(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12N 15/38
C12P 21/08

(45) 공고일자 2001년06월01일
(11) 등록번호 10-0291247
(24) 등록일자 2001년03월09일

(21) 출원번호 10-1993-0003940
(22) 출원일자 1993년03월13일
(65) 공개번호 특1993-0019829
(43) 공개일자 1993년10월19일

(30) 우선권주장 92200721.6 1992년03월13일 EP(EP)

(73) 특허권자 악조 노벨 엔.브이. 에프.지.엠. 헤르만스
네덜란드 엔엘-6824 비엠 아르넴 벨페르베그 76악조 노벨 엔.브이. 이.에이치. 리링크
네덜란드 엔엘-6824 비엠 아르넴 벨페르베그 76
(72) 발명자 재프 마이클 미델도르프
네델란드왕국 쥐디오스 5343 스타링스트라아트 151
(74) 대리인 나영환

심사관 : 이처영

(54) 엡스타인 바르 바이러스와 관련된 펩티드 및 핵산 서열

요약

본 발명은 EBV 오픈 리딩 프레임(open reading frame)인 BFRF 3과 BdRF 1내에서 각각 암호된 VCA-p18이나 VCA-p40 단백질을 적어도 일부분 또는 그것의 작용성 변이체를 포함하고 있고, 엡스타인-바르 비루스(Epstein Barr virus)에 대한 항체와 면역화학적으로 반응적인 펩티드에 관한 것이다. 또한 본 발명은 이들 펩티드를 암호하는 핵산 서열, 이들 펩티드에 대하여 생성된 단일클론 항체, 이 단일클론 항체를 생성할 수 있는 세포주 및 항-유전인자형 항체에 관한 것이다.

본 발명은 또한 본 발명의 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터의 분자 및 이 벡터 분자로 형질전환되거나 형질감염된 숙주세포에 관한 것이다. 본 발명은 또한 EBV 또는 항-EBV 항체를 검측하기 위한 방법 및 면역학적 시약 그리고 엡스타인 바르 비루스 핵산을 증폭시키고 검측하는 방법에 관한 것이다.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

엡스타인 바르 바이러스와 관련된 펩티드 및 핵산 서 열

[도면의 간단한 설명]

제1도는 VCA-p40 및 VCA-p18 단백질을 암호화하는 EBV-암호화된 유전자를 동정하기 위한 시도의 요약.

제2(a)도는 EA 및 VCA의 발현을 위해 유도된 바이러스-생산 세포주 HH514의 핵의 항원 추출물의 웨스턴 블로트.

제2(b)도는 BFRF3-β-갈락토시다제 융합 단백질을 발현하는 이. 콜리의 전체 세포 분해물의 웨스턴 블로트.

제2(c)도는 BdRF1-β-갈락토시다제 융합 단백질을 발현하는 이. 콜리의 전체 세포 분해물의 웨스턴 블로트.

제2(d)도는 β-갈락토시다제만을 발현하는 이. 콜리의 전체 세포 분해물의 웨스턴 블로트.

제3도는 니트로셀룰로우즈 스트립상의 3개의 인간 혈청(혈청 92, 혈청 214 및 혈청 219)을 BFRF3-β-갈락토시다제 융합 단백질로 흡수시킨 면역흡착 블롯.

제4도는 15 EBV와 사람 혈청의 VCA-p18 에피토프 인식을 위한 펩스캔(PEPSCAN) 분석의 결과.

제5(a)도 및 제5(b)도는 VCA-p18에서 유래된 12-mer 펩티드의 분석의 펩스캔 결과(450nm에서의 흡광도).

제6도는 VCA-p40에 대응하는 생쥐 단일클론 항체(EBV.0T41A)와 함께 VCA-p40 단백질로부터 유래된 12-mer 펩티드의 분석의 펩스캔 결과.

제7도는 건강한 혈액 공여체로부터 얻어진 43인간 혈청 샘플의 ELISA 반응성(450nm에서의 흡광도)을 BFRF3-암호화된 VCA-p18 단백질로부터 유래된 선택된 합성 펩티드에 대응하는 IgG-반응성 시험.

제8(a)도, 제8(b)도, 제8(c)도는 합성 펩티드 no.5의 하기 면역 글로불린과의 면역 반응성(ELISA)의 분석.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 엡스타인 바르 바이러스(EBV)에 대한 항체와 면역화학적으로 반응성이 있는 펩티드, 이 펩티드들을 암호하는 핵산 서열, 이 펩티드들에 대한 단일 클론 항체, 단일 클론 항체와 항-유전인자형 항체를 생산할 수 있는 세포주에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명에 의한 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터 분자 및 이 벡터 분자들로 형질 감염 또는 형질 전환된 숙주 세포에 관한 것이다. 본 발명은 또한 EBV 또는 항-EBV 항체를 검출하기 위한 면역학적 시약 및 방법 그리고 엡스타인 바르 바이러스 핵산을 증폭 및 검출시키는 방법에 관한 것이다.

EBV는 아프리카형의 (풍토병성 또는 e) 버키트 림프종(Burkitt's lymphoma=BL)과 관련하여 최초로 발견되었던 다발성의 인체 헤르페스 바이러스 이다. 그 후 상기 바이러스는 비인두성 암(NPC)과 관련된 것으로 밝혀졌으며, 감염성 단핵 세포 증가증(IM)의 병원체인 것으로 나타났다. 감염은 일반적으로 소아기에서 발생하며, 이 경우 일반적으로 무증상 감염을 나타내고, 경우에 따라서는 경미한 증세를 보인다. 그러나, 청년기 또는 성년기에저의 감염은 말초부에 불규칙적인 림프구들을 나타내는 것을 특징으로 하는 IM을 야기할 수 있다. 이러한 림프구 대부분이 T 림프구들이다: 그러나, 그들중에는 EBV로 감염된 B 림프구들이 소수 존재하고 있다. 생체외적으로 B림프구들을 감염시킬 수도 있다. 이런 세포들은 형질전환이 되며, 배양시 무한 증식하여 시켜 “영구증식화” “잠복감염” 또는 “증식 형질전환”되었다고 표현된다. 공지된 바와 같이, EBV로 감염된 모두 개체들은 평생동안 잠재적으로 감염된 상태를 유지하고 있다. 이러한 사실은 순환하고 있는 말초 혈액 림프구중에 연속적으로 소수의 EBV-게놈 양성인 형질전환된 B-세포가 존재하고 있으며, 구강 인두내에서 바이러스들이 연속적이지만 주기적으로 차단(shedding)된다는 것으로부터 추측된다. 대다수의 경우, EBV감염은 순간적으로 약화될수는 있으나 항상 양성이고 자가제한적인 림프증식성 질환을 나타낸다. 그러나, 일부 면역 억제된 개체의 경우, 완전 악성화될 수 있다. 이것은 의도적으로 면역억제시킨 개체, 특히 시클로스포린 A를 사용해 치료하고 있는 기관이식을 받은 소아에서 발생되며, 또는 우연히 HIV로 감염된 개체의 경우, 또는 유전학적으로 XLP(X-결합된 증식성 증후군) 유전자를 보유한 감염된 남성 개체의 경우에서 처럼 면역 억제된 개체의 경우에 발생한다. 이 경우에 EBV-감염된 B 세포의 폴리클론 증식으로 인해 악성이 초래된다. 또한, 이러한 환자의 경우, 경구 모설 백반증 병변에서 상기 바이러스의 조절되지 않는 상피 증식현상을 관찰할 수 있다. 즉, EBV 감염을 제어하는데 있어서 면역 반응이 중요한 역할을 한다.

상술한 바와 같이 EBV는 헤르페스 바이러스중 하나이다. 이 바이러스는 다음과 같은 구조적 특성을 지니고 있다:

- EBV 게놈은 선형의 이중 가닥 DNA 분자로 구성되어 있다(173,000 염기쌍)

- 비리온은 20면체의 캡시드에 의해 둘러싸여진 코어(단백질 및 DNA), 그리고 캡시드를 둘러싼 막 엔벨로프로 구성되어 있다. 상기 20면체의 캡시드는 헥사머 캡소머(capsomer)와 펜타머 캡소머로 구성되어 있다.

상기 막 엔벨로프는 그 외표면상에 스파이크를 갖고 있는 단백질/지질 이중층 막으로 구성되어 있다. 캡시드 쉘(shell)과 엔벨로프 사이의 공간은 테그먼트(tegument)로 지칭되는 무정형 단백질로 충진되어 있다.

- 모든 헤르페스 바이러스와 같이, EBV는 일차 감염 후 그의 숙주 내에서 장기간의 잠복 감염 상태를 유지할 수 있다. 이 잠복기는 EBV와 그의 사람 숙주 사이의 완전한 균형을 나타내며 숙주 면역 시스템에 의해 제어된다. 대부분의 생화학적, 그리고 생물학적 연구는 3종류의 EBV 원형 균주, 즉 B95-8(명주 원숭이 세포주에서 생산된 형질전환성 바이러스), P3HR1(버키트의 임파종 종양 세포주에 의해 생산된 비-형질전환성 바이러스 및 Raji(버키트의 임파종 종양 세포주 내의 잠복 바이러스)에 대해 실시하였다.

지난 몇년간 원형 바이러스 균주 B95-8에 대한 전체 DNA 서열을 결정하였다. 이 서열 분석은 80개 이상의 오픈 리딩 프레임(open reading frame)들을 확인했다. (Baer 등., 1984, Nature 310, p 207-211)

EBV는 그의 생물학적 특성(잠복 감염)때문에 일반적인 바이러스 분석법을 적용할 수 없어서 특히 생물학자들에게 어려운 연구 대상이었다. 또한, 그 세포 및 숙주 범위가 통상 생체외적으로 배양이 용이하지 않은 사람(및 일부 고등 영장류) B-림프구와 상피 세포로 제한되어 있다. 또한 완전히 허용성 있는 세포 유형, 즉 상기 바이러스가 용균적으로 복제하는 세포 유형이 존재하지 않기 때문에 다량의 바이러스를 제조하는데 상당한 어려움이 있다.

B 95-8 분리물, P3HR1-분리물, 및 Raji-분리물의 DNA 분자들이 상세한 제한 효소 지도화를 위한 원형이었으며, 에스케리키아 콜리(E, coli) 플라스미드 및 박테리오파지 람다내로 클로닝시키기 위한 원형이었고, 뉴클레오티드 서열 결정을 위한 원형이었다.

EBV-게놈은 독특하고 병렬식으로 반복된 DNA-요소로 구성된 단일의 이중 가닥 DNA 분자로 구성되어 있다. 이 DNA 분자의 각 말단은 상기 게놈을 공유 결합시켜 원형화시키는 역할을 하는 다수의 말단 서열을 포함하고 있다. 바이러스 입자내에서 EBV 게놈은 선형으로만 검출 가능하다. 대조적으로, 잠복 감염된 세포의 핵 내부에서는 원형의 에피좀(episome) 형태로 존재한다. 내부 반복 서열인 IR1 내지 IR4는 EBV-게놈을 5개의 고유 영역들로 분할시킨다 U2 및 U3 영역들은 EBV 분리물의 종류에 따라 광범위하게 다양하며, 전자는 EBV의 P3HR-1 균주내에서는 거의 전체가 결실되어 있다.

EBV 리딩 프레임들은 이 바이러스 게놈내에 있는 그들의 위치에 따라 명명된다. 그 명칭은 발현이 개시되는 BamH 1 또는 EcoR 1 제한 단편의 머릿글자로 시작한다. 상기 명칭내의 세번째 문자는 발현이 상기 표준지도 상에서 좌선성인지 우선성인지에 따라 L 또는 R로 표시한다(따라서, BLLF2는 BamH 1 제한단편 L에서 출발한 두번째 좌선성 리딩 프레임이다).

EBV의 생산 사이클에서 바이러스 항원들을 혈청학적으로 분류하는 방법은 여러 상이한 형광 기법에 기초

하고 있다.

고정시킨 잠복 감염 상태의 B-세포(예로는 Raji-세포)의 핵에서 항-보체 면역 형광법에 의해 특이적으로 검출된 항원들은 엡스타인-바르 핵 항원(EBNA)으로 분류한다.

화학적 인자 또는 바이러스성 인자들에 의해 바이러스 유전자의 발현이 활성화되면, 일군의 초기 항원(EA)이 검출되며, 그의 합성은 바이러스 DNA 합성을 억제시킴으로써 차단되지는 않는다. 사용된 고정액(메탄올 또는 아세톤)의 종류에 따라, 2 종류의 별개의 EA 세트, 즉 EA_R 및 EA_D가 검출된다. EA는 유도된 세포의핵 및 세포질 내에서 간접 면역 형광법으로 검출가능하다. 바이러스 DNA-합성이 개시된 후 (그리고, 합성에 따라) 바이러스 구조 단백질(VCA)이 합성되며, 이것은 바이러스 생산 세포(즉, P_3HR_1세포)의 세포질과 핵 내에서 간접 면역 형광법으로 검출할 수 있다. 바이러스 생산을 위해 유도해 낸 생존 감염 세포의 표면 상에서는 일군의 항원(MA)이 간접 면역 형광법으로 검출될 수 있다. 이 항원들은 또한 바이러스 엔벨로프 상에서 발견할 수 있으며 바이러스 중화를 위한 중요 타겟이다. 사람 혈청내의 EBV-특이성 항체를 검출하는 방법은 통상 Menke와 Henle에 의해 제시된 혈청학적 방법(Human Pathology, 5, 551-565, 1974)으로 실시할 수 있다.

생화학적 데이타와 면역형광학적 데이타에 의해, 항원 분자들은 5개의 상이한 부류로 대별할 수 있다. 상이한 종류의 바이러스 폴리펩티드들은 그들의 분자량에 따라 표시되며, 바이러스 엔벨로프 단백질을 제외하고는 통상적인 명명법이 확립되지 않았다.

이와 같은 상이한 5그룹의 항원은 다음과 같다:

A. 잠복기 상태중에 발현되는 항원 그룹(EBNA류 와 LMP류)

B. 바이러스 복제를 위한 게놈 활성화 및 초기 유도 현상에 주요 작용을 하는 항원 그룹(IEA)

C. IEA-유전자 생성물에 의해 유도되고, 바이러스 DNA의 복제에 필요한 항원 그룹; 이 항원들은 대부분 바이러스 효소들이다. (EA)

D. 바이러스 입자의 구조적 성분이며, 바이러스 DNA-합성이 개시된후 바이러스 복제사이클의 말기에 발현되는 항원 그룹.(VCA)

E. 감염된 세포의 세포막에서 발현되는 항원 그룹(MA).

[EBV의 바이러스 캡시드 항원(VCA)]

이 항원 복합체의 경우, 폴리아크릴아미드 겔 시스템, 사용된 세포주 및 화학적 유도인자 그리고 사용된 혈청등이 변화하기 때문에 다른 종류의 연구 실험에서 동정된 EBV 특이성 단백질들을 비교한다는 것은 어려운 일이다.

Dolyniuk 등(1979)은 정제된 비리온과 결합된 총 33개의 단백질을 서술한바 있다. 세정제를 이용해 차등용해법(differential solubilization)으로 분석한 결과, 상기 뉴클레오캡시드는 적어도 7개의 단백질들로 구성되어 있다고 제안되었다. VCA 복합체의 중요 성분은 주요 캡시드 단백질(MCP)이다. EBV-MCP는 상기 바이러스 게놈의 BcLF1 리딩 프레임(Bear 등, 1984)내에 암호화 되어 있고, EBV-생산 세포주내에서 153-160 KDa의 비글리코실화된 단백질(pI는 7.5 내지 9.0)로 발현된다. 이 단백질은 세포질내에서 가용성 형태로 합성되고, 그 후 핵으로 운반되어, 여기에서 캡시드로 축합되어 더 이상 세정제에 의해 용해되지 않게 된다. 또 다른 주요 VCA 성분은 분자량이 125 KDa이고 글리코실화된 것이다. 이 단백질은 상기 바이러스 게놈의 BALF 4 리딩 프레임내에 암호화되어 있다. 비록 이 당단백질이 처음에 VCA 성분으로 분류되기는 하였으나, 최근의 연구결과 이것은 사실 세포질 및 핵막의 구조부와 결합되어 있는 것일 수도 있다고 알려지고 있다.

종래 제시된 실험(J.M. Middeldorp와 P. Herbrink, J. Virol, Meth, 21, 133-146, 1988)은 상이한 종류의 EBV 질환과 관련하여 진단학적으로 관련된 EBV 마커 단백질들을 동정하고 특성 규명하는 것을 목적으로 했다.

이것은 VCA/EA 또는 EA를 발현시키기 위해 유도된 바이러스 생산 세포주 HH514-C16(P3HR1의 초유도성 유도체)에서, 또는 EBV 음성 세포주 Ramos와 Bjab에서 생산된 항원들을 함유하고 있는 면역 블로트 스트립들을 사용해 실시했다. (완전히) 잠복 상태로 EBV 게놈을 가진 세포주인 X 50-7과 JC-5를 사용해 EBNA/LMP를 구체적으로 연구했다.

건강한 혈청 양성의 혈액공여자의 혈청, IM 환자의 혈청 및 만성 IM환자 또는 비인두암과 같은 EBV-관련 종양을 지닌 환자의 혈청으로 EBV 항체 응답반응 패턴을 연구했다. 정의된 EBV-게놈 생성물과 반응성이 있는 폴리클론 항체 및 모노클론 항체들을 사용해 이 실험 시스템에서 검출된 단백질 밴드중 일부를 특성 규명 할 수 있다. 그러나, 이 연구 결과는 특정 분자량을 지닌 단백질 또는 폴리펩티드를 제시했을 뿐이었다. 이들 단백질에 대한 EBV 게놈상의 암호 서열에 대해 어떤 유용성 있는 정보도 입수할 수 없었다. 또한 면역 블로트상의 면역반응성 밴드들이 동일 분자량을 지닌 단일 또는 다수의 단백질들과의 반응성으로 인해 얻어진 것인지 여부도 알 수 없다.

면역 블로트 기법을 사용해 18KDa의 분자량을 지닌 EBV 항원을 검출할 수 있다. 이 단백질은 포스포노 아세트산(PAA)을 사용해 바이러스 DNA-합성을 차단시키는 경우 발현되지 않으며, 항-VCA 항체를 함유하는 모든 혈청에 의해 검출되는데, 이로써 VCA-관련 성분임을 알 수 있다. 다른 VCA 성분은 40KDa의 분자량을 지닌 단백질이다. 바이러스 캡시드 항원들중 다수가 핵 펠리트(nuclear pellet)와 결합되어 있다.

현재 EBV 특이성 혈청 진단법은 다소 주관적인 면역형광 시험법에 의해 실시되고 있다. 보다 간단하고 일관성 있는 진단 방법(즉, ELISA)을 발전시킨다는 것은, 일반적인 바이러스 생산 세포주를 사용해 바이러스 항원들을 대량으로 생산하고 정제하는 것이 거의 불가능하기 때문에 어려운 상황이다.

이를 달성하기 위한 유일한 방법은 다른 방법으로 제조된 EBV 항원(들)을 사용하는 것일 것이다. 이들

EBV 항원들은 유전공학 기술 또는 합성 펩티드 기술을 사용하여 제조될 수 있을 것이다.

EBV 감염의 다양한 단계(phase)에 대하여 신뢰성 있는 진단을 가능하게 하는 특이적이고 감도 높은 방법을 개발하기 위해서는 면역 우성인 타이러스 단백질 및 그 에피토프들을 식별하는 것이 대단히 중요하다.

본 발명은 EBV 오픈 리딩 프레임인 BFRF 3 및 BdRF1내에 각각 암호화 되어 있는 VCA-p18 또는 VCA-p40단백질의 적어도 일부를 포함하며 엡스타인 바르 바이러스에 대한 항체들과 면역화학적으로 반응성인 펩티드 및 그 단편들을 제공한다. 따라서, 본 발명의 일부는 EBV 항체들과 면역화학적으로 반응성인 서열 동정 번호 2및 4로 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 각각 176 및 345 아미노산으로 된 펩티드이다.

본 발명에 따른 펩티드들은 시료중의 EBV 또는 EBV-항체들의 존재를 측정하기 위한 진단 방법에 사용하기에 특히 적합한 것으로 판명되었다. 더욱이, 본 발명에 따른 펩티드는 EBV 관련 질병의 치료에 적합한 약제학적 투여 형태로 사용될 수 있다. 활성 성분으로서 상기 펩티드 또는 그 단편을 포함하는 상기와 같이 얻어지는 백신의 제조는 당업자에게는 공지된 것이다.

천연 EBV와는 대조적으로, 본 발명에 따른 펩티드들은 이들이 안전한 비감염원이라는 큰 장점을 갖는다. 또한, 본 발명은 엡스타인 바르 바이러스에 대한 항체들과 여전히 면역화학적으로 반응성인 상기의 펩티드들의 단편을 포함한다.

본 명세서 중에서 사용되는 "펩티드"라는 용어는 생물학적 활성을 갖는 아미노산 분자쇄를 지칭하며, 특정한 길이의 생성물을 지칭하는 것은 아니다. 따라서, 무엇보다도, 단백질, 융합 단백질 또는 융합 펩티드, 올리고펩티드 및 폴리펩티드가 포함된다. 필요하다면, 본 발명에 따른 펩티드들은 생체내 또는 생체외에서 글리코실화, 아미드화, 카르복실화 또는 인산화 등에 의해 변형될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 본 발명에 따른 펩티드들의 산 부가 염류, 아미드류, 에스테르류 및 특히 C-말단 에스테르류 및, N-아실 유도체류와 같은 작용성 변이체들도 본 발명의 일부로 간주된다. 이에 포함된 특정한 단백질들 또는 폴리펩티드들에는 천연적인 변이도 또한 존재할 수 있다는 것을 이해하여야 할 것이다. 이들 변이는, 전체 서열 중에서의 아미노산 차이, 또는 상기 서열중에서의 아미노산의 결실, 치환, 삽입, 역위, 부가에 의해서 증명될 수 있다. 생물학적 및 면역학적 활성을 본질적으로 변경시키지 않을 것으로 예측될 수 있는 아미노산 치환이 문헌상에 기술되어져 있다. 연관된 아미노산들 사이의 아미노산 치환 또는 진화중에 흔한 빈도로 발생하였던 치환으로서는, 무엇보다도, Ser/Ala, Ser/Gly, Asp/Gly, Asp/Asn, Ile/Val 을 들 수 있다(Dayhof, M.D., Atlas of protein sequence and structure, Nat, Biomed. Res, Found., Washington D.C., 1978, vol 5, suppl.3 참조). 이 정보에 기초하여, 리프만과 피어슨은 신속하고 감도 높은 단백질 비교 방법(Science 227, 1435-1441, 1985) 및 상동 단백질 사이의 작용성 유사성을 측정하는 방법을 개발하였다.

본 명세서 중에서 사용되는 것으로서의 "단편"이라는 용어는 본 발명의 펩티드 서열을 포함하는 아미노산 서열을 의미한다. 상기 단편은 VCA-p18 또는 VCA-p40 단백질의 하나 또는 그 이상의 면역원성 결정부를 가지는 펩티드이다. 무엇보다도, 단편들은, DNA에 대해서는 제한 효소를, 그리고 폴리펩티드에 대해서는 단백질 분해 효소를 사용하여, 전구 분자를 효소적으로 절단함으로서 생성될 수 있다. 다른 방법들로서는, 상기 단편들의 화학적 합성 또는 DNA 단편들에 의한 펩티드 단편들의 발현을 들 수 있다.

에피토프(들)을 포함하는 본 발명에 따른 펩티드의 적절한 면역원성 단편들은, 소위, 펩스캔법(pepscan method)에 기초한 geysen,H.M.등(J.Immnol.Meth. 102, 259-274 1987), Geysen,H.M. 등 (Proc, Natl, Acad. Sci. 81, 3998-4002, 1984), 특허 출원 WO 86/06487에 기재되어 있는 방법들에 의해서 발견될 수 있으며, 여기서는, 관심의 대상인 완전한 폴리펩티드의 부분적인 서열과 상응하는, 부분적으로 중첩되어 있는 일련의 펩티드들이 합성되며, 항체들과의 반응성이 조사되어 있다. 게다가, 이 펩티드들 중의 수 많은 영역들은, 비록 이론적인 고려에 의한 예측값이 제한적이기는 하지만, 이들 이론적인 예측값을 기초로 하여 에피토프라고 지목될 수 있다. 이들 영역은 호프와 우즈(Hopp and Woods)에 따른 친수성 기준들(Proc, Natl, Acad. Sci. 78, 3824-3828,1981) 및 초우와 파스만(Chou and Fasman)에 따른 제2차 구조 양태(Advances in Enzymology 47,45-148, 1987)의 조합에 근거하여 결정된다.

본 발명에 따른 바람직한 펩티드들은 서열 동정 번호 5와 6으로 나타낸 바와 같은 아미노산 서열중의 적어도 하나를 포함하는 펩티드들이다. 가장 바람직한 것은 서열 동정 번호 6으로 나타낸 바와 같은 아미노산 서열에 연결된 서열 동정 번호 5로 나타낸 바와 같은 아미노산을 포함하는 펩티드이다. 이러한 조합 펩티드는 표준 혈청학적 기술과 유사하거나 또는 심지어 더욱 양호한 감도로 EBV-VCA에 대한 IgG, IgA, IgM 항체들을 특이적으로 검출하는 데에 극히 유용한 것으로 입증되었다.

이러한 IgM-EBV는 급성 원발성 EBV 감염에 대한 유용한 진단 표지인 반면에, EBV에 대한 IgA는 비인두암의 진단 및 예후에 유용하다. EBV-IgG는 EBV-보균자인 모든 인체에서 양성이며, 이 바이러스로 감염되지 않은 사람에서는 음성이다. 게다가, 특정 아분류의 항체들 각각에 대한 항체 역가에 있어서의 변화는 부가적인 진단적 가치가 있을 수 있다. 상이한 아분류의 항체들은 상이한 단계의 EBV감염에서 특이적인 진단 가치를 가지므로, 예컨대, ELISA와 같은 진단 시험에 본 발명에 따른 조합 펩티드(combi-peptide)를 사용하는 것은 대단히 큰 장점일 수 있다.

본 발명에 따른 펩티드들 또는 그 단편들의 제조는 재조합 DNA 기술의 도움하에 또는 펩티드 합성을 위한 공지의 유기화학적 방법들 중 어느 하나에 의해서 수행된다.

펩티드 합성을 위한 유기화학적 방법들은 균일상 또는 소위 고체상을 이용하여 소정의 아미노산들을 축합 반응시켜서 커플링시키는 것을 포함하도록 고려된다.

축합 반응은 다음과 같이 수행될 수 있다:

a) 축합제의 존재하에, 하나의 유리 카르복실기와 보호된 다른 반응성기들을 갖는 화합물(아미노산, 펩티드)과 하나의 유리 아미노기와 보호된 다른 반응성기들을 갖는 화합물(아미노산, 펩티드)의 축합;

b) 하나의 활성화된 카르복실기와 유리 또는 보호된 다른 반응성기들을 갖는 화합물(아미노산, 펩티드)과 하나의 유리 아미노기와 유리 또는 보호된 다른 반응성기들을 갖는 화합물(아미노산, 펩티드)의 축합.

카르복실기의 활성화는, 무엇보다도, 카르복실기를 N-히드록시-숙신이미드, N-히드록시-벤조트리아졸 또는 p-니트로페닐 에스테르와 같은 활성화된 에스테르, 산 할라이드, 아지드, 무수물 또는 이미다졸리드로 변환시키는 것에 의해 발생시킬 수 있다.

상기의 축합 반응을 위한 가장 통상적인 방법들은 다음과 같다: The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology Vol.1-3(Ed. Gross, E, and Meienhofer, J., 1979, 1980, 1981, Academic Press, Inc.)에 기재된 바와 같은 카르보디이미드법, 아지드법, 혼합 무수물법 및, 활성화된 에스테르류를 사용하는 방법.

"고체상(solid Phase)"을 사용하는 본 발명에 따른 상기한 펩티드의 적당한 단편들의 제조는, 예컨대, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149(1963) 및 Int. J. Peptide Protein Res. 35, 161-214(1990)에 기재되어 있다. 제조하고자 하는 펩티드의 아미노산들의 커플링은 통상적으로 카르복실 말단쪽으로부터 시작한다. 이 방법에서는, 반응성기들이 있거나 이러한 기들을 도입할 수 있도록 하는데 고체상이 필요하다. 이것은 예컨대, 반응성 클로로메틸기들을 갖는 디비닐벤젠과 벤젠의 공중합체이거나 또는, 히드록시메틸 또는 아민-작용기와 반응성을 갖도록 된 중합체 고체상일 수 있다.

특히 적합한 고체상은 예컨대, Wang(1974),J.Am.Chem.Soc,95, 1328에 기재된 p-알콕시벤질 알콜 수지 (4-히드록시-메틸-페녹시-메틸-코폴리스티렌-1% 디비닐벤젠 수지)이다. 합성후, 이 펩티드들은 온화한 조건하에 이 고체상으로부터 절단될 수 있다.

원하는 아미노산 서열을 합성한 후, 이 수지로부터 펩티드의 분리는, 예컨대, 트리플루오로메탄설폰산 또는 삼불소화초산중에 용해된 메탄설폰산을 사용하여 수행된다. 또한, 이 펩티드는 저급 알콜, 바림직하게는, 메탄올이나 에탄올을 사용한 에스테르 교환 반응에 의해 담체로부터 제거될 수 있으며, 이 경우, 펩티드의 저급 알킬 에스테르가 직접 형성된다. 이와 유사하게, 암모니아의 도움에 의한 절단은 본 발명에 따른 펩티드의 아미드를 산출한다.

축합 반응에 참여하지 않을수도 있는 반응성기들은, 언급한 바와 같이, 산, 염기 또는 환원의 도움하에 가수분해에 의해서 매우 용이하게 다시 제거될 수 있는 기들에 의해서 효과적으로 보호된다. 따라서, 카르복실기들은, 예컨대, 고체 지지체상에 결합된 메탄올, 에탄올, 3차 부탄올, 벤질 알콜 또는 p-니트로벤질알콜 및 아민류와의 에스테르화 반응에 의해서 효과적으로 보호될 수 있다.

아미노기를 효과적으로 보호할 수 있는 기들은 에톡시카르보닐, 벤질옥시카르보닐, t-부톡시-카르보닐(t-boc) 또는 p-메톡시-벤질옥시카르보닐기 또는, 벤젠설포닐이나 p-톨루엔-설포닐기와 같은 설폰산으로부터 유래하는 산기들이지만, 예컨대, 벤질 및 트리페닐메틸과 같은 치환 또는 비치환의 아릴 또는 아르알킬기와 같은 다른 기들, 또는 오르토-니트로페닐-설페닐 및 2-벤조일-1-메틸-비닐과 같은 기들도 또한 사용될 수 있다. 특히 적합한 α-아미노-보호기는, 예컨대, 염기 감응성(base-sensitive) 9-플루오레닐-메톡시카르보닐(Fmoc)기이다[Carpino & Han(1970) J.Amer.Chem.Soc 92, 5748].

가능한 보호기에 대한 더욱 광범위한 설명은 문헌[The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 1-9(Eds. Gross, Udenfriend and Meienhofer), 1979-1987, (Academic Press, Inc.)]에서 찾아 볼 수 있다.

또한, 리신의 ε-미노기를 보호하는 것이 필요하며, 아르기닌의 구아니딘기에 대해서도 합당하다. 이와 관련한 관례적인 보호기들은 리신에 대해서는 Boc-기이고, 아르기닌에 대해서는 Pmc- 또는 Pms- 또는 Mbs-기 또는 Mtr- 기이다.

보호기들은, 특정 기의 성질에 따라, 예컨대, 팔라듐과 같은 촉매 및 수소를 사용한 온화한 환원에 의해, 또는 빙초산 중의 HBr을 사용하여, 또는 삼불소화초산의 도움하에, 각종 통상적인 방법들로 절단될 수 있다.

상기에서 이미 언급한 바와 같이, 본 발명에 따른 펩티드들은 재조합 DNA 기술의 도움으로 유사하게 제조될 수 있다. 이러한 가능성은 특히, 펩티드가 반복서열("직렬(tandem)로")내에 편입되는 경우, 또는 펩티드가 (더욱 큰) 단백질 또는 폴리펩티드의 구성 성분으로서 또는, 예컨대, β-갈락토시다제(일부)와의 융합 단백질로서 제조될 수 있는 경우에 중요하다. 따라서, 이러한 유형의 펩티드는 마찬가지로, 본 발명의 영역내에 포함되는 것이다.

이러한 목적을 위해서는, 재조합 DNA의 구성 성분으로서, 본 발명에 따른 펩티드를 암호화하는 핵산 서열이 사용되며, 이것에는 자연적으로 존재하는 EBV 게놈내에서 상술한 핵산 서열의 측면에 존재하는 핵산 단편이 거의 없다.

상기한 후자 방법은 적당한 미생물 숙주에서 소정의 펩티드 하나 이상을 암호하는 핵산 서열을 갖는 재조합 폴리뉴클레오티드를 발현시킴으로써 원하는 펩티드를 제조하는 방법에 관한 것이다.

따라서, 본 발명은, 바람직하게는 SEQ ID NO : 1 및/또는 3에 제시된 핵산의 적어도 일부를 포함하는, 본 발명의 펩티드를 암호하는 핵산 서열을 포함한다.

본 명세서에서 사용되는 "핵산 서열"은 임의의 길이의 뉴클레오티드 폴리머 형태를 의미하는 것으로서, 리보핵산 서열과 데옥시 리보핵산 서열 둘다를 의미한다. 원칙적으로, 이 용어는 상기 분자의 일차 구조를 의미하며, 따라서 이중 가닥 및 단일 가닥 DNA 뿐만 아니라 이중 및 단일 가닥의 RNA와 그것의 변형물을 포함한다. 천연 상태에서는 결합되어 있지 않은 각종의 복제를 가능하게 하는 DNA 서열과 본 발명의 핵산 서열을 결찰시킴으로써, 적당항 숙주의 형질 전환 또는 형질 감염에 사용될 수 있는 재조합 벡터 분자를 산출할 수 있다. 유용한 재조합 벡터 분자는, 예를 들어 폴라스미드, 박테리오파지, 코스미드 또는 라이러스로부터 유도되는 것이 바람직하다. 본 발명의 핵산 서열을 클론하는데 사용될 수 있는 특정한 벡터 또는 클로닝 담체는 당 분야에서 공지되어 있으며, pBR 322, 각종의 pUC, pGEM 및 블루스크립 플라스미드와 같은 플라스미드 벡터, (Kgt-Wes, 샤론 28 및 M13 유래 파지와 같은 박테리오파지, 또는 SV 40, 아데노바이러스 또는 폴리오마 바이러스와 같은 바이러스 벡터가 포함된다. (참고, 로드리퀴즈, R.L. 및 D.T. 덴하르드 저, Vectors: 분자 클로닝 벡터의 연구 및 그의 용도, 버터워스, 1988; 렌스트라, J.A. 외., Arch. Virol. 110, 1-24, 1990)

본 발명에 재조합 벡터 분자제조에 유용한 방법은 당업자에게 공지되었으며, 메니아티스 등에 의해 제시되었다 (Maniatis, T. 외, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2판; Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) 예를 들면, 유전자와 소정의 클로닝 벡터를 동일한 제한 효소(들)로 절단하여 상보성 DNA 말단이 산출되도록 하면 본 발명의 핵산 서열을 클로닝 벡터로 삽입하는 것은 쉽게 수행할 수 있다.

본 발명의 재조합 벡터 분자는 원하는 형질 전환체를 선별하는데 사용될 수 있는 하나 이상의 마커 활성을 추가로 포함할 수 있는데, 예를 들어, pBR322에 있어서 암피실린과 테트라사이클린 내성, pUCB에 있어서 α-갈락토시다제의 α-펩티드와 암피실린 내성을 포함한다.

본 발명은 또한 전술한 핵산 서열 또는 재조합 발현 벡터분자로 형질 전환 또는 형질 감염된 숙주 세포(들)을 포함하는데, 이 세포들은 상응하는 핵산 서열의 발현에 의해 본 발명의 펩티드를 산출할 수 있다.

적당한 숙주 세포는 펩티드 암호 핵산서열이나 상기 핵산 서열을 포함한 재조합 벡터 분자에 의해 형질전환될 수 있고, 필요할 경우, 상기 핵산 서열에 의해 암호되는 상기 펩티드를 발현하는데 사용될 수 있는 미생물 또는 세포이다. 이 숙주 세포는 이.콜리, 바실러스 서브틸리스 및 슈도모나스종과 같은 박테리아 등의 원핵 세포; 또는 효모(예, 사카로마이세스 세레비지에)와 같은 진핵세포나 HeLa 세포 및 차이니즈 햄스터 난소(CHO)세포를 비롯한 포유류 세포, 곤충 또는 식물세포등의 고등 진핵세포일 수 있다. 일반적으로, 원핵세포가 본 발명에 유용한 재조합 벡터 분자를 제조하는데 바람직하다. 본 발명의 핵산 서열을 발현하기 위하여 이 핵산 서열을 발현 벡터로 도입하는데, 즉 상기 서열은 발현 조절 서열에 작동적으로 연결된다. 이러한 조절 서열은 프로모터, 인헨서, 오퍼레이터, 인듀서, 리보좀 결합 부위등을 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명은 발현 조절서열에 작동적으로 연결된 전술한 펩티드 암호 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터 분자를 제공하는데, 이 분자는 형질전환 또는 형질 감염된 숙주 세포(들)내에서 그것의 DNA 서열을 발현할 수 있다. 클로닝 벡터의 선택 부위에 삽입된 뉴클레오티드 서열은, 상기 형질전환 또는 형질 감염된 숙주가 적어도 하나 이상의 면역원 결정인자를 갖는 폴리펩티드를 산출하는 한, 본 발명의 펩티드를 암호하는 완전한 핵산 서열의 단편만을 포함할 수도 있음을 쉽게 이해할 수 있다.

본 발명의 펩티드에 대한 항체도 본 발명의 일부이다. 전술한 펩티드 및 그것의 단편을 사용하여 다클론 및 단일 클론 항체를 생성할 수 있다.

본 발명의 펩티드에 대한 단일 클론 항체는 당업자에 의해 용이하게 제조될 수 있다. 본 발명에 의한 VCA-p18 단백질의 상이한 에피토프에 대한 바람직한 항체는 VCA-p18에 대해, 영국, 포튼 다운에 소재한 유럽 동물 세포 배양물 수집소(ECACC)에 기탁번호 제93020413호 또는 제93020412호로 기탁되어 있는 래트-마우스 하이브리도마 세포주에 의해 생성되는 항체와 동일한 반응성을 갖는 항체이다. VCA-p40 단백질의 에피토프에 대한 바람직한 항체는 VCA-p40에 대해 ECACC에 임시기탁번호 제93020414호로 기탁되어 있는 마우스-마우스 하이브리도마 세포주에 의해 생성되는 항체와 동일한 반응성을 지닌 항체이다.

본 발명의 단일 클론 항체를 분비할 수 있는 불멸의 세포주도 본 발명의 일부에 포함된다. 단일 클론 항체를 생성하는 세포주의 제조 방법은, 예를 들면, 쾰러와 밀스타인 방법(쾰러와 밀스타인은 단일클론 항체-생성 하이브리도마를 형성하는 방법을 고안함(G. 쾰러 및 C. 밀스타인, 1975, Nature 256 : 495-497; 1976, Eur, J. Immunol. 6 : 511-519)), 엡스타인-바르 바이러스로 형질 전환시키는 방법, 또는 종양원성 DNA로 B-림프구를 직접 형질전환시키는 방법 또는 인체나 마우스-인체 하이브리드 골수종 세포주인 융합 파트너로 인체 B-림프구를 직접 융합시키는 방법 또는 상기 골수종 세포주로 EBV-형질전환 B 세포주를 직접 융합하는 방법에 의해 가능하다.

본 발명에 의한 바람직한 세포주는 ECACC에 기탁 번호 제93020413호, 제93020412호 및 제93020414호로 기탁된 세포주이다. 이들 세포주는 1993년 2월 4일 ECACC에 부다페스트 조약(1977)하에 기탁되었다.

기탁 번호 제93020413호와 제93020412호의 세포주는 VCA-p18 단백질의 두 개의 에피토프에 대한 각각의 단일클론 항체(각각 EBV.0T15E 및 EBV.0T15I)를 생성할 수 있다. 이들 세포주는 랫트-마우스 하이브리도마 세포주이다. 임시 기탁번호 제93020414호의 세포주는 VCA-p40 단백질의 에피토프에 대한 항체를 산출할 수 있으며, 이는 마우스-마우스 하이브리도마 세포주이다. 상기 세포주에 의해 생성되는 항체는 각 단백질상의 에피토프를 확인하기 위해 사용할 수 있다(실시예에서 추가로 예시함).

본 발명의 펩티드에 대한 단일 클론 및 폴리클론 항체는 조직 표본 자체의 진단 및 면역화학적 검출시 매우 적당하며, 중화성 항체들은 수동 면역 치료시 매우 유용하다. 특히 단일클론 항체는 항-유전인자형 항체를 생성하는데 사용될 수 있다. 항-유전자인자형 항체를 산출하는 방법은 당업자에게 공지되었다. 전술한 바대로, 본 발명의 단일클론 항체와 반응성 있는 항-유전인자형 항체는 본 발명의 일부에 포함된다.

항-유전인자형 항체는 면역 글로블린의 가변부에 대한 항체이다. 항-유전인자형 항체의 아군집은 "항-유전인자형 β" 또는 "내부-상"으로 공지되어 있다. 이러한 항-유전인자형 β항체는 항원과 구조적 또는 입체적 유사성을 지닌다(위트하그, F.G.C.M. 외, Immunol, Rev: 90; 93-113; 1986) 이러한 유형의 항-유전인자형 항체는 동물 모델의 감염성 질환에 대한 왁찐으로서 널리 사용된다 (히어넉스 J.R.; Infect Immun.; 56; 1407-1413; 1988. 케네디. R.C. 외; Science 232: 220-223; 1986) 항-유전인자형 항체를 분석하는데 사용하기 위해, 다량으로 생성될 수 있다. 항-유전인자형 항체를 생성하는 방법은 당분야에서 공지되었다. 예를 들어, 본 발명의 항-유전인자형 항체는, 표준 방법에 의해 글루타르 알데히드로 KLH에 결합시키고 프로인트 완전 보조액과 혼합시킨 단일클론 항체로 BALB/c 마우스를 면역시켜 수득할 수 있다. 상기 마우스의 비장 세포는 불멸화될 수 있으며, 이렇게 수득된 하이브리도마는 항-유전인자형 항체 생성에 대해 선별할 수 있다. 상기 하이브리도마의 선별은, 예를 들어, 본 발명의 단일클론 항체를 고체상(미량적정 플레이트의 웰)에 결합시키고 증식하는 하이브리도마의 배양 상청액과 함께 이 고체상을 항온 처리함으로서 이루어질 수 있다. HRP(호스 래디쉬퍼옥시다제)에 결합한 EBV 펩티드를 첨가 할 수 있다. 배양 상청액내의 항-유전인자형 항체 존재는, 상기 고체상에 도포된 단일 클론 항체에 대한 이 펩티드 컨쥬게이트의 결합 억제로 나타난다.

항-유전인자형 항체는 예를 들어 EBV-항체를 사용한 면역 분석시 인체 및/또는 동물 EBV-항원의 결합 억제를 의해 사용할 수 있다. 또한 항-유전인자형 항체는 이하에서 언급되는 면역화학 시약의 모의 시약으로서 사용될 수 있다. 상기 항-유전인자형 항체는 또한 EBV 진단 및 치료에 유용할 뿐만 아니라, EBV-항

원의 중요한 에피토프 영역을 확인하는데 유용하다.

본 발명에 의한 하나 이상의 펩티드 또는 항체를 포함하는 면역화학적 시약은 본 발명의 일부를 이룬다.

본 발명에 있어서 "면역화학적 시약"이란 용어는 일반적으로 본 발명의 펩티드 하나 이상과 적당한 지지체 또는 표지 물질로 구성된다. 사용가능한 지지체의 예로는 미량적정 웰 또는 큐벳, 튜브 또는 모세관의 내벽, 멤브레인, 필터, 테스트스트립 또는 입자(예, 라텍스 입자)의 표면, 적혈구, 염료 졸, 금속 졸 또는 졸 입자로서의 금속 화합물, 담체 단백질(예, BSA 또는 KLH)이 있다. 사용가능한 표지 물질의 예로는 방사능 동위원소, 형광성 화합물, 효소, 염료 졸, 금속 졸 또는 졸 입자로서의 금속 화합물이 있다. 샘플내의 EBV에 대한 항체 검출 방법에는 본 발명의 면역화학적 시약을 상기 샘플과 접촉시킨다. 샘플내의 펩티드와 항체 사이에 형성된 면역 복합체의 존재를 검출하며, 이에 의해 샘플내의 EBV 항체 존재를 알수 있으며 이를 정량적으로 결정할 수 있다.

면역 화학적 시약의 상태 및 기타 특성에 따라, 샌드위치 반응, 응집 반응, 경쟁반응 또는 억제 반응등의 면역화학적 반응이 일어난다.

샘플내의 EBV를 검출하기 위하여, 본 발명의 면역화학적 시약(본 발명에 의한 펩티드를 하나 이상 포함함)을 샘플 및 항 EBV와 접촉시키고 그 후 형성된 면역 복합체의 존재를 검출하고 이로부터 샘플내의 EBV 존재를 결정할 수 있다.

샘플내 EBV의 확인에 특히 적당한 방법은 표지 물질과 함께 제공되는 본 발명의 펩티드와 EBV항원(샘플내에 존재하는)사이의 경쟁 반응에 기초하며, 여기서 상기 펩티드와 상기 항원은 고체 지지체에 부착된 EBV에 대한 항체와 경쟁한다.

본 발명은 또한 샘플내 엡스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스의 확인을 위한 방법을 포함하며, 상기 방법은 본 발명에 따른 항체가 샘플과 접촉하고, 그후에 생성된 면역 복합체의 존재를 확인하는데, 상기 면역 복합체는 샘플내 펩스타인-바르 바이러스의 존재의 척도가 되는 것을 특징으로 한다. 본 발명에 따른 시험 키트는 필수 구성물로서 상기한 면역화학 시약을 포함한다. EBV 항체를 확인하기 위해 샌드위치 반응을 수행할 때, 시험 키트는 예를 들어 고체 지지체(예: 마이크로테스트 웰의 내벽)에 피복된 본 발명에 따른 펩티드, 및 본 발명에 따른 표지된 펩티드 또는 표지된 항-항체를 포함할 수 있다. 경쟁 반응을 수행하기 위해서는, 시험 키트가 고체 지지체에 피복된 본 발명에 따른 펩티드, 및 EBV에 대해 생성된 표지된 항체, 바람직하게는 상기 펩티드에 대한 단일 클론 항체를 포함할 수 있다. 응집 반응에서, 시험 키트는 입자 또는 졸에 피복된 본 발명에 따른 펩티드를 포함할 수 있는 면역 화학 시약을 포함할 수 있다. 시험 키트의 또다른 구체예는 EBV(고체 지지체에 피복된)에 대한 항체상의 결합부위를 확인하기 위한 EBV 항원과의 경쟁 반응에서 본 발명에 따른 표지된 펩티드를 면역화학 시약으로서 사용하는 방법이다.

SEQ ID NO: 1 및/또는 3에 따른 새로운 누클레오티드 서열을 EBV DNA 또는 RNA를 확인하기 위한 시험의 기초로 사용하는 것이 본 발명의 범위내에 있으며, 상기 확인 방법은 폴리머라제 사슬 반응(PCR) 또는 핵산 서열에 기초한 증폭(NASBA)과 같은 핵산 증폭 기술이 있으며, EP201,814 및 EP 329,822에 각각 기술되어 있다. 상기 엡스타인-바르 바이러스 핵산 서열의 핵산 증폭을 수행하고, 증폭된 서열을 확인하기 위해 본 발명에 따른 적어도 하나의 핵산 서열 또는 그들의 단편 프라이머를 사용하여 샘플내 엡스타인-바르 바이러스 핵산 서열을 증폭하고 확인하는 방법이 또한 본 발명의 일부이다. 본 발명의 일부로는 또한 상기 언급한 증폭기술을 수행하기 위한 증폭시험키트로서, 본 발명에 따른 누클레오티드 서열의 적어도 일부에 상응하는 적어도 한 세트의 프라이머를 함유하는 상기 키트가 있다.

본 발명은 하기 실시예에 의해 더 구체화 된다:

[범례]

[제1도]

VCA-p40 및 VCA-p18 단백질을 암호화하는 EBV-암호화된 유전자를 동정하기 위한 시도의 요약.

[제2도]

a) EA 및 VCA의 발현을 위해 유도된 바이러스-생산 세포주 HH514의 핵항원 추출물의 웨스턴 블로트.

b) BFRF3-β-갈락토시다제 융합 단백질을 발현하는 이. 콜리의 전체 세포 분해물의 웨스턴 블로트.

c) BdRF1-β-갈락토시다제 융합 단백질을 발현하는 이. 콜리의 전체 세포 분해물의 웨스턴 블로트.

d) β-갈락토시다제만을 발현하는 이. 콜리의 전체 세포 분해질의 웨스턴 블로트.

상기 블로트는 한 세트의 각각의 혈청으로 탐침하였다. 상기 블로트의 1-16레인에 사용된 혈청은 각각 하기와 같다:

1. β-Gal에 대한 마우스 단일 클론 항체(프로메가).

2. 천연 바이러스의 캡시드 단백질로 면역화시켜 생성된 VCA-p40에 대한 마우스 단일 클론 항체(EBV.0T41A).

3. 바이러스의 VCA-P18로 특이적 면역 친화성 정제에 의해 얻은 바이러스 VCA-P18에 대한 단일-특이성의 인간 항체.

4-5. 인간 EBV-혈청 반응 음성인 혈청.

6-16. 바이러스의 VCA-P18 및 VCA-P40에 대해 상이한 상대적 반응성을 가진 인간의 EBV-혈청 반응 양성인 혈청

[제3도]

니트로셀룰로우즈 스트립상의 3개의 인간 혈청(혈청 92, 혈청 214 및 혈청 219)을 하기 양의 BFRF3-β-갈락토시다제 융합 단백질로 미리 흡수시켰다.

1 레인 : 0μg BFRF3-β-갈락토시다제

2 레인 : 0.01μg BFRF3-β-갈락토시다제

3 레인 : 0.2μg BFRF3-β-갈락토시다제

4 레인 : 0.5μg BFRF3-β-갈락토시다제

5 레인 : 1μg BFRF3-β-갈락토시다제

β-갈락토시다제만이 존재하는 레인을 β레인으로 나타내었다.

[제4도]

펩스캔(PEPSCAN) 분석의 결과: VCA-18서열로부터의 12-mer 펩티드와 반응성이 있는 건강한 EBV. 혈청반응 양성인 공여체로부터의 15개 인간 혈청의 비율. VCA-p18단백질의 아미노산 서열내의 12-mer 펩티드의 출발 위치를 X-축에 나타내었다.

[제5(a)도 및 제5(b)도]

VCA-p18에서 유래된 12-mer 펩티드의 분석의 펩스캔 결과(450nm에서의 흡광도). VCA-p18에 대한 2개의 쥐 단일 클론 항체(각각 EBV.0T15E 및 EBV.0T15I)를 사용하였다.

[제6도]

VCA-p40에 대한 마우스 단일클론 항체(EBV.0T41A)를 사용하여 VCA-p40 단백질로부터 유래된 12-mer펩티드의 분석의 펩스캔 결과

[제7도]

BFRF3-암호화된 VCA-p18 단백질로부터 유래된 선택된 합성 펩티드에 대한 IgG-반응성에 대해 시험한, 건강한 혈액 공여체로부터 얻어진 43개의 인간 혈청 샘플의 ELISA 반응성(450nm에서의 흡광도).

△는 표준 혈청 분석에 의해 음성인 혈청을 나타낸다.

□는 표준 혈청 분석에 의해 양성인 혈청을 나타낸다.

◇는 표준 혈청 분석에 의해 EBV 항체에 대해 중간이지만 면역 블로트에서 음성인 혈청을 나타낸다.

*는 표준 혈청 분석에 의해 양성이지만 면역블로트에서 항-p18 항체에 대해 음성인 혈청을 나타낸다.

펩티드 1: H_2N-GVPRRQRAIDKRQRA-COOH

펩티드 2: H_2N-GQPHDTAPRGARKKQ-COOH

펩티드 3: H_2N-AVDTGSGGGGQPHDTAPRGARKKQ-COOH

펩티드 4: H_2N-STAVAQSATPSVSSSISSLRAATSGATAAA-COOH

펩티드 5: S-S-연결에 의해 결합된 펩티드 4 및 3의 콤비-펩티드.

[제8(a)도, 제8(b)도, 제8(c)도]

콤비 펩티드 no.5의 하기 면역 글로뷸린과의 면역 반응성(ELISA)의 분석:

a) 인간 IgG(76VCA-I.F.양성 혈청)

b) 인간 IgM(26IgM 양성 혈청)

c) 인간 IgA(NPC 환자로부터의 35 혈청)

[실시예]

[실시예 1]

EBV 단백질을 암호화하는 새로운 DNA 서열을 분리하고 동정하는 방법.

동정에 따라 새로운 EBV 마아커(marker)분자를 생성시키는 일반적 전략을 하기 단계로 세분할 수 있다.

1. EBV 마아커 분자와 특이적으로 반응하는 항체 시약의 동정 및 제조

2. EBV 발현 세포로부터 분리된, 폴리-A 선택된 mRNA 또는 전체 세포 mRNA로부터 c-DNA 뱅크를 제조하거나, 또는 바이러스 게놈, 바람직하게는 파지람다 gt11의 단편들로부터 게놈 DNA-뱅크를 제조하고, 상기 항체 시약으로 파지합성 단백질을 검색한다.

3. 반응성 파지의 정제 및, 파지 게놈내에 포함된 EBV-특이성 삽입 서열의 동정

4. 삽입 서열을 발표된 원형(原形) EBV-게놈 서열과 상호관련시켜 상응하는 EBV-특이화된 개방 해독틀을 찾아낸다.

5. 이.콜리, 바쿨로바이러스, 효모 또는 고등 진핵 세포와 같은 대체성 숙주 세포내에서 또는 대체적 발현 또는 생산 시스템 내에서 동정된 개방 해독틀의 클로닝, 발현 및 제조.

상기 공정들을 하기에 상세히 설명하고, 제1도에 묘사된 그림으로 설명한다.

[1 단계]

[세포 배양 및 세포 추출물]

P3HR1에서 유래된 세포주 HH514.c16을 롤러병내의 현탁 배양체로서 번식시키고, 20ng/ml의 12-테트라데카노포르볼-13-아세테이트(TPA) 및 3mM 부티르산 나트륨을 사용하여 VCA 발현 및 EA 발현을 유도하였다. 참고문헌[Middeldorp 및 Herbrink(J.Virol.Meth.,21, 133-146, 1988)]

EA-항원만의 선택적 발현을 위해서, 유도된 세포 배양물에 0.5mM 포스포노아세트산을 참가하여 바이러스 DNA 폴리머라제를 차단하였다.

[단일 클론 항체]

단일 클론 항체의 생산을 위해, BALB/c 생쥐를 VCA-유도 HH514 세포(F.Wielaard 등, J. Virol. Meth., 21.105-115, 1988)의 핵분획물로 또는 상기 세포 또는 다른 발현 시스템으로부터 보다 광범위하게 정제된 단백질로 면역화시켰다. 표준 방법에 따라 하이브리도마를 제조하고, 표준 EBV 면역 형광 시험으로, 그리고 Middeldorp 및 Herbrink(상기 참조)에 의해 기술된 VCA-유도 HH514 세포로부터의 항원 추출물을 함유하는 면역블로트 스트립상에서 상층액을 분석하였다.

[항 VCA-p18 항체의 친화성에 의한 정제]

다소 수정된 로빈슨 및 밀러의 방법(The herpesviruses, Vol.1, 151-192, 1991, 플레넘 출판 코오포레이션 출판, 뉴욕)에 따라 항 VCA-p18항체를 인간 EBV-양성 혈청으로부터 정제하였다. 요약하면, 10% 아크릴아미드 겔에서의 전기영동에 의해 분리한 다음에, 단백질을 PVDF-막(밀리포어 코오페레이션, 베드포드, 미국)상에 블로팅시키고, VCA-p18에 상응하는 PVDF-막상의 영역을 잘라내어 친화성 기질로 사용하였다. 차단 용액 (인산염 완충식염수 pH7.4(PBS) 내의 5% 건조 우유 분말, 4% 말혈청)에서 하루밤동안 항온처리하여 상기 스트립에 대한 항체의 비특이적 결합을 방지하였다. 그후에 그 스트립을 희석된 인간 혈청(차단 용액에 1 : 25로 희석)과 2시간 동안 항온 처리하였다. 0.05% 트윈(Tween)-20을 함유하는 PBS로 3번 세척하는 단계후에, 결합된 항체를 두 번의 연속 항온처리로 pH2.7, 0.1M 글리신으로 용출시켰다. 용출액을 pH9.0, 1M 트리스/HCl의 1/20부피로 중화시켰다. 마지막으로, 용출액을 PBS에 대해 투석하고 -20℃에서 분할하여 저장하였다.

[2 단계]

[HH 514.c16 세포의 RNA 정제]

전체 RNA를 매니아티스등(Molecular cloning: A laboratory manual: 콜드 스프링 하아버 실험실, 뉴욕, 1982)에 의해 기술된 구아니디늄/CsCl 방법에 의해 유도된 HH514.c16세포로부터 분리하였다. 폴리(A^+)RNA의 정제를 오수벨 등(Current Protocols in molecular biology(1991)그린 출판 연합, 존 와일리 및 아들, 뉴욕)에 의해 기술된 올리고(dT) 크로마토그래피(Pharmacia, Inc., 피스캐터웨이, 뉴욕)에 의해 수행하였다.

[노오던 블로트 분석]

전체 RNA(10μg)을 글리옥살(P.S Thomas, Methods in Enzymology, 100, 255-266, 1983)에 의해 변성시키고, 아가로즈 겔에서 진행시켰다. 에티듐 브로마이드 염색후에, 분리된 RNA를 니트로셀룰로우즈에 진공-블로팅시켰다. 3시간 예비 혼성화후에, 필터를 42℃에서 [α-^{32}P]-표지되고 (아머샴, 브리스톨, 영국)무작위적으로 프라임되거나 틈 해독(nick translation)된 DNA 프로브로 하루밤동안 혼성화시켰다. 그 혼성화 용액은 50% 포름아미드, 5 × SSPE, 5 × 덴하아르트(Denhardts)용액(0.1% (w/v)폴리비닐피롤리돈, 0.1% (w/v)BSA, 0.1%(w/v)피콜), ml당 0,2mg의 초음파 처리된 청어 혈청 및 0.5% SDS로 구성되었다. 계속해서, 블로트를 세척하고 강화막을 사용하여 X-선 필름(이스트먼 코닥 컴퍼니, 로체스터, 뉴욕, 미국)에 노출시켰다.

[람다-gt11에의 cDNA 라이브러리 작제]

5μg의 폴리(A^+)- 선별된 RNA를 메틸수은 수산화물로 변성시켰다. cDNA합성에 올리고(dT) 또는 헥사누클레오티드 프라이머를 사용했다. 제1 및 제2 가닥 합성의 과정은 문헌 [거블러 및 호프만, Gene, 25, 263-269, 1983)에 기술된 바와 동일하다. EcoRI-메틸화 단계, EcoRI-링커 첨가 단계 및 EcoRI 분해 단계후에, 변형된 cDNA를 마니아티스등의 문헌에 기술된 바와 같이 세파로오즈 CL4B(파마시아) 크로마토그래피에 의해 크기에 따라 선별하였다. 0.5 kB 내지 3.0 kB의 크기를 가진 cDNA를 포스파타제처리한 람다-gt11-아암에 결찰시킨 후에 팩카진 키트 (미합중국, 샌디에고에 소재하는 프로메가)를 사용하여 시험관내 패키징하였다.

[람다-gt11 라이브러리의 면역학적 검색]

올리고(dT)로 프라임된 의한 라이브러리의 총 1 × 10^4개의 재조합 파지 및 헥사누클레오티드로 프라임된 라이브러리의 5 × 10^5개의 재조합체를 친화도 정제된 인체 항-p18 항체 또는 단일클론 항체 EBV.0T41A와의 면역학적 반응성에 대해 검색했다(마니아티스등의 문헌 참조). 제조업체(프로메가)에서 설명한 바에 따라 알칼리성 포스파타제-접합된 항-인체 또는 항-마우스 IgG를 각각 사용하여, 면역반응성 플라크를 검출하였다.

[단계 3]

[누클레오티드 서열 분석]

반복된 플라크의 리프팅과 면역검색에 의해 정제된 양성 플라크의 삽입 DNA를, 5′-말단에 제한 부위를

함유하는 람다-gt11 측부 서열의 프라이머를 사용하여 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의해 증폭시켰다. 적합한 제한 효소를 사용하여 분해한 후에, DNA 단편을 pGEM-4Z에 서브클로닝하고, 문헌[Proe. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463-5467, 1977]에 기술된 생거등의 방법에 변형을 가한 서열분석 키트(파마시아, 스웨덴, 업살라 소재)를 사용하여 양측으로부터 서열분석 하였다.

[단계 4]

[서열의 정렬]

유니버시티 오브 위스콘신, 유전학 컴퓨터 그룹의 소프트웨어 프로그램(그리브쇼프등, Nucl. Acid res., 14, 327-334, 1986)을 사용하여, EMBL-서열 데이타베이스에 축적된 EBV-B95-8 프로토타입(바에르등, Nature 310, 207-211, 1984)의 공지된 서열과 함께 정렬시켰다.

[단계 5]

[BFRF3 및 BdRF1의 이.콜리에서의 클로닝 및 발현]

EBV 게놈-암호화된 개방된 해독 프레임(ORF), BFRF3 및 BdRF1을 HH514.c16 배양물 상청액으로부터 수크로오즈-밀도 원심분리에 의해 분리시킨 비리온으로부터 정제된 바이러스성 DNA를 사용하여 PCR에 의해 증폭시켰다. LacZ 유전자의 5′ -말단의 5번째 코돈에 위치한 발현 벡터 pMLB1113(PBR322의 유도체)(자구르스키 및 베르만, Gene, 27, 183-101, 1984)의 EcoRI-HindIII 부위에 증폭된 단편을 클로닝하는데 5′ -말단에 제한 부위를 함유하는 각 세트의 프라이머를 사용했다. 이러한 구조체로부터 발현된 단백질은 β-갈락토시다제의 처음 5 아미노산, 및 그들의 C-말단에서 β-갈락토시다제의 잔류부위에 연결된 재조합 단백질로 이루어진다. 비-융합 단백질을 유사하게 작제하되, 십입부의 3′ -말단에 종결코돈을 삽입하였다.

[재조합 단백질의 이. 콜리 발현]

1mM IPTG(이소프로필-β-D-티오갈락토피라노시드)를 첨가함으로써 형질 전환된 이.콜리 배양물을 유도하였다. 이를 유도한지 2시간이 경과했을때 박테리아 세포를 원심분리에 의해 수집하여 SDS-PAGE 샘플 완충액에 현탁시키고 면역블롯법에 의해 분석했다.

[실시예 2]

[VCA-p18 및 VCA-p40 단백질의 면역 반응성]

실시예 1에 개관된 절차에 따라 수득한 단백질의 면역 반응성을 면역블롯 분석에 의해 분석했다. 이를 위해, BFRF3- 또는 BdRF1-β-갈락토시다제 융합 단백질 또는 β-갈락토시다제만을 발현하는 VCA-유도 HH514.c16 세포 또는 이.콜리의 모든 세포 단백질을 SDS-PAGE로 분리하고 니트로셀룰로오즈상에 블로팅하였다. 이들 블롯으로부터 제조한 스트립을 각각의 혈청 및 항체 표본과 함께 항온배양시켰다.

[면역블롯 방법]

면역블롯 방법은 실질적으로 문헌[미델도프 및 허브링크, J.Virol. Meth., 21, p133-159, 1988)에 기술된 바에 따라 수행하였으며, 이하에 요약하였다: SBS-PAGE 후에 단백질을 니트로셀룰로오즈 필터로 옮겼다(0.2μ 슈레이커 & 슈엘, 덴 보쉬, 네덜란드), 항체의 필터에 대한 비특이적 결합은 실온에서 적어도 1시간 동안 블로킹 완충액(4% 건조 밀크 분말, 트리스 완충 염수(TBS) 중의 5%말 혈청)과 함께 항온배양함으로써 방지하였다. 인체의 혈청을 블로킹 완충액중에 적합한 희석율로 희석하고 적어도 1시간 동안 항온배앙하였다. 블롯 또는 스트립을 TBS + 0.05% 트윈 20(TBSt)으로 3회 세척한 후에, 알칼리성 포스파타제(AP)-접합된 항-인체 IgG 항체(프로메가), 또는 HRP-접합된 항-마우스 IgG, 또는 항-래트 IgG(오르가논 테크니카 카펠, 복스텔, 네덜란드)를 블로킹 완충액에 적절히 희석하여 첨가했다. 추가로 항온 배양시키고 세정한 후에, 니트로블루 테트라졸륨(NBT) 및 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 포스페이트(BCIP)를 AP에 대한 기질로서, 그리고 4-클로로-나프톨을 HRP에 대한 기질로서 사용하여 블롯을 현상하였다.

형성된 블롯은 제2(a)도～제2(d)도에 도시했다. 1-12열의 블롯에 사용된 혈청은 각기 다음과 같다:

1. B-Gal(프로메가)에 대한 마우스 단일클론 항체

2. 천연 바이러스의 캡시드 단백질로 면역화시켜 생성된 VCA-P40에 대한 마우스 단일클론 항체(EBV.0T41A)

3. 바이러스의 VCA-P18을 이용한 특이적 면역 친화도 정제에 의해 수득한 바이러스 VCA-P18에 대한 단일-특이적인 인체 항체

4-5. 인체 EBV-혈청음성인 혈청

6-16. 바이러스의 VCA-P18 및 VCA-P40에 대해 상이한 상대적 반응성을 가진 인체의 EBV-혈청양성인 혈청

제2(a)도는 12.5% 아크릴아미드중의 환원성 SDS-PAGE에 의해 분리된 천연 바이러스의 폴리펩티드의 면역반응성을 도시한 것이다. 항 β-갈락토시드 항체는 음성(1)인 반면에, VCA-p40(2) 및 VCA-p18(3)에 대해 특이적인 항-혈청은 각각의 바이러스 단백질과 반응한다. 인체 EBV-음성 혈청으로 염색된 스트립 (4) 및 (5)는 반응성을 나타내지 않는 반면에, 스트립(6-16)은 건강한 정상적인 혈청 EBV-단백질에 대해, 양성인 혈액 공여자 또는 활성 EBV 질병을 가진 환자에서 발견된 바와 상이한 면역 반응성을 나타낸다. VCA-p18 및 VCA-p40 밴드의 위치는 우측에 표시했다. 제2(b)도는 10% 아크릴아미드중의 환원성 SDS-PAGE에 의해 분리된, VCA-p18 β-갈락토시다제 융합 단백질(BFRF3-LacZ)을 발현하는 이.콜리로부터 얻은 전체 세포 단백질의 면역반응성을 도시한 것이다. 항 β-갈락토시다제 (1) 및 항 VCA-p18(3)항체는 134 kDa의 원래의 융합 단백질의 이. 콜리에서 단백질 분해성 단편화에 기인한 다수의 단백질 밴드와 특이적으로 반응한다. 인체의 EBV-음성 혈청 (4-5)과 마찬가지로, 항-VCA-p40 단일클론 항체(2)는 음성이다 바이러스 VCA-p18에 대해 상이한 반응성을 가진 인체 혈청은 융합 단백질에 대해서도 유사하게 상이한 반응성을 나타낸다. 또한 다수의 밴드의 염색은 이.콜리에서의 융합 단백질의 단백질 분해성 파괴에 기인한다.

제2(c)도는 이. 콜리에서의 VCA-p40-β-갈락토시다제 융합 단백질에 대한 분석 결과를 도시한 것으로, 이는 단백질분해에 대한 감수성이 적어서 156kDa에 단일 밴드를 나타낸다. 제2(c)도의 해석은 제2(b)도와 유사하다.

제2(d)도는 β-갈락토시다제만을 발현하는 이 콜리의 대조 블롯이다.

전술한 바와 같은 연구로부터, 각각의 이.콜리 구조체가 사실상 각각의 융합 단백질을 발현함이 명백하다. 인체 혈청은 발현된 단백질에 대해서, 천연 바이러스 단백질에 대한 것과 동일한 반응성을 나타낸다.

[실시예 3]

[면역 흡착]

본 발명에 의한 대안적인 펩티드 및 상응하는 천연 바이러스 단백질의 면역 화학적 실체를, 천연 바이러스 단백질(들)을 함유한 면역 블롯에 대해 반응성이 있는 인체 혈청을 상이한 농도의 본 발명에 의한 펩티드로 예비-흡착시켜 블롯상의 상응하는 천연 바이러스 단백질에 대한 특이적 항체 반응성을 소멸시킴으로서 입증할 수 있다. 면역화학적 실체를 입증하는 것 이외에, 본 기술은 면역블롯상의 바이러스 단백질의 면역 반응성이 단일의 (유력한) 단백질종에 대한 항체 결합에 의해 매개된다는 확실한 증거를 제공한다.

전술한 바와 같은 실험을 VCA-p18마커 단백질에 대해 수행하였다:

3인의 건강한 EBV-혈청반응양성 공여자로부터 얻은 인체 혈청(혈청 92, 혈청 214 및 혈청 219)의 면역 반응성을 10% 아크릴아미드 겔에서의 환원성 SDS-PAGE에 의해 분리된, VCA-유도 HH514 세포로부터 얻은 핵 항원을 함유하는 니트로셀룰로오즈 스트립상에서의 면역 블롯 분석에 의해 연구했다. 면역 블롯 분석에 앞서 증가된 양의 정제된 BFRF3-β-갈락토시다제 융합단백질 또는 β-갈락토시다제만으로 혈청을 밤새 예비흡수시켰다. 침전 기질로서 N-클로로-나프톨을 사용하여, 퍼옥시다제-표지화된 양의 항-인체 IgG로 IgG-반응성에 대한 염색을 수행했다. 본 실험의 결과는 제3도에 설명했다. 제3도에 도시된 바와 같은 면역 블롯의 각각의 레인내에서 분석된 1:100 희석된 1ml의 혈청의 예비-흡수에 사용된 정제된 BFRF3-β-갈락토시다제 융합 단백질의 양은 다음과 같다:

레인 1: 0 μg BFRF3-β-갈락토시다제

레인 2: 0.01 μg BFRF3-β-갈락토시다제

레인 3: 0.1 μg BFRF3-β-갈락토시다제

레인 4: 0.5 μg BFRF3-β-갈락토시다제

레인 5: 1 μg BFRF3-β-갈락토시다제

예비-흡착에 β-갈락토시다제만을 사용한 레인을 β 레인으로 표시했다.

제3도로부터 VCA-p18을 나타내는 밴드 (화살표)의 반응성은 예비-흡수 단계중에 BFRF3-β-갈락토시다제 융합 단백질의 농도를 증가시킴에 따라 소멸됨을 알 수 있다. β-갈락토시다제만을 사용한 예비-흡수는 효과가 없는 반면에, 그밖의 EBV-단백질에 의한 반응성은 어떠한 예비-흡수에 의해서도 영향을 받지 않는다. 비-관련 단백질 (예: EBNA, 72kD 또는 40kD의 VCA-p40)의 염색은 효과를 수행하지 않는다.

전술한 실험으로부터, 인체 혈청 항체에 의한 바이러스 VCA-p18의 면역 염색은 BFRF3 융합 단백질로 이들 혈청을 예비흡수 시킴으로서 특이적으로 억제됨이 명백하며, VCA-p18과 BFRF3 해독 프레임에 의해 암호화된 단백질이 면역화학적으로 동일함을 입증한다. 또한 상기 실험은 VCA-p18에 대한 인체 혈청의 반응성은 단일의 바이러스 단백질과의 상호작용에 의해 유발됨을 보여준다.

[실시예 4]

[펩스캔에 의한 면역 반응성 에피토프의 국소화]

[펩티드 합성 및 면역검색(펩스캔)]

12개의 아미노산(AA)을 가지며 ORF BFRF3과 BdRF1의 아미노산 서열 중 11아미노산과 오버랩되는 펩티드를, 문헌[게이유센등, Proc. Nat, Acad Sci., USA, 83, 3998-4002, 1984]에 기술된 바와 같이 화학적으로 활성화된 폴리에틸렌핀상에서 자동화된 고체상 펩티드 합성에 의해 합성했다. 건강한 EBV 혈청양성공여자로부터 얻은 15종의 혈청을 사용하여 문헌[J.Virol. meth., 21, 147-159, 1988]에 기술된 바에 따라 EBV-특이적 항체에 대한 면역반응성을 측정했다. VCA-p18 서열로부터 유래된 12아미노산 펩티드의 펩스캔 분석 결과를 제4도에 도시했다. X축상의 숫자는 각각의 분석된 12-mer 펩티드의 VCA-p18 서열상의 출발위치를 나타낸다. 제4도에서 Y축상에 표시된 것은 BFRF3 해독 프레임에서 암호화된 VCA-p18 단백질의 특정한 12-mer 펩티드에 대해 반응성이 있는 인체 혈청의 백분율이다. 양성 반응은 동일한 세트의 핀상의 EBV-혈청음성인 인체 혈청의 평균 반응성 보다 표준편차의 3배 만큼 큰 반응성을 나타내는 지점으로 정의된다. 제4도로부터 면역우성 도메인(immunodominant domain)은 다음과 같이 정의될 수 있다:

도메인 I: AA 120-140, 도메인 II: AA 152-155,

도메인 III: AA 159-165(이들 수치는 또한 펩스캔에 사용된 12-mer 펩티드의 출발 위치를 나타낸다), 표 1은 본 연구에 사용된 각각의 혈청에 대해 가장 반응성이 큰 펩티드를 상세히 설명한 것이다. 표 1의 첫 번째 칸에 각 혈청의 번호를 제시했다. 두 번째 칸은 도메인 I내에서 가장 반응성이 큰 펩티드에 대한 펩스캔 OD450 값(450nm에서의 광학 밀도)를 제시한 것이며, 그 펩티드는 세 번째칸에 제시했다. 네 번째 칸 및 다섯 번째 칸은 도메인 II 및 III에 대한 유사한 데이타를 나타낸다.

[표 1]

15 EBV VCA-p18 양성 혈청의 면역학적 반응(VCA-p18의 중요한

에피토프 도메인중에 위치한 최고 반응성 펩티드의 반응만을 설명)

혈청번호	도메인 I (펩티드 120-140)		도메인 II (펩티드 152-155)		도메인 III 펩티드 159-165)	
	Elisa OD_{450}	펩티드 A.A.-서열	Elisa OD_{450}	펩티드 A.A.-서열	Elisa OD_{450}	펩티드 A.A.-서열
1	1.418	120-TAVAQSATPSVS-132	-	-	-	-
2	1.820	120-TAVAQSATPSVS-132	0.670	155-DTGSGGGGQPHD-167	0.423	162-GQPHDTAPRGAR-174
3	1.228	128-PSVSSSISSLRA-140	-	-	0.808	162-GQPHDTAPRGAR-174
4	1.230	128-PSVSSSISSLRA-140	-	-	0.761	162-GQPHDTAPRGAR-174
5	0.540	128-PSVSSSISSLRA-140	-	-	1.354	162-GQPHDTAPRGAR-174
6	0.731	129-SVSSSISSLRAA-141	-	-	1.441	162-GQPHDTAPRGAR-174
7	0.385	129-SVSSSISSLRAA-141	-	-	0.770	163-QPHDTAPRGARX-175
8	1.360	131-SSSISSLRAATS-143	-	-	1.343	160-GGGQPHDTAPRG-172
9	1.598	131-SSSISSLRAATS-143	0.510	153-AVDTGSGGGGQP-165	1.481	162-GQPHDTAPRGAR-174
10	1.591	131-SSSISSLRAATS-143	0.474	153-AVDTGSGGGGQP-165	1.481	162-GQPHDTAPRGAR-174
11	1.251	131-SSSISSLRAATS-143	0.958	152-AAVDTGSGGGGQ-164	0.774	162-GQPHDTAPRGAR-174
12	1.839	133-SISSLRAATSGA-145	-	-	0.407	162-GQPHDTAPRGAR-174
13	1.128	134-ISSLRAATSGAT-146	0.460	154-VDTGSGGGGQPH-166	1.535	162-GQPHDTAPRGAR-174
14	1.064	138-RAATSGATAAAS-150	-	-	1.319	162-GQPHDTAPRGAR-174
15	0.695	138-RAATSGATAAAS-150	-	-	0.644	162-GQPHDTAPRGAR-174

[실시예 5]

[BFRF3-암호된 VCA-p18 단백질, 또는 BdRF1-암호된 VCA-p40단백질에 대해 특이성이 있는 래트와 마우스 단일클론 항체의 펩스캔 분석]

실시예 4에 기재된 바와 유사한 방식으로, 인체 혈청에 대해 펩스캔 분석을 수행함으로써 단일클론 항체에 의해 검출된 선형 에피토프의 위치를 확인하였다. 제5(a)도 및 제5(b)도에는 VCA-p18에 대해 지시된 2종의 래트 단일 클론 항체 (각각 EBV.0T15E 및 EBV.0T151)를 사용하여 상기와 같이 분석한 펩스캔 결과를 제시하였으며 상기 항체들은 각각 다른 선형 에피토프를 검출한다. 제6도는 BdRF1 판독프레임에 의해 암호된 VCA-p40에 대해 지시된 마우스 단일 클론 항체(EBV.0T41A)의 펩스캔 분석 결과를 나타낸 것이다 VCA-p40(BdRF1) 서열상의 2종의 래트 단일 클론항체의 교배분석과 VCA-p18(BFRF3) 서열상의 마우스 단일 클론항체의 역은 명백한 음성 결과를 나타냈다. 제6도를 통해 EBV.0T41A가 VCA-p40 단백질의 C-말단영역 중에서 독특한 선형 에피토프를 인식함을 알 수 있다.

[실시예 6]

[컴퓨터 분석 및 펩스캔에 의한 BFRF3 암호된 VCA-p18단백질로부터 유래된 합성 펩티드의 선별 및 정상 인체 혈청과의 이들 펩티드의 면역활성 분석]

t-Boc 화학적으로 표준 고형상 합성방법을 통해 합성 펩티드를 제조하였다.

BFRF3-암호된 VCA-p18 단백질의 펩티드는 제임슨 & 울프(CAB10S4, 181-186, 1988)에 의해 개발된 컴퓨터 프로그램 "항원 지수"를 사용하여 예상되는 고 항원성을 기초로 하거나 [제7도의 펩티드 1 및 2는 이것을 기초로 선택됨] 또는 실시예 4에 기재된 바와 같이 펩스캔중의 작용성 고항원 활성을 기초로 하여 선택된 것이다[제7도의 펩티드 3 및 4는 이것을 기초로 선택된 것, 표 1중의 도메인 I + II와 도메인 III이다], 또한, 펩스캔을 통해 입증된 3개의 최고 반응성 도메인의 조합체인 합성-펩티드(제7도의 펩티드5)를 제조하였고, 펩스캔-반응성이 낮은 펩티드 영역은 제거되었다.

하기와 같은 아미노산서열을 지닌 펩티드 1-5를 고형상, 즉 폴리스티렌 미량적정판의 벽위에 pH 9.6의 0.05M의 $NHCO_3$ 완충액 1㎖당 1㎍으로 4℃에서 하룻밤동안 코팅처리 하였다. pH 7.4의 인산염-완충염수 (PBS)로 2회 세척한 후 상기 벽을 0.05% Tween 20를 함유한 PBS(PBST)중에 1 : 100으로 희석된 100㎕의 인체혈청으로 충전시키고 37℃에서 1시간동안 항온처리하였다. PBS-T로 3회 세척한 후, HRP로 표지된 양 항-인체 IgG 항체를 PBS-T중에 적당히 희석된 상태로 첨가한 후 37℃에서 1시간동안 항온처리하였다. PBS-T로 3회 세척한 후, 기질로서 테트라메틸벤지딘을 사용하여, 결합된 효소활성을 측정하였다. 100㎕의 1M H_2SO_4를 첨가함으로써 반응을 30분에 종료하였다. 멀티스캔 광측정계를 사용하여 450nm에서 흡수도를 측정하였다. 상기된 바와 같이 표준 면역형광 혈청반응 검사 또는 면역 블롯 분석방법을 사용하여 혈청의 EBV-항체를 테스트 했다.

펩티드는 다음과 같았다.

펩티드 1: H_2N-GVPRRQRAIDKRQRA-COOH

펩티드 2: H_2N-GQPHDTAPRGARKKQ-COOH

펩티드 3: H_2N-AVDTGSGGGGQPHDTAPRGARKKQ-COOH

펩티드 4: H_2N-STAVAQSATPSVSSSISSLRAATSGATAAA-COOH

펩티드 5: 펩티드 4의 C-말단부 및 펩티드 3의 N-말단부에 있는 별도의 시스테인 잔기를 사용하여, S-S 결합을 통해 연결된 펩티드 4와 펩티드 3의 합성펩티드.

제7도는 표준방법을 통해 고형상위에 코팅된 펩티드 1-5 및 1 : 100으로 희석된 무작위적 패널의 건강한 인체 혈액 공여자의 혈청을 사용하여 수행한 ELISA 실험결과를 나타낸 것이다.

이어서 이들 혈청을 바이러스 VCA-p18과의 반응성에 대해 면역 블롯으로 테스트 했다.

이들 실험을 통해, 거의 모든 혈청이 펩티드 1에 음성을 띠고 있으며 펩티드 2는 테스트된 혈청의 약 50%

에만 관련이 있기 때문에 “항원 지수”를 기초로한 컴퓨터 추정은 자연 감염된 개체의 혈청에 대한 면역원성과 관련하여 예측성을 갖지 못함이 명백하다. 펩스캔을 기초로 선택된 펩티드는 각각 테스트된 혈청의 60 내지 80%와 양호한 반응성을 지닌다. 놀랍게도, 펩티드 3과 펩티드 4를 결합한 합성-펩티드는 인체 혈청에 대한 95%의 반응성을 보인다.

p18 면역 블롯 음성 혈청은 선택된 혈청에 대해 거의 반응성을 보이지 않는다.

[실시예 7]

[BFRF3-암호된 VCA-p18 단백질로부터 유래된 합성-펩티드 5와 다른 분류의 인체 혈청 항체와의 반응성]

실시예 6에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 지닌 합성-펩티드 5를 사용하여 다른 부류의 인체 혈청 면역글로블린의 반응성을 ELISA(실시예 6에 기재된 방법)를 통해 분석하였다. 모든 경우 실시예 6에서와 거의 같은 방식으로 합성-펩티드 5를 고형상위에 사용하였다. 실시예 6에 기재된 바와 같이 1 : 100으로 희석된 혈청을 사용하여 항체 반응성을 측정하였다. 그 결과는 제8도에 제시하였다. IgG-반응성을 억제하기 위해, 제조업자의 지시에 따라 Gull-Sorb(Gull Laboratories Inc., Salt Lake City, Utah, USA)를 미리 흡수시킨 인체 혈청 중에서 IgM 반응성을 측정하였다. 인체 IgM 중쇄에 특이성을 지닌 HRP-표식된 양의 항-인체 IgM 항체로서 IgM 항체를 측정하였다. 항-IgA 특이적 HRP 표식된 두번째 항체를 사용하여 Gull Sorb 처리 혈청중에서 IgA 반응성을 측정하였다. 제8(a)도에서의 혈청(IgG)은 표준 혈청반응 검사를 통해 VCA-IgG에 양성을 띠는 76명의 건강한 혈청양성 헌혈자 및 EBV 항체에 음성을 띠는 9명의 헌혈자로부터 취하였다.

제8(b)도의 혈청(IgM)은 표준 혈청반응검사에 의해 VCA-IgM에 양성을 띠는 26명의 단핵증 환자와 VCA-IgM에 음성을 띠되 VCA-IgG에 양성을 띠는 18명의 건강한 헌혈자로부터 취하였다. 제8(c)도의 혈청(IgA)은 IgG-VCA에 양성을 띠는, IgA-고유 데이타가 없는 35명의 확실한 비인두종양 환자와 7명의 VCA-IgG 양성 헌혈자로부터 취하였다.

상기 실험을 통해, 표준 혈청 반응 검사보다 감도가 우수하거나 그와 유사한 방식으로써 EBV-VCA에 대한 IgG, IgM 및 IgA항체를 특이적으로 측정하는데 VCA-p18 유래 합성펩티드를 사용할 수 있음을 알 수 있다.

EBV-음성 혈청은 모든 경우 음성이었다.

[서열 목록]

(1) 일반적 정보 :

(i) 출원인 :

(A) 명칭 : 악조 엔. 브이

(B) 스트리트 : 벨페르베그 76

(C) 도시 : 아르넴

(E) 국명 : 네델란드 왕국

(ii) 발명의 명칭 : 엡스타인-바르 바이러스와 관련된 펩티드 및 핵산 서열

(iii) 서열의 수 : 22

(iv) 컴퓨터 판독 형태 :

(A) 매체형 : 플로피 디스크

(B) 컴퓨터 : IBM PC 호환성

(C) 작동 시스템 : PC-DOS/MS-DOS

(D) 소프트웨어 : Patentin Release #1,0, 버젼 #1,25 (EPO)

(2) 서열 동정 번호 1에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 538 염기쌍

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥수 : 이중

(D) 토폴로지 : 알려지지 않았음

(ii) 분자형태 : DNA (게놈)

(vi) 천원 연 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(xi) 서열 기술 : 서열 동정 번호 : 1 :

```
CATGATGGCA CGCCGGCTGC CCAAGCCCAC CCTCCAGGGG AGGCTGGAGG CGGATTTTCC  60
AGACAGTCCC CTGCTTCCTA AATTTCAAGA GCTGAACCAG AATAATCTCC CCAATGATGT 120
TTTTCGGGAG GCTCAAAGAA GTTACCTGGT ATTTCTGACA TCCCAGTTCT GCTACGAAGA 180
GTACGTGCAG AGGACTTTTG GGGTGCCTCG GCGCCAACGC GCCATAGACA AGAGGCAGAG 240
AGCCAGTGTG GCTGGGGCTG GTGCTCATGC ACACCTTGGC GGGTCATCCG CCACCCCCGT 300
CCAGCAGGCT CAGGCCGCCG CATCCGCTGG GACCGGGGCC TTGGCATCAT CAGCGCCGTC 360
CACGGCCGTA GCCCAGTCCG CGACCCCCTC TGTTTCTTCA TCTATTAGCA GCCTCCGGGC 420
CGCGACTTCG GGGGCGACTG CCGCCGCCTC CGCCGCCGCA GCCGTCGATA CCGGGTCAGG 480
TGGCGGGGGA CAACCCCACG ACACCGCCCC ACGCGGGGCA CGTAAGAAAC AGTAGCCC   538
```

(2) 서열 동정 번호 2에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 176 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자 형태 : 펩티드

(vi) 천연원 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(xi) 서열 기술 : 서열 동정번호 : 2 :

```
Met Ala Arg Arg Leu Pro Lys Pro Thr Leu Gln Gly Arg Leu Glu Ala
1               5                  10                  15

Asp Phe Pro Asp Ser Pro Leu Leu Pro Lys Phe Gln Glu Leu Asn Gln
            20                  25                  30

Asn Asn Leu Pro Asn Asp Val Phe Arg Glu Ala Gln Arg Ser Tyr Leu
        35                  40                  45

Val Phe Leu Thr Ser Gln Phe Cys Tyr Glu Glu Tyr Val Gln Arg Thr
    50                  55                  60

Phe Gly Val Pro Arg Arg Gln Arg Ala Ile Asp Lys Arg Gln Arg Ala
65                  70                  75                  80

Ser Val Ala Gly Ala Gly Ala His Ala His Leu Gly Gly Ser Ser Ala
                85                  90                  95

Thr Pro Val Gln Gln Ala Gln Ala Ala Ala Ser Ala Gly Thr Gly Ala
            100                 105                 110

Leu Ala Ser Ser Ala Pro Ser Thr Ala Val Ala Gln Ser Ala Thr Pro
        115                 120                 125

Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Leu Arg Ala Ala Thr Ser Gly Ala
    130                 135                 140

Thr Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ala Val Asp Thr Gly Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Gly Gly Gln Pro His Asp Thr Ala Pro Arg Gly Ala Arg Lys Lys Gln
                165                 170                 175
```

(2) 서열 동정 번호 3에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 1038 염기쌍

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥수 : 이중

(D) 토폴로지 : 알려지지 않았음

(ii) 분자형태 : DNA(게놈)

(vi) 천연 원 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(vi) 서열 기술 : 서열 동정 번호 : 3 :

```
ATGCTATCAG GTAACGCAGG AGAAGGAGCA ACAGCCTGCG GAGGTTCGGC CGCCGCGGGC   60
CAGGACCTCA TCAGCGTCCC CCGCAACACC TTTATGACAC TGCTTCAGAC CAACCTGGAC  120
AACAAACCGC CGAGGCAGAC CCCGCTACCC TACGCGGCCC CGCTGCCCCC CTTTTCCCAC  180
CAGGCAATAG CCACCGCGCC TTCCTACGGT CCTGGGGCCG GAGCGGTCGC CCCGGCCGGC  240
GGCTACTTTA CCTCCCCAGG AGGTTACTAC GCCGGGCCCG CGGGCGGGGA CCCGGGTGCC  300
TTCTTGGCGA TGGACGCTCA CACCTACCAC CCCCACCCAC ACCCCCCTCC GGCCTACTTT  360
GGCTTGCCGG GCCTCTTTGG CCCCCCTCCA CCCGTGCCTC CTTACTACGG ATCCCACTTG  420
CGGGCAGACT ACGTCCCCGC TCCCTCGCGA TCCAACAAGC GGAAAAGAGA CCCCGAGGAG  480
GATGAAGAAG GCGGGGGGCT ATTCCCGGGG GAGGACGCCA CCCTCTACCG CAAGGACATA  540
GCGGGCCTCT CCAAGAGTGT GAATGAGTTA CAGCACACGC TACAGGCCCT GCGCCGGGAG  600
ACGCTGTCCT ACGGCCACAC CGGAGTCGGA TACTGCCCCC AGCAGGGCCC CTGCTACACC  660
CACTCGGGGC CTTACGGATT TCAGCCTCAT CAAAGCTACG AAGTGCCCAG ATACGTCCCT  720
CATCCGCCCC CACCACCAAC TTCTCACCAG GCAGCTCAGG CGCAGCCTCC ACCCCCGGGC  780
ACACAGGCCC CCGAAGCCCA CTGTGTGGCC GAGTCCACGA TCCCTGAGGC GGGAGCAGCC  840
GGGAACTCTG GACCCCGGGA GGACACCAAC CCTCAGCAGC CCACCACCGA GGGCCACCAC  900
CGCGGAAAGA AACTGGTGCA GGCCTCTGCG TCCGGAGTGG CTCAGTCTAA GGAGCCCACC  960
ACCCCCAAGG CCAAGTCTGT GTCAGCCCAC CTCAAGTCCA TCTTTTGCGA GGAATTGCTG 1020
AATAAACGCG TGGCTTGA                                               1038
```

(2) 서열 동정 번호 4에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 345 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자형태 : 펩티드

(vi) 천연 원 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(vi) 서열 기술 : 서열 동정 번호 : 4 :

```
Met Leu Ser Gly Asn Ala Gly Glu Gly Ala Thr Ala Cys Gly Gly Ser
1               5                  10                  15

Ala Ala Ala Gly Gln Asp Leu Ile Ser Val Pro Arg Asn Thr Phe Met
            20                  25                  30

Thr Leu Leu Gln Thr Asn Leu Asp Asn Lys Pro Pro Arg Gln Thr Pro
        35                  40                  45

Leu Pro Tyr Ala Ala Pro Leu Pro Pro Phe Ser His Gln Ala Ile Ala
    50                  55                  60

Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Pro Gly Ala Gly Ala Val Ala Pro Ala Gly
65                  70                  75                  80

Gly Tyr Phe Thr Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Pro Ala Gly Gly
                85                  90                  95

Asp Pro Gly Ala Phe Leu Ala Met Asp Ala His Thr Tyr His Pro His
            100                 105                 110

Pro His Pro Pro Pro Ala Tyr Phe Gly Leu Pro Gly Leu Phe Gly Pro
        115                 120                 125

Pro Pro Pro Val Pro Pro Tyr Tyr Gly Ser His Leu Arg Ala Asp Tyr
    130                 135                 140

Val Pro Ala Pro Ser Arg Ser Asn Lys Arg Lys Arg Asp Pro Glu Glu
145                 150                 155                 160

Asp Glu Glu Gly Gly Gly Leu Phe Pro Gly Glu Asp Ala Thr Leu Tyr
                165                 170                 175

Arg Lys Asp Ile Ala Gly Leu Ser Lys Ser Val Asn Glu Leu Gln His
            180                 185                 190

Thr Leu Gln Ala Leu Arg Arg Glu Thr Leu Ser Tyr Gly His Thr Gly
        195                 200                 205

Val Gly Tyr Cys Pro Gln Gln Gly Pro Cys Tyr Thr His Ser Gly Pro
    210                 215                 220

Tyr Gly Phe Gln Pro His Gln Ser Tyr Glu Val Pro Arg Tyr Val Pro
225                 230                 235                 240

His Pro Pro Pro Pro Pro Thr Ser His Gln Ala Ala Gln Ala Gln Pro
                245                 250                 255

Pro Pro Pro Gly Thr Gln Ala Pro Glu Ala His Cys Val Ala Glu Ser
            260                 265                 270

Thr Ile Pro Glu Ala Gly Ala Ala Gly Asn Ser Gly Pro Arg Glu Asp
        275                 280                 285

Thr Asn Pro Gln Gln Pro Thr Thr Glu Gly His His Arg Gly Lys Lys
    290                 295                 300

Leu Val Gln Ala Ser Ala Ser Gly Val Ala Gln Ser Lys Glu Pro Thr
305                 310                 315                 320

Thr Pro Lys Ala Lys Ser Val Ser Ala His Leu Lys Ser Ile Phe Cys
                325                 330                 335

Glu Glu Leu Leu Asn Lys Arg Val Ala
            340                 345
```

(2) 서열 동정 번호 5에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 24 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자형태 : 펩티드

(vi) 천연 원 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(vi) 서열 기술 : 서열 동정 번호 : 5 :

```
Ala Val Asp Thr Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Pro His Asp Thr Ala
                5                   10                  15

Pro Arg Gly Ala Arg Lys Lys Gln
            20
```

(2) 서열 동정 번호 6에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 30 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자형태 : 펩티드

(vi) 천연 원 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(vi) 서열 기술 : 서열 동정 번호 : 6 :

Ser Thr Ala Val Ala Gln Ser Ala Thr Pro Ser Val Ser Ser Ser Ile
5 10 15

Ser Ser Leu Arg Ala Ala Thr Ser Gly Ala Thr Ala Ala Ala
20 25

(2) 서열 동정 번호 7에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 15 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자형태 : 펩티드

(vi) 천연 원 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(vi) 서열 기술 : 서열 동정 번호 : 7 :

Gly Val Pro Arg Arg Gln Arg Ala Ile Asp Lys Arg Gln Arg Ala
5 10 15

(2) 서열 동정 번호 8에 대한 정보 :

(j) 서열 특징 :

(A) 길이 : 15 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자형태 : 펩티드

(vi) 천연 원 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(vi) 서열 기술 : 서열 동정 번호 : 8 :

Gly Gln Pro His Asp Thr Ala Pro Arg Gly Ala Arg Lys Lys Gln
5 10 15

(2) 서열 동정 번호 9에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 12 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자형태 : 펩티드

(vi) 천연 원 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(vi) 서열 기술 : 서열 동정 번호 : 9 :

Thr Ala Val Ala Gln Ser Ala Thr Pro Ser Val Ser
5 10

(2) 서열 동정 번호 10에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 12 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자형태 : 펩티드

(vi) 천연 원 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(xi) 서열 기술 : 서열 동정 번호 : 10 :

Pro Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Leu Arg Ala
5 10

(2) 서열 동정 번호 11에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 12 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자형태 : 펩티드

(vi) 천연 원 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(xi) 서열 기술 : 서열 동정 번호 : 11 :

Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Leu Arg Ala Ala
5 10

(2) 서열 동정 번호 12에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 12 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자형태 : 펩티드

(vi) 천연 원 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(xi) 서열 기술 : 서열 동정 번호 : 12 :

Ser Ser Ser Ile Ser Ser Leu Arg Ala Ala Thr Ser
5 10

(2) 서열 동정 번호 13에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 12 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자형태 : 펩티드

(vi) 천연 원 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(xi) 서열 기술 : 서열 동정 번호 : 13 :

```
Ser Ile Ser Ser Leu Arg Ala Ala Thr Ser Gly Ala
5                   10
```

(2) 서열 동정 번호 14에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 12 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자형태 : 펩티드

(vi) 천연 원 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(xi) 서열 기술 : 서열 동정 번호 : 14 :

```
Ile Ser Ser Leu Arg Ala Ala Thr Ser Gly Ala Thr
5                   10
```

(2) 서열 동정 번호 15에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 12 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자형태 : 펩티드

(vi) 천연 원 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(xi) 서열 기술 : 서열 동정 번호 : 15 :

```
Arg Ala Ala Thr Ser Gly Ala Thr Ala Ala Ala Ser
5                   10
```

(2) 서열 동정 번호 16에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 12 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자형태 : 펩티드

(vi) 천연 원 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(xi) 서열 기술 : 서열 동정 번호 : 16 :

```
Ala Ala Val Asp Thr Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln
5                   10
```

(2) 서열 동정 번호 17에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 12 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자형태 : 펩티드

(vi) 천연 원 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(xi) 서열 기술 : 서열 동정 번호 : 17 :

Ala Val Asp Thr Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Pro
5 10

(2) 서열 동정 번호 18에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 12 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자형태 : 펩티드

(vi) 천연 원 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(xi) 서열 기술 : 서열 동정 번호 : 18 :

Val Asp Thr Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Pro His
5 10

(2) 서열 동정 번호 19에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 12 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자형태 : 펩티드

(vi) 천연 원 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(xi) 서열 기술 : 서열 동정 번호 : 19 :

Asp Thr Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Pro His Asp
5 10

(2) 서열 동정 번호 20에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 12 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자형태 : 펩티드

(vi) 천연 원 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(xi) 서열 기술 : 서열 동정 번호 : 20 :

Gly Gly Gly Gln Pro His Asp Thr Ala Pro Arg Gly
5 10

(2) 서열 동정 번호 21에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 12 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자형태 : 펩티드

(vi) 천연 원 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(xi) 서열 기술 : 서열 동정 번호 : 21 :

```
Gly Gln Pro His Asp Thr Ala Pro Arg Gly Ala Arg
                5                  10
```

(2) 서열 동정 번호 22에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 12 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자형태 : 펩티드

(vi) 천연 원 :

(A) 미생물 : 엡스타인-바르 바이러스

(xi) 서열 기술 : 서열 동정 번호 : 22 :

```
Gln Pro His Asp Thr Ala Pro Arg Gly Ala Arg Lys
                5                  10
```

(57) 청구의 범위

청구항 1

EBV 오픈 리딩 프레임(open reading frame)인 BFRF 3과 BdRF 1 내에 각각 암호화된 VCA-p18 또는 VCA-p40 단백질 또는 이것의 면역반응성 부분을 포함하며, VCA-p18 및 VCA-p40 단백질 각각에 대한 항체와 면역화학적으로 반응성이 있는 펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열 동정 번호 2에 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서, 서열 동정 번호 4에 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 펩티드.

청구항 4

제2항에 있어서, 서열 동정 번호 5와 6에 나타낸 아미노산 서열 중에서 선택된 아미노산 서열을 하나 이상 포함하는 펩티드.

청구항 5

제4항에 있어서, 서열 동정 번호 6에 나타낸 아미노산 서열에 연결된 서열 동정 번호 5에 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 펩티드.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 할의 펩티드를 암호하는 핵산 서열.

청구항 7

서열 동정 번호 1에 나타낸 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열.

청구항 8

서열 동정 번호 3에 나타낸 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열.

청구항 9

제6항의 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터 분자.

청구항 10

제9항의 재조합 벡터 분자로 형질전환되거나 형질감염된 이.콜리.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 펩티드에 특이성을 가진 항체.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 항체는 단일 클론 항체인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 13

VCA-p18에 대하여, 유럽 동물 세포 배양 수집소(ECACC, 영국 포톤 다운에 소재)에 기탁 번호 제93020413호 및 제93020412호로 각각 기탁되어 있는 래트-마우스 하이브리도마 세포주가 생성하는 단일 클론 항체 EBV.0T15E 또는 EBV.0T151와 동일한 반응성을 갖는 단일 클론 항체.

청구항 14

VCA-p40에 대하여, 유럽 동물 세포 배양 수집소(ECACC, 영국 포톤 다운에 소재)에 기탁 번호 제93020414호로 기탁되어 있는 마우스-마우스 하이브리도마 세포주가 생성하는 단일 클론 항체 EBV.0T41A와 동일한 반응성을 갖는 단일 클론 항체.

청구항 15

NSI을 모세포로 하여 쾰러와 밀스타인(Kohler and Milstein)기법에 의해 제조되며 제13항이나 제14항의 단일 클론 항체를 생성할 수 있는 영구적인 세포주.

청구항 16

제15항에 있어서, 유럽 동물 세포 배양 수집소(ECACC, 영국 포톤 다운에 소재)에 기탁 번호 제93020413호, 또는 제93020412호 또는 제93020414호로 기탁되어 있는 영구적인 세포주.

청구항 17

제11항의 항체와 반응성이 있는 항-유전인자형 항체.

청구항 18

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 펩티드(들)를 하나 이상 포함하는 면역화학 시약.

청구항 19

제11항의 항체를 하나 이상 포함하는 면역화학 시약.

청구항 20

제11항의 항체를 샘플과 접촉시킨 후 형성된 면역 복합체의 존재를 상기 샘플 중의 엡스타인-바르 바이러스 존재의 척도로서 검출하는 것을 특징으로 하는 상기 샘플내의 엡스타인-바르 바이러스를 검출하는 방법.

청구항 21

제18항의 면역화학 시약을 샘플과 접촉시킨 후 그 샘플내의 펩티드와 항체 사이에 형성된 면역 복합체의 존재를 상기 샘플 중의 엡스타인-바르 바이러스에 대한 항체 존재의 척도로서 검출하는 것을 특징으로 하는 상기 샘플내의 엡스타인-바르 바이러스에 특이적인 항체의 검출 방법.

청구항 22

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 펩티드 하나 이상을 엡스타인 바르 바이러스에 특이적인 항체 및 샘플과 접촉시킨 후, 형성된 면역 복합체의 존재를 검출하고 이로부터 상기 샘플내의 엡스타인 바르 바이러스의 존재를 결정함을 특징으로 하는 상기 샘플내의 엡스타인-바르 바이러스를 검출하는 방법.

청구항 23

샘플내의 엡스타인-바르 바이러스 핵산 서열의 핵산을 증폭시키고 증폭된 서열을 검출하기 위하여 프라이머(들)로서 제6항의 핵산 서열을 하나 이상 사용하여 샘플내의 상기 엡스타인-바르 바이러스 핵산 서열을 증폭시키고 검출하는 방법.

청구항 24

제19항의 면역화학 시약이 고정된 고체상, 및 상기 면역화학 시약과 샐플내의 엡스타인-바르 바이러스 사이에 형성된 임의의 면역 복합체를 검출하는 수단을 포함하며 제20항의 방법을 실시하기 위해 사용되는 시험 키트.

청구항 25

핵산 프라이머로서의 제6항의 핵산 서열 하나 이상 및 샘플내의 상기 증폭된 핵산 서열 검출 수단을 포함하며 제23항의 방법을 실시하기 위해 사용되는 시험 증폭 키트.

청구항 26

제7항 또는 제8항의 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터 분자.

청구항 27

샘플내의 엡스타인-바르 바이러스 핵산 서열의 핵산을 증폭시키고 증폭된 서열을 검출하기 위하여 프라이머(들)로서 제7항 또는 제8항의 핵산 서열을 하나 이상 사용하여 샘플내의 상기 엡스타인-바르 바이러스 핵산 서열을 증폭시키고 검출하는 방법.

청구항 28

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항의 항체를 하나 이상 포함하는 면역 시약.

청구항 29

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항의 항체를 샘플과 접촉시킨 후 형성된 면역 복합체의 존재를 상기 샘플중의 엡스타인-바르 마이러스 존재의 척도로서 검출하는 것을 특징으로 하는 상기 샘플내의 엡스타인-바르 바이러스를 검출하는 방법.

청구항 30

제18항의 면역화학 시약이 고정된 고체상, 및 상기 면역화학 시약과 샘플내의 엡스타인-바르 바이러스 사이에 형성된 임의의 면역 복합체를 검출하는 수단을 포함하며 제21항의 방법을 실시하기 위해 사용되는 시험 키트.

청구항 31

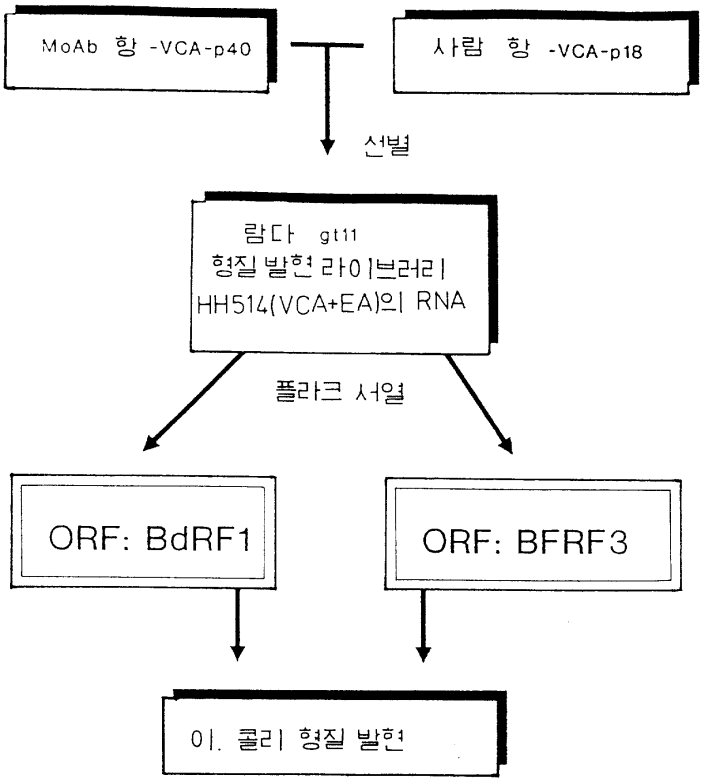
제18항의 면역화학 시약이 고정된 고체상, 및 상기 면역화학 시약과 샘플내의 엡스타인-바르 바이러스 사이에 형성된 임의의 면역 복합체를 검출하는 수단을 포함하며 제22항의 방법을 실시하기 위해 사용되는 시험 키트.

청구항 32

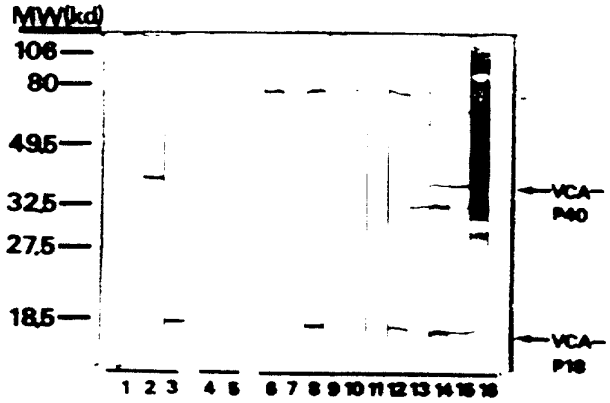
핵산 프라이머로서의 제7항 또는 제8항의 핵산 서열 하나 이상 및 샘플내의 상기 증폭된 핵산 서열 검출 수단을 포함하며 제23항의 방법을 실시하기 위해 사용되는 시험 증폭 키트.

도면

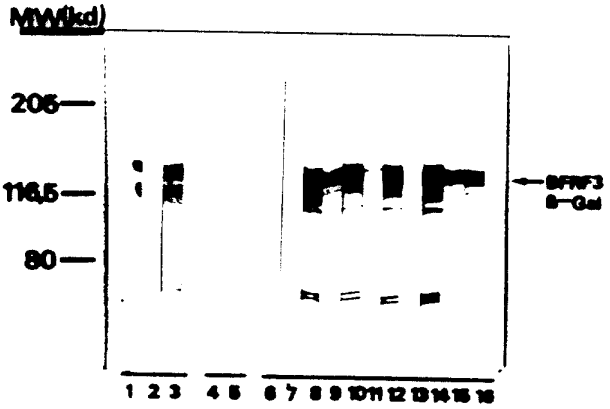
도면1



도면2a

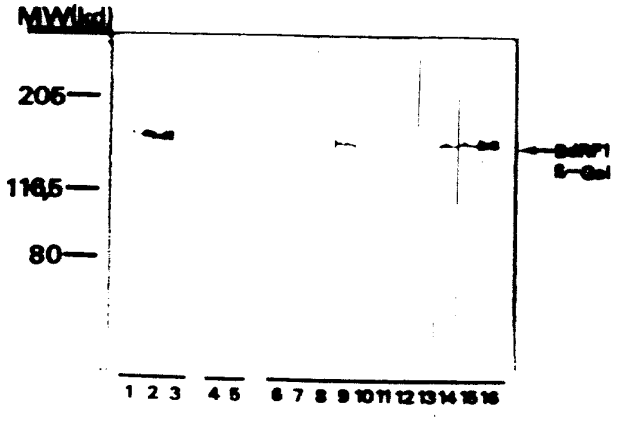


도면2b



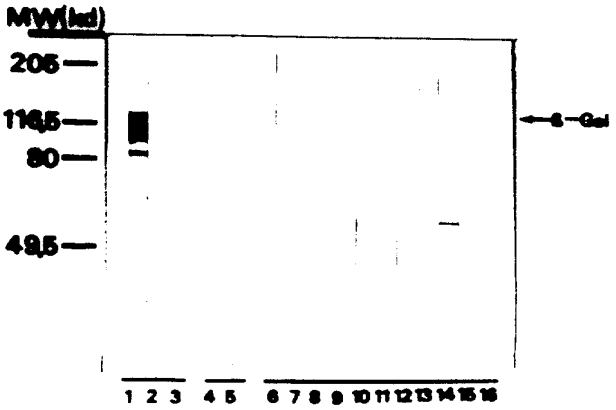
도면2c

이. 콜리 :BdRF1-LacZ



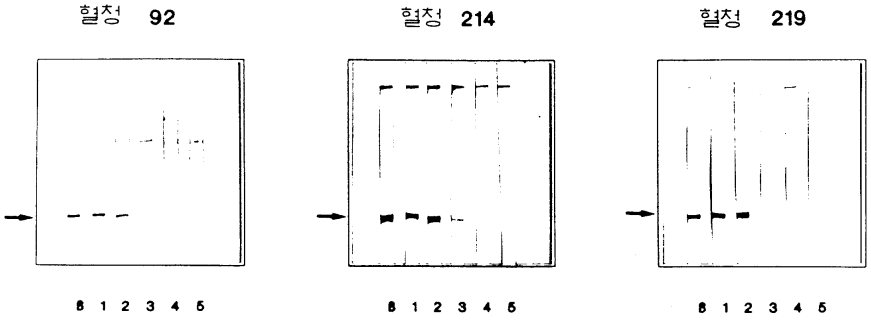
도면2d

이. 콜리 :LacZ



도면3

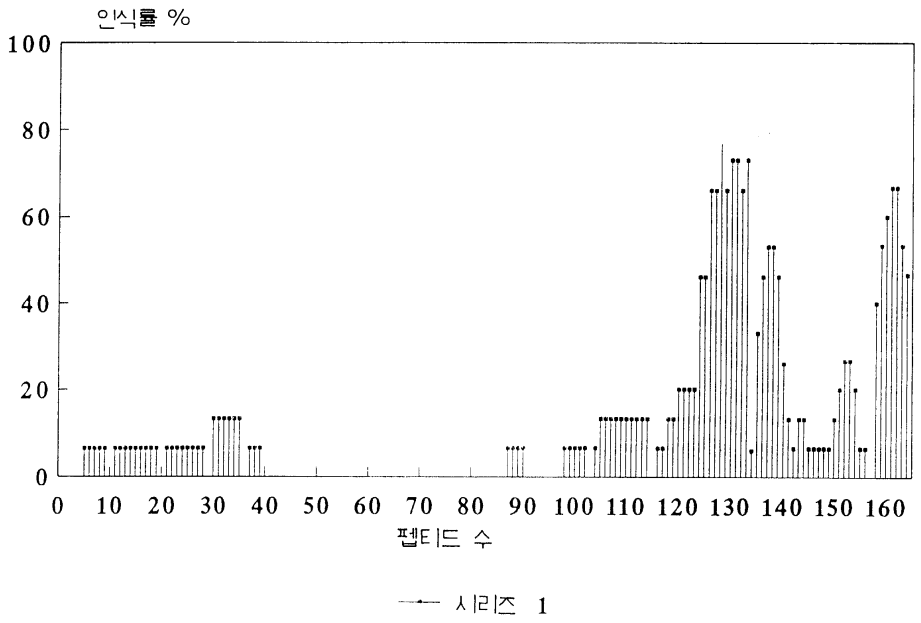
IMMUNO-ADSORPTION



B = 10 ug β- 갈락토시다제
1 = 0 ug BFRF3-βGal
2 = 0.01 ug BFRF3-βGAL
3 = 0.1 ug BFRF3-βGal
4 = 0.5 ug BFRF3-βGal
5 = 1 ug BFRF3-βGal

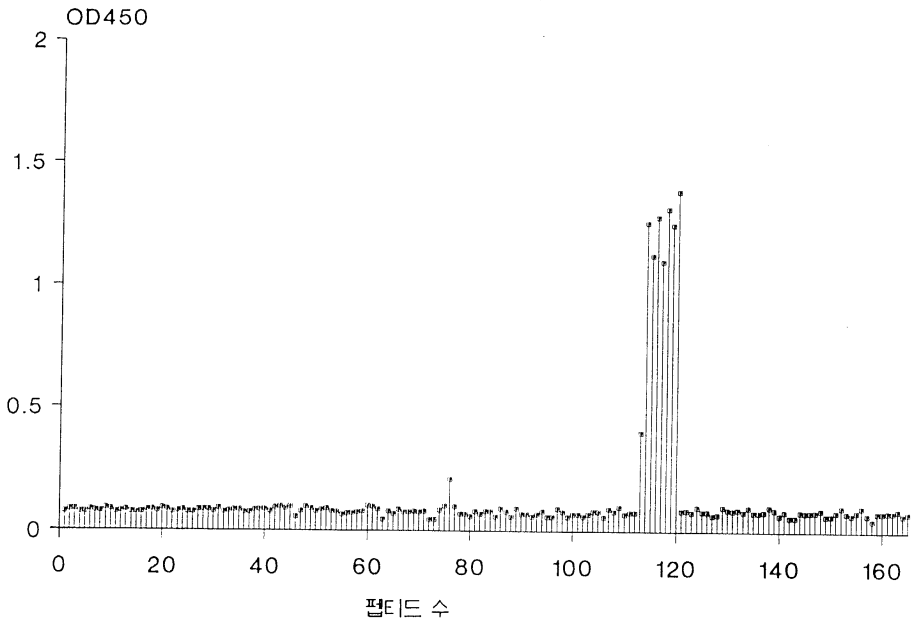
도면4

15 EBV+ 사람 혈청의 VCA-p18 에피토프 인식



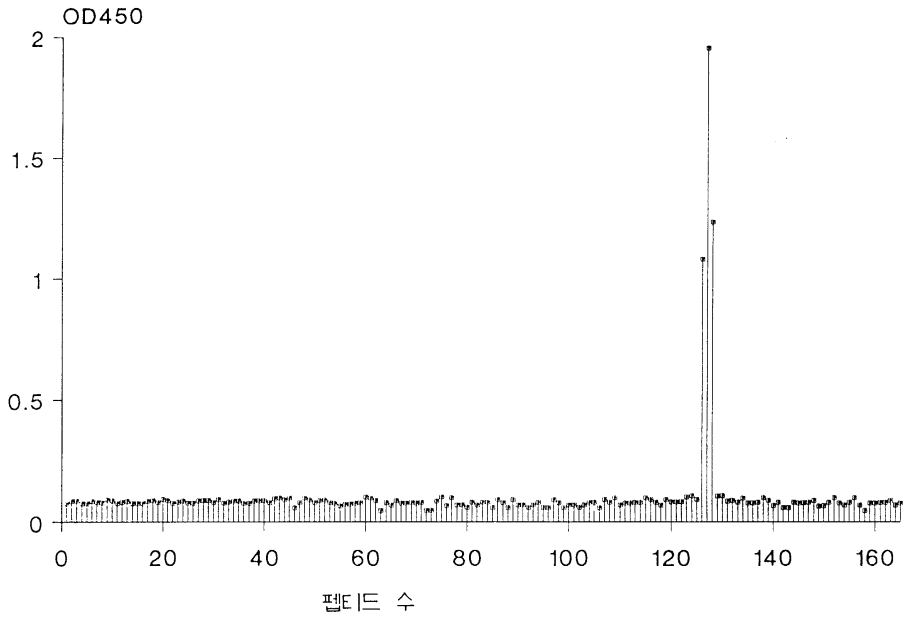
도면5a

BFRF3 EBV. OT15E의 펩스캔

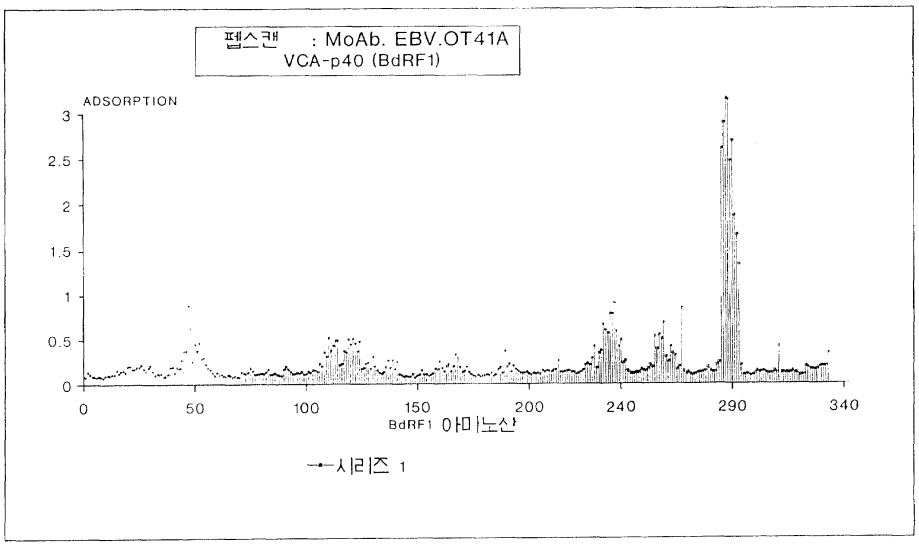


도면5b

BFRF3 EBV. OT151의 펩스캔

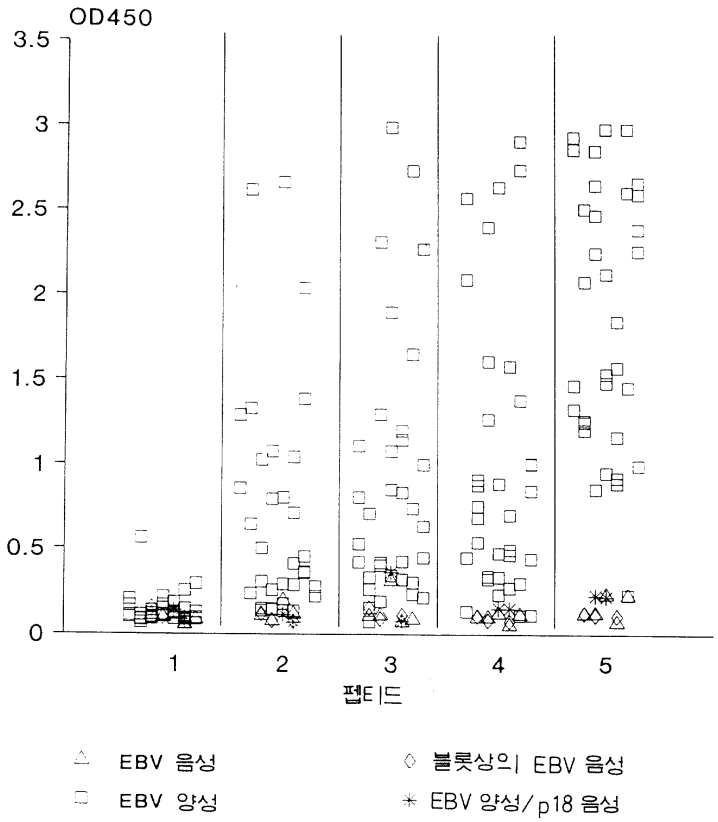


도면6



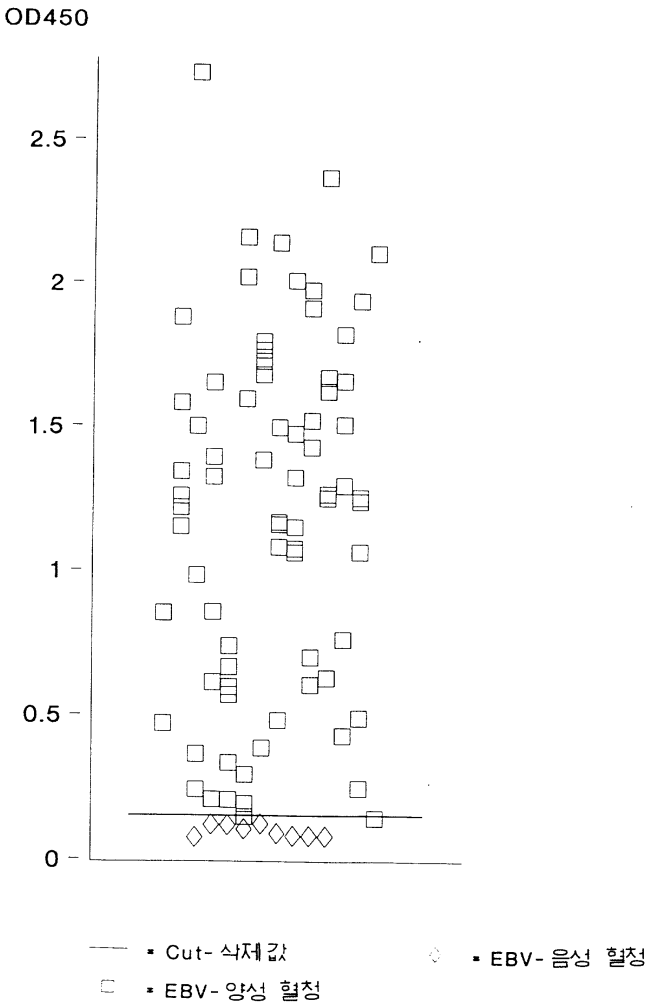
도면7

VCA-p18 펩티드
43 건강한 혈액 공급체의 반응성



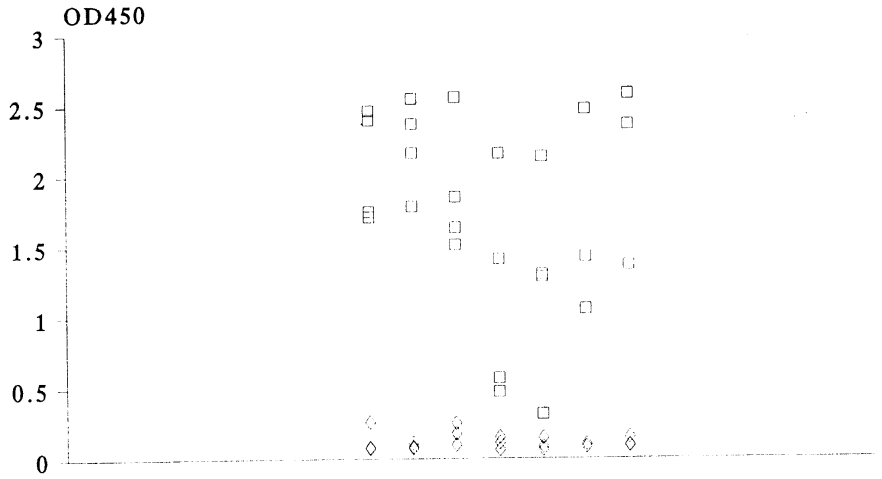
도면8a

VCA-p18 펩티드 ELISA (IgG)
(76 VCA-I.F 양성 혈청)



도면8b

EBV-IgM : VCA-p18 펩티드
18 IgM-음성혈청과 26 IgM-양성혈청의 반응성



◇ IgM- 음성 혈청 □ IgM- 양성 혈청

도면8c

VCA-p18 펩티드 IgA
(35 NPC-환자들의 혈청(홍콩))

