(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C07K 15/04
A61K 39/29

(45) 공고일자 1999년04월01일
(11) 등록번호 특0185426
(24) 등록일자 1998년12월24일

| | | | |
|---|---|---|---|
| (21) 출원번호 | 특1993-704022 | (65) 공개번호 | 특1994-701408 |
| (22) 출원일자 | 1993년12월24일 | (43) 공개일자 | 1994년05월28일 |
| (86) 국제출원번호 | PCT/US 92/05388 | (87) 국제공개번호 | WO 93/00365 |
| (86) 국제출원일자 | 1992년06월24일 | (87) 국제공개일자 | 1993년01월07일 |
| (81) 지정국 | EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 및 리히텐스타인 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 이탈리아 룩셈브르크 네덜란드 스웨덴 그리스 모나코<br>국내특허 : 호주 불가리아 캐나다 핀란드 헝가리 일본 폴란드 대한민국 노르웨이 루마니아 러시아 | | |
| (30) 우선권주장 | 722,489 1991년06월24일 미국(US) | | |

(73) 특허권자 카이론 코오퍼레이션 로버트 피. 블랙버언
미합중국 캘리포니아 94608 에머리빌리 호르톤 스트리트 4560
(72) 발명자 데이비드 와이. 치엔
미합중국 캘리포니아 94507 알라모 더글라스 코트 1121
윌리암 러터
미합중국 캘리포니아 94131 샌프란시스코 에버손 스트리트 80
(74) 대리인 장용식, 정진상

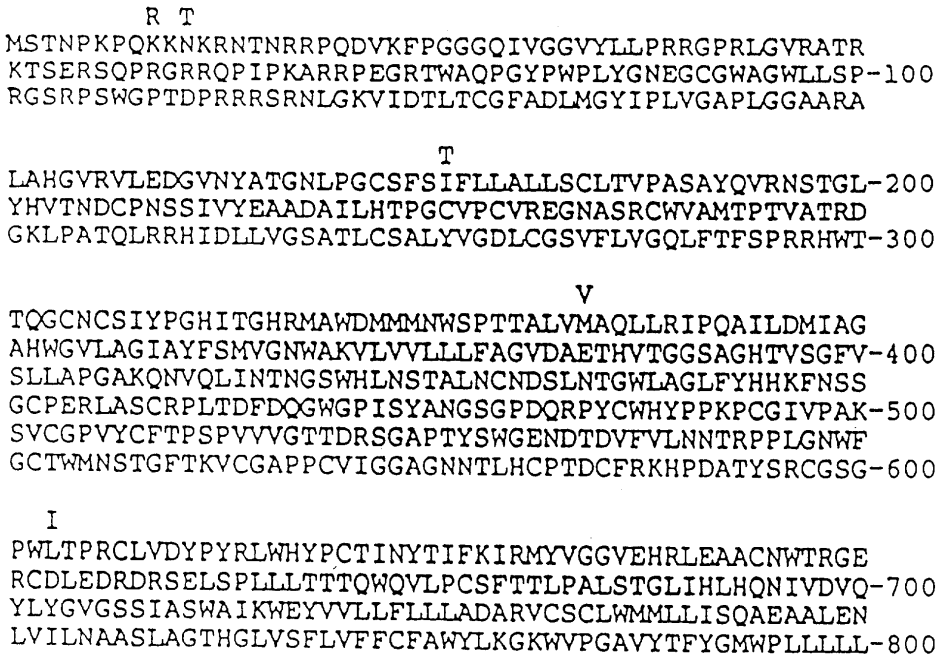
*심사관 : 손민*

# (54) 씨형 간염 바이러스 폴리펩티드

## 요약

면역원성 시약으로서 유용한 HCV에피토프, 및 대응하는 항체와 사용방법이 개시되었다.

## 대표도




## 명세서

[발명의 명칭]

C형 간염바이러스(HCV) 폴리펩티드

[도면의 간단한 설명]

제1도는 HCV원형 분리물 HCV1의 폴리단백질을 나타낸다.

제2도는 HCV1의 혼성 cDNA서열을 나타낸다.

제3도는 인간 분리물 23의 뉴클레오티드 콘센서스(consensus)서열을 나타내고, 변체서열은 서열라인 밑에서 보여진다. 콘센서스 서열에서 암호화된 아미노산도 또한 보여진다.

제4도는 인간 분리물 27의 뉴클레오티드 콘센서스 서열을 나타내고, 변체서열은 서열라인 밑에서 보여진다. 콘센서스 서열에서 암호화된 아미노산도 또한 보여진다.

제5도는 인간분리물 23 및 27의 그리고 HCV1의 정렬된 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 상동 서열은 기호(*)에 의해 표시된다. 비-상동서열은 소문자이다.

제6도는 인간분리물 23 및 27의 그리고 HCV1의 정렬된 아미노산 서열을 나타낸다.

상동 서열은 기호(*)에 의해 표시된다. 비-상동서열은 소문자이다.

제7도는 분리물 Thorn, EC1, HCT #18, 및 HCV1의 혼성 정렬 뉴클레오티드 서열의 비교를 나타낸다.

제8도는 EC10의 뉴클레오티드 서열과 HCV1의 서열의 혼성물의 비교를 나타낸다. ; EC10서열은 점 위의 라인에 있고 HCV1 서열은 점 아래의 라인에 있다.

제9도는 인간 분리물 HCT#18, JH23, JH27, Thorne, EC1의, 그리고 HCV1의 콘센서스 서열의 EnvL 부위에서 암호화된 아미노산 서열 117-308(HCV1에 비하여)의 비교를 나타낸다.

제10도는 인간분리물 HCT #18, JH23, JH27, Thorne, EC1의, 그리고 HCV1의 콘센서스 서열의 EnvR 부위에서 암호화된 아미노산서열 330-360(HCV1에 비하여)의 비교를 나타낸다.

[발명의 상세한 설명]

[기술분야]

본 발명은 C형 간염 바이러스(HCV)감염의 만연을 처리하기 위한 물질 및 방법에 관한 것이다. 더 특이적으로는, 그것은 HCV감염의 검출, 예방 및 치료에서 면역학적 시약으로서 유용한 폴리펩티드에 관한 것이다.

[배경]

HCV는 Houghton 등에 의해 비-A형, 비-B형간염(NANBH)의 원인으로서 먼저 밝혀지고 특정화되었다. 이것은 면역학적 시약으로서 유용한 많은 일반적인 그리고 특이적인 폴리펩티드의 개시로 이끌었다. 예컨대 Houghton 등, EPO Pub. No. 318, 216; Houghton 등, EPO Pub. No. 388, 232; Choo등, Science(1989) 244 : 359-362 ; Kuo등, Science(1989) 244 : 362-364; Houghton등, Hepatology(1991)14 : 381-388 참조. 이러한 공표물은 당업계에 일반적으로 HCV에 대한 광범위한 배경을 제공하며, 뿐만 아니라 HCV 폴리펩티드 면역학적 시약의 제조와 용도를 제공한다. 따라서 간결성을 위해 특히 이 공표물의 개시내용이 참고문헌으로 여기에 통합되었다.

다른 사람들은 Houghton등의 연구를 용이하게 응용하고 확장하였다. 예컨대 Highfield 등, UK Pat. App. 2,239,245(The Wellcome Foundation Ltd.); Wang, EPO Pub. No 442, 394(United Biomedical Inc.); Leung 등, EPO Pub, No. 445,423(Abbott Laboratories); Habits 등, EPO Pub No. 451,891(Akzo N.V.) ;Reyes등, PCT Pub. No WO91/15516(Genelabs Inc.); Maki등, EPO Pub. No. 468,657(Tonen Corp.); 및 Kamada 등, EPO Pub. No. 469,348(Shionogi Seiyaku K.K)참조.

HCV의 운반체 및 HCV-오염된 혈액 또는 혈액산물을 스크리닝하고 확인하기 위한 민감하고 특이적인 방법은 의약의 중요한 진보이다. 수혈후 간염(PTH)은 수혈환자의 대략 10%에서 발생하며, HCV는 이러한 경우의 90%까지를 설명하였다.

이 질병의 주요문제점은 만성간질환으로의 빈번한 진행이다(25-55%). 환자간호 뿐만 아니라 혈액과 혈액산물에 의한 또는 밀접한 개인간의 접촉에 의한 HCV전염의 예방은 HCV에 관련된 항체를 검출하는데 HCV 폴리펩티드 따위의 믿을만한 진단 및 예후 도구를 필요로 한다. 그러한 폴리펩티드는 또한 질병의 예방 및/ 또는 치료에 대한 백신 및 면역요법 치료제로서 유용하다.

HCV는 비교적 새로운 병원체이기 때문에, 질병의 임상과정 및 개체군 내의 HCV의 역학에 대한 추가의 연구를 허용할 부가적인 면역학적 시약을 정의할 계속적인 필요가 존재한다

[발명의 개시]

본 발명은 새로운 HCV 에피토프의 특정화에 관련된다.

이 에피토프의 특정화는 HCV에 대한 항체와 면역학적으로 반응하는 폴리펩티드 산물의 제조를 허용하고 및/또는 생체내에서 항-HCV 항체생성을 일으킨다. 이 폴리펩티드 산물은 진단 테스트에서 표준물 또는 시약으로서 및/ 또는 백신의 성분으로서 유용하다. 이 폴리펩티드 서열내에 포함된 HCV 에피토프에 대해 향하여진 예컨대 폴리클로날 및 모노클로날을 포함하는 항체는 또한 예컨대 진단테스트에서 치료제로서, 항바이러스제의 스크리닝을 위한 및 HCV 폴리펩티드 또는 입자의 분리/ 정제를 위한 유용한 시약이다.

가장 넓은 의미로는, 본 발명은 여기서 개시된 새로 특정화된 HCV 에피토프를 포함하는 폴리펩티드, 그러한 폴리펩티드의 제조방법(예컨대 제조합 및 합성방법). 그러한 폴리펩티드의 사용방법(예컨대 진단, 백신, 및 치료), 그러한 용도에 적용된 조성물 또는 제조물의 제조물품(예컨대, 면역검사 또는 다른 지지체에 고정된 폴리펩티드, 경구 또는 주사가능 제약조성물)에 관한 것이다. 유사하게, 여기서 개시된 HCV 에

피토프에 대한 항체(폴리클로날, 모노클로날, 또는 결합 단편, 단일-체인 항원- 결합단백질 등과 같은 등가물)도 또한 본 발명의 영역내에 포함되고, 뿐만 아니라 그러한 항체의 제조방법, 그러한 항체의 사용방법(예컨대 진단, 백신, 및 치료), 및 그러한 용도에 적용된 조성물 또는 제조물의 제조물품(예컨대, 면역검사 또는 다른 지지체에 고정된 항체, 경구 또는 주사가능 제약조성물)도 본 발명의 영역내에 포함된다.

본 발명의 다른 면은 상기의 항체를 적합한 용기내에 포함하는 HCV 항원의 존재에 대해서 샘플을 분석하기 위한 키트에 관한 것이다.

본 발명의 또 다른 면은 상기에서 기술한 폴리펩티드를 적합한 용기내에 포함하는 HCV 항원에 대해 향하여진 항체의 존재에 대해서 샘플을 분석하기 위한 키트에 관한 것이다.

본 발명의 또 다른 면은 다음과 같다 : HCV 에피토프를 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함하는 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포를 상기 폴리펩티드의 발현을 허용하는 조건하에서 배양하는 것으로 이루어지는 새로 개시한 HCV 에피토프를 포함하는 폴리펩티드의 제조방법; 및 이 방법에 의해 제조된 그러한 HCV 에피토프를 포함하는 폴리펩티드.

면역검사도 또한 본 발명내에 포함된다. 이것은 항원- 항체 복합체의 형성을 허용하는 조건하에서 HCV 항원을 포함하는 것으로 추정되는 샘플을 상기에서 기술한 항체와 배양하고, 항체를 포함하는 항원- 항체 복합체를 검출하는 것으로 이루어지는 HCV 항원의 검출을 위한 면역검사를 포함한다. 항-HCV 항체를 검출하기 위한 면역검사는 항체-항원 복합체의 형성을 허용하는 조건하에서 항-HCV 항체를 포함하는 것으로 추정되는 샘플을 상기에서 기술한 폴리펩티드와 배양하고, 폴리펩티드를 포함하는 항체-항원 복합체를 검출하는 것으로 이루어진다.

여기서 기술된 HCV 에피토프를 포함하는 면역원성 펩티드를 함유하는 HCV 감염의 치료를 위한 백신도 또한 본 발명내에 포함된다.

본 발명의 또 다른면은 여기서 기술된 HCV 에피토프를 포함하는 분리한 면역원성 폴피펩티드를 면역반응을 생성하는데 충분한 양으로 개체에 투여하는 것으로 이루어지는 HCV의 항체의 생성방법이다.

본 발명의 상기의 면들은 하기의 식의 HCV 에피토프의 발견에 의하여 수행된다.

$$aa_x\text{-}aa_y$$

여기서 aa는 아미노산을 나타내고; x및 y는 y-x≥6인 정수이고; $aa_x\text{-}aa_y$ 는 제1도의 아미노산 서열의 일부분을 나타내고; 및 x는 23-34, 36, 66-79, 81-94, 96-98, 101-103, 186-189, 191, 206, 223, 232, 256, 286, 297-299, 321, 347, 357, 413, 414, 432, 465-471, 480-484, 501, 502, 521, 540-549, 579, 594-599, 601-613, 641, 662-665, 685, 705, 706, 729, 782-789, 801, 851-855, 893, 916, 928, 946, 952-954, 1026, 1072, 1109, 1112-1117, 1218, 1240, 1280-1285, 1322, 1338, 1371, 1384, 1410, 1411, 1454, 1492, 1493, 1532-1535, 1560, 1561, 1566-1568, 1571-1577, 1601-1607, 1615-1620, 1655, 1695, 1710-1712, 1728, 1729, 1758-1762, 1781, 1808, 1821, 1851, 1880, 1908-1913, 1925, 1940-1948, 1951, 1966-1969, 1999, 2001-2004, 2006-2014, 2024, 2048-2053, 2055-2057, 2071, 2088-2093, 2108, 2122-2148, 2165, 2187, 2226-2232, 2244-2249, 2267, 2281-2286, 2288, 2289, 2325-2327, 2346, 2347, 2349, 2382, 2401, 2417-2422, 2439-2444, 2446-2456, 2469, 2471-2476, 2495, 2533, 2534, 2573-2578, 2602-2604, 2606-2612, 2632-2638, 2660, 2676-2679, 2688-2693, 2707, 2721, 2757-2762, 2779, 2794, 2795, 2797-2799, 2801, 2802, 2817-2843, 2863-2867, 2878-2884, 2886-2895

로 구성되는 군으로부터 선택된다.

상기의 목적은 또한 하기의 식의 HCV 에피토프를 이용하여 얻어진다.

$$aa_x\text{-}aa_y$$

여기서 aa는 아미노산을 나타내고; x및 y는 y-x≥6인 정수이고; $aa_x\text{-}aa_y$ 는 제1도의 아미노산 서열의 일부분을 나타내고; 및 x는 35(y는 45보다 더 작다), 80(y는 90 보다 더 작다), 95(y는 110보다 더 작다), 99(y는 120보다 더 작다), 100(y는 150보다 더 작다), 190(y는 210보다 더 작다), 500(y는 550보다 더 작다), 600(y는 625보다 더 작다), 1260(y는 1280보다 더 작다), 1569(y는 1931보다 더 작다), 1570(y는

1590보다 더 작다), 1694(y는 1735보다 더 작다), 1949(y는 2124보다 더 작다), 1950(y는 1985보다 더 작다), 2000(y는 2050보다 더 작다), 2005(y는 2025보다 더 작다), 2054(y는 2223보다 더 작다), 2250(y는 2330보다 더 작다), 2287(y는 2385보다 더 작다), 2290(y는 2310보다 더 작다), 2345(y는 2375보다 더 작다), 2348(y는 2464보다 더 작다), 2445(y는 2475보다 더 작다), 2470(y는 2490보다 더 작다), 2605(y는 2620보다 더 작다), 2780(y는 2830보다 더 작다), 2796(y는 2886보다 더 작다), 2800(y는 2850보다 더 작다), 2885(y는 2905보다 더 작다)로 구성되는 군으로부터 선택된다.

상기 식의 어느 쪽에서, x-y는 본 발명의 어떤 구체예에서 10, 20, 30, 40또는 50보다 더 작을 수 있고 또는 같을 수도 있다.

[발명을 수행하는 방식]

여기서 언급한 간행물의 완전한 인용이 배경 또는 참고문헌목록 섹션에서 발견될 수 있다.

Ⅰ. 정의

C형 간염바이러스 또는 HCV는 그것의 병원성 균주가 NANBH를 일으키는 당업계에서 인정된 바이러스 종, 및 그것으로부터 유도된 감독(減毒)균주 또는 결손 방해입자를 나타낸다. 배경섹션에서 인용된 간행물을 일반적으로 참조한다. HCV 게놈은 RNA로 이루어진다. RNA 함유 바이러스는 비교적 높은 자연발생 돌연변이율, 즉 전하는 바에 의하면 삽입 뉴클레오티드 당 $10_{-3}$내지 $10_{-4}$크기의 자연발생 돌연변이율 을 가진다는 것이 알려져 있다(Fields knipe(1986)). 따라서 유전형의 이종성과 유동성이 RNA 바이러스에서는 본질적이기 때문에, HCV종내에서는 병원성이거나 비병원성일 수 있는 다수의 균주/ 분리물이 있다. 다양한 HCV 균주 또는 분리물의 증식, 식별, 검출, 및 분리는 문헌에서 잘 기록되어 있다. 더욱, 여기서의 개시내용은 다양한 균주/분리물에 대한 진단물 및 백신의 제조, 뿐만 아니라 HCV의 복제를 억제하는 약제 따위의, 제약용도를 위한 항-바이러스제의 스크리닝 방법에서 유용성을 갖는 조성물 및 방법을 허용한다.

HCV의 몇가지 다른 균주/분리물에 대한 정보가 여기서 개시되었는데, 특히 균주 또는 분리물CDC/HCV1(또한 HCV1이라고 불리움)이 개시되었다. 부분 게놈 또는 아미노산서열 따위의, 한 균주 또는 분리물로부터의 정보는 당업자들이 표준기술을 이용하여 새로운 균주/분리물을 분리하고 그러한 새로운 균주/분리물이 HCV인지를 확인하도록 하는데 충분하다. 예컨대, 몇가지 다른 균주/ 분리물이 하기에서 기술된다. 많은 인간 혈청으로 부터 (및 다른 지리적지역으로부터)얻어진 이 균주는 HCV1의 게놈서열의 정보를 이용하여 분리되었다.

여기서 제공된 정보는 HCV가 플라비비리대(flaviviridae)와 멀리 연관될 수 있다는 것을 나타낸다. 플라비바이러스과(Flavivirus family)는 인간의 작은, 포피 병원체인 다수의 바이러스를 포함한다. 플라비바이러스 입자의 형태와 조성은 공지되었고 Brinton(1986)에서 논의되었다. 일반적으로 형태에 관해서는 플라비바이러스가 지질 이층구조체에 의해 둘러싸인 중앙의 뉴클레오캡시드를 포함한다. 비리온은 구형이며 약 40-50㎚의 직경을 가진다. 이것의 코어는 직경이 약 25-30㎚이다. 비리온 엔벨로프의 외부표면을 따라 직경이 약 2㎚인 말단 혹을 갖는 약 5-10㎚길이인 돌출부가 있다. 이 과의 전형적인 실례는 황열바이러스, 웨스트나일바이러스(WestNile Virus), 및 뎅그열 바이러스를 포함한다. 그것들은 HCV의 것보다 다소 더 크며 약 3500 아미노산의 폴리단백질 전구물질을 암호화하는 포지티브-가닥 RNA게놈(~11,000 뉴클레오티드)을 갖는다. 이 전구물질 폴리펩티드로부터 개별적인 바이러스 단백질이 절단된다.

HCV게놈 RNA의 게놈구조와 뉴클레오티드 서열이 추론되었다.

이 게놈은 ~10,000뉴클레오티드를 포함하는 단일가닥 RNA인것 같다.

이 게놈은 포지티브-가닥이며, 약 3,000 아미노산의 폴리단백질을 암호화하는 연속적인 번역의 오픈리딩 프레임(ORF)을 갖는다.

ORF에서 구조단백질(들)은 N-말단부위의 대략 처음1/4에서 암호화되는 것 같고, 폴리단백질의 대부분은 비-구조단백질에 대한 것이다. 모든 공지된 바이러스서열과 비교했을 때, 작지만 중요한 동일선형 상동관계가 플라비바이러스과의 비-구조단백질과, 및 페스티바이러스(현재 또한 플라비바이러스과의 부분이라고 생각된다)와 관찰된다.

HCV1의 뉴클레오티드 서열내에 암호화된 추정아미노산 및 다른 증거에 근거하여, 암호화된 HCV 폴리단백질의 가능한 단백질 도메인(domain), 뿐만 아니라 대략적인 경계는 하기와 같다:

| 추정도메인 | 대략적인 경계 (아미노산번호) |
|---|---|
| C( 뉴클레오캡시드 단백질 ) | 1-191 |
| $E_1$ ( 비리온엔벨로프 단백질) | 192-383 |
| $E_2$/NS1( 엔벨로프? ) | 384-800 |
| NS2( 미지의 기능 ) | 800-1050 |
| NS3( 프로테아제? ) | 1050-1650 |
| NS4( 미지의 기능 ) | 1651-2100 |
| NS5( 중합효소 ) | 2100-3011(말단) |

그러나, 이 도메인은 임시적이다. 예컨대 E1-NS2 경계는 아마도 750-810 부위내이고 NS3-NS4 경계는 약 1640-1650이다. 또한 C의 191aa형은 추가로 프로세싱되는 (예컨대, 길이에 있어 약 170aa로) 전구물질이며, NS2, NS4및 NS5 단백질은 각각 추가로 두개의 완전한 단백질로 프로세싱된다는 증거가 있다.

HCV의 다른 균주, 분리물 또는 서브타입은 HCV1과 비교했을 때 아미노산 및 핵산에서 변이를 포함하는 것이 기대된다. 많은 분리물은 HCV1과 비교했을 때 전체 아미노산 서열에서 많은 (즉, 약 40%이상)상동관계를 보이는 것으로 기대된다. 그러나 또한 다른 보다 더 적은 상동 관계의 HCV분리물이 있는 것이 발견될 수 있다. 이것은 예컨대 HCV1의 것과 크기가 유사한 폴리단백질, HCV1의 것과 유사한 소수성 및/또는 항원성 성질의 암호화된 폴리단백질을 암호화하는 대략 9,000뉴클레오티드 내지 대략 12,000 뉴클레오티드의 ORF, 및 HCV1과 보존되는 동일선형 펩티드 서열의 존재 따위의 다양한 기준에 따라 HCV로서 정의될 것이다. 부가적으로, 게놈은 포지티브-가닥 RNA일 것이다.

HCV는 HCV1 폴리단백질의 에피토프와 면역학적으로 식별할 수 있는 적어도 하나의 에피토프를 암호화한다. 에피토프는 이전에 공지된 플라비바이러스와 비교했을 때 HCV에 특유하다. 에피토프의 유일성은 항-HCV항체와의 면역학적 반응성 및 공지된 플라비바이러스종에 대한 항체와의 면역학적 반응성의 결핍에 의하여 결정될 수 있다. 면역학적 반응성을 결정하는 방법은 예컨대 방사성 면역검사에 의하여, ELISA검사에 의하여, 혈구응집 반응에 의하여 당업계에서 공지되었고, 적당한 검사기술의 몇가지 실례가 여기서 제공되었다. 또한, HCV 에피토프서열의 플라비바이러스과에 속하는 것들의 이전에 공지된 서열과의 비교는 유일성을 평가하는데 이용할 수 있다.

상기 이외에도 핵산 상동성 및 아미노산 상동성의 하기의 변수들이 균주/분리물을 HCV로서 확인하는데 단독으로 또는 조합으로 적용될 수 있다. HCV균주와 분리물은 진화적으로 연관되기 때문에, 뉴클레오티드 수준에서의 게놈의 전체 상동성은 약 10% 또는 더 클것이고, 아마도 약 40% 또는 더 클것이고, 아마도 약 60% 또는 더 클것이고, 훨씬 더 아마도 약 80% 또는 더 클것이며, 부가적으로 적어도 약 13뉴클레오티드의 대응하는 인접하는 서열이 있을 것으로 기대된다. HCV 게놈내의 변이성 및 초변이성부위; 따라서 이 부위에서의 상동성은 전체 게놈에서보다 상당히 더 적을 것이라는 것이 주목되어야 한다. 추정 HCV 균주 게놈서열과 예컨대 CDC/HCV1 cDNA서열사이의 대응성은 당업계에서 공지된 기술에 의해 결정할 수 있다.

예컨대, 그것들은 여기서 기술된 HCV cDNA서열(들)과 추정 HCV 폴리뉴클레오티드의 서열정보의 직접적인 비교에 의하여 결정될 수 있다. 예컨대, 또한 그것들은 상동성 부위 사이에서 안정한 이중체를 형성하는 조건(예컨대, $S_1$분해전에 사용되는 것) 하에서 폴리뉴클레오티드를 혼성화시키고, 그후에 단일가닥 특이적인 뉴클레아제(들)로 분해시키고, 그후에 분해된 단편의 크기 결정에 의하여 결정될 수 있다.

HCV의 균주 또는 분리물의 진화적 관계때문에, 추정 HCV균주 또는 분리물은 폴리펩티드 수준에서의 그것의 상동성에 의하여 식별될 수 있다. 일반적으로, HCV균주 또는 분리물은 적어도 10%상동적인, 약 40%이상 상동적인, 아마도 약 70%이상 상동적인, 훨씬 더 아마도 약 80%이상 상동적인 것으로 기대되고, 어떤 것은 폴리펩티드 수준에서 약 90%이상 상동적일 수 있다. 아미노산 서열 상동성을 결정하는 기술은 당업계에서 공지되었다. 예컨대, 아미노산 서열은 직접적으로 및 여기서 제공된 서열과 비교하여 결정될 수 있다. 또한 추정 HCV의 게놈물질의 뉴클레오티드 서열을 결정할 수 있고 (대개는 cDNA 중간 생성물을 경유하여), 여기에 암호화된 아미노산 서열을 결정할 수 있고, 대응부위들을 비교할 수 있다.

여기서 사용되는 표시된 서열 로부터 유도된 폴리뉴클레오티드는 표시된 뉴클레오티드 서열부위에 대응하는 대략 적어도 약 6뉴클레오티드, 바람직하게는 적어도 약 8뉴클레오티드, 더 바람직하게는 적어도 약 10-12뉴클레오티드, 및 훨씬 더 바람직하게는 적어도 약 15-20뉴클레오티드의 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 대응하는은 표시된 서열에 따라서 상동적인 또는 상보적인 것을 의미한다. 바람직하게는, 폴리뉴클레오티드가 유도된 부위의 서열은 HCV게놈에 유일한 서열에 상동적인 또는 상보적

인 것이다. 서열이 HCV게놈에 유일한지의 여부는 당업자들에게 공지 된 기술에 의해 결정될 수 있다. 예컨대, 그 서열을 비감염숙주 또는 다른 생물체에서 존재하는지를 결정하기 위해서는 데이타뱅크(우선일 현재의), 예컨대 Genebank의 서열과 비교할 수 있다. 그 서열을 또한 간염을 유도한다고 알려진 것들 예컨대 HAV, HBV, 및 HDV를 포함하여 다른 바이러스 병원체의 공지된 (우선일 현재의)서열과, 및 플라비비리대에 속하는 것들과 비교할 수 있다. 유도된 서열의 다른 서열과의 대응성 또는 비-대응성은 또한 적합한 스트린전시(stringency)조건하에서 혼성화에 의해 결정될 수 있다. 핵산서열의 상보성을 결정하는 혼성화 기술은 당업계에서 공지되었다. 예컨대 Maniatis등(1982)참조. 부가적으로 혼성화에 의해 형성된 이중체 폴리뉴클레오티드의 미스매치(mismatch)는 예컨대 이중체 폴리뉴클레오티드에서 특이적으로 단일 가닥 부위를 분해하는 S1같은 뉴클레아제로의 분해를 포함하는 공지된 기술에 의해 결정할 수 있다. 전형적인 DNA서열이 유도 될 수 있는 부위는 예컨대 특이적인 에피토프를 암호화하는 부위, 뿐만 아니라 비-전사되는 및/또는 비-번역되는 부위를 포함하지만 제한되지는 않는다.

유도된 폴리뉴클레오티드는 반드시 보여지는 뉴클레오티드 서열로부터 물리적으로 유도되지는 않지만, 예컨대 화학합성 또는 DNA 복제 또는 역전사 또는 번역을 포함하여 어떤 방법으로도 생성될 수 있다. 부가적으로 표시된, 서열에 대응하는 부위의 조합은 의도된 용도와 일치되도록 당업계에서 공지된 방식으로 변형될 수 있다.

유사하게, 표시된 아미노산 또는 핵산서열 로부터 유도된 폴리펩티드 또는 아미노산 서열은 그 서열에 암호화된 폴리펩티드의 것과 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, 또는 그것의 일부분으로서 그 부분이 적어도 3-5아미노산, 더 바람직하게는 적어도 8-10 아미노산, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 11-15아미노산으로 구성되는 것, 또는 면역학적으로 그 서열에 암호화된 폴리펩티드와 식별할 수 있는 것을 나타낸다. 이 용어는 또한 표시된 핵산서열로부터 발현되는 폴리펩티드를 포함한다.

재조합체 또는 유도된 폴리펩티드는 반드시 표시된 핵산 서열로부터 번역되지 않는다 ; 그것은 예컨대 화학합성, 또는 재조합 발현 시스템의 발현, 또는 돌연변이된 HCV를 포함하는 HCV로 부터의 분리를 포함하여, 어떤 방법으로도 생성될 수 있다. 재조합체 또는 유도된 폴리펩티드는 서열에 비천연적인 아미노산 또는 하나 이상의 아미노산 유사체를 포함할 수 있다. 서열속에 아미노산의 유사체를 삽입하는 방법은 당업계에서 공지되었다. 그것은 또한 당업들에게 공지된 하나 이상의 표지를 포함할 수 있다.

여기서 사용되는 용어 재조합 폴리뉴클레오티드는 게놈, cDNA, 세미합성, 또는 합성기원의 폴리뉴클레오티드를 의미하는데, 이것은 그것의 기원 또는 조작에 의하여 : (1)자연계에서 연관된 폴리뉴클레오티드의 전부 또는 일부와 연관되지 않는다, (2)자연계에서 연결된 것이 아닌 다른 폴리뉴클레오티드에 연결된다. 또는 (3)자연계에서 존재하지 않는다.

여기서 사용되는 용어 폴리뉴클레오티드는 어떤 길이의 뉴클레오티드로서 리보뉴클레오티드나 데옥시리보뉴클레오티드의 중합체 형태를 나타낸다. 이 용어는 단지 분자의 일차구조만을 나타낸다. 따라서 이 용어는 이중- 및 단일 -가닥 DNA및 RNA를 포함 한다. 그것은 또한 공지된 유형의 변형물, 예컨대 당업계에서 공지된 표지, 메틸화 ,캡,하나 이상의 천연적으로 존재하는 뉴클레오티드의 유사체로의 치환, 뉴클레오티드간 변형물로서 예컨대 비전하 결합을 갖는 것들(예컨대 메틸포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포르아미데이트, 카르바메이트 등 ) 및 전하결합을 갖는 것들(예컨대 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트등), 펜던트부를 포함하는 것들로서 예컨대 단백질(예컨대 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그날 펩티드, 폴리-L-리신등을 포함하는), 삽입제를 갖는 것들(예컨대 아크리딘, 소랄렌등), 킬레이트화제를 포함하는 것들(예컨대 금속, 방사성금속, 붕소, 산화금속등), 알킬화제를 포함하는 것들, 변형된 결합을 갖는 것들(예컨대 알파 아노머(anomer)핵산 등), 뿐만 아니라 폴리뉴클레오티드의 변형되지 않은 형태를 포함한다. 정제한 폴리펩티드는 실질적으로 다른 폴리펩티드가 없는 상태인 폴리펩티드, 즉 조성물에서 비-단백질성 물질을 고려하지 않고, 원하는 폴리펩티드를 최소 약 50중량%(조성물 내의 전체 폴리펩티드 당 원하는 폴리펩티드), 바람직하게는 최소 약 70%, 및 훨씬 더 바람직하게는 최소 약 90%를 포함하는 조성인 폴리펩티드를 나타낸다. 바이러스 폴리펩티드를 정제하는 기술은 당업계에서 공지되었다. 정제한 항체도 유사하게 정의된다.

재조합 숙주세포, 숙주세포, 세포, 세포주 세포배양물, 및 단일세포 존재로서 배양된 미생물 또는 고등 진핵생물 세포주를 나타내는 다른 그러한 용어들은 재조합 벡터 또는 다른 전달 DNA를 위한 수용체로서 사용될 수 있거나 사용된 세포를 나타내며, 트랜스펙션된 원래의 세포의 자손을 포함한다. 단일의 어버이 세포의 자손은 자연적인, 우발적인 , 또는 계획적인 돌연변이 때문에, 원래 어버이와 형태에 있어서 또는 게놈 또는 전체 DNA전량에 있어서 반드시 완전히 동일할 수는 없다는 것이 이해된다. 레플리콘(replicon)은 세포내에서 폴리뉴클레오티드 복제의 자율적인 단위로서 작용하는; 즉 그 자체의 조절하에서 복제할 수 있는 어떤 유전요소, 예컨대 플라스미드, 염색체, 바이러스, 코스미드 등이다.

백터는 부착된 절편의 복제 및/또는 발현을 일으키기 위해서 다른 폴리뉴클레오티드 절편이 부착되는 레플리콘이다.

조절서열은 그것이 결합된 코딩서열의 발현을 달성하는데 필요한 폴리뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 그러한 조절서열의 본질은 숙주 생물체에 좌우되어 다르다; 원핵생물에서는 그러한 조절서열이 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합부위, 및 터미네이터를 포함한다; 진핵생물에서는 일반적으로 그러한 조절서열이 프로모터, 터미네이터 및 어떤 경우에는 인핸서(enhancer)를 포함한다. 용어 조절서열은 그것의 존재가 발현에 필요한 모든 성분들을 최소로 포함하도록 의도되며, 또한 그것의 존재가 유용한 부가적인 성분, 예컨대 리더(leader)서열을 포함할 수 있다.

작동적으로 연결된은 거기에 기술된 성분들이 그것들을 의도된 방식으로 작용하게 하는 관계로 있는 병치를 나타낸다. 코딩 서열에 작동적으로 연결된조절 서열은 코딩서열의 발현이 조절서열과 양립하는 조건하에서 달성되게 하는 방식으로 결합된다. 오픈리딩 프레임(ORF)은 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열의 부위이다; 이 부위는 전체코딩서열 또는 코딩서열의 일부분을 나타낼 수 있다.

코딩서열은 적합한 조절서열의 조절하에 놓였을 때, mRNA로 전사되는 몇/또는 폴리펩티드로 번역되는 폴리뉴클레오티드 서열이다. 코딩서열의 경계는 5'-말단의 번역개시코돈과 3'-말단의 번역 종결코돈에 의해 결정된다. 코딩서열은 mRNA, cDNA, 및 재조합 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있지만 이것들에 제한

되지 않는다.

면역학적으로 식별할 수 있는은 표시된 폴리펩티드(들), 대개는 HCV단백질에 존재하는 폴리펩티드(들)및 에피토프(들)의 존재를 나타낸다. 면역학적 동일성은 항체결합 및/또는 결합의 경쟁에 의하여 결정될 수 있다; 이러한 기술은 당업자들에게 공지되었다.

여기서 사용되는 에피토프는 폴리펩티드의 항원성 결정자(antigenic determinant)를 나타낸다. 에피토프는 항체의 결합부의를 정의하는 3 또는 그 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 일반적으로 에피토프는 적어도 5아미노산으로 구성되며, 때때로 적어도 8아미노산으로 구성된다. 에피토프 매핑의 방법은 당업계에서 공지되었다.

폴리펩티드는 폴리펩티드내에 포함된 특이적인 에피토프의 항체 인식때문에 그것이 항체에 결합할 때 항체와 면역학적으로 반응성이 있다. 면역학적 반응성은 항체결합에 의하여, 더 특히 항체 결합의 속도론에 의하여, 및/또는 항체가 향하여진 에피토프를 포함하는 알려진 폴리펩티드(들)를 경쟁자(들)로서 사용하는 결합의 경쟁에 의하여 결정될 수 있다. 폴리펩티드가 항체와 면역학적으로 반응성이 있는지의 여부를 결정하는 기술은 당업계에서 공지되었다.

여기서 사용되는 용어 항체는 적어도 하나의 항체 결합부위로 이루어지는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드의 군을 나타낸다.

항체결합부위 또는 결합도메인은 항체 분자(들)의 변이성 도메인의 폴딩에 의해, 항원과의 면역학적 반응을 허용하는, 항원의 에피토프의 특징에 상보적인 내부의 표면형상 및 전하분포를 갖는 3차원적인 결합 공간을 형성함으로써 만들어진다. 항체 결합 부위는 항원 결합에 공헌하는 초변이성 루프를 형성하는 헤비 및/또는 라이트 체인 도메인(각기 $V_H$와 $V_L$)으로부터 형성될 수 있다. 용어 항체는 예컨대 척추동물 항체, 하이브리드 항체, 카메라 항체, 변형 항체, 1가 항체(univalent antibody), Fab 단백질, 및 단일도메인 항체를 포함한다.

여기서 사용되는 단일 도메인 항체(dAb)는 표시된 항원과 면역학적으로 반응하는 VH도메인으로 이루어지는 항체이다.

dAb는 $V_L$도메인을 포함하지 않지만, 항체에서 존재한다고 알려진 다른 항원 결합도메인, 예컨대 카파 및 람다 도메인을 포함할 수 있다. dAb를 제조하는 방법은 당업계에서 공지되었다. 예컨대, Ward등. (1989) 참조.

항체는 또한 $V_H$및 $V_L$도메인, 뿐만 아니라 다른 알려진 항원 결합도메인으로 이루어질 수 있다. 이러한 유형의 항체의 실례 및 그것의 제조방법이 당업계에서 공지되었고 (예컨대, 여기서 참고문헌으로 통합된 미국특허 4,816,467참조), 하기의 것을 포함한다. 예컨대, 척추동물 항체는 대개 Y배치로 집합되며 체인사이에 공유결합을 가질수 있고 또는 갖지 않을 수도 있는 라이트 및 헤비체인으로 이루어지는, 사합체 또는 그것의 집합체인 항체를 나타낸다. 척추동물 항체에서는, 하나의 특별한 항체의 모든 체인의 아미노산 서열이 자연상태에서, 또는 생체외에서 (예컨대, 하이브리도마에서 )그 항체를 생성하는  임파구에 의해 생성되는 한 항체에서 발견되는 체인과 상동적이다. 척추동물 항체는 전형적으로 본래의 항체, 예컨대 정제한 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체를 포함한다. 이 항체의 제조방법의 실례는 아래에서 기술된다.

하이브리드 항체는 헤비 및 라이트 체인의 한쌍은 첫번째 항체의 것과 상동적이고, 헤비 및 라이트 체인의 다른 쌍은 다른 두번째 항체의 것과 상동적인 항체이다. 전형적으로는 이 두쌍의 각각은 다른 에피토프에, 특히 다른 항원의 다른 에피토프에 결합할 것이다. 이것은 이가(divalence)의 성질, 즉 동시에 두 항원에 결합할 수 있는 능력으로 된다. 그러한 하이브리드는 또한 하기에서 나타낸 것처럼 키메라체인을 이용하여 형성될 수도 있다.

키메라 항체(chimeric antibody)는 헤비 및/또는 라이트 체인이 융합 단백질인 항체이다. 전형적으로는 체인의 일정 도메인(constant domain) 은 하나의 특별한 종 및 / 또는 부류로부터 오고, 변이성 도메인은 다른 종 및/또는 부류로부터 온다. 또한 헤비 또는 라이트체인의 각각 또는 둘다 다른 공급원의 항체의 서열을 모방한 서열의 조합으로 구성되는데, 이 공급원이 다른 부류이거나, 다른 기원의 종이고, 융합 포인트가 변이성/일정 경계에 있거나 없는 어떤 항체도 포함된다.

따라서, 어떤 일정 또는 변이성 부위가 공지된 항체서열을 모방하지 않은 항체를 생성하는 것이 가능하다. 그러면 예컨대, 변이성 부위가 특별한 항원에 대한 보다 높은 특이적인 친화성을 갖거나, 또는 일정 부위가 증가된 보체고정을 유도할 수 있는 항체를 제조하는 것, 또는 특별한 일정 부위에 의해 갖게 되는 성질의 다른 개선을 시키는 것이 가능하게 된다.

또 다른 실례는 척추동물 항체의 자연적으로 존재하는 아미노산 서열이 변화된 항체를 나타내는 변형항체이다. 재조합 DNA기술을 이용하여 항체를 새로 고안하여 원하는 성질을 얻을 수 있다.

가능한  변이는 많으며, 하나 이상의 아미노산의 변화로부터 한 부위 예컨대 일정 부위의 완전한 재고안까지 다양하다.

일반적으로 일정부위의 변화는 원하는 세포공정 특성, 예컨대 보체고정의 변화, 막과의 상호작용, 및 다른 효과인자 작용을 얻는다. 변이성 부위의 변화는 항원결합 특성을 변경시키도록 행해질수 있다. 항체를 또한 고안하여 분자 또는 물질의 특이적인 세포 또는 조직부위로의 특이적인 수송을 도울 수 있다. 원하는 변형은 공지된 분자생물학의 기술, 예컨대 재조합기술, 부위지시되는 돌연변이 유발등에 의하여 이루어질 수 있다.

또 다른 실례는 일가항체인데, 이것은 두번째 헤비체인의 Fc(즉 일정)부위에 결합된 헤비체인 /라이트체인 이합체로 이루어진 집합체이다. 이러한 유형의 항체는 항원성 조절을 벗어난다. 예컨대, Glennie 등.(1982) 참조.

또한 항체의 정의내에는 항체의

Fab단편이 포함된다. Fab부위는 헤비 및 라이트 체인의 분지부분을 포함하는 서열에 대략 등가이거나 유사하며, 특정 항원에 대한 면역학적 결합을 나타내는 것으로 보여지는, 그러나 효과인자 Fc부분이 결핍된 헤비 및 라이트 체인의 부분들을 나타낸다. Fab'는 표시된 항원 또는 항원족과 선택적으로 반응할 수 있는, 2H및 2L체인을 포함하는 사합체($F(ab)_2$로서 나타냄)뿐만 아니라 하나의 헤비 및 하나의 라이트 체인의 집합체(흔히 Fab'로서 알려짐)를 포함한다. Fab 항체는 상기에서 기술한 것들과 유사한 부분집합 즉 척추동물 Fab, 하이브리드 Fab,키메라 Fab, 및 변형 Fab로 나눌 수 있다.

항체의 Fab단편을 생성하는 방법은 당업계에서 공지되었고 예컨대 단백질 분해, 및 재조합기술에 의한 합성을 포함한다.

또한 항체 용어에는 1992년 6월 15일 발행된 Cancer Research(여기에 인용된 논문 뿐만 아니라 )에서 Schlom, J.에 의해 공동저작된 논문에서 기술된 유형과 같은 단일-체인 항원-결합(SCA)단백질도 포함된다.

여기서 사용되는 용어 면역원성 폴리펩티드는 보조약의 존재 또는 부재하에서 홀로 또는 운반체에 결합되어, 세포성 및/ 또는 체액성 면역 반응을 유도하는 폴리펩티드이다.

용어 폴리펩티드는 아미노산의 중합체를 나타내며 특이한 길이의 산물을 나타내지 않는다; 따라서 펩티드, 올리고펩티드, 단백질이 폴리펩티드의 정의내에 포함된다. 이 용어는 또한 폴리펩티드의 발현후 변형, 예컨대 글리코실화, 아세틸화, 포스포릴화 등을 배제하거나 나타내지 않는다. 이 정의내에는 예컨대, 하나 이상의 아미노산 유사체를 포함하는 폴리펩티드(예컨대 비천연적인 아미노산 등을 포함), 치환된 결합을 갖는 폴리 펩티드, 뿐만 아니라 천연적으로 존재하는 및 비 -천연적으로 존재하는, 당업계에서 공지된 다른 변형물도 포함된다.

여기서 사용되는 형질변환은 삽입에 이용되는 방법, 예컨대 직접적인 획득, 형질도입, f-교배 또는 일렉트로포레이션(electroporation)에 관계없이 숙주세포내로의 외인성 폴리뉴클레오티드의 삽입을 나타낸다. 외인성 폴리뉴클레오티드는 비-통합벡터 예컨대 플라스미드로서 유지될 수 있거나, 또는 숙주게놈속으로 통합될 수 있다.

여기서 사용되는 치료는 예방 및/또는 치료를 나타낸다.

여기서 사용되는 개체는 척추동물 특히 포유동물종에 속하는 것들을 나타내며 동물(예컨대, 개, 고양이, 소, 돼지, 양, 염소, 토끼, 마우스, 래트, 기니아피그등), 및 원숭이, 침팬지, 비비와 인간을 포함하는 영장류를 포함하지만 이것들에 제한되지는 않는다.

여기서 사용되는 핵산의 센스가닥은 mRNA와 서열상동성을 갖는 서열을 포함한다. 안티-센스가닥은 센스가닥에 상보적인 서열을 포함한다.

여기서 사용되는 바이러스의 포지티브 가닥게놈은RNA나 DNA인 게놈이 단일가닥이고 바이러스 폴리펩티드(들)를 암호화하는 것이다.

포지티브가닥 RNA 바이러스의 실례는 토가비리대, 코로나비리대, 레트로비리대, 피코알엔에이 비리대, 및 칼리시비리대를 포함한다.

또한 이전에는 토가비리대로서 분류되는 플라비비리대가 포함된다. Fields Knipe(1986)참조.

여기서 사용되는 항체포함 신체성분은 관심있는 항체의 공급원인 개체의 신체의 성분을 나타낸다. 항체포함 신체성분은 당업계에서 공지되었고, 예컨대 혈장, 혈청, 척수액, 림프액, 호흡기관의, 장의, 비뇨생식기의 도관의 외부 박편, 눈물, 타액, 젖, 백혈구, 및 골수종을 포함하지만 이것들에 제한되지는 않는다.

여기에 사용되는 생물학적 샘플은 개체로부터 분리한 체액 또는 조직의 샘플을 나타내며, 예컨대 혈장, 혈청, 척수액, 림프액, 피부의, 호흡기관의, 장의, 비뇨생식기의 도관의 외부박편, 눈물, 타액, 젖, 혈구, 종양, 기관을 포함하지만 이것들에 제한되지는 않으며, 또한 생체외 세포배양물 성분의 샘플(세포배양 배지에서의 세포생장으로부터 생기는 조건배지, 추정적으로 바이러스 감염세포, 재조합세포, 및 세포성분들을 포함하지만 제한되지는 않음)을 나타낸다.

II. 발명의 기술

본 발명의 실행은 다른 표시가 없으면 당업계의 기술범위내인 분자생물학, 미생물학, 재조합 DNA, 및 면역학의 통상적인 기술을 이용할 것이다. 그러한 기술은 문헌에서 완전하게 설명되었다. 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), Meth Enzymol 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)

참조. 상기에서 그리고 하기에서 언급한 모든 특허, 특허출원, 및 공표물은 참고문헌에 의해 여기에서 통합되었다.

II. A. 절단형 HCV 폴리펩티드

본 발명의 유용한 물질 및 방법은 새로운 HCV 에피토프의 하기의 확인에 의해 가능하게 된다. 이러한 에피토프(또는 항원성 부위)의 지식은 면역학적 시약으로서 사용할 수 있는 절단형 HCV서열을 포함하는 폴리펩티드의 제조를 가능하게 한다.

적어도 하나의 바이러스 에피토프를 암호화하는 절단형 HCV 아미노산 서열은 유용한 면역학적 시약이다. 예컨대, 그러한 절단형 서열을 포함하는 폴리펩티드는 면역검사에서 시약으로 이용할 수 있다. 이 폴리펩티드는 또한 항혈청생성 또는 백신을 위한 조성물에서 소단위 항원 후보이다. 이러한 절단형 서열은 본래의 바이러스 단백질의 다양한 공지된 처리에 의하여 생성될 수 있지만, 일반적으로는 HCV 서열을 포함하는 합성또는 재조합 폴리펩티드를 만드는 것이 바람직하다. 이 절단형 HCV 서열을 포함하는 폴리펩티드는 전적으로 HCV 서열로 (하나 이상의 인접한 또는 인접하지 않은 에피토프), 또는 융합단백질에서 HCV서열과 이종의 서열로 이루어질 수 있다. 유용한 이종의 서열은 재조합 숙주로부터의 분비를 위해 제공되는 서열, HCV에피토프(들)의 면역 학적 반응성을 증가시키는 서열, 또는 폴리펩티드의 면역검사 지지체나 백신 운반체와의 커플링을 촉진하는 서열을 포함한다. 예컨대 개시내용이 여기서 참고문헌으로 통합되어 있는 EPO Pub. No. 116, 201; U.S. Pat. No. 4, 722, 840; EPO Pub. No. 259,149 ; U.S. Pat. No. 4,629,783참조.

절단형 HCV서열을 포함하는 폴리펩티드의 크기는 광범위하게 변할 수 있는데, 최대 크기는 중요하지 않지만, 최소 크기는 하나의 HCV 에피토프를 제공하는데 충분한 크기의 서열이다.

편의상 최대크기는 대개 원하는 HCV 에피토프 및 이종의 서열의 기능(들)을 제공하는데 필요한것 보다 실질적으로 더 크지 않다. 전형적으로는, 절단형 HCV 아미노산 서열은 길이가 최대 약 50(또는 40)아미노산일 것이며, 때때로 최대 약20, 25 또는 30아미노산일 것이다. 대개는 적어도 약 8, 10, 12 또는 15 아미노산의 HCV서열을 선택하는 것이 바람직하다.

여기서 기술한대로 유용한 절단형 HCV아미노산 서열(옥타머)의 실례가 실시예에서 하기에서 기술된다. 이 펩티드가 반드시 정확하게 하나의 에피토프를 매핑하지는 않는 것이 이해되어야 한다.

이 서열의 비- 면역원성 부분은 통상적인 기술을 이용하여 정의될 수 있고 기술된 서열로부터 삭제될 수 있다. 더욱, 에피토프를 포함하거나 면역원성인 부가적인 절단형 HCV아미노산 서열은 여기서 기술한대로 확인될 수 있다.

하기에 개시된 절단형 HCV 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 산물은 별개의 펩티드로서 또는 보다 큰 폴리펩티드 속에 삽입되어 제조될 수 있고, 여기서 기술한 대로 용도를 발견할 수 있다. 바람직한 응용에서는, E1및/ 또는 E2 도메인의 절단형 서열이 백신과 치료적 산물에서 이용성을 갖는다.

일반적으로는 도메인중 어느 것도 어떤 진단 이용성을 가질수 있지만, C, NS3, NS4및 NS5가 특히 바람직하고, NS3, NS4 또는 NS5도메인의 하나 이상의 에피토프와 C에피토프의 조합이 특히 바람직하다.

II. B. 폴리펩티드의 제조

HCV아미노산 서열을 암호화하는 DNA서열의 이용성은 폴리펩티드의 항원성 활성부위를 암호화하는 발현 벡터의 제조를 가능하게 한다(예컨대, 제2도의 참조). 이러한 항원성 활성부위는 외각 또는 엔벨로프 항원으로부터 또는 코어 항원으로부터, 또는 예컨대 폴리뉴클레오티드 결합단백질, 폴리뉴클레오티드 중합요

소(들), 및 바이러스 입자의 복제 및/또는 어셈블리에 필요한 다른 바이러스 단백질을 포함하는 비-구조적인 항원으로부터 유도될 수 있다. 원하는 폴리펩티드를 암호화하는 단편은 예컨대 통상적인 제한 분해를 이용하여 또는 합성방법에 의하여 바이러스 cDNA 클론으로부터 유도되고, 예컨대 β-갈락토시다제 또는 초산화물 디스무타제(superoxide dismutase )(SOD), 바람직하게는 SOD같은 융합서열 부분을 포함할 수 있는 벡터속에 결합된다. SOD의 융합서열을 포함하는 폴리펩티드의 생성에 유용한 방법 및 벡터가 1986년 10월 1일 공개된 유럽특허청 공개번호 0196056에서 기술되었다. SOD와 HCV폴리펩티드, 즉 HCV cDNA의 혼성물에 암호화된 $NANB_{5-1-1}$, $NANB_{81}$, 및 C100-3의 융합폴리펩티드를 암호화하는 벡터는 각기 섹션IV.B.1, IV.B.2, 및 IV.B.4에서 기술되었다.

오픈리딩프레임(또는 그것의 합성형)을 포함하는 HCV cDNA의 어떤 원하는 부분을 이용하여 완전한 또는 융합 단백질 따위의 재조합 폴리펩티드를 발현할 수 있다. 한편, HCV 에피토프를 포함하는 폴리펩티드는 도면 및 실시예의 아미노산 서열에 근거하여 표준기술을 이용한 화학합성에 의해 제공될 수 있다.

융합된  또는 융합되지 않은 형태인, 그리고 분비를 허용하는 시그날 서열을 포함하는 또는 포함하지 않는 원하는 폴리펩티드를 암호화하는 DNA는 어떤 편리한 숙주에 적합한 발현 벡터속에 결합될 수 있다.

진핵 및 원핵 숙주 시스템이 현재 재조합 폴리펩티드를 형성하는데 이용되며, 숙주 세포주가 EPO공개번호 318,216에 주어져 있다.

그 다음에는 용해된 세포로부터 또는 배양배지로부터 폴리펩티드가 분리되고, 의도된 용도에 필요한 정도로 정제된다. 정제는 당업계에서 공지된 기술, 예컨대 차별적인 추출, 염분류, 이온교환 수지상의 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 원심분리 등에 의하여 행해질 수 있다. 예컨대, 단백질 정제의 많은 방법들에 대해서는 Methods in Enzymology를 참조. 그러한 폴리펩티드를 진단시약으로 이용할 수 있고, 또한 중화항체로 되는 것들은 백신으로 제조할 수 있다. 이 폴리펩티드에 대해서 생긴 항체를 또한 진단시약으로, 또는 수동 면역요법에 이용할 수 있다.

부가적으로 하기에서 논의된 것처럼 예컨대 HCV 입자를 분리하고 확인하는데 이 폴리펩티드에 대한 항체가 유용하다.

HCV 폴리펩티드는 또한 HCV 비리온 및 절두형(아직 그렇지 않으면)에서 분리할 수 있다. 비리온은 조직배양중인 HCV 감염세포에서 또는 감염숙주에서 생장할 수 있다.

II.C. 항원성 폴리펩티드의 제조 및 운반체와의 결합

폴리펩티드의 항원성 부위는 일반적으로 길이가 비교적 작다. 전형적으로는 길이가 8 내지 10 아미노산 또는 더 작다.

5아미노산만큼 적은 단편이 항원성 부위를 특정화할 수 있다. 이러한 절편은 HCV 항원의 부위에 해당할 수 있다. 따라서, HCV의 cDNA를 기초로서 이용하여 HCV 폴리펩티드의 짧은 절편을 암호화하는 DNA가 융합 단백질로서 또는 분리된 폴리펩티드로서 재조합적으로 발현될 수 있다. 부가적으로 짧은 아미노산 서열은 화학합성에 의하여 편리하게 얻을 수 있다. 합성된 폴리펩티드가 정확한 에피토프를 제공하도록 정확하게 만들어졌지만 면역원성이 있기에는 너무 작은 경우에는, 폴리펩티드를 적당한 운반체에 결합시킬 수 있다.

그러한 결합을 얻는 많은 기술이 당업계에서 공지되었는데, 여기에는 Pierce Company, Rockford, Illinois로 부터 얻은 숙신이미딜 4-(N-말레이미도- 메틸)시클로헥산-1- 카르복실레이트(SMCC)및 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜티오)프로피오네이트(SPDP)를 이용한 이항화물 결합의 형성(펩티드가 메르캅트기를 갖고 있지 않으면, 이것은 시스테인 잔기의 첨가에 의하여 제공될 수 있다)이 포함된다. 이러한 시약은 그것들 자신과 한 단백질상의 펩티드 시스테인 잔기사이의 이황화물 결합 및 다른 단백질의 리신의 엡실론-아미노 또는 다른 유리된 아미노기를 통한 아미드 결합을 생성한다. 많은 그러한 이황화물/아미드-형성 시약이 공지되었다. 예컨대, Immun Rev(1982) 62 : 185 참조. 다른 이관능기의 커플링 작용제는 이황화물 결합이 아닌 다른 티오에테르를 형성한다.

이러한 티오에테르-형성작용제중 많은 것이 상업적으로 이용가능하며 6-말레이미도카프로산, 2-브로모아세트산, 2-요드아세트산, 4-(N-말레이미도-메틸)시클로헥산-1-카르복실산 등의 반응성 에스테르를 포함한다. 카르복실기는 그것들을 숙신이미드 또는 1- 히드록실-2-니트로-4-술폰산, 나트륨염과 결합시킴으로써 활성화될 수 있다.

항원을 커플링하는 부가적인 방법은 EPO Pub. No.259,149에서 기술된 로타바이러스/결합펩티드 시스템을 이용하는데, 이것의 개시내용이 참고문헌으로 여기서 통합되었다.

선행하는 리스트는 완전하다고 의미되지는 않으며, 지정된 화합물의 변형물이 명백하게 이용될 수 있다.

그 자체가 숙주에 해로운 항체의 생성을 유도하지 않는 어떤 운반체를 이용할 수 있다. 적합한 운반체는 전형적으로는 크고 느리게 대사되는 고분자로서 단백질 따위; 라텍스 기능적이게된 세파로스® , 아가로스, 셀룰로스, 셀룰로스 비드 등과 같은 다당류; 폴리글루탐산, 폴리리신등과 같은 중합체 아미노산; 아미노산 공중합체; 및 불활성 바이러스 입자등이다. 예컨대, 섹션 H.D 참조. 특히 유용한 단백질 기질은 혈청알부민, 키홀림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin), 면역글로불린 분자, 티로글로불린, 오발부민, 파상풍균유독소, 및 당업자에게 잘 알려진 다른 단백질이다.

II.D. HCV 에피토프를 포함하는 하이브리드 입자면역원의 제조

HCV의 에피토프의 면역원성은 예컨대 B형 간염 표면항원과 연관된것 따위의 입자-형성단백질과 유합되거나 회합된 포유류 또는 효모시스템에서 그것들을 제조함으로써 또한 강화될 수 있다.

예컨대, US 4,722,840참조. HCV 에피토프가 입자-형성 단백질 코딩서열에 직접 결합된 구조체는 HCV 에피토프에 관하여 면역원인 하이브리드를 생성한다. 부가적으로, 제조한 백터 모두가 예컨대 프리-S펩티드와 같이 다양한 정도의 면역원성을 가지며 HBV에 특이적인 에피토프를 포함한다.

따라서 HCV 서열을 포함하는 입자형성 단백질에서 제조한 입자는 HCV및 HBV에 관하여 면역원이다.

간염 표면항원(HBSAg)은 S. cerevisiae에서 (P.Valenzuela 등(1982)), 뿐만 아니라 예컨대 포유동물 세포에서 (P.Valenzuela 등(1984))입자로 형성되고 회합되는 것이 보여졌다.

그러한 입자의 형성은 단량체 소단위의 면역원성을 증가시키는 것이 보여졌다.

이 구조체는 또한 프리표면(pre-S)부위의 55아미노산으로 이루어지는 HBSAg의 면역우성 에피토프를 포함할 수 있다. (Neurath등 (1984)). 효모에서 발현가능한 pre-S-HBSAg입자의 구조체는 1986년 3월 19일 공표된 EPO 174,444에서 개시되고 ;효모발현을 위한 이형의 바이러스 서열을 포함하는 하이브리드는 1966년 3월 26일 공표된 EPO 175,261에서 개시되었다. 이 구조체는 또한 SV40-디히드로폴산리덕타제 벡터를 이용하여 중국햄스터 난소(CHO) 세포 따위의 포유동물 세포에서 발현될 수 있다(Michelle등(1984)).

부가적으로, 입자- 형성단백질 코딩서열의 부분이 HCV 에피토프를 암호화하는 코돈으로 대체될 수 있다. 이러한 대체에서는, 효모 또는 포유동물에서 면역원 입자를 형성하기 위한 단위들의 회합을 매개하는데 필요하지 않은 부위를 삭제하여, HCV 에피토프와의 경쟁으로부터 부가적인 HBV 항원성 부위를 제거할 수 있다.

II.E. 백신의 제조

백신은 HCV부터 유도된 하나 이상의 면역원성 폴리펩티드로부터 제조할 수 있다.

이 폴리펩티드는 다양한 숙주세포(예컨대, 세균, 효모, 곤충, 또는 포유동물 세포)에서 발현될 수 있고, 또는 다르게 바이러스 제조물에서 분리될 수 있고, 또는 합성에 의해 제조될 수 있다. HCV에 대한 단일- 또는 다수- 결합가의 백신은 하나 이상의 구조단백질의 하나 이상의 에피토프, 및/또는 하나 이상의 비구조 단백질의 하나 이상의 에피토프로 이루어질 수 있다. 이 백신은 예컨대, 재조합 HCV폴티펩티드 및/또는 비리온에서 분리한 폴리펩티드로 이루어질 수 있다. 특히, 하기의 HCV 단백질의 하나 이상, 또는 그것으로부터 유도된 소단위 항원을 포함하는 백신이 고려 된다. : E1, E2, C, NS2, NS3, NS4 및 NS5. 특히 바람직한 것은 E1및/ 또는 E2, 또는 그것의 소단위 들을 포함하는 백신이다.

상기 이외에도 또한 하나 이상의 재조합 HCV 폴리펩티드를 발현하는 약화된 미생물의 살아있는 백신을 제조하는 것이 가능하다.

적당한 약화 미생물은 당업계에서 공지되었고, 예컨대 세균뿐만 아니라 바이러스(예컨대, 우두바이러스(Brown등(1986)참조)를 포함한다.

면역원성 폴리펩티드(들)를 활성성분으로 포함하는 백신의 제조는 당업자에게 공지 되었다.
전형적으로는, 그러한 백신은 주사제로서, 액체용액이나 현탁액으로 제조된다;

또한, 주사전 액중용액 또는 현탁액에 적합한 고체형태가 제조될수도 있다. 이 제조물은 또한 유화될 수 있고, 또는 리포솜속에 캡슐화된 단백질일 수 있다. 활성면역원 성분은 종종 활성성분과 양립할 수 있고 제약학적으로 허용가능한 부형제와 혼합된다. 적당한 부형제는 예컨대, 물, 식염수, 덱스트로스, 글리세롤, 에탄올, 또는 그것의 조합이다. 게다가 원한다면 백신이 소량의 보조물질로서 습윤제 또는 유화제, PH완충제, 및/또는 백신의 효능을 증가시키는 보조제를 포함할 수 있다. 효과적일 수 있는 보조제의 실례는 하기를 포함하지만 이것에 제한되지는 않는다: 수산화알루미늄, N-아세틸 -무라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민(thr-MDP), N-아세틸 -노르- 무라밀 -L-알라닐-D-이소글루타민(CGP11637, nor-MDP로서 나타냄), N-아세틸무라밀-L-알라닐-D-이소글루타미닐-L-알라닌-2-(1'-2'-디팔미토일-sn-글리세로-3- 히드록시포스포릴옥시)-에틸아민(CGP19835A, MTP-PE로서 나타냄), 및 RIBI, 이것은 세균으로부터 추출한 3성분인 2%스쾰렌/Tween ® 80 에멀션중의 모노포스포릴지질A, 트레할로스 디미콜레이트 및 세포벽골격(MPL+TDM+CWS)을 포함한다. 보조제의 효능은 다양한 보조제로 이루어지는 백신중의 이 폴리펩티드를 투여한 결과 생기는 HCV 항원서열포함 면역원성 폴리펩티드에 대해 향하여진 항체의 양을 측정함으로써 결정될 수 있다.

백신은 통상적으로 예컨대 피하 또는 근육내 주사에 의해 비경구적으로 투여된다. 다른 투여방식에 적합한 부가적인 제조물은 좌약 그리고 어떤 경우에는 경구 제조물을 포함한다. 좌약에서는 전통적인 결합제 및 운반체가 예컨대 폴리알킬렌 글리콜 또는 트리글리세리드를 포함할 수 있고; 그러한 좌약은 0.5% 내지 10%, 바람직하게는 1%-2%범위로 활성 성분을 포함하는 혼합물로부터 형성될 수 있다.

경구제조물은 정상적으로 이용되는 부형제로서 예컨대 제약 등급의 만니톨, 락토스, 녹말, 스테아르산마그네슘, 소듐사카린, 셀룰로스, 탄산마그네슘 등을 포함한다. 이러한 조성물은 용액, 현탁액, 정제, 환제, 캡슐, 지속된 방출제조물 또는 분말의 형태를 취하며, 활성성분의 10%-95%, 바람직하게는 25%-70%를 포함한다.

단백질은 중성 또는 염형태로서 백신으로 제조할 수 있다.

제약학적으로 허용가능한 염은 산 첨가염(펩티드의 유리된 아미노기로 형성된)을 포함하고 예컨대 염산이나 인산따위의 무기산으로, 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 말레산등과 같은 유기산으로 형성된다. 유리된 카르복실기로 형성된 염은 예컨대 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 또는 수산화제2철 등과 같은 무기염기 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노에탄올, 히스티딘, 프로카인등과 같은 유기염기로부터 유도될 수 있다.

II.P. 백신의 투여량 및 투여

백신은 투약제조물과 적합한 방법으로 그리고 예방적으로 및/또는 치료적으로 효과적일양으로 투여된다. 일반적으로 투여당 5㎍ 내지 250㎍항원의 범위내인 투여량은 치료할 환자, 환자의 면역시스템의 항체 생성능력, 및 원하는 보호의 정도에 좌우된다. 투여하는데 필요한 활성성분의 정확한 양은 실습자의 판단에 좌우될 수 있고 각 환자에 독특할 수 있다.

백신은 단일투여 스케줄로, 또는 바람직하게는 중복투여 스케줄로 주어질 수 있다. 중복투여(multiple dose) 스케줄은 일차적인 백신 접종과정이 1-10 별도의 투여로 있고, 그후 다른 투여는 면역 반응을 유지하고 및/또는강화하는데 필요한 시간간격으로, 예컨대 두번째 투여는 1-4개월시에 주어지고, 필요하면 수개월 후 다음 투여(들)를 하는 것이다. 투여 섭생은  또한 적어도 부분적으로는 개체의 요구에 의해 결정될 것이고 실습자의 판단에 좌우될 것이다.

부가적으로 면역원성 HCV 항원(들)을 포함하는 백신은 다른 면역조절제 예컨대 면역글로불린과 결합하여 투여할 수 있다.

Ⅱ.G. HCV 에피토프에 대한 항체의 제조

여기서 기술된 면역원성 폴리펩티드는 폴리클로날 및 모노클로날을 포함하여 항체를 생성하는데 이용된다. 폴리클로날 항체를 원하면 선택한 포유동물(예컨대, 마우스, 토끼, 염소, 말등)을 HCV 에피토프(들)를 함유하는 면역원성 폴리펩티드로 면역화시킨다. 면역화된 동물의 혈청을 모아서 공지된 방법에 따라 처리한다.

HCV 에피토프에 대한 폴리클로날 항체를 포함하는 혈청이 다른 항원에 대한 항체를 포함한다면, 폴리클로날 항체는 면역친화성 크로마토그래피에 의해 정제할 수 있다. 폴리클로날 항혈청을 생성하고 처리하는 기술은 당업계에서 공지되었다. 예컨대, Mayer 및 Walker(1987)참조. 한편, 폴리클로날 항체는 이전에 HCV로 감염된 포유동물로 부터 분리될 수도 있다.

또한 HCV 에피토프에 대해서 향하여진 모노클로날 항체는 당업자에 의해 용이하게 생성될 수 있다. 하이브리도마에 의해 모노클로날 항체를 만드는 일반적인 방법은 잘 알려져 있다.

불멸의 항체-생성세포주는 세포 융합에 의하여, 그리고 B임파구의 발암성 DNA로 직접적인 형질변환 또는 엡스타인 -바르 바이러스로의 트랜스펙션 따위의 다른 기술에 의하여 생성될 수 있다. 예컨대, M.Schreier등(1980); Hammerling 등 (1981); Kennett등(1980) 참조; 또한 미국특허 4,341,761; 4,399,121; 4,427,783; 4,444,887; 4,466,917; 4,472,500; 4,491,632; 및 4,493,890참조. HCV에피토프에 대해 생성된 모노클로날 항체 패널을 다양한 성질; 즉 아이소타이프(isotype), 에피토프 친화성 등에 대해서 스크리닝할 수 있다.

HCV 에피토프에 대해 향하여진 모노클로날 및 폴리클로날 항체는 진단에 특히 유용하고, 중화 항체는 수동 면역치료에 유용하다.

모노클로날 항체는 특히 항-이디오타이프 항체를 생성하는데 이용할 수 있다.

항-이디오타이프항체(anti-idiotype antibody)는 그것에 대해서 보호를 요구하는 감염성병원체의 항원의 내부이미지를 운반하는 면역글로불린이다. 예컨대, Nisonoff,A.등 (1981)및 Dreesman등(1985) 참조. 항-이디오타이프 항체를 생기게 하는 기술은 당업계에서 공지되었다. 예컨대, Grzych(1985), MacNamara 등(1984), 및 Vytdehaag등(1985)참조. 이러한 항-이디오타이프 항체는 또한 NANBH의 치료, 백신접종 및/또는 진단에 유용하고, 뿐만 아니라 HCV 항원의 면역원 부위의 확인에도 유용할 수 있다.

Ⅱ.H. 면역검사 및 진단키트

본 발명의 폴리펩티드와 항체는 예컨대 생물학적 샘플에서 HCV 항체의 존재, 또는 바이러스 및/ 또는 HCV 폴리펩티드(또는 에피토프)의 존재를 검출하는 면역검사에 유용하다. 면역검사의 디자인은 많은 변화가 있어서 많은 포맷이 당업계에서 공지되었다. 면역검사는 HCV로부터 유도된 적어도 하나의 바이러스 에피토프를 이용할 것이다.

한 구체예에서는 면역검사가 HCV로부터 유도된 바이러스 에피토프의 조합을 이용한다. 이 에피토프는 동일한 또는 다른 바이러스 폴리펩티드로부터 유도될 수 있고, 별도의 재조합 또는 천연 폴리펩티드로, 또는 동일한 재조합 폴리펩티드에서 함께 있을 수 있다. 면역검사는 예컨대 바이러스 에피토프(들)에 향하여진 모노클로날 항체, 하나의 바이러스 항원의 에피토프에 향하여진 모노클로날 항체의 조합, 다른 바이러스 항원의 에피토프에 향하여진 모노클로날 항체, 동일한 바이러스 항원에 향하여진 폴리클로날 항체, 또는 다른 바이러스 항원에 향하여진 폴리클로날 항체를 이용할 수 있다. 프로토콜은 예컨대 경쟁, 또는 직접적인 반응, 또는 샌드위치 유형 검사에 기초할 수 있다.

프로토콜은 또한 예컨대 고체지지체를 이용할 수 있고, 또는 면역침전에 의할 수 있다. 대부분의 검사는 표지된 항체 또는 폴리펩티드의 사용을 포함한다 ; 표지는 예컨대 효소, 형광, 화학발광, 방사성, 또는 염료 분자일 수 있다. 프로브로부터의 시그날을 증폭하는 검사도 또한 공지 되었다 ; 이것의 실례는 바이오틴과 아비딘을 이용하는 검사, 및 효소-표지된 및 매개된 면역검사로서 ELISA검사(하기에서 기술)등이 있다.

전형적으로는, 항-HCV 항체(들)에 대한 면역검사는 생물학적 샘플 따위의 항체를 포함하는 것으로 추정되는 테스트 샘플을 선택 및 제조하고, 그 다음에 그것을 항원-항체 복합체가 형성되게 하는 조건하에서 항원성(즉 에피토프-함유)HCV폴리펩티드(들)와 배양하고, 그후에 그러한 복합체의 형성을 검출하는 것을 포함할 것이다. 적당한 배양조건은 당업계에서 잘 공지되었다. 면역검사는 제한없이 이종의 또는 동종의 포맷으로, 그리고 표준형 또는 경쟁형으로 행해질 수 있다.

이종의 포맷에서는, 폴리펩티드가 전형적으로 고체지지체에 결합되어 배양후 폴리펩티드로부터 샘플의 분리를 촉진시킨다.

사용할 수 있는 고제지지체의 실례는 니트로셀룰로스(예컨대, 막 또는 마이크로타이터웰형태에서), 폴리비닐 클로라이드(예컨대, 시트 또는 마이크로타이터웰에서), 폴리스티렌라텍스(예컨대, 비드 또는 마이크로타이터 플레이트에서 ), 폴리비닐리딘 플루오라이드(Immulon® 로서 알려짐), 디아조화 페이퍼, 나일론막, 활성화비드, 및 프로틴A비드이다. 예컨대, Dynatech Immulon® 1또는 Immulon® 2 마이크로타이터 플레이트 또는 0.25 inch 폴리스티렌 비드(Precision Plastic Ball)를 이종의 포맷에서 이용할 수 있다.

항원성 폴리펩티드를 포함하는 고체지지체는 전형적으로는 테스트 샘플로부터 그것을 분리한후, 그리고 결합된 항체의 검출전에 세척된다. 표준형 및 경쟁형 포맷 둘다 당업계에서 공지되었다.

동종의 포맷에서는, 테스트 샘플이 용액중의 항원과 배양된다.

예컨대, 그것은 형성되는 어떤 항원-항체 복합체를 침전시킬 조건하에 있을 수 있다. 이러한 검사에 대한 표준형 및 경쟁형 포맷 둘다 당업계에서 공지되었다.

표준형 포맷에서는 항원-항체 복합체를 형성하는 HCV 항체의 양이 직접적으로 측정된다. 이것은 항-HCV 항체상의 에피토프를 인식하는 표지된 항-이종개체(예컨대, 항-인간)항체가 복합체 형성에 기인하여 결합할 것인가의 여부를 결정함으로써 이루어질 수 있다. 경쟁형 포맷에서는 샘플내의 HCV 항체의 양은 복합체에서 알고 있는 양의 표지된 항체 (또는 다른 경쟁리간드)의 결합에 대한 경쟁적 효과를 측정함으로써 추론된다.

항-HCV 항체를 포함하는 형성복합체(또는, 경쟁적 검사의 경우에는, 경쟁 항체의 양)가 포맷에 좌우되는 많은 공지된 기술중 어떤 것에 의하여 검출된다. 예컨대, 복합체내의 비표지된 HCV항체는 표지(예컨대, 효소표지)로 복합체화된 항-이종개체 Ig의 결합체를 이용하여 검출될 수 있다.

HCV 폴리펩티드가 분석물인 면역검사에서는, 테스트샘플, 전형적으로는 생물학적 샘플을 항원-항체 복합체의 형성을 허용하는 조건하에서 항-HCV항체와 배양시킨다. 다양한 포맷을 이용할 수 있다.

예컨대, 샌드위치검사가 이용될 수 있는데, 여기서는 고체 지지체에  결합된 항체가 테스트 샘플과 배양되고; 세척되고; 분석물에 대한 이차의 표지된 항체와 배양되고; 다시 지지체가 세척된다.

이차 항체가 지지체에 결합되는지를 결정함으로써 분석물을 검출한다.

이종의 또는 동종의 것일수 있는 경쟁형 포맷에서는, 테스트 샘플이 대개 항체와 배양되고 또한 연속적으로 혹은 동시에 표지된 경쟁 항원이 배양된다. 이것과 다른 포맷은 당업계에서 잘 공지되었다.

HCV 감염에 대한 효율적인 검출시스템은 상기에서 기술한 대로 에피토프의 패널의 이용을 포함할 수 있다. 패널의 에피토프는 하나 또는 다수의 폴리펩티드로 구성될 수 있다. 변화하는 에피토프에 대한 검사는 연속적 또는 동시적일 수 있다.

효소-결합된 면역 흡착제검사(ELISA)는 항원 또는 항체 농도를 측정하는데 이용될 수 있다. 이방법은 항원이나 항체에 대한 효소의 결합에 좌우되며, 정량 표지로서 결합된 효소 활성을 이용한다. 항체를 측정하기 위해서는, 알려진 항원이 고상(예컨대, 마이크로 플레이트 또는 플라스틱 컵)에 고정되고, 테스트 혈청 희석액과 배양 되고, 세척되고, 표지화된 항-면역글로불린과 배양되고, 다시 세척된다. 표지화에 적합한 효소는 당업계에서 공지되었고, 예컨대 호스래디쉬 퍼옥시다제(horseradish perxoida se)를 포함한다. 고상에 결합된 효소활성은 특이적인 기질을 첨가하고, 산물생성 또는 기질이용을 비색정량함으로써 측정된다. 결합된 효소활성은 결합된 항체의 양의 직접적인 함수이다.

항원을 측정하기 위해서는, 알려진 특이적인 항체가 고상에 고정되고, 항원을 포함하는 테스트 물질이 첨가되고, 배양후에 고상이 세척되고, 이차 효소-표지된 항체가 첨가된다. 세척후에 기질이 첨가되고, 효소활성이 비색정량되는데 항원농도에 연관된다. 면역진단에 적합하고 적당한 표지된 시약을 포함하는 키트는 HCV 에피토프를 포함하는 본 발명의 폴리펩티드 또는 HCV 에피토프에 대해 향하여진 항체를 포함하는 적당한 물질을 검사수행에 필요한 남아있는 시약과 물질, 뿐만 아니라 적당한 세트의 검사지시사항과 함께 적합한 용기내에 포장함으로써 제조된다.

III. 일반적인 방법

본 발명의 실행에서 이용되는 일반적인 기술은 예컨대 여기서 인용된 참고문헌들, 특히 EPO Pub. No. 318,216 및 388, 232, 뿐만 아니라 참고문헌으로 여기서 통합된 문헌목록의 참고문헌들에서 발견될 수 있다.

IV. 실시예

하기에서 기술되는 본 발명의 실시예는 단지 예시적인 목적을 위해서만 제공되며 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아니다.

본 개시내용을 고려하여 당업자들에게는 특허청구범위의 영역내에서 수많은 구체예들이 명백할 것이다.

IV.A. HCV 게놈의 에피토프 매핑

하기의 실시예는 제1도에서 보여지는 HCV1 폴리단백질 서열에 대해서 수행된 에피토프 매핑실험의 결과이다. 제3-11도에서 보여지듯이 HCV 분리물 사이에는 이종성이 있는데, 이것은 이러한 아미노산치환물이 하기에 기재된 옥타머에서 만들어질 수 있다는 것을 나타낸다. 다른 HCV 분리물에서 대응하는 위치로부터의 아미노산으로의 치환물 뿐만 아니라, 특별한 아미노산의 합성 유사체로의 치환물 또는 전하에 기초한 보존성 치환물등(특히 치환이 항체 결합을 파괴하지 않을 때)이 본 발명의 범위내이다.

IV.A.1. 오버래핑펩티드(overlapping peptide)의 합성

8×12배열로 블록위에 배열된 폴리에틸렌 핀(Coselco Mimetopes, Victoria, Australia)은 실온에서 30분동안 수조(디메틸포름아미드(DMF)중의 20%v/v피페리딘)에 핀을 놓음으로써 제조하였다. 그다음 핀을 제거하고, 5분간 DMF중에서 세척하고, 그후 메탄올 중에서 4번 세척하였다(2분/세척). 핀을 적어도 10분간 공기건조시키고, 그 다음 DMF중에서 마지막으로 세척하였다(5분). Fmoc- 보호된 아미노산을 커플링하는데 이용하기 위하여 1-히드록시벤조트리아졸(HOBt, 367mg)을 DMF(80mL)중에 녹였다 ;

Fmoc-L-Ala-OPfp, Fmoc-L-Cys(Trt)-OPfp, Fmoc-L-Asp(O-*t*Bu)-OPfp, Fmoc-L-Glu(O-*t*Bu)-OPfp, Fmoc-L-Phe-OPfp, Fmoc-Gly-OPfp, Fmoc-L-His(Boc)-OPfp, Fmoc-L-Ile-OPfp, Fmoc-L-Lys(Boc)-OPfp, Fmoc-L-Leu-OPfp, Fmoc-L-Met-OPfp, Fmoc-L-Asn-OPfp, Fmoc-L-Pro-OPfp, Fmoc-L-Gln-OPfp, Fmoc-L-Arg(Mtr)-OPfp, Fmoc-L-Ser(*t*-Bu)-ODhbt, Fmoc-L-Thr(*t*-Bu)-ODhbt, Fmoc-L-Val-OPfp, 및 Fmoc-L-Tyr-OPfp.

보호된 아미노산을 HOBt를 갖는 마이크로타이터 플레이트웰속에 놓고, 핀블록을 플레이트 위에 놓고, 핀을 웰속에 침지시켰다.

그다음 어셈블리를 플라스틱 주머니속에 밀봉하고 18시간 동안 25℃에서 반응시켜서 첫번째 아미노산을 핀에 커플링시켰다.

그후 블록을 제거하고, 핀을 DMF(2분), MeOH(4×2분)로 세척하고, 다시 DMF(2분)로 세척하여 결합된 아미노산을 깨끗하게 하고 탈보호시켰다. 모든 옥타머가 제조될때까지 각 커플링된 부가적인 아미노산에 대해서 이 과정을 반복하였다.

그 다음에는 에피토프의 대부분이 N-말단에서 발견되지 않고 따라서 연관된 포지티브 전하를 갖지 않기 때문에, 유리된 N-말단을 아세틸화하여 유리된 아미드를 보정하였다. 아세틸화는 마이크로타이터 플레이트의 웰을 DMF/아세트산무수물/트리에틸아민(5 : 2 : 1 v/v/v)으로 채우고 핀을 웰내에서 20℃에서 90분동안 반응시킴으로써 수행되었다. 그 다음에는 핀을 DMF(2분) 및 MeOH(4×2분)로 세척하고, 적어도 10분동안 공기 건조시켰다.

핀을 실온에서 4시간 동안 폴리프로필렌주머니에서 트리플루오로아세트산/페놀/디티오에탄(95 : 2.5 : 2.5,v/v/v)으로 처리함으로써 측쇄 보호기를 제거하였다. 그 다음에는 핀을 디클로로메탄(2×2분), 5% 디-이소프로필에틸아민/디클로로메탄(2×5분), 디클로로메탄(5분)중에서 세척하고, 적어도 10분간 공기건조시켰다.

그후 핀을 물(2분), MeOH(18시간)중에서 세척하고, 진공에서 건조시키고, 실리카겔 상에서 밀봉된 플라스틱 주머니 속에 보관하였다.

IV.A.2. 펩티드의 검사

상기에서 제조한 옥타머-함유핀을 먼저 60℃에서 파열완충액(1% 황산도데실나트륨,01% 2-메르캅토에탄올, 0.1M $NaH_2PO_4$)중에서 30분 동안 초음파처리하였다. 그 다음에는 핀을 물(60℃)에 여러번 침지시키고, 다음에는 비등하는 MeOH(2분)에 침지시키고, 공기 건조시켰다. 그 다음에는 핀을 200㎕차단완충액 (PBS중의 1%오발부민, 1% BSA, 0.1%Tween®, 및 0.05% $NaN_3$)을 포함하는 마이크로타이터웰에서 교반하면서 25℃에서 1시간 동안 미리 코팅시켰다. 그 다음에는 핀을 HCV를 가지는 것으로 진단된 사람환자로부터 얻은 175㎕ 항 혈청을 포함하는 마이크로타이터웰에 침지시키고 하룻밤동안 4℃에서 배양시켰다. 핀을 3명의 개별적인 환자로부터의 항혈청에 대하여 검사하였다. 표본 #PAA 3663-s(A)은 클론 C100-3(1 : 1000희석도에서)에 대한 HCV ELISA, HCV경쟁적 ELISA, HCV 웨스턴블롯(Western blot)에 대한 강한 반응, C100, 5-1-1, 및 C33c(C22는 행해지지 않음)에 대한 4+의 RIBA반응을 나타냈다.

(항원/클론 명칭은 Ortho Diagnostics Systems, Inc. 에서 구입할 수 있는 HCV 면역검사에 관한 문헌에서 기재된 것들 뿐만 아니라, EPO Pub. No. 318, 216및 388, 232에 따른다). 소혈장은 차단완충액에서 1 : 500희석되었다. 표본 #PAA 33028(B)은 클론C100-3(1 : 500희석도에서)에 대한 HCV ELISA, HCV 경쟁적 ELISA, HCV 웨스턴 블롯에 대한 강한 반응, C100, 5-1-1, C33C 및 C22에 대한 4+의 RIBA반응을 나타냈다. 폴리클로날 항혈청은 프로틴 A컬럼을 통한 통과에 의해 부분정제하였고, 차단 완충액에서의 1 : 200의 희석도로 사용하였다. 표본 #PAA s32931(C)은 클론C100-3(1 : 64희석도에서)에 대한 HCV ELISA, HCV 경쟁적 ELISA, HCV웨스턴 블롯에 대한 온건한 반응(3+), C100및 5-1-1에 대한 각기 3+및 4+의 RIBA반응(C33c 및 C22는 행해지지 않음)을 나타냈다.

폴리클로날 항혈청은 프로틴 A컬럼을 통한 통과에 의하여 부분정제하였고, 차단 완충액으로 1 : 500 희석하여 사용하였다.

핀을 실온에서 PBS/Tween® 20(4×10분)으로 세척하고, 그 다음 호스래디쉬 퍼옥시다제-표지된 염소 항-사람 Ig 항혈청(175μL, $NaN_3$없는 차단완충액에서 1 : 2000 희석)을 포함하는 마이크로타이터웰에서 교반하면서 25℃에서 1시간 동안 배양하였다.

항 -사람 항혈청은 사람 Ig 라이트 및 헤비 체인에 특이적이며, IgG및 IgM클래스와 반응한다. 핀을 다시 실온에서 PBS/Tween® 20(4×10분)으로 세척하였다. 기질용액은 $NaH_2PO_4$(1M,200mL)및 시트르산(1M,160mL)을 증류수로 2L로 희석하고, pH를 4.0으로 조정함으로써 제조하였다. 아지노-디-3-에틸벤즈티아조딘술포네이트(ABTS, 50mg)및 과산화수소(0.3μL/mL)을 사용하기 바로 전에 100mL의 완충액에 첨가하여 기질용액을 완전하게 하였다. 마이크로타이터 플레이트의 각 웰에 기질용액 (150μL)을 첨가하고, 핀을 웰속에 침지시키고 어두운 곳에서 25℃로 배양하였다. 발색후에 핀을 제거함으로써 반응을 중지시키고, 405nm에서 용액의 흡광도를 측정하였다.

하기에 나열된 옥타머는 항-HCV 항혈청과 면역반응성이 있었다. 3가지 항혈청 모두와 반응하는 펩티드는 에피토프로서 나열되고, 반면에 단지 하나 또는 두가지 항혈청과 반응하는 펩티드는 약한 에피토프(～에 의해 표시됨)로서 나열되었다. 특히 강한 에피토프는 수가 아닌 문자로 표식되었다(예컨대, EpAA).

[서열식 1a]

| AA# | 서열 | | AA# | 서열 |
|---|---|---|---|---|
| 23 | KEPGGGQA | | 87 | GNEGCGWA |
| 24 | EPGGGQAV | Ep2 | | |
| 25 | PGGGQAVG | | 88 | NEGCGWAG |
| 26 | GGGQAVGG | | 89 | EGCGWAGW |
| 27 | GGQAVGGV | | 90 | GCGWAGWL |
| 28 | GQAVGGVY | | 91 | CGWAGWLL |
| 29 | QAVGGVYL ~ | | 92 | GWAGWLLS |
| 30 | AVGGVYLL | | 93 | WAGWLLSP |
| 31 | VGGVYLLP | | 94 | AGWLLSPR |
| 32 | GGVYLLPR | | 95 | GWLLSPRG |
| 33 | GVYLLPRR | | 96 | WLLSPRGS |
| 34 | VYLLPRRG | | 97 | LLSPRGSR |
| 35 | YLLPRRGP | | 98 | LSPRGSRP |
| 36 | LLPRRGPR | | 99 | SPRGSRPS |
| 66 | PKARRPEG Ep1 | | 100 | PRGSRPSW Ep3 |
| 67 | KARRPEGR | | 101 | RGSRPSWG |
| 68 | ARRPEGRT | | 102 | GSRPSWGP |
| 69 | RRPEGRTW | | 103 | SRPSWGPT |
| 70 | RPEGRTWA | | | |
| 71 | PEGRTWAQ | | 186 | TVPASAYQ Ep4 |
| 72 | EGRTWAQP | | 187 | VPASAYQV |
| 73 | GRTWAQPG EpA | | 188 | PASAYQVR |
| 74 | RTWAQPGY | | 189 | ASAYQVRN |
| 75 | TWAQPGYP | | 190 | SAYQVRNS |
| 76 | WAQPGYPW | | 191 | AYQVRNST |

[서열식 1b]

| | | | |
|---|---|---|---|
| 77 | AQPGYPWP | | |
| 78 | QPGYPWPL | 206 | DCPNSSIV ~ |
| 79 | PGYPWPLG | | |
| 80 | GYPWPLYG | 223 | TPGCVPCV ~ |
| 81 | YPWPLYGN | | |
| 82 | PWPLYGNE | 232 | EGNASRCW Ep5 |
| 83 | WPLYGNEG | | |
| 84 | PLYGNEGC | 256 | TQLRRHID ~ |
| 85 | LYGNEGCG | | |
| 86 | YGNEGCGW | 286 | LVGQLFTF ~ |
| | | 297 | RHWTTQGC Ep6 |
| | | 298 | HWTTQGCN |
| | | 299 | WTTQGCNC |
| | | 321 | MMMNWSPI ~ |
| | | 347 | DMIAGAHW Ep7 |
| | | 357 | LAGIAYFS Ep8 |

[서열식 1c]

413 LINTNGSW EpB
414 INTNGSWH

432 SLNTGWLA ~

465 FDQGWGPI EpC
466 DQGWGPIS
467 QGWGPISY
468 GWGPISYA
469 WGPISYAN
470 GPISYANG
471 PISYANGS

480 PDQRPYCW EpD
481 DQRPYCWH
482 QRPYCWHY
483 RPYCWHYP
484 PYCWHYPP

500 KSVCGPVY Ep9
501 SVCGPVYC
502 VCGPVYCE

521 RSGAPTYS Ep10

540 NNTRPPLG EpE
541 NTRPPLGN
542 TRPPLGNW
543 RPPLGNWF
544 PPLGNWFG
545 PLGNWFGC
546 LGNWFGCT
547 GNWFGCTW
548 NWFGCTWM
549 WFGCTWMN

579 LHCPTDCF ~

Ep12

594 YSRCGSGP $F_A$
595 SRCGSGPW
596 RCGSGPWL
597 CGSGPWLT
598 GSGPWLTP
599 SGPWLTPR
600 GPWLTPRC
601 PWLTPRCL
602 WLTPRCLV
603 LTPRCLVD EpF
604 TPRCLVDY
605 PRCLVDYP
606 RCLVDYPY
607 CLVDYPYR
608 LVDYPYRL
609 VDYPYRLW
610 DYPYRLWH
611 YPYRLWHY $F_B$
612 PYRLWHYP
613 YRLWHYPC

641 EAACNWTR

662 LSPLLLII Ep13
663 SPLLLIII
664 PLLLIIIQ
665 LLLIIIQW

685 LSTGLIHL ~

705 VGSSIASW ~
706 GSSIASWA

729 ARVCSCIW Ep14

[서열식 1d]

782 WVPGAVYT

EpG

783 VPGAVYTF
784 PGAVYTFY
785 GAVYTFYG
786 AVYTFYGM
787 VYTFYGMW
788 YTFYGMWP
789 TFYGMWPL

801 LALPQRAY ~

[서열식 1e]

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 851 | RVEAQLHV EpH | | 1384 | VIKGGRHL Ep20 |
| 852 | VEAQLHVW | | | |
| 853 | EAQLHVWI | | 1410 | LGINAVAY Ep21 |
| 854 | AQLHVWIP | | 1411 | GINAVAYY |
| 855 | QLHVWIPP | | | |
| | | | 1454 | CNTCVIQT ~ |
| 893 | LAVFGPLW ~ | | | |
| | | | 1492 | GRGKPGIY Ep22 |
| 916 | QGLLRFCA ~ | | 1493 | RGKPGIYR |
| 928 | MIGGHYVQ Ep15 | | 1532 | PAETTVRL Ep23 |
| | | | 1533 | AETTVRLR |
| 946 | TGTYVYNH EpI | | 1534 | ETTVRLRA |
| | | | 1535 | TTVRLRAY |
| 952 | NHLTPLRD EpJ | | | |
| 953 | HLTPLRDW | | 1560 | GVFIGLIH Ep24 |
| 954 | LTPLRDWA | | 1561 | VFIGLIHI |
| 1026 | LAPITAYA ~ | | 1581 | ENLPYLVA |
| | | Ep25 | | |
| 1072 | TCINGVCW EpK | | 1567 | NLPYLVAY |
| | | | 1568 | LPYLVAYQ |
| 1109 | LVGWPAPQ Ep16 | | 1569 | PYLVAYQA |
| | | | 1570 | YLVAYQAT |
| 1171 | CPAGHAVG Ep17 | | 1571 | LVAYQATV |
| 1113 | PAGHAVGI | | 1572 | VAYQATVC |
| 1114 | AGHAVGIF | | 1573 | AYQATVCA |
| 1115 | GHAVGIFR | | 1574 | YQATVCAR |
| 1116 | HAVGIFRA | | 1575 | QATVCARQ |
| 1117 | AVGIFRAA | | 1576 | ATVCARQA |
| | | | 1577 | TVCARQAP |
| 1218 | VVPQSEQV EpL | | | |
| | | | 1601 | PPSWDQMW |
| 1240 | VPAAYAAQ ~ | Ep26 | | |
| | | | 1602 | PSWDQMWK |
| 1260 | ATLGFGAY ~ | | 1603 | SWDQMWKC |
| | | | 1604 | WDQMWKCL |
| 1280 | GVRITTGS Ep18 | | 1605 | DQMWKCLI |
| 1281 | VRITTGSP | | 1606 | QMWKCLIR |
| 1282 | RITTGSPI | | 1607 | MWKCLIRL |
| 1283 | ITTGSPIT | | | |
| 1284 | TTGSPITY | | 1615 | KPTLHGPI Ep27 |
| 1285 | TGSPITYG | | 1616 | PTLHGPIP |

[서열식 1f]

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | 1617 | TLHGPIPL |
| 1322 | DATSILGI ~ | 1618 | LHGPIPLL |
| | | 1619 | HGPIPLLY |
| 1338 | TAGARLVV ~ | 1620 | GPIPLLYR |
| 1371 | GEIPFYGK Ep19 | 1655 | VVTSTWVL ~ |

[서열식 1g]

1694 IIPDREVL EpM
1695 IPDREVLY

1710 ECSQHLPY EpN
1711 CSQHLPYI
1712 SQHLPYIE

1728 EKQKALGL EpO
1729 KQKALGLL

1758 EIEWAKLM EpP
1759 IEWAKLMW
1760 EWAKLMWN
1761 WAKLMWNE
1762 AKLMWNEI

1781 LPGNPAIA ~

1808 LFNILGGW Ep28

1821 AAPGAATA ~

1851 ILAGYGAG Ep29

Ep31

1880 VNLLPAIL ~

1908 PGEGAVQW EpG
1909 GEGAVQWM
1910 EGAVQWMN
1911 GAVQWMNR
1912 AVQWMNRL
1913 VQWMNRLI

1925 RGNHVSPI EpR

1940 AAARVTAI Ep30
1941 AARVTAIL
1942 ARVTAILS
1943 RVTAILSS
1944 VTAILSSL
1945 TAILSSLV
1946 AILSSLVT
1947 ILSSLVTQ
1948 LSSLVTQL
1949 SSLVTQLL
1950 SLVTQLLR
1951 LVTQLLRR

1966 SECTIPCS EpS
1967 ECTIPCSG
1968 CTIPCSGS
1969 TIPCSGSW

1999 LMPQLPGI EpT
2000 MPQLPGIP
2001 PQLPGIPE
2002 QLPGIPEV
2003 LPGIPEVS
2004 PGIPEVSC
2005 GIPEVSCQ
2006 IPEVSCQR
2007 PEVSCQRG
2008 EVSCQRGY
2009 VSCQRGYK
2010 SCQRGYKG
2011 CQRGYKGV
2012 QRGYKGVW
2013 RGYKGVWR
2014 GYKGVWRG

2024 IMHTRCHC

2048 VGPRICRN EpU
2049 GPRICRNY
2050 PRICRNYW
2051 RICRNYWS
2052 ICRNYWSG
2053 CRNYWSGT
2054 RNYWSGTE
2055 NYWSGTEP
2056 YWSGTEPI
2057 WSGTEPIN

2071 TPLPAPNY Ep32

2088 EEYVIRQV EpV
2089 EYVIRQVG
2090 YVIRQVGD
2091 VIRQVGDF
2092 IRQVGDFH
2093 RQVGDFHY

2108 DNLKCPCQ ~

[서열식 1h]

| | | |
|---|---|---|
| 2122 | EIELDGVR EpW | |
| 2123 | IELDGVRL | |
| 2124 | ELDGVRLH | |
| 2125 | LDGVRLHR | |
| 2126 | DGVRLHRF | |
| 2127 | GVRLHRFA | |
| 2128 | VRLHRFAP | |
| 2129 | RLHRFAPP | |
| 2130 | LHRFAPPC | |
| 2131 | HRFAPPCK | |
| 2132 | RFAPPCKP | |
| 2133 | FAPPCKPL | |
| 2134 | APPCKPLL | |
| 2135 | PPCKPLLR | |
| 2136 | PCKPLLRE | |
| 2137 | CKPLLREE | |
| 2138 | KPLLREEV | |
| 2139 | PLLREEVS | |
| 2140 | LLREEVSF EpX | |
| 2141 | LREEVSFR | |
| 2142 | REEVSFRV | |
| 2143 | EEVSFRVG | |
| 2144 | EVSFRVGL | |
| 2145 | VSFRVGLH | |
| 2146 | SFRVGLHE | |
| 2147 | FRVGLHEY | Ep38 |
| 2148 | RVGLHEYP | |
| 2165 | EPEPDVAV ~ | EpAA |
| 2187 | GRRLARGS ~ | |
| 2226 | LIEANLLW EpY | |
| 2227 | IEANLLWR | |
| 2228 | EANLLWRQ | |
| 2229 | ANLLWRQE | |
| 2230 | NLLWRQEM | |
| 2231 | LLWRQEMG | |
| 2232 | LWRQEMGG | |
| 2244 | VESENKVV Ep33 | |
| 2245 | ESENKVVI | |
| 2246 | SENKVVIL | |
| 2247 | ENKVVILD | |
| 2248 | NKVVILDS | |
| 2249 | KVVILDSF | |
| 2250 | VVILDSFD | |
| 2267 | EISVPAEI Ep34 | |
| 2280 | REAQALPV EpZ | |
| 2281 | EAQALPVW | |
| 2282 | AQALPVWA | |
| 2283 | QALPVWAR | |
| 2284 | ALPVWARP | |
| 2285 | LPVWARPD | |
| 2286 | PVWARPDY | |
| 2287 | VWARPDYN | |
| 2288 | WARPDYNP | |
| 2289 | ARPDYNPP | |
| 2290 | RPDYNPPL | |
| 2325 | PPPRKKRT Ep35 | |
| 2326 | PPRKKRTV | |
| 2327 | PRKKRTVV | |
| 2345 | AELASRSE Ep36 | |
| 2346 | ELASRSEG | |
| 2347 | LASRSEGS | |
| 2348 | ASRSEGSS | |
| 2349 | SRSEGSSS | |
| 2382 | AESYSSMP Ep37 | |
| 2401 | SDGSWSTV | |
| 2417 | VVCCSMSY | |
| 2418 | VCCSMSYW | |
| 2419 | CCSMSYWI | |
| 2420 | CSMSYWIG | |
| 2421 | SMSYWIGA | |
| 2422 | MSYWIGAL | |

[서열식 1i]

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2439 | QKLPINAL EpBB | | 2602 | LPLAVMGS |
| 2440 | KLPINALS | EpDD | | |
| 2441 | LPINALSN | | 2603 | PLAVMGSS |
| 2442 | PINALSNS | | 2604 | LAVMGSSY |
| 2443 | INALSNSL | | 2605 | AVMGSSYG |
| 2444 | NALSNSLL | | 2606 | VMGSSYGE |
| 2445 | ALSNSLLR | | 2607 | MGSSYGEQ |
| 2446 | LSNSLLRH | | 2608 | GSSYGEQR |
| 2447 | SNSLLRHH | | 2609 | SSYGEQRV |
| 2448 | NSLLRHHN | | 2610 | SYGEQRVE |
| 2449 | SLLRHHNL | | 2611 | YGEQRVEE |
| 2450 | LLRHHNLV | | 2612 | GEQRVEEL |
| 2451 | LRHHNLVY | | | |
| 2452 | RHHNLVYS | | 2632 | KTPMGFSY |
| 2453 | HHNLVYST | Ep41 | | |
| 2454 | HNLVYSTI | | 2633 | TPMGFSYD |
| 2455 | NLVYSTIS | | 2634 | PMGFSYDT |
| 2456 | LVYSTISR | | 2635 | MGFSYDTR |
| | | | 2636 | GFSYDTRC |
| 2469 | QKKVTFDR Ep39 | | 2637 | FSYDTRCE |
| 2470 | KKVTFDRL | | 2638 | SYDTRCED |
| 2471 | KVTFDRLQ | | | |
| 2472 | VTFDRLQV | | 2660 | YQCCDLDP ~ |
| 2473 | TFDRLQVL | | | |
| 2474 | FDRLQVLD | | 2676 | LTERLYVG |
| 2475 | DRLQVLDS | EpEE | | |
| 2476 | RLQVLDSH | | 2677 | TERLYVGG |
| | | | 2678 | ERLYVGGP |
| 2495 | ASKVKANL ~ | | 2679 | RLYVGGPL |
| | | | | |
| 2533 | RKAVTHIN EpCC | | 2688 | NSRGENCG |
| 2534 | KAVTHINS | EpFF | | |
| | | | 2689 | SRGENCGY |
| 2573 | GRKPARLI Ep40 | | 2690 | RGENCGYR |
| 2574 | RKPARLIV | | 2691 | GENCGYRR |
| 2575 | KPARLIVF | | 2692 | ENCGYRRC |
| 2576 | PARLIVFP | | 2693 | NCGYRRCR |
| 2577 | ARLIVFPD | | | |
| 2578 | RLIVFPDL | | 2707 | TSCGNTLI Ep42 |
| | | | | |
| | | | 2721 | AACRAAGL ~ |
| | | | | |
| | | | 2757 | AFTEAMTR |
| | | Ep43 | | |
| | | | 2758 | FTEAMTRY |
| | | | 2759 | TEAMTRYS |
| | | | 2760 | EAMTRYSA |
| | | | 2761 | AMTRYSAP |
| | | | 2762 | MTRYSAPP |

[서열식 1j]

2779 DLELIISC Ep44
2780 LELIISCS

2794 HDGAGKRV
Ep45
2795 DGAGKRVY
2796 GAGKRVYY
2797 AGKRVYYL
2798 GKRVYYLT
2799 KRVYYLTR
2800 RVYYLTRD
2801 VYYLTRDP
2802 YYLTRDPT

2817 WETARHTP
EpGG
2818 ETARHTPV
2819 TARHTPVN
2820 ARHTPVNS
2821 RHTPVNSW
2822 HTPVNSWL
2823 TPVNSWLG
2824 PVNSWLGN
2825 VNSWLGNI
2826 NSWLGNII
2827 SWLGNIIM
2828 WLGNIIME
2829 LGNIIMEA
2830 GNIIMEAP
2831 NIIMEAPT
2832 IIMEAPTL
2833 IMEAPTLW
2834 MEAPTLWA
2835 EAPTLWAR
2836 APTLWARM
2837 PTLWARMI
2838 TLWARMIL
2839 LWARMILM
2840 WARMILMT
2841 ARMILMTH
2842 RMILMTHF
2843 MILMTHFE

2863 LDCEIYGA Ep46
2864 DCEIYGAC
2865 CEIYGACY
2866 EIYGACYS
2867 IYGACYSI

2878 DLPPIIQR Ep47
2879 LPPIIQRL
2880 PPIIQRLH
2881 PIIQRLHG
2882 IIQRLHGL
2883 IQRLHGLS
2884 QRLHGLSA
2885 RLHGLSAF
2886 LHGLSAFS
2887 HGLSAFSL
2888 GLSAFSLH
2889 LSAFSLHS
2890 SAFSLHSY
2891 AFSLHSYS
2892 FSLHSYSP
2893 SLHSYSPG
2894 LHSYSPGE
2895 HSYSPGEI

[서열식 1k]

2912 LGVPPLRA Ep48
2913 GVPPLRAW
2914 VPPLRAWR

2938 AAICGKYL Ep49
2939 AICGKYLE
2940 ICGKYLEN

2966 DLSGWETA
EpHH

2984 VSHARPRW EpII

IV. B. 식별검사

하기의 검사는 후기 항원으로부터 초기 항원을 식별하기 위해 수행되었다.

초기항원에 대한 항체는 검출될 수 있고, HCV 감염을 보다 빠르게 진단하는데 이용될 수 있다. 증가된 ALT를 제공하지만 항-C100-3항체에 대해서 네가티브인 사람 환자로부터 연속방혈이 얻어졌다.

완전한 혈청전환 전에 얻어진 5방혈(C100-3양성)을 울혈하고, 1 : 2000의 희석도로 검사에 이용하였다. 이 검사는 상기의 섹션 IV.A에 기재된 대로 수행되었다. 그러나 핀들의 하나의 복제세트는 호스래디쉬 퍼옥시다제-표지된 염소 항-사람 IgG 특이적인 항혈청과 배양하였고, 반면에 다른 세트는 호스래디쉬 퍼옥시다제 -표지된 염소 항- 사람 IgM 특이적인 항혈청과 배양하였다. IgM 항체와 면역반응성이 있는 에피토프는 초기 에피토프이다.

결과는 대부분의 초기 에피토프가 대략 아미노산 480부터 대략 아미노산 650까지의 부위에서 발견되는 것을 나타냈다.

특히 강한 IgM 에피토프는 아미노산 번호 506, 510, 523, 553, 562, 580으로 시작하는 옥타머, 및 590내지 620의 부위였다. 이 부위로부터의 에피토프를 함유하는 항원을 이용하는 검사는 다른 항원을 이용하는 검사보다 초기 단계에서 HCV감염의 진단을 가능하게 할 것이다.

본 발명자는 부가적으로 절개 가슴 수혈후 NANB 간염을 갖는 5환자로부터 취한 연속적인 혈장표본을 시험하고 3-12년간 계속 연구하였다. 초기의 방혈날짜는 일주일보다 더 적게 떨어져 있었다. 각 표본은 하나의 코어 항원(C22), 두가지의 엔벨로프 항원(E1 및 E2), 및 세가지의 비구조적 부위 항원(C33c, C100,및 NS5)에 대한 EIA에 의하여 IgG및 IgM에 대해 시험하였다.

본 발명자는 C22및 C33c에 대한 IgM반응이 그 항원들에 대한 IgG반응보다 앞선다는 것을 발견하였다.

NS-5는 또한 IgM 반응을 유도하였지만, 이 반응은 그 항원에 대한 IgG반응보다 앞서지 않았다. 따라서 C22및 C33c부위로부터 유도된 에피토프를 이용하고 IgM결합에 대해 검사함으로써 감염의 매우 초기의 단계를 결정할 수 있는 검사를 마련할 수 있게 된다. C33c 부위에 대한 항체는 최장시간 동안
지속하였는데, 이것은 C33c에 대해 향하여진 진단검사가 가장 확실할 것이라는 것을 제안한다.

IV. C. 다른 개체로부터의 HCV분리물의 서열변이

CDC/HCV1으로부터 벗어난 서열을 포함하는 HCV의 분리물이 인간 개체에서 확인되었는데, 그들의 일부는 항-C100-3 항체에 대해서 혈청학적으로 양성이었다(EC10은 항체음성이었다). 이 새로운 분리물의 확인은 CDC/HC1서열을 이용한 PCR기술에 의해 증폭된 HCV 게놈의 절편을 클로닝하고 서열결정함으로써 수행되었다. 이 방법은 여기서 기술한 HCV cDNA서열에 근거한 프라이머와 프로브를 이용한다. 이 방법의 첫번째 단계는 역전사효소를 이용하여 cDNA를 HCV게놈으로, 또는 그것의 복제중간 생성물로 합성하는 것이다. HCV cDNA의 합성후, 그리고 증폭전에, 샘플내의 RNA는 당업계에서 공지된 기술에 의하여 분해된다. 그 다음엔 HCV cDNA의 표시된 절편이 적당한 프라이머의 사용에 의하여 증폭된다. 증폭된 서열을 클로닝하고, 증폭된 서열을 포함하는 클론은 프라이머 사이에 놓인 서열에는 상보적이지만 프라이머와 중복되지 않는 프로브에 의하여 검출된다.

IV.C.1. 미국의 인간으로부터 분리한 HCV분리물

HCV 비리온의 공급원으로 이용된 혈액샘플은 American Red Cross in Charlotte, North Carolina로부터, 그리고 Community Blood Center of Kansas, Kansas City, Missouri로부터 얻어졌다. 샘플을 ELISA검사를 이용하여 HCV C100-3항원에 대한 항체에 대해서 스크리닝하고, 항-HCV항체를 측정하기 위해 폴리클로날 염소 항- 사람 HRP를 이용하여 보충적인 웨스턴 블롯 분석하였다.

각각 American Red Cross로부터의 및 Community Blood Center of Kansas로 부터의 두샘플인 #23및 #27은 이 검사에 의하여 HCV양성인 것으로 결정되었다.

이 샘플의 혈청에 존재하는 바이러스 입자를 Bradley등(1985)에 의해 기재된 조건하에서 초원심분리에 의하여 분리하였다.

10㎍/mL단백질 가수분해효소 K및 0.1% SDS의 최종농도에서 단백질 가수분해효소 K및 SDS로의 분해에 의하여 입자들로부터 RNA를 추출하였다 ; 분해는 37℃에서 1시간 동안이었다. 바이러스 RNA를 클로로포름-페

놀 추출에 의해 추가로 정제하였다.

RNA의 제조에서 HCV RNA는 cDNA로 역전사되었다.

cDNA의 양쪽 가닥이 합성된 후에 결과적인 cDNA가 PCR 방법에 의하여 증폭되었다. 각 HCV분리물에서 유도된 세개의 클론의 HCV cDNA를 서열 분석하였다. 분석은 본질적으로 Chen 및 Seeburg (1985)에서 기재된 방법에 의하여 행해졌다.

샘플23 및 27의 HCV로부터 유도된 클론의 컨센서스 서열은 각각 제3도 및 제3도에서 보여진다.

변이서열도 또한 이 도면들에서 보여지고, 컨센서스 서열에서 암호화된 아미노산도 마찬가지다.

제5도 및 제6도는 샘플23, 27, 및 HCV1의 정렬된 포지티브가닥 뉴클레오티드 서열 (제5도)및 추정되는 아미노산서열(제6도)의 비교를 나타낸다. 제6도에서 HCV1의 아미노산 서열은 HCV게놈 RNA의 큰 ORF에 의해 암호화된 HCV 폴리단백질의 아미노산번호 129-467을 나타낸다. 제5도와 제6도의 조사는 3가지 분리된 클론의 서열에 변이가 있다는 것을 보여준다. 뉴클레오티드수준 및 아미노산 수준에서 서열변이는 바로 밑의 표에서 요약된다. 표에서 , S및 NS1으로 표시된 폴리펩티드는 각각 아미노산 번호 130내지 ~380, 및 380내지~470을 나타내며, 그 도메인들은 이전에 공지된 대로이다. 번호는 추정되는 개시 메티오닌으로부터 붙였다. 술어 S와 NS1은 플라비바이러스 모델을 이용하여 폴리펩티드를 암호화하는 서열의 위치결정에 근거한다. 그러나 상기에서 논의한 대로 최근의 증거는 바이러스 폴리펩티드 도메인에 관하여, 특히 추정 E/NS1 도메인에서 HCV와 플라비 바이러스 사이에 전적인 상관관계는 없다는 것을 제안한다.

참으로, HCV 폴리펩티드와 그것의 코딩 도메인은 플라비 바이러스 모델로부터 실질적인 일탈을 나타낼 수 있다.

*[표 1]*

서열상동성

| | 뉴클레오티드 | | | 암호화 아미노산 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 전체 | S | NS1 | 전체 | S | NS1 |
| | % | % | % | % | % | % |
| HCV1/HCV23 | 93 | 95 | 91 | 92 | 95 | 87 |
| HCV1/HCV27 | 89 | 93 | 84 | 89 | 95 | 82 |
| HCV23/HCV27 | 89 | 93 | 85 | 90 | 93 | 84 |

새로 분리한 HCV서열에 변이가 있음에도 불구하고, 샘플 23및 27(HCV23 및 HCV27이라부름)로 부터의 클로닝된 서열은 각각 1019 뉴클레오티드를 포함하는데, 이것은 선택된 클론에서 이 부위의 삭제 및 첨가 돌연변이체의 결핍을 나타낸다.

제5도 및 제6도의 서열은 또한 분리된 서열이 그 부위에서 재배열되지 않는 것을 나타낸다.

HCV1에 대한 그리고 HCV의 다른 분리물에 대한 컨센서스 서열의 비교는 상기의 표에서 요약되었다. 침팬지 분리물 HCV1, 그리고 인간에서 분리된 HCV 사이의 서열변이는 인간 기원의 HCV 사이에서 보여지는 것과 거의 동일하다.

추정 도메인 중 두가지에서의 서열변이가 일정하지 않은 것은 흥미있다. 추정S부위의 서열은 비교적 일정한 것 같고, 그 부위 전체에 무작위로 흩어져 있는 것 같다. 반대로, 추정 NSI부위는 전체서열보다 더 높은 정도의 다양성을 가지며, 변이가 추정폴리단백질의 추정 N-말단으로부터 아랫쪽으로 약 70아미노산에 위치된 양 28아미노산의 초변이성 포켓에 있는 것같다.

검출된 변이가 증폭과정 동안에 도입된 것으로 생각될 수 있지만, 변이의 모두가 이러한 결과로부터 생긴 것 같지는 않다.

Taq중합효소는 사이클당 DNA주형의 10킬로염기 당 대략 1염기로 서열속에 에러를 도입하는 것으로 평가되었다(Saiki등(1988)). 이러한 평가에 근거하여 1019bp DNA단편의 PCR 증폭 동안에 7에러까지 도입될 수 있다.

그러나 HCV-23과 HCV-27의 세개의 서브클론은 각각 29 및 14 염기변이를 생성하였다.

하기의 기술은 이러한 변이가 자연적으로 발생한다는 것을 제안한다. 염기 변화의 약 60%는 아미노산 서열은 변화시키지 않는 잠재돌연변이이다. PCR 증폭동안 Taq중합효소에 의해 도입되는 변이는 무작위로 일어나는 것으로 여겨진다; 그러나 이결과는 변이서열이 적어도 하나의 특이적인 부위에 몰린다는 것을 보여준다.

IV.C.2. 이탈리아 및 미국에서의 인간으로부터의 HCV분리물

다른 분리물에 존재하는 HCV RAN의 절편은 HCV/cPCR 방법에 의하여 증폭되었다. 이 절편은 추정 HCV 폴리단백질의 메티오닌 암호화 개시 코돈으로부터 아랫쪽으로 ~0.6kb 내지 ~1.6kb의 부위에 걸쳐있다. 이

분리물은 HCV 감염된 개체로부터 얻어진 생물학적 표본으로부터의 것이다. 더 특이적으로는 분리물 HCT#18은 미합중국의 개체로 부터의 인간혈장에서 분리하고, EC1 및 EC10은 이탈리아 환자의 간 생검으로 부터 분리하고, Th는 미합중국 환자의 말초혈액 단핵세포 분획으로 부터 분리하였다. 침팬지로부터 HCV RNA의 필적하는 절편을 분리하였다.

RNA는 인간 혈장표본으로부터 페놀: CHCl: 이소아밀 알코올 추출을 이용하여 추출 되었다. 혈장 0.1mL또는 0.01mL을 10내지 40㎍/mL폴리아데닐산을 포함하는 TENB/단백질 가수분해효소 K/SDS용액(0.05M Tris-HC1,pH8.0,0.001 M EDTA, 0.1M NaC1, 1mg/mL 단백질 가수분해효소 K, 및 0.5% SDS)으로 최종부피 1.0mL로 희석하고, 37℃에서 60분간 배양하였다. 이 단백질 가수분해효소 K분해후에, 결과적인 혈장 분획을 TE(50mM Tris-HC1, pH8.0, 1mM EDTA) 포화된 페놀(pH6.5)로 추출하여 탈단백질화 하였다.

페놀층을 원심분리에 의해 분리하고, 0.1% SDS를 포함하는 TENB로 재추출하였다. 각 추출에서의 결과적인 수층을 모아서, 동일 체적의 페놀/클로로포름/ 이소아밀알코올[1 : 1(99 : 1)]로 두번 추출하였고, 그 다음 동일 체적의 클로로포름/ 이소아밀 알코올의 99 : 1 혼합물로 두번 추출하였다. 원심분리에 의한 층분리후, 수층을 0.2M Na 아세트산염의 최종농도로 가져가고, 두배 체적의 에탄올의 첨가에 의하여 핵산을 침전시켰다. 침전된 핵산은 4℃에서 60분 동안 38K로 SW41 로터에서 초원심분리 또는 4℃에서10K로 10분 동안 마이크로 원심분리기에서 초원심분리에 의하여 회수되었다.

간 생검에서 추출한 RNA는 이탈리아 토리노 Ospedale Maggiore di S.Giovanni Batt ista의 Dr. F. Bonino에 의해 제공되었다.

단핵세포 분획은 제조자의 지시를 이용하여 Ficoll-Paque® (Pharmacia Corp)를 통한 개체의 혈액분액의 침강에 의하여 얻어졌다. 전체 RNA는 Choo등 (1989)에서 기재된 구아니디늄 티오시아네이트 방법을 이용하여 분획으로부터 추출되었다.

샘플로부터 HCV cDNA의 합성은 역전사 효소를 이용하여 수행 되었다. 에탄올 침전후 침전된 RNA나 핵산 분획을 건조시키고, DEPC처리한 증류수속에 재현탁시켰다. 핵산의 이차구조를 65℃에서 10분간 가열함으로써 파괴하고, 샘플을 즉시 얼음에서 냉각시켰다. cDNA를 간의 전체 RNA 1내지 3㎍을 이용하여 합성하였고, 또는 혈장의 10내지 100μL로부터 추출된 핵산(또는 RNA)으로부터 합성하였다.

이 합성은 역전사효소를 이용하였고, 제조자 BRL에 의해 특정된 프로토콜을 이용하여 25μL반응으로 행해졌다. cDNA합성을 위한 모든 반응혼합물은 23 유니트의 RNA 아제억제제인 Rnasin® (Fisher/Promega)을 포함하였다. cDNA합성후 반응 혼합물을 물로 희석하고, 10분간 끓이고, 빨리 얼음 냉각시켰다.

각 세트의 샘플을 2번 PCR 증폭시켰다. 반응을 위한 프라이머는 EnvL 및 EnvR이라고 표시된 부위를 증폭하도록 선택되었다. EnvL 부위는 뉴클레오티드669-1243을 둘러싸고, 추정아미노산 117내지 308을 둘러싼다 ; EnvR부위는 뉴클레오티드 1215-1629를 둘러싸고, 추정 아미노산 300-408을 암호화한다(추정아미노산은 추정 메티오닌 개시코돈으로부터 시작하여 넘버링되었다)

PCR 반응은 1㎍의 RNase A를 첨가한 것을 제외하고는 본질적으로 제조자의지시(Cetus-Perkin-Elmer)에 따라서 수행되었다. 반응은 최종체적 100μL에서 수행되었다.

PCR은 30사이클동안 수행되었는데, 94℃(1분), 37℃(2분), 및 72℃(3분)의 방법이 이용되었는데 마지막 사이클에서는 72℃에서 7분 연장되었다.

그다음에는 샘플을 페놀 : $CHCl_3$로 추출하고, 두번 에탄올 침전시키고, 10mM Tris HCl, pH8.0에 재현탁시키고, Centricon-30(Amicon)여과를 이용하여 농축하였다.

이러한 과정은 효율적으로 크기에 있어 30 뉴클레오티드 보다 작은 올리고 뉴클레오티드를 제거한다 ; 따라서 PCR증폭의 첫번째 라운드로부터의 프라이머가 제거된다.

그 다음엔 Centricon-30 농축 샘플을 두번째 라운드 PCR증폭시켰다. PCR에 의한 증폭을 35사이클 동안 하였는데, 94℃(1분), 60℃(1분), 및 72℃(2분)의 방법을 이용하고 마지막 사이클에서는 72℃에서 7분 연장하였다.

그다음 샘플을 페놀 : $CHCl_3$ 추출하고, 두번 에탈올 침전시키고, EcoRI으로 분해시켰다.

PCR 반응산물은 6% 폴리아크릴아미드겔 상에서의 전기영동에 의해 산물들을 분리하여 분석하였다. 기대된 PCR 산물의 대략적으로 계산된 크기의 DNA를 겔로부터 전기용출 시키고, pGEM-4플라스미드 벡터속에 또는 λgt11속에 서브클로닝하였다. 첫번째 라운드 증폭후 EnvL 및 EnvR의 기대된 산물 크기는 각각 615bp 및 683 bp이다;

두번째 라운드 증폭후에는 EnvL및 EnvR의 기대된 산물 크기는 각각 414bp 및 575bp이다. 증폭된 산물을 포함하는 플라스미드는 숙주세포를 형질변환하는데 이용되었다. ;pGEM-4플라스미드는 DH5-알파를 형질변환하는데 이용되었다. λgt11은 C600 델타-HFL을 형질 변환하는데 이용되었다. 적당한 HCV프로브에 혼성화된 형질변환세포의 클론, 또는 정확한 크기의 삽입체를 갖는 것이 선택되었다. 그다음 삽입체를 M13속에 클로닝하고 서열결정했다.

모든 HCV/cPCR 산물에 대한 프로브는 PCR증폭에 의하여 제조된 HCV cDNA 의 $^{32}P$표지된 단편으로 구성되었다.

EnvL 부위의 변체에 대한 서열정보는 HCT#18의 3클론으로부터, TH의 2클론으로부터, EC1의 3클론으로부터, HCV1클론으로부터 얻어졌다. 이러한 클론에서 추출된 각 분리물의 혼성 뉴클레오티드 서열의 비교는 제 7도에서 보여진다.

도면에서, 각 서열은 EnvL부위의 센스가닥에 대해서 5' 내지 3'이 보여지며, 서열들이 정렬되었다.

수직선과 대문자는 서열 상동성을 나타내며, 선의 부재와 대문자로 쓰여지지 않은 문자는 상동성의 결핍

을 나타낸다.

라인에서 보여지는 서열은 하기와 같다. : 라인1, Thorn; 라인2, EC1; 라인3, HCT#18; 라인4, HCV1.

EnvR 부위의 변체에 대한 서열정보는 EC10의 두 클론으로부터, HCV1클론으로부터 얻어졌다. 두 EC10클론은 단지 하나의 뉴클레오티드에 의해서만 달랐다.

EC10(클론2)의 뉴클레오티드 서열 및 HCV1서열의 혼성물의 비교가 제8도에서 보여진다; 각 서열은 EnvR 부위의 센스가닥에 대해서 5' 내지 3'이 보여지며, 서열들이 정렬되었다. 서열사이의 이중점은 서열 상동성을 나타낸다.

분리물의 각각에 대한 EnvL(아미노산 #117-308)및 EnvR부위 (아미노산 #300-438)에서 암호화된 아미노산 서열의 비교는 각기 제9도 및 제10도에서 보여진다.

상기에서 기술한 대로 분리물 JH23및 JH27에 대한 서열도 도면에 포함되어 있다. 또한 일본의 분리물에서의 서열도 표시되는데 이 서열은 일본의 Dr. T. Miyamura에 의해 제공되었다. 도면에서는 HCV1에 대해서 온전히 그 부위에 대한 아미노산 서열이 주어져 있고, 다양한 분리물에서 비 -상동적인 아미노산이 표시되어 있다.

제9도에서 보여지는 것처럼, EnvL부위에서는 HCV1과 다른 분리물 사이에 전체 약 93%상동성이 있다.

HCT18, Th,및 EC1은 HCV1과 약 97% 상동성을 가진다; JH23및 JH27은 HCV1과 각각 약 96%및 약 95%상동성을 가진다. 제10도는 EnvR 부위에서의 상동성이 EnvL부위에서 보다 상당히 더 작다는 것을 보여준다; 더욱 하나의 소부위는 초변이성인 것 같다(즉, 아미노산 383-405에서). 이러한 데이타가 바로 밑에 표에서 요약되어 있다.

*[표 2]*

EnvR부위의 상동성

| 분리물 | HCV1 과의 퍼센트 상동성 | |
|---|---|---|
| | AA330-AA438 | AA383-AA405 |
| JH23(U.S.) | 83 | 57 |
| JH27(U.S.) | 80 | 39 |
| 일본 | 73 | 48 |
| EC10 (이탈리아) | 84 | 48 |

IV. 산업상 이용성

여기서 확인된 에피토프는 HCV감염에 대한 혈액의 스크리닝, 임상의 HCV진단, 항체의 생성, 및 약제의 제조와 같은 응용을 위하여 상기에서 기술한 대로 폴리펩티드 산물을 제조하는데 이용할 수 있다. 다른 응용도 상기에서 기술되었고, 당업자들에게는 여전히 다른 것들도 용이하게 명백할 것이다.

VII. 참고문헌 목록

Barr et al., Biotechniques (1986) 4 : 428.

Bradleyet al. Gastroenterology(1985)88 : 773.

Botstein, Gene(1979) 8 : 17.

M.A. Brinton,(1986) in The Viruses : The Togaviridae and Flaviviridae(Serieseds. 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., Meth Enzymol(1983) 101 : 307.

Catty(1988), Antibodies, Volume 1 : A Practical Approach(IRL Press).

Chaney et al., Cell Mol Genet (1986) 12 : 237.

Chakrabarti et al., Mol Cell Biol(1985) 5 : 3403.

Chang et al., Nature (1977) 198 : 1056.

Chen and seeburg, DNA (1985) 4:165.

Chirgwin et al., Biochemistry(1979)18 : 5294.

Chomczynski and Sacchi, Anal Biochem (1987) 162 : 156.

Choo et al., Science (1989) 244 : 359.

Clewell et al., Proc Natl Acad Sci USA(1969) 62 : 1159.

Clewell, J Bacteriol(1972)110 : 667.

Cohen, Proc Natl Acad Sci USA (1972) 69 : 2110.

Cousens et al., Gene(1987)61 : 265.

De Boer et al., Proc Natl Acad Sci USA(1983)292 : 128.

Dreesman et al, J Infect Dis(1985)151 : 761.

S.M. Feinstone and J.H. Hoofnagle, New Engl J Med(1984) 311 : 185.

Felgner et al., Proc Natl Acad Sci USA(1987)84 : 7413.

Fields Knipe(1986), Fundamental Virology (Raven Press, N.Y.).

Fiers et al., Nature (1978)273 : 113.

R.J. Gerety et al., in Viral Hepatitis and Liver Disease(B.N.Vyas, J.L.Dienstag, and J.H.Hoofnagle, eds)

Glennie et al., Nature(1982)295 : 712.

Gluzman, Cell (1981)23 : 175.

Goeddel et al., Nuc Acids Res(1980) 8 : 4057.

Graham and Van der Eb, Virology (1978)52 : 546.

Grunstein and Hogness, Proc Natl Acad Sci USA(1975)73 : 3961.

Grych et al., Nature (1985)316 : 74.

Gubler and Hoffman Gene(1983)25 : 263.

Hahn, Virology(1988)162 : 167.

Hammerling et al., (1981), Monoclonal Antibodies T-Cell Hybridomas.

Han, Biochemistry(1987) 26 : 1617.

Helfman, Proc Natl Acad Sci USA (1983) 80 : 31.

Hess et al., J Adv Enzyme Reg (1968) 7 : 149.

Hinnen et al., Proc Natl Acad Sci USA (1978)75 : 1929.

Hitzeman et al., J biol Chem(1980)255 : 2073.

Holland et al., Biochemistry(1978) 17 : 4900.

Holland, J Biol Chem(1981)256 : 1385.

Holland and Holland, J Biol Chem(1980) 255 : 2596.

Hoopes et al., Nuc Acids Res(1981)9 : 5493.

Houghton et al., Nuc Acids Res(1981) 9 : 247

T.V Hunyh 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.

Ito et al., AgricBTol Chem(1984)48 : 341.

Iwarson, British Medical J(1987)295 : 946.

Kennett et al.(1980)Monoclonal Antibodies.

Kniskern et al., Gene(1986)46 : 135.

Kyte and Doolittle, J Mol Bio(1982) 157 : 105-132.

Laemmli, Nature(1970)227 : 680.

Lee et al., Science(1988)239 : 1288.

Luckow and Summers, Virol(1984)17 : 31.

Mackett et al., J Virol(1984)49 : 857.

T.Maniatis et al. (1982) Molecular Cloning; A Laboratory Manual(Cold spring Harbor Press, Cld Spring Harbor, N.Y.).

Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition(Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y).

Manning and Mocarski, Virol (1988) 167 : 477

Mayer and Walker, eds (1987),Immunochemical Methods In Cell And

Molecular Biology (Academic Press, London).

Maxam et al., Meth Enzymol (1980)65 : 499.

MacNamara et al., Science(1984) 226 : 1325.

Messing et al., Nuc Acids Res(1981) 9 : 309.

Messing, Meth Enzymol(1983) 101 : 20-37

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),pp. 375-440.

Moss(1987) in Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(Miller and Calos, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y), p.10.

Nagahuma et al., Anal Biochem (1984) 141 : 74.

Neurath et al., Science(1984) 224 : 392.

Nisonoff et al., Clin Immunol Immunopathol (1981) 21 : 397-406.

L.R. Overby, Curr Hepatol (1985)5 : 49.

L.R. Overby, Curr Hepatol (1986) 6 : 65.

L.R. Overby, Curr Hepatol (1987) 7 : 35.

Pachl et al., J Virol(1987) 61 : 315.

Peleg, Nature (1969)221 : 193.

Pfefferkorn and Shapiro(1974), in Comprehensive Virology, Vol 2(Fraenkel-conrat Wagner, eds., Plenum, N.Y) pp.171-230

A.M. Prince, Ann Rev Microbiol(1983) 37 : 217.

Rice et al. Science(1985) 229 : 726.

Rice et al (1986) in The Viruses : The Togaviridae And Flaviviridae(Series eds. Fraenkerl-Conrat and Wagner, Vol. eds. Schlesinger and Schlesinger, Plenum Press), p.279-328.

Roehrig (1986) in The Viruses : The Togaviridae And Flaviviridae(Series eds. Fraenkerl-Conrat and Wagner, Vol. eds. Schlesinger and Schlesinger, Plenum Press)

Sadler et al., Gene (1980)8 : 279.

Saiki et al., Nature (1986) 324 : 163.

Saiki et al., Science(1988) 239 : 487.

Sanger et al., Proc Natl Acad Sci USA (1977) 74 : 5463.

Setlow, ed. (1988), Genetic Engineering Vol. 10, pp.195-210(Plenum Publishing Co., N.Y.

Schlesinger et al. J Virol (1986) 60 : 1153.

M. Schreier et al., (1980)Hybridoma Techniques

Scopes (1984), Protein Purification, Principles and Practice, 2nd Ed.,(Springer-Verlag,N.Y.).

Shimatake et al., Nature(1981)292 : 128.

Singh et al., Nuc Acids Res (1983) 11 : 4049.

Sippel, Eur J Biochem(1973) 37 : 31.

Smith et al., Mol Cell Biol(1983) 3 : 2156-2165.

Steimer et al., J Virol(1986)58 : 9.

Stollar (1980), in The Togaviruses (R.W.Schlesinger, ed.), pp. 584-622.

Stuve et al., J Virol(1987) 61 : 326.

Sumiyoshi et al. Virol(1987)161 : 497.

Taylor et al., Biochim Biophys Acta (1976) 442 : 324.

Towbin et al. Proc Natl Acad Sci USA (1979) 76 : 4350.

Tsu and Herzenberg (1980), in Selected Methods In Cellular Immunology (W.H. Freeman and Co.)pp.373-391.

Vytdehaag et al., J Immunol(1985)134 : 1225.

P. Valenzuela et al. Nature(1982)298:344.

P. Valenzuela et al.(1984), in Hepatitis B(I.Millman et al., ed, Plenum Press)pp.225-236.

Warner, DNA (1984)3 : 401.

Ward et al., Nature (1989) 341 : 544.

Wu and Grossman, Meth Enzymol(1987), 154Recombinant DNA, Part E.

Wu, Meth Enzymol(1987), 155, Recombinant DNA, part F.

Zoller, Nuc Acids Res(1982) 10 : 6487.

U.S. Patent No. 4,341,761 U.S. Patent No. 4,466,917

U.S. Patent No. 4,399,121 U.S. Patent No. 4,472,500

U.S. Patent No. 4,427,783 U.S. Patent No. 4,491,632

U.S. Patent No. 4,444,887 U.S. Patent No. 4,493,890

U.S. Patent No. 4,816,467

## *(57) 청구의 범위*

### 청구항 1

HCV항체와 반응성이 있는 면역반응부는 필수적으로 제1도에 나타낸 아미노산 413 내지 아미노산 427(AA413-AA427)로 이루어진 HCV폴리펩티드 절편으로 구성되고, 상기의 절편은 대략 30 아미노산의 최대 길이를 갖는 HCV항체와 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기의 절편은 대략 25 아미노산의 최대 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기의 절편은 대략 20아미노산의 최대 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기의 절편은 대략 15 아미노산의 최대 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 면역 반응성이 있는 폴리펩티드.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기의 절편은 대략 12 아미노산의 최대 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

### 청구항 6

HCV항체와 반응성이 있는 면역반응부는 필수적으로 제1도에 나타낸 아미노산 413 내지 아미노산 427(AA413-AA427)로 구성되는 HCV폴리펩티드 절편으로 이루어진 HCV항체와 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

### 청구항 7

HCV항체와 반응성이 있는 면역반응부는 필수적으로 제1도에 나타낸 아미노산 2281 내지 아미노산 2300(AA2281-AA2300)으로 구성되는 HCV폴리펩티드 절편으로 이루어지고, 상기의 절편은 대략 50 아미노산의 최대 길이를 갖는 HCV항체와 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기의 절편은 대략 30 아미노산의 최대 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

### 청구항 9

제7항에 있어서, 상기의 절편은 대략 25 아미노산의 최대 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

### 청구항 10

HCV항체와 반응성이 있는 면역반응부는 필수적으로 제1도에 나타낸 아미노산 2281 내지 아미노산 2300(AA2281-AA2300)로 구성되는 HCV폴리펩티드 절편으로 이루어진 HCV항체와 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

**청구항 11**

HCV항체와 반응성이 있는 면역반응부는 필수적으로 제1도에 나타낸 아미노산 66내지 아미노산 85(AA66-AA85)로 구성되는 HCV폴리펩티드 절편으로 이루어진 HCV항체와 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

**청구항 12**

HCV항체와 반응성이 있는 면역반응부는 필수적으로 제1도에 나타낸 아미노산 540 내지 아미노산 554(AA540-AA554)로 구성되는 HCV폴리펩티드 절편으로 이루어지고, 상기의 절편은 대략 100아미노산의 최대 길이를 갖는 HCV항체와 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 상기의 절편은 대략 50 아미노산의 최대길이를 갖는 것을 특징으로 하는 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

**청구항 14**

제12항에 있어서, 상기의 절편은 대략 30 아미노산의 최대 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

**청구항 15**

제12항에 있어서, 상기의 절편은 대략 25 아미노산의 최대 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

**청구항 16**

제12항에 있어서, 상기의 절편은 대략 20 아미노산의 최대 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

**청구항 17**

HCV항체와 반응성이 있는 면역반응부는 필수적으로 제1도에 나타낸 아미노산 540 내지 아미노산 554(AA540-AA554)로 구성되는 HCV폴리펩티드 절편으로 이루어진 HCV항체와 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

**청구항 18**

HCV항체와 반응성이 있는 면역반응부는 필수적으로 제1도에 나타낸 아미노산 1218내지 아미노산 1267(AA1218-AA1267)로 구성되는 HCV폴리펩티드 절편으로 이루어진 HCV항체와 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

**청구항 19**

HCV항체와 반응성이 있는 면역반응부는 필수적으로 제1도에 나타낸 아미노산 465 내지 아미노산 480(AA465-AA480)로 구성되는 HCV폴리펩티드 절편으로 이루어지고, 상기의 절편은 대략 20 아미노산의 최대 길이를 갖는 HCV항체와 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

**청구항 20**

HCV항체와 반응성이 있는 면역반응부는 필수적으로 제1도에 나타낸 아미노산 465 내지 아미노산 480(AA465-AA480)로 구성되는 HCV폴리펩티드 절편으로 이루어진 HCV항체와 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

**청구항 21**

HCV항체와 반응성이 있는 면역반응부는 필수적으로 제1도에 나타낸 아미노산 2244내지 아미노산 2258(AA2244-AA2258)로 구성되는 HCV폴리펩티드 절편으로 이루어지고, 상기의 절편은 대략 25 아미노산의 최대 길이를 갖는 HCV항체와 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 상기의 절편은 대략 20 아미노산의 최대 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

**청구항 23**

HCV항체와 반응성이 있는 면역반응부는 필수적으로 제1도에 나타낸 아미노산 2244내지 아미노산 2258(AA2244-AA2258)로 구성되는 HCV폴리펩티드 절편으로 이루어진 HCV항체와 면역반응성이 있는 폴리펩티드.

**청구항 24**

HCV항체와 반응성이 있는 면역반응부는 필수적으로 제1도에 나타낸 아미노산 1940내지 아미노산 1959(AA1940-AA1959)로 구성되는 HCV폴리펩티드 절편으로 이루어진 HCV항체와 면역반응성이 있는 폴리펩

티드.

**청구항 25**

제1항 내지 제24항중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드로 이루어진 면역분석 시약.

**청구항 26**

샘플의 C형 간염바이러스(HCV) 단백질에서 면역반응성이 있는 항체의 존재를 검출하는 방법에서, 상기 방법은 제25항에 따른 고정화된 면역분석시약을 상기의 샘플과 접촉시키고, 상기의 시약에 결합된 항체를 검출하는 것으로 이루어지는 방법.

**청구항 27**

단일클론 또는 폴리클론 항체 조성물에서, 상기 항체는 제1항 내지 제24항중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드의 면역반응부에 결합하는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 28**

제1항 내지 제24항중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드의 제조방법에서, 상기의 폴리펩티드는 재조합 발현 또는 화학합성에 의하여 제조되는 것을 특징으로 하는 방법.

## *도면*

### *도면1a*

```
         R  T
MSTNPKPQKKNKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATR
KTSERSQPRGRRQPIPKARRPEGRTWAQPGYPWPLYGNEGCGWAGWLLSP-100
RGSRPSWGPTDPRRRSRNLGKVIDTLTCGFADLMGYIPLVGAPLGGAARA

                                  T
LAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLALLSCLTVPASAYQVRNSTGL-200
YHVTNDCPNSSIVYEAADAILHTPGCVPCVREGNASRCWVAMTPTVATRD
GKLPATQLRRHIDLLVGSATLCSALYVGDLCGSVFLVGQLFTFSPRRHWT-300

                                        V
TQGCNCSIYPGHITGHRMAWDMMMNWSPTTALVMAQLLRIPQAILDMIAG
AHWGVLAGIAYFSMVGNWAKVLVVLLLFAGVDAETHVTGGSAGHTVSGFV-400
SLLAPGAKQNVQLINTNGSWHLNSTALNCNDSLNTGWLAGLFYHHKFNSS
GCPERLASCRPLTDFDQGWGPISYANGSGPDQRPYCWHYPPKPCGIVPAK-500
SVCGPVYCFTPSPVVVGTTDRSGAPTYSWGENDTDVFVLNNTRPPLGNWF
GCTWMNSTGFTKVCGAPPCVIGGAGNNTLHCPTDCFRKHPDATYSRCGSG-600

   I
PWLTPRCLVDYPYRLWHYPCTINYTIFKIRMYVGGVEHRLEAACNWTRGE
RCDLEDRDRSELSPLLLTTTQWQVLPCSFTTLPALSTGLIHLHQNIVDVQ-700
YLYGVGSSIASWAIKWEYVVLLFLLLADARVCSCLWMMLLISQAEAALEN
LVILNAASLAGTHGLVSFLVFFCFAWYLKGKWVPGAVYTFYGMWPLLLLL-800
```

도면1b

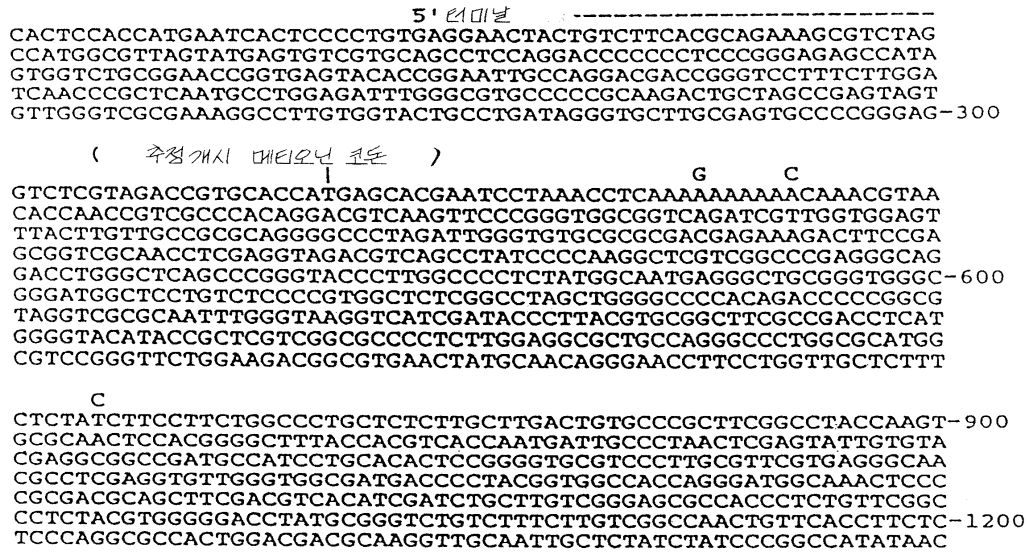
```
                                                          (N)
LALPQRAYALDTEVAASCGGVVLVGLMALTLSPYYKRYISWCLWWLQYFL
TRVEAQLHVWIPPLNVRGGRDAVILLMCAVHPTLVFDITKLLLAVFGPLW-900
ILQASLLKVPYFVRVQGLLRFCALARKMIGGHYVQMVIIKLGALTGTYVY
NHLTPLRDWAHNGLRDLAVAVEPVVFSQMETKLITWGADTAACGDIINGL-1000
PVSARRGREILLGPADGMVSKGWRLLAPITAYAQQTRGLLGCIITSLTGR
DKNQVEGEVQIVSTAAQTFLATCINGVCWTVYHGAGTRTIASPKGPVIQM-1100

             S  T
YTNVDQDLVGWPAPQGSRSLTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRGDSRG
SLLSPRPISYLKGSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPVEN-1200
LETTMRSPVFTDNSSPPVVPQSFQVAHLHAPTGSGKSTKVPAAYAAQGYK

                              L
VLVLNPSVAATLGFGAYMSKAHGIDPNIRTGVRTITTGSPITYSTYGKFL-1300


ADGGCSGGAYDIIICDECHSTDATSILGIGTVLDQAETAGARLVVLATAT
PPGSVTVPHPNIEEVALSTTGEIPFYGKAIPLEVIKGGRHLIFCHSKKKC-1400
DELAAKLVALGINAVAYYRGLDVSVIPTSGDVVVVATDALMTGYTGDFDS

   Y                  (S)
VIDCNTCVTQTVDFSLDPTFTIETITLPQDAVSRTQRRGRTGRGKPGIYR-1500
FVAPGERPSGMFDSSVLCECYDAGCAWYELTPAETTVRLRAYMNTPGLPV
CQDHLEFWEGVFTGLTHIDAHFLSQTKQSGENLPYLVAYQATVCARAQAP-1600
PPSWDQMWKCLIRLKPTLHGPTPLLYRLGAVQNEITLTHPVTKYIMTCMS
ADLEVVTSTWVLVGGVLAALAAYCLSTGCVVIVGRVVLSGKPAIIPDREV-1700
LYREFDEMEECSQHLPYIEQGMMLAEQFKQKALGLLQTASRQAEVIAPAV
QTNWQKLETFWAKHMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPAIASLMAFTAAVTSP-1800
LTTSQTLLFNILGGWVAAQLAAPGAATAFVGAGLAGAAIGSVGLGKVLID

                              (G)
ILAGYGAGVAGALVAFKIMSGEVPSTEDLVNLLPAILSPGALVVGVVCAA-1900

                                                    (HC)
ILRRHVGPGEGAVQWMNRLIAFASRGNHVSPTHYVPESDAAARVTAILSS
```

도면1c

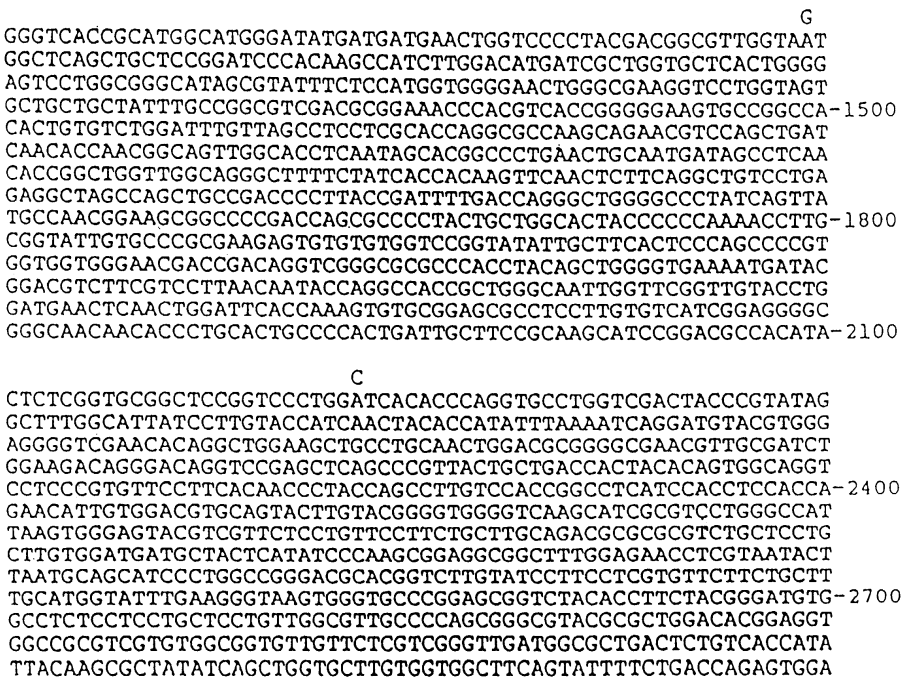
```
LTVTQLLRRLHQWISSECTTPCSGSWLRDIWDWICEVLSDFKTWLKAKLM-2000

                   (V)
PQLPGIPFVSCQRGYKGVWRGDGIMHTRCHCGAEITGHVKNGTMRIVGPR
TCRNMWSGTFPINAYTTGPCTPLPAPNYTFALWRVSAEEYVEIRQVGDFH-2100
YVTGMTTDNLKCPCQVPSPEFFTELDGVRLHRFAPPCKPLLREEVSFRVG
LHEYPVGSQLPCEPEPDVAVLTSMLTDPSHITAEAAGRRLARGSPPSVAS-2200
SSASQLSAPSLKATCTANHDSPDAELIEANLLWRQEMGGNITRVESENKV
VILDSFDPLVAEEDEREISVPAEILRKSRRFAQALPVWARPDYNPPLVET-2300

                                                   (S)
WKKPDYEPPVVHGCPLPPPKSPPVPPPRKKRTVVLTESTLSTALAELATR

                              (FA)
SFGSSSTSGITGDNTTTSSEPAPSGCPPDSDAESYSSMPPLEGEPGDPDL-2400
SDGSWSTVSSEANAEDVVCCSMSYSWTGALVTPCAAEEQKLPINALSNSL
LRHHNLVYSTTSRSACQRQKKVTFDRLQVLDSHYQDVLKEVKAAASKVKA-2500

(F)
NLLSVEEACSLTPPHSAKSKFGYGAKDVRCHARKAVTHINSVWKDLLEDN
VTPIDTTIMAKNEVFCVQPEKGGRKPARLIVFPDLGVRVCEKMALYDVVT-2600
KLPLAVMGSSYGFQYSPGQRVEFLVQAWKSKKTPMGFSYDTRCFDSTVTE

                                                  (G)
SDIRTEEAIYQCCDLDPQARVAIKSLTERLYVGGPLTNSRGENCGYRRCR-2700
ASGVLTTSCGNTLTCYIKARAACRAAGLQDCTMLVCGDDLVVICESAGVQ
EDAASLRAFTEAMTRYSAPPGDPPQPEYDLELITSCSSNVSVAHDGAGKR-2800
VYYLTRDPTTPLARAAWETARHTPVNSWLGNIIMFAPTLWARMILMTHFF
SVLIARDQLEQALDCEIYGACYSIEPLDLPPIIQRLHGLSAFSLHSYSPG-2900

                     G
EINRVAACLRKLGVPPLRAWRHRARSVRARLLARGGRAAICGKYLFNWAV

                                                    (P)
RTKLKLTPIAAAGQLDLSGWFTAGYSGGDIYHSVSHARPRWIWFCLLLLA-3000
AGVGIYLLPNRQ-3011
          |
          종결코돈
```

( ) - 가능하게는 5′ 또는 3′ 터미널 쪽으로 인접물에 기인한 이종성

도면2a




도면2b



도면2c

```
AGCGCAACTGCACGTGTGGATTCCCCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGGCGCGACGCCGTCAT
CTTACTCATGTGTGCTGTACACCCGACTCTGGTATTTGACATCACCAAATTGCTGCTGGC-3000
CGTCTTCGGACCCCTTTGGATTCTTCAAGCCAGTTTGCTTAAAGTACCCTACTTTGTGCG
CGTCCAAGGCCTTCTCCGGTTCTGCGCGTTAGCGCGGAAGATGATCGGAGGCCATTACGT
GCAAATGGTCATCATTAAGTTAGGGGCGCTTACTGGCACCTATGTTTATAACCATCTCAC
TCCTCTTCGGGACTGGGCGCACAACGGCTTGCGAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGT
CGTCTTCTCCCAAATGGAGACCAAGCTCATCACGTGGGGGGCAGATACCGCCGCGTGCGG-3300
TGACATCATCAACGGCTTGCCTGTTTCCGCCCGCAGGGGCCGGGAGATACTGCTCGGGCC
AGCCGATGGAATGGTCTCCAAGGGGTGGAGGTTGCTGGCGCCCATCACGGCGTACGCCCA
GCAGACAAGGGGCCTCCTAGGGTGCATAATCACCAGCCTAACTGGCCGGGACAAAAACCA
AGTGGAGGGTGAGGTCCAGATTGTGTCAACTGCTGCCCAAACCTTCCTGGCAACGTGCAT
CAATGGGGTGTGCTGGACTGTCTACCACGGGGCCGGAACGAGGACCATCGCGTCACCCAA-3600
                                                            T
GGGTCCTGTCATCCAGATGTATACCAATGTAGACCAAGACCTTGTGGGCTGGCCCGCTCC

         C
GCAAGGTAGCCGCTCATTGACACCCTGCACTTGCGGCTCCTCGGACCTTTACCTGGTCAC
GAGGCACGCCGATGTCATTCCCGTGCGCCGGCGGGGTGATAGCAGGGGCAGCCTGCTGTC
GCCCCGGCCCATTTCCTACTTGAAAGGCTCCTCGGGGGGTCCGCTGTTGTGCCCCGCGGG
GCACGCCGTGGGCATATTTAGGGCCGCGGTGTGCACCCGTGGAGTGGCTAAGGCGGTGGA-3900
CTTTATCCCTGTGGAGAACCTAGAGACAACCATGAGGTCCCCGGTGTTCACGGATAACTC
CTCTCCACCAGTAGTGCCCCAGAGCTTCCAGGTGGCTCACCTCCATGCTCCCACAGGCAG
CGGCAAAAGCACCAAGGTCCCGGCTGCATATGCAGCTCAGGGCTATAAGGTGCTAGTACT
CAACCCCTCTGTTGCTGCAACACTGGGCTTTGGTGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGAT

      T
CGATCCTAACATCAGGACCGGGGGTGAGAACAATTACCACTGGCAGCCCCATCACGTACTC-4200
CACCTACGGCAAGTTCCTTGCCGACGGCGGGTGCTCGGGGGGCGCTTATGACATAATAAT
TTGTGACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACATCCATCTTGGGCATCGGCACTGTCCTTGA
CCAAGCAGAGACTGCGGGGGCGAGACTGGTTGTGCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTC
CGTCACTGTGCCCCATCCCAACATCGAGGAGGTTGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCC
TTTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGGAGACATCTCATCTTCTG-4500
TCATTCAAAGAAGAAGTGCGACGAACTCGCCGCAAAGCTGGTCGCATTGGGCATCAATGC
CGTGGCCTACTACCGCGGTCTTGACGTGTCCGTCATCCCGACCAGCGGCGATGTTGTCGT
```

도면2d

```
                                                                A
 CGTGGCAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATACCGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTG
 CAATACGTGTGTCACCCAGACAGTCGATTTCAGCCTTGACCCTACCTTCACCATTGAGAC
 AATCACGCTCCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCACTCAACGTCGGGGCAGGACTGGCAGGGG-4800
 GAAGCCAGGCATCTACAGATTTGTGGCACCGGGGGAGCGCCCCTCCGGCATGTTCGACTC
 GTCCGTCCTCTGTGAGTGCTATGACGCAGGCTGTGCTTGGTATGAGCTCACGCCCGCCGA
 GACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACACCCCGGGGCTTCCCGTGTGCCAGGACCA
 TCTTGAATTTTGGGAGGGCGTCTTTACAGGCCTCACTCATATAGATGCCCACTTTCTATC
 CCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCTTCCTTACCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTG-5100
 CGCTAGGGCTCAAGCCCCTCCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGTGTTTGATTCGCCT
 CAAGCCCACCCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTGGGCGCTGTTCAGAATGA
 AATCACCCTGACGCACCCAGTCACCAAATACATCATGACATGCATGTCGGCCGACCTGGA
 GGTCGTCACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCGGCGTCCTGGCTGCTTTGGCCGCGTATTG
 CCTGTCAACAGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCAGGGTCGTCTTGTCCGGGAAGCCGGCAAT-5400
 CATACCTGACAGGGAAGTCCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGCTCTCAGCA
 CTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGG
 CCTCCTGCAGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCCTGCTGTCCAGACCAACTG
 GCAAAAACTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACTTCATCAGTGGGATACAATA
 CTTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTTAC-5700
 AGCTGCTGTCACCAGCCCACTAACCACTAGCCAAACCCTCCTCTTCAACATATTGGGGGG
 GTGGGTGGCTGCCCAGCTCGCCGCCCCCGGTGCCGCTACTGCCTTTGTGGGCGCTGGCTT
 AGCTGGCGCCGCCATCGGCAGTGTTGGACTGGGGAAGGTCCTCATAGACATCCTTGCAGG
 GTATGGCGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTTGTGGCATTCAAGATCATGAGCGGTGAGGTCCC
 CTCCACGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCGCCATCCTCTCGCCCGGAGCCCTCGTAGT-6000
 CGGCGTGGTCTGTGCAGCAATACTGCGCCGGCACGTTGGCCCGGGCGAGGGGGCAGTGCA
 GTGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCTCCCGGGGGAACCATGTTTCCCCCACGCACTA
 CGTGCCGGAGAGCGATGCAGCTGCCCGCGTCACTGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAAC
 CCAGCTCCTGAGGCGACTGCACCAGTGGATAAGCTCGGAGTGTACCACTCCATGCTCCGG
 TTCCTGGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATATGCGAGGTGTTGAGCGACTTTAAGACCTG-6300
 GCTAAAAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCTGGGATCCCCTTTGTGTCCTGCCAGCGCGG
```

도면2e

GTATAAGGGGGTCTGGCGAGTGGACGGCATCATGCACACTCGCTGCCACTGTGGAGCTGA
GATCACTGGACATGTCAAAAACGGGACGATGAGGATCGTCGGTCCTAGGACCTGCAGGAA
CATGTGGAGTGGGACCTTCCCCATTAATGCCTACACCACGGGCCCCTGTACCCCCCTTCC
TGCGCCGAACTACACGTTCGCGCTATGGAGGGTGTCTGCAGAGGAATATGTGGAGATAAG-6600
GCAGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTATGACTACTGACAATCTCAAATGCCCGTG
CCAGGTCCCATCGCCCGAATTTTTCACAGAATTGGACGGGGTGCGCCTACATAGGTTTGC
GCCCCCCTGCAAGCCCTTGCTGCGGGAGGAGGTATCATTCAGAGTAGGACTCCACGAATA
CCCGGTAGGGTCGCAATTACCTTGCGAGCCCGAACCGGACGTGGCCGTGTTGACGTCCAT
GCTCACTGATCCCTCCCATATAACAGCAGAGGCGGCCGGGCGAAGGTTGGCGAGGGGATC-6900
ACCCCCCTCTGTGGCCAGCTCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCATCTCTCAAGGCAAC
TTGCACCGCTAACCATGACTCCCCTGATGCTGAGCTCATAGAGGCCAACCTCCTATGGAG
GCAGGAGATGGGCGGCAACATCACCAGGGTTGAGTCAGAAAACAAAGTGGTGATTCTGGA
CTCCTTCGATCCGCTTGTGGCGGAGGAGGACGAGCGGGAGATCTCCGTACCCGCAGAAAT
CCTGCGGAAGTCTCGGAGATTCGCCCAGGCCCTGCCCGTTTGGGCGCGGCCGGACTATAA-7200
CCCCCCGCTAGTGGAGACGTGGAAAAAGCCCGACTACGAACCACCTGTGGTCCATGGCTG
TCCGCTTCCACCTCCAAAGTCCCCTCCTGTGCCTCCGCCTCGGAAGAAGCGGACGGTGGT
CCTCACTGAATCAACCCTATCTACTGCCTTGGCCGAGCTCGCCACCAGAAGCTTTGGCAG
CTCCTCAACTTCCGGCATTACGGGCGACAATACGACAACATCCTCTGAGCCCGCCCCTTC
TGGCTGCCCCCCCGACTCCGACGCTGAGTCCTATTCCTCCATGCCCCCCCTGGAGGGGGA-7500
GCCTGGGGATCCGGATCTTAGCGACGGGTCATGGTCAACGGTCAGTAGTGAGGCCAACGC
GGAGGATGTCGTGTGCTGCTCAATGTCTTACTCTTGGACAGGCGCACTCGTCACCCCGTG
CGCCGCGGAAGAACAGAAACTGCCCATCAATGCACTAAGCAACTCGTTGCTACGTCACCA
CAATTTGGTGTATTCCACCACCTCACGCAGTGCTTGCCAAAGGCAGAAGAAAGTCACATT
TGACAGACTGCAAGTTCTGGACAGCCATTACCAGGACGTACTCAAGGAGGTTAAAGCAGC-7800
GGCGTCAAAAGTGAAGGCTAACTTGCTATCCGTAGAGGAAGCTTGCAGCCTGACGCCCCC
ACACTCAGCCAAATCCAAGTTTGGTTATGGGGCAAAAGACGTCCGTTGCCATGCCAGAAA
GGCCGTAACCCACATCAACTCCGTGTGGAAAGACCTTCTGGAAGACAATGTAACACCAAT
AGACACTACCATCATGGCTAAGAACGAGGTTTTCTGCGTTCAGCCTGAGAAGGGGGGTCG

도면2f

TAAGCCAGCTCGTCTCATCGTGTTCCCCGATCTGGGCGTGCGCGTGTGCGAAAAGATGGC-8100
TTTGTACGACGTGGTTACAAAGCTCCCCTTGGCCGTGATGGGAAGCTCCTACGGATTCCA
ATACTCACCAGGACAGCGGGTTGAATTCCTCGTGCAAGCGTGGAAGTCCAAGAAAACCCC
AATGGGGTTCTCGTATGATACCCGCTGCTTTGACTCCACAGTCACTGAGAGCGACATCCG
TACGGAGGAGGCAATCTACCAATGTTGTGACCTCGACCCCCAAGCCCGCGTGGCCATCAA
GTCCCTCACCGAGAGGCTTTATGTTGGGGGCCCTCTTACCAATTCAAGGGGGGAGAACTG-8400
CGGCTATCGCAGGTGCCGCGCGAGCGGCGTACTGACAACTAGCTGTGGTAACACCCTCAC
TTGCTACATCAAGGCCCGGGCAGCCTGTCGAGCCGCAGGGCTCCAGGACTGCACCATGCT
CGTGTGTGGCGACGACTTAGTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGGTCCAGGAGGACGCGGC
GAGCCTGAGAGCCTTCACGGAGGCTATGACCAGGTACTCCGCCCCCCCTGGGGACCCCCC
ACAACCAGAATACGACTTGGAGCTCATAACATCATGCTCCTCCAACGTGTCAGTCGCCCA-8700
CGACGGCGCTGGAAAGAGGGTCTACTACCTCACCCGTGACCCTACAACCCCCCTCGCGAG
AGCTGCGTGGGAGACAGCAAGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAGGCAACATAATCAT
GTTTGCCCCCACACTGTGGGCGAGGATGATACTGATGACCCATTTCTTTAGCGTCCTTAT
AGCCAGGGACCAGCTTGAACAGGCCCTCGATTGCGAGATCTACGGGGCCTGCTACTCCAT
AGAACCACTTGATCTACCTCCAATCATTCAAAGACTCCATGGCCTCAGCGCATTTTCACT-9000
CCACAGTTACTCTCCAGGTGAAATTAATAGGGTGGCCGCATGCCTCAGAAAACTTGGGGT

G
ACCGCCCTTGCGAGCTTGGAGACACCGGGCCCGGAGCGTCCGCGCTAGGCTTCTGGCCAG
AGGAGGCAGGGCTGCCATATGTGGCAAGTACCTCTTCAACTGGGCAGTAAGAACAAAGCT
CAAACTCACTCCAATAGCGGCCGCTGGCCAGCTGGACTTGTCCGGCTGGTTCACGGCTGG
CTACAGCGGGGGAGACATTTATCACAGCGTGTCTCATGCCCGGCCCCGCTGGATCTGGTT-9300
TTGCCTACTCCTGCTTGCTGCAGGGGTAGGCATCTACCTCCTCCCCAACCGATGAAGGTT
GGGGTAAACACTCCGGCCT----------3' 터미널

아미노산 치환을 생성하는 일부를 이중성이 보여진다. 많은 다른 "침묵"돌연변이가 있다
(나타내지 않음.)

도면3a


인 간 23
GlyPheAlaAspLeuMetGlyTyrIleProLeuValGlyAlaProLeuGlyGlyArgAla
1 GGCTTCGCCGACCTCATGGGGTACATACCGCTCGTCGGCGCCCCTCTTGGAGGCCGTGCC
ArgAlaLeuAlaHisGlyValArgValLeuGluAspGlyValAsnTyrAlaThrGlyAsn
61 AGGGCCCTGGCGCACGGCGTCCGGGTTTTGGAAGACGGCGTGAACTATGCAACAGGGAAC
CG A
LeuProGlyCysSerPheSerIlePheLeuLeuAlaLeuLeuSerCysLeuThrValPro
121 CTTCCTGGTTGCTCCTTTTCTATCTTCCTTCTGGCCCTACTCTCTTGCCTGACCGTGCCC
GA T
AlaSerAlaTyrGlnValArgAsnSerThrGlyLeuTyrHisValThrAsnAspCysPro
181 GCTTCAGCCTACCAAGTGCGCAACTCTACGGGGCTTTACCATGTCACCAATGATTGCCCT
AsnSerSerIleValTyrGluAlaAlaAspAlaIleLeuHisAlaProGlyCysValPro
241 AACTCGAGTATTGTGTACGAGGCGGCCGATGCCATCCTGCACGCTCCGGGGTGTGTCCCT
T C
CysValArgGluAspAsnValSerArgCysTrpValAlaValThrProThrValAlaThr
301 TGCGTTCGCGAGGATAACGTCTCGAGATGTTGGGTGGCGGTGACCCCCACGGTGGCCACC
G T
LysAspGlyLysLeuProThrThrGlnLeuArgArgHisIleAspLeuLeuValGlySer
361 AAGGACGGCAAACTCCCCACAACGCAGCTTCGACGTCACATCGATCTGCTTGTCGGGAGC
C A
AlaThrLeuCysSerAlaLeuTyrValGlyAspLeuCysGlySerIlePheLeuValGly
421 GCCACCCTCTGCTCGGCCCTCTACGTGGGGGACCTTTGCGGGTCCATCTTTCTTGTCGGT
T
GlnLeuPheThrPheSerProArgArgHisTrpThrThrGlnAspCysAsnCysSerIle
481 CAACTGTTTACCTTCTCTCCCAGGCGCCACTGGACGACGCAGGACTGCAACTGTTCTATC
C

도면3b


TyrProGlyHisIleThrGlyHisArgMetAlaTrpAspMetMetMetAsnTrpSerPro
541 TATCCCGGCCATATAACGGGTCACCGCATGGCATGGGATATGATGATGAACTGGTCCCCT
G
ThrAlaAlaLeuValValAlaGlnLeuLeuArgIleProGlnAlaIleLeuAspMetIle
601 ACGGCGGCATTGGTAGTAGCTCAGCTGCTCCGGATCCCACAAGCCATCTTGGACATGATC
G AG
AlaGlyAlaHisTrpGlyValLeuAlaGlyMetAlaTyrPheSerMetValGlyAsnTrp
661 GCTGGTGCTCACTGGGGAGTCCTGGCGGGCATGGCGTATTTCTCCATGGTGGGGAACTGG
G
AlaLysValLeuValValLeuLeuLeuPheAlaGlyValAspAlaGluThrHisArgThr
721 GCGAAGGTCCTGGTAGTGCTGCTTCTATTTGCCGGCGTCGACGCGGAAACCCACCGTACC
G
GlyGlySerAlaAlaArgSerThrAlaGlyValAlaSerLeuPheThrProGlyAlaArg
781 GGGGGAAGTGCCGCCCGCAGCACGGCTGGAGTTGCTAGTCTCTTCACACCAGGCGCTAGG
C T A
GlnAsnIleGlnLeuIleAsnThrAsnGlySerTrpHisIleAsnSerThrAlaLeuAsn
841 CAGAACATCCAGCTGATCAACACCAACGGCAGTTGGCACATCAATAGTACGGCCTTGAAC
AT
CysAsnAspSerLeuThrThrGlyTrpLeuAlaGlyLeuPheTyrHisHisLysPheAsn
901 TGCAATGACAGCCTTACCACCGGCTGGTTAGCGGGGCTTTTCTATCACCATAAATTCAAC
A A
SerSerGlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArgProLeuThrAspPheAlaGln
961 TCTTCAGGCTGTCCCGAGAGGTTGGCCAGCTGCCGACCCCTCACCGATTTTGCCCAGG
G A G

도면4a

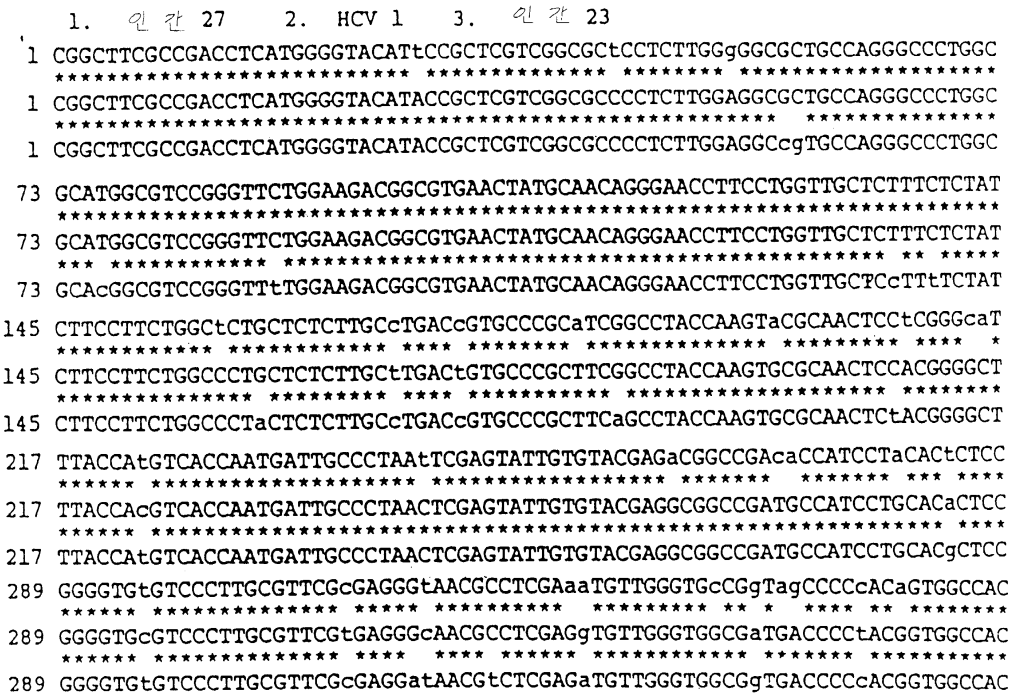
인 간 27

```
    GlyPheAlaAspLeuMetGlyTyrIleProLeuValGlyAlaProLeuGlyGlyAlaAla
1   GGCTTCGCCGACCTCATGGGGTACATTCCGCTCGTCGGCGCTCCTCTTGGGGGCGCTGCC

    ArgAlaLeuAlaHisGlyValArgValLeuGluAspGlyValAsnTyrAlaThrGlyAsn
61  AGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTTCTGGAAGACGGCGTGAACTATGCAACAGGGAAC

    LeuProGlyCysSerPheSerIlePheLeuLeuAlaLeuLeuSerCysLeuThrValPro
121 CTTCCTGGTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCTCTGCTCTCTTGCCTGACCGTGCCC

    AlaSerAlaTyrGlnValArgAsnSerSerGlyIleTyrHisValThrAsnAspCysPro
181 GCATCGGCCTACCAAGTACGCAACTCCTCGGGCATTTACCATGTCACCAATGATTGCCCT

    AsnSerSerIleValTyrGluThrAlaAspThrIleLeuHisSerProGlyCysValPro
241 AATTCGAGTATTGTGTACGAGACGGCCGACACCATCCTACACTCTCCGGGGTGTGTCCCT
      C           C
    CysValArgGluGlyAsnAlaSerLysCysTrpValProValAlaProThrValAlaThr
301 TGCGTTCGCGAGGGTAACGCCTCGAAATGTTGGGTGCCGGTAGCCCCCACAGTGGCCACC
          G
    ArgAspGlyAsnLeuProAlaThrGlnLeuArgArgHisIleAspLeuLeuValGlySer
361 AGGGACGGCAACCTCCCCGCAACGCAGCTTCGACGTCACATCGATCTGCTTGTCGGGAGT
                                      G         G

    AlaThrLeuCysSerAlaLeuTyrValGlyAspLeuCysGlySerValPheLeuValGly
421 GCCACCCTTTGCTCGGCCCTCTATGTGGGGGACTTGTGCGGGTCTGTCTTTCTTGTCGGT
        C                                                   C

    GlnLeuPheThrPheSerProArgArgHisTrpThrThrGlnAspCysAsnCysSerIle
481 CAACTGTTCACTTTCTCCCCCAGGCGCCACTGGACAACGCAAGATTGCAACTGCTCTATC
                    A
```

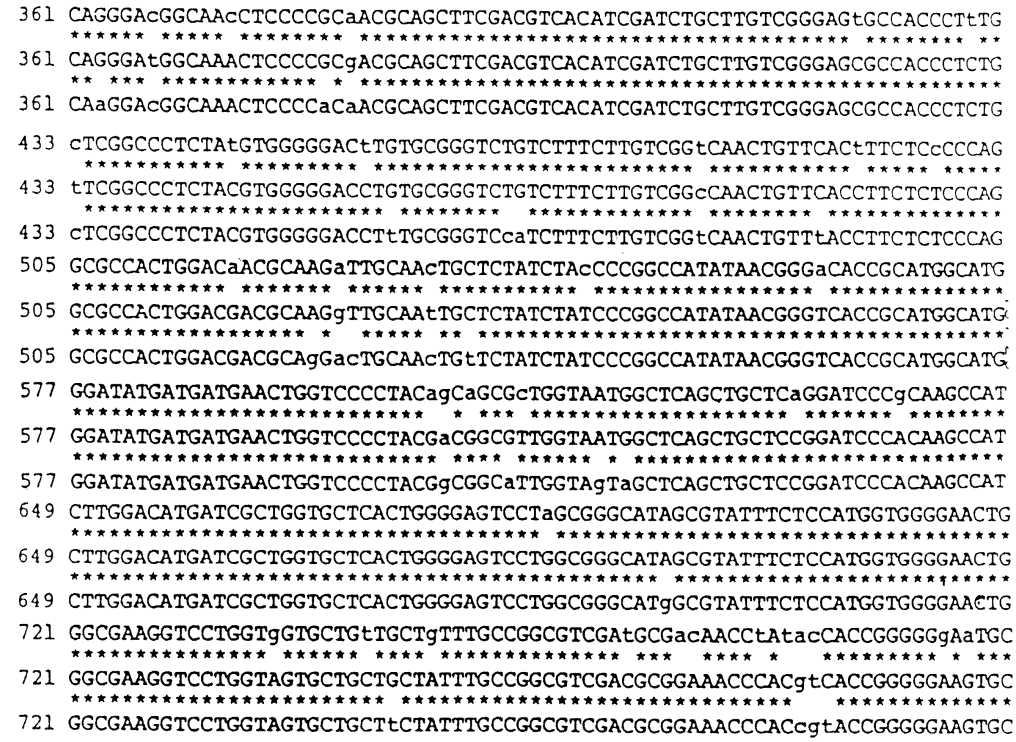
도면4b

```
    TyrProGlyHisIleThrGlyHisArgMetAlaTrpAspMetMetMetAsnTrpSerPro
541 TACCCCGGCCATATAACGGGACACCGCATGGCATGGGATATGATGATGAACTGGTCCCCT

    ThrAlaAlaLeuValMetAlaGlnLeuLeuArgIleProGlnAlaIleLeuAspMetIle
601 ACAGCAGCGCTGGTAATGGCTCAGCTGCTCAGGATCCCGCAAGCCATCTTGGACATGATC
        G

    AlaGlyAlaHisTrpGlyValLeuAlaGlyIleAlaTyrPheSerMetValGlyAsnTrp
661 GCTGGTGCTCACTGGGGAGTCCTAGCGGGCATAGCGTATTTCTCCATGGTGGGGAACTGG

    AlaLysValLeuValValLeuLeuLeuPheAlaGlyValAspAlaThrThrTyrThrThr
721 GCGAAGGTCCTGGTGGTGCTGTTGCTGTTTGCCGGCGTCGATGCGACAACCTATACCACC

    GlyGlyAsnAlaAlaArgThrThrGlnAlaLeuThrSerPhePheSerProGlyAlaLys
781 GGGGGGAATGCTGCCAGGACCACGCAGGCGCTCACCAGTTTTTTCAGCCCAGGCGCCAAG

    GlnAspIleGlnLeuIleAsnThrAsnGlySerTrpHisIleAsnArgThrAlaLeuAsn
841 CAGGATATCCAGCTGATCAACACCAACGGCAGTTGGCACATCAATCGCACGGCCTTGAAC
     G                          T

    CysAsnAlaSerLeuAspThrGlyTrpValAlaGlyLeuPheTyrTyrHisLysPheAsn
901 TGTAATGCGAGCCTCGACACTGGCTGGGTAGCGGGGCTCTTCTATTACCACAAATTCAAC
                 T                   G

    SerSerGlyCysProGluArgMetAlaSerCysArgProLeuAlaAspPheAspGln
961 TCTTCAGGCTGCCCCGAGAGGATGGCCAGCTGTAGGCCCCTTGCCGATTTCGACCAGG
                                                        C
```

도면5a




도면5b



도면5c

```
793 tGcCaggACcacGcagGcgcTcaccAGttTttTCagcCCAGGCGCCAAGCAGgAtaTCCAGCTGATCAACAC
     * *   **   *   *   *    **  *  **   *************** *  ****************
793 CGgCCaCACtgtGtCTGGAtTTGtTAGcCTCcTCgCACCAGGCGCCAAGCAGAACgTCCAGCTGATCAACAC
    ** ** **    * ***** *** *** *** ** ********** * ******* ****************
793 CGcCCgCAgcacGgCTGGAgTTGcTAGtCTCtTCaCACCAGGCGCtAgGCAGAACaTCCAGCTGATCAACAC

865 CAACGGCAGTTGGCACaTCAATcGCACGGCCtTGAACTGtAATGcgAGCCTCgACACtGGCTGGgTaGCgGG
    **************** ***** ******** ******* ****  ****** **** ****** * ** **
865 CAACGGCAGTTGGCACcTCAATAGCACGGCCcTGAACTGCAATGAtAGCCTCAACACCGGCTGGTTgGCaGG
    **************** ******* ****** ************* ***** * ************* ** **
865 CAACGGCAGTTGGCACaTCAATAGtACGGCCtTGAACTGCAATGAcAGCCTtAcCACCGGCTGGTTaGCgGG

937 GCTcTTCTATtACCACAAaTTCAACTCTTCAGGCTGcCCcGAGAGGaTgGCCAGCTGtaGgCCCCTTgCCGA
    *** ****** ******* ***************** ** ****** * ********  * ****** ****
937 GCTTTTCTATCACCACAAgTTCAACTCTTCAGGCTGTCCtGAGAGGcTaGCCAGCTGCCGACCCCTTACCGA
    *************** ** ******************** ****** * ***************** *****
937 GCTTTTCTATCACCAtAAaTTCAACTCTTCAGGCTGTCCcGAGAGGtTgGCCAGCTGCCGACCCCTcACCGA

1009 TTTcGACCAGG
     *** *******
1009 TTTTGACCAGG
     ***** *****
1009 TTTTGcCCAGG
```

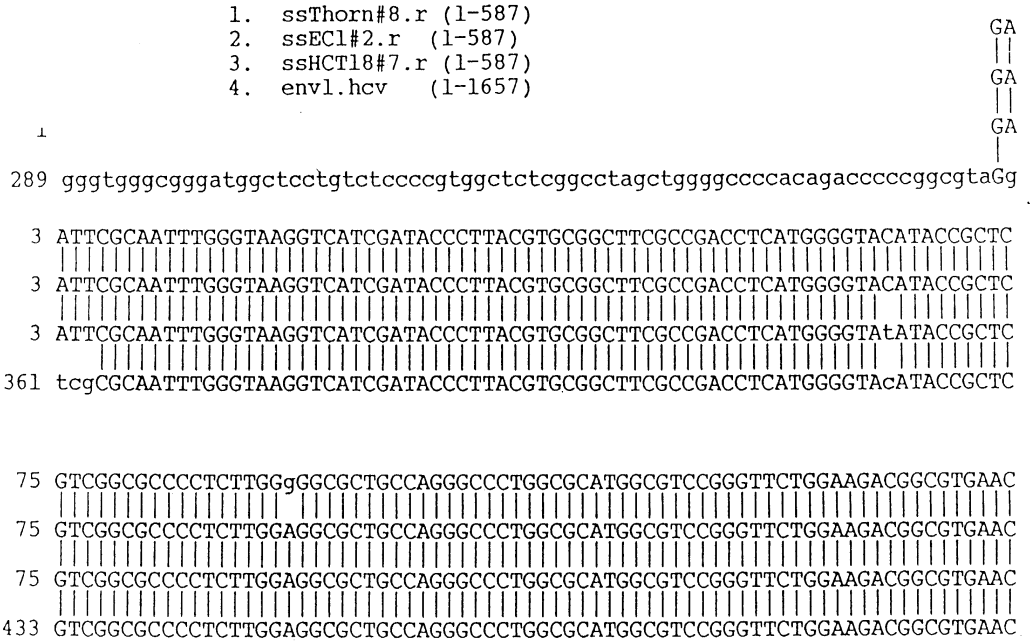
도면6

```
  1 GFADLMGYIPLVGAPLGGAARALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLALLSCLTVPASAYQVRNSsGi
    ********************************************************************** *
  1 GFADLMGYIPLVGAPLGGAARALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLALLSCLTVPASAYQVRNSTGL
    ****************** ***************************************************** *
  1 GFADLMGYIPLVGAPLGGrARALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLALLSCLTVPASAYQVRNSTGL
 73 YHVTNDCPNSSIVYEtADtILHsPGCVPCVREGNASkCWVpvaFTVATRDGnLPATQLRRHIDLLVGSATLC
    *************** ** *** ************* ***   ******** ********************
 73 YHVTNDCPNSSIVYEAADAILHtPGCVPCVREGNASRCWVAmTPTVATRDGKLPATQLRRHIDLLVGSATLC
    ********************** ********* * ****** ****** ***** *****************
 73 YHVTNDCPNSSIVYEAADAILHaPGCVPCVREdNvSRCWVAvTPTVATkDGKLPtTQLRRHIDLLVGSATLC
145 SALYVGDLCGSVFLVGQLFTFSPRRHWTTQdCNCSIYPGHITGHRMAWDMMMNWSPTaALVMAQLLRIPQAI
    ****************************** ************************** **************
145 SALYVGDLCGSVFLVGQLFTFSPRRHWTTQgCNCSIYPGHITGHRMAWDMMMNWSPTtALVMAQLLRIPQAI
    *********** ****************** ************************** *** **********
145 SALYVGDLCGSiFLVGQLFTFSPRRHWTTQdCNCSIYPGHITGHRMAWDMMMNWSPTaALVvAQLLRIPQAI
217 LDMIAGAHWGVLAGIAYFSMVGNWAKVLVVLLLFAGVDAtTytTGGnAarTtqaltSffsPGAKQdiQLINT
    ************************************** *  *** *  *     *   *****  *****
217 LDMIAGAHWGVLAGIAYFSMVGNWAKVLVVLLLFAGVDAETHvTGGSAghTvsGfvSLlaPGAKQNvQLINT
    ************** *************************** *****     *  **  *** ** *****
217 LDMIAGAHWGVLAGmAYFSMVGNWAKVLVVLLLFAGVDAETHrTGGSAarstaGvaSLftPGArQNiQLINT
289 NGSWHiNrTALNCNaSLdTGWvAGLFYyHKFNSSGCPERmASCRPLaDFDQ
    ***** * ****** ** *** ***** *********** ****** ****
289 NGSWHlNSTALNCNDSLnTGWLAGLFYHHKFNSSGCPERLASCRPLTDFDQ
    ***** *********** ******************************** *
289 NGSWHiNSTALNCNDSLtTGWLAGLFYHHKFNSSGCPERLASCRPLTDFaQ
```

1. 인간 27
2. HCV 1
3. 인간 23

도면7a

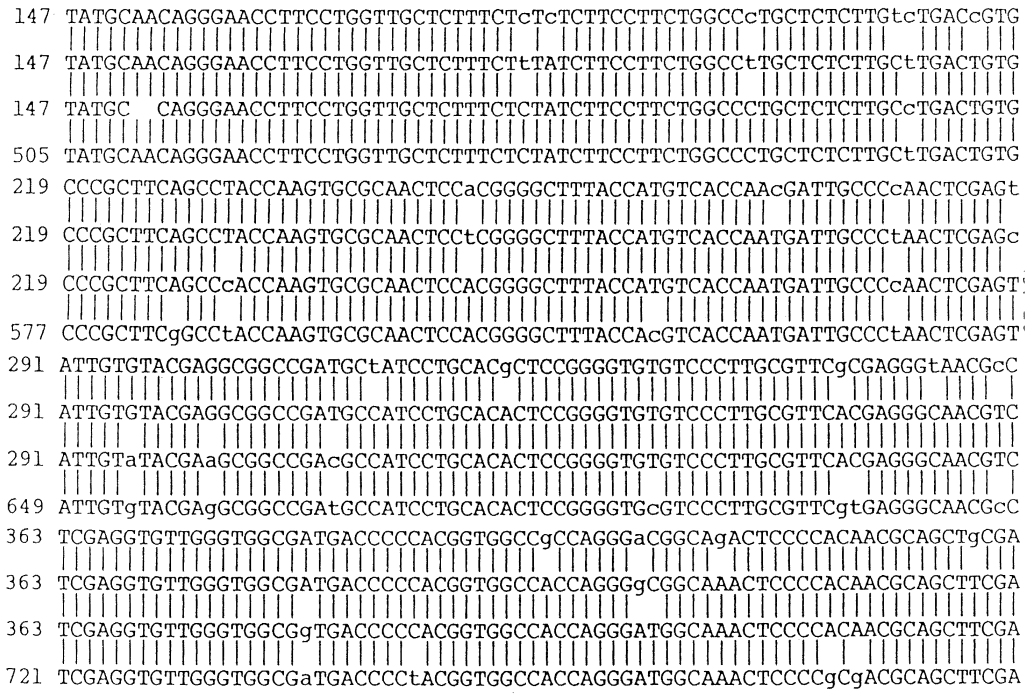
'식별(identity)(비(非)번역)열파벳의 집단쌍(clustered pair)의
점에서의 '부위' 정렬(Region Alignment);



```
                1.  ssThorn#8.r (1-587)
                2.  ssEC1#2.r  (1-587)
                3.  ssHCT18#7.r (1-587)
                4.  envl.hcv   (1-1657)

                                                                                GA
                                                                                ||
                                                                                GA
                                                                                ||
                                                                                GA
                                                                                |
289 gggtgggcgggatggctcctgtctccccgtggctctcggcctagctggggccccacagacccccggcgtaGg

  3 ATTCGCAATTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTTACGTGCGGCTTCGCCGACCTCATGGGGTACATACCGCTC
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
  3 ATTCGCAATTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTTACGTGCGGCTTCGCCGACCTCATGGGGTACATACCGCTC
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||
  3 ATTCGCAATTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTTACGTGCGGCTTCGCCGACCTCATGGGGTAtATACCGCTC
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||
361 tcgCGCAATTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTTACGTGCGGCTTCGCCGACCTCATGGGGTAcATACCGCTC


 75 GTCGGCGCCCCTCTTGGgGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTTCTGGAAGACGGCGTGAAC
    |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 75 GTCGGCGCCCCTCTTGGAGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTTCTGGAAGACGGCGTGAAC
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 75 GTCGGCGCCCCTCTTGGAGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTTCTGGAAGACGGCGTGAAC
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
433 GTCGGCGCCCCTCTTGGAGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTTCTGGAAGACGGCGTGAAC
```

도면7b

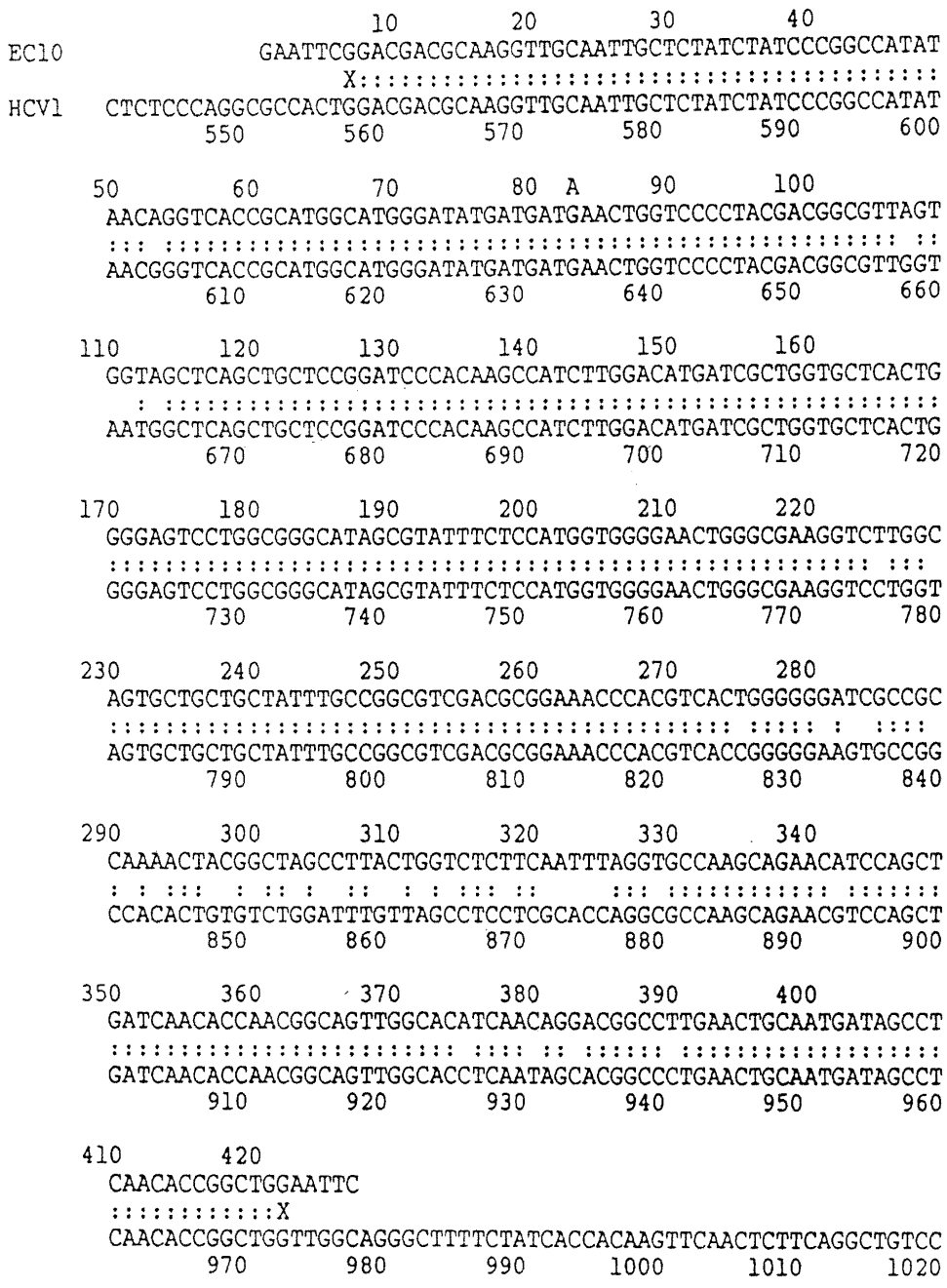
```
147 TATGCAACAGGGAACCTTCCTGGTTGCTCTTTCTcTcTCTTCCTTCTGGCCcTGCTCTCTTGtcTGACcGTG
    |||||||||||||||||||||||||||||||||| | ||||||||||||||| |||||||||||  |||| |||
147 TATGCAACAGGGAACCTTCCTGGTTGCTCTTTCTtTATCTTCCTTCTGGCCtTGCTCTCTTGCtTGACTGTG
    |||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||| ||||||||||| ||||||||
147 TATGC  CAGGGAACCTTCCTGGTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCCTGCTCTCTTGCcTGACTGTG
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||
505 TATGCAACAGGGAACCTTCCTGGTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCCTGCTCTCTTGCtTGACTGTG
219 CCCGCTTCAGCCTACCAAGTGCGCAACTCCaCGGGGCTTTACCATGTCACCAAcGATTGCCCcAACTCGAGt
    |||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||| |||||||| ||||||||
219 CCCGCTTCAGCCTACCAAGTGCGCAACTCCtCGGGGCTTTACCATGTCACCAATGATTGCCCtAACTCGAGc
    ||||||||||||| |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||
219 CCCGCTTCAGCCcACCAAGTGCGCAACTCCACGGGGCTTTACCATGTCACCAATGATTGCCCcAACTCGAGT
    |||||||| ||| |||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||| |||||||||
577 CCCGCTTCgGCCtACCAAGTGCGCAACTCCACGGGGCTTTACCAcGTCACCAATGATTGCCCtAACTCGAGT
291 ATTGTGTACGAGGCGGCCGATGCtATCCTGCACgCTCCGGGGTGTGTCCCTTGCGTTCgCGAGGGtAACGcC
    |||||||||||||||||||||||| ||||||||| |||||||||||||||||||||||| |||||| |||| |
291 ATTGTGTACGAGGCGGCCGATGCCATCCTGCACACTCCGGGGTGTGTCCCTTGCGTTCACGAGGGCAACGTC
    ||||| ||||| |||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
291 ATTGTaTACGAaGCGGCCGAcGCCATCCTGCACACTCCGGGGTGTGTCCCTTGCGTTCACGAGGGCAACGTC
    ||||| ||||| |||||||| |||||||||||||||||||||||| |||||||||||||  |||||||||| |
649 ATTGTgTACGAgGCGGCCGAtGCCATCCTGCACACTCCGGGGTGcGTCCCTTGCGTTCgtGAGGGCAACGcC
363 TCGAGGTGTTGGGTGGCGATGACCCCCACGGTGGCCgCCAGGGaCGGCAgACTCCCCACAACGCAGCTgCGA
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||| ||||| |||||||||||||||||| |||
363 TCGAGGTGTTGGGTGGCGATGACCCCCACGGTGGCCACCAGGGgCGGCAAACTCCCCACAACGCAGCTTCGA
    |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||  |||||||||||||||||||||||||||
363 TCGAGGTGTTGGGTGGCGgTGACCCCCACGGTGGCCACCAGGGATGGCAAACTCCCCACAACGCAGCTTCGA
    |||||||||||||||||| ||||||| |||||||||||||||||||||||||||||| | ||||||||||||
721 TCGAGGTGTTGGGTGGCGaTGACCCCtACGGTGGCCACCAGGGATGGCAAACTCCCCgCgACGCAGCTTCGA
```



도면7c


435 CGTCACATCGATCTGCTTGTCGGGAGCGCcACCCTCTGCTCGGCCCTCTACGTGGGGGACCTGTGCGGGTCc
435 CGTCACATCGATCTGCTTGTCGGGAGCGCtACCCTCTGCTCGGCCCTCTACGTGGGGGACCTGTGCGGGTCT
435 CGTCACATCGATCTGCTTGTCGGGAGCGCCACCCTCTGCTCGGCCCTCTAtGTGGGGGACttGTGCGGGTCT
793 CGTCACATCGATCTGCTTGTCGGGAGCGCCACCCTCTGtTCGGCCCTCTAcGTGGGGGACcTaTGCGGGTCT
507 aTCTTtCTTGTCGGTCAACTGTTcACCTTCTCTCCCAGGCGCCACTGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCT
507 GTCTTcCTTGTCGGTCAACTGTTTACCTTCTCTCCCAGGCGCCACTGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCT
507 GTCTTTCTTGTCGGCCAACTGTTTACCTTCTCTCCCAGGCGCCACTGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCT
865 GTCTTTCTTGTCGGCCAACTGTTcACCTTCTCTCCCAGGCGCCACTGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCT
579 ATCGAATTC
579 ATCGAATTC
579 ATCGAATTC
937 ATCtAtccC

도면8


10 20 30 40
EC10 GAATTCGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGGCCATAT
X
HCV1 CTCTCCCAGGCGCCACTGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGGCCATAT
550 560 570 580 590 600
50 60 70 80 A 90 100
AACAGGTCACCGCATGGCATGGGATATGATGATGAACTGGTCCCCTACGACGGCGTTAGT
AACGGGTCACCGCATGGCATGGGATATGATGATGAACTGGTCCCCTACGACGGCGTTGGT
610 620 630 640 650 660
110 120 130 140 150 160
GGTAGCTCAGCTGCTCCGGATCCCACAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGCTCACTG
AATGGCTCAGCTGCTCCGGATCCCACAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGCTCACTG
670 680 690 700 710 720
170 180 190 200 210 220
GGGAGTCCTGGCGGGCATAGCGTATTTCTCCATGGTGGGGAACTGGGCGAAGGTCTTGGC
GGGAGTCCTGGCGGGCATAGCGTATTTCTCCATGGTGGGGAACTGGGCGAAGGTCCTGGT
730 740 750 760 770 780
230 240 250 260 270 280
AGTGCTGCTGCTATTTGCCGGCGTCGACGCGGAAACCCACGTCACTGGGGGGATCGCCGC
AGTGCTGCTGCTATTTGCCGGCGTCGACGCGGAAACCCACGTCACCGGGGGAAGTGCCGG
790 800 810 820 830 840
290 300 310 320 330 340
CAAAACTACGGCTAGCCTTACTGGTCTCTTCAATTTAGGTGCCAAGCAGAACATCCAGCT
CCACACTGTGTCTGGATTTGTTAGCCTCCTCGCACCAGGCGCCAAGCAGAACGTCCAGCT
850 860 870 880 890 900
350 360 370 380 390 400
GATCAACACCAACGGCAGTTGGCACATCAACAGGACGGCCTTGAACTGCAATGATAGCCT
GATCAACACCAACGGCAGTTGGCACCTCAATAGCACGGCCCTGAACTGCAATGATAGCCT
910 920 930 940 950 960
410 420
CAACACCGGCTGGAATTC
X
CAACACCGGCTGGTTGGCAGGGCTTTTCTATCACCACAAGTTCAACTCTTCAGGCTGTCC
970 980 990 1000 1010 1020

도면9

AA #117-308 ( 추정 엔벨로프 부위 )

1) HCT #18 (USA) 3 클론서열결정
2) JH23 (USA) ?
3) JH 27 (USA) ?
4) PBL-Th (USA) 2 클론서열결정
5) EC1 (머태리) 3 클론서열결정
6) HCV-1 ( 집 팬 지 ) 다 수

C/M←→S

1) (P)
2)
3)
4)
5)
6)RNLGKVIDTLTCGFADLMGYIPLVGAPLGGAARALAHGVRVLEDGVNYATGNL

1) H
2)
3) S T T
4) L
5) (F) S
6)PGCSFSIFLLALLSCLTVPASAYQVRNSTGLYHVTNDCPNSSIVYEAADAILH

1) Y (H) V V T
2)A D V V K T
3)S PVA N
4)A A R T
5) H V T
6)TPGCVPCVREGNASRCWVAMTPTVATRDGKLPATQLRRHIDLLVGSATLCS

1)
2) I D
3) D
4)
5) I
6)ALYVGDLCGSVFLVGQLFTFSPRRHWTTQGCNCSI

요 약 : "S" AA117-308 (93%)

HCT#18, PBL-Th, EC1(머태리)는 HCV-1과 97% 상동성(homology)을 가진다.
JH23 및 JH 27은 각각 HCV-1과 96% 및 95% 상동성을 가진다.

도면10

AA#300-438 ( 추정엔벨로프 부위의 C-터미널 부위 및 NS1의 아미노 ~ 1/3 )

1) JH23
2) JH27
3) 일본의 분리물 (T. Miyamura)
4) EC10 (이태리)

5) HCV-1 ( 침 팬 지 )

?
?
?
2 클론 서열결정
( 하나의 nt 차이, 이것은 아미노산을 변화시키지 않음. )
다수

S ←→ NS1

1) D — A V
2) D — A
3) — V S — VM V
4)
5)TTQGCNCSIYPGHITGHRMAWDMMMNWSPTTALVMAQLLRIPQAILDMIAGA

1) M — R — A RST A VA
2) — T YT — N A R TQALT F
3) L Y — I M — GH R — VQ VT TLT
4) — A — I AK TASLTA
5)HWGVLAGIAYFSMVGNWAKVLVVLLLFAGVDAETHVTGGSAGHTVSGFVSL

1)FS R I — I — T V
2)FT DI — I R — A D
3)FR S KI V — I R — Q F
4)FNL I — I R — N
5)LAPGAKQNVQLINTNGSWHLNSTALNCNDSLNTGWL

요 약 : NS 1 AA 330-660

| "분리물" | % 상동성 (AA330-438) | % 상동성 (AA383-405) |
|---|---|---|
| JH23 | 83 | 57 |
| JH27 | 80 | 39 |
| 일 본 | 73 | 48 |
| EC10 (이태리) | 84 | 48 |