(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
A61K 39/29
C07K 14/18
C07K 16/10

(11) 공개번호 10-2005-0085009
(43) 공개일자 2005년08월29일

(21) 출원번호 10-2005-7008793
(22) 출원일자 2005년05월16일
번역문 제출일자 2005년05월16일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2003/012830
국제출원일자 2003년11월13일
(87) 국제공개번호 WO 2004/046176
국제공개일자 2004년06월03일

(30) 우선권주장 0226722.7 2002년11월15일 영국(GB)

(71) 출원인 글락소 그룹 리미티드
영국 유비6 0엔엔 미들섹스 그린포오드 버클리 애비뉴 글락소 웰컴 하우스

(72) 발명자 브레트, 사라
영국 에스지1 2엔와이 허트포드셔 스티브네지 건넬스 우드 로드글락소 스미스클라인
햄블린, 폴, 앤드류
영국 에스지1 2엔와이 허트포드셔 스티브네지 건넬스 우드 로드글락소 스미스클라인
오길비, 루이즈
영국 에스지1 2엔와이 허트포드셔 스티브네지 건넬스 우드 로드글락소 스미스클라인

(74) 대리인 남상선

심사청구 : 없음

(54) H C V에 대한 백신

요약

본 발명은 C형 간염 바이러스 (HCV) 감염 및 이와 관련된 증상 및 질병의 치료 및 예방에 유용한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 HCV 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 백신, 및 본 발명의 백신을 투여하는 것을 포함하여 HCV로 감염된 개체를 치료하는 방법에 관한 것이다.

명세서

기술분야

본 발명은 C형 간염 바이러스 (HCV) 감염 및 이와 관련된 증상 및 질병을 치료하고 예방하는 데에 유용한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 HCV 코어 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 하나 이상의 추가의 HCV 단백질을 포함하는 DNA 백신, 및 본 발명의 백신을 투여하는 것을 포함하여 HCV로 감염된 개체를 치료하는 방법에 관한 것이다.

HCV는 수혈후 및 지역사회 획득성 비 A, 비 B 간염의 주된 원인물질로서 최근 확인되었다. 약 1억 7천만명이 HCV로 만성 감염되어 있고, 유병률은 1 내지 10% 이다. 유병률이 1.8%인 미국의 건강 관리 비용은 2십억 달러로 추산된다. 간 질환의 40 내지 60%는 HCV로 인한 것이며, 30%의 UK 이식술은 HCV 감염에 따른 것이다. HCV가 초기에 무증상 감염이라고 하더라도, 90%가 넘는 환자는 만성 질병으로 진행한다. 질환 경과는 통상적으로 만성 활동성 간염(70%)으로부터 섬유증(fibrosis), 경변증(cirrhosis)(40%)에서 간세포암(60%)으로 진행한다. 감염에서 경변증까지의 정중 시간(median time)은 20년이고, 간세포암종에 대한 이러한 시간은 20년이다 (Lauer G. and Walker B. 2001, *N. Engl J. Med* 345, 41, Cohen J. 2001, Science 285 (5424) 26).

HCV의 개선된 치료가 매우 필요한 실정이다. 현재 이용가능한 소분자 복제 억제제는 없다. 리바비린 및 페그인터페론(PEGylated interferon)의 현재의 골드 스탠다드(gold standard)는 HCV 감염을 치료하기 위한 버팀줄이다. 그러나, 지속된 반응을 달성하기 위한 현재의 방법의 능력은 부최적인 상태이다 (6개월 이하 동안 전체 50% 반응 속도이지만, 유전형 1b의 경우, 반응 속도는 보다 낮다(27%)). 이러한 치료는 또한 불쾌한 부작용과 관련된다. 이는 특히 치료한 지 최초 6개월 후에 높은 폴 아웃 레이트(fall out rate)를 초래한다.

몇몇 연구는 개개의 HCV 단백질이 DNA에 의한 면역화 후를 포함하여 정상 마우스에서 면역원성임을 밝혀내었다. 몇몇 HCV 백신은 현재 예방 또는 치료를 위한 임상 실험 단계에 있다. 현재 가장 진전된 임상 실험은 E1 또는 E2 외피 단백질을 사용하는 카이론(Chiron) 및 인노제네틱스(Innogenetics)에 의한 2상 단계에 있는 것이다. 트랜스백스(Transvax)에 의한 에피토프 백신은 또한 2상 단계에 있다. DNA를 포함하는 다양한 전달 시스템을 사용하여 코어 및 비-구조 항원으로부터의 서열을 사용하는 몇몇 백신은 전임상 개발 단계에 있다.

HCV는 플라비비라대(flaviviradae) 과의 포지티브 스트란드 RNA 바이러스이며, 이의 게놈은 길이가 9.4kb이며 하나의 오픈 리딩 프레임을 지닌다. HCV 게놈은 하나의 폴리프로테인으로서 번역되며, 이는 그 후 숙주 및 바이러스 프로테아제에 의해 프로세싱되어 구조 단백질 (코어, 외피 E1 및 E2, 및 p7) 및 다양한 효소 활성을 지닌 6개의 비-구조 단백질을 생성시킨다. 1b 유전자형의 예인 HCV J4L6 단리물의 게놈은 수탁 번호 AF054247로서 발견되며 (Yanagi,M., St Claire,M., Shapiro,M., Emerson,S.U., Purcell,R.H. and Bukh,J. "Transcripts of a chimeric cDNA clone of hepatitis C virus genotype 1b are infectious in vivo". Virology 244 (1), 161-172 (1998)), 도 1에 도시되어 있다.

외피 단백질은 인식, 결합 및 표적 세포상으로의 바이러스의 진입을 초래한다. 바이러스 복제에 관여하는 주요 비-구조 단백질로는 NS2 (Zn 의존성 메탈로프로테이나아제), NS3 (세린 프로테아제/헬리카나아제), NS4A (프로테아제 보조인자), NS4B, NS5A 및 NS5B (RNA 중합효소)가 있다 (Bartenschlager B and Lohmann V. 2000. Replication of hepatitis C virus. J. Gen Virol 81, 1631).

HCV 폴리프로테인의 구조는 다음과 같이 표현될 수 있다 (숫자는 각각의 단백질의 최초 아미노산의 위치를 나타내고; J4L6 단리물의 전체 폴리프로테인의 길이는 3010개 아미노산이다)

코어 1-191	E1	E2	P7	NS2	NS3 1027-1657	NS4A	NS4B 1712-1972	NS5A	NS5B 2420-3010

바이러스는 높은 돌연변이율을 지니며, 적어도 6개의 주요 유전자형이 보존적 영역 및 비보존적 영역의 뉴클레오티드 서열을 기초로 하여 규정되었다. 그러나, 추가의 불균일성이 존재하는데, 이는 1명의 환자로부터 단리된 HCV가 항상 밀접하게 관련된 게놈 또는 준-종 (quasi-species)의 혼합물로서 나타나기 때문이다.

HCV 게놈은 고도의 유전자 변이를 나타내며, 이는 6개의 주요 유전자형 (1a, 1b, 2, 3, 4, 5 및 6)로 분류되어 있다. 유전자형 1a, 1b, 2 및 3은 유럽, 북미 및 남미, 아시아, 중국, 일본 및 호주에서 가장 우세하다. 유전자형 4 및 5는 아프리카에서 우세하며, 유전자형 6은 동남 아시아에서 우세하다.

HCV 감염의 개선된 치료법 및 다수의 HCV 유전자형을 치료할 수 있는 능력에 있어서 다양한 치료법을 제공하는 것이 매우 필요하다. 본 발명의 첫 번째 양태에 있어서, 다수의 유전자형에 대한 보호에 있어서 다양한 신규한 백신 제형이 제공된다.

하나 이상의 HCV 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HCV 백신은 공지되어 있다. NS3를 엔코딩하는 플라스미드 DNA 또는 세믈리키 포레스트 (Semliki Forest) 바이러스 벡터를 포함하는 백신이 브린스터(Brinster) 등에 의해 공지되었다 (2002, Journal of General Virology, 83, 369-381). NS5B를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 WO 99/51781에 기재되어 있다. HCV E1, E1+E2 융합체, NS5A 및 NS5B 단백질을 엔코딩하는 코돈 최적화된 유전자 및 이를 포함하는 백신은 WO 97/47358에 기재되어 있다. WO 01/04149에는 코어, NS3, NS4 또는 NS5A 중에서 유래된 HCV 에피토프의 모자이크(mosaic)를 엔코딩하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드가 기재되어 있다. 백신에서 유용한 NS3, NS4, NS5A 및 NS5B를 포함하는 융합 단백질, 및 이러한 융합 단백질을 엔코딩하는 DNA는 WO 01/30812에 기재되어 있으며; 임의로, 융합 단백질은 코어 단백질의 단편들을 포함하는 것으로 여겨진다. WO 03/031588에는 HCV 단백질 NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B를 엔코딩하는 백신으로서 사용하기에 적합한 아데노바이러스 벡터가 기재되어 있다.

"프로세싱되지 않은" 코어 단백질 및 비-구조 단백질을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 백신은 WO 96/37606에 기재되어 있다.

본 발명은 코어, NS3, NS4B 및 NS5B인 HCV 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드 백신을 제공하는 것에 관한 것이다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드 백신은 NS4A HCV 단백질 및/또는 NS5A 단백질을 엔코딩하지 않는다. 바람직하게는, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 백신은 코어, NS3, NS4B 및 NS5B HCV 단백질을 엔코딩하지만 그 밖의 HCV 단백질은 엔코딩하지 않는다. 또한, 본 발명은 의학 및 HCV 감염의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조에서의 이들 항원을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드 백신의 용도를 제공한다.

본 발명의 백신에서 사용되는 폴리뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 DNA 서열이다.

HCV 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 다수의 조합 또는 형태로 존재할 수 있다. 예를 들어, 단백질들은 개개의 단백질로서 발현되거나 융합 단백질로서 발현될 수 있다. DNA 또는 단백질 수준에서 존재할 수 있는 융합체의 예는 NS4B 및 NS5B (NS4B-NS5B)의 아미노산 서열을 함유하거나 이를 엔코딩하는 하나의 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드로 구성된 이중 융합체, NS3-NS4B-NS5B의 아미노산 서열을 함유하거나 이를 엔코딩하는 삼중 융합체, 또는 본 발명의 모든 4가지 항원의 융합체 (코어-NS3-NS4B-NS5B)일 것이다.

본 발명의 바람직한 융합체는 NS4B 및 NS5B 사이 (NS4B-NS5B 또는 NS5B-NS4B); 및 코어 및 NS3 사이 (NS3-코어 또는 코어-NS3)의 이중 융합체를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드이다. 바람직한 삼중 융합체는 NS3-NS4B-NS5B의 아미노산 서열을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드이다.

단일 항원 또는 융합 단백질을 엔코딩하는 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 하나의 발현 벡터 또는 다수의 발현 벡터들에 존재할 수 있다. 바람직하게는, 각각의 항원을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 동일한 발현 벡터 또는 플라스미드에 존재한다. 이와 관련하여, HCV 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 하나의 발현 카세트, 또는 다수의 일련의 발현 카세트내에 존재할 수 있다.

다른 HCV 단백질의 발현을 최적화하기 위해, HCV 코어를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 다른 HCV 단백질 중 하나 이상을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 발현 카세트의 다운스트림에 위치하는 발현 카세트에 존재한다. 바람직하게는, HCV 코어 단백질은 NS5B를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 발현 카세트의 다운스트림에 위치하는 발현 카세트에 바람직하게 존재한다.

본 발명의 올리고뉴클레오티드 백신에 의해 엔코딩된 폴리펩티드는 전장 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 대안적으로 폴리펩티드는 짧아진 유전자의 발현 생성물이 전장 단백질과 교차 반응하는 면역 반응을 생성시킬 수 있기에 충분한 비율의 전장 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 한은 전장 단백질 보다 짧을 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 최초 서열의 영역이 결실된 트렁케이팅된 HCV 단백질인 HCV 단백질의 단편을 엔코딩할 수 있으며, 최종 단편은 최초의 전장 아미노산 서열의 90% 미만을 포함하고, 최초 서열의 70% 미만 또는 50% 미만일 수 있다. 또한, 길이가 8개 이상, 예를 들어 8개 내지 10개 아미노산 또는 20개, 50개, 60개, 70개, 80개, 100개, 150개 또는 200개 이하의 아미노산인 단

편을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 엔코딩된 올리고 또는 폴리펩티드가 HCV 항원성을 나타내는 한은 본 발명의 범위에 속하는 것으로 간주된다. 특히, 제한적이지는 않지만, 본 발명의 이러한 양태는 폴리뉴클레오티드가 완전한 HCV 단백질 서열의 단편을 엔코딩하고 이러한 단백질의 하나 이상의 불연속 에피토프를 나타낼 수 있는 경우를 포함한다.

본 발명의 바람직한 백신의 경우, HCV 폴리펩티드의 하나 이상, 바람직하게는 모두가 트렁케이션 또는 돌연변이에 의해 비활성화된다. 예를 들어, NS3의 헬리카아제 및 프로테아제 활성은 바람직하게는 유전자의 돌연변이에 의해 감소되거나 제거된다. 바람직하게는, 발현된 폴리펩티드의 NS5B 중합효소 활성은 돌연변이에 의해 감소되거나 제거된다. 바람직하게는, 발현된 폴리펩티드의 NS4B 활성은 돌연변이에 의해 감소되거나 제거된다. 바람직하게는, 발현된 폴리펩티드의 코어 단백질의 활성은 트렁케이션 또는 돌연변이에 의해 감소되거나 제거된다. 이러한 견지에서 돌연변이는 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드에 대한 첨가, 결실, 치환 또는 재배열 사건을 포함할 수 있다. 또한, 전장 서열은 두 개 이상의 별도의 부분에서 발현될 수 이다.

HCV 폴리펩티드인 NS3 및 NS5B의 기능적 구조 및 효소적 기능은 당 분야에 공지되어 있다.

NS5B는 RNA-의존성 RNA 중합효소로서 공지되어 있다 (Qin et al., 2001, Hepatology, 33, pp 728-737; Lohmann et al., 2000, Journal of Viral Hepatitis; Lohmann et al., 1997, Nov., Journal of Virology, 8416-8428; De Francesco et al, 2000, Seminars in Liver Disease, 20(1), 69-83). NS5B 폴리펩티드는 4개의 기능적 모티프인 A, B, C 및 D를 지니는 것으로 공지되어 있다.

바람직하게는, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 백신에 의해 엔코딩되는 NS5B 폴리펩티드 서열은 RNA-의존성 RNA 중합효소 활성을 감소시키거나 제거하기 위해 변이된다. 바람직하게는, 폴리펩티드는 NS5B의 모티프 A를 붕괴시키도록 변이되며, 예를 들어 위치 2639에서 아스파르트산 (D)이 글리신 (G)으로 치환되거나; 위치 2644에서 아스파르트산 (D)이 글리신 (G)으로 치환된다. 바람직하게는, 백신 폴리뉴클레오티드에 의해 엔코딩되는 NS5B 폴리펩티드는 이러한 아스파르트산 변이를 둘 모두 함유한다.

바람직하게는, 엔코딩된 NS5B는 이의 모티프 C에서의 붕괴를 함유한다. 예를 들어, 불변 아스파르트산 잔기인 D2727가 H, N 또는 E로 변이되면 NS5B의 완전한 비활성화가 일어난다.

바람직하게는, 본 발명의 DNA 백신에 의해 엔코딩된 NS5B는 모티프 A 돌연변이를 포함하며, 이는 모티프 C 돌연변이를 임의로 포함할 수 있다. 모티프 A에서의 바람직한 변이는 아스파르트산 (D) 2639의 글리신으로의 돌연변이 및 아스파르트산 (D) 2644의 글리신으로의 돌연변이를 포함한다. 바람직하게는, 둘 모두의 변이가 존재한다. 추가의 컨센서스 돌연변이가 실시예 1의 하단부에 기술된 바와 같이 존재할 수 있다.

NS3는 프로테아제 및 헬리카아제 활성 둘 모두를 지니는 것으로 공지되어 있다. 본 발명의 DNA 백신에 의해 엔코딩된 NS3 폴리펩티드는 바람직하게는 NS3의 프로테아제 및 헬리카아제 활성 둘 모두를 붕괴시키도록 변이된다. NS3의 프로테아제 활성은 H-1083, D-1107 및 S-1165의 "세작용기 촉매 (catalytic triad)"에 연관된 것으로 알려져 있다. 바람직하게는, 본 발명의 백신에 의해 엔코딩된 NS3는 세작용기 촉매 잔기에서 돌연변이를 포함하며, 가장 바람직하게는 NS3는 세린 1165에서 발린으로의 하나의 점 돌연변이를 포함한다 (De Francesco, R. Pessi, a and Steinkuhler C. 1998. The hepatitis C Virus NS3 proteinase: structure and function of a zinc containing proteinase. Anti- Viral Therapy 3, 1-18).

NS3의 구조 및 기능은 하기와 같이 표현될 수 있다:

프로테아제	헬리카아제

세작용기 촉매: 확립된 기능적 모티프:

H-1083 I II III IV

D-1107 GKS DECH TAT QRrGRtGR

S-1165

NS3의 헬리카아제 활성에 대한 4개의 중요한 모티프 I, II, III 및 IV가 확인되었다. 바람직하게는, 본 발명의 DNA 백신에 의해 엔코딩된 NS3는 이들 모티프 중 하나 이상에 대한 붕괴성 돌연변이를 포함한다. 가장 바람직하게는, 아스파르트산 1316의 글루타민으로의 치환이 있다 (Paolini, C, Lahm A, De Francesco R and Gallinari P 2000, Mutational analysis of hepatitis C virus NS3-associated helicase. J.Gen Virol. 81, 1649). 이러한 가장 바람직한 NS3 돌연변이인 S1165V 또는 D1316Q 중 어느 것도 공지되거나 추정된 T 세포 에피토프내에 존재하지 않는다.

가장 바람직하게는, 본 발명의 DNA 백신에 의해 엔코딩된 NS3 폴리펩티드는 세린 (S) 1165에서 발린 (V)으로의 돌연변이 및 아스파르트산 (D) 1316에서 글루타민 (Q)으로의 돌연변이를 포함한다. 또한, 실시예 1에 개시된 컨센서스 돌연변이 중 하나 이상이 존재할 수 있다.

HCV 코어 단백질의 생물학적 기능은 복잡하고, 불연속적인 점 돌연변이와 상호관련되지 않는다 (McLauchlan J. 2000. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. J of Viral Hepatitis 7, 2-4). 코어가 림포톡신 β 수용체와 직접 상호작용하며, 또한 NFκB 및 PKR 경로를 간섭할 수 있고 세포 생존 및 아폽토시스에 영향을 미칠 수 있다는 증거가 있다. 코어를 발현하는 재조합 백시니아 작제물은 백시니아에 대한 세포성 반응을 억제하여 이를 생체내에서 보다 독성이 되게 하는 것으로 밝혀졌다.

감염 동안, 코어 단백질은 숙주 세포 프로테아제에 의해 바이러스 폴리프로테인으로부터 2개의 부위에서 절단된다. 첫 번째 절단은 E1의 N-말단 단부를 생성시키는 191에서 이루어진다. 두 번째 절단이 일어나는 잔기는 그 위치가 정확히 결정되지 않았고 아미노산 174 내지 191 사이에 존재하며, 이로써 길이가 약 17개 아미노산인 짧은 코어 펩티드 서열을 유리시킨다 (McLauchlan J. (2000) J. Viral Hepatitis. 7, 2-14; YasuiK, Lau JYN, Mizokami M., et al., J. Virol 1998. 72 6048-6055).

본 발명의 백신에서 사용되는 코어 폴리펩티드는 전장이거나 트렁케이팅된 형태이다. 코어 폴리펩티드는 전장일 수 있지만, 코어 단백질의 임의의 활성을 제거하도록 재배열된 서열일 수 있다. 코어 폴리펩티드는 두 개 이상의 단편으로 스플릿될 수 있으며, 가장 바람직하게는 코어 아미노산 1-65상으로 이어지는 아미노산 66-191으로 구성되고, 대안적으로 코어 아미노산 105-191에 이은 코어 아미노산 1-104로 구성된 폴리펩티드를 형성한다.

가장 바람직하게는, 동일한 세포내에서 다른 HCV 단백질의 생성에 대한 코어의 네거티브 효과를 최소화시키기 위해, 사용되는 코어 단백질은 트렁케이팅된 단백질이다. 본 발명의 이러한 양태에 있어서, 엔코딩되는 코어 단백질이 다른 HCV 단백질의 발현에 대한 코어의 억제 효과를 감소시키기에 충분한 양으로 카르복시 말단 단부로부터 트렁케이팅되는 것이 바람직하다. 가장 바람직하게는, 코어 단백질은 카르복시 말단 단부로부터 트렁케이팅되어, 생성된 단백질의 서열이 코어의 두 번째 절단으로부터 생성된 천연 유리된 C-말단 펩티드를 결여하고; 더욱 바람직하게는, 단백질이 적어도 최종 10개 아미노산을 결여하고, 바람직하게는 적어도 최종 15개 아미노산을 결여하고, 더욱 바람직하게는 최종 20개 아미노산을 결여하고, 더욱 바람직하게는 최종 26개 아미노산을 결여하고, 가장 바람직하게는 최종 40개 아미노산을 결여한다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 코어를 엔코딩하는 가장 바람직한 폴리뉴클레오티드는 아미노산 1-171, 1-165, 1-151을 함유하는 트렁케이팅된 코어를 엔코딩하는 것들이다. 가장 바람직하게는, 본 발명에서 사용하기에 적합한 코어를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 아미노산 1-151 사이의 트렁케이팅된 코어 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드이다. 실시예 1에 개시된 하나 이상의 컨센서스 돌연변이 (consensus mutation)가 존재할 수 있다.

본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 엔코딩된 바람직한 NS4B 폴리펩티드는 HCV 단리물 및 유전자형 사이의 과가변성인 영역을 제거하도록 N-말단 트렁케이션을 함유한다. 바람직하게는, NS4B 폴리펩티드는 N-말단으로부터 30 내지 100개 아미노산, 더욱 바람직하게는 40 내지 80개 아미노산의 결실, 가장 바람직하게는 최초 N-말단 48개 아미노산의 결실을 함유한다 (J4 L6 단리물과 관련하여, 이것은 아미노산 1760에 대한 트렁케이션에 상응하며, 이는 NS4B의 최초 48개 아미노산의 상실이다; 다른 HCV 단리물에서의 동등한 트렁케이션은 또한 본 발명의 일부를 형성한다). 추가로, NS4B 서열은 둘 이상의 단편으로 분할될 수 있고, 야생형 분자에서 발견되는 서열과 상이한 순서로 정렬된 NS4B의 서열을 지닌 폴리펩티드로 발현될 수 있다.

본 발명의 백신에 존재하는 폴리뉴클레오티드는 HCV 바이러스에서 발견되는 천연 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있지만, 뉴클레오티드 서열은 포유동물 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화되는 것이 바람직하다.

코돈 최적화 이외에, HCV 코어, NS3, NS4B 및 NS5B를 엔코딩하는 본 발명의 폴리뉴클레오티드에서의 코돈 유씨지 (usage)는 희귀(rare) 코돈이 집중된 클러스터에서 출현하지 않고, 대조적으로 폴리뉴클레오티드 서열 전체에 걸쳐 비교적 균일하게 이격되거나 코돈 최적화된 유전자로부터 배제되도록 변경되는 것이 바람직하다.

DNA 코드는 4개의 문자 (A, T, C 및 G)를 지니며, 생물체의 유전자에서 엔코딩되는 단백질의 아미노산을 표현하는 3문자 "코돈"을 규정하기 위해 이들을 사용한다. DNA 분자에 걸친 코돈의 선형 서열은 이러한 유전자에 의해 엔코딩되는 단백질(들)의 아미노산의 선형 서열로 번역된다. 코드는 매우 축중성인데, 61개 코돈이 20개의 천연 아미노산 서열을 코딩하며 3개의 코돈이 "정지" 신호를 나타낸다. 따라서, 대부분의 아미노산은 하나 이상의 코돈에 의해 코딩되며, 실제로 몇몇 아미노산은 4개 이상의 상이한 코돈에 의해 코딩된다.

하나 이상의 코돈이 주어진 아미노산을 코딩하는 데에 이용될 수 있는 경우, 생물체의 코돈 유씨지 패턴은 매우 무작위적이지 않은 것으로 관찰되었다. 상이한 종은 이들의 코돈 선택에서 상이한 편향을 나타내며, 추가로 코돈의 이용은 고수준 및 저수준으로 발현되는 유전자들 사이에서 하나의 종에서 현저히 상이할 수 있다. 이러한 편향은 바이러스, 식물, 세균 및 포유동물 세포에서 상이하며, 몇몇 종은 다른 종들 보다 무작위 코돈 선택에서 벗어난 다른 강력한 편향을 나타낸다. 예를 들어, 인간 및 다른 포유동물는 특정 세균 또는 바이러스 보다 덜 강력하게 편향된다. 이러한 이유로, 대장균에서 발현된 포유동물 유전자 또는 포유동물 세포에서 발현된 바이러스 유전자는 효율적 발현에 부적절한 코돈의 분포를 지닐 것이라는 현저한 개연성이 존재한다. 그러나, 대장균 발현에 적합한 코돈 유씨지 패턴을 지닌 유전자는 인간에서 또한 효율적으로 발현될 수 있다. 발현이 일어날 숙주에서 드물게 관찰되는 코돈의 클러스터의 이종성 DNA 서열의 존재는 그러한 숙주에서의 낮은 이종 발현 수준을 예고하는 것으로 믿어진다.

숙주에서 희귀한 코돈으로부터 숙주 우선적 코돈으로 코돈을 변화시키는 것 ("코돈 최적화")이 이종 발현 수준을 향상시킨다는 다수의 예가 있고, 예를 들어 BPV (소과동물 파필로마 바이러스) 후기 유전자 L1 및 L2가 포유동물 코돈 유씨지 패턴을 위해 코돈 최적화되었고, 이는 포유동물 (Cos-1) 세포 배양에서 야생형 HPV 서열에 비해 증가된 발현 수준을 제공하는 것으로 나타났다 (Zhou et. al. J. Virol 1999. 73, 4972-4982). 이러한 실험에서, 포유동물에서 보다 BPV에서 2회 이상으로 빈번히 출현했던 각각의 BPV 코돈 (2 보다 큰 유씨지 비 (usage ratio)) 및 유씨지 비가 1.5 보다 큰 대부분의 코돈이 우선적으로 사용되는 포유동물 코돈에 의해 보존적으로 대체되었다. WO97/31115, WO97/48370 및 WO98/34640 (Merck & Co., Inc.)에는, HIV 유전자 또는 이의 세그먼트의 코돈 최적화가 코돈 최적화된 서열이 최적화가 테일러링(tailoring)된 숙주 포유동물에서 DNA 백신으로서 사용되는 경우에 증가된 단백질 발현 및 개선된 면역원성을 생성시키는 것으로 밝혀졌다. 이들 문헌에 있어서, 서열은 전적으로 최적화된 코돈으로 구성되는데 (이것이 원하지 않는 제한 부위, 인트론 스플라이스 부위 등을 도입시키는 경우를 제외함), 이는 각각의 바이러스 코돈이 의도된 숙주에 대한 최적의 코돈으로 보존적으로 대체되기 때문이다.

"코돈 유씨지 패턴"이란 용어는 해당 뉴클레오티드 서열, 유전자 또는 유전자의 부류 (예를 들어, 고도로 발현되는 포유동물 유전자)의 모든 코돈에 대한 평균 빈도를 나타낸다. 인간을 포함하는 포유동물에 대한 코돈 유씨지 패턴은 이미 공지되어 있다 (참조: Nakamura et. al. Nucleic Acids Research 1996, 24:214-215).

본 발명의 폴리뉴클레오티드에 있어서, 코돈 유씨지 패턴은 바람직하게는 표적 생물체, 예를 들어 대장균 또는 포유동물, 특히 인간의 코돈 편형을 보다 가까이 나타내도록 HCV에 전형적인 코돈으로부터 변경된다. "코돈 유씨지 계수" 또는 코돈 어댑테이션(adaptation) 지수 (Sharp PM. Li WH. Nucleic Acids Research. 153:1281-95, 1987)은 주어진 폴리뉴클레오티드 서열의 코돈 유씨지 패턴이 표적 종의 코돈 유씨지 패턴과 유사한 정도를 나타내는 척도이다. 61개 코돈 각각에 대한 코돈 빈도 (선택된 부류의 유전자의 1000개 코돈 당 출현 횟수로서 표현됨)는 20개의 천연 아미노산 각각에 대해 표준화되며, 이로써 각각의 아미노산에 대해 가장 빈번히 사용된 코돈에 대한 수치는 1로 설정되고 덜 흔한 코돈에 대한 빈도는 0 내지 1 사이에 있게 되도록 비례적으로 스케일링된다. 따라서, 61개 코돈 각각에는 표적 종의 고도로 발현된 유전자에 대해 1 이하의 수치가 할당된다. 이는 우선값 (W)으로서 언급된다. 동일한 종의 고도로 발현되는 유전자에 대한 특정 폴리뉴클레오티드에 대한 코돈 유씨지 계수를 계산하기 위해, 특정 폴리뉴클레오티드의 각각의 코돈에 대한 스케일링된 값을 기록하고, 이러한 모든 값의 기하 평균을 취한다 (이들 값의 자연 로그의 합을 전체 코돈 수로 나누고 역로그를 취함으로써). 계수는 0 내지 1 사이의 값을 지니며, 계수가 클수록 폴리뉴클레오티드에서의 코돈이 더욱 빈번히 사용되는 코돈이다. 폴리뉴클레오티드 서열이 1의 코돈 유씨지 계수를 지니는 경우, 모든 코돈은 표적 종의 고도로 발현된 유전자에 대한 "가장 빈번한" 코돈이다.

본 발명은 HCV 코어, NS3, NS4B 또는 NS5B 아미노산 서열을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 제공하며, 여기서 폴리뉴클레오티드 서열의 코돈 유씨지 패턴은 고도로 발현되는 포유동물 유전자의 코돈 유씨지 패턴과 유사하다. 바람직하게는, 폴리뉴클레오티드 서열은 DNA 서열이다. 바람직하게는, 폴리뉴클레오티드 서열의 코돈 유씨지 패턴은 고도로 발현된 인간 유전자의 코돈 유씨지 패턴과 유사하다.

HCV 코어 (1-191)를 엔코딩하는 코돈 최적화된 폴리뉴클레오티드 서열은 도 2에 도시되어 있다. S1165V 및 D1316Q 폴리펩티드 돌연변이를 포함하는 HCV NS3를 엔코딩하는 코돈 최적화된 폴리뉴클레오티드 서열은 도 3에 도시되어 있

다. 폴리펩티드의 N 말단 1-48 트렁케이션을 포함하는 HCV NS4B를 엔코딩하는 코돈 최적화된 폴리뉴클레오티드 서열은 도 4에 도시되어 있다. D2639G 및 D2644G 폴리펩티드 돌연변이를 포함하는 HCV NS5B를 엔코딩하는 코돈 최적화된 폴리뉴클레오티드 서열은 도 5에 도시되어 있다.

따라서, 본 발명의 백신을 형성하기 위해 HCV 코어, NS3, NS4B 또는 NS5B 아미노산 서열을 엔코딩하는 다수의 코돈을 함께 포함하는 합성 유전자가 제공되며, 여기서 아미노산 서열을 엔코딩하기 위해 사용되는 가능한 코돈의 선택은 최적의 포유동물 코돈 유씨지와 유사하도록 변화되어, 합성 유전자내의 코돈 유씨지의 빈도가 C형 간염 바이러스 유전자 보다 고도로 발현되는 포유동물 유전자의 코돈 유씨지의 빈도와 더욱 가깝게 유사해진다. 바람직하게는, 코돈 유씨지 패턴은 고도로 발현되는 인간 유전자에 대한 코돈 유씨지 패턴과 실질적으로 동일하다. "천연" HCV 코어, NS3, NS4B 및 NS5B 서열은 코돈 유씨지를 위해 분석되었다. HCV 단백질에 대한 코돈 유씨지 계수는 코어 (0.487), NS3 (0.482), NS4B (0.481) 및 NS5B (0.459) 이다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 일반적으로 0.5 보다 크고, 바람직하게는 0.6 보다 크고, 가장 바람직하게는 0.7 보다 크지만 1 보다 작은 고도로 발현되는 인간 유전자에 대한 코돈 유씨지 계수 (상기 정의된 바와 같음)를 지닐 것이다. 바람직하게는, 폴리뉴클레오티드는 또한 0.5 보다 크고, 바람직하게는 0.6 보다 크고, 가장 바람직하게는 0.7 보다 큰 고도로 발현된 대장균 유전자에 대한 코돈 유씨지 계수를 지닐 것이다.

코돈 최적화 이외에, 합성 유전자는 희귀 코돈의 클러스터의 출현을 배제시키기 위해 또한 변이된다. 이는 두 가지 방법 중 하나로 달성될 수 있다. 이것을 달성하는 바람직한 방법은 유전자 서열로부터 희귀 코돈을 배제시키는 것이다. 희귀 코돈을 규정하기 위한 한 가지 방법은 표적 생물체의 고도로 발현되는 유전자 중 특정 아미노산에 대해 사용되는 코돈 중 20% 미만을 나타내는 코돈, 바람직하게는 10% 미만을 나타내는 코돈이다. 또한, 희귀 코돈은 표적 생물체의 고도로 발현되는 유전자에서 0.3 미만, 바람직하게는 0.2 미만의 상대적인 동의적(synonymous) 코돈 유씨지 (RSCU)를 지닌 코돈으로서 규정될 수 있다. RSCU 값은 특정 아미노산에 대한 모든 코돈이 동일하게 빈번히 사용되는 경우에 예상되는 수로 나누어진 관찰된 코돈 수이다. 희귀 코돈의 적절한 정의는 당업자에게 명백할 것이다.

또한, HCV 코어, NS3, NS4B 및 NS5B 폴리뉴클레오티드는 집중된 영역에 존재하는 희귀한 비최적 코돈의 클러스터링을 억제하도록 최적화된다. 따라서, 폴리뉴클레오티드는 RSCU가 0.4 미만 (더욱 바람직하게는 0.3 미만)인 코돈과 같은 개개의 희귀 코돈이 폴리뉴클레오티드 전체에 걸쳐 균일하게 이격되어 있게 되도록 최적화된다.

코돈 최적화된 변이된 코어, NS3 및 NS5B의 발현 수준은 웨스턴 블롯에 의해 평가하여 야생형에 비해 증가된 것으로 밝혀졌다. 트렁케이팅된 코돈 최적화된 NS4B는 NS5B와의 융합체로서 발현되었고, 융합체는 잘 발현된다.

본 발명의 백신은 HCV 폴리펩티드의 개개의 발현을 유도하는 벡터를 포함할 수 있고, 대안적으로 HCV 폴리펩티드는 하나 이상의 융합 단백질로서 발현될 수 있다.

본 발명의 바람직한 백신은 하기 조합체들을 포함하는 단백질 또는 폴리뉴클레오티드 수준에서의 4중 융합체를 포함한다:

HCV 조합체 1:HCV 500

코어	NS3	NS4B	NS5B

HCV 조합체 2: HCV 510

NS3	NS4B	NS5B	코어

HCV 조합체 3: HCV 520

NS4B	NS5B	코어	NS3

HCV 조합체 4: HCV 530

NS5B	코어	NS3	NS4B

HCV 조합체 5: HCV 501

코어(66-191)-(1-65)	NS3	NS4B	NS5B

HCV 조합체 6: HCV 502

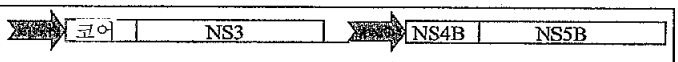
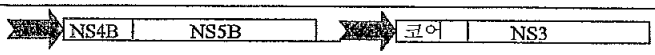
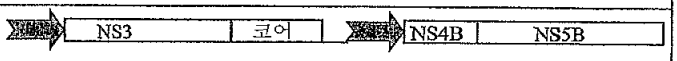
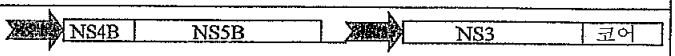
코어(105-191)-(1-104)	NS3	NS4B	NS5B

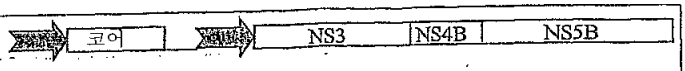
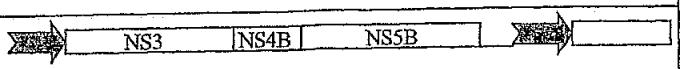
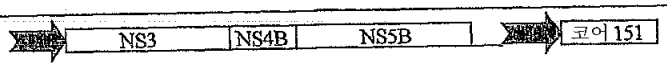
HCV 조합체 7:

NS3	NS4B	NS5B	코어 151

그 밖의 바람직한 융합체는 HCV 조합체 1, 2 및 3과 유사하지만, 코어 단백질은 트렁케이팅된 코어 단백질, 전형적인 코어 1-151이다. 본 발명의 다른 바람직한 백신은 하기 제공되며, 이들은 동일한 플라스미드내의 상이한 발현 카세트에 존재하는 폴리뉴클레오티드 이중 및 삼중 융합체를 포함하며, 각각의 카세트는 프로모터 단위 (예를 들어, HCMV IE)의 독립적인 제어를 받는다 (화살표로 표시됨).

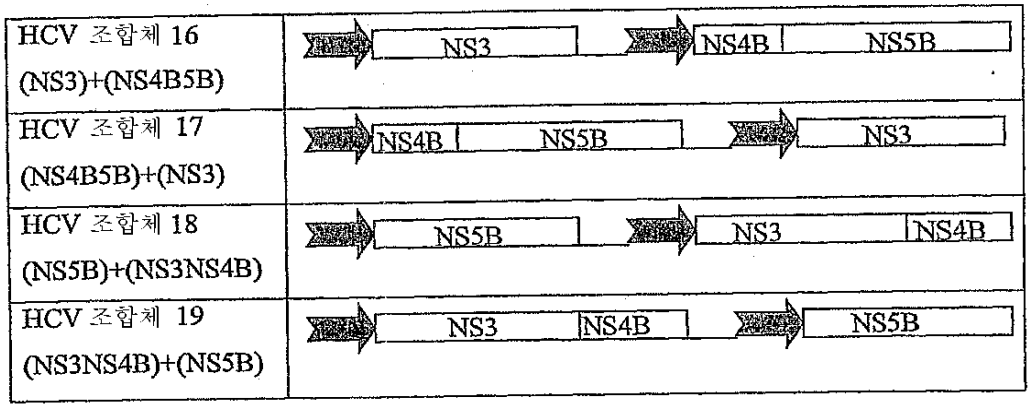
이러한 이중 프로모터 작제물은 동일한 세포내에서 두 개의 별도의 단백질 (하기 표시된 바와 같음)로서 4개의 단백질 항원의 발현을 유도한다.

HCV 조합체 8 (코어NS3)+(NS4B5B)	
HCV 조합체 9 (NS4B5B)+(코어NS3)	
HCV 조합체 10 (NS3코어)+(NS4B5B)	
HCV 조합체 11 (NS4B5B)+(NS3코어)	

HCV 조합체 12 (코어)+(NS3NS4B5B)	
HCV 조합체 13 (NS3NS4B5B)+(코어)	
HCV 조합체 14	
HCV 조합체 15	

바람직한 작제물은 HCV 조합체 7, 9, 11 또는 12 이다. 특히 바람직한 작제물은 7 및 11 이다.

본 발명의 또 다른 양태에 있어서, 폴리뉴클레오티드 백신은 임의로 코어 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하지 않는다. 예를 들어, 본 발명의 이러한 양태의 바람직한 폴리뉴클레오티드는 하기 조합체들을 포함한다:



상기 HCV 조합체 E-L에 대해서, 사용되는 술어, 예를들어, (코어NS3) + (NS4B5B)는 개개의 프로모터에 의해 각각 독립적으로 조절되는 두개의 발현 카세트를 포함하는 폴리뉴클레오티드 벡터를 나타내기 위한 것으로 해석되고, 이 예의 경우에는, 하나의 발현 카세트는 코어NS3 이중 융합 단백질을 엔코딩하고 다른 하나는 NS4B-NS5B 이중 융합 단백질을 엔코딩한다. 각각의 HCV 조합체 E-L은 이에 따라 해석되어야 한다.

상기 HCV 조합체 A-L은 HCV 단백질, 폴리프로테인 융합체, 또는 폴리뉴클레오티드의 상대 배향(relative orientation)을 나타낸다. 상기 HCV 조합체 A-L 모두는 또한 성분 단백질의 활성을 제거하기 위해 각각의 바람직한 돌연변이 또는 트렁케이션(truncation)을 지니는 것으로 기술됨이 본원에 특히 기재되어 있다. 예를들어, 조합체 A-L의 바람직한 변형체(다른 방법으로 달리 지시되지 않는 경우)는 코어(1-191(정확한 순서의 완전한 서열이거나 생물학적 활성을 무력화시키기 위해 두개 이상의 단편으로 분할됨) 또는 바람직하게는, 이의 절단된 형태 1-151 또는 1-165 또는 1-171로 존재하는 코어);NS3 1027-1657(헬리카아제(아스파르트산 1316 대신 글루타민) 및 프로테아제(세린 1165 대신 발린) 활성을 비활성화시키는 돌연변이); NS5B 2420-3010(중합효소 활성을 비활성시키는 아스파르트산 2639 대신 글리신 및 아스파르트산 2644 대신 글리신으로의 돌연변이, 모티프A); 및 NS4B 1712-1972(N-말단의 고도로 가변성인 단편을 제거하기 위해 임의로 1760-1972로 트렁케이션됨)에 대한 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

본 발명은 상기에 기재된 바와 같은 신규 DNA 백신 및 폴리펩티드를 제공한다. 또한 본 발명에 의해 제공되는 것은 기재된 폴리펩티드의 유사체(analogue) 및 이를 포함하는 DNA 백신이다.

용어 "유사체"는 본 발명의 또 다른 폴리뉴클레오티드와 같은 동일한 아미노산 서열을 엔코딩하지만 유전암호(genetic code)의 중복성(redundancy)을 통해서 상이한 뉴클레오티드 서열을 지니며, 예를들어, 동일한 코돈 유씨지(codon usage) 계수 또는 다른 폴리뉴클레오티드의 코돈 유씨지 계수의 0.1 이내, 바람직하게는 0.05이내의 코돈 유씨지 계수를 지니는 동일한 코돈 유씨지 패턴을 유지하는 폴리뉴클레오티드를 언급한다.

HCV 폴리뉴클레오티드 서열은 임의의 다양한 HCV 유전자형(genotype), 스트레인(strain) 또는 단리물(isolate) 중 어느 하나로부터 유도될 수 있다. HCV 단리물는 HCV 1(1a, 1b 또는 1c), HCV 2(2a, 2b 또는 2c), HCV 3(3a, 3b 또는 10a), HCV 4(4a), HCV 5(5a) 및 HCV 6(6a, 6b, 7b, 8b, 9a 및 11a)의 하나 이상의 서브타입(subtype)을 포함하는 6개의 주요한 유전자형으로 분류될 수 있다(Simmonds, J. Gen. Virol., 2001, 693-712). 본 발명에서, 각 HCV 단백질은 동일한 HCV 유전자형 또는 서브타입, 또는 대안적으로 HCV 유전자형 또는 서브유닛의 임의의 조합의 폴리뉴클레오티드 서열로부터 유도될 수 있고, HCV 단백질이 사용될 수 있다. 바람직하게는, 유전자는 감염성의 클론 J4L6(수탁번호 AF0542478 - 도 1 참조)와 같은 유형 1b의 유전자형으로부터 유도된다.

서열분석된 특정한 스트레인은 HCV-J(Kato et al., 1990, PNAS, USA, 87;9724-9528) 및 BK(Takamizawa et al., 1991, J. Virol. 65:1105-1113)를 포함한다.

본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는 엔코딩된 단백질의 발현에 의한 생산에 유용성을 지니고, 이러한 발현은 시험관내, 생체내 또는 생체외에서 일어날 수 있다. 그러므로, 뉴클레오티드는 예를들어, 수율을 증가시키기 위해 재조합 단백질 합성에 포함될 수 있거나, 실제로 DNA 백신접종 기술에서 그 자체로 치료제로서 사용될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티

드가 시험관내 또는 생체외에서 엔코딩되는 단백질의 생성에 사용되는 경우, 예를들어, 세포 배양에서의 세포는 발현시키려는 폴리뉴클레오티드를 포함하도록 변형될 것이다. 이러한 세포는 일시적, 또는 바람직하게는 안정적인 포유동물 세포주(cell line)를 포함한다. 본 발명에 따른 폴리프로테인을 엔코딩하는 벡터의 삽입으로 변형될 수 있는 세포의 특정한 예는 포유동물 HEK293T, CHO, HeLa, 293 및 COS 세포를 포함한다. 바람직하게는, 선택된 세포주는 안정적일뿐만 아니라, 폴리프로테인의 성숙한 당화(glycosylation) 및 세포 표면 발현을 가능하게 하는 세포주일 것이다. 발현은 형질전환된 난모세포에서 이루어질 수 있다. 폴리펩티드는 유전자이식된 비-인간 동물, 바람직하게는 마우스에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드로부터 발현될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드로부터 폴리펩티드를 발현하는 유전자이식된 비-인간 동물은 본 발명의 범위내에 포함된다.

본 발명은 본 발명의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 이러한 발현 벡터는 분자생물학의 분야에서 일상적으로 작제되고, 예를들어, 플라스미드 DNA 및 적합한 개시인자(initiator), 프로모터, 인핸서(enhancer) 및 단백질을 발현시키기 위해 필요할 수 있고 정확한 배향으로 위치되는 폴리아데닐레이션 신호와 같은 기타 엘리먼트의 사용을 포함할 수 있다. 다른 적합한 벡터는 당업자에게 명백할 것이다. 이에 관해 추가의 예로서, 본 발명자들은 샘브룩(Sambrook) 등의 문헌 [Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd Edition. CHS Laboratory Press.(1989)]을 참고한다.

바람직하게는, 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 또는 본 발명에서 벡터내에 사용되는 폴리뉴클레오티드는 숙주세포에 의한 코딩 서열의 발현을 제공할 수 있는 조절 서열에 작동가능하게 연결되는데, 즉 벡터는 발현 벡터다. 용어 "작동가능하게 연결된"은 기재된 성분들이 이들의 의도된 방식으로 기능할 수 있게 하는 관계로 존재하는 병렬구조를 말한다. 코딩 서열에 "작동가능하게 연결된" 프로모터와 같은 조절 서열은 코딩 서열의 발현이 조절 서열과 양립하는 상태하에서 이루어지는 방식으로 배치된다.

발현 카세트는 관심 서열 또는 관심 유전자의 발현을 유도할 수 있는 어셈블리이다. 발현 카세트는 관심 유전자에 작동가능하게 연결된 프로모터와 같은 조절 요소를 포함한다.

벡터는 예를들어, 복제 기점(replication origin), 임의로 폴리뉴클레오티드의 발현을 위한 프로모터 및 임의로 프로모터의 조절물질을 갖춘 플라스미드, 인공 염색체(예를들어, BAC, PAC, YAC), 바이러스 또는 파지(phage) 벡터일 수 있다. 벡터는 하나 이상의 선택성 마커 유전자, 예를들어, 박테리아 플라스미드의 경우에서 앰피실린 또는 카나마이신 내성 유전자 또는 진균 벡터를 위한 내성 유전자를 함유할 수 있다. 벡터는 예를들어, DNA 또는 RNA의 생성을 위해 시험관내에서 사용되거나, 예를들어, 벡터에 의해 엔코딩되는 단백질의 생성을 위한 숙주 세포, 예를들어, 포유동물 숙주 세포를 트랜스펙션시키거나 형질전환시키기 위해 사용될 수 있다. 벡터는 또한, 예를들어, DNA 백신접종법 또는 유전자 요법에서 생체내에서 사용되도록 개조될 수 있다.

프로모터 및 기타 발현 조절 신호는 발현을 일으키고자 하는 숙주 세포와 양립가능하도록 선택될 수 있다. 예를들어, 포유동물 프로모터는 카드뮴과 같은 중금속에 반응하여 유도될 수 있는 메탈로티오네인(metallothionein) 프로모터, 및 β-액틴 프로모터를 포함한다. 바이러스 프로모터, 예를 들어 SV40 거대 T 항원(large T antigen) 프로모터, 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉시형 초기(IE) 프로모터, 라우스 육종 바이러스(rous sarcoma virus) LTR 프로모터, 아데노바이러스 프로모터, 또는 HPV 프로모터, 특히 HPV 업스트림 조절 업스트림 조절 영역(upstream regulatory region, UPR)이 또한 사용될 수 있다. 모든 이들 프로모터는 널리 공지되어 있고, 당 분야에서 쉽게 구입할 수 있다.

적합한 바이러스 벡터의 예는 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터(herpes simplex viral vector), 백시니아(vaccinia) 또는 알파-바이러스 벡터 및 렌티바이러스(lentivirus), 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스를 포함하는 레트로바이러스를 포함한다. 이들 바이러스를 사용하는 유전자 트랜스퍼(gene transfer) 기술은 당업자에게 공지되어 있다. 예를들어, 레트로바이러스 벡터는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 숙주 게놈(genome)으로 안정적으로 통합시키기 위해 사용될 수 있으나, 이러한 재조합은 바람직하지 않다. 대조적으로 복제 결핍 아데노바이러스 벡터는 에피솜(episome)적으로 유지되므로, 일시적인 발현을 가능하게 한다. 곤충 세포(예를들어, 바큘로바이러스(baculovirus) 벡터), 인간 세포 또는 박테리아에서 발현을 유도할 수 있는 벡터는 예를들어, 서브유닛 백신 또는 면역분석법(immunoassay)의 용도를 위해 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 엔코딩되는 다량의 HCV 단백질을 생성하기 위해서 사용될 수 있다.

추가의 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 조성물은 본 발명의 두 번째 양태에 따른 DNA 벡터를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 조성물은 다수의 입자, 바람직하게는, 폴리뉴클레오티드 서열의 코돈 유씨지 패턴이 고도로 발현된 포유동물 유전자, 특히 인간 유전자의 코돈 유

씨지 패턴과 유사한 HCV 아미노산 서열을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 엔코딩하는 벡터를 포함하는 DNA로 코팅된 골드 입자(gold particle)를 포함한다. 대안적인 구체예에서, 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제 및 본 발명의 두 번째 양태에 따른 DNA 벡터를 포함한다. 조성물은 또한 보조제를 포함할 수 있다.

DNA 백신은 액체 백신의 근육으로의 간질성(interstitial) 투여(WO90/11092) 또는 근육내 주사와는 다른 메커니즘에 의해 전달될 수 있다. 예를들어, 피부로의 전달은 면역 메커니즘이 피부 및 점막과 같은 감염에 대한 장벽인 조직에서 면역 메커니즘이 고도로 활발하다는 사실을 이용한다. 피부로의 전달은 주사, 제트 주사기(jet injector)(이는 피부, 또는 근육을 포함하는 하부조직으로 액체를 압력하에서 강제로 밀어넣음), 또는 입자 봄바드먼트(bombardment)에 의해 이루어질 수 있고, 여기서 DNA는 상피를 관통하기에 충분한 농도의 입자상으로 코팅될 수 있다(미국 특허 제 5371015호). 예를들어, 뉴클레오티드 서열은 예를들어, 문헌[Haynes *et al* J. Biotechnology 44: 37-42(1996)]에 기재된 바와 같이, 금 비드로 코팅된 후, 고압하에서 상피내로 투여되는 플라스미드로 혼입될 수 있다. 피부로의 이들 입자의 투입은 상피세포 및 상피 랑게르한스 세포(epidermal Langerhan cell)의 직접적 트랜스펙션을 일으킨다. 랑게르한스 세포는 DNA를 흡수하고, 엔코딩된 펩티드를 발현하고, 이들을 세포 표면 MHC 단백질상에 디스플레이하기 위해 프로세싱하는 항원제시세포(antigen presenting cell, APC)이다. 트랜스펙션된 랑게르한스 세포는 이들이 디스플레이된 항원 단편을 림프구(lymphocyte)에 제시하는 림프절(lymph node)로 이동하여, 면역 반응을 일으킨다. 피부로의 입자 매개 전달에 의해 면역 반응을 유도하기 위해 매우 적은 양의 DNA(1㎍ 미만, 종종 0.5㎍ 미만)가 필요하고, 이는 직접적인 근육내 주사 이후에 면역 반응을 생성하기 위해 필요한 것으로 공지된 ㎎ 양의 DNA와 대조적이다.

본 발명의 폴리뉴클레오티드가 예를들어, DNA 백신접종에서와 같이 치료제로서 사용되는 경우, 핵산이 백신접종시키려는 포유동물 예를들어, 인간에게 투여될 것이다. RNA 또는 DNA, 바람직하게는 DNA와 같은 핵산은 상기에 기재된 벡터와 같은 벡터의 형태로 제공되고, 이는 포유동물의 세포내에서 발현될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 이용가능한 기술에 의해 투여될 수 있다. 예를들어, 핵산은 바람직하게는 피부내, 피하 또는 근육내로 바늘 주사에 의해 주입될 수 있다. 대안적으로, 핵산은 입자 매개 DNA 전달(particle-mediated DNA delivery, PMDD)과 같은 핵산 전달 장치를 사용하여 피부내로 직접적으로 전달될 수 있다. 이 방법에서, 비활성 입자(예를들어, 골드 비드)는 핵산으로 코팅되고, 예를들어, 투입 장치로부터 고압하에서의 방출에 의해 입자를 수용자의 표면(예를들어, 피부)을 통과시킬 수 있기에 충분한 속도로 가속된다. (본 발명의 핵산 분자로 코팅되는 입자는 본 발명의 범위 내이고, 이러한 입자가 로딩된 전달 장치도 마찬가지이다.). 바람직하게는, 조성물은 0.5 내지 5㎛, 약 2㎛의 평균 직경을 지니는 골드 입자를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 코팅된 골드 비드는 카트리지로서 작용할 수 있는 튜브내로 로딩되어, 각 카트리지는 , 0.1 내지 5㎍, 바람직하게는 약 0.5㎍ DNA/카트리지로 코팅된 0.1 내지 1㎎, 바람직하게는 0.5㎎의 골드를 함유하게 된다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본원에 기재된 바와 같은 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 숙주 세포는 박테리아, 예를들어, 대장균, 포유동물, 예를들어, 인간일 수 있거나 곤충 세포일 수 있다. 본 발명에 따른 벡터를 포함하는 포유동물 세포는 시험관내에서 트랜스펙션된 배양된 세포일 수 있거나, 벡터를 포유동물에 투여함으로써 생체내에서 트랜스펙션될 수 있다.

추가의 양태에서, 본 발명은 고도로 발현되는 포유동물 유전자의 코돈 유씨지 패턴과 유사한 코돈 유씨지 패턴을 지니고, 야생형 HCV 아미노산 서열 또는 폴리펩티드의 하나 이상의 천연 기능을 비활성화시키기 충분한 아미노산 서열 변화를 지닌 야생형 서열을 포함하는 돌연변이된 HCV 아미노산 서열을 엔코딩하는 서열을 생성하기 위해, 야생형 HCV 뉴클레오티드 서열의 코돈 유씨지 패턴을 변경시키거나 합성적으로 폴리뉴클레오티드 서열을 생성하는 단계를 포함하여, 상기 기재된 바와 같은 약학적 조성물의 제조 방법을 제공한다.

또한, HCV 감염의 치료 또는 예방에 있어서 본원에 기재된 바와 같은 폴리뉴클레오티드 또는 백신의 용도가 제공된다.

나출된(naked) 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 환자에게 도입하기 위한 적합한 기술은 적합한 비히클을 사용한 국소적 적용을 포함한다. 핵산은 피부, 또는 예를들어, 비내, 경구, 질내 또는 직장내 투여에 의해 점막 표면으로 국소적으로 투여될 수 있다. 나출된 폴리뉴클레오티드 또는 벡터는 인산염 완충 식염수(PBS)와 같은 약학적으로 허용되는 부형제와 함께 존재할 수 있다. DNA 흡수는 부피바카인(bupivacaine)과 같은 촉진제를 단독으로 또는 DNA 제형에 포함시켜 사용함으로써 추가로 촉진될 수 있다. 수용자로의 직접적인 핵산 투여의 기타 방법은 초음파, 전기 자극, 일렉트로포레이션(electroporation) 및 US-5,697,901에 기재되어 있는 마이크로시딩(microseeding)을 포함한다.

핵산 작제물의 흡수는 다양한 공지된 트랜스펙션 기술, 예를들어 트랜스펙션 작용제의 사용을 포함하는 기술에 의해 향상될 수 있다. 이들 제제의 예는 양이온성 제제, 예를들어, 칼슘 포스페이트 및 DEAE-덱스트란 및 리포펙턴트

(lipofectant), 예를들어, 리포펙탐(lipofectam) 및 트랜스펙탐(transfectam)을 포함한다. 투여하려는 핵산의 용량은 변경될 수 있다. 통상적으로, 핵산은 입자 매개 유전자 전달을 위해 1pg 내지 1㎎, 바람직하게는 1pg 내지 10㎍의 핵산 및 기타 경로를 위해 10㎍ 내지 1㎎의 양으로 투여된다.

본 발명의 핵산 서열은 또한 유전자 요법에 유용한 특수화된 전달 벡터에 의해 투여될 수 있다. 유전자 요법 방법은 예를들어, 문헌 [Verme *et al*, Nature 1997, 389:239-242]에 논의되어 있다. 바이러스 및 비-바이러스 벡터 시스템 둘 모두가 사용될 수 있다. 바이러스 기초 시스템은 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스 바이러스, 카나리폭스(canarypox) 바이러스 및 백시니아-바이러스 기초 시스템을 포함한다. 바람직한 아데노바이러스 벡터는 비-인간 영장류로부터 유도된 벡터이다. 특히 미국 특허 6083716에 기재된 바와 같은 Pan9(C68), WO03/046124에 기재된 바와 같은 Pan5, 6 또는 7이다.

비-바이러스 기초 시스템은 핵산의 직접적인 투여, 미소구체 캡슐화(microsphere encapsulation) 기술(폴리(락티드-코-글리콜리드)) 및, 리포솜 기초 시스템을 포함한다. 바이러스 및 비-바이러스 전달 시스템이 조합될 수 있으며, 여기서 최초의 백신접종후 부스터(booster) 주입, 예를들어, 플라스미드와 같은 비-바이러스 벡터를 사용하는 최초의 "프라임(prime)" DNA 백신접종에 이은 바이러스 또는 비-바이러스 기초 시스템을 사용하는 하나 이상의 "부스트" 백신접종을 제공하는 것이 바람직하다. 프라임 부스트 프로토콜은 또한 보조제내의 단백질로 프라이밍하고 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 엔코딩하는 DNA 또는 바이러스 벡터로 부스팅하는 것을 이용할 수 있다. 대안적으로, 단백질 기초 백신이 부스터로서 사용될 수 있다. 단백질 백신이 DNA/바이러스 벡터 백신이 함유하는 모든 항원을 함유하는 것이 바람직하다. 그러나, 단백질은 개별적으로, 또는 폴리프로테인로 제공될 수 있다.

본 발명의 핵산 서열은 또한 형질전환된 세포에 의해 투여될 수 있다. 이러한 세포는 환자로부터 수거된 세포를 포함한다. 본 발명의 나출 폴리뉴클레오티드 또는 벡터는 시험관내에서 이러한 세포내로 도입될 수 있고, 형질전환된 세포는 후에 환자에게 복귀될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 상동 재조합(homologous recombination) 사건에 의해 세포내에 이미 존재하는 핵산내로 통합될 수 있다. 요망시, 형질전환된 세포는 시험관내에서 성장될 수 있고, 생성된 세포 중 하나 이상이 본 발명에 사용될 수 있다. 세포는 공지된 외과술 또는 미세수술 기술 (예를들어, 그래프팅, 미세주사 등)에 의해 환자내의 적합한 부위에 제공될 수 있다.

적합한 세포는 항원제시세포(APC), 예를들어, 수지상 세포(dendritic cell), 대식세포(macrophage), B 세포, 단핵구(monocyte) 및 효과적인 APC가 되도록 공학처리될 수 있는 기타 세포를 포함한다. 이러한 세포는 항원을 제시하기 위한 능력을 증가시키고, T 세포 반응의 활성화 및/또는 유지를 개선시키고, 그 자체로 항-HCV 감염 효과를 지니고/지니거나 수여자와 면역학적으로 양립가능하게 되도록 유전학적으로 변형될 수 있지만 (즉, 매칭된 HLA 하플로타입(haplotype)), 이는 반드시 필요한 것은 아니다. APC는 일반적으로 종양 및 종양 주위(peri-tumoural) 조직을 포함하는 다양한 생물학적 유체 및 기관 중 어느 하나부터 단리될 수 있고, 자가(autologous), 동종이형(allogeneic), 동계(syngeneic) 또는 이종(xenogeneic) 세포일 수 있다.

본 발명의 특정한 바람직한 구체예는 시험관내에서의 형질전환 및 환자로의 복귀를 위해 또는 예를들어, 입자 매개 DNA 전달에 의해 백신내에 함유되어 전달되는 뉴클레오티드의 생체내 표적으로서, 수지상 세포 또는 이의 프로제니터(progenitor)를 항원제시세포로서 사용한다. 수지상 세포는 매우 효능 있는 APC이고(*Banchereau* and Steinman, *Nature* 392:245-251, 1998), 예방적 또는 치료적 항종양 면역을 유도하기 위한 생리적 보조제로서 효과적인 것으로 밝혀졌다(Timmerman and Levy, *Ann. Rev. Med. 50:507-529*, 1999 참조). 일반적으로, 수지상 세포는 이들의 통상적인 외형(시험관내에서 가시적인 현저한 세포질 프로세스(수상 돌기)과 함께 인 시튜 (in situ) 별 모양임), 고효율로 항원을 섭취하고 프로세싱하고 제시하는 능력 및 나이브(naive) T 세포 반응을 활성화시키는 능력에 기초하여 확인될 수 있다. 당연히, 수지상 세포는 생체내 또는 생체외에서 수지상 세포에서 일반적으로 발견되지 않는 특수한 세포 표면 수용체 또는 리간드, 예를들어, 본 발명의 작제물내에서 엔코딩되는 항원(들)을 발현시키도록 고안될 수 있고, 이러한 변형된 수지상 세포는 본 발명에 의해 고려된다. 수지상 세포의 대안으로서, 분비된 소포 항원-로딩된 수지상 세포(엑소좀이라 일컬어짐)가 백신내에 사용될 수 있다(참조: Zivogel et al., Nature Med. 4: 594-600, 1998).

수지상 세포 및 프로제니터는 말초혈액, 골수, 종양-침윤 세포(tumour-infiltrating cell), 종양주위 조직-침윤 세포, 림프절, 비장, 피부, 제대혈(umbilical cord blood) 또는 임의의 기타 적합한 조직 또는 유체로부터 수득될 수 있다. 예를들어, 수지상 세포는 말초혈액으로부터 수거된 단핵구의 배양액에 GM-CSF, IL-4, IL-13 및/또는 TNF와 같은 사이토카인의 조합물을 첨가함으로써 생체외에서 분화될 수 있다. 대안적으로, 말초혈액, 제대혈 또는 골수로부터 수거된 CD34 양성 세포는 배지에 GM-CSF, IL-3, TNF, CD40 리간드, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS), flt3 리간드 (전문 항원제시 세포, 특히 수지상 세포의 발생에서 중요한 사이토카인임) 및/또는 수지상 세포의 분화, 성숙 및 증식을 유도하는 기타 화합물(들)의 조합물을 첨가함으로써 수지상 세포로 분화될 수 있다.

일반적으로, APC는 본 발명에서 고려되는 코돈-최적화된 폴리뉴클레오티드와 같은 항원성 HCV 아미노산 서열을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드로 트랜스펙션될 수 있다. 이러한 트랜스펙션은 생체외에서 일어날 수 있고, 이후 이러한 트랜스펙션된 세포를 포함하는 조성물 또는 백신은 본원에 기재된 바와 같이 치료 목적을 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 수지상 세포 또는 기타 항원제시세포를 표적으로 하는 유전자 전달 비히클이 환자에게 투여되어, 생체내에서 발생하는 트랜스펙션을 일으킬 수 있다. 예를들어, 수지상 세포의 생체내 및 생체외 트랜스펙션은 일반적으로 WO97/24447에 기재된 방법과 같은 당 분야에 공지된 임의의 방법, 또는 문헌 [Mahvi et al., *Immunology and cell Biology* 75:456-460, 1997]에 기재된 입자 매개 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

본 발명의 백신 및 약학적 조성물은 α-인터페론, 바람직하게는 페길레이티드(PEGylated) α-인터페론, 및 리바비린과 같은 항바이러스제와 함께 사용될 수 있다. 백신 및 약학적 조성물은 밀봉된 앰풀(ampoule) 또는 바이얼(vial)과 같은 일회용량(unit-dose) 또는 다회용량(multi-dose) 용기내에 함유되어 제공될 수 있다. 이러한 용기는 바람직하게는 사용때까지 제형의 무균성을 보존하기 위해 밀봉된다. 일반적으로, 제형은 현탁액, 용액 또는 유성 또는 수성 비히클 중의 에멀션으로서 보관될 수 있다. 대안적으로, 백신 또는 약학적 조성물은 사용되기 직전에 단지 멸균된 액체 담체의 첨가만을 필요로 하는 동결-건조 상태에서 보관될 수 있다. 입자 매개 전달을 통해 투여하고자 하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 백신은 압축된 가스 전달 기구와 함께 사용하기에 적합한 카트리지로서 제공될 수 있고, 이 경우의 카트리지는, 임의적으로 기타 약학적으로 허용되는 성분의 존재하에서 내부 표면이 백신 뉴클레오티드 서열을 지니는 입자로 코팅된 중공 튜브로 구성될 수 있다.

본 발명의 약학적 조성물은 보조 화합물, 또는 DNA에 의해 엔코딩되는 단백질에 의해 유도되는 면역반응을 조절하거나 증가시키는 작용을 할 수 있는 기타 물질을 포함할 수 있다. 이들은 항원과는 별개로 또는 항원과의 융합물로서 DNA에 의해 엔코딩될 수 있거나, 제형의 비-DNA 엘리먼트로서 포함될 수 있다. 본 발명의 제형에 포함될 수 있는 보조제 타입 물질의 예로는 유비퀴틴(ubiquitin), 리소좀 관련 막단백질(LAMP), B형 간염 바이러스 코어 항원, flt3-리간드 및 IFN-γ 및 GMCSF와 같은 기타 사이토카인이 있다.

기타 적합한 보조제는 시판되며, 예를들어 프로인트 불완전 애쥬번트 및 완전 애쥬번트 (Difco Laboratories, Detroit, MI); 이미퀴모드(Imiquimod) (3M, St. Paul, MN); 레시미퀴모드(Resimiquimod) (3M, St. Paul, MN); 머크 애쥬번트(Merck Adjuvant) 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); 알루미늄 히드록시드 겔(백반(alum)) 또는 알루미늄 포스페이트와 같은 알루미늄 염; 칼슘, 철 또는 아연의 염; 아크릴화 티로신의 불용성 현탁액; 아크릴화 당; 양이온적 또는 음이온적으로 유도체화된 다당류; 폴리포스파젠; 생분해성 미소 구체(microsphere); 모노포스포릴 지질 A 및 퀼(quil) A가 있다. GM-CSF 또는 인터루킨-2, -7 또는 -12와 같은 사이토카인이 또한 보조제로서 사용될 수 있다.

본 발명의 제형에서, 보조제 조성물은 주로 Th1 유형의 면역 반응을 유도하는 것이 바람직하다. 따라서, 보조제는 주로 Th2에서 주로 Th1 유형의 반응으로 DNA 엔코딩된 항원에 반응하여 생성되는 면역 반응을 조절하는 기능을 할 수 있다. 높은 수준의 Th1 유형 사이토카인(예를들어, IFN-,TNF, IL-2 및 IL-12)은 투여되는 항원에 대한 세포 매개성 면역 반응의 유도를 유리하게 하는 경향이 있다. 반응이 주로 Th1 유형인 바람직한 구체예내에서, Th1 유형 사이토카인의 수준이 Th2 유형 사이토카인의 수준보다 더 큰 범위로 증가할 것이다. 이들 사이토카인의 수준은 표준 검정을 이용하여 용이하게 평가될 수 있다. 사이토카인 패밀리의 검토를 위해, 문헌 [Mosmann and Coffman, *Ann. Rev. Immunol.* 7:145-173, 1989]를 참조하라.

따라서, 주로 Th1 유형 반응을 유도하는데 사용되는 적합한 보조제는 예를들어, 알루미늄 염과 함께 모노포스포릴 지질 A, 바람직하게는 3-데-O-아실화 모노포스포릴 지질 A(3D-MPL)의 조합물을 포함한다. Th1 유형 면역 반응을 우선적으로 유도하는 기타 공지된 보조제는 CpG 함유 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 올리고뉴클레오티드는 CpG 디뉴클레오티드가 메틸화되지 않는다는 점에서 특징이 있다. 이러한 올리고뉴클레오티드는 잘 공지되어 있고, 예를들어, WO96/02555에 기재되어 있다. 면역자극(immunostimulatory) DNA 서열은 또한, 예를들어, 문헌 [Sato et al., *Science* 273:352, 1996]에 기재되어 있다. CpG 함유 올리고뉴클레오티드는 동일하거나 상이한 폴리뉴클레오티드 작제물내의 HCV 항원(들)과 별도로 엔코딩될 수 있거나, 예를들어, 이들과의 융합체로서 이들 바로 근처에 위치할 수 있다. 대안적으로, CpG 함유 올리고뉴클레오티드는 개별적으로, 즉 엔코딩된 항원을 포함하는 조성물의 일부로서가 아니게 투여될 수 있다. CpG 올리고뉴클레오티드는 단독으로 또는 기타 보조제와 함께 사용될 수 있다. 예를들어, 향상된 시스템은 WO00/09159 및 WO00/62800에 기재된 바와 같이 CpG 함유 올리고뉴클레오티드 및 사포닌 유도체의 조합물, 특히 CpG 및 QS21의 조합물을 포함한다. 바람직하게는, 제형은 부가적으로 수중유 에멀션 및/또는 토코페롤(tocopherol)을 포함한다.

또 다른 바람직한 보조제는 사포닌, 바람직하게는 QS21(Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA)이고, 이는 단독으로 또는 기타 보조제와 함께 사용될 수 있다. 예를들어, 향상된 시스템은 WO94/00153에 기재된 바와 같은 QS21

및 3D-MPL의 조합물과 같은 모노포스포릴 지질 A 및 사포닌 유도체의 조합물, 또는 WO 96/33739에 기재된 바와 같이 QS21이 콜레스테롤로 켄칭되는 덜 리액토제닉(reactogenic)한 조합물을 포함한다. 다른 바람직한 제형은 수중유 에멀션 또는 토코페롤을 포함한다. 수중유 에멀션 형태로 QS21, 3D-MPL 및 토코페롤을 포함하는 특히 효능있는 보조제 제형은 WO95/17210에 기재되어 있다.

다른 바람직한 보조제는 몬타니드(Montanide) ISA 720(Seppic, France), SAF(Chiron, Califonia, United States), ISCOMS(CSL), MF-59(Chiron), Detox(Ribi, Hamilton, MT), RC-529(Corixa, Hamilton, MT) 및 기타 아미노알킬 글루코사미니드 4-포스페이트(AGP)를 포함한다.

백신이 보조제를 포함하는 경우, 백신 제형은 두 부분으로 투여될 수 있다. 예를들어, 항원을 엔코딩하는 뉴클레오티드 작제물을 함유하는 제형의 일부가 예를들어, 피하 또는 근육내 주사, 또는 피내 입자 매개 전달에 의해 먼저 투여될 수 있고, 이후 보조제를 함유하는 제형의 일부가 즉시 투여되거나 백신 분야의 숙련된 의사에게 명백할 적합한 기간 후에 계속해서 투여될 수 있다. 이들 상황하에서, 보조제는 항원 제형과 동일한 경로 또는 대안적 경로에 의해 투여될 수 있다. 다른 구체예에서, 제형의 보조제 부분은 항원성 부분 전에 투여될 것이다. 한 구체예에서, 보조제는 항원의 입자 매개 전달 전 또는 후에 항원(들)을 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열의 입자 매개 전달의 부위에서 피부에 적용되는 국소적 제형으로서 투여된다.

바람직하게는, 본 발명의 DNA 백신은 유효한 면역 반응, 통상적으로 HCV 항원, 바람직하게는, 광범위한 에피토프에 대한 CD4+ 및 CD8+ 면역을 자극한다. 백신접종 후 간 섬유증 및/또는 염증이 감소되는 것이 치료 세팅에서 바람직하다.

본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 "포함하는"은 기타 엘리먼트의 존재가 배제되지 않도록 이의 비제한적인 의미로 사용하고자 한다. 그러나, 단어 "포함하는"은 또한 이의 배타적인 의미로 이해될 수 있고, 이는 "구성하는" 또는 "~로 구성되는"과 같은 정도임을 의도한다. 본 발명은 하기의 실시예에 의해 예시되나, 이에 제한되지 않는다.

실시예

실시예 1, *항원 패널(panel)로 도입된 돌연변이:-*

1). 컨센서스(consensus) 돌연변이

모든 공지된 HCV 단리물의 전체 게놈 서열의 비교를 수행했다. J4L6 폴리프로테인내의 특정 위치가 대다수의 다른 HCV 단리물과 다르고/특이한 것으로 확인되었다. 특히 중요한 것은 이들 위치가 1b-그룹 단리물 사이, 나아가 그룹 1a, 2, 3 및 그 밖의 그룹 사이에서 더욱 컨센서스인 잔기로부터 일탈된 것으로 밝혀졌다는 것인데, 여기서 하나 이상의 대안적 아미노산 잔기는 동등한 위치에서 다른 방법으로 우위를 점했다. 선택된 컨센서스 돌연변이 중 어느 것도 공지된 CD4 또는 CD8 에피토프를 간섭하지 않았다. NS3내의 두개의 변화는 실제로 면역우성(immunodominant) HLA-B35-제한된 CD8 에피토프를 복원시켰다 [이소루신(I) 1365 대신 발린(V), 글리신(G) 1366 대신 알라닌(A)].

NS4B의 최초의 48개의 아미노산은 무익한 변이성으로 인해 제거되었다.

코어

알라닌(A) 52 대신 트레오닌(T)

NS3

발린(V) 1040 대신 루신(L)

루신(L) 1106 대신 글루타민(Q)

세린(S) 1124 대신 트레오닌(T)

발린(V) 1179 대신 이소루신(I)

트레오닌(T) 1215 대신 세린(S)

글리신(G) 1289 대신 알라닌(A)

세린(S) 1290 대신 프롤린(P)

이소루신(I) 1365 대신 발린(V)

글리신(G) 1366 대신 알라닌(A)

트레오닌(T) 1408 대신 세린(S)

프롤린(P) 1428 대신 트레오닌(T)

이소루신(I) 1429 대신 세린(S)

이소루신(I) 1636 대신 트레오닌(T)

NS4B

페닐알라닌(F) 1760에서 ORF 시작

NS5B

이소루신(I) 2824 대신 발린(V)

트레오닌(T) 2892 대신 세린(S)

트레오닌(T) 2918 대신 발린(V)

주의. 넘버링은 J4L6 단리물에 대한 폴리프로테인에서의 위치를 따른다.

실시예 2, *플라스미드 DNA 백신의 작제*

HCV 코어, NS3, 트렁케이팅된 NS4B, 및 NS5B를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 SynGene 2e 소프트웨어를 사용하여 포유동물 코돈 유씨지(usage)에 대해 코돈 최적화시켰다. 코돈 유씨지 계수는 각 폴리뉴클레오티드에 대해 0.7 이상으로 개선되었다. 각코돈 최적화, 효소적 녹아웃(knockout) 돌연변이, 및 컨센서스 돌연변이를 포함하는 각각의 새로운 폴리뉴클레오티드 서열의 센스 및 안티센스 가닥을 20개의 뉴클레오티드 중첩을 지닌 40 내지 60개의 뉴클레오티드의 영역으로 분할했다. 이들 영역을 상업적으로 합성하고, 올리고 어셈블리 PCR 방법으로 폴리뉴클레오티드를 생성했다.

클로닝을 위해 사용되는 단일 제한 엔도뉴클레아제 부위를 예시하는 각 폴리뉴클레오티드에 대한 외측의 정방향 및 역방향 PCR 프라이머는 하기와 같이 약술된다:

HCV 코어
정방향 프라이머
5'-GAATTC**GCGGCCGC**C**ATG**AGCACCAACCCCAAGCCCCAGCGCAAGACCAAGCGGAACACC-3'
NotI 번역 시작 코돈

역방향 프라이머
5'-GAATTC**GGATCCTCA**TGCGCTAGCGGGGATGGTGAGGCAGCTCAGCAGCGCCAGCAGGA-3'
BamHI 정지 코돈

HCV NS3
정방향 프라이머
5'-GAATTC**GCGGCCGC**C**ATG**GCCCCCATCACCGCCTACAGCCAGCAGACCCGGGGAC-3'
NotI 번역 시작 코돈

역방향 프라이머
5'-GAATTC**GGATCCTCA**GGTGACCACCTCCAGGTCAGCGGACATGCACGCCATGATG-3'
BamHI 정지 코돈

HCV NS4B
정방향 프라이머
5'-GAATTC**GCGGCCGC**C**ATG**TTTTGGGCCAAGCATATGTGGAACTTCA-3'
NotI 번역 시작 코돈

역방향 프라이머
5'-GAATTC**GGATCCTCA**GCAAGGGGTGGAGCAGTCCTCGTTGATCCAC-3'
BamHI 정지 코돈

HCV NS5B
정방향 프라이머
5'-GAATTC**GCGGCCGC**C**ATG**TCCATGTCCTACACCTGGACCGGCGCCCTGA-3'
NotI 번역 시작 코돈

역방향 프라이머
5'-GAATTC**GGATCCTCA**GCGGTTGGGCAGCAGGTAGATGCCGACTCCGACG-3'
BamHI 정지 코돈

단일 항원을 엔코딩하는 모든 폴리뉴클레오티드는 Not I 및 BamH I 단일 클로닝 부위에 의해 포유동물 발현 벡터 p7313ie내로 클로닝했다(도 7 참조).

엔코딩된 폴리프로테인은 하기와 같다(돌연변이 및 코돈 최적화를 포함함):

HCV 코어 번역:

MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRKTSERS
QPRGRRQPIPKARRPEGRAWAQPGYPWPLYGNEGLGWAGWLLSPRGSRPSWGPTDP
RRRSRNLGKVIDTLTCGFADLMGYIPLVGAPLGGAARALAHGVRVLEDGVNYATGN
LPGCSFSIFLLALLSCLTIPASA

HCV NS3 번역:

MAPITAYSQQTRGLLGCIITSLTGRDKNQVEGEVQVVSTATQSFLATCINGVCWTVY
HGAGSKTLAGPKGPITQMYTNVDQDLVGWQAPPGARSMTPCTCGSSDLYLVTRHA
DVIPVRRRGDSRGSLLSPRPVSYLKGSVGGPLLCPSGHVVGIFRAAVCTRGVAKAVD
FIPVESMETTMRSPVFTDNSSPPAVPQTFQVAHLHAPTGSGKSTKVPAAYAAQGYKV
LVLNPSVAATLGFGAYMSKAHGIDPNIRTGVRTITTGAPITYSTYGKFLADGGCSGGA
YDIIICQECHSTDSTTILGIGTVLDQAETAGARLVVLATATPPGSVTVPHPNIEEVALSN
NGEIPFYGKAIPIEAIKGGRHLIFCHSKKKCDELAAKLSGLGLNAVAYYRGLDVSVIPT
SGDVVVVATDALMTGFTGDFDSVIDCNTCVTQTVDFSLDPTFTIETTTVPQDAVSRS
QRRGRTGRGRSGIYRFVTPGERPSGMFDSSVLCECYDAGCAWYELTPAETSVRLRAY
LNTPGLPVCQDHLEFWESVFTGLTHIDAHFLSQTKQAGDNFPYLVAYQATVCARAQ
APPPSWDQMWKCLIRLKPTLHGPTPLLYRLGAVQNEVTLTHPITKYIMACMSADLEV
VT

HCV NS4B 번역:

MFWAKHMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPAIASLMAFTASITSPLTTQNTLLFNILGGWV
AAQLAPPSAASAFVGAGIAGAAVGSIGLGKVLVDILAGYGAGVAGALVAFKVMSGE
VPSTEDLVNLLPAILSPGALVVGVVCAAILRRHVGPGEGAVQWMNRLIAFASRGNH
VSPTHYVPESDAAARVTQILSSLTITQLLKRLHQWINEDCSTPC

HCV NS5B 번역:

MSMSYTWTGALITPCAAEESKLPINPLSNSLLRHHNMVYATTSRSASLRQKKVTFDR
LQVLDDHYRDVLKEMKAKASTVKAKLLSIEEACKLTPPHSAKSKFGYGAKDVRNLS
SRAVNHIRSVWEDLLEDTETPIDTTIMAKSEVFCVQPEKGGRKPARLIVFPDLGVRVC
EKMALYDVVSTLPQAVMGSSYGFQYSPKQRVEFLVNTWKSKKCPMGFSYGTRCFG
STVTESDIRVEESIYQCCDLAPEARQAIRSLTERLYIGGPLTNSKGQNCGYRRCRASG
VLTTSCGNTLTCYLKATAACRAAKLQDCTMLVNGDDLVVICESAGTQEDAAALRAF
TEAMTRYSAPPGDPPQPEYDLELITSCSSNVSVAHDASGKRVYYLTRDPTTPLARAA
WETARHTPVNSWLGNIIMYAPTLWARMILMTHFFSILLAQEQLEKALDCQIYGACYS
IEPLDLPQIIERLHGLSAFSLHSYSPGEINRVASCLRKLGVPPLRVWRHRARSVRAKLL
SQGGRAATCGRYLFNWAVRTKLKLTPIPAASQLDLSGWFVAGYSGGDIYHSLSRAR
PRWFPLCLLLLSVGVGIYLLPNR

실시예 3, *면역 반응 검정*

C57BL 또는 BALB/c 마우스를 p7313 벡터내에서 개별적으로 발현되는 네개의 HCV 항원의 야생형 또는 코돈 최적화 + 돌연변이된 변형체로 면역화시켰다. 마우스를 1.0㎍/카트리지의 표준량의 PMID로 면역화시키고, 21일째(부스팅1), 및 다시 49일째(부스팅2)에 부스팅시켰다. 비장 세포를 개개의 마우스로부터 수거하고, 다양한 HCV 항원 조제를 사용하여 ELISPOT로 재자극시켰다. IL-2 및 IFNɣ 반응 둘 모두 측정했다. 면역 반응을 측정하는데 사용되는 시약은 미크로겐(Mikrogen)으로부터의 정제된 HCV 코어, NS3, NS4 및 NS5B(유전자형 1b) 단백질, 백시니아-코어(Vaccinia Core) 및 백시니아 NS3-5(유전자형 1b 인 하우스 (in house))이다.

HCV 코어

야생형의 전장(FL-1-191) 또는 트렁케이팅된(TR 1-115) 코어로 면역화된 C57BL 마우스를 HCV 코어 단백질로 재자극시켰고, 정제된 코어 단백질로 양호한 반응이 관찰되었다(도 8).

HCV NS3

PMID를 이용하여 7313 야생형 및 코돈 최적화된 NS3로 마우스를 면역화시켰다. 면역화 및 단일의 부스팅 후의 NS3에 대한 양호한 반응을 ELISPOT에 의한 반응을 판독하기 위한 NS3 단백질 및 백시니아 3-5 둘 모두를 사용하는 C57B1 마우스에서 입증했다. IL-2 및 IFNɣ 반응 둘 모두가 검출되었다. 이 실험에서 작제물의 야생형 및 코돈 최적화(co + m) 버전 사이의 현저한 차이는 없었다(도 9). 그러나, 일시적 트랜스펙션 후의 시험관내 발현에서의 차이는 야생형 및 코돈 최적화 작제물 사이에서 관찰되었다. 더 낮은 DNA 용량에서 또는 첫번째 반응에서 작제물을 비교하기 위한 실험은 플라스미드의 효능에서의 차이를 나타낼 수 있다.

HCV NS4B

BALB/c 마우스의 PMID 면역화 후에 전장 야생형 p7313 NS4B에 대한 반응을 관찰했다. NS4B 단백질 및 백시니아 3-5으로 시험관내에서 재자극시킨 후의 IL-2 및 IFNγ ELISPOT 반응 둘 모두를 관찰했다(도 10).

NS4B 단백질은 고도로 가변성인 영역을 제거하기 위해 N-말단에서 트렁케이팅되었으나, 시험관내 트랜스펙션 연구ㄹ르 수행한 경우에 이 단백질의 발현은 관찰될 수 없었는데, 이는 이용가능한 항혈청(anti-sera)이 N-말단에 대해 생성되었기 때문이다. 이 영역의 발현을 확증하기 위해 NS5B 단백질과 융합시켰다. 최근의 실험은 단독 또는 NS4B 단백질 및 NS3-5 백시니아를 이용하여 트렁케이팅된 NS4B 단백질 단독 또는 NS5B와의 융합체로서 이에 대한 면역 반응이 검출될 수 있다는 것을 확증한다. 야생형 및 코돈 최적화 NS4B에 대해 양호한 반응이 관찰되었다.

HCV NS5B

야생형 및 코돈 최적화(co + M) 서열에 의한 면역화 후에 PMID 후의 NS5B에 대한 면역 반응을 조사했다. ELISPOT에 의한 반응을 판독하기 위해 NS3 단백질 및 백시니아 3-5 둘 모두를 사용하여 C57BL 마우스에서 면역화 및 단일의 부스트 후의 NS5B에 대한 양호한 반응을 입증했다. NS3을 사용할 때, 이 실험에서 작제물의 야생형 및 co + m 변형체 사이에서 면역 반응의 차이는 관찰되지 않았다(도 11).

실시예 4. *HCV 폴리프로테인의 발현*

단일의 융합 폴리프로테인로서 발현시키기 위해 네개의 선택된 HCV 항원 코어, NS3, NS4B 및 NS5B를 p7313ie 내에 포맷팅(formatting)시켰다. 항원은 하기에 나타나는 바와 같이 상이한 작제물에서 상이한 순서로 발현되었다. 단일의 폴리프로테인의 발현을 엔코딩하는 작제물 패널은 차례로 네개의 항원 각각에 의해 아미노-말단 위치가 점유되도록 설계했는데, 이는 이러한 중요한 위치내에서 다른 항원에 비해 하나의 항원의 존재에 의해 발현의 수준이 더욱 현저하게 개선되는지 또는 감소하는지 모니터하기 위해서 였다. 게다가, 코어 단백질이 2개의 단편, 즉 코어 66-191>1-65 및 105-191>1-104를 통해 재배열된 두개의 작제물을 생성했다.

HCV 500

코어	NS3	NS4B	NS5B

HCV 510

NS3	NS4B	NS5B	코어

HCV 520

NS4B	NS5B	코어	NS3

HCV 530

NS5B	코어	NS3	NS4B

HCV 501

코어(66-191)-(1-65)	NS3	NS4B	NS5B

HCV 502

코어(105-191)-(1-104)	NS3	NS4B	NS5B

표준 제조자 프로토콜에 따라, 리포펙타민(Lipofectamine) 2000 트랜스펙션 시약(Invitrogen/Life Technologies)을 이용하여 HEK 293T 세포내로 표준화된 양의 DNA를 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 후 24시간째에 세포를 수거하고,

MOPS 또는 MES 기성 완충제(Invitrogen/Life Technologies)와 함께 미리 형성된 NuPAGE 4-12% 비스-트리스 겔을 사용하여 폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 수행했다. 분리된 단백질을 PVDF막상으로 블롯팅하고, NS5B 전체 단백질에 대해 생성된 래빗 항혈청을 이용하여 단백질 발현을 모니터했다. 두번째 프로브는 양고추냉이 과산화효소(horseradish peroxidase, hrp)에 컨쥬게이션된 항-래빗 면역글로불린 항혈청이고, 이어서 ECL 시약(Amersham Biosciences)을 이용하여 화학-발광성(chemi-luminescent) 검출을 수행했다.

이 발현 연구의 결과는 도 12에 나타냈다. 결과는 단일 항원 발현성 NS5B에 의해 관찰되는 수준보다 더 낮은 수준이지만 모든 폴리프로테인이 유사한 정도로 발현된 것을 나타낸다. HCV500의 약간 더 낮은 분자량은 N-말단 위치로부터의 HCV코어 분해로 인한 것이다. HCV502는 클로닝 에러로 인해 이 실험에서 검출되지 않았다. 다른 클론의 반복 실험에서, HCV502의 발현 수준은 다른 폴리프로테인과 유사했다.

실시예 5, *HCV 폴리프로테인에 대한 면역 반응의 검출*

폴리프로테인의 각각을 엔코딩하는 DNA(1㎍)로 PMID에 의해 C57BL 마우스를 면역화시키고, 실시예 4에 기재된 바와 같이 3주 후에 부스팅했다. ELISPOT 또는 HCV 항원에 대한 세포내 사이토카인 생성을 이용하여 부스팅 후 7일째에 면역 반응을 모니터했다.

HCV 유전자 생성물에 대한 T 세포 반응에 대한 ELISPOT 검정

비장세포(splenocyte)의 준비

부스팅 후 7일째에 면역된 동물로부터 비장을 수득했다. 세포 현탁액을 생성하기 위해 유리 슬라이드 사이에서 제분하여 비장을 처리했다. 염화암모늄 처리로 적혈구를 분해시키고, 비장세포의 미세한 현탁액을 남기기 위해 데브리스(debris)를 제거했다. 세포는 마우스가 단지 일차 면역화된 경우 ELISPOT 검정에 사용하기 위한 RPMI 완전배지내의 4×10^6/㎖의 농도로 재현탁시키고, 마우스가 부스팅된 경우 2×10^6/㎖의 농도로 세포를 재현탁시켰다.

ELISPOT 검정

플레이트를 15㎍/㎖(PBS 중)의 래트 항 마우스 IFNɣ 또는 래트 항 마우스 IL-2(Pharmingen)로 코팅했다. 플레이트를 +4℃에서 밤새 코팅했다. 사용하기 전, 플레이트를 PBS로 세번 세척했다. 4×105 세포/웰(well)로 플레이트에 비장세포를 첨가했다. 재조합 HCV 항원을 미크로겐(Mikrogen)으로부터 수득하고, 1㎍/㎖로 사용했다. CD4 또는 CD8 반응을 측정하기 위해 1 내지 10μM의 최종농도로 펩티드를 검정에 사용했다. 이들 펩티드는 제네메드 씬쎄시스(Genemed Synthesis)에서 수득했다. 각 웰의 전체 부피는 200㎕였다. 항원 자극된 세포를 함유하는 플레이트를 가습된 37℃ 인큐베이터에서 16시간 동안 인큐베이션시켰다. 몇몇 실험에서, NS3-5를 발현하는 재조합 백시니아 또는 백시니아 야생형으로 감염된 세포를 ELISPOT 검정에서 항원으로 사용했다.

ELISPOT 검정 플레이트의 현상

물(세포 분해를 확실하게 하기 위해 1분의 침지와 함께)로 한번 세척하고 PBS로 세번 세척함으로써 플레이트로부터 세포를 분리했다. 바이오틴 컨쥬게이션된 래트 항 마우스 IFN-ɣ 또는 IL-2 (Phamingen)를 PBS중에 1㎍/㎖로 첨가시켰다. 플레이트를 실온에서 2시간 동안 진탕시키며 인큐베이션시켰다. 이후 1/1000 희석도에서 스트렙타비딘 알칼리 포스파타아제(Caltag)의 첨가 전에, 플레이트를 PBS로 세번 세척했다. PBS로 세번 세척한 후, 14 내지 45분 동안 BCICP 기질(Biorad)과 인큐베이션함으로써 스폿(spot)이 나타나게 하였다. 기질을 물로 세척하여 제거하고, 플레이트를 건조시켰다. 영상 분석 시스템을 사용하여 스폿을 세었다.

펩티드 자극에 대해 반응하여 T 세포로부터의 IFNɣ 및 IL2의 생성을 검출하기 위한 유동세포검사(flow cytometry).

약 3×10^6개의 비장세포를 테스트 튜브 마다 등분하고, 펠레트로 스피닝시켰다. 상층액을 제거하고, 펠레트를 분쇄시키기 위해 샘플을 볼텍스(vortex)시켰다. 0.5㎍의 항-CD28 + 0.5㎍의 항-CD49d(Pharmingen)를 각 튜브에 첨가하고, 10분 동안 실온에서 인큐베이션시키기 위해 놔두었다. 1㎖의 배지를 적합한 튜브에 첨가하였는데, 이러한 튜브는 배지를 단독으로 함유하거나 HCV 항원을 지닌 배지를 함유한다. 이후 샘플을 가열된 워터 배쓰(bath)내에서 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 10㎍/㎖의 브레펠딘(Brefeldin) A를 각 튜브에 첨가시키고, 추가 5시간 동안 37℃에서 계속 인큐베이션했다. 이후 프로그램된 워터 배쓰를 6℃로 복귀시키고, 이 온도로 밤새 유지시켰다.

이후 샘플을 항-마우스 CD4-싸이크롬(CyChrome)(Pharmingen) 및 항-마우스 CD8 비오틴(Immunotech)으로 염색시켰다. 샘플을 세척하고, 스트렙타비딘-ECD로 염색시켰다. 샘플을 세척하고, 실온에서 15분 동안 "(인트라프렙 퍼미어빌리제이션 리전트(Intraprep Permeabilization Reagent)" 키트(Immunotech)로부터 100㎕의 염착제(Fixative)를 첨가했다. 세척후, 인트라프렙 키트로부터의 100㎕의 투과 시약(permeabilization reagent)를 항-IFN-γ-PE + 항-IL-2-FITC와 함께 각각의 샘플에 첨가했다. 샘플을 15분 동안 실온에서 인큐베이션시키고, 세척했다. 샘플을 0.5㎖의 완충용액에 재현탁하고, 유동세포분석기상에서 분석했다.

샘플당 전체 500,000개의 세포를 수거했고, 이어서 자극에 대한 반응으로 IFNγ 및/또는 IL-2를 분비하는 세포의 개체군을 결정하기 위해 CD4 및 CD8 세포를 게이트(gate)했다.

결과는 상이한 순서에서 코어, NS3, NS4B 및 NS5B를 엔코딩하는 모든 폴리프로테인이 NS3에 대한 면역 반응을 자극할 수 있음을 나타낸다 (즉, HCV 500, 510, 520, 530). 결과는 도 13에 나타냈다. IL2(도 13A) 및 IFNγ(도 13B) ELISPOT에 의해 모니터되는 경우, NS3 단백질에 대한 반응은 각각의 HCV 폴리프로테인(HCV 500, 510, 520 및 530) 사이에서 유사했다.

반응하는 세포의 표현형(phenotype)은 ICS에 의해 더욱 상세하게 분석했다. 양호한 CD4+ T 세포 반응이 면역우성 NS3 CD4 특이적 펩티드에 대해 유도되었고, 이는 HCV 500, 510, 520, 530 사이에서 유사했다.

표 1. *HCV 폴리프로테인에 의한 면역화 후의 IFNγ를 생성하는 NS3 특이적 CD4 및 CD8 T 세포의 빈도.*

작제물	무(nil)	NS3 단백질	NS3 CD4 펩티드	NS3 CD8 펩티드
NS3 단독	0.05	0.29	0.24	4.4
HCV 500	0.09	0.27	0.38	5.54
HCV 510	0.1	0.17	0.29	3.95
HCV 520	0.1	0.14	0.28	3.32
HCV 530	0.07	0.15	0.21	4.89
HCV 501	0.1	0.05	0.08	0.16

6시간 동안은 항원의 존재 또는 부재하에서, 마지막 4시간 동안은 브레펠딘(Brefeldin) A의 존재하에서, 비장세포의 자극 후에 IFNγ 특이적 T 세포 반응을 검출했다. IFNg는 CD4 또는 CD8 T 세포상에서 게이트(gate)하고 IFNγFITC로 염색함으로써 검출했다.

면역우성 NS3 특이적 펩티드에 대한 강한 CD8 반응이 HCV 500, 510, 520 및 530으로 면역화시킨 후에 또한 생성되었고, 이는 CD8+ 세포의 2.5 내지 6% 사이의 빈도에 도달했다.

HCV 500, 510, 520 및 530에 의한 면역화는 또한 NS4B 및 NS5B 항원 둘 모두에 대한 CD4 및 CD8 반응의 검출을 초래하였으나, CD8 반응은 단일 항원에 의한 면역화 후에서 보다 폴리프로테인에 대해 더 약했다.

표 2. *HCV 폴리프로테인에 의한 면역화 후의 IFNγ를 생성하는 NS5B CD4 또는 CD8 특이적 T 세포의 빈도.*

플라스미드	무(nil)	NS5B 단백질	NS5B CD4 펩티드	NS5B CD8 펩티드
NS5B 단독	0.05	0.1	0.26	1.67
HCV 500	0.09	0.14	0.43	0.35
HCV 510	0.11	0.1	0.29	0.11
HCV 520	0.11	0.09	0.18	0.08
HCV 530	0.07	0.06	0.7	0.12
HCV 501	0.1	0.03	0.13	0.09

6시간 동안은 항원의 존재 또는 부재하에서, 마지막 4시간 동안은 브레펠딘 A의 존재하에서, 비장세포의 자극 후에 IFNɣ 특이적 T 세포 반응을 검출했다. IFNg는 CD4 또는 CD8 T 세포상에서 게이트하고 IFNɣFITC로 염색함으로써 검출했다.

표 3. *HCV 폴리프로테인에 의한 면역화 후의 IFNɣ를 생성하는 NS4B CD4 또는 CD8 특이적 T 세포의 빈도.*

플라스미드	무(nil)	NS4B 단백질	NS4B CD4 펩티드	NS4B CD8 펩티드
NS4B	0.05	0.17	0.18	2.04
HCV500	0.09	0.09	0.1	0.6
HCV510	0.05	0.09	0.09	0.34
HCV520	0.06	0.08	0.05	0.33
HCV530	0.1	0.17	0.1	0.37
HCV501	0.04	0.09	0.06	0.13

6시간 동안은 항원의 존재 또는 부재하에서, 마지막 4시간 동안은 브레펠딘 A의 존재하에서, 비장세포의 자극 후에 IFNɣ 특이적 T 세포 반응을 검출했다. IFNg는 CD4 또는 CD8 T 세포상에서 게이트하고 IFNɣFITC로 염색함으로써 검출했다.

사용된 펩티드는 하기의 서열을 지닌다:

단백질	펩티드
NS3	(C57Bl) CD4 PRFGKAIPIEAIKGG CD8 YRLGAVQNEVILTHP
NS5	(C57BL/6). CD4 SMSYTWTGALITPCA CD8 AAALRAFTEAMTRYS
NS4B	(Balb/c) CD4 IQYLAGLSTLPGNPA CD8 FWAKHMWNFISGIWY

내생적으로 프로세싱된 항원의 인지

HCV 폴리프로테인에 의한 PMID 면역화가 내생적으로 프로세싱된 항원을 인지할 수 있는 반응을 유도하는지의 여부를 결정하기 위해, NS3-5를 발현하는 백시니아 재조합 바이러스로 감염된 표적 세포를 ELISPOT 검정에서 자극제로 사용했다. 결과는 500, 510, 520 및 530에 의한 면역화 후에 양호한 IL-2 및 IFNɣELISPOT 반응이 검출됨을 나타낸다(도 14).

HCV 폴리프로테인에 의한 면역화는 기능적 CTL 활성을 유도한다.

NS3 단독, HCV 500, 510 및 520을 엔코딩하는 0.01㎍의 DNA로 C57BL 마우스를 면역화시켰다. 프라임 및 단일 부스팅 후에, 5일 동안 각 그룹의 비장 세포를 NS3 CD8 펩티드 및 IL2로 시험관내에서 재자극시켰다. 동일한 펩티드로 펄싱된 EL4 세포에 대하여 CTL 활성을 측정했다. 모든 작제물로 면역화된 마우스는 이 검정에서 유사한 치사 수준을 나타냈다.

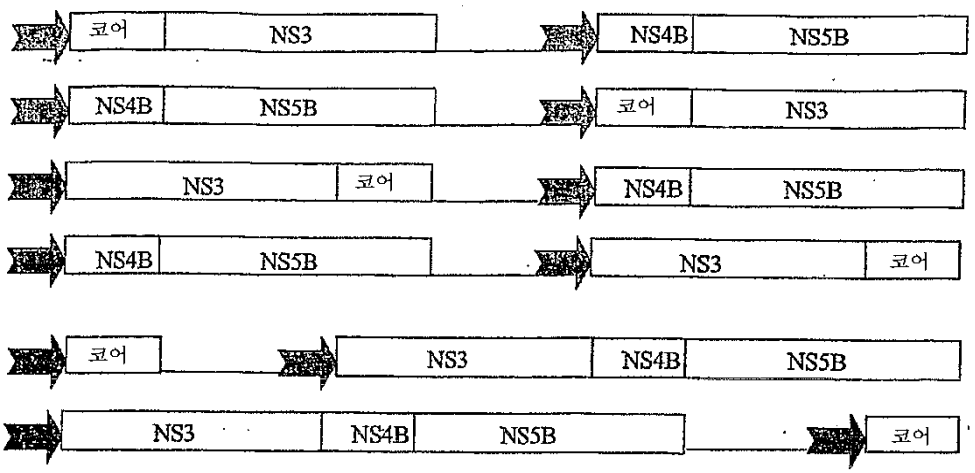
이는 HCV 폴리프로테인에 의한 PMID 면역화가 기능적 CD8 반응을 유도할 수 있음을 나타낸다. 결과는 도 15에 나타냈다.

실시예 6, *이중 프로모터 작제물에 의한 HCV 항원의 전달*

하기의 방법을 이용하여 이중 프로모터 작제물을 생성했다. 발현 카세트 1(아이오와 길이(Iowa-length)의 CMV 프로모터, 엑손 1, 관심 단백질/융합 단백질을 엔코딩하는 유전자, 및 래빗 글로빈 폴리-A 신호를 포함함)을 함유하는 단편을 단일 제한 엔도뉴클레아제 부위 Cla I 및 Xmn에 의해 이의 숙주 벡터, 즉 p7313ie로부터 절제했다. Xmn I 은 절제된 단편의 3-프라임(prime) 단부에서 블런트(blunt) 단부를 생성한다. 수용 플라스미드 벡터는 발현 카세트 2를 함유하는 p7313ie이다. 이는 단일 제한 엔도뉴클레아제 Sse8387I로 분해시킨 후, 생성된 3-프라임 오버행(overhang)을 제거하기 위해 T4 DNA 중합효소와 인큐베이션시켜서, 선형 분자의 5-프라임 및 3-프라임 둘 모두에서 블런트 단부를 생성시킴으로써 제조했다. 이를 259bp의 단편을 제거하는 단일 제한 엔도뉴클레아제 Cla I 으로 절단했다.

Cla I /블런트 양립성 단부에 의해 발현 카세트 1을 p7313ie/발현 카세트 2로 클로닝하여, p7313ie/발현 카세트 1 + 발현 카세트 2를 생성했고, 여기서 카세트 1은 카세트 2의 업스트림에 위치한다.

하기를 포함하는 p7313ie 플라스미드를 생성했다.



각주:

화살표 = 인간 사이토메갈로바이러스 IE 유전자 프로모터 (HCMV IE)

NS4B = 아미노산 49-260을 함유하는 트렁케이팅된 NS4B - 상기 약술된 바와 같음.

코어 = 아미노산 1-191을 함유하는 코어 단백질.

상기 제시된 작제물 패널은 완전하며, 이를 웨스턴 블롯에 의한 293T 세포에서의 일시적 트랜스펙션으로부터의 발현에 대해 모니터하였다. 웨스턴 블롯 분석의 결과는 도 16에 도시되어 있다: 레인 키이 (Lane key):

1. p7313ie/코어 8. p7313ie/코어NS3+ NS4B5B

2. p7313ie/NS3 9. p7313ie/NS4B5B+ 코어NS3

3.p7313ie/NS5B 10. p7313ie/NS3코어+ NS4B5B

4. p7313ie/코어NS4B5B 11. p7313ie/NS4B5B+ NS3코어

5. p7313ie/NS4B5B 12. p7313ie/코어+ NS34B5B

6. p7313ie/NS3코어 13. p7313ie/NS34B5B+ 코어

7. p7313ie/NS34B5B

작제물의 각각의 쌍은 두 개의 독립적 발현 카세트를 함유한다. 카세트들이 벡터내로 삽입되는 순서가 둘 중 하나의 카세트로부터의 발현에 대해 영향을 미칠 것이라는 것은 예측되지 않았다. 그러나, 이러한 결과는 이러한 각각의 발현 카세트가 코어, NS3코어, 또는 코어NS3 카세트의 다운스트림에 위치하는 경우에 NS4B5B 또는 NS34B5B 융합 단백질의 발현에 현저히 불리하다는 것을 나타내준다.

발현 수준은 하나의 항원 작제물에 대한 경우만큼 포지티브하지 않지만, 크기의 현저한 증가 (175-228%)로 인해 어느 정도의 감소가 예측되며, 이는 동일한 질량의 DNA에 대해 약 50%의 세포로 전달되는 플라스미드의 복사체수의 감소에 해당한다.

이중 프로모터 작제물에 의해 유도된 생체내 면역원성

3개의 이중 프로모터 작제물을 면역원성 실험을 위해 선택하였고, 이들은 모든 4개의 항원의 최대 발현을 나타내었다. 이들 작제물은 p7313ie NS4B/NS5B + 코어/NS3, p7313ieNS4B/NS5B + NS3코어 및 p7313ie NS3/NS4B/NS5B + 코어 였다. C57BL 마우스를 PMID에 의해 1㎍ DNA로 면역화시키고, 반응을 IL2에 대한 ELISPOT를 사용하여 우세한 NS3 CD8 T 세포 에피토프에 대해 7일 후에 측정하였다. 결과 (도 17에 도시되어 있음)는 반응이 1회 면역화 후에 모든 3개의 이중 프로모터 작제물에 대해 관찰되었음을 보여준다 (CD4 및 Cd8 NS3 T 세포 특이적 펩티드로 자극된 비장세포).

실시예 7, *코어의 결실 돌연변이.*

3' 단부로부터 시간 당 20개 아미노산을 스패닝하는 영역이 점진적으로 결실되는 코어의 ORF를 엔코딩하는 다수의 유전자를 생성시키고, 완전히 서열분석하였다.

코어 성분	명칭
15-191	코어 Δ15
1-191	코어 191
1-171	코어 171
1-151	코어 151
1-131	코어 131
1-111	코어 111
1-91	코어 91
1-71	코어 71
1-51	코어 51

도 18은 코어의 단편들을 엔코딩하는 유전자들의 범위를 나타내는 DNA 아가로오스 겔을 도시한다. 이러한 작제물은, 292T 세포에서의 코-트랜스펙션에 의한 발현과 함께 NS4B5B 융합체 (p7313ie/NS4B5B)의 발현 수준에 대한 이들의 영향에 대해 시험되었다. 결과는 도 19에 도시되어 있다. 레인은 하기와 같이 로딩되었다:

레인	하기 성분으로 로딩됨 (각각 0.5㎍ DNA를 포함함)	
1	p7313ie/NS4B5B	p7313ie
2	p7313ie/NS4B5B	코어 191
3	p7313ie/NS4B5B	코어 Δ15
4	p7313ie/NS4B5B	코어 171
5	p7313ie/NS4B5B	코어 151
6	p7313ie/NS4B5B	코어 131
7	p7313ie/NS4B5B	코어 111
8	p7313ie/NS4B5B	코어 91
9	p7313ie/NS4B5B	코어 71
10	p7313ie/NS4B5B	코어 51

코어191, 코어 Δ15, 코어171, 코어151 및 코어131의 발현은, NS4B5B의 발현의 항-NS5B 검출 후에, 웨스턴 블롯이 항-코어로 프로빙되는 경우에 명확히 검출된다. 코어의 추가의 트렁케이팅된 형태는 검출되지 않았는데, 이는 아마도 사용된 겔 시스템의 크기 포획 제한으로 인할 것이다.

결과는 둘 모두의 코어 종의 강력한 발현에도 불구하고, 코어171과 함께 회복되고 다시 코어151과 함께 회복되는, 코어191 및 Δ15의 존재하에서의 NS4B5B의 발현 수준의 현저한 감소를 나타낸다. 이러한 결과는 NS4B5B의 경우에 2회 반복되었고, NS3 및 NS5B의 경우에 1회 반복되었다.

실시예 8, *NS3, NS5B, NS4B-NS5B 융합체 및 NS3-NS4B-NS5B 삼중 융합체의 발현에 대한 코어 및 코어 151의 효과*

실험 1 트랜스 포맷 (Trans format)으로의 발현

실험을 코어가 트랜스(*trans*)로 발현되거나 별도의 플라스미드상에서 엔코딩되는 경우, 비구조 항원의 발현에 대한 코어191 대 코어151의 발현의 효과를 모니터하기 위해 수행하였다. 실험 프로토콜은 실시예 7에 기술된 바와 동일하였다. 요약하면, 하기 표에 약술된 두 개의 DNA 플라스미드 벡터 각각 0.5㎍을 표준 프로토콜 (Invitrogen/Life Technologies)로 리포펙타민(Lipofectamine) 2000 트랜스펙션 시약을 사용하여 HEK 293T 세포내로 코트랜스펙션시켰다. (트랜스펙션 및 웨스턴 블롯 방법은 실시예 4와 같다)

결과는 도 20에 도시되어 있으며, 여기서 레인들은 하기 표에 기재된 바와 같이 로딩되었고, 웨스턴 블롯 분석은 항-NS3 및 항-NS5B 항혈청을 사용하여 주로 비구조 단백질의 발현을 검출하고, 항-코어를 사용하는 동일한 블롯의 2차 프로브에 의해 코어의 발현을 검출하기 위해 수행하였다.

레인	비구조 엘리먼트	코어 엘리먼트
1	NS3	공벡터 (Empty vector)
2	NS3	코어 191
3	NS3	코어 151
4	NS5B	공벡터
5	NS5B	코어 191
6	NS5B	코어 151
7	NS4B-NS5B	공벡터
8	NS4B-NS5B	코어 191
9	NS4B-NS5B	코어 151
10	NS3-NS4B-NS5B	공벡터
11	NS3-NS4B-NS5B	코어 191
12	NS3-NS4B-NS5B	코어 151

모든 경우, 코어 151과 트랜스 (*trans*)로 생성된 경우 비구조 단백질 또는 융합체 (NS3, NS5B, NS4B-5B)의 양은 코어191과 트랜스로 발현된 경우에 생성된 수준과 비교하여 현저하게 증가된 것으로 나타났다.

실험 2 - 시스 포맷 (Cis format)으로의 발현

실험을 코어가 시스로 발현되거나 비구조 엘리먼트와 융합된 형태로 동일한 플라스미드상에서 엔코딩되는 경우에 비구조 항원의 발현에 대한 코어191 대 코어151의 발현의 효과를 모니터하기 위해 수행하였다. 각각의 경우, 코어151을 특정된 비구조 영역과의 카르복시-말단 융합체 형태로 코어191 대신 사용하였다.

하기 표에 약술된 DNA 플라스미드 벡터 1㎍을 표준 프로토콜 (Invitrogen/Life Technologies)로 리포펙타민 2000 트랜스펙션 시약을 사용하여 HEK 293T 세포내로 트랜스펙션시켰다. (트랜스펙션 및 웨스턴 블롯 방법은 실시예 4와 같다)

결과는 도 21에 도시되어 있다. 웨스턴 블롯 분석은 겔 A에서 항-NS3 및 항-NS5B 항혈청을 사용하여 주로 비구조 성분들의 발현을 검출하고, 항-코어를 사용하는 동일한 블롯의 2차 프로브에 의해 코어의 발현을 검출하기 위해 수행하였다. 레인들은 하기 표에 기재된 바와 같이 로딩되었다:

레인	비구조 엘리먼트	코어 엘리먼트
1	-	코어 191
3	NS5B	-
4	NS3	코어 191
5	NS3	코어 151
6	NS5B	코어 191
7	NS5B	코어 151
8	NS4B-NS5B	코어 191
9	NS4B-NS5B	코어 151
10	NS3-NS4B-NS5B (HCV 510)	코어 191
11	NS3-NS4B-NS5B (HCV 510c)	코어 151

결과는 항원들이 폴리프로테인 융합체로 존재하는 시스 포맷의 경우에 코어의 트렁케이션이 융합 단백질의 발현을 증가시킨다는 것을 나타낸다.

NS3에 대한 면역 반응에 미치는 코어191 및 코어151의 효과 비교

C57BL 마우스를 PMID에 의해 1.5ug x 2 샷(shot)의 전체 DNA로 면역화시켰다. 면역화된 군은 공벡터 p7313ie 단독, p7313ieNS3, p7313ieNS5B 및 Pp7313ie코어 191 또는 p7313ieNS3, p7313ieNS5B 및 p7313ie코어151에 의한 골드 비드의 코-코팅(co-coating)을 포함하였다. 코-코팅은 이것이 상기 기술된 시험관내 코-트랜스펙션 실험을 의태할 수 있는 동일한 세포에 모든 플라스미드를 전달할 수 있기 때문에 사용되었다. NS3로부터의 우세한 CD8 및 CD4 T 세포 에피토프에 대한 면역 반응은 IFNγ 및 IL2 항원 특이적 반응을 측정하기 위해 세포내 사이토카인 염색을 사용하여 1차 면역화한 지 14일 후에 측정하였다. 결과 (도 22에 도시됨)는 CD4 및 CD8 NS3 반응 둘 모두가 코어 191과 비교하여 코어151의 존재하에서 약 2배 높다는 것을 보여준다.

또 다른 실험에서, C57BL 마우스를 코어 191 또는 코어 151과 함께 p7313ieNS3/NS4B/NS5B 삼중 융합체를 발현하는 플라스미드로 코-코팅된 골드 비드로 면역화시켰다. 동물들을 동일한 작제물로 추가로 부스팅시키고, 반응을 측정하기 위해 세포내 사이토카인 염색을 사용하여 부스팅한 지 7일 후에 NS3에 대한 반응을 모니터하였다. 도 23에 도시된 결과는 NS3 항원 특이적 CD4 및 CD8 반응 둘 모두가 코어 191과 비교하여 코어 151의 존재하에서 약 2배 높음을 보여준다.

전체적으로, 코어의 존재하에서 NS3에 대한 반응을 비교한 생체내 실험은 FL 코어 및 비구조 단백질의 공동 전달이 비구조 항원의 발현을 감소시킬 수 있으며 이것이 작제물의 면역원성을 감소시킨다는 시험관내 발현 데이터를 뒷받침해준다. 이러한 효과는 C 말단 40개 아미노산이 제거된 트렁케이팅된 코어로 코-코팅시킴으로써 적어도 부분적으로 극복될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

코어, NS3, NS4B 및 NS5B인 HCV 단백질의 폴리펩티드 서열을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 의학용 HCV 백신.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 그 밖의 HCV 단백질을 엔코딩하지 않는 HCV 백신.

청구항 3.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 다른 HCV 단백질의 발현에 대한 코어의 억제 효과를 감소시키기에 충분한 양으로 카르복시 말단 단부로부터 트렁케이팅(truncating)된 코어 단백질을 엔코딩함을 특징으로 하는 HCV 백신.

청구항 4.

제 3항에 있어서, 트렁케이팅된 코어 단백질이 적어도 C-말단 10개 아미노산의 결실을 지님을 특징으로 하는 HCV 백신.

청구항 5.

제 4항에 있어서, 트렁케이팅된 코어 단백질이 코어 1-151 서열로 구성됨을 특징으로 하는 HCV 백신.

청구항 6.

제 1항에 있어서, HCV 단백질이 하나 이상의 HCV 단백질을 함유하는 융합 단백질의 형태로 존재함을 특징으로 하는 HCV 백신.

청구항 7.

제 6항에 있어서, 융합 단백질이 NS4B 및 NS5B의 폴리펩티드 서열로 구성된 이중 융합체임을 특징으로 하는 HCV 백신.

청구항 8.

제 6항에 있어서, 융합 단백질이 NS3 및 코어의 폴리펩티드 서열로 구성된 이중 융합체임을 특징으로 하는 HCV 백신.

청구항 9.

제 1항에 있어서, HCV 단백질이 하나 이상의 발현 카세트내에 폴리뉴클레오티드에 의해 엔코딩되어 있음을 특징으로 하는 HCV 백신.

청구항 10.

제 9항에 있어서, 코어 단백질을 엔코딩하는 발현 카세트가 다른 HCV 단백질 중 하나 이상을 엔코딩하는 발현 카세트의 다운스트림에 시스 위치로 존재함을 특징으로 하는 HCV 백신.

청구항 11.

제 10항에 있어서, 코어 단백질을 엔코딩하는 발현 카세트가 NS5B 단백질을 엔코딩하는 발현 카세트의 다운스트림에 위치함을 특징으로 하는 HCV 백신.

청구항 12.

제 1항에 있어서, 존재하는 HCV 단백질 중 하나 이상이 돌연변이에 의해 비활성화됨을 특징으로 하는 HCV 백신.

청구항 13.

제 12항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 모티프 A에 돌연변이를 포함하는 NS5B 단백질을 엔코딩함을 특징으로 하는 HCV 백신.

청구항 14.

제 12항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 프로테아제 활성이 세작용기 촉매 아미노산 중 어느 하나의 돌연변이에 의해 제거된 NS3 단백질을 엔코딩함을 특징으로 하는 HCV 백신.

청구항 15.

제 12항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 헬리카아제 활성이 헬리카아제 모티프 I, II, III 또는 IV 중 하나 이상의 돌연변이에 의해 제거된 NS3 단백질을 엔코딩함을 특징으로 하는 HCV 백신.

청구항 16.

제 12항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 고도로 가변성인 N-말단 영역을 제거하기 위한 트렁케이션을 포함하는 NS4B 단백질을 엔코딩함을 특징으로 하는 HCV 백신.

청구항 17.

제 1항 내지 제 16항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리뉴클레오티드 백신이 HCV 조합체 1 내지 19 중 어느 하나를 엔코딩함을 특징으로 하는 HCV 백신.

청구항 18.

제 1항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 DNA 서열임을 특징으로 하는 HCV 백신.

청구항 19.

제 18항에 있어서, DNA 서열이 플라스미드 형태로 존재함을 특징으로 하는 HCV 백신.

청구항 20.

제 1항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 포유동물 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화됨을 특징으로 하는 백신.

청구항 21.

제 1항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 따른 백신을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하여, 포유동물의 HCV 감염을 예방하거나 치료하는 방법.

청구항 22.

제 1항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오티드 백신을 제공하고, 폴리뉴클레오티드를 골드 비드 (gold bead)상으로 코팅시키고, 골드 비드를 피부내로 전달하는 것을 포함하여, 개체를 백신접종시키는 방법.

청구항 23.

HCV 치료용 약제의 제조에 사용되는 제 1항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 따른 HCV 백신의 용도.

도면

도면1a

HCV J4L6 게놈 야생형 cDNA 서열, 참조 수탁 번호 AF054247

```
   1 gccagccccc tgatgggggc gacactccac catgaatcac tcccctgtga ggaactactg
  61 tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac
 121 cccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccag
 181 gacgaccggg tcctttcttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgccccc
 241 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg
 301 gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac
 361 ctcaaagaaa aaccaaacgt aacaccaacc gccgcccaca ggacgtcaag ttcccgggcg
 421 gtggtcagat cgttggtgga gtttacctgt tgccgcgcag gggccccagg ttgggtgtgc
 481 gcgcgactag gaaggcttcc gagcggtcgc aacctcgtgg aaggcgacaa cctatcccaa
 541 aggctcgccg acccgagggc agggcctggg ctcagcccgg gtacccttgg cccctctatg
 601 gcaatgaggg cctggggtgg gcaggatggc tcctgtcacc ccgcggctcc cggcctagtt
 661 ggggccccac ggaccccccgg cgtaggtcgc gtaacttggg taaggtcatc gataccctta
 721 catgcggctt cgccgatctc atggggtaca ttccgctcgt cggcgccccc ctagggggcg
 781 ctgccagggc cttggcacac ggtgtccggg ttctggagga cggcgtgaac tatgcaacag
 841 ggaacttgcc cggttgctct ttctctatct tcctcttggc tctgctgtcc tgtttgacca
 901 tcccagcttc cgcttatgaa gtgcgcaacg tgtccgggat ataccatgtc acgaacgact
 961 gctccaactc aagcattgtg tatgaggcag cggacgtgat catgcatact cccgggtgcg
1021 tgccctgtgt tcaggagggt aacagctccc gttgctgggt agcgctcact cccacgctcg
1081 cggccaggaa tgccagcgtc cccactacga caatacgacg ccacgtcgac ttgctcgttg
1141 ggacggctgc tttctgctcc gctatgtacg tgggggatct ctgcggatct attttcctcg
1201 tctcccagct gttcaccttc tcgcctcgcc ggcatgagac agtgcaggac tgcaactgct
1261 caatctatcc cggccatgta tcaggtcacc gcatggcttg ggatatgatg atgaactggt
1321 cacctacaac agccctagtg gtgtcgcagt tgctccggat cccacaagct gtcgtggaca
1381 tggtggcggg ggcccactgg ggagtcctgg cgggccttgc ctactattcc atggtaggga
1441 actgggctaa ggttctgatt gtggcgctac tctttgccgg cgttgacggg gagacccaca
1501 cgacggggag ggtggccggc cacaccacct ccgggttcac gtccctttтc tcatctgggg
1561 cgtctcagaa aatccagctt gtgaatacca acggcagctg gcacatcaac aggactgccc
1621 taaattgcaa tgactccctc caaactgggt tctttgccgc gctgttttac gcacacaagt
1681 tcaactcgtc cgggtgcccg gagcgcatgg ccagctgccg ccccattgac tggttcgccc
1741 aggggtgggg ccccatcacc tatactaagc ctaacagctc ggatcagagg ccttattgct
1801 ggcattacgc gcctcgaccg tgtggtgtcg tacccgcgtc gcaggtgtgt ggtccagtgt
1861 attgtttcac cccaagccct gttgtggtgg ggaccaccga tcgttccggt gtccctacgt
1921 atagctgggg ggagaatgag acagacgtga tgctcctcaa caacacgcgt ccgccacaag
1981 gcaactggtt cggctgtaca tggatgaata gtactgggtt cactaagacg tgcggaggtc
2041 ccccgtgtaa catcgggggg gtcggtaacc gcaccttgat ctgccccacg gactgcttcc
2101 ggaagcaccc cgaggctact tacacaaaat gtggctcggg gccctggttg acacctaggt
```

도면1b

2161 gcctagtaga ctacccatac aggctttggc actacccctg cactctcaat ttttccatct
2221 ttaaggttag gatgtatgtg gggggcgtgg agcacaggct caatgccgca tgcaattgga
2281 ctcgaggaga gcgctgtaac ttggaggaca gggataggtc agaactcagc ccgctgctgc
2341 tgtctacaac agagtggcag atactgccct gtgctttcac caccctaccg gctttatcca
2401 ctggtttgat ccatctccat cagaacatcg tggacgtgca atacctgtac ggtgtagggt
2461 cagcgtttgt ctcctttgca atcaaatggg agtacatcct gttgcttttc cttctcctgg
2521 cagacgcgcg cgtgtgtgcc tgcttgtgga tgatgctgct gatagcccag gctgaggccg
2581 ccttagagaa cttggtggtc ctcaatgcgg cgtccgtggc cggagcgcat ggtattctct
2641 cctttcttgt gttcttctgc gccgcctggt acattaaggg caggctggct cctggggcgg
2701 cgtatgcttt ttatggcgta tggccgctgc tcctgctcct actggcgtta ccaccacgag
2761 cttacgcctt ggaccgggag atggctgcat cgtgcggggg tgcggttctt gtaggtctgg
2821 tattcttgac cttgtcacca tactacaaag tgtttctcac taggctcata tggtggttac
2881 aatactttat caccagagcc gaggcgcaca tgcaagtgtg ggtccccccc ctcaacgttc
2941 ggggaggccg cgatgccatc atcctcctca cgtgtgcggt tcatccagag ttaatttttg
3001 acatcaccaa actcctgctc gccatactcg gcccgctcat ggtgctccag gctggcataa
3061 cgagagtgcc gtacttcgtg cgcgctcaag ggctcattcg tgcatgcatg ttagtgcgaa
3121 aagtcgccgg gggtcattat gtccaaatgg tcttcatgaa gctgggcgcg ctgacaggta
3181 cgtacgttta taaccatctt accccactgc gggactgggc ccacgcgggc ctacgagacc
3241 ttgcggtggc ggtagagccc gtcgtcttct ccgccatgga gaccaaggtc atcacctggg
3301 gagcagacac cgctgcgtgt ggggacatca tcttgggtct acccgtctcc gcccgaaggg
3361 ggaaggagat atttttggga ccggctgata gtctcgaagg gcaagggtgg cgactccttg
3421 cgcccatcac ggcctactcc caacaaacgc ggggcgtact tggttgcatc atcactagcc
3481 tcacaggccg ggacaagaac caggtcgaag gggaggttca agtggtttct accgcaacac
3541 aatctttcct ggcgacctgc atcaacggcg tgtgctggac tgtctaccat ggcgctggct
3601 cgaagaccct agccggtcca aaaggtccaa tcacccaaat gtacaccaat gtagacctgg
3661 acctcgtcgg ctggcaggcg ccccccgggg cgcgctccat gacaccatgc agctgtggca
3721 gctcggacct ttacttggtc acgagacatg ctgatgtcat tccggtgcgc cggcgaggcg
3781 acagcagggg aagtctactc tcccccaggc ccgtctccta cctgaaaggc tcctcgggtg
3841 gtccattgct ttgcccttcg gggcacgtcg tgggcgtctt ccgggctgct gtgtgcaccc
3901 gggggggtcgc gaaggcggtg gacttcatac ccgttgagtc tatggaaact accatgcggt
3961 ctccggtctt cacagacaac tcaacccccc cggctgtacc gcagacattc caagtggcac
4021 atctgcacgc tcctactggc agcggcaaga gcaccaaagt gccggctgcg tatgcagccc
4081 aagggtacaa ggtgctcgtc ctgaacccgt ccgttgccgc caccttaggg tttggggcgt
4141 atatgtccaa ggcacacggt atcgacccta acatcagaac tggggtaagg accattacca
4201 cgggcggctc cattacgtac tccacctatg gcaagttcct tgccgacggt ggctgttctg
4261 ggggcgccta tgacatcata atatgtgatg agtgccactc aactgactcg actaccatct
4321 tgggcatcgg cacagtcctg gaccaagcgg agacggctgg agcgcggctc gtcgtgctcg
4381 ccaccgctac acctccggga tcggttaccg tgccacaccc caatatcgag gaaataggcc
4441 tgtccaacaa tggagagatc cccttctatg gcaaagccat ccccattgag gccatcaagg

도면1c

4501 gggggaggca tctcattttc tgccattcca agaagaaatg tgacgagctc gccgcaaagc
4561 tgacaggcct cggactgaac gctgtagcat attaccgggg ccttgatgtg tccgtcatac
4621 cgcctatcgg agacgtcgtt gtcgtggcaa cagacgctct aatgacgggt ttcaccggcg
4681 attttgactc agtgatcgac tgcaatacat gtgtcaccca gacagtcgac ttcagcttgg
4741 atcccacctt caccattgag acgacgaccg tgccccaaga cgcggtgtcg cgctcgcaac
4801 ggcgaggtag aactggcagg ggtaggagtg gcatctacag gtttgtgact ccaggagaac
4861 ggccctcggg catgttcgat tcttcggtcc tgtgtgagtg ctatgacgcg ggctgtgctt
4921 ggtatgagct cacgcccgct gagacctcgg ttaggttgcg ggcttaccta aatacaccag
4981 ggttgcccgt ctgccaggac catctggagt tctgggagag cgtcttcaca ggcctcaccc
5041 acatagatgc ccacttcctg tcccagacta aacaggcagg agacaacttt ccttacctgg
5101 tggcatatca agctacagtg tgcgccaggg ctcaagctcc acctccatcg tgggaccaaa
5161 tgtggaagtg tctcatacgg ctgaaaccta cactgcacgg gccaacaccc ctgctgtata
5221 ggctaggagc cgtccaaaat gaggtcatcc tcacacaccc cataactaaa tacatcatgg
5281 catgcatgtc ggctgacctg gaggtcgtca ctagcacctg ggtgctggta ggcggagtcc
5341 ttgcagcttt ggccgcatac tgcctgacga caggcagtgt ggtcattgtg ggcaggatca
5401 tcttgtccgg gaagccagct gtcgttcccg acagggaagt cctctaccag gagttcgatg
5461 agatggaaga gtgtgcctca caacttcctt acatcgagca gggaatgcag ctcgccgagc
5521 aattcaagca aaaggcgctc gggttgttgc aaacggccac caagcaagcg gaggctgctg
5581 ctcccgtggt ggagtccaag tggcgagccc ttgagacctt ctgggcgaag cacatgtgga
5641 atttcatcag cggaatacag tacctagcag gcttatccac tctgcctgga aaccccgcga
5701 tagcatcatt gatggcattt acagcttcta tcactagccc gctcaccacc caaaacaccc
5761 tcctgtttaa catcttgggg ggatgggtgg ctgcccaact cgctcctccc agcgctgcgt
5821 cagctttcgt gggcgccggc atcgccggag cggctgttgg cagcataggc cttgggaagg
5881 tgctcgtgga catcttggcg ggctatgggg caggggtagc cggcgcactc gtggccttta
5941 aggtcatgag cggcgaggtg ccctccaccg aggacctggt caacttactc cctgccatcc
6001 tctctcctgg tgccctggtc gtcggggtcg tgtgcgcagc aatactgcgt cggcacgtgg
6061 gcccgggaga gggggctgtg cagtggatga accggctgat agcgttcgct tcgcggggta
6121 accacgtctc ccctacgcac tatgtgcctg agagcgacgc tgcagcacgt gtcactcaga
6181 tcctctctag ccttaccatc actcaactgc tgaagcggct ccaccagtgg attaatgagg
6241 actgctctac gccatgctcc ggctcgtggc taagggatgt ttgggattgg atatgcacgg
6301 tgttgactga cttcaagacc tggctccagt ccaaactcct gccgcggtta ccgggagtcc
6361 ctttcctgtc atgccaacgc gggtacaagg gagtctggcg gggggacggc atcatgcaaa
6421 ccacctgccc atgcggagca cagatcgccg gacatgtcaa aaacggttcc atgaggatcg
6481 tagggcctag aacctgcagc aacacgtggc acggaacgtt ccccatcaac gcatacacca
6541 cgggaccttg cacaccctcc ccggcgccca actattccag ggcgctatgg cgggtggctg
6601 ctgaggagta cgtggaggtt acgcgtgtgg gggatttcca ctacgtgacg ggcatgacca
6661 ctgacaacgt aaagtgccca tgccaggttc cggcccccga attcttcacg gaggtggatg
6721 gagtgcggtt gcacaggtac gctccggcgt gcaaacctct tctacgggag gacgtcacgt
6781 tccaggtcgg gctcaaccaa tacttggtcg ggtcgcagct cccatgcgag cccgaaccgg

도면1d

6841 acgtaacagt gcttacttcc atgctcaccg atccctccca cattacagca gagacggcta
6901 agcgtaggct ggctagaggg tctccccctt ctttagccag ctcatcagct agccagttgt
6961 ctgcgccttc tttgaaggcg acatgcacta cccaccatga ctccccggac gctgacctca
7021 tcgaggccaa cctcttgtgg cggcaggaga tgggcggaaa catcactcgc gtggagtcag
7081 agaataaggt agtaattctg gactctttcg aaccgcttca cgcggagggg gatgagaggg
7141 agatatccgt cgcggcggag atcctgcgaa aatccaggaa gttcccctca gcgttgccca
7201 tatgggcacg cccggactac aatcctccac tgctagagtc ctggaaggac ccggactacg
7261 tccctccggt ggtacacgga tgcccattgc cacctaccaa ggctcctcca ataccacctc
7321 cacggagaaa gaggacggtt gtcctgacag aatccaatgt gtcttctgcc ttggcggagc
7381 tcgccactaa gaccttcggt agctccggat cgtcggccgt tgatagcggc acggcgaccg
7441 cccttcctga cctggcctcc gacgacggtg acaaaggatc cgacgttgag tcgtactcct
7501 ccatgccccc ccttgaaggg gagccggggg accccgatct cagcgacggg tcttggtcta
7561 ccgtgagtga ggaggctagt gaggatgtcg tctgctgctc aatgtcctat acgtggacag
7621 gcgccctgat cacgccatgc gctgcggagg aaagtaagct gcccatcaac ccgttgagca
7681 actctttgct gcgtcaccac aacatggtct acgccacaac atcccgcagc gcaagcctcc
7741 ggcagaagaa ggtcaccttt gacagattgc aagtcctgga tgatcattac cgggacgtac
7801 tcaaggagat gaaggcgaag gcgtccacag ttaaggctaa gcttctatct atagaggagg
7861 cctgcaagct gacgccccca cattcggcca aatccaaatt tggctatggg gcaaaggacg
7921 tccggaacct atccagcagg gccgttaacc acatccgctc cgtgtgggag gacttgctgg
7981 aagacactga aacaccaatt gacaccacca tcatggcaaa aagtgaggtt ttctgcgtcc
8041 aaccagagaa gggaggccgc aagccagctc gccttatcgt attcccagac ctgggagttc
8101 gtgtatgcga gaagatggcc ctttacgacg tggtctccac ccttcctcag gccgtgatgg
8161 gctcctcata cggatttcaa tactccccca agcagcgggt cgagttcctg gtgaatacct
8221 ggaaatcaaa gaaatgccct atgggcttct catatgacac ccgctgtttt gactcaacgg
8281 tcactgagag tgacattcgt gttgaggagt caatttacca atgttgtgac ttggcccccg
8341 aggccagaca ggccataagg tcgctcacag agcggcttta catcgggggt cccctgacta
8401 actcaaaagg gcagaactgc ggttatcgcc ggtgccgcgc aagtggcgtg ctgacgacta
8461 gctgcggtaa taccctcaca tgttacttga aggccactgc agcctgtcga gctgcaaagc
8521 tccaggactg cacgatgctc gtgaacggag acgaccttgt cgttatctgt gaaagcgcgg
8581 gaacccagga ggatgcggcg gccctacgag ccttcacgga ggctatgact aggtattccg
8641 ccccccccgg ggatccgccc caaccagaat acgacctgga gctgataaca tcatgttcct
8701 ccaatgtgtc agtcgcgcac gatgcatctg gcaaaagggt atactacctc acccgtgacc
8761 ccaccacccc ccttgcacgg gctgcgtggg agacagctag acacactcca atcaactctt
8821 ggctaggcaa tatcatcatg tatgcgccca ccctatgggc aaggatgatt ctgatgactc
8881 acttttctc catccttcta gctcaagagc aacttgaaaa agccctggat tgtcagatct
8941 acggggcttg ctactccatt gagccacttg acctacctca gatcattgaa cgactccatg
9001 gtcttagcgc atttacactc cacagttact ctccaggtga gatcaatagg gtggcttcat
9061 gcctcaggaa acttggggta ccacccttgc gaacctggag acatcgggcc agaagtgtcc
9121 gcgctaagct actgtcccag gggggggaggg ccgccacttg tggcagatac ctctttaact

도면1e

9181 gggcagtaag gaccaagctt aaactcactc caatcccggc cgcgtcccag ctggacttgt
9241 ctggctggtt cgtcgctggt tacagcgggg gagacatata tcacagcctg tctcgtgccc
9301 gaccccgctg gtttccgttg tgcctactcc tactttctgt aggggtaggc atttacctgc
9361 tccccaaccg atgaacgggg agctaaccac tccaggcctt aagccatttc ctgttttttt
9421 ttttttttt ttttttttt tcttttttt tttctttcct ttccttcttt ttttcctttc
9481 tttttccctt ctttaatggt ggctccatct tagccctagt cacggctagc tgtgaaaggt
9541 ccgtgagccg catgactgca gagagtgctg atactggcct ctctgcagat catgt

도면2

코돈 최적화된 HCV 코어 폴리뉴클레오티드

ATGAGCACCAACCCCAAGCCCCAGCGCAAGACCAAGCGGAACACCAACCGGAGACCCCAGGA
CGTCAAGTTCCCAGGAGGAGGCCAGATCGTGGGCGGCGTGTACCTGCTGCCCCGCCGGGGGC
CCCGGCTGGGCGTGCGCGCCACCCGCAAGACCAGCGAGCGCTCCCAGCCAAGAGGCAGACGC
CAGCCGATCCCGAAGGCCCGCCGCCCTGAGGGCCGGGCTTGGGCCCAGCCAGGCTACCCCTG
GCCCCTGTATGGCAACGAGGGCCTGGGATGGGCTGGGTGGCTCCTCAGCCCCCGGGGGTCTA
GGCCCAGTTGGGGACCGACCGACCCCCGCAGGCGCAGCCGCAACCTGGGAAAGGTGATCGAC
ACGCTCACCTGCGGCTTCGCCGACTTGATGGGATACATCCCTCTGGTGGGGGCCCCTCTGGG
CGGAGCCGCGCGCGCCCTGGCTCACGGGGTCCGGGTGCTCGAGGACGGGGTGAACTACGCCA
CCGGGAACCTGCCCGGCTGCAGCTTCTCCATCTTCCTGCTGGCGCTGCTGAGCTGCCTCACC
ATCCCCGCTAGCGCATGA

도면3

코돈 최적화된 HCV NS3코어 폴리뉴클레오티드

ATGGCCCCCATCACCGCCTACAGCCAGCAGACCCGGGGACTGCTCGGCTGCATCATCACCTC
TCTGACAGGCCGGGATAAGAACCAGGTGGAGGGCGAGGTGCAGGTCGTCTCGACCGCTACCC
AAAGCTTCCTGGCCACCTGTATCAACGGAGTCTGCTGGACGGTGTACCATGGCGCCGGCAGC
AAGACCCTCGCCGGGCCTAAGGGCCCCATCACCCAGATGTACACCAACGTGGACCAGGACCT
GGTGGGCTGGCAGGCGCCCCCCGGGGCGAGGAGTATGACCCCATGCACCTGCGGGAGCTCTG
ACCTGTATCTGGTGACCAGACATGCCGATGTCATCCCGGTGAGGCGTCGCGGGGACAGTAGA
GGGAGCCTGCTGAGCCCCCGCCCCGTCAGCTACCTGAAGGGGTCCGTGGGCGGCCCCCTGCT
GTGCCCCTCTGGCCACGTGGTCGGCATCTTCAGGGCCGCCGTGTGCACGCGCGGCGTGGCCA
AGGCCGTGGACTTTATCCCCGTGGAGAGCATGGAGACCACCATGCGCTCCCCCGTGTTCACC
GACAACAGCAGCCCCCCCGCCGTGCCTCAGACCTTCCAGGTCGCCCACCTCCATGCTCCGAC
GGGCTCCGGGAAGTCCACGAAGGTGCCCGCCGCGTACGCGGCCCAGGGATACAAGGTGCTGG
TCCTCAACCCTAGCGTGGCTGCCACACTCGGGTTTGGAGCGTACATGAGCAAGGCGCACGGC
ATCGACCCCAACATCAGAACTGGCGTCCGGACCATCACAACCGGCGCTCCCATCACTTACTC
TACCTACGGCAAGTTCCTGGCTGATGGGGGGTGTAGTGGGGGCGCGTACGATATTATCATCT
GCCAGGAGTGCCACTCTACCGACAGCACCACAATCCTGGGCATCGGCACCGTCCTCGACCAG
GCTGAGACAGCGGGCGCCCGCCTGGTGGTGCTGGCCACGGCCACTCCCCCCGGCTCCGTCAC
GGTGCCCCACCCCAATATCGAGGAGGTGGCCCTGAGCAACAACGGCGAGATCCCATTCTACG
GCAAGGCTATCCCGATCGAGGCGATTAAGGGAGGCAGACATCTGATCTTCTGCCACAGCAAG
AAGAAGTGCGACGAGCTCGCCGCCAAGCTGAGCGGCCTCGGACTCAACGCCGTGGCTTACTA
CAGGGGACTGGACGTGTCCGTGATCCCGACCAGCGGAGACGTGGTGGTCGTGGCCACCGACG
CCCTGATGACCGGCTTCACCGGAGACTTCGACAGCGTCATCGACTGCAACACCTGCGTGACC
CAGACCGTGGACTTCAGCCTGGACCCCACCTTCACCATCGAGACCACCACAGTGCCCCAGGA
CGCCGTGTCCCGCAGCCAGCGCCGGGGCCGGACCGGCCGCGGCCGGAGTGGCATCTATAGGT
TCGTGACCCCGGGCGAGCGCCCCAGCGGCATGTTCGATAGTTCCGTGCTGTGCGAGTGCTAC
GACGCCGGATGCGCGTGGTACGAGCTGACCCCGGCGGAGACCTCTGTCCGCCTGAGGGCTTA
CTTGAATACCCCGGGCCTGCCCGTGTGCCAGGATCATCTCGAGTTCTGGGAATCCGTCTTCA
CCGGCCTGACACACATCGACGCCCATTTCTTGTCCCAAACCAAGCAGGCTGGCGACAATTTC
CCGTATCTGGTCGCGTACCAGGCCACGGTGTGCGCGCGTGCGCAGGCTCCCCCCCCTAGCTG
GGATCAGATGTGGAAGTGCCTGATCCGCCTGAAGCCCACCCTGCATGGGCCCACCCCCCTGC
TGTACCGCCTGGGCGCGGTGCAGAACGAAGTCACCTTGACCCACCCCATCACCAAGTACATC
ATGGCGTGCATGTCCGCTGACCTGGAGGTGGTCACCTGA

도면4

코돈 최적화된 HCV NS4B 폴리뉴클레오티드

ATGTTTTGGGCCAAGCATATGTGGAACTTCATCAGCGGCATCCAGTACCTCGCCGGGCTGAG
CACCCTCCCGGGCAACCCCGCGATCGCAAGCCTGATGGCGTTCACAGCGAGCATCACCTCCC
CCCTGACTACCCAGAACACACTGCTGTTCAACATCCTGGGGGGCTGGGTCGCCGCTCAGCTG
GCCCCTCCTTCCGCCGCCAGCGCCTTTGTGGGGGCGGGAATCGCCGGGGCCGCCGTCGGCTC
CATCGGACTGGGCAAGGTGCTGGTCGACATCCTGGCGGGCTACGGCGCGGGAGTCGCCGGAG
CCCTGGTGGCCTTCAAGGTGATGAGCGGAGAGGTGCCAAGCACTGAGGACCTGGTGAACCTG
CTGCCGGCGATCCTGAGCCCGGGCGCCCTGGTGGTGGGCGTGGTGTGTGCTGCCATCCTCAG
GCGCCACGTGGGCCCGGGCGAGGGAGCCGTGCAGTGGATGAACCGCCTGATCGCCTTTGCCT
CCCGCGGCAACCACGTCAGCCCTACACATTACGTGCCCGAGAGCGATGCCGCCGCCCGCGTG
ACCCAGATCCTGAGCTCCCTGACCATCACCCAGCTGCTCAAGAGGCTGCACCAGTGGATCAA
CGAGGACTGCTCCACCCCTTGCTGA

도면5

코돈 최적화된 HCV NS5B 폴리뉴클레오티드

ATGTCCATGTCCTACACCTGGACCGGCGCCCTGATCACCCCCTGCGCCGCCGAGGAGAGCAA
GCTCCCGATTAACCCCCTGTCCAACTCTCTGCTCCGCCATCACAACATGGTGTATGCCACCA
CCTCCCGCTCTGCGAGCCTCCGCCAGAAGAAGGTGACGTTCGACAGACTGCAGGTGCTGGAC
GACCATTACAGGGACGTGCTGAAGGAAATGAAGGCCAAGGCTAGCACCGTGAAGGCCAAGCT
GCTCAGCATTGAGGAGGCTTGCAAGCTGACCCCCCCCCCACAGTGCTAAATCCAAGTTCGGCT
ACGGCGCCAAGGACGTGAGGAACCTGTCCTCGCGCGCTGTGAACCATATCCGCAGCGTGTGG
GAGGACCTGCTCGAGGACACCGAGACCCCCATCGACACAACCATCATGGCCAAGTCCGAGGT
GTTCTGCGTGCAGCCGGAGAAAGGAGGCCGCAAGCCAGCCCGCCTGATCGTCTTCCCCGACC
TGGGCGTGAGAGTCTGCGAGAAGATGGCCCTCTACGACGTGGTGTCCACCCTGCCGCAGGCC
GTGATGGGGAGTTCCTACGGCTTCCAGTACAGCCCGAAGCAGAGGGTGGAGTTCCTGGTGAA
CACGTGGAAGTCTAAGAAATGCCCCATGGGGTTCAGTTACGGAACAAGGTGCTTCGGGAGTA
CTGTGACCGAATCCGATATCCGCGTGGAGGAGAGCATCTACCAGTGTTGTGACCTCGCCCCC
GAGGCGAGACAGGCCATCCGCTCCCTGACCGAGAGGCTGTATATCGGCGGCCCACTGACCAA
CAGCAAGGGGCAGAACTGCGGCTATCGCCGTTGTCGGGCCTCCGGGGTGCTCACCACCTCTT
GCGGGAACACCCTCACCTGCTACCTCAAGGCGACCGCTGCCTGCAGAGCCGCGAAGCTGCAG
GACTGCACCATGCTCGTGAACGGCGACGATCTGGTGGTGATCTGTGAGTCCGCGGGCACGCA
GGAGGACGCGGCGGCCCTGCGGGCGTTCACAGAGGCCATGACACGCTACAGTGCCCCCCCCG
GCGACCCCCCCCAGCCCGAATACGATCTGGAGCTCATCACTAGTTGCAGCTCGAACGTGTCT
GTGGCCCATGACGCTTCTGGCAAACGGGTGTATTATCTGACGCGCGATCCCACCACCCCCCT
CGCCAGAGCCGCGTGGGAGACAGCTCGGCACACCCCTGTGAACTCTTGGCTGGGCAACATCA
TCATGTACGCCCCTACCCTGTGGGCTCGCATGATCCTGATGACCCACTTCTTCAGTATCCTC
CTCGCTCAGGAGCAGCTGGAGAAGGCGCTCGACTGCCAGATCTACGGCGCCTGCTATAGTAT
CGAGCCTCTCGACCTGCCCCAGATCATCGAGAGACTGCATGGGCTCAGCGCCTTCTCCCTCC
ATAGTTACTCTCCTGGAGAAATTAACCGGGTGGCGAGCTGTCTGCGGAAGCTCGGCGTCCCC
CCTCTGCGCGTTTGGCGGCATCGCGCCAGGAGTGTGAGGGCCAAGCTGCTGAGCCAGGGCGG
AAGGGCCGCCACCTGCGGCCGGTATCTCTTCAACTGGGCCGTGCGCACCAAGCTCAAGCTCA
CCCCCATCCCTGCCGCCAGTCAGCTGGATCTCAGTGGGTGGTTCGTGGCCGGCTATTCTGGC
GGCGACATCTACCACTCCCTCAGCAGGGCGCGCCCCCGCTGGTTCCCCCTGTGCCTGCTGCT
CCTGAGCGTCGGAGTCGGCATCTACCTGCTGCCCAACCGCTGA

도면6a

HCV J4L6 게놈(야생형 서열)의 번역

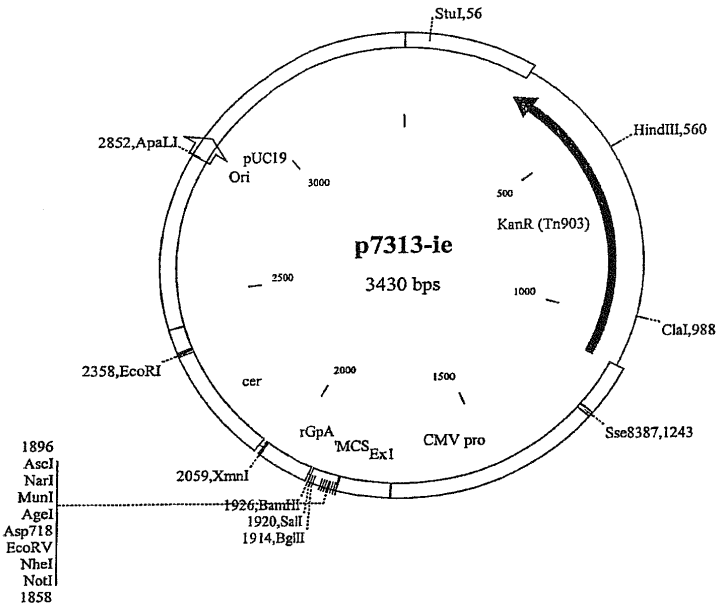
```
   1 MSTNPKPQRK TKRNTNRRPQ DVKFPGGGQI VGGVYLLPRR GPRLGVRATR KASERSQPRG
  61 RRQPIPKARR PEGRAWAQPG YPWPLYGNEG LGWAGWLLSP RGSRPSWGPT DPRRRSRNLG
 121 KVIDTLTCGF ADLMGYIPLV GAPLGGAARA LAHGVRVLED GVNYATGNLP GCSFSIFLLA
 181 LLSCLTIPAS AYEVRNVSGI YHVTNDCSNS SIVYEAADVI MHTPGCVPCV QEGNSSRCWV
 241 ALTPTLAARN ASVPTTTIRR HVDLLVGTAA FCSAMYVGDL CGSIFLVSQL FTFSPRRHET
 301 VQDCNCSIYP GHVSGHRMAW DMMMNWSPTT ALVVSQLLRI PQAVVDMVAG AHWGVLAGLA
 361 YYSMVGNWAK VLIVALLFAG VDGETHTTGR VAGHTTSGFT SLFSSGASQK IQLVNTNGSW
 421 HINRTALNCN DSLQTGFFAA LFYAHKFNSS GCPERMASCR PIDWFAQGWG PITYTKPNSS
 481 DQRPYCWHYA PRPCGVVPAS QVCGPVYCFT PSPVVVGTTD RSGVPTYSWG ENETDVMLLN
 541 NTRPPQGNWF GCTWMNSTGF TKTCGGPPCN IGGVGNRTLI CPTDCFRKHP EATYTKCGSG
 601 PWLTPRCLVD YPYRLWHYPC TLNFSIFKVR MYVGGVEHRL NAACNWTRGE RCNLEDRDRS
 661 ELSPLLLSTT EWQILPCAFT TLPALSTGLI HLHQNIVDVQ YLYGVGSAFV SFAIKWEYIL
 721 LLFLLLADAR VCACLWMMLL IAQAEAALEN LVVLNAASVA GAHGILSFLV FFCAAWYIKG
 781 RLAPGAAYAF YGVWPLLLLL LALPPRAYAL DREMAASCGG AVLVGLVFLT LSPYYKVFLT
 841 RLIWWLQYFI TRAEAHMQVW VPPLNVRGGR DAIILLTCAV HPELIFDITK LLLAILGPLM
 901 VLQAGITRVP YFVRAQGLIR ACMLVRKVAG GHYVQMVFMK LGALTGTYVY NHLTPLRDWA
 961 HAGLRDLAVA VEPVVFSAME TKVITWGADT AACGDIILGL PVSARRGKEI FLGPADSLEG
1021 QGWRLLAPIT AYSQQTRGVL GCIITSLTGR DKNQVEGEVQ VVSTATQSFL ATCINGVCWT
1081 VYHGAGSKTL AGPKGPITQM YTNVDLDLVG WQAPPGARSM TPCSCGSSDL YLVTRHADVI
1141 PVRRRGDSRG SLLSPRPVSY LKGSSGGPLL CPSGHVVGVF RAAVCTRGVA KAVDFIPVES
1201 METTMRSPVF TDNSTPPAVP QTFQVAHLHA PTGSGKSTKV PAAYAAQGYK VLVLNPSVAA
1261 TLGFGAYMSK AHGIDPNIRT GVRTITTGGS ITYSTYGKFL ADGGCSGGAY DIIICDECHS
1321 TDSTTILGIG TVLDQAETAG ARLVVLATAT PPGSVTVPHP NIEEIGLSNN GEIPFYGKAI
1381 PIEAIKGGRH LIFCHSKKKC DELAAKLTGL GLNAVAYYRG LDVSVIPPIG DVVVVATDAL
1441 MTGFTGDFDS VIDCNTCVTQ TVDFSLDPTF TIETTTVPQD AVSRSQRRGR TGRGRSGIYR
1501 FVTPGERPSG MFDSSVLCEC YDAGCAWYEL TPAETSVRLR AYLNTPGLPV CQDHLEFWES
1561 VFTGLTHIDA HFLSQTKQAG DNFPYLVAYQ ATVCARAQAP PPSWDQMWKC LIRLKPTLHG
1621 PTPLLYRLGA VQNEVILTHP ITKYIMACMS ADLEVVTSTW VLVGGVLAAL AAYCLTTGSV
1681 VIVGRIILSG KPAVVPDREV LYQEFDEMEE CASQLPYIEQ GMQLAEQFKQ KALGLLQTAT
1741 KQAEAAAPVV ESKWRALETF WAKHMWNFIS GIQYLAGLST LPGNPAIASL MAFTASITSP
1801 LTTQNTLLFN ILGGWVAAQL APPSAASAFV GAGIAGAAVG SIGLGKVLVD ILAGYGAGVA
1861 GALVAFKVMS GEVPSTEDLV NLLPAILSPG ALVVGVVCAA ILRRHVGPGE GAVQWMNRLI
1921 AFASRGNHVS PTHYVPESDA AARVTQILSS LTITQLLKRL HQWINEDCST PCSGSWLRDV
1981 WDWICTVLTD FKTWLQSKLL PRLPGVPFLS CQRGYKGVWR GDGIMQTTCP CGAQIAGHVK
2041 NGSMRIVGPR TCSNTWHGTF PINAYTTGPC TPSPAPNYSR ALWRVAAEEY VEVTRVGDFH
2101 YVTGMTTDNV KCPCQVPAPE FFTEVDGVRL HRYAPACKPL LREDVTFQVG LNQYLVGSQL
```

도면6b

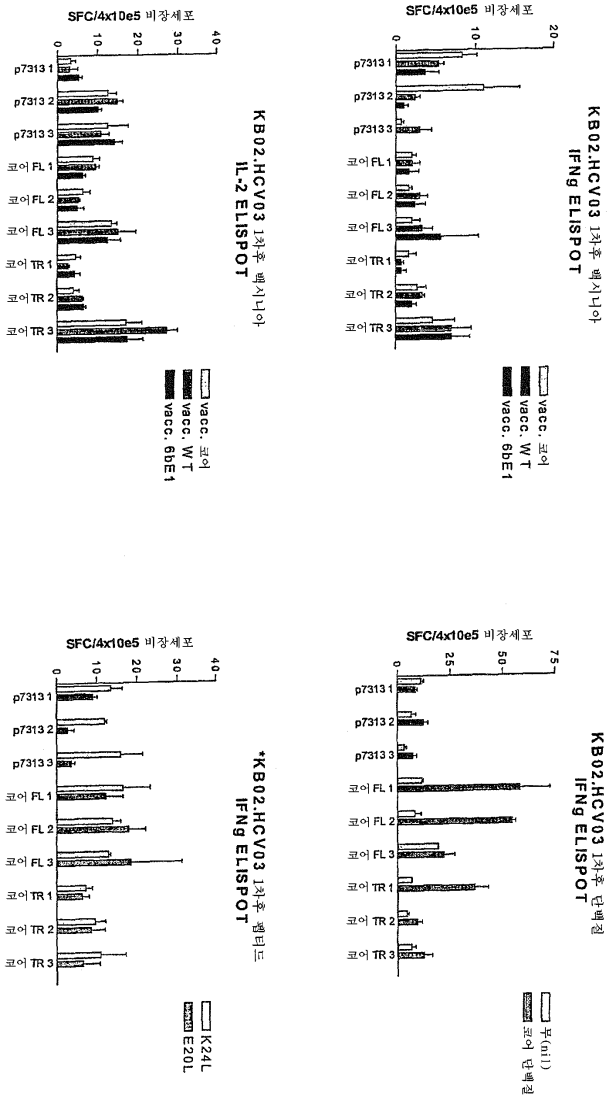
```
2161 PCEPEPDVTV LTSMLTDPSH ITAETAKRRL ARGSPPSLAS SSASQLSAPS LKATCTTHHD
2221 SPDADLIEAN LLWRQEMGGN ITRVESENKV VILDSFEPLH AEGDEREISV AAEILRKSRK
2281 FPSALPIWAR PDYNPPLLES WKDPDYVPPV VHGCPLPPTK APPIPPPRRK RTVVLTESNV
2341 SSALAELATK TFGSSGSSAV DSGTATALPD LASDDGDKGS DVESYSSMPP LEGEPGDPDL
2401 SDGSWSTVSE EASEDVVCCS MSYTWTGALI TPCAAEESKL PINPLSNSLL RHHNMVYATT
2461 SRSASLRQKK VTFDRLQVLD DHYRDVLKEM KAKASTVKAK LLSIEEACKL TPPHSAKSKF
2521 GYGAKDVRNL SSRAVNHIRS VWEDLLEDTE TPIDTTIMAK SEVFCVQPEK GGRKPARLIV
2581 FPDLGVRVCE KMALYDVVST LPQAVMGSSY GFQYSPKQRV EFLVNTWKSK KCPMGFSYDT
2641 RCFDSTVTES DIRVEESIYQ CCDLAPEARQ AIRSLTERLY IGGPLTNSKG QNCGYRRCRA
2701 SGVLTTSCGN TLTCYLKATA ACRAAKLQDC TMLVNGDDLV VICESAGTQE DAAALRAFTE
2761 AMTRYSAPPG DPPQPEYDLE LITSCSSNVS VAHDASGKRV YYLTRDPTTP LARAAWETAR
2821 HTPINSWLGN IIMYAPTLWA RMILMTHFFS ILLAQEQLEK ALDCQIYGAC YSIEPLDLPQ
2881 IIERLHGLSA FTLHSYSPGE INRVASCLRK LGVPPLRTWR HRARSVRAKL LSQGGRAATC
2941 GRYLFNWAVR TKLKLTPIPA ASQLDLSGWF VAGYSGGDIY HSLSRARPRW FPLCLLLLSV
3001 GVGIYLLPNR
```

도면7

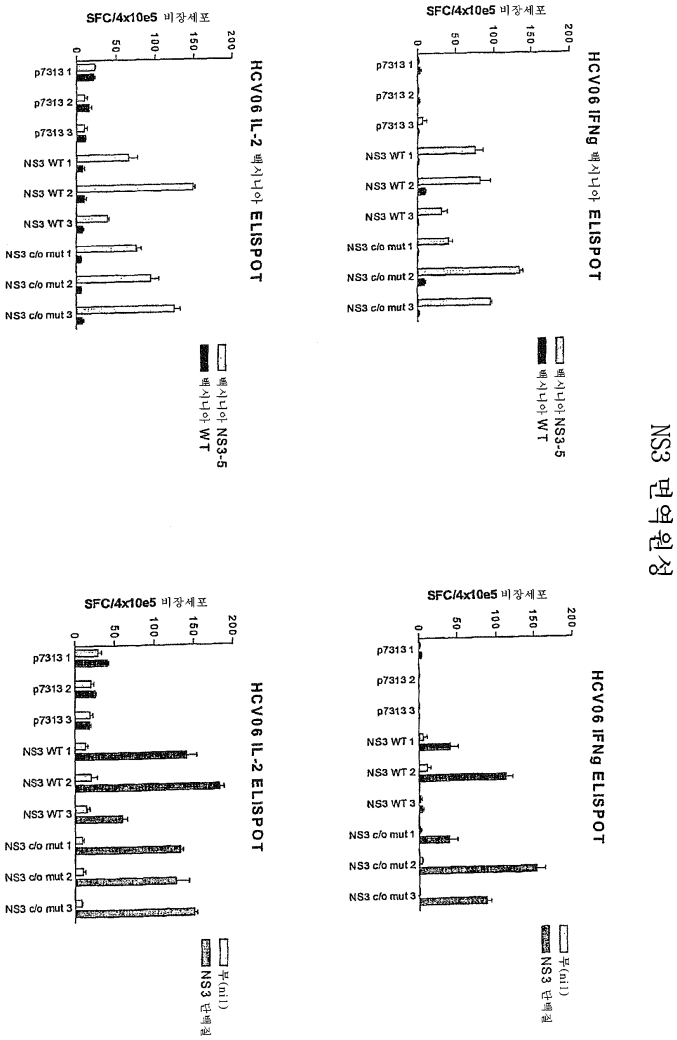
P7313-ie


StuI,56
HindIII,560
ClaI,988
Sse8387,1243
CMV pro
rGpA
MCS
ExI
cer
2358,EcoRI
2852,ApaLI
pUC19
Ori
KanR (Tn903)
p7313-ie
3430 bps
500
1000
1500
2000
2500
3000
1896
AscI
NarI
MunI
AgeI
Asp718
EcoRV
NheI
NotI
1858
2059,XmnI
1926;BamHI
1920,SalI
1914,BglII

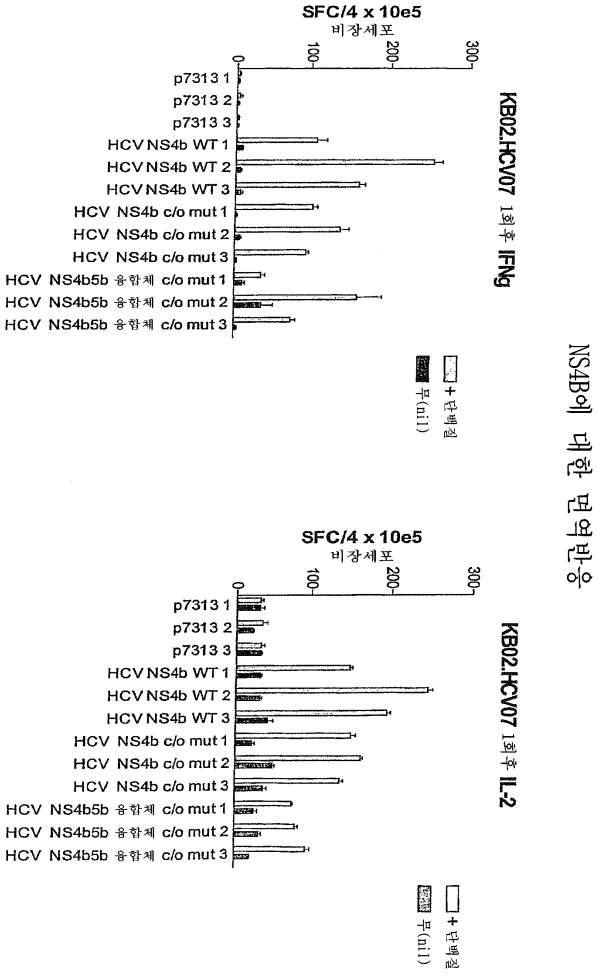
도면8


코어에 대한 면역반응
KB02.HCV03 1차후 백시니아
IFNg ELISPOT
SFC/4x10e5 비장세포
p7313 1
p7313 2
p7313 3
코어 FL 1
코어 FL 2
코어 FL 3
코어 TR 1
코어 TR 2
코어 TR 3
vacc. 코어
vacc. WT
vacc. 6bE1
KB02.HCV03 1차후 백시니아
IL-2 ELISPOT
KB02.HCV03 1차후 단백질
IFNg ELISPOT
무(nil)
코어 단백질
*KB02.HCV03 1차후 펩티드
IFNg ELISPOT
K24L
E20L

도면9

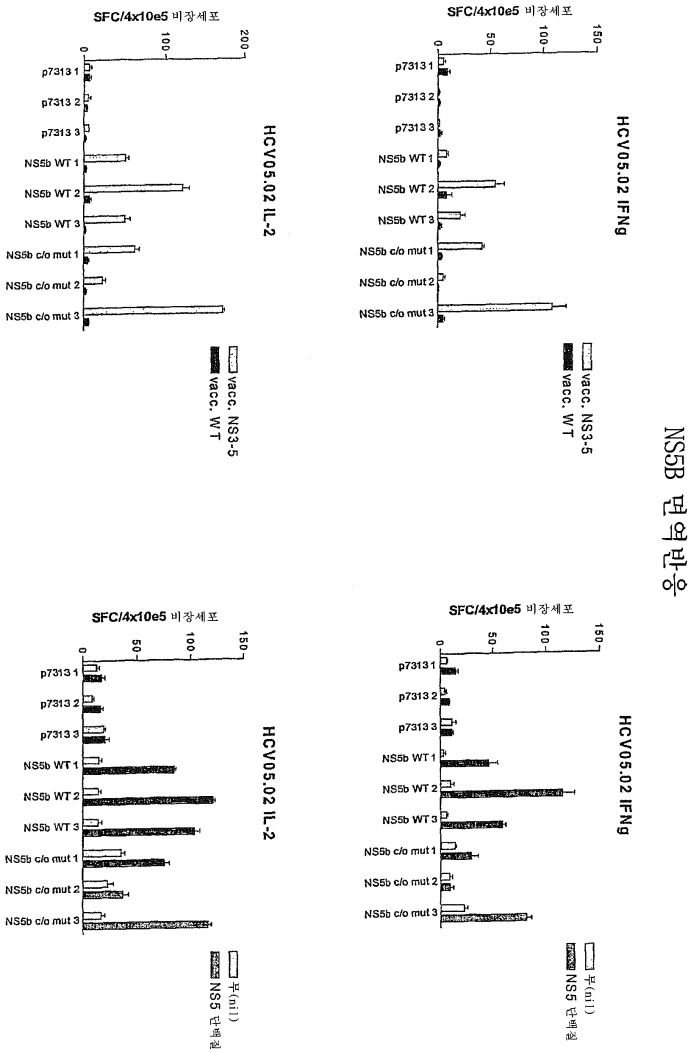

NS3 면역원성
SFC/4x10e5 비장세포
HCV06 IL-2 뽀시너아 ELISPOT
HCV06 IFNg 뽀시너아 ELISPOT
HCV06 IL-2 ELISPOT
HCV06 IFNg ELISPOT
p7313 1
p7313 2
p7313 3
NS3 WT 1
NS3 WT 2
NS3 WT 3
NS3 c/o mut 1
NS3 c/o mut 2
NS3 c/o mut 3
0
50
100
150
200
뽀시너아 WT
뽀시너아 NS3-5
무(nil)
NS3 단백질

도면10



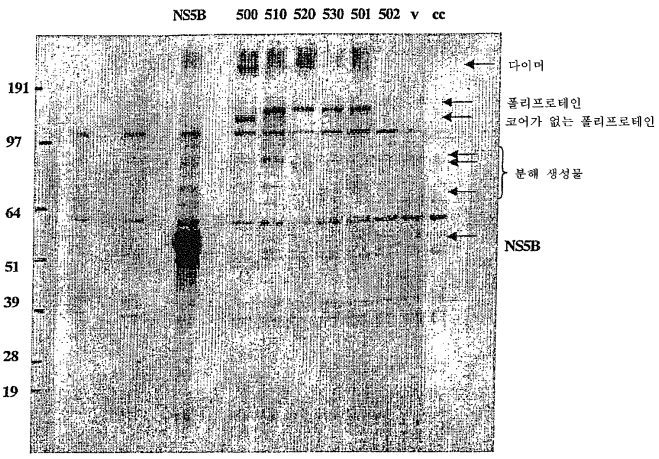
NS4B에 대한 면역반응

도면11

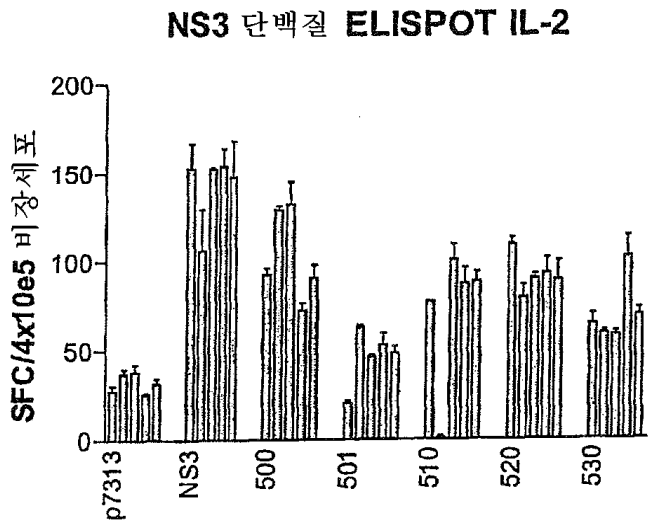


도면12

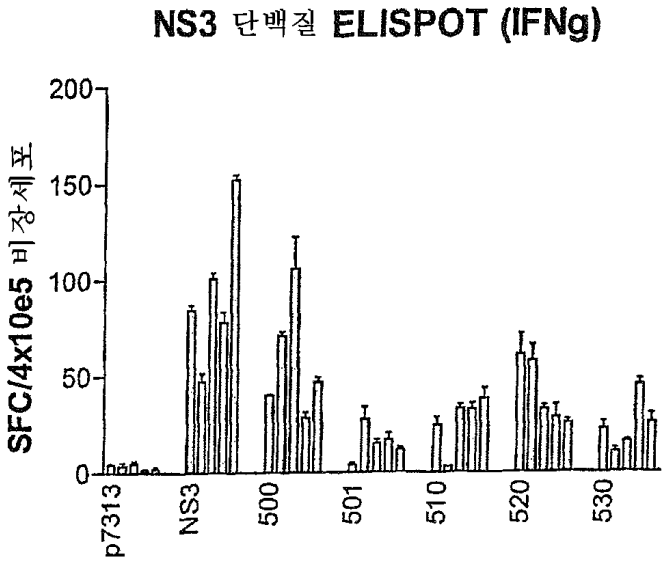
항-HCV NS5B



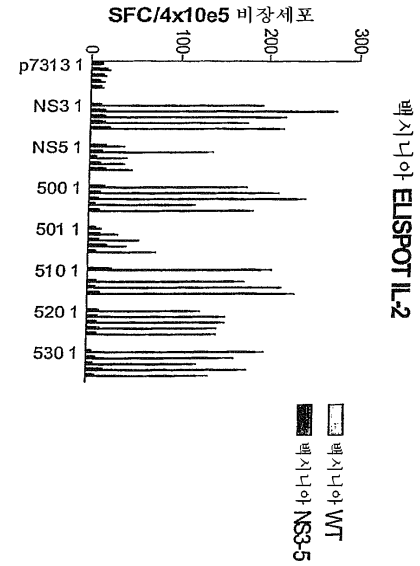
도면13a

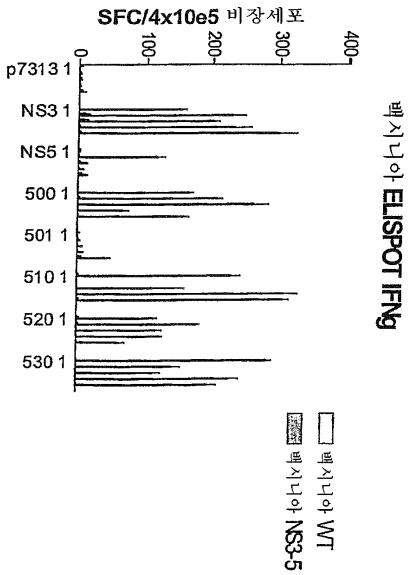

NS3 단백질 ELISPOT IL-2
SFC/4x10e5 비장세포
200
150
100
50
0
p7313
NS3
500
501
510
520
530

도면13b

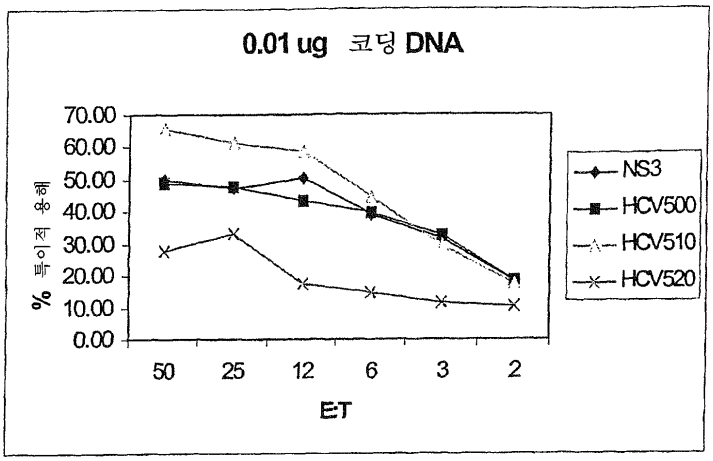

NS3 단백질 ELISPOT (IFNg)
SFC/4x10e5 비장세포
200
150
100
50
0
p7313
NS3
500
501
510
520
530

도면14

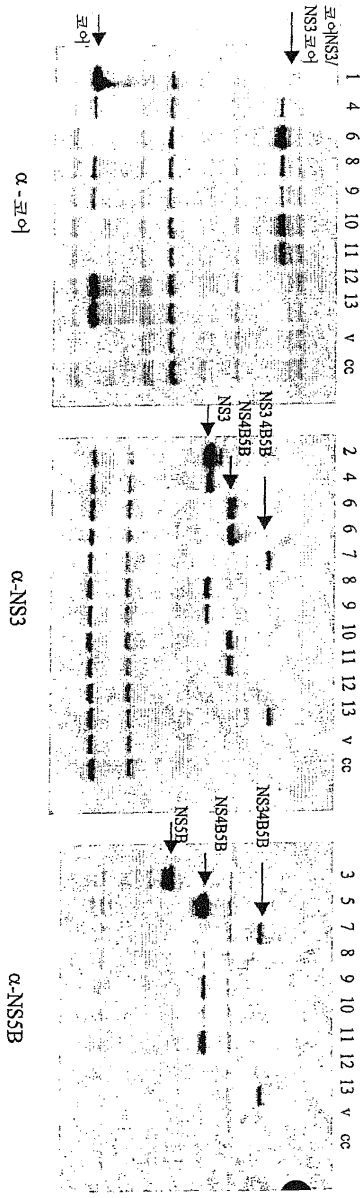

SFC/4x10e5 비장세포
0
100
200
300
p7313 1
NS3 1
NS5 1
500 1
501 1
510 1
520 1
530 1
백시니아 ELISPOT IL-2
백시니아 NS3-5
백시니아 WT


SFC/4x10e5 비장세포
0
100
200
300
400
p7313 1
NS3 1
NS5 1
500 1
501 1
510 1
520 1
530 1
백시니아 ELISPOT IFNg
백시니아 NS3-5
백시니아 WT

도면15

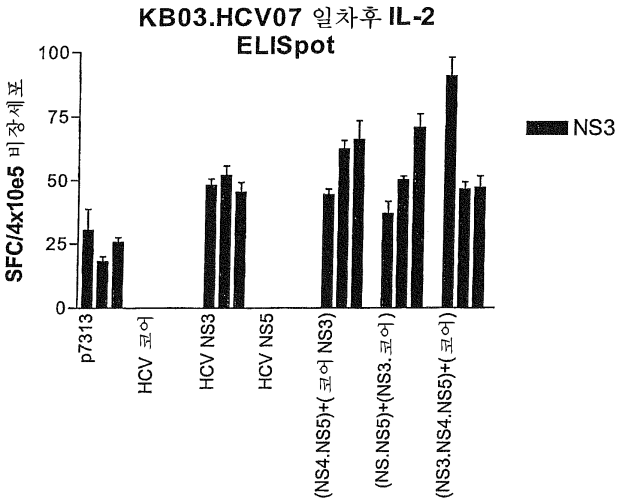

0.01 ug 코딩 DNA
% 특이적 용해
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
50
25
12
6
3
2
E:T
NS3
HCV500
HCV510
HCV520

도면16

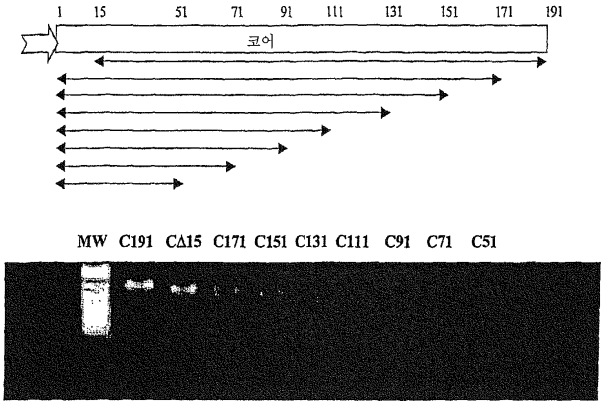

α-코어
α-NS3
α-NS5B
코어NS3/
NS3코어
코어
NS3 4B5B
NS4B5B
NS3
NS34B5B
NS4B5B
NS5B
1 4 6 8 9 10 11 12 13 v cc
2 4 6 6 7 8 9 10 11 12 13 v cc
3 5 7 8 9 10 11 12 13 v cc

도면17

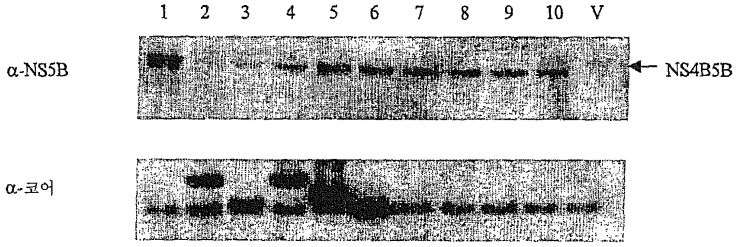
이중 프로모터 작제물에 의해 유도된 NS3 T세포 반응의 비교



도면18

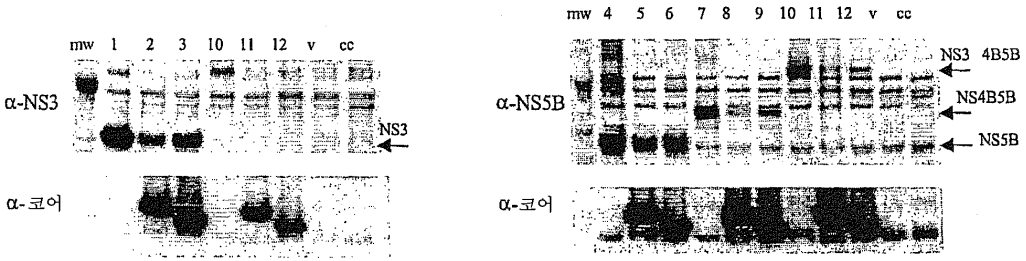


도면19



도면20

293T 세포내의 코-트랜스펙션 후의 NS3, NS5B, NS4B5B
및 NS34B5B의 발현에 대한 코어 및 코어$_{151}$의 효과

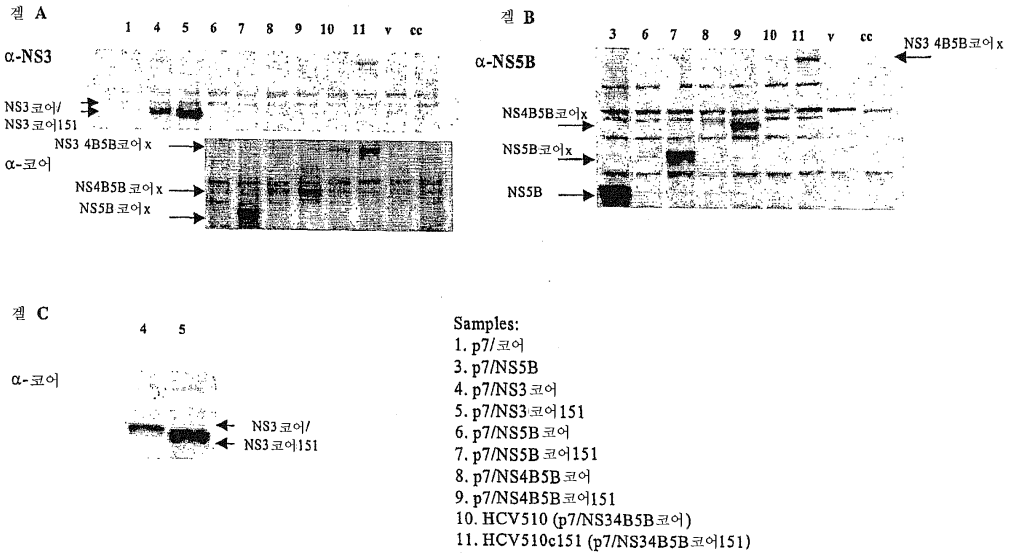


샘플:

1. p7/NS3 + v
2. p7/NS3 + p7/코어
3. p7/NS3 + p7/코어 151
4. p7/NS5B + v
5. p7/NS5B + p7/코어
6. p7/NS5B + p7/코어 151
7. p7/NS4B5B + v
8. p7/NS4B5B + p7/코어
9. p7/NS4B5B + p7/코어 151
10. p7/NS34B5B + v
11. p7/NS34B5B + p7/코어
12. p7/NS34B5B + p7/코어 151

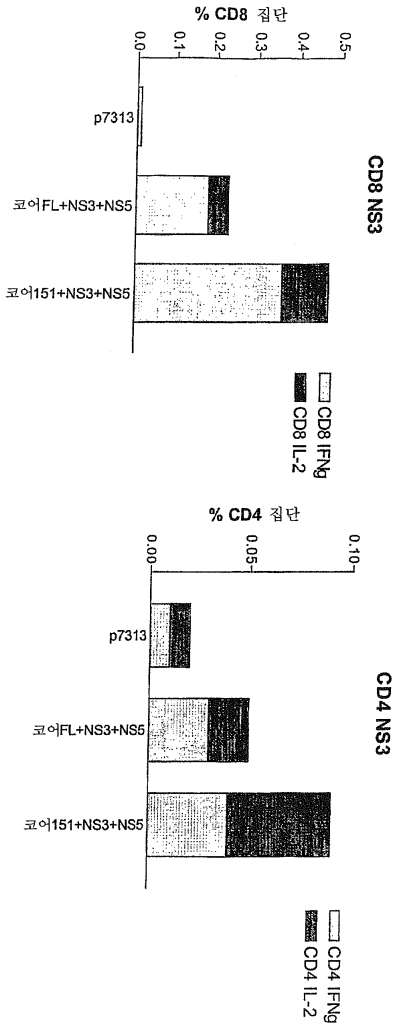
도면21

293T 세포의 일시적 트랜스펙션에서 코어$_{191}$을 코어$_{151}$로
치환한 후의 융합 단백질의 발현에 대한 효과

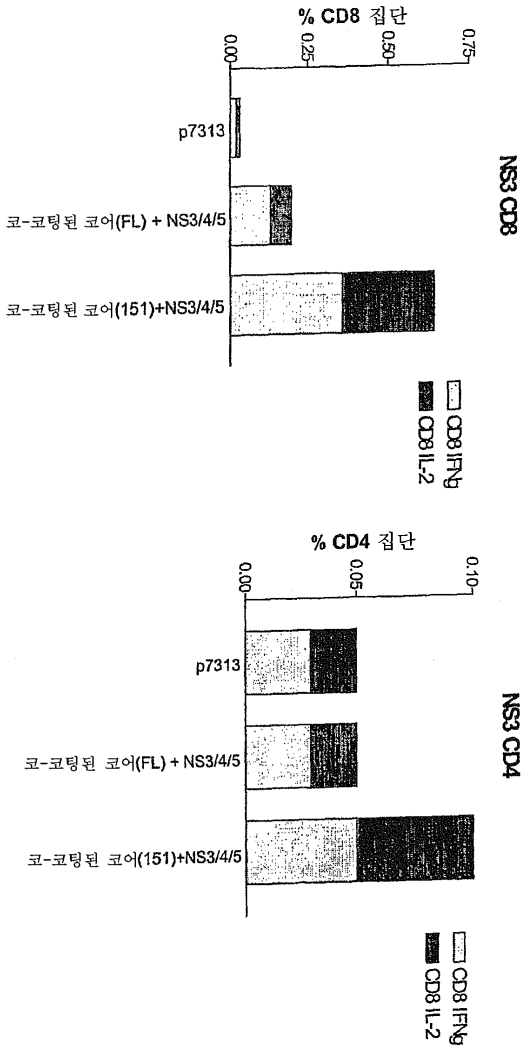


Samples:
1. p7/코어
3. p7/NS5B
4. p7/NS3 코어
5. p7/NS3코어151
6. p7/NS5B 코어
7. p7/NS5B 코어151
8. p7/NS4B5B 코어
9. p7/NS4B5B코어151
10. HCV510 (p7/NS34B5B코어)
11. HCV510c151 (p7/NS34B5B코어151)

도면22


% CD8 집단
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
p7313
코어FL+NS3+NS5
코어151+NS3+NS5
CD8 NS3
CD8 IFNg
CD8 IL-2
% CD4 집단
0.00
0.05
0.10
p7313
코어FL+NS3+NS5
코어151+NS3+NS5
CD4 NS3
CD4 IFNg
CD4 IL-2

도면23


% CD8 집단
0.00
0.25
0.50
0.75
p7313
코-코팅된 코어(FL) + NS3/4/5
코-코팅된 코어(151)+NS3/4/5
NS3 CD8
CD8 IFNg
CD8 IL-2
% CD4 집단
0.00
0.05
0.10
p7313
코-코팅된 코어(FL) + NS3/4/5
코-코팅된 코어(151)+NS3/4/5
NS3 CD4
CD8 IFNg
CD8 IL-2