



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0083160
(43) 공개일자 2024년06월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 39/00 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2022-0140667
(22) 출원일자 2022년10월27일
심사청구일자 2022년10월27일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
이창희
경기도 성남시 수정구 위례광장로 97, 3218동 701호
장규환
경상남도 진주시 내동로348번길 5-10, 201호
(74) 대리인
특허법인정진

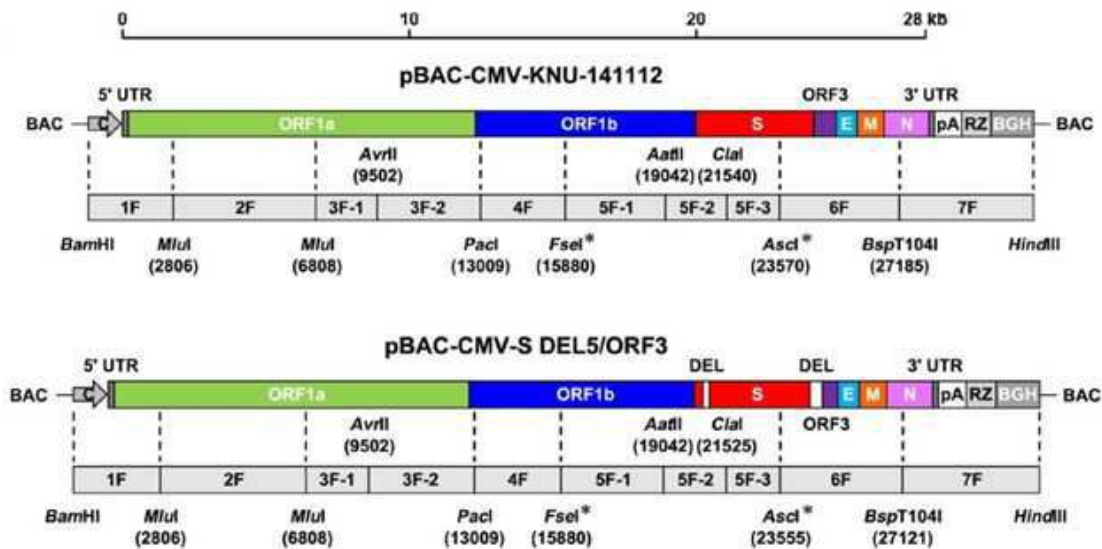
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 돼지 유행성 설사 바이러스 기반 바이러스 벡터 백신 플랫폼 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 돼지 유행성 설사 바이러스 기반 바이러스 벡터 백신 플랫폼 및 이의 용도 등에 관한 것이다. 본 발명의 pBAC-CMV-KNU-141112 및 pBAC-CMV-S DEL5/ORF3의 PEDV 전장 게놈 클론을 성공적으로 얻은 것을 확인하였고, ORF3 유전자 위치에 외래 단백질 항원을 성공적으로 탑재할 수 있다는 것을 확인하였다. 또한, 신종 또는 변종 돼지 유행성 설사 바이러스 스파이크 단백질(S)을 클론 내 S 단백질 위치에 탑재하여, 혈청 테스트 및 항원성에 영향을 미치는 구조의 확인을 하였던 바, 바이러스 벡터 백신 플랫폼으로 폭 넓게 사용 가능할 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/86 (2013.01)

C12N 2770/20021 (2013.01)

C12N 2770/20043 (2013.01)

C12N 2770/20052 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345346882

과제번호 2018R1D1A1B07040334

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(교육부)

연구과제명 돼지유행성설사 바이러스 병원성 인자 규명 및 역유행학 기반 분자약독화 백신 플랫폼 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 경상국립대학교

연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 돼지 유행성 설사 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) cDNA의 전장 뉴클레오티드를 포함하는, 감염성 클론.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 서열번호 1로 표시되는 돼지 유행성 설사 바이러스 cDNA의 전장 뉴클레오티드는 KNU-141112(GenBank accession numbers KR873434)에서 유래한 것을 특징으로 하는, 감염성 클론

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 서열번호 2로 표시되는 돼지 유행성 설사 바이러스 cDNA의 전장 뉴클레오티드는 S DEL5/ORF3(GenBank accession numbers KY825243)에서 유래한 것을 특징으로 하는, 감염성 클론

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 감염성 클론은 cDNA의 전장 뉴클레오티드 서열의 5' 말단에 사이토메갈로바이러스 (CMV)의 발현 프로모터가 위치하고,

cDNA의 전장 뉴클레오티드 서열의 3' 말단에 델타 간염 바이러스 리소자임 절단 부위, 소 성장 호르몬 전사 말단 서열, 및 폴리 아데닌 서열이 위치하는 것을 특징으로 하는, 감염성 클론.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 감염성 클론은 세균 인공 염색체(bacterial artificial chromosome, BAC) 내에서 클로닝되는 것을 특징으로 하는, 감염성 클론.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 감염성 클론은 이중 뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 감염성 클론.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 이중 뉴클레오티드는 감염성 클론의 ORF3 유전자 또는 스파이크 유전자 위치에 삽입된 것을 특징으로

하는, 감염성 클론.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 이중 뉴클레오티드는 GNU-2110 균주에서 유래한 스파이크 단백질(S51)을 코딩하는 서열번호 3으로 표시되는 뉴클레오티드 서열인 것을 특징으로 하는, 감염성 클론.

청구항 9

제1항에 따른 감염성 클론을 포함하는, 재조합 PEDV 생산용 벡터.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 벡터는 재조합 PEDV 생산용 세균 인공 염색체(BAC) 벡터인 것을 특징으로 하는, 재조합 PEDV 생산용 벡터.

청구항 11

제1항에 따른 감염성 클론을 세포에 형질감염시키는 단계; 를 포함하는, 재조합 PEDV 생산방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 세포는 Vero 세포, CHO 세포, MRC-5, LLC-MK2, 또는 MDCK 세포인 것을 특징으로 하는, 재조합 PEDV 생산방법.

청구항 13

제1항에 따른 감염성 클론을 백본으로 하여, 관심 변이체(variant of interest, VOI) 이중 뉴클레오티드를 도입하는 단계; 를 포함하는, 이중 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 PEDV의 생산방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 재조합 PEDV는 모 바이러스(parental virus)와 동일한 성장능을 갖는 것을 특징으로 하는, 이중 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 PEDV의 생산방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 재조합 PEDV는 모 바이러스와 상이한 항원성을 나타내는 것을 특징으로 하는, 이중 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 PEDV의 제조방법.

청구항 16

제13항에 있어서,

상기 재조합 PEDV는 역유전체 시스템(RG system)에 의해 수득 되는 것을 특징으로 하는, 이중 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 PEDV의 제조방법.

청구항 17

제1항 내지 제8항으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 감염성 클론을 유효성분으로 포함하는, 백신 조성물.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 돼지 유행성 설사 바이러스 기반 바이러스 벡터 백신 플랫폼 및 이의 용도 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 돼지 유행성 설사 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)는 자돈에서 급성 장염과 수양성 설사를 유발하며 특히 어린 자돈에 있어서는 폐사율이 100%에 달하는 돼지 바이러스성 원인체이다. 현재 국내에서는 이 바이러스성 질병이 전국적으로 발생 보고되고 있으며 매년 국내 양돈 산업에 막대한 경제적 피해를 주고 있는 실정이다. PED 바이러스는 코로나 바이러스과(Coronaviridae family)에 속하며, 최근에는 돼지 생식기호흡기증후군(porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS)의 원인체인 PRRS 바이러스가 속한 Arteriviridae 과와 함께 Nidovirales 속(order)으로 분류하고 있다. PED 바이러스는 외피를 가진 단일 가닥, 양성(positive)-센스 RNA 바이러스로서, 약 28kb 정도 크기의 유전자를 포함하고 있다. PED 바이러스 유전자는 5' 비번역부위(UTR), 적어도 7개의 ORF(open reading frame), 3' UTR 및 폴리-A 꼬리(tail)로 구성되어 있다. 바이러스 유전자의 약 2/3는 두 개의 ORF 1a와 1b가 차지하고 있으며, 여기에는 바이러스 유전자의 복제와 전사에 관여하는 비구조적 단백질들(nonstructural proteins; NSP)이 코딩되어 있다. 나머지 ORF는 코로나바이러스의 기본적인 구조 단백질인 S(spike), E(envelope), M(membrane) 및 N(nucleocapsid) 그리고 한 개의 악세서리(accessory) 유전자 ORF3를 코딩하고 있다.

[0004] 북미에서 시작된 2013-2014년 PEDV 팬데믹 이후, 이 돼지 장내 코로나바이러스는 전 세계 양돈산업에 막대한 경제적 피해를 입혔다. 따라서 현장에서 PED를 제어하기 위해 많은 연구 노력이 투자되었으며, 이에 따라 PEDV의 분자 역학 및 유전적 진화에 대한 실질적인 정보가 수집되었다. 그러나 PEDV 복제 및 병인의 기본 메커니즘은 아직 완전히 분석되지 않았다. 세포 배양에서 유행성 PEDV 균주를 분리하고, PEDV 계놈을 조작하는 절차의 어려움은 돼지 유행성 설사 바이러스 연구에 걸림돌이 되어왔다.

[0005] 한편, PEDV 계놈의 조작은 표적 RNA 재조합 기술 또는 역유전적 접근을 통해서 이뤄졌다. 역유전학(reverse genetics, RG) 시스템은 바이러스 분자 생물학 및 병원성 메커니즘을 연구하고 새롭고 효과적인 바이러스 벡터 및 백신을 개발하기 위한 현대 바이러스학의 강력한 기술이다. 현재까지 일부 RG 방법은 LP-G1a 및 HP-G2b PEDV 균주 모두에 대해 개발되었으며, 여기서 감염성 cDNA 클론은 T7 프로모터 아래 시험관 내 결찰에 의해 구성되었다. 또는 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus, CMV) 즉시 초기 프로모터에서 박테리아 인공 염색체(bacterial artificial chromosome, BAC) 플라스미드로 조작되었다. 그러나 한국 PEDV 야외 균주 기반의 다용도 RG 플랫폼은 아직 개발되지 않은 실정이다. 따라서 PED 바이러스에 대한 전체염기서열분석을 포함한 역유전학 기법의 구축 및 그 파생 연구가 시급한 상황이다. 상기 기법의 구축 및 이를 활용한 연구 결과들은 PED 바이러스 연구를 한층 향상시킬 수 있으며, 향후 바이러스에 대한 분자 기능학적 해독의 시간을 단축시킬 것으로 판단된다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 HP-G2b 한국 프로토타입 균주 KNU-141112 및 약독화 생백신(live attenuated vaccine, LAV) 균주 S DEL5/ORF3의 첫 감염성 cDNA 클론을 진핵생물 CMV 프로모터의 제어 하에 BAC에서 제작하였다. 각 BAC 플라스미드를 Vero 세포로 형질감염 시켜, 자손 감염성 PEDV, icKNU-141112, 및 icS DEL5/ORF3를 회수하였

으며, 표현형 및 유전형 특성은 각각의 모 바이러스에 필적하였다. 또한, DNA-launched HP-G2b PEDV 감염성 cDNA 클론 pBAC-CMV-KNU-141112를 백본으로 사용하여, EGFP(enhanced green fluorescent protein)을 발현하는 리포터 유전자 또는 변이체 S 단백질을 발현하는 이중 S 유전자로 교체된 ORF3 또는 S 유전자를 갖는 2개의 재조합 바이러스를 구축하였다. 본 발명의 BAC 기반 RG 시스템은 PED 뿐만 아니라 기타 새로운 수의 또는 인간 질병에 대한 차세대 백신 플랫폼 역할을 할 것으로 기대된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 국내 등록특허 제10-0432977호
(특허문헌 0002) 국내 등록특허 제10-0617951호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, pBAC-CMV-KNU-141112 및 pBAC-CMV-S DEL5/ORF3의 PEDV 전장 게놈 클론을 성공적으로 얻은 것을 확인하였고, ORF3 유전자 위치에 외래 단백질 항원을 성공적으로 탑재할 수 있다는 것을 확인하였다. 또한, 신종 또는 변종 돼지 유행성 설사 바이러스 스파이크 단백질(S)을 클론 내 S 단백질 위치에 탑재하여, 혈청 테스트 및 항원성에 영향을 미치는 구조의 확인을 하였던 바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 이에 본 발명의 목적은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 돼지 유행성 설사 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) cDNA의 전장 뉴클레오타이드를 포함하는, 감염성 클론을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 감염성 클론을 포함하는, 재조합 PEDV 생산용 벡터를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 감염성 클론을 세포에 형질감염시키는 단계; 를 포함하는, 재조합 PEDV 생산방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 감염성 클론을 백본으로 하여, 관심 변이체(variant of interest, VOI) 이중 뉴클레오타이드를 도입하는 단계; 를 포함하는, 이중 뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 PEDV의 생산방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 감염성 클론을 유효성분으로 포함하는, 백신 조성물을 제공하는 것이다.
- [0015] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 돼지 유행성 설사 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) cDNA의 전장 뉴클레오타이드를 포함하는, 감염성 클론을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 본 발명의 감염성 클론을 포함하는, 재조합 PEDV 생산용 벡터를 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 본 발명의 감염성 클론을 세포에 형질감염시키는 단계; 를 포함하는, 재조합 PEDV 생산방법을 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 본 발명의 감염성 클론을 백본으로 하여, 관심 변이체(variant of interest, VOI) 이중 뉴클레오타이드를 도입하는 단계; 를 포함하는, 이중 뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 PEDV의 생산방법을 제공한다.

- [0021] 또한, 본 발명은 본 발명의 감염성 클론을 유효성분으로 포함하는, 백신 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일 구현예에서 상기 서열번호 1로 표시되는 돼지 유행성 설사 바이러스 cDNA의 전장 뉴클레오티드는 KNU-141112(GenBank accession numbers KR873434)에서 유래한 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 본 발명의 다른 구현예에서 상기 서열번호 2로 표시되는 돼지 유행성 설사 바이러스 cDNA의 전장 뉴클레오티드는 S DEL5/ORF3(GenBank accession numbers KY825243)에서 유래한 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 감염성 클론은 cDNA의 전장 뉴클레오티드 서열의 5' 말단에 사이토메갈로 바이러스 (CMV)의 발현 프로모터가 위치하고, cDNA의 전장 뉴클레오티드 서열의 3' 말단에 델타 간염 바이러스 리보자임 절단 부위, 소 성장 호르몬 전사 말단 서열, 및 폴리 아데닌 서열이 위치하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다,
- [0025] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 감염성 클론은 세균 인공 염색체(bacterial artificial chromosome, BAC) 내에서 클로닝되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 감염성 클론은 이중 뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 이중 뉴클레오티드는 감염성 클론의 ORF3 유전자 또는 스파이크 유전자 위치에 삽입된 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 이중 뉴클레오티드는 GNU-2110 균주에서 유래한 스파이크 단백질(S51)을 코딩하는 서열번호 3으로 표시되는 뉴클레오티드 서열인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 벡터는 재조합 PEDV 생산용 세균 인공 염색체(BAC) 벡터인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 세포는 Vero 세포, CHO 세포, MRC-5, LLC-MK2, 또는 MDCK 세포인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 재조합 PEDV는 모 바이러스(parental virus)와 동일한 성장능을 갖는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 재조합 PEDV는 모 바이러스와 상이한 항원성을 나타내는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 재조합 PEDV는 역유전체 시스템(RG system)에 의해 수득 되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

- [0035] 본 발명의 pBAC-CMV-KNU-141112 및 pBAC-CMV-S DEL5/ORF3의 PEDV 전장 게놈 클론을 성공적으로 얻은 것을 확인하였고, ORF3 유전자 위치에 외래 단백질 항원을 성공적으로 탑재할 수 있다는 것을 확인하였다. 또한, 신종 또는 변종 돼지 유행성 설사 바이러스 스파이크 단백질(S)을 클론 내 S 단백질 위치에 탑재하였고, 혈청 테스트 및 항원성에 영향을 미치는 구조의 확인을 하였는 바, 바이러스 벡터 백신 플랫폼으로 폭 넓게 사용 가능할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0037] 도 1은 HP-G2b KNU-141112 및 LAV S DEL5/ORF3의 전장 cDNA 게놈 구성을 나타낸 것이다(C: 사이토메갈로 바이러스의 발현 프로모터; Rz: 델타 간염 바이러스 리보자임 절단 부위; BGH: 소의 성장 호르몬 전사 말단 서열; pA: 폴리 아데닌 서열; *: 침묵 돌연변이를 도입해서 생긴 구조 마커 FseI 및 AscI).
- 도 2는 각 cDNA 클론에서 구조된 바이러스를 식별한 결과를 나타낸 것이다. 구체적으로, 도 2a 및 2b는 전장

BAC(pBAC-CMV-KNU-141112 또는 pBAC-CMV-S DEL5/ORF3) 및 pBud-PEDV-N 플라스미드를 Vero 세포에 형질감염 (transfect) 시키고, 구조된 바이러스-유도 CPE를 모니터링한 결과; 및 PEDV N 또는 ORF3 단백질에 대한 Mab를 사용한 IFA(Immunofluorescence assay) 결과를 나타낸 것이다(화살표: 합포체 및 공포를 나타냄). 도 2c 내지 2e는 qRT-PCR에 의한 24 hpi에서 PEDV에 감염된 Vero 세포의 게놈 RNA(도 2c), sg mRNA-N(도 2d) 및 sg mRNA-ORF3(도 2e)의 정량 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 icKNU-141112 및 icS DEL5/ORF3의 유전형 및 표현형 특성을 나타낸 것이다. 구체적으로, 도 3a는 KNU-141112(왼쪽 패널) 및 S DEL5/ORF3(오른쪽 패널)의 모(WT) 및 구조된(icPEDV) 바이러스에서 마커 돌연변이(FseI 및 AscI 인식 부위)를 확인한 것이다. 도 3b는 모(KNU-141112 및 S DEL5/ORF3) 바이러스 및 구조된(icKNU-141112 및 icS DEL5/ORF3) 바이러스의 부분 단편(게놈 위치 15868-15920 및 23542-23592)의 서열 크로마토그램 결과를 나타낸 것이다. 도 3c는 S의 NTD 및 S DEL5/ORF3의 S와 ORF3 사이의 IGR에서 유전형 DEL signature에서 모 및 구조된 바이러스의 서열 분석 결과를 나타낸 것이다. 도 3d는 모 바이러스 및 구조된 바이러스의 성장 동역학을 나타낸 것이다. 도 3e는 모(상단) 및 구조된(하단) 바이러스의 플라크 형태를 이미지로 나타낸 것이다.

도 4는 재조합 icPEDV-EGFP의 구성 및 바이러스학적 특성을 나타낸 것이다. 구체적으로, 도 4a는 BAC에서 재조합 분자 클론 KNU-141112-EGFP를 구축하는 모식도를 나타낸 것이다. 도 4b는 icKNU-141112 및 icPEDV-EGFP로 Vero 세포를 감염시키고 PEDV 특이적 CPE를 관찰한 결과; 및 N 단백질에 대한 Mab를 사용한 IFA(Immunofluorescence assay) 결과를 나타낸 것이다. 도 4c는 icPEDV-EGFP의 성장 동역학 결과를 나타낸 것이다. 도 4d는 icKNU-141112(왼쪽) 및 icPEDV-EGFP(오른쪽)로 감염된 Vero 세포의 플라크를 이미지로 나타낸 것이다.

도 5는 icPEDV-EGFP의 EGFP 유전자의 유전적 안정성을 나타내는 것이다. 구체적으로, 도 5a는 연속 계대 동안 icPEDV-EGFP의 EGFP 발현을 확인한 결과; 및 EGFP 또는 PEDV N에 특이적인 항체로 웨스턴 블롯팅을 수행한 결과를 나타낸 것이다. 도 5b는 icPEDV-EGFP의 EGFP 발현 동역학 결과를 나타낸 것이다. 도 5c는 icPEDV-EGFP의 형광 강도 동역학 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 재조합 icPEDV-S51의 구성 및 바이러스학적 특성을 나타낸 것이다. 구체적으로, 도 6a는 PEDV 균주의 전체 S 유전자를 기반으로 한 계통 발생 분석 결과를 나타낸 것이다(빨간색 삼각형, GNU-2110 균주). 도 6b는 BAC에서 재조합 분자 클론 KNU-141112-S51을 구축하기 위한 모식도를 나타낸 것이다. 도 6c는 icKNU-141112 및 icPEDV-S51로 감염된 Vero 세포에서 PEDV 특이적 CPE를 관찰한 결과; 및 N 단백질에 대한 Mab를 사용한 IFA(Immunofluorescence assay) 결과를 나타낸 것이다. 도 6d는 icKNU-141112 및 icPEDV-S51의 성장 동역학 결과를 나타낸 것이다. 도 6e는 icKNU-141112(왼쪽) 및 icPEDV-S51(오른쪽)에 감염된 Vero 세포의 플라크를 이미지로 나타낸 것이다.

도 7은 icKNU-141112와 icPEDV-S51 간의 교차 중화 결과를 그래프와 히트맵으로 나타낸 것이다(****: $p < 0.0001$).

도 8은 KNU-141112 S 및 GNU-2110 S51의 3D 구조 모델링 및 서열 정렬 결과를 나타낸 것이다. 구체적으로, 도 8a는 KNU-141112 및 GNU-2110의 S 구조의 3D 모델을 나타낸 것이다. 도 8b는 KNU-141112와 GNU-2110 사이의 S의 3D 구조적 정렬 결과를 나타낸 것이다(박스 표시: KNU-141112와 GNU-2110 사이의 S 단백질의 구조적 변이를 보여주는 영역). 도 8c는 N-연결 글리코실화의 예측된 위치를 보여주는 KNU-141112와 GNU-2110 사이의 S 유전자의 유전적 변이의 모식도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 돼지 유행성 설사 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) cDNA의 전장 뉴클레오타이드를 포함하는, 감염성 클론을 제공한다.

본 명세서에 있어서, 상기 서열번호 1로 표시되는 돼지 유행성 설사 바이러스 cDNA의 전장 뉴클레오타이드는 KNU-141112(GenBank accession numbers KR873434)에서 유래할 수 있으며, 상기 서열번호 2로 표시되는 돼지 유행성 설사 바이러스 cDNA의 전장 뉴클레오타이드는 S DEL5/ORF3(GenBank accession numbers KY825243)에서 유래할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 뉴클레오타이드는 95% 이상, 90% 이상, 85% 이상, 80% 이상, 75% 이상, 또는 70% 이상의 상동성을 가지는 뉴클레오타이드를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0041] 본 명세서에 있어서, 상기 감염성 클론은 cDNA의 전장 뉴클레오티드 서열의 5' 말단에 사이토메갈로바이러스(CMV)의 발현 프로모터가 위치하고, cDNA의 전장 뉴클레오티드 서열의 3' 말단에 델타 간염 바이러스 리소자임 절단 부위, 소 성장 호르몬 전사 말단 서열, 및 폴리 아데닌 서열이 위치할 수 있으며, 상기 감염성 클론은 세균 인공 염색체(bacterial artificial chromosome, BAC) 내에서 클로닝될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 본 명세서에 있어서, "세균 인공 염색체(bacterial artificial chromosome, BAC)"는 F 인자의 서열을 포함하는 DNA 서열이다. 소위 F 플라스미드라고 불리는 서열을 함유하는 플라스미드는 300 kb 이상의 길이를 가진 이중 서열을 낮은 카피 개수로 안정하게 유지할 수 있다. 각각의 BAC는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 발명에서 BAC는 pBelo-BACII일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 본 명세서에 있어서, 상기 감염성 클론은 이중 뉴클레오티드를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 이중 뉴클레오티드는 감염성 클론의 ORF3 유전자 또는 스파이크 유전자 위치에 삽입될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 이중 뉴클레오티드는 GNU-2110 균주에서 유래한 스파이크 단백질(S51)을 코딩하는 서열번호 3으로 표시되는 뉴클레오티드 서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 스파이크 단백질은 형태적 및 N-글리코실화 부위의 변화로 인해 균주의 항원성을 변화시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 N-글리코실화 부위의 변화는 S1 및 S2 영역의 N130 및 N1195에서 추가 부위를 가지는 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 본 명세서에 있어서, "이중 뉴클레오티드"는 돼지 유행성 설사 바이러스의 전장 서열로부터 유래하지 않은 서열이다. 따라서, 이중 뉴클레오티드는 관심의 대상이 되는 임의의 유전자일 수 있으며, 임의의 감염물질에서 유래된 항원으로서 인식되는 하나 또는 여러 개의 펩티드 또는 단백질을 코딩하는 유전자일 수 있고, 임의의 감염물질에 대한 항체 또는 감염물질의 복제를 저해하는 하나 이상의 분자를 코딩하는 유전자일 수 있다. 구체적인 예로, 면역조절제, 사이토킨, 면역증강제 및/또는 항염증성 화합물을 코딩하는 뉴클레오티드일 수 있고, 바람직하게는 돼지 유행성 설사 바이러스의 스파이크 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드일 수 있다. 또한, 상기 이중 뉴클레오티드는 표지 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드일 수 있고, 바람직하게는 형광 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 EGFP(enhanced green fluorescent protein)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 형광 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드를 포함하는 감염성 클론은 형광 단백질을 안정적으로 발현할 수 있으며, 바이러스의 단백질 발현 표현형을 변경하지 않을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 표현형은 복제 동역학, CPE, 및 합포체 형성 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0045] 본 명세서에 있어서, "감염물질(infectious agent)"은 임의의 바이러스, 세균, 진균, 기생충 또는 동물을 감염시킬 수 있고 이것이 병을 일으킬 수 있는 기타 감염물질을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0046] 본 발명은 상기 감염성 클론을 포함하는, 재조합 PEDV 생산용 벡터를 제공한다.
- [0047] 본 명세서에 있어서, "재조합 벡터(recombinant vector)"는 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물로서, 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 또는 바이러스 벡터일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면 재조합 PEDV 생산용 세균 인공 염색체(BAC) 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0048] 본 명세서에 있어서, 상기 벡터는 감염물질에 대한 항체를 발현할 수 있으며, 바람직하게는 돼지의 감염물질에 대한 항체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0049] 본 발명은 상기 감염성 클론을 세포에 형질감염시키는 단계; 를 포함하는, 재조합 PEDV 생산방법을 제공한다.
- [0050] 본 명세서에 있어서, 상기 세포는 Vero 세포, CHO 세포, MRC-5, LLC-MK2, 또는 MDCK 세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0051] 또한, 본 발명은 상기 감염성 클론을 백본으로 하여, 관심 변이체(variant of interest, VOI) 이중 뉴클레오티드를 도입하는 단계; 를 포함하는, 이중 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 PEDV의 생산방법을 제공한다.
- [0052] 본 발명의 생산방법을 이용하면, 감염성 클론을 백본으로하여 관심 변이체의 다양한 이중 뉴클레오티드를 다양하게 도입하고, 새로운 재조합 바이러스를 역유전체 방식으로 수득함으로써, 새로운 바이러스 및 이를 이용한 다양한 새로운 백신의 개발에 유용하게 사용될 수 있다. 본 발명의 일예에서는 모 바이러스와 가장 먼 계통관계인 GNU-2110를 VOI 로 하여 KNU-141112 계통 도입한 재조합 바이러스를 구축하였다.
- [0053] 본 명세서에 있어서, 상기 재조합 PEDV는 모 바이러스(parental virus)와 동일한 성장능을 갖거나 상이한 항원성을 나타낼 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 재조합 PEDV는 역유전체 시스템(RG system)에 의해

수득될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 성장능은 모 바이러스와의 성장 동역학, 플라크의 형태, 및 N 단백질 염색 등을 통해 확인할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 상이한 항원성은 모 바이러스 기반 백신에 의해 유도된 항혈청에 대한 NAb 기하 평균 역가에 차이가 있는 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0054] 본 명세서에 있어서, 상기 "역유전체 시스템(RG system)"은 주어진 특정 유전자가 표현형에 미치는 영향 즉, 유전자의 기능을 유전자 염기 조작을 통해 밝혀내는 시스템이다. 상기 시스템은 유전자의 기능 상실 또는 획득으로 나뉜다. 구체적인 예로, 유전자 제거(gene knock-out), RNA 방해(RNA interference), 크리스퍼(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR) 유전자 가위 시스템을 사용한 유전자 조작, 강력한 프로모터의 사용, 및 유전자 복제수를 늘리는 방법을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0055] 본 발명은 상기 감염성 클론을 유효성분으로 포함하는, 백신 조성물을 제공한다.

[0056] 본 명세서에 있어서, 상기 백신 조성물은 하나 이상의 감염물질에 대한 면역 반응을 일으킬 수 있는 하나 이상의 항원을 발현할 수 있으며, 하나 이상의 감염물질에 대한 하나 이상의 항체를 발현할 수 있고, 1가 또는 다가일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0057] 본 명세서에 있어서, 상기 백신은 돼지에 대한 감염물질에 대한 1가 백신일 수 있으며, 바람직하게는 돼지 병원균의 항원을 발현할 수 있다. 상기 돼지 병원균은 바실러스 플레우로뉴모니아, 악티노바실러스 수이스, 헤모필러스 파라수이스, 포진 파르보바이러스, 렙토스피라, 에스케리키아 콜리, 에리시페로트릭스 루시오파티아, 파스테우렐라 물토키다, 보르데텔라 브론키셉티카, 세르풀리나 하이드리오센테리아, 마이코플라스마 하리오뉴모니아, 돼지유행성 설사 바이러스(PEDV), 돼지의 호흡기 코로나바이러스, 로타바이러스, 또는 돼지의 호흡기 및 생식기 증후군, 오제스키(Aujeszky) 질병(슈도라비스), 돼지 인플루엔자, 또는 전염성 위장염을 일으키는 병원균일 수 있으며, 바람직하게는 돼지 코로나 바이러스, 더욱 바람직하게는 돼지 유행성 설사 바이러스의 항원일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0058] 본 명세서에 있어서, 상기 백신 조성물은 부형제로서, 생리학적 식염수 또는 기타 유사한 염수 용액과 같은 희석제가 사용될 수 있다. 또한, 이들 백신은 알루미늄 히드록사이드, 쿠일A, 알루미늄나겔의 현탁액 등과 같은 수성 백신 및 미네랄 오일, 글리세라이드, 지방산 유도체 및 이들의 화합물과 같은 유성 백신의 제제 중에 통상적으로 사용되는 것들로부터의 아쥘반트(adjuvant)를 함유할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0059] 본 명세서에 있어서, 상기 백신은 세포 응답-증강(CRP) 물질, 즉 헬퍼 T 세포(Th2)의 하위군, 예를 들어 인터루킨-1(IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, 감마-IFN(감마-인터페론), 세포 괴사 인자 등을 증강시키는 물질이다. 이들 물질은 수성 또는 유성 아쥘반트와 함께 상기 백신 조성물에 포함될 수 있다. 또한, 세포성 반응을 면역하거나 조절하는 다른 유형의 아쥘반트, 예를 들어 MDP(뮤라밀 디펩티드), ISCOM(면역자극제 복합체) 또는 리포솜이 상기 백신 조성물에 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0060] 본 명세서에 있어서, 상기 백신 조성물은 동물에게 경구적으로, 비강 내로, 피하 내로, 경피 내로, 복강 내로, 근육 내로, 또는 에어로졸로 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0062] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 하기 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0063] [실험방법]

[0064] 1. 세포, 바이러스, 및 항체

[0065] Vero 세포(ATCC CCL-81)는 5% 소 태아 혈청(FBS; fetal bovine serum, Invitrogen) 및 페니실린-스트렙토마이신(PS, 100x; Invitrogen)이 포함된 알파 최소 필수 배지(α -MEM, Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 배양하였다. 세포는 가슴 된 대기의 5% CO₂ 인큐베이터에서 37°C로 유지되었다. 한국 HP-G2b PEDV 균주 KNU-141112 및 그의 LAV 균주 S DEL5/ORF3를 바이러스 성장 배지[1% PS, 0.3% 트립토오스 인산 브로스(TPB; tryptose phosphate broth, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 0.02% 효모 추출물(Difco, Detroit, MI), 10mM HEPES(Invitrogen), 및 5 μ g/ml 트립신(USB, Cleveland, OH)이 보충된 α -MEM]에서 Vero 세포로 감염시켰다. 세포 배양(KNU-141112-P5 및 S DEL5/ORF3-P5)에서 5번째 계대의 각 바이알 스톱을 모 바이러스로서 독립적으로 준비하고 제공하였다. PEDV N 단백질-특이적 단클론항체(monoclonal antibody, MAbs)는 중앙백신연구소(CAVAC, 대전, 대한민국

국)에서 입수하였다. 항-ORF3 MAb는 포유동물 세포 기반 일시적 유전자 발현 시스템을 사용하여 생성된 면역원으로, PEDV 균주 KNU-141112의 재조합 ORF3 단백질을 사용하여 실험실에서 제조하였다. EGFP 및 β -액틴에 특이적인 항체는 각각 Abcam(Cambridge, UK) 및 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)에서 구입하였다. HRP(horseradish peroxidase)-결합 염소 항-마우스 IgG 2차 항체는 Cell Signaling Technology(Danvers, MA)로부터 입수하였다. Alexa Fluor 488-접합, 및 Alexa Fluor 594-접합 염소 항-마우스 2차 항체는 Invitrogen에서 입수하였다.

2. BAC에서 전장 PEDV cDNA 클론의 조립

PEDV KNU-141112 및 S DEL5/ORF3의 전장 뉴클레오티드(nt) 서열(각각 GenBank accession numbers KR873434 및 KY825243)은 3단계 전략을 사용하여 BAC 시스템에서 각 감염성 cDNA 클론의 구조에 대한 참조로서 독립적으로 사용되었다. 첫 번째 단계에서, KNU-141112-P5의 전체 게놈은 다음과 같이 호환 가능한 제한부위 옆에 있는 7개의 연속 단편(1F ~ 7F)으로 분할하였다: 1F, nt 1-2806; 2F, nt 2806-6808; 3F, nt 6808-13009; 4F, nt 13009-15880; 5F, nt 15880-23570; 6F, nt 23570-27185; 7F, nt 27185-28038(도 1의 상단). 큰 크기의 단편은 본질적으로 박테리아에서 불안정할 수 있으므로, 3F와 5F는 다시 2개(3F-1, nt 6808-9502; 3F-2, nt 9502-13009) 또는 3개(5F-1, nt 15880-19042; 5F-2, nt 19042-21540; 5F-3, nt 21540-23570)로 분리하였다. KNU-141112 게놈에 자연적으로 존재하는 제한부위(MluI, AvrII, PacI, AatII, ClaI, BspT104I)를 선별하였고, 단편 5F에는 구조 마커(rescue markers)로 유지된 침묵 돌연변이(각각 A15883C/A15884G 및 A23570G/T23573G/A23574C/A23576C)를 도입하여 각 말단에서 고유한 두 개의 FseI(15880)와 AscI(23570) 부위를 새로 생성하였다. 각 단편 또는 하위 단편의 두 말단에서 각 효소 부위의 위치는 도 1의 상단에 표시하였다. 또한, 5' 말단에 BamHI 제한 부위가 있는 CMV 프로모터 서열을 중첩 PCR(overlapping PCR)에 의해 단편 1F의 5' 말단에 추가하였다. 26-nt 아데닌 서열(26pA), 델타 간염 바이러스(hepatitis delta virus, HDV) 리보자임 자가 절단 부위(Rz), 소 성장 호르몬(bovine growth hormone, BGH) 전사 말단 서열, 및 HindIII 제한부위를 포함하는 합성 필수 요소 서열은 단편 7F의 3' 말단에 추가하였다. 각각의 제한 부위 옆에 있는 각 단편을 Platinum SuperFi Green PCR Master Mix(Invitrogen) 및 특정 프라이머 세트를 사용하여 PCR 증폭하고, QIAEX II Gel Extraction Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 겔 정제하였다. 그런 다음 개별적으로 pCR-XL-2-TOPO 벡터(Invitrogen)에 서브클로닝 하였다. 모든 서브클론은 Sanger 시퀀싱으로 확인하였다. 두 번째 단계에서, 전장 PEDV 클론을 보유하는 백본으로 플라스미드 pBelo-BACII(NEB, Ipswich, MA)을 변형하여 BamHI와 HindIII 제한부위 사이에 고유한 제한 효소 부위(MluI, PacI, FseI, AscI 및 BspT104I)로 구성된 합성 링커를 삽입하였고(도 1의 상단), 생성된 BAC 플라스미드는 pBAC-CMV로 명명하였다. 마지막 단계에서, 해당 pCR-XL-2-TOPO 플라스미드에서 특정 효소로 각 서브클론을 분해하고, 겔 추출 키트로 수집하여, pBAC-CMV 카세트 벡터에 순서대로 순차적으로 조립(7F-1F-3F-2F-4F-5F-6F)하였다. 이때, DNA Ligation Kit LONG(TaKaRa, Otsu, Japan)으로 사용 가능한 제한 부위를 사용하였다. 결합 혼합물(ligation mixture)을 MicroPulser Electroporator(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 사용하여 E. coli DH10B에 전기천공 하였다. 모든 중간 구성물을 NucleoBond Xtra Maxi Kit(Macherey-Nagel, Düren, Germany)로 정제하고, 다음 어셈블리로 진행하기 전에 제한 분석 및 DNA 시퀀싱을 통해 검증했으며, 생성된 BAC 플라스미드를 pBAC-CMV-KNU-141112로 명명하였다. 동일한 전략을 사용하여 pBAC-CMV-S DEL5/ORF3이라는 BAC 시스템에서 S DEL5/ORF3의 전장 cDNA 클론을 생성하였다(도 1의 하단). 두 PEDV 감염성 클론의 유전적 무결성을 광범위한 제한 분석 및 전장 염기서열분석에 의해 확인하였다. DNA 조작 및 복제는 표준 절차에 따라 수행하였다.

3. 감염성 PEDV의 구조(rescue)

NucleoBond Xtra Maxi Kit(Macherey-Nagel, Düren, Germany)를 사용하여 최종 BAC 플라스미드를 제조하였다. 또한, PCR 증폭된 KNU-141112 N 유전자를 pBudCE4.1 발현 벡터(Invitrogen)에 클로닝하여 pBud-PEDV-N 플라스미드를 구축하고, cDNA 클론으로부터 바이러스 회수율을 높이기 위해 N 유전자 in trans를 추가하였다. 시험관 내 형질감염을 위해 Vero 세포를 10% FBS를 포함하는 Opti-MEM(Invitrogen)에서 3.5×10^5 cells/well로 6-웰 조직 배양 플레이트에 접종한 다음, 37°C 및 5% CO₂의 가습 인큐베이터에서 약 90% 합류가 될 때까지 24시간 동안 유지하였다. 세포를 2 μ g의 BAC 플라스미드(pBAC-CMV-KNU-141112 또는 pBAC-CMV-S DEL5/ORF3), 및 9 μ l의 FuGENE HD(Promega, Madison, WI)를 사용한 1 μ g의 pBud-PEDV-N 플라스미드로 제조업체의 프로토콜에 따라 형

질감염 시켰다. 형질감염 18시간 후, 세포를 2회 세척하고, 바이러스 회복 및 확산을 돕기 위해 5 μ g/ml 트립신이 포함된 Opti-MEM으로 보충하였다. 배양 상층액은 합포체 형성을 특징으로 하는 세포변성 효과(CPE; cytopathic effects)의 시각적 관찰에 따라 형질감염 후 4-7일에 수확되었고, 각각의 감염성 클론 유래(ic) '계대 0(P0)' PEDV는 icKNU-141112-P0 또는 icS DEL5/ORF3-P0으로 명명하였다. 그런 다음, 구조된 P0 바이러스를 플라크 정제에 적용하였다. 잘 분리된 단일 플라크를 골라 바이러스 성장 배지에 재현탁하고, -80℃에서 P1 icPEDV 스톡으로 저장하였다. 그 후, 각각의 icPEDV-P1은 10회(P10)까지 Vero 세포에서 연속 계대 하였다. 각 계대 icPEDV를 정제하여, 사용할 때까지 -80℃에서 보관하였다. 각 P5 및 P10 icPEDV 스톡의 전장 게놈은 Sanger 시퀀싱에 의해 확인하였다.

4. 면역형광 분석(Immunofluorescence assay, IFA)

6-웰 조직 배양 플레이트에 배치된 현미경 커버슬립에서 성장한 Vero 세포를 1시간 동안 0.1의 감염 다중도(multiplicity of infection, MOI)로 하여 모(P5) 및 구조(P10) PEDV로 감염시켰다. 감염 24시간 후에(hours post infection, hpi), 감염된 세포를 실온(RT)에서 10분 동안 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 실온에서 10분 동안 PBS의 0.2% Triton X-100으로 투과화 하였다. 세포를 PBS의 1% 소 혈청 알부민으로 실온에서 30분 동안 차단한 다음, 2시간 동안 PEDV N- 또는 ORF3-특이적 MAb로 염색하였다. PBS에서 5회 세척한 후, 세포를 Alexa Fluor 488-결합 또는 594-결합(icPEDV-EGFP 전용) 2차 항체로 실온에서 1시간 동안 배양한 다음, DAPI(4',6-diamidino-2-7 phenylindole, Sigma-Aldrich)로 대비염색(counterstain)하였다. 커버슬립을 마운팅 완충액(mounting buffer)의 유리 현미경 슬라이드에 장착하고, 염색된 세포를 Leica DM IL LED 형광 현미경(Leica, Wetzlar, Germany)으로 시각화 하였다.

5. 정량적 실시간 RT-PCR(Quantitative real-time RT-PCR, qRT-PCR)

게놈 RNA(gRNA) 및 서브게놈 mRNA(sg mRNA) 검출을 위해, 6-웰 조직 배양 플레이트에서 성장한 Vero 세포를 0.1 MOI로 하여 모(P5) 및 구조(P10) PEDV로 감염시켰다. 총 RNA는 TRIzol Reagent(Invitrogen)를 사용하여 24 hpi에 감염된 세포의 용해물에서 추출하고, 제조업체의 지침에 따라 DNase I(TaKaRa)을 처리하였다. 추출된 RNA의 농도는 NanoVue 분광 광도계(GE Healthcare, Piscataway, NJ)를 사용하여 측정하였다. 바이러스 RNA는 gRNA 및 sg mRNA를 표적으로 하는 프라이머/프로브 세트가 있는 One Step PrimeScript RT-PCR 키트(TaKaRa)를 사용하여 정량적 RT-PCR을 수행하였다. 반응은 CronoSTAR 96 Real-Time System(Clontech, Mountain View, CA)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 수행하였다. 각 앰플리콘(amplicon)의 카피 수는 표준 곡선에 의해 결정되었고, 총 세포 RNA의 질량으로 정규화 하였다. N(sg mRNA-N)을 인코딩하는 sg mRNA6도 대조군으로서 샘플에서 증폭되었다. sg mRNA의 양은 gRNA의 10⁷개 카피당 카피로 표시하였다.

6. icKNU-141112 및 icS DEL5/ORF3에서 구조 마커의 식별

TRIzol Reagent를 사용하여 24 hpi에 모(P5) 및 구조(P10) PEDV에 감염된 세포의 용해물에서 총 RNA를 추출하고 DNase I로 처리하였다. RT-PCR을 독립적으로 수행하여 FseI(15880) 및 AscI(23570 및 23555)을 포함하는 1800-bp(게놈 위치 15277- 17076) 및 1000-bp(KNU-141112 및 S DEL5/ORF3에서 각각 게놈 위치 23008-24007 및 22993-23992) 단편을 증폭하였다. 이는 구조 icPEDV에는 분자 마커로서 존재하지만 모 바이러스에는 없었다. PCR 앰플리콘에서 구조 마커의 존재는 FseI 및 AscI를 사용한 제한 효소 분석 및 염기서열분석에 의해 결정하였다.

7. 바이러스 적정

Vero 세포를 0.1 MOI로 하여 트립신의 존재 하에 모(P5) 및 구조(P10) PEDV로 감염시켰다. 배양 상층액을 다양한 시점(6, 12, 24, 36, 48)에서 수집하고 -80℃에서 보관하였다. 바이러스 역가는 Vero 세포를 사용한 플라크 분석에 의해 측정되었고, ml 당 플라크 형성 단위(plaque-forming unit, PFU)로 정의하였다. 간단히 말해서, 6-웰 플레이트에서 성장한 Vero 세포에 트립신을 함유하는 10배 연속 희석된 바이러스 현탁액 200 μ l/웰을 접종하고, 37℃에서 1시간 동안 흡수시켰다. 접종된 세포를 2ml의 미리 혼합된 바이러스 성장 배지 및 1.5% Bacto

Agar(Difco)로 덮고, 적절한 크기의 플라크가 관찰될 때까지 37℃에서 2일 동안 배양하였다. 48 hpi에서 배지를 제거하고, 플라크를 7% 파라포름알데히드로 고정하고, 5% 에탄올의 1% 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다.

8. EGFP를 발현하는 재조합 PEDV의 구축 및 구조

ORF3을 EGFP 유전자로 대체하여 KNU-141112 게놈에 삽입하였다(도 3a). 간단히 말해서, EGFP 유전자를 플랭킹(flanking) PEDV 서열로 PCR 증폭한 다음, 중첩 PCR에 의해 단편 6F의 ORF3-코딩 영역으로 교환하여, ORF3 결실(DEL) EGFP 6F 구축물을 생성하였다. ORF3의 3' 말단에 E 서브게놈 mRNA(sg mRNA)의 전사 조절 서열(TRS)이 존재하기 때문에, 3'-말단 22-nt 서열은 단편 6F에 보존되어 있어, E 단백질의 발현에 대한 간섭을 방지하였다. 6F-ORF3 DEL-EGFP로 명명된 변형된 단편 6F를 pCR-XL-2-TOPO 벡터에 서브 클로닝하였다. 서브클론 6F-ORF3 DEL-EGFP를 AscI 및 BspT104I로 분해하고 겔 정제하였다. pBAC-CMV-KNU-141112 플라스미드도 동일한 효소로 분해하고, 원래 단편 6F를 AscI 및 BspT104I 제한 부위를 통해 EGFP 유전자를 보유하는 6F-ORF3 DEL-EGFP로 대체하였다. 최종 재조합 클론은 전장 염기서열 분석에 의해 확인되었고, pBAC-CMV-KNU-141112-EGFP로 명명하였다. pBAC-CMV-KNU-141112-EGFP의 구조 및 후속 세포 배양 계대를 상기 기재된 바와 같이 수행하였다. 이 BAC 플라스미드에서 구조된 재조합 PEDV는 icPEDV-EGFP로 명명하였다. 각각의 P5 및 P10 icPEDV-EGFP 스톡의 전장 게놈은 Sanger 시퀀싱에 의해 확인되었고, icPEDV-EGFP-P10 바이러스는 전술한 바와 같이 형광 현미경 및 바이러스 적정을 거쳤다.

9. 웨스턴 블롯 분석

Vero 세포를 6-웰 조직 배양 플레이트에서 1일 동안 성장시키고, 표시된 계대 이력(P2-P10)에서 0.1 MOI로 하여 수확된 icKNU-141112-P10 및 icPEDV-EGFP로 감염시켰다. 48 hpi에서, 세포를 80 μ l의 용해 완충액(0.5% Triton X-100, 60 mM β -글리세로포스페이트, 15 mM p-니트로페닐 포스페이트, 25 mM MOPS, 15 mM $MgCl_2$, 80 mM NaCl, 15 mM EGTA[pH 7.4], 1mM 나트륨 오르토바나데이트, 1 μ g/ml E64, 2 μ g/ml 아프로티닌, 1 μ g/ml 류페틴 및 1mM PMSF)에서 수확하였고, 얼음 위에서 각각 1초 동안 5회 초음파 처리하였다. 파쇄액(homogenates)을 30분 동안 얼음에서 용해하고, 4℃에서 30분 동안 15,800 x g(Eppendorf centrifuge 5415R, Hamburg, Germany)로 원심 분리하였다. 또한, 세포를 icKNU-141112-P10 및 icPEDV-EGFP-P10으로 감염시키고, 상기 기재된 바와 같이 지시된 시점에서 용해시켰다. 상층액의 총 단백질 농도는 BCA 단백질 분석법(Pierce, Rockford, IL)을 사용하여 추정하였다. 세포 용해물을 4 x NuPAGE 샘플 완충액(Invitrogen)과 혼합하고 70℃에서 10분 동안 끓였다. 동일한 양의 총 단백질을 환원 조건에서 NuPAGE 4-12% Gradient Bis-Tris 겔(Invitrogen)에서 분리하고, Immobilon-P 멤브레인(Millipore, Bedford, MA)으로 전기 이동하였다. 멤브레인은 후속적으로 4℃에서 2시간 동안 0.05% Tween-20(TBST)을 함유하는 TBS(10mM Tris-HCl[pH 8.0], 150mM NaCl)의 3% 탈지분유(BD Biosciences, San Jose, CA)로 차단하였다. 그 후, EGFP, N 또는 β -액틴에 대한 1차 항체와 4℃에서 밤새 반응시켰다. 그런 다음, 블롯을 4℃에서 2시간 동안 1:5000의 희석도로 HRP- 표지 2차 항체와 함께 배양하였다. 마지막으로, 단백질은 ECL(Enhanced chemiluminescence) 시약(GE Healthcare)을 사용하여 제조업체의 지침에 따라 시각화하였다.

10. EGFP 형광 강도의 검출

2×10^4 세포/웰의 Vero 세포를 96-웰 조직 배양 플레이트에서 24시간 동안 성장시키고, 0.1 MOI에서 icPEDV-EGFP-P10으로 모의 감염 또는 감염시켰다. 표시된 시점에서, 세포를 Leica DM IL LED 형광 현미경으로 검사하여, EGFP 형광 이미지의 사진을 얻었다. 이어서, 마이크로플레이트 형광계(Fluoroskan FL; Thermo Scientific, Waltham, MA)를 사용하여 485/538 nm에서 EGFP의 형광 강도를 측정하였다.

11. 임상 시료 수집 및 염기서열 분석

실험실 진단을 위해 제출된 임상 샘플(대변 및 소장)은 2019년부터 2022년까지 전국 8개 도에 위치한 PED 영향 돼지 농장에서 수집하였다. PEDV 양성 샘플(n = 97)의 S 당단백질 유전자 서열은 Sanger 시퀀싱을 사용하여 결정하였다. 각 분리주의 전체 S 유전자에 걸쳐 있는 두 개의 중첩 cDNA 단편은 RT-PCR로 증폭하였다. 개별 cDNA

애플리콘을 겔 정제하고, pGEM-T Easy Vector System(Promega)을 사용하여 복제하고, 2개의 상용 벡터-특이적 T7 및 SP6 프라이머, 및 유전자-특이적 프라이머를 사용하여 양방향으로 시퀀싱하였다. 이 발명에서 확인된 PEDV의 총 97개의 완전한 S 유전자는 수탁 번호 ON263410-ON263414, ON263422-ON263463 및 OP186873-186932로 GenBank 데이터베이스에 기탁하였다.

[0096] 전체 PEDV 분리주의 완전히 시퀀싱 된 S 유전자의 서열은 ClustalX 2.0 프로그램(Thompson et al., 1997)을 사용하여 정렬하였고, 아미노산 서열 발산(divergences)의 백분율은 동일한 소프트웨어를 사용하여 평가하였다. 계통수는 이웃 결합 방법(neighbor-joining method)을 사용하여 아미노산 서열의 정렬로 구성되었으며, 나무의 각 내부 노드에 대한 백분율 신뢰도 값을 결정하기 위해 1,000번의 복제로 부트스트랩 분석을 받았다. 또한, Mega X 소프트웨어를 사용하여 계통수를 생성하였다.

[0098] 12. 이중 S 유전자를 포함하는 재조합 PEDV의 구축 및 구조

[0099] 이중 S 유전자는 도 6b와 같이 S 유전자를 교체함으로써 KNU-141112 게놈에 도입되었다. S 유전자는 BAC 플라스미드의 2개의 하위 단편인 5F-2 및 5F-3과 단편 6F에 걸쳐 있기 때문에 이 3개의 (하위)단편을 독립적으로 주형으로 사용하여, KNU-141112 S 유전자 코딩 서열을 S51로 명명된 이중 GNU-2110 S 유전자(GenBank accession number ON263450)로 중첩 PCR을 사용하여 대체하였다. 각각의 변형된 단편, 즉 5F-2-S51, 5F-3-S51, 및 6F-S51을 pCR-XL-2-TOPO 벡터에 서브클로닝하였다. 변이 S51 유전자가 있는 재조합 KNU-141112 클론을 구성하기 위해, 3개의 하위 단편인 5F-1, 5F-2-S51 및 5F-3-S51을 먼저 해당 pCR-XL-2-TOPO 플라스미드에서 특정 효소로 분해하였고, FseI 및 AscI로 미리 소화된 pBAC-CMV-KNU-141112 플라스미드와 연결하였다. 그런 다음, 나머지 S51 유전자와 KNU-141112 구조 유전자를 포함하는 단편 6F-S51은 AscI 및 BspT104I 제한 부위를 통해 상기 변형된 BAC 플라스미드의 원래 6F 단편으로 교체하였다. 전체 S 유전자 서열을 GNU-2110의 S 유전자로 교체한 최종 재조합 플라스미드를 pBAC-CMV-KNU-141112-S51로 명명하고, 전장 염기서열분석으로 검증하였다. pBAC-CMV-KNU-141112-S51의 구조 및 후속 세포 배양 계대를 상기 기재된 바와 같이 수행하였다. pBAC-CMV-KNU-141112-S51에서 구조된 재조합 PEDV는 icPEDV-S51로 명명하였다. 각각의 P5 및 P10 icPEDV-S51 스톱의 전장 게놈은 Sanger 시퀀싱으로 확인하였고, icPEDV-S51-P10 바이러스는 상기한 바와 같이 IFA 및 바이러스 적정을 거쳤다.

[0101] 13. 혈청 중화

[0102] 2세대 G2b 백신을 사용하여 예방접종한 암태지에서 수집한 항혈청의 교차 중화 활성은 icKNU-141112 및 isPEDV-S51에 대한 96-웰 microtiter 플레이트에서 VNT(virus neutralization test)를 사용하여 평가하였다. 간단히 말해서, 2×10^4 cells/well의 Vero 세포를 96-웰 조직 배양 플레이트에서 24시간 동안 성장시켰다. 각 재조합 PEDV P10 스톱을 무혈청 α -MEM에 희석하여 50 μ l 부피에서 50% 조직 배양 감염 용량(TCID₅₀)을 달성하였다. 비활성화된 항혈청 샘플을 α -MEM(1:4 ~ 1:512)에 연속 희석하고 동일한 부피의 각 바이러스와 37°C에서 1시간 동안 혼합하였다. 그 후, 100 마이크로리터의 혼합물을 Vero 세포에 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 혼합물을 제거한 후, 세포를 PBS로 5회 행구고, 5% CO₂ 인큐베이터에서 2일 동안, 37°C로 바이러스 성장 배지에 서 유지하였다. 중화 종말점(end point) 역가는 이중 웰의 대조군에 비해 바이러스 특이적 CPE를 $\geq 80\%$ 억제한 최고 혈청 희석액의 역수로 계산하였다. 중화 종말점 역가가 1:4 이상인 혈청 샘플은 PEDV-특이적 중화 항체(NAb)에 대해 양성인 것으로 보았다.

[0104] 14. 구조 모델링 및 서열 정렬

[0105] KNU-141112 및 GNU-2110의 S 당단백질 3차원(3D) 구조 모델은 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org>)을 사용하여 PDB 수탁 코드가 6vv5.1인 저온-전자 현미경 구조 템플릿(cryo-electron microscopy structure template)을 기반으로 생성하였다. KNU-141112와 GNU-2110의 S 구조 정렬 역시 SWISS-MODEL 서버를 이용하여 수행하였다. 또한, N-글리코실화 부위는 NetNGlyc 1.0 서버(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)에서 예측하였다.

[0107] 15. 통계 분석

[0108] 모든 값은 평균 차이(SDM)의 평균 $\pm$ 표준 편차로 표시하였다. GraphPad Prism 7 소프트웨어 패키지(GraphPad Software, San Diego, CA)를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 0.05 미만의 p-값은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0110] [실시예]

[0111] 실시예 1. BAC에서 PEDV 감염성 cDNA 클론의 구축

[0112] BAC에서 HP-G2b PEDV의 전체 게놈과 그의 LAV 균주를 포함하는 2개의 분자 클론을 개발하기 위해, 먼저 KNU-141112 및 S DEL5/ORF3 게놈(도 1)의 특정 부위에 일반적으로 존재하거나 조작된 독특한 제한 부위가 측면에 있고, 1F-7F로 명명된 7개의 인접 바이러스 단편을 합성하였다. 그 후, 각 단편을 pCR-XL-2-TOPO 벡터에 서브 클로닝하였다. 단편 1F의 5' 말단을 CMV 프로모터를 융합시켜, PEDV cDNA 게놈이 형질감염 시 이 프로모터의 제어 하에 전사될 수 있도록 하였다. 단편 7F의 3' 말단은 PEDV 게놈 3'-말단의 정확한 처리를 위해 26 pA, HDV Rz, 및 BGH 종결 신호를 포함하는 서열을 융합하여 변형하였다. 특히, 동의 치환(synonymous substitution)은 단편 5F[게놈 위치 15880 및 23570(S DEL5/ORF3의 경우 23555)]의 양쪽 말단에 독립적으로 도입되어 2개의 신규 제한 부위인 FseI 및 AscI를 생성하고, 이를 유전자 마커로 사용하여 재조합체와 모 바이러스를 구분하였다. 다음으로, 일련의 다중 효소 제한 부위를 포함하는 중간 플라스미드 pBAC-CMV를 백본으로 생성하여 전장 cDNA 클론의 조립을 용이하게 하였다. 마지막으로, 각각의 subclone은 해당 PCR cloning vector에서 적절한 제한부위를 통해 절단하고, 각 DNA subclone을 pBAC-CMV 플라스미드의 다중 클로닝 부위(multicloning site)에 7F-1F-3F-2F-4F-5F-6F의 순서로 순차적으로 클로닝하여 전장 클론을 합성하였다. 이 3단계 전략을 사용하여, BAC 시스템에서 pBAC-CMV-KNU-141112(도 1의 상단) 및 pBAC-CMV-S DEL5/ORF3(도 1의 하단)이라는 두 개의 PEDV 전장 게놈 클론을 성공적으로 얻었다.

[0114] 실시예 2. cDNA 클론에서 감염성 PEDV의 구조(Rescue)

[0115] RG(reverse genetics) 유래 감염성 바이러스를 회수(recover)하기 위해, 전장 BAC(pBAC-CMV-KNU-141112 또는 pBAC-CMV-S DEL5/ORF3) 및 pBud-PEDV-N 플라스미드를 Vero 세포에 형질감염(transfect) 시키고, 구조된 바이러스-유도 CPE를 매일 모니터링하였다. 합포체 융합의 CPE가 나타나면, 배양 상층액을 각 형질감염에서 수집하고 icKNU-141112 및 icS DEL5/ORF3으로 명명하였다. 이 구조된 P0 바이러스는 플라크 정제에 의해 복제되었고, 바이러스 역가를 증가시키기 위해 최대 10회까지 추가로 계대하였다. P10 재조합 바이러스는 표현형 및 유전형 특성을 결정하는 데 사용하였다. 그 결과는 도 2a 및 도 2b에 나타내었다.

[0116] 도 2a 및 2b에 나타난 바와 같이, icKNU-141112 및 icS DEL5/ORF3은 형질 감염된 세포(P0)에서 원래 볼 수 있었던 것과 같이, 감염된 Vero 세포(도 2a 및 도 2b, 첫번째 패널)에서 세포 융합, 합포체 형성, 및 분리 등 각각의 모 바이러스에 필적하는 명백한 CPE이 유도되었다. 이와 다르게, 대조군(mock)은 IFA(Immunofluorescence assay)에서 확인된 바와 같이 CPE를 나타내지 않았다. 재조합 바이러스의 복제는 PEDV N 또는 ORF3 단백질에 대한 MAb를 사용하는 IFA에 의해 확인되었다. 또한, N 단백질은 합포체 세포의 세포질 전체에 분포한 것을 확인할 수 있었다(도 2a의 2열). S DEL5/ORF3는 KNU-141112에 감염된 세포보다, 더 광범위하고 눈에 띄는 거대 다핵 세포에서 공포 형성(vacuolation)과 합포체를 유발하였다. 이 현상은 icKNU-141112에 감염된 세포와 비교하여 재조합 icS DEL5/ORF3 바이러스에 감염된 세포에서 재현되었다(도 2a 및 2b의 화살표). S DEL5/ORF3 균주는 또한 S와 ORF3(S-ORF3 IGR, 게놈 위치 24775-24820) 사이의 유전자간 영역(IGR; intergenic region)에 큰 46-nt DEL을 포함하여 ORF3 발현을 방해할 가능성이 있는 것으로 보고되었다(Lee et al., 2017). 예상대로 ORF3 단백질은 KNU-141112 바이러스에 감염된 세포에서만 검출되었고, S DEL5/ORF3 및 icS DEL5/ORF3에 감염된 세포에서는 검출되지 않았다(도 2b, 두 번째 패널). 다만, ORF3의 TRS는 S-ORF3 IGR에서 46-nt DEL의 상류에 위치하기 때문에, S DEL5/ORF3 및 icS DEL5/ORF3에 감염된 Vero 세포에서 ORF3(sg mRNA-ORF3)을 인코딩하는 sg mRNA는 KNU-141112 및 icKNU-141112에 감염된 세포와 비교하여 비슷한 수준으로 유지되었다(도 2e).

[0117] icPEDV는 제한 효소 소화 및 유전 마커를 운반하는 단편의 뉴클레오티드 시퀀스에 의해 추가로 입증되었다. 구조된 바이러스의 게놈에서, 6개의 동의 치환이 도입되어 FseI(15880) 및 AscI(23570 또는 23555) 인식 부위를 생성하였다. 각 유전자 마커를 포함하는 1800-bp 및 1000-bp 단편은 모 및 구조된 바이러스 균주로부터 증폭된 RT-PCR이었다. 모 KNU-141112 및 S DEL5/ORF3 바이러스에서 증폭된 각 단편은 소화되지 않은 반면, 구조된 icKNU-141112 및 icS DEL5/ORF3 바이러스의 앰플리콘은 FseI 및 AscI에 의해 두 단편(각각 1191 및 609 bp;

564 및 436bp)으로 소화되었다(그림 3a). 그 후, 상기 영역을 구조된 바이러스에서 마커 돌연변이의 존재에 대한 유전자형 검증을 위해 시퀀싱하였다(도 3b). 또한, 두 개의 독립적인 구조된 바이러스의 전장 게놈 서열을 분석하여 상기 영역을 분석하였다. 재조합 icKNU-141112 및 icS DEL5/ORF3 바이러스는 각각의 cDNA 클론과 동일한 서열을 나타내었다. 더욱이, S의 N-말단 도메인(NTD; N-terminal domain)에서 15-nt DEL, 및 S-ORF3 IGR에서 46-nt DEL을 포함하는 S DEL5/ORF3 균주의 유전형적 DEL signature은 최대 10개의 직렬 계대를 통해 icS DEL5/ORF3 감염 세포에서 완전히 유지되었다(도 3c).

[0118] 다음으로, 0.1 MOI의 다단계 성장 분석(multistep growth assay)을 사용하여 구조된 바이러스의 성장 특성을 평가하였다. 그 결과는 도 3d 및 3e에 나타내었다.

[0119] 도 3d에 나타난 바와 같이, icKNU-141112 및 icS DEL5/ORF3은 각각의 모 바이러스에 필적하는 성장 동역학을 나타냈다. 그러나 icS DEL5/ORF3은 icKNU-141112보다 더 효율적으로 복제되어, 6hpi를 제외하고 각 시점에서 icS DEL5/ORF3이 icKNU-141112보다 더 높은 역가를 나타냈다. 그럼에도 불구하고, 두 icPEDV 모두 세포 배양에서 10^6 PFU/ml 이상의 피크 역가에 도달하였다.

[0120] 도 3e에 나타난 바와 같이, 플라크 분석은 구조된 바이러스가 각각의 모 바이러스와 유사한 플라크 크기 및 형태를 보여주었다. 흥미롭게도 icS DEL5/ORF3은 일반적으로 icKNU-141112보다 더 큰 플라크를 생성했으며, 이 결과는 모 S DEL5/ORF3 바이러스의 플라크가 확대된 것을 보여주는 이전 연구와 일치한다(Lee et al., 2017). 이러한 모든 데이터는 야생형 HP-G2b 및 그의 LAV 균주의 2개의 감염성 전장 cDNA 클론이 BAC 시스템에서 성공적으로 구축되었으며, 각각의 icPEDV 및 각각의 모 PEDV는 시험관 내에서 동일한 표현형 특성을 갖는다는 것을 나타낸다.

[0122] 실시예 3. EGFP를 발현하는 재조합 PEDV의 구조 및 특성화

[0123] PEDV ORF3은 일부 필드 분리주(field isolates) 및 세포 적응 균주에서 결실되거나 잘린 유일한 보조 유전자로, 시험관 내 또는 생체 내에서 비 필수적인 기능을 시사한다.

[0124] DNA-launched rescue technique을 사용하여 형광으로 표시된 PEDV 돌연변이를 구성할 수 있는지 여부를 테스트하기 위해, pBAC-CMV-KNU-141112를 사용하여 EGFP 유전자를 ORF3 카세트에 도입하였다. 그 결과는 도 4a에 나타내었다.

[0125] 도 4a에 나타난 바와 같이, E 단백질 발현을 보존하기 위해 E TRS를 포함하는 3'-말단 22개 뉴클레오타이드를 제외하고 PEDV 6F 단편에서 ORF3의 코딩 서열을 EGFP의 코딩 서열로 대체하였다. Vero 세포에서 EGFP-보유 재조합 클론(pBAC-CMV-KNU-141112-EGFP) 및 PEDV N 플라스미드의 형질감염 후, CPE가 관찰되었으며, icPEDV-EGFP로 명명된 구조된 재조합 바이러스는 Vero 세포에서 플라크 정제 및 연속 계대를 하였다.

[0126] icPEDV-EGFP의 표현형을 특성화하기 위해, Vero 세포를 icKNU-141112-P10 및 돌연변이 icPEDV-EGFP-P10으로 감염시켰다. 그 결과는 도 4b에 나타내었다.

[0127] 도 4b에 나타난 바와 같이, 형광 현미경은 EGFP 발현이 icPEDV-EGFP에 감염된 세포에서만 관찰되고, icKNU-141112에 감염된 세포에서는 관찰되지 않음을 입증하였다(도 4b의 2행). 특히, icPEDV-EGFP는 icKNU-141112와 달리 뚜렷한 CPE를 나타내어, EGFP를 발현하는 광범위한 합포체 형성(도 4b의 1행, 화살표)을 보여주었으며, 이는 N 단백질 염색(도 4b의 3행, 화살표)에 의해서도 확인되었다.

[0128] 또한, 두 재조합 바이러스 복제 동역학은 도 4c 및 4d에 나타내었다.

[0129] 도 4c 및 4d에 나타난 바와 같이, 두 재조합 바이러스는 모두 유사한 복제 동역학을 나타냈지만(도 4c), icPEDV-EGFP는 icKNU-141112와 비교하여 향상된 플라크 크기를 나타냈다. 또한, icPEDV-EGFP의 동일성은 제한 효소 분석 및 뉴클레오타이드 시퀀싱에 의해 추가로 확인되었다.

[0130] EGFP 유전자의 안정성 및 유지를 평가하기 위해, icPEDV-EGFP(P2-P10)의 각 계대에 감염된 세포에서 EGFP의 발현 상태를 형광 현미경 및 면역 블로팅으로 조사하였다. 그 결과는 도 5a에 나타내었다.

[0131] 도 5a에 나타난 바와 같이, EGFP의 강한 발현은 Vero 세포에서 10회 연속 계대를 거쳐 안정적으로 유지되었다.

[0132] 다음으로, icPEDV-EGFP-P10의 EGFP 발현 동역학을 면역 블로팅에 의해 감염 후 상이한 시점에서 조사하였다. 그 결과는 5b에 나타내었다.

- [0133] 도 5b에 나타난 바와 같이, icPEDV-EGFP에 감염된 세포의 바이러스 N 단백질의 양은 icKNU-141112에 감염된 세포의 양과 비슷했지만, EGFP는 icPEDV-EGFP에 감염된 세포에서만 검출되었다. N의 발현 동역학과 유사하게, EGFP 발현은 12 hpi에서 나타났고, 점차 증가하여 48 hpi에서 정점을 이루었다.
- [0134] 또한, 유전자 발현 강도(형광 강도)의 정도는 형광 현미경 및 형광측정법에 의해 추가로 검증되었다. 그 결과는 도 5c에 나타내었다.
- [0135] 도 5c에 나타난 바와 같이, 형광 강도가 시간에 비례하여 증가하는 것을 확인하였다. 이는 유전자 발현 강도가 증가함을 의미한다.
- [0136] 종합적으로, RG(reverse genetics) 시스템은 바이러스 단백질 발현 표현형을 변경하지 않고 외래 단백질을 안정적으로 발현하는 재조합 바이러스를 생성하도록 PEDV 계통을 조작할 수 있는 것이다.

[0138] **실시예 4. 한국의 PEDV 유행 균주의 유전자 모니터링**

- [0139] PEDV 감염 cDNA 클론을 조작하여 관심 변이체(VOI; variant of interest)에서 파생된 이중 S 유전자를 포함하는 재조합 PEDV를 생성할 수 있는지 여부를 추가 조사하기 위해, 먼저 S 유전자 돌연변이가 많은 후보 VOI를 찾는 것을 목표로 하였다. 이를 위해 2019-2022년까지 전국적으로 수집된 PEDV 양성 샘플의 완전한 S 유전자 서열을 분석하기 위한 분자 역학 연구를 수행하였다. 유전자 분석에 따르면 본 발명에서 확인된 모든 한국 균주는 KNU-141112와 96.3-99.4%의 아미노산(aa) 동일성을 공유하는 HP-G2b로 분류되었다. 얻은 S 서열은 4가지 모든 유전자형을 포함하여 글로벌 PEDV 균주의 참조 서열과 추가로 비교하였다. 그 결과는 도 6a에 나타내었다. 특히, 2019-2022 유행성 균주 중에서 2021년 제주도에서 분리되고, GNU-2110으로 명명된 한 균주는 계통 위치 21025-21027에 고유한 3-nt(TTA) DEL을 포함하여 S 유전자에서 가장 많은 수(51)의 돌연변이를 보유하고 있었다. 이는 KNU-141112에 비해 약 4% 변이(96.3% 상동성)가 있고, 1-aa 더 짧았다(도 8c). 총 51개의 aa 치환이 S1 및 S2 서브유닛에 무작위로 분포되었으며, 그 중 HP-G2b PEDV의 S1의 NTD/S0(잔기 19-220) 및 "콜라게나제 등가물(collagenase equivalent, COE)"(잔기 502-641) 중화 에피토프에서 16개의 변화가 분명하였다. 후속 계통 발생 분석은 GNU-2110(빨간색 삼각형)이 HP-G2b 한국 원형 균주 KNU-141112(검정색 삼각형)에서 가장 멀리 떨어져 있어 하위 그룹 G2b 내에서 별개의 가지를 형성함을 나타내었다(도 6a). 따라서 GNU-2110을 RG 접근법을 사용하여 KNU-141112 계통에 S 유전자를 도입하기 위한 VOI로 선택하였다.

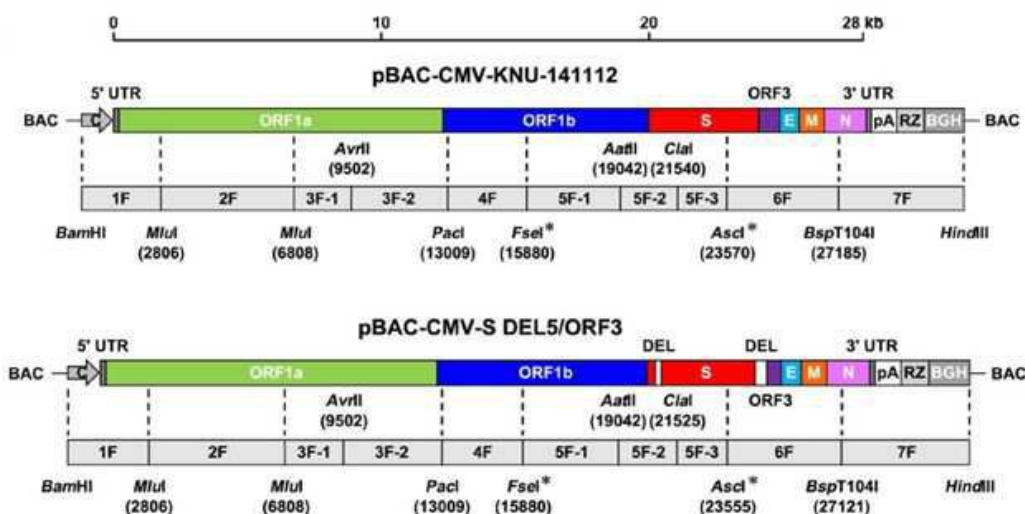
[0141] **실시예 5. VOI에서 유래된 S를 발현하는 재조합 PEDV의 구조 및 특성화**

- [0142] VOI의 S 유전자를 인코딩하는 재조합 PEDV를 생성하기 위해, pBAC-CMV-KNU-141112를 사용하여 고유한 S 유전자를 GNU-2110에서 파생된 이중 S(S51, GenBank accession number ON263450, 서열번호 3)로 교체하고, S51-인코딩 재조합 클론(pBAC-CMV-KNU-141112-S51)을 구축하였다. 이는 도 6b에 나타내었다. icPEDV-S51로 명명된 재조합 바이러스는 형질감염 시 성공적으로 회수되었고, 후속적으로 플라크 정제 및 세포 배양 계대를 거쳤다.
- [0143] 그런 다음, Vero 세포에서 icPEDV-S51의 바이러스학적 특성, 성장 동역학, 및 플라크 형태를 조사하였다. 그 결과는 도 6c 내지 6e에 나타내었다.
- [0144] 도 6c 내지 6e에 나타난 바와 같이, icKNU-141112와 icPEDV-S51은 감염된 Vero 세포에서 합포체 형성을 포함하여 상당한 CPE를 유발하였다(도 6c의 1행). 재조합 icPEDV-S51 바이러스의 증식은 IFA에 의해 확인되었으며, icKNU-141112에 감염된 세포에서 관찰된 것과 유사하게, 융합 세포의 세포질 전체에 걸쳐 N 단백질 염색을 확인하였다(도 6c의 2행). 또한, icPEDV-S51의 성장 동역학 및 플라크 형태는 icKNU-141112의 것과 유사하였다(그림 6d 및 e). icPEDV-S51의 동일성은 제한 효소 소화 및 뉴클레오타이드 시퀀싱에 의해 추가로 입증되었다. 이는 DNA-launched RG system을 모 바이러스의 성장 능력과 동일한 성장 능력을 가진, 현대 변이체에서 유래하는 이중 S 단백질을 발현하는 재조합 PEDV를 구성하는 데 사용할 수 있음을 의미한다.
- [0145] VNT를 사용하여 재조합 icKNU-141112 및 icPEDV-S51 바이러스에 대한 중화 활성을 평가하기 위해, 이전에 2세대 G2b KNU-141112 기반 백신에 의해 유도된 암태지 항혈청을 테스트하였다. 이전 연구에 따르면, 고도로 희석된 항혈청은 64에서 512에 이르는 1:158의 높은 NAb 기하 평균 역가(geometric mean titer, GMT)로 icKNU-141112에 감염된 Vero 세포를 효율적으로 보호하였다. 그러나, 항혈청은 icPEDV-S51 억제에는 덜 효과적이었다(1:22의 NAb GMT). 이는 icKNU-141112에 대한 것보다 거의 3-log₂ 낮다. 이 결과는 도 7에 나타내었다.

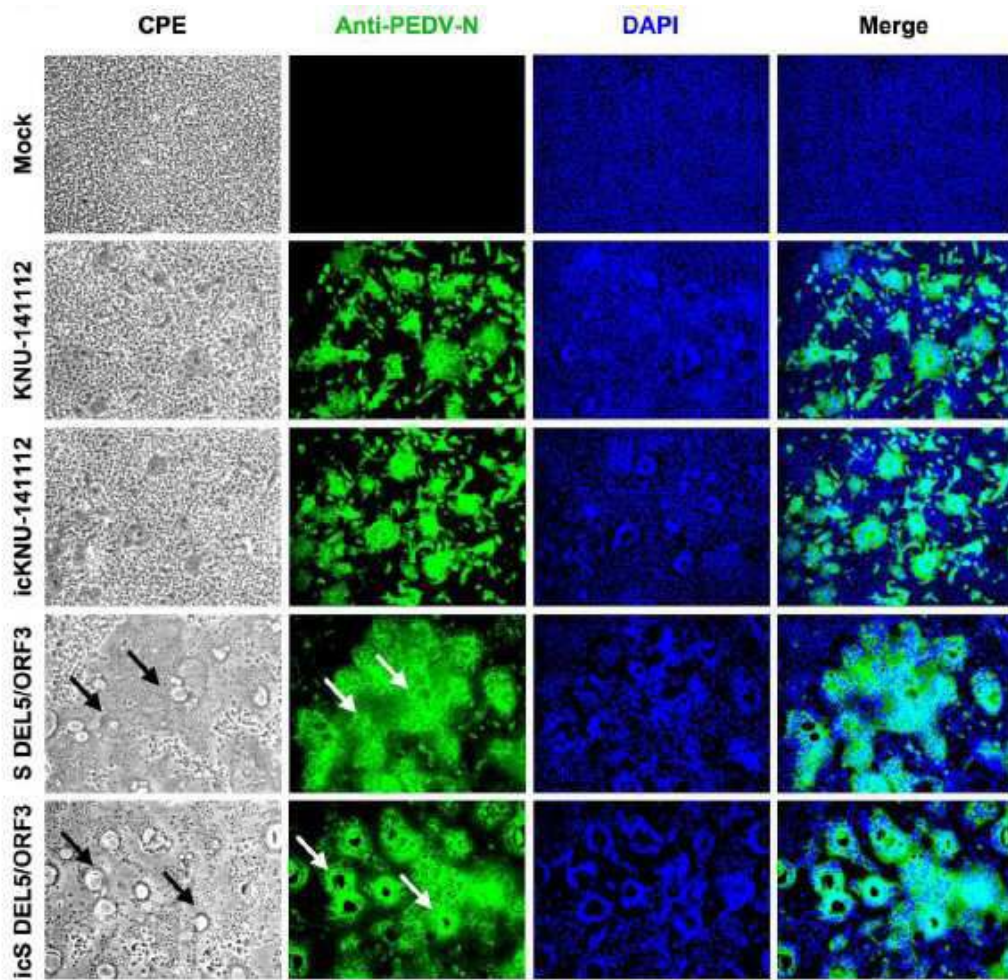
- [0146] 도 7에 나타난 바와 같이, 각 항혈청의 NAb 역가를 히트맵으로 추가로 시각화하였으며, 이는 개별 항혈청이 icKNU-141112에 비해 icPEDV-S51에 대해 상당히 더 낮은 NAb 역가를 나타냄을 보여주었다. 종합적으로, 항혈청은 이중 S 유전자(S51)를 보유하는 재조합 PEDV를 제한적으로 교차 중화시킨 것이고, 이는 KNU-141112(2014년 균주)와 VOI(2021년 균주) 사이의 항원 변이를 시사한다.
- [0147] 또한, 교차 중화 데이터는 KNU-141112와 GNU-2110 사이의 NTD/SO 또는/및 S1의 COE 도메인에서 발견되는 상당한 서열 불일치가 바이러스 중화 활성에 영향을 미칠 수 있음을 암시하였다. 이를 시각화하기 위해, KNU-141112 및 GNU-2110의 S 당단백질 3D 구조를 모델링하였다. 이 결과는 도 8a 내지 8c에 나타내었다.
- [0148] 도 8a 내지 8c에 나타난 바와 같이, 이러한 S 단백질의 구조는 S1-NTD가 표면에 노출된 동종 삼량체로 동일하게 예측되었다. KNU-141112의 S의 3D 구조와 정렬될 때, S51(GNU-2110 S)은 NTD/SO 도메인 표면에 있는 잔기 55-74 및 130-147에서 두 가지 주요 형태 변화를 표시하였다(도 8b). N-연결 글리코실화 부위의 예측은 KNU-141112 S가 NxS/T(x는 프롤린을 제외한 임의의 잔기)에 의해 정의된 21개의 잠재적인 N-글리코실화 부위를 갖는 반면, GNU-2110 균주는 각각 S1 및 S2 영역의 N130 및 N195에서 두 개의 추가 추정 부위를 가진다는 것을 나타낸다(도 8c). 이는, N130 글리칸 모티프는 1-aa 치환(Ser-to-Asn[S130N]) 및 위치 130 및 131에 이소류신(Ile) 잔기 DEL의 발생으로 인한 S51의 NTD/SO 도메인에서 예측되었다. 따라서 위치 130-132에서 'SIKT' 잔기를 N-글리코실화 서열 'NKT'로 변경하였다(도 8c). 따라서, S 중 형태적 및 N-글리코실화 부위 변화가 VOI(GNU-2110)의 항원성에 영향을 미칠 수 있다고 추측하였다.
- [0150] 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 pBAC-CMV-KNU-141112 및 pBAC-CMV-S DEL5/ORF3의 PEDV 전장 게놈 클론을 성공적으로 얻은 것을 확인하였고, ORF3 유전자 위치에 외래 단백질 항원을 성공적으로 탑재할 수 있다는 것을 확인하였다. 또한, 신종 또는 변종 돼지 유행성 설사 바이러스 스파이크 단백질(S)을 클론 내 S 단백질 위치에 탑재하여, 혈청 테스트 및 항원성에 영향을 미치는 구조의 확인을 하였던 바, 바이러스 벡터 백신 플랫폼의 우수성을 검증하였다.
- [0151] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

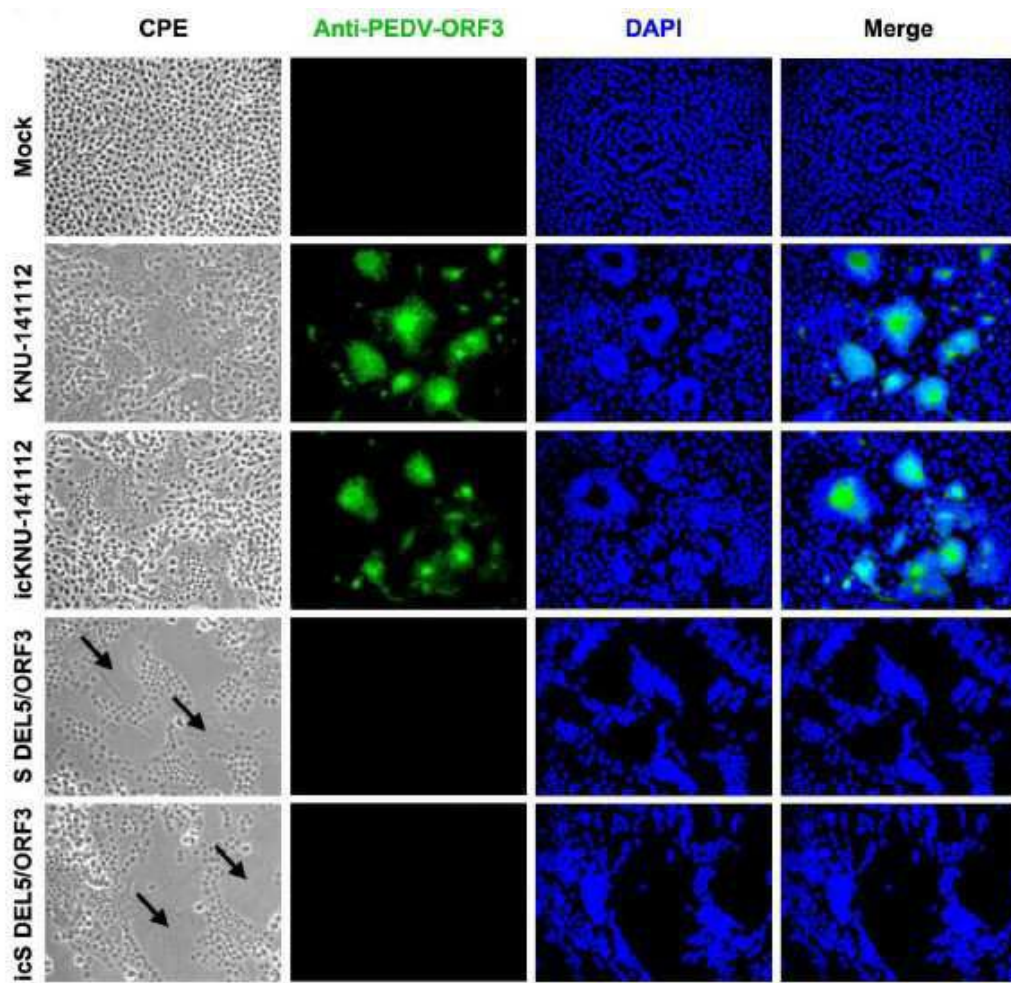
도면1



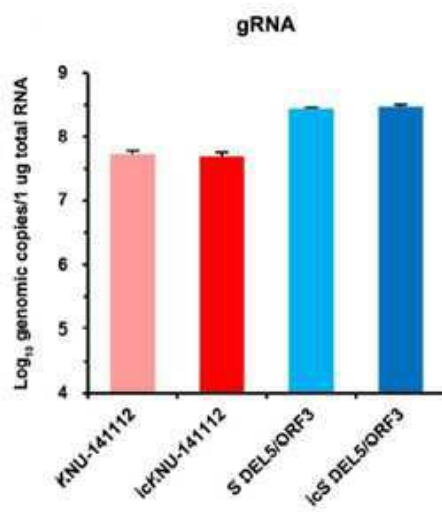
도면2a



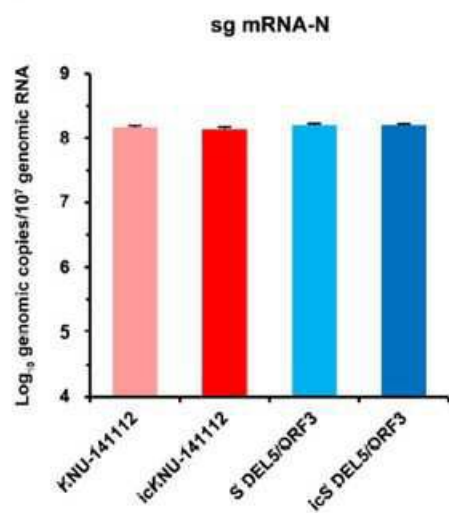
도면2b



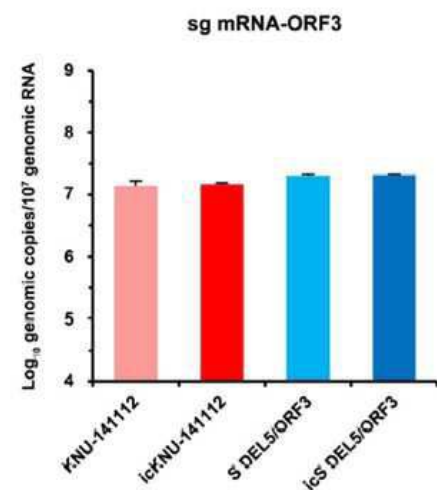
도면2c



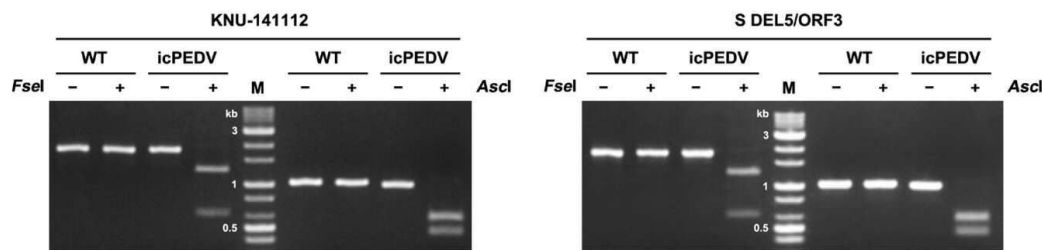
도면2d



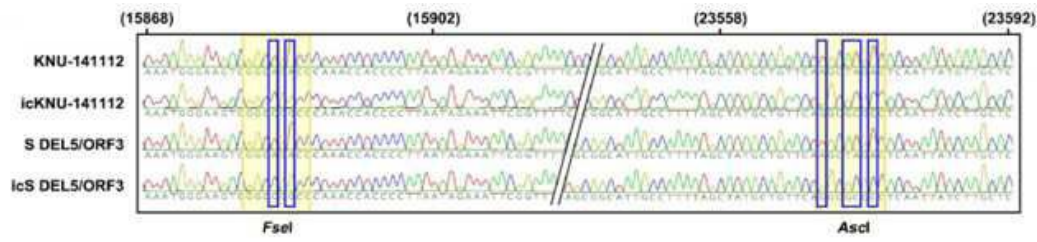
도면2e



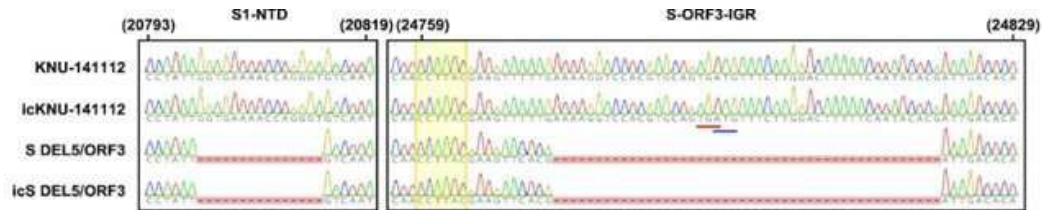
도면3a



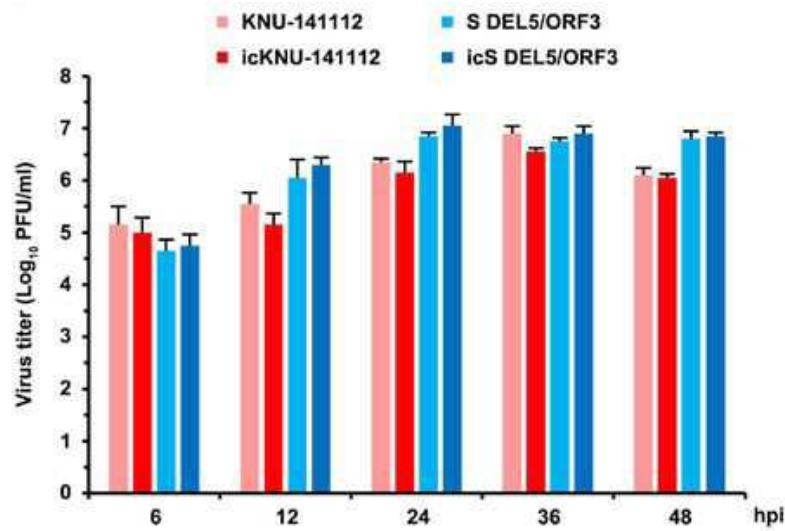
도면3b



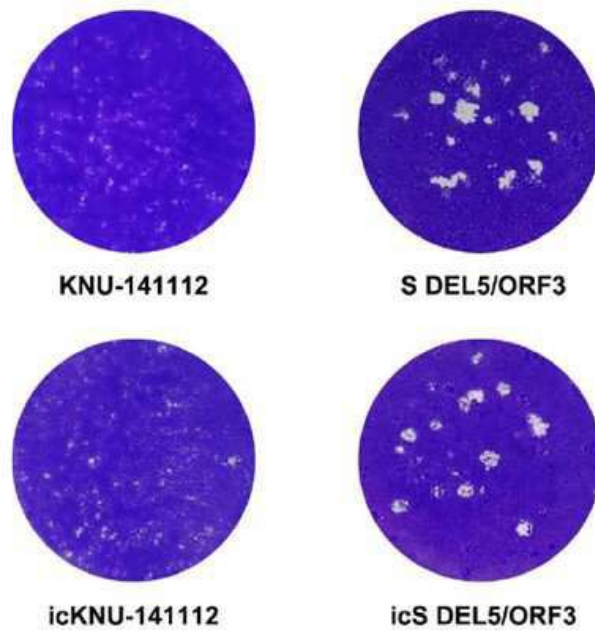
도면3c



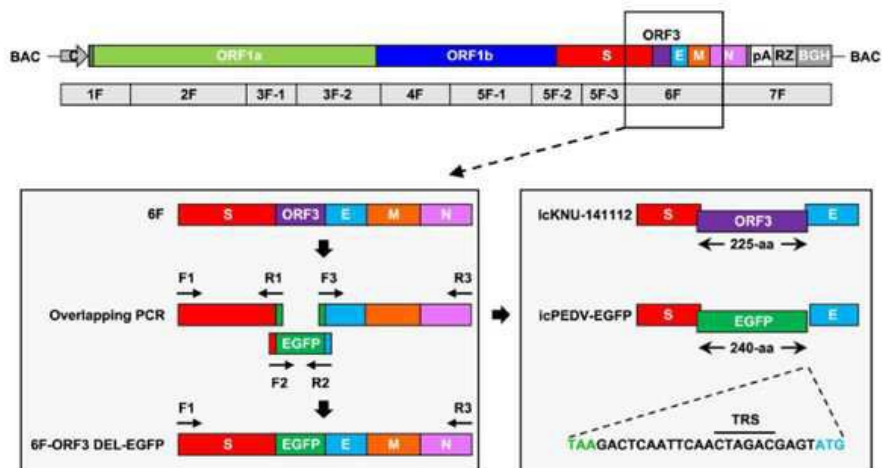
도면3d



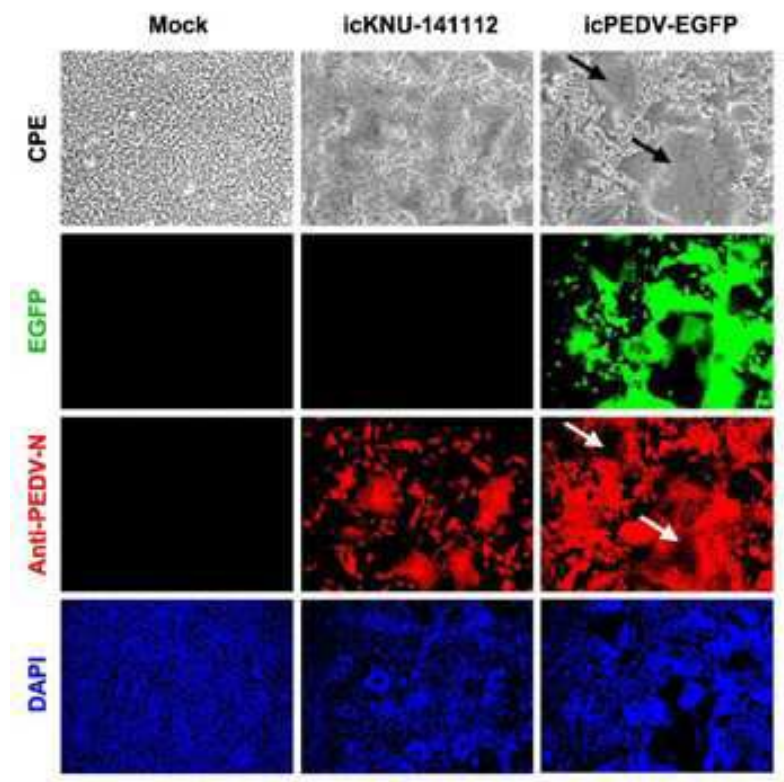
도면3e



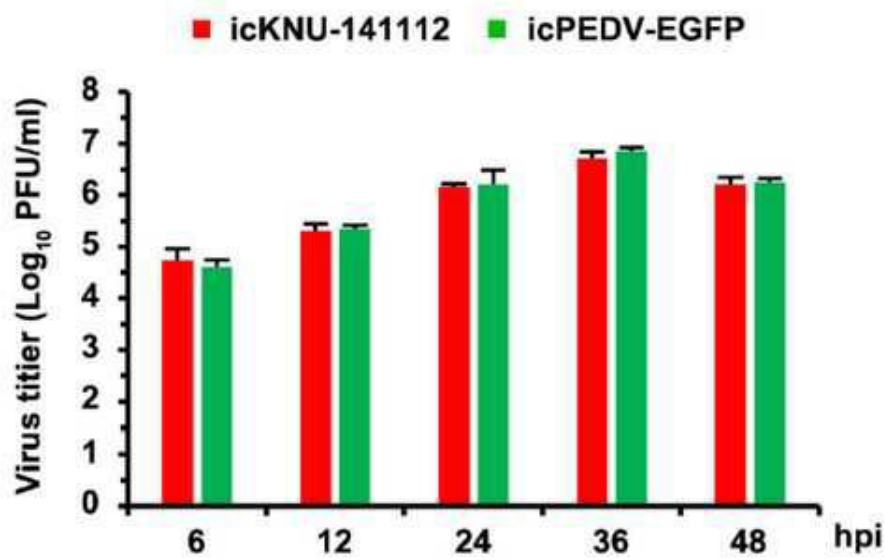
도면4a



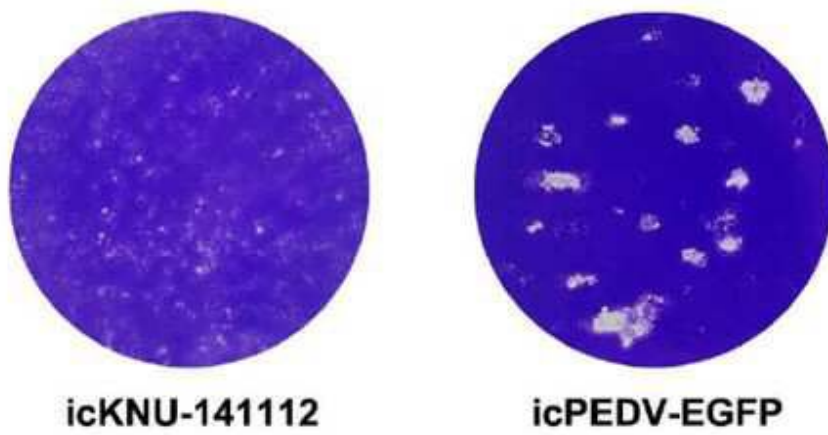
도면4b



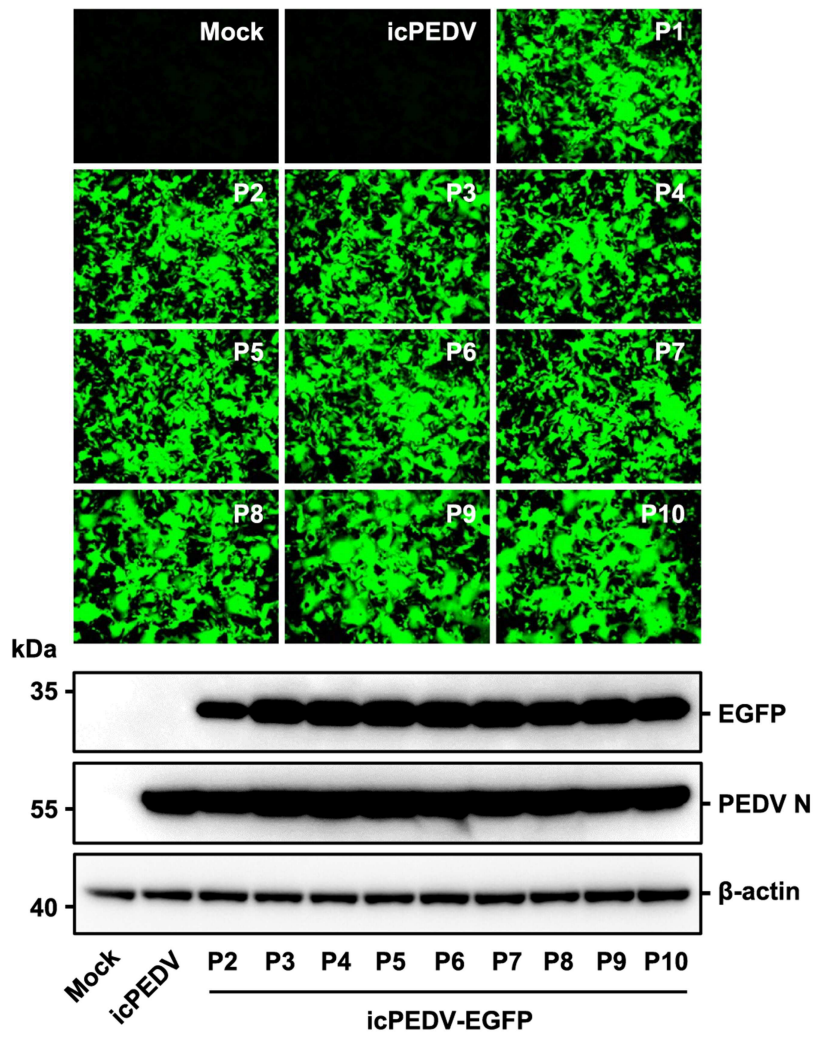
도면4c



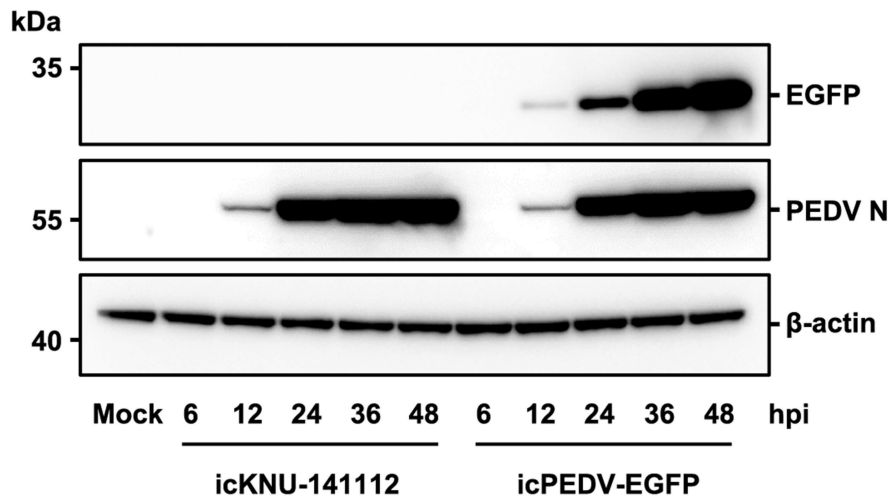
도면4d



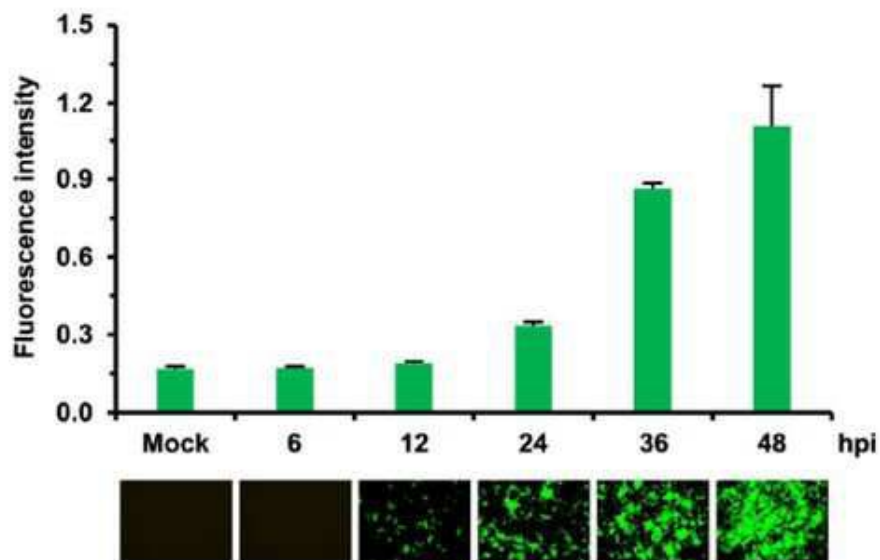
도면5a



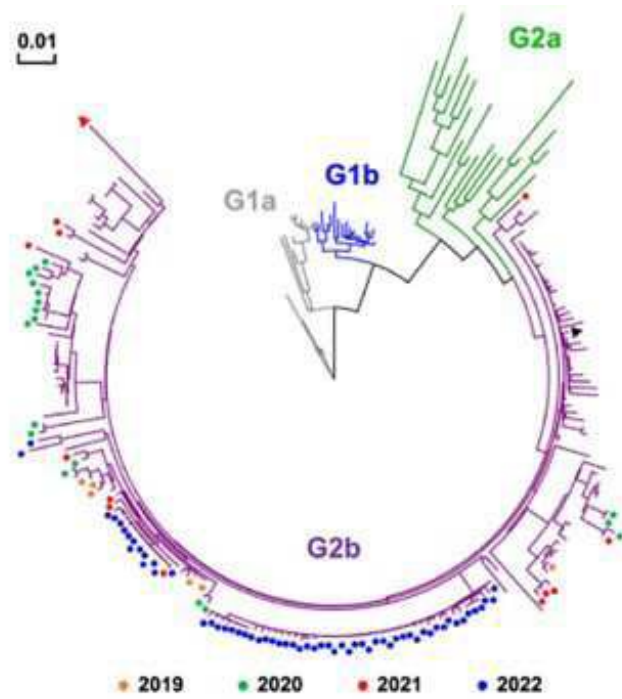
도면5b



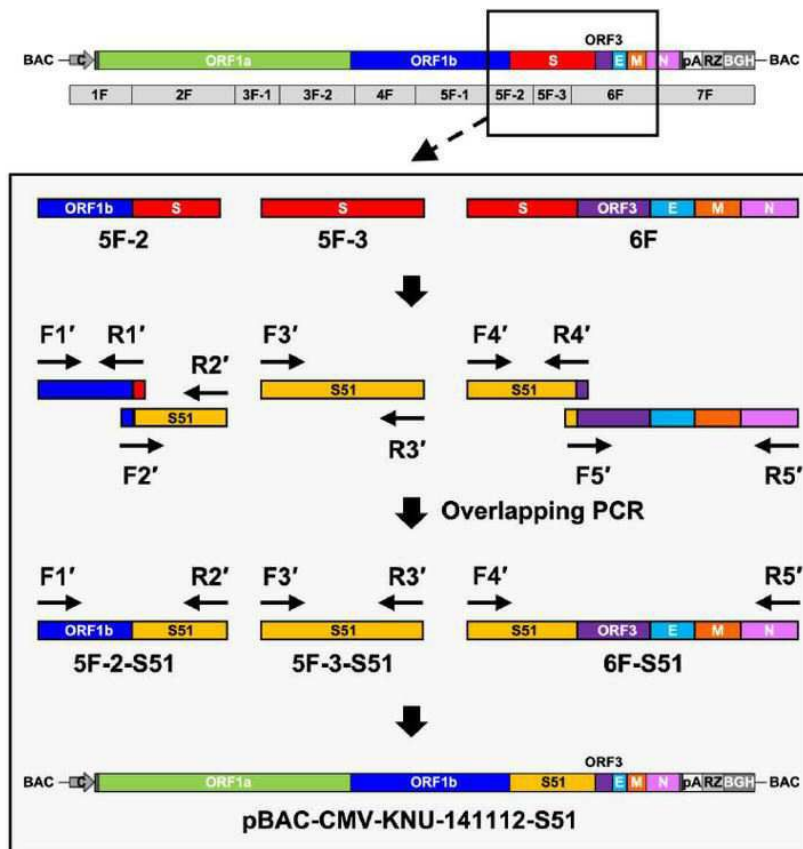
도면5c



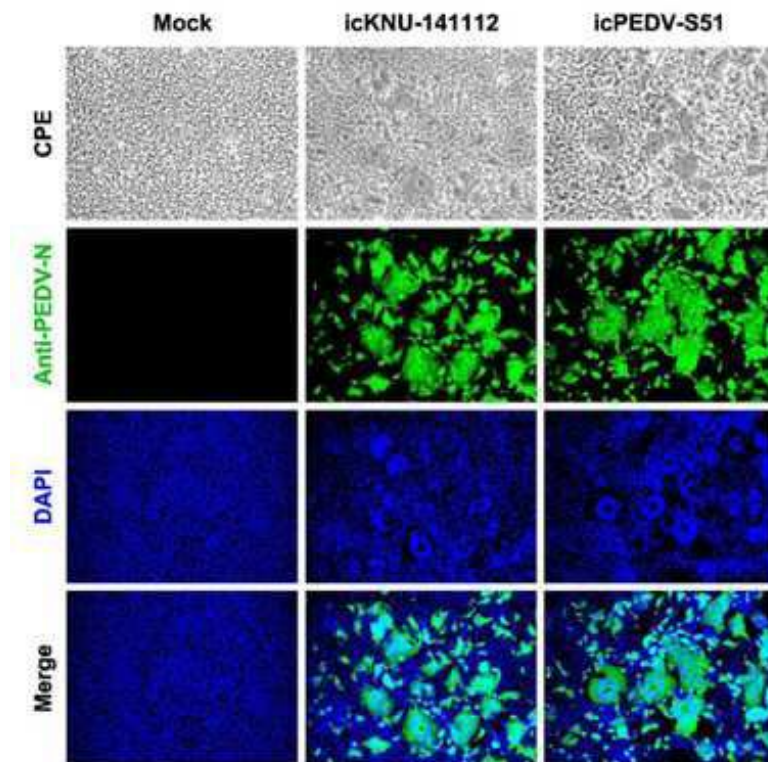
도면6a



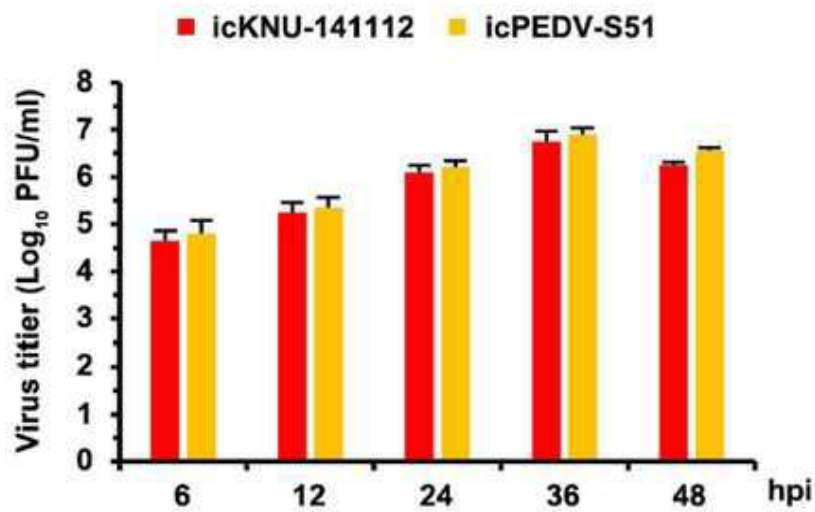
도면6b



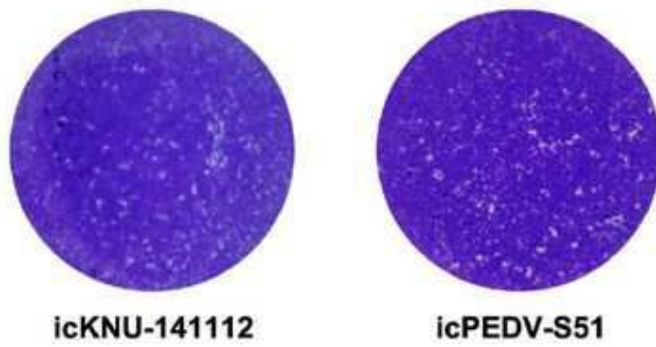
도면6c



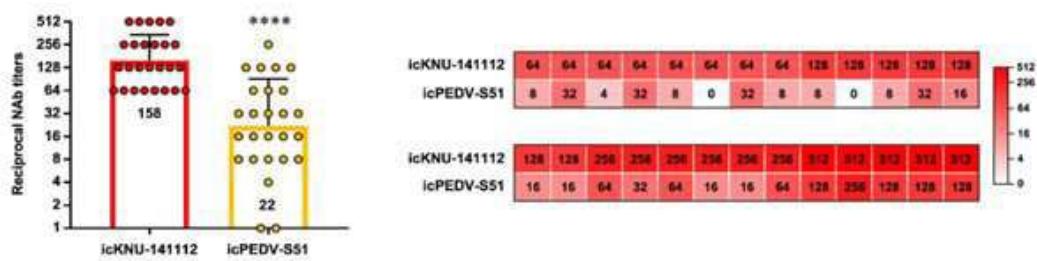
도면6d



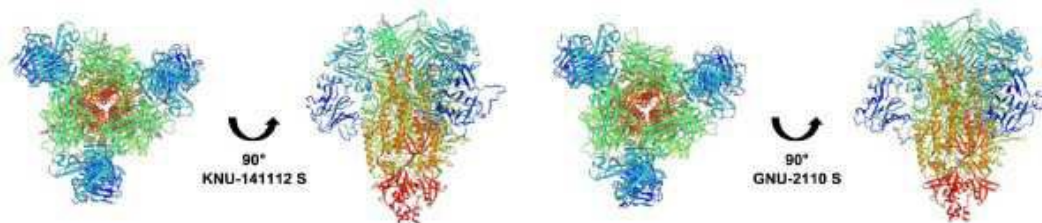
도면6e



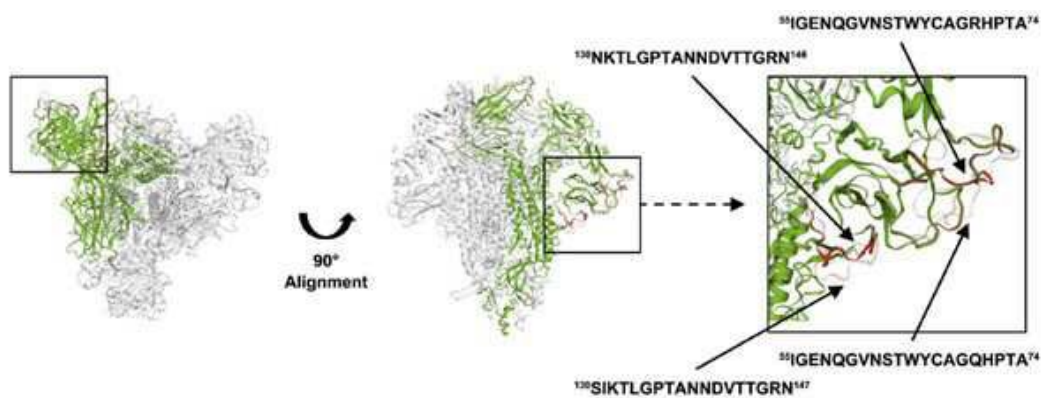
도면7



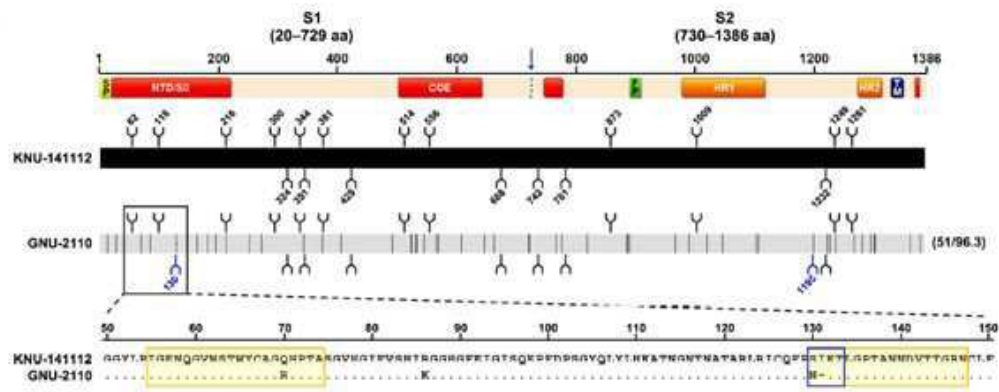
도면8a



도면8b



도면8c



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.