(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년06월21일
(11) 등록번호 10-2545412
(24) 등록일자 2023년06월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/12 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01) *A61K 39/39* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 31/14* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/12 (2013.01)
A61K 39/385 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0122298
(22) 출원일자 2020년09월22일
심사청구일자 2020년09월22일
(65) 공개번호 10-2021-0035756
(43) 공개일자 2021년04월01일
(30) 우선권주장
1020190117745 2019년09월24일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
공개특허공보 제10-2019-0042473호(2019.04.24.)*
Nature Communications, 제10권, 제3836호, 1-11면(2019.8.23.)*
Journal of Virology, 제88권, 제1호, 237-248면(published ahead of print: 2013.10.23.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
조남혁
서울특별시 노원구 노원로 214, 6동 1006호(하계동, 삼익선경아파트)
강준구
서울특별시 성동구 독서당로 272, 113동 1001호(금호동4가, 금호동 대우아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 태웅

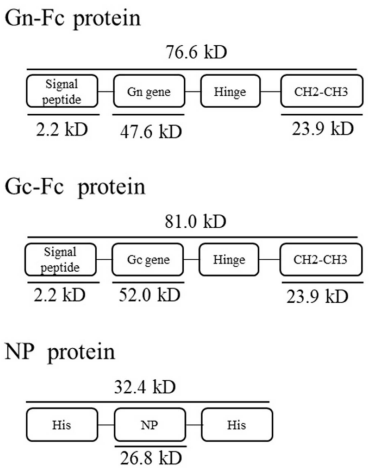
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 김혜민

(54) 발명의 명칭 **중증열성혈소판감소증후증 바이러스에 대한 백신 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 SFTS 바이러스의 Gn 또는 Gc 단백질의 세포외 도메인(extracellular domain)이 사람 항체 Fc 부위에 융합된 재조합 단백질, NP 단백질(전장 서열의 단백질) 또는 이들의 혼합물이 제1형 인터페론 수용체 KO 생쥐에서 보호면역을 제공하는 실험 결과에 기초하여 Gn 또는 Gc 단백질이나 NP 단백질 또는 이들의 혼합물을 이용한 SFTS 바이러스에 대한 백신 조성물을 개시한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 39/39 (2013.01)
A61K 47/6811 (2017.08)
A61P 31/14 (2018.01)
A61K 2039/55505 (2013.01)
A61K 2039/6056 (2013.01)
(72) 발명자
전경석
인천광역시 계양구 황어로115번길 12, 7동 507호(오류동, 신동아아파트)
최훈철
서울특별시 관악구 관악로40길 60, 117동 1405호(봉천동, 현대아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711058473
과제번호	2017M3A9E4061998
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오 · 의료기술개발사업
연구과제명	급성열성혈소판감소증 바이러스의 유전체 및 역학분석을 통한 국가방역체계 연계 원천기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서울대학교
연구기간	2017.06.30 ~ 2019.12.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

Gn 단백질의 세포외 도메인(서열번호 1)과 전장의 NP 단백질(서열번호 3)의 혼합물을 활성성분으로 포함하되,

상기 Gn 단백질은 사람 항체의 Fc 부위에 융합된 형태인,

SFTS 바이러스에 대한 백신 조성물.

청구항 2

제1항에서,

상기 Gn 단백질의 세포외 도메인과 사람 항체의 Fc 부위는, 이들 각 단백질이 서로 간에 3차원 구조 형성을 방해하지 않도록 2~15개 아미노산을 가진 힌지 서열이 이들 단백질 사이에 게재되어, 융합되어 있는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 3

제1항에서,

상기 Gn 단백질이 사람 항체의 Fc 부위에 융합된 형태는, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 그 N-말단의 DVAQAA(Asp Val Ala Gln Ala Ala) 아미노산 서열이 제외된 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

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

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 활성성분 보조제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 보조제는 겔 상의 알루미늄염인 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 중증열성혈소판감소증후증 바이러스에 대한 백신 조성물에 대한 백신 조성물에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 중증열성혈소판감소증후증(Severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS)은 SFTS virus(SFTSV) 감염에 의해 발생하는 감염질환이다. 2009년 중국에서 처음 보고된 이후로 중국, 한국, 일본, 베트남 등 아시아 국가들에서 발생이 보고되고 있다. SFTSV는 3개의 분절 RNA를 유전체로 보유하고 있으며, 각각 RNA 중합효소 (RdRp), 2개의 외막 당단백질(Gn, Gc), 그리고 뉴클레오캡시드(NP) 및 비구조단백질(NS)를 암호화하고 있다. 이 바이러스에 감염되면, 고열, 위장관 합병증, 백혈구 감소증, 혈소판 감소증을 동반하며, 치사율은 5~20%로 알려져 있다(*Lancet Infect Dis* 2018, *18*, 1127-1137, doi:10.1016/S1473-3099(18)30293-7). 아직까지 치료제가 없으며, 백신 개발이 진행되고 있다.

[0004] SFTS 백신 개발은 초기 연구단계에 있으며, 최근 보고를 통해 재조합 바이러스 벡터를 이용한 백신이나 DNA 백신이 감염동물 모델에서 보호면역을 제공할 수 있다는 사실들이 확인되었다(*NPJ Vaccines* 2019, 4, 5, doi:10.1038/s41541-018-0096-y; *Nat Commun* 2019, 10, 3836, doi:10.1038/s41467-019-11815-4). NS 단백질을 이용한 백신은 항체 생성이 유도됨을 확인하였으나, 생쥐감염모델에서 보호면역을 제공하지 못하였다(*Viral Immunol* 2015, 28, 113-122, doi:10.1089/vim.2014.0100). NP와 NS 유전자를 암호화하는 DNA를 마이크로니들을 이용하여 면역하였을 때, 이 항원들에 특이적인 T 세포 반응이 유도된다는 사실도 보고되었으나, 동물감염 모델에서 보호면역을 제공하는지는 밝혀지지 않았다(*Colloids Surf B Biointerfaces* 2017, 159, 54-61, doi:10.1016/j.colsurfb.2017.07.059). 최근에 와서 Gn과 Gc 단백질을 발현하는 재조합 바이러스(live attenuated recombinant vesicular stomatitis virus, rVSV)를 1회 면역하였을 때, 중화항체 생성를 유도할 수 있으며, SFTSV가 치사량으로 감염된 제1형 인터페론 수용체 knock-out (KO) 생쥐에서 완벽한 보호면역을 유도한다는 논문이 보고되었다(*NPJ Vaccines* 2019, 4, 5, doi:10.1038/s41541-018-0096-y). 또한 SFTSV의 5개 유전자를 각각 발현하는 DNA를 같이 면역하였을 때, Gn 및 Gc를 암호화하는 DNA 두가지를 동시에 면역하였을 때, 그리고 NP, NS, RdRp를 암호화하는 세가지 DNA를 함께 면역하였을 때, SFTSV에 감수성이 있는 나이든 족제비(4년 이상)에서 치사감염에 대한 보호면역이 제공된다는 사실도 보고되었다(*Nat Commun* 2019, 10, 3836, doi:10.1038/s41467-019-11815-4). 그러나 아직까지 각각의 구조 단백질 (Gn, Gc, NP)을 개별 면역하였을 때, 어느 정도의 보호면역이 제공되는 지 보고된 바는 없으며, 이 단백질들을 이용한 아단위 단백질 백신의 효능에 관한 연구는 발표되지 않고 있다.

[0005] 본 발명은 Gn 단백질, Gc 단백질, NP 단백질의 백신 효능을 개시한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 Gn 단백질, Gc 단백질, NP 단백질을 이용한 SFTS 바이러스에 대한 백신 조성물을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적이나 구체적인 목적은 이하에서 제시될 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들은 아래의 실시예에서 확인되는 바와 같이, Gn 또는 Gc 단백질의 세포외 도메인(extracellular domain)이 사람 항체 Fc 부위에 융합된 재조합 단백질(Gn-Fc 및 Gc-Fc)과 NP 단백질(전장 서열의 단백질)을 개별로 제1형 인터페론 수용체 KO 생쥐에 면역하고 보호면역을 제공할 수 있는지를 비교검증 하였다. 그 결과 Gc-Fc 단백질은 면역한 생쥐는 모두 사망하였으나, 대조군(Fc만 면역한 그룹)에 비하여 생존 시간이 통계학적으로

유의하게 증가하였으며, Gn-Fc 단백질을 면역한 생쥐는 50%가 생존하였고, NP 단백질을 면역한 생쥐는 60%가 생존하여 각각 유의한 보호 면역 제공 효과가 있음을 확인하였다. 또한 Gn-Fc 및 Gc-Fc와 NP를 혼합하여 제1형 인터페론 수용체 KO 생쥐에 면역하여 보호면역이 상승하는지를 살펴 봤을 때, Gc-Fc와 NP의 혼합 면역의 경우 80%가 생존하였고, Gn-Fc와 NP의 혼합 면역의 경우는 70%가 생존하였으며, Gn-Fc와 Gc-Fc 그리고 NP의 혼합 면역의 경우는 60% 생존하여 전체적으로 혼합 면역의 경우가 개별 면역의 경우보다 생존율이 향상됨을 확인하였다.

[0011] 본 발명은 이러한 실험 결과에 기초하여 제공되는 것으로, 본 발명의 백신 조성물은 Gc 단백질의 세포외 도메인, Gn 단백질의 세포외 도메인, 전장의 NP 단백질 또는 이들의 둘 이상의 혼합물을 활성성분으로 포함하는, SFTS 바이러스에 대한 백신 조성물에 관한 것이다.

[0012] 본 발명에서, 특히 Gc 단백질의 세포외 도메인이나 Gn 단백질의 세포외 도메인은 생체 내 반감기를 향상시키기 위하여 사람 항체 Fc 부위에 융합된 형태일 수 있으며, Fc와 융합될 경우 각 융합되는 단백질이 서로 간에 3차원 구조 형성을 방해하지 않도록 2~15 아미노산을 가진 힌지(hinge) 서열이 게재될 수 있다. 또 이러한 단백질을 유전자 재조합 방식으로 숙주세포를 이용하여 생산하기 위해서는, 아래 실시예에서처럼 분리·정제를 용이하게 하기 위하여 신호 펩타이드(signal peptid) 서열이 N-말단에 위치할 수도 있다. 이러한 서열은 세포외로 해당 단백질이 분비될 때 제거되어 없어지기 때문에, 분리·정제된 단백질에서는 존재하지 않는다.

[0013] 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 병원체의한 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.

[0014] 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 배양액 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.

[0015] 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.

[0016] 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.

[0017] 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.

[0018] 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.

[0019] 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(Sokolovska A et al., Vaccine. 2007 Jun 6;25(23):4575-85; O'Hagan DT AND Rappuoli R., Pharm Res. 2004 Sep;21(9):1519-30.) 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(R. Bomford. Immunological Adjuvants and Vaccines. NATO ASI Series 1989;179:35-41; Vogel FR AND Powell MF. Pharm Biotechnol. 1995;6:141-228.;Derek T. O'Hagan, Methods in Molecular Medicine. 2000; April 15; 42: 65-90) 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.

[0020] 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.

[0021] 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.

[0022] 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[Langer, Science 249: 1527-1533 (1990)], 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 [Langer, supra; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987)], 문헌[Buchwald et al., Surgery 88: 507 (1980)], 문헌[Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)], 문헌[Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974)], 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[Howard et al., J. Neurosurg. 71:105 (1989)] 등을 참조할 수 있다. 이들 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주된다.

[0023] 본 발명의 백신 조성물의 투여량은 의료인에 의해 나이, 체중, 성별, 증상, 합병증, 다른 질환의 이환 유무 등의 환자 특성을 고려하여 결정될 수 있다.

[0024] 또한 투여의 시간적 간격과 횟수는 사용되는 제형이나 활성성분의 혈중 반감기 등을 고려하여 결정될 수 있다.

[0025] 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.

[0026] 본 발명의 백신 조성물에서 활성성분으로 사용되는 각 단백질은 이를 암호화하는 유전자를 이용하여 당업계에 공지된 DNA 재조합 기술로 제조할 수 있다. 이러한 방법은 (i) 상기 각 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 제조하고 (ii) 이 발현벡터를 숙주세포에 형질전환시키고 (iii) 형질전환된 숙주세포를 배양하고, 마지막으로 (iv) 그 배양물로부터 상기 각 단백질을 분리·정제하는 단계를 포함하여 구성된다. 상기 각 단백질을 암호화하는 유전자는 본 명세서에 개시되어 있으며, 이러한 유전자를 이용하여 DNA 재조합 기술로 해당 각 단백질을 생산하는 것, 구체적으로 프로모터나 터미네이터 등의 조절서열이나 신호 펩타이드 서열, 선별마커 등을 포함하는 발현벡터 구성이나 재조합 DNA 기술, 형질전환 방법, 배지의 구성, 형질전환 후 배양 방법 등에 대해서 당업계에 상당한 양의 문헌이 축적되어 있으며, 각 해당 사항에 대해서는 이들 문헌을 참조할 수 있다. 구체적으로 문헌(Nucl. Acid Res. 14:5399-5467, 1986), 문헌(Tet. Lett. 27:5575-5578, 1986), 문헌(Nucl.

Acid Res. 4:2557, 1977), 문헌(Lett., 28:2449, 1978), 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), 문헌(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 문헌(Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)), 문헌(Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) (Capecchi, M.R., Cell, 22:479(1980)), 문헌(Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973)), 문헌(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 문헌(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), 문헌(Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190(1985)), 문헌(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990)) 문헌(Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)) 문헌(Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255, 12073-12080 (1980)), 문헌(Luchansky et al Mol. Microbiol. 2, 637-646 (1988)), 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, 2001년 1월 15일 발행의 제1권 및 제2권) 등을 참조할 수 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 전술한 바와 같이, Gc 단백질의 세포외 도메인, Gn 단백질의 세포외 도메인, 전장의 NP 단백질 또는 이들의 혼합물을 활성성분으로 하는, SFTS 바이러스에 대한 백신 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 본 발명의 백신 조성물의 활성성분인 Gc 단백질, Gn 단백질 또는 NP 단백질의 구조와 분자량을 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명의 백신 조성물의 활성성분인 Gc 단백질, Gn 단백질 또는 NP 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.

도 3은 Gn 및 Gc 항원 면역에 의한 특이 항체 유도 및 면역 혈청을 이용한 바이러스 중화능 검사 결과이다(a. Gn 및 Gn 단백질에 대한 항체 역가. b and c. SFTS 바이러스에 대한 중화능 분석 시험. FRNT: focus reduction neutralization titer)

도 4는 Gc 단백질, Gn 단백질 또는 NP 단백질을 제1형 인터페론 수용체 KO 생쥐에 면역하고 생존율과 체중 변화를 측정한 결과이다.

도 5는 Gc 단백질, Gn 단백질 및/또는 NP 단백질의 혼합물을 제1형 인터페론 수용체 KO 생쥐에 면역하고 생존율과 체중 변화를 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하 본 발명을 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0033] **<실시예 1> 백신 항원으로 사용될 바이러스 단백질의 생산**

[0034] **<실시예 1-1> 백신 항원으로 사용될 바이러스 단백질의 아미노산 서열**

[0035] GenBank 상의 아미노산 정보를 이용하여 백신 항원으로 사용될 바이러스 Gn 단백질, Gc 단백질 및 NP 단백질의 생산하였다. GenBank 상의 아미노산 정보는 GenBank ID: ATW63054.1(Gn 단백질), GenBank ID: AOO85591.1(Gc 단백질), GenBank ID: AJO16084.1(NP 단백질)이다.

[0036] Gn과 Gc 단백질은 signal peptide와 transmembrane domain 및 cytoplasmic domain을 제외한 extracellular domain 만(각각 서열번호 1 및 2)을 사용하였으며, NP 단백질은 전장 서열(서열번호 3)을 사용하였다.

[0037] **<실시예 1-2> 바이러스 단백질 유전자 클로닝 및 발현**

[0038] Gn 및 Gc 단백질(extracellular domain)을 암호화하는 유전자(각각 서열번호 4 및 5)를 합성한 후 도 1과 같이 사람 Ig kappa light chain의 signal peptide 유전자(서열번호 6)가 N-terminal에 융합되고 human IgG1 CH2-CH3 부위 Fc domain 유전자(서열번호 7)가 힌지 서열(hinge region)(서열번호 8)을 매개로 C-terminal에 융합된 재조합 유전자를 pCEP4 mammalian expression vector에 클로닝 하였다. N-terminal과 C-terminal 각각에 6

His(정제를 위하여 사용함)가 연결된 NP 단백질을 암호화하는 유전자(서열번호 9)는 pET28a vector에 클로닝 하였다. 클로닝된 유전자는 각각 HEK293T 세포(Gn, Gc)와 *E.coli* BL21 (NP)에 도입하여 단백질 발현을 유도하였으며, Protein A/G column과 Ni-NTA column을 이용하여 각각 정제하였다. 정제된 단백질의 크기와 순도는 SDS-PAGE를 통해 확인하였다(도 2).

[0039] **<실시예 2> SFTS 바이러스 단백질의 면역과 항체 분석**

[0040] Gn-Fc(서열번호 10, 서열번호 10에서 N-terminal의 DVAQAA 아미노산 서열은 클로닝을 위하여 삽입된 서열임), Gc-Fc(서열번호 11, 서열번호 10에서 N-terminal의 DVAQAA 아미노산 서열은 클로닝을 위하여 삽입된 서열임), NP(서열번호 12), 사람 Fc를 각각 제1형 인터페론 수용체 KO 생쥐(n=4)에 2주 간격으로 3회 면역하고(20ug/mouse +Alum, Gn-Fc, Gc-Fc, Fc; 10ug/mouse + Alum, NP), 3차 면역 2주 후 혈액을 채취하여 Gn, Gc, 및 NP에 대한 항체 역가를 ELISA 방법으로 측정하였다(도 3의 a). 각 항원에 대하여 높은 수준의 항체들이 생성됨을 확인 하였으며(anti-Gn 또는 anti-Gc IgG 평균 titer = 1:4,096, anti-NP IgG 평균 titer = 1:24,576; n = 4/group), 특히 NP 항원에 대한 항체 역가가 높게 유도되는 것이 관찰되었다. 바이러스 당단백질들(Gn과 Gc)에 대해 생성된 항체들의 바이러스 중화능을 확인하기 위하여 SFTS 바이러스를 면역혈청과 반응시키고, Vero 세포에 감염시켜 focus reduction assay를 실시였다 (도 3의 b 및 c). 거의 유사한 수준의 항체가 생성되었음에도 불구하고, Gn-Fc를 면역하여 얻은 혈청이 Gc-Fc를 면역하여 얻은 혈청보다 좀 더 높은 중화 항체가를 형성하였으며, 두 가지 면역 혈청 모두 Fc만을 면역하여 얻은 혈청보다 유의하게 높은 수준의 바이러스 중화능을 보유하고 있음이 확인되었다 (중화항체 역가: Gn-Fc: 929 ± 1134, Gc-Fc: 209 ± 140, Fc: 42 ± 29; n = 4/group, mean titer ± S.D.).

[0041] **<실시예 3> SFTS 바이러스 단백질 면역에 의한 보호 면역 효과**

[0042] Gn-Fc, Gc-Fc, NP, Fc를 각각 제1형 인터페론 수용체 KO 생쥐(n=4~6)에 2주 간격으로 3회 면역하고(20ug/mouse +Alum, Gn-Fc, Gc-Fc, Fc; 10ug/mouse + Alum, NP), 3차 면역 2주 후 10^3 foci-forming unit (FFU)의 SFTS 바이러스를 피하로 감염시켰다. 그리고 매일 몸무게 변화와 사망률을 관찰하였다(도 4).

[0043] PBS를 면역한 생쥐들(대조군)은 몸무게가 서서히 줄고, 감염 6일째까지 모두 사망하였다. Fc를 면역한 생쥐들(대조군)은 감염 이틀째부터 몸무게가 서서히 줄고, 감염 5일째까지 모두 사망하였다. Gc-Fc를 면역한 생쥐들은 감염 4일째부터 몸무게가 줄기 시작하였고, 감염 8일째 모두 사망하였다. Gn-Fc를 면역한 생쥐들은 감염 3일째부터 몸무게가 줄기 시작하였고, 감염 8일째까지 절반이 사망하였으나 나머지 생쥐들은 이후 몸무게가 회복되고 생존하였다. NP를 면역한 생쥐들은 감염 3일째부터 몸무게가 줄기 시작하였으며, 8일째까지 40%가 사망하였으며, 나머지 60% 생쥐들은 이후 서서히 몸무게를 회복하고 생존하였다. 통계학적 분석을 하였을 때 (Log-rank (Mantel-Cox) Test), 백신에 의한 생존 연장 효과 (Gc-Fc 군: p = 0.0046), 또는 사망률 감소 효과 (Gn-Fc 군: p = 0.0054, NP 군: p = 0.0023)는 대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 향상을 보이는 것이 확인되었다.

[0044] **<실시예 4> SFTS 바이러스 단백질 혼합 면역에 의한 보호 면역 효과**

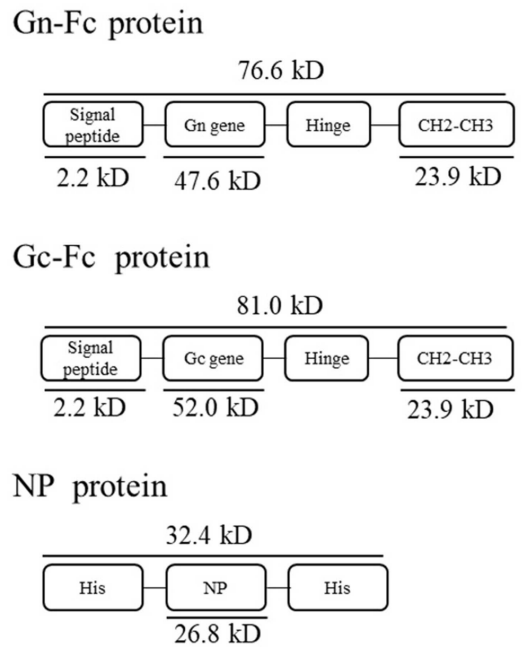
[0045] Gn-Fc와 NP의 혼합물(Gn+NP, 혼합비: 10ug + 10ug), Gc-Fc와 NP의 혼합물(Gc+NP, 혼합비: 10ug + 10ug), Gn-Fc와 Gc-Fc 그리고 NP의 혼합물(Gn+Gc+NP, 혼합비: 10ug + 10ug + 10ug), PBS(Control)를 각각 제1형 인터페론 수용체 KO 생쥐(n=7)에 2주 간격으로 3회 면역하고(20 or 30ug/mouse, +Alum), 3차 면역 2주 후 10^3 foci-forming unit (FFU)의 SFTS 바이러스를 피하로 감염시켰다. 그리고 매일 몸무게 변화와 사망률을 관찰하였다(도 5).

[0046] PBS를 면역한 생쥐들(대조군)은 몸무게가 서서히 줄고, 감염 6일째까지 모두 사망하였다. Gn+NP를 면역한 생쥐들은 감염 4일째부터 몸무게가 줄기 시작하였고, 감염 5일째 14.3%가 사망하고 감염 6일째까지 28.6% 사망하였으나 나머지 생쥐들은 이후 몸무게가 회복하고 생존하였다. Gc+NP를 면역한 생쥐들은 감염 5일째부터 몸무게가 줄기 시작하였고, 감염 6일째 14.3%가 사망하였으나 나머지 생쥐들은 이후 몸무게가 회복하고 생존하였다. Gn+Gc+NP를 면역한 생쥐들은 4일째부터 몸무게가 줄기 시작하였고, 감염 7일째 42.9%가 사망하였으나 나머지 생쥐들은 이후 몸무게가 회복하고 생존하였다.

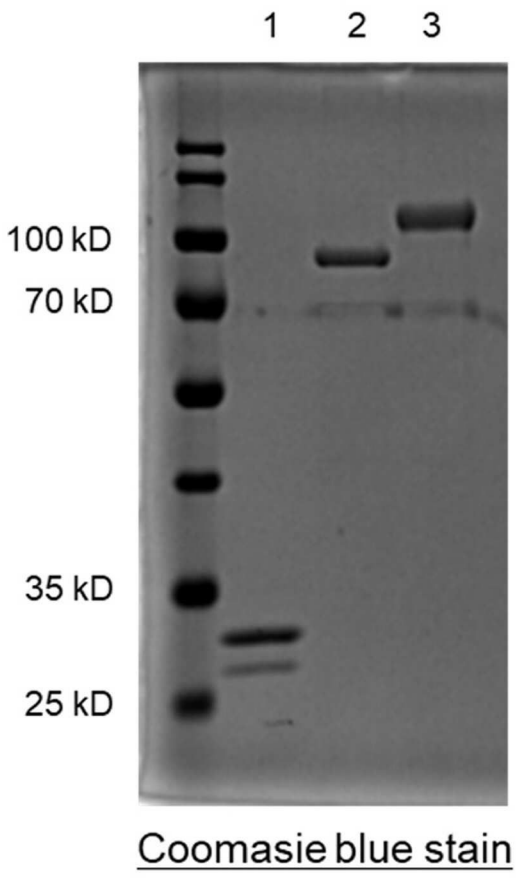
[0047] 통계학적 분석을 하였을 때 (Log-rank (Mantel-Cox) Test), 백신에 의한 생존 연장 효과 (Gc-Fc 군: p = 0.0046), 또는 사망률 감소 효과 (Gn-Fc 군: p = 0.0054, NP 군: p = 0.0023)는 대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 향상을 보이는 것이 확인되었다.

도면

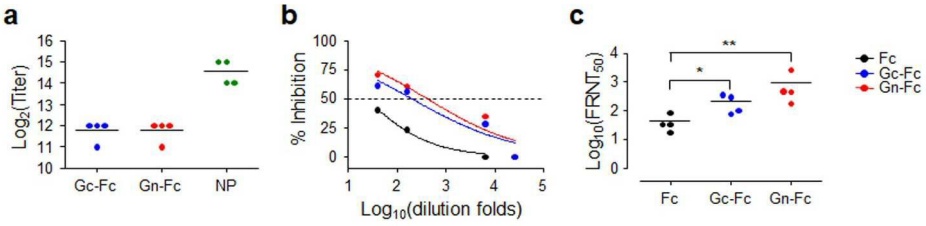
도면1


Gn-Fc protein
76.6 kD
Signal peptide
Gn gene
Hinge
CH2-CH3
2.2 kD
47.6 kD
23.9 kD
Gc-Fc protein
81.0 kD
Signal peptide
Gc gene
Hinge
CH2-CH3
2.2 kD
52.0 kD
23.9 kD
NP protein
32.4 kD
His
NP
His
26.8 kD

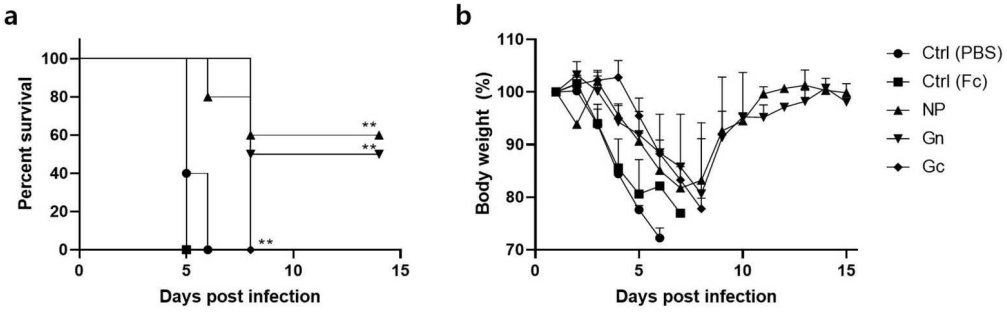
도면2


1
2
3
100 kD
70 kD
35 kD
25 kD
Coomasie blue stain

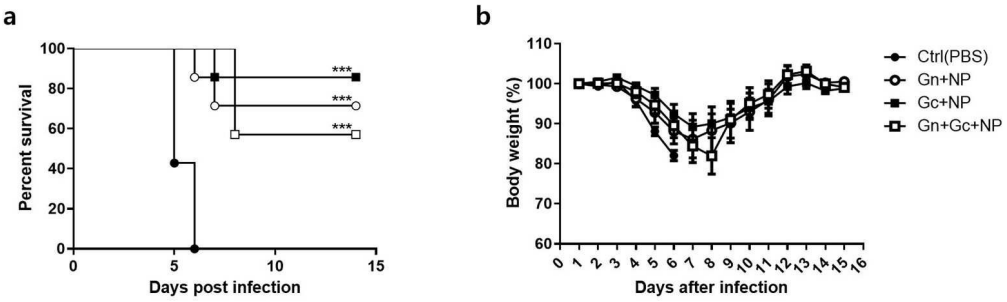
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록

<110> SNU R&DB Foundation

<120> Vaccine Composition for SFTS virus

<130> PP19-000-SNU-CHO

<160> 12

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 438

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Extracellular domain of Gn protein of SFTS virus

<400> 1

Asp Ser Gly Pro Ile Ile Cys Ala Gly Pro Ile His Ser Asn Lys Ser

1 5 10 15

Ala Asp Ile Pro His Leu Leu Gly Tyr Ser Glu Lys Ile Cys Gln Ile

20 25 30

Asp Arg Leu Ile His Val Ser Ser Trp Leu Arg Asn His Ser Gln Phe

35 40 45

Gln Gly Tyr Val Gly Gln Arg Gly Gly Arg Ser Gln Val Ser Tyr Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Ala Asp Trp Leu Gly Met Leu Val Val Lys Lys Ala Lys Gly Ser

85 90 95

Asp Met Ile Val Pro Gly Pro Ser Tyr Lys Gly Lys Val Phe Phe Glu

100 105 110

Arg Pro Thr Phe Asp Gly Tyr Val Gly Trp Gly Cys Gly Ser Gly Lys

115 120 125

Ser Arg Thr Glu Ser Gly Glu Leu Cys Ser Ser Asp Ser Gly Thr Ser

130 135 140

Ser Gly Leu Leu Pro Ser Asp Arg Val Leu Trp Ile Gly Asp Val Ala

145 150 155 160

Cys Gln Pro Met Thr Pro Ile Pro Glu Glu Thr Phe Leu Glu Leu Lys

165 170 175

Ser Phe Ser Gln Ser Glu Phe Pro Asp Ile Cys Lys Ile Asp Gly Ile

180 185 190

Val Phe Asn Gln Cys Glu Gly Glu Ser Leu Pro Gln Pro Phe Asp Val

195 200 205

Ala Trp Met Asp Val Gly His Ser His Lys Ile Ile Met Arg Glu His

210 215 220

Lys Thr Lys Trp Val Gln Glu Ser Ser Ser Lys Asp Phe Val Cys Tyr

225 230 235 240

Lys Glu Gly Thr Gly Pro Cys Ser Glu Ser Glu Glu Lys Thr Cys Lys

245 250 255

Thr Ser Gly Ser Cys Arg Gly Asp Met Gln Phe Cys Lys Val Ala Gly
260 265 270
Cys Glu His Gly Glu Glu Ala Ser Glu Ala Lys Cys Arg Cys Ser Leu
275 280 285
Val His Lys Pro Gly Glu Val Val Val Ser Tyr Gly Gly Met Arg Val
290 295 300
Arg Pro Lys Cys Tyr Gly Phe Ser Arg Met Met Ala Thr Leu Glu Val
305 310 315 320

Asn Gln Pro Glu Gln Arg Ile Gly Gln Cys Thr Gly Cys His Leu Glu
325 330 335
Cys Ile Asn Gly Gly Val Arg Leu Ile Thr Leu Thr Ser Glu Leu Lys
340 345 350
Ser Ala Thr Val Cys Ala Ser His Phe Cys Ser Ser Ala Thr Ser Gly
355 360 365
Lys Lys Ser Thr Glu Ile Gln Phe His Ser Gly Ser Leu Val Gly Lys
370 375 380
Thr Ala Ile His Val Lys Gly Ala Leu Val Asp Gly Thr Glu Phe Thr

385 390 395 400
Phe Glu Gly Ser Cys Met Phe Pro Asp Gly Cys Asp Ala Val Asp Cys
405 410 415
Thr Phe Cys Arg Glu Phe Leu Lys Asn Pro Gln Cys Tyr Pro Ala Lys
420 425 430
Lys Gly Gln Ala Gly Gln
435

<210> 2
<211> 473
<212> PRT
<213> Unknown
<220><223> Extracellular domain of Gc protein of SFTS virus
<400> 2
Cys Asp Glu Met Val His Ala Asp Ser Lys Leu Val Ser Cys Arg Gln

1 5 10 15

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

Arg Cys Thr Ser Val Arg Arg Cys Arg Trp Ala Gly Asp Cys Gln Ser
85 90 95
Gly Cys Pro Pro His Phe Thr Ser Asn Ser Phe Ser Asp Asp Trp Ala
100 105 110
Gly Lys Met Asp Arg Ala Gly Leu Gly Phe Ser Gly Cys Ser Asp Gly
115 120 125
Cys Gly Gly Ala Ala Cys Gly Cys Phe Asn Ala Ala Pro Ser Cys Ile
130 135 140
Phe Trp Arg Lys Trp Val Glu Asn Pro His Gly Ile Ile Trp Lys Val

145 150 155 160
Ser Pro Cys Ala Ala Trp Val Pro Ser Ala Val Ile Glu Leu Thr Met
165 170 175
Pro Ser Gly Glu Val Arg Thr Phe His Pro Met Ser Gly Ile Pro Thr
180 185 190
Gln Val Phe Lys Gly Val Ser Val Thr Tyr Leu Gly Ser Asp Met Glu
195 200 205
Val Ser Gly Leu Thr Asp Leu Cys Glu Ile Glu Glu Leu Lys Ser Lys
210 215 220

Lys Leu Ala Leu Ala Pro Cys Asn Gln Ala Gly Met Gly Val Val Gly
225 230 235 240
Lys Val Gly Glu Ile Gln Cys Ser Ser Glu Glu Ser Ala Arg Thr Ile
245 250 255
Lys Lys Asp Gly Cys Ile Trp Asn Ala Asp Leu Val Gly Ile Glu Leu
260 265 270

Arg Val Asp Asp Ala Val Cys Tyr Ser Lys Ile Thr Ser Val Glu Ala
275 280 285
Val Ala Asn Tyr Ser Ala Ile Pro Thr Thr Ile Gly Gly Leu Arg Phe

290 295 300
Glu Arg Ser His Asp Ser Gln Gly Lys Ile Ser Gly Ser Pro Leu Asp
305 310 315 320
Ile Thr Ala Ile Arg Gly Ser Phe Ser Val Asn Tyr Arg Gly Leu Arg
325 330 335
Leu Ser Leu Ser Glu Ile Thr Ala Thr Cys Thr Gly Glu Val Thr Asn
340 345 350
Val Ser Gly Cys Tyr Ser Cys Met Thr Gly Ala Lys Val Ser Ile Lys
355 360 365

Leu His Ser Ser Lys Asn Ser Thr Ala His Val Arg Cys Lys Gly Asp
370 375 380
Glu Thr Ala Phe Ser Val Leu Glu Gly Val His Ser Tyr Thr Val Ser
385 390 395 400
Leu Ser Phe Asp His Ala Val Val Asp Glu Gln Cys Gln Leu Asn Cys
405 410 415
Gly Gly His Glu Ser Gln Val Thr Leu Lys Gly Asn Leu Ile Phe Leu
420 425 430
Asp Val Pro Lys Phe Val Asp Gly Ser Tyr Met Gln Thr Tyr His Ser

435 440 445
Thr Val Pro Thr Gly Ala Asn Ile Pro Ser Pro Thr Asp Trp Leu Asn
450 455 460
Ala Leu Phe Gly Asn Gly Leu Ser Arg
465 470

<210> 3
<211> 245
<212> PRT
<213> Unknown
<220><223> NP protein of SFTS virus
<400> 3

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

245

<210> 4

<211> 1299

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> gene encoding excellular domain of Gn protein of SFTS virus

<400> 4

gactctggac ctattatctg tgctggacct attcattcaa acaaatctgc tgacatccct 60

catctgctgg gctactccga aaaaatctgc cagattgatc gactgatcca cgtgagctcc 120

tggctgcgga accatagcca gttccaggga tacgtcggac agaggggcgg gcgctctcag 180

gtgagttact atccagccga gaacagctac agccggtggt ccggactgct gtctccatgt 240

gacgcagatt ggctgggaat gctggtggtc aagaaagcta agggctcaga tatgattgtc 300

cccggcccta gctacaaggg gaaagtgttc tttgaacgcc ccaccttcga cggctatgtg 360

ggctgggggt gcggatcagg caaaagccga acagagtccg gagaactgtg cagcagcgac 420

tctggaactt caagcggcct gctgcctagc gatagggtcc tgtggattgg cgacgtggcc 480

tgccagccaa tgaccccaat ccccgaggaa acatttctgg agctgaagag tttctcacag 540

agcgaatttc cagacatctg caaaattgac ggcatcgtgt tcaaccagtg tgaggggggaa 600

agcctgcctc agccatttga tgtcgcttgg atggacgtgg gccactccca taagatcatt 660

atgcgcgagc acaagactaa atgggtccag gaatcctcta gtaaggattt cgtgtgctac 720

aaagagggga ccggaccctg ttccgaatct gaggaaaaga cttgcaaaac cagtgggtca 780

tgtcggggag acatgcagtt ttgcaaggtg gctggctgtg agcacgggga ggaagcctct 840

gaagctaaat gcagatgtag tctggtccat aaacccggcg aggtggtcgt gagttacgga 900

ggcatgcggg tgagacctaa atgctatggg ttcagcagaa tgatggcaac cctggaggtg 960

aaccagcctg aacagaggat cggacagtgc acaggctgtc acctggagtg tattaatggg 1020

ggagtccgac tgatcaccct gacaagtgaa ctgaagtcag caacagtgtg cgcctctcat 1080

ttctgttcaa gcgccactag cggcaagaaa tccaccgaga ttcagtttca cagcgggtcc 1140

ctggtgggaa agactgctat ccatgtcaaa ggagcactgg tggatggcac agagttcact 1200

tttgaagggt cctgcatgtt tccagacgga tgtgatgcag tggactgcac attctgtcgc 1260

gagtttctga agaatcccca gtgctatcct gccaagaaa 1299

<210> 5

<211> 1419

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> gene encoding excellular domain of Gc protein of SFTS virus

<400> 5

tgcgatgaaa tggtccacgc cgatagcaaa ctggtcagct gtaggcaggg aagcgggaac 60

atgaaggaat gcgtcacaac cggaagagct ctgctgccag cagtgaaccc tggacaggag 120

gcctgcctgc acttcacagc tcctggaagt ccagactcaa aatgcctgaa gatcaaagtg 180

aagcggatta atctgaagtg taagaaaagc tcctcttact ttgtgcccga cgcaaggtca 240

cgctgcacta gcgtccggag atgtagatgg gcaggcgatt gccagagcgg atgtccacct 300

catttcacct ctaacagttt ttcagacgat tgggcaggca agatggacag ggcaggactg 360

gggttcagcg gatgctccga tggatgtgga ggagcagctt gcggatgttt caacgcagcc 420

ccctcctgca tcttttggcg caaatgggtg gagaatcctc acggcatcat ttggaaggtc 480

tccccttgtg ctgcatgggt gccatctgcc gtcatcgagc tgacaatgcc cagcggcgaa 540

gtgagaactt tccatccaat gtccgggatt cccacccagg tctttaaggg agtgtctgtc 600

acatatctgg gcagcgacat ggaggtgtcc gggctgactg atctgtgcga aatcgaggaa 660

ctgaaatcca agaaactggc cctggctcct tgtaatcagg caggaatggg agtggtcggc 720

aaggtcgggg agattcagtg cagttcagag gaaagcgcac gcaccatcaa gaaagacggg 780

tgtatttgga acgccgatct ggtgggaatc gagctgcgag tggacgatgc tgtctgctac 840

tccaaaatta catctgtgga agcagtcgcc aattattccg ctatccctac cacaattggc 900

ggcctgcgat tcgaacggtc tcacgacagt caggggaaga tcagcggcag ccccctggac 960

atcaccgcca ttcgaggatc ttttagtgtg aactacagag gcctgaggct gtcactgagc 1020

gagatcactg ctacctgcac aggagaagtg actaatgtca gtggctgcta ttcatgtatg 1080

accggggcaa aagtgagtat taagctgcac agctccaaaa actcaacagc tcatgtgcgc 1140

tgtaagggag acgagactgc attctctgtg ctggaaggcg tccacagtta cacagtgtcc 1200

ctgtcttttg accatgccgt ggtcgatgag cagtgccagc tgaactgtgg gggacacgaa 1260

agccaagtga ctctgaaagg caatctgatc ttcctggacg tgccaaagtt tgtcgatggg 1320

tcatacatgc agacctatca tagcactgtg cccaccggcg ccaatattcc atctcccaca 1380

gattggctga acgctctgtt tgggaatgga ctgagtcgg 1419

<210> 6

<211> 60

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> gene encoding signal peptide

<400> 6

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60

60

<210> 7

<211> 654

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> gene encoding human Fc

<400> 7

gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 60

ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 120

cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 180

ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 240

caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 300

cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 360

ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa 420

ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 480

tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc 540

accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 600

gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ccccgggtaa atga 654

<210> 8

<211> 60

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> gene encoding hinge region

<400> 8

ggccaggccg gccaggagcc caaatctagc gacaaaactc acacaagccc accgagccca 60

60

<

210> 9

<211> 738

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> gene encoding NP protein of SFTS virus

<400> 9

atgtcggagt ggtccaggat tgcagtggag tttggtgagc agcagctcaa tttgtctgag 60

cttgaggatt tcgcgagaga actggcctat gaaggccttg accctgcttt gatcatcaag 120

aagctgaagg agacaggtgg agatgattgg gtgaaggata caaagttcat cattgtcttt 180

gccctgactc gaggcaacaa gatcgtcaag gcatcaggga aaatgtcaaa ctcagggtcc 240

aagaggttga tggcactcca agagaaatat ggactggttg agagggcaga gaccaggctc 300

tcaatcactc ctgtgagggt tgcgcagagc cttcccactt ggacatgtgc tgcagcagca 360

gccttgaagg agtatctccc tgtggggcca gccgtcatga acctgaaggt cgagaattat 420

ccccctgaga tgatgtgcat ggcctttgga tccctgattc caactgcggg ggtatctgaa 480

gccacaacca agaccctgat ggaggcctac tctctgtggc aagatgcctt caccaagact 540

atcaatgtga agatgcgcgg agccagcaag acagaagttt acaactcctt cagggaccct 600

cttcatgctg ctgtgaactc tgtcttcttt cccaatgatg ttcgggtaaa gtggctgaag 660

gccaagggga tccttggccc agatggggtc cccagcagag ctgctgaggt tgctgctgct 720

gcttacagaa acctgtaa 738

<210> 10

<211> 676

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Gn-Fc

<400> 10

Asp Val Ala Gln Ala Ala Asp Ser Gly Pro Ile Ile Cys Ala Gly Pro
1 5 10 15

Ile His Ser Asn Lys Ser Ala Asp Ile Pro His Leu Leu Gly Tyr Ser
20 25 30

Glu Lys Ile Cys Gln Ile Asp Arg Leu Ile His Val Ser Ser Trp Leu
35 40 45

Arg Asn His Ser Gln Phe Gln Gly Tyr Val Gly Gln Arg Gly Gly Arg
50 55 60

Ser Gln Val Ser Tyr Tyr Pro Ala Glu Asn Ser Tyr Ser Arg Trp Ser
65 70 75 80

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

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

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

260 265 270
Phe Cys Lys Val Ala Gly Cys Glu His Gly Glu Glu Ala Ser Glu Ala
275 280 285
Lys Cys Arg Cys Ser Leu Val His Lys Pro Gly Glu Val Val Val Ser
290 295 300
Tyr Gly Gly Met Arg Val Arg Pro Lys Cys Tyr Gly Phe Ser Arg Met
305 310 315 320
Met Ala Thr Leu Glu Val Asn Gln Pro Glu Gln Arg Ile Gly Gln Cys

325 330 335

Thr Gly Cys His Leu Glu Cys Ile Asn Gly Gly Val Arg Leu Ile Thr
340 345 350
Leu Thr Ser Glu Leu Lys Ser Ala Thr Val Cys Ala Ser His Phe Cys
355 360 365
Ser Ser Ala Thr Ser Gly Lys Lys Ser Thr Glu Ile Gln Phe His Ser
370 375 380
Gly Ser Leu Val Gly Lys Thr Ala Ile His Val Lys Gly Ala Leu Val
385 390 395 400
Asp Gly Thr Glu Phe Thr Phe Glu Gly Ser Cys Met Phe Pro Asp Gly

405 410 415
Cys Asp Ala Val Asp Cys Thr Phe Cys Arg Glu Phe Leu Lys Asn Pro
420 425 430
Gln Cys Tyr Pro Ala Lys Lys Gly Gln Ala Gly Gln Glu Pro Lys Ser
435 440 445
Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu
450 455 460
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
465 470 475 480

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
485 490 495
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
500 505 510
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
515 520 525
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
530 535 540
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

545 550 555 560
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
565 570 575

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
580 585 590
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
595 600 605
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
610 615 620

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
625 630 635 640
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
645 650 655
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
660 665 670
Ser Pro Gly Lys
675

<210> 11
<211> 711
<212> PRT
<213> Unknown
<220><223> Gc-Fc
<400> 11

Asp Val Ala Gln Ala Ala Cys Asp Glu Met Val His Ala Asp Ser Lys
1 5 10 15
Leu Val Ser Cys Arg Gln Gly Ser Gly Asn Met Lys Glu Cys Val Thr
20 25 30
Thr Gly Arg Ala Leu Leu Pro Ala Val Asn Pro Gly Gln Glu Ala Cys
35 40 45
Leu His Phe Thr Ala Pro Gly Ser Pro Asp Ser Lys Cys Leu Lys Ile
50 55 60
Lys Val Lys Arg Ile Asn Leu Lys Cys Lys Lys Ser Ser Ser Tyr Phe

65 70 75 80
Val Pro Asp Ala Arg Ser Arg Cys Thr Ser Val Arg Arg Cys Arg Trp
85 90 95

Ala Gly Asp Cys Gln Ser Gly Cys Pro Pro His Phe Thr Ser Asn Ser
100 105 110
Phe Ser Asp Asp Trp Ala Gly Lys Met Asp Arg Ala Gly Leu Gly Phe
115 120 125
Ser Gly Cys Ser Asp Gly Cys Gly Gly Ala Ala Cys Gly Cys Phe Asn
130 135 140

Ala Ala Pro Ser Cys Ile Phe Trp Arg Lys Trp Val Glu Asn Pro His
145 150 155 160
Gly Ile Ile Trp Lys Val Ser Pro Cys Ala Ala Trp Val Pro Ser Ala
165 170 175
Val Ile Glu Leu Thr Met Pro Ser Gly Glu Val Arg Thr Phe His Pro
180 185 190
Met Ser Gly Ile Pro Thr Gln Val Phe Lys Gly Val Ser Val Thr Tyr
195 200 205
Leu Gly Ser Asp Met Glu Val Ser Gly Leu Thr Asp Leu Cys Glu Ile

210 215 220
Glu Glu Leu Lys Ser Lys Lys Leu Ala Leu Ala Pro Cys Asn Gln Ala
225 230 235 240
Gly Met Gly Val Val Gly Lys Val Gly Glu Ile Gln Cys Ser Ser Glu
245 250 255
Glu Ser Ala Arg Thr Ile Lys Lys Asp Gly Cys Ile Trp Asn Ala Asp
260 265 270
Leu Val Gly Ile Glu Leu Arg Val Asp Asp Ala Val Cys Tyr Ser Lys
275 280 285

Ile Thr Ser Val Glu Ala Val Ala Asn Tyr Ser Ala Ile Pro Thr Thr
290 295 300
Ile Gly Gly Leu Arg Phe Glu Arg Ser His Asp Ser Gln Gly Lys Ile
305 310 315 320
Ser Gly Ser Pro Leu Asp Ile Thr Ala Ile Arg Gly Ser Phe Ser Val
325 330 335
Asn Tyr Arg Gly Leu Arg Leu Ser Leu Ser Glu Ile Thr Ala Thr Cys
340 345 350

Thr Gly Glu Val Thr Asn Val Ser Gly Cys Tyr Ser Cys Met Thr Gly

355 360 365

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

370 375 380

Val Arg Cys Lys Gly Asp Glu Thr Ala Phe Ser Val Leu Glu Gly Val

385 390 395 400

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

405 410 415

Gln Cys Gln Leu Asn Cys Gly Gly His Glu Ser Gln Val Thr Leu Lys

420 425 430

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

435 440 445

Met Gln Thr Tyr His Ser Thr Val Pro Thr Gly Ala Asn Ile Pro Ser

450 455 460

Pro Thr Asp Trp Leu Asn Ala Leu Phe Gly Asn Gly Leu Ser Arg Glu

465 470 475 480

Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro

485 490 495

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

500 505 510

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

515 520 525

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

530 535 540

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

545 550 555 560

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

565 570 575

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

580 585 590

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

645 650 655

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

660 665 670

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

675 680 685

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

690 695 700

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

705 710

<210> 12

<211> 245

<212

> PRT

<213> Unknown

<220><223> NP

<400> 12

Met Ser Glu Trp Ser Arg Ile Ala Val Glu Phe Gly Glu Gln Gln Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asp Pro Ala Leu Ile Ile Lys Lys Leu Lys Glu Thr Gly Gly Asp

35 40 45

Asp Trp Val Lys Asp Thr Lys Phe Ile Ile Val Phe Ala Leu Thr Arg

50 55 60

Gly Asn Lys Ile Val Lys Ala Ser Gly Lys Met Ser Asn Ser Gly Ser

65 70 75 80

Lys Arg Leu Met Ala Leu Gln Glu Lys Tyr Gly Leu Val Glu Arg Ala

85 90 95

Glu Thr Arg Leu Ser Ile Thr Pro Val Arg Val Ala Gln Ser Leu Pro

100 105 110

Thr Trp Thr Cys Ala Ala Ala Ala Ala Leu Lys Glu Tyr Leu Pro Val

115 120 125

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

130 135 140

Met Cys Met Ala Phe Gly Ser Leu Ile Pro Thr Ala Gly Val Ser Glu

145 150 155 160

Ala Thr Thr Lys Thr Leu Met Glu Ala Tyr Ser Leu Trp Gln Asp Ala

165 170 175

Phe Thr Lys Thr Ile Asn Val Lys Met Arg Gly Ala Ser Lys Thr Glu

180 185 190

Val Tyr Asn Ser Phe Arg Asp Pro Leu His Ala Ala Val Asn Ser Val

195 200 205

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

210 215 220

Leu Gly Pro Asp Gly Val Pro Ser Arg Ala Ala Glu Val Ala Ala Ala

225 230 235 240

Ala Tyr Arg Asn Leu

245