(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0109612
(43) 공개일자 2024년07월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 39/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7020614
(22) 출원일자(국제) 2022년12월19일
심사청구일자 2024년06월20일
(85) 번역문제출일자 2024년06월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/081912
(87) 국제공개번호 WO 2023/122523
국제공개일자 2023년06월29일
(30) 우선권주장
63/291,565 2021년12월20일 미국(US)

(71) 출원인
조에티스 서비시즈 엘엘씨
미국 뉴저지 (우편번호 07054) 파시파니 실반 웨이 10
(72) 발명자
하우글란드, 오위빈드
노르웨이 0275 오슬로 엔-0213 스코위엔 피.오. 박스 267 하르빗살렌 2에이 조에티스 서비시즈 엘엘씨 내
칼센, 마리우스 안드레 데 페이테르
노르웨이 0275 오슬로 엔-0213 스코위엔 피.오. 박스 267 하르빗살렌 2에이 조에티스 서비시즈 엘엘씨 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

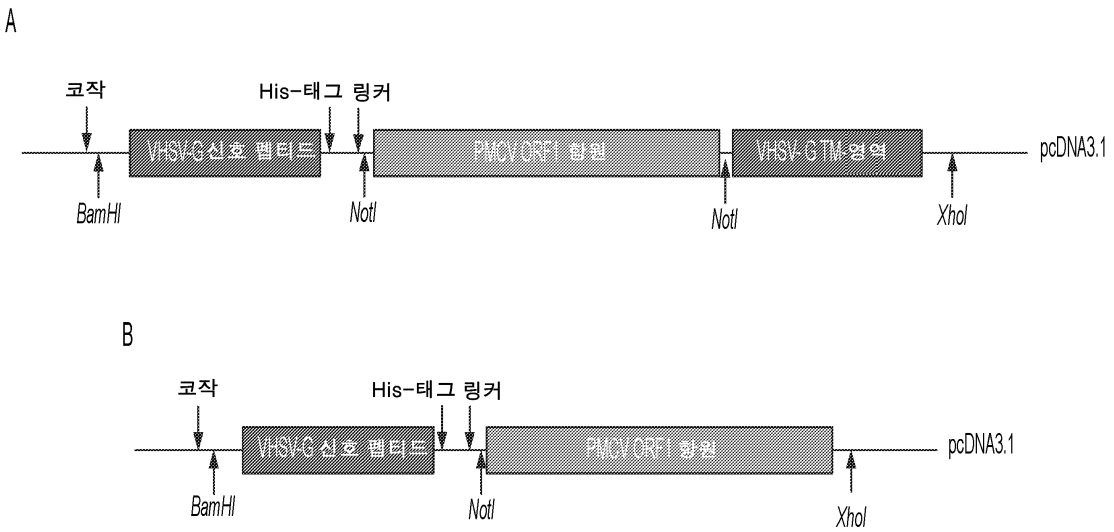
전체 청구항 수 : 총 74 항

(54) 발명의 명칭 **세포 막에서 항원을 발현시키기 위한 조성물 및 방법**

(57) 요 약

DNA 백신을 통해 세포 표면에 전달된 항원의 발현을 표적화하는 시스템이 개시되어 있다. 항원, 백신, 및 감염으로부터 어류를 보호하는 데 이러한 백신을 사용하는 방법이 또한 개시되어 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61P 31/14 (2018.01)
C12N 15/625 (2013.01)
C12N 15/63 (2013.01)
A61K 2039/53 (2013.01)
A61K 2039/552 (2013.01)
C12N 2720/00022 (2013.01)
C12N 2760/16034 (2013.01)
C12N 2760/18034 (2013.01)

(72) 발명자
하우게, 린다 헬레나
노르웨이 0275 오슬로 엔-0213 스코위엔 피.오. 박스 267 하르빗살렌 2에이 조에티스 서비시즈 엘엘씨 내
로데, 마리트
노르웨이 0275 오슬로 엔-0213 스코위엔 피.오. 박스 267 하르빗살렌 2에이 조에티스 서비시즈 엘엘씨 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

N-말단으로부터 C-말단까지, 다음을 포함하는 융합 단백질:

d) 분비된 또는 제1의 막-결합된 단백질(membrane-bound protein)의 N-말단 분비 신호 서열;

e) 비-엔벨로프 바이러스(non-enveloped virus)로부터의 항원;

f) 제2의 막-결합된 단백질의 막관통 도메인(transmembrane domain).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1의 단백질은 감염성 연어 빈혈 바이러스(Infectious salmon anemia virus; ISAV)의 인터페론 a, 인터페론 b, 인터페론 c, 인터페론 d, 인터페론 감마, 인터류킨-2, 인터류킨-4, 인터류킨-12 헤마글루티닌(HE) 단백질, 바이러스 출혈성 패혈증 바이러스 G-단백질 및 대서양 연어 파라믹소바이러스(Atlantic Salmon Paramyxovirus)의 융합 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 상기 제2의 단백질은 감염성 연어 빈혈 바이러스(ISAV)의 헤마글루티닌(HE) 단백질, 바이러스 출혈성 패혈증 바이러스 G-단백질 및 대서양 연어 파라믹소바이러스의 융합 단백질로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택되는, 융합 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 제1의 막-결합된 단백질은 제2의 막-결합된 단백질과 동일한, 융합 단백질.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 막 결합된 단백질은 바이러스 출혈성 패혈증 바이러스 G-단백질(VHSV-G)인, 융합 단백질.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 N-말단 분비 신호 서열은 서열 번호: 7 또는 48에 대해 적어도 90% 동일하거나, 또는 상기 분비 신호 서열은 서열 번호: 48의 일부 또는 서열 번호: 48에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고, 상기 일부는 서열 번호: 7 또는 서열 번호: 7에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 N-말단 분비 신호에서 상이한 아미노산의 적어도 1/2이 보존적 치환인, 융합 단백질.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호: 8 또는 49에 대해 적어도 90% 동일하거나, 또는 상기 막관통 단편은 서열 번호: 49의 일부 또는 서열 번호: 49에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고, 상기 일부는 서열 번호: 8 또는 서열 번호: 8에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 막관통 도메인 내 상이한 아미노산의 적어도 1/2이 보존적 치환인, 융합 단백질.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 비-엔벨로프 바이러스는 물고기 오르토레오바이러스(Piscine Orthoreovirus; PRV), 물고기 심근염 증후군 바이러스(Piscine Myocarditis Syndrome Virus; PMCV), 감염성 췌장 괴사 바이러스(Infectious Pancreatic Necrosis Virus; IPNV), 및 베타노다바이러스(betanodavirus)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 융합 단백질.

청구항 10

제9항에 있어서, 항원은 PMCV ORF-1 항원인, 융합 단백질.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 PMCV ORF-1 항원은 N-말단으로부터 C-말단까지:

a. 서열 번호: 34 또는 서열 번호: 35에 대해 적어도 90% 동일하거나, 적어도 91% 동일하거나, 적어도 92% 동일하거나, 적어도 93% 동일하거나, 적어도 94% 동일하거나, 적어도 95% 동일하거나, 적어도 96% 동일하거나, 적어도 97% 동일하거나, 적어도 98% 동일하거나, 적어도 99% 동일하거나, 또는 100% 동일한 서열, 및

b. 서열 번호: 25 내지 33 중 어느 하나에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 포함하고,

여기서,

i) 상기 아미노산 서열은 서열 번호: 15 또는 서열 번호: 15에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하고/하거나;

ii) 서열 번호: 1과 비교하여, 상기 단백질은 적어도 4개의 연속적인 아미노산 길이의 내부 결실(internal deletion)을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 25에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함하고, 서열 번호: 14 또는 서열 번호: 14에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하는, 융합 단백질.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 15 또는 서열 번호: 15에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하는, 융합 단백질.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 5 또는 서열 번호: 5에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하는, 융합 단백질.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 4 또는 서열 번호: 4에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하는, 융합 단백질.

청구항 16

제11항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 26에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함하고 서열 번호: 14 또는 서열 번호: 14에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하는, 융합 단백질.

청구항 17

제17항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 15 또는 서열 번호: 15에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하는, 융합 단백질.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 5 또는 서열 번호: 5에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하는, 융합 단백질.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 24 또는 서열 번호: 24에 대해 적어도

90% 동일한 서열을 결여하는, 융합 단백질.

청구항 20

제11항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 27에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함하고, 서열 번호: 14 또는 서열 번호: 14에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하는, 융합 단백질.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 15 또는 서열 번호: 15에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하는, 융합 단백질.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 3 또는 서열 번호: 3에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하는, 융합 단백질.

청구항 23

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 24 또는 서열 번호: 24에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하는, 융합 단백질.

청구항 24

제11항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 28에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 4 또는 서열 번호: 4에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하는, 융합 단백질.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 3 또는 서열 번호: 3에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하는, 융합 단백질.

청구항 27

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 24 또는 서열 번호: 24에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하는, 융합 단백질.

청구항 28

제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 29 또는 이에 대해 적어도 95%, 또는 96%, 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 29

제11항, 제16항 및 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 30 또는 이에 대해 적어도 95%, 또는 96%, 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 24 또는 서열 번호: 24에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하는, 융합 단백질.

청구항 31

제11항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 31 또는 이에 대해 적어도 95%, 또는 96%, 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 3 또는 서열 번호: 24, 또는 서열 번호: 3 또는 서열 번호: 24에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열 중 적어도 하나를 결여하는, 융합 단백질.

청구항 33

제11항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 32 또는 이에 대해 적어도 95%, 또는 96%, 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 14 또는 서열 번호: 15, 또는 서열 번호: 14 또는 서열 번호: 15에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열 중 적어도 하나를 결여하는, 융합 단백질.

청구항 35

제11항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 33 또는 이에 대해 적어도 95%, 또는 96%, 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 24 또는 서열 번호: 24에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 결여하는, 융합 단백질.

청구항 37

제11항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 23 또는 서열 번호: 23에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하는, 융합 단백질.

청구항 38

제11항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 22 또는 서열 번호: 22에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하는, 융합 단백질.

청구항 39

제11항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 15 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열 및 서열 번호: 4, 5, 25, 26, 27, 29, 30, 32(또는 서열 번호: 4, 5, 25, 26, 27, 29, 30 또는 32에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열) 중 어느 하나를 포함하고, 여기서 서열 번호: 1과 비교하여, 상기 단백질은 적어도 4개의 연속적인 아미노산 길이의 내부 결실(internal deletion)을 포함하고, 임의로, 상기 단백질은 상기 내부 결실 대신에 링커를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 40

제11항에 있어서, 단백질이 서열 번호: 13 또는 서열 번호: 13에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하고, 서열 번호: 25 또는 서열 번호: 25에 대해 적어도 95%, 또는 96%, 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 함유하는, 융합 단백질.

청구항 41

제11항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 11, 12, 또는 46, 또는 서열 번호: 11 또는 서열 번호: 12 또는 서열 번호: 46에 대해 적어도 90%, 또는 적어도 91%, 또는 적어도 92%, 또는 적어도 93%, 또는 적어도 94%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98%, 또는 적어도 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 42

제41항에 있어서, 서열 번호: 11 또는 서열 번호: 12 또는 서열 번호: 46과 상이한 아미노산의 적어도 50%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 70%, 또는 적어도 80% 또는 적어도 90% 또는 적어도 95% 또는 100%가 보존적 치환

인, 융합 단백질.

청구항 43

제11항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 9, 10 또는 47, 또는 서열 번호: 9, 서열 번호: 10 또는 서열 번호: 47에 대해 적어도 90%, 또는 적어도 91%, 또는 적어도 92%, 또는 적어도 93%, 또는 적어도 94%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 44

제43항에 있어서, 서열 번호: 9 또는 서열 번호: 10 또는 서열 번호: 47과 상이한 아미노산의 적어도 50%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 70%, 또는 적어도 80% 또는 적어도 90% 또는 적어도 95% 또는 100%가 보존적 치환인, 융합 단백질.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질을 암호화(encoding)하는 핵산 서열.

청구항 46

제45항에 있어서, 서열 번호: 16을 포함하는, 핵산 서열.

청구항 47

제1의 프로모터의 작동가능한 제어하에, 제45항 또는 제46항에 따른 핵산 서열을 포함하는 발현 카세트.

청구항 48

제47항에 있어서, 제1의 프로모터가 사이토메갈로바이러스(CMV) 이미디어트-얼리 인핸서(immediate-early enhancer) 및 프로모터인, 발현 카세트.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, 연어 인터페론을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하고, 여기서 상기 연어 인터페론은 서열 번호: 6 또는 서열 번호: 50 또는 서열 번호: 6 또는 50에 대해 적어도 95% 동일한 서열에 제시되는, 발현 카세트.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 핵산 서열은 서열 번호: 18에 대해 65 내지 90% 동일하거나 서열 번호: 19에 대해 65 내지 90% 동일하고 코돈 빈도가 상기 핵산 서열에서 보존되는, 발현 카세트.

청구항 51

제49항 또는 제50항에 있어서, 상기 핵산 서열은 서열 번호: 18 또는 서열 번호: 19에 대해 70 내지 79% 동일한, 발현 카세트.

청구항 52

제49항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아미노산 서열은 서열 번호: 6 또는 서열 번호: 50에 대해 적어도 98% 동일한, 발현 카세트.

청구항 53

제49항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호: 6 또는 50과 상이한 아미노산의 적어도 50%가 보존적 치환인, 발현 카세트.

청구항 54

제49항에 있어서, 서열 번호: 20 또는 서열 번호: 17에 대해 적어도 90% 동일한, 발현 카세트.

청구항 55

제54항에 있어서, 서열 번호: 20 또는 서열 번호: 17에 대해 적어도 95% 동일한, 발현 카세트.

청구항 56

제49항 내지 제535항 중 어느 한 항에 있어서, 연어 인터페론을 암호화하는 상기 핵산 서열은 제2의 프로모터의 작동가능한 제어 하에 존재하는, 발현 카세트.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 제2의 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 이미디어트-얼리 인핸서 및 프로모터인, 발현 카세트.

청구항 58

제47항 내지 제57항 중 어느 한 항에 따른 발현 카세트를 포함하는 벡터.

청구항 59

제57항에 있어서, 플라스미드 벡터인, 벡터.

청구항 60

제58항 또는 제59항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 61

제58항 또는 제59항의 벡터를 포함하는 백신.

청구항 62

제61항에 있어서, 항원은 PMCV ORF-1 항원인, 백신.

청구항 63

감염 예방을 필요로 하는 연어과(salmonid)에서 물고기 심근염 바이러스(PMCV) 감염을 예방하는 방법으로서, 상기 연어과에게 제63항에 따른 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 64

제62항에 있어서, 상기 연어과는 중량이 15 내지 200 그램인, 방법.

청구항 65

제62항에 있어서, 상기 연어과는 중량이 40 내지 110 그램인, 방법.

청구항 66

제63항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 연어과는 대서양 연어(살모 살라르(*Salmo salar*)), 무지개송어(온코린쿠스 마이키스(*Oncorhynchus mykiss*)), 또는 코호 연어(온코린쿠스 키수츠(*Oncorhynchus kisutch*))인, 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 연어과는 살모 살라르인, 방법.

청구항 68

제61항에 있어서, 감염에 대해 연어과를 보호하는 방법에 사용하기 위한, 백신.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 벡터는 항원을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함하고, 여기서 항원은 비-엔벨로프 바이러스인, 백신.

청구항 70

제69항에 있어서, 비-엔벨로프 바이러스는 PMCV인, 백신.

청구항 71

제68항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 연어과는 중량이 15 내지 200 그램인, 백신.

청구항 72

제68항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 연어과는 중량이 40 내지 110 그램인, 백신.

청구항 73

제68항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 연어과는 대서양 연어(살모 살라르), 무지개 송어(온코린쿠스 마이키스), 또는 코호 연어(온코린쿠스 키수츠)인, 백신.

청구항 74

제73항에 있어서, 상기 연어과는 살모 살라르인, 백신.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 일반적으로 백신 분야에 속한다.

배 경 기 술

[0002] 양식업은 1990년부터 2018년까지의 기간 동안 527%를 초과하는, 생산성 측면에서 엄청난 성장을 경험하였다. 2018년도에, 양식업은 전 세계 수생 생물 총 생산량(1억 7900만 톤)의 대략 46% 및 인간 소비용 해산물(수생 포유류, 파충류, 해조류, 및 기타 수생 식물을 제외한, 어류, 갑각류, 연체동물, 및 기타 수생 동물)의 52%에 기여하였다.

[0003] 상업적인 양식업은 주로 세균, 바이러스, 기생충, 및 보다 적은 정도로, 진균에 인해 유발된 감염성 질환에 의해 영향을 받는다. 세균성 질환은 심각한 생물학적 손실 및 따라서 경제적 손실을 입힐 수 있다. 이는 일반적으로 항생제로 제어할 수 있지만, 이러한 약제의 무분별한 사용은 세균 종들 간의 내성 메커니즘의 발달과 전이로 인해 궁극적으로 인간 건강에 위협이 되며, 이들 중 일부는 또한 인간 병원체이다. 또한, 이러한 병원체 중 일부는 배양물 속에서 성장시키기 어렵다. 따라서, 이러한 병원체로부터 보호하는 변형된 생 백신 또는 불활성화 백신은 상업적으로 실행 가능하지 않다.

[0004] DNA 백신은 이의 안정성과 전달의 단순성으로 인해 항원-특이적인 면역 반응을 생성하는 데 매력적인 접근법이 되어 왔다. DNA 백신은 고 순도로 대규모로 쉽게 제조할 수 있고, 반복적으로 투여할 수 있고, 단백질 및 다른 생물학적 중합체에 비해 고도로 안정하다.

[0005] 작제할 수 있는 다양한 형태의 핵산 백신 중에서, 환형 DNA 플라스미드가 가장 간단하다. DNA 예방접종(vaccination)은 항원을 암호화하는 유전자(또는 유전자들)를 함유하는 환형 DNA 플라스미드를 사용한 면역화를 포함한다. 실제로, 유리 DNA(네이키드(naked) DNA)의 주사는 유전자 백신에 의해 암호화된 단백질(항원)에 대해 효과적이고 장기간의 면역 반응을 자극한다. 플라스미드 DNA를 개체(individual)에게 주사하는 경우, 플라스미드는 세포에 의해 흡수되고 이의 유전 정보가 면역 단백질로 해독(translating)된다. 이는 숙주 면역 체계가 항원에 반응하도록 할 수 있다.

[0006] 그러나, DNA 백신은 비교적 신규하며 이러한 백신의 효능을 증진시킬 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0007] 제1 측면에서, 본 발명은 N-말단으로부터 C-말단까지:

[0008] a) 분비된 또는 제1의 막-결합된 단백질의 N-말단 분비 신호;

[0009] b) 비-엔벨로프 바이러스(non-enveloped virus)로부터의 항원;

[0010] c) 제2의 막-결합된 단백질의 막관통 도메인을 포함하는 융합 단백질을 제공한다.

[0011] 특정의 실시양태에서, 제1의 막-결합된 단백질은 제2의 막-결합된 단백질과 동일하다. 특정의 실시양태에서, 상기 막 결합된 단백질은 바이러스 출혈성 패혈증 바이러스 G-단백질(VHSV-G)이다. 바람직하게는, 상기 N-말단 분비 신호 서열은 서열 번호: 7 또는 서열 번호: 48에 대해 적어도 90% 동일하거나, 여기서 상기 분비 신호 서열은 서열 번호: 48의 일부 또는 서열 번호: 48에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고, 여기서 상기 일부는 서열 번호: 7 또는 서열 번호: 7에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 N-말단 분비 신호 서열은 서열 번호: 7에 대해 적어도 90% 동일하거나 상기 N-말단 분비 신호 내 상이한 아미노산의 적어도 1/2은 보존적 치환이다.

[0012] 특정의 실시양태에서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호: 8 또는 서열 번호: 49에 대해 적어도 90% 동일하거나, 여기서 상기 막관통 단편은 서열 번호: 49의 일부 또는 서열 번호: 49에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고, 여기서 상기 일부는 서열 번호: 8 또는 서열 번호: 8에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 바람직하게는, 상기 막관통 도메인은 서열 번호: 8에 대해 적어도 90% 동일하고 상기 N-말단 분비 신호 내 상이한 아미노산의 적어도 1/2은 보존적 치환이다.

[0013] 특정의 실시양태에서, 비-엔벨로프 바이러스는 물고기 심근염 바이러스(Piscine Myocarditis Virus; PMCV), 물고기 오르토레오바이러스(Piscine Orthoreovirus; PRV), 감염성 췌장 괴사 바이러스(Infectious Pancreatic Necrosis Virus; IPNV), 및 베타노다바이러스(betanodavirus)로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있는 어류에 영향을 미치는 비-엔벨로프 바이러스이다.

[0014] 특정의 실시양태에서, 항원은 물고기 심근염 바이러스(PMCV)의 ORF-1에 의해 암호화된다. 일부 구현예에서, 항원은 N-말단으로부터 C-말단까지:

[0015] a. 서열 번호: 34 또는 서열 번호: 35에 대해 적어도 90% 동일하거나, 적어도 91% 동일하거나, 적어도 92% 동일하거나, 적어도 93% 동일하거나, 적어도 94% 동일하거나, 적어도 95% 동일하거나, 적어도 96% 동일하거나, 적어도 97% 동일하거나, 적어도 98% 동일하거나, 적어도 99% 동일하거나, 또는 100% 동일한 서열, 및

[0016] b. 서열 번호: 25 내지 33 중 어느 하나에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 단백질이고,

[0017] 여기서

[0018] i) 상기 단백질은 서열 번호: 15 또는 서열 번호: 15에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하고/하거나;

[0019] ii) 서열 번호: 1과 비교하여, 상기 단백질은 길이가 적어도 4개의 연속적인 아미노산인 내부 결실(internal deletion)을 포함한다.

[0020] 특정의 실시양태에서, 단백질은 서열 번호: 11 또는 서열 번호: 12에 대해 적어도 90% 동일하다.

[0021] 특정의 실시양태에서, 서열 번호: 25에 대해 적어도 95% 동일하고 서열 번호: 14 또는 서열 번호: 14에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여한다. 바람직하게는, 단백질은 서열 번호: 4, 서열 번호: 5, 서열 번호: 15 또는 이들에 대해 적어도 90% 동일한 서열 중 하나 이상을 결여한다.

[0022] 특정의 다른 실시양태에서, 본 발명의 단백질은 서열 번호: 26에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함하고, 서열 번호: 14 또는 서열 번호: 14에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여한다. 단백질은 서열 번호: 26에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함할 수 있고 서열 번호: 14 또는 서열 번호: 14에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여할 수 있고 추가로 서열 번호: 5, 15, 또는 24 중 하나 이상 또는 이들에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여한다.

[0023] 다른 실시양태에서, 단백질은 서열 번호: 27에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함하고, 서열 번호: 14 또는 서열 번호: 14에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여한다. 단백질은 서열 번호: 27에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함할 수 있고 서열 번호: 14 또는 서열 번호: 14에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함할 수 있고 추가로 서열 번호: 3, 15, 또는 24 중 하나 이상 또는 이들에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여한다.

[0024] 다른 실시양태에서, 단백질은 서열 번호: 28에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 임의로, 단백질은 서

열 번호: 3, 4, 또는 24 중 하나 이상 또는 이들에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여한다.

[0025] 다른 실시양태에서, 단백질은 서열 번호: 29 또는 서열 번호: 30 또는 이들 서열 중 어느 하나에 대해 적어도 95%, 또는 96%, 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함한다. 바람직하게는, 단백질은 서열 번호: 3 또는 서열 번호: 24 중 적어도 하나, 또는 서열 번호: 3 또는 서열 번호: 24에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 결여한다.

[0026] 다른 실시양태에서, 단백질은 서열 번호: 32 또는 이에 대해 적어도 95%, 또는 96%, 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하고, 임의로, 서열 번호: 14 또는 서열 번호: 15 중 적어도 하나, 또는 서열 번호: 14 또는 서열 번호: 15에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0027] 다른 실시양태에서, 단백질은 서열 번호: 33 또는 이에 대해 적어도 95%, 또는 96%, 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하고 임의로, 서열 번호: 24 또는 서열 번호: 24에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 결여한다.

[0028] 상술된 실시양태 중 어느 것에서, 단백질은 또한 임의로 서열 번호: 2 및 13 중 적어도 하나, 또는 서열 번호: 2 또는 13에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 결여한 수 있다.

[0029] 특정의 실시양태에서, 단백질은 서열 번호: 11 또는 12 또는 서열 번호: 11 또는 12에 대해 적어도 90%, 또는 적어도 91%, 또는 적어도 92%, 또는 적어도 93%, 또는 적어도 94%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98%, 또는 적어도 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다.

[0030] 특정의 실시양태에서, 단백질은 서열 번호: 15 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열 및 서열 번호: 4, 5, 25, 26 27, 29, 30, 32 중 어느 하나(또는 서열 번호: 4, 5, 25, 26 27, 29, 30, 또는 32에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열)를 포함하고 여기서, 서열 번호: 1과 비교하여, 상기 단백질은 적어도 4개의 연속적인 아미노산 길이의 내부 결실을 포함하고, 임의로, 상기 단백질은 상기 내부 결실 대신에 링커를 포함한다.

[0031] 또 다른 실시양태에서, 단백질은 서열 번호: 13 또는 서열 번호: 13에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하고 서열 번호: 25 또는 서열 번호: 25에 대해 적어도 95%, 또는 96%, 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 함유한다.

[0032] 제2 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제1 측면의 실시양태 중 어느 것에 따른 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 제공한다.

[0033] 제3 측면에서, 본 발명은 제2의 측면의 임의의 실시양태에 따른 핵산 서열을 포함하는 카세트를 제공한다.

[0034] 본 발명의 제4 측면에서, 본 발명의 제3의 측면의 임의의 실시양태에 따른 카세트를 포함하는 벡터가 제공된다.

[0035] 특정의 실시양태에서, 벡터는 면역조절인자를 암호화하는 핵산 서열을 또한 암호화한다. 특정의 실시양태에서, 면역조절인자는 인터페론, 예를 들면, 서열 번호: 6을 포함하는 IFNb 형 인터페론이고, 여기서 인터페론을 암호화하는 상기 핵산 서열은 서열 번호: 18에 대해 65 내지 90% 동일하거나 서열 번호: 19에 대해 65 내지 90% 동일하고, 여기서 코돈 빈도는 상기 핵산 서열 내에서 보존된다. 특정의 실시양태에서, 인터페론을 암호화하는 핵산 서열은 서열 번호: 17 또는 서열 번호: 20 또는 서열 번호: 17 또는 서열 번호: 20에 대해 적어도 90% 동일한 핵산 서열을 포함하고, 여기서 인터페론을 암호화하는 상기 핵산 서열은 서열 번호: 6을 암호화하거나 또는 서열 번호: 6에 대해 95% 동일한 아미노산 서열을 암호화한다.

[0036] 특정의 실시양태에서, 벡터는 플라스미드 벡터 또는 바이러스 벡터일 수 있다.

[0037] 제5의 측면에서, 본 개시내용은 제1 측면의 임의의 실시양태에 따른 융합 단백질 또는 본 발명의 제4 측면에 따른 벡터를 포함하는 백신을 제공한다. 특정의 실시양태에서, 백신은 보조제(adjuvant)를 추가로 포함한다. 특정의 실시양태에서, 백신은 또한 담체를 제공한다. 하나의 실시양태에서, 담체는 지질 또는 리포솜 담체이다.

[0038] 특정의 실시양태에서, 백신은 다가 백신이고 바람직하게는 SAV(SAV-1, SAV-2, SAV-3, SAV-4, SAV-5, 및 SAV-6을 포함하는 연어 알파바이러스), ISAV(감염성 연어 빈혈 바이러스), IPNV(감염성 췌장 괴사 바이러스), ASPV(대서양 연어 폭스바이러스), IHNV(감염성 조혈 괴사 바이러스), VHSV(바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스), PRV(피신 오르토레오바이러스), 에어로모나스 살로니시다 아종. 살모니시다(*Aeromonas salmonicida* subs. *Salmonicida*), 비브리오(리스토넬라) 안귈라룸 혈청형 01(*Vibrio (Listonella) anguillarum* serotype 01), 비브리오(리스토넬라)안퀼라룸 혈청형 02a(*Vibrio (Listonella) anguillarum* serotype 02a), 비브리오 살모니시다(*Vibrio salmonicida*), 모리텔라 비스코사(*Moritella viscosa*), 및 바다 이 단백질(sea lice protein)로 이

루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 추가의 항원을 포함한다.

[0039] 제6의 측면에서, 본 발명은 PMCV 감염에 대해 연어과(salmonid)를 보호하는 방법을 제공하고, 이러한 방법은 이를 필요로 하는 연어과에게 본 발명의 제5의 측면의 임의의 실시양태에 따른 백신을 투여하는 단계를 포함한다. 특정의 실시양태에서 상기 연어과는 중량이 15 내지 200 그램(gram)이다. 특정의 실시양태에서, 연어과는 대서양 연어(살모 살라르(*Salmo salar*)), 무지개 송어(온코린쿠스 마이키스(*Oncorhynchus mykiss*)), 코호 연어(온코린쿠스 키수츠(*Oncorhynchus kisutch*)) 또는 치누크 연어(온코린쿠스 챠위챠(*Oncorhynchus tshawytscha*))이다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1a는 토티비리다에(*Totiviridae*)의 일반적인 비리온 구조(virion structure)이다. 도 1b는 PMCV의 게놈 구조를 나타낸다. 게놈은 3개의 큰 ORF를 포함한다.

도 2a는 세포 표면에서의 발현을 위해 백신 항원을 라우팅(routing)하는 전략의 예시이다. 도 2b는 분비된 항원을 촉진하는 전략의 예시이다.

도 3a는 비-투과된 세포에서 PMCV ORF1의 검출을 입증하는 사진이다. 도 3b는 전장(full length) PMCV ORF-1을 세포 표면으로 라우팅하는 데 사용된 상이한 발현 카세트를 사용하여 수득한 결과를 입증한다.

도 4a는 형질감염된 CHH-1 세포의 IF-염색에 의한 절두된(truncated) 캡시드 변이체의 형광 강도의 평가이다. 도 4b는 면역침강법(IP-Western)에 의한 막-분획으로부터 웨스턴 블롯팅 검출(Western blotting detection)에 의한 단백질 발현을 예시한 것이다. 2개의 블롯은 2개의 상이한 실험을 나타낸다.

도 5는 형질감염된 CHH-1 세포의 전체 세포 용해물로부터의 면역침전 및 웨스턴 블롯팅(Western blotting)에 의한 5개의 서로 다른 플라스미드 골격(backbone)에서 단백질 발현의 평가이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 본 발명을 보다 잘 설명하기 위하여, 다음의 정의가 제공된다.

[0042] 참조 번호에 적용되는 용어 "약"은 해당 값의 10%를 더하거나 뺀 참조 번호를 지칭한다.

[0043] 용어 "코돈 빈도는 상기 핵산 서열에서 보존된다"는 본 발명의 핵산 서열 내 코돈의 적어도 50%의 빈도가 숙주의 게놈 내 동일한 코돈의 빈도로부터 40%를 초과하여 벗어나지 않는 핵산 서열을 기술한다. 예를 들면, 숙주의 게놈에서 주어진 코돈의 빈도가 20%라고 할때, 이후에, 이러한 코돈은, 본 발명에 따른 핵산 서열 내 동일한 코돈의 빈도가 12%(40%가 20% 미만) 내지 28%(40%가 20% 보다 많음)인 경우, 이의 빈도가 숙주의 게놈 내 동일한 코돈의 빈도로부터 40%를 초과하여 벗어나지 않는 코돈의 적어도 50% 중에서 계수된다.

[0044] 예를 들면, 대서양 연어(삼로 살라르)에서 코돈 빈도는 표 1에 제공된다.

표 1

대서양 연어의 게놈에서의 코돈 빈도

아미노산	코돈	1000 개당	빈도
GLY	GGG	15.87	21.91
GLY	GGA	20.24	27.94
GLY	GGT	14.03	19.37
GLY	GGC	22.3	30.78
ASP	GAT	16.76	32.69
ASP	GAC	34.51	67.31
GLU	GAG	45.67	76.69
GLU	GAA	13.88	23.31
VAL	GTG	29.06	45.71
VAL	GTA	6.19	9.74
VAL	GTT	9.77	15.37
VAL	GTC	18.56	29.19

[0045]

ALA	GCG	7.2	11.08
ALA	GCA	13.42	20.65
ALA	GCT	17.5	26.92
ALA	GCC	26.88	41.35
ARG	AGG	13.4	26.85
ARG	AGA	10.12	20.28
ARG	CGG	6.61	13.25
ARG	CGA	4.01	8.036
ARG	CGT	5.74	11.50
ARG	CGC	10.02	20.08
SER	AGT	11.2	13.54
SER	AGC	21.01	25.40
SER	TCG	5.31	6.42
SER	TCA	10.15	12.27
SER	TCT	13.86	16.76
SER	TCC	21.18	25.61
LYS	AAG	39.68	69.87
LYS	AAA	17.11	30.13
ASN	AAT	11.42	28.36
ASN	AAC	28.85	71.64
MET	ATG	27.27	100
ILE	ATA	6.37	13.59
ILE	ATT	11.34	24.19
ILE	ATC	29.17	62.22
TRP	TGG	11.53	100
CYS	TGT	11.05	46.80
CYS	TGC	12.56	53.20
TYR	TAT	8.12	27.21
TYR	TAC	21.72	72.79

[0046]

LEU	TTG	10.16	10.97
LEU	TTA	3.44	3.71
LEU	CTG	45.99	49.65
LEU	CTA	7.18	7.75
LEU	CTT	7.87	8.50
LEU	CTC	17.98	19.41
PHE	TTT	12.55	32.54
PHE	TTC	26.02	67.46
GLN	CAG	35.96	81.21
GLN	CAA	8.32	18.79
HIS	CAT	8.63	32.43
HIS	CAC	17.98	67.57
PRO	CCG	5.93	11.09
PRO	CCA	13.3	24.86
PRO	CCT	13.89	25.97
PRO	CCC	20.37	38.08
THR	ACG	6.91	11.85
THR	ACA	14.69	25.18
THR	ACT	12.76	21.88
THR	ACC	23.97	41.09
아미노산	**코돈**	**1000 개당**	**빈도**

[0047]

[0048] 코돈 CGC는 20.08%의 빈도로 아르기닌을 암호화하는데 - 즉, 살모 살라르의 게놈 내 20.08%의 아르기닌 잔기는 CGC에 의해 암호화된다. 핵산 서열 내에서 아르기닌 잔기의 12.048% 내지 28.112%가 CGC에 의해 암호화된 경우, 코돈 CGC는 이의 빈도가 살모 살라르의 게놈 내 동일한 코돈의 빈도로부터 40%를 초과하여 벗어나지 않는 코돈의 적어도 50% 내에서 계수된 것이다.

[0049] "치료학적 유효량"은 병원체, 예를 들면, 바이러스 또는 세균에 의한 감염으로 유발된, 유해 건강 영향 또는 이의 합병증을 포함하는, 질환의 신호 또는 증상을 예방하거나 감소시키는 데 적절한 항원 또는 백신을 제공받는 대상체(subject)에서 면역 반응을 유도할 수 있는 항원 또는 백신의 양을 지칭한다. 체액 면역성 또는 세포-매개된 면역성 또는 체액 면역성과 세포-매개된 면역성 둘 다는 유도될 수 있다. 백신에 대한 동물의 면역원성 반응은 예컨대, 항체 역가의 측정, 림프구 증식 분석을 통해 간접적으로, 또는 야생형 균주에 의한 챌린지(challenge) 후 신호 및 증상의 모니터링을 통해 직접적으로 평가할 수 있다. 백신에 의해 부여된 보호 면역성은 예컨대, 사망률(mortality), 이환율(morbidity), 온도 수치, 전반적인 신체 상태, 및 대상체의 전반적인 건강 및 성능과 같은 임상 징후의 감소를 측정함으로써 평가할 수 있다. 치료학적으로 유효한 백신의 양은 사용된 특수한 보조제, 사용된 특수한 항원, 또는 대상체의 상태(condition)에 따라 변할 수 있으며, 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0050] "치료하는"은 이러한 용어가 적용되는 장애, 상태, 또는 질환을 예방하거나, 또는 이러한 장애, 상태, 또는 질환의 하나 이상의 증상을 예방하거나 감소하는 것을 지칭한다.

[0051] 본 발명은 세포 표면에 대한 항원의 증진된 표적화를 가능하게 하는 플랫폼(platform)을 제공한다. 따라서, 이러한 가공된(engineered) 항원은 이것이 숙주의 면역계에 의해 인식될 수 있는 세포 표면에 국재화되어 보호 면역 반응이 생성될 수 있다. 따라서, 제1 측면에서, 본 발명은 N-말단으로부터 C-말단까지:

[0052] a) 분비된 또는 제1의 막-결합된 단백질의 N-말단 분비 신호 서열;

[0053] b) 항원;

[0054] c) 제2의 막-결합된 단백질의 막관통 도메인을 포함하는 융합 단백질을 제공한다.

[0055] 특정의 실시양태에서, 상기 제1의 단백질은 인터페론 a, 인터페론 b, 인터페론 c, 인터페론 d, 인터페론 감마,

인터류킨-2, 인터류킨-4, 인터류킨-12로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 제2의 단백질은 대서양 연어 파라믹소바이러스(Atlantic Salmon Paramyxovirus), 감염성 연어 빈혈 바이러스(Infectious salmon anemia virus; ISAV)의 헤마글루티닌(HE) 단백질, 또는 바이러스 출혈성 패혈증 바이러스의 G-단백질의 융합 단백질로부터 독립적으로 선택될 수 있다.

[0056] 제1 및 제2의 단백질은 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 및/또는 제2의 단백질은 이의 신호 및 막관통 도메인 서열이 서열 번호: 38 및 39를 각각 포함하는 대서양 연어 파라믹소바이러스의 융합 단백질일 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2의 단백질은 이의 분비 신호전달 및 막관통 도메인 서열이 서열 번호: 40 및 41을 각각 포함하는 감염성 연어 빈혈 바이러스(ISAV)의 헤마글루티닌(HE) 단백질일 수 있다. 다른 실시양태에서, 제1 및 제2의 단백질은 상이할 수 있다. 예를 들면, 제1의 단백질은 서열 번호: 38을 포함할 수 있고 제2의 단백질은 서열 번호: 41을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 제1의 단백질은 서열 번호: 40을 포함할 수 있고, 제2의 단백질은 서열 번호: 39를 포함할 수 있다. 특정의 실시양태에서, 제1의 단백질은 서열 번호: 7, 38, 및 40으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 제2의 단백질은 서열 번호: 8, 39, 및 41, 또는 각각의 참고 서열과 적어도 90% 동일한 서열로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서, 바람직하게는, 상이한 아미노산 서열은 보존적 치환이다.

[0057] 일부 구현예에서, 제1의 막 단백질은 제2의 막 단백질과 동일하고 바이러스 출혈성 패혈증 바이러스 G-단백질(VHSV-G)이다.

[0058] 따라서, 일부 구현예에서, 상기 N-말단 분비 신호 서열은 서열 번호: 7에 대해 적어도 90%, 또는 적어도 91%, 또는 적어도 92%, 또는 적어도 93%, 또는 적어도 94%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98%, 또는 적어도 99%, 또는 100% 동일하다.

[0059] 위에서 기술한 바와 같이, 바람직하게는, 서열 번호: 7과의 차이를 이끄는 돌연변이는 치환이다. 특정의 유리한 실시양태에서, 상기 N-말단 분비 신호에서 상이한 아미노산의 적어도 1/2(또는 적어도 60% 또는 적어도 70% 또는 적어도 80%, 또는 적어도 90%)는 보존적 치환이다.

[0060] 실시양태에서, VHSV-G 단백질이 N-말단 분비 신호 및 막관통 도메인 둘 다의 원천인 경우,상기 막관통 도메인은 서열 번호: 8에 대해 적어도 90%, 또는 적어도 91%, 또는 적어도 92%, 또는 적어도 93%, 또는 적어도 94%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98%, 또는 적어도 99%, 또는 100% 동일하다.

[0061] 위에서 기술한 바와 같이, 바람직하게는, 서열 번호: 7 및 8과의 차이를 이끄는 돌연변이는 치환이다. 특정의 유리한 실시양태에서, 상기 막관통 도메인에서 상이한 아미노산의 적어도 1/2(또는 적어도 60% 또는 적어도 70% 또는 적어도 80%, 또는 적어도 90%)는 보존적 치환이다.

[0062] 제1 및/또는 제2의 단백질의 추가의 단편이 또한 포함될 수 있다. 따라서, 특정의 실시양태에서, 서열 번호: 7 또는 서열 번호: 7에 대해 적어도 90% 동일한 단백질은 서열 번호: 48 또는 서열 번호: 48에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열 또는 이의 단편에 포함될 수 있다. 상기 단편은 서열 번호: 7 또는 서열 번호: 7에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함할 수 있음이 이해되어야 한다.

[0063] 독립적으로, 서열 번호: 8 또는 서열 번호: 8에 대해 적어도 90% 동일한 단백질은 서열 번호: 49 또는 서열 번호: 49에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열 또는 이의 단편에 포함될 수 있다. 상기 단편은 서열 번호: 8 또는 서열 번호: 8에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함할 수 있음이 이해되어야 한다.

[0064] 서열 번호: 7 및 8과 유사하게, 서열 번호: 48 및 49와의 차이를 이끄는 돌연변이는 치환이다. 특정의 유리한 실시양태에서, 상기 N-말단 분비 신호 서열 및/또는 막관통 도메인에서 상이한 아미노산의 적어도 1/2(또는 적어도 60% 또는 적어도 70% 또는 적어도 80%, 또는 적어도 90%)는 보존적 치환이다.

[0065] 특정의 실시양태에서, 비-엔벨로프 바이러스는 어류에 영향을 미치는 비-엔벨로프 바이러스이다. 이러한 어류에 영향을 미치는 비-엔벨로프 바이러스의 적합한 예는 물고기 심근염 바이러스(Piscine Myocarditis Virus; PMCV), 어류 오르토레오바이러스(Piscine Orthoreovirus; PRV), 감염성 췌장 괴사 바이러스(Infectious Pancreatic Necrosis Virus; IPNV) 및 베타노다바이러스(betanodavirus)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 이들 바이러스로부터의 항원은 단백질 또는 이의 면역학적으로 유효한 단편일 수 있다. 표면 단백질 또는 이러한 표면 단백질의 면역학적으로 유효한 단편이 특히 바람직하다.

[0066] 특정의 실시양태에서, 항원은 비-엔벨로프 바이러스, 예를 들면, PMCV의 캡시드 단백질이다. 따라서, 일부 구현예에서, 항원은 물고기 심근염 바이러스PMCV) ORF-1 항원, 예를 들면, 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 1에 대해

적어도 90% 동일한, 예컨대, 서열 번호: 1에 대해 적어도 95% 동일하거나, 적어도 96% 동일하거나, 적어도 97% 동일하거나, 적어도 98% 동일하거나 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 단백질이다. 서열은 서열 번호: 1과 결실, 삽입, 또는 치환 면에서 상이할 수 있다. 바람직하게는, 적어도 일부 치환은 보존적 치환이다. 특정의 실시양태에서, 치환된 아미노산의 적어도 50%(즉, 적어도 60%, 또는 적어도 70%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 99%, 또는 100%)는 보존적 치환이다.

[0067] 다른 실시양태에서, 항원은 N-말단으로부터 C-말단까지:

[0068] a. 서열 번호: 34 또는 서열 번호: 35에 대해 적어도 90% 동일하거나, 또는 적어도 91% 동일하거나, 또는 적어도 92% 동일하거나, 또는 적어도 93% 동일하거나, 또는 적어도 94% 동일하거나, 또는 적어도 95% 동일하거나, 또는 적어도 96% 동일하거나, 또는 적어도 97% 동일하거나, 또는 적어도 98% 동일하거나, 또는 적어도 99% 동일하거나, 또는 100% 동일한 서열, 및

[0069] b. 서열 번호: 25 내지 33 중 어느 하나에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 포함하고,

[0070] 여기서,

[0071] i) 상기 단백질은 서열 번호: 15 또는 서열 번호: 15에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하고/하거나;

[0072] ii) 서열 번호: 1과 비교하여, 상기 단백질은 길이가 적어도 4개의 연속적인 아미노산인 내부 결실을 포함한다. 특정의 실시양태에서, 단백질은 서열 번호: 11 또는 서열 번호: 12에 대해 적어도 90% 동일하다.

[0073] 물고기 심근염 바이러스(PMCV) ORF-1 항원이 서열 번호: 15를 결여하는 실시양태에서, 보다 큰 결실, 예컨대, C-말단 절두(truncation)가 항원에서 또한 이루어질 수 있음이 이해되어야 한다. 특정의 실시양태에서, 이러한 보다 큰 C-말단 절두는 서열 번호: 13을 포함하거나 또는 이로 이루어진다.

[0074] 특정의 실시양태에서, 서열 번호: 25에 대해 적어도 95% 동일하고 서열 번호: 14 또는 서열 번호: 14에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여한 단백질. 바람직하게는, 단백질은 서열 번호: 4, 서열 번호: 5, 서열 번호: 15 중 하나 이상 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여한다.

[0075] 특정의 다른 실시양태에서, 본 발명의 단백질은 서열 번호: 26에 대해 적어도 95% 동일하고 서열 번호: 14 또는 서열 번호: 14에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여한 서열을 포함한다. 단백질은 서열 번호: 26에 대해 적어도 95% 동일하고 서열 번호: 14 또는 서열 번호: 14에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여한 서열을 포함할 수 있고 추가로 서열 번호: 5, 15, 또는 24 중 하나 이상 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여할 수 있다.

[0076] 다른 실시양태에서, 단백질은 서열 번호: 27에 대해 적어도 95% 동일하고, 서열 번호: 14 또는 서열 번호: 14에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여한 서열을 포함한다. 단백질은 서열 번호: 27에 대해 적어도 95% 동일하고 서열 번호: 14 또는 서열 번호: 14에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여한 서열을 포함할 수 있고 추가로 서열 번호: 3, 15, 또는 24 중 하나 이상 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여할 수 있다.

[0077] 다른 실시양태에서, 단백질은 서열 번호: 28에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 임의로, 단백질은 서열 번호: 3, 4, 또는 24 중 하나 이상 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여한다.

[0078] 다른 실시양태에서, 단백질은 서열 번호: 29 또는 서열 번호: 30 또는 이러한 서열 중 어느 하나에 대해 적어도 95%, 또는 96%, 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함한다. 바람직하게는, 단백질은 서열 번호: 3 또는 서열 번호: 24 중 적어도 하나, 또는 서열 번호: 3 또는 서열 번호: 24에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 결여한다.

[0079] 다른 실시양태에서, 단백질은 서열 번호: 32 또는 이에 대해 적어도 95%, 또는 96%, 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하고, 임의로, 서열 번호: 14 또는 서열 번호: 15 중 적어도 하나, 또는 서열 번호: 14 또는 서열 번호: 15에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 결여한다.

[0080] 다른 실시양태에서, 단백질은 서열 번호: 33 또는 이에 대해 적어도 95%, 또는 96%, 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하고, 임의로, 서열 번호: 24 또는 서열 번호: 24에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 결여한다.

[0081] 위에서 기술한 실시양태 중 어느 것에서, 단백질은 추가로 서열 번호: 2 및 13 중 적어도 하나, 또는 서열

번호: 2 또는 13에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 임의로 결여한다.

[0082] 다른 실시양태에서, 단백질은 서열 번호: 15 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열 및 서열 번호: 4, 5, 25, 26 27, 29, 30, 32 중 어느 하나(또는 서열 번호: 4, 5, 25, 26 27, 29, 30, 또는 32에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열)을 포함하고, 여기서, 서열 번호: 1과 비교하여, 상기 단백질은 길이가 적어도 4개의 연속적인 아미노산인 내부 결실을 포함하고, 임의로, 상기 단백질은 상기 내부 결실 대신에 링커를 포함한다.

[0083] 서열 번호: 1과 비교하여, 상기 물고기 심근염 바이러스(PMCV) ORF-1 항원은 길이가 적어도 4개의 연속적인 아미노산인 내부 결실을 포함할 수 있다. 일반적으로, 내부 결실은 길이가 250개 이하의 아미노산일 수 있다. 바람직하게는, 내부 결실은 길이가 약 10개 아미노산, 또는 길이가 10 내지 250개 아미노산, 또는 길이가 25 내지 250개 아미노산, 또는 길이가 50 내지 250개 아미노산, 또는 길이가 100 내지 250개 아미노산, 또는 길이가 150 내지 250개 아미노산, 또는 길이가 10 내지 200개 아미노산, 또는 길이가 25 내지 200개 아미노산, 또는 길이가 50 내지 200개 아미노산, 또는 길이가 100 내지 200개 아미노산, 또는 길이가 150 내지 200개 아미노산, 또는 길이가 약 200개 아미노산, 또는 길이가 약 50개 아미노산, 또는 길이가 50 내지 150개 아미노산, 또는 길이가 50 내지 100개 아미노산, 또는 길이가 약 100개 아미노산일 수 있다. 특정의 실시양태에서, 내부 결실은 서열 번호: 2, 서열 번호: 3 또는 서열 번호: 14를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.

[0084] 특정의 실시양태에서, 링커는 상기 내부 결실 대신에 존재할 수 있다. 내부 결실 및 링커의 길이가 동일할 필요는 없다. 예를 들면, 링커는 길이가 3 내지 50개 아미노산, 또는 길이가 3 내지 40개 아미노산, 또는 길이가 3 내지 30개 아미노산, 또는 길이가 3 내지 20개 아미노산, 또는 길이가 3 내지 10개 아미노산, 또는 길이가 약 5개 아미노산, 또는 길이가 약 10개 아미노산, 또는 길이가 약 20개 아미노산일 수 있다. 링커의 정확한 서열은 매우 중요하지는 않다. 일반적으로, 바람직한 아미노산은 극성의 하전되지 않거나 하전된 잔기이고, 이는 천연적으로 암호화된 아미노산의 대략 50%를 구성한다. 보다 구체적으로, 트레오닌, 세린, 및 글리신은 이의 작은 크기로 인하여 양호한 가요성(flexibility)을 제공할 수 있고, 또한 물과의 수소 결합의 형성을 통해 수성 용매 속에서 링커 구조의 안정성을 유지하는데 도움을 줄 수 있다. 특정의 실시양태에서 링커는 글리신 및/또는 세린이 풍부하다. 특정의 실시양태에서, 링커는 길이가 5개 아미노산이고 서열 번호: 36을 포함할 수 있다. 서열 번호: 36은 서열 번호: 37에 의해 암호화될 수 있다.

[0085] 또 다른 실시양태에서, 단백질은 서열 번호: 13 또는 서열 번호: 13에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 결여하고 서열 번호: 25 또는 서열 번호: 25에 대해 적어도 95%, 또는 96%, 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 함유한다.

[0086] 특정의 실시양태에서, 단백질은 서열 번호: 11, 12 또는 46 또는 서열 번호: 11 또는 서열 번호: 12 또는 서열 번호: 46에 대해 적어도 90%, 또는 적어도 91%, 또는 적어도 92%, 또는 적어도 93%, 또는 적어도 94%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98%, 또는 적어도 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다.

[0087] 특정의 바람직한 실시양태에서, 융합 단백질은 서열 번호: 9, 10, 또는 47 또는 서열 번호: 9, 10, 또는 47에 대해 적어도 90%, 또는 적어도 91%, 또는 적어도 92%, 또는 적어도 93%, 또는 적어도 94%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98%, 또는 적어도 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 바람직하게는, 상이한 아미노산은 치환이고 이러한 치환 중 적어도 1/2(예컨대, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%)은 보존적 치환이다.

[0088] 제2 측면에서, 본 개시내용은 본 발명의 제1 측면의 실시양태 중 어느 것에 따른 단백질 또는 본 발명의 제2 측면의 실시양태 중 어느 것에 따른 융합 단백질을 암호화한다. 본 발명의 제3 측면에 따른 핵산 서열은, 일부 구현예에서, 서열 번호: 16을 포함하거나 또는 이에 대해 적어도 90%(적어도 91%, 또는 적어도 92%, 또는 적어도 93%, 또는 적어도 94%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98%, 또는 적어도 99%) 동일하다.

[0089] 제3 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제2 측면의 임의의 실시양태에 따른 핵산 서열을 포함하는 발현 카세트를 제공한다. 바람직하게는, 본 발명의 제2 측면의 임의의 실시양태에 따른 핵산 서열은 제1의 프로모터의 작동가능한 제어 하에 있다. 제1의 프로모터는 시미안 바이러스 40 얼리 프로모터(SV40), 사이토메갈로바이러스 이미디어트-얼리 프로모터(CMV), 인간 우비퀴틴 C 프로모터(UBC), 인간 신장 인자 1α 프로모터(EF1A), 마우스 소프로글리세레이트 키나제 1 프로모터(PGK), 및 CMV 얼리 인핸서와 커플링된 닭 β-액틴 프로모터(CAGG)와 같은 이러한 예시적인 프로모터로부터 선택될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 발현 카세트는 또한 항원을 암호화하는

핵산 서열의 전사를 종결하는 폴리아데닐화 신호를 포함한다.

[0090] 임의로, 카세트는 또한 제2의 프로모터의 제어 하에 분자 면역조절인자를 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일반적으로, 제2의 프로모터는 숙주 유기체 내에서 전사를 개시할 수 있다. 숙주가 연어과, 예를 들면, 살모 살라르인 실시양태에서, 적합한 프로모터는 시미안 바이러스 40 얼리 프로모터(SV40), 사이토메갈로바이러스 이미디어트-얼리 프로모터(CMV), 인간 우비퀴틴 C 프로모터(UBC), 인간 신장 인자 1α 프로모터(EF1A), 마우스 소프로글리세레이트 키나제 1 프로모터(PGK), 및 CMV 얼리 인핸서와 커플링된 닭 β-액틴 프로모터(CAGG)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일반적으로, 본 발명의 발현 카세트는 또한 본 발명의 핵산 서열의 전사를 종결시키는 폴리아데닐화 신호를 포함한다.

[0091] 제4 측면에서, 본 출원은 본 발명의 제3 측면의 실시양태 중 어느 것에 따른 카세트를 포함하는 벡터를 개시한다. 플라스미드 벡터 및 바이러스 벡터 둘 다를 포함하는, 본 발명에 적합한 상이한 벡터는 당해 분야에 공지되어 있다. 적합한 프로모터는 pUC-기반 벡터, pVAX-벡터, pcDNA-벡터, NTC-벡터를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 바람직한 실시양태의 세트에서, 벡터는 실시예에 기술된 바와 같은, NTC9385R(Nature Technology Corporation) 또는 이의 변이체이다.

[0092] 다른 실시양태에서, 비교적 신규한 "도기본(doggybone)" 또는 dbDNA™ 플라스미드가 벡터로 사용될 수 있다. dbDNA™ 플라스미드 뿐만 아니라 이러한 플라스미드의 제조 공정은 WO2018033730, WO2016034849, WO2019193361, WO2012017210 및 WO2021161051에 기술되어 있다. 이러한 접근법의 이점은 무-세포 공정(cell-free process)에서 벡터를 합성할 수 있으므로 제조 효율성이 향상된다는 것이다. 무-세포 공정은 가닥 치환 복제(strand displacement replication)를 통한 주형의 증폭을 수반한다. 이러한 합성은 단일 가닥 DNA를 방출하고, 이는 다시 중합효소(polymerase)를 사용하여 이중 가닥-DNA로 복사할 수 있다. 대안적으로, DNA 중합효소 및 별개의 헬리카제를 공급함으로써 가닥 치환을 달성할 수 있다. 복제성 헬리카제는 이중 DNA를 열고 선도-가닥 중합효소(leading-strand polymerase)의 진전을 촉진할 수 있다. 수득되는 이중-가닥 DNA 콘카타머(concatemer)는 효소적으로 절단되고 연결됨으로써 도기본-유사형 DNA 작제물(doggybone-like shape DNA construct)을 형성한다.

[0093] 적합한 바이러스 벡터는 SAV와 같은 알파바이러스, VHSV 및 IHNV와 같은 랍도바이러스(rhabdovirus), ASPV와 같은 파라믹소바이러스, 아데노바이러스, 연어 아가미 폭스바이러스(Salmon gill poxvirus)와 같은 폭스바이러스 등을 포함한다. 이러한 바이러스는 복제를 담당하는 바이러스 게놈의 부분을 제거하기 위해 유전적으로 변형시킬 수 있다. 따라서, 수득된 바이러스는 어류 세포에 감염성이 있고 항원의 생산에 적합하지만, 병원성이지는 않다.

[0094] 카세트가 분자 면역조절인자를 암호화하는 핵산 서열을 함유하지 않는 실시양태에서, 이러한 핵산 서열은 여전히 벡터에 존재할 수 있다.

[0095] 본 측면의 벡터 및 제3 측면의 카세트 둘 다에 적합한 특정의 실시양태에서, 분자 면역조절인자는 인터페론, 바람직하게는 IFNb 등이고 서열 번호: 6(살모 *살라르* 인터페론 B, 또는 IFN-b 단백질) 또는 서열 번호: 50(살모 살라르 인터페론 B1, 또는 IFNb1 단백질) 또는 서열 번호: 6 또는 50에 대해 적어도 95%(예컨대, 적어도 96% 또는 적어도 97% 또는 적어도 98% 또는 적어도 99%) 동일한 서열을 포함하고, 여기서 상기 인터페론 B는 서열 번호: 18에 대해 65 내지 90% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되거나 또는 상기 인터페론 B1은 서열 번호: 19에 대해 65 내지 90% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되고, 여기서 코돈 빈도는 상기 핵산 서열에서 보존된다.

[0096] 특정의 실시양태에서, 인터페론을 암호화하는 핵산 서열은 서열 번호: 18 또는 서열 번호: 19에 대해 70 내지 79% 또는 73 내지 77% 동일하고, 단 코돈 빈도는 인터페론을 암호화하는 상기 핵산 서열에서 보존된다.

[0097] 상기 개시된 바와 같이, 인터페론을 암호화하는 핵산 서열 내 코돈의 적어도 50%의 빈도는 숙주의 게놈내 동일한 코돈의 빈도로부터 40%를 초과하여 벗어나지 않는다. 특정의 실시양태에서, 인터페론을 암호화하는 핵산 서열내 적어도 40%의 코돈의 빈도는 숙주의 게놈내 동일한 코돈의 빈도로부터 30%를 초과하여 벗어나지 않고/않거나, 인터페론을 암호화하는 핵산 서열내 적어도 30% 코돈의 빈도는 숙주의 게놈내 동일한 코돈의 빈도로부터 25%를 초과하여 벗어나지 않고/않거나, 인터페론을 암호화하는 핵산 서열 내 적어도 25% 코돈의 빈도는 숙주의 게놈내 동일한 코돈의 빈도로부터 20%를 초과하여 벗어나지 않는다. 숙주가 살모 살라르인 경우, 살모 살라르 내 코돈 빈도는 표 1에 제공되어 있다.

[0098] 특정의 실시양태에서, 핵산 서열은 서열 번호: 17 또는 서열 번호: 20을 포함하거나 또는 서열 번호: 17 또는 서열 번호: 20 중 하나에 대해 적어도 90% 동일하고(즉, 91% 이상 동일하거나, 92% 이상 동일하거나, 93% 이상

동일하거나, 94% 이상 동일하거나, 95% 이상 동일하거나, 96% 이상 동일하거나, 97% 이상 동일하거나, 98% 이상 동일하거나, 또는 99% 이상 동일하고) 상기 핵산 서열은 위에서 기술한 바와 같이, 서열 번호: 6 또는 50 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 암호화한다.

[0099] 따라서, 특정의 실시양태에서, 벡터는 융합 단백질 및 분자 보조제 둘 다를 포함하고, 여기서:

[0100] a. 융합 단백질은 서열 번호: 9, 10, 또는 47 또는 서열 번호: 9, 서열 번호: 10 또는 서열 번호: 47에 대해 적어도 90%, 또는 적어도 91%, 또는 적어도 92%, 또는 적어도 93%, 또는 적어도 94%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98%, 또는 적어도 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 바람직하게는, 상이한 아미노산은 치환이고 이러한 치환 중 적어도 1/2(예컨대, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%)은 보존적 치환이다; 및

[0101] b. 서열 번호: 17 또는 서열 번호: 20; 및, 임의로

[0102] c. 벡터는 플라스미드 벡터, 바람직하게는 NTC9385R 또는 이의 변이체이다.

[0103] 특정의 실시양태에서, 벡터는 위에서 기술한 바와 같은 발현 카세트 및 추가의 항원, 예컨대, 연어과 알파바이러스 항원을 함유할 수 있다. 벡터가 상이한 분자 면역조절인자를 암호화하는 추가의 핵산을 함유할 수 있는 것이 또한 가능하다.

[0104] 본 발명의 이러한 측면 중 임의의 실시양태에 따른 벡터는 임의로 추가의 항원(들)을 암호화하는 아미노산 서열을 포함한다. 일반적으로, 이러한 추가의 항원은 바이러스, 세균, 원생생물, 또는 기생충 기원을 가질 수 있다. 적합한 벡터는 PMCV, SAV, ISA, IPNV, ASPV(대서양 연어 폭스바이러스), IHNV(감염성 조혈 괴사 바이러스), VHSV(바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스) 및 PRV를 포함한다. 엔벨로프 및 비-엔벨로프 바이러스로부터의 항원이 포함될 수 있다. 특정의 실시양태에서, 항원은 바이러스 구조 단백질 또는 캡시드 단백질, 또는 외부 표면 단백질이다. 보호성 면역 반응을 유발할 수 있는 이러한 단백질의 단편이 또한 적합하다.

[0105] 적합한 세균은, 아에로모나스 삼로니시다 아종. 살모니시다(*Aeromonas salmonicida* subs. *Salmonicida*), 비브리오(리스토넬라) 안귈라룸(*Vibrio (Listonella) anguillarum*), 비브리오 살모니시다(*Vibrio salmonicida*), 모리텔라 비소코사(*Moritella viscosa*), 및 예르시니아 루케리(*Yersinia ruckeri*)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 다시, 세균의 외부 표면에 존재하는 단백질 뿐만 아니라, 보호성 면역 반응을 유발할 수 있는 이러한 단백질이 바람직한 항원이다.

[0106] 적합한 기생충은 바다 이(sea lice)(칼리기다에 과(family Caligidae), 바람직하게는, 레페오프테이루스(Lepeophtheirus) 또는 칼리구스(Caligus) 속)를 포함한다. 바다 이로부터 기원하고 보호성 면역 반응을 유발할 수 있는 단백질이 기술되었으며 서열 번호: 21 또는 이에 대해 적어도 90% 동일산 서열을 포함하지만 이에 제한되지 않는 장 펩타이드 또는 이의 단편을 포함한다.

[0107] 당해 분야의 통상의 숙련가는 기술된 아미노산 서열, 및 참고 아미노산 서열 사이의 차이(제1 측면의 임의의 실시양태에 따른 융합 단백질, 또는 본 발명의 제3 또는 제4 측면의 적합한 특정의 실시양태로서 분자 면역조절인자의 문맥에서)는 삽입, 결실, 또는 치환의 형태일 수 있다. 바람직하게는, 돌연변이는 치환이고, 보다 바람직하게는, 이러한 치환의 적어도 일부는 보존적 치환이다.

[0108] 숙련가는 이것이 암호화하는 단백질의 아미노산 서열의 변형을 야기하는 핵산 서열의 변경이, 있다고 해도, 수득되는 단백질의 3-차원 구조에 거의 영향을 미치지 않을 수 있음을 추가로 알고 있을 것이다. 예를 들어, 소수성 아미노산인, 아미노산 알라닌에 대한 코돈은 글리신과 같은 다른 덜 소수성인 잔기, 또는 발린, 류신, 또는 이소류신과 같은 더 소수성인 잔기를 암호화하는 코돈에 의해 치환될 수 있다. 유사하게, 다른 것을 하나의 음으로 하전된 잔기로, 예를 들면, 글루탐산을 아스파르트산으로, 또는 다른 것을 하나의 양으로 하전된 잔기로, 예를 들면, 아르기닌을 라이신으로 치환하는 변화는 또한 실질적으로 동일한 기능적 활성을 지닌 단백질을 생산하는 것으로 예측할 수 있다.

[0109] 다음의 6개 그룹 각각은 서로에 대해 대표적인 보존적 치환인 아미노산을 함유한다: [1] 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T); [2] 아스파르트산(D), 글루탐산(E); [3] 아스파라긴(N), 글루타민(Q); [4] 아르기닌(R), 라이신(K), 히스티딘(H); [5] 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 발린(V); 및 [6] 페닐알라닌(F), 타이로신(Y), 트립토판(W), (참고: 예컨대, 미국 특허 공보 20100291549).

[0110] 특정의 실시양태에서, 참고 서열과 상이한 아미노산의 적어도 50%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 70% 또는 적

어도 80% 또는 적어도 90% 또는 적어도 95% 또는 100% 모두는 보존적 치환이다.

[0111] 본원에 기술된 실시양태 중 어느 것에 따른 단백질 및/또는 핵산 서열 동일성은 당해 분야에 공지된 다양한 서열 비교 알고리즘 및 프로그램을 사용하여 평가할 수 있다. 서열 비교의 경우, 전형적으로 하나의 서열이 참고 서열(예컨대, 본원에 개시된 서열)로서 작용하고, 이에 대해 시험 서열을 비교한다. 이후에 서열 비교 알고리즘은 프로그램 매개변수를 기반으로, 참고 서열과 비교하여 시험 서열에 대한 서열 동일성 퍼센트를 계산한다.

[0112] 2개의 아미노산 또는 2개의 핵산 서열의 동일성 퍼센트는 예를 들면, 컴퓨터 프로그램, GAP, 즉, Genetics Computer Group(GCG; 위스콘신주 매디슨(Madison) 소재) 위스콘신 패키지 버젼 10.0 프로그램, GAP(Devereux *et al.* (1984), Nucleic Acids Res. 12: 387-95)을 사용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정할 수 있다. 동일성 퍼센트를 계산할 때, 비교되는 서열은 정형적으로 서열들 사이에 가장 큰 일치를 제공하는 방식으로 정렬된다. GAP 프로그램에 대해 선호되는 디폴트(default) 매개변수는 다음과 같다: (1) 뉴클레오타이드에 대한 단항 비교 행렬(unary comparison matrix)(동일성에 대해 1의 값, 비-동일성에 대해 0의 값을 포함함), 및 문헌: *Atlas of Polypeptide Sequence and Structure*, Schwartz and Dayhoff, eds., National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 기술된 바와 같은 Gribskov 및 Burgess의 가중 아미노산 비교 행렬((1986) Nucleic Acids Res. 14: 6745) 또는 다른 비교가능한 비교 행렬의 GCG 구현; (2) 각각의 갭에 대해 8의 페널티(penalty) 및 아미노산 서열에 대한 각각의 갭 내 각각의 기호에 대해 2의 추가 페널티, 또는 각각의 갭에 대해 50의 페널티 및 뉴클레오타이드 서열에 대한 각각의 갭 내 각각의 기호에 대해 3의 추가 페널티; (3) 말단 갭(end gap)에 대한 페널티 없음; 및 (4) 긴 간격에 대한 최대 페널티 없음.

[0113] 서열 동일성 및/또는 유사성은 또한 문헌: Smith and Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482의 국소 서열 동일성 알고리즘, 문헌: Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443의 서열 동일성 정렬 알고리즘, 문헌: Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444의 유사성 방법에 대한 조사, 이러한 알고리즘의 컴퓨터처리된 구현(위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575 소재의 Genetics Computer Group의 Wisconsin Genetics Software Package에서 BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA)을 사용함으로써 결정할 수 있다.

[0114] 유용한 알고리즘의 다른 예는 PILEUP이다. PILEUP은 점진적인, 쌍식 정렬(pairwise alignment)을 사용하여 관련 서열의 그룹으로부터 다중 서열 정렬을 생성한다. 이는 또한 정렬을 생성하는 데 사용된 클러스터링 관계(clustgering relationship)를 나타내는 트리(tree)를 플롯팅할 수 있다. PILEUP은 문헌: Feng & Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360의 단순화된 점진적 정렬 방법을 사용하며; 이러한 방법은 문헌: Higgins and Sharp, 1989, *CABIOS* 5:151-153에 기술된 것과 유사하다. 유용한 PILEUP 매개변수는 3.00의 디폴트 갭 가중치, 0.10의 디폴티 갭 길이 가중치, 및 칭량된 말단 갭을 포함한다.

[0115] 유용한 알고리즘의 다른 예는 문헌: Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; 및 Karin *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5873-5787에 기재된 BLAST 알고리즘이다. 특히 유용한 BLAST 프로그램은 Altschul *et al.*, 1996, *Methods in Enzymology* 266:460-480으로부터 입수된 WU-BLAST-2 프로그램이다. WU-BLAST-2는 수개의 조사 매개변수를 사용하며, 이들 중 대부분은 디폴트 값에 대해 설정된다. 조정가능한 매개변수는 다음의 값으로 설정된다: 오버랩 길이(overlap span)=1, 오버랩 분획(overlap fraction)=0.125, 단어 임계값(word threshold)(T)=II. HSP S 및 HSP S2 매개변수는 특수한 서열의 조성 및 목적한 서열이 조사되는 특수한 데이타베이스의 구성에 따라 프로그램 자체에 의해 확립되나; 이러한 값은 민감도를 증가시키기 위해 조정할 수 있다.

[0116] 추가의 유용한 알고리즘은 문헌: Altschul *et al.*, 1993, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402에 보고된 바와 같은 갭처리된(gapped) BLAST(gapped BLAST)이다. 갭처리된 BLAST는 BLOSUM-62 치환점수; 9로 설정된 임계값 T 매개변수; 비-갭처리된 연장을 개시하는 2개-히트 방법(two-hit method), 10+k의 부과 갭 길이, 10+k의 비용; 16으로 설정된 X_u, 및 데이타 조사 단계에서 40으로 및 알고리즘의 출력 단계에서 67로 설정된 X_g를 사용한다. 갭처리된 알고리즘은 약 22 비트에 상응하는 점수에 의해 개시된다.

[0117] 당해 분야의 통상의 숙련가는 본 발명의 제1 측면에 따른 아미노산, 본 발명의 제2 측면에 따른 핵산, 본 발명의 제3 측면의 발현 카세트 및 본 발명의 제4 측면의 벡터를 제조하기 위해 다수의 방법이 존재함을 인식할 것이다. 예를 들면, 핵산 서열은 소프트웨어 도구, 예컨대, CLC Main Workbench를 사용하여 설계할 수 있고, 인공적으로 합성하거나 표적화된 돌연변이유발을 사용하여 생성할 수 있다. 이러한 서열은 당해 분야의 숙련가에게 이용가능한 유전 가공 기술을 사용하여 발현 카세트 및 벡터 내로 서브클로닝할 수 있다. 예컨대, 문헌: *Molecular cloning: a laboratory manual* (Sambrook & Russell: 2000, Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN: 0879695773), 및 *Current protocols in molecular biology* (Ausubel et al., 1988+ updates, Greene

Publishing Assoc., New York; ISBN: 0471625949)을 참고한다.

[0118] 제5 측면에서, 본 출원은 본 발명의 제4 측면의 실시양태 중 어느 것에 따른 벡터를 포함하는 백신을 개시한다. 백신은 1가 또는 다가일 수 있다. 일반적으로 1가 백신의 용량은 적어도 1 μg의 제4 측면의 실시양태 중 어느 것에 따른 벡터를 함유할 수 있다. 특정의 실시양태에서, 백신의 1회 용량은 1 μg 내지 약 25 μg의 벡터를 함유할 수 있다. 다른 실시양태에서, 백신의 1회 용량은 1 내지 약 20 μg의 벡터터, 또는 약 5 내지 약 20 μg의 벡터 또는 약 5 내지 약 15 μg의 벡터 또는 약 10 내지 약 20 μg의 벡터 또는 약 5 내지 약 10 μg의 벡터를 함유할 수 있다.

[0119] 본 발명에 따른 백신에 적합한 다수의 항원이 상기 기술되었다. 이러한 항원은 본 발명의 제3 및 제4 측면에서, 위에서 기술한 벡터 및 발현 카세트를 포함하는, DNA 백신의 형태로 투여될 수 있다. 다른 실시양태에서, 이러한 항원은 서브단위(subunit)(즉, 정제되거나 부분 정제된 단백질)의 형태로 투여될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 항원은 불활성화된 또는 약화된 유기체를 포함할 수 있다.

[0120] 항원 외에도, 본 발명의 백신은 서열 번호: 6에 의해 암호화된 분자 면역조절인자 또는 이에 대해 95% 동일한 아미노산 서열 외에, 추가로 보조제, 즉, 면역 반응을 향상시키거나 조절하는 물질을 포함할 수 있다.

[0121] 적합한 보조제는 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 적합한 비-제한된 보조제는 사포닌(예컨대, Quil A), 명반(alum), CpG 올리고뉴클레오타이드, 폴리 I:C, 올리고뉴클레오타이드, 사이토킨, 당지질, 예를 들면, BAY® 1005, 4급 아민, 예를 들면, 디메틸 디옥타데실 암모늄 브로마이드(본원에 이후에, "DDA")를 포함한다. 사포닌, 스테롤(예컨대, 콜레스테롤), 및, 임의로, 인지질을 포함하는 복합체는 당해 분야에 기술되어 있다. CpG 올리고뉴클레오타이드와 사포닌, CpG와 콜레스테롤, 및 CpG와 명반은 상승 효과를 유발하는 것으로 보고되었다.

[0122] 항원 및 임의의 추가의 보조제 외에도, 백신은 또한 적합한 약제학적 담체를 포함할 수 있다. 적절한 담체는 당해 분야의 숙련가에게 명백하며 투여 경로에 크게 의존할 것이다. 본 발명에 존재할 수 있는 추가 구성성분은 보조제, 방부제, 표면활성제, 화학적 안정제, 현탁제 또는 분산제이다. 전형적으로, 안정화제, 보조제 및 방부제는 표적 대상체에서 효능에 가장 우수한 제형을 결정하기 위해 최적화된다.

[0123] 특정의 실시양태에서, 백신은 세포막을 가로지르는 벡터의 수송을 촉진하여 항원 및/또는 분자 면역조절제의 증가된 발현을 야기하기 위한 리포솜 보조제 및/또는 담체를 포함할 수 있다. 이러한 리포솜 보조제/담체 시스템의 적합한 비-제한적인 예는 미국 특허 10,456,459에 기술되어 있다.

[0124] 제6 측면에서, 본 출원은 감염에 대해 연어를 보호하는 방법을 개시하며, 이러한 방법은 본 발명의 제5 측면의 구현예 중 어느 것에 따른 백신을 이를 필요로 하는 연어에게 투여하는 단계를 포함한다. 따라서, 본 개시내용은 또한 감염에 대해 연어과를 보호하는데 사용하기 위한 제5 측면의 임의의 실시양태에 따른 백신을 제공한다.

[0125] 백신에 존재하는 항원(들)은 백신이 감염으로부터 보호할 수 있는 발명이 무엇인지를 결정한다는 것이 당해 분야의 숙련가에게 명백하여야 한다. 따라서, 예를 들면 및 제한 없이, 백신이 PMCV 항원을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 경우, 백신은 PMCV로 인한 감염에 대해 사용될 수 있다.

[0126] 본 발명에 따른 백신은 다양한 경로, 예를 들면, 제한없이, 근육내로 연어과에게 투여될 수 있다. 바람직하게는, 백신은 미세용량(microdose)으로 투여하여 1회 용량의 용적이 500 μl 이하, 또는 400 μl 이하, 또는 300 μl 이하 또는 200 μl 이하 또는 약 100 μl 이하 또는 100 μl 이하, 또는 약 50 μl 또는 약 25 μl이도록 한다.

[0127] 본원에 개시된 백신은 감염에 대해 다수의 연어과 종을 보호하는 데 사용될 수 있다. 적합한 연어과는, 대서양 연어(살모 살라르), 코호 연어(온코린쿠스 키수츠), 무지개 송어(온코린쿠스 마이키스), 홍연어(온코린쿠스 네르카(*Oncorhynchus nerka*)), 치누크 연어(온코린쿠스 차위차(*Oncorhynchus tshawytscha*)) 및 다른 종을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0128] 상이한 연령(또는 중량)의 연어과를 본 발명에 따라 예방접종할 수 있다. 특정의 실시양태에서, 연어과는 예방접종 시 중량이 약 15 내지 약 200 그램이다. 따라서, 예방접종 시기에 연어과의 중량은 약 25 내지 약 150 그램 또는 약 40 내지 약 110 그램 또는 약 50 내지 약 100 그램이다.

[0129] **실시예**

[0130] **실시예 1. 표면-표적화 발현 시스템의 제조**

[0131] 대서양 연어에 대한 모든 성공적인 DNA 백신은 엔벨로프 바이러스(enveloped virus)로부터 유래되며 막-결합된

항원을 기반으로 한다. 따라서, 세포의 표면에서 항원의 노출은 효능에 중요할 수 있다.

[0132] PMCV는 3개의 예측된 개방 판독 프레임(open reading frame)을 지닌 6.7 kb의 dsRNA 게놈을 함유하는 네이키드 바이러스(naked virus)이다(도 1). 캡시드 단백질(capsid protein; CP)은 ORF1으로부터 해독되지만, ORF2는 RNA 의존성 RNA 폴리머라제(RNA dependent RNA polymerase; RdRp)를 암호화한다. ORF3 단백질의 기능은 여전히 알려져 있지 않지만, 이는 세포 배양물에서 과-발현되는 경우 세포독성 효과를 지닌 단백질을 암호화하며 바이러스 입자의 조립에 필수적이지 않다.

[0133] PMCV ORF1(캡시드 단백질) 및 PMCV ORF3(공지되지 않은 기능의 단백질)을 발현하는 DNA 백신은 보호를 제공하지 않고 이미 시험되었다(데이타는 나타내지 않음). PMCV는 PMCV ORF1 단백질에 대해 에측된 막관통 영역이 없는 네이키드 바이러스이며, PMCV ORF1 단백질은 세포내적으로만 발현될 수 있음이 입증되었으므로(데이타는 나타내지 않음), 발현된 ORF1 캡시드 단백질이 세포 막에 대해 표적화된 경우 반응을 유발시킬 수 있는 것으로 가설을 세웠다.

[0134] 이 실험의 목적은 세포 표면 발현 항원으로서 PMCV 캡시드 단백질(또는 이의 부분)을 발현하는 DNA 백신을 작제하기 위한 것이었다. 전략은 PMCV ORF1 항원 N-말단의 상부(upstream)로 서열 번호: 7에 따라 바이러스 출혈성 패혈증 바이러스 G-단백질(VHSV-G)의 N-말단 분비 신호 펩타이드를 융합시키는 것이었다. 추가로, 서열 번호: 8에 따른 VHSV-G의 C-말단 막횡단 도메인은 도 2a에 도시된 바와 같이, 항원 C-말단의 하부(downstream)에 융합되어 세포 표면에서 항원을 혼입하였다(von Gersdorff Jørgensen et al., 2012). 백신 항원의 분비된 버젼은 또한 N-말단 분비 신호 펩타이드 만을 사용하고 C-말단 막관통 도메인의 사용은 배제함으로써 제조하였다(도 2b).

[0135] 추가의 작제물은, 대신에 대서양 연어 파라믹소바이러스 융합 단백질의 신호 펩타이드 서열 및 막관통 도메인 서열(서열 번호: 38 및 39 각각) 또는 감염성 연어 빈혈 바이러스(ISAV)의 헤마글루티닌(HE) 단백질(서열 번호: 40 및 41 각각)을 사용하는 경우를 제외하고는, 도 2a에 나타낸 작제물과 유사하게 제조하였다.

[0136] CHH-1 세포를 다양한 DNA 백신 작제물로 형질감염시킨 후 6일차에 면역형광성(immunofluorescence; IF) 염색에 의해 항원 발현의 경로를 연구하였다. 12-웰 플레이트에서 LIPOFECTAMIN® 3000 키트(Thermo Fisher)를 사용하여 형질감염을 수행하였다. 본 실험에서는 pVAX1 발현 벡터(Invitrogen)를 사용하여 DNA 백신을 작제하였고, 1 μg의 플라스미드 DNA를 형질감염에 사용하였다. 세포를 표면 항원-발현의 경우에서만 3.7% 포름알데히드로 고정하거나 3.7% 포름알데히드에 이어 세포내 발현된 단백질 염색을 위해 0.1% 트리톤 X-100을 사용하여 세포를 투과화함으로써 고정시켰다. 백신 항원은 PMCV ORF1에 대한 단클론 항체와 다클론 항체 둘 다를 사용하여 검출하였다. 적절한 형광성-표지된 제2 항체(토끼 항-마우스 FITC(DAKO F0261) 또는 다클론 염소 항-토끼 Alexa Fluor Plus 488(Invitrogen A32731)을 검출에 사용하였다. 세포 내 발현된 항원을 검출하는 염색 투과성 세포(stain permeabilized cell)는 프로토콜의 양성 대조군으로 통상적으로 포함시켰다.

[0137] 도 3에 나타낸 바와 같이, VHSV G-단백질의 사용은 PMCV ORF-1 항원의 발현을 세포 표면으로 전달하는 데 사용될 수 있었다. 감염성 연어 빈혈 바이러스의 헤마글루티닌(HE) 단백질의 신호 단백질과 막관통 도메인을 사용하면 또한 PMCV ORF1 단백질의 막 염색이 야기하였지만, 대서양 연어 파라믹소바이러스의 융합 단백질로부터의 영역을 사용하는 것은 성공적이지 않았다.

[0138] 다음 실험에서, 대서양 연어(삼로 살라르)에서 생체 내(*in vivo*) 표적화를 수행하였다. 항원의 2개의 변이체인, 전장의 캡시드 단백질(G-ORF1) 및 캡시드 단백질의 처음 1/2(서열 번호: 16의 PMCV ORF1 1 내지 1293번 위치)을 발현하는 절두된 캡시드 단백질(G-ORF1-DeltaD)을 시험하였다. 항원 둘 다는 표준 발현 벡터(pcDNA3.1) 둘 다에서 및 연어과 알파바이러스 3(SAV-3)을 기반으로 알파바이러스 레플리콘 백신으로서 발현되었다. PBS 및 pcDNA-eGFP는 음성 백신 대조군 그룹으로서 포함시켰다.

[0139] 본 연구에서 모든 백신의 경우 항원 암호화 유전자는 진핵세포 발현 벡터 pcDNA3.1(+)(Invitrogen) 내 CMV 프로모터의 하부에 삽입하였다. 모든 플라스미드를 멸균된 포스페이트-완충된 염수(PBS) 속에 50 μl의 주사 용적당 10 μg으로 희석하였다. 모든 어류에게 어류의 각 측면에 1회 근육내 주사로 총 20 μg의 용량을 주사하였다. 2개의 비-면역화된 대조군 그룹을 포함시켰는데, 하나의 그룹에는 20 μg의 대조군 백신(pcDNA3.1 중 eGFP)을 제공하였고 하나의 그룹에는 2 x 50 μl의 PBS를 제공하였다.

표 2

백신 그룹	설명	항원을 암호화하는 플라스미드의 상세한 설명	플라스미드 골격	최종 농도의 작제물 (μg/ml)	용량 μg (2 x 0.05 ml)
1	G-ORF1-델타 D	G-PMCV_ORF1_1-1293 (델타 D)	pcDNA3.1(+)	200	20
2	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	pcDNA3.1(+)	200	20
3	repSAV-G-ORF1-델타 D	SAV 레플리콘(replicon) 내 G-PMCV_ORF1_1-1293 (델타 D)	pcDNA3.1(+)	200	20
4	repSAV-G-ORF1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583_SAV 레플리콘 내	pcDNA3.1(+)	200	20
5	eGFP	향상된 녹색 형광성 단백질(대조군)	pcDNA3.1(+)	200	20
6	PBS				NA

[0140]

[0141] 어류(그룹 당 n=45)를 담수에 보관하였으며 평균 중량은 48 그램이었다. 예방접종 전에, 어류를 트리카인(Tricain)(PHARMAQ)을 사용하여 마취시키고, 지방 지느러미(adipose fin) 및/또는 상악골(maxillae)을 단축시켜 태그(tag)화하고, 그룹에 할당하고, 동일한 마취 기간 하에(어류의 각각의 측면에 1회 주사) 0.05 ml의 시험 백신으로 2회 근육내 주사하였다. 면역성을 12℃(명:암 12:12)에서 49일 동안 발달하도록 한 후 어류를 트리카인(Tricain)(PHARMAQ)을 사용하여 다시 마취시키고 노르웨이의 CMS 발병 현장으로부터 기원한 0.1 ml의 균질화된 비장(단리체 ID AL V1223 비장)을 복강내 주사함으로써 감염성 PMCV로 챌린지(challenge)하였다. 이후에 어류를 3개 시점에서 샘플링(sampling)하였다; 챌린지 후 10일차, 20일차 및 50일차(샘플링 시점 당, 그룹 당 n=15)에 샘플링하였다. 심장 심실 및 신장을 후속적인 RNA 추출을 위해 모든 샘플링된 어류로부터 RNALATER®에서 수집하였다. 심장(심실 및 심방)을 또한 조직병리학적 분석을 위해 마지막 샘플링 시점(50일차)에 모든 어류로부터 포르말린 속에서 고정시켰다. RNA를 RNALATER®에 저장된 모든 샘플로부터 추출하고 실시간 RT-PCR로 PMCV RNA의 존재에 대해 PHARMAQ Analytiq(노르웨이 베르겐 소재)로부터 시판되는 서비스를 사용하여 분석하였다. 포르말린에 저장한 심장을 절개하고 조직병리학을 중증도에 따라 0 내지 3으로 점수를 매겼으며, 여기서 0은 병리학적 발견이 없음을 나타내고 3은 중증 병리학의 존재를 나타낸다(노르웨이 베르겐 소재의, PHARMAQ Analytiq에서 제공한 서비스).

[0142] 세포 표면에 전달된 PVCV의 전장 ORF1을 발현하는 백신은 대조군 그룹과 비교하여 챌린지에 대해 유의적인 보호를 입증하였다(일-원(one-way) ANOVA, 심방의 조직학에 대해 던넷 사후 시험(Dunnett's post test)을 사용, $p<0.0001$). 이는 감염 직후 신장 및 심장에서 증가된 Ct 값으로서 둘 다 나타났고(결과는 나타내지 않음), 감염 후 50일차에 조직병리학 점수가 감소하였다(표 3). 캡시드 단백질의 처음 1/2(G-ORF1-델타 D; PMCV ORF1 1 내지 1293번 위치)를 기반으로 한 항원은 보호를 제공하는 데 실패하였고, 표준 발현 벡터와는 대조적으로 연어 알파바이러스 레플리콘을 사용하면 보호에서 추가의 증가가 제공되지 않았다.

표 3

PMCV 로 챌린지한 후 50 일차의 심장 심장 내 조직병리학적 점수.

백신-그룹	설명	평균 조직점수, 심방	표준 편차, 조직점수	N	p-값 (PBS 와 비교)
6	PBS	2,29	0,78	15	NA
5	eGFP	2,21	0,67	15	0,99
4	repSAV-G-ORF1	1,49	0,88	15	0,028
3	repSAV-G-ORF1-Delta D	2,31	0,69	15	0,99
2	G-ORF1	1,11	0,83	15	0,0005
1	G-ORF1-Delta D	2,35	0,83	15	0,99

PMCV 로 챌린지 후 50 일차에 심장 심방에서 조직병리학적 점수. 나타낸 p-값은 개개 그룹을 PBS 대조군 그룹과 일-원 ANOVA 와, 던넷 사후 시험을 사용하여 비교함으로써 계산하였다. NA=적용 불가능.

[0143]

[0144] 세포-표면에 대해 전장 항원을 표적화하는 DNA 백신 후보물은 조직병리학적 점수의 대략 50% 감소를 제공하였고 신장 및 심장에서 감소된 바이러스 부하(qPCR)로 달성되었다.

[0145] 후속적인 생체 내 시험은 세포 표면 발현된 항원, 분비된 항원 또는 세포내 발현된 항원으로서 PMCV ORF1 전장 단백질을 발현하는 DNA 백신의 효능을 비교하였다. 또한, 서열 번호: 45에 의해 암호화된 전장 캡시드 단백질의 코돈-최적화된 버전을 포함시켰다. 연구는 대서양 연어 각각의 5개 그룹이 있는 2개의 평행 면역화 탱크를 함유하였다(탱크 당, 그룹 당 n=30).

[0146] 본 연구에서 모든 백신에 대해 항원 암호화 유전자를 진핵세포 발현 벡터 NTC9385R(Nature Technology Corporation) 내 CMV 프로모터의 하부에 삽입하였다. 모든 플라스미드를 멸균 포스페이트-희석된 염수(PBS) 속에 50 μl의 주사 용적 당 10 μg으로 희석시켰다. 모든 어류에게 어류의 각 측면에 근육내 주사를 총 20 μg의 용량으로 제공하였다. 비-면역화 대조군 그룹을 포함시켰고 표 4에 요약한 바와 같이, 2 x 50 μl의 PBS를 제공하였다.

표 4

백신 그룹	설명	항원을 암호화하는 플라스미드의 설명	플라스미드 골격	하기에서 발현된 항원	최종 농도 작제물 (μg/ml)	용량 μg (2 x 0.05 ml)
1	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	NTC9385R	세포-표면	200	20
2	ORF1	PMCV_ORF1_full_1-2583	NTC9385R	세포내	200	20
3	G-ORF1 코돈 opt	G-PMCV_ORF1_full_1-2583-코돈 최적화됨	NTC9385R	세포-표면	200	20
4	TM 이 있는 G-ORF1	TM 도메인이 없는 G-PMCV_ORF1_full_1-2583	NTC9385R	분비됨	200	20
5	PBS		NA	NA		

나타낸 p-값은 개개 그룹을 PBS 대조군 그룹과 일-원 ANOVA 와, 던넷 사후 시험을 사용하여 비교함으로써 계산하였다. NA=적용 불가능.

[0147]

[0148] 어류를 담수에 보관하였으며 예방접종 시점에 평균 중량은 28 그램이었다. 시험 백신의 투여 동안, 어류를 트리카인(PHARMAQ)을 사용하여 마취시키고, 지방 지느러미 및/또는 상악골을 단축시켜 태그화하고, 그룹에 할당하고, 동일한 마취 기간 하에(어류의 각각의 측면에 1회 주사) 0.05 ml의 시험 백신으로 2회 근육내 주사하

였다. 면역성을 12℃(명:암 12:12)에서 39일 동안 발달하도록 한 후 어류를 트리카인(PHARMAQ)을 사용하여 다시 마취시키고 노르웨이의 CMS 발병 현장으로부터 기원한 0.1 ml의 균질화된 심장(단리체 ID AL V1273 심장)을 복강내 주사함으로써 감염성 PMCV로 챌린지하였다. 이후에 어류(샘플링 시점당, 그룹 당 n=15)를 챌린지 후 21일차 및 56차에 샘플링하였다. 심장 심실 및 신장을 후속적인 RNA 추출을 위해 모든 샘플링된 어류로부터 RNALATER®에서 수집하였다. 심장(심실 및 심방)을 또한 조직병리학적 분석을 위해 마지막 샘플링 시점(56일차)에 모든 어류로부터 포르말린 속에서 고정시켰다. RNA를 RNALATER®에 저장된 모든 샘플로부터 추출하고 실시간 RT-PCR로 PMCV RNA의 존재에 대해 PHARMAQ Analytiq(노르웨이 소재)로부터 시판되는 서비스를 사용하여 분석하였다. 포르말린에 저장한 심장을 절개하고 조직병리학을 중증도에 따라 0 내지 3으로 점수를 매겼으며, 여기서 0은 병리학적 발견이 없음을 나타내고 3은 중증 병리학의 존재를 나타낸다(노르웨이 소재의, PHARMAQ Analytiq에서 제공한 서비스).

[0149] 결과는 PMCV 감염에 대한 유의적인 보호가 세포 표면에 전달된 PVCV의 전장 ORF1(G-ORF1 및 코돈 최적화된 G-ORF1)을 발현하는 백신으로 달성되었음을 나타내었다. 이의 천연 형태(세포내 단백질)에서 PMCV ORF1의 발현은 검출가능한 보호를 제공하지 않았다. 분비에 의한 발현은 일부 보호를 제공하였다(20일차에 신장에서 차이는 검출되지 않았다; 표 5, 6 참고).

표 5

탱크 1. 챌린지 후 3 주차의 신장 내 바이러스 RNA. 나타낸 p-값은 개개 그룹을 PBS 대조군 그룹과 일-원 ANOVA 와, 던넷 사후 시험을 사용하여 비교함으로써 계산하였다. NA=적용 불가능.

백신 그룹	설명	평균 Ct-값, PMCV	표준 편차, Ct	n	p-값(PBS 와 비교)
5	PBS	20,95	0,96	16	NA
1	G-ORF1	23,02	2,17	15	0,0042
3	G-ORF1 코돈 opt	23,09	1,67	15	0,0031
4	TM 이 있는 G-ORF1	20,74	2,02	15	0,99
2	ORF1	19,92	1,41	15	0,30

[0150]

표 6

탱크 2. 챌린지 후 3 주차의 신장 내 바이러스 RNA. 나타낸 p-값은 개개 그룹을 PBS 대조군 그룹과 일-원 ANOVA 와, 던넷 사후 시험을 사용하여 비교함으로써 계산하였다. NA=적용 불가능.

백신 그룹	설명	평균 Ct-값, PMCV	표준 편차, Ct	n	p-값(PBS 와 비교)
5	PBS	20,05	0,73	15	NA
1	G-ORF1	22,12	1,95	15	0,0005
3	G-ORF1 코돈 opt	23,06	1,93	15	<0,0001
4	TM 이 있는 G-ORF1	20,06	1,16	15	>0,99
2	ORF1	19,90	0,67	15	>0,99

[0151]

[0152] **실시예 2: CMS 항원의 항원 활성의 제조 및 결정**

[0153] 세포 막에서 PMCV ORF1 전장 단백질을 발현시키는 것은 챌린지 모델에서 부분적인 보호를 제공하였다. 이러한 발견에도 불구하고, 항원의 발현 수준은 대조군 GFP-작제물의 발현 수준보다 현저하게 더 낮음이 관찰되었다. 본 프로젝트는 영역을 결실시킴으로써 캡시드 단백질의 절두된 버젼을 발현시키는 것이 백신 항원의 발현 수준

및 면역원성을 증가시킬 수 있는지의 여부를 시험하였다.

[0154] 실시예 1에 기술된 발현 시스템(VHSV-G 신호 펩타이드 및 막관통 도메인 서열을 사용)을 PMCV ORF-1 항원을 기반으로 상이한 작제물로 제조하였다.

[0155] VHSV-G 발현 카세트로부터 막-결합된 PMCV 캡시드 항원을 발현하는 제1 연구는 PMCV ORF1 단백질 서열의 처음 부분을 포함시키는 것이 성공에 중요함을 나타내었다. 캡시드 단백질이 세번째로 분할된 경우, 막 결합된 단백질은 처음 세번째를 포함하는 작제물의 경우에서만 성공적으로 달성하였다(데이타는 나타내지 않음).

[0156] PMCV ORF1 캡시드 결실 변이체의 작제 후, 이를 형질감염된 세포의 IF-염색 및 웨스턴 블롯(Western blot)으로 시험하였다. 모든 결실 작제물의 경우, 결실된 PMCV ORF1 서열은 GGGGS 링커(서열 번호: 36)로 대체하였다. 다양한 결실 변이체를 제조하기 위한 전략은 다음과 같았다:

[0157] (1) 제1 라운드에서, 비교적 큰 결실을 시험하였다(IntDel 1-7; 길이가 200개인 아미노산, 100개의 아미노산에 의해 오버랩되어 있고, 길이가 162개 아미노산인 IntDel7은 제외하였다). 일부 N-말단 서열의 포함은 세포 막에 대한 발현된 단백질의 성공적인 전달에 요구되는 것으로 밝혀졌고, 첫번째 결실(IntDel 1)은 PMCV ORF1(서열 번호: 16) 내 298 내지 897번 뉴클레오타이드 위치에서 이루어졌다.

[0158] (2) 제2 라운드에서, 보다 작은 결실-변이체를 IntDel 4-7(IntDel 11-18, 인접하고, 오버랩되지 않은 길이가 50개인 아미노산, IntDel 4 내에서 출발)에 의해 포함된 영역을 중심으로 제조하였다. 이러한 결실 중 첫번째(IntDel 11)를 PMCV ORF1(서열 번호: 16) 내 1384 내지 1533번 뉴클레오타이드 위치에서 작제하였다.

[0159] (3) 제3 라운드에서, 매우 작은 인접한 오버래핑 결실을 지닌 항원 변이체를 제조하였다(IntDel 21-42; 길이가 10개인 아미노산, 2개의 아미노산에 의해 오버랩핑됨). 이러한 결실 중 첫번째(IntDel 21)를 PMCV ORF1(서열 번호: 16) 내 1936 내지 1965번 뉴클레오타이드 위치에서 작제하였다.

[0160] IF-염색 및 웨스턴 블롯에 의한 CHH-1 세포 내에서 PMCV ORF1 캡시드 결실 변이체의 발현. 세포의 면역형광성 염색의 과정은 다음과 같았다: CHH-1 세포를 트립신처리하고 12-웰 플레이트(웰 및 1 ml의 세포-배지 당 150 000개의 세포) 내로 씨딩(seeding)하였다. 세포를 15℃ ON에서 CO2 항온처리기(5% CO_2) 속에서 항온처리하였다.

세포를 씨딩 다음날 1 μg의 플라스미드/웰 및 LIPOFECTAMIN® 3000(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 제조업자의 설명서에 따라 형질감염시켰다. 세포를 15℃에서 5일 동안 CO2 항온처리기(5% CO_2) 속에서 항온처리한 후 세포를 면역염색하였다. 세포-배지를 모든 웰로부터 조심스럽게 제거하고, 모든 웰을 PBS로 조심스럽게 세척하였다. 세포를 3.7%의 포름알데하이드(PBS 속에서 희석시킴)와 함께 15분 동안 실온에서 항온처리함으로써 고정시켰다. 이후에, 세포를 PBS 중 5% 탈지 분유로 1시간 동안 차단시켰다. 마우스 항-HIS(6x-His 태그 단클론 항체(4A12E4) Fisher scientific; 1:1500 희석된 제품 번호 37-2900 및 마우스 항-PMCV ORF1 단클론 항체(mAb#10; 1:200 희석)을 1차 항체로서 사용하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. FITC-접합된 다클론 토끼 항-마우스 면역글로불린(DAKO F0261)을 제2 항체로서 1:1000 희석에서 사용하고 다른 1시간 동안 항온처리하였다. 세포의 염색을 형광 현미경으로 평가하였다.

[0161] 웨스턴 블롯팅에 의한 PMCV ORF1 결실 작제물의 발현 수준의 평가는 다음과 같이 수행하였다: CHH-1 세포를 트립신처리하고 6-웰 플레이트(웰 및 3 ml의 세포-배지 당 1 000 000개의 세포)에 씨딩하였다. 세포를 15℃ ON에서 CO_2 항온처리기(5% CO_2) 속에서 항온처리하였다. 세포를 씨딩 다음날 2.5 μg의 플라스미드/웰 및 LIPOFECTAMIN® 3000(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 제조업자의 설명서에 따라 형질감염시켰다. 세포를 다시 밀봉된 백(sealed bag)에 두고 15℃에서 CO2 항온처리기(5% CO_2) 속에서 6일 동안 항온처리한 후 추가로 분석하였다. 이후에, 플레이트를 빙상에 두고 배지를 제거하였다. 세포를 우선 빙냉 PBS로 2회 세척하였다. 막 용해물을 제조하기 위해, 세포를 먼저 프로테아제 억제제가 들어있는 200 μl의 20 mM 트리스-HCl, pH 7.5를 가하여 수집하고, 세포를 조심스럽게 긁고 세포 현탁액을 예비-냉각된 튜브에 이전시켰다. 이후에, 웰을 다른 100 μl를 사용하여 형질감염 당 총 300 μl의 세포 현탁액이 되도록 플러싱(flushing)하였다. 이는 세제가 없는 완충액이므로, 세포를 주사기 팁(25G, ~5회)을 통과시킴으로써 세포를 용해하고 12 000 rpm에서 10분 동안 4℃로 원심분리하였다. 상층액을 경사분리하고, 막 펠렛을 1x 프로테아제 억제제 칵테일이 들어있는 300 μl의 RIPA 용해-완충액(Abcam, #156034) 속에 용해하여 막-결합된 단백질을 방출하였다. 샘플을 30분 동안 4℃에서 항온처리하는 동안 튜브를 때때로 손으로 튕겨서 펠렛을 재-현탁시켰다. 튜브를 12 000 rpm에서 10분 동안 4℃로 항온처리하고 막-분획 용해물을 새로운 튜브에 이전시키고 면역침전까지 빙상에 유지시켰다. 빙 상에서, 1 μg의 마우스 IgG1anti 6x-His 단클론 항체 4E3D10H2/E3(Fisher Scientific #15442890, 1 mg/ml)를 각각의 샘플에 가하

고 4℃에서 밤새 회전자(rotator) 위에서 항온처리하였다. 면역화된 비드를 ~1 ml의 냉 PBST로 3-5 x 세척함으로써 단백질 G-커플링된 비드를 제조하고(25 μl/샘플) 분취량 당 프로테아제 억제제가 들어있는 25μl의 PBST 속에 재-현탁시켰다. 빙 상에서, 25 μl의 재-평형화시킨 비드를 각각의 샘플에 가하고 샘플-비드 혼합물을 1시간 동안 실온에서 회전시키면서 항온처리하였다. 비드를 프로테이나제 억제제가 들어있는 500 μl의 빙냉 PBST로 3 내지 5회 세척하여 각각의 세척 동안 비드를 약하게 혼합하면서 비-특이적인 결합을 제거하였다. 마지막 세척 후, 가능한 많은 완충액을 비드로부터 제거하고 40 μl의 1x Laemmli 샘플 완충액(BioRad #161-0737)을 가하였다(20 μl의 2x Laemmli 샘플 완충액과 2 μl의 β-머캅토에탄올 및 18 μl의 dH2O를 혼합하여 제조함). 샘플을 70℃에서 10분 동안 항온처리하고, 신속하게 원심분리하고 자기처리하고, 용출제를 새로운 바이알로 이전시켰다. 4 내지 20%의 Criterion™ TGX Stain-Free™ 겔에 이전시키기 전에, 모든 샘플을 98℃에서 5분 동안 변성시켰다. 겔을 200V에서 대략 45분 동안 이동시키고 TRANS-BLOT® TURBO™ 전달 시스템(BioRad), 및 TRANS-BLOT® TURBO™ Midi PVDF 전달 팩 #170-4157을 사용하여 블롯팅(blotting)하였다. 7분의 터보 프로그램을 사용하였다. 막을 즉시 차단-완충액(PBST 중 5% 탈지유)에 두었다. 차단을 1시간 동안 실온에서 수행하였다. 블롯을 1% 탈지유/PBST 속에서 1:500으로 희석시킨 제1 항체 토끼 항-델타 PMCV ORF1과 함께 밤새 4℃에서 회전자 속에서 항온처리하였다. 다음 날 블롯을 PBST로 2 x 15분동안 세척하고 2% 탈지유 속에서 1:1000로 희석시킨 제2 항체 다클론 돼지 항-토끼(DAKO #P0217) 면역글로불린 HRP 및 PRECISION PROTEIN™ StrepTactin-HRP 접합체 1:10000(래더(ladder)를 가시화시키기 위함)와 함께 1시간 동안 실온에서 항온처리하였다. 블롯을 2 x 15분 동안 PBST로 세척한 후 신호를 Clarity western ECL 기판(BioRad #170-5060)으로 검출하였다.

[0162] 결과는 다음과 같이 요약될 수 있다: 세포 막에서 제1 라운드(200개 아미노산 길이의 결실) 발현은 작제물 IntDel 4-7로부터의 항원을 사용하여서만 달성되었다. 따라서, N-말단 일부는 항원을 세포막으로 전달하는 데 요구된다. 따라서, 제2 라운드에서 제조된 작제물(50개 아미노산 길이의 결실)은 IntDel 4-7에 의해 포함된 영역에 집중되었다. 세포 표면 발현이 IntDel 18(서열 번호: 15에 제시된 아미노산 서열을 결여하는 작제물)의 경우 보다 낮았던 것을 제외하고는, 모든 이러한 작제물은 세포 막에서 성공적으로 발현되었다. 결실 작제물(IntDel 15-17)은 증가된 막 발현 수준을 야기하였다. 제1 라운드로부터의 IntDel 6(서열 번호: 1의 500 내지 699번 아미노산을 결여하는 작제물)는 또한 보다 높은 발현 수준을 갖는 것으로 밝혀졌다. 다른 것보다 약간 더 우수한 IntDel 42(서열 번호: 14에 제시된 아미노산을 결여한 작제물)을 제외하고는, 추가의 후보물은 제3 라운드에서 나타나지 않았다. 결과는 도 4에 나타낸다.

[0163] 면역형광성 염색 및 웨스턴 블롯팅의 평가로부터의 결합된 결과를 기반으로, 수개의 결실 후보물을 프로젝트에서 수개의 백신 시도로부터의 결과를 기반으로 선택하였다. 제1 연구에서 모든 백신의 경우 항원을 암호화하는 유전자를 진핵 세포 발현 벡터 NTC9385R(Nature Technology Corporation) 내 CMV 프로모터의 하부에 삽입하였다. 모든 플라스미드를 멸균 포스페이트-완충된 염수(PBS) 속에 50 μl의 주사 용적 당 10 μg으로 희석하였다. 모든 어류에게 어류의 각각의 측면에 1회의 근육내 주사를 총 20 μg의 용량으로 제공하였다. 비-면역화 대조군 그룹을 포함시켰고 표 7에 요약한 바와 같이, 2 x 50μl의 PBS를 제공하였다.

표 7

백신 그룹	설명	항원을 암호화하는 플라스미드의 설명 (위치는 PMCV ORF1 에서의 뉴클레오타이드 위치와 관련된다)	플라스미드 골격	최종 농도 작제물 (μg/ml)	용량 μg (2 x 0.05 ml)
1	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	NTC9385R	200	20
2	G-IntDel-6	G-PMCV ORF1_IntDel6 (pos 1798-2397)	NTC9385R	200	20
3	G-IntDel-15	G-PMCV ORF1_IntDel15 (pos 1984-2133)	NTC9385R	200	20
4	G-IntDel-16	G-PMCV ORF1_IntDel16 (pos 2134-2283)	NTC9385R	200	20
5	G-IntDel-17	G-PMCV ORF1_IntDel17 (pos 2284-2433)	NTC9385R	200	20
6	PBS		NA		

[0164]

[0165] 담수에 보관하고 평균 중량이 20 그램인 대서양 연어(살모 살라르)(그룹 당 n=30)를 트리카인(PHARMAQ)을 사용하여 마취시키고, 지방 지느러미 및/또는 상악골을 단축시켜 태그화하고, 그룹에 할당하고, 동일한 마취 기간

하에(어류의 각각의 측면에 1회 주사) 0.05 ml의 시험 백신으로 2회 근육내 주사하였다. 면역성을 12℃(명:암 12:12)에서 48일 동안 발달하도록 한 후 어류를 트리카인(PHARMAQ)을 사용하여 다시 마취시키고 노르웨이의 CMS 발병 현장으로부터 기원한 0.1 ml의 균질화된 비장(단리체 ID AL V1273 비장)을 복강내 주사함으로써 감염성 PMCV로 챌린지하였다. 이후에 어류(샘플링 시점당, 그룹 당 n=15)를 2개 시점; 챌린지 후 19일차 및 49일차에 샘플링하였다. 심장 심실 및 신장을 후속적인 RNA 추출을 위해 모든 샘플링된 어류로부터 RNALATER®에서 수집하였다. 심장(심실 및 심방)을 또한 조직병리학적 분석을 위해 마지막 샘플링 시점(49일차)에 모든 어류로부터 포르말린 속에서 고정시켰다. RNA를 RNALATER®에 저장된 모든 샘플로부터 추출하고 실시간 RT-PCR로 PMCV RNA의 존재에 대해 PHARMAQ Analytiq(노르웨이 소재)로부터 시판되는 서비스를 사용하여 분석하였다. 포르말린에 저장한 심장을 절개하고 조직병리학을 중증도에 따라 0 내지 3으로 점수를 매겼으며, 여기서 0은 병리학적 발견이 없음을 나타내고 3은 중증 병리학의 존재를 나타낸다(노르웨이 소재의, PHARMAQ Analytiq에서 제공한 서비스).

[0166] 챌린지 후 3주차에 바이러스 부하 및 챌린지 후 7주째의 히스토스코어(histoscore)에 대한 결과를 표 8 및 9 각각에 나타낸다. 모든 결과의 조합된 데이터는 IntDel 변이체 15, 16 및 17(여기서 항원은 서열 번호: 3, 4, 또는 5 각각에 제시된 아미노산 서열을 결여하고 있다)이 전장 캡시드 단백질(G- ORF1)보다 더 우수하게 수행하였음을 나타내었다.

표 8

챌린지 후 3 주차의 신장 내 바이러스 RNA. 나타낸 p-값은 개개 그룹을 PBS 대조군 그룹과 일-원 ANOVA 와 던넷 사후 시험을 사용하여 비교함으로써 계산하였다. NA=적용 불가능.

백신 그룹	설명	평균 Ct-값, PMCV	표준 편차, Ct	n	p-값 (PBS 와 비교)
6	PBS	20,61	1,49	15	NA
1	G-ORF1	23,77	2,57	15	0,0002
2	G-IntDel-6	21,23	1,41	15	0,86
3	G-IntDel-15	23,13	2,81	15	0,0033
4	G-IntDel-16	22,92	1,20	15	0,0082
5	G-IntDel-17	23,13	1,71	15	0,0032

[0167]

표 9

챌린지 후 7 주차의 심방 내 조직병리학적 병변(히스토스코어). 나타낸 p-값은 개개 그룹을 PBS 대조군 그룹과 일-원 ANOVA 와 던넷 사후 시험을 비교함으로써 계산하였다. NA=적용 불가능.

백신-그룹	설명	평균 히스토스코어, 심방	표준 편차, 히스토스코어	N	p-값 (PBS 와 비교)
6	PBS	1,75	0,84	15	NA
1	G-ORF1	1,60	0,83	15	0,99
2	G-IntDel-6	1,54	0,99	15	0,95
3	G-IntDel-15	0,75	0,75	15	0,012
4	G-IntDel-16	1,10	0,63	15	0,16
5	G-IntDel-17	1,32	0,87	15	0,53

[0168]

[0169] 추가의 임상 시험을 수행하여 새로운 항원 결실 후보물을 평가하였다. 제1 연구에서 모든 백신에 대해 항원을 암호화하는 유전자를 진핵세포 발현 벡터 NTC9385R(Nature Technology Corporation) 내 CMV 프로모터의 하부에

삽입하였다. 모든 플라스미드를 멸균 포스페이트-완충된 염수(PBS) 속에서 50 μl의 주사 용적 당 10 μg으로 희석하였다. 모든 어류에게 어류의 각각의 측면에 1회 근육내 주사로 총 20 μg의 용량을 제공하였다. 비-면역화된 대조군 그룹을 포함시켰고 표 10에 요약한 바와 같이, 2 x 50μl의 PBS를 제공하였다.

표 10

백신 그룹	설명	항원을 암호화하는 플라스미드의 설명 (위치는 뉴클레오타이드 위치 PMCV ORF1 와 관련된다)	플라스미드 골격	최종 농도 작제물 (μg/ml)	용량 μg (2 x 0.05 ml)
1	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	NTC9385R	200	20
2	G-IntDel-5	G-PMCV ORF1_IntDel5 (pos 1498-2097)	NTC9385R	200	20
3	G-IntDel-7	G-PMCV ORF1_IntDel7 (pos 2098-2583)	NTC9385R	200	20
4	G-IntDel-42	G-PMCV ORF1_IntDel42 (pos 2440-2469)	NTC9385R	200	20
5	PBS		NA		

[0170]

[0171] 담수에 보관하고 평균 중량이 28 그램인 대서양 연어(살모 살라르)(그룹 당 n=30)를 트리카인(PHARMAQ)을 사용하여 마취시키고, 지방 지느러미 및/또는 상악골을 단축시켜 태그화하고, 그룹에 할당하고, 동일한 마취 기간 하에(어류의 각각의 측면에 1회 주사) 0.05 ml의 시험 백신으로 2회 근육내 주사하였다. 면역성을 12℃(명:암 12:12)에서 58일 동안 발달하도록 한 후 어류를 트리카인(PHARMAQ)을 사용하여 다시 마취시키고 노르웨이의 CMS 발병 현장으로부터 기원한 0.1 ml의 균질화된 심장(단리체 ID AL V1289)을 복강내 주사함으로써 감염성 PMCV로 챌린지하였다. 이후에 어류(그룹 당 n=15)를 2개 시점; 챌린지 후 3주차 및 7주차에 샘플링하였다. 심장 심실 및 신장을 후속적인 RNA 추출을 위해 모든 샘플링된 어류로부터 RNALATER®에서 수집하였다. 심장(심실 및 심방)을 또한 조직병리학적 분석을 위해 마지막 샘플링 시점(7주차)에 모든 어류로부터 포르말린 속에서 고정시켰다. RNA를 RNALATER®에 저장된 모든 샘플로부터 추출하고 실시간 RT-PCR로 PMCV RNA의 존재에 대해 PHARMAQ Analytiq(노르웨이 소재)로부터 시판되는 서비스를 사용하여 분석하였다. 포르말린에 저장한 심장을 절개하고 조직병리학을 중증도에 따라 0 내지 4로 점수를 매겼으며, 여기서 0은 병리학적 발견이 없음을 나타내고 4는 중증 병리학의 존재를 나타낸다(노르웨이 소재의, PHARMAQ Analytiq에서 제공한 서비스).

[0172] 3주 및 7주 동안의 결과를 표 11 및 표 12 각각에 요약한다.

표 11

챌린지 후 3 주차의 신장 내 바이러스 RNA. 나타낸 p-값은 개개 그룹을 PBS 그룹과 일-원 ANOVA 와 던넷 사후 시험을 사용하여 비교함으로써 계산하였다. NA=적용 불가능.

백신 그룹	설명	평균 Ct-값, PMCV	표준 편차, Ct	N	p-값 (PBS 와 비교)
5	PBS	19,44	1,13	15	NA
1	G-ORF1	20,48	1,91	15	0,38
2	G-Del5	22,58	2,69	15	<0,0001
3	G-Del7	21,12	1,99	15	0,06
4	G-Del42	21,12	1,40	15	0,06

[0173]

표 12

챌린지 후 7 주차의 심방 내 조직병리학적 병변(히스토스코어). 나타낸 p-값은 개개 그룹을 PBS 그룹과 일-원 ANOVA 와 던넷 사후 시험을 사용하여 비교함으로써 계산하였다. NA=적용 불가능.

백신-그룹	설명	평균 히스토스코어, 심방	표준 편차, 히스토스코어	N	p-값 (PBS 와 비교)
5	PBS	2,14	0,36	14	NA
1	G-ORF1	2,07	0,70	15	0,99
2	G-Del5	1,64	1,15	14	0,28
3	G-Del7	1,80	0,56	15	0,59
4	G-Del42	1,20	0,94	15	0,0075

[0174]

[0175] **실시예 3: 백신 골격 선택**

[0176] 백신 효능을 최적화하기 위해서는, 플라스미드 골격, 예를 들면, 벡터 크기 및 기능 성분의 특성이 또한 중요하다. 3개의 벡터 후보물을 시험관 내 항원 발현과 관련하여 비교하였다. 후보물은 pcDNA3.1, pVAX1(INVITROGEN™), NTC9385R(Nature Technology Corporation), 및 선천성 면역자극 성분: 보조제(NTC9385R-eRNA41H)를 유도하는 제I형 인터페론으로서 기능하는 RIG-I 효능제 및 RIG-I 효능제를 공-발현하는 NTC9385R의 2개의 변이체 뿐만 아니라 톨-유사 수용체(Toll-like receptor 9) 자극 CpG 모티프(NTC9385R-eRNA41H-CpG)를 포함하였다. NTC9385R NANOPLASMID™은 다른 전통적인 벡터의 크기보다 더 작아서, 형질감염된 세포에서 증진된 흡수 및 지속성을 허용하고 항원 발현을 향상시키도록 하는 변형된 프로모터를 지닌다. 이는 생산 공정에서 항생제의 사용을 대체하는 RNA-기반 수크로스 선택 항생제 유리된 마커(RNA-based sucrose selection antibiotic free marker; RNA-OUT) 및 플라스미드가 안전성 관점으로부터 유리한 특정의 이. 콜라이(*E. coli*) 생산 균주에서만 복제할 수 있도록 보장하는 변형된 복제 기원을 함유한다. 보다 작은 크기는 형질감염 효능 및 수준과 발현 기간에 영향을 미칠 수 있다. 또한, 내성 마커 유전자와 같은 일부 세균 영역 단백질 마커 유전자는 벡터 발현을 현저하게 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 1 킬로염기(kilobase)보다 큰 세균 영역은 간과 같은 정지상태의 조직(quiescent tissue)에서 이식유전자 발현을 사일런스(silence)시키는 것으로 밝혀고, 이는 진핵 세포 영역으로 확산되어 촉진을 불활성화하는 전사되지 않은 세균 영역 매개된 이종염색질(heterochromatin) 형성에 기인하는 경향이 있다(Suschak et al., 2017).

[0177] 웨스턴 블롯팅에 의해 5개의 서로 다른 플라스미드 골격에서 백신 항원 G-ORF1의 시험관내 발현 수준을 평가하는 것은 다음과 같이 수행하였다: CHH-1 세포를 트립신처리하고 6-웰 플레이트(웰 및 3 ml의 세포-배지 당 1 000 000개의 세포) 내로 씨딩하였다. 세포를 15℃ ON으로 CO_2 항온처리기(5% CO_2)에서 항온처리하였다. 세포를 씨딩 다음날 2.5 μg의 플라스미드/웰 및 LIPOFECTAMIN® 3000(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 제조업자의 설명서에 따라 형질감염시켰다. 세포를 밀봉된 백에 다시 넣고 추가의 분석 전에 5일 동안 CO2 항온처리기(5% CO2)에서 15℃로 배양하였다. 이후에, 플레이트를 빙 상에 두고 배지를 제거하였다. 먼저 세포를 빙-냉 PBS로 2회 세척하였다. 1 x 프로테아제 억제제 칵테일(Roche, #1697498)이 들어있는 150 μl의 NP40 용해 완충액(Invitrogen, #FNN021)을 웰에 직접 가하여 전체 세포 용해물을 제조하였다. 용해물을 예비-냉각시킨 에펜도르프 튜브(Eppendorf tube)로 이전시키고, 4℃에서 30분 동안 항온처리하면서, 때때로 튜브를 튕겨서 세포를 재현탁시킨 다음, 4℃에서 10분 동안 12,000rpm으로 원심분리하고 상층액을 새로운 튜브로 이전시키고 면역침전까지 빙상에 두었다. 빙 상에서, 1 μg의 마우스 IgG1항 6x-His 단클론 항체 4E3D10H2/E3(Fisher Scientific #15442890, 1 mg/ml)를 각각의 샘플에 가하고 회전자에서 4℃로 밤새 항온처리하였다. 고정된 비드를 ~1 ml의 냉 PBST로 3 내지 5회 세척하고 분취량당 프로테아제 억제제가 들어있는 25 μl의 PBST에 재-현탁시켜 단백질 G-커플링된 비드를 제조하였다(25 μl/샘플). 빙 상에서, 예비-평형화된 비드 25 μl를 각각의 샘플에 가하고 샘플-비드 혼합물을 회전시키면서 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 비드를 프로테이나제 억제제가 들어있는 빙냉 PBST 500 μl로 3 내지 5회 세척하여 각각의 세척 사이에 비드를 부드럽게 혼합하면서 비-특이적인 결합을 제거하였다. 마지막 세척 후, 가능한 많은 완충액을 비드로부터 제거하고 40 μl의 1x 램믈리(Laemmli) 샘플 완충

액(BioRad #161-0737)을 가하였다(20μl의 2x 램믈리 샘플 완충액과 2μl의 β-머캅토에탄올 및 18μl의 dH20를 혼합하여 제조). 샘플을 70℃에서 10분 동안 항온처리하고, 빠르게 원심분리하고 자화(magnetization)시키고, 용출물을 새 바이알로 옮겼다. 4 내지 20%의 CRITERION™ TGX STAIN-FREE™ 젤에 로딩하기 전에, 모든 샘플을 98℃에서 5분간 변성시켰다. 겔을 200V에서 대략 45분 동안 작동시키고 TRANS-BLOT® TURBO™ 전달 시스템(BioRad) 및 TRANS-BLOT® TURBO™ Midi PVDF 전달 팩 #170-4157을 사용하여 블로팅하였다. 7분 터보 프로그램을 사용하였다. 막을 즉시 차단 완충액(PBST 중 5% 탈지유)에 넣었다. 차단을 실온에서 1시간 동안 수행하였다. 블롯을 1% 탈지유/PBST에 1:500으로 희석된 제1 항체 토끼 항-델타 PMCV ORF1과 함께 밤새 4℃로 회전기에서 항온처리하였다. 다음날 블롯을 PBST로 2 x 15분으로 세척하고 2% 탈지유에 1:1000으로 희석된 제2 항체 다클론 돼지 항-토끼(DAKO #P0217) 면역글로불린 HRP 및 PRECISION PROTEIN™ StrepTactin-HRP 접합체 1:1000과 함께 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다(래더를 가시화하기 위함). 블롯을 PBST을 사용하여 2 x 15분으로 세척한 후 Clarity Western ECL 기질(BioRad #170-5060)에 의한 신호를 검출하였다.

[0178] 본 연구의 모든 백신에 대해 세포막에서의 발현을 위해 전달된 전장 PMCV ORF1 캡시드 유전자(G-ORF1)를 아래 표에 따라 다양한 진핵세포 발현 벡터의 CMV 프로모터 하부에 삽입하였다. 모든 플라스미드를 멸균 포스페이트-완충된 염수(PBS)에서 50μl의 주입 용적당 10μg으로 희석하였다. 모든 어류에게 어류의 각각의 측면에 1회 근육 주사로 총 20μg의 용량을 제공하였다. 비-면역화된 대조군 그룹을 포함시켰고, 이에는 표 13에 요약된 바와 같이, 2 x 50 μl의 PBS를 제공하였다.

표 13

백신 그룹	설명	항원을 암호화하는 플라스미드의 설명	플라스미드 골격	최종 농도 작제물 (μg/ml)	용량 μg (2 x 0.05 ml)
1	G-ORF1-pcDNA3.1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	pcDNA3.1(+)	200	20
2	G-ORF1-pVAX1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	pVAX1	200	20
3	G-ORF1-NTC9385R	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	NTC9385R	200	20
4	G-ORF1-NTC9385R-eRNA41H-CpG	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	NTC9385R-eRNA41H-CpG	200	20
5	G-ORF1-NTC9385R-eRNA41H	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	NTC9385R-eRNA41H	200	20
6	PBS		NA		

[0179]

[0180] 담수에 보관되고 평균 체중이 29g인 대서양 연어(살모 살라르)(그룹 당 n=30)를 Tricain(PHARMAQ)을 사용하여 마취시키고, 지방 지느러미 및/또는 상악골을 단축하여 태그화하고, 그룹에 할당하고, 시험 백신 0.05ml를 동일한 마취 기간하에 2회(어류의 각각의 측면에 1회 주사) 근육내 주사하였다. 면역성이 12℃(명:암 12:12)에서 59일 동안 발달하도록 한 후 어류를 Tricain(PHARMAQ)을 사용하여 다시 마취하고 노르웨이의 CMS 발병 현장에서 기원한 0.1ml의 균질화된 심장(단리체 ID AL V1273 심장)을 복강내 주사하여 감염성 PMCV로 챌린지하였다. 이후에, 어류(그룹 당 n=15)를 2개의 시점; 챌린지 후 20일 및 48일차에 샘플링하였다. 후속적인 RNA 추출을 위해 샘플링된 모든 어류로부터 심장 심실과 신장을 RNALATER®에서 수집하였다. 심장(심실 및 심방)을 조직병리학적 분석을 위해 마지막 샘플링 시점(48일차)에 포르말린에 고정시켰다. RNA를 RNALATER®에 저장된 모든 샘플로부터 추출하고 PHARMAQ Analytiq(노르웨이)에서 시판되는 서비스를 사용하여 PMCV RNA의 존재에 대해 실시간 RT-PCR로 분석하였다. 포르말린에 저장된 심장을 절개하고 조직병리학을 중증도에 따라 0 내지 3으로 점수를 매겼으며, 여기서 0은 병리학적 발견이 없음을 나타내고 3은 중증의 병리학의 존재를 나타낸다(서비스는 노르웨이 소재의 PHARMAQ Analytiq에서 제공됨).

[0181] 형질감염된 CHH-1 세포의 웨스턴 블롯 분석은 3개의 모든 NTC9385R 플라스미드 변이체가 pcDNA3.1 및 pVAX1 플라스미드 골격과 비교하여 보다 우수한 항원 발현을 매개함을 입증하였다(도 5). 임상 시험은 NTC9385R-기반 백

신의 경우 적어도 pcDNA3.1/pVAX1 기반한 백신만큼의 양호한 보호 효과를 입증하였다(참고: 3주 및 7주 각각에 대해 표 14 및 표 15). 결합된 데이터 세트는 NTC9385R-기반 백신 골격에 의한 우수한 보호 경향을 나타내었다. 면역자극성 성분을 지닌 NTC9385R 플라스미드는 추가의 효과를 제공하지 않았다.

표 14

챌린지 후 3 주차의 신장 내 바이러스 RNA. 나타낸 p-값은 개개 그룹을 PBS 그룹과 일-원 ANOVA 와 던넷 사후 시험을 사용하여 비교함으로써 계산하였다. NA=적용 불가능.

백신 그룹	설명	평균 Ct-값, PMCV	표준 편차, Ct	n	p-값(PBS 와 비교)
6	PBS	21,73	1,25	15	NA
1	G-ORF1-pcDNA3.1	22,66	1,20	15	0,24
2	G-ORF1-pVAX1	22,57	1,51	15	0,35
3	G-ORF1-NTC9385R	23,78	1,71	15	0,0008
4	G-ORF1-NTC9385R-eRNA41H-CpG	23,52	1,42	15	0,0034
5	G-ORF1-NTC9385R-eRNA41H	23,03	1,28	15	0,053

[0182]

표 15

챌린지 후 7 주 차의 심장내 바이러스 RNA. 나타낸 p-값은 개개 그룹을 PBS 그룹과 일-원 ANOVA 와 던넷 사후 시험을 사용하여 비교함으로써 계산하였다. NA=적용 불가능.

백신 그룹	설명	평균 Ct-값, PMCV	표준 편차, Ct	n	p-값 (PBS 와 비교)
6	PBS	22,45	1,53	15	NA
1	G-ORF1-pcDNA3.1	23,75	1,73	15	0,26
2	G-ORF1-pVAX1	23,77	2,01	15	0,23
3	G-ORF1-NTC9385R	23,94	2,42	15	0,14
4	G-ORF1-NTC9385R-eRNA41H-CpG	25,63	1,77	15	0,0001
5	G-ORF1-NTC9385R-eRNA41H	24,44	2,02	15	0,031

[0183]

[0184] **실시예 4: 보조제 선택**

[0185] 분자 보조제는 면역원성을 증가시키고 면역 반응의 지속성을 연장하는 것 둘 다에 큰 가능성을 보여주며, 사이토킨, 케모킨, 또는 공-자극성 분자를 발현하는 이러한 분자 보조제가 항원을 암호화하는 DNA 백신 플라스미드와 공-투여될 수 있다. 분자 보조제 플라스미드에 의해 형질감염된 세포는 보조제를 주변 영역으로 분비하여, 국소 항원 제시 세포를 자극한다(Suschak et al., 2017). 어류 I형 인터페론의 보조제 활성은 대서양 연어에서 감염성 연어 빈혈 바이러스(ISAV)에 대한 바이러스 DNA 백신 모델에서 이미 밝혀졌다(Chang et al., 2015). 논문에서는, 제I형 IFN이 ISAV-헤마글루티닌 단백질에 대한 항체 반응을 강화하고 바이러스 챌린지에 대해 증가된 보호를 제공함이 입증되었다.

[0186] 다음의 분자 보조제: IFNa, IFNb, IFNc, IFNd, IFNγ, IL-2, IL-4, IL-12 및 VHSV-G를 후보물의 신속한 효능 스크리닝을 위한 고-처리량 모델(high-throughput model)을 사용하여 보조제 활성에 대해 전장 PMCV ORF1 백신 항원(G-ORF1)과 함께 생체 내에서 시험하였다.

[0187] 이러한 모델은 챌린지 50일 후 조직병리학적 병변에서의 차이가 챌린지 후 20일차에 동일한 그룹에서 심장 및 신장 내 바이러스 RNA 수준에 의해 예측될 수 있다는 놀라운 발견에 기초한다. 따라서, 많은 그룹을 신속한 스크리닝을 위해, 챌린지 후 3주차에 단 하나의 샘플링 지점만 사용할 필요가 있다.

[0188] 보조제의 생체내 스크리닝 연구에서 모든 그룹에 대해, 백신 항원 및 플라스미드 암호화된 면역보강제를 별개의 플라스미드에 투여하였다. 유전자 암호화 항원(G-ORF1) 및 다양한 플라스미드 암호화된 보조제 유전자를 모두 진핵세포 발현 벡터 pcDNA3.1(+)(Invitrogen) 내 CMV 프로모터의 하부에 삽입하였다. 플라스미드를 하기 표에 따라 멸균 포스페이트-완충된 염수(PBS)에서 50μl의 주사 용적 당 10μg으로 희석하였다. 모든 어류에게 어류의 각각의 측면에 1회 근육내 주사로 총 20μg의 용량의 플라스미드(항원과 보조제가 제공된 경우 각 플라스미드 20μg)를 제공하였다. 2개의 비-면역화된 대조군 그룹을 포함시켰고, 하나의 그룹에는 표 16에 요약된 바와 같이, 20μg의 대조군 백신(pcDNA3.1의 eGFP)을 제공하였고 하나의 그룹에는 2 x 50μl의 PBS를 제공하였다.

[0189] 담수에 보관되고 평균 체중이 31 그램인 대서양 연어(살모 살라르)(그룹 당 n=15)를 트리카인(PHARMAQ)을 사용하여 마취하고 지방 지느러미 및/또는 상악골을 단축하여 태그화하고, 그룹에 할당하고, 시험백신 0.05ml를 동일한 마취기간 동안 2회(어류의 각각의 측면에 1회 주사)로 근육 내 주사하였다. 면역성이 12℃(명:암 12:12)에서 50일 동안 발달하도록 한 후 어류를 트리카인(PHARMAQ)을 사용하여 다시 마취시키고 노르웨이의 CMS 발병 현장으로부터 기원한 0.1ml의 균질화된 심장(단리체 ID ALV1223 심장)을 복강내 주사함으로써 감염성 PMCV로 챌린지하였다. 이후에, 챌린지 후 21일차에 어류(그룹 당 n=15)를 샘플링하였다. 심장 심실 및 신장을 후속적인 RNA 추출을 위해 모든 샘플링된 어류로부터 RNALATER®에서 수집하였다. RNA를 RNALATER®에 저장된 모든 샘플로부터 추출하고 실시간 RT-PCR로 PMCV RNA의 존재에 대해 PHARMAQ Analytiq(노르웨이 소재)로부터 시판되는 서비스를 사용하여 분석하였다.

[0190] 7주의 면역화와 3주의 챌린지 후에, 모델은 대부분의 보조제 전략이 효능 개선에 실패했지만, 하나의 보조제 - IFNb가 효과의 수준을 유의적으로 증가시킴을 발견하였다. 결과는 표 17에 나열되어 있다.

표 16

그룹	설명(항원)	작제물 A (항원)의 상세한 설명	설명(보조제)	작제물 B (보조제)의 상세한 설명	최종 농도 작제물 A (μg/ml)	최종 농도 작제물 B (μg/ml)	용량 μg (2 x 0.05 ml)
1	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	없음		200		20
2	eGFP	향상된 녹색 형광성 단백질 (대조군)	없음		200		20
3	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	IFNa1	IFNa1 보조제 작제물	200	200	각각 20
4	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	IFNb	IFNb 보조제 작제물	200	200	각각 20
5	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	IFNc	IFNc 보조제 작제물	200	200	각각 20
6	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	IFNd	IFNd 보조제 작제물	200	200	각각 20
7	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	인터류킨 2	IL-2 보조제 작제물	200	200	각각 20
8	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	인터류킨 4	IL-4 보조제 작제물	200	200	각각 20
9	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	인터류킨 12	IL-12 보조제 작제물	200	200	각각 20
10	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	IFNg	IFN 감마 보조제 작제물	200	200	각각 20
11	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	VHSV-G	VHSV-g 단백질 DNA 백신	200	200	각각 20
12	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	rORF1 (PMCV)	Rec.단백질 PMCV ORF1 (이콜라이)*	200	NA	20
13	PBS	PBS 대조군					

[0191]

표 17

챌린지 후 3 주차의 신장 내 바이러스 RNA. 나타낸 p-값은 개개 그룹을 G-ORF1 대조군 그룹(보조제 없음)과 일-원 ANOVA 와 던넷 사후 시험을 사용하여 비교함으로써 계산하였다. NA=적용 불가능.

백신 그룹	항원 작제물	보조제	평균 Ct-값, PMCV	표준 편차, Ct	n	p-값(G-ORF1 단독 – 그룹 1 과 비교)
13	PBS	없음	19,49	0,96	14	0,0002
1	G-ORF1	없음	23,12	2,60	31	NA
2	eGFP	없음	22,04	1,51	16	0,73
3	G-ORF1	IFNa1	23,17	3,29	15	0,99
4	G-ORF1	IFNb	26,06	3,05	15	0,0033
5	G-ORF1	IFNc	23,53	3,27	14	0,99
6	G-ORF1	IFNd	21,82	2,50	16	0,52
10	G-ORF1	IFNg	21,09	1,69	14	0,11
7	G-ORF1	인터류킨 2	20,70	3,20	13	0,04
8	G-ORF1	인터류킨 4	21,72	2,01	15	0,45
9	G-ORF1	인터류킨 12	23,03	3,24	16	0,99
11	G-ORF1	VHSV-G	20,25	2,52	15	0,004
12	G-ORF1	rORF1 (PMCV)	19,42	0,74	10	0,001

[0192]

[0193] IFNb 및 IFNc를 후속 어류 시험을 위해 선택하였다. 본 시험의 모든 그룹에 대해, 백신 항원 및 플라스미드 암호화된 보조제를 별개의 플라스미드에 투여하였다. 항원을 암호화하는 유전자(G-ORF1) 및 플라스미드 암호화된 보조제 유전자(IFNb 또는 IFNc)를 모두 진핵세포 발현 벡터 pcDNA3.1(+)(Invitrogen) 내 CMV 프로모터의 하부에 삽입하였다. 플라스미드를 하기 표에 따라 멸균 포스페이트-완충된 염수(PBS)에서 50㎕의 주사 용적 당 10㎍으로 희석하였다. 모든 어류에게 어류의 각각의 측면에 1회 근육내 주사로 총 20㎍의 용량의 플라스미드(항원과 보조제가 제공된 경우 각 플라스미드 20㎍)를 제공하였다. 비-면역화된 대조군 그룹을 포함시켰고, 표 18에 요약된 바와 같이, 2 x 50 ㎕의 PBS를 제공하였다.

표 18

그룹	설명(항원)	설명(보조제)	작제물 A (항원)의 상세한 설명	작제물 B (보조제)의 상세한 설명	최종 농도 작제물 A (㎍/ml)	최종 농도 작제물 B (㎍/ml)	용량 ㎍ (2 x 0.05 ml)
1	G-ORF1	없음	G-PMCV_ORF1_full_1-2583		200		20
2	G-ORF1	IFNb	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	IFNb 보조제 작제물	200	200	각각 20
3	없음	IFNb		IFNb 보조제 작제물		200	20
4	G-ORF1	IFNc	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	IFNc 보조제 작제물	200	200	각각 20
5	없음	IFNc		IFNc 보조제 작제물		200	20
6	PBS		PBS 대조군				

[0194]

[0195] 담수에 보관되고 평균 체중이 29 그램인 대서양 연어(살모 살라르)(그룹 당 n=30)를 트리카인(PHARMAQ)을 사용하여 마취하고 지방 지느러미 및/또는 상악골을 단축하여 태그화하고, 그룹에 할당하고, 시험 백신 0.05ml를 동일한 마취기간 동안 2회(어류의 각각의 측면에 1회 주사)로 근육 내 주사하였다. 면역성이 12℃(명:암 12:12)에서 59일 동안 발달하도록 한 후 어류를 트리카인(PHARMAQ)을 사용하여 다시 마취시키고 노르웨이의 CMS 발병 현장으로부터 기원한 0.1ml의 균질화된 심장(단리체 ID ALV1273 심장)을 복강내 주사함으로써 감염성 PMCV로 챌린지하였다. 이후에, 챌린지 후 2개의 시점; 20일 및 48일 차에 어류(그룹 당 n=15)를 샘플링하였다. 심장 심실 및 신장을 후속적인 RNA 추출을 위해 모든 샘플링된 어류로부터 RNALATER®에서 수집하였다. 심장(심실 및 심방)을 또한 조직병리학적 분석을 위해 마지막 샘플링 시점(48일차)에 모든 어류로부터 포르말린 속에서 고정시켰다. RNA를 RNALATER®에 저장된 모든 샘플로부터 추출하고 실시간 RT-PCR로 PMCV RNA의 존재에 대해 PHARMAQ Analytiq(노르웨이 소재)로부터 시판되는 서비스를 사용하여 분석하였다. 포르말린에 저장한 심장을 절개하고 조직병리학을 중증도에 따라 0 내지 3으로 점수를 매겼으며, 여기서 0은 병리학적 발견이 없음을 나타내고 3은 중증 병리학의 존재를 나타낸다(노르웨이 소재의, PHARMAQ Analytiq에서 제공한 서비스).

[0196] 결과는 IFNb가 IFNc보다 우수함을 나타내었다(표 19). 2개의 보조제 사이의 차이는 챌린지 후 7주차의 샘플링 시점에서 가장 두드러졌다(이전 시점으로부터의 데이터는 나타내지 않음). 보조제 만을 제공받은 그룹이 또한 부분적으로 보호되었고 이는 IFN이 선천적 및 적응성 면역 반응 모두의 중요한 효과기임을 반영한다.

표 19

챌린지 후 7 주차의 심장 내 바이러스 RNA. 나타낸 p-값은 개개 그룹을 PBS 대조군 그룹과 일-원 ANOVA 와 던넷 사후 시험을 사용하여 비교함으로써 계산하였다. NA=적용 불가능.

백신 그룹	항원	보조제	평균 Ct-값, PMCV	표준 편차, Ct	n	p-값 (PBS 와 비교)
6	PBS	PBS	23,17	2,40	15	NA
1	G-ORF1	PBS	25,64	2,61	15	0,40
2	G-ORF1	IFNb	30,77	5,61	15	0,0001
3	없음	IFNb	30,38	4,40	15	0,0002
4	G-ORF1	IFNc	25,16	4,79	15	0,64
5	없음	IFNc	22,48	2,15	15	0,99

[0197]

[0198] **실시예 5 - 보조제 전달**

[0199] 본 실험의 목표는 항원 및 분자 보조제를 전달하기 위한 가장 우수한 방법을 결정하기 위한 것이다.

[0200] 플라스미드-암호화된 보조제는 별개의 플라스미드에 전달될 수 있거나 항원을 암호화하는 것과 동일한 플라스미드에 포함될 수 있다. 샘플 플라스미드로부터 항원으로서 발현된 경우, 이는 예컨대, 다음의 방식으로 수행될 수 있다:

[0201] 1. 백신 항원과 별개이지만 동일한 프로모터로부터.

[0202] 2. 백신 항원과 별개의 유사한(동일하지는 않은) 프로모터로부터.

[0203] 3. 항원이 있는 융합 단백질로서 - 자가-절단을 촉진하기 위해 P2A 펩타이드 서열에 의해 분리됨.

[0204] 본 실시예에서, 보조제에 대해 상이한 전달 선택사항을 시험하였다. 세포 표면 발현된 PMCV ORF1 항원(G-ORF1)을 모든 그룹에 제공하였다. 보조제는 다음과 같은 방식으로 제공되었다:

[0205] 1. 별개의 플라스미드(G-ORF1+IFNb)에

[0206] 2. 동일한 CMV 프로모터 하부의 항원과 함께 발현되며 자가-절단 2A 펩타이드(G-ORF1-P2A-IFNb)에 의해 항원과

분리됨

[0207] 3. 항원과 동일한 플라스미드에서 그러나 제2의 CMV 프로모터(G-ORF1-CMV-IFNb)의 하부에 발현됨,

[0208] 4. 하나의 그룹에는 보조제 단독 항원(G-ORF1)을 제공하지 않았다.

[0209] 5. PBS를 제공받은 비-예방접종된 대조군 그룹을 또한 포함시켰다.

[0210] 본 연구의 모든 백신에 대해 유전자를 진핵세포 발현 벡터 pVAX1(Invitrogen)의 CMV 프로모터의 하부에 삽입하였다. 사용된 항원은 G-ORF1(G-PMCV_ORF1_full_1-2583)이었다. 모든 백신을 멸균 포스페이트-완충된 염수(PBS)에 50㎕의 주사 용적 당 10㎍으로 희석시켰다. 모든 어류는 어류의 각각의 측면에 1회 근육내 주사로 총 20㎍의 용량을 제공하였다. 항원 및 별개의 플라스미드에 플라스미드 암호화된 보조제를 제공받은 어류의 경우, 각각의 플라스미드의 용량은 20㎍이었다. 비-면역화된 대조군을 포함시켰고 2 x 50 ㎕의 PBS를 제공하였다. 또한, 하나의 그룹은 표 20에 요약된 바와 같이, 플라스미드 암호화된 보조제 코돈-변경된 버전을 제공받았다.

표 20

[0211]

그룹	작제물 1	작제물 2	보조제 투여	용량 ㎍ (2 x 0.05 ml)
1	G-ORF1	챌린지된 IFNb 코돈	챌린지된 IFNb 보조제 코돈은 별도의 플라스미드에 제공되었다	각각 20
2	G-ORF1	IFNb	IFNb 보조제는 별도의 플라스미드에 제공되었다	각각 20
3	G-ORF1-P2A-IFNb		IFNb 는 동일한 플라스미드에 및 항원과 동일한 프로모터 하에 제공되었다	20
4	G-ORF1-CMV-IFNb		IFNb 는 동일한 플라스미드에 그러나 제 2 의 CMV 프로모터의 하부에 제공되었다	20
5	G-ORF1		보조제 대조군 그룹 없음	20
6	PBS			

[0212] 담수에 보관되고 평균 중량이 25 그램인 대서양 연어(살모 살라르)(그룹 당 n=30)를 트리카인(PHARMAQ)을 사용하여 마취시키고, 지방 지느러미 및/또는 상악골을 단축시켜 태그화하고, 그룹에 할당하고, 동일한 마취 기간 하에(어류의 각각의 측면에 1회 주사) 0.05 ml의 시험 백신으로 2회 근육내 주사하였다. 면역성을 12℃(명:암 12:12)에서 49일 동안 발달하도록 한 후 어류를 트리카인(PHARMAQ)을 사용하여 다시 마취시키고 노르웨이의 CMS 발병 현장으로부터 기원한 0.1 ml의 균질화된 비장(단리체 ID AL V1273 비장)을 복강내 주사함으로써 감염성 PMCV로 챌린지하였다. 이후에 어류(그룹 당 n=15)를 2개 시점; 챌린지 후 19일차 및 47일차에 샘플링하였다. 심장 심실 및 신장을 후속적인 RNA 추출을 위해 모든 샘플링된 어류로부터 RNALATER®에서 수집하였다. 심장(심실 및 심방)을 또한 조직병리학적 분석을 위해 마지막 샘플링 시점(47일차)에 모든 어류로부터 포르말린 속에서 고정시켰다. RNA를 RNALATER®에 저장된 모든 샘플로부터 추출하고 실시간 RT-PCR로 PMCV RNA의 존재에 대해 PHARMAQ Analytiq(노르웨이 소재)로부터 시판되는 서비스를 사용하여 분석하였다. 포르말린에 저장한 심장을 절개하고 조직병리학을 중증도에 따라 0 내지 3으로 점수를 매겼으며, 여기서 0은 병리학적 발견이 없음을 나타내고 3은 중증 병리학의 존재를 나타낸다(노르웨이 소재의, PHARMAQ Analytiq에서 제공한 서비스).

[0213] 임상 시험으로부터의 결과를 챌린지 후 7주차에 심장으로부터 히스토스코어 데이타에 의해 예시한다(표 21).

표 21

챌린지 후 7 주차의 심방 내 조직병리학적 병변(히스토스코어). 나타낸 p-값은 개개 그룹을 PBS 대조군 그룹과 일-원 ANOVA 와 던넷 사후 시험을 사용하여 비교함으로써 계산하였다. NA=적용 불가능.

백신-그룹	설명	평균 히스토스코어, 심방	표준 편차, 히스토스코어	N	p-값(PBS 와 비교)
6	PBS	2,46	0,54	15	NA
5	G-ORF1	1,73	1,00	15	0,20
2	G-ORF1+IFNb	1,00	0,90	15	0,0014
4	G-ORF1-CMV-IFNb	1,13	1,03	15	0,0035
3	G-ORF1-P2A-IFNb	1,73	1,22	15	0,20
1	G-ORF1-CMV-IFNb_코돈 변화됨	1,04	0,96	15	0,003

[0214]

[0215] 다양한 작제물에 대한 항원 발현 수준 및 보조제 활성을 또한 시험관 내에서 평가하였다(결과는 나타내지 않음). 결합된 결과는 선호되는 접근 방식이 항원으로서 동일하지만 별도의 프로모터 하에서의 항원과 동일한 플라스미드에 보조제를 제공하기 위한 것이지만, 상이한 플라스미드에서의 전달도 또한 효과적일 수 있음을 시사한다.

[0216] **실시예 6 - 백신 효능의 지속 기간**

[0217] 초기 연구는 보조제를 제공받은 어류만이 부분적으로 보호되었음을 나타내었고, 이는 IFN이 선천성 면역 반응과 적응성 면역 반응 둘 다의 중요한 효과인자임을 반영한다. DNA 작제물에서 분자 보조제를 포함시켜 수득한 보호 지속 기간을 연구하기 위하여, 장기 추적 백신 시험을 수행하였다.

[0218] 본 연구의 모든 백신에 대해 유전자를 Nature Technology Corporation(NTC)로부터의 진핵세포 발현 벡터 내 CMV 프로모터의 하부에 삽입하였다. 골격은 NTC9385R 또는 NTC9385R-eRNA41H-CpG이었다. 항원과 플라스미드 암호화된 보조제 둘 다를 제공받은 그룹의 경우, 이는 별개의 플라스미드(20㎍의 각각의 플라스미드) 또는 동일한 플라스미드(20㎍)를 제공받았다. 모든 어류에게 어류의 각각의 측면에 1회 근육 주사(0.05ml)를 제공하였다. 비-면역화 대조군을 포함시켰고 2 x 50 ㎕의 PBS를 제공하였다. 백신 그룹에 대한 세부 내용은 하기 표 22를 참고한다.

표 22

그룹	작제물 1	골격 작제물 1	작제물 2	골격 작제물 2	보조제 투여	용량 ㎍ (2 x 0.05 ml)
1	G-ORF1	NTC9385R	IFNb	NTC9385R	항원 + 보조제 – 별도의 플라스미드에	각각 20
2	G-ORF1	NTC9385R			항원만	20
3	IFNb	NTC9385R			보조제 만	20
4	G-ORF1-CMV-IFNb	NTC9385R			동일한 플라스미드에 항원 + 보조제	20
5	G-ORF1-CMV-IFNb	NTC9385R-eRNA41H-CpG			동일한 플라스미드에 항원 + 보조제	20
6	PBS					

[0219]

[0220] 담수에 보관되고 평균 중량이 17 그램인 대서양 연어(살모 살라르)(그룹 당 n=60)를 트리카인(PHARMAQ)을 사용

하여 마취시키고, 지방 지느러미 및/또는 상악골을 단축시켜 태그화하고, 그룹에 할당하고, 동일한 마취 기간 하에(어류의 각각의 측면에 1회 주사) 0.05 ml의 시험 백신으로 2회 근육내 주사하였다. 이후에, 어류를 저장기 탱크에 유지시키고 여기서 면역성이 12℃(명:암 12:12)에서 78일, 120일 또는 183일 동안 발달하도록 하였다. 이러한 시점 각각에서, 어류의 코호트(시점 78 dpv 및 183 dpv에서 그룹 당 n=15, 및 시점 120 dpv에서 n=30)를 챌린지 탱크로 이동시켰다. 이를 트리카인(PHARMAQ)을 사용하여 다시 마취시키고 노르웨이의 CMS 발병 현장으로부터 기원한 0.1 ml의 균질화된 심장(단리체 ID ALV1273 심장)을 복강내 주사함으로써 감염성 PMCV로 챌린지하였다. 이후에 어류(그룹 당 n=15)를 챌린지 후 3주차에 샘플링하였다. 심장 심실 및 신장을 후속적인 RNA 추출을 위해 모든 샘플링된 어류로부터 RNALATER®에서 수집하였다. 예방접종 후 120일 차에 챌린지된 코호트의 경우, 추가의 샘플링을 챌린지 후 7주차에 수행하였다. RNALATER®에 대한 심장 및 신장 외에, 심장(심실 및 심방)을 또한 조직병리학적 분석을 위해 마지막 샘플링 시점(7주차)에 모든 어류로부터 포르말린 속에서 고정시켰다. RNA를 RNALATER®에 저장된 모든 샘플로부터 추출하고 실시간 RT-PCR로 PMCV RNA의 존재에 대해 PHARMAQ Analytiq(노르웨이 소재)로부터 시판되는 서비스를 사용하여 분석하였다. 포르말린에 저장한 심장을 절개하고 조직병리학을 중증도에 따라 0 내지 3으로 점수를 매겼으며, 여기서 0은 병리학적 발견이 없음을 나타내고 3은 중증 병리학의 존재를 나타낸다(노르웨이 소재의, PHARMAQ Analytiq에서 제공한 서비스).

[0221] 백신의 효능은 26주까지의 면역화 후 챌린지(면역화 후 12, 18주 및 26주차에 챌린지)로 평가하였다. 16주차에서의 챌린지는 챌린지 후 20일과 50일차에, 2개의 샘플링 시점으로 50일 동안 이어졌으며, 여기서 심장 및 신장 조직을 qPCR에 의한 분석 및 심장의 조직병리학 평가를 위해 위에서 기술한 바와 같이 샘플링하였다.

[0222] 결과는 챌린지 후 183일/2196도 일(degree day)인, 마지막 챌린지까지 PMCV 감염에 대한 유의적인 보호가 모든 백신으로 달성되었음을 나타내었다. G-ORF1 및 IFNb의 조합은 2개의 구성성분을 별개로 사용하는 것보다 더 우수한 보호를 제공하였다(표 23, 24). 전반적인 결과는 백신이 길고 지속적인 보호를 제공함을 나타낸다.

표 23

탱크 1. 챌린지 전 면역화의 3 개의 상이한 기간으로 챌린지 후 3 주차에 바이러스 RNA. 표준 편차와 함께 PMCV 에 대한 평균 Ct-값을 각각의 그룹에 대해 나타낸다. N=샘플링 시점 당, 그룹 당 15.

백신 그룹	설명	12 주 면역화	18 주 면역화	26 주 면역화
6	PBS	27,42 ± 2,07	29,33 ± 1,62	29,33 ± 1,74
2	G-ORF1	28,70 ± 2,19	30,50 ± 2,38	29,62 ± 3,59
3	IFNb	33,82 ± 3,48	32,65 ± 3,68	28,35 ± 6,22
1	G-ORF1+IFNb	35,88 ± 3,25	33,25 ± 3,36	32,21 ± 1,95

[0223]

표 24

탱크 2. 챌린지 전 3 개의 상이한 면역화 기간으로 챌린지 후 3 주차에 심장에서 바이러스 RNA. 표준 편차와 함께 PMCV 에 대한 평균 Ct-값을 각각의 그룹에 대해 나타낸다. 샘플링-시점 당, 그룹 당 N=15.

백신-그룹	설명	12 주 면역화	18 주 면역화	26 주 면역화
6	PBS	27,68 ± 2,32	27,58 ± 2,04	28,80 ± 1,90
4	G-ORF1-CMV-IFNb	36,73 ± 4,69	33,75 ± 2,80	32,93 ± 3,31
5	G-ORF1-CMV-IFNb	33,58 ± 3,10	30,70 ± 2,14	32,63 ± 4,13

[0224]

표 25

탱크 1. 18 주의 면역화 기간 후 챌린지 후 7 주차의 심방 내 조직병리학적 병변(히스토스코어). 나타낸 p-값은 개개 그룹을 PBS 대조군 그룹과 일-원 ANOVA 와 던넷 사후 시험을 사용하여 비교함으로써 계산하였다. NA=적용 불가능.

백신 그룹	설명	평균 히스토스코어, 심방	표준 편차, 히스토스코어	N	p-값(PBS 와 비교)
6	PBS	1,54	1,08	12	NA
2	G-ORF1	0,60	0,74	15	0,01
3	IFNb	0,43	0,78	15	0,0025
1	G-ORF1+IFNb	0,43	0,65	14	0,0028

[0225]

표 26

탱크 2. 18 주의 면역화 기간 후 챌린지 후 7 주차의 심방 내 조직병리학적 병변(히스토스코어). 나타낸 p-값은 개개 그룹을 PBS 대조군 그룹과 일-원 ANOVA 와 던넷 사후 시험을 사용하여 비교함으로써 계산하였다. NA=적용 불가능.

백신-그룹	설명	평균 히스토스코어, 심방	표준 편차, 히스토스코어	N	p-값(PBS 와 비교)
6	PBS	1,68	0,75	11	NA
4	G-ORF1-CMV-IFNb	0,07	0,18	15	<0,0001
5	G-ORF1-CMV-IFNb	0,50	0,76	8	0,0002

[0226]

[0227] **실시예 7 - 보조제 효능의 최적화**

[0228] IFNb의 보조제 잠재능을 추가로 최적화하기 위한 시도에서, 본 발명자는 대서양 연어 및 밀접하게 관련된 종에서 상동 유전자를 확인하였다. 연어류는 최근 진화적으로 전체 게놈 중복을 경험하였으므로, 많은 연어 유전자가 중복(분기된 상동체)으로 발견된다. 초기에 시험한 IFNb-보조제와 유사하지만 동일하지 않은 3개의 새로운

유전자를 선택하였다(표 27). 이는:

[0229] - 대서양 연어(살모 살라르) - IFNb1(분기형 파라로그 유전자)

[0230] - 갈색 송어(살모 트루타)-IFN a3-유사 유전자

[0231] - 홍연어(온코린쿠스 네르카) - IFNa3-유사 유전자.

표 27

유전자	GenBank 수탁 번호		1	2	3	4
IFNb 살모 살라르 (서열 번호: 6)		1		*6*	*5*	*11*
IFNb1 살로 살라르	EU768890.1	2	96.74		*9*	*13*
IFNa3 유사 살모 트루타	XM_029727364.1	3	97.28	95.11		*11*
IFNa3 유사 온코린쿠스 네르카	XM_029635101.1	4	94.02	92.93	94.02	

대안의 IFNb 보조제의 쌍식 비교(pairwise comparison)는 아미노산 동일성(%) 및 상이한 아미노산의 수(이탤릭체)로서 나타내었다.

[0232]

[0233] 상동 재조합을 통한 연어 게놈 내로의 백신 통합이 중요할 수 있으므로, 보조제와 연어 게놈 사이의 서열 유사성을 감소시킴으로써 위험 완화를 수득할 수 있다. 이는 먼저 플라스미드 암호화된된 보조제를 단백질 서열로 해독함으로써 수행하였다. 이후에, 이러한 서열을 코돈 빈도 분포(대서양 연어에서 사용 빈도에 의해 주어진 확률로 지정된 코돈)를 기반으로 단백질로부터 다시 뉴클레오타이드 서열로 역해독하였다(역-해독). 역 해독은 빈도 분포를 기반으로 한 코돈을 사용하도록 설정된 소프트웨어가 장착된 CLC Main Workbench(Qiagen)를 사용하여 수행하였다.

[0234] 이러한 절차 후에 반환된 새로운 보조제 서열은 뉴클레오타이드 수준에서 야생형 IFNb 서열에 대해 74 내지 80% 동일하였다. 이후에, 4개의 코돈-변화된 버전(RT로서 지칭됨)을 포함하는, 4개의 원래의 천연 보조제 후보물의 활성을 시험관 내 검정을 사용하여 비교하였다.

[0235] 따라서, IFNb에 대한 야생형 핵산 서열(서열 번호: 18)은 IFNb에 대한 RT 핵산 서열(서열 번호: 17)에 대해 대략 76% 동일하였고, IFNb1에 대한 야생형 핵산 서열(서열 번호: 19)은 IFNb1에 대한 RT 핵산 서열(서열 번호: 20)에 대해 대략 78% 동일하였다.

[0236] 다양한 IFNb 후보물의 시험을 촉진하고 이의 보조제 잠재능을 평가하기 위하여, 시험관 내 스크리닝 검정을 확립하였다. 이 시험의 원리는 RT-qPCR에 의해 Mx-발현(IFN-유도된 유전자)을 정량화하기 위한 것이다. Mx 단백질은 광범위한 RNA 바이러스에 대해 항바이러스 활성을 갖는 큰 GTPase의 상과(superfamily)에 속한다. 생체 내에서, Mx 유전자의 발현은 제I형 인터페론(IFN)의 존재에 의해 엄격하게 조절되며, 수개의 바이러스 감염 동안 이의 유도가 설명되었다. CHH-1 세포는 IFNb 자극(수용체 결여의 잠재적 결과)에 반응하여 Mx를 발현하지 않고 TO 세포는 쉽게 형질감염될 수 없으므로, 검정을 다음과 같은 방식으로 설정하였다:

[0237] IFNb 유전자의 작용성/활성을 음성 대조군으로서 포함된 비-보조제 처리된 작제물과 함께 다양한 보조제 작제물로 CHH-1 세포를 형질감염시킴으로써 연구하였다. 형질감염 후 7일차에, CHH-1 세포 형질감염체로부터 분비된 IFN 분자를 함유하는 세포 배양 배지를 수집하고 다른 어류 세포주(TO 세포)에 다른 희석으로 이전시켰다. TO 세포의 항온처리를 위해 사용된 조건화 배지의 최종 비율은 전형적으로 1:6; 1:60, 1:600 및 1:6000이었고, 이는 시험관 내 모델이 보조제 활성의 정량적 척도를 제공하도록 한다. 조건화 배지와 함께 3일의 항온처리 후, 세포 배양 배지를 조심스럽게 제거하고 세포로부터 RNA를 추출하여 TO 세포를 샘플링하였다. IFNb에 의해 유도된 Mx 반응은 다음의 프라이머/프로브(primer/probe)를 사용하여 qPCR로 분석하였다:

[0238] 서열 번호: 42 Mx Fwd: GATGCTGCACCTCAAGTCCTATTA

[0239] 서열 번호: 43 Mx Rev: CGGATCACCATGGGAATCTGA

[0240] 서열 번호: 44 Mx 프로브: 6-FAM-CAGGATATCCAGTCAACGTT-MGB

[0241] 결과는 하기 표 28에 제공한다:

표 28

작제물	전이된 CHH-1 조건화된 배지대 TO-세포의 비		
	1:6	1:60	1:600
살모 살라르 IFNb 야생형(서열 번호: 18	21.61	24.29	34.44
살모 살라르 IFNb RT (서열 번호: 17)	20,86	22,33	26,39
살모 살라르 IFNb1 야생형 (서열 번호: 19)	20.94	21.77	23.66
살모 살라르 IFNb1 RT (서열 번호: 20)	20.57	21.05	21.84
살모 트루타 IFNa3 유사 야생형	20.66	22.17	27.04
살모 트루타 IFNa3 유사 RT	21.49	21.96	26.82
온쿠린쿠스 네르카 INFa3 야생형	20.99	24.04	31.26
온쿠린쿠스 네르카 INFa3 RT	21.28	22.87	28.13
eGFP	Ct 없음	Ct 없음	Ct 없음
주형 대조군 없음	Ct 없음		

CHH-1 세포로부터 이전된 상이한 농도의 조건화된 배지와 함께 항온처리된 TO 세포에서 Mx 에 대한 실시간 Ct 값. 보다 낮은 Ct 값은 보다 높은 수준의 IFN 유도를 나타낸다.

[0242]

[0243] 이러한 결과는 RT 작제물이 야생형 서열과 비교하여 약간 더 높은 면역조절 활성을 가짐을 입증한다. 결과는 또한 IFNb1이 IFNb보다 더 높은 면역조절 활성을 가지고 있음을 명확하게 나타낸다.

[0244] 시험관 내 연구를 기반으로, 4개의 RT INFb 보조제를 어류에서 백신 보조제로서 시험하기 위해 선택하였다(2개의 별개의 플라스미드로 PMCV 캡시드 항원(G-ORF1) 및 보조제를 제공받은 모든 그룹). 또한, 한 그룹에는 음성 보조제 대조군 그룹으로서 G-ORF1 백신 항원및 eGFP 암호화 플라스미드를 제공하였다. 모든 어류에게 어류 각각의 측면에 1회 근육 주사를 제공하였다. 모든 어류는 별개의 플라스미드에 항원 및 플라스미드 암호화된 보조제를 제공받았고, 각각의 플라스미드에 대한 용량은 20㎍이었다. 표 29에 요약된 바와 같이, 비-면역화 대조군 그룹을 포함시켰고 2 x 50 ㎕의 PBS를 제공하였다.

표 29

그룹	설명(항원)	항원의 상세한 설명	항원 골격	설명(보조제)	보조제 골격	최종 농도 A µg/ml	최종 농도 B (µg/ml)	용량 µg (2 x 0.05 ml)
1	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	NTC9385R	IFNb 에스. 살라르(*S.salar*)	pVAX1	200	200	각각 20
2	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	NTC9385R	IFNb1_에스. 살라르	pVAX1	200	200	각각 20
3	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	NTC9385R	IFNb_에스. 트루타(*S. trutta*) IFNa3-유사	pVAX1	200	200	각각 20
4	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	NTC9385R	IFNb_오. 네르카(*O. nerka*) INFa3-유사	pVAX1	200	200	각각 20
5	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_full_1-2583	NTC9385R	eGFP	pcDNA3.1(+)	200	200	각각 20
6	PBS	PBS 대조군	NA					

[0245]

[0246] 담수에 보관하고 평균 중량이 20 그램인 대서양 연어(살모 살라르)(그룹 당 n=30)를 트리카인(PHARMAQ)을 사용하여 마취시키고, 지방 지느러미 및/또는 상악골을 단축시켜 태그화하고, 그룹에 할당하고, 동일한 마취 기간 하에(어류의 각각의 측면에 1회 주사) 0.05 ml의 시험 백신으로 2회 근육내 주사하였다. 면역성이 12℃(명:암 12:12)에서 48일 동안 발달하도록 한 후, 어류를 트리카인(PHARMAQ)을 사용하여 다시 마취시키고 노르웨이의 CMS 발병 현장으로부터 기원한 0.1 ml의 균질화된 심장(단리체 ID ALV1273 심장)을 복강내 주사함으로써 감염성 PMCV로 챌린지하였다. 이후에 어류(그룹 당 n=15)를 2개의 시점; 챌린지 후 19일차 및 49일차에 샘플링하였다. 심장 심실 및 신장을 후속적인 RNA 추출을 위해 모든 샘플링된 어류로부터 RNALATER®에서 수집하였다. 심장(심실 및 심방)을 또한 조직병리학적 분석을 위해 마지막 샘플링 시점(49일차)에 모든 어류로부터 포르말린 속에서 고정시켰다. RNA를 RNALATER®에 저장된 모든 샘플로부터 추출하고 실시간 RT-PCR로 PMCV RNA의 존재에 대해 PHARMAQ Analytiq(노르웨이 소재)로부터 시판되는 서비스를 사용하여 분석하였다. 포르말린에 저장한 심장을 절개하고 조직병리학을 중증도에 따라 0 내지 3으로 점수를 매겼으며, 여기서 0은 병리학적 발견이 없음을 나타내고 3은 중증 병리학의 존재를 나타낸다(노르웨이 소재의, PHARMAQ Analytiq에서 제공한 서비스).

[0247] 결과를 아래 표 30 및 31에 나타내었다.

표 30

탱크 1. 챌린지 후 3 주차의 신장 내 바이러스 RNA. 나타낸 p-값은 개개 그룹을 PBS 대조군 그룹과 일-원 ANOVA 와, 던넷 사후 시험을 사용하여 비교함으로써 계산하였다. NA=적용 불가능.

백신 그룹	설명	평균 Ct-값, PMCV	표준 편차, Ct	n	p-값(PBS 와 비교)
6	PBS	19,89	0,79	15	NA
1	G-ORF1 + IFNb 에스. 살라르	25,42	1,51	15	<0,0001
2	G-ORF1 + IFNb1 에스. 사라르	27,66	1,31	15	<0,0001
3	G-ORF1 + IFNb a3 에스. 트루타	27,13	1,09	15	<0,0001
4	G-ORF1 + IFNb a3 오. 네르카	26,74	1,25	15	<0,0001
5	G-ORF1 + EGFP	23,23	2,10	15	0,028

[0248]

표 31

탱크 2. 챌린지 후 3 주 차의 신장 내 바이러스 RNA. 나타낸 p-값은 개개 그룹을 PBS 대조군 그룹과 일-원 ANOVA 와, 던넷 사후 시험을 사용하여 비교함으로써 계산하였다. NA=적용 불가능.

백신 그룹	설명	평균 Ct-값, PMCV	표준 편차, Ct	n	p-값(PBS 와 비교)
6	PBS	20,73	1,44	15	NA
1	G-ORF1 + IFNb 에스. 살라르	26,55	0,94	15	<0,0001
2	G-ORF1 + IFNb1 에스. 살라르	26,27	0,99	15	<0,0001
3	G-ORF1 + IFNb a3 에스. 트루타	26,72	1,15	15	<0,0001
4	G-ORF1 + IFNb a3 오. 네르카	26,43	1,09	11	<0,0001
5	G-ORF1 + EGFP	21,63	1,76	15	0,20

[0249]

[0250] 전반적인 결론은 IFNb1 RT 작제물을 사용하여 유발시킨 보호가 IFNb RT 작제물에 의해 유발된 보호보다 약간 더 높았지만, 시험한 모든 RT 보조제는 유사한 보호를 제공한다는 것이다. 이러한 보조제의 코돈-변화된 버젼이 상동 재조합의 위험을 감소시키는 데 바람직하다.

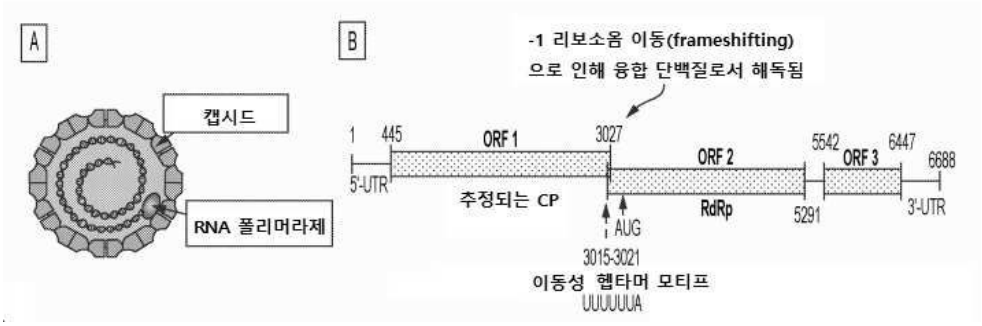
[0251] 보조제를 전달하는 가장 우수한 방법은 항원과 별개인 그러나 동일한 프로모터를 사용하면서 항원과 동일한 플라스미드에 존재하는 것이지만 상이한 플라스미드를 사용한 항원 및 보조제의 전달 또한 효과적이다.

[0252] 본 명세서에 인용된 모든 공보인, 특허 공보 및 비특허 공보 모두는 본 발명이 속하는 기술분야의 숙련가의 기술 수준을 나타낸다. 이들 공보 모두는 각각의 개별 공보가 참조로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 나타내어진 경우와 동일한 정도로 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

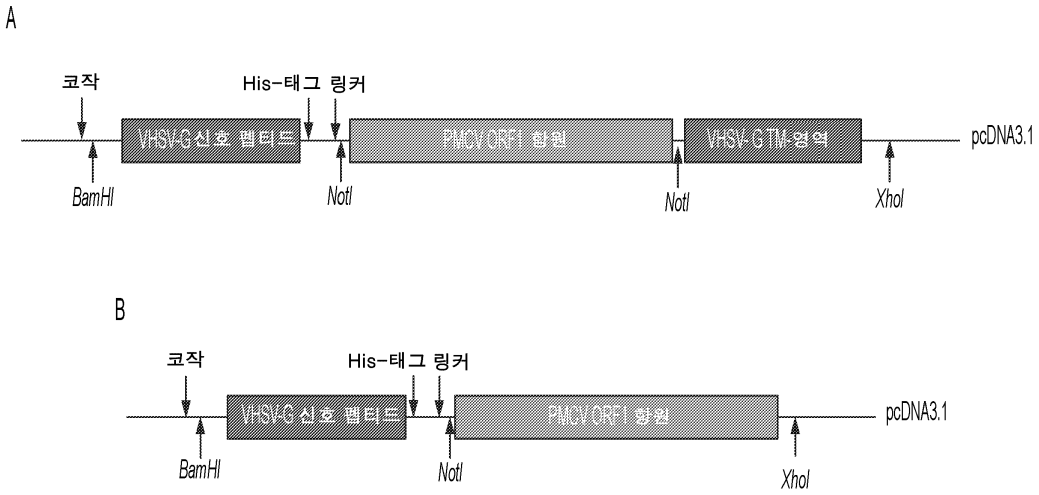
[0253] 본원에서 본 발명이 특수한 실시양태를 참조로 설명되었지만, 이들 실시양태는 단지 본 발명의 원리 및 적용을 예시하는 것임을 이해하여야 한다. 따라서, 예시적인 실시양태에 대해 다수의 수정이 이루어질 수 있고, 다음의 청구범위에 정의된 바와 같이 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않고 다른 배열이 고안될 수 있다는 것이 이해되어야 한다.

도면

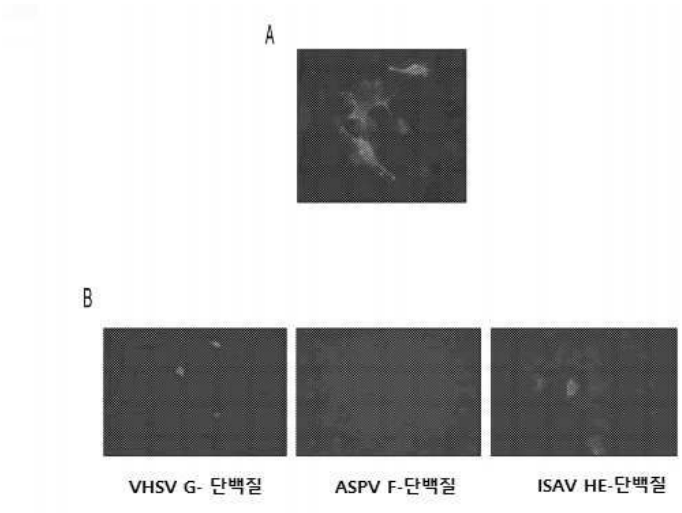
도면1



도면2



도면3

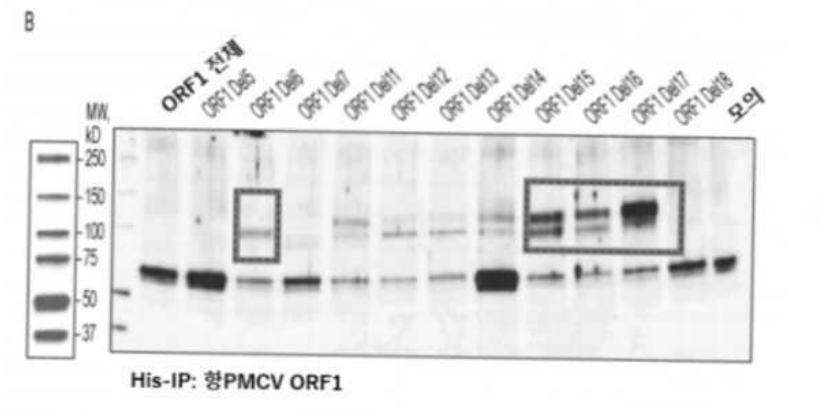


도면4a

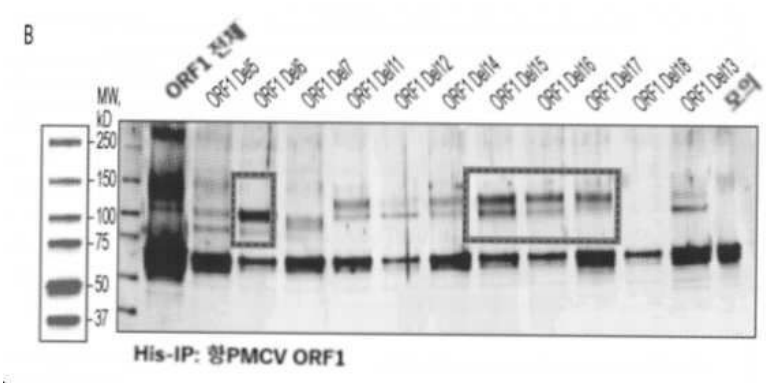
A

설명	형광 강도	
	Exp. 1	Exp. 2
모의(Mock)	-	-
ORF1 전체(full)	++	++
Del5	++	++
Del6	++	++(+)
Del7	++	++
Del11	++(+)	++
Del12	++	++
Del13	++	++
Del14	++	++
Del15	++	++(+)
Del16	+++	+++
Del17	+++	+++(+)
Del18	(+)	(+)

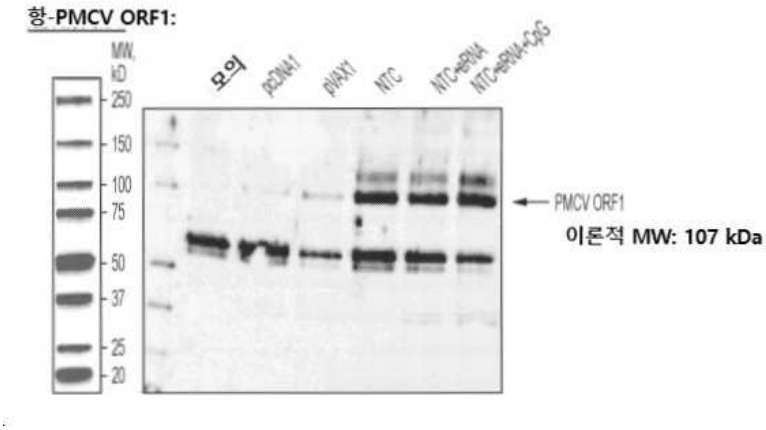
도면4b



도면4c


B
ORF1 전체
ORF1Del5
ORF1Del6
ORF1Del7
ORF1Del11
ORF1Del12
ORF1Del14
ORF1Del15
ORF1Del16
ORF1Del17
ORF1Del18
ORF1Del13
음성
MW, kD
250
150
100
75
50
37
His-IP: 항PMCV ORF1

도면5


항-PMCV ORF1:
MW, kD
음성
pCDNA1
pVAX1
NTC
NTC+siRNA
NTC+siRNA+CpG
250
150
100
75
50
37
25
20
PMCV ORF1
이론적 MW: 107 kDa

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.