



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0038457
(43) 공개일자 2008년05월06일

(51) Int. Cl.

C12N 7/04 (2006.01)

- (21) 출원번호 10-2008-7009258(분할)
(22) 출원일자 2008년04월17일
심사청구일자 2008년04월17일
(62) 원출원 특허 10-2002-7017425
원출원일자 2002년12월20일
심사청구일자 2006년05월15일
번역문제출일자 2008년04월17일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2001/006738
국제출원일자 2001년06월15일
(87) 국제공개번호 WO 2002/00881
국제공개일자 2002년01월03일
(30) 우선권주장
00113088.9 2000년06월27일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인

바이엘 악티엔게젤샤프트

독일 데-51368 레버쿠젠

아이디-텔리스타드 비.브이.

네덜란드 엔엘-8219 피에이취 텔리스타드 에텔헤르트베그 15

(72) 발명자

스크라프 토비아스

독일 51061 쾰른 게르스텐캄프 10

리츠세위지크 프랑시스쿠스 안토니우스 마리아

네덜란드 엔엘-8244 에이케이 텔리스타드 스케르메르 9

(74) 대리인

이은선, 최규팔

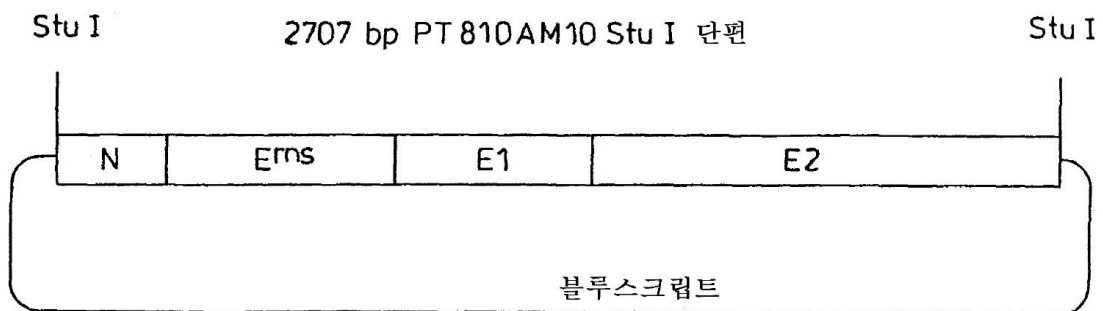
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) BVDV 바이러스-유사 입자

(57) 요약

본 발명은 소바이러스-유사 설사바이러스(bovin viral diarrhea virus)성 입자, BVDV 바이러스-유사 입자를 형성하기 충분한 BVDV 구조 단백질들의 폴리프로테인을 코딩하는 것에 상응하는 폴리시스트론 RNA 및 DNA, BVDV 바이러스-유사 입자의 어셈블리(assembly)를 위한 인자 및 구조 단백질을 코딩하는 바이러스 벡터, BVDV 바이러스-유사 입자를 포함하는 백신, 진단용 키트 및 BVDV 바이러스-유사 입자를 제조하는 방법에 관한 것이다.

대표도



플라스미드 BSM584

특허청구의 범위

청구항 1

감염성 RNA를 포함하지 않는 BVDV 바이러스-유사 입자.

청구항 2

제 1 항에 있어서, BVDV 구조 단백질 N, E^{rns}, E1 및 E2를 포함하는 BVDV 바이러스-유사 입자.

청구항 3

제 1 항에 따른 BVDV 바이러스-유사 입자 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함유함을 특징으로 하는, BVDV에 대한 면역화를 위한 약제학적 조성물.

청구항 4

제 3 항에 따른 약제학적 조성물을 인간을 제외한 동물에게 투여함을 특징으로 하여 BVDV 감염으로 인한 질환을 치료하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 소바이러스성 설사바이러스(bovin viral diarrhea virus)성 바이러스-유사 입자, BVDV 바이러스성 입자를 형성하기 충분한 BVDV 구조 단백질들의 폴리프로테인을 코딩하는 폴리시스트론 RNA 및 그에 상응하는 DNA, BVDV 바이러스성 입자의 어셈블리(assembly)를 위한 인자 및 구조 단백질을 코딩하는 바이러스 벡터, BVDV 바이러스성 입자를 포함하는 백신, 진단용 키트 및 BVDV 바이러스성 입자를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 소바이러스-유사 설사바이러스(BVDV)가 소에서 소바이러스-유사 설사의 병인체이고 전세계적으로 넓은 분포도 및 90% 정도의 높은 유병률을 갖는다.
- <3> BVDV는 플라비바이러스(Flaviviridae)과의 페스티바이러스(pestivirus) 속의 구성원이다[Horzinek (1991), Pestiviruses - taxonomic perspectives, Arch. Virology Suppl. 3, 55-65]. BVDV는 하나의 큰 폴리프로테인으로 해독될 수 있는 하나의 오픈 리딩 프레임에 코딩하는 대략 12.5 킬로 베이스(kb)의 (+)-스트랜드 RNA 게놈을 갖는다[Collet et al. (1988), protein encoded by bovin viral diarrhea virus: the genomic organisation of a pestivirus, Virology 165, 200-208]. BVDV 비리온은 당단백질을 포함하는 외피에 의해 둘러싸인 뉴클레오캡시드에 적합한 게놈 RNA로 구성된다.
- <4> 구조 단백질, 뉴클레오캡시드 단백질 (N) 및 3개의 외피 당단백질 (E^{rns} 또는 gp48, E1 또는 gp25 및 E2 또는 gp53)은 폴리프로테인의 N 말단 끝에서 가까운 순서대로 발견된다. 모든 3개의 당단백질이 시그널 펩티드 서열에 우선하고 소포체(ER)의 루멘에서 숙주 시그널 펩티다제에 의해 폴리프로테인으로부터 유리된다.
- <5> 관련된 플라비바이러스(Flaviviridae), 즉 C형 간염 바이러스에 대하여 구조 단백질을 코딩만하는 게놈 분절의 발현은 바이러스-유사 입자를 형성하기에 충분하다[Baumert et al. (1998), Hepatitis C virus structure protein assemble into virus-like particles in insect cells, J. Virol. 72, 3827-3836].
- <6> 소 허피스바이러스 1(BHV-1)은 감염성 소 비기관지염(IBR) 및 감염성 농포성 외음부질염(IPV) 및 감염성 귀두염(IBP)의 병인체이다. BHV-1은 전세계적으로 높은 유병율로 소에서 발견된다.
- <7> BHV-1은 알파허피스바이러스의 구성원이다. 약 136킬로 염기쌍의 더블 스트랜드 DNA 게놈을 갖고, 약 70개의 유전자(이중 약 30개의 유전자는 바이러스 복제에 비필수적이다)를 코딩한다. 비필수 당단백질 E (gE) 유전자의

결실을 갖는 자발적 돌연변이체를 안전하고 유효한 마커 백신에 사용한다[Kaashoek et al. (1994), A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovin herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine, Vaccine 12, 439-444].

- <8> BVDV 유도 질환을 예방하기 위한 백신은 불활성화된 BVDV 균주, 분리된 BVDV 당단백질에 기초한 서브유니트 백신, 약독화된 BVDV 균주[reviewed by Van Oirschot et al. (1999), Vaccination of cattle against bovin viral diarrhoea, Vet. Microbiol. 64, 169-183], DNA 백신[Reddy et al. (1999), Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 22, 231-246; Harpin et al. (1999), Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the bovin viral diarrhoea virus major glycoprotein E2, J. Gen. Virol. 80, 3137-3144], 또는 벡터 백신에 기초한다. 약독화된 BVDV 균주에 기초한 백신은 면역억제 및 자궁내 감염을 유발할 수 있고[Roth & Kaerberle (1983), Suppression of neutrophil and lymphocyte function induced by a vaccinal strain of bovin viral diarrhoea virus with or without administration of ACTH, Am. J. Vet. Res. 44, 2366-2372; Liess et al. (1984), Studies on transplacental transmissibility of a bovin virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle, Zentrbl. Veterinarmed. Reihe B 31, 669-681] 모체 항체의 존재하에서는 덜 유효할 수 있다.
- <9> 불활성화된 BVDV에 기초한 백신 또는 서브유니트 백신은 항원이 세포내에서 생산되지 않음으로써 면역계의 T 세포 구획에 덜 효과적으로 제시되기 때문에 덜 유효할 수 있다. 예를 들면, 3개의 바쿨로바이러스(baculovirus) BVDV E2 서브유니트 백신중 2개는 양 모델에서 태아 BVDV 감염을 예방하지 못했다[Bruschke et al. (1997), A subunit vaccine based on glycoprotein E2 of bovin virus diarrhoea virus induces fetal protection in sheep against homologous challenge, Vaccine 15, 1940-1945].
- <10> DNA 백신 및 벡터 백신은 단점이 없지만 현재 사용되고 있는 DNA 및 벡터 백신은 구조 단백질의 일부만을 발현 시키고 더욱 면역성인 바이러스-유사 입자를 형성하지 못한다. 예를 들면, WO 95/12682은 BHV-1 균주의 TK 좌위에서 BVDV E2만의 발현을 기술한다[cf. also Kweon et al. (1999), bovin herpesvirus expressing envelop protein (E2) of bovin viral diarrhoea virus as a vaccine candidate, J. Vet. Med. Sci. 61, 395-401].
- <11> BVDV는 항원변이를 보이고 여러 항원 그룹으로 구분될 수 있다(BVDV IA 및 IB, 및 BVDV II). 이 항원변이는 주로 E2의 서열 변이에 기초한다[van Rijn et al. (1997), Subdivision of the pestivirus genus based on envelop protein E2, Virology 237, 337-348].
- <12> 또한 덜 가변성인 N, E^{rns} 및 E1 단백질을 발현시키는 백신 [Elahi et al. (1999), Induction of humoral and cellular immune responses against the nucleocapsid of bovin viral diarrhoea virus by an adenovirus vector with an inducible promotor, Virology 261, 1-7]보다 교차보호에서 단 한가지 형태의 BVDV의 E2에 기초한 백신이 더욱 한정된다[Bolin and Ridpath (1996), glycoprotein E2 of bovin viral diarrhoea virus expressed in insect cells provides calves limited protection from systemic infection and disease, Arch. Virol. 141, 1463-1477].

발명의 내용

과제 해결수단

- <13> 본 발명은 BVDV 바이러스-유사 입자를 제공한다.
- <14> 본 명세서에서 사용되는 바 용어 "바이러스-유사 입자"는 그의 감염성 야생형 카운터파트와 공통되는 구조적 성질을 대부분 갖는 바이러스의 구조 단백질 대부분 또는 모두로 구성되는 입자를 언급한다. 그러나 숙주 세포와 상호작용하는 경우 적절한 핵산 서열이 이 입자에 존재하지 않기 때문에 바이러스-유사 입자는 자손 바이러스를 생산하지 않는다. BVDV 바이러스-유사 입자의 경우, 뉴클레오캡시드는 비어있거나 관련이 없는 RNA를 포함할 수 있지만, 그의 전체적인 구조는 야생형 뉴클레오캡시드와 유사하고 둘러싸는 외피는 야생형 BVDV에서 발견되는 것과 같은 동일한 막 당단백질 E1 및 E2 및 동일한 막 관련 단백질 E^{rns}를 포함한다.
- <15> 특히, 본 발명에 따른 바이러스성 입자는 BVDV 구조 단백질 N, E^{rns}, E1 및 E2를 포함한다. 본 발명은 다양한 자연발생 BVDV 균주 예로서 BVDV I A 형 균주(NADL 균주로 나타냄), BVDV I B형 균주(Osloss 균주로 나타냄) 및 세포병원 균주 87-2552를 포함하는 BVDV II형 균주(890 균주로 나타냄)[Reddy et al. (1995), Antigenic differences between a field isolate and vaccine strains of bovin viral diarrhoea virus, J. Clin. Microbiol. 33, 2159-2161] 및 본 명세서중 실시예에서 사용되는 BVDV type I 균주 PT810으로부터 유래될 수

있는 BVDV 바이러스성 입자를 주시한다. 본 발명은 또한 자연발생 단백질과 동일하지 않지만 돌연변이 구조 단백질이 바이러스성 입자로 어셈블링 될 수 있는 능력을 유지하는 하는 아미노산 치환, 결실 및/또는 삽입을 포함하는 BVDV 구조 단백질을 포함하는 BVDV 바이러스성 입자를 주시한다.

- <16> BVDV 구조 단백질은 해독후 프로세싱되는 폴리프로테인으로부터 유도된다. 본 발명에 따른 BVDV 바이러스-유사 입자를 제조하기 위하여 DNA 주형으로부터 구조 단백질을 합성하는 정보를 포함하는 숙주 세포를 사용하는 것이 바람직하다. BVDV 구조 단백질의 폴리프로테인을 코딩하는 자연발생된 RNA로부터 제조된 cDNA는 DNA 주형으로부터 전사된 mRNA가 세포 핵에서 스플라이스솜에 의해 인식되는 아주 많은 스플라이스 부위를 포함하고 있기 때문에 작용하지 못한다. 상기 cDNA로부터 전사된 RNA는 해독되기 전에 파괴될 것이다.
- <17> 따라서, 본 발명은 BVDV 구조 단백질 N, E^{rns}, E1 및 E2를 코딩하는 리보뉴클레오티드 서열을 포함하고, 세포 핵 중 그의 폴리프로테인 코딩 부분내에서의 스플라이싱이 거의 없거나 전혀 없는 폴리시스트론 RNA 분자를 제공한다.
- <18> 본 발명에 따른 RNA 분자의 바람직한 일례는 서열번호 2에 따른 아미노산 서열을 갖는 폴리프로테인을 코딩하는 리보뉴클레오티드 서열을 포함하고 그의 폴리프로테인 코딩 부분내 강력한 포텐셜(potential) 스플라이싱 부위, 즉, -22 이상의 스코어를 갖는 포텐셜 스플라이스 수용 부위 및 -13.1 이상의 스코어를 갖는 포텐셜 스플라이스 공여 부위가 존재하지 않는 RNA로 표시된다.
- <19> 본 발명에 따른 RNA 분자의 가장 바람직한 일례는 서열번호 1의 뉴클레오티드 17부터 뉴클레오티드 2710의 폴리뉴클레오티드 서열에 상응하는 리보뉴클레오티드 서열을 포함하는 RNA 분자로 표시된다.
- <20> 본 발명의 RNA 분자는 또한 본 발명에 의해 제공되는 상응하는 DNA 단편으로부터 수득될 수 있다.
- <21> 본 발명에 따른 DNA 단편은 BVDV 구조 단백질 N, E^{rns}, E1 및 E2를 코딩하지만, 강력한 포텐셜의 스플라이스 부위를 포함하지 않는다. 스플라이스 부위는 엑손-인트론 결합(junctions)(스플라이스 공여자 서열) 또는 인트론-엑손 결합(스플라이스 수용 서열)이고 핵중 스플라이스솜에 의해 프리-mRNA로부터 인트론을 제거하여 엑손상에 위치하는 코딩 부위를 함께 융합하여 완전한 오픈 리딩 프레임 형성을 위하여 사용되는 진핵세포 mRNAs중 인식 서열이다. BVDV RNA가 통상 세포질중 머물러 있기 때문에 BVDV cDNA는 사용되지 않는 '우발성(accidental)' 스플라이싱 시그널을 포함한다. BHV1과 같은 바이러스성 벡터에 의해 BVDV cDNA를 발현시켜, RNA는 핵내에서 생성되고 스플라이스솜에 의해 프로세싱 될 것이다[Shiu et al. (1997), The presence of RNA splicing signals in the cDNA construct of the E2 gene of classical swine fever virus affected its expression, J. Virol. Methods 69, 223-230].
- <22> N, E^{rns}, E1 및 E2를 코딩하는 BVDV cDNA로부터 대부분의 (포텐셜) 스플라이싱 시그널을 제거하기 위하여, PC/유전자 버전 2.32의 핵산 및 단백질 서열 분석 소프트웨어 시스템(Jan. 1989)을 사용할 수 있다. 이 소프트웨어 프로그램에서 Staden의 방법[(1984), Computer methods to locate signals in nucleic acid sequence, Nucl. Acids. Res. 12, 505-519]에 기초하는 임의의 "스플라이스 결합"이 본 발명에서 사용하기에 적절하다.
- <23> 본 발명에 따른 DNA 단편의 바람직한 일례는 서열번호 1에 따른 뉴클레오티드 17 내지 뉴클레오티드 2710의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA로 표시된다.
- <24> 본 발명은 추가로 BVDV 바이러스-유사 입자를 생성하기에 적절한 DNA 작제물을 제공한다. BVDV 구조 단백질이 숙주 세포에서 발현되도록 하기 위하여 DNA는 시스-조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 상기 조절 서열은 세포 내에서 RNA 폴리머라제에 결합할 수 있고, 하류(3' 방향) 코딩 서열의 전사를 개시시킬 수 있다. 본 발명을 한정하기 위한 목적으로 시스-조절 서열의 3' 말단에 Kozak 보존 서열 및 코딩 서열의 해독 개시 코돈(ATG)이 이어지고 상기 서열은 검출가능한 배경 수준으로 전사를 개시할 수 있는 최소한의 염기 또는 요소를 포함하도록 상류(5' 방향)로 신장된다. 시스-조절 서열중 전사 개시 부위 및 RNA 폴리머라제 II 복합체를 결합시키는 단백질 결합 모티프가 발견될 것이다. 상기 조절 서열의 선택은 본 분야의 기술자에게 자명하다. 적절한 시스-조절 서열은 진핵세포 유전자, 바람직하게 포유동물로부터, 또는 포유동물을 감염시키는 바이러스로부터 유래된 유전자로부터 유래될 수 있다. 예로서 마우스 백혈병 바이러스(MuLV) 말단의 긴 반복서열(MLV-LTR)과 같은 레트로바이러스의 말단의 긴 반복서열상에 위치하는 시스-조절 서열 및 원숭이 바이러스 40 (SV40) 프로모터이다.
- <25> 본 발명에 따른 DNA 작제물의 바람직한 일례에서 BVDV 구조 단백질의 폴리프로테인을 코딩하는 DNA는 인간 사이토메갈로바이러스 초기 1 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

- <26> 본 발명에 따른 DNA 작제물은 추가로 바람직하게 코딩 부위의 3' 말단에 종결자 서열을 포함한다. 진핵세포중 RNA 폴리머라제 II에 의한 mRNA 합성은 통상 'TATA-Box' 하류로부터 근거리에서 정확한 개시점을 갖지만, 정확한 종결 시그널은 갖지 않는다. 전사 부위의 3' 말단의 상류에서 발견되는 poly(A) 시그널은 mRNA 3' 말단의 절단 및 폴리아데닐화에서 중요한 기능을 하고[Keller (1995), No end yet to messenger RNA 3' processing, Cell 81, 829-832] 전사와 종결과 관련되지만 poly(A) 시그널의 하류 서열은 mRNA 전사의 종결에서 중요한 작용을 하는 것으로 판단된다. 이 서열은 전사 복합체를 지연시키거나 중지시키는 것과 관련된다[Vandenbergh (1991), An apparent pause site in the transcription unit of the rabbit alpha-globin gene, J. Mol. Biol. 220, 255-270]. 유효한 종결 및 폴리아데닐화에 의해 mRNA는 안정성을 얻기 때문에, 소 성장 호르몬 유전자의 하류에서 발견되는 것과 같은 종결 시그널은 자주 진행 세포의 발현 벡터에 포함된다.
- <27> 본 발명의 DNA 작제물의 바람직한 일례에서 BVDV 구조 단백질의 폴리프로테인을 코딩하는 DNA에 소 성장 호르몬 종결 서열이 잇따른다.
- <28> 실제 관점으로부터 바이러스 벡터의 용도는 하기 이유에서 바람직한다:
- <29> · 바이러스 벡터는 삽입된 유전자(들)상에서 고수준으로 코딩되는 단백질을 발현시킬 수 있고;
- <30> · 재조합 바이러스는 서브유닛 백신보다 저비용으로 적절한 숙주 세포에서 고 역가로 생성될 수 있고;
- <31> · 숙주에 투여할 때 재조합 바이러스는 삽입된 유전자(들) 상에서 코딩되는 단백질을 발현시키고, 숙주내에서 상기 단백질을 다량 발현시키고;
- <32> · 삽입된 유전자(들)에 의해 코딩되는 단백질은 세포내에서 발현되고, 따라서 유효하게 MHC I형 분자에 의해 제시되어 숙주의 세포성 T 세포를 자극시킬 수 있고;
- <33> · BVDV 계놈의 모든 구조 단백질은 변형된 생(live) 바이러스 백신과 유사하게 발현될 수 있고 바이러스성 입자를 형성할 수 있지만, 야생형으로의 역전(reversion)과 같은 상기 백신에서 통상적으로 발생하는 위험이 없고;
- <34> · 생 백신은 통상적으로 죽은(killed) 백신보다 더욱 면역원성을 가진다.
- <35> 본 발명은 BVDV 바이러스-유사 입자의 어셈블리(assembly)에 필요한 BVDV 구조 단백질 및 인자를 코딩하는 바이러스 벡터를 제공한다.
- <36> 더욱 바람직한 일례로 바이러스 벡터는 송아지 허피스바이러스 1(BHV-1)로 표시된다.
- <37> 추가의 바람직한 일례로 당단백질 E (gE)를 코딩하는 서열내 결실을 포함하거나 gE를 코딩하는 계놈 영역이 완전하게 결핍되어 있는 BHV-1 벡터는 BVDV 바이러스-유사 입자의 제조에 사용된다. BHV-1 벡터의 한 예는 수탁번호 I-1213하에 프랑스, 인스티튜트 파스테르(Institut Pasteur, France)에 기탁된 Difivac-1이다. 상기 벡터 사용으로 이중 마커 성질을 갖는 BHV-1/BVDV 백신을 생산할 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같이 BHV-1/BVDV 백신으로 면역화된 숙주, 특히 소는 BHV-1 gE 또는 BHV-1gI/gE 복합체 및 BVDV 비구조성 단백질, 특히 NS3 또는 p80를 제외하고 BHV-1 및 BVDV에 대하여 항체를 형성한다. 체액, 특히 비액 샘플 및 혈청 샘플에서 항-BHV-1gE 또는 항-BHV-1gI/gE 항체 및/또는 항-BVDV 항체의 존재를 측정하여 야생형 BHV-1 및/또는 야생형 BVDV로 감염된 숙주, 특히 소를 이 BVH-1/BVDV 백신으로 백신화된 숙주로부터 선별할 수 있다.
- <38> 본 발명에 따른 바이러스 벡터의 가장 바람직한 일례는 2000년 6월 8일 콜렉션 내셔널 드 컬처 드 마이크로오가니즘스, 인스티튜트 파스테르(25, Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris, France)에 기탁된 수탁번호 CNCM I-2488하에 기탁된 A9-SV-1F9(Difivac-1의 gE 좌위중 합성된 BVDV 캡시드; E^{rns}, E1 및 E2)이다.
- <39> 본 발명은 또한 상기 언급된 바이러스 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 바이러스 벡터를 감염 또는 형질 감염에 의해 숙주 세포내로 삽입할 수 있다. 적절한 숙주세포의 예는 배아 소 기관(EBTr) 세포 또는 Madin-Darby 소 신장(MDBK) 세포이다.
- <40> 본 발명은 또한 BVDV 바이러스-유사 입자 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는, BVDV 유도 질환에 대하여 숙주를 면역화시키는 백신을 제공한다. 본 발명에 유용한 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제의 예는 안정화제 예를 들면, 탄수화물(예를 들면 소르비톨, 만니톨, 전분, 수크로오스, 글루코오스, 텍스트란), 알부민 또는 카제인과 같은 단백질, 소 혈청 또는 탈지유와 같은 제제를 포함하는 단백질 및 완충액(예를 들면 포스페이트 완충액)을 포함한다. 임의로 어쥬번트 활성을 갖는 하나 이상의 화합물을 백신에 첨가할 수 있다. 적절한 어쥬번트는 예를 들면 수산화알루미늄, 포스페이트 또는 옥사이드 및 유성 유화제 예로서 사포닌을

포함한다.

- <41> 투여되는 유용한 유효량은 나이, 체중, 투여 방식 및 백신화시키고자 하는 병원체의 유형에 따라 달라질 것이다. 적절한 투여량은 예를 들면 약 10^3 - 10^7 pfu/동물일 수 있다.
- <42> 본 발명에 따른 백신은 비강내, 진피내, 피하내 또는 근육내 투여될 수 있다.
- <43> 본 발명에 따른 바람직한 백신은 백신화된 숙주에서 BVDV 바이러스-유사 입자를 세포내에서 생성하고 BVDV 유도 질환에 대하여 예방하기 위한 유익한 면역 반응을 유도하는 BHV-1/BVDV 재조합 바이러스 벡터를 포함한다. 또한 상기 백신은 BHV-1 유도 질환을 예방하고, gE가 없는 BHV-1을 벡터로 사용하는 경우, 상기 백신으로 백신화된 숙주는 BHV-1 또는 BVDV로 감염된 숙주로부터 선별될 수 있다.
- <44> 본 발명은 또한 항-BVDV 항체의 존재 및/또는 부재를 검출, 특히 생물학적 샘플 예로서 생물학적 체액 샘플, 특히 비액 샘플 또는 혈청 샘플 중 항-BVDV 및 항-BHV-1 항체의 존재 및/또는 부재를 검출하기 위한 진단용 키트를 제공한다. 이 진단 시험을 사용하여 야생형 바이러스로 감염된 숙주 및 본 명세서에 기재된 BHV-1/BVDV 백신만으로 백신화된 숙주를 선별한다.
- <45> 이 진단 시험에서 검출된 항-BHV-1 및/또는 항-BVDV 항체는 백신 중 존재하지 않는 바이러스 항원, 특히 BHV-1gE 및 BHV-1 gI/gE 복합체 및 BVDV 비구조 단백질, 특히 NS3 또는 p80과 반응한다.
- <46> 본 발명은 또한
- <47> (a) 상기 설명된 바와 같은 DNA 작제물을 BVDV 바이러스-유사 입자의 어셈블리를 위한 인자를 코딩하는 바이러스 벡터내로 삽입하고,
- <48> (b) DNA에 의해 코딩되는 폴리프로테인을 발현시킬 수 있는 적절한 숙주 세포를 감염시키고
- <49> (c) 적절한 조건하에 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, BVDV 바이러스-유사 입자를 제조하는 방법을 제공한다.
- <50> 본 발명은 또한
- <51> (a) 적절한 숙주 세포를 상기 설명된 바와 같은 벡터로 감염시키고
- <52> (b) 적절한 조건하에 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는 BVDV 바이러스-유사 입자를 제조하는 방법을 제공한다.
- <53> 본 발명은 추가로
- <54> (a) 상기 설명된 바와 같은 DNA 작제물을 BHV-1 계통내로 삽입하고,
- <55> (b) 벡터에 의해 코딩되는 폴리프로테인을 발현시킬 수 있는 적절한 숙주세포를 감염시키고,
- <56> (c) 적절한 조건하에 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, BVDV 바이러스-유사 입자의 형성을 위한 모든 구조 단백질을 코딩하는 BHV1/BVDV 재조합 바이러스를 제조하는 방법을 제공한다.
- <57> 감염 배양액의 상층액에 세포, 예로서 EBTr 세포 또는 MDBK 세포의 모노레이어를 가하여 적절한 숙주 세포를 재조합 바이러스로 감염시킬 수 있다. 예를 들면, 배지를 제거한 후 150 cm^2 조직 배양 플라스크 중 모노레이어 상에 1 내지 3ml의 바이러스 포함하는(10^3 내지 10^7 pfu/ml) 배양 배지를 가할 수 있다. 2시간동안 인큐베이션시킨 후 신선한 조직 배양 배지를 30ml 이하로 가할 수 있다. 감염 2 내지 3일 후 전체 세포병변효과(cpe)가 가시화될 것이고 10^8 pfu/ml이 배지에서 관찰될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <58> **BVDV 구조 단백질에 대한 코딩 영역의 작제**
- <59> 최근의 BVDV 단리물의 구조 단백질의 아미노산 서열을 측정하기 위하여 최근 유럽에서 분리된 BVDV I형 균주 PT810의 5' 쪽 1/2의 뉴클레오티드 서열을 표준 방법을 사용하여 확인하였다.
- <60> 뉴클레오타이드 단백질 N 및 당단백질, E^{rns}, E1 및 E2의 코딩 영역은 유추된 아미노산 서열을 공개된 BVDV 서열과 비교하여 동정되었다. 코딩 영역은 핵내에서 BHV-1에 의해 발현되는 경우 스플라이소좀에 의해 인식되고 프

로세싱될 수 있는 서열(스플라이싱 시그널)을 포함하였다. 따라서, 코딩 포텐셜은 영향을 받지 않는 반면 대부분의 (포텐셜) 스플라이싱 시그널은 제거되는 방식으로 상기 서열은 적응하였다. 적응 서열은 합성적으로 제작되었고 N 단백질의 첫번째 아미노산을 제외하고 원 BVDV 서열과 동일한 아미노산을 코딩한다.

<61> BVDV 균주 PT810에서 N 단백질의 아미노산은 세련이지만 합성 코딩 영역의 유효한 해독을 위하여 이 아미노산을 메티오닌으로 대체하고 Kozak 보존 서열에 우선하였다. 단백질 코딩 영역을 종결시키기 위하여 그의 막 영역 바로 뒤에 E2 단백질의 추정 카복시-말단 종결부위에 종결 코돈을 삽입하였다. 클로닝을 용이하게 하기 위하여 Stu I 제한효소에 의해 인식되는 서열을 총 길이가 2715 뉴클레오티드인 합성 서열의 양측에 첨가하였다. 참조 서열번호 1. 더블 스트랜드 DNA 단편을 합성하고 원핵세포 플라스미드 블루스크립트에서 클로닝하고 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 박테리아에서 증식시켰다. 참조 도 1.

<62> **Difivac-1의 gE 좌위에 대한 BHV-1/BVDV 재조합/발현 카세트 작제**

<63> gE 결실 Za 균주(WO 92/21751에서 Difivac-1로 개명됨)의 Us 영역에서 밝혀진 재조합 분석을 통해 당단백질 E 유전자 및 이웃하는 US9 유전자 및 US1.5 유전자 일부의 수반되는 이중 역위가 나타났다. 또한 이 분석을 통하여 재조합점의 위치가 나타났다[Rijsewijk et al. (1999), Spontaneous BHV-1 recombinants in which the gI/gE/US9 region is replaced by a duplication/inversion of the US1.5/US2 region, Arch. Virol. 144, 1527-1537]. 참조 도 2.

<64> Za 균주의 게놈중 이질성 유전자를 gE 결실 부위에 또는 근접하게 삽입하기 위하여 재조합 카세트를 작제하였다. 이 목적으로 gI 유전자 부분을 코딩하고 Za 재조합점의 40 bp 상류에서 종결하는 0.8 킬로 염기쌍 Bsa I 단편 및 Za 재조합점의 40bp 하류에서 개시하고 US1.5 유전자 부분을 코딩하는 0.7 킬로 염기쌍 Bsa I 단편을 그의 원 배향으로 pUC18에서 클로닝하였다. 이 작제물을 pM400으로 명명하고 재조합 단편사이에 발현 카세트 삽입을 위한 유일한 Sma I 부위를 갖는다. 참조 도 3.

<65> pM400의 Sma I 부위에서 플라스미드 pVR1012로부터의 1.9 킬로 염기쌍 Bal I - Acc65 I 단편을 측면에 위치하는 재조합 단편과 동일한 배향으로 그의 시스-조절 서열과 함께 클로닝하였다. 시스-조절 서열은 인간 사이토메갈로바이러스 초기 1 프로모터(hCMVIEp.) 및 그의 5' 비해독 리더(5'UT), 및 소 성장호르몬 종결 서열(BT)이다. 생성된 작제물은 pS205로 명명되고 프로모터 영역 및 종결 영역사이에 유일한 EcoR V 부위를 갖는다.

<66> pS205의 EcoR V 부위에서 BVDV 뉴클레오펙시드 단백질 N 및 BVDV 당단백질, E^{rns}, E1 및 E2를 코딩하는 2707 염기쌍 Stu I 단편을 프로모터/종결자 및 측면에 위치하는 재조합 서열과 동일한 배향으로 클로닝하였다. 이 BHV-1/BVDV 재조합/발현 카세트를 pS318로 명명하였다. 참조 도 3.

<67> **BVDV 구조 단백질에 대한 코딩 영역을 발현하는 BHV-1 재조합 바이러스의 작제 및 분리**

<68> BVDV 뉴클레오펙시드 단백질 N 및 BVDV 당단백질, E^{rns}, E1 및 E2를 발현하는 BHV-1/BVDV 재조합체(도 4에 나타냄)를 작제하기 위하여, 선형 pS318 플라스미드 및 Za 균주의 게놈 DNA를 표준 방법에 따라 소 세포에 동반형질 감염시키고(cotransfection) 동반형질감염 48시간후 세포를 냉동/해동시켜 추정의 재조합 바이러스로부터 유리시켰다. 이 재조합 바이러스를 분리하기 위하여 세포 조각(debris)을 펠릿화하고 상층액을 사용하여 96개의 웰 플레이트상에서 소 세포를 감염시키고 항-BVDV E2 MAbs 166로 면역염색법을 사용하여 BVDV 양성 웰을 확인하였다. BVDV E2 양성 웰의 배지내 바이러스를 회석하여 또다른 96개의 웰 마이크로플레이트상에서 소 세포를 감염시키고 BVDV E2 양성 싱글 플라크로부터의 바이러스는 정제된 재조합체를 수득하기 위하여 세번 플라크 정제(plaque purified)되었다. 이 방법으로 수득한 재조합체중 하나를 A9-SV-1F9로 명명하고 MDBK 세포상에서 8회 계대하고 6개의 상이한 소 세포주 패널상에서 발현의 안정성을 시험하였다. 참조 도 5. 8회의 계대후에도 시험된 모든 유형의 소 세포에서 실질적으로 모든 플라크는 BVDV E2 양성으로 밝혀졌다. MDBK 세포에서 BVDV E2 양성 플라크의 퍼센트를 측정하고 8회의 계대후에서 여전히 90% 이상임이 밝혀졌다.

<69> **서열 목록의 설명**

<70> 서열번호 1 및 2

<71> BVDV 균주 PT810의 단백질 N, E^{rns}, E1 및 E2를 코딩하는 합성 DNA 단편 PT810AM10의 2715개의 긴 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. DNA 단편 양측에 제한효소 Stu I의 인식서열을 첨가하고 개시 코돈(ATG) 상류에 Kozak 보존 서열을 삽입한다. PT810AM10 서열은 통상의 유전자 코드를 사용하여 해독되고 코딩되는 아미노산 서열은 뉴클레오티드 서열 밑에 3문자로 표시되었다. 오픈 리딩 프레임에 의해 코딩되는 모든 아미노산은 오픈 리딩 프레임의

첫번째 아미노산을 제외하고 BVDV 균주 PT810에서 발견되는 것과 일치한다. PT810에서 첫번째 아미노산은 세린 잔기이지만 PT810AM10에서 메티오닌 잔기로 바뀌었다. 단백질 코딩 영역 말단의 종결 코돈은 DNA 단편 말단의 Stu I 부위와 중첩한다.

<72> 서열번호 3 및 4

<73> 단백질 N을 코딩하는 서열번호 1의 분절.

<74> 서열번호 5 및 6

<75> 단백질 E^{rns}를 코딩하는 서열번호 1의 분절.

<76> 서열번호 7 및 8

<77> 단백질 E1을 코딩하는 서열번호 1의 분절.

<78> 서열번호 9 및 10

<79> 단백질 E2를 코딩하는 서열번호 1의 분절.

도면의 간단한 설명

<80> 도 1

<81> 플라스미드 BSM584의 구조. 2715개 뉴클레오타이드의 긴 DNA 단편 PT810AM10 를 원핵세포 플라스미드 블루스크립트에서 클로닝하였다. 플라스미드 BSM584를 제한효소 Stu I로 분해하여 2707개 뉴클레오타이드의 긴 단편을 유리 시켜 BHV-1 재조합/발현 카세트 pS205내로 삽입하였다. 참조 도 3.

<82> 도 2

<83> 상단부: 벡터로서 사용된 Za 또는 Difivac-1 균주에서 발견되는 BHV-1 게놈 및 재조합체의 구조도. 야생형 BHV-1의 길이는 대략 136 킬로 염기쌍이고 길고(L) 짧은(S) 분절을 갖는다. 짧은 단편은 사전 박스에 표시된 역위 반복서열에 접하는 유일한 영역을 갖는다.

<84> 중앙부: 유일한 짧은(Us) 영역에서 8개의 오픈 리딩 프레임이 인식되었다: US1.5, US2, PK, gG, gD, gI gE 및 US9.

<85> 하단부: 자연발생적 gE 결실 돌연변이 Za 또는 Difivac-1(Dif.)에서 gE 및 US9 유전자는 결실되고 US1.5 유전자 일부는 대신 증폭된다. 재조합점을 화살표로 나타낸다. 이 Difivac-1 돌연변이체는 WO 92/21751 및 Rijsewijk등의 [Arch. Virol. (1999)144, 1527-1537]에 기술되어 있다.

<86> 도 3

<87> 재조합/발현 카세트 플라스미드 pS318의 도.

<88> Difivac-1 균주로부터 분리된 두개의 gE 좌위의 상류측으로부터의 0.8 킬로 염기쌍 Bsa I (B) 단편 및 gE 좌위의 하류측으로부터의 0.7 킬로 염기쌍 Bsa I 단편을 각각 원핵세포 플라스미드 pUC18의 Hinc II 부위 및 EcoR I 부위에서 클로닝하였다. 0.8 kbp Bsa I 단편을 Hinc II 부위내로 삽입하기 위하여 Bsa I 단편을 둔단화하였다 (blunt ended). 0.7 kbp Bsa I 단편을 EcoR I 부위내로 삽입하기 위하여 EcoR I 링커를 표준방법을 사용하여 이 단편에 첨가하였다. 생성된 플라스미드를 pM400으로 명명하였다. pM400의 Sma I 부위에서 인간 사이토메갈로 바이러스의 IE1 프로모터/인핸서(hCMVIEp.) 및 동일한 프로모터 의 5' 비해독 영역(5'UT) 및 소 성장 호르몬 종결자 (BT) 서열을 포함하는 플라스미드 pVR1012로부터 수득한 단편을 삽입하였다. 생성된 플라스미드를 pS205로 명명하였다. pS205의 유일한 EcoR V 부위내로 플라스미드 BSM584로부터의 2707 bp Stu I 단편을 삽입하였다. 생성된 클론을 플라스미드 pS318로 명명하고 이 플라스미드를 동반형질감염 시험에 사용하여 BVDV 유전자를 Za(Difivac-1)의 gE 좌위내로 재조합하였다. 참조 도 4.

<89> 도 4

<90> BVDV 균주 PT810의 모든 구조 단백질을 코딩하는 BHV-1/BVDV 재조합 A9-SV-1F9의 도. 상부에서 BHV-1 게놈의 구조가 표시되었다. 중앙에는 모든 유전자의 위치와 함께 유일한 짧은 영역을 포함하는 EcoR I 단편 및 하단부에는 BVDV 균주 PT810의 구조 단백질을 코딩하는 2707 bp의 긴 단편과 함께 BVDV 발현 카세트를 나타내었다. BVDV 오픈 리딩 프레임보다 인간 사이토메갈로바이러스 IE1 프로모터/인핸서 영역(hCMVIEIp.) 및 이 프로모터의

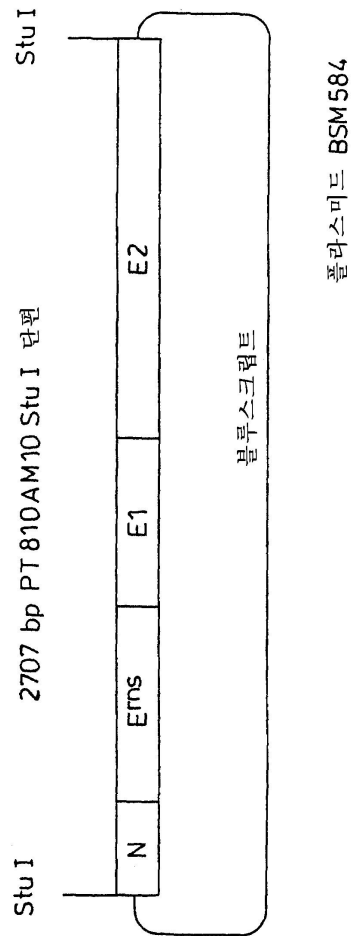
5' 비해독(5'UT) 리더가 우선하고 BVDV 오픈 리딩 프레임은 소 성장 호르몬 종결자 서열(BT)이 이어진다. 카세트를 gE 좌위에서 이 게놈에서 발견되는 재조합 부위의 40bp 상류의 Difivac-1 게놈내로 주위 유전자와 동일한 배향으로 삽입하였다.

<91> 도 5

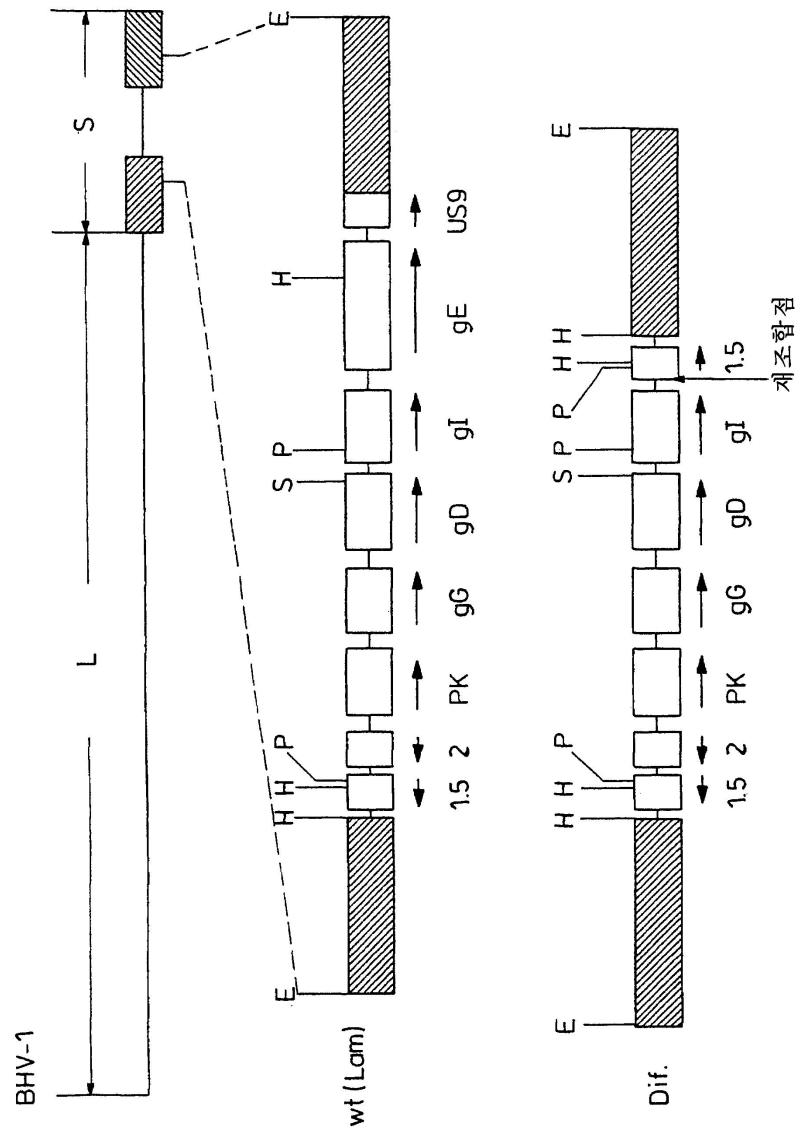
<92> BHV-1/BVDV 재조합 A9-SV-1F9로 감염되고 감염후 4일간 항-BVDV E2 MAbs 166로 염색된 MDBK 세포 모노레이어의 IPMA. 주위 세포는 염색되지 않는 반면 감염된 세포는 항체에 의해 염색된 둥근 플라크를 형성한다.

도면

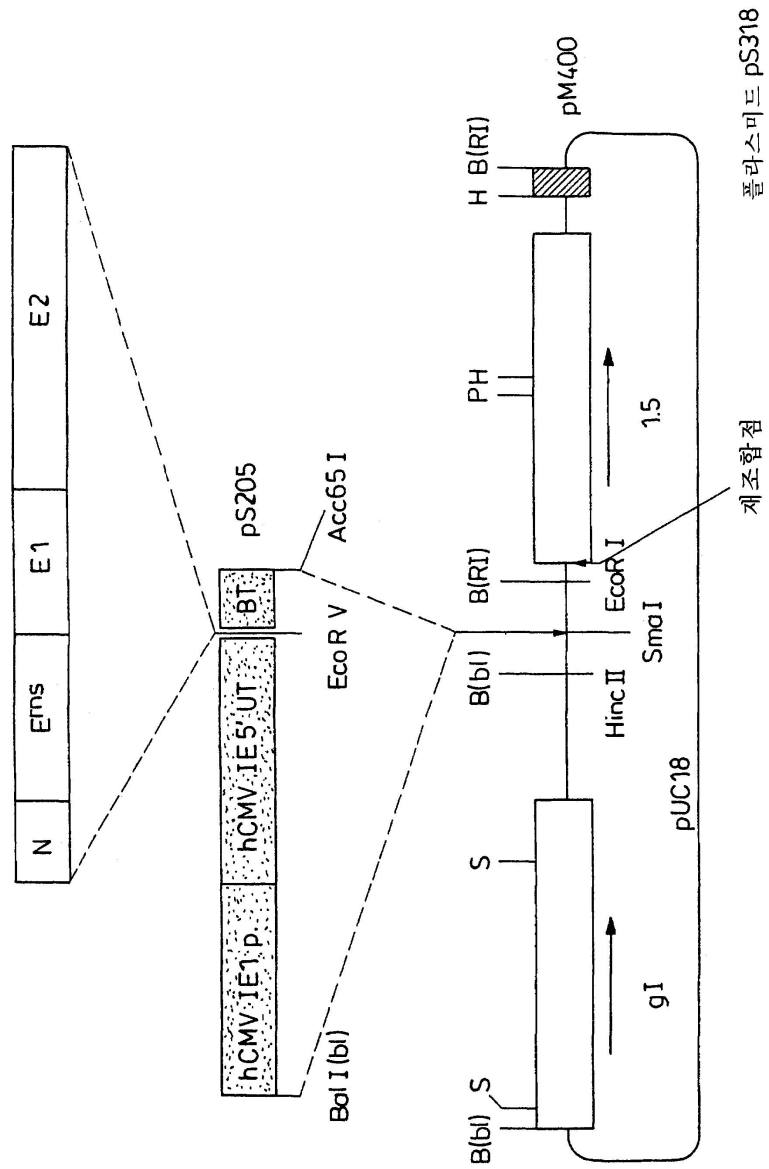
도면1



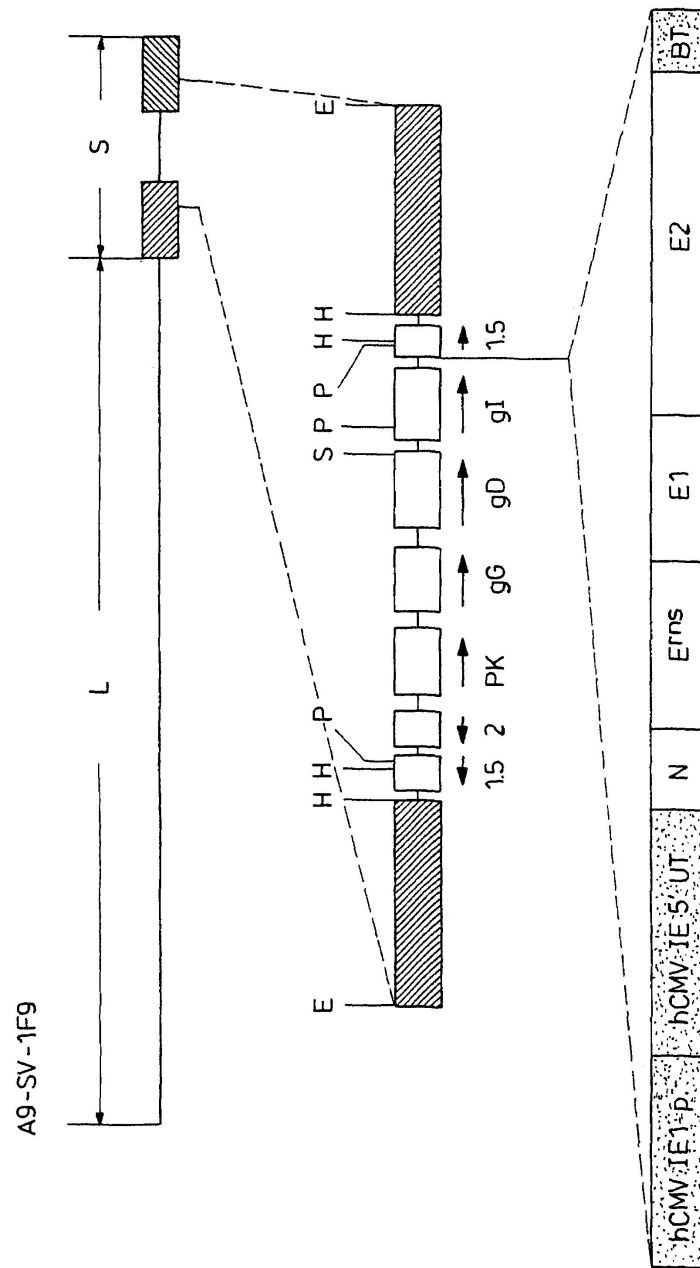
도면2



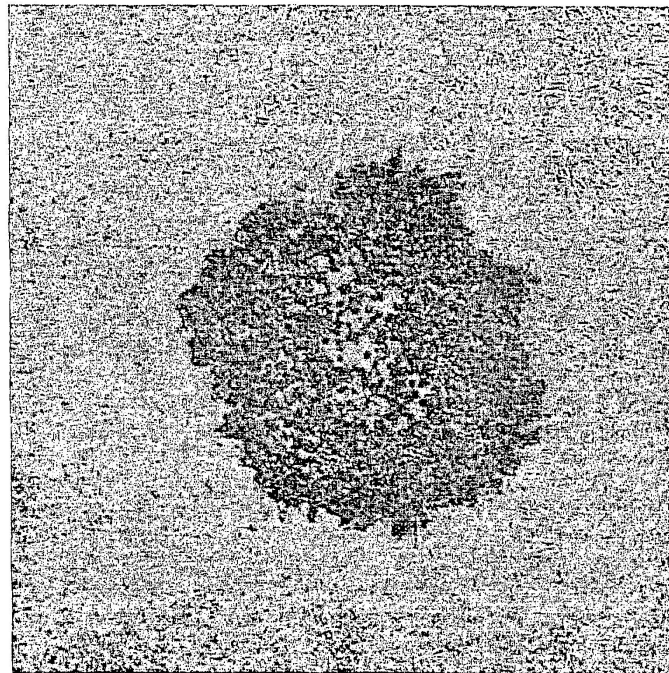
도면3



도면4



도면5



서열목록

<110> Bayer AG
 ID-Lelystad B.V.
 <120> BVDV virus-like particles
 <130> Le A 34 440
 <160> 10
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 2715
 <212> DNA
 <213> Bovine viral diarrhea virus
 <220><221> CDS
 <222> (17)..(2707)
 <223>
 <220>

<221> 3'UTR
 <222> (8)..(16)
 <223> Kozak consensus sequence
 <400> 1
 aaggcctgcc gccacc atg gac acg aaa gaa gaa ggg gca aca aaa aaa caa 52
 Met Asp Thr Lys Glu Glu Gly Ala Thr Lys Lys Gln
 1 5 10
 cag aaa ccg gac cgc gtt gaa aaa ggg cgc atg aaa ata acg cct aaa 100
 Gln Lys Pro Asp Arg Val Glu Lys Gly Arg Met Lys Ile Thr Pro Lys
 15 20 25
 gaa act gaa aaa gat tcc cgg
 acc aaa cca cct gat gct acg atc gtc 148
 Glu Thr Glu Lys Asp Ser Arg Thr Lys Pro Pro Asp Ala Thr Ile Val
 30 35 40
 gtc gac ggc gtc aaa tac caa gtc aaa aaa ggc aaa gtc aaa tcc 196
 Val Asp Gly Val Lys Tyr Gln Val Lys Lys Lys Gly Lys Val Lys Ser

45	50	55	60	
aaa aac acc caa gat	ggg ctc tac cac aat	aaa aat aaa cca caa gaa		244
Lys Asn Thr Gln Asp				
Gly Leu Tyr His Asn Lys	Asn Lys Pro Gln Glu			
65	70	75		
tca cgc aaa aaa ctg	gaa aaa gct cta ttg gct	tgg gca ata ttg gct		292
Ser Arg Lys Lys Leu	Glu Lys Ala Leu Leu	Ala Trp Ala Ile Leu Ala		
80	85	90		
gtt gta tta ttt caa	gtc aca atg ggg gaa aac	ata aca caa tgg aac		340
Val Val Leu Phe Gln	Val Thr Met Gly Glu	Asn Ile Thr Gln Trp Asn		
95	100	105		
ttg caa gac aat gga	acc gaa ggc gtc caa	cgg gct atg ttt gaa cgc		388
Leu Gln Asp Asn Gly	Thr Glu Gly Val Gln	Arg Ala Met Phe Glu Arg		
110	115	120		
ggc gtc aat cgg agc	tta cat gga atc tgg	ccc gaa aaa atc tgc acc		436
Gly Val Asn Arg Ser	Leu His Gly Ile Trp	Pro Glu Lys Ile Cys Thr		
125	130	135	140	
ggc gtc cca tct cat	ttg gcc acc gat atg	gaa		
ttg aaa cga att cat	484			
Gly Val Pro Ser His	Leu Ala Thr Asp Met	Glu Leu Lys Arg Ile His		
145	150	155		
gga atg atg gac gca	tct gaa aaa acc aac	tat aca tgc tgc cgg ctt		532
Gly Met Met Asp Ala	Ser Glu Lys Thr Asn	Tyr Thr Cys Cys Arg Leu		
160	165	170		
caa cga cat gaa tgg	aat aaa cat ggc tgg	tgc aat tgg tac aat atc		580
Gln Arg His Glu Trp	Asn Lys His Gly Trp	Cys Asn Trp Tyr Asn		
Ile				
175	180	185		
gaa cct tgg att ctg	ctt atg aat cgg acc	caa gct aac ctc act gaa		628
Glu Pro Trp Ile Leu	Leu Met Asn Arg Thr	Gln Ala Asn Leu Thr Glu		
190	195	200		
ggc caa cca caa cgc	gaa tgc gcc gtc acc	tgc cgc tat gac cgg aat		676
Gly Gln Pro Gln Arg	Glu Cys Ala Val Thr	Cys Arg Tyr Asp Arg Asn		
205	210	215	220	
tcc gac ttg aat gtc	gtg aca caa gcc cgg	gac tct ccg aca cca ctt		724
Ser Asp Leu Asn Val	Val Thr Gln Ala Arg	Asp Ser Pro Thr Pro Leu		
225	230	235		
acg gga tgc aaa aaa	ggg aaa aac ttc tct	ttt tgc ggc atc gtc atc		772
Thr Gly Cys Lys Lys	Gly Lys Asn Phe Ser	Phe Ser Gly Ile Val Ile		
240	245	250		
caa ggc cct tgc aat	ttt gaa att gct gca	tct gac gtc ctc ttc aaa		820
Gln Gly				
Pro Cys Asn Phe Glu	Ile Ala Ala Ser Asp	Val Leu Phe Lys		
255	260	265		
gaa cat gac tgc aca	tcc ata ttt caa gat	act gct cat tac ctc gtt		868
Glu His Asp Cys Thr	Ser Ile Phe Gln Asp	Thr Ala His Tyr Leu Val		
270	275	280		
gat ggg atg act aac	tct ttg gag tct gct	cga caa gga act gca aaa		916
Asp Gly Met Thr Asn	Ser Leu Glu Ser Ala	Arg Gln Gly Thr Ala Lys		
285	290			
	295	300		
cta aca act tgg ctg	ggg cga caa ctt ggg	ata ttg ggg aaa aaa ctg		964
Leu Thr Thr Trp Leu	Gly Arg Gln Leu Gly	Ile Leu Gly Lys Lys Leu		
305	310	315		
gaa aac aaa tcc aaa	aca tgg ttc ggg gct	tat gca tct tcc cct tac		1012

Glu Asn Lys Ser Lys Thr Trp Phe Gly Ala Tyr Ala Ser Ser Pro Tyr
320 325 330
tgc gat gtt gaa cga aaa ctt ggc tac atc
tgg ttt aca aaa aat tgc 1060
Cys Asp Val Glu Arg Lys Leu Gly Tyr Ile Trp Phe Thr Lys Asn Cys
335 340 345
acc cct gcc tgc ctc ccc aaa aac aca aaa att gtt gga cct ggg aaa 1108
Thr Pro Ala Cys Leu Pro Lys Asn Thr Lys Ile Val Gly Pro Gly Lys
350 355 360
ttt gac acc aat gcc gaa gat gga aaa ata tta cat gaa atg ggg ggc 1156
Phe Asp Thr Asn Ala Glu Asp Gly Lys Ile
Leu His Glu Met Gly Gly
365 370 375 380
cac ctt tcg gaa gtt cta tta ctt tca ctt gtt gtt cta tcc gat ttc 1204
His Leu Ser Glu Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Val Leu Ser Asp Phe
385 390 395
gca ccc gaa act gcc tct gcg atg tat ctt gtc cta cat ttt tcc atc 1252
Ala Pro Glu Thr Ala Ser Ala Met Tyr Leu Val Leu His Phe Ser Ile
400 405 410

cca caa cga cac acc gat gtt ctg gac tgc gat aaa tct caa cta aat 1300
Pro Gln Arg His Thr Asp Val Leu Asp Cys Asp Lys Ser Gln Leu Asn
415 420 425
cta acc atg ggc gtc aca acc gcc gat gtt ata ccc gga tcc gtc tgg 1348
Leu Thr Met Gly Val Thr Thr Ala Asp Val Ile Pro Gly Ser Val Trp
430 435 440
aat atg ggc aaa tat gtt tgc ata cga ccc gac tgg tgg cct
tat gaa 1396
Asn Met Gly Lys Tyr Val Cys Ile Arg Pro Asp Trp Trp Pro Tyr Glu
445 450 455 460
acg gct gct gtt ctg gct ttg gaa gaa gtt ggg caa gtt aca cgg atc 1444
Thr Ala Ala Val Leu Ala Leu Glu Glu Val Gly Gln Val Thr Arg Ile
465 470 475
gtc ttg cgg gca ctc cgc gac ttg aca cgc atc tgg aac gct gcc aca 1492
Val Leu Arg Ala Leu Arg Asp Leu Thr Arg Ile Trp Asn Ala Ala
Thr
480 485 490
acc act gca ttt ctt gtc tgc ctt gtt aaa gtt gtc cgc gga caa gtc 1540
Thr Thr Ala Phe Leu Val Cys Leu Val Lys Val Val Arg Gly Gln Val
495 500 505
tta caa ggc gtc ata tgg tta ctg cta ata acg ggc gtc caa gga cgc 1588
Leu Gln Gly Val Ile Trp Leu Leu Leu Ile Thr Gly Val Gln Gly Arg
510 515 520

ctc gat tgc aaa cct gac ttc tca tat gcc att gcc aaa aat gaa aaa 1636
Leu Asp Cys Lys Pro Asp Phe Ser Tyr Ala Ile Ala Lys Asn Glu Lys
525 530 535 540
att gga cca ctg ggg gct gaa gga ctt act acc act tgg tat gaa tac 1684
Ile Gly Pro Leu Gly Ala Glu Gly Leu Thr Thr Thr Trp Tyr Glu Tyr
545 550 555
tct gat ggg atg caa ctt tcc gac act atg gtt gaa gct cga tgc aaa 1732
Ser
Asp Gly Met Gln Leu Ser Asp Thr Met Val Glu Ala Arg Cys Lys
560 565 570
gat ggg gaa ttt aca ttc atc caa aaa tgc aaa acg gaa acc cga tat 1780
Asp Gly Glu Phe Thr Phe Ile Gln Lys Cys Lys Thr Glu Thr Arg Tyr
575 580 585

ctg gcc acc ttg cac aca cgg gcc tta cgg aca tct gtc gtt ttt gaa	1828
Leu Ala Thr Leu His Thr Arg Ala Leu Pro Thr Ser Val Val Phe Glu	
590 595	
600	
aaa ctt ttt gat gga aat aaa ttg gcg gac atc gtt gaa atg gat gac	1876
Lys Leu Phe Asp Gly Asn Lys Leu Ala Asp Ile Val Glu Met Asp Asp	
605 610 615 620	
aac ttc gaa ttt gcg atc tgc ccc tgc gat gca aaa ccc gtc gtc cgc	1924
Asn Phe Glu Phe Ala Ile Cys Pro Cys Asp Ala Lys Pro Val Val Arg	
625 630 635	
ggg aaa ttt aac aca aca cta cta	
aat ggg ccc gcc ttc caa atg gtc 1972	
Gly Lys Phe Asn Thr Thr Leu Leu Asn Gly Pro Ala Phe Gln Met Val	
640 645 650	
tgc ccc att gga tgg act gga tct gtc tcc tgc acc cta gcc aat aaa	2020
Cys Pro Ile Gly Trp Thr Gly Ser Val Ser Cys Thr Leu Ala Asn Lys	
655 660 665	
gac acc ctc gat acg gcc gtc gtc cgg aca tat aaa cgc gtt tcc cca	2068
Asp Thr Leu Asp Thr Ala Val Val Arg Thr	
Tyr Lys Arg Val Ser Pro	
670 675 680	
ttc cct aat cgg caa gga tgc gtt act caa aaa ctt ctc ggg gaa gat	2116
Phe Pro Asn Arg Gln Gly Cys Val Thr Gln Lys Leu Leu Gly Glu Asp	
685 690 695 700	
ctt tat gat tgc atc ttg ggc gga aac tgg act tgc atc gaa ggg gaa	2164
Leu Tyr Asp Cys Ile Leu Gly Gly Asn Trp Thr Cys Ile Glu Gly Glu	
705 710 715	
caa cta cga tac act ggg ggc acc att gaa tcc tgc aag tgg tgc ggc	2212
Gln Leu Arg Tyr Thr Gly Gly Thr Ile Glu Ser Cys Lys Trp Cys Gly	
720 725 730	
tac aaa ttc ttg aaa tcg gaa ggg cta cca cac tat cca att ggc aaa	2260
Tyr Lys Phe Leu Lys Ser Glu Gly Leu Pro His Tyr Pro Ile Gly Lys	
735 740 745	
tgc cgc tta caa aat gaa act ggc tac cgg ctt gtc gac gac acc tct	2308
Cys Arg Leu Gln Asn Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Val Asp Asp Thr Ser	
750 755 760	
tgc aat gtc ggc ggc gtc gca att gtc cca cat gga ctt gtc aaa tgc	2356
Cys Asn Val Gly Gly Val Ala Ile Val Pro His Gly Leu Val Lys Cys	
765 770 775 780	
aaa att ggg gat acc gtc gtc caa gtc gtc gca atg gac acg aaa ctt	2404
Lys Ile Gly Asp Thr Val Val Gln Val Val Ala Met Asp Thr Lys Leu	
785 790 795	
gga cct atg cct tgc aaa cca cat gaa ata ata tca tcg gaa gga ccc	2452
Gly Pro Met Pro Cys Lys Pro His Glu Ile Ile Ser Ser Glu Gly Pro	
800 805 810	
gtt gaa aaa acg gca tgc aca ttc aac tat aca cgg acc tta acg aac	2500
Val Glu Lys Thr Ala Cys Thr Phe Asn Tyr Thr Arg Thr Leu Thr Asn	
815 820 825	
aaa tat ttt gaa ccc cgg	
gac aat tac ttc caa caa tac atg cta aaa 2548	
Lys Tyr Phe Glu Pro Arg Asp Asn Tyr Phe Gln Gln Tyr Met Leu Lys	
830 835 840	
ggg gac tac caa tat tgg ttt gat ctg gaa gtc tct gac cac cat cgg	2596
Gly Asp Tyr Gln Tyr Trp Phe Asp Leu Glu Val Ser Asp His His Arg	

845 850 855 860
gat tac ttt acg gaa ttc cta ctt gtc att gtt gtc gcc ctc ttg ggc 2644
Asp Tyr Phe Thr
Glu Phe Leu Leu Val Ile Val Val Ala Leu Leu Gly
865 870 875
gga cgc tat gtc ctt tgg cta ctt gtc aca tac atg gtc ctc tcc gaa 2692
Gly Arg Tyr Val Leu Trp Leu Leu Val Thr Tyr Met Val Leu Ser Glu
880 885 890
caa aat gcc tcg gct taggcctt 2715
Gln Asn Ala Ser Ala
895

<210> 2
<211> 897
<212> PRT
<213> Bovine viral diarrhea virus
<400> 2
Met Asp Thr Lys Glu Glu Gly Ala Thr Lys Lys Gln Gln Lys Pro Asp

1 5 10 15
Arg Val Glu Lys Gly Arg Met Lys Ile Thr Pro Lys Glu Thr Glu Lys
20 25 30
Asp Ser Arg Thr Lys Pro Pro Asp Ala Thr Ile Val Val Asp Gly Val
35 40 45
Lys Tyr Gln Val Lys Lys Lys Gly Lys Val Lys Ser Lys Asn Thr Gln
50 55 60
Asp Gly Leu Tyr His Asn Lys Asn Lys Pro Gln Glu Ser Arg Lys Lys
65 70 75 80
Leu Glu Lys Ala Leu Leu Ala Trp Ala Ile Leu Ala Val Val Leu Phe
85 90 95
Gln Val Thr Met Gly Glu Asn Ile Thr Gln Trp Asn Leu Gln Asp Asn
100 105 110
Gly Thr Glu Gly Val Gln Arg Ala Met Phe Glu Arg Gly Val Asn Arg
115 120 125
Ser Leu His Gly Ile Trp Pro Glu Lys Ile Cys Thr Gly Val Pro Ser
130 135 140
His Leu Ala Thr Asp Met Glu Leu Lys Arg Ile His Gly Met Met Asp
145 150 155 160
Ala Ser Glu Lys Thr Asn Tyr Thr Cys Cys Arg Leu Gln Arg His Glu
165 170 175
Trp Asn Lys His Gly Trp Cys Asn Trp Tyr Asn Ile Glu Pro Trp Ile
180 185 190
Leu Leu Met Asn Arg Thr Gln Ala Asn Leu Thr Glu Gly Gln Pro Gln
195 200 205
Arg Glu Cys Ala Val Thr Cys Arg Tyr Asp Arg Asn Ser Asp Leu Asn
210 215 220

Val Val Thr Gln Ala Arg Asp Ser Pro Thr Pro Leu Thr Gly Cys Lys
225 230 235 240
Lys Gly Lys Asn Phe Ser Phe Ser Gly Ile Val Ile Gln Gly Pro Cys
245 250 255
Asn Phe Glu Ile Ala Ala Ser Asp Val Leu Phe Lys Glu His Asp Cys
260 265 270
Thr Ser Ile Phe Gln Asp Thr Ala His Tyr Leu Val Asp Gly Met Thr
275 280 285
Asn Ser Leu Glu Ser Ala Arg Gln Gly Thr Ala Lys Leu Thr Thr Trp
290 295 300
Leu Gly Arg Gln Leu Gly Ile Leu Gly Lys Lys Leu Glu Asn Lys Ser
305 310 315 320
Lys Thr Trp Phe Gly Ala Tyr Ala Ser Ser Pro Tyr Cys Asp Val Glu
325 330 335
Arg Lys Leu Gly Tyr Ile Trp Phe Thr Lys Asn Cys Thr Pro Ala Cys
340 345 350
Leu Pro Lys Asn Thr Lys Ile Val Gly Pro Gly Lys Phe Asp Thr Asn
355 360 365
Ala Glu Asp Gly Lys Ile Leu His Glu Met Gly Gly His Leu Ser Glu
370 375 380
Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Val Leu Ser Asp Phe Ala Pro Glu Thr
385 390 395 400
Ala Ser Ala Met Tyr Leu Val Leu His Phe Ser Ile Pro Gln Arg His
405 410 415
Thr Asp Val Leu Asp Cys Asp Lys Ser Gln Leu Asn Leu Thr Met Gly
420 425 430
Val Thr Thr Ala Asp Val Ile Pro Gly Ser Val Trp Asn Met Gly Lys
435 440 445
Tyr Val Cys Ile Arg Pro Asp Trp Trp Pro Tyr Glu Thr Ala Ala Val
450 455 460
Leu Ala Leu Glu Glu Val Gly Gln Val Thr Arg Ile Val Leu Arg Ala
465 470 475 480
Leu Arg Asp Leu Thr Arg Ile Trp Asn Ala Ala Thr Thr Thr Ala Phe
485 490 495
Leu Val Cys Leu Val Lys Val Val Arg Gly Gln Val Leu Gln Gly Val
500 505 510
Ile Trp Leu Leu Leu Ile Thr Gly Val Gln Gly Arg Leu Asp Cys Lys
515 520 525
Pro Asp Phe Ser Tyr Ala Ile Ala Lys Asn Glu Lys Ile Gly Pro Leu
530 535 540
Gly Ala Glu Gly Leu Thr Thr Thr Trp Tyr Glu Tyr Ser Asp Gly Met
545 550 555 560

Gln Leu Ser Asp Thr Met Val Glu Ala Arg Cys Lys Asp Gly Glu Phe
 565 570 575
 Thr Phe Ile Gln Lys Cys Lys Thr Glu Thr Arg Tyr Leu Ala Thr Leu

 580 585 590
 His Thr Arg Ala Leu Pro Thr Ser Val Val Phe Glu Lys Leu Phe Asp

 595 600 605
 Gly Asn Lys Leu Ala Asp Ile Val Glu Met Asp Asp Asn Phe Glu Phe

 610 615 620
 Ala Ile Cys Pro Cys Asp Ala Lys Pro Val Val Arg Gly Lys Phe Asn

 625 630 635 640
 Thr Thr Leu Leu Asn Gly Pro Ala Phe Gln Met Val Cys Pro Ile Gly
 645 650 655
 Trp Thr Gly Ser Val Ser Cys Thr Leu Ala Asn Lys Asp Thr Leu Asp

 660 665 670
 Thr Ala Val Val Arg Thr Tyr Lys Arg Val Ser Pro Phe Pro Asn Arg

 675 680 685
 Gln Gly Cys Val Thr Gln Lys Leu Leu Gly Glu Asp Leu Tyr Asp Cys

 690 695 700
 Ile Leu Gly Gly Asn Trp Thr Cys Ile Glu Gly Glu Gln Leu Arg Tyr

 705 710 715 720
 Thr Gly Gly Thr Ile Glu Ser Cys Lys Trp Cys Gly Tyr Lys Phe Leu
 725 730 735
 Lys Ser Glu Gly Leu Pro His Tyr Pro Ile Gly Lys Cys Arg Leu Gln

 740 745 750
 Asn Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Val Asp Asp Thr Ser Cys Asn Val Gly

 755 760 765
 Gly Val Ala Ile Val Pro His Gly Leu Val Lys Cys Lys Ile Gly Asp

 770 775 780
 Thr Val Val Gln Val Val Ala Met Asp Thr Lys Leu Gly Pro Met Pro

 785 790 795 800
 Cys Lys Pro His Glu Ile Ile Ser Ser Glu Gly Pro Val Glu Lys Thr
 805 810 815
 Ala Cys Thr Phe Asn Tyr Thr Arg Thr Leu Thr Asn Lys Tyr Phe Glu

 820 825 830
 Pro Arg Asp Asn Tyr Phe Gln Gln Tyr Met Leu Lys Gly Asp Tyr Gln

 835 840 845
 Tyr Trp Phe Asp Leu Glu Val Ser Asp His His Arg Asp Tyr Phe Thr

 850 855 860
 Glu Phe Leu Leu Val Ile Val Val Ala Leu Leu Gly Gly Arg Tyr Val

 865 870 875 880
 Leu Trp Leu Leu Val Thr Tyr Met Val Leu Ser Glu Gln Asn Ala Ser
 885 890 895

Ala

<210> 3

<211> 303

<212> DNA

<213> Bovine viral diarrhea virus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(303)

<223> Protein N

<400> 3

```

atg gac acg aaa gaa gaa ggg gca aca aaa aaa caa cag aaa ccg gac      48
Met Asp Thr Lys Glu Glu Gly Ala Thr Lys Lys Gln Gln Lys Pro Asp
1           5           10           15
cgc gtt gaa aaa ggg cgc atg aaa ata acg cct aaa gaa act gaa aaa      96
Arg Val Glu Lys Gly Arg Met Lys Ile Thr Pro Lys Glu Thr Glu Lys
20          25          30
gat tcc cgg
acc aaa cca cct gat gct acg atc gtc gtc gac ggc gtc      144
Asp Ser Arg Thr Lys Pro Pro Asp Ala Thr Ile Val Val Asp Gly Val
35          40          45
aaa tac caa gtc aaa aaa aaa ggc aaa gtc aaa tcc aaa aac acc caa      192
Lys Tyr Gln Val Lys Lys Lys Gly Lys Val Lys Ser Lys Asn Thr Gln
50          55          60
gat ggg ctc tac cac aat aaa aat aaa cca caa gaa tca cgc aaa aaa      240
Asp Gly Leu
Tyr His Asn Lys Asn Lys Pro Gln Glu Ser Arg Lys Lys
65          70          75          80
ctg gaa aaa get cta ttg gct tgg gca ata ttg gct gtt gta tta ttt      288
Leu Glu Lys Ala Leu Leu Ala Trp Ala Ile Leu Ala Val Val Leu Phe
85          90          95
caa gtc aca atg ggg      303
Gln Val Thr Met Gly
100

```

<210> 4

<211> 101

<212> PRT

<213> Bovine viral diarrhea virus

<400> 4

```

Met Asp Thr Lys Glu Glu Gly Ala Thr Lys Lys Gln Gln Lys Pro Asp

1           5           10           15
Arg Val Glu Lys Gly Arg Met Lys Ile Thr Pro Lys Glu Thr Glu Lys

20          25          30
Asp Ser Arg Thr Lys Pro Pro Asp Ala Thr Ile Val Val Asp Gly Val

35          40          45
Lys Tyr Gln Val Lys Lys Lys Gly Lys Val Lys Ser Lys Asn Thr Gln

50          55          60
Asp Gly Leu Tyr His Asn Lys Asn Lys Pro Gln Glu Ser Arg Lys Lys

65          70          75          80

```

Leu Glu Lys Ala Leu Leu Ala Trp Ala Ile Leu Ala Val Val Leu Phe

85 90 95

Gln Val Thr Met Gly

100

<210> 5

<211> 681

<212> DNA

<213> Bovine viral diarrhea virus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(681)

<223> Protein ERNS

<400> 5

gaa aac ata aca caa tgg aac ttg caa gac aat gga acc gaa ggc gtc 48

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

1 5 10 15

caa cgg gct atg ttt gaa cgc ggc gtc aat cgg agc tta cat gga atc 96

Gln Arg Ala Met Phe Glu Arg Gly Val Asn Arg Ser Leu His Gly Ile

20 25 30

tgg ccc gaa

aaa atc tgc acc ggc gtc cca tct cat ttg gcc acc gat 144

Trp Pro Glu Lys Ile Cys Thr Gly Val Pro Ser His Leu Ala Thr Asp

35 40 45

atg gaa ttg aaa cga att cat gga atg atg gac gca tct gaa aaa acc 192

Met Glu Leu Lys Arg Ile His Gly Met Met Asp Ala Ser Glu Lys Thr

50 55 60

aac tat aca tgc tgc cgg ctt caa cga cat gaa tgg aat aaa cat ggc 240

Asn Tyr Thr

Cys Cys Arg Leu Gln Arg His Glu Trp Asn Lys His Gly

65 70 75 80

tgg tgc aat tgg tac aat atc gaa cct tgg att ctg ctt atg aat cgg 288

Trp Cys Asn Trp Tyr Asn Ile Glu Pro Trp Ile Leu Leu Met Asn Arg

85 90 95

acc caa gct aac ctc act gaa ggc caa cca caa cgc gaa tgc gcc gtc 336

Thr Gln Ala Asn Leu Thr Glu Gly Gln Pro Gln Arg Glu Cys Ala Val

100 105

110

acc tgc cgc tat gac cgg aat tcc gac ttg aat gtc gtg aca caa gcc 384

Thr Cys Arg Tyr Asp Arg Asn Ser Asp Leu Asn Val Val Thr Gln Ala

115 120 125

cgg gac tct ccg aca cca ctt acg gga tgc aaa aaa ggg aaa aac ttc 432

Arg Asp Ser Pro Thr Pro Leu Thr Gly Cys Lys Lys Gly Lys Asn Phe

130 135 140

tct ttt tcg ggc atc gtc atc caa ggc

cct tgc aat ttt gaa att gct 480

Ser Phe Ser Gly Ile Val Ile Gln Gly Pro Cys Asn Phe Glu Ile Ala

145 150 155 160

gca tct gac gtc ctc ttc aaa gaa cat gac tgc aca tcc ata ttt caa 528

Ala Ser Asp Val Leu Phe Lys Glu His Asp Cys Thr Ser Ile Phe Gln

165 170 175

gat act gct cat tac ctc gtt gat ggg atg act aac tct ttg gag tct 576

Asp Thr Ala His Tyr Leu Val Asp Gly Met

Thr Asn Ser Leu Glu Ser

180 185 190

gct cga caa gga act gca aaa cta aca act tgg ctg ggg cga caa ctt 624
Ala Arg Gln Gly Thr Ala Lys Leu Thr Thr Trp Leu Gly Arg Gln Leu
195 200 205

ggg ata ttg ggg aaa aaa ctg gaa aac aaa tcc aaa aca tgg ttc ggg 672
Gly Ile Leu Gly Lys Lys Leu Glu Asn Lys Ser Lys Thr Trp Phe Gly
210 215 220

gct tat gca 681
Ala Tyr Ala
225
<210> 6
<211> 227
<212> PRT
<213> Bovine viral diarrhea virus
<400> 6
Glu Asn Ile Thr Gln Trp Asn Leu Gln Asp Asn Gly Thr Glu Gly Val

1 5 10 15
Gln Arg Ala Met Phe Glu Arg Gly Val Asn Arg Ser Leu His Gly Ile

20 25 30
Trp Pro Glu Lys Ile Cys Thr Gly Val Pro Ser His Leu Ala Thr Asp

35 40 45
Met Glu Leu Lys Arg Ile His Gly Met Met Asp Ala Ser Glu Lys Thr

50 55 60
Asn Tyr Thr Cys Cys Arg Leu Gln Arg His Glu Trp Asn Lys His Gly

65 70 75 80
Trp Cys Asn Trp Tyr Asn Ile Glu Pro Trp Ile Leu Leu Met Asn Arg

85 90 95
Thr Gln Ala Asn Leu Thr Glu Gly Gln Pro Gln Arg Glu Cys Ala Val

100 105 110
Thr Cys Arg Tyr Asp Arg Asn Ser Asp Leu Asn Val Val Thr Gln Ala

115 120 125
Arg Asp Ser Pro Thr Pro Leu Thr Gly Cys Lys Lys Gly Lys Asn Phe

130 135 140
Ser Phe Ser Gly Ile Val Ile Gln Gly Pro Cys Asn Phe Glu Ile Ala

145 150 155 160
Ala Ser Asp Val Leu Phe Lys Glu His Asp Cys Thr Ser Ile Phe Gln
165 170 175
Asp Thr Ala His Tyr Leu Val Asp Gly Met Thr Asn Ser Leu Glu Ser

180 185 190
Ala Arg Gln Gly Thr Ala Lys Leu Thr Thr Trp Leu Gly Arg Gln Leu

195 200 205
Gly Ile Leu Gly Lys Lys Leu Glu Asn Lys Ser Lys Thr Trp Phe Gly

210 215 220
Ala Tyr Ala

225
 <210> 7
 <211> 585
 <212> DNA
 <213> Bovine viral diarrhea virus
 <220>

 <221> CDS
 <222> (1)..(585)
 <223> Protein E1
 <400> 7
 tct tcc cct tac tgc gat gtt gaa cga aaa ctt ggc tac atc tgg ttt 48
 Ser Ser Pro Tyr Cys Asp Val Glu Arg Lys Leu Gly Tyr Ile Trp Phe
 1 5 10 15
 aca aaa aat tgc acc cct gcc tgc ctc ccc aaa aac aca aaa att gtt 96
 Thr Lys Asn Cys Thr Pro Ala Cys Leu Pro Lys Asn Thr Lys Ile Val
 20 25 30
 gga cct ggg
 aaa ttt gac acc aat gcc gaa gat gga aaa ata tta cat 144
 Gly Pro Gly Lys Phe Asp Thr Asn Ala Glu Asp Gly Lys Ile Leu His
 35 40 45
 gaa atg ggg ggc cac ctt tcg gaa gtt cta tta ctt tca ctt gtt gtt 192
 Glu Met Gly Gly His Leu Ser Glu Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Val
 50 55 60
 cta tcc gat ttc gca ccc gaa act gcc tct gcg atg tat ctt gtc cta 240
 Leu Ser Asp
 Phe Ala Pro Glu Thr Ala Ser Ala Met Tyr Leu Val Leu
 65 70 75 80
 cat ttt tcc atc cca caa cga cac acc gat gtt ctg gac tgc gat aaa 288
 His Phe Ser Ile Pro Gln Arg His Thr Asp Val Leu Asp Cys Asp Lys
 85 90 95
 tct caa cta aat cta acc atg ggc gtc aca acc gcc gat gtt ata ccc 336
 Ser Gln Leu Asn Leu Thr Met Gly Val Thr Thr Ala Asp Val Ile Pro
 100 105
 110
 gga tcc gtc tgg aat atg ggc aaa tat gtt tgc ata cga ccc gac tgg 384
 Gly Ser Val Trp Asn Met Gly Lys Tyr Val Cys Ile Arg Pro Asp Trp
 115 120 125
 tgg cct tat gaa acg gct gct gtt ctg gct ttg gaa gaa gtt ggg caa 432
 Trp Pro Tyr Glu Thr Ala Ala Val Leu Ala Leu Glu Glu Val Gly Gln
 130 135 140
 gtt aca cgg atc gtc ttg cgg gca ctc
 cgc gac ttg aca cgc atc tgg 480
 Val Thr Arg Ile Val Leu Arg Ala Leu Arg Asp Leu Thr Arg Ile Trp
 145 150 155 160
 aac gct gcc aca acc act gca ttt ctt gtc tgc ctt gtt aaa gtt gtc 528
 Asn Ala Ala Thr Thr Thr Ala Phe Leu Val Cys Leu Val Lys Val Val
 165 170 175
 cgc gga caa gtc tta caa ggc gtc ata tgg tta ctg cta ata acg ggc 576
 Arg Gly Gln Val Leu Gln Gly Val Ile Trp
 Leu Leu Leu Ile Thr Gly
 180 185 190
 gtc caa gga 585
 Val Gln Gly
 195
 <210> 8
 <211> 195

<212> PRT
 <213> Bovine viral diarrhea virus
 <400> 8
 Ser Ser Pro Tyr Cys Asp Val Glu Arg Lys Leu Gly Tyr Ile Trp Phe

1 5 10 15
 Thr Lys Asn Cys Thr Pro Ala Cys Leu Pro Lys Asn Thr Lys Ile Val
 20 25 30
 Gly Pro Gly Lys Phe Asp Thr Asn Ala Glu Asp Gly Lys Ile Leu His
 35 40 45
 Glu Met Gly Gly His Leu Ser Glu Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Val
 50 55 60
 Leu Ser Asp Phe Ala Pro Glu Thr Ala Ser Ala Met Tyr Leu Val Leu
 65 70 75 80
 His Phe Ser Ile Pro Gln Arg His Thr Asp Val Leu Asp Cys Asp Lys
 85 90 95
 Ser Gln Leu Asn Leu Thr Met Gly Val Thr Thr Ala Asp Val Ile Pro
 100 105 110
 Gly Ser Val Trp Asn Met Gly Lys Tyr Val Cys Ile Arg Pro Asp Trp
 115 120 125
 Trp Pro Tyr Glu Thr Ala Ala Val Leu Ala Leu Glu Glu Val Gly Gln
 130 135 140
 Val Thr Arg Ile Val Leu Arg Ala Leu Arg Asp Leu Thr Arg Ile Trp
 145 150 155 160
 Asn Ala Ala Thr Thr Thr Ala Phe Leu Val Cys Leu Val Lys Val Val
 165 170 175
 Arg Gly Gln Val Leu Gln Gly Val Ile Trp Leu Leu Leu Ile Thr Gly
 180 185 190
 Val Gln Gly

195
 <210> 9
 <211> 1122
 <212> DNA
 <213> Bovine viral diarrhea virus
 <220>

<221> CDS
 <222> (1)..(1122)
 <223> Protein E2
 <400> 9

cgc ctc gat tgc aaa cct gac ttc tca tat gcc att gcc aaa aat gaa 48
 Arg Leu Asp Cys Lys Pro Asp Phe Ser Tyr Ala Ile Ala Lys Asn Glu
 1 5 10 15
 aaa att gga cca ctg ggg gct gaa gga ctt act acc act tgg tat gaa 96
 Lys Ile Gly Pro Leu Gly Ala Glu Gly Leu Thr Thr Thr Trp Tyr Glu
 20 25 30
 tac tct gat

```

ggg atg caa ctt tcc gac act atg gtt gaa gct cga tgc      144
Tyr Ser Asp Gly Met Gln Leu Ser Asp Thr Met Val Glu Ala Arg Cys
35          40          45
aaa gat ggg gaa ttt aca ttc atc caa aaa tgc aaa acg gaa acc cga      192
Lys Asp Gly Glu Phe Thr Phe Ile Gln Lys Cys Lys Thr Glu Thr Arg
50          55          60
tat ctg gcc acc ttg cac aca cgg gcc tta ccg aca tct gtc gtt ttt      240
Tyr Leu Ala
Thr Leu His Thr Arg Ala Leu Pro Thr Ser Val Val Phe
65          70          75          80
gaa aaa ctt ttt gat gga aat aaa ttg gcg gac atc gtt gaa atg gat      288
Glu Lys Leu Phe Asp Gly Asn Lys Leu Ala Asp Ile Val Glu Met Asp
85          90          95
gac aac ttc gaa ttt gcg atc tgc ccc tgc gat gca aaa ccc gtc gtc      336
Asp Asn Phe Glu Phe Ala Ile Cys Pro Cys Asp Ala Lys Pro Val Val
100          105
110
cgc ggg aaa ttt aac aca aca cta cta aat ggg ccc gcc ttc caa atg      384
Arg Gly Lys Phe Asn Thr Thr Leu Leu Asn Gly Pro Ala Phe Gln Met
115          120          125
gtc tgc ccc att gga tgg act gga tct gtc tcc tgc acc cta gcc aat      432
Val Cys Pro Ile Gly Trp Thr Gly Ser Val Ser Cys Thr Leu Ala Asn
130          135          140
aaa gac acc ctc gat acg gcc gtc gtc
cgg aca tat aaa cgc gtt tcc      480
Lys Asp Thr Leu Asp Thr Ala Val Val Arg Thr Tyr Lys Arg Val Ser
145          150          155          160
cca ttc cct aat cgg caa gga tgc gtt act caa aaa ctt ctc ggg gaa      528
Pro Phe Pro Asn Arg Gln Gly Cys Val Thr Gln Lys Leu Leu Gly Glu
165          170          175
gat ctt tat gat tgc atc ttg ggc gga aac tgg act tgc atc gaa ggg      576
Asp Leu Tyr Asp Cys Ile Leu Gly Gly Asn
Trp Thr Cys Ile Glu Gly
180          185          190
gaa caa cta cga tac act ggg ggc acc att gaa tcc tgc aag tgg tgc      624
Glu Gln Leu Arg Tyr Thr Gly Gly Thr Ile Glu Ser Cys Lys Trp Cys
195          200          205
ggc tac aaa ttc ttg aaa tcg gaa ggg cta cca cac tat cca att ggc      672
Gly Tyr Lys Phe Leu Lys Ser Glu Gly Leu Pro His Tyr Pro Ile Gly
210          215          220

aaa tgc cgc tta caa aat gaa act ggc tac cgg ctt gtc gac gac acc      720
Lys Cys Arg Leu Gln Asn Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Val Asp Asp Thr
225          230          235          240
tct tgc aat gtc ggc ggc gtc gca att gtc cca cat gga ctt gtc aaa      768
Ser Cys Asn Val Gly Gly Val Ala Ile Val Pro His Gly Leu Val Lys
245          250          255
tgc aaa att ggg gat acc gtc gtc caa gtc gtc gca atg gac acg aaa      816
Cys
Lys Ile Gly Asp Thr Val Val Gln Val Val Ala Met Asp Thr Lys
260          265          270
ctt gga cct atg cct tgc aaa cca cat gaa ata ata tca tcg gaa gga      864
Leu Gly Pro Met Pro Cys Lys Pro His Glu Ile Ile Ser Ser Glu Gly
275          280          285
ccc gtt gaa aaa acg gca tgc aca ttc aac tat aca cgg acc tta acg      912
Pro Val Glu Lys Thr Ala Cys Thr Phe Asn Tyr Thr Arg Thr Leu Thr
290          295

```

300
aac aaa tat ttt gaa ccc cgg gac aat tac ttc caa caa tac atg cta 960
Asn Lys Tyr Phe Glu Pro Arg Asp Asn Tyr Phe Gln Gln Tyr Met Leu
305 310 315 320
aaa ggg gac tac caa tat tgg ttt gat ctg gaa gtc tct gac cac cat 1008
Lys Gly Asp Tyr Gln Tyr Trp Phe Asp Leu Glu Val Ser Asp His His
325 330 335
cgg gat tac ttt acg gaa ttc cta
ctt gtc att gtt gtc gcc ctc ttg 1056
Arg Asp Tyr Phe Thr Glu Phe Leu Leu Val Ile Val Val Ala Leu Leu
340 345 350
ggc gga cgc tat gtc ctt tgg cta ctt gtc aca tac atg gtc ctc tcc 1104
Gly Gly Arg Tyr Val Leu Trp Leu Leu Val Thr Tyr Met Val Leu Ser
355 360 365
gaa caa aat gcc tcg gct 1122
Glu Gln Asn Ala Ser Ala

370
<210> 10
<211> 374
<212> PRT
<213> Bovine viral diarrhea virus
<400> 10
Arg Leu Asp Cys Lys Pro Asp Phe Ser Tyr Ala Ile Ala Lys Asn Glu

1 5 10 15
Lys Ile Gly Pro Leu Gly Ala Glu Gly Leu Thr Thr Thr Trp Tyr Glu

20 25 30
Tyr Ser Asp Gly Met Gln Leu Ser Asp Thr Met Val Glu Ala Arg Cys

35 40 45
Lys Asp Gly Glu Phe Thr Phe Ile Gln Lys Cys Lys Thr Glu Thr Arg

50 55 60
Tyr Leu Ala Thr Leu His Thr Arg Ala Leu Pro Thr Ser Val Val Phe

65 70 75 80
Glu Lys Leu Phe Asp Gly Asn Lys Leu Ala Asp Ile Val Glu Met Asp

85 90 95
Asp Asn Phe Glu Phe Ala Ile Cys Pro Cys Asp Ala Lys Pro Val Val

100 105 110
Arg Gly Lys Phe Asn Thr Thr Leu Leu Asn Gly Pro Ala Phe Gln Met

115 120 125
Val Cys Pro Ile Gly Trp Thr Gly Ser Val Ser Cys Thr Leu Ala Asn

130 135 140
Lys Asp Thr Leu Asp Thr Ala Val Val Arg Thr Tyr Lys Arg Val Ser

145 150 155 160
Pro Phe Pro Asn Arg Gln Gly Cys Val Thr Gln Lys Leu Leu Gly Glu
165 170 175
Asp Leu Tyr Asp Cys Ile Leu Gly Gly Asn Trp Thr Cys Ile Glu Gly

180 185 190

Glu	Gln	Leu	Arg	Tyr	Thr	Gly	Gly	Thr	Ile	Glu	Ser	Cys	Lys	Trp	Cys			
						200										205		
Gly	Tyr	Lys	Phe	Leu	Lys	Ser	Glu	Gly	Leu	Pro	His	Tyr	Pro	Ile	Gly			
						215										220		
Lys	Cys	Arg	Leu	Gln	Asn	Glu	Thr	Gly	Tyr	Arg	Leu	Val	Asp	Asp	Thr			
						230										235	240	
Ser	Cys	Asn	Val	Gly	Gly	Val	Ala	Ile	Val	Pro	His	Gly	Leu	Val	Lys			
						250										255		
Cys	Lys	Ile	Gly	Asp	Thr	Val	Val	Gln	Val	Val	Ala	Met	Asp	Thr	Lys			
						265										270		
Leu	Gly	Pro	Met	Pro	Cys	Lys	Pro	His	Glu	Ile	Ile	Ser	Ser	Glu	Gly			
						280										285		
Pro	Val	Glu	Lys	Thr	Ala	Cys	Thr	Phe	Asn	Tyr	Thr	Arg	Thr	Leu	Thr			
						295										300		
Asn	Lys	Tyr	Phe	Glu	Pro	Arg	Asp	Asn	Tyr	Phe	Gln	Gln	Tyr	Met	Leu			
						310										315	320	
Lys	Gly	Asp	Tyr	Gln	Tyr	Trp	Phe	Asp	Leu	Glu	Val	Ser	Asp	His	His			
						330										335		
Arg	Asp	Tyr	Phe	Thr	Glu	Phe	Leu	Leu	Val	Ile	Val	Val	Ala	Leu	Leu			
						345										350		
Gly	Gly	Arg	Tyr	Val	Leu	Trp	Leu	Leu	Val	Thr	Tyr	Met	Val	Leu	Ser			
						360										365		
Glu	Gln	Asn	Ala	Ser	Ala													