(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C07K 14/18

(45) 공고일자 1999년05월01일
(11) 등록번호 10-0185373
(24) 등록일자 1998년12월24일

(21) 출원번호	10-1990-0702467	(65) 공개번호	특1992-0700045
(22) 출원일자	1990년11월17일	(43) 공개일자	1992년02월19일
번역문제출일자	1991년01월01일		
(86) 국제출원번호	PCT/US 90/01348	(87) 국제공개번호	WO 91/00037
(86) 국제출원일자	1990년03월15일	(87) 국제공개일자	1988년08월08일
(81) 지정국	국내특허 : 오스트레일리아 핀란드 헝가리 일본 대한민국 노르웨이 러시아		
(30) 우선권주장	325,338 1989년03월17일 미국(US) 341,334 1989년04월20일 미국(US) 355,002 1989년05월18일 미국(US)		
---	---
(73) 특허권자	카이론 코오퍼레이션 로버트 피. 블랙버언 미합중국 캘리포니아주 94608 에머리빌리 호르톤 스트리트 4560
(72) 발명자	미카엘 하우튼 미합중국 캘리포니아주 94526 댄빌 로우즈미드 코오트 53 쿠이-림 츄우 미합중국 캘리포니아주 94530 엘 세리토 퍼언 스트리트 5700 죠오지 쿠오 미합중국 캘리포니아주 94122 샌프란시스코 6 아베뉴 1370
(74) 대리인	장용식, 정진상

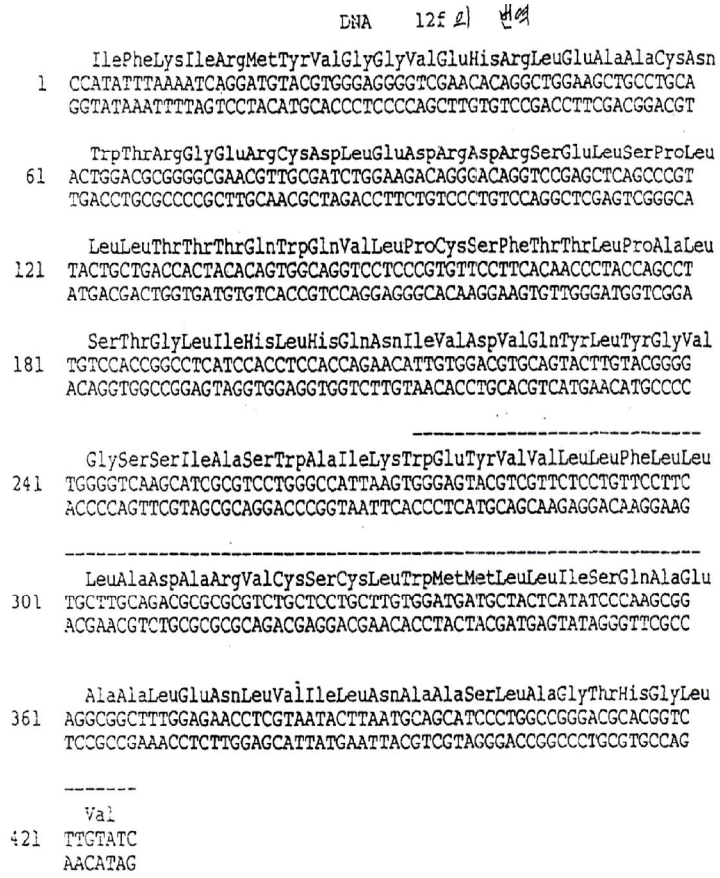
심사관 : 한현숙

(54) HCV 폴리단백질에서 유래되는 HCV 아미노산 서열 부분을 포함하는 폴리펩티드 및 그 사용

요약

내용 없음.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

HCV 폴리단백질에서 유래되는 HCV 아미노산 서열 부분을 포함하는 폴리펩티드 및 그 사용

[발명의 상세한 설명]

[기술분야]

본 발명은 비 A, 비 B형 간염 바이러스(NANBV) 감염의 확산을 처리하기 위한 물질 및 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 NANBH의 병원학적 병원체(agent)인 간염 C형 바이러스(HCV)의 게놈으로부터 유래된 폴리뉴클레오티드, 그 안에 코드화된 폴리펩티드, 및 이 폴리펩티드에 대한 항체에 관한 것이다. 이들 시약은 HCV와 그것의 감염에 대한 선별(Screening) 제제로서, 및 그 질병에 대한 보호제로서 유용하다.

[본 출원에 인용된 참고문헌]

Barr et al. (1986), Biotechniques 4:428.
Botstein (1979), Gene 8:17.
Brinton, M.A. (1986) in THE VIRUSES: THE TOGAVIRIDAE AND FLAVIVIRIDAE (Series eds. Fraenkel-Conrat and Wagner, vol. eds. Schlesinger and Schlesinger, Plenum Press), p.327-374.
Broach (1981) in: Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Vol. 1, p.445, Cold Spring Harbor Press.
Broach et al. (1983), Meth. Enz. 101:307.
Chang et al. (1977), Nature 198:1056.
Chirgwin et al. (1979), Biochemistry 18:5294.
Chomczynski and Sacchi (1987), Analytical Biochemistry 162:156.
Clewell et al. (1969), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62:1159.

Clewell (1972), J. Bacteriol. 110:667.
Cohen (1972), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110.
Cousens et al. (1987), gene 61:265.
De Boer et al. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 292:128.
Dreesman et al. (1985), J. Infect. Disease 151:761.
Feinstone, S.M. and Hoofnagle, J.H. (1984), New Engl. J. Med. 311:185.
Fields & Knipe (1986), FUNDAMENTAL VIROLOGY (Raven Press, N.Y.).
Fiers et al. (1978), Nature 273:113.
Gerety, R.J. et al., in VIRAL HEPATITIS AND LIVER DISEASE (Vyas, B.N., Dienstag, J.L., and Hoofnagle, J.H., eds, Grune and Stratton, Inc., 1984) pp 23-47.
Goeddel et al. (1980), Nucleic Acids Res. 8:4057.
Graham and Van der Eb (1978), Virology 52:546.
Grunstein and Hogness (1975), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:3961.
Grych et al. (1985), Nature 316:74.
Gubler and Hoffman (1983), Gene 25:263.
Hahn (1988) Virology 162:167.
Hammerling et al. (1981), MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS.
Han (1987), Biochemistry 26:1617.
Helfman (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:31.
Hess et al. (1968), J. Adv. Enzyme Reg 7:149.
Hinnen et al. (1978), Proc. Natl. Acad. Sci. 75:1929.
Hitzeman et al. (1980), J. Biol. Chem. 255:2073.
Holland et al. (1978), Biochemistry 17:4900.
Holland (1981), J. Biol. Chem. 256: 1385.
Houghton et al. (1981), Nucleic Acids Res. 9:247
Hunyh, T.V. et al. (1985) in DNA CLONING TECHNIQUES; A PRACTICAL APPROACH (D. Glover, Ed., IRL Press, Oxford, U.K.) pp. 49-78.
Immun. Rev. (1982) 62:185.
Iwarson (1987), British Medical J. 295:946.

Kennett et al. (1980) MONOCLONAL ANTIBODIES.
Kyte and Doolittle (1982), J. Mol. Biol. 157:105-132.
Laemmli (1970), Nature 227, 680.
Lee et al. (1988), Science 239:1288.
Maniatis, T., et al. (1982) MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).
Mayer and Walker, eds. (1987), IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (Academic Press, London).
Maxam et al. (1980), Methods in Enzymology 65:499.
MacNamara et al. (1984), Science 226:1325.
Messing et al. (1981), Nucleic Acids Res. 9:309.
Messing (1983), Methods in Enzymology 101:20-37.
METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press).
Michelle et al., Int. Symposium on Viral Hepatitis.
Monath (1986) in THE VIRUSES: THE TOGAVIRADAE AND FLAVIVIRIDAE (Series eds. Fraenkel-Conrat and Wagner, vol. eds. Schlesinger and Schlesinger, Plenum Press), p.375-440.
Nagahuma et al. (1984), Anal. Biochem. 141:74.
Neurath et al. (1984), Science 224:392.
Nisonoff et al. (1981), Clin. Immunol. Immunopathol. 21:397-406.
Overby, L.R. (1985), Curr. Hepatol. 5:49.
Overby, L.R. (1986), Curr. Hepatol. 6:65.
Overby, L.R. (1987), Curr. Hepatol. 7:35.
Peleg (1969), Nature 221:193.
Pfefferkorn and Shapiro (1974), in COMPREHENSIVE VIROLOGY, Vol. 2 (Fraenkel-Conrat & Wagner, eds., Plenum, N.Y.) pp. 171-230.
Prince, A.M. (1983), Annu. Rev. Microbiol. 37:217.
Rice et al. (1985), Science 229:726.

Rice et al. (1986) in THE VIRUSES: THE TOGAVIRIDAE AND FLAVIVIRIDAE (Series eds. Fraenkel-Conrat and Wagner, vol. eds. Schlesinger and Schlesinger, Plenum Press), p.279-328.
Roehrig (1986) in THE VIRUSES: THE TOGAVIRIDAE AND FLAVIVIRIDAE (Series eds. Fraenkel-Conrat and Wagner, vol. eds. Schlesinger and Schlesinger, Plenum Press)
Sadler et al. (1980), Gene 8, 279.
Saiki et al. (1986), Nature 324: 163.
Saiki et al. (1988), Science 239:487.
Sanger et al. (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463.
Schlesinger et al. (1986), J. Virol. 60:1153.
Schreier, M., et al. (1980) HYBRIDOMA TECHNIQUES
Scopes (1984), PROTEIN PURIFICATION, PRINCIPLES AND PRACTICE, SECOND EDITION (Springer-Verlag, N.Y.).
Shimatake et al. (1981), Nature 292:128.
Sippel (1973), Eur. J. Biochem. 37:31.
Steimer et al. (1986), J. Virol. 58:9.
Stollar (1980), in THE TOGAVIRUSES (R.W. Schlesinger, ed., Academic Press, N.Y.), pp. 584-622.
Sumiyoshi et al. (1987), Virology 161:497.
Taylor et al. (1976), Biochem. Biophys. Acta 442:324.
Towbin et al. (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350.
Tsu and Herzenberg (1980), in SELECTED METHODS IN CELLULAR IMMUNOLOGY (W.H. Freeman and Co.) pp. 373-391.
Vytdehaag et al. (1985), J. Immunol. 134:1225.
Valenzuela, P., et al. (1982), Nature 298:344.
Valenzuela, P., et al. (1984), in HEPATITIS B (Millman, I., et al., ed, Plenum Press) pp. 225-236.
Warner (1984), DNA 3:401.
Wu and Grossman (1987), Methods in Enzymology Vol. 154, RECOMBINANT DNA, Part E.
Wu (1987), Methods in Enzymology vol 155, RECOMBINANT DNA, part F.
Zoller (1982), Nucleic Acids Res. 10:6487.

[인용된 특허]

EP0 공보 제 318,216호

PCT 공보 WO 89/04669

미국 특허 제 4,341,761호

미국 특허 제 4,399,121호

미국 특허 제 4,427,783호

미국 특허 제 4,444,887호

미국 특허 제 4,466,917호

미국 특허 제 4,472,500호

미국 특허 제 4,491,632호

미국 특허 제 4,493,890호

[배경기술]

비 A, 비 B형 간염(NANBH)은 전파될 수 있는 하나의 또는 일군의 질병으로서 또는 바이러스에 의해 유도되는 것으로 믿어지며, 또한 공지의 간염 바이러스 예를 들면 간염 A형 바이러스(HAV), 간염 B형 바이러스(HBV), 및 델타 간염 바이러스(HDV)에 의해 유도되는 간염 뿐만 아니라 사이토메갈로바이러스(CMV) 또는 엡스타인-바르 바이러스(EBV)에 의해 유도되는 간염을 포함한 바이러스-관련 간 질병의 다른 형태들과는 구별되는 종류의 질병이다. NANBH는 수혈받은 개체에게서 처음 확인되었다. 사람으로부터 침팬지로의 전파 및 침팬지간의 연속적인 계대는 NANBH가 전파가능한 감염성 병원체 또는 병원체들에 의한 것이라는 증거를 증명하였다.

전염원역학의 증거는 NANBH에 세가지 타입이 있을 수 있다는 것을 시사한다: 물로 전파되는 유행병 타입; 혈액 또는 주사바늘과 관련된 타입; 및 산발적으로 발생하는 (획득된 공통성) 타입. 그러나, NANBH의 원인이 될 수 있는 병원체들의 수는 아직 미지이다.

NANBH의 임상적인 진단 및 확인은 다른 바이러스 마아커들을 배제함으로써 주로 이루어져 왔었다. 추정되는 NANBV 항원 및 항체를 검출하기 위해 사용된 방법중에는 아가-겔확산법, 카운터 면역전기영동법, 면역형광현미경검사법, 면역전자현미경검사법, 방사선면역측정법 및 효소-결합 면역흡착 검사법이 있다. 그러나, 이들 측정법중 어느 것도 NANBH에 대한 진단 시험으로서 사용될 수 있도록 충분히 민감하고 특이적이며 재생가능한 것으로 증명된 것은 없었다.

이전에는 NANBH의 병원체와 관련된 항원 항체 시스템의 정체 또는 특이성에 대한 것으로서 명확한 것이든 일치하는 것이든 없었다. 이것은 적어도 부분적으로는 개체의 NANBV의 HBV에 선행하여 또는 동시·감염에 의한 것이었고, HBV와 관련된 가용성 및 입상 항원의 공지된 복합성때문이었으며, 또한 간 세포의 게놈으로의 HBV DNA의 통합에 의한 것이었다. 또한, NANBH가 하나이상의 감염성 병원체에 의하여 유발된다는 가능성 뿐만아니라, NANBH가 오진되어 왔었다는 가능성이 있다. 더욱이, 혈청학적 측정법이 NANBH에 걸린 환자의 혈청에서 무엇을 검출할 수 있는 지도 불분명하다. 오랫동안 아가-겔 확산법 및 카운터 면역 전기영동측정법이, 때로 혈청 시료들 사이에서 발생하며, 특이적인 NANBV 항원-항체 반응을 나타내는 것이 아닌 자기면역반응 또는 비특이적인 단백질 상호작용을 검출하는 것으로 추정되어 왔다. 면역형광법, 효소-결합면역흡착법, 및 방사선 면역측정법은 기타의 다른 질병 및 간 질병이외의 질병에 걸린 환자에서 뿐만이 아니라 NANBH에 걸린 환자의 혈청에 고빈도로 존재하는 류머티스성-인자와 같은 물질을 저수준이라도 검출하는 것으로 여겨진다. 검출된 반응성중 일부는 숙주-규정 세포질성 항원에 대한 항체를 나타낼 것이다.

NANBV로서 많은 후보 바이러스가 있었다. 예를 들어 프린스(Prince, 1983), 파인스톤과 후우프나글(Feinstone Floofnagle, 1984) 및 오버비(Overby, 1985, 1986, 1987)에 의한 개관논문과, 이바르손(Iwarson, 1987)에 의한 논문을 참고할 수 있다. 그러나, 이들 논문에는 이들 후보 바이러스중 그 어떤 것도 NANBH의 병원학적 병원체를 나타낸다는 증거는 없다.

NANBV 및 NANBV 감염 혈액 또는 혈액 생성물의 운반체를 선별하고 확인하기 위한 민감하고 특이적인 방법에 대한 요구는 상당하다. 수혈-후 간염(PTH)는 수혈받은 환자의 대략 10%에게서 발생하며, NANBH가 이런 경우의 90% 정도를 차지한다. 이 질병에 있어서의 주된 문제점은 만성 간 손상으로의 빈번한 진전(25-55%)이다.

혈액 및 혈액 생성물에 의한 또는 밀접한 개인간의 접촉에 의한 NANBH의 전파의 방지뿐만이 아니라 환자 보살핌에는 NANBV에 관련된 핵산, 항원 및 항체를 검출하기 위한 믿을만한 선별, 진단 및 예후(prognostic)기구를 필요로 한다. 또한, 질병의 예방 및/ 또는 치료를 위해 효과적인 백신 및 면역치료적 치료제에 대한 필요성도 없다.

본 출원인은 혈액-내포 NANBH(BB-NANBH)의 주요 병원학적 병원체인 것으로 증명된, 신규한 바이러스인 간염 C형 바이러스(HCV)를 발견하였다. 원형 HCV 단리물인 CDC/HCV1(HCV1으로도 호칭됨)의 부분적인 게놈 서열을 포함하는 본 출원인의 초기작업은 EPO 공보 제 318,216호(1989년 5월 31일 공개)와 PCT 공보 WO 89/04669(1989년 6월 1일 공개)에 기재되어 있다. 이들 특허출원의 내용과, 대응하는 국내단계의 모든 특허출원의 내용은 본원에서 참고로써 혼용한다. 이들 출원은 특히 재조합 DNA의 클로닝 방법 및 HCV 서열의 발현, HCV폴리펩티드, HCV 면역진단기법, HCV 프로프 진단기법, 항-HCV 항체, 및 신규한 HCV 서열의 분리방법과, 새로운 HCV 단리물의 서열에 대하여 교시한다.

[발명의 개시]

본 발명은 부분적으로는 EPO 공보 제 318,216호에 또는 PCT 공보 WO 89/04669에 개시되지 않은 신규한 HCV 서열 및 폴리펩티드를 토대로 한다. 본 발명에는 이들 신규한 서열과 폴리펩티드, 그중에서도 특히

면역진단시약, 프로브 진단시약, 항-HCV 항체 제조, PCR 기법 및 재조합 DNA 기법의 출원이 포함된다. 본 발명에는 또한, 본원에 개시된 HCV 폴리펩티드의 면역원성을 토대로 한 신규한 면역측정법이 포함된다. 본원에서 청구되고, 반면에 EPO 공보 제 318,216호에 기재된 기법을 사용하여 개발된 신규한 목적 물질은 그 출원, 또는 그의 대응하는 모든 출원을 선행하는 우선일을 갖는다. 그러므로, 본 발명은 HCV 항원 및 항체에 대한 시료를 선별하는데 유용하고, HCV 감염의 치료에 유용한 신규한 조성물 및 방법을 제공한다.

따라서, 본 발명의 한 측면은 HCV cDNA로부터 유래된 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드로서, 그 HCV cDNA는 클론 13i, 또는 클론 26j, 또는 클론 59a, 또는 클론 84a, 또는 클론 CA156e, 또는 클론 pi14a, 또는 클론 216a, 또는 클론 CA290a, 또는 클론 ag30a, 또는 클론 205a, 또는 클론 18g, 또는 클론 16jh에 있고, 또는 HCV cDNA는 제17도에서 뉴클레오티드 번호-319에서 1348까지 또는 8866까지로 표시되는 서열의 것이다.

본 발명의 다른 측면은 HCV cDNA가 제17도에서 뉴클레오티드 번호 -319에서 1348까지 또는 8659에서 8866까지로 표시되는 서열의 것인 HCV cDNA내에 코드화된 에피토프를 포함하는 정제된 폴레펩티드이다.

본 발명의 또 하나의 측면은 HCV cDNA로부터 유래된 DNA의 ORF를 포함하는 재조합 발현벡터로 형질전환된 세포에 의해 생산된 면역원성 폴리펩티드로서, 그 HCV cDNA는 클론 CA279a, 클론 CA74a, 또는 클론 13i, 또는 클론 CA290a, 또는 클론 33C, 또는 클론 40b, 또는 클론 33b, 또는 클론 25c, 또는 클론 14c, 또는 클론 8f, 또는 클론 33f, 또는 클론 33g, 또는 클론 39c, 또는 클론 15e에 있는 HCV cDNA 서열로부터 유래된 서열로 구성되며, 상기 ORF는 소정의 숙주에 적합한 제어 서열에 작동가능하게 연결된다.

본 발명의 또 다른 측면은 HCV 에피토프를 포함하는 펩티드로서, 이 펩티드는 하기의 일반식:

$$AA_x - AA_y$$

의 것이고, 상기 식에서 x와 y는 제17도에 도시된 아미노산 번호를 표시하며,

상기 펩티드는 AA1-AA25, AA1-AA50, AA1-AA84, AA9-AA177,

AA1-AA25, AA1-AA50, AA1-AA84, AA9-AA177,
AA1-AA10, AA5-AA20, AA20-AA25, AA35-AA45, AA50-AA100,
AA40-AA90, AA45-AA65, AA65-AA75, AA80-90, AA99-AA120,
AA95-AA110, AA105-AA120, AA100-AA150, AA150-AA200,
AA155-AA170, AA190-AA210, AA200-AA250, AA220-AA240,
AA245-AA265, AA250-AA300, AA290-AA330, AA290-305,
AA300-AA350, AA310-AA330, AA350-AA400, AA380-AA395,
AA405-AA495, AA400-AA450, AA405-AA415, AA415-AA425,
AA425-AA435, AA437-AA582, AA450-AA500, AA440-AA460,
AA460-AA470, AA475-AA495, AA500-AA550, AA511-AA690, AA515-
AA550, AA550-AA600, AA550-AA625, AA575-AA605, AA585-AA600,
AA600-AA650, AA600-AA625, AA635-AA665, AA650-AA700,
AA645-AA680, AA700-AA750, AA700-AA725, AA700-AA750,
AA725-AA775, AA770-AA790, AA750-AA800, AA800-AA815,
AA825-AA850, AA850-AA875, AA800-AA850, AA920-AA990,
AA850-AA900, AA920-AA945, AA940-AA965, AA970-AA990,
AA950-AA1000, AA1000-AA1060, AA1000-AA1025, AA1000-AA1050,
AA1025-AA1040, AA1040-AA1055, AA1075-AA1175,
AA1050-AA1200, AA1070-AA1100, AA1100-AA1130,
AA1140-AA1165, AA1192-AA1457, AA1195-AA1250,

AA1200-AA1225, AA1225-AA1250, AA1250-AA1300,
AA1260-AA1310, AA1260-AA1280, AA1266-AA1428,
AA1300-AA1350, AA1290-AA1310, AA1310-AA1340, AA1345-
AA1405, AA1345-AA1365, AA1350-AA1400, AA1365-AA1380,
AA1380-AA1405, AA1400-AA1450, AA1450-AA1500,
AA1460-AA1475, AA1475-AA1515, AA1475-AA1500,
AA1500-AA1550, AA1500-AA1515, AA1515-AA1550,
AA1550-AA1600, AA1545-AA1560, AA1569-AA1931,
AA1570-AA1590, AA1595-AA1610, AA1590-AA1650,
AA1610-AA1645, AA1650-AA1690, AA1685-AA1770,
AA1689-AA1805, AA1690-AA1720, AA1694-AA1735,
AA1720-AA1745, AA1745-AA1770, AA1750-AA1800,
AA1775-AA1810, AA1795-AA1850, AA1850-AA1900,
AA1900-AA1950, AA1900-AA1920, AA1916-AA2021,
AA1920-AA1940, AA1949-AA2124, AA1950-AA2000,
AA1950-AA1985, AA1980-AA2000, AA2000-AA2050,
AA2005-AA2025, AA2020-AA2045, AA2045-AA2100,
AA2045-AA2070, AA2054-AA2223, AA2070-AA2100,
AA2100-AA2150, AA2150-AA2200, AA2200-AA2250,
AA2200-AA2325, AA2250-AA2330, AA2255-AA2270,
AA2265-AA2280, AA2280-AA2290, AA2287-AA2385,
AA2300-AA2350, AA2290-AA2310, AA2310-AA2330,
AA2330-AA2350, AA2350-AA2400, AA2348-AA2464,
AA2345-AA2415, AA2345-AA2375, AA2370-AA2410,
AA2371-AA2502, AA2400-AA2450, AA2400-AA2425,
AA2415-AA2450, AA2445-AA2500, AA2445-AA2475,
AA2470-AA2490, AA2500-AA2550, AA2505-AA2540,
AA2535-AA2560, AA2550-AA2600, AA2560-AA2580,
AA2600-AA2650, AA2605-AA2620, AA2620-AA2650,
AA2640-AA2660, AA2650-AA2700, AA2655-AA2670,
AA2670-AA2700, AA2700-AA2750, AA2740-AA2760,
AA2750-AA2800, AA2755-AA2780,
AA2780-AA2830, AA2785-AA2810, AA2796-AA2886,
AA2810-AA2825, AA2800-AA2850, AA2850-AA2900,
AA2850-AA2865, AA2885-AA2905, AA2900-AA2950,
AA2910-AA2930, AA2925-AA2950, AA2945-끝 (C'말단).

으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

본 발명의 또 하나의 측면은 HCV cDNA에 코드화된 에피토프에 대한 단일클론성 항체이며, 그 HCV cDNA는 제17도의 뉴클레오티드 번호 -319에서 1348까지 또는 8659에서 8866까지로 표시되는 서열의 것이나, 또는 클론 13i, 또는 클론 26j, 또는 클론 59a, 또는 클론 84a, 또는 클론 CA156e, 또는 클론 167b, 또는 클론 pi14a, 또는 클론 CA216a, 또는 클론 CA290a, 또는 클론 ag30a, 또는 클론 205a, 또는 클론 18g, 또는 클론 16jh에 존재하는 서열이다.

본 발명의 또 다른 측면은 HCV cDNA내에 코드화된 에피토프를 포함하는 폴리펩티드에 대한 정제된 다중클론성 항체의 제제이고, 그 HCV cDNA는 제17도의 뉴클레오티드 번호 -319에서 1348까지 또는 8659에서 8866까지로 표시되는 서열의 것이나, 또는 클론 13i, 또는 클론 26j, 또는 클론 59a, 또는 클론 84a, 또는 클론 CA156e, 또는 클론 167b, 또는 클론 pi14a, 또는 클론 CA216a, 또는 클론 CA290a, 또는 클론 ag30a, 또는 클론 205a, 또는 클론 18g, 또는 클론 16jh에 존재하는 서열이다.

본 발명의 또 하나의 측면은 HCV에 대한 폴리뉴클레오티드 프로브로서, 이 프로브는 제17도의 뉴클레오티드 번호 -319에서 1348까지 또는 8659에서 8866까지로 표시되는 HCV cDNA 서열, 또는 HCV cDNA서열의 상보체로부터 유래된 HCV 서열로 구성된다.

본 발명의 또 하나의 측면은 약 8 또는 그 이상의 뉴클레오티드 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드 프로브를 포함하는, HCV로부터 유래하는 폴리뉴클레오티드의 존재를 시료에서 분석하기 위한 키트로서, 상기 뉴클레오티드 서열은 제17도의 뉴클레오티드 번호 -319에서 1348까지 또는 8659에서 8866까지로 표시되는 서열인 HCV cDNA로부터 유도되며, 폴리뉴클레오티드 프로브는 적당한 용기안에 있는 것을 특징으로 한다.

본 발명의 또 하나의 측면은 HCV 항원과 면역학적으로 반응하는 항체를 포함하는, HCV항원의 존재를 시료에서 분석하기 위한 키트로, 그 항원은 제17도에서 뉴클레오티드 번호 -319에서 1348까지 또는 8659에서 8866까지로 표시되는 서열의 HCV cDNA 내에 코드화된 에피토프를 함유하고, 그 HCV cDNA는 클론 13i, 또는 클론 26j, 또는 클론 59a, 또는 클론 84a, 또는 클론 CA156e, 또는 클론 167b, 또는 클론 pi14a, 또는 클론 CA216a, 또는 클론 CA290a, 또는 클론 ag30a, 또는 클론 205a, 또는 클론 18g, 또는 클론 16jh에 있다.

본 발명의 또 다른 측면은 제17도에서 뉴클레오티드 번호 -319에서 1348까지 또는 8659에서 8866까지로 표시되는 서열의, 또는 클론 13i, 또는 클론 26j, 또는 클론 59a, 또는 클론 84a, 또는 클론 CA156e, 또는 클론 167b, 또는 클론 pi14a, 또는 클론 CA216a, 또는 클론 CA290a, 또는 클론 ag30a, 또는 클론 205a, 또는 클론 18g, 또는 클론 16jh에 있는 HCV cDNA내에 코드화된 HCV 에피토프를 함유하는 항원성 폴리펩티드를 포함하는 HCV 항원의 존재에시료에서 분석하기 위한 키트이다.

본 발명의 또 하나의 측면은 클론 CA279a, 또는 클론 CA74a, 또는 클론 13i, 또는 클론 CA290a, 또는 클론 33C, 또는 클론 40b, 또는 클론 33b, 또는 클론 25c, 또는 클론 14c, 또는 클론 8f, 또는 클론 33f, 또는 클론 33g, 또는 클론 39c, 또는 클론 15e에 있는 HCV cDNA로부터 발현된 항원성 폴리펩티드를 포함

하는 HCV 항체의 존재를 시료에서 분석하기 위한 키트이며, 상기 항원성 폴리펩티드는 적당한 용기내에 있는 것을 특징으로 한다.

본 발명의 또 다른 하나의 측면은 시료중의 HCV 핵산을 검출하기 위한 방법으로서, 그 방법은 (a) 제17도에서 뉴클레오티드 번호 -319에서 1348까지 또는 8659에서 8866까지로 표시되는 서열의 HCV cDNA서열로부터 유래된 HCV서열로 구성된, HCV에 대한 폴리뉴클레오티드 프로브를 시료의 핵산과, 프로브와 시료의 HCV 핵산 사이의 폴리뉴클레오티드 이중체(duplex)의 형성을 허용하는 조건하에서 반응시키는 단계와, (b) 단계 (a)에서 형성된, 프로브를 함유하는 폴리뉴클레오티드 이중체를 검출하는 단계로 이루어진다.

본 발명의 또 하나의 측면은 HCV 항원을 검출하기 위한 면역검사법으로서, 이 방법은 (a) 제17도에서 뉴클레오티드 번호 -319에서 1348까지 또는 8659에서 8866까지로 표시되는 서열의, 또는 클론 13i, 또는 클론 26j, 또는 클론 59a, 또는 클론 84a, 또는 클론 CA156e, 또는 클론 167b, 또는 클론 pi14a, 또는 클론 CA216a, 또는 클론 16jh에 존재하는 서열인 HCV cDNA에 코드환된 HCV 에피토프에 대한 항체와, HCV 항원을 함유하는 것으로 추측되는 시료을, 항원-항체 복합체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양하는 단계와, (b) 항체를 함유하는 단계(a)에서 형성된 항원-항체 복합체를 검출하는 단계로 이루어진다.

본 발명의 또 다른 측면은 HCV 항원에 대한 항체를 검출하기 위한 면역검사법으로, 이 방법은 (a) 제17도에서 뉴클레오티드 번호 -319에서 1348까지 또는 8659에서 8866까지로 표시되는 서열의, 또는 클론 13i, 또는 클론 26j, 또는 클론 59a, 또는 클론 84a, 또는 클론 CA156e, 또는 클론 167b, 또는 클론 pi14a, 또는 클론 CA216a, 또는 클론 CA290a, 또는 클론 ag30a, 또는 클론 205a, 또는 클론 18g, 또는 클론 16jh에 존재하는 서열인 HCV cDNA에 코드화된 에피토프를 함유하는 항원 폴리펩티드와, 항-HCV항체를 함유하는 것으로 추측되는 시료를, 항원-항체 복합체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양하는 단계와, (b) 항원 폴리펩티드를 함유하는 단계(a)에서 형성된 항원-항체 복합체를 검출하는 단계로 이루어진다.

본 발명의 또 다른 측면은 HCV cDNA내에 코드화된 HCV 에피토프를 함유하는 면역원성 폴리펩티드를 포함하는 HCV 감염의 치료를 위한 백신으로서, 그 HCV cDNA는 제17도에서 뉴클레오티드 번호 -319에서 1348까지 또는 8659에서 8866까지로 표시되는 서열이거나, 또는 클론 13i, 또는 클론 26j, 또는 클론 59a, 또는 클론 84a, 또는 클론 CA156e, 또는 클론 167b, 또는 클론 pi14a, 또는 클론 CA216a, 또는 클론 CA290a, 또는 클론 ag30a, 또는 클론 205a, 또는 클론 18g, 또는 클론 16jh에 존재하는 서열이며, 그 면역원성 폴리펩티드는 약학적으로 허용되는 부형제중에 약리학적으로 유효량만큼 존재한다.

본 발명의 또 하나의 측면은 HCV cDNA내에 코드화된 HCV 에피토프를 함유하는 분리된 면역원성 폴리펩티드를 개체(individual)에 투여하는 것으로 이루어지는 HCV에 대한 항체의 생성방법으로서, 그 HCV cDNA는 제17도의 뉴클레오티드 번호 -319에서 1348까지 또는 8659에서 8866까지로 표시되는 서열이거나, 또는 클론 CA279a, 또는 클론 CA74a, 또는 클론 13i, 또는 클론 CA290a, 또는 클론 33C, 또는 클론 40b, 또는 클론 33b, 또는 클론 25c, 또는 클론 14c, 또는 클론 8f, 또는 클론 33f, 또는 클론 33g, 또는 클론 39c, 또는 클론 15e에 존재하는 서열이고, 그 면역원성 폴리펩티드는 약학적으로 허용가능한 부형제중에 약리학적으로 유효한 양만큼 존재한다.

본 발명의 또 하나의 다른 측면은 제17도에 도시된 HCV cDNA로부터 유래된 안티센스(antisense) 폴리뉴클레로티드이다.

본 발명의 또 다른 측면은 정제된 융합 폴리펩티드 C100-3의 제조방법이며, 이 방법은 (a) 폴리펩티드 C100-3을 함유하는 미정제 세포 용해물을 제공하는 단계, (b) 폴리펩티드가 침전을 형성할 수 있을 정도의 양의 아세톤으로 이 미정제 세포 용해물을 처리하는 단계, (c) 침전된 물질을 분리하여 용해시키는 단계, (d) 음이온 교환 크로마토그래피에 의하여 C100-3 폴리펩티드를 분리하는 단계, 그리고 (e) 겔 여과에 의하여 단계 (d)의 C100-3 폴리펩티드를 분리하는 단계로 이루어진다.

[도면의 간단한 설명]

제1도는 클론 12f내의 HCV cDNA의 서열 및 그것에 코드화된 아미노산을 도시한다.

제2도는 클론 k9-1내의 HCV cDNA서열 및 그것에 코드화된 아미노산을 도시한다.

제3도는 클론 15e의 서열 및 그것에 코드화된 아미노산을 도시한다.

제4도는 클론 13i내의 HCV cDNA의 뉴클레오티드 서열, 그것에 코드화된 아미노산 및 클론 12f와 중첩하는 서열을 도시한다.

제5도는 클론 26j내의 HCV cDNA의 뉴클레오티드 서열, 그것에 코드화된 아미노산, 및 클론 13i와 중첩하는 서열을 도시한다.

제6도는 클론 CA59a내의 HCV cDNA의 뉴클레오티드 서열, 그것에 코드화된 아미노산, 및 클론 26i와 K9-1과 중첩하는 서열을 도시한다.

제7도는 클론 CA84a내의 HCV cDNA의 뉴클레오티드 서열, 그것에 코드화된 아미노산, 및 클론 CA59a와 중첩하는 서열을 도시한다.

제8도는 클론 CA156e내의 HCV cDNA의 뉴클레오티드 서열, 그것에 코드화된 아미노산, 및 클론 CA84a와 중첩하는 서열을 도시한다.

제9도는 클론 CA167b내의 HCV cDNA의 뉴클레오티드 서열, 그것에 코드화된 아미노산, 및 클론 CA156e와 중첩하는 서열을 도시한다.

제10도는 클론 CA216a내의 HCV cDNA의 뉴클레오티드 서열, 그것에 코드화된 아미노산, 및 클론 CA167b와

의 중첩을 도시한다.

제11도는 클론 CA290a내의 HCV cDNA의 뉴클레오티드 서열, 그것에 코드화된 아미노산, 및 클론 CA216a와의 중첩을 도시한다.

제12도는 클론 ag30a내의 HCV cDNA의 뉴클레오티드 서열, 및 클론 CA290a와의 중첩을 도시한다.

제13도는 클론 CA205a내의 HCV cDNA의 뉴클레오티드 서열, 및 클론 CA290a중의 HCV cDNA 서열과의 중첩을 도시한다.

제14도는 클론 18g내의 HCV cDNA의 뉴클레오티드 서열, 및 클론 ag30a중의 HCV cDNA 서열과의 중첩을 도시한다.

제15도는 클론 16jh내의 HCV cDNA의 뉴클레오티드 서열, 그것에 코드화된 아미노산, 및 클론 15e중의 HCV cDNA 서열과의 뉴클레오티드 중첩을 도시한다.

제16도는 클론 pi14a, CA167b, CA156e, CA84a, CA59a, K9-1, 12f, 14i, 11b, 7f, 7e, 8h, 33c, 40b, 37b, 35, 36, 81, 32, 33b, 25c, 14c, 8f, 33f, 33g, 39c, 35f, 19g, 26g, 및 15e로부터 유래된 HCV cDNA의 ORF를 도시한다.

제17도는 상술된 클론들로부터 유래된 편집된 HCV cDNA 서열의 감각 스트랜드와 EPO 공보 제 318,216호에서 공개된 편집된 HCV cDNA 서열을 도시한다. 그 서열이 유래된 클론들은 b114a, 18g, ag30a, CA205a, CA290a, CA216a, pi14a, CA167b, CA156e, CA84a, CA59a, K9-1(k9-1로도 칭함), 26j, 13i, 12f, 14i, 11b, 7f, 7e, 8h, 33c, 40b, 37b, 35, 36, 81, 32, 33b, 25c, 14c, 8f, 33f, 33g, 39c, 35f, 19g, 26g, 15e, b5a, 및 16jh 였다. 이 도면에서 서열위의 세개의 대쉬는 추정되는 개시코돈인 메티오닌 코돈의 위치를 가리킨다. 또한 이 도면에는 혼성 HCV cDNA에 코드화된 추정되는 폴리단백질의 아미노산 서열이 도시된다.

제18도는 항원의 지도화(mapping) 연구에 사용된 면역학적 콜로니 선별법의 다이아그램이다.

제19도는 HCV와 웨스트 나일 바이러스에 코드화된 폴리단백질의 소수성 프로필을 도시한다.

제20도는 추정되는 HCV 폴리단백질의 친수성/소수성 프로필 및 항원 지수의 추적도이다.

제21도는 HCV와 플래비바이러스의 보존된 공-선형(co-linear)의 펩티드를 도시한다.

[발명을 수행하기 위한 형태(mode)]

I. 정의

당분야의 종사자들에 의해 지금까지 알려지지 않았던 NANBH의 병원학적 병원체에 대하여 용어 간염 C형 바이러스 라는 용어가 정해져 왔다. 따라서, 본원에서 사용된 바와 같이, 간염 C형 바이러스(HCV)는 이전에는 NANBV 및/ 또는 BB-NANBV의 원인이 되는 NANBH를 초래하는 병원체를 말한다. 용어 HCV, NANBV, 및 BB-NANBV는 본원에서 상호교환하여 사용된다. 이런 용어개념의 연장으로서, NANB 간염(NANBH) 으로 불렸던 HCV에 의해 유발되는 질병을 C형 간염으로 부른다. 용어 NANBH와 C형 간염은 본원에서 상호교환하여 사용될 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은 용어 HCV는 NANBH를 유발하는 병원성 스트레인의 한 바이러스종, 및 독약화(attanuated)된 스트레인 또는 그것으로부터 유래된 결핍성 간섭 입자를 표시한다. 아래에서 나타는 바와 같이, HCV 게놈은 RNA로 구성된다. RNA 함유 바이러스는 상대적으로 높은 비율, 즉, 기록상으로는 포함된 뉴클레오티드 당 10^{-3} 내지 10^{-4}오더(order)로 자발적인 돌연변이가 일어나는 것으로 알려져 있다(Fields % Knipe (1986)). 그러므로, 아래에서 기술되는 HCV 종내에서 전염성이 강하거나 또는 발명하지 않는 스트레인이 다수 있다. 본원에 기재된 조성물 및 방법들은 다양한 HCV 스트레인 또는 단리물의 증식, 확인, 검출 및 분리를 가능하게 한다. 더욱이, 본원의 내용은 다양한 스트레인에 대한 진단시약 및 백신의 제조뿐만 아니라, 예컨대 HCV의 복제를 저해하는 제제와 같이 약리적인 사용을 위한 항-바이러스제에 대한 스크리닝 과정에 활용되는 조성물 및 방법들을 허용한다.

본원에 제공되는 정보는, 비록 그것이 이하 CDC/HCV1(HCV1으로도 칭함) 으로 언급되는 원형 스트레인 또는 HCV의 단리물로부터 유래되는 것이긴 하지만, 바이러스 분류학자가 그런 종에 속하는 다른 스트레인을 확인할 수 있게 하기에 충분하다. 본원에 제공된 정보는 HCV가 플래비-와 같은(Flavi-like)유사 바이러스라는 것을 확실하게 해준다. 플래비바이러스 입자의 형태 및 조성은 공지이며, 브린튼에 의해 논의된다(Brinton, 1986). 일반적으로, 형태에 있어서 플래비바이러스는 지질이중층에 의해 둘러싸여진 중앙의 뉴클레오캡시드를 함유한다. 비리온은 구형으로 직경은 약 40-50nm이다. 그것의 코어(core)는 직경이 약 25-30nm이다. 비리온 엔벨로프(envelope)의 외면을 따라 약 2nm의 직경을 가진 말단 노브가 달린 약 5-10nm 길이의 돌출부들이 있다.

HCV 의 상이한 스트레인 또는 단리물은 원형 단리물(isolate)인 HCV1과 비교할 때 아미노산 및 핵산에서 변이를 함유할 것으로 기대된다. 많은 단리물이 HCV1과 비교하여 총 아미노산 서열에서 커다란 (즉 약 40% 이상) 동종성을 보일 것으로 예견된다. 그러나, 또한 다른 것들은 동종성이 적은 HCV 단리물인 것으로 발견될 수도 있다. 이것들은 예를 들어 HCV1의 폴리단백질과 크기가 유사한 폴리단백질을 코드화하는 대략 9,000 뉴클레오티드에서 대략 12,000 뉴클레오티드의 ORF, HCV1의 폴리단백질의 소수성 및 항원성 특성과 유사한 코드화된 폴리단백질, 및 HCV1으로 보존된 공-선형의 펩티드 서열의 존재같은 다양한 범주에 따라 HCV 스트레인으로서 규정될 것이다. 또한, 게놈은 양성-스트랜드 RNA일 것이다.

HCV는 본원에 기재된 cDNA가 유래되는 HCV 게놈의 에피토프와 면역학적으로 동일시할 수 있는 에피토프를 적어도 하나 코드화한다; 바람직하게는 에피토프는 본원에 기재된 아미노산에 함유되어 있다. 에피토프는 다른 공지의 플래비바이러스에 비교할 때 HCV에 특유하다. 이 에피토프의 특유성은 항-HCV 항체와

의 면역학적 반응성 및 다른 플래비바이러스 종에 대한 항체와의 면역학적 반응성의 결핍에 의해 측정될 수 있다. 면역학적 반응성의 측정법은 예컨대 방사성 면역검사법에 의해, ELISA 검사법에 의해, 혈구응집법(hemagglutlnation)에 의해 당해 기술분야에 공지이고, 여러 가지의 적당한 검사기법의 실례가 본원에서 제공된다.

상술한 것에 덧붙여, 후술하는 핵산 동종성 및 아미노산 동종성의 매개변수들이 단독으로 또는 조합하여, 스트레인 또는 단리물을 HCV로서 확인하는데 이용될 수 있다. HCV 스트레인과 단리물이 진화적으로 관련되기 때문에, 뉴클레오티드 수준에서의 게놈의 전체 동종성은 아마도 약 40% 또는 그 이상일 것으로, 추측컨대 약 60% 또는 그 이상일 것으로, 그리고 심지어는 아마 약 80% 또는 그 이상일 것으로 예측된다; 또한 적어도 약 13 뉴클레오티드의 해당하는 연속적인 서열이 있을 것이다. 추정되는 HCV 스트레인 게놈 서열과 CDC/HCV1 cDNA 서열 사이의 대응성은 당해 기술분야에 공지된 기법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 그것들은 추정되는 HCV로부터 유래하는 폴리뉴클레오티드의 서열정보와, 본원에 기재된 HCV cDNA 서열(들)을 직접 비교함으로써 측정될 수 있다. 예를 들면, 또한 동종성 영역 사이에서 안정한 이중체를 형성하는 조건하에 폴리뉴클레오티드들 (예컨대, S_1소화에 앞서 사용될 수도 있는 것들)을 혼성화하고, 단일 스트랜드 특이적 뉴클레아제(들)로 소화시킨 후, 소화된 단편의 크기 측정을 행함으로써 측정될 수 있다.

HCV의 스트레인 또는 단리물의 진화상의 관계때문에, 추정되는 HCV 스트레인 또는 단리물은 폴리펩티드 수준에서 그것들의 동종성에 의하여 확인될 수 있다. 일반적으로, HCV 스트레인 또는 단리물은 폴리펩티드 수준에서 약 40% 이상, 아마도 약 70% 이상, 나아가 아마도 약 80% 이상, 그리고 어떤 경우에는 약 90% 이상까지의 동종성을 보일 것으로 예측된다.

아미노산 서열 동종성의 측정기법은 당해 기술분야에 공지이다. 예를 들어, 아미노산 서열은 직접 측정될 수도 있고 본원에 제공된 서열에 비교될 수도 있다. 또는 달리, 추정되는 HCV의 게놈 물질의 뉴클레오티드 서열이 측정될 수 있고 (통상적으로 cDNA 중간체를 경유하여), 그것에 코드화된 아미노산이 결정될 수 있으며, 대응하는 영역이 비교될 수 있다.

본원에 사용된 바와 같이, 지정된 서열 로부터 유래된 폴리뉴클레오티드란 지정된 뉴클레오티드 서열의 영역에 해당하는, 대략 적어도 약 6뉴클레오티드, 바람직하게는 적어도 약 8뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 적어도 약 10-12 뉴클레오티드, 그리고 가장 바람직하게는 적어도 약 15-20 뉴클레오티드로 이루어지는 폴리뉴클레오티드를 언급하다. 대응하는 의 의미는 지정된 서열과 동종성이거나 상보성인는 것을 의미한다. 폴리뉴클레오티드가 유래되는 영역의 서열은 HCV 게놈에 독특한 서열에 동종성이거나 상보성인 것이 바람직하다. 서열이 HCV 게놈에 독특한 것인가의 여부는 당해 기술분야에 숙련된 자에게 공지된 기술로 결정될 수 있다. 예를 들어, 서열을 데이터뱅크, 즉 유전자 은행에 있는 서열과 비교함으로써, 감염되지 않은 숙주나 다른 유기체에 이 서열이 존재하는지를 측정할 수 있다. 또한 간염을 유발하는 것으로 공지된 HAV, HBV 및 HDV 등의 기타 바이러스 병원체의 서열 및 플래비비리대(Flaviviridae)의 다른 구성원에 비교할 수도 있다. 유래된 서열과 다른 서열과의 또한 대응 또는 비대응은 적절한 조건하에서 혼성화시킴으로써 측정될 수 있다. 핵산 서열의 상보성을 측정하기 위한 혼성화 기술은 당해 기술분야에 공지되어 있으며 예를 들어 매니아티스 등에 의해 검토되었다(1982). 또한, 혼성화에 의해 형성된 이중체 폴리뉴클레오티드의 미스매치(mismatch)는 예컨대 이중체 폴리뉴클레오티드에 있어서 단일-스트랜드 지역을 특이적으로 절단하는 S1과 같은 뉴클레아제를 이용한 절단 등을 포함하는 공지의 기술에 의해 측정할 수 있다. 전형적인 DNA서열이 유래 될 수 있는 영역은 비-전사 및/또는 비-번역된 영역뿐만 아니라 특이적 에피토프 코드화하는 영역이나 이것에 국한되지는 않는다.

유래된 폴리뉴클레오티드는 반드시 도시된 뉴클레오티드 서열로부터 물리적으로 유래하는 것이 아니라, 예를들어 화학적 합성, DNA 복제, 역전사 또는 번역을 포함한 모든 방법으로도 제조할 수 있다. 또한 지정된 서열에 대응되는 영역의 조합을 이용 의도와 일치하도록 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 변형할 수 있다.

마찬가지로, 지정된 핵산 서열 로부터 유래하는 폴리뉴클레오티드나 아미노산 서열이란 아미노산 서열이 서열내에서 코드화된 폴리펩티드 또는 이것의 일부와 동일한 폴리펩티드를 일컫는 것이며, 여기에서 일부는 3-5 아미노산, 바람직하게는 적어도 8-10 아미노산, 더욱 바람직하게는 적어도 11-15 아미노산으로 이루어지거나 서열내에서 코드화된 폴리펩티드와 면역학적으로 동일한 것이다.

재조합 또는 유래된 폴리펩티드는 반드시 지정된 핵산 서열, 예를 들어 본원에 기술된 HCV cDNA 서열로부터 또는 HCV 게놈으로부터 번역되는 것은 아니며 예를 들어 화학적 합성, 재조합 발현 체계의 발현, 또는 돌연변이 HCV로부터의 단리를 포함한 어떠한 방법으로라도 제조될 수 있다. 재조합 또는 유래된 폴리펩티드에는 하나 또는 그 이상의 아미노산 유사체 또는 그 서열내의 비자연적 아미노산이 포함된다. 또한 당해 기술분야에 숙련된 자에게 공지된 하나 또는 그 이상의 표지(label)가 포함될 수 있다.

본원에 사용된 재조합 폴리뉴클레오티드 의 의미는 게놈, cDNA, 반합성, 또는 합성 기원의 폴리뉴클레오티드를 의미하며, 이것은 기원과 조작방법 때문에 (1) 자연상태에서 결합되는 폴리뉴클레오티드 모두 또는 일부와 결합되지 않거나, (2) 자연상태에서 결합되는 것과는 다른 폴리뉴클레오티드에 결합되거나, (3) 자연상태에서는 발생되지 않는다.

본원에서 사용된 폴리뉴클레오티드 의 의미는 리보뉴클레오티드이거나 데옥시리보뉴클레오티드이거나 간에 모든 길이의 뉴클레오티드의 중합체 형태를 일컫는다. 이 의미는 단지 분자의 기본적 구조만을 지칭하는 것이다. 그러므로, 이 의미는 2중- 및 단일 스트랜드 RNA뿐만 아니라 2중- 및 단일-스트랜드 DNA를 포함하는 것이다. 그것은 변성되지 않은 형태의 폴리뉴클레오티드뿐만 아니라 또한 공지된 유형의 변성, 예를 들어 당해 기술분야에 공지된 표지, 메틸화, 캡(caps), 자연발생 뉴클레오티드중의 하나 또는 그 이상을 유사체로 치환하는 것, 예컨대 하전되지 않은 결합(예를 들어 포스폰산 메틸, 포스포트리에스테르, 포스포아마드에이트, 카보메이트, 등)을 가지는 것, 예를 들어 단백질 (뉴클레아제, 독소, 항체, 시그널(signal)펩티드, 폴리-E-라이신 등을 포함)과 같은 부속부(pendant moiety)를 함유하는 것, 삽입체(

예를 들어, 아크리딘, 소탈렌(psoralen), 등)를 가지는 것, 킬레이터(예를 들어, 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화금속, 등)를 함유하는 것, 알킬화제를 가지는 것, 변성된 결합(예를 들어, 알파 아노머(anomer) 핵산, 등)을 가지는 것 같은 뉴클레오티드내의 변성을 포함한다.

정제된 바이러스 뉴클레오티드 의 의미는 본질적으로 자유로운 족, 바이러스 폴리 뉴클레오티드가 자연적으로 경합하는 폴리펩티드를 약 20% 미만, 바람직하게는 약 50% 미만, 더욱 바람직하게는 약 70% 미만, 그리고 더욱 바람직하게는 90% 미만으로 함유하는 HCV 게놈 또는 이것의 단편이다. 바이러스 입자로부터 유래하는 바이러스 폴리뉴클레오티드를 정제하는 기술은 당해 기술분야에 공지되어 있으며 예를 들면 혼란유발제(chaotropic agent)를 사용한 입자파괴, 이온-교환 크로마토그래피, 친화 크로마토그래피, 그리고 밀도에 따른 침전에 의한 폴리뉴클레오티드(들)와 폴리펩티드의 상이한 추출 및 분리방법이 있다.

용어 정제된 바이러스 폴리펩티드는 본질적으로 자유로운, 즉 바이러스 폴리펩티드가 자연적으로 결합되는 세포성분을 약 50% 미만, 바람직하게는 약 70% 미만, 더욱 바람직하게는 약 90% 미만으로 함유하는 HCV 폴리펩티드 또는 이것의 단편을 의미한다. 바이러스 폴리펩티드를 정제하기 위한 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있으며 이 기술들의 실례는 상기에서 언급되었다.

재조합 숙주세포, 숙주세포, 세포, 세포주, 세포 배양물 및, 미생물이나 단일 세포체로서 배양된 고도의 진핵 세포주를 지칭하는 기타 용어는 재조합 벡터나 기타 전이 DNA에 대한 수용체로서 사용될 수 있거나 사용되어 온 세포를 의미하며, 트랜스펙트된 원래 세포의 자손을 포함한다. 단일 어버이 세포의 자손은 형태에 있어서나 게놈 또는 총 DNA보충물에 있어서 자연적, 우발적, 또는 계획된 변이에 기인하는 원래의 어버이와 완전히 일치할 필요는 없다.

레플리콘(replicon)은 세포내에서 독립적인 폴리뉴클레오티드 복제 단위로서 작용하는, 즉 자체의 지배하에서 복제될 수 있는 예컨대 플라스미드, 염색체, 바이러스, 코스미드 등의 유전적 요소이다.

벡터는 부착된 단편의 복제 및/또는 발현을 야기시키기 위해 다른 폴리뉴클레오티드 단편이 부착된 레플리콘이다.

제어서열(control sequence)이란 폴리뉴클레오티드 서열이 연결되는 코드 서열의 발현에 효과를 주기 위해 필요한 폴리뉴클레오티드 서열이다. 이러한 제어서열의 성질은 숙주 유기체에 따라 상이하다; 원핵세포에 있어서, 이러한 제어서열에는 일반적으로 프로모터, 리보소옴 결합부위, 및 터미네이터가 있고; 진핵세포에 있어서, 이러한 제어서열로서는 프로모터, 터미네이터, 그리고 어떤 경우에는 인핸서가 있다. 용어 제어서열은, 최소한, 발현을 위해 존재할 필요가 있는 모든 성분을 포함하며, 또한 예를 들어 리이더(leader)서열과 같이 존재 자체가 장점이 되는 추가의 성분들이 포함될 수도 있다.

작동가능하게 결합된은 병렬위치를 의미하는데, 여기에서, 이렇게 기술된 성분들은 의도했던 방법대로 기능할 수 있는 관계에 있다. 코딩 서열에 대하여 작동가능하게 결합된 제어서열은 제어서열과 양립될 수 있는 조건에서 코딩 서열의 발현을 이루는 방식으로 연결된다.

오픈 리딩 프레임(ORF)은 폴리펩티드를 코드화하는 폴리뉴클레오티드 서열의 영역이며, 이 영역은 코딩 서열의 일부, 또는 전체 코딩 서열을 나타낸다.

코딩 서열은 적절한 조절 서열의 지배하에 놓여졌을 때 mRNA로 전사되거나/또는 폴리펩티드로 번역되는 폴리뉴클레오티드 서열이다. 코딩 서열의 경계는 5'-말단의 번역개시코돈과 3'-말단의 번역중지코돈에 의해 결정된다. 코딩 서열에는 mRNA, cRNA, 및 재조합 폴리뉴클레오티드 서열이 포함되나 이것에 국한되지는 않는다.

면역학적으로 동일함을 증명할 수 있는은 지정된 폴리뉴클레오티드 (들), 보통 HCV 단백질에 존재하는 에피토프(들)와 폴리펩티드(들)의 존재를 의미한다. 면역적 동일성은 항체결합, 및/또는 결합에 있어서의 경쟁에 의해 결정될 수 있으며, 이 기술은 당해 기술분야에 통상의 지식을 가진 자에게 공지되어 있으며 또한 전술하였다.

본원에 사용된 바와 같이, 에피토프는 펩티드의 항원 결정기를 의미하며, 에피토프는 에피토프에 대하여 유일한 공간구조내의 3개의 아미노산으로 이루어질 수 있고, 일반적으로 에피토프는 적어도 5개의 이러한 아미노산으로 구성되고, 더욱 일반적으로는 적어도 8-10개의 이러한 아미노산으로 구성된다. 아미노산의 공간적 구조를 측정하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있으며 예를 들면 X-ray 결정학 및 2-차원 핵자기 공명이 있다.

폴리펩티드는 폴리펩티드내에 함유된 특이적 에피토프의 항체 인식에 기인하여 항체에 결합될 때 항체와 면역학적으로 반응성이 있다. 면역학적 반응성은 항체 결합에 의해, 더 구체적으로는 항체 결합의 역학(kinetics)에 의해, 및/또는 항체에 대한 에피토프를 함유하는 공지의 폴리펩티드(들)을 경합자(들)로서 사용하는 경합에 의해 측정될 수 있다. 폴리펩티드가 항체와 면역학적으로 반응성인가의 여부를 측정하기 위한 기술은 당해 기술분야에 공지되어 있다.

본원에 사용된 바와 같이, 면역원성 폴리펩티드는 단독으로, 또는 보조제의 존재 또는 부재하에 담체에 결합되어 세포 및/또는 체액 반응을 유도하는 폴리펩티드이다.

용어 폴리펩티드는 아미노산의 중합체를 의미하고 특정 길이의 제조물을 의미하지는 않으며, 그러므로 펩티드, 올리고펩티드, 및 단백질은 폴리펩티드의 정의에 속하게 된다. 또한 이 용어는 예를 들어 글리코실화, 아세틸화, 포스포릴화 등과 같은 폴리펩티드의 후-발현 변성을 의미하지는 않거나 배제한다. 예를들어 하나 또는 그 이상의 아미노산 유사체(예를들어, 비자연적 아미노산 등을 포함)가 함유된 폴리펩티드, 자연발생 및 비-자연발생된 당해 기술분야 공지의 기타변성 및 치환된 결합이 있는 폴리펩티드가 그 정의에 포함된다.

본원에 사용된 형질전환은 예를 들어 직접적 흡수, 형질도입, f-교배 또는 일렉트로포레이션과 같은 삽

입에 사용되는 방법에 상관없이, 외인성 폴리뉴클레오티드를 숙주세포내에 삽입하는 것을 의미한다. 외인성 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 플라스미드와 같은 비-통합 벡터로서 유지되거나 숙주의 게놈에 통합될 수 있다.

본원에 사용된 치료는 예방법 및/또는 치료법을 의미한다.

본원에 사용된 개체(individual)는 척추동물, 바람직하게는 포유동물 종의 구성원을 의미하고, 가축, 변종 동물, 및 사람을 포함한 영장류를 포함하지만 여기에 국한되지는 않는다.

본원에 있어서, 핵산의 감작(Sense) 스트랜드는 mRNA의 서열과 동질인 서열을 가지는 서열을 함유한다. 항-감작 스트랜드에는 감작 스트랜드와 상보적인 서열이 함유되어 있다.

본원에 있어서, 바이러스의 양성 스트랜드 게놈은 RNA이거나 DNA이거나 간에 게놈이 단일-스트랜드이고 바이러스 폴리펩티드(들)를 코드화하는 것이다. 양성 스트랜드 RNA 바이러스의 실례로서는 토가비리대(Togaviridae), 코로나비리대(Coronaviridae), 레트로비리대(Retroviridae), 피코로나비리대(Picoronaviridae), 및 칼리시비리대(Caliciviridae)가 있다. 또한 이전에 토가비리대로 분류된 플래비비리대가 여기에 포함된다(Fields Knipe (1986) 참조).

본원에 있어서, 항체-함유 신체 성분은 흥미있는 항체의 근원인 개체의 신체성분을 의미한다. 항체를 함유하는 신체성분은 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 혈장, 혈청, 척수액, 림프액, 호흡기, 장 및 비뇨기관의 외부 구역, 눈물, 타액, 젖, 백혈구 및 골수종이 포함되나 이것에 국한되지는 않는다.

본원에 있어서, 정제된 HCV는 바이러스가 정상적으로 결합된 세포 성분으로부터, 그리고 감염조직에 존재할 수 있는 다른 유형의 바이러스로부터 단리된 HCV 조성물을 의미한다.

바이러스를 단리하기 위한 기술은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 원심분리 및 친화 크로마토그래피가 포함되며, 정제된 HCV의 제조방법은 전술되었다.

본원에 사용된 용어 HCV 입자는 비리온 형성에 있어서의 중간체인 입자뿐만 아니라 전체 비리온을 포함한다. HCV 입자는 일반적으로 HCV 핵산과 결합된 1개 또는 그 이상의 HCV 단백질을 가진다.

본원에 있어서, 용어 프로브는 프로브내의 적어도 1개의 서열과 표적영역에 있는 서열과의 상보성에 기인하여, 표적영역에 있는 서열과의 혼성 구조를 형성하는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 그러나, 프로브는 중합효소 사슬반응을 프라이밍하기 위해 사용된 서열(들)에 상보적인 서열은 함유하지 않는다.

본원에 있어서, 용어, 표적영역은 증폭 및/또는 검출된 핵산의 영역을 의미한다.

본원에 있어서, HCV RNA를 포함하는 용어 바이러스 RNA 는 바이러스 게놈으로부터의 RNA, 이것의 단편, 이것의 전사체, 및 이것으로부터 유래하는 변이체서열을 의미한다.

본원에 있어서, 생물학적 시료는 개체로부터 단리된 조직이나 액의 시료를 의미하며, 예컨대 혈장, 혈청, 골수액, 림프액, 그리고 피부, 호흡기, 장 및 비뇨기관의 외부구역, 눈물, 타액, 젖, 혈액세포, 종양, 기관, 및 또한 체외 세포배양성분 (세포배양 배지내의 세포성장에서 초래되는 조건화배지, 바이러스 감염된 것으로 추정되는 세포, 재조합세포 및 세포성분을 포함하지만 이것에 국한되지는 않는다)을 포함하지만 여기에 국한되지는 않는다.

II. 본 발명의 기술

본 발명의 실시에 있어서는 특기하지 않는 한 이 분야 공지 기술에 속하는 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 및 면역학의 종래 기술을 사용한다.

그러한 기술은 문헌에 충분히 설명되어 있다.

참고문헌으로는 예컨대

Maniatis, Fitsch & Sambrook, MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL (1982); DNA CLONING, VOLUMES I AND II (D.N Glover ed. 1985); OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (M.J. Gait ed, 1984); NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); TRANSCRIPTION AND TRANSLATION (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Freshney ed. 1986); IMMOBILIZED CELLS AND ENZYMES (IRL Press, 1986); B. Perbal, A PRACTICAL GUIDE TO MOLECULAR CLONING (1984); the series, METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (J.H. Miller and M.P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory), Methods in Enzymology Vol. 154 and Vol. 155 (Wu and Grossman, and Wu, eds., respectively), Mayer and Walker, eds. (1987), IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (Academic Press, London), Scopes, (1987), PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE, Second Edition (Springer-Verlag, N.Y.), and HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, VOLUMES I-IV (D.M. Weir and C. C. Blackwell eds 1986)

등이 있다. 앞에서 그리고 이하에서 언급되는 모든 특허, 특허출원와 문헌이 여기에 참고로 통합되어 있다.

본발명의 유용한 재료 및 방법은 HCV cDNA 서열을 포함하는 cDNA 라이브러리로부터 분리된 뉴클레오티드 서열의 군의 제공에 의해 가능하게 된다. 이들 cDNA 라이브러리는 HCV-감염 침팬치의 혈장에 존재하는 핵산 서열로부터 유래된 것이다. 이들 라이브러리의 하나인 c 라이브러리(ATCC No. 40394)의 구성은 EPO 공고 제318,216 호에 보고되었다. 여기에 보고된 HCV cDNA를 함유하는 몇 개의 클론들은 c 라이브러리로부터 얻어졌다. 여기에 보고된 다른 클론들은 다른 HCV cDNA 라이브러리로부터 얻어졌으나 c 라이브러리에서 서열 함유클론의 존재는 확인되었다. EPO 공고 제318,216 호에서 논의된 바와같이 c 라이브러리로부터 분리된 HCV cDNA 서열의 군은 사람 또는 침팬지 기원이 아니고 HBV 게놈내에 포함된 서열에 특이할 만한 상동성을 나타내지 않는다.

본 명세서에서 기술된 HCV cDNA 의 효용가능성(availability)은 공여 혈액을 포함해서 생물학적 시료중의 바이러스 폴리뉴클레오티드를 검출하는데 유용한 시약인 폴리뉴클레오티드 프로브의 구성을 가능하게 한다. 예컨대 이들 서열로부터 약 8-10 뉴클레오티드 또는 그 이상의 DNA 올리고머를 합성하는 것이 가능한바, 이 올리고머는 예컨대 공여 혈액, 바이러스가 정착한 것으로 추정되는 것의 혈청 또는 바이러스가 복제하고 있는 세포 배양계에서 HCV RNA 의 존재를 검출하는 혼성화 프로브로서 유용하다. 또한 cDNA 서열은 HCV 감염중에 증가된 항체의 존재에 대한 진단 시약으로서 유용한 HCV 특이적 폴리펩티드의 설계 및 제조를 가능하게 한다. cDNA 로부터 유래된 정제 폴리펩티드에 대한 항체는 또한 예컨대 공여 혈액시료, NANBH에 걸린 환자로부터 채취한 혈청을 포함하는 생물학적 시료와 HCV 복제에 사용되는 조직 배양계에서 바이러스 항원을 검출하는데 사용될 수 있다. 더욱이, 제17도에 도시된 HCV cDNA의 ORF 부분에서 코드화되는 본 명세서에서 개시된 면역원 폴리펩티드는 HCV 선별, 진단 및 치료에 유용하고 이들 목적에 유용한 항체를 유발시키는데 또한 유용하다.

본 명세서에서 기술된 신규한 cDNA 서열은 HCV 게놈을 더 특성화시킬수 있다. 이들 서열로부터 유래된 폴리뉴클레오티드 프로브 및 프라이머는 cDNA 라이브러리에 존재하는 서열의 증폭 및/또는 부가적인 중첩 cDNA 에 대한 cDNA 라이브러리의 선별에 사용될 수 있으며, 차례로 더 중첩된 서열을 얻는데 사용될 수 있다. EPO 공고 제318,216 호에서 그리고 하기하는 바와같이 HCV의 게놈은 거대한 폴리단백질을 코드화하는 거대한 오픈 리딩 프레임(ORF)으로 주로 구성된 RNA로 나타나 있다.

본 명세서에서 제공된 HCV cDNA 서열, 이들 서열로부터 유래된 폴리펩티드, 본 명세서에 기재된 면역원 폴리펩티드와 이들 폴리펩티드에 대한 항체는 골수 NABV(BB-NANBV) 병원체의 분리와 동정(identification)에 또한 유용하다. 예컨대 cDNA 로부터 유래된 폴리펩티드에 함유된 HCV 에피토프에 대한 항체는 바이러스 분리를 위한 친화성 크로마토그라피에 기초한 방법에 사용될 수 있다. 또한, 이 항체를 다른 기술로 분리한 바이러스 입자를 확인하는데 이용할 수 있다. 분리된 바이러스 입자내의 게놈 물질과 바이러스 항원은 더 특성화될 수 있다.

상기한 것이외에 이하에서 제공하는 정보에 의해서 부가적인 HCV 균주 또는 단리물을 동정할 수 있다. 부가적인 HCV 균주 또는 단리물의 분리 및 특성화는 바이러스 입자 및/또는 바이러스 RNA 를 포함하는 신체 성분으로부터 핵산을 분리하고, 하기하는 HCV cDNA 프로브에 근거한 폴리뉴클레로티드 프로브를 사용하여 cDNA 라이브러리를 만들고, 하기하는 HCV cDNA서열을 함유하는 클론에 대해 라이브러리를 선별하고, 새로운 단리물로부터의 HCV cDNA를 하기 하는 cDNA 와 비교하는 것으로 이루어질 수 있다. 여기에서 또는 바이러스 게놈에서 코드화되는 폴리펩티드는 상기한 폴리펩티드 및 항체를 이용하는 면역학적 교차반응성을 위해 모니터될 수 있다. 상기 정의 부분에서 기술된 바와같이 HCV의 매개변수내에 적합한 균주 또는 단리물은 용이하게 동정할 수 있다. HCV 균주를 동정하는 다른 방법은 본 명세서에서 제공된 정보에 근거해서 이 분야의 전문가에게 자명할 것이다.

[HCV cDNA 서열의 분리]

하기하는 신규한 HCV cDNA서열은 EPO 공고 제318,216 호에 보고된 HCV 게놈에 대한 cDNA 서열의 연장이다. 클론 b114a, 18g, ag30a, CA205a, CA290a, CA216a, pi14a, CA167b, CA156e, CA84a 및 CA59a에 존재하는 서열은 보고된 서열의 상류에 있고, 편집되었을 때 복합 HCV cDNA 서열의 뉴클레오티드 -319 내지 1348 를 산출한다(뉴클레오티드에서 음수는 추정 개시 MET 코돈을 시작하는 뉴클레오티드의 상류로의 거리를 나타낸다). 클론 b5a 및 16jh 에 존재하는 서열은 보고된 서열의 하류에 존재하고 복합 서열의 뉴클레오티드 8659 내지 8866 을 산출한다. 상기 클론의 서열을 포함하는 복합 HCV cDNA 서열은 제17도에 도시된다.

본 명세서에서 기술된 신규한 HCV cDNA 는 람다 gt 11 (ATCC No. 40394) 에 존재하는 c 라이브러리를 포함하는 다수의 HCV cDNA 라이브러리로부터 분리되었다. HCV cDNA 라이브러리는 고역가의 바이러스, 즉 적어도 10^6 침팬치 감염성 투여량/ml(CID/ml)을 함유하는, 만성 HCV 감염 침팬지로부터의 푸울된(pooled) 혈청을 사용하여 구성되었다. 푸울된 혈청을 사용하여 바이러스 입자를 분리하고; 이들 입자에서 분리된 핵산을 바이러스 게놈에 대한 cDNA 라이브러리의 구성에서 주형으로 사용하였다. 추정상의 HCV 입자를 분리하고 c HCV cDNA 라이브러리를 구성하는 방법은 EPO 공고 제318,216 호에 기재되어 있다. HCV cDNA 라이브러리를 구성하는 다른 방법은 이 기술분야에 잘 알려져 있으며 이들 공지 방법의 몇가지는 하기하는 실시예에 기재되어 있다. 서열의 분리는 공지의 HCV cDNA 서열의 5'-영역 및 3'-영역으로부터 유래된 합성 폴리뉴클레오티드 프로브를 사용하는 라이브러리를 선별하여 이루어졌다. cDNA 서열은 회복하는 방법의 설명은 주로 역사적인 흥미거리이다. 얻어진 서열(그리고 그것의 상보서열)이 본 명세서에서 제공되며 이 서열의 어느 부분도 합성법을 사용하거나 또는 본 명세서에 기재된 것과 유사한 방법을 사용하여 부분적으로 서열을 회복한 것과 합성법을 결합하여 제조될수 있다.

[바이러스 폴리펩티드 및 단편의 제조]

HCV cDNA 서열 또는 그것으로부터 유래된 뉴클레오티드서열(그 서열의 단편 또는 수정을 포함)이 효용될 수 있게 됨에 따라서 어느 한 스트랜드에서 코드화되는 폴리펩티드의 항원적 활성영역을 코드화하는 발현 벡터를 구성할수 있게 되었다. 이들 항원적 활성영역은 코트(coot) 또는 엔벨로프 항원으로부터 또는 코어 항원으로부터 또는 예컨대 폴리뉴클레오티드 결합 단백질, 폴리뉴클레오티드 중합효소 및 복제에 필요한 다른 바이러스 단백질 및/또는 바이러스 입자의 조립체를 포함하는 비구조적인 항원으로부터 유래될 수 있다. 소정의 폴리펩티드를 코드화하는 단편은 통상의 제한 절단 또는 합성법을 사용하여 cDNA 클론으로부터 유래되고, 베타-갈락토시다제 또는 수퍼옥사이드 미스뮤타제(SOD)와 같은, 바람직하게는 SOD와 같은 융합 서열의 부분을 포함하는 벡터에 연결된다. SOD의 융합 서열을 함유하는 폴리펩티드의 제조에 유용한 방법과 벡터는 유럽 특허청 공개 제0196056호(공개일 1986. 10. 1)에 기재되어 있다. SOD의 융합 폴리펩티드를 발현하는 벡터 및 다수의 HCV 클론에서 코드화되는 HCV 폴리펩티드가 하기하는 실시예에 기재된다. 어느 한 감작 스트랜드에서 오픈 리딩 프레임을 함유하는 HCV cDNA의 소정의 부분은 숙성체 또는 융합 단백질과 같은 재조합 폴리펩티드로서 얻어질 수 있다. 또한, cDNA에 코드화된 폴리펩티드는 화학적 합성에 의해 제공될수 있다.

융합된 형태이든 성숙된 형태이든지간에 그리고 분비를 허용하는 시그날 서열을 포함하든지 포함하지 않든지간에 소정의 폴리펩티드를 코드화하는 DNA는 편의상의 숙주에 적당한 발현벡터로 연결될 것이다. 진핵생물 또는 원핵생물 숙주계 양자 모두 재조합 폴리펩티드를 형성하는데 사용되고 더 공통적인 제어계(control system)의 일부의 요약과 숙주 세포주가 아래에서 제공된다. 그리고 나서 폴리펩티드를 용균된 세포 또는 배지로부터 분리하고 의도된 용도에 필요한 범위까지 정제한다. 정계는 이 분야공지의 기술로 하는바 예컨대 미분 추출, 염분별, 이온교환수지에서의 크로마토그라피, 친화성 크로마토그라피, 원심분리등을 사용할 수 있다(예컨대, 단백질을 정제하는 다양한 방법을 위한 효소학에서의 방법을 참조). 그러한 폴리펩티드는 진단제로서 사용될 수 있고 또는 항체 중화를 일으키는 것들은 백신으로 제제될수 있다. 이들 폴리펩티드에 대해 유발된 항체는 진단제로서 또는 수동적 면역치료를 위해 사용될 수 있다. 또한 하기하는 바와같이 이들 폴리펩티드에 대한 항체는 HCV 입자의 분리 및 동정에 유용하다.

[항원성 폴리펩티드의 제조 및 담체와의 컨쥬게이션(conjugation)]

폴리펩티드의 항원영역은 일반적으로 그 길이가 비교적 작은, 전형적으로는 8 내지 10 아미노산이다. 5개 아미노산 정도의 단편이 항원 영역을 특성화할 수 있다. 이들 단편들은 HCV 항원영역에 대응한다. 따라서 기본으로 HCV의 cDNA를 사용해서 HCV 폴리펩티드의 짧은 부분을 코드화하는 DNA는 융합 단백질 또는 분리된 폴리펩티드의 어느 하나로서 재조합적으로 발현될수 있다. 또한 짧은 아미노산 서열은 화학적 합성에 의해 간편하게 얻을 수 있다. 합성된 폴리펩티드가 올바르게 구성되어 올바른 에피토프를 제공하지만 너무 짧아서 면역원성이 없는 경우에 폴리펩티드를 적당한 담체에 결합할 수 있다.

그러한 결합을 위한 많은 기술이 공지되어 있는바, 그중 하나는 일리노이스주 로크포드 소재의 피어스사로부터 구입할 수 있는 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜-티오) 프로피오네이트(SPDP) 및 숙신이미딜 4-(N-말레이미도-메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC)를 사용하여 이황화결합을 형성하는 것이 있다(만일 펩티드에 술푸히드릴기가 없으면 시스테인 잔기를 첨가하여 형성할 수 있다). 이들 시약은 그들 자신과 한 단백질의 펩티드 시스테인 잔기 사이에 이황화 결합을 형성하고 라이신에 엡실론-아미노 또는 다른 단백질에서 다른 유리 아미노기를 통해서 아미노 결합을 형성한다(예컨대 Immun. Rev.((1982) 62 : 185) 참조). 다른 2-관능성 커플링제는 이황화 결합보다는 티오에테르를 형성한다. 다수의 이들 티오-에테르-형성제는 상업적으로 입수할수 있고 6- 말레이미도카프로산, 2-브로모아세트산, 2-아이오도아세트산, 4-(말레이미도-메틸) 시클로헥산-1-카르복실산등의 반응성 에스테르를 포함한다. 카르복실기는 이것을 숙신이미드 또는 1-히드록시-2-니트로-4-술폰산, 나트륨염과 결합시킴으로써 활성화될 수 있다. 커플링 항원의 다른 방법은 EPO 공고 제 259,149 호에 기재된 로타바이러스/ 결합 펩티드 시스템을 채용하는 바 그 개시내용은 여기에 참고로 통합되어 있다. 상기 리스트는 제한적인 것이 아니고 거론된 화합물을 수정한 것을 사용할 수 있는 것도 명백하다.

숙주에 유해한 항체의 제조를 유도하지 않는 어떠한 담체도 사용될 수 있다. 적당한 담체는 전형적으로는 크고, 천천히 대사되는 거대분자로서 예컨대 단백질; 라텍스 기능성 세파로스, 아가로스, 셀룰로스, 셀룰로스 비이드등과 같은 다당질; 폴리글루탐산, 폴리라이신등과 같은 중합성 아미노산; 아미노산 공중합체; 그리고 비활성 바이러스입자등이 있다. 특히 유용한 단백질은 혈청 알부민, 키홀 림페트(Keyhole limpet) 헤모시아닌, 면역글로부린분자, 티로글로부린, 오브알부민, 파상풍 톡시드 및 기타 이 분야 공지의 다른 단백질이 있다.

전체 길이의 바이러스 단백질 이외에 적어도 하나의 바이러스 에피토프를 코드화하는 끝을 자른(truncated) HCV 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드는 면역학적시약으로서 유용하다. 예컨대 그러한 끝을 자른 서열을 포함하는 폴리펩티드는 면역측정법에서 시약으로서 사용될수 있다. 이들 폴리펩티드는 또한 항혈청 제조 또는 백신을 위한 조성물에서 예비적인 하위단위 항원이다. 이들 끝을 자른 서열이 본래의 바이러스 단백질의 여러가지 공지된 처리에 의해 제조될수 있지만 HCV 서열을 포함하는 합성 또는 재조합 폴리펩티드를 만드는 것이 일반적으로 바람직하다. 이들 끝을 자른 HCV 서열을 포함하는 폴리펩티드는 완전히 HCV 서열(1 또는 그 이상의 에피토프, 인접하는 또는 인접하지 않는) 또는 HCV 서열, 그리고 융합단백질에서 이형성 서열로 구성될 수 있다. 유용한 이형성 서열은 재조합 숙주로부터의 분비를 제공하거나 HCV 에피토프의 면역학적 반응성을 향상시키거나 폴리펩티드가 면역검사 지지체 또는 백신담체에 결합하는 것을 용이하게 하는 서열을 포함한다. 다음의 특허를 참조할수 있는데 그 개시는 여기에 참고로 통합되어 있다; EFO 공고 제116,201 호, 미국특허 제4,722,840 호, EPO 공고 제259,149, 미국특허 제4,629,783 호.

끝을 자른 HCV 서열을 포함하는 폴리펩티드의 크기는 크게 변할 수 있는데 최소 크기는 HCV 에피토프를 제공하기에 충분한 크기의 서열이고 최대 크기는 결정적인 것은 아니다. 편의상 최대 크기는 소정의 HCV 에피토프 및 이형성 서열의 기능을 제공하는데 요구되는 것보다 실질적으로 큰 것은 아니다. 전형적으로는 끝을 자른 HCV 아미노산 서열 길이의 범위는 약 5내지 100아미노산이다. 그러나 더 전형적으로는 HCV 서열의 최대 길이는 약 50 아미노산이고 바람직하게는 30 아미노산이다. 10,12 또는 15 아미노산 이상 20 또는 25 아미노산 이하의 HCV 서열을 선택하는 것이 보통 바람직하다.

에피토프를 포함하는 끝을 자른 HCV 아미노산 서열은 여러가지 방법으로 동정할수 있다. 예컨대 전체 바이러스 단백질 서열은 전체 단백질 서열에 걸친 일련의 짧은 펩티드를 제조함으로써 선별될 수 있다. HCV 폴리단백질의 부위의 항원적 선별의 예는 하기하는 바와같다. 또한 예컨대 100머(mer) 폴리펩티드로 개시하여 소정의 반응성을 보이는 에피토프의 존재에 대한 각각의 폴리펩티드를 시험하고 점차로 흥미있는 에피토프가 위치하는 동정된 100합체로부터의 더 작고 중첩하는 단편을 시험하는 것은 일상적인 것이다. 면역검사에서 그러한 펩티드의 선별은 이 분야 공지기술의 범위내이다. 또한 잠재적인 에피토프를 확인하기 위하여 단백질 서열의 컴퓨터 분석을 하고 선별을 위해서 확인된 부위로 이루어진 올리고펩티드를 제조하는 것이 공지되어 있다. 친수성/소수성이 항원 지수 이상으로 나타나는 경우인 HCV 아미노산 서열의 그러한 컴퓨터 분석이 제20도에 표시되어 있다. 제17도에 도시한 바와같이 아미노산은 개시 MET(위치1)로부터 숫자 매김되어 있다. 면역원성의 그러한 컴퓨터 분석이 실제로 존재하는 에피토프를 언제나 확인하는 것은 아니고 에피토프를 함유하는 것으로서 단백질 부위의 확인이 정확하지 않을 수 있다는 것은 이 분야의 전문가에게 공지되어 있다.

클론 5-1-1, 81, CA74a, 35f, 279a, C36, C33b, CA290a, C8f, C12f, 14c, 15e, C25c, C33c, C33f, 33g, C39c, C40b, CA167b 로 구성된 발현 벡터로부터 발현되는 유용한 HCV 아미노산 서열의 예를 이하에서 기재한다. 본 명세서에서 기재된 바와같이 유용할수 있는 HCV 아미노산 서열의 다른예를 아래에 설명한다. 이들 펩티드는 꼭 정확하게 하나의 에피토프를 지도화하는 것은 아니고 비면역원성의 HCV서열을 포함할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 이들 서열의 비면역원 부위는 상기한 바와같이 통상의 기술을 사용하여 규명할 수 있고 기재된 서열로부터 삭제할수 있다. 또한 에피토프로 이루어진 또는 면역원성인 부가적인 끝이 잘린 HCV 아미노산 서열이 상기와 같이 확인될수 있다. 다음의 서열은 아미노산 번호(즉, AAn)에 의해 주어지는데, n은 제17도에 지정된 아미노산 번호이다.

AA1-AA25; AA1-AA50; AA1-AA84; AA9-AA177; AA1-AA10;
AA5-AA20; AA20-AA25; AA35-AA45; AA50-AA100;
AA40-AA90; AA45-AA65; AA65-AA75; AA80-90; AA99-AA120;
AA95-AA110; AA105-AA120; AA100-AA150; AA150-AA200;
AA155-AA170; AA190-AA210; AA200-AA250; AA220-AA240;

AA245-AA265; AA250-AA300; AA290-AA330; AA290-305;
AA300-AA350; AA310-AA330; AA350-AA400; AA380-AA395;
AA405-AA495; AA400-AA450; AA405-AA415; AA415-AA425;
AA425-AA435; AA437-AA582; AA450-AA500; AA440-AA460;
AA460-AA470; AA475-AA495; AA500-AA550; AA511-AA690;
AA515-AA550; AA550-AA600; AA550-AA625; AA575-AA605;
AA585-AA600; AA600-AA650; AA600-AA625; AA635-AA665;
AA650-AA700; AA645-AA680; AA700-AA750; AA700-AA725;
AA700-AA750; AA725-AA775; AA770-AA790; AA750-AA800;
AA800-AA815; AA825-AA850; AA850-AA875; AA800-AA850;
AA920-AA990; AA850-AA900; AA920-AA945; AA940-AA965;

AA970-AA990; AA950-AA1000; AA1000-AA1060;
AA1000-AA1025; AA1000-AA1050; AA1025-AA1040;
AA1040-AA1055; AA1075-AA1175; AA1050-AA1200;
AA1070-AA1100; AA1100-AA1130; AA1140-AA1165;
AA1192-AA1457; AA1195-AA1250; AA1200-AA1225;
AA1225-AA1250; AA1250-AA1300; AA1260-AA1310;
AA1260-AA1280; AA1266-AA1428; AA1300-AA1350;
AA1290-AA1310; AA1310-AA1340; AA1345-AA1405;
AA1345-AA1365; AA1350-AA1400; AA1365-AA1380;
AA1380-AA1405; AA1400-AA1450; AA1450-AA1500;
AA1460-AA1475; AA1475-AA1515; AA1475-AA1500;
AA1500-AA1550; AA1500-AA1515; AA1515-AA1550;
AA1550-AA1600; AA1545-AA1560; AA1569-AA1931;
AA1570-AA1590; AA1595-AA1610; AA1590-AA1650;
AA1610-AA1645; AA1650-AA1690; AA1685-AA1770;
AA1689-AA1805; AA1690-AA1720; AA1694-AA1735;
AA1720-AA1745; AA1745-AA1770; AA1750-AA1800;
AA1775-AA1810; AA1795-AA1850; AA1850-AA1900;
AA1900-AA1950; AA1900-AA1920; AA1916-AA2021;
AA1920-AA1940; AA1949-AA2124; AA1950-AA2000;
AA1950-AA1985; AA1980-AA2000; AA2000-AA2050;
AA2005-AA2025; AA2020-AA2045; AA2045-AA2100;
AA2045-AA2070; AA2054-AA2223; AA2070-AA2100;
AA2100-AA2150; AA2150-AA2200; AA2200-AA2250;
AA2200-AA2325; AA2250-AA2330; AA2255-AA2270;
AA2265-AA2280; AA2280-AA2290; AA2287-AA2385;
AA2300-AA2350; AA2290-AA2310; AA2310-AA2330;
AA2330-AA2350; AA2350-AA2400; AA2348-AA2464;
AA2345-AA2415; AA2345-AA2375; AA2370-AA2410;
AA2371-AA2502; AA2400-AA2450; AA2400-AA2425;
AA2415-AA2450; AA2445-AA2500; AA2445-AA2475;
AA2470-AA2490; AA2500-AA2550; AA2505-AA2540;
AA2535-AA2560; AA2550-AA2600; AA2560-AA2580;
AA2600-AA2650; AA2605-AA2620; AA2620-AA2650;
AA2640-AA2660; AA2650-AA2700; AA2655-AA2670;
AA2670-AA2700; AA2700-AA2750; AA2740-AA2760;
AA2750-AA2800; AA2755-AA2780;
AA2780-AA2830; AA2785-AA2810; AA2796-AA2886;
AA2810-AA2825; AA2800-AA2850; AA2850-AA2900;
AA2850-AA2865; AA2885-AA2905; AA2900-AA2950;
AA2910-AA2930; AA2925-AA2950; AA2945-끝 (C' 말단)

상기 HCV 아미노산 서열은 별개의 펩티드로서 제조될 수 있고 또는 더 큰 폴리펩티드에 병합될 수 있고 본원에 기술된 바와같은 용도를 발견할 수 있다. 끝이 절단된 HCV 서열을 포함하는 부가적인 폴리펩티드를 실시예에 기재한다.

HCV와 플래비바이러스의 추정상의 폴리단백질에 대한 관찰된 관계에서 HCV 비-구조적(NS) 단백질의 추정상의 도메인을 추측할 수 있다. 추정상의 플래비바이러스 전구체 폴리단백질내의 개개의 NS 단백질의 위치는 널리 공지되어있다. 또한, 이는 폴리단백질의 소수성에 있어서 관찰된 총방황변이(fluctuation)와 일치한다. 플래비바이러스의 NS5가 비리온 중합효소를 코드화하고, NS1이 동물에 있어서 효과적인 백신으로 나타난 보체결합 항원에 대응한 것이 확인되었다. 최근에, 플래비바이러스 프로테아제의 기능이 NS3에 있다는 것이 밝혀졌다. 전술된 HCV와 플래비바이러스 사이에 관찰된 유사성때문에 HCV 폴리단백질에 있어서 대응하는 단백질 도메인의 대략적인 위치와 기능에 관한 추론이 가능하다. 예를들어 박테리아, 효모, 곤충 및 척추동물 세포를 포함하는 다양한 재조합 숙주세포에 있어서 이러한 도메인을 함유하는 폴리펩티드의 발현은 진단, 검출 및 백신에 사용될 수 있는 중요한 면역학적 시약을 발생시킬 수 있게한다.

본원에 기재된 HCV 단리물과 플래비바이러스의 추정상의 폴리단백질의 비-구조 단백질의 영역이 어느정도의 유사성을 나타내지만, N-말단쪽에 있는 추정상의 구조 영역간에는 유사성이 거의 없다. 이 영역에 있어서는 서열에 있어서의 분기(divergence)가 더 크고, 또한 두 영역간의 소수성 프로필에 있어서는 유사성을 덜 보인다. 이 분기 는 HCV 내의 추정상의 NS1 도메인의 N-말단 영역에서 시작되어 추정된 N-말단까지 연장된다. 그럼에도 불구하고 여전히 HCV 폴리단백질내의 추정상의 뉴클레오캡시드(N-말단 염기 도메인) 및 E(일반적으로 소수성) 영역의 대략의 위치를 예견할 수 있다. 실시예에 있어서, 예견은 HCV 폴리단백질의 소수성 프로필에 있어서 관찰되는 변화와 플래비바이러스 단백질의 위치 및 특성을 근거로 한다. 이러한 예견으로부터, 유용한 면역학적 제제에 부합될 수 있는 HCV 다단백질의 대략적 영역을 확인할 수 있다. 예를들어, 플래비바이러스의 E 및 NS1 단백질은 보호성 백신으로서의 효력을 가진다고 공지되어 있다. 예를들어 추정상의 NS3, C 및 NS5 등과같은 본원에 기재된 HCV 단리물내에서 항원성이라고 나타난 것 이외에도 이 영역도 또한 진단제를 제공한다. 또한, 바이러스-코드화 효소의 위치 및 발현은 항-바이러스 효소 억제제, 즉 예를들어 효소 자체와의 상호작용에 의한 효소 활성을 방해하는 저해제나 효소의 발현을 방해할 수 있는 물질 (예를들어, 항-감작 RNA, 또는 발현을 간섭하는 기타 약제)에 대한 평가를 허용한다.

[HCV 에피토프를 함유하는 혼성체 입자 면역원의 제조]

HCV 의 에피토프의 면역원성은 또한 예를들어 간염 B 표면항원과 관련된 체계와 같이 입자-형성 단백질과로 융합 또는 조립된 포유동물 또는 효모의 체계내에서 제조함으로써 증강될 수 있다. NANBV 에피토프가 입자-형성 단백질 코드서열에 직접 결합되어 있는 구성물은 HCV 에피토프에 관하여 면역원성인 혼성체를 생성한다. 또한, 제조된 모든 벡터에는 면역원성의 정도가 다양한 예컨대 전(pre)-S 펩티드와 같이 HBV 에 특이적인 에피토프가 포함된다. 따라서, HCV 서열을 포함하는 입자 형성 단백질로부터 축조된 입자는 HCV 및 HBV 에 대하여 항원성이다.

간염 표면 항원(HBSAg)은 형성되어 예를들어 포유동물 세포(Valenzuela, P. 등(1984)) 뿐만아니라 삭카로마이세스 세레비시아(Valenzuela, P. 등, (1982))내의 입자로 조립되는 것으로 알려져 왔다. 이러한 입자의 형성은 단량체 하위단위의 면역원성을 증강시키는 것으로 알려져 왔다 구성물(construct)은 또한 표면 전구체(pre-S) 영역의 55 아미노산을 포함하는, HBSAg의 면역강화(immunodominant) 에피토프를 포함한다 (Neurath 등, (1984)). 효모내에서 발현가능한 pre-S-HBSAg 입자의 구성물은 1986년 3월 19일에 공고된 EPO 174,444 호에 개시되었으며, 효모 발현을 위한 이형 바이러스 서열을 포함하는 혼성체는 1966년 3월 26일에 공고된 EPO 175,261 호에 개시되어있다. 이러한 구성물들은 또한 SV40 히드로폴레이트 환원효소 벡터를 사용하여 예컨대 중국산 햄스터 난소(CHO) 세포와 같은 포유동물의 세포에서 발현될 수도 있다(Michelle등, (1984)).

또한, 입자-형성 단백질 코딩 서열 부분은 HCV 에피토프를 코드화하는 코돈으로 교체될 수도 있다. 이 교체에 있어서, 효모나 포유동물내에서 면역원성 입자를 형성하기위해 단위의 집합을 매개하는데 요구되지 않은 영역은 결실시킬수 있으므로 HCV 에피토프와의 경쟁으로부터 추가의 HCV 항원성 부위들을 제거할 수 있다.

[백신의 제조]

백신은 실시예에 기술된 cDNA 서열을 포함하여 HCV cDNA로부터 유래되는 1개 또는 그 이상의 면역원성 폴리펩티드로부터 제조될 수 있다. HCV 와 플래비바이러스 사이에서 관찰된 동종성은 폴리펩티드가 코드화되는 게놈의 영역뿐만아니라 백신으로서 가장 효과적인 폴리펩티드에 관한 정보를 제공해준다. 플래비바이러스 게놈의 일반적인 구조는 Rice등(1986)에 의해 설명되었다. 플래비바이러스 게놈 RNA 는 유일한 바이러스-특이적인 mRNA 종이라고 믿어지며, 이것은 2개의 큰 비구조적 단백질 NS4 와 NS5, 그리고 더 작은 비구조적 단백질의 복합체 세트뿐만아니라 3개의 바이러스 구조적 단백질, 즉 C, M, 그리고 E로 번역된다. 플래비바이러스에 대한 주요 중화 에피토프가 E(엔벨로프) 단백질에 있다는것은 공지되어 있다(Roehrig,(1986)). 그러므로, 백신은 HCV E의 에피토프를 함유하는 재조합 폴리펩티드로 구성될 수도 있다. 이 폴리펩티드는 박테리아, 효모, 또는 포유동물세포에서 발현될 수도 있고, 또는 바이러스 조성물로부터 단리될 수도 있다 또한, 다른 구조적 단백질에도 보호성 항-HCV 항체를 산출할 수 있는 에피토프가 함유될 수 있다고 예견된다. 그러므로, E, C 및 M의 에피토프를 함유하는 폴리펩티드는 단독으로 또는 HCV 백신과 조합하여 사용될 수 있다.

상기에 덧붙여서, HS1 (비구조적 단백질 1)을 사용한 면역화는 황색열의 방지를 초래할 수도 있다 (Schlesinger 등, (1986)). 면역화에 의해 중화 항체가 발생되지 않더라도 이것은 사실이다. 그러므로, 특히 이 단백질이 플래비바이러스중에서 고도로 보존되는 것으로 보이므로, HCV NS1도 또한 HCV 감염에 대하여 보호적일 것으로 보인다. 또한, 비구조적 단백질은 심지어 중화항체의 생산을 야기하지 않더라도 바이러스 병원성에 대한 보호를 제공할 수 있을 것으로 보인다.

HCV ORF 의 다양한 영역에 걸친 클론된 HCV cDNA들로부터 발현된 폴리펩티드의 면역원성에 관련하여 실시예에 제공된 정보는 또한 이것을 백신에 사용할 수 있는 예견을 가능하게 한다.

상기에 대한 고찰에 있어서, HCV에 대한 다가의 백신은 1개 또는 그 이상의 구조적 단백질로부터의 1개 또는 그 이상의 에피토프, 및/또는 1개 또는 그이상의 비구조적 단백질로부터의 에피토프로 이루어질 수 있다. 예를들어, 이 백신은 재조합 HCV 폴리펩티드 및/또는 비리온으로부터 단리된 폴리펩티드로 이루어질 수도 있다. 특히, 백신은 다음과 같은 HCV 단백질(: E, NSI, C, NS2, NS3, NS4 및 NS5) 또는 이것으로부터 유래되는 하위 단위 항원중의 1개 또는 그 이상으로 이루어진다고 예측할 수도 있다. E 및/또는 NS1, 또는 이것의 하위단위로 이루어지는 백신이 특히 바람직하다.

활성성분으로서 면역원성 폴리펩티드(들)를 함유하는 백신의 제조는 당해 기술분야에 숙련된 자에게 공지되어 있다. 전형적으로는, 이러한 백신은 액체 용액이나 현탁액과 같이 주사가능하게 제조된다; 주사 이전에 액체내의 용액 또는 액체내의 현탁액으로 적합한 고체형도 또한 제조될 수 있다. 제조물은 또한 유탁화되거나 리포조옴내에 단백질 캡슐화될 수도 있다. 활성 면역원성 성분은 약학적으로 허용되고 활성성분과 병용될 수 있는 보조제와 혼합될 수도 있다. 적합한 보조제로서는 예를들어 물, 식염수, 덱스트로스 글리세롤, 에탄올 등과 이것들의 조합물이 있다. 또한, 필요에 따라 백신은 예컨대 습윤제 또는 유화제, pH 완충제 및/또는 백신의 효과를 증강시키는 보조제와 같은 최소량의 보조적 물질을 함유할 수도 있다. 효과적일 수 있는 보조제의 실례로서는 다음과 같은 것이 있으나 이것에 국한되는 것은 아니다: 수산화 알루미늄, N-아세틸-무라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민(thr-MDP), N-아세틸-노르(nor)- 무라밀-L- 알라닐-D- 이소글루타민(CGP 11637, nor-MDP 참조), N-아세틸무라밀-L- 알라닐-D-이소글루타미닐-L- 알라닌-2-(1'-2'-디팔미토일 -sn-글리세로-3-히드록시포스포릴옥시)-에딜아민(CGP 19835A, MTP-PE 참조), 및 RIBI, 이 RIBI에는 박테리아로부터 추출한 3가지 성분, 즉 모노포스포릴 지질 A, 트레할로오스 디미콜레이트, 및 2% 스쿠알렌/Tween80 현탁액내의 세포벽 골격(MPL+TDM+CWS)이 함유되어있다. 보조제의 효과는 다양한 보조제로 구성된 백신내의 면역원성 폴리펩티드를 투여함으로써 초래되는 HCV 항원성 서열이 함유된 면역원성 폴리펩티드에 대한 항체의 양을 측정함으로써 결정된다.

백신은 종래에 예를들어 피하 또는 정맥내에 주사함으로써 비경구적으로 투여되었다. 다른 형태의 투여방법에 적합한 또다른 방법으로는 좌약이있고, 경우에 따라 경구용이 있다. 좌약에 있어서, 종래의 결합제와 담체로서는 예를들어 폴리알킬렌 글리콜, 또는 트리글리세리드가 있다; 이러한 좌약은 활성성분을 0.5%내지 10%, 바람직하게는 1% 내지 2%의 범위만큼 함유하는 혼합물로부터 형성될 수 있다. 경구용 조성에는 예를들어 만니톨, 락토오오스, 당분, 스테아르산 마그네슘, 삭카린 나트륨, 셀룰로오스, 탄산 마그네슘 등의 제약단계의 보통 사용되는 보조제가 포함된다. 이러한 조성물은 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 일련의 방출형태 및 분말의 형태를 취하며, 활성 성분을 10%-95%, 바람직하게는 25%-70% 함유한다.

단백질은 중성 또는 염 형태로 백신내에 처방된다. 약학적으로 허용되는 염은 (펩티드의 유리 아미노기와 함께 형성된) 산 부가염을 포함하며, 이것은 예를들어 염산 또는 인산과 같은 무기산, 또는 예컨대

아세트산, 옥살산, 타르타르산, 말레산 등과 같은 유기산으로 형성된다. 유리 카르복실기로 형성된 염은 또한 예를들어 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화칼슘 또는 수산화철과 같은 무기염기, 그리고 예컨대 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기 염기로부터 유래된다.

[백신의 복용량(dosage) 및 처방]

백신은 복용량 조성과 양립될 수 있는 방식, 및 예방적 및/또는 치료적으로 효과적일 수 있는 양으로 처방된다. 일반적으로 복용량당 5㎍ 내지 250㎍ 범위인 처방되는 양은 치료대상, 피검체가 항체를 합성하는 면역 체계의 능력, 및 원하는 보호범위 등에 달려있다. 처방되어야할 활성성분의 정확한 양은 실시자의 판단에 달려있으며, 각 피검체마다 다르다.

백신은 단일 복용스케줄로, 바람직하게는 다중 복용 스케줄로 주어질 수 있다. 다중 복용 스케줄은 면역화의 1차경로가 별도의 1-10회 복용이며 그 다음에 면역 반응을 유지하거나 강화시키기에 필요한 간격에 따라 다시 투여하는 것이며, 예를들어 1-4개월에 2회 투여하고, 필요에 따라 수개월 후에 다시 투여하는 것이다. 또한 투여요법은 적어도 부분적으로는 각각의 필요에 의해 결정하며 실시자의 판단에 의존한다.

또한, 면역원성 HCV 항원(들)을 함유하는 백신을 기타 면역조절제, 예를들어 면역 글로불린과 함께 투여할 수도 있다.

[HCV 에피토프에 대한 항체의 제조]

상기와 같이 제조된 면역원성 폴리펩티드를 사용하여 다중클론 및 단일클론 모두의 항체를 제조하였다. 만일 다중클론 항체가 바람직하면, 선별된 포유동물(예를들어, 마우스, 토끼, 염소, 말, 등)을 HCV 에피토프(들)가 들어있는 면역원성 폴리펩티드로 면역화된다. 면역화된 동물로부터의 혈청을 수집하고 공지의 방법에 따라 처리하였다. 만일 HCV 에피토프에 대한 다중클론 항체를 함유하는 혈청이 다른 항원에 대한 항체가 함유하면, 다중클론항체는 면역친화 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 다중클론 항혈청을 제조하고 처리하는 기술은 당해 기술분야에 공지되어 있다 (예를들어, Mayer 및 Walker(1987) 참조).

또한, 다중클론 항체는 HCV로 사전에 감염된 포유동물로부터 단리될 수도 있다. 감염된 개체의 혈청으로부터의 HCV 에피토프에 대한 항체를 정제하기 위한, 친화 크로마토그래피를 기초로 하고 SDS의 융합 폴리펩티드, 및 cDNA 클론 5-1-1내에서 코드화된 폴리펩티드를 사용하는 방법의 실례는 EPO공보 제318,216호에 제공되었다.

HCV 에피토프에 대한 단일클론 항체는 또한 당해 기술분야에 숙련된 자에 의해 용이하게 제조될 수 있다. 하이브리도마에 의해 단일클론 항체를 제조하기 위한 일반적 방법론은 널리 공지되어 있다. 불멸화 항체-제조 세포주는 세포융합, 및 또한 예컨대 온코진(oncogenic) DNA로 B 림프 세포를 직접 형질전환시키거나 엡스타인-바르타이러스로 트랜스픽션시키는 것과 같은 다른 기술을 사용하여 발생시킬 수 있다 (예를들어, M. Screier 등(1980); Hammerling 등 (1981); Kennett 등 (1980); 미합중국 특허 제4,341,761호; 4,399,121호; 4,427,783호; 4,444,887호; 4,466,917호; 4,472,500호; 4,491,632호; 및 4,493,890호 참조). HCV 에피토프에 대하여 제조된 단일클론 항체 패널은 다양한 특성 즉, 이소타입, 에피토프 친화도 등을 위하여 선별될 수 있다.

HCV 에피토프에 대한 단일클론성 및 다중클론성 항체는 진단에 특히 유용하며, 중성화 항체는 수동면역치료법에 유용하다. 특히 단일클론 항체는 항-이디오형 항체를 발생시키는 데 사용될 수 있다.

항-이디오형 항체는 보호가 필요한 감염성 병원체의 항원의 내부 이미지(internal image)를 운반하는 면역글로불린이다(예를들어, Nisonoff, A. 등, (1981) 및 Dreesman 등 (1985) 참조).

항-이디오형 항체를 발생시키는 기술은 당해 기술분야에 공지되어 있다(예를들어 Grzych (1985), MacNamara 등 (1984), 및 Uytdehaag 등 (1985) 참조). 이러한 항-이디오타입 항체는 HCV 항원의 면역원성 영역을 밝히는 것 뿐만 아니라 NANBH의 치료 및/또는 진단에도 유용할 수 있다.

당해 기술분야에 통상의 지식을 가진자는 HCV 에피토프에 대한 다양한 유형의 항체가 제조될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 항체 는 적어도 한 개의 항체결합부위로 이루어지는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 군을 의미한다. 항체결합부위 또는 결합도메인 은 항체분자(들)의 다양한 도메인의 접힘으로부터 형성되어 내부표면형태와 함께 3차원 결합공간을 형성하고 항원의 에피토프의 특징에 대하여 상보적인 전하분포를 형성함으로써 항원과의 면역학적 반응을 허용한다. 항체결합부위는 중쇄(heavy chain) 및/또는 경쇄영역 (각각 VH 및 VL)으로부터 형성될 수 있고, 이것은 항원결합에 기여하는 매우 다양한 루프를 형성한다. 용어 항체 는 예를들어 척추동물항체, 혼성체항체, 키메라항체, 변경된 항체, 1가항체, Fab 단백질 및 단일도메인 항체를 포함한다.

단일영역항체(dAb)는 VH 도메인으로 이루어지는 항체이며 이것은 지정된 항원과 면역학적으로 반응한다. dAB는 VL 도메인을 함유하지는 않으나 항체에 존재하는 것으로 공지된 기타의 항원결합도메인, 예를들어 카파 및 람다 도메인을 함유할 수 있다. dAB들을 제조하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다(예를들어, Ward등 (1989) 참조).

항체는 또한 공지의 항원결합도메인 뿐만 아니라 VH 및 VL 도메인으로 이루어질 수도 있다. 이러한 유형의 항체의 실례 및 이러한 제조방법은 당해 기술분야에 공지되어 있으며 (예를 들어, 미합중국 특허 제4,816,467호 참조, 본원에서 참조하였음)다음과 같은 것을 포함한다. 예를들어, 척추동물항체 는 대개 Y 배치로 집합되고 사슬간에 공유결합이 있거나 없을 수도 있는 중쇄와 경쇄를 포함하는, 4합체 또는 이것의 집합체인 항체를 의미한다. 척추동물 항체에 있어서, 특별한 항체의 모든 사슬의 아미노산 서열은 원위치(insitu) 또는 생체외에서(예를들어, 하이브리도마) 항체를 제조하는 림프구에 의해 제조된 1개 항체에서 발견되는 사슬과 동형이다. 척추동물항체는 전형적으로 원래의 항체, 예를들어 정제된 다중클

론 항체 및 단일클론 항체를 포함한다. 이러한 항체 제조방법의 실례는 전술되었다.

혼성체 항체는 1쌍의 중쇄 및 경쇄가 제1항체에 있는 것과 동종구조인 반면, 중쇄 및 경쇄의 다른쌍은 상이한 제2항체와 동종구조이다. 전형적으로, 이 2쌍들은 특히 상이한 항원상의 각각 상이한 에피토프들을 결합시킨다. 이 결과, 2가 특성, 즉 동시에 2개의 항원을 결합시키는 능력이 발생된다. 그러한 혼성체는 이하 설명하는 것처럼 키메라 사슬을 사용하여 형성할 수도 있다.

키메라 항체는 중쇄 및/또는 경쇄가 융합 단백질인 항체이다. 주로 사슬의 불변 도메인은 하나의 특정한 종 및/또는 강으로부터 유래하고 가변 도메인은 다른 종 및/또는 강으로부터 유래한다. 또한 중쇄 또는 경쇄의 어느 한쪽 또는 양쪽이 상이한 근원의 항체에 있는 서열을 모방한 서열의 조합체로 이루어지는 어떤 항체도 포함되는데, 이러한 근원이 다른 강이든 태생의 다른 종이든, 그리고 융합점이 가변/불변 경계에 있든 없든 상관이 없다. 따라서 가변영역도 불변영역도 공지의 항체 서열을 모방하지 않은 항체를 제조할 수 있다. 따라서 예컨대 가변영역이 특정한 항원에 대한 특이적 친화성이 더 높거나 불변영역이 향상된 보체 결합을 유도할 수 있는 항체를 구성하거나, 또는 특정한 불변영역이 가지는 성질을 달리 개선시키는 것이 가능하다.

또다른 예는 변경 항체 인데, 척추동물의 항체에 있는 자연발생적인 아미노산 서열이 변화된 항체를 뜻한다. 재조합체 DNA 방법을 이용하여 원하는 특성을 얻도록 항체를 재설계할 수 있다. 가능한 변형은 다수이고 하나 또는 그 이상의 아미노산을 변화시키는 것에서부터 한 영역 예컨대 불변영역의 완전한 재설계에 이르기까지 가능하다. 불변영역을 변화시키면 통상 원하는 세포 공정 특성, 예컨대 보체결합, 막과의 상호작용 및 기타 효과기 작용에서의 변화를 달성할 수 있다. 가변영역에서의 변화는 항원 결합 특성을 변경시키기 위해 행해진다. 항체는 또한 분자 또는 물질을 특정한 세포 또는 조직 부위에 특이하게 공급하는 것을 돕도록 처리될 수도 있다. 분자 생물학에 있어서의 공지기술, 예컨대 재조합체 기술, 부위 지정 돌연변이 유발등으로 원하는 변경을 행할 수 있다.

또 다른 예는 제2 중쇄의 Fc(즉 불변) 영역에 결합된 중쇄/경쇄 2합체로 이루어지는 집합체인 1 가 항체이다. 이러한 유형의 항체는 항원성 조절을 벗어난다(예컨대 글레니(Glennie) 등 (1982) 참조).

항체의 Fab 단편은 또한 항체의 정의에 포함된다. Fab 영역은, 중쇄 및 경쇄의 지부(枝部)를 포함하고 특정한 항원에 면역학적으로 결합한다고 나타났지만 효과기 Fc 부분은 결여된 서열과 대략 같거나 유사한 경쇄 및 중쇄 부분을 뜻한다. Fab 에는 하나의 중쇄와 하나의 경쇄의 집합체(통상 Fab'로 알려짐)와, 지정된 항원 또는 항원군과 선택적으로 반응할 수 있는 2H와 2L사슬이 들어있는 4합체($F(ab)_2$라 칭함)가 포함된다. Fab 항체는 상기한 것과 유사한 하위세트 즉 척추동물의 Fab, 혼성 Fab, 키메라 Fab 및 변경 Fab 로 분리될 수 있다. 항체의 Fab 단편의 제조방법은 본분야 공지이고 예컨대 단백질 가수분해와 재조합체 방법에 의한 합성이 있다.

II. H. 진단학적 올리고뉴클레오티드 프로브와 키트

분리된 HCV cDNA의 개시부를 기부(basis)로 사용하여 절단하거나 또는 합성적으로 약 8개 이상의 뉴클레오티드로 된 올리고머를 제조할 수 있는데 이것은 HCV 게놈과 혼성화되고 바이러스 병원체의 확인, 더 나아가 바이러스 게놈의 특성화와, 병에 걸린 개체내의 바이러스의 검출에 유용하다. HCV 폴리뉴클레오티드 (자연발생의 또는 유도된)에 대한 프로브는 혼성화에 의한 독특한 바이러스 서열을 검출할 수 있도록 하는 길이이다. 6-8개의 뉴클레오티드가 작용가능한 길이이지만 10-12개의 뉴클레오티드 서열이 바람직하고 약 20개의 뉴클레오티드가 최적이다. 바람직하게는, 이러한 서열들은 이종성이 결여된 영역으로부터 유도된다. 이러한 프로브는 자동화된 올리고뉴클레오티드 합성법을 포함하여 일상적인 방법으로 제조될 수 있다. 유용한 프로브중에는 예컨대 여기 개시된 새로 분리된 클론으로부터 유래된 것들과 이하 기재한 cDNA 라이브러리를 프로브화하는데 유용한 각종 올리고머가 있다. HCV 게놈의 어떤 특유한 부분에 대한 보체가 만족스럽다. 프로브로 사용하기 위해 완전한 상보성이 바람직한데, 이것은 단편의 길이가 증가함에 따라 필요하지 않을 수도 있다.

그러한 프로브를 진단법으로서 사용하기 위해 혈액 또는 혈청과 같은 분석할 생물학적 시료를 처리하여, 필요하다면, 그속에 함유되어 있는 핵산을 추출한다. 시료로부터의 핵산은 겔 전기영동 또는 기타 크기 분리법으로 처리한다; 또한, 핵산 시료를 크기 분리하지 않고서 돗트(dot) 블롯팅할 수도 있다. 그런 다음 프로브를 표지한다. 적당한 표지 및 프로브 표지방법을 본분야 공지이고, 예컨대 닉 번역 또는 키나제 처리로 합체화된 방사성 표지, 비오틴, 형광 프로브 및 화학 발광프로브를 들 수 있다. 그런 다음 시료로부터 추출한 핵산을 적당한 엄격한(stringency) 혼성화 조건하에서 표지된 프로브로 처리하고 프로브가 들어있는 폴리뉴클레오티드 이중체(duplex)를 검출한다.

프로브는 HCV 게놈에 완전히 상보적으로 만들 수 있다. 따라서 가양성(false positive)을 방지하기 위해 통상 고도의 엄격한 조건이 바람직하다. 그러나 고도의 엄격한 조건은 프로브가 이종성이 결여된 바이러스 게놈 영역에 상보적일 때만 사용해야 한다. 혼성화의 엄격성은 혼성화와 세척 과정동안, 온도, 이온강도, 기간 및 포름아미드의 농도를 포함하여 다수의 인자로써 결정된다. 이러한 인자들은 예컨대 마니아티스 티.(Maniatis, T. (1982))에 약술되어 있다.

일반적으로 HCV 게놈서열은 비교적 낮은 수준, 즉 ㎖당 약 10^{-2}-10^{-3} 침팬지 감염성 투여량(CID)으로 감염된 개체의 혈청에 존재한다고 예상된다. 이 수준은 혼성화 분석검사에서 증폭 기술을 사용하는 것을 필요로 할 수 있다. 이러한 방법은 본 분야 공지이다. 예컨대 엔조 바이오케미칼 코오퍼레이션 바이오브리지 시스템은 미변성 3'-폴리-dT-꼬리를 DNA 프로브에 가하기 위해 말단 데옥시뉴클레오티드 트랜스퍼라제를 사용한다. 폴리 dT-꼬리가 달린 프로브를 표적 뉴클레오티드 서열에 혼성화하고, 그런다음 비오민-변성 폴리-A에 혼성화한다. PCT 출원 84/03520과 EPA124221에는 (1)검체(analyte)를 효소-표지된 올리고뉴클레오티드에 상보적인 단일 스트랜드의 DNA 프로브에 어닐링하고; (2) 결과의 꼬리가 붙은 이중체를 효소표지된 올리고뉴클레오티드에 혼성화하는 DNA 혼성화 분석이 기재되어 있다. EPA 204510에는 검체 DNA가 폴리-A 서열과 같은 프로브의 꼬리에 혼성화하는 서열을 가지고 다수의 표지된 스트랜드를 결합시

킬 수 있는 증폭자 스트랜드인, 폴리-dT 꼬리와 같은 꼬리를 가진 프로브와 접촉하는 DNA 혼성화 분석이 기재되어 있다. 특히 바람직한 방법에는 첫번째로 약 10,000배, 즉 약 10^6개 서열 /㎖까지 혈청에서 표적 HCV 서열을 증폭시키는 것이 포함된다. 이것은 예컨대 사이키 등(Saiki et al. (1986))에 의해, 율리스에 의해 미합중국 특허 제 4,683,195호 및 율리스 등에 의해 미합중국 제 4,683,202호에 기술된 중합효소 연쇄 반응(PCR) 방법으로 달성된다. 그런다음 증폭된 서열을 1989년 5월 24일 공고된 EP 317,077에 기재된 혼성화 검사를 이용하여 검출할 수 있다. 10^6/㎖의 수준에서 서열을 검출하는 이러한 혼성화 검사는 단일 스트랜드의 검체 핵산에 결합하고 다수의 단일 스트랜드의 표지된 올리고뉴클레오티드에 결합하는 핵산 다중체를 이용한다. 표지된 폴리뉴클레오티드 프로브와 함께 사용되는 적당한 용액상 샌드위치 검사와 프로브의 제조방법은 1987년 6월 16일 공고된 EPO 225,807에 기재되어 있다.

프로브는 진단 키트속에 포장될 수 있다. 진단 키트에는 표지될 수 있는 프로브 DNA가 포함될 수 있고; 또한, 프로브 DNA는 미표지되고 표지하기 위한 성분들은 키트내에 분리된 용기에 포함될 수 있다. 키트에는 또한 다른 적절히 포장된 시약과 특정한 혼성화 프로토콜에 필요한 재료, 예컨대 표준 뿐만 아니라 테스트를 실행하기 위한 교시가 포함될 수 있다.

[면역검사와 진단 키트]

HCV 항체, 예컨대 이하 실시예에서 기재될 항원 선별법으로 검출되는 것 뿐만 아니라 실시예에서 기재될 분리된 클론으로부터 유도되거나 이 클론내에 코드화되는 것을 함유한 HCV혈청과 면역학적으로 반응하는 폴리펩티드와 그 복합체 및 이러한 폴리펩티드 중의 HCV 특이성 에피토프에 대해 발생하는 항체 모두 생물학적 시료에 있어 HCV 항체의 존재 또는 바이러스 및/또는 바이러스성 항원의 존재를 검출하는 면역검사에서 유용하다. 면역검사의 설계는 상당히 변형될 수 있고 이러한 것들 다수가 본분야 공지이다. 예컨대 면역검사는 하나의 바이러스성 에피토프를 이용할 수 있다. 또한, 면역검사는 이러한 근원으로부터 유래된 바이러스성 에피토프의 조합을 이용할 수 있다; 이러한 에피토프들은 동일하거나 상이한 바이러스성 폴리펩티드로부터 유래될 수 있고, 분리된 재조합체 또는 천연 폴리펩티드에 또는 함께 동일한 재조합체 폴리펩티드에 있을 수 있다. 예컨대 바이러스성 에피토프에 대한 단일클론성 항체, 하나의 바이러스 항원의 에피토프에 대한 단일클론성 항체의 조합, 상이한 바이러스성 항원의 에피토프에 대한 단일클론성 항체, 동일한 바이러스성 항원에 대한 다중클론성 항체 또는 상이한 바이러스성 항원에 대한 다중클론성 항체를 사용할 수 있다. 프로토콜은 예컨대 경합 또는 직접 반응 또는 샌드위치형 검사에 기초한다. 또한 프로토콜은 고형 지지체를 이용하거나 면역침강에 의한 것일 수 있다. 대부분의 검사에서는 표지된 항체 또는 폴리펩티드를 이용한다; 표지는 예컨대 형광, 화학 발광, 방사성 또는 염료 분자이다. 프로브로부터의 시그널을 증폭시키는 검사도 공지되어 있다; 그 예로는 비오틴과 아비딘을 이용하는 검사 및 ELISA 분석과 같은 효소로 표지되고 효소로 조정되는 면역검사가 있다.

추정 폴리단백질의 항원 영역중 몇몇은 폴리단백질의 부분을 코드화하는 HCV cDNA의 박테리아성 발현 생성물의 항원성을 선별함으로써 지도화되고 확인된다(실시예 참조). HCV의 다른 항원성 영역은 효모 시스템과 곤충과 척추동물로부터 유도된 세포시스템을 포함하여, 다른 발현시스템에서 HCV cDNA의 부분들을 발현함으로써 검출할 수 있다. 또한, 항원성 인덱스와 소수성/친수성 프로필에 대한 연구는 영역의 항원성의 확률에 관계되는 정보를 제공한다.

HCV cDNA의 발현에 의한 항원 지도화에 관한 연구는 이러한 cDNA를 함유한 수많은 클론이 NANBH를 가진 개체로부터의 혈청과 면역학적으로 반응하는 폴리펩티드를 발현함을 보여주었다. 단일 폴리펩티드는 어느것도 모든 혈청과 면역학적으로 반응하는 것은 아니었다.

이러한 폴리펩티드중 5개는 비록 검출에 있어 중첩이 완전하지 않았지만 많은 다른 환자의 혈청에서 이러한 폴리펩티드중의 HCV 에피토프에 대한 항체가 검출되었다는 점에서 매우 면역원성이 있었다. 따라서 각종 클론에서 코드화된 폴리펩티드의 면역원성에 대한 결과는, 효과적인 검출시스템에는 에피토프의 패널을 이용하는 것이 포함된다는 것을 제시한다. 패널중의 에피토프는 하나 또는 복수의 폴리펩티드로 구성될 수 있다.

면역진단에 적합하고 적당한 표지된 시약이 들어있는 키트는 HCV 에피토프가 들어있는 본 발명의 폴리펩티드 또는 적당한 용기중의 HCV 에피토프에 때한 항체를 포함하는 적당한 재료와 함께, 분석을 행하는 필요한 잔존시약 및 재료와 적당한 분석 교시 세트를 포장하여 구성된다.

[바이러스성 게놈에 대한 cDNA로부터 유도된 프로브를 사용한 HCV 게놈, 비리온 및 바이러스성 항원의 추가 특성확인]

실시예에 기재된 새로이 분리된 클론에서의 HCV cDNA 서열 정보는 HCV 게놈의 서열의 추가 정보를 얻는데 사용되고 HCV 병원체의 확인 및 분리에 사용되므로 게놈의 특성, 바이러스성 입자의 구조 및 그것을 구성하는 항원의 특성을 포함하여 HCV 병원체의 특성화에 도움을 준다. 이러한 정보는 차례로 부가적인 폴리뉴클레오티드 프로브, HCV 게놈으로부터 유도된 폴리펩티드 및 NANBH로 초래되는 HCV의 진단 및/또는 처리에 유용한 HCV 에피토프에 대한 항체에 도달할 수 있다.

상기한 클론에서의 cDNA 서열 정보는 EP 0,316,218과 여기에 기재된 클론중의 cDNA가 유래되는 HCV 게놈의 아직 정의되지 않은 영역으로부터 유래되는 부가의 cDNA 서열을 분리하기 위한 프로브를 설계하는데 유용하다. 예컨대 제17도에 도시된 복합체 HCV cDNA 서열의 5'-말단 또는 3'-말단에 근접한 영역으로부터 유래되는 약 8개 이상의 뉴클레오티드, 바람직하게는 20개 이상의 뉴클레오티드로 된 서열을 함유하는 표지된 프로브는 HCV cDNA 라이브러리로부터 중첩되는 cDNA서열을 분리하는데 사용될 수 있다. 게놈 단편(segment)의 특성화는 정제된 HCV 입자로부터 분리된 바이러스 게놈으로부터 될 수 있다. HCV 입자의 정제 방법과 정제시 HCV 입자의 검출 방법은 이하 기재될 것이다. 바이러스성 입자로부터 폴리뉴클레오티드 게놈을 분리하는 과정은 본분야 공지이고 사용되는 한 과정은 EP 0,218,316에 기재되어 있는 것이다. 그런후에, 분리된 게놈 단편을 클로닝하고 서열화한다. 클로닝되는 서열의 증폭을 이용하는 이러한 방법은 한 예는 이하에 기재되고 클론 16jh가 산출된다.

cDNA 라이브러리를 구성하는 방법은 본분야 공지이고 상기 및 하기되어 있다; 람다-gt11에서 HCV cDNA 라이브러리를 구성하는 방법은 EPO 공보 제 318,216호에 기재되어 있다. 그러나 핵산 프로브로 선별하는데 유용한 cDNA 라이브러리는 본분야 공지의 다른 벡터, 예컨대 람다-gt10(Huynh et al. (1985))에 구성될 수 있다.

[HCV에 대한 항 바이러스 제제에 대한 선별]

HCV에 대한 세포 배양과 동물 모델 시스템의 효용성은 HCV 복제를 억제하는 항 바이러스성 제제, 특히 바이러스성 복제를 억제하면서 세포 성장과 증식을 우선적으로 허용하는 제제를 선별할 수 있게 한다. 이러한 스크리닝 방법은 본분야 전문가들에게 공지이다. 통상적으로 항 바이러스성 제제는 다양한 농도에서 바이러스성 복제를 지원하는 세포 배양 시스템에서의 바이러스 복제를 방해하는 작용과 동물 모델 시스템에서의 감염성 또는 바이러스 병원성의 저해(및 저수준의 독성)에 대해 시험하였다.

HCV 항원과 HCV 폴리뉴클레오티드를 검출하기 위해 여기에 제공된 방법 및 조성물은 바이러스 복제에서의 제제의 효과를 검출하는데 있어 셀 플라크(plaque)검사 또는 ID_{50} 검사에 대해 양자택일적이고 더 민감한 수단을 제공하는 항바이러스 제제의 스크리닝에 유용하다.

예컨대, 여기 기재된 HCV-폴리뉴클레오티드 프로브는 세포 배양에서 생성되는 바이러스성 핵산의 양을 정량하는데 사용될 수 있다. 이것은 예컨대 표지된 HCV-폴리뉴클레오티드 프로브와의 감염된 세포 핵산의 혼성화 또는 경합 혼성화로써 이루어질 수 있다. 예컨대 항-HCV 항체도 여기에 기재된 면역검사를 이용하여 세포 배양액중의 HCV 항원을 확인 및 정량하는데 사용할 수 있다. 또한 경합 검사로 감염된 세포 배양액중의 HCV 항원을 정량하는 것이 바람직하므로 여기에 기재된 HCV cDNA 내에 코드화되는 폴리펩티드는 이러한 경합 검사에서 유용하다. 일반적으로 HCV cDNA로부터 유도된 재조합체 HCV 폴리펩티드를 표지하고, 세포배양액 시스템에서 생성된 항원에 대한 이 표지된 폴리펩티드의 HCV 폴리펩티드로의 결합 저해를 모니터한다. 더욱이, 이러한 방법은 HCV가 세포를 죽지 않도록 하면서 세포 라인에서 복제할 수 있는 경우에 특히 유용하다.

이러한 방법으로 그 유효성을 테스트하는 항 바이러스성 제제는 본분야 공지이고 예컨대 비리온 성분 및/또는 바이러스의 결합 및/또는 복제에 필요한 세포 성분과 상호 작용하는 것들이 포함된다. 대표적인 항바이러스성 제제로는 예컨대 비리온 폴리머라제의 저해인자 및/또는 전구체 폴리펩티드의 절단에 필요한 프로테아제를 들 수 있다. 다른 항 바이러스성 제제로는 핵산과 작용하여 바이러스 복제를 방지하는 것, 예컨대 항감작 폴리뉴클레오티드 등이 있다.

항감작 폴리뉴클레오티드 분자는 게놈 또는 RNA의 지정된 영역에 특이적으로 혼성화하도록 하는 상보적 뉴클레오티드 서열로 이루어진다. 항감작 폴리뉴클레오티드는 예컨대 mRNA에 결합함으로써 단백질 번역을 차단하는 분자를 포함하거나 또는 트랜스크립타제로 바이러스성 RNA의 복제를 저해하는 분자일 수도 있다. 또한 예컨대 바이러스성 RNA에서 절단을 초래하여 바이러스 RNA가 불활성화되도록 하는 제제를 (비공유적으로 부착하거나 또는 공유적으로 결합하여) 운반하는 분자도 포함한다. 또한 항감작 뉴클레오티드는 바이러스 감염성, 복제능력 또는 만성성을 증가시키며 바이러스 감염성, 복제능력 또는 만성성에 필요한 세포 폴리뉴클레오티드에 결합한다. HCV 유래 RNA에 혼성화하는 항감작 분자는 여기에 제공되는 HCV cDNA의 서열 정보에 기초하여 설계된다. HCV 에 대한 항-감작 폴리뉴클레오티드에 기초한 항바이러스 제제는 특이성이 높게 결합하고, 용해도가 높고 안정하고 독성이 낮도록 설계된다. 그러므로 이것들은 예컨대 리포좀과 같은 특수화된 시스템으로 또는 유전자 요법으로 공급될 수 있다. 또한, 그것들은 유사체, 부착된 단백질, 염기들간의 치환 또는 변경된 결합 등을 포함할수 있다.

다른 유형의 약품들은 HCV 게놈의 중요한 제어영역을 모방 하는 폴리뉴클레오티드를 기초로 할 수 있고 이것은 바이러스 감염성 또는 복제를 담당하는 시스템의 핵심 성분과의 상호작용으로 인해 치료성이 있을수 있다.

[일반적 방법]

배지에서 세포를 성장시키기위해 바이러스로부터 게놈을 추출하고, cDNA 라이브러리를 제조 및 프로브하고, 클론을 서열화하고, 발현벡터를 구성하고, 세포를 형질전환하고, 방사면역검사 및 ELISA 검사와 같은 면역학적 검사등을 수행하는데 사용되는 일반적 기술은 본분야 공지이며 이들 기술을 설명하는 실험실 매뉴얼도 입수될 수 있다 그러나, 일반적인 지침으로서, 다음은 이러한 과정을 위해서와 그것들을 수행하는데 유용한 물질을 위해 현재 구입되는 몇가지 공급원을 제시한다.

원핵 및 진핵숙주세포는 둘다 지정된 숙주와 적합성인 적절한 제어서열이 사용될 때 원하는 코딩서열의 발현에 사용될수 있다. 원핵숙주 중에는 대장균이 가장 빈번히 사용된다. 원핵세포를 위한 발현 제어서열은 오퍼레이터 부분을 임의적으로 함유하는 프로모터와 리보소옴 결합부위를 포함한다. 원핵숙주와 적합성인 전달벡터는 통상 예를들면 앰피실린 및 테트다사이클린 저항성을 부여하는 오페론을 함유하는 플라스미드인 pBR 322 와 항생제 저항성 마커를 부여하는 서열을 역시 함유하는 각종 pUC 벡터로부터 유래된다. 이들 마커는 선택에 의해 성공적인 형질전환체를 얻기위해 사용될 수 있다. 통상 사용되는 원핵세포 제어서열은 베타 락타마제(페니실리나제) 및 락토오스 프로모터시스템(Chang et al. (1977)), 트립토판(trp) 프로모터 시스템(Goeddel et al. (1980) 및 람다 유도된 P_L 프로모터 및 N 유전자 리보소옴 결합부위(Shimatake et al. (1981)) 및 trp 및 lac UV5 프로모터의 서열로부터 유도된 혼성체 tac 프로모터(De Boer et al. (1983))를 포함한다. 전술한 시스템들은 대장균과 특히 적합성이다. 만일 원한다면 대응 제어서열을 가진 바실러스 또는 슈도모나스 균주와 같은 다른 원핵숙주가 사용될 수 있다.

진핵 숙주는 배양계내에 효모 및 포유동물 세포를 포함한다. 삭카로마이세스 세레비시에 및 삭카로마이세스 칼스베르겐시스가 가장 통상적으로 사용되는 효모 숙주이며, 편리한 진핵 숙주이다. 효모 적합성 벡터는 영양 요구성 변이주에 원영양성(protrophy)를 부여하거나 야생형 균주에 중금속에 대한 내성을 부여함으로써 성공적인 형질전환체의 선별을 허용하는 마아커를 지닌다. 효모적합성 벡터는 2미크론의 복제기원(Broach et al.(1983)), CEN3 및 ARS1의 조합, 또는 숙주세포 게놈에 적당한 단편의 병합을 가

져오게되는 서열과 같은, 복제를 보장하는 다른 수단들을 사용할 수 있다. 효모벡터에 대한 제어서열은 본분야 공지이며 3포스포글리세레이트 키나제에 대한 프로모터(Hitzeman (1980))를 포함하여 당분해효소의 합성을 위한 프로모터(Hess et al.(1968); Holland et al. (1978)를 포함한다. 에놀라제유전자로부터 유도된 것들 (Holland (1981))과 같은 터미네이터도 또한 포함될 수 있다. 특히 유용한 제어시스템은 글리세르알데히드-3 포스페이트 탈수소효소(GAPDH) 프로모터 또는 알코올 탈수소효소(ADH) 조절성 프로모터, GAPDH로부터 또한 유래된 터미네이터, 그리고 분비가 요망된다면 효모 알파인자로부터의 리이더 서열을 포함하는 것들이다. 또한, 작동가능하게 연결되어 있는 전사조절영역 및 전사개시영역은 그것들이 야생형 유기체에 자연적으로 관련되지 않도록 될 수 있다. 이들 시스템은 1984년 10월 3일 공고된 EOP 120,551, 1984년 8월 22일 공고된 EPO 116,201, 1985년 12월 18일 공고된 EPO 164,556 에 상세히 기술되어있고 이것들은 본원인에게 양도되고 여기에 참고로 포함된다.

발현을 위한 숙주로서 유용한 포유동물 세포주들은 본분야 공지이며 HeLa 세포, 중국산 햄스터 난소(CHO) 세포, 베이비 햄스터 신장(BHK) 세포, 및 많은 다른 세포주들을 포함하여 어메리칸 타입 컬춰 컬렉션(hon)으로 부터 구입되는 많은 불멸화된 세포주를 포함한다. 포유동물 세포에 대한 적합한 프로모터들도 본분야 공지이며 시미안 바이러스 40 (SV40)(Fiers (1978)), 로우스 사르코마 바이러스(RSV), 아데노바이러스(ADV), 및 소의 파필로마 바이러스(BPV)로부터의 바이러스 프로모터와 같은 바이러스 프로모터를 포함한다. 포유동물 세포는 또한 터미네이터 서열 및 폴리 A 부가서열을 요할 수 있고 발현을 증가시키는 인핸서 서열이 또한 포함될 수 있으며 유전자의 증폭을 일으키는 서열도 또한 바람직하다. 이들 서열은 본분야 공지이다. 포유동물 세포에서 복제에 적합한 벡터는 바이러스 레플리콘, 또는 숙주 게놈에 NANBV 에피토프를 코드화하는 적당한 서열의 통합을 보장하는 서열들을 포함할 수 있다.

형질전환은 예를들면 바이러스에 폴리뉴클레오티드를 패키징하는 것과 숙주세포를 바이러스로 형질도입하는것 그리고 폴리뉴클레오티드의 직접 흡수에 의한 것을 포함하여 숙주세포에 폴리뉴클레오티드를 도입하는 어떤 공지의 방법으로도 될 수 있다. 사용되는 형질전환 과정은 형질전환되는 숙주에 의존한다. 예를들면, BB-NANBV 서열을 함유하는 람다-gt11에 의한 대장균 숙주세포의 형질전환은 아래의 실시예 부분에 논의되어있다. 직접흡수에 의한 세균성 형질전환은 염화칼슘 또는 염화루비듐으로의 처리(Cohen(1972); Maniatis(1982))를 일반적으로 채용한다. 직접흡수에 의한 효모형질전환은 하이넨 외(Hinnen et al.(1978))의 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 직접흡수에 의한 포유동물 형질전환은 그라함과 반데르 에브(Graham Vander Eb(1978))의 인산칼슘침전법과 각종 공지의 수정안들을 사용하여 행할수 있다.

벡터축조는 본분야 공지의 기술들을 사용한다. 부위 특이성 DNA 절단은 이들 시중구입되는 효소들의 제조업자가 일반적으로 명시하고 있는 조건하에 적합한 제한효소로 처리함으로써 수행된다. 일반적으로, 37℃에서 1-2 시간의 배양에 의해 약 1마이크로그램의 플라스미드 또는 DNA서열이 약 1마이크로리터 완충액 용액중 1단위의 효소에 의해 절단된다. 제한효소와 함께 배양후, 단백질은 페놀/클로로포름 추출에 의해 제거되고 DNA는 에탄올과의 침전에 의해 회수된다. 절단된 단편은 Methods in Enzymology (1980) 65 : 499-560 에서 발견되는 일반적 방법에 따라 폴리아크릴아미드 또는 아가로오스 겔 전기영동 기술을 사용하여 분리될 수 있다.

점착 말단 절단 단편은 혼합물내에 존재하는 적당한 데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트(dNTP)의 존재하에 대장균 DNA 폴리머라제 I(Klenow)을 사용하여 평활말단으로 될 수 있다. S1 뉴클레아제로의 처리도 또한 사용되어 어떤 단일 스트랜드 DNA 부분의 가수분해를 가져올 수 있다.

T4 DNA 리가제와 ATP 를 사용하여 표준완충액 및 온도조건을 사용하여 연결이 수행되며 점착말단 연결은 평활말단 연결보다 더 적은 ATP 및 더 적은 리가아제를 요한다. 벡터 단편을 연결혼합물의 일부로서 사용할때, 벡터단편은 종종 세균성 알칼리 포스파타제(BAP)또는 송아지 장내 알칼리 포스파타제로 처리되어 5'-인산염을 제거하고 따라서 벡터의 재연결을 방지하며, 또 다르게는 원하지 않는 단편의 제한효소 소화가 연결을 방지하기 위해 사용할 수 있다.

연결혼합물은 대장균과 같은 적당한 클로닝 숙주로 형질전환되며 성공적인 형질전환체는 예를들면 항생제 저항성에 의해 선택되며 정확한 구조에 대해 선별된다.

합성 올리고 뉴클레오티드는 와너(Warner (1984))에 의해 기술된 바와같이 자동화된 올리고뉴클레오티드 합성기를 사용하여 제조될 수 있다. 만일 원한다면 합성스트랜드는 반응을 위한 표준조건을 사용하여 ^{32}P-ATP 의 존재하에 폴리뉴클레오티드 키나제로 처리하여 ^{32}P로 표지될 수 있다.

cDNA 라이브러리로부터 분리된 것들을 포함하여 DNA서열은 예를들면 졸러(Zoller (1982))에 의해 기술된 바와같은 부위지정 돌연변이유발을 포함하여 공지기술에 의해 변형될 수 있다. 간단히는, 변형될 DNA는 단일 스트랜드 서열로서 파지로 패키징하고, 수정될 DNA의 부분에 상보적이며, 원하는 변형안이 자체서열에 포함되어있는 합성올리고뉴클레오티드를 프라이머로 사용하여 DNA 폴리머라제로 이중 스트랜드 DNA로 전환시킨다. 결과된 2중 스트랜드 DNA는 파지로 지지하는 숙주세균을 형질 전환된다. 파지의 각 스트랜드의 복제를 함유하는 형질 전환된 세균의 배양액을 한천에 놓아 플라크를 얻는다. 이론적으로, 새로운 플라크의 50% 가 돌연변이된 서열을 갖는 파지를 함유하며 나머지 50%는 원래의 서열을 갖는다. 플라크의 복제물은 변형되지 않은 서열과는 혼성화를 허용하지 않으나 정확한 스트랜드와 혼성화를 허용하는 표지된 합성 프로브로 온도 및 조건에서 혼성화된다. 혼성화에 의해 확인된 서열을 회수 및 클론한다. DNA 라이브러리는 그룬스타인과 호그니스(Grunstein Hogness(1975))의 방법을 사용하여 프로브될 수 있다. 간단히는, 이 방법에서, 프로브할 DNA를 니트로 셀룰로오스 필터상에 고정화시키고 변성시키고 0-50% 포름아미드, 75M NaCl, 75mM 시트르산나트륨, 소혈청알부민 각각 0.02%(wt/v), 폴리비닐피롤리돈 및 피콜(Ficoll), 50mM 인산나트륨(pH6.5), 0.1% SDS 및 100 마이크로그램/㎖ 담체 변성된 DNA를 함유하는 완충액으로 사전 혼성화시킨다. 완충액중 포름아미드의 백분율, 또한 사전혼성화와 후속 혼성화의 시간 및 온도등은 요구되는 엄격성에 의존한다. 낮은 엄격성 조건을 요하는 올리고머 프로브는 일반적으로 낮은 백분율의 포름아미드, 낮은 온도 및 더 긴 혼성화시간으로 사용된다. cDNA 또는 게놈 서열로부터 유도된 것들과 같은 30 또는 40개 이상의 뉴클레오티드를 함유하는 프로브는 일반적으로 더 높은 온도, 예

를들면, 약 40- 42℃ 및 높은 백분율, 예를들면 50%의 포름아미드를 사용한다. 사전혼성에 이어서, 5'-^{32}P-표지된 올리고뉴클레오티드 프로브를 완충액에 첨가하고 필터를 혼성화 조건하에 이 혼합물에서 배양시킨다. 세척후, 처리된 필터를 혼성화된 프로브의 위치를 보기 위해 자동방사성 측정하고 원래 한천판상의 해당위치의 DNA를 원하는 DNA 의 공급원으로 사용한다.

일상적 벡터 축조를 위해, 연결혼합물을 대장균 균주 HB101 또는 다른 적합한 숙주로 형질 전환시키고 성공적인 형질전환체를 항생제 저항성 또는 다른 마아커에 의해 선별한다.

다음에 클레웰(Clewell et at.(1969))의 방법에 따라 형질전환체로부터 플라스미드를 제조하고 보통 이어서 클로람 페니콜 증폭(Clewell(1972))을 한다. DNA를 보통 제한효소분석 및/또는 서열화에 의해 분리 및 분석한다. 서열화는 메씽외(Messing et al.(1981)에 의해 더 기술되는 상거외(Sanger et al.(1977))의 디데옥시법에 의해, 또는 맥삼 외(Maxam et at.(1980))의 방법에 의해 될 수 있다. GC-풍부 영역에서 종종 관찰되는 밴드압축의 문제는 바르 외(Barr et al. (1986))에 따라 T-디아조구아노신의 사용에 의해 극복되었다.

항원이나 항체농도를 측정하기 위해 효소 연결된 면역흡착 검사법(ELISA)이 사용될 수 있다. 이 방법은 항원 또는 항체에 효소의 컨쥬게이션에 의존하며 결합된 효소활성을 정량적 수준으로 사용한다. 항체를 측정하기 위해, 공지의 항원을 고상(예를들면, 마이크로플레이트 또는 플라스틱 컵)에 고정시킨 시험 혈청 희석액과 배양시키고 세척하고 효소로 표지된 항 면역글로 분린과 배양시키고 다시 세척한다. 표지에 적합한 효소는 본 분야 공지이며 예를들면 양 고추냉이 과산화수소를 포함한다. 고상에 결합된 효소활성은 특이적 기질을 첨가하고 생성물 형성 또는 기질이용을 비색계로 구함으로써 측정된다. 결합된 효소활성은 결합된 항체 양의 직접함수이다.

항원을 측정하기 위해, 공지의 특이적 항체를 고상에 고정시키고 항원을 함유하는 시험물질을 첨가하고 배양 후 고상을 세척하고 제2의 효소 표지된 항체를 첨가한다. 세척후, 기질을 첨가하고 효소활성을 비색계로 측정하고 항원농도와 관련시킨다.

[실시예]

이하에 본 발명 실시예를 기술하나 단지 예시할 목적으로만 제공되며 본 발명의 범위를 제한하지는 않는다. 본 명세서에 비추어, 청구범위내에서 다수의 구체예가 당업자에게 명백할 것이다.

[중첩 HCV cDNA 클론 13i, 26j, CA59a, CA84a, CA 156e, 및 CA 167b의 분리 및 서열]

EP0공고 No. 318,216(1989년 5월 31일 공고) 및 WO 89/04669(1989년 6월 1일 공개)에 그 제법이 기술되어있는 HCV cDNA(ATCC No. 40394)를 함유하는 람다-gt11 라이브러리로 부터 클론 13i, 26j, CA59a, CA84a, CA 156e 및 CA 167b를 분리하였다. 라이브러리의 선별은 휴인(Huynh (1985))에 의해 기술된 방법을 사용하여 이하에 기술된 프로브로 하였다. 각각의 프로브로 양성클론이 나타난 빈도는 약 50,000중의 1이었다.

클론 13i의 분리는 클론 12f의 서열로부터 유래된 합성프로브를 사용하여 달성되었다.

프로브의 서열은

서열 1

5' GAA CGT TGC GAT CTG GAA GAC AGG GAC AGG 3'

이었다.

클론 26j의 분리는 클론 K9-1의 5'- 영역으로부터 유래된 프로브를 사용하여 달성되었다.

프로브의 서열은

서열 2

5' TAT CAG TTA TGC CAA CGG AAG CGG CCC CGA 3'

이었다.

클론 12f와 클론 K9-1(K9-1 라고도 함)에 대한 분리방법은 EP0 공고 No. 318,216 호에 기술되어 있고 그것들의 서열을 각각 제1도와 제2도에 나타내었다. 클론 13i 와 26j 의 HCV cDNA 서열은 각각 제4도와 제5도에 나타내었다. 또한, 여기에서 코드화된 아미노산 클론 13i 와 클론 12f의 중첩, 그리고 클론 26j 와 클론 13i 의 중첩도 또한 나타내었다. 이들 클론에 대한 서열은 클론 K9-1의 서열을 확인하였다. 클론 K9-1은 다른 HCV cDNA 라이브러리로부터 분리되었다 (EP0 218,316 참조).

클론 CA59a는 클론 26j 의 5'- 영역의 서열을 기초로 한 프로브를 이용하여 분리되었다.

이 프로브의 서열은

서열 3

5' CTG GTT AGC AGG GCT TTT CTA TCA CCA CAA 3'

이었다.

클론 CA59a의 서열로부터 유래된 프로브를 클론 CA84a 를 분리하기 위해 사용하였다. 이 분리에 사용된

프로브의 서열은

서열 4

5' AAG GTC CTG GTA GTG CTG CTG CTA TTT GCC 3'

이었다.

클론 CA 156e 는 클론 CA84a 의 서열로부터 유래된 프로브를 사용하여 분리하였다. 프로브의 서열은

서열 5

5' ACT GGA CGA CGC AAG GTT GCA ATT GCT CTA 3'

이었다.

클론 CA167b는 클론 CA 156e의 서열로부터 유래된 프로브를 사용하여 분리하였다. 프로브의 서열은

서열 6

5' TTC GAC GTC ACA TCG ATC TGC TTG TCG GGA 3'

이었다.

클론 CA59a, CA84a, CA156e 및 CA167b내의 HCV cDNA의 뉴클레오티드 서열을 각각 제6도, 7도, 8도 및 9도에 나타내었다. 거기서 코드화된 아미노산, 또한 관련클론의 서열과의 중첩도 도면에 나타내었다.

[pi HCV cDNA 라이브러리의 창제]

pi 라이브러리인 HCV cDNA의 라이브러리는 본질상 같은 기술을 이용하는 EPO 공고 No. 318,216 에 기술된 람다-gt11 HCV cDNA 라이브러리(ATCC No. 40394)를 제조하기 위해 사용된 감염성 침판지 혈청과 같은 배치로부터 제조되었다. 그러나, pi 라이브러리의 축조는 프라이머- 연장법을 이용하였고 여기서 역전사효소에 대한 프라이머는 클론 CA 59A의 서열을 기초로 하였다.

프라이머의 서열은

서열 7

5' GGT GAC GTG GGT TTC 3'

이었다.

[클론 pi 14a의 분리 및 서열]

클론 CA167b(상기참조)를 분리하기 위해 사용된 프로브로 상기 문헌에 기술된 pi HCV cDNA 라이브러리를 선별하여 클론 pi 14a를 산출하였다. 이 클론은 람다 gt-11 HCV cDNA 라이브러리(ATCC No, 40394)로부터 분리된 클론 CA167b, CA156e, CA84a 및 CA 59a를 중첩하는 약 800 염기쌍의 cDNA를 함유한다. 또한, pi14a는 또한 클론 CA167b중의 HCV cDNA의 상류에 약 250 염기쌍의 DNA를 함유한다.

[클론 CA216a, CA290a 및 ag30a의 분리 및 서열]

클론 CA167b 의 서열을 기초로 다음 서열을 갖는 합성프로브가 만들어졌다.

서열 8

5' GGC TTT ACC ACG TCA CCA ATG ATT GCC CTA 3'

상기 프로브를 사용하여 람다 gt-11 HCV cDNA 라이브러리(ATCC No. 40394)를 선별함으로써 클론 CA216a를 산출하였으며 그의 HCV 서열을 제10도에 나타내었다.

클론 CA 216a의 서열을 기초로 다음서열을 갖는 또 다른 프로브를 만들었다.

서열 9

5' TTT GGG TAA GGT CAT CGA TAC CCT TAC GTG 3'

이 프로브로 람다-gt11 라이브러리(ATCC No. 4G394)를 선별하여 클론 CA 290a를 산출하였고 거기서의 HCV 서열을 제11도에 나타내었다.

병행된 연구과정에서, 프라이머-연장 cDNA 라이브러리는 상기에 언급된 원 람다-gt11 cDNA 라이브러리에서 사용된 동일한 감염성 혈장으로부터 추출된 핵산을 이용하여 제조되었다. 사용된 프라이머는 CA 216a 및 CA 290a 클론의 서열을 기초로 한다.

서열 10

5' GAA GCC GCA CGT AAG 3'

cDNA 라이브러리는 pi14a 및 K9-1 클론의 분리에 사용된 상기 라이브러리에 대하여 전술된 것과 비슷한

방법을 사용하여 제조되었다;

이 라이브러리를 스크리닝하기 위해 사용된 프로브는 CA902a 클론의 서열을 기초로 한다:

서열 11

5' CCG GCG TAG GTC GCG CAA TTT GGG TAA 3'

ag30a 클론은 상기 프로브를 가진 새로운 라이브러리로 부터 분리되며 HCV 서열의 약 670 염기쌍을 가지고 있다 (제12도 참조). 이 서열의 일부는 CA 216a 와 CA290a 클론의 HCV 서열과 중첩되어진다. 그러나 ag30a 서열의 약 300 개 염기쌍들은 CA290a 클론의 상류에 위치한다. 중첩되지 않은 서열은 개시코돈(*), 및 HCV ORF 의 개시를 지시할 수 있는 종지코돈을 나타낸다. 또한 12도에는 추정되는 폴리펩티드(/)의 추정상의 첫아미노산 뿐만아니라, 번역을 조절하는데 있어서 역할을 할 수 있는 추정상의 작은 코드화된 펩티드(#) 및 그에 코드화되어 있는 하류 아미노산들도 나타나 있다.

[CA205a 클론의 분리 및 서열]

CA205a 클론은 CA290a 클론(제11도)의 HCV 서열로부터 유래하는 합성프로브를 사용하여 원래의 람다 gt-11 라이브러리(ATCC No. 40394)로부터 분리되어진다. 프로브의 서열은 다음과 같다:

서열 12

5' TCA GAT CGT TGG TGG AGT TTA CTT GTT GCC 3'

제13도에서 보여주는 바와같이, CA205a에서 HCV cDNA의 서열은 ag30a 와 CA290a 클론 양쪽 모두의 cDNA 서열과 중첩된다. CA290a의 cDNA서열과의 중첩은 서열위의 점선으로 나타나 있다(도면은 또한 이 단편위에 코드화되어 있는 추정상의 아미노산을 도시한다).

CA205a과 ag30a 클론의 HCA cDNA 서열로부터 알 수 있듯이, 추정상의 HCV 폴리단백질은 ATG 개시코돈에서 시작하는 것으로 보인다; 양 클론의 HCV 서열은 이 ATG로부터 42뉴클레오티드 상류에 연속하는 2중의 종지 코돈(TGATAG)을 포함하고 있다. HCV ORF는 이 종지코돈 이후에 시작되어 적어도 8907 뉴클레오티드가 계속 연장되는 것으로 보인다 (제17도에 나타나 있는 복합 HCA cDNA참조).

[18g 클론의 분리 및 서열]

ag30a 클론(제12도 참조)의 서열, 및 원래의 람다 gt-11 라이브러리(ATCC No, 40394)와의 중첩클론의 서열을 기초로, 합성프로브 CA30a가 다음과 같은 서열을 가지도록 제조된다:

서열 13

5' CCA TAG TGG TCT GCG GAA CCG GTG AGT ACA 3'

프로브로 원래의 람다-gt11 HCV cDNA 라이브러리를 선별함으로써 189 클론 즉, 제14도에 도시된 HCV cDNA서열을 얻었다. 또한 ag30클론과의 중첩, 및 HCV cDNA 안에 코드화되어 있는 추정상의 폴리펩티드도 도시하였다.

클론 18g(C18g 또는 18g)의 cDNA는 상기에 언급된 클론 ag30a과 CA205a의 cDNA와 중첩된다. C18g의 서열도 또한 ag30a 클론에서 본 바와같은 2중 종지 코돈 영역을 포함하고 있다. 이들 종지 코돈 상류의 폴리뉴클레오티드는 HCV 게놈의 5'- 영역의 일부에 해당되며 짧은 ORF 를 포함하는 것으로 추정적으로 나타내고 이는 정제된 HCV 게놈을 직접 서열화함으로써 확인될 수 있다. 이 추정적인 작은 코드화된 펩티드들은 아마 번역과정에 있어 조절 작용을 할 수도 있다. C18g로 표시되는 이 상류의 HCV 게놈 영역은 클론 12f의 HCV cDNA 서열 상류의 cDNA 서열을 분리하기 위한 EPO 공보 제 318,216호에 나타나있는 기초적인 기술을 사용하여, 서열 분석을 위해 분리되어질 수 있다. 근본적으로, C18g서열에 근거한 역전사효소의 작은 합성 올리고뉴클레오티드 프라이머를 합성하여 HCV 게놈 RNA의 대응 서열에 결합할 수 있도록 사용한다. 프라이머의 서열은 C18g의 공지된 5'- 말단에 근접하나 프라이머 서열 상류의 프로브 서열을 설계할 수 있을 정도로 충분히 하류에 위치하여야 한다. 이미 알려져 있는 프라이밍 및 클로닝 방법이 이용되어진다. 결과의 cDNA 라이브러리는 밝혀진 C18g 서열에서 유추되듯이 프라이밍 부위의 상류 서열로 선별되어진다. HCV 게놈 RNA는 HANBH를 지닌 개체의 간조직 시료나 혈장으로부터 얻을 수 있다. HCV는 플래비와 유사한 바이러스이기 때문에 게놈의 5'-말단부분에 캡 수조의 형태로 변형될 수 있다. 플래비 바이러스는 5'-말단부분 캡구조를 가진 것으로 알려져 있다.

[베타 HCV cDNA 라이브러리로부터의 클론의 서열과 분리]

HCV게놈의 3'말단을 나타내는 cDNA를 가진 클론을 이미 EPO공보 No. 318,216에 기술되어진, HCV cDNA 람다-gt11 라이브러리(ATCC 4039k)를 만들때 사용된 원래의 감염성 침팬지 플라즈마 푸울로부터 구성되어진 cDNA 라이브러리에서 분리되어진다.

DNA 라이브러리를 만들기 위하여는, 혈장에서 추출된 RNA는 폴리(rA)중합효소에 의해 다수의 rA 염기의 꼬리 를 가지게 되며 올리고$(dT)_{12-18}$을 역전사 효소의 프라이머로서 이용하여 cDNA를 합성한다. 얻어진 RNA : cDNA 혼성체는 RNAase H로 절단되어 2중 스트랜드 HCV cDNA로 전환되어진다. 얻어진 HCV cDNA 는 Huynh 에 기술되어진 근본적 기술을 사용하여 람다-gt10 에 클론되어지며 베타(혹은 b) HCV-cDNA 라이브러리가 생긴다. 사용된 일련의 공정은 다음과 같다.

혈장 알리퀏(12㎖)을 단백질효소 K로 처리한후 0.05M Tris-Cl, pH7.5, 0.5%(v/v) β-메르캅토에탄올, 0.1%(w/v)히드로퀴놀론, 1㎜M EDTA로 포화된 동일용량의 페놀용액에서 추출한다. 얻어진 수성상을 페놀

혼합물로 재추출한후 페놀과 클로로포름의 1:1 혼합물: 아이소아밀 알코올(24:1)로 3회 추출하고, 클로로포름과 아이소아밀 알콜(1:1) 혼합물로 2회 추출하였다. NaCl 200mM로 액상을 조절한 수성상내의 핵산을 2.5배의 냉 순수에탄올에 -20℃ 상태에서 밤새 침전시킨다. 침전물을 10,000 RPM으로 40분동안 원심분리하여 수집한후, 20mM NaCl을 함유한 70% 에탄올로 세척하고, 100% 냉 에탄올로 세척하여 건조기에서 5분간 건조한 후에 물에 용해한다.

감염성 침팬지 플라즈마 푸울에서 분리된 핵산은 MS2 RNA를 운반매개체로 이용하여, 사람의 태반 리보뉴클레아제 저해제 (HPRI)의 존재하에 폴리-A 중합효소로 폴리 rA 꼬리를 달게 된다. 혈장 2㎖에 존재하는 양의 분리된 핵산은 TMN(50mM Tris HCl, pH 7.9, 10mM $MgCl_2$, 250mM NaCl, 2.5mM $MnCl_2$, 2mM 디시오스테이(DTT) 40μM-α[^{32}P] ATP, 20 HPRT) 및 9~10개의 RNase 유리폴리 A 중합효소(BRL) 가 있는 용액에서 배양한다. 37℃에서 10분간 배양후 반응은 EDTA 용액으로 종지시킨다(최종 농도 250mM). 용액은 동일용량의 페놀-클로로포름 및 클로로포름으로 차례대로 추출하고 핵산은 200mM NaCl을 포함한 에탄올 2.5배 용량에 -20℃에서 밤동안 침전시킨다.

[b5a 클론의 분리]

베타 HCV cDNA 라이브러리를 15e 클론의 HCV cDNA 서열에 기초한 서열을 가지는 합성 프로브를 사용하여 혼성화함으로써 선별하였다. 15e 클론의 분리는 EPO 공보 제 318,216호에 기술되어 있으며, 그 서열은 제3도에 나타나 있다. 합성 프로브의 서열은 다음과 같다:

서열 14

5' ATT GTG AGA TCT ACG GGG CCT GCT ACT CCA 3'

라이브러리를 선별함으로써 베타-5a(b5a) 클론이 산출되며 이것은 대략 1000 염기쌍 정도의 HCV cDNA 부위를 포함하고 있다. 이 cDNA의 5'영역은 35f, 19g, 26g, 15e클론 (상기에 기술되어 있음)과 중첩된다. 15e 클론과 중첩되는 3'서열과 3'말단 폴리 A 서열사이의 영역은 대략 200 염기쌍 정도를 함유하고 있다. 이 클론으로 HCV 게놈의 3'말단서열 부위를 확인할 수 있다.

b5a 의 서열은 16jh 클론(상기 참조)의 HCV cDNA 서열안에 속한다. 또한, 이 서열은 CC34a 에도 존재하며 원래의 람다 gt11 라이브러리(ATCC No, 40394)에서 분리되어진다 (원래의 람다 gt11 라이브러리는 여기서 C 라이브러리로 명명된다)

[HCV 게놈 3' 영역의 PCR 증폭에 의하여 만들어지는 클론들의 서열 및 분리]

HCV 게놈의 3'영역으로부터 유래하는 뉴클레오티드 서열을 가진 다중 cDNA클론이 제조되어왔다. 이것은 Saiki et at. (1986) 및 Saiki et at.(1988)에 기술되어 있는 중합효소 사슬반응 기술로 게놈의 표적부위를 증폭하여 이루어졌다. 이러한 방법들은 아래 기술된 바와같이 수정되어 왔다. 증폭된 HCV RNA는 EPO 공보 제 318,216호에 기술된 HCV cDNA 람다 gt11 라이브러리의 제조에 사용되어지는 원래의 감염성 침팬지 플라즈마 푸울로부터 얻어진다. HCV RNA 의 분리는 상기된 것과 같다. 분리된 RNA 는 침팬지 혈청에서 분리된 핵산이 핵산 기질을 대신하는 것 외에는 Sippel (1973)에 기술된 것처럼 대장균 폴리-A 중합효소로 ATP을 사용, 3' 말단에 꼬리를 형성한다. 그리고 나서 꼬리가 있는 RNA는 Han(1987)에 잘 기술된 것처럼 올리고 dT-프라이머 어댑터를 사용하여, 역전사 효소에 의해 cDNA로 역전사된다.

프라이머-어댑터의 서열 및 그 구성은 다음과 같다:

스터퍼(stuffer)	NotI	SP6 프로모터	프라이머
AATTC	GCGGCCGC	CATACGATTTAGGTGACACTATAGAA	T_{15}

얻어진 cDNA는 2개의 프라이머를 이용, PCR에 의해 증폭되어진다:

프라이머	서열
JH32 (30머)	ATAGCGGCCGCCCTCGATTGCGAGATCTAC
JH11 (20머)	AATTCGGGCGGCCGCCATACGA

JH32 프라이머는 66℃의 Tn 추정온도에서 cDNA의 표적부위의 5'- 말단과 혼성이 가능한 20개의 뉴클레오티드 서열을 가진다. JH11은 올리고 dT- 프라이머 어댑터 부위에서 유래한다. 따라서 이것은 T_m 64℃에서 cDNA 의 3'말단에 특이적이다. 이 2개의 프라이머는 증폭된 HCV cDNA를 계속적으로 클로닝하는데 사용하기 위하여 5'말단에 제한효소 Not I의 인식부위를 가지도록 설계되어 있다.

PCR 반응은 4가지 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트, 버퍼염과 금속이온, 테르무스 아쿠아티쿠스(Thermus aquaticus)에서 분리된 항열성 DNA 중합효소(Taq 중합효소)등을 포함한 100 마이크로리터의 반응 혼합물에서 부유성 cDNA와 프라이머에 의해 수행되어진다.

이것은 Perkin Elmer Cetus PCR 키트에 있다. 이 반응은 Pertain Elmer Cetus DNA 더멀 사이클러(thermal cycler)에서 35사이클동안 행해진다. 각 사이클은 95℃에서 1.5분동안의 변성단계, 60℃에서 2분간의 어닐링단계, 72℃에서 3분간의 프라이머 연장단계로 구성되어 있다. PCR 산물들은 30개의 뉴클레오티드로 이루어진 프로브 JH34를 이용한 서던 블롯 분석을 거치게 된다. 이 프로브의 서열은 15e 클론의 3'말단부의 서열에 근거한다.

JH34의 서열은 다음과 같다:

서열 15

5' CTT GAT CTA CCT CCA ATC ATT CAA AGA CTC 3'

HCV cDNA 프로브로 검출된 PCR산물들은 대략 50내지 400 염기쌍 정도의 크기에 이른다.

증폭된 HCV cDNA 를 클론하기 위하여, PCR 산물들은 Not I으로 절단되어 폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 크기가 선별되어진다. 300염기쌍보다 큰 DNA는 pUC 185의 Not I 부위로 클로닝되어진다. pUC 18S 벡터는 pUC 18S의 EcoRI 과 Sal I 부위사이에 클로닝된 Not I 폴리링커를 포함하도록 구성되어 있다. 클론은 JH34 프로브를 이용, HCV cDNA에 대해 선별되어진다. 많은 양성 클론이 얻어지며 서열이 밝혀졌다. 이들 클론중의 하나인 16jh에 삽입된 HCV cDNA의 뉴클레오티드 서열 및 그에 코드화되어 있는 아미노산 등은 제15도에 나타나 있다. 이 부위를 다른 클론과 비교하여 16jh 클론의 HCV cDNA서열에서의 뉴클레오티드의 이중성을 도면에 표시하였다.

[편집된 HCV cDNA 서열]

HCV cDNA 서열은 상기에 기술된 다양한 HCV cDNA 라이브러리에서 유래하는 일련의 중첩 클론으로부터 편집되었다. 이 서열에서, b114a, 18g, ag30a, CA205a, CA290a, CA16a, pi14a, CA167b, CA156e, CA84a, CA59a, 클론들로부터 얻어진, 편집된 HCV cDNA 서열은 제16도와 같이 EPO 공보 제 318,216호에 밝혀진 편집된 HCV cDNA 서열의 상류에 있다. b5a와 16jh 클론에서 얻어진 편집된 HCV cDNA서열은 EPO 공보 제 318,216 호에 밝혀진 편집된 HCV cDNA서열의 하류에 있다.

제17도는 EPO공보 No. 318,216에 밝혀진 편집된 HCV cDNA서열과 위에서 기술된 클론으로부터 유래하는 편집된 HCV cDNA서열을 도시한다. 서열이 유래된 클론들은 b114a, 18g, ag30a, CA205a, CA290a, CA216a, pi14a, CA167b, CA156e, CA84a, CA59a, K9-1(k9-1), 26j, 13i, 12f, 14i, 14c, 8f, 33f, 33g, 39c, 35f, 19g, 26g, 15e, b5a, 16jh 이다. 도면에서 서열위에 있는 3개의 실선은 추정상의 개시 메티오닌 코돈의 위치를 나타낸다.

b114a 클론은 프로브가 상기 18g 클론을 검출하는데 이용된 합성 프로브라는 것 이외에는 상기 b5a 클론의 클로닝 과정에 의해 얻어진다.

클론 b114a는 18g, ag30a, CA205a 클론과 중첩되나, 단 18g 클론 서열의 상류에 2개의 여분의 뉴클레오티드가 있다 (즉, 5'-CA). 이 여분의 2개 뉴클레오티드는 제17도에서 보이는 HCV 게놈 서열에 포함되어 있다.

비록 상기 기술된 클론의 일부가 원 HCV cDNA 람다 gt11 라이브러리가 아닌 다른 라이브러리에서 얻어졌다하더라도 이들 클론은 원 라이브러리의 HCV cDNA 서열과 중첩되는 HCV cDNA서열을 포함하고 있다는 사실은 주목하여야 한다. 따라서 근본적으로 모든 HCV서열은 원래의 람다 gt11 C 라이브러리에서 유래한다. 원 라이브러리는 맨처음의 HCV cDNA 클론(5-1-1) 을 분리하는데 사용되어진다. 5-1-1 클론의 분리는 EPO 공보 No. 318,216호에 기술되어 있다.

[융합 폴리펩티드 C100-3의 정제(다른 방법)]

융합 폴리펩티드 -3 (HCV C100-3 또는 C100-3 이라 명명)은 N-말단에 초과산화물 디스뮤테아제(SOD)의 C-말단의 프레임내 C100 HCV 폴리펩티드로 구성되어 있다. 효모에서의 발현에 의한 폴리펩티드와 추출된 숙주 효모세포의 불용성 단편을 준비하는 방법은 EPO 공보 제 318, 216 호에 기술되어 있다. 융합 폴리펩티드를 제조하는 또 다른 방법은 아래에 기술되어 있다.

이 방법에서, 항원은 아세톤으로 미정제 세포 분쇄물에서 침전시킨후 항원이 침전된 아세톤을 이온- 교환 크로마토그래피에 실행시킨 다음, 겔 여과로 더욱 정제한다.

융합 폴리펩티드 C100-3(HCV C100-3)은 pAB24C100-3(ATCC 67976)으로 형질 전환된 JSC308 효모균주에서 발현된다: 형질 전환된 효모는, 발현조건(즉, 1%포도당을 포함한 YEP 내에서 성장시킴으로써) 하에서 성장된다(EPO 318,216참조).

버퍼 A (20㎖ Tris HCl, pH8.0, 1mM EDTA, 1mM PMSF)에 세포를 현탁함으로서 세포 융해물을 제조한다. 세포들을 Dynomill 유형 또는, 이와 같은 균질기에서 비이드를 사용하여 마쇄한다. 세포의 파괴정도는 위상렌즈가 장치된 현미경으로 세포의 수를 계수함으로써 모니터링된다. 파괴된 세포들은 어둡게 보이며 살아있는 세포는 밝은 색조를 띤다. 파괴된 세포의 백분율을 측정한다.

파괴된 세포의 백분율이 90% 혹은 그 이상일때 파괴된 세포의 잔유물을 원심분리로 유리구와 분리하고, 유리구를 버퍼 A로 세척한다. 세척물과 균등물을 결합한 후에, 분쇄물에 있는 불용성물질은 원심분리로 얻는다. 펠릿내의 물질을 세척하여 버퍼 B(50mM 글리신, pH12.0, 1mM DTT, 500mM NaCl)에 현탁하고 버퍼 C(50mM 글리신, pH10.0 1mM DTT)에 현탁하여 가용성 단백질을 제거한다. 불용성 물질을 원심분리로 회수하고, SDS가 함유된 버퍼 C(50mM 글리신, pH 10.0, 1mM DTT)에 현탁하여 가용화한다.

추출용액을 베타-메르캅토에탄올의 존재하에 가열하여 한외여과에 의해 농축시킨다. 추출물내의 HCV C100-3을 냉 아세톤으로 침전시킨다. 가능한 필요에 따라 침전물은 약 -15℃ 또는 그 이하의 온도에 저장되어야 한다.

이온- 교환 크로마토그래피 이전에, 아세톤 침전물은 원심분리로 회수하여 질소속에서 건조시킨다. 침전물을 버퍼 D(50mM 글리신, pH10.0, 1mM DTT,7M 요소)로 현탁하고 원심분리하여 불용성 물질 펠릿이 되도록한다. 상등물질을 미리 버퍼 D로 평형화된 양이온 교환컬럼에 적용시킨다. 단편들은 수집하고 SDS 폴리아크릴이미드 겔에서 겔 전기영동이나 혹은 자외선 흡광도에 의해 측정하였다. HCV C100-3 폴리펩티드

를 가진 단편들이 수집된다.

겔 여과에 의해 HCV C100-3 폴리펩티드를 정제하기 위하여서는 이온교환컬럼으로부터 모여진 단편들을 베타- 메르캅토에탄올과 SDS 의 존재하에 가열하고 용출액을 한외여과로 농축시킨다. 농축물을 미리 버퍼 E (20mM Tris HCl pH7.0, 1mM DTT, 0.1% SDS)로 평형화된 겔여과컬럼에 적용시킨다. 불순물의 존재뿐만아니라 용출 단편내의 HCV C100-3의 존재를 폴리펩티드의 가시화 및 SDS 존재하에서 폴리아크릴아미드상의 겔 전기영동에 의하여 결정한다. 정제되어진 HCV C100-3를 포함하는 이들 단편들이 모여진다.

HCV C100-3에 많은 단편들을 겔 여과과정을 반복함으로써 더욱 정제한다.

침전물을 제거할 필요성이 있을 경우에는, 침전물을 지닌 HCV C100-3을 0.22 마이크론 필터로 여과한다.

[HCV cDNA에 코드화되어 있는 폴리펩티드의 항원성과 발현]

HCV 게놈 ORF에 분포된 많은 HCV cDNA에 코드화된 폴리펩티드들을 대장균에서 발현시키고, NANBH를 지닌 다양한 개체들로부터 얻어진 혈청을 이용하여 그 항원성을 검사했다. 클론된 HCV cDNA를 지닌 발현 벡터는 pSODcf1로부터 만들어진다 (Steimer EMD, (1986)). 정확한 리이딩 프레임을 얻을 수 있음을 분명히 하기위해서는, pSODcf1 벡터를 EcoRI 과 BamHI으로 완전히 분해하여 얻어진 BamHI-EcoRI 단편에 세 개의 링커 AB, CD, EF 중 어느 하나를 연결하고나서 알칼리 포스파타제로 처리하여 3개의 별개의 발현 벡터, pcf1AB, pcf1CD, Pcf1EF를 제조한다. 링커는 여섯개의 올리고머 A, B, C, D, E, F로부터 제조되었다. 각 올리고머를 이것에 상보적인 올리고머에 어닐링되기 전에 ATP 의 존재하에 키나제 처리하여 포스포릴화하였다. 합성 링커의 서열은 다음과 같다.

명칭	DNA 서열(5' 내지 3')
A	GATC CTG AAT TCC TGA TAA
B	GAC TTA AGG ACT ATT TTA A
C	GATC CGA ATT CTG TGA TAA
D	GCT TAA GAC ACT ATT TTA A
E	GATC CTG GAA TTC TGA TAA
F	GAC CTT AAG ACT ATT TTA A

각각의 세링커는 원래의 EcoRI 부위를 파괴하고 링커내에 단, 다른 리딩프레임내에, 새로운 EcoRI 부위를 발생시킨다. 그러므로 발현벡터에 삽입될때 클론에서 분리된 HCV cDNA EcoRI 단편은 세 개의 서로 다른 리딩 프레임안에 있다.

지정된 람다-gt11 클론내에 HCV cDNA 단편들은 EcoRI를 이용한 절단에 의해 절단된다;

각 단편은 pcf1AB, pcf1CD 와 Pcf1EF 로 삽입되었다. 그 다음에 이들 발현 구성물들은 D1210 대장균 세포로 형질 전환되었으며 그 형질 전환체는 클론되었고, 각 클론으로부터의 재조합 박테리아는 융합 폴리펩티드의 발현을 유발시켰는데 이는 IPTG 의 존재하에 그 박테리아를 성장시킴으로써 일어난다.

지정된 HCV cDNA의 발현 생성물들의 항원성은 Helfman et al. (1983)에 기재된 방법의 변형된 방법을 사용하여 콜로니의 직접적인 면역학적 선별에 의해 실험되었다. 간단히, 제18도에 나타난 바와같이 필터당 약 1,000 콜로니가 되도록 박테리아를 앰피실린 플레이트위에 덮여진 니트로- 셀룰로스필터에 플레이팅했다. 콜로니는 니크로셀룰로스필터 위로 플레이팅된 복사체(replica)이며 이 복사체를 2mM IPTG와 앰피실린의 존재하에서 밤새 다시 성장시켰다. 박테리아 콜로니를 $CHCl_3$ 증기로 포화된 분위기하에서 약 15내지 20분동안 니트로셀룰로스 필터에 현탁시켜 용해시켰다. 그리고 나서 각 필터를 50mM Tris HCl 10m1, pH 7.5 150mM NaCl, 5mM $MgCl_2$, 3%(w/v)BSA, 40 마이트로그램/ 리소자임 ml 과 0.1 마이크로그램1ml DNase가 들어있는 개별적인 100mm 페트리접시에 놓아두었다. 이 플레이트를 상온에서 적어도 8시간 동안 완만하게 교반했다. 필터를 TBST (50mM Tris HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 0.005% Tween 20)에 씻어냈다. 배양후, 세포 잔류물을 씻어내고 10% 양(sheep) 혈청을 함유한 TBS(Tween이 없는 TBST)에 1시간 동안 배양시켰다. 그리고 나서 필터를 NANBH를 가진 개체로부터의 TBS내에서 사전 처리된 혈청들과 함께 배양시켰다. 이들 혈청은: 3 마리의 침팬지: 혈청이 HCV C100-3 폴리펩티드(EP0 공보 No.318,216 이하 참조)(또한 C100 이라고 한다)의 항체에 대해 양성인 만성 NANBH 를 가진 8명의 환자; 혈청이 항-C100 항체에 음성인 만성 NANBH를 가진 8명의 환자, 혈청이 항-C100 항체에 음성인 1명의 회복기 환자: 1명은 항-C100 항체에 강한 양성을 나타내는 혈청을 가지며, 1명은 항-C100 항체에 부분적으로 양성을 나타내는 혈청을 가지는 NANBH를 획득한 집단인 6명의 환자를 포함했다. TBS로 희석된 혈청을 hSOD로 사전에 흡수시킴으로써 사전처리했다. 혈청을 함유한 필터의 배양을 최소한 2시간 실행했다. 배양후 필터를 TBST로 30분동안 2번 세척했다. 혈청내 항체가 결합한 발현 단백질을 ^{125}I 로 표지된 양의 항-인간 항체로 2시간 동안의 배양함으로써 표시화하였다. 세척후, 필터를 TBST 로 30분간 2번 세척, 건조 및 방사선 사진 촬