

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-519615

(P2021-519615A)

(43) 公表日 令和3年8月12日 (2021.8.12)

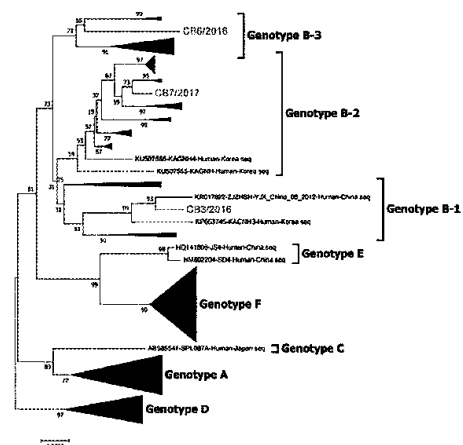
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	4 B 0 6 5
C 0 7 K 16/10 (2006.01)	C 0 7 K 16/10	4 C 0 8 5
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2021-509707 (P2021-509707)	(71) 出願人	520416163 アイ. ディー. バイオ. 大韓民国 28644 チュンチョンブ ード チョンジュンシ ソウォング ネ スドンロー 52 151
(86) (22) 出願日	平成31年4月23日 (2019.4.23)	(74) 代理人	100124431 弁理士 田中 順也
(85) 翻訳文提出日	令和2年10月27日 (2020.10.27)	(74) 代理人	100174160 弁理士 水谷 馨也
(86) 国際出願番号	PCT/KR2019/004857	(74) 代理人	100175651 弁理士 追田 恭子
(87) 国際公開番号	W02019/208995	(72) 発明者	チョイ ヨージョン 大韓民国 28627 チュンチョンブ ード チョンジュンシ ソウォング タ プゴルロー 6 ナンバー108-706 最終頁に続く
(87) 国際公開日	令和1年10月31日 (2019.10.31)		
(31) 優先権主張番号	10-2018-0047865		
(32) 優先日	平成30年4月25日 (2018.4.25)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)		

(54) 【発明の名称】 新規な重症熱性血小板減少症候群ウイルス

(57) 【要約】

本発明は、新規な遺伝子型の重症熱性血小板減少症候群ウイルスおよびその免疫原性組成物としての用途に関するものであって、本発明のウイルスは、重症熱性血小板減少症ウイルスは、従来の血小板減少症ウイルスと遺伝的に異なり、系統学的に B 遺伝子型で 3 つに細分化される新規なウイルスであるので、ある特定の遺伝子型のウイルスだけに制限された防御能を示すワクチンの特性上、本発明の新規なウイルスを S F T S V に対する交差免疫原性に優れたワクチンとして有用に利用することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

L 遺伝子の ORF (6 2 5 5 b p) で発現されたタンパク質の 1 4 4 7 番のアミノ酸がバリンまたは 1 9 1 3 番のアミノ酸がリジンであり、M 遺伝子の ORF (3 2 2 2 b p) で発現されたタンパク質の 8 3 番目のアミノ酸がチロシン、4 0 4 番目のアミノ酸がスレオニンまたは 9 0 4 番目のアミノ酸がバリンである、重症熱性血小板減少症ウイルス (s e v e r e f e v e r t h r o m b o c y t o p e n i a s y n d r o m e v i r u s 、 S F T S V) 。

【請求項 2】

配列番号 1 の塩基配列を含む L 遺伝子、配列番号 2 の塩基配列を含む M 遺伝子、配列番号 3 の塩基配列を含む NP 遺伝子および配列番号 4 の塩基配列を含む NS 遺伝子を含む、請求項 1 に記載の重症熱性血小板減少症ウイルス。

10

【請求項 3】

L 遺伝子の ORF (6 2 5 5 b p) で発現されたタンパク質の 1 4 4 7 番のアミノ酸がイソロイシンまたは 1 9 1 3 番のアミノ酸がアルギニンであり、M 遺伝子の ORF (3 2 2 2 b p) で発現されたタンパク質の 8 3 番目のアミノ酸がフェニルアラニン、4 0 4 番目のアミノ酸がスレオニンまたは 9 0 4 番目のアミノ酸がイソロイシンである、重症熱性血小板減少症ウイルス。

【請求項 4】

配列番号 5 の塩基配列を含む L 遺伝子、配列番号 6 の塩基配列を含む M 遺伝子、配列番号 7 の塩基配列を含む NP 遺伝子および配列番号 8 の塩基配列を含む NS 遺伝子を含む、請求項 3 に記載の重症熱性血小板減少症ウイルス。

20

【請求項 5】

L 遺伝子の ORF (6 2 5 5 b p) で発現されたタンパク質の 1 4 4 7 番のアミノ酸がイソロイシンまたは 1 9 1 3 番のアミノ酸がアルギニンであり、M 遺伝子の ORF (3 2 2 2 b p) で発現されたタンパク質の 8 3 番目のアミノ酸がチロシン、4 0 4 番目のアミノ酸がアラニンまたは 9 0 4 番目のアミノ酸がイソロイシンである、重症熱性血小板減少症ウイルス。

【請求項 6】

配列番号 9 の塩基配列を含む L 遺伝子、配列番号 1 0 の塩基配列を含む M、配列番号 1 1 の塩基配列を含む NP 遺伝子および配列番号 1 2 の塩基配列を含む NS 遺伝子を含む、請求項 5 に記載の重症熱性血小板減少症ウイルス。

30

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の重症熱性血小板減少症ウイルスまたはその抗原を有効成分として含む、重症熱性血小板減少症の予防または治療用免疫原性組成物。

【請求項 8】

不活化した重症熱性血小板減少症ウイルスと薬剤学的に許容可能な担体 (c a r r i e r) またはアジュバント (a d j u v a n t) を含む、請求項 7 に記載の重症熱性血小板減少症の予防または治療用免疫原性組成物。

【請求項 9】

前記免疫原性組成物の形態は、生ワクチン、不活化ワクチン、弱毒化された重症熱性血小板減少症ウイルスの遺伝子を用いて生産したサブユニットワクチン、ベクトルワクチン、キメラワクチン、DNA および RNA ワクチンからなる群から選択される、請求項 7 に記載の重症熱性血小板減少症の予防または治療用免疫原性組成物。

40

【請求項 10】

配列番号 1 の塩基配列を含む L 遺伝子、配列番号 2 の塩基配列を含む M 遺伝子、配列番号 3 の塩基配列を含む NP 遺伝子および配列番号 4 の塩基配列を含む NS 遺伝子を含む重症熱性血小板減少症ウイルスと、配列番号 5 の塩基配列を含む L 遺伝子、配列番号 6 の塩基配列を含む M 遺伝子、配列番号 7 の塩基配列を含む NP 遺伝子と配列番号 8 の塩基配列を含む NS 遺伝子を含む重症熱性血小板減少症ウイルスと、配列番号 9 の塩基配列を含む

50

L 遺伝子、配列番号 10 の塩基配列を含む M、配列番号 11 の塩基配列を含む NP 遺伝子および配列番号 12 の塩基配列を含む NS 遺伝子を含む重症熱性血小板減少症ウイルス、またはこれらの抗原を有効成分として含む、請求項 7 に記載の重症熱性血小板減少症の予防または治療用免疫原性組成物。

【請求項 11】

請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のウイルスまたはその抗原を持って免疫化に反応して生成された抗体。

【請求項 12】

請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のウイルスまたはその抗原を含む重症熱性血小板減少症ウイルスの診断キット。

10

【請求項 13】

(a) 抗原 - 抗体複合体が形成されることができ条件で検体から分離された試料を請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のウイルスまたはその抗原と接触させる段階と、

(b) 抗原 - 抗体複合体の形成を検出する段階とを含む、重症熱性血小板減少症ウイルス抗体を検出する方法。

【請求項 14】

(a) 請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のウイルスまたはその抗原を免疫反応を誘導するのに有効な量でヒトでない動物に投与する段階と、

(b) 前記重症熱性血小板減少症ウイルスに対する抗体を含有する抗血清または血漿を収集する段階とを含む、ヒトでない動物から重症熱性血小板減少症ウイルスに対する抗血清を製造する方法。

20

【請求項 15】

(a) 検体から分離された試料を請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のウイルスまたはその抗原と接触させ、抗原 - 抗体複合体を形成させる段階と、

(b) 前記複合体の形成を検出する段階とを含む、重症熱性血小板減少症の診断に関する情報を提供する方法。

【請求項 16】

重症熱性血小板減少症ウイルスを含む、組成物の重症熱性血小板減少症の予防または治療用途。

【請求項 17】

重症熱性血小板減少症ウイルスを含む、組成物の重症熱性血小板減少症ウイルスの診断用途。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な遺伝子型の重症熱性血小板減少症候群ウイルス、およびその免疫原性組成物としての用途に関する。

【背景技術】

【0002】

重症熱性血小板減少症候群 (Severe fever with thrombocytopenia syndrome、SFTS) は、高熱、嘔吐、下痢、血小板減少、白血球減少、および多臓器不全などの症状を伴い、致死率が 6 ～ 30 % に至る深刻な疾患である (Yu X J et al .、N . Engl . J . Med . 2011 ; 364 : 1523 - 32 ; Ding F et al Clin Infect Dis 2013 ; 56 : 1682 - 3) 。

40

【0003】

SFTS 原因病原体は、SFTSV (severe fever thrombocytopenia syndrome virus、重症熱性血小板減少症ウイルス、ブニヤウイルス科 (Bunyaviridae) に属する。ブニヤウイルスとは 3 つの分節を含むマイナス鎖 (negative - strand) RNA ウイルスであるが、オルソブ

50

ニヤウイルス (Orthobunyavirus)、ハンタウイルス (Hantavirus)、ナイロウイルス (Nairovirus)、フレボウイルス (Phlebovirus)、トスポウイルス (Tospovirus) を含む 5 つの属 (genus) からなる。SFTSV は、フレボウイルス属 (Phlebovirus genus) に属し、ここにリフトバレー熱ウイルス (Rift valley fever virus) などが属している。SFTSV は、2011 年に中国で初めて報告され (Yu XJ et al. ibid)、中国だけでなく韓国、そして日本でも持続的に発症している新変異型ウイルスである。SFTSV は、直径が 80 ~ 100 nm である球状のウイルスである。このウイルスは、single-stranded negative sense RNA segment である L 分節 (large (L) segment)、M 分節 (medium (M) segment)、S 分節 (small (S) segment; NP、NS) などの 3 つの遺伝子を有する。

10

【0004】

SFTSV ウイルスは、フタトゲチマダニ (Haemaphysalis longicornis) を媒介とするものであって、該ダニは、韓国でも広く分布していると知られている (Chae JS et al. J Vet Sci 2008; 9: 285 - 93; Kim CM et al. Appl Environ Microbiol 2006; 72: 5766 - 76)。SFTSV ウイルスの血清転換およびウイルス血症が、ヤギ、羊、牛、豚、および犬のような飼育動物から発見され、これらの動物も SFTSV ウイルスが広がった地域において中間媒介体として作用したと考えられている (Zhao L et al. Emerg Infect Dis 2013; 18: 963 - 5; Ni u G et al. Emerg Infect Dis 2013; 19: 756 - 63)。患者の血液からは SFTSV が検出され、特に重症患者の血液には SFTSV 濃度が非常に高いので、血液を介してヒト - ヒト間の伝播が可能である (Tang X、Wu W、Wang H、et al. J Infect Dis 2013; 207: 736 - 739)。

20

【0005】

SFTSV に対する抗ウイルス剤は、まだ開発されていないので、SFTSV 治療は輸血、新代替療法など、臓器不全に対する保存療法が根幹をなす。中国では、2012 年からリバビリン併用を治療ガイドラインに導入しているが、最近発表された治療の結果では、リバビリン投与群と非投与群間の死亡率に差がなかった。したがって、SFTSV に対するワクチンが必要であるが、まだワクチンが開発されていないのが実情である。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、新規な遺伝子型の重症熱性血小板減少症ウイルス、及びこれを用いた免疫原性組成物を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

前記目的を達成するために、本発明は、新規な重症熱性血小板減少症ウイルスを提供する。

40

【0008】

また、本発明は、重症熱性血小板減少症の予防または治療用免疫原性組成物を提供する。

【0009】

また、本発明は、重症熱性血小板減少症ウイルスまたはその抗原に対する抗体を提供する。

【0010】

また、本発明は、重症熱性血小板減少症ウイルスの診断キットを提供する。

【0011】

50

また、本発明は、重症熱性血小板減少症ウイルス抗体を検出する方法を提供する。

【 0 0 1 2 】

また、本発明は、重症熱性血小板減少症ウイルスに対する抗血清を生産する方法を提供する。

【 0 0 1 3 】

さらに、本発明は、重症熱性血小板減少症の診断に関する情報を提供する方法を提供する。

【発明の効果】

【 0 0 1 4 】

本発明の重症熱性血小板減少症ウイルスは、従来の血小板減少症ウイルスと遺伝的に異なり、系統学的にB遺伝子型でも細分化される新規なウイルスであるので、ある特定の遺伝子型のウイルスだけに制限された防御能を示すワクチンの特性上、本発明の新規なウイルスをSFTSVに対する交差免疫原性に優れたワクチンとして有用に利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 5 】

【図1】本発明の新規なウイルス3種と中国、日本、韓国で分離されたSFTSV L遺伝子の系統図を示した図である。

【図2】本発明の新規なウイルス3種と中国、日本、韓国で分離されたSFTSV M遺伝子の系統図を示した図である。

【図3】本発明の新規なウイルス3種と中国、日本、韓国で分離されたSFTSV S(NP)遺伝子の系統図を示した図である。

【図4】本発明の新規なウイルス3種と中国、日本、韓国で分離されたSFTSV S(NS)遺伝子の系統図を示した図である。

【図5】本発明のB-1(CB3/2016)、B-2(CB7/2017)およびB-3(CB6/2016)遺伝子型の新規なウイルス3種のL遺伝子およびM遺伝子におけるアミノ酸変異部位を示した図である。

【図6】本発明のB-1(CB3/2016)、B-2(CB7/2017)およびB-3(CB6/2016)遺伝子型の新規なウイルス3種のワクチンの効果を確認した図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 6 】

以下、添付された図面を参照して、本発明の実施例において本発明を詳細に説明する。ただし、次の実施例は、本発明の例示として提示されるものであって、当業者に周知著名な技術、または構成についての具体的な説明が本発明の要旨を不要に曖昧にしようと判断される場合には、その詳細な説明を省略することができ、これにより本発明が限定されるものではない。本発明は、後述する特許請求の範囲の記載及びそれから解釈される均等範囲内で多様な変形及び応用が可能である。

【 0 0 1 7 】

また、本明細書で使用される用語ら(terminology)は、本発明の好適な実施例を適切に表現するために使用された用語であって、これは、使用者、運用者の意図または本発明が属する分野の慣例などによって変わりうる。したがって、本用語に対する定義は、本明細書全般にわたった内容に基づいて定められるべきである。明細書全体において、ある部分がある構成要素を「含む」としたとき、これは特に相反する記載がない限り、他の構成要素を除外するものではなく、他の構成要素をさらに含むことができることを意味する。

【 0 0 1 8 】

一側面においては、本発明は、L遺伝子のORF(6255bp)で発現されたタンパク質の1447番のアミノ酸がバリンまたは1913番のアミノ酸がリジンであり、M遺伝子のORF(3222bp)で発現されたタンパク質の83番目のアミノ酸がチロシン

10

20

30

40

50

、４０４番目のアミノ酸がスレオニンまたは９０４番目のアミノ酸がバリンである、重症熱性血小板減少症ウイルス（severe fever thrombocytopenia syndrome virus、SFTSV）に関するものである。本発明の一実施例において、前記ウイルスは、Ｂ－１（ＣＢ３）と命名した。

【００１９】

一実施例において、前記重症熱性血小板減少症ウイルスは、遺伝子型Ｂ－１に属し、従来の遺伝子型Ｂに分類されたウイルスであるＬ遺伝子のＯＲＦ（６２５５ｂｐ）で発現されたタンパク質の１４４７番目のアミノ酸であるイソロイシンがバリンに置換され、１９１３番目のアミノ酸であるアルギニンがリジンに置換され（配列番号１３）、Ｍ遺伝子の９０４番目のアミノ酸であるイソロイシンがバリンに置換された（配列番号１４）ウイルスであることができる。

10

【００２０】

一実施例において、前記重症熱性血小板減少症ウイルスは、配列番号１の塩基配列を含むＬ遺伝子、配列番号２の塩基配列を含むＭ遺伝子、及び配列番号３の塩基配列を含むＮＰ及び配列番号４の塩基配列を含むＮＳを含むＳ遺伝子を含むことができる。

【００２１】

一実施例において、前記重症熱性血小板減少症ウイルスは、Ｌ遺伝子のＯＲＦ（６２５５ｂｐ）で発現された配列番号１３のアミノ酸配列、Ｍ遺伝子のＯＲＦ（３２２２ｂｐ）で発現された配列番号１４のアミノ酸配列、ＮＰ遺伝子のＯＲＦで発現された配列番号１５のアミノ酸配列とＮＳ遺伝子のＯＲＦで発現された配列番号１６のアミノ酸配列を含むことができる。

20

【００２２】

一側面においては、本発明は、Ｌ遺伝子のＯＲＦ（６２５５ｂｐ）で発現されたタンパク質の１４４７番のアミノ酸がイソロイシンまたは１９１３番のアミノ酸がアルギニンであり、Ｍ遺伝子のＯＲＦ（３２２２ｂｐ）で発現されたタンパク質の８３番目のアミノ酸がフェニルアラニン、４０４番目のアミノ酸がスレオニンまたは９０４番目のアミノ酸がイソロイシンである、重症熱性血小板減少症ウイルスに関するものである。本発明の一実施例において、前記ウイルスは、Ｂ－２（ＣＢ４）と命名した。

【００２３】

一実施例において、前記重症熱性血小板減少症ウイルスは、遺伝子型Ｂ－２に属し、従来の遺伝子型Ｂに分類されたウイルスのＭ遺伝子の８３番目のアミノ酸であるチロシンがフェニルアラニンに置換されたウイルスであることができる。

30

【００２４】

一実施例において、前記重症熱性血小板減少症ウイルスは、配列番号５の塩基配列を含むＬ遺伝子、配列番号６の塩基配列を含むＭ遺伝子、配列番号７の塩基配列を含むＮＰ、及び配列番号８の塩基配列を含むＮＳを含むＳ遺伝子を含むことができる。

【００２５】

一実施例において、前記重症熱性血小板減少症ウイルスは、Ｌ遺伝子のＯＲＦで発現された配列番号１７のアミノ酸配列、Ｍ遺伝子のＯＲＦで発現された配列番号１８のアミノ酸配列、ＮＰ遺伝子のＯＲＦで発現された配列番号１９のアミノ酸配列およびＮＳ遺伝子のＯＲＦで発現された配列番号２０のアミノ酸配列を含むことができる。

40

【００２６】

一側面では、本発明は、Ｌ遺伝子のＯＲＦ（６２５５ｂｐ）で発現されたタンパク質の１４４７番のアミノ酸がイソロイシンまたは１９１３番のアミノ酸がアルギニンであり、Ｍ遺伝子のＯＲＦ（３２２２ｂｐ）で発現されたタンパク質の８３番目のアミノ酸がチロシン、４０４番目のアミノ酸がアラニンまたは９０４番目のアミノ酸がイソロイシンである、重症熱性血小板減少症ウイルスに関するものである。本発明の一実施例において、前記ウイルスは、Ｂ－３（ＣＢ１）と命名した。

【００２７】

一実施例において、前記重症熱性血小板減少症ウイルスは、遺伝子型Ｂ－３に属し、従

50

来の遺伝子型 B に分類されたウイルスの M 遺伝子の 404 番目のアミノ酸であるスレオニンがアラニンに置換されたウイルスであることができる。

【0028】

一実施例において、前記重症熱性血小板減少症ウイルスは、配列番号 9 の塩基配列を含む L 遺伝子、配列番号 10 の塩基配列を含む M 遺伝子、及び配列番号 11 の塩基配列を含む NP 及び配列番号 12 の塩基配列を含む NS を含む S 遺伝子を含むことができる。

【0029】

一実施例において、前記重症熱性血小板減少症ウイルスは、L 遺伝子の ORF で発現された配列番号 21 のアミノ酸配列、M 遺伝子の ORF で発現された配列番号 22 のアミノ酸配列、NP 遺伝子の ORF で発現された配列番号 23 のアミノ酸配列および NS 遺伝子の ORF で発現された配列番号 24 のアミノ酸配列を含むことができる。

10

【0030】

本発明の一実施例において、分離した重症熱性血小板減少症ウイルスの遺伝子解析の結果、これらの遺伝子配列が既知の重症熱性血小板減少症ウイルスの遺伝子と異なり、これを系統的に分類した結果、それぞれの遺伝子が既知のうちの B 遺伝子型グループではない少なくとも 3 つに細分化され、分離される遺伝子型であることを明らかにした。

【0031】

本発明で使用される用語「置換」は、それぞれ他のアミノ酸またはヌクレオチドによって一つ以上のアミノ酸またはヌクレオチドの交替を意味する。

【0032】

本発明の重症熱性血小板減少症ウイルスは、マイナスイオン鎖 RNA ウイルスであって、Bunyaviridae と phlebovirus 属に属する。直径 80 ~ 100 nm の球状のウイルスであって、フタトゲチマダニを媒介とし、誘電体は、large (L)。Medium (M)。small (S) セグメントからなり、RNA dependent RNA polymerase (RdRp)、glycoprotein precursor (M)、glycoprotein N (Gn)、glycoprotein C (Gc)、nucleocapsid protein (NP) および non-structural protein (NSs) の 6 つのタンパク質をコードする。マイナスまたはアンチセンス鎖 (ウイルスタンパク質をコードするセンス鎖またはプラス鎖のアンチセンス) は、タンパク質または遺伝子がアンチセンスとしてコードされ、遺伝子のタンパク質への発現のためにセンス鎖またはプラス鎖 RNA の生成後、これから翻訳を実行し、タンパク質が生成される。

20

30

【0033】

一側面では、本発明は、重症熱性血小板減少症ウイルスまたはその抗原を有効成分として含む、重症熱性血小板減少症の予防または治療用免疫原性組成物に関するものである。

【0034】

一実施例において、本発明の免疫原性組成物は、不活化した重症熱性血小板減少症ウイルスと薬剤学的に許容可能な担体 (carrier) またはアジュバント (adjuvant) を含むことができる。

【0035】

一実施例において、前記免疫原性組成物は、ワクチン組成物であることができ、この形態は生ワクチン、不活化ワクチン、弱毒化された重症熱性血小板減少症ウイルスの遺伝子を用いて生産したサブユニットワクチン、ベクトルワクチン、キメラワクチン、DNA および RNA ワクチンからなる群から選択されることができる。

40

【0036】

一実施例において、前記免疫原性組成物は、配列番号 1 の塩基配列を含む L 遺伝子、配列番号 2 の塩基配列を含む M 遺伝子および配列番号 3 の塩基配列を含む S 遺伝子を含む重症熱性血小板減少症ウイルスと、配列番号 4 の塩基配列を含む L 遺伝子、配列番号 5 の塩基配列を含む M 遺伝子および配列番号 6 の塩基配列を含む S 遺伝子を含む重症熱性血小板減少症ウイルスと、配列番号 7 の塩基配列を含む L 遺伝子、配列番号 8 の塩基配列を含む

50

M 遺伝子および配列番号 9 の塩基配列を含む S 遺伝子を含む重症熱性血小板減少症ウイルス又はこれらの抗原を有効成分として含むことができる。

【0037】

本発明の免疫原性組成物（すなわち、ワクチン）を製造するために、本発明によるウイルスまたはこれの抗原は、生理学的に許容可能な形に変換される。これはインフルエンザのワクチン接種に使用されたワクチン製造の経験を基にして実施することができる（Stickl、H. 等により開示された。[1974] Dtsch. med. Wschr. 99、2386 - 2392）。ワクチン接種の製造のために、例えば、ウイルス粒子はアンプル内、好ましくはガラスアンプルで 1 % のヒトアルブミンおよび 2 % ペプトン存在下 100 ml のリン酸 - 緩衝生理食塩水（PBS）で凍結乾燥される。別の方法では、ワクチン接種は、製剤においてウイルスの順次凍結 - 乾燥によって生成されることができる。この製剤は、マンニトール、デキストラン、糖、グリシン、ラクトースまたはポリビニルピロリドンのような追加の添加剤または酸化防止剤または不活性ガス、安定剤または生体内投与に適した組換えタンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン）などの他の補助剤を含有することができる。それから、ガラスアンプルを密封し、4 および室温間で数ヶ月間保存することができる。しかし、他の要求事項がない限り、前記アンプルは、好ましくは - 20 未満で保存することができる。

10

【0038】

予防接種または治療のために、凍結乾燥物は、0.1 ~ 0.5 ml の水溶液、好ましくは生理食塩水またはトリス緩衝液に溶解され、全身または局所的に、すなわち非経口、皮下、筋肉内または当業者に公知された任意の他の投与経路によって投与することができる。投与形態、服用量および投与回数は、公知の方法で当業者によって最適化されることができる。しかし、最も一般的には、患者は、最初のワクチン接種から約 1 ヶ月 ~ 6 週間後に二回目のワクチン接種を受ける。

20

【0039】

本発明において、用語「予防」とは、本発明による免疫原性組成物の投与により重症熱性血小板減少症の発生、拡散、および再発を抑制または遅延させる全ての行為を意味する。

【0040】

本発明で使用される用語「治療」とは、本発明による免疫原性組成物の投与により、重症熱性血小板減少症およびそれによる合併症の症状を好転させたり、有利に変更するすべての行為を意味する。本発明が属する技術分野における通常の知識を有する者であれば、大韓医学協会などで提示された資料を参照して、本願の組成物が効果がある疾患の正確な基準を知り、改善、向上、および治療の程度を判断することができるであろう。

30

【0041】

本発明において有効成分と結合して使用された「治療学的に有効な量」という用語は、移植拒絶反応によって発生した疾患を予防または治療に有効な量を意味し、本発明の組成物の治療的に有効な量は、いろんな要素、例えば、投与方法、目的部位、患者の状態などにより変わりうる。したがって、人体に使用する際の投与量は、安全性と効率性を共に考慮し、適正量に決定されるべきである。動物実験を通じて決定された有効量からヒトに使用される量を推定することも可能である。有効な量を決定する際に考慮すべきこれらの事項は、例えば、Hardman and Limbird、eds.、Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics、10th ed. (2001)、Pergamon Press と、EW Martin ed.、Remington's Pharmaceutical Sciences、18th ed. (1990)、Mack Publishing Co に記述されている。

40

【0042】

本発明の薬学的組成物は、薬学的に有効な量で投与する。本発明で使用される用語、「薬学的に有効な量」は、医学的治療に適用可能な合理的な恩恵 / リスク比で疾患を治療す

50

るのに十分であり、副作用を起こさない程度の量を意味し、有効容量水準は、患者の健康状態、移植の種類、重症度、薬物の活性、薬物に対する感度、投与方法、投与時間、投与経路、および排出比率、治療期間、配合または同時使用される薬剤を含む要素、並びにその他の医学分野でよく知られている要素に基づいて決定することができる。本発明の組成物は、個別治療剤として投与したり、他の治療薬と併用して投与されることができ、従来の治療剤と順次または同時に投与することができ、単一または複数投与が可能である。前記した要素を全部考慮し、副作用なく最小限の量で最大の効果が得られる量を投与することが大事であり、これは当業者によって容易に決定されることができる。

【0043】

本発明の薬学的組成物は、生物学的製剤に通常使用される担体、希釈剤、賦形剤、または二つ以上のこれらの組み合わせを含むことができる。本発明で使用される用語「薬学的に許容可能な」とは、前記組成物に曝される細胞やヒトに毒性がない特性を示すことを意味する。前記担体は、組成物を生体内送達に適したものであれば特に制限されず、例えば、Merck Index、13th ed.、Merck & Co. Inc.に記載された化合物、食塩水、滅菌水、リンゲル液、緩衝食塩水、デキストロース溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール、エタノール、およびこれらの成分のうち1成分以上を混合して用いることができ、必要に応じて抗酸化剤、緩衝液、静菌剤など他の通常の添加剤を添加することができる。また、希釈剤、分散剤、界面活性剤、結合剤、および潤滑油を付加的に添加して水溶液、懸濁液、乳濁液などのような注入用剤形、丸薬、カプセル、顆粒または錠剤に製剤化することができる。さらに、当分野の適正な方法で、またはRemington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing Company, Easton PA、18th、1990)に開示されている方法を用いて、各疾患または成分に応じて好ましく製剤化することができる。

10

20

【0044】

一実施例において、前記薬学的組成物は、経口型剤形、外用剤、坐剤、滅菌注射溶液および噴霧剤を含む群から選択される1つ以上の剤形であることができ、経口型または注射剤形がより好ましい。

【0045】

本発明で使用される用語「投与」とは、任意の適切な方法で、個体または患者に所定の物質を提供することを意味し、目的とする方法に応じて非経口投与（例えば、静脈内、皮下、腹腔内または局所に注射剤形に適用）したり、経口投与することができ、投与量は、患者の体重、年齢、性別、健康状態、食餌、投与時間、投与方法、排泄率および疾患の重症度などによってその範囲が多様である。本発明の組成物の経口投与用の液状製剤としては、懸濁剤、内用液剤、乳剤、シロップ剤などが該当するが、一般に使用される単純希釈剤である水、流動パラフィン以外に様々な賦形剤、例えば、湿潤剤、甘味剤、芳香剤、保存剤などが一緒に含まれることができる。非経口投与用製剤には、滅菌された水溶液、非水性溶剤、懸濁剤、乳剤、凍結乾燥製剤、坐剤などが含まれる。本発明の薬学的組成物は、活性物質が標的細胞に移動できる任意の装置によって投与することもできる。好ましい投与方式および製剤は、静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などである。注射剤は、生理食塩液、リンゲル液などの水性溶剤、植物油、高級脂肪酸エステル（例えば、オレイン酸エチルなど）、アルコール類（例えば、エタノール、ベンジルアルコール、プロピレングリコール、グリセリンなど）などの非水性溶剤などを用いて製造することができ、変質防止のための安定化剤（例えば、アスコルビン酸、亜硫酸水素ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、BHA、トコフェロール、EDTAなど）、乳化剤、pH調整のための緩衝剤、微生物発育を阻止するための保存剤（例えば、硝酸フェニル水銀、チメロサル、塩化ベンザルコニウム、フェノール、クレソール、ベンジルアルコールなど）などの薬学的担体を含むことができる。

30

40

【0046】

本発明で使用される用語、「個体」とは、前記の癌が発症したり、又は発症する可能性

50

のあるヒトを含むサル、牛、馬、羊、豚、鶏、七面鳥、ウズラ、ネコ、イヌ、マウス、ラット、ウサギ、またはモルモットを含むすべての動物を意味し、「検体」とは、これらより分離した全血、血漿、血清、尿、または唾液であることができる。

【0047】

本発明の薬学的組成物は、薬剤学的に許容可能な添加剤をさらに含むことができ、この時、薬剤学的に許容可能な添加剤としては、デンプン、ゼラチン化デンプン、微結晶セルロース、乳糖、ポビドン、コロイダルシリコンジオキサイド、リン酸水素カルシウム、ラクトース、マンニトール、飴、アラビアゴム、アルファデンプン、トウモロコシ澱粉、粉末セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、オパドライ、でん粉グリコール酸ナトリウム、カルナウバロウ、合成ケイ酸アルミニウム、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸アルミニウム、ステアリン酸カルシウム、白糖、デキストロース、ソルビトール、およびタルクなどが使用されることができる。本発明による薬剤学的に許容可能な添加剤は、前記組成物に対して0.1～90重量部含まれることが好ましいが、これに限定されるものではない。

10

【0048】

一側面においては、本発明は、本発明のウイルスまたはその抗原を有し、免疫化に反応して生成された抗体に関するものである。

【0049】

前記抗体は、全(whole)抗体の形態であるばかりでなく、抗体分子の機能的な断片を含む。全抗体は、2つの全体の長さの軽鎖(light chain)および2つの全体の長さの重鎖(heavy chain)を有する構造であり、それぞれの軽鎖は、重鎖とジスルフィド結合(disulfide bond)で連結されている。抗体分子の機能的な断片とは、抗原結合機能を保有する断片を意味し、抗体断片の例は、(i)軽鎖の可変領域(VL)および重鎖の可変領域(VH)と軽鎖の定常領域(CL)および重鎖の一番目の定常領域(CH1)からなるFab断片；(ii)VHおよびCH1ドメインからなるFd断片；(iii)単一抗体のVLおよびVHドメインからなるFv断片；(iv)VHドメインからなるdAb断片(Ward ES et al., Nature 341: 544-546 (1989))；(v)分離されたCDR領域；(vi)2つの連結されたFab断片を含む2価の断片であるF(ab')₂断片；(vii)VHドメインおよびVLドメインが抗原結合部位を形成するように結合させるペプチドリンカーによって結合された単一鎖Fv分子(scFv)；(viii)二重特異性単一鎖Fv二量体(PECT/US92/09965)および(ix)遺伝子融合によって製作された多価または多重特異性断片であるダイアボディ(diabody)WO94/13804)などを含む。

20

30

【0050】

一側面においては、本発明は、重症熱性血小板減少症ウイルスまたはその抗原、またはこれに対する抗体を含む重症熱性血小板減少症ウイルスの診断キットに関するものである。

【0051】

一実施例において、前記キットは、本発明によるウイルスを含むウイルス試料および前記抗原-抗体複合体の検出用試薬を含むことができる。前記抗原-抗体複合体検出用試薬は、放射状免疫解析、ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay)または免疫蛍光解析用試薬を含む。

40

【0052】

一実施例において、抗原-抗体複合体の検出は、抗原抗体結合により抗体および/または抗原を容易に検出することができるOuchterlonyプレート、ウェスタンブロット、Crossed IE、Rocket IE、Fused Rocket IE、Affinity IEのような免疫電気泳動(Immuno Electrophoresis)で達成することができる。このような方法で用いられる試薬または物質は、公知されたものであり、例えば、抗原-抗体反応、抗原に特異的に結合する基質、核酸また

50

はペプチドアプタマー、複合体と相互作用する受容体またはリガンドまたは補助因子との反応を通じて検出できたり、または質量解析計を利用することができる。前記本願の抗原-抗体複合体と特異的に相互作用し、または結合する試薬または物質は、チップ方式またはナノ粒子(nanoparticle)と一緒に使用することができる。前記免疫解析または免疫染色の方法は、Enzyme Immunoassay、ET Maggio、ed.、CRC Press、Boca Raton、Florida、1980; Gaastra、W.、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)、in Methods in Molecular Biology、Vol. 1、Walker、JM ed.、Humana Press、NJ、1984等に記載されている。上述した免疫解析プロセスによる最終的なシグナルの強さを解析し、すなわち、正常試料とのシグナル対照を行うことにより、感染の有無を診断することができる。

10

【0053】

一側面においては、本発明は、重症熱性血小板減少症ウイルスまたはその抗原、またはこれに対する抗体を含む診断組成物に関するものである。

【0054】

診断組成物に使用される本発明の化合物は、検出可能に標識されるのが好ましい。生体分子を標識させるのに使用可能な様々な方法が当業者に公知されており、本発明の範疇内で考慮される。前記方法は、Tijssen、「Practice and theory of enzyme immunoassays」、Burden、R Hand von Knippenburg (Eds)、Volume 15 (1985)、「Basic methods in molecular biology」; Davis LG、Dibmer MD; Battey Elsevier (1990)、Mayer et al.、(Eds)「Immunochemical methods in cell and molecular biology」Academic Press、London (1987)、or in the series「Methods in Enzymology」、Academic Press、Inc.に記述されている。

20

【0055】

通常の技術者に公知の標識方法と多くの他の標識がある。本発明で使用されうる標識種類としては、例えば、酵素、放射性同位元素、コロイド金属、蛍光化合物、化学発光化合物、および生物発光化合物がある。

30

【0056】

通常使用される標識は、蛍光物質(例えば、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッドなど)、酵素(例えば、わさびペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ)、放射性同位元素(例えば、 ^{32}P または ^{125}I)、ビオチン、ジゴキシゲニン、コロイド金属、化学発光または生物発光化合物(例えば、ジオキシセタン、ルミノールまたはアクリジニウム)を含む。酵素またはビオチニル基の共有結合法、ヨウ化法、リン酸化法、ビオチン化法などのような標識方法が当分野でよく知られている。

40

【0057】

検出方法としては、オートラジオグラフィー、蛍光顕微鏡、直接および間接酵素反応などがあり、これらに限定されない。通常使用される検出解析法では、放射性同位元素または非-放射性同位元素の方法がある。これらは、その中でもウエスタンブロッティング、オーバーレイ-解析法、RIA(Radioimmuno Assay)およびIRMA(Immune Radioimmunometric Assay)、EIA(Enzyme Immuno Assay)、ELISA(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)、FIA(Fluorescent Immuno Assay)およびCLIA(Chemiluminescent Immune Assay)がある。

50

【0058】

一側面においては、本発明は、抗原 / 抗体複合体が形成されうる条件下で検体から分離された試料を、本発明のウイルスまたはその抗原と接触させる段階と、抗原 / 抗体複合体の形成を検出する段階とを含む、重症熱性血小板減少症ウイルス抗体を検出する方法に関するものである。

【 0 0 5 9 】

一側面においては、本発明は、本発明のウイルスまたはその抗原を免疫反応を誘導するのに有効な量でヒトでない動物に投与する段階と、前記重症熱性血小板減少症ウイルスに対する抗体を含有する抗血清または血漿を収集する段階を含む、ヒトでない動物から重症熱性血小板減少症ウイルスに対する抗血清を生産する方法に関するものである。

【 0 0 6 0 】

一側面においては、本発明は、検体から分離された試料を、本発明のウイルスまたはその抗原と接触させて抗原 - 抗体複合体を形成させる段階と、前記複合体の形成を検出する段階とを含む、重症熱性血小板減少症の診断に関する情報を提供する方法に関するものである。

【 発明の実施をするための最良の形態 】

【 0 0 6 1 】

下記の実施例を通じて本発明をより詳細に説明する。しかし、下記の実施例は、本発明の内容を具体化するためのものに過ぎず、これにより本発明が限定されるものではない。

【 0 0 6 2 】

実施例 1 . ウイルスの分離

【 0 0 6 3 】

大学病院の来院患者のうち、重症熱性血小板減少症の症状が疑われる患者の血液、動物（ヤギおよび捨て犬）の血液および野生ダニ均質物を用いて、real time PCR、PCRおよびELISA解析で、SFTSV (severe fever thrombocytopenia syndrome virus、重症熱性血小板減少症ウイルス) の陽 / 陰性を確認した。具体的には、ウイルス感染の前日に、Vero E6細胞を12ウェルプレートに分注した後、細胞密度が60%超になるように培養した後、細胞をPBSで洗浄し、感染が疑われる患者の血清300μl (血液全体を3000rpmで20分間遠心分離して得られた血清) を1時間処理して、感染させた。感染後に血清を除去し、PBSで細胞を洗浄した後、1%FBS DMEM培地に交換し、2週間培養した。2週間後、RT-PCR (reverse transcription後、real time PCRで確認) および免疫蛍光解析法 (immuno fluorescence assay) (実験室で生産したmouse SFTSV NP抗体を1次抗体およびFITCがconjugationされた抗体を2次抗体として使用) でウイルス分離の有無を確認し、ウイルスが分離されない場合には、最初に感染させた上澄み液を別のVero E6細胞に感染させる方法でウイルスを分離した。分離したウイルスは、CB3 / 2016、CB7 / 2017およびCB6 / 2016と命名した。

【 0 0 6 4 】

実施例 2 . 分離されたウイルスの遺伝子解析

【 0 0 6 5 】

Vero E6細胞を用いて分離されたウイルスCB3 / 2016、CB7 / 2017およびCB6 / 2016をそれぞれ逆転写 (Reverse-transcription)、PCRおよびNGS (Next generation sequencing) して、それぞれのL、M、S (NP、NS) 遺伝子の全長配列を確認した。具体的には、それぞれのウイルスからRNAを抽出し、逆転写 (Reverse-transcription) PCRを使ってcDNAを作製した。以後、それぞれのSFTSVウイルスのL、M、S遺伝子に対してPCRを行い、それぞれの全長遺伝子を獲得した。遺伝子配列解析のためNGS方法を使って、各ウイルスのL、M、S遺伝子をillumina nextera XT kitを使用してtagmentationおよびindex PCRをilluminaで提供するプロトコルに従って行った。それから、最終サンプルを

10

20

30

40

50

illumina miniseq 機器を用いて、Fastaq ファイルを生成し、生成されたファイルの遺伝子配列を CLC main workbench program を用いて、それぞれの全長遺伝子配列を解析した。確認された遺伝子配列を韓国、中国、日本で分離された従来のウイルスの遺伝子と統合して、遺伝子解析した結果、本発明において分離した SFTSV 等 CB1、CB3 および CB4 は、現在、中国や韓国で分離されたウイルス (Yux J et al., N. Engl. J. Med. 2011) および韓国で初めて分離された (Gangwon / 2012) ウイルスの遺伝子とは、遺伝的に異なる新しい遺伝子型 (genotype) の SFTSV であることを確認した。併せて、MEGA 7.0 プログラムを使って本発明のウイルスと韓国、中国、日本で分離されるウイルスを L、M、S (NP、NS) 遺伝子に対して系統学的遺伝子解析を進めた結果、本発明のウイルスは、韓国国内の分離株が最も多く属するグループ B に近かったが、遺伝子 L、M および S (NP と NS) 遺伝子から従来のウイルスと差異を示し、少なくとも 3 つ以上のグループに細分化して区別されていることが確認できた (図 1 ~ 4)。そこで、本発明で分離した三つの遺伝子型 SFTSV を B - 1 (CB3 / 2016)、B - 2 (CB7 / 2017) および B - 3 (CB6 / 2016) で遺伝子型を細分化して命名した。

10

【0066】

実施例 3 . ウイルス別 L、M および S 遺伝子アミノ酸配列の差異を確認

【0067】

3 - 1 . L 遺伝子アミノ酸配列の差異

20

【0068】

本発明において分離した新たな細部遺伝子型 B - 1、B - 2 および B - 3 のウイルスの L、M および S 遺伝子の ORF (open reading frame) を基準にアミノ酸配列を解析した結果、L および M 遺伝子から差異を示した。具体的には、B 遺伝子型のうち、L 遺伝子の ORF (6255 bp) は、RdRp を暗号化しており、本発明の遺伝子型 B - 1 ウイルスは、RdRp の 1447 番のアミノ酸がバリンまたは 1913 番のアミノ酸がリジンとして示され、遺伝子型 B - 2 ウイルスおよび B - 3 ウイルスは、RdRp の 1447 番のアミノ酸がイソロイシンまたは 1913 番のアミノ酸がアルギニンとして示された (図 5 A および表 1)。

30

【0069】

【表 1】

	L 遺伝子		M 遺伝子		
アミノ酸	1447	1913	83	404	904
B-1 type	Val	Lys	Tyr	Thr	Val
B-2 type	Ile	Arg	Phe	Thr	Ile
B-3 type	Ile	Arg	Tyr	Ala	Ile

【0070】

40

3 - 2 . M 遺伝子アミノ酸配列の差異

【0071】

本発明において分離した新たな細部遺伝子型 B - 1、B - 2 および B - 3 のウイルスの L、M および S 遺伝子のアミノ酸配列を分析した結果、L および M 遺伝子の差異を示した。具体的には、B 遺伝子型の M 遺伝子の ORF (3222 bp) は、Gn および Gc タンパク質を暗号化しており、本発明の遺伝子型 B - 1 ウイルスは、M 遺伝子の ORF の 83 番のアミノ酸がチロシン、404 番のアミノ酸がスレオニンまたは 904 番のアミノ酸がバリンとして示され、遺伝子型 B - 2 ウイルスは、M 遺伝子の ORF の 83 番のアミノ酸がフェニルアラニン、404 番のアミノ酸がスレオニンまたは 904 番のアミノ酸がイソロイシンとして示され、遺伝子型 B - 3 ウイルスは、M 遺伝子の ORF の 83 番のアミノ

50

酸がチロシン、404番のアミノ酸がアラニンまたは904番のアミノ酸がイソロイシンとして示された(図5Bおよび表1)。

【0072】

実施例4．遺伝子型別の遺伝子の同一性の比較

【0073】

現在、韓国で分離されるSFTSVを本発明の細部遺伝子型B-1、B-2およびB-3を含む遺伝子解析を行い、各遺伝子型別L、MおよびS遺伝子の同一性を比較解析した。その結果、同じ遺伝子型に属するウイルス間には約96~100%の遺伝子の同一性(nucleotide level)を示すのに対し、互いに異なる遺伝子型のウイルス間には91~97%と比較的低い遺伝子の同一性が示された(表2~5)。また、本発明の遺伝子型B-3グループの場合には、同じグループ内での同一性が約95~100%程度と比較的低い同一性を示し、B-3グループ内でも、他の遺伝子型グループを細分化することができる可能性が確認された。

10

【0074】

【表2】

配列同一性(%) (ヌクレオチド同一性)			
遺伝子型	B-1	B-2	B-3
B-1	96.4~100.0%	96.0~97.4%	95.9~97.1%
B-2	98.6~99.6%	97.2~100.0%	96.2~97.1%
B-3	98.1~99.8%	98.2~99.9%	96.5~100.0%

20

L遺伝子の同一性の比較

【0075】

【表3】

配列同一性(%) (ヌクレオチド同一性)			
遺伝子型	B-1	B-2	B-3
B-1	95.8~100.0%	94.5~97.1%	93.2~96.8%
B-2	98.3~99.6%	95.7~100.0%	93.7~96.8%
B-3	94.8~99.3%	95.3~99.7%	94.4~100.0%

30

40

M遺伝子の同一性の比較

【0076】

【表 4】

配列相同性(%) (ヌクレオチド同一性)			
遺伝子型	B-1	B-2	B-3
B-1	95.8~100.0%	94.5~97.1%	93.2~96.8%
B-2	98.3~99.6%	95.7~100.0%	93.7~96.8%
B-3	94.8~99.3%	95.3~99.7%	94.4~100.0%

10

S(NP)遺伝子の相同性の比較

【0077】

【表 5】

配列相同性(%) (ヌクレオチド同一性)			
遺伝子型	B-1	B-2	B-3
B-1	95.8~100.0%	94.8~97.4%	94.3~96.8%
B-2	98.9~100.0%	95.1~100.0%	94.8~98.2%
B-3	96.2~100.0%	94.9~100.0%	96.1~100.0%

20

S(NS)遺伝子の相同性の比較

30

【0078】

実施例 5 . 遺伝子型別交差免疫原性の解析及びワクチン効果の確認

【0079】

5 - 1 . 遺伝子型別交差免疫原性の解析

各 genotype 別交差免疫原性を比較解析するために、FRNT50 (fifty percent of Focus reduction neutralization test) を行った。具体的には、本発明において分離した新たな細部遺伝子型 B-1、B-2 および B-3 のウイルスを大量に増殖させた後、それぞれホルマリン (0.05%) を添加して不活化した後、不活化の有無を 3 回のウイルス分離 (isolation) により確認した。不活化した前記ワクチン (inactivated whole vaccine) を 20% のスクロース (sucrose) を活用し、超遠心分離によりタンパク質を生産した後、これをフェレットに免疫化した。2 週間後、フェレットに追加免疫を実施した後、(2 番の免疫 2 週間隔)、血を採血して血清を分離した。分離した血清を 30 分間 56℃ で不活性化させた後、10 分の 1 に希釈した後、2 倍ずつ階段希釈した。200 FFU/ml で希釈したウイルスを、階段希釈したウイルスと 1:1 で 37℃ で反応させた。6 ウェルプレートに分注した Vero E6 細胞を洗浄した後、前記反応させたウイルスで感染させ、1 時間後に洗浄した後、1% FBS が含有された 0.8% DMEM アガロースゲルを細胞に注いだ。感染 5 日後、ホルマリンを活用して固定し、3 時間後、3 回洗浄を行った後、10% triton x-100 を 5 分ずつ室温で処理した。その後、3 回洗浄し、5% BSA でブロッキングを行った。生産した polyclonal

40

50

a l N P a n t i b o d y を 1 次 抗 体 と し て 用 い、イ ン キ ュ ベー シ ョ ン し た 後、3 回 洗 浄 し、2 次 抗 体 と し て H R P c o n j u g a t e d 抗 体 を 1 時 間 反 応 さ せ 洗 浄 し た 後、D A B で 発 色 し て、結 果 を 確 認 し た。ウ イ ル ス の み 感 染 さ せ た ウ ェ ル の f o u c u s f o r m i n g より 5 0 % 減 少 し た 値 ま で を 有 効 と 解 釈 し た。

【 0 0 8 0 】

【 表 6 】

	セラム		
ウ イ ル ス	B-1	B-2	B-3
B-1	1280	1280	320
B-2	640	2560	320
B-3	640	640	640

10

【 0 0 8 1 】

B - 1、B - 2 お よ び B - 3 の 交 差 免 疫 原 性 を 確 認 し た 結 果、前 記 表 6 の 通 り、各 ウ イ ル ス に 対 し て 最 も 高 い 力 価 が 示 さ れ た。し た が っ て、同 一 g e n o t y p e に 属 す る ウ イ ル ス 間 に は 高 い 交 差 中 和 反 応 を 見 せ た が、各 々 異 な る g e n o t y p e 間 の ウ イ ル ス に は、比 較 的 低 い 中 和 反 応 を 示 す こ と が 分 か っ た。

20

【 0 0 8 2 】

5 - 2 . ワ ク チ ン 効 果 の 確 認

【 0 0 8 3 】

本 発 明 に お い て 分 離 さ れ た 新 た な 細 部 遺 伝 子 型 B - 1、B - 2 お よ び B - 3 の ウ イ ル ス を 大 量 に 増 殖 さ せ た 後、そ れ ぞ れ ホ ル マ リ ン (0 . 0 5 %) を 添 加 し て 不 活 化 し た 後、不 活 化 す る か 否 か を 3 回 ウ イ ル ス 分 離 (i s o l a t i o n) を 通 じ て 確 認 し た。不 活 化 し た 前 記 ワ ク チ ン (i n a c t i v a t e d w h o l e v a c c i n e) を 2 週 間 隔 で 2 回、各 ウ イ ル ス に 対 し て フ ェ レ ッ ト 5 匹 づ つ に 免 疫 化 し た 後、各 ウ イ ル ス に 対 し て $1 \times 10^{7.6} / \text{ml}$ の 攻 撃 接 種 を し た。

30

【 0 0 8 4 】

攻 撃 接 種 の 結 果、対 照 群 の 動 物 は、1 0 日 以 内 に す べ て の 攻 撃 ウ イ ル ス に 感 染 し た 時 に は 斃 死 し た が、ワ ク チ ン を 投 与 し た グ ル ー プ の 全 フ ェ レ ッ ト は 生 存 し、体 温 の 増 加、体 重 減 少 を 感 染 2 - 8 日 後、確 認 す る こ と が で き た が、そ れ 以 降 は 回 復 す る こ と を 確 認 す る こ と が で き た (図 6)。

【 0 0 8 5 】

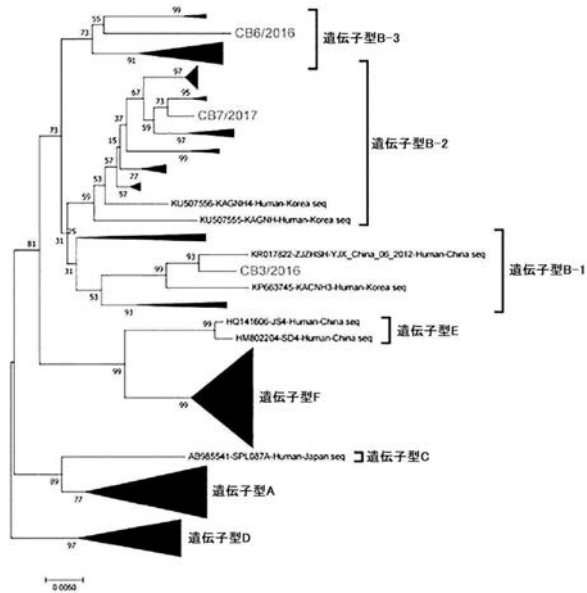
以 上 の 結 果 を 要 約 す る と、S F T S V に は さ ま ざ ま な 遺 伝 子 を 持 つ 数 々 の 遺 伝 子 型 ウ イ ル ス が 存 在 し、同 じ 遺 伝 子 型 に 属 す る ウ イ ル ス 間 に は 比 較 的 高 い 遺 伝 子 の 相 同 性 が 高 い 交 差 免 疫 反 応 を 示 す が、他 の 遺 伝 子 型 の ウ イ ル ス と は 比 較 的 低 い 遺 伝 子 の 相 同 性 お よ び 低 い 交 差 免 疫 原 性 を 示 し た の で、様 々 な 遺 伝 子 型 に 対 す る 交 差 免 疫 原 性 を 示 す た め に は、あ る 特 定 遺 伝 子 型 の ウ イ ル ス だ け に 制 限 さ れ た 防 御 能 を 示 す こ と を 類 推 す る こ と が で き る。

40

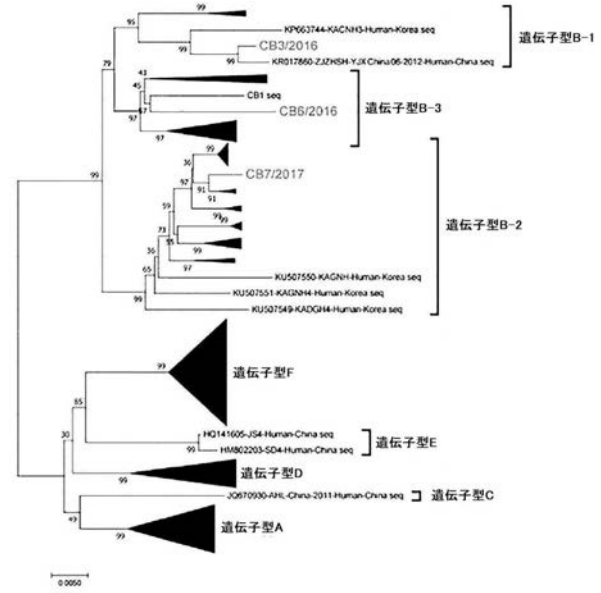
【 0 0 8 6 】

し た が っ て、本 発 明 の 細 部 遺 伝 子 型 B - 1、B - 2 お よ び B - 3 に 属 す る 新 規 な ウ イ ル ス C B 3 / 2 0 1 6、C B 7 / 2 0 1 7 お よ び C B 6 / 2 0 1 6 は、遺 伝 子 型 B の S F T S V に 対 す る 交 差 免 疫 原 性 に 優 れ た ワ ク チ ン と し て 有 用 に 利 用 す る こ と が で き る も の と 考 え ら れ る。

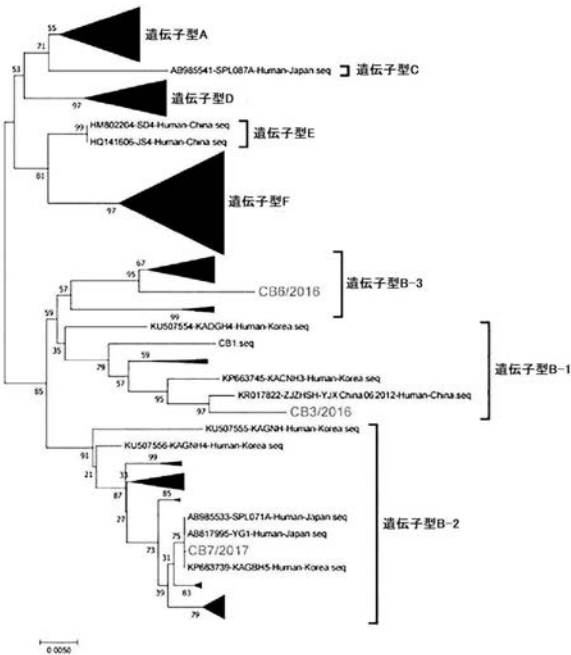
【図 1】



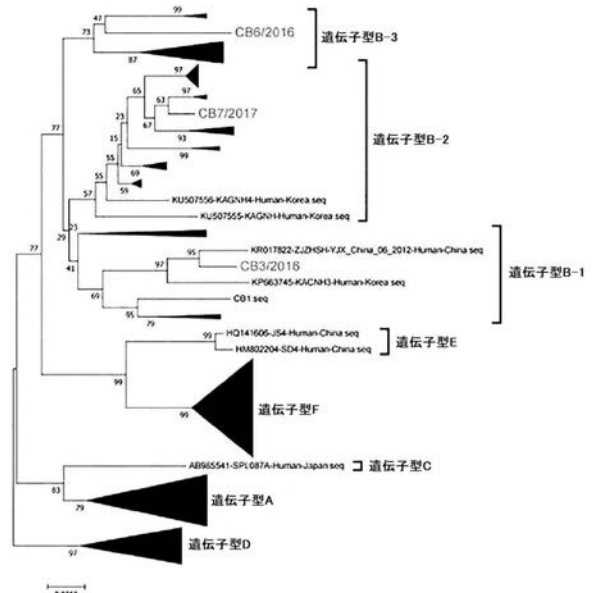
【図 2】



【図 3】



【図 4】

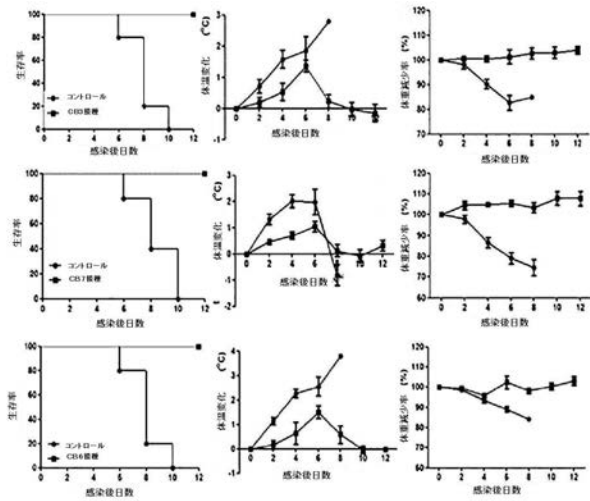


【図 5】

遺伝子型B(B-1, B-2, B-3)型.



【図 6】



【配列表】

2021519615000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/004857

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N 7/00(2006.01)i, C07K 16/10(2006.01)i, A61K 35/76(2006.01)i, A61K 39/12(2006.01)i, A61P 31/14(2006.01)i, G01N 33/569(2006.01)i</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 7/00; C12N 7/01; C12Q 1/70; G01N 33/569; C07K 16/10; A61K 35/76; A61K 39/12; A61P 31/14 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome(SFTS), immunity, vaccine, diagnosis		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YUN, S.-M. et al. Molecular genomic characterization of tick-and human-derived severe fever with thrombocytopenia syndrome virus isolates from South Korea. PLoS Negl. Trop. Dis. 22 September 2017, vol. 11, no. 9, thesis no. e0005893, pages 1-15, Retrieved from <doi: 10.1371/journal.pntd.0005893> See abstract; page 12; tables 1-3; figures 1-4.	1-2,7-17
A		3-6
X	KR 10-2015-0042419 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 21 April 2015 See claims 1-14; sequence identifier nos. 1-6.	3,5,7-17
X	FU, Y. et al. Phylogeographic analysis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus from Zhoushan Islands, China: implication for transmission across the ocean. Scientific Reports. 2016, vol. 6, thesis no. 19563, pages 1-8 See the entire document.	16-17
X	YOSHIKAWA, T. et al. Phylogenetic and Geographic Relationships of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome Virus in China, South Korea, and Japan. The Journal of Infectious Diseases. 2015, vol. 212, pages 889-898 See the entire document.	16-17
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 AUGUST 2019 (19.08.2019)		Date of mailing of the international search report 19 AUGUST 2019 (19.08.2019)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/004857

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2016-0054161 A (REPUBLIC OF KOREA(ANIMAL AND PLANT QUARANTINE AGENCY)) 16 May 2016 See abstract; claims 1-5.	16-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational application No.
PCT/KR2019/004857

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0042419 A	21/04/2015	KR 10-1630499 B1 WO 2015-053455 A1	15/06/2016 16/04/2015
KR 10-2016-0054161 A	16/05/2016	KR 10-1785290 B1	18/10/2017

국제조사보고서		국제출원번호 PCT/KR2019/004857																		
A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 7/00(2006.01)i, C07K 16/10(2006.01)i, A61K 35/76(2006.01)i, A61K 39/12(2006.01)i, A61P 31/14(2006.01)i, G01N 33/569(2006.01)i																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 7/00; C12N 7/01; C12Q 1/70; G01N 33/569; C07K 16/10; A61K 35/76; A61K 39/12; A61P 31/14 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 중증열성혈소판감소증후군(Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, SFTS), 면역(immunity), 백신(vaccine), 진단(diagnosis)																				
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>YUN, S.-M. 등, 'Molecular genomic characterization of tick and human-derived severe fever with thrombocytopenia syndrome virus isolates from South Korea', PLoS Negl. Trop. Dis., 2017.09.22, 11권, 9호, 논문번호 e0005893, 페이지 1-15, doi: 10.1371/journal.pntd.0005893 초록; 페이지 12; 표 1-3; 도면 1-4 참조.</td> <td>1-2, 7-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>3-6</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>KR 10-2015-0042419 A (서울대학교산학협력단) 2015.04.21 청구항 1-14; 서열번호 1-6 참조.</td> <td>3, 5, 7-17</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>FU, Y. 등, 'Phylogeographic analysis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus from Zhoushan Islands, China: implication for transmission across the ocean', Scientific Reports, 2016, 6권, 논문번호 19563, 페이지 1-8 전체 문헌 참조.</td> <td>16-17</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>YOSHIKAWA, T. 등, 'Phylogenetic and Geographic Relationships of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome Virus in China, South Korea, and Japan', The Journal of Infectious Diseases, 2015, 212권, 페이지 889-898 전체 문헌 참조.</td> <td>16-17</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X	YUN, S.-M. 등, 'Molecular genomic characterization of tick and human-derived severe fever with thrombocytopenia syndrome virus isolates from South Korea', PLoS Negl. Trop. Dis., 2017.09.22, 11권, 9호, 논문번호 e0005893, 페이지 1-15, doi: 10.1371/journal.pntd.0005893 초록; 페이지 12; 표 1-3; 도면 1-4 참조.	1-2, 7-17	A		3-6	X	KR 10-2015-0042419 A (서울대학교산학협력단) 2015.04.21 청구항 1-14; 서열번호 1-6 참조.	3, 5, 7-17	X	FU, Y. 등, 'Phylogeographic analysis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus from Zhoushan Islands, China: implication for transmission across the ocean', Scientific Reports, 2016, 6권, 논문번호 19563, 페이지 1-8 전체 문헌 참조.	16-17	X	YOSHIKAWA, T. 등, 'Phylogenetic and Geographic Relationships of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome Virus in China, South Korea, and Japan', The Journal of Infectious Diseases, 2015, 212권, 페이지 889-898 전체 문헌 참조.	16-17
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
X	YUN, S.-M. 등, 'Molecular genomic characterization of tick and human-derived severe fever with thrombocytopenia syndrome virus isolates from South Korea', PLoS Negl. Trop. Dis., 2017.09.22, 11권, 9호, 논문번호 e0005893, 페이지 1-15, doi: 10.1371/journal.pntd.0005893 초록; 페이지 12; 표 1-3; 도면 1-4 참조.	1-2, 7-17																		
A		3-6																		
X	KR 10-2015-0042419 A (서울대학교산학협력단) 2015.04.21 청구항 1-14; 서열번호 1-6 참조.	3, 5, 7-17																		
X	FU, Y. 등, 'Phylogeographic analysis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus from Zhoushan Islands, China: implication for transmission across the ocean', Scientific Reports, 2016, 6권, 논문번호 19563, 페이지 1-8 전체 문헌 참조.	16-17																		
X	YOSHIKAWA, T. 등, 'Phylogenetic and Geographic Relationships of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome Virus in China, South Korea, and Japan', The Journal of Infectious Diseases, 2015, 212권, 페이지 889-898 전체 문헌 참조.	16-17																		
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																				
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "B" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																				
국제조사의 실제 완료일 2019년 08월 19일 (19.08.2019)		국제조사보고서 발송일 2019년 08월 19일 (19.08.2019)																		
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150																		

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2015년 1월)

국제 조사 보고서

국제출원번호

PCT/KR2019/004857

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2016-0054161 A (대한민국(농림축산식품부 농림축산검역본부장)) 2016.05.16 요약; 청구항 1-5 참조.	16-17

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/004857

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0042419 A	2015/04/21	KR 10-1630499 B1 WO 2015-053455 A1	2016/06/15 2015/04/16
KR 10-2016-0054161 A	2016/05/16	KR 10-1785290 B1	2017/10/18

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2015년 1월)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/569 (2006.01)		G 0 1 N 33/569		L
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		N
C 1 2 N 15/31 (2006.01)		C 1 2 N 15/31		Z N A

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T R I T O N

(72) 発明者 バク ス - ジン

大韓民国 2 8 1 2 3 チュンチョンブク - ド チョンジュ - シ チョンウォン - グ オチャン - ユップ オチャンジュンガン - ロ 8 3 ナンバー 7 0 5 - 1 5 0 4

(72) 発明者 キム ヨン - イル

大韓民国 3 4 0 0 6 デジョン ユソン - グ 1 3 6 ペオン - ギル ワリョン - ロ 7 5 ナンバー 2 0 8 - 1 7 0 2

(72) 発明者 ユ ミン - アー

大韓民国 3 0 0 6 4 セジョン 1 - ロ ドウム 1 0 5 ナンバー 5 1 9 - 2 1 0 2

F ターム (参考) 4B065 AA95X BA22 CA44

4C085 AA03 BA51 DD61 EE01 FF24 GG01 GG08

4C087 AA01 AA02 BC83 NA14 ZA53

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA75 EA53