



등록특허 10-2649950



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년03월22일  
(11) 등록번호 10-2649950  
(24) 등록일자 2024년03월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12Q 1/70* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)  
*C12N 7/04* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12Q 1/701* (2013.01)  
*C12N 7/045* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7038994(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2014년10월03일  
심사청구일자 2021년12월29일
- (85) 번역문제출일자 2021년11월29일
- (65) 공개번호 10-2021-0154988
- (43) 공개일자 2021년12월21일
- (62) 원출원 특허 10-2016-7010089  
원출원일자(국제) 2014년10월03일  
심사청구일자 2019년10월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/059060
- (87) 국제공개번호 WO 2015/051255  
국제공개일자 2015년04월09일
- (30) 우선권주장  
61/886,438 2013년10월03일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
US05024947 A\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

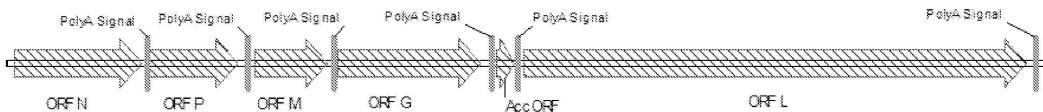
전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 김현태

- (54) 발명의 명칭 세포주로부터 랍도바이러스를 탐지 및 제거하는 방법

**(57) 요약**

본 발명은 곤충 세포에서 생산된 생성물로부터 바이러스의 존재를 탐지하고 제거하기 위한 조성물, 방법, 혼합물 및 키트에 관한 것이다. 본 발명은 또한 곤충 세포에서 생산되고 바이러스가 없거나 실질적으로 없는 단백질, 웨타이드, 폴리웨타이드, 약물, 생물학적 생성물, 백신 항원 및 바이러스-유사 입자에 관한 것이다. 본 발명은 또한 샘플에서 랍도바이러스를 탐지하기 위한 조성물, 방법, 분석법 및 키트에 관한 것이다.

**대 표 도 - 도1**

Sf9 랍도바이러스 계획 형태 지도

(52) CPC특허분류

*A61K 2039/5258 (2013.01)*

*C12N 2760/20021 (2013.01)*

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

생물학적 생성물을 포함하는 Sf9 또는 Sf21 곤충 세포로, 여기서 곤충 세포는 SEQ ID NO: 1에 따른 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열 또는 이로부터 암호화된 랍도바이러스가 없는 것인 곤충 세포.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

곤충 세포는 Sf9 세포인 곤충 세포.

#### 청구항 3

제 2 항에 있어서,

Sf9 세포는 ATCC CRL-1711로 기탁된 세포주로부터 유래된 것인 곤충 세포.

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서,

생물학적 생성물이 단백질, 펩타이드, 약물, 바이러스-유사 입자(VLP), DNA, RNA, 바이러스 또는 백신 항원인 곤충 세포.

#### 청구항 5

제 1 항에 있어서,

생물학적 생성물이 유전자 치료를 위한 재조합 바이러스인 곤충 세포.

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서,

생물학적 생성물이 단백질 또는 바이러스-유사 입자(VLP)인 곤충 세포.

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

삭제

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

삭제

#### 청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

본 발명은 세포주로부터 랍도바이러스를 탐지 및 제거하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002]

SF21 및 SF9 세포와 같은 곤충 세포는 인간 질환에 사용하기 위한 치료적 생물학적 생성물의 생산을 포함하는, 단백질 발현을 위해 일반적으로 사용된다. 곤충 세포는 주로 바클로바이러스 발현 시스템과 함께 사용된다. 이런 바클로바이러스-곤충 세포 발현 시스템은 고밀도로 성장하고 충분한 수준의 단백질을 발현하는 능력 및 이들이 대용량 혼탁 배양에 쉽게 적합하게 될 수 있다는 사실 때문에 생물학적 생성물의 생산에 사용되었다. 이런 세포는 광범위한 테스팅의 결과로서, 오염 바이러스가 없다고 오랫동안 생각되었다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0003]

오염 바이러스가 없는 곤충 세포, 곤충 세포가 오염 바이러스가 없는지를 측정하는 방법 및 오염 바이러스가 없고 인간 치료에 적합한 곤충 세포로부터 생산된 생성물에 대한 요구가 당업계에 존재한다.

#### 과제의 해결 수단

[0004]

한 양태에서, 본 발명은 샘플에서 오염원을 탐지하기 위한 조성물, 방법, 분석법 및 키트를 제공한다. 일부 실시태양에서, 샘플은 곤충 세포주에서 생산되거나 곤충 세포주를 사용하여 생성되는 단백질, 웨타이드, 약물, 생물학적 생성물, 바이러스, 백신 항원 또는 바이러스-유사 입자(VLP) 제제이다. 일부 실시태양에서, 곤충 세포주는 Sf9 또는 Sf21이다. 일부 실시태양에서, 오염제는 바이러스 또는 바이러스 계놈의 일부이다. 일부 실시태양에서, 본 발명은 "Sf9 랍도바이러스"로 불리는 새로운 바이러스의 탐지를 위한 조성물, 방법, 분석법 및 키트를 제공한다. 한 양태에서, 본 발명은 Sf9 랍도바이러스의 핵산 서열과 다른 특징을 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 샘플에 있는 Sf9 랍도바이러스 또는 Sf9 랍도바이러스 핵산 또는 Sf9 랍도바이러스 입자가 복제를 할 수 있는지를 측정하는 조성물, 방법, 분석법 및 키트를 제공한다. 일부 실시태양에서, 본 발명은 (i) 샘플이, RT-PCR에 의해 측정된 대로, Sf9 랍도바이러스 RNA의 탐지가능한 수준을 함유하는지; (ii) Sf9 랍도바이러스 RNA가 샘플에 있는 뉴클레아제 저항 입자에 존재하는지 및/또는 (iii) Sf9 랍도바이러스 RNA가 복제를 할 수 있는지를 측정하기 위한 조성물, 방법, 분석법 및 키트를 제공한다.

[0005]

한 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 1의 적어도 25개, 적어도 50개, 적어도 100개, 적어도 250개, 적어도 500개, 적어도 750개, 적어도 1000개, 적어도 1250개, 적어도 1500개 또는 적어도 2000개 연속 뉴클레오티드 또는 SEQ ID NO: 1의 역상보를 포함하는 핵산 서열을 탐지하는 단계를 포함하여 바이러스를 탐지하는 방법을 제공한다. 일부 실시태양에서, 본 발명에 개시된 바이러스를 탐지하는 방법은 PCR 분석법에서 하나 이상의 프라이머 및 하나 이상의 표지화된 프로브를 사용하는 단계를 포함한다. 일부 실시태양에서, 프로브는 표지화된 프로브이다.

[0006]

일부 실시태양에서, 본 발명은 바이러스를 탐지하기 위한 방법을 제공하며 상기 방법은 약 1개 문자의 RNA 및 약 50개 문자의 RNA의 민감성 수준을 가진다.

[0007] 한 양태에서, 본 발명은 단백질, 펩타이드, 약물, 생물학적 생성물, 백신 항원 또는 바이러스-유사 입자(VLP) 제제로부터 바이러스를 제거하기 위한 방법을 제공하며, 단백질, 펩타이드, 약물, 생물학적 생성물, 백신 항원 또는 VLP 제제는 곤충 세포를 사용하여 생성되거나 곤충 세포에서 생산되며, 바이러스는 SEQ ID NO: 1과 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 상동성을 가진 서열을 포함한다. 다른 실시태양에서, 바이러스는 SEQ ID NO: 1에 따른 서열을 포함한다. 실시태양에서, 곤충 세포는 Sf9 세포 또는 Sf21 세포이다. 추가 실시태양에서, Sf9 세포는 ATCC CRL-1711로서 기탁된 세포주로부터 유래된다.

[0008] 한 양태에서, 본 발명은 곤충 세포에서 생산된 단백질, 펩타이드, 약물, 생물학적 생성물, 백신 항원 또는 VLP 제제를 제공하며, 단백질, 펩타이드, 약물, 생물학적 생성물, 백신 항원 또는 VLP는 SEQ ID NO: 1과 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 상동성을 가진 뉴클레오티드 서열을 포함하는 바이러스가 실질적으로 없다. 다른 실시태양에서, 바이러스는 SEQ ID NO: 1에 따른 서열을 포함한다. 실시태양에서, 곤충 세포는 Sf9 세포 또는 Sf21이다. 추가 실시태양에서, Sf9 세포는 ATCC CRL-1711로서 기탁된 세포주로부터 유래된다. 본 발명은 또한 이런 물질을 포함하며 선택적으로 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합된 조성물뿐만 아니라 이런 물질에서 바이러스의 존재 또는 부존재를 탐지하기 위한 키트를 포함한다.

[0009] 한 양태에서, 본 발명은 샘플에서 입자들 상에 응집되는 및/또는 입자들 내에 단백질 막으로 싸이는 Sf9 랍도바이러스의 존재 또는 부존재를 탐지하는 방법을 제공한다. 일부 실시태양에서, 샘플은 단백질, 펩타이드, 약물, 생물학적 생성물, 백신 항원 또는 VLP 제제이다. 일부 실시태양에서, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다: (i) 샘플을 RNA를 분해시킬 효소로 처리시키는 단계; (ii) 샘플을 카오트로픽제(chaotropic agent)와 같은 하나 이상의 물질로 처리하여, 효소 활성을 중지시키고 입자를 분리시키는 단계; (iii) RT-PCR에 의해 최종 샘플에서 Sf9 랍도바이러스 RNA의 존재 또는 부존재를 탐지하는 단계. 다른 실시태양에서, 상기 방법은 단계(i)에서 샘플에 효소 처리를 하기 전에 RT-PCR에 의해 샘플에서 Sf9 랍도바이러스 RNA의 존재 또는 부존재를 탐지하는 단계를 포함한다. 일부 실시태양에서, 단계(i) 및 (ii) 이후 탐지된 RNA 신호는 단계(i) 이전에 탐지된 RNA 신호와 비교된다. 일부 실시태양에서, 효소 처리 및 입자의 분리 이후 탐지된 RNA는 입자로 샘플에 존재한다.

[0010] 한 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 1에 따른 바이러스의 단편 또는 SEQ ID NO: 1에 상보적인 서열의 단편을 추가로 제공하며, 단편은 표지되거나 화학적으로 변형된다.

[0011] 한 양태에서, 본 발명은 과밤나방(*S. exigua*) 세포 및 랍도바이러스를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시태양에서, 랍도바이러스는 SEQ ID NO: 1과 적어도 70% 상동성을 가진 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 랍도바이러스는 SEQ ID NO: 1에 따른 서열을 포함한다.

### 발명의 효과

[0012] 본 발명의 내용 중에 포함되어 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 센스 배향(5' to 3')으로 도시된 Sf9 랍도바이러스 계놈의 지도를 제공한다.

도 2는 전자투사현미경(TEM)에 의해 이미지화된 Sf9 랍도바이러스의 9개의 개별 이미지를 제공한다.

도 3은 미리-감염, 또는 통로 0, 1 또는 2에서 Sf9 컨디션드 배지에 노출된 곤충 세포에서 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호(AMCY-SeE1, AMCY-SeE4, AMCY-SeE5, HvAM1, HzAM1, HzFB33, HsAM1, 또는 AgAM1)의 탐지를 도시하는 그래프이다. 데이터는 총 세포 RNA의  $\mu$ g당 팬토그램(fg) 랍도바이러스 RNA로서 표현된다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 샘플에서 오염체를 확인 및/또는 샘플로부터 오염체를 제거하는 조성물, 방법, 분석법 및 키트를 제공한다. 한편, 본 발명은 곤충 세포주 Sf9 세포에 존재하는 대로 확인된 새로운 바이러스를 제공한다. 치료 목적을 위한 생물학적 생성물을 생산하기 위한 약물 개발에서 일반적으로 사용되는 Sf9 세포 및 다른 곤충 세포주는 오랫동안 오염 바이러스가 없는 것으로 생각되었다. 그러나, 본 발명자들은 본 발명에 개시된 새로운 바이러스는 Sf9 세포에 존재하였다는 것을 놀랍게 발견하였다. 본 발명에 기술된 연구를 기초로, 새로운 바이러스는 랍도바이러스인 것으로 결정되었다. 비록 랍도바이러스가 Sf9 이외의 세포주에서 발견되었으나, 본 발명에 개시된 랍도바이러스는 "Sf9 랍도바이러스"로 불린다. Sf9 랍도바이러스의 서열은 SEQ ID NO: 1로 본 발명에 제공된

다.

[0015] 본 발명은 바이러스의 핵산 및 다른 특징, 바이러스, 및 바이러스가 실질적으로 없는 세포 또는 생물학적 생성물을 탐지하는데 사용하기 위한 방법, 분석법 및 키트를 제공한다. 한 실시태양에서, 생물학적 생성물은 치료 및/또는 진단 목적을 위한 생성물이다. 다른 실시태양에서, 치료 및/또는 진단 목적을 위한 생성물은 곤충 세포주를 사용하여, 적어도 부분적으로 생성된다. 다른 실시태양에서, 곤충 세포주는 Sf9 또는 Sf21이다.

[0016] 한 양태에서, 본 발명은 Sf9 세포에서 바이러스의 존재를 탐지하기 위한 조성물, 분석법, 방법 및 키트를 제공한다. 한 양태에서, 본 발명은 단백질, 웨타이드, 약물, 생물학적 생성물, 백신 항원 또는 VLP 제제의 존재를 탐지하기 위한 조성물, 분석법, 방법 및 키트를 제공한다. 한 다른 실시태양에서, 약물은 Sf9 세포와 같은 곤충 세포를 사용하여 생성되거나 곤충 세포에서 생산되었다. 한 양태에서, 본 발명은 단백질, 웨타이드, 약물, 생물학적 생성물, 백신 항원 또는 VLP 제제와 같은 샘플에서 Sf9 랍도바이러스가 입자들 상에 응집되거나 입자들 내에 단백질 막으로 싸이는지를 측정하는 방법을 제공한다. 한 양태에서, 본 발명은 샘플(예를 들어, 단백질, 웨타이드, 약물, 생물학적 생성물, 백신 항원 또는 VLP 제제)에서 동정된 Sf9 랍도바이러스가 복제할 수 있는지를 측정하기 위한 조성물, 분석법, 방법 및 키트를 제공한다.

[0017] 한 양태에서, 본 발명은 샘플에서 바이러스의 탐지에 관한 것이다. 한 실시태양에서, 표적 핵산은 분리, 증폭 및 탐지된다. (예를 들어, 역전사 PCR(RT-PCR)에 의해) 표적 RNA 서열을 탐지하고 증폭하는 방법을 포함하는, 핵산을 분리, 증폭 또는 탐지하는 방법은, 예를 들어, Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Fourth Edition (2012) 및 Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology (2011)에서와 같이 당업계에 주지되어 있다.

[0018] 한 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 1의 적어도 25개, 적어도 50개, 적어도 100개, 적어도 250개, 적어도 500개, 적어도 750개, 적어도 1000개, 적어도 1250개, 적어도 1500개 또는 적어도 2000개 연속 뉴클레오티드 또는 SEQ ID NO: 1의 역상보를 포함하는 핵산 서열을 탐지하는 단계를 포함하여 바이러스를 탐지하는 방법을 제공한다. 일부 실시태양에서, 본 발명에 개시된 바이러스를 탐지하는 방법은 PCR 분석법에서 하나 이상의 프라이머 및 하나 이상의 표지화된 프로브를 사용하는 단계를 포함한다. 추가 실시태양에서, 상기 방법은 SEQ ID NO: 2 (TCTGTATTATGGGTTTGATCAGCTAAG)에 따른 서열을 가진 포워드 프라이머 및 SEQ ID NO: 3 (CTCGCTGCTGAGCGGTT)에 따른 서열을 가진 리버스 프라이머를 사용하는 단계를 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 방법은 SEQ ID NO: 4 (AGGATTGGAGAATTATAC)에 따른 서열을 가진 프로브를 사용하는 단계를 포함한다.

[0019] 일부 실시태양에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 1에 따른 바이러스를 제공한다. 일부 실시태양에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 1에 따른 바이러스의 단편 또는 SEQ ID NO: 1에 상보적인 서열의 단편을 추가로 제공한다. 일부 실시태양에서, Sf9 랍도바이러스 계놈의 단편 또는 랍도바이러스 계놈에 상보적인 서열은 표지화되거나 화학적으로 변형된다.

[0020] 일부 실시태양에서, 본 발명은 Sf9 랍도바이러스를 탐지할 수 있는 서열을 포함하는 표지화된 프로브를 제공한다. 일부 실시태양에서, 표지화된 프로브는 Sf9 랍도바이러스 계놈의 일부 또는 Sf9 랍도바이러스에서 서열의 역상보에 상보적이다.

[0021] 일부 실시태양에서, 서열, 단편 또는 프로브는, 예를 들어, FAM, VIC, JOE, 5-(2'-아미노에틸)아미노나프탈렌-1-설폰산, 쿠마린 및 쿠마린 유도체, 루시퍼 엘로우, 텍사스 레드, 테트라메틸로다민, 6-카복시 플루오레세인, 테트라클로로-6-카복시플루오레세인, 5-카복시로다민 및 사이아닌 염료와 같은 플루오레세인 및 플루오레세인 유도체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 발색단으로 표지화된다. 한 실시태양에서, 프로브는 6-카복시-플루오레세인(FAM)으로 표지화된다. 일부 실시태양에서, 본 발명은 바이러스를 탐지하기 위한 방법을 제공하며 상기 방법은 약 1개 문자의 RNA 내지 약 50개 문자의 RNA 사이의 민감성 수준을 가진다. 다른 실시태양에서, 상기 방법은 약 2개 문자의 RNA 내지 약 20개 문자의 RNA 사이의 민감성 수준을 가진다. 다른 실시태양에서, 상기 방법의 민감성 수준은 약 2개, 약 3개, 약 4개, 약 5개, 약 6개, 약 7개, 약 8개, 약 9개, 약 10개, 약 11개, 약 12개, 약 13개, 약 14개, 약 15개, 약 16개, 약 17개, 약 18개, 약 19개, 약 20개, 약 21개, 약 22개, 약 23개, 약 24개, 또는 약 25개 문자의 RNA이다.

[0022] 한 양태에서, 본 발명은 곤충 세포에서 생산된 단백질, 웨타이드, 약물, 생물학적 생성물, 백신 항원, 바이러스 또는 VLP 제제 또는 곤충 세포에서 생산된 단백질, 웨타이드, 약물, 생물학적 생성물, 백신 항원, 바이러스 또는 VLP 제제를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시태양에서, VLP 제제는 칼리시바이러스 VLP 제제이다. 다른 실시태양에서, VLP 제제는 노로바이러스 VLP 제제이다. VLP 제제는 하나 이상의 바이러스 또는 바이러스 균

주로부터의 하나 이상의 캡시드 단백질 또는 캡시드 단백질의 일부를 포함하는 단가 또는 다가 VLP 제제를 포함한다. 예를 들어, 노로바이러스 VLP 제제는 하나 이상의 노로바이러스 유전자군으로부터의 하나 이상의 캡시드 단백질 또는 캡시드 단백질의 일부를 포함하는 단가 또는 다가 VLP 제제를 포함한다. 본 발명에 사용된 "단가 VLP"는 단일 바이러스 균주로부터의 VLP 항원을 함유하는 VLP를 의미하는 반면, 본 발명에 사용된 "다가 VLP"는 둘 이상의 바이러스 균주로부터의 VLP 항원을 함유하는 VLP를 의미한다. 다른 단가 VLP는 동일한 VLP 제제에 함께 존재할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시태양에서, 노로바이러스 VLP 제제는 하나의 노로바이러스 유전자군으로부터의 VP1 및/또는 VP2 캡시드를 포함할 수 있거나 제 2 노로바이러스 유전자군으로부터의 VP1 및/또는 VP2 단백질과 함께 하나의 노로바이러스 유전자군으로부터의 VP1 및/또는 VP2 단백질을 포함할 수 있다. 노로바이러스 VLP 제제의 한 예는, 예를 들어, 본 발명에 기술된, 노로바이러스 유전자군 I, 유전자형 1/노로바이러스 유전자군 II, 유전자형 4(GI.1/GII.4) 2가 VLP이다.

[0023]

한 양태에서, 본 발명은 샘플에서 SEQ ID NO: 1과 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 상동성의 서열을 가진 바이러스의 존재 또는 부존재를 탐지하기 위한 키트를 제공하며, 키트는 하나 이상의 프라이머를 포함한다. 일부 실시태양에서, 키트는 포워드 프라이머, 리버스 프라이머 및 프로브를 포함한다. 다른 실시태양에서, 포워드 프라이머는 SEQ ID NO: 2에 따른 서열을 가지며; 리버스 프라이머는 SEQ ID NO: 3에 따른 서열을 가지며; 프로브는 SEQ ID NO: 4에 따른 서열을 가진다. 일부 실시태양에서, 프로브는 예를 들어, FAM, VIC, JOE, 5-(2'-아미노에틸)아미노나프탈렌-1-설폰산, 쿠마린 및 쿠마린 유도체, 루시퍼 엘로우, 텍사스 레드, 테트라메틸로다민, 6-카복시 플루오레세인, 테트라클로로-6-카복시플루오레세인, 5-카복시로다민 및 사이아닌 염료와 같은 플루오레세인 및 플루오레세인 유도체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 발색단으로 표지화된다. 한 실시태양에서, 프로브는 6-카복시-플루오레세인(FAM)으로 표지화된다.

[0024]

한 양태에서, 본 발명은 Sf9 랍도바이러스가 샘플에 존재하는지를 측정하고 Sf9 랍도바이러스가 복제할 수 있는지를 측정하기 위한 테스트를 위한 조성물, 방법, 분석법 및 키트를 제공한다. 일부 실시태양에서, 상기 방법은 RT-PCR에 의해 샘플에서 Sf9 랍도바이러스의 존재 또는 부존재를 탐지하는 단계를 포함하며, 상기 방법은 PCR 분석법에 하나 이상의 프라이머 및 하나 이상의 표지화된 프로브를 사용하는 단계를 포함하며, 상기 분석법은 SEQ ID NO: 2 (TCTGTATTATGGGTTTGATCAGCTAAG)에 따른 서열을 가진 포워드 프라이머 및 SEQ ID NO: 3 (CTCGCTGCTGAGCGGTT)에 따른 서열을 가진 리버스 프라이머, 및 SEQ ID NO: 4 (AGGATTGGAGAATTATAC)에 따른 서열을 가진 프로브의 사용을 포함한다. 실시태양에서, 본 발명은 샘플에 RNase A 처리를 하고 뒤이어 카오토로픽제로 처리하여 RNase A 활성을 정지시키고 입자를 분리하는 단계를 포함하며, 샘플에서 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호가 입자 및/또는 덩어리에 존재하는지를 측정하는 방법을 더 제공한다. 처리된 샘플은 상기한 대로 RT-PCR 분석법으로 처리된다. 최종 샘플에서 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호는 Sf9 랍도바이러스가 샘플에서 입자로 존재하는 것을 나타낸다. 실시태양에서, 본 발명은 Sf9 랍도바이러스 RNA가 복제할 수 있는지를 측정하기 위한 방법을 추가로 제공한다. 이를 위해서, 샘플은, 예를 들어, 과밤나방 세포와 같은 Sf9 랍도바이러스 복제를 허용하는 세포주로 배양된 후 세포의 패시지가 이어진다. 증가하는 Sf9 랍도바이러스 RT-PCR 신호는 바이러스가 복제할 수 있다는 것을 나타낸다. 따라서, 본 발명은 Sf9 랍도바이러스의 존재 또는 부존재를 탐지하는 것뿐만 아니라 Sf9 랍도바이러스의 감염성을 분석하기 위한 키트를 제공한다. 실시태양에서, 키트는 (i) 포워드 및 리버스 프라이머 및 Sf9 랍도바이러스 RNA의 탐지를 위한 프로브; (ii) RNase; (iii) 카오토로픽제; 및 (iv) 과밤나방 세포주를 포함한다.

[0025]

한 양태에서, 본 발명은 랍도바이러스, 랍도바이러스 핵산 또는 랍도바이러스 입자가 없거나 랍도바이러스 발현이 없는 곤충 세포를 제공한다. 다른 실시태양에서, 곤충 세포는 Sf9 또는 Sf21 세포이다. 일부 실시태양에서, 곤충 세포는 본 발명에 개시된 Sf9 랍도바이러스가 없고, Sf9 랍도바이러스 핵산 또는 입자가 없다. 일부 실시태양에서, 랍도바이러스는 Sf9 또는 Sf21 세포로부터 제거되었다. 다른 실시태양에서, 랍도바이러스, 랍도바이러스 핵산 또는 랍도바이러스 입자의 발현은 곤충 세포에서 차단된다. 예를 들어, 일부 실시태양에서, 랍도바이러스 발현은 랍도바이러스 계놈에 표적화된 siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드에 의해 차단된다. 따라서, 일부 실시태양에서, 본 발명은 Sf9 랍도바이러스 계놈 또는 랍도바이러스 계놈에 상보적인 서열을 제공한다. 다른 실시태양에서, Sf9 랍도바이러스 계놈 또는 랍도바이러스 계놈에 상보적인 서열의 단편은 표지화되거나 화학적으로 변형된다. 따라서, 일부 실시태양에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 1 또는 이의 상보적 서열에 해당하는 표지화된 또는 화학적으로 변형된 siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

[0026]

한 양태에서, 본 발명은 곤충 세포에서 생산된 단백질, 펩타이드, 약물, 생물학적 생성물, 백신 항원 또는 VLP 제제로부터 랍도바이러스를 제거하는 방법을 제공한다. 일부 실시태양에서, 상기 방법은 랍도바이러스(예를 들

어, Sf9 랍도바이러스)의 존재 또는 부존재를 탐지한 후 정제하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시태양에서, 곤충 세포에서 생산된 단백질, 웨타이드, 약물, 생물학적 생성물, 백신 항원 또는 VLP 제제로부터 랍도바이러스를 제거하는 방법은, 예를 들어, 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, SDR HyperD 크로마토그래피 및 당업계에 공지되고 개시된, 예를 들어, 전문이 참조로 본 발명에 포함된 미국특허 No. 8,481,693에 공지되고 개시된 다른 크로마토그래피 방법), 여과(예를 들어, 초여과, 희석여과 및  $0.2\mu\text{m}$  여과), 희석제에 의한 처리 또는 다른 정제 방법을 포함하며, 상기 방법은 랍도바이러스의 존재 또는 부존재를 탐지한 후 정제하는 단계를 더 포함한다.

[0027] 랍도바이러스는 적어도 6개 속: 리사바이러스(다른 것들 중에서, 라비 바이러스 포함), 베시쿨로바이러스(다른 것들 중에서, 베시쿨라 스트로마티티스 바이러스(VSV)), 에페메로바이러스(다른 것들 중에서, 소 유행열 바이러스), 사이토르합도바이러스(다른 것들 중에서, 상추 괴사 노랑 바이러스와 같은 식물 바이러스를 포함), 뉴클레오르합도바이러스(다른 것들 중에서, 감자 노랑 난장이 바이러스) 및 노비르합도바이러스를 포함하는 음성(-)센스 RNA 바이러스의 다양한 과인 랍도바리대 과(목: 모노네가비리대)에 속한다.

[0028] 스포돕테라 프루기퍼르다 및 다른 레피돕테란 곤충 종들로부터의 세포와 같은 곤충 세포는 당업계에 주지되어 있고 재조합 단백질의 생산, 예를 들어, 백신을 포함하는 치료 생성물의 생산을 위한 바쿨로바이러스 또는 다른 바이러스의 감염 및 복제를 지원하는데 일반적으로 사용된다. Sf9 세포주는 에스. 프루기퍼르다 나소 세포로부터 최초로 얻은 Sf21 세포의 클론 분리체이다. Sf9 세포주 ATCC CRL-1711은 1983년 미국 미생물 보존 센터(ATCC)에 기탁되었다. 다른 곤충 세포주는 스포돕테라 엑시구아, 헬리오디스 비레신스, 헬리코베라파 제아, 헬리오디스 서브플렉사, 안티카르시아 쟈마탈리스 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0029] 본 발명에 사용된 용어 "Sf9 랍도바이러스"는 본 발명에 개시된 새로운 바이러스를 의미한다. Sf9 랍도바이러스의 핵산 서열은 SEQ ID NO: 1로 본 발명에 제공된다. 본 발명에 사용된 용어 "복제 능력이 있는" 또는 "복제 가능한"은, Sf9 랍도바이러스 또는 Sf9 랍도바이러스 RNA 분자를 기술하는데 사용될 때, 숙주 세포에서 자가 복제하고 전사를 제공하는 바이러스 또는 RNA를 의미한다.

[0030] 본 발명에 사용된 용어 "프라이머"는 PCR 반응에서 사용될 충분한 수의 염기를 가진 일련의 뉴클레오티드 잔기를 의미한다. 프라이머는 샘플에서 동일한, 유사한 또는 상보적 DNA 또는 RNA의 존재를 증폭, 확인 또는 밝히는데 사용될 수 있다. 본 발명에 사용된 용어 "프로브"는 동일한, 유사한 또는 상보적 핵산 서열의 탐지에 사용된 핵산 서열을 의미한다.

[0031] 한 양태에서, 본 발명은 샘플에서 바이러스를 탐지하거나 샘플에서 바이러스를 제거하기 위한 조성물, 방법, 분석법 및 키트를 제공하며, 샘플은 단백질, 웨타이드, 약물, 생물학적 생성물, 백신 항원 또는 VLP 제제이다. 본 발명에 사용된, 용어 "바이러스-유사 입자 및 VLP"는 상호 교환하여 사용되며 한 형질에서 감염성인 것으로 입증되지 않은 바이러스와 같은 구조를 의미한다. 본 발명에 사용된 용어 "약물"은 치료제를 함유하며 부형제와 함께, 약학적 조성물 또는 약품을 제제화하는데 사용된 재료를 의미한다. 본 발명에 사용된 "생물학적 생성물"은 세포 또는 유기체에 의해 생산된 생성물 또는 재료를 의미한다. 생물학적 생성물은 유기체의 천연 생성물일 수 있거나 일부 방식으로 변형되어 생물학적 생성물을 생산하는 유기체에 의해 생산될 수 있다. 생물학적 생성물의 예는 백신, 항체(예를 들어, 단클론 항체), 치료 단백질, 바이러스(예를 들어, 유전자 치료를 위한 재조합 바이러스, 예를 들어, 바쿨로바이러스), 효소, 성장 인자, 폴리사카라이드, DNA 및 RNA를 포함하는 핵산 및 입자(예를 들어, 바이러스-유사 입자)를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 생물학적 생성물은, 예를 들어, 당화 또는 방사성 표지화에 의해 변형될 수 있다.

[0032] 한 양태에서, 본 발명은 복제할 수 있는 Sf9 랍도바이러스를 탐지 또는 Sf9 랍도바이러스가 복제 능력이 있는지를 측정하기 위한 조성물, 방법, 분석법 및 키트를 제공한다. 따라서, 한 양태에서, 본 발명은 샘플에 존재하는 Sf9 랍도바이러스가 복제할 수 있는지를 측정하기 위한 수단을 제공한다. 일부 실시태양에서, 상기 방법은 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호를 포함하는 샘플을 Sf9 랍도바이러스 복제를 지원할 수 있는 세포주로 배양하는 단계를 포함한다. 일부 실시태양에서, Sf9 랍도바이러스 복제를 지원할 수 있는 세포주는, 예를 들어, 스포돕테라 엑시구아 세포주일 수 있다. 여러 이런 세포주가 본 발명에 개시되며, 예를 들어, BCIRL/AMCY-SeE1, BCIRL/AMCY-SeE4, 및 BCIRL/AMCY-SeE5와 같은 스포돕테라 엑시구아 세포주로부터 유래된 세포주를 포함한다. 일부 실시태양에서, 에스, 엑시구아 세포주는 10% 소 태아 혈청으로 EX-세포 420 배지에서 배양된다. 일부 실시태양에서, 복제성 Sf9 랍도바이러스는 여러 시점에서 본 발명에 기술된 RT-PCR에 의해 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호를 측정함으로써 탐지된다. 예를 들어, 한 실시태양에서, Sf9 랍도바이러스 RNA를 탐지하는 RT-PCR은 세포주에 의한 배양 이전; 세포주에 의한 배양 직후(폐시지 0) 및 세포주의 연속 폐시지 이후(예를 들어, 폐시지 1 및 2 이후)에 샘

풀 상에서 실행된다. 적어도 1회 패시지 이후, RT-PCR에 의해 탐지된 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호의 증가는 바이러스가 에스 액시구아 세포주에서 복제되고 있는 것을 나타낸다. RT-PCR에 의해 탐지된 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호의 변화의 감소 또는 부족은 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호가 복제할 수 있는 바이러스와 관련이 없다는 것을 나타낸다.

[0033] 본 발명에 사용된 대로, 세포주, 샘플, 단백질, 웹타이드, 약물, 생물학적 생성물, 백신 항원, VLP 제제 등이 바이러스가 "실질적으로 없다"는 용어는 세포, 샘플, 단백질, 웹타이드, 약물, 생물학적 생성물, 백신 항원, VLP 제제 등이 PCR 또는 RT-PCR 분석법 등에 의해 측정된 대로 바이러스의 탐지가능한 수준을 포함하지 않다는 것을 의미한다.

[0034] 일부 실시태양에서, 본 발명에 기술된 조성물, 방법 및 키트는 리보뉴클레아제(RNase)와 같은 RNA를 분해하는 효소를 사용한다. 일부 실시태양에서, RNase는 RNA를 분해하는 뉴클레아제이다. 일부 실시태양에서, RNase는 응집 때문에 분해에 저항성을 가질 수 있는 단백질 막으로 싸이지 않은 RNA를 분해하는 완전한 수단을 제공한다. RNase는 RNase A, RNase H, RNase III, RNase I 및 기타와 같은 엔도리보뉴클레아제일 수 있거나 RNase II, RNase R, 엑소리보뉴클레아제 I 또는 기타와 같은 엑소리보뉴클레아제일 수 있다. 리보뉴클레아제 A(RNase A)는 연구에 주로 사용된 췌장 리보뉴클레아제이며 단일 가닥 RNA를 특이적으로 절단시킨다.

[0035] 카오토로픽제는 당업계에 공지되며 부탄올, 에탄올, 프로판올, 페놀, 염화마그네슘, 과염소산 리튬, 아세트산 리튬, 염화 구아니디늄, 황산 도데실 나트륨, 티오우레아 및 우레아를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 카오토로픽제는 수소 결합을 과과함으로써 다른 분자의 소수성 효과를 약화시킨다. 따라서, 카오토로픽제는 핵산, 단백질 및 지질 이중층과 같은 구조를 과과 및/또는 분자를 변형시킨다. 또한, 카오토로픽제는 효소를 변형시킴으로써 RNase 효소 또는 DNase 효소의 활성을 막을 수 있으며 또한 VLP와 같은 입자의 과과 또는 분리를 가능하게 할 수 있다.

[0036] 본 발명에 사용된 대로, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 사용의 내용이 분명하게 달리 나타내지 않는 한 복수 형태를 포함한다. 용어 "또는"은 포괄적인 것으로 이해된다. 문구 "적어도 하나"의 의미는 문구 "하나 이상"의 의미와 동일하다. 용어 "포함하다(comprise)", "포함하는(comprising)", "함유하는(containing)", "가지는(having)" 등은 "포함하는(including)" 등을 의미할 수 있다. 본 명세서 전체에서 용어 "약"의 사용은 값이 값을 측정하는데 사용되는 방법에 대한 표준 편차를 포함하며 또는 적절한 경우, 인용된 값의 20% 초과 또는 미만의 값을 포함하는 것을 나타내는 것을 의미한다.

[0037] 실시예

#### 실시예 1. 스포돕테라 프루기페르다 Sf9 곤충 세포주에서 랍도바이러스의 탐지

[0038] 스포돕테라 프루기페르다 Sf9 곤충 세포주의 재조합 바클로바이러스로부터 얻은 생산 세포(EOPC) 재료의 말단에 곤충 기원의 레트로바이러스 요소에 대한 무작위 스크리닝을 실시하였다. 이를 위해서, 바이러스 입자-결합 RNA를 EOPC 재료로 제조하였고 무작위 프라이머 RT-PCR 클로닝을 실시하였다. 최종 플라스미드 DNA 클론의 DNA 서열 분석은 13,267 뉴클레오티드로 이루어지고 6개 오픈 리딩 프레임을 함유하는 복제 능력이 있는 랍도바이러스 계놈의 존재와 일치하는 서열 콘티그(contig)의 어셈블리를 허용하였다. 아미노산 서열 수준에서 상동성 연구는 식물 기원의 랍도바이러스와 관련된 최고 상동성 점수를 가진 여러 랍도바이러스의 L 단백질에 대해 약하나 일치하는 상동성을 나타내었다.

[0039] qRT-PCR 분석법은 Sf9 세포-관련 랍도바이러스에 대해 개발되었고 총 세포 RNA, 컨디션드 배지 및 제조용 Sf9 세포 은행의 바클로바이러스 용해물에서 일치하는 신호를 입증하였다. 유사한 신호가 1983년에 동결된 ATCC-유래 Sf9 세포주(ATCC CRL-1711)에서 탐지되었고, 이는 랍도바이러스 오염원은 Sf9 세포주의 최초 분리시에 존재할 가능성이 있었다는 것을 나타낸다.

[0040] EOPC 재료에 대한 노출 후 다른 패시지 수준에서 수확한 두 인간 세포주 샘플의 분석은 패시지 1 세포에서 강한 랍도바이러스 신호를 나타내었으나, 패시지에 의한 EOPC 재료의 희석과 일치하는 패시지 4 내지 6 사이의 백그라운드 수준으로 신호를 빠르게 감소시켰고 인간 세포에서 복제하는 바이러스의 뚜렷한 능력을 나타내지 않았다.

[0041] 놀워크 VLP 및 컨센서스 VLP 백신 제제와 같은 노로바이러스 VLP 백신은, 예를 들어, 미국 특허 Nos. 7,955,603, 8,431,116, 8,481,693, 및 8,841,120 및 미국특허출원 공개공보 Nos. 2011-0182975, 2013-0273102, 및 2014-0004145에 기술되며, 이의 각각은 모든 목적을 위해 전문이 참조로 본 발명에 포함된다. 모노포스포릴

지질 A(MPL) 및 수산화 알루미늄(Al(OH)<sub>3</sub>)으로 항원보강된 근육내 노로바이러스 GI.1/GII.4 2가 바이러스-유사 입자(VLP) 백신을 적어도 133명 피험자에서 테스트하였다(총 234명의 피험자가 연구에 등록되었고; 133명의 피험자가 백신을 투여받았고 101명의 피험자가 위약을 투여받았다).

#### [0043] 실시예 2. EOPC 재료에서 입자-관련 RNA 서열의 랜덤 프라이머 클로닝 및 분석

가능한 RNA-함유 바이러스 또는 바이러스-유사 입자를 탐지하기 위해서, 랜덤 RT-PCR 클로닝 목적을 위한 EOPC 재료로 시작하였다. EOPC 재료는 과편을 정화한 후 뉴클레아제 분해 처리되어 유리(입자-결합 아님) 핵산을 제거하였다. 뉴클레아제 분해 이후, 재료를 20% 수크로오스 쿠션을 통해 100,000 x g에서 원심분리하여 바이러스 입자를 수집하였다. 현저한 양의 미손상 바클로바이러스는 이런 과정에서 수집될 수 있다는 것이 예측되었다. 그런 후에 고속 펠렛화 재료에 핵산 추출을 실시하고 RNase-유리 DNase로 처리하여 바클로바이러스와 게놈 DNA를 제거하면서, 임의의 바이러스 RNA가 손상되지 않게 남겼다.

5' 말단(TATTGCGGCCGCTTCTNNNNNNNN)에서 Not I 제한 위치로 태그된 랜덤 N9 프라이머를 제 1 가닥 역전사효소 반응과 제 2 가닥 클레나우 DNA 중합효소 반응 모두에 사용하였고, Not I 서열 태그(TATTGCGGCCGCTTCTT)로 이루어진 PCR 그룹을 사용하여 증폭될 수 있는 이중 가닥 DNA를 얻었다. PCR 증폭은 분리된 RNA 집단에 제한된 양의 서열 복잡성을 나타내는 몇몇 뚜렷한 밴드의 증폭을 초래하였다. 이 절차를 수회 반복하여 각 시기에 다르나 뚜렷한 집단의 밴드를 얻었다(랜덤 프라이밍의 사용에 의해 예상되지 않았다). 최초에 서열화된 142개 클론 중에서, 1개 클론은 곤충 바이러스 역전사효소와 상동성을 나타내는 것으로 발견되었고, 32개 클론은 랍도바이러스의 L 단백질과 멀게 상동성인 것으로 나타났다. 랍도바이러스 상동성은 단지 아미노산 서열 수준에서 관찰되었고 L 유전자의 일부를 통해 24-26% 상동성의 범위에 있었다. 잔존하는 서열은 리보솜 서열, 바클로바이러스 서열 또는 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 수준에서 알려진 상동성이 없는 서열을 나타내는 것으로 발견되었다. 바클로바이러스 및 리보솜 클론의 분리는 바이러스 RNA 분리 과정 동안 뉴클레아제 처리에 대항한 특정 RNA 및 DNA 서열의 존재의 표시이다.

랍도바이러스 상동성을 나타내는 클론뿐만 아니라 진뱅크 데이터베이스와 탐지 가능한 상동성을 나타내지 않은 클론의 전부의 추가 서열 분석은 각각 대략 7,000 및 4,500 뉴클레오티드의 2개의 큰 서열 콘티그의 빌딩을 얻었고, 각각은 랍도바이러스 L 단백질에 상동성을 가진 오픈 리딩 프레임의 일부를 함유한다. 두 서열 콘티그가 동일한 바이러스 게놈 서열의 일부이었는지를 측정하기 위해서, 추가 RT-PCR 클로닝을 각 콘티그로부터의 한 프라이머를 사용하여 실행하였다. 추가 클로닝은 이런 두 콘티그에 미치는 서열을 나타내는 클론의 분리를 초래하였다. 마지막으로, cDNA 말단의 빠른 증폭 (RACE) 기술을 사용하여 13,267개 뉴클레오티드 신규 랍도바이러스 게놈(SEQ ID NO: 1)의 서열을 완성하는 5' 및 3' 말단 클론의 분리를 가능하게 하였다.

랍도바이러스 게놈의 특징 맵은 도 1에 도시된다. 맵은 다음 기준을 기초로 한 랍도비리대 과의 일원인 음성 가닥 RNA 바이러스의 센스 배향(5' to 3')을 도시한다:

1. 이 바이러스의 큰 오픈 리딩 프레임과 여러 랍도바이러스 서열의 L(큰 폴리미라제) 유전자 사이의 아미노산 서열 상동성을 진뱅크에 보고되었다;

2. 잔존하는 유전자의 게놈 구조 및 크기는 일반적인 랍도바이러스의 전형이다;

3. G 및 L 사이의 짧은 보조 유전자의 존재는 여러 형태의 랍도바이러스에서 일반적이다;

4. 이 바이러스 및 임의의 다른 바이러스의 N, P, M 및 G 유전자 사이의 임의의 상동성의 부존재. 후자는 크고 매우 다양한 그룹의 바이러스를 나타내는 랍도바이러스의 전형이며 일원들 사이의 상동성은 L 유전자 생성물에서만 주로 발견된다. (Ammar et al., *Annu Rev Entomol* 54; 447 (2009); Jackson et al., *Annu. Rev. Phytopathol* 43, 623 (2005); Walker et al., *Virus Res.* 162(1-2), 110 (2011) 참조.)

N, P, M 및 G 오픈 리딩 프레임의 배정은 코딩 서열의 표준 랍도바이러스 게놈 레이아웃 및 크기를 기초로 하였다. G 유전자가 예상된 소수성 신호 펩타이드 및 막투과 도메인을 가진 타입 1 막 당단백질을 분명하게 암호화 한다는 사실은 이것과 일치하였다.

Sf9 랍도바이러스를 곤충 세포주로부터 분리하였고, 다른 랍도바이러스와의 상동성 관계는 이것은 곤충 벡터에 의해 운반된 식물 바이러스일 수 있다는 것을 나타낸다(아래 표 1 참조). 식물 랍도바이러스는 주로 곤충 벡터에 의해 운반되며 일반적으로 곤충 벡터에서 다세대적으로 복제된다(Ammar et al. (2009)). 또한, Sf9 세포주 (최초 Sf21 세포주의 유도체)는 스포돌테라 프루기페르다(멸강나방)의 난소 조직으로부터 유래되었고 이는 바이러스는 곤충 벡터 호스트에서 수직 감염능력이 있다는 것을 암시한다(Vaughn et al., *In Vitro*, 13(4); 213

(1977)).

[0054]

표 1의 상동성 데이터의 검토는 Sf9 랍도바이러스는 L 유전자 아미노산 서열 상동성의 검토를 통해 다른 랍도바이러스와 멀게 연관된다는 것을 나타낸다. 최고 점수를 가진 1회분은 모든 식물 랍도바이러스와 뒤이은 포유류 랍도바이러스이다. 중요한 것은, Sf9 랍도바이러스에서 다른 유전자 중 어느 것도 RNA 또는 아미노산 서열 수준에서 임의의 다른 바이러스와 어떠한 상동성도 나타내지 않으며 이런 수준의 차이는 식물 랍도바이러스의 전형이다(Ammar *et al.* (2009); Jackson *et al.* (2005); Walker *et al.* (2011)).

표 1

[0055]

다른 랍도바이러스 L 단백질 아미노산 서열에 대한 Sf9 랍도바이러스의 관련성

다른 공개된 랍도바이러스 L 단백질 아미노산 서열에 대한 Sf9 세포 랍도바이러스의 관련성						
설명	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
1 L 단백질[Lettuce yellow mottle virus]>gb   ABV56129.1	399	399	53%	2.00E-109	27%	YP_002308376.1
2 RNA-의존성 RNA 폴리머라제 [Lettuce necrotic yellows virus]	399	399	54%	3.00E-109	27%	YP_425092.1
3 RNA-의존성 RNA 폴리머라제 [Persimmon virus A]	392	392	52%	3.00E-107	27%	BAM36035.2
4 폴리머라제[Barely yellow striate mosaic virus]	380	380	63%	1.00E-103	25%	ACT21686.1
5 폴리머라제[Northern cereal mosaic virus]	379	379	54%	5.00E-103	27%	NP_597914.1
6 폴리머라제 단백질[Northern cereal mosaic virus]	379	379	54%	5.00E-103	27%	ADE61677.1
7 RNA-의존성 RNA 폴리머라제 [Raspberry vein chlorosis virus]	348	348	45%	1.00E-96	27%	CBL76312.2
8 L 단백질[Lettuce big-vein associated virus]>sp   Q8BOU2.1	345	345	50%	8.00E-93	25%	YP_002308576.1
9 L 단백질[Lettuce big-vein associated virus]	340	340	50%	5.00E-91	25%	AFA36170.1
10 폴리머라제[Sonchus yellow net virus]>sp   P31332.1	320	320	53%	4.00E-85	25%	NP_042286.1
11 L 단백질[Rice yellow stunt virus]	311	311	49%	3.00E-82	25%	BAI79332.1
12 L[Maize mosaic virus]>sp   Q6EOW6.1	310	310	53%	4.00E-82	25%	YP_052855.1
13 주정 RNA-의존성 RNA 폴리머라제 [Strawberry crinkle virus]	298	298	34%	6.00E-82	29%	AAP03645.2
14 대형 단백질[Rice yellow stunt virus]>sp   O10378.1	303	303	51%	8.00E-80	24%	NP_620502.1
15 L 단백질[Australian bat lyssavirus]>sp   Q9QSP0.2	297	297	52%	6.00E-78	25%	NP_478343.1
16 폴리머라제[Bokeloh bat lyssavirus]	297	297	54%	7.00E-78	26%	AEL79469.1
17 폴리머라제 [Aravan virus]>gb   ABV03822.1	290	290	52%	9.00E-76	25%	YP_007641396.1
18 폴리머라제 [Rabies virus]	290	290	54%	1.00E-75	25%	AFP66217.1
19 폴리머라제 [Rabies virus]	290	290	54%	1.00E-75	25%	AFP66212.1
20 폴리머라제 [Lagos bat virus]	289	289	55%	2.00E-75	25%	AFW16650.1
21 폴리머라제 [Rabies virus]	289	289	54%	2.00E-75	25%	ABZ81176.1
22 폴리머라제 [Irkut virus]>gb   ABV03823.1	289	289	52%	2.00E-75	25%	YP_007641401.1
23 대형 단백질 [Rabies virus]>gb   ADZ98845.1	289	289	54%	2.00E-75	24%	ACR39383.1

24 폴리머라제[Rabies virus]	289	289	54%	2.00E-75	25%	ABZ81226.1
25 폴리머라제[Irkut virus]	289	289	52%	2.00E-75	25%	AFP74572.1
26 폴리머라제[Khujand virus]	288	332	68%	3.00E-75	25%	ABV03824.1
27 대형 단백질[Rabies virus]	288	288	54%	3.00E-75	24%	ABU52978.1
28 대형 단백질[Rabies virus]	288	288	54%	4.00E-75	25%	ACF42345.1
29 폴리머라제[Rabies virus]	288	288	52%	5.00E-75	25%	AFN24114.1
30 대형 단백질[Rabies virus]	288	288	54%	5.00E-75	24%	ADJ29912.1
31 대형 단백질[Rabies virus]	287	287	54%	6.00E-75	24%	AFM52659.1
32 대형 단백질[Rabies virus]	287	287	54%	8.00E-75	25%	BAL45940.1
33 대형 단백질[Rabies virus]	287	287	54%	9.00E-75	24%	AFN27427.1
34 폴리머라제 단백질[Lagos bat virus]	287	287	52%	1.00E-74	25%	ADD84516.1
35 RNA-의존성 RNA 폴리머라제[Rabies virus]	286	286	54%	1.00E-74	24%	AEK98550.1
36 대형 단백질[Rabies virus]	286	286	52%	1.00E-74	25%	AFN27417.1
37 폴리머라제 단백질[Shimoni bat virus]	286	286	52%	1.00E-74	25%	ADD84511.1
38 L 단백질[Rabies virus]	286	286	54%	2.00E-74	25%	ADU55582.1
39 L 단백질[Rabies virus]	285	285	54%	3.00E-74	24%	BAI43366.1
40 RNA 폴리머라제[Rabies virus]	285	285	54%	3.00E-74	25%	AEZ55976.1
41 RNA-의존성 RNA 폴리머라제[Rabies virus]	285	285	54%	3.00E-74	24%	BAM83861.1
42 폴리머라제[Rabies virus]	285	285	54%	3.00E-74	25%	ABZ81201.1
43 L 단백질[European bat lyssavirus 2]>sp   A4UHQ7.1	285	285	54%	3.00E-74	25%	YP_001285397.1
44 대형 단백질[Rabies virus]	285	285	54%	3.00E-74	24%	AFP36387.1
45 폴리머라제[Rabies virus]	285	285	52%	4.00E-74	25%	AFN24334.1
46 RNA-의존성 RNA 폴리머라제[Rabies virus]	285	285	54%	5.00E-74	24%	ACP41226.1
47 폴리머라제[Rabies virus]	285	285	54%	5.00E-74	24%	ABZ81196.1
48 대형 단백질[Rabies virus]	284	284	54%	5.00E-74	24%	AFN27407.1
49 폴리머라제[European bat lyssavirus 2]	284	284	54%	5.00E-74	25%	ABZ81191.1
50 RNA-의존성 RNA 폴리머라제[Rabies virus]	284	284	54%	6.00E-74	24%	ADR03124.1

[0056] 실시예 3. Sf9 세포, 컨디션드 배지 및 바클로바이러스 용해물에서 Sf9 랍도바이러스의 정량화. 태그만 qRT-PCR 분석법은 다양한 배지 분획에서 Sf9 랍도바이러스를 정량화하기 위해 개발되었다. 랍도바이러스 RNA를 정량화하는데 사용된 qRT-PCR 분석법은 RT 및 PCR 단계 모두에서 포워드 및 리버스 프라이머를 사용하는 단일 단계 태그만 분석법이었다. 따라서 분석법은 (+) 및 (-) 가닥 RNA를 탐지할 수 있다. 양성 대조군으로서 및 정량화 목적을 위해 이 분석법에서 사용된 RNA 표준은 인 비트로 전사를 통해 생산된 (-)-가닥 RNA이었다. 이 표준을 사용하여, 분석법은 대략 4개 문자의 RNA의 탐지의 한계를 가졌다.

[0057] 프라이머 및 프로브 서열은 L 유전자 내의 뉴클레오티드 위치 7200-7264에 미치는 64개 뉴클레오티드 표적 서열에 위치된다. 프라이머 및 프로브 서열은 다음과 같다:

[0058] EOPC60 FWD : TCTGTATTATGGGTTTGATCAGCTAAG

[0059] EOPC60 REV : CTCGCTGCTGAGCGGTTT

[0060] EOPC60 Prb : 6FAM-AGGATTGGAGAATTATAC

[0061] 정량화 목적을 위한 표준 곡선 RNA를 T7 RNA 폴리머라제를 사용하는 EOPC 클론 60 DNA의 인 비트로 전사 후 플라스미드 DNA의 선형화로 제조하였다. 주형 플라스미드 DNA를 뒤이어 DNase로 뒤이어 분해하였고 표준 곡선을 정제하였다. 대략 5kb의 RNA를 예상하였으나 동일한 세기, 3.5kb 및 5kb의 두 RNA가 지옥살-아가로스 겔 분석에 의해 나타내어진 대로 생산되었다. 두 RNA의 더 작은 것이 표적 서열을 함유하는데 충분히 크며 미성숙 전사 종결의 결과로서 생산될 수 있었다. 정량화 목적을 위해, 표준 곡선 RNA의 평균 분자량은, 따라서, 4.25kb 또는  $1.4 \times 10^6$  달톤이다. 표준 곡선 RNA는 역전사효소 단계 없이 PCR 반응에서 시행될 때 단지 흔적 신호만을 생산

하는 것으로 나타나서 주형 DNA가 없다는 것을 입증하였다. 태그만 분석법에서 표준 곡선으로서 이런 RNA의 사용은 4개 문자의 표준 곡선 RNA와 동일한 0.01 fg의 RNA의 탐지의 재생가능한 한계를 입증하였다.

[0062] EOPC 60 태그만 분석법을 사용하여 막 농축과 초원심분리 이전과 이후에 Sf9 세포 컨디션드 배지에서 Sf9 랍도 바이러스를 추적하였다. 이런 데이터는 표 2에 도시되며 배지에서 바이러스 신호는 0.2 마이크론 살균 여과 배지에 의해 유지되지 않으며 100,000 kD 문자량 컷오프 막에 의해 완전히 유지되는 것을 입증한다. 또한, 100,000 x g 원심분리는 바이러스 신호를 더 작은 부피로 재현탁될 수 있는 펠렛으로 농축시킨다. 이런 데이터는 Sf9 세포 컨디션드 배지에서 미손상 랍도바이러스 입자의 존재와 일치한다.

표 2

[0063] 배지 농축 및 초원심분리 이전 및 이후 Sf9 세포-컨디션드 배지에서 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호

샘플	설명	살균 여과?	분자/mL
519.190	Sf9 컨디션드 배지	N	2.87e+07
490.194.1	Sf9 컨디션드 배지	Y	2.79e+07
490.194.2	100 kD 잔류액	N	2.54e+08
490.194.3	100 kD 잔류액	Y	4.01e+08
490.194.4	100 kD 투과액	N	0
490.194.5	100 kD 투과액	Y	0
490.194.6	100,000 x g 490.194.2의 상청액	N	1.84e+07
490.194.7	100,000 x g TBS에 재현탁된 펠렛	N	3.48e+09

[0064] 표 3은 Sf9 컨디션드 배지, 바클로바이러스 용해물 및 총 세포 RNA의 다양한 소스에서 Sf9 랍도바이러스의 농도에 관한 추가 데이터를 도시한다. 현저한 양의 랍도바이러스 RNA를 EOPC 재료(Sf9 세포의 바클로바이러스 용해물)에서 탐지하였다. EOPC 재료의 직접 샘플링은 대략  $2 \times 10^{10}$  RNA copies per mL의 랍도바이러스 RNA 농도를 나타내었다. 바이러스 입자가 고속 원심분리에 의해 EOPC 재료로부터 수집될 때 대략  $4.5 \times 10^{10}$ 의 역가가 계산되었다. 이런 4배 불일치는 EOPC 재료의 직접 샘플링이 입자-결합 및 유리 RNA 모두를 탐지하면서 고속 원심분리는 입자-결합 RNA에 대해 특이적이라는 것의 가능성과 일치한다. 랍도바이러스 RNA 신호는 또한  $10^{10}$  RNA copies per mL와 가깝게 Sf9 세포 컨디션드 배지에서 탐지하였다.

표 3

[0065] 컨디션드 배지, 바클로바이러스 용해물 및 총 세포 RNA에서 Sf9 랍도바이러스 농도

샘플	설명	PCR 샘플 크기	PCR 신호 (fg)	최초 샘플에서 RNA 분자/mL
514.089DR	100,000 x g 바클로바이러스 용해물로부터의 펠렛	0.6 mL의 최초 용해물과 동일	53,980.86	3.87e+07
514.092DR	100,000 x g 바클로바이러스 용해물로부터의 펠렛	0.6 mL의 최초 용해물과 동일	68,867.60	5.02e+07
521.102B	Sf9/바클로바이러스 용해물	0.008 mL의 용해물과 동일	2581.37	1.39e+08
521.102B	Sf9/바클로바이러스 용해물	0.008 mL의 용해물과 동일	4183.10	2.25e+08
521.138	Sf9/바클로바이러스 용해물	0.008 mL의 용해물과 동일	4688.83	2.52e+08
521.102A	Sf9 컨디션드 배지	0.008 mL의 배지와 동일	160.34	8.63e+06
521.102B	Sf9 컨디션드 배지	0.008 mL의 배지와 동일	181.64	9.78e+06
				RNA 분자/세포
521.160	Sf9 세포 총 RNA Sf9 WCB	4.4e+04 세포	154652	1511
521.200	Sf9 세포 총 RNA ATCC Sf9 세포 (1983)	4.4e+04 세포	334567	3273

[0066] 생존 가능한 Sf9 세포에서 랍도바이러스 RNA 농도에 관해, 증식기(log phase) Sf9 세포는 대략 1500 RNA copies per cell을 함유하는 것으로 발견되었고 이는 낮은 수준의 감염을 표시하며 관찰된 사이토파티시티(cytopathicity)의 부족과 일치한다. 랍도바이러스 감염은 이의 최초 분리로부터의 Sf9 세포주에 고유한 것이며 (Vaughn et al., 1977) 일상적인 배양 동안 의사 오염 때문이 아니라는 의견을 지지하는 데이터는 1983(ATCC CRL-1711)에 기탁된 미국 미생물 보존 센터(ATCC) Sf9 클론의 분석으로부터 얻었다. 이 경우에 랍도바이러스 RNA 신호를 ATCC 세포주에서 3273 RNA copies per cell로 탐지되었고, Sf9 제조용 세포 은행(WCB) 내에서 본 수준과 일치하였다. **실시예 4. Sf9 랍도바이러스는 인간 세포주 A549 및 HEK293에서 복제하지 않는다.**

[0067] HEK 293 및 A549 세포는 놀워크 및 컨센서스 VLP 생산 작업으로부터의 EOPC 재료에 의한 이런 세포의 처리 이후 바이러스 통합의 증거에 대해 테스트되었다. 놀워크 VLP EOPC 재료(Meridian Part # 85190, Lot 08110043) 및 컨센서스 VLP EOPC 재료(Meridian Part # 85188, Lot 09110048)를 3개의 인간 세포주에 대한 배양을 통해 복제-능력 레트로바이러스의 존재에 대해 테스트하였고 증폭가능한 역전사효소 활성의 존재 때문에 음성인 것으로 발견되었다. 접종 이후 다른 패시지에서 이런 세포주의 샘플(Raji, 293 및 A549 세포)에 추가 테스팅을 실행하였다.

[0068] 패시지 0, 1, 4 및 6으로부터의 A549 및 HEK 293 세포의 추가 동결 세포 샘플을 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호의 존재에 대해 테스트하였다. 이를 위해서, 세포 샘플을 해동하고 총 세포 RNA를 제조하고 EOPC60 qRT-PCR 분석법을 실행하였다. 이런 데이터는 표 4에 도시되고 패시지 0에서 채취한 세포의 RNA에서 강한 랍도바이러스 RNA 신호를 나타내나, 이런 신호는 배양시에 세포의 연속된 패시지로 백그라운드 수준으로 급격하게 떨어진다. 이런 데이터는 패시지에 의한 EOPC의 회색과 일치하나 Sf9 분리된 랍도바이러스의 복제와는 일치하지 않는다. 따라서, Sf9 랍도바이러스가 인간 세포에서 복제할 수 있다는 증거가 없다.

#### 표 4

인간 세포주 A549 및 HEK293에서 Sf9 랍도바이러스 복제의 부존재에 대한 증거

	A549 세포 - Exp527.044 플레이트 1	HEK293 세포 - Exp527.044 P플레이트 2
	fg 랍도바이러스 RNA/ μL 세포 RNA	
컨센서스 - P0	17209.00	12620.00
컨센서스 - P1	381.44	17.33
컨센서스 - P4	0.15	0.03
컨센서스 - P6	0.06	0.01
놀워크 - P0	41126.00	20141.00
놀워크 - P1	994.42	21.81
놀워크 - P4	0.15	0.06
놀워크 - P6	0.02	0.00
미처리 - P0	0.04	0.04
미처리 - P1	0.03	0.02
미처리 - P4	0.03	0.17
미처리 - P6	0.03	0.08

[0070] **실시예 5. Sf9 랍도바이러스 RNA의 존재에 대한 놀워크 약물의 테스팅.** 놀워크 VLP 약물(NWDS13)을 4.5mL의 약물 샘플을 뉴클레아제로 처리하여 임의의 잔여 유리 혁산을 제거한 후 100,000 x g에서 원심분리를 통해 입자를 수집함으로써 입자-결합 랍도바이러스 RNA 신호의 존재에 대해 테스트하였다. 그런 후에 재현탁 재료를 카오트로 픽제로 용해하고 RNA를 정제하였다. 뉴클레아제 처리 및 원심분리 이전에, 샘플을 외피 바이러스 입자의 회복을 위한 내부 대조군으로서 설치류 백혈병 바이러스(MLV)의 샘플로 스파이크하였다. 뒤이은 MLV qRT-PCR 분석은 MLV 스파이크의 우수한 회복을 나타내었다. 이런 제제로부터의 RNA를 Sf9 랍도바이러스에 대해 테스트하였고 최초 약물 샘플에서 mL당 240개 문자의 랍도바이러스 RNA와 동일한 신호를 탐지하였다. 각 VLP의 50μg의 추정 복

용량에서, 인간 복용량 당 10개 분자 미만의 랍도바이러스를 계산하였다. 테스트한 샘플이 약물에 존재하는 입자-결합 RNA를 나타내지만 이것이 미손상 게놈 RNA를 가진 잔류 미손상 랍도바이러스 입자의 존재의 어떠한 표시인 것으로 결론 내릴 수 없는데, 이는 특히 바이러스 제거 연구가 노로바이러스 VLP 정제 공정을 사용하여 15 내지 18 로그의 누적 외피 바이러스 감염성 감소를 입증하였기 때문이다.

[0071] 뉴클레아제 분해를 2개의 다른 시나리오로 사용하여 유리 핵산을 제거하였다. EOPC 재료의 경우에, 뉴클레아제 분해를 사용하여 유리 핵산을 제거하였고 바이러스 입자-결합 RNA는 RT-PCR 클로닝을 위해 분리될 수 있었다. 이들은 랍도바이러스 cDNA 클론의 동정을 유도하는 실험이다. 이런 실험에서, 정화된 EOPC 재료를 pH 7.0으로 적정하였고 벤조나제 및 터보 DNase를 각각 50 및 5 units/mL의 최종 농도에 첨가하였다. EOPC 재료는 Sf9001 곤충 세포 배지를 기반으로 하였기 때문에, 마그네슘의 첨가는 뉴클레아제 활성의 활성화에 필요로 하지 않았다. 뉴클레아제 첨가 이후, 재료는 2시간 동안 37°C로 배양하였고, 그 후 EDTA를 20mM의 최종 농도에 첨가하였다. 그런 후에 바이러스 입자를 수크로오스 쿠션을 통해 100,000 x g에서 원심분리하였고 입자-결합 핵산을 쿠아겐으로부터의 QIAamp 바이러스 RNA 분리 키트를 사용하여 분리하였다. 이런 키트는 임의의 과도한 뉴클레아제 활성을 불활성화하는 카오토로픽제를 사용하여 미손상 입자-결합 RNA의 분리를 초래한다. 이런 재료를 뒤이어 라이프 테크놀러지로부터의 터보 DNA-유리 키트로 처리하여 바이러스 입자-결합 RNA와 공동 분리될 수 있는 바클로바이러스 DNA를 제거하였다. 뉴클레아제 처리 단계에 대해 내부 대조군이 사용되지 않은 반면, 상대적으로 적은 리보솜 또는 바클로바이러스 서열이 최종 cDNA 클론에서 동정되었다는 사실은 뉴클레아제 처리의 유효성의 표시이다.

[0072] 유리 핵산을 제거하기 위한 뉴클레아제의 사용의 두 번째 예는 입자-결합 랍도바이러스 서열의 존재에 대한 놀워크 VLP 약물의 테스팅을 필요로 하였다. 이 경우에, VLP 샘플을 Tric-HCl의 첨가에 의해 pH 7.5, pH 7.4, 30mM의 최종 농도로 조절하였고, 뒤이어 NaOH에 의해 적정하였다. 설치류 백혈병 바이러스(MLV)의 내부 대조군 샘플의 첨가 이후, MgCl<sub>2</sub>를 다시 10mM의 최종 농도에 첨가하고 벤조나제 및 터보 DNase를 각각 25 및 5 units per mL의 최종에 첨가하였다. 뉴클레아제 분해는 1시간 동안 37°C에서 진행되게 하였고, 그 후 샘플을 20mM EDTA로 조절하였고 20% 수크로오스 쿠션 위에서 100,000 x g에서 원심분리하였고 RNA를 라이프 테크놀러지로부터의 MagMAX 바이러스 RNA 분리 키트를 사용하여 펠렛으로부터 분리하였다. 내부 MLV 스파이크는 입자-결합 RNA가 뉴클레아제 분해로부터 보호되었고 최종 RNA 제제에서 발견되었다는 것을 나타내었다. 유리 핵산의 분해의 정도를 관찰하는데 대조군을 사용하지 않았고, 유리한 반응 조건의 존재하에서 뉴클레아제의 상당한 양의 사용은 필수적으로 모든 유리 핵산을 제거하는 것으로 예상될 수 있는데, 특히 단지 소량의 핵산이 약물에 존재하기 때문이다.

[0073] 연구의 결과는 식물 또는 곤충 기원의 랍도바이러스가 Sf9 세포주에서 동정되었다는 것을 나타내었고 이런 바이러스 오염은 이의 최초 분리로부터의 Sf9 세포주에 고유할 것 같다. Sf9 랍도바이러스 게놈은 완전히 서열화되었고, 식물 랍도바이러스에 가장 근접한 상동성을 나타내며, 이는 게놈 구조와 모든 랍도바이러스의 전형적인 오픈 리딩 프레임 크기 분포를 나타낸다. 바이러스 입자는 Sf9 세포 컨디션드 배지와 바클로바이러스 용해물에서 탐지되었고 랍도바이러스 RNA는 RNA copies per cell의 면에서 정량화하였다. 내인성 감염에 의해 Sf9 세포에서 세포독성의 증거가 없다. 또한, 연구는 바이러스가 인간 세포에서 복제하는 능력이 결여된다는 것을 나타내었다. 본 발명에 개시된 약물 제조 공정은 외피 바이러스를 효과적으로 제거 및/또는 불활성화하는 것으로 입증되었다. 예를 들어, 외피 바이러스는 세정제 처리에 의해 분리될 수 있고 바클로바이러스는 산 처리에 의해 불활성화되고 제거될 수 있고 뒤이은 원심분리에 의해 불활성이며 응집된 바클로바이러스를 제거하였다. 예를 들어, 공정에서 단계는 모델 외피 바이러스, A-MuLV(GI.1 DS 제조에서 누적 > 18.22 log<sub>10</sub> 감소 및 GII.4 DS 제조에서 >15.73 log<sub>10</sub>) 및 AcNPV(GI.1 DS 제조에서 누적 > 15.30 log<sub>10</sub> 감소 및 GII.4 DS 제조에서 >11.54 log<sub>10</sub>)를 제거하는 것으로 입증되었다.

#### 실시예 6. RNase A-저항성 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호에 대한 약물의 분석

[0074] 실시예 5는 Sf9 곤충 세포와 관련된 신규 랍도바이러스의 특징을 기술한다. 한 실험은 놀워크 VLP 약물의 한 연구 로트에서 벤조나제-저항성, 입자-결합 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호에 대한 증거를 보고하였고, 노로바이러스 VLP 상에 응집되거나 내에 포장된 소형 잔류 랍도바이러스 RNA 단편의 존재에 대한 가능성을 나타내었다. 또한, 잔여 미손상 랍도바이러스 입자 오염에 대한 가능성은 실시예 5에 기술된 연구에 의해 배제되지 않았다. 정제 놀워크 VLP 약물 재료 및 컨센서스 VLP 약물 재료의 두 로트 각각을 이전 RNase A 처리에 의한 및 처리 없는 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호에 대해 테스트하였다. 최종 데이터는 약물에서 관찰된 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호는 RNase A 분해에 민감하였고 VLPs 또는 잔여 Sf9 랍도바이러스 입자에 단백질 막으로 쌓인 RNA를 나타내지 않았다.

다. 적절한 수단을 선택하여 RT-PCR 억제제에 대해 제어하였고 실제 입자-결합 랍도바이러스 RNA는 RNase A 분해에 취약하지 않다는 것을 입증하였다.

[0076] 이 연구에서, 놀워크 및 컨센서스 VLP 약물에서 뉴클레아제-저항성 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호의 조직을 추가로 다루기 위한 실험을 총 4개 로트의 약물 재료를 조사하고 응집 때문에 분해에 저항성일 수 있는 단백질 막으로 싸이지 않은 랍도바이러스 RNA 신호를 분해하는 더욱 완전한 수단으로서 리보뉴클레아제 A를 사용함으로써 실행하였다. RNase A를 가진 및 갖지 않은 약물의 처리 이후, 실험 디자인은 카오토로픽제의 존재하에서 RNA 정제 단계(RNase 활성을 파괴) 및 민감성 qRT-PCR 분석법에 의한 임의의 잔존 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호의 정량화를 포함하였다.

[0077] **놀워크 약물의 분석.** 놀워크 약물 재료를  $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ( $4 \times 10^{14}$  RNase A 분자/ $\text{mL}$ )의 최종 농도에 RNase A의 첨가와 함께 또는 첨가 없이 1시간 동안  $37^\circ\text{C}$ 에서 pH 6.5에서 배양하였다. 배양 이후, 샘플을 RNase 활성을 즉시 불활성화하고 부유하는 단백질 막으로 쌓인 RNA일 수 있는 임의의 VLP 또는 바이러스 입자를 분리하기 위해 강한 카오토로픽제를 이용하는 매그맥스(MagMax) 바이러스 분리 프로토콜을 사용하여 RNA 정제시켰다. 정제 RNA 샘플을 감압 건조(speedvac drying)에 의해 추가로 농축하고 실시예 3에 기술된 EOPC-60 qRT-PCR 분석법을 사용하여 qRT-PCR 분석을 실시하였다.  $840\mu\text{L}$ 의 약물 재료를 RNase로 처리하거나 처리하지 않고 RNase 활성을 위해 변성하는 조건하에서 RNA 추출을 실시하였다. 최종 정제 RNA 샘플을 최초 약물 샘플로부터 84배 농축하였다.  $3 \times 1\mu\text{L}$ 의 각 정제 RNA 샘플을 삼중 qRT-PCR 반응에서 테스트하였다.

[0078] 표 5는 이런 실험의 결과를 도시하며, 두 놀워크 VLP 약물 로트(NWDS 16)의 단 하나는 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호를 나타내었고 이 신호는 최초 약물 재료에 51 RNA copies per mL와 동일하였다. 놀워크 약물 로트 NWDS09는 신호를 나타내는데 실패하였다(최초 약물에서 < 12 RNA copies per mL). 로트 NWDS 16 재료는 양성인 반면, RNase A로 처리된 동일 재료는 신호를 나타내지 않았다. 이런 관찰은 비-입자-단백질 막으로 쌓인(비-보호) 상태에서 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호의 존재와 일치한다.

**표 5**

RNA 추출 이전에 RNase A 처리된 및 처리되지 않은 놀워크 약물 RNA 샘플의 랍도바이러스 RNA Ct 값

처리	NWDS16	NWDS09
없음	$36.5^*$	$\geq 40$
RNase A	$\geq 40$	$\geq 40$

[0080] <sup>\*</sup>36.5의 Ct 값은 PCR 샘플 크기 및 샘플 농도의 정도를 기초로 한 최초 약물의 mL 당 Sf9 랍도바이러스 RNA의 51 복제물에 해당한다.  $\geq 40$ 의 Ct 값은 이런 연구에 사용되고 반응당 1 RNA 복제물의 탐지 한계를 기초로 한 샘플 크기에 대한 약물에서 < 12 RNA copies per mL을 나타낸다. 표 6은 RT-PCR 억제제에 대한 대조군으로서 qRT-PCR 분석 직전에 정해진 랍도바이러스 RNA 스파이크의 첨가 이후에 동일한 샘플에 대한 Ct 값을 도시한다. 모든 4개 샘플에 대한 유사한 Ct 값을 오염하는 RT-PCR 억제제의 부존재에 대한 증거를 제공하였다.

**표 6**

RT-PCR 억제제에 대한 테스트로서 대조군 랍도바이러스 RNA로 스파이크된 놀워크 약물 샘플에 대한 랍도바이러스 RNA Ct 값

처리	NWDS16	NWDS09
없음	20.36	20.73
RNase A	20.35	20.46

[0082] **컨센서스 약물 재료의 분석.** R&D 로트 DCN12 또는 DCN15로부터의 컨센서스 약물 재료를  $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ( $4 \times 10^{14}$  RNase A 분자/ $\text{mL}$ )의 최종 농도에 RNase A의 첨가와 함께 또는 첨가 없이 1시간 동안  $37^\circ\text{C}$ 에서 pH 6.5에서 배양하였다. 배양 이후, 샘플을 RNase 활성을 즉시 불활성화하고 부유하는 단백질 막으로 쌓인 RNA일 수 있는 임의의 VLP 또는 바이러스 입자를 분리하기 위해 강한 카오토로픽제를 이용하는 매그맥스(MagMax) 바이러스 분리 프로토콜을 사용하여 RNA 정제시켰다. 정제 RNA 샘플을 감압 건조(speedvac drying)에 의해 추가로 농축하고 실시예 3에 기

술된 EOPC-60 qRT-PCR 분석법을 사용하여 qRT-PCR 분석을 실시하였다. 1000 μL의 약물 재료를 RNase로 처리하거나 처리하지 않고 RNase 활성을 위해 변성하는 조건하에서 RNA 추출을 실시하였다. 최종 정제 RNA 샘플을 최초 약물 샘플로부터 100배 농축하였다. 3 x 1 μL의 각 정제 RNA 샘플을 삼중 qRT-PCR 반응에서 테스트하였다. 표 7은 이런 실험의 결과를 아래에 도시한다. 두 컨센서스 VLP 약물 로트(DCN 12)의 단 하나는 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호를 나타내었고 이 신호는 최초 약물 재료에 128 RNA copies per mL와 동일하였다. 컨센서스 약물 로트 DCN15는 신호를 나타내는데 실패하였다(최초 약물에서 < 10 RNA copies per mL). 로트 DCN 12 재료는 양성인 반면, RNase A로 처리된 동일 재료는 신호를 나타내지 않았다. 이런 관찰은 비-입자-단백질 막으로 쌓인(비-보호) 상태에서 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호의 존재와 일치하였다.

### 표 7

[0083] RNA 추출 이전 RNase A 처리된 및 처리되지 않은 컨센서스 약물 RNA 샘플의 랍도바이러스 RNA Ct 값

처리	DCN12	DCN15
없음	36.5*	≥40
RNase A	≥40	≥40

\*35.6의 Ct 값은 PCR 샘플 크기 및 샘플 농도의 정도를 기초로 한 최초 약물의 ML 당 Sf9 랍도바이러스 RNA의 128 복제물에 해당한다. ≥40의 Ct 값은 이런 연구에 사용되고 반응당 1 RNA 복제물의 탐지 한계를 기초로 한 샘플 크기에 대한 약물에서 < 10 RNA copies per mL를 나타낸다. 표 8은 RT-PCR 억제제에 대한 대조군으로서 qRT-PCR 분석 직전에 정해진 랍도바이러스 RNA 스파이크의 첨가 이후에 동일한 샘플에 대한 Ct 값을 도시한다. 모든 4개 샘플에 대한 유사한 Ct 값을 오염하는 RT-PCR 억제제의 부존재에 대한 증거를 제공하였다.

### 표 8

[0085] RT-PCR 억제제에 대한 테스트로서 대조군 랍도바이러스 RNA로 스파이크된 컨센서스 약물 샘플에 대한 랍도바이러스 RNA Ct 값

처리	DCN12	DCN15
없음	20.70	20.77
RNase A	20.81	20.69

[0086] RNase A 처리는 랍도바이러스 입자 내에서 RNA를 분해하지 않을 것이라는 것을 입증하는 대조군 실험. 상기 데이터가 정제된 놀워크 및 컨센서스 VLP 약물 재료에서 단백질 막으로 쌓인 랍도바이러스 RNA의 부존재에 대한 증거를 제공하는 한, 추가 대조군 실험을 실행하여 RNase A 처리는 바이러스 입자에서 단백질 막으로 쌓인 것으로 알려진 RNA 신호의 감소 또는 제거를 초래하지 않는다는 것을 입증하였다. 이런 데이터는 표 6 및 8에 도시된 데이터를 확인한다. 이런 대조군 실험에서, 상당량의 Sf9 랍도바이러스를 함유하는 것으로 알려진 생산 종료(EOP) 재료는 놀워크 및 컨센서스 약물에 대해 상기한 대로 처리하였고 신호는 RT-PCR로 정량화하였다. 280 μL의 EOP 재료를 RNase A로 처리하거나 처리하지 않았고 RNase 활성을 위해 변성하는 조건하에서 RNA 추출을 실시하였다. 최종 정제 RNA 샘플을 최초 EOP 샘플로부터 5.6배 농축하였다. 3 x 1 μL의 각 정제 RNA 샘플을 삼중 qRT-PCR 반응에서 테스트하였다. 데이터는 아래에 표 9에 제공된다. RNA 추출 단계 이전에 RNase A 처리는 EOP 재료에서 탐지된 랍도바이러스 RNA 신호에 대한 효과가 없었다. RNase A 대 EOP 재료에서 랍도바이러스 RNA의 화학양론적 비는 > 10,000:1이었다. 이런 데이터는 카오트로피제는 비-분해된, 입자-결합 RNA의 성공적인 정제를 유도하는 상당한 농도의 RNase A를 불활성화하는데 성공적으로 사용될 수 있다는 것을 입증한다.

### 표 9

[0087] RNA 추출 이전에 RNase A 처리한 및 처리하지 않은 EOP 재료에 대한 랍도바이러스 RNA Ct 값

처리	EOP 재료
없음	14.57
RNase A	14.67

[0088] 실시예 7. Sf9 랍도바이러스의 투과전자현미경(TEM). Sf9 세포 컨디션드 배지 및 바클로바이러스 용해물에서 동

정된 Sf9 랍도바이러스를 접선 유동 여과와 수크로오스 구배 원심분리를 통해 부분적으로 정제하였고 투과전자 현미경(TEM)으로 이미지화하였다. 여러 뚜렷한 외피를 가진, 구형 내지 직사각형 입자가 관찰되었다. 270개 입자의 측정이  $65.6 \times 49.6$  nm의 평균 치수를 나타내었다. 바이러스 입자의 이런 관찰은 Sf9 배지 및 용해물에서 뚜렷하게 기능성이고, 입자-결합된, 랍도바이러스 게놈 RNA의 존재를 도시하는 이전 분자 생물학적 데이터와 일치한다.

[0089] 이 연구에서, Sf9 랍도바이러스의 투과전자현미경사진을 생성하도록 설계된 실험을 실행하였다. "빈 벡터" 바클로바이러스로 감염된 Sf9 세포의 10리터 웨이브 백 배지를 제조하고 뒤이어 채취하였다. 정제된 용해물을 접선 유동 여과에 의해 대략 112mL로 농축하였다. 6mL의 농축액을 두 20-60% 수크로오스 밀도 계단 구배 위에 각각 2회 적층하였고 90분 동안 10°C에서 100,000 x g에서 원심분리하였다. 150mM NaCl(시트레이트 베퍼 용액(CBS))을 함유하는 10mM 시트레이트 베퍼, pH 6.0를 사용하여 수크로오스 계단 용액을 제조하였다. 수크로오스 구배를 1.5mL 분획으로 분류하고 분획들을 실시에 3에 기술된 qRT-PCR 분석법(EOPC-60 분석법)을 사용하여 분석하였다. 최강 Sf9 랍도바이러스 신호를 함유하는 피크 분획(각 구배로부터의 분획# 13)을 합쳤다. 합쳐진 분획을 CBS로 32mL의 최종 부피로 조절하였고, CBS에서 4mL 30% 수크로오스 쿠션 위에 적층하고 1시간 동안 10°C에서 100,000 x g에서 원심분리하였다. 원심분리 이후, 상청액을 버리고 펠렛화된 재료를 300 μL의 CBS에 재현탁하였다. 이런 최종 재료를 우란일 아세테이트로 음성 염색 후 TEM 분석을 실시하였다. 구형 내지 직사각형이었고 크기와 모양이 다소 불규칙한 다수의 외피 바이러스 입자의 존재를 입증하는 여러 현미경 사진을 캡쳐하였다. 대부분의 현미경 사진은 과편 또는 정제 바이러스 입자 제제를 오염시키는 재료가 거의 없는 깨끗한 이미지를 도시하였다. 270개 입자의 치수의 분석은  $65.61 \pm 14.52 \times 49.56 \pm 11.58$  nm의 평균 크기를 나타내었다. 대표적 TEM 이미지는 2에 제공된다.

#### 실시예 8. 곤충 세포 감염성 연구

[0090] 바이러스에 의해 이미 감염되지 않은 추가 선택 곤충 세포주에서 복제하는 랍도바이러스의 능력을 입증하는 연구를 실시하였다.

[0091] 본 발명에 개시된 Sf9 랍도바이러스를 재조합 바클로바이러스에 의한 감염 후 Sf9 세포 용해물에서 최초로 발견하였으나, 바이러스는 또한 바클로바이러스 감염과 무관하게 Sf9 세포 컨디션드-배지에서 탐지하고 정량화하였다. 건강한 SF9 세포 내의 랍도바이러스 RNA 수준을 또한 정량화하였다. 바이러스를 테스트한 모든 SF9 세포에서 동정하였고 세포독성 효과를 유도하지 않을 정도로 충분하게 낮은 수준에서 복제하는 것으로 보였다.

[0092] Sf9 랍도바이러스에 대한 감염성 분석을 개발하기 위해서, 실험을 Sf9 랍도바이러스가 추가 곤충 세포주 상에서 전파될 수 있는지를 결정하기 위해 개시하였다. 표 10은 미국 농무부(USDA)의 농업 연구 서비스(ARS)로부터 받은 여러 곤충 세포주의 목록을 도시한다.

**표 10**

Sf9 랍도바이러스 감염성을 테스트하기 위한 USDA로부터 받은 세포주의 목록

세포주 이름	종 및 조직의 기원
BCIRL/AMCY-SeE1	스포돕테라 엑시구아 난자
BCIRL/AMCY-SeE4	스포돕테라 엑시구아 난자
BCIRL/AMCY-SeE5	스포돕테라 엑시구아 난자
BCIRL/HvAM1	헬리오디스 비레신스 난소
BCIRL/HzAM1	헬리코베라파 제아 난소
BCIRL-HzFB33	헬리코베라파 제아 체지방
BCIRL-HsAM1	헬리오디스 서브플렉사 난소
BCIRL-AgAM1	안티카르시아 쟈마탈리스 난소

[0093] 표 10에 제공된 세포주의 각각은 10mL의 Ex-Cell 420 배지 + 10% 소 태아 혈청을 가진 T25 조직 배양 플라스크에 놓았고, 5mL의 배지를 제거하고 Sf9 세포 상호오염도(carryover)가 없도록 보장하기 위해서 원심분리하고 0.2 마이크론 막을 통해 여과한 Sf9 세포로부터의 5mL의 컨디션드 배지로 이를 대체함으로써 Sf9 랍도바이러스에 노출시켰다. Sf9 컨디션드 배지를 24시간 동안 세포 배지 상에 잔존시켰고, 이후 배지를 제거하였고 곤충 세포주를 EX-Cell 420 배지 + 10% FBS에서 추가로 배양하였다. 합류도에 도달한 후, 각 배지의 세포의 대략 10%를 수집하였고 동결 세포 펠렛(p0)으로 저장하면서 각각의 새로운 서브배지를 지속된 성장과 패시징을 위해 제조하였다. 이런 방식으로 각 세포주의 2개의 추가 동결 세포 펠렛을 패시지 횟수 p1 및 p2를 위해 수집하였다. Sf9

랍도바이러스에 노출된 각 세포주로부터의 동결 세포 샘플의 수집 이후, 총 세포 RNA를 각 세포 샘플로부터 뿐만 아니라 Sf9 랍도바이러스에 노출되지 않았던 각 세포주로부터의 대조군 세포로부터 정제되었다. 각 RNA 샘플을 임의의 랍도바이러스 RNA 신호의 탐지 및 정량화에 대해 기술된 Sf9 랍도바이러스 qRT-PCR 분석법에서 테스트하였다. 데이터는 "총 세포 RNA의  $\mu$ g당 팬토그램 (fg) 랍도바이러스 RNA"로서 표현되었고 도 3에 제공된다.

[0096] 도 3의 데이터의 검사는 여러 유의미한 관찰을 유도한다. 먼저, 세포주 HsAM1은 Sf9 세포-컨디션드 배지에 대한 노출 이전 및 이후 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호를 나타내었고, 이는 이런 세포주는 Sf9 랍도바이러스 또는 밀접하게 관련된 동류로 이미 감염된다는 것을 암시하였다. Sf9 세포-컨디션드 배지에 대한 추가 노출은 감염성 신호에서 추가 증가를 초래하지 않았다. 둘째로, 세포주 HvAM1, HzAM1, HzFB33 및 AgAM1은 Sf9 랍도바이러스를 상당한 복제하는 능력을 나타내지 않았다. 낮은 수준 RNA 신호가 예상했던 대로 컨디션드 배지에 대한 즉시 노출 이후 관찰되었으나, 이런 신호는 후속 패시지에서 바이러스 복제의 경우에 예상했던 대로 증가가 없었다. 마지막으로, 반대로, 3개의 파밤나방 세포주는 각 패시지에 의해 적어도 100배만큼 증가하는 RNA 신호를 가진 Sf9 랍도바이러스의 표시된 복제를 나타내었다. 패시지 2에서 이런 세포에서 Sf9 랍도바이러스 RNA 신호 수준은 Sf9 세포에서 구조성으로 관찰된 이런 수준과 동일하다.

[0097] 따라서, 연구의 결과는 Sf9 스포돕테라 프루기페르다 세포주에서 최초로 동정된 Sf9 랍도바이러스(또는 밀접한 동류)는 헬리오디스 서브플렉사 난소로부터 유래된 다른 레피돕테란 종으로부터의 제 2 곤충 세포주에 구조성으로 존재하는 것을 나타내었다. 또한, Sf9 랍도바이러스는 스포돕테라 엑시구아 난자로부터의 최초로 유래된 3개의 스포돕테라 엑시구아 세포주에서 쉽게 복제하는 것으로 관찰되었다.

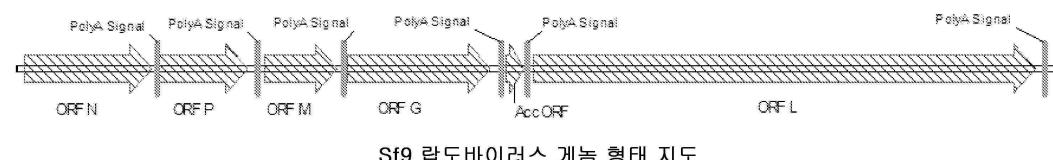
[0098] 상기 예시적 실시예에서 설명한 대로 본 발명의 여러 변형 및 변화는 당업자에게 상기되는 것으로 예측된다. 결과적으로 첨부된 청구항에 나타난 것과 같은 이런 제한만이 본 발명에 가해져야 한다. 본 발명에 인용된 모든 공개공보는 모든 목적을 위해 전문이 참조로서 본 발명에 포함된다.

#### 참조목록

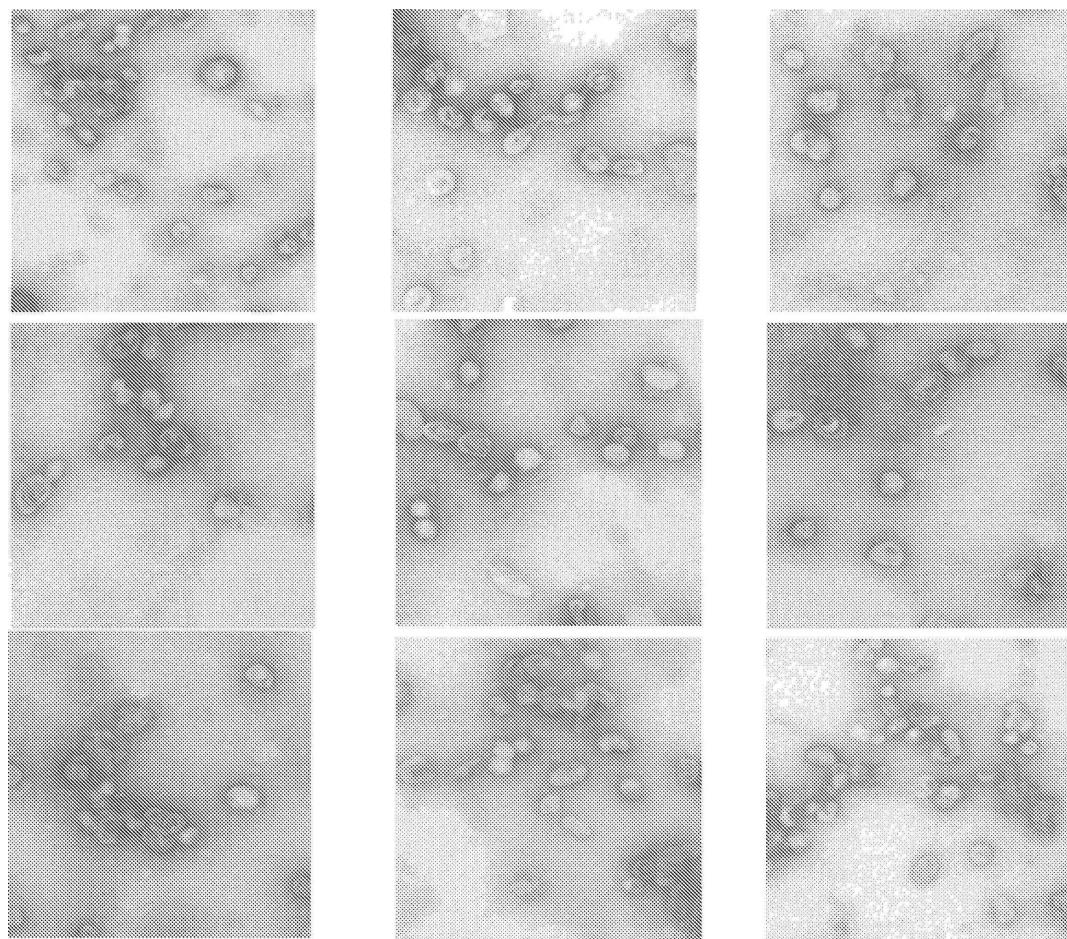
1. Ammar el D, Tsai CW, Whitfield AE, Redinbaugh MG, Hogenhout SA. Cellular and molecular aspects of rhabdovirus interactions with insect and plant hosts. *Annu Rev Entomol*, 54, 447-468 (2009).
2. Jackson AO, Dietzgen RG, Goodin MM, Bragg JN, Deng M. Biology of plant rhabdoviruses. *Annu Rev Phytopathol*, 43, 623-660 (2005).
3. Walker PJ, Dietzgen RG, Joubert DA, Blasdell KR. Rhabdovirus accessory genes. *Virus Res*, 162(1-2), 110-125).
4. Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro*, 13(4), 213-217 (1977).

#### 도면

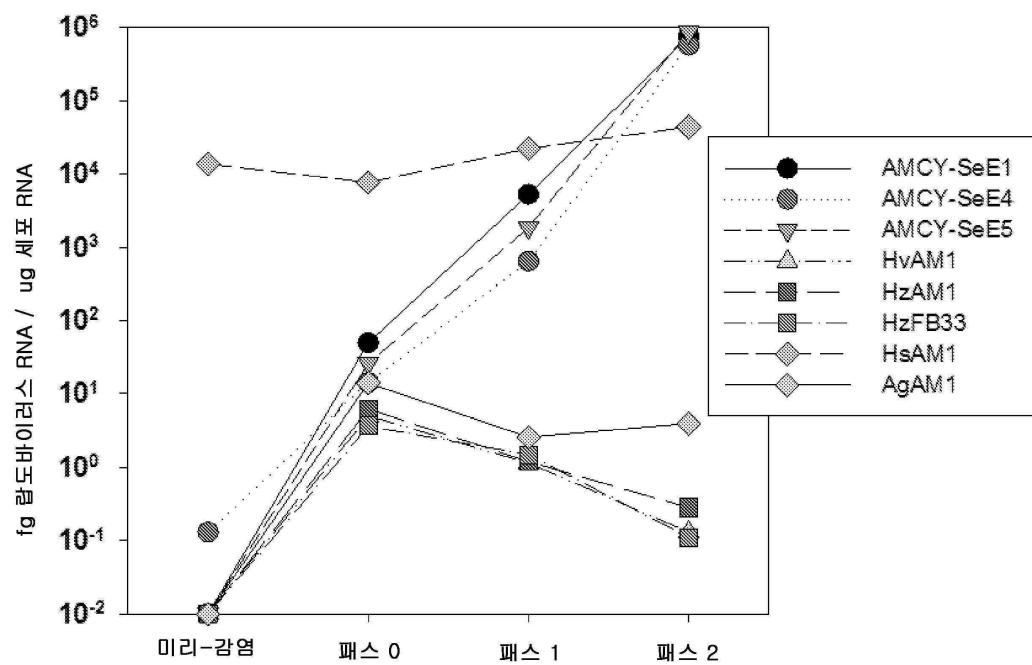
##### 도면1



## 도면2



## 도면3



## 서 열 목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Takeda Vaccines, Inc.

Haynes, Joel

&lt;120&gt; METHODS OF DETECTION AND REMOVAL OF RHABDOVIRUSES FROM CELL LINES

&lt;130&gt; LIGO-026/01WO

&lt;150&gt; US 61/886,438

&lt;151&gt; 2013-10-03

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 13267

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rhabdovirus sp.

&lt;400&gt; 1

acataaaaaa atgaaaacaa tgaaacactg aactaattac atcctgaact gaactagaca	60
cacaaaatcc aatgaaaatt atacgataaa tgatcctaac tcttatacat gacaacgact	120
acttcacgga tatcggttc tttagatctt tcatgacaca ggaaaccatg aagccagtat	180

gggaagaatt gggcacagga gaaacagagt tccaaggac cgtggacatc ccagggagat	240
ctctcaagcc agaaaaaaca gattggagtg ttgatacatg tcggagatc agtttaatc	300
tgaagttacc tggtaaaata tggcaactgg cccatcaaga aaccatctt aacagattc	360
ttacatttt cgtactggg tatgttccaa atacacacac agccacagaa attgtactct	420
ccatggcatc actaatctt aaggacaagg ccaaaggacc tattgattt atttggatg	480
actcattca agcttagtccc tctgatgagt gtgggttctc cggtgttggaa gaaactccat	540
tggtatcg acaacacccg gatgatgatg actacacatt gagagaagat gaagaatcag	600

ccgctatgaa tgaggaagaa aaaatacaag cagctctaaa aactttggaa attcaagata	660
ctccagtaga cctgaaggat gcatctggaa ttgtcttga gacaaaggag gacagagaac	720
aaaggatcaa gaatgagaaa gctctacatg tagaggatga tatcaacgct ctaactcaga	780
ttacaaaaca attcttgtt gagtattcca caggctccct acagaattt gttgcaagg	840
ctactactat ttcatagat aataatgcta ctaacggctt cacccgttgc catctccatg	900
ccatcagagt catgaacttc attgctctaa caatgcttag aaaggttaacc aagtc当地atg	960
cccagatgat caatgcctt ctgaaggagc aatacaagag aaatattgcc tccctaatcc	1020

ccggcgccct ctccctgag ttgctcctc ccagtaagag ctgcattgtat aaactgacag	1080
ctatttctaa gaatgaccgg gcagtcaatt cattcttgc aaagggttgtg atgctcaaca	1140
tggaggagga acggagaaac ccttccttgg ttgcttgct tggggcttcc cttctcaccc	1200
acaccacttg gaatggaatg gggatttac atgttatttt tgaagtttgt ctattccatc	1260
agattagctg gaagaggttg gtcacagagt ccctgacctc actaacaag atgtcatggg	1320
gtgaagtctg tcaattcctc atcaagtatc aagcaaagg aaatcctgac ccaacggttg	1380
cctggccag aatcattgtat gattcttact ttatgagatt aaccacagta aatcatccca	1440
cacttgctgc attatttagtg gaatccctca taagatctca gaaagatgtat ggaatcctga	1500
atgccaactg gcccattccaa cacagggaca ccatcaatta ttatagggac gctgccaagc	1560
ttctcactga taagctcaca ggacagactg ctacagtcca agcccttacc aatgaagccg	1620
ctgatctgt tagaacaatg aatgcaggac cctctagata ccacccaagg cctagtaacc	1680
ttatccccat ggttagatcta aaccggaaag acttataaga cttaccttatt atcccaagac	1740
taatttccat aataatcccc aaaaagacaa ttactgttat tttcttattaa aaaaccaatg	1800
aaaattatgc agagaatatt gagacatata gtatccttct tctcaaagtc ctggtgccaa	1860
tcctccgatc ccgtcttagt gtgcgactgt gагtacccctc ctctcaagag aaactatcaa	1920
ctgatttact ctataatggc ttcccactct cttgacacca ttgatctatc tgaaattggaa	1980
ttgacaaggg agttctgac tggggttggc gattacatga ctggacaaag accggttcca	2040
gcctcaatc ctccagaggt cggtcactcc ccctctgtat aagtggaaaa acgattggaa	2100
gaactgaaga attactggac tcagtttagag gatcccttgc atgagagaat tctcaatacc	2160
ttgaaagcga tcagcatctt gagcggagac accagaggag atctgagtgg aaaatataaa	2220
catctagtcc gcattagcgg agatgacatg ccccaattat tggacgaact tatagacatc	2280
tgtttctgg ggcctaagac tctaattgtt accttacgaa tggcgataac cgcctataacc	2340
gctgcattag ccagaaatgc caagtccacc atctcagata ttactaccgc atcagcagat	2400
ttgatggtca tcactcagat gatacgtcc cagcaggaat cttccatc atcattagag	2460
catctcttc atgcttggaa taacgtcgcc agtggatga ctgcttatac agcggactg	2520
gataagagaa ccctcaagtt gacacagtt acaccggccag tcaagcctga ccatcaccgg	2580
ccccctcta cagcctccag tcataccct gatgcttgc tggggcttca tataaacata	2640
accccccgtt gtgcatataa gtcccaattt ggggtattga ctgctgtcc caatggaaac	2700
attggtttc ttgcaaataa ctccgatggc actgtgatag ccaaacttgt ggaagtaatt	2760
aggaagccac gccctctcact gacggccctc aataagaacc tgtctgagct gatcaattat	2820
gtcaaggcaa atccgaagat ctttgctact tactctaccc tttctcctca ggataagctt	2880

aatatcctga atgagatcca cttctgcata ccagatctta ccaatcaatg ggtcaaggcc	2940
tgataacatt ccctccctc acaaactcta aagatatctc catccttgat gacatttta	3000
ttaattatat ttaagtacga tttaagatct acataccaaa accaaccatt ttgatgatta	3060
acatgttatt ataaaaaacc aatgaaacctt atacgtaat tgagataagt ttgatitcat	3120
tgttccttgt gtcatcaccc aacttttga gctcgaacaa tgagtgtct tgaacggatt	3180
gcacggagcc tatcatgaa gaagttgaac cctaggagaa ctccaaagac tcagcctatt	3240
cctgaaaagg ctactgtcta tcatccttc atgctcttt atgatctcaa tttagctatt	3300
gagggtaaaa tccacatctc cgctatcacc attatagtga atgcccttc cttagctgg	3360
gcaatagaac tcittcactc tgaactcatcg tggtcaggt gtcttgagta ctttggaaa	3420
tccatcaagg ataacatatt ggcatccata aaccctcgag ttgatccaaa tggaacatgt	3480
catatgatga catcaatcat aacttcctc ggattcttag atggatcctg catcaactca	3540
gaagcagagc caagacagct cacaggatct agatcctggg agatcatgtc tcctaatcag	3600
aatctcattt tgataaccct aggattcaaa ataaccttga aaaccttcgc acagcaccag	3660
agatacagct tgcgtgacca tggattccac aaattggaga tgctcaacga gaaagagaag	3720
aaaatgttga actatatggg ggtcaaaca ttaaaacccc agtatacaca tgaaaagaca	3780
ttcgagaaac tcattctcaa gaacaaagggt ccaaagggtt ctcgtgtcag ggcaattctt	3840
cactctcaa gtcgtgacat gtggcttcca accgctcctt ctctccacc cacatatgaa	3900
gatggatcct cagatgaatg ggatcagcaa caactgcaca gcctcaacca cctgcataca	3960
ccttcgttcc ccctgagggc cccaggaca tccccacccc aacaactctc cccaaaacccg	4020
acatccacaa cccaacccct cccacaactc acacaaccaa acaagcccc agaactctcc	4080
aagtagacac ttgacagccc ccaccaatta cttttagatc ataaaaaacc aacaggcaga	4140
atataagacc tatcaatttag agatattaaa aaatactaata taaacaatta tacatcaagc	4200
attggctcat ttttttttca ttaagtttat caacgatcat atttaccta agcctccggg	4260
ctgtaacctg ctccaatctt ctctctatc ctaatggcat tttgactaac aactctactc	4320
acaatcatcc cctatggac ttttatattt tttatgagaa cagttccctt acctatactc	4380
aattccctgt ggccccagac tgctctagta ttcttagatac tagagatgag cagtagccca	4440
ccactgttac ttgtggaag gttgatcaag aatctcaagc tgagtggga ctccctttat	4500
ggcaagagag aattgacacc acttgcctt ggaactctg gggcaattac aaaggatcca	4560
ttgtatctaa atcctcagta cctctaaagg atatccatc gggtagtgcc cggaatggat	4620
attggcttt gagcaatgat gaagttcaag agattgatca tgcccttac aacttgat	4680
attattgtta ctgggcaga aatgaatatac ctgggagctt ttatatgaga tatgtaaaga	4740

aagtcggat cataagaaat cctgatgggt ctataaagac tcctagagga tcctgggtc	4800
atgagttgga caacttgtgg ggagatcaga tgaggatct agtattcga agatttgggg	4860
gagaatctag ctgcctctt aagatatacg atgtgagagc aggggtctg tcaaatctc	4920
ggtcaaacctt catcttagtg tccctccct ccttgaattt gcagttctt gtatcacttg	4980
aatccactga gacgaaatgc tcattggag ataagacata tgatattgtg cagagcatgg	5040
gaggctatct ccttccatc gacataggtt atgcgaactg gcgaggccct tggatccta	5100
cccctcagca tccgggtcgtaaaagaagat caattatgga gttccggat caaacatctt	5160
tcagatataa ccaatttata aattatcact catccccaa acacaagaga catgatcaag	5220
aattttaggtt ccctctcagt ctaaaatcca gttatgatta tgctcaattt agatatgagc	5280
agaatttcat catccgacag atcaataaga attttggatt attacagaag agcatttg	5340
atattcagtt ttcttaagtgg cagaatctca gtccacccaa tcttgctatg aaaattgctc	5400
attatgtcac cggtctatc cactctatag gtgggttca tcatggatct tattcaattc	5460
aaagaacgga aaaatccatt actaaggta atctgggtt tccatgtt attttcatg	5520
gaatgtataa gtgc当地agg gaaccatcca aggagggtt ttggcagaa cccgtcacag	5580
ggatcttatt caagtctcattt attccgactc atttctcact aagttccctt tggcacatgt	5640
ggtaaatgg ttcttctatt gtccctctga caggtcaaat tcttccctt gaaatcaca	5700
tggatcaattt ggagggttca acacagggtt aagcaagat ggtcaaaagt atgtacacga	5760
atgttaggtt gttggatca acagaggaat ttcaagata ccaaactcag ggaattacct	5820
ctgtatgaaca atcaataaca gtaaatcattt ggattggct tttgatacat ggtggatgt	5880
ccatagctac tggatatattt gtagcactt tggatccctt aatctaaaa ttgttcagac	5940
atataattga gaaagggag gcatcgtagt aggagggtt gcatctgagg gaaacctcaa	6000
gaaaagaatt tgtcaagggtt agggggaaac catgggtgtt ctaagctacc acagttcca	6060
caagagattt gactccaggt ggctctctcc atcaaggat catgactcac aaagtccctt	6120
caggccctaa cagatcgatc cagccatcat tcattggc tecatctggc cccaaacccac	6180
tcctcttata aaaaaccaat gaaacttata cagatcgatcc ttgactgccaaatggatct	6240
cacttagac actatgaggtt atattgaaatc tctgatcaat tcacatctt agctgttggaa	6300
ccttaaatct ttgattacag acactgtttt gattcactca agggatctt acaatccctt	6360
cttatacatt atctgttttgc tcaaaccttac catcacagcc agtgcgttggaaacttgc	6420
tggaaattt aagaagatca tattccttct tctatgggtt ggttaagtca ccaactacc	6480

tatcaaacca atacatgaga acagtgtatt attcctgcta taaaaaaaga tcataccctt	6540
tccatctcag ctccctagtc aaatcttagt ttcattaat caccatggac gaattacaaa	6600
gtgataatgt ccgtaaaaaa cgtccccctt tatcaactca ttgtgacacc cctctcaccc	6660
tcaacaatgc cagaaaagcc ttattagiac ctgcacccgg tcaattcata catccaata	6720
accccattcg acgagagtc ttggagatgc agagacaact tcagataaca cccccaatc	6780
tatttgatct atcaaaagtt cagggtttt tcctaaatgt gttaatgta ccagtctcta	6840
gccttcctt attagaattt agacaagcat tgcacttggc ttctcaacta taccaagtag	6900
aagttaagg ggttctcaaa gagctagggg catcagctac taaaattgtat atatctcctc	6960
tgtataaaaa taaggactta attaatctt atctigaaaa atgtttctgg gaggaagcag	7020
ttgtcatgag tgaaatgat aactctagtc agggatcctg gtggtaaga gcagataaag	7080
agcttattct ctttagacga cctgggcttg atatcataat tggggagaat ttaatgtcaa	7140
tccagacatc tcagaactcc atattggtct cccgagatca tctaaccata ttgtcagatc	7200
tcgctgctga gcggtttagt ataattctcc aatccttctt agctgatcaa acccataata	7260
cagatatgcc cacccttcc gaattaagtt tatttcttaa ggaaggagat gaaatgctaa	7320
ctttagcagg aaatcaagga tatgatctaa tttatacttt agaatcttcc tgtacttccc	7380
gatttagtagg gaactatgaa ggaggcttgt ggaaagatc taaattccgg catgaaattg	7440
ttaaagattt agagaaaaga gcctcagatc taaatttaca tcctcaactt agagttagag	7500
aacaactgtt agattcagtt tttgaacgaa atctaaacgc ctccacccaa ctgtatggc	7560
tatatcgcat atgggtcac ccaactctgg atccattact tggacaata gccctaaag	7620
aattgggaac aacaccaaga ttgtacctat cacaccaagc tcaggagatt aacaacaagt	7680
ttaaggaaga gttcataaaa agatatttaa atagacataa ggagtggccg gaattagatg	7740
tatcgaaatt accaagacat aacatcattc gagtccatata tgagaagaaa ttacaatttc	7800
cttctaaatc cagacaatat aggagatctc atctctcctt ggtagaattc aaagatgtat	7860
tccctgtga tcctaaattt gatcttattt aattttatgt tgataaatcc atctccttag	7920
gtttcccaga tctccttaac gagatctata gaaacaagag tatcggaat tcactagcaa	7980
gatccttatt gcttaatttc ctctcctctg acattcaga ccccaagaa tttctgaaga	8040
atatagatac ctcaagggttt ctcctgttcaag agatttggtt tgggtacac gaaaaagaga	8100
gagaaggaaa gctaaaggca aggctgtttt gattactgac cttagtgaaa cgatcatatg	8160
tagttatcac agaaaaactc ttggctgagc atctattcc gtatccctt gaaataacca	8220
tgacggatga cgagtttagtt ttggagaaaa agaggcatgc attcaataca gaacgaaaaaa	8280
acaaatttat ggtgagttt gatccccca agtggAACAC caatatgaga gccccagaca	8340

cacagccatt ttaccacact atagatacga tgttgggtt ggaaaattgt tttaccagga	8400
cacatgaaat gttctacaat tcctttgt accttataga cggttcttat ctcccaacaa	8460
tagtgtatga tgggtcaaa acagatattg gatgtggcg acatcatctt ggggaatcg	8520
aaggctcag acaaaaagga tggactctgt ggacagttat gtgatcagg ctatgtcg	8580
aaaaatatat ttcaatatg tctatcatgg gacaggggaa caatcaaatg ctacttctaa	8640
cttcgattc taataccccg gaagaatatg ccctctctca agttaatgtat ttccttcagt	8700
cattaaagga taaaactgtca ctaataggtc ctccctctcaa gttggaggaa acttggattt	8760
ccaaagactt ttattnat gaaagtatc ctatcaaagg aggtgttct ctcaccacat	8820
cgtgaaaaaa atcatgcaga atgttccgtt gttcaacga ggactatccc accatagagt	8880
ccagtttgc ctccttagct gcaaaccgtt actctgcagt ggctgctgtat aactttacac	8940
agactctgtt tttgtttac ttattnaat tagtaggtct attccaatgc aatattagaa	9000
gaccctatct ccaaagaac tcattttatc aatcgtaga tcgaaataga accttcacag	9060
ttgcctctgc aaaagaccaa aagaagaaac ttcatgtccc tttgttcta tcaccccaa	9120
atcagctaca gcctaccgag gttttgttag gactatgtt gactccgagg acttggag	9180
gatatccagt tttctgtac ccattcggtct tgataaaggg agccccagac caattatcat	9240
ttgatcttgc gtccttaaaa ttattncaa agtcagcaga tgcaactgtt aataggataa	9300
taaccctgtt atccagtcca ttccctctccg agtataagaa ttattncta cttnntatga	9360
accctgaggc aattaacctg gagtctcacac ccactctgc agaggcaagg agaactacga	9420
tgttagaatt tcttccaac agtgatcgta ttaaccagcc ttacataaaa gaattcctaa	9480
acatcattca tgagaatgca aatcaatcta tggaagattt ttaacctca aatcctgtac	9540
ttcatccacg tgaatctct ttcttatttc aggcaactcc acaatacaga gctcaacaag	9600
taatttggaa gctccaaag accccaacaa tggctagagt ctacttaaga gagggagata	9660
gagatcttta tgcactgtta gagatgtctg agttgaatca tttaagtca gtattacgac	9720
aagtcttgc tgagtaggc aggtattcat tgcctcaattt caactcttg gttgaacatt	9780
ccacctttt aaggaacatg ggttgggtt aaataattga aggtgttagat agtcccctc	9840
ctcatgaggt ctccatcta gaggtcatga catctattac agaatgccag gattctccac	9900
atgcagacct ggggttcata tcaatgttac tgaacacccc taaagatgtt gcagggaaatt	9960
ctctgcaat tggaccaca agaccttata gaggatctat cactaaaaat aaagtcaact	10020
ccttataaac aaaaatccaa gccagaaccc ctctctgtt acaaagagct ctatgttg	10080
caggactgga atcctggca ttcaactaagg attcttcaact tgctcgtt tcaaggggtt	10140
tagttggag tttacagac ttaccgtatg aactgttgc tccacaggtt gatcagg	10200

cgggatcata tcaacatcac ttacgaaatg atagactaga caatggggga atcagtctg	10260
ttttaccgaa tcaaggtaacc aaattacaat tcaacactgt cccctctgtat gtttgaataa	10320
aaggaagtaa aaataagaat gtcatgttcc aaggcctt agtgatgtt ggaagtgtaa	10380
ttggcgaggg actgcttaca gaaggtatca attatccaga gacaaaacta tttcacatcc	10440
atattaggaa tcccttcc atacaggatc ttgataaaa tccaatcacc tatcccccta	10500
ttcaacagcc tatcagattt tgacgaaacc cccaatctcc ttcttattt ttcccatctg	10560
acaaaatcat gccttatata aaaagaattc taaaatatcc tatctgtca cggaagatc	10620
tcaatgtat ttctacagaa tctcgcttca atacttattt ggctacgag tgcataaact	10680
tgcttgatcc atggcatgg gtctctggat ctgactcgag attggtaact aacgaaataa	10740
ccatcaactg ggctctctct tgaatattt tagagctatg tcttggatc agccttac	10800
ttcttagctat ttcttcacc ccaactaaaa tcattgatcc ggaatggcat atcaatagag	10860
tgataaatgt tgtcaaagct tcccctctct cctcatggaa gaatttaaca aatctcttt	10920
tctgcaatgt ctcccaacc cctctttagt atttcttag agctatgagc ccacaaactt	10980
ctgagggttt aacaattca aatgttgac ttatactaaa gacttcattt acattgatcc	11040
ttcagaatat cttcacat aggaatttca taaaaggaaa agtacccac ctgatttgac	11100
ccccggctgt gtcttttaac ctgcaccctt acagggtcat agaaatccta gggtggttat	11160
ataaggaaca tgaagttcat aaatccatc tttcataacct ctcttaaggac atgcttagatt	11220
tgaaacttag gagtttggaa ggtccctatg ttcccaattt agactttgg gggagcccta	11280
cccgaaatatc tggatcagc tctgagtc tggattatct ttgtaaattt gaagacgtaa	11340
ttaaatcttag atccatagag gtactcacag ttgctacaat atttgcattca aatccactcc	11400
caatgcctct agttactggc cccattgtta agtcgggtgt tgtgaacaca aggctgcaag	11460
tatctttta ttcaaggggg gacgtactgc atccggattt aggacataga gattatagaa	11520
ctttctttt ccgaccagct ccattgccca catcaggggc ttataagcta tcaagtgttt	11580
tgccttaact aggaagctgt gccttgacaa aatgcctctg tttagctgtat ggaacagggt	11640
gattcaccag aacactcgct cttagagatg attcgaaaac aattgtattt aatacattag	11700
taactgtatca agattatgtt acacaaatgg acccaattca aaatatccca gacattgcag	11760
atcttccaat ttcttgcag aagaaagtgg tggcctaag ggaggtcaat gattatccaa	11820
cagatataac aagccggat ttggacatc aaattctgga cagatttggaa ggttgcattca	11880
tcttggttac aggagatgctt gcggacccct ctctgcacca tagtggaaat gtttagtt	11940

tgttcaaaggc ctatatggat attagctaa ttgtgaattc cgttcatggt atctttaaga	12000
ttcatactca cagaaggctt gtccctacatc aggctctggt tatattgtt acttattatg	12060
actctgttgt ttagtaaga agtcaattct ctctccgatc caacaatgaa ttttatcttg	12120
ttggtgcagg aaacaaggta gtcctaaaa tccttccact aaatattatt actctggcag	12180
atggtaatcc gaccctaaat gttggctaa gcagagatgc tgaactgatg ctgaataaaa	12240
gtctcaacaa cttaaataga caacaaggc aactgcaaga gtcacaaaaa tctacctaca	12300
tacagattac atccaactta atgcctcacc tccattacca agatctaact tttcacctag	12360
ttggtcagta tccatggttt aaacaggaat actttgatata cggggaaatcc aaggatgggg	12420
atctcagacc tatactactca tcttgtatcc ataaggttt aacctctata cacaaggca	12480
ataccaaata tgaggagaaa gatgttagcaa gatttgggtt aaagcaattt actctaagag	12540
agctgtcaga tatattatcc tcctatctt ttctgatact gtctgtctt cccctagcca	12600
gatgaaattc ttggataacct cacttcttga aagaaggatg ctgttatgg atacaatgtg	12660
agaatgggtt gtgggtctt tctccctatc tgggggttgtt cccacctgcg agatcaacct	12720
atcattttag actgtatagg acacaagatt tattaaatca tggcgatc cagaggattt	12780
gcagatctgt tggtttagct cacatgttac acttcaggga acctgacgat aaacatctta	12840
aagaagagtt catctttact agaccatcaa ggaaattcac attctatgtat cctaaactca	12900
agggactaaa agacaagatt aaatgtcaga gttggcaatg gtcagtcaa tctcctgggtt	12960
atcaactgga tcagtttgcg cgaatttccc aaaatcccaa gaaataagga gcatctatca	13020
aatcacccga ccaatgatttgc tctctttgc ctccatcaaa ctatataaa atcaatcaat	13080
cgtcttaaag ttctcttgc ttttgggtttaa tagattataa aaaaccaatt attttaatta	13140
cttctctcat ttacagtttgc tggccctaa gaatatctgg ctcatgtca tcaagggtgg	13200
accctctatt ttatcttcat ttctctcag caaccactg catcaatcat ttctccct	13260
gcttgcc	13267
<210> 2	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Rhabdovirus sp.	
<400> 2	
tctgtattat gggtttgc agctaaag	27
<210> 3	
<211> 18	
<212> DNA	

<213> Rhabdovirus sp.

<400> 3

ctcgctgctg agcggtt

18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Rhabdovirus sp.

<400> 4

aggat~~t~~ggag aattatac

18