



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0017554  
(43) 공개일자 2018년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/39 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)

A61K 39/12 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0101563

(22) 출원일자 2016년08월10일

심사청구일자 2016년08월10일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

정태성

경상남도 진주시 진양호로239번길 13, 203동 202호 (평거동, 평거하우스토리아파트)

서종표

제주특별자치도 제주시 구좌읍 하도서문길 9

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

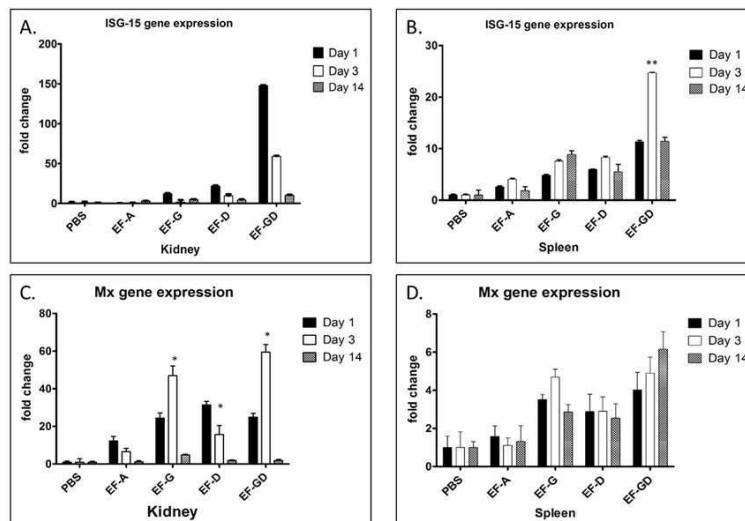
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 어류 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 예방 또는 치료용 DNA 백신

(57) 요약

본 발명은 DDx41 유전자 및 VHS 바이러스 당단백질 유전자를 포함하는 재조합 발현백터를 유효성분으로 하는 어류의 바이러스성 출혈성 패혈증의 예방 또는 치료용 DNA 백신 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 DNA 백신은 분자 보조제로서 DDx41 유전자를 사용하였고, 바이러스 항원으로서 VHSV 당단백질 유전자를 사용하여 상기 DNA 백신을 넙치 치어에 접종한 결과 높은 방어율을 보임을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 DNA 백신은 VHS 바이러스에 대한 분자 보조제를 첨가하여 만든 효과적인 DNA 백신으로써, 어류, 특히 넙치의 바이러스성 출혈성 패혈증 감염에 대한 예방 및 치료용 백신으로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 2039/552 (2013.01)

A61K 2039/55516 (2013.01)

A61K 2039/55561 (2013.01)

(72) 발명자

**이우재**

부산광역시 해운대구 해운대로 789, 1802호 (좌동)

**김재성**

경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교 501동  
201호

**김영립**

경상남도 진주시 강남로167번길 14, 402호 (칠암동, 삼성타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 213004-04-4-SB430

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 Golden Seed 프로젝트

연구과제명 수출용 터벗 대량생산 시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2016.03.01 ~ 2016.12.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 VHSV(viral hemorrhagic septicemia virus) 당단백질을 암호화하는 유전자 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 DDX41(DEAD box protein 41) 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 유효성분으로 함유하는 어류의 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 예방 또는 치료용 DNA 백신 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 어류는 넙치과에 속하는 어류인 것을 특징으로 하는 어류의 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 예방 또는 치료용 DNA 백신 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 DDX41 단백질을 암호화하는 유전자는 보조제(adjuvant)인 것을 특징으로 하는 어류의 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 예방 또는 치료용 DNA 백신 조성물.

#### 청구항 4

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 VHSV 당단백질을 암호화하는 유전자 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 DDX41 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터.

#### 청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 DNA 백신 조성물을 어류에 투여하는 것을 특징으로 하는, 어류의 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 예방 또는 치료 방법.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 백신 조성물을 어류의 근육내 주사하는 것을 특징으로 하는 어류의 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 예방 또는 치료 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 어류 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 예방 또는 치료용 DNA 백신에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 바이러스성 출혈성 패혈증(Viral Hemorrhagic Septicemia, VHS)은 아이트베드(Egtved)병이라고 불려오던 질병으로, 원인 병원체인 출혈성 패혈 바이러스(Viral Hemorrhagic Septicemia Virus: VHSV)는 담수산 연어과 어류에 가장 감수성이 높은 것으로 알려져 왔지만 최근에 와서는 감염 대상의 범위가 확대되어 담수 및 해수 어류 모두에 질병을 유발하며, 일본과 우리나라 자연산 해수어종에서 바이러스성 출혈성 패혈증이 검출되었을 뿐만 아니라 저수온기 동안 양식 넙치에 치명적인 질병을 유발하는 것으로 보고되었다. 국내 양식넙치 생산량의 절반 가량을 차지하는 제주지역 넙치의 바이러스성 질병 발생조사를 위해 2007~2008년의 기간 동안 제주특별자치도 해양수산연구원에 질병검사를 의뢰한 결과, 가장 문제가 되는 질병은 바이러스성 출혈성 패혈증인 것으로 나타났다. 특히 바이러스성 출혈성 패혈증은 양식 넙치에서 병원성이 높아 대량폐사를 유발하며, 혼합 감염을 포함하면 전체 바이러스성 질병 중 약 60%에 이르는 높은 발생률을 보이고 있다.

[0003] 출혈성 패혈 바이러스(VHSV)는 음성 단일가닥 RNA 바이러스로 람도바이러스(rhabdovirus)과에 속한다. VHS는 어린 치어기뿐 아니라 출하 시기의 큰 성어에서도 폐사를 일으키며 감염어는 체색흑화, 복막과 복강 내의 투명 복수액 저류, 간 울혈, 비장 비대, 신장종대, 간, 신장, 비장 및 골격근에 괴사와 아가미 새엽의 비후, 간농축,

골격근 혈구 축적 등의 내부증상이 나타나며, 피부 상피층 또는 아가미 내피 세포를 통해 바이러스가 어체로 침입하여 혈류를 타고 신장, 비장의 조혈 형성조직 등 내부장기로 빠르게 이동하는 것으로 보고되어있다. 또한 VHS는 'OIE notifiable disease'로 규정되어 수산물 유통 시 검역이 되는 질병(OIE, 2001)으로 넙치의 수출입에 있어서 중요한 질병이기도 하다.

[0004] 양식 어류의 감염 질병을 방지하기 위한 항생제의 지속적인 사용은 내성균을 유발시키며 환경 오염 등의 문제를 일으키고 있어 이에 대한 대책으로 수산 선진국인 노르웨이, 영국, 미국, 캐나다 등에서는 항생제 사용을 제한하는 대신 백신 개발을 적극적으로 추진하고 있다. 향후 국내외 양식산업의 확대에 따라 백신의 수요는 점차 증가할 것으로 예상되며, 이에 따라 우리나라도 백신 개발에 투자가 필요하다. 이에 출혈성 패혈 바이러스의 구조와 항원단백질에 대한 연구, 이들 기초 연구를 바탕으로 백신 개발 연구가 수행되고 있다. 또한 생산량 증가 및 생산경비 절감을 위하여 면역 보조제(adjuvant)가 첨가된 백신 개발이 절실한 실정이다.

[0005] 통상적인 능동 백신(active vaccine)은 사균 또는 약독화 형태(attenuated form)의 감염원으로 이루어진다. 또한, 감염원의 변형 생성물(독소이드(toxoid)) 또는 감염원의 성분(캡슐과 같은 것)이 사용된다. 이러한 백신은 이들이 유도하는 항체 반응에 일부 한계와 문제점을 가진다. 또한, 생존 불가능한(사균, 약독화 유기체, 독소이드 또는 캡슐) 백신이 사용되고 얻어지는 보호 면역이 오래 지속되지 않는 경우, 다량의 백신을 반복적으로 투여할 필요가 있다. 더 나아가, 약독화 생백신 및 사백신을 제조하는 방법은 천연 단백질의 구조를 변화시킬 수 있기 때문에 백신의 항원성을 저하시킬 수 있고, 대부분의 경우 세포 매개 면역 반응이 아닌 체액성 면역 반응이 발생한다.

[0006] 따라서, 새로운 백신접종 방법이 광범위하게 연구되고 있는데, 이는 관련 항원에 대한 유전자를 함유하는 DNA 조각을 주사하는 것을 포함한다. DNA 백신의 경우, 원하는 관련 항원(병원체 기원)에 대한 유전자는 숙주 세포에서 삽입 유전자의 발현을 증가시키도록 조작되는 박테리아 플라스미드로 클로닝된다. 숙주에 주입된 후, 상기 플라스미드는 숙주 세포에 들어가고, 여기에서 숙주세포의 DNA와 통합되지 않고 핵 내에서 에피솜(episome)으로 존재한다. 숙주세포의 대사 기구(metabolic machinery)를 이용하여, 에피솜 내의 삽입 클론 DNA는 이것이 코딩하는 항원의 합성을 지시한다.

[0007] 한편, 한국등록특허 제1464310호에는 '바이러스성 출혈성 패혈증 불활성 백신'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2002-0035457호에는 '한국형 전염성 조혈기 괴사 바이러스의 신규 지 및 엠1유전자 및 이를 이용한 어류 백신'이 개시되어 있으나, 본 발명의 어류 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 예방 또는 치료용 DNA 백신에 대해서는 개시된 바가 없다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로, 본 발명자는 어류에서의 VHSV 감염 방어에 효과적인 백신 개발의 일환으로 VHSV 당단백질을 기반으로 한 DNA 백신에 분자 보조제(molecular adjuvant)를 적용하여, 특히 넙치에 많이 발생하여 피해를 끼치고 있는 백신의 면역원성을 증강시킨 VHS DNA 백신을 개발하였다. 본 DNA 백신은 분자 보조제로서 DDx41 유전자를 사용하였고, 바이러스 항원으로서 VHSV 당단백질 유전자를 사용하였다. 본 발명의 DNA 백신은 면역 관련 유전자 발현을 유도하며, 넙치 치어에 DNA 백신을 접종하였을 때 대조군에 비교하여 높은 방어율을 보임을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

### 과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 VHSV 당단백질을 암호화하는 유전자 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 DDx41 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 유효성분으로 함유하는 어류의 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 예방 또는 치료용 DNA 백신 조성물을 제공한다.

[0010] 또한 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 VHSV 당단백질을 암호화하는 유전자 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 DDx41 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 DNA 백신 조성물을 어류에 투여하는 것을 특징으로 하는, 어류의 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

## 발명의 효과

[0012] 본 발명의 DNA 백신을 통해 어류의 출혈성 패혈 바이러스(VHSV)에 대한 감염을 예방 및 치료하는 방법을 제공할 수 있어 어류의 생산성 향상에 기여할 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명에 사용된 플라스미드 구축물을 나타낸다. A. 인서트(insert)가 들어가지 않은 벡터인 EF-A; B. VHSV G 유전자가 삽입된 EF-G; C. DDx41 유전자가 삽입된 EF-D; D. VHSV G 및 DDx41 유전자가 삽입된 EF-GD.

도 2는 HINAE 세포에서의 VHSV G 및 DDx41 단백질 발현을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 결과이다.

도 3은 각 벡터를 투여한 넙치의 신장(kidney) 및 비장(spleen)에서의 인터페론 유전자인 IFN-1(A, B) 및 IFN- $\gamma$  (C, D) 발현을 qPCR를 통해 확인한 결과이다. \*은 대조군(PBS)에 대하여  $p < 0.05$ 로 유의적 차이를 나타낸다.

도 4는 각 벡터를 투여한 넙치의 신장(kidney) 및 비장(spleen)에서의 IRF-3 유전자 발현을 qPCR를 통해 확인한 결과이다. \*은 대조군(PBS)에 대하여  $p < 0.05$ 로 유의적 차이를 나타낸다.

도 5는 각 벡터를 투여한 넙치의 신장(kidney) 및 비장(spleen)에서의 ISG-15(A, B) 및 Mx(C, D) 유전자 발현을 qPCR를 통해 확인한 결과이다. \*은 대조군(PBS)에 대하여  $p < 0.05$ 로 유의적 차이를 나타낸다.

도 6은 각 벡터를 투여한 넙치의 신장(kidney) 및 비장(spleen)에서의 IL-6(A, B) 및 IL-1 $\beta$  (C, D) 유전자 발현을 qPCR를 통해 확인한 결과이다. \*은 대조군(PBS)에 대하여  $p < 0.05$ 로 유의적 차이를 나타낸다.

도 7은 각 벡터를 투여한 넙치를 대상으로 바이러스를 감염시킨 후 14일간의 생존율(A) 및 이 후 넙치의 신장에서 추출한 RNA로부터 RT-PCR를 수행하여 바이러스 감염에 의한 폐사 또는 백신 효능을 입증한 결과를 나타낸다.

도 8은 본 발명의 백신 조성물의 작용기전 모델을 나타낸다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 VHSV 당단백질을 암호화하는 유전자 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 DDx41 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 유효성분으로 함유하는 어류의 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 예방 또는 치료용 DNA 백신 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명에서 "DNA 백신"은 하나 이상의 면역원을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 다양한 재조합 벡터, 예를 들어 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 바이러스 벡터, 예를 들어 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터 등의 형태를 취할 수 있으며, 플라스미드 벡터가 바람직하다. 상기 벡터는 DNA 단편이 숙주 세포로 도입되기 위한 수단을 의미하며, 이러한 벡터는 형질 발현에 관련된 기본적 구성요소, 프로모터, 구조유전자, 개시 코돈, 종결 코돈, 폴리아데닐화 시그널 등을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 면역원성 표적 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 일반적으로 DNA 백신의 경우 생체내로의 전달 효율이 낮은 단점이 있으므로, 최적의 프로모터, 인핸서 등을 사용하여 목적 유전자의 발현을 증진시킬 필요가 있다.

[0016] 진핵 세포에서 발현되는 벡터의 제조에 유용한 프로모터의 예로는 원숭이 바이러스 40(SV40), 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 사람 면역 결핍 바이러스(HIV), 예를 들면 HIV의 긴 말단 반복부(LTR) 프로모터, 몰로니 바이러스, 시토메갈로바이러스(CMV), 예를 들면 EF-1 $\alpha$  프로모터, CMV 프로모터, 엡스타인 바 바이러스(EBV), 로우스 사코마 바이러스(RSV) 프로모터 뿐만 아니라,  $\beta$ -액틴 프로모터, 사람 헤모글로빈, 사람 근육 크레아틴, 사람 메탈로티오네인 유래의 프로모터가 있으나 이것으로 제한되지는 않는다.

[0017] 폴리 아데닐화 시그널의 예로는, SV40 폴리A 서열 및 LTR A 서열이 있으나 이것으로 제한되지는 않는다. 인핸서는 사람 액틴, 사람 미오신, 사람 헤모글로빈, 사람 근육 크레아틴과, CMV, RSV 및 EBV와 같은 바이러스성 인핸서를 포함하는 군에서 선택될 수 있으나 이것으로 제한되지 않는다. 또한, Kozak 영역과 같은 기타 영역을 유전자 작제물에 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에서는 상기 조건을 충족시키는 벡터로 pTracer-EF<sup>TM</sup>-EF/V5-His A을 기본 벡터로

사용하였다.

- [0019] 본 발명의 일 구현예에서는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 VHSV 당단백질을 암호화하는 유전자 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 DDx41 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 VHS DNA 백신 조성물에 함유되는 벡터, EF-GD를 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 VHSV 당단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 VHS DNA 백신 조성물에 함유되는 면역원성 벡터, EF-G를 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 DDx41 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 VHS DNA 백신에 함유될 수 있는 보조제 벡터, EF-D를 제공한다.
- [0022] 본 발명에서 발현 벡터란 개체의 세포 내에 존재하는 경우 삽입물이 발현되도록 삽입물에 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 이러한 유전자 작제물인 발현 벡터를 제조 및 정제하기 위해 표준 재조합 DNA 기술을 이용할 수 있다. DNA 백신은 노출(naked)된 상태나, 리포솜, 예를 들어 레시틴 리포솜으로 패키징(packaging)되거나 또는 콜로이달 골드 입자(colloidal gold particle)로 코팅되어 사용될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 벡터에 삽입되는 VHSV 당단백질을 암호화하는 유전자는 이의 발현물이 면역반응을 유도하는 항원으로 작용하여 면역원으로 작용할 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터에 삽입되는 DDx41 단백질을 암호화하는 유전자는 이의 발현물이 면역반응을 증강시키는 보조제로서 사용될 수 있다. 상기 두 단백질을 코딩하고자 할 경우, 단일 유전자 발현 기구, 즉 하나의 프로모터에 여러 구조 유전자를 연속적으로 배치하여 융합된 하이브리드 형태로 제조할 수도 있고, 단일 벡터에 다중 프로모터 시스템을 이용하여 각 유전자가 각각의 프로모터 시스템에서 독립적으로 발현되고 조절되도록 할 수도 있다. 그리고 발현되는 폴리펩타이드의 유전자는 하나 이상의 결실, 삽입, 치환, 또는 그 밖의 변형에 의해 원래의 폴리펩타이드와 다른 아미노산 서열을 갖는 변이체를 포함할 수 있다. 그러나 이런 변이체는 원래의 폴리펩타이드와 마찬가지로 체액성 면역 또는 세포성 면역을 자극하는 능력을 가져야 한다.
- [0024] 본 발명의 백신 조성물에 포함되는 DNA 백신은 바람직하게는 진핵 세포에서의 발현에 필요한 조절 성분들이 작동가능하게 연결된 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 이는 DNA 플라스미드 형태일 수 있다. 이러한 DNA 백신은 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 VHSV 당단백질을 암호화하는 유전자 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 DDx41 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 플라스미드이다. 상기 면역원은 VHSV 감염 질환에 대한 면역 반응을 유도할 수 있다.
- [0025] 본 명세서에서 사용된 용어 "보조제(adjuvant)"는 면역세포의 초기 활성화 과정에서 비특이적으로 항원에 대한 면역반응을 촉진하는 물질로, 숙주에게 면역원은 아니지만 면역계의 세포의 활성을 증대시킴으로써 면역을 강화하는 제제, 분자 등을 말한다. 면역증강제는 항원의 표면적을 증가시키거나, 체내에서 항원의 정체를 연장시켜 림프 시스템이 항원에 접근할 수 있도록 하거나, 항원 방출을 지연시키거나, 항원을 대식구에 표적화 시키거나, 대식구를 활성화시키는 등을 포함하는 다양한 메카니즘에 의해 작용하는 것으로 보고 되었다.
- [0026] 상기 어류는 바람직하게는 넙치과 어류일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 넙치일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 본 발명의 일 구현예에서 상기 DNA 백신을 넙치에 투여한 경우, 인터페론 유전자, 특히 인터페론-1 유전자 발현을 증가시켰으며, 그 외 IRF-3, ISG-15, Mx-1, IL1 $\beta$  등 면역 관련 유전자 발현을 유도하며, 넙치 치어에 백신 화시킨 후 바이러스 감염시 대조군, 항원 유전자(VHSV 당단백질을 암호화하는 유전자) 또는 보조제(DDx41 단백질을 암호화하는 유전자)만 포함한 투여군보다도 우수한 방어율을 보임을 확인하였다.
- [0028] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 DDx41 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 효효성분으로 함유하는 백신 보조제(adjuvant) 조성물을 제공한다.
- [0029] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 VHSV 당단백질을 암호화하는 유전자 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 DDx41 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.
- [0030] 본 발명의 재조합 발현 벡터는 상술한 바와 같다.
- [0031] 또한, 본 발명은 상기 DNA 백신 조성물을 어류에 투여하는 것을 특징으로 하는, 어류의 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0032] 상기 어류는 바람직하게는 넙치과 어류일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 넙치일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 본 발명의 DNA 백신은 어류에 주사하는 방식으로 투여하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 치어의 근육내 주사할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로는 넙치 치어에 0.1~2 $\mu$ g의 DNA 백신을 근육 주사하는 방식으로 이루어질 수 있으며, 더 바람직하게는 평균 5.2g의 넙치 치어에 0.5~1.5 $\mu$ g의 DNA 백신을 근육 주사할 수 있다.

[0034] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

## [0035] 재료 및 방법

### [0036] 1. 세포주 및 바이러스

[0037] 넙치 배아(flower embryo)에서 유래한 HINAE(Hirame natural embryo) 세포는 25℃, 10% FBS와 항생제 (penicillin, 100 units/ml; streptomycin, 100 $\mu$ g/ml; amphotericin B, 250ng/ml)가 첨가된 Leibovitz's L-15 배지(Life Technologies, 미국)에서 배양하였다. 바이러스 저장액(stock)을 준비하기 위하여, EPC 세포를 W-VHSV 150402-P2 바이러스로 1° MOI(multiplicity of infection)로 감염시켰다. 1시간 후 접종원을 제거하고 2% FBS가 첨가된 L-15 배지로 교체하여 세포병변효과(cytopathic effect, CPE)가 나타날 때까지 14℃에서 배양하였다. 넓은 CPE가 관찰되면 배지를 수집하여 세포 debris(cellular debris)를 저속원심분리로 제거하고 상층액의 바이러스 농도는 TCID<sub>50</sub>(50% Tissue Culture Infective Dose)으로 결정하였다.

### [0038] 2. 백신 및 보조제 제조

[0039] VHSV 당단백질(glycoprotein, G) cDNA는 남해 양식장에서 자연적으로 감염된 넙치로부터 획득하였다. 총 RNA는 R&A-BLUE™ Total RNA Extraction Kit(Intron Biotechnology, 미국)을 사용하여 감염된 넙치의 비장(spleen)으로부터 추출하였다. 추출된 RNA는 게놈 DNA를 제거하기 위해 DNase I 처리하였으며, 1 $\mu$ g의 총 RNA는 SuperScript III FirstStrand synthesis system(Life Technologies, 미국)을 사용하여 역전사하여 전체 cDNA를 합성하였다. G 유전자는 VHSV 바이러스 균주 KR-CJA의 G 유전자(Accession Number: JQ651388.1)로부터 설계된 프라이머(측면에 *Kpn* I 및 *Not* I 포함)(서열번호 9 및 10)를 사용하여 다음의 PCR 조건으로 증폭하였다: 1회 변성 사이클(94℃, 3분)->30 사이클(94℃, 30초 변성->55℃, 20초 어닐링->72℃, 90초 증폭)->1회 증폭(72℃, 5분). 증폭된 G 유전자(종결코돈 없이 1521bp)는 pTracer™ EF/V5-His A 벡터(Invitrogen, 미국) EF-1 $\alpha$  프로모터의 다운스트림에 삽입하였으며, 제조된 벡터를 DH5 $\alpha$  세포에 형질전환시켰다. 상기 벡터는 최종 시퀀싱으로 서열 확인하였으며 이를 EF-G로 명명하였다(도 1B).

[0040] 넙치 유래 DDx41를 획득하기 위해, 건강한 넙치 신장에서 RNeasy mini kit(Qiagen, 미국)를 이용하여 총 RNA를 추출하였고, 추출된 RNA 1 $\mu$ g은 상술한 방법으로 전체 cDNA를 합성하였다. DDx41 유전자는 넙치 DEAD box protein 41(DDx41) mRNA(accession number: KJ934880.1)로부터 설계된 프라이머(측면에 *Kpn* I 및 *Not* I 포함)(서열번호 5 및 6)를 사용하여 상기 PCR 조건으로 증폭하였다. 증폭된 DDx41 유전자(종결코돈 없이 1842bp)는 pTracer™ EF/V5-His A 벡터(Invitrogen, 미국) EF-1 $\alpha$  프로모터의 다운스트림에 삽입하였으며, 제조된 벡터를 DH5 $\alpha$  세포에 형질전환시켰다. 상기 벡터는 최종 시퀀싱으로 서열 확인하였으며 이를 EF-D로 명명하였다(도 1C).

[0041] DNA 백신-보조제 구축물을 제작하기 위하여, EF-G 벡터는 부위 특이적 변이 유도(site-directed mutagenesis)로 GFP-Zeocin 카세트를 제거하고 *Avr* II 및 *Spe* I의 두 제한효소를 삽입하였다. DDx41는 *c-myc* 에피토프와 *Avr* II 및 *Spe* I을 포함하는 새로운 프라이머(서열번호 7 및 8)를 사용하여 증폭하여 상기 변이 EF-G 벡터의 CMV 프로모터 하부에 위치한 *Avr* II 및 *Spe* I사이에 삽입하였다. DH5 $\alpha$  세포에 형질전환시킨 후, 상기 벡터는 최종 시퀀싱으로 서열 확인하였으며 이를 EF-GD로 명명하였다(도 1D).

[0042] **3. 웨스턴 블롯 분석**

[0043] 4개의 플라스미드(EF-G, EF-D, EF-GD 및 EF-A(empty vector))은 Maxi-Prep Plasmid Extraction Kit(Intron)를 사용하여 정제하였다. 정제한 플라스미드 700ng은 12-웰 플레이트( $3 \times 10^5$  cells/well)에서 배양한 H1NAE 세포로 형질감염시켰다.

[0044] 700ng의 플라스미드 DNA,  $1\mu\text{l}$ 의 Lipofectamine 2000(Life Technologies, 미국) 및 Opti-MEM(Life Technologies)을 함유하는 혼합물의 총 부피  $250\mu\text{l}$ 을 각 웰에 형질감염시켰다. 형질감염 4시간 경과, DNA-Lipofectamine 복합체는  $500\mu\text{l}$ 의 10% FBS L-15 배지로 교체하였다. 형질감염된 세포는 이 후 실험동안  $20^\circ\text{C}$  배양기에서 유지시켰다. 형질감염 5일 경과 후 세포를 수확하였으며, 1x수동적 용해 완충액(1x Passive Lysis Buffer)으로 세포를 용해하였다. 발현 단백질을 정량하기 위해 BCA(Bicinchoninic Acid) 단백질 분석을 수행하였다. 세포 용해물은 SDS-PAGE 로딩 완충액에 현탁하여 5분간 끓인 후 10% 아크릴아미드 겔에 로딩하였다. 전기영동 후 단백질은 PVDF(polyvinylidene difluoride) 막에 이동시켜 5% 탈지분유로 1시간 동안 블로킹하였다. 1차 항체로는 v5(ThermoScientific, 미국) 항체를 1:20000의 농도로 또는 myc(Abcam, 미국) 항체를 1:3000의 농도로 희석하여 1시간 동안 교반하면서 반응시켰고, 염소 항-마우스 IgG-HRP(horseradish peroxidase)-결합된 2차 항체(ThermoScientific, 미국)를 1:3000의 농도로 희석하여 1시간 반응하였다. 상기 막은 ECL 검출 키트를 이용하여 단백질 발현 여부를 확인하였다. 그 결과 예측되는 재조합 DDx41 및 VHSV 당단백질의 크기는 각각 68 kDa 및 56 kDa이다.

[0045]

[0046] **4. 백신화 및 바이러스 도전 실험(Immunization and Viral Challenge)**

[0047] 각 수조에 30마리의 넙치( $\pm 5.2$  g)을  $14^\circ\text{C}$ 에서 사육하였으며, 총 5개 수조를 준비하였다. 상기 제작한 플라스미드(empty vector EF-A, G-based DNA vaccine EF-G, adjuvant EF-D, and vaccine-adjuvant EF-GD)  $1\mu\text{g}$ 을  $100\mu\text{l}$  PBS 용액에 희석하여 넙치에 근육내(intramuscularly) 접종하였다.  $100\mu\text{l}$  PBS 용액을 접종한 그룹은 음성 대조군으로 사용하였다. 접종 15일 후, 넙치를  $1 \times 10^6$  virus/ml(W-VHSV 150402-P2)  $100\mu\text{l}$ 을 복강내(intraperitoneally) 감염시켰다. 각 그룹의 폐사율은 14일간 기록하였다. 수확한 죽은 어류를 검정한 후 신장을 분리하여 총 RNA를 추출하여 RT-PCR를 수행하였다. 백신 효과(Vaccine efficacy)는 누적 폐사율(cumulative percent of mortality, CPM) 및 상대적 생존율(relative percent survival, RPS)(RPS=  $[1-(\% \text{ mortality of vaccinates fish} / \% \text{ mortality of control fish}) \times 100]$ )을 비교하여 결정하였다. 폐사 데이터는 2회 독립적인 실험으로 수집하였다.

[0048]

[0049] **5. qPCR(Quantitative real-time PCR) 분석**

[0050] 각 실험군으로부터 각각 백신 1, 3 및 14일 경과된 넙치로부터 신장과 비장을 수집하여 TRIzol reagent(Life Technologies, 미국)를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 총 RNA  $2\mu\text{g}$ 으로부터 cDNA를 합성하여 qPCR 분석의 주형으로 사용하였다. IFN-경로 관련 유전자인 IFN-1, IFN- $\gamma$ , IRF-3, ISG-15, Mx 및 염증성 사이토카인(inflammatory cytokines) IL-1 $\beta$ , IL-6 유전자의 발현 정도를 qPCR로 평가하였다. qPCR에 사용된 프라이머는 표 1에 기재하였다. 각 프라이머에 의한 증폭 특이성(specificity)은 해리곡선(dissociation curves)으로 확인하였다.  $\Delta\Delta\text{Ct}$  방법이 상기 면역 유전자 전사체의 배수 변화(fold change)를 정량하기 위해 이용되었다. 각 타겟 유전자 발현은 액틴의 발현 수준으로 표준화하였으며, PBS 그룹의 평균 발현 수준을 '1'로 간주하여 다른 실험군의 수치를 상대적으로 나타내었다.

표 1

본 발명에 사용된 프라이머

| Target<br>(GenBank Accession<br>Number) | Purpose                                       | Primer Name                                  | Sequence of Oligonucleotide (5' -> 3')                                                              | 서열<br>번호 |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| DDX41<br>(Degenerate)                   | PCR                                           | WCUP-1892<br>WCUP-1893                       | AARATCCAGAACTTTGCCAARAG<br>CCWATYCTGTGGACRTAGTT                                                     | 3<br>4   |
|                                         | Expression vector<br>(pTracer-EF-V5/His A)    | DDx41-KpnI<br>DDx41-NotI                     | GGCCGGTACCATGGAACCGAAAAATAGACCCAAAAAG<br>GCTAGCGGCCGCGCGACCGTCTGACTTCTGGAGAACTGCG                   | 5<br>6   |
|                                         | vaccine-adjuvant<br>construct                 | DDx41-AvrII<br>DDx41-SpeI/myc                | GAGCCTAGGATGGAATAAGACCCAAAAA<br>CAGACTAGTTTACAGATCCTCTCTGAGATGAGTT<br>TTTGTTTCAAGTCCATGGAGCTATGAGCC | 7<br>8   |
| VHSV glycoprotein<br>(JQ651388.1)       | Expression vector<br>(pTracer-EF-V5/His A)    | VHSV_G-KpnI<br>VHSV_G-NotI                   | CGTCGGTAGCATGGAATGGAATACTTTTTCTTGGTG<br>GCTAGCGGCCGCGCGACCGTCTGACTTCTGGAGAACTGCG                    | 9<br>10  |
| B-actin<br>(AU050773)                   | qPCR (amplicon: 85 bp)<br>(efficiency: 109%)  | WCUP-90<br>WCUP-91                           | TGATGAAGCCAGAGCAAGA<br>CTCCATGTCATCCAGTTGGT                                                         | 11<br>12 |
| IFN- $\gamma$<br>(AU261156)             | qPCR (amplicon: 100 bp)<br>(efficiency: 107%) | WCUP-794<br>WCUP-795                         | ATGCTTAACAGGATCTTCTCGTTT<br>GTCTGAATTTATGATCCATCCATCT                                               | 13<br>14 |
| IL-6<br>(DQ884914)                      | qPCR (amplicon: 63 bp)<br>(efficiency: 107%)  | WCUP-653<br>WCUP654                          | CAGCTGCTGCAAGACATGGA<br>GATGTTGTGCGCCGTCATC                                                         | 15<br>16 |
| Mx<br>(AB110446)                        | qPCR (amplicon: 100bp)<br>(efficiency: 98%)   | WCUP361<br>WCUP362                           | AGGCAAAGATTGAAACCATAAAGC<br>CTGCCTGGGAGTAAACCATCAT                                                  | 17<br>18 |
| IL-1 $\beta$<br>(AB070835)              | qPCR (amplicon: 96bp)<br>(efficiency: 104%)   | WCUP377<br>WCUP378                           | AATGCAACGTGAGCCAGATG<br>GGTTGACCACACTTCTCAT                                                         | 19<br>20 |
| IFN- $\gamma$<br>(AB435094.1)           | qPCR (amplicon: 100bp)<br>(efficiency: 107%)  | Jf-IFN $\gamma$ -Fwd<br>Jf-IFN $\gamma$ -Rev | TGTACGAGGAGGCGAGTTCT<br>GAGTTTCTTGGCGTCTCAGG                                                        | 21<br>22 |
| IRF-3<br>(GU017417)                     | qPCR (amplicon: 100bp)<br>(efficiency: 106%)  | WCUP-651<br>WCUP-652                         | AGCTGGTGGAGCAGTTCTTA<br>CATCACCTTCAGCCCTCTGT                                                        | 23<br>24 |
| ISG-15<br>(AB519717)                    | qPCR (amplicon: 100bp)<br>(efficiency: 100%)  | Jf-ISG15-Fwd<br>Jf-ISG15-Rev                 | GAGAGTCAGCAGAGGCTGGT<br>CAGACGCAGTAACAGGTCCA                                                        | 25<br>26 |

## 6. 통계적 분석

각 데이터는 3마리 넘치로부터의 결과의 평균±표준편차(SD)로 나타내었다. one way ANOVA(analysis of variance)로 각 유전자의 복제간에 차이를 보이는지 결정하기 위해 수행하였고 이 후 Tukey's multiple comparison을 실시하여 대조군과 실험군의 차이를 평가하였다. 통계분석은 SPSS v17.0을 사용하였으며,  $p < 0.05$  에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내는 것으로 간주하였다. 생존 데이터는 Kaplan-Meier survival with a chi-square test, GraphPad Prism v.5 Software을 사용하였다.

### 실시예 1. 단백질 발현

웨스턴 블롯 분석을 통하여 VHSVg 및 DDx41 단백질 발현을 확인하였다. EF- $\alpha$  프로모터에 의해 조절되는 백신 구 축물인 EF-G 또는 D 벡터에서 G 또는 DDx41 단백질은 v5 에피토프가 결합되어 있으며, EF-GD 벡터의 DDx41는 myc 에피토프가 결합되어 있다. 따라서 v5 또는 myc 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 결과, VHSVg 및 DDx41 단백질 이 각각 56 및 68 kDa의 크기를 갖는 밴드로 검출됨을 확인하였다(도 2).

### 실시예 2. 면역 관련 유전자의 발현 확인

#### 2.1. 유도되는 인터페론 타입 확인

면역-보조제가 어떤 형태의 인터페론을 유도하는지 평가하기 위해 IFN-1(타입 I 인터페론) 및 IFN- $\gamma$ (타입 II 인터페론)의 발현을 조사하였다. EF-D 접종 후 1일에는 신장과 비장에서 모두 IFN-1 발현이 크게 상향조절되었 으며 이는 EF-A 및 PBS 그룹보다 75배 가량 차이를 보였다(도 3A 및 3B). EF-GD 그룹은 1일에 신장에서는 EF-A 및 PBS 그룹보다 125배 가량 현저하게 증가함을 확인하였으나 비장에서는 EF-D 그룹 다음으로 가장 발현량이 증 가함을 확인하였다. IFN- $\gamma$ 의 경우에는 EF-D 및 EF-GD 그룹은 신장과 비장에서 약 2배 발현 증가를 관찰하였다 (도 3C 및 3D). EF-G 그룹도 1일에 IFN-1 발현이 유의적으로 상향조절하지만 EF-GD 그룹에서처럼 증가하지는 않 았다. 상기 결과는 타입 I 인터페론이 본 발명의 백신-보조제에 의해 활성화됨을 시사한다.

[0059] 2.2. 인터페론 조절인자(interferon-regulatory factor) 발현

[0060] 면역-보조제가 IRF-3 및 IRF-7 같은 인터페론 조절인자의 발현을 유도하는지 확인하였다. 신장에서 IRF-3의 발현은 백신 1일에 관찰되었으며, 3일에 EF-D, -G 및 -GD 그룹에서 유의적으로 증가하였다(도 4A). 그러나 비장에서는 EF-GD 그룹이 1일에 EF-D 또는 EF-G 그룹보다 130배 가량 현저하게 증가함을 확인하였다. 상기 결과는 EF-D 및 EF-GD가 타입 I 인터페론 신호전달경로 면역 반응의 다운스트림 활성을 개시할 수 있음을 보여준다.

[0061] 2.3. 인터페론 조절인자(interferon-regulatory factor) 발현

[0062] IFN-1 신호경로는 마크로파지와 수지상세포 같은 APCs(antigen-specific cells)의 방출을 자극하는 이펙터(effector)의 양에 의존한다. 본 발명에서는 인터페론에 의해 자극되는 유전자인 ISG-15, Mx 및 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , IL-6의 발현을 평가하였다. 신장에서의 ISG-15는 EF-GD 그룹에서 발현이 현저히 증가한(150배 가량) 반면, EF-D 및 EF-G 그룹에서는 발현 증가가 관찰되지 않았다(도 5A). 비장에서의 ISG-15는 신장에서보다는 증가폭이 크지 않으나 3일에 대조군에 비해 25배 가량 증가함을 확인하였다(도 5B). 신장에서의 Mx는 EF-G 및 EF-GD 그룹에서 3일에 각각 45배 및 60배 증가하였다(도 5C). EF-D 그룹은 1일에 발현 증가를 보여주었으나, 비장에서는 뚜렷한 증가를 확인할 수 없었다(도 5D).

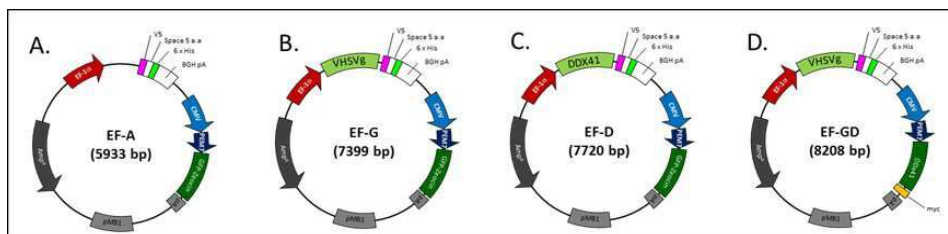
[0063] 전-염증성 사이토카인인 IL-6 발현은 비록 3일에 EF-D 및 EF-GD 그룹에서 8배 가량 증가하고, EF-G 그룹에서는 1일에 5배 증가를 나타내지만, 통계적으로는 유의적 차이를 보이지 않았다(도 6A). 또한, 비장에서는 전혀 발현 변화가 관찰되지 않았다(도 6B). 신장에서 IL-1 $\beta$ 의 발현은 EF-D, -G 및 GD 그룹에서 각각 12-, 13- 및 20-배 증가를 보였으나(도 6C), 비장에서는 유의적인 증가를 관찰할 수 없었다(도 6D). 이들 결과를 종합해 보면, 백신 구성물이 병원균이 세포에 침입한 후 APC를 방출하는데 중요한 이펙터 유전자를 자극할 수 있음을 보여준다.

[0064] 실시예 3. VHSV 감염 어류에 대한 백신 효과

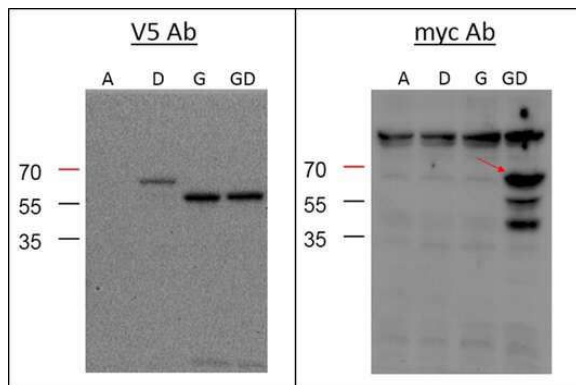
[0065] 백신이 면역반응 유전자를 유도할 뿐 아니라, 병원균에 의해 감염된 어류를 보호할 수 있는지 확인하는 것이 중요하다. 대조군인 PBS 및 EF-A 그룹에서 생존율은 다른 그룹과 비교해서 45 및 35%로 낮았다. G-기반 DNA 백신(EF-G)을 접종한 어류는 76% 생존율을 가졌으며, 이는 기존의 연구에서 보고된 것과 일치하였다. EF-D 그룹은 71% 생존율을 보였다. 상기 실시예 2에서 기재한 바와 같이 EF-GD 그룹은 다른 그룹에 비해 현저하게 면역 유전자 발현이 증가하는 것과 같이, 생존율도 83%로 가장 높았다(도 7). 모든 죽은 어류는 VHSV 감염 징후를 보였으며 VHSV G 유전자가 검출되었다. 따라서, 이는 DDx41가 바이러스 감염 어류에서 G-기반 DNA 백신의 보조제로 활용될 수 있음을 보여준다.

도면

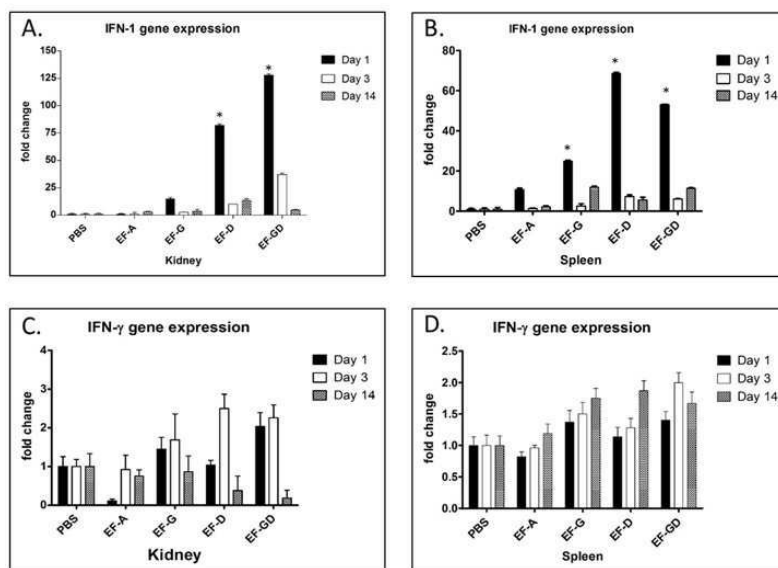
도면1



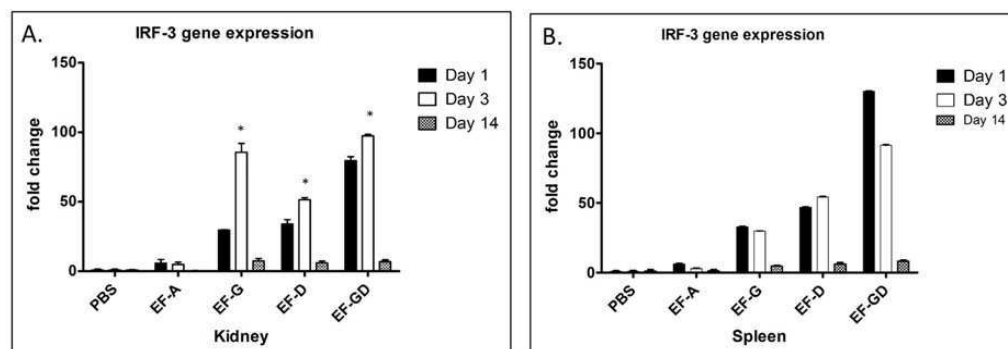
도면2



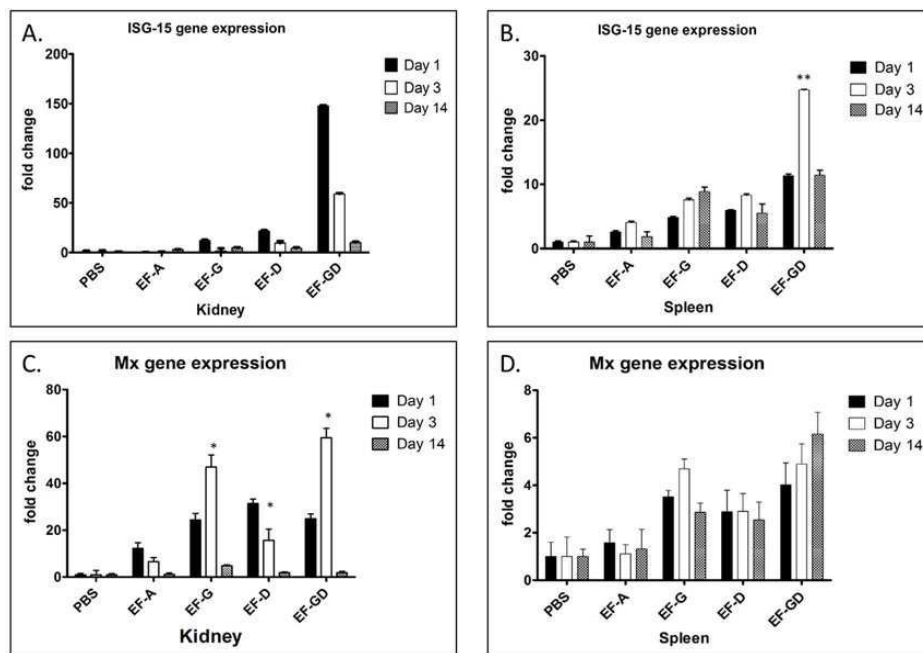
도면3



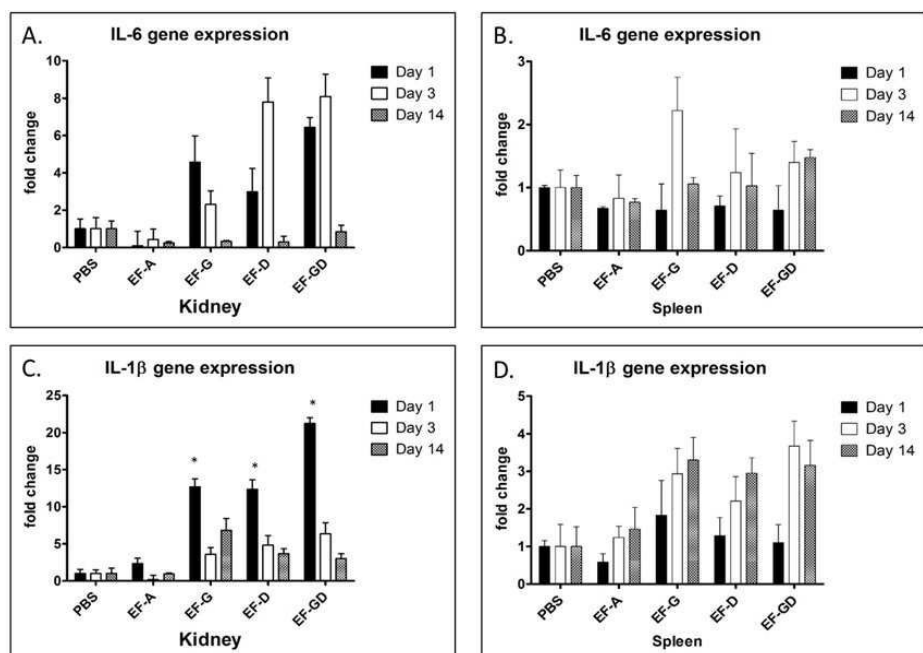
도면4



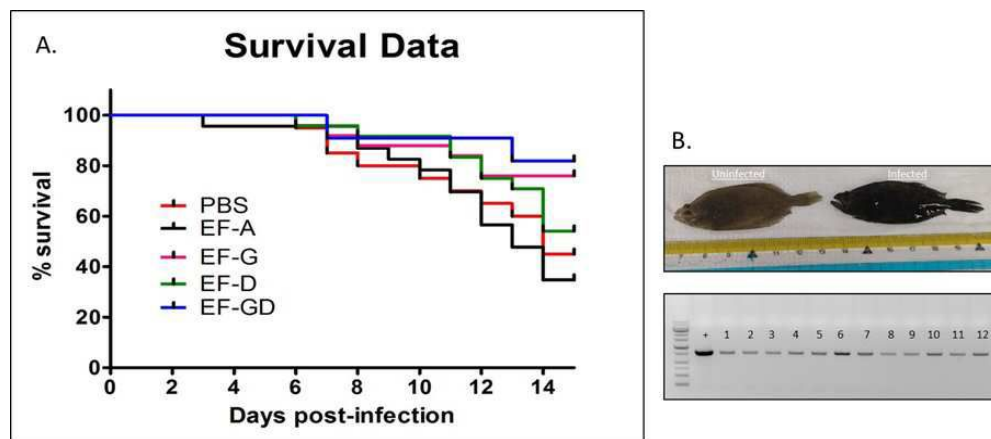
도면5



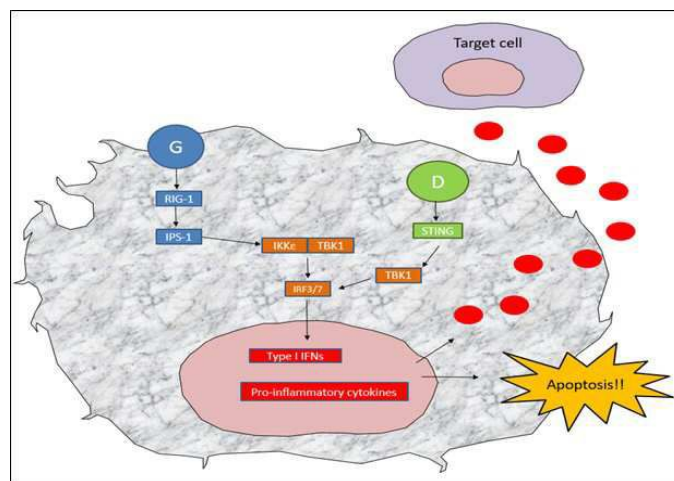
도면6



도면7



도면8



## 서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> DNA vaccine for prevention and treatment of fish viral hemorrhagic septicemia
- <130> PN16233
- <160> 26
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 507
- <212> PRT
- <213> viral hemorrhagic septicemia virus
- <400> 1

Met Glu Trp Asn Thr Phe Phe Leu Val Ile Leu Val Ile Ile Ile Lys

1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Gln Ile Thr Gln Arg Pro Pro Val Glu Asn Ile Ser

20 25 30

Thr Tyr His Val Asp Trp Asp Thr Pro Leu Tyr Thr His Pro Ser Asn

35 40 45

Cys Arg Lys Asn Ser Phe Val Pro Ile Arg Pro Asp Gln Leu Arg Cys

50 55 60

Pro His Glu Phe Glu Asp Thr Asn Lys Gly Leu Val Ser Val Pro Ala

65 70 75 80

Gln Ile Ile His Leu Pro Leu Ser Val Thr Ser Val Ser Ala Val Ala

85 90 95

Asn Gly His Tyr Leu His Arg Val Thr Tyr Arg Val Thr Cys Ser Thr

100 105 110

Asn Phe Phe Gly Gly Gln Thr Ile Glu Lys Thr Ile Leu Glu Ala Lys

115 120 125

Leu Ser Arg Gln Glu Ala Ile Asn Glu Ala Gly Lys Asp His Glu Tyr

130 135 140

Pro Phe Phe Pro Glu Pro Ser Cys Ile Trp Met Lys Asp Asn Val His

145 150 155 160

Lys Asp Ile Thr His Tyr Tyr Lys Thr Pro Lys Thr Val Ser Ile Asp

165 170 175

Leu Tyr Ser Arg Lys Phe Leu Asn Pro Asp Phe Ile Glu Gly Val Cys

180 185 190

Thr Thr Ser Pro Cys Pro Thr His Trp Gln Gly Val Tyr Trp Ile Gly

195 200 205

Ala Thr Pro Gln Ala His Cys Pro Thr Ser Glu Thr Leu Lys Gly His

210 215 220

Leu Phe Thr Arg Thr His Asp His Arg Val Val Lys Ala Ile Val Ala

225 230 235 240

Gly His His Pro Trp Gly Leu Thr Met Ala Cys Lys Val Thr Phe Cys

245 250 255

Gly Thr Glu Trp Ile Lys Thr Asp Leu Gly Asp Leu Ile Gln Val Thr

260 265 270  
 Gly Gln Gly Gly Ala Asn Lys Leu Ser Pro Lys Lys Cys Val Asn Thr  
 275 280 285  
 Asp Val Gln Met Arg Gly Ala Thr Asp Asp Phe Ser Tyr Leu Asn His  
 290 295 300  
 Leu Ile Thr Asn Met Ala Gln Arg Thr Glu Cys Leu Asp Ala His Ser  
  
 305 310 315 320  
 Asp Ile Thr Ala Ser Gly Lys Ile Ser Pro Phe Leu Leu Ser Lys Phe  
 325 330 335  
 Arg Pro Ser His Pro Gly Pro Gly Lys Ala His Tyr Leu Leu Asp Gly  
 340 345 350  
 Gln Ile Met Arg Gly Glu Cys Asp Tyr Glu Ala Val Val Ser Ile Asn  
 355 360 365  
 Tyr Asn Ser Ala Gln Tyr Lys Thr Val Asn Asn Ile Trp Lys Ser Trp  
 370 375 380  
  
 Asn Arg Ile Asp Asn Asn Thr Asp Gly Tyr Asp Gly Met Ile Phe Gly  
 385 390 395 400  
 Asp Lys Leu Ile Ile Pro Asp Ile Glu Lys Tyr Gln Ser Ile Tyr Asp  
 405 410 415  
 Ser Gly Met Leu Val Gln Arg Asn Leu Val Glu Ile Pro His Pro Ser  
 420 425 430  
 Ile Val Phe Val Ser Asn Thr Ser Asp Leu Ser Thr Asn Tyr Ile His  
 435 440 445  
 Thr Asn Leu Ile Pro Ser Asp Trp Ser Phe Asn Trp Ser Leu Trp Pro  
  
 450 455 460  
 Ser Leu Ser Gly Met Gly Val Val Gly Gly Ala Phe Leu Leu Leu Val  
 465 470 475 480  
 Leu Cys Cys Cys Cys Arg Ala Ser Pro Pro Pro Pro Ser Tyr Gly Ile  
 485 490 495  
 Pro Met Gln Gln Phe Ser Arg Ser Gln Thr Val  
 500 505  
 <210> 2

<211> 614  
 <212> PRT  
 <213> *Paralichthys olivaceus*  
 <400> 2

Met Glu Thr Glu Asn Arg Pro Lys Lys Arg Ser His Gly Glu Asp Glu

|                                                                 |    |    |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|----|----|
| 1                                                               | 5  | 10 | 15 |
| Gly Ser Gly Ser Glu Arg Ser Glu Asp Asp Asp Tyr Val Pro Tyr Val |    |    |    |
| 20                                                              | 25 | 30 |    |
| Pro Val Lys Ile Arg Lys Gln Gln Ile Leu Gln Lys Met Leu Arg Leu |    |    |    |
| 35                                                              | 40 | 45 |    |
| Arg Gly Lys Ala Val Asp Glu Asp Gln Lys Asp Ser Gly Glu Asp Gln |    |    |    |
| 50                                                              | 55 | 60 |    |
| Arg Asp Glu Glu Glu Gly Leu Gly Pro Arg Ser Asn Val Ser Leu Leu |    |    |    |
| 65                                                              | 70 | 75 | 80 |

|                                                                 |     |     |  |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|--|
| Asp Gln His Gln His Leu Lys Glu Lys Ala Glu Ala Arg Lys Glu Ser |     |     |  |
| 85                                                              | 90  | 95  |  |
| Ala Lys Glu Lys Gln Leu Lys Glu Glu Glu Lys Ile Leu Glu Ser Val |     |     |  |
| 100                                                             | 105 | 110 |  |
| Ala Glu Gly Arg Ala Leu Met Ser Val Lys Glu Met Ala Lys Gly Ile |     |     |  |
| 115                                                             | 120 | 125 |  |
| Ile Tyr Asp Asp Pro Ile Lys Thr Ser Trp Lys Ala Pro Arg Tyr Ile |     |     |  |
| 130                                                             | 135 | 140 |  |
| Leu Asn Met Pro Asp Thr Arg His Glu Arg Val Arg Lys Lys Phe His |     |     |  |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Ile Leu Val Asp Gly Asp Arg Ile Pro Ala Pro Ile Lys Ser Phe Arg |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |
| Glu Met Lys Leu Pro Pro Ala Ile Leu Lys Gly Leu Lys Lys Lys Gly |     |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| Ile Val His Pro Thr Pro Ile Gln Ile Gln Gly Ile Pro Thr Val Leu |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| Ser Gly Arg Asp Met Ile Gly Ile Ala Phe Thr Gly Ser Gly Lys Thr |     |     |     |

210                      215                      220  
 Leu Val Phe Thr Leu Pro Ile Met Met Phe Ala Leu Glu Gln Glu Lys  
 225                      230                      235                      240  
 Arg Leu Pro Phe Phe Lys Arg Glu Gly Pro Tyr Gly Leu Ile Ile Cys  
                          245                      250                      255  
 Pro Ser Arg Glu Leu Ala Arg Gln Thr His Gly Ile Ile Glu Tyr Tyr  
                          260                      265                      270  
 Cys Lys Leu Leu Glu Glu Glu Gly Ala Pro Gln Leu Arg Thr Ala Leu  
                          275                      280                      285  
 Cys Ile Gly Gly Met Ser Val Lys Glu Gln Met Glu Val Val Lys His  
  
 290                      295                      300  
 Gly Val His Met Met Val Ala Thr Pro Gly Arg Leu Met Asp Leu Leu  
 305                      310                      315                      320  
 Gln Lys Lys Met Val Ser Leu Asp Ile Cys Arg Tyr Leu Ala Leu Asp  
                          325                      330                      335  
 Glu Ala Asp Arg Met Ile Asp Met Gly Phe Glu Glu Asp Ile Arg Thr  
                          340                      345                      350  
 Ile Phe Ser Tyr Phe Lys Gly Gln Arg Gln Thr Leu Leu Phe Ser Ala  
                          355                      360                      365  
  
 Thr Met Pro Lys Lys Ile Gln Asn Phe Ala Lys Ser Ala Leu Val Lys  
                          370                      375                      380  
 Pro Ile Thr Ile Asn Val Gly Arg Ala Gly Ala Ala Ser Leu Asp Val  
 385                      390                      395                      400  
 Ile Gln Glu Val Glu Tyr Val Lys Glu Glu Ala Lys Met Val Tyr Leu  
                          405                      410                      415  
 Leu Glu Cys Leu Gln Lys Thr Pro Pro Pro Val Leu Ile Phe Ala Glu  
                          420                      425                      430  
 Lys Lys Ala Asp Val Asp Ala Ile His Glu Tyr Leu Leu Leu Lys Gly  
  
                          435                      440                      445  
 Val Glu Ala Val Ala Ile His Gly Gly Lys Asp Gln Glu Glu Arg Thr  
                          450                      455                      460

Lys Ala Ile Glu Ser Phe Lys Glu Gly Lys Lys Asp Val Leu Val Ala  
 465 470 475 480  
 Thr Asp Val Ala Ser Lys Gly Leu Asp Phe Pro Ala Ile Gln His Val  
 485 490 495  
 Val Asn Tyr Asp Met Pro Glu Glu Ile Glu Asn Tyr Val His Arg Ile  
 500 505 510

Gly Arg Thr Gly Arg Ser Gly Lys Thr Gly Ile Ala Thr Thr Phe Ile  
 515 520 525  
 Asn Lys Gly Cys Asp Glu Ser Val Leu Met Asp Leu Lys Ala Leu Leu  
 530 535 540  
 Val Glu Ala Lys Gln Lys Val Pro Pro Val Leu Gln Val Leu Gln Thr  
 545 550 555 560  
 Gly Asp Glu Thr Met Leu Asp Ile Gly Gly Glu Arg Gly Cys Thr Phe  
 565 570 575  
 Cys Gly Gly Leu Gly His Arg Ile Thr Asp Cys Pro Lys Leu Glu Val

580 585 590  
 Met Gln Thr Lys Gln Val Thr Asn Ile Gly Arg Lys Asp Tyr Leu Ala  
 595 600 605

His Ser Ser Met Asp Phe

610

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

aaratccaga actttgccaa rag

23

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4  
ccwatyctgt ggacrtagtt 20

<210> 5  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> primer  
<400> 5  
ggccggtacc atggaaaccg aaaatagacc caaaaag 37  
<210> 6  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> primer  
<400> 6  
gctagcggcc gcgcgaccgt ctgacttctg gagaactgcg 40  
<210> 7  
<211> 29  
<212> DNA  
<213>  
> Artificial Sequence  
<220><223> primer  
<400> 7  
gagcctagga tggaaaatag acccaaaaa 29  
<210> 8  
<211> 64  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> primer  
<400> 8  
cagactagtt tacagatcct cttctgagat gagtttttgt tcgaagtcca tggagctatg 60  
agcc 64  
<210> 9  
<211> 37  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

cgtcggtagc atggaatgga atactttttt cttggtg

37

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

gctagcggcc gcgcgaccgt ctgacttctg gagaactgcg

40

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

tgatgaagcc cagagcaaga

20

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

ctccatgtca tcccagttgg t

21

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

atgcttaaca ggatcttctt cgttt

25

<210> 14

<211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 14  
 gtctgaattt atgatccatc catct 25  
 <210> 15  
 <211>  
 > 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 15  
 cagctgctgc aagacatgga 20  
 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 16  
 gatgttgtgc gcccgatc 20  
 <210> 17  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 17  
 aggcaaagat tgaaccata aagc 24  
 <210> 18  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 18

|                           |    |
|---------------------------|----|
| ctgtcctggg agtaaaccat cat | 23 |
| <210> 19                  |    |
| <211> 20                  |    |
| <212> DNA                 |    |
| <213> Artificial Sequence |    |
| <220><223> primer         |    |
| <400> 19                  |    |
| aatgcaacgt gagccagatg     | 20 |
| <210> 20                  |    |
| <211> 20                  |    |
| <212> DNA                 |    |
| <213> Artificial Sequence |    |
| <220><223> primer         |    |
| <400> 20                  |    |
| ggttgaccac acttctcatt     | 20 |
| <210> 21                  |    |
| <211> 20                  |    |
| <212> DNA                 |    |
| <213> Artificial Sequence |    |
| <220><223> primer         |    |
| <400> 21                  |    |
| tgtacgagga ggcgagttct     | 20 |
| <210> 22                  |    |
| <211> 20                  |    |
| <212> DNA                 |    |
| <213> Artificial Sequence |    |
| <220><223> primer         |    |
| <400> 22                  |    |
| gagttttcttg gcgtctcagg    | 20 |
| <210> 23                  |    |
| <211> 20                  |    |
| <212> DNA                 |    |
| <213> Artificial Sequence |    |
| <220><223> primer         |    |

|                        |                     |    |
|------------------------|---------------------|----|
| <400>                  | 23                  |    |
| agctgggtgga gcagttccta |                     | 20 |
| <210>                  | 24                  |    |
| <211>                  | 20                  |    |
| <212>                  | DNA                 |    |
| <213>                  | Artificial Sequence |    |
| <220><223>             | primer              |    |
| <400>                  | 24                  |    |
| catcaccttc agccctctgt  |                     | 20 |
| <210>                  | 25                  |    |
| <211>                  | 20                  |    |
| <212>                  | DNA                 |    |
| <213>                  | Artificial Sequence |    |
| <220><223>             | primer              |    |
| <400>                  | 25                  |    |
| gagagtcagc agaggctggt  |                     | 20 |
| <210>                  | 26                  |    |
| <211>                  | 20                  |    |
| <212>                  | DNA                 |    |
| <213>                  | Artificial Sequence |    |
| <220><223>             | primer              |    |
| <400>                  | 26                  |    |
| cagacgcagt aacaggtcca  |                     | 20 |