(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년06월26일
(11) 등록번호 10-2678876
(24) 등록일자 2024년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/195 (2006.01) *A61K 39/02* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/195 (2013.01)
A61K 39/0208 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0055172
(22) 출원일자 2019년05월10일
심사청구일자 2022년03월11일
(65) 공개번호 10-2020-0129967
(43) 공개일자 2020년11월18일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020040100263 A
KR1020190053697 A
US20060039920 A1
US20110045011 A1

(73) 특허권자
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
조남혁
서울특별시 노원구 노원로 214, 6동 102호(하계동, 삼익선경아파트)
하나영
서울특별시 성북구 동소문로17길 18, 612호(동소문동6가)
(74) 대리인
특허법인 태웅

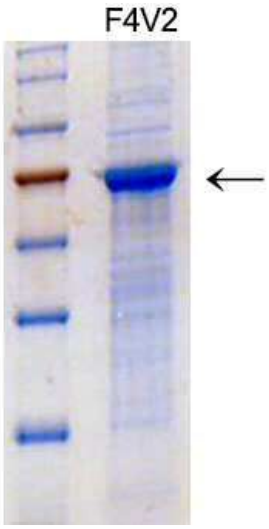
전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 문영준

(54) 발명의 명칭 **오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 신규 재조합 단백질 항원 및 이를 이용한 백신 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 쯔쯔가무시 균 감염 여부 등의 진단과 그 쯔쯔가무시 균에 대한 백신으로 유용하게 사용할 수 있는, ScaA 및 TSA56항원의 보존 서열로부터 도출한 신규 재조합 단백질을 융합한 항원과 이를 이용한 백신 조성물을 개시한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 31/04 (2018.01)
A61K 2039/55505 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI16C0472
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 보건산업진흥원
연구사업명 감염병위기대응기술개발사업
연구과제명 ScaA 기반 쯔쯔가무시병 백신 개발
기 여 율 1/1
과제수행기관명 서울대학교 산학협력단
연구기간 2016.04.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진, 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 재조합 단백질 항원.

청구항 2

제1항 기재의 재조합 단백질 항원을 암호화하는 유전자.

청구항 3

(i) 제2항 기재의 유전자 포함하는 발현벡터를 제조하는 단계, (ii) 이 발현벡터를 숙주세포에 형질전환시키는 단계, (iii) 형질전환된 숙주세포를 배양하는 단계, 및 (iv) 그 배양물로부터 제1항 기재의 재조합 단백질 항원을 분리·정제하는 단계를 포함하는, 제1항 기재의 재조합 단백질 항원의 제조 방법.

청구항 4

제1항 기재의 재조합 단백질 항원을 활성성분으로 포함하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 약학적으로 허용되는 담체는 희석제, 부형제, 안정화제 및 방부제로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 조성물은 항원 보조제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 항원 보조제는 겔 상의 알루미늄염인 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 신규 재조합 단백질 항원 및 이를 이용한 백신 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 쯔쯔가무시병 (scrub typhus)은 오리엔티아 쯔쯔가무시균(*Orientia tsutsugamushi*, 이하 "쯔쯔가무시균")에 감염된 털진드기 유충이 사람을 물었을 때 발생하는 절지동물 매개 감염질환으로서, 러시아 연해주, 한국, 일본, 중국, 및 동남아시아 지역, 호주 북부 등, 주로 아시아-태평양 지역에서 매년 백만명 이상의 환자들이 발생하고 있는 것으로 추정되고 있다. 감염된 털진드기 유충에 물린 환자는 1-2주간의 잠복기를 거쳐 발열, 오한, 가피 생성, 발진, 근육통, 림프절 종대 등의 증상을 나타낸다. 감염 초기에 진단되면 적절한 항생제 처방을 통하여 치료가 가능하지만, 초기 임상증상이 다른 열성감염질환과 유사하여 감별진단이 어렵고, 임상현장에서 간편하고 빠르게 진단할 수 있는 방법이 없기 때문에 중증의 전신성 열성질환으로 발전하는 경우가 많으며, 매년 적지 않은 사망자가 발생하고 있다.

[0004] 쯔쯔가무시균은 100종 이상의 다양한 혈청형(serotype) 또는 유전형(genotype)이 존재하고 있는 것으로 알려져 있는데, 전통적으로 알려진 길리엄(Gilliam), 카프(Karp) 및 카토(Kato) 등의 원형(prototype)을 포함하여 수십여 가지의 아형(strain)들로 분류되고 있다(Am J Trop Med Hyg.1985.34(6):1173; J Clin Microbiol. 1991.29(2):340;J Clin Microbiol. 1993.31(3):598). 쯔쯔가무시균의 유전형은 이 세균의 주요 막단백질인 56kDa Type specific antigen (TSA56)을 암호화하는 유전자에 의해 분류된다. 한국에서는 카프형과 유사한 보령 유전형에 의한 감염이 주로 발생하고 있지만, 쯔쯔가무시병이 발생하고 있는 국가들에서 발견되고 있는 쯔쯔가무시균의 유전형의 종류와 빈도는 매우 다양한 것으로 알려져 있다.

[0005] 사람이나 생쥐감염모델에서 쯔쯔가무시균에 감염에 의해 유도되는 보호면역은 감염되었던 쯔쯔가무시균의 유전형에 특이적인 것으로 알려져 있으며, 항체반응의 지속성은 1~2년으로 비교적 짧게 유지된다. 또한 다른 유전형이 2차 감염되었을 때에는 방어능이 제공되지 않는다. 예를 들면, 길리암 혈청형에 감염된 환자가 2달후에 다시 카프 혈청형에 재감염 되어 쯔쯔가무시병이 발병한 예가 보고된 바 있다. 이러한 쯔쯔가무시균의 유전적 다양성으로 인하여 아직까지 효과적인 백신이 개발되지 못하고 있을 뿐만 아니라, 이 질환을 혈청학적으로 진단하는 데에도 장애가 되고 있다. 또한 최근에는 동남아시아, 인도 등지에서 항생제 저항균에 대한 보고가 있었으며, 우리나라와 중국 등 동아시아지역에서 발생보고가 증가하고 있어 공공 보건에 커다란 문제가 되고 있다. 따라서 다양한 쯔쯔가무시균 유전형들에 대한 감염을 효과적으로 신속히 진단하고, 효과적인 보호면역을 제공할 수 있는 기술개발의 필요성이 증가하고 있는 상황이다.

[0006] 쯔쯔가무시병 백신 개발을 위하여 지난 70여년간 다양한 연구가 진행되어 왔다. 초기 연구들에서 쯔쯔가무시병 백신의 개발은 포르말린 처리나 감마선 조사를 통한 사백신(Killed-vaccine)은 사람에게서 효과적인 보호 면역을 제공하지 못하는 것으로 확인되었고, TSA56 단백질(56-kDa Type-Specific Antigen) 및 47KDa의 외막 단백질을 이용한 재조합 단백질 백신(Subunit vaccine), DNA 백신 등이 연구되어 왔으나, 이들 백신들은 동일한 유전형 감염에 대해서만 일시적인 방어면역을 유도하는 것으로 보고 되었고 다른 유전형에 대해서는 보호면역을 유도하지 못하는 것으로 확인되었다(Lancet. 1945.2(6380):734; Infect Immun. 1997.65(4):1541; Am J Trop Med Hyg. 2005.72(4):458).

[0007] 현재 쯔쯔가무시균의 주요 막단백질인 56kDa Type specific antigen (TSA56)과 surface cell antigen A(ScaA)가 인비트로(*in vitro*) 및 인비보(*in vivo*) 실험에서 숙주세포(host cell)의 면역 반응을 일으키는 것으로 알려졌으나(Vaccine. 1997.15(16):1741; PLoS Negl Trop Dis. 2015.9(3):e0003585) 백신 실용화 단계에는 미치지 않고 있다.

[0008] 따라서 이러한 유전적 차이를 극복하고, 다양한 유전형이나 혈청형들에 대해서 보편적인 보호면역을 제공할 수 있는 백신 항원의 개발이 필요한 상황이다. 그리고 이렇게 다양한 유전형들을 효과적으로 조기에 진단하는데 필요한 진단 항원의 개발도 시급하다.

[0009] 본 발명에서는 기후변화에 따라 지속적으로 확산되는 쯔쯔가무시균 피해를 억제하기 위한 백신 조성물을 개시하

였다. 본 발명의 조성물은 여러 유전자형에서 보존된 부위를 항원으로 이용하였기 때문에 쯔쯔가무시균의 유전적 차이를 극복하고 보편적인 보호면역을 제공할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 신규 재조합 단백질 항원을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 단백질 항원을 이용하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 단백질 항원을 이용하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 진단용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 기타 다른 목적이나 구체적인 목적은 이하에서 제시될 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명자들은 아래의 실시예에서 확인되는 바와 같이, 미국립생물정보학센터(National Center for Biotechnology Information)의 유전자서열 데이터베이스에서 다양한 유전자형의 쯔쯔가무시균 유래의 15개 ScaA 유전자 아미노산서열과 1,030개 TSA56 단백질 유전자 염기서열을 수집하였다. 이들 중에서 전체 아미노산 서열 변이의 평균값보다 낮은 아미노산 서열을 포함하는 보존블럭을 규정하고, 이 보존블럭에서 유래한 ScaA 및 TSA56 재조합한 단백질의 (이하 "F4V2")의 서열을 결정하였으며 이들의 항원성을 확인하였다.

[0017] 상기 F4V2 재조합 단백질들을 마우스에 면역하였을 때 항체 생산이 유도되었으며 이들의 항혈청은 쯔쯔가무시균 감염을 억제하는 효과를 나타내었다.

[0018] 전술한 바의 실험 결과는 본 발명의 F2V2 재조합 단백질 항원이 쯔쯔가무시 균에 대한 백신의 활성성분으로서 유용함을 보여주는 결과라 할 수 있다.

[0019] 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 재조합 단백질 항원을 암호화하는 유전자에 관한 것이고, 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 이러한 유전자를 이용하여 재조합 단백질 항원을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0020] 본 발명의 제조 방법은 상기 재조합 단백질 항원을 암호화하는 유전자를 이용하여 당업계에 공지된 DNA 재조합 기술 등으로 제조할 수 있다. 이러한 방법은 (i) 상기 재조합 단백질 항원을 암호화하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 제조하고 (ii) 이 발현벡터를 숙주세포에 형질전환시키고 (iii) 형질전환된 숙주세포를 배양하고, 마지막으로 (iv) 그 배양물로부터 상기 재조합 단백질 항원을 분리·정제하는 단계를 포함하여 구성된다.

[0021] 상기 재조합 단백질 항원인 목적 단백질(생산하고자 하는 단백질임)을 암호화하는 목적 유전자는 그 유전자가 암호화하는 목적 단백질 서열을 기초로 화학적으로 합성될 수 있다. 이러한 화학적 합성 방법은 당업계에 주지되어 있는데, 예컨대 고체상 합성 기술, 용액상 합성 기술 등을 이용할 수 있고, 이들 기술을 응용하여 자동화한 시판되는 유전자 합성기(DNA synthesizers) 등을 이용할 수 있다. 구체적인 사항들은 문헌[Nucleic Acids Res. 1986.14(13):5399], 문헌[Tet. Lett. 27:5575-5578, 1986], 문헌[Nucl. Acid Res. 4:2557, 1977], 문헌[Lett., 28:2449, 1978] 등을 참조할 수 있다.

[0022] 본 발명에서 발현벡터는 플라스미드, 코스미드, 파지미드, 파지 등 형태의 핵산일 수 있으며, 숙주 미생물에 따라 적합한 벡터를 상용화된 벡터 중에서 구입하여 사용하거나 구입·개조하여 사용할 수 있다. 예컨대 숙주 미생물로서 대장균을 사용할 경우 pUC19, pSTV28, pBBR1MCS, pBluscriptII, pBAD, pTrc99A, pET, pACYC184, pBR322, pJE101, pJE102,, pJE103 등을 사용할 수 있다.

[0023] 재조합 DNA 기술을 포함한 발현벡터 구성에 대해서는 당업계에 상당한 양의 문헌이 축적되어 있으며, 예컨대 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001)], 문헌[F M Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley amp; Sons, Inc. (1994)], 문헌 [Marston, F (1987) DNA Cloning Techniques] 등을 참조할 수 있다. 본 명세서에서 인용되는 모든 문헌은 명시적인 언급이 없더라도 본 명세서의 일부로서 간주 된다.

[0024] 발현벡터는 상기 재조합 단백질 항원을 암호화하는 목적 유전자 이외에, 그 목적 유전자와 작동 가능하게 연결됨으로써 상기 목적 유전자의 전사와 번역에 영향을 미치는 조절서열을 포함한다.

[0025] 이러한 조절서열에는 통상적으로 프로모터 서열, 전사종결 신호 서열(polyadenylation signal) 등이 포함된다. 여기서 "작동가능하게 연결된다"는 의미는 어떤 유전자의 전사 및/또는 번역이 영향을 받도록 연결된다는 의미이다. 예컨대 어떠한 프로모터가 그것에 연결된 어떤 유전자의 전사에 영향을 준다면 그 프로모터와 그 유전자는 작동가능하게 연결된 것이다.

[0026] 본 명세서에서 "프로모터"는 당업계에 알려진 통상의 의미를 따르는데, 구체적으로는 어떤 유전자의 전사 개시점을 기준으로 상위(5'쪽)에 위치하고, DNA-의존 RNA 중합효소에 대한 결합 부위, 전사 개시점, 전사 인자 결합 부위 등을 포함하는, 하나 이상의 유전자의 전사를 제어하는 기능을 갖는 핵산 서열을 의미한다. 이러한 프로모터는 그것이 원핵생물 유래일 경우 전사 개시점 상위에 있는 Prib-now box(통상 전사 개시점(+1) -10 부근 위치), Hogness box(통상 전사 개시점(+1) -35 부근 위치)를 포함하며, 그것이 진핵생물 유래일 경우 전사 개시점 상위에 있는 TATA 박스(통상 전사 개시점(+1) -20 내지 -30 위치에 존재), CAAT 박스(통상 전사 개시 부위와 비교하여 대략 -75 위치에 존재), 인핸서, 전사 억제 인자 등을 포함한다.

[0027] 프로모터는 그것에 연결된 목적유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터라면 구성적 프로모터(특정 유기체에서 상시적으로 발현을 유도하는 프로모터), 유도성 프로모터(특정 외부 자극에 반응하여 목적 유전자의 발현을 유도하는 프로모터) 모두 사용 가능하며, 바람직하게는 특정 숙주 미생물에 적합한 프로모터를 사용하는 경우이다. 예컨대 대장균을 숙주 미생물로 사용할 경우 T7A1, T7A2, T7A3, λpL, λpR, lac, lacUV5, trp, tac, trc, phoA, rrnB, 1PL 등의 프로모터, 숙주 미생물로서 효모를 사용할 경우 GAL1, GAL10, ADH1, TDH3, PGK 등의 프로모터를 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

[0028] 상기 발현벡터는 프로모터 이외에 전사 종결 서열인 터미네이터 서열을 포함하여 구성되는데, 터미네이터 서열은 poly(A) 첨가 신호(polyadenylation signal)로 작용하는 서열로서 전사의 완결성 및 효율성을 높이기 위한 것이다. 숙주 미생물에 따라 적합한 터미네이터 서열은 당업계에 공지되어 있으며, 예컨대 숙주 미생물이 대장균일 경우 tac 터미네이터 서열, rrnB 터미네이터 서열 등을 사용할 수 있고, 숙주 미생물이 효모일 경우 ADH1 터미네이터 서열 등을 사용할 수 있다.

[0029] 상기 발현벡터는 선별 마커 유전자를 추가로 포함할 수 있다. 선별 마커 유전자는 그러한 마커 유전자를 포함하는 숙주 미생물의 선별을 가능하게 하는 형질을 암호화하는 유전자로서 일반적으로는 항생물질 내성 유전자이다. 사용 가능한 항생물질 내성 유전자의 예로는 퓨로마이신 내성 유전자(예컨대 *Streptomyces alboniger*로부터 유래된 퓨로마이신 N-아세틸 트랜스퍼라제 유전자), 네오마이신 내성 유전자(예컨대 *Streptomyces fradiae*로부터 유래된 아미노글리코사이드 포스포트랜스퍼라제 유전자), 하이그로마이신 내성 유전자(*Streptomyces hygroscopicus* 로부터 유래된 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 유전자), 블레오마이신 내성 유전자(Streptomyces verticillus로부터 유래된 블레오마이신 결합 단백질), 블라스티시딘 내성 유전자(예컨대 *Streptomyces verticillum*로부터 유래된 블라스티시딘 S-아세틸트랜스퍼라제 유전자), 하이그로마이신 내성 유전자(예컨대 *Escherichia coli*로부터 유래된 아미노사이클리톨 포스포트랜스퍼라제 유전자), 암피실린 내성 유전자(β-락타마제 유전자) 등을 들 수 있다.

[0030] 본 발명의 방법에 있어서, 발현벡터는 또한 목적유전자의 용이한 클로닝을 위해서 제한효소 인식 부위(restriction enzyme recognition site)를 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 (a) 단계의 발현벡터를 제작한 후에는 이를 숙주 미생물에 형질전환시키는 (b) 단계가 수행되게 된다.

[0032] 형질전환은 목적 유전자가 도입됨에 의한 숙주 미생물의 유전자형의 변형을 의미하는데, 그 도입된 왜래 유전자는 숙주 미생물의 게놈과 독립적으로 존재하거나 숙주 유기체의 게놈에 통합되어 존재할 수 있다.

[0033] 상기 발현벡터를 숙주 미생물에 형질전환시키는 방법도 당업계에 공지되어 있으며, 공지된 방법 중 임의의 방법을 선택하여 사용할 수 있는데, 예컨대 숙주 미생물이 대장균 등 원핵세포인 경우, 형질전환은 $CaCl_2$ 방법, 하나한 방법, 전기 천공 방법, 칼슘 포스페이트 침전법 등을 사용할 수 있고, 숙주 미생물이 효모 등 진핵세포인 경우에, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법, 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있다. 형질전환 방법과 관련하여 구체적인 사항은 문헌(Proc Natl Acad Sci U S A. 1972.69(8):2110), 문헌(J Mol Biol. 1983.166(4):557)), 문헌(Nucleic Acids Res. 1988.16(13):6127) (Cell. 1980.22(2 Pt 2):479), 문헌(Virology. 1973.52(2):456), 문헌(EMBO J. 1982;1(7):841)), 문헌(Gene. 1980.10(2):87), 문헌(Mol Cell Biol. 1985.5(5):1188), 문헌(Proc Natl Acad Sci U S A. 1990.87(24):9568)) 문헌(Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)) 문

헌(J Biol Chem. 1980.255(24):12073)), 문헌(Mol Microbiol. 1988.2(5):637) 등을 참조할 수 있다.

[0034] 본 발명의 방법에서 형질전환에 사용될 수 있는 숙주 미생물은 원핵세포 또는 진핵세포일 수 있다. 원핵세포로서는 그람-양성 세균과 그람-음성 세균 모두 사용할 수 있다. 구체적으로 에세리키아(Escherichia) 속 세균을 포함하여 살모넬라(Salmonella) 속 세균, 쉬겔라(Shigella) 속 세균, 엔테로박터(Enterobacter) 속 세균, 세라티아(Serratia) 속 세균, 에르위니아(Erwinia) 속 세균, 세라티아(Serratia) 속 세균, 슈도모나스(Pseudomonas) 속 세균, 카울로박터(Caulobacter) 속 세균, 시네코시스티스(Synechocystis) 속 세균(예컨대 시네코시스티스 종 PCC 6803 또는 시네코콕코스 종 PCC 6301), 시네코콕코스(Synechococcus) 속의 세균, 바실러스 속의 세균(예컨대 *Bacillus brevis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringienesis* 등), 락토콕코스(Lactococcus) 속의 세균(예컨대 *Lactococcus lactis*), 스트렙토마이세스(Streptomyces) 속 세균(예컨대 *Streptomyces lividans, Streptomyces ambofaciens, Streptomyces fradiae, Streptomyces griseofuscus*), 로도콕코스(Rhodococcus) 속 세균(예컨대 *Rhodococcus erythropolis*), 코리네박테리움(Corynebacterium)속 세균(예컨대 *Corynebacterium gluamicum*), 미코박테리움(Mycobacterium) 속 세균(예컨대 *Mycobacterium smegmatis*) 등을 사용할 수 있다.

[0035] 진핵세포로서는 효모세포, 예컨대 피키아 속 효모(예컨대 *Pichia pastoris*), 사카로마이세스 속 효모(예컨대 *Saccharomyces cerevisiae*), 한세눌라 속 효모(예컨대 *Hansenula polymorpha*), 클루이베로마이세스 속 효모(예컨대 *Kluyveromyces lactis*), 스키조사카로마이세스 속 효모(예컨대 *Schizosaccharomyces pombe*) 등을 사용할 수 있다.

[0036] 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*)을 사용하는 경우이다. 대장균에서의 발현은 다른 발현 숙주 미생물에 비해 비용, 수율 측면에서 여러 가지 장점을 제공할 수 있다. 목적유전자의 고수율의 발현을 위해 적합한 대장균으로서 대장균 W3110, 대장균 BL21, BL21(DE3), DH1, DH4I, DH5, DH5I, DH5IF', DH5IMCR, DH10B, DH10B/p3, DH1 IS, C600, HB101, JM101, JM105, JM109, JM110, K38, RR1, Y1088, Y1089, CSH18, ER1451, ER1647, NovaBlue, DH5α, K12 RV308, K12 C600, K-12, MG1655, HB101 균주 등을 들 수 있다. 보다 자세한 것은 문헌(Brown, Molecular Biology Labfax, Academic Press (1991))을 참조할 수 있으며, 이 문헌도 마찬가지로 본 명세서의 일부로서 간주 된다.

[0037] 대장균에서 목적 단백질 기능 발휘·유지를 위해서는 단백분해효소 활성이 손상된 대장균을 숙주 미생물로 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 구체적인 사항은 문헌(Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California, 119-128 (1990))을 참조할 수 있다.

[0038] 또 대장균에서 목적유전자의 고수율의 발현을 위해서는 목적유전자의 서열을 대장균에서 선호되는 코돈으로 최적화시켜 이용할 수도 있다. 이와 관련해서는 문헌(Nucleic Acids Res. 1992.20 Suppl:2111))을 참조할 수 있다.

[0039] 본 발명의 방법에 있어서, 전술한 바와 같이 형질전환된 숙주 미생물이 얻어지면 이 숙주 미생물을 배양하여 상기 재조합 단백질 항원을 생산하게 된다.

[0040] 형질전환된 숙주 미생물의 배양도 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.

[0041] 세포 배양에 사용되는 배지는 형질전환된 숙주 미생물이 효율적으로 이용할 수 있는 탄소원, 질소원, 미량원소 등을 포함하는 한, 천연 배지와 합성 배지 모두를 사용할 수 있다. 만일 숙주세포로서 동물세포를 사용할 경우, 예컨대 Eagles's MEM (Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. Science 130:432(1959)), α-MEM (Nat New Biol. 1971.230(10):52)), Iscove's MEM (J Exp Med. 1978.147(3):92), DMEM (Virology. 1959.8(3):396)) 등을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 배지에 대해서 구체적인 것은 문헌 [R. Ian Freshney, Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique, Alan R. Liss, Inc., New York]를 참조할 수 있다.

[0042] 목적 단백질의 분리·정제 방법도 당업계에 공지되어 있으며, 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다. 예컨대 한외 여과, 겔 여과, 이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피(표지 펩티드가 결합된 경우), HPLC, 소수성 크로마토그래피, 등전점 크로마토그래피 등의 방법이나 이들을 조합하는 방법이 사용될 수 있다.

[0043] DNA 재조합 기술에 의한 본 발명의 목적 단백질의 생산에 대해서는 본 명세서의 기재 내용 이외에 문헌 [Sambrook 등, Molecular Cloning A Laboratory Mannual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, US(1989)], 문헌[Ausubel 등, Current Protocols in Molecular Biology, Jon Willey & Sons, US(1993)], 문헌[Sambrook, J. & Russel, D. 저, Molecular Cloning, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001

년 1월 15일 발행의 제1권 7.42 내지 7.45, 제2권 8.9 내지 8.17] 등을 참조할 수 있다.

[0044] 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 재조합 단백질 항원을 활성성분으로 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.

[0045] 본 명세서에서, "백신"은 숙주인 사람에게서 해당 병원체에 대한 면역 반응을 유도함으로써 해당 병원체의 감염 또는 재감염의 예방, 해당 병원체에 의한 증상의 중증도 감소 또는 증상의 제거, 또는 해당 병원체나 그 병원체에 의한 질환의 실질적 또는 완전한 제거를 포함하는 의미이다. 따라서 본 발명의 백신 조성물은 해당 병원체의 감염 전에 예방적으로 사람에게 투여되거나 해당 병원체의 감염 후에 치료적으로 사람에게 투여될 수 있다. 여기서 상기 "면역 반응"은 체액성 면역 반응, 세포성 면역 반응 또는 이들을 모두 포함하는 의미이다.

[0046] 또 본 명세서에서, "활성성분"은 단독으로 면역 반응을 유도하거나 또는 그 자체로는 면역 반응을 유도할 수 없는 담체와 함께 면역 반응을 유도할 수 있는 성분을 의미한다. 따라서 활성성분은 스스로가 반드시 면역원성(면역 반응을 유도할 수 있는 능력)을 가질 필요는 없다. 본 발명에서 상기 활성성분은 필수적이지는 않지만 정제된 것이 바람직하다. 여기서 "정제된"은 그 대상 물질이 존재하는 원래의 유기체(즉 본 발명에서는 형질전환된 미생물)의 세포 성분 또는 그 배상액 성분 등(오염물임)이 실질적으로 감소되었거나 제거된 상태를 의미한다. 오염물이 실질적으로 감소되었거나 제거된 상태는 순도가 50% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 더 바람직하게는 99% 이상을 의미한다. 순도는 크로마토그래피, 겔 전기영동, 면역학적 분석 등 당업계에 공지된 방법을 통하여 평가될 수 있으며, 정제 방법도 후수하는 바와 같이 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있다.

[0047] 또 본 명세서에서, 상기 "쯔쯔가무시 균"은 오리엔티아 쯔쯔가무시로 분류·동정된 모든 미생물을 포함하는 의미이다. 구체적으로는 길리엄(Gilliam) 혈청형, 카프(Karp) 혈청형, 카토(Kato) 혈청형 및 보령(Boryoung) 혈청형을 포함하는 의미이다.

[0048] 본 발명의 백신 조성물은 임의의 적절한, 약학적으로 허용되는 제제로 제조될 수 있다. 예컨대 즉석 투여 용액 또는 현탁액 형태이거나, 투여 전 희석에 적절한 농축된 원액이거나, 또는 재구성 가능한 형태 예컨대 동결건조, 냉동-건조, 또는 냉동 제제 형태로 제조될 수 있다.

[0049] 본 발명의 백신 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함하여 제제화될 수 있다. 백신 조성물의 제제화를 위하여 사용될 수 있는 약학적으로 허용되는 담체는 대한민국 약전이나 제외국의 약전 특히 미국, 일본, 유럽의 약전에 열거·규정되어 있으며, 이들 약전을 참조할 수 있다.

[0050] 이러한 담체는 통상 희석제, 부형제, 안정화제, 방부제 등을 포함할 것이다. 적절한 희석제로서는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유, 땅콩유와 같은 식물성유 등의 비수성 용매나 염수(바람직하게는 0.8%의 염수), 완충 매질을 포함한 물(바람직하게는 0.05M의 인산염 완충액) 등의 수성 용매 등을 들 수 있고, 적절한 부형제로서는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 나트륨 클로라이드, 무수 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 들 수 있으며, 적절한 안정화제로서는 소르비톨, 만니톨, 전분, 수크로스, 덱스트란, 글루타메이트, 글루코스 등의 탄수화물이나 분유, 혈청 알부민, 카제인 등의 동물성, 식물성 또는 미생물성 단백질 등의 단백질을 들 수 있다. 적절한 방부제로서는 티메로살, 메르티올레이트, 젠타마이신, 네오마이신, 니스타틴, 암포테리신 B, 테트라사이클린, 페니실린, 스트렙토마이신, 폴리믹신 B 등을 들 수 있다.

[0051] 본 발명의 백신 조성물은 항원 보조제(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 항원 보조제는 항원에 대한 면역 반응을 증강시키는 하나 이상의 물질로 이루어진 것일 수 있다. 보조제는 항원을 서서히 방출시키는 조직 저장소로서 및/또는 면역 반응을 비특이적으로 증강시키는 임파성 시스템 활성자로서 기능할 수 있다(Hood et al., Immunology, Second Ed., 1984, benjamin/Cummings: Menlo Park, California, p.384). 항원 보조제는 예컨대 완전 프로인트(Freund), 불완전 프로인트, 사포닌, 겔 성상의 알루미늄 보조제, 표면 활성 물질(예: 리소레시틴, 플루론 글리콜, 다중 음이온, 펩티드, 오일 또는 탄화수소 에멀젼 등), 식물성 오일(면실유, 땅콩유, 옥수수유 등), 비타민 E 아세테이트 등일 수 있다.

[0052] 현재 인체에 적용 가능한 항원 보조제 중에서 가장 널리 사용되고 있는 것은 알루미늄 보조제이며, 이러한 알루미늄 보조제는 인산알루미늄(Aluminum phosphate), Potassium aluminum sulfate, 수산화 알루미늄(Aluminum hydroxide) 등 알루미늄 염(Aluminium salts)의 겔 성상으로 사용되고 있다. 이러한 알루미늄 보조제는 일반적으로 Th2-type의 면역반응을 이끌어내어 백신 효과를 증강시키는 것으로 알려져 있다(Vaccine. 2007.25(23):4575; Pharm Res. 2004.21(9):1519) 본 발명의 실시예에서 사용한 Invivogen사의 Alhydrogel®은 수산화 알루미늄(Aluminium hydroxide)의 겔 형태 현탁액(colloidal)이다. 이러한 알루미늄 보조제는 그 제조 방법이 당업계에 공지되어 있어(Immunological Adjuvants and Vaccines. NATO ASI Series. 1989.179:35-41;

Pharm Biotechnol. 1995.6:141; Methods in Molecular Medicine. 2000.42:65) 직접 제조하여 사용하거나, 상업적으로 유통되는 제품을 구입하여 사용할 수도 있다. 상업적으로 유통되는 제품으로서는 아래의 실시예에서 사용된 Invivogen사의 Alhydrogel® 2% 제품을 비롯하여 Sigma사의 Aluminum hydroxide Gel 제품, BRENNTAG사의 Alhydrogel™ 제품 등을 들 수 있다.

[0053] 본 발명의 백신 조성물은 임의적 단위 용량으로 제조될 수 있다. 단위 용량은 사람에 1회 이상 투여되기 위한 용도로 포장된 낱개의 제품에 포함된 활성성분과 약학적으로 허용되는 담체의 양을 말하는 것으로, 이러한 활성성분과 담체의 적절한 양은 본 발명의 백신 조성물이 1회 이상 접종될 때 백신으로서 기능할 수 있는 양으로 이러한 양은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 비임상적 및 임상적으로 결정될 수 있다.

[0054] 본 발명의 백신 조성물은 바람직하게는 비경구적으로 예컨대 직장, 경피, 정맥 내 주사, 동맥 내 주사, 근육 내 주사, 피 내 주사, 피하 주사, 복막 내 주사, 심실 내 주사 등을 통해 투여될 수 있다.

[0055] 본 발명의 백신 조성물은 조절 방출 시스템으로 투여될 수 있다. 예컨대 그러한 조절 방출 시스템으로서는 리포좀, 이식 삼투성 펌프, 경피 패치 등의 방식 등을 들 수 있다. 바람직하게는 리포좀 방식으로 활성성분을 전달하는 경우이다. 리포좀 방식에 의해 활성성분을 전달하는 것과 관련해서는 문헌[Science. 1990.249(4976):1527)], 문헌[Treat at al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (des.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989)] 등을 참조할 수 있다. 여타의 활성성분의 전달 방식과 관련해서는 문헌 [Crit Rev Biomed Eng. 1987.14(3):201], 문헌[Surgery. 1980.88(4):507], 문헌[N Engl J Med. 1989.321(9):574], 문헌[Controlled Drug Bioavailability. Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984)], 문헌[Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983)], 문헌[During et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989)], 문헌[J Neurosurg. 1989.71(1):105)] 등을 참조할 수 있다. 이들 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주된다.

[0056] 본 발명의 백신 조성물의 투여량은 의료인에 의해 나이, 체중, 성별, 증상, 합병증, 다른 질환의 이환 유무 등의 환자 특성을 고려하여 결정될 수 있다.

[0057] 또한 투여의 시간적 간격과 횟수는 사용되는 제형이나 활성성분의 혈중 반감기 등을 고려하여 결정될 수 있다.

[0058] 이처럼 투여량과 투여의 시간적 간격이나 횟수는 의료인의 판단에 따라 좌우되고 개인에 따라 결정되어야 하지만, 통상의 적절한 투여량은 1일 기준 개인 체중 1kg당 약 0.1 내지 10mg 범위 내에서 결정될 것이고 투여 간격은 3 내지 10일, 투여 횟수는 1 내지 5회 범위 내에서 결정될 것이다.

[0059] 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 재조합 단백질 항원을 포함하는 쯔쯔가무시 균의 특이 항체 검출용 조성물에 관한 것이다.

[0060] 본 발명의 검출용 조성물은 생체 시료 중의 쯔쯔가무시 균의 특이 항체, 특히 ScaA 항원 대한 특이 항체를 검출하기 위한 것으로, 본 발명의 조성물은 생체 시료와 접촉하여 그 반응 정도를 측정함으로써 쯔쯔가무시 균의 감염자와 비감염자를 구분하기 위한 용도로 사용될 수 있다. 특히 쯔쯔가무시병의 발병 위험 기간 동안 쯔쯔가무시병과 동일·유사한 증상을 보이는 환자가 쯔쯔가무시 균의 감염자인지 또는 비감염자인지를 구분하기 위한 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

[0061] 본 명세서에서, "특이적 결합"이란 쯔쯔가무시 균에 대한 특이 항체, 특히 ScaA 항원 대한 특이 항체에 특이적으로 결합하는 상기 재조합 단백질 항원이 그 항체와만 결합하고 다른 단백질과는 실질적으로 결합하지 않는 경우를 의미한다. 여기서 "실질적으로"란 정도는 낮지만 비특이적인 결합체는 형성될 수 있다는 것을 의미하는데, 이러한 비특이적 결합은 후술하는 바와 같이 특이적 결합의 검출 이전에 세척 용액에 의하여 세척·제거될 수 있다.

[0062] 또 본 명세서에서, "생체 시료"는 쯔쯔가무시 균에 대한 특이 항체, 특히 ScaA 항원 대한 특이 항체가 존재할 수 있는 시료로서 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 눈물, 점액, 콧물, 질 분비물 등을 포함하며, 바람직하게는 혈청이다. 그것은 항체는 혈청 중에 높은 농도로 존재한다는 것이 당업계에 알려져 있기 때문이다.

[0063] 본 발명의 조성물은 상기 재조합 단백질 항원이 그 가용성 용액 예컨대 탄산염 완충용액 또는 중탄산염 완충용액에 용해된 형태이거나 동결건조된 형태일 수 있다.

[0064] 한편 본 발명의 조성물은 지지체에 고정되어 사용될 수 있으며, 사용될 수 있는 고체 지지체로는 예컨대 입자(수지 비드, 자기 비드, 금속 미립자, 금 콜로이드 등), 기판(마이크로 타이터 플레이트, 유리 기판, 실리콘 기

판, 수지제 기판, 전극 기판, 막 등) 등을 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 않는다. 지지체의 재료로서는 (i) 유리, 석영 유리, 알루미나, 사파이어, 포스테라이트(forsterite), 산화규소 등의 무기 재료나 (ii) 폴리에틸렌, 폴리비닐아세탈, 아크릴 수지, 폴리카보네이트, 폐놀 수지, 우레아 수지, 에폭시 수지, 멜라민 수지, 실리콘 수지, 폴리페닐렌옥시드, 폴리술폰, 폴리에틸렌글리콜, 아가로스, 아크릴아미드, 니트로셀룰로오스, 나일론, 라텍스 등의 유기 재료가 사용될 수 있다.

[0065] 본 발명의 조성물을 지지체에 고정하는 방법은 흡착(예컨대 코팅)에 의해서 직접적으로 고정될 수 있으며, 단백질과 지지체 모두에 결합하는 링커 등을 사용하여 간접적으로 고정될 수도 있다.

[0066] 본 발명의 조성물을 지지체에 흡착시켜 사용할 경우, 이러한 흡착은 예컨대 pH 9.5인 0.06M 탄산염 완충용액 또는 중탄산염 완충용액으로 본 발명의 조성물을 희석하고 그 희석액을 지지체에 일정온도에서 일정시간 접촉시킴으로써 이루어질 수 있다. 여기서 흡착에 필요한 시간과 온도는 충분한 흡착이 이루어지는 한 특별한 제한이 없는데, 예컨대 4℃에서 흡착이 이루어질 경우 72시간 동안 수행될 수 있으며, 또한 예컨대 37℃에서 흡착이 이루어질 경우 2시간 동안 수행될 수 있다. 흡착된 후에는 증류수나 에탄올 등으로 세척할 수 있으며, PBS 등의 용액에 함유된 소 혈청 알부민(BSA) 등의 차단제로 코팅할 수도 있다. 차단제로 코팅한 후에는 증류수나 차단제를 함유하지 아니한 완충용액 등으로 세척할 수도 있다.

[0067] 지지체에 흡착된 본 발명의 조성물(구체적으로 그 조성물에 포함된 상기 재조합 단백질 항원을 말함)은 지지체에 생체 시료를 처리할 경우 그 생체 시료 중의 쯔쯔가무시 균에 대한 특이 항체 특히 ScaA에 대한 특이 항체와 결합체를 형성하게 된다. 결합체를 형성을 유도한 후에는 비특이적으로 결합된 항체 등을 제거하거나 오염물질 등을 제거하기 위하여 Tween 20과 같은 세척 완충액이나 증류수 등의 세척제로 세척하는 것이 바람직할 수 있다.

[0068] 상기 결합체는 다양한 방법을 통하여 검출함으로써 생체 시료 중의 쯔쯔가무시 균에 대한 특이 항체 특히 ScaA에 대한 특이 항체 존재 유무 및/또는 존재 정도를 정성적·정량적으로 확인할 수 있다. 이는 결과적으로 피검자가 쯔쯔가무시 균에 감염되었는지에 대해 유용한 정보를 제공하게 될 것이다.

[0069] 상기 결합체는 검출제를 사용하여 검출할 수 있는데, 검출제는 예컨대 쯔쯔가무시 균에 대한 특이 항체 특히 ScaA에 대한 특이 항체와 결합하는 2차 항체일 수 있다. 2차 항체의 예로서는 항체(일차 항체)의 Fc 부분을 인식하는 것일 수 있으며, 이러한 2차 항체는 Fc 부분을 조류(예를 들면, 닭 등), 포유 동물(예를 들면, 토끼, 염소, 말, 양, 쥐 등) 등의 동물에 면역화시켜 그 동물의 혈액으로부터 분리·정제하여 얻어질 수 있다.

[0070] 2차 항체는 검출 시그널을 제공하는 표지(label)나 효소와 접합됨으로써 검출을 편리하게 할 수 있다.

[0071] 표지 접합은 검출 시그널을 제공할 수 있는 임의의 표지를 항체에 결합시키는 것이다. 그러한 표지로서는 트리티움, 요오드(^{131}I, ^{125}I, ^{123}I, ^{121}I), 인(^{32}P), 황(^{35}S), 금속류(예를 들면, ^{68}Ga, ^{67}Ga, ^{68}Ge, ^{54}Mn, ^{99}Mo, ^{99}Tc, ^{133}Xe 등) 등의 방사성 동위원소, 플루오레세인이소티오시아네이트, 테트라메틸로다민이소티오시아네이트, 치환 로다민이소티오시아네이트, 디클로로트리아진이소티오시아네이트, 알렉사(Alexa) 또는 알렉사플루오로(AlexaFluoro) 등의 형광성 물질 또는 형광단 등을 들 수 있다.

[0072] 효소 접합은 항체에 퍼옥시다제(POD), 알칼리포스파타제, β-갈락토시다제, 우레아제, 카탈라제, 글루코스옥시다제, 락트산 탈수소 효소, 아밀라제 또는 비오틴-아비딘 복합체 등의 효소 등을 결합시키는 것으로, 이들 효소는 특정 기질과 반응할 경우 특정 검출 시그널을 제공한다. 예컨대 퍼옥시다제는 아미노살리실산과 과산화수소 또는 p-페닐렌디아민과 과산화수소와 반응하는 경우 자주색을 나타내며, 알칼리성 포스파타제는 디니트로페닐포스페이트와 반응하는 경우 황색을 나타내고, β-갈락토시다제는 O-니트로페닐-베타-D-갈락토피라노사이드와 반응하여 자주색을 나타낸다.

[0073] 상기 표지나 효소는 바람직하게는 항체와 공유결합된다.

[0074] 이들 2차 항체 등의 검출제를 사용하여 검출할 경우, 이들 2차 항체의 상기 결합체와의 반응 정도를 효소 면역측정법, 형광 면역 측정법, 방사 면역 측정법, 발광 면역 측정법 등 다양한 당업계의 공지·관용된 면역학적 측정 방법을 사용하여 측정할 수 있다. 바람직하게는 효소 면역 측정법, 가장 바람직하게는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 사용하는 경우이다.

[0075] 본 발명의 또 다른 측면에 있어서, 쯔쯔가무시 균 감염 여부 진단에 유용한 정보를 제공하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0076] 본 발명의 방법은 전술한 바의 생체 시료 중에 있는 쯔쯔가무시 균 특이 항체의 검출 방법과 동일한 단계를 포함하여 구성되며, 따라서 그 검출 방법에 대한 설명이 본 발명의 방법에 그대로 유효하다.

발명의 효과

[0078] 본 발명은 전술한 바와 같이, 쯔쯔가무시 균 감염 여부 등의 진단과 그 쯔쯔가무시 균에 대한 백신으로 유용하게 사용할 수 있는, ScaA 및 TSA56 항원 보존 부위 서열로부터 도출한 신규 재조합 단백질 항원을 제공할 수 있다.

[0079] 본 발명의 신규 재조합 단백질 항원은 유전형 차이에 따른 방어 면역 유도능의 차이와 진단력의 차이를 극복할 수 있는 백신 조성물과 진단 조성물을 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0081] 도 1은 정제된 cScaA_F4-ucTSA56_V2재조합 단백질의 쿠마시 블루 염색 결과이다.

도 2는 쯔쯔가무시균 감염에 후 면역된 생쥐들의 생존율 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0082] 이하 본 발명을 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0084] **<실시예> 시료 준비**

[0085] **<실시예1> ScaA의 보존블럭(conserved blocks) 동정**

[0086] 미국립생물정보학센터(National Center for Biotechnology Information)의 유전자서열 데이터베이스에서 15개의 *ScaA* 유전자 아미노산서열을 수집하였다[표 1]. 수집된 서열정보를 단백정렬 프로그램(Muscle program embedded in MEGA7 software)을 이용하여 정렬(Align) 하였다. 분류에 사용된 유전그룹 및 유전자형(genogroups, genotypes)은 TSA56 유전자 정보에 기반하여 결정되었다(PLoS Negl Trop Dis. 2017.11(3):e0005408).

[0087] 15개 유전자들이 공통으로 보유하는 아미노산 서열이 보존된 구간을 정의하기 위하여 각 아미노산 서열위치에서 나타나는 변이의 수와 연속된 10개의 아미노산구간 서열에 나타나는 유전자간 변이의 평균값을 계산하였다. 그리고 전체 아미노산 서열 변이의 평균값보다 낮은 아미노산 서열이 10개 이상 이어진 13개의 보존블럭들(Conserved blocks;CB)을 규정하였다. 15개 유전자에서 확인된 13개 보존블럭 중 보존부위 13은 autotransporter domain을 포함하므로 제외하였으며 나머지 12개의 보존서열(consensus sequences)들의 위치와 아미노산 서열은 [표 1]에 나타내었다.

표 1

[0088]

Conserved Blocks (CB)	Amino acid position	Amino acid sequence	서열번호
CB1	1 - 74	MKNSRKISLIFFTTLFTISNITITQTADNDPSASSSSSGGFTGSGASQSNNTTESSNDNQGDTGSGATSNPSNP	서열번호 1
CB2	139 -149	SNPSNPIEGAS	서열번호 2
CB3	179 - 214	GKKPKKSPFKKLKEFGSTLSLSGHTKPEEPSEGATG	서열번호 3
CB4	228 - 252	KQLASSTLSLSSTTPEEPKAPIVLS	서열번호 4
CB5	333 - 370	SDLKPTSPITSSVSMPNLSDTDVSSSSSPPTRRSSSII	서열번호 5
CB6	378 - 393	FDLSFFSSTTHGGKTE	서열번호 6
CB7	406 - 424	FVVQSPTIVSSDLKICGNI	서열번호 7
CB8	720 - 733	GGKIIVRNNGTLTH	서열번호 8
CB9	810 - 819	SQGSYSGNIG	서열번호 9
CB10	830 - 854	LLPKSKRPSLIEVEGSVHTNQCSIS	서열번호 10
CB11	909 - 941	KSKKGSSTNPEKFKKKPVTVFSINYTTNSDGTV	서열번호 11
CB12	1019 - 1103	FAGLVDKKKKDKGDDGASSSSGSSSVAPSARVSPEVSDDEEGGKGEDIQASTVSHLHSKDSAHSEQSQDKDHTEDPEDPTEAAIE	서열번호 12

[0089] 쯔쯔가무시균 보령균주의 ScaA 단백질(Genbank accession no. WP_011944269)에서 보존블럭 8 ~ 12(CB8 ~12)을

포함하는 cScaA_F4를 선정하였으며, 이에 해당하는 아미노산 서열 정보는 [표 2]에 나타내었다

표 2

[0090]

ScaA fragment	Amino acid sequence
cScaA_F4 (서열번호13)	MKLFISYDKSVNKSSIFCSDIIFSHPEDTINILGNTDIKGNIGTKGNSGGKIIVRNNGTLTHSGGDIGNNKTSNSNSLQA LLLCENASFISKPDSNSIPYTCNIKEITADKNSNIELNSNADWKTNIIPVGTGATVTMSQGSYSGNIGTKEKPMANVTLL PKSKRPSLIEVEGSVHTNQCSISDKSSAKGEVMLLGDYTVTAQTSDGSGSINVGNAKINLGLNTLTLASDNIIILGHKSK KGSSTNPEKFKKKPVTVFSINYTTNSDGTVKTQGKLKLSKYHDPNNKIIVNVNHQGDLRDLSKHGTQTVIQPVDIADTGG LNISNLVYICDGKCKWQLVPGSDGKFVFAGLVDKKKKDKGDDGASSSSGSSSVAPSARVSPEVSDDEEG

[0092] **<실시예2> TSA56의 보존블럭(conserved blocks) 동정**

[0093] 미국립생물정보학센터(National Center for Biotechnology Information)의 염기서열 데이터베이스에서 1030개의 *TSA56* 유전자 염기서열을 수집하고, 이들 중에서 전체 TSA56 단백질을 암호화하는 부위의 85% 이상을 포함하고 있는 324개의 서열 중 206개의 유전자 서열을 선발하였다(미국립생물정보학센터에서 등재된 *TSA56* 유전자 서열 중에는 ORF 전체를 포함하는 서열과 그 일부만을 포함하는 서열이 존재하며, 따라서 이들 유전자 서열 중에서 해당 균주의 전장의 TSA 단백질 아미노산 서열과 비교하여 85% 이상의 아미노산 서열을 암호화하는 부위를 포함하는 유전자를 선발한 것임).

[0094] 선발된 206개의 *TSA56* 유전자들을 아미노산 서열로 바꾸고 MAFFT 알고리즘(Multiple Alignment using Fast Fourier Transform; Molecular biology and evolution, 2013, 30, 772-780) 프로그램을 이용하여 다중서열정렬(Align) 하였다.

[0095] 206개의 유전자들의 주요 아미노산 보존서열(major consensus sequences)들부터 추론된 17개 유전형의 보존 블럭들의 아미노산 서열을 [표3]에 정리하였다.

표 3

[0096]

17 genotypes	Amino acid sequence	서열번호
Karp_C	SASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESTRLDPADADGKKHLSLTTGLPFGGTLAAGMT IAPGFRAELGVMYLTNIKLTPPQPTIMPISIADRDFGIDRIAWLKNCAGIDYWRHLVVGLAALS NANKPSASPVKVLSDKITQIYSDIKLPNSASVEQIQNKMQELNDVLEELRDSFDGYISNAFANQ IQLNFQATAQEAVAAAAVRLLNGNDQIAQLYKDLVKLQRHAGIKKAMEKLAAQEAEFDLSMIVG QVKLYADVMTTESFS	서열번호14
Karp_B	SASAIELGDEGGLECGPYGKVGIVGGMITGVESTRLDSADAEGKKRLPLTTSMPFGGTLAAGMT IAQGFRAELGVMYLTNIKLTPPQPTIMPISIADRDFGIDRIAWLKNYAGIDYWRHLVVGLAALS NANKPSASPVKVLSDKITQIYSDVKLPNSASVEQIQNKMQELNDLLEELRESFDGYLGGNAFAN QIQLNFQATAQEAVAAAAVRLLNGNDQIAQLYKDLVKLQRHAGIKKAMEKLAAQEAEFDLSMIV GQVKLYADLFITESFS	서열번호15
Karp_A	SASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESTRLDPADADGKKHLPLTTSMPFGGTLAAGMT IAQGFRAELGVMYLTNIKLTPPQPTIMPISIADRDFGIDRIAWLKNCAGIDYWRYLVVGLAALS NANKPSASPVKVLSDKITQIYSDIKLPNSASVEQIQNKMQELNDVLEELRESFDGYLGGNAFAN QIQLNFQATAQEAVAAAAVRLLNGNDQIEQLYKDLVKLQRHAGIKKAMEKLAAQEAEFDLSMIV GQVKLYADVMITESFS	서열번호16
Staitama	SASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGMITGAESARLDQADTTGKKHLPLTTSMPFGGTLNAGIT ITPWLRAELGVMYLRNIKLTPPQPTIMPISIADRDFAIDRVAWLKNYAGIDYWRYMVIGLAALS NANKPSDPPVKVLSDKITQIYNDIRLPNSASVEQIQNKMQELNELLEEVRDSFEGYIGGNAFAN QIQLNFQATAQEAAAAAAVRLLNGNDQIVQLYKDLVKLKRHAGFKKSMDKLAAQETEFDLSMIV GQVKLYADLVATESFS	서열번호17
Boryong	SASAIELEDEVGLECGPYAKVGVVGGMITGAESTRLDSTDSEGKKHLSLTTGLPFGGTLAAGMT IAPGFRAELGVMYLRNIKLTPPQPTMMPISIADRDFGIDRIAWLKNCAGIDYWRSLVVGLAALS NANKPSASPVKVLSDKIIQIYSDIKLPNSASIEQIQSKIQELGDTLEELRDSFDGYI- NNAFVNQIHLNFQATAQEAVAAAAVRLLNGSDQIAQLYKDLVKLQRHAGIRKAMEKLAAQETEF DLSMVVGQVKLYADLVTTESFS	서열번호18
JG-C	SASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESTRLDPADADGKKHLPLTTSMPFGGTLAAGMT IAPGFRAELGVMYLRNIKLTPPQPTIMPISIADRDEGVDRIAWLKNYAGIDYWRHLVVGVTALS HANKPSVTPVKVLSDKITKIYSDIRLPNSASVEQIQAKMEELNNILEELRESFDGYLANAFANQ IQLNFQVTAQDAAAAAAVRALNGNEQIIQLYKDLVKLQRHAGIRKAMEQLAVQETEFDLSMIVG QVKLYADLFTTESFS	서열번호19

Kawasaki	SASAIELGDEGVLECGPYAKIGVVGGMVTGVESARLDPADVDCKKHLSLTTMLPFGGTLAAGMT IAPGFRAELGVMYLRNIKLTPPQPTIMPISIADRDLGVDRIAWLKNYAGIDYWRYLVVGVTALS NANKPSVSSVKVLSDKITQIYSDIRLPNSASVEQIQTKMQELNDVLEELRESFDGYLANAFANQ IQLNFQVTAQEAAAAAAVRALNGNEQIIQLYKDLVKLQRHAGIRKAMEKLAAQEVELDLSMIVA QVKLYADVVATESFS	서열번호20
JG_B	SASAMEFGDEGGGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESTRLDSADAGGKRYLPLTTGLPFGGTLAAG MTIAPGFRAELGVMYLRNIKLVPPQPTIMPISIADRDVGVDRIAWLKNYAGIDYWRHLVVGVTA LSHANKPSVTPVKVLSDKITKIYSDIRLPNSASVEQIQAKMQELNNVLEELRESFEGYLANAFA NQIQLNFQVTAQEAAAAAAVRALNGNEQIIQLYKDLVKLQRHAGISKAMEQLAAQETEFDLSMV VGQVKLYADLVATESFS	서열번호21
JG_A	LASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESTRLDSADADGKKHLSLITGIPFGGTLAAGMT IAPGFRAELGVMYLRNIKLTPPQPTIMPISIADRDVGVDRIAWLKDYAGIDYWRHLVVGVTALS HANKPSVTPVKVLSDKITKIYSDIRLPNSASVEQIQAKMQELNNVLEELRESFDGYLANAFVNQ IQLNFQVTAQEAAAAAAVRALNGNEQIIQLYKDLVKLQRHAGIRKAMEQLAAQETEFDLSMIVG QVKLYADLFTTESFS	서열번호22
Gilliam	SASAIELGEEGGLECGPYGKVGIVGGMITGAESTRLDSTDSEGKKHLSLTTGLPFGGTLAAGMT IAPGFRAELGVMYLRNIKLTPPQPTIMPISIADRDVGVDRIAWLKNYAGIDYWRHLVVGVTALS HANKPSVTPVKVLSDKITKIYSDIKLPNSASVEQIQSKMQELNDVLEDLRDSFDGYMGNAFANQ IQLNFQATAQEAVAAAAAVRLLNGNDQIAQLYKDLVKLQRHAGVKKAMEKLAAQETEFDLSMIVG QVKLYADLFTTESFS	서열번호23
TD	SASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGIITGVESARLDPADTNGKKLLPLTTSMPFGGTLAAGMT IAQGFRAELGVMYLRNIKITPPQPTIMSISIADRNAGVDRIAWLRNYAGIEYWRHLVVGVAAMS NANKPSTSAVKVLGDKISQIYCDIKLPNSASVEQIQGKMQELGDILEALRDSFEGYIANAFANQ IQLNFQVTAQEAVAAAAVRALNRNEQIAQLYKDLVKLQRHAGIRKAMEKLAAQETEFDLSMIVG QVKLYADLMTTESFS	서열번호24
TA763_B	SASAIELGDEGGLECGPYAKVGIVGGMITGAESTRLDSSDAEGKKRLSLTTSVPFGGTLAAGIT IAQGFRAELGVMYLTNIKLTPPQPVIMPISTADRDMGVDRIAWLKQYAGIDYWRHLVVGIAALS NANKPSASPVKVLSDKITKIYSDIKLPNSASIEQIQRKMQELNDVLEGLRDAFDGYINNAFVDQ IQLNFQATAQEAVAAAAVRLLNGNDQIVQLYKDLVKLQRHAGIKKAMEKLAAQEAEFDLSMIVG QVKLYADLMTTESFS	서열번호25
TA763_A	SASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESARLDPADHEGKKHLPLTTSMPFGGTLAAGMT IAQGFRAELGVMYLRNIKLTPPQPTIMPISIADRDFGVDRIAWLKEYAGIDYWRHLVVGVTALS NANKPSASPVKILSEKITQIYSDIRLPNSASVEQIQSKMQELSDLLEELRDSFDGYISNAFAGQ IQLNFQATAQEAVAAAAVRLLNGNDQIAQLYKDLVKLQRHAGIRKAMEKLAAQETEFDLSMIVG QVKLYADLMTTESFS	서열번호26
Kato_B	SASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESTRLDPADAGGKKHLPLTTGLPFGGTLAAGMT IAPGFRAELGVMYLTNVKLTPPQPTIMPISIADRDLGVDRIAWLKNYAGIDYWRHIVVGVTAMS NANKPSVSPVKVLSDKIVQIYRDVKLPNSASVEQIQNKMQELNDILDDIRDSFDGCIGGNAFAN QIQLNFQATAQEAAAAAAVRVLNNNDQIIQLYKDLVKLKRHAGIKKAMEELAAQETEFDLSMIV GQVKLYADLFTTESFS	서열번호27
Kato_A	SASAIELGEEGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESTRLDPADVDGKKHLPLTTGLPFGGTLAAGMT IAPGFRAELGVMYLTNIKLTPPQPTIMPISIADRDFGVDRIAWLKEYAGIDYWRDMVVGITAMS NANKPSASPIKVLSDKISQIYDDIRLPNSASVEQIQSKMQELSETLEELRESFDGCIGNAFANQ IQLDFQATVQEATAAAAVRVLNGNGQIIQLYKDLVKLKRHAGIKKAMEKLAAQETEFDLSMIVG QVKLYADLMTTESFS	서열번호28
Shimokashi	SANAIEFDENSLECGPYAKVGIVGGVLSGVESARLDPADSEGKKHLPLIKGMPFGVTLAAGMTI TPGVRAEISAMYLMNVKLTPPQPNIMPISIADRDIAVDRIAWLKNYAGIDYWRDVVVGITALSN ANKPNVSAVKILSDKISQIYADIKLPDSASVDQIQNKVQELNKVLEDVRESFDGFILNAFAQPV RLNFAATAQEAAAAAAIRALNDGENNGIIQLYKDLYKLQRNVALKKSMKQLGDEEIEFDLHMAV GQVKLYADLFTIDSFS	서열번호29
TA586	SASAIELGDEGGLECGPYARVGVVGGMITGVESTRLDSTDPEGKKHLSLTTGLPFGGTLAAGMT IAPGFRAELGVMYLRNIKLTPPPAIVMPISIADRDLGVDRIAWLKEYAGIDYWRHLVVGIAALS NANKPNASPVKVLSDKISQIYKDIKLANSASVEQIQSKMQELNDILEDLRESFDGYISNAFANQ IQLDFHATAQEAAAAAAVRVLNNNEQIIQLYKDLVKLKRHAGIRKAMEQLAAQETEFDLSMIVG QVKLYADVFTTESFS	서열번호30

[0098] 17개의 유전형에 포함된 유전자들의 7개 보존 블럭에 포함되는 아미노산 서열 중에서 가장 빈도수가 높은 각 위치의 아미노산으로 구성된 서열을 ucTSA56_V2로 하였으며, 해당 서열 정보는 [표 4]에 나타내었다.

표 4

[0099]

TSA56 fragment	Amino acid sequence
ucTSA56_V2 (서열번호31)	SASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESTRLDSADADGKKHAPGFRAELGVMYLTNIKLTPPQPTIMPISIADRDFG VDRIAWLKNYAGIDYWRHLVVGVTALSNANKPSVSPVKVLSDKITQIYSDIKLPNSASVEQIQNKMQELNDVLEELRDSFDG YIGNAFANQIQLNFQATAQEAAAAAAVRALNGNDQIIQLYKDLVKLQRHAGIKKAMEKLAAQETEFDLSMIVGQVKLYADLF TTESFSLE

[0101] **<실시예3> cScaA_F4-ucTSA56_V2 발현 단백질 항원 제조**

[0102] 상기 <실시예1>의 cScaA_F4(이하 "F4") 및 <실시예2>의 ucTSA56_V2(이하 "V2") 각각을 암호화하는 핵산서열과, 이들의 융합 단백질인 cScaA_F4-ucTSA56_V2(이하, F4V2)을 암호화하는 핵산서열을 각각 화학적으로 합성하여 제작하고, 이들을 재조합 방법으로 제작, 분리, 정제한 후 F4와 V2의 혼합물과 F4V2을 백신 항원으로 사용하였다.

[0103] F4V2의 핵산 서열과 아미노산 서열은 아래의 [표 5]와 [표 6]에 나타내었다.

표 5

[0104]

ScaA-ucTSA56 fragment	Nucleic acid sequence
cScaA_F4-ucTSA56_V2 (서열번호32)	ATGAAACTGTTCATCTCTTACGACAAATCTGTTAACAAATCTTCTATCTTCTGCTCTGACATCATCTTCTCTCAC CCGGAAGACACCATCAACATCCTGGGTAACACCGACATCAAAGGTAACATCGGTACCAAAGGTAACTCTGGTGGT AAAATCATCGTTCGTAACAACGGTACCCTGACCCACTCTGGTGGTGACATCGGTAACAACAAAACCTCTAACTCT AACTCTCTGCAGGCGCTGCTGCTGTGCGAAAACGCGTCTTTCATCTCTAAACCGGACTCTAACTCTATCCCGTAC ACCTGCAACATCAAAGAAATCACCGCGGACAAAAACTCTAACATCGAACTGAACTCTAACGCGGACTGGAAAACC AACATCATCCCGGTTGGTACCGGTGCGACCGTTACCATGTCTCAGGGTTCTTACTCTGGTAACATCGGTACCAAA GAAAAACCGATGGCGAACGTTACCCTGCTGCCGAAATCTAAACGTCCGTCTCTGATCGAAGTTGAAGGTTCTGTT CACACCAACCAGTGCTCTATCTCTGACAAATCTTCTGCGAAAGGTGAAGTTATGCTGCTGGGTGACTACACCGTT ACCGCGCAGACCTCTGACGGTTCTGGTTCTATCAACGTTGGTAACGCGAAAATCAACCTGGGTCTGAACACCCTG ACCCTGGCGTCTGACAACATCATCATCCTGGGTCACAAATCTAAAAAAGGTTCTTCTACCAACCCGGAAAAATTC AAAAAAAAACCGGTTACCGTTTTCTCTATCAACTACACCACCAACTCTGACGGTACCGTTAAAACCCAGGGTAAA CTGAAACTGTCTAAATACCACGACCCGAACAACAAAATCATCGTTAACGTTAACCACCAGGGTGACCTGCGTGAC CTGTCTAAACACGGTACCCAGACCGTTATCCAGCCGGTTGACATCGCGGACACCGGTGGTCTGAACATCTCTAAC CTGGTTTACATCTGCGACGGTAAATGCAAATGGCAGCTGGTTCCGGGTTCTGACGGTAAATTCGTTTTCGCGGGT CTGGTTGACAAAAAAAAAAAAGACAAAGGTGACGACGGTGCGTCTTCTTCTTCTGGTTCTTCTTCTGTTGCGCCG TCTGCGCGTGTTTCTCCGGAAGTTTCTGACGACGAAGAAGGTTCTGCCAGCGCGATCGAACTGGGTGACGAAGGC GGTCTGGAATGTGGCCCGTATGCGAAAGTGGGCGTAGTTGGCGGCATGATTACCGGCGTCGAGTCCACCCGTCTG GATTCTGCGGATGCTGATGGTAAAAAACACGCGCCGGGCTTCCGTGCTGAACTGGGCGTGATGTACCTGACCAAC ATCAAGCTGACTCCGCCGCAGCCGACCATCATGCCGATCTCCATTGCCGATCGTGACTTCGGTGTTGACCGTATC GCCTGGCTGAAAAACTACGCCGGTATCGACTACTGGCGTCATCTGGTAGTAGGCGTTACCGCGCTTAGCAACGCG AATAAACCGTCCGTTTCTCCGGTAAAAGTTCTGTCAGACAAAATTACCCAGATTTACAGCGATATCAAACTGCCG AACAGCGCTTCTGTTGAACAAATCCAGAACAAAATGCAGGAGCTGAACGACGTGCTGGAAGAACTGCGCGACAGC TTCGACGGTTACATCGGCAACGCCTTTGCTAACCAGATTCAGCTGAACTTCCAGGCGACCGCTCAAGAAGCGGCA GCGGCAGCTGCTGTTCGCGCACTGAACGGTAACGATCAGATCATCCAACTGTACAAAGATCTTGTGAAACTCCAG CGTCATGCTGGCATTAAGAAAGCGATGGAGAAACTGGCGGCGCAGGAAACCGAGTTCGATCTGAGTATGATCGTG GGTCAGGTTAAACTGTATGCTGACCTGTTCACCACCGAATCTTTCTCCCTCGAGTGA

표 6

[0105]

ScaA-ucTSA56 fragment	Amino acid sequence
cScaA_F4-ucTSA56_V2 (서열번호33)	MKLFISYDKSVNKSSIFCSDIIFSHPEDTINILGNTDIKGNIGTKGNSGGKIIVRNNGTLTHSGGDIGNNKTSNS NSLQALLLCENASFISKPDSNSIPYTCNIKEITADKNSNIELNSNADWKTNIIPVGTGATVTMSQGSYSGNIGTK EKPMANVTLLPKSKRPSLIEVEGSVHTNQCSISDKSSAKGEVMLLGDYTVTAQTSDGSGSINVGNAKINLGLNTL TLASDNIIILGHKSKKGSSTNPEKFKKKPVTVFSINYTTNSDGTVKTQGKLKLSKYHDPNNKIIVNVNHQGDLRD LSKHGTQTVIQPVDIADTGGLNISNLVYICDGKCKWQLVPGSDGKFVFAGLVDKKKKDKGDDGASSSSGSSSVAP SARVSPEVSDDEEGSASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESTRLDSADADGKKHAPGFRAELGVMYLTN IKLTPPQPTIMPISIADRDFGVDRIAWLKNYAGIDYWRHLVVGVTALSNANKPSVSPVKVLSDKITQIYSDIKLP NSASVEQIQNKMQELNDVLEELRDSFDGYIGNAFANQIQLNFQATAQEAAAAAAVRALNGNDQIIQLYKDLVKLQ RHAGIKKAMEKLAAQETEFDLSMIVGQVKLYADLFTTESFSLE

[0107] F4, V2 및 F4V2를 암호화하는 각 핵산서열을 PCR로 증폭한 후 대장균 발현벡터인 pET-28a(+)플라즈미드에 클로닝하고, *Escherichia coli* BL21(DE3)에 도입하였다. 이 재조합 대장균을 Kanamicin(50㎍/ml)이 함유 된 LB

broth에서 OD600nm (Optical Density 600nm)의 값이 0.6-0.8에 도달 할 때까지 배양하였다. 이후, 0.1mM isopropyl β-D-thiogalactoside(IPTG)을 첨가 후, 16℃에서 18시간 동안 배양하여 단백질의 발현을 유도 하였다. 발현 유도가 끝난 균은, 10분 동안 1,000 x g의 속도로 원심분리 한 후 1mg/ml의 리소자임(lysozyme)을 포함하는 Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) His-결합 완충액(300mM NaCl, 50 mM sodium phosphate buffer, 10mM imidazole)에 현탁 시켜 4℃에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 얼음 위에서 5분간 초음파처리를 하였으며 이를 통해 얻어진 용해물을 1,600 x g로 4℃에서 20분간 원심 분리 하였다. 상층액을 수거하고 결합 완충액으로 미리 평형화시킨 Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) His-결합 레진(Resin)과 4℃에서 60분 동안 반응시켰다. 레진은 50mM imidazole이 포함 된 결합 완충액으로 세척 후, 250mM imidazole이 포함된 결합 완충액으로 단백질을 정제하였다. 이후, Free imidazole을 제거하기 위하여 인산완충액(pH7.4)에 4℃에서 18시간동안 투석 (Dialysis)을 진행하였으며, 정제된 단백질의 내독소(Endotoxin)을 제거하기 위해 Endotoxin removal resin을 사용하였다. 정제된 단백질 용액의 내독소 농도가 EU<0.05/dose 수준으로 제거되는 것을 LAL(Limulus amebocyte lysate) assay을 통해 확인 하였다. 추출한 단백질은 쿠마시 블루 염색(Coomasie blue stain)으로 확인 하였으며 그 결과를 [도 1]에 나타내었다(F4V2에 대한 것만 제시되어 있음).

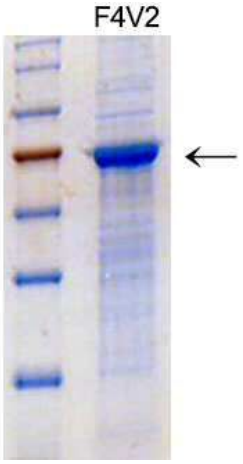
[0108] **<실험예> 마우스 백신 후 감염 실험**

[0109] 상기 제조된 재조합 항원인 F4+V2 (F4와 V2의 혼합 백신, 각 5 ㎍/mouse), 그리고 F4V2 (5 ㎍/mouse) 백신 항원을 C57BL/6(6-8주령,암컷) 생쥐들(n = 5/group)에 면역보강제와 함께 피하(Subcutaneous) 주사하여 2주 간격으로 3회 면역하고, 3차 면역 2 주, 후 3가지 O. tsutsugamushi 유전형 (Boryong, Karp, Kato) 균주(각각 1000 x LD50)를 복강으로 감염시켰다. 감염 후 한달간 감염된 생쥐들의 생존율을 분석하였다 [도 2].

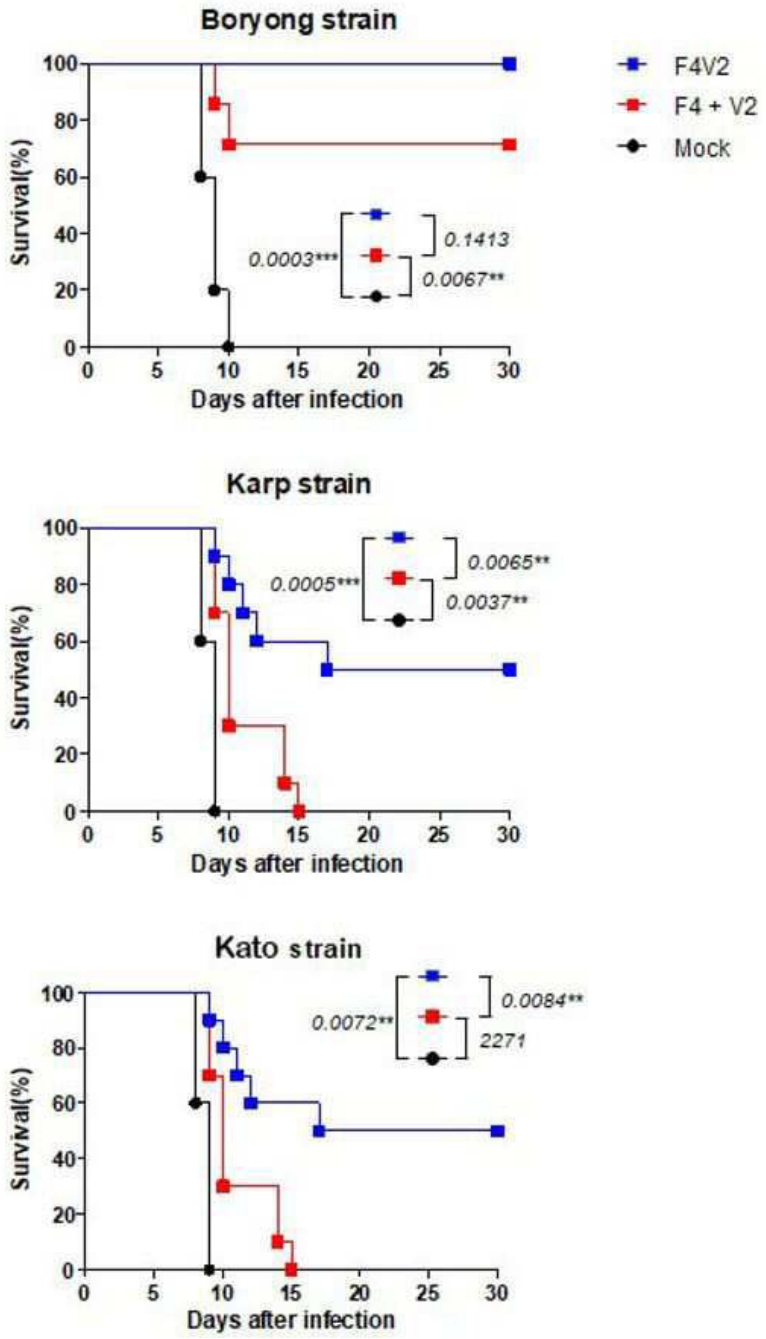
[0110] 생존율 결과를 통계학적으로 분석하였을 때 (Survivial test, Log-rank (Mantel-Cox) Test), 모든 균주 감염 실험에서 F4V2 면역그룹이 면역을 하지않은 그룹에(Mock) 비하여 통계학적으로 유의한 생존율 향상 효과를 보였으며, F4+V2 면역그룹은 Boryong과 Karp 균주 감염에 대하여 통계학적으로 유의한 생존율 향상 효과를 나타냈다. 한편, F4V2 면역그룹은 F4+V2 면역그룹에 비하여 Karp 및 Kato 균주 감염실험에서 통계학적으로 유의한 생존율 향상효과를 보였다.

도면

도면1



도면2



서 열 목 록

<110> CHO, NH

<120> Novel Recombinant Protein Antigens of Orientia tsutsugamushi and the Vaccine Composition Using the Same

<130> PP19-000

<160> 33

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 74

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB1

<400> 1

Met Lys Asn Ser Arg Lys Ile Ser Leu Ile Phe Phe Thr Thr Leu Phe
1 5 10 15

Thr Ile Ser Asn Ile Thr Ile Thr Gln Thr Ala Asp Asn Asp Pro Ser
20 25 30

Ala Ser Ser Ser Ser Ser Gly Gly Phe Thr Gly Ser Gly Ala Ser Gln
35 40 45

Ser Asn Asn Thr Thr Glu Ser Ser Asn Asp Asn Gln Gly Asp Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ala Thr Ser Asn Pro Ser Asn Pro
65 70

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB2

<400> 2

Ser Asn Pro Ser Asn Pro Ile Glu Gly Ala Ser
1 5 10

<210> 3

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB3

<400> 3

Gly Lys Lys Pro Lys Lys Ser Pro Phe Lys Lys Leu Lys Glu Phe Gly
1 5 10 15

Ser Thr Leu Ser Leu Ser Gly His Thr Lys Pro Glu Glu Pro Ser Glu
20 25 30

Gly Ala Thr Gly

35

<210> 4

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB4

<400> 4

Lys Gln Leu Ala Ser Ser Thr Leu Ser Leu Ser Ser Thr Thr Pro Glu

1 5 10 15

Glu Pro Lys Ala Pro Ile Val Leu Ser

20 25

<210> 5

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB5

<400> 5

Ser Asp Leu Lys Pro Thr Ser Pro Ile Thr Ser Ser Val Ser Met Pro

1 5 10 15

Asn Leu Ser Asp Thr Asp Val Ser Ser Ser Ser Ser Pro Pro Thr Arg

20 25 30

Arg Ser Ser Ser Ile Ile

35

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB6

<400> 6

Phe Asp Leu Ser Phe Phe Ser Ser Thr Thr His Gly Gly Lys Thr Glu

1 5 10 15

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB7

<400> 7

Phe Val Val Gln Ser Pro Thr Ile Val Ser Ser Asp Leu Lys Ile Cys
1 5 10 15

Gly Asn Ile

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB8

<400> 8

Gly Gly Lys Ile Ile Val Arg Asn Asn Gly Thr Leu Thr His
1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB9

<400> 9

Ser Gln Gly Ser Tyr Ser Gly Asn Ile Gly
1 5 10

<210> 10

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB10

<400> 10

Leu Leu Pro Lys Ser Lys Arg Pro Ser Leu Ile Glu Val Glu Gly Ser
1 5 10 15

Val His Thr Asn Gln Cys Ser Ile Ser

20 25

<210> 11

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB11

<400> 11

Lys Ser Lys Lys Gly Ser Ser Thr Asn Pro Glu Lys Phe Lys Lys Lys

1 5 10 15

Pro Val Thr Val Phe Ser Ile Asn Tyr Thr Thr Asn Ser Asp Gly Thr

20 25 30

Val

<210> 12

<211> 85

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB12

<400> 12

Phe Ala Gly Leu Val Asp Lys Lys Lys Lys Asp Lys Gly Asp Asp Gly

1 5 10 15

Ala Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Val Ala Pro Ser Ala Arg Val

20 25 30

Ser Pro Glu Val Ser Asp Asp Glu Glu Gly Gly Lys Gly Glu Asp Ile

35 40 45

Gln Ala Ser Thr Val Ser His Leu His Ser Lys Asp Ser Ala His Ser

50 55 60

Glu Gln Ser Gln Asp Lys Asp His Thr Glu Asp Pro Glu Asp Pro Thr

65 70 75 80

Glu Ala Ala Ile Glu

85

<210> 13

<211> 389

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cScaA_F4

<400> 13

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

Phe Cys Ser Asp Ile Ile Phe Ser His Pro Glu Asp Thr Ile Asn Ile
20 25 30

Leu Gly Asn Thr Asp Ile Lys Gly Asn Ile Gly Thr Lys Gly Asn Ser
35 40 45

Gly Gly Lys Ile Ile Val Arg Asn Asn Gly Thr Leu Thr His Ser Gly
50 55 60

Gly Asp Ile Gly Asn Asn Lys Thr Ser Asn Ser Asn Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

Leu Leu Leu Cys Glu Asn Ala Ser Phe Ile Ser Lys Pro Asp Ser Asn
85 90 95

Ser Ile Pro Tyr Thr Cys Asn Ile Lys Glu Ile Thr Ala Asp Lys Asn
100 105 110

Ser Asn Ile Glu Leu Asn Ser Asn Ala Asp Trp Lys Thr Asn Ile Ile
115 120 125

Pro Val Gly Thr Gly Ala Thr Val Thr Met Ser Gln Gly Ser Tyr Ser
130 135 140

Gly Asn Ile Gly Thr Lys Glu Lys Pro Met Ala Asn Val Thr Leu Leu
145 150 155 160

Pro Lys Ser Lys Arg Pro Ser Leu Ile Glu Val Glu Gly Ser Val His
165 170 175

Thr Asn Gln Cys Ser Ile Ser Asp Lys Ser Ser Ala Lys Gly Glu Val
180 185 190

Met Leu Leu Gly Asp Tyr Thr Val Thr Ala Gln Thr Ser Asp Gly Ser
195 200 205

Gly Ser Ile Asn Val Gly Asn Ala Lys Ile Asn Leu Gly Leu Asn Thr

210 215 220

Leu Thr Leu Ala Ser Asp Asn Ile Ile Ile Leu Gly His Lys Ser Lys

225 230 235 240

Lys Gly Ser Ser Thr Asn Pro Glu Lys Phe Lys Lys Lys Pro Val Thr

245 250 255

Val Phe Ser Ile Asn Tyr Thr Thr Asn Ser Asp Gly Thr Val Lys Thr

260 265 270

Gln Gly Lys Leu Lys Leu Ser Lys Tyr His Asp Pro Asn Asn Lys Ile

275 280 285

Ile Val Asn Val Asn His Gln Gly Asp Leu Arg Asp Leu Ser Lys His

290 295 300

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

305 310 315 320

Leu Asn Ile Ser Asn Leu Val Tyr Ile Cys Asp Gly Lys Cys Lys Trp

325 330 335

Gln Leu Val Pro Gly Ser Asp Gly Lys Phe Val Phe Ala Gly Leu Val

340 345 350

Asp Lys Lys Lys Lys Asp Lys Gly Asp Asp Gly Ala Ser Ser Ser Ser

355 360 365

Gly Ser Ser Ser Val Ala Pro Ser Ala Arg Val Ser Pro Glu Val Ser

370 375 380

Asp Asp Glu Glu Gly

385

<210> 14

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Karp_C

<400> 14

Ser Ala Ser Ala Ile Glu Leu Gly Asp Glu Gly Gly Leu Glu Cys Gly

1 5 10 15

Pro Tyr Ala Lys Val Gly Val Val Gly Gly Met Ile Thr Gly Val Glu

20 25 30

Ser Thr Arg Leu Asp Pro Ala Asp Ala Asp Gly Lys Lys His Leu Ser

35 40 45

Leu Thr Thr Gly Leu Pro Phe Gly Gly Thr Leu Ala Ala Gly Met Thr

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Lys Leu Thr Pro Pro Gln Pro Thr Ile Met Pro Ile Ser Ile Ala

85 90 95

Asp Arg Asp Phe Gly Ile Asp Arg Ile Ala Trp Leu Lys Asn Cys Ala

100 105 110

Gly Ile Asp Tyr Trp Arg His Leu Val Val Gly Leu Ala Ala Leu Ser

115 120 125

Asn Ala Asn Lys Pro Ser Ala Ser Pro Val Lys Val Leu Ser Asp Lys

130 135 140

Ile Thr Gln Ile Tyr Ser Asp Ile Lys Leu Pro Asn Ser Ala Ser Val

145 150 155 160

Glu Gln Ile Gln Asn Lys Met Gln Glu Leu Asn Asp Val Leu Glu Glu

165 170 175

Leu Arg Asp Ser Phe Asp Gly Tyr Ile Ser Asn Ala Phe Ala Asn Gln

180 185 190

Ile Gln Leu Asn Phe Gln Ala Thr Ala Gln Glu Ala Val Ala Ala Ala

195 200 205

Ala Val Arg Leu Leu Asn Gly Asn Asp Gln Ile Ala Gln Leu Tyr Lys

210 215 220

Asp Leu Val Lys Leu Gln Arg His Ala Gly Ile Lys Lys Ala Met Glu

225 230 235 240

Lys Leu Ala Ala Gln Glu Ala Glu Phe Asp Leu Ser Met Ile Val Gly

245 250 255

Gln Val Lys Leu Tyr Ala Asp Val Met Thr Thr Glu Ser Phe Ser

260 265 270

<210> 15

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Karp_B

<400> 15

Ser Ala Ser Ala Ile Glu Leu Gly Asp Glu Gly Gly Leu Glu Cys Gly
1 5 10 15

Pro Tyr Gly Lys Val Gly Ile Val Gly Gly Met Ile Thr Gly Val Glu
20 25 30

Ser Thr Arg Leu Asp Ser Ala Asp Ala Glu Gly Lys Lys Arg Leu Pro
35 40 45

Leu Thr Thr Ser Met Pro Phe Gly Gly Thr Leu Ala Ala Gly Met Thr
50 55 60

Ile Ala Gln Gly Phe Arg Ala Glu Leu Gly Val Met Tyr Leu Thr Asn
65 70 75 80

Ile Lys Leu Thr Pro Pro Gln Pro Thr Ile Met Pro Ile Ser Ile Ala
85 90 95

Asp Arg Asp Phe Gly Ile Asp Arg Ile Ala Trp Leu Lys Asn Tyr Ala
100 105 110

Gly Ile Asp Tyr Trp Arg His Leu Val Val Gly Leu Ala Ala Leu Ser
115 120 125

Asn Ala Asn Lys Pro Ser Ala Ser Pro Val Lys Val Leu Ser Asp Lys
130 135 140

Ile Thr Gln Ile Tyr Ser Asp Val Lys Leu Pro Asn Ser Ala Ser Val
145 150 155 160

Glu Gln Ile Gln Asn Lys Met Gln Glu Leu Asn Asp Leu Leu Glu Glu
165 170 175

Leu Arg Glu Ser Phe Asp Gly Tyr Leu Gly Gly Asn Ala Phe Ala Asn
180 185 190

Gln Ile Gln Leu Asn Phe Gln Ala Thr Ala Gln Glu Ala Val Ala Ala
195 200 205

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

260 265 270

<210> 16
<211> 272
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Karp_A
<400> 16
Ser Ala Ser Ala Ile Glu Leu Gly Asp Glu Gly Gly Leu Glu Cys Gly
1 5 10 15
Pro Tyr Ala Lys Val Gly Val Val Gly Gly Met Ile Thr Gly Val Glu
20 25 30
Ser Thr Arg Leu Asp Pro Ala Asp Ala Asp Gly Lys Lys His Leu Pro
35 40 45

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

115 120 125
Asn Ala Asn Lys Pro Ser Ala Ser Pro Val Lys Val Leu Ser Asp Lys
130 135 140

Ile Thr Gln Ile Tyr Ser Asp Ile Lys Leu Pro Asn Ser Ala Ser Val
145 150 155 160
Glu Gln Ile Gln Asn Lys Met Gln Glu Leu Asn Asp Val Leu Glu Glu
165 170 175
Leu Arg Glu Ser Phe Asp Gly Tyr Leu Gly Gly Asn Ala Phe Ala Asn
180 185 190

Gln Ile Gln Leu Asn Phe Gln Ala Thr Ala Gln Glu Ala Val Ala Ala
195 200 205
Ala Ala Val Arg Leu Leu Asn Gly Asn Asp Gln Ile Glu Gln Leu Tyr
210 215 220
Lys Asp Leu Val Lys Leu Gln Arg His Ala Gly Ile Lys Lys Ala Met
225 230 235 240
Glu Lys Leu Ala Ala Gln Glu Ala Glu Phe Asp Leu Ser Met Ile Val
245 250 255
Gly Gln Val Lys Leu Tyr Ala Asp Val Met Ile Thr Glu Ser Phe Ser
260 265 270

<210> 17
<211> 272
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Saitama
<400> 17
Ser Ala Ser Ala Ile Glu Leu Gly Asp Glu Gly Gly Leu Glu Cys Gly
1 5 10 15
Pro Tyr Ala Lys Val Gly Val Val Gly Gly Met Ile Thr Gly Ala Glu
20 25 30
Ser Ala Arg Leu Asp Gln Ala Asp Thr Thr Gly Lys Lys His Leu Pro
35 40 45

Leu Thr Thr Ser Met Pro Phe Gly Gly Thr Leu Asn Ala Gly Ile Thr
50 55 60
Ile Thr Pro Trp Leu Arg Ala Glu Leu Gly Val Met Tyr Leu Arg Asn
65 70 75 80

Ile Lys Leu Thr Pro Pro Gln Pro Thr Ile Met Pro Ile Ser Ile Ala
85 90 95
Asp Arg Asp Phe Ala Ile Asp Arg Val Ala Trp Leu Lys Asn Tyr Ala
100 105 110
Gly Ile Asp Tyr Trp Arg Tyr Met Val Ile Gly Leu Ala Ala Leu Ser

115 120 125
Asn Ala Asn Lys Pro Ser Asp Pro Pro Val Lys Val Leu Ser Asp Lys
130 135 140
Ile Thr Gln Ile Tyr Asn Asp Ile Arg Leu Pro Asn Ser Ala Ser Val
145 150 155 160
Glu Gln Ile Gln Asn Lys Met Gln Glu Leu Asn Glu Leu Leu Glu Glu
165 170 175
Val Arg Asp Ser Phe Glu Gly Tyr Ile Gly Gly Asn Ala Phe Ala Asn
180 185 190

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

260 265 270
<210> 18
<211> 271
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Boryong
<400> 18
Ser Ala Ser Ala Ile Glu Leu Glu Asp Glu Val Gly Leu Glu Cys Gly
1 5 10 15

Pro Tyr Ala Lys Val Gly Val Val Gly Gly Met Ile Thr Gly Ala Glu
20 25 30
Ser Thr Arg Leu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Gly Lys Lys His Leu Ser
35 40 45

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

115 120 125
Asn Ala Asn Lys Pro Ser Ala Ser Pro Val Lys Val Leu Ser Asp Lys
130 135 140
Ile Ile Gln Ile Tyr Ser Asp Ile Lys Leu Pro Asn Ser Ala Ser Ile
145 150 155 160
Glu Gln Ile Gln Ser Lys Ile Gln Glu Leu Gly Asp Thr Leu Glu Glu
165 170 175
Leu Arg Asp Ser Phe Asp Gly Tyr Ile Asn Asn Ala Phe Val Asn Gln
180 185 190

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

260 265 270

<210> 19

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JG_C

<400> 19

Ser Ala Ser Ala Ile Glu Leu Gly Asp Glu Gly Gly Leu Glu Cys Gly
1 5 10 15

Pro Tyr Ala Lys Val Gly Val Val Gly Gly Met Ile Thr Gly Val Glu
20 25 30

Ser Thr Arg Leu Asp Pro Ala Asp Ala Asp Gly Lys Lys His Leu Pro
35 40 45

Leu Thr Thr Ser Met Pro Phe Gly Gly Thr Leu Ala Ala Gly Met Thr
50 55 60

Ile Ala Pro Gly Phe Arg Ala Glu Leu Gly Val Met Tyr Leu Arg Asn
65 70 75 80

Ile Lys Leu Thr Pro Pro Gln Pro Thr Ile Met Pro Ile Ser Ile Ala
85 90 95

Asp Arg Asp Glu Gly Val Asp Arg Ile Ala Trp Leu Lys Asn Tyr Ala
100 105 110

Gly Ile Asp Tyr Trp Arg His Leu Val Val Gly Val Thr Ala Leu Ser

115 120 125

His Ala Asn Lys Pro Ser Val Thr Pro Val Lys Val Leu Ser Asp Lys
130 135 140

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

Glu Gln Ile Gln Ala Lys Met Glu Glu Leu Asn Asn Ile Leu Glu Glu
165 170 175

Leu Arg Glu Ser Phe Asp Gly Tyr Leu Ala Asn Ala Phe Ala Asn Gln
180 185 190

Ile Gln Leu Asn Phe Gln Val Thr Ala Gln Asp Ala Ala Ala Ala Ala

195 200 205

Ala Val Arg Ala Leu Asn Gly Asn Glu Gln Ile Ile Gln Leu Tyr Lys

210 215 220

Asp Leu Val Lys Leu Gln Arg His Ala Gly Ile Arg Lys Ala Met Glu

225 230 235 240

Gln Leu Ala Val Gln Glu Thr Glu Phe Asp Leu Ser Met Ile Val Gly

245 250 255

Gln Val Lys Leu Tyr Ala Asp Leu Phe Thr Thr Glu Ser Phe Ser

260 265 270

<210> 20

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Kawasaki

<400> 20

Ser Ala Ser Ala Ile Glu Leu Gly Asp Glu Gly Val Leu Glu Cys Gly

1 5 10 15

Pro Tyr Ala Lys Ile Gly Val Val Gly Gly Met Val Thr Gly Val Glu

20 25 30

Ser Ala Arg Leu Asp Pro Ala Asp Val Asp Cys Lys Lys His Leu Ser

35 40 45

Leu Thr Thr Met Leu Pro Phe Gly Gly Thr Leu Ala Ala Gly Met Thr

50 55 60

Ile Ala Pro Gly Phe Arg Ala Glu Leu Gly Val Met Tyr Leu Arg Asn

65 70 75 80

Ile Lys Leu Thr Pro Pro Gln Pro Thr Ile Met Pro Ile Ser Ile Ala

85 90 95

Asp Arg Asp Leu Gly Val Asp Arg Ile Ala Trp Leu Lys Asn Tyr Ala

100 105 110

Gly Ile Asp Tyr Trp Arg Tyr Leu Val Val Gly Val Thr Ala Leu Ser

115 120 125

Asn Ala Asn Lys Pro Ser Val Ser Ser Val Lys Val Leu Ser Asp Lys

130 135 140

Ile Thr Gln Ile Tyr Ser Asp Ile Arg Leu Pro Asn Ser Ala Ser Val
145 150 155 160
Glu Gln Ile Gln Thr Lys Met Gln Glu Leu Asn Asp Val Leu Glu Glu
165 170 175
Leu Arg Glu Ser Phe Asp Gly Tyr Leu Ala Asn Ala Phe Ala Asn Gln
180 185 190

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

260 265 270

<210> 21
<211> 273
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> JG_B
<400> 21
Ser Ala Ser Ala Met Glu Phe Gly Asp Glu Gly Gly Gly Gly Leu Glu
1 5 10 15
Cys Gly Pro Tyr Ala Lys Val Gly Val Val Gly Gly Met Ile Thr Gly
20 25 30
Val Glu Ser Thr Arg Leu Asp Ser Ala Asp Ala Gly Gly Lys Arg Tyr
35 40 45

Leu Pro Leu Thr Thr Gly Leu Pro Phe Gly Gly Thr Leu Ala Ala Gly
50 55 60
Met Thr Ile Ala Pro Gly Phe Arg Ala Glu Leu Gly Val Met Tyr Leu

65 70 75 80

Arg Asn Ile Lys Leu Val Pro Pro Gln Pro Thr Ile Met Pro Ile Ser

85 90 95

Ile Ala Asp Arg Asp Val Gly Val Asp Arg Ile Ala Trp Leu Lys Asn

100 105 110

Tyr Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Arg His Leu Val Val Gly Val Thr Ala

115 120 125

Leu Ser His Ala Asn Lys Pro Ser Val Thr Pro Val Lys Val Leu Ser

130 135 140

Asp Lys Ile Thr Lys Ile Tyr Ser Asp Ile Arg Leu Pro Asn Ser Ala

145 150 155 160

Ser Val Glu Gln Ile Gln Ala Lys Met Gln Glu Leu Asn Asn Val Leu

165 170 175

Glu Glu Leu Arg Glu Ser Phe Glu Gly Tyr Leu Ala Asn Ala Phe Ala

180 185 190

Asn Gln Ile Gln Leu Asn Phe Gln Val Thr Ala Gln Glu Ala Ala Ala

195 200 205

Ala Ala Ala Val Arg Ala Leu Asn Gly Asn Glu Gln Ile Ile Gln Leu

210 215 220

Tyr Lys Asp Leu Val Lys Leu Gln Arg His Ala Gly Ile Ser Lys Ala

225 230 235 240

Met Glu Gln Leu Ala Ala Gln Glu Thr Glu Phe Asp Leu Ser Met Val

245 250 255

Val Gly Gln Val Lys Leu Tyr Ala Asp Leu Val Ala Thr Glu Ser Phe

260 265 270

Ser

<210> 22

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JG_A

<400> 22

Leu Ala Ser Ala Ile Glu Leu Gly Asp Glu Gly Gly Leu Glu Cys Gly
1 5 10 15

Pro Tyr Ala Lys Val Gly Val Val Gly Gly Met Ile Thr Gly Val Glu
20 25 30

Ser Thr Arg Leu Asp Ser Ala Asp Ala Asp Gly Lys Lys His Leu Ser
35 40 45

Leu Ile Thr Gly Ile Pro Phe Gly Gly Thr Leu Ala Ala Gly Met Thr
50 55 60

Ile Ala Pro Gly Phe Arg Ala Glu Leu Gly Val Met Tyr Leu Arg Asn
65 70 75 80

Ile Lys Leu Thr Pro Pro Gln Pro Thr Ile Met Pro Ile Ser Ile Ala
85 90 95

Asp Arg Asp Val Gly Val Asp Arg Ile Ala Trp Leu Lys Asp Tyr Ala
100 105 110

Gly Ile Asp Tyr Trp Arg His Leu Val Val Gly Val Thr Ala Leu Ser
115 120 125

His Ala Asn Lys Pro Ser Val Thr Pro Val Lys Val Leu Ser Asp Lys
130 135 140

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

Glu Gln Ile Gln Ala Lys Met Gln Glu Leu Asn Asn Val Leu Glu Glu
165 170 175

Leu Arg Glu Ser Phe Asp Gly Tyr Leu Ala Asn Ala Phe Val Asn Gln
180 185 190

Ile Gln Leu Asn Phe Gln Val Thr Ala Gln Glu Ala Ala Ala Ala Ala
195 200 205

Ala Val Arg Ala Leu Asn Gly Asn Glu Gln Ile Ile Gln Leu Tyr Lys
210 215 220

Asp Leu Val Lys Leu Gln Arg His Ala Gly Ile Arg Lys Ala Met Glu
225 230 235 240

Gln Leu Ala Ala Gln Glu Thr Glu Phe Asp Leu Ser Met Ile Val Gly

245 250 255

Gln Val Lys Leu Tyr Ala Asp Leu Phe Thr Thr Glu Ser Phe Ser

260 265 270

<210> 23

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gilliam

<400> 23

Ser Ala Ser Ala Ile Glu Leu Gly Glu Glu Gly Gly Leu Glu Cys Gly
1 5 10 15

Pro Tyr Gly Lys Val Gly Ile Val Gly Gly Met Ile Thr Gly Ala Glu
20 25 30

Ser Thr Arg Leu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Gly Lys Lys His Leu Ser
35 40 45

Leu Thr Thr Gly Leu Pro Phe Gly Gly Thr Leu Ala Ala Gly Met Thr
50 55 60

Ile Ala Pro Gly Phe Arg Ala Glu Leu Gly Val Met Tyr Leu Arg Asn
65 70 75 80

Ile Lys Leu Thr Pro Pro Gln Pro Thr Ile Met Pro Ile Ser Ile Ala
85 90 95

Asp Arg Asp Val Gly Val Asp Arg Ile Ala Trp Leu Lys Asn Tyr Ala
100 105 110

Gly Ile Asp Tyr Trp Arg His Leu Val Val Gly Val Thr Ala Leu Ser

115 120 125

His Ala Asn Lys Pro Ser Val Thr Pro Val Lys Val Leu Ser Asp Lys
130 135 140

Ile Thr Lys Ile Tyr Ser Asp Ile Lys Leu Pro Asn Ser Ala Ser Val
145 150 155 160

Glu Gln Ile Gln Ser Lys Met Gln Glu Leu Asn Asp Val Leu Glu Asp
165 170 175

Leu Arg Asp Ser Phe Asp Gly Tyr Met Gly Asn Ala Phe Ala Asn Gln

180 185 190

Ile Gln Leu Asn Phe Gln Ala Thr Ala Gln Glu Ala Val Ala Ala Ala
195 200 205

Ala Val Arg Leu Leu Asn Gly Asn Asp Gln Ile Ala Gln Leu Tyr Lys
210 215 220

Asp Leu Val Lys Leu Gln Arg His Ala Gly Val Lys Lys Ala Met Glu
225 230 235 240

Lys Leu Ala Ala Gln Glu Thr Glu Phe Asp Leu Ser Met Ile Val Gly
245 250 255

Gln Val Lys Leu Tyr Ala Asp Leu Phe Thr Thr Glu Ser Phe Ser
260 265 270

<210> 24

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TD

<400> 24

Ser Ala Ser Ala Ile Glu Leu Gly Asp Glu Gly Gly Leu Glu Cys Gly
1 5 10 15

Pro Tyr Ala Lys Val Gly Val Val Gly Gly Ile Ile Thr Gly Val Glu
20 25 30

Ser Ala Arg Leu Asp Pro Ala Asp Thr Asn Gly Lys Lys Leu Leu Pro
35 40 45

Leu Thr Thr Ser Met Pro Phe Gly Gly Thr Leu Ala Ala Gly Met Thr
50 55 60

Ile Ala Gln Gly Phe Arg Ala Glu Leu Gly Val Met Tyr Leu Arg Asn
65 70 75 80

Ile Lys Ile Thr Pro Pro Gln Pro Thr Ile Met Ser Ile Ser Ile Ala
85 90 95

Asp Arg Asn Ala Gly Val Asp Arg Ile Ala Trp Leu Arg Asn Tyr Ala
100 105 110

Gly Ile Glu Tyr Trp Arg His Leu Val Val Gly Val Ala Ala Met Ser

115 120 125

Asn Ala Asn Lys Pro Ser Thr Ser Ala Val Lys Val Leu Gly Asp Lys

130 135 140

Ile Ser Gln Ile Tyr Cys Asp Ile Lys Leu Pro Asn Ser Ala Ser Val

145 150 155 160

Glu Gln Ile Gln Gly Lys Met Gln Glu Leu Gly Asp Ile Leu Glu Ala

165 170 175

Leu Arg Asp Ser Phe Glu Gly Tyr Ile Ala Asn Ala Phe Ala Asn Gln

180 185 190

Ile Gln Leu Asn Phe Gln Val Thr Ala Gln Glu Ala Val Ala Ala Ala

195 200 205

Ala Val Arg Ala Leu Asn Arg Asn Glu Gln Ile Ala Gln Leu Tyr Lys

210 215 220

Asp Leu Val Lys Leu Gln Arg His Ala Gly Ile Arg Lys Ala Met Glu

225 230 235 240

Lys Leu Ala Ala Gln Glu Thr Glu Phe Asp Leu Ser Met Ile Val Gly

245 250 255

Gln Val Lys Leu Tyr Ala Asp Leu Met Thr Thr Glu Ser Phe Ser

260 265 270

<210> 25

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TA763_B

<400> 25

Ser Ala Ser Ala Ile Glu Leu Gly Asp Glu Gly Gly Leu Glu Cys Gly

1 5 10 15

Pro Tyr Ala Lys Val Gly Ile Val Gly Gly Met Ile Thr Gly Ala Glu

20 25 30

Ser Thr Arg Leu Asp Ser Ser Asp Ala Glu Gly Lys Lys Arg Leu Ser

35 40 45

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

115 120 125
Asn Ala Asn Lys Pro Ser Ala Ser Pro Val Lys Val Leu Ser Asp Lys
130 135 140
Ile Thr Lys Ile Tyr Ser Asp Ile Lys Leu Pro Asn Ser Ala Ser Ile
145 150 155 160
Glu Gln Ile Gln Arg Lys Met Gln Glu Leu Asn Asp Val Leu Glu Gly
165 170 175
Leu Arg Asp Ala Phe Asp Gly Tyr Ile Asn Asn Ala Phe Val Asp Gln
180 185 190

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

260 265 270

<210> 26

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TA763_A

<400> 26

Ser Ala Ser Ala Ile Glu Leu Gly Asp Glu Gly Gly Leu Glu Cys Gly
1 5 10 15

Pro Tyr Ala Lys Val Gly Val Val Gly Gly Met Ile Thr Gly Val Glu
20 25 30

Ser Ala Arg Leu Asp Pro Ala Asp His Glu Gly Lys Lys His Leu Pro
35 40 45

Leu Thr Thr Ser Met Pro Phe Gly Gly Thr Leu Ala Ala Gly Met Thr
50 55 60

Ile Ala Gln Gly Phe Arg Ala Glu Leu Gly Val Met Tyr Leu Arg Asn
65 70 75 80

Ile Lys Leu Thr Pro Pro Gln Pro Thr Ile Met Pro Ile Ser Ile Ala
85 90 95

Asp Arg Asp Phe Gly Val Asp Arg Ile Ala Trp Leu Lys Glu Tyr Ala
100 105 110

Gly Ile Asp Tyr Trp Arg His Leu Val Val Gly Val Thr Ala Leu Ser

115 120 125

Asn Ala Asn Lys Pro Ser Ala Ser Pro Val Lys Ile Leu Ser Glu Lys
130 135 140

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

Glu Gln Ile Gln Ser Lys Met Gln Glu Leu Ser Asp Leu Leu Glu Glu
165 170 175

Leu Arg Asp Ser Phe Asp Gly Tyr Ile Ser Asn Ala Phe Ala Gly Gln
180 185 190

Ile Gln Leu Asn Phe Gln Ala Thr Ala Gln Glu Ala Val Ala Ala Ala

195 200 205

Ala Val Arg Leu Leu Asn Gly Asn Asp Gln Ile Ala Gln Leu Tyr Lys
210 215 220

Asp Leu Val Lys Leu Gln Arg His Ala Gly Ile Arg Lys Ala Met Glu
225 230 235 240
Lys Leu Ala Ala Gln Glu Thr Glu Phe Asp Leu Ser Met Ile Val Gly
245 250 255
Gln Val Lys Leu Tyr Ala Asp Leu Met Thr Thr Glu Ser Phe Ser

260 265 270

<210> 27
<211> 272
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Kato_B
<400> 27
Ser Ala Ser Ala Ile Glu Leu Gly Asp Glu Gly Gly Leu Glu Cys Gly
1 5 10 15
Pro Tyr Ala Lys Val Gly Val Val Gly Gly Met Ile Thr Gly Val Glu
20 25 30
Ser Thr Arg Leu Asp Pro Ala Asp Ala Gly Gly Lys Lys His Leu Pro
35 40 45

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

115 120 125
Asn Ala Asn Lys Pro Ser Val Ser Pro Val Lys Val Leu Ser Asp Lys
130 135 140
Ile Val Gln Ile Tyr Arg Asp Val Lys Leu Pro Asn Ser Ala Ser Val
145 150 155 160

Glu Gln Ile Gln Asn Lys Met Gln Glu Leu Asn Asp Ile Leu Asp Asp
165 170 175
Ile Arg Asp Ser Phe Asp Gly Cys Ile Gly Gly Asn Ala Phe Ala Asn
180 185 190

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

260 265 270

<210> 28
<211> 271
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Kato_A
<400> 28
Ser Ala Ser Ala Ile Glu Leu Gly Glu Glu Gly Gly Leu Glu Cys Gly
1 5 10 15
Pro Tyr Ala Lys Val Gly Val Val Gly Gly Met Ile Thr Gly Val Glu
20 25 30
Ser Thr Arg Leu Asp Pro Ala Asp Val Asp Gly Lys Lys His Leu Pro
35 40 45

Leu Thr Thr Gly Leu Pro Phe Gly Gly Thr Leu Ala Ala Gly Met Thr
50 55 60
Ile Ala Pro Gly Phe Arg Ala Glu Leu Gly Val Met Tyr Leu Thr Asn
65 70 75 80
Ile Lys Leu Thr Pro Pro Gln Pro Thr Ile Met Pro Ile Ser Ile Ala
85 90 95

Asp Arg Asp Phe Gly Val Asp Arg Ile Ala Trp Leu Lys Glu Tyr Ala
100 105 110
Gly Ile Asp Tyr Trp Arg Asp Met Val Val Gly Ile Thr Ala Met Ser

115 120 125
Asn Ala Asn Lys Pro Ser Ala Ser Pro Ile Lys Val Leu Ser Asp Lys
130 135 140
Ile Ser Gln Ile Tyr Asp Asp Ile Arg Leu Pro Asn Ser Ala Ser Val
145 150 155 160
Glu Gln Ile Gln Ser Lys Met Gln Glu Leu Ser Glu Thr Leu Glu Glu
165 170 175
Leu Arg Glu Ser Phe Asp Gly Cys Ile Gly Asn Ala Phe Ala Asn Gln
180 185 190

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

260 265 270
<210> 29
<211> 272
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Shimokashi
<400> 29
Ser Ala Asn Ala Ile Glu Phe Asp Glu Asn Ser Leu Glu Cys Gly Pro
1 5 10 15
Tyr Ala Lys Val Gly Ile Val Gly Gly Val Leu Ser Gly Val Glu Ser
20 25 30

Ala Arg Leu Asp Pro Ala Asp Ser Glu Gly Lys Lys His Leu Pro Leu
35 40 45

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

115 120 125
Ala Asn Lys Pro Asn Val Ser Ala Val Lys Ile Leu Ser Asp Lys Ile
130 135 140
Ser Gln Ile Tyr Ala Asp Ile Lys Leu Pro Asp Ser Ala Ser Val Asp
145 150 155 160
Gln Ile Gln Asn Lys Val Gln Glu Leu Asn Lys Val Leu Glu Asp Val
165 170 175
Arg Glu Ser Phe Asp Gly Phe Ile Leu Asn Ala Phe Ala Gln Pro Val
180 185 190

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

260 265 270
<210> 30

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TA586

<400> 30

Ser Ala Ser Ala Ile Glu Leu Gly Asp Glu Gly Gly Leu Glu Cys Gly
1 5 10 15

Pro Tyr Ala Arg Val Gly Val Val Gly Gly Met Ile Thr Gly Val Glu
20 25 30

Ser Thr Arg Leu Asp Ser Thr Asp Pro Glu Gly Lys Lys His Leu Ser
35 40 45

Leu Thr Thr Gly Leu Pro Phe Gly Gly Thr Leu Ala Ala Gly Met Thr
50 55 60

Ile Ala Pro Gly Phe Arg Ala Glu Leu Gly Val Met Tyr Leu Arg Asn
65 70 75 80

Ile Lys Leu Thr Pro Pro Pro Ala Ile Val Met Pro Ile Ser Ile Ala
85 90 95

Asp Arg Asp Leu Gly Val Asp Arg Ile Ala Trp Leu Lys Glu Tyr Ala
100 105 110

Gly Ile Asp Tyr Trp Arg His Leu Val Val Gly Ile Ala Ala Leu Ser
115 120 125

Asn Ala Asn Lys Pro Asn Ala Ser Pro Val Lys Val Leu Ser Asp Lys
130 135 140

Ile Ser Gln Ile Tyr Lys Asp Ile Lys Leu Ala Asn Ser Ala Ser Val
145 150 155 160

Glu Gln Ile Gln Ser Lys Met Gln Glu Leu Asn Asp Ile Leu Glu Asp
165 170 175

Leu Arg Glu Ser Phe Asp Gly Tyr Ile Ser Asn Ala Phe Ala Asn Gln
180 185 190

Ile Gln Leu Asp Phe His Ala Thr Ala Gln Glu Ala Ala Ala Ala Ala
195 200 205

Ala Val Arg Val Leu Asn Asn Asn Glu Gln Ile Ile Gln Leu Tyr Lys

210 215 220

Asp Leu Val Lys Leu Lys Arg His Ala Gly Ile Arg Lys Ala Met Glu

225 230 235 240

Gln Leu Ala Ala Gln Glu Thr Glu Phe Asp Leu Ser Met Ile Val Gly

245 250 255

Gln Val Lys Leu Tyr Ala Asp Val Phe Thr Thr Glu Ser Phe Ser

260 265 270

<210> 31

<211> 254

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ucTSA56_V2

<400> 31

Ser Ala Ser Ala Ile Glu Leu Gly Asp Glu Gly Gly Leu Glu Cys Gly

1 5 10 15

Pro Tyr Ala Lys Val Gly Val Val Gly Gly Met Ile Thr Gly Val Glu

20 25 30

Ser Thr Arg Leu Asp Ser Ala Asp Ala Asp Gly Lys Lys His Ala Pro

35 40 45

Gly Phe Arg Ala Glu Leu Gly Val Met Tyr Leu Thr Asn Ile Lys Leu

50 55 60

Thr Pro Pro Gln Pro Thr Ile Met Pro Ile Ser Ile Ala Asp Arg Asp

65 70 75 80

Phe Gly Val Asp Arg Ile Ala Trp Leu Lys Asn Tyr Ala Gly Ile Asp

85 90 95

Tyr Trp Arg His Leu Val Val Gly Val Thr Ala Leu Ser Asn Ala Asn

100 105 110

Lys Pro Ser Val Ser Pro Val Lys Val Leu Ser Asp Lys Ile Thr Gln

115 120 125

Ile Tyr Ser Asp Ile Lys Leu Pro Asn Ser Ala Ser Val Glu Gln Ile

130 135 140

Gln Asn Lys Met Gln Glu Leu Asn Asp Val Leu Glu Glu Leu Arg Asp

145 150 155 160

Ser Phe Asp Gly Tyr Ile Gly Asn Ala Phe Ala Asn Gln Ile Gln Leu

165 170 175

Asn Phe Gln Ala Thr Ala Gln Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Val Arg

180 185 190

Ala Leu Asn Gly Asn Asp Gln Ile Ile Gln Leu Tyr Lys Asp Leu Val

195 200 205

Lys Leu Gln Arg His Ala Gly Ile Lys Lys Ala Met Glu Lys Leu Ala

210 215 220

Ala Gln Glu Thr Glu Phe Asp Leu Ser Met Ile Val Gly Gln Val Lys

225 230 235 240

Leu Tyr Ala Asp Leu Phe Thr Thr Glu Ser Phe Ser Leu Glu

245 250

<210> 32

<211> 1932

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cScaA_F4-ucTSA56_V2_N

<400> 32

atgaaactgt tcatctctta cgacaaatct gttaacaaat cttctatctt ctgctctgac 60

atcatcttct ctcacccgga agacaccatc aacatcctgg gtaacaccga catcaaaggt 120

aacatcggta ccaaaggtaa ctctggtggt aaaatcatcg ttcgtaacaa cggtaccctg 180

acccactctg gtggtgacat cggtaacaac aaaacctcta actctaactc tctgcaggcg 240

ctgctgctgt gcgaaaacgc gtctttcatc tctaaaccgg actctaactc tatcccgtac 300

acctgcaaca tcaaagaaat caccgcggac aaaaactcta acatcgaact gaactctaac 360

gcggactgga aaaccaacat catcccggtt ggtaccggtg cgaccgttac catgtctcag 420

ggttcttact ctggtaacat cggtaccaaa gaaaaaccga tggcgaacgt taccctgctg 480

ccgaaatcta aacgtccgtc tctgatcgaa gttgaaggtt ctgttcacac caaccagtgc 540

tctatctctg acaaatcttc tgcgaaaggt gaagttatgc tgctgggtga ctacaccgtt 600

accgcgcaga cctctgacgg ttctggttct atcaacgttg gtaacgcgaa aatcaacctg 660

ggtctgaaca ccctgaccct ggcgtctgac aacatcatca tcctgggtca caaatctaaa 720

aaaggttctt ctaccaaccc ggaaaaattc aaaaaaaaac cggttaccgt tttctctatc 780

aactacacca ccaactctga cggtaccgtt aaaacccagg gtaaactgaa actgtctaaa 840

taccacgacc cgaacaacaa aatcatcgtt aacgttaacc accagggtga cctgcgtgac 900

ctgtctaaac acggtaccca gaccgttatc cagccggttg acatcgcgga caccggtggt 960

ctgaacatct ctaacctggt ttacatctgc gacggtaaat gcaaatggca gctggttccg 1020

ggttctgacg gtaaattcgt tttcgcgggt ctggttgaca aaaaaaaaaa agacaaaggt 1080

gacgacggtg cgtcttcttc ttctggttct tcttctgttg cgccgtctgc gcgtgtttct 1140

ccggaagttt ctgacgacga agaaggttct gccagcgcga tcgaactggg tgacgaaggc 1200

ggtctggaat gtggcccgta tgcgaaagtg ggcgtagttg gcggcatgat taccggcgtc 1260

gagtccaccc gtctggattc tgcggatgct gatggtaaaa aacacgcgcc gggcttccgt 1320

gctgaactgg gcgtgatgta cctgaccaac atcaagctga ctccgccgca gccgaccatc 1380

atgccgatct ccattgccga tcgtgacttc ggtgttgacc gtatcgcctg gctgaaaaac 1440

tacgccggta tcgactactg gcgtcatctg gtagtaggcg ttaccgcgct tagcaacgcg 1500

aataaaccgt ccgtttctcc ggtaaaagtt ctgtcagaca aaattaccca gatttacagc 1560

gatatcaaac tgccgaacag cgcttctgtt gaacaaatcc agaacaaaat gcaggagctg 1620

aacgacgtgc tggaagaact gcgcgacagc ttcgacggtt acatcggcaa cgcctttgct 1680

aaccagattc agctgaactt ccaggcgacc gctcaagaag cggcagcggc agctgctgtt 1740

cgcgcactga acggtaacga tcagatcatc caactgtaca aagatcttgt gaaactccag 1800

cgtcatgctg gcattaagaa agcgatggag aaactggcgg cgcaggaaac cgagttcgat 1860

ctgagtatga tcgtgggtca ggttaaactg tatgctgacc tgttcaccac cgaatctttc 1920

tccctcgagt ga 1932

<210> 33

<211> 643

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cScaA_F4-ucTSA56_V2_P

<400> 33

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

Phe Cys Ser Asp Ile Ile Phe Ser His Pro Glu Asp Thr Ile Asn Ile
20 25 30

Leu Gly Asn Thr Asp Ile Lys Gly Asn Ile Gly Thr Lys Gly Asn Ser
35 40 45
Gly Gly Lys Ile Ile Val Arg Asn Asn Gly Thr Leu Thr His Ser Gly

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

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

195 200 205
Gly Ser Ile Asn Val Gly Asn Ala Lys Ile Asn Leu Gly Leu Asn Thr
210 215 220
Leu Thr Leu Ala Ser Asp Asn Ile Ile Ile Leu Gly His Lys Ser Lys
225 230 235 240
Lys Gly Ser Ser Thr Asn Pro Glu Lys Phe Lys Lys Lys Pro Val Thr
245 250 255
Val Phe Ser Ile Asn Tyr Thr Thr Asn Ser Asp Gly Thr Val Lys Thr
260 265 270

Gln Gly Lys Leu Lys Leu Ser Lys Tyr His Asp Pro Asn Asn Lys Ile

275 280 285

Ile Val Asn Val Asn His Gln Gly Asp Leu Arg Asp Leu Ser Lys His

290 295 300

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

305 310 315 320

Leu Asn Ile Ser Asn Leu Val Tyr Ile Cys Asp Gly Lys Cys Lys Trp

325 330 335

Gln Leu Val Pro Gly Ser Asp Gly Lys Phe Val Phe Ala Gly Leu Val

340 345 350

Asp Lys Lys Lys Lys Asp Lys Gly Asp Asp Gly Ala Ser Ser Ser Ser

355 360 365

Gly Ser Ser Ser Val Ala Pro Ser Ala Arg Val Ser Pro Glu Val Ser

370 375 380

Asp Asp Glu Glu Gly Ser Ala Ser Ala Ile Glu Leu Gly Asp Glu Gly

385 390 395 400

Gly Leu Glu Cys Gly Pro Tyr Ala Lys Val Gly Val Val Gly Gly Met

405 410 415

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

420 425 430

Lys Lys His Ala Pro Gly Phe Arg Ala Glu Leu Gly Val Met Tyr Leu

435 440 445

Thr Asn Ile Lys Leu Thr Pro Pro Gln Pro Thr Ile Met Pro Ile Ser

450 455 460

Ile Ala Asp Arg Asp Phe Gly Val Asp Arg Ile Ala Trp Leu Lys Asn

465 470 475 480

Tyr Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Arg His Leu Val Val Gly Val Thr Ala

485 490 495

Leu Ser Asn Ala Asn Lys Pro Ser Val Ser Pro Val Lys Val Leu Ser

500 505 510

Asp Lys Ile Thr Gln Ile Tyr Ser Asp Ile Lys Leu Pro Asn Ser Ala

515 520 525

Ser Val Glu Gln Ile Gln Asn Lys Met Gln Glu Leu Asn Asp Val Leu

530 535 540

Glu Glu Leu Arg Asp Ser Phe Asp Gly Tyr Ile Gly Asn Ala Phe Ala

545 550 555 560

Asn Gln Ile Gln Leu Asn Phe Gln Ala Thr Ala Gln Glu Ala Ala Ala

565 570 575

Ala Ala Ala Val Arg Ala Leu Asn Gly Asn Asp Gln Ile Ile Gln Leu

580 585 590

Tyr Lys Asp Leu Val Lys Leu Gln Arg His Ala Gly Ile Lys Lys Ala

595 600 605

Met Glu Lys Leu Ala Ala Gln Glu Thr Glu Phe Asp Leu Ser Met Ile

610 615 620

Val Gly Gln Val Lys Leu Tyr Ala Asp Leu Phe Thr Thr Glu Ser Phe

625 630 635 640

Ser Leu Glu

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진, 오리엔티아 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 재조합 단백질 항원.

【변경후】

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진, 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 재조합 단백질 항원.