



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0103535  
(43) 공개일자 2010년09월27일

(51) Int. Cl.

A61K 39/12 (2006.01) C07K 14/01 (2006.01)  
C12N 15/34 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7014080

(22) 출원일자(국제출원일자) 2008년12월31일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년06월25일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/088678

(87) 국제공개번호 WO 2009/088950

국제공개일자 2009년07월16일

(30) 우선권주장

61/017,863 2007년12월31일 미국(US)

(71) 출원인

베링거인겔하임베트메디카인코퍼레이티드

미국 미주리 64506 세인트조세프 노스 벨트 하이웨이 2621

(72) 발명자

본 에릭

미국 미주리주 64506 세인트 조셉 노쓰 벨트 하이웨이 2621

세퍼 메릴

미국 미주리주 64506 세인트 조셉 노쓰 벨트 하이웨이 2621

(74) 대리인

장훈

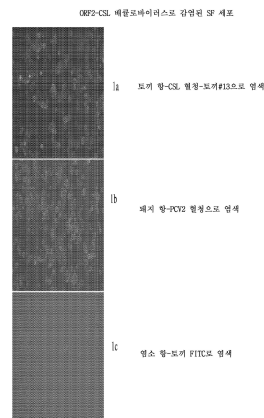
전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 외래 아미노산 삽입물을 갖는 PCV2 ORF2 바이러스 유사 입자

(57) 요약

본 발명은 아미노산 서열의 생성 및 이용과 관련된 방법 및 조성물을 포함한다. 특히, PCV2 ORF2는, PCV2 ORF2를 암호화하는 DNA가 발현 시스템으로 삽입되는 경우, 이의 면역원성 또는 항원성을 보유하는 아미노산 서열을 생성하는 바이러스-유사 입자로서 유용한 것으로 보인다. PCV2에 대해 외래인 DNA 서열이 ORF2 DNA에 '인-프레임'으로 결합될 수 있으며, PCV2에 대해 외래인 DNA를 포함한 전체 서열이 발현된다. 이러한 서열은 이들의 항원성 및 따라서 면역원성 조성물에서의 이들의 잠재적 유용성을 보유하는 것으로 밝혀졌다.

대표도 - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

PCV2 (porcine circovirus type 2)로부터의 아미노산 절편 및

PCV2 이외의 유기체로부터의 것으로서, 상기 PCV2 아미노산 절편에 결합되는 외래 아미노산 절편을 포함하는, 면역원성 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 PCV2 아미노산 절편이 개방 판독 프레임 2를 포함하는 조성물.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 PCV2 아미노산 절편이 서열번호 10과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 조성물.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 외래 아미노산 절편이 동물에의 투여 후 감염에 대한 임상적, 병리학적, 및/또는 조직병리학적 징후를 나타내는 병원체로부터 유도되는 조성물.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 외래 아미노산 절편이 상기 PCV2 아미노산 절편으로부터 별개로 검출가능한 조성물.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 외래 아미노산 절편이 상기 외래 아미노산 절편에 대해 특이적인 검정에 의해 검출가능한 조성물.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 검정이 모노클로날 항체를 포함하는 조성물.

### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 외래 아미노산 절편이, PCV2에 결합되지 않은 동일한 아미노산 절편과 비교하여 이의 면역학적 특성을 80% 이상 보유하는 조성물.

### 청구항 9

제1항에 있어서, 상기 조성물이 이의 투여를 받은 동물에서 면역학적 반응을 유도하는 조성물.

### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 면역학적 반응이 상기 외래 아미노산 절편에 대해 특이적인 조성물.

### 청구항 11

제9항에 있어서, 상기 면역학적 반응이 감염에 대한 임상적, 병리학적, 및/또는 조직병리학적 징후의 발생을 감소시키거나 증증도를 완화시키기에 충분한 조성물.

### 청구항 12

제1항에 있어서, 상기 결합이 상기 PCV2 아미노산 절편의 아미노 또는 카복실 말단에 존재하는 조성물.

### 청구항 13

제1항에 있어서, 상기 결합이 PCV2 아미노산 절편의 아미노 말단과 카복실 말단 사이의 위치에 존재하는

조성물.

#### 청구항 14

제1항에 있어서, 상기 외래 아미노산 절편이 크립토스포리듐 파르븀 (*Cryptosporidium parvum*), 돼지 인플루엔자 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 유기체로부터 유도되는 조성물.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 상기 외래 아미노산 절편이 서열번호 1 및 6으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 조성물.

#### 청구항 16

제14항에 있어서, 상기 조성물이 크립토스포리듐 파르븀, 돼지 인플루엔자 및 이들의 조합에 의한 감염의 발생 또는 중증도를 감소시키는 조성물.

#### 청구항 17

제1항에 있어서, 상기 외래 아미노산 절편이 약 8 내지 약 200개 아미노산의 길이를 갖는 조성물.

#### 청구항 18

제1항에 있어서, 애주번트, 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제, 안정화제 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 성분을 추가로 포함하는 조성물.

#### 청구항 19

백터 DNA; 및

제1 유기체 종으로부터 유도되는 DNA; 및

제2 유기체 종으로부터 유도되는 DNA

를 포함하는 발현 벡터로서,

여기서, 상기 제1 및 제2 유기체 종이 서로 상이하고, 백터 DNA가 유도되는 유기체 종과도 상이한, 발현 벡터.

#### 청구항 20

제19항에 있어서, 상기 백터 DNA가 배콜로바이러스로부터 것인 발현 벡터.

#### 청구항 21

제19항에 있어서, 상기 제1 유기체 종이 PCV2인 발현 벡터.

#### 청구항 22

제19항에 있어서, 상기 제1 유기체 종으로부터 유도되는 DNA가 PCV2 ORF2로부터의 것인 발현 벡터.

#### 청구항 23

제20항에 있어서, 상기 PCV2 ORF2 DNA가 서열번호 7과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 발현 벡터.

#### 청구항 24

제21항에 있어서, 상기 제2 유기체 종으로부터의 DNA가 이의 투여를 받은 동물에서 면역학적 반응을 유도하는 아미노산 절편을 암호화하는 발현 벡터.

#### 청구항 25

제24항에 있어서, 상기 면역학적 반응이 상기 제1 유기체 종, 상기 제2 유기체 종, 및 이들의 조합으로부터의 감염에 대한 임상적, 병리학적, 또는 조직병리학적 징후의 발생 또는 중증도를 감소시키는 발현 벡터.

#### 청구항 26

제19항에 있어서, 상기 제2 유기체 종으로부터의 DNA가 크립토스포리둠 파르븀, 이.콜라이(*E. coli*) 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 발현 벡터.

#### 청구항 27

제26항에 있어서, 상기 제2 유기체 종으로부터의 DNA가 서열번호 1 및 6으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 아미노산 절편을 암호화하는 발현 벡터.

#### 청구항 28

항원을 암호화하는 DNA를 PCV2 DNA와 조합하여 조합된 DNA 삽입물을 생성하는 단계; 및  
상기 조합된 DNA 삽입물을 발현 시스템에서 발현시키는 단계  
를 포함하는, 항원 생성 방법.

#### 청구항 29

제28항에 있어서, 상기 항원이 약 8 내지 200개 아미노산의 길이를 갖는 방법.

#### 청구항 30

제28항에 있어서, 상기 항원이 PCV2와는 상이한 유기체 종으로부터 유도되는 방법.

#### 청구항 31

제30항에 있어서, 상기 유기체 종이 크립토스포리둠 파르븀, 돼지 인플루엔자 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법.

#### 청구항 32

제28항에 있어서, 상기 항원이 서열번호 1 및 2로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 방법.

#### 청구항 33

제28항에 있어서, 상기 PCV2 DNA가 ORF2인 방법.

#### 청구항 34

제33항에 있어서, 상기 ORF2 DNA가 서열번호 7과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 방법.

#### 청구항 35

제28항에 있어서, 상기 발현 시스템이 배큘로바이러스 발현 시스템을 포함하는 방법.

#### 청구항 36

백신 또는 면역원성 조성물에서의, 제28항의 방법에 의해 발현되는 항원의 용도.

#### 청구항 37

바이러스-유사 입자로서의 PCV2 ORF2의 용도.

### 명세서

### 기술분야

#### 연관 출원

[0001]

[0002]

본원은 2007년 12월 31일자로 출원된 미국 가출원 제61/017,863호 (이의 교시 및 내용이 본원에 참조로 삽입

됨)를 우선권으로 주장한다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본원은 컴퓨터 판독가능한 포맷의 서열 목록 (이의 교시 및 내용이 본원에 참조로 삽입됨)을 포함한다.

[0005] 발명의 배경

[0006] 기술분야

[0007] 본원은 목적하는 아미노산 서열을 발현시키기 위한 벡터로서의 돼지 서코바이러스 타입 2 (porcine circovirus type 2: PCV2) 바이러스-유사 입자의 이용에 관한 것이다. 보다 특히, 본원은 병원체의 면역원성 아미노산 서열을 발현시키기위한 이러한 벡터의 이용 및 이러한 발현된 면역원성 아미노산 서열의 면역원성 조성물에서의 후속 이용에 관한 것이다. 더욱 특히, 본원은 목적하는 아미노산 서열을 발현시키기 위한 벡터로서의 PCV2로부터의 개방 판독 프레임 2 (open reading frame 2: ORF2)의 이용에 관한 것이다. 더욱더 특히, 본원은 외래 아미노산 서열의 PCV2 ORF2로의 삽입 및 ORF2 서열 및 외래 아미노산 서열의 발현 시스템에서의 후속 발현에 관한 것이다. 더욱 특히, 본원은 이러한 발현된 서열의 면역원성 조성물에서의 이용에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0008] PCV2 개방-판독 ORF2 유전자는 곤충 세포 배양으로 발현될 수 있다. 또한, PCV2 ORF2 단백질은 바이러스-유사 입자 (virus-like particle: VLP)로 조립될 것 같다고 밝혀졌다. 이러한 VLP는 본질적으로 공 PCV2 캡시드이며, 고도로 면역원성이다. 관련 펩타이드 영역을 바이러스-유사 입자로 융합시키는 첫 번째 기술이 1986년에 있었다 [참조: Delpeyroux et al. 1986. A poliovirus neutralization epitope expressed on hybrid hepatitis B surface antigen particles. Science. Jul 25;233(4762):472-5, 이의 교시 및 내용이 본원에 참조로 삽입됨].

[0009] CSL 30량체에 대해 지시된 모노클로날 항체 (3E2)가 수동 면역요법을 통해 마우스에서 크립토스포리듐 (*Cryptosporidium*) 감염에 대해 얼마간의 효능을 갖는다는 것이 밝혀졌다. 포자소체 리간드 (Circumsporozoite ligand: CSL)는 30개 아미노산 (30량체)의 면역원성 단백질 서열이다. 모노클로날 항체 3E2가 CSL로부터의 N-말단의 30개 아미노산에 있는 에피토프를 인식하는 것으로 결정되었다. 30량체의 단백질 서열은 AINGGGATLPQKLYLTPNVLTAGFAPYIGV (서열번호 1)이다. 이러한 CSL 30량체에 대한 펩타이드는 화학적 합성에 의해 생성된 후, 예방접종된 동물에서 항체 반응을 유도하기 위해 백신 제제에 사용될 수 있다. 애주번트와 조합된 화학적으로 합성된 CSL 펩타이드를 사용한 예방접종에 의해 항-CSL 30량체 면역 반응을 생성할 수 있다. 그러나, 시판 백신에서 화학적으로 합성된 CSL 펩타이드의 사용 비용이 터무니없이 비싸다.

[0010] 인플루엔자 바이러스는 A, B 및 C로 표시되는 3가지 타입으로 구분된다. 인플루엔자 타입 A 및 B는 거의 모든 겨울에 발생하고 종종 입원 및 사망에 대한 증가율과 연관되는 호흡 질환 유행병의 원인이다. 인플루엔자 타입 A 바이러스는 헤마글루티닌 (HA) 및 뉴라미니다제 (NA)로 불리는 2개의 바이러스 단백질에서의 차이에 기초하여 서브타입으로 분류된다. 인플루엔자 바이러스 매트릭스 1 (달리, M1으로 공지됨)은 어셈블리 및 버딩에 필요한 중요한 단백질이다. HA 및 NA는 인플루엔자 바이러스 M1과 상호작용하며; 세포질 테일 및 막관통 도메인을 통해 M1과 연관된다. M2 단백질은 인플루엔자 바이러스의 복제 사이클에 중요하며, 또한 고도로 선택적이며 pH-조절되고 양성자-전도 채널을 형성하는 능력 때문에 바이러스 엔벨로프의 필수적 성분이다. M2 채널은 양성자가 바이러스 내부로 들어가는 것을 가능하게 하며, 산성화는 M1 단백질과 리보핵 코어와의 상호작용을 약화시킨다.

[0011] 인플루엔자 M2-단백질은 바이러스-감염된 세포에서 풍부한 4량체의 타입 III 막관통 단백질이다. M2e는 인플루엔자 A M2-단백질의 외부 도메인이다. 사람 인플루엔자 A M2e-서열은 길이가 단지 23 내지 24개 아미노산이며, 다수의 유행병 및 2가지의 주용 범유행병의 발생을 통해 거의 변화되지 않는다. 주목할 것으로서, 비록 많은 돼지 인플루엔자 A 스트레인이 최근에 발생했지만, 돼지 인플루엔자 A 바이러스의 M2e 영역은 비교적 변화되지 않았다. 인플루엔자 A 바이러스 스트레인에서 M2e 영역 표적 서열의 보존된 특성 때문에, M2e는 인플루엔자 백신에 대한 "보편적" 항원으로 간주된다. 24량체 M2e 표적 서열에 대한 하나의 바람직한 아미노산 서열은 MSLLETVETPIRNEWGCRNDSSD (서열번호 6) (또한, M2ae1으로도 언급됨)이다. 인플루엔자 A M2e 영역 24량체에 대한 펩타이드는 화학적 합성에 의해 생성된 후, 예방접종된 동물에서 항체 반응을 유도하기 위한 백신 제제에 사용될 수 있다. 애주번트와 조합된 화학적으로 합성된 M2e 펩타이드를 사용한 예방접종에 의해 항-인플루엔자 A M2e 24량체 면역 반응을 생성할 수 있다. 그러나, 시판 백신에서 화학적으로 합성된 M2e 펩타이드의 사용 비

용은 더무니없이 비싸다.

[0012] 아미노산 서열 또는 단백질을 발현시키기 위한 시스템 또는 수단 (machinery)으로서 PCV2 ORF2의 바이러스-유사 입자 특성의 이용이 제안된 바 없었으며, PCV2 ORF2와 관련되지 않거나 외래인 아미노산 서열 또는 단백질을 발현시키기 위한 시스템 또는 수단으로서 상기 이용은 더욱 제안된 바 없다. 따라서, 30량체 CSL 펩타이드 또는 24량체 인플루엔자 A M2e 펩타이드의 대표적인 예를 포함한 면역학적 관련 펩타이드를 생성하기 위한 벡터로서의 PCV2 ORF2의 바이러스-유사 입자 특성의 이용 및 이어 이러한 펩타이드의 면역원성 조성물 또는 백신에서의 이용도 제안된 바 없었다.

[0013] 발명의 요약

[0014] 본 발명은 PCV2 ORF2 내의 절편 또는 이 절편에 결합되는 천연 PCV2 ORF2에 대해 외래인 절편을 포함하나 이들의 면역원성 또는 항원성을 여전히 보유하는 바이러스-유사 입자로서 PCV2 ORF2를 사용할 수 있음을 입증한다. 구체적으로, 이러한 사용을 입증하는 예가 본원에 제공된다. 바람직한 양태에서, PCV2 ORF2에 대해 외래인 핵산 서열 절편은 ORF2 서열에 결합되거나 통합되고 발현 시스템에서 발현될 수 있다. 유리하게는, 발현된 아미노산 절편은 이의 면역학적 특성 또는 항원성을 보유한다. 바람직한 양태에서, PCV2 ORF2 및 외래 아미노산 서열 모두 이들의 면역학적 특성을 보유한다. 외래 서열은 아미노 또는 카복실 말단 (terminus 또는 end) 또는 이들 사이의 임의의 위치에서 PCV2 ORF2 서열에 결합되거나 통합될 수 있다. 발현된 외래 아미노산 서열은 길이가 바람직하게는 적어도 8개 아미노산, 보다 바람직하게는 8 내지 200개 아미노산이므로, 삽입된 외래 핵산 절편의 길이는 적어도 24개 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 24 내지 600개 뉴클레오타이드이다. 임의의 특정 핵산 또는 아미노산 절편에 대해 바람직한 길이는 당업자에 의해 결정될 수 있을 것이나 바람직하게는 아미노산 절편의 투여 후 동물에서 유도되는 면역 반응에 기초하여 선택될 것이다. 바람직한 외래 아미노산 절편은 병원체 (이의 절편이 면역 반응을 유도한다)에 의한 감염에 대한 임상적 및/또는 병리학적인 또는 조직병리학적인 징후의 발생을 감소시키거나 중증도를 완화시킬 것이다. 바람직하게는, 절편은 동물에서 면역 반응을 유도하는 것으로 공지된 아미노산 절편과 적어도 80%, 보다 바람직하게는 85%, 보다 더욱 바람직하게는 90%, 보다 더욱 바람직하게는 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 가장 바람직하게는 적어도 99%의 서열 상동성을 가질 것이다. 보다 더욱 바람직하게는, 절편은 동물에서 면역 반응을 유도하는 것으로 공지된 아미노산 절편과 적어도 80%, 보다 바람직하게는 85%, 보다 더욱 바람직하게는 90%, 보다 더욱 바람직하게는 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 가장 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가질 것이다. 바람직하게는, 아미노산 절편은, 아미노산 절편이 이를 필요로 하는 동물에 투여되는 경우, 아미노산 절편이 유도되는 병원체로부터의 감염에 대해 임상적, 병리학적인 또는 조직병리학적인 징후의 발생을 감소시키거나 중증도를 완화시키는 면역 반응을 유도할 것이다. 따라서, 본 발명의 하나의 양상은 특정 병원체에 의한 감염에 대한 임상적, 병리학적인, 및/또는 조직병리학적인 징후의 발생을 감소시키거나 중증도를 완화시키는 아미노산 절편 또는 아미노산 절편을 발현시키는 핵산 서열을 확인한다. 또한, 이들 아미노산 절편은, 벡터, 바람직하게는 PCV2 ORF2로 삽입되고, 발현 시스템, 바람직하게는 배칼로바이러스 발현 시스템에서 발현되며, 회수된 후, 마지막으로 이를 필요로 하는 동물에 투여되는 아미노산 절편을 발현시키는, 핵산 서열을 유추하는데 사용될 수 있다. 일부 바람직한 양태에서, 발현된 생성물은 온전한 상태이고 외래 아미노산 절편은 발현된 서열로부터 분리되지 않으며, 다른 바람직한 양태에서, 외래 아미노산 절편은 발현된 서열로부터 제거되거나 절단된다. 따라서, 후술되는 CSL 서열의 경우, 외래 CSL 서열은 이의 발현 후 ORF2 서열의 일부로서 남아 이를 필요로 하는 동물에 키메라 서열로서 투여되거나, 외래 CSL 서열은 ORF2 서열로부터 절단되고 이를 필요로 하는 동물에 별도로 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0015] 하나의 바람직한 양태에서, 본 발명은 예로서 CSL 30량체를 사용하는 특정 적용을 제공한다. CSL 30량체는 이를 캐리어 단백질에 융합시킴으로써 비용-효과적이고 면역학적으로 관련된 방식으로 본원에서 제공된다. 이는 이의 발현이 PCV2 ORF2 서열의 카복실 또는 아미노 말단 상의 "테일"로서 인-프레임 결합된 CSL 30량체를 생성하거나 PCV2 ORF2 서열 내에 인-프레임 통합되는 방식으로 PCV2 ORF2 CSL 배칼로바이러스를 생성함으로써 수행된다. 본원에서 그 예는 PCV2 ORF2 단백질의 카복실 말단에서 CSL 30량체 테일을 결합하나, 당업자는 이러한 위치가, ORF2 서열 내에서뿐만 아니라 PCV2 ORF2의 아미노 말단에서 결합되는 돼지 인플루엔자 아미노산 절편의 예로써 추가로 입증되는 바와 같이, 필요에 따라 조절될 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다. 따라서, 곤충 세포가 PCV2 ORF2 CSL 배칼로바이러스로 감염되는 경우, 또한 "테일"로서 CSL 30량체를 포함하는 키메라 PCV2 ORF2 VLP가 생성될 것이다. 이러한 PCV2 ORF2가 CSL 30량체에 대한 캐리어로서 사용될 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 CSL 30량체의 PCV2 ORF2에의 융합이 면역학적으로 적합하며 실시되었다는 것을 입증한다. 곤충 세포에서 키메라 PCV2 ORF2 CSL 발현에 대한 면역학적 적합성은 PCV2 ORF2 단백질에 대해 지시되는 항체 및



또한 CSL 30량체에 대해 지시되는 항체에 의해 검출되었다.

- [0017] 이전의 작업들은 PCV2 ORF2 단백질이 곤충 세포 배양에서 최소량의 하류 프로세싱으로 매우 고수준으로 발현될 수 있다는 것을 입증하였다. 본원은 PCV2 ORF2 캡시드가 CSL 30량체에 대한 캐리어로서 사용되도록 CSL 30량체가 PCV2 ORF2 단백질의 카복실 말단에 인-프레임 "테일"로서 융합될 수 있다는 것을 입증한다. 키메릭 PCV2 ORF2 CSL 단백질은 또한 곤충 세포 배양에서 최소량의 하류 프로세싱으로 고수준으로 발현되어 비용-효과적인 백신 제제에서 항원으로 사용될 수 있다. 유리하게는, 비록 CSL 30량체에 대해 지시되는 모노클로날 항체 3E2가 마우스에서 수동 면역요법을 통해 크립토스포리듐 (*Cryptosporidium*) 감염에 대해 얼마간의 효능을 제공하는 것으로 밝혀졌지만, CSL 30량체에 대해 지시되는 폴리클로날 항체 반응이 크립토스포리듐 감염에 대해 보다 강력하고 효과적인 반응을 유도할 수 있을 것 같다.
- [0018] 키메릭 PCV2 ORF2 CSL 항원에 대한 몇몇 잠재적 사용은 개별적 예방접종, 수동 예방접종, 및 혈청 요법을 포함한다. 개별 예방접종을 위해, 키메릭 PCV2 ORF2 CSL 항원은 크립토스포리듐에 대한 보호적인 체액성 및/또는 세포-매개된 반응을 유도하도록 개별 동물을 예방접종하기 위해 이를 필요로 하는 동물에 투여된다. 수동 예방접종을 위해, 키메릭 PCV2 ORF2 CSL 항원은 수유하는 자식에게 수동적으로 전달될 수 있는 CSL 30량체에 대해 지시되는 강력한 체액성 및/또는 세포-매개된 반응을 유도하도록 투여된다. 이러한 수동 모체 면역은 결국 자식에서 크립토스포리듐 감염을 감소시키거나 방지할 것이다. 혈청 요법을 위해, 키메릭 PCV2 ORF2 CSL 항원은 혈청 요법에 사용될 수 있는 CSL 30량체에 대해 지시되는 강력한 체액성 반응을 유도하도록 투여된다. 커다란 동물 (즉, 말)은 항-CSL 30량체 항혈청을 생성하기 위해 키메릭 PCV2 ORF2 CSL로 과면역시킬 수 있다. 항혈청은 크립토스포리듐 감염에 의해 발병되는 임상적 질환을 감소시키기 위해 임상적으로 병에 걸린 동물에 경구적으로 투여될 수 있다.
- [0019] 본 발명에 기초하여, 당업자는 또한 CSL 30량체 및 돼지 인플루엔자 24량체와 같은 아미노산 절편이 바이러스-유사 입자 캐리어 (즉, PCV1, 파보바이러스, 엔테로바이러스, 및 캡시드 구조를 갖는 다른 바이러스)와 융합될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 또한, PCV2 ORF2 VLP는 외래 DNA (즉, 관련 항원을 암호화하거나 유전자 요법에 사용하기 위한 DNA 백신)를 패키징하고 운반하는데 사용될 수 있다.
- [0020] 본 발명에 대한 하나의 추가의 양상은 항원성 또는 면역원성 조성물 또는 백신에서 본 발명의 방법을 이용하여 발현되는 아미노산의 용도이다. 이러한 조성물 또는 백신은 애주번트, 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제, 및/또는 안정화제와 추가로 배합될 수 있다.
- [0021] 본원에서 사용되는 "애주번트"는 수산화알루미늄 및 인산알루미늄, 사포닌, 예를 들어 Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), 유중수 에멀전, 수중유 에멀전, 수중유중수 에멀전을 포함할 수 있다. 에멀전은 특히 경질 유동 파라핀 오일 (유립 약전 타입); 이소프레노이드 오일, 예를 들어 특히 이소부텐 또는 데켄과 같은 알칸의 올리고머화로부터 생성되는 스쿠알란 또는 스쿠알렌 오일; 선형 알킬기를 포함하는 산 또는 알콜의 에스테르, 보다 특히 식물성유, 에틸 올레에이트, 프로필렌 글리콜 디-(카프릴레이트/카프레이트), 글리세릴 트리-(카프릴레이트/카프레이트) 또는 프로필렌 글리콜 디올레에이트; 측쇄된 지방산 또는 알콜의 에스테르, 특히 이소스테아르산 에스테르에 기초될 수 있다. 상기 오일은 에멀전을 형성하기 위해 유화제와 배합하여 사용된다. 유화제는 바람직하게는 비이온성 계면활성제, 특히 소르비탄의 에스테르, 만니이드의 에스테르 (예: 무수 만니톨 올레에이트), 글리콜의 에스테르, 폴리글리콜의 에스테르, 프로필렌 글리콜의 에스테르, 및 올레산, 이소스테아르산, 리시놀레산 또는 하이드록시스테아르산의 에스테르 (이는 임의로 에톡실화될 수 있다), 및 폴리옥시프로필렌-폴리옥시에틸렌 공중합체 블럭, 특히 플루로닉 (Pluronic) 제품, 특히 L121이다 [참조: Hunter et al., The Theory and Practical Application of Adjuvants (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). JohnWiley and Sons, NY, pp51-94 (1995) 및 Todd et al., Vaccine 15:564-570 (1997)].
- [0022] 예를 들어, 문헌 [참조: "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" edited by M. Powell and M. Newman, Plenum Press, 1995]의 147면에 기술된 SPT 에멀전 및 이 문헌의 183면에 기술된 에멀전 MF59를 사용할 수 있다.
- [0023] 애주번트에 대한 추가의 예는 아크릴산 또는 메타크릴산의 중합체 및 말레산 무수물과 알케닐 유도체의 공중합체 중에서 선택되는 화합물이다. 유리한 애주번트 화합물은 특히 슈가 또는 폴리알콜의 폴리알케닐 에테르와 가교-결합된 아크릴산 또는 메타크릴산의 중합체이다. 이들 화합물은 카보머로 알려져 있다 [참조: Phameuropa Vol. 8, No. 2, June 1996]. 당업자는 또한 적어도 3개의 하이드록실 그룹 (바람직하게는 8개 미만)을 갖고 적어도 3개의 하이드록실 그룹의 수소 원자가 적어도 2개의 탄소 원자를 갖는 불포화된 지방족 라디칼로 대체된

폴리하이드록실화된 화합물과 가교-결합된 아크릴 중합체를 기술하는 미국 특허 제2,909,462호를 언급할 수 있다. 바람직한 라디칼은 2 내지 4개의 탄소 원자를 포함하는 것, 예를 들어 비닐, 알릴 및 기타 에틸렌계 불포화 그룹을 갖는 것이다. 불포화된 라디칼은 다른 치환체, 예를 들어 메틸을 포함할 수 있다. Carbopol (BF Goodrich, Ohio, USA)로 시판되는 제품이 이러한 애주버트를 포함하는 조성물에 특히 적합하다. 이들은 알릴 공급원 또는 알릴 펜타에리트리톨과 가교-결합된다. 이들 중합체를 물에 용해시키면, 면역원성, 면역학적 또는 백신 조성물이 혼입될 애주버트 용액을 생성하도록 바람직하게는 생리학적 pH로 중화된 산성 용액을 만든다.

[0024] 추가의 적합한 애주버트는, 이로 제한됨이 없이, RIBI 애주버트 시스템 (Ribi Inc.), 블릭 공중합체 (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), 모노포스포릴 지질 A, 아브리딘 지질-아민 애주버트, 이.콜라이로부터의 열-민감 장독소 (제조합 등), 콜레라 독소, IMS 1314 또는 무라밀 디펩타이드를 포함한다.

[0025] 또한, 상기 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 "약제학적으로 허용되는 담체"는 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 안정화제, 희석제, 보존제, 항세균제, 항진균제, 등장화제, 흡수 지연제 등을 포함한다.

[0026] 본원에서 사용되는 "보호제"는 항-미생물적 활성제, 예를 들어 겐타미신, 메르티올레이트 등을 언급한다. 특히, 보호제의 첨가는 다수-용량 조성물의 제조에 가장 바람직하다. 이들 항-미생물적 활성제는 임의의 미생물 오염으로부터 목적하는 조성물을 보호하거나 목적 조성물에서 임의의 미생물 성장을 억제하기에 효과적인 농도로 첨가된다.

[0027] 또한, 상기 방법은 또한 제품의 저장수명을 증가시키고/시키거나 유지하기 위한 임의의 안정화제, 예를 들어 사카라이드, 트레할로즈, 만니톨, 사카로즈 등을 포함할 수 있다.

[0028] 본원 및 이에 제공되는 공정에서 사용되는 PCV2 ORF2 DNA는 PCV2 분리물 내의 고도로 보존된 도메인이며, 따라서 PCV2 ORF2는 PCV2 ORF2 DNA의 공급원으로 효과적이다. 바람직한 ORF2 서열은 서열번호 7로 제공된다.

[0029] 본 발명의 방법을 이용하여 생성되는 아미노산 서열은 바람직하게는 천연 또는 "천연 발생" 서열과 동일하다. "천연 발생" 서열은 이들의 자연 상태에서 발견되는 서열이다. 예를 들어, 천연 발생 PCV2 ORF2 DNA는, 돼지의 PCV2로부터 분리되거나 확인된 전장의 PCV2 ORF2 서열을 서열-분석할 때 발견되는 DNA 서열이다. 그러나, 이러한 서열이 자연 그대로의 서열과 비교하여 20% 정도의 서열 상동성으로 변형되거나 변화될 수 있으며 면역학적 조성물에서 이들을 유용하게 하는 항원적 특성을 여전히 보유할 수 있다는 것이 당업자에 의해 믿어진다. 물론, 변화는, 자연 그대로의 서열과 비교하여, 바람직하게는 15% 미만, 보다 바람직하게는 6 내지 10%, 더욱 바람직하게는 5% 미만, 더욱 더 바람직하게는 4% 미만, 더 바람직하게는 3% 미만, 보다 더욱 더 바람직하게는 2% 미만, 가장 바람직하게는 1% 미만이다. 면역학적 조성물의 항원적 특성은 당해 기술 분야에 공지된 통상의 방법으로 평가될 수 있다. 또한, 변형된 항원의 항원적 특성은, 변형된 항원이 이의 자연 그대로 또는 천연 발생 형태의 항원과 비교하여 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 보다 바람직하게는 90%의 보호 면역을 부여하는 경우 여전히 보유된다. 그러한 것으로서, 보호 면역은 일반적으로 병원체에 의한 감염에 대한 임상적, 병리학적, 및/또는 조직병리학적 징후의 발생 또는 중증도를 감소시킬 것이다. 임상적, 병리학적, 및/또는 조직병리학적 징후의 발생 또는 중증도의 "감소 (decrease 또는 reduction)"는, 발현된 아미노산 서열이 유도되는 병원체로 감염시, 발현된 서열의 투여를 받지 않은 "대조군" 동물과 비교하여, 발현된 아미노산 서열의 투여를 받은 동물에서 임상적 징후의 발생 또는 중증도가 감소되는 것을 의미한다. 이와 관련해서, 용어 "감소"는 상기 정의된 대조군과 비교하여 적어도 10%, 바람직하게는 25%, 보다 바람직하게는 50%, 가장 바람직하게는 100% 이상의 감소를 의미한다. 본원에서 사용되는 "면역원성 조성물"은 면역학적 반응을 유도하는 아미노산 서열 또는 단백질에 대한 세포성 및/또는 항체-매개된 면역 반응과 더불어 숙주에서 "면역학적 반응"을 유도하는 아미노산 또는 단백질을 의미한다. 바람직하게는, 이러한 면역원성 조성물은 선택된 병원체에 대한 감염 및 이와 연관된 임상적 징후에 대한 보호적 면역을 부여할 수 있다. 일부 형태에서, 자연 그대로의 아미노산 서열 또는 단백질의 면역원성 부분은 이러한 조성물에서 항원성 성분으로 사용된다.

[0030] 본원에서 사용되는 "면역원성 부분"은 자연 그대로의 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드의 절단된 및/또는 치환된 형태 또는 단편을 언급한다. 바람직하게는, 이러한 절단된 및/또는 치환된 형태 또는 단편은 전장의 폴리펩타이드로부터의 적어도 8개의 인접한 아미노산을 포함할 것이다. 보다 바람직하게는, 절단되거나 치환된 형태 또는 단편은 전장의 천연 발생 폴리펩타이드로부터의 적어도 10개, 바람직하게는 적어도 15개, 보다 바람직하게는 적어도 19개의 인접한 아미노산을 가질 것이다. 또한, 이러한 서열은 보다 큰 단편 또는 절단된 형태의 일부일 수 있는 것으로 믿어진다.



[0031]

당해 기술 분야에서 알려진 바와 같이, "서열 동일성"은 2개 이상의 폴리펩타이드 서열 또는 2개 이상의 폴리뉴클레오타이드 서열, 즉 참조 서열 및 이와 비교되는 소정의 서열 사이의 관련성을 언급한다. 서열 동일성은, 소정의 서열의 스트링과 참조 서열의 스트링 (string) 간의 매칭에 의해 측정시, 서열들을 최고의 서열 유사성을 생성하도록 최적으로 정렬시킨 후 소정의 서열을 참조 서열과 비교함으로써 결정된다. 이러한 정렬시, 서열 동일성은 하나하나의 위치마다 확인되며, 예를 들어 특정 위치에서 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기가 동일하면 서열은 그 위치에서 "동일"하다. 이어서, 이러한 위치 동일성에 대한 총 수를 참조 서열의 뉴클레오타이드 또는 잔기의 총 수로 나누어 서열 동일성 (%)을 구한다. 서열 동일성은, 이로 제한됨이 없이, 하기 문헌에 기술된 것을 포함하여 공지된 방법으로 쉽게 계산될 수 있다 [참조: Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New York (1988), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); 및 Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988), 이의 교시가 본원에 참조로 삽입됨]. 서열 동일성을 측정하는 바람직한 방법은 시험되는 서열들 간에 가장 큰 매치가 이루어지도록 고안된다. 서열 동일성을 측정하는 방법은 소정의 서열들 사이의 서열 동일성을 측정하는 일반적으로 이용가능한 컴퓨터 프로그램으로 체계화된다. 이러한 프로그램의 예는, 이로 제한됨이 없이, GCG 프로그램 패키지 [참조: Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research, 12(1):387 (1984)], BLASTP, BLASTN 및 FASTA [참조: Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol, 215:403-410 (1990)]를 포함한다. BLASTX 프로그램은 NCBI 및 다른 공급원으로부터 공개적으로 이용가능하다 [참조: BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol, 215:403-410 (1990), 이의 교시가 본원에 참조로 삽입됨]. 이들 프로그램은 소정의 서열과 참조 서열 사이에 최고 수준의 서열 동일성을 생성하도록 디폴트 갭 웨이트 (default gap weight)를 이용하여 서열을 최적으로 정렬한다. 일례로서, 참조 뉴클레오타이드 서열에 대해, 예를 들어 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95%의 "서열 동일성"을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드란, 소정의 폴리뉴클레오타이드 서열이 참조 뉴클레오타이드 서열의 100개 뉴클레오타이드당 15개 이하, 바람직하게는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개 이하의 포인트 돌연변이를 포함할 수 있다는 것을 예외로 하여, 소정의 폴리뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열이 참조 서열과 동일하다는 것이다. 달리는, 참조 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95%의 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드에서, 참조 서열의 뉴클레오타이드의 15% 이하, 바람직하게는 10%, 보다 바람직하게는 5%가 결실되거나 다른 뉴클레오타이드로 치환될 수 있거나, 참조 서열의 총 뉴클레오타이드에 대해 15% 이하, 바람직하게는 10%, 보다 바람직하게는 5%의 뉴클레오타이드가 참조 서열로 삽입될 수 있다. 참조 서열에 대한 이러한 돌연변이는 참조 뉴클레오타이드 서열의 5' 또는 3' 말단 위치에서 또는 참조 서열의 뉴클레오타이드 또는 참조 서열 내의 하나 이상의 인접한 그룹의 뉴클레오타이드 사이에 개별적으로 산재된 이들 말단 위치 사이의 어떠한 위치에서도 일어날 수 있다. 유사하게, 참조 아미노산 서열에 대해, 예를 들어 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 서열 동일성을 갖는 소정의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드란, 소정의 폴리펩타이드 서열이 참조 아미노산 서열의 100개 아미노산당 15개 이하, 바람직하게는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개 이하의 변형을 포함할 수 있다는 것을 예외로 하여, 폴리펩타이드의 소정의 아미노산 서열이 참조 서열과 동일하다는 것이다. 달리는, 참조 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95%의 서열 동일성을 갖는 소정의 폴리펩타이드 서열을 수득하게 위해, 참조 서열의 아미노산 잔기의 15% 이하, 바람직하게는 10%, 보다 바람직하게는 5%가 결실되거나 다른 뉴클레오타이드로 치환될 수 있거나, 참조 서열의 총 아미노산 잔기에 대해 15% 이하, 바람직하게는 10%, 보다 바람직하게는 5%의 아미노산이 참조 서열로 삽입될 수 있다. 참조 서열에 대한 이러한 변형은 참조 아미노산 서열의 아미노 또는 카복실 말단 위치에서 또는 참조 서열의 잔기 또는 참조 서열 내의 하나 이상의 인접한 그룹의 잔기에 개별적으로 산재된 이들 말단 위치 사이의 어떠한 위치에서도 일어날 수 있다. 바람직하게는, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환이란 점에서 상이하다. 그러나, 보존적 아미노산 치환은 서열 동일성을 측정하는 경우에는 매치에 포함되지 않는다.

[0032]

본원에서 사용되는 "서열 상동성"은 2개 서열의 관련성을 측정하는 방법을 언급한다. 서열 상동성을 측정하기 위해, 2개 이상의 서열이 최적으로 정렬되고, 필요한 경우, 갭이 도입된다. 그러나, "서열 동일성"과는 대조적으로, 서열 상동성 측정시, 보존적 아미노산 치환이 매치로서 계산된다. 달리, 참조 서열과 95% 서열 상동성을 갖는 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 수득하기 위해서, 참조 서열의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드의 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95%가 또 다른 아미노산 또는 뉴클레오타이드와 매치되거나 보

존적 치환을 포함해야 하거나, 참조 서열 내의 총 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드의 15% 이하, 바람직하게는 10% 이하, 보다 바람직하게는 5% 이하의 아미노산 또는 뉴클레오타이드의 수 (보존적 치환은 포함하지 않음)가 참조 서열 내로 삽입될 수 있다. 바람직하게는, 상동성 서열은 적어도 50개, 보다 바람직하게는 100개, 더욱 바람직하게는 250개, 보다 더욱 바람직하게는 500개 뉴클레오타이드의 길이를 포함한다.

[0033] "보존적 치환"은 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드가 크기, 소수성 등을 포함한 특징 또는 특성이 유사한 또 다른 아미노산 또는 뉴클레오타이드로 치환되어 전체 작용성은 유의하게 변화하지 않는 것을 가리킨다.

[0034] "분리된"은 이의 천연 상태에서부터 "인간의 조작으로" 변화된 것을 의미하며, 즉 이것이 자연 상태에서 일어나는 경우에는 최초 환경으로부터 변화되거나 떼어내 지거나 둘 모두이다. 예를 들어, 살아있는 유기체에 천연적으로 존재하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 "분리"되지 않으나, 자연 상태의 공존 물질로부터 구분된 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 본원에서 사용되는 바와 같이 "분리"된다.

[0035] 당업자는 본원에 기술된 조성물이 공지된 것으로서 주사가능하고 생리학적으로 허용되며 멸균된 용액을 포함할 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다. 비경구 주사 또는 주입용의 즉시 사용가능한 용액을 제조하기 위해서, 수성의 등장성 용액, 예를 들어 식염수 또는 상응하는 혈장 단백질 용액이 용이하게 이용가능하다. 또한, 본 발명의 면역원성 및 백신 조성물은 회석제, 등장화제, 안정화제, 또는 애주번트를 포함할 수 있다. 회석제는 물, 식염수, 텍스트로즈, 에탄올, 글리세롤 등을 포함할 수 있다. 등장화제는, 특히 염화나트륨, 텍스트로즈, 만니톨, 소르비톨, 및 락토스를 포함할 수 있다. 안정화제는, 특히 알부민 및 에틸렌디아민테트라아세트산의 알칼리 염을 포함한다. 적합한 애주번트는 상술된 것들이다.

[0036] 면역원성 조성물은 하나 이상의 다른 면역조절제, 예를 들어 인터루킨, 인터페론 또는 기타 사이토킨을 추가로 포함할 수 있다. 면역원성 조성물은 또한 겐타마이신 및 메르티올레이트를 포함할 수 있다.

[0037] 추가의 양상은 본원에서 제공되는 단백질에 대한 적어도 1 용량의 면역원성 조성물을 포함하는 용기에 관한 것이다. 상기 용기는 목적하는 단백질 또는 아미노산 서열의 면역원성 조성물을 1 내지 250 용량, 바람직하게는 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 또는 250 용량을 포함할 수 있다.

[0038] 추가의 양상은 상술된 용기, 및 단백질에 대한 적어도 1 용량의 면역원성 조성물을 동물에게 투여하기 위한 정보를 포함하는 지침 매뉴얼을 포함하는 키트에 관한 것이다. 또한, 추가의 양상에 따라, 상기 지침 매뉴얼은 아미노산 또는 단백질에 대한 적어도 1 용량의 면역원성 조성물의 2차 또는 추가의 투여에 관한 정보를 포함한다. 바람직하게는, 지침 매뉴얼은 또한 면역 자극제를 투여하기 위한 정보를 포함한다. 본원에서 사용되는 "면역 자극제"는 바람직하게는 특정 면역 반응, 예를 들어 특정 병원체에 대한 면역 반응을 개시하거나 증가시키지 않으면서 일반적인 면역 반응을 일으킬 수 있는 임의의 작용물 또는 조성물을 의미한다. 바람직한 키트에서, 면역 자극제를 적합한 용량으로 투여하는 것이 추가로 지시된다. 또한, 키트는 적어도 1 용량의 면역 자극제를 포함하는 용기를 포함할 수 있다.

[0039] 그러나, 본 발명의 방법을 이용하여 생성되는 항원은, 동물에게 투여되는 경우, 항원과 관련된 감염에 대한 면역 반응을 유도, 자극 또는 증진시킬 수 있는 적어도 하나의 항원을 포함하는 물질에 대한 임의의 조성물을 언급하는 것이다. 본원에서 사용되는 용어 "면역원성 단백질", "면역원성 폴리펩타이드" 또는 "면역원성 아미노산 서열"은 상기 면역원성 단백질, 면역원성 폴리펩타이드 또는 면역원성 아미노산 서열을 포함하는 병원체에 대해 숙주에서 면역 또는 면역학적 반응을 유발하는 임의의 아미노산 서열을 언급한다. 본원에서 사용되는 "면역원성 단백질", "면역원성 폴리펩타이드" 또는 "면역원성 아미노산 서열"은 임의의 단백질의 전장 서열, 이의 유사체 또는 이의 면역원성 단편을 포함한다. "면역원성 단편"은 하나 이상의 에피토프를 포함하여 관련 병원체에 대해 면역학적 반응을 유발하는 단백질의 단편을 의미한다. 본 발명의 하나의 바람직한 양태에서, 단백질계 항원의 면역원성 단편은 ORF2 서열에 대한 서열에 결합된다. 이들 단백질계 항원은 길이가 바람직하게는 적어도 8개 아미노산, 보다 바람직하게는 8 내지 200개 아미노산이다. 이러한 단편은 당해 기술 분야에 공지된 다수의 에피토프 맵핑을 이용하여 확인될 수 있다 [참조: Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey]. 예를 들어, 선형 에피토프는, 예를 들어 동시에 고체 지지체 상에서 다수의 펩타이드 (단백질 분자의 일부에 상응)를 합성하고 지지체에 결합되어 있는 펩타이드를 항체와 반응시킴으로써 결정될 수 있다. 이러한 기술은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 문헌 [참조: U.S. Patent No. 4,708,871; Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715]에 기술되어 있다. 마찬가지로, 구조적 에피토프도 아미노산을, 예를 들어 X-선 결정학 및 2-차원 핵자기공명에 의해 공간 구조를 측정함으로써 쉽게 확인된다 [참조: Epitope Mapping Protocols, 상기 참조]. 또한, 합성 항원은 정의 중에, 예를 들어 폴리에피토

프, 플랭킹 에피토프 및 기타 재조합 또는 합성적으로 유도된 항원을 포함한다 [참조: Bergmann et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777-2781; Bergmann et al. (1996), J. Immunol. 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), Immunol. and Cell Biol. 75:402-408; Gardner et al., (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, June 28-July 3, 1998].

- [0040] 조성물 또는 백신에 대한 "면역학적 또는 면역 반응"은 관심물의 조성물 또는 백신에 대한 세포성 및/또는 항체-매개된 면역 반응이 숙주에서 전개되는 것이다. 통상적으로, "면역 반응"은, 이로 제한됨이 없이, 하나 이상의 하기 효과를 포함한다: 관심물의 조성물 또는 백신에 포함되는 항원 또는 항원들에 대해 특이적으로 지시되는 항체, B 세포, 헬퍼 T 세포, 서프레스 T 세포, 및/또는 세포독성 T 세포 및/또는 yδ T 세포의 생성 또는 활성화. 바람직하게는, 숙주는 치료적 또는 보호적 면역학적 반응을 나타내어 새로운 감염에 대한 내성이 증진되고/되거나 질환에 대한 임상적 중증도가 감소될 것이다. 이러한 보호는 상술된 숙주 감염과 관련된 증상 (임상적, 병리학적, 및 조직 병리학적 증상)의 발생 또는 중증도의 감소 (상기 증상의 완전한 결여를 포함)에 의해 입증될 것이다.
- [0041] 본원에서 사용되는 용어 "면역학적 활성 성분"은 상기 성분이 투여되는 동물에서 면역 반응을 유도하거나 자극시키는 성분을 의미한다. 바람직한 양태에 따라, 면역 반응은 상기 성분 또는 상기 성분을 포함하는 미생물에 대해 지시된다. 추가의 바람직한 양태에 따라, 면역학적 활성 성분은 약화된 미생물 (변형된 생 바이러스 (MLV)를 포함), 사멸 미생물 또는 미생물의 적어도 면역학적 활성부이다.
- [0042] 본원에서 사용되는 "미생물의 면역학적 활성부"는 상기 성분이 투여되는 동물에서 면역 반응을 유도하거나 자극하는 적어도 하나의 항원을 포함하는 미생물의 단백질-, 슈가- 및/또는 당단백질 포함 부분을 의미한다. 바람직한 양태에 따라, 면역 반응은 미생물의 면역학적 활성부 또는 면역학적 활성부를 포함하는 미생물에 대해 지시된다.
- [0043] 또한, 본 발명의 면역원성 및 백신 조성물은 하나 이상의 수의학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 "수의학적으로 허용되는 담체"는 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 애주번트, 안정화제, 희석제, 보존제, 항세균제, 항진균제, 등장화제, 흡수지연제 등을 포함한다.
- [0044] 본 발명에 따른 조성물은 피내, 기관내 또는 질내 적용될 수 있다. 조성물은 바람직하게는 근육내 또는 비내 적용될 수 있다. 동물의 신체에서는, 정맥내 주사를 통해 또는 표적 조직으로의 직접적 주입에 의해 상술된 바와 같이 약제학적 조성물을 적용하는 것이 유리한 것으로 입증될 수 있다. 전신 적용을 위해서는, 정맥내, 혈관내, 근육내, 비내, 동맥내, 복강내, 경구, 또는 경막내 경로가 바람직하다. 국소 적용은 피하, 피내, 피부내, 심장내, 엽내, 골수내, 폐내 또는 치료될 조직 (연결 조직, 골 조직, 근육 조직, 신경 조직, 상피 조직) 내에 또는 부근에 직접적으로 수행될 수 있다. 치료에 대한 목적하는 지속 기간 및 효율에 따라, 본 발명에 따른 조성물은 1회 또는 수회, 또한 간헐적으로, 예를 들어 수일, 수주, 수개월 동안 매일, 및 상이한 용량으로 투여될 수 있다.
- [0045] "외래" 아미노산 절편 또는 "외래" DNA 절편은 상이한 종으로부터 유도되는 절편을 언급한다. 예를 들어, CSL 30량체는 PCV2 ORF2에 대해 "외래"이고, 배콜로바이러스에 대해 외래이다.
- [0046] "아미노 말단" 또는 "카복실 말단"은 각각 아미노 말단 또는 카복실 말단을 의미한다. 아미노산과 관련하여, 아미노 또는 카복실 말단에 결합된 임의의 외래 아미노산 절편은 비-외래 서열의 제1 아미노산 앞 또는 마지막 아미노산 뒤에 있을 것이다. 예를 들어, M2ae1 절편은 PCV2 ORF2의 아미노 말단에 결합되는 경우, M2ae1 절편은 첨부된 도면에서 나타나 있는 바와 같이 PCV2 ORF2의 제1 아미노산 앞에 보인다.
- [0047] 절편이 공지된 병원체로부터 "유도"되거나 이와 "연관"되는 경우, 이는 절편의 기원을 언급하는 것이다. 예를 들어, CSL 30량체는 크립토스포리듐 파르븀 (*Cryptosporidium parvum*)으로부터 "유도"되거나 이와 "연관"되고, M2ae1은 돼지 인플루엔자로부터 "유도"되거나 이와 "연관"된다.
- [0048] "유도" 또는 "유발"은 원인을 의미한다. 예를 들어, CSL 30량체의 투여는 이러한 투여를 받은 동물에서 면역 반응을 "유도"하거나 "유발"한다.
- [0049] "임상적" 징후는 증상과 같이 살아있는 동물로부터 직접적으로 관측될 수 있는 병원체로부터의 감염의 징후를 언급한다. 대표적인 예는 선택되는 병원체에 의존적일 것이나, 콧물, 줄음, 기침, 고열, 체중 증가 또는 감소, 탈수, 설사, 부기, 절뚝거리기 등을 포함할 수 있다.
- [0050] "병리학적" 징후는 현미경 또는 분자 수준으로 생화학 실험을 통해 또는 부검에 대해 육안으로 관측가능한 감염



에 대한 징후를 언급한다.

[0051] "조직병리학적" 징후는 감염으로부터 생기는 조직 변화의 징후를 언급한다.

[0052] 따라서, 본 발명의 하나의 양상은 PCV2로부터의 아미노산 절편 및 PCV2 이외의 유기체로부터의 것으로서 PCV2 아미노산 절편에 결합되는 외래 아미노산 절편을 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다. 하나의 바람직한 PCV2 아미노산 절편은 개방 판독 프레임 2 또는 이의 면역원성 부분을 포함한다. 바람직한 형태에서, PCV2 아미노산 절편은 서열번호 7과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는다. 바람직하게는, 외래 아미노산 절편은 동물에의 투여 후 감염에 대한 임상적, 병리학적, 및/또는 조직병리학적 징후를 나타내는 병원체로부터 유도된다. 보다 바람직하게는, 외래 아미노산 서열은 공지된 병원체와 연관되거나 이로부터 유도되는 항원이다. 유리하게는, 외래 아미노산 절편은 PCV2 아미노산 절편으로부터 별개로 검출가능하며, 이는 검출 시스템, 검정, 모노클로날 항체, 면역블롯 등이 PCV2 아미노산 절편의 존재 하에서 외래 아미노산 절편의 존재를 확인하고 PCV2 아미노산 절편과 외래 아미노산 절편을 식별 또는 구분할 수 있다는 것을 의미한다. 바람직하게는, 외래 아미노산 절편은 외래 아미노산 절편에 대해 특이적인 검정 또는 시험에 의해 검출가능하다. 하나의 바람직한 검정 또는 시험은 외래 아미노산 절편에 대해 특이적인 모노클로날 항체를 포함한다. 바람직하게는, 외래 아미노산 절편은 PCV2에 결합되지 않은 동일한 아미노산 절편과 비교하여 이의 면역학적 특성을 80% 이상 보유한다. 본 조성물은 이의 투여를 받은 동물에서 면역 반응을 유도할 수 있음을 특징으로 한다. 이러한 면역학적 반응은 외래 아미노산 절편 또는 PCV2 아미노산 절편, 또는 이들 모두에 대해 특이적일 수 있다. 바람직하게는, 면역 반응은 감염에 대한 임상적, 병리학적, 및/또는 조직병리학적 징후의 발생을 감소시키거나 중증도를 완화시키기에 충분하다. 본원의 실시예에 의해 입증되는 바와 같이, 외래 아미노산 서열의 PCV2 서열과의 결합은 PCV2 아미노산 절편의 아미노 또는 카복실 말단에 또는 PCV2 아미노산 절편의 아미노 말단과 카복실 말단 사이의 임의의 위치 (point)에 존재할 수 있다. 외래 아미노산 절편은 크립토스포리둠 파르븀, 돼지 인플루엔자 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 유기체로부터 유도된다. 바람직한 형태에서, 외래 아미노산 절편은 천연 서열의 항원적 특성을 보유하고 서열번호 1 및 6으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는다. 이러한 조성물은 외래 아미노산 절편이 유도되거나 연관된 유기체에 의한 감염의 발생 또는 중증도를 감소시킬 것이다. 예를 들어, 서열번호 1 및 6에 대해, 이들 외래 아미노산 절편은 각각 크립토스포리둠 파르븀 및 돼지 인플루엔자로부터 유도되거나 이와 연관되며, 서열번호 1 및 6이 동물에 투여되는 것에 따라 크립토스포리둠 파르븀 또는 돼지 인플루엔자의 발생 또는 중증도를 감소시킬 것이다. 유리하게는, PCV2의 발생 또는 중증도는 또한 외래 아미노산 절편 및 PCV2 아미노산 절편을 포함하는 조성물이 온전한 상태이거나 외래 절편이 PCV2 절편으로부터 절단된 후 공동-투여되는 경우, 감소될 것이다. 일부 바람직한 형태에서, 본 조성물은 애주번트, 약제학적으로 허용되는 담체, 보호제, 안정화제 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 성분을 추가로 포함할 것이다.

[0053] 본 발명의 또 다른 양상으로, 벡터 DNA; 및 제1 유기체 종으로부터 유도되는 DNA; 및 제2 유기체 종으로부터 유도되는 DNA를 포함하며, 제1 및 제2 유기체 종이 서로 상이하고, 벡터 DNA가 유도되는 유기체 종과도 상이한, 발현 벡터가 유도된다. 일부 바람직한 형태에서, 발현 벡터는 배콜로바이러스로부터의 것이다. 본 발명의 하나의 양태는 제1 유기체 종으로서 PCV2를 포함한다. PCV2가 제1 유기체 종인 경우, 이로부터 유도되는 하나의 바람직한 DNA 절편은 PCV2 ORF2이다. 바람직한 형태에서, PCV2 ORF2 DNA는 서열번호 7과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 제2 유기체 종으로부터의 DNA는 이의 투여를 받은 동물에서 면역 반응을 유도하는 아미노산 절편을 암호화한다. 동물에게 병원성인 임의의 유기체가 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있다. 바람직하게는, 유기체는 이를 필요로 하는 동물에 투여시 면역학적 반응을 유도하는 아미노산 절편을 가질 것이다. 보다 바람직하게는, 발현되는 아미노산 서열은 공지된 병원체와 관련된 항원이다. 바람직한 형태에서, 면역학적 반응은 제1 유기체 종, 제2 유기체 종, 및 이들 모두로부터의 감염에 대한 임상적, 병리학적, 또는 조직병리학적 징후의 발생 또는 중증도를 감소시키는데 효과적일 것이다. 본 발명의 하나의 양태에서, 제2 유기체 종으로부터의 DNA는 크립토스포리둠 파르븀, 이.콜라이, 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 제2 유기체 종으로부터의 DNA 절편에 대한 대표적인 예는 서열번호 1 및 6으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 천연 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖고 항원적 특성을 보유하는 아미노산 절편을 암호화한다.

[0054] 본 발명의 또 다른 양상은 항원을 생성하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 본 방법은 항원을 암호화하는 DNA를 PCV2 DNA와 조합하여 조합된 DNA 삽입물을 생성하는 단계; 및 상기 조합된 DNA 삽입물을 발현 시스템에서 발현시키는 단계를 포함한다. 바람직한 형태에서, 항원의 길이는 약 8 내지 200개 아미노산이다. 바람직하게는, PCV2 DNA와 조합되는 항원-암호화 DNA는 PCV2와는 상이한 유기체 종으로부터 유도된다. 임의의 유기체 종이 사

용될 수 있으나, 바람직하게는 발현되는 아미노산 서열은 공지된 병원체와 관련된 항원이다. 대표적인 예는 크립토포리듬 파르부, 돼지 인플루엔자 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 유기체 종을 포함한다. 크립토포리듬 파르부 및 돼지 인플루엔자가 유기체 종으로서 사용되는 경우, 바람직한 아미노산 절편은 천연 서열의 항원 특성을 보유하고 서열번호 1 및 6으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 가질 것이다. 바람직한 PCV2 서열은 ORF2 및, 특히, 서열번호 7 및 천연 서열의 항원 특성을 보유하고 서열번호 7과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 서열을 포함할 것이다. 하나의 바람직한 발현 시스템은 배큘로바이러스 발현 시스템을 포함한다.

[0055] 본 발명의 또 다른 양상은 백신 또는 면역원성 조성물에서 상술된 방법에 의해 발현되는 항원의 용도를 제공한다. 바람직하게는, 항원은 공지된 병원체와 연관된다. 이러한 면역원성 조성물 또는 백신은 애주번트, 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제, 안정화제 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 성분을 추가로 포함할 수 있다.

[0056] 본 발명의 추가의 양상은 바이러스-유사 입자로서의 PCV2 ORF2의 용도를 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

[0057] 도 1a는, 토끼 항-CSL 혈청으로 염색된, ORF2-CSL 배큘로바이러스로 감염된 SF 세포의 사진이다.  
 도 1b는, 돼지 항-PCV2 혈청으로 염색된, ORF2-CSL 배큘로바이러스로 감염된 SF 세포의 사진이다.  
 도 1c는, 염소 항-토끼-FITC로 염색된, ORF2-CSL 배큘로바이러스로 감염된 SF 세포의 사진이다.  
 도 2는 배큘로바이러스 감염 세포로부터의 ORF2-CSL의 발현을 확인하는 SDS PAGE 분석이다.  
 도 3은 항-PCV2의 토끼 면역전 0일 혈청 및 토끼 면역후 84일 혈청에서 ORF2, CSL 펩타이드 및 ORF2-CSL에 대한 스폿 블롯 결과이다.  
 도 4a는 ORF2-CSL 단백질을 나타내는 웨스턴 블롯 사진이다.  
 도 4b는 ORF2 및 ORF2-CSL 단백질을 나타내는 쿠마시 염색된 블롯이다.  
 도 5는 내부 AscI 제한 부위를 갖는 PCV2 ORF2 서열 및 내부 AscI 제한 부위를 갖지 않는 PCV2 ORF2 서열을 비교한 것이다.  
 도 6은 내부 M2ae1 아미노산 서열을 갖는 PCV2 ORF2 서열 및 내부 M2ae1 아미노산 서열을 갖지 않는 PCV2 ORF2 서열을 비교한 것이다.  
 도 7은 아미노 M2ae1 아미노산 서열을 갖는 PCV2 ORF2 서열 및 아미노 M2ae1 아미노산 서열을 갖지 않는 PCV2 ORF2 서열을 비교한 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 하기 실시예는 본 발명에 따른 바람직한 재료 및 절차를 제시한다. 그러나, 이들 실시예는 단지 설명을 위한 것으로서, 결코 본 발명의 전체 범위에 대해 제한을 두려는 것이 아니다.

#### [0059] 실시예 1

#### [0060] 재료 및 방법:

#### [0061] CSL 30량체 역해독

[0062] CSL 30량체 펩타이드의 아미노산 서열은 AINGGGATLPQKLYLTPNVLTAGFAPYIGV (서열번호 1)이다. 이러한 30량체 아미노산 서열은 드로소필라 (*Drosophila*)에 대한 최적 코돈 사용을 이용해 뉴클레오타이드 서열로 역해독되었다. ORF2 유전자의 3' 말단 + CSL 30량체에 대한 뉴클레오타이드 서열과 매칭되는 상보적 프라이머 서열을 합성하였다.

#### [0063] 프라이머 디자인



- [0064] PCV2-5-HA 프라이머 (서열번호 2)
- [0065] 5'-TGGATCCGCCATGACGTATCC-3' (PCV2 ORF2 ATG 출발 부위에 밑줄 그어짐)
- [0066] L-PCV2CSL 프라이머 (서열번호 3)
- 5'-  
AGATCTACACGCCGATGTAGGGGGCGAAGCCGGCGGTCAGCACGTTGGGGGTCAGGT  
ACA  
GCTTCTGGGGCAGGGTGGCGCCGCCCGCCGTTGATGGCGGGTTCAAGTGGGGGGTCTTT  
AA-3'
- [0067]
- [0068] C-말단 CSL 테일을 갖는 PCV2 ORF2의 PCR
- [0069] pGEM-T Easy 플라스미드 (Promega)에 미리 클로닝된 PCV2 ORF2 유전자를 PCR 반응을 위한 주형으로 사용하였으며, Amplitaq Gold (Applied Biosystems) 및 PCV2-5-HA 및 L-PCV2CSL 프라이머와 혼합하였다. PCR 반응물을 10 분 동안 94℃로 가열하였다. 이어서, PCR 반응을 30초 동안 94℃, 30초 동안 40℃ 및 1분 동안 72℃의 40 사이클을 통해 진행하였다. 10분 동안 72℃의 최종 사이클 후 PCR 사이클을 완료하였다. PCV2 ORF2 CSL PCR 생성물을 아가로스 겔 전기영동으로 가시화하였다. PCR 생성물을 겔로부터 정제하고, pGEM-T Easy 클로닝 벡터에 결합시킨 후, DH5 α 이.콜라이 컴피턴트 세포로 형질전환시키고, 암피실린 내성에 대해 스크리닝하였다. 형질 전환된 콜로니를 암피실린을 갖는 LB 브로쓰 3 ml를 접종시키는데 사용하고, 37℃에서 밤새 성장시켰다. 밤새 배양물 1.5 ml 분취물을 원심분리로 수거하고, Qiagen Mini-Prep 플라스미드 키트로 플라스미드 DNA를 추출하였다. 이어서, 정제된 플라스미드 DNA를 디데옥시뉴클레오타이드 서열분석으로 확인하였다.
- [0070] PCV2 ORF2 CSL 유전자를 pGEM-T Easy 플라스미드로부터 제한효소 BamHI 및 NotI으로 분해시켜 절단해내고, 배콜로바이러스 트랜스퍼 벡터 pVL1393에 결합시켰다. 이어서, 생성된 PCV2 ORF2 CDL/pVL1393 플라스미드를 형질감염에서의 후속 이용을 위해 Qiagen Mini-Prep 플라스미드 키트를 사용하여 정제하였다.
- [0071] PCV2 ORF2 CSL 유전자를 포함하는 재조합 배콜로바이러스의 생성
- [0072] PCV2 ORF2 CDL/pVL1393 플라스미드 및 DiamondBac<sup>®</sup> 선형화 배콜로바이러스 DNA (Sigma)를 27℃에서 5시간 동안 ESCORT 형질감염 시약 (Sigma)을 사용하여 Sf9 곤충 세포로 공동형질감염시켰다. 형질감염 배지를 제거하고, 형질감염된 세포를 약하게 세척하고, 배지를 보충한 후, 27℃에서 인큐베이션하였다. 5일 후, 생성된 재조합 배콜로바이러스를 포함하는 세포 상청액을 수거하고 4℃에서 저장하였다. 잔류하는 형질감염된 Sf9 세포를 아세트:메탄올로 고정시키고, 돼지 항-PCV2 항혈청을 사용하는 면역형광 검정 (IFA)에 사용하여 형질감염된 세포에서 PCV2 ORF2의 발현을 확인하였다.
- [0073] 수거된 PCV2 ORF2 CSL 재조합 배콜로바이러스 상청액을 바이러스 스톱의 생성 전에 Sf9 세포에 대해 플라크 정제하였다.
- [0074] 키메라 PCV2 ORF2 CSL (C-말단 테일로서 CSL 30량체와 융합된 PCV2 ORF2 유전자)의 가시화 및 면역학적 검출
- [0075] IFA를 PCV2 ORF2, H5HHA 또는 H7HA 항원의 검출을 위해 형질감염된 Sf9 세포에 대해 수행하였다. 재료는 고정된 6-웰 플레이트, 돼지 항-PCV2, 닭 항-H5 및 항-H7, 염소-닭 FITC, 염소 α-닭 FITC, 토끼 α-돼지 FITC, 1xPBS 및 글리세롤 (50:50)을 포함한다. Sf9 세포를 6-웰 플레이트에 고정시키고 1xPBS로 세정하였다. 2 ml의 PBS를 각각의 웰에 남겼다. 20 μl의 돼지 항-PCV2를 형질감염되지 않은 Sf9 세포 웰, PCV2 ORF2-HA 형질감염된 웰, 및 PCV2 ORF2 CSL 형질감염된 웰에 가하였다. 알파 PCV2 혈청은 1:100 희석이었다. 플레이트를 선회시켜 (swirl) 혼합하였다. 1:100 희석의 닭 α-H5 및 α-H7을 상기한 바와 같이 형질감염되지 않은 Sf9 세포 웰, H7HA 형질감염된 웰, H7HA 형질감염된 웰 및 H5HA 형질감염된 웰에 가하였다. 플레이트를 다시 선회시켜 혼합하였다. 플레이트를 1시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 1차 항체 용액을 제거하였다. 이어서, 웰을 PBS로 3회 세척하고, 마지막 세척물을 제거시켰다. 2 ml의 PBS를 각각의 웰에 가하였다. 이어서, 20 ml의 토끼 α-돼지를 1차 PCV2 항혈청을 갖는 웰에 가하고, 함께 혼합하였다. 이어서, 20 ml의 염소 α-닭 FITC를 웰에 가하고, 1차 닭 혈청으로 처리하고, 혼합하였다. 이들을 1시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. FITC 용액을

제거하고, PBS로 3회 세척하였다. 최종 세척물을 제거하였다. 이어서, 1 ml의 글리세롤을 각각의 웰에 가하고, 과량을 손목으로 살짝 때려서 제거하였다. 이어서, 각각의 웰의 구체적인 형광을 관측하였다. 그 결과, PCV2 ORF2-HA 및 CSL 재조합물과 같이, H5HA 재조합 배칼로바이러스가 생성되었다.

## [0076] 실시예 2

[0077] 배칼로바이러스-감염된 SF+ 세포 (샘플 070)으로부터 ORF2-CSL의 발현 분석

### [0078] 재료 및 방법:

[0079] 배칼로바이러스-감염된 SF+ 세포의 샘플 (펠릿 및 상청액)을 이들 배칼로바이러스-감염된 SF+ 세포로부터 ORF2-CSL을 분석하기 위해 96, 120 및 144시간에 수집하였다. 하기 절차를 각각의 샘플에 적용하였다. SF+ 세포 샘플을 해동시키고, 상청액을 제거하였다. 펠릿을 200  $\mu$ l의 100mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.3에 재현탁시키고, 위아래로 피펫팅하여 혼합하였다. 이어서, 샘플을 실온 (약 25 내지 30℃)에서 30분 동안 놔두었다. 이어서, 샘플을 4℃에서 20,000xg로 2분 동안 원심분리시켰다. 상청액 및 펠릿의 바이카보네이트 용해물을 분리시키고, 전체 샘플을 약 4℃에서 얼음에 저장하였다.

[0080] 이어서, 펠릿의 바이카보네이트 용해물 및 상청액 샘플을 MOPS 완충액 중의 10% Bis-Tris 겔 상에서 SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE) 분석하였다. 15  $\mu$ l의 각각의 펠릿 바이카보네이트 용해물 및 20  $\mu$ l의 각각의 상청액 샘플을 이들 각각에게 할당된 레인의 겔에 로딩하였다. 레인 1은 10 kDa 마커를 포함하였다. 레인 2는 96시간 샘플로부터의 펠릿에 대한 NaHCO<sub>3</sub> 용해물을 포함하였다. 레인 3는 120시간 샘플로부터의 펠릿에 대한 NaHCO<sub>3</sub> 용해물을 포함하였다. 레인 4는 144시간 샘플로부터의 펠릿에 대한 NaHCO<sub>3</sub> 용해물을 포함하였다. 레인 5는 96시간 샘플로부터의 상청액을 포함하였다. 레인 6은 120시간 샘플로부터의 상청액을 포함하였다. 레인 7은 144시간 샘플로부터의 상청액을 포함하였다. 레인 8은 대조군으로 작용할 변형되지 않은 ORF2 20  $\mu$ l를 포함하였다. 겔에 대한 결과가 도 2에 도시된다.

### [0081] 결과:

[0082] 96, 120 및 144시간 샘플 각각으로부터의 펠릿에 대한 바이카보네이트 용해물을 포함한 레인 2, 3 및 4는 ORF2-CSL의 발현을 분명히 나타내었다. 이러한 결과는 ORF2-CSL이 새로운 배칼로바이러스 제작물로부터 실제로 발현된다는 것을 제시한다. ORF2-CSL은 ORF2보다 약 3 kDa 큰 것으로 평가되며, 관측된 분자량은 이러한 평가와 일치한다. 또한, ORF2-CSL은 120시간 및 144시간 샘플의 상청액을 포함한 레인 6 및 7에 존재하는 것으로 관측되었으며, 144시간 샘플에서 그 존재가 더욱 강하였다. ORF2-CSL이 시간 경과에 따라 상청액에 출현하는 것이 관측되었다는 사실은, ORF2의 바이러스-유사-입자 (VLP) 구조가 여전히 충분히 온전하다는 것을 제시한다.

## [0083] 실시예 3

### [0084] 재료 및 방법:

[0085] 본 실시예는 면역전 및 면역후 토끼 혈청 및 돼지 항-PCV2 혈청을 사용한 ORF2, ORF2-CSL, 및 CSL 펩타이드의 스폿 블롯 (Spot Blot) 분석을 나타낸다. 3개의 단백질이 본 실시예에 사용되었다: 표준 ORF2 단백질, CSL 펩타이드 및 감염 후 144시간의 배칼로바이러스-감염된 SF+ 세포로부터의 ORF2-CSL 바이카보네이트 용해물 펠릿. 5  $\mu$ l의 각각의 단백질 샘플을 한 장의 니트로셀룰로즈에 일렬로 스폿팅하고, 각각의 스폿을 표지하였다. 이러한 과정을 3회 반복하여, 각각의 단백질 샘플로부터 하나의 스폿을 포함하는 (총 3개의 스폿) 동일하게 스폿팅된 3장의 니트로셀룰로즈를 생성하였다. 각각의 스폿 블롯을 건조시킨 후, 약 50 ml의 TTBS + 2% 분유 (w/v) 중에서 1시간 이상 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 막을 1차 항체와 인큐베이션하였다. 제1 니트로셀룰로즈 부분 (piece)을 1시간 동안 TTBS + 2% 분유 중에 1:100으로 희석된 돼지 항-PCV2 혈청과 함께 인큐베이션 (블롯팅)하였다. 제2 니트로셀룰로즈 부분을 1시간 동안 TTBS + 2% 분유 중에 1:200으로 희석된 토끼 면역전 혈청과 함께 인큐베이션 (블롯팅)하였다. 제3 니트로셀룰로즈 부분을 1시간 동안 TTBS + 2% 분유 중에 1:200으로 희석된 토끼 면역후 혈청과 함께 인큐베이션 (블롯팅)하였다.

[0086] 각각의 블롯을 TTBS (1x TBS + 0.05% Tween20, 새로이 제조됨)로 2분 동안 3회 세척하였다. 200 ml의 1M

Tris, pH 8를 292.2g NaCl에 가하여 TBS 세척물을 제조하고, pH를 HCl로 7.4로 조절한 후, 용액을 물 (적당량)을 가해 총 용적을 1 L가 되게 하고, 여과물을 멸균시켰다. 세척 후, 막을 2차 항체와 함께 인큐베이션하였다. 제1 니트로셀룰로즈 부분을 1시간 동안 TTBS + 2% 분유 중에 1:1000으로 희석된 염소 항-돼지-HRP와 함께 인큐베이션하였다. 제2 니트로셀룰로즈 부분을 1시간 동안 TTBS + 2% 분유 중에 1:1000으로 희석된 염소 항-토끼-HRP와 함께 인큐베이션하였다. 제3 니트로셀룰로즈 부분을 1시간 동안 TTBS + 2% 분유 중에 1:1000으로 희석된 염소 항-토끼-HRP와 함께 인큐베이션하였다. 이어서, 각각의 블롯을 TTBS로 2분 동안 2회 세척한 후, PBS (10x PBS 1L)로 2분 동안 1회 세척하였다. 0.96 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (일염기성) 무수물을 13.1 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (이염기성) 무수물 및 87.7 g NaCl에 가해 PBS를 제조하고, 혼합물을 물에 용해시킨 후, pH를 HCl로 7.4로 조절하며, 용액을 1 L가 되게 한 후, 여과물을 멸균시켰다.

[0087] 이어서, 10 ml의 Opt-2CN 기질을 각각의 블롯에 가하고, 약 5분 미만 동안 전개시켰다. 블롯을 각각 물로 세정하여 반응을 정지시키고, 분석하였다. 스폿 블롯에 대한 결과를 도 3에 볼 수 있다.

[0088] 결과:

[0089] ORF2 및 ORF2-CSL를 니트로셀룰로즈 부분에서 돼지 항-PCV2 혈청과 반응하였으며, 이는 ORF2-CSL의 ORF2 부분이 구조적으로 온전하다는 것을 나타낸다. 제2 니트로셀룰로즈 부분으로부터의 결과는 ORF2-CSL이 또한 토끼 면역전 혈청과 반응한다는 것을 나타낸다. 제3 니트로셀룰로즈로부터의 결과는 ORF2-CSL의 CSL 부분이 토끼 면역후 혈청과 반응하므로 예측된 바와 같다 (구조적으로 온전하다)는 것을 제시한다. 또한, 토끼 면역후 혈청에 의한 CSL 펩타이드와의 반응성 (면역전 혈청 또는 항-PCV2 혈청에 의해서는 반응성 없음)은 면역후 혈청에서 CSL 반응의 특이성을 확증한다. 이들 자료는 CSL 펩타이드가 ORF2와의 융합 단백질로서 발현된다는 것을 강력히 지시한다.

[0090] **실시예 4**

[0091] 웨스턴 블롯

[0092] 재료 및 방법:

[0093] 본 실시예는, 토끼 면역후 혈청을 사용한, ORF2 및 감염 후 144시간의 배칼로바이러스-감염된 SF+ 세포로부터의 ORF2-CSL 펩릿 및 상청액에 대한 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다. 단백질 샘플을 MOPS 완충액 중의 10% Bis-Tris 겔 상에서 SDS-PAGE 분석을 수행하였다. 2개의 레플리케이트 샘플 세트를 동일한 겔에서 전개시켰다. 레인 1은 10 kDa 마커를 포함하였다. 레인 2는 예비-염색된 마커를 포함하였다. 레인 3은 감염 후 144시간의 배칼로바이러스 감염된 SF+ 세포로부터의 ORF2-CSL 바이카보네이트 용해물 펩릿을 포함하였다. 레인 4는 동일 샘플로부터의 ORF2-CSL 상청액을 포함하였다. 레인 5는 표준 ORF2 단백질 샘플을 포함하였다. SDS-PAGE 후, 단백질을 Novex Blot Module (Novex; San Diego, CA)에서 겔로부터 폴리비닐리덴 디플루오라이드 (PVDF) 막으로 전기영동적으로 이동시켰다 (약 1시간 초과 동안 일정한 30 V). 트랜스블롯팅 후, 샘플 레인을 약 50 ml TTBS + 2% 분유 중에서 1시간 이상 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 블롯을 2개의 레플리케이트 블롯으로 잘랐다. 하나는 1시간 동안 TTBS + 2% 분유 중에 1:200으로 희석된 1차 항체인 토끼 면역후 혈청과 인큐베이션/블롯팅하고, 다른 하나는 건조시키고 염색시켜 총 단백질 프로필을 나타내었다. 제2 블롯에 대한 결과를 도 4B에서 볼 수 있다.

[0094] 이어서, 제1 블롯을 TTBS (1x TBS + 0.05% Tween20, 새로이 제조됨)로 2분 동안 3회 세척하였다. 이어서, 블롯을 1시간 동안 TTBS + 2% 분유 중에 1:1000으로 희석된 제2 항체인 염소 항-토끼-HRP와 함께 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 블롯을 TTBS (1x TBS + 0.05% Tween20, 새로이 제조됨)로 2분 동안 2회, PBS로 2분 동안 1회 세척하였다. 이어서, 블롯을 10 ml Opti-4CN 기질을 사용하여 가시화하여 약 5분 미만 동안 블롯을 전개시켰다. 블롯을 물로 세척하여 진행을 정지시키고 분석하였다. 이러한 블롯에 대한 결과를 도 4A에서 볼 수 있다.

[0095]

[0096] **실시예 5**

- [0097] 본 실시예는 인플루엔자 M2ae 영역의 24개 아미노산에 대한 인-프레임 삽입을 갖는 PCV2 ORF2 VLP를 생성한다.
- [0098] 재료 및 방법:
- [0099] AscI을 갖는 M2ae1 24량체
- [0100] M2ae1 24량체의 아미노산 서열은 MSLLETVETPIRNEWGCRNDSSD (서열번호 6)이다. M2ae1 24개 아미노산 서열을 드로소필라 (*Drosophila*)에 대한 최적 코돈 사용을 이용해 이의 뉴클레오타이드 서열로 역해독하였다. PCR을 수행하여 M2ae1 암호화 영역으로 플랭킹 AscI 제한 효소 부위를 추가하였다.
- [0101] PCV2 ORF2 암호화 영역에 AscI 제한 부위의 도입
- [0102] 부위-지시된 돌연변이유발을 이용하여, AscI 제한 효소 부위를 PCV2 ORF2 (서열번호 7)의 암호화 영역에 도입하였다 (도 5 참조). 도 5에 나타난 바와 같이, AscI 부위의 도입은 PCV2 ORF2 암호화 영역으로 2개의 아미노산 변화: Y36W (아미노산 위치 36에서 타이로신을 트립토판으로 함, 전하가 없지만 극성인 아미노산을 또 다른 전하가 없지만 극성인 아미노산으로 대체) 및 W38A (아미노산 위치 38에서 트립토판을 알라닌으로 함, 전하가 없는 극성 아미노산을 전하가 없는 비극성 아미노산으로 대체)를 도입하였다.(서열번호 8).
- [0103] PCV2 ORF2 암호화 영역으로 M2ae1의 삽입
- [0104] PCV2 ORF2으로 M2ae1 영역의 삽입에 대한 표시가 도 6에 나타나 있다 (서열번호 9). 간단히 설명하면, 표준 분자 생물학 방법을 이용하여, M2ae1-AscI 영역을 배큘로바이러스 트랜스퍼 벡터인 pVL1393의 PCV2 ORF2 유전자의 AscI 부위로 클로닝하였다. 이어서, 생성된 PCV2 ORF2 내부 M2ae1/pVL1393 (A-34로 지칭) 플라스미드를 형질감염에서의 후속 이용을 위해 Qiagen Mini-Prep 플라스미드 키트를 사용하여 정제하였다.
- [0105] 내부 M2ae1을 갖는 PCV2 ORF2를 포함하는 재조합 배큘로바이러스의 생성
- [0106] A-34 PCV2 ORF2 내부 M2ae1/pVL1393 플라스미드 및 DiamondBac<sup>®</sup> 선형화된 배큘로바이러스 DNA (Sigma)를 28℃에서 5시간 동안 ESCORT 형질감염 시약 (Sigma)를 사용하여 Sf9 곤충 세포로 공동형질감염시켰다. 형질감염 배지를 제거한 후, 형질감염된 세포를 약하게 세척하고, 배지를 보충한 후, 27 ℃에서 인큐베이션하였다. 5일 후, 생성된 재조합 배큘로바이러스를 포함하는 세포 상청액을 수거하고 4 ℃에서 저장하였다. 잔류하는 형질감염된 Sf9 세포를 아세트산:메탄올로 고정시키고, 항-인플루엔자 A M2 모노클로날 항체 14C2를 사용한 면역형광 검정 (IFA)에 사용하여 M2ae1 영역 형질감염된 Sf9 세포의 발현을 확인하였다. PCV2 ORF2 및 내부 M2ae1 절편을 포함하는 발현된 키메라 단백질의 서열이 서열번호 11에 제공된다.
- [0107] 이어서, 수거된 A-34 M2ae1 ORF2 PCV2 배큘로바이러스 DB 상청액을 바이러스 스톡 물질의 생성 전에 Sf9 세포에 대한 제한 회석에 의해 정제하였다.
- [0108] 내부 M2ae1를 갖는 PCV2 ORF2의 면역학적 검출
- [0109] A-34 M2ae1 ORF2 PCV2 배큘로바이러스 DB-감염된 Sf9 세포에서 M2ae1 발현은 IFA에 의해 앞서 확인되었다. 그러나, PCV2 ORF2와 함께 M2ae1의 발현을 추가로 확인하기 위한 수단으로서, 배큘로바이러스-감염된 곤충 세포 배양물로부터의 PCV2 ORF2 내부 M2ae1 수거된 상청액에 대한 면역블롯을 수행하였다.
- [0110] 간단히 설명하면, 배큘로바이러스-감염된 곤충 세포 배양물로부터의 수거된 상청액을 PVDF 막에 블롯팅하고, PCV2 ORF2 및/또는 M2ae1 항원의 존재를 면역블롯으로 시험하였다. PCV2 ORF2의 면역블롯 검출을 사용되는 1차 항체는 항-PCV2 ORF2 모노클로날 항체 6C4-2-4A3-5D10 및 정제된 돼지 항-PCV2 ORF2 IgG였다. M2ae1의 면역블롯 검출을 위해 사용되는 1차 항체는 항-M2 모노클로날 항체 14C2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 및 돼지 항-M2aeC5 혈청이었다. 면역블롯에 사용되는 각각의 2차 항체는 HRP-표지된 염소 항-마우스 접합체 및 염소-항-돼지 접합체였다. Opti-4CN 기질 (BioRad)를 면역블롯에 대한 비색 검출에 사용하였다. 면역블롯은 PCV2



ORF2 및 M2ae1 항원의 존재를 보였다.

[0111] 본 실시예에 사용되는 이러한 재료 및 방법이 하기에서 더욱 상세히 기술된다:

[0112] 재료 및 방법:

[0113] 플라스미드 정제를 위해, QIAprep Spin MiniPrep (QIAGEN, Gaithersburg, MD)를 사용하였으며, 제작자의 프로토콜에 따랐다. 간단히 설명하면, 1.5 ml의 배양물을 14,000 rpm으로 1분 동안 펠릿화시켰다. 상청액을 버리고, 펠릿화 절차를 반복하며, 상청액을 다시 버렸다. 펠릿을 250  $\mu$ l의 완충액 P1에 재구성하고, 250  $\mu$ l의 완충액 P2에 가한 후, 역위 (inversion)에 의해 혼합하였다. 이어서, 350  $\mu$ l의 완충액 N3을 가하고, 역위에 의해 혼합한 후, 10분 동안 14,000 rpm으로 회전시켰다. 상청액을 수집관의 QIAprep 스피ن 컬럼에 옮기고, 60초 동안 14,000 rpm으로 회전시킨 후, 플로우 쓰루 (flow through)를 버리고, 컬럼을 재조립하였다. 이어서, 750  $\mu$ l의 완충액 PE를 가하고, 60초 동안 14,000 rpm으로 회전시킨 후, 플로우 쓰루를 버리고, 컬럼을 재조립하였다. 컬럼을 1분 동안 14,000 rpm으로 회전시켜 이를 건조시킨 후, 컬럼을 새로운 1.5 ml 튜브에 옮겼다. 마지막으로, 50  $\mu$ l의 H<sub>2</sub>O를 가하고, 1분 동안 실온에서 인큐베이션한 후, 컬럼을 버리기 전에 1분 동안 14,000 rpm으로 회전시켰다.

[0114] M2ae1 단편을 자르고, 정제하며, 결합시키기 위해서, 제한 분해를 New England Biolabs (Ipswich, MA) 제품 및 절차를 이용해 수행하였다. 간단히 설명하면, 6  $\mu$ l의 New England Biolabs 완충액 4, 49  $\mu$ l의 DNA, 및 5  $\mu$ l의 AscI를 600  $\mu$ l 원심분리 튜브에서 함께 혼합하였다. 상기 튜브를 1시간 동안 37 °C에서 인큐베이션하고, 각각의 튜브에 3  $\mu$ l의 6X 로딩 염료를 가한 후, 잘 흔들었다. 이어서, 반응물을 60분 동안 약 100 V에서 수행되는 1.5% 아가로스 겔에 로딩한 후, 겔을 사진찍거나 스캐닝하였다. 목적하는 밴드를 겔로부터 절단해내고, 1.5 ml 원심분리 튜브에 넣은 후, 10 mg의 겔 슬라이스 당 10  $\mu$ l의 막 결합 용액을 가하였다. 이를 볼텍싱하고 겔이 완전히 용해될 때까지 50 내지 65 °C에서 인큐베이션하였다. 미니 컬럼을 수집관에 삽입하고, 제조된 DNA를 컬럼 어셈블리에 옮겼다. 이를 1분 동안 실온에서 인큐베이션한 후, 1분 동안 14,000 rpm으로 원심분리하고, 플로우 쓰루를 버렸다. 세척 단계는 700  $\mu$ l의 막 세척 용액을 가하고, 1분 동안 14,000 rpm으로 원심분리하며, 플로우 쓰루를 버리고, 500  $\mu$ l의 막 세척 용액을 가한 후, 5분 동안 14,000 rpm으로 원심분리하고, 플로우 쓰루를 버리며, 1분 동안 14,000 rpm으로 뚜껑을 열고 재원심분리시켜 막을 건조시키는 것으로 이루어졌다. 용출 단계는 미니 컬럼을 1.5 ml 원심분리 튜브에 옮기고, 50  $\mu$ l의 뉴클레아제-비함유 H<sub>2</sub>O를 가한 후, 1분 동안 실온에서 인큐베이션하며, 1분 동안 14,000 rpm으로 원심분리한 후, 컬럼을 버리고, 후속 사용을 위해 -20 °C에서 저장하는 것으로 이루어졌다.

[0115] 결합 반응 (1)은 1  $\mu$ l의 ORF2-AscI PVL1393 벡터, 7  $\mu$ l의 M2ae1 삽입물, 1  $\mu$ l의 10X 결합 완충액, 및 1  $\mu$ l의 T-4 DNA 리가제를 0.5 ml 마이크로퓨지 튜브에서 혼합함으로써 수행하였다. 이를 4 °C에서 주말이 끝날 때까지 인큐베이션하였다.

[0116] M2ae1/AscI-ORF2-PVL1393의 형질전환 (형질전환 1) 및 M2ae1 절편의 재결합을 통상의 프로토콜을 이용해 수행하였다. 간단히 설명하면, Max Effic 컴피턴트 DHSx 세포를 얼음 상에서 해동시키고, 반응당 50  $\mu$ l를 17 x 100 mm pp 팔콘 튜브 (Falcon tube)에 옮겼다. 여분의 세포를 EtOH/드라이아이스 조에서 재동결시켰다. 이어서, 2  $\mu$ l의 결합 반응물 1을 세포에 가하고, 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션한 후, 정확히 45초 동안 정확히 42 °C에서 세포를 열 쇼크처리하였다. 튜브를 2분 동안 얼음에 두고, 950  $\mu$ l SOC를 가한 후, 약 225 rpm으로 진탕시키면서 1시간 동안 37 °C에서 인큐베이션하였다. 이어서, 50 및 200  $\mu$ l 분취물을 역위된 (inverted) LB 및 CIX에 스프레딩하고, 밤새 37 °C에서 인큐베이션하였다.

[0117] M2ae1을 재결합시키기 위한 결합 반응 (2)을 0.5 ml 마이크로퓨지 튜브에서 1  $\mu$ l의 AscI PVL1393 벡터, 7  $\mu$ l의 농축된 M2ae1 삽입물, 1  $\mu$ l의 10X 결합 완충액 및 1  $\mu$ l의 T-4 DNA 리가제를 혼합함으로써 수행하였다. 이를 4 °C에서 인큐베이션하였다.

[0118] 농축된 M2ae1/AscI-ORF2-PVL1393를 세포에 형질전환시키기 위해, 형질전환 반응 (2)을 통상의 방법으로 수행하였다. 간단히 설명하면, Max Effic 컴피턴트 DHSx 세포를 얼음 상에서 해동시키고, 반응당 50  $\mu$ l를 17 x 100 mm pp 팔콘 튜브에 옮겼다. 여분의 세포를 EtOH/드라이아이스 조에서 재동결시켰다. 이어서, 2  $\mu$ l의 결합 반응물 2를 세포에 가하고, 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션한 후, 정확히 45초 동안 정확히 42 °C에서 세포를 열 쇼크처리하였다. 튜브를 2분 동안 얼음에 두고, 950  $\mu$ l SOC를 가한 후, 약 225 rpm으로 진탕시키면서 1시



간 동안 37 °C에서 인큐베이션하였다. 이어서, 50 및 200 µl 분취물을 역위된 LB 및 CIX에 스프레딩하고, 밤새 37 °C에서 인큐베이션하였다.

[0119] 목적하는 클론에 대한 콜로니를 점검하기 위해서, PCR 반응을 하기 변수 및 시약을 사용하여 설정하였다: 5분 동안 95 °C에서 1 사이클, 15초 동안 95 °C에서 35 사이클, 15초 동안 50 °C에서 35 사이클, 60초 동안 72 °C에서 35 사이클, 5분 동안 72 °C에서 1 사이클 및 무한대로 4 °C에서 1 사이클; 12.5 µl의 2X Amplitaq Gold Mastermix, 11.5 µl의 Rnase/Dnase 유리수, 0.5 µl의 프라이머 pvl-U, 0.5 µl의 프라이머 겔-scrnL, 및 선별된 콜로니. comb(s)를 48 웰 2% 아가로즈 E-겔 카세트 (Invitrogen)로부터 제거하였다. 정확히 10 µl의 DEPC H<sub>2</sub>O EMD를 각각의 웰에 로딩하고, 10 µl의 DNA 마커 및 10 µl의 샘플 (6X 로딩 염료를 포함)를 목적하는 웰에 가하였다. "EG"로 표시될 때까지 전원 버튼을 눌렀다. E-겔 마더 베이스 (E-Gel Mother base)로 슬라이딩하고 (정확히 삽입되는 경우, 안정된 적색 빛을 발한다), 다시 전원 버튼을 눌렀다 (적색 빛이 녹색이 될 것이며 이는 겔이 전개되고 있음을 나타낸다). 겔을 약 20분 동안 전개시켰다. 이어서, 3 ml의 LB 브로쓰 및 6 µl의 CAR 스톱을 1 루프의 선별 콜로니로 접종시킴으로써 MiniPrep을 위해 선별 콜로니를 성장시켰다. 이어서, 이를 약 225 rpm으로 진탕시키면서 37 °C에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0120] 이어서, 플라스미드를 제작자의 지시에 따라 상술된 바와 같이 QIAprep Spin MiniPrep 키트를 사용해 정제하였다.

[0121] 플라스미드 정제 및 서열 분석을 위한 M2ae1/pGemT-Easy 선별 콜로니의 밤샘 배양을 개시하기 위해서, 3 ml의 LB 브로쓰 및 6 µl의 CAR 스톱을 1 루프의 선별 콜로니로 접종시킴으로써 MiniPrep을 위해 선별 콜로니를 성장시켰다. 이어서, 이를 약 225 rpm으로 진탕시키면서 37 °C에서 밤새 인큐베이션하였다. QIAprep Spin MiniPrep을 위해 이들을 상술된 바와 같이 정제하였다.

[0122] M2ae1 단편을 자르기 위해서, 제한 분해를 New England Biolabs의 통상의 절차에 따라 수행하였다. 간단히 설명하면, 5 µl의 New England Biolabs 완충액 4, 25 µl의 DNA, 5 µl의 AscI 및 15 µl의 H<sub>2</sub>O를 600 µl 원심 분리 튜브에서 함께 혼합하였다. 상기 튜브를 1시간 동안 37 °C에서 인큐베이션하고, 각각의 튜브에 3 µl의 6X 로딩 염료를 가한 후, 잘 혼합하였다. 이어서, 반응물을 60분 동안 약 100 V에서 수행되는 1.5% 아가로즈 겔에 로딩한 후, 겔을 사진찍거나 스캐닝하였다.

[0123] 이어서, M2ae1 단편을 QIAEX II 아가로즈 겔 추출 프로토콜 (QIAGEN, QIAEX II Handbook 02/99)에 따라 정제하고, 결합 반응 (3)에 의해 PVL1393에 결합시켰다. 간단히 설명하면, M2ae1을 PVL1393에 결합시키기 위해서, 2 µl의 PVL1393 벡터, 6 µl의 AscI 농축 M2ae1 삽입물, 1 µl의 10X 결합 완충액, 및 1 µl의 T-4 DNA 리가제를 0.5 ml 마이크로퓨지 튜브에서 함께 혼합하고, 4 °C에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0124] AscI-M2ae1/PVL1393 삽입물을 DHSx 세포에 형질전환시키기 위해, Max Effic 컴피턴트 DHSx 세포를 얼음 상에서 해동시키고, 반응당 50 µl를 17 x 100 mm pp 팔콘 튜브에 옮겼다. 여분의 세포를 EtOH/드라이아이스 조에서 재동결시켰다. 이어서, 2 µl의 결합 반응물 2를 세포에 가하고, 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션한 후, 정확히 45초 동안 정확히 42 °C에서 세포를 열 쇼크 처리하였다. 튜브를 2분 동안 얼음에 두고, 950 µl SOC를 가한 후, 약 225 rpm으로 진탕시키면서 1시간 동안 37 °C에서 인큐베이션하였다. 이어서, 50 및 200 µl 분취물을 역위된 LB 및 CIX에 스프레딩하고, 밤새 37 °C에서 인큐베이션하였다.

[0125] ORF2-AscI-PVL1393을 AscI으로 제한 절단하기 위해서, 2 µl의 New England Biolabs 완충액 4, 2.5 µl의 DNA, 2 µl의 AscI 및 12.5 µl의 H<sub>2</sub>O를 600 µl 원심분리 튜브에서 함께 혼합하였다. 상기 튜브를 1시간 동안 37 °C에서 인큐베이션하고, 각각의 튜브에 3 µl의 6X 로딩 염료를 가한 후, 잘 혼합하였다. 이어서, 반응물을 60분 동안 약 100 V에서 수행되는 1.5% 아가로즈 겔에 로딩한 후, 겔을 사진찍거나 스캐닝하였다.

[0126] 이어서, 겔을 정제하고, 탈포스포릴화 반응 및 또 다른 결합 반응을 수행하였다 겔 정제는 WIZARD SV 겔 클린업 (WIZARD SV Gel Clean-up) 단계들에 따랐다. 간단히 설명하면, 미니 컬럼을 수집관에 삽입하고, 제조된 DNA를 컬럼 어셈블리에 옮겼다. 이를 1분 동안 실온에서 인큐베이션한 후, 1분 동안 14,000 rpm으로 원심분리하고, 플로우 쓰루를 버렸다. 세척 단계는 700 µl의 막 세척 용액을 가하고, 1분 동안 14,000 rpm으로 원심분리하며, 플로우 쓰루를 버리고, 500 µl의 막 세척 용액을 가한 후, 5분 동안 14,000 rpm으로 원심분리하고, 플로우 쓰루를 버리며, 1분 동안 14,000 rpm으로 뚜껑을 열고 재원심분리시켜 막을 건조시키는 것으로 이루어졌다. 용출 단계는 미니 컬럼을 1.5 ml 원심분리 튜브에 옮기고, 50 µl의 뉴클레아제-비함유 H<sub>2</sub>O를 가한 후, 1분 동안 실온에서 인큐베이션하며, 1분 동안 14,000 rpm으로 원심분리한 후, 컬럼을 버리고, 후속 사용

을 위해 -20 °C에서 저장하는 것으로 이루어졌다. 탈포스포릴화 단계는 2 µl의 10X SAP 완충액을 16 µl의 겔 정제된 플라스미드에 가하고, 2 µl의 SAP를 가한 후, 15분 동안 37 °C에서 인큐베이션하고, 15분 동안 65 °C에서 SAP를 불활성화시키는 것을 포함하였다. 이어서, 4 µl의 AscI-ORF2-PVL1393 벡터, 12 µl의 AscI 절단 M2ae1 삽입물, 2 µl의 10X 결합 완충액, 및 2 µl의 T-4 DNA 리가제를 0.5 ml 마이크로퓨지 튜브에서 함께 혼합함으로써 결합 반응을 수행하고, 4 °C에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0127] 증식 및 추가의 스크리닝을 위해 결합된 벡터 및 삽입물을 DHSx 세포에 형질전환시키기 위해, Max Effc 컴피턴트 DHSx 세포를 얼음 상에서 해동시키고, 반응당 50 µl를 17 x 100 mm pp 팔콘 튜브에 옮겼다. 여분의 세포를 EtOH/드라이아이스 조에서 재동결시켰다. 이어서, 2 µl의 결합 반응물 2를 세포에 가하고, 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션한 후, 정확히 45초 동안 정확히 42 °C에서 세포를 열 쇼크 처리하였다. 튜브를 2분 동안 얼음에 두고, 950 µl SOC를 가한 후, 약 225 rpm으로 진탕시키면서 1시간 동안 37 °C에서 인큐베이션하였다. 이어서, 50 및 200 µl 분취물을 역위된 LB 및 CIX에 스프레딩하고, 밤새 37 °C에서 인큐베이션하였다.

[0128] 목적하는 삽입물의 존재에 대해 형질전환체를 스크리닝하기 위해서, Amplitaq Gold PCR 반응을 하기 변수 및 시약을 사용하여 수행하였다: 5분 동안 95 °C에서 1 사이클, 20초 동안 95 °C에서 35 사이클, 20초 동안 50 °C에서 35 사이클, 20초 동안 72 °C에서 35 사이클, 5분 동안 72 °C에서 1 사이클 및 무한대로 4 °C에서 1 사이클; 12.5 µl의 2X Amplitaq Gold Mastermix, 11.5 µl의 Rnase/Dnase 유리수, 0.5 µl의 프라이머 pvl-U, 0.5 µl의 프라이머 ae1 scrnL, 및 선별된 콜로니. comb(s)를 48 웰 2% 아가로스 E-겔 카세트 (Invitrogen)로부터 제거하였다. 정확히 7.5 µl의 DEPC H<sub>2</sub>O EMD를 각각의 웰에 로딩하고, 10 µl의 DNA 마커 및 10 µl의 샘플 (6X 로딩 염료를 포함)를 목적하는 웰에 가하였다. "EG"로 표시될 때까지 전원 버튼을 눌렀다. E-겔 마더 베이스로 슬라이딩하고 (정확히 삽입되는 경우, 안정된 적색 빛을 발한다), 다시 전원 버튼을 눌렀다 (적색 빛이 녹색이 될 것이며 이는 겔이 전개되고 있음을 나타낸다). 겔을 약 20분 동안 전개시켰다. 이어서, 3 ml의 LB 브로쓰 및 6 µl의 CAR 스톱을 M2ae1-AscI/PVL1393 형질전환으로부터의 1 루프의 선별 콜로니로 접종시킴으로써 MiniPrep을 위해 선별 콜로니를 성장시켰다. 이어서, 이를 약 225 rpm으로 진탕시키면서 37 °C에서 밤새 인큐베이션하였다. 서열 분석을 위한 플라스미드 정제를 위해서, QIAprep Spin MiniPrep을 제작자의 지시에 따라 사용하였다. 간단히 설명하면, 1.5 ml의 배양물을 14,000 rpm으로 1분 동안 펠릿화시켰다. 상청액을 버리고, 펠릿화 절차를 반복하며, 상청액을 다시 버렸다. 펠릿을 250 µl의 완충액 P1에 재구성하고, 250 µl의 완충액 P2에 가한 후, 역위에 의해 혼합하였다. 이어서, 350 µl의 완충액 N3을 가하고, 역위에 의해 혼합한 후, 10분 동안 14,000 rpm으로 회전시켰다. 상청액을 수집관의 QIAprep 스핀 컬럼에 옮기고, 60초 동안 14,000 rpm으로 회전시킨 후, 플로우 쓰루를 버리고, 컬럼을 재조립하였다. 이어서, 750 µl의 완충액 PE를 가하고, 60초 동안 14,000 rpm으로 회전시킨 후, 플로우 쓰루를 버리고, 컬럼을 재조립하였다. 컬럼을 1분 동안 14,000 rpm으로 회전시켜 이를 건조시킨 후, 컬럼을 새로운 1.5 ml 튜브에 옮겼다. 마지막으로, 50 µl의 H<sub>2</sub>O를 가하고, 1분 동안 실온에서 인큐베이션한 후, 컬럼을 버리기 전에 1분 동안 14,000 rpm으로 회전시켰다.

[0129] Sf9 곤충 세포를 배칼로바이러스 DNA로 형질감염시키기 위해서, 96.4 µl의 엑셀 배지 (Excel Medium), 1 µl의 DiamondBac Cur Virus DNA (1 µg/µl), 및 3.6 µl의 재조합 트랜스퍼 플라스미드 (pVL1393 중) (1 µg)를 멸균된 6 ml 폴리스티렌 튜브에서 조립하였다. ESCORT 및 엑셀 1:20의 마스터믹스 100 µl를 각각의 폴리스티렌 튜브에 가하고, 15분 동안 실온에서 인큐베이션하여 형질감염 혼합물 (475 µl 엑셀, 25 µl ESCORT)을 만들었다. Sf9 세포에 대한 단층의 6 웰 플레이트를 2 ml의 엑셀로 2회 세척하였으며 제2 세척 후 세포 상에 배지를 남겼다. 세척 배지를 흡인한 후, 0.8 ml의 엑셀을 6 웰 플레이트의 각각의 웰에 가하고, 6 웰 플레이트의 각각의 웰에 0.2 ml의 형질감염 혼합물을 가하였다. 이를 5시간 동안 28 °C에서 인큐베이션한 후, 형질감염 혼합물을 흡인하였다. 세포를 1회 세척한 후, 2 ml의 TNM-FH를 가하고, 120 내지 144시간 동안 28 °C에서 인큐베이션하였다.

[0130] 형질감염물을 수거하고 IFA를 위해 세포를 고정시키기 위해서, 형질감염된 Sf9 세포로부터의 상청액을 생물안전성 후드에서 무균적으로 수거하고, 2.0 ml 냉동바이알에 옮긴 후, 1 ml의 냉동 아세톤:메탄올 (50:50)을 웰 중의 잔류 Sf9 세포에 가하였다. 이를 10분 동안 실온에서 인큐베이션하고, 고정제를 제거하고, 플레이트를 배기 후드 (fume hood)에서 공기 건조시킨 후, 최종의 IFA를 위해 플레이트를 4 °C 또는 더 차갑게 저장하였다.

[0131] Sf9 형질감염된 세포에서 M2ae1의 발현을 시험하기 위해, 간접적 면역 형광 검정 (IFA)를 수행하였다. 플레이트를 PBS에서 간단히 세척하여 고정된 세포를 재수화시킨 후, PBS를 제거하였다. 이어서, 500 µl의 1차 항체인 αM2ae1을 웰에 가하고, 37 °C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 1차 항체를 제거한 후, 웰을 PBS로 3회 세척하고 최종 세척물을 제거하였다. 이어서, 500 µl의 2차 항체인 α 래빗 FITC (PBS 중 1:500)를 웰에 가하

고, 37 °C에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 2차 항체를 제거하고, 웰을 PBS로 3회 세척하며, 최종 세척물을 제거하였다. 이어서, 웰을 약 0.5 ml의 글리세롤:물 (50:50)으로 코팅하고, 과량의 글리세롤:물을 제거하여 세포층을 도립 UV 광현미경으로 관측할 수 있었다.

[0132] 배칼로바이러스-감염된 Sf9 세포의 클론을 발견하기 위해서, 배칼로바이러스의 제한 회석을 Sf9 세포의 계대 50에 대해 수행하였다. 간단히 설명하면, 배칼로바이러스 물질의 TNM-FH로의 10배 회석을 수행하였다. 회석을 수행하기 바로 전에, 배칼로바이러스 물질을 간단히 불텍싱하여 철저히 혼합하였다. 초기  $10^{-1}$  회석은 0.1 ml의 배칼로바이러스를 0.9 ml의 TNM-FH로 피펫팅한 후 간단히 불텍싱하여 혼합함으로써 수행하였다.  $10^{-2}$  회석은 0.1 ml의  $10^{-1}$  회석된 배칼로바이러스를 0.9 ml의 TNM-FH로 피펫팅하고 간단히 불텍싱하여 혼합함으로써 수행하였다.  $10^{-3}$  회석은 1 ml의  $10^{-2}$  회석된 배칼로바이러스를 9 ml의 TNM-FH로 피펫팅하고 간단히 불텍싱하여 혼합함으로써 수행하였다.  $10^{-4}$  회석 및 각각의 후속한 회석 ( $10^{-7}$ 까지)은 1 ml의  $10^{-3}$  회석된 배칼로바이러스를 9 ml의 TNM-FH로 피펫팅하고 간단히 불텍싱하여 혼합함으로써 수행하였다. 회석된 배칼로바이러스 물질을 96 웰의 가능한 한 많은 웰에 가하였다. 플레이트를 쌓아 커다란 지프-락 백에 넣고, 28 °C의 어두운 곳에서 인큐베이션하였다. 상청액을 4 내지 7일 후 웰로부터 수거하였다.

[0133] 세포를 고정시키고, UV 광 하에서의 관측을 위해 M2ae1 ORF2 플레이트를 염색하기 위해서, 상청액을 생물안전성 후드에서 멀티-채널 피펫터 및 멸균 필터 팁을 사용하여 새로운 96웰 플레이트에 무균적으로 옮겼다. 상청액-포함 플레이트를 단기간 저장을 위해서는 4 °C 또는 장기간 저장을 위해서는 -70 °C에서 저장할 수 있다. 웰 중의 잔류 Sf9 세포는 이에 첨가된 200  $\mu$ l의 냉각 아세톤:메탄올 (50:50)을 가지며, 이를 10분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 고정제를 제거하고, 플레이트를 배기 후드에서 공기 건조시킨 후, 플레이트를 PBS로 간단히 세척하여 고정된 세포를 재수화시켰다. 이어서, PBS를 제거하고, 100  $\mu$ l의 인플루엔자 A M2 (14C2) (Santa Cruz Biotech)를 웰에 가하고, 1시간 동안 37 °C에서 인큐베이션하였다. 이어서, 1차 항체를 제거한 후, 웰을 PBS로 3회 세척하고 최종 세척물을 제거하였다. 이어서, 100  $\mu$ l의 2차 항체인 염소 + 마우스 FITC를 웰에 가하고, 1시간 동안 37 °C에서 인큐베이션하였다. 이어서, 2차 항체를 제거한 후, 웰을 PBS로 3회 세척하고, 최종 세척물을 제거하였다. 웰을 약 0.5 ml의 글리세롤:물 (50:50)으로 코팅하고, 과량의 글리세롤:물을 제거한 후, 도립 UV 현미경으로 세포층을 관측하였다.

[0134] 단일 M2ae1 ORF2 PCV2 배칼로바이러스를 96 웰 Sf9 플레이트 상의 계대 1을 제한 회석하여 분리하였다 (계대 52). 간단히 설명하면, 배칼로바이러스 물질의 TNM-FH로의 10배 회석을 수행하였다. 회석을 수행하기 바로 전에, 배칼로바이러스 물질을 간단히 불텍싱하여 철저히 혼합하였다. 초기  $10^{-1}$  회석은 0.1 ml의 배칼로바이러스를 0.9 ml의 TNM-FH로 피펫팅한 후 간단히 불텍싱하여 혼합함으로써 수행하였다.  $10^{-2}$  회석은 0.1 ml의  $10^{-1}$  회석된 배칼로바이러스를 0.9 ml의 TNM-FH로 피펫팅하고 간단히 불텍싱하여 혼합함으로써 수행하였다.  $10^{-3}$  회석은 0.1 ml의  $10^{-2}$  회석된 배칼로바이러스를 9 ml의 TNM-FH로 피펫팅하고 간단히 불텍싱하여 혼합함으로써 수행하였다.  $10^{-4}$  회석 및 각각의 후속한 회석 ( $10^{-6}$ 까지)은 0.1 ml의 앞서 (예를 들어,  $10^{-4}$  회석에 대해서는  $10^{-3}$ ) 회석된 배칼로바이러스를 0.9 ml의 TNM-FH로 피펫팅하고 간단히 불텍싱하여 혼합함으로써 수행하였다.  $10^{-7}$  회석은 1 ml의  $10^{-6}$  회석된 배칼로바이러스를 9 ml의 TNM-FH로 피펫팅하고 간단히 불텍싱하여 혼합함으로써 수행하였다.  $10^{-8}$  회석은 1 ml의  $10^{-7}$  회석된 배칼로바이러스를 9 ml의 TNM-FH로 피펫팅하고 간단히 불텍싱하여 혼합함으로써 수행하였다. 이어서, 0.1 ml의  $10^{-7}$  및  $10^{-8}$  회석된 배칼로바이러스 물질을 96 웰의 가능한 한 많은 웰에 가하였다. 플레이트를 쌓아 커다란 지프-락 백에 넣고, 28 °C의 어두운 곳에서 인큐베이션하였다. 상청액을 4 내지 7일 후 웰로부터 수거하였다.

[0135]  $10^{-7}$  및  $10^{-8}$  제한 회석물에 대한 IFA를 수행하기 위해서, Sf9 세포를 고정시키고, M2ae1 ORF2 PCV2 형질감염된 세포의 존재를 검출하기 위해 염색하였다. 간단히 설명하면, 상청액을 생물안전성 후드에서 멀티-채널 피펫터 및 멸균 필터 팁을 사용하여 새로운 96웰 플레이트에 무균적으로 옮겼다. 상청액-포함 플레이트를 단기간 저장을 위해서는 4 °C 또는 장기간 저장을 위해서는 -70 °C에서 저장할 수 있다. 웰 중의 잔류 Sf9 세포는 이에 첨가된 200  $\mu$ l의 냉각 아세톤:메탄올 (50:50)을 가지며, 이를 10분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 고정제를 제거하고, 플레이트를 배기 후드에서 공기 건조시킨 후, 플레이트를 PBS로 간단히 세척하여 고정된 세포를 재수화시켰다. 이어서, PBS를 제거하고, 100  $\mu$ l의 1차 항체인 인플루엔자 A M2 (14C2) (Santa Cruz Biotech)를

웰에 가하고, 1시간 동안 37 °C에서 인큐베이션하였다. 이어서, 1차 항체를 제거한 후, 웰을 PBS로 3회 세척하고 최종 세척물을 제거하였다. 이어서, 100 μl의 2차 항체인 염소 + 마우스 FITC를 웰에 가하고, 1시간 동안 37 °C에서 인큐베이션하였다. 이어서, 2차 항체를 제거한 후, 웰을 PBS로 3회 세척하고, 최종 세척물을 제거하였다. 웰을 약 0.5 ml의 글리세롤:물 (50:50)으로 코팅하고, 과량의 글리세롤:물을 제거한 후, 도립 UV 현미경으로 세포층을 관측하였다. 그 결과 양성이었다.

[0136] 상기의 제한 효소로부터 M2ae1 ORF2 PCV2를 증폭시키기 위해, 상청액을 사용하였다. 간단히 설명하면, 100 μl의 각각의 바이러스를 Sf9 세포에 대한 6 웰 플레이트의 단일 웰에 가하고, 이 플레이트를 28 °C의 어두운 곳에 두었다. 4 내지 7일 후 상청액을 수거하고 세포층을 고정시킬 수 있었다.

[0137] 이어서, 선별된 M2ae1 내부 PCV2 ORF2 배컬로바이러스를 제한 효소하고, 증폭 수거하며, Sf9 세포 고정을 수행하였다. 간단히 설명하면, 형질감염된 Sf9 세포로부터의 상청액을 생물안전성 후드에서 수거하고, 2.0 ml 냉동 바이알로 옮긴 후, 1 ml의 냉각된 아세톤:메탄올 (50:50)을 웰 중의 잔류 Sf9 세포에 가하였다. 이를 10분 동안 실온에서 인큐베이션하고, 고정제를 제거한 후, 플레이트를 배기 후드에서 공기 건조시키고, 최종적인 IFA를 위해 플레이트를 4 °C에서 저장하였다.

[0138] 결과

[0139] 상기된 방법을 이용하여 M2ae1 단편의 존재 및 이의 면역원성 또는 항원성이 검출가능하였다.

## [0140] 실시예 6

[0141] 본 실시예는 인플루엔자 A M2ae1 영역이 PCV2 ORF2 VLP에 대해 아미노 테일로서 삽입될 수 있다는 것을 입증한다.

[0142] 3'-KpnI를 갖는 M2ae1 24량체

[0143] M2ae1 24량체의 아미노산 서열은 MSLLETVETPIRNEWGCRNDSSD (서열번호 6)이다. M2ae1 24개 아미노산 서열을 드로소필라에 대한 최적 코돈 사용을 이용해 뉴클레오타이드 서열로 역해독하였다. 특정 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 PCR을 수행함으로써 M2ae1 암호화 영역에 3'-KpnI 제한 효소 부위를 첨가하였다.

[0144] PCV2 ORF2 암호화 영역의 5'-말단에 KpnI 제한 부위의 도입

[0145] 특정 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하는 PCR을 수행하여 PCV2 ORF2 유전자의 5'-말단에 KpnI 제한 효소 부위를 첨가하였다 (도 7 참조).

[0146] PCV2 ORF2의 5'-말단에 아미노 M2ae1의 결합

[0147] 표준 분자 생물학 방법을 이용하여, M2ae1-KpnI 영역을 PCV2 ORF2 유전자의 5'-말단 KpnI 부위에 클로닝하였다 (서열번호 12). 이어서, 아미노 M2ae1 PCV2 ORF2 영역을 배컬로바이러스 트랜스퍼 벡터 pVL1393에 클로닝하였다. 이어서, 생성된 아미노 M2ae1PCV2 ORF2 /pVL1393 플라스미드를 형질감염에서의 후속 사용을 위해 Qiagen Mini-Prep 플라스미드 키트를 사용하여 정제하였다.

[0148] M2ae1 테일을 갖는 PCV2 ORF2를 포함하는 재조합 배컬로바이러스의 생성

[0149] 아미노 M2ae1PCV2 ORF2 /pVL1393 플라스미드 및 DiamondBac<sup>®</sup> 선형화 배컬로바이러스 DNA (Sigma)를 28°C에서 5시간 동안 ESCORT 형질감염 시약 (Sigma)을 사용하여 Sf9 곤충 세포로 공동형질감염시켰다. 형질감염 배지를 제거하고, 형질감염된 세포를 약하게 세척하고, 배지를 보충한 후, 27°C에서 인큐베이션하였다. 5일 후, 생성된 재조합 배컬로바이러스를 포함하는 세포 상청액을 수거하고 4°C에서 저장하였다. 잔류하는 형질감염된 Sf9 세포를 아세톤:메탄올로 고정시키고, 항-인플루엔자 A M2 모노클로날 항체 14C2를 사용하는 면역형광 검정



(IFA)에 이용하여 형질감염된 Sf9 세포에서 M2ae1의 발현을 확인하였다.

[0150] 수거된 PCV2 ORF2 아미노 M2ae1 배칼로바이러스 DB 상청액을 바이러스 스톱물의 생성에 사용하였다.

[0151] PCV2 ORF2 아미노 M2ae1의 면역학적 검출

[0152] PCV2 ORF2 아미노 M2ae1 배칼로바이러스 DB-감염된 Sf9 세포에서 M2ae1 발현은 IFA에 의해 앞서 확인되었다. 그러나, PCV2 ORF2와 함께 M2ae1의 발현을 추가로 확인하기 위한 수단으로서, 배칼로바이러스-감염된 곤충 세포 배양물로부터의 PCV2 ORF2 아미노 M2ae1 수거된 상청액에 대한 면역블롯을 수행하였다.

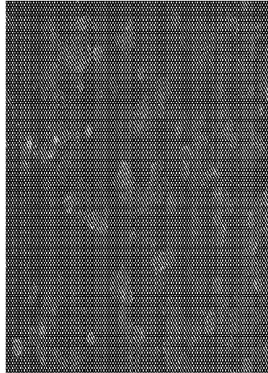
[0153] 간단히 설명하면, 배칼로바이러스-감염된 곤충 세포 배양물로부터의 수거된 상청액을 PVDF 막에 블롯팅하고, PCV2 ORF2 및/또는 M2ae1 항원의 존재를 면역블롯으로 시험하였다. PCV2 ORF2의 면역블롯 검출을 사용되는 1차 항체는 항-PCV2 ORF2 모노클로날 항체 6C4-2-4A3-5D10 및 정제된 돼지 항-PCV2 ORF2 IgG였다. M2ae1의 면역블롯 검출을 위해 사용되는 1차 항체는 항-M2 모노클로날 항체 14C2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 및 돼지 항-M2aeC5 혈청이었다. 면역블롯에 사용되는 각각의 2차 항체는 HRP-표지된 염소 항-마우스 접합체 및 염소-항-돼지 접합체였다. Opti-4CN 기질 (BioRad)를 면역블롯에 대한 비색 검출에 사용하였다. 면역블롯은 ORF2 및 M2ae1의 존재를 보였다.



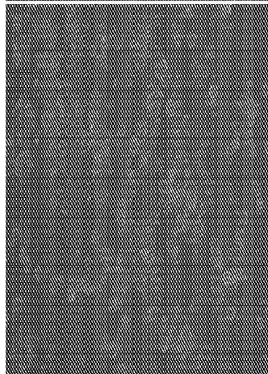
도면

도면1

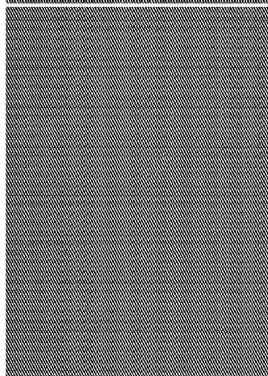
ORF2-CSL 배콜로바이러스로 감염된 SF 세포



1a 토끼 항-CSL 혈청-토끼#13으로 염색



1b 돼지 항-PCV2 혈청으로 염색

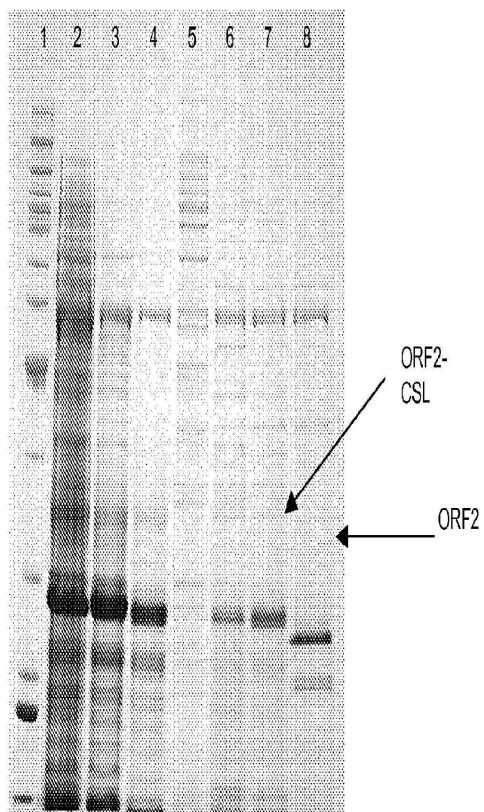


1c 염소 항-토끼 FITC로 염색

도면2

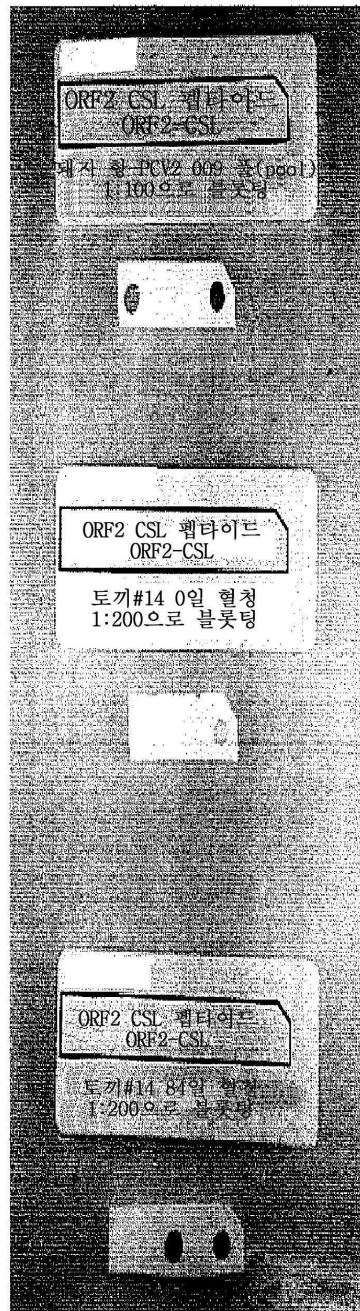
10% Bis-Tris/MOPS 겔

- 1) 10 kDa 마커
- 2) 펠릿의 96시간  $\text{NaHCO}_3$  용해물-15  $\mu\text{l}$
- 3) 펠릿의 120시간  $\text{NaHCO}_3$  용해물-15  $\mu\text{l}$
- 4) 펠릿의 144시간  $\text{NaHCO}_3$  용해물-15  $\mu\text{l}$
- 5) 96시간 상청액 - 20  $\mu\text{l}$
- 6) 120시간 상청액 - 20  $\mu\text{l}$
- 7) 144시간 상청액 - 20  $\mu\text{l}$
- 8) ORF2 Lot001 - 20  $\mu\text{l}$

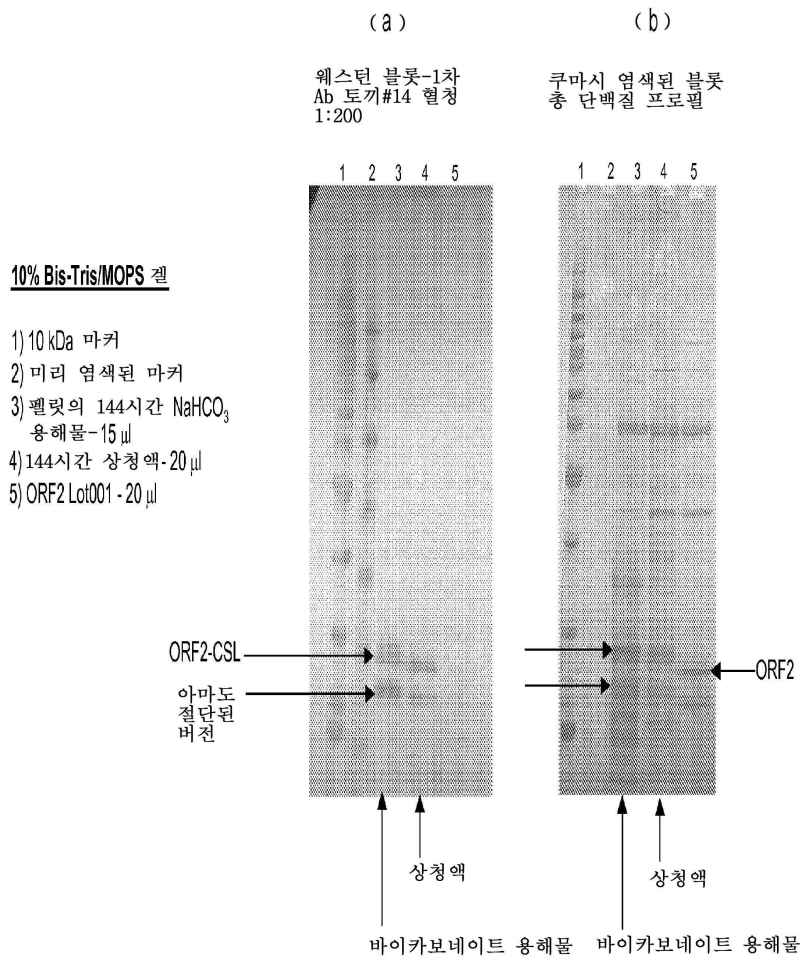


도면3

스폿 블롯 결과



도면4



도면5

# AscI 제한 효소 부위를 갖는 PCV2 ORF2를 변형되지 않은 PCV2 ORF2에 비교하는 정렬

```

M T Y P R R R Y R R R R R R R R R S H L G Q I L R R R R P W L V H P R H 34
>PCV2 AscI ATGACGTATCCAAAGGCGGTTACCGCAGAAGAAGACACCGCCCGCCGATCTTGGCCAGATCCTCCGCCCGCCCTCGCTCCACCCCGCCGACC 103
M T Y P R R R Y R R R R R R R R R S H L G Q I L R R R R P W L V H P R H 34
>PCV2 ORF2 ATGACGTATCCAAAGGCGGTTACCGCAGAAGAAGACACCGCCCGCCGATCTTGGCCAGATCCTCCGCCCGCCCTCGCTCCACCCCGCCGACC 103

R W A R R R K N G I F N T R L S R T F G Y T V K A T T V T P S W A V 69
      *AscI
>PCV2 AscI GCTGGCGGCCCGCAAGGAAAAATGGCATCTTCACACCCCGCCCTCCCGCACCTTCGGATATACGTCAAGCTACACAGCTCACAAGCCCTCCTGGGCGGT 206
R W R R R K N G I F N T R L S R T F G Y T V K A T T V T P S W A V 69
>PCV2 ORF2 GCTACCGTTGGAGAAGAAAAATGGCATCTTCACACCCCGCCCTCCCGCACCTTCGGATATACGTCAAGCTACACAGCTCACAAGCCCTCCTGGGCGGT 206

D M M F N I D D F V P P G G T N K I S I P F E Y R I R K V K V 103
>PCV2 AscI GGACATGATGAGATTTAATATTGACGACTTTGTTCCCGGGAGGGGACCAAAATCTATACCTTTGAATACACAGAAATAGAAAGGTTAAAGTT 309
D M M F N I D D F V P P G G T N K I S I P F E Y R I R K V K V 103
>PCV2 ORF2 GGACATGATGAGATTTAATATTGACGACTTTGTTCCCGGGAGGGGACCAAAATCTATACCTTTGAATACACAGAAATAGAAAGGTTAAAGTT 309

E F W P C S P I T O G D R G V G S T A V I L D D N F V T K A T A L T 137
>PCV2 AscI GAATTCGTGCCCTGCTCCCCATCACCAGGGTGATAGGGAGTGGCTCCACTGCTGTATTCTAGATGATACTTTGTAAACAAGGCCACAGCCCTAACCT 412
E F W P C S P I T O G D R G V G S T A V I L D D N F V T K A T A L T 137
>PCV2 ORF2 GAATTCGTGCCCTGCTCCCCATCACCAGGGTGATAGGGAGTGGCTCCACTGCTGTATTCTAGATGATACTTTGTAAACAAGGCCACAGCCCTAACCT 412

Y D P Y V N Y S S R H T I P Q P F S Y H S R Y F T P K P V L D S T I D 172
>PCV2 AscI ATGACCCATATGTAATACTACTCTCCCGCCATACAATCCCGCCCAACCTTCTCCCTACACTCCCGTTACTTCACCCCAACCTGTCTTGACTCCACTATTGA 515
Y D P Y V N Y S S R H T I P Q P F S Y H S R Y F T P K P V L D S T I D 172
>PCV2 ORF2 ATGACCCATATGTAATACTACTCTCCCGCCATACAATCCCGCCCAACCTTCTCCCTACACTCCCGTTACTTCACCCCAACCTGTCTTGACTCCACTATTGA 515

Y F Q P N N K R N Q L W L R L Q T S R N V D H V G L G T A F E N S K 206
>PCV2 AscI TTACTTCCAACCAATAACAAAGGATCAGCTTGGCTGAGGCTACAAACCTCTAGAAATGGACACGTTAGGCTCGGCACTGCGTTTCGAAAACAGTAAA 618
Y F Q P N N K R N Q L W L R L Q T S R N V D H V G L G T A F E N S K 206
>PCV2 ORF2 TTACTTCCAACCAATAACAAAGGATCAGCTTGGCTGAGGCTACAAACCTCTAGAAATGGACACGTTAGGCTCGGCACTGCGTTTCGAAAACAGTAAA 618

Y D Q D Y N I R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L E P * 233
>PCV2 AscI TAGGACCCAGGACTACAATATCGGTAAACCATGTATGTACAAATTCAGAGAAATTAATCTTAAAGACCCCCACTTGAACCCCTAA 702
Y D Q D Y N I R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L E P * 233
>PCV2 ORF2 TAGGACCCAGGACTACAATATCGGTAAACCATGTATGTACAAATTCAGAGAAATTAATCTTAAAGACCCCCACTTGAACCCCTAA 702

PCV2 AscI = 부가된 AscI 부위를 갖는 PCV2 ORF2.
PCV2 ORF2 = 변형되지 않은 PCV2 ORF2.

```



PCV2 AscI 암호화 영역으로의 M2ae1 영역의 삽입을 표시하는 정렬

M T Y P R R R Y R R R R R H R P R S H L G Q I L R R R R P E W L V H P R H 34  
AscI ATGACGTATCCAAAGGAGCGTTACCGCAGAAGAAGACACGCCCGCGAGCCATCTTGGCCAGATCTTCGCGCGCGCCCTGGCTGCTCCACCCCGCCACC 103  
M T Y P R R R Y R R R R R H R P R S H L G Q I L R R R R P W L V H P R H 34  
>int M2ae1 ATGACGTATCCAAAGGAGCGTTACCGCAGAAGAAGACACGCCCGCGAGCCATCTTGGCCAGATCTTCGCGCGCGCCCTGGCTGCTCCACCCCGCCACC 103  
R W R A M S L L T E V E T P I R N E W G C R C N D S S D R R R A R R K N 42  
GCT-----\*AscI  
>PCV2 AscI R W R A M S L L T E V E T P I R N E W G C R C N D S S D R R R A R R K N 69  
GCTTGGCGCGCATAGACCTGCTACCGAGGTGGAGACCCCATCCGCAACGAGTGGGGGTGCGCGTGCACGATAGCAGCGATCGGCGCGCGCAAGGAAAA 125  
>int M2ae1 GCTTGGCGCGCATAGACCTGCTACCGAGGTGGAGACCCCATCCGCAACGAGTGGGGGTGCGCGTGCACGATAGCAGCGATCGGCGCGCGCAAGGAAAA 202  
G I F N T R L S R T F G Y T V K A T T V T P S W A V D M M R F N I 76  
>PCV2 AscI TGGCACTTCAACACCGCCTCCCGACCTTCGGATATATCTCAAGGCTACACAGTCAACAGCGCCCTCTTGGCGGTGGACATGATGAGATTAAATATT 228  
G I F N T R L S R T F G Y T V K A T T V T P S W A V D M M R F N I 103  
>int M2ae1 TGGCACTTCAACACCGCCTCCCGACCTTCGGATATATCTCAAGGCTACACAGTCAACAGCGCCCTCTTGGCGGTGGACATGATGAGATTAAATATT 309  
D D C F T T T T C C C C G G G G G G G A C C A A A A A T C T A C C C T T G A A T A C A G A A T A G A A A G G T T A A G T T G A A T T C T G G C C T G C T C C C C A 311  
>PCV2 AscI GAGCACTTTCCTCCCGGAGGGGACCAAAATCTCTATACCCTTGAATACACAGTAAGAAAGGTTAAGTTGAATTTCTGGCCCTGCTCCGCCA 331  
D D F V P P G G G T N K I S I L P F E Y Y R I R K V K V E F W P C S P 137  
>int M2ae1 GAGCACTTGTTCCTCCCGGAGGGGACCAAAATCTCTATACCCTTGAATACACAGTAAGAAAGGTTAAGTTGAATTTCTGGCCCTGCTCCGCCA 412  
I T Q G D R G G V G S T A V I L D G N F V T K A T A L T Y D P Y V N Y S 145  
>PCV2 AscI TCACCGAGGTAGGAGTGGCTCCACTGCTGTATTCTAGATTAACCTTTGTTAAACAGGCAAGCCCTAACCTATGACCCATGTAAACTACTC 434  
I T Q G D R G G V G S T A V I L D G N F V T K A T A L T Y D P Y V N Y S 172  
>int M2ae1 TCACCGAGGTAGGAGTGGCTCCACTGCTGTATTCTAGATTAACCTTTGTTAAACAGGCAAGCCCTAACCTATGACCCATGTAAACTACTC 515  
S R H T I P Q P F S Y H S R Y F T P K P V L D S T I D Y F Q P N N K 179  
>PCV2 AscI CTCGCGCATATCCCAACCCCTCTCCCTACCACTCCCGTACTTCCACCCAAACCTGTTCTGACTCCACTTGTATTCATCCCAACCAATCAACAA 537  
S R H T I P Q P F S Y H S R Y F T P K P V L D S T I D Y F Q P N N K 206  
>int M2ae1 CTCGCGCATATCAATCCCCACCCCTCTCCCTACCACTCCCGTACTTCCACCCAAACCTGTTCTTGACTTCCACTATTGATTACTTCCAAACCAATCAACAA 618  
R N Q L W L R L Q T S R N V D H V G L G T A F E N S K Y D Q D Y N I 213  
>PCV2 AscI AGGAATCAGCTTTGGCTGAGGCTACAAACCTCTAGAATGTGACACAGGTAGGCTTCGGCACTGGTTCGAAAACAGTAAATACGACCAAGGACTACAATATCC 640  
R N N Q L W L R L Q T S R N V D H V G L G T A F E N S K Y D Q D Y N I 240  
>int M2ae1 AGGAATCAGCTTTGGCTGAGGCTACAAACCTCTAGAATGTGACACAGGTAGGCTTCGGCACTGGTTCGAAAACAGTAAATACGACCAAGGACTACAATATCC 721  
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L E P \* 241  
>PCV2 AscI GTGTACCATGTATGACAAATTACAGAAATTAAATCTTAAAGACCCCGCCACTTGAACCCATAA 702  
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L E P 260  
>int M2ae1 GTGTAAACATGTATGTACAAATTACAGAAATTAATCTTAAAGACCCCGCCACTTGAACCCATAA 783

PCV2 AscI = 부가된 AscI 부위를 갖는 PCV2 ORF2.  
Int M2ael = PCV2 AscI 암호화 영역의 AscI 부위로 삽입된 M2ael.



<211> 30

<212> PRT

<213> Cryptosporidium parvum

<400> 1

Ala Ile Asn Gly Gly Gly Ala Thr Leu Pro Gln Lys Leu Tyr Leu Thr

1 5 10 15

Pro Asn Val Leu Thr Ala Gly Phe Ala Pro Tyr Ile Gly Val

20 25 30

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Porcine circovirus

<220><221> misc\_feature

<223> Primer

<400> 2

tggatccgcc atgacgtatc c 21

<210> 3

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 3

agatctacac gccgatgtag ggggcgaagc cggcggtcag cacgttgggg gtcaggtaca 60

gcttctgggg cagggtggcg ccgccgccgt tgatggcggg ttcaagtggg gggctcttaa 120

<210> 4

<211> 806

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCV2 ORF2 with cryptosporidium parvum ligand tail

<400> 4

tggatccgcc atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag 60

ccatcttgge cagatcttcc gccccgccct ctggtctgtc cccccgcc accgtaccg 120

ttggagaagg aaaaatggca ttttcaacac ccgctcttcc cgcaccttcg gatatactgt 180

caaggctacc acagtcacaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat ttaatatga 240  
cgactttgtt cccccgggag gggggaccaa caaatctct ataccctttg aatactacag 300  
aataagaaag gttaaggttg aattctggcc ctgctcccc atcaccagg gtgatagggg 360

agtgggctcc acigctgta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac 420  
ctatgaccca tatgtaaact actctcccg ccatacaatc cccaaccct tctctacca 480  
ctcccgttac ttcacacca aacctgttct tgactccact attgattact tccaacaaa 540  
taacaaaagg aatcagcttt ggctgaggct acaaacctct agaaatgtgg accacgtagg 600  
cctcggcact gcgttcgaaa acagtaaata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaacat 660  
glatgtacaa ttcagagaat ttaatcttaa agaccccca cttgaaccg ccatcaacgg 720  
cgcgggcgcc accctgcccc agaagctgta cctgaccccc aacgtgctga ccgcccgtt 780

cgccccctac atcggcgtgt agatct 806

<210> 5

<211> 266

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Translation of PCV2 ORF2 with CSL tail

<400> 5

Gly Ser Ala Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His

1 5 10 15

Arg Pro Arg Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu

20 25 30

Val His Pro Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe

35 40 45

Asn Thr Arg Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr

50 55 60

Val Thr Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp

65 70 75 80

Asp Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe

85 90 95

Glu Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser

100 105 110

Pro Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu

115 120 125

Asp Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr

130 135 140

Val Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His

145 150 155 160

Ser Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr

165 170 175

Phe Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr

180 185 190

Ser Arg Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser

195 200 205

Lys Tyr Asp Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe

210 215 220

Arg Glu Phe Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro Ala Ile Asn Gly

225 230 235 240

Gly Gly Ala Thr Leu Pro Gln Lys Leu Tyr Leu Thr Pro Asn Val Leu

245 250 255

Thr Ala Gly Phe Ala Pro Tyr Ile Gly Val

260 265

<210> 6

<211> 24

<212> PRT

<213> swine influenza virus

<400> 6

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 7

<211> 702

<212> DNA



<213> Porcine circovirus

<400> 7

atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60  
cagatcctcc gccgccgccc ctggctcgtc ccccccgcc accgctaccg ttggagaagg 120  
aaaaatggca tcttcaacac cgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caaggctacc 180  
acagtcacaa cgcctcctg ggcgtggac atgatgagat ttaatttga cgactttgtt 240  
ccccgggag gggggaccaa caaatctct atacccttg aatactacag aataagaaag 300  
gttaagggtt aattctggcc ctgctcccc atcaccagg gtgataggg agtgggctcc 360

actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgaccca 420  
tatgtaaact actcctcccg ccatacaatc cccaaccct tctctacca ctcccgttac 480  
ttcacacca aacctgttct tgactccact attgattact tccaacaaa taacaaaagg 540  
aatcagcttt ggctgaggct acaaacctct agaaatgtgg accacgtagg cctcggcact 600  
gcgttcgaaa acagtaata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaacat gtatgtacaa 660  
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca ctgaaccct aa 702

<210> 8

<211> 702

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCV2 ORF2 with AscI restriction enzyme site

<400> 8

atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60  
cagatcctcc gccgccgccc ctggctcgtc ccccccgcc accgctggcg cgcccgaagg 120  
aaaaatggca tcttcaacac cgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caaggctacc 180  
acagtcacaa cgcctcctg ggcgtggac atgatgagat ttaatttga cgactttgtt 240  
ccccgggag gggggaccaa caaatctct atacccttg aatactacag aataagaaag 300  
gttaagggtt aattctggcc ctgctcccc atcaccagg gtgataggg agtgggctcc 360

actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgaccca 420  
tatgtaaact actcctcccg ccatacaatc cccaaccct tctctacca ctcccgttac 480  
ttcacacca aacctgttct tgactccact attgattact tccaacaaa taacaaaagg 540  
aatcagcttt ggctgaggct acaaacctct agaaatgtgg accacgtagg cctcggcact 600  
gcgttcgaaa acagtaata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaacat gtatgtacaa 660  
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca ctgaaccct aa 702

<210> 9

<211> 783

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCV2 ORF2 and swine influenza M2ae1

<400> 9

```
atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc      60
cagatcctcc gccgccgccc ctggctcgtc caccgccgcc accgctggcg cgccatgagc      120
ctgctgaccg aggtggagac ccccatccgc aacgagtggg gctgccgctg caacgatagc      180
agcgatcggc gcgcccgaag gaaaaatggc atcttcaaca cccgcctctc ccgcaccttc      240
ggataactg tcaaggctac cacagtcaca acgccctcct gggcgggtgga catgatgaga      300
ttaatatgt acgactttgt tccccggga ggggggacca acaaaatctc tatacccttt      360
```

```
gaatactaca gaataagaaa ggttaaggtt gaattctggc cctgctcccc catcacccag      420
ggtgataggg gactgggctc cactgctgtt attctagatg ataactttgt aacaaaggcc      480
acagccctaa cctatgacct atatgtaaac tactcctccc gccatacaat cccccaaccc      540
ttctcctacc actcccgta cttcacaccc aaacctgttc ttgactccac tattgattac      600
ttccaaccaa ataacaaaag gaatcagctt tggctgaggc taaaaacctc tagaaatgtg      660
gaccacgtag gcctcggcac tgcgttcgaa aacagtaa atcgaccagga ctacaatac      720
cgtgtaacca tgtatgtaca attcagagaa ttaaatctta aagaccccc acttgaaccc      780
```

taa 783

<210> 10

<211> 233

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 10

```
Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1           5           10           15
Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
           20           25           30
Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
           35           40           45
```

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr  
 50 55 60  
 Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val  
 65 70 75 80  
 Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr  
 100 105 110  
  
 Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn  
 115 120 125  
 Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr  
 130 135 140  
 Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr  
 145 150 155 160  
 Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro  
 165 170 175  
  
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn  
 180 185 190  
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp  
 195 200 205  
 Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe  
 210 215 220  
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro  
 225 230  
 <210> 11  
 <211> 260  
 <212> PRT  
  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCV2 ORF2 and internal swine influenza M2ael  
 <400> 11  
 Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg  
 1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro  
 20 25 30  
 Arg His Arg Trp Arg Ala Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro  
 35 40 45  
 Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp Arg Arg  
 50 55 60  
 Ala Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg Leu Ser Arg Thr Phe  
 65 70 75 80  
 Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr Pro Ser Trp Ala Val  
 85 90 95  
 Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly  
 100 105 110  
 Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val  
 115 120 125  
 Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly  
 130 135 140  
 Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala  
 145 150 155 160  
 Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr  
 165 170 175  
 Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro  
 180 185 190  
 Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn  
 195 200 205  
 Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn Val Asp His Val Gly  
 210 215 220  
 Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp Gln Asp Tyr Asn Ile  
 225 230 235 240  
 Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe Asn Leu Lys Asp Pro  
 245 250 255  
 Pro Leu Glu Pro

260

<210> 12

<211> 774

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCV2 ORF2 and amino swine influenza M2ael

<400> 12

atgagtctgc tgactgaagt agaaacacca atacgcaatg agtggggctg ccgctgcaac 60  
gactcttctg atggtacctt tccaaggagg cgttacgca gaagaagaca ccgccccgc 120  
agccatcttg gccagatcct ccgccgccgc ccttggtctg tccacccccg ccaccgctac 180  
cgttggagaa ggaaaaatgg catcttcaac accgcctct cccgcacctt cggatatact 240

gtcaaggcta ccacagtcac aacgcctcc tgggcggtgg acatgatgag atttaattatt 300  
gacgactttg ttccccggg aggggggacc aacaaaatct ctataccctt tgaatactac 360  
agaataagaa aggttaaggt tgaattctgg ccttgctccc ccatcaccca gggatgatagg 420  
ggagtgggct ccaactgctg tattctagat gataactttg taacaaaggc cacagcccta 480  
acctatgacc catatgtaaa ctactcctcc cgccatacaa tcccccaacc cttctcctac 540  
cactccggtt acttcacacc caaacctgtt cttgactcca ctattgatta ctccaacca 600  
aataacaaaa ggaatcagct ttggctgagg ctacaaacct ctagaaatgt ggaccacgta 660

ggcctcggca ctgcgttcga aaacagtaaa tacgaccagg actacaatat ccgtgtaacc 720  
atgtatgtac aattcagaga atttaattct aaagaccccc cacttgaacc ctaa 774

<210> 13

<211> 257

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCV2 ORF2 and amino swine influenza M2ael

<400> 13

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp Gly Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr

20 25 30

Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg

35 40 45



Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg  
 50 55 60  
 Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr  
 65 70 75 80  
 Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met  
 85 90 95  
  
 Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys  
 100 105 110  
 Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu  
 115 120 125  
 Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser  
 130 135 140  
 Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu  
 145 150 155 160  
  
 Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln  
 165 170 175  
 Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp  
 180 185 190  
 Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp  
 195 200 205  
 Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr  
 210 215 220  
  
 Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr  
 225 230 235 240  
 Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu  
 245 250 255  
 Pro