



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0114209
(43) 공개일자 2007년11월29일

(51) Int. Cl.

C07K 14/18 (2006.01) *C07K 14/005* (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01) *C07K 14/005* (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7023368(분할)

(22) 출원일자 2007년10월11일

심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2003-7002227

원출원일자 2003년02월15일

심사청구일자 2006년07월07일

번역문제출일자 2007년10월11일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2001/001808

국제출원일자 2001년08월15일

(87) 국제공개번호 WO 2002/13855

국제공개일자 2002년02월21일

(30) 우선권주장

09/705,547 2000년11월03일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인

트리웹 아베

스웨덴 에스-141 57 후딩 햄소배겐 7

(72) 발명자

살버그 마티

스웨덴 에스-125 33 알브스조 폭슬라가르가탄 59

헬트그렌 카타리나

스웨덴 에스-11732 스톡홀름 5티알. 헬레네보레스
가탄 에스2

(74) 대리인

김성기, 신정건

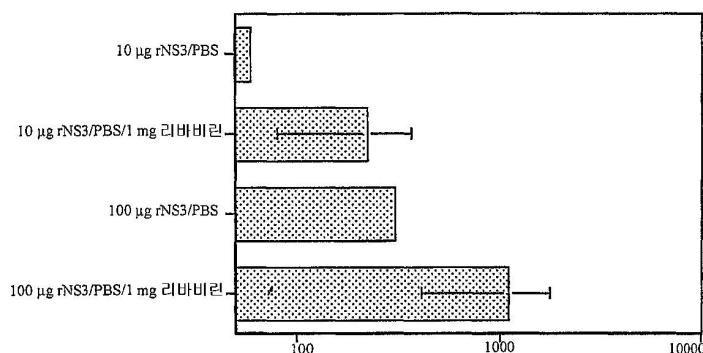
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 리바비린 함유 백신 및 이것의 사용 방법

(57) 요 약

본 명세서에서는 가축, 스포츠용 동물 또는 애완 동물 및 인간 등의 동물에서 백신의 효과를 증강시키기 위한 조성물 및 방법에 대해 개시한다. 보다 구체적으로, 질병, 바람직하게는 HCV 감염을 치료 및 예방하는 데 사용하기 위한 리바비린 및 항원, 바람직하게는 간염 C 바이러스(HCV)에 존재하는 에피토프를 보유하는 항원을 함유하는 백신 조성물에 대해 개시한다.

대표도 - 도1



EIA에서의 평균 NS3 억가

(30) 우선권주장

60/225,767 2000년08월17일 미국(US)

60/229,175 2000년08월29일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

서열 번호 16의 서열로 이루어진 정제 또는 단리된 핵산 또는 이의 상보물.

청구항 2

서열 번호 16의 100개 이상의 연속 뉴클레오티드로 이루어진 정제 또는 단리된 핵산 또는 이의 상보물.

청구항 3

제2항에 있어서, 서열 번호 16의 200개 이상의 연속 뉴클레오티드로 이루어진 정제 또는 단리된 핵산.

청구항 4

제2항에 있어서, 서열 번호 16의 500개 이상의 연속 뉴클레오티드로 이루어진 정제 또는 단리된 핵산.

청구항 5

제2항에 있어서, 서열 번호 16의 1000개 이상의 연속 뉴클레오티드로 이루어진 정제 또는 단리된 핵산.

청구항 6

제1항의 핵산을 포함하는 백터.

청구항 7

제1항의 핵산을 포함하는 단리된 세포.

청구항 8

제1항의 핵산을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 면역 보강제(adjuvant)를 더 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 10

제2항의 핵산을 포함하는 백터.

청구항 11

제2항의 핵산을 포함하는 단리된 세포.

청구항 12

제3항의 핵산을 포함하는 백터.

청구항 13

제3항의 핵산을 포함하는 단리된 세포.

청구항 14

제4항의 핵산을 포함하는 백터.

청구항 15

제4항의 핵산을 포함하는 단리된 세포.

청구항 16

제5항의 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 17

제5항의 핵산을 포함하는 단리된 세포.

청구항 18

제1항의 핵산을 포함하는 조성물.

청구항 19

제2항의 핵산을 포함하는 조성물.

청구항 20

제3항의 핵산을 포함하는 조성물.

청구항 21

제4항의 핵산을 포함하는 조성물.

청구항 22

제5항의 핵산을 포함하는 조성물.

청구항 23

제18항에 있어서, 면역 보강제를 더 포함하는 조성물.

청구항 24

제19항에 있어서, 면역 보강제를 더 포함하는 조성물.

청구항 25

제20항에 있어서, 면역 보강제를 더 포함하는 조성물.

청구항 26

제21항에 있어서, 면역 보강제를 더 포함하는 조성물.

청구항 27

제22항에 있어서, 면역 보강제를 더 포함하는 조성물.

청구항 28

제18항에 있어서, 리바비린을 더 포함하는 조성물.

청구항 29

제19항에 있어서, 리바비린을 더 포함하는 조성물.

청구항 30

제20항에 있어서, 리바비린을 더 포함하는 조성물.

청구항 31

제21항에 있어서, 리바비린을 더 포함하는 조성물.

청구항 32

제22항에 있어서, 리바비린을 더 포함하는 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 가축, 스포츠용 동물 또는 애완 동물과 인간 등의 동물에게서 백신 효과를 증강시키기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 바람직한 구체예는 리바비린의 면역 보강제(adjuvant)로서의 용도 및 리바비린과 항원을 함유하는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

<2> 인간, 사육 가축, 스포츠용 동물, 및 가정 애완 동물의 질병을 예방하기 위해 백신을 사용하는 것은 일반적인 일이다. 그러나, 백신에 사용되는 항원은 추후의 항원에의 노출에 대한 보호를 제공하기에 충분한 농도로 항체 역가를 높이거나 또는 장기간에 걸쳐 그러한 농도를 나타낼 수 있는 잠재력을 유지하기에 충분한 면역원성을 보유하지 못한 경우가 빈번하다. 또한, 다수의 백신은 대체로 박테리아 및 바이러스 감염에 대한 1차 면역 방어 작용인 세포 매개 면역을 유도하는 기능이 부족하다. 더 강력한 백신의 개발 및 항원 함유 제제의 면역원성을 증강시키는 방법에 대해 현재 상당히 많은 연구가 집중되고 있다[참고 문헌의 예: 미국 특허 제6,056,961호; 제6,060,068호; 제6,063,380호; 및 Li 등의 문헌, Science 288:2219-2222(2000)].

<3> 그러한 "약한" 백신 중에서도 악명이 높은 것은 간염 B 백신이다. 예를 들어, 간염 B 바이러스에 대한 재조합 백신, 예컨대 Genhevacb(Pasteur Merieux Serums et Vaccines, 58, Avenue Leclerc 69007 Lyon, France), Engerixb(스미스, 클라인 앤드 심볼 프렌치) 및 Recombivaxhb(마크, 샤프, 앤드 돔)는 0일, 30일, 및 60일 또는 80일 째 3회 이상 접종한 후 1년 후에 반드시 추가 접종하는 경우에만 효력이 나타난다(Chedid 등, 미국 특허 제6,063,380호). 또한, 이를 백신을 접종받은 다수의 피험자들은 반응을 나타낸다고 하더라도 미미하게 반응 한다. HBV 감염은 세계 여러 지역의 풍토병이기 때문에, 기존의 HBV 백신이 지닌 낮은 면역원성 특성을 매우 심각한 문제로 대두되었다.

<4> 더 강력한 체액 및/또는 세포 반응을 얻기 위해, 백신에 존재하는 항원에 대한 환자의 면역 반응을 증강시키는 물질 중에 함유된 백신을 투여하는 것은 보편적인 일이다. 백신 프로토콜에 가장 일반적으로 사용되는 면역 보강제는 오일 제제와 명반이다(Chedid 등, 미국 특허 제6,063,380호). 더 많은 종류의 안전하고 효과적인 면역 보강제가 요구되고 있다.

<5> 뉴클레오사이드 유사체는 바이러스 복제를 감소시킬 수 있는 능력으로 인해 항-바이러스 요법에 널리 사용되어 왔다[Hosoya 등, J. Inf. Dis., 168:641-646(1993)]. 리바비린(1- β -D-리보푸라노실-1,2,4-트리아졸-3-카르복사미드)은 RNA 및 DNA 바이러스 복제를 억제하기 위해 사용되어 온 합성 구아노신 유사체이다(Huffman 등, Antimicrob. Agents. Chemother., 3:235(1973); Sidwell 등, Science, 177:705(1972)]. 리바비린은 IMP를 IMX(IMX는 후에 GMP로 전환된다) 전환시키는 이노시톨 모노-포스페이트(IMP) 디하이드로게나제(IMPDH)의 경쟁적 억제제인 것으로 밝혀졌다. 이에 대해서는 De Clercq의 문헌[Anti viral Agents: characteristic activity spectrum depending on the molecular target with which they interact, Academic press, Inc., New York N.Y., pp. 1-55(1993)]을 참조할 수 있다. GTP의 세포내 풀은 장기간의 리바비린 치료로 인해 고갈되었다.

<6> 연구자들은 일부 구아노신 유사체가 항바이러스 활성을 지닐 뿐 아니라 면역계에도 영향을 미친다는 것을 알게 되었다(미국 특허 제6,063,772호 및 제4,950,647호). 리바비린은 기능성 체액 면역 반응을 억제하고[Peavy 등, J. Immunol., 126:861-864(1981); Powers 등, Antimicrob. Agents. Chemother., 22:108-114(1982)], 비만 세포 분비의 IgE-매개 조절을 억제하는 것으로 확인되었다[Marquardt 등, J. Pharmacol. Exp. Therapeutics, 240:145-149(1987)]. 몇몇 연구자들은 리바비린의 일일 경구 요법은 인간과 마우스에 면역 조절 효과를 나타낸다고 보고하였다[Hultgren 등, J. Gen. Virol., 79:231-239(1998) 및 Cramp 등, Gastron. Enterol., 118:346-355(2000)]. 그러나, 리바비린이 면역계에 미치는 영향에 관한 현재의 지식은 아직 미미한 수준이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<7> 본 발명은 가축, 스포츠용 동물 또는 애완 동물과 인간 등의 동물에게서 백신 효과를 증강시키기 위한 조성물 및 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 보다 구체적으로, 바람직한 구체예는 리바비린의 면역 보강제 (adjuvant)로서의 용도 및 리바비린과 항원을 함유하는 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<8> 발명의 개요

<9> 본 발명자들은 리바비린이 항원에 대한 면역 반응을 증강 또는 촉진하는 면역 보강제로서 사용될 수 있다는 것을 발견하였다. 본 명세서에서 개시하는 본 발명의 구체예는 항원 및 리바비린을 함유하는 "강력한" 백신 제제를 포함한다. 일반적으로 이들 제제는 항원에 대한 면역 반응을 증강 또는 촉진하기에 충분한 양의 리바비린을 함유한다. 본 발명의 다른 양태는 인간을 비롯한 동물의 항원에 대한 면역 반응을 증강 또는 촉진하는 방법을 포함한다. 한 방법의 예를 들어 보면, 항원에 대한 유효 면역 반응이 필요한 동물을 먼저 확인한 다음, 항원과 함께 일정량의 리바비린을 투여한다. 어떤 방법에서는, 리바비린과 항원을 함께(예컨대, 단일 조성물로서) 투여하고, 다른 방법에서는 리바비린과 항원을 개별적으로 투여한다. 몇몇 구체예는 또한 리바비린과 항원을 함유하는 조성물의 제조 방법과 그 용도에 관한 것이다.

<10> 본 발명의 조성물은 리바비린 및 사설상 어떠한 종류의 항원 또는 에피토프도 포함하지만, 바람직한 조성물은 리바비린과 간염 바이러스 항원 또는 에피토프를 함유한다. 항원 또는 에피토프는 웨티드 또는 핵산계(예컨대, 웨티드 항원을 암호화하는 RNA 또는 피염체에 도입되면 웨티드 항원을 발현하는 작제물)일 수 있다. 리바비린 및 간염 A 바이러스(HAV) 유래의 항원 또는 에피토프를 포함하는 웨티드 또는 상기 웨티드를 암호화하는 핵산을 함유하는 조성물이 한 구체예가 된다. 리바비린 및 간염 B 바이러스(HBV) 유래의 항원 또는 에피토프를 포함하는 웨티드 또는 상기 웨티드를 암호화하는 핵산을 함유하는 조성물 역시 한 구체예가 된다. 적절한 HBV 항원의 예로는 간염 B 표면 항원(HBsAg), 간염 코어 항원(HBcAg), 간염 e 항원(HBeAg) 및 이들 분자를 암호화하는 핵산을 들 수 있다. 그 밖에도 리바비린 및 간염 C 바이러스(HCV) 유래의 항원 또는 에피토프를 포함하는 웨티드 또는 상기 웨티드를 암호화하는 핵산을 함유하는 조성물도 한 구체예가 된다. 적절한 HCV 항원으로는 HCV 서열(예컨대, NS3 및/또는 NS4A)의 하나 이상의 도메인 및 이들 분자를 암호화하는 핵산을 들 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.

<11> 새로운 HCV 서열 역시 발견되었다. HCV에 감염된 환자로부터 HCV 계놈의 신규 NS3/4A 단편을 클로닝하고 그 서열을 분석하였다(서열 번호 16). 이 서열은 가장 밀접하게 관련된 HCV 서열과의 상동성이 93%에 불과한 것으로 확인되었다. 이 신규 웨티드(서열 번호 17) 및 아미노산 길이가 최소한 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15 또는 20개인 이의 단편들, 이들 분자를 암호화하는 핵산, 상기 핵산을 보유하는 백터, 및 상기 백터, 핵산 또는 웨티드를 보유하는 세포 역시 본 발명의 한 구체예가 된다. 특히 바람직한 구체예는 리바비린 및 서열 번호 17의 HCV 웨티드 또는 아미노산 길이가 최소한 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15 또는 20개인 이의 단편들(서열 번호 25) 또는 상기 웨티드 또는 단편들을 암호화하는 핵산을 함유하는 백신 조성물이다.

<12> 또한, 본 발명자들은 NS3/4A 웨티드의 절두형 돌연변이체 및 단백질 분해 절단 부위가 없는 돌연변이체가 면역 원성이 크다는 사실을 발견하였다. 이들 신규 웨티드(서열 번호 29-32 및 43-49) 및 아미노산 길이가 최소한 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15 또는 20개인 이들의 단편들(예, 서열 번호 26, 17 및 33-42), 이들 분자들을 암호화하는 핵산, 상기 핵산을 보유하는 백터, 및 상기 백터, 핵산 또는 웨티드를 보유하는 세포 역시 한 구체예가 된다. 특히 바람직한 구체예는 리바비린 및 서열 번호 29-32 및 43-49의 하나 이상의 HCV 웨티드 또는 아미노산 길이가 최소한 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15 또는 20개인 이의 단편들(서열 번호 26, 27 및 33-42) 또는 상기 웨티드 또는 단편들을 암호화하는 핵산을 함유하는 백신 조성물이다.

<13> 또한, 상기 항원의 혼합물을 함유한 조성물도 본 발명의 한 구체예가 된다. 예를 들어, 몇몇 조성물은 HBV 항원, HAV 항원 및 리바비린; 또는 HBV 항원, HCV 항원 및 리바비린; 또는 HAV 항원, HCV 항원 및 리바비린; 또는 HBV 항원, HAV 항원, HCV 항원 및 리바비린을 포함한다. 다른 구체예는 리바비린 및 전술한 항원의 혼합물을 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구체예는 비제한적인 예로 명반, 오일 및 면역 반응을 증강시키는 기타 화합물을 비롯하여 당업계에 공지된 다른 면역 보강제, 결합제, 유화제, 캐리어 및 충전제를 포함하기도 한다.

<14> 본 명세서에 개시된 조성물의 제조 방법 및 사용 방법 역시 본 발명의 한 양태이다. 몇몇 방법은 단일 조성물(예, 백신 조성물)로 제제화하기 위해 웨티드 또는 핵산 항원(예, HAV, HBV, HCV 항원)과 리바비린을 혼합하여 실시한다. 바람직한 방법은 HCV의 하나 이상의 도메인 상에 존재하는 에피토프를 갖는 HCV 항원(예, NS3 및/또는 NS4A)과 리바비린을 혼합하는 단계를 포함한다.

<15> 본 명세서에 개시된 조성물을 사용하는 바람직한 방법은 이를 필요로 하는 동물에게 충분한 양의 리바비린 및 간염 바이러스 항원(예, HBV 항원, HAV 항원, HCV 항원, 이들 항원 중 하나를 암호화하는 핵산 또는 이들의 임의의 조합물)을 투여하는 것을 포함한다. 한가지 실시 방법의 예를 들면, 간염 바이러스 항원에 대한 유효 면역 반응이 필요한 동물(예컨대, 간염에 감염될 위험이 있거나 이미 감염된 동물)을 먼저 확인하고, 간염 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 증강 또는 촉진하기에 유효한 양의 리바비린 및 간염 바이러스 항원(단일 조성물로 또는 개별적으로)을 투여한다. 바람직하게는, HCV에 대한 유효 면역 반응이 필요한 동물을 확인한 후, 상기 동물에게 리바비린 및 서열 번호 1, 6, 7, 또는 17에 존재하는 항원 또는 에피토프를 포함하는 웨티드, 또는 상기 웨티드를 암호화하는 핵산을 함유하는 조성물을 투여한다. 특히 바람직한 방법은 HCV에 대한 유효 면역 반응이 필요한 동물을 확인한 후, 항원에 대한 면역 반응을 증강 또는 촉진하기에 충분한 양의 리바비린 및 HCV 항원 [예, NS3/4A(서열 번호 17), 돌연변이 NS3/4A(서열 번호 29-32 및 43-49), 또는 아미노산 길이가 최소한 3, 4-10, 10-20, 20-30, 또는 30-50개인 이들의 단편(예, 서열 번호 25-27 및 33-42), 또는 이를 분자 중 하나 이상을 암호화하는 핵산]을 함유하는 조성물을 상기 동물에게 투여하는 것을 포함한다.

효과

<16> 본 발명의 조성물은 가축, 스포츠용 동물 또는 애완 동물과 인간 등의 동물에게서 백신 효과를 증강시키는 효과가 있고, 본 발명의 신규 웨티드 및 이 웨티드를 암호화하는 핵산은 수용체에게 유효 면역 반응을 제공하는 조성물을 제조할 수 있는 강력한 면역원으로서 작용하는 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<17> 본 발명자들은 리바비린 및 항원(예컨대, 바이러스, 박테리아, 사상균, 효모 또는 기생충 등의 병원균의 에피토프를 포함하는 분자)을 함유하는 조성물이 항원에 대한 동물의 면역 반응을 증강 및/또는 촉진한다는 사실을 발견하였다. 즉, 리바비린은 효과적인 "면역 보강제(adjuvant)"라는 사실을 발견하였는데, "면역 보강제"는 본 명세서에서 특정 항원에 대한 면역 반응을 증강 또는 촉진하는 능력을 보유한 물질을 의미하는 용어로 사용된다. 리바비린의 면역 보강 활성은 항원에 대한 면역-매개 보호작용의 현저한 증가, 항원에 대해 생성된 항체 역가의 증가 및 증식성 T 세포 반응의 증가에 의해 분명히 확인되었다.

<18> 본 명세서에서는 리바비린 및 항원 또는 에피토프를 함유하는 몇 가지 조성물(예, 백신)에 대해 기술한다. 리바비린을 함유하는 백신 조성물은, 예컨대 리바비린의 양, 리바비린의 형태, 및 항원의 종류에 따라 다양할 수 있다. 항원은 웨티드 또는 핵산(예컨대, 웨티드 항원을 암호화하는 RNA 또는 피험체에 도입되면 웨티드 항원을 발현하는 작제물)일 수 있다. 바람직한 조성물은 리바비린 및 간염 바이러스 항원(예, HAV 항원, HBV 항원, HCV 항원, 이들 분자들을 암호화하는 핵산, 또는 이들의 임의의 조합물)을 함유한다. 특히, 서열 번호 1에 존재하는 하나 이상의 HCV 항원 또는 에피토프, 또는 상기 HCV 항원을 암호화하는 핵산을 리바비린과 혼합하여 상기 조성물을 제조하는 것이 바람직하다. 즉, 일부 비제한적인 구체예는 리바비린 및 서열 번호 1을 포함하는 웨티드, 또는 서열 번호 1의 연속 아미노산 길이가 최소한 2500, 2000, 1600, 1200, 800, 400, 200, 100, 50, 10 또는 3개인 이들의 단편을 함유하는 조성물을 포함한다. 또 다른 구체예는 리바비린 및 서열 번호 13을 암호화하는 핵산, 또는 서열 번호 13의 연속 뉴클레오파이드의 길이가 최소한 9, 12, 15, 20, 30, 50, 75, 100, 200, 500개인 이의 단편들을 함유하는 조성물에 관한 것이다.

<19> 다른 구체예는 리바비린 및 서열 번호 1의 특정 단편을 함유하는 조성물(예, 백신)을 포함하는데, 이때 상기 단편은 HCV의 특정 도메인에 해당한다. 일부 구체예는, 예컨대 서열 번호 1의 아미노산 1-182, 183-379, 380-729, 730-1044, 1045-1657, 1658-1711, 1712-1917, 또는 1972-3011에 상응하는 HCV의 단편을 포함한다. 리바비린 및 상기 단편들 중 하나 이상을 암호화하는 핵산을 함유하는 조성물 역시 본 발명의 한 구체예가 된다.

<20> 그 밖에도, 새로운 HCV 서열을 발견하였다. HCV에 감염된 환자로부터 HCV의 NS3/4A 도메인에 상응하는 새로운 핵산 및 단백질을 클로닝하였다(서열 번호 16). 진뱅크(Genebank) 검색을 통해 클로닝된 서열이 HCV 서열과 최대 상동성을 가졌으나, 가장 밀접하게 관련된 HCV 계통(수탁 번호 AJ 278830)과의 상동성이 93%에 불과하다는 것을 알게 되었다. 이러한 신규 웨티드(서열 번호 17) 및 아미노산 길이가 최소한 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15 또는 20개인 이의 단편들, 이를 분자를 암호화하는 핵산, 상기 핵산을 보유하는 벡터, 상기 벡터, 핵산 또는 웨티드를 보유하는 세포 역시 본 발명의 한 구체예가 된다. 또한, 본 명세서에서 개시하는 백신 예 중 일부는 리바비린 및 이들 신규 NS3/4A 웨티드 또는 아미노산 길이가 최소한 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15 또는 20개인 이의 단편(예, 서열 번호 25), 또는 이를 분자 중 하나 이상을 암호화하는 핵산을 포함한다.

<21> 신규 NS3/4A 웨티드의 돌연변이체 역시 생성하였다. 본 발명자들은 절두형 돌연변이체(예, 서열 번호 29) 및 단

백질 분해 절단 부위가 없는 돌연변이체가 면역원성이 크다는 것을 발견하였다. 이들 신규 웨티드 서열 번호 29-32 및 43-49 및 아미노산 길이가 최소한 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15 또는 20개인 이의 단편(예, 서열 번호 26, 27 및 33-42), 이들 분자를 암호화하는 핵산, 상기 핵산을 보유하는 벡터, 및 상기 벡터, 핵산 또는 웨티드를 보유하는 세포 역시 한 구체예가 된다. 또한, 본 명세서에 기술된 조성물 중 일부는 리바비린 및 전술한 돌연변이 HCV 웨티드 중 하나 이상, 또는 아미노산 길이가 최소한 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15 또는 20개인 이의 단편을 포함한다. 다른 백신 예는 리바비린 및 전술한 웨티드 중 하나 이상을 암호화하는 핵산(예, DNA)을 포함한다.

<22> 이러한 조성물의 제조 방법 및 사용 방법 역시 구체예가 된다. 예를 들어, 전술한 조성물은 리바비린을 제공하는 단계, 항원(예, HCV 항원을 포함하는 웨티드 또는 상기 웨티드를 암호화하는 핵산)을 제공하는 단계, 및 상기 리바비린과 상기 항원을 혼합하여 과정체에서 상기 항원에 대한 면역 반응을 증강 또는 촉진하는 데 사용될 수 있는 조성물을 제제화함으로써 제조할 수 있다. 바람직한 방법은 바람직한 항원 또는 에피토프(예, 서열 번호 1, 6, 7, 또는 17을 포함하는 웨티드 또는 이의 특정 단편들, 예컨대 서열 번호 1의 아미노산 1-182, 183-379, 380-729, 730-1044, 1045-1657, 1658-1711, 1712-1971, 1972-3011 및 이들 분자를 암호화하는 핵산)과 리바비린을 혼합하는 것을 포함한다. 다른 항원 또는 에피토프 역시 리바비린과 혼합할 수 있는데, 그 예로는 연속 아미노산 길이가 최소한 2500, 2000, 1600, 1200, 800, 400, 200, 100, 50, 10 또는 3개인 서열 번호 1의 단편과 이들 단편을 암호화하는 핵산을 들 수 있으며, 이에 국한되는 것은 아니다. 특히 바람직한 방법은 새로 발견된 NS3/4A 단편 또는 NS3/4A 돌연변이체(예, 절두형 돌연변이체 또는 단백질 분해 절단 부위가 없는 돌연변이체), 또는 아미노산 길이가 4개 이상인 이의 단편 또는 이들 분자를 중 하나 이상을 암호화하는 핵산을 함유하는 백신을 제조하는 방법에 관한 것이다.

<23> 인간을 비롯한 동물의 항원에 대한 면역 반응을 증강 또는 촉진하는 방법은 본 발명의 한 구체예가 된다. 이러한 방법은, 예를 들어 항원/에피토프에 대한 유효 면역 반응이 필요한 동물을 확인하는 단계 및 항원/에피토프와 항원/에피토프에 대한 면역 반응을 증강 또는 촉진하기에 유효한 양의 리바비린을 함유하는 조성물을 상기 동물에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서는, 리바비린 및 항원을 단일 혼합물 형태로가 아니라 개별적으로 투여한다. 이 경우 리바비린은 항원 투여 직전 또는 직후에 투여하는 것이 바람직하다. 바람직한 방법은 필요로 하는 동물에게 리바비린 및 간염 항원(예, HAV 항원, HBV 항원, HCV 항원, 이들 분자를 암호화하는 핵산, 또는 이들의 임의의 조합물)을 투여하는 것을 포함한다. 이러한 방법 중 일부는 HCV 항원, 예컨대 서열 번호 1을 포함하는 웨티드, 서열 번호 1의 연속 아미노산을 최소한 2500, 2000, 1600, 1200, 800, 400, 200, 100, 50, 10 또는 3개 갖는 이의 단편들을 포함한다. 또 다른 방법은 리바바린 및 서열 번호 13을 암호화하는 핵산 또는 상기 단편들 중 하나 이상의 암호화하는 핵산을 함유하는 조성물을 포함한다.

<24> 일부 바람직한 방법은, 예컨대 리바바린 및 서열 번호 1을 포함하는 웨티드 또는 HCV 도메인에 상응하는 이의 특정 단편(비제한적인 예로 서열 번호 1의 아미노산 1-182, 183-379, 380-729, 730-1044, 1045-1657, 1658-1711, 1712-1971, 또는 1972-3011을 포함하는 웨티드가 있음)을 함유하는 조성물(예, 백신)의 용도에 관한 것이다. 특히 바람직한 방법은 서열 번호 17의 NS3/4A 단편 또는 단백질 분해 절단 부위가 없는 돌연변이 NS3/4A(예, 서열 번호 29-32 및 43-49), 또는 아미노산 길이가 최소한 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15 또는 20개인 이의 단편들(예, 서열 번호 26, 27 및 33-42)을 함유하는 백신 조성물의 용도에 관한 것이다. 리바비린 및 상기 단편들을 암호화하는 핵산을 함유하는 조성물 역시 본 발명의 방법에 사용될 수 있다.

<25> 다른 구체예는 HCV 감염을 치료 및 예방하는 방법에 관한 것이다. 한 방법의 예를 들면, 리바비린 및 HCV 항원 또는 에피토프를 HCV 감염의 치료 및/또는 예방을 위한 약제를 제조하는 데 사용한다. 다른 방법으로는, HCV 감염을 예방 및/또는 치료하는 약제를 필요로 하는 개체를 확인하고, 이 개체에 리바비린 및 HCV 항원 또는 에피토프, 바람직하게는 서열 번호 1에 존재하는 에피토프, 보다 바람직하게는 연속 아미노산 길이가 최소한 2500, 2000, 1600, 1200, 800, 400, 200, 100, 50, 10, 또는 3개인 서열 번호 1의 단편, 또는 가장 바람직하게는 1-182, 183-379, 380-729, 730-1044, 1045-1657, 1658-1711, 1712-1971, 또는 1972-3011과 같은 서열 번호 1의 단편, 또는 서열 번호 1 또는 상기 단편들을 암호화하는 핵산을 포함하는 약제를 투여한다. 특히 바람직한 방법은 리바비린 및 서열 번호 17의 NS3/4A 단편 또는 단백질 분해 절단 부위가 없는 돌연변이 NS3/4A(예, 서열 번호 29-32 및 43-49) 또는 아미노산 길이가 최소한 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15 또는 20개인 이의 단편(예, 서열 번호 25-27 및 33-42) 또는 이들 분자 중 하나 이상을 암호화하는 핵산을 함유하는 백신 조성물의 용도에 관한 것이다. 하기 섹션에서는 리바비린의 면역 보강제로서의 용도에 대해 더 상세히 설명한다.

<26> 리바비린

<27> 본 명세서에 기술된 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에게 투여하기 위한 약제를 제조하는 종래의 생약 조제술

에 따라 제조할 수 있다. 리바비린은 시판업체(예컨대 시그마 및 ICN)로부터 구입할 수 있다. 리바비린 및/또는 항원은 변형을 가하거나 가하지 않고 백신으로 제제화할 수 있다. 예를 들어, 리바비린 및/또는 항원을 변형시키거나 유도체화하여 보다 안정한 분자 및/또는 보다 강력한 면역 보강제를 제조할 수 있다. 한 방법으로, 리바비린 및/또는 항원의 안정성은 친수성 중합체(예, 폴리에틸렌 글리콜)와 같은 지지체에 이 분자들을 결합시켜서 증강시킬 수 있다.

<28> 합리적 약물 디자인 및 조합 화학법에서의 통상적인 기법을 이용하여 더 많은 리바비린 유도체를 생성할 수 있다. 예를 들어, 몰리큘러 시뮬레이션즈 인코포레이티드(MSI)와 다수의 기타 공급업체는 기술자들이 유기 분자의 조합 라이브러리를 구축할 수 있도록 하는 소프트웨어를 제공한다. 예를 들어 C2.아날로그 빌더 (C2.Analog Builder) 프로그램과 세리우스2 분자 다이버시티(Cerius2 molecular diversity) 소프트웨어의 MSI 스위트를 통합하여 본 명세서에 기술된 구체예와 함께 사용될 수 있는 리바비린 유도체의 라이브러리를 제작할 수 있다(참조 사이트 예: <http://msi.com/life/products/cerius2/index.html>).

<29> 한 방법으로서, 리바비린의 화학 구조를 컴퓨터로 판독가능한 매체 상에서 기록하고, 하나 이상의 모델링 소프트웨어 응용 프로그램으로 그 정보를 호출한다. C2.아날로그 빌더 프로그램과 C2 다이버시티 프로그램을 함께 사용하면, 사용자가 예컨대 각 치환기 위치에 대한 R-기의 다양성을 기초로 하여 대규모의 가상 라이브러리를 생성할 수 있다. 그 후 가상 라이브러리에서 생성된 모델링된 리바비린 유도체와 구조가 동일한 화합물을 통상적인 화학적 방법을 이용하여 제조하거나, 또는 시판업체로부터 구입할 수 있다.

<30> 그 후 새로 제조된 리바비린 유도체를, 분자의 면역 보강 활성 정도 및/또는 면역 반응을 조절할 수 있는 능력의 정도를 측정하는 분석을 통해 스크리닝한다. 몇몇 분석은 C2.루디(C2.Ludi)와 같은 가상 약물 스크리닝 소프트웨어를 포함할 수 있다. C2.루디는 사용자로 하여금, 관심있는 단백질(예, RAC2 또는 다른 GTP 결합 단백질)의 활성 부위와 상호작용하는 능력에 대해 분자들(예, 리바비린 유도체)의 데이터베이스를 검색할 수 있게 하는 소프트웨어 프로그램이다. 가상 약물 스크리닝 소프트웨어를 사용하여 발견한 예측 상호작용을 기초로 하여, 분자의 면역 보강 활성 및/또는 면역 반응을 조절하는 정도를 측정하는 통상적인 분석을 통한 추가 특성 규명을 위해 리바비린 유도체에 우선 순위를 매길 수 있다. 실시예 1에서는 리바비린의 면역 보강 활성을 평가하는 데 사용된 몇 가지 분석법에 대해 설명한다.

<31> [실시예]

<32> 실시예 1

<33> 하기 분석에서는 특정 조성물의 면역 보강 활성의 정도를 측정하기 위해 임의의 리바비린 유도체 또는 리바비린 유도체의 조합물을 사용할 수 있다. 제1 세트의 실험에서는, 3~5 마리의 Balb/c 마우스(BK 유니버설, 스웨덴 옵슬라 소재) 그룹에 재조합 간염 C 바이러스 비구조 3(rNS3) 단백질 10 μ g 또는 100 μ g을 0주 및 4주 째에 복강 또는 피하(예컨대, 꼬리 밑등에) 주사로 접종하였다. rNS3는 단독의 인산염 완충 염수(PBS) 또는 1 mg의 리바비린을 함유하는 PBS(캘리포니아주 코스타 메사 소재의 ICN으로부터 입수)에 용해시켰다. 마우스에 1회 접종 당 총 용량 100 μ l를 주사하였다.

<34> 1차 복강 접종 후 2주, 4주 및 6주 째에, 모든 마우스로부터 안와후방 샘플링으로 채혈하였다. 혈청 샘플을 모아서, rNS3에 대한 항체의 존재에 대해 분석하였다. 항체 역가를 측정하기 위해, 효소면역분석(EIA)을 실시하였다[참고 문헌의 예: Hultgren 등, J. Gen. Virol. 79:2381-91(1998) 및 Hultgren 등, Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4:630-632(1997)]. 항체 농도는 405 nm에서의 흡광도가 비접종 마우스의 것의 2배 이상으로 나타난 최고 혈청 희석액으로 기록하였다.

<35> PBS 중에서 1 mg 리바비린과 함께 혼합된 10 μ g 또는 100 μ g의 rNS3를 접종한 마우스는 고농도의 NS3 항체를 지속적으로 나타내었다. 접종 후 2주 째에 EIA로 검출된 항체 역가를 도 1에 도시하였다. 1 mg의 리바비린 및 10 μ g 또는 100 μ g의 rNS3를 함유하는 백신 조성물은 rNS3만으로 이루어진 백신 조성물보다 현저히 더 높은 항체 역가를 유도하였다.

<36> 제2 세트의 실험에서는, 8 마리의 Balb/c 마우스 그룹에 0주 및 4주에 0 mg, 1 mg, 3 mg, 또는 10 mg의 리바비린(시그마)을 함유하는 인산염 완충 염수 100 μ l 중의 10 μ g 또는 50 μ g의 rNS3를 복강 주사하였다. 4주, 6주 및 8주 째에, 마우스로부터 채혈하고 혈청을 분리하여 동결시켰다. 실험 완료 후, 전술한 바와 같이 재조합 NS3에 대한 항체의 농도에 대해 혈청을 테스트하였다. rNS3에 대한 평균 항체 농도를 스튜던트 t-테스트(모수 분석) 또는 맨-휘트니(비-모수 분석) 및 소프트웨어 패키지 StatView 4.5(아바쿠스 컨셉츠, 캘리포니아주 베를리 소재)를 이용하여 그룹들간에 서로 비교하였다. rNS3를 최대 10 μ g까지 3가지 용량으로 첨가하였을 때의 리

바비린의 면역 보강 효과를 표 1에 기재하였다. rNS3를 최대 50 μg 까지 3가지 용량으로 첨가하였을 때의 리바비린의 면역 보강 효과는 표 2에 기재하였다. 10 μg 또는 50 μg 의 상이한 양의 rNS3와 상이한 양의 리바비린을 접종한 마우스에서의 평균 rNS3 항체 역가의 모수 비교를 각각 표 3 및 4에 기재하였다. 10 μg 또는 50 μg 의 상이한 양의 rNS3와 상이한 양의 리바비린을 접종한 마우스에서의 평균 NS3 항체 역가의 비-모수 비교 결과는 각각 표 5 및 6에 기재하였다. 제시된 값은 재조합 rNS3에 대한 종점 역가를 나타낸다.

표 1

리바비린 양 (mg/1회 분량)	면역원 양 (μg /1회 분량)	마우스 ID	표시된 시기의 rNS3에 대한 항체 역가		
			4주	6주	8주
무	10	5:1	300	1500	1500
무	10	5:2	<60	7500	1500
무	10	5:3	<60	1500	300
무	10	5:4	60	1500	1500
무	10	5:5	<60	1500	nt
무	10	5:6	60	1500	1500
무	10	5:7	<60	7500	7500
무	10	5:8	300	37500	7500
그룹 평균 역가 (평균 \pm SD)			180 \pm 139	7500 \pm 12421	3042 \pm 3076
1	10	6:1	300	37500	37500
1	10	6:2	<60	1500	1500
1	10	6:3	300	37500	187500
1	10	6:4	300	37500	7500
1	10	6:5	60	nt	nt
1	10	6:6	<60	37500	7500
1	10	6:7	<60	37500	7500
1	10	6:8	300	7500	7500
그룹 평균 역가 (평균 \pm SD)			252 \pm 107	28071 \pm 16195	36642 \pm 67565
3	10	7:1	60	37500	7500
3	10	7:2	60	37500	37500
3	10	7:3	300	7500	7500
3	10	7:4	300	37500	7500
3	10	7:5	300	37500	37500
3	10	7:6	300	37500	37500
3	10	7:7	60	7500	7500
3	10	7:8	60	37500	37500
그룹 평균 역가 (평균 \pm SD)			180 \pm 128	30000 \pm 13887	22500 \pm 34637
10	10	8:1	300	37500	37500
10	10	8:2	300	37500	37500
10	10	8:3	<60	300	300
10	10	8:4	60	7500	7500
10	10	8:5	<60	300	300
10	10	8:6	<60	37500	37500
10	10	8:7	<60	7500	7500
10	10	8:8	<60	nt	nt
그룹 평균 역가 (평균 \pm SD)			220 \pm 139	18300 \pm 18199	18300 \pm 18199

표 2

리바비린 양 (mg/1회 분량)	면역원 양 (μ g/1회 분량)	마우스 ID	표시된 시기의 rNS3에 대한 항체 역가		
			4주	6주	8주
무	50	1:1	60	7500	7500
무	50	1:2	60	7500	7500
무	50	1:3	60	7500	7500
무	50	1:4	<60	1500	300
무	50	1:5	300	37500	37500
무	50	1:6	60	7500	7500
무	50	1:7	60	37500	7500
무	50	1:8	.	.	.
그룹 평균 역가 (평균 \pm SD)			100 \pm 98	15214 \pm 15380	10757 \pm 12094
1	50	2:1	60	7500	7500
1	50	2:2	300	37500	7500
1	50	2:3	60	187500	7500
1	50	2:4	60	37500	187500
1	50	2:5	60	37500	7500
1	50	2:6	60	37500	37500
1	50	2:7	300	37500	7500
1	50	2:8	300	37500	37500
그룹 평균 역가 (평균 \pm SD)			150 \pm 124	52500 \pm 55549	37500 \pm 62105
3	50	3:1	60	37500	7500
3	50	3:2	300	37500	37500
3	50	3:3	300	37500	7500
3	50	3:4	60	37500	7500
3	50	3:5	300	37500	7500
3	50	3:6	60	37500	7500
3	50	3:7	-	7500	37500
3	50	3:8	1500	7500	37500
그룹 평균 역가 (평균 \pm SD)			387 \pm 513	30000 \pm 13887	18750 \pm 15526
10	50	4:1	300	7500	7500
10	50	4:2	300	37500	37500
10	50	4:3	60	7500	7500
10	50	4:4	60	7500	7500
10	50	4:5	60	1500	1500
10	50	4:6	60	7500	37500
10	50	4:7	-	7500	7500
10	50	8:8	60	37500	7500
그룹 평균 역가 (평균 \pm SD)			140 \pm 124	10929 \pm 11928	15214 \pm 15380

<38>

표 3

그룹	주	평균 \pm SD	그룹	평균 \pm SD	분석	p-값
10 μ g NS3/ 리바비린 없음	4	180 \pm 139	10 μ g NS3/ 1 mg 리바비린	252 \pm 107	스튜던트 t-테스트	0.4071
	6	7500 \pm 12421		28071 \pm 16195	스튜던트 t-테스트	0.0156
	8	3042 \pm 3076		36642 \pm 67565	스튜던트 t-테스트	0.2133
10 μ g NS3/ 리바비린 없음	4	180 \pm 139	10 μ g NS3/ 3 mg 리바비린	180± 128	스튜던트 t-테스트	1.000
	6	7500 \pm 12421		30000± 13887	스튜던트 t-테스트	0.0042
	8	3042 \pm 3076		22500± 34637	스튜던트 t-테스트	0.0077
10 μ g NS3/ 리바비린 없음	4	180 \pm 139	10 μ g NS3/ 10mg 리바비린	220± 139	스튜던트 t-테스트	0.7210
	6	7500 \pm 12421		18300± 18199	스튜던트 t-테스트	0.1974
	8	3042 \pm 3076		18300± 18199	스튜던트 t-테스트	0.0493

<39>

표 4

그룹	주	평균 \pm SD	그룹	평균 \pm SD	분석	p-값
50 μ g NS3/ 리바비린 없음	4	100 \pm 98	50 μ g NS3/ 1 mg 리바비린	150 \pm 124	스튜던트 t-테스트	0.4326
	6	15214 \pm 15380		52500 \pm 55549	스튜던트 t-테스트	0.1106
	8	10757 \pm 12094		37500 \pm 62105	스튜던트 t-테스트	0.2847
50 μ g NS3/ 리바비린 없음	4	100 \pm 98	50 μ g NS3/ 3 mg 리바비린	387 \pm 513	스튜던트 t-테스트	0.2355
	6	15214 \pm 15380		30000 \pm 13887	스튜던트 t-테스트	0.0721
	8	10757 \pm 12094		18750 \pm 15526	스튜던트 t-테스트	0.2915
50 μ g NS3/ 리바비린 없음	4	100 \pm 98	50 μ g NS3/ 10mg 리바비린	140 \pm 124	스튜던트 t-테스트	0.5490
	6	15214 \pm 15380		10929 \pm 11928	스튜던트 t-테스트	0.5710
	8	10757 \pm 12094		15214 \pm 15380	스튜던트 t-테스트	0.5579

유의 수준: NS = 유의성 없음 ; * = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001

<40>

표 5

그룹	주	평균 \pm SD	그룹	평균 \pm SD	분석	p-값
10 μ g NS3/ 리바비린 없음	4	180 \pm 139	10 μ g NS3/ 1 mg 리바비린	252 \pm 107	맨-휘트니	0.4280
	6	7500 \pm 12421		28071 \pm 16195	맨-휘트니	0.0253
	8	3042 \pm 3076		36642 \pm 67565	맨-휘트니	0.0245
10 μ g NS3/ 리바비린 없음	4	180 \pm 139	10 μ g NS3/ 3 mg 리바비린	180 \pm 128	맨-휘트니	0.0736
	6	7500 \pm 12421		30000 \pm 13887	맨-휘트니	0.0050
	8	3042 \pm 3076		22500 \pm 34637	맨-휘트니	0.0034
10 μ g NS3/ 리바비린 없음	4	180 \pm 139	10 μ g NS3/ 10mg 리바비린	220 \pm 139	맨-휘트니	0.8986
	6	7500 \pm 12421		18300 \pm 18199	맨-휘트니	0.4346
	8	3042 \pm 3076		18300 \pm 18199	맨-휘트니	0.2102

<41>

표 6

그룹	주	평균 \pm SD	그룹	평균 \pm SD	분석	p-값
50 μ g NS3/ 리바비린 없음	4	100 \pm 98	50 μ g NS3/ 1 mg 리바비린	150 \pm 124	맨-휘트니	0.1128
	6	15214 \pm 15380		52500 \pm 55549	맨-휘트니	0.0210
	8	10757 \pm 12094		37500 \pm 62105	맨-휘트니	0.1883
50 μ g NS3/ 리바비린 없음	4	100 \pm 98	50 μ g NS3/ 3 mg 리바비린	387 \pm 513	맨-휘트니	0.1400
	6	15214 \pm 15380		30000 \pm 13887	맨-휘트니	0.0679
	8	10757 \pm 12094		18750 \pm 15526	맨-휘트니	0.2091
50 μ g NS3/ 리바비린 없음	4	100 \pm 98	50 μ g NS3/ 10mg 리바비린	140 \pm 124	맨-휘트니	0.4292
	6	15214 \pm 15380		10929 \pm 11928	맨-휘트니	0.9473
	8	10757 \pm 12094		15214 \pm 15380	맨-휘트니	0.6279

유의 수준: NS = 유의성 없음 ; * = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001

<42>

<43>

상기 데이터는 리바비린이 HCV 항원 또는 HCV 에피토프에 대한 면역 반응을 촉진 또는 증강시킨다는 것을 입증하는 것이다. 1 mg 정도의 리바비린과 10 μ g의 rNS3 항원을 함유하는 백신 조성물을 접종한 후에 rNS3에 대한 강력한 면역 반응이 유도되었다. 상기 데이터는 또한 항원에 대한 면역 반응을 촉진하는 데 충분한 리바비린의 양이 25~30 g의 Balb/c 마우스의 경우 1회 접종당 1~3 mg이라는 증거를 제시한다. 그러나, 이러한 양은 단지

기준을 위해 제시한 것이며, 본 발명의 범위를 어떤 방식으로든지 한정하는 것으로 해석되어서는 안된다. 하지만, 데이터는 약 1~3 mg의 리바비린을 함유하는 백신 조성물이 리바비린 없이 유도된 면역 반응보다 12배 더 강력한 면역 반응을 유도한다는 것을 나타낸다(표 3 및 4). 따라서, 리바비린은 동물의 체액 면역 반응에 대해 현저한 면역 보강 효과를 나타냄으로써, 항원에 대한 면역 반응을 증강 또는 촉진한다. 하기 실시예에서는 항원에 대한 면역 반응을 증강 또는 촉진하는 데 필요한 리바비린의 양에 대해 더 쉽게 이해하기 위해 실시된 실험에 대해 설명한다.

<44>

실시예 2

<45>

면역 보강 효과를 제공하기에 충분한 리바비린의 양을 결정하기 위해, 아래의 실험을 수행하였다. 제1 세트의 실험에서는, 마우스 그룹(그룹당 3 마리)에 20 μ g rNS3 단독 또는 20 μ g rNS3와 0.1 mg, 1 mg 또는 10 mg의 리바비린의 혼합물을 접종하였다. 그 후 항원에 대한 항체의 농도를 EIA로 측정하였다. 1주 및 3주 째의 평균 종점 역가를 그래프로 작성하여 도 2에 나타내었다. 본 발명자들은 리바비린에 의한 면역 보강 효과는 투여된 리바비린의 양에 따라 상이한 키네틱을 나타낸다는 것을 발견하였다. 예를 들어, 적은 용량(< 1 mg)의 리바비린은 1주 째 항체 농도를 증가시켰으나 3주 째에는 증가시키지 못한 반면, 더 많은 용량(1~10 mg)은 3주 째에 항체 농도를 증가시키는 것으로 확인되었다.

<46>

제2 세트의 실험 역시 수행하였다. 이 실험에서는, 마우스 그룹에 다양한 양의 리바비린과 rNS3를 함유하는 백신 조성물을 주사하였고, 이 동물들에서 IgG 반응을 모니터하였다. 백신 조성물은 약 100 μ l의 인산염 완충 염수 및 20 μ g의 rNS3를 포함하고, 0.1 mg, 1.0 mg 또는 10 mg의 리바비린(시그마)을 함유하거나 함유하지 않았다. 6주 째에 마우스로부터 채혈하여, 전술한 바와 같이 EIA로 rNS3-특이적 IgG 농도를 측정하였다. 표 7에 나타낸 바와 같이, 지속적 항체 농도에 대한 면역 보강 효과는 25~30 g 마우스의 경우 1회 주사당 1~10 mg을 투여하였을 때 가장 두드러졌다.

표 7

면역원	면역원과 혼합된 리바비린의 양 (mg)	마우스 ID	표시된 시기의 rNS3 IgG의 종점 역가		
			1주	2주	3주
20 μ g rNS3	없음	1	60	360	360
20 μ g rNS3	없음	2	360	360	2160
20 μ g rNS3	없음	3	360	2160	2160
		평균	260 \pm 173	960 \pm 1039	1560 \pm 1039
20 μ g rNS3	0.1	4	2160	12960	2160
20 μ g rNS3	0.1	5	60	60	60
20 μ g rNS3	0.1	6	<60	2160	2160
			1110 \pm 1484	5060 \pm 6921	1460 \pm 1212
20 μ g rNS3	1.0	7	<60	60	12960
20 μ g rNS3	1.0	8	<60	2160	2160
20 μ g rNS3	1.0	9	360	2160	2160
		평균	360	1460 \pm 1212	5760 \pm 6235
20 μ g rNS3	10.0	10	360	12960	77760
20 μ g rNS3	10.0	11	<60	2160	12960
20 μ g rNS3	10.0	12	360	2160	2160
		평균	360	5760 \pm 6235	30960 \pm 40888

<47>

제3 세트의 실험에서는, 1차 백신 접종 및 추가 접종 후의 리바비린의 면역 보강 효과를 조사하였다. 이 실험에서는, 리바비린을 함유하거나 함유하지 않고, 10 μ g의 rNS3를 함유하는 백신 조성물을 마우스에게 2회 복강 주사하고, 전술한 바와 같이 항원에 대한 IgG 서브클래스 반응을 모니터하였다. 따라서, 마우스에게 0.1 또는 1.0 mg의 리바비린(시그마)을 함유하거나 함유하지 않고, 재조합 NS3 10 μ g만을 함유하는 인산염 완충 염수 100 μ l를 0주와 4주 째에 접종하였다. 6주 째에 마우스로부터 채혈하여, 전술한 바와 같이 EIA로 NS3-특이적 IgG 서브클래스를 측정하였다. 표 8에 나타낸 바와 같이, 백신 접종 전에 면역원에 리바비린을 첨가하는 것은 NS3-특이적 면역 반응에 있어서 IgG 서브클래스 반응을 변화시키지 않는다. 따라서, 리바비린 및 항원을 함유하는 백신 조성물의 면역 보강 효과는 Th1/Th2 균형의 이동에 의해서는 설명될 수 없다. 리바비린의 면역 보강 효과에는 또 다른 메카니즘이 관여하는 것으로 보인다.

표 8

면역원	면역원과 혼합된 리바비린의 양 (mg)	마우스 ID	표시된 NS3 IgG 서브 클래스의 종점 역가			
			IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
10 µg rNS3	없음	1	360	60	<60	60
10 µg rNS3	없음	2	360	<60	<60	60
10 µg rNS3	없음	3	2160	60	<60	360
		평균	960±1039	60	-	160±173
10 µg rNS3	0.1	4	360	<60	<60	60
10 µg rNS3	0.1	5	60	<60	<60	<60
10 µg rNS3	0.1	6	2160	60	60	360
			860±1136	60	60	210±212
10 µg rNS3	1.0	7	2160	<60	<60	60
10 µg rNS3	1.0	8	360	<60	<60	<60
10 µg rNS3	1.0	9	2160	<60	<60	60
		평균	1560±1039	-	-	60

<49>

<50> 이 실시예에 제시된 데이터는 리바비린이 면역 보강제로서 투여될 수 있다는 것을 추가로 확인해 주고, 리바비린의 양이 면역 보강 효과의 키네틱을 조절할 수 있다는 것을 입증한다. 하기 실시예에서는 항원에 대한 면역 반응을 증강 또는 촉진하는 리바비린의 능력을 평가하기 위해 수행된 또 다른 분석에 대해 설명한다.

<51>

실시예 3

<52>

이 분석은 특정 백신 조성물이 세포 면역 반응을 조절하는 정도를 측정하기 위해 임의의 리바비린 유도체 또는 리바비린 유도체의 조합물을 사용하여 실시할 수 있다. 리바비린 함유 백신에 대한 CD4⁺ T 세포 반응을 측정하기 위해, 마우스 그룹에 PBS 중의 100 µg rNS3 또는 PBS 중의 100 µg rNS3 및 1 mg 리바비린을 피하 주사하였다. 마지막 접종한 후 10일 째 마우스를 죽이고, 이들의 림프절을 회수하여 배액시켰다. 그 후 시험관내 리콜 분석을 실시하였다(참고 문헌의 예: Hultgren 등, J. Gen. Virol. 79:2381-91(1998) 및 Hultgren 등, Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4:630:632(1997)]. 배양 96시간 째에 [³H] 티미딘의 혼입 정도를 통해 CD4⁺ T 세포 증식의 양을 측정하였다.

<53>

도 3에 도시된 바와 같이, 1 mg의 리바비린과 혼합된 100 µg의 rNS3를 접종한 마우스는 PBS 중의 100 µg rNS3를 접종한 마우스보다 더 큰 T 세포 증식성 반응을 나타내었다. 이러한 데이터는 리바비린이 세포 면역 반응을 증강 또는 촉진한다(예컨대, T 세포의 효과적인 프라이밍을 촉진함으로써)는 또 다른 증거를 제시하는 것이다. 하기 섹션에서는 본 발명의 구체예에 사용될 수 있는 항원 및 에피토프 중 몇 가지에 대해 설명한다.

<54>

항원 및 에피토프

<55>

동물의 면역 반응을 유발하는 데 사용될 수 있는 사실상 모든 항원을 리바비린과 함께 사용하여 본 발명의 조성물을 제조할 수 있다. 즉, 이러한 조성물(예, 백신)에 혼입될 수 있는 항원은 박테리아 항원 또는 에피토프, 진균 항원 또는 에피토프, 식물 항원 또는 에피토프, 사상균 항원 또는 에피토프, 바이러스 항원 또는 에피토프, 암 세포 항원 또는 에피토프, 독소 항원 또는 에피토프, 화학적 항원 또는 에피토프 및 자가 항원 또는 에피토프를 포함한다. 이들 분자 중 다수는 면역 보강제 없이도 현저한 면역 반응을 유도하지만, 상기 항원 또는 에피토프에 대한 면역 반응을 증강 또는 촉진하기 위해 리바비린을 "강력한" 또는 "약한" 항원 또는 에피토프와 병용하여 투여하거나, 또는 함께 혼합하여 투여할 수 있다. 또한, 리바비린을 면역 보강제로서 사용하면 더 적은 양의 항원을 사용하면서도 면역원성을 유지할 수 있게 된다.

<56>

본 발명의 백신 조성물에는 펩티드 항원 외에도, 핵산계 항원을 사용할 수 있다. 각종 핵산계 백신이 공지되어 있으며, 이러한 면역요법 조성물 및 방법은 리바비린을 포함하도록 재구성함으로써 확대될 수 있다(참고 문헌의 예: 미국 특허 제5,589,466호 및 제6,235,888호). 한 방법의 예를 들면, 목적 폴리펩티드 항원을 암호화하는 유전자를, 피험체에 도입되면 폴리펩티드를 발현할 수 있는 발현 벡터내로 클로닝한다. 발현 작제물을 리바비린과의 혼합물로서, 또는 리바비린과 병용하여(예컨대, 리바비린 투여 직후 동일 부위에 발현 작제물을 투여한다) 피험체에 투여한다. 대안으로, 목적 폴리펩티드 항원을 암호화하는 RNA를 리바비린과의 혼합물로서, 또는 리바비린과 병용하여 피험체에 투여한다.

<57>

항원이 DNA(예컨대, DNA 백신 조성물 제제)일 경우, 적절한 프로모터는 유인원 바이러스 40(SV40), 마우스 유선

종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 인간 면역결핍증 바이러스(HIV), 예컨대 HIV 롱 터미널 리피트(LTR) 프로모터, 몰로니 바이러스, ALV, 사이토메갈로바이러스(CMV), 예컨대 CMV 초기 발현 프로모터, 엡슈타인 바 바이러스(EBV), 라우스 육종 바이러스(RSV)를 포함할 뿐 아니라, 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 혈모글로빈, 인간 근육 크레아틴 및 인간 메탈로티오네인 등의 인간 유전자 유래의 프로모터를 포함한다. 몇몇 구체예, 특히 인간을 위한 유전자 백신의 제조에 유용한 폴리아데닐화 시그널의 비제한적인 예로는 SV40 폴리아데닐화 시그널 및 LTR 폴리아데닐화 시그널이 있다. 특히, SV40 폴리아데닐화 시그널로서 불리는, pCEP4 플라스미드(인비트로겐, 캘리포니아주 샌 디에고 소재)에 존재하는 SV40 폴리아데닐화 시그널이 사용된다.

<58>

유전자 작제물에는 유전자 발현에 필요한 조절성 요소 외에도 다른 요소를 포함시킬 수 있다. 이러한 추가적인 요소에는 인핸서가 포함된다. 비제한적인 인핸서의 예로는 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 혈모글로빈, 인간 근육 크레아틴 유래의 인핸서 등의 인간 유래 인핸서 및 바이러스 인핸서, 예컨대 CMV, RSV 및 EBV 유래의 인핸서를 포함하는 군에서 선택될 수 있다. 유전자 작제물에는 포유동물 복제 기점을 포함시켜서, 세포 내에서 작제물을 염색체 외부에 유지시키고 작제물을 여러 카피 생산할 수 있도록 할 수 있다. 인비트로겐(캘리포니아주 샌디에고 소재)에서 시판하는 pCEP4 및 pREP4는 엡슈타인 바 바이러스의 복제 기점과 핵 항원 EBNA-1 암호화 영역을 포함하는데, 이 플라스미드는 염색체로 통합되지 않고 많은 카피수의 에피좀 복제를 유도한다. 복제되는 것이든 복제되지 않는 것이든 간에 게놈으로 통합되지 않고 발현될 수 있는 모든 형태의 DNA가 사용될 수 있다. 하기 실시예에서는 핵산계 항원 및 리바비린을 함유하는 조성물의 용도에 대해서 설명한다.

<59>

실시예 4

<60>

다음은 핵산계 항원 및 리바비린을 함유하는 백신을 동물에게 접종하는 것에 대한 설명이다. 5~6주령의 암컷 및 수컷 Balb/C 마우스에 2.5% 아버틴 0.3 ml를 복강 주사하여 마취시킨다. 전방 대퇴부에 1.5 cm를 절제하여, 사두근이 직접 보이게 한다. 제1 그룹의 마우스에, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터에 의해 발현이 유도되는 gp-120 유전자를 보유한 발현 작제물 약 20 μ g을 주사하고, 제2 그룹에는 gp-120을 암호화하는 시험관내에서 전사되고 캡핑된 RNA[예컨대, SP6, T7, 또는 T3, (암비온)] 약 5 μ g을 주사한다. 이들 두 그룹은 대조군이다. 제3 그룹의 마우스에는 1 mg의 리바비린과 혼합된 gp-120 유전자 및 CMV 프로모터를 보유한 발현 벡터 약 20 μ g을 주사하고, 제4 그룹의 마우스에는 1 mg의 리바비린과 혼합된 시험관내에서 전사되고 캡핑된 RNA 약 5 μ g을 주사한다. 1 cc 주사기 내 용액(PBS) 0.1 ml의 백신을 27 게이지 바늘을 통해 근육의 말단 삽입 부위로부터 무릎 쪽으로 약 0.5 cm 위치에 약 0.2 cm 깊이로 1분 동안 주사하였다. 나중의 위치 확인을 위해 주사 부위에 봉합사를 올려 둔 후, 스테인레스 스틸 클립으로 피부를 닫는다.

<61>

접종 전(0일)과 접종 후 40일 이상까지 혈액 샘플을 채취한다. 각 샘플로부터 얻은 혈청을 연속 희석시키고, 효모에서 제조된 재조합 gp-120 단백질을 항원으로서 사용하여 항체의 검출을 위한 표준 ELISA 기법으로 분석한다. gp-120에 대해 특이적인 IgG 및 IgM 항체 둘 다 모든 샘플에서 검출되겠지만, 리바비린을 함유하는 그룹 3 및 4는 혈청에서 검출된 항체의 양 및/또는 역가에 의해 측정시 gp-120에 대해 더 큰 면역 반응을 나타낼 것이다.

<62>

본 발명의 바람직한 구체예는 리바비린과 바이러스, 바람직하게는 간염 바이러스 상에 존재하는 바이러스 항원 또는 에피토프를 포함한다. 조성물은, 예컨대 리바비린 및 HAV 항원, HBV 항원, HCV 항원 또는 이들 바이러스 중 하나 이상에 존재하는 이들 항원 또는 에피토프의 임의의 조합물을 포함한다. 간염 항원은 웨티드 또는 핵산일 수 있다. HAV 감염에 대한 백신 접종에 사용될 수 있는 조성물은, 예컨대 리바비린 및 서열 번호 12의 아미노산 길이가 최소한 3-10개인 연속 아미노산, 10-50개인 연속 아미노산, 50-100개인 연속 아미노산, 100-200개인 연속 아미노산, 200-400개인 연속 아미노산, 400-800개인 연속 아미노산, 800-1200개인 연속 아미노산, 1200-1600개인 연속 아미노산, 1600-2000개인 연속 아미노산 및 2000-2227개인 연속 아미노산으로 이루어진 HAV 웨티드를 포함한다.

<63>

또한, 리바비린 및 전술한 HAV 웨티드 중 하나 이상을 암호화하는 핵산을 함유하는 조성물은 HAV 감염을 치료 또는 예방하는 데 사용될 수 있다. 바람직한 핵산계 항원은 HAV 서열의 연속 뉴클레오타이드 길이가 9개 이상인 뉴클레오타이드 서열(예, 서열 번호 15)을 포함한다. 즉, 핵산계 항원은 서열 번호 15의 뉴클레오타이드 길이가 최소한 9-25개인 연속 뉴클레오타이드, 25-50개인 연속 뉴클레오타이드, 50-100개인 연속 뉴클레오타이드, 100-200개인 연속 뉴클레오타이드, 200-500개인 연속 뉴클레오타이드, 500-1000개인 연속 뉴클레오타이드, 1000-2000개인 연속 뉴클레오타이드, 2000-4000개인 연속 뉴클레오타이드, 4000-8000개인 연속 뉴클레오타이드 및 8000-9416개인 연속 뉴클레오타이드 또는 이들 서열에 상응하는 RNA를 포함한다.

<64>

유사하게, 바람직한 HBV 백신 예는 리바비린 및 HBsAg(서열 번호 10) 또는 HBcAg 및 HBeAg(서열 번호 11)의 3개

이상의 연속 아미노산으로 이루어진 HBV 웨티드를 포함한다. 즉, 일부 구체에는 리바비린 및 서열 번호 10 또는 서열 번호 11의 아미노산 길이가 최소한 3-10개인 연속 아미노산, 10-50개인 연속 아미노산, 50-100개인 연속 아미노산, 100-150개인 연속 아미노산, 150-200개인 연속 아미노산 및 200-226개인 연속 아미노산으로 이루어진 HBV 웨티드를 포함한다.

<65> 또한, 리바비린 및 전술한 HBV 웨티드 중 하나 이상을 암호화하는 핵산을 함유하는 조성물은 HBV 감염을 치료 또는 예방하는 데 사용될 수 있다. 바람직한 핵산계 항원은 HBV의 9개 이상의 연속 뉴클레오타이드로 이루어진 뉴클레오타이드 서열(예, 서열 번호 14)을 포함한다. 즉, 핵산계 항원은 서열 번호 14의 뉴클레오타이드 길이가 최소한 9-25개인 연속 뉴클레오타이드, 25-50개인 연속 뉴클레오타이드, 50-100개인 연속 뉴클레오타이드, 100-200개인 연속 뉴클레오타이드, 200-500개인 연속 뉴클레오타이드, 500-1000개인 연속 뉴클레오타이드, 1000-2000개인 연속 뉴클레오타이드, 2000-4000개인 연속 뉴클레오타이드, 4000-8000개인 연속 뉴클레오타이드 및 8000-9416개인 연속 뉴클레오타이드 또는 이들 서열에 상응하는 RNA를 포함한다. 하기 실시예에서는 리바비린을 시판되는 HBV 백신 제제와 병용하여 사용하는 것에 대해 설명한다.

실시예 5

<67> HBsAg 및 명반을 함유하는 시판되는 백신(엥게릭스, SKB)의 2가지 용량과 혼합하였을 때의 리바비린의 면역 보강 효과를 테스트하였다. 엥게릭스 백신 약 0.2 μ g 또는 2 μ g을 PBS 또는 PBS 중의 1 mg 리바비린과 함께 혼합하고, 이 혼합물을 마우스 그룹(그룹당 3 마리)에 복강 주사하였다. 4주 째에 동일한 혼합물을 함유하는 추가 접종분을 주사하고 6주 째 모든 마우스로부터 채혈하였다. 혈청 샘플을 1:60~1:37500으로 희석시키고, 희석액을 전술한 바와 같이 EIA로 테스트하였는데, 단, 정제된 인간 HBsAg는 고체상 항원 상태로 사용하였다. 하기 표 9에 나타낸 바와 같이, 리바비린을 함유하는 백신 조성물은 백신이 이미 명반을 함유하고 있음에도 불구하고 기존 백신 2 μ g에 대한 반응을 증강시켰다. 즉, 최적 용량보다 적은 백신 용량(즉, 검출가능한 항체를 단독으로는 유도하지 못하는 용량)에 리바비린을 첨가함으로써 항체를 검출가능한 정도로 생성할 수 있으며, 이는 리바비린의 첨가가 면역 반응을 감소시키지 않으면서 백신 조성물에 더 적은 양의 항원을 사용할 수 있도록 한다는 증거가 된다.

표 9

주	EIA에서의 HBsAg에 대한 종점 항체 억가																	
	0.02 μ g 엥게릭스							0.2 μ g 엥게릭스										
	리바비린 없음			1mg 리바비린			리바비린 없음			1mg 리바비린			#1	#2	#3	#1	#2	#3
<68>	6	<60	<60	<60	<60	<60	<60	<60	<60	300	60	<60						

<69> 몇몇 HCV 백신 조성물은 리바비린 및 서열 번호 1의 3개 이상의 연속 아미노산으로 이루어진 HCV 웨티드 또는 상기 HCV 웨티드를 암호화하는 핵산을 함유한다. 즉, 백신 조성물은 리바비린 및 서열 번호 1의 아미노산 길이가 최소한 3-10개인 연속 아미노산, 10-50개인 연속 아미노산, 50-100개인 연속 아미노산, 100-200개인 연속 아미노산, 200-400개인 연속 아미노산, 400-800개인 연속 아미노산, 800-1200개인 연속 아미노산, 1200-1600개인 연속 아미노산, 1600-2000개인 연속 아미노산, 2000-2500개인 연속 아미노산, 및 2500-3011개인 연속 아미노산인 HCV 웨티드 중 하나 이상 또는 상기 단편들 중 하나 이상을 암호화하는 핵산을 함유할 수 있다.

<70> 바람직한 HCV 조성물은 리바비린 및 HCV 코어 단백질(서열 번호 2), HCV E1 단백질(서열 번호 3), HCV E2 단백질(서열 번호 4), HCV NS2(서열 번호 5), HCV NS3(서열 번호 6), HCV NS4A(서열 번호 7), HCV NS4B(서열 번호 8), 또는 HCV NS5A/B(서열 번호 9)의 3개 이상의 연속 아미노산으로 이루어진 웨티드 또는 이들 도메인의 조합으로 이루어진 웨티드를 함유한다. 즉, 바람직한 HCV 백신은 리바비린 및 서열 번호 2~9 중 하나 이상의 아미노산 길이가 최소한 3-10개인 연속 아미노산, 10-50개인 연속 아미노산, 50-100개인 연속 아미노산, 100-200개인 연속 아미노산, 200-400개인 연속 아미노산, 400-800개인 연속 아미노산 및 800-1040개인 연속 아미노산인 웨티드를 함유한다. 이들 도메인은 서열 번호 1의 아미노산 잔기 1-182, 183-379, 380-729, 730-1044, 1045-1657, 1658-1711, 1712-1971, 또는 1972-3011에 상응한다. 따라서, 바람직한 구체에는 또한 서열 번호 1의 1-182, 183-379, 380-729, 730-1044, 1045-1657, 1658-1711, 1712-1971, 또는 1972-3011 중 하나 이상 또는 이들의 단편을 포함한다.

<71> 리바비린 및 전술한 펩티드 중 하나 이상을 암호화하는 핵산을 함유하는 백신 조성물 역시 한 구체예가 된다. 바람직한 핵산계 항원은 HCV의 9개 이상인 연속 뉴클레오타이드로 이루어진 뉴클레오타이드 서열(서열 번호 1 3)을 포함한다. 즉, 핵산계 항원은 서열 번호 13 중 임의의 하나의 뉴클레오타이드 길이가 최소한 9-25개인 연속 뉴클레오타이드, 25-50개인 연속 뉴클레오타이드, 50-100개인 연속 뉴클레오타이드, 100-200개인 연속 뉴클레오타이드, 200-500개인 연속 뉴클레오타이드, 500-1000개인 연속 뉴클레오타이드, 1000-2000개인 연속 뉴클레오타이드, 2000-4000개인 연속 뉴클레오타이드, 4000-8000개인 연속 뉴클레오타이드, 및 8000-9416개인 연속 뉴클레오타이드 또는 이들 서열에 상응하는 RNA를 포함한다. 하기 섹션에서는 리바비린 및 항원을 함유하는 조성물 중 몇 가지에 대해 설명한다.

<72> **리바비린 및 항원을 함유하는 조성물**

<73> 리바비린 및 병원균(예, 바이러스, 박테리아, 사상균, 효모 및 기생충)의 항원 또는 에피토프를 함유하는 조성물(예, 백신)은 비제한적인 예로 면역 보강제, 결합제, 부형제, 예컨대 안정화제(장기간 보관을 촉진하기 위한 것), 유화제, 중점제, 염, 방부제, 용매, 분산 매질, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 등장성 물질 및 흡수 지연제 등의 기타 성분들을 함유할 수 있다. 이들 조성물은 질병 또는 증상을 피하기 위한 예방적 조치로서, 또는 이미 질병 또는 증상이 있는 동물을 치료하기 위한 치료제로서 동물을 치료하는 데 적합하다.

<74> 다수의 기타 성분들이 백신에 함유될 수 있다. 예를 들어, 리바비린 및 항원은 통상적인 부형제(예컨대, 리바비린 및/또는 항원과 해로운 반응을 하지 않는 비경구, 장(예, 경구) 또는 국소 투여에 적합한 약학적 허용 유기 또는 무기 캐리어 성분)과 함께 사용될 수 있다. 적절한 약학적 허용 캐리어로는 물, 염 용액, 알코올, 아라비아 검, 식물유, 벤질 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 젤라틴, 탄수화물, 예컨대 락토스, 아밀로스 또는 전분, 스테아르산마그네슘, 탈크, 규산, 점성 파라핀, 방향유, 지방산 모노글리세라이드 및 디글리세라이드, 펜타에리트리톨 지방산 에스테르, 히드록시 메틸셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈 등이 포함되며, 이에 국한되는 것은 아니다. 더 많은 적절한 캐리어가 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 15판, Easton:Mack Publishing Company, 1405-1412 및 1461-1487쪽(1975)] 및 국립 약전 XIV 14판(Washington, American Pharmaceutical Association(1975))에 개시되어 있다.

<75> 본 발명의 유전자 작제물은 이 물질 없이 동일한 유전자 백신을 투여한 경우 발생하는 세포에 의한 유전자 작제물의 업테이크 및/또는 발현에 비해 세포에 의한 유전자 작제물의 업테이크 및/또는 발현을 증가시키는 물질과 함께 제제화하거나, 또는 병용 투여할 수 있다. 이러한 물질 및 유전자 작제물과 이러한 물질을 병용 투여하는데 대한 프로토콜은 1993년 1월 26일에 출원된 미국 출원 제08/008,342호, 1993년 3월 11일에 출원된 미국 출원 제08/029,336호, 1993년 9월 21일에 출원된 미국 출원 제08/125,012호, 1994년 1월 26일에 출원된 PCT 특허 출원 번호 PCT/US94/00899 및 1994년 4월 1일에 출원된 미국 출원 제08/221,579호에 기술되어 있다. 이러한 물질의 예로는 CaPO_4 , DEAE 텍스트란, 음이온 지질; 세포의 기질-활성 효소; 사포닌; 렉틴; 에스트로겐 화합물 및 스테로이드 호르몬; 히드록실화 저급 알킬; 디메틸 살포시드(DMSO); 우레아; 및 벤조산 에스테르, 아닐리드, 아미딘, 우레тан 및 이의 염산염, 예컨대 국소 마취제 계열의 것을 들 수 있다. 또한, 유전자 작제물은 지질/다중 양이온 복합체 내로 캡슐화되거나, 또는 이와 병용 투여될 수 있다.

<76> 백신은 멸균시킬 수 있으며, 필요에 따라 리바비린 또는 항원과 해로운 반응을 하지 않는 보조제, 예컨대 윤활제, 방부제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 삼투압에 영향을 주는 염, 완충제, 착색제, 풍미제 및/또는 방향 성분 등과 혼합될 수 있다.

<77> 특정 백신 조성물의 유효 투여량 및 투여 방법은 환자 개개인과 질병의 유형 및 단계에 따라 달라질 뿐 아니라 당업자에게 잘 알려져 있는 기타 요인들에 따라 달라진다. 백신의 치료 효능과 독성은 세포 배양 또는 실험 동물에서 표준 약학적 절차에 의해, 예컨대 ED_{50} (집단의 50%에서 치료 효과를 나타내는 용량)에 의해 측정할 수 있다. 세포 배양 분석 및 동물 실험으로부터 얻은 데이터는 인간에 사용할 수 있는 용량 범위로 제제화하는데 이용될 수 있다. 백신의 투여량은 독성을 나타내지 않고 ED_{50} 을 포함하는 순환 농도 범위 내에 속하는 것이 바람직하다. 투여량은 상기 범위 내에서 리바비린 유도체 및 항원의 유형, 사용되는 제형, 환자의 감수성 및 투여 경로에 따라 달라진다.

<78> 리바비린은 수년간 시판되어 왔기 때문에, 다수의 제형과 투여 경로가 공지되어 있다. 본 명세서에 개시된 구체예에는 공지된 모든 제형과 투여 경로가 제공될 수 있다. 동물에서 항원에 대한 면역 반응을 증강시키기에 효과적인 리바비린의 양은 그 동물에서, 약 $0.25\text{--}12.5 \mu\text{g}/\text{mL}$, 바람직하게는 약 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 항원의 혈청 농도를 달성하기에 충분한 양인 것으로 간주할 수 있다. 몇몇 구체예에서는 리바비린의 양은 백신을 접종하는 동물의 체

중에 따라 결정된다. 따라서 백신 조성물 중의 리바비린의 양은 체중 1 kg당 약 0.1~6.0 mg일 수 있다. 즉, 몇몇 구체예는 동물의 체중 1 kg당 약 0.1-1.0 mg, 1.1-2.0 mg, 2.1-3.0 mg, 3.1-4.0 mg, 4.1-5.0 mg, 5.1-6.0 mg에 해당하는 양의 리바비린을 함유한다. 보다 일반적으로는 백신은 약 0.25-2000 mg의 리바비린을 함유한다. 즉, 몇몇 구체예는 약 250 µg, 500 µg, 1 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg, 900 mg, 1 g, 1.1 g, 1.2 g, 1.3 g, 1.4 g, 1.5 g, 1.6 g, 1.7 g, 1.8 g, 1.9 g 및 2 g의 리바비린을 함유한다.

<79> 통상적인 백신 조성물은 항원에 대한 면역 반응을 증강시키는 데 충분한 양의 리바비린을 첨가함으로써 개질시킬 수 있다. 즉, 기존의 통상적인 백신 조성물은 이 조성물에 단순히 리바비린을 첨가하거나, 또는 통상적인 백신과 리바비린을 병용 투여함으로써(예컨대, 항원 투여 직전 또는 직후에) 개질시킬 수 있다. 당업자라면 백신 내 항원의 양은 항원의 종류와 그 면역원성에 따라 달라질 수 있음을 알 것이다. 따라서, 백신 중의 항원의 양은 다양할 수 있다. 그러나, 대체적으로 백신은 약 0.25-5 mg, 5-10 mg, 10-100 mg, 100-500 mg 및 최대 2000 mg의 항원(예, 간염 바이러스 항원)을 함유할 수 있다.

<80> 본 명세서에 개시된 몇몇 방법에서는, 리바비린 및/또는 항원의 정확한 양은 치료 대상 환자의 개별 주치의가 선택한다. 또한, 리바비린의 양은 동일한 또는 동등한 양의 항원과 함께 또는 이와 별도로 첨가할 수 있으며, 이들 양은 환자 특이적 또는 항원 특이적으로 고려하여 충분한 농도를 제공하도록 특정 백신 접종 프로토콜 실시 중에 조절할 수 있다. 이러한 상황에서, 고려될 수 있는 환자 특이적 요인과 항원 특이적 요인에는 환자의 질병 상태의 심각도, 나이, 환자의 체중, 식이요법, 투여 시기 및 빈도, 병용 약물, 반응 감수성 및 치료법에 대한 내성/반응을 들 수 있으며, 이에 국한되는 것은 아니다. 다음 섹션에서는 신규 HCV 유전자의 발견 및 본 명세서에 개시된 구체예에 사용될 수 있는 돌연변이 HCV 서열의 생성에 대해 설명한다.

신규 NS3/4A 및 돌연변이 NS3/4A 서열

<82> HCV에 감염된 환자로부터 HCV의 NS3/4A 도메인에 상응하는 신규 핵산 및 단백질을 클로닝하였다(서열 번호 16 및 17). 진뱅크 검색을 통해 클로닝된 서열이 HCV 서열과 가장 큰 상동성을 지녔으나, 가장 밀접하게 관련된 HCV 서열(수탁 번호 AJ 278830)과의 상동성이 93%에 불과하다는 것을 알게 되었다. 신규 NS3/4A 웨პ티드의 절두형 돌연변이체 및 단백질 분해 절단 부위가 없는 NS3/4A 돌연변이체 역시 생성하였다. 이들 신규 웨პ티드 및 이 웨პ티드를 암호화하는 핵산은 리바비린과 혼합하여 수용체에게 HCV에 대한 유효 면역 반응을 제공하는 조성물을 제조할 수 있는 강력한 면역원임을 발견하였다. 신규 NS3/4A 도메인의 클로닝 및 각종 NS3/4A 돌연변이체의 생성에 대해서는 하기 실시예에서 설명한다.

실시예 6

<84> 폴리미라제 연쇄 반응(PCR)을 이용하여 HCV에 감염된 환자의 혈청(HCV 유전자형 1a)으로부터 NS3/4A 서열을 증폭하였다. 혈청으로부터 전체 RNA를 추출하고, cDNA를 합성하고, 표준 프로토콜에 따라 PCR을 수행하였다[Chen M 등, J. Med. Virol. 43:223:226(1995)]. cDNA 합성은 안티센스 프라이머 "NS4KR"(5'-CCG TCT AGA TCA GCA CTC TTC CAT TTC ATC-3'(서열 번호 18))을 이용하여 개시하였다. 이 cDNA로부터 NS3 및 NS4A 유전자를 포함하는, 아미노산 1007~1711에 상응하는 HCV의 2079 염기쌍 DNA 단편을 증폭하였다. 정확도가 높은 폴리미라제(Expand High Fidelity PCR, 독일 만하임 소재의 브링거-만하임)를 "NS3KF" 프라이머(5'-CCT GAA TTC ATG GCG CCT ATC ACG GCC TAT-3'(서열 번호 19)) 및 NS4KR 프라이머와 함께 사용하였다. NS3KF 프라이머는 EcoRI 제한 효소 절단 부위와 출발 코돈을 포함하였고, 프라이머 NS4KR은 XbaI 제한 효소 절단 부위와 종결 코돈을 포함하였다.

<85> 그 후 증폭된 단편을 서열을 분석하였는데, 그 서열이 서열 번호 16의 서열이다. 서열 비교 분석을 통해 그 유전자 단편이 정말 유전자형 1a의 바이러스 균주로부터 유래된 것임을 알게 되었다. NCBI 웹사이트를 이용하여 진뱅크 데이터베이스에 대해 전산화된 BLAST 검색을 통해 가장 가까운 HCV 상동체와의 뉴클레오타이드 서열 동일성이 93%임을 알게 되었다.

<86> 그 후 증폭된 DNA 단편을 EcoRI 및 XbaI으로 분해하여, 같은 효소로 분해한 pcDNA3.1/His 플라스미드(인비트로겐)에 삽입하였다. 그 후 NS3/4A-pcDNA3.1 플라스미드를 EcoRI 및 XbaI으로 분해하고, 삽입물을 QiaQuick 키트(퀘이아젠, 독일 함부르크)를 이용하여 정제하고, EcoRI/XbaI으로 분해한 pVAX 백터(인비트로겐)에 결찰시켜서 NS3/4A-pVAX 플라스미드를 생성하였다.

<87> NS3/4A DNA로부터 NS4A 서열을 결실시켜서 rNS3 절두형 돌연변이체를 얻었다. 따라서, EcoRI 및 Not I 제한 부위를 각각 포함하는 프라이머 NS3KF 및 3'Not I(5'-CCA CGC GGC CGC GAC GAC CTA CAG-3'(서열 번호 20))를 이용하

여 NS3/4A-pVAX의 NS3 유전자 서열을 PCR로 증폭하였다. 그 후 NS3 단편(1850 bp)을 EcoRI 및 NotI으로 분해한 pVAX 플라스미드에 결찰시켜서 NS3-pVAX 벡터를 생성하였다. 플라스미드를 BL21 E. 콜라이 세포에서 증폭시켰다. 플라스미드의 서열을 분석하고, 제한 절단으로 검증하였으며, 그 결과는 원래 서열을 기초로 한 예상 결과와 동일하였다.

<88> NS3와 NS4A 사이의 단백질 분해 절단 부위를 변화시키기 위해, QUICKCHANGE™ 돌연변이 유발 키트(스트라타진)을 사용하여 제조업자의 지시에 따라서 NS3/4A-pVAX 플라스미드를 돌연변이시켰다. "TPT" 돌연변이를 유발하기 위해, 프라이머 5'-CTGGAGGTCTCACGCCCTACCTGGGTGCTCGTT-3'(서열 번호 21) 및 5'-ACCGAGCACCCAGGTAGGCGTGACGACCTCCAG-3'(서열 번호 22)을 이용하여 플라스미드를 증폭시켜서 NS3/4A-TPT-pVAX를 얻었다. "RGT" 돌연변이를 생성하기 위해서는 프라이머 5'-CTGGAGGTCTCCGCGTACCTGGGTGCTCGTT-3'(서열 번호 23)과 5'-ACCGAGCACCCAGGTACC-GCGGACGACCTCCAG-3'(서열 번호 24)를 이용하여 플라스미드를 증폭시켜서 NS3/4A-RGT-pVAX를 얻었다.

<89> 모든 돌연변이된 작제물의 서열을 분석하여 돌연변이가 정확히 생성되었는지를 확인하였다. 플라스미드는 컴피턴트 BL21 E. 콜라이에서 증폭시켰다. 생체내 주입에 사용된 플라스미드 DNA는 퀴아젠(Quiagen) DNA 정제 컬럼을 사용하여 제조업자의 지시에 따라 정제하였다(퀴아젠 게엠베하, FRG 헬렌 소재). 얻어진 플라스미드 DNA의 농도는 분광광도법으로 측정하였고(Dynaquant, 파마시아, 스웨덴 읍살라 소재), 정제된 DNA를 1 mg/ml의 농도로 멸균 인산염 완충 염수(PBS)에 용해시켰다. 야생형과 돌연변이의 접합점의 아미노산 서열을 하기 표 10에 나타내었다. 하기 섹션에서는 HCV 웨티드를 암호화하는 몇 가지 핵산에 대해 설명한다.

표 10

플라스미드	추정 아미노산 서열
*NS3/4A-pVAX	TKYMTCMSADLEVVT <u>ST</u> WVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 25)
NS3/4A-TGT-pVAX	TKYMTCMSADLEV <u>TGT</u> WVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 26)
NS3/4A-RGT-pVAX	TKYMTCMSADLEV <u>RGT</u> WVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 27)
NS3/4A-TPT-pVAX	TKYMTCMSADLEV <u>TPT</u> WVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 33)
NS3/4A-RPT-pVAX	TKYMTCMSADLEV <u>RPT</u> WVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 34)
NS3/4A-RPA-pVAX	TKYMTCMSADLEV <u>RPA</u> WVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 35)
NS3/4A-CST-pVAX	TKYMTCMSADLEV <u>CST</u> WVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 36)
NS3/4A-CCST-pVAX	TKYMTCMSADLEV <u>CCST</u> WVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 37)
NS3/4A-SSST-pVAX	TKYMTCMSADLEV <u>SSST</u> WVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 38)
NS3/4A-SSSSCST-pVAX	TKYMTCMSAD <u>SSSSCST</u> WVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 39)
NS3/4A-VVVVTST-pVAX	TKYMTCMSAD <u>VVVVTST</u> WVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 40)
NS5-pVAX	<u>ASEDVVC</u> CSMSYTWTG (SEQ. ID. NO.: 41)
NS5A/B-pVAX	<u>SSEDVVVC</u> CSMWWVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 42)
*NS3/4A 단편에 대한 야생형 서열은 NS3/4-pVAX이다. NS3/4A 중지점은 일줄로 표시하였으며, 여기서 P1 지점은 제1 Thr(T)에 해당하며, P1' 지점은 NS3/4-pVAX 서열 뒤에 오는 아미노산에 해당한다. NS3 프로테이제는 야생형 NS3/4A 서열에서 P1과 P1' 지점 사이를 절단한다	

<90>

HCV 웨티드를 암호화하는 핵산

<91>

핵산 구체예는 전술한 HCV 웨티드(예컨대, 서열 번호 17, 29, 31, 32 및 43-49) 또는 아미노산 길이가 최소한 4, 6, 8, 10, 12, 15, 또는 20개인 그 단편(예컨대, 서열 번호 25-27 및 32-42)을 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇 가지 구체예는, 예를 들어 이들 HCV 웨티드를 암호화하는 계놈 DNA, RNA 및 cDNA를 포함한다. HCV 뉴클레오타이드의 구체예는 서열 목록에 제시된 DNA 서열(예, 서열 번호 16) 뿐만 아니라 서열 목록에 제시된 아미노산 서열(예, 서열 번호 17)을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 염증 조건(예컨대, 0.5 M NaHPO₄, 7.0% 나트륨 도데실 살페이트(SDS), 1 mM EDTA 중에서 50°C에서, 필터에 결합된 DNA에 대해 하이브리드화하고, 0.2 x SSC/0.2% SDS 중에서 50°C에서 세척하는 조건) 하에 서열 목록에 제시된 DNA 서열에 하이브리드화하는 임의의 뉴클레오타이드 서열 및 덜 염증한 조건(예컨대, 0.5 M NaHPO₄, 7.0% 나트륨 도데실 살페이트(SDS), 1 mM EDTA 중에서 37°C에서 하이브리드화하고, 0.2 x SSC/0.2% SDS 중에서 37°C에서 세척하는 조건) 하에 서열 목록에 제시된 아미노산 서열(서열 번호 17)을 암호화하는 DNA 서열에 하이브리드화하는 임의의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

<92>

핵산 구체예는 또한 전술한 서열의 단편, 변형체, 유도체 및 변이체를 포함한다. 바람직한 구체예로는 신규 HCV 서열 또는 이의 상보 서열 중 하나의 12개 이상의 연속 염기를 포함하는 핵산을 들 수 있으며, 바람직한 단편은 서열 번호 17의 NS3/4A 문자를 암호화하는 핵산 또는 이의 상보 서열의 12개 이상의 연속 염기를 포함하는 것이다.

<94> 이러한 점에서, 본 발명의 핵산 구체예는 12~약 2079개의 연속 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 본 발명의 일부 DNA 단편은, 예컨대 서열 번호 16의 연속 뉴클레오타이드가 최소한 12-15, 15-20, 20-30, 30-50, 50-100, 100-200, 200-500, 500-1000, 1000-1500, 1500-2079개인 핵산 또는 이의 상보 서열을 포함한다. 핵산 구체예는 또한 치환, 추가, 또는 결실과 같은 돌연변이에 의해 변형될 수 있다. 뉴클레오타이드 암호화 서열의 축퇴성으로 인해, 예컨대 서열 번호 17에 제시된 것과 실질적으로 동일한 HCV 아미노산 서열을 암호화하는 다른 DNA 서열이 몇몇 구체예에 사용될 수 있다. 이러한 것의 비제한적인 예로는 서열 내에서 기능적으로 동등한 아미노산 잔기를 암호화하는 상이한 코돈으로 치환시켜서 침묵 변화를 유도하거나, 또는 서열 내에서 기능적으로 동등하지 않는 아미노산 잔기를 암호화하는 상이한 코돈으로 치환시켜서 검출가능한 변화를 생성함으로써 변형시킨, NS3/4A의 전부 또는 일부를 암호화하는 핵산 서열(서열 번호 16) 또는 이러한 서열의 전부 또는 일부에 상보적인 핵산을 들 수 있다.

<95> 전술한 핵산 서열을 이용함으로써, 이를 분자에 상보적인 프로브를 디자인하여 이를 올리고뉴클레오타이드 합성에 의해 제조할 수 있다. 바람직한 프로브는 이러한 HCV 분리물 고유의 핵산 서열(서열 번호 16)을 포함한다. 이러한 프로브는 HCV의 천연 공급원(이 중 일부는 그 자체가 신규 HCV일 수 있다)을 분리하기 위해 환자로부터 cDNA를 스크리닝하는 데 이용할 수 있다. 스크리닝은, 예컨대 필터 하이브리드화 또는 PCR로 실시할 수 있다. 필터 하이브리드화로 실시하려면, 표지된 프로브는 이 NS3/4A 켈티드 고유의 핵산 서열(서열 번호 16)의 15-30개 이상의 염기쌍을 포함하는 것이 바람직하다. 이용되는 하이브리드화 세척 조건은 중간 정도에서 높은 정도의 염증도로 하는 것이 바람직하다. 하이브리드화는 0.5 M NaHPO₄, 7.0% 나트륨 도데실 살피아이트(SDS), 1 mM EDTA 중에서 42°C에서 밤새 수행할 수 있으며, 세척은 0.2 x SSC/0.2% SDS 중에서 42°C에서 수행할 수 있다. 이러한 조건에 관한 정보에 대해서는, 예컨대 Sambrook 등의 문헌[1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.]; 및 Ausubel 등의 문헌[1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Intersciences, N.Y.]을 참고로 할 수 있다.

<96> HCV 핵산은 또한 전술한 핵산을 사용하여 HCV에 감염된 환자로부터 분리할 수 있다(역시 실시예 6 참조). 따라서, HCV에 감염된 환자로부터 얻은 RNA를 역전사시키고, 얻어진 cDNA를 PCR 또는 다른 증폭 기법을 이용하여 증폭시킨다. 프라이머는 NS3/4A 서열(서열 번호 16)로부터 얻은 것이 바람직하다.

<97> PCR 기법의 개요에 대해서는 문헌[Molecular Cloning to Genetic Engineering, White, B.A. Ed. in Methods in Molecular Biology 67: Humana Press, Totowa(1997)] 및 "PCR Methods and Applications"이라의 표제의 문헌(1991, Cold Spring Harbor Laboratory Press)을 참고로 할 수 있다. mRNA 증폭에 대해서는, mRNA를 cDNA로 역전사시킨 후 PCR(RT-PCR)을 수행하는 방법이나, 또는 미국 특허 제5,322,770호에 기술된 바와 같이 상기 두 단계에 한가지 효소를 사용하는 방법은 본 발명의 범위에 속하는 것이다. 또 다른 기법은 Marshall R.L. 등의 문헌[PCR Methods and Applications 4:80-84, 1994]에 기술된 바와 같이 역전사효소 비대칭 캡 리가제 연쇄 반응(RT-AGLACR)을 이용하는 것을 포함한다.

<98> 요약하면, 하기 표준 절차에 따라서 RNA를 분리한다. 첫번 째 가닥 합성의 프라이머로서 증폭된 단편의 5' 최말단에 대해 특이적인 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 RNA 상에서 역전사 반응을 수행한다. 그 후 얻어진 RNA/DNA 하이브리드를 표준 말단 트랜스퍼라제 반응을 이용하여 구아닌으로 "테일링(tailed)"한다. 이어서 하이브리드를 RNase H로 분해하고, 폴리-C 프라이머를 사용하여 제2 가닥 합성을 프라이밍한다. 이렇게 하면 증폭된 단편의 상류의 cDNA 서열이 쉽게 분리된다. 이용될 수 있는 클로닝 기법의 개요에 대해서는, 예컨대 상기 Sambrook 등의 문헌(1989)을 참고로 할 수 있다.

<99> 이러한 증폭 방법 각각에서는 증폭시킬 서열의 어느 한 쪽 상의 프라이머를 dNTP 및 열에 안정한 폴리머라제, 예컨대 Taq 폴리머라제, Pfu 폴리머라제 또는 Vent 폴리머라제와 함께 적절히 제조된 핵산 샘플에 추가한다. 샘플 내의 핵산을 변성시키면 프라이머가 샘플 내의 상보적 핵산 서열에 특이적으로 하이브리드화한다. 이어서 하이브리드화된 프라이머를 연장시킨다. 그 후 변성, 하이브리드화, 및 연장 반응으로 이루어진 사이클을 한번 더 실시한다. 프라이머 부위 사이의 핵산 서열을 포함하는 증폭된 단편이 생성되도록 사이클을 다수회 반복한다. PCR에 대해서는 미국 특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,965,188호를 비롯하여 여러 특허에 추가로 설명되어 있다.

<100> 프라이머는 NS3/4A 분자 고유의 핵산 서열(서열 번호 16)의 일부분에 실질적으로 상보적이 되도록 선택함으로써 프라이머 사이의 서열이 증폭되도록 한다. 프라이머의 뉴클레오타이드 길이는 최소한 16-20, 20-25, 또는 25-30개인 것이 바람직하다. 안정한 하이브리드의 형성은 DNA의 용점(T_m)에 의존한다. T_m은 프라이머의 길이, 용액의 이온 강도 및 G+C 함량에 의해 결정된다. 프라이머의 G+C 함량이 더 많을수록, 용점은 더 높아지는데, 그 이유

는 G:C 쌍은 3개의 H 결합에 의해 유지되는 반면, A:T 쌍은 2개의 H 결합에 의해서만 유지되기 때문이다. 본 명세서에 개시된 증폭 프라이머의 G+C 함량은 10~75%인 것이 바람직하고, 35~60%인 것이 보다 바람직하며, 40~55%인 것이 가장 바람직하다. 특정한 분석 조건 설정 하의 적절한 프라이머의 길이는 당업자가 실험에 의해 결정할 수 있다.

<101> 프라이머의 간격은 증폭될 세그먼트의 길이와 관련이 있다. 본 명세서에 기술된 구체예에서 HCV 웨티드를 암호화하는 핵산 서열을 보유하는 증폭된 세그먼트의 크기는 약 25 bp 이상에서 HCV 게놈의 전체 길이에 이를 수 있다. 25~1000 bp의 증폭 단편이 일반적이며, 50~1000 bp의 단편이 바람직하고, 100~600 bp가 가장 바람직하다. 증폭 프라이머로는 NS3/4A 영역의 특이적 증폭이 일어나게 하는 어떠한 서열도 가능하며, 예컨대 클로닝을 용이하게 하는 제한 부위와 같은 변형을 포함할 수 있다.

<102> PCR 생성물을 서브클로닝하고 서열을 분석하여 증폭된 서열이 HCV 웨티드의 서열을 나타내는지를 확인할 수 있다. 그 후 PCR 단편을 이용하여 다양한 방법에 의해 전체 길이 cDNA를 분리할 수 있다. 예를 들어, 증폭된 단편을 표지하여 cDNA 라이브러리, 예컨대 박테리오파지 cDNA 라이브러리를 스크리닝하는 데 이용할 수 있다. 또는, 게놈 라이브러리의 스크리닝을 통해 게놈 클론을 분리하는 데 표지된 단편을 이용할 수도 있다. 또한, 예컨대 감염된 환자로부터 분리한 RNA로부터 합성한 cDNA를 이용하여 발현 라이브러리를 제작할 수 있다. 이와 같은 방식으로, HCV 유전자 생성물에 대해 생성된 항체와 함께 표준 항체 스크리닝 기법을 이용하여 HCV 유전자 생성물을 분리할 수 있다(스크리닝 기법에 대해서는, 예컨대 Harlow, E. 및 Lane 편저, 1998, 문헌 Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor]를 참조로 할 수 있다).

<103> 구체예는 또한 (a) 선행 핵산 및/또는 이의 상보 서열(즉, 안티센스) 중 임의의 것을 포함하는 DNA 벡터; (b) 핵산의 발현을 지령하는 조절성 요소와 작동가능하게 결합된 선행 핵산 서열 중 임의의 것을 포함하는 DNA 발현 벡터; (c) 숙주 세포에서 암호화 서열의 발현을 지령하는 조절성 요소와 작동가능하게 결합된 선행 핵산 서열 중 임의의 것을 보유하는 유전자 조작된 숙주 세포를 포함한다. 이들 재조합 작제물은 숙주 세포에서 스스로 복제할 수 있다. 또는, 재조합 작제물은 숙주 세포의 염색체 DNA에 통합될 수 있다. 이러한 재조합 폴리뉴클레오파우스는 일반적으로 HCV 게놈 또는 인간의 조작에 의한 반합성 또는 합성에 의해 생성된 cDNA 폴리뉴클레오파우스를 포함한다. 따라서, 자연적으로 발생하지 않는 서열 및 이의 상보 서열을 포함하는 재조합 핵산이 제공된다.

<104> HCV 웨티드를 암호화하는 핵산 또는 HCV 유전자의 상보 서열인 서열을 갖는 핵산은 자연 상태로 이용될 수도 있지만, 이들을 때로, 예컨대 결실, 치환 또는 삽입에 의해 변형시킬 수 있으며, 인간에 존재하지 않는 서열을 부가시킬 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 조절성 요소에는 유도성 및 비유도성 프로모터, 인핸서, 오퍼레이터 및 발현을 유도 및 조절하는 당업자에게 공지된 기타 요소가 포함되며, 이에 국한되는 것은 아니다. 이러한 조절성 요소의 비제한적인 예로는 사이토메갈로바이러스 hCMV 이를 초기 발현 유전자, SV40 아데노바이러스의 초기 또는 후기 발현 프로모터, lac 시스템, trp 시스템, TAC 시스템, TRC 시스템, 파지 A의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코트 단백질의 제어 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제에 대한 프로모터, 산 포스파타제의 프로모터, 및 효모 α -접합 인자의 프로모터를 들 수 있다.

<105> 또한, 재조합 HCV 웨티드 암호화 핵산 서열 및 이의 상보 서열을 조작하여 이들의 프로세싱 또는 발현을 변형시킬 수 있다. 비제한적인 예로, 본 발명의 HCV 핵산을 프로모터 서열 및/또는 리보솜 결합 부위와 결합시키거나, 또는 시그널 서열을 HCV 웨티드 암호화 서열의 상류에 삽입시켜서 웨티드의 분비를 가능하게 함으로써 회수 또는 생체 이용률을 촉진시킬 수 있다. 그 밖에도, 번역, 개시 및/또는 종결 서열을 생성 및/또는 파괴하거나, 또는 암호화 영역 내에 변형을 유발하고/유발하거나, 새로운 제한 부위를 형성하거나 기존의 제한 부위를 파괴하거나, 또는 시험관내 변형을 더 촉진하기 위해 특정 HCV 핵산을 시험관내 또는 생체내에서 돌연변이시킬 수 있다(실시예 6 참조). 당업계에 공지된 임의의 돌연변이 유발 기법을 이용할 수 있으며, 이의 비제한적인 예로 시험관내 특정 부위 지정 돌연변이 유발이 있다[Hutchinson 등, J. Biol. Chem., 253:6551(1978)].

<106> 또한, 다른 단백질 또는 다른 단백질의 도메인을 암호화하는 핵산을 HCV 웨티드를 암호화하는 핵산에 결합시켜서 융합 단백질을 생성할 수 있다. 융합 단백질을 암호화하는 뉴클레오파우스는 전체 길이 NS3/4A 서열(서열 번호 16), 절두형 NS3/4A 서열 또는 비관련 단백질 또는 웨티드, 예컨대 후술하는 바와 같은 폴리 히스티딘, 헤마글루티닌, 효소, 형광 단백질, 또는 발광 단백질에 융합된 NS3/4A 서열의 웨티드 단편을 포함할 수 있으며, 이에 국한되는 것은 아니다.

<107> 놀랍게도, 본 발명자들은 NS3-pVAX 및 NS3/4A-pVAX 벡터를 면역 경쟁력이 있는 포유동물에게 주사하면 강력한 면역 반응을 유발할 수 있다는 사실을 발견하였다. 하기 실시예에서는 이러한 실험에 대해 더 상세히 설명한다.

<108> 실시예 7

<109> 체액 면역 반응이 NS3-pVAX 및 NS3/4A-pVAX 백터에 의해 유발되는지를 확인하기 위해, 실시예 6에서 설명한 발현 작제물을 퀴아젠 DNA 정제 시스템을 이용하여 제조업자의 지시에 따라 정제하고, 정제된 DNA 백터를 4~10 마리로 구성된 Balb/c 마우스 그룹에 접종하는 데 사용하였다. 전술한 바와 같이 플라스미드를 재생 전경골(TA) 근육에 직접 주사하였다[Davis 등, Human Gene Therapy 4(6):733(1993)]. 요약하면, 마우스에 0.9% 멸균 NaCl 중의 0.01 mM 카디오톡신(cadiotoxin)(라톡산, 프랑스 로잔 소재) 50 μl /TA로 근육 주사하였다. 5일 후, 각 TA 근육에 rNS3 또는 DNA를 함유하는 PBS 50 μl 를 주사하였다.

<110> 덴마크의 웰레가드, 스웨덴 읍살라의 찰스 리버, 스웨덴의 B&K 솔렌투나에 있는 분양소로부터 동종 교배한 마우스 종 C57/BL6(H-2b), Balb/C(H-2d) 및 CBA(H-2k) 입수하였다. 모든 마우스는 암컷이었으며, 4~8주령에 사용하였다. 체액 반응의 모니터를 위해, 모든 마우스에 4주마다 플라스미드 DNA 50 μl /TA를 추가 접종하였다. 또한, 일부 마우스에는 전술한 바와 같이 정제한 재조합 NS3(rNS3) 단백질을 주사하였다. rNS3를 접종한 마우스는 2회 이상 접종하지 않았다. 모든 마우스로부터 한달에 2회 채혈하였다.

<111> 마우스 중 NS3 항체의 존재를 검출하기 위해 효소 면역흡착 분석(EIA)을 이용하였다. 이들 분석은 Chen 등의 문헌[Hepatology 28(1):219(1998)]에 기술된 것과 사실상 동일하게 수행하였다. 요약하면, 96-웰 미량역가 플레이트(년크, 덴마크 코펜하겐 소재)에서 50 mM 탄산나트륨 완충액(pH 9.6) 중 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 rNS3를 4°C에서 밤새 수동적으로 흡착시켰다. 그 후 PBS, 2% 염소 혈청 및 1% 소 혈청 알부민을 함유하는 희석 완충액과 함께 37°C에서 1시간 동안 항온처리하여 플레이트를 블로킹시켰다. 그 후 1:60에서부터 시작한 마우스 혈청의 연속 희석액을 플레이트 상에서 1시간 동안 항온처리하였다. 결합된 마우스 혈청 항체는 알칼라인 포스파타제 접합 염소 항-마우스 IgG(시그마 셀 프로덕츠, 미주리주 세인트 루이스 소재)로 검출한 다음, 기질 pNPP(0.5 M MgCl₂를 함유한 1 M 디에탄올 아민 완충액 5 mM 당 1 정제)를 첨가하였다. 반응을 1 M NaOH를 첨가하여 중단시키고, 405 nm에서 흡광도를 읽었다.

<112> 4주 후, NS3/4A-pVAX를 접종한 마우스는 5 마리 마우스 중 4 마리가 NS3 항체를 생성한 반면, NS3-pVAX를 접종한 마우스는 5 마리 마우스 중 1 마리가 항체를 생성하였다(도 4). 6주 후, NS3/4A-pVAX를 접종한 5 마리 마우스 중 4 마리가 고농도($>10^4$)의 NS3 항체(평균 농도 10800 \pm 4830)를 생성하였고, 1 마리는 역가가 2160이었다. NS3-pVAX를 접종한 모든 마우스가 NS3 항체를 생성하였으나, 이들 중 어느 것도 NS3/4A-pVAX 작제물에 의해 생성된 정도의 농도로 항체를 생성하지는 않았다(평균 농도 1800 \pm 805). NS3/4A 융합 작제물에 의해 생성된 항체 농도는 6주 째 NS3-pVAX에 의해 유도된 항체의 농도보다 훨씬 높았다(평균 계수 7.6 대 3.4, p<0.05, 맨-휘트니 계수 합 테스트, 및 p<0.01, 스튜던트 t-테스트). 따라서, NS3-pVAX 또는 NS3/4A-pVAX의 접종은 항-NS3 항체의 생성을 유도하였으나, NS3/4A 융합 유전자가 더 강력한 면역원이었다. 하기 실시예에서는 NS3/4A-TPT-pVAX 작제물이 강력한 면역 반응을 유발하는지를 확인하기 위해 수행한 실험에 대해 설명한다.

<113> 실시예 8

<114> NS3/4A의 증강된 면역원성이 단지 NS4A의 존재에 의한 것인지, 또는 그 밖에도 NS3/4A 융합 단백질이 NS3/4A 접합점에서 절단되어야만 하는지를 테스트하기 위해 새로운 실험을 수행하였다. 첫번 째 실험에서는, Balb/c 마우스에서 NS3-pVAX, NS3/4A-pVAX 및 NS3/4A-TPT-pVAX 백터의 면역원성을 비교하였다. 0주에 전술한 바와 같이 마우스에 접종하고, 2주 후 모든 마우스로부터 채혈하여 1:60의 혈청 희석액에서 NS3에 대한 항체의 존재를 확인하였다(표 11). 4주 째 다시 마우스로부터 채혈하였다. NS3/4A-TPT-pVAX 백터는 NS3-pVAX 백터와 유사하였지만 (4/10 대 0/10; NS, 피셔 정확성 테스트), NS3/4A-pVAX 백터는 지속적으로 가장 강력한 면역원이 되었다. 따라서, 마우스에 접종된 HCV 작제물 모두는 NS3에 대한 면역 반응을 유발할 수 있었으나, NS4A 서열 및 NS3와 NS4A 서열 사이의 기능적 단백질 분해 절단 부위가 가장 강력한 면역 반응을 유발하였다.

표 11

1차 접종 후 경과 시간 (주)	1회의 100 μ g 근육내 접종 후 개개의 면역원에 대해 반응하는 항체의 수		
	NS3-pVAX	NS3/4A-pVAX	NS3/4A-TPT-pVAX
2	0/10	17/20	4/10
4	0/10 (<60)	20/20 (2415±3715) 55% > 10 ³ 10% > 10 ⁴	10/10 (390±639) 50% > 10 ² 10% > 10 ³

<115>

<116> 만성 감염 단계시에는 HCV는 간세포에서 복제되어 간 내로 확산된다. 만성 및 지속성 바이러스 감염을 퇴치하는 데 있어서 주된 요소는 세포 매개 면역 방어 시스템이다. CD4⁺ 및 CD8⁺ 림프구는 만성 HCV 감염기 동안 간에 침윤하지만, 바이러스를 제거하거나 간 손상을 예방하지는 못한다. 또한, 지속성 HCV 감염은 간세포 암종(HCC)의 발병과 연관이 있다. 하기 실시예에서는 NS3 및 NS3/4A 작제물이 NS3에 대한 T-세포 매개 면역 반응을 유발할 수 있는지를 확인하기 위해 수행한 실험에 대해 설명한다.

<117>

실시예 9

<118>

전술한 작제물이 NS3에 대한 세포 매개 반응을 유발할 수 있는지를 조사하기 위해, 생체내 종양 성장 분석을 수행하였다. 이 목적을 위해, NS3/4A 유전자를 안정하게 형질감염시킨 SP2/0 종양 세포주를 제조하였다. NS3/4A 유전자를 보유하는 pcDNA3.1 플라스미드를 Bg1II 분해로 선형화시켰다. 선형화된 플라스미드 DNA 총 5 μ g을 형질감염 시약(Superfect, 퀴아젠, 독일) 60 μ g과 혼합하고, 이 혼합물을 35 mm 디쉬 중의 SP2/0 세포의 50% 융합 층에 첨가하였다. 형질감염된 SP2/0 세포(NS3/4A-SP2/0)를 제네티신 800 μ g/ml의 존재 하에 14일간 배양하고, 개개의 클론을 분리하였다. 안정한 NS3/4A-발현 SP2/0 클론을 PCR과 RTPCR로 확인하였다. 클로닝된 세포주를 10% 태아 소 혈청, L-글루타민 및 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 DMEM 중에서 유지시켰다.

<119>

그 후 Balb/c 마우스에서 SP2/0 및 NS3/4A-SP2/0 세포주의 생체내 성장 속도를 평가하였다. 마우스의 오른 쪽 염구리에 2 x 10⁶ 개의 종양 세포를 피하 주사하였다. 매일 피부를 통해 종양의 크기를 측정하였다. 2가지 세포 주의 성장 속도를 비교하였다. 예를 들어, 매 시점 평균 종양 크기는 2가지 세포주에 있어서 서로 다르지 않았다(표 12a 및 표 12b 참조). 하기 실시예에서는 NS3/4A 작제물을 접종한 마우스가 NS3에 대한 T-세포 반응을 나타내는지를 확인하기 위해 수행한 실험에 대해 설명한다.

표 12a

마우스 ID	종양 세포주	표시된 시점에서의 생체내 최대 종양 크기									
		5	6	7	8	11	12	13	14	15	
1	SP2/0	1.6	2.5	4.5	6.0	10.0	10.5	11.0	12.0	12.0	
2	SP2/0	1.0	1.0	2.0	3.0	7.5	7.5	8.0	11.5	11.5	
3	SP2/0	2.0	5.0	7.5	8.0	11.0	11.5	12.0	12.0	13.0	
4	SP2/0	4.0	7.0	8.0	10.0	13.0	15.0	16.5	16.5	17.0	
5	SP2/0	1.0	1.0	3.0	4.0	5.0	6.0	6.0	6.0	7.0	

<120>

표 12b

마우스 ID	종양 세포주	표시된 시점에서의 생체내 최대 종양 크기								
		5	6	7	8	11	12	13	14	15
그룹 평균		1,92	3.3	5.0	6.2	9.3	10.1	10.7	11.6	12.1
6	NS3/4A-SP2/0	1.0	2.0	3.0	3.5	4.0	5.5	6.0	7.0	8.0
7	NS3/4A-SP2/0	2.0	2.5	3.0	5.0	7.0	9.0	9.5	9.5	11.0
8	NS3/4A-SP2/0	1.0	2.0	3.5	3.5	9.5	11.0	12.0	14.0	14.0
9	NS3/4A-SP2/0	1.0	1.0	2.0	6.0	11.5	13.0	14.5	16.0	18.0
10	NS3/4A-SP2/0	3.5	6.0	7.0	10.5	15.0	15.0	15.0	15.5	20.0
그룹 평균		1.7	2.7	3.7	5.7	9.4	10.7	11.4	12.4	14.2
그룹 평균간의 스튜던트 t-테스트 비교의 p-값		0.7736	0.6918	0.4027	0.7903	0.9670	0.7986	0.7927	0.7508	0.4623

<121>

<122>

실시예 10

<123>

T-세포 반응이 NS3/4A 접종에 의해 유발되는지를 조사하기 위해, 면역화시킨 마우스의 면역 방어 시스템이 NS3-발현 종양 세포주를 공격하는 능력을 분석하였다. Balb/c 마우스에서 SP2/0 골수종 세포주의 종양 성장의 생체내 억제율을 테스트하기 위한 프로토콜은 이미 상세히 개시된 바 있다[Encke 등, J. Immunol. 161:4917(1998)]. 이 모델에서의 종양 성장 억제는 세포독성 T 림프구(CTL)의 프라이밍에 의존한다. 요약하면, 10 마리의 마우스 그룹에 NS3-pVAX 100 μ g 또는 NS3/4A-pVAX 100 μ g을 한달 간격으로 5회 근육 주사하였다. 마지막 접종 2주 후, 2×10^6 SP2/0 또는 NS3/4A-SP2/0 세포를 각 마우스의 오른 쪽 염구리에 주사하였다. 2주 후, 마우스를 죽이고, 최대 종양 크기를 측정하였다. NS3-pVAX를 접종한 마우스에서의 SP2/0와 NS3/4A-SP2/0의 평균 종양 크기에는 차이가 없었다(표 13a 및 표 13b 참조).

표 13a

마우스 ID	면역원	용량 (μ g)	종양 세포주	종양 성장	최대 종양 크기 (mm)
1	NS3-pVAX	100	SP2/0	유	5
2	NS3-pVAX	100	SP2/0	유	15
3	NS3-pVAX	100	SP2/0	무	-
4	NS3-pVAX	100	SP2/0	유	6
5	NS3-pVAX	100	SP2/0	유	13
그룹 합계				4/5	9.75±4.992
6	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	유	9
7	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	유	8
8	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	유	7
9	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	무	-
10	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	무	-
				3/5	8.00±1.00

주: 통계적 분석 (StatView): 최대 종양 크기에 대한 스튜던트 t-테스트
0.05 미만의 P-값은 유의적인 것으로 간주한다

<124>

표 13b

최대 직경에 대한 언페어드 t-테스트

그룹화 번수: 1열

가정치=0

행 배제: NS3DNA-종양-001213

	평균자	DF	t- 값	P- 값
NS3-sp2, NS3-spNS3	1.750	5	0.58	0.584

최대 직경에 대한 그룹 정보

그룹화 번수: 1열

행 배제: NS3DNA-종양-001213

	총계	평균	평방 편차	표준 편차	표준 오차
NS3-sp2	4	9.750	24.917	4.992	2.496
NS3-spNS3	3	8.000	1.000	1.000	0.57

<125>

<126>

다음의 실험에서는 NS3/4A-pVAX를 접종한 Balb/c 마우스에서 SP2/0 또는 NS3/4A-SP2/0 종양 성장의 억제를 평가하였다. NS3/4A-pVAX 플라스미드를 접종한 마우스에서 NS3/4A-SP2/0 종양 세포의 성장은 비형질감염 SP2/0 세포의 성장과 비교하여 현저히 억제되었다(표 14a 및 표 14b 참조). 따라서, NS3/4A-pVAX 접종은 생체내에서 NS3/4A를 발현하는 세포의 성장을 억제하는 CTL을 유도한다. 하기 실시예에서는 NS3에 대한 세포 매개 반응을 유발하는 데 있어서의 각종 NS3 함유 조성물의 효능을 분석하기 위해 수행한 실험에 대해 설명한다.

표 14a

마우스 ID	면역원	용량 (μg)	종양 세포주	종양 성장	최대 종양 크기 (mm)
11	NS3/4A-pVAX	100	SP2/0	무	-
12	NS3/4A-pVAX	100 ^a	SP2/0	유	24
13	NS3/4A-pVAX	100	SP2/0	유	9
14	NS3/4A-pVAX	100	SP2/0	유	11
15	NS3/4A-pVAX	100	SP2/0	유	25
				4/5	17.25±8.421
16	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	무	-
17	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	유	9
18	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	유	7
19	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	유	5
20	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	유	4
				4/5	6.25±2.217

주: 통계적 분석 (StatView): 최대 종양 크기에 대한 스튜던트 t-테스트
0.05 미만의 P-값은 유의적인 것으로 간주한다

<127>

표 14b

최대 직경에 대한 언페어드 t-테스트

그룹화 번수: 1열

가정치=0

행 배제: NS3DNA-종양-001213

	평균자	DF	t- 값	P- 값
NS3/4-sp2, NS3/4-spNS3	11.000	6	2.526	0.044

최대 직경에 대한 그룹 정보

그룹화 번수: 1열

행 배제: NS3DNA-종양-001213

	총계	평균	평방 편차	표준 편차	표준 오차
NS3/4-sp2	4	17.250	70.917	8.421	4.211
NS3/4-spNS3	4	6.250	4.917	2.217	1.109

<128>

실시예 11

<130>

각종 NS3 함유 조성물의 투여가 세포 매개 면역 반응의 유발에 영향을 미치는지를 분석하기 위해서 마우스에 PBS, rNS3, 비관련 DNA 또는 NS3/4 작제물을 접종하고, 전술한 바와 같이 종양 크기를 측정하였다. NS3/4A 작제물은 종양 크기를 통계학적으로 유의적인 수준으로 감소시키기에 충분한 T-세포 반응을 유발할 수 있었다(표 15a 및 표 15b 참조). 하기 실시예에서는 종양 크기의 감소가 NS3-특이적 T-림프구의 생성에 의한 것인지를 확인하기 위해 수행된 실험에 대해 설명한다.

표 15a

마우스 ID	면역원	용량 (μ g)	종양 세포주	형 -NS3	종양 성장	최대 종양 크기 (mm)
1	NS3-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	+	12.0
2	NS3-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	+	20.0
3	NS3-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	60	+	18.0
4	NS3-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	+	13.0
5	NS3-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	+	17.0
그룹 평균				60	5/5	16.0 \pm 3.391
6	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	2160	+	10.0
7	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	<60	-	-
8	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	<60	-	-
9	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	360	-	-
10	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	<60	+	12.5
그룹 평균				1260	2/5	11.25 \pm 1.768
11	NS3/4A-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	+	10.0
12	NS3/4A-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	-	-
13	NS3/4A-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	-	-
14	NS3/4A-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	+	13.0
15	NS3/4A-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	+	13.5
그룹 평균				<60	3/5	12.167 \pm 1.893
16	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	60	+	10.0
17	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	360	-	-
18	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	2160	+	8.0
19	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	2160	+	12.0
20	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	2160	+	7.0
그룹 평균				1380	4/5	9.25 \pm 2.217
36	p17-pcDNA3	100	NS3/4A-SP2/0	<60	+	20.0
37	p17-pcDNA3	100	NS3/4A-SP2/0	<60	+	7.0
38	p17-pcDNA3	100	NS3/4A-SP2/0	<60	+	11.0
39	p17-pcDNA3	100	NS3/4A-SP2/0	<60	+	15.0
40	p17-pcDNA3	100	NS3/4A-SP2/0	<60	+	18.0
그룹 평균				<60	5/5	14.20 \pm 5.263
41	rNS3/CFA	20	NS3/4A-SP2/0	>466560	+	13.0
42	rNS3/CFA	20	NS3/4A-SP2/0	>466560	-	-
43	rNS3/CFA	20	NS3/4A-SP2/0	>466560	+	3.5
44	rNS3/CFA	20	NS3/4A-SP2/0	>466560	+	22.0
45	rNS3/CFA	20	NS3/4A-SP2/0	>466560	+	17.0
그룹 평균				466560	4/5	17.333 \pm 4.509
46	PBS	-	NS3/4A-SP2/0	<60	+	10.0
47	PBS	-	NS3/4A-SP2/0	<60	+	16.5
48	PBS	-	NS3/4A-SP2/0	60	+	15.0
49	PBS	-	NS3/4A-SP2/0	<60	+	21.0
50	PBS	-	NS3/4A-SP2/0	<60	+	15.0
51	PBS	-	NS3/4A-SP2/0	<60	-	-
그룹 평균				60	5/6	15.50 \pm 3.937

주: 통계적 분석 (StatView): 최대 종양 크기에 대한 스튜던트 t-테스트
0.05 미만의 P-값은 유의적인 것으로 간주한다

표 15b

최대 종양 크기에 대한 언페어드 t-테스트
그룹화 변수: 그룹
가정치=0

	평균자	DF	t- 값	P- 값
p17-sp3-4, NS3-100-sp3-4	2.950	5	.739	.4933
p17-sp3-4, NS3/4-10-sp3-4	2.033	6	.628	.5532
p17-sp3-4, NS3-10-sp3-4	-1.800	8	-.643	.5383
p17-sp3-4, NS3/4-100-sp3-4	4.950	7	1.742	.1250
p17-sp3-4, PBS-sp3-4	-1.300	8	-.442	.6700
p17-sp3-4, rNS3-sp3-4	-3.133	6	-.854	.4259
NS3-100-sp3-4, NS3/4-10-sp3-4	-.917	3	-.542	.6254
NS3-100-sp3-4, NS3-10-sp3-4	-4.750	5	-1.811	.1299
NS3-100-sp3-4, NS3/4-100-sp3-4	2.000	4	1.092	.3360
NS3-100-sp3-4, PBS-sp3-4	-4.250	5	-1.408	.2183
NS3-100-sp3-4, rNS3-sp3-4	-6.083	3	-1.744	.1795
NS3/4-10-sp3-4, NS3-10-sp3-4	-3.833	6	-1.763	.1283
NS3/4-10-sp3-4, NS3/4-100-sp3-4	2.917	5	1.824	.1277
NS3/4-10-sp3-4, PBS-sp3-4	-3.333	6	-1.344	.2274
NS3/4-10-sp3-4, rNS3-sp3-4	-5.167	4	-1.830	.1412
NS3-10-sp3-4, NS3/4-100-sp3-4	6.750	7	3.416	.0112
NS3-10-sp3-4, PBS-sp3-4	.500	8	.215	.8350
NS3-10-sp3-4, rNS3-sp3-4	-1.333	6	-.480	.6480
NS3/4-100-sp3-4, PBS-sp3-4	-6.250	7	-2.814	.0260
NS3/4-100-sp3-4, rNS3-sp3-4	-8.083	5	-3.179	.0246
PBS-sp3-4, rNS3-sp3-4	-1.833	6	-.607	.5662

<132>

실시예 12

<134>

NS-3 특이적 T-세포가 NS3/4A 접종에 의해 생성된 것인지를 확인하기 위해 시험관내 T-세포 매개 종양 세포 용해 분석을 이용하였다. 이 분석에 대해서는 기존의 문헌[Townsend 등, J. Virol. 71:3365(1997)]에 상세히 개시되어 있다. 요약하면, 5 마리의 Balb/c 마우스 그룹에 NS3/4A-pVAX 100 μ g을 3회 근육 주사하였다. 마지막 접종 2주 후 마우스를 죽이고 비장 세포를 회수하였다. 3×10^6 개의 비장 세포 및 3×10^6 개의 NS3/4A-SP20 세포를 사용하여 재자극 배양을 시작하였다. 5일 후, NS3/4A-SP2/0 또는 SP2/0 세포를 표적으로 사용하여 표준 ^{51}Cr -방출 분석을 수행하였다. NS3/4A-SP2/0 세포의 용해와 SP2/0 세포의 용해 간의 비로서 특이적 용해율(%)을 계산하였다. 이펙터 대 표적의 비를 20:1로 하였을 때, NS3/4A-pVAX를 접종한 마우스만이 테스트한 5 마리 중에서 4 마리에서 10% 이상의 특이적 용해율을 나타내었다(도 5A 및 B 참조). 따라서, NS3/4A를 접종한 마우스는 암 세포 증식 감소를 나타내고/나타내거나, NS3/4A는 암 세포의 용해를 유발하였다. 하기 섹션에서는 HCV 폴리펩티드의 몇 가지 예에 대해 더 상세히 설명한다.

<135>

HCV 웹티드

<136>

이전 섹션에서 기술한 바와 같이 HCV 웹티드를 암호화하는 핵산을 분자생물학의 통상적인 기법을 이용하여 조작하여 HCV 웹티드를 발현하는 재조합 작제물을 생성할 수 있다. 본 발명의 HCV 웹티드 또는 이의 유도체는 실질적으로 서열 목록에 제시된 것과 같은 모든 아미노산 서열의 1차 아미노산 서열(서열 번호 17, 29-32 및 43-49) 및 기능적으로 동등한 아미노산 잔기가 서열 내에서 침묵 변화를 초래하는 잔기로 치환된 변형된 서열을 비롯하여 아미노산 길이가 4개 이상인 이의 단편(예컨대, 서열 번호 25-27 및 33-42)을 포함하며, 이에 국한되는 것은 아니다. 서열 번호 17, 29-32 및 43-49의 서열의 바람직한 단편은 4개 이상의 아미노산이며, 기능적으로 동등한 아미노산 잔기가 서열 내에서 침묵 변화를 초래하는 잔기로 치환된 변형된 서열을 비롯하여 발견된 NS3/4A 웹티드 고유의 아미노산 서열(서열 번호 17)을 포함한다. HCV 웹티드는, 예컨대 아미노산의 길이가 최소한 12-15, 15-20, 20-25, 25-50, 50-100, 100-150, 150-250, 250-500 또는 500-704개일 수 있다. 다른 단편(예컨대, 서열 번호 25-27 및 33-42) 역시 본 발명의 또 다른 양태이다.

<137>

본 발명의 구체예는 또한 전술한 것과 실질적으로 동일한 HCV 웹티드를 포함한다. 즉, 서열 번호 17 내의 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 HCV 웹티드 및 기능적 등가물로서 작용하는 유사한 극성의 또 다른 아미노산으로 치환되어 침묵 변형이 일어난 이의 단편이다. 서열 내에서의 아미노산의 치환체는 그 아미노산이 속하는 부류의 다른 구성원으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 비극성(소수성) 아미노산에는 알라닌, 루신, 이소루신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌이 포함된다. 극성 중성 아미노산에는 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민이 포함된다. 양전하(염기성) 아미노산에는 아르기닌, 리신 및 히스티딘이 포함된다. 음전하(산성) 아미노산에는 아스파르트산 및 글루탐산이 포함된다. 방향족

아미노산에는 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신이 포함된다.

<138>

본 발명의 HCV 웨티드는 화학적 합성 방법(예컨대, 고체상 웨티드 합성)에 의해 문헌[Merrifield 등, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149(1964), Houghten 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:51:32(1985), Stewart and Young(Solid phase peptide synthesis, Pierce Chem Co., Rockford, IL(1984) and Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co., N.Y.]에 개시된 기법 등의 당업계에 공지된 기법을 이용하여 제조할 수 있다. 이러한 폴리웨티드는 아미노산 말단 상에 메티오닌을 포함시키거나 포함시키지 않고 합성할 수 있다. 화학적으로 합성된 HCV 웨티드는 상기 참고문헌에 개시된 방법을 이용하여 산화시켜서 이황화 다리를 형성할 수 있다.

<139>

본 발명의 HCV 웨티드는 화학적으로 합성될 수 있지만, 재조합 DNA 기법에 의해 이를 폴리웨티드를 제조하는 것이 더 효과적일 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어 전술한 바와 같은 HCV 뉴클레오타이드 서열 및 적절한 전사 및 번역 제어 서열을 함유하는 발현 벡터를 작제하는 데 이용될 수 있다. 이러한 방법에는, 예컨대 시험관내 재조합 DNA 기법, 합성 기법 및 생체내 유전자 재조합이 포함된다. 대안으로, HCV 뉴클레오타이드 서열을 암호화 할 수 있는 RNA를, 예컨대 합성기를 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 예컨대 문헌[Oligonucleotide Synthesis, 1984, Gait, M. J. ed., IRL Press, Oxford]에 기술된 기법을 참고할 수 있다. 따라서, 몇몇 구체 예는 본 발명의 HCV 웨티드를 발현하도록 조작한 세포주에 관한 것이다. 예를 들어, 몇몇 세포는 서열 번호 17, 23-32 및 43-49의 HCV 웨티드 또는 이를 분자의 단편을 발현하도록 제조된다.

<140>

본 발명의 HCV 웨티드를 발현하기 위해 각종 숙주-발현 벡터 시스템을 이용할 수 있다. 적절한 발현 시스템의 비제한적인 예로는 미생물, 예컨대 HCV 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환시킨 박테리아(예컨대, *E. coli* 또는 *B. subtilis*); HCV 뉴클레오타이드 서열을 보유하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환시킨 효모(예컨대, 사카로마이세스 (*Saccharomyces*), 페치아(*Pichia*)); HCV 서열을 보유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예, 배콜로바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염시킨 곤충 세포 시스템; HCV 서열을 보유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예, 콜리플라워 모자이크 바이러스, CHO, BHK, 293, 3T3)을 들 수 있다.

<141>

박테리아 시스템에서는 발현시킨 HCV 유전자 생성물의 사용 목적에 따라서 다수의 발현 벡터를 유리하게 선택할 수 있다. 예를 들어, 다량의 단백질을 생산하고자 하는 경우, HCV 웨티드의 약학 조성물의 생성 또는 HCV 웨티드에 대한 항체의 생성을 위해, 예컨대 정제가 용이한 고농도의 융합 단백질 생성물의 발현을 유도하는 벡터를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 벡터의 비제한적인 예로는 *E. coli* 발현 벡터 pUR278[Ruther 등, *EMBO J.*, 2:1791(1983)](이 벡터에서는 HCV 암호화 서열을 lacZ 암호화 영역과 리딩 프레임이 맞게 벡터에 개별적으로 결찰시켜서 융합 단백질을 생성할 수 있다); pIN 벡터[Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res.*, 13:3101-3109(1985); Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.*, 264:5503-5509(1989)] 등을 들 수 있다. pGEX 벡터는 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST)와의 융합 단백질로서 이종 폴리웨티드를 발현하는 데 사용될 수도 있다. 일반적으로, 이러한 융합 단백질은 가용성이며, 글루타티온-아가로스 비이드에 흡착시킨 후 유리 글루타티온의 존재 하에 용리시켜서 용해된 세포로부터 정제할 수 있다. pGEX 벡터는 트롬빈 또는 Xa 인자 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 디자인하여 클로닝된 표적 유전자 생성물이 GST 부분으로부터 방출되도록 할 수 있다.

<142>

곤충 시스템에서는, 오토그라파 캘리포니카(*Autographa californica*) 핵 폴리헤드로시스 바이러스(AcNPV)를 이 종 유전자를 발현시키기 위한 벡터로서 사용한다. 이 바이러스는 스포돕테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포에서 증식한다. HCV 암호화 서열을 바이러스의 비필수 영역(예컨대, 폴리헤드린 유전자)에 개별적으로 클로닝하고, AcNPV 프로모터(예컨대, 폴리헤드린 프로모터)의 제어 하에 배치한다. HCV 유전자 암호화 서열을 성공적으로 삽입하면 폴리헤드린 유전자가 불활성화되고 비폐색 재조합 바이러스(즉, 폴리헤드린 유전자에 의해 암호화되는 단백질 코트가 없는 바이러스)가 생성된다. 그 후 이러한 재조합 바이러스를 사용하여 스포돕테라 프루기페르다 세포를 감염시키며, 이 세포에서 삽입된 유전자가 발현된다[참고 문헌의 예: Smith 등, *J. Virol.* 46:584(1983) 및 Smith의 미국 특허 제4,215,052호].

<143>

포유동물 숙주 세포에서는 다수의 바이러스계 발현 시스템을 이용할 수 있다. 아데노바이러스를 발현 벡터로서 사용하는 경우, 목적하는 HCV 뉴클레오타이드 서열을 아데노바이러스 전사/번역 조절 복합체, 예컨대 후기 발현

프로모터 및 3분열(tripartite) 리더 서열에 결찰시킬 수 있다. 그 후 이러한 키메라 유전자를 시험관내 또는 생체내 재조합에 의해 아데노바이러스 계놈에 삽입시킬 수 있다. 바이러스 계놈을 비필수 영역(예컨대, 영역 E1 또는 E3)으로 삽입하면 감염된 숙주에서 생존할 수 있고 HCV 유전자 생성물을 발현할 수 있는 재조합 바이러스를 얻어진다[참고 문헌의 예: Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659(1984)]. 삽입된 HCV 뉴클레오타이드 서열의 효율적인 번역에는 특이적 개시 시그널이 필요할 수도 있다. 이러한 시그널은 ATG 개시 코돈 및 인접 서열을 포함한다.

<144> 그러나, HCV 암호화 서열의 일부분만이 삽입되는 경우, 아마도 ATG 개시 코돈을 비롯하여 외생 번역 조절 시그널이 제공될 수 있다. 또한, 개시 코돈은 전체 삽입체의 번역을 확실히 하기 위해 목적 암호화 서열의 리딩 프레임과 일치하도록 삽입할 수 있다. 이러한 외생 번역 조절 시그널 및 개시 코돈은 그 기원이 다양할 수 있으며, 천연 및 합성된 것일 수 있다. 발현 효율은 적절한 전사 인핸서 요소, 전사 종결서열 등을 포함시켜서 증대시킬 수 있다[참고 문헌의 예: Bittner 등, Methods in Enzymol., 153:516-544(1987)].

<145> 또한, 삽입된 서열의 발현을 조절하고, 원하는 특이적인 방식으로 유전자 생성물을 변형 및 프로세싱하는 숙주 세포주를 선택할 수 있다. 단백질 생성물의 이러한 변형(예, 글리코실화) 및 프로세싱(예, 절단)은 단백질의 기능에 있어서 중요한 것이다. 서로 다른 숙주 세포는 단백질 및 유전자 생성물의 번역 후 프로세싱 및 변형을 위한 특징적이고 특이적인 메카니즘을 보유한다. 발현된 이종 단백질의 정확한 변형 및 프로세싱을 보장하도록 적절한 세포주 또는 숙주 시스템을 선택할 수 있다. 이 목적을 위해, 1차 전사체의 적절한 프로세싱, 유전자 생성물의 글리코실화 및 인산화를 위한 세포 소기관을 보유하는 진핵생물 숙주 세포를 사용할 수 있다. 이러한 포유동물 숙주 세포의 비제한적인 예로는 CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3 및 WI38이 있다.

<146> 장기간의 고수율 재조합 단백질 생산을 위해서는 안정한 발현이 바람직하다. 예를 들어, 전술한 HCV 웨티드를 안정하게 발현하는 세포주를 조작할 수 있다. 바이러스 복제 기점을 포함하는 발현 벡터를 사용하는 것보다는 숙주 세포를 적절한 발현 조절 요소(예컨대, 프로모터, 인핸서 서열, 전자 종결서열, 폴리아데닐화 부위 등) 및 선별 마커에 의해 제어된 DNA로 형질전환시킬 수 있다. 이종 DNA의 도입 후, 조작된 세포를 농축 배지에서 1~2 일간 배양하고 나서, 배지를 선별 배지로 교환한다. 재조합 플라스미드 내의 선별 마커는 선별에 대한 내성을 부여하여, 세포가 그 플라스미드를 자신의 염색체에 안정하게 통합시켜 성장하게 함으로써 성장점을 형성하게 되며, 이를 클로닝하여 세포주로 증폭시킨다. 이 방법은 HCV 유전자 생성물을 발현하는 세포주를 조작하는 데 편리하게 이용된다.

<147> 허파스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제[Wigler 등, Cell 11:223(1977)], 하이포크산틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제[Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026(1962)] 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제[Lowy 등, Cell 22:817(1980)]를 비롯하여 다수의 선별 시스템을 이용할 수 있으며, 유전자들은 각각 tk⁻, hgprt⁻ 또는 aprt⁻ 세포에서 이용될 수 있다. 또한, 하기 유전자에 대한 선별의 기초로서 항대사물질 내성을 이용할 수 있다: dhfr; 이는 메토트렉세이트에 대한 내성을 부여한다[Wigler 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567(1980); O'Hare 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527(1981)]; gpt, 이는 미코페놀산에 대한 내성을 부여한다[Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072(1981)]; neo, 이는 아미노글리코시드 G-418에 대한 내성을 부여한다[Colberre-Garapin 등, J. Mol. Biol. 150:1(1981)]; 및 hygro, 이는 하이그로마이신에 대한 내성을 부여한다[Santerre 등, Gene 30:147(1984)].

<148> 대안으로, 발현되는 융합 단백질에 특이적인 항체를 이용함으로써 임의의 융합 단백질을 쉽게 정제할 수 있다. 예를 들어, Janknecht 등에 의해 기술된 시스템은 인간 세포주에서 발현되는 비변성 융합 단백질의 즉석 정제를 가능하게 한다[Janknecht 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8972-8976(1991)]. 이 시스템에서는, 목적 유전자를 백시니아 재조합 플라스미드에 서브클로닝하여, 유전자의 오픈 리딩 프레임이 6개의 히스티딘 잔기로 이루어진 아미노 말단 태그에 번역 가능하게 융합되도록 한다. 재조합 백시니아 바이러스에 감염된 세포로부터의 추출물을 Ni²⁺ 니트릴로아세트산-아가로스 컬럼 상에 로딩하고, 이미다졸-함유 완충액을 사용하여 히스티딘-태그 단백질을 선택적으로 용리시킨다. 하기 실시예에서는 본 발명의 핵산에 의해 암호화된 HCV 웨티드를 발현하는데 이용된 방법에 대해 설명한다.

실시예 13

<150> NS3/4A 융합 단백질, 이의 절두형 및 돌연변이형의 특성을 규명하기 위해, 실시예 6에 기술된 벡터 작제물을 생체내에서 전사 및 번역시키고, 생성된 폴리펩티드를 나트륨 도데실 살레이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE)을 통해 시각화하였다. 시험관내 전사 및 번역은 T7이 결합된 망상적혈구 용해물 시스템(프로메가,

위스콘신주 매디슨 소재)을 사용하여 제조업자의 지시에 따라 수행하였다. 발현 작제물의 모든 시험관내 번역 반응은 35 S-표지 메티오닌(아미 sham 인터내셔널, Plc, 영국 버킹엄셔 소재)을 사용하여 30°C에서 수행하였다. 표지된 단백질은 12% SDS-PAGE 겔 상에서 분리하고, X-선 필름(Hyper Film-MP, 아미 sham)에 6~18시간 동안 노출시켜서 시각화하였다.

<151> 시험관내 분석 결과 모든 단백질이 그 개개의 발현 작제물로부터 다량 발현되었음이 확인되었다. rNS3 작제물 (NS3-pVAX 벡터)은 약 61 kDa의 단일 웨პ티드를 생성한 반면, TPT 작제물(NS3/4A-TPT-pVAX) 및 RGT 작제물 (NS3/4A-RGT-pVAX)은 약 67 kDa의 단일 폴리웨პ티드를 생성하였으며, 이는 NS3/4A-pVAX 작제물로부터 생성된 절단되지 않은 NS3/4A 웨პ티드의 분자량과 동일한 것이다. 발현된 NS3/4A 웨პ티드로부터 생성된 절단된 생성물은 약 61 kDa였으며, 이는 NS3-pVAX 벡터로부터 생성된 rNS3와 크기가 동일하였다. 이러한 결과는 발현 작제물이 기능을 나타내었고, NS3/4A 작제물은 효소 활성이 있으며, rNS3는 예상 크기의 웨პ티드를 생성하였고, TPT 및 RGT 돌연변이는 NS3-NS4A 접합점에서의 절단을 완전히 파괴하였음을 입증하는 것이었다.

<152> 본 발명의 HCV 핵산 및 웨პ티드를 포함하는 서열, 작제물, 벡터, 클론 및 기타 물질은 농축된 형태이거나 분리된 형태일 수 있다. 본 명세서에서 사용된 "농축된(enriched)"이란 용어는 물질의 농도가 자연 상태의 농도의 약 2, 5, 10, 100, 또는 1000배 이상인 것을 의미하며, 예를 들어 유용하게는 0.01 중량%, 바람직하게는 약 0.1 중량% 이상인 것을 의미한다. 약 0.5 중량%, 1 중량%, 5 중량%, 10 중량% 및 20 중량%의 농축 제제 역시 고려될 수 있다. "분리된"이란 용어는 물질이 원래 환경(예컨대, 자연 발생적인 것이라면 자연 환경)으로부터 제거될 것을 요한다. 예를 들어, 살아있는 동물에 존재하는 자연 발생적 폴리뉴클레오타이드는 분리된 상태가 아니지만, 자연계에 공존하는 물질의 일부 또는 전부로부터 격리시킨 동일한 폴리웨პ티드는 분리된 상태이다. 서열은 정제된 형태로 존재하는 것이 유용할 수 있다. "정제된"이란 용어는 절대 순도를 요하지는 않으며, 상대적 개념으로 사용된 것이다. 분리된 단백질은 통상적으로, 예를 들어 전기영동 결과가 코마시 염색법에 의해 균질한 상태로 확인될 정도로 정제된다. 출발 물질 또는 천연 물질을 적어도 1배 이상, 바람직하게는 2~3배, 보다 바람직하게는 4배 또는 5배 정도로 정제하는 것은 분명히 포함된다.

<153> 본 발명의 HCV 유전자 생성물을 식물, 곤충 및 동물에서 발현시켜서 형질전환 생물체를 생성할 수도 있다. HCV 웨პ티드를 보유하는 바람직한 형질전환 식물체로는 아라비돕시스(*Arabidopsis*), 옥수수 및 클라마이도모나스(*Chlamydomonas*)가 있다. HCV 웨პ티드를 보유하는 바람직한 곤충 시스템의 비제한적인 예로는 D. 멜라노개스터 (*D. melanogaster*) 및 C. 엘레간스(*C. elegans*)가 있다. 비제한적인 예로서 양서류, 과충류, 조류, 마우스, 햄스터, 래트, 토끼, 기니 피그, 돼지, 소형 돼지, 염소, 개, 고양이 및 비인간 영장류, 예컨대 벼문, 원숭이 및 침팬지를 비롯하여 임의의 종의 동물을 본 발명의 HCV 분자를 보유하는 형질전환 동물을 생성하는 데 이용할 수 있다. 이러한 형질전환 생물체는 바람직하게는 본 발명의 HCV 웨პ티드의 생식 세포 전달을 나타낸다.

<154> 형질전환 동물의 기초 혈통을 구축하기 위해 동물에 HCV 트랜스유전자를 도입하거나, 또는 기존의 HCV 유전자를 넉 아웃시키거나 대체하는 데에는 당업계에 공지된 임의의 기법이 바람직하게 이용된다. 이러한 기법의 비제한적인 예로는 전핵 마이크로인젝션[Hoppe, P.C. 및 Wagner, T.E., 1989, 미국 특허 제4,873,191호]; 레트로바이러스를 매개로 생식 세포에 유전자를 전달하는 방법[Van der Putten 등, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82:6148-6152(1985)]; 배아 줄기 세포로의 유전자 표적화[Thompson 등, Cell 56:313-321(1989)]; 배아의 일렉트로포레이션[Lo, Mol. Cell. Biol. 3:1803-1814(1983)]; 및 정자를 매개로 한 유전자 전달[Lavitano 등, Cell 57:717-723(1989); Gordon, Transgenic Animals, Int. Rev. Cytol. 115:171-229(1989)]이 있다. 하기 섹션에서는 본 발명의 HCV 웨პ티드와 상호작용하는 항체의 제조에 대해 설명한다.

항-HCV 항체

<156> HCV 웨პ티드의 합성 또는 발현 및 분리 또는 정제 후에, 분리된 또는 정제된 웨პ티드를 항체를 생성하는 데 사용할 수 있다. 문맥에 따라서 "항체"란 용어는 폴리클로널 항체, 모노클로널 항체, 키메릭 항체, 단일 쇄 항체, Fab 단편 및 Fab 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편들을 포함할 수 있다. HCV 웨პ티드를 인식하는 항체는 비제한적인 예로서 생물공학적 용도, 치료/예방 용도 및 진단 용도를 비롯하여 다수의 용도를 사용될 수 있다.

<157> 항체의 생산을 위해서는, 염소, 토끼, 래트, 마우스 및 인간 등의 각종 숙주에 HCV 웨პ티드를 주사하여 면역화시킬 수 있다. 숙주의 종에 따라서 다양한 면역 보강제를 사용하여 면역 반응을 증대시킬 수 있다. 이러한 면역 보강제로는 리바비린, 프로인트, 미네랄 겔, 예컨대 수산화알루미늄, 및 표면 활성 성분, 예컨대 리소레시틴, 플루로닉 폴리올, 다중음이온, 웨პ티드, 오일 에멀젼, 키홀 림펫 해모시아닌 및 디니트로페놀을 들 수 있으며, 이에 국한되는 것은 아니다. BCG(바실러스 칼랫-구에린) 및 코리네박테리움 파르벰(*Corynebacterium parvum*) 역

시 유효하게 사용될 수 있는 면역 보강제이다.

<158> 특이적 항체를 유도하는 데 사용된 웨티드는 4개 이상의 아미노산, 바람직하게는 최소한 10~15개의 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 한 방법의 예로, NS3/4A의 단편을 암호화하는 아미노산의 짧은 스트레치를 키홀 럼펫 혜모시아닌 등의 다른 단백질에 융합시켜서 항체가 키메라 분자에 대해 생성되도록 한다. 또한, 리바비린 및 NS3/4A(서열 번호 17), 아미노산 길이가 최소한 4, 6, 8, 10, 12, 15 또는 20개인 이의 단편, 이를 분자 중 하나 이상을 암호화하는 핵산을 함유하는 조성물을 동물에게 투여한다. HCV 웨티드에 상응하는 합성 3-머, 10-머, 및 15-머 웨티드를 마우스에 주사함으로써 HCV를 특이적으로 인식할 수 있는 항체를 생성할 수 있지만, 전술한 바와 같이 제조한 재조합 HCV 웨티드를 사용하여 더 다양한 종류의 항체를 생성할 수 있다.

<159> HCV 웨티드에 대한 항체를 생성하기 위해, 형질감염 또는 형질전환된 세포로부터 실질적으로 순수한 웨티드를 분리한다. 최종 제조물 내의 웨티드의 농도를, 예컨대 아미콘 필터 장치 상에서 농축시켜서 수 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 조정한다. 그 후 아래와 같이 목적 웨티드에 대한 모노클로널 또는 폴리클로널 항체를 제조할 수 있다.

<160> HCV 웨티드에 대한 모노클로널 항체는 배양시 연속 세포주에 의해 항체 분자의 생성을 제공하는 임의의 기법을 이용하여 제조할 수 있다. 이러한 기법에는 Koehler 및 Milstein의 문헌[Nature 256:495-497(1975)]에서 처음 개시된 하이브리도마 기법, 인간 B-세포 하이브리도마 기법[Kosbor 등, Immunol. Today 4:72(1983); Cote 등, Proc. Natl. Acad. Sci. 80:2026-2030(1983)] 및 EBV 하이브리도마 기법[Coie 등, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss Inc., New York N.Y., pp 77-96(1985)]을 들 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 또한, "키메라 항체"의 생산을 위해 개발된 기법, 적절한 항원 특이성과 생물학적 활성을 갖는 분자를 얻기 위해 마우스 항체 유전자를 인간 항체 유전자에 스플라이싱하는 기법을 이용할 수도 있다[Morrison 등, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-6855(1984); Neuberger 등, Nature 312:604-608(1984); Takeda 등, Nature 314:452-454(1985)]. 대안으로, 단일 쇄 항체의 생산에 대해 기술된 기법(미국 특허 제4,946,778호)을 HCV-특이적 단일 쇄 항체를 생산하는 데 이용할 수 있다. Orlandi 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. 86:3833-3837(1989)] 및 Winter G. 및 Milstein C의 문헌[Nature 349:293-299(1991)]에 개시된 바와 같이, 항체는 럼프 구 군집에서의 생체내 생산을 유도하거나, 재조합 면역글로불린 라이브러리 또는 고도로 특이적인 결합 반응물 질류를 스크리닝함으로써 생산할 수도 있다.

<161> HCV 웨티드에 대한 특이적 결합 부위를 포함하는 항체 단편 역시 생성할 수 있다. 예를 들어, 이러한 단편의 비제한적인 예로는 항체 분자의 웨신 분해에 의해 생성될 수 있는 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 단편 및 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 단편의 이황화 다리를 환원시킴으로써 생성될 수 있는 Fab 단편을 들 수 있다. 또는, Fab 발현 라이브러리는 목적하는 특이성을 갖는 모노클로널 Fab 단편을 신속하고 쉽게 확인할 수 있도록 하기 위해 제작될 수 있다[Huse W.D. 등, Science 256:1275-1281(1989)].

<162> 한 방법으로서, HCV 웨티드에 대한 모노클로널 항체를 다음과 같이 제조한다. 요약하면, 선별된 단백질 또는 이로부터 유래된 웨티드 몇 마이크로그램을 수주일에 걸쳐서 마우스에 반복적으로 접종한다. 그 후 마우스를 죽이고, 비장의 항체 생산 세포를 분리한다. 폴리에틸렌 글리콜의 존재 하에 마우스 골수종 세포와 비장 세포를 융합시키고, 아미노프테린을 포함하는 선별 배지(HAT 배지) 상에서 세포를 성장시켜 과량의 비융합 세포를 파괴한다. 성공적으로 융합된 세포를 희석시키고, 희석물 분약을 미량역가 플레이트의 웰에 넣고 거기에서 배양을 계속한다. Engvall, E. 등의 문헌[Meth. Enzymol. 70:419(1980)]에 처음 개시된 ELISA 등의 면역분석 방법 및 이 방법의 변형 방법에 의해 웰의 상청액 중에서 항체를 검출함으로써 항체-생산 클론을 확인한다. 선별된 양성 클론을 증폭시키고, 이의 모노클로널 항체 생성물을 사용 목적으로 회수할 수 있다. 모노클로널 항체 생산에 대한 상세한 절차는 Davis 등의 문헌[Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, New York, 섹션 21-2]에 기술되어 있다.

<163> 단일 단백질의 이종 애피토프에 대한 항체를 함유하는 폴리클로널 항혈청은 전술한 것으로부터 유래된 발현된 단백질 또는 웨티드를 적절한 동물에 접종함으로써 제조할 수 있으며, 면역원성을 증강시키기 위해 이를 변형시킬 수도 있고 변형시키지 않을 수도 있다. 효율적인 폴리클로널 항체 생산은 항원 또는 숙주 종 둘 다와 관련된 다수의 요인에 의해 영향을 받는다. 예를 들어, 작은 분자들은 다른 것보다 면역원성이 더 적은 경향이 있으며, 캐리어 및 면역 보강제의 사용이 필요할 수 있다. 또한, 숙주 동물은 접종 부위와 투여량에 따른 반응이 다양하며, 부적절한 양이나 과량의 항원은 항혈청의 역가를 떨어뜨리게 된다. 소량(ng 수준)의 항원을 여러 부위에 피내 주사하는 것이 가장 확실한 것으로 보인다. 토끼에 대한 면역화 프로토콜에 대해서는 Vaitukaitis 등의 문헌[J. Clin. Endocrinol. Metab. 33:988-991(1971)]에서 찾아볼 수 있다.

<164> 정기적으로 추가 접종을 실시하고, 반정량적으로, 예컨대 아가에서 알고 있는 농도의 항원에 대해 이중 면역학산을 실시하여 측정한 항체 역가가 떨어지기 시작할 때 항혈청을 회수한다. 이에 대해서는, 예를 들어 Ouchterlony, O. 등의 문헌[*Handbook of Experimental Immunology*, 19장, D. Wier(ed) Blackwell(1973)]을 참조로 할 수 있다. 항체의 안정기 농도는 일반적으로 혈청 1 ml당 0.1~0.2 mg(약 12 μM)이다. 항원에 대한 항혈청의 친화력을, 예컨대 Fisher, D.의 문헌[*Manual of Clinical Immunology*, 42장, 2판(Rose and Friedman, Eds.) Amer. Soc. For Microbiol., Washington, D.C.(1980)]에 기술된 바와 같이 경쟁적 결합 곡선을 작성하여 결정한다. 어느 프로토콜에 따라 제조된 항체 제조물이라도 생물학적 샘플 중의 항원-보유 물질의 농도를 측정하는 정량적 면역분석에 유용하며, 이들은 또한 반정량적으로 또는 정성적으로(예컨대, 생물학적 샘플 중의 HCV의 존재를 확인하기 위한 진단적 목적으로) 사용되기도 한다. 하기 섹션에서는 진단 구체예 몇 가지를 더 상세히 설명한다.

진단 구체예

<166> 일반적으로, 본 발명의 진단법은 핵산을 이용하는 분석인지 단백질을 이용한 분석인지에 따라 분류된다. 일부 진단적 분석은 환자로부터 얻은 샘플 중의 본 발명의 HCV 핵산 서열의 존재 또는 부재를 검출하지만, 다른 분석은 본 발명의 HCV 웨티드가 환자로부터 얻은 생물학적 샘플 중에 존재하는지를 확인하고자 하는 것이다. 또한, HCV의 신속한 검출 및 확인을 가능하게 하는 본 명세서에 기술된 시약 및 방법을 포함시킨 키트의 제조 역시 본 발명의 구체예가 된다. 이러한 진단 키트는, 예를 들어 HCV를 특이적으로 검출하는 본 발명의 핵산 프로브 또는 항체를 포함한다. 이러한 키트의 검출 성분은 일반적으로 하기 시약 중 하나 이상과 함께 제공된다. DNA, RNA 또는 단백질을 흡착 또는 결합시킬 수 있는 지지체가 종종 제공된다. 유용한 지지체로는 니트로셀룰로스 멤브레인, 나일론 멤브레인 또는 양전하 치환기의 어레이를 보유함으로써 특성화될 수 있는 유도체화된 나일론 멤브레인을 포함한다. 1종 이상의 제한 효소, 조절 시약, 완충액, 증폭 효소 및 비인간 폴리뉴클레오타이드 유사 송아지-흉선 DNA 또는 연어 정자 DNA를 이들 키트에 제공할 수 있다.

<167> 유용한 핵산 기초 진단법에는 직접 DNA 시퀀싱, 서든 블롯 분석, 닷 블롯 분석, 핵산 증폭 및 이러한 방법의 병용법을 들 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 이러한 분석을 위한 출발점은 HCV에 감염된 것으로 의심되는 환자 또는 HCV 감염 위험이 있는 환자로부터 얻은 생물학적 샘플로부터 분리 또는 정제된 핵산이다. 이 샘플로부터 핵산을 추출하고, 본 발명의 HCV 핵산 서열[예컨대, NS3/4A(서열 번호 16)]에 인접한 영역에 상응하는 프라이머를 사용하여 RT-PCR 및/또는 DNA 증폭에 의해 핵산을 증폭시킬 수 있다.

<168> 몇몇 구체예에서는, HCV 서열과 특이적으로 하이브리드화하는 핵산 프로브를 정렬된 어레이로 지지체 상에 부착시키는데, 이때 핵산 프로브를 서로 중첩되지 않도록 지지체의 서로 다른 영역에 부착시킨다. 바람직하게는, 이러한 정렬된 어레이는, 프로브의 개별 위치를 기록하고, 분석 절차의 일부로서 그 기록을 호출할 수 있는 "어드레서블(addressable)"이 되도록 디자인한다. 이러한 프로브를 지지체의 서로 다른 알고 있는 지점에 결합시킨다. 각 핵산 프로브의 정확한 위치를 알고 있기 때문에 이들 "어드레서블" 어레이가 결합 분석에서 특히 유용하게 된다. 그 후 여러 생물학적 샘플 제제로부터의 핵산을 통상적인 방법(예컨대, 방사능 또는 형광)에 의해 표지하고, 표지된 샘플을 하이브리드화가 일어날 수 있는 조건하에 상기 어레이에 적용한다.

<169> 샘플 중의 핵산이 어레이 상의 프로브에 하이브리드화한다면, 하이브리드의 위치에 상응하는 지지체 상의 지점에서 시그널이 검출될 것이다. 각 표지된 샘플의 실체를 알고 있고, 표지된 샘플이 적용된 지지체 상의 영역을 알고 있기 때문에, 다행 변이체의 존재 확인은 신속하게 결정될 수 있다. 이러한 방법은 고처리량 진단 분석 또는 검출 분석 분야의 기술자에게 공지되어 있는 기법을 이용하면 쉽게 자동화된다.

<170> 또한, 앞서 제시한 것과 반대 방법을 이용할 수도 있다. 생물학적 샘플 중에 존재하는 핵산을 지지체 상에 배치하여 어드레서블 어레이를 형성할 수 있다. 샘플은 지지체 상의 알고 있는 지점에 중첩되지 않도록 배치하는 것이 바람직하다. 각 샘플 중의 HCV 핵산의 존재는, 생물학적 샘플이 배치된 지점에 상응하는 어레이 상의 위치에 HCV 웨티드를 암호화하는 핵산에 대해 상보 서열인 표지된 핵산 프로브를 적용함으로써 결정한다. 생물학적 샘플의 실체 및 어레이 상의 그 위치를 알고 있기 때문에, HCV에 감염된 환자의 확인은 신속하게 결정될 수 있다. 이러한 방법 역시 고처리량 진단 분석 분야의 기술자에게 공지되어 있는 기법을 이용하면 쉽게 자동화된다.

<171> 당업계에 공지된 임의의 어드레서블 어레이 기법을 이용할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 어레이의 한 특정 구체예가 Genechips™로서 알려져 있으며, 이는 미국 특허 제5,143,854호; PCT 공개 공보 WO 90/15070 및 92/10092에 개괄적으로 기술되어 있다. 이러한 어레이는 일반적으로 기계적 합성 방법 또는 광 유도 합성 방법을 이용하여 제조되며, 이 방법은 포토리소그래피 및 고체상 올리고뉴클레오타이드 합성의 병용법을 포함한다[Fodor 등,

Science, 251:767-777(1991)]. 고체 지지체 상에 올리고뉴클레오타이드 어레이를 고정시키는 것은 "Very Large Scale Immobilized Polymer Synthesis"(VLSPISTM)로서 일반적으로 알려진 기법의 개발에 의해 가능하게 되었으며, 이 기법에서는 통상 프로브를 칩의 고체 표면 상에 고밀도 어레이로 고정시킨다. VLSPISTM 기법의 예는 미국 특허 제5,143,854호 및 제5,412,087호 및 PCT 공개 공보 WO 90/15070, WO 92/10092 및 WO 95/11995에 제시되어 있으며, 이 문헌들은 광 유도 합성 기법 등의 기법을 통해 올리고뉴클레오타이드 어레이를 형성하는 방법에 대해 설명한다. 고체 지지체 상에 고정된 뉴클레오타이드의 어레이를 제공하기 위한 목적의 방법을 고안하는 데 있어서, 하이브리드화 패턴 및 진단 정보를 최대화하기 위한 시도로 칩 상에 올리고뉴클레오타이드 어레이를 정렬 및 배치하기 위한 추가의 프리젠테이션 기법을 개발하였다. 이러한 프리젠테이션 기법의 예는 PCT 공개 공보 WO 94/12305, WO 94/11530, WO 97/29212, 및 WO 97/31256에 개시되어 있다.

<172> 다양한 표지 및 접합 기법이 당업자에게 공지되어 있으며, 이는 다양한 핵산 분석에 사용될 수 있다. 올리고표지법, 닉(nick) 번역, 말단 표지법 또는 표지된 뉴클레오타이드를 사용하는 PCR 증폭을 비롯하여 하이브리드화 또는 PCR을 위한 표지된 핵산을 제조하기 위한 여러 방법이 존재한다. 대안으로, HCV 웨პ티드를 암호화하는 핵산을 mRNA 프로브의 생성을 위한 벡터에 클로닝할 수 있다. 이러한 벡터들은 당업계에 공지되어 있으며, 시판되기도 하고, 적절한 RNA 폴리머라제, 예컨대 T7, T3 또는 SP6 및 표지된 뉴클레오타이드를 첨가하여 시험판내에서 RNA 프로브를 합성하는 데 이용할 수 있다. 파마시아 바이오테크(뉴저지주 피스카타웨이 소재), 프로메가(위스콘신주 매디슨 소재) 및 U.S. 바이오케미칼 코포레이션(오하이오주 클리브랜드 소재) 등의 다수의 회사가 상기 절차를 위한 상업용 키트 및 프로토콜을 공급한다. 적절한 리포터 분자 또는 표지로는 방사성 핵종, 효소, 형광, 화학발광 또는 색원체는 물론, 기질, 보조 인자, 억제제, 자기 입자 등을 포함된다.

<173> 환자로부터 얻은 단백질 샘플 중의 HCV 웨პ티드의 존재 역시 통상적인 분석 및 본 명세서에 개시된 구체예에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 HCV 웨პ티드와 면역반응성인 항체를 사용하여 HCV 감염의 존재에 대해 생물학적 샘플을 스크리닝할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 HCV 웨პ티드에 반응성인 항체를 사용하여 생물학적 샘플로부터 얻은 본 발명의 HCV 웨პ티드를 면역침전시키거나, 또는 웨스턴 또는 이뮤노블롯 상에서 생물학적 샘플로부터 얻은 단백질과 반응시킨다. 바람직한 진단 구체예는 또한 효소-결합 면역흡착분석(ELISA), 방사선면역분석(RIA), 면역방사계측법(IRMA) 및 면역효소분석(IEMA)을 포함하며, 여기에는 본 발명에 개시된 HCV 웨პ티드에 대해 특이적인 모노클로널 및/또는 폴리클로널 항체를 이용하는 샌드위치 분석도 포함된다. 대표적인 샌드위치 분석에 대해서는 David 등의 미국 특허 제4,376,110호 및 4,486,530호에 기술되어 있다. 다른 구체예는 미국 특허 제5,290,678호; 제5,604,105호; 제5,710,008호; 제5,744,358호 및 제5,747,274호에 개시된 면역-스트립 기법의 양태를 이용한다.

<174> 또 다른 바람직한 단백질계 진단법에서는, 전술한 항체를 정렬된 어레이로 지지체 상에 부착시키는데, 이때 다수의 항체가 서로 중첩되지 않도록 지지체 상의 서로 다른 영역에 부착시킨다. 핵산을 이용한 어레이에서와 마찬가지로, 단백질을 이용한 어레이는, 서로 다른 위치를 기록하고, 분석 절차의 일부로서 그 기록을 호출할 수 있도록 "어드레서블" 어레이가 되도록 디자인된 정렬된 어레이이다. 이러한 프로브를 지지체 상의 알고 있는 서로 다른 위치에 결합시킨다. 각 프로브의 정확한 위치를 알고 있기 때문에 이러한 "어드레서블" 어레이는 특히 결합 분석에 유용하게 된다. 예를 들어, 어드레서블 어레이는 생물학적 샘플 중에 존재하는 HCV 웨პ티드를 특이적으로 인식하는 다수의 항체 프로브가 결합되어 있는 여러 영역을 갖는 지지체를 포함할 수 있고, 그 안에서 확인된 HCV의 아이소타입을 구별할 수 있다.

<175> 한 방법으로서, 생물학적 샘플로부터 단백질을 입수한 다음, 통상적인 방법(예컨대, 방사능, 색채 또는 형광)에 의해 표지한다. 그 후 표지된 샘플을 결합이 가능한 조건에서 어레이에 적용한다. 샘플 중의 단백질이 어레이 상의 항체 프로브에 결합한다면, 항체-단백질 복합체의 위치에 해당하는 지지체 상의 지점에서 시그널이 검출될 것이다. 각 표지된 샘플의 실체를 알고 있고, 표지된 샘플이 적용된 지지체 상의 영역을 알고 있기 때문에, 존재의 확인, 농도 및/또는 발현 수준을 신속히 결정할 수 있다. 즉, 알고 있는 농도의 표지된 HCV 웨პ티드 스탠더드를 사용함으로써 연구자들은 테스트 샘플 중의 특정 웨პ티드의 단백질 농도를 정확히 측정할 수 있으며, 또한 HCV 웨პ티드의 발현 수준을 평가할 수 있다. HCV 웨პ티드의 농도 또는 발현 수준을 보다 정확히 측정하기 위해 통상적인 농도 측정법을 이용할 수 있다. 이러한 방법은 고처리량 진단 분석 분야의 기술자에게 공지된 기법을 이용하면 쉽게 자동화된다.

<176> 또 다른 구체예에서, 전술한 방법과 반대 방법을 이용할 수 있다. 생물학적 샘플 중에 존재하는 단백질을 지지체 상에 배치하여 어드레서블 어레이를 형성할 수 있다. 바람직하게는 단백질 샘플은 지지체 상에 서로 중첩되지 않도록 알고 있는 지점에 배치한다. 그 후 HCV 웨პ티드에 특이적인 에피토프를 인식하는 표지된 항체 프로브

를 적용함으로써 각 샘플 중의 HCV 웨티드의 존재를 확인한다. 생물학적 샘플의 실체와 어레이 상의 그 지점을 알고 있기 때문에, HCV 웨티드의 존재의 확인, 농도 및/또는 발현을 신속히 결정할 수 있다.

<177> 즉, 알고 있는 농도의 표지된 HCV 웨티드 스탠더드를 사용함으로써, 연구자들은 샘플 중의 웨티드 농도를 정확히 측정할 수 있고, 이 정보로부터 웨티드의 발현 수준을 평가할 수 있다. 또한, 통상적인 농도 측정법을 이용하여 HCV 웨티드의 농도 또는 발현 수준을 보다 정확히 측정할 수 있다. 이러한 방법 역시 고처리량 진단 분석 분야의 기술자에게 공지된 기법을 이용하면 쉽게 자동화된다. 앞서 상세히 설명한 바와 같이, 당업계에 공지된 임의의 어드레서를 어레이 기법을 이용할 수 있다. 하기 섹션에서는 본 발명의 HCV 핵산 또는 HCV 웨티드 중 하나 이상의 함유할 수 있는 조성을 중 몇 가지에 대해 설명한다.

<178> 본 발명의 HCV 핵산 또는 웨티드를 함유하는 조성물

<179> 몇몇 구체에는 지지체에 결합된 HCV 핵산 또는 웨티드 중 하나 이상을 포함한다. 바람직하게는 이러한 지지체는 다량체를 형성하기 위해 제조된다. 이러한 다량체는 HCV 웨티드 또는 핵산을 분자에 대한 충분한 친화력이 얹어지는 형태 또는 방식이 되도록 한다. HCV 핵산 또는 웨티드를 지닌 다량체는 목적 분자를 고분자 지지체 상에 결합시킴으로써 얻을 수 있다. "지지체"란 캐리어, 단백질, 수지, 세포 막, 또는 이러한 분자들을 결합 또는 고정시키는 데 사용되는 임의의 고분자 구조를 칭할 수 있다. 고체 지지체의 비제한적인 예로는 반응 트레이의 웰의 벽, 시험관, 폴리스티렌 비이드, 자기 비이드, 니트로셀룰로스 스트립, 멤브레인, 미립자, 예컨대 라텍스 입자, 동물 세포, Duracyte®, 인공 세포 등이 있다. HCV 핵산 또는 웨티드를 무기 캐리어, 예컨대 산화규소 재료(예컨대, 실리카 젤, 제올라이트, 규조토 또는 아민화된 유리)에, 예를 들어 캐리어 상의 히드록시기, 카르복시기 또는 아미노기 및 반응성 기를 통한 공유 결합에 의해 결합시킬 수도 있다.

<180> 몇몇 다량체에서는, 고분자 지지체는 소수성 비공유 결합에 의해 HCV 핵산 또는 웨티드의 일부분과 상호작용하는 소수성 표면을 가진다. 몇몇 경우, 지지체의 소수성 표면은 플라스틱 또는 소수성 기가 결합되어 있는 임의의 다른 종합체, 예컨대 폴리스티렌, 폴리에틸렌 또는 폴리비닐이다. 또한, HCV 핵산 또는 웨티드는 단백질 및 올리고당류/다당류(예컨대, 셀룰로스, 전분, 글리코겐, 키토산 또는 아민화된 세파로스)를 비롯한 캐리어에 공유 결합시킬 수 있다. 상기한 후자의 다량체에서는 분자 상의 반응성 기, 예컨대 히드록시기 또는 아미노기를 이용하여 캐리어 상의 반응성 기에 결합시켜서 공유 결합을 형성할 수 있다. 그 밖의 다량체는 HCV 핵산 또는 웨티드를 부착시키기 위해 화학적으로 활성화된 다른 반응성 기를 가진 지지체를 포함한다. 예를 들어, 브롬화시아노겐 활성화 매트릭스, 에폭시 활성화 매트릭스, 티오 및 티오프로필 젤, 니트로페닐 클로로포르메이트 및 N-히드록시 숙신이미드 클로로포르메이트 결합, 또는 옥시란 아크릴 지지체가 사용된다(시그마).

<181> 체내에 사용하기 위한(즉, 예방용 또는 치료용) 캐리어는 생리적이고 비독성이어야 하며, 면역 반응성이 없는 것이 바람직하다. 체내에 사용하기 위한 적절한 캐리어에는 폴리-L-리신, 폴리-D, L-알라닌, 리포좀 및 Chromosorb®(존스-맨빌 프로덕츠, 텐버 컴퍼니)가 있다. 리간드 접합된 Chromosorb®(Sybsorb-Pk)는 용혈성 요독증의 예방에 대해 인간에서 테스트되었으며, 부작용을 나타내지 않는 것으로 보고되었다[Amstrong 등, J. Infectious Diseases 171:1042-1045(1995)]. 몇몇 구체예의 경우, 생물체의 체내에서 HCV 핵산 또는 웨티드에 대한 결합 능력을 보유하는 "네이키드(naked)" 캐리어(즉, HCV 핵산 또는 웨티드가 결합되지 않은 것)를 투여한다. 한 방법으로서, 네이키드 캐리어를 HCV 핵산 또는 웨티드와 별도로 투여하고, 생물체의 체내에 이 둘다가 존재하게 되면, 캐리어와 HCV 핵산 또는 웨티드가 다중결합 복합체로 조립되도록 "전구약물형" 요법을 고안한다.

<182> 또한, 링커, 예컨대 HCV 핵산 또는 웨티드와 지지체 사이에 적절한 길이의 링커(예컨대, λ 파지의 가요성 영역을 모방하도록 제작된 " λ 링커")를 삽입함으로써 HCV 웨티드, 하이브리드, 또는 결합 파트너의 가요성을 더욱 증가시켜서 지지체에 의해 부과될 수 있는 임의의 공간적 장애를 극복하는 것도 고려된다. 최적 세포 반응 또는 이의 부족을 정하는 링커의 길이의 결정은 본 명세서에 상세히 설명된 분석에서 다양한 링커를 사용하여 HCV 핵산 또는 웨티드를 스크리닝함으로써 결정할 수 있다.

<183> 한 종류 이상의 HCV 핵산 또는 웨티드를 포함하는 복합 지지체 역시 고려된다. "복합 지지체"는 캐리어, 수지, 또는 2종 이상의 상이한 HCV 핵산 또는 웨티드를 결합 또는 고정시키는 데 사용되는 임의의 고분자 구조일 수 있다. 전술한 바와 같이, HCV 핵산 또는 웨티드와 지지체 사이에 적절한 길이의 λ 링커 등의 링커를 삽입함으로써 분자 내의 가요성을 증가시켜서 발생할 수 있는 임의의 공간적 장애를 극복하는 것도 고려된다. 최적 세포 반응 또는 이의 부족을 정하는 링커의 길이의 결정은 본 명세서에 상세히 설명된 분석에서 다양한 링커를 사용하여 HCV 핵산 또는 웨티드를 스크리닝함으로써 결정할 수 있다.

<184> 다른 구체예에서는, 전술한 다량체 지지체 및 복합 지지체는 다량체화된 HCV 핵산 또는 웨티드를 결합시켜서 각각 "다량체화된-다량체 지지체"와 "다량체화된-복합 지지체"를 형성할 수 있다. 다량체화된 리간드는, 예컨대 분자생물학의 통상적인 기법을 이용하여 2 이상의 HCV 핵산 또는 웨티드를 직렬로 결합시켜서 얻을 수 있다. HCV 핵산 또는 웨티드의 다량체 형태는, 예를 들어 더 큰 친화력을 갖는 물질을 얻을 수 있는 능력으로 인해 다수의 용도에서 유용하게 사용될 수 있다. 다량체화된 물질을 보완하기 위해 개개의 도메인 사이에 링커 또는 스페이서, 예컨대 가요성 λ 링커를 병입하는 것 역시 몇몇 구체예에서 유용할 수 있다. 예를 들어 단백질 결합 도메인 사이에 적절한 길이의 λ 링커를 삽입하면 분자 내의 가요성을 더욱 증가시켜서 공간적 장애를 극복할 수 있다. 유사하게, 다량체화된 HCV 핵산 또는 웨티드와 지지체 사이에 링커를 삽입하면 가요성을 더욱 증가시키고 지지체에 의해 부과되는 공간적 장애를 제한할 수 있다. 적절한 링커 길이의 결정은 본 명세서에서 상세히 설명한 분석에서 HCV 핵산 또는 웨티드를 스크리닝함으로써 결정할 수 있다.

<185> 본 발명의 구체예는 전술한 바와 같이 유전자 백신을 포함하기도 있다. 이러한 조성물은 리바비린 및 NS3/4A(서열 번호 17), NS3(서열 번호 29), 또는 돌연변이(예컨대, 서열 번호 30-32 및 43-49) 또는 이의 단편(예컨대, 서열 번호 25-27 및 33-42)을 암호화하는 핵산을 함유한다. 하기 실시예에서는 인간에게 사용하기에 적합한 유전자 백신의 제조에 대해 설명한다.

<186> 실시예 14

<187> HCV 발현 플라스미드는 NS3/4A 웨티드를 발현하도록 조작된다. NS3/4A-pVAX의 NS3/4A 암호화 서열을 EcoRI 및 XbaI으로 분해한 후, 분리된 단편을 플라스미드 A에 삽입시켜서 이것이 CMV 프로모터와 RSV 인핸서 요소의 전사제어 범위에 들도록 한다(Pachuk 등의 미국 특허 제6,235,888호 참조). 플라스미드 골격 A는 그 길이가 3969 염기쌍이고, 이 플라스미드는 E. 콜라이에서의 복제를 위한 PBR 복제 기점 및 가나마이신 내성 유전자를 보유하고 있다. NS3/4A와 같은 삽입체를 폴리링커 영역에 클로닝하면, 이는 삽입체를 프로모터와 폴리아데닐화 시그널 사이에 배치하여 작동가능하게 결합시킨다. 클로닝된 삽입체는 CMV 프로모터와 RSV 인핸서 요소의 제어 범위에 든다. 클로닝 부위의 바로 옆 3'쪽에 위치한 SV40 폴리 A 시그널의 존재에 의해 폴리아데닐화 시그널이 제공된다. 그 후 rNS3/4A 작제물 500 µg과 리바비린 1 mg을 혼합하여 NS3/4A 함유 백신을 제조한다.

<188> 상기 백신 조성물은 포유동물(예컨대, 마우스 또는 토끼)에서 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있거나, 또는 바람직하게는 HCV 바이러스에 만성 감염된 인간에게서 항체를 생성하기 위해 근육 주사할 수 있다. 역시 수용체에게는 바람직하게는 4주 간격으로 혼합물을 3회 추가 접종한다. 3차 접종시까지 HCV에 특이적인 항체의 역가는 현저히 증가할 것이다. 또한, 이 시점에서, 상기 피험체는 NS3에 대한 항체 및 T-세포 매개 면역 반응의 증가를 나타낼 것이며, 이는 EIA로 검출시 NS3 특이적 항체의 증가된 분획 및 RT-PCR로 검출시 바이러스 로드의 감소에 의해 입증이 가능하다.

<189> 구체예는 또한 NS3/4A 융합 단백질 또는 이를 분자를 암호화하는 핵산을 포함한다. 예를 들어, 재조합 단백질의 생산 및 정제는 보조 아미노산을 첨가하여 "태그"를 형성함으로써 촉진할 수 있다. 이러한 태그의 비제한적인 예로는 His-6, Flag, Myc 및 GST가 있다. 태그는 C-말단, N-말단에 부가할 수 있거나, 또는 NS3/4A 아미노산 서열 내에 부가할 수 있다. 또 다른 구체예는 아미노 또는 카르복시 말단이 절단되거나, 내부 결실이 있거나, 또는 추가의 폴리웨티드 서열이 아미노 또는 카르복시 말단, 또는 내부에 부가된 NS3/4A 융합 단백질을 포함한다. 다른 구체예는 NS3/4A 단백질 분해 절단 부위의 잔기가 치환된 NS3/4A 융합 단백질, 또는 이의 절두형 또는 돌연변이형을 포함한다. 상기 치환의 비제한적인 예로는 P1' 부위가 Ser, Gly, 또는 Pro이거나, P1 지점이 Arg이거나, 또는 P8~P4' 서열이 Ser-Ala-Asp-Leu-Glu-Val-Val-Thr-Ser-Thr-Trp-Val(서열 번호 28)인 서열이 있다.

<190> 다른 구체예는 NS3에 대한 증강된 면역 반응을 유발할 수 있는 NS3/4A 융합 단백질, 또는 이의 절두형 또는 변형을 포함하는 면역원에 관한 것이다. 면역원은 실질적으로 정제된 형태로 제공될 수 있는데, 실질적으로 정제된 형태란 면역원에 다른 단백질, 지질, 탄수화물 또는 자연 상태에서 결합되어 있는 기타 화합물이 실질적으로 없도록 했음을 의미한다. 구체예는 또한 NS3/4A 융합 단백질(서열 번호 17) 또는 이의 절두형 또는 돌연변이형(예컨대, 서열 번호 29-32 및 43-49) 또는 이의 단편(예컨대, 서열 번호 25-27 및 33-42) 및 면역 보강제, 예컨대 리바비린을 함유하는 백신 조성물을 포함한다. 하기 실시예에서는 NS3/4A 융합 단백질 및 면역 보강제를 함유하는 백신 조성물을 제조하는 한 방법에 대해 설명한다.

<191> 실시예 15

<192> 태깅된 NS3/4A 작제물을 생성하기 위해, NS3/4A-pVAX의 NS3/4A 암호화 서열을 EcoRI 및 XbaI으로 분해하고, 분

리된 단편을 Xpress 벡터(인비트로겐)에 삽입한다. Xpress 벡터를 사용하면 2가 양이온에 대한 친화력이 높은 짧은 N-말단 리더 펩티드를 보유한 재조합 융합 단백질의 생산이 가능하다. 니켈-킬레이트화 수지(인비트로겐)를 사용하여 재조합 단백질을 1 단계로 정제할 수 있으며, 그 후 엔테로키나제를 사용하여 리더를 절단할 수 있다. 바람직한 벡터는 pBlueBacHis2 Xpress이다. pBlueBacHis2 Xpress 벡터는 다중 클로닝 부위, 암피실린 내성 유전자 및 lac Z 유전자를 포함하는 배클로바이러스 발현 벡터이다. 따라서, 분해된 증폭 단편을 pBlueBacHis2 Xpress 벡터로 클로닝하고, 이 벡터로 SF9 세포를 감염시킨다. 그 후 제조업자의 지시에 따라 발현 단백질을 분리하거나 정제한다. 그 후 rNS3/4A 100 μ g과 리바비린 1 mg을 혼합하여 NS3/4A 함유 백신 조성물을 제조한다.

<193> 상기 백신 조성물은 포유동물(예컨대, 마우스 또는 토끼)에서 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있거나, 또는 바람직하게는 HCV 바이러스에 만성 감염된 인간에게서 항체를 생성하기 위해 근육 주사할 수 있다. 수용체에는 바람직하게는 4주 간격으로 혼합물을 3회 추가 접종한다. 3차 접종시까지 HCV에 특이적인 항체의 역가는 현저히 증가할 것이다. 또한, 이 시점에서, 상기 피험체는 NS3에 대한 항체 및 T-세포 매개 면역 반응의 증가를 나타내게 될 것이며, 이는 EIA로 검출시 NS3 특이적 항체의 증가된 분획 및 RT-PCR로 검출시 바이러스 로드의 감소에 의해 확인이 가능하다. 하기 섹션에서는 본 명세서에 개시된 조성물을 사용하는 방법에 대한 추가 설명을 제공한다.

리바비린 및 항원을 함유하는 조성물의 사용 방법

<195> 본 명세서에서 기술된 백신의 투여 경로에는 경피, 비경구, 위장관, 경기관지 및 경폐포가 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 경피 투여는 크림, 린스, 젤 또는 리바비린 및 항원이 피부에 침투할 수 있게 하는 기타 화합물을 도포하여 이루어질 수 있다. 비경구 투여 경로의 예로는 전기적 또는 직접 주사, 예컨대 중앙 정맥류로의 직접 주사, 정맥 주사, 근육 주사, 복강 주사, 피내 주사 또는 피하 주사가 있으나 이에 국한되는 것은 아니다. 위장관 투여 경로의 예로는 섭취 및 직장 투여가 있으나 이에 국한되는 것은 아니다. 경기관지 및 경폐포 투여 경로로는 구강 또는 비강을 통한 흡입이 있으나 이에 국한되는 것은 아니다.

<196> 경피 투여에 적합한 리바비린 및 항원을 함유하는 조성물은 피부에 직접 도포하거나, 보호성 캐리어, 예컨대 경피 디바이스("경피 패치")에 혼입하여 사용하는 약학적 허용 혼탁액, 오일, 크림 및 연고를 포함하지만, 이들에만 국한되는 것은 아니다. 적절한 크림, 연고 등의 예는, 예컨대 문헌[Physician's Desk Reference]에서 찾아볼 수 있다. 적절한 경피 디바이스의 예는 1989년 4월 4일에 등록된 Chinen 등의 미국 특허 제4,818,540호에 기술되어 있다.

<197> 비경구 투여에 적합한 리바비린 및 항원을 함유하는 조성물은 비제한적인 예로 약학적 허용 멸균 등장성 용액을 포함한다. 이러한 용액은 염수, 인산염 완충 염수 및 중앙 정맥류 주사, 정맥 주사, 근육 주사, 복강 주사, 피내 주사 또는 피하 주사용 오일 제제를 포함하나 이것에만 국한되는 것은 아니다.

<198> 경기관지 및 경폐포 투여에 적합한 리바비린 및 항원을 함유하는 조성물은 흡입을 위한 다양한 유형의 에어로졸을 포함하나 이에 국한되는 것은 아니다. 이러한 것들의 경기관지 및 경폐포 투여에 적합한 디바이스 역시 본 발명의 구체예가 된다. 이러한 디바이스의 비제한적인 예로는 분무기와 증발기가 있다. 현재 사용되고 있는 분무기 및 증발기의 여러 형태를 리바비린 및 항원을 함유하는 백신을 전달하는 데 쉽게 적용할 수 있다.

<199> 위장관 투여에 적합한 리바비린 및 항원을 함유하는 조성물은 비제한적인 예로 약학적 허용 분말, 환약 또는 내복액 및 직장 투여용 좌약을 포함한다.

<200> 특히 본 명세서에서 기술한 유전자 작제물은 전통적인 주사기, 무바늘 주입 디바이스, 또는 "마이크로프로젝타일 충격 유전자 총" 등을 비롯하여 여러 수단에 의해 투여할 수 있다. 대안으로, 유전자 백신은 개체로부터 분리한 세포에 다양한 수단을 통해 도입할 수 있다. 이러한 수단의 예로는 체외 형질감염, 일렉트로포레이션, 마이크로인젝션 및 마이크로프로젝타일 충격을 들 수 있다. 유전자 작제물은 세포에 의해 업테이크된 후, 이는 개체로 재이식된다. 백신화된 세포가 원래 다른 개체로 취한 것일지라도 유전자 작제물이 혼입된 다른 비면역원성 세포를 개체에 이식할 수도 있다.

<201> 몇몇 구체예에 따르면, 유전자 작제물을 무바늘 주입 디바이스를 사용하여 개체에 투여한다. 일부 구체예에 따르면, 유전자 작제물은 무바늘 주입 디바이스를 사용하여 피내, 피하 및 근육에 동시에 투여한다. 무바늘 주사 디바이스는 널리 공지되어 있고 널리 이용되고 있다. 당업자라면 본 명세서의 교시에 따라 유전 물질을 개체의 세포에 전달하는 데 무바늘 주사 디바이스를 이용할 수 있다. 무바늘 주사 디바이스는 유전 물질을 모든 조직에 전달하는 데 매우 적합하다. 이들은 특히 유전 물질을 피부 및 근육 세포에 전달하는 데 유용하다. 몇몇 구체예에서는 DNA 분자를 함유하는 액체를 개체의 피부 표면을 향하여 추진시키는 데 무바늘 주사 디바이스를 사용할

수 있다. 액체는 피부에 충돌시 액체가 피부 표면을 침투하고 피부 및 그 아래의 근육 조직을 관통할 수 있을 정도의 충분한 속도로 추진된다. 이로써, 유전 물질이 피내, 피하 및 근육으로 동시에 투여된다. 몇몇 구체예에서는 핵산 분자를 기관의 세포에 도입하기 위해 다른 기관의 조직에 유전 물질을 전달하는 데 무바늘 주사 디바이스를 사용할 수 있다.

<202> 리바비린 및 항원을 함유하는 백신은 다양한 질병을 치료 및 예방하고, 항원에 대한 동물의 면역 반응을 증강시키는 데 사용될 수 있다. 당업자라면 박테리아 질병, 바이러스 질병, 진균 질병 및 암의 치료 또는 예방을 필요로 하는 피험체에게 통상적인 백신을 투여했음을 알 것이다. 본 명세서에 개시된 백신은 리바비린을 첨가하여 변형시킨 종래의 백신을 포함하기 때문에 본 명세서에 개시된 방법은 항원 및 리바비린을 함유하는 백신을 사용하여 질병을 치료 및 예방하는 방법을 포함한다.

<203> 바람직한 구체예는 간염 감염을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다. 이러한 구체예에서, 치료 또는 예방을 요하는 동물에게 간염 항원(예컨대, 웨티드 항원 또는 핵산계 항원)과 상기 동물에서 면역 보강 활성을 나타내기에 충분한 양의 리바비린을 투여한다. 따라서, 현재 이용되고 있는 진단 테스트 또는 임상적 평가방법을 이용하여 동물이 치료 또는 예방이 필요한지를 확인할 수 있다. 이러한 구체예에 이용될 수 있는 간염 바이러스 항원의 범주는 다양하다. 바람직한 간염 바이러스 항원에는 HBV 항원, HAV 항원, HCV 항원, 이들 항원을 암호화하는 핵산, 또는 이들의 임의의 조합물을 포함한다. 매우 바람직한 구체예는 간염 B 표면 항원(HBsAg), 간염 코어 항원(HBcAg) 및 간염 E 항원(HBeAg)으로 구성된 군에서 선택된 HBV 항원, 특히 전술한 웨티드 및 핵산계 항원을 포함한다. 리바비린 및 항원은 별도로, 또는 함께 투여할 수 있으며, 다른 면역 보강제(예, 오일, 명반 또는 면역 반응을 증강시키는 기타 물질)를 필요로 하는 동물에게 투여할 수도 있다. 따라서, 바람직한 구체예는 감염된 동물 또는 감염 위험이 있는 동물을 확인하고, 상기 동물에 간염 항원(예컨대, HBsAg, HBcAg 및 HBeAg) 및 면역 보강 활성을 나타내기에 충분한 양의 리바비린을 투여함으로써 동물의 간염(예컨대, HBV)을 치료 또는 예방하는 방법을 포함한다.

<204> 다른 구체예는 필요로 하는 동물에게 면역 반응을 증강시키기에 유효한 양의 리바비린과 함께 항원을 투여함으로써 면역 반응을 증강시키는 방법을 포함한다. 이러한 구체예에서, 항원에 대한 면역 반응 증강이 필요한 동물은 현재 이용되고 있는 진단 테스트 또는 임상적 평가 방법을 이용하여 확인한다. 종종 이들 개체는 질병(예컨대, 박테리아, 진균, 사상균, 바이러스 또는 암)을 앓고 있거나, 또는 이들 질병에 걸릴 위험이 있다. 그러나, 증강된 면역 반응을 요하는 동물은 중독된 동물(예컨대, 독이 있는 곤충이나 동물에게 물린 동물)이나, 독소 또는 기타 독성 화합물을 노출된 동물일 수 있다. 일단 필요한지가 확인되면, 그 동물에서 면역 반응을 증강시키기에 유효한 양의 리바비린 및 적절한 항원을 이들 동물에게 투여한다.

<205> 전술한 바와 같이, 상기 구체예에 이용될 수 있는 간염 바이러스 항원의 비제한적인 예는 HBV 항원, HAV 항원, HCA 항원, 이들 분자를 암호화하는 핵산, 또는 이들의 임의의 조합물을 포함한다. 매우 바람직한 구체예는 간염 B 표면 항원(HBsAg), 간염 코어 항원(HBcAg) 및 간염 E 항원(HBeAg)으로 구성된 군에서 선택된 HBV 항원, 특히 전술한 웨티드 및 핵산계 항원을 포함한다. 리바비린 및 항원은 별도로, 또는 함께 투여할 수 있으며, 다른 면역 보강제(예, 오일, 명반 또는 면역 반응을 증강시키는 기타 물질)를 필요로 하는 동물에게 투여할 수도 있다. 따라서, 바람직한 구체예는 치료를 요하는 동물을 확인하고, 상기 동물에 간염 항원(예컨대, HBsAg, HBcAg 및 HBeAg) 및 그 동물에서 면역 반응을 증강시키기에 유효한 양의 리바비린을 투여함으로써 동물의 간염 항원(예컨대, HBV)에 대한 면역 반응을 증강시키는 방법을 포함한다.

<206> 한 방법의 예로서, 개체가 HCV에 감염되는 것으로부터 보호하기 위해 NS3에 대한 세포 및 체액 면역 반응을 유발하기에 충분한 양의 상기 백신 조성물을 비감염 개체에 투여한다. 다른 구체예에서는, HCV-감염 개체를 확인하고, HCV 감염을 감소 또는 제거하기 위해 NS3에 대한 세포 및 체액 면역 반응을 증강시키기에 충분한 양의 NS3 및 리바비린을 함유하는 백신 조성물을 투여한다. 이러한 개체의 감염 단계는 만성 또는 급성 단계일 수 있다. 또 다른 구체예에서는, HCC를 앓고 있는 HCV에 감염된 개체에게 NS3-발현 종양 세포에 대한 세포 및 체액 면역 반응을 유발하기에 충분한 양의 NS3/4A 융합 유전자 및 리바비린을 함유하는 조성물을 투여한다.

<207> 본 발명을 구체예와 실시예를 참조로 하여 설명하였으나, 본 발명의 발명 사상으로부터 벗어나지 않고 다양한 변형이 이루어질 수 있음을 이해해야 한다. 따라서, 본 발명은 하기 특허청구범위에 의해서만 한정된다.

도면의 간단한 설명

<208> 도 1은 리바비린 1 mg의 단일 용량과 재조합 간염 C 바이러스(HCV) 비구조 3 단백질(NS3) 10 및 100 μ g을 동시에 투여하였을 때 이에 대한 체액 반응을 평균 종점 역가로 측정하여 나타낸 그라프이다.

<209> 도 2는 리바비린 0.1, 1.0, 또는 10 mg의 단일 용량과 재조합 간염 C 바이러스(HCV) 비구조 3 단백질(NS3) 20 μg 을 동시에 투여하였을 때 이에 대한 체액 반응을 평균 종점 역가로 측정하여 나타낸 그래프이다.

<210> 도 3은 NS3-특이적 림프절 증식 반응에 리바비린 1 mg의 단일 용량이 미치는 효과를 시험관내 리콜(recall) 반응으로 측정하여 나타낸 그래프이다.

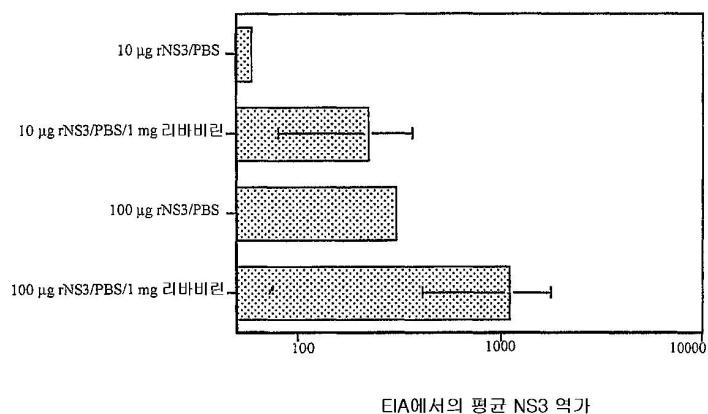
<211> 도 4는 1차 접종 후 시간이 경과함에 따른 H-2^d 마우스에서의 NS3에 대한 항체 역가를 나타낸 그래프이다. ◇는 NS3/4A-pVAX를 접종한 마우스에서의 항체 역가를 나타내고, □는 NS3-pVAX를 접종한 마우스에서의 항체 역가를 나타낸다.

<212> 도 5A는 이펙터 대 표적의 비가 변화함에 따른 SP2/0 표적 세포의 특이적 CTL-매개 용해의 비율(%)을 나타낸 그래프이다. 대조군 면역원으로 인산염 완충 염수(PBA)를 사용하였다.

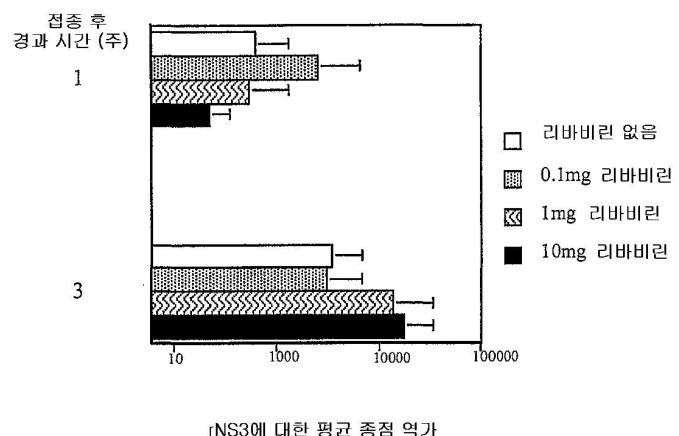
<213> 도 5B는 이펙터 대 표적의 비가 변화함에 따른 SP2/0 표적 세포의 특이적 CTL-매개 용해의 비율(%)을 나타낸 그래프이다. 면역원으로 플라스미드 NS3/4A-pVAX를 사용하였다.

도면

도면1

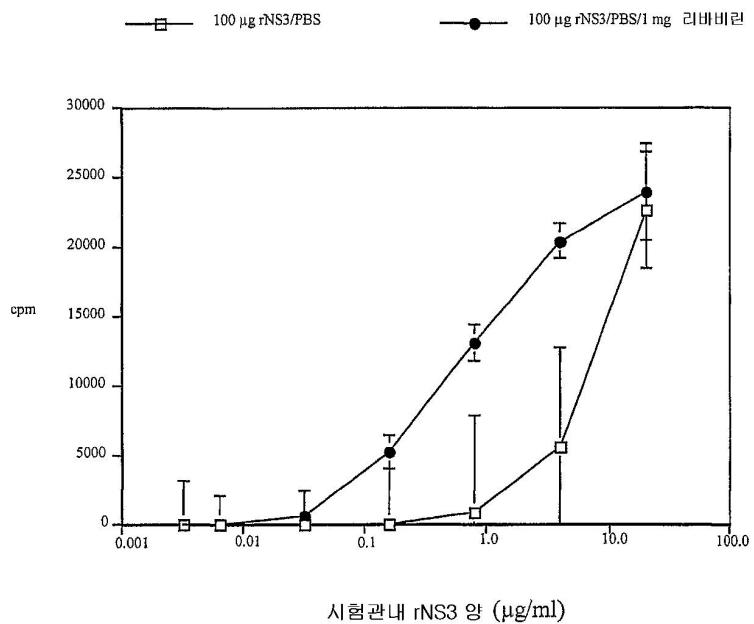


도면2

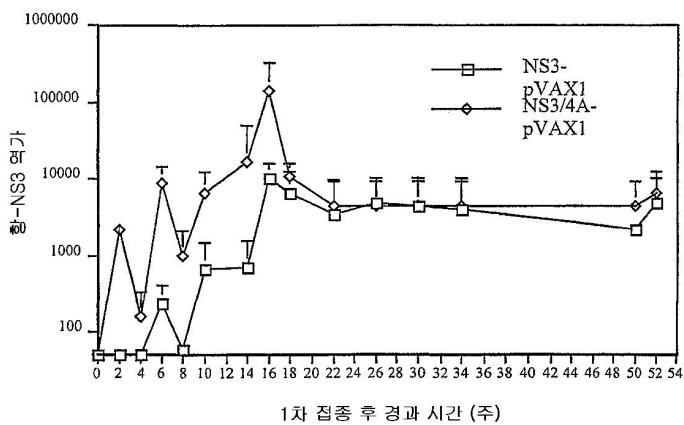


rNS3에 대한 평균 종점 역가

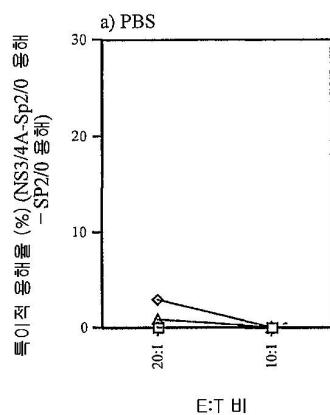
도면3



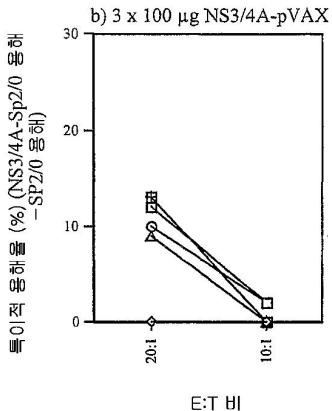
도면4



도면5a



도면5b



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> TRIPEP AB
 SALLBERG, Matti
 HULTGREN, Catharina

<120> VACCINES CONTAINING RIBAVIRIN AND
 METHODS OF USE THEREOF

<130> TRIPEP.023QPC

<140> PCT/IB01/01808

<141> 2001-08-01

<150> US 09/705,547

<151> 2000-11-03

<150> US 60/229,175

<151> 2000-08-29

<150> US 60/225,767

<151> 2000-08-17

<160> 49

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 3011

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis C virus sequence

<400> 1

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 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 Val 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 His 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

 Asn 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 Lys 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 Ala 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 Tyr Pro Glu Ala			
580	585	590	
Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Arg 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 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 Val Tyr Ala Leu
 Tyr Gly Met Trp Pro 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 Thr Cys Val Val
 865 870 875 880

 His Pro Ala Leu Val Phe Asp Ile Thr Lys 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 Cys Val Tyr
 Asn His Leu Ala 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 Leu Ala Pro Ile Thr
 Ala Tyr Ala 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
 Thr 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
 Thr 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 Thr 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 Glu 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 Lys 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 Ala 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 Ser 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 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 Gly 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
Pro Pro Ser Trp Asp Gln Met Arg 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
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 Leu Asp		
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 Ala Val Gly Val Val Phe Ala		
Ser Ile Leu Arg Arg		
1890	1895	1900
Arg 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 2000
 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 Lys Asn Met Trp Ser Gly Thr Phe Phe 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 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 Pro Ala Leu Pro Val Trp
 2275 2280 2285
 Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Leu 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 Pro 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 Lys 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 Ala
 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 Leu 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 Arg Val
 2690 2695 2700
 Leu Thr Thr Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Arg 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 Ser 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
Val Tyr Tyr Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala		2800
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
Pro Ile Ile Gln Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser		2880
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 Trp Ser Val Arg		
2915	2920	2925
Ala Arg Leu Leu Ala Arg Gly Gly Lys 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 Ala Ala Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu		
2995	3000	3005
Pro Asn Arg		
3010		

<210> 2

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis C virus core protein sequence

<400> 2

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn		
1	5	10
Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gln Ile Val Gly		15
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
 180

<210> 3

<211> 197

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis C virus E1 protein sequence

<400> 3

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

Ala Ile Met Asp Met Ile Ala Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly

165 170 175
 Ile Lys Tyr Phe Ser Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Val Val
 180 185 190
 Leu Leu Leu Phe Ala
 195

<210> 4

<211> 350

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis C virus E2 protein sequence

<400> 4

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

Asn Asn Thr Arg Pro Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met
 165 170 175
 Asn Ser Thr Gly Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile
 180 185 190
 Gly Gly Val Gly Asn Asn Thr Leu Leu Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg
 195 200 205
 Lys Tyr Pro Glu Ala Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Arg Ile
 210 215 220
 Thr Pro Arg Cys Met Val
 Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro
 225 230 235 240

Cys Thr Ile Asn Tyr Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly
 245 250 255
 Val Glu His Arg Leu Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg
 260 265 270

Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu
 275 280 285
 Ser Thr Thr Gln Trp Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro
 290 295 300
 Ala Leu Ser Thr Gly Leu
 Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val
 305 310 315 320

Gln Tyr Leu Tyr Gly Val Gly Ser Ser Ile Ala Ser Trp Ala Ile Lys
 325 330 335
 Trp Glu Tyr Val Val Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala
 340 345 350

<210> 5

<211> 315

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis C virus NS2 protein sequence

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

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

Ala Pro Leu Arg Asp Trp
 Ala His Asn Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val
 225 230 235 240

Ala Val Glu Pro Val Val Phe Ser Arg Met Glu Thr Lys Leu Ile Thr
 245 250 255

Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala Cys Gly Asp Ile Ile Asn Gly Leu Pro
 260 265 270

Val Ser Ala Arg Arg Gly Gln Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Gly
 275 280 285

Met Val Ser Lys Gly Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala
 290 295 300

Gln Gln Thr Arg Gly Leu
 Leu Gly Cys Ile Ile
 305 310 315

<210> 6

<211> 613

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis C virus NS3 protein sequence

<400> 6

Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu Val Gln
 1 5 10 15

Ile Val Ser Thr Ala Thr Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys Ile Asn Gly
 20 25 30

Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr Ile Ala Ser
 35 40 45

Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Thr Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu
 50 55 60

Val

Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ser Arg Ser Leu Thr Pro Cys Thr
 65 70 75 80

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

Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg
 100 105 110

Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu Cys Pro
 115 120 125

Thr Gly His Ala Val Gly

Leu Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly
 130 135 140

Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn Leu Glu Thr Thr
 145 150 155 160

Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Ala Val Pro
 165 170 175

Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys
 180 185 190

Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Lys Gly Tyr Lys Val Leu

195	200	205	
Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Met			
210	215	220	
Ser Lys Ala His Gly Val			
Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr			
225	230	235	240
Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu			
245	250	255	
Ala Asp Ala Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys Asp			
260	265	270	
Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Ser Gly Ile Gly Thr Val			
275	280	285	
Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu Ala Thr			
290	295	300	
Ala Thr Pro Pro Gly Ser			
Val Thr Val Ser His Pro Asn Ile Glu Glu			
305	310	315	320
Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys Ala Ile			
325	330	335	
Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys His Ser			
340	345	350	
Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala Leu Gly Ile			
355	360	365	
Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile Pro Thr			
370	375	380	
Ser Gly Asp Val Val Val			
Val Ser Thr Asp Ala Leu Met Thr Gly Phe			
385	390	395	400
Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val Thr Gln			
405	410	415	
Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr Thr Thr			
420	425	430	
Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly Arg Thr Gly			
435	440	445	
Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly Glu Arg Pro			
450	455	460	
Ser Gly Met Phe Asp Ser			
Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp Ala Gly			
465	470	475	480
Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu Arg			
485	490	495	
Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp His Leu Gly			
500	505	510	
Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp Ala His Phe			
515	520	525	
Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Phe Pro Tyr Leu Val Ala			
530	535	540	
Tyr Gln Ala Thr Val Cys			
Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ser Trp			
545	550	555	560
Asp Gln Met Arg Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu His Gly			
565	570	575	

Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu Val Thr
 580 585 590
 Leu Thr His Pro Ile Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met Ser Ala Asp
 595 600 605
 Leu Glu Val Val Thr
 610

<210> 7

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis C virus NS4A protein sequence

<400> 7

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

<210> 8

<211> 260

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis C virus NS4B protein sequence

<400> 8

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

Asp Ser Val Gly Leu Gly
 Lys Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr
 130 135 140
 Gly Ala Gly Val Ala Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys Ile Met Ser Gly
 145 150 155 160

Glu Val Pro Ser Thr Glu Asp Leu Val Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu
 165 170 175
 Ser Pro Gly Ala Leu Ala Val Gly Val Val Phe Ala Ser Ile Leu Arg
 180 185 190
 Arg Arg Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu
 195 200 205
 Ile Ala Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val
 210 215 220
 Pro Glu Ser Asp Ala Ala
 Ala Arg Val Thr Ala Ile Leu Ser Ser Leu
 225 230 235 240

Thr Val Thr Gln Leu Leu Arg Arg Leu His Gln Trp Ile Ser Ser Glu
 245 250 255
 Cys Thr Thr Pro
 260

<210> 9

<211> 1040

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis C virus NS5A/B protein sequence

<400> 9

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

Thr Thr Asp Asn Leu Lys Cys Pro Cys Gln
 130 135 140
 Ile Pro Ser Pro Glu Phe Phe Thr Glu Leu Asp Gly Val Arg Leu His

145	150	155	160
Arg Phe Ala Pro Pro Cys Lys Pro Leu Leu Arg Glu Glu Val Ser Phe			
165	170	175	
Arg Val Gly Leu His Glu Tyr Pro Val Gly Ser Gln Leu Pro Cys Glu			
180	185	190	
Pro Glu Pro Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Met Leu Thr Asp Pro Ser			
195	200	205	
His Ile Thr Ala Glu Ala Ala Gly Arg Arg Leu Ala Arg Gly Ser Pro			
210	215	220	
Pro Ser Met Ala Ser Ser			
Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala Pro Ser Leu			
225	230	235	240
Lys Ala Thr Cys Thr Ala Asn His Asp Ser Pro Asp Ala Glu Leu Ile			
245	250	255	
Glu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met Gly Gly Asn Ile Thr Arg			
260	265	270	
Val Glu Ser Glu Asn Lys Val Val Ile Leu Asp Ser Phe Asp Pro Leu			
275	280	285	
Val Ala Glu Glu Asp Glu Arg Glu Val Ser Val Pro Ala Glu Ile Leu			
290	295	300	
Arg Lys Ser Arg Arg Phe			
Ala Pro Ala Leu Pro Val Trp Ala Arg Pro			
305	310	315	320
Asp Tyr Asn Pro Leu Leu Val Glu Thr Trp Lys Lys Pro Asp Tyr Glu			
325	330	335	
Pro Pro Val Val His Gly Cys Pro Leu Pro Pro Pro Arg Ser Pro Pro			
340	345	350	
Val Pro Pro Pro Arg Lys Lys Arg Thr Val Val Leu Thr Glu Ser Thr			
355	360	365	
Leu Pro Thr Ala Leu Ala Glu Leu Ala Thr Lys Ser Phe Gly Ser Ser			
370	375	380	
Ser Thr Ser Gly Ile Thr			
Gly Asp Asn Thr Thr Ser Ser Glu Pro			
385	390	395	400
Ala Pro Ser Gly Cys Pro Pro Asp Ser Asp Val Glu Ser Tyr Ser Ser			
405	410	415	
Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu Ser Asp Gly			
420	425	430	
Ser Trp Ser Thr Val Ser Ser Gly Ala Asp Thr Glu Asp Val Val Cys			
435	440	445	
Cys Ser Met Ser Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Leu Val Thr Pro Cys Ala			
450	455	460	
Ala Glu Glu Gln Lys Leu			
Pro Ile Asn Ala Leu Ser Asn Ser Leu Leu			
465	470	475	480
Arg His His Asn Leu Val Tyr Ser Thr Thr Ser Arg Ser Ala Cys Gln			
485	490	495	
Arg Lys Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Leu Asp Ser His			
500	505	510	
Tyr Gln Asp Val Leu Lys Glu Val Lys Ala Ala Ala Ser Lys Val Lys			
515	520	525	
Ala Asn Leu Leu Ser Val Glu Glu Ala Cys Ser Leu Ala Pro Pro His			

530	535	540	
Ser Ala Lys Ser Lys Phe			
Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val Arg Cys His			
545	550	555	560
Ala Arg Lys Ala Val Ala His Ile Asn Ser Val Trp Lys Asp Leu Leu			
565	570	575	
Glu Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn Glu			
580	585	590	
Val Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Arg Lys Pro Ala Arg Leu			
595	600	605	
Ile Val Phe Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu			
610	615	620	
Tyr Asp Val Val Ser Lys			
Leu Pro Leu Ala Val Met Gly Ser Ser Tyr			
625	630	635	640
Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Gln Ala			
645	650	655	
Trp Lys Ser Lys Lys Thr Pro Met Gly Leu Ser Tyr Asp Thr Arg Cys			
660	665	670	
Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Ser Asp Ile Arg Thr Glu Glu Ala Ile			
675	680	685	
Tyr Gln Cys Cys Asp Leu Asp Pro Gln Ala Arg Val Ala Ile Lys Ser			
690	695	700	
Leu Thr Glu Arg Leu Tyr			
Val Gly Gly Pro Leu Thr Asn Ser Arg Gly			
705	710	715	720
Glu Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Arg Val Leu Thr Thr			
725	730	735	
Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Arg Tyr Ile Lys Ala Arg Ala Ala Cys			
740	745	750	
Arg Ala Ala Gly Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Cys Gly Asp Asp			
755	760	765	
Leu Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Val Gln Glu Asp Ala Ala Ser			
770	775	780	
Leu Arg Ala Phe Thr Glu			
Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly			
785	790	795	800
Asp Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys Ser			
805	810	815	
Ser Asn Val Ser Val Ala His Asp Gly Ala Gly Lys Arg Val Tyr Tyr			
820	825	830	
Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu Thr			
835	840	845	
Ala Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Met Phe			
850	855	860	
Ala Pro Thr Leu Trp Ala			
Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe Phe Ser			
865	870	875	880
Val Leu Ile Ala Arg Asp Gln Leu Glu Gln Ala Leu Asn Cys Glu Ile			
885	890	895	
Tyr Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Pro Ile Ile			
900	905	910	

Gln Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser Pro
 915 920 925
 Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ala Cys Leu Arg Lys Leu Gly Val Pro
 930 935 940
 Pro Leu Arg Ala Trp Arg
 His Arg Ala Trp Ser Val Arg Ala Arg Leu
 945 950 955 960

Leu Ala Arg Gly Gly Lys Ala Ala Ile Cys Gly Lys Tyr Leu Phe Asn
 965 970 975
 Trp Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Thr Ala Ala Gly
 980 985 990
 Arg Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Thr Ala Gly Tyr Ser Gly Gly Asp
 995 1000 1005
 Ile Tyr His Ser Val Ser His Ala Arg Pro Arg Trp Phe Trp Phe Cys
 1010 1015 1020
 Leu Leu Leu Ala Ala
 Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn Arg
 1025 1030 1035 1040

<210> 10

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis B virus S antigen (HBsAg) sequence

<400> 10

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

Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
 65 70 75 80
 Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
 85 90 95
 Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly
 100 105 110
 Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala
 115 120 125
 Gln Gly Thr Ser Met

Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp
 130 135 140
 Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys
 145 150 155 160

Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu

165	170	175
Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu		
180	185	190
Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile		
195	200	205
Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val		
210	215	220
Tyr Ile		
225		

<210> 11

<211> 212

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis B virus C antigen and e antigen
(HBcAg/HBeAg) sequence

<400> 11

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

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

Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val			
130	135	140	
Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala			
145	150	155	160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr			
165	170	175	
Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro			
180	185	190	
Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg			
195	200	205	
Glu Ser Gln Cys			
210			

<210> 12

<211> 2227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis A virus sequence

<400> 12

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

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

Phe Gly Ile Glu Ile

Gln	Val	Gln	Ile	Asn	Pro	Thr	Pro	Phe	Gln	Gln					
130							135			140					
Gly	Gly	Leu	Ile	Cys	Ala	Met	Val	Pro	Gly	Asp	Gln	Ser	Tyr	Gly	Ser
145							150			155				160	

Ile	Ala	Ser	Leu	Thr	Val	Tyr	Pro	His	Gly	Leu	Leu	Asn	Cys	Asn	Ile
165							170			175					
Asn	Asn	Val	Val	Arg	Ile	Lys	Val	Pro	Phe	Ile	Tyr	Thr	Arg	Gly	Ala
180							185			190					
Tyr	His	Phe	Lys	Asp	Pro	Gln	Tyr	Pro	Val	Trp	Glu	Leu	Thr	Ile	Arg
195							200			205					
Val	Trp	Ser	Glu	Leu	Asn	Ile	Gly	Thr	Gly	Thr	Ser	Ala	Tyr	Thr	Ser
210							215			220					
Leu	Asn	Val	Leu	Ala	Arg										
Phe	Thr	Asp	Leu	Glu	Leu	His	Gly	Leu	Thr						
225							230			235					240

Pro	Leu	Ser	Thr	Gln	Met	Met	Arg	Asn	Glu	Phe	Arg	Val	Ser	Thr	Thr
245							250			255					
Glu	Asn	Val	Val	Asn	Leu	Ser	Asn	Tyr	Glu	Asp	Ala	Arg	Ala	Lys	Met
260							265			270					
Ser	Phe	Ala	Leu	Asp	Gln	Glu	Asp	Trp	Lys	Ser	Asp	Pro	Ser	Gln	Gly
275							280			285					
Gly	Gly	Ile	Lys	Ile	Thr	His	Phe	Thr	Thr	Trp	Thr	Ser	Ile	Pro	Thr
290							295			300					
Leu	Ala	Ala	Gln	Phe	Pro										
Phe	Asn	Ala	Ser	Asp	Ser	Val	Gly	Gln	Gln						

305	310	315	320
Ile Lys Val Ile Pro Val Asp Pro Tyr Phe Phe Gln Met Thr Asn Thr			
325	330	335	
Asn Pro Asp Gln Lys Cys Ile Thr Ala Leu Ala Ser Ile Cys Gln Met			
340	345	350	
Phe Cys Phe Trp Arg Gly Asp Leu Val Phe Asp Phe Gln Val Phe Pro			
355	360	365	
Thr Lys Tyr His Ser Gly Arg Leu Leu Phe Cys Phe Val Pro Gly Asn			
370	375	380	
Glu Leu Ile Asp Val Thr			
Gly Ile Thr Leu Lys Gln Ala Thr Thr Ala			
385	390	395	400
Pro Cys Ala Val Met Asp Ile Thr Gly Val Gln Ser Thr Leu Arg Phe			
405	410	415	
Arg Val Pro Trp Ile Ser Asp Thr Pro Tyr Arg Val Asn Arg Tyr Thr			
420	425	430	
Lys Ser Ala His Gln Lys Gly Glu Tyr Thr Ala Ile Gly Lys Leu Ile			
435	440	445	
Val Tyr Cys Tyr Asn Arg Leu Thr Ser Pro Ser Asn Val Ala Ser His			
450	455	460	
Val Arg Val Asn Val Tyr			
Leu Ser Ala Ile Asn Leu Glu Cys Phe Ala			
465	470	475	480
Pro Leu Tyr His Ala Met Asp Val Thr Thr Gln Val Gly Asp Asp Ser			
485	490	495	
Gly Gly Phe Ser Thr Thr Val Ser Thr Glu Gln Asn Val Pro Asp Pro			
500	505	510	
Gln Val Gly Ile Thr Thr Met Arg Asp Leu Lys Gly Lys Ala Asn Arg			
515	520	525	
Gly Lys Met Asp Val Ser Gly Val Gln Ala Pro Arg Gly Ser Tyr Gln			
530	535	540	
Gln Gln Leu Asn Asp Pro			
Val Leu Ala Lys Lys Val Pro Glu Thr Phe			
545	550	555	560
Pro Glu Leu Lys Pro Gly Glu Ser Arg His Thr Ser Asp His Met Ser			
565	570	575	
Ile Tyr Lys Phe Met Gly Arg Ser His Phe Leu Cys Thr Phe Thr Phe			
580	585	590	
Asn Ser Asn Asn Lys Glu Tyr Thr Phe Pro Ile Thr Leu Ser Ser Thr			
595	600	605	
Ser Asn Pro Pro His Gly Leu Pro Ser Thr Leu Arg Trp Phe Phe Asn			
610	615	620	
Leu Phe Gln Leu Tyr Arg			
Gly Pro Leu Asp Leu Thr Ile Ile Ile Thr			
625	630	635	640
Gly Ala Thr Asp Val Asp Gly Met Ala Trp Phe Thr Pro Val Gly Leu			
645	650	655	
Ala Val Asp Pro Trp Val Glu Lys Glu Ser Ala Leu Ser Ile Asp Tyr			
660	665	670	
Lys Thr Ala Leu Gly Ala Val Arg Phe Asn Thr Arg Arg Thr Gly Asn			
675	680	685	
Ile Gln Ile Arg Leu Pro Trp Tyr Ser Tyr Leu Tyr Ala Val Ser Gly			

690	695	700	
Ala Leu Asp Gly Leu Gly			
Asp Lys Thr Asp Ser Thr Phe Gly Leu Phe			
705	710	715	720
Leu Phe Glu Ile Ala Asn Tyr Asn His Ser Asp Glu Tyr Leu Ser Phe			
725	730	735	
Ser Cys Tyr Leu Ser Val Thr Glu Gln Ser Glu Phe Tyr Phe Pro Arg			
740	745	750	
Ala Pro Leu Asn Ser Asn Ala Met Leu Ser Thr Glu Ser Met Met Ser			
755	760	765	
Arg Ile Ala Ala Gly Asp Leu Glu Ser Ser Val Asp Asp Pro Arg Ser			
770	775	780	
Glu Glu Asp Arg Arg Phe			
Glu Ser His Ile Glu Cys Arg Lys Pro Tyr			
785	790	795	800
Lys Glu Leu Arg Leu Glu Val Gly Lys Gln Arg Leu Lys Tyr Ala Gln			
805	810	815	
Glu Glu Leu Ser Asn Glu Val Leu Pro Pro Arg Lys Met Lys Gly			
820	825	830	
Leu Phe Ser Gln Ala Lys Ile Ser Leu Phe Tyr Thr Glu Glu His Glu			
835	840	845	
Ile Met Lys Phe Ser Trp Arg Gly Val Thr Ala Asp Thr Arg Ala Leu			
850	855	860	
Arg Arg Phe Gly Phe Ser			
Leu Ala Ala Gly Arg Ser Val Trp Thr Leu			
865	870	875	880
Glu Met Asp Ala Gly Val Leu Thr Gly Arg Leu Ile Arg Leu Asn Asp			
885	890	895	
Glu Lys Trp Thr Glu Met Lys Asp Asp Lys Ile Val Ser Leu Ile Glu			
900	905	910	
Lys Phe Thr Ser Asn Lys Tyr Trp Ser Lys Val Asn Phe Pro His Gly			
915	920	925	
Met Leu Asp Leu Glu Glu Ile Ala Ala Asn Ser Lys Asp Phe Pro Asn			
930	935	940	
Met Ser Glu Thr Asp Leu			
Cys Phe Leu Leu His Trp Leu Asn Pro Lys			
945	950	955	960
Lys Ile Asn Leu Ala Asp Arg Met Leu Gly Leu Ser Gly Val Gln Glu			
965	970	975	
Ile Lys Glu Gln Gly Val Gly Leu Ile Ala Glu Cys Arg Thr Phe Leu			
980	985	990	
Asp Ser Ile Ala Gly Thr Leu Lys Ser Met Met Phe Gly Phe His His			
995	1000	1005	
Ser Val Thr Val Glu Ile Ile Asn Thr Val Leu Cys Phe Val Lys Ser			
1010	1015	1020	
Gly Ile Leu Leu Tyr Val			
Ile Gln Gln Leu Asn Gln Asp Glu His Ser			
1025	1030	1035	1040
His Ile Ile Gly Leu Leu Arg Val Met Asn Tyr Ala Asp Ile Gly Cys			
1045	1050	1055	
Ser Val Ile Ser Cys Gly Lys Val Phe Ser Lys Met Leu Glu Thr Val			
1060	1065	1070	
Phe Asn Trp Gln Met Asp Ser Arg Met Met Glu Leu Arg Thr Gln Ser			
1075	1080	1085	

Phe Ser Asn Trp Leu Arg Asp Ile Cys Ser Gly
 Ile Thr Ile Phe Lys
 1090 1095 1100
 Ser Phe Lys Asp Ala Ile Tyr Trp Leu Tyr Thr Lys Leu Lys Asp Phe
 1105 1110 1115 1120
 Tyr Glu Val Asn Tyr Gly Lys Lys Lys Asp Ile Leu Asn Ile Leu Lys
 1125 1130 1135
 Asp Asn Gln Gln Lys Ile Glu Lys Ala Ile Glu Glu Ala Asp Asn Phe
 1140 1145 1150
 Cys Ile Leu Gln Ile Gln Asp Val Glu Lys Phe Asp Gln Tyr Gln
 Lys
 1155 1160 1165
 Gly Val Asp Leu Ile Gln Lys Leu Arg Thr Val His Ser Met Ala Gln
 1170 1175 1180
 Val Asp Pro Asn Leu Gly Val His Leu Ser Pro Leu Arg Asp Cys Ile
 1185 1190 1195 1200
 Ala Arg Val His Gln Lys Leu Lys Asn Leu Gly Ser Ile Asn Gln Ala
 1205 1210 1215
 Met Val Thr Arg Cys Glu Pro Val Val Cys Tyr Leu Tyr Gly Lys Arg
 1220
 1225 1230
 Gly Gly Gly Lys Ser Leu Thr Ser Ile Ala Leu Ala Thr Lys Ile Cys
 1235 1240 1245
 Lys His Tyr Gly Val Glu Pro Glu Lys Asn Ile Tyr Thr Lys Pro Val
 1250 1255 1260
 Ala Ser Asp Tyr Trp Asp Gly Tyr Ser Gly Gln Leu Val Cys Ile Ile
 1265 1270 1275 1280
 Asp Asp Ile Gly Gln Asn Thr Thr Asp Glu Asp Trp Ser Asp Phe Cys
 1285 1290
 1295
 Gln Leu Val Ser Gly Cys Pro Met Arg Leu Asn Met Ala Ser Leu Glu
 1300 1305 1310
 Glu Lys Gly Arg His Phe Ser Ser Pro Phe Ile Ile Ala Thr Ser Asn
 1315 1320 1325
 Trp Ser Asn Pro Ser Pro Lys Thr Val Tyr Val Lys Glu Ala Ile Asp
 1330 1335 1340
 Arg Arg Leu His Phe Lys Val Glu Val Lys Pro Ala Ser Phe Phe Lys
 1345 1350 1355 1360

 Asn Pro His Asn Asp Met Leu Asn Val Asn Leu Ala Lys Thr Asn Asp
 1365 1370 1375
 Ala Ile Lys Asp Met Ser Cys Val Asp Leu Ile Met Asp Gly His Asn
 1380 1385 1390
 Ile Ser Leu Met Asp Leu Leu Ser Ser Leu Val Met Thr Val Glu Ile
 1395 1400 1405
 Arg Lys Gln Asn Met Ser Glu Phe Met Glu Leu Trp Ser Gln Gly Ile
 1410 1415 1420
 Ser Asp Asp Asp Asn Asp
 Ser Ala Val Ala Glu Phe Phe Gln Ser Phe
 1425 1430 1435 1440
 Pro Ser Gly Glu Pro Ser Asn Trp Lys Leu Ser Ser Phe Phe Gln Ser
 1445 1450 1455
 Val Thr Asn His Lys Trp Val Ala Val Gly Ala Ala Val Gly Ile Leu
 1460 1465 1470
 Gly Val Leu Val Gly Gly Trp Phe Val Tyr Lys His Phe Ser Arg Lys
 1475 1480 1485
 Glu Glu Glu Pro Ile Pro Ala Glu Gly Val Tyr

His Gly Val Thr Lys
 1490 1495 1500
 Pro Lys Gln Val Ile Lys Leu Asp Ala Asp Pro Val Glu Ser Gln Ser
 1505 1510 1515 1520
 Thr Leu Glu Ile Ala Gly Leu Val Arg Lys Asn Leu Val Gln Phe Gly
 1525 1530 1535
 Val Gly Glu Lys Asn Gly Cys Val Arg Trp Val Met Asn Ala Leu Gly
 1540 1545 1550
 Val Lys Asp Asp Trp Leu Leu Val Pro Ser His Ala Tyr Lys Phe
 Glu
 1555 1560 1565
 Lys Asp Tyr Glu Met Met Glu Phe Tyr Phe Asn Arg Gly Gly Thr Tyr
 1570 1575 1580
 Tyr Ser Ile Ser Ala Gly Asn Val Val Ile Gln Ser Leu Asp Val Gly
 1585 1590 1595 1600
 Phe Gln Asp Val Val Leu Met Lys Val Pro Thr Ile Pro Lys Phe Arg
 1605 1610 1615
 Asp Ile Thr Gln His Phe Ile Lys Lys Gly Asp Val Pro Arg Ala Leu
 1620
 1625 1630
 Asn Arg Leu Ala Thr Leu Val Thr Val Asn Gly Thr Pro Met Leu
 1635 1640 1645
 Ile Ser Glu Gly Pro Leu Lys Met Glu Glu Lys Ala Thr Tyr Val His
 1650 1655 1660
 Lys Lys Asn Asp Gly Thr Thr Val Asp Leu Thr Val Asp Gln Ala Trp
 1665 1670 1675 1680
 Arg Gly Lys Gly Glu Gly Leu Pro Gly Met Cys Gly Gly Ala Leu Val
 1685 1690
 1695
 Ser Ser Asn Gln Ser Ile Gln Asn Ala Ile Leu Gly Ile His Val Ala
 1700 1705 1710
 Gly Gly Asn Ser Ile Leu Val Ala Lys Leu Val Thr Gln Glu Met Phe
 1715 1720 1725
 Gln Asn Ile Asp Lys Lys Ile Glu Ser Gln Arg Ile Met Lys Val Glu
 1730 1735 1740
 Phe Thr Gln Cys Ser Met Asn Val Val Ser Lys Thr Leu Phe Arg Lys
 1745 1750 1755 1760

 Ser Pro Ile His His Ile Asp Lys Thr Met Ile Asn Phe Pro Ala
 1765 1770 1775
 Ala Met Pro Phe Ser Lys Ala Glu Ile Asp Pro Met Ala Met Met Leu
 1780 1785 1790
 Ser Lys Tyr Ser Leu Pro Ile Val Glu Glu Pro Glu Asp Tyr Lys Glu
 1795 1800 1805
 Ala Ser Val Phe Tyr Gln Asn Lys Ile Val Gly Lys Thr Gln Leu Val
 1810 1815 1820
 Asp Asp Phe Leu Asp Leu
 Asp Met Ala Ile Thr Gly Ala Pro Gly Ile
 1825 1830 1835 1840
 Asp Ala Ile Asn Met Asp Ser Ser Pro Gly Phe Pro Tyr Val Gln Glu
 1845 1850 1855
 Lys Leu Thr Lys Arg Asp Leu Ile Trp Leu Asp Glu Asn Gly Leu Leu
 1860 1865 1870
 Leu Gly Val His Pro Arg Leu Ala Gln Arg Ile Leu Phe Asn Thr Val
 1875 1880 1885
 Met Met Glu Asn Cys Ser Asp Leu Asp Val Val
 Phe Thr Thr Cys Pro

1890	1895	1900	
Lys Asp Glu Leu Arg Pro Leu Glu Lys Val	Leu Glu Ser Lys Thr Arg		
1905	1910	1915	
Ala Ile Asp Ala Cys Pro Leu Asp Tyr Thr	Ile Leu Cys Arg Met Tyr	1920	
1925	1930	1935	
Trp Gly Pro Ala Ile Ser Tyr Phe His Leu	Asn Pro Gly Phe His Thr		
1940	1945	1950	
Gly Val Ala Ile Gly Ile Asp Pro Asp Arg	Gln Trp Asp Glu Leu		
Phe			
1955	1960	1965	
Lys Thr Met Ile Arg Phe Gly Asp Val	Gly Leu Asp Leu Asp Phe Ser		
1970	1975	1980	
Ala Phe Asp Ala Ser Leu Ser Pro Phe Met	Ile Arg Glu Ala Gly Arg		
1985	1990	1995	2000
Ile Met Ser Glu Leu Ser Gly Thr Pro Ser	His Phe Gly Thr Ala Leu		
2005	2010	2015	
Ile Asn Thr Ile Ile Tyr Ser Lys His Leu	Leu Tyr Asn Cys Cys Tyr		
2020			
	2025	2030	
His Val Cys Gly Ser Met Pro Ser Gly Ser	Pro Cys Thr Ala Leu Leu		
2035	2040	2045	
Asn Ser Ile Ile Asn Asn Ile Asn Leu	Tyr Tyr Val Phe Ser Lys Ile		
2050	2055	2060	
Phe Gly Lys Ser Pro Val Phe Phe Cys Gln	Ala Leu Arg Ile Leu Cys		
2065	2070	2075	2080
Tyr Gly Asp Asp Val Leu Ile Val Phe Ser	Arg Asp Val Gln Ile Asp		
2085	2090		
	2095		
Asn Leu Asp Leu Ile Gly Gln Lys Ile Val	Asp Glu Phe Lys Lys Leu		
2100	2105	2110	
Gly Met Thr Ala Thr Ser Ala Asp Lys Asn	Val Pro Gln Leu Lys Pro		
2115	2120	2125	
Val Ser Glu Leu Thr Phe Leu Lys Arg Ser	Phe Asn Leu Val Glu Asp		
2130	2135	2140	
Arg Ile Arg Pro Ala Ile Ser Glu Lys Thr	Ile Trp Ser Leu Met Ala		
2145	2150	2155	2160
Trp Gln Arg Ser Asn Ala Glu Phe Glu Gln	Asn Leu Glu Asn Ala Gln		
2165	2170	2175	
Trp Phe Ala Phe Met His Gly Tyr Glu Phe	Tyr Gln Lys Phe Tyr Tyr		
2180	2185	2190	
Phe Val Gln Ser Cys Leu Glu Lys Glu Met	Ile Glu Tyr Arg Leu Lys		
2195	2200	2205	
Ser Tyr Asp Trp Trp Arg Met Arg Phe Tyr	Asp Gln Cys Phe Ile Cys		
2210	2215	2220	
Asp Leu Ser			
2225			

<210> 13

<211> 9416

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis C virus sequence

<400> 13

gccagcccc tcatggggc gacactccac catgaatcac tcccctgtga ggaactactg 60
 tttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgcgtcgag cctccaggac 120
 cccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccag 180
 gacgaccggg tccttcttg gataaaccg ctcaatgcct ggagatttg gcgtgcccc 240
 gcaagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgttact gcctgtatgg 300
 gtgcttgcga gtccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgaccacg aatctaaac 360
 ctcaaagaaa aaccaaacgt aacccaacc gtcgcccaca ggacgtcaag ttcccgggt 420
 gcggtcagat
 cgtttgttga gtttacttgt tgcgcgcag gggccctaga ttgggtgtgc 480
 gcgcgacgag gaagacttc gaggcgctc aacctcgagg tagacgtcag cctatcccc 540
 aggcaacgtcg gcccggggc aggacctggg ctcaagccgg gtacccttgg cccctctatg 600
 gcaatgaggg ttgcgggtgg gcgggatggc tcctgtctcc cctgtgtct cggcttagt 660
 gggggccac agaccccccgg ctaggtcgc gcaatttggg taaggtcatc gataccctta 720
 cgtcggcctt cccgacacccatgggtaca taccgtcgat cggccccccttggaggcg 780
 ctgcaggcgc cctggcgcata ggcgtccggg ttcttggaa ggcgtgaac tatgcaacag 840
 ggaaccttc tggttgcct
 ttctctatct tccttcttgc cctgtctct tgcctgactg 900
 tgccgccttc agcctaccaa gtgcgcattt cctcgggctt taccatgtc accaatgatt 960
 gcccataactc gaggttgttgc taccggcgccat cctgcacact cgggggtgtg 1020
 tccttgcgt tcgcgggggtt aacgccttgc ggtgttgggtt ggcgtgacc cccacgggt 1080
 ccaccaggga cggcaacactc cccacaacgc agcttcgacg tcatatcgat ctgcttgcg 1140
 ggagcgcac cctctgcctg gccctctacg tggggacact gtgcgggtct gtcttcttgc 1200
 ttggtaact gtttaccttc tctccaggg accactggac gacgcaagac tgcaatttttgc 1260
 ctatctatcc cggccatata acgggtcatc
 gcatggcatg gaatatgtat atgaactgg 1320
 cccctacggc agcgttgttgc ttagctcagc tgctccgaat cccacaagcc atcatggaca 1380
 tgatcgctgg cggccacttgc ggagtcttgc cgggcataaa gtatttctcc atggggggaa 1440
 actggcgaa ggtcttgta gtgcgtctgc tattttccgg cgtcgcacgc gaaacccacg 1500
 tcaccggggg aaatgcggc cgcaccacgg ctgggttgtt tggctcttcc acaccaggcg 1560
 ccaagcagaa catccaactg atcaacacca acggcgttg gcacatcaat agcacggcct 1620
 tgaactcgaa tggaaacgcctt aacaccgggtt ggttagcagg gtccttctat cagcacaaat 1680
 tcaacttcc aggtgttgcctt gagaggttgg ccagctgcgc
 acgccttacc gatttggcc 1740
 agggctgggg tcctatcagt tatgcacacg gaagcggcct cgacgaacgc ccctactgt 1800
 ggcactaccc tccaaagaccc tgcgttgcattt tgccgcggaaa gagcgtgtgtt gggccggat 1860
 attgttccac tcccgcccc gttgttgttgc gaacgaccga caggtcggtc ggccttactt 1920
 acagctgggg tccaaatgtat acggatgtct tgcgttccaa caacaccagg ccaccgtgg 1980
 gcaatgggtt cgggttgttacc tggatgaact caactggattt caccaagtg tgcggagcgc 2040
 ccccttgcgtt catggaggg gttggcaaca acacccgtt ctgcggccactt gattgttcc 2100
 gcaaatatcc ggaagccaca tactctcggtt ggcgtccgg tcccaggatt
 acacccagggt 2160
 gcatggtcga ctaccgtat aggcttggc actatcttgc taccatcaat tacaccatata 2220
 tcaaaatcgat gatgtacgttggc ggggggtcg agcagggctt ggaagcggcc tgcactgg 2280
 cgcggggcgaa acgtgtgtat ctggaaagaca gggacaggc cggactcage cgggtgtgc 2340
 tgcgttgcgtt acagttggcag gtccttccgtt gtttttccac gaccctgcca gcctgttcca 2400
 cggccctcat ccacccatccac cagaacatgg tggacgttca gtaacttgcgtt ggggttaggtt 2460
 caagcatcgcc gtcctggcc attaagtggg agtacgttgc ttcctgttcc cttctgttgc 2520
 cagacgcgcg cgtctgttcc tgcgttgttgc tgcgttgttactt catatccaa gcgaggccgg
 2580
 ctttgagaa cctcgtaata ctcaatgcacatccctggc cgggacgcattt ggttttgttgc 2640
 ctttcttgcgtt gtttttctgc tttgcgttgtt atctgaaggg taggtgggtt cccggagccgg 2700
 tctacggcctt ctacggatg tggcccttcc tccgttgcctt gtcggccgtt cctcagccgg 2760

catacgact ggacacggag gtggccgcgt cgtgtggcg cggtgttctt gtcgggttaa 2820
 tggcgcgtac tctgtcgcca tattacaagc gctatatacg ctgggtgcgt tggtggcttc 2880
 agtattttctt gaccagagta gaagcgcac tgcaacgtgt ggccccccc ctcaacgtcc 2940
 gggggggcgc cgatgccgtc atcttactca cgtgtgttagt acacccggcc ctggattttg 3000

acatcaccaa actactctcg gccatctcg gaccccttg gattctcaa gccagttgc 3060
 ttaaagtccc ctacttcgtc cgcgttcaag gccttctccg gatctgcgcg ctgcgcgg 3120
 agatagccgg aggtcattac gtgcaaattgg ccatcatcaa gttagggcg cttactggca 3180
 cctgtgtta taaccatctc gtcctctc gagaactggc gcacaacggc ctgcgagatc 3240
 tggccgtggc tggaaacca gtcgttctt cccgaatgga gaccaagctc atcacgtggg 3300
 gggcagatac cggcgtgc ggtgacatca tcaacggctt gcccgtctt gcccgttaggg 3360
 gcccggatc actgttggg ccagccgacg gaatggtctc caaggggtgg aggttgcgtt 3420
 cgcggatc

ggcgtacgcc cagcagacga gaggcctctt aggggttata atcaccagcc 3480
 tgactggccg ggacaaaaac caagtggagg gtgagggttca gatcgtgtca actgttaccc 3540
 agacccctt gcaacgtgc atcaatgggg tatgtggac tgcgttaccac gggggccgaa 3600
 cgaggaccat cgcacccatccc aagggtctcg tcatccagac gtataccaaat gtggatcaag 3660
 acctcggtgg cttggccgtt cctcaagggtt cccgcttattt gacaccctgc acctgcggct 3720
 cctcggttcc ttactggc acgaggcagc ccgtatcat tccgtgcgc cggcgaggtg 3780
 atagcagggg tagctgtt tggcccccggc ccatttccta cttgaaaggc tcctcggggg 3840
 gtccgtgtt gtggccacg

ggacacggcc tggccctatt cagggccgcgt gtgtgcaccc 3900
 gtggagtggc taaggcgggtg gactttatcc ctgtggagaa cctagagaca accatgagat 3960
 ccccggtttt caccggacaac tccctccac cagcgttgc ccagagctt caggtggccc 4020
 acctcgatgc tcccccggc acggtaaga gcaaccaaggtt cccgctgcg tacgcagcca 4080
 agggcttacaa ggtgtgggtg ctcaacccctt ctgtgtgc aacactggc tttgggtt 4140
 acatgtccaa gggccatggg gttgatctta atatcaggac cgggggtgaga acaatttacca 4200
 ctggcagccc catcgtac tccacccatc gcaaggctt tgccgacgcc ggggtgtt 4260
 gaggtgttta tgacataata atttgtgacg

agtggccactc cacggatgcc acatccatct 4320
 cggccatcg cactgttccctt gaccaaggc agactgcggg ggcgagactg gttgtgtcg 4380
 ccactgttac ccccccggc tccgttactt tgcgttccatcc taacatcgag gagtttgc 4440
 tgcgttccatcc cggagagatc cccttttacg gcaaggctt cccctcgag gtgttcaagg 4500
 gggaaagaca tctcatctt tggccactaa agaagaatgtt cgacgagctc gcccggaaac 4560
 tggcgtccattt gggcatcaat ggcgtggctt actaccggc ttttgcgtt tctgttcatcc 4620
 cgaccaggcg cgtgttgcgtc gtcgttgcgtc ccgtatctt catgacttgc tttaccgggg 4680
 acttcgactc tgcgtatgtac tgcaacacgt gtgttactca

gacagtgtt ttagccctt 4740
 acccttaccc taccatttgcg acaaccacgc tccccagga tgcgttctcc aggactcaac 4800
 gcccggccag gactggcagg gggaaagccag gcatctatag atttggca cccggggagc 4860
 gcccctccgg catgttgcac tgcgttccatcc tgcgttgcgtt ctatgcgcg ggctgtgtt 4920
 ggtatgtatc caccggccg cggactacatc ttaggttacg agcgttacatg aacacccgg 4980
 ggctccctt gttccaggac catttggat tttgggggg cgttttacg ggccttactc 5040
 atatagatgc ccacttctt tcccaagacaa agcagatggg ggagaactttt ctttacccgg 5100
 tagcttacca accggccgtt tgcgttgcgtt ctcaaggcccc tccccatcg

tgggaccaga 5160
 tgcggaaatgt ttttgcgtt cttaaacccca ccctccatgg gccaacaccc ctgttataaca 5220
 gactggccgc ttttgcgtt cttttttttt gacgttaccc aatcaccacaa tacatcatga 5280
 catgttgcgtt cccggccgtt tgcgttccatcc tgcgttgcgtt ctatgcgcg ggctgtgtt 5340
 tggcgttccatcc cccggccgtt tgcgttccatcc tgcgttgcgtt ctatgcgcg ggctgtgtt 5400
 ttttgcgttccatcc tgcgttccatcc tgcgttgcgtt ctatgcgcg ggctgtgtt 5460
 agatggaaaga gtttgcgttccatcc tgcgttccatcc tgcgttgcgtt ctatgcgcg ggctgtgtt 5520
 agttaagca gaaaggccctt ggccttccatcc tgcgttccatcc tgcgttgcgtt ctatgcgcg ggctgtgtt 5580

cccccgttccatcc tgcgttccatcc tgcgttccatcc tgcgttgcgtt ctatgcgcg ggctgtgtt 5640
 attttgcgttccatcc tgcgttccatcc tgcgttccatcc tgcgttgcgtt ctatgcgcg ggctgtgtt 5700
 ttgcgttccatcc tgcgttccatcc tgcgttccatcc tgcgttgcgtt ctatgcgcg ggctgtgtt 5760

tccttcaa catattgggg gggtgggtgg ctgcccagct cgccgcccc ggtgccgcta 5820
 ccgccttgtt gggcgctggc ttagctggcg ccgcactcga cagcgttgg ctgggaaagg 5880
 tcctcttgc aatttttgc gcctatggcg cggcgctggc gggagcttt gtggcattca 5940
 agatcatgag cggtgaggc cctccacgg aggaccttgt caatctgctg cccccatcc 6000

tctcacctgg agcccttgc gtcgggtgg tctttgcate aatactgcgc cggcggttg 6060
 gccccggcga gggggcagtg caatggatga accggtaat agcccttcgc tcccgaaaa 6120
 accatgttcc ccccacacac tacgtggcg agagcgatgc agccgcccgc gtcactgc 6180
 tactcagcag cctcaactgtt acccagcttc tgaggcgact gcatcgttgg ataagctgg 6240
 agtgttaccac tccatgttcc ggttccctggc taagggacat ctggactgg atatgcgagg 6300
 tgctgagcga cttaagacc tggctgaaag ccaagctcat gccacaactg cctggattc 6360
 ccttgcgtc ctggcagcgc gggataggg gggctggcagg agagacggc attatgcaca 6420
 ctcgtgc 6420

ctgtggagct gagatcactg gacatgtcaa aaacgggacg atgaggatcg 6480
 tcggcttag gacctgcaag aacatgttgg gtgggacgtt ctcatatgcctacacca 6540
 cggggccctg tactccctt cctgcggcga actataagtt cgcgtgtgg aggggtgtcg 6600
 cagaggaata cgtggagata aggccgggtgg gggacttcca ctacgtatcg ggcgtgacta 6660
 ctgacaatct caaatggcccg tgccagatcc catggcccg attttcaaa gaattggacg 6720
 gggtgcgcct acatagggtt gggccctt gcaagccctt gtcggggag gaggatcat 6780
 tcagagttagg actccacag taccgggtgg ggtgcattt accttgcgag cccgaaccgg 6840
 acgtggcggtt gttgacgtcc 6840

atgcgtcaactg atccctccca tataacagca gaggcgcccg 6900
 ggagaagggtt ggcgagggg tcacccctt ctatggccag ctccctggct agccagctgt 6960
 ccgcctccatc tctcaaggca acttgcaccc ccaaccatga ctccctgtac gccgagctca 7020
 tagaggctaa cctctgtgg aggcaggaga tggggccaa catcaccagg gttgagttag 7080
 agaacaatgggtt ggttgcgtt gactcccttgc atccctgtt ggcagaggag gatgagcggg 7140
 aggtctcgatcc acccgagaa attctgcgga agtctcgag attcgccccca gcccgtcc 7200
 tctggcgccg gccgactac aacccctgc tagtagagac gtggaaaaag cctgactacg 7260
 aaccacctgtt ggtccatggc tgccgttac 7260

cacctccacg gtccctccctt gtgcctccgc 7320
 ctgcggaaaaa gctgtacgggtt gtcctcacccg aatcaaccctt acctactgcc ttggccgagc 7380
 ttggccaccaa aagttttggc agtccctaa ctccggcat tacggcgac aatacgacaa 7440
 catccctgtt gcccggccct tctggctgcc ccccgactc cgacgtgtgg tcctattttt 7500
 ccatggccccc cctggggggg gggctgggg atccggatct cagcgtgggg tcatgggtcg 7560
 cggtcgttag tggggccgac acggaaatgt tcgtgtgttgc ctcaatgtt tattccgtt 7620
 caggcgactc cgtcaccccg tgcgtgcgg aggaacaaa actggccatc aacgcactga 7680
 gcaactcggtt gtcgttacatcacaatctgg ttttccac 7680

cacttcacgc agtgcgttgc 7740
 aaaggaaagaa gaaagtccaa ttgtacagac tgcaagtttgc ggacagccat taccaggacg 7800
 tgctcaaggaa ggtcaagca gggcgctaa aagtgaaggc taacttgc tccgttaggg 7860
 aagtttgcag cctggcgccc ccacatttcg ccaatccaa gtttgcgtt ggggaaaaag 7920
 acgtccgttgc ccatgtccaga aaggccgttgc cccacatccaa ctccgtgtgg aaagaccc 7980
 ttggaaagacg tggtaacacca atagacacta ccatcatggc caagaacggg gtttctgc 8040
 ttcaagctgtt gaaagggggtt cgttacggatct cgttccccc gacgtgggg 8100
 tgcgtgttgc cgagaagatg gcccgttacg acgtgggttgc caagctcccc 8100

ttggccgttga 8160
 tggggagctt ctacggattt caataactcactc caggacacgg ggttgaattt ctcgtgc 8220
 cgttggaaatgc caagaagacc ccgtatgggc tctcgatgtt taccggctgtt tttgacttca 8280
 cagtcactgtt gggcgacatc cgttacgggg aggcaattttt ccaatgttgc gacgtggacc 8340
 cccaaaggcccg cgtggccatc aagtccctca ctggagggctt ttatgttggg gccccttta 8400
 ctaatttcaag gggggaaaaac tgcggctacc gcagggttgc cgcggccaga gtactgacaa 8460
 ctatgtgttgc taacccctt actcgatcaca tcaaggcccg ggcgttgcgttgc 8520
 ggctccaggatc ctgcaccatgtt ctcgtgttgc ggcgttgcgttgc 8520

8580
 cgggggttcca ggaggacggc ggcgttgc gggccatgg accaggactt 8640
 ccggccccc cggggacccc ccacaaccatc aatacgactt ggagcttata acatcatgtt 8700
 cctccaaatgtt gtcgttgc cgcgttgcgttgc 8760

acacctacaac ccccctcgcg agagccgcgt gggagacacg aagacacact ccagtcaatt 8820
cctggcttagg caacataatc atgtttgccc ccacactgtg ggcgaggatg atactgatga 8880
ccacacttctt tagcgtctc atagccaggg atcagcttga acaggtctc aactgcgaga 8940
tctacggage ctgctactcc atagaaccac tggatctacc tccaaatcatt caaagactcc 9000

atggccttag cgccatttca ctccacagtt actctccagg tgaaattaat agggtgccg 9060
catgccttag aaaacttggg gtcccccct tgcgagctg gagacaccgg gcctggagc 9120
tccgcgttag gcttctggcc agaggaggca aggctgccc atgtggcaag taccttca 9180
actgggcagt aagaacaag ctcaactca ctccgataac ggccgctggc cggctggact 9240
tgtccggctg gttcacggct ggctacagcg ggggagacat ttatcacagc gtgtctcatg 9300
cccgcccccc ctgggttctgg tttgctac tcctgcttc tgcaagggtt ggcatttacc 9360
tcctccccaa ccgatgaaga ttggctaaac cactccagggc caataggcca ttccct 9416

<210> 14

<211> 3182

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis B virus sequence

<400> 14

gctgggtggct ccagttcagg aacagtaaac cctgttctga ctactgcctc tcccttatcg 120
tcaatcttct cgaggattgg ggaccctgcg ctgaacatgg agaacatcac atcaggattc 180
ctaggacccc ttctcggtt acaggcgggg ttttcttgc tgacaagaat cctcacaata 240
ccgcagagtc tagactcggt gtggacttct ctcattttc tagggggAAC taccgtgtgt 300
cttggccaaa attcgacgtc cccacacctc aatcactcac caaccttgc tccctcaact 360
tgtcctggtt atcgctggat gtgtctgcgg cgttttatca tcttccttcatcctgtc 420
ctatgcctca
tcttcttgc gtttctctg gactatcaag gtatgttgc cgtttgcct 480
ctaattccag gatcctcaac aaccaggcagc ggaccatgcc ggacactgcat gactactgt 540
caaggaacct ctatgtatcc ctccctgtgc tgtaccaaac cttcgacgg aaattgcacc 600
tgtattccca tcccatatc ctgggtttc ggaaaattcc tatggagtg ggcctcagcc 660
cgtttctccct ggctcagtt actatgtcctt ttgttctagt gtttgcgtagg gctttcccc 720
actgtttggc tttcaggat atggatgtat tggtattggg ggcacatct gtacagcatc 780
tttagtccct tttaccgcgt gttaccaatt ttctttgtc ttgggtata catttaaacc 840
ctaacaaaaac aaagagatgg
ggttactctc taaattttat gggttatgtc attggatgtt 900
atgggtcctt gccacaagaa cacatcatac aaaaaatcaa agaatgtttt agaaaacttc 960
ctattaacag gcctattgtat tgaaagatgtat gtcaacgaat tgggttctt tgggtttt 1020
ctgcccctt tacacaatgt gtttacgtcg tggatgtatgc tttgtatgc tttgtatcaat 1080
ctaaggcaggc tttcacttgc tcgcacaactt acaaggcctt tctgtgtaaa caatacgt 1140
accttaccc cggtgcggg caacggccag gtcgtgcctt aatgtttgtt gacgcaccc 1200
ccactggctg gggcttggc atggccatc aggcacatgcg tggacccctt tggctcctc 1260
tgccgatcca tactgcggaa ctccctagccg
cttgcgtttgc tcgcagcagg tctggagcaa 1320
acattatcggt gactgtataac tctgttgc tatccgcata atatacatcg ttccatggc 1380
tgcttaggtcg tgctgcacatc tggatctgc gggacgtc cttgtttac gtccctgtgg 1440
cgctgaatcc tgcggacac cttctcggtt gtcgttggg actctctgtt ccccttc 1500
gtctggcgtt ccgaccgacc acggggcgcata cttctcttgc cgcgtactcc cggctgtgc 1560
cttctcatct gccggacccgt gtgcacttgc cttcacctct gcacgtgcata tggagaccac 1620
cgtaacgccca caccatataat tggccaaaggctt acataag aggacttgc gactctc 1680

aatgtcaacg accgaccctt aggcatactt caaagactgt
ttgtttaaag actgggagga 1740
gttggggag gagattaggt taaaggtctt tgtacttagga ggctgttaggc ataaatttgt 1800
ctgcgcacca gcaccatgca acttttcac ctgcctaa tcatcttgc ttcatgtct 1860
actgttcaag cctccaagct gtgccttggg tggcttggg gcatggacat cgaccctt 1920
aaagaatttgg gagctactgt ggagtactc tcgttttgc cttctgactt ctttccttca 1980
gtacgagatc ttcttagatac cgccctcagct ctgtatcggg aagecttaga gtctcctgag 2040
cattgttccac ctcaccatc tgcactcagg caagcaattc ttgcttggg ggaactaatg 2100
actctagcta cctgggtggg ttttaatttgc gaagatccag cgtctagaga
ccttagtagtc 2160
agttagtgc acactaatat gggccctaaag ttccaggcaac tcttgcgtt tcacatttc 2220
tgtctcactt ttggaagaga aacagttata gagtatttgg tgtcttcgg agtgtggatt 2280
cgccactcctc cagctttagt accaccaat gcccctatcc tatcaact tccggagact 2340
actgttgttgc gacgacgagg caggtccctt agaagaagaa cccctcgcc tcgcagacg 2400
aggtctcaat cgccgcgtcg cagaagatct caatctcggg aatctcaatg ttagtattcc 2460
ttggactcat aagggtggga acttactgg gctttattct tctactgtac ctgtctttaa 2520
tcctcatttgg aaaacaccat ctttcttata tatacatttca caccacacaa ttatcaaaaa
2580
atgtgaacag tttgttaggcc cactcacagt taatgagaaa agaagattgc aattgattat 2640
gcctgccttccaa aggttaccaat atatttacca ttggataagg gtattaaacc 2700
ttattatccaa gaacatcttgc ttaatcatttgc ctccaaactt agacactt tacacactct 2760
atggaaaggcg ggttatattat ataagagaga aacaacacat agcgcctcat ttgtgggtc 2820
accatatttgc tggaaacaag atctacagca tggggcagaa ctgtttccacc agcaatcc 2880
tgggatttttcccgaccac cagttggatc cagccctcag agcaacaccc gcaaatcc 2940
atgggactt caatcccaac aaggacaccc ggcacacgc caacaaggta ggagctggag 3000

cattcgggct gggttccacc ccacccacg gaggccctt ggggtggagc cctcaggctc 3060
agggcataacttccaaacttgc ccagccaaatc cgcctctgc ctccaccaat cgccagtc 3120
gaaggcagcc taccggctg tctccaccc tggaaacac tcatctcag gccatgc 3180
gg 3182

<210> 15

<211> 7478

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis A virus sequence

<400> 15

tgtacaccca ccggcggtt cctaggctat aggctaaatt tcccttccc tgtccctccc 120
ttatccctt ttgtttgtc tgtaaatatt aattctgca ggttcagggt tcttaatct 180
gtttctctat aagaacactc aatttcacg cttctgtct tcttcttcc agggctctcc 240
ccttgcctta ggctctggcc gttgcgcggc gcggggtcaa ctccatgatt agcatggac 300
tgtaggagtc taaattgggg acgcagatgt ttggacgtc accttgca gttaaatgg 360
ctctcatgaa cctcttgat ctccacaaag ggtaggcta cgggtgaaac ctcttaggct 420
aataacttctta
tgaagagatg ctttggatag ggtaacacgcg gcggatattt gtgagttgtt 480
aagacaaaaaa ccattcaacg ccggaggact ggctctcattc cagtggatgc attgatgg 540
ttgttgtca gggctgtctc taggttaat cttagacactc tctgtgttca gggcaacac 600
catttggctt taaatggat cctgtgagag ggggtccctc cattgacagc tggactgttc 660
tttggggctt tatgtgtgtt ttgcctctga ggtactcagg ggcattttagg ttttcctca 720

tgggacttg aaatctatga tgggggtt tcatcattct gtgactgtt aaattataaa 3780
 tactgtcct tgggggttta agagtgaaat cctgcttat gtcataacaac aattgaacca 3840
 agatgaacac ttcacataaa
 ttgggggtt gagagttatg aattatgcg atattggctg 3900
 ttcagttatt tcatgtggta aagtttttc caaaatgtt gaaacagttt ttaattggca 3960
 aatggattct agaatgtgg agctgaggac tcagagctc tctaattggt taagagat 4020
 ttgttcagga attactattt taaaagttt taaggatgcc atatattggt tatatacaaa 4080
 attgaaggat ttatgttgg taaattatgg caagaaaaag gatattctt atattctaa 4140
 agataatcg caaaaaatag aaaaagccat tgaagaagca gacaattttt gcattttgca 4200
 aattcaagat gttagagaaat ttgtatcgta tcagaaagggtt gttgatttaa tacaaaagct 4260
 gagaactgtc cattcaatgg cgcaagttga
 ccccaatttg ggggttcatt tgcacccct 4320
 cagagattgc atagcaagag tccaccaaaa gctcaagaat ctggatcta taaatcaggc 4380
 catgttaaca agatgtggc cagttgttgc ctattgtat ggcaaaagag ggggaggaa 4440
 aagtttgcact tcaatttgc tggcaacca aatttgcattt cactatggt ttgaacccct 4500
 gaaaaatatt tacaccaac ctgtggcctc agattattgg gatggatata gtggacaatt 4560
 agttgcattt attgtatgata ttggccaaaaa cacaacagat gaagatggt cagattttt 4620
 tcaatttagt tcaggatgcc caatgagatt gaatatggct tctctagagg agaagggcag 4680
 acattttcc tctcccttta taatagcaac ttcaattttgg
 tcaaatccaa gtcaccaaaaac 4740
 agtttatgtt aaggaagca ttgtatcgtag gcttcatttt aagggttgaag ttaaacctgc 4800
 ttcattttt aaaaatccctc acaatgatgtt gttgaatgtt aatttggca aaacaaatgt 4860
 tgcaattaag gacatgtctt gtgttgattt aataatggat ggacacaata tttcattgt 4920
 ggattttactt agttcccttag tgatgacagt taaaatttggg aaacagaata tgatgt 4980
 catggatgtt tggcttcagg gaatttccaga tgatgacaat gatagtgcag tggctgat 5040
 tttccagttt tttccatctg gtgaaccatc aaatttggaaat ttatctatgtt tttccaaatc 5100
 tgtcactaat cacaagtggg ttgtgtggg agctgcagg tgcatttttgc
 gagtgcttgc 5160
 gggggatgg tttgtgtata agcatttttc ccgcaaaagag gaagaaccaat tccagctga 5220
 aggggttat catggcgtga ctaagccaa acaagtgtt aaattggatg cagatccagg 5280
 agatgtcccg tcaactctag aatagcagg attagttggg aaaaatctgg ttcagttgg 5340
 agttggtagg aaaaatggat gtgtgagat ggtcaatgat gccttaggg tgaaggatga 5400
 ttgggggttta gtacccctc atgcttataa atttggaaat gattatggaaat tgatggat 5460
 ttacttcaat agaggtggaa cttaacttcc aatttgcgtt ggtatgtt ttatccaaatc 5520
 ttttagatgtg ggatttcaag atgttgcattt aatgaaggat cctacaatttccaaatgttgc
 5580
 agatattactt caacacttta ttaagaaagg agatgtgcct agacccctaa atcgcttggc 5640
 aacatttagt acaaccgtta atgaaactcc tatgttattt tctgaggac cattaaatgtt 5700
 ggaagaaaaa gccactttagt ttcataagaa gaatgtatgtt actacagtgg atttgactgt 5760
 agatcaggca tggagaggaa aagggtgaagg tcttcctgaa atgtgtggg gggccctgt 5820
 gtcataat cagtcctatac agaatgcaat ttgggttattt catgttgcgtt gaggaaatcc 5880
 aatttctgtg gcaaaatgttgc ttactcaaga aatgttccaa aacattgttgc agaaaaatgt 5940
 aagtcaagaga ataatgaaat tggaaatttac tcaatgttca atgaatgttgc tctccaaatc 6000

 gctttttaga aagagtccca ttcatcaccatcattgataaa accatgatta atttccctgc 6060
 agctatgcctt ttcctttaaag ctgaaatttgc tccaaatgtt atgttgcattt ccaatatttgc 6120
 attacctattt gttggggaaac cagaggatca aagggatctt tcaatggat 6180
 aatagtaggc aagactcagc tagttgtatc ttgtatgttgc ctattacagg 6240
 ggctccaggc atigatgttcaatgttgc ttcatctctt ggggttccctt atgttcaaga 6300
 aaaatttgcacc aaaaagggat taaaatttgggtt ggttggaaat ggttgcgtt tagggatca 6360
 cccaaatgttgc gcccaggaa ttatccatc tactgtcatg atggaaaatttgc ttttgcatttgc 6420
 agatgttgc
 tttacaactt gtccaaaga tgaatttggaa ccatttggaa aagttttgg 6480
 atcaaaaaca agagccatttgc atgcttgcctt tttggattt acaatttctat gtcgaatgtt 6540
 ttgggggttca gctatcgat tttccattt gatccaggat tttcacacag gtttgcgtt 6600
 tggcatagat cctgtatgac agtggatgtt attatgttgc acaatgttgc gtttggaga 6660
 tttgggttca gatggat tttccatc tactgtcatg atggaaaatttgc ttttgcatttgc 6720

ggaagcaggt agaatcatga gtgaattatc tggaacacca tctcattttg gaacagctct 6780
 tatcaatact atcattttt ctaaacatct gctgtacaac tgggttatac atgtttgtgg 6840
 ttcaatgc tctgggtctc
 cttgcacagc ttgttgaat tcaatttata ataattattaa 6900
 tctgttattt gtgtttctaa aatatttgg aaagtctcca gtttctttt gtcaagctt 6960
 gaggatcctt tggatcgag atgatgtttt gatagttttt tccagagatg ttcaattga 7020
 caatcttgc tggatggac agaaaattgt agatgagttc aaaaaacttg gcatgacagc 7080
 cacctcagct gataaaaatg tgcctcaact gaagccagg tcaattga ctttctcaa 7140
 aagatcttc aatttggtgg agggatagaat tagacactgca attcagaaa agacaatttg 7200
 gtcttgcatg gcttggcaga gaagtaacgc tggatgtttag cagaatttag aaaatgtca 7260
 gtggtttgc ttatgcatg gctatgatg
 ctatcagaaa ttattttttt ttgttcagtc 7320
 ctgttggag aaagagatga tagaatatag actaaatct tatgatttgg ggagaatgag 7380
 attttatgac cagttttca ttgtgacct ttcatttgcattt gttaaacaa attttcttac 7440
 tcttctgag gtttgcattt ttcttttgc tgcatttgc 7478

<210> 16

<211> 2061

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis C virus NS3/4A coding region

<400> 16

atggcgccta tcaacggccta tgcccagcag acaaggggcc tttggatg cataatcacc 60
 agcttgaccg gcccggacaa aaaccagggt gagggtgagg ttcatgtgt gtcaactgct 120
 gcccagact tcttggcaac ctgcatttacac ggggtgtttt ggactgtcta ccatggagcc 180
 ggaacaagga ccatcgctc acctaagggtt cctgttattcc agatgtacac caatgtggac 240
 caagacctcg taggtggcc cgctcccaa ggtggccgctt cattaaacacc atgcacttgc 300
 ggctcctcg acctttacactt ggtcacgagg cacggcgatg tcattctgt ggcggacgg 360
 ggtgatggca gggcggccctt gtttcgccc cggcttatctt cttacttggaa aggctctcg 420
 ggaggccctc
 tgctgtggcc cgcaggacat gcccgttgcatttgc tattcagagc cgcggatgc 480
 acccggtggag tggctaaaggc ggtggacttc atccccgttag agagctttaga gacaaccatg 540
 aggtccccgg tggcttcaga caactccctcc ccaccaggcag tggcccgatg ctaccaatgt 600
 gcccacccgc atgtccccc acggcggatgtt aagggccacca aggtccccggc cgcatacgca 660
 gctcagggtctt acaagggtctt ggtgctcaac ccctccgtt ctgcaacaat gggcttgggt 720
 gcttacatgtt ccaaggccca tggatttgcatttgcataacatca ggactgggtt gaggacaattt 780
 actactggca gcccgttgcatttgc tttttttttt tttttttttt tttttttttt 840
 tcagggggtt ctatgcat
 aataattttt gacggatgtcc actccacggaa tgcaacatcc 900
 atcttggca ttggactgtt ctttgcacca gcaagagaccg cggggcgag actgactgtg 960
 ctcggccaccc ctacccctcc gggctcgctc actgtgccttcc atccatacat cggaggagggtt 1020
 gctctgtcca ctaccggaga gatccctttt tatggcaagg ctattccctt tgaagcaattt 1080
 aaggggggga gacatctcat ttttgcacca tcaaagaaga agtgcacgaa gctggccgca 1140
 aaactgggtcg ctttggccgtt caatggccgtt gcttacttacc gggcccttga tggccgttgc 1200
 atcccgacca gttgtgacgt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1260
 ggcgacttgc attcgggtat agactgcac
 acgtgttca cccagacagt cgcacttgc 1320
 cttgacccta ctttgcaccaat tggatgttgc tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1380
 caacgtcggtt gtaggactgg cagaggaaatccaggatctt acagattgtt ggcaccgggg 1440
 gagcgttccctt ctggcatgtt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1500

gcttggtatg agcttacgcc cgccgagacc acagttagc tacgagcata catgaacacc 1560
 ccgggacttc ccgtgtgcca agaccatctt gaattttggg agggcgtctt tacgggtctc 1620
 acccacatag acgeccactt cctatcccag acaaaggcaga gtggggaaaa ccttccctat 1680
 ctggtagcgt accaagccac cgtgtgcgt agagctcaag
 cccctccccc gtcgtggac 1740
 cagatgtgga agtgcgtat ccgtctcaag cccaccctcc atgggccaac acctctgcta 1800
 tatagactgg gcgcgttcca gaatgaagtc accctgacgc acccagtcac caagtatatac 1860
 atgacatgtatgtcgctga cctggaggcgtc gtcacgagta cctgggtctcg 1920
 gttctggctgtcttggccgc gtattgccta tccacaggtc gcgtggcat agtaggtagg 1980
 attgtcttgtt ccggaaagcc ggcaatcata cccgacaggg aagtccctcta ccgggagttc 2040
 gatgaaatgg aagagtgcgt a 2061

<210> 17

<211> 686

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis C virus NS3/4A peptide

<400> 17

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

Ile	Ala	Ser	Pro	Lys	Gly	Pro	Val	Ile	Gln	Met	Tyr	Thr	Asn	Val	Asp
65															
															80
Gln	Asp	Leu	Val	Gly	Trp	Pro	Ala	Pro	Gln	Gly	Ala	Arg	Ser	Leu	Thr
85															
															95
Pro	Cys	Thr	Cys	Gly	Ser	Ser	Asp	Leu	Tyr	Leu	Val	Thr	Arg	His	Ala
100															
															110
Asp	Val	Ile	Pro	Val	Arg	Arg	Gly	Asp	Gly	Arg	Gly	Ser	Leu	Leu	
115															
															125
Ser	Pro	Arg	Pro	Ile											
Ser	Tyr	Leu	Lys	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu					
130															
															140
Leu	Cys	Pro	Ala	Gly	His	Ala	Val	Gly	Ile	Phe	Arg	Ala	Ala	Val	Cys
145															
															155
															160

Thr	Arg	Gly	Val	Ala	Lys	Ala	Val	Asp	Phe	Ile	Pro	Val	Glu	Ser	Leu
165															
															175
Glu	Thr	Thr	Met	Arg	Ser	Pro	Val	Phe	Ser	Asp	Asn	Ser	Ser	Pro	Pro
180															
															190
Ala	Val	Pro	Gln	Ser	Tyr	Gln	Val	Ala	His	Leu	His	Ala	Pro	Thr	Gly
195															
															205
Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	Lys	Val	Pro	Ala	Ala	Tyr	Ala	Ala	Gln	Gly	Tyr
210															
															220
Lys	Val	Leu	Val	Leu	Asn										

Pro Ser Val Ala Ala Thr Met Gly Phe Gly			
225	230	235	240
Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly			
245	250	255	
Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly			
260	265	270	
Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile			
275	280	285	
Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile			
290	295	300	
Gly Thr Val Leu Asp Gln			
Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val			
305	310	315	320
Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn			
325	330	335	
Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly			
340	345	350	
Lys Ala Ile Pro Leu Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe			
355	360	365	
Cys His Ser Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala			
370	375	380	
Leu Gly Val Asn Ala Val			
Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val			
385	390	395	400
Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met			
405	410	415	
Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys			
420	425	430	
Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu			
435	440	445	
Thr Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly			
450	455	460	
Arg Thr Gly Arg Gly Lys			
Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly			
465	470	475	480
Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr			
485	490	495	
Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val			
500	505	510	
Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp			
515	520	525	
His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp			
530	535	540	
Ala His Phe Leu Ser Gln			
Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr			
545	550	555	560
Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro			
565	570	575	
Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr			
580	585	590	
Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn			
595	600	605	

Glu Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met
 610 615 620
 Ser Ala Asp Leu Glu Val
 Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly
 625 630 635 640

Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val
 645 650 655
 Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp
 660 665 670
 Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys
 675 680 685

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cloning oligonucleotide

<400> 18

ccgtctagat cagcactttt ccatttcata 30

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cloning oligonucleotide

<400> 19

cctgaattca tggcgctat cacggcctat 30

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cloning oligonucleotide

<400> 20

ccacgcggcc gcgacgaccc acag 24

<210> 21

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cloning oligonucleotide

<400> 21

ctggaggatcg tcacgcctac ctgggtgctc gtt 33

<210> 22

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cloning oligonucleotide

<400> 22

accgagcacc caggtaggcg tgacgacctc cag 33

<210> 23

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cloning oligonucleotide

<400> 23

ctggaggatcg tccgcgtac ctgggtgctc gtt 33

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cloning oligonucleotide

<400> 24

accgagcacc caggtaccgc ggacgacctc cag 33

<210> 25

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis C virus NS3/4A peptide

<400> 25

Thr	Lys	Tyr	Met	Thr	Cys	Met	Ser	Ala	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Thr	Ser
1															
														15	
Thr	Trp	Val	Leu	Val	Gly	Gly	Val	Leu							
20															25

<210> 26

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant Hepatitis C virus NS3/4A peptide

<400> 26

Thr	Lys	Tyr	Met	Thr	Cys	Met	Ser	Ala	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Thr	Gly
1															
														15	
Thr	Trp	Val	Leu	Val	Gly	Gly	Val	Leu							
20															25

<210> 27

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant Hepatitis C virus NS3/4A peptide

<400> 27

Thr	Lys	Tyr	Met	Thr	Cys	Met	Ser	Ala	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Arg	Gly
1															
														15	
Thr	Trp	Val	Leu	Val	Gly	Gly	Val	Leu							
20															25

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis C virus NS3/4A peptide

<400> 28

Ser	Ala	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Thr	Ser	Thr	Trp	Val
1					5					10	

<210> 29

<211> 632

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus NS3 peptide Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis C virus NS3 peptide

<400> 29

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

Ile	Ala	Ser	Pro	Lys	Gly	Pro	Val	Ile	Gln	Met	Tyr	Thr	Asn	Val	Asp
65										70			75		80

Gln	Asp	Leu	Val	Gly	Trp	Pro	Ala	Pro	Gln	Gly	Ala	Arg	Ser	Leu	Thr
85										90			95		

Pro	Cys	Thr	Cys	Gly	Ser	Ser	Asp	Leu	Tyr	Leu	Val	Thr	Arg	His	Ala
100										105			110		

Asp	Val	Ile	Pro	Val	Arg	Arg	Arg	Gly	Asp	Gly	Arg	Gly	Ser	Leu	Leu
115										120			125		

Ser	Pro	Arg	Pro	Ile											
-----	-----	-----	-----	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Ser	Tyr	Leu	Lys	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu					
130										135			140		

Leu	Cys	Pro	Ala	Gly	His	Ala	Val	Gly	Ile	Phe	Arg	Ala	Ala	Val	Cys
145										150			155		160

Thr	Arg	Gly	Val	Ala	Lys	Ala	Val	Asp	Phe	Ile	Pro	Val	Glu	Ser	Leu
165										170			175		

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

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

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

Lys Val Leu Val Leu Asn
 Pro Ser Val Ala Ala Thr Met Gly Phe Gly
 225 230 235 240

Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
 245 250 255
 Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
 260 265 270
 Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
 275 280 285
 Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
 290 295 300
 Gly Thr Val Leu Asp Gln
 Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
 305 310 315 320

Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
 325 330 335
 Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
 340 345 350
 Lys Ala Ile Pro Leu Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe
 355 360 365
 Cys His Ser Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala
 370 375 380
 Leu Gly Val Asn Ala Val
 Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val
 385 390 395 400

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

Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr
 485 490 495
 Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val
 500 505 510
 Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp
 515 520 525
 His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp
 530 535 540
 Ala His Phe Leu Ser Gln
 Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr
 545 550 555 560

Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro
 565 570 575
 Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr
 580 585 590
 Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn

595	600	605
Glu Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met		
610	615	620
Ser Ala Asp Leu Glu Val		
Val Thr		
625	630	

<210> 30

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis C virus NS4A peptide

<400> 30

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

<210> 31

<211> 686

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant Hepatitis C virus NS3/4A

<400> 31

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

Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp			
65	70	75	80
Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ala Arg Ser Leu Thr			
85	90	95	
Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala			
100	105	110	
Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Gly Arg Gly Ser Leu Leu			
115	120	125	

Ser Pro Arg Pro Ile

Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
 130 135 140
 Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
 145 150 155 160

Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Leu
 165 170 175
 Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
 180 185 190
 Ala Val Pro Gln Ser Tyr Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
 195 200 205
 Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr
 210 215 220
 Lys Val Leu Val Leu Asn
 Pro Ser Val Ala Ala Thr Met Gly Phe Gly
 225 230 235 240

Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
 245 250 255
 Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
 260 265 270
 Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
 275 280 285
 Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
 290 295 300
 Gly Thr Val Leu Asp Gln
 Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
 305 310 315 320

Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
 325 330 335
 Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
 340 345 350
 Lys Ala Ile Pro Leu Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe
 355 360 365
 Cys His Ser Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala
 370 375 380
 Leu Gly Val Asn Ala Val
 Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val
 385 390 395 400

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

Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr
 485 490 495
 Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val

500	505	510	
Arg Leu Arg Ala Tyr	Met Asn Thr Pro Gly	Leu Pro Val Cys Gln Asp	
515	520	525	
His Leu Glu Phe Trp	Glu Gly Val Phe Thr	Gly Leu Thr His Ile Asp	
530	535	540	
Ala His Phe Leu Ser Gln			
Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr			
545	550	555	560

Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro			
565	570	575	
Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr			
580	585	590	
Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn			
595	600	605	
Glu Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met			
610	615	620	
Ser Ala Asp Leu Glu Val			
Val Thr Gly Thr Trp Val Leu Val Gly Gly			
625	630	635	640

Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val			
645	650	655	
Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp			
660	665	670	
Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys			
675	680	685	

<210> 32

<211> 686

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant Hepatitis C virus NS3/4A

<400> 32

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

Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp			
65	70	75	80
Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ala Arg Ser Leu Thr			
85	90	95	
Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala			
100	105	110	
Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Gly Arg Gly Ser Leu Leu			
115	120	125	

Ser Pro Arg Pro Ile

Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
 130 135 140
 Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
 145 150 155 160

Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Leu
 165 170 175
 Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
 180 185 190
 Ala Val Pro Gln Ser Tyr Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
 195 200 205
 Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr
 210 215 220
 Lys Val Leu Val Leu Asn
 Pro Ser Val Ala Ala Thr Met Gly Phe Gly
 225 230 235 240

Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
 245 250 255
 Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
 260 265 270
 Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
 275 280 285
 Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
 290 295 300
 Gly Thr Val Leu Asp Gln
 Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
 305 310 315 320

Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
 325 330 335
 Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
 340 345 350
 Lys Ala Ile Pro Leu Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe
 355 360 365
 Cys His Ser Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala
 370 375 380
 Leu Gly Val Asn Ala Val
 Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val
 385 390 395 400

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

Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr
 485 490 495
 Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val

500	505	510	
Arg Leu Arg Ala Tyr	Met Asn Thr Pro Gly	Leu Pro Val Cys Gln Asp	
515	520	525	
His Leu Glu Phe Trp	Glu Gly Val Phe Thr	Gly Leu Thr His Ile Asp	
530	535	540	
Ala His Phe Leu Ser Gln			
Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr			
545	550	555	560

Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro			
565	570	575	
Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr			
580	585	590	
Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn			
595	600	605	
Glu Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met			
610	615	620	
Ser Ala Asp Leu Glu Val			
Val Arg Gly Thr Trp Val Leu Val Gly Gly			
625	630	635	640

Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val			
645	650	655	
Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp			
660	665	670	
Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys			
675	680	685	

<210> 33

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant Hepatitis C virus NS3/4A peptide

<400> 33

Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Pro			
1	5	10	15
Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu			
20	25		

<210> 34

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant Hepatitis C virus NS3/4A peptide

<400> 34

Thr	Lys	Tyr	Met	Thr	Cys	Met	Ser	Ala	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Arg	Pro
1															
														15	
Thr	Trp	Val	Leu	Val	Gly	Gly	Val	Leu							
20															25

<210> 35

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant Hepatitis C virus NS3/4A peptide

<400> 35

Thr	Lys	Tyr	Met	Thr	Cys	Met	Ser	Ala	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Arg	Pro
1															
														15	
Ala	Trp	Val	Leu	Val	Gly	Gly	Val	Leu							
20															25

<210> 36

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant Hepatitis C virus NS3/4A peptide

<400> 36

Thr	Lys	Tyr	Met	Thr	Cys	Met	Ser	Ala	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Cys	Ser
1															
														15	
Thr	Trp	Val	Leu	Val	Gly	Gly	Val	Leu							
20															25

<210> 37

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant Hepatitis C virus NS3/4A peptide

<400> 37

Thr	Lys	Tyr	Met	Thr	Cys	Met	Ser	Ala	Asp	Leu	Glu	Val	Cys	Cys	Ser
1															
														15	
Thr	Trp	Val	Leu	Val	Gly	Gly	Val	Leu							

20 25

<210> 38

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant Hepatitis C virus NS3/4A peptide

<400> 38

<210> 39

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant Hepatitis C virus NS3/4A peptide

<400> 39

Thr	Lys	Tyr	Met	Thr	Cys	Met	Ser	Ala	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	Cys	Ser
1														15	
Thr	Trp	Val	Leu	Val	Gly	Gly	Val	Leu							
20									25						

<210> 40

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant Hepatitis C virus NS3/4A peptide

<400> 40

Thr	Lys	Tyr	Met	Thr	Cys	Met	Ser	Ala	Asp	Val	Val	Val	Val	Thr	Ser
1										10					15
Thr	Trp	Val	Leu	Val	Gly	Gly	Val	Leu							
20									25						

<210> 41

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis C virus NS5 peptide

<400> 41

Ala	Ser	Glu	Asp	Val	Val	Cys	Cys	Ser	Tyr	Thr	Trp	Thr	Gly
1		5				10					15		

<210> 42

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant Hepatitis C virus NS5A/B peptide

<400> 42

Ser	Ser	Glu	Asp	Val	Val	Cys	Cys	Ser	Met	Trp	Val	Leu	Val	Gly	Gly
1		5				10				15					
Val	Leu														

<210> 43

<211> 686

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant Hepatitis C virus NS3/4A

<400> 43

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

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

Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Gly Arg Gly Ser Leu Leu
 115 120 125
 Ser Pro Arg Pro Ile
 Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
 130 135 140
 Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
 145 150 155 160

Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Leu
 165 170 175
 Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
 180 185 190
 Ala Val Pro Gln Ser Tyr Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
 195 200 205
 Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr
 210 215 220
 Lys Val Leu Val Leu Asn
 Pro Ser Val Ala Ala Thr Met Gly Phe Gly
 225 230 235 240

Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
 245 250 255
 Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
 260 265 270
 Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
 275 280 285
 Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
 290 295 300
 Gly Thr Val Leu Asp Gln
 Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
 305 310 315 320

Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
 325 330 335
 Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
 340 345 350
 Lys Ala Ile Pro Leu Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe
 355 360 365
 Cys His Ser Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala
 370 375 380
 Leu Gly Val Asn Ala Val
 Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val
 385 390 395 400

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

Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr

485	490	495	
Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val			
500	505	510	
Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp			
515	520	525	
His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp			
530	535	540	
Ala His Phe Leu Ser Gln			
Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr			
545	550	555	560

Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro			
565	570	575	
Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr			
580	585	590	
Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn			
595	600	605	
Glu Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met			
610	615	620	
Ser Ala Asp Leu Glu Val			
Val Thr Pro Thr Trp Val Leu Val Gly Gly			
625	630	635	640

Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val			
645	650	655	
Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp			
660	665	670	
Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys			
675	680	685	

<210> 44

<211> 686

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant Hepatitis C virus NS3/4A

<400> 44

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

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

Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Gly Arg Gly Ser Leu Leu
 115 120 125
 Ser Pro Arg Pro Ile
 Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
 130 135 140
 Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
 145 150 155 160

Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Leu
 165 170 175
 Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
 180 185 190
 Ala Val Pro Gln Ser Tyr Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
 195 200 205
 Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr
 210 215 220
 Lys Val Leu Val Leu Asn
 Pro Ser Val Ala Ala Thr Met Gly Phe Gly
 225 230 235 240

Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
 245 250 255
 Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
 260 265 270
 Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
 275 280 285
 Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
 290 295 300
 Gly Thr Val Leu Asp Gln
 Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
 305 310 315 320

Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
 325 330 335
 Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
 340 345 350
 Lys Ala Ile Pro Leu Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe
 355 360 365
 Cys His Ser Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala
 370 375 380
 Leu Gly Val Asn Ala Val
 Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val
 385 390 395 400

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

Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr

485	490	495	
Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val			
500	505	510	
Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp			
515	520	525	
His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp			
530	535	540	
Ala His Phe Leu Ser Gln			
Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr			
545	550	555	560

Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro			
565	570	575	
Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr			
580	585	590	
Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn			
595	600	605	
Glu Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met			
610	615	620	
Ser Ala Asp Leu Glu Val			
Val Arg Pro Thr Trp Val Leu Val Gly Gly			
625	630	635	640

Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val			
645	650	655	
Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp			
660	665	670	
Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys			
675	680	685	

<210> 45

<211> 686

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant Hepatitis C virus NS3/4A

<400> 45

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

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

Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Gly Arg Gly Ser Leu Leu
 115 120 125
 Ser Pro Arg Pro Ile
 Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
 130 135 140
 Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
 145 150 155 160

Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Leu
 165 170 175
 Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
 180 185 190
 Ala Val Pro Gln Ser Tyr Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
 195 200 205
 Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr
 210 215 220
 Lys Val Leu Val Leu Asn
 Pro Ser Val Ala Ala Thr Met Gly Phe Gly
 225 230 235 240

Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
 245 250 255
 Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
 260 265 270
 Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
 275 280 285
 Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
 290 295 300
 Gly Thr Val Leu Asp Gln
 Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
 305 310 315 320

Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
 325 330 335
 Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
 340 345 350
 Lys Ala Ile Pro Leu Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe
 355 360 365
 Cys His Ser Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala
 370 375 380
 Leu Gly Val Asn Ala Val
 Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val
 385 390 395 400

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

Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr

485	490	495	
Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val			
500	505	510	
Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp			
515	520	525	
His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp			
530	535	540	
Ala His Phe Leu Ser Gln			
Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr			
545	550	555	560

Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro			
565	570	575	
Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr			
580	585	590	
Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn			
595	600	605	
Glu Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met			
610	615	620	
Ser Ala Asp Leu Glu Val			
Val Arg Pro Ala Trp Val Leu Val Gly Gly			
625	630	635	640

Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val			
645	650	655	
Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp			
660	665	670	
Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys			
675	680	685	

<210> 46

<211> 686

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant Hepatitis C virus NS3/4A

<400> 46

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

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

Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Gly Arg Gly Ser Leu Leu
 115 120 125
 Ser Pro Arg Pro Ile
 Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
 130 135 140
 Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
 145 150 155 160

Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Leu
 165 170 175
 Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
 180 185 190
 Ala Val Pro Gln Ser Tyr Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
 195 200 205
 Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr
 210 215 220
 Lys Val Leu Val Leu Asn
 Pro Ser Val Ala Ala Thr Met Gly Phe Gly
 225 230 235 240

Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
 245 250 255
 Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
 260 265 270
 Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
 275 280 285
 Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
 290 295 300
 Gly Thr Val Leu Asp Gln
 Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
 305 310 315 320

Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
 325 330 335
 Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
 340 345 350
 Lys Ala Ile Pro Leu Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe
 355 360 365
 Cys His Ser Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala
 370 375 380
 Leu Gly Val Asn Ala Val
 Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val
 385 390 395 400

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

Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr

485	490	495	
Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val			
500	505	510	
Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp			
515	520	525	
His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp			
530	535	540	
Ala His Phe Leu Ser Gln			
Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr			
545	550	555	560

Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro			
565	570	575	
Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr			
580	585	590	
Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn			
595	600	605	
Glu Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met			
610	615	620	
Ser Ala Asp Leu Glu Val			
Val Cys Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly			
625	630	635	640

Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val			
645	650	655	
Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp			
660	665	670	
Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys			
675	680	685	

<210> 47

<211> 686

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant Hepatitis C virus NS3/4A

<400> 47

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

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

Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Gly Arg Gly Ser Leu Leu
 115 120 125
 Ser Pro Arg Pro Ile
 Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
 130 135 140
 Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
 145 150 155 160

Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Leu
 165 170 175
 Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
 180 185 190
 Ala Val Pro Gln Ser Tyr Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
 195 200 205
 Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr
 210 215 220
 Lys Val Leu Val Leu Asn
 Pro Ser Val Ala Ala Thr Met Gly Phe Gly
 225 230 235 240

Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
 245 250 255
 Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
 260 265 270
 Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
 275 280 285
 Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
 290 295 300
 Gly Thr Val Leu Asp Gln
 Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
 305 310 315 320

Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
 325 330 335
 Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
 340 345 350
 Lys Ala Ile Pro Leu Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe
 355 360 365
 Cys His Ser Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala
 370 375 380
 Leu Gly Val Asn Ala Val
 Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val
 385 390 395 400

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

Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr

485	490	495	
Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val			
500	505	510	
Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp			
515	520	525	
His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp			
530	535	540	
Ala His Phe Leu Ser Gln			
Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr			
545	550	555	560

Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro			
565	570	575	
Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr			
580	585	590	
Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn			
595	600	605	
Glu Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met			
610	615	620	
Ser Ala Asp Leu Glu Val			
Cys Cys Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly			
625	630	635	640

Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val			
645	650	655	
Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp			
660	665	670	
Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys			
675	680	685	

<210> 48

<211> 686

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant Hepatitis C virus NS3/4A

<400> 48

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

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

Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Gly Arg Gly Ser Leu Leu
 115 120 125
 Ser Pro Arg Pro Ile
 Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
 130 135 140
 Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
 145 150 155 160

Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Leu
 165 170 175
 Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
 180 185 190
 Ala Val Pro Gln Ser Tyr Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
 195 200 205
 Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr
 210 215 220
 Lys Val Leu Val Leu Asn
 Pro Ser Val Ala Ala Thr Met Gly Phe Gly
 225 230 235 240

Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
 245 250 255
 Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
 260 265 270
 Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
 275 280 285
 Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
 290 295 300
 Gly Thr Val Leu Asp Gln
 Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
 305 310 315 320

Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
 325 330 335
 Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
 340 345 350
 Lys Ala Ile Pro Leu Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe
 355 360 365
 Cys His Ser Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala
 370 375 380
 Leu Gly Val Asn Ala Val
 Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val
 385 390 395 400

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

Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr

485	490	495	
Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val			
500	505	510	
Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp			
515	520	525	
His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp			
530	535	540	
Ala His Phe Leu Ser Gln			
Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr			
545	550	555	560

Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro			
565	570	575	
Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr			
580	585	590	
Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn			
595	600	605	
Glu Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met			
610	615	620	
Ser Ala Asp Leu Glu Val			
Ser Ser Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly			
625	630	635	640

Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val			
645	650	655	
Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp			
660	665	670	
Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys			
675	680	685	

<210> 49

<211> 686

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant Hepatitis C virus NS3/4A

<400> 49

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

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

Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Gly Arg Gly Ser Leu Leu
 115 120 125
 Ser Pro Arg Pro Ile
 Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
 130 135 140
 Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
 145 150 155 160

Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Leu
 165 170 175
 Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
 180 185 190
 Ala Val Pro Gln Ser Tyr Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
 195 200 205
 Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr
 210 215 220
 Lys Val Leu Val Leu Asn
 Pro Ser Val Ala Ala Thr Met Gly Phe Gly
 225 230 235 240

Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
 245 250 255
 Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
 260 265 270
 Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
 275 280 285
 Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
 290 295 300
 Gly Thr Val Leu Asp Gln
 Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
 305 310 315 320

Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
 325 330 335
 Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
 340 345 350
 Lys Ala Ile Pro Leu Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe
 355 360 365
 Cys His Ser Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala
 370 375 380
 Leu Gly Val Asn Ala Val
 Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val
 385 390 395 400

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

Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr

485	490	495	
Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val			
500	505	510	
Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp			
515	520	525	
His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp			
530	535	540	
Ala His Phe Leu Ser Gln			
Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr			
545	550	555	560

Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro			
565	570	575	
Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr			
580	585	590	
Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn			
595	600	605	
Glu Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met			
610	615	620	
Ser Ala Asp Ser Ser Ser			
Ser Cys Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly			
625	630	635	640

Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val			
645	650	655	
Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp			
660	665	670	
Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys			
675	680	685	