



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2017-0053537  
(43) 공개일자 2017년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/165 (2006.01) A61K 35/66 (2017.01)  
A61K 38/16 (2006.01) C12N 15/81 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
C07K 14/165 (2013.01)  
A61K 35/66 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0156184  
(22) 출원일자 2015년11월06일  
심사청구일자 2015년11월06일

(71) 출원인  
충북대학교 산학협력단  
충청북도 청주시 서원구 충대로 1 (개신동)

(72) 발명자  
안지영  
충청북도 청주시 흥덕구 서현북로 15, 508동 901호(가경동, 대림e편한세상아파트)

이은지  
충청북도 청주시 흥덕구 대농로 43, 107동 2901호(복대동, 신영지웰시티)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인  
위병갑

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 돼지 유행성설사 바이러스의 에피토프 단백질, 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 이를 발현하는 형질전환체 및 이를 포함하는 돼지 유행성설사 바이러스 예방 또는 치료용 조성물

**(57) 요약**

본 발명은 돼지 유행성설사 바이러스의 에피토프 단백질, 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 이를 발현하는 형질전환체 및 이를 포함하는 돼지 유행성설사 바이러스 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명은 구투여에도 무해하다는 이점으로 기존의 약물투여로 인한 백신의 부작용인 단점을 감소시키고 백신 제조 과정에서 피할 수 없었던 세포파쇄나 항원 추출, 정제, 안정화 등 백신 제조공정을 획기적으로 단순화시킬 수 있다. 또한 본 발명의 외래단백질인 PED의 Spike 단백질이 표면발현 된 효모 전세포는 단백질 어레이, 항체제작, 생물전환 및 외래단백질 개량에 유용하게 이용될 수 있다.

**대표도** - 도1



(52) CPC특허분류

*A61K 38/162* (2013.01)

*C12N 15/81* (2013.01)

*C12N 2770/20032* (2013.01)

*C12N 2770/20033* (2013.01)

(72) 발명자

**김양훈**

경기도 용인시 기흥구 언남로 15, 210동 2006호(언남동, 동일하이빌 2차 아파트)

**안근아**

충청북도 청주시 서원구 내수동로 52, S1-5동 325호(개신동)

**이세희**

충청북도 청주시 서원구 내수동로 52, S1-5동 325호(개신동)

**박가영**

충청북도 청주시 서원구 내수동로 52, S1-5동 325호(개신동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ010530

부처명 농업진흥청

연구관리전문기관 충북대학교

연구사업명 공동연구사업/국책기술개발사업

연구과제명 환경 유해물질 노출에 따른 가축질환 모니터링 및 진단시스템개발

기 여 율 1/1

주관기관 충북대학교

연구기간 2014.01.01 ~ 2016.12.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 5 내지 7로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 돼지 유행성설사 바이러스(PEDv) 에피토프 단백질.

#### 청구항 2

제1항의 에피토프를 포함하는 돼지 유행성설사 바이러스(PEDv) 항원.

#### 청구항 3

제1항의 에피토프 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

#### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 유전자는 서열번호 1 내지 3 중에서 선택된 어느 하나로 표시되는 염기서열인 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

#### 청구항 5

제3항에 있어서,

상기 재조합 벡터는 에피토프 단백질을 세포 표면에 발현하는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

#### 청구항 6

제3항에 있어서,

상기 재조합 벡터는 상기 에피토프 단백질을 암호화하는 유전자를 효모 고정단백질 CWP2의 신호 서열과 CWP2 서열의 사이에 삽입하여 구성한 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

#### 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 재조합 벡터는 효모 고정단백질 CWP2의 신호서열을 코딩하는 서열목록 9의 염기서열, 서열목록 1 내지 3 중에서 선택된 어느 하나의 에피토프 단백질을 암호화하는 염기서열 및 효모 표면단백질 CWP2를 암호화하는 서열목록 12의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

#### 청구항 8

제3항 내지 제7항 중 어느 한 항의 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체.

#### 청구항 9

제8항에 있어서,

상기 형질전환체는 효모인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

#### 청구항 10

제8항 또는 9항의 형질전환체, 상기 형질전환체의 단백질 추출물 또는 상기 형질전환체로부터 분리된 재조합 PEDv 에피토프 단백질을 포함하는 돼지 유행성설사 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물.

## 발명의 설명

**기술분야**

[0001] 본 발명은 돼지 유행성설사 바이러스의 에피토프 단백질, 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 이를 발현하는 형질전환체 및 이를 포함하는 돼지 유행성설사 바이러스 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 돼지 유행성설사(porcine epidemic diarrhea ; PED)는 원인체인 PED 바이러스 (porcine epidemic diarrhea virus ; PEDv)의 감염에 의하여 연령에 관계없이 발생하는 돼지의 전염병으로 구토와 수양성 설사가 특징이다. 또한, 이 질병은 1992년 처음으로 국내에서 발생보고 된 후 전국적으로 확산되어 포유자돈 설사병 중 가장 피해가 심하며, 양돈 농가에 많은 경제적 피해를 주는 주요 질병이다. 돼지 유행성 설사병을 일으키는 PEDv는 주로 소장 용모세포에 증식하여 용모 상피세포를 변성 또는 괴사시켜 용모의 위축과 탈락을 동반하고, 흡수장애를 초래하여 지속적인 수양성 설사를 일으킨다. 돼지의 연령에 상관없이 장염을 일으키며 심한 설사와 탈수현상을 동반하고 심지어 자돈에서의 치사율은 80~90%에 이른다.

[0003] 대부분의 바이러스가 원인인 질병들처럼 PED 또한, 백신을 통한 예방에만 의존하고 있는데, 그 백신체제는 비교적 단가가 비싼 배양배지 및 동물세포배양기 등 생산비가 높으며, 또한 혈청배지에 포함된 다양한 이종단백질로 인하여 백신을 접종 시 이러한 이종단백질들에 의한 부작용 발생이 상존하고 있다. 대장균에서 생산된 재조합 백신의 경우 병원체 오염의 배제와 저렴한 대량 생산비용의 이점이 있으나 동식물 단백질의 경우 대장균과의 번역 후 변형체계의 차이로 인해 면역성이 저하되기도 하며, 재조합 대장균 백신의 경우 투여 시 장의 비우호적 조건에 의해 단백질이 파괴되기도 한다. 식물과 같은 고등생물의 단백질 발현 체계를 이용할 경우 면역성 저하 문제나 장의 비우호적 조건을 회피할 수 있기는 하나, 이 역시 유전자변형체(genetically modified organism)로서 박테리아, 바이러스 또는 동물에 있는 유전자를 삽입하여 새로운 종을 만들어내는 것에는 매우 유용하나 GMO를 섭취함으로써 인한 인체에 대한 안전성과 GMO 재배로 인한 유전자오염으로 환경 위해성에 대한 문제가 제기되고 있다. 또한, 기존의 혈관에 주입시키는 주사백신체제는 백신이 혈관 내에서만 순환하므로 장내에는 영향을 주지 못하기 때문에 장내 서식하여 돼지유행성설사증을 유발하는 PEDv의 면역에 효과가 없으며, 경구로 섭취하는 방식의 경구백신체제만이 PEDv의 면역에 효과가 있는 것으로 알려졌다. 그러나 코로나바이러스 속에 속하는 PEDv는 RNA 바이러스의 일종으로 변이율이 높기 때문에 기존의 백신의 효능을 상실할 확률이 높다. 따라서, 여전히 효과가 우수하면서도 안전하고 안정적인 돼지 유행성설사 백신에 대한 연구 및 개발이 요망된다.

[0004] 한편, 미생물의 세포표면에 원하는 단백질을 부착하여 발현시키는 기술을 세포표면발현(Cell Surface Display) 기술이라 한다. 이 세포표면 발현기술은 박테리아나 효모와 같은 진핵생물의 고정 단백질을 표면발현 모체(Surface Anchoring Motif)로 사용하여 외래 단백질을 표면에 발현시키는 기술로서 어떤 단백질을 세포 표면에 발현시키는가에 따라 그 응용범위가 결정되어지며, 따라서 세포표면 발현기술을 이용한 산업적 응용 잠재력은 상당하다고 할 수 있다. 성공적인 세포표면 발현기술을 위해서는 표면발현모체가 가장 중요하다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

- [0005] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허 KR20090011215A
- (특허문헌 0002) 2. 한국공개특허 KR20050107860A
- (특허문헌 0003) 3. 한국공개특허 KR20120066555A
- (특허문헌 0004) 4. 미국공개특허 US20150283229A1

**비특허문헌**

- [0006] (비특허문헌 0001) 1. Protein Expression and Purification 41 (2005) 378383

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0007] 본 발명은 효과가 우수하면서도 안전하고 안정적인 돼지 유행성설사에 적용될 수 있는, 신규한 에피토프 단백질, 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 이를 발현하는 형질전환체 및 이를 포함하는 돼지 유행성설사 바이러스 예방 또는 치료용 조성물을 제공하고자 한다.

**과제의 해결 수단**

[0008] 상기 상술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 5 내지 7 중에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 돼지 유행성설사 바이러스(PEDv) 에피토프 단백질을 제공한다.

[0009] 본 발명의 일 태양에 따르면, 상기 에피토프를 포함하는 돼지 유행성설사 바이러스(PEDv) 항원을 제공한다.

[0010] 본 발명의 일 태양에 따르면, 제1항의 에피토프 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 태양에 따르면, 상기 유전자는 서열번호 1 내지 3 중에서 선택된 어느 하나로 표시되는 염기서열인 것을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명의 일 태양에 따르면, 상기 재조합 벡터는 에피토프 단백질을 세포 표면에 발현하는 것을 특징으로 한다.

[0013] 본 발명의 일 태양에 따르면, 상기 재조합 벡터는 상기 에피토프 단백질을 암호화하는 유전자를 효모 고정단백질 CWP2의 신호 서열과 CWP2 서열의 사이에 삽입하여 구성한 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명의 일 태양에 따르면, 상기 재조합 벡터는 효모 고정단백질 CWP2의 신호서열을 코딩하는 서열목록 9의 염기서열, 서열목록 1 내지 3 중에서 선택된 어느 하나의 에피토프 단백질을 암호화하는 염기서열 및 효모 고정단백질 CWP2를 암호화하는 서열목록 12의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명의 일 태양에 따르면, 상기 상술한 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0016] 본 발명의 일 태양에 따르면, 상기 형질전환체는 효모인 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 일 태양에 따르면, 상술한 형질전환체, 상기 형질전환체의 단백질 추출물 또는 상기 형질전환체로부터 분리된 재조합 PEDv 에피토프 단백질을 포함하는 돼지 유행성설사 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

**발명의 효과**

[0018] 본 발명의 구축된 재조합 벡터체제는 안정화를 이루고, 효모 전세포의 외피에 PEDv를 중화시키는 PEDv의 표면단백질인 Spike단백질의 항원결정부위 COE영역을 발현 유도 시키는데 효과가 있을 뿐만 아니라 표면발현 유도된 재조합 효모는 경구투여에도 무해하다는 이점으로 기존의 약물투여로 인한 백신의 부작용인 단점을 감소시키고 백신 제조 과정에서 피할 수 없었던 세포파쇄나 항원 추출, 정제, 안정화 등 백신 제조공정을 획기적으로 단순화시킬 수 있다. 또한 본 발명의 외래단백질인 PED의 Spike 단백질이 표면발현 된 효모 전세포는 단백질 어레이, 항체제작, 생물전환 및 외래단백질 개량에 유용하게 이용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0019] 도 1은 효모세포의 외피로 PED 바이러스(PEDv)의 항원결정부위인 COE영역을 발현 유도하는 목적으로 설계된 재조합 벡터에 대한 설계도이다.

도 2a는 pYES2 효모발현 벡터를 기초로 하여 효모 표면발현 유도되도록 설계한 재조합 서열 CWP2P의 신호서열, HA tag, PED 바이러스의 Spike 단백질 서열, Gly-Ser Linker, CWP2P의 신호서열을 제외한 유전자 서열 구조를 도입시키는 도면을 모식화하여 나타낸 그림이다.

도 2b는 재조합서열 제작 방법은 중합효소 연쇄반응 방법을 이용하여 증폭된 유전자에 설계된 프라이머로 합성해 나가는 방식으로 하였으며, Agarose gel 전기영동 사진은 목적하는 PEDv의 항원결정기 유전자와 그 유전자에 재조합서열을 합성한 과정이다. (① M : 100bp ladder, 1 : PEDv1유전자, 2 : 재조합서열을 합성한 PEDv1유전자, ② M : 100bp ladder, 3 : PEDv2유전자, 4 : 재조합서열을 합성한 PEDv2유전자, ③ M : 100bp ladder, 5 : PEDv3유전자, 6 : 재조합서열을 합성한 PEDv3유전자, ④ M : 100bp ladder, 7 : CWP2 유전자, 8 : 재조합서열

을 합성한 CWP2 유전자)

도 3은 본 발명의 PEDv 항원결정기 3영역(PEDv1, PEDv2, PEDv3)의 서열과 NCBI에 등재되어있는 2014년 이전에 발생한 PEDv서열의 차이점을 비교하여 나타낸 그림이다. 도 3a - PEDv1, 도3b - PEDv2, 도3c - PEDv3.

도 4는 Non-Induction 형질전환주의 intensity를 1로 기준하여 그에 대한 Induction 형질전환주의 intensity를 상대성으로 나타낸 수치를 그래프화 하여 나타낸 것이다.

도 5는 형질전환주 3종(10, 11, 15)에 대해 Western blot 방법을 이용하여 HRP를 기질로 하는 HA 1차 항체로 탐색하였고, SDS-PAGE 전기영동에 의해 단백질을 분리하여 발현 유도된 PED 바이러스의 Spike 단백질의 크기가 약 23kDa임을 확인한결과이다.(Host : Host로 사용한 효모, INVSc1, 10, 11, 15 : 형질전환주 10, 11, 15, M : 단백질 마커(broad range))

도 6은 형질전환주 3종(10, 11, 15)을 열처리로 사멸화시켜 Western blot을 이용하여 항체 결합력이 유지되는지 확인한 결과이며, 도면그림에서 열처리한 사멸효모의 band signal을 보아 여전히 항체와의 결합능이 유지되고 있으므로 항체 탐색능의 안정성이 유지되고 있음을 확인한 결과이다(Host:열처리 하지 않은 Host인 효모 INVSc1의 HA 항체 탐색 결과, 10:발현된 형질전환주 10번의 HA 항체 탐색 결과, 11:발현된 형질전환주 11번의 HA 항체 탐색 결과, 15:발현된 형질전환주 15번의 HA 항체 탐색 결과, A:각각 발현된 형질전환주를 70℃에서 30분간 열처리 한 것을 HA 항체로 탐색한 western blot 결과, B:각각 발현된 형질전환주를 100℃에서 30분간 열처리 한 것을 HA 항체로 탐색한 western blot 결과).

도 7은 형광면역항체법(Immunofluorescence Assay)를 이용하여 형질전환주3종의 세포(10, 11, 15)와 FITC과장의 형광을 나타내는 HA 1차 항체를 반응하여 형질전환주의 발현된 항원이 효모세포 외피에 유도되었음을 공초점 현미경(Confocal)로 촬영하여 확인한 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 상기 상술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은, 신규한 돼지 유행성설사 바이러스(PEDv) 에피토프 단백질, 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 이를 발현하는 형질전환체 및 이를 포함하는 돼지 유행성설사 바이러스 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 이하 도면을 참조하여 본 발명을 구체적으로 설명한다.
- [0021] 본 발명은 서열번호 5 내지 7 중에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 돼지 유행성설사 바이러스(PEDv) 에피토프 단백질을 제공한다.
- [0022] 본 발명에서 용어, 돼지 유행성설사 바이러스 "PEDv(porcine epidemic diarrhea virus)"는 코로나바이러스과(coronaviridae)에 속하며 단일 가닥 RNA를 게놈(genome)으로 가지며 길이는 약 28Kb이고, 3개의 주요 구성 단백질인 spike 단백질(180-220KDa)과 막단백질 또는 외피 단백질 (27-32KDa) 그리고 뉴클레오캡시드 단백질(55-58KDa)을 암호화 하고 있다. 이는 같은 종인 SARS 코로나바이러스와 유사한 구조를 가지며 트립신이 첨가된 아프리카 녹색원숭이 신장세포(Vero cell)에서 배양된다.
- [0023] 본 발명에서 용어, "Spike 단백질"은 PEDv의 주요 구성 단백질로서, 목표 세포를 인식하고 바이러스와 세포막(cellular membrane)를 융합시키는 생물학적으로 중요한 기능을 가지고 있다. Spike 단백질의 일부인 COE(CO-26K fragment equivalent) 유전자를 약독화 항원결정기(neutralization epitope)로 이용할 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 용어, "에피토프"는 특정 항체에 의해 인식되는 항원결합부위의 아미노산 잔기 세트, 또는 T 세포에서는 T 세포 수용체 단백질 및/또는 주요 조직적합성 복합체 (Major Histocompatibility Complex, MHC)수용체에 의해 인식되는 잔기이다. 에피토프는 항체, T 세포 수용체 또는 HLA에 의해 인식되는 부위를 형성하는 분자로, 일차, 이차 및 삼차 펩티드 구조, 또는 전하를 의미한다.
- [0025] 본 발명의 새로운 돼지 유행성설사 바이러스 에피토프 단백질은 서열목록 5 내지 7 중에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하며, 각각 서열목록 1 내지 3의 염기서열을 갖는 것이 바람직하다. 본 발명은 2014년에 유행한 PEDv에 감염된 야생자돈에서 PEDv를 분리하였으며, PEDv를 중화시키는 항원 결정부위라고 알려진(비특허 문헌 1) PEDv1인 COE영역(아미노산 502-639, 서열목록 1)과 PEDv2(아미노산 696-779, 서열목록 2), PEDv3(아미노산 696-779, 아미노산 1365-1383, 서열목록 3참조) 영역을 효모의 세포막 표면에 발현시켰으며, 2014년 이전에 발생하던 NCBI에 등재되어있는 PEDv의 Spike 단백질(KF738262)와 본 발명의 PEDv서열을 비교분석한 결과 이는 2014년 이전에 국내에서 유행하던 PEDv와 서열이 다른 것으로 나타났다(도 3 참조). 본 발명에 따른 PEDv의 COE영역은 이전의 PEDv의 서열과 다르며, 연구가치가 있을 뿐 아니라, 이렇게 서열이 변하는 PEDv의 항원 결정

부위를 효모의 표면에 발현하는 시스템을 구축하여 어떠한 결정부위라도 발현이 가능하여 이용 가능 범위를 증가시킬 필요성이 있다.

- [0026] 본 발명의 일 태양에 따르면, 상기 에피토프를 포함하는 돼지 유행성설사 바이러스(PEDv) 항원을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 일 태양에 따르면, 상술한 에피토프 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하여, 바람직하게 상기 유전자는 서열번호 1 내지 3 중에서 선택된 어느 하나로 표시되는 염기서열일 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 용어, "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 상기 유전자는 변형된 것으로써 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [0029] 본 발명에서 용어, "벡터"는 숙주 세포로 염기의 클로닝 및/또는 전이를 위한 임의의 매개물을 말한다. 벡터는 다른 DNA 단편이 결합하여 결합된 단편의 복제를 가져올 수 있는 복제단위 (replicon)일 수 있다. "복제단위"란 생체 내에서 DNA 복제의 자가 유닛으로서 기능하는, 즉, 스스로의 조절에 의해 복제가 가능한, 임의의 유전적 단위 (예를 들면, 플라스미드, 파지, 코스미드, 염색체, 바이러스)를 말한다. 용어 "벡터"는 시험관 내, 생체 외 또는 생체 내에서 숙주 세포로 염기를 도입하기 위한 바이러스 및 비 바이러스 매개물을 포함한다.
- [0030] 바람직하게, 본 발명의 재조합 벡터는 에피토프 단백질을 세포 표면에 발현하는 세포 표면 발현 벡터일 수 있다. 이를 위하여, 본 발명에서는 효모의 고정단백질인 CWP2를 표면발현모체로 하여 발현기술에 적용하였다. CWP2는 92개의 아미노산으로 구성되어 있으며 표면발현 모체로 사용되는 효모의 고정단백질 중 가장 짧은 서열로 이루어져 있어 발현이나 클로닝에 다루기 용이한 장점이 있다. 또한 표면발현 효율이 높은 편으로 알려져 있다.
- [0031] 보다 바람직하게, 본 발명의 재조합 벡터는 에피토프 단백질을 암호화하는 유전자를 효모 고정단백질 CWP2의 신호 서열과 CWP2 서열의 사이에 삽입하여 구성할 수 있다. 일례로, 상기 재조합 벡터는 효모 고정단백질 CWP2의 신호서열을 코딩하는 서열목록 9의 염기서열, 서열목록 1 내지 3 중에서 선택된 어느 하나의 에피토프 단백질을 암호화하는 염기서열 및 효모 고정단백질 CWP2를 암호화하는 서열목록 12의 염기서열로 이루어질 수 있다. 또한, 플라스미드의 발현을 확인하기 위하여 HA tag, 재조합 서열의 안정성을 부여하기 위한 글라이신-세린 링커(Glycine-Serine linker) 서열을 추가로 더 삽입할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 따른 재조합 벡터의 도면을 모식화하여 나타내면 도 1과 같다. N말단 영역부터 GAL1 프로모터를 포함하여, CWP2P의 신호서열, HA tag, PED 바이러스의 Spike 단백질 서열, 글라이신-세린 링커, CWP2P의 신호서열을 제외한 유전자 서열 구조로 이루어져 있다. 이와 같이 재조합된 서열은 전체 774bp 뉴클레오타이드로 구성되며, 23kDa 크기의 PED 바이러스 Spike 단백질이 효모의 표면에 발현되도록 설계된 벡터 시스템이다.
- [0033] 본 발명의 일 태양에 따르면, 상기 상술한 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다. 보다 바람직하게는 형질전환체는 효모일 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 용어, "형질전환"은 외부로부터 주어진 DNA에 의하여 생물의 유전적인 성질이 변하는 것으로, 즉 생물의 어떤 계통의 세포에서 추출된 핵산의 일종인 DNA를 다른 계통의 살아있는 세포의 주었을 때 DNA가 그 세포에 들어가서 유전형질이 변화하는 현상으로 형질변환 형질전환 또는 형변환 등이라고도 한다. 본 발명에서 용어, "형질전환체"는 형질전환으로 인해 생성된 형질전환식물 또는 형질전환동물을 의미하며, 유전자 재조합 기술을 이용하여 특정 유전자의 변형 또는 변이가 유발되어 생성된 유전자재조합체를 포함한다.
- [0035] 본 발명의 일 태양에 따르면, 상술한 형질전환체, 상기 형질전환체의 단백질 추출물 또는 상기 형질전환체로부터 분리된 재조합 PEDv 에피토프 단백질을 포함하는 돼지 유행성설사 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0036] 본 발명의 용어, "감염의 예방 또는 치료용 조성물"은 생체에 면역력을 주는 항원을 함유한 생물학적인 체제로서, 감염증의 예방을 위하여 사람이나 동물에 주사하거나 경구 투여함으로써 생체에 면역이 생기게 하는 면역원 또는 항원성 물질인 백신 조성물 및 사료 조성물이 포함될 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 용어, "예방"은 본 발명의 PEDV 에피토프 단백질을 발현하는 형질전환체 또는 상기 형질전환체를

유효성분으로 하는 조성물의 투여로 상기 PEDV 감염을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.

[0038] 본 발명에서 용어, “치료”는 본 발명의 PEDV 에피토프 단백질을 발현하는 형질전환체 또는 상기 형질전환체를 유효성분으로 하는 조성물의 투여로 상기 PEDV의 감염 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.

[0039] “면역원” 또는 “항원성 물질”은 펩티드, 폴리펩티드, 상기 폴리펩티드를 발현하는 유산균, 단백질, 상기 단백질을 발현하는 유산균, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 재조합 박테리아 및 재조합 바이러스로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다. 구체적인 예를 들면, 상기 항원 물질은 불활성화된 전체 또는 부분 세포 제제 형태, 또는 통상적인 단백질 정제, 유전 공학 기법 또는 화학 합성에 의해 수득되는 항원 분자 형태일 수 있다.

[0040] 상기 조성물 내 상기 항원성 물질은 적절한 범위로 포함될 수 있다.

[0041] 본 발명의 백신 조성물은 수의학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "수의학적으로 허용 가능한 담체"란 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항원보강제, 안정제, 희석제, 보존제, 항균제 및 항진균제, 등장성 작용제, 흡착지연제 등을 포함한다. 백신용 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제, 희석제로는 락토즈, 텍스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 전분, 글리세린, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘실리케이이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명의 백신용 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 레시틴 유사 유화제에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 슈크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테이이트 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 사용할 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제제가 포함된다. 비수용성제제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0043] 본 발명에서 사용한 사료 조성물은 본 발명에 따른 사료 첨가제를 유효성분으로 포함하는 한 당업계에 공지된 다양한 형태의 조성비로 당업자에 의해 적절하게 구성될 수 있으며, 바람직하게는 단백질 20%, 지방, 에테르추출물 4.5%, 지방, 산 가수분해 5.4%, 조섬유질 4.7%, 회분 6%, 칼슘 0.80% 및 인산염 0.62%를 포함하는 사료 조성물일 수 있다.

[0044] 본 발명이 적용할 수 있는 개체는 특별히 한정되지 않고, 어떠한 형태의 것이든 적용 가능하다. 예를 들면, 닭, 돼지, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 래트, 마우스, 소, 양, 염소 등과 같은 동물에 제한없이 적용가능하다.

[0045] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다 할 것이다.

[0046] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0047] **1. 재조합 벡터 pYECWP-PED 제조**

[0048] 효모(*Saccharomyces Cerevisiae*)균주에서 PED 항원을 효율적으로 표면발현 유도하기 위해 서열을 표면발현에 적합하도록 효모의 고정단백질인 CWP2를 표면발현의 모체로 이용하여 설계하였다. 본 재조합 플라스미드는 CWP2의 신호 펩타이드와 그 나머지 유전자 서열 사이에 플라스미드가 발현되는 것을 확인하기 위한 HA tag, PED 바이러스의 표면단백질인 Spike 단백질서열(PEDv1,2,3), 재조합서열의 안정성을 부여하기 위한 글라이신-세린 링커 서

열을 삽입하여 재조합서열을 설계하였다(표 1 및 도 1 참조)

표 1

[0049]

유전자명		염기서열	참조
제한효소 Site	HindIII	AAGCTT	
	BamHI	GGATCC	
	EcoRI	GAATTC	
CWP2 신호서열		ATGCAATTCTCTACTGTCGCTTCCGTTGCTTTCGTCGCTTTGGCTAACTTTGTTGCCGCT	서열목록 9
HA tag		TACCCATACGACGTTCCAGACTACGCT	서열목록 10
PEDv Spike 단백질	PEDv1 (COE)	GTTACTCTGCCATCATTTAATGATCATTCTTTTGTTAACATTACTGTATCTGCTTCCTTTGGTGGTCATAGTGGTGCCAACCTTATTGCATCTGACACTACTATCAATGGGTTAGTTCTTTCTGTGTGACACTAGACAATTCACCATTTCAGTGTTTATAACGTTACAAACAGTTATGGTTATGTGTCTAAATCACAGGACAGTAATTGCCCTTTCACCTTGCAATCTGTTAATGATTACCTGTCTTTTAGCAAATTTGTGTTCCACCAGCCTTTTGGCTAGTGCCTGTATCATAGATCTTTTGGTTACCCTGAGTTTAGTAGTGGTGTAAAGTTACGTCCCTTACTTTCAACTCACAAGGGTGAGTTGATTACTGGCACGCCTAAACCCTTGAAGGTGTCACGGACGTT	서열목록 1 (도 3a)
	PEDv2	TCTGTTACGCCATGTTCTTTTTAGAGCAGGCTGCATATGTTGATGATGATATAGTGGGTGTTATTCTAGTTTGTCTAGCTCCACTTTAACAGTACTAGGGAGTTGCTGGTTTCTTCTACCATTCTAATGATGGCTCTAATGTACAGAGCCTGTGTTGGTGTATAGTAACATAGGTGTTTGTAAATCTGGCAGTATTGGCTACGTCCCATCTCAGTCTGGCCAAGTCAAGATTGCACCCACGGTACT	서열목록 2 (도 3b)
	PEDv3 (PEDv2+C-terminus)	TCTGTTACGCCATGTTCTTTTTAGAGCAGGCTGCATATGTTGATGATGATATAGTGGGTGTTATTCTAGTTTGTCTAGCTCCACTTTAACAGTACTAGGGAGTTGCTGGTTTCTTCTACCATTCTAATGATGGCTCTAATGTACAGAGCCTGTGTTGGTGTATAGTAACATAGGTGTTTGTAAATCTGGCAGTATTGGCTACGTCCCATCTCAGTCTGGCCAAGTCAAGATTGCACCCACGGTACTTTCTCAGGTGTTGTAGGGTCTAGACTTCAACCTTACGAAGTTTTGAAAAGGTC	서열목록 3 (도 3c)
	전체 서열	서열목록 4 참조	서열목록 4
글라이신-세린 링커		GGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGTCT	서열목록 11
CWP2 유전자		GAATCCGCTGCCGCATTTCCTCAAATCACTGACGGTCAAATCCAAGCTACTACCACTGCTACCACCGAAGCTACCACCACTGCTGCCCATCTCCACCGTTGAAAAGTGTCTCCATCCAGCACCGAAAATATCTCTCAAAAAGTAAAATGGTGTGCTAAGGCCGCTGTCGGTATGGGTGCCGGTGTCTAGCTGCTGCTGCTATGTTGTTATAA	서열목록 12

[0050]

본 재조합 서열의 제작은 CWP2의 신호 펩타이드, HA tag, PEDv Spike 단백질서열을 포함하는 PED 도메인과 글라이신-세린 링커, 신호 펩타이드 서열을 제외한 나머지 CWP2 유전자 서열을 포함하는 CWP2 도메인으로 분리하여 제작하였다.

[0051]

PEDv 도메인은 PEDv의 Genomic 플라스미드에서 Spike 단백질 서열을 증폭시킨 후 프라이머를 이용하여 CWP2의 신호 펩타이드서열과 HA tag 서열을 합성하여 제작하였다. 이에 사용한 프라이머는 총 11개이며 하기의 표2에 나타내었다.

표 2

[0052]

프라이머명	염기서열(5'-3')	서열목록
PEDV1-F	GTTACTCTGCCATCATTTAATGATCATTCTTTTG	13
PEDV1-R	GGATCCAACGTCCTGACACCTTCAAG	14
PEDV2-F	TCTGTTACGCCATGTTCTTTTTAGAGCAGC	15
PEDV2-R	GGATCCAGTAACCGTGGGTGCAATCTTGAC	16
PEDV3-R1	CCTACAACAACCTGAGAAAAGTAAACCGTGGGTG	17
PEDV3-R2	TCGTAAGGTTGAAGTCTAGGACCCCTACAACAACC	18
PEDV3-R3	GGATCCGACCTTTTCAAAAAGTTCGTAAGGTTGA	10
HA-F1	CCATACGACGTTCCAGACTACGCTGTTACTCTGCC	20
SS-HA-F	TGGCTAACTTGTGTGCCGTTACCCATACGACGTT	21
SS-F1	CGCTTCCGTTGCTTTCGTCGCTTTGGCTAACTTTG	22
SS-F2	AAGCTTATGCAATTCTCTACTGTCGCTTCCGTTGC	23

[0053] CWP2 도메인은 효모(*Saccharomyces Cerevisiae*)의 genomic DNA에서 CWP2의 신호 펩타이드서열을 제외한 나머지 유전자를 증폭시킨 후 프라이머를 이용하여 글라이신-세린 링커 서열을 합성하여 제작하였다. 이에 사용한 프라이머는 총 4개이며 하기의 표3과 같다.

표 3

프라이머명	염기서열(5'-3')	서열목록
CWP2-F	GAATCCGCTGCCGCCATTTCTCAA	24
CWP2-R	GAATTCTTATAACAACATAGCAGCAGCAGCTAGAG	25
GSL-CWP-F	GTTCTGGTGGTGGTGGTCTGAATCCGCTGCCGCC	26
GSL-F	GGATCCGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGT	27

[0055] 상기의 두 도메인을 제작한 후 각각 T-Vector에 도입하여 염기서열을 확인한 후 GAL1을 Promoter로 하는 효모발현벡터 pYES2 Vector에 제한효소 BamHI/EcoRI Site(표1)를 이용하여 CWP2 도메인을 서브클로닝 하였고, 그 벡터에 제한효소 HindIII/BamHI Site(표1)를 이용하여 PEDv 도메인을 서브클로닝 하여 재조합벡터 pYECWP-PED1을 완성하였다(도면2). 또한 PEDv1 항원결정기 서열 뿐만 아니라 PEDv2와 PEDv2에 C-terminus 서열을 합성한 PEDv3 영역도 PEDv1과 마찬가지로 재조합 벡터군을 구축하였고, PEDv에 대한 항체생성능이 있는지 연구하여 PED에 대한 예방체제를 구축하는 것이 목적이다.

[0056] **2. PEDv Spike 단백질의 효모 표면발현**

[0057] 제작된 재조합 벡터 pYECWP-PED1을 효모에 표면발현 시키기 위해 INVITROGEN사의 S. c. EasyComp. Transformation Kit를 이용하여 효모(INVSc1)에 형질전환하였고, 포도당이 2% 첨가된 SC-URA Agar 배지에 도말한 것을 37℃에서 48시간 배양하였다. 배양된 형질전환주 40개를 임의로 선정하여 갈락토스를 유도물질로 하여 PEDv Spike 단백질이 효모의 표면에 발현되도록 하였다.

[0058] 그 조건은 형질전환주 Colony를 2% 포도당이 첨가된 SC-URA 액체배지에 접종하여 30℃에서 하룻밤 동안 200rpm으로 진탕 배양하였고, 배양된 배양액의 흡광도를 OD 600nm에서 측정한 후 2% 갈락토스와 1% 라피노스가 첨가된 SC-URA 액체배지에 흡광도 0.4가 되도록 계산하여 접종한 후 30℃에서 20시간동안 200rpm으로 진탕 배양하여 표면발현을 유도하였다.

[0059] **3. 효모의 외피로 발현 유도된 재조합효모 40개주의 발현 확인**

[0060] 상기 상술한 내용과 같은 조건으로 표면 발현 유도된 재조합효모 40개주의 외래 단백질인 PED바이러스의 Spike 단백질의 발현을 검증하기 위해 Dot blot 방법을 이용하였다.

[0061] 발현된 배양액을 20배 농축한 농축액에 5x 용해(lysis) 버퍼를 첨가하여 100℃에서 10분 동안 처리하여 세포를 용해한 것을 Sample로 하여 PVDF Membrane에 Dot으로 Host인 Yeast(INVSc1)과 재조합효모 40개주의 Non-induction Sample과 Induction Sample을 20ul씩 로딩하였다. 그 후 1X PBS-T(tween20)버퍼용액에 5% Skim Milk 첨가하여 4℃에서 하룻밤 동안 Blocking하였고, 1X PBS-T(tween20)버퍼용액으로 세척한 후 서양고추냉이 과산화수소(Horseradish peroxidase, HRP)활성을 갖는 HA 1차항체로 실온에서 3시간 동안 반응시켰다. 또한 1X PBS-T(tween20)버퍼용액으로 세척한 후 기질 ECL Solution을 사용하여 발색하여 항체탐색 결과를 확인하였다(도면 4). 그 결과 가장 강한 신호를 띄는 재조합 효모 3종(10, 11, 15)를 선발하였다.

[0062] **4. 재조합효모 3종(10, 11, 15)의 발현 및 단백질 크기확인**

[0063] 상기에서 선발된 재조합효모 3종이 PED 바이러스의 Spike 단백질의 여부를 확인하기 위해 한 개의 SDS-PAGE Gel에 똑같이 두 셋트를 로딩하여 한 셋트는 Western blot으로 HA 항체와의 반응을 확인하였고, 나머지 한 셋트는 쿠마지블루 염색을 하여 단백질 크기를 확인하여 PED Spike 단백질의 23kDa Size임을 검증하였다.(도면5).

[0064] **5. 재조합효모 3종(10,11,15)의 열처리 사멸 후 안정성**

[0065] 본 발명의 재조합효모는 PEDv에 대한 항체 생성능 여부를 알아보기 위한 PED의 예방체제로서 재조합효모를 열로 처리하여 사멸시킨 후에 사료첨가제로서 이용해야한다. 그 가능성을 보기 위하여 본 발명의 재조합효모 3종을 열 온도 70℃와 100℃에서 각각 30분간 처리하여 Western blot을 통해 HA tag 항체와 탐지하는지 연구한 결과 열처리로 인해 균은 사멸하였으나 Western blot결과에서는 여전히 항체와 결합능을 유지하고 있는 신호의 결과

를 나타냈다(도면6).

[0066] 6. 재조합효모 3종(10, 11, 15번 형질전환체)의 형광면역법에 의한 세포관찰로 표면발현 여부 확인

[0067] 발현된 재조합효모 3종의 Cell을 형광면역법을 이용하여 에펜토르프 튜브상에서 FITC가 라벨되어 있는 HA 1차 형광항체와 반응시켰고, 재조합 효모의 표면에 노출된 PED Spike 단백질과 결합을 하는지 확인하기 위해 공초점 현미경(Confocal)로 촬영하여 FITC과장의 형광 신호를 확인하였다(도면7).

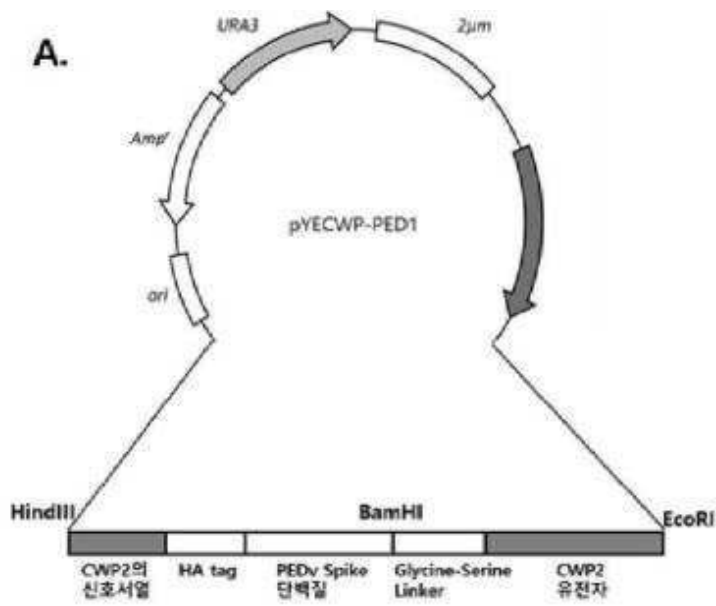
[0068] 이제까지 본 발명에 대하여 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

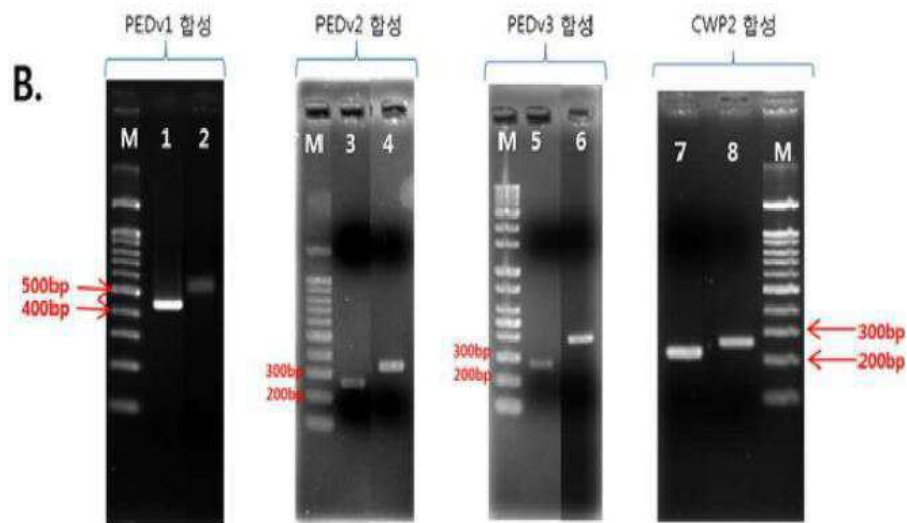
도면1



도면2a



도면2b



도면3a

KF738262(NCBI)  
Optipam-PED  
GACGATGGTTTCTATCCTATTTCTTCTAGAAAACCTCTGAGTCATGAACAGCCAATTTCT  
GACGATGGTTTTTACCCATTTTCTTCTAGAAAACCTCTGAGTCATGAACAGCCAATTTCT  
\*\*\*\*\*

KF738262(NCBI)  
Optipam-PED  
TTTGTGGTTGGCCATCATTAAATGATCATCTTTTGTAAACATTACTGTCCTGGCTCC  
TTTGTGACTCTGCCATCATTAAATGATCATCTTTTGTAAACATTACTGTAATCTGGCTCC  
\*\*\*\*\*

KF738262(NCBI)  
Optipam-PED  
TTTGGTGGTCATAGTGGTGGCCAACTTATTGCATCTGACACTACTATCAATGGGTTTAGT  
TTTGGTGGTCATAGTGGTGGCCAACTTATTGCATCTGACACTACTATCAATGGGTTTAGT  
\*\*\*\*\*

KF738262(NCBI)  
Optipam-PED  
TCTTTCGTGTTGAAACTAGACAATTTACCATTTCACTGTTTTATAACGTTACAACAGT  
TCTTTCGTGTTGACACTAGACAATTTACCATTTCACTGTTTTATAACGTTACAACAGT  
\*\*\*\*\*

KF738262(NCBI)  
Optipam-PED  
TATGGTTATGTGCTACATCACAGGATAGTAACTGCCCTTTCACCTTGCATCTGTAAAT  
TATGGTTATGTGCTAAATCACAGGACAGTAAATGCCCTTTCACCTTGCATCTGTAAAT  
\*\*\*\*\*

KF738262(NCBI)  
Optipam-PED  
GATTACCTGTCCTTTAGTAAATTTTGTGTTCCACCAGCCTTTGGCTAGTGCCGTACC  
GATTACCTGTCCTTTAGCAAAATTTTGTGTTCCACCAGCCTTTGGCTAGTGCCGTACC  
\*\*\*\*\*

KF738262(NCBI)  
Optipam-PED  
ATAGATCTTTTGGTTAACCTGAGTTTGGCAGTGGTGTAAAGTTAAGTCCCTTACTTT  
ATAGATCTTTTGGTTAACCTGAGTTTGGTAGTGGTGTAAAGTTAAGTCCCTTACTTT  
\*\*\*\*\*

KF738262(NCBI)  
Optipam-PED  
CAATTCACAAAGGGTGAAGTTACTGGCACGCCAAACCACCTGAAGGTGTCACGGAC  
CAATTCACAAAGGGTGAAGTTACTGGCACGCCAAACCACCTGAAGGTGTCACGGAC  
\*\*\*\*\*

KF738262(NCBI)  
Optipam-PED  
GTTTCTTTTATGACTCTGGATGTGTACCAAGTACTACTATCTATGGCTTTAAAGGTGAG  
GTTTCTTTTATGACTCTGGATGTGTACCAAGTACTACTATCTATGGCTTTAAAGGTGAG  
\*\*\*\*\*

도면3b

KF738262(NCBI)  
Optipam-PED  
GGACAGTTGTTAGCCTTTAAGAATGTCACTAGTGGTGTGTTTATCTGTTACGCCATGT  
GGACAGTTGTTAGCCTTTAAGAATGTCACTAGTGGTGTGTTTATCTGTTACGCCATGT  
\*\*\*\*\*

KF738262(NCBI)  
Optipam-PED  
TCTTTTCAGAGCAGGCTGCATATGTTGATGATGATATAGTGGGTGTTATTCTAGTTG  
TCTTTTCAGAGCAGGCTGCATATGTTGATGATGATATAGTGGGTGTTATTCTAGTTG  
\*\*\*\*\*

KF738262(NCBI)  
Optipam-PED  
TCTAGCTCCACITTTAACAGTACTAGGGAGTTGCCGGTTTCTTCTACCATTCTAATGAT  
TCTAGCTCCACITTTAACAGTACTAGGGAGTTGCCGGTTTCTTCTACCATTCTAATGAT  
\*\*\*\*\*

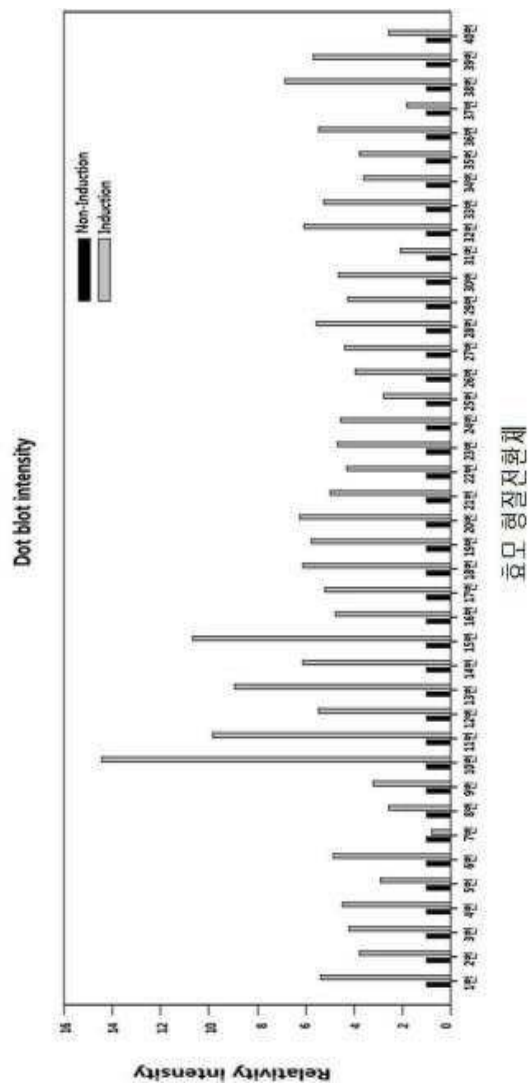
KF738262(NCBI)  
Optipam-PED  
GGCTCTAATTGTACAGAGCCTGTGTTGGTGTATAGTAACATAGGTGTTTGTAAATCTGGC  
GGCTCTAATTGTACAGAGCCTGTGTTGGTGTATAGTAACATAGGTGTTTGTAAATCTGGC  
\*\*\*\*\*

KF738262(NCBI)  
Optipam-PED  
AGTATTGGCTACGTCCCATCTCAGTCTGGCCAAGTCAAGATTGCACCCACGGTTACTGGG  
AGTATTGGCTACGTCCCATCTCAGTCTGGCCAAGTCAAGATTGCACCCACGGTTACTGGG  
\*\*\*\*\*

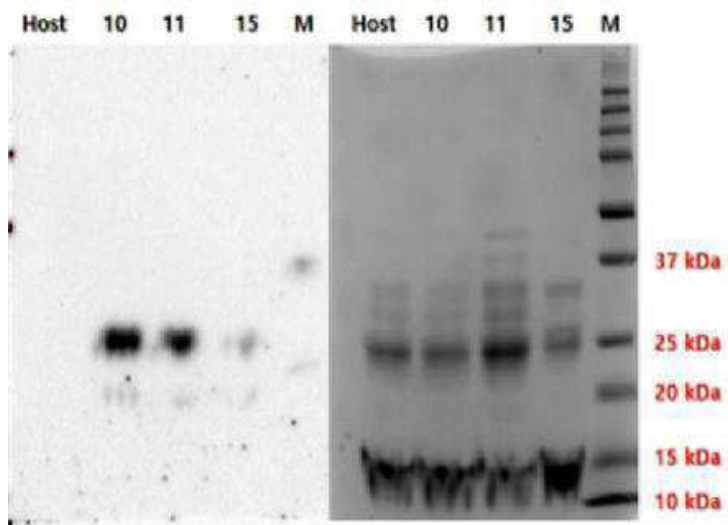
도면3c

<p>KF738262(NCBI) <u>Optipam</u>-PED</p>	<p>GGACAGTTGTTAGCCTTAAGAAATGTCACTAGTGGTGCCTTTATCTGTTACGCCATGT GGACAGTTGTTAGCCTTAAGAAATGTCACTAGTGGTGCCTTTATCTGTTACGCCATGT *****</p>	<p>—</p> <p><b>PEDv2 (2085- 2337NT서 열)</b></p>
<p>KF738262(NCBI) <u>Optipam</u>-PED</p>	<p>TCTTTTTCAGAGCAGGCTGCATATGTTGATGATATAGTGGTGTATTCTAGTTTG TCTTTTTCAGAGCAGGCTGCATATGTTGATGATATAGTGGTGTATTCTAGTTTG *****</p>	
<p>KF738262(NCBI) <u>Optipam</u>-PED</p>	<p>TCTAGCTCCACTTTAAACAGTACTAGGGAGTTGCCGGTTCTTCTACCATCTAA TGAT TCTAGCTCCACTTTAAACAGTACTAGGGAGTTGCCGGTTCTTCTACCATCTAA TGAT *****</p>	
<p>KF738262(NCBI) <u>Optipam</u>-PED</p>	<p>GGCTCTAATTGTACAGACCCTGTGTTGGTGTATAGTAACA TAGGTGTTTGTAAA TCTGGC GGCTCTAATTGTACAGACCCTGTGTTGGTGTATAGTAACA TAGGTGTTTGTAAA TCTGGC *****</p>	
<p>KF738262(NCBI) <u>Optipam</u>-PED</p>	<p>AGTATTGGCTACGTCCCATCTCAGTCTGGCCAAGTCAAGATTGCACCCACGGTTACTGGG AGTATTGGCTACGTCCCATCTCAGTCTGGCCAAGTCAAGATTGCACCCACGGTTACTGGG *****</p>	
<p>KF738262(NCBI) <u>Optipam</u>-PED</p>	<p>GTGTGTGCATTACTAGTGTCTGCTGCATTCCACTGGTTGTT GTGTGTGCATTACTAGTGTCTGCTGCATTCCACTGGTTGTT *****</p>	<p><b>C-terminus (3992- 4149NT 서 열)</b></p>
<p>KF738262(NCBI) <u>Optipam</u>-PED</p>	<p>TGCTGTGCTTGT TTTTCAGGTTGTTGTAGGGTCC TAGACTTC TGCTGTGCTTGT TTTTCAGGTTGTTGTAGGGTCC TAGACTTC *****</p>	
<p>KF738262(NCBI) <u>Optipam</u>-PED</p>	<p>GAAAAGGTCCACGTGCAGTGA* GAAAAGGTCCACGTGCAGTGA* *****,</p>	

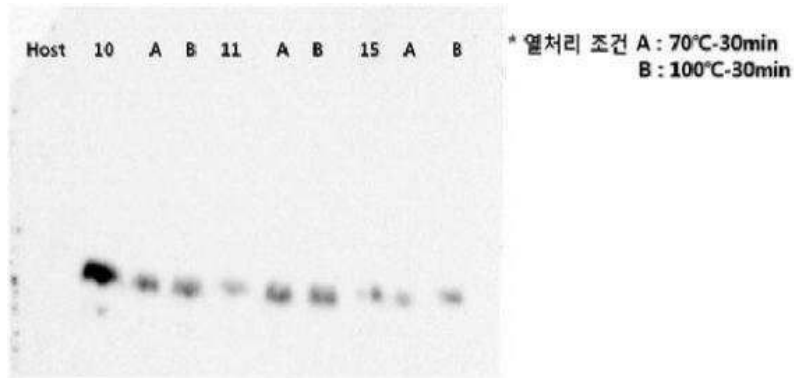
도면4



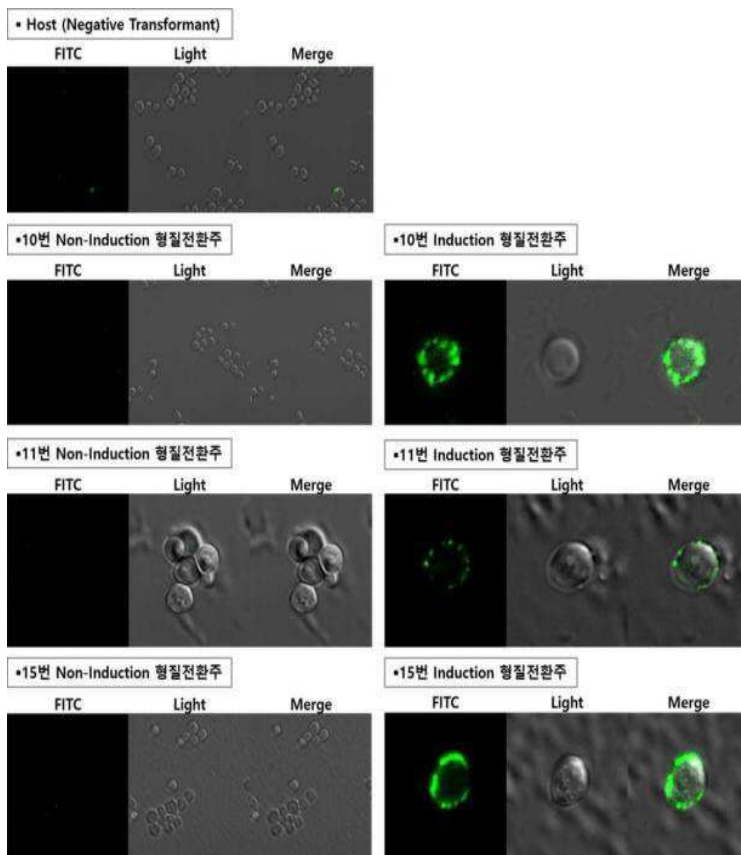
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation of Chungbuk National University
- <120> Epitope protein of PEDV, Recombinant vector containing genes encoding thereof, Transformant expressing thereof, and Composition for preventing or treating PEDV comprising thereof
- <160> 27
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1

<211> 420  
 <212> DNA  
 <213> porcine epidemic diarrhea virus, PEDv1(COE)  
 <400> 1  
 gttactctgc catcatttaa tgatcattct ttgttaaca ttactgtatc tgcttccttt 60  
 ggtggtcata gtggtgccaa ctttattgca tctgacacta ctatcaatgg gtttagttct 120  
 ttctgtgttg aactagaca attcaccatt tcaactgttt ataacgttac aaacagttat 180  
 ggttatgtgt ctaaatcaca ggacagtaat tgccttttca ccttgcaatc tgtaaatgat 240  
 tacctgtctt ttagcaaatt ttgtgtttcc accagccttt tggctagtgc ctgtatcata 300  
 gatctttttg gttaccctga gtttagtagt ggtgttaagt ttacgtcctt ttactttcaa 360  
 ctcaaaagg gtgagttgat tactggcacg cctaaaccac ttgaagggtg cacggacgtt 420  
 420

<210> 2  
 <211> 252  
 <212> DNA  
 <213> porcine epidemic diarrhea virus, PEDv2  
 <400> 2  
 tctgttacgc catgttcttt ttcagagcag gctgcatatg ttgatgatga tatagtgggt 60  
 gttatttcta gtttgtctag ctccactttt aacagtacta gggagttgcc tggtttcttc 120  
 taccattcta atgatggctc taattgtaca gagcctgtgt tgggtatag taacataggt 180  
 gtttgtaaat ctggcagtat tggctacgtc ccatctcagt ctggccaagt caagattgca 240  
 cccacggtta ct 252

<210> 3  
 <211> 309  
 <212> DNA  
 <213> porcine epidemic diarrhea virus, PEDv3  
 <400> 3  
 tctgttacgc catgttcttt ttcagagcag gctgcatatg ttgatgatga tatagtgggt 60  
 gttatttcta gtttgtctag ctccactttt aacagtacta gggagttgcc tggtttcttc 120  
 taccattcta atgatggctc taattgtaca gagcctgtgt tgggtatag taacataggt 180  
 gtttgtaaat ctggcagtat tggctacgtc ccatctcagt ctggccaagt caagattgca 240  
 cccacggtta ctttctcagg ttgtttagg ggtcctagac ttcaacctta cgaagttttt 300

gaaaaggtc 309

<210> 4

<211> 4161

<212> DNA

<213> porcine epidemic diarrhea virus, spike protein

<400> 4

atgaagtctt taacctactt ctggttgttc ttaccagtac tttcaacact tagcctacca 60

caagatgtca ccaggtgctc agctaacact aattttaggc ggttcttttc aaaatthaat 120

gttcaggcgc ctgcagttgt tgtactgggc ggttatctac ctattggtga aaaccagggt 180

gtcaattcaa cttaggtactg tgctggccaa catccaactg ctagtggcgt tcatggtatc 240

ttgttagcc atattagagg tggatcatggc tttgagattg gcatttcgca agagcctttt 300

gactctagtg gttaccagct ttatttacat aaggctacta acggtaacac taatgctact 360

gcgcgactgc gcatttgcca gtttcctagc attaaaacat tgggccccac tgctaataat 420

gatgttacia caggtegtaa ttgctatatt aacaaagcca tcccagctca tatgagtga 480

catagtgttg tcggcataac atgggataat gatcgtgtca ctgtcttttc tgacaagatc 540

tattattttt attttaaaaa tgattggtcc cgtgttgcca caaagtgtta caacagtgga 600

ggttttgcta tgcaatatgt ttacgaacc accattaca tgcttaatgt tactagtgt 660

ggtgaggatg gtatttctta tcaaccctgt acagctaatt gcattggtta tgctgccaat 720

gtatttgcta ctgagcccaa tggccacata ccagaaggtt ttagttttaa taattggttt 780

cttttgccta atgattccac tttggtgcat ggttaagggtg tttccaacca accattgttg 840

gtcaattgtc ttttggccat tcttaagatt tatggactag gccaattttt ctctttaat 900

caaacgatcg atggcgtttg taatggagct gctgtgcagc gtgcaccaga ggctctgagg 960

tttaacatta atgacacctc tgtcattctt gctgaaggct caattgtact tcatactgct 1020

ttaggaacaa atttttcttt tgtttgcagt aattcctcaa atcctcactt agctaccttc 1080

gccatacctc tgggtgctac ccaagtacct tattattggt ttcttaaagt ggatacttac 1140

aactccactg ttataaatt tttggctggt ttacctccta ccgtcaggga aattgcatc 1200

accaagtatg gtgatgttta tgtaaatggg tttggatact tgcatctcgg tttgttggat 1260

gctgtcacia ttaatttcac tggatcatggc actgacgatg atgtttctgg tttttggacc 1320

atagcatcga ctaattttgt tgatgcactc atcgaagttc aaggaaccgc cattcagcgt 1380

attctttatt gtgatgatcc tgttagccaa ctcaagtgtt ctcaggttgc ttttgacctt 1440

gacgatgggt ttiaccctat ttcttctaga aaccttctga gtcatgaaca gccaatctt 1500

tttgttactc tgccatcatt taatgatcat tcttttgta acattactgt atctgcttcc 1560  
 tttggtggtc atagtgggtc caaccttatt gcatctgaca ctactatcaa tgggtttagt 1620  
  
 tctttctgtg ttgacactag acaatttacc atttcaactgt tttataacgt taaaaacagt 1680  
 tatggttatg tgictaaatc acaggacagt aattgccctt tcaccttgca atctgttaat 1740  
 gattacctgt cttttagcaa attttgtgtt tccaccagcc ttttggctag tgctgtacc 1800  
 atagatcttt ttggttacc tgagtttgg agtgggtgta agtttacgtc cctttacttt 1860  
 caattcaca agggtgagtt gattactggc acgcctaac cacttgaagg tgcacggac 1920  
 gtttctttta tgactctgga tgtgtgtacc aagtatacta tctatggctt taaagtgag 1980  
 ggtatcatta cccttacaaa ttctagcttt ttggcagggt tttattacac atctgattct 2040  
  
 ggacagttgt tagcctttaa gaatgtcact agtgggtctg tttattctgt tacgccatgt 2100  
 tctttttcag agcaggetgc atatgtgat gatgatatag tgggtgttat ttctagtttg 2160  
 tctagctcca cttttaacag tactagggag ttgcctggtt tcttctacca ttctaagat 2220  
 ggctctaatt gtacagagcc tgtgttgggt tatagtaaca taggtgtttg taaatctggc 2280  
 agtattggct acgtcccatc tcagctggc caagtcaaga ttgcacccac ggttactggg 2340  
 aatattagta ttcccacaa ctttagtatg agtattagga cagaatattt acagctttac 2400  
 aacacgcctg ttagtgttga ttgtgccaca tatgtttgta atggttaact tcgttgtaaa 2460  
  
 caattactca cccagtacac tgcagcatgt aagaccatag agtcagcatt acaactcagc 2520  
 gctagccttg agtctgttga agttaactct atgcttacta tttctgaaga ggctctacag 2580  
 ttagctacca ttagttcgtt taatgggtgat ggatataatt ttactaatgt gctgggtgtt 2640  
 tctgtgatg atcctgcaag tggcaggggt gtacaaaaa ggtcttttat tgaagacctg 2700  
 ctttttaata aagtggttac taatggcctt ggtactgttg atgaagacta taagcctgt 2760  
 tctaattggc gtctctggc agatctagtc tgtgcacagt attactctgg tgtcatggta 2820  
 ctacctgggt ttgttgacgc tgagaagctt cacatgtata gtgcgtctct catcgggtgt 2880  
  
 atggtgctag gaggttttac ttctgcagcg gcattgcctt ttagctatgc tgttcaagct 2940  
 agactcaatt atcttgctct acagacggat gttctacagc ggaaccagca attgcttgct 3000  
 gagtctttta actctgctat tggtaataata acttcagcct ttgagagtgt taaagaggct 3060  
 attagcaaa cttccaaggg tttgaacact gtggctcatg cgcttactaa ggttcaagag 3120  
 gttgttaact cgcaggggtc agctttgact caacttaccg tacagctgca acacaacttc 3180  
 caagccattt ctagtctat tgatgacatt tactctcgac tggacattct ttcagccgat 3240

gttcaggttg accgtctcat caccggcaga ttatcagcac ttaatgcttt tgttgctcaa 3300

accctcacta agtatactga ggttcaggct agcaggaagt tagcacagca aaaggttaat 3360

gagtgcgtta aatcgcaatc tcagcgttat ggtttttgtg gtggtgatgg cgagcacatt 3420

ttctctctgg tacaggcagc acctcagggc ctgctgtttt tacatacagt acttgtaccg 3480

agtgattttg tagatgttat tgccatcgct ggcttatgcg ttaacgatga aattgccttg 3540

actctacgtg agcctggctt agtcttgttt acgcatgaac ttcaaatca tactgcgacg 3600

gaatattttg tttcatcgcg acgtatgttt gaacctagaa aacctaccgt tagtgatttt 3660

gttcaaatgg agagttgtgt ggtcacctat gtcaatttga ctagagacca actaccagat 3720

gtaatcccag attacatcga tgtaacaaa acacttgatg agattttagc ttctctgccc 3780

aatagaactg gtccaagtct tcctttagat gtttttaatg ccacttatct taatctcact 3840

ggtgaaattg cagattttaga gcagcgttca gagtctctcc gtaatactac agaggagctc 3900

caaagtctta tatataat caacaacaca ctagttgacc ttgagtggct caaccgagtt 3960

gagacatata tcaagtggcc gtggtgggtt tggttgatta ttttcattgt tctcatcttt 4020

gttgtgtcat tactagtgtt ctgctgcatt tccacgggtt gttgtggatg ctgcggtgc 4080

tgctgtgctt gtttctcagg ttgtttagg ggtcctagac ttcaacctta cgaagttttt 4140

gaaaaggtcc acgtgcagtg a 4161

<210> 5

<211> 140

<212> PRT

<213> PEDv1 aminoacid sequence

<400> 5

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

1 5 10 15

Ser Ala Ser Phe Gly Gly His Ser Gly Ala Asn Leu Ile Ala Ser Asp

20 25 30

Thr Thr Ile Asn Gly Phe Ser Ser Phe Cys Val Asp Thr Arg Gln Phe

35 40 45

Thr Ile Ser Leu Phe Tyr Asn Val Thr Asn Ser Tyr Gly Tyr Val Ser

50 55 60

Lys Ser Gln Asp Ser Asn Cys Pro Phe Thr Leu Gln Ser Val Asn Asp

65 70 75 80

Tyr Leu Ser Phe Ser Lys Phe Cys Val Ser Thr Ser Leu Leu Ala Ser  
 85 90 95

Ala Cys Ile Ile Asp Leu Phe Gly Tyr Pro Glu Phe Ser Ser Gly Val  
 100 105 110

Lys Phe Thr Ser Leu Tyr Phe Gln Leu Thr Lys Gly Glu Leu Ile Thr  
 115 120 125

Gly Thr Pro Lys Pro Leu Glu Gly Val Thr Asp Val  
 130 135 140

<210> 6

<211> 84

<212> PRT

<213> PEDv2 aminoacid sequence

<400> 6

Ser Val Thr Pro Cys Ser Phe Ser Glu Gln Ala Ala Tyr Val Asp Asp  
 1 5 10 15

Asp Ile Val Gly Val Ile Ser Ser Leu Ser Ser Ser Thr Phe Asn Ser  
 20 25 30

Thr Arg Glu Leu Pro Gly Phe Phe Tyr His Ser Asn Asp Gly Ser Asn  
 35 40 45

Cys Thr Glu Pro Val Leu Val Tyr Ser Asn Ile Gly Val Cys Lys Ser  
 50 55 60

Gly Ser Ile Gly Tyr Val Pro Ser Gln Ser Gly Gln Val Lys Ile Ala  
 65 70 75 80

Pro Thr Val Thr

<210> 7

<211> 103

<212> PRT

<213> PEDv3 aminoacid sequence

<400> 7

Ser Val Thr Pro Cys Ser Phe Ser Glu Gln Ala Ala Tyr Val Asp Asp  
 1 5 10 15

Asp Ile Val Gly Val Ile Ser Ser Leu Ser Ser Ser Thr Phe Asn Ser  
 20 25 30  
 Thr Arg Glu Leu Pro Gly Phe Phe Tyr His Ser Asn Asp Gly Ser Asn  
 35 40 45  
 Cys Thr Glu Pro Val Leu Val Tyr Ser Asn Ile Gly Val Cys Lys Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Ile Gly Tyr Val Pro Ser Gln Ser Gly Gln Val Lys Ile Ala  
 65 70 75 80  
 Pro Thr Val Thr Phe Ser Gly Cys Cys Arg Gly Pro Arg Leu Gln Pro

85 90 95  
 Tyr Glu Val Phe Glu Lys Val  
 100

<210> 8  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> porcine epidemic diarrhea virus, spike protein  
 <400> 8

Pro Glu Asp Val  
 1  
 <210> 9  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> Saccharomyces Cerevisiae  
 <400> 9

atgcaattct ctactgtcgc ttccgttgct ttcgtcgctt tggctaactt tgttgccgct 60  
 60

<210> 10  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> HA tag  
 <400> 10

taccatacgc acgttccaga ctacgct 27

<210> 11  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Glycine-Serine linker  
 <400> 11  
 ggtggtggtg gttctggtgg tgggtggttct 30  
 <210> 12  
 <211> 219  
 <212> DNA  
 <213> Saccharomyces Cerevisiae  
 <400> 12  
 gaatccgctg ccgccatttc tcaaatcact gacggtcaaa tccaagctac taccactgct 60  
  
 accaccgaag ctaccaccac tgctgcccga tcttccaccg ttgaaactgt ttctccatcc 120  
 agcaccgaaa ctatctctca acaaactgaa aatggtgctg ctaaggccgc tgtcggtatg 180  
 ggtgccggtg ctctagctgc tgctgctatg ttgttataa 219  
 <210> 13  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer, PEDV1-F  
 <400> 13  
 gttactctgc catcatttaa tgatcattct ttg 34  
 <210> 14  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 ><223> primer, PEDV1-R  
 <400> 14  
 ggatccaacg tccgtgacac cttcaag 27  
 <210> 15  
 <211> 30  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer, PEDV2-F  
 <400> 15  
 tctgttacgc catgttcttt ttcagagcag 30  
 <210> 16  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer, PEDV2-R  
 <400> 16  
 ggatccagta accgtgggtg caatcttgac 30  
  
 <210> 17  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer, PEDV3-R1  
 <400> 17  
 cctacaacaa cctgagaaag taaccgtggg tg 32  
 <210> 18  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer, PEDV3-R2  
 <400> 18  
 tcgtaaggtt gaagtctagg acccctacaa caacc 35  
 <210> 19  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer, PEDV3-R3  
 <400> 19  
  
 ggatccgacc tttcaaaaa cttcgtagg ttga 34  
 <210> 20

<211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer, HA-F1  
 <400> 20  
 ccatacgacg ttccagacta cgctgttact ctgcc 35  
 <210> 21  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer, SS-HA-F  
 <400> 21  
 tggctaactt tgttgccgct taccatacg acgtt 35  
 <210> 22  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer, SS-F1  
 <400> 22  
 cgcttcggtt gctttcgctg ctttggctaa ctttg 35  
 <210> 23  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer, SS-F2  
 <400> 23  
 aagcttatgc aattctctac tgctgcttcc gttgc 35  
 <210> 24  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer, CWP2-F  
 <400> 24

gaatccgctg ccgccatttc tcaa 24

<210> 25

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer, CWP2-R

<400> 25

gaattcttat aacaacatag cagcagcagc tagag 35

<210> 26

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer, GSL-CWP-F

<400> 26

gttctggtgg tgggtgttct gaatccgctg ccgcc 35

<210> 27

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer, GSL-F

<400> 27

ggatccggtg gtggtggttc tgggtggtgt g 31