



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년12월05일  
(11) 등록번호 10-2474263  
(24) 등록일자 2022년11월30일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 7/00 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)  
A61K 39/135 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 7/00 (2013.01)  
A61K 39/12 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-0109597
- (22) 출원일자 2017년08월29일  
심사청구일자 2020년08월07일
- (65) 공개번호 10-2019-0023604
- (43) 공개일자 2019년03월08일
- (56) 선행기술조사문헌  
Virus Research 210 (2015) pp. 154-164.\*  
KR1020100064161 A  
KR1020140140158 A  
KR1020170050990 A  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
주식회사 옵티팜  
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명6로 63
- (72) 발명자  
한범구  
대전광역시 서구 둔산로 201, 102동 303호(둔산동, 국화아파트)  
오미경  
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명3로 31, 101동 922호(두산위브센티움)  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
김순용

전체 청구항 수 : 총 5 항

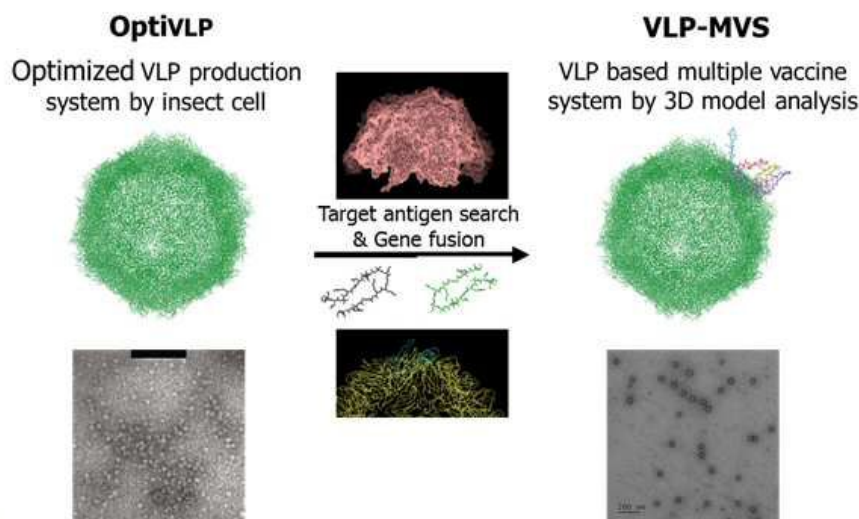
심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 바이러스 유사입자 기반의 복합백신

(57) 요약

본 발명은 PRRSV (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus) 또는 구제역바이러스 (Foot-and-mouth disease virus) 의 병원성 에피토프가 삽입된 재조합 PCV2 (Porcine circovirus type 2) 의 ORF2, 이를 이용한 복합 백신 조성물 및 이를 이용한 감염 질환 예방 방법에 관한 것이다. 본 발명의 재조합 PCV2 ORF2 를 이용하는 경우, 곤충 또는 대장균 세포에서 바이러스 유사 입자를 효과적으로 생산할 수 있고, 이는 2종 이상의 돼지 바이러스에 대하여 효과적으로 면역 효과를 유도할 수 있으므로, PCV2 기반의 돼지 복합 백신으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61K 39/135* (2013.01)

*C07K 14/005* (2013.01)

*C12N 2750/10023* (2013.01)

*C12N 2750/10034* (2013.01)

*C12N 2770/10023* (2013.01)

*C12N 2770/10034* (2013.01)

*C12N 2770/32123* (2013.01)

*C12N 2770/32134* (2013.01)

(72) 발명자

**최재방**

충청북도 청주시 청원구 오창읍 2산단로 160, 107  
동 302호(오창대성베르힐아파트)

**이시내**

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명3로 31,  
102동 416호(두산위브센티움)

**김현일**

서울특별시 성북구 아리랑로6길 30, 비동 101호(동  
선동5가, 문화연립)

**박철세**

충청북도 청주시 흥덕구 증안로 77, 210동 702호(  
북대동, 현대2차아파트)

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

PRRSV (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus) 또는 구제역 바이러스 (Foot-and-mouth virus)의 에피토프가 PCV2 (Porcine circovirus type 2) ORF2 아미노산 서열(NCBI 등록번호 FJ755686)의 61 내지 62 번 아미노산 사이, 85 내지 86 번 아미노산 사이, 130 내지 131 번 아미노산 사이, 190 내지 191 번 아미노산 사이로 이루어진 군에서 선택된 1종 부위에 삽입되고,

상기 PRRSV 에피토프는 서열번호 3 또는 4의 아미노산 서열로 표시되고,

상기 구제역 바이러스 에피토프는 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열로 표시되는,

제조합 PCV2 (Porcine circovirus type 2) ORF2 (Open Reading Frame 2).

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 제조합 PCV2 ORF2는 서열번호 18 내지 서열번호 30으로 이루어진 군에서 선택된 1종의 아미노산 서열인, 제조합 PCV2 (Porcine circovirus type 2) ORF2 (Open Reading Frame 2).

**청구항 4**

제1항의 제조합 PCV2 (Porcine circovirus type 2) ORF2 (Open Reading Frame 2) 가 도입된 세포.

**청구항 5**

제1항의 제조합 PCV2 (Porcine circovirus type 2) ORF2 (Open Reading Frame 2) 가 도입된 대장균.

**청구항 6**

제4항의 세포 또는 제5항의 대장균에서 생산된 바이러스 유사 입자.

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

본 발명은 PRRSV (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus) 또는 구제역바이러스 (Foot-and-mouth virus) 의 병원성 에피토프가 삽입된 제조합 PCV2 (Porcine circovirus type 2) ORF2, 이를 이용한 복합

[0001]

백신 조성물 및 이를 이용한 감염 질환 예방 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

- [0003] 바이러스 유사입자(Virus like particle, VLP)는 바이러스와 유사한 구조를 갖는 게놈이 제거된 입자로 자가 조립 (self-assembly)되는 것이 가장 큰 특징이며 차세대 백신으로 그 가능성을 높이 평가 받고 있다. 게놈이 없기 때문에 복제와 감염이 불가능하고, 크기가 작아 세포 내 침투가 용이하며, virion과 유사한 형태로 강력한 체액성 및 세포성 면역을 유도하는 것이 특징이다. VLP기반으로 인체에서는 HBV, HPV, HEV와 influenza에 대한 백신이 허가되어 판매되고 있으며 가축에서는 PCV2에 대한 예방백신이 개발되어 적용되고 있다.
- [0004] 돼지 썩코바이러스 2형(PCV2), 돼지생식기호흡기바이러스(PRRSV) 및 구제역 바이러스 (FMDV) 는 돼지에서 질병을 유발하는 대표적인 바이러스이다.
- [0005] PCV2 (Porcine Circovirus type2)는 원형의 단일 가닥 DNA 게놈을 함유하는 작은(17 nm) 정이십면체 비외피형 바이러스로서 지금까지 알려진 가장 작은 동물 바이러스 중 하나이다. PCV2 게놈의 길이는 약 1768 bp이며, 이 바이러스는 PCV1(Porcine Circovirus type1)과 대략 80%의 서열 동일성을 공유한다. 하지만 일반적으로 비-병독성인 PCV1과는 대조적으로, PCV2에 감염된 돼지는 통상적으로 이유 후 전신성 소모성 증후군 (PMWS; Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome)이라고 하는 증상을 나타낸다. PMWS는 임상적으로 소모 (wasting), 피부의 창백함, 수척함, 호흡 곤란, 설사, 황달을 보이는 것이 특징이다. PCV2 감염 돼지를 부검하는 동안, 미시적 병변 및 육안 병변이 다수의 조직 및 기관에서 또한 나타나는데, 림프 기관이 가장 흔한 병변 부위이다. PCV2 핵산 또는 항원의 양과 미시적 림프 병변의 중증도 간에 강한 상관관계가 관찰되었다. PCV2에 감염된 돼지의 사망률은 80%에 이르며, PMWS 외에도, PCV2는 가성 광견병 (pseudorabies), 돼지 생식기호흡기 증후군 (PRRS: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome), 글래서병 (Glasser's disease), 연쇄구균성 수막염 (streptococcal meningitis), 살모넬라증 (salmonellosis), 이유후 대장균증 (postweaning colibacillosis), 식이성간증 (dietetic hepatitis) 및 화농성 기관지폐렴 (suppurative bronchopneumonia)을 포함하는 다수의 다른 감염을 동반한다. 따라서, PCV2의 감염을 예방할 수 있는 백신 치료제에 대한 필요성이 매우 크다.
- [0006] 한편, PCV2의 ORF2 (Open Reading Frame 2) 유전자는 외피단백질 (capsid protein)을 암호화하는 것으로, 상기 ORF2에 의해 생성된 외피단백질은 바이러스 유사 입자(virus like particle)을 형성한다. 대략 30kDa의 분자량을 갖는 PCV2의 ORF2 단백질은 상기 ORF2 유전자를 포함하는 바이러스 벡터로 세포를 감염시켜, 이로부터 분리하는 방법을 통해 일반적으로 수득할 수 있다. 또한 발현된 ORF2 단백질은 자가 조립에 의해 자연적으로 바이러스 유사 입자 형태를 형성할 수 있으며 이를 통한 백신이 개발되어 양돈산업 분야에 적용되고 있다.
- [0007] 돼지생식기호흡기바이러스(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus; PRRSV)는 아테리비리데 (Arteriviridae)에 속하는 단일가닥 양성 RNA 게놈을 함유하는 45-80 nm의 구형의 바이러스이다. PRRSV 게놈은 약 15 kb 로 8개의 ORF (open reading frame)을 가지며, ORF1a와 ORF1b는 유전물질을 복제하는 효소가 암호화된 비구조 단백질과, ORF2~7까지 각각 바이러스의 외형을 이루는 6개의 구조 단백질 (GP2, GP3, GP4, E, M, N)로 구성되어 있다. PRRSV는 번식장애와 호흡기 질환이 복합적으로 나타나는 질병으로 모돈의 유사산 및 분만 저하, 식욕결핍, 발열, 허약자돈, 폐청색증, 성장지연, 호흡곤란 등의 다양한 증상을 보이며, 다른 병원성 바이러스 및 세균과 상호작용으로 인하여 전세계 양돈산업에 경제적으로 엄청난 피해를 주고 있다. 이러한 PRRSV는 1980년대 후반에 유럽에서 처음으로 보고 되었으며 1994년에 북미에서 분리되면서 이를 각각 유럽형(Genotype 1)과 북미형(Genotype 2)으로 명명하였다. PRRSV 유럽형과 북미형은 50-60% 유전적 유사성을 보이며, 2006년 중국에서 Highly pathogenic PRRSV (HP-PRRSV)가 중국에서 최초로 보고되었다. PRRSV는 대식세포에 존재하는 바이러스 수용기인 CD163을 인식하여 감염되는 특이적이 바이러스로 심한 변이와 특이적인 면역반응으로 인해 기존 백신보다 현장에서 특이적으로 적용할 수 있는 새로운 백신이 요구되는 상황이다.
- [0008] PRRSV 백신은 생독 백신 (Ingelvac PRRS MLV, Boehringer ingelheim)이 주를 이루고 있으며, 이로 인해 생독 백신에 의한 바이러스 전파가 문제가 되고 있고, 아시아 국가들의 분리주 들도 북미주와 가까운 것이 밝혀졌다. 이는 무분별한 백신남용으로 인해 돼지의 질병에 미치는 영향에 대해 시사하는 바가 크다고 할 수 있다. 이 문제를 개선하고자 구조단백질을 이용한 백신을 개발하고자 하였으나 현재까지 그 효과가 미비한 것으로 보고되었다. PRRSV 차세대 백신 개발을 위해 최근 미국에서 PRRSV의 5개 구조 단백질을 이용한 PRRSV VLP를 개발하였으며 그 가능성을 확인하였다.
- [0009] 구제역 바이러스 (Foot-and-mouth virus; FMD)는 전염성이 매우 강하여 무리에서 한 마리가 감염되면 나머지 가축에게 모두 급속하게 감염된다. 또한 치사율이 50% 이상에 달하는 가축의 제 1종 바이러스성 법정전염병으로

특별한 치료법은 없고 감염 동물과 접촉한 다른 동물들을 살처분해야 하기 때문에 신속한 진단과 대처가 필요하다.

[0010] 구제역의 원인이 되는 바이러스는 피코나비리대과 (Picornaviridae family)의 아프소바이러스 (aphthovirus)에 속하는 바이러스이며, 바이러스 게놈은 약 8,000개의 핵산 염기로 이루어진 단일 RNA 가닥 (single-stranded RNA)으로 구성되어 있다. 상기 RNA는 초기에 단일 폴리펩타이드로 번역된 후 감염된 세포 내에서 바이러스에 의해 암 호화된 프로테아제 (viral protease)에 의해 연속적으로 절단되어 4개의 캡시드 단백질(VP1~VP4) 및 비구조 폴리펩타이드 (2C, 3A, 3B, 3C 및 3D)를 생성한다. 이러한 구제역 바이러스의 혈청형은 7가지 타입 (A, O, C, Asia 1, SAT 1, SAT 2, SAT 3)이 존재하고 80여 가지의 아형(subtype)이 있다고 알려져 있다.

[0011] 구제역 백신으로 생독백신은 잘 사용되고 있지 않으며, 현재 사독백신이 전 세계적으로 널리 사용되고 있다. 국내에서도 2010년 11월 28일 구제역이 발생한 이후 독점적으로 공급되는 외국계 제약회사의 사독백신을 사용하고 있으나, 이 백신은 단가가 높아 축산업자들에게 적지 않은 부담이 되고 있다. 또한 사독백신은 일반적으로 면역 원성이 떨어져 어주번트 (oil adjuvant)를 사용하는데, 이로 인해 백신을 접종한 이근부 이하 목근육에 비화농성병소가 발생하는 부작용이 나타난다. 그런데 이 부위는 식육으로서 가치가 특히 높은 부분이기 때문에 이로 인해 국내에서 연간 1천억원에 달하는 피해가 발생하고 있다. 국내에서 현재 사용되고 있는 사독백신의 접종 프로토콜은 모든에게 6개월 간격으로 백신을 접종하고 자돈에게 모체이행항체가 소실된 후 1회 백신을 접종하도록 되어 있다. 그러나 기존 백신의 높은 단가 및 목근육에 생기는 부작용으로 인하여 구제역 백신 접종 기피현상이 발생하고 있어, 국내의 구제역 방어선이 허물어지고 있는 상황이다. 따라서 이러한 단점을 개선한 구제역 백신의 개발이 절실한 실정이다.

[0012] 또한 불활성화 바이러스 백신의 제작은 생물재해/생물보안 위험을 일으키는데, 인접 환경의 오염을 방지하기 위해 바이러스가 고-봉쇄 설비에서 제조되어야 하기 때문이다. 추가적으로, 불활성화 바이러스 제품의 무해성이 완전히 보장될 수 없다. 실제로, 유럽에서의 여러 최근의 FMDV 사례가 불완전하게 불활성화된 바이러스로 추적되었다. 이러한 잠재적인 생물재해/생물보안 위험은 적극적인 백신 공급원의 수를 소수로 제한한다. 이와 같은 제한은 지역이 돌발에 효과적 및 즉각적으로 반응하는 능력을 방해할 수 있다.

[0013] 불활화된 백신의 가장 큰 단점은 바이러스 항원을 주기적으로 접종하는 것이 필요하며, 바이러스가 방출될 위험이 있다는 것이다. 이러한 단점을 보완하기 위해서 할 수 있는 것은 재조합 단백질을 이용한 안전한 백신을 생산하는 것이다. 현재 이용 가능한 구제역 바이러스 백신의 단점 및 한계를 해결하기 위하여 바이러스 유사입자인 VLP(Virus like particle)백신을 이용할 수 있다. 재조합 백신은 생성과정에서 전염성이 있는 바이러스를 필요로 하지 않기 때문에 바이러스가 방출될 위험이 없다. 재조합 단백질이나 펩타이드는 생산과정이 쉽고, 보관에 용이한 장점도 있다. 또한 구제역 바이러스의 RNA가 포함되지 않아 안정성이 높으면서도 방어능이 향상된 백신이며 오일 어주번트(oil adjuvant)를 필수적으로 사용하지 않아도 되므로 돼지 목근육 부위의 폐기로 인한 경제적 손실을 막을 수 있다.

[0014] FMDV 관련 대표적인 VLP 연구는 Asia 1형 VLP를 제작하기 위하여 구제역 바이러스의 구조 단백질인 P1과 3C유전자를 Dual vector에 삽입한 재조합 배칼로바이러스를 제작하고 Bac-to-Bac system을 이용하여 곤충세포에서 발현한 것이라 할 수 있다. 또한 FMDV 관련 VLP 연구는 전 세계적으로 많이 이루어지고 있다. 1970대 중반까지 구제역바이러스의 주요한 면역물질인 VP1을 이용하여 발현하였고, 이 단백질을 기초로 하여 재조합 단백질을 생산하였다. 대장균에서 발현된 VP1은 돼지, 소에서 중화항체를 유도할 수 있었다. 바이러스의 VP1의 G-H loop는 중화항체를 유도하기 위한 주요한 면역성 유발부위이므로 이 부위의 펩타이드를 이용한 백신개발 연구가 보고되고 있다. 하지만 소와 돼지에 G-H loop 합성 펩타이드를 접종하였을 때에는 높은 수준의 중화항체가 생성되었으나 질병으로부터 방어되지 않았다. 구제역의 특이 T 세포 에피토프만을 면역하였을 경우, 감수성 소에서 바이러스T 세포 에피토프 백신은 기대하는 만큼의 방어효과가 나타나지 않았다.

[0015] 따라서 돼지에 감염되는 대표적인 바이러스인 PRRSV, PCV2, FMDV 를 모두 효과적으로 예방할 수 있는 새로운 백신에 대한 필요성 및 이를 제조하기 위한 방법에 대한 필요성이 있으며, 특히 상기 바이러스에 대하여 동시에 면역화할 수 있는 새로운 복합 백신에 대한 필요성이 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0017] 본 발명자들은 PRRSV, PCV2, FMDV 를 모두 효과적으로 예방할 수 있는 새로운 백신에 대해 연구하던 중, 국내

유래 PCV2(Porcine circovirus type 2)의 ORF2 (Open Reading Frame 2) 유전자의 특정 부위에 선별된 병원성 바이러스의 에피토프를 삽입해도 3차 구조의 형태가 변형되지 않으며, 바이러스 유사 입자 (virus like particle, VLP)가 효과적으로 생산됨을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0018] 따라서 본 발명의 목적은 PCV2의 ORF2 부위에 PRRSV 또는 FMDV 의 병원성 에피토프가 삽입된 재조합 PCV2의 ORF2 및 이를 이용한 복합 백신 조성물을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0020] 상기 목적을 제공하기 위하여, 본 발명은 PRRSV (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus) 또는 구제역 바이러스 (Foot-and-mouth disease virus) 의 병원성 에피토프가 삽입된 재조합 PCV2 (Porcine circovirus type 2) ORF2 (Open Reading Frame 2)를 제공한다.

[0021] 또한 본 발명은 상기 재조합 PCV2 ORF2 가 도입된 세포 또는 대장균을 제공한다.

[0022] 또한 본 발명은 상기 세포 또는 대장균에서 생산된 바이러스 유사 입자를 제공한다.

[0023] 또한 본 발명은 바이러스 유사 입자를 포함하는 복합 백신 조성물을 제공한다.

**발명의 효과**

[0025] 본 발명의 재조합 PCV2 ORF2 를 이용하는 경우, 곤충 또는 대장균 세포에서 바이러스 유사 입자를 효과적으로 생산할 수 있고, 이는 2종 이상의 돼지 바이러스에 대하여 효과적으로 면역 효과를 유도할 수 있으므로, PCV2 기반의 돼지 복합 백신으로 유용하게 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0027] 도 1은 PCV2 VLP 기반의 복합백신 생산 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 코돈 최적화된 PCV2의 ORF2 유전자의 3차 구조를 분석해서 외부 에피토프의 삽입 가능 부위를 예측한 도이다.

도 3은 코돈 최적화된 PCV2의 ORF2 유전자 기반의 복합백신 발현용 재조합 발현벡터를 구축하는 과정의 모식도이다.

도 4는 곤충세포가 재조합 베칼로바이러스에 감염되었는지 여부를 확인하고 웨스턴 블랏을 통해 삽입 에피토프의 발현을 확인한 도이다.

도 5는 대장균에서 IPTG 유도에 따른 재조합 단백질의 발현을 정제하여 전기영동을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 대장균에서 생산 정제한 바이러스 유사입자를 전자현미경(TEM)으로 확인한 도이다.

도 7은 재조합 바이러스 곤충세포 감염 뒤 에피토프 유전자의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 제작한 재조합바이러스의 곤충세포 감염뒤 에피토프 유전자의 발현 확인 (IFA) 결과를 나타낸 도이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0028] 본 발명은 PRRSV (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus) 또는 구제역바이러스 (Foot-and-mouth disease virus) 의 병원성 에피토프가 삽입된 재조합 PCV2 (Porcine circovirus type 2) ORF2 (Open Reading Frame 2) 를 제공한다.

[0029] 본 발명은 PCV2 ORF2의 3차 구조 예측에 의해 바이러스 유사입자 생성 시 구조에 영향을 주지 않는 부위를 선정하고 선정 부위에 PRRSV와 FMDV의 주요항원부위라고 알려진 에피토프를 선별하여 PCV2 바이러스 유사입자 표면에 표출될 수 있도록 융합 발현한 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 재조합 PCV2의 ORF2 는 PCV2 (Porcine circovirus type 2) ORF2 아미노산 서열의 61 내지 62 번 아미노산 사이, 85 내지 86 번 아미노산 사이, 130 내지 131 번 아미노산 사이, 190 내지 191 번 아미노산 사이로 이루어진 군에서 선택된 1종 부위에 삽입되는 것일 수 있으며, 상기 위치는 PCV2의 ORF2 (NCBI 등록번호 FJ755686) 를 기준으로 설명될 수 있다.

[0030] 본 발명의 재조합 PCV2 (Porcine circovirus type 2) 의 ORF2 는 서열번호 18 내지 서열번호 30으로 이루어진

군에서 선택된 1종의 아미노산 서열인, 재조합 PCV2 (Porcine circovirus type 2) ORF2 (Open Reading Frame 2) 일 수 있으며, 상기 아미노산 서열은 각각 서열번호 5 내지 서열번호 17 로 이루어진 군에서 선택된 염기서열에 의해 코딩되는 것일 수 있다.

- [0031] 본 발명의 PCV2 의 ORF2 기반의 재조합 PCV2 ORF2 유전자는 국내 분리주의 ORF2 서열과 항원인식부위를 곤충 세포 및 대장균 시스템에 맞도록 코돈 최적화시킨 것이다.
- [0032] 본 발명에서 "코돈 최적화(codon optimization)"란 특정 유전자를 다른 개체에서 발현시키는 경우, 유전자가 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 발현할 수 있도록 유전자의 염기서열을 변환시키는 것을 말한다.
- [0033] 본 발명에서 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 벡터는 목적인 코딩 서열과 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는 데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다.
- [0034] 또한 본 발명은 재조합 PCV2 (Porcine circovirus type 2) ORF2 (Open Reading Frame 2) 가 도입된 세포를 제공한다.
- [0035] 본 발명에서 "세포"는 Sf9, Sf21, High five 세포 또는 Tn5 등의 일반적인 곤충 세포를 포함하며, 바람직하게는 Sf9 또는 High five 세포이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0036] 또한 본 발명은 재조합 PCV2 (Porcine circovirus type 2) ORF2 (Open Reading Frame 2) 가 도입된 대장균을 제공한다.
- [0037] 또한 본 발명은 상기 세포 또는 대장균에서 생산된 바이러스 유사 입자를 제공한다.
- [0038] 본 발명에서 "바이러스 유사 입자"는 바이러스 외피를 구성하도록 조립된 단백질 코트 또는 캡시드를 포함하는 것으로, 상기 바이러스 유사 입자는 바이러스의 외피 (capsid) 형태를 유지하여 살아있는 바이러스와 유사한 효과를 가진다. 또한 PCV2의 ORF2 단백질 단독 형태에 비해 면역원성이 증가된다.
- [0039] 또한 본 발명은 상기 바이러스 유사 입자를 포함하는 복합 백신 조성물을 제공한다.
- [0040] 본 발명의 실시예에서는 코돈 최적화된 PCV2 ORF2 기반의 재조합 PCV2 ORF2 를 이용하여 제조된 바이러스 유사 입자를 이용하여 복합 백신 백신 조성물을 제조하였으며, 상기 복합 백신 조성물은 항체 생성능 및 바이러스 방어능이 우수한 바, PCV2와 PRRSV 또는 구제역 감염 질환의 예방에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 "백신"은 항원 물질을 포함하는 수의학용 백신으로, PCV2와 PRRSV 또는 구제역에 대하여 특이적이고 능동 또는 수동의 면역성을 유도하기 위한 목적으로 투여된다.
- [0042] 본 발명의 "대상 가축 감염 질환"에는 이유후 전신성 소모성 증후군 (PMWS; Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome), 가성 광견병 (pseudorabies), 돼지 생식기 및 호흡기 증후군 (PRRS: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome), 글래서병 (Glasser's disease), 연쇄구균성 수막염 (streptococcal meningitis), 살모넬라증 (salmonellosis), 이유후 대장균증 (postweaning colibacillosis), 식이성 간증 (dietetic hepatosis) 및 화농성 기관지폐렴 (suppurative bronchopneumonia) 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명의 백신 조성물은 유효 성분인 바이러스 유사 입자 이외에도 백신 조성물을 구성하는 데 적절한 하나 이상의 면역 증강제 또는 부형제 또는 담체를 포함할 수 있다.
- [0044] 본 발명에의 조성물에 포함될 수 있는 면역증강제는 주사한 동물의 면역 반응을 증대시키는 물질을 의미하는 것으로, 다수의 상이한 면역증강제가 기술 분야의 당업자에게 공지되어 있다. 상기 면역증강제는 프로인트 완전 및 불완전 면역 증강제, 비타민 E, 비이온성 차단 폴리머, 뮤라밀디캡티드, Quil A, 광유 및 무광물유 및 카보폴(Carbopol), 유중수형 유제 면역증강제등을 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체는 기술 분야의 당업자에게 공지되어 있으며, 단백질, 설탕 등을 포함하지만, 이로 제한되는 것은 아니다. 상기의 담체는 수용액 또는 비-수용액, 현탁액, 및 에멀전 일 수 있다. 비-수용액 담체의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식용유 예컨대 올리브 오일, 및 주사가능한 유기 에스테르 예컨대 에틸 올리에이트를 들 수 있다. 수용액 담체는 식염수 및 완충배지를 포함하는, 물, 알콜/수용액, 에멀전 또는 현탁액을 포함한다. 비경구 담체는 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화나트륨, 유산처리 링거 또는 고정 오일을 포함한다. 정맥주사용 담체는 예컨대 링거 텍스트로스를 기본

으로 하는 것과 같은 전해질 보충제, 액체 및 영양 보충제 등을 포함한다.

[0046] 본 발명의 백신 조성물은 방부제 및 기타 첨가제 예컨대 예를 들면 항미생물제제, 항산화제, 킬레이트제, 불활성 가스 등과 같은 것을 추가로 포함할 수 있다. 상기 방부제는 포르말린, 티메로살, 네오마이신, 폴리믹신 B 및 암포테리신 B 등을 포함한다. 본 발명의 백신 조성물은 하나 이상의 적절한 유화제, 예로서 스팬(Span) 또는 트윈(Tween)을 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 백신 조성물은 보호제를 포함할 수 있으며, 당업계에 공지된 보호제를 제한 없이 사용할 수 있고, 이는 락토오스(Lactose; LPGG) 또는 트레할로오스(Trehalose; TPGG)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 또한, 본 발명은 상기 백신 조성물을 가축에게 투여하는 단계를 포함하는 바이러스 감염 질환의 예방 방법을 제공한다. 본 발명에서 가축에 백신 조성물을 투여하는 방법은 일반적인 백신 투여 방법에 의할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니지만 장내 또는 비경구 경로, 경구, 비강 내, 정맥 내, 근육 내, 피하, 피내 또는 다른 적절한 경로를 통한 투여를 수행할 수 있고, 바람직하게는 근육 내, 피내, 피하에 투여된다.

[0048] 본 발명에서 백신 접종 대상인 가축은 돼지에 제한되지 않으며, 본 발명에서 돼지에게 백신 조성물 투여는 면역학적 유효량으로 투여할 수 있다. 상기 "면역학적 유효량"이란 PCV2와 구제역 또는 PRRS 관련된 질병의 예방 효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용이나 심각한 또는 과도한 면역반응을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 정확한 투여 농도는 투여될 특정 면역원에 따라 달라지며, 예방 접종 대상의 연령, 체중, 건강, 성별, 개체의 약물에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 방법 등 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있으며, 1회 내지 수회 투여가능 하다.

[0050] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0052] **실시예 1 - 코돈 최적화된 PCV2의 ORF2기반의 복합백신 유전자 제조**

[0053] 곤충 세포에서 발현 효율을 높이기 위해 국내 분리주로부터 얻은 PCV2의 ORF2 유전자(NCBI 등록번호 FJ755686)의 염기서열의 3차 구조 분석을 수행하였으며 PCV2의 ORF2 유전자 부위에서 총 4군데의 에피토프 치환부위를 선정하였다. 에피토프 선정을 위한 3차원 구조 분석 및 선정된 부위를 도 2에 나타내었다.

[0054] 도 2에 나타낸 바와 같이, PCV2 ORF2의 아미노산 서열 번호 61~62, 85~86, 130~131, 190~191 부위를 에피토프 치환 부위로 선정하였다. 상기 부위는 PCV2 ORF2 구조단백질의 3차 구조 예측과 이전에 보고된 문헌을 참고하여 선정된 것으로, PCV2 바이러스 유사입자 형성에 영향이 없으며, PRRSV와 FMDV의 에피토프가 표면으로 돌출될 수 있는 부위를 선발하였다. 선발된 부위에 FMDV와 PRRSV의 에피토프 아미노산을 서열을 부가하여 PCV2와 이중의 바이러스의 에피토프가 융합발현 될 수 있는 유전자 서열을 제작하였다. 도입에 사용한 FMDV와 PRRSV의 주요 에피토프 대상 아미노산 서열을 하기 표 1에 나타내었다.

**표 1**

	아미노산 서열	서열번호
FMDV epitope -1	LPNVRGDLQVLAQKAARPLP	서열번호 1
FMDV epitope -2	LPNVRGDLQVLAQKAARPLPRHKQKIVAPVKQSL	서열번호 2
PRRSV epitope -1	SHLQLIYNL	서열번호 3
PRRSV epitope -2	SNDSSSHLQLIYNLTLCEGSGSSLDFFCHGS	서열번호 4

[0057] 상기 아미노산을 기반으로 발현에 필요한 유전자를 곤충세포와 대장균에 맞도록 코돈 최적화했다. 코돈 최적화는 원래의 염기서열을 곤충세포와 대장균에서 주로 사용되는 염기서열로 변경하는 방법으로 수행하였다. 본 발명의 코돈 최적화된 PCV2 ORF2기반의 복합백신 유전자가 곤충세포와 대장균에서 발현되는 경우 원래 단백질과 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 생산할 수 있다.

[0059] 본 발명에서 제조된 서열정보는 다음 표 2와 같이 표시하였다.

**표 2**

	염기서열	아미노산 서열
61~ 62 위치에 삽입 - 56FMB (FMDV)	서열번호 5	서열번호 18
61~62 위치에 삽입 - 56FMBT(FMDV)	서열번호 6	서열번호 19
85~86 위치에 삽입 - 80FMB (FMDV)	서열번호 7	서열번호 20

85~86 위치에 삽입 - 80FMBT (FMDV)	서열번호 8	서열번호 21
130~131 위치에 삽입 - 125FMB (FMDV)	서열번호 9	서열번호 22
130~131 위치에 삽입 - 125FMBT (FMDV)	서열번호 10	서열번호 23
190~191 위치에 삽입 - 185FMB (FMDV)	서열번호 11	서열번호 24
61~62 위치에 삽입 - 56PRGP5 (PRRSV)	서열번호 12	서열번호 25
61~62 위치에 삽입 - 56PRGP5M (PRRSV)	서열번호 13	서열번호 26
85~86 위치에 삽입 - 80PRGP5 (PRRSV)	서열번호 14	서열번호 27
85~86 위치에 삽입 - 80PRGP5M (PRRSV)	서열번호 15	서열번호 28
130~131 위치에 삽입 - 125PRGP5 (PRRSV)	서열번호 16	서열번호 29
130~131 위치에 삽입 - 125PRGP5 (PRRSV)	서열번호 17	서열번호 30

**[0063] 실시예 2 - 코돈 최적화된 PCV2의 ORF2기반의 복합백신 항원의 곤충세포 발현을 위한 재조합 벡터의 구축**

**[0064]** 상기 실시예 1에서 얻은 코돈 최적화된 PCV2 ORF2기반의 복합 백신 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제조하였으며 이의 제작 과정을 도 3에 간략하게 나타내었다. 발현 벡터의 백본으로 pFastBac™ Dual과 pGEX4T1 벡터를 이용하여 코돈 최적화된 서열에 도입하여 클로닝하였다. 상기와 같은 방법으로 제조한 재조합 발현벡터의 발현을 확인하기 위해서, 정방향 프라이머 (GCGGCCGCATGACGTATCCAAGGAGGCAT) 및 역방향 프라이머 (GGATCTCAGGGTTTAAGTGGGGGTC)를 사용하여, PCR을 수행한 후, 전기영동을 통해 확인하였다. 구체적으로 상기 실시예 1에서 얻은 코돈 최적화된 FMDV-epitope-PCV2-ORF2의 복합백신 서열을 포함하는 DNA 단편을 pFastBac™ Dual (ThermoFisher SCIENTIFIC Cat. No. 10359-016) 벡터에 삽입하여 전이벡터 pFastBac™Dual-56FMBT를 제작하였다. 이 벡터에서 FMDV-epitope-PCV2-ORF2 단백질 코딩 DNA 단편은 폴리헤드린 프로모터의 다운스트림에 위치한다. 제작한 전이벡터의 DNA를 MAX Efficiency®DH10Bac™(ThermoFisher SCIENTIFIC Cat. No. 10361012) 대장균에 제조사의 제공 방법에 따라 형질전환하였으며, 이를 통해 FMDV-epitope-PCV2-ORF2 유전자가 삽입된 Bacmid를 제작하였다. 상기 방법으로 제작한 Bacmid를 100µl의 Sf-900™III SFM (ThermoFisher SCIENTIFIC Cat. No. 12658019) 배지에 혼합하고, 셀렉틴 II (Cellfectin II, Invitrogen) 5µl를 100µl의 Sf-900™III SFM 배지에 혼합한 후 각각을 15분 동안 27 °C에서 방치하였다. 그 후 두 혼합액을 섞어주고 다시 15분 동안 27 °C에서 방치하였다. 밤나방과 세포주, Sf9 (*Spodoptera frugiperda* 9) (ThermoFisher SCIENTIFIC Cat. No. B82501)를 25 mm 배양 플라스크당 1.0 x 10<sup>6</sup>개의 세포로 분주하여, 위 혼합액을 배양액에 접종하고, 더 배양하여 세포변성을 확인 후 재조합바이러스 rAc-PCV2-56FMBT를 제작하였다.

**[0065]** 이와 같은 방법으로 제작된 재조합바이러스는 용균반점법 (Plaque assay)으로 순수하게 분리하였다. 순수 분리된 바이러스는 T-75 플라스크(Corning Inc.)에 재접종하여 증식시킴으로써 대량으로 바이러스를 수득할 수 있었다. 수득한 바이러스들은 BacPAK™ qPCR Titration Kit (Clontech)를 이용하여 정량 후 사용하였다. 재조합 벡터의 정상적인 발현을 SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏으로 확인하였으며, 감염된 세포의 형태를 비감염된 대조군 Sf9 세포와 비교하고 그 결과를 도 4에 나타내었다.

**[0066]** 도 4에 나타낸 바와 같이, 재조합 벡터로 형질전환된 Sf9 세포가 수득됨을 확인하였으며, 재조합 벡터가 모두 정상적으로 발현됨을 확인하여, 이후 실시예에 사용하였다.

**[0068] 실시예 3 - 코돈 최적화된 PCV2의 ORF2기반의 복합백신 항원의 대장균 발현을 위한 발현 벡터의 구축**

**[0069]** 상기 실시예1에서 얻은 코돈 최적화된 PRRSV-epitope-PCV2-ORF2의 복합백신 서열을 포함하는 DNA 단편을 pGEX4T1 벡터에 삽입하여 전이벡터 pGEX4T1-PRGP5를 제작하였다. 구체적으로 PCV2에 PRRS 에피토프가 포함된 유전자를 정방향 프라이머 5'CCGGATCCATGACGTATCCAAGGCGCGTTAC3' 와 역방향 프라이머 5' GGCTCGAGTTACGGCTTAAGCGGCGATCTTT3' 을 이용하여 PCR로 증폭시킨 후, pGEX4T1 벡터의 BamH I/Xho I 위치에 삽입시켰다. 이 벡터에서 PRRSV-epitope-PCV2-ORF2 단백질 코딩 DNA 단편은 tac 프로모터의 다운스트림에 위치한다.

**[0071] 실시예 4 - PCV2의 ORF2기반의 복합백신 항원의 곤충세포 발현**

**[0072]** 상기 실시예 2에서 제조한 재조합 발현벡터를 이용하여 코돈 최적화 된 PCV2 ORF2기반의 복합백신 유전자를 발현하는 재조합 베큘로바이러스에 감염된 곤충세포를 제조하였다. 구체적으로, Sf9 세포주를 60mm 디쉬에 1x10<sup>6</sup> 세포로 넣어주고, Sf-900III SFM (Gibco-BRL, USA) 3ml을 첨가하여 27°C에서 최소 1시간 이상 배양함으로써 세포를 디쉬에 부착시켰다. 상기 실시예 2에서 제조한 재조합 벡터와 BD BaculoGold DNA를 Sf-900III SFM 100 µl에 혼합한 용액 A, 및 CELLFECTIN Reagent(Gibco-BRL, USA) 와 Sf-900III SFM 100 µl를 혼합한 용액 B를 27°C

에서 각 각 15-30분간 반응시켰다. 반응 후, 용액 A, B를 혼합한 후, 27℃에서 15-30분간 반응시켰으며,  $1 \times 10^6$  세포로 분주된 Sf9 세포주에 접종하여 재조합 베칼로바이러스를 곤충세포에 감염시켰다.

[0073] 상기 방법으로 제조한 재조합 베칼로바이러스를 접종하여 감염된 곤충세포 및 배양액으로부터 DNA를 추출하여 전기 영동으로 형질감염 여부를 확인하였다. 또한 세포 형태, 세포 크기 등의 변화를 통하여 재조합 베칼로바이러스에 감염된 세포와 그렇지 않은 세포를 비교하였다. 그 결과 곤충세포가 재조합 베칼로바이러스에 감염되었음을 확인하였다.

[0075] **실시예 5 - 코돈 최적화된 PCV2의 ORF2기반의 복합백신 유전자의 대장균 발현**

[0076] 상기 실시예 3에서 제작한 전이벡터의DNA는 Rosetta<sup>TM</sup>2(DE3) (Novagen Cat. No.71397-4) 대장균에 제조사의 제공 방법에 따라 형질전환을 수행하였다. 얻어진 콜로니는 순수배양을 할 수 있도록 적절한 항생제가 함유된 LB 배지를 이용하여 37℃에서 전 배양을 진행하였고, 본 배양은 OD 600nm 값이 1.0될 때까지 배양한 후 단백질 발현을 유도하기 위하여 0.3 mM IPTG(Isopropyl-β-D-thio-galactoside)를 첨가하여 18℃에서overnight 배양하였다. 배양된 균을 침전시키기 위하여 저속으로 원심분리를 수행하였고, 침전된 균은 PBS(phosphate-buffered saline, pH7.4) 를 이용하여 풀어준 후 초음파분쇄를 실시하였다. 분해된 균은 원심분리를 통하여 상층액과 침전물을 분리한 후, SDS-PAGE 및 Western blotting을 통하여 단백질 발현을 확인하였다.

[0077] 단백질 발현이 확인된 상층액은 GStrap<sup>TM</sup> HP, 5 x 1 ml Columns (GE Healthcare, Cat. No.17-5281-01) 을 통과시킨 후 10mM Glutathione (reduced) 가 포함된 완충액을 이용하여 정제를 진행하였다. 다음으로 18℃에서 TEV protease를 처리하여 표지단백질인 GST를 제거하였다. GST제거와 동시에 단백질 침전이 발생하였고, 침전물은 원심분리를 통하여 상층액과 분리하였다. 이 침전을 20mM CAPS, 150mM NaCl, 4mM 2-mercaptoethanol, pH 11 buffer로 해리시켰으며, 이를 통해 최종적으로 순수한 목적단백질을 수득하였다.

[0079] **실시예 6 - 재조합 바이러스 유사 입자의 제조**

[0080] 상기 실시예 4에서 제조한 재조합 베칼로바이러스를 곤충세포에 접종하여 이로부터 바이러스 유사 입자(VLP)를 얻었다. 보다 구체적으로, Sf9 세포주를 T-75 플라스크에  $5 \times 10^6$  개의 세포주로 넣어주고, Sf-900III SFM (Gibco-BRL, USA) 10ml을 첨가하여 27℃에서 최소 1시간 이상 배양함으로써 세포를 디쉬에 부착시켰다. 그 후 세포에 재조합 베칼로바이러스를 접종하였고, 세포 및 배양액을 수거하여 이로부터 바이러스 유사 입자를 얻었다. 상기 방법으로 얻어진 바이러스 유사 입자를 전자현미경(TEM)으로 확인하였다. 그 결과 700nm 크기의 PCV2 바이러스 유사 입자 클러스터는 이질염색질(heterochromatin)과 구별되도록 생성되었음을 확인하였다.

[0082] **실시예 7 - 코돈 최적화된 PCV2 ORF2 기반의 복합백신 유전자를 이용한 곤충세포에서 PCV2 ORF2 단백질의 발현능 확인**

[0083] 상기 실시예 1에서 제조한 PCV2의 ORF2 유전자 이용시 곤충세포에서의 ORF2 단백질 발현양을 웨스턴 블롯팅, SDS-PAGE 및 ELISA 방법으로 확인하였다. 구체적으로, SDS-PAGE를 위해 시료를 10% SDS-폴리아크릴아마이드 겔에서 80V의 전압으로 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후, 겔은 Coomassie brilliant blue solution로 염색하고 Destaining solution으로 탈색하여 관찰하였다. 웨스턴 블롯팅은, SDS-PAGE 겔을 nitrocellulose membrane에 300mA로 2-3시간 동안 트랜스퍼하였고, 차단을 위하여 TBS-T 완충액에 녹인 5% 스킴 밀크를 1시간 처리하였다. 1차 항체로 메디안디노스틱사의 PCV2 단클론항체 (Anti-PCV2, Cat.No. 9051, 1:500)를 5% 스킴 밀크를 녹인 TBS-T 완충액에 희석하여 1시간 처리한 후, 15분씩 3번 세척하였다. 2차 항체 역시 5% 스킴 밀크를 녹인 TBS-T 완충액에 희석하여 1시간 동안 처리하였고, 15분씩 3번 세척하였다. 최종적으로 membrane에 DAB (Sigma)를 처리하여 특이 밴드를 관찰하였다. 또한, ELISA는 Synbiotics사의 Ag detection ELISA 키트를 이용하였으며, 각 시료를 PBS로  $10^{-1} \sim 10^{-4}$ 의 농도가 되게 10진 희석하여 웰당 100 μl씩 1시간 처리한 후, PBS-T 완충액으로 3번 세척하였다. 여기에 2차 항체를 PBS에 희석하여 1시간 동안 처리하였고, PBS-T 완충액으로 3번 세척한 후, TMB 용액으로 발색정도를 관찰하였다.

[0084] 그 결과 대장균 발현 정제 시료 및 곤충세포 발현 배양액에서 PCV2의 ORF2 기반의 복합백신 항원의 발현을 확인할 수 있었다.

[0086] **실시예 8 - PCV2 ORF2 기반의 백신 조성물의 제조 및 항체 생성능 확인**

[0087] 항원의 안정성 확인과 함께 항체 형성여부를 확인하기 위해서 모델 동물인 기니피그 (guinea pig)을 이용한 동물 실험으로 항체 생성 여부를 확인하였다. 동물 실험은 상업용 백신인 CircoFLEX<sup>TM</sup>, 구제역백신, Ingelvac MLV 백신

신을 대조군으로 하여 2종류 부형제에 대한 테스트를 진행하였다. 이때 사용한 부형제는 0.1% Carbopol (부형제 A) 또는 10% Rehydrogel이 포함된 30% Al(OH)<sub>3</sub> (부형제 B)이다. 면역을 위하여, 3개체의 기니픽에 코돈 최적화된 PCV2 ORF2기반의 발현단백질을 부형제와 1:1 (v/v)로 희석하여 1ml씩 주사하였다. 주사는 3주 간격으로 2회 주사하였으며 주사 뒤 1, 2주일 뒤에 혈청을 분리하여 시료로 사용하였다. 항원에 대한 특이 항체의 생성여부 및 혈액내 항체가 를 분석하기 위해서 Synbiotics사의 항체가 측정용 ELISA 키트(SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking)를 사용하였다. 이때, 흡광도 값이 낮을수록(0.4 이하) PCV2에 대한 방어 항체가 대량 생산된 것으로 측정하였다.

[0088] 실시예 9 - SPF miniature pig에서 PCV2 ORF2 기반 백신 조성물의 항체 생성능 확인

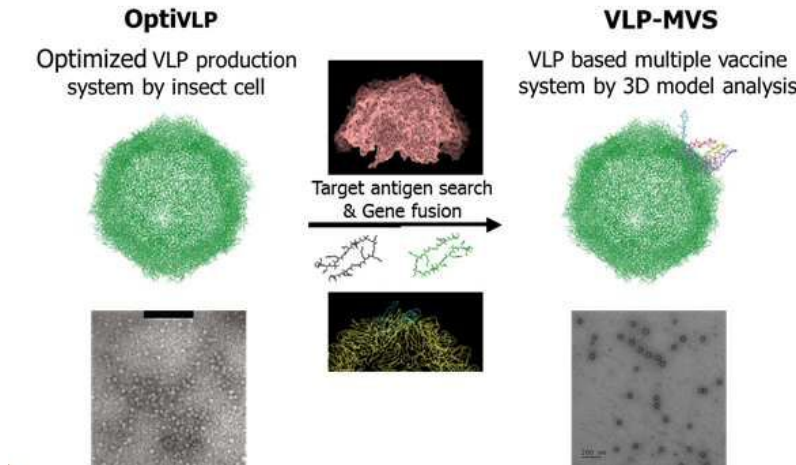
[0089] 돼지에서 상기 실시예8에서 제조한 본 발명의 백신 조성물의 항체 생성능 확인을 위하여, PCV2/FMDV/PRRSV 항체가 음성인 SPF miniature pig 3두에 본 발명의 백신 조성물을 접종한 뒤 1주 간격으로 혈액을 채혈하고 Synbiotics 사의 PCV2 Ab ELISA, Prionics사의 FMDV Ab ELISA 키트를 이용해 항체가를 측정하였다. 대조군으로는 CircoFLEX™, 구제역백신, Ingelvac MLV백신을 사용하였고, 그 결과를 확인하였다.

[0091] 실시예 10 - 백신 투여에 의한 바이러스 방어능 확인

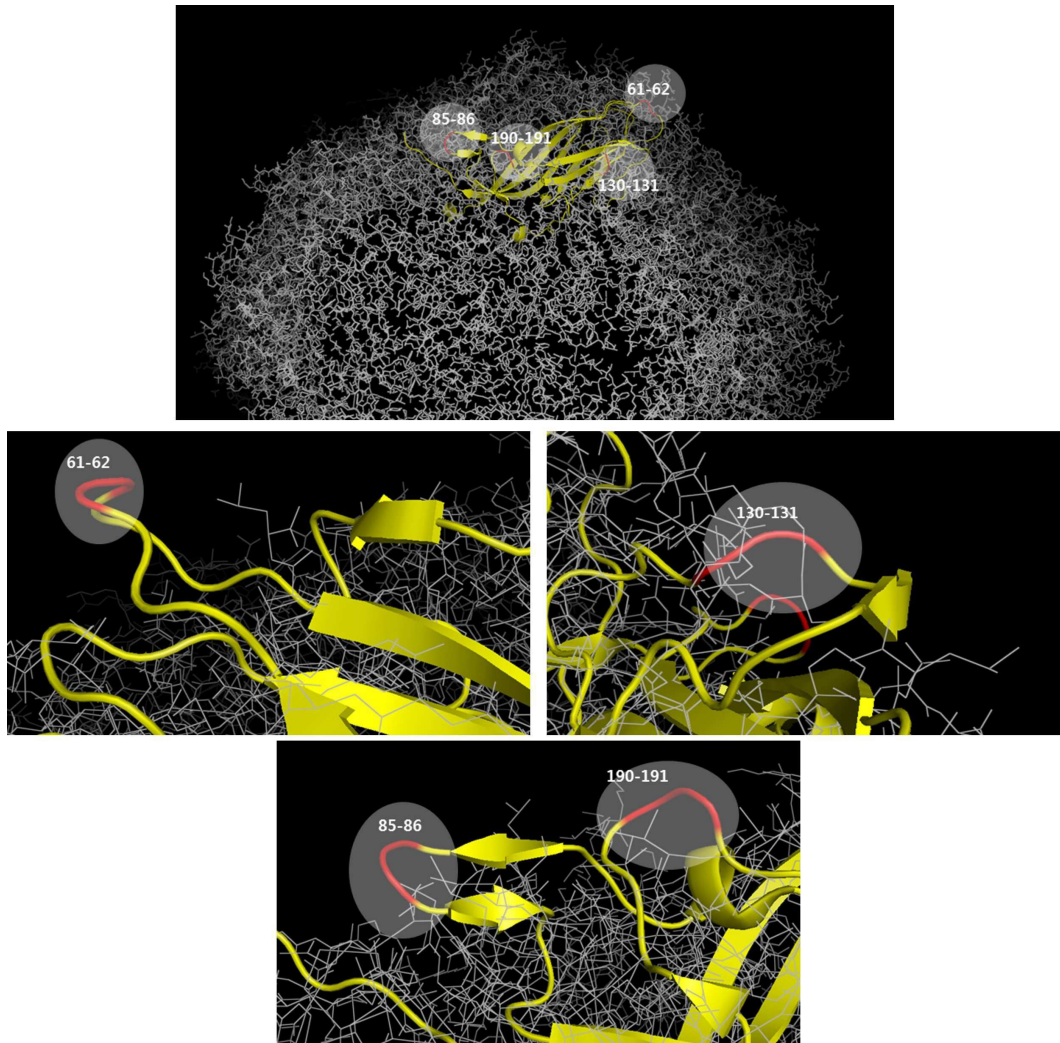
[0092] 본 발명의 백신 투여에 의한 바이러스 방어능을 확인하기 위해서, 사양 농가의 사양 시험을 진행했다. 구체적으로 본 발명의 재조합 PCV2 ORF2 기반의 복합 항원을 주사한 10두, 양성 대조군으로서 상업용 백신 (CircoFLEX™, 구제역백신, Ingelvac MLV)을 주사한 10두 및 음성 대조군으로서 백신 주사를 하지 않은 자돈 10두를 이용한 시험을 수행하였다. 백신은 1회 접종하였고 안정성 확인을 위해 접종량의 10배까지 접종을 진행하였다. 백신 접종 후 매주 채혈과 임상증상을 비교하였으며 그 결과를 확인하였다.

도면

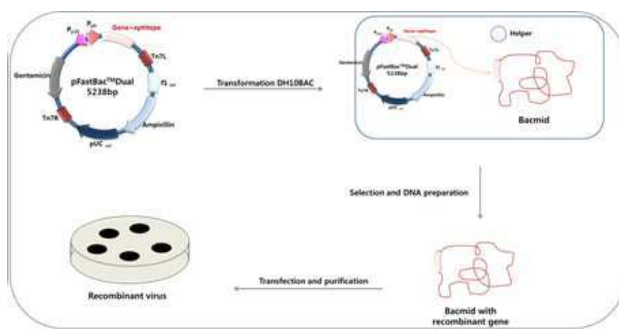
도면1



도면2

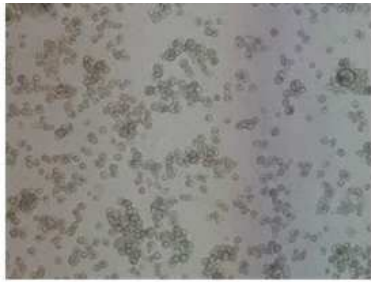


도면3

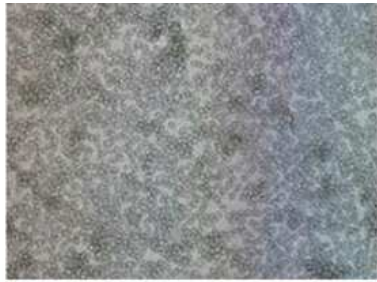


Bac-to-Bac baculovirus expression system

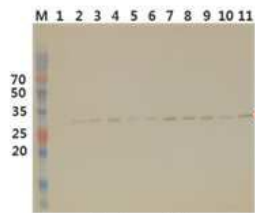
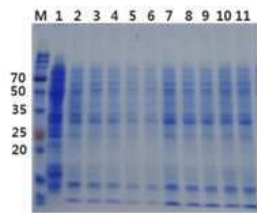
도면4



56FMBT infected Sf9 cell

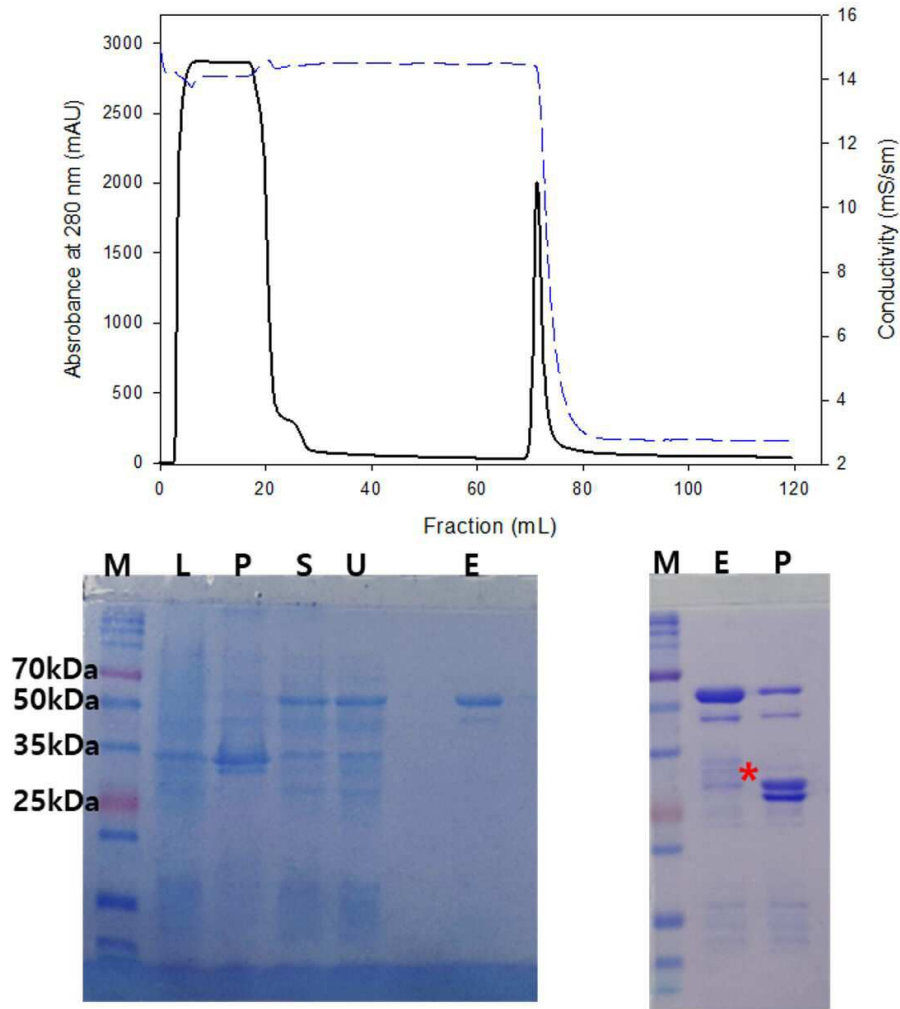


Uninfected Sf9 cell



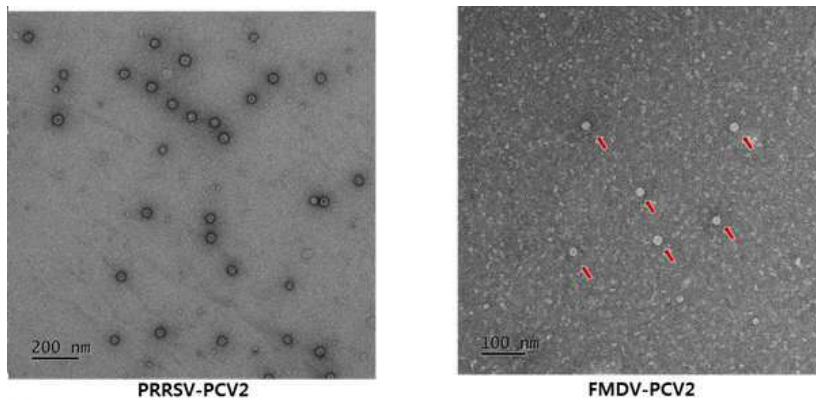
- M, Marker
- 1, Sf9 control
- 2, 56FMBT-14-1
- 3, 56FMBT-14-2
- 4, 56FMBT-14-3
- 5, 56FMBT-14-4
- 6, 56FMBT-14-5
- 7, 56FMBT-14-6
- 8, 56FMBT-14-7
- 9, 56FMBT-14-8
- 10, 56FMBT-14-9
- 11, 56FMBT-14-10

도면5

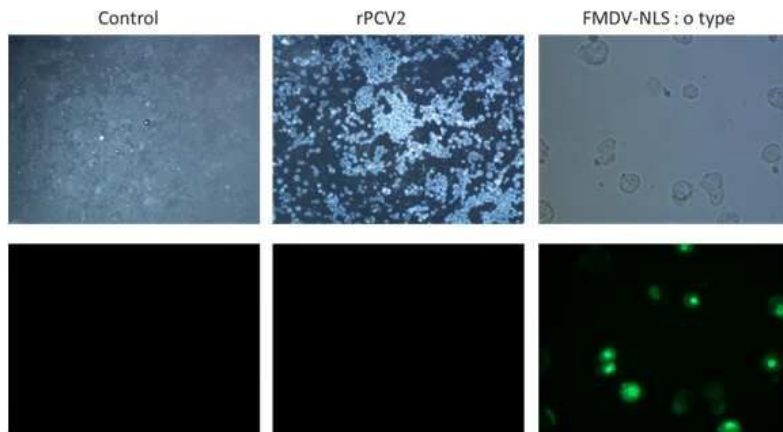


L: lysates, P: pellet, S: supernatant, U: unbound, E: eluent, P: protease treatment  
\*: target protein

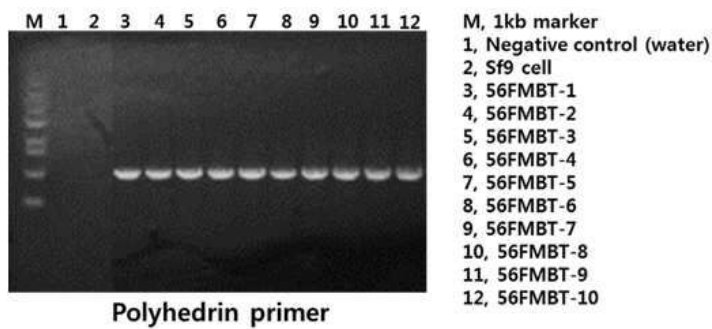
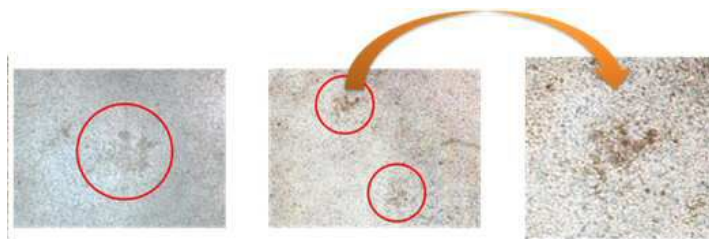
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> Optipharm.CO.,LTD
- <120> A combination vaccine based on virus like particle
- <130> OTIP1-50p
- <160> 30
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> FMDV epitope -1
- <400> 1

Leu Pro Asn Val Arg Gly Asp Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys Ala Ala

1 5 10 15

Arg Pro Leu Pro

20

<210> 2

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> FMDV epitope -2

<400> 2

Leu Pro Asn Val Arg Gly Asp Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys Ala Ala

1 5 10 15

Arg Pro Leu Pro Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln

20 25 30

Ser Leu

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRRSV epitope -1

<400> 3

Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu

1 5

<210> 4

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRRSV epitope -2

<400> 4

Ser Asn Asp Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Leu

1 5 10 15

Cys Glu Gly Ser Gly Ser Ser Leu Asp Asp Phe Cys His Gly Ser

20 25 30

<210> 5

<211> 762

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 56FMB (FMDV)

<400> 5

atgacgtacc caaggaggcg ttaccggcga cgtagacatc gccctcgag ccaccttgg 60

cagatactcc gccctagacc atggctcgtc ccccccgcc accgtcacag gtggaggagg 120

aaaaatggta tcttcaacac cgcctgtca agaacgttg gatatactat caagcgaacc 180

acactgccta atgtgcgtgg cgatctccaa gtgctggctc agaaggccgc gcgtccattg 240

cctgtcaaga cgccatcctg ggctgtggac atgatgagat tcaatattaa cgacttcctt 300

ccccctggag ggggctcaaa cccccgttct gtgccgttg agtactacag aatcagaaag 360

gtcaaggttg aattctggcc atgctctccg atcaccagg gtgatcgggg agtgggctcc 420

agtgtgttta tcttagacga caactttgia actaaggcca cagcactgac atatgacccc 480

tatgtaaact actccagcag acataccata acccaacct tctcgtacca tagcaggtag 540

ttcacaccta aacctgtctt agattccact attgattact ttcacacaaa caacaaaaga 600

aaccagctgt ggttagatt gcagactgct ggaatgtgg accacgtagg cctcggtagt 660

gcattcgaga acagtattta cgatcaggaa tacaatatcc gtgtcaccat gtatgttcaa 720

ttcagagagt tcaacttaa ggaccgcct ttgaaacct aa 762

<210> 6

<211> 804

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 56FMBT(FMDV)

<400> 6

atgacgtatc caaggaggcg ttaccgtcgg agaagacacc gccctcgtag ccatcttgg 60

caaatcttgc gccccgccc atggctcgtc ccccccgtc atcgtcacag ctggagacgt 120

aaaaacggta tcttcaacac ccgactctcc cgcaccttcg gatacactat caagcgaacc 180

acactgccta acgtgagagg gcacctccaa gtgctggctc agaaggcagc taggccgtg 240

cctagacaca agcaaaagat tgtggcacct gtaaagcagt cattagtcaa aactcccagc 300

tgggctgtgg acatgatgag attcaatatt aacgactttt tgccccagg cgggggttca 360

aatccacggt ctgtgccctt cgagtattac agaatcagga aggttaaggt tgaattctgg 420  
 ccctgcagcc ctatcacgca aggagatagg ggagtgggca gtagtgcggt tattctggat 480

gataactttg taacaaaggc cacagccttg acctacgac cttatgtgaa ttactctteg 540  
 cgccatacca taactcagcc tttctcctac cactcgcgct acttcagcc gaaaccagtc 600  
 ttagactcca ctattgacta cttccaacca aataataaaa gaaaccagtt gtggctgaga 660  
 ctacaaacag ctggaaacgt tgatcacgta ggtctcggca ctgcctttga aaactctata 720  
 tatgaccagg agtacaacat ccgtgtcacc atgtacgtcc agttccgaga gtttaacctt 780  
 aaggaccgcg cactgaaacc ctaa 804

<210> 7  
 <211> 762  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 80FMBT (FMDV)

<400> 7

atgacgtatc caaggcgtag ataccgtaga agaagacacc gtccccgcag ccaccttgg 60  
 cagatcctca ggcgccgacc ctggttggtc catccgaggc accgtcaccg gtggaggagg 120  
 aaaaatggca tcttcaaac gcgactgagc cgcacattcg gctacactat taagegtacc 180  
 acagtaaaga cgccttcgtg ggcggtgac atgatgcgtt tcaacattaa cgacttctt 240  
 cccccgggag ggggtctgcc caacgtgaga ggcgatttac aagtctggc tcaaaaggca 300  
 gctaggcctc tgccttcaaa tccccgctct gtgccattcg agtactacag aatcagaaaa 360

gttaaggttg agttctggcc ttgctcggc atcacacagg gtgatcgcgg agtcggetca 420  
 agtgccgtta ttctagacga taacttcgtc acaaaggcca cagcctcac ctatgacce 480  
 tatgtgaact actcctcccg ccataccata acccaacct tctcatacca ctctcgatac 540  
 tttacccta agccagtctt ggattccact atcgattact tccagccaaa caacaagaga 600  
 aatcagctgt ggttgagact ccaaactgct ggaatgtag accatgtggg actcggctact 660  
 gcattcgaaa acagtatata cgaccaggaa tacaacatcc gtgtaactat gtatgtgcag 720  
 ttcagagagt ttaatttgaa agaccacact ttaaacct aa 762

<210> 8  
 <211> 804  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 80FMB (FMDV)

<400> 8

atgacgtacc caaggaggcg ttaccggaga cgtcgtcaca ggccacgcag ccatcttggc 60  
 cagatcctgc gcagaaggcc ttggctcgtc cacccecgtc atcgtcaccg ctggagacgt 120  
 aaaaacggta tcttcaacac cagactcagc cgcactttcg gatacactat taagcgaacg 180  
 acagtcaaaa cgccatcctg ggccgtggac atgatgagat tcaatattaa cgactttctt 240  
 cccccaggag ggggcttacc caatgtgcga ggtgatctcc aagtctctggc ccagaaggca 300  
 gcgaggcctc tgcctcgtca caagcagaaa attgtggctc ctgtaaagca gtctttatca 360

aaccccaggt ctgtgccctt tgaatactat agaatacga aagttaaggt tgaattctgg 420  
 ccatgctccc cgatcaccca gggtgacagg ggagttggtt cgtctgctgt tattctggat 480  
 gacaactttg tcacaaaggc aacagccctc acctatgacc cgtatgtgaa ctactcgtcc 540  
 cgccacacaa tcaccagcc ttttcatac cactcaagat acttcacccc taagcctgtg 600  
 ttggatagta ctatcgatta cttccaacca aacaataaga gaaaccaact gtggttgcgc 660  
 ttgcaaaactg ctggaaactg agatcatgtc ggcttgggca ctgctttcga gaacagtata 720  
 tacgaccaag agtacaatat ccgtgtaacc atgtatgtcc agttcagaga gttcaatcta 780

aaagaccgcg ctctgaagcc ctaa 804

<210> 9

<211> 762

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 125FMB (FMDV)

<400> 9

atgacgtatc caaggaggag gtatcgtaga agaagacacc gcccgcgcag ccatcttggc 60  
 cagatactcc gtagacgcc ctggctcgtc caccacgcc accgtcaccg ttggcgtagg 120  
 aaaaatggta tcttcaacac acgctcgtcg cgaaccttcg gttacactat caaacgaacc 180  
 acagtcaaga cgcttcttg ggccgtggac atgatgagat tcaatattaa tgactttctt 240  
 cccccaggag ggggctcaaa cccacgtctt gtgcccttcg aatactaccg tataagaaag 300

gtaagggtt agttctggcc ttgcagccc atcacacaag gtgacagagg agtgggctcc 360  
 agtgctgtca ttctagatga taacttcgtg ctgccaaacg tacggggtga cctccaggtg 420  
 ctggcacaaa aggcagctag gccctgcct acgaaagcca ccgccttgac ctacgacccc 480  
 tacgtcaatt actcgtctcg ccataccatc actcagccct tctctacca ttcccgtac 540  
 tttacccca agcctgtcct cgattcaact attgattact tccaacctaa caacaagaga 600

aaccagctgt ggttgagatt acaaactgct gaaacgttg accacgtagg attgggcact 660  
 gcgttcgaga acagtatcta cgatcaggaa tataacatca gagtaacaat gtatgtgcag 720

ttagagagt tcaatttgaa agaccacct ttaaagecat aa 762

<210> 10  
 <211> 804  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 125FMBT (FMDV)  
 <400> 10

atgacgtatc caagaaggcg ttacagacgg agaagacacc gccacgcag ccatcttgg 60  
 caaattctgc gcagacgcc gtggtctggt catccccgcc atcgcatcg ctggagacga 120  
 aaaaatggca tctcaacac ccgtctctcg cgcacattcg gatatactat caaacgtacc 180  
 acagtcaaaa caccctcatg ggcagtcgac atgatgagat tcaatattaa tgactttctt 240

ccacctgggg ggggctcaaa tccgcgctct gtcccgtttg aatattatag aatacgaag 300  
 gttaaagttg agttctggcc ctgtagtccg atcaccagg gtgatcgggg agtaggctct 360  
 agtgctgtta tctggatga taactttgta ctgccaacg tgagaggtga ttgcaagtg 420  
 ctggcccaga aagcagcgag gccactgcct cgtcacaac agaaaatagt ggcaccggtt 480  
 aagcagtcct taactaaggc cacagcctta acgtatgatc cgtatgtgaa ctactccagc 540  
 agacatacca ttacgcagcc gttcagctat cactctcgtt actttacccc taaacctgtc 600  
 ctggattcaa cgattgatta ttttcagccg aacaacaaaa gaaatcagtt atggttgcga 660

ctacaaactg ctgtaagtgt agatcatgtg ggcctcggta ctgcgtttga gaatagtatt 720  
 tacgaccagg aatacaatat ccgtgttacc atgtatgttc aatttcgtga atttaattta 780  
 aaggaccctc cacttaaac ttaa 804

<210> 11  
 <211> 762  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 185FMB (FMDV)  
 <400> 11

atgacgtacc cacgcaggag gtatcggcga agacgccata gacccgcag ccacttagga 60  
 cagatcctcc gcccccgcc atggctcgtc ccccccgtc accgtcaccg ttggagaagg 120

aagaatggca tcttcaacac ccgcttgtcc agaacattcg gatatactat caagcgaacc 180  
 acagtcaaaa cgccatcatg ggcagtgac atgatgagat ttaatatcaa tgacttcctt 240  
 cctcctggag ggggctcgaa ccctcgttct gtccccttcg agtactaccg tattagaaag 300  
 gtaagggtg agttctggcc gtgctcccc atcacccaag gtgatagggg tgtgggttct 360  
 agtgctgtga ttctcgaiga caatttgtc acaaaggcca cagcctaac ctatgacct 420  
 tatgtaaact acagctcggc tcatacgata acccagecgt tctcatacca ctcccgttac 480  
 ttactccca agcctgtcct ggattctact attgattact tccaaccaa caacaaaaga 540

aaccagctgt ggttgcgtct acaaactgcg ctgcctaacg tgagaggcga ttgcaagtg 600  
 ctggctcaga aggcagctag gccactgcca ggaacgttg accatgtagg tctcggcact 660  
 gctttcgaga acagtatata cgaccaggaa tacaacatca gagtaacat gtacgtgcag 720  
 ttcagagaat tcaatctgaa agacccccct cttaaaccgt aa 762

<210> 12  
 <211> 729  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 56PRGP5 (PRRSV)

<400> 12  
 atgacgtatc caaggcgcg ttaccgccgt agaagacatc gccctcgtag ccatcttggc 60

cagattctcc gccgtcgtcc ctggttagtg caccgcgctc accgtcatcg gtggagaagg 120  
 aaaaatggca ttttaacac ccgctgtcgc cgaacgtttg gatatactat caagcgaacc 180  
 acttcccatc tgcaactgat atacaacttg gtcaaaacgc caagttgggc agtggatag 240  
 atgcggttca acattaatga cttttaccg ccaggagggg gttcaaacc ccgctctgtg 300  
 ccgtttgaat attaccgaat ccgcaaagtc aaagtggaat tctggccctg ttcccctatt 360  
 acacaggggtg accgggggtg cggctctagt gcagttatc tagatgataa ttttgtaaca 420  
 aaggccacgg cccttaccta tgatccttat gttaattaca gcagccgcca tacaatcacc 480

cagcctttct cgtaccactc acgctatfff accccgaac ctgtgctgga ttcaactatt 540  
 gattatfff aaccaaaaca taaacgtaat cagctgtggt tgcggctgca aactgctggg 600  
 aatgtagatc atgttggett aggtaccgcg ttcgaaaata gtatatatga ccaggagtat 660  
 aacatccgtg taacaatgta tgttcagttc agagagtta atctgaaaga tccgccgctt 720  
 aagccgtaa 729

<210> 13  
 <211> 795

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 56PRGP5M (PRRSV)  
 <400> 13

atgacgtatc caaggcgccg ttaccggaga agaagacacc gcccgcgctc tcatttgggt 60  
 cagatcctcc gccggaggcc ttggetggtc catccccgcc accgtcaccc ctggagacgc 120  
 aaaaatggca tattcaatac ccgtctgtcg cgcacgttcg gatatactat taaacgaacc 180  
 acaagtaatg acagcagctc acatttacag ctgatttata acttgacgct ctgtgagggt 240  
 agcgggagct cgtagatga tttctgccac ggttcagtca aaacaccatc ttgggcgggtg 300  
 gacatgatgc gttttaatat caatgatttt ctccgccag gagggggctc aaatcctcgc 360  
 tctgtgcctt ttgaatatta tagaataaga aaggttaagg ttgaattctg gccttgctct 420  
  
 ccgatcacac agggtgaccg aggtgtgggc tccagtccg tgattctgga tgataacttt 480  
 gtgacgaagg caacagccct gacgtatgat ccgatgtta attattcctc acgtcatacc 540  
 attacccaac ctttctccta ccatagccgg tactttacce ccaaacctgt cctggatagt 600  
 accattgact atttcagcc aaacaacaaa cgtaatcaac tgtggttaag actacagacc 660  
 gctggaacg tagatcatgt tgggttaggc actgcatttg aaaatagtat ttatgaccag 720  
 gagtacaaca tccgtgtaac tatgtacgta caatttcggg aatttaactc gaaagatccg 780  
 ccgcttaagc cgtaa 795

<210> 14  
 <211> 729  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 80PRGP5 (PRRSV)  
 <400> 14

atgacgtatc cacgtcgccg ttategccgg cgcagacatc ggcccgcttc acatctgggc 60  
 caaatactca ggcgccgtcc gtggtagtc catcctcgtc atcgtcaccc ctggagacgt 120  
 aaaaatggga tctttaacac ccgcctgagc cgtactttcg gttacacgat caagcgaacc 180  
 acagtcaaaa cgcccagtgt ggcggtggat atgatgagat ttaatattaa tgattttctg 240  
 ccgccaggag gtggctctca tctacaactg atttataacc tctcaaaccc tcgctctgtg 300  
  
 ccgtttgaat actatcgaat tcggaaagt aaagtggaat tttggccgtg tccccgatc 360  
 acacagggtg atcgggggtg ggcgacagc gcagttatc tggatgacaa ctttgttaca 420

aaggccacag cccttaccta tgatccttat gtaaattatt ccagccggca tactataacc 480  
 cagcccttct cgtatcactc acgctacttt acccccaaac cggctcttaga ttccactatt 540  
 gattatttcc agccaaacaa caagagaaat cagctgtggt tgagattaca aactgctgga 600  
 aatgttgacc acgttgacct ggggacggct tttgagaata gtatatatga ccaggagtac 660  
 aatatccgtg taaccatgta cgtacagttc cgagaattca atcttaaaga tccgccattg 720

aaaccttaa 729

<210> 15

<211> 795

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 80PRGP5M (PRRSV)

<400> 15

atgacgtatc caaggcgcg ttaccggaga cgaagacatc ggcctcgcag ccatcttggc 60  
 cagatcttac gccgcgtcc ctggctgggt catcctcgcc accggcatcg ctggcgcagg 120  
 aaaaatggca tttcaatac ccgcctgtcc cgtacctttg gatatactat caaacgaacc 180  
 acagtcaaaa cgccatcttg ggcagtagac atgatgcgtt ttaatattaa tgatttttta 240

cctccagggtg ggggaagtaa cगतagctca tcccatctac aactgattta taatttgacg 300  
 ctgtgcgaag gcagcgggtc aagcttagac gacttttgcc acggctcctc aaacccccgt 360  
 tctgtgccgt ttgaatacta tcgtataaga aaggttaagg tggaaattctg gccttgttcc 420  
 ccgatcactc agggtgaccg tggagtgggt tcttcggctg ttattctgga tgataatfff 480  
 gttacaaaag ccacggcctt aacctatgat ccgatgtaa attacagttc ccgccatacc 540  
 attacacagc cattctcgta tcactctcgc tatfffacc ccaaacctgt cctcgattca 600  
 actattgatt attccaacc aaataacaaa agaaccagc tgtggttcgc gttgcaaacg 660

gcgggtaatg tcgaccagt gggctcggc actgcattcg aaaacagtat atacgatcag 720  
 gagtacaata tccgtgtaac aatgtatggt cagtttcgtg agtttaactc gaaagatccg 780  
 ccgcttaagc cgtaa 795

<210> 16

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 125PRGP5 (PRRSV)

<400> 16

atgacgtatc caaggcgccg ttaccgccc cgtagacacc gccccctag ccatcttgg 60  
cagatattac gccggcgctc gtggttagtc cacccacggc atcgatcatc gtggagaagg 120

aagaatggca tcttcaatac gcgacttagc cgcaccttcg ggtacactat taaacgaaca 180  
acagtcaaaa cgccgtcctg ggcggtggac atgatgcgtt ttaatattaa cgatttttta 240  
ccgccaggtg ggggctctaa cccgcctctc gtgccctttg aatattatag aattagaaaa 300  
gttaaggttg aattctggcc gtgtagtccg atcaccagg gtgatagggg agtgggttca 360  
agtgcagtta ttctagatga caactttgtt agtcatctgc agctgatcta taattgaca 420  
aaggcaacag cctcacgta tgatccatac gtaaattact cctcacgcca tactataacc 480  
cagcccttct cgtatcactc tcggtacttt accccgaac ctgttctgga tagcacaatt 540

gattattttc aaccaaaaaa caaacggaat cagctgtggt tgagactgca aactgctggt 600  
aacgtggacc acgtgggctt gggtagctgc ttcgagaatt caatttatga tcaagaatat 660  
aatatccgcg tcacatgta tgtacagttt cgtgagtta atcttaaaga cctccactg 720  
aaaccttaa 729

<210> 17  
<211> 795  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> 125PRGP5 (PRRSV)  
<400> 17

atgacgtatc caaggcgccg ttaccggaga cgccgtcatc gtccgcgag ccatcttggc 60  
  
caaattctaa gacgccgcc ttggttagta cacccgcc atcgccacc gtggagacgt 120  
aaaaatggta tcttcaaac ccggetcagt agaacctttg gttatagat caagcaacc 180  
acagtcaaaa cgccatcatg ggcggtggac atgatgaggt ttaatattaa tgatttctg 240  
ccccgggtg ggggctcaaa cctcgtagt gttccgtttg aatattatcg tattagaaag 300  
gtcaaggttg agttttggcc atgttccccg atcaccaag gtgatcgagg gttgggctcc 360  
agtgcagtta ttttagatga taattttgta agcaatgact ctagctcca tctgcagctg 420  
atttacaact tgacactgtg cgagggtca ggcagctcgt tagatgattt ttgcatggc 480

tccacaaaag ccacagcct gacctatgat ccctatgtga actattcttc tcgccatag 540  
ataactcage cgttctcata ccaactcgcg tatttcacc cgaaaccggt cctcgattct 600  
actatagact atttcagc aaataataaa agaatacagc tgtggttgcg gttgcaact 660  
gctggtaatg tagaccagt tggactgggc actgcatttg aaaacagtat ttacgatcag 720

gaatataaca tccgtgttac aatgtacgic cagtttagag aattcaatct taaagacccc 780  
cctcttaaac cttaa 795

<210> 18  
<211> 253  
<212> PRT

<213> Artificial Sequence  
<220><223> 56FMB (FMDV)  
<400> 18

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 His Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg  
35 40 45  
Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Leu Pro Asn  
50 55 60

Val Arg Gly Asp Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys Ala Ala Arg Pro Leu  
65 70 75 80  
Pro Val Lys Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile  
85 90 95  
Asn Asp Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro  
100 105 110  
Phe Glu Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys  
115 120 125  
Ser Pro Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile  
130 135 140  
Leu Asp Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro  
145 150 155 160  
Tyr Val Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr  
165 170 175  
His Ser Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp  
180 185 190

Tyr Phe Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln  
 195 200 205

Thr Ala Gly Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn  
 210 215 220

Ser Ile Tyr Asp Gln Glu Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln  
 225 230 235 240

Phe Arg Glu Phe Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro  
 245 250

<210> 19

<211> 267

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 56FMBT(FMDV)

<400> 19

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 His Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg  
 35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Leu Pro Asn  
 50 55 60

Val Arg Gly Asp Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys Ala Ala Arg Pro Leu  
 65 70 75 80

Pro Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Ser Leu Val  
 85 90 95

Lys Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp  
 100 105 110

Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu  
 115 120 125

Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro  
 130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Glu Phe Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro

260 265

<210> 20

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 80FMB (FMDV)

<400> 20

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 His Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg

35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Val Lys Thr

50 55 60

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



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

260 265

<210> 22

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 125FMB (FMDV)

<400> 22

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 His Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg  
 35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Val Lys Thr  
 50 55 60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu  
 65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val 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 Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn  
 115 120 125

Phe Val Leu Pro Asn Val Arg Gly Asp Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys  
 130 135 140

Ala Ala Arg Pro Leu Pro Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro  
 145 150 155 160

Tyr Val Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr  
 165 170 175

His Ser Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp  
 180 185 190

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

195 200 205  
 Thr Ala Gly Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn  
 210 215 220  
 Ser Ile Tyr Asp Gln Glu Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln  
 225 230 235 240

Phe Arg Glu Phe Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro  
 245 250

<210> 23  
 <211> 267  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 125FMBT (FMDV)  
 <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 His Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg

35 40 45  
 Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Val Lys Thr  
 50 55 60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu  
 65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val 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 Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn  
 115 120 125

Phe Val Leu Pro Asn Val Arg Gly Asp Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys  
 130 135 140

Ala Ala Arg Pro Leu Pro Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val

145                    150                    155                    160  
 Lys Gln Ser Leu Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val  
                           165                    170                    175  
 Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser  
  
                           180                    185                    190  
 Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe  
                           195                    200                    205  
 Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala  
                           210                    215                    220  
 Gly Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile  
 225                    230                    235                    240  
 Tyr Asp Gln Glu Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg  
                           245                    250                    255  
  
 Glu Phe Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro  
                           260                    265  
 <210>    24  
 <211>    253  
 <212>    PRT  
 <213>    Artificial Sequence  
 <220><223>    185FMB (FMDV)  
 <400>    24  
 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 His Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg  
  
                           35                    40                    45  
 Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Val Lys Thr  
                           50                    55                    60  
 Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu  
                           65                    70                    75                    80  
 Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr Tyr





<400> 26

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 His Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg  
 35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Ser Asn Asp  
 50 55 60

Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Leu Cys Glu Gly  
 65 70 75 80

Ser Gly Ser Ser Leu Asp Asp Phe Cys His Gly Ser Val Lys Thr Pro  
 85 90 95

Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu Pro  
 100 105 110

Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg  
 115 120 125

Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr Gln  
 130 135 140

Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe  
 145 150 155 160

Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser  
 165 170 175

Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr Phe  
 180 185 190

Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro Asn  
 195 200 205

Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala Gly Asn Val  
 210 215 220

Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp Gln  
 225 230 235 240

Glu Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe Asn  
 245 250 255

Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro  
 260

<210> 27  
 <211> 242  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 80PRGP5 (PRRSV)  
 <400> 27

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 His Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg  
 35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Val Lys Thr  
 50 55 60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu  
 65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Ser Asn  
 85 90 95

Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val  
 100 105 110

Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly  
 115 120 125

Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala  
 130 135 140

Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Thr  
 145 150 155 160

Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu  
 165 170 175

Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu  
 180 185 190  
 Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala Gly Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly  
 195 200 205  
 Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp Gln Glu Tyr Asn Ile Arg Val  
 210 215 220  
 Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu  
 225 230 235 240

Lys Pro

<210> 28  
 <211> 264  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 80PRGP5M (PRRSV)  
 <400> 28

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 His Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg  
 35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Val Lys Thr  
 50 55 60  
 Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu  
 65 70 75 80  
 Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Asp Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile  
 85 90 95  
 Tyr Asn Leu Thr Leu Cys Glu Gly Ser Gly Ser Ser Leu Asp Asp Phe  
 100 105 110  
 Cys His Gly Ser Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg  
 115 120 125

Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr Gln  
 130 135 140  
 Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe  
 145 150 155 160  
 Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser  
 165 170 175  
 Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr Phe  
 180 185 190

Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro Asn  
 195 200 205  
 Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala Gly Asn Val  
 210 215 220  
 Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp Gln  
 225 230 235 240  
 Glu Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe Asn  
 245 250 255  
 Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro

260  
 <210> 29  
 <211> 242  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 125PRGP5 (PRRSV)  
 <400> 29

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 His Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg  
 35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Val Lys Thr  
 50 55 60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu  
 65                      70                      75                      80  
 Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val 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 Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn  
                                  115                      120                      125  
 Phe Val Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Lys Ala Thr Ala  
                                  130                      135                      140  
 Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Thr  
 145                      150                      155                      160  
 Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu  
                                  165                      170                      175  
 Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu  
                                  180                      185                      190  
  
 Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala Gly Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly  
                                  195                      200                      205  
 Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp Gln Glu Tyr Asn Ile Arg Val  
                                  210                      215                      220  
 Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu  
 225                      230                      235                      240  
 Lys Pro

<210> 30  
 <211> 265  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 125PRGP5 (PRRSV)  
 <400> 30

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