



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2016년10월17일  
 (11) 등록번호 10-1667122  
 (24) 등록일자 2016년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*G01N 33/569* (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2014-7007225  
 (22) 출원일자(국제) 2012년08월10일  
 심사청구일자 2014년03월19일  
 (85) 번역문제출일자 2014년03월19일  
 (65) 공개번호 10-2014-0064884  
 (43) 공개일자 2014년05월28일  
 (86) 국제출원번호 PCT/IB2012/054092  
 (87) 국제공개번호 WO 2013/027149  
 국제공개일자 2013년02월28일  
 (30) 우선권주장  
 61/526,792 2011년08월24일 미국(US)  
 (56) 선행기술조사문헌  
 KR1020110091579 A\*  
 Journal of General Virology, (2008), Vol. 89,  
 pp 2114-2121\*  
 EP1028127 A1  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
**조에티스 서비스즈 엘엘씨**  
 미국 뉴저지 (우편번호 07932) 플로햄 파크 캠퍼스 드라이브 100  
 (72) 발명자  
**안켄바우어, 로버트, 쥐.**  
 미국 49001 미시간 칼라마주 포티지 로드 7000 조에티스 엘엘씨  
**넬슨, 린, 디.**  
 미국 49001 미시간 칼라마주 포티지 로드 7000 조에티스 엘엘씨  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
**양영준, 김영**

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 양경식

(54) 발명의 명칭 **개선된 백신 진단**

**(57) 요약**

본 발명은 (a) 키메라 페스티바이러스가 투여된 동물과 (b) 야생형 소 바이러스성 설사 바이러스(BVDV)로 감염되거나 종래 BVDV 백신으로 면역화된 동물간을 식별하는 개선된 진단 방법 및 키트에 관한 것이다.

(72) 발명자

**오옌, 낸시 엘.**

미국 49001 미시간 칼라마주 포티지 로드 7000 조  
에티스 엘엘씨

**웰치, 시아오-쿤, 더블유.**

미국 49001 미시간 칼라마주 포티지 로드 7000 조  
에티스 엘엘씨

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- a) 동물로부터 수득한 혈청 샘플을, 소 바이러스성 설사 바이러스(BVDV) E<sup>rns</sup> 단백질과 교차반응하는 항체가 결합할 수 있는 가지뿔영양(pronghorn) 페스티바이러스(pestivirus) E<sup>rns</sup> 단백질 또는 그의 단편과 함께 인큐베이션하는 단계;
- b) 인큐베이션에 이어서 또는 인큐베이션과 동시에 상기 샘플을, 검출될 항체가 특이적으로 결합하는 BVDV E<sup>rns</sup> 단백질과 접촉시키는 단계; 및
- c) 상기 샘플에서 BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함하는, 상기 BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 존재 또는 부재를 측정하는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 샘플을 가지뿔영양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질 또는 그의 단편과 함께 인큐베이션하는 단계가 상기 샘플에서 상기 항체의 존재 또는 부재를 검출하는 단계 전에 수행되는 것인 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 샘플을 가지뿔영양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질 또는 그의 단편과 함께 인큐베이션하는 단계가 상기 샘플에서 상기 항체의 존재 또는 부재를 검출하는 단계와 동시에 수행되는 것인 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 검출될 항체가, BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에는 존재하지만 가지뿔영양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질에는 존재하지 않는 적어도 하나의 에피토프에 특이적으로 결합하는 것인 방법.

#### 청구항 5

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 항체의 존재가, 동물이 야생형 BVDV로 감염되었거나 종래 BVDV 백신으로 면역화되었음을 나타내는 것인 방법.

#### 청구항 6

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 항체의 부재가, 동물이 1) 야생형 BVDV로 감염되지 않았거나 또는 2) 종래 BVDV 백신으로 면역화되지 않았거나, 또는 가지뿔영양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질을 발현하는 키메라 페스티바이러스로 면역화되었음을 나타내는 것인 방법.

#### 청구항 7

제1항 또는 제4항에 있어서, 동물이 BVDV 감염에 감수성인 동물인 방법.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 동물이 소, 양, 염소 또는 돼지 종인 방법.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 동물이 소인 방법.

#### 청구항 10

가지뿔염양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질에 존재하지 않는 적어도 하나의 BVDV E<sup>rns</sup> 에피토프에 대한 항체의 존재 또는 부재의 검출을 촉진하는 시약을 포함하며, 상기 시약 중 하나는 BVDV E<sup>rns</sup> 단백질과 교차반응하는 항체가 결합할 수 있는 가지뿔염양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질 또는 그의 단편이고, 상기 시약 중 또 다른 하나는 검출될 상기 항체가 특이적으로 결합하는 BVDV E<sup>rns</sup> 단백질인, 제1항 또는 제4항의 방법에 사용되는 진단 키트.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 상기 시약 중 하나가, 야생형 BVDV 또는 종래 BVDV 백신에는 존재하지만 가지뿔염양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질에는 존재하지 않는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체인 진단 키트.

**청구항 12**

제10항에 있어서, 효소-연결 면역흡착 검정(ELISA), 측방 유동 검정, 웨스턴 블롯팅, PCR, 방사면역검정, 고체상 방사면역검정, 전기화학발광 검정, 면역블롯팅, 면역침전 및 면역염색으로 이루어진 군으로부터 선택된 검정을 수행하기 위한 시약을 포함하는 진단 키트.

**청구항 13**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 소 바이러스성 설사 바이러스(BVDV) E<sup>rns</sup> 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 부재를 나타내는 샘플이 (i) E<sup>rns</sup>가 아닌 BVDV 단백질 또는 (ii) E<sup>rns</sup>가 아닌 BVDV 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 존재 또는 부재에 대하여 추가로 시험되는 것인 방법.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 샘플이 BVDV 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 존재 또는 부재에 대하여 시험되고, 또한 상기 단백질이 p80 및 E2로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 (a) 키메라 페스티바이러스(pestivirus)가 투여된 동물과 (b) 야생형 소 바이러스성 설사 바이러스(BVDV)로 감염되거나 종래 BVDV 백신으로 면역화된 동물간을 식별하는 개선된 진단 방법 및 키트에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 소 바이러스성 설사 바이러스(BVD 바이러스 또는 BVDV)를 포함한 페스티바이러스가 가축과 야생 동물 양쪽 모두의 몇몇 종으로부터 단리되었다. BVDV에 대한 확인된 숙주로는 아메리카 들소, 영양, 순록 및 다양한 사슴 종이 포함되며, 반면에 기린 및 가지뿔염양(pronghorn)에서는 독특한 페스티바이러스 종이 동정되었다. BVDV는 플라비바이러스과(Flaviviridae)의 소형 RNA 바이러스이다. BVDV는 양에서 보더병 및 돼지에서 돼지콜레라의 병원체인 다른 페스티바이러스와 긴밀한 관계에 있다.

[0003] 특히 소에서 BVDV가 원인이 되는 질환은 광범위하게 만연하며 경제적 과멸을 가져올 수 있다. 소에서의 BVDV 감염은 사육문제로 귀결될 수 있으며, 유산 또는 조산을 초래할 수 있다. BVDV는 임신우의 태반을 가로지를 수 있으며, 바이러스에 면역관용(immunotolerant)이고 여생 동안 지속적으로 바이러스혈증을 앓게 되는 지속 감염(PI) 송아지의 출산으로 귀결될 수 있다. 감염우는 체온 상승, 설사, 기침 및 소화기 점막 궤양을 특징으로 하는 "점막 질환"을 또한 보일 수 있다. 이들 지속 감염 동물은 가축매에 바이러스를 퍼뜨리고 점막 질환의 창결을 조장하는 공급처를 제공하며, 장질환 또는 폐렴 유발의 원인이 되는 미생물 감염에 매우 걸리기 쉽게 된다.

[0004] 현재 이용가능한 BVDV 백신으로는 화학적-불활성화 야생형 바이러스를 함유하는 것들, 또는 변형-생(ML) BVDV를 함유하는 것들이 있다. BVDV는 소 또는 돼지 세포에서의 반복 계대에 의하여, 또는 바이러스에 온도-민감성 표현형을 부여하는 화학적-유발 돌연변이에 의하여 약독화시킬 수 있다. 그러나, 기존 불활성화 및 ML 백신으로는 백신접종 동물과 자연감염 동물간의 식별이 이루어지지 않는다.

[0005] 야생형 바이러스에 존재하지 않는 부가적인 항원 결정기를 함유할 수 있거나, 또는 야생형 바이러스에 존재하는 항원 결정기가 결여될 수 있는 "표식(marked)" 백신이 필드에서의 BVDV 감염 방제를 위한 효과적인 수단이 될 수 있다. US 특허출원 2010/0360055(Luo et al., 전문이 본원에 참조로 포함됨)에서는 후자, 즉 BVDV의 E<sup>rns</sup> 단백질을 가지뿔영양 페스티바이러스로부터의 E<sup>rns</sup> 단백질로 치환하는 키메라 페스티바이러스 백신에 기반한 백신에 대하여 기술하고 있다. 당해 키메라 페스티바이러스는 ATCC<sup>®</sup>에 UC 25548로 기탁되었으며 PTA-9939라는 ATCC<sup>®</sup> 수탁 번호를 부여받았다. 적당한 진단 검정의 동반하에, 당해 키메라 페스티바이러스의 사용은 야생형 BVDV로 감염되거나 종래 BVDV 백신으로 면역화된 동물과 대비하여 그 키메라 페스티바이러스가 투여된 동물들간의 식별을 가능케 해줄 것이다.

**발명의 내용**

[0006] 한 실시양태에서, 동물이 BVDV에 노출되었거나 종래 BVDV 백신으로 면역화되었는지 여부를 측정하는 방법이 제공되며, 여기서 BVDV로 감염되거나 종래 BVDV 백신으로 면역화된 동물은, BVDV에는 존재하지만, BVDV로부터의 E<sup>rns</sup> 단백질을 더 이상 발현하지 않지만 가지뿔영양 페스티바이러스로부터의 E<sup>rns</sup> 단백질은 BVDV에서 발현하는 키메라 페스티바이러스에는 존재하지 않는 적어도 하나의 E<sup>rns</sup> 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 보유한다.

[0007] 한 실시양태에서,

[0008] a) 동물로부터 혈청 샘플을 수득하는 단계;

[0009] b) 상기 샘플을 가지뿔영양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질 또는 그의 단편과 함께 인큐베이션하는 단계; 및

[0010] c) 상기 샘플에서 BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 존재 또는 부재를 검출하는 단계

[0011] 를 포함하는, BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 존재 또는 부재를 측정하는 방법이 제공된다.

[0012] 또 다른 실시양태에서, BVDV에는 존재하지만, BVDV로부터의 E<sup>rns</sup> 단백질을 더 이상 발현하지 않지만 가지뿔영양 페스티바이러스로부터의 E<sup>rns</sup> 단백질은 BVDV에서 발현하는 키메라 페스티바이러스에는 존재하지 않는 적어도 하나의 E<sup>rns</sup> 에피토프에 대한 항체를 검출할 수 있는 시약을 포함하는, 동물이 BVDV에 노출되었거나 종래 BVDV 백신으로 면역화되었는지 여부를 측정하는 진단 키트가 제공된다.

[0013] 추가 실시양태에서, BVDV 또는 종래 BVDV 백신에는 존재하지만, BVDV로부터의 E<sup>rns</sup> 단백질을 더 이상 발현하지 않지만 가지뿔영양 페스티바이러스로부터의 E<sup>rns</sup> 단백질은 BVDV에서 발현하는 키메라 페스티바이러스에는 존재하지 않는 에피토프에 결합하는 항체에 대한 용도가 제공된다.

[0014] 또 다른 실시양태에서,

[0015] a) 동물로부터 혈청 샘플을 수득하는 단계;

[0016] b) 상기 샘플을 가지뿔영양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질 또는 그의 단편과 함께 인큐베이션하는 단계; 및

[0017] c) 상기 샘플에서 BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 존재 또는 부재를 검출하는 단계

[0018] 를 포함하는, 동물이 BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 보유하는지 여부를 측정하는 방법이 제공된다.

[0019] 또 다른 실시양태에서, 상기 샘플을 가지뿔영양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질 또는 그의 단편과 함께 인큐베이션하는 단계는 상기 샘플에서 상기 항체의 존재 또는 부재를 검출하는 단계 전에 수행되는, BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 존재 또는 부재를 측정하는 방법이 제공된다.

[0020] 또 다른 실시양태에서, 상기 샘플을 가지뿔영양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질 또는 그의 단편과 함께 인큐베이션하는 단계는 상기 샘플에서 상기 항체의 존재 또는 부재를 검출하는 단계와 동시에 수행되는, BVDV E<sup>rns</sup> 단백질

에 특이적으로 결합하는 항체의 존재 또는 부재를 측정하는 방법이 제공된다.

- [0021] 또 다른 실시양태에서, 상기 항체는 BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에는 존재하지만 가지뿔영양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질에는 존재하지 않는 적어도 하나의 에피토프에 특이적으로 결합하는, BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 존재 또는 부재를 측정하는 방법이 제공된다.
- [0022] 또 다른 실시양태에서, 상기 항체의 존재는 동물이 BVDV로 감염되었거나 종래 BVDV 백신으로 면역화되었음을 나타내는, BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 존재 또는 부재를 측정하는 방법이 제공된다.
- [0023] 또 다른 실시양태에서, 상기 항체의 부재는 a) 동물이 1) BVDV로 감염되지 않았거나 또는 2) 종래 BVDV 백신으로 면역화되지 않았거나; 또는 b) 가지뿔영양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질을 발현하는 키메라 페스티바이러스로 면역화되었음을 나타내는, BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 존재 또는 부재를 측정하는 방법이 제공된다.
- [0024] 또 다른 실시양태에서, 혈청 샘플이 BVDV 감염에 감수성인 동물로부터 취득되는, 샘플에서 BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 존재 또는 부재를 측정하는 방법이 제공된다.
- [0025] 또 다른 실시양태에서, 혈청 샘플이 소, 양, 염소 또는 돼지 종인 동물로부터 취득되는, 샘플에서 BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 존재 또는 부재를 측정하는 방법이 제공된다.
- [0026] 또 다른 실시양태에서, 혈청 샘플이 소인 동물로부터 취득되는, 샘플에서 BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 존재 또는 부재를 측정하는 방법이 제공된다.
- [0027] 또 다른 실시양태에서, 가지뿔영양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질에 존재하지 않는 적어도 하나의 BVDV E<sup>rns</sup> 에피토프에 대한 항체의 존재 또는 부재의 검출을 촉진하는 시약을 포함하며, 상기 시약 중 하나는 가지뿔영양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질 또는 그의 단편인, BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 존재 또는 부재를 측정하는 진단 키트가 제공된다.
- [0028] 또 다른 실시양태에서, 가지뿔영양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질에 존재하지 않는 적어도 하나의 BVDV E<sup>rns</sup> 에피토프에 대한 항체의 존재 또는 부재의 검출을 촉진하는 시약을 포함하며, 상기 시약 중 하나는 BVDV 또는 종래 BVDV 백신에는 존재하지만 가지뿔영양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질에는 존재하지 않는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체인, BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 존재 또는 부재를 측정하는 진단 키트가 제공된다.
- [0029] 또 다른 실시양태에서, 효소-연결 면역흡착 검정(ELISA), 측방 유동 검정, 웨스턴 블롯팅, PCR, 방사면역검정, 고체상 방사면역검정, 전기화학발광 검정, 면역블롯팅, 면역침전 및 면역염색으로 이루어진 군으로부터 선택된 검정을 수행하기 위한 시약을 포함하는, BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 존재 또는 부재를 측정하는 진단 키트가 제공된다.
- [0030] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 항체가 BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에는 존재하지만 가지뿔영양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질에는 존재하지 않는 에피토프에 특이적으로 결합하는, 동물이 BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 보유하는지 여부를 측정하는 방법을 제공한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0031] 하기 정의는 본 발명 실시양태의 설명에 채용되는 용어에 적용될 수 있다. 하기 정의는 본원에 참조로 포함되는 각각의 개별 참고문헌에 포함된 임의의 모순되는 정의를 대신한다.
- [0032] 본원에서 달리 정의하지 않는 한, 본 발명과 관련하여 사용되는 과학/기술용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 지니는 것으로 한다. 또한, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수형은 복수형을 포함하고 복수형은 단수형을 포함하기로 한다.
- [0033] "약" 또는 "대략"은, 측정가능한 수치 변수와 관련하여 사용될 때, 그 변수의 지시값 및 그 지시값의 실험오차

내(예를 들어, 평균에 대한 95% 신뢰구간내) 또는 그 지시값의 10%내에 있는(어느 한쪽 큰 쪽) 그 변수의 모든 값을 언급한다.

- [0034] 본원에서 사용되는 용어 "동물"은 소, 양, 염소 및 돼지 종(가축 및 야생 모두)를 비롯하여(이에 한정되지 않음) BVDV 감염에 감수성인 임의의 동물을 포함하는 것으로 의미된다.
- [0035] 본원에서 사용되는 용어 "항체(antibody 또는 antibodies)"는 에피토프의 인식에 의하여 항원에 결합할 수 있는 면역글로불린 분자를 언급한다. 면역글로불린은 "불변" 및 "가변" 영역을 갖는 "경" 및 "중" 폴리펩티드 쇠로 이루어진 혈청 단백질이며 불변 영역의 구성에 기초하여 수종의 클래스(예를 들어, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM)로 세분된다. 소정 항원에 대하여 "특이적인" 항체는 항체의 가변 영역이 배타적으로 특이적 항원을 인식하고 그에 결합하는 것을 나타낸다. 항체는 폴리클로날 혼합물 또는 모노클로날일 수 있다. 항체는 천연원으로부터 또는 재조합원으로부터 유래한 무손상 면역글로불린일 수 있거나, 또는 무손상 면역글로불린의 면역 반응성 부분일 수 있다. 항체는 예를 들어 Fv, Fab', F(ab')<sub>2</sub>를 비롯하여 다종다양한 형태로 및 단일쇄로 존재할 수 있다. 항체는 항원-결합 단백질로 전환될 수 있으며, 여기에는 항체 단편이 포함되고 그에 한정되지 않는다.
- [0036] 본원에서 사용되는 용어 "항원"은 대상체에 노출시 그 항원에 대하여 특이적인 면역 반응을 유도하게 될 하나 이상의 에피토프(선형, 입체구조 또는 둘 모두)를 함유하는 분자를 언급한다. 용어 "항원"은 약독화, 불활성화 또는 변형 생 박테리아, 바이러스, 진균, 기생충 또는 그 밖의 미생물을 언급할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "항원"은 자연에서 그 항원이 회합되어 있는 전 생물로부터의 분리되어 있고 불연속되어 있는 서브유닛 항원을 또한 언급할 수 있다. 용어 "항원"은 항-이디오타입 항체 또는 그의 단편과 같은 항체, 및 항원 또는 항원 결정기(에피토프)를 모방할 수 있는 합성 펩티드 미모토프(mimotope)를 또한 언급할 수 있다. 용어 "항원"은 DNA 면역화 적용에서와 같이 생체내에서 항원 또는 항원 결정기를 발현하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 또한 언급할 수 있다.
- [0037] "완충제"란 또 다른 화학물질의 농도 변화를 방지하는 화학 시스템을 의미하며, 예를 들어 양성자 공여자 및 수용자 시스템은 수소 이온 농도(pH)의 현저한 변화를 방지하는 완충제로서 작용한다. 완충제의 추가 예는 약산과 그의 염(공액염기) 또는 약염기와 그의 염(공액산)의 혼합물을 함유하는 용액이다.
- [0038] 본원에서 사용되는 용어 "BVDV", "BVDV 단리물" 또는 "BVDV 균주"는 바이러스 게놈, 관련 단백질 및 기타 화학 성분(예컨대, 지질)으로 구성되는, 타입 I 및 타입 II를 포함한(이에 한정되지 않음) 소 바이러스성 설사 바이러스를 언급한다. 다수의 타입 I 및 타입 II 소 바이러스성 설사 바이러스가 당업자에게 알려져 있으며 예를 들어 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(ATCC<sup>®</sup>, 미국 20108 버지니아주 매너사스)을 통해 입수가 가능하다. 소 바이러스성 설사 바이러스는 RNA 형태의 게놈을 갖는다. RNA는 클로닝에 사용하기 위하여 DNA로 역전사시킬 수 있다. 따라서, 본원에서 핵산 및 소 바이러스성 설사 바이러스 서열에 관한 언급은 바이러스 RNA 서열 및 그 바이러스 RNA 서열에서 유래한 DNA 서열 양측 모두를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "NADL"은 ATCC에 VR-534로 기탁된 BVDV의 참고 균주(reference strain)를 언급한다.
- [0039] 본원에서 사용되는 용어 "세포주" 또는 "숙주 세포"는 바이러스가 복제될 수 있거나 또는 유지될 수 있는 원핵 생물 또는 진핵생물 세포를 의미한다.
- [0040] "세포성 면역 반응" 또는 "세포-매개성 면역 반응"은 T-림프구 또는 기타 백혈구 또는 양측 모두에 의해 매개되는 면역 반응이며, 활성화된 T-세포, 백혈구, 또는 양측 모두에 의해 생성된 시토카인, 케모카인 및 유사 분자의 생성을 포함한다.
- [0041] 본원에서 사용되는 용어 "키메라(chimeric 또는 chimera)"는 하나보다 많은 전구세포에서 유래하는 유전적 또는 물리적 성분을 함유하는 미생물, 예를 들어 바이러스를 의미한다.
- [0042] 본원에서 사용되는 용어 "종래 BVDV 백신"은 야생형 BVDV에 기반한 백신을 의미한다. 바이러스는 약독화 또는 불활성화시킬 수 있다. 그러나 바이러스는 유전자 변형되지 않는다.
- [0043] 본원에서 사용되는 용어 "배양물"은 다른 종 또는 타입의 부재하에서 성장하는 세포 또는 미생물의 집단을 의미한다.
- [0044] 본원에서 사용되는 용어 "DIVA"는 백신접종 동물로부터 감염 동물을 식별하는 것을 의미한다.
- [0045] "용량"은 대상체에 주어진 백신 또는 면역원적 조성물을 언급한다. "제1 용량" 또는 "프라이밍 백신"은 0일차



에 주어진 용량을 언급한다. "제2 용량" 또는 "제3 용량" 또는 "연간 용량"은 제1 용량에 후속하여 주어진 그러한 조성물의 양을 언급하며, 제1 용량과 동일한 백신 또는 면역원적 조성물일 수 있거나 또는 아닐 수 있다.

- [0046] 본원에서 사용되는 용어 "에피토프"는 T-세포 수용체 또는 특이적 항체에 결합하는 항원의 특이적 부위를 의미하고, 전형적으로 약 3개 아미노산 잔기 내지 약 20개 아미노산 잔기를 포함하며 연속적 또는 비연속적일 수 있다.
- [0047] "단편"은 단백질 또는 유전자의 말단절단된 부분을 언급한다. "기능성 단편" 및 "생물학적 활성 단편"은 전장 단백질 또는 유전자의 생물학적 특성을 보유하는 단편을 언급한다. "면역원적 활성 단편"이란 면역 반응을 도출하는 단편을 언급한다.
- [0048] 본원에서 사용되는 용어 "이중"은 상이한 종 또는 균주에서 유래함을 의미한다.
- [0049] 본원에서 사용되는 용어 "동종"은 동일한 종 또는 균주에서 유래함을 의미한다.
- [0050] "체액성 면역 반응"은 적어도 부분적으로는 항체에 의하여 매개되는 면역 반응을 언급한다.
- [0051] 대상체에서의 "면역 반응"은 항원에 대한 체액성 면역 반응, 세포성 면역 반응, 또는 체액성/세포성 면역 반응의 발생을 언급한다. 면역원적 반응은 진단 목적 또는 기타 시험에 충분할 수 있거나, 또는 건강에의 악영향 또는 그의 합병증을 비롯하여, 병원체로의 감염에 의해 초래된 질환의 증세 또는 증후를 방지하기에 알맞을 수 있다.
- [0052] 본원에서 사용되는 "면역원적" 또는 "면역원성"은 항원에 대하여 특이적으로 지향된 면역 반응을 도출하는 능력을 언급한다.
- [0053] 본원에서 사용되는 용어 "면역원적 조성물"은 단독으로 또는 제약상 허용되는 담체와 함께 동물에 투여시 면역 체계에 의해 인식될 수 있으며 그에 따라 특이적 면역 반응의 생성을 가져오는(즉, 면역원적 활성을 가지는) 조성물을 의미한다.
- [0054] 본원에서 사용되는 용어 "면역학적 유효량"은 동물에서 면역원적 또는 면역학적 반응 유도에 유효한 항원의 양을 언급한다. 면역 반응은 제한 없이 세포성 및/또는 체액성 면역의 유도를 포함할 수 있다.
- [0055] 본원에서 사용되는 "단리"는 그의 자연발생 환경으로부터 제거하는 것을 의미한다. 미생물을 언급하는 경우, 그는 단독으로 또는 이중 숙주 세포, 또는 염색체 또는 벡터(예를 들어, 플라스미드, 파지 등)로 존재할 수 있다. "단리 박테리아", "단리 혐기성 박테리아", "단리 박테리아 균주", "단리 바이러스", "단리 바이러스 균주" 등은, 예를 들어 배양물에서, 예컨대 그의 자연발생 환경으로부터 분리시, 그 박테리아 또는 바이러스에 타 미생물이 실질적으로 없는 조성물을 언급한다. "단리"는, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 같은 임의의 각별히 정의된 물질을 기술하는 데 사용될 때, 물질- 예컨대 폴리펩티드 또는 핵산 -이 정상적으로 발견되는 당초의 세포 환경으로부터 분리되어 있는 물질을 언급한다. 따라서 본원에서 사용되는 바와 같이, 단지 예로서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 가지고 구축한 재조합 세포주는 "단리" 핵산을 이용한다. 이와 달리, 특정 단백질 또는 특이적인 면역원적 단편이 백신 또는 타 조성물로서 청구되거나 또는 사용되는 경우, 그는 단리된 것으로 생각될 것인데, 그 이유는 자연에서 존재할 수 있는 방식과 비교하여 동정, 분리 및 어느 정도는 정제되었기 때문이다. 단백질 또는 그의 특이적인 면역원적 단편이 항원을 생성하는 재조합 박테리아 또는 진핵생물 발현 벡터에서 생산되는 경우, 그는 단리 단백질 또는 핵산으로서 존재하는 것으로 생각된다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드를 가지고 구축한 재조합 세포주는 "단리" 핵산을 이용한다.
- [0056] 본원에서 사용되는 용어 "감염 다중도(MOI)"는, 소정의 감염에 얼마나 많은 접종물이 사용될 것인지를 상술하는, 세포당 미생물 수의 비율을 언급한다.
- [0057] 본원에서 사용되는 용어 "병원체" 또는 "병원성 미생물"은 그의 숙주 동물에서 질환, 병 또는 비정상 상태를 유도하거나 또는 그의 원인이 될 수 있는 미생물 - 예를 들어, 바이러스, 박테리아, 진균, 원생동물 또는 기생충 -을 의미한다.
- [0058] 본원에서 사용되는 용어 "페스티바이러스"는 플라비바이러스과 페스티바이러스속으로부터의 RNA 바이러스를 의미한다. 페스티바이러스는 BVDV(타입 1 및 타입 2), 돼지콜레라 바이러스(CSFV)와 보더병 바이러스(BDV), 및 멧돼지, 아메리카들소, 엘란드, 들소, 알파카, 푸두, 봉고, 다양한 사슴 종, 기린, 순록, 샤무아 및 가지뿔영양과 같은 종으로부터 단리한 페스티바이러스를 포함하며 그들에 한정되지 않는다 (문헌 [Vilcek and Nettleton; *Vet Microbiol.* 116:1-12 (2006)] 참조).



- [0059] "계약상 허용되는"은 건전한 의학적 판단의 범주내에 있고, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 등 없이 대상체의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하며, 타당한 이익-위험비에 부합하는, 그들의 목적 용도에 효과적인 물질을 언급한다.
- [0060] 본원에서 사용되는 용어 "예방하다", "예방하는" 또는 "예방" 등은 미생물의 복제 억제, 미생물의 전파 억제, 또는 미생물 자체의 그의 숙주내 설정 억제를 의미한다. 본원에서 사용되는 이들 용어 등은 감염의 하나 이상의 증세 또는 증후를 억제하거나 또는 봉쇄하는 것을 또한 의미할 수 있다.
- [0061] 백신 또는 다른 조성물에 관하여 본원에서 사용되는 "보호", "보호하는" 등은 백신 또는 조성물이 그 백신 또는 조성물에 사용된 항원(들)이 유래하는 생물이 원인이 되는 질환의 증후를 예방 또는 감소시키는 것을 의미한다. 용어 "보호" 및 "보호하는" 등은 백신 또는 조성물이 대상체에 이미 존재하는 질환 또는 그 질환의 하나 이상의 증후를 치료적으로 처치하는데 사용될 수 있음을 또한 의미한다.
- [0062] 본원에서 사용되는 용어 "특이적 결합", "특이적으로 결합한다" 등은 생리학적 또는 검정 조건하에서 측정가능하고, 선택적인 복합체를 형성하는 두 중 이상의 분자로서 정의된다. 적당히 선택된 조건하에서 그러한 결합은 실질적으로 억제되지 않으면서 동시에 비-특이적 결합이 억제되면, 항체 또는 다른 억제제는 단백질에 "특이적으로 결합한다"고 일컫는다. 특이적 결합은 높은 친화도를 특징으로 하고, 화합물 또는 단백질에 대하여 선택적이다. 비-특이적 결합은 보통 낮은 친화도를 띤다. 예를 들어 IgG 항체에서의 결합은 일반적으로 적어도 약  $10^{-7}$  M 또는 그 초과, 예컨대 적어도 약  $10^{-8}$  M 또는 그 초과, 또는 적어도 약  $10^{-9}$  M 또는 그 초과, 또는 적어도 약  $10^{-10}$  M 또는 그 초과, 또는 적어도 약  $10^{-11}$  M 또는 그 초과, 또는 적어도 약  $10^{-12}$  M 또는 그 초과, 또는 그 초과의 친화도를 특징으로 한다. 해당 용어는 예를 들어 항원-결합 도메인이 다수의 항원에 의해 운반되지 않는 특정 에피토프에 대하여 특이적인 경우에 또한 적용가능하고, 그 경우에 그 항원-결합 도메인을 운반하는 항체는 일반적으로 다른 항원에 결합하지 않을 것이다.
- [0063] 본원에서 사용되는 용어 "치료 유효량"은 투여되는 대상체에서의 질환 치료에 필요한 미생물, 또는 서브유닛 항원, 또는 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드 분자, 및 그들의 조합, 또는 백신 또는 조성물의 양을 의미한다.
- [0064] 본원에서 사용되는 용어 "치료하다", "치료하는" 또는 "치료" 등은 미생물에 의한 감염을 감소 또는 제거하는 것을 의미한다. 본원에서 사용되는 이들 용어 등은 미생물의 복제 감소, 미생물의 전파 감소, 또는 미생물 자체의 그의 숙주내 설정능 감소를 또한 의미할 수 있다. 본원에서 사용되는 이들 용어 등은 미생물에 의한 감염의 하나 이상의 증세 또는 증후를 감소, 호전 또는 제거시키거나, 또는 미생물에 의한 감염으로부터의 회복을 촉진시키는 것을 또한 의미할 수 있다.
- [0065] 본원에서 사용되는 용어 "백신접종하다" 및 "백신접종하는" 등은 동물에 백신 또는 면역원적 조성물을 투여하는 것을 의미한다.
- [0066] 본원에서 사용되는 용어 "백신" 및 "백신 조성물"은 감염을 예방 또는 감소시키거나, 또는 감염의 하나 이상의 증세 또는 증후를 예방 또는 감소시키는 조성물을 의미한다. 병원체에 대응한 백신 조성물의 보호 효과는 보통은 대상체에서 면역 반응, 즉 세포-매개성 또는 체액성 면역 반응 또는 양측의 조합을 유도함으로써 달성된다. 일반적으로 말해서, 감염의 폐지 또는 감소된 이환율, 증세 또는 증후의 호전, 또는 감염 대상체로부터 미생물의 촉진된 제거는 백신 조성물의 보호 효과를 나타내는 것이다. 본 발명의 백신 조성물은 BVDV가 원인이 되는 감염에 대응하여 보호 효과를 제공한다.
- [0067] 본원에서 사용되는 용어 "수의학상 허용되는 담체"는 건전한 의학적 판단의 범주내에 있고, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 등 없이 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하며, 타당한 이익-위험비에 부합하는, 그들의 목적 용도에 효과적인 물질을 언급한다.
- [0068] 하기 설명은 본 발명의 실시예에 있어서 당업자에 도움을 주기 위하여 제공된다. 비록 그렇다 치더라도, 본 발명 발견의 취지 또는 범주로부터 이탈함이 없이 당업자에 의하여 본원에서 논의되는 실시양태에 변형 및 변동이 가해질 수 있으므로 당해 설명은 본 발명을 부당하게 제한하는 것으로 해석되지 아니하여야 한다.
- [0069] **검출, 진단 방법, 키트**
- [0070] 본 발명은 감염 또는 백신접종을 통해 동물이 특이적인 페스티바이러스에 노출되었는지 여부를 측정하는 방법을 제공한다.
- [0071] DIVA 백신 - 감염 동물과 백신접종 동물간의 식별을 가능케 해주는 백신 - 을 사용하는 백신접종은 동물 대상체

의 노출력을 평가하는 수단을 제공한다. 이러한 식별은 경쟁적, 직접 또는 간접 방식일 수 있는 효소-연결 면역흡착 검정(ELISA), 측방 유동 검정, 웨스턴 블롯팅, PCR, 방사면역검정, 고체상 방사면역검정(SPRIA), 전기화학발광(ECL) 검정, 면역블롯팅, 면역침전 및 면역염색을 포함한(이들에 한정되지 않음) 다양한 진단 방법 중 어느 것을 통해 달성될 수 있다. 이들 및 다른 방법은 당업자에게 손쉽게 인식되며 알려져 있다.

[0072] 본원 기재의 키메라 페스티바이러스는 그들의 계능 조성 및 발현 단백질 양측 모두에서 야생형 BVDV 균주와 구별될 수 있다. 그러한 구별은 백신접종 동물과 감염 동물간의 식별을 가능케 해줄 수 있다. 예를 들어, 특정 실험실 시험에서의 BVDV 양성 판정 동물이 야생형 BVDV 균주를 보유하거나 또는 종래 BVDV 백신으로 면역화되었는지 여부, 또는 키메라 페스티바이러스가 투여되거나 또는 비-감염상태인지 여부에 관하여 측정될 수 있다.

[0073] 다양한 검정이 측정 수행에 이용될 수 있다. 예를 들어, 바이러스를 감염 양성 판정 동물로부터 분리할 수 있다. 핵산-기반 검정은 서던 또는 노던 블롯 분석, PCR 및 서열분석을 포함할 수 있으며 그들에 한정되지 않는다. 이와 달리, 단백질-기반 검정이 채용될 수 있다. 단백질-기반 검정의 경우, 감염이 의심되는 세포 또는 조직을 BVDV 양성 판정 동물로부터 분리할 수 있다. 세포 추출물이 그러한 세포 또는 조직으로부터 준비될 수 있으며 백신으로 미리 투여된 키메라 페스티바이러스 또는 야생형 BVDV의 존재를 판별적으로 동정해낼 수 있는 바이러스 단백질에 대한 적당한 항체를 사용하여 예를 들어 웨스턴 블롯에 투입될 수 있다.

[0074] 동물에서 유도된 면역 반응의 정도와 특질은 각종 기술을 사용하여 평가할 수 있다. 예를 들어, 혈청을 접종 동물로부터 채취하여 키메라 바이러스에 대하여 특이적인 항체의 존재 또는 부재에 대하여 시험할 수 있다.

[0075] 그러한 평가의 수행시, 동물에 의해 생성된 항체는 검정에서 시험 항원에 대하여 특이적이고, 다른 페스티바이러스로부터의 동일 항원과는 교차반응성이 아닌 것이 중요하다. 가지뿔영양 페스티바이러스 E<sup>fns</sup> 단백질을 인식하고 그에 결합하는 항체가 야생형 BVDV에 존재하는 E<sup>fns</sup> 단백질에도 결합할 것이라고는 예상되지 않았었다. 그러나, 소에 키메라 페스티바이러스의 반복투여는 종종 야생형 BVDV E<sup>fns</sup> 단백질과의 제한된 교차반응성을 보이는 항체의 생성을 가져왔다. 이들 교차반응성 항체는 플레이트에 결합한 야생형 BVDV E<sup>fns</sup> 단백질(즉, 시험 항원)에 결합할 수 있으며, 야생형 BVDV로의 이전의 감염 또는 종래 BVDV 백신으로의 백신접종을 시사하는 결과 - 즉, 위양성 결과를 도출한다. 따라서, 검정의 정확성 및 특이성을 개선할 필요가 존재한다. 이는 동물로부터의 혈청을 가지뿔영양 E<sup>fns</sup> 단백질의 존재하에 인큐베이션함으로써 달성될 수 있다. 단백질은 천연일 수 있거나 - 즉, 가지뿔영양 페스티바이러스로부터 정제 - 또는 재조합 발현될 수 있다. 가지뿔영양 E<sup>fns</sup> 단백질의 첨가는 검정 플레이트(들)에로의 혈청 첨가 전에, 또는 검정 플레이트(들)에로의 혈청 첨가와 동시에 행해질 수 있다. 이는 E<sup>fns</sup> 교차반응성 항체의 제거에 효과적이며, 그에 따라 보다 정확하고 신뢰성 있는 검정이 도출된다.

[0076] 본 발명의 키트는 (1) BVDV-감염 동물 또는 종래 BVDV 백신으로 면역화된 동물과 (2) 키메라 페스티바이러스가 투여된 동물의 검출 및 그들간의 식별에 유용한 하나 이상의 시약을 포함할 수 있다. 키트는 전 BVDV, 또는 키메라 페스티바이러스에는 존재하지 않는 BVDV 폴리펩티드, 에피토프 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 존재에 대한 샘플 분석용 시약을 포함할 수 있다. 이와 달리, 본 발명의 키트는 키메라 페스티바이러스, 또는 야생형 BVDV에는 존재하지 않는 폴리펩티드, 에피토프 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 존재에 대한 샘플 분석용 시약을 포함할 수 있다. 바이러스, 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 존재는 항체, PCR, 하이브리드화, 및 당업자에게 알려져 있는 그 밖의 검출 방법을 이용하여 측정될 수 있다.

[0077] 본 발명의 또 다른 키트는 특정 에피토프에 대한 항체 검출용 시약을 제공할 수 있다. 에피토프는 키메라 페스티바이러스에는 존재하고 야생형 BVDV에는 존재하지 않거나, 또는 이와 달리 야생형 BVDV에는 존재하고 키메라 페스티바이러스에는 존재하지 않는다. 그러한 시약은 항체의 존재에 대한 샘플 분석에 유용하고, 당업자에게 쉽사리 알려져 있고 이용가능하다. 항체의 존재는 당업자에게 알려져 있는 표준 검출 방법을 이용하여 측정될 수 있다.

[0078] 특정 실시양태에서, 키트는 키메라 페스티바이러스가 투여된 동물로부터 BVDV-감염 또는 BVDV-백신접종 동물의 검출 및 식별에 그 키트가 유용함을 표시하는 인쇄된 설명서 세트 또는 라벨을 포함할 수 있다.

[0079] **항체**

[0080] 항체는 모노클로날, 폴리클로날 또는 재조합 항체일 수 있다. 항체는 면역원 또는 그의 일부에 대하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 면역원의 아미노산 서열에 기반하거나 또는 클로닝 기술에 의하여 재조합적으로 제조된

합성 펩티드 또는 천연 유전자 생성물 및/또는 그의 일부를 단리하여 면역원으로서 사용할 수 있다. 면역원은 일반적으로 문헌 [Harlow and Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1988)]에 기재된 바와 같이 당업자 주지의 표준 항체 생산 기술에 의한 항체 생산에 사용될 수 있다. 항체 단편 역시 그 항체로부터 당업자 공지 방법에 의하여 제조될 수 있으며, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, 및 Fv를 포함한다.

[0081] 항체의 생산시, 목적 항체에 대한 스크리닝은 당해분야에 알려진 면역학에서의 표준 방법에 의하여 달성될 수 있다. 일반적으로, ELISA와 웨스턴 블롯팅 양측 모두는 사용될 수 있는 면역검정 타입이며, 양측 모두 당업자에게 주지이다. 폴리클로날 및 모노클로날 항체 양측 모두 검정에 사용될 수 있다. BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에의 결합에 사용되는 항체는 고체 지지체 기질에 결합시킬 수 있다. 항체는 검출가능한 모이어티 또는 표지와 접합시킬 수 있다. 본 발명에서의 사용에 고려되는 검출가능한 모이어티로는 비오틴, 금, 페리틴, 알칼리성 포스파타제, β-갈락토시다제, 피옥시다제, 우레아제, 플루오레세인, 로다민, 3중 수소, <sup>14</sup>C 및 아이오딘화를 비롯한(그들에 한정되지 않음) 형광, 금속, 효소 및 방사성 마커가 포함될 수 있으며 그들에 한정되지 않는다. 검출가능한 모이어티와 접합된 항체는 경쟁적 ELISA 검정에서와 같이 BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에 결합할 수 있거나, 또는 간접 ELISA 검정에서와 같이 BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에 결합하는 동물로부터의 항체에 결합할 수 있다.

[0082] 통상적인 표지 접합체-특이적 결합 검정 기술의 경우, 검정하고자 하는 액체 배지의 샘플을 다양한 시약 조성물과 조합한다. 그러한 조성물은 표지와 혼입된 결합 성분을 포함하는 표지 접합체를 포함한다. 접합체 중의 결합 성분은 시약 조성물의 타 성분(만약에 있으면) 및 검정 중인 배지내 리간드와 함께 참여하여 접합체의 두 종 또는 형태, 예를 들어 결합중(접합체 복합체)과 자유종을 생성하는 결합 반응 시스템을 형성한다. 결합중의 경우에 접합체의 결합 성분은 상응하는 결합 파트너에 의하여 결합되며, 반면에 자유종의 경우에 결합 성분은 그렇게 결합되지 않는다. 검체의 양은 결합 접합체:비-결합 접합체의 양에 비례한다.

[0083] **검정 개발의 개요**

[0084] 키메라 페스티바이러스를 투여하였으며, BVDV의 E<sup>rns</sup> 단백질이 가지뿔영양 페스티바이러스로부터의 E<sup>rns</sup> 단백질로 치환되는 소는 본원 기재의 본 발명의 이용을 통하여 야생형 BVDV로 자연 감염되거나 또는 종래 BVDV 백신으로 면역화된 소로부터 구별해낼 수 있다. 다양한 연령대의 소를 비-처리하거나 또는 생 또는 불활성화 키메라 페스티바이러스, 또는 생 또는 불활성화 BVDV의 3회 용량을 각각의 용량간에 약 3주의 기간을 두고 투여한다. 각각의 투여 뒤 2 내지 3주 후 또는 더 늦게, 그러나 후속 투여보다는 먼저 혈청 샘플을 채취한다. BVDV의 야외(야생형) 균주로 감염되거나 종래 BVDV 백신으로 면역화된 소와 대비하여, 키메라 페스티바이러스를 투여받은 소들 또는 처리받지 않는 소들간을 식별하기 위하여, 감별 진단 검정을 통해 혈청 샘플을 시험한다.

[0085] 경쟁적 ELISA의 경우, 야생형 BVDV 또는 키메라 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질(천연, 합성 또는 재조합 유래)이 검정에서 항원 공급원으로 사용될 수 있다. 야생형 BVDV에 존재하는 E<sup>rns</sup> 단백질이 시험 항원으로 사용되는 경우, 표지된 야생형 BVDV E<sup>rns</sup>-특이적 mAb에 의한 결합의 결여는 야생형 BVDV-특이적 에피토프에 결합하는 항체의 소 혈청내 존재를 나타내며, 이는 자연(야생형) 감염 또는 종래 BVDV 백신으로의 면역화를 표시하는 것이다. 이와는 대조적으로, 키메라 페스티바이러스를 투여한 소로부터의 혈청은 플레이트를 덮고 있는 야생형 BVDV E<sup>rns</sup> 단백질에 결합하는 항체를 함유하지 않을 것이다. 따라서, 표지된 야생형 BVDV E<sup>rns</sup>-특이적 mAb는 그 결합된 단백질에 결합할 것이며, 그에 따라 후속 발색이 일어난다.

[0086] 상기 검정에서, 가지뿔영양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질을 인식하고 그에 결합하는 항체가 또한 야생형 BVDV에 존재하는 E<sup>rns</sup> 단백질에도 결합하리라는 것은 놀라운 점이었다. 소에 키메라 페스티바이러스의 반복 투여가 종종 야생형 BVDV E<sup>rns</sup> 단백질과의 제한된 교차반응성을 보인 항체의 생성으로 귀결되고, 이는 BVDV로의 이전의 감염 또는 종래 BVDV 백신으로의 백신접종을 시사하는 결과로 인도하였기 때문에, 검정의 정확성 및 특이성을 개선할 필요가 존재하였다.

[0087] 개선된 경쟁 ELISA의 경우, 검정 플레이트에로의 소 혈청 첨가 전에 또는 그와 동시에 혈청 샘플을 재조합 발현된 가지뿔영양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질과 함께 인큐베이션한다. 이렇게 하면, 가지뿔영양 페스티바이러스

E<sup>rns</sup> 단백질에 결합할 수 있지만 또한 야생형 BVDV E<sup>rns</sup> 단백질과의 교차반응성도 발생한 항체를 효과적으로 제거한다. 따라서, 검정에서의 발색은 동물이 BVDV 노출 이력이 없거나 또는 키메라 페스티바이러스로 백신접종 받은 것을 나타내는 반면에, 무발색은 동물이 야생형 BVDV에 노출되었거나 또는 종래 BVDV 백신으로 백신접종 받았음을 나타낸다.

[0088] 본 발명은 하기 실시예로 좀더 상세히 설명되지만 결코 그들에 제한되지 않는다.

[0089] **실시예 1**

[0090] BVDV-NADL E<sup>rns</sup>를 발현하는 제조합 배칼로바이러스를 구축하였다. BVDV의 C 유전자의 3' 부분과 전장 E<sup>rns</sup> 유전자의 유전자 융합체를 코딩하는 DNA 분자를 프라이머 올리고(Oligo) 250(서열 1; 5'-CACCATGAAAATAGTGCCTCAAGAAATC-3')와 올리고 252(서열 2; 5'-TTAAGCGTATGCTCCAAACCACGTC-3')를 가지고 BVDV-NADL cDNA의 전장을 함유하는 플라스미드로부터 PCR로 증폭하였다. PCR 생성물을 제조업자의 사용설명서에 따라 pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO(인비트로젠(Invitrogen), 미국 캘리포니아주 칼스배드)중으로 클로닝한 다음 원샷<sup>®</sup> 컴피턴트 이. 콜라이(One Shot<sup>®</sup> Competent *E. coli*, 인비트로젠)중으로 형질전환시켰다. 제조합 플라스미드를 추출하고 삽입체를 서열분석에 의하여 확인하였다. 당해 플라스미드를 pENTR-E<sup>rns</sup>로 명명하였다. 제조업자의 사용설명서에 따라 pENTR-E<sup>rns</sup> 및 배칼로다이렉트(BaculoDirect<sup>TM</sup>) 배칼로바이러스 발현 시스템(인비트로젠)을 사용하여 BVDV-NADL E<sup>rns</sup> 단백질을 발현하는 제조합 배칼로바이러스를 구축하였다. BVDV-NADL E<sup>rns</sup> 단백질을 발현하는 제조합 배칼로바이러스를 생성하여 플라크 정제하고 팽창시킨 다음 4℃ 및 -80℃ 모두에서 저장하였다. 제조합 배칼로바이러스내 BVDV-NADL E<sup>rns</sup> 단백질의 발현은 BVDV E<sup>rns</sup>-특이적 MAb 15C5(아이덱스 래보러토리즈 인크.(Idexx Laboratories Inc.), 미국 메인주 웨스트브룩)을 사용하여 면역형광 염색 및 웨스턴 블롯으로 확인하였다.

[0091] 유사한 전략을 이용하여 가지뿔영양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질을 배칼로바이러스에서 발현시켰다. 가지뿔영양 E<sup>rns</sup> 단백질의 발현은 항-His(C-term) MAb(인비트로젠)을 사용하여 면역형광 염색 및 웨스턴 블롯으로 확인하였다.

[0092] ELISA 항원의 생성을 위해, 100 ml 현탁 배양물중의 Sf21 또는 Sf9 세포를 제조합 배칼로바이러스 스톡으로 0.2 내지 5의 MOI로 감염시켰다. 세포를 27℃에서 2 내지 4일 인큐베이션 후 수확하였다. 세포를 저속(약 800g)으로 10 min 동안 원심분리하여 세포를 수집하였다. 세포를 자연 용해/결합 완충제(pH 8.0 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM 이미다졸, 및 1% IGEPAL CA-630)로 용해시켰다. 혼합물을 피펫으로 집었다 놓았다 하여 세포 덩어리를 파괴한 다음, -80℃에서 1시간 이상 동안 동결시켰다. 해동 후, 혼합물을 8000g로 20분 동안 4℃에서 원심분리로 청정화하였다. 배칼로-가지뿔영양 E<sup>rns</sup> 용해물로 명명한 최종 상청액을 분취하여 -80℃에서 저장하였다.

[0093] 검정의 수행시, ELISA 플레이트를 카르보네이트/비카르보네이트 완충제(pH 9.0)에 1 µg/ml이 되도록 희석한, BVDV 타입 1 E<sup>rns</sup> 단백질에 특이적으로 결합하는 100 µl/웰의 MAb WB210(베테리너리 래보러토리 에이전시(Veterinary Laboratory Agency), 영국 서리)으로 4℃에서 밤새 코팅하였다. 다음날, 플레이트를 PBST 세척 완충제(0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS)로 3회 세척한 다음 블로킹 완충제(PBST + 1% 카제인 나트륨 염)와 함께 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음에 플레이트를 PBST로 3회 세척하고, 100 µl의 배칼로-BVDV E<sup>rns</sup> 용해물(PBS에 1:1600 희석)을 각각의 웰에 첨가한 다음, 플레이트를 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이 인큐베이션 기간 동안, 60 µl의 소 혈청 샘플을 블로킹 완충제와 소정 농도의 배칼로-가지뿔영양 E<sup>rns</sup> 용해물을 함유하는 60 µl 샘플 희석제에 첨가하였다. 혈청-희석제 혼합물을 실온에서 적어도 30분 동안 인큐베이션하였다. PBST로 3회 세척 후, 혈청-희석제 혼합물을 ELISA 플레이트의 웰로 이송하였다. 다중 웰을 각각의 플레이트상에 블랭크 상태로 방치하여 비-경쟁 15C5-HRP 대조군으로서 역할을 담당케 하였다. 플레이트를 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. PBST로 3회 더 세척 후, 100 µl MAb 15C5-HRP 접합체(BVDV E<sup>rns</sup>에 특이적; 블로킹 완충제에 희석)를 각각의 웰에 37℃에서 1시간 동안 첨가하였다. 3회 세척 후, 100 µl ABTS 기질(KPL, 미국 메릴랜드주 게이터스버그)을 각각의 웰에 첨가하고 발색을 위하여 실온에서 20 내지 60분 동안 인큐베이션하였다. 광학밀도(OD)를 405/490 nm의 파장에서 측정하였다. 각각의 혈청 샘플에 대한 접합체



대조군으로부터의 OD 억제율의 %를 하기 수식으로 계산한다:

[0094]  $\%억제 = (\text{샘플의 OD}) \div (15C5\text{-HRP 대조군의 평균 OD}) \times 100\%$

[0095] 처리군 당 6마리의 BVDV 혈청-음성 소를 불활성화 BVDV(NADL 균주), 키메라 페스티바이러스로 백신접종 하거나, 또는 백신접종 하지 않았다(NTX). 백신접종은 3주 간격으로 행하였다. 백신 투여 전에 혈청 샘플을 각각의 시점에서 수집하였다. 이어서 샘플을 상기 검정으로 시험하였다.

[0096] **결과**

[0097] 표 1에 제시한 데이터는 실험 항원 및 비처리 대조군을 투여한 소의 혈청학적 반응 비교를 나타낸다. 제시한 데이터는 원 진단 검정과 본 발명인 개선된 진단 검정을 이용하여 생성되었다. 두 용량의 불활성화 BVDV, 또는 두 용량의 불활성화 키메라 페스티바이러스를 소에 투여 후 혈청 샘플을 채취하였다. 몇몇 기지의 BVDV 양성 및 음성 샘플에 기초하여, 양성("Pos"), 음성("Neg") 또는 불명("+/-")에 대한 컷오프 값을 다음과 같이 정의하였다:

[0098]  $< 40\% = \text{Pos}$

[0099]  $40\% - 50\% = +/-$

[0100]  $> 50\% = \text{Neg}$

**표 1**

동물 ID	처리	%억제	
		원 검정 (비회석)	개선된 검정 (1:1)
1358	NTX	Neg	Neg
1364	NTX	Neg	Neg
1365	NTX	Neg	Neg
1368	NTX	Neg	Neg
1372	NTX	Neg	Neg
1374	NTX	Neg	Neg
1351	BVDV (NADL 균주)	Pos	Neg
1352	BVDV (NADL 균주)	Pos	Pos
1354	BVDV (NADL 균주)	Pos	Neg
1361	BVDV (NADL 균주)	Pos	Pos
1363	BVDV (NADL 균주)	Pos	Pos
1370	BVDV (NADL 균주)	Pos	Neg
1355	키메라 페스티바이러스	NA	Neg
1357	키메라 페스티바이러스	Neg	Neg
1359	키메라 페스티바이러스	Neg	Neg
1360	키메라 페스티바이러스	Neg	Neg
1366	키메라 페스티바이러스	Neg	Neg
1369	키메라 페스티바이러스	Pos	Neg

[0101]

[0102] 표 2에 제시한 데이터는 표 1에 대하여 진술한 실험의 연속을 나타낸다. 여기서, 불활성화 BVDV 또는 불활성화 키메라 페스티바이러스의 제3 용량 투여 후 혈청 샘플을 채취하였다.

표 2

동물 ID	처리	%억제	
		원 검정 (비회석)	개선된 검정 (1:1)
1358	NTX	Neg	Neg
1364	NTX	Neg	Neg
1365	NTX	Neg	Neg
1368	NTX	Neg	Neg
1372	NTX	Neg	Neg
1374	NTX	Neg	Neg
1351	BVDV (NADL 균주)	Pos	Pos
1352	BVDV (NADL 균주)	Pos	Pos
1354	BVDV (NADL 균주)	Pos	Pos
1361	BVDV (NADL 균주)	Pos	Pos
1363	BVDV (NADL 균주)	Pos	Pos
1370	BVDV (NADL 균주)	Pos	Pos
1355	키메라 페스티바이러스	Pos	Neg
1357	키메라 페스티바이러스	Pos	Neg
1359	키메라 페스티바이러스	Pos	Neg
1360	키메라 페스티바이러스	Neg	Neg
1366	키메라 페스티바이러스	+/-	Neg
1369	키메라 페스티바이러스	Pos	Neg

[0103]

[0104] 원 E<sup>rns</sup> DIVA 검정 및 개선된 E<sup>rns</sup> DIVA 검정을 이용하여 생성된 표 3에 제시한 데이터는 생 약독화 BVDV 또는 생 키메라 페스티바이러스의 3회 용량을 투여한 소에서의 혈청학적 반응 비교를 나타낸다.

표 3

동물 ID	처리	%억제	
		원 검정 (비회석)	개선된 검정 (1:1)
5688	NTX	Neg	Neg
5699	NTX	Neg	Neg
5700	NTX	Neg	Neg
5701	NTX	Neg	Neg
5706	NTX	Neg	Neg
5709	NTX	Neg	Neg
1351	BVDV (NADL 균주)	Pos	Neg
1352	BVDV (NADL 균주)	Pos	Neg
1354	BVDV (NADL 균주)	Pos	Neg
1361	BVDV (NADL 균주)	Pos	Pos
1363	BVDV (NADL 균주)	Pos	Pos
1370	BVDV (NADL 균주)	Pos	Neg
1355	키메라 페스티바이러스	Neg	Neg
1357	키메라 페스티바이러스	Neg	Neg
1359	키메라 페스티바이러스	Pos	Neg
1360	키메라 페스티바이러스	Neg	Neg
1366	키메라 페스티바이러스	Neg	Neg
1369	키메라 페스티바이러스	Neg	Neg

[0105]

[0106] 데이터는 소 혈청을 검정 플레이트에의 첨가 전에 재조합 발현된 가지뿔영양 페스티바이러스 E<sup>rns</sup> 단백질과 함께 인큐베이션하는 부가적인 단계가 BVDV와 가지뿔영양 E<sup>rns</sup> 단백질 양측 모두에 결합할 수 있는 교차반응성 항체의 제거에 효과적임을 증명해 보여준다. 따라서, 키메라 페스티바이러스를 투여받는 그들 동물의 혈청학적 상태는



개선된 DIVA 검정에서 BVDV-음성을 나타내었고, 오류적 BVDV-양성(즉, BVDV로 감염되거나 또는 종래 BVDV 백신으로 백신접종됨)을 나타내지 않았다.

[0107] **실시예 2**

[0108] 실시예 1에서 기재한 DIVA 검정을 또 다른 BVDV-특이적 항원 포획 검정 또는 항체 검정과 병행하여 조합하여, 실시예 1의 DIVA 검정으로 검출한 음성 샘플(즉, 키메라 페스티바이러스로 백신접종을 받은 동물, 또는 나이브(naive) 비-감염 동물로부터 유래되는 샘플)이 실제로 나이브한지, 또는 그 대신 키메라 페스티바이러스로 백신접종을 받은 동물로부터 유래되는 것인지를 측정하였다.

[0109] 실시예 1의 DIVA 검정으로부터의 음성 샘플을 키메라 페스티바이러스로 백신접종을 받은 동물에조차도 존재할 BVDV에 대한 제2 항원 또는 항체의 존재에 대하여 시험하였다. 당해 검정에서, 실시예 1의 DIVA 검정으로 BVDV "음성" 판정을 받는 동물로부터의 샘플을 또 다른 BVDV-특이적 항원 또는 항체의 존재 또는 부재에 대하여 추가 분석하였다. 예를 들어, 실시예 1의 DIVA 검정을 또 다른 BVDV 항원, 예를 들어 BVDV E2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체에 대한 항원 포획 시험 또는 항체 검출 시험과 조합하였다. 이와 달리, 실시예 1의 DIVA 검정으로 BVDV "음성" 판정을 받는 동물로부터의 샘플을 BVDV p80/125 (즉, NS 2/3) 비-구조 단백질에 대하여 특이적인 항체에 대하여 분석하였다. 그러한 단백질의 검출을 위한 검정은 상업적으로 이용가능하고, 예를 들어 세렐리자® 비브이디브이 피80 에이비 모노 블로킹 키트(SERELISA® BVDV p80 Ab Mono Blocking kit, 신바이오틱스 코포레이션(Synbiotics Corporation), 미국 미주리주 캔자스 시티)를 기술한다.

[0110] 실시예 1의 DIVA 검정과 p80와 같은 또 다른 BVDV 항원에 특이적으로 결합하는 항체에 대한 검정의 조합으로부터의 예시적인 판독은 표 4에 예시된 바의 결과를 산출할 것이다.

**표 4**

동물 상태	지시 검정에 의한 판독	
	DIVA	p80
나이브 (비-감염; 비-백신접종)	-	-
야생형 BVDV로 감염	+	+
야생형 BVDV 백신(생 또는 사)으로 백신접종	+	+
개선된 키메라 페스티바이러스 백신(생 또는 사)으로 백신접종	-	+

[0111]

[0112] 비록 본 발명은 그의 특정 버전에 관하여 상세히 기재되었지만, 그 밖의 버전도 가능하다. 따라서, 첨부 특허 청구범위의 범주는 본원에 포함된 버전의 기재에 한정되지 아니한다.

**서열 목록**

SEQUENCE LISTING

<110> Ankenbauer, Robert G  
 Nelson, Lynn D  
 Oien, Nancee L  
 Welch, Siao-Kun W

<120> IMPROVED VACCINE DIAGNOSTICS

<130> PC71766

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer Oligo 250

<400> 1

cacatgaaa atagtgccca aagaatc

27

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

primer Oligo 252

<400> 2

ttaagcgtat gctccaaacc acgtc

25