



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 39/29 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0068460

(43) 공개일자 2007년06월29일

(21) 출원번호 10-2007-7011275

(22) 출원일자 2007년05월17일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2007년05월17일

(86) 국제출원번호 PCT/US2005/037499

(87) 국제공개번호 WO 2006/044923

국제출원일자 2005년10월18일

국제공개일자 2006년04월27일

(30) 우선권주장 US 60/620,158 2004년10월18일 미국(US)

(71) 출원인 글로브이문
미국, 콜로라도 80010, 오로라, #138, 몬트뷰 블러바드 12635 E.

(72) 발명자 듀크, 씨. 리차드
미국, 콜로라도 80222, 덴버, 사우스 조세핀 스트리트 934
프란주소프, 알렉스
미국, 콜로라도 80218, 덴버, 오그덴 스트리트 860
할러 아우레리아
미국, 콜로라도 80301, 보울더, 콘코드 드라이브 7661
킹. 에이치, 토마스
미국, 콜로라도 80212, 덴버, 페리 스트리트 4105

(74) 대리인 이세진

전체 청구항 수 : 총 84 항

(54) 만성 C 형 간염에 대한 효모계 치료

(57) 요약

본 발명은 C형 간염 바이러스(HCV)의 감염에 대하여 동물을 백신화하고 동물에서 C형 간염의 감염을 치료 또는 예방하기 위한 백신을 포함한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 동물에서 HCV에 대한 면역반응을 유발하기 위하여 백신으로 직접적으로 또는 효모계 백신 비히클과 조합되어 이용될 수 있는 다양한 신규한 HCV 융합 단백질을 포함한다. 또한 본 발명은 HCV 감염의 검출 및/또는 치료 또는 예방을 위한 진단 또는 치료 프로토콜에서 본 발명에 따른 HCV 융합 유전자 및 단백질의 이용을 포함한다.

대표도

도 1a

특허청구의 범위

청구항 1.

a) 효모 비히클; 및

b) 상기 효모 비히클에 의해 재조합으로 발현하는 HCV 융합 단백질을 포함하되, 상기 HCV 융합 단백질은 HCV 코어 서열의 적어도 일부와 결합된 HCV NS3 프로테아제의 적어도 일부를 포함함을 특징으로 하는 백신.

청구항 2.

제 1항에 있어서,

HCV NS3 프로테아제는 천연 HCV NS3 프로테아제의 촉매 도메인이 결핍된 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 3.

제 1항에 있어서,

HCV NS3 프로테아제는 전장의 NS3 단백질의 개시 N-말단의 88개 아미노산에 후속된 HCV NS3의 262개의 아미노산(서열번호: 20의 1115 내지 1376 위치)으로 필수적으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 4.

제 1항에 있어서,

HCV 코어의 소수성 C-말단 서열이 절단된 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 5.

제 1항에 있어서,

HCV 코어 서열은 전장의 HCV 코어 서열의 2 내지 140 위치의 아미노산(서열번호: 20의 2 내지 140 위치)으로 필수적으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 6.

제 1항에 있어서,

HCV 코어 서열은 두 개의 아미노산, 글루타메이트 및 아스파르테이트를 포함하도록 확장된 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 7.

제 1항에 있어서,

HCV 코어 서열은 G-G-G-H-H-H-H-H-H (서열번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하도록 확장된 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 8.

제 1항에 있어서,

HCV NS 3 프로테아제는 이의 N-말단에서 서열번호: 9 (MADEAP)에 나타낸 아미노산 서열과 연결된 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 9.

제 1항에 있어서,

융합 단백질은 서열번호: 2로 필수적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 10.

a) 효모 비히클: 및

b) 상기 효모 비히클에 의해 재조합으로 발현되는 HCV 융합 단백질을 포함하되, 상기 HCV 융합 단백질은 전장의 불활성화된 HCV NS3 단백질을 특징으로 하는 백신.

청구항 11.

제 10항에 있어서,

HCV NS3 단백질은 서열번호: 20의 HCV 폴리단백질 서열의 잔기 1165에 돌연변이를 포함하여 상기 단백질의 단백질 분해 활성이 불활성화된 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 12.

제 10항에 있어서,

HCV NS3프로테아제는 이의 N-말단에서 서열번호: 9 (MADEAP)에 나타낸 아미노산 서열과 연결된 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 13.

제 10항에 있어서,

상기 융합 단백질은 서열번호: 4로 필수적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 14.

a) 효모 비히클; 및

b) 상기 효모 비히클에 의해 재조합으로 발현되는 HCV 융합 단백질을 포함하되, 상기 HCV 융합 단백질은 절단된 HCV E2 단백질에 융합된 절단된 HCV E1 단백질을 포함함을 특징으로 하는 백신.

청구항 15.

제 14항에 있어서,

절단된 HCV E1 단백질은 HCV E1의 1 내지 156 아미노산(서열번호: 20의 192 내지 347 위치)으로 필수적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 16.

제 14항에 있어서,

절단된 HCV E2 단백질은 HCV E2의 1 내지 334 아미노산(서열번호: 20의 384 내지 717 위치)으로 필수적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 17.

제 14항에 있어서,

절단된 HCV E1 단백질은 이의 N-말단에서 서열번호: 9(MADEAP)에 나타난 아미노산 서열과 연결된 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 18.

제 14항에 있어서,

융합 단백질은 서열번호: 6으로 필수적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 19.

a) 효모 비히클; 및

b) 상기 효모 비히클에 의해 재조합으로 발현되는 HCV 융합 단백질을 포함하되, 상기 HCV 융합 단백질은 트랜스멤브레인 도메인이 결실된 HCV NS4b 단백질을 특징으로 하는 백신.

청구항 20.

제 19항에 있어서,

트랜스멤브레인 도메인이 결실된 HCV NS4b 단백질은 HCV NS4b의 아미노산 177 내지 261 (서열번호: 20의 1888 내지 1972 위치)과 연결된 HCV NS4b의 아미노산 1 내지 69 (서열번호: 20의 1712 내지 780)로 필수적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 21.

제 19항에 있어서,

트랜스멤브레인 도메인이 결실된 HCV NS4b 단백질은 이의 N-말단에서 서열번호: 9(MADEAP)에 나타낸 아미노산 서열과 연결된 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 22.

제 19항에 있어서,

융합 단백질은 서열번호: 8로 필수적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 23.

a) 효모 비히클; 및

b) 상기 효모 비히클에 의해 재조합으로 발현되는 HCV 융합 단백질을 포함하되, 상기 HCV 융합 단백질은 전장의 HCV E2 단백질에 융합된 전장의 HCV E1 단백질에 융합된 전장의 HCV 코어 단백질을 포함함을 특징으로 하는 백신.

청구항 24.

제 23항에 있어서,

전장의 HCV 코어 단백질은 이의 N-말단에서 서열번호: 9(MADEAP)에 나타낸 아미노산 서열과 연결된 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 25.

제 23항에 있어서,

융합 단백질은 서열번호: 12로 필수적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 26.

a) 효모 비히클; 및

b) 상기 효모 비히클에 의해 재조합으로 발현되는 HCV 융합 단백질을 포함하되, 상기 HCV 융합 단백질은 결실된 멤브레인 도메인을 갖는 HCV E2 단백질 및 결실된 트랜스멤브레인 도메인을 갖는 HCV E1 단백질과 융합된 절단된 HCV 코어 단백질을 포함함을 특징으로 하는 백신.

청구항 27.

제 26항에 있어서,

절단된 HCV 코어 단백질은 HCV 코어 단백질의 2 내지 140 위치(서열번호: 20의 2 내지 140)로 필수적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 28.

제 26항에 있어서,

결실된 트랜스멤브레인 도메인을 갖는 HCV E1 단백질은 HCV E1 단백질의 1 내지 156 위치(서열번호: 20의 192 내지 347 위치)로 필수적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 29.

제 26항에 있어서,

결실된 트랜스멤브레인 도메인을 갖는 HCV E2 단백질은 HCV E2 단백질의 1 내지 334 (서열번호: 20의 384 내지 717 위치)로 필수적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 30.

제 26항에 있어서,

절단된 HCV 코어 단백질은 이의 N-말단에서 서열번호: 9(MADEAP)에 나타난 아미노산 서열과 연결된 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 31.

제 26항에 있어서,

융합 단백질은 필수적으로 서열번호: 14로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 32.

a) 효모 비히클; 및

b) 상기 효모 비히클에 의해 재조합으로 발현되는 HCV 융합 단백질을 포함하되, 상기 HCV 융합 단백질은 HCV NS4b로 융합된 HCV NS4a로 융합된 HCV NS3을 포함하고, 상기 HCV NS3 프로테아제는 불활성화되고 HCV NS4b는 트랜스 멤브레인이 결핍된 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 33.

제 32항에 있어서,

HCV NS3 단백질은 HCV NS3의 1 내지 631 위치(서열번호: 20의 1027 내지 1657)로 이루어지고, 상기 서열번호: 20의 1165 위치에 있는 세린은 프로테아제를 불활성화시키기 위하여 알라닌으로 치환된 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 34.

제 32항에 있어서,

HCV NS4a 단백질은 HCV NS4a 단백질의 1 내지 54 위치(서열번호: 20의 635 내지 691)로 필수적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 35.

제 32항에 있어서,

HCV NS4b 단백질은 HCV NS4b의 177 내지 261 위치(서열번호: 20의 1888 내지 1972)에 융합된 HCV NS4b의 1 내지 69 위치(서열번호: 20의 1712 내지 1780 위치)로 필수적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 36.

제 32항에 있어서,

HCV NS3 단백질은 이의 N-말단에서 서열번호: 9(MADEAP)에 나타낸 아미노산 서열과 연결된 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 37.

제 32항에 있어서,

융합 단백질은 서열번호: 16으로 필수적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 38.

a) 효모 비히클; 및

b) 상기 효모 비히클에 의해 재조합으로 발현되는 HCV 융합 단백질을 포함하되, 상기 HCV 융합 단백질은 HCV NS5b 단백질에 융합된 HCV NS5a 단백질을 포함하고, NS5b 단백질은 NS5b C-말단의 불활성화 결실을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 39.

제 38항에 있어서,

HCV NS5a 단백질은 HCV NS5a의 1 내지 448(서열번호: 20의 1973 내지 2420)로 필수적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 40.

제 38항에 있어서,

HCV NS5b 단백질은 HCV NS5b의 1 내지 539 위치(서열번호: 20의 2421 내지 2959)로 필수적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 41.

제 38항에 있어서,

HCV NS5a 단백질은 이의 N-말단에서 서열번호: 9(MADEAP)에 나타난 아미노산 서열과 연결된 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 42.

제 38항에 있어서,

융합 단백질은 서열번호: 18로 필수적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 43.

제 1항 내지 제 42항 중 어느 한 항에 있어서,

융합 단백질의 발현은 유도성 프로모터의 제어하에서 이루어진 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 44.

제 43항에 있어서,

유도성 프로모터는 CUP1인 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 45.

제 1항 내지 제 42항 중 어느 한 항에 있어서,

백신은 추가로 수지상 세포를 포함하되, 상기 수지상 세포는 HCV 융합 단백질을 재조합으로 발현하는 효모 비히클로 세포내 로딩된 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 46.

제 1항 내지 제 45항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 하나의 생물학적 반응 조절제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 47.

제 46항에 있어서,

생물학적 반응 조정제는 사이토카인, 호르몬, 지질 유도체 및 작은 분자 약물로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 48.

제 46항에 있어서,

생물학적 반응 조정제는 항-CTLA-4, 항-CD137, 항-CD28, 항-CD40, 알렘투주맙, 데니루킨 디프티톡스, 항-CD4, 항-CD25, 항-PD1, 항-PD-L1, 항-PD-L2, FOXP3-차단제, Flt-3 리간드, 이미퀴모드, 과립구-대식구 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 사르그라모스틴, Toll 유사 수용체(TLR)-7 작용제 및 TLR-9 작용제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 49.

HCV 감염에 대하여 동물을 보호하기 위한 제형에서 제 1항 내지 제 48항 중 어느 한 항에 따른 백신의 이용.

청구항 50.

HCV 항원에 대하여 항원 특이적이고, 세포 매개된 면역 반응을 유발하기 위한 제형에서 제 1 항 내지 제 48항 중 어느 한 항에 따른 백신의 이용.

청구항 51.

질병 또는 용태를 치료하거나 예방하기 위한 제형에서 제 1항 내지 제 48항 중 어느 한 항에 따른 백신의 이용.

청구항 52.

HCV로 감염될 위험에 있는 개인의 모집단을 면역화시키기 위한 제형에서 제 1항 내지 제 48항 중 어느 한 항에 따른 백신의 이용.

청구항 53.

HCV로 감염된 개인의 모집단을 치료하기 위한 제형에서 제 1항 내지 제 48항 중 어느 한 항에 따른 백신의 이용.

청구항 54.

제 1항 내지 제 48항 중 어느 한 항에 따른 백신을 HCV로 감염되거나 HCV로 감염될 위험에 놓인 동물에게 투여하는 단계를 포함하여 동물에게 상기 백신의 투여가 HCV 감염 또는 동물에서 HCV 감염으로부터 야기된 적어도 하나의 증상을 감소 또는 완화시키는 것을 특징으로 하는 C형 바이러스 감염(HCV)에 대한 동물의 보호방법.

청구항 55.

제 1항 내지 제 48항 중 어느 한 항에 따른 백신을 동물에게 투여하는 단계를 포함한 HCV 항원에 대한 항원 특이적이고 세포 매개된 면역 반응을 유발하는 방법.

청구항 56.

제 1항 내지 제 48항 중 어느 한 항에 따른 백신을 HCV로 감염된 개인의 모집단에게 투여하는 단계를 포함한 상기 개인의 모집단에서 HCV 항원에 대한 항원 특이적이고 세포 매개된 면역반응을 유발하는 방법.

청구항 57.

제 1항 내지 제 48항 중 어느 한 항에 따른 백신은 HCV로 감염될 위험에 놓인 개인의 모집단에게 투여하는 단계를 포함한 상기 개인의 모집단을 HCV에 대하여 면역화시키는 방법.

청구항 58.

제 53항 내지 제 57항 중 어느 한 항에 있어서,

백신은 HCV 항원을 코딩하는 바이러스 벡터를 포함한 백신에 부스터로서 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 59.

제 53항 내지 제 57항 중 어느 한 항에 있어서,

백신은 상이한 HCV 백신으로 부스팅하기 전에 면역계를 초회감작하기 위하여 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 60.

HCV 코어 서열의 적어도 일부와 연결된 HCV NS3 프로테아제의 적어도 일부를 포함하되, 상기 HCV NS3 프로테아제는 천연의 HCV NS3 프로테아제의 촉매 도메인이 결핍된 것을 특징으로 하는 분리된 HCV 융합 단백질.

청구항 61.

제 60항에 있어서,

HCV NS3 프로테아제는 전장의 NS3 단백질의 개시 N-말단의 88개 아미노산에 후속된 HCV NS3의 262개 아미노산 (서열번호: 20의 1115 내지 1376위치)으로 필수적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 분리된 융합 단백질.

청구항 62.

제 60항에 있어서,

HCV 코어의 소수성 C-말단 서열이 절단된 것을 특징으로 하는 분리된 융합 단백질.

청구항 63.

제 62항에 있어서,

HCV 코어 서열은 전장의 HCV 코어 서열의 2 내지 140 위치의 아미노산 (서열번호: 20의 2 내지 140 위치)으로 필수적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 분리된 융합 단백질.

청구항 64.

제 60항에 있어서,

HCV 코어 서열은 두 개의 아미노산, 글루타메이트 및 아스파르테이트를 포함하도록 부가된 것을 특징으로 하는 분리된 융합 단백질.

청구항 65.

제 60항에 있어서,

HCV 코어 서열은 G-G-G-H-H-H-H-H-H (서열번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하도록 확장된 것을 특징으로 하는 분리된 융합 단백질.

청구항 66.

제 60항에 있어서,

HCV NS3 프로테아제는 이의 N-말단에서 서열번호: 9(MADEAP)에 나타난 아미노산 서열과 연결된 것을 특징으로 하는 분리된 융합 단백질.

청구항 67.

제 60항에 있어서,

융합 단백질은 서열번호: 2로 필수적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 분리된 융합 단백질.

청구항 68.

서열번호: 4, 서열번호: 6, 서열번호: 8, 서열번호: 12, 서열번호: 14, 서열번호: 16 및 서열번호: 18로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열로 필수적으로 이루어진 핵산 서열에 의해 코딩되는 분리된 융합 단백질.

청구항 69.

제 60항 내지 제 68항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자.

청구항 70.

제 69항의 분리된 핵산 분자를 포함하는 재조합 핵산 분자.

청구항 71.

제 70항에 있어서,

바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 재조합 핵산 분자.

청구항 72.

제 71항에 따른 재조합 핵산 분자로 형질감염된 재조합 세포.

청구항 73.

제 72항에 있어서,

세포는 종양 세포인 것을 특징으로 하는 재조합 세포.

청구항 74.

제 72항에 있어서,

세포는 효모 세포인 것을 특징으로 하는 재조합 세포.

청구항 75.

a) 제 60항 내지 제 68항 중 어느 한 항에 따른 HCV 융합 단백질; 및

b) 약제학적으로 허용된 담체를 포함하는 백신.

청구항 76.

제 60항 내지 제 68항 중 어느 한 항에 따른 HCV 융합 단백질을 코딩하는 분리된 핵산 분자를 포함하는 백신.

청구항 77.

HCV 감염에 대하여 동물을 보호하기 위한 제형에서 제 60항 내지 제 68항 중 어느 한 항에 따른 백신의 용도.

청구항 78.

HCV 항원에 대하여 항원 특이적이고 세포 매개된 면역 반응을 매개하기 위한 제형에서 제 60항 내지 제 68항 중 어느 한 항에 따른 백신의 용도.

청구항 79.

HCV로 감염될 위험에 놓인 개인의 모집단을 면역화시키기 위한 제형에서 제 60항 내지 제 68항 중 어느 한 항에 따른 백신의 용도.

청구항 80.

HCV로 감염된 개인의 모집단을 치료하기 위한 제형에서 제 60항 내지 제 68항 중 어느 한 항에 따른 백신의 용도.

청구항 81.

HCV로 감염된 또는 HCV로 감염될 위험에 놓인 동물에게 제 60항 내지 제 68항 중 어느 한 항에 따른 백신을 투여하는 단계를 포함하고 상기 동물에게 백신의 투여는 HCV 감염 또는 동물에서 HCV 감염으로부터 야기된 적어도 하나의 증상을 감소 또는 예방하는 C형 감염에 대한 동물의 보호방법.

청구항 82.

제 60항 내지 제 68항 중 어느 한 항에 따른 백신을 투여하는 것을 포함한 HCV 항원에 대하여 항원 특이적이고, 세포 매개된 면역 반응을 유발하는 방법.

청구항 83.

제 60항 내지 제 68항 중 어느 한 항에 따른 백신을 HCV로 감염된 개인의 모집단에게 투여하는 단계를 포함하고 상기 개인의 모집단에서 HCV 항원에 대한 항원 특이적이고, 세포 매개된 면역 반응을 유발하는 방법.

청구항 84.

제 60항 내지 제 68항 중 어느 한 항에 따른 백신을 HCV로 감염될 위험에 있는 개인의 모집단에게 투여하는 단계를 포함하고 상기 개인의 모집단에서 HCV 항원에 대하여 면역화시키는 방법.

명세서

기술분야

본 발명은 C형 간염 바이러스 (hepatitis C virus, HCV)에 대하여 동물을 백신화하고 동물에서 C형 간염 바이러스의 감염을 치료 또는 예방하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경기술

C형 간염 바이러스(HCV)는 전세계적으로 급성 및 만성 간염의 주요 원인 인자이다. 전세계적으로 2억 명의 만성적으로 HCV로 감염된 개인들이 있으며, 이들 중 4백만명이 미국에 거주하는 것으로 추정된다. 감염의 주요한 근원은 수혈 또는 IV 약물의 이용을 포함한 비경구적 경로를 통해서이다. 현재 혈액은행 관리와 연관된 높은 정도의 안전성에도 불구하고 감염률은 IV 약물의 이용 및 다른 형태의 노출로 인하여 지속적으로 증가하고 있다.

3차 국립 건강 및 영양 조사 (NHANES III)의 데이터에 따르면, 미국내 HCV 감염 환자의 약 70%가 만성적으로 감염될 것이다. 만성 감염 개인의 상당 비율은 경화증, 간 대상부전, 간 이식, 간세포 암종 및 사망으로의 진행을 포함한 만성 HCV

감염의 심각한 휴유증을 앓게 된다. HCV로 만성 감염된 환자에 대한 소급된 장기간 추적 연구는 간경화로 진행될 비율을 10 내지 29년에 이르는 추적 시간에 약 20 내지 50%로 추정한다(1-4). 수혈에 노출된 후 HCV로 만성 감염된 환자에 대한 전향적 장기간 추적 연구는 경화증으로 진행할 비율을 8 내지 16년에 이르는 상대적으로 짧은 추적 시간에 약 10 내지 15%로 추정한다(5-8). 바이러스 감염에 대하여 이차로 경화증을 발병할 환자의 약 1 내지 3%가 약 2 내지 6%의 연간 사망률을 보이는 간세포 암종을 연간 발병할 것으로 예상된다(9-10). NHANES III 양성률 데이터 및 연령 특이적 발생빈도 속도를 이용한 역학 모델은 가까운 미래에 악화된 불만족한 의료 요구를 예고하며, 미국의 인구에서 2015년까지 경화증 및 관련된 합병증으로의 진행에 절정에 달할 것을 추정한다(11). 인터페론계 요법을 사용한 만성 바이러스 감염의 저해는 여러 거대 계열에서 경화증, 간세포 및 사망으로의 진행 속도를 변화시킨다는 것을 보여주었다(12-14). 그러나, 미국에서 우세하게 발견되는 유전형인 만성 C형 감염의 유전형 1을 리바비린(ribavirin)을 함유한 폴리에틸렌글리콜화된(pegylated) 인터페론-α로 치료할 경우에 지속된 바이러스의 반응 속도는 약 50%이다. 또한, 리바비린이 더해진 인터페론계 요법은 우울증, 자살 관념, 감기 유사 증상 및 호중성백혈구 감소증을 포함한 심각한 안전상의 문제점을 가지고 있다. 치료 옵션은 현재 인터페론계 치료에 대한 부분적 반응자, 재발 환자 및 무반응자로 제한되어 있다.

HCV는 엔벨로프를 가진 양성 RNA 바이러스의 플라비비리데 과(Flaviviridae family)의 일원이다. 세포로 유입되자마자 약 3000개의 아미노산으로 이루어진 폴리단백질로 번역되는 약 9600 뉴클레오타이드의 게놈을 가지고 있다. 세 개의 구조 단백질과 7개의 비구조 단백질은 세포 및 HCV 유래의 프로테아제에 의하여 번역과 동시에 또는 후에 생성된다. 바이러스 단백질 중 일부의 역할은 아직 명확하게 규명되지 않았지만, HCV 구조 코어 단백질, E1 및 E2 표면 글리코단백질, 비구조 NS2 및 NS3 프로테아제 및 NS5B RNA 의존성 RNA 폴리머라제와 같은 다수가 HCV 생명 주기에서 필수적인 기능을 수행하는 것으로 공지되어 있다. HCV는 지금까지 분리된 바이러스 게놈의 유전적인 이질성을 기초로 하여 6개의 주요 유전형과 100개 이상의 아형을 가지고 있다.

유전형 1a, 1b 및 2가 북아메리카 및 유럽에서 우세하게 발견되고 있는 반면 남아메리카에서는 HCV 유전형 1a, 1b 및 3이 우세하다. 유전형 4, 5 및 6은 그 외 전세계에 걸쳐 관찰되고 있다(19). 특정 HCV 유전형의 지리적 우세함에도 불구하고 인구 움직임의 증가로 인하여 대부분의 유전형이 전세계에 걸쳐 동정되고 있다. 상이한 HCV 유전형은 현재 추천되고 있는 인터페론/리바비린 치료법에 대한 반응 측면에서 다양하다. 특히, HCV 유전형 1로 감염된 환자의 50%가 현재 치료 요법에 난치인 상태이다(19). 추가로 아프리카인-아메리카인 환자들 중에서 인터페론 알파에 대한 반응 속도는 카우카시안 혈통 보다 낮았다. 이러한 데이터는 개인의 기존하는 세포성 면역 반응을 이상적으로 증폭하는 선택적 치료에 대한 요구를 제안한다.

【표 1】
HCV 유전자 및 유전자 생산물

유전자	기능	HCV 유전형 1a 및 1b 간의 % 동일성
코어	뉴클레오캡사이드 코어 단백질	98.4
E1	엔벨로프 글리코단백질	81.8
E2	엔벨로프 글리코단백질	79.9
P7	이온 채널	81.0
NS2	메탈로프로테아제	80.1
NS3	프로테아제/헬리카제	92.1
NS4a	NS3 프로테아제 보조인자	91.1
NS4b	미지	82.4
NS5a	미지	77.7
NS5b	RNA-의존성 RNA 폴리머라제	87.5

국립 생명공학정보 센터로부터 접근번호 AF011753 (gi:2327074)하의 HCV 단백질 서열을 획득하였다. 유전자흐름 생물정보학 웹사이트 (Institut de Genetique Humaine, 141 rue de la Cardonille, Montpellier France) 유래의 배열 프로그램이 균주 1a 및 1b로부터 유래된 HCV 단백질의 아미노산 서열을 비교하기 위하여 이용되었다.

많은 연구는 HCV로 감염된 개인에서 바이러스 복제, 바이러스 혈증의 정도 및 만성적 상태로의 진행은 $CD4^+$ 헬퍼 (T_H) 및 $CD8^+$ 세포독성 T 림프구(CTLs)에 의해 매개되고 코어 및 NS3을 포함한 구조 및 비구조 바이러스의 단백질에 대한 HCV 특이적 세포성 면역에 의해 직접 및 간접적으로 영향을 받는다는 것을 제안하고 있다(15). 만성 HCV 감염 사람에서 효과적인 면역이 결핍되어 있다는 것은 다른 유전형의 HCV에 의해 중복 감염이 발생된다는 것에 의해 추가로 암시된다. 세포성 면역 반응의 강건함과 폭이 HCV 감염의 천연 경로에 영향을 미치는 것으로 제안되어 왔으므로 바이러스에 노출된 개인에서 T 세포 면역 반응을 자극하는 면역치료 생산물을 개발하는 것이 중요하다.

사람과 침팬지에 대한 연구는 HCV가 혈액과 간에서 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 반응이 개시되기 전 수주일 동안 복제할 수 있다는 것을 밝혀냈다. 또한, 혈액에서 확장된 이후에도 $CD8^+$ (및 $CD4^+$)에 의해 기능의 습득이 지연될 수 있다(15). 기능적 $CD8^+$ T 세포의 출현은 바이러스 혈증의 제어와, 일부의 경우에는 적어도 혈청 트랜스아미나제의 상승과 속도론적으로 연관되며, 이는 급성 C형 간염 동안에 간의 손상이 면역 병리학적이라는 것을 제안한다. 혈액, 간 또는 이 둘 모두에서 검출 가능한 바이러스 특이적인 T 림프구 반응을 생성하지 못하는 개인은 지속적인 HCV 감염의 높은 위험에 놓여 있다. 가장 중요하게, 세포성 면역 반응의 생성은 감염이 영구적으로 제어될 것이라고 필수적으로 보장하지 못한다. 지속적인 감염의 재발과 확립을 예방하기 위하여 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 반응은 바이러스가 복제하는 명백한 제어 시점 이외에도 수 주 또는 수개월 동안 지속되어야 한다.

$CD4^+$ T 세포는 $CD8^+$ T 세포의 반응을 활성화하고 지속할 수 있는 도움을 제공함으로써 항-HCV 면역에서 필수적인 역할을 담당한다. 보호적 $CD4^+$ T 세포는 코어, NS3, NS4 및 NS5 단백질에 있는 에피토프를 우세하게 인지할 수 있으며, 기타 HCV 유전자 생산물에 대한 반응도 보고되어 있다(20-21). $CD4^+$ T 세포는 $CD8^+$ T 세포에 도움을 제공함에 더하여 감마 인터페론 및 T_H2 -유형과는 반대로 초기 염증성 T_H1 사이토카인을 생산하는데 중요한 것으로 밝혀졌다. 만성 감염의 제어를 위해 HCV 특이적 메모리 $CD4^+$ T 세포의 확립이 동등하게 중요하다(20 & 22).

$CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 반응이 자연히 호조되는(self-limited) HCV 감염에서 공통적이라는 발견은 그들이 바이러스 혈증을 제어하는데 공조한다는 것을 제안한다. 급성 C형 간염의 감염을 해결하는 동안 초회감작된 메모리 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포는 침팬지와 아마도 사람에게 바이러스의 지속성으로부터 장기간 보호를 제공한다. 침팬지 모델은 각 메모리 T 세포 아집합(subset)의 항체에 의해 매개된 고갈을 통하여 급성 C형 간염의 제어에서 $CD8^+$ T 세포의 중요성 및 $CD4^+$ T 세포 도움에 대한 의존성에 대한 직접적인 증거를 제시하고 있다(24). $CD4^+$ T 세포와 대조적으로 급성 및 메모리 $CD8^+$ T 세포는 모든 HCV 단백질을 동등하게 인식하고, $CD4^+$ T 세포와 같이 감마 인터페론을 포함한 초기염증 사이토카인을 생산할 수 있다는 것이 중요하다(15).

급성으로부터 만성으로 HCV 감염의 전이는 숙주의 생존 동안에 회복되지 않는 것으로 나타난 HCV 특이적 $CD4^+$ T 세포의 실질적인 손실과 연관된다. $CD8^+$ T 세포의 활성화도 또한 감염을 해결하는데 불충분할 정도로 손상된다.

면역치료법에 대한 다수의 실험 방식은 일반적으로 DNA, 재조합 바이러스 및 자가 수지상 세포계 백신 전략의 이용을 포함하여 연구되어 왔다. DNA 백신은 사람에서 면역 반응의 초회감작에 우수하지만, 부스팅(boosting)에 저조하다. 반대로 재조합 바이러스는 부스팅에 우수하지만, 벡터의 중화로 제한된다. 또한, 수지상 세포계 백신은 환자 특이적이고 노동 집약적이다. 따라서 당업계에서는 HCV에 대한 효과적인 면역치료 방식이 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

발명의 요약

본 발명의 한 양태는 (a) 효모 비히클; 및 (b) HCV 융합 단백질을 포함하되, 상기 효모 비히클은 융합 단백질을 재조합으로 발현하는 것을 특징으로 한 백신에 관한 것이다. HCV 융합 단백질은 후술되는 HCV 융합 단백질로부터 선택될 수 있으며, HCV 융합 단백질은 HCV 코어 서열의 적어도 일부와 연결된 HCV NS3 프로테아제의 적어도 일부를 포함하는 HCV 융합 단백질이 특히 바람직하다.

따라서, 한 측면에서 HCV 융합 단백질은 HCV 코어 서열의 적어도 일부와 연결된 HCV NS3 프로테아제의 적어도 일부를 포함한다. 상기 HCV NS3 프로테아제는 천연 HCV NS3 프로테아제의 촉매 도메인을 결핍하는 것이 바람직하다. 한 측면에서, HCV NS3 프로테아제는 전장 NS3 단백질의 개시 N-말단 88개의 아미노산에 후속된 HCV NS3의 262 아미노산(서열번호: 20의 1115 내지 1376 위치)으로 필수적으로 이루어진다. 한 측면에서, HCV 코어의 소수성 C-말단 서열은 절단된 것이다. 한 측면에서, HCV 코어 서열은 전장 HCV 코어 서열의 아미노산 위치 2 내지 140(서열번호: 20의 2 내지 140 위치)으로 필수적으로 이루어진다. 다른 측면에서, HCV 코어 서열은 두 개의 아미노산, 글루타메이트와 아스파테이트를 포함하도록 부가된다. 다른 측면에서, HCV 코어 서열은 아미노산 서열 G-G-G-H-H-H-H-H(서열번호: 10)를 포함하도록 부가된다. 한 측면에서, HCV NS3 프로테아제는 이의 N-말단에서 서열번호: 9에 나타난 아미노산 서열(MADEAP)과 연결된다. 또 다른 측면에서, 융합 단백질은 서열번호: 2로 필수적으로 이루어진다.

다른 측면에서, 융합 단백질은 전장의 불활성화된 HCV NS3 단백질을 포함한다. 한 측면에서, HCV NS3 단백질은 HCV 폴리단백질 서열, 즉 서열번호: 20의 1165번 잔기에서 돌연변이를 포함하며, 이는 상기 단백질의 단백질 분해 활성을 불활성화시킨다. 다른 측면에서, HCV NS3 프로테아제는 이의 N-말단에서 서열번호: 9에 나타난 아미노산 서열(MADEAP)과 연결된다. 또 다른 측면에서, 융합 단백질은 서열번호: 4로 필수적으로 이루어진다.

또 다른 측면에서, 융합 단백질은 절단된 HCV E2 단백질과 융합된 절단된 HCV E1 단백질을 포함한다. 한 측면에서, 절단된 HCV E1 단백질은 HCV E1의 1 내지 156 아미노산(서열번호: 20의 192 내지 347 위치)으로 필수적으로 이루어진다. 또 다른 측면에서, 절단된 HCV E2 단백질은 HCV E2 단백질의 1 내지 334의 아미노산(서열번호: 20의 384 내지 717 위치)으로 필수적으로 이루어진다. 또 다른 측면에서, 절단된 HCV E1 단백질은 이의 N-말단에서 서열번호: 9에 나타난 아미노산 서열(MADEAP)과 연결된다. 다른 측면에서, 융합 단백질은 서열번호: 6으로 필수적으로 이루어진다.

다른 측면에서, 융합 단백질은 트랜스멤브레인 도메인이 결실된 HCV NS4b 단백질을 포함한다. 한 측면에서, 트랜스멤브레인 도메인이 결실된 HCV NS4b 단백질은 HCV NS4b의 177 내지 261 아미노산(서열번호: 20의 1888 내지 1972 위치)과 연결된 HCV NS4b의 1 내지 69 아미노산(서열번호: 20의 1712 내지 1780 위치)으로 이루어진다. 또 다른 측면에서, 트랜스멤브레인 도메인이 결실된 HCV NS4b 단백질은 이의 N-말단에서 서열번호: 9에 나타난 아미노산 서열(MADEAP)과 연결된다. 또 다른 측면에서, 융합 단백질은 서열번호: 8로 필수적으로 이루어진다.

또 다른 측면에서, 융합 단백질은 전장의 HCV E2 단백질에 융합된 전장의 HCV E1 단백질에 융합된 전장의 HCV 코어 단백질을 포함한다. 한 측면에서, 전장의 HCV 코어 단백질은 이의 N-말단에서 서열번호: 9에 나타난 아미노산 서열(MADEAP)과 연결된다. 다른 측면에서, 융합 단백질은 서열번호: 12로 필수적으로 이루어진다.

다른 측면에서, 융합 단백질은 결실된 트랜스멤브레인 도메인을 갖는 HCV E1 단백질 및 결실된 트랜스멤브레인 도메인을 갖는 HCV E2 단백질에 융합된 절단된 HCV 코어 단백질을 포함한다. 한 측면에서, 절단된 HCV 코어 단백질은 HCV 코어 단백질의 2 내지 140 위치(서열번호: 20의 2 내지 140 위치)로 필수적으로 이루어진다. 다른 측면에서, 결실된 트랜스멤브레인 도메인을 갖는 HCV E1 단백질은 HCV E1 단백질의 1 내지 156 위치(서열번호: 20의 192 내지 347 위치)로 필수적으로 이루어진다. 또 다른 측면에서, 절단된 HCV E2 단백질은 HCV E2 단백질의 1 내지 334의 위치(서열번호: 20의 384 내지 717 위치)로 필수적으로 이루어진다. 또 다른 측면에서 절단된 HCV 코어 단백질은 이의 N-말단에서 서열번호: 9에 나타난 아미노산(MADEAP)과 연결된다. 다른 측면에서, 융합 단백질은 서열번호: 14로 필수적으로 이루어진다.

다른 측면에서, 융합 단백질은 HCV NS4b에 융합된 HCV NS4a에 융합된 HCV NS3을 포함하되, HCV NS3 프로테아제는 불활성화되고 HCV NS4b는 트랜스멤브레인이 결핍된 것을 특징으로 한다. 한 측면에서, HCV NS3 단백질은 HCV HS3의 1 내지 631 위치(서열번호: 20의 1027 내지 1657 위치)로 필수적으로 이루어지고, 프로테아제를 불활성화시키기 위하여 서열번호: 20의 1165 위치에 세린은 알라닌으로 치환된 것을 특징으로 한다. 한 측면에서, HCV NS4a 단백질은 HCV NS4a 단백질의 1 내지 54 위치(서열번호: 20의 635 내지 691 위치)로 필수적으로 이루어진다. 또 다른 측면에서, HCV NS4b 단백질은 HCV NS4b의 177 내지 261 위치(서열번호: 20의 1888 내지 1972)로 융합된 HCV NS4b의 1 내지 69 위치(서열번호: 20의 1712 내지 1780)로 필수적으로 이루어진다. 다른 측면에서, HCV NS3 단백질은 이의 N-말단에서 서열번호: 9에 나타난 아미노산 서열(MADEAP)과 연결된다. 또 다른 측면에서, 융합 단백질은 서열번호: 16으로 필수적으로 이루어진다.

또 다른 측면에서, 융합 단백질은 HCV NS5b 단백질에 융합된 HCV NS5a 단백질을 포함하되, NS5b 단백질은 NS5b C-말단의 불활성화 결실을 포함하는 것을 특징으로 한다. 한 측면에서, HCV NS5a 단백질은 HCV NS5a의 1 내지 448(서열번호: 20의 1973 내지 2420 위치)로 필수적으로 이루어진다. 한 측면에서, HCV NS5b 단백질은 HCV NS5b의 1 내지

539 위치 (서열번호: 20의 2421 내지 2959 위치)로 필수적으로 이루어진다. 또 다른 측면에서, HCV NS5a 단백질은 이의 N-말단에서 서열번호: 9에 나타난 아미노산 서열(MADEAP)과 연결된다. 다른 측면에서, 융합 단백질은 서열번호: 18로 필수적으로 이루어진다.

한 양태에서, 융합 단백질의 발현은 *CUP1*와 같은 유도성 프로모터의 제어 하에 있다.

본 발명의 다른 양태는 분리된 HCV 융합 단백질에 관한 것으로서, HCV 단백질은 전술된 단백질 중 어느 하나이며, 특히 서열번호: 2, 서열번호: 4, 서열번호: 6, 서열번호: 8, 서열번호: 12, 서열번호: 14, 서열번호: 16 및 서열번호: 18로부터 선택된다.

본 발명의 다른 양태는 전술된 융합 단백질 중 어느 하나를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자이다. 한 양태에서, 융합 단백질의 발현은 *CUP1*와 같은 유도성 프로모터의 제어하에 있다.

본 발명의 다른 양태는 상기 분리된 핵산 분자 중 어느 하나를 포함하는 재조합 핵산 분자에 관한 것이다. 한 양태에서, 재조합 핵산 분자는 바이러스 벡터이다.

본 발명의 또 다른 양태는 본 발명에 따른 재조합 핵산 분자 중 어느 하나로 형질감염된 재조합 세포에 관한 것이다. 그러한 세포는 이에 제한되는 것은 아니지만, 종양 세포 또는 효모 세포이다.

본 발명의 다른 양태는 (a) 전술된 HCV 융합 단백질; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한 백신에 관한 것이다.

본 발명의 또 다른 양태는 (a) 수지상 세포; 및 (b) 전술된 HCV 융합 단백질을 포함한 백신에 관한 것이다. 상기 백신은 효모 비히클을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 수지상 세포가 또한 효모 비히클을 포함하는 것을 특징으로 한다.

본 발명의 또 다른 양태는 전술된 HCV 융합 단백질을 코딩하는 분리된 핵산 분자를 포함하는 백신에 관한 것이다.

본 발명의 분리된 HCV 융합 단백질을 포함하는 전술된 본 발명의 백신은 적어도 하나의 생물학적 반응 조절제를 또한 포함할 수 있다. 그러한 생물학적 반응 조절제는 이에 제한되는 것은 아니지만, 사이토카인, 호르몬, 지질 유도체 및 작은 분자 약물을 포함할 수 있다. 그러한 생물학적 반응 조절제는 이에 제한되는 것은 아니지만, 항-CTLA-4, 항-CD137, 항-CD28, 항-CD40, 알렘투주맵(alemtuzumab), 데니루킨 디프티톡스(denileukin diftitox), 항-CD4, 항-CD25, 항-PD1, 항-PD-L1, 항-PD-L2, FOXP3-차단제, Flt-3 리간드, 이미퀴모드(imiquimod), 과립구-대식구 콜로니 자극 인자(GM-CSF), 사르그라마스틴(sargramostim), Toll 유사 수용체(TLR)-7 작용제 및 TLR-9 작용제를 포함할 수 있다.

본 발명의 다른 양태는 HCV에 의해 감염 또는 HCV에 의해 감염될 위험에 있는 동물에게 본 발명의 백신 중 어느 하나를 투여하고, 동물에게 백신의 투여는 HCV 감염 또는 동물에서 HCV 감염으로부터 야기되는 적어도 하나의 증상을 감소 또는 예방하는 단계를 포함한 C형 간염 바이러스 감염에 대하여 동물을 보호하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 백신을 동물에게 투여하는 단계를 포함한 HCV 항원에 대하여 항원 특이적이고, 세포 매개적인 면역 반응을 유발하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 다른 양태는 HCV로 감염된 개인의 모집단(population)에게 본 발명에 따른 백신 중 어느 하나를 투여하는 단계를 포함한 상기 개인의 모집단에서 HCV 항원에 대하여 항원 특이적이고, 세포 매개적인 면역 반응을 유발하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 또 다른 양태는 HCV로 감염될 위험에 있는 개인의 모집단에게 본 발명에 따른 백신 중 어느 하나를 투여하는 단계를 포함한 상기 개인의 모집단을 HCV에 대하여 면역화시키는 방법에 관한 것이다.

상기 방법에서 백신은 HCV 항원을 코딩하는 바이러스 백신을 포함하는 백신에 부스터로서 투여될 수 있다. 전술된 방법과 달리 상기 백신은 다른 HCV 백신으로 부스팅하기 이전에 면역 시스템을 초회감작하기 위하여 투여될 수 있다.

본 발명의 다른 양태는 HCV 감염에 대하여 동물을 보호하기 위한 제형에서 전술된 백신 중 어느 하나의 이용에 관한 것이다.

본 발명의 또 다른 양태는 HCV 항원에 대하여 항원 특이적이고, 세포 매개적인 면역 반응을 유발하기 위한 제형에서 전술된 백신 중 어느 하나의 이용에 관한 것이다.

본 발명의 다른 양태는 질병 또는 용태를 치료하거나 예방하기 위한 제형에서 전술된 백신 중 어느 하나의 이용에 관한 것이다.

본 발명의 또 다른 양태는 HCV로 감염될 위험에 있는 개인의 모집단을 면역화시키기 위한 제형에서 전술된 백신 중 어느 하나의 이용에 관한 것이다.

본 발명의 다른 양태는 HCV로 감염된 개인의 모집단을 치료하기 위한 제형에서 전술된 백신 중 어느 하나의 이용에 관한 것이다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 일반적으로 C형 간염 바이러스(HCV)에 대하여 동물을 면역화시키고 동물에서 C형 간염 바이러스의 감염을 치료 또는 예방하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 효모 비히클 및 동물에서 HCV 감염에 대하여 면역 반응을 유발하기 위하여 선택된 HCV 항원 융합 단백질을 포함한 특히 효모계 백신의 이용을 포함한다. 또한 본 발명은 본 발명에 따른 HCV 융합 유전자 및 단백질의 백신에서의 이용 및 HCV에 대한 백신 프로토콜을 포함한다.

임상적 증거들은 C형 간염 바이러스(HCV) 감염의 제거 및 제어는 세포에 의해 매개되는 면역에 의해 용이하고 만성 감염 개인에게서 면역의 증진은 치료 이점을 가질 수 있다는 것을 제안하고 있다. 본 발명자들 및 다른 이들에 의해 보고된 이전의 연구는 백신 및 면역치료 벡터로서 전체, 재조합 S. 세레비시아 효모의 사용에 대한 잠재력을 보여주고 있다(1998년 11월 3일에 등록된 미국특허 5,830,463, 2001년 11월 15일에 출원된 미국특허출원 09/991,363, 이들의 전문은 본 발명에서 참조로 인용된다). 본 발명자들의 효모계 면역치료 생산물은 다양한 동물 종의 생체 내에서 다양한 바이러스 및 암 항원을 발현하는 표적 세포를 살상할 수 있는 면역 반응을 유발하고 이를 CD8⁺ CTL-매개 방식으로 수행한다는 것을 보여주었다(16-17).

본 발명은 1998년 11월 3일에 등록된 미국특허 5,830,463; 2001년 11월 15일에 출원된 미국특허출원 09/991,363에 개시된 효모계 면역치료 생산물에 관한 기반 기술(platform technology)에서의 진보에 관한 것이다. 본 발명자들은 S. 세레비시아가 수지상 세포에 의해 식균되고, 수지상 세포를 직접 활성화하며, 이어서 상기 수지상 세포는 매우 효율적인 방식으로 CD4 및 CD8 T 세포에 효모 연관 단백질을 제시한다는 것을 보여주었다 (Stubbs et al. *Nature Med.* 5:625-629, 2001; 상기된 미국특허출원 09/991,363). 돌연변이된 Ras 종양단백질을 발현하는 S. 세레비시아가 자발성 폐암을 가진 마우스 모델내에서 동종의 돌연변이를 보유한 확립된 종양을 특이적으로 제거한다는 것을 보여주었고 (Lu et al., *Cancer Research* 64:5084-5088, 2004) 이러한 방식은 현재 췌장암, 폐암 및 직장결장암을 가진 환자에서 사람 임상 시험의 1 단계에서 검사되고 있다. 이러한 기반 기술을 기반으로 한 면역치료 생산물은 생산하기 간단하고, 숙주 면역 반응에 의해 증화되지 않고 항원 특이적인 면역 반응을 부스트하기 하기 위하여 반복적으로 투여될 수 있고 제조함에 있어 환자 특이적인 방식이 요구되지 않는다.

보다 특정되게 그리고 예시로서 본 발명자들은 신규한 HCV 융합 단백질을 발현하고 열에 의해 불활성화된 재조합 S. 세레비시아 효모를 포함하는 효모계 백신을 개발하였고, 한 양태에서 NS3 및 코어 단백질 서열 모두의 적어도 일부를 포함한다. 다른 양태는 신규한 전장의 불활성화된 NS3 HCV 단백질, 신규한 절단된 E1-E2 융합 단백질 및 신규한 TM 도메인이 결실된 HCV NS4 융합 단백질을 포함한다. 본 발명의 다른 양태는 여기서 공개된 측면에서 명백할 것이다.

HCV 코어 단백질 및 NS3 프로테아제는 HCV로 감염된 세포에서 풍부하게 발현되고 바이러스 복제에 필수적이다; 이러한 특성은 높은 정도의 서열 보존성과 조합되어 그들을 면역치료에 탁월한 표적으로 만들고 있다. 본 발명의 백신은 동물에서 NS3 및 코어 항원을 발현하는 바이러스로 감염된 세포에 대하여 세포독성 T 세포 (CTL) 반응 뿐만 아니라 항원 특이적인 증폭적 T 세포 반응을 생성하고 HCV 항원을 발현하는 종양에 대하여 동물을 보호한다는 것을 보여주었다(실시예 및 18 참조). 백신의 투여는 HCV NS3 및 코어 단백질을 표적으로 하는 HCV 특이적인 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 반응을 증대시켜 바이러스의 양을 감소시키고 결국 HCV로 감염된 개인에서 바이러스를 제거할 것으로 예상된다.

본 발명의 효모계 백신의 구성성분으로서 이용되는 신규한 HCV 융합 단백질은 효모에서 이중성 항원의 발현을 위한 신규한 작제물을 사용하여 제조하는데, 여기서 바람직한 항원 단백질 또는 펩타이드는 그들의 아미노 말단에서 (a) 여기서 설

명된 특정한 합성 펩타이드; 또는 (b) 내인성 효모 단백질의 적어도 일부와 융합되는 것으로, 상기 융합 파트너는 효모에서 단백질의 발현에 상당히 증진된 안정성을 제공하고/거나 효모 세포에 의한 단백질의 번역후 수식을 방지한다. 또한, 융합 펩타이드는 항체와 같은 선별 인자에 의해 인지될 수 있도록 설계될 수 있는 에피토프를 제공하고, 작제물내 백신화 항원에 대한 면역 반응에 부정적으로 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그러한 인자는 본 발명에서 유용한 단백질의 동정, 선별 및 정제에 유용하다.

또한, 본 발명은 특히, 단백질의 선별 및 동정에서 이용하기 위하여 항원 작제물의 C-말단에 융합되는 펩타이드의 이용을 고려할 수 있다. 그러한 펩타이드는 이에 제한되는 것은 아니지만, 펩타이드 태그(예, 6X His) 또는 기타 다른 짧은 에피토프 태그와 같은 합성 또는 천연의 펩타이드를 포함한다. 본 발명에 따른 항원의 C-말단에 부착되는 펩타이드는 앞서 설명된 N-말단 펩타이드의 부가 또는 부가 없이 이용될 수 있다.

아울러, 본 발명자들은 효모계 백신에 이용하기 위하여 동일한 작제물 내에 하나 이상의 항원으로부터 유래된 다수의 (둘 이상의) 면역원성 도메인을 제공하는 여러 서로 다른 신규한 융합 단백질 HCV 항원을 개시한다. 다수의 면역원성 도메인을 포함한 예시적인 융합 단백질은 여기서 설명되는 HCV NS3 및 코어 단백질 또는 이들의 면역원성 일부를 포함하는 융합 단백질이다. 그 외 융합 단백질이 또한 아래에서 설명된다.

전술된 바와 같이 NS3 및 코어는 급성 및 만성 감염에서 감염된 세포에서 풍부하게 발현되고 바이러스 복제에 필수적이며 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 모두에 의해 인식되는 에피토프를 포함하고 있다. 상기 단백질, 특히 단일 백신으로 두 단백질을 표적화하는 것의 부가적인 장점은 아미노산 수준에서 상당한 정도의 보존성이다. 코어 및 NS3 단백질은 미국에서 가장 우수한 HCV 균주인 HCV 유전형 1a 및 1b 간에서 가장 보존적이다(표 1). 코어 단백질은 균주 1a 및 1b 간에 98%의 아미노산 동일성을 보이며, 다른 5개의 HCV 유전형의 경우에는 상기 HCV 1a 단백질 서열과 비교하였을 때 86-95%에 이르는 동일성이 확인되었다. NS3 단백질 또한 상이한 HCV 균주 간에 상당히 보존적이다 - 균주 1a 및 1b 간에는 92%의 아미노산 동일성이, 다른 HCV 유전형의 경우에도 상기 HCV 1a 단백질 서열과 비교하였을 때 81-86%에 이르는 동일성이 존재한다. 다양한 HCV 유전형 간에 높은 정도의 코어 및 NS3 단백질의 보존성은 바이러스 기능을 위한 특정된 전체 단백질 도메인의 필수적인 특징을 신호한다. 본 발명의 백신은 단일 생산물임에도 불구하고 두 개의 바이러스 항원, NS3 프로테아제 및 코어 단백질을 표적화하도록 설계되었다. 상기 방식은 더욱 광범위한 면역반응을 발생시키기 위하여 기타 필수적이고 보존적인 HCV 바이러스 단백질의 단백질 서열을 통합하도록 용이하게 확장될 수 있다. 이러한 부가적인 융합 단백질 및 백신이 여기서 예시된다.

HCV 폴리단백질 유전자 및 이에 의해 코딩된 폴리 단백질에 대한 핵산 및 아미노산 서열이 당업계에 알려져 있다. 예를 들어 C형 간염 바이러스 균주 H77에 대한 폴리단백질 유전자의 핵산 서열이 Database Accession No. AF01153 (gi:2327074)에 개시되어 있으며, 여기서 서열번호: 19에 나타내었다. 서열번호: 19는 HCV 균주 H77 폴리단백질을 코딩하며, 이는 여기서 서열번호: 20에 나타난 아미노산 서열을 갖는다. 서열번호: 20 내에서 HCV 단백질은 다음 위치를 포함한다; HCV 코어 (서열번호: 20의 1 내지 191 위치); HCV E1 엔벨로프 글리코단백질 (서열번호: 20의 192 내지 383); HCV E2 엔벨로프 글리코단백질 (서열번호: 20의 384 내지 746); HCV P7 이온 채널 (서열번호: 20의 747 내지 809); HCV NS2 메탈로프로테아제 (서열번호: 20의 810 내지 1026); HCV NS3 프로테아제/헬리카제 (서열번호: 20의 1027 내지 1657); HCV NS4a NS3 프로테아제 보조인자(서열번호: 20의 1658 내지 1711); HCV NS4b (서열번호: 20의 1712 내지 1972); HCV NS5a (서열번호: 20의 1973 내지 2420); 및 HCV NS5b RNA 의존성 RNA 폴리머라제 (서열번호: 20의 2421 내지 3011). 전술된 바와 같이 HCV 균주는 높은 아미노산 동일성을 보인다(표 1 참조). 따라서, 여기서 제공된 지침과 예시적인 HCV 균주에 대한 참조를 이용한다면 당업자가 본 발명의 조성물 및 백신에 이용될 HCV 균주 유래의 다양한 HCV계 융합 단백질을 용이하게 제조할 수 있다.

HCV의 제어 및 제거는 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 모두를 필요로 하고 충분한 세포성 면역의 결핍이 만성적 감염의 발달과 연관이 있다는 것은 자명하다. 따라서, 만성 HCV 감염 개인에게서 존재하지만 불충분한 HCV 특이적 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 자극이 치료 이점을 가질 것이라고 제안하는 것은 설득력이 있다. 가설에 의해 구속하지 않아도 본 발명자들은 이 상적인 HCV 면역치료는 강력한 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 반응을 자극하기 위하여 항원을 MHC class I 및 class II 항원 제시 경로로 항원을 전달할 수 있는 비병원성 벡터로 이루어진다는 것을 확신한다. 이러한 벡터는 다른 치료 생산물과 유사하게 반복적으로 투여될 수 있어야 한다. 본 발명의 백신 및 조성물을 이러한 목표에 이상적으로 적합하다.

본 발명 이전에 공지된 일부 면역치료 백신 조제품은 (일반적으로 항원제시세포 또는 APC로 언급되는) 수지상 세포 및 대식세포에 의해 세포이입(endocytosis)되는 정제된 바이러스 단백질로 이루어진다. 상기 삼켜진 물질내 단백질은 폴리펩

타이드 (10-20 아미노산)으로 소화되고 APC 내 특정 엔도솜(endosome)에서 class II MHC 분자에 결합된다. 그 다음 상기 펩타이드 + class II MHC 분자 복합체는 APC의 표면에 발현된다. 항원 특이적 $CD4^+$ 헬퍼 T 세포(T_H)는 class II MHC + 펩타이드의 조합과 결합하여 활성화되어 림포카인을 생산한다.

애주번트 없이 세포외로 투여된 가용성 항원은 유형 2 헬퍼 T 세포 (T_H2)를 자극하는 경향이 있으며, 이는 체액성 면역 반응으로 이어지는 B 세포에 작용하는 림포카인을 생산한다. T_H2 반응은 세포 매개 면역의 유도에 중요한 유형 1 헬퍼 T 세포 (T_H1)를 억제하는 경향이 있다. 표적화된 바이러스 항원이 감염된 세포의 표면에 있다면, 항체를 생성하는 방식이 치료 효과를 가질 수 있다. 그러나, 표적화된 바이러스 항원이 감염된 세포 내부에서 발견된다면, 항체는 거의 효과를 발휘하지 못한다. 또한, T_H2 반응으로 향하는 성향 때문에 $CD8^+$ CTL은 외인적으로 유도된 단백질 항원에 반응하여 보통 활성화되지 않는다. $CD8^+$ CTL이 만성적 바이러스 감염에 대한 보호를 위해 요구된다면 재조합 단백질을 도입하는 방식은 성공적이지 않을 것이라고 주장하는 것이 타당하다.

세포의 항원과 대조적으로 $CD8^+$ CTL은 표적될 세포에 의해 합성된 항원에 반응하여 유도된다. 이러한 항원은 내인성 항원으로 정의된다. 감염된 세포에 의해 합성된 바이러스 단백질은 소포체로의 펩타이드 전달과 커플링된 사이토솔(cytosol)의 프로테아좀에 의해 펩타이드(8-10 아미노산)로 소화된다. 소포체에서 class I MHC 분자의 적합한 접합은 감염 세포 또는 종양 세포의 표면으로 이동되기 전에 프로테아좀에서 생성된 펩타이드의 결합에 의존한다. $CD8^+$ T 세포는 MHC I 수용체-펩타이드 복합체의 조합에 반응하여 일반적으로 감염 세포의 살상을 포함한 세포 매개 면역 반응으로 이어지는 $INF-\gamma$ 를 포함한 림포카인을 생산한다.

CTL은 효과적으로 활성화되기 위하여 IL-2 및 IL-12를 요구하는 것으로 나타났다. $CD8^+$ CTL은 약간의 IL-2를 생산하는 반면에 $CD4^+$ T_H1 세포가 CTL-매개 반응을 위한 IL-2의 주요 근원이라고 일반적으로 수용되고 있다. IL-12는 수지상 세포 및 대식세포에 의해 생산된다. 또한, 최대의 CTL 활성을 달성하기 위하여 수지상 세포에 의한 항원의 제시가 요구된다는 것이 명백하다. 따라서, $CD4^+$ T_H1 세포와 같이 CTL은 최대로 활성화되어 바이러스 감염된 세포에 반응하기 위해서는 항원 제시 세포(APC)와의 상호작용을 요구한다.

수지상 세포 그 자체가 감염되지 않았다면, 바이러스 감염된 세포에 의해 합성된 항원이 어떻게 수지상 세포내에서 class I MHC 경로로의 길을 발견할 수 있는지 불명료하였다. 그러나 최근 데이터는 수지상 세포가 감염 세포를 인식할 수 있고 감염 세포는 감염의 결과로 아포토시스되고 "교차-초화감작(외인성 항원의 내인성 항원 제시 경로로의 전달)"이 일어나 수지상 세포 및 대식세포에 의해 삼켜진 세포/입자와 연관된 단백질의 일부는 class I MHC 경로로의 길을 발견할 수 있다는 것을 암시하고 있다(23). 또한, (후술되는) 특정 "위험" 신호가 이러한 과정을 증진시킬 수 있다(25).

면역 반응은 세포외 플루이드로부터 외래 물질을 섭취한 수지상 세포 및 대식세포에 의해 일차적으로 개시된다. 충분하게 항원을 제시하는 상기 세포의 능력을 증가시키기 위한 방법은 증진된 T 세포 매개 세포 면역 반응으로 이어져야 한다. 이러한 측면에서, 재조합 S. 세레비시에 효모는 풍부하게 당화된 효모가 천연적으로 애주번트와 유사한 성질을 보유하고 다수의 항원을 발현하도록 용이하게 조작될 수 있다는 부가적 장점(16, 27-29)을 가진 면역자극 복합체(ISCOM)의 미립자 특징을 보인다(26). S. 세레비시에 효모 세포는 대식세포 및 수지상세포를 포함한 전문적인 항원 제시 세포에 의해 섭취된다. 효모 연관 단백질은 class I 및 class II MHC 모두를 통하여 효율적으로 제시되어 종양 세포에 보호적인 항원 특이적 CTL-매개 면역으로 이어진다(16-17).

수지상세포 및 대식세포는 이의 표면에 미생물 패턴 인식 분자로서 작용하는 다양한 수용체를 가지고 있다; 즉 그들은 당화 패턴, 지질단백질 및 핵산 조성에서의 차이를 기반으로 하여 병원체를 인식한다. 그리하여 상기 항원 제시 세포(APC)는 미생물의 만노단백질, 펩티도글리칸, 글루칸, 지질단백질, 이중 가닥 RNA 및 CpG 아일랜드 함유 DNA를 위한 수용체를 가지고 있다(30-32). 이러한 수용체의 채용은 수지상세포의 성숙, 활성화, 증진된 식균작용, 채용한 물질과 연관된 항원의 효율적인 제시로 이어지는 "위험" 신호라고 명명된 결과로 이어진다(33).

실제로, 수지상세포와 대식세포는 다른 미생물 보다 효모를 인식하는 수용체를 더 많이 가지고 있다. 이러한 수용체는 TLR-2, TLR-4, TLR-6, CD14, Dectin-1, Dectin-2, DEC-205 및 만노스 수용체 군(family)을 포함한다(30, 34). 조잡한 사카로미세스 세레비시에 효모 세포 벽의 조제품인 지모산(zymosan)의 섭취는 다수의 초기염증성 유전자의 상향 조절로 이어진다(35). 본 발명자의 데이터는 마우스 및 사람 수지상세포와 대식세포에 의한 전체 효모의 섭취가 $TNF-\alpha$,

GM-CSF, 인터페론- γ , IL-2 및 IL-12와 같은 초기염증성 T_H1 -유형 사이토카인의 분비를 촉진할 뿐만 아니라 접촉 분자(ICAM-1, CD54), 공조자극 분자(B7-1, B7-2, CD80, CD86), class I 및 class II MHC 분자를 포함한 다양한 세포 표면 분자의 상향 조정으로 이어진다는 것을 암시하고 있다.

효모는 수지상세포와 직접 상호작용하는 것에 더하여 그들을 면역치료를 위한 이상적인 기반으로 만드는 다양한 다른 특성을 가지고 있다. 첫째, 다양한 항원이 단일 효모 균주 내에서 발현되도록 조작될 수 있고(29), 이러한 제형은 DNA 백신과 작제의 용이함 및 다양한 항원을 표적할 수 있는 능력을 포함한 많은 장점을 공유한다. DNA 백신과 달리 효모계 면역치료 제형은 잠재적으로 독성인 오염물질을 제거하기 위한 광범위한 정제를 요구하지 않는다. 아래에서 더욱 구체적으로 설명될 것이나, 재조합 효모에서 발현되는 이중성 단백질은 시험관내 및 생체내에서 강력한 $CD8^+$ CTL-매개 면역 반응을 위한 항원으로서 작용한다(16-17). 동물 검사에서 효모 제형은 치료 뿐만 아니라 예방적 치료로서 종양 성장으로부터 면역화된 동물을 보호하고 치료하는데 성공적이었다(16-17). 이러한 결과는 본 발명의 백신이 HCV 면역치료로서 광범위한 면역 반응을 유발하는데 효과적일 수 있다는 것을 제안한다.

본 발명에서 본 발명자들은 HCV NS3-코어 융합 단백질을 유도성 프로모터의 제어 하에서 발현하고, 또한 GI-5005로 정의된 신규한 재조합 효모 면역치료를 생성하였다. NS3 또는 코어 특이적 항체를 이용한 GI-5005 세포 용해질의 면역블롯 분석은 47kD 단백질을 개시하고 있다. GI-5005 효모는 천만 세포당 $5\mu g$ 이상의 HCV 융합 단백질을 생산한다. C57BL/6 및 BALB/c 마우스에서 GI-5005 효모의 주입은 림프구 증폭, 세포독성 및 사이토카인 방출 분석법에 의해 보여지는 바와 같이 강력한 NS3 및 코어 항원 특이적 헬퍼 및 세포독성 T 세포 면역 반응의 유도로 이어진다. GI-5000 시리즈 효모로 백신화된 마우스는 HCV-항원을 발현하는 동계 종양 세포의 시험감염으로부터 보호되었다. 치료의 대리 모델에서의 결과 뿐만 아니라 면역원성 및 종양 보호 결과가 또한 여기서 제시된다. 아울러, 만성 HCV 감염 환자에서 단계 1 시험이 기술될 것이다.

본 발명의 백신과 조성물

본 발명의 한 양태는 HCV 감염 또는 그로부터 야기되는 질병에 대한 보호 또는 HCV 감염으로부터 야기되는 적어도 하나의 증상을 완화하기 위한 방법에 이용될 수 있는 조성물(백신)에 관한 것이다. 조성물 또는 백신. 백신은 (a) 효모 비히클 및 (b) 상기 효모 비히클에 의해 발현되는 이중성 융합 단백질을 포함한다. 전술된 바와 같이 본 발명은 본 발명의 백신에 항원으로 이용되기 위한 여러 증진된 HCV 융합 단백질을 포함하고, 그러한 백신은 효모 비히클을 포함할 수 있지만, (후술되는) 효모 비히클을 포함하지 않는 다른 백신도 본 발명에 의해 포함될 수 있다. 특히, 본 발명은 효모 비히클에서 이중성 단백질의 발현을 안정화시키고, 발현된 이중성 단백질의 해독후 수정을 방지하고/거나 여기서 설명되는 효모 비히클의 부재에서도 (즉, 통상적이거나 다른 비 효모계 백신 조성물에서도) 항원을 백신화하는데 이용될 수 있는 새로운 융합 단백질 작제물을 제공한다. 일부 양태에서 신규한 융합 단백질은 단일 백신에 있는 다수의 선별된 항원을 이용함으로써 광범위한 세포성 면역 반응을 제공한다. 본 발명의 한 양태는 하나 이상의 상기 융합 단백질이 효모 비히클에 로딩되거나 전술된 효모 비히클과 복합되거나 혼합되어 본 발명이 백신을 형성하는 것이지만, 효모 비히클과의 접합으로 상기 융합 단백질은 가장 일반적으로 효모 비히클 (예, 온전한 효모 또는 효모 스페로플라스트에 의해, 선택적으로 효모 사이토플라스트, 효모 고스트 또는 효모 맴브레인 추출물 또는 이의 분획물에 대하여 추가로 진행될 수 있다)에 의해 재조합 단백질로서 발현된다.

본 발명에서 유용한 융합 작제물은 (a) (여기서 설명된 바와 같이 다양한 융합 단백질과 다수의 항원 작제물 뿐만 아니라 전장 항원의 면역원성 도메인 및 에피토프를 포함한) 적어도 하나의 HCV 항원; 및 (b) 합성 펩타이드를 포함하는 융합 단백질이다.

한 양태에서, 합성 펩타이드가 HCV 항원의 N-말단에 연결되는데, 상기 펩타이드는 HCV 항원에 이중성인 적어도 두 개의 아미노산 잔기로 이루어지며, 상기 펩타이드는 효모 비히클에서 융합 단백질의 발현을 안정화시키고 발현된 융합 단백질의 번역후 수정을 방지한다. 합성 펩타이드 및 항원의 N-말단 일부는 함께 다음과 같은 조건을 갖는 융합 단백질을 형성한다: (1) 융합 단백질의 1번 위치에 있는 아미노산 잔기는 메티오닌이다 (즉, 합성 펩타이드의 첫 번째 아미노산은 메티오닌이다); (2) 융합 단백질의 2번 위치에 있는 아미노산 잔기는 글리신 또는 프롤린이 아니다 (즉, 합성 펩타이드의 두 번째 아미노산은 글리신 또는 프롤린이 아니다); (3) 융합 단백질의 2-6번 위치에 있는 아미노산 잔기 중 어떤 것도 메티오닌이 아니다 (즉, 합성 펩타이드가 6개의 아미노산 보다 짧은 경우에는 단백질의 2-6 위치에 있는 아미노산은 합성 펩타이드 또는 단백질의 일부분이라는 여부와 관계없이 메티오닌을 포함하지 않는다); 및 (4) 융합 단백질의 2-6 위치에 있는 아미노산 잔기 중 어떤 것도 리신 또는 아르기닌이 아니다 (즉, 합성 펩타이드가 5개의 아미노산 보다 짧은 경우에는 단백질의 2-

6 위치에 있는 아미노산은 합성 펩타이드 또는 단백질의 일부분이라는 여부와 관계없이 리신 또는 아르기닌을 포함하지 않는다). 합성 펩타이드는 단지 2개의 아미노산으로 짧을 수 있지만, 바람직하게는 (3개, 4개, 5개 아미노산을 포함한) 적어도 2-6개의 아미노산이며, 전체적으로 6개의 아미노산 보다 길어 약 200개의 아미노산까지 길어질 수 있다.

한 양태에서, 펩타이드는 $M-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6$ 의 아미노산 서열을 포함하되, M은 메티오닌이고; X_2 는 글리신, 프롤린, 리신 또는 아르기닌을 제외한 임의의 아미노산이며; X_3 은 메티오닌, 리신 또는 아르기닌을 제외한 임의의 아미노산이고; X_4 는 메티오닌, 리신 또는 아르기닌을 제외한 임의의 아미노산이며; X_5 는 메티오닌, 리신 또는 아르기닌을 제외한 임의의 아미노산이고, X_6 은 메티오닌, 리신 또는 아르기닌을 제외한 임의의 아미노산이다. 한 양태에서 X_6 잔기는 프롤린이다. 효모 세포에서 HCV 항원의 발현 안정성을 증진시키고/거나 효모에서 단백질의 번역후 수정을 방지하는 예시적인 합성 서열은 서열 M-A-D-E-A-P (서열번호: 9)를 포함한다. 발현 생산물의 증진된 안정성에 추가하여 본 발명자들은 상기 융합 파트너는 작제물내 백신화 항원에 대한 면역 반응에 부정적인 영향을 미치지 않을 것이라고 확신한다. 또한, 합성 융합 펩타이드는 항체와 같은 선별 인자에 의해 인식될 수 있는 에피토프를 구비하도록 설계될 수 있다.

본 발명의 다른 양태에서, 본 발명에서 이용되는 합성 펩타이드의 해독 개시 부위를 코딩하는 핵산은 코자크(Kozak) 해독 서열 규칙에 따라 A-C-C-A-T-G-G (서열번호: 21)이다. 상기 서열의 ATG는 초기 해독 개시 부위이고, M-A-D-E-A-P (서열번호: 9)의 메티오닌을 코딩한다.

본 발명에 개시된 다양한 양태가 조합될 수 있다는 것으로 해석되어야 한다. 예를 들어, 본 발명의 한 관점에서 합성 펩타이드가 M-A-D-E-A-P (서열번호: 9)일 경우에, 상기 펩타이드의 개시 부위를 코딩하는 핵산 서열은 전술된 바와 같이 A-C-C-A-T-G-G (서열번호: 10)이다. 본 발명에 따른 양태의 다양한 다른 조합이 당업자에게 명료할 것이다.

상기 양태와 유사하고 (필수적이지 않지만) 상기 양태의 제한을 포함할 수 있는 본 발명의 다른 특정 양태는 (iii) HCV 항원의 C- 말단과 연결된 펩타이드를 포함하는 백신을 포함하는 것이다. 상기 펩타이드는 HCV 항원에 이중성인 적어도 두 개의 아미노산 잔기로 이루어지고, 상기 펩타이드는 효모 비히클에서 융합 단백질을 안정화시키거나 발현된 융합 단백질의 번역후 수정을 방지한다. 본 발명의 한 예시적인 측면에서 상기 펩타이드는 아미노산 서열 E-D (Glu-Asp)를 포함한다. 상기 서열은 소수성을 저해하도록 작용한다.

본 발명에서 "이중성 아미노산"은 특정한 아미노산 서열의 측면에 천연적으로 위치하지 않거나 (즉, 생체 내에서 천연적으로 존재하지 않는), 특정한 아미노산 서열의 기능과 관련이 없거나, 천연적으로 발생하는 서열의 뉴클레오타이드가 주어진 아미노산 서열이 유래되는 유기체의 표준 코돈 이용(usage)을 사용하여 해독되었다면 유전자에서 발생함에 따라 특정한 아미노산 서열을 코딩하는 천연적으로 발생하는 핵산 서열 측면에 위치하는 뉴클레오타이드에 의해 코딩되지 않는 아미노산 서열이다. 따라서, HCV 항원에 이중성인 적어도 두 개의 아미노산 잔기는 HCV 항원의 측면에서 천연적으로 발견되지 않는 두 개의 아미노산 잔기이다.

본 발명의 다른 양태는 HCV 감염 또는 그로부터 야기된 증상으로부터 동물을 보호하기 위하여 이용될 수 있는 조성물 (백신)에 관한 것으로, (a) 효모 비히클 및 (b) 상기 효모 비히클에 의해 발현되는 이중성 융합 단백질을 포함한다. 한 양태에서, 상기 융합 단백질은 (i) (여기서 설명된 다양한 융합 단백질 및 다수의 항원 작제물 뿐만 아니라 전장 항원의 면역원성 도메인 및 에피토프를 포함한) 적어도 하나의 HCV 항원과 융합된 (ii) HCV 항원의 N-말단에 연결된 효모 단백질을 포함하는 것으로, 상기 효모 단백질은 내인성 효모 단백질의 약 2개 내지 약 200개의 아미노산으로 이루어지며, 상기 효모 단백질은 효모 비히클에서 융합 단백질의 발현에 상당히 증진된 안정성을 제공하거나 효모 세포에 의해 발현된 융합 단백질의 번역후 수정을 방지한다. 또한, 합성 펩타이드와 같이 내인성 효모 항원, 융합 파트너는 작제물의 백신화 항원에 대한 면역 반응에 부정적인 영향을 미치지 않는다. 본 발명의 이러한 측면은 전술된 발명의 다른 양태와 연관지어 이용될 수 있다.

내인성 효모 단백질은 내인성 효모 단백질의 약 2개 내지 약 200개 (또는 최대 22kDa)의 아미노산으로 이루어지며, 상기 효모 단백질은 효모 비히클에서 융합 단백질의 발현을 안정화시키고 발현된 융합 단백질의 번역후 수정을 방지한다. 적합한 내인성 효모 단백질이 이러한 양태에서 이용될 수 있고, 특히 바람직한 단백질은 이에 제한되는 것은 아니지만, SUC2 (효모 인버타제; 동일한 프로모터로부터 단백질을 사이토졸에서 발현하고 이를 분비 경로로 지시할 수 있어 우수한 후보자이지만, 배지의 탄소원에 의존한다): 알파 인자 신호 리더 서열; SEC7; CPY; 포스포엔올피루베이트 카르복시키나제 PCK1, 포스포글리세로키나제 PGK 및 글루코오스 존재시 억제할 수 있는 발현 및 사이토졸의 위치결정(localization)을 위한 트리오스 포스페이트 이소머라제 TPI 유전자 생산물; 세포벽에서의 위치 결정 및 체류를 위한 Cwp2p; 히트 쇼크 단

백질 SSA1, SSA3, SSA4, SSC1 및 KAR2, 이들은 열처리에 세포가 노출되자마자 발현이 유도되고 단백질은 보다 열에 안정적이다; 미토콘드리아로의 운반을 위한 미토콘드리아 단백질 CYC1; 딸세포 형성의 초기 단계 중에서 효모 세포에서의 위치결정을 위한 BUD 유전자; 액틴 다발상으로 앵코(anchoring)하기 위한 ACT1을 포함한다.

한 양태에서, 융합 단백질에서 이용되는 내인성 효모 단백질/펩타이드 또는 합성 펩타이드는 융합 단백질의 동정 및 정제를 위한 항체 에피토프를 포함한다. 항체는 내인성 항원에 선택적으로 결합하는 것이 이미 이용 가능하거나 용이하게 생성할 수 있다. 아울러, 특정 세포내 위치로 (예, 분비 경로로, 미토콘드리아로, 핵으로) 단백질을 지시하고자 한다면, 작제물은 세포내 기구가 그 전달 시스템을 최적화하도록 효모 단백질에 대한 내인성 신호를 이용할 수 있다. 바람직하게는 융합 파트너에 선택적으로 결합하는 항체가 이용 가능하거나 생산된다. 본 발명에서 문구 "선택적으로 결합한다"는 것은 특정한 단백질에 선호하여 결합하는 항체, 항원 결합 절편 또는 본 발명의 결합 파트너의 능력을 의미한다. 보다 자세하게 용어 "선택적으로 결합한다"는 것은 한 단백질의 다른 단백질 (예, 항원에 항체, 이의 단편 또는 결합 파트너)로의 특정한 결합을 의미하는 것으로, 표준 분석법 (예, 면역 분석법)에 의해 측정된다면 결합의 정도는 분석법에서 백그라운드 대조군보다 통계적으로 상당히 높다. 예를 들어 면역 분석법을 실시할 경우에 대조군은 일반적으로 항체 또는 항원 결합 절편만을 함유하는 (즉, 항원이 부재하는) 반응 구/관을 포함하고, 항원의 부재에서 항체 또는 이의 항원 결합 절편에 의한 반응의 양 (예, 구에 대한 비특이적 결합)이 백그라운드로서 간주된다. 결합은 효소 면역 분석법 (예, ELISA), 면역블롯 분석법 등을 포함하여 당업계에 표준적인 다양한 방법을 사용하여 측정될 수 있다.

한 양태에서, 본 발명의 백신은 HCV 항원의 C-말단과 연결된 펩타이드를 포함할 수 있는데, 상기 펩타이드는 상기 펩타이드에 대한 항체에 의해 융합 단백질의 인식을 가능하게 한다. 한 측면에서, 펩타이드는 G-G-G-H-H-H-H-H-H (서열번호: 10)의 아미노산 서열을 포함한다. 상기 양태는 단독으로 또는 전술된 융합 단백질의 다른 양태와 접합하여 이용될 수 있다.

전술된 바와 같이 본 발명의 백신 및 조성물에서 이용되는 융합 단백질은 동물을 백신화하기 위한 적어도 하나의 HCV 항원을 포함한다. 조성물 또는 백신은 하나 이상의 HCV 항원의 하나 이상의 면역원성 도메인을 포함하여 하나, 둘, 약간, 여러, 다수의 HCV 항원을 포함할 수 있다. 예를 들어 융합 단백질은 HCV E1 엔벨로프 글리코단백질, HCV E2 엔벨로프 당단백질, HCV P7 이온 채널, HCV NS2 메탈로프로테아제, HCV NS3 프로테아제/헬리카제, HCV NS4a NS3 프로테아제 보조인자, HCV NS4b, HCV NS5a, HCV NS5b RNA에 의존성 RNA 폴리머라제 및 HCV 코어 서열로부터 선택된 하나 이상의 HCV 단백질의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 바람직한 양태에서, HCV 코어 서열 이외의 HCV 단백질의 일부는 HCV 코어 서열의 적어도 일부와 연결된다. 다른 측면에서, 융합 단백질은 하나 이상의 HCV 항원의 적어도 하나의 면역원성 도메인을 포함한다.

본 발명에서 용어 "항원"의 일반적인 이용은 단백질의 일부 (펩타이드, 일부 단백질, 전장 단백질)를 의미하되, 상기 단백질은 천연적으로 존재하거나 합성하여 유래되고, 또는 세포의 조성물 (전체 세포, 세포 용해질 또는 파쇄된 세포), 유기체 (전체 유기체, 용해질 또는 파쇄된 세포) 또는 탄화수소 또는 기타 분자 또는 이의 일부를 의미하되, 상기 항원은 항원 특이적 면역 반응 (체액성 및/또는 세포성 면역 반응)을 유발하거나, 선택적으로 항원이 투여된 동물의 세포 및 조직 내에서 접하는 동일하거나 유사한 항원에 대한 용인제(toleragen)로서 작용한다.

본 발명의 한 양태에서, 면역 반응을 자극하는 것이 바람직할 경우, 용어 "항원"은 용어 "면역원"과 상호 교환적으로 이용될 수 있고, 동물에게 (예를 들면, 본 발명의 백신을 통하여) 면역원을 투여하는 것은 동물의 조직 내에서 접하는 동일하거나 유사한 항원에 대한 항원 특이적인 면역 반응을 끌어올리도록 체액성 및/또는 세포성 면역 반응을 유발하는 (즉, 항원성인) 단백질, 펩타이드, 세포 조성물, 유기체 또는 기타 분자를 설명하는데 이용된다. 따라서, 한 양태에서 특정 항원에 대하여 동물을 백신화한다는 것은 항원 투여의 결과로서 항원 또는 이의 면역원성 또는 이의 용인성 일부에 대한 면역반응이 유발된다는 것을 의미한다. 백신화는 바람직하게는 보호 또는 치료 효과로 이어지고, 상기 항원 (또는 상기 항원의 근원)에 대한 추후 노출은 동물에서 질병 또는 용태를 감소 또는 예방하는 상기 항원 (또는 상기 항원의 근원)에 대한 면역 반응을 유발한다. 백신의 개념은 당업계에 공지되어 있다. 본 발명의 치료 조성물을 투여함으로써 유발되는 면역 반응은 백신의 투여가 부재한 경우와 비교하였을 때 면역 반응 (예, 세포성 반응, 체액성 반응, 사이토카인 생산)의 일면에서의 검출 가능한 변화일 수 있다.

"백신화 항원"은 면역원 또는 용인제일 수 있지만, 백신에서 이용된 항원일 수 있으며, 생물학적 반응 (면역 반응의 유발, 용인)은 백신화 항원에 대하여 유발될 것이다.

주어진 항원의 면역원성 도메인 (일부, 절편, 에피토프)은 동물에게 투여되었을 때 면역원으로서 작용하는 적어도 하나의 에피토프를 포함하는 항원의 일부 [즉, 펩타이드 절편 또는 서브유닛 또는 항체 에피토프 또는 기타 구조형 (conformational) 에피토프]일 수 있다. 예를 들어 단일 단백질은 다수의 상이한 면역원성 도메인을 포함할 수 있다. 면역원성 도메인은 체액성 반응의 경우에는 단백질 내부의 직쇄 서열일 필요는 없다.

에피토프는 주어진 항원 내에서 면역 반응을 유발하기에 충분한 단일 면역원성 부위 또는 주어진 항원 내에서 면역 반응을 억제, 결실 또는 불활성화하기에 충분한 단일 용인 부위로 정의된다. 당업자는 T 세포 에피토프는 B 세포 에피토프와 크기 및 조성에서 상이하고, Class I MHC 경로를 통하여 제시되는 에피토프는 Class II MHC 경로를 통하여 제시되는 에피토프와 다르다는 것을 인식하고 있다. 에피토프는 면역 반응의 유형에 따라 직쇄 서열 또는 구조형 에피토프 (보존된 결합 영역)일 수 있다. 항원은 단일 에피토프 만큼 작거나 그 보다 클 수 있으며 다수의 에피토프를 포함할 수 있다. 항원의 크기는 약 5-12 아미노산 (예, 펩타이드) 만큼 작거나, 다량체 및 용합 단백질, 키메라 단백질, 전체 세포, 전체 미생물 또는 이의 일부 (예, 전체 세포의 용해질 또는 미생물의 추출물)를 포함하여 전장 단백질만큼 클 수도 있다. 또한, 항원은 탄수화물을 포함할 수 있으며, 효모 비히클 또는 본 발명의 조성물에 로딩될 수 있다. 일부 양태에서, (즉, 항원이 재조합 핵산 분자로부터 효모 비히클에 의해 발현된다면) 항원은 완전한 세포 또는 미생물 보다는 단백질, 용합 단백질, 키메라 단백질 또는 이의 단편이다. 본 발명의 바람직한 HCV 용합 단백질이 여기서 설명된다.

본 발명의 또 다른 양태에서, 백신의 HCV 항원 일부는 둘 이상의 항원을 포함하는 용합 단백질로서 제조된다. 한 측면에서, 용합 단백질은 하나 이상의 항원 (예, HCV NS3 서열 및 HCV 코어 서열)의 둘 이상의 면역원성 도메인 또는 둘 이상의 에피토프를 포함할 수 있다. 그러한 백신은 광범위한 환자에서 항원 특이적 면역을 제공할 수 있다. 예를 들어 본 발명에서 유용한 다수 도메인 용합 단백질은 다수의 도메인을 가질 수 있으며, 각 도메인은 단백질 내에서 발견되는 돌연변이된 아미노산을 포함하고 그의 양 측면에 있는 적어도 4개의 아미노산 잔기로 이루어지며, 상기 돌연변이는 특정 질병 또는 용태 (예, HCV 감염)와 연관된다.

본 발명의 한 양태에서, 본 발명에서 기술된 임의의 아미노산 서열은 특정된 아미노산 서열의 C- 및/또는 N-말단 각각의 측면에 적어도 하나 내지 적어도 약 20개까지 추가 이중성 아미노산 서열이 위치하도록 제조될 수 있다. 이렇게 형성된 단백질 또는 폴리펩타이드는 특정한 아미노산 서열로 "필수적으로 이루어진"이라고 기술될 수 있다. 본 발명에서 상기 이중성 아미노산 서열은 특정한 아미노산 서열의 측면에 천연적으로 위치하지 않거나 (즉, 천연 생체 내에서 발견되지 않는), 특정한 아미노산 서열의 기능과 관련이 없거나, 천연적으로 발생하는 서열에서 그러한 뉴클레오타이드가 주어진 아미노산 서열이 유래되는 유기체의 표준 코돈 이용(usage)을 사용하여 해독되었다면 유전자에서 발생함에 따라 특정한 아미노산 서열을 코딩하는 천연적으로 발생하는 핵산 서열 측면에 위치하는 뉴클레오타이드에 의해 코딩되지 않는 아미노산 서열이다. 유사하게, "필수적으로 이루어진"이라는 문구가 본 발명에서 핵산 서열과 관련되어서 사용되면 특정한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열의 5'- 및/또는 3'- 말단 각각에 적어도 하나 내지 약 60개까지 추가 이중성 뉴클레오타이드가 측면에 위치하는 특정한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 의미한다. 이중성 뉴클레오타이드는 천연 유전자에서 발생함에 따라 특정한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열의 측면에 천연적으로 위치하지 않거나 (즉, 천연 생체 내에서 발견되지 않는) 단백질에 어떠한 추가 기능을 부여하거나 특정한 아미노산 서열을 갖는 단백질의 기능을 변화시키는 단백질을 코딩하지 않는다.

본 발명의 바람직한 측면에서, HCV 항원은 HCV NS3 프로테아제 및 코어 서열로 이루어진 HCV 단백질이다. 다른 측면에서, HCV 항원은 HCV 코어 서열과 연결된 천연 NS3 단백질의 촉매 도메인을 결여한 HCV NS3 단백질로 이루어진다. 다른 측면에서, HCV 항원은 HCV 코어 서열과 연결된 천연 NS3 단백질의 초기 N-말단 88개 아미노산에 후속된 HCV NS3의 262개 아미노산 (HCV NS3; 서열번호: 20의 89-350 위치)으로 이루어진다. 한 측면에서, HCV 코어 서열은 소수성 C-말단 서열을 결여한다. 다른 측면에서, HCV 코어 서열은 C-말단의 두 개의 아미노산, 글루타메이트 및 아스파르트산을 결여한다. 바람직한 측면에서, HCV 코어 서열은 천연 HCV 코어 서열의 2 내지 140 위치의 아미노산으로 이루어진다.

그러한 백신의 한 예가 실시예 1에서 설명된다. 이러한 양태에서, 효모 (예, 사카로미세스 세레비시애)는 구리 유도성 프로모터, *CUP1*의 제어 하에서 HCV NS3-코어 용합 단백질을 발현하도록 조작되었다. 상기 용합 단백질은 N-부터 C- 말단에 이르는 프레임 내에서 융합된 다음 서열 요소를 가진 단일 폴리펩타이드이다 (괄호에 서열번호: 2에 나타난 용합 단백질의 아미노산 서열로 번호를 매긴 HCV 폴리단백질 (서열번호: 20)): 1) 프로테아좀의 분해에 저항성을 부여하는 서열 MADEAP (서열번호: 9)(서열번호: 2의 1 내지 6 위치); 2) HCV NS3 프로테아제 단백질의 아미노산 89 내지 350 (서열번호: 20의 1115 내지 1376 위치) (서열번호: 2의 6 내지 268 위치); 3) 클로닝에 도입된 단일 트레오닌 아미노산 잔기 (서

열번호: 2의 269 위치); 4) HCV 코어 단백질의 아미노산 2 내지 140 (서열번호: 20의 2 내지 140 위치) (서열번호: 2의 270 내지 408 위치); 및 5) 코어 변이체의 친수성을 증가시키기 위한 E-D 서열 (서열번호: 2의 409 내지 410 위치). 서열번호: 2의 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호: 1에 나타내었다.

본 발명의 다른 측면에서, HCV 항원은 불활성화된 전장의 HCV NS3으로서 본 발명에 따른 융합 단백질의 부분이다. 그러한 백신의 예는 실시예 2에서 설명된다. 이러한 양태에서, 효모 (예, 사카로미세스 세레비시예)는 구리 유도성 프로모터, *CUP1*의 제어 하에서 불활성화된 전장의 HCV NS3 융합 단백질을 발현하도록 조작되었다. 상기 전장 HCV NS3를 포함한 융합 단백질은 N-부터 C- 말단에 이르는 프레임 내에서 융합된 다음 서열 요소를 가진 단일 폴리펩타이드이다 (괄호에 서열번호: 4에 나타난 융합 단백질의 아미노산 서열로 번호를 매긴 HCV 폴리단백질): 1) 프로테아좀의 분해에 저항성을 부여하는 서열 MADEAP (서열번호: 9)(서열번호: 4의 1 내지 6 위치); 및 2) HCV NS3 프로테아제 단백질의 아미노산 1 내지 631 (서열번호: 20의 1027 내지 1657 위치)(서열번호: 4의 7 내지 637) (HCV 폴리펩타이드 잔기 1165에 있는 아미노산은 단백질 분해 활성을 불활성화하기 위하여 세린으로부터 알라닌으로 변경되었다). 서열번호: 4의 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호: 3에 나타내었다.

본 발명의 다른 바람직한 측면에서, 효모 백신은 절단된 HCV E1-E2 융합 단백질을 포함한다. 그러한 백신의 예는 실시예 3에서 설명된다. 이러한 양태에서, 효모 (예, 사카로미세스 세레비시예)는 N-부터 C- 말단에 이르는 프레임 내에서 융합된 다음 서열 요소를 가진 단일 폴리펩타이드로서 E1-E2 융합 단백질을 발현하도록 조작된다 (괄호에 융합 단백질의 아미노산 서열은 서열번호: 6에 나타난 번호를 매긴 HCV 폴리단백질): 1) 프로테아좀의 분해에 저항성을 부여하는 서열 MADEAP (서열번호: 9) (서열번호: 6의 1 내지 6 위치); 2) HCV 단백질 E1의 아미노산 1 내지 156 (서열번호: 20의 192 내지 347) (서열번호: 7의 7 내지 162 위치); 및 3) HCV 단백질 E2의 아미노산 1 내지 334 (서열번호: 20의 384 내지 717 위치) (서열번호: 6의 163 내지 446 위치). 상기 융합 단백질에 있어서, E1의 36개 C-말단 소수성 아미노산 및 E2의 29개 C-말단 소수성 아미노산은 효모내 사이토플라즘 축적을 촉진하기 위하여 융합 단백질로부터 제거되었다. 서열번호: 6의 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호: 5에 나타내었다.

본 발명의 또 다른 바람직한 측면에서, 효모 백신은 트랜스멤브레인(TM) 도메인이 결실된 HCV NS4b 융합 단백질을 포함한다. 그러한 백신의 예는 실시예 4에서 설명된다. 상기 융합 단백질은 N-부터 C-말단에 이르는 프레임 내에서 직렬로 배열된 다음 서열 요소를 갖는 단일 폴리펩타이드이다 (괄호에 서열번호: 8에 나타난 융합 단백질의 아미노산 서열로 번호를 매긴 HCV 폴리단백질): 1) 프로테아좀의 분해에 저항성을 부여하는 서열 MADEAP (서열번호: 9)(서열번호: 8의 1 내지 6 위치); 2) HCV 단백질 NS4b의 아미노산 1 내지 69 (서열번호: 20의 1712 내지 1780) (서열번호: 8의 7 내지 75 위치); 3) HCV 단백질 NS4b의 아미노산 177 내지 261(서열번호: 20의 1888 내지 1972 위치) (서열번호: 8의 76 내지 160 위치). 다수의 멤브레인 스패닝(spanning) 도메인을 포함하는 NS4b 아미노산 70 내지 176에 상응하는 107개의 아미노산 영역 (서열번호: 20의 1781 내지 1887)은 효모내 사이토플라즘 축적을 촉진하기 위하여 제거되었다. 서열번호: 8의 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호: 7에 의해 나타내었다.

본 발명의 또 다른 바람직한 측면에서, 효모 백신은 코어-E1-E2 융합 단백질을 포함한다. 융합 단백질은 N-부터 C- 말단에 이르는 프레임 내에서 직렬로 배열된 다음 서열 요소를 갖는 단일 폴리펩타이드이다 (괄호에 서열번호: 12에 나타난 융합 단백질의 아미노산 서열로 번호를 매긴 폴리단백질): 1) 프로테아좀의 분해에 저항성을 부여하는 서열 MADEAP (서열번호: 9)(서열번호: 12의 1 내지 6 위치); 2) 전장의 코어, E1 및 E2 단백질을 코딩하는 비변형된 HCV 폴리단백질의 아미노산 1 내지 746 (서열번호: 20의 2 내지 746)(서열번호: 12의 7 내지 751 위치; 7 내지 196 위치를 스패닝하는 코어; 197 내지 387 위치를 스패닝하는 E1; 및 388 내지 751 위치를 스패닝하는 E2). 서열번호: 12의 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호: 11에 의해 나타내었다.

본 발명의 다른 바람직한 측면에서, 효모 백신은 트랜스멤브레인 도메인이 결실된 코어-E1-E2 융합 단백질을 포함한다. 상기 융합 단백질은 N-부터 C-말단에 이르는 프레임 내에서 융합된 다음 서열 요소를 갖는 단일 펩타이드이다 (괄호에 서열번호: 14에 나타난 융합 단백질의 아미노산 서열로 번호를 매긴 폴리단백질): 1) 프로테아좀의 분해에 저항성을 부여하는 서열 MADEAP (서열번호: 9), 2) HCV 코어 단백질의 아미노산 2 내지 140 (서열번호: 20의 2 내지 140)(서열번호: 14의 7 내지 145 위치), 3) HCV 단백질 E1의 아미노산 1 내지 156 (서열번호: 20의 192 내지 347)(서열번호: 14의 146 내지 301 위치), 및 4) HCV 단백질 E2의 아미노산 1 내지 334 (서열번호: 20의 384 내지 717)(서열번호: 14의 302 내지 635 위치). 코어 단백질의 51개 C-말단 소수성 아미노산, E1의 36개 C-말단 소수성 아미노산 및 E2의 29개 C-말단 소수성 아미노산은 효모내 사이토플라즘 축적을 촉진하기 위하여 융합 단백질로부터 제거되었다. 서열번호: 14의 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호: 13에 나타내었다.

본 발명의 또 다른 바람직한 측면에서, 효모 백신은 NS3 프로테아제가 불활성화되고 NS4b는 트랜스멤브레인 도메인이 결여된 NS3-NS4a-NS4b 융합 단백질을 포함한다. NS3-NS4a-NS4b는 N-부터 C-말단에 이르는 프레임 내에서 융합

된 다음 서열 요소를 갖는 단일 펩타이드이다 (괄호에 서열번호: 16에 나타난 융합 단백질의 아미노산 서열로 번호를 매긴 폴리단백질): 1) 프로테아좀의 분해에 저항성을 부여하는 서열 MADEAP (서열번호: 9)(서열번호: 16의 1 내지 6위치); 2) 전장의 HCV NS3 단백질에 대응하는 아미노산 1 내지 631 (서열번호: 20의 1027 내지 1657)(139의 세린(서열번호: 20의 1165 위치)은 NS3의 단백질 분해 잠재력을 불활성화시키기 위하여 알라닌으로 변경된다)(서열번호: 16의 7 내지 634 위치); 3) NS4a 단백질의 아미노산 1 내지 54 (서열번호: 20의 1658 내지 1711)(서열번호: 16의 635 내지 691 위치); 4) HCV 단백질 NS4b의 아미노산 1 내지 69 (서열번호: 20의 1712 내지 1780)(서열번호: 16의 692 내지 776 위치); 및 5) HCV 단백질 NS4b의 아미노산 177 내지 261 (서열번호: 20의 1888 내지 1972)(서열번호: 16의 777 내지 845 위치). 다수의 멤브레인 스페닝 도메인을 포함하는 NS4b 아미노산 70 내지 176에 상응하는 107개 아미노산 영역(서열번호: 20의 1781 내지 1887)은 효모내 사이토플라즘 축적을 촉진하기 위하여 제거되었다. 서열번호: 16의 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호: 15에 나타내었다.

본 발명의 다른 바람직한 측면에서, 효모 백신은 NS5b C-말단의 불활성화 결실을 갖는 NS5a-NS5b 융합 단백질을 포함한다. 상기 NS5a-NS5b 융합 단백질은 N-부터 C-말단에 이르는 프레임 내에서 융합된 다음 서열 요소를 갖는 단일 폴리펩타이드이다 (괄호에 서열번호: 18에 나타난 융합 단백질의 아미노산 서열로 번호를 매긴 폴리단백질): 1) 프로테아좀의 분해에 저항성을 부여하는 서열 MADEAP (서열번호: 9)(서열번호: 18의 1 내지 6위치); 2) 아미노산 1 내지 448에 대응하는 NS5a 단백질의 전체 (서열번호: 20의 1973 내지 2420)(서열번호: 18의 7 내지 454 위치); 및 3) NS5b의 아미노산 1 내지 539(서열번호: 20의 2421 내지 2959)(서열번호: 18의 455 내지 993 위치). HCV 복제에서 NS5b의 활성화를 위해 요구되는 52개 C-말단 잔기가 상기 단백질을 불활성화하기 위하여 결실되었다. 서열번호: 18의 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호: 17에 나타내었다.

본 발명에 따르면, 전술된 융합 단백질은 각 융합 단백질의 N-말단에 연결되고 HCV 항원에 이중성인 적어도 2-6개의 아미노산 잔기로 이루어진 펩타이드를 포함할 수 있다. 한 측면에서, 펩타이드는 M-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆의 아미노산 서열을 포함하되, X₂는 글리신, 프롤린, 리신 또는 아르기닌을 제외한 임의의 아미노산이며; X₃는 메티오닌, 리신 또는 아르기닌을 제외한 임의의 아미노산이고; X₄는 메티오닌, 리신 또는 아르기닌을 제외한 임의의 아미노산이며; X₅는 메티오닌, 리신 또는 아르기닌을 제외한 임의의 아미노산이고, X₆은 메티오닌을 제외한 임의의 아미노산이다. 한 측면에서, X₆은 프롤린이다. 다른 측면에서, 펩타이드는 아미노산 서열 M-A-D-E-A-P (서열번호: 9)를 포함한다.

본 발명의 특정 측면에서, 상기 융합 단백질은 두 개의 HCV 단백질(예, HCV NS3 및 HCV 코어 서열) 사이에 이중성 링커 서열을 포함한다. 바람직한 양태에서, 이중성 링커 서열은 단일 이중성 아미노산 잔기로 이루어진다. 보다 바람직한 양태에서, 이중성 링커 서열은 단일 트레오닌 잔기로 이루어진다.

본 발명에 따른 전술된 조성물(예, 백신)에서, 효모 비히클과 관련하여 다음 측면이 본 발명에 포함된다. 한 양태에서, 효모 비히클은 전체 효모, 효모 스페로플라스트, 효모 사이토플라스트, 효모 고스트 및 아세포(subcellular) 효모 멤브레인 추출물 또는 이의 분획물로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 한 측면에서, 효모 비히클의 제조에 이용되는 효모 세포 또는 효모 스페로플라스트는 항원을 코딩하는 재조합 핵산 분자로 형질전환되어 상기 항원이 효모 세포 또는 효모 스페로플라스트에 의해 재조합으로 발현된다. 이러한 측면에서, 상기 항원을 재조합으로 발현하는 효모 세포 또는 효모 스페로플라스트는 효모 사이토플라스트, 효모 고스트 또는 아세포 효모 막 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 효모 비히클을 생산하는데 이용된다. 한 측면에서, 상기 효모 비히클은 비병원성 효모로부터 유래된다. 다른 측면에서, 상기 효모 비히클은 사카로마이세스, 스킨조사카로마이세스, 클루베로마이세스, 한세놀라, 칸디다 및 피키아로 이루어진 그룹으로부터 선택된 효모로부터 유래된다. 한 측면에서, 상기 사카로마이세스는 S. 세레비시애이다.

일반적으로 효모 비히클 및 항원은 여기서 설명된 기술에 의해 연관될 수 있다. 한 측면에서, 상기 효모 비히클은 세포내로 HCV 항원에 의해 로딩된다. 다른 측면에서, 상기 HCV 항원은 효모 비히클에 공유결합으로 또는 비공유결합으로 부착된다. 또 다른 측면에서, 상기 효모 비히클 및 HCV 항원은 혼합에 의해 연관된다. 다른 측면에서, 항원은 효모 비히클 또는 상기 효모 비히클이 유래된 효모 세포 또는 효모 스페로플라스트에 의해 재조합으로 발현된다.

보다 자세하게, 본 발명에서 효모 비히클은 본 발명의 백신 또는 치료 조성물에서 항원과 접합하여 또는 애주번트로서 사용될 수 있는 효모 세포 (예, 전체 또는 온전한 세포) 또는 (후술하는) 이들의 유도체이다. 따라서 효모 비히클은 이에 제한되는 것은 아니지만, 살아있는 온전한 효모 미생물 (즉, 세포벽을 포함한 모든 성분을 가진 효모 세포), 살상된 (죽은) 온전한 효모 미생물 또는 효모 스페로플라스트 (즉, 세포벽이 결핍된 효모 세포), 효모 사이토플라스트(즉, 세포벽과 핵이 결핍된 효모 세포), 세포 고스트(즉, 세포벽, 핵 및 사이토플라즘이 결핍된 세포) 또는 (앞서 아세포 효모 입자로서 언급된) 아세포 효모 막 추출물 또는 이의 분획물을 포함한 효모 미생물의 유도체를 포함할 수 있다.

효모 스페로플라스트는 통상적으로 효모 세포벽의 효소 분해에 의해 생긴다. 그러한 방법은 예를 들면 Franzusoff et al. 1991, *Meth. Enzymol.* 194, 662-674에 설명되어 있고, 이의 전문이 본 발명에서 참조로 인용된다. 효모 사이토플라스트는 일반적으로 효모 세포의 탈핵화에 의해 생산된다. 그러한 방법은 예를 들면, Coon, 1978, *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 48, 45-55에 설명되어 있고, 이의 전문이 본 발명에서 참조로 인용된다. 효모 고스트는 일반적으로 투과되거나 용해된(lysed) 세포를 재봉합하여 생산될 수 있으며 필수적이지 않지만, 상기 세포의 적어도 일부 세포기관(organelle)을 포함할 수 있다. 그러한 방법은 예를 들면, Franzusoff et al. 1983, *J.Biol. Chem.*, 258,3608-3614 및 Bussey et al. 1979, *Biochem. Biophys. Acta* 553, 185-196에 기술되어 있으며, 각각 이의 전문은 본 발명에서 참조로 인용된다. 아세포 효모 막 추출물 또는 이의 분획물은 천연 핵 또는 사이토플라즘이 결핍된 효모 막을 의미한다. 상기 입자는 당업계에 알려진 초음파 처리 또는 다른 막 분쇄 방법과 이어지는 재봉합에 의해 생산되는 천연의 효모 막 크기부터 마이크로입자까지를 포함하는 임의의 크기일 수 있다. 아세포 효모 막 추출물을 생산하는 방법은 예를 들면 Franzusoff et al. 1991, *Meth. Enzymol.* 194, 662-674에 기술되어 있다. 항원이 효모 막 추출물의 제조 이전에 효모에 의해 재조합으로 발현된 경우에는 효모 막 일부분 및 상기 항원을 포함하는 효모 막 추출물의 분획물을 또한 이용할 수 있다.

임의의 효모 균주가 본 발명의 효모 비히클을 생산하는데 이용될 수 있다. 효모는 단일세포(unicellular) 미생물로서 다음 3개의 부류 중 어느 하나에 속한다: 자낭균(Ascomycete), 담자균류(Basidiomycete) 및 불완전 균류(Fungi Imperfecti). 병원성 효모 균주 또는 이의 비병원성 돌연변이체가 본 발명에서 이용될 수 있지만, 비병원성 효모 균주가 바람직하다. 바람직한 효모 균주 속(genera)에는 사카로마이세스, (병원성일 수도 있는) 칸디다, 크립토크쿠스, 한세놀라, 클루베로마이세스, 피카아, 로도토룰라, 스키토사카로마이세스 및 야로위아 등이 포함되며, 사카로마이세스, 칸디다, 한세놀라, 피키아 및 스키토사카로마이세스가 보다 바람직하고 사카로마이세스가 더욱 바람직하다. 바람직한 효모 균주 종(species)에는 사카로마이세스 세레비시애, 사카로마이세스 칼스버젠시스, 칸디다 알비칸스, 칸디다 케피르, 칸디다 트로피칼리스, 크립토크쿠스 라우렌티, 크립토크쿠스 네오포르만스, 한세놀라 아노말라, 한세놀라 폴리모르파, 클루베로마이세스 프라질리스, 클루베로마이세스 락티스, 클루베로마이세스 마르크시아누스 바르 락티스, 피키아 파스토리스, 로도토룰라 루브라, 스키토사카로마이세스 폼베 및 야로위아 리포리티카 등을 포함한다. 다양한 이와 같은 종들이 아종(subspecies), 유형, 아형(subtype) 등을 포함한다는 것이 자명하며, 그들은 모두 상술한 종 내에 포함된다. 보다 바람직한 효모 종은 S. 세레비시애, C. 알비칸스, H. 폴리모르파, P. 파스토리스 및 S. 폼베를 포함한다. S. 세레비시애는 상대적으로 다루기 용이하고 식품 첨가제로서 이용되는 "Generally Recognized As Safe" or "GRAS"이므로 특히 바람직하다(GRAS, FDA 제안된 Rule 62FR18938, 1997년 4월 17일). 본 발명의 한 양태는 S 세레비시애 균주와 같이 플라스미드를 더욱 높은 카피수(copy number)로 복제할 수 있는 효모 균주이다.

한 양태에서, 본 발명의 바람직한 효모 비히클은 수지상 세포 또는 대식세포와 같이 효모 비히클과 항원이 전달되는 세포 유형과 융합할 수 있는 것으로, 이에 의하여 효모 비히클과 많은 양태에서는 항원을 상기 세포 유형으로 더욱 효과적으로 전달할 수 있다. 본 발명에서 효모 비히클과 표적 세포 유형의 융합은 효모 세포 막 또는 이의 입자가 표적 세포 유형(예, 수지상 세포 또는 대식세포)의 막과 융합하여 합포체(syncytium)를 형성하는 능력을 의미한다. 본 발명에서 합포체는 세포의 통합에 의해 생산된 다핵의 프로토플라즘(protoplast) 덩어리를 말한다. (HIV, 인플루엔자 바이러스, 폴리오바이러스 및 아데노바이러스와 같은 면역 결핍 바이러스의 표면 단백질을 포함한) 수많은 바이러스의 표면 단백질 및 (난자와 정자 간의 융합에 관여하는 것과 같은) 다른 융합제(fusogen)가 두 막 간의 (즉, 바이러스와 포유동물의 세포 막 간 또는 포유동물의 세포 막 간) 융합을 효율적으로 만들 수 있다. 예를 들면, 표면에 HIV gp120/gp41이라는 이중성의 항원을 생산하는 효모 비히클은 CD4+ T-림프구와 융합할 수 있다. 그러나 효모 비히클로 표적 부(moiety)의 통합은 일부 상황에서는 바람직할 수 있지만, 필수적이지 않다. 본 발명자들은 본 발명에 따른 효모 비히클이 수지상 세포 (뿐만 아니라 대식세포와 같은 다른 세포)에 의해 용이하게 획득되는 것을 보여주었다.

효모 비히클은 당업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 환자에게 직접 투여되거나 먼저 수지상 세포와 같은 담체로 로딩된 조제물을 포함한 본 발명의 조성물로 제형화될 수 있다. 예를 들면 효모 비히클은 동결건조법에 의해 건조시킬 수 있다. 효모 비히클을 함유하는 제형은 베이킹 또는 양조 공정에서 사용되는 효모에 행해지는 바와 같이 효모를 케이크 또는 정제로 패킹(packing)하여 제조할 수 있다. 또한, 항원을 수지상 세포로 로딩하거나 다른 유형의 투여 이전에 효모 비히클은 또한 숙주 세포에 의해 용인(tolerated)될 수 있는 등장성 완충용액과 같은 약제학적으로 허용되는 부형제와 혼합할 수 있다. 그러한 부형제의 예에는 물, 식염수, 링거 용액(Ringer's solution), 텍스트로오스 용액, 한스 용액(Hank's solution) 및 다른 수용성의 생리학적으로 평형된 염 용액을 포함한다. 불휘발유, 참기름, 에틸 올레이트 또는 트리글리세리드와 같은 비수용성 비히클이 또한 사용될 수 있다. 다른 유용한 제형은 소듐 카르복시메틸셀룰로오스, 소르비톨, 글리세롤 또는 텍스트란과 같은 점도 증진제를 포함한 현탁액을 포함한다. 부형제는 또한 등장성 및 화학적 안정성을 개선하는 성분과 같은 첨가제를 미량 포함할 수 있다. 완충제의 예로는 포스페이트 완충제, 비카르보네이트 완충제 및 트리스 완충제가 포함되는 한편, 보존제의 예에는 티메로살, m- 또는 o-크레솔, 포르말린 및 벤질 알코올이 포함된다. 표준 제형은 주입할 수 있는

액체 또는 주입용 현탁액 또는 용액으로서 적합한 액체에 수용될 수 있는 고체일 수 있다. 따라서 비액체 제형에서 부형제는 예를 들면 텍스트로스, 사람 혈청 알부민 및/또는 보존제를 포함할 수 있으며, 투여 전에 여기에 멸균수 또는 식염수가 첨가될 수 있다.

본 발명에서 용어 "효모 비히클-항원 복합체" 또는 "효모-항원 복합체"는 효모 비히클과 항원의 연관을 설명하기 위하여 일반적으로 이용된다. 상기 연관은 효모 (재조합 효모)에 의한 항원이 발현, 효모로 항원의 도입, 효모와 항원의 물리적 부착 및 완충용액 또는 다른 용액 또는 제형에서와 같이 효모와 항원을 함께 혼합하는 것을 포함한다. 이러한 유형의 복합체는 하기에서 설명된다.

한 양태에서, 효모 비히클의 제조에 이용되는 효모 세포는 항원을 코딩하는 이중성의 핵산 분자로 형질전환되어 상기 항원은 상기 효모 세포에 의해 발현된다. 그러한 효모는 본 발명에서 재조합 효모 또는 재조합 효모 비히클로서 정의된다. 그 다음 상기 효모 세포는 온전한 세포로서 수지상 세포로 로딩되거나, 살상되거나, 효모 스페로플라스트, 사이토플라스트, 고스트 또는 아세포 입자의 형성과 같은 방법에 의해 유도체화되고, 이어서 상기 유도체는 수지상 세포로 로딩될 수 있다. 항원을 발현하는 재조합 스페로플라스트를 생산하기 위하여 효모 스페로플라스트는 재조합 핵산 분자로 직접적으로 형질감염될 수 있다 (예, 스페로플라스트는 전체 효모로부터 생산되고, 이어서 형질감염된다).

본 발명에서 분리된 핵산 분자 또는 핵산 서열은 그것의 천연 환경으로부터 제거되어진 핵산 분자 또는 서열이다. 그에 따라 "분리된"이란 핵산 분자가 정제된 정도를 필수적으로 반영하지는 않는다. 효모 비히클을 형질감염시키는데 유용한 분리된 핵산 분자는 DNA, RNA 또는 DNA 또는 RNA의 유도체를 포함할 수 있다. 분리된 핵산 분자는 이중가닥 또는 단일가닥일 수 있다. 본 발명에서 유용한 분리된 핵산 분자는 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 핵산 분자를 포함한다. 이 때, 상기 단편은 본 발명에 따른 조성물에서 유용한 적어도 하나의 에피토프를 포함한다.

본 발명의 효모 비히클로 형질전환된 핵산 분자는 하나 이상의 단백질 또는 이의 일부 (단편, 도메인, 구조형 에피토프)를 코딩하는 핵산 분자 서열을 포함할 수 있다. 그러한 핵산 분자는 일부 또는 전체 코딩 영역, 조절 영역 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 효모 균주의 한 장점은 수많은 핵산 분자를 보유할 수 있고 수많은 이중성의 단백질을 생산할 수 있다는 것이다. 본 발명에 따른 효모 비히클에 의해 생산될 바람직한 항원의 개수는 효모 비히클에 의해 적절하게 생산될 수 있는 임의의 항원의 개수이고, 적어도 1개 내지 적어도 약 5개 이상이며 약 2 내지 약 5개의 이중성 항원이 보다 바람직하다.

효모 비히클 내에서 핵산 분자에 의해 코딩되는 펩타이드 또는 단백질은 전장 단백질 또는 아미노산이 결실 (예, 단백질의 절단된 형태), 삽입, 역위, 치환 및/또는 유도체화되고 (예, 아세틸화, 당쇄화, 인산화, 글리세로포스파티딜 이노시톨(GPI) 앵커(anchor)가 부착된), 상기 변형된 단백질은 천연 단백질과 실질적으로 유사한 생물학적 기능을 발휘하는 (또는 천연 단백질과 비교했을 때 증대되거나 억제된 기능을 발휘하는) 기능적으로 등가의 단백질일 수 있다. 변형은 이에 제한되는 것은 아니지만, 단백질에 대한 직접적인 변형 또는 예를 들면 무작위적 또는 표적 돌연변이를 일으킬 수 있는 전통적 또는 재조합 DNA 기술을 이용하여, 상기 단백질을 코딩하는 핵산 분자에 변형을 일으키는 기술에 의해 달성될 수 있다. 기능적으로 등가의 단백질은 상기 단백질의 생물학적 활성을 측정하는 분석법을 사용하여 선별될 수 있다. 바람직한 HCV 항원은 전술된 바와 같다.

본 발명에 따른 효모 비히클에서 항원의 발현은 당업계에서 공지된 기술을 사용하여 달성된다. 간단히 설명하면, 적어도 하나의 원하는 항원을 코딩하는 핵산 분자가 숙주 효모 세포로 형질전환되었을 때 상기 핵산 분자의 구성성(constitutive) 또는 조절된 발현이 일어나기 위하여 핵산 분자는 전사 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 방식으로 발현 벡터로 삽입시킨다. 하나 이상의 항원을 코딩하는 핵산 분자는 하나 이상의 전사 조절 서열에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 발현 벡터일 수 있다.

본 발명의 재조합 분자에서 핵산 분자는 전사 조절 서열, 해독 조절 서열, 복제 기원(origin of replication) 및 효모 세포와 양립할 수 있는(compatible) 핵산 분자의 발현을 조절하는 기타 조절 서열과 같은 조절 서열을 포함한 발현 벡터에 작동가능하게 연결된다. 특히, 본 발명의 재조합 분자는 하나 이상의 전사 조절 서열에 작동가능하게 연결된 핵산 분자를 포함한다. 용어 "작동가능하게 연결된"이란 핵산 분자가 숙주 세포로 형질감염 (즉, 형질전환, 형질도입 또는 형질감염)되었을 때 발현될 수 있는 방식으로 상기 핵산 분자가 전사 조절 서열에 연결된 것을 의미한다.

생산되는 단백질의 양을 조절할 수 있는 전사 조절 서열은 전사의 개시, 연장 및 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 특히 중요한 전사 조절 서열은 프로모터 및 업스트림 활성화 서열과 같은 전사 개시를 조절하는 서열이다. 임의의 적합한 효모의 프로모터가 본 발명에서 이용될 수 있으며 다양한 그러한 프로모터가 당업계에 알려져 있다. 사카로마이세스 세레비시에서 발현시키는데 바람직한 프로모터는 이에 제한되는 것은 아니지만 알코올 탈수소효소 I (ADH1) 또는 II (ADH2), CUP1, 포스포글리세리트 키나제(PGK), 트리오스 포스페이트 이소머라제 (TPI), 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수

소효소(GADPH; 또는 트리오스 포스페이트 탈수소효소인 TDH3로서 언급됨), 갈락토키나제(GAL1), 갈락토오스-1-포스페이트 우리딜-트랜스퍼라제(GAL7), UDP-갈락토오스 에피머라제(GAL10), 사이토크롬 c_1 (CYC1), Sec7 단백질(SEC7) 및 산 포스파타제(Pho5)를 코딩하는 유전자의 프로모터를 포함하며, ADH2/GADPH 및 CYC1/GAL10 프로모터와 같은 하이브리드 프로모터가 보다 바람직하고, 세포내 글루코오스 농도가 낮을 때(예, 약 0.1 내지 0.2%) 유도되는 ADH2/GADPH 프로모터가 더욱더 바람직하다. 마찬가지로 인헨서로 언급되기도 하는 수많은 업스트림 활성화 서열(UAS)이 알려져 있다. 사카로마이세스 세레비시에에서 발현시키는데 바람직한 업스트림 활성화 서열은 이에 제한되는 것은 아니지만 PCK1, TPI, TDH3, CYC1, ADH1, ADH2, SUC2, GAL1, GAL7 및 GAL10을 코딩하는 유전자의 UAS 뿐만 아니라 GAL4 유전자 산물에 의해 활성화되는 다른 UAS를 포함하며, ADH2 UAS가 특히 바람직하다. ADH2 UAS는 ADR1 유전자 산물에 의해 활성화되므로 이중성의 유전자가 ADH2 UAS에 작동가능하게 연결되었을 때 ADR1 유전자를 과발현하는 것이 바람직하다. 사카로마이세스 세레비시에에서 발현시키는데 바람직한 전사 종결 서열은 α -인자, GADPH 및 CYC1 유전자의 종결 서열을 포함한다.

메틸트로픽 효모(methyltrophic yeast)에서 유전자를 발현시키는데 바람직한 전사 조절 서열은 알코올 산화효소 및 포르메이트 탈수소효소를 코딩하는 유전자의 전사 조절 영역을 포함한다.

본 발명에 따른 효모 세포로 핵산 분자의 형질감염은 세포로 핵산 분자를 투입시키는 임의의 방법에 의해 달성될 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니지만, 확산, 능동 운반(active transport), 초음파 처리, 전기천공, 미세 주입, 리포펙션, 흡착 및 프로토플라스트 융합을 포함한다. 형질감염된 핵산 분자는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 효모 염색체로 통합되거나 염색체의 벡터로서 유지되도록 할 수 있다. 그러한 핵산 분자를 보유하는 효모 비히클의 예가 본 발명에서 상세히 설명된다. 상기된 효모 사이토플라스트, 효모 고스트 및 아세포 효모 막 추출물 또는 이의 분획물은 원하는 핵산 분자로 온전한 효모 미생물 또는 효모 스페로플라스트를 형질감염시키고, 항원을 생산한 후 당업계에 공지된 기술을 사용하여 상기 미생물 또는 스페로플라스트를 추가로 조작하여 상기 원하는 항원을 함유하는 사이토플라스트, 고스트 또는 아세포 효모 막 추출물 또는 이의 분획물을 생산함으로써 재조합에 의해 생산될 수 있다.

재조합 효모 비히클의 생산 및 상기 효모 비히클에 의한 항원의 발현에 효과적인 조건은 효모 균주가 배양될 수 있는 효과적인 배지를 포함한다. 효과적인 배지는 일반적으로 동화할 수 있는 탄수화물, 질소 및 포스페이트 원 뿐만 아니라 적합한 염, 미네랄, 금속 및 비탄민과 성장 인자와 같은 기타 영양분을 포함하는 수용성의 배지이다. 배지는 복합 영양분을 포함하거나 제한된 최소 배지일 수도 있다. 본 발명의 효모 균주는 이에 제한되는 것은 아니지만, 생물 반응기, 엘렌메이어(Erlenmeyer) 플라스크, 시험관, 마이크로티터 디쉬 및 페트리 플레이트를 포함한 다양한 용기에서 배양될 수 있다. 배양은 효모 균주에 적합한 온도, pH 및 산소 농도에서 수행한다. 그러한 배양 조건은 당업자에게 공지되어 있다(예를 들면, Guthrie et al. (eds.), 1991, *Methods in Enzymology*, vol.194, Academic Press, San Diego를 참조).

본 발명의 한 양태에서, 효모 비히클에서 재조합으로 항원을 발현시키는 것에 선택적으로 효모 비히클은 세포내에 단백질 또는 펩타이드 항원 또는 탄수화물 또는 항원으로 작용하는 다른 분자에 의해 로딩된다. 이어서 세포내에 항원을 보유한 효모 비히클은 환자에게 투여되거나 (상기된 바와 같이) 수지상 세포와 같은 담체로 로딩될 수 있다. 이 때, 펩타이드는 약 30-50개의 아미노산 보다 적은 또는 동등한 아미노산 서열을 포함하는 한편 단백질은 약 30-50개의 아미노산 보다 많은 아미노산 서열을 포함하고 단백질은 다량체일 수도 있다. 항원으로서 유용한 단백질 또는 펩타이드는 T 세포 에피토프만 큼 작고 (즉, 5개의 아미노산 보다 크고) 다수의 에피토프, 단백질 단편, 전장 단백질, 키메라 단백질 또는 융합 단백질을 포함한 것보다 큰 임의의 적합한 크기일 수도 있다. 펩타이드 및 단백질은 천연적으로 또는 인공 합성적으로 유도체화될 수 있다; 그러한 변형은 이에 제한되는 것은 아니지만, 당쇄화, 인산화, 아세틸화, 미리스틸화, 프렌일화, 팔미토일화, 아미드화 및/또는 글리세로포스파티딜 이노시톨의 부가를 포함할 수 있다. 펩타이드 및 단백질은 확산, 능동 수송, 리포솜 융합, 전기 천공, 식균작용, 냉동-해동 사이클 및 초음파처리와 같은 당업계에 공지된 기술에 의해 본 발명의 효모 비히클로 직접적으로 삽입될 수 있다. 펩타이드, 단백질, 탄수화물 또는 기타 분자에 의해 직접적으로 로딩될 수 있는 효모 비히클은 온전한 효모 뿐만 아니라 생산된 후 수지상 세포로 로딩되기 전에 항원에 의해 로딩될 수 있는 스페로플라스트, 고스트 또는 사이토플라스트를 포함한다. 또한, 온전한 효모가 항원에 의해 로딩되고 그 다음 이로부터 스페로플라스트, 고스트, 사이토플라스트 또는 아세포 입자가 제조될 수 있다. 이러한 양태에서 효모 비히클로 로딩될 수 있는 항원의 수는 적어도 1, 2, 3, 4 내지 정수로 증가하는 수백 또는 수천개의 항원이며, 예를 들면 이는 미생물의 로딩, 포유동물의 종양 세포 또는 이의 일부의 로딩에 의해 구비될 것이다.

본 발명의 다른 양태에서, 항원은 효모 비히클에 물리적으로 부착된다. 효모 비히클로 항원의 물리적인 부착은 이에 제한되는 것은 아니지만, 항원과 효모 비히클의 외부 표면간의 화학적인 교차연결 또는 예를 들면 항체 또는 다른 결합 파트너를 사용함에 의한 항원과 효모 비히클의 외부 표면간의 생물학적 연결을 포함한 공유 및 비공유 연관 방법을 포함하여 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 달성될 수 있다. 화학적 교차연결은 예를 들면 글루타르알데히드 연결, 광친화

라벨링(photoaffinity labelling), 카르보디이미드로 처리, 디설파이드 결합할 수 있는 화학 물질로 처리 및 당업계에 알려진 표준의 다른 교차연결 화학 물질로 처리를 포함한 방법에 의해 달성될 수 있다. 또한, 효모 막의 지질 이중층 또는 세포벽 조성물의 전하를 변화시킬 수 있는 화학 물질을 효모 비히클과 접촉시켜 효모의 외부 표면이 특정 전하 특성을 갖는 항원과 융합하거나 결합하도록 할 수도 있다. 항체, 결합 펩타이드, 가용성 수용체 및 기타 리간드와 같은 표적 인자가 융합 단백질로서 항원에 통합되거나 효모 비히클로 항원을 결합시키는 항원과 연관될 수 있다.

또 다른 양태에서, 효모 비히클과 항원은 완충 용액 또는 다른 적합한 제형에서 효모 비히클과 항원을 적절히 혼합함으로써 보다 수동적이고, 비특이적 또는 비공유 결합 메커니즘에 의해 서로 연관된다. 본 발명의 한 양태에서, 효모 비히클과 항원은 수지상 세포 또는 대식세포와 같은 담체로 세포내 로딩되어 본 발명에 따른 치료학적 조성물 또는 백신을 형성할 수 있다. 또한, 본 발명의 항원 (즉, 본 발명의 신규한 HCV 융합 단백질)은 효모 비히클이 부재한 상태로 수지상 세포로 로딩될 수 있다. 상기 두 성분의 로딩이 달성될 수 있는 다양한 형태가 이하 상세히 설명된다. 본 발명에서 용어 "로딩" 및 이의 유도체는 임의의 성분(예, 효모 비히클 및/또는 항원)이 세포(예, 수지상 세포)로 삽입, 도입 또는 유입되는 것을 의미한다. 성분을 세포내로 로딩한다는 것은 세포내 구획(예, 플라스마 멤브레인을 통하여 최소한으로 사이토플라즘, 파고솜, 리소솜 또는 세포의 다른 세포내의 공간)으로 성분을 삽입 또는 도입하는 것을 의미한다. 성분을 세포로 로딩하는 것은 상기 성분이 세포로 (예, 전기천공에 의해) 유입되도록 하거나 성분이 몇몇 과정에 의해 (예, 식균 작용) 실질적으로 세포로 유입될 수 있도록 하는 환경에 위치시키는 (예, 세포 근처 또는 세포와 접촉하여) 임의의 기술을 의미한다. 로딩 기술은 이에 제한되는 것은 아니지만, 확산, 능동 수송, 리포솜 융합, 전기 천공, 식균 작용 및 소음과 처리를 포함한다. 바람직한 양태에서, 효모 비히클 및/또는 항원을 수지상 세포로 로딩하는 수동적 메커니즘이 이용되며, 그러한 수동적 메커니즘은 수지상 세포에 의한 효모 비히클 및/또는 항원의 식세포작용을 포함한다.

전술된 HCV 융합 단백질은 효모에서 상기 단백질의 발현에 특히 유용한 N-말단 및/또는 C-말단 수정 없이 백신에 제공될 수 있다. 그러한 HCV 융합 단백질은 융합 단백질과 통상적인 애주번트의 조합, 수지상 세포와 융합 단백질의 부가, 융합 단백질을 코딩하는 DNA 또는 핵산 또는 핵산 분자를 포함하는 바이러스 백신 벡터의 제공 또는 본 발명에 따른 특정 HCV 융합 단백질 (예, 본 발명의 E1-E2 융합)로 구성된 슈도바이러스를 작제하는 것과 같이 다른 비효모계 백신에서 유용하다.

따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 HCV 감염 또는 상기 감염으로부터 야기되는 증상으로부터 동물을 보호하기 위한 조성물에 관한 것으로, 상기 (백신일 수도 있는) 조성물은 (a) (전술된 N- 및 C-말단 수정을 갖거나 갖지 않는) 하나 이상의 전술된 HCV 융합 단백질; 및 (b) (약제학적으로 허용되는 부형제 또는 애드쥬번트를 포함할 수 있는) 약제학적으로 허용된 전달 비히클을 포함한다.

본 발명의 또 다른 양태는 (전술된 N- 및 C-말단 수정을 갖거나 갖지 않는) HCV 융합 단백질을 코딩하는 핵산 작제물 (예, 바이러스 벡터 또는 다른 재조합 핵산 분자)을 포함한 DNA 또는 바이러스 벡터 백신과 같은 핵산계 백신에 관한 것이다. 상기 백신은 추가로 (약제학적으로 허용되는 부형제 또는 애드쥬번트를 포함할 수 있는) 약제학적으로 허용되는 전달 비히클을 추가로 포함할 수 있다.

본 발명의 다른 양태는 본 발명에 따른 다양한 HCV 융합 단백질, 특히 E1-E2 융합 단백질로 구성된 슈도바이러스에 관한 것이다. 본 발명에 따른 효모계 백신과 조합하여 특히 유용한 N- 또는 C-말단 수정은 여기에 포함되거나 그렇지 않을 수 있다.

본 발명의 한 양태에서, 조성물 또는 백신은 생물학적 반응 조정제 화합물 또는 그러한 조정제를 생산할 수 있는 능력을 (즉, 그러한 조정제를 코딩하는 핵산 분자로 형질전환됨으로써) 포함할 수 있지만, 그러한 조정제가 본 발명에 따른 강력한 면역 반응을 달성하는데 필수적이지 않다. 예를 들면, 효모 비히클은 적어도 하나의 항원 및 적어도 하나의 생물학적 반응 조정제 화합물로 형질전환 또는 로딩될 수 있거나, 본 발명의 백신 또는 조성물은 적어도 하나의 생물학적 반응 조정제와 접합하여 투여될 수 있다. 생물학적 반응 조정제는 면역 반응을 조절할 수 있는 화합물이며, 면역조절 화합물로서 정의될 수 있다. 특정 생물학적 반응 조정제는 보호 면역 반응을 자극하는 반면에 일부는 해로운 면역 반응을 억제할 수 있다. 특정 생물학적 반응 조정제는 세포 매개 면역 반응을 선호하여 증진시키는 한편 다른 생물학적 반응 조정제는 체액성 면역 반응을 선호하여 증진시킨다 (즉, 체액성 면역에 비해 증가된 수준의 세포성 면역이 있는 면역 반응을 자극하거나 또는 그와 반대로 자극할 수 있다). 면역 반응의 자극 또는 억제를 측정하고 체액성 면역 반응으로부터 세포성 면역 반응을 구별할 수 있는 다양한 기술이 당업계에 공지되어 있다.

적합한 생물학적 반응 조정제는 사이토카인, 호르몬, 리피드의 유도체, 작은 분자 약물 및 이에 제한되는 것은 아니지만, 인터루킨 2(IL-2), 인터루킨 4(IL-4), 인터루킨 10(IL-10), 인터루킨 12(IL-12), 인터페론 감마(IFN- γ), 인슐린 유사 성장 인자 I(IGF-I), 형질전환 성장 인자 베타(TGF- β) 스테로이드, 프로스타글란딘 및 류코트리엔과 같은 다른 성장 조

정제를 포함한다. IL-2, IL-12 및/또는 IFN 감마를 생산하는 (즉, 발현하는) 그리고 가능한 분비하는 효모 비히클의 능력은 세포 매개 면역을 증진시키는 한편, IL-4, IL-5 및/또는 IL-10을 발현하고 가능한 분비하는 효모 비히클의 능력은 체액성 면역을 증진시킨다. 다른 적합한 생물학적 반응 조절제는 이에 제한되는 것은 아니지만, 항 CTLA-4 항체 (예, 아네르기 T 세포를 방출하기 위하여); T 세포 공조 자극제 (예, 항-CD137, 항-CD28, 항-CD40); 알렘투주맵 (예, CamPath®), 테니루킨 디프티톡스 (예, ONTAK®), 항-CD4, 항-CD25, 항-PD-1, 항-PD-L1, 항-PD-L2 또는 FOXP3을 차단하는 인자 (예, CD4+/CD25+ T 제어 세포를 활성의 제거/살상을 위하여); Flt3 리간드, 이미퀴모드 (Aldara®), GM-CSF, 사르그라모스틴 (Leukine®), Toll 유사 수용체 (TLR)-7 작용제 또는 TLR-9 작용제 (예, 수지상 세포, 대식세포 및 기타 전문적인 항원-제시 세포의 개수를 증가시키거나 활성 상태를 증가시키기 위한 인자). 그러한 생물학적 반응 조절제는 당업계에 공지되어 있고 대중적으로 이용 가능하다.

본 발명의 조성물 및 치료 백신은 HCV 감염으로부터 개체를 보호하거나 그러한 감염의 증상을 치료하거나 완화시키는 다른 화합물을 추가로 포함할 수 있다.

전술된 바와 같이 본 발명은 HCV 융합 단백질 또는 그러한 HCV 융합 단백질을 코딩하는 핵산 분자가 통상적인 또는 비효모계 조성물 또는 백신과 같이 본 발명의 효모 비히클이 부재한 조성물 또는 백신에서의 이용을 포함한다. 상기 조성물은 HCV 융합 단백질에 더하여 애주번트와 같은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 효모계 백신은 약제학적으로 허용되는 담체와 접합하여 제공될 수 있다.

본 발명에서 약제학적으로 허용되는 담체는 본 발명의 방법에서 유용한 HCV 융합 단백질을 적합한 생체내 또는 생체의 부위로 전달하기에 적합한 물질 또는 비히클을 의미한다. 상기 담체는 이에 제한되는 것은 아니지만, 애주번트, 부형제 또는 다른 유형의 전달 비히클 또는 담체를 포함할 수 있다.

애주번트는 일반적으로 특정 항원에 대한 동물의 면역 반응을 증진시키는 성분이다. 적합한 애드주번트는 이에 제한되는 것은 아니지만 프로인트 애드주번트; 기타 박테리아의 세포벽 성분; 알루미늄염; 칼슘염; 실리카; 폴리뉴클레오타이드; 유독소; 혈청 단백질; 바이러스의 코트 단백질; 기타 박테리아 유래의 조제물; 감마 인터페론; 헌터 티터맥스 애주번트 (Hunter's Titermax Adjuvant, CytRxTM, Inc. Norcross, GA)와 같은 블록 혼성중합체 애주번트; 리비 애주번트 (Ribi Adjuvant, Ribi ImmunoChem Research, Inc. Hamilton, MT로부터 입수 가능); 및 사포닌과 퀴일 A (Quil A, Superfos Biosector A/S, Denmark로부터 입수 가능함)와 같은 유도체를 포함한다.

담체는 일반적으로 치료되는 동물에서 치료 조성물의 반감기를 증가시키는 화합물이다. 적합한 담체는 이에 제한되는 것은 아니지만, 중합체의 제어 방출 제형, 생물분해성 이식물, 리포솜, 오일, 에스테르 및 글리콜을 포함한다.

본 발명의 치료 조성물은 또한 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함할 수 있다. 본 발명에서 약제학적으로 허용되는 부형제는 본 발명의 방법에서 이용되는 치료 조성물을 생체내 또는 생체의 부위에 전달하는데 적합한 임의의 성분을 의미한다. 바람직한 약제학적으로 허용되는 부형제는 조성물 (또는 효모 비히클 또는 효모 비히클을 포함한 수지상 세포)이 신체내 표적 세포, 조직 또는 부위에 도달하자마자 그 표적 부위에서 면역 반응을 유도할 수 있는 형태로 상기 조성물을 유지할 수 있다. 본 발명의 적합한 부형제는 백신을 한 부위로 특정하게 표적화하지 않지만, 운반하는 부형제 또는 방식을 포함한다 (또한, 비특이적인 담체로 정의된다). 약제학적으로 허용되는 부형제의 예로는 이에 제한되는 것은 아니지만, 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 링거 용액, 텍스트로스 용액, 혈청 함유 용액, 한스 용액, 기타 수용성의 생리학적 평형 용액, 오일, 에스테르 및 글리콜 등이 포함된다. 수용성 담체는 예를 들면 화학적 안정성 및 등장성을 증진시킴으로써 수령자의 생리학적 조건에 근접시키는데 요구되는 적합한 보조 성분을 포함할 수 있다. 적합한 보조 성분은 예를 들면, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드, 소듐 락테이트, 포타슘 클로라이드, 칼슘 클로라이드 및 포스페이트 완충제, 트리스 완충제 및 비카르보네이트 완충제를 생산하는데 이용되는 다른 성분을 포함한다. 보조 성분은 또한, 티머로살, m- 또는 o-크레솔, 포르말린 및 벤졸 알코올과 같은 보조제를 포함할 수 있다.

본 발명에 따른 방법

본 발명의 다른 양태는 HCV 감염에 대하여 또는 이로부터 야기되는 질병에 대하여 동물을 보호하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 HCV 감염 또는 이로부터 야기되는 적어도 하나의 증상을 감소 또는 예방하기 위하여 HCV를 앓고 있거나 HCV 감염으로 발달할 위험에 있는 동물에게 본 발명에 따른 백신 또는 조성물을 투여하여 HCV 감염 또는 상기 동물에서 HCV 감염으로부터 야기되는 적어도 하나의 증상을 감소 또는 예방하는 단계를 포함한다.

본 발명의 또 다른 양태는 동물에서 항원 특이적인 체액성 면역 반응 및/또는 항원 특이적 세포 매개 면역 반응을 유발하기 위한 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 본 발명의 백신 또는 조성물을 동물에게 투여하는 것을 포함한다. 본 발명의 방법은 동물에서 항원 특이적인 세포 매개 면역 반응을 유발한다.

상기 양태에서, 백신 또는 조성물은 (1) (a) 효모 비히클; 및 (b) 하나 이상의 전술된 HCV 융합 단백질을 포함하는 조성물; 및/또는 (2) (a) 하나 이상의 전술된 HCV 융합 단백질; 및 (b) (약제학적으로 허용되는 부형제 또는 애드주번트를 포함하거나 이를 수 있는) 약제학적으로 허용되는 전달 비히클; 및/또는 (3) 하나 이상의 전술된 HCV 융합 단백질을 코딩하는 분리된 핵산 분자 (예, DNA 작제물, 벡터, 바이러스 벡터); 및/또는 (4) (a) 효모 비히클 및/또는 (b) 하나 이상의 HCV 융합 단백질을 (부가한) 포함한 분리된 수지상 세포 (예, 자가 수지상 세포); 및/또는 (5) 전술된 HCV 항원 단백질을 포함하는 E1-E2로 구성된 HCV 슈도바이러스를 포함할 수 있다.

본 발명의 한 양태에서, 본 발명의 백신 또는 조성물은 통상적인 백신 또는 조성물을 포함하여 하나 이상의 다른 백신 또는 면역치료 조성물의 투여를 포함하는 프로토콜로 투여될 수 있다. 예를 들어, 그러한 다른 백신 또는 면역치료 조성물은 HCV 항원을 코딩하는 DNA 백신 또는 HCV 항원을 포함하는 기타 바이러스 백신과 같은 항원을 포함하는, 항원을 코딩하는, 항원을 발현하는 조성물을 포함할 수 있다. 백신을 위한 바이러스 벡터가 당업계에 공지되어 있으며, 이에 제한되는 것은 아니지만, 폭스 바이러스(바시니아, 카나리 아비폭스), 아데노바이러스, 아데노연관 바이러스, 알파 바이러스(Sindbis, VEE)를 포함한다. 단백질계 백신을 포함한 다른 유형의 백신이 이러한 양태에 의해 포함된다. 한 측면에서, 통상적인 백신 또는 본 발명의 일부가 아닌 백신 또는 효모 비히클을 포함하지 않는 본 발명의 백신 (예, 약제학적으로 허용되는 담체와 조합된 본 발명에 따른 신규한 HCV 융합 단백질 또는 본 발명에 따른 신규한 HCV 융합 단백질을 코딩하는 DNA 백신을 포함하는 백신)은 HCV 항원에 대한 개체의 면역 반응을 초회감작하기 위하여 초기에 투여될 수 있다. 이어서, 본 발명의 백신 또는 조성물, 특히 본 발명에 따른 효모계 백신이 면역 반응을 부스트하기 위하여 개체에 투여될 수 있다. 또한, 특히 본 발명에 따른 효모계 백신을 포함한 본 발명의 백신 또는 조성물은 면역 반응을 초회감작하기 위하여 개체에 투여될 수 있으며, 통상적인 또는 다른 백신 또는 조성물 (예, 본 발명에 따른 신규한 HCV 융합 단백질을 포함하는 비효모계 백신 또는 본 발명의 신규한 HCV 융합 단백질을 코딩하는 DNA 백신)이 상기 반응을 부스트하기 위하여 이용될 수 있다.

본 발명에 따른 치료 조성물 또는 백신의 이용 방법은 동물에서 면역 반응을 유발하여 동물이 HCV 감염 또는 HCV 감염으로부터 야기되는 질병 용태 또는 증상으로부터 보호되도록 한다. 본 발명에서 문구 "질병으로부터 보호된"이란 질병의 증상이 감소하는 것; 질병의 발병이 감소하는 것 및/또는 질병의 심도가 감소하는 것을 의미한다. 동물을 보호한다는 것은 본 발명에 따른 치료 조성물이 동물에게 투여되었을 때, 질병의 발병을 예방하고/거나 질병의 징후, 신호 또는 원인을 치료하거나 완화시킬 수 있는 능력을 의미할 수 있다. 질병으로부터 동물을 보호한다는 것은 질병의 발병을 예방하고 (예방적 치료 또는 예방적 백신) 질병을 보유하거나 질병의 초기 징후를 가진 동물을 치료하는 (치료적 치료 또는 치료적 백신) 것을 포함한다. 특히, 동물을 질병으로부터 보호한다는 것은 일부 경우에는 과잉반응 또는 해로운 면역 반응을 추가로 억제하는 (즉, 감소, 억제 또는 차단) 이로온 또는 보호적 면역 반응을 유도하여 동물에서 면역 반응을 유발함으로써 달성된다. 용어 "질병"은 동물의 정상적인 건강에서의 이탈을 의미하며, 질병 징후가 존재하는 상태 뿐만 아니라 이탈(예, 감염, 유전자 돌연변이, 유전자 결핍 등)이 일어났지만 증상이 아직 드러나지 않은 용태를 포함한다.

한 양태에서, 본 발명의 백신은 HCV로 감염된 개인 또는 개인의 모집단에게 투여된다. 다른 양태에서, 본 발명의 백신은 HCV에 감염될 위험에 있는 개인 또는 개인의 모집단에게 투여된다. 상기 개인은 예를 들면 개인의 정상 또는 전체 모집단보다 HCV 감염에 더 높은 위험에 있는 것으로 동정된 모집단을 포함할 수 있다. 상기 모집단은 적합한 변수에 의해 정의될 수 있다. 다른 양태에서, 본 발명의 백신은 공지되거나 예상된 감염 상태 또는 HCV로 감염될 감수성에 상관없이 개인 또는 개인의 모집단에게 투여된다.

보다 자세하게, 본 발명의 백신이 본 발명에 따른 방법에 의해 동물에게 투여되었을 때 바람직하게는 질병의 완화 (예, 질병의 적어도 하나의 징후 또는 임상 소견의 감소), 질병의 제거, 일차 질병의 발병으로부터 야기되는 이차 질병의 예방 또는 완화, 질병의 예방 및 질병에 대한 효과기 세포 면역의 자극을 포함한 결과를 발생시킨다.

본 발명은 동물에게 본 발명의 조성물 또는 백신을 전달하는 것을 포함한다. 투여 과정은 생체의 또는 생체 내에서 수행될 수 있다. 생체의 투여는 효모 비히클과 항원이 세포에 로딩되도록 특정 용태중인 환자로부터 제거된 세포(수지상 세포)의 집단에게 본 발명의 조성물을 투여하고 그 세포를 환자에게 되돌리는 것과 같은 환자의 외부에서 조절 단계의 일부를 수행하는 것을 의미한다. 본 발명의 치료 조성물은 임의의 적합한 투여 모드에 의해 환자에게 되돌려지거나 환자에게 투여될 수 있다.

효모 비히클과 항원으로 로딩된 수지상 세포, 효모 비히클 단독 또는 신규한 HCV 융합 단백질을 함유한 조성물을 포함하는 백신 또는 조성물의 투여는 단독으로 또는 본 발명의 담체와 조합되어 전신으로, 점막으로 및/또는 표적 부위에 근접하도록 (예, 종양 근처로) 수행될 수 있다. 바람직한 투여의 경로는 예방 또는 치료될 용태의 유형, 사용되는 항원 및/또는 표적 세포의 집단 또는 조직에 따라 달라지지만, 당업자에게 자명할 것이다. 바람직한 투여 방법은 이에 제한되는 것은 아니지만, 정맥내 투여, 복강내 투여, 근육내 투여, 결절내(intranodal) 투여, 치관내 투여, 동맥내 투여 (예, 목동맥으로), 피하내 투여, 경피 전달, 기관내 투여, 피하내 투여, 관절내 투여, 심실내 투여, 흡입 (예, 에어로졸), 두개골내, 척수강내, 안구내, 귀내(aural), 비강내, 경구, 폐포내 투여, 카테터(catheter)의 주입 및 조직으로의 직접 주입을 포함한다. 특히 바람직한 투여 경로는 정맥내, 복강내, 피하내, 피내, 결절내, 근육내, 경피, 흡입, 비강내, 경구, 안구내, 관절내, 두개골내 및 척수강내를 포함한다. 비경구 전달은 피내, 근육내, 복강내, 가슴막내, 폐포내, 정맥내, 피하내, 동맥 카테터 및 정맥의 카테터 경로를 포함할 수 있다. 귀내 전달은 이어 드롭(ear drop)을 포함하거나, 비강내 전달은 노즈 드롭(nose drop) 또는 비강내 주입을 포함하거나, 안구내 전달은 아이 드롭(eye drop)을 포함할 수 있다. 에어로졸 (흡입) 전달은 당업계에 공지된 표준 방법을 사용하여 수행할 수 있다(예를 들어 Stribling et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 189:11277-11281, 1992, 이의 전문은 본 발명에서 참조로 인용된다). 예를 들면, 한 양태에서, 본 발명의 조성물 또는 백신은 적합한 흡입 장치 또는 분무기를 이용하는 분무식 전달에 적합한 조성물로 제형화될 수 있다. 구강 전달은 입을 통하여 섭취될 수 있는 고체 및 액체를 포함할 수 있고, 점액 면역의 발달과 효모 비히클을 함유하는 조성물은 예를 들면, 구강 전달용 정제 또는 캡슐로서 용이하게 제조될 수 있을 뿐만 아니라 식품 및 음료 생산물로 제형화될 수도 있기 때문에 유용하다. 점액의 면역을 조정하는 다른 투여 경로는 바이러스에 의한 감염의 치료에 유용하다. 그러한 경로는 기관지내, 경피내, 근육내, 비강내, 다른 흡입식, 직장, 피하내, 국소, 경피, 질 및 요도 경로를 포함한다.

본 발명의 한 양태에서, 백신은 호흡기 계통으로 투여된다. 다른 양태에서, 백신은 투여의 비경구 경로에 의해 투여된다. 또 다른 양태에서, 백신은 추가로 수지상 세포 또는 대식세포를 포함하되, 융합 단백질을 발현하는 효모 비히클은 생체의에서 수지상 세포 또는 대식세포로 전달되고 HCV 항원을 발현하는 효모 비히클을 포함하는 수지상 세포 또는 대식세포가 동물에게 투여된다. 이러한 양태의 한 측면에서, 수지상 세포 또는 효모 비히클은 자유 항원으로 추가로 로딩되었다. 한 측면에서, 백신은 치료 백신으로서 투여된다. 다른 측면에서, 백신은 예방 백신으로서 투여된다.

본 발명에서 효과적인 투여 프로토콜 (즉, 효과적인 방식으로 백신 또는 치료 조성물을 투여하는 것)은 질병 또는 용태를 가지고 있거나, 질병 또는 용태로 발전할 위험을 가진 동물에서 면역 반응을 유도하여 바람직하게는 그 결과로 동물이 상기 질병으로부터 보호되는 적합한 용량 변수 및 투여 모드를 포함한다. 효과적인 용량 변수는 특정 질병과 관련하여 당업계에 공지된 표준 방법을 사용하여 결정할 수 있다. 그러한 방법은 예를 들면, 생존율, 부작용(즉, 독성) 및 질병의 진행 또는 퇴행의 확인을 포함한다.

본 발명에서 적합한 단일 용량은 동물에게 적합한 기간에 걸쳐서 한 차례 이상 투여되었을 때 항원 특이적 면역 반응을 유발할 수 있는 용량이다. 용량은 치료되는 질병 또는 용태에 따라 매우 달라진다. 예를 들면, 한 양태에서, 본 발명에 따른 효모 비히클의 단일 용량은 조성물이 투여되는 유기체의 체중 1 킬로그램 당 약 1×10^5 내지 약 5×10^7 의 효모 세포 등가물이다. 바람직한 양태에서 용량당 효모 세포는 유기체의 체중에 맞게 조절되지 않는다. 이러한 양태에서, 본 발명에 따른 효모 비히클의 단일 용량은 용량당 약 1×10^4 내지 약 1×10^9 의 효모 세포이다. 보다 바람직하게는 본 발명에 따른 효모 비히클의 단일 용량은 용량 당 (즉, 유기체 당) 약 0.1 Y.U. (1×10^6 세포) 내지 약 100 Y.U. (1×10^9 세포)이며, 0.1×10^6 세포의 증가분(즉, 1.1×10^6 , 1.2×10^6 , 1.3×10^6 ...)으로 임의의 중간 용량을 포함한다. 이러한 용량의 범위는 마우스, 원숭이, 사람 등을 포함한 임의의 크기의 임의의 유기체에서 효과적으로 이용될 수 있다.

백신이 효모 비히클과 항원이 수지상 세포로 로딩됨으로써 투여되는 경우에 본 발명에 따른 백신의 바람직한 단일 용량은 1회 투여시 개인당 약 0.5×10^6 내지 약 40×10^6 의 수지상 세포이다. 바람직하게는 단일 용량은 개인당 약 1×10^6 내지 20×10^6 의 수지상 세포이고, 보다 바람직하게는 개인당 1×10^6 내지 10×10^6 의 수지상 세포이다.

백신이 본 발명의 융합 단백질 및 담체를 포함할 경우에, 바람직한 단일 용량은 약 0.01 마이크로그램 x 동물 체중의 킬로그램⁻¹ 내지 약 10 밀리그램 x 동물 체중의 킬로그램⁻¹이다. 더 바람직한 단일 용량은 약 1 마이크로그램 x 동물 체중의 킬로그램⁻¹ 내지 약 10 밀리그램 x 동물 체중의 킬로그램⁻¹을 포함한다. 보다 더 바람직한 단일 용량은 약 5 마이크로그램 x 동물 체중의 킬로그램⁻¹ 내지 약 7 밀리그램 x 동물 체중의 킬로그램⁻¹을 포함한다. 더욱 더 바람직한 단일 용량은 약 10 마이크로그램 x 동물 체중의 킬로그램⁻¹ 내지 약 5 밀리그램 x 동물 체중의 킬로그램⁻¹을 포함한다. 에어로졸에 의해 전달

된다면, 특히 바람직한 단일 용량은 약 0.1 밀리그램 x 동물 체중의 킬로그램⁻¹ 내지 약 5 밀리그램 x 동물 체중의 킬로그램⁻¹을 포함한다. 비경구적으로 전달된다면, 특히 바람직한 단일 용량은 약 0.1 마이크로그램 x 동물 체중의 킬로그램⁻¹ 내지 약 10 마이크로그램 x 동물 체중의 킬로그램⁻¹을 포함한다.

치료 조성물의 "부스터"는 항원에 대한 면역 반응이 특정 항원 또는 항원에 대한 면역 반응을 제공하거나 기억 반응(memory response)을 유도하는 것이 요구되거나 필요한 경우에 바람직하게 투여된다. 부스터는 최초 투여 후 약 2주 내지 여러 해에 걸쳐서 투여될 수 있다. 한 양태에서, 투여 스케줄은 유기체의 체중 1kg 당 조성물 중 약 1×10^5 내지 약 5×10^7 의 효모 세포 등가물이 약 1 개월 내지 약 6개월의 기간에 걸쳐서 약 1 회 내지 약 4회 투여되는 것이다.

본 발명에 따른 방법에서 백신 및 치료 조성물은 척추동물 부류, 특별한 제한 없이 영장류, 설치류, 가축 및 애완동물을 포함한 포유동물에 투여할 수 있다. 가축은 소비되거나 유용한 생산물을 생산하는 동물(예, 우를 생산하는 양)을 포함한다. 보호될 바람직한 포유동물은 사람, 개, 고양이, 마우스, 래트, 염소, 양, 소, 말 및 돼지를 포함하며, 사람이 특히 바람직하다. 본 발명에서 "환자" 또는 "개체"는 여기서 설명된 진단, 예방적 또는 치료적 치료의 대상이 되는 임의의 동물을 기술하는데 사용될 수 있다.

분리된 융합 단백질, 핵산 및 세포

본 발명의 다른 양태는 HCV 항원을 포함하는 분리된 융합 단백질을 포함하여 분리된 단백질을 포함한다. 또한, 본 발명에서는 상기 단백질을 코딩하는 분리된 핵산 분자, 상기 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함한 재조합 핵산 분자, 그러한 핵산 분자 또는 재조합 핵산 분자를 포함하거나 형질감염/형질전환된 세포 및 바이러스 벡터를 포함한 벡터를 포함한다.

본 발명에서 분리된 단백질 또는 폴리펩타이드는 전장 단백질, 융합 단백질 또는 그러한 단백질의 단편, 도메인, 구조형 에피토프 또는 상동체를 포함한다. 보다 자세하게 본 발명에 따른 분리된 단백질은 그의 천연 환경으로부터 분리된(즉, 인간이 조작이 가해진)(폴리펩타이드 또는 펩타이드를 포함한) 단백질이며, 예를 들면 정제 단백질, 부분적으로 정제된 단백질, 재조합으로 제조된 단백질, 합성하여 제조된 단백질을 포함할 수 있다. 그에 따라 "분리된"이란 단백질이 분리된 정도까지 반영하지는 않는다. 바람직하게는 본 발명의 분리된 단백질은 재조합으로 생산된다. 본 발명에서 용어 "변형" 및 "돌연변이"는 본 발명에 언급된 단백질 또는 이의 일부의 아미노산 서열(또는 핵산 서열)에 대한 변형/돌연변이의 경우에는 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

본 발명에서 용어 "상동체"는 천연적으로 존재하는 단백질 또는 펩타이드에 대한 하나 이상의 미미한 변형 또는 돌연변이에 의해 상기 천연적으로 존재하는 단백질 또는 펩타이드(즉, "프로토타입" 또는 "야생형" 단백질)와 상이하지만, 천연적으로 존재하는 형태의 측쇄(side chain) 구조와 전반적인 기본 단백질을 유지하는 단백질 또는 펩타이드를 의미하는데 이용된다. 그러한 변화는 이에 제한되는 것은 아니지만, 하나 또는 몇 개 아미노산 측쇄에서 변화; 결실(예를 들면 단백질 또는 펩타이드의 절단된 형태), 삽입 및/또는 치환을 포함한 하나 또는 몇 개 아미노산의 변화; 하나 또는 몇 개 원소의 입체화학에서의 변화; 및/또는 이에 제한되는 것은 아니지만, 메틸화, 당쇄화, 인산화, 아세틸화, 미리스틸화, 프레닐화, 팔미토일화, 아미드화 및/또는 글리코실포스파티딜 이노시톨의 첨가를 포함한 미미한 파생화를 포함한다. 상동체는 천연적으로 존재하는 단백질 또는 펩타이드와 비교하였을 때 증진된, 감소된 또는 실질적으로 유사한 성질을 가진다. 상동체는 단백질의 작용제 또는 단백질의 길항제를 포함할 수 있다. 상동체는 분리된 천연적으로 존재하는 단백질에 대한 직접적인 수정, 단백질의 직접 합성 또는 예를 들면 무작위적이거나 표적화된 돌연변이를 일으키기 위한 전통적 또는 재조합 DNA 기술을 사용하여 단백질을 코딩하는 핵산 서열에 대한 변형을 포함하여 단백질의 제조를 위해 당업계에 공지된 기술을 사용하여 제조될 수 있다.

한 측면에서, 본 발명에 따른 단백질 또는 도메인 및/또는 상동체 또는 이의 단편의 최소 크기는 본 발명의 융합 단백질 또는 조성물에서 항원 또는 면역원으로 작용하거나, 시험관 내 분석법에서 표적으로 작용하는 것과 같이 필요한 생물학적 활성을 가지기에 충분한 크기이다. 한 양태에서, 본 발명의 단백질은 본 발명에 따른 단백질의 적어도 약 8개의 아미노산, 적어도 약 25개의 아미노산, 적어도 약 30개의 아미노산, 적어도 약 40개의 아미노산, 적어도 약 50개의 아미노산, 적어도 약 75개의 아미노산, 적어도 약 100개의 아미노산, 적어도 약 125개의 아미노산, 적어도 약 150개의 아미노산, 적어도 약 175개의 아미노산, 적어도 약 200개의 아미노산, 적어도 약 250개의 아미노산, 적어도 약 300개의 아미노산, 적어도 약 350개의 아미노산, 적어도 약 400개의 아미노산, 적어도 약 450개의 아미노산, 적어도 약 500개의 아미노산, 적어도 약 550개의 아미노산, 적어도 약 600개의 아미노산 등, 본 발명의 단백질의 8개 아미노산 내지 전장에 이르는 전체 정수(예,

8, 9, 10...25, 26...102, 103,...)로 단백질의 조합 또는 이의 일부의 전장 또는 더 길 수 있다. 단백질의 최대 크기에 대해서는 통상적인 제한 이외의 특별한 제한은 없어서, 단백질은 단백질의 일부, 기능성 도메인 또는 이의 생물학적으로 활성이거나 유용한 단편 또는 전장의 단백질 또는 단편, 목적이란 더해진 추가 서열을 포함할 수 있다.

본 발명에 따른 바람직한 융합 단백질은 본 발명에서 설명된 융합 단백질을 포함한다. 본 발명에 의해 포함되는 예시적 융합 단백질을 서열번호: 2, 서열번호: 4, 서열번호: 6, 서열번호: 8, 서열번호: 12, 서열번호: 14, 서열번호: 16, 서열번호: 18로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 이루어지거나, 이루어지는 융합 단백질을 포함한다. 다양한 HCV 단백질 서열이 당업계에 공지되어 있으므로 다른 융합 단백질은 본 발명에서 제공된 지침이 주어진 바 당업자에 게 자명할 것이다.

본 발명은 본 발명의 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 이루어지거나, 이루어지는 핵산 분자를 포함한다. 본 발명에서, 분리된 핵산 분자는 이의 천연 환경 즉, 상기 핵산 분자가 천연에서 위치하는 게놈 또는 염색체인 그것의 천연 환경으로부터 제거된 (즉, 인간의 조작이 가해진) 핵산 분자이다. 이에 "분리된"은 핵산 분자가 정제된 정도를 필수적으로 반영하지는 않지만, 상기 분자는 상기 분자가 천연적으로 존재하는 전체 게놈 또는 전체 염색체를 포함하지 않는다는 것을 의미한다. 분리된 핵산 분자는 유전자를 포함할 수 있다. 유전자를 포함하는 분리된 핵산 분자는 그 유전자를 포함하는 염색체의 단편이 아니라 동일한 염색체에 천연적으로 존재하는 추가 유전자 없이 상기 유전자와 관련된 코딩 영역과 조절 영역을 포함한다. 분리된 핵산 분자는 천연에서 특정된 핵산 서열의 측면에 정상적으로 위치하는 않는 (즉, 이형성의 서열) 추가 핵산이 측면 (즉, 서열의 5' 및/또는 3'의 말단)에 위치하는 특정한 핵산 서열을 또한 포함할 수 있다. 분리된 핵산 분자는 DNA, RNA(예, mRNA), 또는 DNA 또는 RNA 중 어느 하나의 유도체(예, cDNA)를 포함할 수 있다. "핵산 분자"는 일차적으로 물리적인 핵산 분자를 의미하는 것이고 "핵산 서열"은 일차적으로 핵산 분자의 뉴클레오타이드 서열을 의미하는 것이지만, 상기 두 문구는 특히 단백질 또는 단백질의 도메인을 코딩할 수 있는 핵산 분자 또는 핵산 서열이라는 관점에서 상호교환적으로 사용될 수 있다.

바람직하게는 본 발명에 따른 분리된 핵산 분자는 재조합 DNA 기술(예, 중합효소연쇄반응(PCR) 증폭, 클로닝) 또는 화학적 합성법을 이용하여 제조할 수 있다. 분리된 핵산 분자는 천연의 핵산 분자 및 뉴클레오타이드가 삽입, 결실, 치환 및/또는 역위되어 이러한 변형이 원하는 목적을 제공하도록 변형된 핵산 분자를 포함한 상동체를 포함한다. 단백질 상동체 (예, 핵산 분자 상동체에 의해 코딩된 단백질)는 앞에서 설명되었다.

핵산 분자 상동체는 당업계에 공지된 다양한 방법을 이용하여 제조될 수 있다(예를 들어 상기 문헌 Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989). 예를 들어 핵산 분자는 이에 제한되는 것은 아니지만, 위치 지정 돌연변이, 핵산 분자에 돌연변이를 유발할 수 있는 화합물을 처리, 핵산 단편의 효소 처리에 의한 절단, 핵산 단편의 라이게이션, PCR 증폭 및/또는 핵산 서열의 선별된 영역의 돌연변이 유발, 올리고뉴클레오타이드 혼합물의 합성과 핵산 분자의 혼합체를 "세우기" 위한 혼합군의 라이게이션 및 이들의 조합과 같은 전통적인 돌연변이 유발 기술 및 재조합 DNA 기술을 포함한 다양한 기술을 사용하여 변형될 수 있다. 핵산 분자 상동체는 그 핵산 분자에 의해 코딩된 단백질의 기능에 대하여 스크리닝 및/또는 야생형 유전자와의 혼성화에 의해 변형된 핵산의 혼합물로부터 선택할 수 있다.

본 발명의 융합 단백질을 발현하는 재조합 핵산 분자는 형질감염될 세포내에서 하나 이상의 융합 단백질을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 분자의 발현을 효과적으로 조절할 수 있는 적어도 하나의 전사 조절 서열에 작동가능하게 연결된 상기 핵산 분자를 포함할 수 있는 분자이다. "핵산 분자"는 일차적으로 물리적인 핵산 분자를 의미하는 것이고 "핵산 서열"은 일차적으로 핵산 분자의 뉴클레오타이드 서열을 의미하는 것이지만, 상기 두 문구는 특히 단백질을 코딩할 수 있는 핵산 분자 또는 핵산 서열이라는 관점에서 상호교환적으로 사용될 수 있다. 또한 본 발명에서 용어 "재조합 분자"는 일차적으로 전사 조절 서열에 작동가능하게 연결된 핵산 분자를 의미하는 것이지만, 동물에게 투여되는 용어 "핵산 분자"와 상호교환적으로 이용될 수 있다.

재조합 발현 벡터는 핵산 서열, 일반적으로 외인성 서열이고, 본 발명의 융합 단백질을 코딩하는 분리된 핵산 분자에 작동가능하게 연결되며, 융합 단백질의 재조합 생산을 가능하게 하며, 본 발명에 따른 숙주 세포로 핵산 분자를 전달할 수 있는 재조합 벡터를 포함한다. 상기 벡터는 벡터로 삽입될 분리된 핵산 분자에 인접하여 천연적으로 존재하지 않는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 상기 벡터는 RNA 또는 DNA이거나, 원핵 또는 진핵일 수 있으며, 본 발명에서는 바람직하게는 바이러스 또는 플라스미드이다. 재조합 벡터는 핵산 분자의 클로닝, 서열분석 및/또는 이외의 조작에 이용될 수 있고, (예, DNA 백신 또는 바이러스 벡터에 백신처럼) 상기 분자의 전달에 이용될 수 있다. 재조합 벡터는 핵산 분자의 발현에 바람직하게 이용되며, 또한 발현 벡터로 정의될 수 있다. 바람직한 재조합 벡터는 형질감염된 숙주 세포에서 발현될 수 있다.

본 발명의 재조합 분자에서 핵산 분자는 전사 조절 서열, 해독 조절 서열, 복제 기원(origin of replication) 및 효모 세포와 양립할 수 있는(compatible) 핵산 분자의 발현을 조절하는 기타 조절 서열과 같은 조절 서열을 포함한 발현 벡터에 작동가능하게 연결된다. 특히, 본 발명의 재조합 분자는 하나 이상의 전사 조절 서열에 작동가능하게 연결된 핵산 분자를 포함한다. 용어 "작동가능하게 연결된"이란 핵산 분자가 숙주 세포로 형질감염(즉, 형질전환, 형질도입 또는 형질감염)되었을 때 발현될 수 있는 방식으로 상기 핵산 분자가 전사 조절 서열에 연결된 것을 의미한다.

전사 조절 서열은 전사의 개시, 연장 및 종료를 조절하는 서열이다. 특히 중요한 전사 조절 서열은 프로모터, 인핸서, 오퍼레이터 및 리프레서 서열과 같은 전사 조절을 개시하는 것이다. 적합한 전사 조절 서열은 본 발명에 따른 숙주 세포에서 기능할 수 있는 전사 조절 서열을 포함한다. 당업자에게는 다양한 적합한 전사 조절 서열이 공지되어 있다.

본 발명에서 용어 "형질감염"은 외인성 핵산 분자(즉, 재조합 핵산 분자)를 세포내로 삽입할 수 있는 임의의 방법을 의미한다. 용어 "형질전환"은 이 용어가 핵산 분자를 조류, 박테리아 및 효소와 같은 미생물 또는 식물 세포로 도입하는데 이용할 경우 용어 "형질감염"과 상호교환적으로 이용될 수 있다. 미생물 시스템에서 용어 "형질전환"은 미생물 또는 식물에 의한 외인성 유전자의 습득으로 인한 유전되는 변화를 설명하는데 이용되며 "형질감염"과 본질적으로 같은 의미이다. 따라서, 형질감염 기술은 이에 제한되는 것은 아니지만, 형질전환, 세포의 화학적 처리, 입자 사격(particle bombardment), 전기천공, 미세주입, 리포펙션(lipofection), 흡수, 감염 및 원형질체 융합을 포함한다.

본 발명의 재조합 핵산 분자에 유용한 한 유형의 재조합 벡터는 재조합 바이러스 벡터이다. 그러한 벡터는 투여 후에 동물 또는 생체 외에서 숙주 세포에서 발현될 바이러스 코트에 패키징되는(packaged) 본 발명의 융합 단백질을 코딩하는 재조합 핵산 서열을 포함한다. 이에 제한되는 것은 아니지만, 알파바이러스, 폭스 바이러스, 아데노바이러스, 헤르페스바이러스, 렌티바이러스, 아데노연관 바이러스 및 레트로바이러스를 기반으로 한 것을 포함한 다양한 재조합 바이러스 벡터가 이용될 수 있다. 특히 바람직한 바이러스 벡터는 아데노바이러스 및 아데노연관 바이러스를 기반으로 한다. 유전자 전달에 적합한 바이러스 벡터는 당업계에 공지되어 있으며, 본 발명에서 이용을 위하여 당업자에 의해 선별될 수 있다. 현재 바이러스 벡터에 대한 상세한 사항은 "Molecular Biotechnology," Second Edition, by Glick and Pasternak, ASM Press, Washington D.C., 1998, pp. 555-590에 제공되며, 이의 전문이 본 발명의 참조로서 인용된다.

본 발명에 따른 재조합 핵산 분자로 형질감염할 적합한 숙주 세포는 동물, 곤충, 박테리아, (효모를 포함한) 곰팡이 세포를 포함하여 형질감염 또는 형질전환될 세포를 포함한다. 한 양태에서, 숙주 세포는 본 발명의 융합 단백질로 형질감염되고 발현하는 조양 세포를 포함한 동물 세포이다. 그러한 세포는 실시예 부분에서 예시되며, 본 발명의 백신 또는 조성물에 의해 유도된 항원 특이적 T 세포 반응을 평가하는데 유용하다. HCV 항원에 대한 다른 백신 또는 조성물도 그러한 형질감염된 종양 세포에서 검사될 수 있다.

실시예

하기 실험 결과들은 예시의 목적으로 제공된 것이며, 본 발명의 범위를 제한하도록 의도된 것이 아니다.

실시예

실시예 1

하기 실시예는 본 발명에 따른 절단된 NS3-코어 융합 단백질 효모 백신인 GI-5005의 조작을 설명한다.

GI-5005 사카로미세스 세레비시에는 구리 유도성 프로모터 *CUP1*의 제어하에서 HCV NS3-코어 융합 단백질을 발현하도록 조작하였다. (유전형 1a, H77 균주, cDNA는 NIH에 의해 제공된) HCV 게놈의 두 영역은 생산물을 생성하기 위하여 PCR에 의해 증폭되었다. NS3-코어 융합 단백질은 N-부터 C-말단에 이르는 프레임 내에서 융합된 하기 서열 요소를 가지는 단일 폴리펩타이드이다 (서열번호: 2에 나타냄)(괄호에 번호를 매긴 HCV 폴리단백질): 1) 프로테아좀의 분해에 대한 저항성을 부여하는 서열 MADEAP; 2) HCV NS3 프로테아제 단백질의 아미노산 89 내지 350 (1115 내지 1376); 3) 클로닝에 도입된 단일 트레오닌 아미노산 잔기; 4) HCV 코어 단백질의 아미노산 2 내지 140 (2 내지 140); 및 5) 코어 변이체의 친수성을 증가시키기 위한 서열 ED.

HCV NS3-코어 융합 단백질의 발현은 구리에 의해 유도되고 열에 의해 불활성화된 GI-5005 효모 유래 용해질의 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인되었다. HCV NS3(Virostat) 또는 HCV 코어 단백질 (Anogen)에 특이적인 모노클로날 항체가 단백질을 검출을 위해 이용되었다(도 1a 및 도 1b 참조).

실시예 2

하기 실시예는 본 발명의 불활성화된 HCV NS3 효모 백신인 GI-5003의 조작을 설명한다.

GI-5003 사카로미세스 세레비시에는 구리 유도성 프로모터 *CUP1*의 제어하에서 불활성화된 전장의 HCV NS3 단백질을 발현하도록 조작하였다. (유전형 1a, H77 균주, cDNA는 NIH에 의해 제공된) HCV 게놈의 단일 영역은 생산물을 생성하기 위하여 PCR에 의해 증폭되었다. 불활성화된 NS3 단백질은 N-부터 C-말단에 이르는 프레임 내에서 융합된 하기 서열 요소를 가지는 단일 폴리펩타이드이다(서열번호: 4에 나타낸)(괄호에 번호를 매긴 HCV 폴리단백질): 1) 프로테아좀의 분해에 대한 저항성을 부여하는 서열 MADEAP; 및 2) HCV NS3 프로테아제 단백질의 아미노산 1 내지 631 (1027 내지 1657) (HCV 폴리펩타이드 잔기 1165에 있는 아미노산은 단백질 분해 활성을 불활성화시키기 위하여 세린으로부터 알라닌으로 변경되었다).

HCV NS3 단백질의 발현은 구리에 의해 유도되고 열에 의해 불활성화된 GI-5003 효모 유래 용해질의 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인되었다. HCV NS3(Virostat)에 특이적인 모노클로날 항체가 단백질을 검출을 위해 이용되었다(도 1a 및 도 1b 참조).

실시예 3

다음 실시예는 본 발명에 따른 절단된 HCV E1-E2 융합 단백질 효모 백신인 GI-5000 시리즈의 조작을 설명한다.

E1-E2 융합 단백질은 N-부터 C-말단에 이르는 프레임 내에서 융합된 다음 서열 요소를 가진 단일 펩타이드이다 (서열번호: 6에 나타낸)(괄호에 번호를 매긴 HCV 폴리단백질): 1) 프로테아좀의 분해에 대한 저항성을 부여하는 서열 MADEAP, 2) HCV 단백질 E1의 아미노산 1 내지 156 (192 내지 347), 3) HCV 단백질 E2의 아미노산 1 내지 334 (384-717). E1의 36개 C-말단 소수성 아미노산 및 E2의 29개 C-말단 소수성 아미노산이 효모내 사이토플라즘 축적을 촉진하기 위하여 융합 단백질로부터 제거되었다.

HCV E1/E2 융합 단백질의 발현이 구리에 의해 유도되고 열에 의해 불활성화된 GI-5003 효모 유래 용해질의 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인되었다(도 1c 참조).

실시예 4

다음 실시예는 본 발명에 따른 TM-도메인이 결실된 HCV NS4b 융합 단백질 효모 비히클인 GI-5000 시리즈의 조작을 설명한다.

NS4b 단백질은 N-부터 C-말단으로 이어지는 프레임 내에서 직렬로 배열된 다음 서열 요소를 가지는 단일 폴리펩타이드이다 (서열번호: 8에 나타낸)(괄호에 번호를 매긴 폴리펩타이드); 1) 프로테아좀의 분해에 저항성을 부여하기 위한 MADEAP 서열, 2) HCV 단백질 NS4b의 아미노산 1 내지 69 (1712 내지 1780), 3) HCV 단백질 NS4b의 아미노산 177 내지 261 (1888 내지 1972). 다수의 멤브레인 스패닝 도메인을 포함하는 NS4b 아미노산 70 내지 176 (1781 내지 1887)에 대응되는 107개의 아미노산 영역이 효모내 사이토플라즘 축적을 촉진하기 위하여 제거되었다.

HCV NS4b 융합 단백질의 발현은 구리에 의해 유도되고 열에 의해 불활성화된 효모 유래 용해질의 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인되었다 (도 1d 참조).

실시예 5

다음 실시예는 HCV 항원을 발현하는 (또한 TarmogenTM으로 정의된) GI-5005 효모 비히클을 사용한 마우스에서의 비임상 약리학 연구: 면역원성 연구를 설명한다.

GI-5005는 실시예 1에서 설명된 바와 같이 효모의 구리 유도성(*CUP1*) 프로모터 (서열번호: 2)의 제어 하에서 절단된 HCV 유전형 1a로부터 유래된 NS3 및 코어 유전자 생산물의 융합 단백질을 코딩하는 효모 발현 플라스미드로 안정적으로 형질도입된 S.세레비시에 효모 (ATCC로부터 입수된 W303 균주)로 이루어진다. 하기 연구에서, C57BL/6 (H-2^b) 및 BALB/cBy (H-2^d) 마우스는 GI-5005 효모로 피하 주입되었다. 림프구 증폭, 세포 매개 세포독성, 사이토카인 분비 및 종

양 시험감염으로부터의 보호를 포함한 GI-5005에 의한 항원 특이적 림프구의 유도를 검출하기 위한 시험관내 및 생체내 분석법이 도입되었다. 이러한 연구를 지지하기 위하여 다음 효모 균주, 세포주 및 재조합 바이러스가 생성되고 유지되었다:

GI-5003: HCV-NS3 단백질을 발현하는 효모 균주. GI-5003은 촉매 도메인이 단일 점 돌연변이에 의해 불활성화된 전장의 NS3를 발현한다.

GI-5005-L: 1YU 당 50ng 이하의 HCV-NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 GI-5005 효모 균주.

GI-5005-M: 1YU 당 약 500ng의 HCV-NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 GI-5005 효모 균주.

GI-5005-H: 1YU 당 약 1400ng의 HCV-NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 GI-5005 효모 균주.

EL4-NS3: HCV NS3를 코딩하는 DNA로 안정적으로 형질감염된 C57BL/6 유래의 EL4 림프종 세포 (H-2^b).

A20-NS3: HCV NS3를 코딩하는 DNA로 안정적으로 형질감염된 BALB/c 유래의 A20 림프종 세포 (H-2^d).

P815-NS3: HCV NS3를 코딩하는 DNA로 안정적으로 형질감염된 DBA/2 유래의 P815 백혈병 세포 (H-2^d).

베타-갈락토시다제 (**rVV-lac**), HIV-1 Gag (**rVV-Gag**), HCV NS3 (**rVV-NS3**) 및 HCV 코어 (**rVV-Core**) 단백질을 코딩하는 재조합 우두종 바이러스(rVV).

아래 설명된 연구 및 특정 실험에서 달리 언급되지 않는다면 (그룹 당 5마리; 6-10주령된) 암컷 BALB/c 및/또는 C57BL/6 마우스는 주 단위로 5YU (5천만) GI-5005 또는 GI5003으로 피하 주입되었고 최종 주입 후 7일째에 희생시켰다. 각 그룹으로부터 모은 비장 세포 현탁액이 10% 열에 의해 불활성화된 소태아혈청, L-글루타민, HEPES 및 2-메르캅토에탄올로 보충된 RPMI-1640 조직 배양 배지로 준비되고, HCV 항원 특이적 (전형적으로 rVV-NS3 및/또는 rVV-코어)이고 효모 항원 특이적인 (일반적으로 GI-5005) 자극 모두를 이용하는 시험관내 촉진(*in vitro* stimulation, IVS) 조건하에 두었다. 표준 분석법이 GI-5005 투여에 의해 유도되는 면역 반응을 평가하기 위하여 도입되며 H³-티미딘 삽입에 의해 평가되는 림프구 증폭, ⁵¹Cr-표지된 표적 세포를 도입하는 세포 매개 세포독성 분석법, 사이토카인 분비의 정량화 및 종양 시험감염으로부터 보호를 포함한다.

(a) GI-5005는 항원 특이적 림프구 증폭을 유도한다.

GI-5005의 면역원성을 평가하기 위한 예비 실험에서 C57BL/6 마우스는 5YU (5천만)의 열에 의해 불활성화된 GI-5005 효모 세포로 3주 동안 주별 주입되었다. 마우스는 면역화로 인한 어떠한 명백한 역효과도 보이지 않았다. 최종 면역화 후 7일째에 비장 세포를 수득하였고 단일 세포 현탁액은 무(nothing), EL4 림프종 세포, EL4-NS3 (HCV NS3을 안정적으로 발현하는 EL4), rVV-NS3 (HCV NS3을 코딩하는 재조합 우두종 바이러스) 또는 rVV-코어로 시험관 내에서 자극되었다. 림프구 증폭은 5일 후에 배양물에서 표준 티미딘 통합 분석법을 사용하여 평가되었다. 보다 자세하게는 5YU GI-5005로 주입된 C57BL/6 마우스 유래의 비장 세포를 96구의 바닥이 U자형인 조직 배양 판의 각 구에 (400,000 세포/구) 위치시키고, 무, 미토마이신 C로 처리된 EL4 (10,000 세포/구), 미토마이신 C로 처리된 EL4-NS3 (10,000 세포/구), rVV-NS3 (400,000 pfu/구) 또는 rVV-코어 (400,000 pfu/구)로 시험관 내에서 자극하였다. 3HTdR을 5일째에 첨가하였고 판은 그 후 18시간째에 회수하였다. 결과는 3중의 시료에 대하여 평균 CPM+/- S.D.으로 표현된다. 도 2에 제시된 결과는 GI-5005가 NS-3 및 코어 특이적 림프구 증폭을 유도한다는 것을 보여준다.

(b) GI-5005는 항원 특이적 세포독성 효과기 세포 반응을 유도한다:

GI-5005는 HCV NS3를 안정적으로 발현하는 종양 세포를 살상하는 세포독성 효과기 세포를 유도한다

도 3은 GI-5005로의 면역화가 HCV NS3를 발현하는 종양 세포를 살상할 수 있는 세포독성 효과기 세포를 유도한다는 것을 보여준다. 특히, 5YU의 GI-5005로 3주 동안 주별 주입된 C57BL/6 마우스 유래의 비장 세포가 25 cm² 조직 배양 플라스크에 30 x 10⁶ 세포/플라스크로 (도 3a-3b 참조) 또는 24구의 바닥이 편평한 조직 배양 판에 6 x 10⁶/구로 (도 3c 참조)

각 구에 위치시켰다. 비장 세포는 1 YU (10^7 효모 세포)의 GI-5005/플라스크 (도 3A)로; 무, 1 YU/플라스크의 GI-1001 또는 1 YU/플라스크의 GI-5005 (도 3b); 또는 6×10^6 pfu/구의 rVV-lac 또는 rVV-NS3로 (도 3c) 6일 동안 시험관 내에서 자극되었다. rVV-lac 또는 rVV-NS3와 배양된 비장 세포는 T 세포 성장 인자의 근원으로서 10%의 T-스팀의 존재 하에서 추가 3일 동안 확장되었다. 6일 (도 3a, 3b) 또는 9일 (도 3c)의 IVS 배양 기간의 종료 시점에 비장 세포 배양물의 두 배 희석액이 지시된 바와 같이 일만의 ^{51}Cr 로 표지된 EL4 또는 EL4-NS3 세포와 혼합되었다. E:T 비율은 IVS 배양 기간의 개시 시점에 비장 효과기 세포 농도를 기반으로 한 효과기:표적의 비율을 의미한다. 결과는 96-구의 바닥이 V자형인 구에서의 공동 배양 6시간 후에 분리된 3중의 시료에 대하여 특이 용해 (specific lysis) \pm S.D.을 평균 백분율로서 표현한다. 백분율 자발적 크롬 방출 값은 EL-4의 경우에는 19% (도 3a), EL4-NS3의 경우에는 40% (도 3a, 3b), EL4-NS3의 경우에는 29% (도 3c)이었다.

도 3a에 제시된 결과에서 ^{51}Cr 표지된 비형질감염된 EL4 림프종 세포 또는 HCV-NS3를 안정적으로 발현하는 EL4 세포 (EL4-NS3)에 대한 검사 전에 GI-5005로 면역화된 C57BL/6 마우스 유래의 비장 세포는 효모 대 비장 세포 비율 1:3으로 6일 동안 GI-5005 효모로 시험관 내에서 자극되었다. 자극된 비장 세포는 용량 의존적 방식으로 EL4-NS 표적을 살상하였다. 반대로 현저하게 낮은 살상이 비형질감염된 EL4-세포에서 관찰되었다. 상기 데이터는 GI-5005로의 면역화가 NS3 특이적 세포독성 효과기 세포를 유도한다는 증거를 제공함에 추가하여 GI-5005 효모가 NS3 특이적 세포독성 효과기 세포를 재자극하기 위하여 시험관내에서 사용될 수 있다는 것을 암시하였다. 도 3b에 제시된 결과는 이러한 발견을 추가로 확인시켜주고 GI-5005로 면역화된 마우스 유래 비장 세포의 GI-5005로의 시험관내 촉진(IVS)은 무 (nil) 또는 벡터 대조군 효모 (GI-1001)로의 IVS와 비교하였을 때 EL4-NS3에 대하여 증진된 세포독성 활성을 가능하게 하는 세포독성 효과기 세포를 보여주었다. IVS 기간 동안 세포독성 효과기 세포를 활성화하기 위하여 HCV NS3 항원의 일부 형태에 노출하기 위한 요건이 NS3을 코딩하는 재조합 우두종 바이러스(rVV-NS3, 도 3c)로의 자극을 사용하여 추가로 연구되었다. 상기 데이터는 면역화된 마우스의 비장에 존재하는 NS3 특이적 세포독성 효과기 세포가 무관한 항원 베타-갈락토시다제를 코딩하는 재조합 바이러스 rVV-lac와의 IVS와 비교하였을 때 rVV-NS3로의 IVS에 의해 자극된다는 것을 보여주었다.

GI-5005는 HCV NS3 또는 코어를 코딩하는 재조합 우두종 바이러스로 감염된 종양 세포를 살상하는 세포독성 효과기 세포를 유도한다

앞서 제시된 결과는 GI-5005로의 면역화는 NS3를 발현하는 동계의 종양 세포를 살상할 수 있는 세포독성 효과기 세포의 유도로 이어진다는 것을 입증하였다. 그러나, GI-5005도 또한 HCV 코어 항원을 발현한다. HCV 코어 항원을 발현하는 안정적으로 형질감염된 종양 세포주를 유도하는 시도는 성공적이지 않았다. 코어 발현 표적 세포의 결여를 극복하기 위하여 도 4에 제시된 연구가 수행되었다. 간단히 설명하면, H-2^d-보유 P815 백혈병 세포는 GI-5005 또는 GI-5003 (코어가 아니라 전장의 HCV-NS를 발현하는 Tarmogen^{TMTM})으로 면역화되고 GI-5005의 존재하에서 5일 동안 시험관 내에서 자극된 BALB/c 마우스 유래의 비장 세포를 도입하는 표준 크롬 방출 분석법에서 이용하기 앞서 HCV NS3 또는 HCV 코어를 코딩하는 재조합 우두종 바이러스로 하룻밤 동안 감염되었다. 보다 자세하게는, 5YU의 GI-5005 (GI-5005) 또는 5YU의 GI-5003 (GI-5003)으로 3주 동안 주별 주입된 BALB/c 마우스 유래의 비장 세포가 24-구의 바닥이 편평한 조직 배양판의 각 구에 위치시키고 (8×10^6 /세포) 5일 동안 GI-5005 (1×10^6 /세포)로 시험관 내에서 자극되었다. IVS 배양 기간 종료시에 비장 세포 배양물의 두 배 희석액이 HCV NS3 (도 4a) 또는 HCV 코어 (도 4b)를 코딩하는 재조합 우두종 바이러스로 하룻밤 동안 감염된 일만의 ^{51}Cr 표지된 P815 백혈병 세포와 혼합하였다. E:T 비율은 IVS 배양 기간의 초기에 비장 효과기 세포 농도를 기반으로 한 효과기:표적 세포의 비율을 의미한다. 결과는 96-구의 바닥이 V자형인 판에서의 공동 배양 6시간 후에 분리된 3중의 시료에 대하여 특이 용해 \pm S.D.을 평균 백분율로서 표현한다. 백분율 자발적 크롬 방출 값은 P815-rVV-NS3의 경우에는 21%, P815-rVV-코어의 경우에는 40%이었다.

도 4a 및 4b는 GI-5005는 rVV-NS3 (도 4a) 또는 rVV-코어 (도 4b)로 감염된 종양 세포를 살상할 수 있는 세포독성 세포를 유도하는 한편 GI-5003에 의해 유도된 살상은 NS3에 제한된다는 것을 보여준다. 요약하면, 도 3 및 4에 제시된 결과는 GI-5005로의 면역화가 NS3 및 코어 특이적 세포독성 효과기 세포 활성을 유도한다는 것을 암시한다.

(c) GI-5005는 초기염증성 사이토카인을 분비하는 세포를 유도한다

도 5는 나이브(naive) 또는 GI-5005로 면역화된 C57BL/6 마우스 유래의 비장 세포가 GI-5005 효모와의 조직 배양물에 위치하였을 때 분비되는 사이토카인을 보여준다. 세포가 배제된 상층액이 배양 개시 48시간 후에 회수되었고 사이토카인 농도가 흐름 세포측정기(flow cytometer)를 기반으로 한 LuminexTM 분석법 (Biosource)을 사용하여 결정되었다. 보다 자세하게는 5YU의 GI-5005로 3번 주별 주입된 나이브 C57BL/6 마우스 또는 C57BL/6 유래의 비장 세포를 24구의 바닥

이 편평한 조직 배양 판의 각 구에 위치시켰다(1×10^6 효모 세포/구). 비장 세포는 GI-5005 (1×10^6 효모 세포/구) 또는 이노오마이신 (750ng/mL)이 더해진 PMA (15ng/mL)로 자극되었다. 세포가 배제된 상층액이 배양 개시 48시간 후에 회수되었고 사이토카인이 콜로라도 대학 암 센터의 흐름 세포측정 기관에 의해 흐름 세포측정기 LuminexTM 분석법 (Biosource)을 이용하여 정량분석되었다. IFN-g=IFN- γ ; TNF-a=TNF- α .

이러한 결과는 GI-5005 투여가 초기염증성 사이토카인 IL-6, GM-CSF, IFN- γ and TNF- α 뿐만 아니라 IL-2 및 IL-5를 분비하는 T 세포를 유발한다는 것을 보여준다. 시험관 내에서 효모에 노출된 면역화된 마우스로부터 유래된 비장 세포의 사이토카인 반응은 크기에 있어서 이노오마이신이 더해진 PMA로 나이브 C57BL/6 마우스로부터 유래된 T 세포의 폴리클로날을 자극한 즉시 관찰된 것과 유사하다. 또한, 도 5는 효모에 대한 나이브 C57BL/6 비장 세포의 사이토카인 반응을 보여주며, 효모에 대한 본래의 반응은 아마도 집단에 있는 단핵세포 및 수지상 세포로부터 유래된 IL-6, IL-12 및 TNF- α 의 분비를 포함한다. 유사한 결과가 나이브 및 면역화된 BALB/c 마우스로부터 수득한 비장 세포에서 수득되었다(도 8 및 11 참조).

(d) GI-5005로 유도된 면역반응에 대한 반복 투여의 효과

도 6, 7 및 8에 제시된 결과는 C57BL/6 및 BALB/c 마우스에 대하여 시행된 GI-5005로 1회, 2회 또는 3회 주별 면역화를 비교하는 실험으로부터 나온 것이다. 도 6은 NS3- 및 코어 특이적 림프구 증폭을 실험하고 도 7은 NS3 및 코어 특이적 세포독성 세포 활성의 유도를 보여주며, 도 8은 사이토카인 분비 프로필을 보여준다. 전체적으로 상기 결과는 GI-5005의 단일 주입은 약한 반응을 유도하며 추가 투여에 의해 상당히 증진된다는 것을 암시한다.

도 6은 GI-5005로 1회, 2회 또는 3회 주별 면역화를 받은 C57BL/6 마우스 유래의 비장 세포에 대하여 수행된 림프구 증폭 분석법의 결과이다. 자세하게는, 5YU의 GI-5005로 1회, 2회 또는 3회 주별 면역화를 받은 C57BL/6 유래의 비장 세포를 96구의 바닥이 U자형인 조직 배양 판의 각 구에 위치시키고 (400,000세포/구) 무, rVV-NS3, rVV-코어 또는 rVV-rastafar (100,000 pfu/세포) 시험관 내에서 자극되었다. 3HTdR이 5일째에 추가되었고 판은 그 후 18시간째에 회수되었다. 결과는 3중의 시료에 대하여 평균 CPM+/-S.D.으로서 표현된다. HCV NS3 및 코어 특이적 림프구의 반응은 면역화 회수에 비례하여 증가하였고 계산된 자극 지표는 1회 대 3회 면역화로 rVV-NS3에 대하여 1.8로부터 2.8로, rVV-코어에 대하여 6.5로부터 8.6으로 증진되었다. (사람의 Ras를 코딩하는) rVV-rastafar에 대하여 어떠한 자극도 없었다는 것은 GI-5005에 의해 유도된 반응이 항원 특이적이라는 것을 보여준다.

도 7은 GI-5005로 1회, 2회, 3회 주별 면역화를 받은 C57BL/6 및 BALB/c 마우스로부터 유래된 비장 효과기 세포에 대하여 수행된 크롬 방출 분석법의 결과를 나타낸다. 자세하게는, 5YU의 GI-5005로 1회, 2회 또는 3회 주별 면역화를 받은 C57BL/6 (도 7a 및 7b) 또는 BALB/c 마우스(도 7c 및 7d)로부터 유래된 비장 세포를 24구의 바닥이 편평한 조직 배양 판의 각 구에 (10×10^6 /구) 위치시키고 5일 동안 GI-5005 (1×10^6 /구)로 시험관 내에서 자극하였다. IVS 배양 기간의 종료 시에 비장 세포 배양물의 두 배 희석액이 일만개의 ⁵¹Cr 표지된 EL4 림프종 세포(도 7a 및 7c), 또는 HCV NS3 (도 7a 및 7c) 또는 HCV 코어 (도 7b 및 7d)를 코딩하는 재조합 우두종 바이러스로 하룻밤 동안 감염된 P815 백혈병 세포 (도 7c 및 7d)와 혼합되었다. E:T 비율은 IVS 배양 기간의 초기에 비장 효과기 세포 농도를 기반으로 한 효과기:표적 세포 비율을 의미한다. 결과는 96구의 바닥이 V자형인 판에서의 공동 배양 6시간 후에 분리된 3중의 시료에 대하여 특이 용해 +/-

S.D.을 평균 백분율로서 표현한다. 백분율 자발적 ⁵¹Cr 방출은 EL-4-rVV-NS3의 경우에는 10%, EL4-rVV-코어에 대하여 10%, P815-rVV-NS3에 대하여 12% 및 P815-rVV-코어에 대하여 11%이었다. 도 4에 보고된 발견은 도 7에 제시된 결과를 확인시켜주면서 rVV-NS3 또는 rVV-코어로 감염된 동계 종양 세포 표적에 대하여 용량 의존적으로 살상하고 면역 회수에 비례하여 증가한다는 것을 보여준다.

도 8에 제시된 결과는 GI-5005로 1회, 2회 또는 3회 주별 면역화를 받은 C57BL/6 및 BALB/c 마우스 유래의 비장 세포의 GI-5005와의 시험관내 자극에 반응하여 사이토카인 분비 프로필을 보여준다. 자세하게는 5YU의 GI-5005로 1회, 2회 또는 3회 주별 면역화를 받은 C57BL/6 (위 패널) 및 BALB/c 마우스 (아래 패널)로부터 유래된 비장 효과기 세포를 24구의 바닥이 편평한 조직 배양 판의 각 구에 (10×10^6 /구) 위치시키고 GI-5005로 (1×10^6 /구) 시험관 내에서 자극하였다. 세포가 배제된 상층액은 배양 개시 48시간 후에 회수되었고 사이토카인이 콜로라도 대학 암 센터의 흐름 세포측정 기관에 의해 흐름 세포측정기 LuminexTM 분석법 (Biosource)을 이용하여 정량분석되었다. IFN-g=IFN- γ ; TNF-a=TNF- α . 이러한 결과는 효모 항원에 대하여 면역화된 마우스로부터 유래된 세포의 사이토카인 반응은 T_H1 유사한 초기염증성 다양성으로 우세하고 1회 이상의 면역화가 반응의 충분한 스펙트럼을 보기 위하여 요구된다는 것을 보여준다. T_H2 사이토카인 IL-4 및 IL-10이 일반적으로 검출되지 않는다는 것은 본 발명의 효모 비히클이 일차적으로 체액성 보다는 세포성 면역을 유발한다는 것을 제안한다.

상기 제시된 데이터는 GI-5005에 의해 유도된 면역반응이 반복된 주별 투여에 의해 증진된다는 것을 암시하였다. GI-5005와의 면역반응의 부스팅을 조사하기 위하여 표 2에 정리된 실험이 수행되었다. 간단히 설명하면, GI-5005로 5회 주별 주입을 받은 암컷 BALB/c 마우스는 부스팅 없이 또는 주별, 2주별, 월별 또는 2개월별 간격으로 부스팅에 의해 후속되었다. 마우스는 최종 부스팅 후 16일 째에 희생되었다. 결과는 반복된 주별 면역화는 12주 주입 후에도 후속 투여가 림프구 증폭 및 세포 매개 세포독성 분석법에 의해 측정된 바와 같이 부스팅을 발생시킨다는 점에서 중화 및/또는 용인의 유도를 유발하지 않는다는 것을 보여준다.

[표 2]
GI-5005로 면역화 및 부스팅 스케줄

그룹	0일	7일	14일	21일	28일	35일	42일	49일	56일	63일	70일	77일	84일	100일
PBS 대조군	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	희생
부스트 안함						-	-	-	-	-	-	-	-	희생
2개월 부스트						-	-	-	-	-	-	-		희생
1개월 부스트						-	-	-		-	-	-		희생
2주 부스트						-		-		-		-		희생
1 주 부스트														희생

I= GI-5005로의 면역화

도 9는 표 2에 정리된 면역화 스케줄에 따라 GI-5005를 받은 BALB/c 마우스로부터 유래된 비장 세포에 대하여 수행된 림프구 증폭 분석법의 결과를 나타낸다. 간단히 설명하면, 표 2에 정리된 면역화 스케줄에 따라 5YU의 GI-5005로 면역화된 BALB/c 마우스로부터 유래된 비장 세포가 96구의 바닥이 U자형인 조직 배양 판의 각 구에 (400,000 세포/구)에 위치되었고 무 (Bkgd), GI-5005 (320,000 또는 20,000 효모 세포/구), 콘카나발린 A (ConA; 2.5g/mL) 또는 리포폴리사카라이드 + 텍스트란 설페이트 (LPS+ DS; 25µg/ml 및 20µg/mL)로 시험관 내에서 자극되었다. 3HTdR은 3일째에 첨가되었고 판은 18시간 후에 회수되었다. 결과는 3종의 시료에 대하여 평균 CPM+/-S.D.으로서 표현된다. 도 9는 효모 연관된 항원에 대한 부스팅 가능한 면역이 매우 명료하고 어떠한 용인도 유도되지 않음이 명백하다.

도 10은 표 2에 설명된 바와 같이 면역화되고 부스팅된 BALB/c 마우스로부터 유래된 비장 효과기 세포에 대하여 수행된 크롬 방출 분석법의 결과를 보여준다. 간단히 설명하면, 표 2에 설명된 스케줄에 따라 5YU의 GI-5005로 면역화된 BALB/c 마우스로부터 유래된 비장 세포가 24구의 바닥이 편평한 조직 배양 판의 각 구에 (10 x 10⁶/구) 위치되었고 5일 동안 GI-5005 (1x10⁶/구)로 시험관 내에서 자극되었다. IVS 배양 기간의 종료 시에 비장 세포 배양액의 두 배 희석액이 일만 개의 ⁵¹Cr 표지된 P815-NS3 백혈병 세포와 혼합되었다. E:T 비율은 효과기:표적 세포의 비율을 의미한다. 결과는 96구의 바닥이 V자형인 판에서의 공동 배양 6시간 후에 분리된 3종의 시료에 대하여 특이 용해 +/- S.D.을 평균 백분율로서 표현한다. 백분율 자발적 ⁵¹Cr 방출은 P815-NS3에 대하여 12%이었다. 도 10에 제시된 결과는 도 9에 보고된 발견을 확인함과 동시에 HCV NS3를 안정적으로 발현하는 동계의 종양 세포에 대한 용량 의존적인 살상을 보여주고 추가로 GI-5005에 의해 유도된 CTL 반응의 부스팅능 뿐만 아니라 지속성을 입증한다.

(e) GI-5005로 유도된 면역 반응의 지속성

GI-5005로 면역화 즉시 유도된 세포성 면역 반응의 강력함을 평가하기 위하여 GI-5005의 3회 주별 용량을 받은 C57BL/6 및 BALB/c 마우스는 투여 후 1개월째 및 2개월째에 희생되었다. 도 11은 효모 특이적 림프구 증폭의 지속성을 실험한 한편, 도 12는 NS3 및 코어 특이적 세포독성 세포 활성의 지속성을 실험하며 도 13은 효모 뿐만 아니라 NS3 특이적 사이토카인 분비 프로필을 보여준다. 전체적으로 GI-5005의 투여는 오래 지속되고 강력한 메모리 T 세포 반응을 유도한다는 것을 제한한다.

GI-5005로 유도된 림프구 증폭적 반응의 지속성

도 11에 제시된 결과는 3회 주별 면역화에 이어 적어도 2달이 경과한 후 효모 항원에 대한 증폭적 반응을 보여준다. 간단히 설명하면, 무 (나이프) 또는 5YU의 GI-5005로 3회 주별 면역화를 받고 희생되기 이전에 5주(1개월 지속성) 또는 9주(2개월 지속성) 동안 유지된 C57BL/6 (도 11a) 및 BALB/c (도 11b) 마우스로부터 수득한 비장 세포는 96구의 바닥이 U자형인 조직 배양 판의 각 구에 (400,000세포/구) 위치되고 무(Bkgd) 또는 GI-5005로 시험관 내에서 (400,000 효모 세포/구) 자극되었다. ³HTdR이 5일째에 첨가되었고 판은 그로부터 18 시간 후에 회수되었다. 결과는 3종의 시료에 대하여 평균 CPM +/- S.D.로서 표현된다. 상기 결과는 도 2 및 도 6에 나타난 HCV NS3 또는 코어 특이적 증폭 반응과는 반대로 효모 특이적인 것을 실험한 것임을 주목하여야 한다. 이러한 특정한 실험에서의 효모 항원에 대한 자극 지수는 약 11 내지 77에 이른다.

GI-5005으로 유도된 세포독성 효과기 세포 반응의 지속성

도 12에 나타난 바와 같이 그리고 림프구 증폭 반응에 대한 결과와 유사하게 GI-5005로 유도된 세포독성 효과기 세포 활성의 지속성은 적어도 2개월 지속된다. 간단히 설명하면, 무 (나이프) 또는 5YU의 GI-5005로 3회 주별 면역화를 받고 희생되기 이전에 5주 (1개월 지속성) 또는 9주 (2개월 지속성) 동안 유지된 C57BL/6 (도 12a) 또는 BALB/c (도 12b) 마우스로부터 수득한 비장 세포는 24구의 바닥이 편평한 조직 배양 판의 각 구에 (10 x 10⁶세포/구) 위치되었고 5일 동안 시험관 내에서 GI-5005로 (1 x 10⁶ 효모 세포/구) 자극되었다. IVS 배양 기간의 종료시에 비장 세포 배양물의 두 배 희석액이 일만개의 ⁵¹Cr로 표지된 EL4-NS3 림프종 세포 (도 12a) 또는 P815-NS3 백혈병 세포(도 12b)와 혼합되었다. E:T 비율은 IVS 배양 기간의 초기에 비장 효과기 세포 농도를 기준으로 한 효과:표적 세포 비율을 의미한다. 결과는 96구의 바닥이 V자형인 판에서의 공동 배양 6시간 후에 분리된 3종의 시료에 대하여 특이 용해 +/- S.D.을 평균 백분율로서 표현한다. 백분율 자발적 ⁵¹Cr 방출은 EL-4-NS3에 대하여 11%이었고, P815-NS3에 대하여 11%이었다.

GI-5005로 유도된 사이토카인 분비 반응의 지속성

도 13은 GI-5005로 3회 주별 면역화를 받은 C57BL/6 및 BALB/c로부터 유래된 비장 세포의 GI-5005 및 rVV-NS3와의 시험관내 자극에 반응하여 사이토카인 분비 프로파일의 지속성을 나타낸다. 간단히 설명하면, 무 (나이프) 또는 5YU GI-5005로 3회 주별 면역화를 받고 희생되기 이전에 5주 (1개월 지속성) 또는 9주 (2개월 지속성) 동안 유지된 C57BL/6 (도 13a 및 13b) 또는 BALB/c (도 13c 및 13d) 마우스로부터 수득한 비장 세포는 24구의 바닥이 편평한 조직 배양 판의 각 구에 (10 x 10⁶세포/구) 위치되고 GI-5005 (1 x 10⁷/구) 또는 rVV-NS3 (1 x 10⁷ pfu/구)로 시험관 내에서 자극되었다. 세포가 배제된 상층액은 배양 개시 후 48시간 (GI-5005로의 IVS) 또는 120 시간 (rVV-NS3로의 IVS) 후에 수집되었다. 사이토카인은 Luminex TM 분석법(Biosource)을 사용하여 정량분석되었다. IFN-g = IFN-γ; TNF-a = TNF-α. 상기 결과는 GI-5005와의 면역화로 유도된 사이토카인 분비 세포의 지속성은 적어도 2개월이다. 사이토카인의 효모 특이적 프로파일과 대조되게 상기 데이터는 자극제로서 rVV-NS3를 사용한 항원 특이적 (즉, NS3 특이적) 반응은 GM-CSF 및 IFN-γ로 주도적으로 제한된다.

(f) 상이한 용량의 GI-5005로 투여시의 비교

도 14 및 도 15에 요약된 결과는 서로 다른 양의 항원을 발현하는 GI-5005 TarmogenTM에 의한 세포독성 효과기 세포 및 사이토카인 분비 세포의 유도를 비교한 것이다. 이러한 연구는 유효성 분석법의 발달의 일부로서 수행되었다.

간단히 설명하면, HCV NS3-코어 융합 단백질의 1YU 당 약 1400, 500 및 <50ng을 발현하는 GI-5005 TarmogenTM를 생산하였다. 이는 유도 기간 중에 존재하는 구리의 양을 다양화함으로써 달성되었다. 세 개의 TarmogenTM은 각각 GI-5005-H (1400ng/YU; 0.02ng 단백질/ng 총 단백질), GI-5005-M (500ng/YU; 0.008ng의 융합 단백질/총 단백질) 및 GI-5005-L (<50ng/YU; <0.001ng 단백질/ng 총 단백질)로서 명명된다. 5마리의 암컷 BALB/c 마우스(H-2^d)의 그룹이 세 개의 용량 0.1, 1 및 10 YU의 세 개의 상이한 GI-5005 TarmogenTM로 주별로 면역화되었다. 마우스는 3회 주별 주입 후 7일째에 희생되었고 그들의 비장 세포는 이제 설명되는 바와 같이 시험관 내에서 자극되었다(IVS).

도 14에서 그룹별로 모아진 면역화된 마우스 유래의 비장 세포는 세 개의 상이한 GI-5005 TarmogenTM 중 하나로 개별적으로 IVS에 위치되었다. IVS 배양의 세포 매개 세포독성 활성은 HCV NS3를 안정적으로 발현하는 H-2^d를 보유한 P815 세포에 대하여 평가되었다. 간단히 설명하면, GI-5005-H(도 14a - 도14c), GI-5005M (도 14d - 14f) 또는 GI-

5000-L (도 14g - 14i) 중 어느 하나의 0.1, 1 또는 10YU로 3회 주별 면역화를 받은 BALB/c 마우스 유래의 비장 세포는 24구의 바닥이 편평한 조직 배양 판의 각 구에 (10×10^6 세포/구) 위치되었고 5일 동안 지시된 GI-5005 TarmogenTM (2×10^6 효모 세포/구)로 시험관 내에서 자극되었다. IVS 배양 기간의 종료시에 비장 세포 배양물의 두 배 희석액이 일만개의 ^{51}Cr 로 표지된 P815-NS3 백혈병 세포와 혼합되었다. E:T 비율은 IVS 배양 기간의 초기에 비장 효과기 세포 농도를 기준으로 한 효과기:표적 세포 비율을 의미한다. 결과는 96구의 바닥이 V자형인 판에서의 공동 배양 6시간 후에 분리된 3종의 시료에 대하여 특이 용해 \pm S.D.을 평균 백분율로서 표현한다. 백분율 자발적 ^{51}Cr 방출은 P815-NS3에 대하여 12%이었다. 각 도면의 부호에서 10YU, 1YU & 0.1YU는 면역화를 위해 이용된 GI-5005의 양을 의미한다. 상기 데이터는 단일 변수를 기반으로 한 명백한 용량 반응을 보여준다: 즉, 면역화 또는 시험관 내 자극에서 이용되는 TarmogenTM에서 발현되는 HCV 항원의 양을 나타낸다. 유사한 결과가 도 15에 나타낸 데이터로부터 유추될 수 있다.

도 15는 효모 특이적 항원에 반응하기 위하여 분비된 IL-6의 정도 대 HCV NS3 특이적 항원에 반응하기 위하여 분비된 GM-CSF의 정도를 나타낸다. 자세하게는, GI-5005-H (도 15a), GI-5005M (도 15b) 또는 GI-5000-L (도 15c) 중 어느 하나의 0.1, 1 또는 10YU (X-축)로 3회 주별 주입을 받은 BALB/c마우스 유래의 비장 세포는 24구의 바닥이 편평한 조직 배양 판의 각 구에 (10×10^6 세포/구) 위치되었고, GI-5005-H (2×10^6 효모 세포/구) 또는 rVV-NS3 (100×10^6 pfu/구)으로 시험관 내에서 자극되었다. 세포가 배제된 상층액이 배양 개시 후 72 시간 (GI-5005로 IVS) 또는 120시간 (rVV-NS3로 IVS) 후에 수집되었다. 사이토카인은 LuminexTM 분석법 (Biosource)을 사용하여 정량분석되었다. 간단히 설명하면, 상기 데이터는 IL-6을 분비하는 세포의 유도는 면역화에 이용된 TarmogenTM의 개수에 의해 달라지는 것이지 TarmogenTM에서 발현되는 HCV 항원의 개수에 의해 달라지지 않는다는 것을 암시한다. 반대로 GM-CSF를 분비하는 세포의 유도는 두 기준 모두에 의존된다. 도 14 및 15에 제시된 데이터를 기반으로 최소한 500ng의 용합 단백질/YU 또는 0.008ng의 단백질/ng 총 단백질이 항원 특이적 반응을 유도하기 위하여 요구된다.

실시예 6

다음 실시예는 HCV 항원을 발현하는 GI-5005 TarmogenTM를 사용하여 마우스에서 비임상적 약리학적 연구를 보여준다: 종양 보호 및 치료 연구.

HCV에 대한 보호 또는 치료의 생체내 동물 모델이 이용 가능하지 않기 때문에 본 발명자들은 GI-5005의 활성을 입증하기 위하여 생체내에서 HCV 항원을 보유한 종양에 대한 보호 및 치료가 이용되어 왔다.

(a) GI-5005는 NS3을 발현하는 종양 세포에 대한 보호성 면역을 유도한다

전술된 실험은 C57BL/6 및 BALB/c 마우스에서 GI-5005의 면역원성을 입증한다. GI-5005 효모의 주입이 보호성 면역을 유발하는지 결정하기 위하여 BALB/c 마우스는 GI-5005 또는 GI-5003 (HCV NS3 프로테아제만을 발현하는 TarmogenTM) 중 어느 하나의 0.1, 0.7 또는 5YU로, 음성 대조군으로서 5YU의 GI-4014 (돌연변이된 Ras 단백질을 발현하는 TarmogenTM) 또는 무료 3주 동안 일주일에 한 차례 피하로 주입되었다. 최종 면역 후 1주일째에 마우스는 HCV NS3 (A20-NS3)으로 안정적으로 형질감염되고 피하로 주입된 동계의 A20 종양 세포로 시험감염되었다. 종양 부피는 시험감염 후 21일째에 측정되었다. 도 16에 제시된 데이터는 HCV NS3 항원을 발현하는 TarmogenTM, GI-5005 또는 GI-5003로 면역화된 마우스가 A20-NS3 종양 세포로의 시험감염으로부터 보호되는 반면에 무 또는 GI-4014로 감염된 마우스는 그렇지 못하였다. 결과는 평균 종양 부피 \pm S.D.으로서 표현된다. 상기 결과는 GI-5005가 HCV NS3를 발현하는 동계의 종양 세포로부터 마우스를 보호하는 용량 및 항원 의존적 면역 반응을 유도한다는 것을 보여준다.

상기 실험은 GI-5005로 3주 동안 주별로 주입되고 그 후 7일째에 피하로 주입된 EL4-NS3 림프종 세포로 시험감염된 C57BL/6 마우스에서 반복되었다. 간단히 설명하면, (그룹 당 5마리의) C57BL/6 마우스는 3주 동안 주별로 무 (나이프) 또는 5YU의 GI-5005로 피하 주입되었다. 마우스는 최종 면역 후 7일째에 피하 주입된 5×10^4 A20-NS3로 시험감염되었다. 종양은 시험감염후 지정된 날짜에 측정되었다. 결과는 평균 종양 부피 \pm S.D.으로서 표현된다. 숫자는 측정 가능한 종양을 지닌 동물의 수를 의미한다 (* 면역화된 마우스로부터 절개된 종양은 더 이상 NS3을 발현하지 않는 것으로 나타났다). 도 17에 제시된 결과는 GI-5005로 주입된 마우스가 EL4-NS3로의 시험감염으로부터 보호되는데 반하여 나이브 마우스는 그렇지 못하였다. GI-5005의 주입이 EL4 단독으로의 시험감염으로부터 마우스를 보호하지 못하였다는 것은 보호성 면역이 항원 특이적이라는 것을 의미한다(데이터가 제시되지 않았음). 면역화된 마우스에서 성장한 종양이 여전히 HCV NS3를 발현하는지 여부를 결정하기 위하여 5마리의 나이브 마우스 대조군 뿐만 아니라 종양 성장의 증거를 보인

GI-5005로 면역화된 두 마리의 마우스로부터 절개된 종양이 항생제 G4.18을 함유한 조직 배양 배지에 위치되었다. EL4-NS3에서 HCV NS3을 코딩하는 포유동물의 발현 벡터는 네오마이신 유사체 G4.18의 존재하에서 형질감염체가 성장하도록 하는 네오마이신 저항 유전자를 함유하는데 이로 인하여 HCV NS3의 안정적 발현이 유지된다. 나이브 마우스로부터 절개된 EL4-NS3 종양 세포는 G4.18의 존재 하에서 성장하는데 반하여 GI-5005로 면역화된 마우스 유래의 종양은 그렇지 못하였다. 이러한 관찰은 형질감염된 항원의 발현을 제거하기 위한 면역의 압력이 있다는 것을 제안한다. 이러한 관찰은 GI-5005가 NS3를 발현하는 동계의 종양 세포로의 시험감염에 대하여 생체내 보호적 면역 반응을 유도한다는 것을 암시한다.

(b) "보호적" 마우스에서 면역반응

HCV NS3를 발현하는 동계의 종양 세포를 거부하는 "보호"마우스의 이용 가능성은 보호 면역을 설정함에 있어서, 항원 특이적 면역 반응을 검사할 기회를 제공하였다. EL4-NS3 종양 세포를 거부한 전술된 5마리의 마우스 유래 비장 세포가 모아졌고 96구의 바닥이 U자형인 조직 배양 판의 각 구에 (4×10^5 세포/구) 위치되었고 무, GI-1001 (2×10^5 효모 세포/구), GI-5005 (2×10^5 효모 세포/구), rVV-Gag (1×10^5 pfu/구), rVV-NS3 (1×10^5 pfu/구) 또는 rVV-코어 (1×10^5 pfu/구)로 자극되었다. $^3\text{HTdR}$ 이 5일째에 첨가되었고 세포는 그 후 18시간째에 회수되었다. 결과는 4종의 시료에 대하여 평균 CPM+/-S.D.으로 표현된다. 도 18은 HCV NS3 및 HCV 코어 특이적 뿐만 아니라 효모 특이적 자극에 대하여 보호된 마우스로부터 유래된 비장 세포의 증폭 반응을 나타낸다. 도 19는 세포독성 효과기 세포 활성을 실험한다. 이러한 실험에서 EL4-NS3 종양 세포를 거부하는 5마리의 면역화된 마우스 또는 나이브 마우스로부터 유래된 비장 세포는 함께 모아져 24구의 바닥이 편평한 조직 배양 판의 각 구에 (8×10^6 비장세포/구) 위치되었고 5일 동안 GI-5005 (1×10^6 효모 세포/구) 또는 rVV-NS3 (8×10^5 pfu/구) 중 어느 하나로 시험관 내에서 자극되었다. IVS 배양 기간의 종료시에 비장 세포 배양물의 두 배 희석액이 rVV-NS3로 하룻밤 동안 감염된 일만개의 ^{51}Cr 표지된 EL4 표지 세포와 혼합되었다. E:T 비율은 IVS 배양 기간의 초기에 비장 효과기 세포 농도를 기반으로 한 효과기:표적 세포 비율을 의미한다. 결과는 96구의 바닥이 V자형인 판에서의 공동 배양 5시간 후에 분리된 3종의 시료에 대하여 특이 용해 +/- S.D.을 평균 백분율로서 표현한다. 백분율 자발적 ^{51}Cr 방출은 EL4-rVV-NS3에 대하여 33%이었다. 종합하면, 상기 발견은 보호된 마우스, 즉 NS3를 발현하는 종양 세포를 거부하는 면역화된 마우스는 실시예 5에 나타난 간단하게 면역화된 마우스에 비교하였을 때 HCV NS3에 대한 면역 반응을 증진시켰다.

(c) GI-5005는 종양을 보유한 나이브 마우스로부터 분리된 비장 세포에서 세포독성 효과기 세포 활성을 자극한다

앞서 제시된 결과는 GI-5005의 이차 항원, 소위 HCV NS3를 발현하는 종양 세포에 대한 노출은 증진된 증폭 및 세포독성 효과기 세포 반응에 의해 제안된 바와 같이 효과를 부스팅한다는 것을 제안한다. GI-5005 효모가 항원을 보유한 마우스 유래의 T 세포 활성을 추가로 자극하여 만성 HCV 감염 환자에서 T 세포 활성화를 모방할 수 있는지 여부를 확인하기 위하여 나이브 C57BL/6 마우스가 EL4-MS3 종양 세포로 피하 주입되었다. 3주 후에 종양 부피가 약 2500mm^3 에 이르렀을 때 마우스는 희생되었고 비장 세포는 벡터 대조군 (GI-1001) 또는 GI-5005 효모와 배양되었다. rVV-NS3으로 감염된 EL4 표적 세포에 대한 세포독성 효과기 세포는 시험관 내 자극의 개시 후 6일째에 측정되었다. 자세하게는, EL4-NS3 종양 세포로 감염된 5 마리의 나이브 마우스 유래 비장 세포가 21일 이전에 함께 모아졌고 24구의 바닥이 편평한 조직 배양 판의 각 구에 (8×10^6 비장 세포/구) 위치되었고 GI-1001 또는 GI-5005로 시험관 내에서 (1×10^6 효모 세포/구) 자극되었다(IVS). IVS 배양 기간의 종료시에 비장 세포 배양물의 두 배 희석액이 rVV-NS3로 하룻밤 동안 감염된 일만개의 ^{51}Cr 표지된 EL4 표지 세포와 혼합되었다. E:T 비율은 IVS 배양 기간의 초기에 비장 효과기 세포 농도를 기반으로 한 효과기:표적 세포 비율을 의미한다. 결과는 96구의 바닥이 V자형인 판에서의 공동 배양 5시간 후에 분리된 3종의 시료에 대하여 특이 용해 +/- S.D.을 평균 백분율로서 표현한다. 백분율 자발적 ^{51}Cr 방출은 EL4-rVV-NS3에 대하여 33%이었다. 도 20에 제시된 결과는 GI-5005가 HCV-NS3을 발현하는 종양을 보유한 마우스로부터 유래된 세포독성 효과기 세포를 자극할 수 있다는 것을 보여준다.

(d) GI-5005는 NS3를 발현하는 종양 세포에 대한 치료 활성을 유도한다

도 20에 제시된 결과는 GI-5005가 EL4-NS3를 발현하는 종양을 보유한 C57BL/6의 비장 세포로부터 NS3 특이적 세포 독성 효과기 활성을 재자극할 수 있다는 것을 보여준다. 이는 치료 효과가 달성 가능하다는 것을 제안한다. 이러한 가능성을 평가하기 위하여 (그룹 당 5마리의) BALB/c 마우스가 HCV NS3를 코딩하는 DNA로 안정적으로 형질감염된 1.25×10^5 A20-NS3 B 림프종 세포로 피하 주입되었다. 종양 이식 후 7일이 개시되면서 마우스는 PBS 또는 1YU의 GI-5005로

3주 동안 일주일에 1회 면역화되었다. 종양 성장은 모니터링되었고 마우스는 PBS 그룹에서 종양이 2500mm³에 이르렀을 때인 종양 이식 후 28일에 희생되었다. 도 21의 결과는 평균 종양 부피 \pm S.D.로서 표현되고 숫자는 측정 가능한 종양을 보유한 동물의 수를 의미한다 (* 모든 종양을 보유한 마우스로부터 절개된 종양이 NS3를 발현한다는 것이 확인되었다).

도 21은 GI-5005의 치료적 투여는 종양의 경감으로 이어진다. 간단히 설명하면, PBS로 처리된 5마리의 모든 종양 보유 마우스가 종양 성장을 보이는데 반하여 GI-5005로 처리된 5마리 중 3마리만이 종양 성장을 보였고, 상기 처리된 동물에서 발생한 종양은 훨씬 더 천천히 성장하는 것으로 확인되었다 (PBS 처리 그룹 대 GI-5005로 처리된 그룹에서 종양 보유 마우스의 평균 종양 부피는 2488 \pm 636 대 1264 \pm 548mm³이었다). 그러나 전술된 EL4-NS3로 획득된 결과와 대조되게 HCV NS3 단백질이 A20-NS3 종양 보유 마우스 유래의 모든 종양에서 발현되었다 (데이터가 제시되지는 않았음).

GI-5005의 면역치료 특성은 도 22에 나타낸 이식된 종양 세포의 수가 다양화된 2차 연구에서 확인되었다. 간단히 설명하면, (그룹 당 5마리의) BALB/c 마우스가 2.5 x 10⁴, 5.0 x 10⁴ 또는 1 x 10⁵ A20-NS3 B 림프종 세포로 피하 주입되었다. 마우스는 종양 이식 후 7, 14 또는 21일째에 PBS 또는 10YU의 GI-5005으로 종양에 이격된 피부 위치로의 피하 주입에 의해 치료 면역화되었다. 종양 부피는 치료의 개시 후 지정된 일자에 측정되었다. 결과는 치료 개시 후 24일째에 평균 종양 부피 \pm S.D. (도 22a) 및 종양 보유 마우스의 백분율 (도 22b)로서 표현한다.

실시예 7

다음 실시예는 본 발명에 따른 효모 백신으로의 독성 연구를 설명한다.

전술된 바와 같이 GI-5005 TarmogenTM이 지금까지 많은 상이한 연구에서 300마리 이상의 마우스에게 투여되었을 때 총체적으로 관찰 가능한 독성은 보이지 않았다. 효모계 백신 기반을 이용한 다른 관련 생산물은 주요한 관찰 가능한 독성 없이 마우스, 래트, 래비트, 돼지꼬리를 갖는 붉은 털 마카크 원숭이에게 투여되어 왔다. GI-5005 TarmogenTM에 대한 다른 효모계 생산물의 유사성과 안정성 데이터의 관련성 때문에 GI-5005 TarmogenTM에 대한 많은 비임상적 안전성 평가가 독성 데이터 또는 GI-5005에 후속되어 설명된다.

상기 연구의 목적은 수컷 및 암컷 뉴질랜드 래비트에서 연속적으로 13주까지 1mL의 고정된 용량 부피로 주별로 한 차례 피하 주입하고(1일, 8일, 15일, 22일, 29일, 36일, 43일, 50일, 57일, 64일, 71일, 78일, 85일 및 92일에 투여) 특정된 회복/검시 시간을 거쳐서 GI-5005의 독성 영향을 결정하기 위한 것이다(표 3). 용량은 이전 연구로부터 이용 가능한 데이터를 기반으로 선택되었다. 피하 경로는 사람에서 상기 검사 물품의 투여의 의도된 경로이다. 중간 보고는 아래 정리된 바와 같다. 5 마리의 수컷 및 5 마리의 암컷 뉴질랜드 화이트 래비트로 이루어진 세 개의 처리군 (그룹 2 내지 4)은 검사 물품을 1, 10 및 1000 효모 유닛(YU)의 해당 용량으로 투여받았다. 5 마리의 동물/성으로 이루어진 대조군 (그룹 1)은 비히클인 멸균된 인산 완충 용액(PBS)을 받았다. 검사 물품 또는 비히클은 1, 8, 15, 22, 29일에 한 차례 투여되었다. 추가로 5 마리의 동물/성/그룹 (저 및 중용량 그룹) 및 10 마리의 동물/성/그룹 (고용량 그룹)으로 이루어진 3개의 처리군 (그룹 6 내지 8)은 검사 물품을 1, 10 및 100YU의 해당용량을 투여받았다. 10마리의 동물/성의 대조군 (그룹 5)은 비히클 PBS를 받았다. 그룹 5-8에서 검사 물품 또는 비히클은 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85 및 92일에 한 차례 투여되었다. 그룹 5-8의 5 마리의 동물/성이 94일째에 희생되었다. 그룹 5 및 8에 남아있는 5마리의 동물/성은 약 23일의 회복 기간 동안 유지되었다.

[표 3]
래비트 GLP 독성 연구 설계

그룹 번호	치료	용량 효모 유닛 (YU)*	초기 M/F	말기 검시 (31일) M/F	말기 검시 (97일) M/F	회복기 검시 (120일)* M/F
1	PBS	0	5/5	5/5		
2	GI-5005	1	5/5	5/5		
3	GI-5005	10	5/5	5/5		
4	GI-5005	100	5/5	5/5		
5	PBS	0	10/10		5/5	5/5
6	GI-5005	1	5/5		5/5	

7	GI-5005	10	5/5		5/5	
8	GI-5005	100	10/10		5/5	5/5
* 검사 및 대조군 물품은 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85 및 92일째에 단일 피하 주입(1.0mL 총 부피)으로서 투입될 것이다. 1 호모 유닛은 1천만의 열로 살상된 호모 세포와 동등하다. 보고 목적을 위하여 호모 유닛은 YU로서 간략하게 표기될 것이다.						

모든 동물은 이환율, 사망률, 손상 및 하루 두차례 사료 및 물의 이용도에 대하여 관찰되었다. 상세한 임상 조사, 주입 부위 염증 평가, 감염성 조사 및 체중과 사료 소비량 측정이 연구 과정 중에 수행되었다. 임상 병리학적 소견(혈액학, 임상 화학 및 요검사)이 투여전, 각 투여 다음날에 모든 생존 동물에 대하여 그리고 31일째 부검시에 그룹 1 내지 4의 동물에 대하여 수행되었다. 추가 혈액 시료가 투여 전 및 투여 후 1시간에 혈청 항체 분석을 위해 모든 생존 동물로부터 그리고 31일째 부검시에 그룹 1 내지 4의 동물의 경우에 혈청 항체 분석을 위하여 동물로부터 수집되었다. 31일, 97일 및 120일의 부검시에 적합한 그룹에 속한 모든 동물은 안락사되었고 프로토콜에 설계된 기관 중량 측정과 함께 완전한 육안 및 현미경 조사가 수행되었다.

생존, 임상적 발견, 사료 소비, 감염성 또는 기관 중량에 대한 무처리와 관련된 효과가 관찰되었다. 현미경적으로, 처리와 관련된 변화가 모든 용량에서 양 성의 주입 부위에서 관찰되었고, 섬유증, 아급성 염증 및 괴사를 포함한다. 또한, 육아종 염증이 주입 부위의 전체는 아니지만 일부에서 발견되었다. 이러한 발견의 빈도 및 심각성은 일반적으로 용량과 관련이 있었다. 1YU에서 암컷과 10 및 100YU에서 양 성의 골수에 과립구 과다형성 및 10YU에서 암컷과 100YU에서 양 성의 비장에서 소포림프종 과다형성 및/또는 반응성 적색 속질/간질 과다형성이 주입 부위에서 관찰된 염증에 대한 이차 반응으로 간주되었다. 이러한 발견은 현미경으로 주입 부위에서 두꺼워지는 조직의 발견과 관련이 있다. 흥반 및 부종으로 이루어진 치료와 관련된 자극이 100YU에서 양 성의 주입 부위에서 관찰되었고, 최소한의 발견이 10YU에서 양 성에서 주지되었으며, 치료와의 관계를 제안한다. 주입 부위에서 투여 후에 회복의 기미는 없었다. 효과가 적당하였음에도 불구하고 생체중의 감소가 100YU의 양 성에서 주지되며, GI-5005로의 치료에 대한 관계를 제안한다.

혈액학 및 임상 화학에서 치료와 관련된 효과가 관찰되었고 주입 부위에서 관찰된 국소적인 염증 반응에 대한 이차로서 간주되었다. 중성구 개수에서의 증가를 반영하며 백혈구 개수에서의 치료와 관련된 증가는 일반적으로 발병 및 심각성이 용량과 관련되면서 모든 GI-5005 처리된 그룹에서 주지되었다. 중성구 개수의 일부 회복은 다음 투여 이전에 주지되었다. 글로불린 수치에서의 치료와 관련된 증가가 일반적으로 발병 및 심각성이 용량과 관련되면서 관찰되었다. 증가는 회복의 기미는 없이 시간에 따라 점진적이었다.

이러한 연구의 조건과 발견을 기반으로 수컷 및 암컷 래비트에게 1, 10 및 100YU의 용량으로 GI-5005의 투여는 명백한 전신적 독성을 유발하지 않았다. 일차적으로 치료와 관련된 발견은 주입 주위에서의 섬유증, 아급성 염증 및 괴사의 국소적인 영향에 제한되었고, 검사된 최고의 용량을 제외하면 빈번하지 않았고 약하거나 중간 정도였다. 주입 부위 반응은 임상 설정시에 강력한 용량 제한 효과를 제시할 것이다. 중성구 개수 및 글로불린 수치의 동반 증가는 국소적 염증 반응에 대한 이차적인 것으로 간주되었다.

래비트 독성 연구에서 GI-5005의 면역원성 및 이 연구의 면역 독성학적 관련성을 입증하기 위하여 림프구 증폭 분석법이 수행되었다. 래비트에서 림프구 증폭을 분석하기 위한 표준화된 방법은 없지만, 호모 단백질에 반응하여 림프구 증폭의 비최적화된 분석법이 5회 면역화된 후 2일째 (31일)에 회수된 회맹장 및 거드랑이 림프 노드로부터 분리된 림프구를 사용하여 수행되었다. 각 래비트로부터 분리된 림프 노드 세포 현탁액은 지정된 개수의 열로 살상된 GI-5005 호모 세포와 96구의 바닥이 U자형인 판에서의 조직 배양에 (구당 4×10^5) 위치되었다. 림프구 증폭은 배양 3일째에 18시간 동안 $1\mu\text{Ci}$ /구의 ^3H -TdR과 합침으로써 측정되었다. 수컷 (도 23a) 대 암컷 (도 23b) 림프 노드 세포에 대하여 얻어진 평균 자극 지수는 도 23에 나타나 있다 (결과는 각 용량 그룹 내 각 래비트로부터 나온 평가 가능한 림프 노드 세포 시료에 대하여 얻어진 평균 자극 지수 \pm S.E.M.으로 제시된다). 결국, 데이터는 비히클인 PBS로 면역화된 10 중 1 래비트만이 GI-5005 호모에 대하여 10 이상의 자극 지수를 보이는데 반하여 1, 10 또는 100 YU GI-5005로 면역화된 래비트들 10 중 9, 10 중 7, 10 중 8이 각각 10 보다 높은 자극 지수로 반응하였다. 수컷 대 암컷 래비트 림프 노드 세포의 반응성 간에 어떠한 차이도 인식되지 않았고 용량 반응 효과는 명백하지 않았다.

MPI 연구 962-003의 일부로서 GI-5005로 주입된 래비트 (그룹 1-4)의 혈청에서 효소 결합 면역흡착 분석법(ELISA)이 항-사카로미세스 세레비시에 항체(ASCA)를 검출하고 역가를 측정하기 위해 이용되었다. 실험된 혈청 시료는 첫회 주입

이전인 1일에 그리고 5회 주별 주입 이전인 29일에 수득되었다. 모든 래비트는 연구의 개시점에서 1:100 이하의 ASCA 역가를 보였다(표 4). 반대로 GI-5005을 받은 모든 래비트는 4회 주별 주입의 투여 후에 상승된 ASCA 역가를 보였다. 그러나, 상기 역가는 1:10,000 이하로 낮았으며, 용량 반응 효과는 관찰되지 않았다.

[표 4]

MPI 연구 962-003의 일부로서 GI-5005로 주입된 래비트 (그룹 1-4)의 혈청에서 항-사카로미세스 세레비시에 항체 (ASCA)의 요약

주입	평균 ASCA 유닛 (1일)	평균 ASCA 유닛 (15일)	평균 ASCA 유닛 (29일)
PBS	4+/-5	3+/-4	6+/-8
GI-5005(1YU)	4+/-7	3+/-4	84+/-43
GI-5005(1YU)	2+/-2	6+/-10	127+/-162
GI-5005(1YU)	6+/-10	19+/-17	165+/-84
양성의 래비트 항혈청*	311+/-85	311+/-85	311+/-85

* 양성의 대조군 래비트 항혈청의 1:1000 희석액은 상기 분석법에서 이용될 때 311+/-85 ASCA 유닛을 포함하며, 95%의 신뢰수준 내에서 관찰된 300이하의 ASCA 유닛 값은 1:1000 이하의 역가를 나타낼 것임을 제안한다. 평균 데이터 +/- S.D.은 하기 표에 나타낸다.

PBS 또는 1, 10 또는 100YU의 GI-5005로 5주 동안 주별로 면역화된 래비트에서 생산된 HCV-NS3 및 코어 특이적 혈청 항체의 존재는 이러한 TarmogenTM에 함유된 이중성 단백질에 대하여 유도된 체액성 항체 반응에 대한 더 나은 이해를 위하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 정량적으로 평가되었다. 면역화된 동물로부터 수득된 혈청에서는 어떠한 HCV 특이적 항체도 관찰되지 않았다. 반대로 NS3 및 코어 단백질과 특이적으로 반응하는 항체는 100YU의 GI-5005로 5 주별 용량을 투여받은 후 31일째 검사된 래비트 9 중 7로부터 나온 혈청 시료 및 10YU 용량 그룹에 속한 동물의 3 중 1로부터 나온 혈청 시료에서 검출되었다. 31일에 PBS 또는 1YU 그룹의 혈청 시료에서는 HCV 특이적 항체가 검출되지 않았다. 상기 분석은 GI-5005에 함유된 이중성 HCV NS3-코어 단백질에 대한 혈청 항체의 용량 의존적 유도는 래비트에서 TarmogenTM의 피하 투여의 결과로서 발생한다는 것을 보여준다.

예비적인 97일 및 120일의 임상 병리학 및 총체적 관찰 데이터는 31일의 코호트(cohort)로부터 나온 발견과 일관된다. 수컷 및 암컷 래비트에게 GI-5005를 1, 10 및 100YU의 용량으로 13회 주별 투여한 것은 어떠한 명백한 전신 독성을 유발하지 않았다. 일차 치료와 관련된 발견은 일반적으로 빈도 및 심각성과 용량과 관련되면서 국소 부위 반응에 제한된다. 그러나, 100YU 용량 그룹에서는 보다 심각한 육아종 변화, 섬유증 및 괴사가 주입 부위 반응에서 관찰되었고 임상적 설정에서 강력한 용량 제한 효과를 제시할 것이다. 이러한 97일 코호트의 조직병리학적 분석은 여전히 이용 가능하지 않다. 중성구 개수에서의 증가를 반영하면서 백혈구 개수에서의 치료와 관련된 증가 및 글로불린 수치에서의 증가는 둘 모두의 효과에 대하여 일반적으로 개시 및 심각성이 용량과 관련되면서 관찰되었다. 이러한 증가는 회복의 기미 없이 시간에 따라 점진적이 경향이 있었다.

GI-5005 TarmogenTM 시리즈 생산물 및 프로토타입으로 주입된 331마리의 C57BL/6 및 BALB/c 마우스로부터 얻은 총체적인 안전성 평가는 치료와 관련된 사망은 없었고, 약하거나 중간 정도의 모발 상실 및 약 5% 동물의 주입 부위에서 지연형 과감수성과 일관된 약간의 궤양화를 동반한 염증을 보였다. 주입 부위 반응성은 일반적으로 피부 외상에 보다 감수성인 C57BL/6 마우스에 제한되었으며, 그룹 하우징(housing) 조건으로부터 발생된 털다듬기 행위에 대하여 이차적인 것일 수 있다. 다른 총체적인 임상적 비정상 또는 역 반응은 관찰되지 않았다.

[표 5]

GI-5005 Tarmogen™ 및 프로토타입으로 수행된 안전성 연구의 요약

연구 유형	검사된 종	결론
안전성 평가	마우스	300마리 이상의 마우스가 피하 경로를 통하여 열로 불활성화된 손상되지 않은 효모로 주입되었다. G25BL/6 마우스의 약 5%에서 주입된 약하거나 중간 정도의 피부 반응을 제외하고는 주입 부위에서 역 효과가 관찰되지 않았으며, 10YU만큼 높은 용량에서 어떤 마우스에서도 어떤 시간대에서도 해로운 효과가 관찰되지 않았다.
28일째 GLP 안전성 연구	래비트	수컷 및 암컷 래비트에게 1, 10 및 100YU 용량으로 GI-5005의 총 5회 용량의 주별 투여는 명백한 전신적 독성을 유발하지 않았다. 역 반응은 약하거나 중간 정도의 주입 부위 반응에 제한되었다. 연구 동물은 치료 요법을 용인하였다.
97일째 GLP 안전성 연구	래비트	예비적인 97일 임상 병리학 및 총체적인 관찰 데이터는 31일 고호트의 발견과 일관된다. 어떠한 명백한 전신적 독성도 없었다. 일차 치료와 관련된 발견은 국소 부위 반응에 제한되며 빈도 및 심각성은 일반적으로 용량과 관련이 있었다. 97일의 조직병리학적 분석은 여전히 이용 가능하지 않다. 종성구 수치에서의 증가를 반영하며 백혈구 수치에서의 치료와 관련된 증가 및 글로불린 수치에서의 증가가 또한 관찰되었고 일반적으로 발병 및 심각성은 이 두 효과에 대하여 용량과 관련된다.

여기서 기재되거나 인용된 각 간행물은 이들의 전문은 본 발명에서 참조로 인용된다.

참조문헌

1. Kiyosawa et al., Hepatology 12 (1990):671-675.
2. Tong et al., NEJM 332 (1995):1463-1466.
3. Yano et al., Hepatology 23 (1996):1334-1340.
4. Gordon et al., Hepatology 28 (1998) 2:562-567.
5. Di Bisceglie et al., Hepatology 14 (1991):969-974.
6. Koretz et al., Ann Intern Med 119 (1993):110-115.
7. Mattson et al., Liver 13 (1993):274-276.
8. Tremolada et al., J Hepatol 16 (1992):273-281.
9. Fattovich et al., Gastroenterology 112 (1997):463-472.
10. Serfaty et al., Hepatology 27 (1998):1435-1440.
11. Armstrong et al., Hepatology 31 (2000):777-82.
12. Shiratori et al., Annals of Internal Medicine, 142 (2005):105-114.
13. Yoshida et al., IHIT Study Group (Inhibition of Hepatocarcinogenesis by Interferon Therapy). Ann. Intern. Med 131 (1999):174-81.
14. Okanoue et al., Viral hepatitis therapy study group. J Hepatol 30 (1999): 653-9.
15. Shoukry et al., Annual Rev. Microbiol 58 (2004):391-424.
16. Stubbs et al., Nat Med 7 (2001):625-629.

17. Lu et al., Cancer Research 64 (2004):5084-5088.
18. Haller et al., Abstract, "A novel yeast-based immunotherapeutic product for chronic hepatitis C virus infection". AASLD Meeting, March 4-5, 2005, Chicago, IL
19. Mondelli et al., Journal of Hepatology 31 (1999):65-70.
20. Day et al., Journal of Virology (2002):12584-12595.
21. Lauer and Walker, New England Journal of Medicine 345 (2001) 1:41-52.
22. Grakoui et al., Science Mag. Report 342 (2003).
23. Yewdell et al., Adv. Immunol 73 (1999):1-77.
24. Shoukry et al., The Journal of Experimental Medicine 197 (2003):1645-1655.
25. Matzinger, Science 296 (2002):301-305.
26. Faló et al., Nat Med 1 (1995):649-53.
27. Kikuchi et al., Int. Immunopharmacol, 2 (2002):1503-1508.
28. Tada et al., Microbiol Immunol, 46 (2002):503-512.
29. Pichuanes et al., "Expression of heterologous gene products in yeast. *In* Protein Engineering - Principles and Practice. J. L. Cleland and C. S. Craik, editors." Wiley-Liss, New York (1996):129-162.
30. Underhill, Eur. J. Immunol, 33 (2003):1767-1775.
31. Ozinsky et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 97 (2000):13766-13771.
32. Akira et al., Nat. Immunol, 2 (2001):675-680.
33. Medzhitov et al., Science 296 (2002):298-300.
34. Gantner et al., J. Exp. Med, 197 (2003):1107-1117.
35. Huang et al., Science, 294 (2001):870-875.
36. Savolainen et al., Allergy 53 (1998):506-512.
37. Mari et al., Clin. Exp. Allergy, 33 (2003):1429-1438.
38. Kortekangas-Savolainen et al., Clin Exp Allergy 24 (1994):836-842.
39. Belchi-Hernandez et al., Allergy Clin. Immunol, 97 (1996):131-134.
40. Dentico et al., Eur J Epidemiol, 8 (1992):650-655.
41. Joossens et al., Gastroenterology 122 (2002):1242-7.
42. Sandborn et al., Inflammatory Bowel Dis, 7 (2001):192-201.

43. Ponton et al., Med. Mycology 38 (2000):225-236.

44. Wheeler et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 100 (2003):2766-2770.

본 발명의 다양한 실시예가 상세히 기술되어 있지만 당업계에서 본 실시예의 변형 및 응용이 가능함은 명백하다. 그러나 상기 그러한 변형 및 응용은 이하의 청구항에 기재된 본 발명의 범위 내에 속하는 것으로 명백히 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

도 1a 및 1b는 본 발명에 따른 효모 비히클에서 절단된 NS3-코어 융합 단백질 및 불활성화된 HCV NS3 융합 단백질의 발현을 보여주는 웨스턴 블롯(도 1a) 및 쿠사미 염색(도 1b)의 디지털 이미지이다.

도 1c는 본 발명에 따른 효모 비히클에서 절단된 HCV E1-E2 융합 단백질의 발현을 보여주는 웨스턴 블롯의 디지털 이미지이다.

도 1d는 본 발명에 따른 효모 비히클에서 트랜스멤브레인(TM) 도메인이 결실된 HCV NS4b 융합 단백질의 발현을 보여주는 웨스턴 블롯의 디지털 이미지이다.

도 2는 절단된 NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 본 발명의 백신이 NS3- 및 코어 특이적인 림프구 증폭을 유도한다는 것을 예시하는 그래프이다.

도 3a 내지 3c는 절단된 NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 본 발명의 백신이 NS3 특이적인 세포독성 효과기 세포를 유도한다는 것을 예시하는 그래프이다.

도 4a 및 4b는 절단된 NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 본 발명의 백신이 HCV NS3 또는 코어를 코딩하는 재조합 백신 바이러스로 감염된 종양 세포를 살상하는 세포독성 효과기 세포를 유도한다는 것을 보여주는 그래프이다.

도 5는 절단된 NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 본 발명의 백신이 마우스 비세포(splenocyte)에 의한 초기염증성 사이토카인의 분비를 유도한다는 것을 예시하는 그래프이다.

도 6은 절단된 NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 본 발명의 백신으로 1회, 2회 및 3회 주별 면역화에 의해 유도된 증폭한 림프구를 나타내는 그래프이다.

도 7a 내지 7d는 절단된 NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 본 발명의 백신으로 1회, 2회 및 3회 주별 면역화에 의해 유도된 세포독성 효과기 세포 활성을 나타내는 그래프이다.

도 8a 및 도 8b는 절단된 NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 본 발명의 백신으로 1회, 2회 및 3회 주별 면역화에 의해 유도된 초기염증성 효모 특이적인 사이토카인 분비 세포를 보여주는 그래프이다.

도 9는 서로 다른 면역화 프로토콜 하에서 절단된 NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 본 발명의 백신으로 면역화되고 부스팅된 BALB/c 마우스로부터 유래된 비장에서 림프구 증폭을 예시하는 그래프이다.

도 10은 서로 다른 면역화 프로토콜 하에서 절단된 NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 본 발명의 백신으로 면역화되고 부스팅된 BALB/c 마우스로부터 유래된 비장 효과기 세포에서 세포독성 효과기 세포 활성을 예시하는 그래프이다.

도 11a 및 11b는 절단된 NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 본 발명의 백신으로 유도된 림프구 증폭 반응의 지속성을 보여주는 그래프이다.

도 12a 및 12b는 절단된 NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 본 발명의 백신으로 유도된 세포독성 효과기 세포의 지속성을 나타내는 그래프이다.

도 13a 내지 13d는 절단된 NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 본 발명의 백신으로 유도된 효모 및 NS3 특이적 사이토카인 분비 세포의 지속성을 나타내는 그래프이다.

도 14a 내지 14i는 서로 다른 양의 절단된 NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 본 발명의 백신으로 유도된 세포독성 효과기 세포 활성을 예시하는 그래프이다.

도 15a 내지 15c는 서로 다른 양의 절단된 NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 본 발명의 백신으로 유도된 초기염증성 사이토카인 분비 세포를 나타내는 그래프이다.

도 16은 절단된 NS3-코어 융합 단백질 또는 불활성화된 HCV NS3 프로테아제 융합 단백질을 발현하는 본 발명의 백신이 BALB/c 마우스에서 HCV NS3를 발현하는 동계의 종양 세포로의 시험감염에 대하여 보호적 면역을 유도한다는 것을 나타내는 그래프이다.

도 17은 절단된 NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 본 발명의 백신이 C57BL/6 마우스에서 HCV NS3를 발현하는 동계의 종양 세포로의 시험감염에 대하여 보호적 면역을 유도한다는 것을 예시하는 그래프이다.

도 18은 "보호된" 마우스의 비장 세포에서 림프구의 증폭적 활성을 나타내는 그래프이다.

도 19는 "보호된" 마우스의 비장 세포에서 세포독성 효과기 세포 활성을 나타내는 그래프이다.

도 20은 절단된 NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 본 발명의 백신이 종양을 보유한 나이브(naive) 마우스로부터 분리된 비장 세포에서 세포독성 효과기 세포 활성을 자극한다는 것을 예시하는 그래프이다.

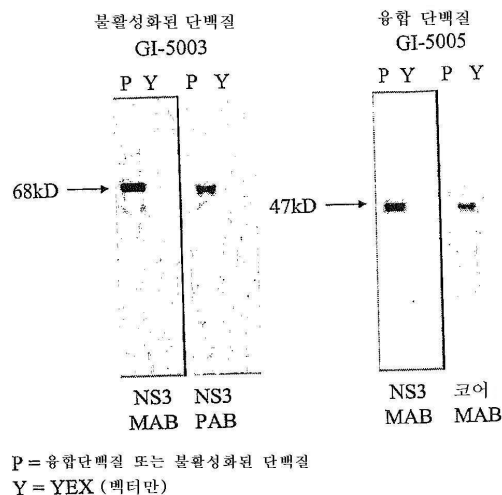
도 21은 절단된 NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 본 발명의 백신이 HCV NS3을 발현하는 동계의 B 세포 림프종을 보유한 BALB/c 마우스에서 치료 면역을 유도한다는 것을 나타내는 그래프이다.

도 22a 및 22b는 절단된 NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 본 발명의 백신이 HCV NS3을 발현하는 동계의 B 세포 림프종을 보유한 BALB/c 마우스에서 치료 면역을 유도한다는 것을 나타내는 그래프이다.

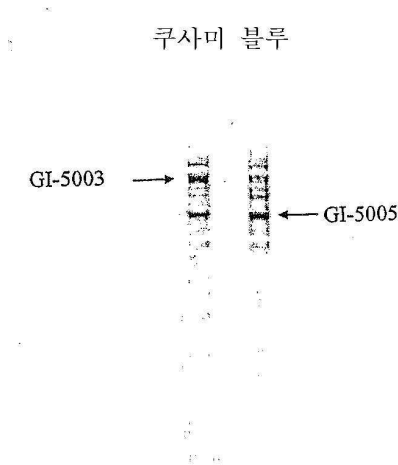
도 23a 및 23b는 절단된 NS3-코어 융합 단백질을 발현하는 본 발명의 백신이 암수의 뉴질랜드 화이트 래비트에서 효모 특이적인 림프구 증폭을 유도한다는 것을 나타내는 그래프이다.

도면

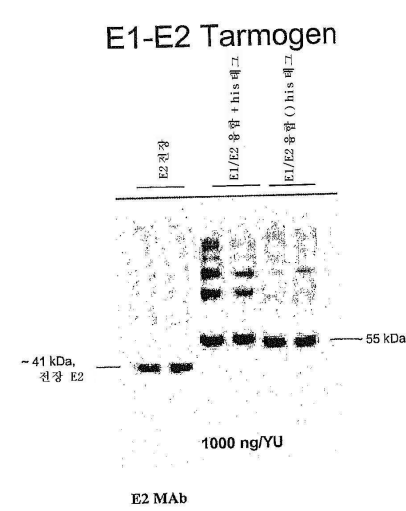
도면1a



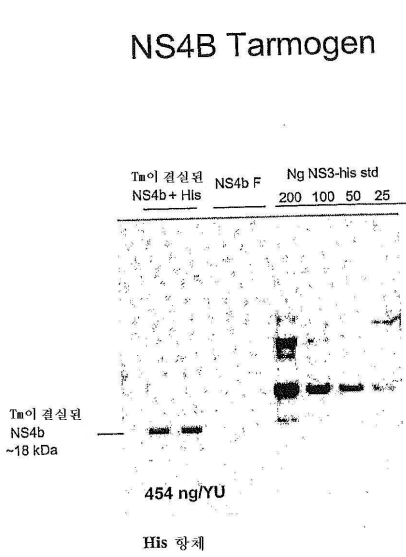
도면1b



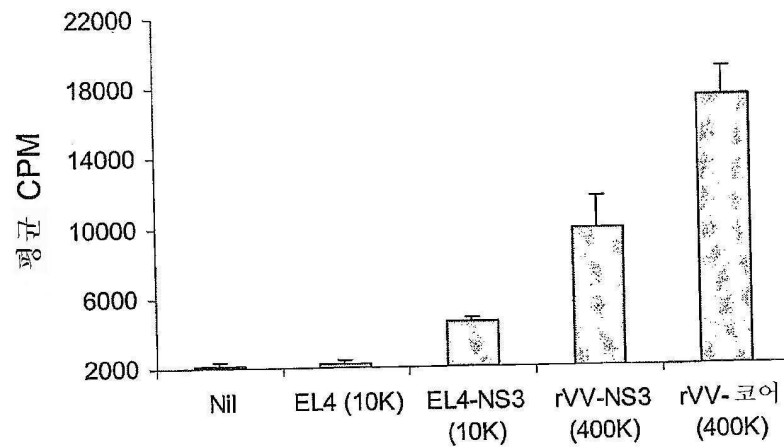
도면1c



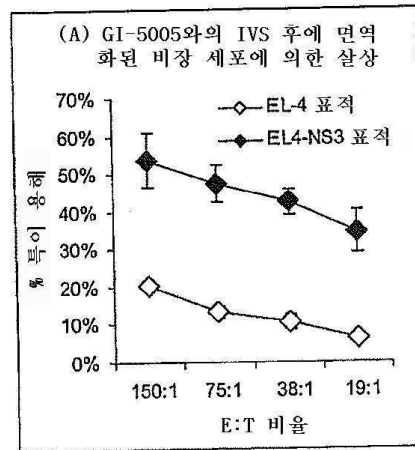
도면1d



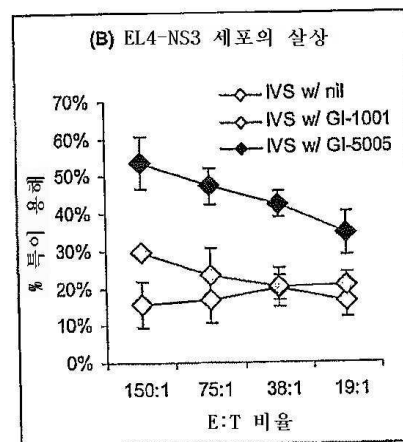
도면2



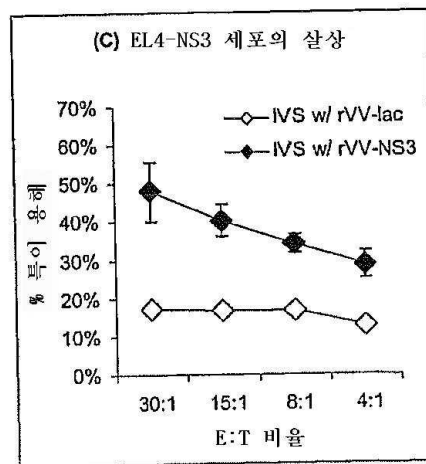
도면3a



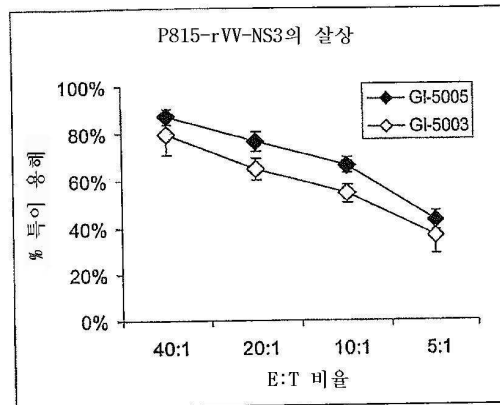
도면3b



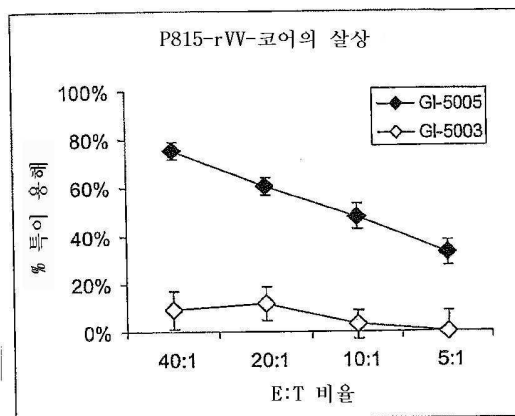
도면3c



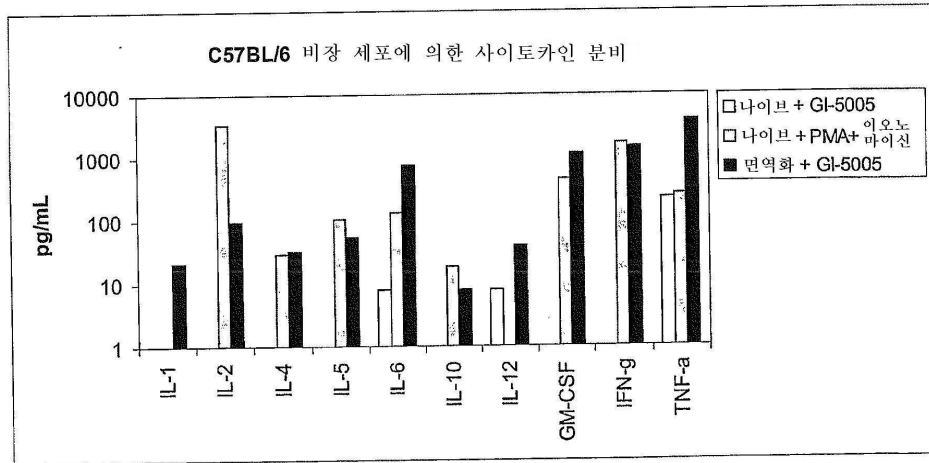
도면4a



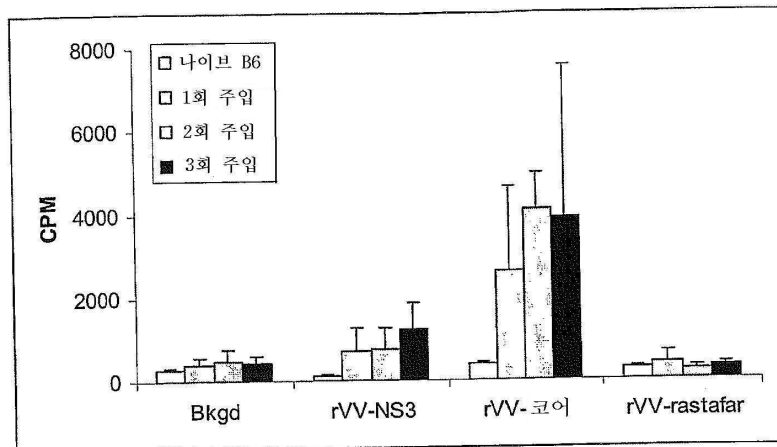
도면4b



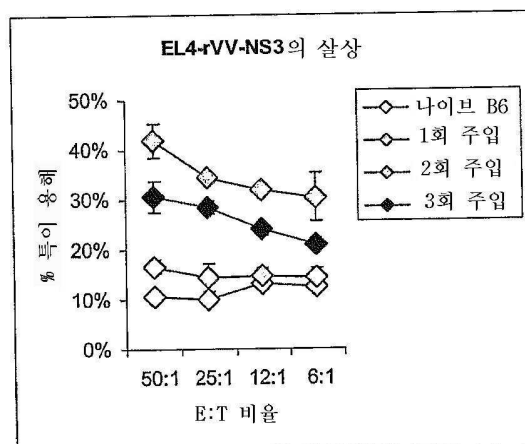
도면5



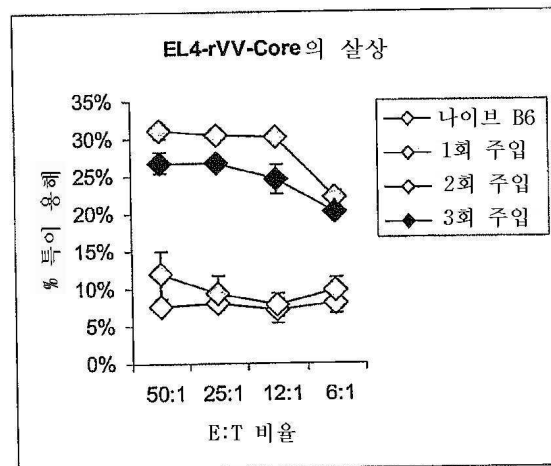
도면6



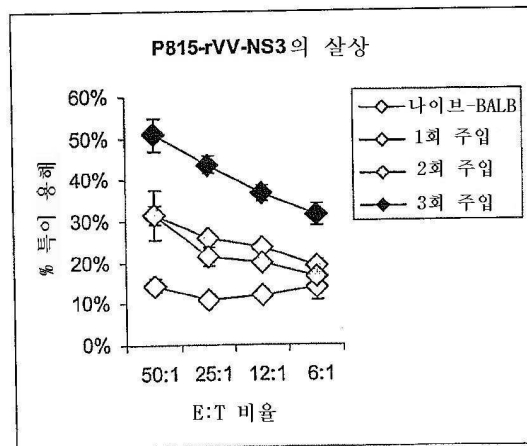
도면7a



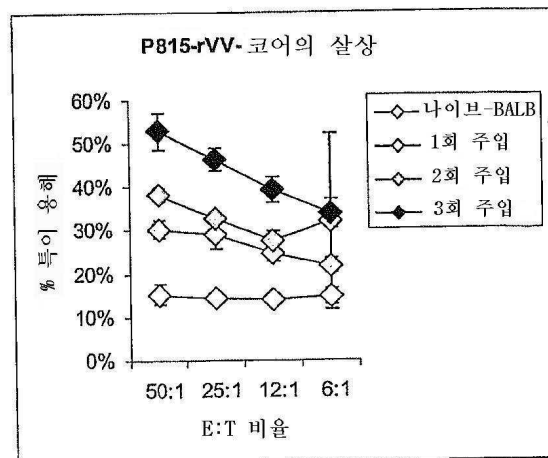
도면7b



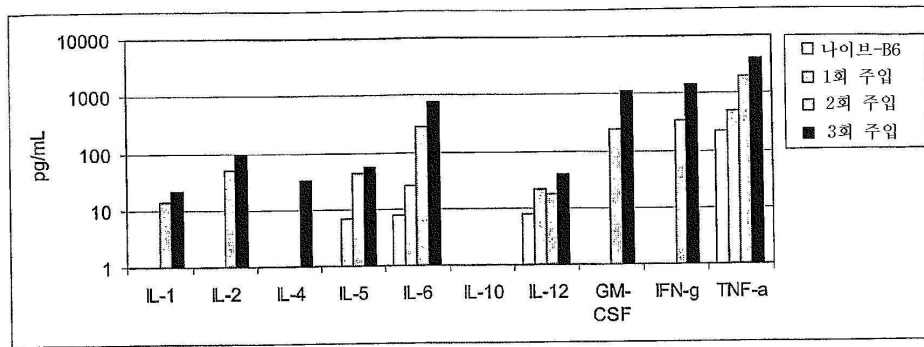
도면7c



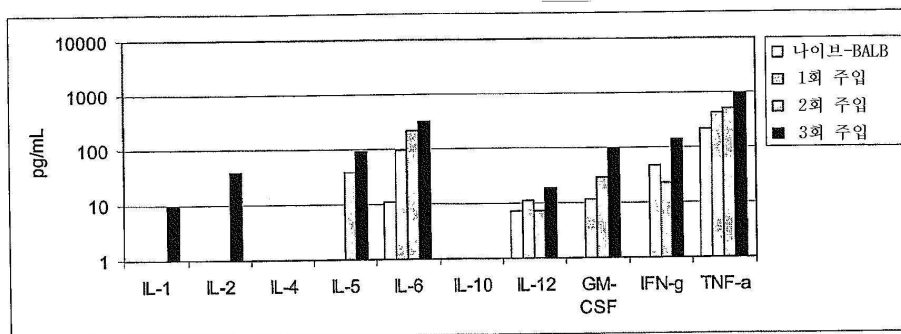
도면7d



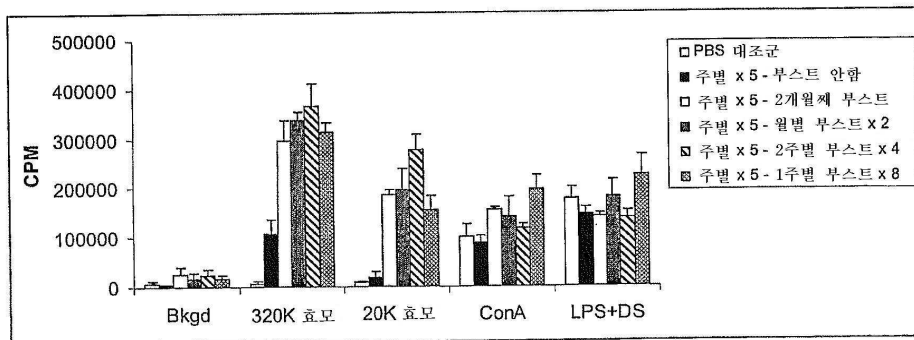
도면8a



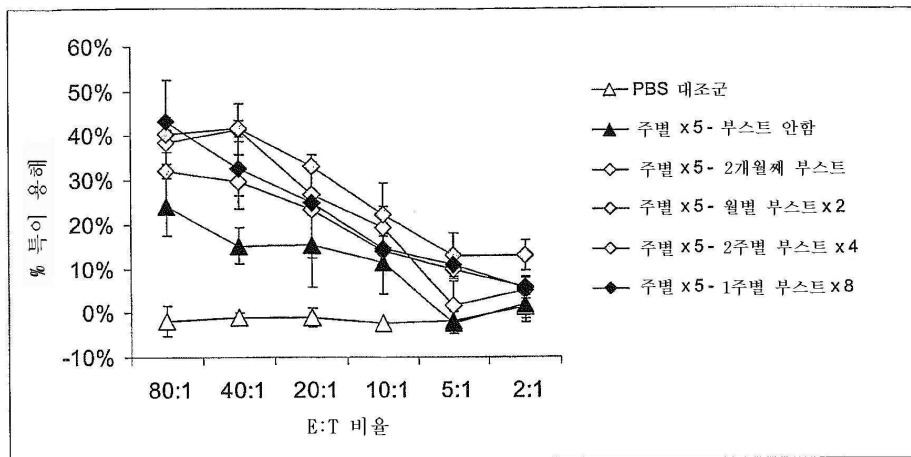
도면8b



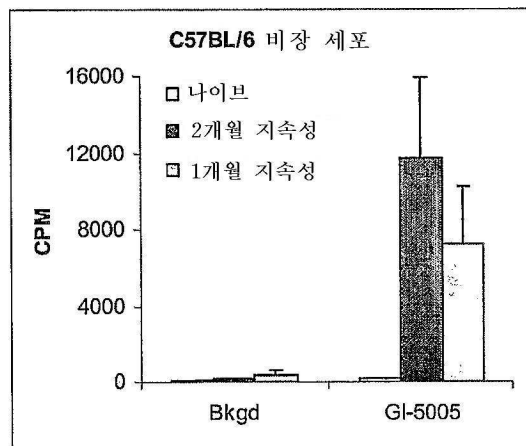
도면9



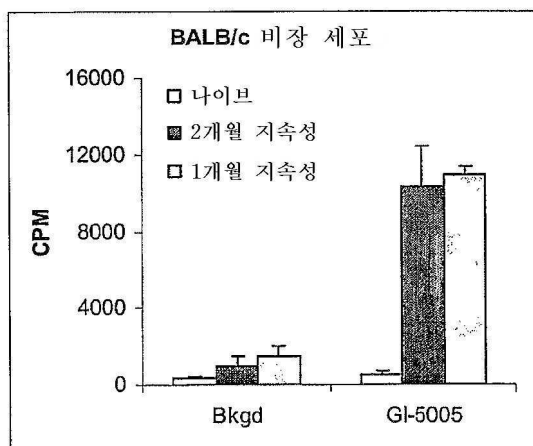
도면10



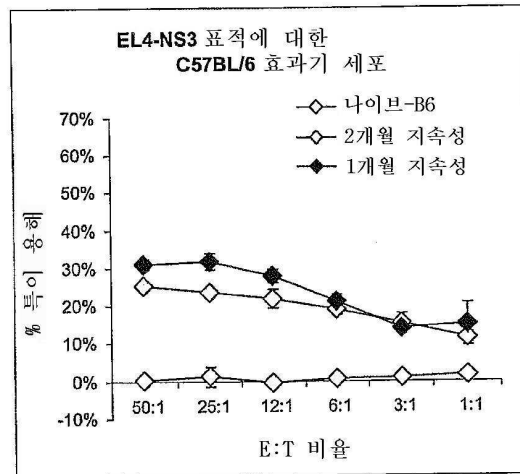
도면11a



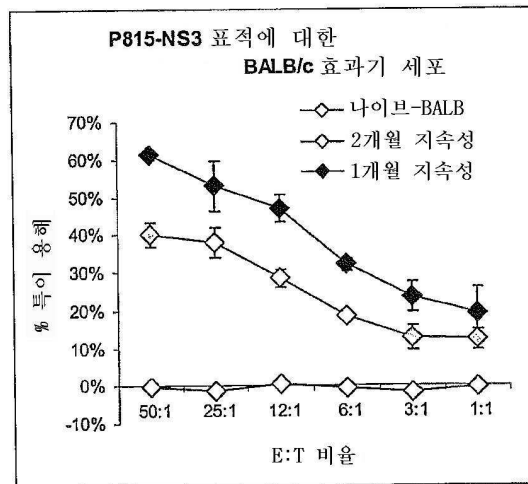
도면11b



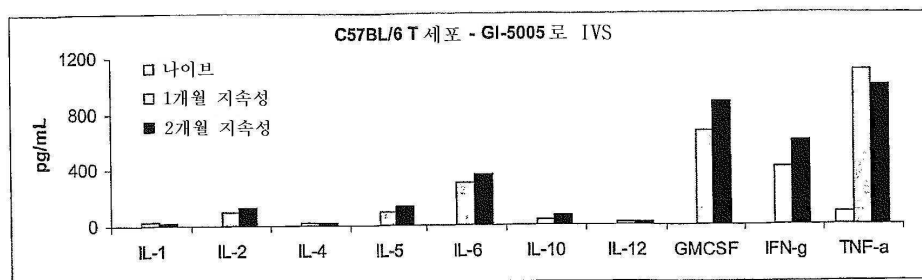
도면12a



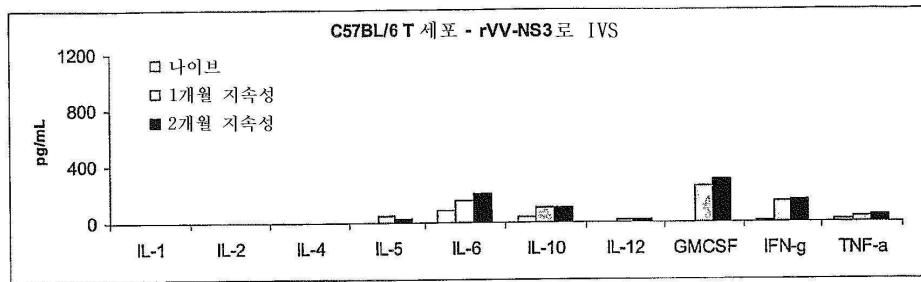
도면12b



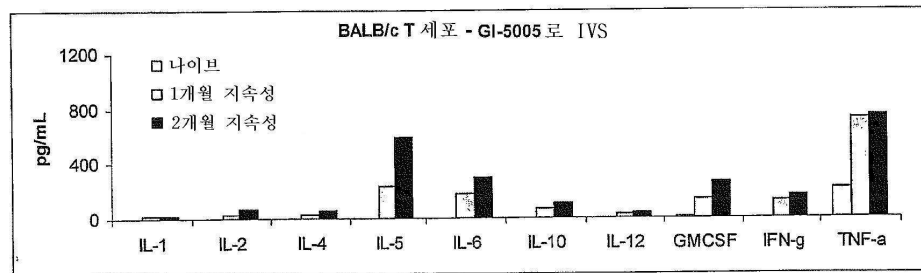
도면13a



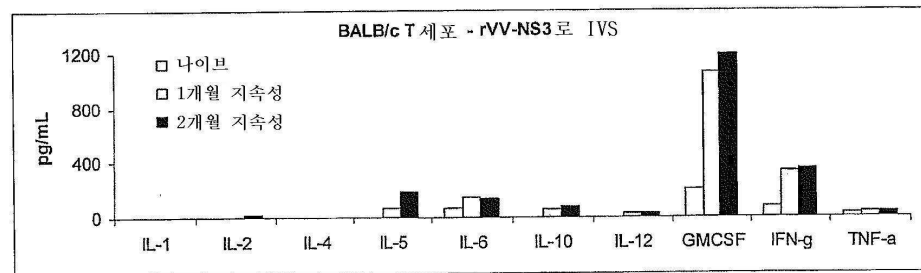
도면13b



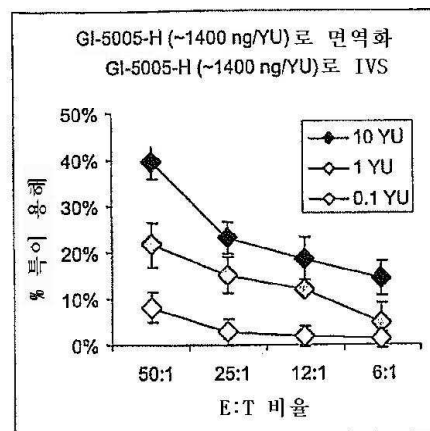
도면13c



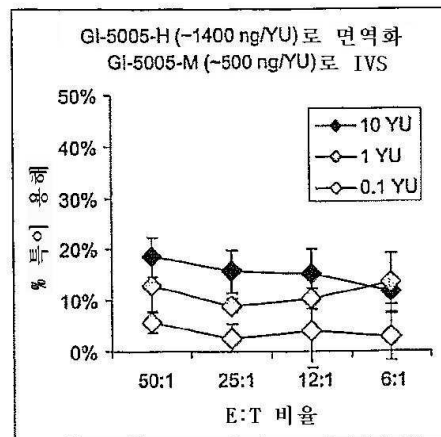
도면13d



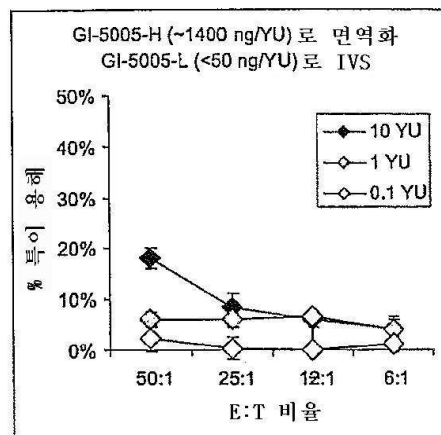
도면14a



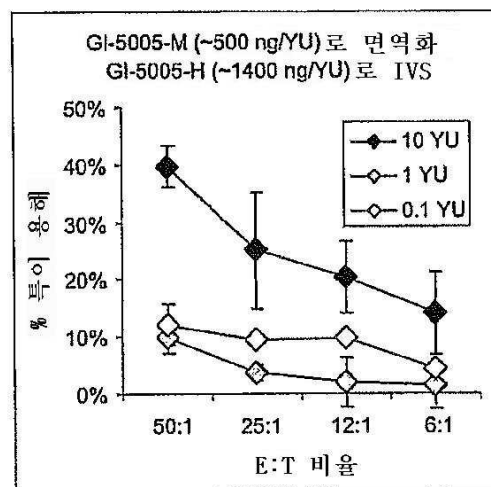
도면14b



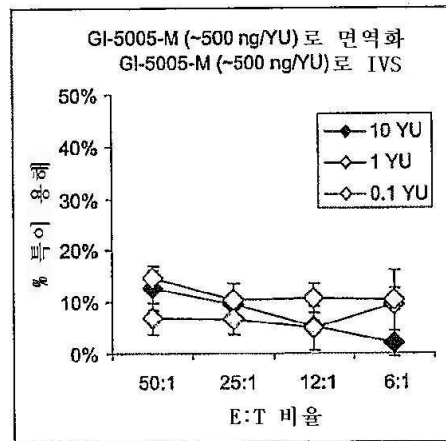
도면14c



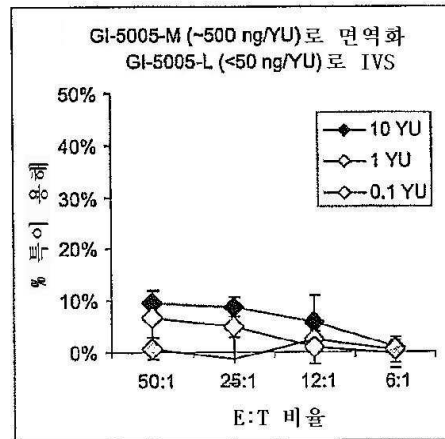
도면14d



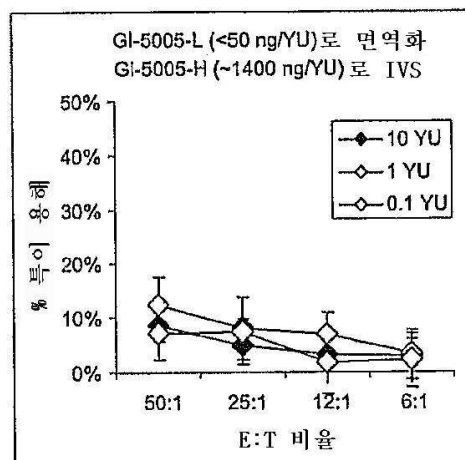
도면14e



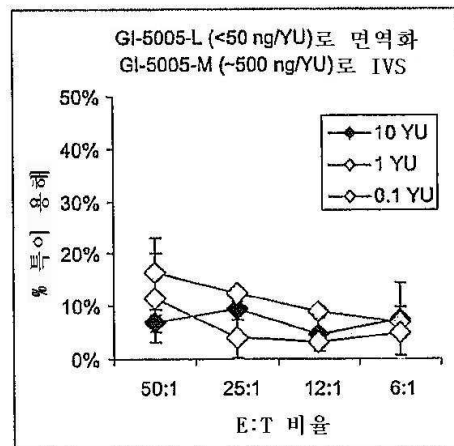
도면14f



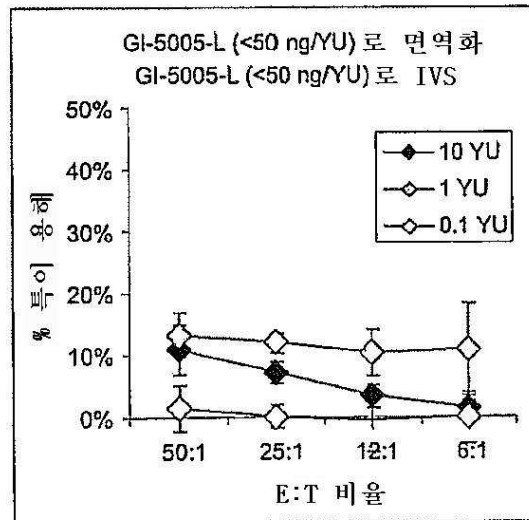
도면14g



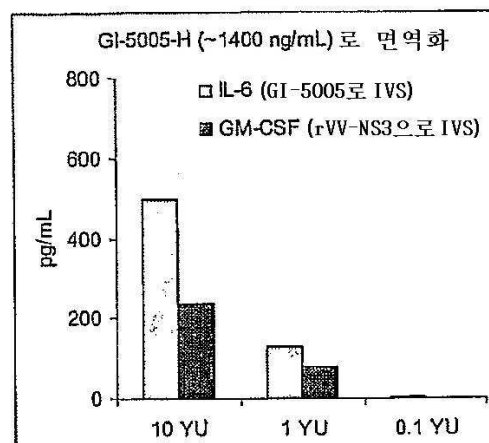
도면14h



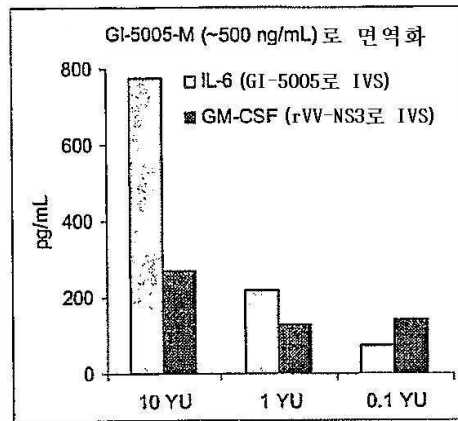
도면14i



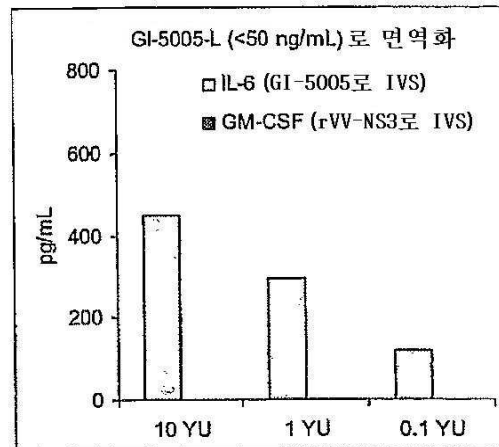
도면15a



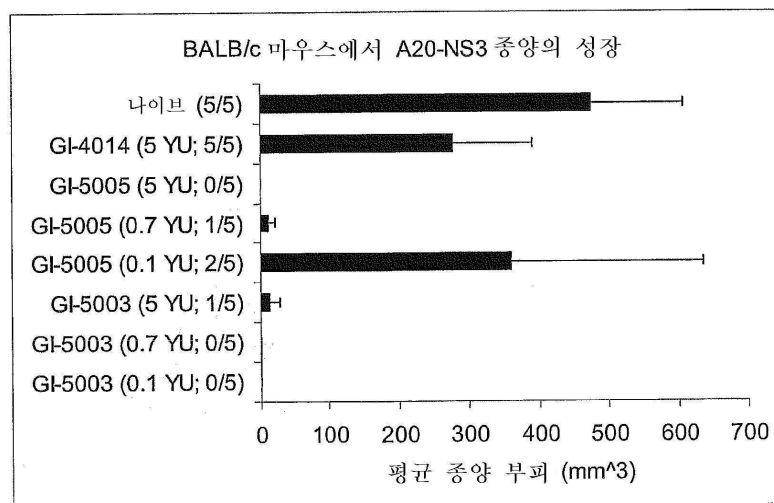
도면15b



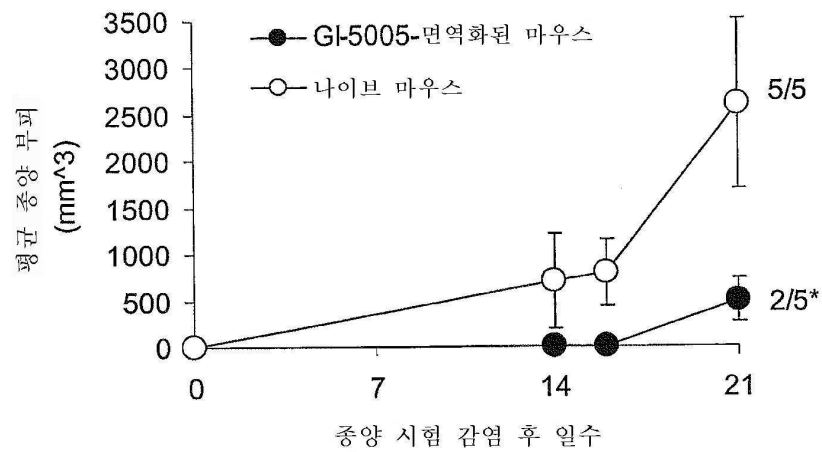
도면15c



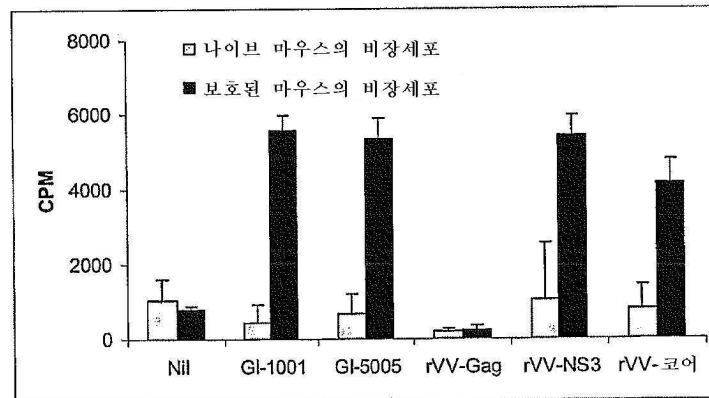
도면16



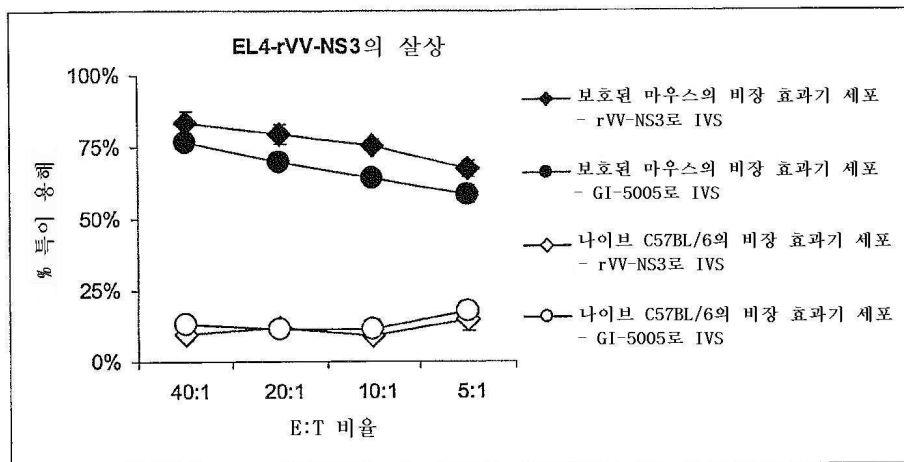
도면17



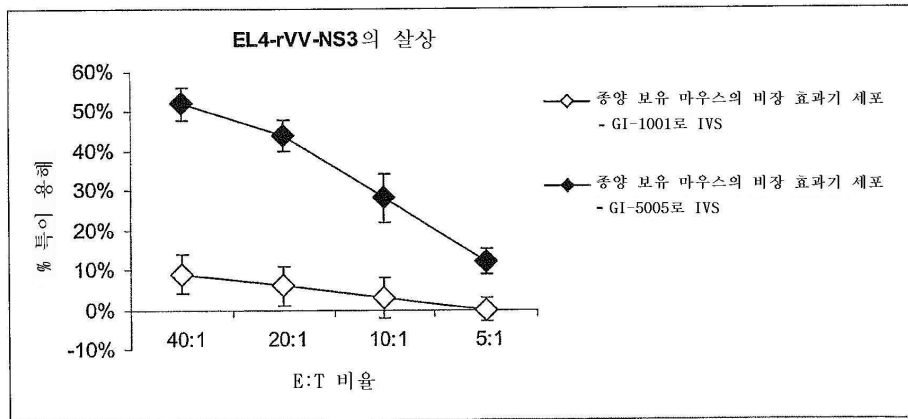
도면18



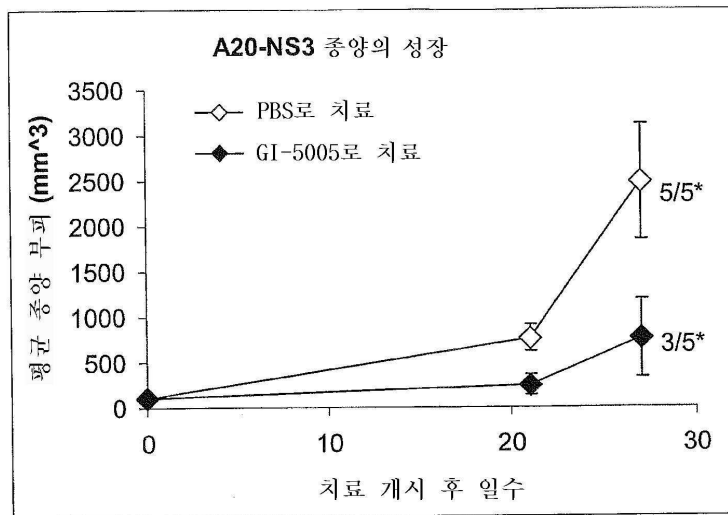
도면19



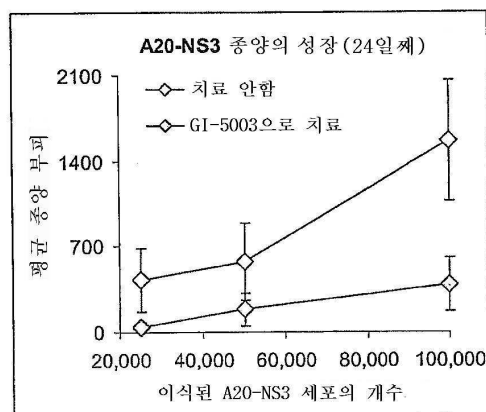
도면20



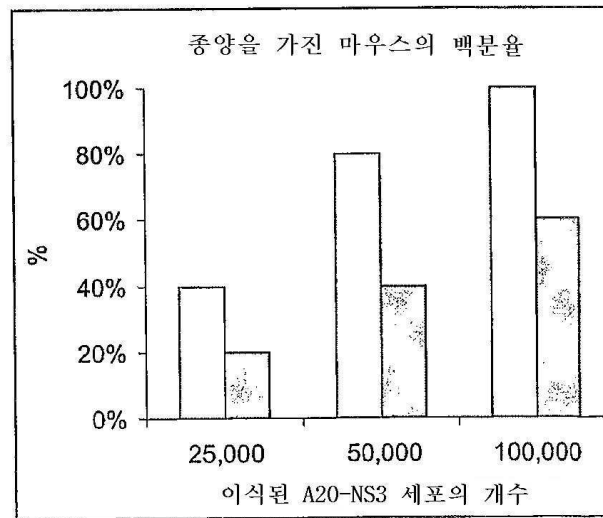
도면21



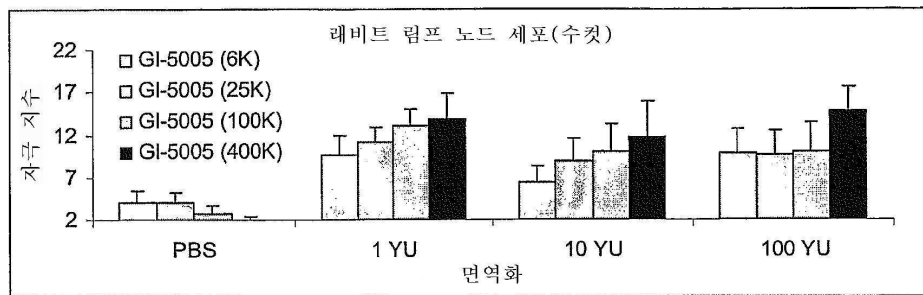
도면22a



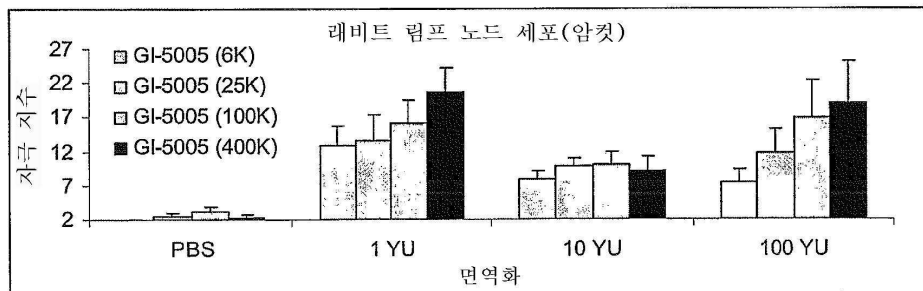
도면22b



도면23a



도면23b



서열목록

<110> GLOBEIMMUNE, INC.

<120> YEAST-BASED THERAPEUTIC FOR CHRONIC HEPATITIS C INFECTION

<130> P074GBI03US

<150> US 60/620,158

<151> 2004-10-18

<160> 21

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1233

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant fusion protein construct

<400> 1

atggccgacg aggcaccaca aggttccgc tcattgacac cctgtacctg cggctcctcg	60
gacctttacc tggtcacgag gcacgccgat gtcattcccg tgcgccggcg aggtgatagc	120
aggggtagcc tgctttcgcc ccggcccatt tcctacttga aaggctcctc ggggggtccg	180
ctgttggtgcc ccgcgggaca cgccgtgggc ctattcaggg ccgcggtgtg caccctgga	240
gtggctaaaag cgggtggactt tatccctgtg gagaacctag ggacaaccat gagatccccg	300
gtgttcacgg acaactcctc tccaccagca gtgccccaga gcttcaggt ggcccacctg	360
catgctccca ccggcagcgg taagagcacc aagggtcccg ctgcgtacgc agcccagggc	420
tacaagggtg tgggtgctca cccctctgtt gctgcaacgc tgggctttgg tgcttacatg	480
tccaaggccc atgggggttga tcctaataac aggaccgggg tgagaacaat taccactggc	540
agcccatca cgtactccac ctacggcaag ttcccttgccg acggcgggtg ctcaggaggt	600
gcttatgaca taataatttg tgacgagtgc cactccacgg atgccacatc catcttgggc	660
atcggcactg tccttgacca agcagagact gcgggggcca gactgggtgt gctcgccact	720
gctaccctc cgggctccgt cactgtgtcc catcctaaca tcgaggaggt tgctctgtcc	780
accaccggag agatcccctt ttacactagt acgaatccta aacctcaaag aaaaacaaa	840
cgtaacacca accgtcgccc acaggacgtc aagttcccg gtggcgggtca gatcggttgg	900
ggagtttact tggtgccgcg caggggccct agattgggtg tgcgcgcgac gaggaagact	960
tccgagcggc cgcaacctcg aggtagacgt cagcctatcc ccaaggcacg tcggcccag	1020
ggcaggacct gggctcagcc cgggtaccct tggcccctct atggcaatga gggttgcggg	1080

tgggcgggat ggctcctgtc tccccgtggc tctcggccta gctggggccc cacagacccc 1140
 cggcgtaggt cgcgcaattht gggtaagggtc atcgataccc ttacgtgcgg cttcgccgac 1200
 ctcatgggggt acataaccgct cgctcgaggac tag 1233

<210> 2
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant fusion protein

<400> 2
 Met Ala Asp Glu Ala Pro Gln Gly Ser Arg Ser Leu Thr Pro Cys Thr
 1 5 10 15
 Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile
 20 25 30
 Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg
 35 40 45
 Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu Cys Pro
 50 55 60
 Ala Gly His Ala Val Gly Leu Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly
 65 70 75 80
 Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn Leu Gly Thr Thr
 85 90 95
 Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Ala Val Pro
 100 105 110
 Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys
 115 120 125
 Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu
 130 135 140
 Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Met
 145 150 155 160
 Ser Lys Ala His Gly Val Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr
 165 170 175
 Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu
 180 185 190

Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys Asp
195 200 205

Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val
210 215 220

Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu Ala Thr
225 230 235 240

Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Ser His Pro Asn Ile Glu Glu
245 250 255

Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Thr Ser Thr Asn
260 265 270

Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln
275 280 285

Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu
290 295 300

Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr
305 310 315 320

Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala
325 330 335

Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro
340 345 350

Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Cys Gly Trp Ala Gly Trp Leu Leu Ser Pro
355 360 365

Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg Arg Arg Ser
370 375 380

Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp
385 390 395 400

Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Glu Asp
405 410

<210> 3
<211> 1914
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recombinant fusion protein construct

<400> 3

atggccgacg aggcaccagc gcccatcacg gcgtacgccc agcagacgag aggcctccta	60
gggtgtataa tcaccagcct gactggccgg gacaaaaacc aagtggaggg tgaggtccag	120
atcgtgtcaa ctgctacca aaccttcctg gcaacgtgca tcaatggggg atgctggact	180
gtctaccacg gggccggaac gaggaccatc gcatcaccca agggtcctgt catccagatg	240
tataccaatg tggaccaaga ccttgtgggc tggcccgcctc ctcaagggtc ccgctcattg	300
acaccctgta cctgcggctc ctcggaacctt tacctgggtca cgaggcacgc cgatgtcatt	360
cccgtgcgcc ggcgaggtga tagcaggggt agcctgcttt cgccccggcc catttcctac	420
ttgaaaggct ccgctggggg tccgctgttg tgccccgcgg gacacgccgt gggcctattc	480
agggccgcgg tgtgcaccg tggagtggct aaagcgggtg actttatccc tgtggagaac	540
ctagggacaa ccatgagatc cccggtgttc acggacaact cctctccacc agcagtgcc	600
cagagcttcc aggtggccca cctgcatgct cccaccggca gcggtagag caccaaggtc	660
ccggctgcgt acgcagccca gggctacaag gtgttggtgc tcaaccctc tgttgctgca	720
acgctgggct ttggtgctta catgtccaag gcccatgggg ttgatcctaa tatcaggacc	780
ggggtgagaa caattaccac tggcagcccc atcacgtact ccacctacgg caagttcctt	840
gccgacggcg ggtgctcagg aggtgcttat gacataataa tttgtgacga gtgccactcc	900
acggatgcca catccatctt gggcatcggc actgtccttg accaagcaga gactgcgggg	960
gcgagactgg ttgtgctcgc cactgctacc cctccgggct ccgtcactgt gtcccatcct	1020
aacatcgagg aggttgctct gtccaccacc ggagagatcc ccttttacgg caaggctatc	1080
cccctcgagg tgatcaaggg ggaagacat ctcatcttct gccactcaa gaagaagtgc	1140
gacgagctcg ccgcgaagct ggtcgcatg ggcataatg ccgtggccta ctaccgcggt	1200
cttgacgtgt ctgtcatccc gaccagcggc gatgttgctg tcgtgtcgac cgatgctctc	1260
atgactggct ttaccggcga cttcgactct gtgatagact gcaacacgtg tgtcactcag	1320
acagtcgatt tcagccttga ccctaccttt accattgaga caaccacgt cccccaggat	1380
gctgtctcca ggactcaacg ccggggcagg actggcagg ggaagccagg catctataga	1440
tttgtggcac cgggggagcg cccctccggc atgttcgact cgtccgtcct ctgtgagtgc	1500

tatgacgcgg gctgtgcttg gtatgagctc acgcccgcg agactacagt taggctacga 1560
gcgtacatga acaccccggg gcttcccgtg tgccaggacc atcttgaatt ttgggagggc 1620
gtcttttacgg gcctcactca tatagatgcc cactttttat cccagacaaa gcagagtggg 1680
gagaactttc cttacctggt agcgtaccaa gccaccgtgt gcgctagggc tcaagcccct 1740
cccccatcgt gggaccagat gtggaagtgt ttgatccgcc ttaaaccac cctccatggg 1800
ccaacacccc tgctatacag actgggcgct gttcagaatg aagtcaccct gacgcacca 1860
atcaccaa atcatcatgac atgcatgtcg gccgacctgg aggtcgtcac gtag 1914

<210> 4
<211> 637
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> recombinant fusion protein

<400> 4
Met Ala Asp Glu Ala Pro Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr
1 5 10 15
Arg Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys
20 25 30
Asn Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Thr Gln Thr
35 40 45
Phe Leu Ala Thr Cys Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly
50 55 60
Ala Gly Thr Arg Thr Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met
65 70 75 80
Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly
85 90 95
Ser Arg Ser Leu Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu
100 105 110
Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser
115 120 125
Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser
130 135 140
Ala Gly Gly Pro Leu Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Leu Phe

145	150	155	160
Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile			
165	170	175	
Pro Val Glu Asn Leu Gly Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp			
180	185	190	
Asn Ser Ser Pro Pro Ala Val Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu			
195	200	205	
His Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr			
210	215	220	
Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala			
225	230	235	240
Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Val Asp Pro			
245	250	255	
Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr			
260	265	270	
Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly			
275	280	285	
Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr			
290	295	300	
Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly			
305	310	315	320
Ala Arg Leu Val Val Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr			
325	330	335	
Val Ser His Pro Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu			
340	345	350	
Ile Pro Phe Tyr Gly Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly			
355	360	365	
Arg His Leu Ile Phe Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala			
370	375	380	
Ala Lys Leu Val Ala Leu Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly			
385	390	395	400
Leu Asp Val Ser Val Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ser			
405	410	415	
Thr Asp Ala Leu Met Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile			
420	425	430	

Asp Cys Asn Thr Cys Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro
435 440 445

Thr Phe Thr Ile Glu Thr Thr Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg
450 455 460

Thr Gln Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg
465 470 475 480

Phe Val Ala Pro Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val
485 490 495

Leu Cys Glu Cys Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro
500 505 510

Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu
515 520 525

Pro Val Cys Gln Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly
530 535 540

Leu Thr His Ile Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly
545 550 555 560

Glu Asn Phe Pro Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg
565 570 575

Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile
580 585 590

Arg Leu Lys Pro Thr Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu
595 600 605

Gly Ala Val Gln Asn Glu Val Thr Leu Thr His Pro Ile Thr Lys Tyr
610 615 620

Ile Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr
625 630 635

<210> 5
<211> 1491
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recombinant fusion protein construct

<400> 5
atggccgacg aggcaccata ccaagtgcgc aattcctcgg ggctttacca tgtcaccaat

60

gattgcccta actcgagtat tgtgtacgag gcggccgatg ccatacctgca cactccgggg 120

tgtgtccctt gcgttcgcga gggtaacgcc tcgaggtggt gggtaggcgtt gacccccacg 180

gtggccacca gggacggcaa actccccaca acgcagcttc gacgtcatat cgatctgctt 240

gtcgggagcg ccaccctctg ctcggccctc tacgtggggg acctgtgcgg gtctgtcttt 300

cttggtggtc aactgtttac cttctctccc aggcgccact ggacgacgca agactgcaat 360

tgttctatct atcccgcca tataacgggt catcgcatgg catgggatat gatgatgaac 420

tggcccccta cggcagcggt ggtggtagct cagctgctcc ggatcccaca agccatcatg 480

gacatggaaa cccacgtcac cgggggaagt gccggccgca ccacggctgg gcttggtggt 540

ctccttacac caggcgccaa gcagaacatc caactgatca acaccaacgg cagttggcac 600

atcaatagca cggccttgaa ctgcaatgaa agccttaaca ccggctgggt agcagggctc 660

ttctatcagc acaaattcaa ctcttcaggc tgtcctgaga ggttggccag ctgccgacgc 720

cttaccgatt ttgccaggg ctggggctct atcagttatg ccaacggaag cggcctcgac 780

gaacgcccct actgctggca ctaccctcca agaccttggt gcattgtgcc cgcaaagagc 840

gtgtgtggcc cggtatattg cttcactccc agccccgtgg tggtaggaac gaccgacagg 900

tcgggcgcgc ctacctacag ctgggggtgca aatgatacgg atgtcttcgt ccttaacaac 960

accaggccac cgctgggcaa ttggttcggt tgtacctgga tgaactcaac tggattcacc 1020

aaagtgtgcg gagcgcccc ttgtgtcatc ggaggggtgg gcaacaacac cttgctctgc 1080

cccactgatt gtttccgcaa gcatccggaa gccacatact ctcggtgcgg ctccggctcc 1140

tggattacac ccagggtgcat ggtcgactac ccgtatagc tttggcacta tccttgatcc 1200

atcaattaca ccatattcaa agtcaggatg tacgtgggag gggtcgagca caggctggaa 1260

gcggcctgca actggacgcg gggcgaacgc tgtgatctgg aagacaggga caggctccgag 1320

ctcagcccat tgctgctgtc caccacacag tggcaggctc ttccgtgttc tttcacgacc 1380

ctgccagcct tgtccaccgg cctcatccac ctccaccaga acattgtgga cgtgcagtac 1440

ttgtacgggg tagggtaag catcgctcc tgggccatta agtgggagta g 1491

<210> 6
 <211> 496
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant fusion protein

<400> 6

Met Ala Asp Glu Ala Pro Tyr Gln Val Arg Asn Ser Ser Gly Leu Tyr
1 5 10 15

His Val Thr Asn Asp Cys Pro Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala
20 25 30

Asp Ala Ile Leu His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly
35 40 45

Asn Ala Ser Arg Cys Trp Val Ala Val Thr Pro Thr Val Ala Thr Arg
50 55 60

Asp Gly Lys Leu Pro Thr Thr Gln Leu Arg Arg His Ile Asp Leu Leu
65 70 75 80

Val Gly Ser Ala Thr Leu Cys Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys
85 90 95

Gly Ser Val Phe Leu Val Gly Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg
100 105 110

His Trp Thr Thr Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile
115 120 125

Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Val Val Ala Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Met
145 150 155 160

Asp Met Glu Thr His Val Thr Gly Gly Ser Ala Gly Arg Thr Thr Ala
165 170 175

Gly Leu Val Gly Leu Leu Thr Pro Gly Ala Lys Gln Asn Ile Gln Leu
180 185 190

Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys
195 200 205

Asn Glu Ser Leu Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His
210 215 220

Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Arg
225 230 235 240

Leu Thr Asp Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Ser Tyr Ala Asn Gly

245	250	255
Ser Gly Leu Asp Glu Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro Arg Pro		
260	265	270
Cys Gly Ile Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe		
275	280	285
Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro		
290	295	300
Thr Tyr Ser Trp Gly Ala Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu Asn Asn		
305	310	315
Thr Arg Pro Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser		
325	330	335
Thr Gly Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile Gly Gly		
340	345	350
Val Gly Asn Asn Thr Leu Leu Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His		
355	360	365
Pro Glu Ala Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro		
370	375	380
Arg Cys Met Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr		
385	390	395
Ile Asn Tyr Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu		
405	410	415
His Arg Leu Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp		
420	425	430
Leu Glu Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr		
435	440	445
Thr Gln Trp Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu		
450	455	460
Ser Thr Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr		
465	470	475
Leu Tyr Gly Val Gly Ser Ser Ile Ala Ser Trp Ala Ile Lys Trp Glu		
485	490	495

<210> 7
 <211> 483
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant fusion protein construct

<400> 7

```

atggccgacg aggcaccatc tcagcactta ccgtacatcg agcaagggat gatgctcgct      60
gagcagttca agcagaaggc cctcggcctc ctgcagaccg cgtcccgcca tgcagaggtt      120
atcacccctg ctgtccagac caactggcag aaactcgagg tcttctgggc gaagcacatg      180
tggaatttca tcagtgggat acaataacttg gcgggcctgt caactagtcc tggagccctt      240
gtagtcggtg tggctctgcgc agcaatactg cgccggcagc ttggcccggg cgaggggggca      300
gtgcaatgga tgaaccggct aatagccttc gcctcccggg ggaaccatgt ttccccacg      360
cactacgtgc cggagagcga tgcagccgcc cgcgtcactg ccatactcag cagcctcact      420
gtaaccacgc tcctgaggcg actgcatcag tggataagct cggagtgtac cactccatgc      480
tag                                                                    483
  
```

<210> 8

<211> 160

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant fusion protein

<400> 8

```

Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly
  1              5              10              15

Met Met Leu Ala Glu Gln Phe Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln
              20              25              30

Thr Ala Ser Arg His Ala Glu Val Ile Thr Pro Ala Val Gln Thr Asn
  35              40              45

Trp Gln Lys Leu Glu Val Phe Trp Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile
  50              55              60

Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Thr Ser Pro Gly Ala Leu
  65              70              75              80

Val Val Gly Val Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg His Val Gly Pro
  
```

	85		90		95										
Gly	Glu	Gly	Ala	Val	Gln	Trp	Met	Asn	Arg	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Ser
			100					105					110		
Arg	Gly	Asn	His	Val	Ser	Pro	Thr	His	Tyr	Val	Pro	Glu	Ser	Asp	Ala
			115					120					125		
Ala	Ala	Arg	Val	Thr	Ala	Ile	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Val	Thr	Gln	Leu
			130					135					140		
Leu	Arg	Arg	Leu	His	Gln	Trp	Ile	Ser	Ser	Glu	Cys	Thr	Thr	Pro	Cys
			145					150					155		160

<210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic peptide

<400> 9
 Met Ala Asp Glu Ala Pro
 1 5

<210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic peptide

<400> 10
 Gly Gly Gly His His His His His
 1 5

<210> 11
 <211> 2256
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant fusion protein construct

<400> 11

atggccgacg aggcaccaag cacgaatcct aaacctcaaa gaaaaaccaa acgtaacacc	60
aaccgtcgcg cacaggacgt caagttcccc ggtggcgggtc agatcgttgg tggagtttac	120
ttgttgccgc gcagggggccc tagattgggt gtgcgcgcga cgaggaagac ttccgagcgg	180
tcgcaacctc gaggtagacg tcagcctatc cccaaggcac gtcggcccga gggcaggacc	240
tgggctcagc ccgggtaccc ttggccccctc tatggcaatg agggttgcgg gtgggcggga	300
tggctcctgt ctccccgtgg ctctcggcct agctgggggc ccacagaccc ccggcgtagg	360
tcgcgcaatt tgggtaaggt catcgatacc cttacgtgcg gcttcgccga cctcatgggg	420
tacataccgc tcgtcggcgc ccctcttgga ggcgctgccg gggccctggc gcatggcgtc	480
cgggttctgg aagacggcgt gaactatgca acagggaaacc ttcttggttg ctctttctct	540
atcttccttc tggccctgct ctcttgcttg actgtgcccg cttcagccta ccaagtgcgc	600
aattcctcgg ggctttacca tgtcaccaat gattgcccta actcgagtat tgtgtacgag	660
gcggccgatg ccatcctgca cactccgggg tgtgtccctt gcgttcgcga gggtaacgcc	720
tcgaggtgtt ggggtggcgg gacccccacg gtggccacca gggacggcaa actccccaca	780
acgcagcttc gacgtcatat cgatctgctt gtcgggagcg ccaccctctg ctcggcctc	840
tacgtggggg acctgtgcgg gtctgtcttt cttgttggtc aactgtttac cttctctccc	900
aggcgccact ggacgacgca agactgcaat tgttctatct atcccggcca tataacgggt	960
catcgcatgg catgggatat gatgatgaac tgggtccccta cggcagcggt ggtggtagct	1020
cagctgctcc ggatcccaca agccatcatg gacatgatcg ctggtgctca ctggggagtc	1080
ctggcgggca tagcgtatth ctccatgggtg gggaaactggg cgaaggctct ggtagtgtg	1140
ctgctatthg ccggcgtcga cgcggaaacc cacgtcaccg ggggaagtgc cggccgcacc	1200
acggctgggc ttgttggtct cttacacca ggcgccaaagc agaacatcca actgatcaac	1260
accaacggca gttggcacat caatagcacg gccttgaact gcaatgaaag ccttaacacc	1320
ggctggttag cagggtctct ctatcagcac aaattcaact cttcaggctg tcctgagagg	1380
ttggccagct gccgacgcct taccgattth gcccagggtc ggggtcctat cagttatgcc	1440
aacggaagcg gcctcgacga acgcccctac tgctggcact accctccaag accttggtgc	1500
attgtgcccc caaagagcgt gtgtggcccc gtatatthgt tcaactccag ccccggtgtg	1560

gtgggaacga cgcacaggtc gggcgcgctt acctacagct ggggtgcaaa tgatacggat 1620
 gtcttcgtcc ttaacaacac caggccaccg ctgggcaatt gggtcgggtg tacctggatg 1680
 aactcaactg gattcaccaa agtgtgcgga ggcggccctt gtgtcatcgg aggggtgggc 1740
 aacaacacct tgctctgccc cactgattgt ttccgcaagc atccggaagc cacatactct 1800
 cgggtgcggct ccggtccctg gattacaccc aggtgcatgg tcgactaccc gtataggctt 1860
 tggcactatc cttgtaccat caattacacc atattcaaag tcaggatgta cgtgggaggg 1920
 gtcgagcaca ggctggaagc ggcttgaac tggacgcggg gcgaacgctg tgatctggaa 1980
 gacagggaca ggtccgagct cagcccattg ctgctgtcca ccacacagtg gcaggtcctt 2040
 ccgtgttctt tcacgaccct gccagccttg tccaccggcc tcatccacct ccaccagaac 2100
 attgtggacg tgcagtactt gtacggggta gggtaagca tcgcgtcctg ggccattaag 2160
 tgggagtacg tcgttctcct gttcctcctg cttgcagacg cgcgcgtctg ctctgcttg 2220
 tggatgatgt tactcatatc ccaagcggag gcgtag 2256

<210> 12
 <211> 751
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant fusion protein

<400> 12
 Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr
 1 5 10 15
 Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg
 35 40 45
 Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg
 50 55 60
 Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr
 65 70 75 80
 Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Cys
 85 90 95

Gly Trp Ala Gly Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp
100 105 110

Gly Pro Thr Asp Pro Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile
115 120 125

Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu
130 135 140

Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val
145 150 155 160

Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly
165 170 175

Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Val
180 185 190

Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Val Arg Asn Ser Ser Gly Leu Tyr His Val
195 200 205

Thr Asn Asp Cys Pro Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Ala
210 215 220

Ile Leu His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ala
225 230 235 240

Ser Arg Cys Trp Val Ala Val Thr Pro Thr Val Ala Thr Arg Asp Gly
245 250 255

Lys Leu Pro Thr Thr Gln Leu Arg Arg His Ile Asp Leu Leu Val Gly
260 265 270

Ser Ala Thr Leu Cys Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser
275 280 285

Val Phe Leu Val Gly Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp
290 295 300

Thr Thr Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly
305 310 315 320

His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Ala Ala
325 330 335

Leu Val Val Ala Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Met Asp Met
340 345 350

Ile Ala Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser
355 360 365

Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Ala

370		375		380
Gly Val Asp Ala Glu Thr His Val Thr Gly Gly Ser Ala Gly Arg Thr				
385		390		400
Thr Ala Gly Leu Val Gly Leu Leu Thr Pro Gly Ala Lys Gln Asn Ile				
	405		410	415
Gln Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ser Thr Ala Leu				
	420		425	430
Asn Cys Asn Glu Ser Leu Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr				
	435		440	445
Gln His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys				
	450		455	460
Arg Arg Leu Thr Asp Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Ser Tyr Ala				
465		470		480
Asn Gly Ser Gly Leu Asp Glu Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro				
	485		490	495
Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr				
	500		505	510
Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly				
	515		520	525
Ala Pro Thr Tyr Ser Trp Gly Ala Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu				
	530		535	540
Asn Asn Thr Arg Pro Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met				
545		550		560
Asn Ser Thr Gly Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile				
	565		570	575
Gly Gly Val Gly Asn Asn Thr Leu Leu Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg				
	580		585	590
Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Ile				
	595		600	605
Thr Pro Arg Cys Met Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro				
	610		615	620
Cys Thr Ile Asn Tyr Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly				
625		630		640
Val Glu His Arg Leu Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg				
	645		650	655

Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu
660 665 670

Ser Thr Thr Gln Trp Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro
675 680 685

Ala Leu Ser Thr Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val
690 695 700

Gln Tyr Leu Tyr Gly Val Gly Ser Ser Ile Ala Ser Trp Ala Ile Lys
705 710 715 720

Trp Glu Tyr Val Val Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val
725 730 735

Cys Ser Cys Leu Trp Met Met Leu Leu Ile Ser Gln Ala Glu Ala
740 745 750

<210> 13
<211> 1908
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recombinant fusion protein construct

<400> 13
atggccgacg aggcaccaag tacgaatcct aaacctcaaa gaaaaaccaa acgtaacacc 60
aaccgtcgcc cacaggacgt caagttcccg ggtggcggtc agatcgttgg tggagtttac 120
ttgttgccgc gcaggggccc tagattgggt gtgcgcgcga cgaggaagac ttccgagcgg 180
tcgcaacctc gaggtagacg tcagcctatc cccaaggcac gtcggcccga gggcaggacc 240
tggtgtcagc ccgggtaccc ttggcccctc tatggcaatg agggttgcgg gtgggcggga 300
tggctcctgt ctccccgtgg ctctcggcct agctggggcc ccacagaccc ccggcgtagg 360
tcgcgcaatt tgggtaaggt catcgatacc cttacgtgcg gcttcgccga cctcatgggg 420
tacataccgc tcgtctacca agtgcgcaat tcctcggggc ttaccatgt caccaatgat 480
tgccctaact cgagtattgt gtacgaggcg gccgatgcca tcctgcacac tccggggtgt 540
gtcccttgcg ttcgcgaggg taacgcctcg aggtgttggg tggcgggtgac cccacggtg 600

gccaccaggg acggcaaaact cccacacaacg cagcttcgac gtcatatcga tctgcttgtc 660

gggagcgcca ccctctgctc ggccctctac gtgggggacc tgtgcggggc tgtctttctt 720

gttggtcaac tgtttacctt ctctcccagg cgccactgga cgacgcaaga ctgcaattgt 780

tctatctatc ccggccatat aacgggtcat cgcatggcat gggatatgat gatgaactgg 840

tcccctacgg cagcggttggg ggtagctcag ctgctccgga tcccacaagc catcatggac 900

atggaaaccc acgtcaccgg gggaagtgcc ggccgcacca cggctgggct tgttggtctc 960

cttacaccag gcgccaagca gaacatccaa ctgatcaaca ccaacggcag ttggcacatc 1020

aatagcacgg ccttgaactg caatgaaagc cttaacaccg gctgggttagc agggctcttc 1080

tatcagcaca aattcaactc ttcaggctgt cctgagaggt tggccagctg ccgacgcctt 1140

accgattttg ccaggggctg gggtcctatc agttatgcc aacggaagcg cctcgacgaa 1200

cgcccctact gctggcacta ccctccaaga ccttgtggca ttgtgcccgc aaagagcgtg 1260

tgtggcccgg tatattgctt cactcccagc cccgtgggtg tgggaacgac cgacaggctc 1320

ggcgcgccta cctacagctg gggtgcaaat gatacggatg tcttcgtcct taacaacacc 1380

aggccaccgc tgggcaattg gttcggttgt acctggatga actcaactgg attcaccaaa 1440

gtgtgcgagg cgcccccttg tgtcatcgga ggggtgggca acaacacctt gctctgcccc 1500

actgattgtt tccgcaagca tccggaagcc acatactctc ggtgcggtc cggtccctgg 1560

attacacca ggtgcatggc cgactaccgc tataggcttt ggcactatcc ttgtaccatc 1620

aattacacca tattcaaagt caggatgtac gtgggagggg tcgagcacag gctggaagcg 1680

gcctgcaact ggacgcgggg cgaacgctgt gatctggaag acagggacag gtccgagctc 1740

agccattgct tgctgtccac cacacagtgg caggtccttc cgtgttcttt cacgaccctg 1800

ccagccttgt ccaccggcct catccacctc caccagaaca ttgtggacgt gcagtacttg 1860

tacggggtag ggtcaagcat cgcgtcctgg gccattaagt gggagtag 1908

<210> 14
 <211> 635
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant fusion protein

<400> 14
Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr
1 5 10 15
Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly
20 25 30
Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg
35 40 45
Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg
50 55 60
Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr
65 70 75 80
Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Cys
85 90 95
Gly Trp Ala Gly Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp
100 105 110
Gly Pro Thr Asp Pro Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile
115 120 125
Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu
130 135 140
Val Tyr Gln Val Arg Asn Ser Ser Gly Leu Tyr His Val Thr Asn Asp
145 150 155 160
Cys Pro Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Ala Ile Leu His
165 170 175
Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ala Ser Arg Cys
180 185 190
Trp Val Ala Val Thr Pro Thr Val Ala Thr Arg Asp Gly Lys Leu Pro
195 200 205
Thr Thr Gln Leu Arg Arg His Ile Asp Leu Leu Val Gly Ser Ala Thr
210 215 220
Leu Cys Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu
225 230 235 240
Val Gly Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Thr Gln
245 250 255
Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met

260	265	270
Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Ala Ala Leu Val Val		
275	280	285
Ala Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Met Asp Met Glu Thr His		
290	295	300
Val Thr Gly Gly Ser Ala Gly Arg Thr Thr Ala Gly Leu Val Gly Leu		
305	310	315
320		
Leu Thr Pro Gly Ala Lys Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn Thr Asn Gly		
325	330	335
Ser Trp His Ile Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Glu Ser Leu Asn		
340	345	350
Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe Asn Ser Ser		
355	360	365
Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Arg Leu Thr Asp Phe Ala		
370	375	380
Gln Gly Trp Gly Pro Ile Ser Tyr Ala Asn Gly Ser Gly Leu Asp Glu		
385	390	395
400		
Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro		
405	410	415
Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val		
420	425	430
Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr Ser Trp Gly		
435	440	445
Ala Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu Asn Asn Thr Arg Pro Pro Leu		
450	455	460
Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe Thr Lys		
465	470	475
480		
Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile Gly Gly Val Gly Asn Asn Thr		
485	490	495
Leu Leu Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr		
500	505	510
Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro Arg Cys Met Val Asp		
515	520	525
Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile Asn Tyr Thr Ile		
530	535	540

Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu Glu Ala
545 550 555 560

Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp
565 570 575

Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Gln Trp Gln Val
580 585 590

Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly Leu Ile
595 600 605

His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly Val Gly
610 615 620

Ser Ser Ile Ala Ser Trp Ala Ile Lys Trp Glu
625 630 635

<210> 15
<211> 2538
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recombinant fusion protein construct

<400> 15
atggccgacg aggcaccagc gcccatcacg gcgtacgccc agcagacgag aggcctccta 60
gggtgtataa tcaccagcct gactggccgg gacaaaaacc aagtggaggg tgaggtccag 120
atcgtgtcaa ctgctacca aaccttctctg gcaacgtgca tcaatggggg atgctggact 180
gtctaccacg gggccggaac gaggaccatc gcatcaccca agggctctgt catccagatg 240
tataccaatg tggaccaaga ccttgtgggc tggcccgcctc ctcaagggtc ccgctcattg 300
acaccctgta cctgcggctc ctcggaacctt tacctgggtca cgaggcacgc cgatgtcatt 360
cccgtgcgcc ggcgaggtga tagcaggggt agcctgcttt cgccccggcc catttcctac 420
ttgaaaggct ccgctggggg tccgctgttg tgccccgcgg gacacgccgt gggcctattc 480
agggccgcgg tgtgcacccg tggagtgggt aaagcgggtg actttatccc tgtggagaac 540
ctagggacaa ccatgagatc cccggtgttc acggacaact cctctccacc agcagtgcc 600
cagagcttcc aggtggccca cctgcatgct cccaccggca gcggtgaagag caccaaggctc 660

ccggctgctg	acgcagccca	gggctacaag	gtgttggtgc	tcaaccctc	tgttgctgca	720
acgctgggct	ttggtgctta	catgtccaag	gcccattggg	ttgatcctaa	tatcaggacc	780
ggggtgagaa	caattaccac	tggcagcccc	atcacgtact	ccacctacgg	caagttcctt	840
gccgacggcg	ggtgctcagg	aggtgcttat	gacataataa	tttgtgacga	gtgccactcc	900
acggatgcc	catccatctt	gggcatcggc	actgtccttg	accaagcaga	gactgcgggg	960
gcgagactgg	ttgtgctcgc	cactgctacc	cctccgggct	ccgtcactgt	gtcccatcct	1020
aacatcgagg	aggttgctct	gtccaccacc	ggagagatcc	ccttttacgg	caaggctatc	1080
cccctcgagg	tgatcaagg	gggaagacat	ctcatcttct	gccactcaaa	gaagaagtgc	1140
gacgagctcg	ccgcgaagct	ggtcgcattg	ggcatcaatg	ccgtggccta	ctaccgcggt	1200
cttgacgtgt	ctgtcatccc	gaccagcggc	gatgttgctg	tcgtgtcgac	cgatgctctc	1260
atgactggct	ttaccggcga	cttcgactct	gtgatagact	gcaacacgtg	tgtcactcag	1320
acagtgcgatt	tcagccttga	ccctaccttt	accattgaga	caaccacgct	ccccaggat	1380
gctgtctcca	ggactcaacg	ccggggcagg	actggcagg	ggaagccagg	catctataga	1440
tttgtggcac	cgggggagcg	cccctccggc	atgttcgact	cgcccgctct	ctgtgagtgc	1500
tatgacgcgg	gctgtgcttg	gtatgagctc	acgcccgcgg	agactacagt	taggctacga	1560
gcgtacatga	acaccccg	gcttcccg	tgccaggacc	atcttgaatt	ttgggagggc	1620
gtctttacgg	gcctcactca	tatagatgcc	cactttttat	cccagacaaa	gcagagtggg	1680
gagaactttc	cttacctgg	agcgtaccaa	gccaccgtgt	gcgctagggc	tcaagccct	1740
cccccatcgt	gggaccagat	gtggaagtgt	ttgatccgcc	ttaaaccac	cctccatggg	1800
ccaacacccc	tgctatacag	actgggcgct	gttcagaatg	aagtcaccct	gacgcacca	1860
atcaccaa	acatcatgac	atgcatgtcg	gccgacctgg	aggtcgtcac	gagcacctgg	1920
gtgctcgttg	gcggcgctct	ggctgctctg	gccgcgtatt	gcctgtcaac	aggctgcgtg	1980
gtcatagtgg	gcaggattgt	cttgtccggg	aagccggcaa	ttatacctga	cagggagggtt	2040
ctctaccagg	agttcgatga	gatggaagag	tgctctcagc	acttaccgta	catcgagcaa	2100
gggatgatgc	tcgctgagca	gttcaagcag	aaggccctcg	gcctcctgca	gaccgcgtcc	2160
cgccatgcag	aggttatcac	ccctgctgtc	cagaccaact	ggcagaaact	cgaggctctc	2220

tgggcgaagc acatgtggaa ttcatcagt gggatacaat acttggcggg cctgtcaact 2280
 agtcctggag cccttgtagt cggtgtggtc tgcgcagcaa tactgcgccg gcacgttggc 2340
 ccgggcgagg gggcagtgca atggatgaac cggctaatag ccttcgcctc ccgggggaac 2400
 catgtttccc ccacgcacta cgtgccggag agcgatgcag ccgcccgcgt cactgccata 2460
 ctcagcagcc tcaactgtaac ccagctcctg aggcgactgc atcagtggat aagctcggag 2520
 tgtaccactc catgctag 2538

<210> 16
 <211> 845
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant fusion protein

<400> 16
 Met Ala Asp Glu Ala Pro Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr
 1 5 10 15
 Arg Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys
 20 25 30
 Asn Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Thr Gln Thr
 35 40 45
 Phe Leu Ala Thr Cys Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly
 50 55 60
 Ala Gly Thr Arg Thr Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met
 65 70 75 80
 Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly
 85 90 95
 Ser Arg Ser Leu Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu
 100 105 110
 Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser
 115 120 125
 Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser
 130 135 140
 Ala Gly Gly Pro Leu Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Leu Phe
 145 150 155 160

Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile
165 170 175

Pro Val Glu Asn Leu Gly Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp
180 185 190

Asn Ser Ser Pro Pro Ala Val Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu
195 200 205

His Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr
210 215 220

Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala
225 230 235 240

Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Val Asp Pro
245 250 255

Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr
260 265 270

Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly
275 280 285

Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr
290 295 300

Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly
305 310 315 320

Ala Arg Leu Val Val Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr
325 330 335

Val Ser His Pro Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu
340 345 350

Ile Pro Phe Tyr Gly Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly
355 360 365

Arg His Leu Ile Phe Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala
370 375 380

Ala Lys Leu Val Ala Leu Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly
385 390 395 400

Leu Asp Val Ser Val Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ser
405 410 415

Thr Asp Ala Leu Met Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile
420 425 430

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

435		440		445
Thr Phe Thr Ile Glu Thr Thr Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg				
450		455		460
Thr Gln Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg				
465		470		475 480
Phe Val Ala Pro Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val				
	485		490	495
Leu Cys Glu Cys Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro				
	500		505	510
Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu				
	515		520	525
Pro Val Cys Gln Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly				
	530		535	540
Leu Thr His Ile Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly				
	545		550	555 560
Glu Asn Phe Pro Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg				
	565		570	575
Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile				
	580		585	590
Arg Leu Lys Pro Thr Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu				
	595		600	605
Gly Ala Val Gln Asn Glu Val Thr Leu Thr His Pro Ile Thr Lys Tyr				
	610		615	620
Ile Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp				
	625		630	635 640
Val Leu Val Gly Gly Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser				
	645		650	655
Thr Gly Cys Val Val Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro				
	660		665	670
Ala Ile Ile Pro Asp Arg Glu Val Leu Tyr Gln Glu Phe Asp Glu Met				
	675		680	685
Glu Glu Cys Ser Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Met Leu				
	690		695	700
Ala Glu Gln Phe Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala Ser				
	705		710	715 720

Arg His Ala Glu Val Ile Thr Pro Ala Val Gln Thr Asn Trp Gln Lys
725 730 735

Leu Glu Val Phe Trp Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile
740 745 750

Gln Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Thr Ser Pro Gly Ala Leu Val Val Gly
755 760 765

Val Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg His Val Gly Pro Gly Glu Gly
770 775 780

Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile Ala Phe Ala Ser Arg Gly Asn
785 790 795 800

His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu Ser Asp Ala Ala Ala Arg
805 810 815

Val Thr Ala Ile Leu Ser Ser Leu Thr Val Thr Gln Leu Leu Arg Arg
820 825 830

Leu His Gln Trp Ile Ser Ser Glu Cys Thr Thr Pro Cys
835 840 845

<210> 17
<211> 2982
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recombinant fusion protein construct

<400> 17
atggccgacg aggcaccatc cggttcctgg ctaagggaca tctgggactg gatatgcgag 60
gtgctgagcg actttaagac ctggctgaaa gccaagctca tgccacaact gcctgggatt 120
ccctttgtgt cctgccagcg cgggtatagg ggggtctggc gaggagacgg cattatgcac 180
actcgctgcc actgtggagc tgagatcact ggacatgtca aaaacgggac gatgaggatc 240
gtcggtccta ggacctgcag gaacatgtgg agtgggacgt tccccattaa cgctacacc 300
acggggcccct gtactcccct tcctgcgccg aactataagt tcgcgctgtg gaggggtgtct 360
gcagaggaat acgtggagat aaggcgggtg ggggacttcc actacgtatc gggatatgact 420
actgacaatc ttaaattgcc gtgccagatc ccatcgcccg aatttttcac agaattggac 480

ggggtgcgcc tacataggtt tgcgccccct tgcaagccct tgctgcggga ggaggtatca	540
ttcagagtag gactccacga gtacccggtg gggtcgcaat taccttgcca gcccgaaaccg	600
gacgtagccg tgttgacgtc catgctcact gatccctccc atataacagc agaggcggcc	660
gggagaaggt tggcgagagg gtcacccccct tctatggcca gtcctcggc cagccagctg	720
tccgctccat ctctcaaggc aacttgcaacc gccaaaccatg actccccctga cgccgagctc	780
atagaggcta acctcctgtg gaggcaggag atgggaggga acatcaccag ggttgagtca	840
gagaacaaaag tgggtgattct ggactccttc gatccgcttg tggcagagga ggatgagcgg	900
gaggtctccg taccgcgaga aattctgcgg aagtctcgga gattcgcccg ggcctgccc	960
gtttgggagc ggccggacta caaccccccg ctagtagaga cgtggaaaaa gcctgactac	1020
gaaccacctg tgggtccatg ctgcccgtc ccacctccac ggtccccctc tgtgcctccg	1080
cctcgaaaaa agcgtacggt ggtcctcacc gaatcaacc tatctactgc cttggccgag	1140
cttgccacca aaagttttg cagctcctca acttccggca ttacgggga caatacgaca	1200
acatcctctg agcccgcccc ttctgggtgc cccccgact ccgacgttga gtcctattct	1260
tccatgcccc ccctggaggg ggagcctggg gatccggatc tcagcgacgg gtcatggctg	1320
acggtcagta gtggggccga cacggaagat gtcgtgtgct gctcaatgtc ttattcctgg	1380
acaggcgcac tcgtaccccc gtgcgctgcg gaagaacaaa aactgcccac caacgcactg	1440
agcaactcgt tgctacgcca tcacaatctg gtgtattcca ccacttcacg cagtgccttg	1500
caaaggcaga agaaagtcac atttgacaga ctgcaagttc tggacagcca ttaccaggac	1560
gtgctcaagg aggtcaaagc agcggcgta aaagtgaagg ctaacttgct atccgtagag	1620
gaagcttgca gcctgacgcc ccacattca gccaaatcca agtttggtc tggggcaaaa	1680
gacgtccgtt gccatgccag aaaggccgta gccacatca actccgtgtg gaaagacctt	1740
ctggaagaca gtgtaacacc aatagacact accatcatgg ccaagaacga ggttttctgc	1800
gttcagcctg agaagggggg tcgtaagcca gctcgtctca tcgtgttccc cgacctgggc	1860
gtgcgctgt gcgagaagat ggccctgtac gacgtgggta gcaagctccc cctggccgtg	1920
atgggaagct cctacggatt ccaatactca ccaggacagc gggttgaatt cctcgtgcaa	1980
gcgtggaagt ccaagaagac cccgatgggg ttctcgtatg ataccgctg ttttgactcc	2040

acagtcaactg agagcgacat ccgtacggag gagggcaattt accaatgttg tgacctggac 2100
 ccccaagccc gcgtggccat caagtccctc actgagaggc tttatgttgg gggccctctt 2160
 accaattcaa ggggggaaaa ctgcggctac cgcaggtgcc gcgcgagcgg cgtactgaca 2220
 actagctgtg gtaacaccct cacttgctac atcaaggccc gggcagcctg tcgagccgca 2280
 gggctccagg actgcaccat gctcgtgtgt ggcgacgact tagtcgttat ctgtgaaagt 2340
 gcgggggtcc aggaggacgc ggcgagcctg agagccttca cggaggctat gaccaggtac 2400
 tccgcccccc ccgggggaccc cccacaacca gaatacgact tggagcttat aacatcatgc 2460
 tcctccaacg tgtcagtcgc ccacgacggc gctggaaaga gggcttacta ccttaccgct 2520
 gaccctacaa cccccctcgc gagagccgcg tgggagacag caagacacac tccagtcaat 2580
 tcctggctag gcaacataat catgtttgcc cccacactgt gggcgaggat gatactgatg 2640
 acccatttct ttagcgtcct catagccagg gatcagcttg aacaggctct taactgtgag 2700
 atctacggag cctgctactc catagaacca ctggatctac ctccaatcat tcaaagactc 2760
 catggcctca gcgcattttc actccacagt tactctccag gtgaaatcaa taggggtggcc 2820
 gcatgcctca gaaaacttgg ggtcccgccc ttgcgagctt ggagacaccg ggcccggagc 2880
 gtccgcgcta ggcttctgtc cagaggaggc agggctgcca tatgtggcaa gtacctcttc 2940
 aactgggcag taagaacaaa gctcaaactc actccaatat ag 2982

<210> 18
 <211> 993
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> recombinant fusion protein

<400> 18
 Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Ile Trp Asp
 1 5 10 15
 Trp Ile Cys Glu Val Leu Ser Asp Phe Lys Thr Trp Leu Lys Ala Lys
 20 25 30
 Leu Met Pro Gln Leu Pro Gly Ile Pro Phe Val Ser Cys Gln Arg Gly
 35 40 45
 Tyr Arg Gly Val Trp Arg Gly Asp Gly Ile Met His Thr Arg Cys His

50	55	60															
Cys Gly Ala Glu Ile Thr Gly His Val Lys Asn Gly Thr Met Arg Ile																	
65	70	75	80														
Val Gly Pro Arg Thr Cys Arg Asn Met Trp Ser Gly Thr Phe Pro Ile																	
	85	90	95														
Asn Ala Tyr Thr Thr Gly Pro Cys Thr Pro Leu Pro Ala Pro Asn Tyr																	
	100	105	110														
Lys Phe Ala Leu Trp Arg Val Ser Ala Glu Glu Tyr Val Glu Ile Arg																	
	115	120	125														
Arg Val Gly Asp Phe His Tyr Val Ser Gly Met Thr Thr Asp Asn Leu																	
	130	135	140														
Lys Cys Pro Cys Gln Ile Pro Ser Pro Glu Phe Phe Thr Glu Leu Asp																	
	145	150	155	160													
Gly Val Arg Leu His Arg Phe Ala Pro Pro Cys Lys Pro Leu Leu Arg																	
	165	170	175														
Glu Glu Val Ser Phe Arg Val Gly Leu His Glu Tyr Pro Val Gly Ser																	
	180	185	190														
Gln Leu Pro Cys Glu Pro Glu Pro Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Met																	
	195	200	205														
Leu Thr Asp Pro Ser His Ile Thr Ala Glu Ala Ala Gly Arg Arg Leu																	
	210	215	220														
Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ser Met Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu																	
	225	230	235	240													
Ser Ala Pro Ser Leu Lys Ala Thr Cys Thr Ala Asn His Asp Ser Pro																	
	245	250	255														
Asp Ala Glu Leu Ile Glu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met Gly																	
	260	265	270														
Gly Asn Ile Thr Arg Val Glu Ser Glu Asn Lys Val Val Ile Leu Asp																	
	275	280	285														
Ser Phe Asp Pro Leu Val Ala Glu Glu Asp Glu Arg Glu Val Ser Val																	
	290	295	300														
Pro Ala Glu Ile Leu Arg Lys Ser Arg Arg Phe Ala Arg Ala Leu Pro																	
	305	310	315	320													
Val Trp Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Val Glu Thr Trp Lys																	
	325	330	335														

Lys Pro Asp Tyr Glu Pro Pro Val Val His Gly Cys Pro Leu Pro Pro
 340 345 350
 Pro Arg Ser Pro Pro Val Pro Pro Pro Arg Lys Lys Arg Thr Val Val
 355 360 365
 Leu Thr Glu Ser Thr Leu Ser Thr Ala Leu Ala Glu Leu Ala Thr Lys
 370 375 380
 Ser Phe Gly Ser Ser Ser Thr Ser Gly Ile Thr Gly Asp Asn Thr Thr
 385 390 395 400
 Thr Ser Ser Glu Pro Ala Pro Ser Gly Cys Pro Pro Asp Ser Asp Val
 405 410 415
 Glu Ser Tyr Ser Ser Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro
 420 425 430
 Asp Leu Ser Asp Gly Ser Trp Ser Thr Val Ser Ser Gly Ala Asp Thr
 435 440 445
 Glu Asp Val Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Leu
 450 455 460
 Val Thr Pro Cys Ala Ala Glu Glu Gln Lys Leu Pro Ile Asn Ala Leu
 465 470 475 480
 Ser Asn Ser Leu Leu Arg His His Asn Leu Val Tyr Ser Thr Thr Ser
 485 490 495
 Arg Ser Ala Cys Gln Arg Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln
 500 505 510
 Val Leu Asp Ser His Tyr Gln Asp Val Leu Lys Glu Val Lys Ala Ala
 515 520 525
 Ala Ser Lys Val Lys Ala Asn Leu Leu Ser Val Glu Glu Ala Cys Ser
 530 535 540
 Leu Thr Pro Pro His Ser Ala Lys Ser Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys
 545 550 555 560
 Asp Val Arg Cys His Ala Arg Lys Ala Val Ala His Ile Asn Ser Val
 565 570 575
 Trp Lys Asp Leu Leu Glu Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile
 580 585 590
 Met Ala Lys Asn Glu Val Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Gly Arg
 595 600 605
 Lys Pro Ala Arg Leu Ile Val Phe Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys

610	615	620	
Glu Lys Met Ala Leu Tyr Asp Val Val Ser Lys Leu Pro Leu Ala Val			
625	630	635	640
Met Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu			
	645	650	655
Phe Leu Val Gln Ala Trp Lys Ser Lys Lys Thr Pro Met Gly Phe Ser			
	660	665	670
Tyr Asp Thr Arg Cys Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Ser Asp Ile Arg			
	675	680	685
Thr Glu Glu Ala Ile Tyr Gln Cys Cys Asp Leu Asp Pro Gln Ala Arg			
	690	695	700
Val Ala Ile Lys Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Val Gly Gly Pro Leu			
705	710	715	720
Thr Asn Ser Arg Gly Glu Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser			
	725	730	735
Gly Val Leu Thr Thr Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Ile Lys			
	740	745	750
Ala Arg Ala Ala Cys Arg Ala Ala Gly Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu			
	755	760	765
Val Cys Gly Asp Asp Leu Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Val Gln			
	770	775	780
Glu Asp Ala Ala Ser Leu Arg Ala Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr			
785	790	795	800
Ser Ala Pro Pro Gly Asp Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu			
	805	810	815
Ile Thr Ser Cys Ser Ser Asn Val Ser Val Ala His Asp Gly Ala Gly			
	820	825	830
Lys Arg Val Tyr Tyr Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg			
	835	840	845
Ala Ala Trp Glu Thr Ala Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly			
	850	855	860
Asn Ile Ile Met Phe Ala Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met			
865	870	875	880
Thr His Phe Phe Ser Val Leu Ile Ala Arg Asp Gln Leu Glu Gln Ala			
	885	890	895

Leu Asn Cys Glu Ile Tyr Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp
900 905 910

Leu Pro Pro Ile Ile Gln Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu
915 920 925

His Ser Tyr Ser Pro Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ala Cys Leu Arg
930 935 940

Lys Leu Gly Val Pro Pro Leu Arg Ala Trp Arg His Arg Ala Arg Ser
945 950 955 960

Val Arg Ala Arg Leu Leu Ser Arg Gly Gly Arg Ala Ala Ile Cys Gly
965 970 975

Lys Tyr Leu Phe Asn Trp Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro
980 985 990

Ile

<210> 19
<211> 9599
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 19
gccagcccc tgatgggggc gacactccac catgaatcac tcccctgtga ggaactattg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgctgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccag 180
gacgaccggg tcctttcttg gataaaccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcaagactgc tagccgagta gtgttggtgc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
gtgcttgca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac 360
ctcaaagaaa aaccaaactg aacaccaacc gtcgcccaca ggacgtcaag ttcccgggtg 420
gcggtcagat cgttggtgga gtttacttgt tgccgcgcag gggccctaga ttgggtgtgc 480
gcgcgacgag gaagacttcc gagcggtcgc aacctcgagg tagacgtcag cctatcccca 540
aggcacgtcg gcccgagggc aggacctggg ctacgcccgg gtacccttgg ccctctatg 600
gcaatgaggg ttgcgggtgg gcgggatggc tcctgtctcc ccgtggctct cggcctagct 660
ggggccccac agacccccgg cgtaggtcgc gcaatttggg taaggtcac gataccctta 720

cgtgcggctt cgccgacctc atgggggtaca taccgctcgt cggcgcccct cttggaggcg	780
ctgccagggc cctggcgcat ggcgtccggg ttctggaaga cggcgtgaac tatgcaacag	840
ggaaccttcc tggttgctct ttctctatct tccttctggc cctgctctct tgcctgactg	900
tgcccgcttc agcctaccaa gtgcgcaatt cctcggggct ttaccatgtc accaatgatt	960
gccctaactc gagtattgtg tacgaggcgg ccgatgccat cctgcacact ccgggggtgtg	1020
tcccttgctg tcgcgagggt aacgcctcga ggtgttgggt ggcggtgacc cccacggtgg	1080
ccaccaggga cggcaaaactc cccacaacgc agcttcgacg tcatatcgat ctgcttgtcg	1140
ggagcgccac cctctgctcg gccctctacg tgggggacct gtgcgggtct gtctttcttg	1200
ttggtcaact gtttaccttc tctcccaggc gccactggac gacgcaagac tgcaattgtt	1260
ctatctatcc cggccatata acgggtcatc gcatggcatg ggatatgatg atgaactggt	1320
cccctacggc agcgttggtg gtagctcagc tgctccgat cccacaagcc atcatggaca	1380
tgatcgctgg tgctcactgg ggagtcctgg cgggcatagc gtatttctcc atggtgggga	1440
actgggcgaa ggtcctggta gtgctgctgc tatttgccgg cgtcgacgcg gaaaccacg	1500
tcaccggggg aaatgccggc cgcaccacgg ctgggcttgt tggctctcctt acaccaggcg	1560
ccaagcagaa catccaactg atcaacacca acggcagttg gcacatcaat agcacggcct	1620
tgaactgcaa tgaaagcctt aacaccggct ggtagcagg gctcttctat cagcaciaat	1680
tcaactcttc aggctgtcct gagagggtga ccagctgccg acgccttacc gattttgccc	1740
agggctgggg tcctatcagt tatgccaacg gaagcggcct cgacgaacgc ccctactgct	1800
ggcactaccc tccaagacct tgtggcattg tgcccgcaaa gagcgtgtgt ggcccggtat	1860
attgcttcac tcccagcccc gtggtggtgg gaacgaccga caggtcgggc gcgcctacct	1920
acagctgggg tgcaaatgat acggacgtct tcgtccttaa caacaccagg ccaccgctgg	1980
gcaattggtt cggttggtacc tggatgaact caactggatt caccaaagtg tgcggagcgc	2040
ccccttggtg catcggaggg gtgggcaaca acaccttgct ctgccccact gattgcttcc	2100
gcaaacatcc ggaagccaca tactctcggg ggggctccgg tccttgatt acaccagggt	2160
gcatggtcga ctaccogtat aggctttggc actatccttg taccatcaat tacaccatat	2220
tcaaagtcag gatgtacgtg ggaggggtcg agcacaggct ggaagcggcc tgcaactgga	2280

cgcggggcga acgctgtgat ctggaagaca gggacaggtc cgagctcagc ccgttgctgc	2340
tgtccaccac acagtggcag gtccttccgt gttctttcac gaccctgcc a gccttgtcca	2400
ccggcctcat ccacctccac cagaacattg tggacgtgca gtacttgtac ggggtagggg	2460
caagcatcgc gtcctgggcc attaatggg agtacgtcgt tctcctgttc cttctgcttg	2520
cagacgcgcg cgtctgctcc tgcttgtgga tgatgttact catatcccaa gcggaggcgg	2580
ctttggagaa cctcgtaata ctcaatgcag catccctggc cgggacgcac ggtcttgtgt	2640
ccttcctcgt gttcttctgc tttgcgtggg atctgaaggg taggtgggtg cccggagcgg	2700
cctacgcctt ctacgggatg tggcctctcc tctgtctcct gctggcgttg cctcagcggg	2760
catacgcact ggacacggag gtggccgcgt cgtgtggcgg cgttgttctt gtcgggttaa	2820
tggcgctgac tctgtcgcca tattacaagc gctatatcag ctggtgcatg tgggtggcttc	2880
agtattttct gaccagagta gaagcgcaac tgcacgtgtg ggttcccccc ctcaacgtcc	2940
ggggggggcg cgatgccgtc atcttactca tgtgtgtagt acacccgacc ctggtatttg	3000
acatcaccaa actactcctg gccatcttcg gacccctttg gattcttcaa gccagtttgc	3060
ttaaagtccc ctacttcgtg cgcgttcaag gccttctccg gatctgcgcg ctagcgcgga	3120
agatagccgg aggtcattac gtgcaaatgg ccatcatcaa gttaggggcg cttactggca	3180
cctatgtgta taaccatctc acccctcttc gagactgggc gcacaacggc ctgcgagatc	3240
tggccgtggc tgtggaacca gtcgttttct cccgaatgga gaccaagctc atcacgtggg	3300
gggcagatac cgccgcgtgc ggtgacatca tcaacggctt gcccgctctt gcccgtaggg	3360
gccaggagat actgcttggg ccagccgacg gaatggtctc caaggggtgg aggttgcagg	3420
cgcccatcac ggcgtacacc cagcagacga gaggcctcct aggggtgtata atcaccagcc	3480
tgactggccg ggacaaaaac caagtggagg gtgaggtcca gatcgtgtca actgctaccc	3540
aaaccttcct ggcaacgtgc atcaatgggg tatgctggac tgtctaccac ggggccggaa	3600
cgaggaccat cgcatacccc aagggtcctg tcatccagat gtataccaat gtggaccaag	3660
accttgtggg ctggcccgt cctcaagggt cccgctcatt ggcaccctgc acctgcccgt	3720
cctcggacct ttacctggtc acgaggcacg ccgatgtcat tcccgtagcg cggcgaggtg	3780
atagcagggg tagcctgctt tcgccccggc ccatttccta cttgaaaggc tcctcggggg	3840

gtccgctgtt gtgccccgcg ggacacgcgc tgggcctatt cagggccgcg gtgtgcaccc	3900
gtggagtggc taaggcgggtg gactttatcc ctgtggagaa cctagggaca accatgagat	3960
ccccggtgtt cacggacaac tcctctccac cagcagtgcc ccagagcttc caggtggccc	4020
acctgcatgc tcccaccggc agcggtaaga gcaccaaggt cccggctgcg tacgcagccc	4080
agggctacaa ggtgttggtg ctcaaccocct ctgttgctgc aacgctgggc tttggtgctt	4140
acatgtccaa ggcccatggg gttgatccta atatcaggac cggggtgaga acaattacca	4200
ctggcagccc catcacgtac tccacctacg gcaagttcct tgccgacggc ggggtgctcag	4260
gaggtgctta tgacataata atttgtgacg agtgccactc cacggatgcc acatccatct	4320
tgggcatcgg cactgtcctt gaccaagcag agactgcggg ggcgagactg gttgtgctcg	4380
ccactgctac ccctccgggc tccgtcactg tgtcccatcc taacatcgag gaggttgctc	4440
tgtccaccac cggagagatc cccttttacg gcaaggctat cccctcgag gtgatcaagg	4500
ggggaagaca tctcatcttc tgccattcaa agaagaagtg cgacgagctc gccggaagc	4560
tggtcgcatt gggcatcaat gccgtggcct actaccggg tcttgacgtg tctgtcatcc	4620
cgaccagcgg cgatgttgtc gtcgtgtcga ccgatgctct catgactggc ttaccggcg	4680
acttcgactc tgtgatagac tgcaaacagt gtgtcactca gacagtcgat ttcagccttg	4740
accctacctt taccattgag acaaccacgc tccccagga tgctgtctcc aggactcaac	4800
gccggggcag gaccggcagg gggaagccag gcatctatag atttgtggca ccgggggagc	4860
gccctccgg catgttcgac tcgtccgtcc tctgtgagtg ctatgacgcg ggctgtgctt	4920
ggtatgagct cacgcccgc gagactacag ttaggctacg agcgtacatg aacaccccg	4980
ggcttccgt gtgccaggac catcttgaat tttgggaggg cgtctttacg ggcctcactc	5040
atatagatgc ccactttcta tcccagacaa agcagagtgg ggagaacttt ccttacctgg	5100
tagcgtacca agccaccgtg tgcgctaggg ctcaagcccc tccccatcg tgggaccaga	5160
tgtggaagtg tttgatccgc cttaaaccac cctccatgg gccaacaccc ctgctataca	5220
gactgggcgc tgttcagaat gaagtcaccc tgacgcaccc aatcaccaaa tacatcatga	5280
catgcatgtc ggccgacctg gaggtcgtea cgagcacctg ggtgctcggt gccggcgctc	5340
tggctgctct ggccgcgtat tgccgtgcaa caggctgcgt ggtcatagtg ggcaggatcg	5400

tcttgtccgg gaagccggca attatacctg acagggaggt tctctaccag gagttcgatg	5460
agatggaaga gtgctctcag cacttaccgt acatcgagca agggatgatg ctcgctgagc	5520
agttcaagca gaaggccctc ggccctcctgc agaccgcgtc ccgccatgca gaggttatca	5580
cccctgctgt ccagaccaac tggcagaaac tcgaggtctt ttgggcgaag cacatgtgga	5640
atttcatcag tgggatacaa tacttggcgg gcctgtcaac gctgcctggg aaccccgcca	5700
ttgcttcatt gatggctttt acagctgccg tcaccagccc actaaccact ggccaaaccc	5760
tcctcttcaa catattgggg ggggtgggtgg ctgccagct cgccgcccc ggtgccgcta	5820
ctgcctttgt gggcgctggc ctagctggcg ccgccatcgg cagcgttgga ctggggaagg	5880
tcctcgtgga cattcttgca gggatatggcg cgggcgtggc gggagctctt gtagcattca	5940
agatcatgag cggtgaggtc cctccacgg aggacctggg caatctgctg ccgcctatcc	6000
tctcgcttgg agcccttgta gtcggtgtgg tctgcgcagc aatactgcgc cggcacgttg	6060
gcccgggcga gggggcagtg caatggatga accggctaata agccttcgcc tcccggggga	6120
accatgtttc cccacgcac tacgtgccgg agagcgatgc agccgcccgc gtcactgcca	6180
tactcagcag cctcactgta acccagctcc tgaggcgact gcatcagtgg ataagctcgg	6240
agtgtaccac tccatgctcc ggttcctggc taaggacat ctgggactgg atatgcgagg	6300
tgctgagcga ctttaagacc tggctgaaag ccaagctcat gccacaactg cctgggattc	6360
cctttgtgtc ctgccagcgc gggatatagg gggctctggcg aggagacggc attatgcaca	6420
ctcgctgcca ctgtggagct gagatcactg gacatgtcaa aaacgggacg atgaggatcg	6480
tcggtcctag gacttgcagg aacatgtgga gtgggacgtt cccattaac gcctacacca	6540
cgggcccctg tactcccctt cctgcgccga actataagtt cgcgctgtgg aggggtgtctg	6600
cagaggaata cgtggagata aggcgggtgg gggacttcca ctacgtatcg ggtatgacta	6660
ctgacaatct taaatgcccg tgccagatcc catcgcccga atttttcaca gaattggacg	6720
gggtgcgcct acacaggttt gcgccccctt gcaagccctt gctgcgggag gaggtatcat	6780
tcagagtagg actccacgag taccgggtgg ggtcgcaatt accttgcgag cccgaaccgg	6840
acgtagccgt gttgacgtcc atgctcactg atccctccca tataacagca gaggcggccg	6900
ggagaagggtt ggcgagaggg tcacccccctt ctatggccag ctctcgggt agccagctgt	6960

ccgctccatc tctcaaggca acttgcacccg ccaaccatga ctcccctgac gccgagctca	7020
tagaggctaa cctcctgtgg aggcaggaga tgggcgga catcaccagg gttgagtcag	7080
agaacaaagt ggtgattctg gactccttcg atccgcttgt ggcagaggag gatgagcggg	7140
aggtctccgt acctgcagaa attctgcgga agtctcggag attcgcccgg gccctgcccg	7200
tctgggcgcg gccggactac aacccccgc tagtagagac gtggaaaaag cctgactacg	7260
aaccacctgt ggtccatggc tgcccgtac cacctccacg gtcccctcct gtgcctccgc	7320
ctcggaaaaa gcgtacggtg gtcctcacccg aatcaaccct atctactgcc ttggccgagc	7380
ttgccaccaa aagttttggc agctcctcaa cttccggcat tacgggagac aatacgacaa	7440
catcctctga gcccgcacct tctggctgcc ccccgactc cgacgttgag tcctattctt	7500
ccatgcccc cctggagggg gagcctgggg atccggatct cagcgacggg tcatggtcga	7560
cggtcagtag tggggccgac acggaagatg tcgtgtgctg ctcaatgtct tattcctgga	7620
caggcgact cgtcaccccg tgcgctgcgg aagaacaaaa actgcccacg aacgcactga	7680
gcaactcgtt gctacgccat cacaatctgg tgtattccac cacttcacgc agtgcttgcc	7740
aaaggcagaa gaaagtcaca tttgacagac tgcaagttct ggacagccat taccaggacg	7800
tgctcaagga ggtcaaagca gcggcgtcaa aagtgaaggc taacttgcta tccgtagagg	7860
aagcttgcat cctgacgccc ccacattcag ccaaatccaa gtttggtat ggggcaaaag	7920
acgtccgttg ccatgccaga aaggccgtag cccacatcaa ctccgtgtgg aaagaccttc	7980
tggaagacag tgtaacacca atagacacta ccatcatggc caagaacgag gttttctgcg	8040
ttcagcctga gaaggggggt cgtaagccag ctcgctcat cgtgttcccc gacctggcg	8100
tgcgctgtg cgagaagatg gccctgtacg acgtggttag caagctcccc ctggccgtga	8160
tgggaagctc ctacggattc caatactcac caggacagcg ggttgaattc ctctgcaag	8220
cgtggaagtc caagaagacc ccgatgggggt tctcgtatga taccgctgt tttgactcca	8280
cagtcactga gagcgacatc cgtaaggagg aggaattta ccaatgttgt gacctggacc	8340
ccaagcccc cgtagccatc aagtccctca ctgagaggct ttatgttggg ggccctctta	8400
ccaattcaag gggggaaaac tgcggctacc gcagggtccg cgcgagcggc gtactgacaa	8460
ctagctgtgg taacaccctc acttgctaca tcaaggcccc ggcagcctgt cgagccgcag	8520

ggctccagga ctgcaccatg ctcggtgtgtg ggcagcactt agtcgttatc tgtgaaagtg 8580
 cggggggtcca ggaggacgcg gcgaacctga gagccttcac ggaggctatg accaggtact 8640
 ccgccccccc cggggacccc ccacaaccag aatacgactt ggagcttata acatcatgct 8700
 cctccaacgt gtcagtcgcc cacgacggcg ctggaaagag ggtctactac cttaccctgtg 8760
 accctacaac cccctcgcg agagccgcgt gggagacagc aagacacact ccagtcaatt 8820
 cctggctagg caacataatc atgtttgccc ccacactgtg ggcgaggatg atactgatga 8880
 cccatttctt tagcgtcttc atagccaggg atcagcttga acaggctctt aactgtgaga 8940
 tctacggagc ctgctactcc atagaaccac tggatctacc tccaatcatt caaagactcc 9000
 atggcctcag cgcattttca ctccacagtt actctccagg tgaaatcaat aggggtggccg 9060
 catgcctcag aaaacttggg gtcccgcctt tgcgagcttg gagacaccgg gcccgagcg 9120
 tccgcgctag gcttctgtcc agaggaggca gggctgccat atgtggcaag tacctcttca 9180
 actgggcagt aagaacaaag ctcaaactca cccaataac ggccgctggc cggctggact 9240
 tgtccggttg gttcacggct ggctacagcg ggggagacat ttatcacagc gtgtctcatg 9300
 cccggccccg ctggttcttg ttttgccctac tctgtctgc tgcaggggta ggcactctacc 9360
 tcctcccaa cccatgaagg ttggggtaaa cactccggcc tcttaagcca tttcctgttt 9420
 tttttttttt tttttttttt tttttctttt tttttttctt tcctttcctt ctttttttcc 9480
 tttctttttc cttcttttaa tgggtggctcc atcttagccc tagtcacggc tagctgtgaa 9540
 aggtccgtga gccgcatgac tgcagagagt gctgatactg gcctctctgc agatcatgt 9599

<210> 20
 <211> 3011
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus

<400> 20
 Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1 5 10 15
 Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
 20 25 30
 Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
 35 40 45
 Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro

50	55	60																	
Ile	Pro	Lys	Ala	Arg	Arg	Pro	Glu	Gly	Arg	Thr	Trp	Ala	Gln	Pro	Gly				
65						70				75					80				
Tyr	Pro	Trp	Pro	Leu	Tyr	Gly	Asn	Glu	Gly	Cys	Gly	Trp	Ala	Gly	Trp				
				85					90					95					
Leu	Leu	Ser	Pro	Arg	Gly	Ser	Arg	Pro	Ser	Trp	Gly	Pro	Thr	Asp	Pro				
			100					105					110						
Arg	Arg	Arg	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Ile	Asp	Thr	Leu	Thr	Cys				
			115				120					125							
Gly	Phe	Ala	Asp	Leu	Met	Gly	Tyr	Ile	Pro	Leu	Val	Gly	Ala	Pro	Leu				
130						135					140								
Gly	Gly	Ala	Ala	Arg	Ala	Leu	Ala	His	Gly	Val	Arg	Val	Leu	Glu	Asp				
145					150				155					160					
Gly	Val	Asn	Tyr	Ala	Thr	Gly	Asn	Leu	Pro	Gly	Cys	Ser	Phe	Ser	Ile				
				165				170						175					
Phe	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Cys	Leu	Thr	Val	Pro	Ala	Ser	Ala	Tyr				
			180					185					190						
Gln	Val	Arg	Asn	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	His	Val	Thr	Asn	Asp	Cys	Pro				
			195				200					205							
Asn	Ser	Ser	Ile	Val	Tyr	Glu	Ala	Ala	Asp	Ala	Ile	Leu	His	Thr	Pro				
			210			215					220								
Gly	Cys	Val	Pro	Cys	Val	Arg	Glu	Gly	Asn	Ala	Ser	Arg	Cys	Trp	Val				
225					230				235					240					
Ala	Val	Thr	Pro	Thr	Val	Ala	Thr	Arg	Asp	Gly	Lys	Leu	Pro	Thr	Thr				
				245				250						255					
Gln	Leu	Arg	Arg	His	Ile	Asp	Leu	Leu	Val	Gly	Ser	Ala	Thr	Leu	Cys				
			260					265					270						
Ser	Ala	Leu	Tyr	Val	Gly	Asp	Leu	Cys	Gly	Ser	Val	Phe	Leu	Val	Gly				
			275				280					285							
Gln	Leu	Phe	Thr	Phe	Ser	Pro	Arg	Arg	His	Trp	Thr	Thr	Gln	Asp	Cys				
			290			295					300								
Asn	Cys	Ser	Ile	Tyr	Pro	Gly	His	Ile	Thr	Gly	His	Arg	Met	Ala	Trp				
305					310				315				320						
Asp	Met	Met	Met	Asn	Trp	Ser	Pro	Thr	Ala	Ala	Leu	Val	Val	Ala	Gln				
				325				330					335						

Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Met Asp Met Ile Ala Gly Ala His
 340 345 350
 Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met Val Gly Asn Trp
 355 360 365
 Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Ala Glu
 370 375 380
 Thr His Val Thr Gly Gly Asn Ala Gly Arg Thr Thr Ala Gly Leu Val
 385 390 395 400
 Gly Leu Leu Thr Pro Gly Ala Lys Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn Thr
 405 410 415
 Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Glu Ser
 420 425 430
 Leu Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe Asn
 435 440 445
 Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Thr Ser Cys Arg Arg Leu Thr Asp
 450 455 460
 Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Ser Tyr Ala Asn Gly Ser Gly Leu
 465 470 475 480
 Asp Glu Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro Arg Pro Cys Gly Ile
 485 490 495
 Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser
 500 505 510
 Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr Ser
 515 520 525
 Trp Gly Ala Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu Asn Asn Thr Arg Pro
 530 535 540
 Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe
 545 550 555 560
 Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile Gly Gly Val Gly Asn
 565 570 575
 Asn Thr Leu Leu Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala
 580 585 590
 Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro Arg Cys Met
 595 600 605
 Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile Asn Tyr

610	615	620																	
Thr	Ile	Phe	Lys	Val	Arg	Met	Tyr	Val	Gly	Gly	Val	Glu	His	Arg	Leu				
625					630					635					640				
Glu	Ala	Ala	Cys	Asn	Trp	Thr	Arg	Gly	Glu	Arg	Cys	Asp	Leu	Glu	Asp				
				645					650					655					
Arg	Asp	Arg	Ser	Glu	Leu	Ser	Pro	Leu	Leu	Leu	Ser	Thr	Thr	Gln	Trp				
			660					665					670						
Gln	Val	Leu	Pro	Cys	Ser	Phe	Thr	Thr	Leu	Pro	Ala	Leu	Ser	Thr	Gly				
	675						680					685							
Leu	Ile	His	Leu	His	Gln	Asn	Ile	Val	Asp	Val	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Gly				
690					695						700								
Val	Gly	Ser	Ser	Ile	Ala	Ser	Trp	Ala	Ile	Lys	Trp	Glu	Tyr	Val	Val				
705				710					715						720				
Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Ala	Asp	Ala	Arg	Val	Cys	Ser	Cys	Leu	Trp				
				725					730					735					
Met	Met	Leu	Leu	Ile	Ser	Gln	Ala	Glu	Ala	Ala	Leu	Glu	Asn	Leu	Val				
			740					745					750						
Ile	Leu	Asn	Ala	Ala	Ser	Leu	Ala	Gly	Thr	His	Gly	Leu	Val	Ser	Phe				
	755						760					765							
Leu	Val	Phe	Phe	Cys	Phe	Ala	Trp	Tyr	Leu	Lys	Gly	Arg	Trp	Val	Pro				
770						775					780								
Gly	Ala	Ala	Tyr	Ala	Phe	Tyr	Gly	Met	Trp	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu				
785				790					795						800				
Leu	Ala	Leu	Pro	Gln	Arg	Ala	Tyr	Ala	Leu	Asp	Thr	Glu	Val	Ala	Ala				
				805					810					815					
Ser	Cys	Gly	Gly	Val	Val	Leu	Val	Gly	Leu	Met	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser				
		820						825					830						
Pro	Tyr	Tyr	Lys	Arg	Tyr	Ile	Ser	Trp	Cys	Met	Trp	Trp	Leu	Gln	Tyr				
	835						840					845							
Phe	Leu	Thr	Arg	Val	Glu	Ala	Gln	Leu	His	Val	Trp	Val	Pro	Pro	Leu				
850					855						860								
Asn	Val	Arg	Gly	Gly	Arg	Asp	Ala	Val	Ile	Leu	Leu	Met	Cys	Val	Val				
865				870						875					880				
His	Pro	Thr	Leu	Val	Phe	Asp	Ile	Thr	Lys	Leu	Leu	Leu	Ala	Ile	Phe				
			885						890					895					

Gly Pro Leu Trp Ile Leu Gln Ala Ser Leu Leu Lys Val Pro Tyr Phe
900 905 910

Val Arg Val Gln Gly Leu Leu Arg Ile Cys Ala Leu Ala Arg Lys Ile
915 920 925

Ala Gly Gly His Tyr Val Gln Met Ala Ile Ile Lys Leu Gly Ala Leu
930 935 940

Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asn His Leu Thr Pro Leu Arg Asp Trp Ala
945 950 955 960

His Asn Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val Ala Val Glu Pro Val Val Phe
965 970 975

Ser Arg Met Glu Thr Lys Leu Ile Thr Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala
980 985 990

Cys Gly Asp Ile Ile Asn Gly Leu Pro Val Ser Ala Arg Arg Gly Gln
995 1000 1005

Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Gly Met Val Ser Lys Gly Trp Arg
1010 1015 1020

Leu Gln Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Thr Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu
1025 1030 1035 1040

Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu
1045 1050 1055

Gly Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Thr Gln Thr Phe Leu Ala Thr
1060 1065 1070

Cys Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg
1075 1080 1085

Thr Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val
1090 1095 1100

Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ser Arg Ser Leu
1105 1110 1115 1120

Ala Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His
1125 1130 1135

Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu
1140 1145 1150

Leu Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro
1155 1160 1165

Leu Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Leu Phe Arg Ala Ala Val

1170	1175	1180
Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn		
1185	1190	1195 1200
Leu Gly Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro		
	1205	1210 1215
Pro Ala Val Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr		
	1220	1225 1230
Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly		
	1235	1240 1245
Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe		
	1250	1255 1260
Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Val Asp Pro Asn Ile Arg Thr		
1265	1270	1275 1280
Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr		
	1285	1290 1295
Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile		
	1300	1305 1310
Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly		
	1315	1320 1325
Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val		
	1330	1335 1340
Val Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Ser His Pro		
1345	1350	1355 1360
Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr		
	1365	1370 1375
Gly Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile		
	1380	1385 1390
Phe Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val		
	1395	1400 1405
Ala Leu Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser		
	1410	1415 1420
Val Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ser Thr Asp Ala Leu		
1425	1430	1435 1440
Met Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr		
	1445	1450 1455

Cys Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile
1460 1465 1470

Glu Thr Thr Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg
1475 1480 1485

Gly Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro
1490 1495 1500

Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys
1505 1510 1515 1520

Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr
1525 1530 1535

Val Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln
1540 1545 1550

Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile
1555 1560 1565

Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Phe Pro
1570 1575 1580

Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro
1585 1590 1595 1600

Pro Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro
1605 1610 1615

Thr Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln
1620 1625 1630

Asn Glu Val Thr Leu Thr His Pro Ile Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys
1635 1640 1645

Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly
1650 1655 1660

Gly Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val
1665 1670 1675 1680

Val Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro
1685 1690 1695

Asp Arg Glu Val Leu Tyr Gln Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ser
1700 1705 1710

Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Met Leu Ala Glu Gln Phe
1715 1720 1725

Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala Ser Arg His Ala Glu

1730	1735	1740	
Val Ile Thr Pro Ala Val Gln Thr Asn Trp Gln Lys Leu Glu Val Phe			
1745	1750	1755	1760
Trp Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala			
	1765	1770	1775
Gly Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala Ile Ala Ser Leu Met Ala			
	1780	1785	1790
Phe Thr Ala Ala Val Thr Ser Pro Leu Thr Thr Gly Gln Thr Leu Leu			
	1795	1800	1805
Phe Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val Ala Ala Gln Leu Ala Ala Pro Gly			
	1810	1815	1820
Ala Ala Thr Ala Phe Val Gly Ala Gly Leu Ala Gly Ala Ala Ile Gly			
	1825	1830	1835
Ser Val Gly Leu Gly Lys Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly			
	1845	1850	1855
Ala Gly Val Ala Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys Ile Met Ser Gly Glu			
	1860	1865	1870
Val Pro Ser Thr Glu Asp Leu Val Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu Ser			
	1875	1880	1885
Pro Gly Ala Leu Val Val Gly Val Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg			
	1890	1895	1900
His Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile			
	1905	1910	1915
Ala Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro			
	1925	1930	1935
Glu Ser Asp Ala Ala Ala Arg Val Thr Ala Ile Leu Ser Ser Leu Thr			
	1940	1945	1950
Val Thr Gln Leu Leu Arg Arg Leu His Gln Trp Ile Ser Ser Glu Cys			
	1955	1960	1965
Thr Thr Pro Cys Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Ile Trp Asp Trp Ile			
	1970	1975	1980
Cys Glu Val Leu Ser Asp Phe Lys Thr Trp Leu Lys Ala Lys Leu Met			
	1985	1990	1995
Pro Gln Leu Pro Gly Ile Pro Phe Val Ser Cys Gln Arg Gly Tyr Arg			
	2005	2010	2015

Gly Val Trp Arg Gly Asp Gly Ile Met His Thr Arg Cys His Cys Gly
2020 2025 2030

Ala Glu Ile Thr Gly His Val Lys Asn Gly Thr Met Arg Ile Val Gly
2035 2040 2045

Pro Arg Thr Cys Arg Asn Met Trp Ser Gly Thr Phe Pro Ile Asn Ala
2050 2055 2060

Tyr Thr Thr Gly Pro Cys Thr Pro Leu Pro Ala Pro Asn Tyr Lys Phe
2065 2070 2075 2080

Ala Leu Trp Arg Val Ser Ala Glu Glu Tyr Val Glu Ile Arg Arg Val
2085 2090 2095

Gly Asp Phe His Tyr Val Ser Gly Met Thr Thr Asp Asn Leu Lys Cys
2100 2105 2110

Pro Cys Gln Ile Pro Ser Pro Glu Phe Phe Thr Glu Leu Asp Gly Val
2115 2120 2125

Arg Leu His Arg Phe Ala Pro Pro Cys Lys Pro Leu Leu Arg Glu Glu
2130 2135 2140

Val Ser Phe Arg Val Gly Leu His Glu Tyr Pro Val Gly Ser Gln Leu
2145 2150 2155 2160

Pro Cys Glu Pro Glu Pro Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Met Leu Thr
2165 2170 2175

Asp Pro Ser His Ile Thr Ala Glu Ala Ala Gly Arg Arg Leu Ala Arg
2180 2185 2190

Gly Ser Pro Pro Ser Met Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala
2195 2200 2205

Pro Ser Leu Lys Ala Thr Cys Thr Ala Asn His Asp Ser Pro Asp Ala
2210 2215 2220

Glu Leu Ile Glu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met Gly Gly Asn
2225 2230 2235 2240

Ile Thr Arg Val Glu Ser Glu Asn Lys Val Val Ile Leu Asp Ser Phe
2245 2250 2255

Asp Pro Leu Val Ala Glu Glu Asp Glu Arg Glu Val Ser Val Pro Ala
2260 2265 2270

Glu Ile Leu Arg Lys Ser Arg Arg Phe Ala Arg Ala Leu Pro Val Trp
2275 2280 2285

Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Val Glu Thr Trp Lys Lys Pro

2290	2295	2300
Asp Tyr Glu Pro Pro Val Val His Gly Cys Pro Leu Pro Pro Pro Arg		
2305	2310	2315 2320
Ser Pro Pro Val Pro Pro Pro Arg Lys Lys Arg Thr Val Val Leu Thr		
2325	2330	2335
Glu Ser Thr Leu Ser Thr Ala Leu Ala Glu Leu Ala Thr Lys Ser Phe		
2340	2345	2350
Gly Ser Ser Ser Thr Ser Gly Ile Thr Gly Asp Asn Thr Thr Thr Ser		
2355	2360	2365
Ser Glu Pro Ala Pro Ser Gly Cys Pro Pro Asp Ser Asp Val Glu Ser		
2370	2375	2380
Tyr Ser Ser Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu		
2385	2390	2395 2400
Ser Asp Gly Ser Trp Ser Thr Val Ser Ser Gly Ala Asp Thr Glu Asp		
2405	2410	2415
Val Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Leu Val Thr		
2420	2425	2430
Pro Cys Ala Ala Glu Glu Gln Lys Leu Pro Ile Asn Ala Leu Ser Asn		
2435	2440	2445
Ser Leu Leu Arg His His Asn Leu Val Tyr Ser Thr Thr Ser Arg Ser		
2450	2455	2460
Ala Cys Gln Arg Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Leu		
2465	2470	2475 2480
Asp Ser His Tyr Gln Asp Val Leu Lys Glu Val Lys Ala Ala Ala Ser		
2485	2490	2495
Lys Val Lys Ala Asn Leu Leu Ser Val Glu Glu Ala Cys Ser Leu Thr		
2500	2505	2510
Pro Pro His Ser Ala Lys Ser Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val		
2515	2520	2525
Arg Cys His Ala Arg Lys Ala Val Ala His Ile Asn Ser Val Trp Lys		
2530	2535	2540
Asp Leu Leu Glu Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala		
2545	2550	2555 2560
Lys Asn Glu Val Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Gly Arg Lys Pro		
2565	2570	2575

Ala Arg Leu Ile Val Phe Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys
2580 2585 2590

Met Ala Leu Tyr Asp Val Val Ser Lys Leu Pro Leu Ala Val Met Gly
2595 2600 2605

Ser Ser Tyr Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu
2610 2615 2620

Val Gln Ala Trp Lys Ser Lys Lys Thr Pro Met Gly Phe Ser Tyr Asp
2625 2630 2635 2640

Thr Arg Cys Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Ser Asp Ile Arg Thr Glu
2645 2650 2655

Glu Ala Ile Tyr Gln Cys Cys Asp Leu Asp Pro Gln Ala Arg Val Ala
2660 2665 2670

Ile Lys Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Val Gly Gly Pro Leu Thr Asn
2675 2680 2685

Ser Arg Gly Glu Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val
2690 2695 2700

Leu Thr Thr Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Ile Lys Ala Arg
2705 2710 2715 2720

Ala Ala Cys Arg Ala Ala Gly Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Cys
2725 2730 2735

Gly Asp Asp Leu Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Val Gln Glu Asp
2740 2745 2750

Ala Ala Asn Leu Arg Ala Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala
2755 2760 2765

Pro Pro Gly Asp Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr
2770 2775 2780

Ser Cys Ser Ser Asn Val Ser Val Ala His Asp Gly Ala Gly Lys Arg
2785 2790 2795 2800

Val Tyr Tyr Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala
2805 2810 2815

Trp Glu Thr Ala Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile
2820 2825 2830

Ile Met Phe Ala Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His
2835 2840 2845

Phe Phe Ser Val Leu Ile Ala Arg Asp Gln Leu Glu Gln Ala Leu Asn

2850 2855 2860

Cys Glu Ile Tyr Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro
 2865 2870 2875 2880

Pro Ile Ile Gln Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser
 2885 2890 2895

Tyr Ser Pro Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ala Cys Leu Arg Lys Leu
 2900 2905 2910

Gly Val Pro Pro Leu Arg Ala Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg
 2915 2920 2925

Ala Arg Leu Leu Ser Arg Gly Gly Arg Ala Ala Ile Cys Gly Lys Tyr
 2930 2935 2940

Leu Phe Asn Trp Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Thr
 2945 2950 2955 2960

Ala Ala Gly Arg Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Thr Ala Gly Tyr Ser
 2965 2970 2975

Gly Gly Asp Ile Tyr His Ser Val Ser His Ala Arg Pro Arg Trp Phe
 2980 2985 2990

Trp Phe Cys Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu
 2995 3000 3005

Pro Asn Arg
 3010

<210> 21
 <211> 7
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> oligonucleotide

<400> 21
 accatgg