(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년11월04일
(11) 등록번호 10-2027809
(24) 등록일자 2019년09월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/195 (2006.01) *A61K 39/02* (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01) *C12P 21/00* (2006.01)
G01N 33/569 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/195 (2013.01)
A61K 39/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0177203
(22) 출원일자 2017년12월21일
심사청구일자 2017년12월21일
(65) 공개번호 10-2018-0072586
(43) 공개일자 2018년06월29일
(30) 우선권주장
1020160176031 2016년12월21일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
PLOS: neglected tropical disease, (2015.03.13.), DOI:10.1371/journal.pntd.0003585. 1부.*
(뒷면에 계속)

(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

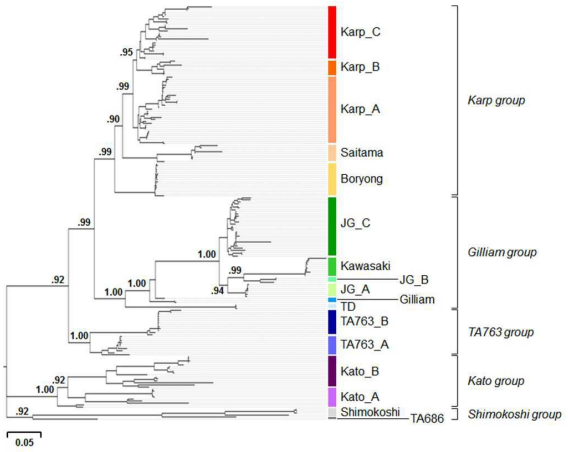
전체 청구항 수 : 총 19 항 심사관 : 손영희

(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, TSA56 항원의 보존 서열로부터 도출한 신규 재조합 단백질 항원과 이를 이용한 이를 이용한 백신 조성물을 개시한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C07K 16/1246 (2013.01)
C12P 21/00 (2013.01)
G01N 33/56911 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
KR1020150123356 A
NCBI, GenBank Accession No. AJC11312.1, 'ScaA, partial [Orientia tsutsugamushi str. Karp]', 2015.03.24
KR1020140100263 A
US20090311722 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI14C0365010015
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 질환극복기술개발사업
연구과제명 생분해성 마이크로니들을 이용한 쯔쯔가무시병 패치 백신 개발
기 여 율 1/1
주관기관 서울대학교산학협력단
연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 23의 아미노산 서열로 이루어진, 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 재조합 단백질 항원.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항 기재의 재조합 단백질 항원을 암호화하는 유전자.

청구항 4

(i) 제1항 기재의 재조합 단백질 항원을 암호화하는 유전자를 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 5

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

청구항 6

제5항에 있어서,

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

청구항 7

제6항에 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 8

제5항에 있어서,

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

청구항 9

제8항에 있어서,

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

청구항 10

제1항 기재의 재조합 단백질 항원을 포함하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 특이 항체 검출용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 쯔쯔가무시 균의 특이 항체는 TSA56 항원에 대한 특이 항체인 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 특이 항체 검출용 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 조성물은 생체 시료로서 혈청과 접촉되어 사용되는 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 특이 항체 검출용 조성물.

청구항 13

제1항 기재의 재조합 단백질 항원을 포함하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균 특이 항체의 검출용 키트.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 키트는 생체 시료 중의 쯔쯔가무시 균 특이 항체와 이 특이 항체에 특이적으로 결합하는 상기 제1항 기재의 재조합 단백질 항원의 결합체를 검출하기 위한 검출제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 특이 항체 검출용 키트.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 검출제는 표지 또는 효소와 결합된 2차 항체인 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 특이 항체 검출용 키트.

청구항 16

제13항에 있어서,

상기 키트는 담체, 세정 버퍼, 시료 희석액, 효소 기질, 반응 정지액 및 사용 방법을 교시하는 설명서 중에서 하나 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 특이 항체 검출용 키트.

청구항 17

(a) 생체 시료와, 제1항 기재의 재조합 단백질 항원을 포함하는 쯔쯔가무시 균의 특이 항체 검출용 조성물과 반응시켜, 생체 시료 중의 쯔쯔가무시 균의 특이 항체와 이 특이 항체에 특이적으로 결합하는 제1항 기재의 재조합 단백질 항원의 결합체를 형성시키는 단계, 및 (b) 그 결합체를 검출하는 단계를 포함하는 생체 시료 중의 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 특이 항체의 검출 방법

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 쯔쯔가무시 균의 특이 항체는 TSA56 항원에 대한 특이 항체인 것을 특징으로 하는 생체 시료 중의 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 특이 항체의 검출 방법

청구항 19

제17항에 있어서,

상기 생체 시료는 혈청인 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 특이 항체의 검출 방법.

청구항 20

제17항에 있어서,

상기 (b) 단계의 결합체를 검출하는 단계는 검출 시그널을 제공할 수 있는 표지나 효소로 접합된 이차 항체를 상기 결합체와 반응시키는 단계, 및 상기 결합체와의 반응 정도를 측정하는 단계를 포함하여 수행되는 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 특이 항체의 검출 방법.

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

[0002] 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.

[0003] 쯔쯔가무시균은 매우 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 수 십여 가지의 아형(strain)들로 분류되고 있다(Eisemann ans Osterman 1985, Am J Trop Med Hyg. Nov;34(6):1173-8; Akira Tamura and Akiyoshi Kawamura 1991, J.CLIN.MICROBIOL. Feb.1991, Vol.29,No.2; WOO-HYUN CHANG et al. 1993, J.CLIN.MICROBIOL. Mar.1993,p.598-605). 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 쯔쯔가

무시균의 유전형의 종류와 빈도는 매우 다양한 것으로 알려져 있다.

[0004] 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.

[0005] 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(Buckland and Dudgeon, 1945; Lancet 2, 734~737; Kawamura et al., 1940. Trop.Dis.Bull. 37, 269~270; Seong et al., 1997. Infect.Immun. 65, 1541~1545; Yu et al., 2005. Am.J.Trop.Med.Hyg. 72, 458~46).

[0006] 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.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 신규 재조합 단백질 항원을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 단백질 항원을 이용하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 단백질 항원을 이용하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 진단용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 기타 다른 목적이나 구체적인 목적은 이하에서 제시될 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자들은 아래의 실시예에서 확인되는 바와 같이, 미국립생물정보학센터(National Center for Biotechnology Information)의 염기서열 데이터베이스에서 2015년 12월 31일까지 발표된 1,030개 TSA56 단백질 유전자 염기서열을 수집하고, 이들 중에서 전체 TSA56 단백질 서열의 암호화 부위(ORF 부위) 85% 이상을 포함하는 206개의 유전자들을 선발한 후(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), 이들 206개의 유전자들의 아미노산 서열과 염기서열을 분석하여 통계학적으로 유의한 차이를 보이는 17개의 유전형으로 분류하고, 계통수의 거리를 기준으로 이를 다시 5개의 유전형 그룹으로 분류하였다. 이들 유전형에 대해서 다음 유전형 간 변이가 비교적 적은 보존 블럭(Conserved blocks)을 Gblocks 프로그램(Systematic biology, 2007, 56, 564-577.) 등을 이용하여 연속된 아미노산 서열의 비특이적 변화가 적고 일관성이 높은 7개 구간 (C1 ~ C7)을 규정하였으며, 17개의 유전형에 포함된 유전자들의 아미노산 서열들을 서로 비교하여 7개의 보존 블럭에 포함되는 아미노산 서열들 중에서 가장 빈도수가 높은 각 위치의 아미노산을 규정하고 이를 토대로 전체를 대표하는 서열("대표서열")을 도출하였다.

[0012] 그 후 본 발명자들은 상기 17개의 유전형 서열, 5개 그룹 유전형의 서열 그리고 1개의 대표서열 중, 대표적으로 보령 유전형의 7개의 보존 블럭 서열을 연결한 재조합 단백질 항원(C1 보존 블럭의 중 "LSLTTGLPFGGTLAAGMTIA"

의 아미노산 서열이 제거되었음, 이 아미노산 서열이 transmembrane motif를 구성하는 것으로 예측되었으며, 재조합 단백질의 생산량을 저해하는 것이 확인되었기 때문임)을 대장균에서 발현/정제하여 제조하고 이 재조합 단백질의 진단으로서의 가능성을 확인하고자 이 재조합 단백질을 쯔쯔가무시 균 감염 항혈청과 반응시켜 western blot과 ELISA로 그 반응성을 확인할 결과 보령 TSA56 항원과 유사한 반응성을 가짐 확인하였으며, 또 이 재조합 단백질의 백신으로서의 가능성을 확인하고자 이 재조합 단백질 항원을 생쥐에 면역하였을 때, TSA56에 대한 항체 생성 등의 체액성 면역 등을 효과적으로 유도하고 또 이 재조합 단백질 항원으로 면역된 생쥐가 TSA56 항원을 면역한 실험군보다 다른 유전형에 대한 저항성이 더 큰 것을 확인하였다.

[0013] 본 발명은 도 3 내지 8의 17개의 유전형, 도 9 및 10의 5개의 그룹 유전형 및 도 11의 1개의 대표서열에서 각 7개 C1 내지 C7의 보존 블럭 서열이 그 순서대로 연결된 서열번호 1 내지 23의 중 어느 하나의 서열로 이루어진 재조합 항원 단백질에 관한 것이다. 또한, 대표서열을 이용한 재조합 단백질 항원을 제조하여 해당 단백질 항원을 생쥐에 면역하였을 경우에도 쯔쯔가무시 감염 생쥐의 생존률이 비교군(TSA56 항원 면역 생쥐)보다 높은 것을 확인하였다.

[0014] 바람직하게는 각 C1에서 trnasmembrane helix로 예측되는 구간(Boryong 유전형의 경우 47번째 아미노산에서 66번째 아미노산인 LSLTTGLPFGGTLAAGMTIA)의 아미노산 서열이 제거되어 연결된 재조합 항원 단백질인 것이 바람직하다. 이러한 trnasmembrane helix의 구간은, 도 3 내지 8의 17개의 유전형, 도 9 및 10의 5개의 그룹 유전형 및 도 11의 1개의 대표서열의 C1 서열에서, 상기 Boryong 유전형의 서열에 대응하는 서열을 찾거나 이러한 구간의 예측을 가능하게 하는 TMHMM Server v. 2.0 프로그램(http://www.enzim.hu/hmmtop/) 등을 이용하여 찾을 수 있다.

[0015] 전술하였지만, 이들 23개의 각 아미노산 서열로 이루어진 재조합 단백질 항원 중 대표적으로 보령 균주에 대한 재조합 단백질 항원은 쯔쯔마무시 균 감염 항혈청에 대해서 TSA56 항원과 유사한 반응성을 보여 진단으로서의 효과뿐만 아니라 TSA56 항원보다 다른 유전형에 대해서도 면역 반응을 유도하여 백신으로서의 효과를 가진다. TSA56이나 기존 이를 이용한 재조합 단백질 백신은 다른 유전형에 대해서 면역 반응을 유도하지 못하는 것으로 알려져 있다(Seong et al., 1997. Infect.Immun. 65, 1541-1545; Yu et al., 2005. Am.J.Trop.Med.Hyg. 72, 458-46).

[0016] 한편 각 서열들은 대표서열과 적어도 68.8%의 서열 상동성을 가지므로 그 대표서열과 공통된 서열을 포함하고 68.8% 이상의 서열 상동성을 가지는 재조합 항원도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 이해된다. 여기서 "대표서열과 공통된 서열"은 대표서열과 나머지 22개의 서열을 정렬하였을 때 각 위치에서 23개의 서열 모두에서 서로 공통된 아미노산으로 이루어진 서열을 의미한다.

[0017] 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.

[0018] 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.

[0019] 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[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] 등을 참조할 수 있다.

[0020] 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.

[0021] 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.

[0022] 발현벡터는 상기 재조합 단백질 항원을 암호화하는 목적 유전자 이외에, 그 목적 유전자와 작동 가능하게 연결됨으로써 상기 목적 유전자의 전사와 번역에 영향을 미치는 조절서열을 포함한다.

[0023] 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.

[0024] 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.

[0025] 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.

[0026] 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.

[0027] 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.

[0028] 본 발명의 방법에 있어서, 발현벡터는 또한 목적유전자의 용이한 클로닝을 위해서 제한효소 인식 부위(restriction enzyme recognition site)를 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 (a) 단계의 발현벡터를 제작한 후에는 이를 숙주 미생물에 형질전환시키는 (b) 단계가 수행되게 된다.

[0030] 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.

[0031] 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(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 Har

[0032] bor Laboratory (1982)) 문헌(Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255, 12073-12080 (1980)), 문헌(Luchansky et al Mol. Microbiol. 2, 637-646 (1988)) 등을 참조할 수 있다.

[0033] 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.

[0034] 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.

[0035] 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, DHIOB/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.

[0036] 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.

[0037] 또 대장균에서 목적유전자의 고수율의 발현을 위해서는 목적유전자의 서열을 대장균에서 선호되는 코돈으로 최적화시켜 이용할 수도 있다. 이와 관련해서는 문헌(Wada et al., Nucleic Acids Res. 20:2111-2118 (1992))을 참조할 수 있다.

[0038] 본 발명의 방법에 있어서, 전술한 바와 같이 형질전환된 숙주 미생물이 얻어지면 이 숙주 미생물을 배양하여 상기 재조합 단백질 항원을 생산하게 된다.

[0039] 형질전환된 숙주 미생물의 배양도 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.

[0040] 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 (Stanner, C.P. et al., Nat. New Biol. 230:52(1971)), Iscove's MEM (Iscove, N. et al., J. Exp.Med.147:923(1978)), DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium, Dulbecco, R. et al., Virology 8:396(1959)) 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.

[0041] 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.

[0042] 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, 2001년 1월 15일 발행의 제1권 7.42 내지 7.45, 제2권 8.9 내지 8.17] 등을 참조할 수 있다.

[0043] 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 재조합 단백질 항원을 활성성분으로 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.

[0044] 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.

[0045] 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.

[0046] 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.

[0047] 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.

[0048] 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.

[0049] 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.

[0050] 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, 땅콩

유, 옥수수유 등), 비타민 E 아세테이트 등일 수 있다.

[0051] 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.

[0052] 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.

[0053] 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.

[0054] 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.

[0055] 본 발명의 백신 조성물의 투여량은 의료인에 의해 나이, 체중, 성별, 증상, 합병증, 다른 질환의 이환 유무 등의 환자 특성을 고려하여 결정될 수 있다.

[0056] 또한 투여의 시간적 간격과 횟수는 사용되는 제형이나 활성성분의 혈중 반감기 등을 고려하여 결정될 수 있다.

[0057] 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.

[0058] 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 재조합 단백질 항원을 포함하는 쯔쯔가무시 균의 특이 항체 검출용 조성물에 관한 것이다.

[0059] 본 발명의 검출용 조성물은 생체 시료 중의 쯔쯔가무시 균의 특이 항체, 특히 TA56 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.

[0060] 본 명세서에서, "특이적 결합"이란 쯔쯔가무시 균에 대한 특이 항체, 특히 TSA56 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.

[0061] 또 본 명세서에서, "생체 시료"는 쯔쯔가무시 균에 대한 특이 항체, 특히 TSA56 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.

[0062] 본 발명의 조성물은 상기 재조합 단백질 항원이 그 가용성 용액 예컨대 탄산염 완충용액 또는 중탄산염 완충용액에 용해된 형태이거나 동결건조된 형태일 수 있다.

[0063] 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 기판, 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, 페놀 수지, 우레아 수지, 에폭시 수지, 멜라민 수지, 실리콘 수지, 폴리페닐렌옥시드, 폴리술폰, 폴리에틸렌글리콜, 아가로스, 아크릴아미드, 니트로셀룰로오스, 나일론, 라텍스 등의 유기 재료가 사용될 수 있다.

[0064] 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.

[0065] 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.

[0066] 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 TSA56에 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.

[0067] 상기 결합체는 다양한 방법을 통하여 검출함으로써 생체 시료 중의 쯔쯔가무시 균에 대한 특이 항체 특히 TSA56에 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.

[0068] 상기 결합체는 검출제를 사용하여 검출할 수 있는데, 검출제는 예컨대 쯔쯔가무시 균에 대한 특이 항체 특히 TSA56에 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.

[0069] 2차 항체는 검출 시그널을 제공하는 표지(label)나 효소와 접합됨으로써 검출을 편리하게 할 수 있다.

[0070] 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.

[0071] 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 반

응하여 자주색을 나타낸다.

[0072] 상기 표지나 효소는 바람직하게는 항체와 공유결합된다.

[0073] 이들 2차 항체 등의 검출제를 사용하여 검출할 경우, 이들 2차 항체의 상기 결합체와의 반응 정도를 효소 면역 측정법, 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.

[0074] 본 발명은 다른 측면에 있어서, 쯔쯔가무시 균 특이 항체 특히 TSA56 항원에 대한 특이 항체의 검출용 키트에 관한 것이다.

[0075] 본 발명의 검출용 키트는 상기 재조합 단백질 항원을 포함함을 특징으로 한다.

[0076] 본 발명의 키트에 포함되는 상기 재조합 단백질 항원은 지지체 결합되어 있거나 유리된 형태일 수 있으며, 가용성 용액에 용해된 형태이거나 동결건조된 형태일 수 있다.

[0077] 본 발명의 키트는 생체 시료 중의 쯔쯔가무시 균 특이 항체 특히 TSA56 항원에 대한 특이 항체와 이 특이 항체에 특이적으로 결합하는 상기 재조합 단백질 항원의 결합체를 검출하기 위한 검출제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 검출제는 전술한 바의 표지 또는 효소와 결합된 2차 항체일 수 있다.

[0078] 또한 본 발명의 키트는 담체, 세정 버퍼, 시료 희석액, 효소 기질, 반응 정지액 등을 추가로 포함할 수도 있으며, 결과의 해석 방법 등을 포함한 사용 방법을 교시하는 설명서를 추가로 포함할 수도 있다.

[0079] 본 발명의 또 다른 측면에 있어서, 생체 시료 중의 쯔쯔가무시 균의 특이 항체, 특히 TA56 항원 대한 특이 항체의 검출 방법에 관한 것이다.

[0080] 본 발명의 방법은 (a) 생체 시료와, 상기 재조합 단백질 항원을 포함하는 쯔쯔가무시 균의 특이 항체 검출용 조성물과 결합시켜, 생체 시료 중의 쯔쯔가무시 균의 특이 항체, 특히 TA56 항원 대한 특이 항체와 이 특이 항체에 특이적으로 결합하는 상기 재조합 단백질 항원의 결합체를 형성시키는 단계, 및 (b) 그 결합체를 검출하는 단계를 포함하여 구성된다.

[0081] 본 발명의 방법에서 상기 (a) 단계의 생체 시료는 전술한 바의 이유에서 바람직하게는 혈청이다.

[0082] 또 본 발명의 방법에서, 상기 (b) 단계의 결합체를 검출하는 단계는 검출 시그널을 제공할 수 있는 표지나 효소로 접합된 이차 항체를 상기 결합체와 반응시키는 단계 및 상기 결합체와의 반응 정도를 측정하는 단계를 포함하여 구성된다. 여기서 2차 항체의 결합체와의 반응 정도는 전술한 바와 같이 효소 면역 측정법, 형광 면역 측정법, 방사 면역 측정법, 발광 면역 측정법 등에 의하여 가능하며, 바람직하게는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 사용하는 경우이다.

[0083] 본 발명의 또 다른 측면에 있어서, 쯔쯔가무시 균 감염 여부 진단에 유용한 정보를 제공하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0084] 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

[0085] 본 발명은 전술한 바와 같이, 쯔쯔가무시 균 감염 여부 등의 진단과 그 쯔쯔가무시 균에 대한 백신으로 유용하게 사용할 수 있는, TSA56 항원의 보존 서열로부터 도출한 신규 재조합 단백질 항원을 제공할 수 있다.

[0086] 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

[0087] 도 1은 수집된 206개 tsa56유전자들의 계통수(phylogenetic tree)분석과 그에 따른 유전형 분류 결과이다.

도 2는 206개 TSA56 단백질들의 아미노산서열 분석을 통해 확인된 7개의 보존 블럭(conserved blocks: C1 ~ C7)이다.

도 3 내지 8은 17개의 각 유전형에 대해서 도출된 7개의 보존 블럭들의 각 아미노산 서열이다.

도 9 내지 10은 5개의 그룹 유전형에 대해서 도출된 7개의 보존 블럭들의 각 아미노산 서열이다.

도 11은 대표서열의 7개의 보존 블럭들의 각 아미노산 서열이다.

도 12는 백신항원으로 사용된 cTSA56_Boryong의 아미노산 서열이다.

도 13은 정제된 cTSA56_Boryong 제조합 단백질과 TSA56_Boryong 재조합 단백질의 쿠마시 블루 염색 결과와 건강한 사람과 쯔쯔가무시 균 감염의 항혈청을 이용한 western blot 결과이다.

도 14는 재조합 단백질을 마우스에 3회 면역한 후 유도되는 TSA56_Boryong 단백질에 특이적인 IgG1 및 IgG2c 항체 역가를 나타낸 결과이다.

도 15 및 도16은 쯔쯔가무시균 감염에 후 면역된 생쥐들의 생존율 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0088] 이하 본 발명을 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0089] **<실시예 1> TSA56의 보존블럭(conserved blocks) 동정과 cTSA56 재조합 단백질 항원의 제조**

[0090] 미국립생물정보학센터(National Center for Biotechnology Information)의 염기서열 데이터베이스에서 2015년 12월 31일까지 발표된 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). 상기 선발된 206개의 유전자 서열은 아래 [표 1]에 나타나 있다(아래 [표 1]에서 Sequence ID로 특정된 206개의 유전자 서열이며, 이는 총 324개의 유전자 서열 중 서로 서열이 같은 유전자 서열들이 존재하기 때문에 최종 206개로 선발되었음).

표 1

[0091] 선발된 206개의 유전자 서열

NCBI Accession no.	Sequence ID	Strain name		
AB534164	1	Matsuzawa		
AF430144	1	yeo-joo		
JQ898367	1	CBNU-20		
AF173043	2	Matsuzawa		
AF173044	3	Mori		
AF173045	3	Okazaki		
AF173046	3	Kamimoto		
AF173047	4	402I		
AF173176	5	Hirahata		
AF173177	5	R9		
AF201835	5	Hirahata		
AF201837	5	R9		
AF173178	6	R39		
AF201836	6	R39		
AF302986	6	CMM1		
AF302987	6	KNP1		
AF302988	6	KNP2		
JX188387	6	TD-17		
JX188390	6	5-05		
JX235718	6	Sato?		
KC693731	6	SH234		
AF430143	7	je-cheon		
AY222636	8	TW261		
EF213088	9	UT213		

EF213089	10	UT336		
EF213092	11	UT169		
EF213094	12	UT395		
EF213097	13	UT221		
EF213098	14	FPW2031		
EF213100	15	UT219		
EU551148	16	Taitung-7		
GQ332744	17	TP0607a		
GQ332748	18	KHC0606a		
GU120155	19	MZ01-1		
GU120156	20	MZ01-2		
GU446616	21	OI06-2		
GU446617	22	OI07		
HQ660203	23	Inha-Kp241680-1		
HQ660204	23	Inha-Kp241680-2		
HQ660208	23	Inha-Kp1186344		
HQ660207	24	Inha-Kp155080		
KC688322	25	O2		
KC688323	26	O3		
M33004	27	Karp		
DQ323176	28	Hualien-12		
EF213081	29	UT176		
EF213084	30	UT177		
GQ332747	31	KHC0609c		
GU120145	32	HL05		
GU446597	33	KM16-1		
HQ718450	34	04QNg_VN		
AF173049	35	LA-1		
HQ718432	36	T0224198_KH		
AY222628	36	TW73R		
GQ332746	36	KM0607h		
AY222632	37	TW45R		
GU120146	37	KM01		
GU120150	37	KM05		
GU446590	37	KM11-1		
GU446601	37	KM18		
GU446602	37	KM19-1		
AY222637	38	TW201		
AY222640	38	TWyu81		
GU120158	38	PH01		
GU120159	38	PH02		
GU120161	38	PH04		
EF583448	38	Taitung-6		
AY357216	39	Taitung-3		
EF213078	40	UT76		
HQ718445	41	T1118373_KH		
EF213080	41	UT167		
EF213082	41	UT316		
EF213083	41	UT332		
EF213086	41	UT150		
HQ718446	42	T1121050_KH		
EF213090	42	UT418		
FJ374771	43	Lc-1		
GQ332742	44	KM0605a		
GU120152	44	KM07		
GU120154	44	KM09		
GU446593	44	KM13		
GQ332743	45	TY0610a		

GQ332745	46	TP0708a	
GU120140	47	HL02-1	
GU120144	48	HL04	
GU446591	49	KM11-2	
GU446592	50	KM12	
GU446599	51	KM17-1	
GU446600	52	KM17-2	
GU446614	53	OI05-2	
GU446618	54	OI08	
HQ718422	55	S0902151_KH	
HQ718423	56	S0915092_KH	
HQ718427	57	S1007358_KH	
HQ718428	58	S1020210_KH	
HQ718433	58	T0727121_KH	
HQ718431	59	T0122244_KH	
HQ718434	60	T0925265Lu_KH	
HQ718436	60	T0928182Li_KH	
HQ718437	60	T1008243Sp_KH	
HQ718447	61	U0215166_KH	
HQ718448	62	01QNg_VN	
HQ718451	63	05QNg_VN	
HQ718452	64	05QN_VN	
HQ718454	64	07QN_VN	
HQ718453	65	06QN_VN	
HQ718455	66	11QY87_VN	
HQ718457	66	15QY87_VN	
HQ718456	67	13QY87_VN	
HQ718458	68	33BVKH_VN	
KJ001159	69	Jin / 2012	
KJ001163	69	Jin / 2013	
AF302983	70	HSB1	
AF302984	70	HSB2	
AF302989	70	FAR1	
AF302995	70	UAP7	
AF302991	71	UAP1	
AF302992	71	UAP2	
AF302993	71	UAP4	
AF430141	72	young-worl	
AF430142	73	pa-joo	
AY222634	74	TW441	
AY222638	75	TW141	
AY222639	76	TW121	
GQ332749	77	CH0711a	
KC693732	78	SH245	
AF173048	79	Nishino	
GQ332750	80	TPC0701a	
GQ495609	81	KOR 03-S47	
GQ495610	82	KOR 03-S45	
HQ660198	82	Inha-B201883-1	
HQ660199	82	Inha-B201883-2	
HQ660200	82	Inha-B201883-3	
HQ660201	82	Inha-B1009202-1	
HQ660202	82	Inha-B1009202-2	
HQ660205	82	Inha-B1341342-1	
HQ660206	82	Inha-B1341342-2	
HQ660211	82	Inha-B201883-4	
HQ660212	82	Inha-B203537-1	
HQ660213	82	Inha-B203537-2	

HQ660214	82	Inha-B697253-1	
JQ898362	82	CBNU-15	
JQ898370	82	CBNU-24	
JQ898371	82	CBNU-25	
JQ898384	82	CBNU-38	
JQ898388	82	CBNU-42	
JQ898390	82	CBNU-44	
JQ898350	83	CBNU-3	
JQ898351	84	CBNU-4	
JQ898352	84	CBNU-5	
JQ898355	84	CBNU-8	
JQ898381	84	CBNU-35	
JQ898354	85	CBNU-7	
JQ898356	86	CBNU-9	
JQ898357	87	CBNU-10	
JQ898368	87	CBNU-21	
JQ898386	87	CBNU-40	
JQ898389	87	CBNU-43	
JQ898359	88	CBNU-12	
JQ898365	88	CBNU-18	
JQ898372	88	CBNU-26	
JQ898373	88	CBNU-27	
JQ898375	88	CBNU-29	
JQ898377	88	CBNU-31	
JQ898379	88	CBNU-33	
JQ898382	88	CBNU-36	
JQ898383	88	CBNU-37	
JQ898385	88	CBNU-39	
JQ898363	89	CBNU-16	
JQ898369	90	CBNU-22	
JQ898378	91	CBNU-32	
JQ898387	92	CBNU-41	
JQ898391	93	CBNU-45	
L04956	94	B119	
M63380	95	Kuroki	
AY222631	96	TW461	
AY335819	97	Taitung-2	
AY525145	98	Hualien-2	
AY834392	99	Taitung-5	
DQ314548	99	Hualien-10	
GQ332760	99	KMO606a	
GU120171	99	TT05	
AY834393	100	Hualien-7	
AY856071	101	Hualien-9	
DQ323174	102	Hualien-8	
DQ789360	103	Hualien-13	
GQ332757	103	KHC0707a	
GU120157	103	MZ02	
HQ718439	104	T1015340Sp_KH	
EF213079	104	UT196	
EF213091	104	UT144	
EF213096	104	UT125	
EF213085	105	FPW2016	
EF213093	106	FPW2049	
EF213099	107	UT329	
GQ332758	108	TPC0707a	
GQ332759	109	KHC0706a	
GU120164	110	TT01-2	

GU120165	111	TT02-1	
GU120166	112	TT02-2	
GU446594	113	KM14	
GU446598	114	KM16-2	
GU446609	115	OI02	
HQ718426	116	S1006257_KH	
HQ718429	117	S1213056_KH	
HQ718430	118	S1227072_KH	
HQ718440	119	T1015340_KH	
HQ718441	120	T1019165_KH	
HQ718443	121	T1116018_KH	
HQ718444	122	T1116116_KH	
HQ718460	123	61QN_VN	
KJ001161	124	Liu / 2011	
KJ001162	125	Mu / 2013	
AF173037	126	Oishi	
AF173038	127	Taguchi	
JQ898349	127	CBNU-2	
JQ898353	127	CBNU-6	
JQ898364	127	CBNU-17	
AF173039	128	Kanda	
M63383	128	Kawasaki	
JQ898358	128	CBNU-11	
JQ898380	128	CBNU-34	
GQ332756	129	PT0712b	
JQ898348	130	CBNU-1	
JQ898360	131	CBNU-13	
JQ898361	132	CBNU-14	
JQ898366	133	CBNU-19	
JQ898374	134	CBNU-28	
JQ898376	135	CBNU-30	
AY243357	136	Hualien-1	
GQ332754	137	NT0711a	
GQ332755	138	TT0711a	
AF050669	139	Sxh951	
AF173033	140	Ikeda	
AF173034	140	LP-1	
AF173035	140	Iwataki-1	
AF302985	140	HSB3	
AF302990	140	FAR2	
JX235719	140	Kaisei?	
GQ495611	140	KOR 03-S17	
AF173036	141	405S	
AF302994	142	UAP6	
HQ660210	143	Inha-W351003-2	
JX188389	144	SH216	
U19903	145	Yonchon	
DQ485289	146	Taiwan CDC Gilliam	
DQ514319	147	Neimeng-65	
GU120147	147	KM02	
HQ718421	148	S0617100_KH	
GQ332753	149	TT0705a	
GU120168	149	TT03-1	
GU446595	150	KM15-1	
GU446596	151	KM15-2	
AY787232	152	Taitung-4	
DQ323175	153	Hualien-11	

EF213095	154	UT302	
GU120149	155	KM04	
GU120153	156	KM08	
GU120172	156	TT06-1	
GU446604	156	KM20	
GU446607	156	KM21-3	
GU120160	157	PH03	
GU120162	158	PH05	
GU120173	159	TT06-6	
GU446588	160	KM10-1	
GU446589	161	KM10-2	
GU446603	162	KM19-2	
GU446613	163	OI05-1	
HQ718459	164	45QN_VN	
AY222630	165	TW521	
AY222635	166	TW381	
DQ852664	166	Hualien-14	
GQ332751	166	KHC0704a	
GU120142	166	HL03-1	
GQ332752	167	NT0707a	
GU120139	168	HL01	
GU120141	169	HL02-2	
GU446606	170	KM21-2	
GU446620	171	OI10	
GU446621	172	OI011	
HQ718449	173	02QNg_VN	
U80636	174	TA763	
AF173040	175	Omagari	
M63382	175	Kato	
AF173050	176	LF-1	
AY636101	177	Hualien-3	
AY714316	178	Hualien-5	
AY714317	179	Hualien-6	
GQ332761	180	HC0605a	
GQ332762	181	KM0607b	
GU120143	182	HL03-2	
GU120148	183	KM03	
GU120169	184	TT03-2	
GU120170	185	TT04	
GU446608	186	OI01-2	
GU446610	187	OI03-1	
GU446611	188	OI03-2	
GU446612	189	OI04	
U19904	190	TA678	
AY222629	191	TW62R	
AY222633	191	TW44R	
GU120151	191	KM06	
GU446605	191	KM21-1	
AY222641	192	TWyu11	
AY714315	193	Hualien-4	
GQ332763	193	KHC0606b	
EF213087	194	FPW1038	
GU120163	195	TT01-1	
GU446615	196	OI06-1	
GU446619	197	OI09	
HQ718420	198	S0522327_KH	
HQ718438	198	T1009163Lu_KH	
HQ718424	199	S0923259_KH	

HQ718425	199	S0923262_KH	
HQ718435	199	T0928133_KH	
HQ718442	199	T1027262_KH	
U19905	200	TA716	
AB536749	201	N.A.	
AB711341	202	80-Yamagata-201	
M63381	202	Shimokoshi	
AB751254	203	R08-m133	
AF173042	204	LX-1	
AF201834	205	Fuji	

[0092] 상기 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. 206개의 유전자들이 공통으로 보유하는 단백질 암호화 구간을 다시 염기서열로 바꾸고 계통수 작성에 사용하였다.

[0093] 계통수 작성을 위해 JModelTest 2.0 프로그램(Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9(8), 772; Guindon S and Gascuel O (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood, Systematic Biology 52: 696-704)을 사용하여 염기서열들의 최적화된 치환행렬로 보정하였다. 유전자 계통수(phylogenetic tree)는 Maximum Likelihood 일종인 RaxML(Randomized Axelerated Maximum Likelihood, BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE Vol. 22 no. 21 2006, pages 2688-690)을 기반으로 SeaView4.5.1 프로그램을 통해 작성하였으며, Shimodaira-Hasegawa-like(SH-like) test(Molecular biology and evolution, 2010, 27, 221-224)를 통해 통계학적으로 유의한 차이를 보이는(support value: = 0.9) 17개의 유전형으로 분류하고, 계통수의 거리를 기준으로 이를 다시 5개의 유전형 그룹으로 나누었다[도 1]. 206개의 유전자들간 아미노산 서열이 보존된 구간을 정의하기 위하여 아미노산 서열의 각 위치에서 연속된 10개의 아미노산 단위로(예컨대 첫 번째 아미노산은 그 다음 9개의 아미노산과 함께 하나의 구간이 되고, 두 번째 그 다음 9개의 아미노산과 함께 하나의 구간이 됨) 해당 각 구간 서열에 나타나는 유전자 간 아미노산 변이의 산술적 평균값을 계산하여, 전체 평균값인 3.3 아미노산 변이/site의 값을 얻었으며, 아미노산 서열의 각 위치에서 연속된 10개 아미노산 구간의 아미노산 변이의 수가 상기 평균값보다 낮게 유지되는 구간을 지정하였다. 다음 Gblock 프로그램(Systematic biology, 2007, 56, 564-577)을 이용하여 연속된 아미노산 서열의 차이가 유전자들 간에 적고 일관성이 높은 보존 부위를 지정하였다. 이 두 가지 방법을 이용하여 유전자들 간에 차이가 상대적으로 적은 7개의 보존블럭들(Conserved blocks)을 규정하였다[도 2]. 206개의 유전자들의 주요 아미노산 보존서열(major consensus sequences)들부터 추론된 17개 유전형, 5개의 유전형 그룹, 그리고 전체 서열을 대표하는 대표서열(Universal conserved sequence)의 보존 블럭들의 아미노산 서열을 [도 3] 내지 [도 11]에 정리하였다.

[0094] 그리고 아래의 [표 2]에 대표서열(C1 내지 C7이 순서대로 연결된 서열)과 나머지 22개의 서열들의 서열 상동성을 비교할 결과를 나타내었다.

표 2

[0095] 대표서열과 나머지 서열의 서열 상동성 비교 결과

유전형	대표서열과의 서열 상동성(%)
Karp_C con	94.5
Karp_B con	91.9
Karp_A con	92.3
Saitama con	85.6
Boryong con	88.2
JG_C con	92.3
Kawasaki con	89.7
JG_B con	89.3
JG_A con	92.3
Gilliam con	92.3
TD con	87.1
TA763_B con	88.9

TA763_A con	91.9
Kato_B con	91.9
Kato_A con	90
Shimokoshi con	72.7
TA686 con	87.5
Karp group con	94.5
Gilliam group con	94.1
TA763 group con	92.6
Kato group con	93.4
Shimokoshi group con	76.4
Universal TSA56 con	100

[0096] 이들 총 23개의 보존 블럭들의 아미노산 서열로 이루어진 재조합 단백질 항원(각 보존 블럭 서열들이 그 순서대로 연결되어 이루어진 단백질 항원)의 진단과 백신으로서의 이용 가능성을 확인하고자, 대표적으로 [도 4]의 보령(Boryong) 유전형의 7개의 보존 블럭 서열들을 연결하여 이루어진 서열의 단백질(이하 "cTSA56_Boryong")과 대표서열의 단백질(universal conserved TSA56; 이하 "ucTSA56")를 실험에 사용하였다. cTSA56_Boryong의 각 C1 내지 C7의 서열들은 206개의 유전자들 중에서 보령 유전형으로 확인된 17개 유전자 중 7개의 보존부위에 해당하는 아미노산 서열들에서 가장 빈도가 높은 아미노산들의 서열들을 추출하여 얻은 것이다. 상기 cTSA56_Boryong의 서열을 [도 12](및 서열번호 24)에 제시하였는데, [도 12]에 제시된 cTSA56_Boryong의 아미노산 서열은 [도 4]에 제시된 보령 유전형 보존블럭 1(C1) 아미노산 서열 중에서 "LSLTTGLPFGGTLAAGMTIA"의 아미노산 서열이 제거된 것으로서, 이 아미노산 서열이 transmembrane motif를 구성하는 것으로 예측되었고 또 재조합 단백질의 생산량을 저해하는 것이 확인되었기 때문에 이를 제외하고 재조합 항원 단백질을 제조하였다. ucTSA56는 17개의 유전형에 포함된 유전자들의 7개 보존 블럭에 포함되는 아미노산 서열 중에서 가장 빈도수가 높은 각 위치의 아미노산으로 구성된 서열이며 해당 서열을 [도 11] 및 서열번호 23에 제시하였다.

[0097] cTSA56_Boryong 또는 ucTSA56을 암호화하는 핵산서열을 화학적으로 합성하여 PCR로 증폭한 후 대장균 발현벡터인 pET-28a(+)플라즈미드에 클로닝하고, *Escherichia coli* BL21(DE3)에 도입하였다. 이 재조합 대장균을 Kanamicin(50㎍/ml)이 함유된 LB broth에서 OD600nm (Optical Density 600nm)의 값이 0.6-0.8에 도달할 때까지 배양하였다. 이후, 0.1mM isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG)을 첨가 후, 16℃에서 18시간 동안 배양하여 단백질의 발현을 유도하였다.

[0098] 발현 유도가 끝난 균은, 10분 동안 1,000xg의 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 현탁시켜 4℃에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 얼음 위에서 5분간 초음파처리를 하였으며 이를 통해 얻어진 용해물을 1,600xg로 4℃에서 20분간 원심 분리하였다.

[0099] 상층액을 수거하고 결합 완충액으로 미리 평형화시킨 Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) His-결합 레진(Resin)과 4℃에서 60분 동안 반응시켰다.

[0100] 레진은 50mM imidazole이 포함된 결합 완충액으로 세척 후, 250mM imidazole이 포함된 결합 완충액으로 단백질을 정제하였다. 이후, Free imidazole을 제거하기 위하여 인산완충액(pH7.4)에 4℃에서 18시간 동안 투석(Dialysis)을 진행하였으며, 정제된 단백질은 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 확인하였다.

[0101] 추출한 단백질은 전기영동하여 쿠마시 블루 염색(Coomasie blue stain)한 결과와, 쯔쯔가무시병 환자 혈청과 항-His항체를 이용한 western blot기법으로 반응 여부를 확인한 결과를 [도 13]에 나타내었다. [도 13]의 결과는 예상한 바의 분자량을 갖는 30kDa의 cTSA56_Boryong 재조합 단백질이 얻어짐을 보여주며, cTSA56_Boryong 재조합 단백질이 건강한 사람의 혈청에는 반응하지 않고 쯔즈가무시 균 감염 환자(OT patient)의 혈청에는 반응함으로써 쯔즈가무시 균 감염 환자의 진단에 유용하게 사용될 수 있음을 보여준다.

[0102] **<실시예 2> cTSA56_Boryong 재조합 단백질 항원을 이용한 면역원성 및 백신 효능 검증**

[0103] **1. 재조합 단백질 항원 면역 및 혈액 채취**

[0104] 정제된 cTSA56_Boryong 재조합 단백질 20㎍과 TSA56_Boryong(대조군으로서 보령 유전형 TSA56 단백질의 세포외

부위, 즉 signal peptide 및 transmembrane domain 제외) 20㎍, 음성 대조군으로 인산완충액을 면역하였다. 각각의 백신 제제는 인산 완충액과 총량이 80㎕이 되게 섞어준 후, 면역 보강제인 2% Alhydrogel 20㎕을 첨가하여 총량 혼합비율(final volume ratio)이 4:1(항원:면역 보강제)이 되게 한 후 실온에서 15분간 반응시켜 주었다.

[0105] 이렇게 제조된 각 백신 제제는 C57BL/6(6-8주령,암컷) 생쥐들에 피하(Subcutaneous) 주사하여, 2주 간격으로 총 3회 면역하였다.

[0106] 매회 면역 7일 후, 안와채혈을 통해 혈액을 획득하였으며, 2500 x g로 5분간 원침하여 혈청을 분리하였다.

[0107] **2. 특이 항체 정량을 위한 ELISA**

[0108] 0.05M bicarbonate buffer(pH 9.5)에 정제된 TSA56_Boryong 단백질을 1㎍/㎖의 농도로 희석한 뒤 Immunoassay plate에 100㎕/well씩 4℃에서 18시간 동안 코팅하였다

[0109] 세척액(0.05% Phosphatate Buffered Sakine Tween-20, PBST)을 이용해 코팅된 well들을 세척하고, 3% BSA(Bovine serum albumin) 용액으로 실온에서 2시간 동안 Blocking하였다.

[0110] 마우스의 혈청 100배 희석액을 2배씩 단계 희석(serial dilution)하여 100㎕/well씩 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 반응시켜 주었다.

[0111] 세척액(0.05% Phosphatate Buffered Sakine Tween-20, PBST)을 이용해 세척 한 후, 10000배 희석한 anti-mouse-IgG1, IgG2c HRP conjugate를 100㎕/well로 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시켜 주었다.

[0112] 세척액(0.05% Phosphatate Buffered Sakine Tween-20, PBST)을 이용해 세척 한 후, 발색제인 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine (TMB) 용액을 100㎕/well씩 첨가하여 실온에서 7분간 반응시켜 주었다.

[0113] 반응정지용액(1N H_2SO_4)을 100㎕/well로 첨가한 후, Microplate reader을 이용해 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0114] 음성대조군인 인산완충액군을 제외한 cTSA56_Boryong 재조합 단백질과 TSA56_Boryong 단백질 면역 실험군에서 TSA56_Boryong에 대한 특이적인 IgG1 및 IgG2c 항체 역가가 거의 유사하게 증가하는 것을 확인하였다 [도 14].

[0115] **3. 마우스 감염실험**

[0116] 앞에서와 같이 각 백신 제제를 C57BL/6(6-8주령,암컷) 생쥐들(n = 5/group)에 피하(Subcutaneous) 주사하여, 2주 간격으로 총 3회 면역한 뒤 7일 후, 반수치량 100배(100 X LD50)에 해당하는 보령 또는 카프 유전형 쯔쯔가무시균을 복강내(Intraperitoneal) 경로로 감염시켰다. 감염 후, 30일 동안 마우스의 생존률을 관찰하였다.

[0117] TSA56_Boryong이나 cTSA56_Boryong 재조합 단백질을 면역한 생쥐들은 모두 보령 유전형 감염 후에 생존하였다. 카프 유전형을 감염시킨 생쥐들에서 TSA56_Boryong 면역군은 40% 만 생존한 반면, cTSA56_Boryong 면역군은 모두 생존하였다. 항원을 면역하지 않은 음성대조군에서는 모든 생쥐들이 사망하였다. 따라서 cTSA56_Boryong 재조합 단백질 면역을 통해 동일 유전형에 대한 보호면역이 유도될 수 있을 뿐만 아니라, 다른 유전형에 대해서도 보다 향상된 보호면역이 제공될 수 있음을 확인하였다. 해당결과는 [도 15]에 나타내었다.

[0118] <cTSA56_Boryong 재조합 단백질 항원>

[0119] 상기 실시예의 cTSA56_Boryong 또는 TSA56_Boryong 백신 제제를 C57BL/6(6-8주령,암컷) 생쥐들(n = 5/group)에 피하(Subcutaneous) 주사하여, 2주 간격으로 총 3회 면역한 뒤 7일 후, 반수치량 100배(100 X LD50)에 해당하는 보령 또는 카프 유전형 쯔쯔가무시균을 복강내(Intraperitoneal) 경로로 감염시켰다. 감염 후, 30일 동안 마우스의 생존률을 관찰하였다.

[0120] TSA56_Boryong이나 cTSA56_Boryong 재조합 단백질을 면역한 생쥐들은 모두 보령 유전형 감염 후에 생존하였다. 카프 유전형을 감염시킨 생쥐들에서 TSA56_Boryong 면역군은 40%만 생존한 반면, cTSA56_Boryong 면역군은 모두 생존하였다. 항원을 면역하지 않은 음성대조군에서는 모든 생쥐들이 사망하였다. 따라서 cTSA56_Boryong 재조합 단백질 면역을 통해 동일 유전형에 대한 보호면역이 유도될 수 있을 뿐만 아니라, 다른 유전형에 대해서도 보다 향상된 보호면역이 제공될 수 있음을 확인하였다. 해당결과는 [도 15]에 나타내었다.

[0121] <ucTSA56 재조합 단백질 항원>

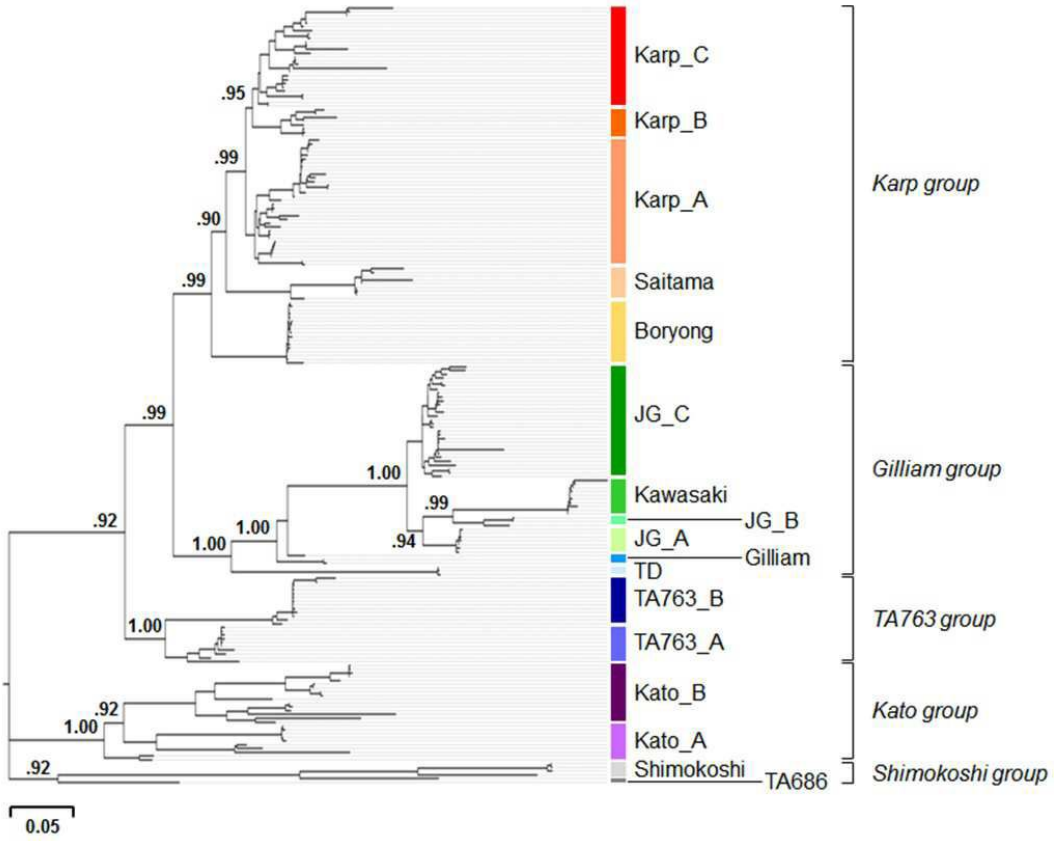
[0122] ucTSA56 재조합 단백질 항원을 C57BL/6(6-8주령,암컷) 생쥐들(n = 5/group)에 주사하여, 상기 실시예에 언급된 방법과 동일한 방법으로 마우스 생존률에 끼치는 영향을 관찰하였다. 대조군으로는 TSA56_Boryong를

사용하였다.

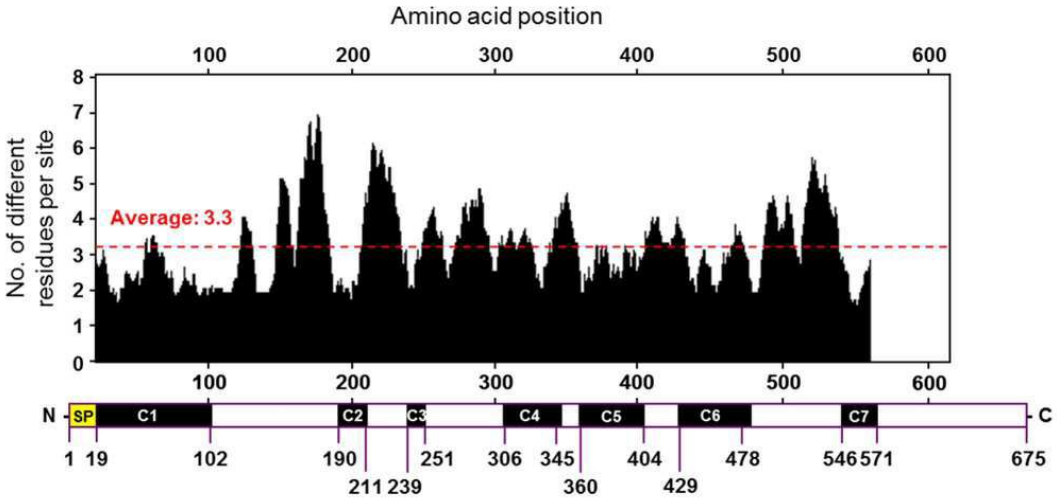
[0123] 그 결과, TSA56_Boryong이나 ucTSA56 재조합 단백질을 면역한 생쥐들은 모두 보령 유전형 감염 후에 생존하였다. 카프 유전형을 감염시킨 생쥐들에서 TSA56_Boryong 면역군은 20% 만 생존한 반면, ucTSA56 면역군은 모두 생존하였다. 카토 유전형을 감염시킨 생쥐들에서 TSA56_Boryong 면역군은모두 사망하였으나, ucTSA56 면역군은 40%가 생존하였다. 항원을 면역하지 않은 음성대조군에서는 모든 생쥐들이 사망하였다. 따라서 ucTSA56 재조합 단백질 면역을 통해 다양한 유전형에 대해서 보다 향상된 보호면역이 제공될 수 있음을 확인하였다. 해당결과는 [도 16]에 나타내었다.

도면

도면1



도면2



도면3

	확인된 보존블럭들(conserved blocks)의 아미노산 서열
17 genotypes	
Karp_C (SEQ ID NO. 1)	C1: SASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESTRLDPADADGKKHLSLTTGLPFGGTLAAGMTIAPGFRAELGVMYLTNI C2: KLTPPQPTIMPISIADRDFGID C3: RIAWLKNCAGIDY C4: WRHLVVGLAALSNANKPSASPVKVLSDKITQIYSDIK C5: LPNSASVEQIQNKMQELNDVLEELRDSFDGYISNAFANQIQLNF C6: QATAQEAVAAAAVRLLNGNDQIAQLYKDLVKLQRHAGIKKAMEKLAAQ C7: EAEFDLSMIVGQVKLYADVMTTESFS
Karp_B (SEQ ID NO. 2)	C1: SASAIELGDEGGLECGPYGKVGIVGGMITGVESTRLDSADAEGKKRLPLTTSMPFGGTLAAGMTIAQGFRAELGVMYLTNI C2: KLTPPQPTIMPISIADRDFGID C3: RIAWLKNYAGIDY C4: WRHLVVGLAALSNANKPSASPVKVLSDKITQIYSDVK C5: LPNSASVEQIQNKMQELNDLLEELRESFDGYLGGNAFANQIQLNF C6: QATAQEAVAAAAVRLLNGNDQIAQLYKDLVKLQRHAGIKKAMEKLAAQ C7: EAEFDLSMIVGQVKLYADLFITESFS
Karp_A (SEQ ID NO. 3)	C1: SASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESTRLDPADADGKKHLPLTTSMPFGGTLAAGMTIAQGFRAELGVMYLTNI C2: KLTPPQPTIMPISIADRDFGID C3: RIAWLKNCAGIDY C4: WRYLVVGLAALSNANKPSASPVKVLSDKITQIYSDIK C5: LPNSASVEQIQNKMQELNDVLEELRESFDGYLGGNAFANQIQLNF C6: QATAQEAVAAAAVRLLNGNDQIEQLYKDLVKLQRHAGIKKAMEKLAAQ C7: EAEFDLSMIVGQVKLYADVMITESFS

도면4

	확인된 보존블럭들(conserved blocks)의 아미노산 서열
17 genotypes	
Saitama (SEQ ID NO. 4)	C1: SASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGMITGAESARLDQADTTGKKHLPLTTSMPFGGTLNAGITITPWLRAELGVMYLRNI C2: KLTPPQPTIMPISIADRDFAID C3: RVAWLKNYAGIDY C4: WRYMVIGLAALSNANKPSDPPVKVLSDKITQIYNDIR C5: LPNSASVEQIQNKMQELNELLEEVRDSFEGYIGGNAFANQIQLNF C6: QATAQEAAAAAAVRLLNGNDQIVQLYKDLVKLKRHAGFKKSMDKLAAQ C7: ETEFDLSMIVGQVKLYADLVATESFS
Boryong (SEQ ID NO. 5)	C1: SASAIELEDEVGLECGPYAKVGVVGGMITGAESTRLDSTDSEGKKHLSLTTGLPFGGTLAAGMTIAPGFRAELGVMYLRNI C2: KLTPPQPTMMPISIADRDFGID C3: RIAWLKNCAGIDY C4: WRSLVVGLAALSNANKPSASPVKVLSDKIIQIYSDIK C5: LPNSASIEQIQSKIQELGDTLEELRDSFDGYINNAFVNQIHLNF C6: QATAQEAVAAAAVRLLNGSDQIAQLYKDLVKLQRHAGIRKAMEKLAAQ C7: ETEFDLSMVVGQVKLYADLVTTESFS
JG_C (SEQ ID NO. 6)	C1: SASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESTRLDPADADGKKHLPLTTSMPFGGTLAAGMTIAPGFRAELGVMYLRNI C2: KLTPPQPTIMPISIADRDEGVD C3: RIAWLKNYAGIDY C4: WRHLVVGVTALSHANKPSVTPVKVLSDKITKIYSDIR C5: LPNSASVEQIQAKMEELNNILEELRESFDGYLANAFANQIQLNF C6: QVTAQDAAAAAAVRALNGNEQIIQLYKDLVKLQRHAGIRKAMEQLAVQ C7: ETEFDLSMIVGQVKLYADLFTTESFS

도면5

	확인된 보존블럭들(conserved blocks)의 아미노산 서열
17 genotypes	
Kawasaki (SEQ ID NO. 7)	C1: SASAIELGDEGVLECGPYAKIGVVGGMVTGVESARLDPADVDCKKHLSLTTMLPFGGTLAAGMTIAPGFRAELGVMYLRNI C2: KLTPPQPTIMPISIADRDLGVD C3: RIAWLKNYAGIDY C4: WRYLVVGVTALSNANKPSVSSVKVLSDKITQIYSDIR C5: LPNSASVEQIQTKMQELNDVLEELRESFDGYLANAFANQIQLNF C6: QVTAQEAAAAAAVRALNGNEQIIQLYKDLVKLQRHAGIRKAMEKLAAQ C7: EVELDLSMIVAQVKLYADVVATESFS
JG_B (SEQ ID NO. 8)	C1: SASAMEFGDEGGGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESTRLDSADAGGKRYLPLTTGLPFGGTLAAGMTIAPGFRAELGVMYLRNI C2: KLVPPQPTIMPISIADRDVGVD C3: RIAWLKNYAGIDY C4: WRHLVVGVTALSHANKPSVTPVKVLSDKITKIYSDIR C5: LPNSASVEQIQAKMQELNNVLEELRESFEGYLANAFANQIQLNF C6: QVTAQEAAAAAAVRALNGNEQIIQLYKDLVKLQRHAGISKAMEQLAAQ C7: ETEFDLSMVVGQVKLYADLVATESFS
JG_A (SEQ ID NO. 9)	C1: LASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESTRLDSADADGKKHLSLITGIPFGGTLAAGMTIAPGFRAELGVMYLRNI C2: KLTPPQPTIMPISIADRDVGVD C3: RIAWLKDYAGIDY C4: WRHLVVGVTALSHANKPSVTPVKVLSDKITKIYSDIR C5: LPNSASVEQIQAKMQELNNVLEELRESFDGYLANAFVNQIQLNF C6: QVTAQEAAAAAAVRALNGNEQIIQLYKDLVKLQRHAGIRKAMEQLAAQ C7: ETEFDLSMIVGQVKLYADLFTTESFS

도면6

	확인된 보존블럭들(conserved blocks)의 아미노산 서열
17 genotypes	
Gilliam (SEQ ID NO. 10)	C1: SASAIELGEEGGLECGPYGKVGIVGGMITGAESTRLDSTDSEGKKHLSLTTGLPFGGTLAAGMTIAPGFRAELGVMYLRNI C2: KLTPPQPTIMPISIADRDVGVD C3: RIAWLKNYAGIDY C4: WRHLVVGVTALSHANKPSVTPVKVLSDKITKIYSDIK C5: LPNSASVEQIQSKMQELNDVLEDLRDSFDGYMGNAFANQIQLNF C6: QATAQEAVAAAAVRLLNGNDQIAQLYKDLVKLQRHAGVKKAMEKLAAQ C7: ETEFDLSMIVGQVKLYADLFTTESFS
TD (SEQ ID NO. 11)	C1: SASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGIITGVESARLDPADTNGKKLLPLTTSMPFGGTLAAGMTIAQGFRAELGVMYLRNI C2: KITPPQPTIMSISIADRNAGVD C3: RIAWLRNYAGIEY C4: WRHLVVGVAAMSNANKPSTSAVKVLGDKISQIYCDIK C5: LPNSASVEQIQGKMQELGDILEALRDSFEGYIANAFANQIQLNF C6: QVTAQEAVAAAAVRALNRNEQIAQLYKDLVKLQRHAGIRKAMEKLAAQ C7: ETEFDLSMIVGQVKLYADLMTTESFS
TA763_B (SEQ ID NO. 12)	C1: SASAIELGDEGGLECGPYAKVGIVGGMITGAESTRLDSSDAEGKKRLSLTTSVPFGGTLAAGITIAQGFRAELGVMYLTNI C2: KLTPPQPVIMPISTADRDMGVD C3: RIAWLKQYAGIDY C4: WRHLVVGIAALSNANKPSASPVKVLSDKITKIYSDIK C5: LPNSASIEQIQRKMQELNDVLEGLRDAFDGYINNAFVDQIQLNF C6: QATAQEAVAAAAVRLLNGNDQIVQLYKDLVKLQRHAGIKKAMEKLAAQ C7: EAEFDLSMIVGQVKLYADLMTTESFS

도면7

	확인된 보존블럭들(conserved blocks)의 아미노산 서열
17 genotypes	
TA763_A (SEQ ID NO. 13)	C1: SASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESARLDPADHEGKKHLPLTTSMPFGGTLAAGMTIAQGFRAELGVMYLRNI C2: KLTPPQPTIMPISIADRDFGVD C3: RIAWLKEYAGIDY C4: WRHLVVGVTALSNANKPSASPVKILSEKITQIYSDIR C5: LPNSASVEQIQSKMQELSDLLEELRDSFDGYISNAFAGQIQLNF C6: QATAQEAVAAAAVRLLNGNDQIAQLYKDLVKLQRHAGIRKAMEKLAAQ C7: ETEFDLSMIVGQVKLYADLMTTESFS
Kato_B (SEQ ID NO. 14)	C1: SASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESTRLDPADAGGKKHLPLTTGLPFGGTLAAGMTIAPGFRAELGVMYLTNV C2: KLTPPQPTIMPISIADRDLGVD C3: RIAWLKNYAGIDY C4: WRHIVVGVTAMSNANKPSVSPVKVLSDKIVQIYRDVK C5: LPNSASVEQIQNKMQELNDILDDIRDSFDGCIGGNAFANQIQLNF C6: QATAQEAAAAAAVRVLNNNDQIIQLYKDLVKLKRHAGIKKAMEELAAQ C7: ETEFDLSMIVGQVKLYADLFTTESFS
Kato_A (SEQ ID NO. 15)	C1: SASAIELGEEGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESTRLDPADVDGKKHLPLTTGLPFGGTLAAGMTIAPGFRAELGVMYLTNI C2: KLTPPQPTIMPISIADRDFGVD C3: RIAWLKEYAGIDY C4: WRDMVVGITAMSNANKPSASPIKVLSDKISQIYDDIR C5: LPNSASVEQIQSKMQELSETLEELRESFDGCIGNAFANQIQLDF C6: QATVQEATAAAAAVRVLNGNGQIIQLYKDLVKLKRHAGIKKAMEKLAAQ C7: ETEFDLSMIVGQVKLYADLMTTESFS

도면8

	확인된 보존블럭들(conserved blocks)의 아미노산 서열
17 genotypes	
Shimokoshi (SEQ ID NO. 16)	C1: SANAIEFDENSLECGPYAKVGIVGGVLSGVESARLDPADSEGKKHLPLIKGMPFGVTLAAGMTITPGVRAEISAMYLMNV
	C2: KLTPPQPNIMPISIADRDIAVD
	C3: RIAWLKNYAGIDY
	C4: WRDVVVGITALSNANKPNVSAVKILSDKISQIYADIK
	C5: LPDSASVDQIQNKVQELNKVLEDVRESFDGFILNAFAQPVRLNF
	C6: AATAQEAAAAAAAIRALNDGENNGIIQLYKDLYKLQRNVALKKSMKQLGDE
	C7: EIEFDLHMAVGQVKLYADLFTIDSFS
TA686 (SEQ ID NO. 17)	C1: SASAIELGDEGGLECGPYARVGVVGGMITGVESTRLDSTDPEGKKHLSLTTGLPFGGTLAAGMTIAPGFRAELGVMYLRNI
	C2: KLTPPPAIVMPISIADRDLGVD
	C3: RIAWLKEYAGIDY
	C4: WRHLVVGIAALSNANKPNASPVKVLSDKISQIYKDIK
	C5: LANSASVEQIQSKMQELNDILEDLRESFDGYISNAFANQIQLDF
	C6: HATAQEAAAAAAVRVLNNNEQIIQLYKDLVKLKRHAGIRKAMEQLAAQ
	C7: ETEFDLSMIVGQVKLYADVFTTESFS

도면9

	확인된 보존블럭들(conserved blocks)의 아미노산 서열
5 genogroups	
Karp (SEQ ID NO. 18)	C1: SASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESTRLDSADADGKKHLPLTTSMPFGGTLAAGMTIAPGFRAELGVMYLTNI
	C2: KLTPPQPTIMPISIADRDFGID
	C3: RIAWLKNCAGIDY
	C4: WRHLVVGLAALSNANKPSASPVKVLSDKITQIYSDIK
	C5: LPNSASVEQIQNKMQELNDVLEELRDSFDGYIGGNAFANQIQLNF
	C6: QATAQEAVAAAAVRLLNGNDQIAQLYKDLVKLQRHAGIKKAMEKLAAQ
	C7: EAEFDLSMIVGQVKLYADLVITESFS
Gilliam (SEQ ID NO. 19)	C1: SASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESTRLDSADADGKKHLSLTTGLPFGGTLAAGMTIAPGFRAELGVMYLRNI
	C2: KLTPPQPTIMPISIADRDVGVD
	C3: RIAWLKNYAGIDY
	C4: WRHLVVGVTALSHANKPSVTPVKVLSDKITKIYSDIR
	C5: LPNSASVEQIQAKMQELNDVLEELRESFDGYLANAFANQIQLNF
	C6: QVTAQEAAAAAAAVRALNGNEQIIQLYKDLVKLQRHAGIRKAMEQLAAQ
	C7: ETEFDLSMIVGQVKLYADLFTTESFS
TA763 (SEQ ID NO. 20)	C1: SASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESTRLDSADAEGKKHLPLTTSMPFGGTLAAGMTIAQGFRAELGVMYLTNI
	C2: KLTPPQPVIMPISTADRDMGVD
	C3: RIAWLKQYAGIDY
	C4: WRHLVVGIAALSNANKPSASPVKVLSDKITQIYSDIK
	C5: LPNSASVEQIQSKMQELSDLLEELRDSFDGYISNAFAGQIQLNF
	C6: QATAQEAVAAAAVRLLNGNDQIAQLYKDLVKLQRHAGIRKAMEKLAAQ
	C7: ETEFDLSMIVGQVKLYADLMTTESFS

도면10

	확인된 보존블럭들(conserved blocks)의 아미노산 서열
5 genogroups	
Kato (SEQ ID NO. 21)	C1: SASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESTRLDPADVDGKKHLSLTTGLPFGGTLAAGMTIAPGFRAELGVMYLTNV C2: KLTPPQPTIMPISIADRDFGVD C3: RIAWLKEYAGIDY C4: WRHLVVGVTAMSNANKPSVSPVKVLSDKIVQIYRDIK C5: LPNSASVEQIQNKMQELNDILEEIRDSFDGCIGGNAFANQIQLNF C6: QATAQEAAAAAAVRVLNNNDQIIQLYKDLVKLKRHAGIKKAMEKLAAQ C7: ETEFDLSMIVGQVKLYADLFTTESFS
Shimokoshi (SEQ ID NO. 22)	C1: SANAIELDENSLECGPYAKVGIVGGVLSGVESARLDPADSEGKKHLPLIKGMPFGVTLAAGMTITPGVRAEISAMYLMNV C2: KLTPPQPNIMPISIADRDIGVD C3: RIAWLKNYAGIDY C4: WRDVVVGITALSNANKPNVSAVKVLSDKISQIYADIK C5: LPDSASVEQIQNKVQELNKVLEDVRESFDGFILNAFAQQVQLNF C6: AATAQEAAAAAAVRALNDGENNGIIQLYKDLYKLQRHVALKKSMEQLGAE C7: EIEFDLHMAVGQVKLYADLFTIDSFS

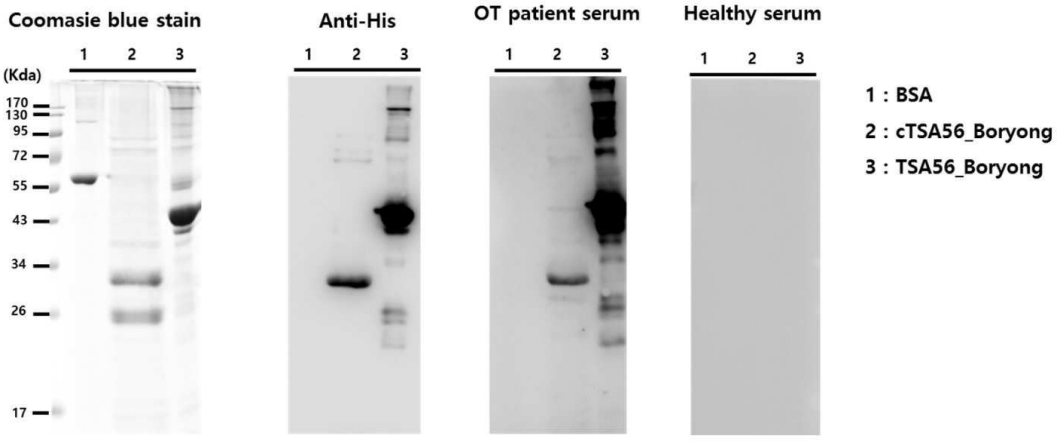
도면11

	확인된 보존블럭들(conserved blocks)의 아미노산 서열
Universal conserved blocks	
(SEQ ID NO. 23)	C1: SASAIELGDEGGLECGPYAKVGVVGGMITGVESTRLDSADADGKKHLPLTTGMPFGGTLAAGMTIAPGFRAELGVMYLTNI C2: KLTPPQPTIMPISIADRDFGVD C3: RIAWLKNYAGIDY C4: WRHLVVGVTALSNANKPSVSPVKVLSDKITQIYSDIK C5: LPNSASVEQIQNKMQELNDVLEELRDSFDGYIGNAFANQIQLNF C6: QATAQEAAAAAAVRALNGNDQIIQLYKDLVKLQRHAGIKKAMEKLAAQ C7: ETEFDLSMIVGQVKLYADLFTTESFS

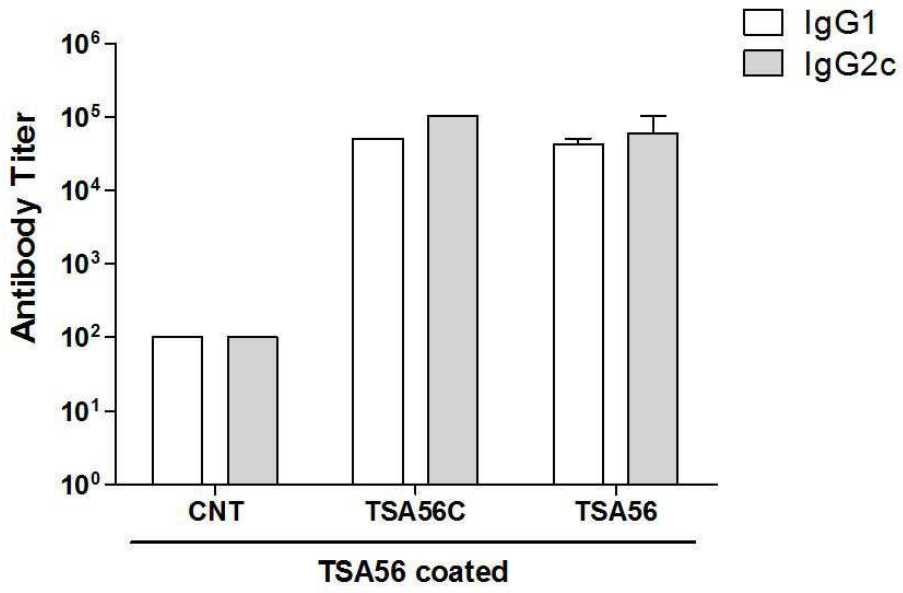
도면12

```
SASAIELEDE VGLECGPYAK VGVVGGMITG AESTRLDSTD SEGKKHPGFR  50
AELGVMYLRN IKLTPPQPTM MPISIADRDF GIDRIAWLKN CAGIDYWRSL 100
VVGLAALSNA NKPSASPVKV LSDKIIQIYS DIKLPNSASI EQIQSKIQEL 150
GDTLEELRDS FDGYINNAFV NQIHLNFQAT AQEAVAAAAV RLLNGSDQIA 200
QLYKDLVKLQ RHAGIRKAME KLAAQETEFD LSMVVGQVKL YADLVTTESFS 251
```

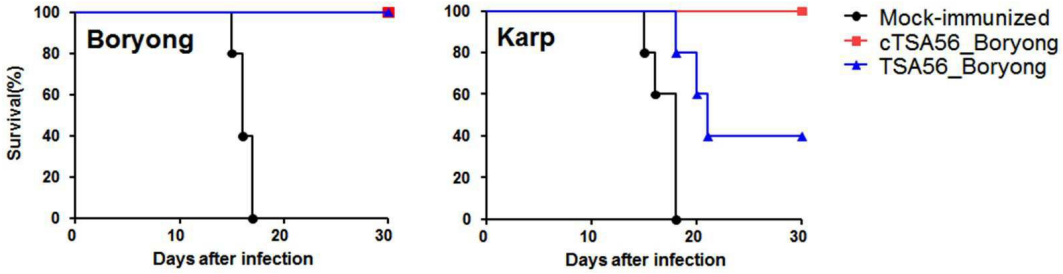
도면13



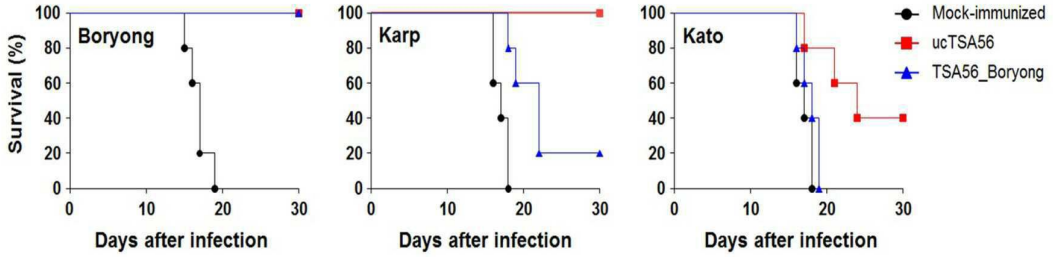
도면14



도면15



도면16



서 열 목 록

<110> NAM HYUK, cho

<120> Novel Recombinant Protein antigens of orientia tsutsugamushi and the Vaccine Composition Using the Same

<130> PP17-544

<160> 24

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Karp_C

<400> 1

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> 2

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Karp_B

<400> 2

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> 3

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Karp_A

<400> 3

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> 4
<211> 272
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Saitama
<400> 4
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> 5

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Boryong

<400> 5

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> 6

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JG_C

<400> 6

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> 7

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Kawasaki

<400> 7

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> 8

<211> 273

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JG_B

<400> 8

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> 9

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JG_A

<400> 9

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> 10

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gilliam

<400> 10

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> 11

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TD

<400> 11

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> 12
<211> 271
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> TA763_B

<400> 12

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> 13
<211> 271
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> TA763_A
<400> 13

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> 14

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Kato_B

<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 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> 15
<211> 271
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Kato_A
<400> 15
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> 16

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Shimokoshi

<400> 16

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> 17

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TA686

<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 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> 18

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Karp

<400> 18

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 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 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 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 Val Ile Thr Glu Ser Phe Ser

260 265 270

<210> 19

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gilliam

<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 Ser 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 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 Arg Leu Pro Asn Ser Ala Ser Val
145                 150                 155                 160
Glu Gln Ile Gln Ala 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

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> 20

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TA763

<400> 20

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 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 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 Gln 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 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> 21

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Kato

<400> 21

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 Val 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

Val 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 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 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 Ile Leu Glu Glu

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 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 Phe Thr Thr Glu Ser Phe Ser
260 265 270

<210> 22
<211> 272
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Shimokoshi
<400> 22

Ser Ala Asn Ala Ile Glu Leu 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 Gly 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 Val Leu Ser Asp Lys Ile
130 135 140
Ser Gln Ile Tyr Ala Asp Ile Lys Leu Pro Asp Ser Ala Ser Val Glu
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 Gln Val
180 185 190
Gln Leu Asn Phe Ala Ala Thr Ala Gln Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala
195 200 205
Val 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 His Val Ala Leu Lys Lys Ser Met
225 230 235 240

Glu Gln Leu Gly Ala 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> 23
<211> 271
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Universal conserved blocks
<400> 23

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 Leu Pro
35 40 45
Leu Thr Thr Gly 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 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 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
Asn Ala Asn Lys Pro Ser Val 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 Gly Asn Ala Phe Ala Asn Gln
180 185 190
Ile Gln Leu Asn Phe Gln Ala Thr Ala Gln Glu Ala Ala Ala Ala Ala
195 200 205
Ala Val Arg Ala Leu Asn Gly Asn Asp Gln Ile Ile 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 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> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cTSA56_Boryong

<400> 24

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 Pro Gly

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Trp Arg Ser Leu Val Val Gly Leu Ala Ala Leu Ser Asn Ala Asn Lys

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ser Lys Ile Gln Glu Leu Gly Asp Thr Leu Glu Glu Leu Arg Asp Ser

145 150 155 160

Phe Asp Gly Tyr Ile Asn Asn Ala Phe Val Asn Gln Ile His Leu Asn

165 170 175

Phe Gln Ala Thr Ala Gln Glu Ala Val Ala Ala Ala Ala Val Arg Leu

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Tyr Ala Asp Leu Val Thr Thr Glu Ser Phe Ser

245 250

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 제15항

【변경전】

제13항에 있어서

【변경후】

제14항에 있어서