



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년08월08일  
(11) 등록번호 10-2564081  
(24) 등록일자 2023년08월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
G01N 33/68 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61K 39/12 (2006.01) A61K 39/145 (2006.01)  
C07K 14/005 (2006.01) C12Q 1/70 (2006.01)  
G01N 33/50 (2017.01)
- (52) CPC특허분류  
G01N 33/6854 (2013.01)  
A61K 39/12 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7028087
- (22) 출원일자(국제) 2016년03월04일  
심사청구일자 2021년03월03일
- (85) 번역문제출일자 2017년09월29일
- (65) 공개번호 10-2017-0122262
- (43) 공개일자 2017년11월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/021003
- (87) 국제공개번호 WO 2016/141338  
국제공개일자 2016년09월09일
- (30) 우선권주장  
62/128,744 2015년03월05일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
US07700285 B1\*  
(뒷면에 계속)

- (73) 특허권자  
베링거 인겔하임 애니멀 헬스 유에스에이 인크.  
미국 조지아 (우편번호 30096) 델루스 새틀라이트  
블러바드 3239
- (72) 발명자  
아이어 에이런 브이.  
미국 코네티컷주 06877-0368 릿지필드 피.오. 박  
스 368 릿지베리 로드 900 브이피 아이피 레갈 베  
링거 인겔하임 유에스에이 코포레이션  
헤르만 조셉 랄프  
미국 코네티컷주 06877-0368 릿지필드 피.오. 박  
스 368 릿지베리 로드 900 브이피 아이피 레갈 베  
링거 인겔하임 유에스에이 코포레이션  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
장훈

전체 청구항 수 : 총 34 항

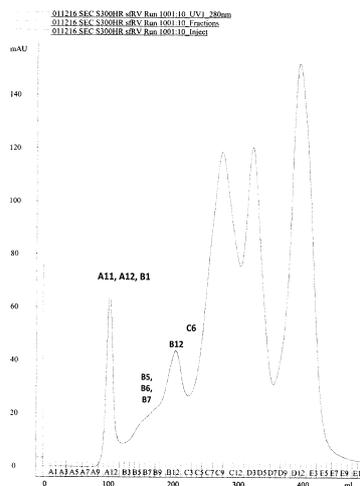
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 **특히 바칼로바이러스-발현 아단위 항원을 위한 마커 시스템**

(57) 요약

본 발명은 감염된 개체와 백신 접종된 개체 사이의 구별을 위한 순응 마커 (compliance marker) 및 마커 백신 분야에 속한다. 특히, 본 발명은 개체가 배양된 곤충 세포에서 바칼로바이러스 발현 시스템에 의해 생산된 재조합 단백질을 포함하는 면역원성 조성물을 투여받았는지 여부를 결정하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

*A61K 39/145* (2013.01)  
*C07K 14/005* (2013.01)  
*C12Q 1/701* (2013.01)  
*G01N 33/5091* (2013.01)  
*A61K 2039/5252* (2013.01)  
*C12N 2750/10034* (2013.01)  
*C12N 2760/16134* (2013.01)  
*C12N 2760/20034* (2013.01)  
*G01N 2333/08* (2013.01)

(72) 발명자

**루프 마이클 비.**

미국 코넥티컷주 06877-0368 릿지필드 피.오. 박스  
368 릿지베리 로드 900 브이피 아이피 레갈 베링거  
잉겔하임 유에스에이 코포레이션

**본 에릭 마틴**

미국 코넥티컷주 06877-0368 릿지필드 피.오. 박스  
368 릿지베리 로드 900 브이피 아이피 레갈 베링거  
잉겔하임 유에스에이 코포레이션

**셰퍼 메릴 린**

미국 코넥티컷주 06877-0368 릿지필드 피.오. 박스  
368 릿지베리 로드 900 브이피 아이피 레갈 베링거  
잉겔하임 유에스에이 코포레이션

(56) 선행기술조사문헌

BONTO FABRUARY et al., Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 2014, Vol. 14, pp 746-756. 1부.\*

JENNA ANDERSON et al., Clinical and Vaccine Immunology, 2014, Vol. 21, pp 443-452. 1부.\*

M. STEWART et al., Vaccine, 2010, Vol. 28, pp 3047-3054. 1부.\*

WO2014033149 A1

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

배양된 곤충 세포에서 발현 시스템에 의해 생산된 재조합 단백질을 포함하는 면역원성 조성물을 개체가 투여받았는지 여부를 결정하는 방법으로서,

상기 방법은 상기 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스인 바이러스로부터의 하나 이상의 항원에 특이적인 하나 이상의 항체의 존재 또는 부재를 결정하는 것을 포함하고,

상기 하나 이상의 항원이

- a. 서열 번호 1의 서열과 70% 이상의 서열 동일성(sequence identity)을 가지는 서열; 또는
- b. 서열 번호 7의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질이고, 상기 생물학적 샘플에서 상기 하나 이상의 항체의 존재는 상기 개체가 상기 면역원성 조성물을 투여받았음을 나타내는 것인, 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 발현 시스템이 바콜로바이러스 발현 시스템인, 방법.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 하기의 단계들을 포함하는, 방법:

- a. 상기 생물학적 샘플을 고체 지지체에 고정된 포획제 (capture reagent)와 접촉시키되, 여기서 상기 고정된 포획제가 상기 하나 이상의 항체와 결합할 수 있는 것인, 단계; 및
- b. 상기 포획제에 결합된 상기 하나 이상의 항체의 존재 또는 부재를 결정하되, 여기서 상기 포획제에 결합된 상기 하나 이상의 항체의 존재가 상기 생물학적 샘플에 상기 하나 이상의 항체가 존재함을 나타내는 단계.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 포획제가 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법:

- a. 서열 번호 1 내지 6 중의 어느 하나로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질;
- b. 서열 번호 7 또는 서열 번호 8의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질; 및
- c. 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스로서, 여기서, 상기 바이러스가 임의로 불활성화되고/되거나 상기 바이러스가 임의로 반정제된 전체 바이러스인, RNA 바이러스.

#### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 RNA 바이러스가

- a. (-)ssRNA 바이러스; 또는
- b. 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 상기 RNA 바이러스가:
  - i. 서열 번호 1의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질을 포함하는 바이러스; 또는
  - ii. 서열 번호 7의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질을 포함하는 바이러스; 또는

iii. 이의 게놈이 서열 번호 1의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질 또는 서열 번호 7의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 바이러스; 또는

iv. 이의 게놈이 서열 번호 9의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 핵산 서열에 대해 역 상보적인 서열을 갖는 RNA 분자를 포함하는 바이러스; 또는

v. 이의 게놈이 서열 번호 15의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 핵산 서열에 대해 역 상보적인 서열을 갖는 RNA 분자를 포함하는 바이러스

인, 방법.

## 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 방법이

a. 상기 생물학적 샘플에서 상기 하나 이상의 항체의 존재 또는 부재 여부를 결정하는 단계로서, 여기서, 상기 항체가

i. 서열 번호 1의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질에 특이적인 항체; 또는

ii. 서열 번호 7의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질에 특이적인 항체

인, 단계;

b. 상기 생물학적 샘플을 고체 지지체에 고정된 포획제와 접촉시키되, 여기서, 상기 포획제가 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 단계:

i. 서열 번호 1 내지 6 중의 어느 하나로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열, 또는 서열 번호 7 또는 서열 번호 8의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질, 또는

ii. 서열 번호 1의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질을 포함하는 임의로 불활성화된 바이러스, 또는

iii. 서열 번호 7의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질을 포함하는 임의로 불활성화된 바이러스, 또는

iv. 이의 게놈이 서열 번호 1의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 바이러스로서, 여기서, 상기 바이러스가 임의로 불활성화된, 바이러스, 또는

v. 이의 게놈이 서열 번호 7의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 바이러스로서, 여기서, 상기 바이러스가 임의로 불활성화된, 바이러스, 또는

vi. 이의 게놈이 서열 번호 9의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 핵산 서열에 역 상보적인 서열을 포함하는 RNA 분자를 포함하는 바이러스로서, 여기서, 상기 바이러스가 임의로 불활성화된, 바이러스, 또는

vii. 이의 게놈이 서열 번호 15의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 핵산 서열에 역 상보적인 서열을 포함하는 RNA 분자를 포함하는 바이러스로서, 여기서, 상기 바이러스가 임의로 불활성화된, 바이러스, 또는

viii. 서열 번호 1 또는 서열 번호 7의 5 내지 11개의 연속 아미노 잔기로 이루어진 서열들로부터 선택된 서열을 가지는 합성 펩티드;

c. 상기 생물학적 샘플을 상기 고정된 포획제로부터 분리하는 단계;

d. 상기 고정된 포획제-항체 복합체를 상기 포획제-항체 복합체의 항체와 결합하는 검출제 (detectable agent)

와 접촉시키는 단계; 및

e. 상기 검출제에 대한 검출 수단을 사용하여 상기 포획제에 결합된 항체의 수준을 측정하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 상기 측정 단계 (e)가 상기 포획제에 결합된 항체의 수준을 측정하기 위해 표준 곡선과의 비교를 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 8**

제6항에 있어서, 상기 포획제-항체 복합체의 항체와 결합하는 상기 검출제가 검출 가능한 항체인, 방법.

**청구항 9**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 생물학적 샘플에서, 상기 재조합 단백질에 특이적인 항체, 상기 재조합 단백질에 특이적인 폴리펩티드, 및 상기 재조합 단백질을 인코딩하는 DNA 서열에 특이적인 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 분석 물질의 존재를 결정하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 10**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 재조합 단백질이 PCV2 ORF2 단백질 및 인플루엔자 헤마글루티닌으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 11**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 생물학적 샘플이 포유류 또는 조류로부터 단리된, 방법.

**청구항 12**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 생물학적 샘플이 전혈, 혈장, 혈청, 오줌, 및 구강액으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 13**

제3항에 있어서, 상기 고정된 포획제가 마이크로타이터 플레이트 상에 코팅된, 방법.

**청구항 14**

제3항에 있어서, 상기 포획제가 바콜로바이러스-발현 단백질인, 방법.

**청구항 15**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 면역원성 조성물이 배양된 곤충 세포에서 바콜로바이러스 발현 시스템에 의해 생산된 재조합 단백질, 및 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스인 바이러스로부터의 하나 이상의 항원을 포함하는 조성물인, 방법.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 상기 RNA 바이러스가 불활성화된, 방법.

**청구항 17**

제15항에 있어서, 상기 재조합 단백질이 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법:

- a. PCV2 ORF2 단백질 및
- b. 인플루엔자 헤마글루티닌.

**청구항 18**

제15항에 있어서, 상기 RNA 바이러스가 하기를 포함하는, 방법:

- a. (-)ssRNA 바이러스; 또는 하기를 포함하거나 하기로 이루어진 단백질을 포함하는 바이러스인, 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스:
  - i. 서열 번호 1의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열; 또는
  - ii. 서열 번호 7의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열; 또는
- b. 이의 게놈이 하기를 포함하거나 하기로 이루어진 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는, 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스:
  - i. 서열 번호 1의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열; 또는
  - ii. 서열 번호 7의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열; 또는
- c. 이의 게놈이 하기를 포함하는, 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스:
  - i. 서열 번호 9의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 핵산 서열에 대해 역 상보적인 서열을 가지는 RNA 분자; 또는
  - ii. 서열 번호 15의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 핵산 서열에 대해 역 상보적인 서열을 가지는 RNA 분자.

**청구항 19**

개체가 배양된 곤충 세포에서 바클로바이러스 발현 시스템에 의해 생성된 재조합 단백질을 포함하는 면역원성 조성물을 투여받았는지 여부를 결정하기 위한 키트로서,

여기서, 상기 키트가 고체 지지체에 고정된 하나 이상의 포획제를 함유하고, 상기 하나 이상의 고정된 포획제가 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스로부터의 하나 이상의 항원에 특이적인 항체와 결합할 수 있고,

상기 하나 이상의 포획제가 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 키트:

- a. 서열 번호 1의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질; 및
- b. 서열 번호 7의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 상기 RNA 바이러스가 하기를 포함하거나 하기로 이루어진, 키트:

- a. (-)ssRNA 바이러스; 또는
- b. 하기를 포함하거나 하기로 이루어진 단백질을 포함하는, 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스:
  - i. 서열 번호 1의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열; 또는
  - ii. 서열 번호 7의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열; 또는
- c. 게놈이 하기를 포함하거나 하기로 이루어진 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는, 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스:
  - i. 서열 번호 1의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열; 또는
  - ii. 서열 번호 7의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열; 또는
- d. 이의 게놈이 하기를 포함하는, 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스:
  - i. 서열 번호 9의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 핵산 서열에 대해 역 상보적인 서열을 가지는 RNA 분자; 또는
  - ii. 서열 번호 15의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 핵산 서열에 대해 역 상보적인 서열을 가지는 RNA 분자.

**청구항 21**

제19항에 있어서, 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스로부터의 상기 하나 이상의 항원이 하기를 포함하거나 하기로 이루어진 단백질인, 키트:

- a. 서열 번호 1의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열; 또는
- b. 서열 번호 7의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열; 또는
- c. 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스에 특이적인 하나 이상의 핵산 분자로서, 여기서, 상기 하나 이상의 핵산 분자가 하기를 포함하거나 하기로 이루어진 단백질을 인코딩하는, 핵산 분자:
  - i. 서열 번호 1의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열; 또는
  - ii. 서열 번호 7의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열; 또는
- d. 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스에 특이적인 하나 이상의 핵산 분자로서, 여기서, 상기 하나 이상의 핵산 분자가 하기를 포함하는 서열을 인코딩하는 RNA인, 핵산 분자:
  - i. 서열 번호 3의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 핵산 서열에 대해 역 상보적인 서열 (inverse complement); 또는
  - ii. 서열 번호 4의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 핵산 서열에 대해 역 상보적인 서열.

**청구항 22**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 곤충 세포 또는 곤충 세포들이 스포도프테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) (Sf) 세포 또는 스포도프테라 프루기페르다로부터 유래된 세포주로부터의 세포인, 방법.

**청구항 23**

제19항에 있어서, 상기 곤충 세포 또는 곤충 세포들이 스포도프테라 프루기페르다 (Sf) 세포 또는 스포도프테라 프루기페르다로부터 유래된 세포주로부터의 세포인, 키트.

**청구항 24**

제3항에 있어서, 상기 포획제가 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스의 바이러스 입자 또는 바이러스 유사 입자 또는 이들 둘 모두를 포함하거나 이로 이루어지고, 상기 조성물 또는 상기 포획제가 하기의 단계들을 포함하는 방법에 의해 수득될 수 있는, 방법:

- i) 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스에 감염된 곤충 세포의 배양물로부터 상등액을 수득하되, 여기서, 상기 상등액이 RNA 바이러스의 바이러스 입자 또는 바이러스 유사 입자 또는 이들 둘 모두를 포함하는 단계,
- ii) 적어도 하나의 필터를 통한 미세 여과 (micro filtration)를 포함하는 분리 단계를 통해 바이러스 입자 또는 바이러스 유사 입자 또는 이들 둘 모두로부터 세포 찌꺼기를 분리하는 단계, 및
- iii) 임의로, 상기 바이러스 입자 또는 바이러스 유사 입자 또는 이들 둘 모두를 함유하는 ii)의 여과액을 사이즈 배제 크로마토그래피에 적용하되, 여기서 용리액 중 단백질의 존재는 260 nm 또는 280 nm ( $A_{260}$  또는  $A_{280}$ )에서 흡광도를 측정함으로써 측정되는 단계.

**청구항 25**

제19항에 있어서, 상기 포획제가 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스의 바이러스 입자 또는 바이러스 유사 입자 또는 이들 둘 모두를 포함하거나 이로 이루어지고, 상기 조성물 또는 상기 포획제가 하기의 단계들을 포함하는 방법에 의해 수득될 수 있는, 키트:

- i) 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스에 감염된 곤충 세포의 배양물로부터 상등액을 수득하되, 여기서, 상기 상등액이 RNA 바이러스의 바이러스 입자 또는 바이러스 유사 입자 또는 이들 둘 모두를 포함하는 단계,
- ii) 적어도 하나의 필터를 통한 미세 여과 (micro filtration)를 포함하는 분리 단계를 통해 바이러스 입자 또

는 바이러스 유사 입자 또는 이들 둘 모두로부터 세포 찌꺼기를 분리하는 단계, 및

iii) 임의로, 상기 바이러스 입자 또는 바이러스 유사 입자 또는 이들 둘 모두를 함유하는 ii)의 여과액을 사이즈 배제 크로마토그래피에 적용하되, 여기서 용리액 중 단백질의 존재는 260 nm 또는 280 nm ( $A_{260}$  또는  $A_{280}$ )에서 흡광도를 측정함으로써 측정되는 단계.

#### 청구항 26

제24항에 있어서, 상기 RNA 바이러스가 하기를 포함하거나 하기로 이루어지는 방법:

- a. (-)ssRNA 바이러스; 또는
- b. 하기를 포함하거나 하기로 이루어진 단백질을 포함하는, 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스:
  - i. 서열 번호 1의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열; 또는
  - ii. 서열 번호 7의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열; 또는
- c. 이의 게놈이 하기를 포함하거나 하기로 이루어진 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는, 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스:
  - i. 서열 번호 1의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열; 또는
  - ii. 서열 번호 7의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열; 또는
- d. 이의 게놈이 하기를 포함하는, 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스:
  - i. 서열 번호 9의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 핵산 서열에 대해 역 상보적인 서열을 가지는 RNA 분자; 또는
  - ii. 서열 번호 15의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 핵산 서열에 대해 역 상보적인 서열을 가지는 RNA 분자.

#### 청구항 27

제25항에 있어서, 상기 RNA 바이러스가 하기를 포함하거나 하기로 이루어지는 키트:

- a. (-)ssRNA 바이러스; 또는
- b. 하기를 포함하거나 하기로 이루어진 단백질을 포함하는, 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스:
  - i. 서열 번호 1의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열; 또는
  - ii. 서열 번호 7의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열; 또는
- c. 이의 게놈이 하기를 포함하거나 하기로 이루어진 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는, 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스:
  - i. 서열 번호 1의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열; 또는
  - ii. 서열 번호 7의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열; 또는
- d. 이의 게놈이 하기를 포함하는, 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스:
  - i. 서열 번호 9의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 핵산 서열에 대해 역 상보적인 서열을 가지는 RNA 분자; 또는
  - ii. 서열 번호 15의 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 핵산 서열에 대해 역 상보적인 서열을 가지는 RNA 분자.

#### 청구항 28

제5항에 있어서, 상기 (-)ssRNA 바이러스가 람도바이러스(*Rhabdoviridae*) 과(family)에 속하는 바이러스인, 방법.

**청구항 29**

제18항에 있어서, 상기 (-)ssRNA 바이러스가 랩도바이러스 과에 속하는 바이러스인, 방법.

**청구항 30**

제20항에 있어서, 상기 (-)ssRNA 바이러스가 랩도바이러스 과에 속하는 바이러스인, 키트.

**청구항 31**

제26항에 있어서, 상기 (-)ssRNA 바이러스가 랩도바이러스 과에 속하는 바이러스인, 방법.

**청구항 32**

제27항에 있어서, 상기 (-)ssRNA 바이러스가 랩도바이러스 과에 속하는 바이러스인, 키트.

**청구항 33**

제22항에 있어서, 상기 곤충 세포 또는 곤충 세포들은 Sf9 세포 및 Sf+ 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 34**

제23항에 있어서, 상기 곤충 세포 또는 곤충 세포들은 Sf9 세포 및 Sf+ 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 키트.

**청구항 35**

삭제

**청구항 36**

삭제

**청구항 37**

삭제

**청구항 38**

삭제

**청구항 39**

삭제

**청구항 40**

삭제

**청구항 41**

삭제

**청구항 42**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

**서열 목록**

[0001]

[0002] 본 출원은 37 C.F.R. 1.821-1.825에 따른 서열 목록을 포함한다. 본 출원에 수반되는 서열 목록은 이로써 그 전체가 참고 문헌으로 포함된다.

[0003] **본 발명의 기술분야**

[0004] 본 발명은 감염된 개체와 백신 접종된 개체 사이의 구별을 위한 순응 마커 (compliance marker) 및 마커 백신 분야에 속한다. 특히, 아단위 항원 (subunit antigen)을 포함하는 백신을 위한 순응 마커에 관한 것으로, 순응 마커는 병원체에 감염된 동물과 상기 병원체 유래의 아단위 항원으로 처리된 동물을 구별할 수 있게 하는 DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) 시스템에 관한 것이고, 여기서 상기 아단위 항원은 배양된 곤충 세포에서, 바람직하게는 유전자 조작 바큇로바이러스 (genetically engineered baculovirus)에 의해 발현되었다.

**배경 기술**

[0005] **관련 기술의 설명**

[0006] 바큇로바이러스는 큰 막대 모양의 이중 가닥 DNA 바이러스로서 무척추동물, 특히 곤충을 감염시키지만, 포유류 또는 다른 척추동물 세포에서는 복제하지 않는다. 1940년대부터 이들은 작물 분야에서 생물 농약으로 처음 사용되기 시작하였다. 또한, 곤충 세포에서 인간 베타 인터페론의 과발현을 기술한 첫 논문 [참조: Smith et al. Mol Cell Biol. 3: 2156-2165 (1983)]의 발표 이후, 유전자 조작 바큇로바이러스는 몇몇 입증된 인간 및 동물용 아단위 백신을 위한 항원의 생산을 포함하여, 곤충 세포 배양에서 복합 재조합 단백질을 생산하기 위하여 폭넓게 사용되고 있다 [참조: van Oers et al. J Gen Virol. 96: 6-23 (2015)].

[0007] 백신 접종은 특히 많은 식용 동물들을 기르는 고밀도의 갇힌 환경에서 무리(herd)의 건강을 관리하는 데 필수적인 수단이다. 백신 접종을 한 것으로 추정되는 동물에게 질병이 발생하는 경우, 백신이 동물을 보호하지 못했는지 또는 백신이 제대로 전달되었는지 여부에 대한 의문이 생기며, 백신의 적절한 전달에 대한 후자의 가능성을 백신 순응도 (vaccine compliance)라고 한다.

[0008] 동물이 적절하게 백신 접종되었는지를 결정하기 위한 순응 마커의 사용은 생산자에 의해 매우 요구된다. WO 2009/058835 A1에서는 예를 들어, 돼지 인플루엔자 백신에 순응 마커로 첨가된 정제 자일라나제의 사용을 기술한다. 바큇로바이러스-발현 아단위 항원을 포함하는 백신에 관하여는, 순응 마커로서 바큇로바이러스 항원을 사용할 수도 있지만, 현재 사용되는 시스템은 동물에서 양성인지 테스트하는데 한계가 있고 다량의 항원을 필요로 한다 [참조: Gerber et al. Res Vet Sci. 95:775-81 (2013); Lehnert, Top Agrar 5: S11-S14 (2011)].

[0009] 바이러스성 발병 및 감염을 통제하기 위한 프로그램에 사용되는 백신은, 집단 내에서 바이러스 감염의 지속적인 존재를 모니터링하는 효과적인 시스템을 가져야 한다. 그러나, 백신 접종은 예를 들어 혈청학적 의미로서, 백신 접종된 개체와 노출된 개체 모두 바이러스에 특이적인 항체를 생산함에 따라, 감염의 확산에 대한 대규모 감시를 복잡하게 한다. 전염성의 악성 바이러스 균주와 바이러스 백신 사이의 항원 유사성은 종종 감염된 개체와 백신 접종된 개체 사이에 구분할 수 없는 항체가 생기고 지속됨에 따라, 감염된 피험자와 백신 접종된 피험자 사이의 구별을 방해한다.

[0010] DIVA (감염된 동물과 백신 접종된 동물의 구별) 백신 접종 전략에 대한 관심이 세계적으로 증가하고 있다. 예를 들어, 조류 인플루엔자 균주 H5N1 HPAI에 대한 WHO/FAO/OIE 합동 회의에서는 모든 백신 접종이 DIVA를 사용하여 실시되도록 권고되었으므로, 감염 확산을 모니터링할 수 있다. 그러나 현재의 DIVA 방법은 규모 확장이 어렵고, 백신 접종을 다른 순환 바이러스 균주 감염으로부터 구별하는데 종종 문제점이 있다.

[0011] 현재의 모니터링 방법은 백신 접종된 동물의 물리적 태깅(tagging), 감시 동물(sentinel animal)의 사용, 바이러스 검사 등을 포함한다. 그러나 이러한 현재의 방법은 물류 및 경제적인 이유로 많은 한계가 있다.

[0012] 백신 접종된 동물의 물리적 태깅은 귀 태그, 다리 밴드 또는 날개 태그와 같은 물리적 수단에 의한, 백신 접종된 개체의 시간 소모적인 개별(individual) 식별을 포함한다. 또한, 백신 접종되지 않은 감시 동물의 사용은 물류 및 경제적으로 어렵고, 만일 감시 동물이 바이러스에 감염되면 (예를 들어 H5N1 바이러스에 감염된 가금류), 사람에게 확산될 확률이 높다는 위험이 있다. 생바이러스의 스크리닝 및 검출을 통한 개별 바이러스학적 검사 또는 RT-PCR 감시 검사는 매우 고가의 인프라가 큰 공정으로 아단위백신에 적용할 수 없고, 개체의 현재 상태에 관한 정보만을 제공하며, 해당 개체의 감염 및/또는 백신 접종 내역을 분석할 수 없다.

[0013] 상기 한계를 고려하여, 백신 접종된 동물과 감염된 동물의 혈청학적 구별을 허용하는 마커 백신의 사용이 매우

바람직하며, 이러한 마커 백신은 음성 또는 양성 마커 백신으로 제조될 수 있다.

- [0014] 음성 마커 백신은 병원체의 항원 부분을 사용하거나 병원체로부터 항원을 제거함으로써 준비되고, 감염된 동물에서 특이적 항체를 유발한다. 음성 마커 백신은 대개 아단위백신이나 면역원성 항원이 결핍된 유전자 조작 균주를 포함하는 약화된 생백신이다. 음성 마커 백신의 예는 고전적인 돼지 열병에 대한 백신 접종을 위한 아단위 항원으로서 바콜로바이러스-발현 고전적인 돼지 열병 바이러스 (CSFV) E2 단백질의 사용이고, 백신 접종된 돼지 혈청에서의 CSFV의 다른 항원, 예를 들어 E<sup>RNS</sup> 단백질 또는 NS3 단백질에 특이적인 항체의 검출은 CSFV 감염을 보여준다.
- [0015] 양성 마커 백신은 백신 접종된 개체에서는 특이적인 항체를 유도하지만 감염된 개체에서는 그렇지 않은, 추가적인 항원을 함유한다. 양성 마커 백신 접근법의 예는 WO 2007/053899 A1에 기술되어 있는데, 여기에는 별개로 생산된 불활성화된 H6N2 조류 인플루엔자 (AI) 바이러스 및 과상풍 독소가 조류에게 백신을 접종하기 위해 한 번에 주입되도록 합쳐졌고, 이어서 과상풍 독소에 특이적인 항체가 상기 조류로부터 얻어진 혈청에서 상기 조류가 백신 접종된 것을 나타내는 마커로서 검출되었다.
- [0016] 그러나, 백신 항원과 마커 항원을 별도로 생산하는 것은 비교적 비용이 많이 들고, 더불어 하나의 백신 접종 체에서 두 성분을 혼합하기 위한 혼합 단계가 필요하며, 백신 성분/항원의 안정성에도 추가로 영향을 미칠 수 있다.
- [0017] 따라서, 양성 마커 백신을 저렴하게 생산하기 위한 간단한 마커 시스템이 필요하며, 특히 바콜로바이러스-발현 항원을 포함하는 아단위백신이 필요하다.
- [0018] 더욱이, 유효량의 순응 마커가 필요하며, 이는 적은 양의 바콜로바이러스-발현 아단위 항원으로 백신 접종의 민감한 식별을 가능하게 한다.

**도면의 간단한 설명**

- [0019] 도 1: 증폭된 생성물을 겔 상에서 측정하여 크기를 확인하였다.
- 도 2: 컷 인서트 및 벡터를 겔 상에서 측정하여 벡터의 선형화를 확인하였다.
- 도 3: 웰 2, 5, 7, 10, 11, 및 12로부터의 양성 클론을 시퀀싱하고, 변형을 확인하기 위해 콘택(contigs)을 구조체 기준 서열과 정렬시켰다; 모든 클론은 완벽하게 일치했다.
- 도 4: G 유전자 구조체의 발현을 평가하기 위한 웨스턴 블롯 (Western Blots).
- 도 5: 상등액의 가용성 및 불용성 세포 분획을 단백질에 대해 프로빙하였다; 이 때, 단백질은 불용성 부분에만 존재한다.
- 도 6: AKTA 상에서 등용매 조건을 사용하여 사이즈 배제 크로마토그래피 수행 결과. 컬럼으로부터의 단백질의 용출을 280nm에서의 UV 흡수로 모니터링하였다.
- 도 7: 실시간 PCR 결과: 컬럼 1은 웰 번호를 나타낸다. 컬럼 2는 사용된 특정 프로브에 연결된 형광 물질 6-카복시플루오레세인 (FAM)을 보여준다. 컬럼 3은 사이즈 배제 크로마토그래피 (분획 A11, A12, B1, B5, B12 및 C6)로부터 유도된 SfRV 항원의 분획 또는 표준 곡선을 생성하는데 사용된 공지된 양의 SfRV 특이적 핵산을 갖는 표준 (웰 7 내지 14)을 나타낸다. 웰 15는 음성 대조군 (템플릿 없음)으로 제공되고 웰 16은 포획에 의한 분류 (SEC) 전에 농축 SfRV 항원을 함유하는 양성 대조군으로서 제공된다.
- 도 8: ELISA; ELISA 플레이트는 반-정제된 SfRV (패널 A), 사이즈 배제 분획 A11 (패널 B), A12 (패널 C) 및 B1 (패널 D)를 포함하는 4가지 다른 항원으로 코팅하였다. 플레이트를 음성 대조군 동물로부터의 혈청 (역삼각형) 또는 SfRV를 함유하는 실험용 백신을 투여한 동물로부터의 28일차 혈청 (원형)으로 프로빙하였다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0020] 상기 기술적 문제에 대한 해결책은 청구 범위에서 특징지어진 발명의 설명 및 실시 형태에 의해 달성된다.
- [0021] 따라서, 본 발명의 다른 양상들은 청구 범위에 따라 구현된다.
- [0022] 본 발명은 바콜로바이러스-발현 항원을 생산하기 위한 랫도바이러스 (*Rhabdovirus*)에 감염된 Sf+ 세포의 사용이, 양성 마커 백신을 저렴하고 효율적으로 생산하고 아단위백신의 적절한 전달을 나타내는 민감한 방법을

허용하는 쉽고 생산 내제적인 순응 마킹을 가능하게 한다는 놀라운 발견에 기초한다.

- [0023] 따라서 첫 번째 양태에서, 본 발명은 개체가 배양된 곤충 세포에서 발현 시스템, 바람직하게 바큇로바이러스 발현 시스템에 의해 생산된 재조합 단백질을 포함하는 면역원성 조성물, 특히 백신을 투여받았는지 여부를 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 개체로부터 생물학적 샘플을 얻는 단계; 및 상기 생물학적 샘플에서 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스인 바이러스로부터 하나 이상의 항원을 투여받았음을 나타내는 하나 이상의 마커의 존재 또는 부재를 결정하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 생물학적 샘플에서 상기 하나 이상의 마커의 존재가 상기 개체가 상기 면역원성 조성물을 투여받았음을 나타내거나, 또는 상기 생물학적 샘플에서 상기 하나 이상의 마커의 부재가 상기 개체가 상기 면역원성 조성물을 투여받지 않았음을 나타낸다.
- [0024] 본원에서 사용되는 용어 "재조합 단백질"은 특히 재조합 DNA 기술에 의해 생산되는 폴리펩티드와 같은 재조합 DNA 분자로부터 발현되는 단백질 분자를 의미한다. 이러한 기술의 예는 발현된 단백질을 코딩하는 DNA가 적합한 발현 벡터, 바람직하게는 바큇로바이러스 발현 벡터에 삽입되는 경우, 이 경우 결과적으로 형질전환(transfect)에 사용되고, 또는 감염을 위한 바큇로바이러스 발현 벡터, 단백질 또는 DNA에 의해 코딩된 폴리펩티드 생산을 위한 숙주 세포의 경우를 포함한다. 따라서 본원에서 사용되는 용어 "재조합 단백질"은 특히 재조합 DNA 분자로부터 발현되는 단백질 분자를 의미한다.
- [0025] 특정 예에 따르면, 재조합 단백질은 하기 단계를 갖는 방법에 의해 생산된다: 단백질을 인코딩하는 유전자는 바큇로바이러스 전달 벡터에 복제되고; 곤충 세포에서 상동 재조합에 의해 상기 유전자를 함유하는 재조합 바큇로바이러스를 제조하기 위해 전달 벡터가 사용되고; 상기 단백질은 이후 재조합 바큇로바이러스로 감염되는 동안 곤충 세포에서 발현된다.
- [0026] 대안적인 예에 따르면, 재조합 단백질은 재조합 발현 플라스미드로부터의 곤충 세포에서 발현된다. 이 대안적인 예에서는 바큇로바이러스가 필요하지 않다.
- [0027] 또한, 용어 "서열을 포함하는 재조합 단백질 (recombinant protein consisting of a sequence)"은 특히 임의의 번역과 동시의 변형 및/또는 번역 후의 변형 또는 폴리펩티드가 발현되는 세포에 의해 영향을 받는 서열의 변형에 관한 것으로 이해된다. 따라서, 본원에 기재된 용어 "서열을 포함하는 재조합 단백질"은 또한 폴리펩티드가 발현되는 세포에 의해 영향을 받는 하나 이상의 변형, 특히, 바람직하게는 글리코실화, 인산화, 및 아세틸화로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 단백질 생합성 및/또는 단백질 프로세싱에 영향을 받는 아미노산 잔기의 변형을 갖는 서열에 관한 것이다.
- [0028] 바람직하게는, 본 발명의 재조합 단백질은 바큇로바이러스 발현 시스템, 특히 배양 곤충 세포에 의해 생산되거나 얻어진다.
- [0029] 본원에서 사용되는 용어 "발현 시스템"은 숙주 염색체 내로 유전자를 안정적으로 도입시키는 운반체 또는 벡터 뿐만 아니라 숙주 세포에서 유전자의 발현을 위한 운반체 또는 벡터를 특히 포함한다.
- [0030] 본원에서 사용되는 "바큇로바이러스 발현 시스템"은 특히 상기 단백질을 발현하도록 설계된 재조합 바큇로바이러스 벡터를 사용하여 곤충 세포에서 목적하는 단백질을 생산하기 위한 시스템을 의미한다. 바큇로바이러스 발현 시스템은 일반적으로 곤충 세포에서 재조합 단백질 발현을 달성하는 데 필요한 모든 요소를 포함하며, 전형적으로 원하는 단백질을 발현시키기 위한 바큇로바이러스 벡터의 조작, 조작된 바큇로바이러스 벡터의 곤충 세포로의 도입, 원하는 단백질이 발현되도록 적절한 성장 배지에서 조작된 바큇로바이러스 벡터를 함유하는 곤충 세포의 배양, 및 단백질의 회수를 포함한다. 전형적으로, 바큇로바이러스 벡터의 조작은 선택된 유전자에 대한 코딩 서열이 비필수적인 바이러스 유전자에 대한 프로모터 뒤에 삽입되는 재조합 바큇로바이러스의 제작 및 분리를 포함하며, 여기서 현재 사용되는 대부분의 바큇로바이러스 발현 시스템은 오토그라파 캘리포니카 핵다면체 바이러스 (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*, AcMNPV) [참조: *Virology* 202 (2), 586-605 (1994), NCBI Accession No.: NC\_001623]의 서열을 기초로 한다. 바큇로바이러스 발현 시스템은 기술분야에 잘 알려져 있고, 예를 들어, 문헌 ["Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual" by David R. O'Reilly, Lois Miller, Verne Luckow, pub. by Oxford Univ. Press (1994), "The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide" by Linda A. King, R. D. Possee, published by Chapman & Hall (1992)]에 기재되어 있다. 재조합 단백질을 생산하기 위한 바큇로바이러스 시스템의 예시적인 비제한적인 예는 예를 들어 WO 2006/072065 A2에 기재되어 있다.
- [0031] 상기 첫 번째 양태에 따르면, 본 발명은 따라서 개체가 배양된 곤충 세포에서 발현 시스템에 의해 생산된 재조합 단백질을 포함하는 면역원성 조성물을 투여받았는지 여부를 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 또한 이

하에서 "본 발명의 방법"으로 칭해지기도 하며, 상기 방법은 상기 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서 개체가 특히 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스인 바이러스로부터 하나 이상의 항원을 투여받았음을 보여주는 하나 이상의 마커의 존재 또는 부재를 결정하는 것을 포함하고, 상기 생물학적 샘플에서 상기 하나 이상의 마커의 존재는 상기 개체가 상기 면역원성 조성물을 투여받았음을 나타낸다.

- [0032] 본원에서 사용되는 "곤충 세포"는 곤충 중으로부터 유래된 세포 또는 세포 배양을 의미한다. 본 발명과 관련하여 특히 흥미로운 것은 스포도프테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) 및 트리코플루시아 니 (*Trichoplusia ni*) 종으로부터 유래된 곤충 세포이다.
- [0033] 본원에서 사용되는 "곤충 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스"는 곤충 세포와 상호 작용하여 바이러스, 또는 적어도 바이러스 게놈이 곤충 세포 안에 통합될 정도로 곤충세포와 상호작용할 수 있는, 바이러스 표면상의 바이러스 잠복 구조 (virus harboring structure)로서 특히 이해된다.
- [0034] 곤충 세포의 상기 감염은 특히 바이러스의 숙주 세포로의 부착, 바이러스의 세포로의 유입, 세포질에서의 비리온의 탈피 (uncoating), 바이러스 게놈의 복제 및 전사, 바이러스성 단백질 및 어셈블리의 발현 및 새로운 전염성 바이러스 입자의 방출을 더욱 포함한다.
- [0035] 바람직하게는, 본 발명의 면역원성 조성물은 마커 백신, 특히 양성 마커 백신이다.
- [0036] 본원에 기재된 용어 "마커 백신"은 특히 면역화된 유기체에서 면역을 유도하는 백신을 명시하고, 실제 병원체에 의해 야기된 유기체의 면역과는 다르다.
- [0037] "양성 마커 백신"은 특히 백신 접종된 개체에는 존재하지만 감염된 개체에는 존재하지 않는 특정 항체의 생산을 유도하는 추가 항원을 함유하는 마커 백신에 관한 것이다.
- [0038] 본원의 문맥에서 사용된 용어 "마커"는 바람직하게는 용어 "바이오 마커"와 동등하고, 특히 개체가 면역원성 조성물, 바람직하게는 양성 마커 백신, 또는 더욱 바람직하게는 백신 접종 피험자에서는 발견되지만 감염자에서는 발견되지 않는 특이적인 항체의 생산을 유도하는 양성 마커 백신의 추가적인 항원에 노출된 것을 나타내는 측정 가능한 물질 또는 화합물을 의미한다.
- [0039] 본원에서 사용된 용어 "면역원성 조성물"은 특히 조성물에 노출된 개체에서 면역 반응을 이끌어내는 조성물을 의미한다. 면역 반응은 항체의 유도 및/또는 T-세포 반응의 유도를 포함할 수 있다. 조성물의 의도된 기능에 따라, 하나 이상의 항원이 포함될 수 있다. 바람직하게는, 본원에 기술된 면역원성 조성물은 백신이다.
- [0040] 본원에서 사용된 용어 "백신"은 관련 기술에 따라 정의되며 특정 질병에 대한 개체의 면역성을 유도하거나 향상시키는 조성물과 관련된다. 이를 위해, 백신은 병원체와 유사한 화합물 또는 상기 질병을 일으키는 상기 병원체의 화합물을 포함한다. 이 화합물과 접촉하면, 개체의 면역계가 작동하여 화합물을 외부 인자로 인식하고 파괴시킨다. 이후 면역계는 이 화합물과의 접촉을 기억하여, 나중에 질병을 유발하는 병원체와 접촉시 쉽고 효율적인 병원체의 인식 및 파괴가 보장된다. 본 발명에 따르면, 백신은 당해 기술분야에 공지된 백신의 임의의 제형, 예컨대 근육 주사용 백신, 점막 백신 또는 피하 또는 피부 내 주사용 백신뿐만 아니라 흡입용 백신, 예를 들면 에어로졸일 수 있다. 이러한 백신 제형은 당해 기술분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 다음에 기술되어 있다 [참조: Neutra MR et al. 2006 Mucosal vaccines: the promise and the challenge 6(2): 148-58 또는 F. P. Nijkamp, Michael J. Parnham 2011; Principles of Immunopharmacology ISBN-13: 978-3034601351].
- [0041] 따라서, 본 발명의 방법은 특히, 배양된 곤충 세포에서 바칼로바이러스 발현 시스템에 의해 생산된 재조합 단백질을 포함하는 면역원성 조성물을 개체가 투여받았는지 여부를 결정하는 방법이며, 상기 방법은 상기 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서 개체가 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스인 바이러스로부터 하나 이상의 항원을 투여받았음을 보여주는 하나 이상의 마커의 존재 또는 부재를 결정하는 것을 포함하고, 상기 생물학적 샘플에서 상기 하나 이상의 마커의 존재는 상기 개체가 상기 면역원성 조성물을 투여받았음을 나타낸다.
- [0042] 바람직하게는, 생물학적 샘플은 개체가 백신 접종되거나 각각 백신 접종된 것으로 추정되는 날로부터 적어도 14일 및 가장 바람직하게는 14일 내지 35일 후에 상기 개체로부터 수득된다.
- [0043] 바람직하게는, 본원에 언급된 곤충 세포는 스포도프테라 프루기페르다 (Sf) 세포 또는 스포도프테라 프루기페르다로부터 유래된 세포주로부터의 세포이고, 보다 바람직하게는 Sf9 세포 및 Sf+ 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 각각 본원에 언급된 곤충 세포는 바람직하게는 스포도프테라 프루기페르다 (Sf) 세포 또는 스포도프테라 프루기페르다로부터 유래된 세포주로부터의 세포이고, 보다 바람직하게는 Sf9 세포 및 Sf+ 세포로 이루어

진 그룹으로부터 선택된다.

- [0044] 개체가 본 발명에 언급된 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스로부터 하나 이상의 항원을 투여받았음을 보여주는 하나 이상의 마커는 또한 이하에서 "본 발명의 하나 이상의 마커"로도 칭해지며, 바람직하게는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 마커이다: 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스인 바이러스로부터의 하나 이상의 항원에 특이적인 항체; 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스인 바이러스로부터의 하나 이상의 항원; 및 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스에 특이적인 하나 이상의 핵산 분자.
- [0045] 가장 바람직하게는, 본 발명의 하나 이상의 마커는 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스인 바이러스로부터의 항원에 특이적인 항체이다.
- [0046] 바람직하게는, 본원에 기재된 항체는 다클론성 항체이다.
- [0047] 본원에서 사용되는 용어 정의된 항원에 대해 "특이적인 항체"는 친화성을 가지거나, 예를 들어 약  $10^5 M^{-1}$ ,  $10^6 M^{-1}$ ,  $10^7 M^{-1}$ ,  $10^8 M^{-1}$ ,  $10^9 M^{-1}$ ,  $10^{10} M^{-1}$ ,  $10^{11} M^{-1}$ ,  $10^{12} M^{-1}$  또는  $10^{13} M^{-1}$  이상의  $K_a$ (즉,  $1/M$  단위를 가지는 특정 결합 상호작용의 평형 결합 상수)로 항원과 결합하는 특히 항체, 바람직하게는 다클론성 항체를 가리킨다. 대안적으로, 결합 친화도는  $M$  (예를 들어,  $10^{-5} M$  내지  $10^{-13} M$ ) 단위를 가지는 특정 결합 상호작용의 평형 해리 상수 ( $K_d$ )로 정의될 수 있다. 항체의 결합 친화도는 통상의 기술자에게 잘 알려진 기술을 사용하여 용이하게 결정될 수 있다 [참조: 예를 들어, Scatchard *et al.* (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660; 미국 특허번호 5,283,173; 5,468,614; BIACORE® 분석; 또는 이와 동등한 것].
- [0048] 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스로부터의 하나 이상의 항원은 본원에 언급된 바와 같이 이하에서 "본 발명에 따른 하나 이상의 항원"이라고도 불리는데, 바람직하게는 서열 번호 1의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성 (sequence identity)을 가지는 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질 및/또는 서열 번호 7의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질이다.
- [0049] 본 발명의 문맥에서 언급된 용어 "90% 이상"에 관하여, 상기 용어는 바람직하게는 "91% 이상", 더욱 바람직하게는 "92% 이상", 더욱 더 바람직하게는 "93% 이상" 또는 특히 "94% 이상"을 언급하는 것으로 이해된다.
- [0050] 본 발명의 문맥에서 언급된 용어 "95% 이상"에 관하여, 상기 용어는 바람직하게는 "96% 이상", 더욱 바람직하게는 "97% 이상", 더욱 더 바람직하게는 "98% 이상" 또는 특히 "99% 이상"을 언급하는 것으로 이해된다.
- [0051] 본원에서 사용되는 용어 "100% 서열 동일성을 갖는"은 용어 "동일하다"와 동등한 것으로 이해된다.
- [0052] 본원에서 사용되는 용어 "항원"은 특히 면역 반응을 유도할 수 있는 임의의 분자, 모이어티 또는 독립체를 의미한다. 이것은 세포성 및/또는 체액성 면역 반응을 포함한다.
- [0053] 퍼센트 서열 동일성은 당업계에 공지된 의미를 가지며, 두 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오타이드 서열 사이의 유사성을 측정하는 다수의 방법이 있다 [참조: 예를 들어, Lesk, Ed., *Computational Molecular Biology*, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, Ed., *Biocomputing: Informatics And Genome Projects*, Academic Press, New York, (1993); Griffin & Griffin, Eds., *Computer Analysis Of Sequence Data, Part I*, Humana Press, New Jersey, (1994); von Heinje, *Sequence Analysis in Molecular Biology*, Academic Press, (1987); 및 Gribskov & Devereux, Eds., *Sequence Analysis Primer*, M Stockton Press, New York, (1991)]. 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드를 정렬시키는 방법은 GCG 프로그램 패키지 [참조: Devereux *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 12:387 (1984)], BLASTP, BLASTN, FASTA [참조: Atschul *et al.* *J. Molec. Biol.* 215:403 (1990)], 및 Smith와 Waterman의 로컬 상동성 알고리즘 [참조: *Adv. App. Math.*, 2:482-489 (1981)]을 사용하는 Bestfit 프로그램 (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711)을 포함하는 컴퓨터 프로그램으로 성문화된다. 예를 들어, FASTA 알고리즘을 사용하는 컴퓨터 프로그램 ALIGN이 사용될 수 있고, 아핀 갭 서치 (affine gap search)에서 갭 오픈 페널티 (gap open penalty)는 -12이고, 갭 확장 페널티 (gap extension penalty)는 -2이다. 본 발명의 목적을 위해, 뉴클레오타이드 서열은 프로그램에서 설정된 디폴트 다중 배향 매개 변수를 사용하여 DNASTAR Inc.에 의한 MegAlign 소프트웨어 버전 11.1.0 (59), 419의 Clustal W 방법을 사용하여 정렬되고 (갭 페널티 = 15.0, 갭 길이 페널티 = 6.66, 지연 발산 서열 (delay divergent sequence)(%) = 30%, DNA 전이

중량 = 0.50 및 DNA 중량 매트릭스 = IUB), 각각 단백질/아미노산 서열은 프로그램에서 설정된 디폴트 다중 배향 매개 변수를 사용하여 DNASTAR Inc.에 의한 MegAlign 소프트웨어 버전 11.1.0 (59), 419의 Clustal W 방법을 사용하여 정렬된다 (갭 페널티 = 10.0을 갖는 Gonnet 시리즈 단백질 중량 매트릭스, 갭 길이 페널티 = 0.2, 및 자연 발산 서열(%) = 30%).

- [0054] 본원에 사용된 용어 "서열 번호 X의 서열과의 서열 동일성"은 용어 "서열 번호 X의 길이에 걸친 서열 번호 X의 서열과의 서열 동일성" 또는 용어 "서열 번호 X의 전체 길이에 걸친 서열 번호 X의 서열에 대한 서열 동일성"과 각각 상응하는 것으로 특히 이해된다. 이 문맥에서, "X"는 1 내지 24 중에서 선택되는 임의의 정수이고, 따라서 "서열 번호 X"는 본원에 언급된 임의의 서열 번호를 나타낸다.
- [0055] 본원에 언급된 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스에 특이적인 하나 이상의 핵산 분자는 또한, 이하에서 용어 "본 발명에 따른 하나 이상의 핵산 분자"라고도 불리며, 바람직하게는 하기를 인코딩하는 핵산 분자이다: 서열 번호 1의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질 및/또는; 서열 번호 7의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질; 및/또는 서열 번호 9의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 핵산 서열에 대해 역 상보적인 서열을 갖는 RNA; 및/또는 서열 번호 15의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 핵산 서열에 대해 역 상보적인 서열을 갖는 RNA.
- [0056] 바람직하게는, 본 발명의 방법은 생물학적 샘플을 고체 지지체에 고정된 포획제(capture reagent)와 접촉시키는 단계 (여기서 고정된 포획제는 본 발명의 하나 이상의 마커와 결합할 수 있다); 및 포획제에 결합된 상기 하나 이상의 마커의 존재 또는 부재를 결정하는 단계 (여기서 포획제에 결합된 상기 하나 이상의 마커의 존재는 상기 생물학적 샘플에 상기 하나 이상의 마커가 존재함을 나타낸다)를 포함한다.
- [0057] 본원에 사용된 용어 "포획제"는 특히 마커와 결합할 수 있는 분자 또는 다중 분자 복합체를 의미한다. 포획제는 바람직하게는 마커에 상당히 특이적으로, 바람직하게는 친화성을 가지고 또는  $K_a > 10^5 \text{ M}^{-1}$  또는 바람직하게는  $> 10^6 \text{ M}^{-1}$ 로 결합할 수 있다. 포획제는 임의로 자연 발생적, 재조합, 또는 합성 생체 분자일 수 있다. 단백질 및 핵산 리간드 (아프타머)는 포획제로서 매우 적합하다. 전체 바이러스 또는 바이러스 단편 또는 합성 펩티드는 또한 항체와 결합할 수 있기 때문에, 바람직한 포획제로서 작용할 수 있다.
- [0058] 본원에 사용된 용어 "고정된"은 특히 포획제가 임의의 방식 또는 방법으로 표면 (예: 고체 지지체)에 부착될 수 있음을 의미한다; 예를 들면, 가역성 또는 비가역성 결합, 공유 결합 또는 비공유 부착 등을 포함한다.
- [0059] 본원에 언급된 고체 지지체에 고정되어 있으며 본 발명의 하나 이상의 마커와 결합할 수 있는 포획제는 또한, 이하에서 용어 "본 발명에 따른 포획제"라고도 불리며, 바람직하게는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된다: 서열 번호 1 내지 6 중에서 어느 하나의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질; 서열 번호 7 또는 서열 번호 8의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질; 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스, 여기서 상기 바이러스는 임의로 불활성화된다; 서열 번호 9의 서열을 특징으로 하는 서열과 특이적 혼성화가 가능한 올리고뉴클레오타이드; 서열 번호 15의 서열을 특징으로 하는 서열과 특이적 혼성화가 가능한 올리고뉴클레오타이드.
- [0060] 본원에 기술된 용어 "특이적 혼성화"는 특히 엄격한 조건 하에서의 혼성화와 관련이 있다. 상기 혼성화 조건은 종래의 프로토콜에 따라 설정될 수 있다 [참조: 예를 들어 Sambrook, "Molecular Cloning, A Laboratory Handbook", 2<sup>nd</sup> edition (1989), CSH Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989); 또는 Higgins and Hames (eds) "Nucleic acid hybridization, a practical approach" IRL Press Oxford, Washington DC (1985)]. 특이적 혼성화 조건에 대한 예는 65°C에서 4xSSC 및 0.1% SDS에서의 혼성화에 이어서 65°C에서 0.1xSSC, 0.1% SDS로 세척하는 것이다. 대안적으로, 엄격한 혼성화 조건은 예를 들어 42°C에서 50% 포름아미드, 4xSSC이다.

- [0061] 본원에 언급된 용어 "고체 지지체"는 비-유동성 물질을 의미하며, 중합체, 금속 (상자성, 강자성 입자), 유리, 및 세라믹과 같은 물질로 만들어진 칩, 용기, 및 입자(마이크로입자 및 비드 포함); 실리카, 알루미늄, 및 중합체 겔과 같은 겔 물질; 중합체, 금속, 유리 및/또는 세라믹으로 제조될 수 있는 모세관; 제올라이트 및 기타 다공성 물질; 전극; 마이크로타이터 플레이트; 솔리드 스트립; 및 큐벳, 튜브 또는 기타 분광계 샘플 용기를 포함한다. 분석의 고체 지지체 구성 요소는 "고체 지지체"가 그 표면 상에 하나 이상의 모이어티를 함유한다는 점에서 분석이 접할 수 있는 불활성 고체 표면과 구별되며, 직접 또는 간접적으로 포획제와 상호 작용하도록 의도된다. 고체 지지체는 튜브, 스트립, 큐벳, 또는 마이크로타이터 플레이트와 같은 고정된 성분이거나, 비드 및 마이크로입자와 같은 비-고정 성분일 수 있다. 마이크로입자는 또한 균일 분석 형식을 위한 고체 지지체로 사용될 수도 있다. 단백질과 기타 물질의 공유 결합 또는 비-공유 결합을 허용하는 다양한 마이크로입자가 사용될 수 있다. 이러한 입자는 폴리스티렌 및 폴리(메틸메타크릴레이트)와 같은 중합체 입자; 금 나노 입자 및 금 콜로이드와 같은 금 입자; 및 실리카, 유리, 및 금속 산화물 입자와 같은 세라믹 입자를 포함한다. 예를 들어 본원에 참고문헌으로 포함된 문헌을 참조한다 [Martin, C.R., et al., Analytical Chemistry-News & Features 70 (1998) 322A-327A].
- [0062] "칩"은 금속, 유리 또는 플라스틱과 같은 고체, 비 다공성 물질이다. 물질은 임의로 전체 또는 특정 영역에 코팅될 수 있다. 물질의 표면에는 눈에 띄거나 좌표에 있는 스팟의 임의의 배열이 있다. 물질의 표면에 링커 또는 스페이서가 있거나 없는, 한정된 폴리펩티드가 각 지점에 고정될 수 있다. 상기 및 하기에 언급된 모든 문서는 본원에 참고문헌으로 포함된다.
- [0063] 본원에 언급된 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스는 또한 이하에서 "본 발명에 따른 RNA 바이러스"로도 불리며, 바람직하게는: (-)ssRNA 바이러스 및 임의로 랩도바이러스 과에 속하는 바이러스; 및/또는 서열 번호 1의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질을 포함하는 바이러스 및/또는; 서열 번호 7의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질; 및/또는 게놈이 서열 번호 1의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 바이러스 및/또는; 서열 번호 7의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질; 및/또는 게놈이 서열 번호 9의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상, 특히 100% 서열 동일성을 가지는 핵산 서열에 대해 역 상보적인 서열을 갖는 RNA 분자를 포함하는 바이러스 및/또는; 서열 번호 15의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상, 특히 100% 서열 동일성을 가지는 핵산 서열에 대해 역 상보적인 서열이다.
- [0064] 서열 목록의 모든 뉴클레오타이드 서열은 5' - '3 방향으로 입력된다. 서열 번호 9 및 15의 서열은 양의 극성(+가닥)을 갖는 cDNA를 인코딩한다. 용어 "역 상보적"은 서열이 기준 서열과 역-평행임을 의미한다.
- [0065] 본 발명에 따른 RNA 바이러스는 곤충 세포주에서 바람직하게는 2주 이상, 바람직하게는 3주 이상 복제할 수 있다.
- [0066] 바람직하게는, 본 발명의 방법은 생물학적 샘플에서 본 발명의 하나 이상의 마커의 존재 또는 부존재를 결정하는 것을 포함하고, 여기서 상기 마커는 서열 번호 1의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질에 특이적인 항체 또는; 서열 번호 7의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질에 특이적인 항체이고; 상기 방법은 하기의 단계를 포함한다:
- [0067] a. 생물학적 샘플을 고체 지지체에 고정된 포획제와 접촉시키는 단계, 여기서 포획제는 서열 번호 1 내지 6 중 어느 하나의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 서열 또는 서열 번호 7 또는 서열 번호 8의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질, 서열 번호 1의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는

아미노산 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질 및/또는; 서열 번호 7의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질을 포함하는 임의로 불활성화된 바이러스, 이의 게놈이 서열 번호 1의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 바이러스 (여기서 상기 바이러스는 임의로 불활성화됨), 이의 게놈이 서열 번호 9의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상, 특히 100% 서열 동일성을 가지는 핵산 서열에 대해 역 상보적인 서열 및/또는; 서열 번호 15의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상, 특히 100% 서열 동일성을 가지는 핵산 서열에 대해 역 상보적인 서열을 포함하는 RNA 분자를 포함하는 바이러스 (여기서 상기 바이러스는 임의로 불활성화됨)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

- [0068] b. 생물학적 샘플을 고정된 포획제로부터 분리하는 단계;
- [0069] c. 고정된 포획제-항체 복합체가 시약-항체 복합체의 항체와 결합하는 검출제(detectable agent)와 접촉하는 단계; 및
- [0070] d. 검출제에 대한 검출 수단을 사용하여 포획제에 결합된 항체의 수준을 측정하고, 측정 단계 (d)는 바람직하게는 포획제에 결합된 항체의 수준을 측정하기 위해 표준 곡선과의 비교를 포함하는 단계를 추가로 포함하는 단계.
- [0071] 바람직하게는, 시약-항체 복합체의 항체에 결합하는 상기 검출제는 검출 가능한 항체, 보다 바람직하게는 표지된 2차 항체이다.
- [0072] 본원에 기술된 포획제는 바람직하게는 바콜로바이러스-발현 단백질이고, 상기 바콜로바이러스-발현 단백질은 본 발명의 바콜로바이러스에 의해 바람직하게 발현되고, 본원의 아래에서 기술된다.
- [0073] 본 발명의 또 다른 바람직한 양태에 따르면, 본 발명의 하나 이상의 마커는 또한 본 발명에 따른 RNA 바이러스에 특이적인 하나 이상의 T 세포 및/또는 본 발명에 따른 RNA 바이러스에 특이적인 하나 이상의 B 세포 및/또는 본 발명에 따른 하나 이상의 항원을 제시하는 하나 이상의 항원 제시 세포일 수 있다. 상기 하나 이상의 B 세포 및/또는 상기 하나 이상의 T 세포 및/또는 상기 하나 이상의 항원 제시 세포의 존재 또는 부재는 바람직하게는 유세포 분석에 의해 결정되고, 특히 본 발명에 따른 하나 이상의 형광 표지된 항원은 상기 하나 이상의 B 세포 및/또는 상기 하나 이상의 T 세포를 표지하기 위해 사용되고/되거나 본 발명에 따른 하나 이상의 형광 표지된 항원은 상기 하나 이상의 항원 제시 세포를 표지하기 위해 사용된다.
- [0074] 본원에 언급된 배양된 곤충 세포에서 발현 시스템에 의해 생성된 재조합 단백질은 또한 이하에서 "본 발명의 재조합 단백질"이라고도 불리며, 바람직하게는 PCV2 ORF2 단백질이고, 상기 PCV2 ORF2 단백질은 특히 서열 번호 23의 서열과 90% 이상, 바람직하게는 91% 이상, 더욱 바람직하게는 92% 이상, 더욱 더 바람직하게는 93% 이상 또는 특히 94% 이상 또는 95% 이상의 서열 동일성을 가지는 단백질이다.
- [0075] 또 다른 바람직한 양태에 따르면, 본 발명의 재조합 단백질은 인플루엔자 헤마글루티닌, 특히 조류 인플루엔자 헤마글루티닌인데, 상기 조류 인플루엔자 헤마글루티닌은 바람직하게는 H5N1 바이러스의 H5 단백질이고, 상기 H5N1 바이러스의 H5 단백질은 더욱 바람직하게는 서열 번호 24의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질이다.
- [0076] 본 발명의 방법은 바람직하게는 생물학적 샘플에서 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 분석 물질의 존재를 결정하기 위한 단계를 추가로 포함한다: 본 발명의 재조합 단백질에 특이적인 항체, 본 발명의 재조합 단백질에 특이적인 폴리펩티드, 본 발명의 재조합 단백질을 인코딩하는 DNA 서열에 특이적인 뉴클레오타이드 서열.
- [0077] 본 발명의 방법의 맥락에서, 면역원성 조성물은 바람직하게는 아래에 기술된 면역원성 조성물이다.
- [0078] 본원에 사용된 용어 "생물학적 샘플"은 개체로부터(예를 들어 돼지 또는 새로부터) 얻은 임의의 샘플을 의미하며, 세포 함유 체액, 말초 혈액, 혈장 또는 혈청, 타액, 조직 호모게네이트, 폐 및 기타 장기 흡인물, 및 세척

및 관장액, 및 인간 또는 동물 피험체로부터 얻을 수 있는 임의의 다른 공급원을 포함한다.

- [0079] 동물의 경우, "생물학적 샘플"의 예는, 그 동물에 존재한다면, 혈액, 세포, 대변, 설사, 젖, 점액, 가래, 고름, 타액, 정액, 땀, 눈물, 오줌, 눈물, 안구 유체, 질 분비물, 및 구토를 포함한다.
- [0080] 본원에 언급된 생물학적 샘플은 바람직하게는 포유류 또는 조류, 바람직하게는 돼지 또는 닭(*Gallus gallus domesticus*)으로부터 단리되고, 및/또는 전혈, 혈장, 혈청, 오줌, 및 구강액으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 본원에서, 용어 "혈청"은 "혈액 혈청(blood serum)"과 동등한 의미이다.
- [0081] 본원에 사용된 용어 "구강액"은 특히 구강 내에서 개별적으로 또는 조합으로 발견되는 하나 이상의 유체를 의미한다. 이들은 타액 및 점막 누출액을 포함하지만 이에 국한되지는 않는다. 구강액은 특히 여러 공급원 (예를 들어, 귀밑샘, 턱밑샘, 설하선, 부속샘, 잇몸 점막 및 볼점막)으로부터의 유체의 조합을 포함할 수 있고, 용어 "구강액"은 이들 각각의 공급원으로부터의 개별적 또는 조합한 유체를 포함하는 것으로 이해된다. 용어 "타액"은 입안에서 일반적으로 발견되는, 특히 씹은 후에 발견되는 구강액의 조합을 의미한다. 본원에 사용된 용어 "점막 누출액"은 구강 점막 간질에서 구강 내로 혈청 성분의 수동 확산에 의해 생성된 액체를 의미한다. 점막 누출액은 종종 타액의 한 구성 성분을 형성한다.
- [0082] 본원에 기술된 고정된 포획제는 바람직하게는 마이크로타이터 플레이트, 특히 ELISA 리더(reader)에 의해 판독될 수 있는 마이크로타이터 플레이트 상에 코팅된다.
- [0083] 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 재조합 바칼로바이러스를 제공하고, 상기 바칼로바이러스는 서열 번호 1 내지 6 중에서 어느 하나의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질 및/또는; 서열 번호 7 또는 서열 번호 8의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질을 인코딩하는 DNA 서열을 포함하고; 및/또는 상기 바칼로바이러스는 서열 번호 9 내지 14 중에서 어느 하나의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 서열 및/또는; 서열 번호 15 또는 서열 번호 16의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 DNA 서열을 포함한다.
- [0084] 본 발명은 벡터, 특히 전달 벡터를 추가로 포함하고, 서열 번호 1 내지 6 중에서 어느 하나의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질 및/또는; 서열 번호 7 또는 서열 번호 8의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질을 인코딩하는 DNA 서열을 함유하고; 및/또는 서열 번호 9 내지 14 중에서 어느 하나의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 DNA 서열 및/또는; 서열 번호 15 또는 서열 번호 16의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 DNA 서열을 함유한다.
- [0085] 본 발명의 문맥에서의 전달 벡터는 바람직하게는 "바칼로바이러스 전달 벡터"이다.
- [0086] 용어 "전달 벡터"는 당해 기술분야에 공지되어 있고 제2 핵산이 연결된 제1 핵산 분자를 지칭하며, 예를 들어 플라스미드, 코스미드 또는 파지(phages)를 포함한다.
- [0087] 특정 실시 형태에서, 전달 벡터는 "발현 벡터 (expression vector)"일 수 있는데, 이는 원하는 단백질을 인코딩하는 DNA를 발현하는데 사용되는 복제 가능한 DNA 구조물을 지칭하며, (i) 유전자 발현에서 조절 역할을 하는 유전적 요소(들), 예를 들어 프로모터, 오퍼레이터, 또는 인핸서, 이들이 작용적으로 연결된 (ii) mRNA로 전사되어 단백질로 번역되는 목적 단백질을 인코딩하는 DNA 서열, 및 (iii) 적절한 전사 및 번역 개시 및 종료 서열의 집합을 포함하는 전사 단위를 포함한다. 프로모터 및 기타 조절 요소의 선택은 일반적으로 대상 숙주 세포에 따라 다르다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유틸리티의 발현 벡터는 벡터 형태로는 염색체에 결합되지 않는, 원형 이중 가닥 DNA 루프를 지칭하는 "플라스미드"의 형태로 종종 존재한다. 본 발명은 동등한 기능을 제공하고 후속적으로 당해 기술분야에서 공지될 수 있는 다른 형태의 발현 벡터를 포함하도록 의도된다.
- [0088] 특정 전달 벡터는 일반적으로 포유류, 미생물, 바이러스 또는 곤충 유전자로부터 유래될 수 있는 전사 또는 번역을 조절하기 위한 조절 요소를 함유할 수 있다. 통상적으로 복제의 기원에 의해 부여되는 숙주에서 복제하는

능력, 및 형질 전환체의 인식을 용이하게 하는 선택 유전자(selection gene)가 추가로 포함될 수 있다.

- [0089] "바이러스성 벡터"로 지칭될 수 있는, 바이러스로부터 유래된 전달 벡터가 본 발명의 특정 실시 형태에서 사용될 수 있다. 몇 가지 예는 바콜로바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 등을 포함한다. 바이러스성 벡터, 특히 바콜로바이러스 벡터, 예를 들어 바콜로바이러스 전달 벡터가 본 발명에 따라 특히 바람직하다. 발현 벡터에 관해서는, 바이러스성 벡터는 조절 요소를 포함할 수 있다.
- [0090] 임의의 전달 벡터의 디자인은 변형될 숙주 세포의 선택 및/또는 발현하고자 하는 단백질의 유형과 같은 요인에 따라 좌우될 수 있다. 또한, 벡터의 카피 수, 그 카피 수를 조절하는 능력 및 항생물질 마커(예를 들어, 암피실린)와 같은 벡터에 의한 다른 임의의 단백질의 발현도 고려될 수 있다.
- [0091] 또 다른 양태에 따르면 본 발명은 면역원성 조성물을 제공하고, 또한 이하에서 "본 발명에 따른 면역원성 조성물"로도 불리며, 상기 조성물은 배양된 곤충 세포에서 바콜로바이러스 발현 시스템에 의해 생성된 재조합 단백질; 및 본 발명에 따른 RNA 바이러스로부터의 하나 이상의 항원을 포함하고, 여기서 상기 바이러스는 바람직하게는 불활성화되고; 여기서 상기 재조합 단백질은 바람직하게는 서열 번호 23의 서열과 90% 이상, 바람직하게는 91% 이상, 더욱 바람직하게는 92% 이상, 더욱 더 바람직하게는 93% 이상 또는 특히 94% 이상 또는 95% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 PCV2 ORF2 단백질; 및 인플루엔자 헤마글루티닌, 특히 조류 인플루엔자 헤마글루티닌, 바람직하게는 H5N1 바이러스의 H5 단백질, 더욱 바람직하게는 서열 번호 24의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질; 및 서열 번호 1 내지 8 중에서 어느 하나의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0092] 본원에 사용된 용어 "불활성화된"은 항원이 포유류 숙주에 투여될 때 질병을 유발하지 않는다는 것 또는 숙주 세포에서 복제하지 않는다는 것을 의미한다.
- [0093] 다양한 물리적 및 화학적 불활성화 방법이 당해 기술분야에 공지되어있다. 용어 "불활성화된"은 이전에 독성이 있었거나 독성이 없는 바이러스가 면역원성을 유지하면서 조사되거나(자외선(UV), X선, 전자선 또는 감마선), 가열되거나, 또는 화학적으로 불활성 처리되거나, 죽은 것을 의미한다. 일 실시 형태에서, 본원에 개시된 불활성화된 바이러스는 불활성화제로 처리함으로써 불활성화된다. 적합한 불활성화제는 베타-프로피오락톤, 바이너리 또는 베타- 또는 아세틸-에틸렌이민, 글루타르알데히드, 오존, 및 포르말린 (포름알데히드)을 포함한다.
- [0094] 포르말린 또는 포름알데히드에 의한 불활성화의 경우, 포름알데히드는 전형적으로 물 및 메틸 알코올과 혼합되어 포르말린을 생성한다. 메틸 알코올의 첨가는 활성화 과정에서 분해 또는 교차 반응을 방지한다.
- [0095] 보다 구체적으로, 용어 "불활성화된"은 바이러스가 생체 내 또는 시험관 내에서 복제할 수 없다는 것을 의미한다. 예를 들어, 용어 "불활성화된"은 시험관 내에서 증식되고, 예를 들면, 그 후 더이상 복제할 수 없도록 화학적 또는 물리적 수단을 사용하여 비활성화된 바이러스를 의미할 수 있다.
- [0096] 바람직하게는 불활성화된 본 발명에 따른 바이러스는 바이너리 에틸렌이민 (BEI)으로 불활성화된 바이러스이다.
- [0097] 본 발명은 상기 재조합 단백질을 인코딩하는 재조합 바콜로바이러스를 곤충 세포에 도입하는 단계 (여기서, 상기 곤충 세포는 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스로 감염된다), 상기 재조합 바콜로바이러스 및 상기 RNA 바이러스가 잠복하는 상기 곤충 세포를 배양하는 단계; 및 상기 재조합 단백질 및 상기 바이러스를, 바람직하게는 상등액에서, 회수하는 단계를 포함하는 본 발명의 면역원성 조성물의 제조 방법을 추가로 제공하고; 그리고 바람직하게는 상기 재조합 단백질을 인코딩하는 DNA 서열을, 상기 서열을 바콜로바이러스의 게놈에 도입할 수 있는 전달 벡터에 삽입하여, 이로써 재조합 바콜로바이러스를 생산하는 초기 단계를 추가로 포함한다.
- [0098] 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 개체가 배양된 곤충 세포에서 바콜로바이러스 발현 시스템에 의해 생성된 재조합 단백질을 포함하는 면역원성 조성물을 투여받았는지 여부를 결정하기 위한 키트, 특히 시험 키트를 제공하며, 여기서 상기 키트는 고체 지지체에 고정된 하나 이상의 포획제를 함유하고, 여기서 하나 이상의 고정된 포획제는 본 발명에 따른 하나 이상의 항원에 특이적인 항체; 본 발명에 따른 RNA 바이러스로부터의 하나 이상의 항원; 및 본 발명에 따른 하나 이상의 핵산 분자로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 마커와 결합할 수 있고; 여기서 상기 하나 이상의 포획제는 바람직하게는 서열 번호 1 내지 6 중에서 어느 하나의 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질; 서열 번호 7 또는 서열 번호 8의 서

열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 또는 특히 100% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 이루어진 단백질; 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스 (여기서 상기 바이러스는 임의로 불활성화된다); 서열 번호 9의 서열을 특징으로 하는 서열과 특이적 혼성화가 가능한 올리고뉴클레오타이드; 및 서열 번호 15의 서열을 특징으로 하는 서열과 특이적 혼성화가 가능한 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0099] 또한, 본 발명은 서열 번호 17 내지 22 중에서 어느 하나의 서열과 90% 이상 또는 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성을 가지는 서열로 이루어진 그룹으로부터 각각 선택되는 프라이머 또는 한 쌍의 프라이머를 제공한다.

[0100] 또 다른 양태에 따르면, 본 발명의 포획제는 바이러스성 입자 및/또는 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스의 바이러스 유사 입자를 포함하거나 이로써 이루어지고, 여기서 상기 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스는 바람직하게는 본 발명에 따른 RNA 바이러스이고, 여기서 상기 포획제는 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 얻어진다:

[0101] i) RNA 바이러스, 바람직하게는 본 발명의 RNA 바이러스에 감염된 곤충 세포의 배양물로부터 상등액을 수득하는 단계, 여기서 상기 상등액은 바이러스성 입자 및/또는 RNA 바이러스와 같은 바이러스 유사 입자를 포함하고, 상기 곤충 세포는 바콜로바이러스에 감염되지 않으며 및/또는 바람직하게는 플라스미드로 형질전환되지 않으며,

[0102] ii) 적어도 하나의 필터, 바람직하게는 두 개의 필터를 통한 미세 여과(micro filtration)를 포함하는 분리 단계를 통해 바이러스성 입자 및/또는 바이러스 유사 입자로부터 세포 찌꺼기를 분리하고, 여기서 하나 이상의 필터는 바람직하게는 바이러스성 입자 및/또는 바이러스 유사 입자보다 큰 세공(pore) 사이즈를 갖고, 특히 약 0.1  $\mu\text{m}$  내지 약 4  $\mu\text{m}$ , 바람직하게는 약 0.2  $\mu\text{m}$  내지 약 2  $\mu\text{m}$ 의 세공 사이즈를 갖고, 여과액을 수집하는 단계,

[0103] iii) 및 임의로 상기 바이러스성 입자 및/또는 바이러스 유사 입자를 함유하는 ii)의 여과액을 사이즈 배제 크로마토그래피에 적용하는 단계, 여기서 바람직하게는 용리액 중 단백질의 존재는 260 nm 또는 280 nm( $A_{260}$  또는  $A_{280}$ )에서 흡광도를 측정함으로써 측정되고, 여기서 최초의  $A_{260}$  또는  $A_{280}$  피크를 나타내는 용리액이 수집된다.

[0104] 또한, 본 발명은 상기 포획제를 포함하는 조성물을 제공하고, 여기서 상기 조성물은 상기 방법에 의해 수득된다.

[0105] 본원에 기술된 사이즈-배제 크로마토그래피(SEC) 단계에서, 분자는 불활성 다공성 매질, 특히 불활성 겔 매질 (바람직하게는 가교 결합된 다당류, 예를 들어, 구형 구슬의 형태로 가교 결합된 아가로스 및 텍스트란이다)로 충전된 층에서 크기에 따라 분리된다. 부풀린 겔 구슬의 가장 큰 세공보다 큰 분자는 겔 구슬에 들어가지 않으므로 크로마토그래피 층을 가장 빠르게 통과한다. 크기와 모양에 따라 겔 구슬에 다른 정도로 들어가는 작은 분자는, 층을 통과하는데 지체된다. 분자는 따라서 분자 크기가 감소하는 순서로 일반적으로 용리된다. 본원에 기재된 크기-배제 크로마토그래피에 적합한 매질을 포함하는 SEC 컬럼은 바람직하게는 HiPrep 26/60 Sephacryl S300HR 컬럼 (GE Healthcare Bio-Sciences)이다.

[0106] 특히 최초의  $A_{260}$  또는  $A_{280}$  피크를 나타내는 용리액은 ii)의 여과액에 포함된 가장 큰 단백질 구조를 포함하는 ii)의 여과액의 일부인 것으로 이해된다. 따라서, 최초의  $A_{260}$  또는  $A_{280}$  피크를 나타내는 용리액은 ii)의 여과액에 포함된 바이러스성 입자 및/또는 바이러스 유사 입자의 대부분을 함유하는 용리액, 또는 이의 일부이다.

[0107] 실시예

[0108] 하기 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이다. 이것은 어떤 방식으로도 청구항의 범위를 제한하지 않는다.

[0109] **실시예 1:**

[0110] **랍도바이러스에 의한 Sf 세포의 감염, 반-정제된 랍도바이러스의 생산, 및 랍도바이러스 항원의 클로닝 및 발현**

[0111] 이후 SF+ 및 Sf9 세포의 랍도바이러스(이하에서 또한 SfRV 또는 SFRV(Sf 세포 랍도바이러스)로도 명명된다) 감염을 확인하기 위해, 프라이머는 독특한 5' 및 3' 제한 부위를 삽입하는 목적으로 SFRV G 및 N 유전자를 증폭시키도록 설계하였다. 또한, 3' 말단 프라이머는 TEV (tobacco etch virus) 프로테아제 절단 부위, 이어서, 6X 히스티딘 태그를 첨가하도록 설계하였다. 이것은 His 태그를 사용하여 니켈 컬럼에서 발현된 단백질을 정제할 수 있도록 하고, 그 후 TEV 프로테아제를 사용하여 His 태그를 절단하여 본래의 G 또는 N 단백질을 생성하기 위해 수행하였다.

- [0112] G 유전자 구조체 (서열 번호 1의 서열을 포함)에 사용된 프라이머의 서열은 서열 번호 17 및 18에 기재된 서열이며, G 유전자 구조체에 대한 핵산 서열은 서열 번호 12로 표시되며, G 유전자 구조체에 대한 아미노산 서열은 서열 번호 4의 서열이다.
- [0113] N 유전자 구조체 (서열 번호 7의 서열을 포함)에 사용된 프라이머의 서열은 서열 번호 21 및 22에 기재된 서열이며, N 유전자 구조체에 대한 핵산 서열은 서열 번호 16로 표시되며, N 유전자 구조체에 대한 아미노산 서열은 서열 번호 8의 서열이다.
- [0114] 또한, SFRV G 당단백질의 막 관통 (transmembrane) 영역 및 세포 내 (intracellular) 영역은 K. Hofmann & W. Stoffel (1993)TMbase - A database of membrane spanning proteins segments, Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374,166에 기술된 Tmpred ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)), Moller S1, Croning MD, Apweiler R., Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions, Bioinformatics (2001) 17 (7): 646-653에 기술된 숨겨진 Markov 모델을 사용하는 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 및 SOSUI (<http://tiarrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>)를 사용하여 예측하였다. Tmpred 및 TMHMM의 결과에 기초하여, SFRV G 서열은 아미노산 550에서 종결되고, TEV 절단 부위, 6X His 태그 및 Pst I 부위를 첨가하였다. 상기 G 유전자 구조체(서열 번호 2의 서열을 포함)에 사용할 수 있는 프라이머의 서열은 서열 번호 17 내지 19에 기재된 서열이며, G 유전자 구조체에 대한 핵산 서열은 서열 번호 13으로 표시되며, G 유전자 구조체에 대한 아미노산 서열은 서열 번호 5의 서열이다.
- [0115] 또한, 꿀벌 멜리틴 분비 시그널의 서열은 절단된 SFRV G 서열에 결합하였고 [참조: Chouljenko et al. J Virol, 84:8596-8606 (2010); Tessier et al. Gene. 98:177-83 1991)], 여기서 멜리틴 서열은 N 말단을 대체함으로써 TEV 절단 및 6X His와 함께 전장 SFRV G에 첨가하였다. 상기 G 유전자 구조체 (서열 번호 3의 서열을 포함)에 사용할 수 있는 프라이머의 서열은 서열 번호 20 및 18에 기재된 서열이며, G 유전자 구조체에 대한 핵산 서열은 서열 번호 14로 표시되며, G 유전자 구조체에 대한 아미노산 서열은 서열 번호 6의 서열이다.
- [0116] GenBank (수탁 번호 KF947078)에 기탁된, MA 등에 따른 SFRV의 전체 게놈 서열 [참조: J Virol. 88:6576-6585 (2014)]은 프라이머 설계를 위한 기반으로 사용하였다. 비슷하게, TEV 절단 부위에 대해, 이용 가능한 공개된 정보에 기초하여 서열 ENLYFQG가 사용하였다.
- [0117] SFRV는 Sf9 (부착 세포) 및 Sf+ (현탁 세포)의 성장에 사용되는 사용된 배양액으로부터 정제하였다: 사용된 배양액은 SFRV 감염되고 통상적으로 증식된 Sf9 및 Sf+ 세포로부터 수집하고, 0.2 마이크론 필터를 통해 여과되어 세포 찌꺼기를 제거하였다. 여과액을 NaCl-Tris HCl-EDTA (NTE) 버퍼 pH 7.4에서 30% 수크로오스 층에 로딩하고 3시간 동안 4°C에서 32,000 rpm으로 초원심분리를 수행하였다. 상등액을 조심스럽게 흡입하고 펠렛을 다시 수확시켜 NTE 버퍼에 다시 현탁시켰다. 총 단백질 함량은 나노드롭 기계에서 측정하였고 분취량 (aliquot)에 로트 번호를 부여하고 추후 사용할 때까지 ≤-70°C에서 동결시켰다. 이 항원 제제는 아래에 기술된대로, ELISA 플레이트 코팅용 반-정제 바이러스를 함유한다.
- [0118] 사용된 SF9 배양액은 SFRV 바이러스성 RNA 추출의 공급원으로 사용하였다. QIAamp 바이러스성 RNA 추출 키트 (Qiagen)는 제조업체의 지침에 따라 사용하였다.
- [0119] G 및 N 유전자를 증폭시키기 위해 One-Step Superscript III 키트를 제조업체의 지침에 따라 사용하였다. 구배 (gradient) RT-PCR을 다음과 같은 조건에서 사용하였다: 60°C에서 30분(RT 단계) 동안 1 사이클 후 94°C에서 2분 동안 1 사이클. 이어서 94°C에서 15초 동안 40 사이클 후, 구배 75°C 내지 50°C로 60초간 어닐링 (annealing)한 다음, 68°C에서 2분간 연장하였다. 최종적으로 반응을 68°C에서 5분 동안 단일 사이클로 수행하고, 4°C에서 무한정 유지하였다.
- [0120] 증폭된 생성물은 크기를 확인하기 위해 겔 상에서 작동시켰다. 예상되는 크기의 겔 밴드를 겔로부터 잘라내고 제조업체의 지침을 사용하여 Qiaquick 겔 추출 키트를 사용하여 정제하였다 (도 1).
- [0121] 하기에서는, G 유전자(서열 번호 1의 서열을 포함)를 사용하는 추가적인 연구만 기술된다.
- [0122] 앞서 말한 바와 같이 약 1.6Kb의 예상 크기를 갖는 증폭된 G 유전자 (도 1의 상부 밴드)를 잘라내어 겔 추출하였다. 이어서, Eco RI 및 Pst I 제한 효소로 절단 하였다. 절단된 결과물이 인서트이다. 유사하게 바칼로바이러스 전달 벡터 플라스미드 pVL1393 (Pharmingen)을 Eco RI 및 Pst I 제한 효소로 절단하여 벡터를 생성 하였다. 컷 인서트 및 벡터를 겔 (도 2 참조)상에서 작동시켜 벡터의 선형화를 확인하였다. 밴드를 잘라내어 겔을 추출하고 벡터를 탈인산화 시켰다. 인서트 (Eco RI-PstI 절단 SFRV-G 구조체)를 벡터 (Eco RI-PstI 절단 pVL1393,

탈인산화됨)에 클로닝하고 표준 절차를 사용하여 결찰 (ligation)하였다.

- [0123] 결찰된 생성물은 이. 콜라이 (*E. coli*) 세포 (Invitrogen의 One Shot Max efficiency DH5 a chemically competent cells) 및 암피실린을 함유한 LB 한천 상에 플레이팅된 세포를 형질전환시키는데 사용하였다. 다음날 콜로니를 수집하고 콜로니 PCR을 사용하여 플라스미드의 활용을 위해 스크리닝하고 클론 번호를 부여하였다.
- [0124] 콜로니 PCR에 대한 반응 조건은 다음과 같았다: 98°C에서 3분간 1 사이클한 다음 98°C에서 30초간 34 사이클의 변성, 58°C에서 30초간 어닐링한 후 72°C에서 2분간 연장. 이 단계에 이어 72°C에서 10분간 마지막 연장 단계를 거친 후 4°C에서 최종 유지하였다.
- [0125] 플라스미드를 함유하는 클론을 식별하기 위해 PCR 생성물을 아가로오스 겔 상에서 작동시켰다 (도 3 참조).
- [0126] 그런 다음 양성 클론을 LB-암피실린 브로쓰(broth)에서 성장시키고, 제조업체의 지시에 따라 Qiaprep 미니프렙 (miniprep) 플라스미드 정제 키트 (Qiagen)를 사용하여 배양물로부터 플라스미드를 정제하였다. 이렇게 생성된 전달 벡터는 SFRV G 유전자 구조체를 함유하고 분취하여(aliquoted) 로트 넘버를 부여하였다.
- [0127] SFRV G 유전자 구조체를 발현하는 재조합 바큘로바이러스를 생성하기 위해, ESCORT 형질전환 시약 (SAFC)을 사용하여 전달 플라스미드를 선형화된 flashBAC ULTRAbaculovirus backbone DNA (Genway biotech)와 함께 Sf9 세포로 공동 형질전환하였다. 1주일 후, 형질 전환으로부터 얻은 상등액 (p0)을 새로운 Sf9 세포에 접종하여 생성되었을 수도 있는 임의의 재조합 바큘로바이러스를 증폭시켰다.
- [0128] 형질전환으로부터의 세포 펠렛을 수집하고 SDS 겔 상에서 작동시키고 웨스턴 블롯을 위한 니트로셀룰로오스 막 위에 전송하였다. 단백질을 항 His 항체 (Invitrogen)로 프로빙하였다. 예측된 단백질 크기는 약 71.5KDa이다. 겔은 시험한 5개의 클론 (2, 5, 7, 10 및 11) 모두에 대해서 62KDa 마커 이상에서 2개의 근접한 밴드가 나타났지만 세포 대조군 레인 (cc)에서는 밴드가 나타나지 않았다 (도 4).
- [0129] 재조합 바이러스의 클론 2와 5를 더 통과시켜 스피너 플라스크에서 성장시켜 Sf+ 현탁 배양에서 대량으로 단백질을 생산하였다. 상등액의 가용성 및 불용성 세포 분획을 단백질에 대해 프로빙하였다. 이 때, 단백질은 불용성 부분에만 존재하였다 (도 5). 결과적으로, SFRV G 당단백질의 C-말단 절단은 ELISA 분석에서 사용하기 위한 다음 단계로서 생성된다.
- [0130] **실시예 2:**
- [0131] **ELISA 개발**
- [0132] ELISA는 SFRV에 감염된 Sf 세포에서 PCV2 또는 바큘로바이러스로 발현된 다른 아단위 백신으로 백신 접종된 동물에서 SFRV에 대한 항체 반응의 존재를 평가하기 위해 개발되었다. 간단히 말하면, ELISA 플레이트를 Sf9 또는 Sf+ 세포 상등액으로부터의 반-정제된 SFRV 항원(상기 기재된 바와 같음)의 250ng/웰로 코팅하였다.
- [0133] ● 코팅은 항원을 탄산염-중탄산염 버퍼 pH 9.0에서 희석하여 250ng/웰의 최종 농도를 얻도록 함으로써 수행하였다. 코팅은 밤새 4°C에서 수행하였다.
- [0134] ● 다음날 플레이트를 PBS-Tween (PBST)으로 세척하고 10% 우유로 실온에서 1시간 동안 블로킹시켰다.
- [0135] ● 그 후, 플레이트는 PCV2 아단위 항원, SFRV 감염된 Sf 세포에서 발현된 바큘로바이러스로 백신 접종된 동물, 또는 백신 접종이 없는 대조군으로부터 1:100으로 희석한 혈청 (블로킹 버퍼)으로 프로빙하였다.
- [0136] ● 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 배양한 다음 PBST로 5X회 세척하여 결합되지 않은 항체를 제거하였다.
- [0137] ● 그런 다음 플레이트를 1:10,000으로 희석한 2차 항체 (염소 항-돼지 IgG H+L-HRP 콘쥬게이트 - Bethyl laboratories)로 프로빙하고, 37°C에서 1시간 동안 배양한 다음 PBST로 5X회 세척하여 결합되지 않은 항체를 제거하였다.
- [0138] ● 마지막으로, SureBlue TMB 기질 (KPL)을 첨가하고 플레이트를 실온에서 5분 동안 배양한 다음 TMB 블로킹 용액 (KPL)으로 블로킹하였다.
- [0139] ● 플레이트를 450nm에서 확인하였다.
- [0140] **ELISA 플레이트 설정:**
- [0141] ● a열, 웰 1 내지 10을 Sf9 유래된 SFRV로 코팅하였다.

- [0142] ● b열, 웰 1 내지 10을 Sf+ 유래된 SFRV로 코팅하였다.
- [0143] ● 돼지 혈청을 중복하여 평가하였고 PCV2 (A, B) 아단위 항원으로 백신 접종된 동물을 볼드체로 표시하였다. 동물들이 백신 접종을 통해 SFRV와 접촉하고 SFRV에 대한 항체를 생성한 경우에는 양성 결과를 나타내야 한다.
- [0144] ● 음성 대조군은 이탤릭체로 (C 및 D) 표시하였다.
- [0145] ● 컬럼 9 및 10은 버퍼의 대조군이다 (1차 항체 없음).
- [0146] ELISA의 결과는 표 1에 나타난다.

**표 1**

	A		B		C		D		9	10
	1	2	3	4	5	6	7	8		
a 열	<b>0,774</b>	<b>0,626</b>	<b>0,217</b>	<b>0,215</b>	<i>0,058</i>	<i>0,098</i>	<i>0,095</i>	<i>0,091</i>	0,044	0,039
b 열	<b>1,857</b>	<b>0,909</b>	<b>1,556</b>	<b>1,028</b>	<i>0,993</i>	<i>0,554</i>	<i>0,104</i>	<i>0,103</i>	0,041	0,033

- [0147]
- [0148] 표 1은 Sf9 세포 (A열) 및 Sf+ 세포 (B열)에서 유래된 SFRV 항원을 평가하는 데이터를 보여준다. 4개의 혈청 샘플을 중복하여 평가하였다. 컬럼 A 및 B는 실험에서 사용된 백신으로 백신 접종된 동물로부터의 28일차 혈청을 함유하는 반면, 컬럼 C 및 D는 음성 대조군 동물로부터의 혈청을 함유하였다. 결과는 Sf9 및 Sf+ 세포 모두 SFRV를 함유하고 있으며 바이러스 항원으로 사용될 수 있음을 보여준다. 더욱이, 대조군 동물이 아닌 백신 접종된 동물에서 항원의 특이적인 인식은 SFRV의 내재적 순응 마커로서의 유용성을 암시한다.

[0149] **데이터 해석:**

- [0150] ● ELISA 판독 결과에 근거하여, PCV2 아단위 항원 (A그룹 및 B그룹)으로 백신 접종된 동물은 반-정제된 SFRV에 대해 양호한 반응성을 보인다.
- [0151] ● 음성 대조군 (C그룹 및 D그룹)은 반-정제된 SFRV에 대한 반응성을 나타내지 않는다.
- [0152] ● 결과는 내재적 순응 마킹 및 DIVA 접근법에 대한 SFRV의 유용성을 나타낸다.

[0153] **실시예 3:**

[0154] **상기 기술된 SFRV 항원 (여기서 상기 항원은 서열 번호 1 내지 6 중에서 어느 하나의 서열을 포함하는 단백질이거나, 또는 본 발명에 따른 정제된 또는 반정제된 바이러스이다)을 사용하는 ELISA**

[0155] 범위 : SFRV 항원에 대한 항체 존재를 위한 시험 혈청 (또는 구강액)

[0156] 재료 및 방법

[0157] A. 장비

- [0158] ● ELISA 워셔
- [0159] ● ELISA 리더
- [0160] ● 세포 배양을 위한 WFI, USP (Gibco, catalog# A12873-02)
- [0161] ● 탄산염-중탄산염 버퍼 (pH 9.6) 정제 (Sigma, catalog# C3041- 100CAP)
- [0162] ● 96 웰 이뮤노플레이트 (등근바닥 또는 평평한 바닥 플레이트, Nunc Maxisorb)
- [0163] ● 12-채널 피펫터, 1 $\mu$ l 내지 1mL 범위의 여러 종류의 피펫터
- [0164] ● 피펫 팁

- [0165] ● 37℃ 인큐베이터
- [0166] ● 4℃ 냉장고
- [0167] ● 볼텍서 (Vortexer)
- [0168] ● 플레이트 뚜껑 (Thermo, catalog# AB-0752)
- [0169] ● S-블록 2mL 희석 블록 (Phenix catalog# M-1810S, 또는 동급 제품)
- [0170] ● 시약 저장통
- [0171] ● 타이머
- [0172] B. 시약
- [0173] 1. 코팅 버퍼: 탄산염-중탄산염 버퍼
- [0174] ■ 100mL WFI
- [0175] ■ 탄산-염-중탄산염 버퍼 1캡슐
- [0176] ■ 캡슐을 열고, WFI에 분말을 뿌리고, 용해될 때까지 혼합한다
- [0177] ■ 0.2 $\mu$ m 필터를 사용한 필터 살균 용액
- [0178] ■ 4℃에서 보관
- [0179] ■ 유효 기간: 1주
- [0180] ■ 분석 당 필요량 (4 플레이트): 50mL
- [0181] 2. 10X PBS:
- [0182] ■ PBS 농축액 1 패키지, Fisher BP665-1
- [0183] ■ 1L 이하의 충분한 양의 GenPur H<sub>2</sub>O (또는 동급 제품)
- [0184] ■ 상온에서 보관
- [0185] ■ 유효 기간: 1년
- [0186] 3. 세척 버퍼 용액: Dulbeccos PBS에서 0.05% Tween 20.
- [0187] ■ 0.5 mL의 Tween 20, Fisher BP337, 또는 동등 제품
- [0188] ■ 100mL 10X D-PBS, pH 7.2 내지 7.4
- [0189] ■ 1L 이하의 충분한 양의 GenPur H<sub>2</sub>O (또는 동급 제품)
- [0190] ■ pH 7.2  $\pm$  0.1 까지
- [0191] ■ 상온에서 보관
- [0192] ■ 유효 기간: 6개월
- [0193] ■ 분석 당 필요량 (4 플레이트): 2리터
- [0194] 4. PBST:
- [0195] ■ 500mL 1X PBS pH 7.4 (Gibco, catalog# 10010-023)
- [0196] ■ 0.3 mL의 Tween 20, Fisher BP337, 또는 동등 제품
- [0197] ■ 상온에서 보관
- [0198] ■ 유효 기간: 6개월
- [0199] ■ 분석 당 필요량 (4 플레이트): 100mL

- [0200] 5. 블로킹 용액 (block solution): PBST 용액에서의 10% 탈지 분유
- [0201] ■ 20g 블롯팅 등급 블록, Bio-Rad 170-6404, 또는 동등 제품
- [0202] ■ 200mL PBST
- [0203] ■ 4°C에서 보관
- [0204] ■ 유효 기간: 0일
- [0205] ■ 분석 당 필요량 (4 플레이트): 200mL
- [0206] 6. SFRV 항원:
- [0207] ■ 감염되지 않은 SF 또는 SF+ 세포 배양 상등액을 0.2 마이크론 필터 (Thermo cat 456-0020)로 여과한다. 이러한 맥락에서, "감염되지 않은 SF 또는 SF+ 세포 배양 상등액"은 배양된 SF 또는 SF+ 세포의 상등액을 의미하며, 여기서 상기 세포는 바콜로바이러스에는 감염되지 않지만, SFRV에 감염된다.
- [0208] 또한, 본 명세서에서 기술된 세포의 맥락에서, 용어 "SF"는 용어 "Sf"와 동일하고, 용어 "SF+"는 "Sf+"와 동일하고, "SF9"는 "Sf9"와 각각 동일하다.
- [0209] ■ 여과액을 30% 수크로오스 층에 로딩하여 4°C에서 28,000 내지 34,000 rpm으로 2 내지 4시간 동안 원심분리한다.
- [0210] ■ 원심분리 후, 상등액을 조심스럽게 흡입하고, 펠렛을 pH 7.4의 NaCl-트리스-EDTA 버퍼에 현탁시킨다.
- [0211] ■ 이것이 반-정제된 항원이다.
- [0212] ■ 단백질 농도는 분광광도법으로 추정되며, 단백질은 분취하여 추후 사용할 때까지 -70°C에서 동결시켰다.
- [0213] 7. 2차 항원: 염소 항-돼지 IgG h+1 HRP Conjugated. Bethyl Labs Cat. No. A100-105P, 4°C±3.0°C에서 보관됨.
- [0214] 8. 기질: SureBlue TMB 1-Component Microwell Peroxidase Substrate.
- [0215] Kirkgaard and Perry Laboratories Cat No. 52-00-01 또는 동등 제품. 기질은 4°C±3.0°C에서 보관하고 25°C±2.0°C에서 사전 배양하고, 25°C±3.0°C에서 사용할 것이다.
- [0216] 9. 정지 용액: TMB 정지 용액. Kirkgaard and Perry Laboratories Cat No. 50-85-04 또는 동등 제품. 상온에서 보관됨.
- [0217] C. 절차
- [0218] 1. 상기 B1에 열거된 제조법을 사용하여 코팅 버퍼를 준비한다.
- [0219] 2. 버퍼 코팅시 SFRV 항원을 250ng/웰로 희석한다. 항원을 10회 반전시켜서 섞는다. 250ng/100 $\mu$ l (즉, 2.5 $\mu$ g/ml = 250ng/웰)로 코팅한다.
- [0220] 3. 희석된 SFRV 항원 100 $\mu$ l를 모든 웰에 첨가하고,
- [0221] 4. 플레이트 뚜껑으로 테스트 플레이트를 밀봉하고 4°C에서 밤새 배양하고, 방해물 최소화하기 위해 냉장고 맨 아래 부분에 둔다.
- [0222] 다음날
- [0223] 5. 오직 현재 분석에 대한 블로킹 용액을 충분히 준비한다. 4 플레이트용 200mL 블록을 권장한다. 필요할 때까지 4°C에서 보관한다.
- [0224] 6. 울트라워시 플러스 마이크로타이더 플레이트 워셔, 또는 이와 동등한 제품을 사용하여 세척 버퍼로 테스트 플레이트를 5회 씻는다.
- [0225] 7. 테스트 플레이트의 모든 웰에 블로킹 용액 100 $\mu$ l. 테스트 플레이트를 덮고 37°C±2.0°C에서 1.0시간 동안 배양한다.
- [0226] 8. 블로킹 배양 동안, 시험 혈청 샘플을 s-블록의 블록에서 1:100으로 희석한다. 구강액의 경우, 샘플을 블록에

서 1:2로 희석한다. 각 샘플은 개별적으로 테스트된다. 동일한 방식으로 양성 및 음성 대조군을 희석한다.

- [0227] 9. 테스트 플레이트(들)를 1X회 세척한다. 마지막 세척 후에 플레이트를 페이퍼 타월 위에서 부드럽게 두드린다.
- [0228] 10. 미리 희석시킨 테스트 샘플을 각 플레이트(들)에 웰 당 100 $\mu$ l 첨가한다. 웰이 피펫 팁과의 접촉하지 않도록 한다. 각 테스트 샘플 사이에 팁 변경.
- [0229] 테스트 플레이트(들)를 덮고 혈청 샘플을 37 $^{\circ}$ C에서 1.0시간 동안 배양한다. 구강액의 경우 샘플을 4 $^{\circ}$ C $\pm$ 2.0 $^{\circ}$ C에서 16.0시간 동안 배양한다.
- [0230] 11. 테스트 플레이트(들)를 세척하기 직전에, 냉장고에서 2차 항체 바이알을 꺼내고 블록에서 1:10,000으로 희석한다. 1:10,000 희석을 달성하기 위해 연속 희석법 (serial dilution)을 권장한다 (4 희석). 희석된 항체를 10회 반전시켜서 섞는다.
- [0231] 12. 테스트 플레이트(들)를 5회 세척한다.
- [0232] 13. 희석된 감지용 항체(detection antibody)를 테스트 플레이트(들)의 모든 웰에 100 $\mu$ l 첨가한다. 테스트 플레이트(들)를 덮고 혈청 샘플을 37 $^{\circ}$ C $\pm$ 2.0 $^{\circ}$ C에서 1.0시간 동안 배양한다.
- [0233] 14. 즉시 SureBlue TMB 1-Component Microwell Peroxidase Substrate를 냉장고 (4 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ C)에서 꺼내고 갈색 또는 불투명한 고밀도 폴리에틸렌 (HDPE) 용기에 적절한 양을 옮기고 25 $^{\circ}$ C $\pm$ 2.0 $^{\circ}$ C에서 1시간 $\pm$ 15분 동안 배양한다 (벤치탑).
- [0234] 15. 테스트 플레이트(들)를 5회 세척한다. 마지막 세척 후에 플레이트를 페이퍼 타월 위에서 부드럽게 두드린다. 플레이트(들)를 세척하는 동안 플레이트 리더를 켜는 것을 권장한다.
- [0235] 16. 기질 100 $\mu$ l를 테스트 플레이트(들)의 모든 웰에 첨가한다.
- [0236] 17. 25 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 배양한다.
- [0237] 18. 100 $\mu$ l 정지 용액을 모든 웰에 첨가하여 반응을 정지시킨다.
- [0238] 19. 450nm에서 흡광도를 측정한다.
- [0239] D. 수락 기준 / 결과
- [0240] ■ 양성 대조군: SFRV/SRFV G 당단백질로 과다면역된 돼지로부터의 혈청 (또는 구강액, 각각)
- [0241] ■ 순수한 돼지 혈청 (또는 구강액, 각각) 또는 SFRV 항원에 대한 반응이 미미한 백신 접종되지 않은 돼지로부터의 혈청 (또는 구강액, 각각)

[0242] **실시예 4:**

[0243] **반-정제된 람다바이러스의 생산, 사이즈 배제 크로마토그래피 (SEC), 실시간 PCR (Real Time PCR), SEC 분획의 전자 현미경 검사, 및 ELISA**

[0244] **반-정제된 람다바이러스의 생산:**

[0245] 컬럼에 로딩하기 전, 중공 섬유 여과를 사용하여 5리터에서 800mL까지 농축된, SfrV로 감염된 Sf+ 곤충 세포의 세포 배양 상등액 (40mL)을 1.2 $\mu$ m 시린지 필터로 여과하였으므로, 반-정제된 람다바이러스를 생산하였다. 결과 여과액은 이 실시예에 따른 "반-정제된 람다바이러스"이다.

[0246] **사이즈 배제 크로마토그래피 (SEC):**

[0247] 사이즈 배제 크로마토그래피는 1mL/분의 유속에서 HiPrep 26/60 Sephacryl S300HR 컬럼 (GE Healthcare Bio-Sciences)을 갖는 AKTA 익스플로러 상에서 등용매 조건을 사용하여 수행하였다. 컬럼을 1.5 컬럼 부피의 버퍼 (1X 인산염 완충 실란, pH 7.4, Gibco)로 평형을 만든 다음, (i)에 따라 제조된 반-정제된 람다바이러스의 정제된 샘플 (약 5% 컬럼 부피)을 주입하였다. 1.5 컬럼 부피의 버퍼에 대해 1.0mL/분의 유속에서 분리가 일어났고, 전체 분리 단계를 걸친 주입 시간으로부터 분획 (8mL)을 수집하였다. 컬럼으로부터의 단백질의 용출을 280nm에서의 UV 흡수로 모니터링하였다 (도 6).

[0248] 분획은 TCA/아세트 침전을 사용하여 피크 분획을 농축한 후 4 내지 12% SDS-PAGE (Thermo Fisher)로 분석하였다. 간단히, 각 분획 1mL를 TCA (200  $\mu$ l)로 얼음에서 1시간 동안 침전시켰다. 샘플을 20,000 xg에서 2

분간 원심분리하고, 상등액을 제거하였다. 분획을 500  $\mu$ l의 얼음처럼 차가운 아세톤으로 세척하고 볼텍싱 (vortexing)하여 섞은 후 20,000 xg에서 2분간 원심분리하였다. 원심분리 및 아세톤 단계를 총 3회의 아세톤 세척에 대해 반복하였다. 펠렛을 20분간 건조시키고, 20 $\mu$ l의 겔 로딩 버퍼에 현탁시키고, 겔 상에 로딩하였다. 겔을 Imperial proteins stain (Thermo Fisher)을 사용하여 1시간 동안 염색하고 탈이온수에서 3시간 이상 탈색시켰다. 겔 분석 후, 분획의 단백질 농도는 표준으로써 소 혈청 알부민을 사용하여 BCA 분석 (Thermo Fisher)에 의해 결정하였다.

[0249] **실시간 PCR:**

[0250] 실시간 PCR을 위한 하기의 방법 및 서열을 사용하여 (i)의 반-정제된 랩도바이러스 (여과액) 및 (ii)의 SEC에 의해 수집된 분획에서의 SfrV RNA의 존재를 검출/정량화하였다:

[0251] **프라이머/프로브/지-블록 대조군:**

이름	서열	계놈 위치*
Rhab_qPCR-F	서열 번호 25	5584-5603
Rhab_qPCR-R	서열 번호 26	5654-5672 (RC)
Rhab_qPCR-PR (FAM)	서열 번호 27	5624-5646 (RC)
Rhab_gBlock	서열 번호 28	5565-5690

[0252]

[0253] \* GenBank Reference strain: KF947078에 기초한 계놈 위치. 모든 서열이 SfrV 당단백질을 인코딩하는 부위를 목표로 한다.

[0254] **사이클 조건:**

[0255] 50 $^{\circ}$ C에서 10분간 1 사이클

[0256] 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 1 사이클

[0257] 95 $^{\circ}$ C에서 15초간 40 사이클.

[0258] 57 $^{\circ}$ C에서 15초간 \*\*데이터 수집 (FAM)

[0259] **수행한 단계의 간단한 설명:**

[0260] 증폭은 제안된 제조업체가 제안하는 프로토콜에 따라 BioRad iTaq Universal Probes One-Step 키트 (Cat # 172-5141)를 사용하여 수행한다. 프라이머는 25 $\mu$ l 반응에서 0.4 $\mu$ M의 최종 농도로 첨가하는 반면, 프로브는 0.16 $\mu$ M의 최종 농도로 첨가한다. 각각의 실험에서, 표준 곡선은 예상된 앰플리콘 (amplicon)에 상응하는 합성 이중 가닥 지-블록 (IDT) 서열을 구성하였다. 반응은 다음 조건 하에서 CFX96 실시간 PCR 검출 시스템 (BioRad)을 사용하여 수행하였다: 50 $^{\circ}$ C에서 10분간 초기 역전사, 이어서 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 초기 변성, 이어서 40 사이클의 95 $^{\circ}$ C에서 15초간 변성 및 어닐링 및 57 $^{\circ}$ C에서 15초간 연장과 함께 FAM 채널로 데이터 수집. 광학 데이터는 CFX Manager 소프트웨어 (버전 2.1, BioRad)를 사용하여 분석 하였다. 실행은 표준 곡선의 일관성, 0.99를 초과하는 r 제곱 값 및 80 내지 120% 사이로 계산된 효율에 근거하여 유효하다고 간주되었다. 각 측정에 대해, 사이클 임계 (Ct) 측정 모드에서 회귀 설정 (regression setting)을 사용하여 임계선 (threshold line)이 자동으로 계산되었다. 기저선 빼기 (baseline subtraction)는 기저선 빼기 모드를 사용하여 자동으로 수행되었다.

[0261] 실시간 PCR의 결과는 도 7에 나타난다.

[0262] **도 7:**

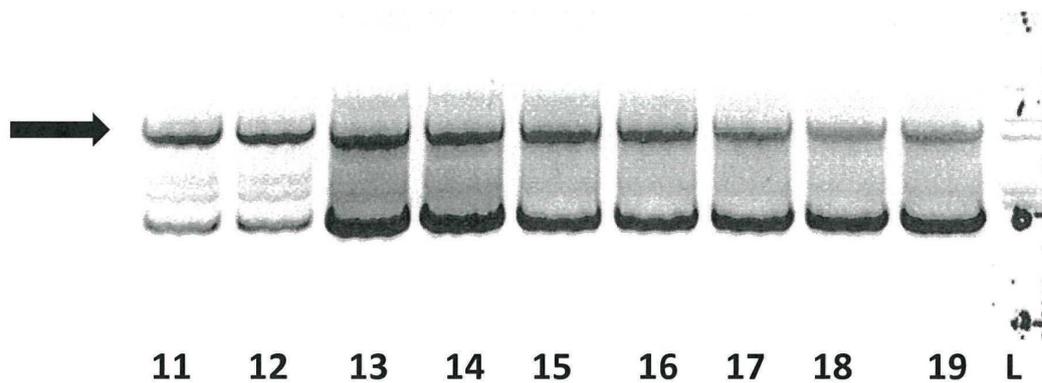
[0263] 컬럼 1은 웰 번호를 나타낸다. 컬럼 2는 이 실시간 PCR에 사용된 특정 프로브에 연결된 형광 물질 6-카복시플루오레세인 (FAM)을 보여준다. 컬럼 3은 사이즈 배제 크로마토그래피 (분획 A11, A12, B1, B5, B12 및 C6)로부터 유도된 SfrV 항원의 분획 또는 표준 곡선을 생성하는데 사용된 공지된 양의 SfrV 특이적 핵산을 갖는 표준 (웰 7 내지 14)을 나타낸다. 웰 15는 음성 대조군 (템플릿 없음)으로 제공되고 웰 16은 포획에 의한 분류 (SEC) 전에 농축 SfrV 항원을 함유하는 양성 대조군으로서 제공된다.

- [0264] 정량 사이클 (Cq)은 형광이 검출되는 사이클이다. 낮은 Cq 값은 샘플의 특정 표적의 더 높은 카피 수를 나타낸다. 이 데이터는 컬럼 4에 나타난다. 추정된 게놈 카피 수는 서열 정량화 (SQ)로 컬럼 5에 표시되며 mL 당 게놈 카피 수를 보여준다.
- [0265] 데이터는 출발 물질이 SfRV 특이적인 게놈 카피/mL (웰 16) 6 로그를 가지며, 유사하게 분획 A11 및 A12는 6 로그의 게놈 카피/mL를 갖는 것을 나타낸다. 이 두 분획은 꼬리 끝부분 분획 B1과 함께 대다수 SfRV 바이러스성 입자/비리온 및 바이러스 유사 입자 (VLPs)를 함유해야 한다. 다른 분획 B5, B12 및 C6은 SEC 내 하위 바이러스성 입자를 함유해야 하며, 따라서 바이러스성 RNA가 있는 경우 그 양은 더 적어야 한다.
- [0266] **전자 현미경 검사:**
- [0267] (ii)의 SEC에 의해 수집된 분획을 전자 현미경 검사를 위해 2.5% 인산 텅스텐산 (PTA)으로 3분간 염색하였다 (음성 염색). 분획 A1 및 A12 (도 6 참조)에서 SfRV의 바이러스성 입자로 추정되는 약 30 내지 35 nm의 입자가 관찰되었다.
- [0268] **ELISA:**
- [0269] ELISA는 실시예 2에 기술된 바와 같이 수행하였으며, 실시예 3에 기술된 물질 및 방법을 사용하였으며, 차이점은 "SFRV 항원" (실시예 3의 목차 B. 6.) 대신에 (i)의 반-정제된 랩도바이러스 (여과액) 및 (ii)의 SEC에 의해 수집한 분획 A11, A12, 및 B1을 사용하였고, 각각을 코팅 버퍼에서 100  $\mu$ l에서 250 ng의 농도로 희석시킨 후, 100  $\mu$ l의 상기 항원을 웰 상에 코팅하였다는 것이다.
- [0270] 시험 혈청 샘플로서 실험용 백신으로 면역된 동물의 혈청을 사용하였으며, 상기 백신은 SfRV에 감염된 배양된 곤충 세포에서 바칼로바이러스 발현 시스템에 의해 생성된 재조합 단백질을 포함한다. 실험용 백신 투여로부터 28일 후 동물로부터 채취한 혈액으로부터 혈청을 얻었다.
- [0271] 음성 대조군으로서, 각각 면역되지 않은 동물에 상응하는 혈청을 사용하였다.
- [0272] ELISA의 결과는 도 8에 나타난다.
- [0273] ELISA 플레이트는 반-정제된 SfRV (패널 A), 사이즈 배제 분획 A11 (패널 B), A12 (패널 C) 및 B1 (패널 D)를 포함하는 4가지 다른 항원으로 코팅하였다. 플레이트를 음성 대조군 동물로부터의 혈청 (역삼각형) 또는 SfRV를 함유하는 실험용 백신을 투여한 동물로부터의 28일차 혈청 (원형)으로 프로빙하였다.
- [0274] 결과는 백신 접종된 동물로부터의 혈청이 코팅된 항원에 반응한 반면, 음성 대조군 혈청은 최소 반응을 했다는 것을 보여준다. 더욱이, 백신 접종된 동물은 증가된 OD 값에 의해 입증되는 바와 같이 분획 A11, A12 및 B1 (패널 B, C 및 D)로 코팅된 웰에서 강하게 반응하였고, 반정제된 SfRV (패널 A)와 비교하여 반응은 이들 분획과 더 백백한 균집을 이루었다. 이것은 코팅된 항원에 대한 더 강한 인식 및 보다 구체적인 반응을 나타낸다 (분획 A11, A12 및 B1).
- [0275] **서열 목록:**
- [0276] 서열 번호 1은 SFRV G 단백질의 서열에 상응하고,
- [0277] 서열 번호 2는 절단된 SFRV G 단백질의 서열에 상응하고,
- [0278] 서열 번호 3은 N-말단 벨리틴 서열을 갖는 절단된 SFRV G 단백질의 서열에 상응하고,
- [0279] 서열 번호 4는 변형을 갖는 서열 번호 1 (6x His 태그를 포함)에 상응하고,
- [0280] 서열 번호 5는 변형을 갖는 서열 번호 2 (6x His 태그를 포함)에 상응하고,
- [0281] 서열 번호 6은 변형을 갖는 서열 번호 3 (6x His 태그를 포함)에 상응하고,
- [0282] 서열 번호 7은 SFRV N 단백질의 서열에 상응하고,
- [0283] 서열 번호 8은 변형을 갖는 서열 번호 7 (6x His 태그를 포함)에 상응하고,
- [0284] 서열 번호 9는 서열 번호 1을 인코딩하는 서열에 상응하고,
- [0285] 서열 번호 10은 서열 번호 2를 인코딩하는 서열에 상응하고,
- [0286] 서열 번호 11은 서열 번호 3을 인코딩하는 서열에 상응하고,

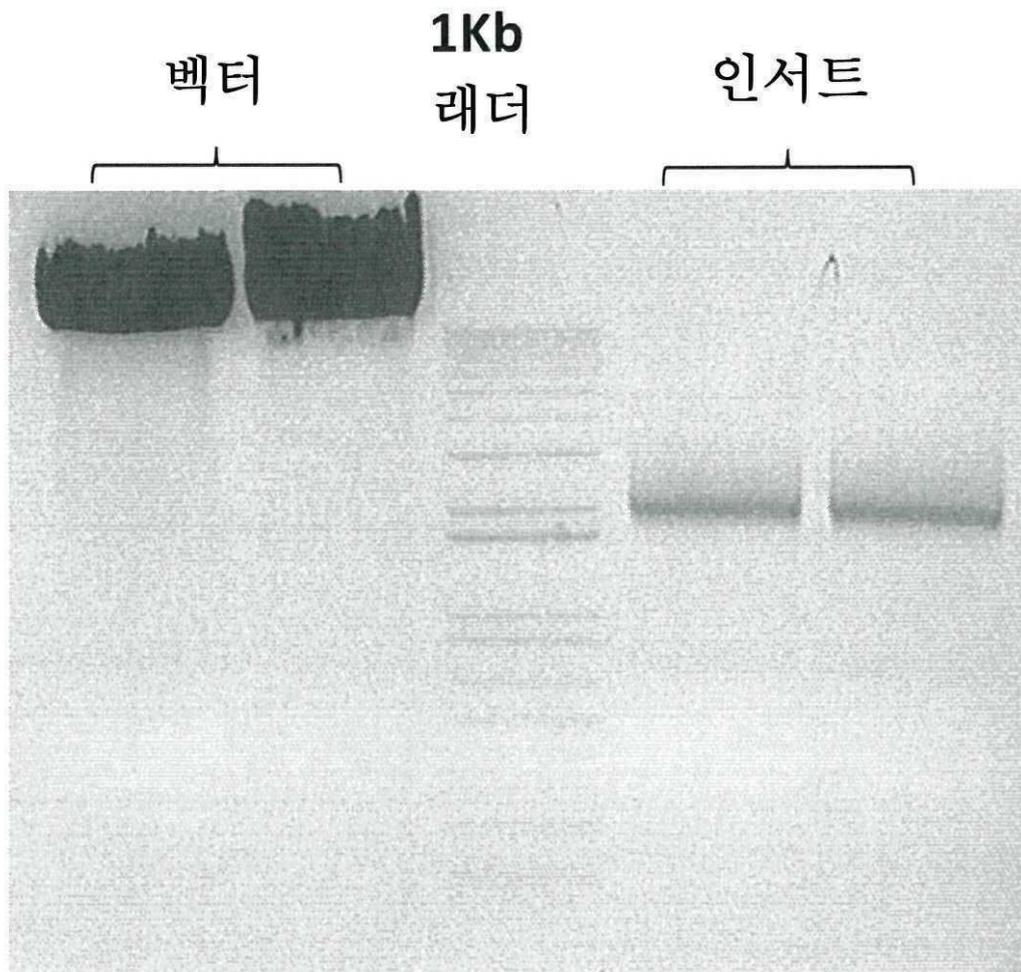
- [0287] 서열 번호 12는 서열 번호 4를 인코딩하는 서열에 상응하고,
- [0288] 서열 번호 13은 서열 번호 5를 인코딩하는 서열에 상응하고,
- [0289] 서열 번호 14는 서열 번호 6을 인코딩하는 서열에 상응하고,
- [0290] 서열 번호 15는 서열 번호 7을 인코딩하는 서열에 상응하고,
- [0291] 서열 번호 16은 서열 번호 8을 인코딩하는 서열에 상응하고,
- [0292] 서열 번호 17은 서열 번호 12 또는 서열 번호 13을 구성하기 위한 정방향 프라이머에 상응하고,
- [0293] 서열 번호 18은 서열 번호 12 또는 서열 번호 14을 구성하기 위한 역방향 프라이머에 상응하고,
- [0294] 서열 번호 19는 서열 번호 13을 구성하기 위한 역방향 프라이머에 상응하고,
- [0295] 서열 번호 20은 서열 번호 14를 구성하기 위한 정방향 프라이머에 상응하고,
- [0296] 서열 번호 21은 서열 번호 16을 구성하기 위한 정방향 프라이머에 상응하고,
- [0297] 서열 번호 22는 서열 번호 16을 구성하기 위한 역방향 프라이머에 상응하고,
- [0298] 서열 번호 23은 PCV2 ORF2 단백질의 서열에 상응하고,
- [0299] 서열 번호 24는 헤마글루티닌 H5 단백질 (인플루엔자 바이러스)의 서열에 상응한다.

**도면**

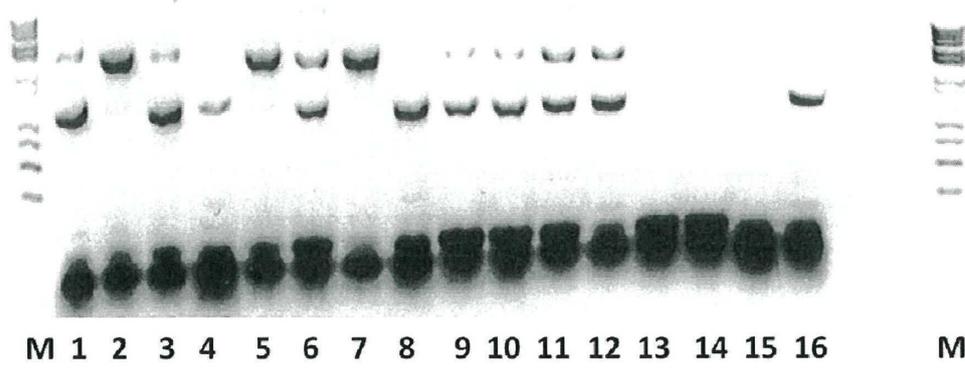
**도면1**



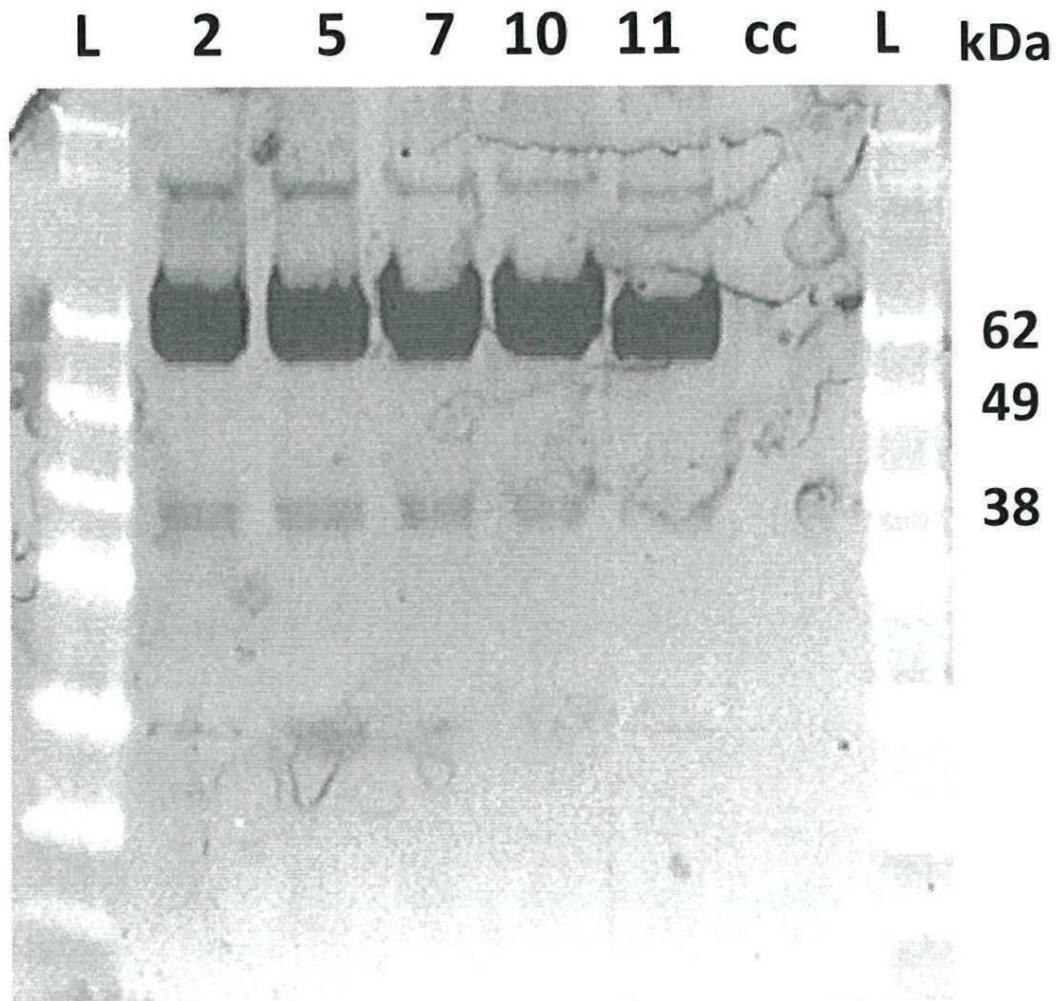
도면2



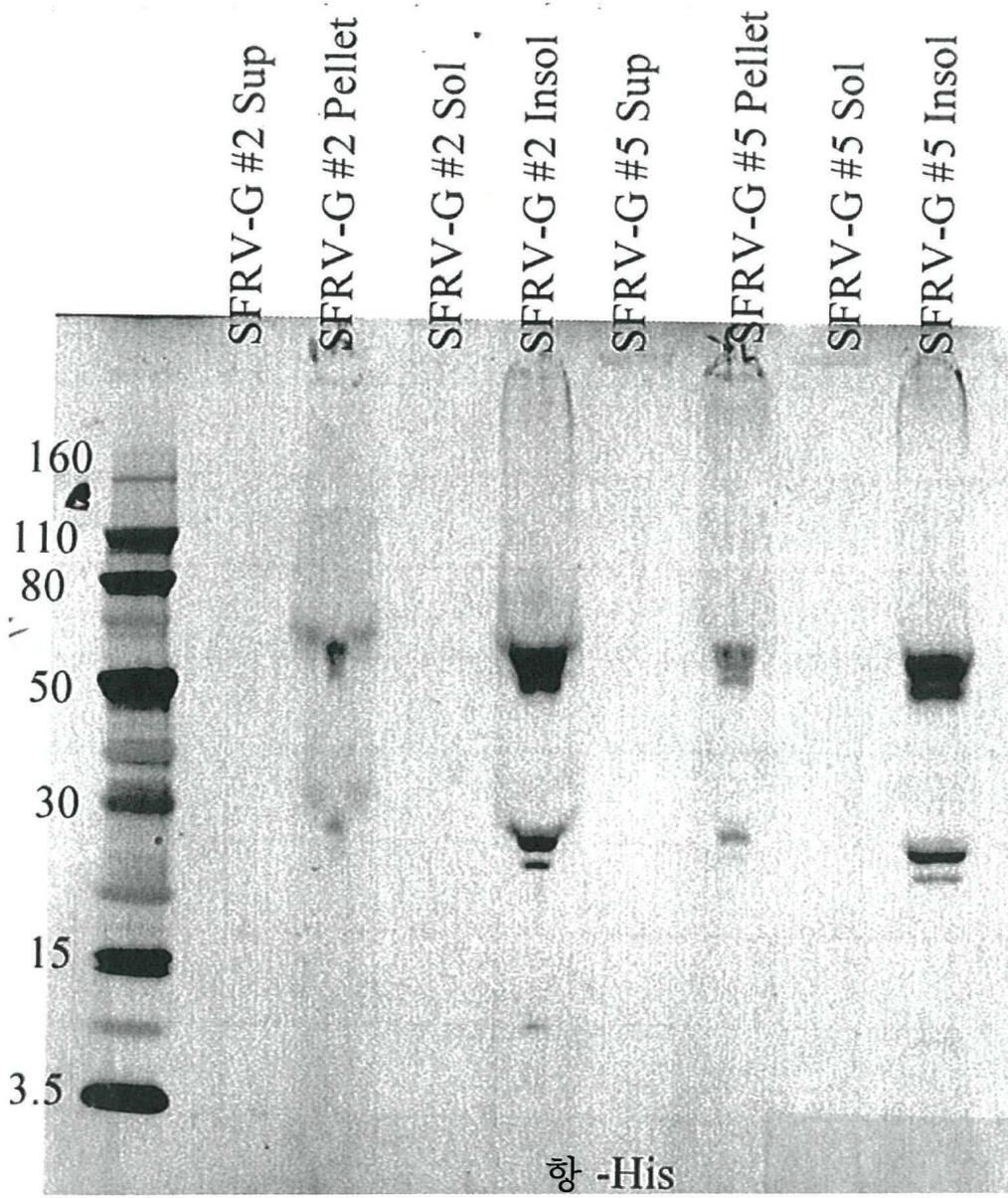
도면3



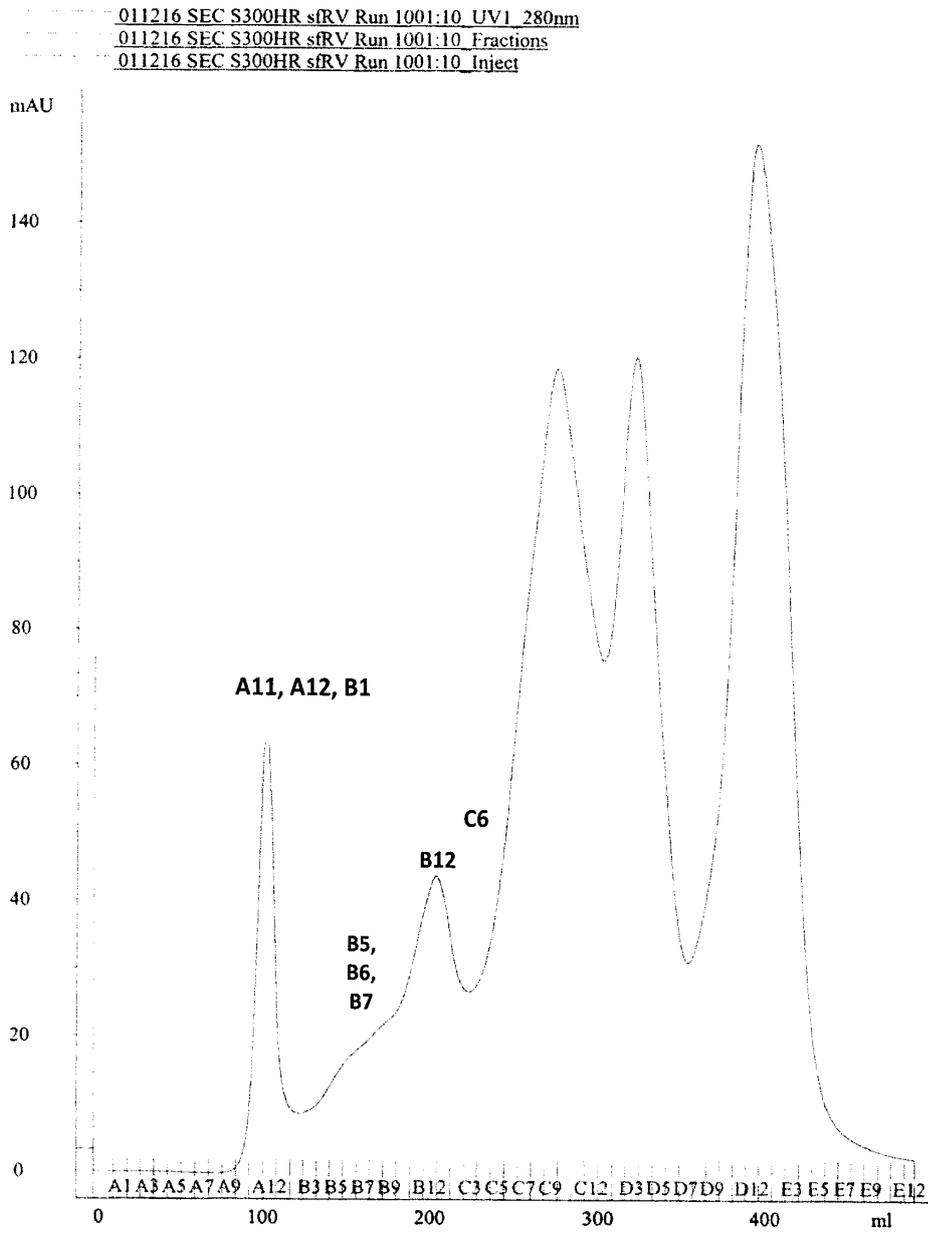
도면4



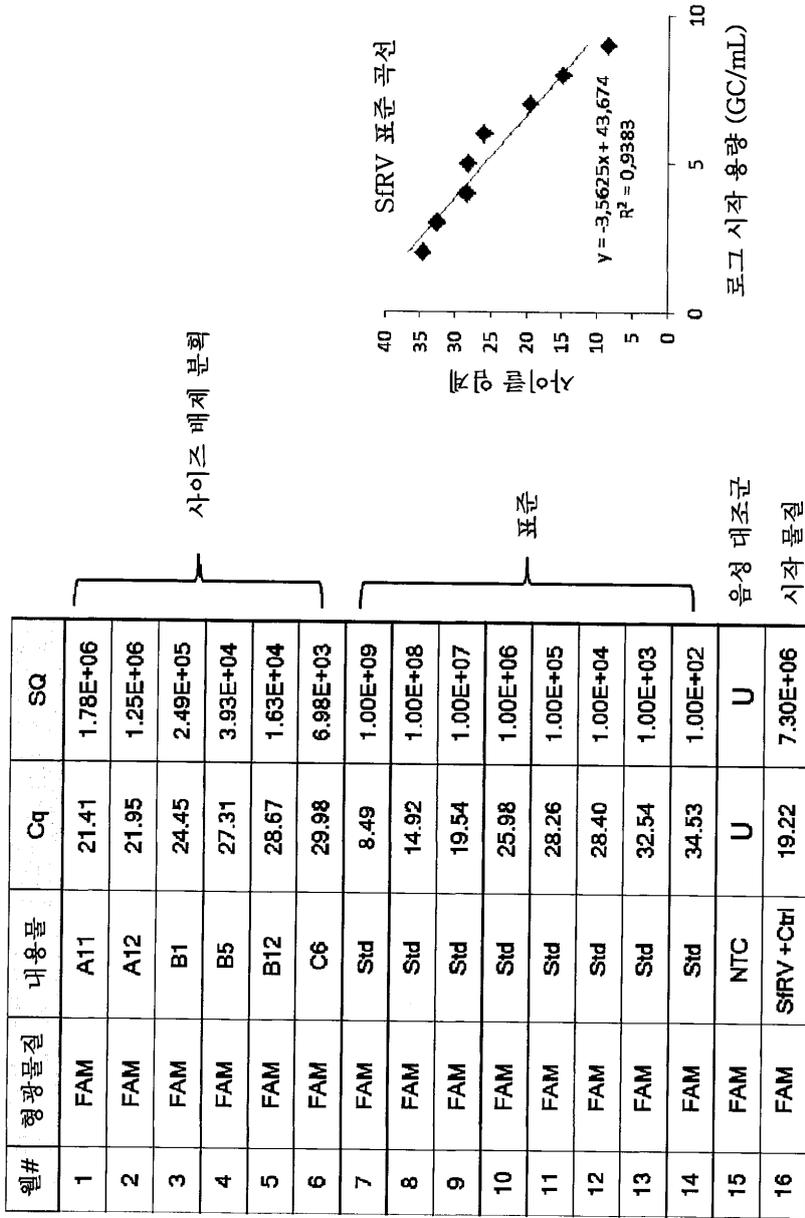
도면5



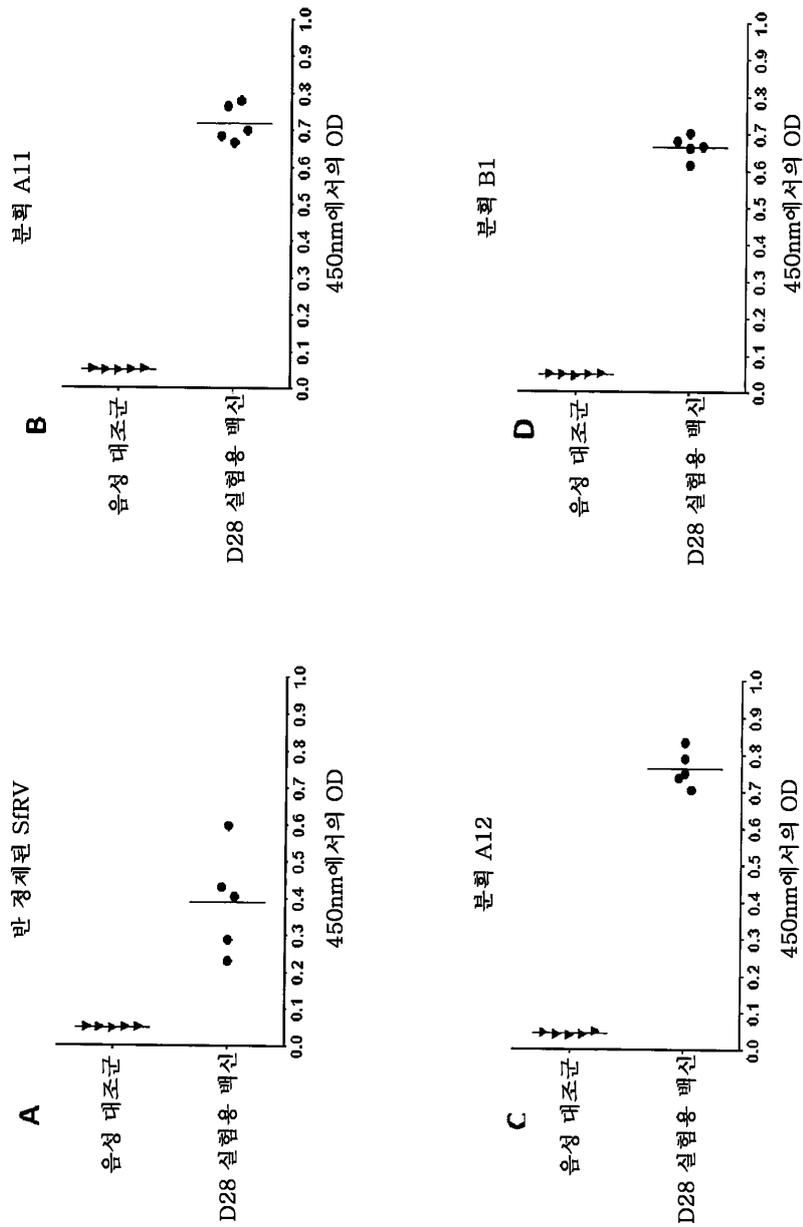
도면6



도면7



도면8



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

<120> MARKER SYSTEM, IN PARTICULAR FOR BACULOVIRUS-EXPRESSED SUBUNIT ANTIGENS

<130> P10-0168

<150> 62/128,744

<151> 2015-03-05

<160> 28

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 610

<212> PRT

<213> SFRV

<400> 1

Met Val Phe Leu Ser Leu Ser Thr Ile Ile Phe Ile Leu Ser Leu Arg

1                    5                    10                    15

Ala Val Thr Cys Ser Asn Pro Leu Ser Tyr Pro Asn Gly Ile Leu Thr

20                    25                    30

Asn Asn Ser Thr His Asn His Pro Leu Ser Asp Phe Tyr Ile Phe Tyr

35                    40                    45

Glu Asn Ser Ser Leu Thr Tyr Thr Gln Phe Pro Val Ala Pro Asp Cys

50                    55                    60

Ser Ser Ile Leu Asp Thr Arg Asp Glu Gln Tyr Pro Thr Thr Val Thr

65                    70                    75                    80

Leu Trp Lys Val Asp Gln Glu Ser Gln Ala Glu Trp Gly Leu Leu Leu

85                    90                    95

Trp Gln Glu Arg Ile Asp Thr Thr Cys Ser Trp Asn Phe Trp Gly Asn

100                    105                    110

Tyr Lys Gly Ser Ile Val Ser Lys Ser Ser Val Pro Leu Lys Asp Ile

115                    120                    125

Pro Ser Gly Ser Ala Arg Asn Gly Tyr Trp Ala Leu Ser Asn Asp Glu

130                    135                    140

Val Gln Glu Ile Asp His Val Pro Tyr Asn Leu Arg Tyr Tyr Cys Tyr

145                    150                    155                    160

Trp Cys Arg Asn Glu Tyr Pro Gly Ser Phe Tyr Met Arg Tyr Val Lys

165                    170                    175

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

180                    185                    190

Gly Ser Trp Val His Glu Leu Asp Asn Leu Trp Gly Asp Gln Met Arg

195                    200                    205

Tyr Leu Val Ile Arg Arg Phe Gly Gly Glu Ser Ser Cys Pro Leu Lys  
 210 215 220  
 Ile Tyr Asp Val Arg Ala Gly Val Leu Ser Lys Ser Arg Ser Asn Phe  
 225 230 235 240  
 Ile Leu Val Ser Leu Pro Ser Leu Asn Leu Gln Phe Ser Val Ser Leu  
 245 250 255  
 Glu Ser Thr Glu Thr Lys Cys Ser Phe Gly Asp Lys Thr Tyr Asp Ile  
 260 265 270  
 Val Gln Ser Met Gly Gly Tyr Leu Leu Ser Ile Asp Ile Gly Asn Ala  
 275 280 285  
 Asn Trp Arg Gly Pro Trp Asp Pro Thr Pro Gln His Pro Gly Arg Glu  
 290 295 300  
 Arg Arg Ser Ile Met Glu Phe Pro Asp Gln Thr Ser Phe Arg Tyr Asn  
 305 310 315 320  
 Gln Phe Ile Asn Tyr His Ser Ser Pro Arg His Lys Arg His Asp Gln  
 325 330 335  
 Glu Phe Glu Phe Pro Leu Ser Leu Lys Ser Ser Tyr Asp Tyr Ala Gln  
 340 345 350  
 Phe Arg Tyr Glu Gln Asn Phe Ile Ile Arg Gln Ile Asn Lys Asn Phe  
 355 360 365  
 Gly Leu Leu Gln Lys Ser Ile Cys Asp Ile Gln Phe Ser Lys Trp Gln  
 370 375 380  
 Asn Leu Ser Pro Pro Asn Leu Ala Met Lys Ile Ala His Tyr Val Thr  
 385 390 395 400  
 Gly Ser Ile His Ser Ile Gly Gly Val His His Gly Ser Tyr Ser Ile  
 405 410 415  
 Gln Arg Thr Glu Lys Ser Ile Thr Lys Val Asn Leu Val Phe Pro Ile  
 420 425 430  
 Val Ile Val His Gly Met Tyr Lys Cys Gln Arg Glu Pro Ser Lys Glu  
 435 440 445  
 Val Val Trp Ala Glu Pro Val Thr Gly Ile Leu Phe Lys Ser Pro Ile

450                      455                      460  
 Pro Thr His Phe Ser Leu Ser Ser Ser Trp Leu Pro Gly Val Asn Gly

465                      470                      475                      480  
 Ser Ser Ile Val Pro Leu Thr Gly Gln Ile Leu Leu Pro Glu Ile Thr

                            485                      490                      495  
 Met Asp His Leu Glu Val Val Gln Gln Val Glu Ala Lys Met Val Lys

                            500                      505                      510  
 Ser Met Tyr Thr Asn Val Glu Leu Phe Gly Ser Thr Glu Glu Phe Gln

                            515                      520                      525  
 Arg Tyr Gln Thr Gln Gly Ile Thr Ser Asp Glu Gln Ser Asn Thr Val

                            530                      535                      540  
 Asn Pro Trp Ile Gly Leu Leu Ile His Gly Gly Val Ser Ile Ala Thr

545                      550                      555                      560  
 Gly Ile Leu Val Ala Leu Leu Ile Pro Ser Ile Leu Lys Leu Phe Arg

                            565                      570                      575  
 His Ile Ile Glu Lys Gly Glu Ala Ser Leu Glu Glu Arg Leu His Leu

                            580                      585                      590  
 Arg Glu Thr Ser Arg Lys Glu Phe Val Lys Val Arg Gly Lys Pro Trp

                            595                      600                      605  
 Gly Val

610

<210> 2

<211> 550

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of a truncated SFRV G protein

<400> 2

Met Val Phe Leu Ser Leu Ser Thr Ile Ile Phe Ile Leu Ser Leu Arg  
 1                      5                      10                      15

Ala Val Thr Cys Ser Asn Pro Leu Ser Tyr Pro Asn Gly Ile Leu Thr  
                             20                      25                      30

Asn Asn Ser Thr His Asn His Pro Leu Ser Asp Phe Tyr Ile Phe Tyr  
 35 40 45  
 Glu Asn Ser Ser Leu Thr Tyr Thr Gln Phe Pro Val Ala Pro Asp Cys  
 50 55 60  
 Ser Ser Ile Leu Asp Thr Arg Asp Glu Gln Tyr Pro Thr Thr Val Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Trp Lys Val Asp Gln Glu Ser Gln Ala Glu Trp Gly Leu Leu Leu  
 85 90 95  
 Trp Gln Glu Arg Ile Asp Thr Thr Cys Ser Trp Asn Phe Trp Gly Asn  
 100 105 110  
 Tyr Lys Gly Ser Ile Val Ser Lys Ser Ser Val Pro Leu Lys Asp Ile  
 115 120 125  
 Pro Ser Gly Ser Ala Arg Asn Gly Tyr Trp Ala Leu Ser Asn Asp Glu  
 130 135 140  
 Val Gln Glu Ile Asp His Val Pro Tyr Asn Leu Arg Tyr Tyr Cys Tyr  
 145 150 155 160  
 Trp Cys Arg Asn Glu Tyr Pro Gly Ser Phe Tyr Met Arg Tyr Val Lys  
 165 170 175  
 Lys Val Arg Ile Ile Arg Asn Pro Asp Gly Ser Ile Lys Thr Pro Arg  
 180 185 190  
 Gly Ser Trp Val His Glu Leu Asp Asn Leu Trp Gly Asp Gln Met Arg  
 195 200 205  
 Tyr Leu Val Ile Arg Arg Phe Gly Gly Glu Ser Ser Cys Pro Leu Lys  
 210 215 220  
 Ile Tyr Asp Val Arg Ala Gly Val Leu Ser Lys Ser Arg Ser Asn Phe  
 225 230 235 240  
 Ile Leu Val Ser Leu Pro Ser Leu Asn Leu Gln Phe Ser Val Ser Leu  
 245 250 255  
 Glu Ser Thr Glu Thr Lys Cys Ser Phe Gly Asp Lys Thr Tyr Asp Ile  
 260 265 270  
 Val Gln Ser Met Gly Gly Tyr Leu Leu Ser Ile Asp Ile Gly Asn Ala



Arg Tyr Gln Thr Gln Gly Ile Thr Ser Asp Glu Gln Ser Asn Thr Val  
 530 535 540

Asn Pro Trp Ile Gly Leu  
 545 550

<210> 3

<211> 618

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of a truncated SFRV G protein with N-terminal melittin  
 sequence

<400> 3

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile  
 1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala Asn Pro Leu Ser Tyr Pro Asn Gly Asn Pro Leu  
 20 25 30

Ser Tyr Pro Asn Gly Ile Leu Thr Asn Asn Ser Thr His Asn His Pro  
 35 40 45

Leu Ser Asp Phe Tyr Ile Phe Tyr Glu Asn Ser Ser Leu Thr Tyr Thr  
 50 55 60

Gln Phe Pro Val Ala Pro Asp Cys Ser Ser Ile Leu Asp Thr Arg Asp  
 65 70 75 80

Glu Gln Tyr Pro Thr Thr Val Thr Leu Trp Lys Val Asp Gln Glu Ser  
 85 90 95

Gln Ala Glu Trp Gly Leu Leu Leu Trp Gln Glu Arg Ile Asp Thr Thr  
 100 105 110

Cys Ser Trp Asn Phe Trp Gly Asn Tyr Lys Gly Ser Ile Val Ser Lys  
 115 120 125

Ser Ser Val Pro Leu Lys Asp Ile Pro Ser Gly Ser Ala Arg Asn Gly  
 130 135 140

Tyr Trp Ala Leu Ser Asn Asp Glu Val Gln Glu Ile Asp His Val Pro  
 145 150 155 160

Tyr Asn Leu Arg Tyr Tyr Cys Tyr Trp Cys Arg Asn Glu Tyr Pro Gly



Val His His Gly Ser Tyr Ser Ile Gln Arg Thr Glu Lys Ser Ile Thr  
 420 425 430

Lys Val Asn Leu Val Phe Pro Ile Val Ile Val His Gly Met Tyr Lys  
 435 440 445

Cys Gln Arg Glu Pro Ser Lys Glu Val Val Trp Ala Glu Pro Val Thr  
 450 455 460

Gly Ile Leu Phe Lys Ser Pro Ile Pro Thr His Phe Ser Leu Ser Ser  
 465 470 475 480

Ser Trp Leu Pro Gly Val Asn Gly Ser Ser Ile Val Pro Leu Thr Gly  
 485 490 495

Gln Ile Leu Leu Pro Glu Ile Thr Met Asp His Leu Glu Val Val Gln  
 500 505 510

Gln Val Glu Ala Lys Met Val Lys Ser Met Tyr Thr Asn Val Glu Leu  
 515 520 525

Phe Gly Ser Thr Glu Glu Phe Gln Arg Tyr Gln Thr Gln Gly Ile Thr  
 530 535 540

Ser Asp Glu Gln Ser Asn Thr Val Asn Pro Trp Ile Gly Leu Leu Ile  
 545 550 555 560

His Gly Gly Val Ser Ile Ala Thr Gly Ile Leu Val Ala Leu Leu Ile  
 565 570 575

Pro Ser Ile Leu Lys Leu Phe Arg His Ile Ile Glu Lys Gly Glu Ala  
 580 585 590

Ser Leu Glu Glu Arg Leu His Leu Arg Glu Thr Ser Arg Lys Glu Phe  
 595 600 605

Val Lys Val Arg Gly Lys Pro Trp Gly Val  
 610 615

<210> 4

<211> 623

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO:1 with modifications (including 6x His tag)

<400> 4

Met Val Phe Leu Ser Leu Ser Thr Ile Ile Phe Ile Leu Ser Leu Arg  
 1 5 10 15  
 Ala Val Thr Cys Ser Asn Pro Leu Ser Tyr Pro Asn Gly Ile Leu Thr  
 20 25 30  
 Asn Asn Ser Thr His Asn His Pro Leu Ser Asp Phe Tyr Ile Phe Tyr  
 35 40 45  
  
 Glu Asn Ser Ser Leu Thr Tyr Thr Gln Phe Pro Val Ala Pro Asp Cys  
 50 55 60  
 Ser Ser Ile Leu Asp Thr Arg Asp Glu Gln Tyr Pro Thr Thr Val Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Trp Lys Val Asp Gln Glu Ser Gln Ala Glu Trp Gly Leu Leu Leu  
 85 90 95  
 Trp Gln Glu Arg Ile Asp Thr Thr Cys Ser Trp Asn Phe Trp Gly Asn  
 100 105 110  
  
 Tyr Lys Gly Ser Ile Val Ser Lys Ser Ser Val Pro Leu Lys Asp Ile  
 115 120 125  
 Pro Ser Gly Ser Ala Arg Asn Gly Tyr Trp Ala Leu Ser Asn Asp Glu  
 130 135 140  
 Val Gln Glu Ile Asp His Val Pro Tyr Asn Leu Arg Tyr Tyr Cys Tyr  
 145 150 155 160  
 Trp Cys Arg Asn Glu Tyr Pro Gly Ser Phe Tyr Met Arg Tyr Val Lys  
 165 170 175  
  
 Lys Val Arg Ile Ile Arg Asn Pro Asp Gly Ser Ile Lys Thr Pro Arg  
 180 185 190  
 Gly Ser Trp Val His Glu Leu Asp Asn Leu Trp Gly Asp Gln Met Arg  
 195 200 205  
 Tyr Leu Val Ile Arg Arg Phe Gly Gly Glu Ser Ser Cys Pro Leu Lys  
 210 215 220  
 Ile Tyr Asp Val Arg Ala Gly Val Leu Ser Lys Ser Arg Ser Asn Phe  
 225 230 235 240

Ile Leu Val Ser Leu Pro Ser Leu Asn Leu Gln Phe Ser Val Ser Leu  
 245 250 255  
 Glu Ser Thr Glu Thr Lys Cys Ser Phe Gly Asp Lys Thr Tyr Asp Ile  
 260 265 270  
 Val Gln Ser Met Gly Gly Tyr Leu Leu Ser Ile Asp Ile Gly Asn Ala  
 275 280 285  
 Asn Trp Arg Gly Pro Trp Asp Pro Thr Pro Gln His Pro Gly Arg Glu  
 290 295 300  
  
 Arg Arg Ser Ile Met Glu Phe Pro Asp Gln Thr Ser Phe Arg Tyr Asn  
 305 310 315 320  
 Gln Phe Ile Asn Tyr His Ser Ser Pro Arg His Lys Arg His Asp Gln  
 325 330 335  
 Glu Phe Glu Phe Pro Leu Ser Leu Lys Ser Ser Tyr Asp Tyr Ala Gln  
 340 345 350  
 Phe Arg Tyr Glu Gln Asn Phe Ile Ile Arg Gln Ile Asn Lys Asn Phe  
 355 360 365  
  
 Gly Leu Leu Gln Lys Ser Ile Cys Asp Ile Gln Phe Ser Lys Trp Gln  
 370 375 380  
 Asn Leu Ser Pro Pro Asn Leu Ala Met Lys Ile Ala His Tyr Val Thr  
 385 390 395 400  
 Gly Ser Ile His Ser Ile Gly Gly Val His His Gly Ser Tyr Ser Ile  
 405 410 415  
 Gln Arg Thr Glu Lys Ser Ile Thr Lys Val Asn Leu Val Phe Pro Ile  
 420 425 430  
  
 Val Ile Val His Gly Met Tyr Lys Cys Gln Arg Glu Pro Ser Lys Glu  
 435 440 445  
 Val Val Trp Ala Glu Pro Val Thr Gly Ile Leu Phe Lys Ser Pro Ile  
 450 455 460  
 Pro Thr His Phe Ser Leu Ser Ser Ser Trp Leu Pro Gly Val Asn Gly  
 465 470 475 480  
 Ser Ser Ile Val Pro Leu Thr Gly Gln Ile Leu Leu Pro Glu Ile Thr

485 490 495

Met Asp His Leu Glu Val Val Gln Gln Val Glu Ala Lys Met Val Lys

500 505 510

Ser Met Tyr Thr Asn Val Glu Leu Phe Gly Ser Thr Glu Glu Phe Gln

515 520 525

Arg Tyr Gln Thr Gln Gly Ile Thr Ser Asp Glu Gln Ser Asn Thr Val

530 535 540

Asn Pro Trp Ile Gly Leu Leu Ile His Gly Gly Val Ser Ile Ala Thr

545 550 555 560

Gly Ile Leu Val Ala Leu Leu Ile Pro Ser Ile Leu Lys Leu Phe Arg

565 570 575

His Ile Ile Glu Lys Gly Glu Ala Ser Leu Glu Glu Arg Leu His Leu

580 585 590

Arg Glu Thr Ser Arg Lys Glu Phe Val Lys Val Arg Gly Lys Pro Trp

595 600 605

Gly Val Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly His His His His His His

610 615 620

<210> 5

<211> 563

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO:2 with modifications (including 6x His tag)

<400> 5

Met Val Phe Leu Ser Leu Ser Thr Ile Ile Phe Ile Leu Ser Leu Arg

1 5 10 15

Ala Val Thr Cys Ser Asn Pro Leu Ser Tyr Pro Asn Gly Ile Leu Thr

20 25 30

Asn Asn Ser Thr His Asn His Pro Leu Ser Asp Phe Tyr Ile Phe Tyr

35 40 45

Glu Asn Ser Ser Leu Thr Tyr Thr Gln Phe Pro Val Ala Pro Asp Cys

50 55 60





His His His

<210> 6

<211> 631

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO:3 with modifications (including 6x His tag)

<400> 6

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile

1                    5                    10                    15

Ser Tyr Ile Tyr Ala Asn Pro Leu Ser Tyr Pro Asn Gly Asn Pro Leu

                  20                    25                    30

Ser Tyr Pro Asn Gly Ile Leu Thr Asn Asn Ser Thr His Asn His Pro

                  35                    40                    45

Leu Ser Asp Phe Tyr Ile Phe Tyr Glu Asn Ser Ser Leu Thr Tyr Thr

                  50                    55                    60

Gln Phe Pro Val Ala Pro Asp Cys Ser Ser Ile Leu Asp Thr Arg Asp

65                    70                    75                    80

Glu Gln Tyr Pro Thr Thr Val Thr Leu Trp Lys Val Asp Gln Glu Ser

                  85                    90                    95

Gln Ala Glu Trp Gly Leu Leu Leu Trp Gln Glu Arg Ile Asp Thr Thr

                  100                    105                    110

Cys Ser Trp Asn Phe Trp Gly Asn Tyr Lys Gly Ser Ile Val Ser Lys

                  115                    120                    125

Ser Ser Val Pro Leu Lys Asp Ile Pro Ser Gly Ser Ala Arg Asn Gly

                  130                    135                    140

Tyr Trp Ala Leu Ser Asn Asp Glu Val Gln Glu Ile Asp His Val Pro

145                    150                    155                    160

Tyr Asn Leu Arg Tyr Tyr Cys Tyr Trp Cys Arg Asn Glu Tyr Pro Gly

                  165                    170                    175

Ser Phe Tyr Met Arg Tyr Val Lys Lys Val Arg Ile Ile Arg Asn Pro

                  180                    185                    190

Asp Gly Ser Ile Lys Thr Pro Arg Gly Ser Trp Val His Glu Leu Asp  
 195 200 205  
 Asn Leu Trp Gly Asp Gln Met Arg Tyr Leu Val Ile Arg Arg Phe Gly  
 210 215 220  
 Gly Glu Ser Ser Cys Pro Leu Lys Ile Tyr Asp Val Arg Ala Gly Val  
 225 230 235 240  
  
 Leu Ser Lys Ser Arg Ser Asn Phe Ile Leu Val Ser Leu Pro Ser Leu  
 245 250 255  
 Asn Leu Gln Phe Ser Val Ser Leu Glu Ser Thr Glu Thr Lys Cys Ser  
 260 265 270  
 Phe Gly Asp Lys Thr Tyr Asp Ile Val Gln Ser Met Gly Gly Tyr Leu  
 275 280 285  
 Leu Ser Ile Asp Ile Gly Asn Ala Asn Trp Arg Gly Pro Trp Asp Pro  
 290 295 300  
  
 Thr Pro Gln His Pro Gly Arg Glu Arg Arg Ser Ile Met Glu Phe Pro  
 305 310 315 320  
 Asp Gln Thr Ser Phe Arg Tyr Asn Gln Phe Ile Asn Tyr His Ser Ser  
 325 330 335  
 Pro Arg His Lys Arg His Asp Gln Glu Phe Glu Phe Pro Leu Ser Leu  
 340 345 350  
 Lys Ser Ser Tyr Asp Tyr Ala Gln Phe Arg Tyr Glu Gln Asn Phe Ile  
 355 360 365  
  
 Ile Arg Gln Ile Asn Lys Asn Phe Gly Leu Leu Gln Lys Ser Ile Cys  
 370 375 380  
 Asp Ile Gln Phe Ser Lys Trp Gln Asn Leu Ser Pro Pro Asn Leu Ala  
 385 390 395 400  
 Met Lys Ile Ala His Tyr Val Thr Gly Ser Ile His Ser Ile Gly Gly  
 405 410 415  
 Val His His Gly Ser Tyr Ser Ile Gln Arg Thr Glu Lys Ser Ile Thr  
 420 425 430  
  
 Lys Val Asn Leu Val Phe Pro Ile Val Ile Val His Gly Met Tyr Lys



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



Met Val Asp Leu Asn Pro Glu Asp Leu

515 520

<210> 8

<211> 534

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO:7 with modifications (including 6x His tag)

<400> 8

Met Thr Gln Gly Thr Met Lys Pro Val Trp Glu Glu Leu Gly Thr Gly

1 5 10 15

Glu Thr Glu Phe Gln Gly Thr Val Asp Ile Pro Gly Arg Ser Leu Lys

20 25 30

Pro Glu Lys Thr Asp Trp Ser Val Asp Thr Cys Arg Glu Ile Ser Leu

35 40 45

Asn Leu Lys Leu Pro Gly Glu Ile Trp Gln Leu Ala His Gln Glu Thr

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr His Thr Ala Thr Glu Ile Val Leu Ser Met Ala Ser Leu Ile Phe

85 90 95

Lys Asp Lys Ala Lys Ala Pro Ile Asp Leu Ile Trp Asp Asp Ser Phe

100 105 110

Gln Ala Ser Pro Ser Glu Glu Cys Gly Phe Ser Val Val Gly Glu Thr

115 120 125

Pro Leu Val Ile Gly Gln His Pro Asp Asp Asp Asp Tyr Thr Leu Arg

130 135 140

Glu Asp Glu Glu Ser Ala Ala Met Asn Glu Glu Glu Lys Ile Gln Ala

145 150 155 160

Ala Leu Lys Thr Leu Gly Ile Gln Asp Thr Pro Val Asp Leu Lys Asp

165 170 175

Ala Ser Gly Ile Val Phe Glu Thr Lys Glu Asp Arg Glu Gln Arg Ile

180 185 190

Lys Asn Glu Lys Ala Leu His Val Glu Asp Asp Ile Asn Ala Leu Thr  
 195 200 205  
 Gln Ile Thr Lys Gln Phe Leu Phe Glu Tyr Ser Thr Gly Ser Leu Gln  
 210 215 220  
 Lys Phe Val Ala Lys Ala Thr Thr Ile Phe Ile Asp Asn Asn Ala Thr  
 225 230 235 240  
 Asn Gly Phe Thr Arg Leu His Leu His Ala Ile Arg Val Met Asn Phe  
 245 250 255  
 Ile Ala Leu Thr Met Leu Arg Lys Val Thr Lys Ser Asn Ala Gln Met  
 260 265 270  
 Ile Asn Ala Phe Leu Lys Glu Gln Tyr Lys Arg Asn Ile Ala Ser Leu  
 275 280 285  
 Ile Pro Gly Ala Leu Ser Ser Asp Phe Ala Pro Pro Ser Lys Ser Cys  
 290 295 300  
 Ile Asp Lys Leu Thr Ala Ile Ser Lys Asn Asp Pro Ala Val Ser Ser  
 305 310 315 320  
 Phe Phe Ala Lys Val Val Met Leu Asn Met Glu Glu Glu Arg Arg Asn  
 325 330 335  
 Pro Ser Leu Val Ala Cys Leu Gly Ala Ser Leu Leu Thr His Thr Thr  
 340 345 350  
 Trp Asn Gly Met Gly Ile Leu His Val Ile Phe Glu Val Cys Leu Phe  
 355 360 365  
 His Gln Ile Ser Trp Lys Arg Leu Val Thr Glu Ser Leu Thr Ser Leu  
 370 375 380  
 Thr Lys Met Ser Trp Gly Glu Val Ser Gln Phe Leu Ile Lys Tyr Gln  
 385 390 395 400  
 Ala Lys Gly Asn Pro Asp Pro Thr Val Ala Trp Ala Arg Ile Ile Asp  
 405 410 415  
 Asp Ser Tyr Phe Met Arg Leu Thr Ile Val Asn His Pro Thr Leu Ala  
 420 425 430  
 Ala Leu Leu Val Glu Ser Leu Ile Arg Ser Gln Lys Asp Asp Gly Ile



acgaaatgct catttggaga taagacatat gatattgtgc agagcatggg aggctatctc 840  
 ctctccatcg acataggtaa tgcgaactgg cgaggccctt gggatcctac ccctcagcat 900  
 ccgggtcgtg aaagaagatc aattatggag tttccggatc aaacatcttt cagatataac 960  
 caatttataa attatcactc atcccacaaga cacaagagac atgatcaaga atttgagttc 1020  
 cctctcagtc taaaatccag ttatgattat gctcaattta gatatgagca gaatttcac 1080  
 atccgacaga tcaataagaa ttttggatta ttacagaaga gcatttgtga tattcagttt 1140  
 tctaagtggc agaatctcag tccaccaat ctgtctatga aaattgccca ttatgicacc 1200

ggctctatcc actctatagg tgggtttcat catggatctt attcaattca aagaacggaa 1260  
 aaatccatta ctaaggtaaa tctgggtgtt cccattgtta ttgttcatgg aatgtataag 1320  
 tgccaaaggg aaccatccaa ggaggtgggt tgggcagaac ccgtcacagg gatcttattc 1380  
 aagtctccta ttccgactca tttctcacta agttcctctt ggctacctgg ggtaaatggt 1440  
 tcttctattg tcctctgac aggtcaaat ctctccctg aaatcacaat ggatcacttg 1500  
 gaggttgtag aacaggttga agcaaagatg gtcaaaagta tgtacacgaa ttagagttg 1560  
 ttggatcaa cagaggaatt tcaaagatac caaactcagg gaattacctc tgatgaacaa 1620

tcaaatacag taaatccttg gattgggctt ttgatacatg gtggagtgtc catagctact 1680  
 ggaatattag tagcactttt gatcccctca atcttaaaat tgttcagaca tataattgag 1740  
 aaaggggagg catcggttaga ggagaggttg catctgaggg aaacctcaag aaaagaattt 1800  
 gtcaaggtta ggggaaacc atggggtgtc 1830

<210> 10

<211> 1650

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence encoding SEQ ID NO:2

<400> 10

atggttttct taagtttacc aacgatcata ttatctctaa gcctccgggc tgtaacctgc 60  
 tccaatctc tctctatcc taatggcatt ttgactaaca actctactca caatcatccc 120

ctatcggact tttatatttt ttatgagaac agttccctta cctatactca attcctgtg 180  
 gccccagact gcctagtagt tctagatact agagatgagc agtatcccac cactgttact 240  
 ttgtggaagg ttgatcaaga atctcaagct gagggtggac tccttttatg gcaagagaga 300  
 attgacacca cttgtcctg gaacttctgg ggcaattaca aaggatccat tgatctaaa 360  
 tcctcagtag ctctaaagga tatcccatcg ggtagtcccc ggaatggata ttgggctttg 420  
 agcaatgatg aagttcaaga gattgatcat gtcccttaca acttgagata ttattgttac 480

tgggtcagaa atgaatatcc tgggagcttt tatatgagat atgtaaagaa agttcggatc 540  
  
 ataagaatc ctgatgggtc tataaagact cctagaggat cctgggttca tgagttggac 600  
 aacttgtggg gagatcagat gaggtatcta gttattcgaa gatttggggg agaacttagc 660  
 tgcctctta agatataatga tgtgagagca ggggttctgt caaaatctcg gtcaaacttc 720  
 atcttagtgt cccttcctc cttgaatttg cagttctctg taccacttga atccactgag 780  
 acgaaatgct catttggaga taagacatat gatattgtgc agagcatggg aggctatctc 840  
 ctctccatcg acataggtaa tgcgaactgg cgaggccctt gggatcctac ccctcagcat 900  
 cgggtcgtg aaagaagatc aattatggag tttccggatc aaacatcttt cagatataac 960  
  
 caattataa attatcactc atccccaaga cacaagagac atgatcaaga atttgagttc 1020  
 cctctcagtc taaaatccag ttatgattat gctcaattta gatagagca gaatttcac 1080  
 atccgacaga tcaataagaa ttttggatta ttacagaaga gcatttgtga tattcagttt 1140  
 tctaagtggc agaactcag tccaccaat cttgctatga aaatgcca ttatgtcacc 1200  
 ggctctatcc actctatagg tgggtttcat catggatctt attcaattca aagaacggaa 1260  
 aatccatta ctaaggtcaa tctggtgttt ccattgtta ttgttcatgg aatgtataag 1320  
 tgccaaaggg aaccatcaa ggaggtggtt tgggcagaac ccgtcacagg gatcttattc 1380  
  
 aagtctccta tccgactca tttctcacta agttcctctt ggctacctgg ggtaaatggt 1440  
 tcttctattg tcctctgac aggtcaaatt cttctcctg aaatcacaat ggatcacttg 1500  
 gaggttgtac aacaggttga agcaaatgag gtcaaaagta tgtacacgaa ttagagttg 1560  
 tttggatcaa cagaggaatt tcaaagatac caaactcagg gaattacctc tgatgaacaa 1620  
 tcaaatagag taaatccttg gattgggctt 1650  
  
 <210> 11  
 <211> 1854  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> sequence encoding SEQ ID NO:3  
 <400> 11  
  
 atgaaattct tagtcaacgt tgccttgtt tttatggctg tatacatttc ttacatctat 60  
  
 gccaatctc tctcctatcc taatggcaat cctctctcct atcctaatgg cattttgact 120  
 aacaactcta ctcaaatca tcccctatcg gacttttata tttttatga gaacagttcc 180  
 cttaactata ctcaattccc tgtggcccca gactgctcta gtattctaga tactagagat 240  
 gagcagtatc ccaccactgt tactttgtgg aaggttgatc aagaatctca agctgagtgg 300

ggactccttt tatggcaaga gagaattgac accacttgct cctggaactt ctggggcaat 360  
 tacaaaggat ccattgtatc taaatcctca gtacctctaa aggatatccc atcgggtagt 420  
 gcccggaatg gatattgggc tttgagcaat gatgaagttc aagagattga tcatgtcct 480  
  
 tacaacttga gatattattg ttactgggtc agaaatgaat atcctgggag cttttatag 540  
 agatatgtaa agaaagtctg gatcataaga aatcctgatg ggtctataaa gactcctaga 600  
 ggatcctggg ttcatgagtt ggacaacttg tggggagatc agatgaggta tctagttatt 660  
 cgaagatttg ggggagaatc tagctgccct cttaaagatat atgatgtgag agcaggggtt 720  
 ctgtcaaaat ctcggtcaaa cttcatctta gtgtcccttc cctccttgaa tttgcagttc 780  
 tctgtatcac ttgaatccac tgagacgaaa tgctcatttg gagataagac atatgatatt 840  
 gtgcagagca tgggaggcta tctcctctcc atcgacatag gtaatgcgaa ctggcgaggc 900  
  
 ccttgggata ctacccctca gcatccgggt cgtgaaagaa gatcaattat ggagtttccg 960  
 gatcaaacat ctttcagata taaccaattt ataaattatc actcatcccc aagacacaag 1020  
 agacatgata aagaatttga gttccctctc agtctaaaat ccagttatga ttatgctcaa 1080  
 tttagatatg agcagaattt catcatccga cagatcaata agaattttgg attattacag 1140  
 aagagcattt gtgatattca gttttctaag tggcagaatc tcagtcacc caatcttgct 1200  
 atgaaaattg cccattatgt caccggctct atccactcta taggtggtgt tcatcatgga 1260  
 tcttattcaa ttcaaagaac ggaaaaatcc attactaagg tcaatctggt gttteccatt 1320  
  
 gttattgttc atggaatgta taagtccaa aggaacat ccaaggaggt gtttgggca 1380  
 gaaccgctca cagggatctt attcaagtct cctattecga ctcatcttc actaagttec 1440  
 tcttggctac ctggggtaaa tggttcttct attgtccctc tgacaggtca aattcttctc 1500  
 cctgaaatca caatggatca cttggaggtt gtacaacagg ttgaagcaaa gatggtcaaa 1560  
 agtatgtaca cgaatgtaga gttgtttgga tcaacagagg aatttcaaag ataccaaact 1620  
 caggaatta cctctgatga acaatcaat acagtaaatc cttggattgg gcttttgata 1680  
 catggtggag tgtccatagc tactggaata ttagtagcac ttttgatccc ctcaatctta 1740  
  
 aaattgttca gacatataat tgagaaaggg gaggcacgt tagaggagag gttgcatctg 1800  
 agggaaacct caagaaaaga atttgtcaag gttaggggga aacctgggg tgtc 1854  
 <210> 12  
 <211> 1884  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> sequence encoding SEQ ID NO:4

<400> 12

gaattcatgg ttttcttaag tttatcaacg atcatattta tcctaagcct cgggctgta 60  
 acctgctcca atcctctctc ctatccta atggcattttga ctaacaactc tactcacaat 120  
 catcccctat cggactttta tattttttat gagaacagtt cccttaccta tactcaattc 180  
 cctgtggccc cagactgctc tagtattcta gatactagag atgagcagta tcccaccact 240  
  
 gttactttgt ggaaggttga tcaagaatct caagctgagt ggggactcct tttatggcaa 300  
 gagagaattg acaccacttg ctcttggaac tcttggggca attacaaagg atccattgta 360  
 tctaaatcct cagtacctc aaaggatata ccatcgggta gtgcccgaa tggatattgg 420  
 gctttgagca atgatgaagt tcaagagatt gatcatgtcc cttacaactt gagatattat 480  
 tgttactggt gcagaaatga atatcctggg agcttttata tgagatatgt aaagaaagt 540  
 cggatcataa gaaatcctga tgggtctata aagactccta gaggatcctg ggttcatgag 600  
 ttggacaact tgggggaga tcagatgagg tatctagtta ttcgaagatt tgggggagaa 660  
  
 tctagctgcc ctcttaagat atatgatgtg agagcagggg ttctgtcaa atctcggta 720  
 aacttcatct tagtgcctc tccctccttg aatttgagct tctctgtatc acttgaatec 780  
 actgagacga aatgctcatt tggagataag acatatgata ttgtgcagag catgggaggc 840  
 tatctcctc ccatcgacat aggtaatgag aactggcgag gcccttggga tectaccct 900  
 cagcatccgg gtctgaaag aagatcaatt atggagtctc cggatcaaac atctttcaga 960  
 tataaccaat ttataaatta tcaatcatcc ccaagacaca agagacatga tcaagaattt 1020  
 gatttccctc tcagtctaaa atccagttat gattatgctc aatttagata tgagcagaat 1080  
  
 ttcatcatcc gacagatcaa taagaatttt ggattattac agaagagcat ttgtgatatt 1140  
 cagttttcta agtggcagaa tctcagttca ccaatcttg ctatgaaaat tgccattat 1200  
 gtcaccggct ctatccactc tataggtggt gttcatcatg gatcttattc aattcaaaga 1260  
 acggaaaaat ccattactaa ggtcaatctg gtgtttcca ttgttattgt tcatggaatg 1320  
 tataagtgcc aaaggaacc atccaaggag gtggtttggg cagaaccctg cacagggatc 1380  
 ttattcaagt ctctattcc gactcatttc tactaagtt cctcttgct acctggggta 1440  
 aatggttctt ctattgtccc tctgacaggt caaattctc tccctgaaat cacaatggat 1500  
  
 cacttggagg ttgtacaaca ggttgaagca aagatggtca aaagtatga cacgaatgta 1560  
 gagttgtttg gatcaacaga ggaatttcaa agataccaaa ctgaggaat tacctctgat 1620  
 gaacaatcaa atacagtaaa tcttggatt gggcttttga tacaatggtg agtgtccata 1680  
 gctactggaa tattagtagc acttttgatc cctcaatct taaaattgtt cagacatata 1740  
 attgagaaag gggagcctc gtttagagg aggttgcatc tgagggaac ctcaagaaaa 1800

gaatttgta aggttagggg gaaacatgg ggtgtcgaaa acctgtattt tcagggccac 1860  
 catcaccatc accattaact gcag 1884

<210> 13

<211> 1704

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence encoding SEQ ID NO:5

<400> 13

gaattcatgg ttttcttaag tttatcaacg atcatattta tcctaagcct cgggctgta 60  
 acctgctcca atcctctctc ctatccta atggcattttga ctaacaactc tactcacaat 120  
 catcccctat cggactttta tattttttat gagaacagtt cccttaccta tactcaattc 180  
 cctgtggccc cagactgctc tagtattctc gatactagag atgagcagta tcccaccact 240  
 gttactttgt ggaaggttga tcaagaatct caagctgagt ggggactcct tttatggcaa 300  
 gagagaattg acaccacttg ctcttggaac ttctggggca attacaaagg atccattgta 360

tctaaatcct cagtacctct aaaggatata ccatcgggta gtgcccggaa tggatattgg 420  
 gctttgagca atgatgaagt tcaagagatt gatcatgtcc cttacaactt gagatattat 480  
 tgttactggt gcagaaatga atatctctgg agcttttata tgagatatgt aaagaaagtt 540  
 cggatcataa gaaatcctga tgggtctata aagactccta gaggatcctg ggttcatgag 600  
 ttggacaact tgtggggaga tcagatgagg tatctagtta ttcgaagatt tgggggagaa 660  
 tctagctgcc ctcttaagat atatgatgtg agagcagggg ttctgtcaaa atctcgggtca 720  
 aacttcatct tagtgcctct tccctccttg aatttgcagt tctctgtatc acttgaatcc 780

actgagacga aatgctcatt tggagataag acatatgata ttgtgcagag catgggaggc 840  
 tatctctctc ccatcgacat aggtaatgcg aactggcgag gcccttggga tctaccctc 900  
 cagcatccgg gtcgtgaaag aagatcaatt atggagtctc cggatcaaac atctttcaga 960  
 tataaccaat ttataaatta tcaatcatcc ccaagacaca agagacatga tcaagaattt 1020  
 gaggttccctc tcagtctaaa atccagttat gattatgctc aatttagata tgagcagaat 1080  
 ttcatcatcc gacagatcaa taagaatttt ggattattac agaagagcat ttgtgatatt 1140  
 cagttttcta agtggcagaa tctcagtcca cccaatcttg ctatgaaaat tgcccattat 1200

gtcaccggct ctatccactc tataggtggt gttcatcatg gatcttattc aattcaaaga 1260  
 acggaaaaat ccattactaa ggtcaatctg gtgttttccca ttgttattgt tcatggaatg 1320  
 tataagtgcc aaaggaacc atccaaggag gtggtttggg cagaaccctg cacagggatc 1380

ttattcaagt ctctattcc gactcatttc tcaactaagtt cctcttggct acctggggta 1440  
aatggttctt ctattgtccc tctgacaggt caaattcttc tccctgaaat cacaatggat 1500  
cacttggagg ttgtacaaca ggttgaagca aagatgggtca aaagtatgta cacgaatgta 1560  
gagttgtttg gatcaacaga ggaatttcaa agataccaaa ctcaggaat tacctctgat 1620

gaacaatcaa atacagtaaa tccttggatt gggcttgaaa acctgtatctc tcagggccac 1680  
catcaccate accattaact gcag 1704

<210> 14  
<211> 1908  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> sequence encoding SEQ ID NO:6  
<400> 14

gaattcatga aattcttagt caacgttgcc cttgttttta tggctgtata catttcttac 60  
atctatgcca atcctctctc ctatccta atggcaatctc tctctatcc taatggcatt 120  
ttgactaaca acctactca caatcatccc ctatcggact tttatatttt ttatgagaac 180  
agttccctta cctatactca attcctctgt gccccagact gctctagat tctagatact 240

agagatgagc agtateccac cactgttact ttgtggaagg ttgatcaaga atctcaagct 300  
gagtggggac tccttttatg gcaagagaga attgacacca cttgctcctg gaacttctgg 360  
ggcaattaca aaggatccat tgtatctaaa tcctcagtac ctctaaagga tatcccatcg 420  
ggtagtgccc ggaatggata ttgggctttg agcaatgatg aagttcaaga gattgatcat 480  
gtcccttaca acttgagata ttattgttac tggcgcagaa atgaatatcc tgggagcttt 540  
tatatgagat atgtaaagaa agttcggatc ataagaaatc ctgatgggtc tataaagact 600  
cctagaggat cciggggtca tgagttggac aacttgtggg gagatcagat gaggtatcta 660

gttattcgaa gatttggggg agaacttagc tgccctctta agatataatga tgtgagagca 720  
ggggttctgt caaaatctcg gtcaaacttc atcttagtgt ccttccctc cttgaatttg 780  
cagttctctg taccacttga atccactgag acgaaatgct catttggaga taagacatat 840  
gatattgtgc agagcatggg aggtatctc ctctccatcg acataggtaa tgccaactgg 900  
cgaggccctt gggatcctac ccctcagcat ccgggtcgtg aaagaagatc aattatggag 960  
tttccggatc aaacatcttt cagatataac caatttataa attatcactc atccccaaga 1020  
cacaagagac atgatcaaga atttgagttc cctctcagtc taaaatccag ttatgattat 1080

gctcaattta gatagagca gaatttcac atccgacaga tcaataagaa ttttggatta 1140

ttacagaaga gcatttgtga tattcagttt tctaagtggc agaatctcag tccaccaat 1200  
 cttgctatga aaattgccca ttatgtcacc ggctctatcc actctatagg tgggttcat 1260  
 catggatctt attcaattca aagaacggaa aaatccatta ctaaggtcaa tctgggtttt 1320  
 cccattgtta ttgttcatgg aatgtataag tgccaaaggg aaccatccaa ggagggtggt 1380  
 tgggcagaac ccgtcacagg gatcttattc aagtctccta ttccgactca tttctcacta 1440  
 agttcctctt ggctacctgg ggtaaatggt tcttctattg tccctctgac aggtcaaatt 1500  
  
 cttctccctg aaatcacaat ggatcacttg gaggttgtac aacaggttga agcaaagatg 1560  
 gtcaaaagta tgtacacgaa tgtagagttg tttggatcaa cagaggaatt tcaaagatac 1620  
 caaactcagg gaattacctc tgatgaacaa tcaaatacag taaatccttg gattgggctt 1680  
 ttgatacatg gtggagtgtc catagctact ggaatattag tagcactttt gatcccctca 1740  
 atcttaaat tgttcagaca tataattgag aaagggagg catcgttaga ggagaggttg 1800  
 catctgaggg aaacctcaag aaaagaattt gtcaaggtta gggggaacc atggggtgtc 1860  
 gaaaacctgt atttcaggg ccaccatcac catcaccatt aactgcag 1908

<210> 15

<211> 1563

<212> DNA

<213> SFRV

<400> 15

atgacacagg gaacatgaa gccagtatgg gaagaattgg ggacaggaga aacagagttc 60  
 caagggaccg tggacattcc agggagatct ctcaagccag aaaaaacaga ttggagtgtt 120  
 gatacatgtc gggagatcag tttaaatctg aagttacctg gtgaatatg gcaactggcc 180  
 catcaagaaa ccatcttcaa cagatctctt acatcttacc ctactgggta tgttccaaat 240  
 acacacacag ccacagaaat tgtactctcc atggcatcac taatcttcaa ggacaaggcc 300  
 aaagcaccta ttgatttgat ttgggatgac tcatttcaag ctagtccttc tgaggagtgt 360  
  
 gggttctccg ttgttgaga aactcattg gttatcggac aacaccgga tgatgatgac 420  
 tacacattga gagaagatga agaatcagcc gctatgaatg aggaagaaaa aatacaagca 480  
 gctctaaaaa ctttgggaat tcaagatact ccagtagacc tgaaggatgc atctggaatt 540  
 gtctttgaga caaaggagga cagagaacaa aggatcaaga atgagaaagc tctacatgta 600  
 gaggatgata tcaacgctct aactcagatt acaaaacaat tcttgtttga gtattccaca 660  
 ggctccctac agaaatttgt tgcaaaggct actactatct tcatagataa taatgctact 720  
 aacggcttca cccgtttgca tctccatgcc atcagagtca tgaacttcat tgctctaaca 780

atgcttagaa aggtaaccaa gtcaaatgcc cagatgatca atgcctttct gaaggagcaa 840  
 tacaagagaa atattgcctc cctaattccc ggcgccctct cctctgattt tgctcctccc 900  
 agtaagagct gcattgataa actgacagct atttctaaga atgacccggc agtcagtcca 960  
 ttctttgcaa aggttgatg gctcaacatg gaggaggaac ggagaaacce ttctctggtt 1020  
 gcttgctctg gggttcctc tctcaccac accacttga atggaatggg gattttacat 1080  
 gttatTTTTg aagtttGtct attccatcag attagctgga agaggttggT cacagagtcc 1140  
 ctgacctcac taacaaagat gtcatggggT gaagtcagtc aattcctcat caagtatcaa 1200

gcaaagggaa atcctgacct aacggttgcc tgggccagaa tcattgatga ttcttacttt 1260  
 atgagattaa ccatagtaaa tcatcccaca cttgctgcat tattagtgga atccctcata 1320  
 agatctcaga aagatgatgg aatcctgaat gccaaactggg ccatccaaca caggacacc 1380  
 atcaattatt atagggacgc tgccaagctt ctactgata agctcacagg acagactgct 1440  
 acagtccaag cccttaccaa tgaagccgct gatctagtta gaacaatgaa tgcaggacct 1500  
 tctagatacc acccaaggcc tagtacctt atcccatgg tagatctaaa cccggaagac 1560  
 tta 1563

<210> 16

<211> 1617

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence encoding SEQ ID NO:8

<400> 16

ggatccatga cacagggAAC catgaagcca gtatgggaag aattggggac aggagaaaca 60  
 gagttccaag ggaccgtgga cattccaggG agatctctca agccagaaaa aacagattgg 120  
 agtgttgata catgtcggga gatcagtTTa aatctgaagT tacctggtga aatatggcaa 180  
 ctggcccatc aagaaccat cttcaacaga tttcttacct tttacgtac tgggtatgTt 240  
 ccaaatacac acacagccac agaaattgta ctctccatgg catcactaat ctcaaggac 300  
 aaggccaaag cacctattga tttgatttgg gatgactcat ttcaagctag tcctctgag 360

gagtgtgggt tctccgttgt tggagaaact ccattggtta tcggacaaca cccgatgat 420  
 gatgactaca cattgagaga agatgaagaa tcagccgcta tgaatgagga agaaaaaata 480  
 caagcagctc taaaaacttt gggaattcaa gatactccag tagacctgaa ggatgcatct 540  
 ggaaattgtct ttgagacaaa ggaggacaga gaacaaagga tcaagaatga gaaagctcta 600  
 catgtagagg atgatatcaa cgctctaact cagattacaa aacaattctt gtttgagtat 660  
 tccacaggct ccctacagaa atttgttgca aaggctacta ctattttcat agataataat 720

gctactaacg gcttcacccg tttgcatctc catgcatca gagtcatgaa cttcattgct 780

ctaacaatgc ttagaaaggt aaccaagtca aatgccaga tgatcaatgc ctttctgaag 840

gagcaataca agagaaat atgcctcccta atccccggcg cctctcctc tgattttgct 900

cctcccagta agagctgcat tgataaactg acagctatct ctaagaatga cccggcagtc 960

agttcattct ttgcaaaggt tgtgatgctc aacatggagg aggaacggag aaacccttct 1020

ctggttgctt gtcttggggc ttccctctc acccacacca cttggaatgg aatggggatt 1080

ttacatgta ttttgaagt ttgtctattc catcagatta gctggaagag gttggtcaca 1140

gagtcctga cctcactaac aaagatgtca tggggtgaag tcagtcaatt cctcatcaag 1200

tatcaagca agggaaatcc tgaccaacg gttgcctggg ccagaatcat tgatgattct 1260

tactttatga gattaacat agtaaactc ccacacttg ctgcattatt agtggaatcc 1320

ctcataagat ctcaagaaga tgatggaatc ctgaatgcca actgggcat ccaacacagg 1380

gacaccatca attattatag ggacgtgcc aagcttctca ctgataagct cacaggacag 1440

actgctacag tccaagcct taccaatgaa gccgtgatc tagttagaac aatgaatgca 1500

ggacctcta gataccacc aaggctagt acccttatcc ccatggtaga tetaaacceg 1560

gaagacttag aaaacctgta ttttcagggc caccatcacc atcaccatta actgcag 1617

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer to construct SEQ ID NO:12 or SEQ ID NO:13

<400> 17

aaaaaagaat tcatggtttt ctttaag 26

<210> 18

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer to construct SEQ ID NO:12 or SEQ ID NO:14

<400> 18

tttttctgca gttaatggtg atggtgatgg tggccctgaa aatacaggtt ttcgacacc 60

catggt 66

<210> 19

<211> 68  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer to construct SEQ ID NO:13  
 <400> 19  
 ttttttctgc agttaatggt gatggtgatg gtggccctga aaatacaggt tttcaagccc 60  
 aatccaag 68  
 <210> 20  
 <211> 99  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> forward primer to construct SEQ ID NO:14  
 <400> 20  
 tatatagaat tcatgaaatt cttagtcaac gttgcccttg tttttatggt cgtatacatt 60  
 tcttacatct atgccaatcc tctctcctat cctaattggc 99  
  
 <210> 21  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> forward primer to construct SEQ ID NO:16  
 <400> 21  
 aaaaaaggat ccatgacaca gg 22  
 <210> 22  
 <211> 66  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer to construct SEQ ID NO:16  
 <400> 22  
 tttttctgca gttaatggtg atggtgatgg tggccctgaa aatacaggtt ttctaagtct 60  
 tccggg 66  
 <210> 23  
 <211>  
 > 233  
 <212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 23

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg  
 1                    5                    10                    15  
 Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro  
                   20                    25                    30  
 Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg  
                   35                    40                    45  
 Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr  
  
                   50                    55                    60  
 Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val  
 65                    70                    75                    80  
 Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr  
                   85                    90                    95  
 Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr  
                   100                    105                    110  
 Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn  
  
                   115                    120                    125  
 Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr  
                   130                    135                    140  
 Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr  
 145                    150                    155                    160  
 Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro  
                   165                    170                    175  
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn  
  
                   180                    185                    190  
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp  
                   195                    200                    205  
 Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe  
                   210                    215                    220  
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro  
 225                    230

<210> 24

<211> 552

<212> PRT

<213> Avian influenza virus

<400> 24

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val

1                    5                    10                    15  
 Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile

                  20                    25                    30  
 Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys

                  35                    40                    45  
 Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn

                  50                    55                    60  
 Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val

65                    70                    75                    80  
 Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn

                  85                    90                    95  
 Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu

                  100                    105                    110  
 Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Asn Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser

                  115                    120                    125  
 Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Ser Ser Ser Phe Phe

                  130                    135                    140  
 Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Ala Tyr Pro Thr Ile

145                    150                    155                    160  
 Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp

                  165                    170                    175  
 Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln

                  180                    185                    190  
 Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg

                  195                    200                    205

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Asn Gly  
 210 215 220  
 Arg Met Asp Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn  
 225 230 235 240  
 Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile  
 245 250 255  
 Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Val Glu Tyr Gly  
 260 265 270  
 Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser  
 275 280 285  
 Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys  
 290 295 300  
 Tyr Val Lys Ser Asn Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile  
 325 330 335  
 Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr  
 340 345 350  
 Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys  
 355 360 365  
 Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser  
 370 375 380  
 Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe  
 385 390 395 400  
 Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp  
 405 410 415  
 Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met  
 420 425 430  
 Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu  
 435 440 445  
 Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly



caacctccaa gtgatccatt gtg	23
<210> 28	
<211> 126	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 28	
cctggggtaa atggttcttc tattgtcct ctgacaggtc aaattcttct cctgaaatc	60
acaatggatc acttggaggt tgtacaacag gttgaagcaa agatgggtcaa aagtatgtac	120
acgaat	126