

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
C12N 15/42  
A61K 39/29  
C07K 14/78  
G01N 33/576

(45) 공고일자 2003년12월31일  
(11) 등록번호 10-0394693  
(24) 등록일자 2003년08월01일

(21) 출원번호	10-1996-0706582	(65) 공개번호	특 1997-0703425
(22) 출원일자	1996년11월20일	(43) 공개일자	1997년07월03일
번역문제출일자	1996년11월20일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1995/06169	(87) 국제공개번호	WO 1995/32291
(86) 국제출원일자	1995년05월19일	(87) 국제공개일자	1995년11월30일
(81) 지정국	국내특허 : 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 체코 헝가리 일본 북한 대한민국 스리랑카 마다가스카르 몽고 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 루마니아 슬로바키아 우크라이나 베트남 중국 에스 토니아 그루지야 라이베리아 리투아니아 라트비아 AP ARIPO특허 : 말라 위 수단 케냐 EA 유라시아특허 : 벨라루스 카자흐스탄 러시아 아르메니아 키르기즈 EP 유럽특허 : 오스트리아 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 핀란드 영국 룩셈부르크 포르투갈 스웨덴 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부아르 카 메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고		

(30) 우선권주장	08/246,985 1994년05월20일 미국(US)
	08/285,543 1994년08월03일 미국(US)
	08/285,558 1994년08월03일 미국(US)
	08/329,729 1994년10월26일 미국(US)
	08/344,271 1994년11월23일 미국(US)
	08/357,509 1994년12월16일 미국(US)
	08/389,886 1995년02월15일 미국(US)
(73) 특허권자	제네랩스 테크놀로지스, 인코포레이티드
(72) 발명자	미국 94063 캘리포니아 레드우드 시티 페노브스코트 드라이 브 505 중수 피. 킴 미합중국 94306 캘리포니아 팔로 알토 쿼다 스트리트 1844 커크 이. 프라이 미합중국 94303 캘리포니아 팔로 알토 로스 로우드 2604 라본느 마리 영 미합중국 94306 캘리포니아 팔로 알토 칼리지 애브뉴 1450 제프리 엠. 린넨 미합중국 94404 캘리포니아 포스터 시티 카타마란 스트리트 슈트1 1017 존 웨이지스 미합중국 94070 캘리포니아 산 카를로스 체리 스트리트 슈트6 1244 남상선
(74) 대리인	남상선

**심사관 : 권오희**

**(54) G형 간염바이러스 및 이것의 분자클로닝 방법**

**명세서**

**기술분야**

<1>

본 발명은 BIA/BIIB/BIIC/BIID/BIIE (N-(ABCDE))형 간염 관련된 바이러스성 제(agent)(HGV)와 관련있는 핵산, 폴리펩티드, 항원, 에피토프, 백신 및 항체 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 진단 방법 및 치료 방법에 관한 것이다.

## 배경기술

## 참고문헌:

- Abstracts, *The 1992 San Diego Conf : Genetic Recognition*, Clin. Chem. 39(4):705 (1993).
- Alexander, W. A., et al., *J. Virol.* 66:2934-2942 (1992).
- Alter, H.J., et al., *New Eng. J. Med.* 321:1494-1500 (1989a).
- Alter, M.J., et al., *N. Engl. J. Med.* 327:1899 (1989b).
- Alter, H.J., *Abstracts of Int. Symp. on Viral Hepatitis and Liver Dis.*, p. 47 (1993).
- Altschul, S., et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10 (1990).
- Ascadi, G., et al., *Nature* 352:815 (1991).
- Ausubel, F.M., et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley and Sons, Inc., Media PA.
- Barany, F., *PCR Methods Appl.* 1:5 (1991).
- Barham, W. B., et al., *J. Med. Virol.* 42:129-132 (1994).

- Baron, S., et al., *JAMA* 266:1375 (1991).
- Bazan, J. F., et al., *Virology* 171:637-639 (1989).
- Beames, et al., *Biotechniques* 11:378 (1991).
- Belyavsky, A., et al., *Nuc. Acids Res.* 17:2919-2932 (1989).
- Blackburn, G.F., et al., *Clin. Chem.* 37:1534-1539 (1991).
- Bradley, D.W., et al., *J. Infec. Dis.*, 148:2 (1983).
- Bradley, D.W., et al., *J Gen. Virol.*, 69:1 (1988).
- Bradley, D.W. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 84:6277 (1987).
- Briand, J.-P., et al., *J. Immunol. Meth.* 156:255 (1992).
- Cahill, P., et al., *Clin. Chem.* 37:1482 (1991).
- Carter, J.M., et al., *Methods Mol. Biol.* 36:207-223 (1994).
- Chambers, T.J., et al., *Ann. Rev. Microbiol* 44:649 (1990a).
- Chambers, T.J., et al., *PNAS* 87:8898 (1990b).
- Chomczynski et al, *Anal. Biochem.* 162:159 (1987).
- Christian, R.B., et al., *J. Mol. Biol.* 227:771 (1992).
- Commandeur, et al., *Virology* 198:282-287 (1994).
- Crea, R., U.S. Patent No. 4,888,286, issued December 19, 1989.
- DeGraaf, M.E., et al., *Gene* 128:13 (1993).
- DiBisceglie, A.M., et al., *Hepatology* 16:649 (1992).
- DiBisceglie, A.M., et al., *NEJM* 321:1506 (1989).
- DiCesare, J., et al., *Biotechniques* 15:152-157 (1993).
- Dienstag, J.L., et al, *Sem Liver Disease* 6:67 (1986).
- Earl, P. L., et al., "Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia" In *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. Eds.), Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, New York (1991).
- Eaton, M. A. W., et al., U.S. Patent No. 4,719,180, issued Jan. 12, 1988.

- Egholm, et al., *Nature* 365:566 (1993).
- Elroy-Stein, O., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:6126-6130 (1989).
- EPO patent application 88310922.5, filed 11/18/88.
- Falkner, F.G., et al., *J. Virol.* 62:1849-1854 (1988).
- Farci, P., et al., *NEJM* 330:88 (1994).
- Felgner and Rhodes, *Nature* 349:251 (1991).
- Fickett, J.W., *Nuc. Acids Res.* 10:5303-5318 (1982).
- Fling, S. P., et al., *Analytical Biochem.* 155:83-88 (1986).
- Folgori, A., et al., *EMBO J.* 13:2236 (1994).
- Francki, R.I.B., et al., *Arch. Virol. Suppl* 2:223 (1991).
- Frank, R., and Doring, R., *Tetrahedron* 44:6031-6040 (1988).
- Frohman, M.A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8998-9002 (1988).
- Fuerst, T. R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8122-8126 (1986).
- Gellissen, G., et al., *Antonie Van Leeuwenhoek*, 62(1-2):79-93 (1992).
- Geysen, M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002 (1984).
- Gingeras, T.R., et al., *Ann. Biol. Clin.* 48:498 (1990).
- Gingeras, T.R., et al., *J. Inf. Dis.* 164:1066 (1991).
- Goeddel, D.V., *Methods in Enzymology* 185 (1990).
- Grakoui, A., et al., *J. Virol.* 67:2832 (1993).
- Grakoui, A., et al., *J. Virol.* 67:1385-1395 (1993).
- Guatelli, J.C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874 (1990).
- Gubler, U., et al, *Gene*, 25:263 (1983).
- Guthrie, C., and G.R. Fink, *Methods in Enzymology* 194 (1991).
- Guttermann, J.U., *PNAS* 91:1198 (1994).

- Harlow, E., et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988).
- Haynes, J., et al., *Nuc. Acid. Res.* 11:687-706 (1983).
- Hieter, P.A., et al., *Cell* 22:197-207 (1980).
- Hijikata, M., et al., *PNAS* 88:5547 (1991).
- Hochuli, E., in GENETIC ENGINEERING, PRINCIPALS AND PRACTICE, VOL. 12 (J. Stelow Ed.) Plenum, NY, pp. 87-98 (1990).
- Holodniy, M., et al., *Biotechniques* 12:36 (1992).
- Hopp, T.P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:3824-3828 (1981).
- Horn, T., and Urdea, M.S., *Nuc. Acids. Res.* 17:6959 (1989).
- Houghten, R.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5131 (1985).
- Hudson, D., *J. Org. Chem.* 53:617 (1988).
- Irwin, M.J., et al., *J. Virol.* 58:5036 (1994).
- Jacob, J.R., et al., in THE MOLECULAR BIOLOGY OF HCV, Section 4, pages 387-392 (1991).
- Jacob, J.R., et al., *Hepatology* 10:921-927 (1989).
- Jacob, J.R., et al., *J. Infect. Dis.* 161:1121-1127 (1990).
- Janknecht, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8972-8976 (1991).
- Kaufman, R. J., "Selection and coamplification of heterologous genes in mammalian cells," in *Methods in Enzymology*, vol. 185, pp537-566. Academic Press, Inc., San Diego CA (1991).
- Kakumu, S., et al., *Gastroenterol.* 105:507 (1993).
- Katz, E.D., and Dong, M., *Biotechniques* 8:546 (1990).
- Kawasaki, E.S., et al., in PCR TECHNOLOGY: PRINCIPLES AND APPLICATIONS OF DNA AMPLIFICATION (H.A. Erlich, ed.) Stockton Press (1989).
- King, L. A., et al., *The baculovirus expression system. A laboratory guide*, Chapman & Hall, London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, 1992.
- Kyte, J., & Doolittle, R. F., *J. Mol. Biol.* 157:105-132 (1982).

- Koonin, E.V., and Dolja, V.V., *Critical Reviews in Biochem. & Mol. Biol.* 28:375-430 (1993).
- Krausslich, H.G., et al., VIRAL PROTEINASES AS TARGETS FOR CHEMOTHERAPY (Cold Spring Harbor Press, Plainville, NY) (1989).
- Kumar, R., et al., *AIDS Res. Human Retroviruses* 5(3):345-354 (1989).
- Lanford, R.E., et al., *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 25:174-182 (1989).
- Larder, B.A., and Kemp, S.D., *Science* 246:1155 (1989).
- Lau, Y.F., et al., *Mol. Cell. Biol.* 4:1469-1475 (1984).
- Lomell, H., et al., *Clin. Chem.* 48:492 (1990).
- Maniatis, T., et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
- Marshall, W.S., and Caruthers, M.H., *Science* 259:1564 (1993).
- Messing, J., *Methods in Enzymol.* 101:20 (1983).
- Michelle, et al., *International Symposium on Viral Hepatitis*.
- Miller, J. H., EXPERIMENTS IN MOLECULAR GENETICS, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY (1972).
- Morrissey, D.V., et al., *Anal. Biochem.* 181:345 (1989).
- Moss, B., et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Section IV, Unit 16) (1991).
- Moss, B., et al., U.S. Patent Number 5,135,855, issued 4 August 1992.
- Mullis, K.B., U.S. Patent No. 4,683,202, issued 28 July 1987.
- Mullis, K.B., et al., U.S. Patent No. 4,683,195, issued 28 July 1987.
- Obeid, O.E., et al., *Virus Research* 32:69-84 (1994).
- Osikowicz, G., et al., *Clin. Chem.* 36:1586 (1990).
- Patterson, J.L., and Fernandez-Larsson, R., *Rev. Infect. Dis.* 12:1139 (1990).

- Pearson, W.R. and Lipman, D.J., *PNAS* **85**:2444-2448 (1988).
- Pearson, W.R., *Methods in Enzymology* **183**:63-98 (1990).
- Pitha, *Biochem Biophys Acta*, **204**:39 (1970a).
- Pitha, *Biopolymers*, **9**:965 (1970b).
- Porath, J., *Protein Exp. and Purif.* **3**:263 (1992).
- Pritchard, C.G., and Stefano, J.E., *Ann. Biol. Chem.* **48**:492 (1990).
- Reichard, O., et al., *Lancet* **337**:1058 (1991).
- Reilly, P.R., et al., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992).
- Reyes, G., et al., *Science*, **247**:1335 (1990).
- Reyes, G., et al., *Molecular and Cellular Probes* **5**:473-481 (1991).
- Rice, C.M., et al., *New Biol.* **1**:285-296 (1989).
- Roberts, N.A., et al., *Science* **248**:358 (1990).
- Romanos, M.A., et al., *Yeast* **8**(6):423-488 (1992).
- Sanger, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**:5463 (1977).
- Sambrook, J., et al., In MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. 2 (1989).
- Saiki, R.K., et al., *Science* **239**:487-491 (1988).
- Schagger, H., et al., *Anal. Biochem.* **166**:368-379 (1987).
- Scharf, S. J., et al., *Science* **233**:1076 (1986).
- Schuler, G.D., et al., *Proteins: Struc., Func. and Genet.* **9**:180 (1989).
- Scott, J.K., and Smith, G.P., *Science* **249**:386 (1990).
- Scott, J.K., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:5398 (1992).
- Smith, D.B., et al., *Gene* **67**:31 (1988).
- Smith, J.P., *Curr. Opin. Biotechnol.* **2**:668 (1991).
- Sreenivasan, M.A., et al., *J. Gen. Virol.* **65**:1005 (1984).
- Sumiyoshi, H., et al., *J. Virol.* **66**:5425-5431 (1992).
- Summerton, J., et al., U.S. Patent No. 5,142,047, issued 08/25/92.

Summerton, J., et al., U.S. Patent No. 5,185,444 issued 02/09/93.  
 Tam, A., et al., *Virology* **185**:120 (1991).  
 Tam, J.P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:5409 (1988).  
 Tessier, D. C., *Gene* **98**:177-183 (1991).  
 Tonkinson, J.L., and Stein, C.A., *Antiviral Chem. and Chemother.* **4**(4):193-200 (1993).  
 Ulmer, et al., *Science* **259**:1745 (1993).  
 Urdea, M., *Clin. Chem.* **39**:725 (1993).  
 Urdea, M., et al., *AIDS* **7**:S11 (1993).  
 Wages, J.M., et al., *Amplifications* **10**:1-6 (1993).  
 Walker, G.T., *PCR Methods Appl.* **3**:1-6 (1993).

Wang, A.M., et al. in PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS (M.A. Innis, et al., eds.) Academic Press (1990).  
 Wang, B., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:4156 (1993).  
 Whetsell, A.J., et al., *J. Clin. Micro.* **30**:845 (1992).  
 Wolf, J.A., et al., *Nature* **247**:1465 (1990).  
 Vacca, J.P., et al., *PNAS* **91**:4096 (1994).  
 VanGemen, B., et al., *J. Virol. Methods* **43**:177 (1993).  
 Valenzuela, P., et al., *Nature* **298**:344 (1982).  
 Valenzuela, P., et al., in HEPATITIS B, eds. I. Millman, et al., Plenum Press, pages 225-236 (1984).  
 Yarbrough, et al., *J. Virol.* **65**:5790 (1991).  
 Yoo, B.J., et al., *J. Virol.* **69**:32-38 (1995).  
 Yoshio, T., et al., U.S. Patent No. 4,849,350, issued July 18, 1989.  
 Zhang, Y., et al., *J. Virol.* **65**:6101-6110 (1991).

<9> A형 간염 바이러스(HAV) 및 B형 간염 바이러스(HBV) 이외의 바이러스에 기인하는 바이러스성 간염에는 비A, 비B형 간염(NANBH)이 있다. NANBH는, 예컨대 장대 비경구적과 같이 개개의 유형의 전염 모드를 기초로 하여 추가로 규정될 수 있다.

<10> 장으로 전염되는 NANBH 또는 ET-NANBH로서 공지된 NANBH의 제 1의 형태는 음식 및 음용수가 배설물에 의해 오염된 공중위생 취약 지역에 주로 제한되어 있다. E형 간염 바이러스(HEV)로 명명되는 원인성 제의 분자 클로닝은 최근에 설명되었다(Reyes et al., 1990; Tam et al.).

<11> 비경구적으로 전염되는 NANBH, 또는 PT-NANBH로 공지된 NANBH의 제 2 형태는 비경구적인 경로, 전형적으로 혈액 또는 혈액 생성물에 노출됨으로써 전염된다. 이러한 간염의 비율은 (i) 장소, (ii) 혈액 은행에서의 ALT 시험 여부, 및 (iii) AIDS에 걸릴 위험성이 높은 환자를 배제함에 의해 달라진다. 수혈 중 약 10%가 PT-NANBH 감염을 일으켰고 이 중 약 절반은 만성질환 상태를 계속 유지하였다(Dienstag). 항-HCV 시험의 수행 후, 수혈된 유닛 당 HCV 혈청전환은 심장 수술환자중에서 1% 미만으로 감소하였다(Alter).

<12> 사람 수혈자에서 수혈 후 NANBH를 생성시키는 것으로 증명된 사람 혈장 샘플은 침팬지내에서 PT-NANBH 감염을 일으키기 위해 성공적으로 사용되었다(Bradly). 감염된 침팬지 혈장으로부터 분리된 RNA를 사용하여, 만성 PT-NANBH 감염된 사람 환자의 혈청으로 면역스크리닝하기 위한 발현 벡터내에서 cDNA 라이브러리를 구성한다. 상기 절차로 PT-NANBH 특이적인 cDNA 클론을 확인하였고 그런 다음 바이러스 서열을 프로브로 사용하여 PT-NANBH 바이러스성 제의 7,300개의 연속 염기쌍을 이루는 오버랩핑 단편의 세트를 확인하였다. 서열분석된 바이러스성 제를 C형 간염 바이러스(HCV)로 명명하였다(참조예: HCV의 서열은 1988년 11월 18일에 출원된 EPO 특허 출원 88310922.5호에 제시되어 있음). HCV의 전장 서열(~9,500nt)은 현재 입수가 가능하다.

<13> 질병 통제 센터(CDC; Phoenix, AZ, 1973-1975; 1978-1983)에서 수행된 영장류 전염 연구로 원래 비A, 비B형 간염 (NANBH)의 다중적 제의 존재에 대한 실질적인 증거가 제공되었다: NANBH의 대부분의 경우와 관련된 일차적 제는 현재 PT-NANBH 및 ET-NANBH에 대해 각각 HCV 및 HEV(상기 참조)로 인식된다. CDC(Atlanta, GA, 1989-현재)에서 항-HCV 항체에 대한 조사 (기본형) 및 업무용 시험을 사용하여 수행된 후기의 전염병 연구로 공동체-획득된 모든 NANBH의 약 20%가 또한 비C형임이 밝혀졌다. HEV의 존재에 대



한 상기 샘플의 추가 시험(참조: Reyes, et al., WO A 9115603 (Genelabs Inc.) 17 October 1991)으로 공동체-획득된 비A, 비B, 비C형 간염의 상기 경우에도 또한 비E인 것으로 나타났다.

<14> 또한, 센티넬 카운티(Sentinel County) 환자의 간 생검용 표본, 혈청 및 혈장 (미리암 올터 (Miriam Alter) 및 크리스 크라비친스키(Kris Krawczynski) 박사의 실험)은 NANBH의 많은 선의의 환자 역시 후속하여 바이러스 감염과 일치하는 만성 지속성 간염(CPH) 또는 만성 활동성 간염(CAH)으로 발전하는 비-C형 간염(혈청학적으로 및 역전사효소-중합효소 연쇄 반응(RT-PCR; Kawasaki, et al.; Wang, et al., 1990)에 의해 HCV 감염의 모드 마커에 대해 네가티브하다는 점에서)인 것으로 나타났다.

### 발명의 상세한 설명

#### <15> 발명의 요약

<16> 본 발명은 신규하게 발견된 비-A/비-B/비-C/비-D/비-E (N-(ABCDE))형 간염 관련된 바이러스 제제의 특징화 및 단리에 관한 것이며, 이러한 바이러스 제제는 본원에서 G형 간염 바이러스(HGV)로 명명된다. 본원에는 HGV 게놈의 일부의 cDNA 리플리카(replica)의 패밀리가 기재되어 있다. 또한, 또 다른 HGV 서열 및 HGV 변이체의 서열을 단리하고, 특징화하는 방법이 기재되어 있다.

<17> 본 발명은 HGV 게놈 폴리뉴클레오타이드, 이것에 대한 cDNA 및 이것의 상보서열을 포함한다. 폴리뉴클레오타이드에 관한 경우, 본 발명의 몇몇 일면으로는 정제된 G형 간염 바이러스 게놈 폴리뉴클레오타이드; HGV 유도된 RNA 및 DNA 폴리뉴클레오타이드; 재조합 HGV 폴리뉴클레오타이드; HGV 또는 HGV 변이체 cDNA 또는 이들의 상보적 서열로부터 유도된 서열을 구성하는 재조합 폴리뉴클레오타이드; HGV의 에피토프를 엔코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드; 상기 재조합 폴리뉴클레오타이드중 어느 하나를 포함하는 재조합 벡터, 및 이러한 벡터중 어느 하나로 형질전환된 숙주 세포가 있다. 본 발명의 또 다른 일면은 HGV 및/또는 이것의 변이체에 대한 폴리뉴클레오타이드 프로브이다.

<18> HGV와 다른 바이러스 서열을 비교하기 위해 서열 정보를 이용하는, HGV의 게놈의 특성에 대한 최근 연구는 HGV가 바이러스의 플라비비리과에 속하는 한 일원임을 암시한다.

<19> HGV 유도된 cDNA 서열의 일부는 천연 바이러스의 변이체를 단리하거나 샘플중 바이러스의 존재를 결정하기 위한 프로브로서 효과적이다. 또한, 이들 cDNA는 HGV-특이적 폴리펩티드 항원을 포함하는 유용한 HGV 엔코딩된 폴리펩티드 서열을 생성시킨다. 이들 코딩 서열은 진단 시험에서의 시약 및/또는 백신의 성분, 또는 표준물질로서 유용한 폴리펩티드를 생성시킨다. 또한, HGV 게놈의 다른 부분을 이들 cDNA로부터 유도된 프로브를 사용하여 단리시키고 서열분석할 수 있으며, 이로써 예방, 치료 및 진단용으로 유용한 추가의 프로브 및 폴리펩티드가 생성된다.

<20> 본 발명의 그 밖의 일면으로는 HGV cDNA 또는 이것의 상보서열로부터 유도된 오픈 리딩 프레임(ORF)이 삽입된 재조합 발현 시스템으로써 ORF가 바람직한 숙주와 양립가능한 조절 서열에 작동적으로 결합된 시스템, 재조합 발현 시스템으로 형질 전환된 세포 및 형질전환된 세포에 의해 생성된 폴리펩티드가 있다.

<21> 본 발명의 또 다른 일면은 정제된 HGV 입자; 정제된 HGV로부터의 폴리펩티드의 제제형; 정제된 HGV 폴리펩티드; 정제된 HGV 펩티드; 및 HGV 또는 HGV 변이체내에 함유된 에피토프와 면역학적으로 동일시킬 수 있는 에피토프를 포함하는 정제된 폴리펩티드가 있다.

<22> 본 발명의 일면으로는 HGV 폴리펩티드; HGV 게놈, HGV cDNA 또는 이것의 상보서열로부터 유도된 서열로 구성된 재조합 폴리펩티드; HGV 에피토프로 구성된 재조합 폴리펩티드; 및 HGV 폴리펩티드로 구성된 융합 폴리펩티드가 있다.

<23> 또한, 폴리펩티드 서열내에 함유된 HGV 에피토프에 대해 유도시킨 폴리클로날 및 모노클로날 항체는 모두 치료제로서, 진단 시험용으로서, 이들 cDNA가 유도되는 HGV 제제를 단리하는데 있어서, 및 항바이러스 제제의 스크리닝에 있어서 유용하다.

<24> 또한, 본 발명은 HGV 에피토프에 대해 유도시킨 폴리클로날 항체의 정제된 제제형; 및 HGV 에피토프에 대해 유도시킨 모노클로날 항체를 포함한다.

<25> 키트(kit)에 관한 본 발명의 몇몇 일면으로는 샘플을 약 8개 이상의 뉴클레오타이드를 갖는 HGV로부터의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 프로브를 포함하는 HGV로부터 유도된 폴리뉴클레오타이드의 존재에 대해 적당한 컨테이너내에서 조사하고; 샘플을 HGV 항원내에 존재하는 HGV 에피토프를 함유하는 폴리펩티드로 구성된 HGV 항원에 대해 유도된 항체의 존재에 대해 적당한 컨테이너내에서 분석하고; 샘플을 항-HGV 항체로 구성된 HGV 항원의 존재에 대해 적당한 컨테이너내에서 분석하는 키트가 있다.

<26> 본 발명의 다른 일면으로는 고체 기질에 부착되는, HGV 에피토프로 구성된 폴리펩티드; 및 고체 기질에 부착되는, HGV 에피토프에 대한 항체가 있다.

<27> 본 발명의 일면으로는 HGV 폴리펩티드를 엔코딩하는 서열을 함유하는 발현벡터로 형질전환된 숙주 세포를 상기 폴리펩티드를 발현시키는 조건하에 인큐베이션시키는 것을 포함하여 HGV 폴리펩티드를 생성시키는 기술; 및 이러한 방법으로 제조되는 폴리펩티드(예를 들면, HGV 에피토프를 함유함)가 있다.

<28> 또한, 본 발명은 샘플의 핵산을 HGV 폴리뉴클레오타이드에 대한 프로브와, 프로브와 샘플로부터의 HGV 핵산 간의 폴리뉴클레오타이드 듀플렉스를 생성시키는 조건하에 반응시키고, 프로브를 함유하는 폴리뉴클레오타이드 듀플렉스를 검출하는 것을 포함하여 샘플중에 존재하는 HGV 핵산을 검출하는 방법을 포함한다. 본 발명은 하기 하이브리드화를 기초로 하는 검출 방법을 포함한다: 리포터(reporter) 표지화; 중합효소 연쇄 반응; 자력 서열 복제; 리가아제 연쇄 반응; 및 가닥 치환 증폭. 또한, 검출 방법으로는 시그널 증폭법(예를 들면, 분지된 DNA 프로브 및 Q-베타 복제효소 방법)이 있다.

<29> 또한, 본 발명은 샘플(HGV로 감염된 것으로 추정되는)을 검출하려는 HGV의 항원/에피토프에 대해

유도시킨 프로브 항체와 함께 항원-항체 복합체를 형성시키는 조건하에 인큐베이션시키고; 프로브 항체를 함유하는 항원-항체 복합체를 검출하는 것을 포함하여, HGV를 검출하는 면역검정법을 포함하는 면역검정법을 포함한다. HGV 항원에 대해 유도된 항체를 검출하는 면역검정법은 HGV를 함유하는 것으로 추정되는 샘플을 HGV의 에피토프를 포함하는 프로브 폴리펩티드와 항체-항원 복합체를 형성시키는 조건하에 인큐베이션시키고; 프로브 항원을 함유하는 항체-항원 복합체를 식별하는 것을 포함한다.

- <30> 또한, HGV 에피토프를 함유하는 면역원성 펩티드를 포함하여 HGV 감염을 치료 및/또는 예방하기 위한 HGV 백신, HGV의 비활성화된 제제형, 또는 HGV의 환원된 제제형은 본 발명의 일부를 구성한다.
- <31> 또 다른 일면에 있어서, 본 발명은 HGV로 감염된 조직배양 성장된 세포를 포함한다. 한 가지 구체적인 경우에, 조직배양 성장된 세포는 영양류 간(liver) 세포이다.
- <32> 본 발명의 또 다른 일면은 시험 피검자에게 HGV 에피토프를 함유하는 면역원성 폴리펩티드를 면역 반응을 유도시키기에 적당한 양으로 투여하는 것을 포함하여, HGV에 대한 항체를 생성시키는 방법이다.
- <33> 본 발명은 또한 HGV 모자이크 폴리펩티드로서, HGV의 2개 이상의 에피토프를 함유하고, 천연 HGV 코딩 서열에서 에피토프 사이에 정상적으로 개재하는 아미노산이 실질적으로 결핍된 HGV 모자이크 폴리펩티드를 포함한다. 이러한 모자이크 폴리펩티드는 상기 논의된 적용 및 방법에서 유용하다.
- <34> 또한, 본 발명은 에피토프 제시 도중에 천연 HGV 항원성 에피토프를 의태하는 무작위 펩티드 에피토프(미미토프(mimotope))를 포함한다. 이러한 미미토프는 상기 논의된 적용 및 방법에서 유용하다. 또한, 본 발명은 무작위 펩티드 HGV 에피토프를 확인하는 방법을 포함한다. 본 발명의 방법에 있어서, 무작위 펩티드 에피토프의 라이브러리가 생성되거나 선별된다. 라이브러리는 항-HGV 항체와 접촉된다. 항체와 특이적으로 면역반응성인 미미토프가 확인된다. 본 발명의 방법에 의해 생성된 혈청(항-HGV 항체를 함유함) 또는 항체가 사용될 수 있다. 임의 펩티드 라이브러리는 예를 들면 파아지상에서 디스플레이되거나 조합형 라이브러리로서 생성될 수 있다.
- <35> 또 다른 일면에 있어서, 본 발명은 HGV 감염을 예방하고/하거나 치료하기 위한 치료 화합물 및 치료 방법을 포함한다.
- <36> 본 발명의 제반 목적 및 특징은 하기 본 발명의 상세한 설명을 첨부된 도면과 함께 숙지하는 경우에, 더욱 완전하게 이해될 것이다.
- <37> **발명의 상세한 설명**
- <38> 1. 정의
- <39> 하기에 정의된 용어는 본원에서는 다음의 의미를 가진다:
- <40> 1. 본원에서 잠정적으로 HGV라 명명하는 "비-A/비-B/비-C/비-D/비-E형 간염 바이러스성 제(agent) {N-(ABCDE)}"는 (i) 미스택스(mystax), 침팬지 또는 사람을 포함하는 일부 영양류에서 감염될 수 있고, (ii) A형 간염 바이러스 (HAV), B형 간염 바이러스 (HBV), C형 간염 바이러스 (HCV), D형 간염 바이러스 (HDV) 및 E형 간염 바이러스 (HEV)와는 혈청학적으로 구별되고 (HGV가 이들 바이러스와 함께 피검자를 동시-감염시킬 수 있다해도), (iii) 바이러스의 플라비비리대과의 일원인 바이러스, 바이러스 타입 또는 바이러스 클래스를 의미한다.
- <41> 2. "HGV 변이체"란 본원에 기재된 HGV 폴리뉴클레오타이드 서열 (예를 들면, 서열번호 14)과 포괄적 서열 상동성, 즉, 바이러스 게놈 폴리뉴클레오타이드 서열의 길이에 대한 서열 동일성이 약 40% 이상, 바람직하게는 55% 또는 65%, 더욱 바람직하게는 80%인 바이러스 단리물로서 정의된다.
- <42> "서열 상동성"은 본질적으로 하기와 같이 결정된다. 유사한 길이의 2개의 폴리뉴클레오타이드 서열 (바람직하게는, 전체 바이러스 게놈)은 이들이 ALIGN 프로그램을 이용하여 정렬되는 경우, 최대 스코어링 정렬에서의 핵산의 40% 이상, 바람직하게는 55% 또는 65%, 또는 더욱 바람직하게는 80%가(1의 ktup, 디폴트 매개변수 및 디폴트 PAM 매트릭스를 이용하여) 동일하게 정렬된다면 서로에 대해 상동인 것으로 간주된다.
- <43> ALIGN 프로그램은 서열 비교 프로그램의 FASTA 버전 1.7 스위트(suite)로 발견된다(참조: Pearson, 등, 1988; Pearson, 1990; program available from William R. Pearson, Department of Biological Chemistry, Box 440, Jordan Hall, Charlottesville, VA).
- <44> 2개의 바이러스가 서로에 대해 "고도로 상동"임을 결정하는 경우에, 1개의 바이러스에 대한 모든 바이러스 단백질(또는 폴리단백질)의 완전한 서열은 1의 ktup, 디폴트 매개변수 및 디폴트 PAM 매트릭스를 이용하는 상기 스위트의 ALIGN 프로그램을 이용하여 다른 바이러스의 단백질 또는 폴리단백질과 최적으로 및 포괄적으로 정렬된다. 비유사성 영역 또는 유사성 영역은 분석으로부터 제외되지 않는다. 2개 서열 간의 길이의 차이는 미스매치로서 간주된다. 대안적으로, 바이러스 구조 단백질이 바이러스 단리물의 관련성을 결정하는데 전형적으로 사용된다. 고도로 상동인 바이러스는 40% 이상, 또는 바람직하게는 55% 또는 65%, 또는 더욱 바람직하게는 80%의 포괄적 폴리펩티드 서열 동일성을 가진다.
- <45> 3. 2개의 핵산 단편은 이들이 하기 조건하에 HGV 또는 이것의 변이체(예를 들면, HGV 핵산에 하이브리드되지만, 플라비비리대과 바이러스중 다른 일원으로부터의 폴리뉴클레오타이드에는 하이브리드되지 않는 프로브)에 특이적으로 하이브리드되거나 중합효소 연쇄 반응을 특이적으로 프라이밍시킬 수 있는 경우, HGV 폴리뉴클레오타이드에 대해 "선택적으로 하이브리드화될 수 있는" 것으로 간주된다: (i) 전형적인 하이브리드화 및 세척 조건(참조: Maniatis, et al., pages 320-328 and 382-389), (ii) 예를 들면, 2 x SSC, 0.1% SDS, 실온 2회, 각각 30분; 그 후 2 x SSC, 0.1% SDS, 37°C 1회, 30분; 그 후 2 x SSC, 실온 2회, 각각 10분과 같은, 약 25 내지 30%이하의 염기쌍 미스매치를 발생시키는 완화된 엄중 세척 조건을 이용하는 경우, 또는 (iii) 표준 조건(참조: Saiki, R.K., et al.)하의 전형적인 중합 효소 연쇄 반응(PCR)에 사용되는 프라이머를 선택하여, HGV 또는 이것의 변이체의 서열을 특이적으로 증폭시키는

경우.

- <46> 바람직하게는, 고도로 상동인 핵산 가닥은 20 내지 30%미만의 염기쌍 미스매치, 더욱 바람직하게는 5 내지 20%미만의 염기쌍 미스매치를 함유한다. 상동성의 이러한 정도는 유전자 라이브러리(또는 유전 물질의 다른 공급원)로부터의 클론을 확인하기 위한 적당한 엄중도를 갖는 세척 조건을 이용하여 선택될 수 있으며, 이는 본 발명의 기술 분야에 널리 공지되어 있다.
- <47> 4. 본원에 사용된 "HGV 폴리뉴클레오티드"는 다음과 같이 정의된다. 약 100개가 넘는 뉴클레오티드를 갖는 폴리뉴클레오티드의 경우, HGV 폴리뉴클레오티드는 HGV 변형체에 의해 엔코딩된 폴리뉴클레오티드 서열과 상기 "2"번에 규정된 상동 서열을 포함한다. 길이가 약 100개 미만의 뉴클레오티드인 폴리뉴클레오티드의 경우, HGV 폴리뉴클레오티드는 HGV 또는 이것의 변이체의 서열에 선택적으로 하이브리드화되는 서열을 포함한다. 또한, HGV 폴리뉴클레오티드는 HGV 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다(하기 참조).
- <48> 본원에 사용된 "폴리뉴클레오티드"란 전형적인 핵산과 수소 결합할 수 있는 염기를 지지하는 골격을 갖는 중합체 분자를 의미하며, 여기서, 골격은 중합체 분자 및 전형적인 핵산(예를 들면, 단일가닥 DNA)간에 서열 특이적 방법으로 수소 결합을 형성할 수 있도록 하는 방식으로 염기를 제시한다. 이러한 염기는 전형적으로 이노신, 아데노신, 구아노신, 시토신, 우라실 및 티민이다. 많은 폴리뉴클레오티드 변형법, 예를 들면 표지, 메틸화 및 1개 이상의 천연 뉴클레오티드를 유사체로 치환하는 것은 본 발명의 기술 분야에 공지되어 있다.
- <49> 중합체 분자로는 이중가닥 및 단일가닥 RNA와 DNA, 및 메틸포스포네이트 결합과 같은 이들의 골격 변형물이 있다. 또한, 이러한 중합체 분자로는 폴리비닐 골격(Pitha, 1970a/b), 모르폴리노 골격(Summerton, et al., 1992, 1993)과 같은 대안적인 중합체 골격이 있지만, 이들에 제한되지 않는다. 다수의 다른 하전된 및 비하전된 폴리뉴클레오티드 유사체가 보고되어 있다. 다수의 골격 변형물이 당분야에 공지되어 있고, 이들로는 비하전된 연결(예를 들면, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트 및 카르바메이트) 및 하전된 연결(예를 들면, 포스포르티오에이트 및 포스포로디티오에이트)가 있지만, 이들에 제한되지 않는다. 또한, 연결은 하기 대표적인 변형을 함유할 수 있다: 단백질과 같은 펩티드 부분(예를 들면, 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그널 펩티드 및 폴리-L-리신을 포함함); 인터칼레이터(예를 들면, 아크리딘 및 프소할렌), 킬레이터(예를 들면, 금속, 방사성 금속, 붕소 및 산화성 금속), 알킬레이터, 및 다른 변형된 연결(예를 들면, 알파 아노머 핵산).
- <50> 5. "HGV 폴리펩티드"는 HGV 폴리펩티드와 상동인 임의의 폴리펩티드로서 본원에 정의된다. 본원에 사용된 "상동성"은 다음과 같이 정의된다. 한 가지 구체예에서, 폴리펩티드는 이것이 HGV 또는 이것의 변이체의 서열에 선택적으로 하이브리드화되는 핵산에 의해 엔코딩되는 경우에 HGV 폴리펩티드와 상동이다.
- <51> 또 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 이것이 상기에서 규정된 바와 같이 HGV 또는 이것의 변이체에 의해 엔코딩되는 경우에 HGV 폴리펩티드와 상동이며, 이러한 그룹의 폴리펩티드는 전형적으로 15개를 넘는, 바람직하게는 25개, 더욱 바람직하게는 35개의 연속 아미노산이다. 또한, 약 60개 보다 긴 아미노산인 폴리펩티드의 경우, "폴리펩티드 상동성"을 결정하기 위한 서열 비교는 국소 정렬 프로그램인 LALIGN를 이용하여 수행된다. 폴리펩티드 서열은 1의 ktup, 디폴트 매개변수 및 디폴트 PAM을 이용하는 LALIGN 프로그램을 이용하여 상기 규정된 바와 같이 HGV 아미노산 서열 또는 이것의 변이체중 어느 하나에 대해 비교된다.
- <52> 60개의 아미노산 보다 긴 최적 정렬을 가지며, 동일하게 정렬된 아미노산이 65% 보다 큰, 바람직하게는 70%, 더욱 바람직하게는 80%인 임의의 폴리펩티드 (전형적으로 HGV 항체와 특이적으로 면역반응하지 않는 폴리펩티드)는 "상동 폴리펩티드"인 것으로 간주된다. LALIGN 프로그램은 서열 비교 프로그램의 FASTA 버전 1.7 스위트에서 발견된다(참조: Pearson 등, 1988; Pearson, 1990; program available from William R. Pearson, Department of Biological Chemistry, Box 440, Jordan Hall, Charlottesville, VA).
- <53> 6. 폴리뉴클레오티드는 이것이 HGV 게놈, HGV의 cDNA 또는 이들의 상보서열의 영역과 같거나 실질적으로 같은 염기쌍 서열을 갖는 경우 또는 이것이 상기 "2"번, "3"번 또는 "4"번에 기재된 상동성을 나타내는 경우, HGV "로부터 유도"된다.
- <54> 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 "단편"은 이것이 (i) HGV 폴리뉴클레오티드의 오픈 리딩 프레임에 의해 엔코딩되거나 (ii) 상기 "2"번 및 "5"번에 기재된 HGV 폴리펩티드에 대한 상동성을 나타내거나 (iii) HGV 포지티브 혈청과 특이적으로 면역 반응성인 경우, HGV "로부터 유도"된다.
- <55> 7. "실질적으로 단리된" 및 "정제된"은 여러 가지 상황에서 사용되며, 전형적으로 HGV 바이러스 입자, 성분(예를 들면, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드), 또는 비관련된 성분 또는 오염성분(예를 들면, 혈청 세포, 단백질, 비-HGV 폴리뉴클레오티드 및 비-HGV 항체)으로부터 유리된 관련 화합물(예를 들면, 항-HGV 항체)을 부분 이상 정제하는 것을 의미한다. 목적 화합물 또는 성분을 단리시키거나 정제시키는 방법 및 과정은 하기 기술된다(예를 들면, 융합 단백질의 친화력 정제법 및 HGV 폴리펩티드의 재조합 제조법).
- <56> 8. 본 발명에 있어서, 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드를 엔코딩하는 서열을 나타내는 경우, 표현 "핵산 서열"은 공지된 서열 뿐만 아니라 상동 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드 서열을 엔코딩하는 축퇴 핵산 서열을 포함시키고자 한다.
- <57> 9. "에피토프"란 특정 항체의 항원 결합 부분이 상호작용하는 항원의 특정 부분으로서 규정된 항원 결정인자이다.
- <58> 10. 항원 또는 에피토프는 에피토프/항원이 HGV 감염된 혈청에 존재하는 항체에 결합하지만 HGV 로 감염되어 있지 않거나 감염된 적이 없는 개체로부터의 대부분의 혈청(약 90%를 넘고, 바람직하게는 95%를 넘음)에 존재하는 항체에는 결합하지 않는 경우, HGV 포지티브 혈청과 "특이적으로 면역반응성"이다. "특이적으로 면역반응성인" 항원 또는 에피토프는 특정 HGV 에피토프 또는 항원에 대해 오도시킨 모

노클로날 또는 폴리클로날 항체와 또한 면역반응성일 수 있다.

<59> 항체 또는 항체 조성물(예를 들면, 폴리클로날 항체)은 이것이 HGV 항원과는 면역반응성이지만 HAV, HBV, HCV, HDV 또는 HEV 항원과는 면역반응성이 아닌 경우, HGV와 "특이적으로 면역반응성"이다. 또한, "특이적으로 면역반응성인 항체"는 HGV, HAV, HBV, HCV, HDV 또는 HEV로 비감염되거나 이들에 비노출된 피검자로부터 수득된 정상 혈청에 전형적으로 존재하는 항원과는 면역반응성이 아니다.

<60> II. N-(ABCDE) 혈청.

<61> 항-HCV에 대한 혈청학적 시험이 이용가능해지고 HCV-RNA에 대한 RT-PCR 검정이 개발됨에 따라(참조: Kawasaki, et al.; Wang, et al., 1990) 수혈후 비-HCV 간염 및 지역-획득된 비-HCV 간염 둘 모두의 몇몇 사례가 확인되었다. 사람 간염 예인, PNF 2161은 (질병 통제 및 예방 센터(Centers for Disease Control and Prevention)에 의해 후원된 지역-획득된 간염의 센티널 카운티스 스터디(Sentinel Counties Study)(Alter, et al., 1989b)를 통해) NANB 간염 (NANBH)을 갖는 것으로 최초로 확인되었다. PNF 2161은 수혈한 지 약 8주 후에 피크 혈청 ALT 수준이 1141 IU (정상,  $\leq 45$  IU)인 급성 간염을 나타낸 중년의 코카서스인 남성 환자로부터 수득된 샘플이었다. 급성 간염의 에피소드를 분석한 결과, 상기 환자는 그 후 7년 동안 변동적이긴 하지만 지속적으로 상승하는 ALT 수준을 가지며, 이는 만성 감염과 일치하지만, 이러한 진단은 조직병리학적으로 확인되지 않았다.

<62> HGV를 클로닝하는데 사용되는 혈장 표본(본원에 기재된)은 급성 간염의 에피소드가 있는지 약 4<sup>1/2</sup> 년후인 1989년 6월에 수득되었고, 저온-보관되었다. 환자 PNF 2161은 제 1세대 면역검정 시험(Ortho HCV ELISA Test System; Ortho Diagnostics, Raritan, NJ)에 의한 지속적으로 네가티브한 결과를 토대로 하여 초기에는 HCV로 감염되지 않는 것으로 믿어졌다. 그러나, 제 2세대 HCV 면역검정(Ortho) 및 HCV 5'-비코딩 영역 프라이머를 사용하는 PCR을 이용하는 후속 시험은 환자가 HCV로 감염되었음을 입증하였다.

<63> III. HGV 관련된 서열의 단리.

<64> HGV 서열을 함유하는 클론을 확인하기 위한 한 가지 방법으로서는, cDNA 라이브러리가 감염된 HGV 혈청으로부터 발현 벡터 람다 gt11내에 제조되었다(실시예 1). 그 후 폴리뉴클레오타이드 서열은 혈청 PNF 2161과 면역반응성인 펩티드의 발현을 위해 선택되었다. 제 1 라운드 스크리닝은 PNF 2161 혈청(파아지 라이브러리를 생성하는데 사용되는)을 사용하여 수행된다. 또한, 추정되는 다른 N-(ABCDE) 혈청을 사용하여 스크리닝할 수 있다.

<65> 이러한 방법에 의해 확인된 재조합 단백질은 진단 시험에서 기질로서 작용할 수 있는 펩티드에 대한 후보체를 제공한다. 또한, 이러한 방법에 의해 확인된 핵산 코딩 서열은 또 다른 HGV 코딩 서열을 확인하기 위한 유용한 하이브리드화 프로브로서 작용한다.

<66> 상기 기재된 혈청은 람다 gt11에서 cDNA 라이브러리를 생성시키는데 사용되었다(실시예 1). 실시예 1에 예시된 방법에 있어서, 감염된 혈청을 희석없이 8% PEG중에 침전되고, 라이브러리는 생성되는 펠릿화된 바이러스로부터 생성되었다. 감염된 사람 공급원으로부터의 혈청은 같은 방법으로 처리되었다.

<67> PEG 침전에 대한 유리한 다른 방법으로서는, 초원심분리가 감염된 혈청 또는 다른 생물학적 표본으로부터 미립자 제제를 펠릿화시키는데 사용될 수 있다. 핵산이 추출될 수 있는 바이러스 입자를 단리시키기 위해, 2ml 이하인 혈청이 PBS를 사용하여 약 10ml까지 희석되고, 3K에서 10분간 스피닝되고, 상층액이 4°C에서 Ti70.1 로터(참조: Beckman Instruments, Fullerton, CA)내에서 40,000rpm(약 110,000 x g)으로 최소 시간인 2시간 동안 원심분리된다. 그 후, 상층액이 흡인되고, 펠릿이 표준 핵산 추출기법에 의해 추출된다.

<68> cDNA 라이브러리는 펠릿화된 혈청으로부터 추출된 RNA를 표준물질로서 이용하는 역전사 반응에서 무작위 프라이머를 사용하여 생성되었다. 생성된 분자는 서열 독립성 단일 프라이머 증폭(SISPA; Reyes, et al., 1991) 링커 프라이머에 연결되고, 비선택적 방식으로 신장시킨 후, 예를 들면 람다 gt11과 같은 적합한 벡터내로 클로닝시켜서 펩티드 항원을 발현시키고 스크리닝되었다. 다른 방법으로, 람다 gt10 벡터가 또한 이용될 수 있다.

<69> 람다 gt11은  $\beta$ -갈락토시다아제 유전자의 번역 종결 코돈의 업스트림에 있는 유일한 EcoRI 삽입 부위 53개 염기쌍을 함유하는 특히 유용한 발현 벡터이다. 따라서, 삽입된 서열은  $\beta$ -갈락토시다아제 유전자 생성물의 N-말단 부분, 이중 펩티드 및 임의로  $\beta$ -갈락토시다아제 펩티드의 C-말단 영역(C-말단 부분은 이중 펩티드 코딩 서열이 번역 종결 코돈을 함유하지 않는 경우에 발현됨)을 함유하는  $\beta$ -갈락토시다아제 융합 단백질로 발현된다.

<70> 또한 이러한 벡터는 허용 온도, 예를 들면 32°C에서는 바이러스 용원을 유발시키고, 상승된 온도, 예를 들면 42°C에서는 바이러스를 용해시키는 온도-민감성 리프레서(c1857)를 생성시킨다. 이러한 벡터의 장점으로는 (1) 고도로 효율적인 재조합 클론의 생성, (2) 비허용 온도가 아닌 허용 온도에서 숙주-세포 성장을 기초로 하여 용원화된 숙주 세포를 선별하는 능력 및 (3) 재조합 융합 단백질의 생성이 있다. 또한, 이중 삽입서열을 함유하는 파아지가 비활성  $\beta$ -갈락토시다아제 효소를 생성시키므로, 삽입서열을 함유하는 파아지는 전형적으로  $\beta$ -갈락토시다아제를 사용하는 비색계 기질 전환 반응을 이용하여 확인된다.

<71> 실시예 1에는 N-(ABCDE) 간염 혈청 PNF 2161에 대한 cDNA 라이브러리의 제조가 기술되어 있다. 라이브러리는 PNF 2161을 이용하여 면역스크리닝되었다(실시예 3). 면역반응성인 다수의 람다 gt11 클론이 확인되었다. 면역 포지티브 클론이 플라크 정제되었고, 이들의 면역반응성이 재시험되었다. 또한, 정상 사람 혈청을 갖는 클론의 면역반응성이 시험되었다.

<72> 또한, 이들 클론은 클로닝된 삽입 서열의 "외인성" 성질에 대해서 조사되었다. 이러한 기초 시험은 클로닝된 단편이 사람 또는 다른 잠재적으로 오염성인 핵산(예를 들면, 대장균, 사카로마이세스 세레비시애(S.cerevisiae) 및 미토콘드리아)의 일부를 나타내지 않음을 입증한다. 클론 삽입서열은 중합효소 연쇄 반응 후 EcoRI 분해에 의해 단리되었다. 그 후, 삽입서열이 정제되고 표지화되어, 막-결합된 정상



사람 DNA, 정상 미스택스 DNA 및 세균 DNA(대조 DNA)에 대한 하이브리드화 프로브로서 사용되었다(실시에 4A).

- <73> 클론 470-20-1(PNF2161 cDNA 공급원)은 PNF 2161 혈청을 사용하여 면역스크리닝함으로써 단리된 클론 중의 하나였다. 클론은 정상 사람 혈청과는 비반응성이었다. 이 클론은 거대한 오픈 리딩 프레임 (203개 염기쌍; 서열번호 3)을 가지며, 이는 람다 gt11 벡터의  $\beta$ -갈락토시다아제 유전자와 프레임적으로 연결된다. 이 클론은 사람, 효모 및 대장균 게놈 DNA를 사용하는 게놈 DNA 하이브리드화 분석 및 게놈 PCR 분석에 의해 외인성이다(실시에 4B).
- <74> 서열은 RT-PCR에 의해 결정된 바와 같이 PNF2161 혈청내에 존재하였다(실시에 4C). 연속 희석된 PNF 2161 RNA의 RT-PCR은 ml당 470-20-1 특이적 서열의 약  $10^5$ 개 이상의 카피가 있음을 암시한다. 서열은 바이러스 유사 입자와 관련된 서열 밴딩(banding)과 일치하는 밀도에서, 수크로오스 구배 분획으로 또한 검출되었다(실시에 5).
- <75> 제 2의 클론인 클론 470-exp1(서열번호 37)을 발현시키는 대장균의 세균 용해질은 클론 470-20-1과 필적할 만한 수준으로 PNF 2161 혈청과 특이적으로 면역반응성인 것으로 또한 나타났다. 470-exp1의 코딩 서열은 종결 코돈에 의해 플랭킹되며(서열번호 14에 대한 서열 비교를 기초로 하여; 또한, 도 1 참조), 내부 메티오닌을 가졌다.
- <76> 클론 470-20-1에 인접해 있는 서열번호 14에 함유된 또 다른 서열은 클론 470-20-1로부터의 프라이머를 사용하는 앵커 중합효소 연쇄 반응(Anchor PCR)에 의해 수득되었다(실시에 6). 이러한 경우, PNF 2161 2-cDNA 공급원 라이브러리는 주형으로 이용되었고, 여기서 cDNA/상보서열 이중-가닥 DNA 생성물은 람다 아암(arm)에 연결되었지만, 혼합물은 패키징되지 않았다.
- <77> 470-20-1 특이적 프라이머는 주형으로서 SISPA-증폭된 PNF 2161 cDNA를 사용하는 증폭 반응에서 사용되었다(실시에 4). 증폭된 DNA 단편의 동일성은 (i) 크기 및 (ii) 470-20-1 특이적 올리고뉴클레오타이드 프로브(서열번호 16)와의 하이브리드화에 의해 확인되었다. 470-20-1 특이적 시그널은 SISPA-증폭된 PNF 2161로부터의 PCR에 의해 증폭된 cDNA에서 검출되었으며, 이는 공급원 물질내에 470-20-1이 존재함을 입증한다.
- <78> 상기 470-20-1 특이적인 프라이머는 또한 기질로서 하기의 RNA 공급원을 사용하는 증폭 반응에서 사용되었다: 정상 미스택스 간 RNA, 정상 타마린(tamarin)(Sanguis laboratis) 간 RNA, 및 MY131 간 RNA (실시에 4). 상기 실험으로부터의 결과는 470-20-1 서열이 모 혈청 샘플(PNF 2161) 및 PNF 2161 샘플(MY131)로 시험된 동물로부터의 RNA 간 샘플내에 존재함을 입증한다. 정상 대조 RNA 둘 모두는 470-20-1 서열의 존재에 대해 네가티브였다.
- <79> 또한, PNF 2161 혈청 및 다른 클로닝 공급원 또는 관련된 공급원 물질은 선택된 클로닝된 서열로부터의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 직접 시험되었다. 특이적 증폭 생성물은 특정 올리고뉴클레오타이드 프로브 470-20-1-152F(서열번호 16)에 하이브리드화시킴으로써 검출되었다. 특이적 시그널은 470-20-1 특이적 프라이머를 사용하는 경우 PNF 2161의 다수의 추출물내에서 재현가능하게 검출되었다.
- <80> HGV 및 간 질환 사이의 질병 관련성은 실시에 4F에 제시된 데이터에 의해 추가로 지지된다. 간염 환자로부터의 혈청 및 비정상적 간 기능을 갖는 혈액 도너로부터의 혈청은 HGV 특이적 프라이머를 사용하여 RT-PCR 스크리닝에 의해 HGV의 존재에 대해 평가되었다. HGV 특이적 서열은 이들 혈청 샘플중 6/152에서 검출되었다. HGV 포지티브는 대조 샘플(n=11) 중에서는 검출되지 않았다.
- <81> 상기 제시된 결과는 간의 N-(ABCDE) 바이러스 감염(예를 들면, 간염) 및/또는 감염과 관련된 바이러스 제제의 단리, 및 다른 조직 및 세포 타입의 생성된 질병을 나타낸다.
- <82> IV. HGV 재조합 항원의 추가 특징화
- <83> A. 재조합 라이브러리의 스크리닝.
- <84> 추가의 후보체 HGV 항원은 본 발명의 라이브러리로부터 상기 기술된 스크리닝 방법을 사용하여 수득될 수 있다. 상기에 기술된 cDNA 라이브러리는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection)(12301 Parklawn Dr., Rockville, MD, 20852)에 하기 명칭으로 기탁되어 있다: PNF 2161 cDNA 공급원, ATCC 75268.
- <85> 제 2의 PNF 2161 cDNA 라이브러리는 제 2의 PNF 2161 cDNA 공급원 라이브러리가 람다 gt11 아암에 연결되지만 패키징되지 않는다는 것을 제외하고는, 본질적으로 제 1의 PNF 2161 cDNA 라이브러리에 대해 기술된 바와 같이 생성되었다. 이러한 비패키징된 라이브러리는 하기 기술된 신장 클론을 수득하는데 사용되었다. 이러한 제 2의 라이브러리의 패키징된 버전(PNF 2161 2-cDNA 공급원 라이브러리)은 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852)에 하기 명칭으로 기탁되어 있다: PNF 2161 2-cDNA 공급원, ATCC 75837.
- <86> 상기에 생성된 재조합 라이브러리 이외에, N-(ABCDE) 간염 혈청으로부터의 다른 재조합 라이브러리가 이와 유사하게 생성되고, 본원에 기술된 바와 같이 스크리닝될 수 있다.
- <87> B. 에피토프 맵핑, 교차 하이브리드화 및 게놈 서열의 단리.
- <88> 항원 코딩 DNA 단편은 (i) 전술된 면역스크리닝하거나 (ii) 잠재적 항원 영역을 확인하기 위해 알고리즘(참조: "ANTIGEN", Intelligenetics, Mountain View, CA)을 사용하여 코딩 서열(예를 들면, 서열번호 14)을 이용한 컴퓨터 분석함으로써 확인될 수 있다. 항원 코딩 DNA 단편은 서브클로닝될 수 있다. 그후, 서브클로닝된 삽입서열은 부분적 DNase I 분해에 의해 무작위 단편을 생성시키도록 단편화되거나 특이적인 제한 엔도뉴클레아제 분해에 의해 특이적인 서브단편을 생성시키도록 단편화될 수 있다. 생성되는 DNA 단편은 람다 gt11 벡터내로 삽입되어, 클로닝된 삽입서열의 에피토프 맵을 제공하기 위해 면역스크리닝될 수 있다.

- <89> 또한, DNA 단편은 중복 HGV 서열을 확인하기 위해 하이브리드화 실험에서 프로브로서 사용될 수 있으며, 이들 DNA 단편은 연속 클론의 세트를 확인하기 위해 프로브로서 추가로 사용될 수 있다. 연속 클론 세트가 생성되면 HGV의 게놈의 서열이 밝혀질 수 있다.
- <90> 임의의 상기 설명된 클론 서열 (예를 들면, 서열번호 14 또는 클론 470-20-1로부터 유래된)은 람다 gt10 또는 "LAMBDA ZAP II" (Stratagene, San Diego, CA)와 같은 벡터내에서 생성되는 cDNA 및 DNA 라이브러리를 프로빙하는데 사용될 수 있다. 공지 서열의 특이적인 서브단편은 중합효소 연쇄 반응에 의해 단리되거나 이러한 서열을 함유하는 벡터의 제한 엔도뉴클레아제 분해 후에 단리될 수 있다. 생성된 DNA 단편은 임의의 선택된 라이브러리에 대해 방사성 표지된 프로브로서 사용될 수 있다. 특히, 클론 삽입서열의 5' 및 3' 말단 서열은 추가 클론을 확인하기 위한 프로브로서 유용하다.
- <91> 또한, 클로닝된 삽입서열의 5' 말단에 의해 제공된 서열은 제 1-가닥 cDNA 또는 DNA 합성 반응 (Maniatis, et al.; Scharf, et al.)에서 서열 특이적 프라이머로서 유용하다. 예를 들면, 특이적으로 프라이밍된 PNF 2161 cDNA 및 DNA 라이브러리는 주형으로서의 PNF 2161 핵산상에서 서열번호 14로부터 유래된 특이적 프라이머를 사용함으로써 제조될 수 있다. 신규한 cDNA의 제 2-가닥은 RNase H 및 DNA 중합효소 I을 사용하여 합성된다. 상기 방법은 공지된 클론 삽입서열 5' 말단 근처에 있는 핵산 영역에 상응하는 DNA/cDNA 분자를 확인하거나 생성시킨다. 따라서, 신규하게 단리된 이러한 서열은 플랭킹 서열 등을 추가로 확인하고, HGV에 대한 전체 게놈을 구성하는 서열을 확인하는데 이용될 수 있다. 상기에 기술된 바와 같이, 신규한 HGV 서열이 단리된 후, 폴리뉴클레오티드가 HGV 항원을 엔코딩하는 특정 서열을 확인하기 위해 클로닝되고 면역스크리닝될 수 있다.
- <92> 목적 서열을 추가로 함유하는 신장 클론 서열 (서열번호 14)은 실시예 6에 기술된 "앵커(Anchor) PCR" 방법을 이용하여 클론 PNF 470-20-1 (서열번호 3)에 대해 획득되었다. 요약하면, 방법은 PNF 2191 SISPA cDNA를 람다 gt11 아암에 연결시키고, gt11-특이적 프라이머 및 2개의 470-20-1 특이적 프라이머중 하나를 사용하여 연결 반응물을 증폭시키는 것으로 구성된다.
- <93> 증폭 생성물은 전기영동적으로 분리되고, 필터에 전달되며, 필터에 결합된 DNA는 470-20-1 특이적인 프로브를 사용하여 프로브된다. 하이브리드화 포지티브밴드 시그널에 상응하는 밴드는 겔 정제되고, 클로닝되고, 서열분석된다.
- <94> C. 항원 폴리펩티드 및 항체의 제조.
- <95> 본 발명의 재조합 펩티드는 차동 침전법, 분자체 크로마토그래피, 이온-교환 크로마토그래피, 등전점 포커싱, 겔 전기영동 및 친화성 크로마토그래피를 포함할 수 있는 표준 단백질 정제 방법에 의해 정제될 수 있다.
- <96> 본 발명의 한 구체예의 경우, 본 발명의 항원의 폴리뉴클레오티드 서열은 플라스미드 p-GEX (실시예 7A) 또는 이것의 다양한 유도체 (pGEX-GLI)에서 클로닝되었다. 플라스미드 pGEX (Smith, et al., 1988) 및 이것의 유도체는 단백질 글루타티온-S-트랜스퍼라제 (sj26)에 프레임적으로 융합된 클로닝된 삽입서열의 폴리펩티드 서열을 발현시킨다. 한 가지 벡터 구성물(플라스미드 pGEX-hisB)에 있어서, 6개 히스티딘의 아미노산 서열이 융합 단백질의 카르복시 말단에 삽입된다.
- <97> 다양한 재조합 pGEX 플라스미드가 대장균의 적당한 균주내로 형질전환될 수 있고, 융합 단백질 생성이 실시예 7A에 기술된 IPTG (이소프로필-티오 갈락토피라노시드)를 첨가함으로써 유도될 수 있다. 그 후, 가용화된 재조합 융합 단백질은 유도된 배양물의 세포 용해질로부터 글루타티온 아가로오스 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있다 (실시예 7A).
- <98> 플라스미드 pGEX-hisB에 의해 발현되는 불용성 융합 단백질은 단백질의 가용화에 모두 유용한 6M 우레아 또는 6M 이소티오시안산 구아니디늄을 함유하는 완충액내에서, 고정된 금속 이온 친화성 크로마토그래피 (Porath)에 의해 정제될 수 있다. 다른 방법으로, pGEX-GLI 또는 이것의 유도체에서 발현되는 불용성 단백질은 가용성 단백질을 분리시키기 위한 원심분리 후에 불용성 단백질의 가용화의 조합법을 사용하여 정제될 수 있으며, 이온 교환 또는 크기 배제 크로마토그래피와 같은 표준 크로마토그래피법 및 다른 방법이 공지되어 있다.
- <99>  $\beta$ -갈락토시다아제 융합 단백질 (예를 들면, 람다 gt11 클론에 의해 생성되는 단백질)의 경우, 융합된 단백질은 세포 용해 물질을 표면 결합된 항- $\beta$ -갈락토시다아제 항체를 갖는 고체 지지체에 통과 시킴으로써 친화성 크로마토그래피에 의해 용이하게 단리될 수 있다. 예를 들면 친화성 크로마토그래피에 의한 470-20-1 코딩 서열로부터 유래된  $\beta$ -갈락토시다아제/융합 단백질의 정제는 실시예 7B에 기재되어 있다.
- <100> 본 발명은 또한 HGV 코딩 서열 및 코딩 영역을 적당한 숙주에서 발현시킬 수 있는 발현 조절 요소를 함유하는 상기에 기술된 람다 gt11 또는 pGEX 벡터와 같은 발현 벡터를 포함한다. 조절 요소는 일반적인 프로모터, 번역 개시 코돈, 및 번역 및 전사 종결 서열, 및 삽입서열을 벡터내로 삽입시키는 삽입 부위를 포함한다.
- <101> 바람직한 항원 폴리펩티드를 엔코딩하는 DNA는 적당한 숙주 시스템에서 폴리펩티드를 발현시키는 임의의 개수의 시판 벡터내로 클로닝될 수 있다. 이들 시스템으로는 바클로바이러스 발현 (Reilly et al.; Beames, et al.; Pharmingen; Clontech, Palo Alto, CA), 백시니아 발현 (Earl, 1991; Moss, et al.), 세균에서의 발현 (Ausubel, et al., Clontech), 효모에서의 발현 (Gellissen, 1992; Romanos, 1992; Goeddel; Guthrie and Fink), 예를 들면 차이나이스 햄스터 난소(CHO) 세포주 (Haynes, 1983; Lau, 1984; Kaufman, 1990)와 같은 포유동물 세포내의 발현 (Clontech; Gibco-BRL, Ground Island, NY)이 있지만, 이들에 제한되지는 않는다. 이들 재조합 폴리펩티드 항원은 직접 발현되거나 융합 단백질로서 발현될 수 있다. 발현된 서열의 배양 배지내로의 분비를 촉진시키는 선도 서열과 같은 많은 특징이 발현 벡터내로 조작될 수 있다.
- <102> 수 개의 상기 시스템을 이용하는 거대한 HGV 폴리펩티드의 발현은 실시예 16에 기술된다.

<103> 효모 시스템에서의 발현은 상업적 생성의 장점을 가진다. 백시니아 및 CHO 세포주에 의한 재조합 단백질 생성은 포유동물 발현 시스템이라는 장점을 가진다. 또한, 백시니아 바이러스 발현은 하기를 포함하여 여러 장점을 가진다: (i) 이것의 광범위한 숙주 범위; (ii) 재조합 단백질의 신뢰성 있는 번역후 변형, 프로세싱, 폴딩, 수송, 분비 및 어셈블리; (iii) 비교적 가용성 재조합 단백질의 고수준 발현; 및 (iv) 외래 DNA를 수용하는 대규모 능력.

<104> 재조합 발현된 폴리펩티드 생성된 HGV 폴리펩티드 항원은 전형적으로 용해된 세포 또는 배양 배지로부터 분리된다. 정제는 염 분류법, 이온 교환 크로마토그래피, 및 친화성 크로마토그래피를 포함하여 본 발명의 기술분야에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 면역친화성 크로마토그래피는 본 발명의 방법에 의해 확인된 HGV 항원을 기초로 하여 생성된 항체를 사용하는 경우에 이용될 수 있다.

<105> 또한, HGV 폴리펩티드 항원은 HGV 입자 (하기 참조)로부터 분리될 수 있다.

<106> 폴리펩티드의 연속적 항원 결정인자는 일반적으로 비교적 작고, 전형적으로 6 내지 10개 아미노산 길이를 가진다. 더욱 작은 단편은 항원 영역, 예를 들어 구조적 에피토프로서 확인되어 왔다. HGV 폴리펩티드 항원은 상기에 기술된 바와 같이 확인된다. 각각의 생성된 가닥의 DNA 코딩 영역은 융합 단백질 또는 분리된 폴리펩티드로서 재조합적으로 발현될 수 있다. 또한, 아미노산 서열은 시판되는 합성기 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 또는 "PIN" 기법(Applied Biosystems)을 사용하여 편리하게 화학적으로 합성될 수 있다.

<107> 또 다른 구체예의 경우, 본 발명은 다수의 에피토프로 구성되는 모자이크 단백질을 포함한다. HGV 모자이크 폴리펩티드는 전형적으로 2개 이상의 HGV 에피토프를 함유하며, 상기 폴리펩티드는 천연 HGV 코딩 서열내의 에피토프 사이에 정상적으로 개재하는 아미노산이 실질적으로 결여되어 있다. 상기 기술된 폴리펩티드 발현 벡터/숙주 시스템을 사용하는 표준 재조합 DNA법을 이용하여 모자이크 단백질을 생성시키는, 다수의 텐덤 에피토프를 엔코딩하는 합성 유전자 (Crea; Yoshio et al.; Eaton et al.)가 구성될 수 있다.

<108> 또한, 다수 항원 펩티드는 앞서 기술된 방법에 의해 상업적으로 합성될 수 있다(Tam, J.P., 1988; Briand et al.). 예를 들면,  $\alpha$ - 및 e-아미노기를 갖는 리신 잔기의 면역학적으로 비활성인 작은 코어 매트릭스는 목적 에피토프를 나타내는 같거나 다른 합성 펩티드 (전형적으로 길이는 6 개 내지 15개 잔기임)의 다수의 카피를 앵커링시키는데 사용될 수 있다. 모자이크 단백질 또는 다수의 항원 펩티드 항원은 다수의 에피토프의 분배에 기인하는 시그널 증폭으로 인해 면역검정에서 보다 높은 감응성 및 특이성을 제공한다.

<109> 이들 방법중 어느 하나에 의해 수득된 항원은 항체 생성, 진단 시험 및 백신 개발에 사용될 수 있다.

<110> 또 다른 일면에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드 항원에 대해 유도된 특이적인 항체를 포함한다. 이들 방법중 어느 하나에 의해 수득된 항원은 항체의 생성에 직접 사용되거나 적당한 캐리어 분자에 커플링될 수 있다. 많은 이러한 캐리어는 본 발명의 기술분야에 공지되어 있고, 상업적으로 입수가능하다 (e.g., Pierce, Rockford IL). 전형적으로, 항체를 제조하기 위해, 토끼 같은 숙주 동물이 정제된 항원 또는 융합된 단백질 항원으로 면역화된다. 하이브리드 또는 융합된 단백질은 글루타티온-S-트랜스퍼라제 또는  $\beta$ -갈락토시다아제와 같은 다른 단백질로부터 유래된 다수의 코딩 서열을 사용하여 생성될 수 있다. 숙주 혈청 또는 혈장이 적당한 시간 간격 후에 수집되고, 이러한 혈청은 항원에 대해 특이적인 항체에 대해 시험된다. 실시예 8에는 Sj26/470-20-1 하이브리드 단백질내의 470-20-1 항원에 특이적인 토끼 혈청 항체의 제조가 설명되어 있다. 이러한 기술은 비제한적으로 서열번호 14로서 제시된 코딩 서열로부터 유래된 서열을 포함하여, HGV로부터 유래된 모든 면역원성 서열에 동일하게 적용가능하다.

<111> 면역화된 동물의 감마 글로불린 분획 또는 IgG 항체는 예를 들면 포화된 황산 암모늄 침전법 또는 DEAE Sephadex 크로마토그래피법, 친화성 크로마토그래피법 또는 폴리클로날 항체의 제조에 대해 본 발명의 당업자에게 공지된 다른 기술을 이용함으로써 수득될 수 있다.

<112> 다른 방법으로서, 정제된 항원 또는 융합된 항원 단백질은 모노클로날 항체를 제조하는데 사용될 수 있다. 본원에서는, 면역화된 동물로부터의 비장 또는 림프구를 본 발명의 당업자에게 공지된 방법에 의해 분리시키고, 불멸화시키거나 하이브리도마를 제조하는데에 사용한다. 사람 유래된 하이브리도마를 제조하기 위하여, 사람 림프구 도너가 선택된다. HGV로 감염된 것으로 공지된 도너가 적합한 림프구 도너일 수 있다. 림프구는 말초 혈액 샘플로부터 분리될 수 있다. 엡스타인바르 바이러스 (EBV)가 사람 림프구를 불멸화시키는 데에 사용될 수 있거나 적당한 융합 파트너가 사람 유래된 하이브리도마를 제조하는 데에 사용될 수 있다. 바이러스 특이적인 폴리펩티드를 사용하는 체외 1차 감응화가 사람 모노클로날 항체의 생성에서 또한 사용될 수 있다.

<113> 불멸화된 세포에 의해 분리된 항체는 바람직한 특이성을 갖는 항체를 분리시키는 클론을 결정하기 위해 예를 들면 ELISA 또는 웨스턴 블롯법을 사용함으로써 스크리닝한다 (실시예 10; Ausubel et al.).

<114> 본 발명의 HGV-포지티브 혈청 또는 혈장, 또는 본 발명의 항체를 이용하여, 다른 항원 펩티드 및 에피토프가 분리될 수 있다. 예를 들면, 많은 다른 기술이 많은 펩티드의 동시 합성을 위해 개발되어 왔다 (참조: Geysen, et al.; Houghten; Frank and Doring; Hudson). 게이센(Geysen) 등에 의해 개발된 방법은 많은 다른 펩티드 서열이 생성되고, 항원성에 대해 시험될 수 있는 상대적 단순성으로 인해 특히 유용하다. 상기 게이센 방법 (또한 MULTI-PIN 펩티드 합성법으로서 언급됨)의 경우, 펩티드는 마이크로-역가 플레이트에 부착된 폴리아크릴아미드산 그래프팅된 폴리메틸렌 로드 (rod)상에서 합성된다. MULTI-PIN 방법은 많은 신타아제 (플레이트당 96개의 펩티드)가, 본 발명의 폴리클로날 또는 모노클로날 항체, 상업적으로 입수가능한 시약 및 수단을 이용하여 면역학적으로 스크리닝될 수 있게 한다. 면역반응성 펩티드가 확인되고, 특징화된다.

<115> 6,000개 이하의 올리고펩티드가 2주 동안에 합성되어, 단일 아미노산의 분해를 위한 에피토프에

대한 바이러스 항원 서열을 스크리닝하는 것을 실용적으로 만들 수 있는 것으로 (특정 항원의 모든 가능한 오버랩핑하는 아미노산 서열을 합성함으로써) 알려져 왔다 (Geysen et al.).

- <116> 면역우세 펩티드를 스캐닝하는 또 다른 방법은 통상의 자동화된 펩티드 합성법을 이용하여 HGV 코딩 서열에 상응하는 보다 긴 펩티드 (예를 들면, 10 내지 30개의 아미노산)를 합성하는 것이다(Carter, et al., 1994; Obeid, et al., 1994; Commandeur et al., 1994). 상기 방법은 보다 긴 펩티드가 구조적 에피토프를 의사하는 형태로 폴딩될 수 있다는 장점을 가진다.
- <117> 또한, HGV 항체, 특히 모노클로날 HGV 항체는 이것의 바이러스-엔코딩된 표적 폴리펩티드를 의사하는 무작위 폴리펩티드를 확인하는 데에 사용될 수 있다(Scott and Smith, 1990; Smith, 1991). 예를 들면, 파아지상에 디스플레이되는 무작위 펩티드 라이브러리 (RPL) (Scott and Smith, 1990)는 항체 생성 또는 백신 개발을 위한 펩티드 리간드의 공급원으로서 사용될 수 있다. RPL 방법은 파아지 표면상에서 펩티드-리간드 함유 융합 단백질을 발현시키고, 이러한 리간드 엔코딩 파아지를 항체를 이용하는 친화성 선택에 의해 부화시켰다 (Smith, J.P., 1991; Christian et al.; Scott, et al., 1992; Folgori, et al.). 특정 항체에 의해 검출되는 상기의 무작위 펩티드 에피토프는 에피토프 제시 동안에 천연 항원 에피토프 (mimotopes)를 의사한다. HGV 항원 의사체 (mimotopes)는 RPL로부터 단리될 수 있다. RPL을 발현시키는 핵사- 내지 데카-펩티드 파고토프 (파아지상에서 디스플레이되는 미모토프)는 공지된 방법 (Scott and Smith: Smith, J.P., 1991; Christian, et al.; Scott et al.; DeGraaf, et al.; Folgori, et al.)에 의해 제조될 수 있고, 본 발명의 HGV 관련된 사람 혈청 또는 항체에 의해 스크리닝될 수 있다.
- <118> 470-20-1 미미토프의 단리를 위해 RPL을 사용하는 한 가지 예는 하기와 같다. 무작위 데카펩티드 -p111 융합 파아지 디스플레이 라이브러리는 이미 기술된 방법에 따라 구성된다(DeGraaf, et al., 1993). 간단하게, 화학적으로 합성된 단일가닥의 촉화 삼입서열은 SfiI 제한 오버행(overhang)을 생성시키는 보다 짧은 올리고뉴클레오타이드로 어닐링된다. 어닐링된 DNA는 SfiI-절단 fuse-5 벡터 DNA내로 연결된다.
- <119> 대장균 MC1061은 연결된 DNA로 형질전환된다. 상기 라이브러리는 20 mg/ml 테트라시클린이 함유된 갖는 LB 배지내에서 약 10배의 개체수 배증을 통해 증폭된다. 상기 라이브러리는 하나 이상의 470-20-1 면역반응성 혈청 (또는 본 발명의 항체)을 사용하여 친화성 선택된다. 폴리스티렌 비드 (Precision Plastic Ball Company, Chicago, IL)는 4°C에서 하룻밤 동안 pH 9.6인 50mM NaHCO<sub>3</sub> 중에서 황산암모늄 단편화된 포지티브 혈청 (예를 들면, PNF 2161)으로 피복된다. 항체-피복된 비드는 PBS로 완전히 세척되고, BSA로 블로킹된다.
- <120> 이러한 혈청-피복되고 블로킹된 비드는 4°C에서 4시간 동안 과량의 M13K07-UV로 사멸된 파아지와 함께 예비 인큐베이션된다. 그 후, 라이브러리 파아지는 상기 예비 인큐베이션 혼합물에 첨가되고, 4°C에서 12시간 동안 인큐베이션된다. 비결합된 파아지는 제거되고, 비드는 TTB (50mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5%의 "TWEEN 20" (V/V), 1mg/ml BSA) 완충액을 사용하여 광범위하게 세척된다. 결합된 파아지는 용리 완충액 (pH 9.0인 2M Tris-HCl을 사용하여 pH 2.2로 조정된 0.1M HCl)으로 용리된다. 용리되고 부화된 파아지는 플라크 면역스크리닝에 의해 제 2의 포지티브 혈청 (예를 들면, Mys 136 혈청)으로 스크리닝된다.
- <121> 선택된 파고토프의 추가 스크리닝은 포지티브 또는 네가티브 혈청 또는 특이적인 HGV 모노클로날 항체의 거대 패널을 사용하여 수행될 수 있다. 선택된 파고토프는 ELISA 검정 또는 항체 생성에 직접 사용할 수 있다. 다른 방법으로서, 파고토프 코딩 뉴클레오타이드의 서열이 결정되고, 통상의 벡터/숙주 시스템에서 발현될 수 있고, 항원으로서 사용될 수 있다.
- <122> 상기 기술된 바와 같이 확인된 의사 폴리펩티드는 검출 검정에서 항원으로서 작용할 수 있거나 항원-특이적 항체의 생성에서 사용될 수 있다.
- <123> D. ELISA 및 단백질 블롯 스크리닝.
- <124> HGV 항원이 확인되는 경우, 전형적으로 상기에 기술된 바와 같은 플라크 면역스크리닝을 통해, 항원이 발현되고 정제될 수 있다. 그 후, 상기 항원은 예를 들면 단리된 항원 펩티드를 사용하는 ELISA 또는 단백질 블롯 검정법 (Western blots)과 같은 대안적인 면역검정을 이용하여, 다수의 추정되는 HGV 간염 혈청에 대해 신속히 스크리닝될 수 있다. 항원 폴리펩티드 융합체는 상기에 기술된 바와 같이 일반적으로  $\beta$ -갈락토시다아제 또는 글루타민-S-트랜스퍼라제와 같은 융합 파트너에 대한 친화성 크로마토그래피에 의해 단리될 수 있다. 다른 방법으로서, 항원 자체는 이것에 대해 생성된 항체를 사용하여 정제될 수 있다 (하기 참조).
- <125> 일반적인 ELISA 검정 포맷은 실시예 10에 제시된다. 할로우(Harlow) 등은 면역검정 및 항체/항원 스크리닝을 위한 많은 유용한 기술을 기술하고 있다.
- <126> 목적 항원을 포함하는 정제된 항원 폴리펩티드 또는 융합 폴리펩티드는 예를 들면 다중 웰 폴리스티렌 플레이트와 같은 고체 지지체에 부착된다. 시험되는 혈청은 희석되고, 웰에 첨가된다. 결합된 항원에 항체가 결합하기에 충분한 시간 후에, 혈청은 웰로부터 세척된다. 표지된 리포터 항체가 적당한 기질과 함께 각각의 웰에 첨가된다: 정제된 항원 폴리펩티드 또는 항원을 함유하는 융합된 폴리펩티드에 결합된 항체를 함유하는 웰은 포지티브 시그널에 의해 검출된다.
- <127> 본 발명의 폴리펩티드 항원을 사용하는 단백질 블롯 분석법에 대한 전형적인 포맷은 실시예 10에 제시된다. 일반적인 단백질 블롯팅법은 오수벨(Ausubel) 등에 의해 기술되어 있다. 실시예 10의 경우에, 470-20-1/sj26 융합 단백질은 다수의 혈청 샘플을 스크리닝하기 위해 사용된다. 실시예 10에 제시된 결과는 수 개의 다른 N-(ABCDE) 간염 혈청 공급원이 폴리펩티드 항원과 면역반응성을 증명한다.
- <128> 상기에 제시된 결과는 본 발명의 폴리펩티드 항원이 이러한 방법에 의해, HGV의 검출을 위해 추정되는 HGV 감염된 혈청 샘플의 패널에 대해 신속히 스크리닝될 수 있음을 증명한다.
- <129> E. 세포 배양 시스템, 동물 모델 및 HGV의 단리.



- <130> HGV 감염성 연구는 침팬지, 사이노몰구스 (*cynomolgus*) 원숭이 및 4마리의 미스택스 피검자에서 수행되어 왔다 (실시에 4H). 이러한 연구에 의해 상기 동물 모델에서의 HGV 감염성에 대한 추가의 정보가 수득되어 왔다. 본원에 기술된 HGV는 타마린, 사이노몰구스 원숭이 및 침팬지를 감염시킬 수 있는 장점을 가진다.
- <131> 다른 방법으로서, 감염된 동물 (침팬지, 비비, 원숭이 또는 사람)로부터 수득된 일차 간세포는 체외에서 배양될 수 있다. 분화된 영양류 간세포를 장기간 유지시킬 수 있는 성장 인자 및 호르몬이 보충된 혈청-비혈유 배지가 기술되었다(Lanford et al.; Jacob et al., 1989, 1990, 1991). 일차 간세포 배양물에 부가하여, 감염된 세포를 갖는 불멸화된 배양물이 또한 생성될 수 있다. 예를 들면, 일차 간세포 배양물은 다수의 세포 (HepG2와 같은)에 융합되어 적당한 불멸화된 세포주를 제공할 수 있다. 일차 간세포 배양물은 또한 종양유전자 또는 형질전환된 표현형을 유발시키는 유전자의 도입에 의해 불멸화될 수 있다. 이러한 종양유전자 또는 유전자는 SV40, 사람 세포성 종양유전자 및 엡스타인 바르 바이러스를 포함하여 당 분야에 공지된 많은 공급원으로부터 유래될 수 있다.
- <132> 또한, 감염되지 않은 간세포 (예를 들면, 원발성 또는 지속성 간종양 세포주)는 배양물중의 세포를 부분-정제된 입자 제제형 (예를 들면, 분별 원심분리법 및/또는 분자체법에 의해, 감염된 혈청으로부터 제조됨)으로서 또는 감염성 혈청으로 HGV에 노출시킴으로써 감염될 수 있다. 그 후, 이러한 감염된 세포는 증식될 수 있고, 바이러스가 본 발명의 기술분야에 공지된 방법에 의해 계대될 수 있다. 또한, 림프성 세포주와 같은 다른 세포 유형이 HGV의 증식을 위해 유용할 수 있다.
- <133> HGV의 단백질 유사성 연구는 플라비비리과내의 다른 바이러스와 유사한 아미노산 영역을 검출해왔다. 상기 바이러스과의 구성원들은 다양한 조직 배양 시스템 (ATCC-Viruses catalogue, 1990)에서 증식될 수 있는 것으로 공지되어 있다. 유사성에 의해, HGV는 하기 조직 배양 시스템중 하나 이상에서 증식될 수 있는 것으로 여겨진다: Hela 세포, 일차 햄스터 신장 세포, 원숭이 신장 세포, vero 세포, LLC-MK2 (붉은털 원숭이 신장 세포), KB 세포 (사람 구강 표피류 종양세포), 오리 배아세포, 일차 양 연수막 세포, 일차 양 맥락막 총 세포, 돼지 신장 세포, 소 배아 신장 세포, 소 비갑개 세포, 계배 세포, 일차 토끼 신장 세포, BHD-21 세포, 또는 PK-13 세포.
- <134> HGV의 발현에 부가하여, HGV 폴리뉴클레오타이드 서열, cDNA 또는 체외 전사된 RNA의 영역은 재조합 수단에 의해 조직 배양 세포내로 도입될 수 있다. 이러한 재조합 조각은 HGV의 개별 성분의 개별적 발현을 가능케 한다.
- <135> RNA 샘플은 감염된 조직 또는, 특히 감염된 세포 배양물로부터 제조될 수 있다. 상기 RNA 샘플은 겔상에서 분별화될 수 있고, 클로닝된 HGV 서열로부터 유래된 프로브를 이용하는 하이브리드화 분석을 위해 막에 전달될 수 있다.
- <136> HGV 입자는 본 발명의 기술분야에 공지된 방법에 의해, 감염된 혈청, 감염된 조직, 상기-기술된 세포 배양 배지, 또는 배양된 감염 세포로부터 단리될 수 있다. 이러한 방법은 음이온 및/또는 양이온 교환 물질을 이용하는 크기 분류법 (예를 들면, 한외여과법, 침전법, 침강법), 밀도를 기초로한 분리, 친수성 특성 및 친화성 크로마토그래피를 기초로한 기술을 포함한다. 단리 과정 동안에, HGV는 (i) 본 발명의 항-HGV 간염 관련된 항체를 사용하여, (ii) 확인된 HGV 핵산 서열을 기초로한 하이브리드화 프로브를 사용하여(예를 들면, 실시에 5), 또는 (iii) RT-PCR에 의해 확인될 수 있다.
- <137> HGV에 대해 유도된 항체는 면역친화성 크로마토그래피를 통해 HGV 입자의 정제에서 사용될 수 있다(Harlow, et al.; Pierce). HGV 폴리펩티드 또는 융합 폴리펩티드 (470-20-1과 같은)에 대해 유도된 항체는 항체가 이들의 면역선택성을 유지시키는 방식으로 고체 지지체에 고정된다. 항체를 고체 지지체에 상기와 같이 부착시키기 위해, 스페이서 그룹을 함유하는 2기능 커플링제 (Pierce; Pharmacia, Piscataway, NJ)가 자주 사용되어 항체의 항원 결합 부위의 접근성을 유지시킨다.
- <138> HGV 입자는 비제한적으로 면역형광 현미경법, 전자 현미경법, 입자를 구성하는 단백질의 웨스턴 블롯 분석법, 부분-정제된 입자를 이용하는 동물 및/또는 세포 시스템내에서의 감염 연구, 및 침강 특성을 포함하는, 표준 방법에 의해 더 특징화 될 수 있다. 실시에 5에 제시된 결과는 본 발명의 바이러스 입자가 엔벨로프되지 않은 바이러스 입자 보다는 엔벨로프된 바이러스 입자와 더욱 유사함을 암시한다.
- <139> HGV 입자는 HGV 게놈을 수득하기 위해 분해될 수 있다. 상기 입자의 분해는, 예를 들면 칼레이트 제의 존재하에서 세정제를 사용하여 처리함으로써 달성될 수 있다. 게놈 핵산은 그 후에 더 특징화될 수 있다. 특징화는 DNAse 및 RNase 선택도의 분석을 포함할 수 있다. 게놈의 색의 수 (실시에 41) 및 형태 (예를 들면, 환상)는 전자 현미경법 및 침강 특성법에 의한 가시화를 포함하여 본 발명의 기술분야에 공지된 기술에 의해 결정될 수 있다.
- <140> 단리된 게놈은 또한 전체 게놈을, 이것의 분할되는지의 여부 및 RNA 또는 DNA 게놈인지의 여부와 무관하게 서열분석할 수 있다 (예를 들면, RT-PCR, 염색체 워킹(walking) 기법, 또는 연속한 클로닝된 서열로부터의 프라이머를 사용하는 PCR을 이용하여). HGV의 전체 서열의 결정은 게놈 조직화 연구 및 공지된 바이러스 제제의 코딩 및 조절 서열과 HGV 서열의 비교를 가능하게 한다.
- <141> F. 항-HGV 간염 활성을 갖는 제제에 대한 스크리닝.
- <142> HGV의 증식을 위한 세포 배양물 및 동물 모델 시스템의 사용은 감염성 HGV의 생성을 억제시키는 항-간염제를 스크리닝하는 능력을 제공한다: 특히, HGV의 복제를 억제시키는 약제. 세포 배양물 및 동물 모델은 정상 세포 기능 및 생존성에 대한 이러한 항-간염 약제의 효과의 평가를 가능하게 한다. 잠재적인 항-바이러스 제제 (천연 생성물 또는 합성 화합물을 포함함: 예를 들면, 소분자, 진균 추출물과 같은 복합 혼합물, 및 안티-센스 올리고뉴클레오타이드)는 전형적으로 일정한 농도 범위에 걸쳐 항-바이러스 활성에 대해 스크리닝된다. 그 후, HGV 복제 및/또는 항원 생성에 대한 효과는 전형적으로 바이러스 거대분자 합성 또는 거대분자 (예를 들면, DNA, RNA 또는 단백질)의 축적을 모니터링함으로써 평가된다. 이러한 평가는 정상 세포 기능 (DNA 복제, RNA 전사, 일반적인 단백질 번역 등)에 대한 항-바이러스 제제의 효과에 대해 종종 이루어진다.

- <143> HGV의 검출은 본원에서 기술된 방법을 포함하여 많은 방법에 의해 달성될 수 있다. 예를 들면, 항체는 본 발명의 항원에 대해 생성될 수 있고, 상기 항체는 세포 배양물중의 HGV 항원을 확인 및 정량하기 위한 항체-기초 검정법 (Harlow, et al.)에서 사용될 수 있다. HGV 항원은 경합 검정법을 이용하여 배양물중에서 정량될 수 있다: 클로닝된 HGV 서열에 의해 엔코딩된 폴리펩티드는 이러한 검정법에서 사용될 수 있다. 전형적으로, 재조합적으로 제조된 HGV 항원 폴리펩티드는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 생성시키기 위해 제조되고 사용될 수 있다. 재조합 HGV 폴리펩티드는 리포터 분자를 사용하여 표지된다. 그 후, 이러한 표지된 폴리펩티드가 이것의 동족 항체에 결합하는 것의 억제제는 HGV 항원을 함유하는 샘플 (예를 들면, 세포 배양 배지 또는 혈청)의 존재하에 평가된다. 샘플중의 HGV 항원의 수준은 비표지된 재조합 단백질을 공지 농도로 사용하여 생성된 표준 곡선과 억제 수준을 비교함으로써 결정된다.
- <144> 본 발명의 HGV 서열은 세포 배양물 시스템중에서 생성된 HGV 핵산 서열의 양을 정량하기 위해 사용될 수 있는 폴리뉴클레오타이드 프로브/프라이머의 생성에 특히 유용하다. 이러한 정량은 많은 방법으로 달성될 수 있다. 예를 들면, 리포터 분자로 표지된 프로브는 감염된 세포 핵산을 갖는 표지된 프로브의 표준 도트-블롯 하이브리드화법 또는 경합 검정법에서 사용될 수 있다. 또한, 샘플중의 표적 핵산 수준을 정량하기 위한 중합효소 연쇄 반응을 이용하는 많은 방법이 있다(Osikowicz, et al.).
- <145> 보호 항체가 또한 세포 배양물 및 상기에 기술된 동물 모델 시스템을 사용하여 확인될 수 있다. 예를 들면, 폴리클로날 또는 모노클로날 항체는 본 발명의 항원에 대해 생성될 수 있다. 그 후, 이러한 항체는 세포 배양물 또는 동물을 감염시키기 전에 전염성 HGV-함유 접종물 (예를 들면, 혈청)을 예비-처리하기 위해 사용된다. 세포 배양물 또는 동물이 감염되는 것을 보호하는 단일 항체 또는 항체 혼합물의 능력이 평가된다. 예를 들면, 세포 배양물 및 동물내에서, 바이러스 항원 및/또는 핵산 생성의 부재는 스크린으로서 작용한다. 또한, 동물에서, 상승된 ALT 값과 같은 HGV 감염 질환 증상의 부재는 또한 보호 항체가 존재함을 암시한다.
- <146> 다른 방법으로서, 회복기 환자의 혈청은 보호 항체의 존재에 대해 스크리닝될 수 있고, 그 후 이러한 혈청은 항체와 결합하는 HGV 감염-관련 제제 항원을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 확인된 HGV 항원은 그 후에 재조합적으로 또는 합성적으로 제조된다. 항원이 보호 항체를 생성시키는 능력은 상기와 같이 시험된다.
- <147> 초기 스크리닝 후에, 보호 항체를 생성시킬 수 있는 것으로 확인된 단일 형태 또는 조합 형태인 항원은 시험 동물을 접종시키는 백신으로서 사용될 수 있다. 동물은 그 후에 전염성 HGV로 시험된다. 감염으로부터의 보호는 감염으로부터 자신을 보호하는 항체를 생성하는 동물의 능력을 나타낸다. 또한, 동물 모델을 사용함으로써 세포성 면역을 활성화시키는 항원이 확인될 수 있다.
- <148> 동물 모델 연구에서, 바이러스 제조물 (예를 들면, 감염된 혈청)에 의한 공격에 대응하는 보호 면역 반응은 (i) 감염으로부터 동물을 보호하거나 (ii) 질환의 발현을 억제한다.
- <149> G. 백신 및 보호 면역의 발생.
- <150> 백신은 본 발명의 방법에 의해 확인된 하나 이상의 면역원성 폴리펩티드로부터 제조될 수 있다. HGV로부터 단리된 서열 및 다른 공지된 바이러스 단백질 간의 계통 조직화 유사성은 효과적인 백신에 대한 후보체인 것으로 여겨지는 폴리펩티드에 관한 정보를 제공할 수 있다. 부가하여, 많은 컴퓨터 프로그램이 단백질 항원 결정인자 영역을 엔코딩하는 단리된 서열의 영역을 확인하기 위해 이용될 수 있다(참조: Hopp et al.; "ANTIGEN", Intelligenetics, Mountain View CA).
- <151> 활성 성분으로서 면역원성 폴리펩티드를 함유하는 백신은 전형적으로 용액 또는 현탁액으로서 주사가능한 형태로 제조된다. 또한, 면역원성 폴리펩티드는 수성 형태로 주사시키기 전에 재현탁시키기에 적당한 고체 또는 동결건조된 상태로 제조될 수 있다. 면역원성 폴리펩티드는 또한 리포솜내에서 에멀션화되거나 캡슐화될 수 있다. 상기 폴리펩티드는 이것과 양립가능한 약제학적으로 허용되는 부형제로 종종 혼합된다. 이러한 부형제는 비제한적으로 하기 성분 및 이들의 조합을 포함한다: 식염수, 물, 당 (덱스트로스 및 소르비톨과 같은), 글리세롤, 알코올(에탄올 [EtOH]과 같은) 및 본 발명의 기술분야에 공지된 성분. 또한, 백신 제제형은 습윤제, 에멀션화제 (예를 들면, 세정제) 및 pH 완충제와 같은 소량의 다른 보조 물질을 함유할 수 있다. 부가하여, 백신 제제형의 효과를 강화시키는 많은 보조제가 입수가 가능하다. 이러한 보조제의 예는 비제한적으로 하기를 포함한다: N-아세틸-무라닐-L-트레오닐-D-이소글루타민 및 N-아세틸-노르-무라닐-L-알라닐-D-이소글루타민, 및 수산화 알루미늄을 포함하는 관련 화합물의 군.
- <152> 본 발명의 백신에 사용되는 면역원성 폴리펩티드는 재조합되거나, 합성되거나 예를 들면 독성이 약화된 HGV 입자로부터 단리된 형태일 수 있다. 상기 폴리펩티드는 중성 또는 염 형태로 백신내로 포몰레이션되는 것이 보통이다. 약제학적으로 허용되는 유기염 및 무기염은 본 발명의 기술분야에 널리 공지되어 있다.
- <153> HGV 감염-관련 제제 백신은 비경구적으로 투여되고, 전형적으로 피하 또는 근육내 주사함으로써 투여된다. 다른 가능한 포몰레이션은 경구적 및 좌약 포몰레이션을 포함한다. 경구적 포몰레이션은 보통 부형제 (예를 들면, 약제학적 등급의당, 사카린, 셀룰로오스 등)를 사용하고, 일반적으로 10 내지 98%의 면역원성 폴리펩티드를 함유한다. 경구적 조성물은 알약, 캡슐, 정제, 용액, 현탁액, 분말 등의 형태를 취하고 지속 또는 장기 방출되도록 포몰레이션될 수 있다. 좌약 포몰레이션은 종래의 결합제 및 캐리어를 사용하고, 전형적으로 0.1 내지 10%의 면역원성 폴리펩티드를 함유한다.
- <154> 상기 정보의 견지에서, 하나 이상의 구조적 또는 비-구조적 바이러스-제제 폴리펩티드로 구성된 HGV 감염 관련 제제에 대한 다가 백신이 제조될 수 있다. 이러한 백신은 예를 들면 재조합 발현된 HGV 폴리펩티드, HGV 비리온으로부터 단리된 폴리펩티드, 합성 폴리펩티드 또는 모자이크 폴리펩티드 형태의 어셈블된 에피토프를 함유할 수 있다. 부가하여, 비활성화된 HGV의 사용을 통해, HGV 감염 감염에 대한 보호를 부여하는 백신을 제조할 수 있다. 이러한 비활성화는 바이러스 용해질의 제조 후, 용해질을 적당한 유기 용매, 세정제 또는 포르말린으로 처리함으로써 달성될 수 있다.
- <155> 백신은 또한 약독된 HGV 균주로부터 제조될 수 있다. 이러한 독성이 약독된 HGV는 상기에 기술된

세포 배양물 및/또는 동물 모델 시스템을 이용하여 수득될 수 있다. 전형적으로, 약독된 균주는 체외 또는 체내의 다중 계대배양 후에 단리된다. 약독된 균주의 검출은 본 발명의 기술분야에 공지된 방법에 의해 달성된다. 약독된 HGV를 검출하는 한 가지 방법은 HGV 항원에 대한 항체 프로브, 서열-특이적인 하이브리드화 프로브, 또는 감염된 동물에 대한 서열-특이적인 프라이머를 사용하는 증폭법 또는 HGV-감염된 체외 배양물의 검정법을 사용하는 것이다.

<156>

다른 방법으로서, 또는 상기 방법에 부가하여, 약독된 HGV 균주는 본 원에 제시된 정보로부터 수득될 수 있는 게놈 정보를 기초로하여 구성될 수 있다. 전형적으로, 예를 들면 바이러스 발병에 관련된 폴리펩티드를 엔코딩하는 감염성 체제 게놈의 영역은 결실될 수 있다. 상기 결실은 바이러스 복제를 간섭하지 않아야 한다. 또한, 재조합 약독된 HGV 구성물은 HGV에 대해 보호 면역 반응을 야기시킬 수 있는 에피토프(들)을 발현시킨다. 바람직한 면역 반응은 체액성 및 세포성 면역 둘 모두를 포함할 수 있다. 약독된 HGV의 게놈은 그 후에 세포 및 바이러스 복제가 가능한 조건하에서 성장된 세포를 형질전환시키는 데에 사용된다. 이러한 약독된 균주는 백신으로서 뿐만 아니라 바이러스 항원 및/또는 HGV 입자의 생성원으로 사용된다.

<157>

HGV 에피토프를 함유하는 하이브리드 입자 면역원도 또한 생성될 수 있다. HGV 에피토프의 면역원성은 에피토프가 공지된 입자 형성 단백질과 융합 또는 어셈블되는 진핵 시스템 (예를 들면, 포유동물 또는 효모 시스템)내에서 에피토프를 발현시킴으로써 강화될 수 있다. 이러한 한 가지 단백질은 B형 간염 표면 단백질이다. HGV 에피토프가 입자 형성 단백질에 대한 코딩 서열에 직접 결합되는 재조합 구성물은 HGV 에피토프 및 입자 형성 단백질에 대해 면역원성인 하이브리드 단백질을 생성시킨다. 다른 방법으로서, 입자 형성에 관여하지 않는 입자-형성 단백질 코딩 서열의 선택된 부분은 HGV 에피토프에 상응하는 코딩 서열로 대체될 수 있다. 예를 들면, 입자-형성 단백질에 특이적인 면역반응성의 영역은 HGV 에피토프 서열에 의해 대체될 수 있다.

<158>

B형 간염 표면 항원은 효모 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 포유동물 세포내에서 입자내로 발현되고 어셈블되는 것으로 밝혀졌다 (Valenzuela, et al., 1982 and 1984; Michelle, et al.). 이러한 입자는 강화된 면역반응성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 하이브리드 단백질을 사용하는 이들 입자의 형성, 즉, 이중 바이러스 서열을 갖는 재조합 구성물은 종래에 기술되어 졌다(EP0 175, 261, 1986년 3월 26일에 공개됨). HGV 에피토프를 함유하는 이러한 하이브리드 입자는 또한 백신 응용에서 유용할 수 있다.

<159>

본 발명의 백신은 포물레이션 방법과 양립가능한 투여량으로 투여되며, 이러한 양은 예방 또는 치료 요법에 약학적으로 유효한 양일 것이다. 투여되는 면역원의 양은 치료되는 피검자, 보호 면역 반응의 발생에 대한 치료되는 피검자 면역 시스템의 수용력, 및 바람직한 보호 수준에 의존한다.

<160>

본 발명의 HGV 백신은 1회량 또는 수 회 분량으로 투여될 수 있다. 투여량 섭생법은 치료 환자의 요구량 및 내성에 따라 또한 결정된다. HGV 면역원성 폴리펩티드에 부가하여, 백신 포물레이션은 다른 면역조절제와 함께 투여될 수 있다.

<161>

HGV 백신접종에 대한 또 다른 방법의 경우, 적당한 조절하에 있는 HGV 단백질을 엔코딩하는 DNA 구성물은 포유동물 조직내로 직접 체내 삽입된다. 이러한 구성물의 삽입은 "유전적 면역화"를 생성시킨다. 유사한 DNA 구성물이 세포 및 발현되는 엔코딩된 단백질에 의해 흡수되는 것으로 밝혀졌다 (Wolf, et al.; Ascadi, et al.). 주입된 DNA는 숙주 세포 염색질 또는 복제물내로 삽입되지 않는 것으로 나타난다. 이러한 발현은 동물 시스템내의 체내 바이러스 공격으로부터의 보호를 포함하여 중요한 체액성 및 세포성 면역 반응을 발생시킨다 (Wang, et al., 1993; Ulmer, et al.). 한 가지 구체예의 경우, DNA 구조물은 세포 DNA 흡수를 촉진시키기 위해 등장성 식염수 중의 메틸파라벤과의 염화수소 부피바카인 같은 국소 마취제를 사용하여 예비-처리한 후에 골격근내로 주입된다. 주입된 DNA 구성물은 근세포에 의해 흡수되고 엔코딩된 단백질이 발현된다.

<162>

가용성 바이러스 서브유닛 단백질과의 백신 접종과 비교하는 경우에, 유전적 면역화는 바이러스 단백질의 확실한 체내 발현이란 장점을 가진다. 이러한 바이러스 단백질은 숙주 세포 조직적합성 항원 및 천연 바이러스 감염과 함께 발생하는 다른 단백질과 함께 발현된다. 이러한 유형의 면역화는 많은 가용성 서브유닛 단백질 백신과는 대조적으로, 체액성 및 세포성 면역 반응을 모두 유도시킬 수 있다. 따라서, 이러한 유형의 면역화는 백신 접종에 대한 전염성 체제 및 수반되는 안전성 고려 없이도, 생존하는 약독화된 백신의 많은 유리한 특징을 유지한다.

<163>

바람직한 백신 항원을 엔코딩하는 플라스미드 또는 다른 DNA 구조물을 체내조직에 직접 주사하는 것은 한 가지 전달 수단이다. DNA 구조물을 전달하는 다른 수단도 또한 이용될 수 있다. 이러한 수단은 DNA를 리포솜, 양이온성 지질 시약 또는 시토펙틴 (리포펙틴 같은)을 사용하여 패키징시키는 다양한 지질-기초 방법을 포함한다. 이러한 방법은 펄그너(Felgner) 및 로즈(Rhodes)(1991)에 의해 요약된 바와 같이, 체내 흡수 및 발현을 촉진시킨다. 이러한 기초 방법에 대한 다양한 변형은 하기를 포함한다: (i) 특정 세포에 대한 표적화, (ii) 흡수 후에 DNA 구조물의 세포내 침전, 또는 (iii) 발현을 촉진시키기 위해, 펩티드 또는 다른 부분을 삽입시킴. 다른 방법의 경우에, 바람직한 백신 항원을 엔코딩하는 서열은 적당한 레트로바이러스 벡터내로 삽입될 수 있다. 생성되는 재조합 레트로바이러스 벡터는 백신 항원의 체내 발현을 위해 피검자내로 접종된다. 상기에 언급된 바와 같이, 이러한 방법은 바이러스 항원에 대한 체액성 및 세포성 면역을 모두 유도시키는 것으로 나타난다 (Irvin, et al.).

<164>

또한, 본 발명의 HGV 백신은 다른 백신 제제, 예를 들면 다른 간염 백신과 조합되어 투여될 수 있다.

<165>

H. 합성 펩티드.

<166>

HGV 폴리펩티드의 코딩 서열을 사용하여, 이러한 폴리펩티드와 유사한 합성 펩티드를 발생시킬 수 있다. 합성 펩티드는 상업적으로 합성되거나 본 발명의 기술분야의 표준 방법 및 장치 (Applied Biosystems, Foster City CA)를 이용하여 제조될 수 있다.

- <167> 다른 방법으로서, 펩티드를 엔코딩하는 올리고뉴클레오티드 서열은 올리고뉴클레오티드 합성 방법에 의해 직접 합성되거나, 거대 코딩 서열의 경우에는, 코딩 서열에 상응하는 다중 올리고뉴클레오티드 단편의 탠덤 정렬을 포함하는 일련의 클로닝 단계에 의해 합성될 수 있다 (Crea; Yoshio et al.; Eaton et al.). 올리고뉴클레오티드 코딩 서열은 표준 재조합 방법에 의해 발현될 수 있다 (Maniatis et al.; Ausubel et al.).
- <168> V. 바이러스 계능의 특징화.
- <169> 실시예 4에 도시된 바와 같이, HGV 계능은 RNA 분자인 것으로 나타나며, 플라비비리대와 바이러스로 분류되는 바이러스 서열과 최대 서열 유사성을 가진다. 이러한 패밀리에는 플라비바이러스 (Flavivirus), 페스티바이러스 (Pestivirus) 및 C형 간염 바이러스의 하나 이상으로 구성된 미분류된 속을 포함한다. HGV 바이러스는 하기에 논의되는 단백질 모티프를 제외하고는, 플라비비리대의 다른 인지된 일원과 현저한 포괄적 (예를 들면, 바이러스의 길이 걸쳐) 서열 동일성을 가지지 않는다.
- <170> 플라비비리대의 일반적인 일원으로는 수크로오스 구배중 1.1 내지 1.23 g/ml의 밀도를 가지고, 열, 유기 용매 및 세정제에 감응성인 엔벨로프된 바이러스이다. 실시예 5에 나타나는 바와 같이, HGV는 엔벨로프된 플라비비리대 바이러스 (HCV)와 유사한 밀도 특성을 가진다. HGV 비리온의 온전성은 유기 용매에 감응성인 것으로 또한 나타난다 (실시예 5).
- <171> 플라비비리대 비리온은 바이러스 단백질을 엔코딩하는 유일한 mRNA로서 또한 작용하는 선형 단일-가닥 (ss) RNA의 단일 분자를 함유한다. ssRNA 분자는 전형적으로 9 내지 12 킬로염기의 길이이다.
- <172> 바이러스 단백질은 성숙한 바이러스 단백질로 후속-프로세싱되는 한 가지 폴리단백질 전구체로부터 유래된다. 플라비비리대의 대부분의 일원들은 이들의 3' 말단에 폴리(A) 테일을 함유하지 않는다. 비리온은 약 15 내지 20 중량%이다.
- <173> 플라비비리대과에 속하는 구성원들은 코어 단백질 및 2개 또는 3개의 막-관련 단백질을 가진다. 플라비바이러스과중 3가지 속의 바이러스의 유사한 구조 단백질은 서열 수준에서 서로 거의 유사성을 나타내지 않는다. 비구조성 단백질은 RNA 의존성 RNA 중합효소 (RDRP), 헬리카아제, 및 세린 프로테아제에 대해 보존된 모티프를 함유한다. 이러한 보존된 아미노산 또는 모티프의 짧은 블록은 "MACAW"와 같이 본 발명의 기술분야에 공지된 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 검출될 수 있다 (Schuler, et al.). 이러한 모티프는 상기 단백질에 의해 프로세싱된 기질에 의해 부과되는 제약과 관련있는 것으로 생각된다 (Koonin and Dolja). 이러한 모티프의 순서는 플라비비리대과의 구성원에서 보존되어 있다. HGV의 계능은, 예를 들면 (i) 헬리카아제 유전자, (ii) 세린-유사 프로테아제 도메인, 및 (iii) RNA 의존성 RNA 중합효소 (RDRP)과 같은 플라비비리대과의 구성원에서 발견되는 단백질 모티프를 함유한다(참조: 도 5, "GDD" 서열).
- <174> 서열 정보는 본원에서는 HGV의 수 개의 상이한 균주/단리물에 대해 기술된다. 이러한 정보를 이용하여 본 발명의 당업자는 본원에 기술된 바와 같이 하이브리드화, 프라이머 신장, 및 RT-PCR법 (예를 들면, 기재된 HGV 변이체 서열을 기초로한 축퇴 프라이머를 사용하는)을 사용하여 신규한 균주/단리물을 단리시킬 수 있다.
- <175> 본 발명의 경우에, HGV는 플라비비리대과의 일원으로 여겨지는 신규한 단리물이다. 이러한 바이러스과내에서, 바이러스에 의해 엔코딩된 구조성 단백질의 조사는 바이러스 단리물이 구별되는 바이러스 종의 일원인지에 대한 가장 명확한 결정을 가능하게 한다. 비-구조성 단백질은 바이러스 종의 1개 과내에서 상이한 바이러스 종 사이에 대부분 보존되어 있다. 이는 하기와 같은 효소적 기능을 보존해야 할 필요성의 결과로 생각된다: 바이러스 폴리단백질의 단백질 가수분해성 절단, 및 바이러스 헬리카아제 및 바이러스의 RNA 의존성 RNA 중합효소에 의한 RNA 계능의 복제.
- <176> 플라비비리대과의 임의의 속, 예를 들면 플라비비리대 속내에서 수 개의 종에 대한 조사를 통해 이러한 보존된 기능을 위한 유전자가 구조성 단백질 보다 종간에 더욱 고도로 보존되어 있음이 입증되었다. 따라서, 바이러스 단리물이 공지된 종의 "변이체 단리물"에 대해 신규한 종을 나타내는 지에 대한 주요 결정인자중 하나는 공지된 바이러스 종과 신규한 바이러스 단리물 간의 구조성 단백질의 포괄적 상동성을 측정하는 것이다.
- <177> 비-구조성 단백질에서 발견되는 약 200개 이하의 아미노산의 영역내에서 발견되는 국소 상동성은 단리물이 변이체인지 또는 신규한 종인지에 대한 불확정 척도이다. 전형적으로, 약 40% 이하의 포괄적인 구조성 단백질 상동성을 갖는 바이러스 단리물은 다른 종 (바이러스) 또는 다른 속으로서 분류된다. HGV의 구조성 영역은 "GENBANK"에 기술된 임의의 바이러스와 비교하는 경우에, 각각 40% 이하의 상동성을 가진다 (비교는 본 발명의 기술분야의 표준 방법에 의해 수행됨). 따라서, HGV는 신규한 종이고, 가능하게는 포지티브 가닥 RNA 바이러스의 신규한 속인 것으로 간주된다.
- <178> 바이러스 단리물의 계통발생적 위치를 결정하기 위해 조사되는 또 다른 중요한 영역은 5' 내지 3' 비번역 영역 (UTR)이다. 이러한 영역은 바이러스 단리물 사이에서 비교된다. 예를 들면, 모든 HCV, 플라비비리대의 미분류된 속은 상기 속의 모든 다른 구성원들과 약 90% 이상이 보존되는 5' 비번역 영역을 가진다. 또한, HCV의 구성원들은 약 24 내지 약 50개 뉴클레오티드 길이의 3' 비번역 영역을 공유한다.
- <179> 5'-비번역 영역이 BLASTN상의 FASTA와 함께 질의 서열로서 사용되는 경우에는, "GENBANK" (Ver. 86)내의 임의의 바이러스에서 중요한 정렬이 발견되지 않는다. 또한, HGV는 임의의 다른 공지된 바이러스와 상동성이 거의 없는 약 250개 이상의 뉴클레오티드 길이인 3'-비번역 영역을 함유한다.
- <180> 플라비비리대과의 구성원들은 (i) 질병을 유발시키지 않는, 식물성 절지동물 벡터 (진드기 및 모기) 내지 (ii) 광범위한 척추동물 숙주 (사람, 영장류, 다른 포유동물, 유대류의 포유동물 및 조류)에 걸친 광범위한 동물내에서 복제되는 것으로 공지되어 있다. 플라비비리대과 중 30종 이상의 구성원이 사람에게 열병 또는 발진 내지 출혈열, 뇌염 또는 간염과 같은 잠재적으로 치명적인 질병을 유발시킨다. 플라비비리대과 중 10종 이상의 구성원은 가축에게 심각하고 경제적으로 중요한 질병을 유발시킨다.
- <181> VI. 이용성



<182> A. 발명.

<183> 한 가지 관점에서, 본 발명은 실질적으로 단리된 형태로 G형 간염 바이러스(HGV) 폴리펩티드로부터 유래된 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. 한 가지 구체예에서, HGV 폴리뉴클레오타이드는 (i) 영장류에서의 전염, (ii) A형 간염 바이러스(HAV), B형 간염 바이러스(HBV), C형 간염 바이러스(HCV), D형 간염 바이러스 및 E형 간염 바이러스(HEV)와 혈청학적으로 구별됨, 및 (iii) 플라비비리대 바이러스과의 일원임을 특징으로 한다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 DNA 또는 RNA (또는 이들의 유사체 또는 변이체)로 구성될 수 있고, 본 발명의 기술분야에 공지된 방법에 따라, 재조합적으로 생성, 단리 또는 합성될 수 있다.

<184> 일반적으로, 본 발명의 HGV 폴리뉴클레오타이드의 길이는 10개 이상의 뉴클레오타이드일 것이다. 또 다른 구체예에서, HGV 폴리뉴클레오타이드의 길이는 15개 이상의 뉴클레오타이드일 것이다. 또 다른 구체예에서, HGV 폴리뉴클레오타이드의 길이는 20개 이상의 뉴클레오타이드일 것이다.

<185> 특정 구체예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 HGV 게놈의 cDNA 또는 cDNA 상보서열을 포함한다. 특정 구체예에서, 이러한 cDNA 또는 cDNA 상보서열은 서열번호 14, 서열번호 37 및 서열번호 19, 또는 이들의 상보서열로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드와 40% 이상의 서열 상동성을 가질 것이다. 또 다른 구체예에서, 이러한 cDNA는 서열번호 14, 서열번호 37 및 서열번호 19, 또는 이들의 상보서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오타이드와 55% 이상의 서열 상동성을 나타낼 것이다. 특정 구체예에서, 본 발명의 cDNA 또는 cDNA 상보서열 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 14, 서열번호 37, 및 서열번호 19, 또는 이들의 상보서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로부터 유래된 서열을 가질 것이다.

<186> 또 다른 일반적인 구체예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 HGV와 특이적으로 하이브리드화되는 폴리뉴클레오타이드 프로브이다. 또 다른 일반적인 구체예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 HGV의 에피토프를 엔코딩할 것이다. 더욱 상세하게는, 상기 에피토프를 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 14, 서열번호 19 또는 서열번호 37로부터 유래되는 서열을 포함할 수 있다.

<187> 또 다른 일반적인 구체예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 HGV 폴리뉴클레오타이드와 선택적으로 하이브리드화될 수 있는 뉴클레오타이드의 연속 서열을 포함한다. 이에 관해, HGV는 하기 아미노산 서열 중 하나와 40% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 엔코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하는 게놈으로서 특징화된다: 서열번호 15의 2873개의 아미노산 서열, 서열번호 38의 190개의 아미노산 서열, 서열번호 20의 67개의 아미노산 서열. 더욱 특히, 폴리뉴클레오타이드 프로브는 HGV와 특이적으로 하이브리드화될 것이다. 검출 표지물 또는 다른 개질물을 함유하거나, 고체 지지체에 고정될 수 있다.

<188> 상기에 기술된 바와 같은 DNA 폴리뉴클레오타이드는 또한 HGV 특이적으로 면역 반응성인 항원 결정인자를 엔코딩할 수 있다. 이에 관해, HGV는 아미노산 서열을 엔코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하는, 게놈, cDNA 또는 이들의 상보서열을 가지는 것으로 특징화된다. 이러한 아미노산 서열은 하기 아미노산 서열 중 하나와 40% 이상의 서열 상동성을 가진다: 서열번호 15의 2873개 아미노산, 서열번호 38의 190개 아미노산 또는 서열번호 20의 67개 아미노산.

<189> 또 다른 특정 구체예에서, HGV 항원 결정인자와 특이적으로 반응하는 HGV-엔코딩 DNA 폴리뉴클레오타이드는 본 발명에 따라, 서열번호 15의 2873개 아미노산 서열, 서열번호 38의 190개 아미노산 서열 또는 서열번호 20의 67개 아미노산 서열에 대해 55% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함한다.

<190> 또 다른 특정 구체예에서, DNA 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 14, 서열번호 37 및 서열번호 19, 또는 이들의 상보서열로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드와 40% 이상의 서열 상동성을 나타낼 수 있다.

<191> 또 다른 구체예에서, 본 발명은 HGV-유래된 폴리펩티드를 엔코딩하는 DNA 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 더욱 특히, 상기 폴리뉴클레오타이드에 의해 엔코딩된 폴리펩티드는 HGV 게놈, cDNA 또는 이들의 상보서열에 의해 엔코딩된 15 내지 60개 이상의 아미노산의 연속 서열과 55%의 서열 상동성을 갖는 15 내지 60개 이상의 아미노산의 연속 서열을 포함한다.

<192> 특정 구체예에서, HGV-폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 PNF 2161 cDNA 공급원 람다 gt11 라이브러리내에 엔코딩될 수 있다. 또 다른 특정 구체예에서, DNA 폴리뉴클레오타이드는 HGV의 에피토프를 엔코딩할 수 있다. 추가 구체예에서, 폴리뉴클레오타이드는 HGV와 특이적으로 하이브리드화되는 프로브일 수 있다.

<193> 관련 일면에서, 본 발명은 HGV 폴리펩티드를 엔코딩하는 DNA 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 재조합 벡터를 포함한다. 또 다른 관련 일면에서, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 세포를 포함한다.

<194> 또 다른 관련 일면에서, 본 발명은 HGV 간염 바이러스 게놈, cDNA 또는 이의 상보서열과 특이적으로 하이브리드화되는 폴리뉴클레오타이드 프로브를 포함한다. 특정 구체예에서, 폴리뉴클레오타이드 프로브 서열은 서열번호 19, 서열번호 37, 또는 서열번호 14 또는 이들의 상보서열로부터 유래된 서열과 40% 이상의 서열 상동성을 가진다. 또 다른 특정 구체예에서, 폴리뉴클레오타이드 프로브는 서열번호 19, 서열번호 37 또는 서열번호 14, 또는 이들의 상보서열로부터 유래된다.

<195> 또 다른 관련 일면에서, 본 발명은 시험 피검자내의 HGV 간염 바이러스 핵산을 검출하는 방법을 포함한다. 상기 방법에 따르면, 샘플을 함유하는 핵산은 피검자로부터 수득된다. 그런 다음 상기 샘플은 HGV 간염 바이러스 게놈과 특이적으로 하이브리드화되는 1종 이상의 폴리뉴클레오타이드 프로브와 결합된다. 그 후에 HGV 핵산과 프로브와의 하이브리드화에 의해 형성된 HGV 핵산/프로브 복합체가 검출된다. 이러한 검출은 HGV 핵산에 대한 1종 이상의 리포터 잔기를 함유하는 프로브의 하이브리드화에 의해 달성될 수 있다.

<196> 특정 구체예에서, 상기 기술된 방법은 2개의 프로브(프라이머)가 HGV 핵산의 내부 영역을 규정

하는, HGV 핵산 특이적인 프로브의 사용을 포함한다. 이러한 구체예에서, 각 프로브는 HGV 핵산 내부 영역에 대해 3'-말단 내부를 함유하는 한가닥을 가진다. 상기 핵산/프로브 하이브리드화 복합체는 그 후에 프라이머 신장 반응에 의해 단편을 함유하는 이중-가닥 프로브로 전환된다. (i) 이중-가닥 단편을 변형시켜 단일-가닥 단편을 생성시키는 단계, (ii) 단일 가닥을 프로브와 하이브리드화시켜 가닥/프로브 복합체를 형성시키는 단계, (iii) DNA 중합효소 및 4개의 모든 데옥시리보뉴클레오타이드의 존재하에서 가닥/프로브 복합체로부터의 이중-가닥 단편을 생성시키는 단계, 및 (iv) 바람직한 정도의 증폭이 달성될 때까지 단계 (i) 내지 단계 (iii)을 반복하는 단계를 연속적으로 반복함으로써, 프로브-함유 단편이 증폭된다. 증폭 생성물은 그 후에 확립된 방법에 따라 확인된다. 본 발명은 방법은 증폭을 위해 사용되는 특이적인 프로브/프라이머 서열이 아닌 상기에 기술된 내부 영역과 선택적으로 하이브리드화될 수 있는 제 3의 폴리뉴클레오타이드 프로브를 추가로 포함할 수 있다.

<197> 또 다른 특정 구체예에서, HGV 핵산/프로브 복합체의 검출은 자력 서열 복제, 리가아제 연쇄 반응, 또는 가닥 치환 증폭과 같은 표적 증폭 방법에 의해 달성된다. 추가의 특정 구체예에서, 검출은 분지형 DNA 프로브 또는 Q-베타 복제효소법과 같은 시그널 증폭 기술을 사용하여 수행된다.

<198> 또 다른 관련 일면에서, 본 발명은 폴리뉴클레오타이드 유래된 HGV 간염 바이러스의 존재에 대해 샘플을 분석하기 위한 키트를 포함한다. 일반적인 구체예에서, 상기 키트는 HGV 폴리뉴클레오타이드와 특이적으로 하이브리드화되는 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 1종 이상의 폴리뉴클레오타이드 프로브 및 적합한 컨테이너를 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 키트는 HGV 폴리뉴클레오타이드의 내부 영역을 규정하는 2개의 폴리뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서, 각 프로브는 상기 영역에 대해 내부에 3'-말단을 함유하는 한 가닥을 가진다. 추가 구체예에서, 상기 프로브는 중합효소 연쇄 반응 증폭을 위한 프라이머로서 유용할 수 있다.

<199> 추가적인 관련 일면에서, 본 발명은 HGV 간염 바이러스 입자를 실질적으로 단리된 형태로 포함한다.

<200> 본 발명은 또한 HGV 간염 바이러스로부터의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 제조물을 실질적으로 단리된 형태로 포함한다. 이에 관해, 상기 HGV 바이러스는 하기와 같이 특징화된다; (i) 영장류에 있어서 전염될 수 있고; (ii) A형 간염 바이러스 (HAV), B형 간염 바이러스 (HBV), C형 간염 바이러스 (HCV), D형 간염 바이러스 및 E형 간염 바이러스 (HEV)와 혈청학적으로 구별되고; (iii) 플라비비리데 바이러스과의 일원이다. 상기에서 정의한 바와 같이 HGV 폴리펩티드는 화학 합성법 및 재조합 DNA 발현법을 포함하는 통상의 수단에 의해 제조될 수 있다. 이러한 폴리펩티드는 또한 고체상에 고정될 수 있다.

<201> 특정 구체예에서, 상기 폴리펩티드는 1종 이상의 항-HGV 항체와 특이적으로 면역반응성이다. 추가의 특정 구체예에서, 상기 폴리펩티드는 HGV와 특이적으로 면역반응성인 항원 결정인자를 포함한다. 이러한 관계에서, HGV는 서열번호 15의 2873개의 아미노산 서열, 서열번호 38의 190개의 아미노산 서열 또는 서열번호 20의 67개의 아미노산 서열과 40% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 엔코딩하는 오픈 리딩 프레임 (ORF)을 포함하는 게놈을 가짐으로써 특징화된다. 특정 구체예에서, 상기 ORF는 앞서 언급된 아미노산 서열중 한 서열과 55% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 엔코딩한다. 추가 구체예에서, 상기 폴리펩티드 서열은 서열번호 15의 2873개의 아미노산 서열 또는 이의 단편, 서열번호 38의 190개의 아미노산 서열 또는 이의 단편, 또는 서열번호 20의 67개의 아미노산 서열 또는 이의 단편으로부터 유래된다.

<202> 또 다른 특정 구체예에서, 상기 HGV 간염 바이러스로부터의 폴리펩티드는 HGV 게놈, cDNA 또는 이의 상보서열에 의해 엔코딩된 약 60개 이상의 아미노산의 연속 서열을 포함한다. 더욱 상세하게는, 이러한 펩티드 서열은 PNF 2161 cDNA 공급원 람다 gt11 라이브러리에 의해 엔코딩될 수 있다.

<203> 특정 구체예에서, 재조합적으로 발현되는 HGV 폴리펩티드는 서열번호 20, 서열번호 38 또는 서열번호 15로부터 유래된 폴리펩티드 서열을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 이러한 폴리펩티드는 서열번호 14 또는 서열번호 14의 상보서열로부터 유래된 서열에 의해 엔코딩될 수 있다.

<204> 추가적인 관련 구체예에서, 본 발명에 따라서, HGV 간염 바이러스 폴리펩티드는 HGV 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드를 포함하는 융합 폴리펩티드일 수 있다. 더욱 상세하게는, 이러한 융합 폴리펩티드는 제 2 폴리펩티드 시그널 서열로서  $\beta$ -갈락토시다아제 또는 글루타티온-S-트랜스퍼라제 단백질 서열을 포함할 수 있다. 다른 방법의 경우에, 제 2 폴리펩티드는 입자 형성 단백질을 포함할 수 있다.

<205> 상기-기술된 폴리펩티드는 구조성 또는 비-구조성 바이러스 단백질로부터 유래될 수 있다.

<206> 추가적인 관련 일면에서, 본 발명은, 적당한 조건하에서, HGV 간염 바이러스 게놈, cDNA 또는 이의 상보서열로부터 유래된 cDNA의 오픈 리딩 프레임 (ORF)을 발현시킬 수 있는 클로닝 벡터를 포함한다. 본 발명의 이러한 일면에서, 상기 ORF는 바람직한 숙주와 양립가능한 조절 서열에 작동가능하게 결합된다. 관련 일면에서, 본 발명은 이러한 벡터로 형질전환된 세포를 포함한다. 상기 벡터의 특정 구체예에서, 상기 ORF는 서열번호 14 또는 이의 상보서열로부터 유래될 수 있다. 추가적인 특정 구체예에서, 상기 ORF는 서열번호 37 또는 서열번호 19로부터 유래될 수 있다.

<207> 관련 일면에서, 본 발명은 HGV 간염 바이러스 폴리펩티드의 제조 방법을 포함한다. 상기 방법은 오픈 리딩 프레임 (ORF) 서열의 발현을 달성하는데 적당한 조건하에서 상기에 기술된 벡터를 함유하는 세포를 배양하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 ORF 서열은 서열번호 15, 서열번호 38 및 서열번호 20으로 구성된 폴리펩티드 서열 또는 이의 단편으로 구성된 군으로부터 선택되는 폴리펩티드 서열을 엔코딩한다. 또한, 상기 ORF 서열은 HGV cDNA, 또는 이의 상보서열로부터 유래될 수 있다. 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 벡터는 대장균 세포내에서 발현되는 람다 gt11 파아지 벡터이다.

<208> 추가적인 관련 일면에서, 본 발명은 HGV 간염 바이러스 감염에 대해 특이적인 항체를 함유하는 혈청을 스크리닝하는데 사용하기 위한 진단용 키트를 포함한다. 이러한 키트는 1종 이상의 항-HGV 항체와 특이적으로 면역반응성인 에피토프를 포함하는 실질적으로 단리된 HGV 폴리펩티드 항원을 포함할 수 있다. 이러한 키트는 또한 상기 항체가 항원에 결합하는 것을 검출하는 수단을 포함한다.

- <209> 이러한 키트에 관하여, HGV는 아미노산 서열을 엔코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)를 포함하는, 게놈, cDNA 또는 이의 상보서열을 가짐으로써 특징화된다. 이러한 아미노산 서열은 전형적으로 서열번호 15의 2873개의 아미노산 서열, 서열번호 38의 190개의 아미노산 서열 또는 서열번호 20의 67개의 아미노산 서열과 40% 이상의 서열 상동성을 가진다. 특정 구체예에서, 본 발명의 키트는 재조합적으로 제조되거나 화학적으로 합성된 폴리펩티드 항원을 포함할 수 있다. 본 발명의 키트의 폴리펩티드 항원은 또한 고체 지지체에 부착될 수 있다.
- <210> 특정 구체예에서, 상기-기술된 키트의 검출 수단은 상기 폴리펩티드 항원이 부착되는 고체 지지체를 포함한다. 이러한 키트는 또한 비-부착된 리포터-표지된 항-사람 항체를 포함할 수 있다. 이러한 구체예의 경우에, 항체와 HGV 폴리펩티드 항원과의 결합은 리포터-표지된 항체와 상기 항체와의 결합에 의해 검출될 수 있다.
- <211> 관련 일면에서, 본 발명은 시험 피검자에서 HGV 간염 바이러스 감염을 검출하는 방법을 포함한다. 이러한 검출 방법은 HGV 시험 피검자로부터의 혈청을 실질적으로 분리된 HGV 폴리펩티드 항원과 반응시키는 단계 및 결합된 항체의 존재에 대해 항원을 조사하는 단계를 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 고체 지지체에 부착되는 폴리펩티드 항원을 포함하고, 혈청은 이러한 지지체와 반응한다. 후속하여, 상기 지지체는 리포터-표지된 항-사람 항체와 반응한다. 상기 고체 지지체는 그 후에 리포터-표지된 항체의 존재에 대해 조사된다.
- <212> 추가 일면에서, 본 발명은 HGV 간염 바이러스 백신 조성물을 포함한다. 상기 조성물은 실질적으로 분리된 HGV 폴리펩티드 항원을 포함하며, 상기 항원은 1종 이상의 항-HGV 항체와 특이적으로 면역반응성인 에피토프를 포함한다. 펩티드 항원은 재조합 발현 또는 화학 합성을 포함하여 본 발명의 기술분야에 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 펩티드 항원은 바람직하게는 약제학적으로 허용되는 캐리어내에 약리학적으로 유효한 양으로 존재한다.
- <213> 추가적인 관련 일면에서, 본 발명은 HGV 간염 바이러스 에피토프와 특이적으로 면역반응성인 모노클로날 항체를 포함한다. 또 다른 관련 일면에서, 본 발명은 HGV와 특이적으로 면역반응성인 폴리클로날 항체의 실질적으로 분리된 제조물을 포함한다. 특정 구체예에서, 이러한 폴리클로날 항체는 친화성 크로마토그래피에 의해 제조된다.
- <214> 관련 일면에서, 본 발명은 HGV에 대한 항체를 제조하는 방법을 포함한다. 상기 방법은 피검자에게, 1종 이상의 항-HGV 항체와 특이적으로 면역반응성인 에피토프를 포함하는 실질적으로 분리된 HGV 폴리펩티드 항원을 투여하는 것을 포함한다. 상기 항원은 피검자내에서 면역 반응을 발생시키기에 충분한 양으로 투여된다.
- <215> 또 다른 관련 일면에서, 본 발명은 HGV 항원을 함유하는 혈청을 스크리닝하는데 사용하기 위한 진단용 키트를 포함한다. 상기 진단용 키트는 HGV 폴리펩티드 항원과 특이적으로 면역반응성인 실질적으로 분리된 항체 및 폴리펩티드 항원이 상기 항체에 결합하는 것을 검출하는 수단을 포함한다. 한 가지 구체예에서, 항체는 고체 지지체에 부착된다. 특정 구체예에서, 항체는 모노클로날 항체일 수 있다. 상기 키트의 검출 수단은 제 2의 표지된 모노클로날 항체를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 상기 검출 수단은 표지된 경쟁 항원을 포함할 수 있다.
- <216> 또 다른 관련 일면에서, 본 발명은 시험 피검자내에서 HGV 감염을 검출하는 방법을 포함한다. 본 발명의 이러한 일면에 따르면, 시험 피검자로부터의 혈청은 상기에 기술된 키트의 실질적으로 분리된 HGV 특이적인 항체와 반응한다. 상기 HGV 특이적인 항체는 그 후에 결합된 항원의 존재에 대해 조사된다.
- <217> 추가적인 관련 일면에서, 본 발명은 HGV로 감염된 시험관내에서 성장된 세포를 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 세포는 조직 배양으로 성장시킨 간세포이다. 더욱 상세하게는, 조직 배양 세포는 불멸화된 간세포일 수 있거나, HGV 감염된 영장류의 간에서 유래된 세포주로부터의 세포일 수 있다.
- <218> 관련 일면에서, 본 발명은 HGV를 증식시키는 방법을 포함한다. 상기 방법은 상기에 기술된 바와 같이, HGV의 증식을 촉진시키는데 유효한 조건하에서, 시험관내에서 성장시킨 HGV-감염 세포를 배양하는 것을 포함한다. 또 다른 관련 일면에서, 본 발명은 이러한 증식 방법에 의해 제조된 HGV 입자를 포함한다.
- <219> 추가 일면에서, 본 발명은 모자이크 폴리펩티드를 포함한다. 네이티브(native) HGV 코딩 서열에서 에피토프 사이에 정상적으로 개재하는 아미노산이 실질적으로 결핍된, 이러한 폴리펩티드는 HGV의 2종 이상의 에피토프를 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 모자이크 폴리펩티드는 고체 지지체에 부착된다. 추가적인 관련 일면에서, 본 발명은 상기에 기술된 모자이크 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산을 포함한다.
- <220> 또 다른 관련 일면에서, 본 발명은 시험 피검자내에서 HGV 감염을 검출하는 방법을 포함한다. 상기 방법은 피검자로부터의 항체-함유 샘플을 상기에 기술된 바와 같은 모자이크 폴리펩티드와 접촉시키는 단계 및 결합된 항체의 존재에 대해 항원을 조사하는 단계를 포함한다.
- <221> 추가적인 관련 일면에서, 본 발명은 HGV 백신 조성물을 포함한다. 상기 백신 조성물은 1종 이상의 HGV 에피토프를 포함하는 모자이크 폴리펩티드를 포함한다. 상기 모자이크 폴리펩티드는 약제학적으로 허용되는 캐리어중에 약리학적으로 유효한 양으로 존재한다.
- <222> B. HGV에 대한 면역검정.
- <223> 본 발명의 방법에 의해 수득된 항원에 대한 한 가지 유용성은 HGV 간염 바이러스로 감염된 시험 피검자의 혈청중에 존재하는 항체의 검출을 위한 진단용 시약으로서의 용도이며, 이에 의해 피검자내에서 감염이 표시된다; 예를 들면, 470-20-1 항원, 서열번호 14에 의해 엔코딩된 항원 또는 이의 상보서열, 및 완전한 바이러스 서열중 어느 한 가닥의 일부에 의해 엔코딩된 항원. 본 발명의 항원은 HGV를 검출하기 위해, 단독으로 사용되거나 서로 조합된 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 항원은 또한 HAV, HBV, HCV 및 HEV와 같은 다른 간염 제(agent)에 대한 진단용 검정물과 커플링될 수 있다.

- <224> 한 가지 진단적 구성에 있어서, 시험 혈청은 본 발명의 방법에 의해 수득된 표면-결합된 항원, 예를 들면 470-20-1 항원을 갖는 고체상 시약과 반응한다. 항-HGV 항체를 상기 시약에 결합시키고, 세척에 의해 비결합된 혈청 성분을 제거한 후에, 상기 시약을 고체 지지체상에 결합된 항-HGV항체의 양에 비례하여 리포터를 상기 시약에 결합시키기 위해 리포터-표지된 항-사람 항체와 반응시킨다. 상기 시약을 재세척하여 비결합되고 표지된 항체를 제거하고, 상기 시약과 결합된 리포터의 양을 결정한다. 전형적으로, 상기 리포터는 적당한 형광계용 또는 비색계용 기질(Sigma, St. Louis, MO)의 존재하에서 고체상을 인큐베이션시킴으로써 검출되는 효소이다.
- <225> 상기 검정에 있어서의 고체 표면 시약은 중합체 비드, 딥 스틱, 96-웰 플레이트 또는 필터 재료와 같은 고체 지지체 재료에 단백질 재료를 부착시키기 위한 공지 기술에 의해 제조된다. 이러한 부착법은 일반적으로 지지체에 단백질을 비특이적으로 흡착시키거나 활성화된 카르복실, 하이드록실 또는 알데히드기와 같은 고체 지지체상의 화학적 반응성기에 전형적으로 유리 아민기를 통해 단백질을 공유부착시키는 것을 포함한다. 다른 방법의 경우에, 스트렙타비딘 피복된 플레이트를 바이오티닐화된 항원(들)과 함께 사용할 수 있다.
- <226> 또한 본 발명의 형성부분은 이러한 진단법을 수행하는 검정 시스템 또는 키트이다. 상기 키트는 일반적으로 표면-결합된 재조합 HGV 항원 (예를 들면, 상기와 같은 470-20-1 항원), 및 표면-결합된 항-HGV 항원 항체를 검출하기 위한 리포터-표지된 항-사람 항체를 포함한다.
- <227> 균일 검정으로 공지된 제 2 진단적 구성에 있어서, 고체 지지체에 결합하는 항체는 매질내에서 직접 검출될 수 있는 반응 매질내에서 약간의 변화를 생성시킨다. 지금까지 제안된 균일 검정의 공지된 일반적 유형은 (a) 항원에 결합하는 항체가 보고된 이동성 (스핀 분열 피크의 확장)의 변화에 의해 검출되는, 스핀-표지된 리포터, (b) 결합이 형광 효능 또는 분극화의 변화에 의해 검출되는 형광 리포터, (c) 항체 결합이 효소/기질 상호작용을 유발시키는 효소 리포터, 및 (d) 결합이 리포솜 용해 및 캡슐화된 리포터의 방출을 유발시키는 리포솜-결합된 리포터를 포함한다. 본 발명의 단백질 항원에 대해 이러한 방법을 적합화시키는 것은 균일 검정 시약을 제조하는 종래의 방법을 따른다.
- <228> 상기에 기술된 각 검정법의 경우에, 검정법은 시험 개체로부터의 혈청과 단백질 항원을 반응시키는 단계 및 결합된 항체의 존재에 대해 항원을 조사하는 단계를 포함한다. 상기 조사 단계는 제 1 방법에서와 같이, 표지된 항-사람 항체를 조사하려는 (예를 들면, 급성, 만성 또는 회복기로부터) 항체에 부착시키는 단계 및 상기 지지체에 결합된 리포터의 양을 측정하는 단계를 포함하거나, 제 2 방법에서와 같이, 균일 검정 시약상에 결합하는 항체의 효과를 관찰하는 단계를 포함할 수 있다.
- <229> 제 3 진단적 구성은 HGV-특이적인 항원을 검출할 수 있는 HGV 항체의 사용을 포함한다. 상기 HGV 항원은, 예를 들면 후보 혈청 샘플내에 존재하는 HGV 항원이 HGV 특이적인 모노클로날 또는 폴리클로날 항체와 반응하는 항원 포획 검정법을 이용하여 검출될 수 있다. 상기 항체를 고체 기질에 결합시키고, 상기 항원을 그 후에 제 2의 다른 표지된 항-HGV 항체에 의해 검출한다. 항체는 표준 방법에 의해 본 발명의 펩티드를 이용하여 제조할 수 있다. 또한, 실질적으로 분리된 항체 (반응성에 영향을 미칠 수 있는 혈청 단백질을 본질적으로 비함유하는)가 발생할 수 있다 (예를 들면, 친화성 정제 (Harlow 등)).
- <230> C. HGV에 대한 하이브리드화 검정.
- <231> 본 발명의 방법에 의해 수득된 핵산 서열에 대한 한 가지 유용성은 혈청중에 존재하는 HGV 서열에 대한 진단용 제(agent)로서의 용도이며, 이에 의해 개체내에서 감염이 표시된다. 본 발명의 코딩 서열, 특히 클론 470-20-1 및 서열번호 14에서 유래된 프라이머 및/또는 프로브는 HGV를 검출하기 위해서, 단독으로 사용되거나 서로 조합된 형태로 사용될 수 있다.
- <232> 한 가지 진단적 구성에 있어서, 시험 혈청은, 예를 들면 470-20-1 서열에서 유래된 프라이머를 사용하는 PCR 또는 RT-PCR 조건하에서 반응된다. 증폭 반응에서 사용되는 혈청내에 HGV의 존재는 프라이머에 의해 표적화된 서열의 특이적인 증폭에 의해 검출될 수 있다. 실시예 4는 상이한 공급원 재료를 스크리닝하기 위해, 본 발명의 클론으로부터 유래된 프라이머를 사용하는 중합효소 연쇄 증폭 반응의 사용을 설명한다. 이러한 증폭 반응의 결과는 다양한 상이한 공급원 주형을 사용하는 증폭 반응에 의해 상동 서열을 검출하기 위해 본 발명의 클론 (예를 들면, 470-20-1)으로부터 유래된 프라이머의 능력을 증명한다. 실시예 4의 증폭 반응은 주형 재료로서 혈청으로부터 직접 수득된 핵산의 사용을 포함한다.
- <233> 다른 방법의 경우에, 프로브는 본 발명의 HGV 서열로부터 유래될 수 있다. 이러한 프로브는 그 후에 표지되고, 시험 혈청 또는 조직 샘플로부터 수득된 핵산에 대한 하이브리드화 프로브로서 사용될 수 있다. 상기 프로브는 다양한 리포터 분자를 사용하여 표지될 수 있고, 따라서 검출될 수 있다: 예를 들면, 방사성 동위원소 표지 및 화학발광 검출 리포터 시스템 (Tropix, Bedford, Mass.).
- <234> 중합효소 연쇄 반응, 자력 서열 복제법 [또한 "NASBA" (VanGemen, 등)으로도 공지된 "3SR"(Guatelli, et al.; Gingeras, et al., 1990)], 리가아제 연쇄 반응(Barany), 가닥-치환 증폭 ["SDA" (Walker)], 및 다른 기술에 의해 구체화되는 표적 증폭 방법은 표적 서열의 카피수를 증가시킨다. 분지형 DNA 프로브 (Horn and Urdea; Urdea, et al.) 및 Q-베타 복제효소법 (Cahill, et al.; Lomell, et al.)에 의해 예시되는 시그널 증폭법은 먼저 특이적인 분자 프로브를 결합시키고, 그 후에 상기 프로브의 전체 또는 일부를 복제하거나 다른 방법으로 프로브 시그널을 증폭시킨다.
- <235> 본 발명에 기술된 특이적인 핵산 서열 또는 동일하거나 유사한 (관련) 바이러스 게놈내의 연속 서열의 검출을 위해서, PCR에 의한 증폭을 위한 대안법으로서 증폭 및 검출 방법을 사용할 수 있다. 많은 이러한 기술은 핵산 진단학 분야에 공지되어 있다 [참조: The 1992 San Diego Conference: Genetic Recognition, Clin. Chem. 39(4): 705 (1993)].
- <236> 1. 자력 서열 복제.
- <237> 자력 서열 복제 (3SR)법은 PCR과 강도는 유사하지만 등온적인 증폭을 야기시킨다. 씨멀 사이클-구동되는 PCR보다는, 3SR은 a) 역전사효소에 의한 cDNA 합성, b) RNase H에 의한 RNA 가닥 분해, 및 c)



T7 RNA 중합효소에 의한 RNA 전사의 협조된 3-효소 반응으로서 작동한다.

- <238> 전체 반응 서열이 등온적으로 (전형적으로 42℃) 발생되므로, 고가의 온도-사이클링 장치는 불필요하다. 가열, 유기용매 또는 다른 메카니즘의 의한 듀플렉스의 부재하에서, 단지 단일-가닥 주형 (즉, 우세하게 RNA)만이 증폭된다.
- <239> 3SR 증폭에서 사용하기에 적당한 프라이머는 당업자에 의해 본 발명의 바이러스 서열로부터 선택될 수 있다. 예를 들면, 3SR법에 의한 바이러스 서열의 등온 증폭을 위해, 프라이머 470-20-1-77F (서열번호 9)를 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 대해 바람직한 T7 프로모터 서열 및 T7 전사 개시 부위를 첨가함으로써 변형시킨다. 이러한 변형은 적당한 3SR 프라이머 T7-470-20-1-77F (서열번호 9)를 생성시킨다. 프라이머 470-20-1-211R (서열번호 10)은 변형 또는 T7 프로모터중 어느 하나 없이도 이러한 반응에 사용할 수 있다.
- <240> PNF 2161로부터 추출된 RNA를, 20mM의 Tris-HCl, pH 8.1 (실온에서), 15mM의 MgCl<sub>2</sub>, 10mM의 KCl, 2mM의 스피리딘 HCl, 5mM의 디티오프레이트 (DTT), 각각 1mM의 dATP, dCTP, dGTP, 및 TTP, 각각 7mM의 ATP, CTP, GTP 및 UTP, 및 0.15 μM의 각 프라이머를 함유하는 100 μl 반응액중의 AMV 역전사효소 (30U), RNase H (3U), T7 RNA 중합효소 (100U)와 함께 인큐베이션시킨다. 증폭은 42℃에서 1 내지 2시간 동안 인큐베이션시키는 동안 발생한다.
- <241> 초기에, 프라이머 T7-470-20-1-77F를 표적 RNA에 어닐링시키고, AMV 역전사 효소에 의해 신장시켜 개시 RNA 가닥에 상보적인 cDNA를 생성시킨다. RNase H에 의해 RNA 가닥을 분해시킨 후에, 역전사효소는 제 2 가닥 DNA의 합성을 촉매하여, (이중-가닥) T7 프로모터 서열을 함유하는 이중-가닥 주형을 생성시킨다. RNA 전사에 의해 단일 가닥 RNA가 생성된다. 이러한 RNA는 그 후에 증폭의 추가 라운드를 위해 사이클로 재진입하고, 최종적으로 고농도의 생성물 RNA를 갖는 풀물이 생성된다. 상기 생성물은 매우 적은 양의 DNA와 함께, T7 프로모터(T7-470-20-1-77F)를 함유하는 프라이머와 동일한 가닥의 단일-가닥 RNA가 우세하다.
- <242> 다른 방법의 경우에, 다른 프라이머 (470-20-1-211R)는 T7 프로모터를 함유할 수 있거나, 두 프라이머는 모두 프로모터를 함유할 수 있으며, 이는 반응 생성물로서 RNA의 양 가닥을 생성시킨다. 3SR 반응의 생성물은 RNA의 표준 분석법 (예를 들면, 노던 블롯, RNA 슬롯 또는 도트 블롯, RNA-염색 염료를 사용하는 직접적인 겔 전기영동)에 의해 검출되고, 특징화되거나 정량될 수 있다. 또한, 상기 생성물은 바 이오틴-아비딘 친화성 상호작용 또는 핵산 프로브의 특이적인 하이브리드화를 이용하는 방법에 의해 검출될 수 있다.
- <243> 3SR 생성물의 신속하고 특이적인 분석을 위한 한 가지 기술의 경우에, 방사성표지된 올리고뉴클레오타이드 470-20-1-152R (서열번호 21)에 대한 생성물의 용액 하이브리드화는 비-변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 수행된다. 이러한 검정 (겔 이동성 시프트-타입 검정)을 통해 하이브리드화되지 않은 올리고뉴클레오타이드에 상응하는 밴드 보다 느리게 이동하는 밴드로서 특이적인 프로브-생성물 하이브리드가 검출된다.
- <244> 2. 리가아제 연쇄 반응 (LCR)
- <245> 검출 시스템의 또 다른 예로서, HGV 서열은 리가아제 연쇄 반응 (LCR) 프라이머의 디자인을 위한 기초를 형성할 수 있다. LCR은 연속 5'-포스페이트 ("공여체" 올리고) 및 3'-하이드록실 ("수용체" 올리고) 말단을 갖는 2개의 바로 연속한 올리고뉴클레오타이드를 연결시키는 DNA 리가아제의 Nick-클로징 활성을 사용한다. 주형-의존성 방법으로 완전히 상보적인 말단 만을 연결하는 DNA 리가아제의 특성은 고도의 특이성을 유도시키며, 이러한 연결은 연결되는 말단이 표적 가닥과 서열이 완전히 매칭되지 않으면 발생하지 않는다.
- <246> 프라이머 및 표적 핵산 사이의 단일 염기 미스매치의 식별을 위한 특이성의 견지에서 장점을 갖는 PCR에 대한 대안으로서, LCR은 HGV 서열에 대해 상동성을 갖는 바이러스의 균주를 검출하거나 "타입결정"하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 기술은 상기 염기 변화가 약물 내성을 부여하는 것으로 공지된 경우에, 특이적인 돌연변이의 존재를 평가하는데 적당하다(Larder and Kemp; Gingeras, et al., 1991).
- <247> 주형-상보적 공여체 및 수용체 올리고뉴클레오타이드 및 상기 공여체 및 수용체에 대해 상보적인 올리고뉴클레오타이드의 존재하에서, LCR에 의한 지수적 증폭이 가능하다. 이러한 구제예에서, 연결의 각 라운드는 사이클 반응에서, 후속 라운드를 위한 추가 주형을 생성시킨다.
- <248> 예를 들면, 프라이머 470-20-1-211R (서열번호 10), 연속 올리고뉴클레오타이드 (B, 서열번호 22) 및 동족 올리고 (211R', 서열번호 23, 및 B', 서열번호 24)를 사용하여 본 발명의 서열의 LCR 증폭을 수행할 수 있다. 역전사를 cDNA를 생성시키기 위해 표준 방법에 의해 먼저 수행하며, 이를 그 후에, 각 0.1-1 μM의 4개의 LCR 프라이머, 20mM의 Tris-HCl, pH 8.3 (실온), 25mM KCl, 10mM의 MgCl<sub>2</sub>, 10mM의 디티오프레이트 (DTT), 0.5mM의 NAD<sup>+</sup>, 0.01%의 Triton X-100, 및 5 유닛의 DNA 리가아제 (참조: Ampligase, Epicentre Technologies, Madison, WI, 또는 열안정성 DNA 리가아제의 다른 상업적 공급자)를 포함하는 25μl의 반응액에서 증폭된다.
- <249> 써멀 사이클링은 94℃에서 1분 30초 간, 94℃에서 1분간, 65℃에서 2분간 수행하고, 25-40 사이클 동안 반복한다. 생성물 합성의 특이성은 3'-말단 위치에서의 프라이머-주형 매치에 의존한다. 생성물을 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 검출하고, 에티뮴 브로마이드 염색을 수행한다; 다른 방법으로서, 하나의 수용체 올리고 (211R' 또는 B)는 겔 전기영동 후에 방사선 자동 사진법에 의한 가시화를 위해 5'-방사능표지시킨다.
- <250> 다른 방법으로서, 고체상 포획 및 검출을 위해, 공여체 올리고는 특이적인 결합성 부분 (예를 들면, 바 이오틴)으로 3'-말단-표지되고, 수용체는 특이적인 검출성기 (예를 들면, 형광 염료)로 5'-표지된다.

### 3. 증폭된 DNA의 분석법.

많은 방법이 증폭된 DNA의 분석에 대해 기술되어 왔다. 이러한 기술중 일부는 고-배출 적용에 유리하며, 이 경우에 겔 전기영동은 비실용적이고, 예를 들면 신속한 고-해상 HPLC법 (Katz and Dong)이 적당하다. 그러나, 일반적으로, 핵산 프로브를 사용하는 감염성 질병 생물체 스크리닝은 병원체 검출을 위해 필요한 특이성을 확정하기 위한 별도의 증폭후 하이브리드화 단계를 포함한다.

이러한 한 가지 검출 구체에는 친화성-기초 하이브리드 포획법이다(Holodniy, et al.). 이러한 구체에서, PCR은 하나의 바이오티닐화된 프라이머로 수행한다. 증폭시킨 후에, 이중가닥 생성물을 변성시킨 다음에 혼합된 바이오티닐화된 프라이머를 갖는 가닥에 상보적인 퍼옥시다아제-표지된 프로브와 하이브리드화시킨다. 그런 다음 상기 하이브리드화된 생성물을 아비딘 (또는 스트렙타비딘) 피복된 표면 (예를 들면, 막 필터, 마이크로웰, 라텍스 또는 상자성 비드)와 접촉하는 완충액중에서 인큐베이션시킨다.

본 발명의 방법에 의해 분석하려는 PCR 생성물의 부피와 접촉하는 다량의 피복된 고체상은 더욱 낮은 농도의 바이오티닐화된 PCR 생성물 뿐만 아니라 모든 유리 바이오티닐화된 프라이머를 본질적으로 포획하기에 충분한 바이오틴-결합 부위를 함유해야 한다. 상기 고체상을 3회 내지 4회 세척시킨 후에, 결합된 하이브리드화된 생성물은 과산화수소를 함유하는 시트르산 완충액내에서 o-페닐렌디아민과의 인큐베이션에 의해 검출된다.

다른 방법으로서, 포획은 프로브-피복된 표면에 의해 매개된 후에, 바이오티닐화된 프라이머 및 아비딘-리포터 효소 컨쥬게이트에 의한 친화성-기초 검출이 수행될 수 있다(WhetseII, et al.).

### 4. 추가 방법

본 발명의 바이러스 서열은 또한 분지형 DNA 프로브를 사용하여, 검출에 대한 시그널 증폭 방법을 위한 기초를 형성할 수 있다. 분지형 프로브 (Horn and Urdea; Urdea)는 HIV RNA 및 DNA의 검출 및 정량에 대해 기술되어 왔다 (Urdea, et al.). 이러한 방법의 경우에, 올리고뉴클레오타이드 프로브 (RNA, DNA 또는 핵산 유사체)는 표적 RNA 또는 DNA에 상보적인 서열을 사용하여 합성된다. 상기 프로브는 독특한 분지형 서열 또는 표적 RNA 또는 DNA에 비상보적인 서열을 또한 함유한다.

이러한 독특한 서열은 분지형의 2차 검출기 프로브의 하이브리드화를 위한 표적을 구성하고, 각 프로브는 3차 프로브를 위한 표적으로서 작용하는 하나 이상의 상이한 독특한 서열을 함유한다. 시그널 증폭 경로내의 각 분기점에서, 상이한 독특한 서열은 2차, 3차 등의 검출 프로브의 하이브리드화를 유도한다. 연속물중 최종 프로브는 전형적으로 검출에 유용한 효소 (예를 들면, 알칼리 포스파타아제)에 결합된다. 프라이머의 순차적인 하이브리드화는 결과적으로 고도의 분지형 구조의 성장을 야기시키고, 이러한 구조의 아암은 효소-결합된 프로브내에서 종결된다.

효소적 턴오버 (turnover)는 최종 증폭을 제공하며, 고도로 민감한 화학발광성 기질 (예를 들면, LumiPhos(Lumigen, Detroit, MI), 알칼리 포스페이트 표지에 대한 기질로서)의 선택은 검정 당 원래 표적 서열의 10,000개 이하의 분자와 비슷하게, 예민한 민감성을 초래한다. 이러한 검출법의 경우에, 증폭은 효소적 메카니즘보다는 분자 하이브리드화에만 의존하며, 이와 같은 임상 표본에서의 억제물질에 대해 예를 들면 PCR 보다 감수성이 훨씬 낮다. 이와 같이, 이러한 검출법은 검정전의 대규모 정제 없이, 시험 샘플내에서의 핵산 방출에 대한 미정제법의 사용을 가능하게 한다.

본 발명의 바이러스 서열의 민감한 검출을 위한 증폭은 Q-β 복제효소법에 의해서도 달성될 수 있다(Cahill, et al.; Lomell, et al.; Pritchard, et al.). 이러한 방법의 경우에, 특이적인 프로브는 표적 서열에 상보적이도록 디자인된다. 상기 프로브는 그 후에 표준 분자 클로닝법에 의해 Q-β 파아지로 부터의 복제가능한 RNA의 서열내로 삽입된다. 레플리콘의 특이적인 영역내로의 삽입은 Q-β 복제효소에 의한 복제를 방해하지 않는다.

분자 하이브리드화 및 여러 사이클의 세척 후에, 복제효소가 첨가되고, 프로브 RNA의 증폭이 일어난다. "가역적인 표적 포획"법은 하이브리드화되지 않은 프로브의 복제 (Morrissey, et al.)로부터의 잠재적 배경을 감소시키는 한 가지 공지기술이다.

증폭된 레플리콘은 DNA, RNA 또는 핵산 유사체 프로브를 사용하는 표준 분자 하이브리드화 기술에 의해 검출될 수 있다.

HIV DNA 또는 RNA 서열의 증폭 및 검출을 위한 추가 방법은 문헌에 공지되어 있으며, 분자 진단학 분야의 일부 적용을 위한 PCR에 대해 바람직하다. 이러한 대안적인 기술은 본 발명에 기재된 서열의 검출, 특징화 (예를 들면, 본원에 기술된 서열의 다중-관련성 군주로서 존재하는 서열 다양성, 약물 내성의 인자형 변화 특징), 또는 정량을 위한 기초를 형성할 수 있다.

또한, 본 발명의 형성부는 바로 앞에 기술된 증폭/하이브리드화 검정법을 수행하기 위한 검정 시스템 또는 키트이다. 이러한 키트는 일반적으로 증폭 반응 또는 하이브리드화 프로브에서 사용하기 위한 특이적인 프라이머중 어느 하나를 포함한다.

### D. 치료 용도.

상기에 기술된 바와 같이, 본 발명의 HGV 항원은 백신 제조에서 사용될 수 있다.

또한, 본 발명의 폴리펩티드 항원에 대해 생성된 항체는 수동적 면역치료 또는 수동적 면역예방에 사용될 수 있다. 상기 항체는 항체의 다른 치료적 투여에 사용되는 양과 유사한 양으로 투여될 수 있다. 예를 들면, 폴링된 감마 글로불린은 감염의 확립을 간섭하는 광견병, 홍역 및 B형 간염과 같은 다른 바이러스 질병의 초기 인큐베이션 동안에, 체중 11b 당 0.02 내지 0.1 ml로 투여된다. 이와 같이, HGV 항원과 반응성인 항체는 단독으로 수동 투여되거나 HGV로 감염되는 숙주에 대한 또 다른 항-바이러스성 제 (agent)와 함께 수동 투여되어, 감염을 처리하는 숙주의 능력을 강화시킨다.

- <268> 본원에 기재된 HGV 서열은 플라비비리대과의 일원으로서 HGV임을 증명한다(상기 참조). 플라비비리대는 3가지 속인 플라비바이러스(flavivirus), 페스티바이러스(petstivirus) 및 C형 간염 바이러스 속으로 분류된다 (Francki, et al.). 모든 플라비비리대는 3000 내지 4000개의 아미노산의 긴 단일 폴리펩티드를 엔코딩하는 9.0 내지 12kb 길이의 포지티브 가닥 RNA 게놈을 가진다. 이러한 폴리펩티드는 바이러스 캡시드 단백질, 바이러스 엔벨로프 단백질(들) 및 최소한 5개의 비-구조성 단백질 (NS)을 포함하여, 약 10개의 단백질로 단백질가수분해적으로 절단된다. 비-구조성 단백질은 키모트립신-유사 세린 프로테아제, RNA 헬리카아제(NS3), 및 RNA-의존성 RNA 중합효소 (NS5)를 포함한다. 플라비비리대의 NS 단백질은 바이러스 폴리펩티드의 단백질가수분해적인 절단을 위해 요구된다. 상기 NS 단백질은 바이러스 게놈의 복제를 위해 요구된다 (Chambers, et al., 1990a).
- <269> 부가적으로, 수 개의 세포성 단백질이 플라비비리대의 복제에 관여하는 것으로 확인되었다. 예를 들면, 세포성 시그널 펩티다아제 효소는 수 개의 절단 부위에서 바이러스 폴리펩티드를 절단시켜, 바이러스 프로테아제를 발현시키기 위해 요구될 수 있다 (Hijikata, et al.).
- <270> 플라비바이러스 복제에서 요구되는 기능의 수행시에 상기 단백질을 방해하는 억제제는 HGV에 의한 감염의 치료에서도 또한 치료적 가치를 가질 수 있다. 최종적으로, 항바이러스 활성을 가지고, 사람 면역계를 조절하는 사이토카인 또는 다른 폴리펩티드는 HGV 감염의 치료에 효과적일 수 있다.
- <271> 유사체에 의해 HGV의 NS5 단백질의 활성을 억제하는 것으로 예상될 수 있는, 플라비비리대 RNA 의존성 RNA 중합효소를 억제하는 것으로 공지된 한 가지 화합물은 리바비린으로도 공지된 뉴클레오타이드 유사체 1-B-D-리보푸라노실-1-2,4-트리아졸 3-카르복사미드 (Patterson, et al.)이다. 리바비린의 작용 방법은 세포간 구아닌 푸울의 고갈 및 바이러스 RNA의 캡핑의 방해와 관련된 것으로 생각된다(Patterson, et al.).
- <272> HCV로 감염된 개체의 경우에, 바이러스 역가 및 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT— 간 기능장애에 대한 표지 효소)의 혈청 수준의 현저한 감소는 리바비린이 투여되는 동안에 관찰된다 (Reichard, et al.; Di Bisceglie, et al., 1992). 리바비린이 플라비비리대 감염의 치료에 대해 광범위한 효능을 가지는 것으로 나타나므로, HGV-유도된 간 질환이 있는 환자에 리바비린을 투여한 후에는, 유리한 결과가 예상된다.
- <273> 플라비비리대 감염의 치료에 효능이 있는 것으로 공지된 화합물의 또 다른 클래스는 사이토카인 인터페론  $\alpha$ , 인터페론  $\beta$  및 인터페론  $\gamma$ 를 포함한다 (Baron, et al.; Gutterman). 인터페론은 (i) 바이러스 RNA의 복제 및 번역을 방해하는 세포성 단백질 발현의 유도, (ii) 사람 세포성 면역계의 성분의 활성화 둘 모두에 의해서 항바이러스제의 역할을 하는 것으로 생각된다 (Baron, et al.). 상기 인터페론은 HBV, HDV 및 HCV에 의한 감염을 포함하는 바이러스 감염의 치료에 대해 광범위한 적용성을 가진다 (Gutterman; Farci, et al.). 특히, 복합적인 연구는 단독형태 또는 다른 항바이러스 치료와 조합된 형태의 인터페론이 C형 간염 바이러스에 의한 감염의 치료에 효과적임을 나타냈다 (Di Bisceglie, et al., 1989; Kakumu, et al.). HGV의 명백한 간친화성 특성 및 플라비비리대과에서의 이의 분류, 이 두 사실로 인해, HGV 감염은 유사한 인터페론 치료에 대해 반응하는 것으로 예측된다.
- <274> 강력한 항바이러스 활성을 갖는 화합물의 또 다른 클래스는 바이러스 프로테아제의 억제물질이다 (Krausslich, et al.). 모든 플라비비리대는 비-구조성 영역의 다중 부위에서 게놈 폴리펩티드의 다중 부위를 절단하기 위해 요구되는 키모트립신 유사 세린 프로테아제를 엔코딩한다. 이러한 프로테아제의 촉매 부위를 구성하는 아미노산 잔기는 널리 기술되어 있고, 히스티딘, 아스파르트산 및 세린 잔기를 포함한다 (Grakoui, et al.). 플라비바이러스인 황열 바이러스의 추가 연구는 활성 부위의 세린 잔기의 돌연변이가 바이러스 복제를 억제시킨다는 것을 나타내었다 (Chambers, et al., 1990b).
- <275> HGV NS3 단백질의 억제제는 효소적 절단의 전이 상태를 모방하도록 디자인될 수 있다. 다른 방법으로서, 이러한 억제제는 종래에 합성된 화합물의 매스 스크리닝에 의해 단리될 수 있다. 추정 HGV NS3 단백질 분해효소 억제제의 활성은 플라비비리대 연구에서 널리 사용되는 시험관내 전사/번역 시스템의 사용을 통해 결정될 수 있다 (Hijikata, et al.; Grakoui, et al.).
- <276> 다른 방법으로서, HGV 게놈은 바쿨로바이러스 또는 백시니아와 같은 진핵세포 단백질 발현에 적합한 벡터내로 클로닝될 수 있고, 상기 화합물의 효능은 조직 배양 시스템내에서 결정될 수 있다 (Grakoui, et al.). 유사한 방법은 HIV 프로테아제의 강력한 억제제를 수득하기 위해 성공적으로 사용되어 왔다 (Vacca, et al.; Roberts, et al.).
- <277> HGV에 의한 감염에 의해 유발된 질병을 치료하는 또 다른 방법은 본 발명에서 기술된 HGV의 서열의 일부를 엔코딩하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(Tonkinson and Stein) 또는 올리고뉴클레오타이드 유사체의 합성에 의존한다. 모든 플라비비리대에 일정하므로, HGV의 게놈이 9 내지 12kb 크기의 포지티브 가닥 RNA 분자임이 예측된다. 바이러스 게놈의 단일 가닥 특성은 HGV를 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 예민하게 민감성으로 만들어야 한다. 바이러스 복제를 억제하는 데에 사용될 수 있는 표적 서열은 HGV의 5'-비번역 영역, HGV의 리보솜 결합 부위 또는 HGV 게놈의 번역을 방해하는 다른 서열을 포함한다.
- <278> 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 상업적으로 입수가 가능한 합성기를 사용하여 합성될 수 있다. 바람직하게는, 상기 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레아제 절단에 내성이라는 장점을 갖는 포스포로디티오에이트 골격을 사용하여 합성된다 (Marshall & Caruthers). 부가적으로, 비하전되거나 아미드 타입 골격을 갖는 올리고뉴클레오타이드 (Egholm, et al.)와 같은 다른 올리고뉴클레오타이드 유사체가 사용될 수 있다. 이러한 올리고뉴클레오타이드는 상업적으로 입수가 가능하고 (Biosearch, Millipore, Bedford, MA), 이것의 유리한 점은 전하의 결핍으로 상기 올리고뉴클레오타이드가 생물학적 막을 횡단한다는 것이고, 막은 하전된 거대분자의 통과를 일반적으로 저지한다.
- <279> 안티센스 적용을 위한 올리고뉴클레오타이드 (또는 이의 유사체)는 HGV 게놈내의 표적 서열에 대한 하이브리드화를 촉진시키는 8개 이상의 뉴클레오타이드 길이이다. 예를 들면 바이러스 RNA 표적 서열에 대한 DNA 올리고머의 하이브리드화 동안에, 하이브리드화 복합체는 RNase H와 같은 세포성 효소에 의해 분

해될 수 있다. HGV 주형의 감소는 그 후에 HGV-관련 질병의 병세를 악화시킨다.

- <280> 상기에 기술된 치료법의 유용성 및 효능은 상기에 기술된 세포 시스템을 이용하여 시험관내에서, 상기에 기술된 동물 모델 시스템을 이용하여 생체내에서 평가될 수 있다.
- <281> 하기 실시예는 본 발명을 설명할 뿐이지 제한하는 것은 아니다.

### 도면의 간단한 설명

- <282> 도 1은 470-20-1 클론에 대한 서열번호 14의 오픈 리딩 프레임의 관계를 나타낸 도면이다.
- <283> 도 2는 글루타민산 친화도 컬럼으로부터 용리된 구배 분획으로부터의 예시적인 단백질 프로파일을 도시한 도면이다.
- <284> 도 3은 도 2로부터의 분획 샘플의 예시적인 나트륨 도데실 설페이트 폴리악릴아미드 겔 전기영동 분석을 도시한 도면이다.
- <285> 도 4A는 음이온 교환 컬럼으로부터 용리된 구배 분획으로부터의 예시적인 단백질 프로파일을 도시한 도면이다.
- <286> 도 4B 및 4C는 도 4A로부터의 분획 샘플의 대표적인 나트륨 도데실 설페이트 폴리악릴아미드 겔 전기영동 분석을 도시한 도면이다.
- <287> 도 5A 및 5B는 HGV와 플라비비리과중 2개의 다른 구성원, 즉 돼지 콜레라 바이러스 및 C형 간염 바이러스와의 아미노산 정렬을 도시한 도면이다.
- <288> 도 6은 HGV 에피토프를 함유하는 세균성 발현 플라스미드인 pGEX-Hisb-GE3-2 벡터의 일부에 대한 지도이다.
- <289> 도 7A 내지 7D는 정제된 HGV GE3-2 단백질의 웨스턴 블롯 분석의 결과를 도시한 도면이다.
- <290> 도 8A 내지 8D는 정제된 HGV Y5-10 항원의 웨스턴 블롯 분석의 결과를 도시한 도면이다.
- <291> 도 9A 내지 9D는 Y5-5, GE3-2 및 Y5-10 항원의 웨스턴 블롯 분석의 결과를 도시한 도면이다.
- <292> 도 10A 내지 10F는 GE-NS2b 및 GE-NS5a 항원의 웨스턴 블롯 분석의 결과를 도시한 도면이다.
- <293> 도 11은 HGV의 코딩 서열의 Kyte-Doolittle 소수성 플롯을 도시한 도면이다.
- <294> 도 12는 HGV pET 클론과 항-T7.태그 모노클로날 항체와의 웨스턴 블롯 분석의 결과를 도시한 도면이다.
- <295> 도 13A 내지 13D는 HGV pET 클론 GE-N55b의 웨스턴 블롯 분석의 결과를 도시한 도면이다. 도 13E는 상응하는 쿠마시 (coomassie)-염색된 겔을 도시한다.
- <296> 도 14A 내지 14C는 HGV pET 클론 GE-E2의 웨스턴 블롯 분석의 결과를 도시한 도면이다. 도 14D는 상응하는 쿠마시-염색된 겔을 도시한다.
- <297> 도 15A 내지 15C는 HGV pET 클론 GE-NS5b의 웨스턴 블롯 분석의 결과를 도시한 도면이다. 도 15D는 상응하는 쿠마시-염색된 겔을 도시한다.
- <298> 도 16은 HGV의 코딩 영역의 개략도를 도시한다.

### 실시예

- <299> **재료 및 방법**
- <300> 합성 올리고뉴클레오타이드 링커 및 프라이머를 상업적으로 입수가능한 자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성기를 사용하여 제조하였다. 다른 방법의 경우에, 주문-디자인된 합성 올리고뉴클레오타이드가 상업적 공급자로부터 구입될 수 있다.
- <301> 표준 분자 생물학 및 클로닝법을 본질적으로 종래에 기술된 바와 같이 수행하였다 (Ausubel, et al., Sambrook, et al., and Maniatis, et al.).
- <302> 면역반응성 단백질 항원의 스크리닝 및 검출을 위해 항혈청 및/또는 항체의 사용에 관련된 보편적인 조작을 본질적으로 종래에 기술된 바와 같이 수행하였다(Harlow, et al.). 유사하게, 항바이러스 항체의 검출을 위한 ELISA 및 웨스턴 블롯 검정법은 제조자에 의해 기술된 바와 같이 수행하거나 (Abbott, N. Chicago, IL, Genelabs Diagnostics, Singapore), 본 발명의 기술분야에 공지된 표준 기술을 사용하여 수행하였다 (Harlow, et al.).

- <303> **실시예**
- <304> **실시예 1**

- <305> PNF2161 cDNA 라이브러리의 구성

- <306> A. 혈청으로부터 RNA의 분리.
- <307> 비희석된 PNF 2161 혈청 1mm를 PEG (MW 6,000)를 8%까지 첨가하고, 4℃에서 마이크로퓨지내에서 15분간 12K로 원심분리시킴으로써 침전시켰다. RNA는 본질적으로 촘크진스키(Chomczynski)에 의해 기술된 바와 같이 생성되는 혈청 펠렛으로부터 추출하였다.
- <308> 상기 펠렛을 4M 구아니디늄 이소티오시아네이트, 0.18% 2-메르캅토에탄올, 및 0.5% 사르코실을



함유하는 용액으로 처리하였다. 처리된 펠릿을 산성 페놀-클로로포름을 사용하여 수 회 추출하고, 상기 RNA를 에탄올로 침전시켰다. 이러한 용액을 -70℃에서 약 10분간 유지시키고, 그 후에 10분간 4℃의 마이크로퓨지내에서 스펀시켰다. 생성되는 펠릿을 100 µl의 DEPC-처리된 (디에틸 피로카르보네이트) 물중에서 재현탁시키고, pH = 5.2인 10 µl의 3M의 NaOAc, 2배 부피의 100% 에탄올 및 1배 부피의 100% 이소프로판올을 상기 용액에 첨가하였다. 상기 용액을 -70℃에서 10분 이상 유지시켰다. 상기 RNA 펠릿을 5℃에서 15분간 12,000 x g로 마이크로퓨지에서 원심분리시킴에 의해 회수하였다. 상기 펠릿을 70% 에탄올중에 세척하고, 진공하에서 건조시켰다.

#### B. cDNA의 합성

##### (i) 제 1 가닥 합성

cDNA 분자의 합성을 하기와 같이 수행하였다. 상기 기술된 RNA 제조물을 무작위 뉴클레오타이드 핵사머 프라이머를 사용하는 구블러(Gubler) 등의 방법에 따라, cDNA로 전사시켰다(cDNA Synthesis Kit, BMB, Indiapolis, IN or GIBCO/BRL).

제 2-가닥 cDNA의 합성후에, T4 DNA 중합효소를 혼합물에 첨가시켜, cDNA 분자의 불런트-말단의 수를 최대화시켰다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 10분간 인큐베이션시켰다. 상기 반응 혼합물을 페놀/클로로포름 및 클로로포름 이소아밀 알코올로 추출하였다.

상기 cDNA를 2배 부피의 100% 에탄올을 첨가하고, -70℃에서 15분간 냉각시킴으로써 침전시켰다. 상기 cDNA를 원심분리에 의해 수집하고, 펠릿을 70% 에탄올로 세척하고, 진공하에서 건조시켰다.

#### C. 이중 가닥 cDNA 분자의 증폭.

cDNA 펠릿을 12 µl의 증류수중에서 재현탁시켰다. 재현탁된 cDNA 분자에 하기 성분을 첨가하였다: 5 µl의 인산화된 링커 (링커 AB, 서열번호 1 및 서열번호 2로 구성된 이중가닥 링커로, 서열번호 2는 서열번호 1에 대해 3' 내지 5' 배향이고, 서열번호 1에 부분적으로 상보적인 서열이다), 2 µl의 10x 연결 완충액 (pH=7.6인 0.66M의 Tris.Cl, 50mM의 MgCl<sub>2</sub>, 50mM의 DTT, 10mM의 ATP) 및 1 µl의 T4 DNA 리가아제 (0.3 내지 0.6 바이스 유닛). 전형적으로, 상기 cDNA 및 링커를 1:100의 비율로 혼합하였다. 상기 반응물을 14℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션시켰다. 다음날 아침에, 반응물을 70℃에서 3분간 인큐베이션시켜 리가아제를 불활성화시켰다.

1.5mM의 MgCl<sub>2</sub> 및 50mM의 KCl (완충액 A)를 함유하는 pH 8.3인 10mM의 Tris-Cl 완충액 100 µl에 약 1 µl의 링커-연결된 cDNA 제조물, 2 µl의 서열번호 1로 도식된 서열을 갖는 프라이머, 각각 200 µM의 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP, 및 2.5 유닛의 써머스 아쿠아티스(*Thermus aquaticus*) DNA 중합효소 (Taq 중합효소)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 변성을 위해 30초간 94℃까지 가열하고, 프라이머 어닐링을 위해 30초간 50℃까지 냉각시키고, 그 후에 Taq 중합효소에 의한 프라이머 신장을 위해 0.5 내지 3분간 72℃까지 가열하였다. 연속적인 가열, 냉각 및 중합효소 반응을 포함하는 증폭 반응을 퍼킨-엘머 세투스(Perkin-Elmer Cetus) DNA 써멀 사이클러의 도움을 받아 추가로 25-40회를 반복하였다(Mullis;Mullis, et al.; Reyes, et al., 1991; Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT).

증폭 반응 후에, 상기 용액을 페놀/클로로포름, 클로로포름/이소아밀 알코올로 추출하고, 2배 부피의 에탄올로 침전시켰다. 생성되는 증폭된 cDNA 펠릿을 20 µl의 TE (pH=7.5)중에서 재현탁시켰다.

#### D. 람다 벡터내로의 cDNA의 클로닝.

cDNA의 구성에서 사용되는 링커는 증폭된 cDNA를 람다 gt11 벡터내로 직접 삽입시키는 EcoRI 부위를 함유하였다 (Promega, Madison WI or Stratagene, La Jolla, CA). EcoRI으로 이미 분해되고 알칼리 포스파타아제로 처리되어, 5' 포스페이트가 제거하여 벡터의 자체-연결을 방지시킨 람다 벡터를 제조사(Promega)로부터 구입하였다.

EcoRI-분해된 cDNA 제조물을 람다 gt11 (Promega)내로 연결하였다. 상기 연결 반응의 조건은 하기와 같았다: 1 µl의 벡터 DNA (Promega, 0.5mg/ml); 0.5 또는 3 µl의 PCR 증폭된 삽입 cDNA; 0.5 µl의 10 x 연결 완충액 (pH=7.8인 0.5M의 Tris-HCl; 0.1M의 MgCl<sub>2</sub>; 0.2M의 DTT; 10mM의 ATP; 0.5mg/ml의 우혈청 알부민(BSA)), 0.5 µl의 T4 DNA 리가아제 (0.3 내지 0.6 바이스 유닛) 및 5 µl의 최종 반응 부피까지의 증류수.

상기 연결 반응을 14℃에서 하룻밤 동안 (12 내지 18시간) 인큐베이션시켰다. 연결된 cDNA를 람다 DNA 패키징 시스템 ("GIGAPAK", Stratagene, LaJolla, CA)을 사용하는 표준 방법에 의해 패키징시키고, 그 후에 다양한 희석물로 플레이트시켜 역가를 결정하였다. 표준 X-gal 블루/화이트 검정법을 이용하여 라이브러리의 재조합 빈도를 결정하였다 (Miller; Maniatis, et al.).

각 라이브러리내의 재조합 퍼센트를 또한 하기와 같이 결정하였다. 많은 무작위 클론을 선택하고, 상응하는 파아지 DNA를 단리시켰다. 그 후에 중합효소 연쇄 반응 (Mullis;Mullis, et al.)을, 단리된 파아지 cDNA를 주형으로서 사용하고, cDNA 분자에 대한 EcoRI 삽입 부위를 플랭킹하는 람다 서열로부터 유래된 람다 DNA 서열을 프라이머로서 사용하여 수행하였다. 삽입서열의 존재 또는 부재는 중합효소 연쇄 반응 생성물의 겔 분석으로부터 명백했다.

혈청 샘플 PNF 2161로부터 생성된 상기 cDNA-삽입서열 파아지 라이브러리를 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville MD 20852)에 기탁하였고, 기탁번호 ATCC 75268 (PNF 2161 cDNA 공급원)로 지정받았다.

#### 실시에 2

##### 재조합 라이브러리의 면역스크리닝

실시에 1에서 생성된 람다 gt11 라이브러리를 이러한 라이브러리가 생성되는 PNF 2161 혈청에 의

해 인식될 수 있는 항원의 생성에 대해 면역스크리닝하였다. 상기 파아지를, 대장균 플레이팅 균주 대장균 KM392를 사용하여 플라크 형성을 위해 플레이팅하였다. 다른 방법으로서, 대장균 Y1090R (Promega, Madison WI)를 사용할 수 있다.

<327> 람다 gt11 클론에 의해 발현된 융합 단백질을 본질적으로 오수벨(Ausubel)등이 기술한 바와 같이 혈청 항체로 스크리닝하였다.

<328> 각 라이브러리를 150mm 플레이트 당 약  $2 \times 10^4$  파아지로 플레이팅하였다. 플레이트를 니트로셀룰로오스 필터를 사용하여 하룻밤 동안 오버레이시켰다. 필터를 TBS (10mM, Tris pH 7.5; 150mM의 NaCl)로 세척하고, AIB (1% 젤라틴을 갖는 TBS 완충액)로 블로킹하고, AIB로 100배 희석된 1차 항체와 함께 인큐베이션시켰다.

<329> TBS로 세척시킨 후에, 필터를 제 2 항체인 알칼리 포스파타아제에 컨주게이션된 염소-항-사람 IgG (Promega)와 함께 인큐베이션시켰다. 반응성 플라크를, 기질 (예를 들면, BCIP, 5-브로모-4-클로로-3-인돌일-포스페이트), NBT (니트로 블루테트라졸리움염 (Sigma))로 현상시켰다. 1차 스크리닝으로부터의 포지티브 지역을 리플레이트시키고, 순수한 플라크가 수득될 때까지 면역스크리닝하였다.

#### <330> 실시예 3

##### <331> PNF 2161 라이브러리의 스크리닝

<332> 람다 gt11내의 PNF 2161의 cDNA 라이브러리를 실시예 2에서와 같이 PNF 2161 혈청으로 스크리닝하였다. 상기 스크리닝의 결과를 표 1에 제시하였다.

<333> 표 1

#### PNF 2161 라이브러리

라이브러리 <sup>1</sup>	재조합(%) <sup>2</sup>	항체 <sup>3</sup>	#스크리닝된 클론	# 플라크-정제된 클론
PNF/RNA	85	PNF	$5.5 \times 10^3$	4
PNF/RNA	90	PNF	$8 \times 10^4$	7
전체				11

<335> 1. 지시된 사람 공급원으로부터 구성된 cDNA 라이브러리.

<336> 2. 블루/화이트 플라크 검정에 의해 결정되고, 무작위로 선택된 클론의 PCR 증폭에 의해 확인된 바와 같이 지시된  $\lambda$ gt11 라이브러리내의 재조합 클론(%).

<337> 3. 각 지시된 라이브러리의 면역스크리닝에 사용되는 항혈청 공급원.

<338> 상기 스크리닝에 의해 단리된 클론 (PNF 2161 클론 470-20-1, 서열번호 3;  $\beta$ -갈락토시다아제 인-프레이밍 융합 번역된 서열, 서열번호 4) 중 하나를 사용하여 실시예 6에 기술된 바와 같은 신장 클론을 생성시켰다. 클론 470-20-1 핵산 서열을 서열번호 3 (서열번호 4의 단백질 서열)으로서 제시하였다. SISPA 클로닝 링커가 없는 상기 단리된 핵산 서열을 서열번호 19 (서열번호 20의 단백질)로서 제시하였다.

#### <339> 실시예 4

##### <340> 면역반응성 470-20-1 클론의 특징화

<341> A. 면역반응성 클론의 서던 블롯 분석법.

<342> 면역반응성 클론의 삽입서열을 하기 대조구 DNA 공급원과 하이브리드화되는 이의 능력에 대해 스크리닝하였다: 정상 사람 말초혈 림프구 (스탠포드 대학 혈액은행으로부터 구입됨, Stanford, California) DNA, 및 대장균 KM392 게놈 DNA(Ausubel, et al.; Maniatis, et al.; Sambrook, et al.).

<343> 10 $\mu$ g의 사람 림프구 DNA 및 2 $\mu$ g의 대장균 게놈 DNA를 EcoRI 및 HindIII로 분해시켰다. 제한 분해 생성물을 아가로스 겔상에서 전기영동적으로 분별화시키고(Ausubel, et al.), 제조자의 설명에 따라 나일론 또는 니트로셀룰로오스막(Schleicher and Schuell, Keene, NH)으로 이동시켰다.

<344> 면역반응성 클론으로부터의 프로브를 하기와 같이 제조하였다. 각 클론을 gt11 벡터의 EcoRI 클로닝 부위를 플랜킹하는 람다 gt11 서열에 상응하는 프라이머를 사용하여 증폭시켰다. 증폭을 각 면역반응성 클론을 주형으로서 사용하는 중합 효소 연쇄 반응에 의해 수행하였다. 생성되는 증폭 생성물을 EcoRI로 분해시키고, 증폭된 단편을 겔-정제하고, 상기 겔로부터 용리시켰다 (Ausubel, et al.). 그 후에, 면역반응성 클론으로부터 유래되는, 생성되는 증폭된 단편을 <sup>32</sup>P-dNTP를 사용하는 상업적으로 입수 가능한 키트 (BMB)를 사용하여 무작위 프라임 표지시켰다.

<345> 그 후에 무작위 프라임된 프로브를 상기-제조된 나일론막과 하이브리드화시켜, 대조 DNA에 대한 삽입 서열의 하이브리드화에 대해 시험하였다. 470-20-1 삽입서열은 임의의 대조 DNA와 하이브리드화되지 않았다.

<346> 포지티브 하이브리드화 대조구로서, 사람 C-카파 유전자 단편으로부터의 프로브 유도체(Hieter)를 사람 DNA에 대한 단일 유전자 카피 대조구로서 사용하였고, 대장균 중합효소 유전자 단편을 대장균 DNA에 대해 유사하게 사용하였다.

&lt;347&gt;

## B. 게놈 PCR.

&lt;348&gt;

PCR 검출을 먼저 전개시켜, 라이브러리 구성 동안에 비의도적으로 클로닝될 수 있는 수 개의 게놈 DNA에 대한 외인성을 증명하고, 그 후에 클로닝 공급원 및 관련된 표본 재료중의 클로닝된 서열의 존재에 대해 시험하였다. SISPA-증폭된 핵산 및 1차 공급원으로부터 추출된 핵산, 및 관련된 공급원 재료(예를 들면, 동물계대 연구로부터)로부터 추출된 핵산을 포함하여, 수 개의 다른 타입의 표본을 시험하였다.

&lt;349&gt;

"게놈 PCR"이란 관련 생물체로부터의 게놈 DNA내의 특이적인 서열의 존재를 시험하는 것을 의미한다. 예를 들면, 미스택스-유래된 클론에 대한 게놈 PCR은 하기와 같은 게놈 DNA를 포함한다:

&lt;350&gt;

1. 사람 DNA (1  $\mu$ g/rxn.)

&lt;351&gt;

2. 미스택스 DNA (0.1 내지 1  $\mu$ g/rxn.)

&lt;352&gt;

3. 대장균 (10 내지 100 ng/rxn.)

&lt;353&gt;

4. 효모 (10 내지 100 ng/rxn.)

&lt;354&gt;

사람 및 미스택스 DNA를 제(agent)에 대한 직접적 및 최종적 공급원으로서 시험하였다. 상업적 효소 조제물의 빈번한 오염물질로서는, 대장균 게놈 DNA를 시험하였다. 편재하는 생물체로서는, DNA가 시약을 오염시켜서 클로닝될 수 있는 효모를 또한 시험하였다.

&lt;355&gt;

부가하여, 네가티브 대조구 (예를 들면, 완충액 또는 물 단독인), 및 약  $10^5$  c/rxn.을 포함하는 포지티브 대조구를 또한 증폭시켰다.

&lt;356&gt;

개별 서열에 대해 결정될 수 있는 바와 같이, 증폭 조건은 다르지만, 하기 표준 PCR 프로토콜을 엄격히 따른다: PCR을 100 $\mu$ l의 반응액당 pH 8.3인 10mM의 Tris, 50mM의 KCl, 1.75mM의 MgCl<sub>2</sub>, 1.0uM의 각 프라이머, 200uM의 각 dATP, dCTP 및 dGTP, 및 300  $\mu$ M의 dUTP, 2.5 유닛의 Taq DNA 중합효소, 및 0.2 유닛의 우라실-N-글리코실라아제를 함유하는 반응액에서 수행하였다. 사이클링을 94°C에서 1분 이상, 그런 다음 변성(92-94°C에서 15분간), 어닐링(55-56°C에서 30초간), 신장(72°C에서 30초간)을 30 내지 40 회 반복 수행하였다. PCR 시약을 모으고, 증폭된 DNA 없이 유지되는 특수하게-디자인된 실험실에서 증폭 반응을 구성하였다.

&lt;357&gt;

증폭된 서열 및 "허위 포지티브"에 의한 시험의 이와 같은 절충물에 의한 오염에 대한 추가 배리어로서, PCR을 TTP 대신 dUTP로 수행하여, 증폭된 서열이 네이티브 DNA와 생화학적으로 구별되도록 만들었다. 모든 오염 PCR 생성물을 효소적으로 증폭될 수 없게 만들기 위해서, 상기 효소 우라실-N-글리코실라아제를 모든 게놈 PCR 반응에 포함시켰다. 써멀 사이클링의 종결시에, 상기 반응을 72°C에서 유지시켜, 우라실-N-글리코실라아제의 복원 및 증폭된 U-함유 서열의 가능한 분해를 억제시킨다.

&lt;358&gt;

"고온 개시 (HOT START) PCR"을, 다양한 서열의 증폭에 대한 상기 일반 프로토콜을 더욱 확고히 하기 위해, 표준 기술 ("AMPLIWAX", 퍼킨-엘머(Perkin-Elmer)바이오테크놀로지; 다른 방법으로서, 수동 기술이 사용됨)을 이용하여 수행되며, 상기 서열들은 이상적으로는 최대 민감성 및 특이성을 위해 상이한 증폭 조건을 요구한다.

&lt;359&gt;

증폭된 DNA의 검출은 2개의 PCR 프라이머 서열에 대해 내부에 위치하고, 프라이머와 전혀 오버랩되지 않거나 최소의 오버랩되는 특이적인 올리고뉴클레오타이드 서열과 하이브리드화에 의해 수행된다. 일부 경우에 있어서, 전기영동된 PCR 생성물의 직접 가시화는 에티움 브로마이드 형광을 사용하여 수행하지만, 프로브 하이브리드화도 또한 각 경우에 수행되어, 특이적인 증폭 생성물 및 비특이적인 증폭 생성물을 구별시킨다. 용액중에서 방사성표지된 프로브에 대한 하이브리드화를 8 내지 15% 폴리아크릴아미드겔(증폭된 서열의 크기에 적당한) 내에서의 전기영동 및 방사선자동사진법에 의해 수행하였다.

&lt;360&gt;

클론 470-20-1을 사람, 대장균 및 효모 DNA에 대해 게놈 PCR에 의해 시험하였다. 특이적인 서열은 네가티브 대조 반응물 또는 시험된 모든 게놈 DNA에서 전혀 검출되지 않고,  $10^5$  카피의 DNA/반응물은 용이하게-검출되는 시그널을 야기시켰다. 이러한 민감성 (즉,  $10^5$ /반응물)은 1 $\mu$ g의 총 DNA를 함유하는 반응물에서 단일 카피의 사람 서열을 검출하는데 적당하며, 이것은 약  $1.5 \times 10^5$  세포로부터의 DNA를 나타낸다.

&lt;361&gt;

## C. 직접적 혈청 PCR

&lt;362&gt;

혈청 또는 다른 클로닝 공급원 또는 관련 공급원 재료를 선택된 클로닝된 서열로부터의 프라이머를 사용하는 PCR에 의해 직접 시험하였다. 이러한 실험의 경우에, HGV 바이러스 입자를 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 사용하여 혈청으로부터 직접 침전시키거나, PNF 및 특정한 다른 혈청의 경우에는, 초원심분리에 의해 펠릿화시켰다.

&lt;363&gt;

RNA의 정제를 위해서, 상기 펠릿화된 재료를 구아니디늄 티오시아네이트중에서 용해시키고, 산 구아니디늄 페놀법에 의해 추출하였다(Chomczynski, et al.).

&lt;364&gt;

다른 방법으로서, 상기 방법의 변형은 상업적으로 입수가 가능한 시약, 예를 들면 "TRIAGENT" (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) 또는 "TRIZOL" (Lie Technologies, Gaithersburg, MD)를 통해 제공되며, 이를 사용함으로써 이행되고, 관련 프로토콜은 RNA를 단리시키기 위해 사용한다. 부가하여, PCR 분석에 적당한 RNA를 이전 농도 또는 바이러스 입자의 펠릿화가 없는 바이러스를 함유하는 혈청 또는 다른 유체로부터, "PURESCRIPT" 시약 및 프로토콜 (Gentra Systems, Minneapolis, MN)을 통해 직접 단리시켰다.

&lt;365&gt;

단리된 DNA를 PCR을 위한 주형으로서 직접 사용하였다. RNA를 역전사효소(Gibco/BRL)를 사용하여 역전사시키고, 그 후에 상기 cDNA 생성물을 후속 PCR 증폭을 위한 주형으로서 사용하였다.

- <366> 470-20-1의 경우에, PNF 혈청의 20 내지 50ul의 균등물로부터의 핵산을 각 RT-PCR 또는 PCR 반응 내로 투입 주형으로서 사용하였다. 프라이머는 하기와 같이 470-20-1을 기초로하여 디자인하였다: 470-20-1-77F (서열번호 9) 및 470-20-1-211R (서열번호 10). 역전사는 MMLV-RT (Gibco/BRL) 및 무작위 헥사머(Promega)를 사용하여, 실온에서 약 10분간, 42℃에서 15분간, 및 99℃에서 5분간 인큐베이션시키고, 4℃까지 신속히 냉각시킴으로써 수행하였다. 상기 합성된 cDNA는 100ul의 반응액당 1.75mM의  $MgCl_2$ , 0.2 내지 1μM의 각 프라이머, 각각 200μM의 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP, 및 2.5 내지 5.0 유닛의 Taq DNA 중합효소("AMPLITAQ", Perkin-Elmer)를 함유하는 반응내에서, 정제 없이 PCR에 의해 직접 증폭시킨다. 사이클링을 "GENEAMP SYSTEM 9600" 써멀 사이클러 (Perkin-Elmer) 또는 다른 써멀 사이클러 (Perkin-Elmer; MJ Research, Watertown, MA)내의 비교되는 사이클링 조건하에서, 94℃에서 1분 이상, 이어서 변성(94℃에서 15초간 10회 사이클; 92℃ 또는 94℃에서 15초간 연속 사이클), 어닐링(55℃에서 30초간), 신장(72℃에서 30초간)을 40 내지 45회 반복 수행하였다.
- <367> 포지티브 대조구는 (i) Hoechst 33258 형광검정법을 사용하여 농도가 평가된 이전의 증폭된 PCR 생성물, (ii) 목적 DNA 서열을 함유하는 정제된 플라스미드 DNA, 또는 (iii) 목적 DNA 서열이 T7, T3 또는 SP6과 같은 파아지 RNA 프로모터의 전사 조절하에 배열된 플라스미드 클론으로부터 유래된 정제된 RNA 전사체 및 상업적으로 입수가 가능한 시험관내 전사 키트의 사용을 통해 제조된 RNA로 구성된다. 부가하여, 약 10 내지 100 카피/rxn.에 상당하는 포지티브 대조 DNA의 분취액은 DNA 증폭 반응의 억제제의 존재에 대한 대조구로서 클로닝 공급원 표본으로부터 추출된 핵산을 함유하는 반응물내로 스파이크(spike)될 수 있다. 각각의 개별 추출물을 하나 이상의 포지티브 대조구로 시험하였다.
- <368> 특이적인 생성물을 특이성의 확인을 위해 특이적인 올리고뉴클레오티드 프로브 470-20-1-152F (서열번호 16)과 하이브리드화시킴으로써 검출하였다. 10ul의 PCR 생성물의 하이브리드화를 약  $1 \times 10^6$  cpm의 <sup>32</sup>P-표지된 470-20-1-152F를 함유하는 20ul의 반응물의 용액중에서 수행하였다. 특이적인 하이브리드를 폴리아크릴아미드겔내의 하이브리드화되지 않은 올리고로부터 전기영동 분리 및 방사선자동사진법을 수행하여 검출하였다.
- <369> PNF에 부가하여, 정상 혈청으로부터 추출된 핵산을 또한 "혈청 PCR" 프로토콜 서열을 이용하여 역전사시키고, 증폭시켰다. 정상 사람 혈청에서는 시그널이 전혀 검출되지 않았다. PNF 혈청내의 특이적인 시그널은 470-20-1 특이적인 프라이머를 사용하여 다중 추출물중에서 재현성있게 검출되었다.
- <370> D. SISPA 클로닝되지 않은 핵산으로부터의 증폭
- <371> SISPA (Sequence-Independent Single Primer Amplification) 증폭된 cDNA를 주형으로서 사용하였다 (실시예 1). 선택된 클로닝된 서열로부터 디자인된 서열-특이적 프라이머를 사용하여 주형으로부터 목적 DNA 단편을 증폭시켰다. 전형적으로, 상기 주형은 클로닝 조작에서 사용된 SISPA-증폭된 샘플이었다. 예를 들면, 증폭 프라이머 470-20-1-77F (서열번호 9) 및 470-20-1-211R (서열번호 10)은 클론 470-20-1 서열 (서열번호 3)으로부터 선택되었다. 이러한 프라이머를 주형으로서 SISPA-증폭된 PNF2161 cDNA를 주형으로서 증폭 반응에서 사용하였다.
- <372> 증폭된 DNA 단편의 동일성을 (i) 470-20-1 서열 (서열번호 3)을 기초로하여 디자인된 특이적인 올리고뉴클레오티드 프로브 470-20-1-152F (서열번호 16)와의 하이브리드화 및/또는 (ii) 크기에 의해 확인하였다. DNA 블롯 검출에 사용되는 프로브는 제조자의 권장 (BMB)에 따라서 말단 트랜스퍼라제를 사용하여 디고옥시제닌(digoxigenin)으로 표지시켰다. 그 후에 증폭된 DNA의 하이브리드화를 서던 블롯 또는 액체 하이브리드화 (Kumar, et al., 1989) 분석법중 하나를 이용하여 수행하였다.
- <373> 증폭 반응에서 사용된 포지티브 대조 DNA는 농도가 Hoechst 33258 형광 분석법에 의해 평가되는 이전에 증폭된 PCR 생성물이거나 클로닝된 목적 삽입서열을 함유하는 정제된 플라스미드 DNA이었다.
- <374> 상기 470-20-1 특이적인 시그널을 PCR에 의해 SISPA-증폭된 PNF2161로부터 증폭된 cDNA내에서 검출하였다. 네가티브 대조 반응은 비반응성이었고, 포지티브 대조 DNA 주형을 검출하였다.
- <375> E. 간 RNA 샘플로부터의 증폭.
- <376> 조직을 5M의 구아니딘 티오시아네이트중에서 추출하고 4M의 LiCl에 의해 RNA를 직접 침전시키는, 캐탈(Cathal) 등의 방법을 수행하여 간 생체검사용 재료로부터 RNA를 제조하였다. 상기 RNA 펠릿을 2M의 LiCl로 세척한 후에, 잔여 오염 단백질을 페놀:클로로포름을 사용하여 추출함으로써 제거하고, RNA를 에탄올 침전에 의해 회수하였다.
- <377> 상기 470-20-1 특이적인 프라이머를 또한 하기 RNA 공급원을 기질로서 사용하는 증폭 반응에서 사용하였다: 정상 미스택스 간 RNA, 정상 타마린 (*Sanguinus labiatus*) 간 RNA, 및 MY131 간 RNA. MY131은 1ml의 PNF 2161 혈장을 정맥내 접종한 미스택스이다. 간 효소 (SCID)의 분명한 증가 및 명백한 바이러스 감염의 조직학적 증거가 있었다. 조직학적 상호관계는 MY131의 간에서 가장 분명하고, MY131의 간은 SCID 활성의 피크 또는 그 인근에서 수득된다. 미스택스 131 간 RNA는 HCV의 비-코딩 프라이머 (서열번호 7 및 서열번호 8)를 갖는 증폭된 생성물을 제공하지 않았다.
- <378> 증폭 반응을 2개의 실험을 위해 듀플리케이트내에서 수행하였다. 이러한 증폭 반응의 결과를 표 2에 제시하였다.



&lt;379&gt;

표 2

470-20-1 프라이머를 사용한 PCR

	실험 1		실험 2	
	A	B	A	B
정상 My 간 RNA	-	-	-	-
정상 타마린 간 RNA	-	-	-	-
My131 간 RNA	+	+	+	+
PNF 2161	++	++	++	++

&lt;381&gt;

상기 결과는 470-20-1 서열이 모혈청 샘플 (PNF2161), 및 PNF 2161 샘플(MY131)의 계대 동물로부터의 간 RNA 샘플내에 존재함을 증명한다. 그러나, 양 대조 RNA 모두는 470-20-1 서열의 존재에 대해 네카티브이다.

&lt;382&gt;

F. RNA 주형을 사용하는 중합효소 연쇄 반응에 의한 HGV 서열에 대한 혈청 패널의 스크리닝.

&lt;383&gt;

1. 고-ALT 공여체

&lt;384&gt;

HGV 및 간 질환 사이의 질병 관련성을 비정상적인 간 기능을 갖는 간염 환자 및 혈액 도너로부터의 혈청의 HGV-특이성 프라이머를 사용하는, 중합효소 연쇄 반응 스크리닝에 의해 평가하였다. 상기 혈액 도너로부터의 혈청은 1ml당 45 국제 단위 이상의 혈청 ALT 수준을 갖는 혈액 공여체로부터의 혈청으로 구성된다.

&lt;385&gt;

전체 152개의 혈청으로 구성된 혈청 패널을 선택하였다. 하기 혈청을 혈청 패널을 위해 선택하였다: 스탠포드 대학 혈액 은행 (SUBB)에서의 스크리닝된 혈액 공여체로부터의 104개의 고-ALT 혈청; 북 캘리포니아, 이집트 및 페루로부터의 34개의 N-(ABCDE)형 간염 혈청; 및 간 질환 및/또는 간염 바이러스 감염에 걸린 것으로 추정되는 다른 도너로부터의 14개의 혈청. 패널에 대한 네가티브 대조구는 하기와 같았다: 바이러스 감염에 대한 위험 인자의 부재로 알려진 9명의 고도로 스크리닝된 혈액 도너 (SUBB) ("슈퍼노말(supernormal)" 혈청, 예를 들면 0-네가티브, Rh-네가티브; HIV에 네가티브인 공지된 간염 제(agent), 및 CMV; 이들의 이전의 다중 혈액 공여체는 질병의 유발없이 수혈되었다); 및 2명의 무작위 혈액 도너. 이러한 혈청을 470-20-1 프라이머 77F (서열번호 9) 및 211R (서열번호 10)을 사용하는 RT-PCR에 의해 HGV 특이적인 서열의 존재에 대해 검정하였다.

&lt;386&gt;

RNA 추출 및 RT-PCR을 프라이머 470-20-1-211R이 5'-바이오틸화되어 용액중의 하이브리드화에 이은 스트렙타비딘-피복된 상자성 비드를 사용하는 하이브리드화된 프로브의 친화성 포획을 포함하는 방법에 의해 증폭된 생성물의 신속한 스크리닝을 촉진시키는 것을 제외하고는, 본질적으로 실시예 4C에서 기술된 바와 같이 수행하였다. 친화성 상호작용을 통한 하이브리드화된 서열의 포획과 함께 특이적인 표지된 프로브와의 하이브리드화에 의한 핵산의 분석법은 핵산 분석법 분야에 널리 공지되어 있다.

&lt;387&gt;

시험에 이용되는 혈청의 양에 따라, 30 내지 50  $\mu$ l의 혈청으로부터의 RNA를 RT/PCR 반응당 사용하였다. 각 혈청을 반응당 10, 100 또는 1000카피의 RNA 전사체에 상응하는 포지티브 대조구 및 적당한 네가티브 (완충액) 대조구와 함께, 이중으로 시험하였다. 네가티브 대조구는 전혀 반응성이 아니었고, 반응당 10개 이상의 카피가 각 PCR 작업에서 검출가능하였다. 불명확한 결과는 2개의 이중 반응중 단 하나의 반응에 존재하는 특이적인 하이브리드화 시그널로서 정의하였다.

&lt;388&gt;

이러한 혈청 패널의 증폭 분석로부터 생성물의 효율적이고 고도로 민감성인 분석을 전기화학발광성 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하는 친화성-기초 하이브리드 포획을 위해 특별히 디자인된 장치 (QPCR 시스템 5000<sup>TM</sup>, Perkin-Elmer)를 사용하여 수행하였다. QPCR 5000<sup>TM</sup>을 이용하는 검정법은 설명되었다 (DiCesare, et al.; Wages, et al.).

&lt;389&gt;

각 반응의 생성물을 프로브 470-20-1-152F (전기화학발광성 루테늄 킬레이트로 5'-말단 표지된)와의 하이브리드화 및 "QPCR 5000"을 이용하는 측정에 의해 검정하였다. 소정의 증폭 작업에서 네가티브 대조구 표준편차의 평균 및 3배의 합의 컷오프 (cutoff)를 기초로 하여, 34개의 가능한 포지티브 전체를 확인 시험을 위해 선택하였다.

&lt;390&gt;

상기 34개의 샘플을 용액 하이브리드화 및 전기영동에 의해 분석하였다 (실시예 4C). 상기 34개의 샘플중에서, 6개의 혈청(즉, 6/152)은 이중 반응에서 특이적인 하이브리드화 서열을 가지는 것으로 나타났다. 상기 6개의 샘플중 3개는 포지티브 대조구와 비교해볼때, 강력히 반응성이었다: SUBB로부터의 1개의 고-ALT 혈청 및 이집트로부터의 2개의 N-(ABCDE) 혈청.

&lt;391&gt;

제 2 혈액 샘플을 초기 샘플을 취한지 1년후에 고도로 포지티브인 SUBB 혈청 공여체로부터 수득하였다. 제 2 혈청 샘플은 상기에 기술된 PCR법에 의해 HGV 포지티브인 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 사람내에서 HGV에 의한 지속적 감염을 확증한다. 상기 혈청을 "JC"로 명명하였다. 또한, 상기 혈청 공여체는 HCV 네가티브 (혈청반응성 시험 및 PCR에 의해 결정됨)이고, HAV 및 HBV에 대해 항체 네가티브였다.

&lt;392&gt;

부가하여, 이집트로부터의 제 3 N-(ABCDE) 혈청, 북캘리포니아의 N-(ABCDE)형 간염에 걸린 혈액 도너 및 N-(ABCDE)형 간염 혈청은 또한 이러한 방법에 의해 약하게 포지티브인 것으로 나타난다. 2개의 다른 혈청은 2개의 증폭 반응중 한 반응에서 특이적인 서열의 존재로서 규정되는 불명확한 결과를 제공하

였다.

<393>

이러한 HGV-포지티브 및 불명확한 혈청으로부터의 반복된 혈청 분취액의 후속 PCR 분석은 시험된 8개의 혈청중 6개에서 HGV-포지티브인 결과를 초래하고, 나머지 2개의 혈청중에서 불명확한 결과를 초래하였다.

<394>

제 2 프라이머 세트를 HGV 포지티브인 샘플의 확인을 위해 사용하였다. 진단용 증폭을 위한 이러한 프라이머 세트 (GV57-4512MF, 서열번호 121 및 GV57-4657MR, 서열번호 122)를 추정적인 NS5 코딩 영역으로부터 유래된 HGV의 보존영역으로부터 선택하였다. 약 2.2kb 단편을 5개의 각 개별 HGV 단리물로부터 증폭시켰다. 상기 증폭 반응에 사용된 프라이머는 470EXT4-2189R (서열번호 119) 및 470EXT4-29F (서열번호 120)이었다. 상기 증폭된 DNA 단편을 서열분석하고, 이 서열을 정렬하였다. 고도로 보존된 영역을 상기 정렬로부터 확인하고, 5개의 서열을 통해 분기하는 상태에 있는 위치에서의 혼합된 염기 합성을 포함하도록 최적 프라이머 서열을 디자인하였다. 생성되는 NS5 프라이머는 하기와 같았다: GV57-4512MF, 서열번호 121 및 GV57-4657MR, 서열번호 122. 이러한 프라이머를 시험 샘플로부터 165bp의 진단용 단편을 증폭시키기 위해 사용하였다.

<395>

내부 프로브 서열, GV22dc-89MF (서열번호 123)는 특이적으로 증폭된 생성물의 검출을 위해 또 다른 고도로 보존된 영역으로부터 유래되었다. 상기 프로브는 또한 낮은 염중 조건하에서 최소로 분기하는 HGV 서열을 검출하기에 충분한 길이이다.

<396>

진단용 NS5 서열의 존재에 대한 표본의 분석은 470-20-1 프라이머에 대해 기술된 바와 같이 샘플 제조, 증폭 및 액체 하이브리드화를 위한 동일한 조건을 따른다(실시에 4C). 470-20-1 및 NS5 프라이머쌍 모두를 사용하는 PCR에 의해 분석된 혈청 샘플에 대한 결과를 표 3에 나타냈다.

<397>

표 3

NS5-영역 프라이머쌍 (GV57)	470-20-1 프라이머쌍			
		+	-	불확정
	+	71	0	1
	-	6	13	2
	불확정	2	1	0

<399>

상기에서 HGV 포지티브로서 확인된 8개의 혈청으로부터 수득된 추가 분취액의 PCR 추가 분석을 470-20-1 프라이머 세트 (서열번호 9 및 서열번호 10) 및 NS5 프라이머 세트를 사용하여 수행하였다. 이러한 분석의 경우에, 상기 HGV PCR 분석은 8개 혈청중 5개에서 일관되게 포지티브인 결과를 제공하였다. 이러한 결과를 표 4에 제시하였다.

<400>

대조적으로, 2개의 무작위 도너 또는 9개의 고도로 스크리닝된 "슈퍼노말" 혈청중에서 PCR 분석 중 어느 한 세트에서 포지티브인 것은 없었다.

<401>

이러한 결과는 HGV 및 간 질환 사이의 질병 관련성을 뒷받침한다.

<402>

표 4

표본 군	시험된 갯수	포지티브 갯수
고-ALT 도너	104	1
비-ABCDE형, 기타	48	4
정상 도너	2	0
"슈퍼노말"	9	0
전체	163	5

<404>

고-ALT 공여체로부터의 추가의 혈청 시험은 하기 결과를 생성시켰다. 상기에 기술된 104개 혈청의 초기 패널에 부가하여, 총 495개의 혈청이 시험되었다. 이러한 495개의 표본중에서 6개가 프라이머쌍 470-20-1-77F (서열번호 9) 및 470-20-1-211R (서열번호 10)을 사용하여 HGV 포지티브로서 확인되었다. 이러한 6개의 혈청은 하기의 HCV 프로파일을 가진다: R25342, HCV 네가티브; R17749, HCV 포지티브; J53171, HCV 포지티브, HBV 포지티브; J54406, HCV 네가티브; R08074, HCV 네가티브; 및 X31049, HCV 네가티브. 포지티브 스코어는 2개 이상의 개별 반응에서의 반복된 반응성을 기초로 하였다. R25342를 시험하였고, NS5 프라이머쌍을 사용하는 PCR에 의해 포지티브로 확인되었다. 따라서, 약 1.2%의 검출율이 관찰되었다 (시험된 599개의 샘플중 7개).

<405>

증가된 ALT를 갖는 혈액 도너로부터 신선하게-수득된 혈장 샘플을 PCR(470-20-1 프라이머쌍)에 의한 HGV RNA의 시험을 위해, SUBB, 페닌슐라 혈액 은행(Peninsula Blood Bank)(Burlingame, CA), 및 뉴욕 혈액 센터(New York Blood Center)(New York, NY)로부터 또한 수득하였다. 시험되는 214개의 총 혈액 공여물중에서, 총 5개 (약 2.3%)가 HGV RNA 포지티브였다. 이러한 5개의 혈청은 하기의 HCV 프로파일을 가진다: T55806, HCV 포지티브; T55806, HCV 포지티브; T55875, HCV 네가티브; T56633, HCV 네가티브; R38730, HCV 네가티브; 및 3831781, HCV 네가티브. 이러한 두개의 도너, T55806 및 T55875로부터의 후속 혈액 공여물도 또한 HGV RNA 포지티브였다. T55806, T55875 및 T56633을 시험하였고, NS5 프라이머쌍을

사용하는 PCR에 의해 포지티브로 확인하였다.

<406>

## 2. 허용된 혈액 도너의 스크리닝

<407>

정상 혈액 도너 집단에서의 HGV의 확산을 평가하기 위해서, SUBB에서의 수혈을 위해 스크리닝된 혈액 도너로부터 혈청을 수집하였다. 769명의 독특한 도너를 나타내는 총 968개의 표본을 HGV RNA에 대해 시험하였다. 상기 샘플을 470-20-1 프라이머쌍을 사용하는 PCR에 의해 스크리닝하였다.

<408>

총 16개의 혈청을 검출가능한 HGV RNA를 가지는 것으로 확인하였다. 이러한 혈청중에서 6개는 3명의 도너로부터 듀플리케이트를 나타내며, 시험된 769명중 총 13명의 독특한 도너는 RNA PCR에 의해 HGV 포지티브였다. 모든 포지티브 샘플이 시험되고, NS5 프라이머쌍을 사용하는 PCR에 의해 포지티브임을 확인하였다. 이러한 도너는 다른 정상 혈청테스트 뿐만아니라 정상 ALT 수준에 의해 특징화된다. 따라서, 정상 혈액 도너 집단중에서 시험된 약 1.7%의 시험된 혈청은 HGV 포지티브이다. 따라서, HGV의 존재는 허용된 혈액 도너 및 거부된 혈액 도너 모두에서 검출되었다.

<409>

## 3. 다양한 지리학적 장소로부터의 표본.

<410>

지리학적으로 광범위하게 분포된 공급원으로부터의 간염 환자의 집단에서의 HGV 감염의 존재를 PCR에 의해 평가하였다. 상기 PCR 반응을 470-20-1 PCR 프라이머쌍을 이용하여 본질적으로 실시예 4C에서 기술된 바와 같이 수행하였다. 이집트, 그리이스, 오스트레일리아 (참조: 실시예 4F-4), 페루, 영국, 이탈리아, 독일, 한국, 미합중국 및 일본으로부터의 혈청 샘플을 시험하였다. HGV RNA는 시험된 모든 집단의 서브세트에서 검출가능하였다.

<411>

## 4. 수혈후 관련된 HGV 감염 및 비경구적인 전염.

<412>

HGV RNA를 수 개의 수혈후 감염의 경우 (일본 및 유럽 기원의 경우는 실시예 4F-3에 포함되어 있음)에서 검출하였다. 일본으로부터 1건, 미합중국으로부터 2건 및 오스트레일리아로부터 1건의 총 4건에 대하여, 다중 시점을 HGV RNA의 존재에 대해 검정하였다. 상기 경우중 3건에 대하여, (i) 전-수혈 샘플이 환자의 이전 HGV 상태를 확정하는 데에 유용하였고, (ii) 샘플이 도너 HGV 상태를 확정하는 데에 개개의 혈액 도너 내지 이러한 3건에 걸쳐 유용하였다.

<413>

제 1의 경우는 1980년 12월 2일에 수혈된 일본 환자였다. 수혈 후에, 이 환자는 비-B, 비-C 간염이 발병했다. 상기 환자로부터의 총 5개의 혈청을 470-20-1 프라이머쌍을 사용하는 PCR에 의해 HGV RNA에 대해 시험하였다. HGV RNA는 수혈받은지 약 2주 내지 약 8개월 후에 검출되었다. 수혈후 1년 이상이 지난 후 취해진 샘플은 불명확했다 (즉, 한 개의 이중 반응에서만 포지티브였다). 전-수혈 샘플은 시험에 대해 전혀 유용하지 않았다.

<414>

BIZ 및 ST0 (각각 표 5 및 6) 경우는 NIH에서 수행된 장래에 이행된 심장 수술 연구 (Alter, et al., 1989)로부터 나타났다. 이러한 개개의 환자에 대하여, 수혈 전의 혈청이 유용하고, 이것은 470-20-1 프라이머쌍을 사용하는 PCR에 의해 HGV RNA에 대해 네가티브인것으로 결정되었다. BIZ는 HGV RNA에 대해 수혈후 1일 내지 내지 수혈후 198주에 걸쳐 포지티브인 것으로 시험되었다. BIZ에 대한 총 9명의 혈액 도너중에서, 시험된 8명중 2명은 HGV 포지티브인 것으로 밝혀졌다. ST0는 HGV RNA에 대해 수혈후 5주 내지 수혈후 92주에 걸쳐 포지티브인 것으로 시험되었다.

<415>

표 5

### HGV의 수혈-관련성 전염: BIZ의 경우

채취일	시간	ALT IU/L	470 PCR 결과
10/30/78	-4일	23	-
11/01/78	-1일	31	-
11/03/78	+1일	29	+
11/17/78	+2주	51	+
03/22/79	+20주	135	+
06/28/79	+34주	133	+
04/06/81	+127주	141	+
08/20/82	+198주	39	+

&lt;417&gt;

표 6

HGV의 수혈-관련성 전염: ST0의 경우

채취일	시간	ALT IU/L	470 PCR 결과
06/15/83	-1일	23	-
07/18/83	+5주	80	+
10/31/83	+20주	75	+
12/31/83	+28주	30	+
01/02/85	+81주	90	-
03/20/85	+92주	23	+

&lt;419&gt;

또한 장래에 규정된 제 4경우는, 오스트레일리아의 시드니에서 수행된 수혈후 간염 연구에 참가한 심장 수술 환자였다. 확인가능한 다른 위험 인자를 갖지 않는 상기 환자 (PA-124)는 수술 동안에 14 유닛의 혈액 (4 유닛의 패킹된 적혈구 세포, 10 유닛의 혈소판)을 수용하였다. 이러한 14 유닛중 1유닛은 HGV 포지티브이고; 다른 13 유닛은 HGV 네가티브였다. 14명의 혈액 도너의 HBV 및 HCV 혈청 학은 반응성 HCV EIA를 제외하고는 네가티브였다 (제 1 세대 시험). 다른 HCV 테스트는 포지티브 발견을 확인하지 못했다.

&lt;420&gt;

환자 PA-124 (표 7)의 경우에, 혈청 ALT는 수술한지 2주 후에 취한 샘플로 시작하여 증가하였고, 14주의 기간 동안 전-수술 수준의 10배 이상으로 관찰되었다. 수혈전, 4주 후, 및 8주 후에 수행된 HCV에 대한 PA-124로부터의 혈청의 PCR 결과는 모두 네가티브였다. 상기 환자로부터의 혈청을 470-20-1 PCR 프라이머를 사용하는 HGV RNA에 대해 시험하였다. 전-수혈 샘플은 HGV RNA에 대해 네가티브였다. 포지티브 결과는 수혈 후에, 동시적이고 이후 계속적인 ALT 증가를 입증하였다. HGV RNA의 존재는 수혈후 1년 후에 검출되었다. 이러한 데이터는 HGV가 비경구적으로 전염될 수 있다는 결론을 뒷받침한다.

&lt;421&gt;

표 7

HGV의 수혈-관련성 전염: PA-124의 경우

수술후 경과된 주	ALT IU/L	470 PCR 결과
수혈전	7	-
2	74	+
4	86	+
8	135	+
12	179	+
14	78	+
18	9	+
24	6	+
36	11	+
52	11	+
64	23	-
84	10	-

&lt;423&gt;

장래에 규정된 수혈후 전염의 경우에 부가하여, HGV 감염의 추가 경우는 다중 수혈 및 정맥내 약물 사용 (IVDU)에 의해 규정된 위험군에서 확인하였다 (표 8).

&lt;424&gt;

표 8

코딩된 혈청의 HGV RT-PCR 시험:선택된 간염 및 비경구적인 위험군

군	시험된 갯수	포지티브 갯수
자가면역 간염	10	0
원발성 담즙성 간경변	20	0
추정되는 급성 비A-E형 간염	24	2
만성 간염 (비A-C형) (간 생체 검사법에 의해 확인됨)	34	3
간세포성 암종	20	2
만성 HBV	20	2
만성 HCV	50	6
혈우병	49	9
IVDU	54	15
복합적으로 수혈된 빈혈증	100	19

&lt;426&gt;

100명의 다중적으로 수혈된 겸상적혈구 빈혈증 및 탈라세미아 환자중에서, 19명 (19%)이 검출 가능한 혈청 HGV RNA를 가지는 것으로 발견되었다. 유사하게, 49명의 혈우병 환자중 9명 (18%)이 470-20-1 및 NS5 프라이머를 사용하는 경우에, HGV 포지티브였다. 현재까지는, 54 IVDU 중 15가 HGV RNA에 대해 PCR 포지티브인 것으로 밝혀졌다. 이러한 비경구적인 위험군중에서의 감염율 (18-28%)은 증가된 ALT (1-2%)를 갖는 혈액 도너에서의 비율 이상인 것으로 나타난다. 이러한 결과는 HGV 전염에 대한 비경구적인 루트의 중요성을 뒷받침한다.

&lt;427&gt;

5. 선택된 간염 질환군의 PCR 스크리닝.

&lt;428&gt;

급성 및 만성 간염, 간세포성 암종, HBV 감염 또는 HCV 감염에 걸린 환자로부터의 혈청은 종합효소 연쇄 반응을 사용하여 HGV의 존재에 대해 시험하였다 (표 8에 제시된 데이터). 간질환이 있는 환자로부터의 표본의 각 세트에 있어서, HGV 포지티브 표본이 입증되었다 (감염성 제(agent)와 배제적으로 관련 있는 것으로 생각되지 않는, 자가면역 간염 및 원발성 담즙성 경화증에 걸린 환자로부터의 표본을 제외함).

&lt;429&gt;

수혈 후 간염 환자로부터의 혈청의 수집에서 나타난 바와 같이 (실시에 4F-4), HGV 감염은 급성 간염 동안에 확립되지만, 순환 바이러스 RNA는 수 개월 내지 수 년 동안 측정되는 만성 감염 동안에 계속 검출된다.

&lt;430&gt;

약 10 내지 20%의 동시-감염율이 HBV 및 HCV 감염이 있는 환자중에서 관찰되었다. HGV 감염은 다른 간염 바이러스와의 동시-감염이 있거나 없는 간염과 관련된 것으로 나타난다. 동시-감염은 유사한 위험 인자 및 이러한 간염 바이러스에 대한 전염 루트를 반영할 수 있다. 상기에 언급된 바와 같이, 혈우병 환자, IVDU 및 다중적으로 수혈된 빈혈증 환자 및 같은 비경구적인 위험군에서 HGV의 확산 범위는 더욱 커진다 (다른 간염 위험군과 비교하는 경우).

&lt;431&gt;

6. 사람에서 HGV에 의한 지속적 감염

&lt;432&gt;

BIZ, ST0 및 PA-124의 수혈 후 간염의 경우는 수혈 및 급성 감염 후에 각각 3.8, 1.8 및 1.0 년까지 PCR-검출가능한 바이러스를 가지는 것으로 나타났다. 추가 혈청 샘플을, 초기 포지티브 샘플 이후 1년 내지 1.5년에, 공여체 JC (실시에 4F-1)로부터 수득하였다. 이러한 후속 혈청 샘플도 또한 HGV 포지티브였다. HGV 감염이 처음으로 검출된 혈청 샘플에 후속하여 수 개월 후에 수득된, 다른 고-ALT 도너 (T55806, T55875, R25342)로부터의 추가 혈청도 또한 포지티브였다. 유사하게, HGV 감염이 실험용 영장류 (CH1356, 실시에 4H)에서 확립되는 경우에, HGV RNA는 접종 후 1.5년에 걸쳐 검출되었다. 이러한 데이터는 사람 및 실험용 영장류에서의 지속적인 HGV 바이러스 감염을 확증한다.

&lt;433&gt;

G. 서열분석을 위한 환자 RNA로부터의 긴 단편의 증폭.

&lt;434&gt;

변화된 HGV 단리물에 대한 서열 정보를 얻기 위해 HGV 게놈의 수 개의 정보 영역을 증폭시키도록 PCR 프라이머를 디자인하였다. 상기 프라이머 470EXT4-2189R (서열번호 119) 및 470EXT4-29F (서열번호 120)는 본래의 470-20-1 서열을 함유하는 2.2 kb의 단편을 증폭시키도록 디자인되었다. 샘플로부터의 RNA는 "SUPERSCRIPIT II" 역전사효소 (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD)를 사용하여 역전사시켰다. 생성되는 cDNA를 효율적인 광범한 PCR ("XL PCR BUFFERS" 및 "rTth-XL", Perkin Elmer/Applied Biosystems Div., Foster City, CA)을 위한 시약을 사용하여 증폭시켰다.

&lt;435&gt;

상기 증폭 반응은 아가로오스겔 전기영동상의 정확한 크기의 밴드가 검출되는 경우에 포지티브인 것으로 간주된다. 샘플은 증폭 생성물의 예비 DNA 서열분석에 의해 포지티브인 것으로 확인되었다. 하기 혈청 샘플은 이러한 증폭법에 의해 HGV RNA에 대해 포지티브인 것으로 시험되었다: PNF 2161; R10291

(JC); 및 북아메리카, 이집트 및 일본 그룹으로부터의 각 표본. 그러나, 페루인 혈청으로부터는 포지티브 샘플이 전혀 검출되지 않았다.

&lt;436&gt;

다양한 HGV 포지티브 표본으로부터의 성공적인 증폭은 상기에 논의된 470-20-1 프라이머쌍을 사용하는 PCR 증폭에 의해 수득된 결과를 확인시킨다. 그러나, 증폭 달성의 실패는 불충분한 RNA 품질 또는 낮은 카피수 또는 단리물간의 국소적인 서열 차이를 반영할 수 있으며, 선택된 프라이머 세트는 보편적으로 기능하지 않는다.

&lt;437&gt;

HGV 게놈의 추정되는 5'-비번역 영역으로부터의 서열 정보를 얻기 위하여, 프라이머를 5'-비번역 영역 (HGV PNF 2161-변이체를 기초로하는)으로부터 단편을 증폭시키도록 디자인하였다. 상기 두 단편은 하기의 프라이머 세트에 의해 규정된다: 728개의 염기쌍 단편을 생성시키는, FV94-22F (서열번호 124) 및 FV94-724R(서열번호 125); 및 847개의 염기쌍 단편을 생성시키는, FV94-94F (서열번호 126) 및 FV94-912R (서열번호 127).

&lt;438&gt;

효율적인 광범한 PCR을 증진시키도록 설명된 상기 조건을 사용하였다. 생성물을 시험된 대부분의 샘플로부터 수득하였고, 이는 샘플내의 HGV RNA의 존재를 확인시킨다.

&lt;439&gt;

H. 영장류에서 HGV의 감염성.

&lt;440&gt;

2마리의 침팬지 (CH1323 및 CH1356으로 명명됨), 6마리의 사이노몰구스 원숭이 (CY143, CY8904, CY8908, CY8912, CY8917 및 CH8918) 및 6마리의 미스텍스(MY29, MY131, MY98, MY187, MY229, MY254) 피검체에 PNF 2161을 접종하였다. 전-접종 및 접종후에 혈청을 ALT 및 HGV RNA 서열의 존재에 대해 모니터링 하였다 (상기에 기술된 PCR 스크리닝에 의해 결정되는 바와 같이).

&lt;441&gt;

1마리의 cynomologous 원숭이 (CY8904)는 총 17개의 개별적 혈액 채취로부터 포지티브인 RNA PCR 결과 (접종후 39일) 및 하나의 불명확한 결과를 나타냈다. CH1356으로 명명되는 1마리의 침팬지의 경우에, RT-PCR에 의해 관찰되는 바이러스 감염이 지속되었다. 표 9에 나타난 바와 같이, 현저한 ALT 증가는 관찰되지 않았고, 순환성 바이러스는 접종후 상당히 경과된 시간 지점에서만 검출되었다. 바이러스 감염은 접종 직후 및 접종한지 118일 후에 관찰되었다. 암시적 반응성이 제1 접종후 시간 지점 (8일)에서 또한 관찰되었고, 이는 나머지 접종물을 나타낼 수 있다.

&lt;442&gt;

표 9

### PNF 2161로 접종한 후 CH1356으로부터의 ALT 및 PCR 결과

접종후 지난 일수	ALT*	HGV PCR
0	59	-
8	65	±
15	85	-
22	89	-
29	89	-
36	86	-
39	31	-
47	74	-
54	40	-
61	57	-
84	65	±
89	63	+
98	64	-
118	84	+
125	73	+
134	74	+
159	80	+
610	(자료없음)	+

&lt;444&gt;

\* 접종전의 평균 ALT 기준선은 50이었다.

&lt;445&gt;

상기에 제시된 데이터는 HGV 감염이 실험용 영장류에서 1.7년 까지 지속적임을 나타낸다.

&lt;446&gt;

I. 바이러스 게놈의 특징화.

&lt;447&gt;

cDNA 라이브러리로부터의 470-20-1의 단리 (실시에 1)는 PNF 2161에서 검출된 바이러스 게놈이



RNA임을 시사한다. RNA와 HGV 바이러스 게놈의 동일성을 확인하는 추가 실험은 하기를 포함한다.

- <448> 본래의 클로닝 공급원에서 RNA 또는 DNA 중 어느 하나의 선택적인 분해(예를 들면, DNase-비함유 RNase 또는 RNase-비함유 DNase)후에, HGV 특이적인 프라이머를 사용하는 증폭 및 증폭 생성물의 검출은 DNA 주형과 RNA를 구별시키는 작용을 한다.
- <449> 대안적인 방법은 (i) 반응물내에 임의의 RNA-의존성 DNA 중합효소 (즉, 역전사효소)의 부재하에 DNA-의존성 DNA 중합효소, 및 (ii) 반응물내의 DNA-의존성 DNA 중합효소 및 RNA-의존성 DNA 중합효소를 사용하는 증폭 반응 (본래의 클로닝 공급원으로부터의 핵산)을 이용한다. 이러한 방법에 있어서, HGV 게놈이 DNA 이거나 DNA 중간체를 가지는 경우에, 증폭된 생성물은 증폭 반응의 두 유형 모두에서 검출된다. HGV 게놈이 단지 RNA인 경우에, 증폭된 생성물은 단지 역전사효소-함유 반응물에서 검출된다.
- <450> 전체 핵산 (즉, DNA 또는 RNA)을 실시예 4C에 기술된 바와 같이 단백질 분해 효소 K 및 SDS를 사용한 다음 페놀 추출에 의해 PNF 2161로부터 추출하였다. 정제된 핵산을 그 후에 (i) PCR이 역전사 단계에 의해 진행되거나, (ii) 역전사 단계가 생략된 중합효소 연쇄 반응 (PCR)을 이용하여 증폭시켰다. 증폭은 PCR 반응이 역전사에 의해 진행되는 경우에만 재현가능하게 수득되었다. 대조구로서 DNA 주형은 별도의 반응에서 성공적으로 증폭되었다. 이러한 결과는 HGV 바이러스 게놈의 특성이 RNA임을 증명한다.
- <451> PNF 2161에 본래 존재했던 클로닝된 이중-가닥 DNA 서열의 가닥은 하기를 포함하는 다양한 수단에 의해 유도될 수 있다. 감염된 공급원 혈청으로부터의 비증폭된 게놈 RNA의 노던 또는 도트 블롯팅을 수행하고, 이어서 클로닝된 서열의 각 가닥에 상응하는 프로브와 듀플리게이트 블롯을 하이브리드화시킬 수 있다. 다른 방법으로서, M13 벡터로부터 단리된 단일-가닥 cDNA 프로브(Messing) 또는 다중 가닥-특이적인 올리고뉴클레오타이드 프로브를 부가된 민감성을 위해 사용하였다. 공급원 혈청이 단일-가닥 RNA를 함유하는 경우에, 단 한 개의 프로브 (즉, 470-20-1 클론의 한 가닥으로부터의 서열)가 하이브리드화 임중도의 적당한 조건하에서 시그널을 생성한다. 공급원 혈청이 이중-가닥 RNA를 함유하는 경우에, 두 가닥-프로브는 모두 시그널을 생성할 것이다.
- <452> 1개 또는 다른 특이적인 프라이머를 사용하는 역전사에 의해 개시되는 중합 효소 연쇄 반응은 노던 블롯팅에 대해 훨씬 더 민감한 대안을 나타낸다. PNF 2161 혈청에 존재하는 정제된 비리온으로부터 추출된 게놈 RNA를 각 RT/PCR에서 투입 주형으로서 사용하였다. 무작위적 6량체를 사용하는 cDNA 합성 보다는, HGV 서열-특이적인 프라이머를 사용하였다. 한 가지 cDNA 합성 반응은 클로닝된 서열중 한 가닥에 상보적인 프라이머로 수행하고(예를 들면, 470-20-1-77F); 제 2 cDNA 합성 반응은 반대 편 가닥으로부터 유래된 프라이머를 사용하여 수행되었다(예를 들면, 470-20-1-211R).
- <453> 생성되는 제 1 가닥 cDNA를 2개의 HGV 특이적인 프라이머를 사용하여 증폭시켰다. 대조구를 PCR에 의한 성공적인 증폭을 위해 포함시켰다 (예를 들면, DNA 대조구). 클로닝된 서열의 각 가닥으로부터의 RNA 전사체를 또한 사용하여, 기술된 특이적인 프라이머를 사용하는 경우에 수득되는 역전사 효율을 또한 조절하였다.
- <454> 특이적인 생성물을 에티듐 브로마이드 염색을 사용하는 아가로오스겔 전기영동에 의해 검출하였다. DNA 대조구 (즉, PCR 증폭을 위한 이중-가닥 DNA 대조구)는 역전사에 사용된 프라이머와 무관하게 성공적으로 증폭되었다. 단일-가닥 RNA 전사체 (즉, 역전사 효율 및 가닥 특이성에 대한 대조구)는 반대-가닥 프라이머가 cDNA 합성에 사용되는 경우에만 증폭되었다.
- <455> PNF-유래된 HGV 폴리뉴클레오타이드는 프라이머 470-20-1-211R이 역전사에 사용되는 경우에만 특이적인 증폭된 생성물을 야기시키며, 이것은 혈청내에 존재하는 본래의 HGV 폴리뉴클레오타이드 서열이 470-20-1-211R에 상보적이고 단일-가닥 RNA임을 나타낸다.
- <456> 실시예 5
- <457> PNF 2161의 수크로오스 밀도 구배 분리
- <458> A. PNF-2161 제(agent)의 밴딩.
- <459> TNE (50mM의 Tris-Cl, pH 7.5, 100mM의 NaCl, 1mM의 EDTA) 중의 10 내지 60%의 수크로오스 ("ULTRAPURE", Gibco/BRL)의 연속 구배는 호퍼 사이언티픽(Hoefer Scientific)(San Francisco, CA)로부터의 구배 메이커를 사용하여 제조하였다. 약 12.5ml의 구배를 -70°C에 보관된 0.4ml의 PNF 혈청과 오버레이시키고, 37°C에서 신속하게 해동시킨 후에, TNE중에 희석하였다.
- <460> 그 후에, 상기 구배를 4°C에서 SW40 로터 (Beckman Instruments)에서 40,000rpm ( $r_{av}$ 에서 약 200,000 x g)로 약 18시간 동안 원심분리시켰다. 약 0.6ml 부피의 분획을 튜브의 바닥으로부터 모으고, 밀도 계산을 위해 0.5ml를 초원심분리 튜브내로 직접 칭량하였다.

&lt;461&gt;

표 10

## PNF 분획의 측정된 밀도 및 470-20-1의 존재

분획	밀도	검출된 470-20-1*
1	1.274	-
2	1.274	-
3	1.266	-
4	1.266	-
5	1.260	-
6	1.254	-
7	1.248	+
8	1.206	+
9	1.146	+
10	1.126	+++
11	1.098	++++
12	1.068	+++
13	1.050	+
14	1.034	+
15	1.036	+
16	1.018	-
17	1.008	+
18	1.020	+

&lt;463&gt;

\* "+" 및 "-" 스코어는 초기에는 40-사이클 PCR을 기초로한다. "+", "++", "+++", 및 "++++"을 구별하기 위해, 초기의 포지티브 스코어 (7 내지 18)를 나타내는 분획을 PCR의 30사이클로 증폭시켰다.

&lt;464&gt;

그 후에, 추정되는 바이러스 입자를 4°C에서 Ti70.1 로터에서 40,000 rpm(약 110,000 x g)으로 2 시간 동안의 원심분리에 의해 펠릿화시키고, 산 구아니딘늄 페놀법 ("TRI REAGENT", Molecular Research Center, Cincinnati, OH)을 사용하여 RNA를 추출하고, 회수를 개선시키는 캐리어로서 글리코겐을 사용하여 알코올-침전시켰다. 정제된 핵산을 2mM의 DTT 및 1U/μl의 재조합 RNasin을 함유하는 RNase-비함유 완충액내에 용해시켰다.

&lt;465&gt;

RNA PCR에 의한 구배 분획의 분석 (실시에 4C)은 1.126 내지 1.068 g/ml의 밀도 분획으로 제한된 470-20-1 특이적인 시그널에서 구별되는 피크를 나타냈다(표 10). 470-20-1 시그널은 이러한 조건하에서 수크로오스 구배내의 바이러스 입자의 예상된 움직임과 일치하는 불연속 밴드를 형성하는 것으로 나타났다.

&lt;466&gt;

B. 상대적인 바이러스 입자 밀도.

&lt;467&gt;

PNF 2161은 HCV와 동시-감염되는 것으로 증명되었다 (상기 참조). 다른 공지된 간염 바이러스 입자에 대한 470-20-1 바이러스 입자의 특성을 비교하기 위해서, 혈청 PNF 2161 및 정제된 A형 간염 바이러스의 샘플을 수크로오스 구배상에 층화시켰다 (상기에 설명된 바와 같이). 분획 (0.6ml)을 모으고, 펠릿화시키고, RNA를 추출하였다. 각 분획으로부터 단리된 RNA를 HAV (서열번호 5; 서열번호 6), HCV (서열번호 7; 서열번호 8) 및 470-20-1 (서열번호 9, 서열번호 10) 특이적인 프라이머를 사용하여 증폭반응(PCR)시켰다.

&lt;468&gt;

생성물 밴드를 아가로오스겔상의 증폭 반응의 전기영동적 분리에 이어, 에티듐 브로마이드 염색에 의해 확인하였다. 이러한 분석의 결과를 표 11에 제시하였다.



&lt;469&gt;

표 11

평균 밀도	HAV	HCV	470-20-1
1.269	-	-	-
1.263	+	-	-
1.260	+	-	-
1.246	++	-	-
1.238	++	-	-
1.240	+	-	-
1.207	+	-	-
1.193	+	-	-
1.172	+	±	-
1.150	+	±	±
1.134	+	+	±
1.118	+	+	+
1.103	+	+	+
1.118	+	+	+
1.103	+	+	+
1.088	±	+	+
1.084	-	+	+
1.080	-	+	+
1.070	-	+	+
1.057	-	+	±
1.035	-	±	-
1.017	-	-	-
1.009	-	-	-

&lt;471&gt;

이러한 결과는 470-20-1 입자가 HAV 보다 HCV 입자와 더욱 유사함을 시사한다.

&lt;472&gt;

또한, 혈청 PNF 2161 및 HAV 입자를 수크로오스 구배 원심분리시키기 전에 클로로포름으로 처리하였다. 이러한 실험의 결과는 470-20-1 제(agent)가, 비-엔벨로프 바이러스 (HAV) 보다 엔벨로프 플라비비리대 구성원(HCV)과 더욱 유사한 특성을 가지므로, 엔벨로프 바이러스일 수 있음을 시사한다.

&lt;473&gt;

#### 실시에 6

&lt;474&gt;

#### 470-20-1 신장 클론의 생성

&lt;475&gt;

#### A. 앵커 PCR.

&lt;476&gt;

RNA를 실시에 1에 기술된 바와 같이 PNF2161 혈청으로부터 직접 추출하였다. 상기 RNA를 "CHROMA SPIN" 100 겔여과 컬럼 (Clontech)를 통과시켜 저분자량의 불순물을 제거하였다. cDNA를 BMB cDNA 합성 키트를 사용하여 합성하였다. cDNA를 합성시킨 후에, 상기 PNF cDNA를 50 내지 100배 초과량의 KL-1/KL-2 SISPA 또는 JML-A/JML-B 링커 (각각 서열번호 11/서열번호 12 및 서열번호 17/서열번호 18)에 연결시키고, 프라이머 KL-1 또는 프라이머 JML-A중 어느 하나를 사용하여 35사이클동안 증폭시켰다.

&lt;477&gt;

470개의 신장 클론은 EcoRI 분해된 (탈인산화된) 람다 gt11 아암 (1 $\mu$ g) 및 EcoRI 분해된 PNF cDNA (0.2 $\mu$ g)를 함유하는 10 $\mu$ l의 연결 반응액으로부터의 1 $\mu$ l 분취액의 앵커된 PCR에 의해 생성시켰다. 연결 반응의 PCR 증폭 (40사이클)을 470-20-77F (서열번호 9) 또는 470-20-1-211R (서열번호 10)중 하나와 함께 람다 gt11 역방향 프라이머 (서열번호 13)를 사용하여 수행하였다. PCR에 대한 모든 프라이머의 농도는 0.2 $\mu$ M이었다.

&lt;478&gt;

증폭 생성물 (9 $\mu$ l/100 $\mu$ l)을 1.5%의 아가로오스겔상에서 분리시키고, "NYTRAN" (Schleicher and Schuell, Keene, NH)에 블롯팅시키고, 470-20-1에 특이적인 디옥시제닌-표지된 올리고뉴클레오타이드 프로브로 프로빙시켰다. 상기 디옥시제닌 표지화를 말단 트랜스퍼라제 (BMB)를 사용하여 제조자의 권고에 따라서 수행하였다. 하이브리드화된 밴드를 겔-정제시키고, "TA CLONING VECTOR PCR II"(Invitrogen)내로 클로닝하고, 서열분석하였다.

&lt;479&gt;

470-20-1에 대한 5' 및 3' 신장을 모두 가지는 많은 클론을 확인하였다. 모든 서열은 2개 이상의 독립적 단리물의 서열분석으로부터의 컨센서스 서열을 기초로한다. 이러한 앵커 PCR 방법을 유사한 방식

으로 반복하여, 5' 내지 3' 신장 서열을 추가로 수득하였다. 이러한 PCR 증폭 반응을 이전의 신장 클론으로부터 수득된 서열로부터 유래된 HGV 특이적인 프라이머와 함께 람다 gt11 역방향 프라이머(서열번호 13)를 사용하여 수행하였다. 이러한 반응을 위한 기질은 패키징되지 않은 PNF 2161 2-cDNA 공급원 DNA이다.

- <480> 서열분석을 제조자의 권고 (Applied Biosystem, Foster City, CA)에 따른 Applied Biosystem model 373A DNA 서열분석 시스템상에서, "DYDEOXY TERMINATOR CYCLE SEQUENCING" (생거(Sanger) 등의 방법의 변형법)을 이용하여 수행하였다. 서열 데이터를 서열표에 제시하였다. 서열을 핵산 및 아미노산 수준 모두에서 "GENBANK", EMBL 데이터베이스 및 dbEST (National Library of Medicine) 서열과 비교하였다. 검색 프로그램인 FASTA, BLASTP, BLASTN 및 BLASTX (Altschul, et al.)은 이러한 서열이 핵산 및 아미노산 서열 모두로서 신규함을 나타냈다.
- <481> 선택된 프라이머쌍을 사용하여 수득된 개별적인 클론을 정렬하여 컨센서스 서열을 수득하였다. HGV-PNF 2161 변이체에 대한 서열을 구성하는 데에 사용된 일련의 컨센서스 서열은 하기와 같다: 4E3, 서열번호 26; 3E3, 서열번호 27; 2E5, 서열번호 28; 1E5, 서열번호 29; 4E5, 서열번호 30; 3E5, 서열번호 31; 2E3, 서열번호 32; 1E3, 서열번호 33; 4E5-20, 서열번호 34; 5E3, 서열번호 39; 6E3, 서열번호 40; 7E3, 서열번호 42; 5E5, 서열번호 43; 6E5(44F), 서열번호 44; 8E3, 서열번호 98; 9E3, 서열번호 109; 10E3, 서열번호 110; 11E3, 서열번호 116; 12E3, 서열번호 118; 5'-말단, 서열번호 175; 및 3'-말단, 서열번호 167.
- <482> 개별적인 컨센서스 서열을 정렬시키고, 오버랩핑 서열을 확인하고, HGV-PNF 2161 변이체에 대한 컨센서스 서열을 결정하였다. 이러한 컨센서스 서열을 4개의 다른 HGV 변이체에 대해 수득된 서열과 비교하였다: JC (서열번호 182), BG34 (서열번호 176), T55806 (서열번호 178), 및 EB20-2 (서열번호 180).
- <483> HGV-PNF 2161 변이체의 컨센서스 서열은 서열번호 14로서 제시된 9391개의 염기쌍으로 구성된다. 이러한 서열은 연속적 오픈 리딩 프레임 (서열번호 15)을 나타낸다. 폴리단백질의 카이트-돌리틀(Kyte-Doolittle) 소수성 플롯을 도 11로서 제시하였다.
- <484> 본래의 470-20-1 클론 및 신장에 의해 수득된 서열 간의 관계를 도 1에 개략적으로 도시하였다. 도면에 나타난 바와 같이, 470-20-1의 단백질 코딩 서열과 반대의 극성을 갖는 DNA 가닥은 긴 연속 오픈 리딩 프레임을 포함한다.
- <485> HGV의 아미노산 서열을 단백질 서열의 PIR 데이터베이스 (IntelliGenetics, Inc., Mountain View, CA)에 있는 모든 바이러스 서열과 비교하였다. 상기 비교는 프로그램 버전 1.7의 "FASTA" 스위트의 "SSEARCH" 프로그램을 사용하여 수행하였다(Pearson, et al.). 국소 서열 유사성을 갖는 영역을 HGV 서열 및 바이러스의 플라비비리대과에 속하는 2개의 바이러스 사이에서 발견하였다. 유사성 정렬을 도 5A 및 5B에 제시하였다.
- <486> 이러한 정렬중에는 이들 바이러스의 RNA-의존성 RNA 중합효소 (RDRP)에 대한 모티프가 존재한다. 보존된 RDRP 아미노산 모티프는 별표 및 위첨자인 굵은체에 의해 도 5A 및 5B에서 나타내었다(Koonin and Dolja). 이들 정렬은 상기 HGV 코딩 서열의 상기 부분이 RDRP와 상응함을 입증한다. HGV의 RNA 게놈에 관한 데이터와 조합된 이러한 정렬 데이터는 HGV를 플라비비리대과의 일원으로서 분류하는 것을 뒷받침한다.
- <487> HoCV (돼지 콜레라 바이러스) 및 HCV와 HGV 폴리단백질 (서열번호 15)의 포괄적인 아미노산 서열 동일성은 각각 17.1% 및 25.5%이다. 이러한 포괄적인 서열 동일성의 수준은 HGV가 HoCV 및 HCV 모두로부터의 개별적 바이러스 독립체임을 증명한다. 설명을 위해, 바이러스 BVDV (Bovine Diarrhea Virus) 및 HCV의 플라비비리대과의 두 구성원의 경우에, 아미노산의 16.2%가 HGV와 포괄적으로 정렬될 수 있다.
- <488> 속에 포함된 구성원들은 포괄적으로 정렬되는 경우에, 일반적으로 높은 상동성을 나타내며, 예를 들면 BVDV 대 HoCV는 71.2%의 동일성을 나타낸다. HCV가 구성원인 명명되지 않은 속의 다양한 구성원들(변이체)은 포괄적으로 정렬되는 경우에, 65% 내지 100%의 동일성을 나타낸다.
- <489> B. RACE PCR: 5' 말단 클로닝.
- <490> HGV 게놈의 5'-말단을 나타내는 클론을 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)법을 이용하는 변형된 앵커 PCR법에 의해 수득하였다. 상기 RACE법은 프로만(Frohman) 등 (1988) 및 벨리아우스키(Belyausky) 등 (1989)에 의해 최초로 기술되었다. 요약하면, HGV의 5'-말단 클론을 하기와 같이 수득하였다.
- <491> 제 1-가닥 cDNA 합성을 무작위 6량체를 사용하여 프라이밍하고, 합성을 "SUPERScript II" 또는 "rTth" 역전사효소 (GIBCO/BRL)중 하나를 사용하여 수행하였다. 제 1-가닥 합성시킨 후에, 상기 RNA 주형을 염기 가수분해 (NaOH)에 의해 분해시켰다. 상기 cDNA 샘플을 아세트산의 첨가에 의해 중성화시키고, 글래스 매트릭스 지지체 ("GENO-BIND," Clontech, Palo Alto, CA)에 흡착시킴으로써 정제하였다. 정제시킨 후에, 상기 cDNA를 에탄올 침전에 의해 농축시키고, 80%의 에탄올로 2회 세척하였다.
- <492> 본래 기술된 RACE법을 하기와 같이 변형시켰다. 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 앵커 (서열번호 174) (Clontech)를 코발트 클로라이드의 존재하에서, T4 RNA 리가아제를 사용하여 제 1가닥 cDNA의 3' 말단에 연결시킨다. 상기 올리고뉴클레오타이드 앵커를 2가지로 개질된 채로 제조업체로부터 입수하였다: (i) 앵커의 3' -말단은 콘카테머(concatamer) 형성을 방해하는 아미노기로 개질되고, (ii) 5' -말단은 제 1가닥 cDNA에 연결을 가능하게 하는 인산기를 함유한다.
- <493> 앵커를 연결시킨 후에, 상기 cDNA를 앵커 서열 (AP 프라이머, 서열번호 134)에 상보적인 프라이머와 함께 수 개의 HGV-특이적인 프라이머를 사용하는 PCR 증폭을 위한 주형으로서 사용하였다. 생성되는 증폭 생성물을 아가로오스겔 전기영동에 의해 분리시키고, 필터로 이동시키고, 네스팅된 HGV-특이적인 올리고뉴클레오타이드 프로브와 하이브리드화시켰다. HGV-프로브에 하이브리드화된 밴드를 단리하여, "pCR-II"(Invitrogen, San Diego, CA)내로 클로닝하고, 서열분석하였다.

<494> C. HGV 3' 말단 클로닝.

<495> HGV 게놈의 3'-말단을 나타내는 클론을 변형된 앵커된 RT-PCR법에 의해 수득하였다. 요약하면, cDNA를 합성시키기 전에, 폴리 A 종합효소 (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD)를 사용하여 PNF 2161 RNA로의 폴리(A) 테일의 첨가를 촉매시켰다. 상기 폴리(A) 첨가를 제조자의 권고에 따라서 수행하였다. 폴리(A) 개질된 RNA를 정제시킨 후에, 프라이머 GV-5446IRT (서열번호 184)를 사용하여, "SUPERScript II" (GIBCO/BRL)로 역전사를 수행하였다. 생성되는 cDNA를 하기 프라이머 세트를 사용하는 PCR에 의해 증폭시켰다: GV59-5446F (서열번호 171) 및 GV-5446IR (서열번호 172).

<496> 증폭시킨 후에, 생성물을 아가로오스겔 전기영동에 의해 분리시키고, 필터로 이동시키고, 디고옥시세틴-표지된 올리고뉴클레오타이드 프로브 (E5-7-PRB, 서열번호 173)와 하이브리드화시켰다. 상기 올리고뉴클레오타이드와 하이브리드화된 생성물을 단리하고, 정제하고, "pCR-II"내로 클로닝하고, 서열분석하였다. 이러한 방법에 의해 단리된 2개의 클론을 MP3-3 (서열번호 168) 및 MP3-7 (서열번호 169)이었다.

<497> 실시예 7

<498> 470-20-1 융합 단백질의 단리

<499> A. 470-20-1/글루타티온-S-트랜스퍼라제 융합 단백질의 발현 및 정제

<500> 470-20-1 펩티드를 함유하는 글루타티온-S-트랜스퍼라제 (sj26) 융합 단백질의 발현을 하기와 같이 수행하였다. 본래의 람다 gt11 470-20-1 클론에 상응하는 237개의 염기쌍 삽입서열(양 측면상에 17개의 뉴클레오타이드의 S1SPA 링커를 함유함)을, 프라이머 gt11 F (서열번호 25) 및 gt11 R (서열번호 13)을 사용하여 종합 효소 연쇄 반응시키고, Eco RI으로 분해시켜, 람다 gt11 470-20-1 클론으로부터 단리하였다.

<501> 상기 삽입서열을 변형된 pGEX 벡터인 pGEX MOV내로 클로닝하였다. pGEX MOV는 카복시 말단에서 6개의 히스티딘과 융합된 sj26 단백질(sj26his)을 엔코딩한다. 상기 470-20-1 폴리펩티드 코딩 서열을 벡터내의 sj26his 코딩 서열의 다운스트림에 위치한 클로닝 부위에서 벡터내로 도입하였다. 이와 같이, 상기 470-20-1 폴리펩티드는 sj26his/470-20-1 융합 단백질로서 발현된다. 상기 sj26 단백질 및 상기 융합 단백질의 6개의 히스티딘 영역은 글루타티온-컨쥬게이션된 비드 (Smith, D.B., et al.) 및 고정된 금속 이온 비드 (Hochula; Porath)를 사용하는 이중 크로마토그래피법에 의해 융합 단백질의 친화성 정제를 가능하도록 한다.

<502> 대장균 균주 W3110 (ATCC 카탈로그 제 27352호)는 470-20-1 삽입서열을 함유하는 pGEX MOV로 형질전환된다. Sj26his 단백질 및 470-20-1 융합 단백질을 2mM의 이소프로필-β-티오갈락토피라노시드 (IPTG)의 첨가에 의해 유도시켰다. 상기 융합 단백질을, 통상의 이온-교환 크로마토그래피와 함께, 공개된 방법 (참조: Smith, D.B., et al.; Porath)에 따른 글루타티온-친화성 크로마토그래피 또는 고정화된 금속 이온 크로마토그래피 (IMAC)중 한 방법에 의해 정제하였다.

<503> 정제된 470-20-1 융합 단백질은 PNF2161과 면역반응성이 있다. 그러나, 정제된 sj26his 단백질은 PNF2161과 면역반응성이 아니었으며, 이는 470-20-1 펩티드 및 PNF2161 간의 특이적인 면역반응의 존재를 시사한다.

<504> B. 470-20-1/β-갈락토시다아제 융합 단백질의 단리

<505> 람다 파아지 gt11 또는 gt11/470-20-1중 하나로 감염된 KM392 용원을 배양물의 O.D.가 0.4에 도달할 때까지, 32°C에서 인큐베이션시켰다. 그 후에, 상기 배양물을 43°C의 워터 배스 (water bath)중에서 15분간 인큐베이션시켜 gt11 펩티드 합성을 유도시키고, 37°C에서 1시간 더 인큐베이션시켰다. 세균 세포를 펠릿화시키고, 용해 완충액 (10mM의 Tris, pH 7.4, 2%의 "TRITON X-100" 및 1%의 아프로티닌)중에서 용해시켰다. 세균 용해질을 원심분리 (10K, 10분간, Sorvall JA20 rotor)에 의해 정화시키고, 정화된 용해질을 항-β-갈락토시다아제 (Promega)와 컨쥬게이션된 세파로오스(Sephacrose) 4B 비드와 함께 인큐베이션시켰다.

<506> β-갈락토시다아제 융합 단백질의 결함 및 용리를 제조자의 지시에 따라 수행하였다. 전형적으로, 단백질의 결함 및 결핍의 세척을 용해 완충액을 사용하여 수행하였다. 결함된 단백질을 pH 10인 0.1M의 탄산염/중탄산염 완충액으로 용리시켰다. 정제된 470-20-1/β-갈락토시다아제 단백질은 PNF2161 및 항-β-갈락토시다아제 항체와 모두 면역반응성이다. 그러나, gt11 용원에 의해 발현되고 정제된 β-갈락토시다아제는 PNF2161과는 면역반응성이 없지만, 항-β-갈락토시다아제 항체와는 면역반응성이 있다.

<507> 실시예 8

<508> 470-20-1 융합 단백질의 정제 및 항-470-20-1 항체의 제조

<509> A. 글루타티온 친화성 정제

<510> 글루타티온 친화성 정제에 필요한 재료는 50ml의 글루타티온 친화성 매트릭스 환원형 (Sigma), XK 26/30 파마시아 컬럼, 2.5 x 10cm Bio-Rad "ECONO-COLUMN"(Richmond, CA), Gilson (Middleton, WI) HPLC, DTT (Sigma), 글루타티온 환원형(Sigma), 우레아, 및 2염기성 인산나트륨을 포함한다.

<511> 하기 용액을 융합 단백질의 정제에 사용하였다:

<512> 완충액 A: 인산 완충 염수, pH 7.4, 및

<513> 완충액 B: 50mM의 Tris pH 8.5, 8mM의 글루타티온, (환원형 글루타티온)

<514> 스트립 완충액: 8M의 우레아, 100mM의 Tris pH 8.8, 10mM의 글루타티온, 1.5 NaCl.

- <515> 470-20-1 삼입서열을 함유하는 플라스미드 pGEX MOV를 가진 대장균을 발효기(20리터)내에서 성장시켰다. 상기 세균을 모으고, 2mM의 플로오르화 페닐메틸설포닐 (PMSF)를 함유하는 인산 완충 염수(PBS) 중에서 마이크로-플로이다izer(micro-fluidizer)를 사용하여 용해시켰다. 다른 명시가 없는 한, 하기의 모든 과정은 4°C에서 수행하였다.
- <516> 로딩용 미정제 용해질을 용해된 세균을 "OAKRIDGE" 튜브내로 위치시키고, 벡만(Beckman) 모델 JA-20 로터내에서 20K rpm (40k x g)으로 회전시킴으로써 제조하였다. 상층액을 0.4µm 필터를 통해 여과시키고, 그 후에 0.2µm 필터를 통과시켰다.
- <517> 2.5 x 10cm의 "ECONO-COLUMN"을 실온에서 2시간 동안 PBS중에서 불린 글루타티온 친화성 매트릭스를 사용하여 패킹시켰다. 상기 컬럼은 4 베드 부피의 PBS로 세척함으로써 평형화시켰다.
- <518> 상기 컬럼을 1분당 8ml의 유속으로 미정제 용해질을 사용하여 로딩시켰다. 후속하여, 상기 컬럼을 같은 유속으로 5 컬럼 부피의 PBS를 사용하여 세척하였다.
- <519> 상기 컬럼을 유속을 0.75 내지 1ml/min으로 세팅하고, 완충액 B를 도입시킴으로써 용리시켰다. 완충액 B를 5 컬럼 부피에 대하여 컬럼을 통해 펌핑하고, 2분간 분획을 수집하였다. 전형적인 용리 프로파일을 도 2에 도시하였다. 상기 분획내에 존재하는 단백질의 함량 및 순도를 표준 SDS PAGE에 의해 평가하였다 (도 3). 470-20-1/sj26his 융합 단백질을 이의 예측된 분자량 및 PNF2161 혈청에 대한 면역 반응성을 기초로 하여 확인하였다. 추가의 조작을 위하여, 상기 단백질을 융합 단백질을 함유하는 분획 또는 융합 단백질을 함유하는 겔 영역의 추출에 의해 겔로부터 분리하였다.
- <520> B. 음이온 교환에 의한 클론 470-20-1 융합 단백질의 정제.
- <521> 용액은 하기를 포함한다:
- <522> 완충액 A (10mM의 인산나트륨 pH 8.0, 4M의 우레아, 10mM의 DTT);
- <523> 완충액 B (10mM의 인산나트륨 pH 8.0, 4M의 우레아, 10mM의 DTT, 2.0M의 NaCl); 및
- <524> 스트립 완충액 (8M의 우레아, 100mM의 Tris pH 8.8, 10mM의 글루타티온, 1.5 NaCl).
- <525> 미정제 용해질 (또는 상기로부터 풀링된 분획과 같은 다른 단백질 공급원)을 4.0ml/min의 유속으로 "HIGH-Q-50" (Biorad, Richmond, CA) 컬럼상에 로딩하였다. 그 후에 상기 컬럼을 4.0ml/min의 유속으로 완충액 A를 사용하여 5 컬럼 부피에 대해 세척하였다.
- <526> 이러한 세척 후에, 구배를 개시하고, 15 컬럼 부피로 완충액 A로부터 완충액 B로 런닝시켰다. 그 후에, 구배를 1 컬럼 부피에 대해 100%의 완충액 B까지 단계적으로 진행하였다. 전형적인 구배를 도 4A에 도시하였다. 분획을 10분 마다 수집하였다. 470-20-1/sj26his 융합 단백질의 순도를 표준 SDS-PAGE에 의해 평가하고 (도 4B 및 도 4C), 관련 분획을 풀링시켰다 (약 분획 34 내지 37, 도 4C).
- <527> C. 항-470-20-1 항체의 제조
- <528> 정제된 470-20-1/sj26his 융합 단백질을 토끼에게 프로이드 애췌번트중에 피하 주사하였다. 약 1mg의 융합 단백질을 0일 내지 21일째에 주입시키고, 토끼 혈청을 전형적으로 6 내지 8주 째에 수집하였다.
- <529> 2번째 토끼를 정제된 sj26his 단백질을 사용하여 유사하게 면역화시켰다.
- <530> 소형용해질을, 470-20-1/sj26his 융합 단백질, sj26his 단백질 및 β-갈락토시다아제/470-20-1 융합 단백질을 발현시키는 세균으로부터 제조하였다. 상기 용해질을 겔상에서 분별화시키고, 막으로 이동시켰다. 개별적인 웨스턴 블롯을 2마리 토끼로부터의 혈청을 사용하여 수행하였다.
- <531> 470-20-1 융합 단백질을 사용하여 면역화시킨 동물로부터의 혈청은 pGEX MOV 또는 470-20-1 삼입서열을 함유하는 pGEX MOV중 하나로 형질전환된 IPTG-유도된 대장균 W3110의 소형용해질내의 모든 sj26his 융합 단백질과 면역반응성이었다. 이러한 혈청은 또한 470-20-1 람다 gt11 구성물로부터의 소형용해질내의 융합 단백질과도 면역반응성이었다.
- <532> 제 2 토끼 혈청은 소형용해질내의 sj26his 및 470-20-1/sj26his 융합 단백질 모두와 면역반응성이었다. 이러한 혈청은 470-20-1 람다 gt11 구성물로부터의 소형용해질내의 470-20-1/β-갈락토시다아제와 면역반응성이라고 예측되지 않는다. 어떤 혈청도 β-갈락토시다아제와 면역반응성인 것으로 예측되지 않았다.
- <533> 융합 단백질로 면역화된 동물로부터의 혈청내에 존재하는 항-470-20-1 항체는 친화성 크로마토그래피 (470-20-1 리간드를 사용하는)에 의해 정제된다.
- <534> 다른 방법으로서, sj-26 단백질 서열이 없는 470-20-1 항원을 제공하기 위해 융합 단백질을 절단할 수 있다. 그 후에, 470-20-1 항원은 상기에 기술된 항체를 생성시키기 위해 단독으로 사용된다.
- <535> 실시에 9
- <536> 토끼 항-펩티드 혈청
- <537> 펩티드를 전체 HGV 서열을 커버하도록, 특히 비-구조성 및 구조성 유전자에서 각 작용기를 커버하도록 디자인하였다. 펩티드를 통상의 기술에 의해 상업적으로 합성하였다. 대표적인 펩티드를 표 12에 제시하였다.

&lt;538&gt;

표 12

명칭	펩티드의 크기 (aa)	서열번호 14에 대한 종말점
PEP1/NS2a	30	2674/2763
PEP2/E1	16	733/780
PEP3/E2	18	1219/1272
PEP4/NS2B	18	3061/3114
PEP5/NS3	21	3571/3633
PEP6/NS3**	18	4909/4959

&lt;540&gt;

표 12 (계속)

명칭	펩티드의 크기 (aa)	서열번호 14에 대한 종말점
PEP7/NS4A	18	5275/5328
PEP8/NS4B	16	6097/6144
PEP9/NS5A	16	7033/7080
PEP10/NS5B	18	7783/7836

&lt;542&gt;

\*\* NS3 펩티드는 HGV-PNF 2161 변이체 폴리펩티드 서열중에 없는 C 말단상에 외래 시스테인을 가진다; 실제 서열은 Q이다.

&lt;543&gt;

상기 펩티드를 KLH에 커플링시켰다. 숙주로서 토끼를 사용하여, 컨쥬게이션된 펩티드를 다중 위치에서 피하적으로 주입시켰다. 항-펩티드 토끼 혈청은 상업용 설비에 의해 생성하였다. 1주 걸러 취해진 혈액으로 2주의 면역화 프로토콜을 사용하였다.

&lt;544&gt;

토끼 항-펩티드 혈청은 펩티드-특이적이고, 높은 역가를 가지는 것으로 나타났다. 토끼 항-펩티드 혈청은 또한 대장균 및 바콜로바이러스내에서 발현되는 상응하는 재조합 단백질을 인식한다. 항체 종말점 역가는 1:500,000 희석 내지 1:625,000 희석이다. 토끼 항-펩티드 7 (NS4a)은 단지 1:1,000의 낮은 종말점 역가를 가졌다. 따라서, 예를 들면 바콜로바이러스 시스템내에서 발현되는 NS4a 단백질에 대한 토끼 항-혈청은 더욱 유용한 시약일 수 있다.

&lt;545&gt;

토끼 항-펩티드 혈청은, 예를 들면 바콜로바이러스 및 백시니아에서 발현된 상응하는 HGV 단백질을 면역침전시키는데에 유용하다. 토끼 항-펩티드 혈청은 HGV 항원을 검출하는 EIA에서 포획 항체로서 유용하다. 토끼 항-펩티드 혈청은 HGV 단백질의 특징화에 있어서 더 유용하다.

&lt;546&gt;

#### 실시에 10

&lt;547&gt;

#### 혈청학

&lt;548&gt;

#### A. 혈청 패널의 웨스턴 블롯 분석

&lt;549&gt;

470-20-1 융합 항원 (상기에 기술된)을 혈청의 패널을 스크리닝하기 위해 사용하였다. 많은 패널은 간염 환자 및 비감염된 대조군 모두로부터 유래하는 사람 혈청이었다.

&lt;550&gt;

친화성 정제된 470-20-1 융합 항원 (실시에 8)을 12%의 SDS-PAGE 상에 2 µg/cm으로 로딩시켰다. 상기 겔을 200V에서 2시간 동안 런닝시켰다. 상기 항원을 겔로부터 니트로셀룰로오스 필터로 이동시켰다.

&lt;551&gt;

그 후에, 막을 1%의 우혈청 알부민, 3%의 정상 염소 혈청, 0.25%의 젤라틴, 100mM의 NaPO<sub>4</sub>, 100mM의 NaCl, 및 1%의 탈지 건조 우유의 용액을 사용하여 2시간 동안 블로킹시켰다. 그 후에, 상기 막을 건조시키고, 1 내지 2mm의 스트립으로 절단하였고; 각각의 스트립은 470-20-1 융합 항원을 함유하였다. 상기 스트립을 전형적으로 TBS (150mM의 NaCl; 20mM의 Tris HCl, pH 7.5)로 재수화시키고, 실온에서 진탕시키면서 패널 혈청 (1:100)중에 하룻밤 동안 인큐베이션시켰다.

&lt;552&gt;

상기 스트립을 TBS + "TWEEN 20" (0.05%)중에서 각 5분간 2회 세척하고, TBS중에서 각 5분간 2회 세척하였다. 그 후에, 상기 스트립을 실온에서, 진탕시키면서 2차 항체 (프로메가(Promega) 항-사람 IgG-알칼리 포스파타아제 컨쥬게이트, 1:7500)중에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 후에, 상기 스트립을 TBS + "TWEEN 20"중에서 2회 x 5분 세척시킨후, TBS중에서 2회 x 5분 세척하였다.

&lt;553&gt;

결합된 항체를 pH 9.5 완충액 (100mM Tris, 100mM의 NaCl, 5mM의 MgCl<sub>2</sub>)중의 BCIP (실시에 2) 및 NBT (실시에 2)를 함유하는 기질 용액중에 스트립을 인큐베이션시킴으로써 검출하였다. 발색을 약 15분 동안 진행시키고, 이 시점에서 증류수중에서 3회 세척함으로써 발색을 중지시켰다.

&lt;554&gt;

시험 혈청은 하기의 개체군으로부터 유래되었다: (i) HBV Ab, 표면 Ag에 네가티브인 혈액 도너, HCV, HIV, HTLV-1 Abs에 네가티브인 혈액 도너; (ii) B형 간염 바이러스로 감염된 개체로부터의 혈청



(HBV); (iii) 제 2세대 HCV ELISA 검정법에서 반응성임에 의해 C형 간염 바이러스로 감염되는 개체로부터의 혈청 (HCV); 및 (iv) HAV, HBV, HCV 또는 HEV에 혈청학적으로 네가티브인 개체 (HXV).

이러한 스크리닝의 결과를 표 13에 제시하였다.

표 13

#### 470-20-1 혈청 패널링 결과의 요약

샘플	시험된 사람* 혈청 갯수	+	IND*	-
혈액 도너	30	1 (3.3%)	2 (6.7%)	27(90.0%)
HBV	40	7 (17.5%)	4 (10.0%)	29 (72.5%)
HCV	38	11 (28.95%)	11 (28.95%)	16 (42.1%)
HxV	122	20 (16.4%)	12 (9.8%)	90 (73.8%)

\* 불명확하고, 약 반응성

이러한 결과는 많은 상이한 혈청 샘플중에 470-20-1 항원의 존재를 시사한다. 상기 항원은 정상 사람 혈청과 면역반응성이 아니다.

B. 항체 검출을 위한 일반적 ELISA 프로토콜

폴리스티렌 96 웰 플레이트 ("IMMULON II" (PGC))를 pH 9.5인 0.1M의 중탄산 나트륨 완충액중의 5µg/ml (웰 당 10 µL)으로 피복시켰다. 플레이트를 "PARAFILM"으로 밀봉하고, 4°C에서 하룻밤 동안 저장하였다.

플레이트를 흡인시키고, 300uL의 10% 정상 염소 혈청으로 블로킹시키고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다.

플레이트를 PBS 0.5% "TWEEN-20"으로 5회 세척하였다.

항혈청을 pH 7.2인 1 x PBS중에서 희석시켰다. 항혈청 (0.1mL)의 바람직한 희석물(들)을 각 웰에 첨가하고, 상기 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 후에, 상기 플레이트를 PBS 0.5% "TWEEN-20"으로 5회 세척하였다.

양고추냉이 과산화효소 (HRP)-컨쥬게이션된 염소 항-사람 항혈청 (Cappel)을 PBS중에서 1/5,000으로 희석시켰다. 상기 용액 0.1 mL을 각 웰에 첨가하였다. 상기 플레이트를 37°C에서 30분 동안 인큐베이션시키고, 그 후에 PBS로 5회 세척하였다.

시그마 ABTS (기질)를 플레이트에 첨가하기 바로 전에 제조하였다.

상기 시약은 pH 4.2인 50mL의 0.05M의 시트르산, 0.078mL의 30% 과산화 수소 용액 및 15mg의 ABTS로 구성된다. 0.1mL의 기질을 각 웰에 첨가하고, 그 후에 실온에서 30분간 인큐베이션시켰다. 상기 반응을 0.050mL의 5% SDS (w/v)를 첨가하여 정지시켰다. 상대 흡광도를 410nm에서 측정하였다.

#### 실시에 11

##### 선택된 HGV 항원의 발현

HGV의 전체 코딩 서열을 50개 이상의 다른 오버랩핑 cDNA 단편내로 서브클로닝하였다. 대부분의 cDNA 단편의 길이는 약 200bp 내지 약 500bp였다. 상기 cDNA 단편을 발현 벡터인 pGEX-HisB내로 개별적으로 클로닝하였다. 상기 벡터는 상기 기술된 pGEX-MOV와 유사하다.

pGEX-hisB는 pGEX-2T (Genbank 수탁번호 A01438; 상업적으로 입수가 가능한 발현 벡터)의 변이체이다. 상기 pGEX-2T 벡터는 트롬빈 절단 부위의 바로 다운스트림에 위치하는 NcoI 부위의 삽입에 의해 변형되었다. 이러한 부위는 pGEX-2T에서 발견되는 EcoRI 부위 다음에 위치하는, 폴리-히스티딘 (6개의 히스티딘) 엔코딩 서열 다음에 위치하는 BamHI 부위 다음에 위치한다. 목적 코딩 서열은 전형적으로 NcoI 부위 및 BamHI 부위 사이에 삽입된다. 도 6 (서열번호 115)의 경우에, 삽입된 서열은 GE3-2 항원을 엔코딩한다. 벡터 서열의 나머지는 pGEX-2T와 동일하다. 융합 단백질의 발현은 본질적으로 다른 pGEX-유래된 발현 벡터를 사용하여 상기 기술된 바와 같이 수행된다.

모든 50개 단편의 클로닝을 본질적으로 하기에 기술된 바와 같이 수행하고, 이 경우에 특이적인 프라이머를 50개의 코딩 영역에 대해 각각 선택하였다. 각 HGV 삽입 DNA를, 실시에 4C에 기술된 바와 같은 특이적인 프라이머 세트를 사용하여 PNF 2161 또는 다른 HGV(+) 혈청으로부터 추출된 RNA로부터 PCR 증폭시켰다. 전형적으로, 5' 프라이머는 NcoI 제한 부위를 함유하고, 3' 프라이머는 BamHI 제한 부위를 함유하였다. 증폭된 단편중의 NcoI 프라이머는 발현 벡터인 pGEX-HisB 또는 pGEX MOV중의 GST-Sj26 코딩 서열과 증폭된 코딩 서열의 인-프레임 융합을 가능하게 하였다.

증폭된 HGV 삽입 DNA를 제한 효소인 NcoI 및 Bam HI로 분해시켰다. 분해된 삽입 DNA를 겔 정제시키고, NcoI 및 BamHI-분해된 pGEX hisB 또는 pGEX MOV와 연결시켰다. 대장균 균주 W3110 (ATCC #27325, American Type Culture Collection, Rockville, MD)을 연결 생성물을 사용하여 형질전환시켰다. 암피실린 저항성 콜로니를 선별하였다. 상기 삽입서열의 존재를 삽입된 분자 (프라이머 GLI F (서열번호 235) 및 GLI R (서열번호 236)를 플랭킹하는 pGEX 벡터 서열과 상동인 프라이머를 사용하여, 암피실린 내성 콜로니로부터의 삽입서열의 PCR 증폭에 의해 확인하였다.

<574> PCR 증폭 생성물의 크기는 삽입서열 크기 + 벡터로부터 유래된 약 160bp 이다. 적당한 삽입서열을 갖는 형질전환체를 선별하고, 실시예 7에 기술된 바와 같이 IPTG에 의해 단백질을 유도시켰다. 발현된 재조합 단백질을 추정 HGV-감염된 사람 혈청에 대한 특이적인 면역반응성에 대해 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다.

<575> GE3, GE9, GE15, GE17, GE4, EXP3, GE1-N 및 GE57로 명명되는 8개의 단편은 추정 HGV-감염된 사람 혈청과 반응하는 경우에 명백한 면역원성 반응을 나타내는 항원을 엔코딩한다.

<576> A. GE3, GE9, GE15, GE17, GE4, EXP3, GE1-N 및 GE57의 클로닝.

<577> 클론 GE3, GE9, GE15, GE17, GE4, EXP3, GE1-N 및 GE57에 대한 코딩 서열 삽입서열을, SISPA-증폭된 이중가닥 cDNA 또는 PNF 2161 또는 T55806으로부터 수득된 RNA로부터, 각 단편에 특이적인 PCR 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄 반응에 의해 생성시켰다. 하기 표 14는 서열번호 14 및 각 클론 삽입서열의 생성에 사용되는 프라이머 세트에 대한 각 클론의 코오디네이트(coordinate)를 나타낸다.

표 14

클론	혈청 공급원	서열번호 14상의 코오디네이트	F 프라이머 (서열번호)	R 프라이머 (서열번호)
GE3	PNF2161	6615-6977	GE-3F (서열번호 46)	GE-3R (서열번호 47)
GE9	PNF2161	8154-8441	GE-9F (서열번호 48)	GE-9R (서열번호 49)
GE15	PNF2161	3615-3935	GE-15F (서열번호 111)	GE-15R (서열번호 112)
GE17	PNF2161	3168-3305	GE-17F (서열번호 113)	GE-17R (서열번호 114)
GE4	PNF2161	6825-7226	GE4F (서열번호 149)	GE4R (서열번호 150)
EXP3	PNF2161	6648-7658	470EXP3F (서열번호 151)	470EXP3R (서열번호 152)
GE1-N	PNF2161	5850-6239	GE1-NF (서열번호 237)	GE1-NR (서열번호 238)
GE57	T55806	271*-456*	GE57F (서열번호 239)	GE57R (서열번호 240)

\* 이러한 서열은 서열번호 178에 대해 주어진다.

GE57의 아미노산 서열은 서열번호 241로서 제시된다.

GE3-5' 프라이머 (GE-3F, 서열번호 46)의 경우에, 침묵 점 돌연변이를 도입시켜 천연 NcoI 제한 부위를 변형시켰다. 상기에 기술된 프라이머를 이용하여, PCR 증폭 생성물을 생성시켰다. 상기 증폭 생성물을 겔 정제시키고, NcoI 및 BamHI으로 분해시키고, 다시 겔 정제시켰다. 정제된 NcoI/BamHI GE3, GE9, GE15, GE17, GE4, GE1-N 및 GE57 단편을 각각 탈인산화되고 NcoI/BamHI로 절단된 pGEX-HisB 벡터내로 연결시켰다. 상기 정제된 NcoI/BamHI EXP3 단편을 탈인산화되고 NcoI/BamHI 절단된 pGEX-MOV 벡터내로 연결시켰다.

각 연결 혼합물을 대장균 W3110 균주내로 형질전환시키고, 암피실린 저항성 콜로니를 선별하였다. 상기 암피실린 내성 콜로니를 Tris/EDTA 완충액중에서 재현탁시키고, 프라이머 GLI F (서열번호 235) 및 GLI R (서열번호 236)을 사용하는 PCR에 의한 분석으로 삽입 서열의 존재를 확인하였다. 8개의 후보 클론을 각각 GE3-2, GE9-2, GE15-1, GE17-2, GE4-8, EXP3-7, GE1-N 및 GE57로 명명하였다.

B. GE3-2, GE9-2, GE15-1, GE17-2, GE4-8, EXP3-7, GE1-N 및 GE57 융합 단백질의 발현.

GE3-2, GE9-2, GE15-1, GE17-2, GE4-8, EXP3-7, GE1-N 및 GE57-함유 벡터를 갖는 암피실린 내성 세균의 콜로니를 암피실린 함유 LB 배지내로 개별적으로 접종시켰다. 상기 배양물을, IPTG (이소프로필티오-베타-갈락토시드; Gibco-BRL)를 단백질 발현의 유도를 위해 0.3 내지 1mM의 최종 농도까지 첨가하는 시기인 OD가 0.8 내지 0.9에 이를 때까지 성장시켰다. IPTG의 존재하에서 3 내지 4시간 동안 접종을 지속시켰다.

세균 세포를 원심분리에 의해 취하고, SDS 샘플 완충액 (0.0625M의 Tris, pH 6.8, 10%의 글리세롤, 5%의 메르캅토에탄올, 2.3%의 SDS)중에서 재현탁시켰다. 상기 재현탁된 펠릿을 5분간 비등시키고, 그 후에 원심분리에 의해 불용성 세포 찌꺼기를 제거했다. GE3-2, GE9-2, GE15-1, GE17-2, GE4-8, EXP3-7, GE1-N 및 GE57의 IPTG-유도된 배양물로부터 수득된 상층액을 비유도된 용해질과 함께 SDS-폴리아크릴아미

드 겔 전기영동 (PAGE)에 의해 분석했다. 그 후에, 이러한 겔로부터의 단백질을 니트로셀룰로오스 필터로 이동시킨다 (예를 들면, 웨스턴 블로팅에 의해).

- <587> 상기 필터를 먼저 GST 단백질에 대해 유도된 토끼 폴리클로날 항체 또는 마우스 모노클로날 항체 (RM001, Sierra Biosource, CA)를 인큐베이션시켜, 적당한 크기의 GST-융합 단백질 발현을 검출했다. 상기 클론의 예측된 단백질 크기는 각각 40, 38, 39, 32, 42, 64, 42 및 33 KDa이다. 융합 단백질에 대한 적당한 분자량에서 밴드를 갖는 RM001의 면역반응성은 세균 세포에 의한 상기 클론의 융합 단백질의 성공적인 발현을 증명한다. 클론 단백질의 발현은 쿠마쉬 브릴리언트 블루-염색된 겔상에서의 IPTG 유도 동안에 적당한 크기의 단백질의 초과 발현이 나타남으로써 모니터링된다.
- <588> C. HGV 단백질의 웨스턴 블롯 분석.
- <589> HGV 클론 단백질의 발현이 항-GST 항체를 사용하는 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인되는 경우에, 그 후에 상기와 같이 제조된 필터의 제 2세트를 수 개의 HGV(+) 및 HGV(-) 사람 혈청에 노출시켰다. 완전한 세포 용해질의 웨스턴 블롯 분석에 사용되는 사람 혈청을 람다-gt11-니트로셀룰로오스 필터를 사용하여 예비-흡착시킨다. 람다-gt11-니트로셀룰로오스 필터를 하기와 같이 제조한다. 간단하게, KM392 배양물의 하룻밤 배양물을 LB중에서 제조한다. 상기 배양물을 0.2%의 말토오스를 함유하는 신선한 LB중에서 10배 희석시키고, 진동시키면서 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다.
- <590> 1시간 후에, 상기 배양물을 동일 부피의 MgCa 용액 (0.01M의  $MgCl_2$  및 0.01M의  $CaCl_2$ )과 혼합시켰다. 상기 혼합물에 람다 gt11을  $2 \times 10^4$  PFU/ml의 역가까지 첨가하고, 진동시키지 않고 30분 동안 인큐베이션시켰다. 30분 후에, (상기 파아지/대장균 혼합물 각 1ml당) 15ml의 용융된 (55°C) LB 탑(top) 아가 (0.8%의 아가를 함유한 LB)를 첨가한다: 8ml의 상기 혼합물을 각 15cm의 LB 아가 플레이트상에 스프레딩했다. 탑 아가가 고형화된 후에, 상기 플레이트를 37°C에서 3-5시간 동안 인큐베이션시켰다.
- <591> 플라크가 발생한 후에, 니트로셀룰로오스 필터를 플레이트상에 위치시키고, 상기 플레이트를 37°C에서 하룻밤 동안 더 인큐베이션시켰다. 상기 니트로셀룰로오스 필터를 분리하고, TBS (50mM의 Tris-HCl, pH 7.5, 150mM의 NaCl) + 0.05%의 "TWEEN 20"을 사용하여 완전히 세척했다. 그 후에, 상기 세척된 필터를 TBS중에서 1%의 젤라틴을 사용하여 하룻밤 동안 블로킹시켰다. 상기 필터를 TBS로 3회 (매회 5분간) 세척했다.
- <592> 사람 혈청의 예비-흡착을 위하여, 각 혈청을 블로킹 용액 (실시에 10에 기술된)중에서 100배 희석시켰다. 그 후에, 10ml의 희석된 혈청을 상기와 같이 제조된 2개의 람다 gt11 필터로 하룻밤 동안 인큐베이션시켰다. 람다 gt11 필터를 분리하고, 예비-흡착된 혈청을 웨스턴 블롯 분석에 사용했다.
- <593> 웨스턴 블롯 분석은 클론 GE3-2, GE9-2, GE15-1, GE17-2, GE4-8, EXP3-7, GE1-N 및 GE5701 HGV(+) 혈청에 대해 특이적인 면역반응성을 나타냄을 증명한다. 상기 GE-4-8 단백질을 J21689 혈청과 면역반응성이었다. J21689는 HGV PCR (실시에 4)에 의해 결정된 바와 같은 HGV(+) 혈청, 및 HCV PCR과 혈청학적 분석에 의해 결정된 바와 같은 HCV(+) 이다. 상기 EXP3-7 단백질은 JC 및 T55806과 면역반응성이었다. JC는 고 ALT임에 대해 혈액 은행에 의해 거부된, 실시에 4F에서 확인된 HGV-포지티브 혈청이다. 초기 혈청 샘플로부터 1년 후에 취한 제 2 JC 샘플은 PCR 분석에 의해 HGV에 대해서도 또한 포지티브이다. T55806은 또한 고 ALT임에 대해 혈액 은행에 의해 거부된, 실시에 4F에서 확인된 HGV-포지티브 혈청이다. 상기 혈청은 HCV에 동시-포지티브이다.
- <594> 또한, GE15-1 및 GE-17은 PNF 2161 및 T55806에 대해 약하지만 특이적인 면역반응성을 나타냈다. GE1-N은 PNF2161, JC, T55806, T56633, T27034 및 R0001과 면역반응성이 있다. T56633, T27034 및 R0001은 실시에 4F에서 확인된 HGV(+) 혈청이다. GE57은 E57963 및 R0001과 면역반응성이 있다. E57963은 HGV 및 HCV 동시-포지티브인 혈청이다. GE3-2 및 GE9-2는 또한 HGV 혈청과 또한 특이적으로 면역반응성이 있다. 그러나, 8개의 항원은 모두 HGV 네가티브 혈청 T43608 및 R05072와 면역반응성이 없다.
- <595> GE3-2 및 GE9-2 융합 단백질을, 글루타민-컨쥬게이션된 비드 (Smith, D.B. 등) 및 고정화된 금속 이온 비드 (Hochuli; Porath)를 사용하는 2중 크로마토그래피법을 이용하여 본질적으로 실시에 7에서와 같이 세균 세포 용해질로부터 정제했다. 상기 정제된 단백질을 하기와 같이 웨스턴 블롯 분석했다.
- <596> 정제된 HGV 단백질 (예를 들면, GE3-2 및 GE9-2 단백질)의 다양한 양을 12%의 아크릴아미드겔상에 로딩시켰다. PAGE를 수행한 후에, 표준 방법을 이용하여 단백질을 겔로부터 니트로셀룰로오스막으로 이동시켰다. 개개의 막을 많은 사람 또는 마우스 혈청중 하나와 함께 인큐베이션시켰다. 과량의 혈청을 막을 세척함으로써 제거했다.
- <597> 상기 막을, 스크리닝에 사용되는 혈청에 의존하여, 알칼리 포스파타아제-컨쥬게이션된 염소 항-사람 항체 (Promega) 또는 알칼리 포스파타아제-컨쥬게이션된 염소 항-마우스 항체 (Sigma)와 함께 인큐베이션시켰다. 상기 막을 재세척하여, 과량의 염소 항-사람 IgG 항체를 제거하고, NBT/BCIP에 노출시켰다. GE3 융합 단백질을 갖는 전형적인 염색된 막의 사진을 도 7A 내지 도 7D에 도시하였다.
- <598> 상기 도면은 하기 혈청을 이용하는 정제된 GE3-2 단백질의 웨스턴 블롯 분석의 결과를 도시한다: GST-Sj26 단백질에 대해 유도된, N-(ABCDE) 사람 (JC) 혈청(도 7A), N-(ABDE) 사람 (PNF2161) 혈청 (도 7B), 슈퍼 노말 (SN2) 혈청 (도 7C), 및 마우스 모노클로날 항체 (RM001)(도 7D).
- <599> 각 도면의 경우에, 레인 1은 예비-염색된 분자량 표준물(Bio-Rad)을 함유하고, 레인 2-5는 각각 하기의 GE3-2 융합 단백질의 양을 함유한다: 4 $\mu$ g, 2 $\mu$ g, 1 $\mu$ g 및 0.5 $\mu$ g. 숫자는 0.6cm의 겔 (웰 크기) 당  $\mu$ g의 로딩 양을 나타낸다. 사람 JC, PNF 2161 및 슈퍼 노말 2 혈청은 1:100이다. 항-sj26 희석은 1:1000이다. JC 블롯내 약 97K에서 나타나는 밴드는 GE3.2 융합 단백질 제조물내의 소부분의 오염물질에 대해 반응성이다. 단백질 마커 크기는 142.9, 97.2, 50, 35.1, 29.7 및 21.9KD이다.
- <600> 도 7A 내지 7D에 도시된 바와 같이, GE3-2는 JC 혈청과의 특이적인 면역반응성을 나타냈다. GE3-2는 PNC2161과 약하게 반응하였고, 이는 불명확하거나 네가티브로 기록되었다.

병렬 실험의 경우에, GE9-2는 PNF 2161 혈청에 대해 약하지만 특이적인 면역 반응성을 나타냈다.

## 실시에 12

### 예시적인 에피토프 라이브러리의 구성

#### A. Y5 라이브러리.

중합효소 연쇄 반응을 사용하여 PNF2161 SISPA-증폭된 cDNA로부터의 3개의 오버랩핑 DNA 단편을 증폭시켰다. PNF 2161 SISPA-증폭된 cDNA를 JML-A/B 링커(서열번호 54 및 서열번호 55)를 사용하여 제조했다. 상기 재료의 1 $\mu$ l를 1 $\mu$ M의 JML-A 프라이머를 사용하여 30사이클 (94°C에서 1분, 55°C에서 1.5분 및 72°C에서 2분) 동안 재증폭시켰다. 총 반응 부피는 100 $\mu$ l이었다. 이러한 3회의 증폭으로부터의 생성물을 조합하고, 제조자의 지시에 따라 "WIZARD PCR COLUMN" (Promega)를 단일 통과시켜 과량의 PCR 프라이머로부터 분리시켰다. 상기 "WIZARD PCR COLUMN"은 이온세기가 높은 완충액중에서 DNA와 결합하고, 이온세기가 낮은 완충액중에서 DNA와 분리되는 실리카-기재 수지이다. 상기 증폭된 DNA를 100 $\mu$ l의 증류수를 사용하여 컬럼으로부터 용리시켰다.

상기 용리된 DNA를 1.5%의 아가로오스 TBE겔 (Maniatis 등)상에서 분별화시키고, 에티뮴 브로마이드 염색 후에 UV 광으로 가시화시켰다. 150 내지 1000 bp인 DNA 단편의 강한 스미어가 관찰됐다. 재-증폭된 cDNA의 1 $\mu$ m를, 표 15에 제시되어 있는 각 프라이머쌍과 함께 PCR 반응에서 주형으로서 사용했다.

표 15

프라이머	서열번호	증폭된 단편의 크기
470ep-F1	서열번호 56	810
470ep-R1	서열번호 57	
470ep-F2	서열번호 58	750
470ep-R3	서열번호 59	
470ep-F4	서열번호 60	669
470ep-R4	서열번호 61	

상기 프라이머를 표 15에 나타난 크기의 HGV 특이적인 DNA 단편의 증폭을 초래하도록 디자인했다. 증폭 반응의 경우에, 상기 프라이머쌍을 1 $\mu$ M의 농도로 사용했다. 증폭은 100 $\mu$ l의 총 반응 부피로 94°C에서 1분간 30사이클 동안, 54°C에서 1.5분 동안, 72°C에서 3분 동안 수행했다. 3개의 다른 프라이머쌍 PCR 반응은 각각 예측된 크기를 갖는 생성물의 특이적인 증폭을 초래했다. 각 프라이머쌍 반응을 위하여, 3개의 독립적인 PCR 반응으로부터의 증폭 생성물을 조합하고, 상기 기술된 바와 같이 "WIZARD PCR COLUMN"을 사용하여 정제시켰다. 상기 정제된 생성물을 50 $\mu$ l의 증류수중에서 용리시켰다.

각 정제된 생성물로부터의 샘플 (약 1 내지 2 $\mu$ g의 각 프라이머-쌍 증폭된 DNA 단편을 함유하는 14 $\mu$ l)를 조합했다. 모든 3개의 다른 증폭된 단편의 조합된 샘플을 5 $\mu$ l의 10X DNase 분해 완충액 (500mM의 Tris pH 7.5, 100mM의 MnCl<sub>2</sub>) 및 2 $\mu$ l의 dH<sub>2</sub>O에 첨가했다. 이러한 분해 혼합물로부터, 10 $\mu$ l의 샘플을 분리하여, 5 $\mu$ l의 스톱 (Stop) 용액 (100mM의 EDTA, pH 8.0)을 함유하는 튜브내에 위치시켰다. 상기 샘플은 0 "분해의 분" 시간점이다. 분해 반응의 나머지를 25°C에서 위치시켰다. 분해 혼합물에 1/25 희석된 RNase-없는 DNase I (Stratagene)의 1 $\mu$ l를 첨가했다. 다양한 시간점에서, 10 $\mu$ l의 분해를 회수하여, 5 $\mu$ l의 스톱 용액과 혼합시켰다. DNase I 분해된 DNA 생성물을 1.5% 아가로오스 TBE겔상에서 분석했다.

수 개의 분해 실험의 결과는 분해의 40분이 DNA 단편을 100 - 300bp의 크기로 양호하게 분포시킴을 나타냈다. 그 후에, DNase I 분해를 실온에서 40분간 방치된 전체 분해와 함께 반복했다. 분해는 18 $\mu$ l의 스톱 완충액을 첨가함으로써 정지시키고, 분해된 DNA 생성물을 "WIZARD PCR COLUMN"을 사용하여 정제시켰다. 상기 "WIZARD-PCR COLUMN"을 50 $\mu$ l의 dH<sub>2</sub>O로 용리시키고, 상기 용리된 DNA를 하기 반응 혼합물에 첨가했다: 7 $\mu$ l의 제한 효소 완충액 C (Promega, 10mM의 MgCl<sub>2</sub>, 1mM의 DTT, 50mM의 NaCl, 10mM의 Tris, pH 7.9, 1X 농도); 11 $\mu$ l의 1.25mM의 dNTP; 및 2 $\mu$ l의 T4 DNA 중합효소 (베링거-만하임). 이러한 반응 혼합물을 37°C에서 30분간 유지시키는 동안에, pH 8.0인 70 $\mu$ l의 페놀/CHCl<sub>3</sub>을 첨가하고, 혼합했다. 상기 페놀/CHCl<sub>3</sub>을 분리시키고, 1회 추출하여 DNA 샘플을 함유하는 150 $\mu$ l의 총 수성 부피를 생성시켰다. 상기 DNA를 2부피의 무수 에탄올 및 0.5 부피의 7.5M의 NH<sub>4</sub>-아세테이트를 사용하여 에탄올 침전시켰다. 상기 DNA를 15분간 14,000 rpm으로 "EPPENDORF MICROFUGE"내에서 원심분리에 의해 펠릿화시키고, 42°C에서 5분간 건조시키고, 25 $\mu$ l의 dH<sub>2</sub>O중에서 재현탁시켰다.

상기 DNA를 5'-인산화된 SISPA 링커 KL1 (서열번호 62) 및 KL2 (서열번호 63)에 연결시켰다. 수 개의 다른 농도의 SISPA 링커 및 DNA를 시험했다. 최고 수준의 연결 (하기에 기술된 바와 같이 평가됨)은 하기 연결 반응 조건하에서 발생했다: 총 10 $\mu$ l의 반응 부피중에서, 6 $\mu$ l의 DNA, 2 $\mu$ l의 5.0 x 10<sup>-12</sup> M의 KL1/KL2 링커, 1 $\mu$ l의 10X 리가아제 완충액 (New England Biolabs) 및 1 $\mu$ l의 400 유닛/ $\mu$ l T4 DNA 리가아제 (New England Biolabs). 연결은 16°C에서 하룻밤 동안 수행했다.

2개의 반응을 하기와 같이 병렬적으로 진행시킨다. 연결된 재료의 2 $\mu$ l의 샘플을 100 $\mu$ l의 총 반응부피 (94°C에서 1분간, 55°C에서 1.5분간 및 72°C에서 2분간, 25사이클) 중에서 KL1 SISPA 프라이머를 사용하여 증폭시켰다. 연결의 정도는 1.5%의 아가로오스 TBE 겔을 사용하는 전기영동에 의해 1/5의 PCR 반응 증폭된 생성물을 분리시킴으로써 평가했다. 상기 겔을 에티뮴 브로마이드로 염색하고, 밴드를 UV 광



을 이용하여 가시화시켰다.

- <614> 복제 반응으로부터의 증폭 생성물을 "WIZARD PCR COLUMNS"을 사용하여 정제시키고, 정제된 DNA를 50  $\mu$ l의 dH<sub>2</sub>O중에서 용리시켰다. PCR KL1/KL2 증폭된 DNA의 25  $\mu$ l 분취액을 30  $\mu$ l의 총 부피중에서 36유니트의 EcoRI (Promega)를 사용하여 분해시켰다. 상기 반응을 37°C에서 하룻밤 동안 수행했다. 분해된 DNA를 "SEPHADEX G25" 스핀 컬럼을 사용하여 정제시켰다.
- <615> EcoRI 분해된 DNA를 하룻밤 반응시켜, EcoRI로 예비-분해되고 송아지 장의 알칼리 포스파타아제 (Stratagene, La Jolla, CA)로 처리된  $\lambda$ gt11 아암에 연결시켰다. 상기 연결 혼합물을 제조자의 지시에 따라 "G1GAPACK GOLD PACKAGING EXTRACT" (Stratagene)을 사용하여 패키징하였다. 수득된 재조합 파아지 양의 역가측정은 KM-392의 론(lawn)상에서 패키징된 파아지의 1/10 희석물을 플레이트팅함으로써 수행하는데, 상기 플레이트는 20  $\mu$ l의 x-gal (5-브로모-4-클로로-3-인돌일- $\beta$ -D-갈락토시다아제; Sigma) 100mg/ml 용액 및 20  $\mu$ l의 IPTG (이소프로필-1-티오- $\beta$ -D-갈락토시다아제; Sigma)의 0.1M 용액을 함유한다. 역가는 75% 이상의 재조합 파아지를 함유하여  $1.2 \times 10^6$  파아지/ml로 수득되었다.
- <616> 재조합 플라크의 %는 8개의 무작위하게 선택된 플라크를 프라이머 11F (서열번호 25) 및 11R (서열번호 13)을 사용하는 PCR분석에 의해 확인되었다. 증폭된 F1/R1, F2/R3, 및 F4/R4의 분해로부터 유래된 DNA 단편을 함유하는 이러한 패키징된 라이브러리는 DNA를 증폭시키고, 이는 라이브러리 Y5로 명명된다.
- <617> B. ENV 라이브러리.
- <618> ENV 라이브러리로 명명된 발현 라이브러리를 하기와 같이 생성시켰다. 1  $\mu$ l의 PNF 2161 SISPA 증폭된 DNA를 하기 프라이머쌍을 사용하는 중합효소 연쇄 반응에서 주형으로서 사용했다: 525개의 뉴클레오타이드 HGV 단편을 생성시키는 GEP-F15(서열번호 128) 및 GEP-R15 (서열번호 129); 및 765개의 뉴클레오타이드 HGV 단편을 생성시키는 GEP-F17 (서열번호 130) 및 GEP-R16 (서열번호 131).
- <619> PCR 증폭을 94°C에서 1시간 동안, 52°C에서 1분 동안 및 72°C에서 3분 동안을 35사이클 수행했다. 증폭된 생성물을 정제시키고, DNase I으로 분해시켰다. cDNA에 KL1 및 KL2 링커를 연결하고, DNA 단편을 증폭시키고, 람다 gt11내에서 라이브러리를 구성하는 것은 본질적으로 실시예 12A에 기술된 바와 같이 수행했다. 상기 라이브러리의 재조합 빈도는 70% 이상이었다. 람다 gt11의 플래깅 영역으로부터 유래된 프라이머를 사용하는 중합효소 연쇄 반응에 의한 삽입서열 분석은 재조합 빈도를 확인하고, 삽입서열 크기가 150-500개의 뉴클레오타이드임을 나타낸다.
- <620> C. NS3 라이브러리.
- <621> NS3으로 명명되는 발현 라이브러리를 하기와 같이 구성했다. 제 1 단편을 프라이머 470ep-F9 (서열번호 132) 및 470ep-R9 (서열번호 133)를 사용하고 주형으로서 PNF2161 SISPA 증폭된 핵산을 사용하는 중합효소 연쇄 반응에 의해 증폭시켰다. 이러한 증폭의 예측되는 생성물은 777개의 염기쌍이다. 상기 증폭된 단편은 TAE 겔상에서 분리에 의해 겔 정제시켰다. 상기 단편을 "GENECLEAN" (Bio 101, LaJolla, CA)를 사용하여 추가로 정제시켰다.
- <622> 단편 F9/R9를 공급원 재료로서 신장 클론 GE3L-11 (서열번호 41)을 사용하여 증폭시켰다. 약 25ng의 GE3L-11을 증폭 반응에서 F9 및 R9 프라이머와 함께 주형으로서 사용했다.
- <623> F9/R9 증폭은 모두 "TAQ START" (Clontech, Palo Alto, CA)를 사용하여 94°C에서 1분간, 52°C에서 2분간, 및 72°C에서 3분간을 30사이클 수행했다. 양 반응으로부터의 상기 증폭 생성물을 조합시켰다. 생성물은 DNase I (10  $\mu$ l의 GE3L 생성물 및 25  $\mu$ l의 PNF SISPA 생성물)로 분해시켰다. GE3L-기초 증폭 생성물은 대부분의 증폭 생성물 개시 재료를 나타냈다. cDNA에 KL1 및 KL2 링커를 연결하고, DNA 단편을 증폭시키고, 람다 gt11내에서 라이브러리를 구성하는 것은 본질적으로 실시예 12A에 기술된 바와 같이 수행했다.
- <624> 수득된 역가는  $2.5 \times 10^6$  파아지/ml이고, % 재조합 파지는 99% 이상인 것으로 결정되었다. 삽입서열 크기의 중합효소 연쇄 반응 분석으로 재조합 빈도를 확인하였고, 삽입서열 크기가 150 내지 550개의 뉴클레오타이드임 나타냈다.
- <625> 부가하여, 제 2 단편을 GEP-F10/GEP-R10 프라이머 (각각 서열번호 135 및 서열번호 136)을 사용하여 증폭시켰다. 1  $\mu$ l의 PNF2161 SISPA 증폭된 핵산을 주형으로서 사용했다. 570개의 뉴클레오타이드를 갖는 상기 예측된 단편 크기를 수득했다. 생성되는 증폭 생성물을 F9/R9 증폭에 대해 바로 위에 기술된 바와 같이 조작하였다. 람다 gt11에 삽입되는 경우에 이러한 단편에 대해 수득된 역가는  $1.47 \times 10^6$  파아지/ml 이며, 90%의 재조합 빈도를 갖는다.
- <626> D. NS2 라이브러리.
- <627> NS2 에피토프 라이브러리를 실시예 12A에 기술된 방법을 사용하여 구성하였다. HGV 단백질 NS2, NS3 및 NS5b의 전부 또는 일부를 함유하는 4개의 DNA 단편을 1  $\mu$ l의 PNF 2161 SISPA DNA (본질적으로 실시예 12A에서와 같이 제조됨)로부터 증폭시켰다. 상기 라이브러리를 표 16에 주어진 프라이머 및 주형으로서 SISPA 증폭된 PNF2162 DNA를 사용하여 증폭시켰다.



&lt;628&gt;

표 16

단편	nt	
9E3-REV (서열번호 264) E394-R (서열번호 265)	592	E2의 aa 358 (389중에) 내지 NS-2의 aa 166
GEP-F12 (서열번호 266) GEP-R12 (서열번호 267)	663	NS-2의 aa 144 (313중에) 내지 NS-3의 aa 51
GEP-F14 (서열번호 268) GEP-R13 (서열번호 269)	715	NS-3의 aa 357 -594
470epF8 (서열번호 270) GEP-R14 (서열번호 271)	648	NS-5의 aa 716-847 (716 내지 말단)

&lt;630&gt;

모든 증폭은 94℃/1분, 48℃/2분, 및 73℃/3분을 35사이클 수행했다. 모든 증폭은 예측된 크기의 단편이상을 생성시켰다. 증폭된 생성물을 약 1:1:1:1의 비율로 혼합하고, DNase I으로 부분 분해시켰다. 상기와 같이, 분해 생성물을 KL1 SISPA 링커에 연결시키고, 증폭시키고, EcoRI로 분해시켰다. 분해된 단편을 람다 gt11내로 연결시켰다. 상기 연결 반응을 패키징하였다.

&lt;631&gt;

패키징된 연결 생성물을 플레이팅했다. 생성되는 라이브러리를, 관찰된 삽입서열 크기가 150 내지 500개의 뉴클레오타이드를 갖고, 70% 이하의 재조합 파지를 함유하도록 결정한다.

&lt;632&gt;

E. VNS5a 라이브러리.

&lt;633&gt;

프라이머 470EXT4-2189R (서열번호 119) 및 470EXT4-29F (서열번호 120)를 사용하여, NS4a의 3'-말단 및 NS5b의 5'-말단 뿐만 아니라 HGV 단백질 NS4b 및 NS5a에 대한 전체 코딩 서열을 함유하는 2.1kb의 DNA 단편을 단리하였다. 이러한 프라이머를 사용하는 PCR 증폭을 실시예 4G에 기술된 바와 같이 수행했다. 성공적인 증폭은 하기를 포함하는 다중 HGV-감염된 혈청을 사용하는 경우에 관찰된다: 컷오프 이상의 ALT 값으로 인해 수혈이 거부된 혈액 도너로부터의 T56633; 간염을 앓고있는 이집트인으로 부터 유래된 E20; 및 전격성 간염을 발달시키는 오스트레일리아인으로 부터 유래된 샘플 AH0591.

&lt;634&gt;

E21-A 및 E20의 증폭된 생성물을, 본질적으로 실시예 6에서 기술된 바와 같이 벡터 T/A (Invitrogen로부터 입수됨, San Diego, CA)의 T 오버행 (overhang) 부위내로 클로닝하였다. 그 후에, 이러한 2개의 플라스미드로부터의 2.1kb의 HGV 삽입서열을 약 150 유닛의 제한 효소 EcoRI를 사용하여 약 20ug의 플라스미드 DNA를 분해함으로써 단리시켰다. 37°C에서 하룻밤 동안 인큐베이션시킨 후에, 분해 생성물을 TAE 아가로오스겔 전기영동에 의해 분리시켰다. 생성물을 목적 단편을 함유하는 아가로오스겔의 구획으로부터 절제하였다. 아가로오스를 용융시키고, 유리된 DNA의 추출을 제조자의 지시 (Bio 101, La Jolla, CA)에 따라 "GENECLEAN II" 키트를 사용하여 수행했다.

&lt;635&gt;

샘플 T56633 및 AH0591의 PCR 증폭으로부터 수득된 DNA 단편 뿐만 아니라 E21-A 및 E20 샘플로부터 유래된 정제된 2.1kb의 단편을 실시예 12A에 기술된 바와 같이 DNase I를 사용하여 개별적으로 분해시켰다. 모든 4개의 샘플에 대하여, 분해 조건은 100 내지 1000nt의 크기의 단편을 단리시키도록 결정했다. 정제 및 트리밍 (trimming) (실시예 12A) 후에, 4개의 HGV 감염된 각 샘플로부터 유래된 단편을 다른 세트의 SISPA 링커에 개별적으로 연결시켰다. 연결 후에, DNA를 SISPA 증폭시켰다.

&lt;636&gt;

증폭된 DNA를 37°C에서 하룻밤 동안 약 100 유닛의 EcoRI를 사용하여 개별적으로 분해시켰다. 그 후에, 분해된 DNA를 G25 수지 (5'3' Inc, Boulde, CO)를 사용하는 스핀 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제시켰다. 샘플 T56633, AH0591, 및 E21-A로부터의 분해된 DNA를 1:1:1의 비로 조합하고, 이러한 DNA 혼합물을 실시예 12A에 기술된 바와 같이 λgt11의 EcoRI 부위내로 연결시켰다. "GIGAPACK III XL"추출물 (Stratagene, LaJolla, CA)를 사용하여 패키징시킨 후에, 생성되는 라이브러리를 IPTG 및 XGAL의 존재하에서 플레이팅하였고, 약  $1.0 \times 10^6$  파아지/ml의 역가 및 약 70%의 재조합 빈도를 가지는 것으로 측정되었다.

&lt;637&gt;

### 실시예 13

&lt;638&gt;

### 에피토프 라이브러리의 면역스크리닝

&lt;639&gt;

A. 면역반응성 Y5 클론의 단리.

&lt;640&gt;

2개의 HGV 포지티브 혈청인 PNF2161 및 JFC를 본질적으로 실시예 2에 기술된 바와 같이 Y5 라이브러리의 면역스크리닝을 위해 사용했다. Y5 파아지 라이브러리를 플레이트 당 약 15,000 파아지로 20개의 플레이트상에 플레이팅했다. 상기 플레이트를 약 5시간 동안 인큐베이션시키고, 니트로셀룰로오스 필터 (Schleicher 및 Schuell)로 하룻밤동안 오버레이시켰다. 상기 필터를 AIB (1%의 젤라틴 + 0.02%의 Na 아지드)중에 6시간 동안 인큐베이션시킴으로써 블로킹시켰다. 블로킹된 필터를 TBS로 1회 세척했다.

&lt;641&gt;

10개의 Y5 라이브러리 필터를 교반하면서 PNF2161 혈청을 사용하여 하룻밤동안 인큐베이션시키고, 10개의 필터를 JC 혈청과 함께 인큐베이션시켰다. 두 혈청 모두 AIB내에서 1:10으로 희석시켰다. 비-특이적인 항체 결합을 감소시키기 위하여, 희석된 혈청을, 야생형 λgt11이 흡착되는 니트로셀룰로오스 필터를 사용하여 하룻밤 동안 인큐베이션시킴으로써 예비처리하였다.

&lt;642&gt;

상기 필터를 혈청으로부터 분리시키고, TBS를 사용하여 3회 세척하고, 염소항-사람 알칼리 포스 파타아제-퀴뉴레이션된 2차 항체 (Promega; AIB중에서 1/7500으로 희석시킴)와 함께 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 상기 필터를 TBS로 4회 세척했다. 결합된 2차 항체를, NBT 및 BCIP를 함유하는 AP 완충액

(100mM의 NaCl, 5mM의 MgCl<sub>2</sub>, 100mM의 Tris pH 9.5)중에서 필터를 인큐베이션시킴으로써 검출했다.

<643>

초기 스크리닝에서 포지티브로 시험된 플라크를 선택하고, 500 μl의 PDB(100mM의 NaCl, 8.1mM의 MgSO<sub>4</sub>, 50mM의 Tris pH 7.5, 0.02%의 젤라틴)중에서 용리시켰다. 상기 면역반응성 파아지를 100mm 플레이트 당 100 내지 500개 플라크의 총 밀도로 용리된 파아지를 리플레이팅함으로써 정제하였다. 상기 플레이트를 본질적으로 상기에 기술된 바와 같이 적당한 HGV-포지티브 혈청으로 재-면역스크리닝하였다. 발색후에, 수 개의 단리된 포지티브 플라크를 선택하고, 500 μl의 PDB내로 주입시켰다. 1시간의 인큐베이션 후에, 2 μl의 재-정제된 파아지 PDB 용액을, 11F(서열번호 25) 및 1R(서열번호 13) PCR 프라이머를 함유하는 PCR 반응에서 주형으로서 사용했다. 이러한 프라이머는 λgt11의 EcoRI 부위의 5' 에서 70개의 뉴클레오타이드(nt) 및 3' 에서 90개의 nt에 위치한 서열과 상동이다. 상기 PCR 반응을 94℃에서 1분간, 55℃에서 1.5분간 및 72℃에서 2분간의 30사이클을 통해 증폭시켰다.

<644>

상기 PCR 증폭 반응을 아가로오스겔상에서 크기-분별화시켰다. 정제된 플라크의 PCR 증폭은 각 단일-플라크 증폭 반응에 대해 단일 밴드를 야기시키고, 이 경우에 단편은 DNA 삽입서열 + 약 140bp의 5' 내지 3' 파아지 플랭킹 서열을 함유한다. 단일 밴드를 초래시키는 PCR 반응으로부터의 증폭된 생성물을 제조자의 지시에 따라서 "S-300 HR" 스피너 컬럼 (Pharmacia)를 사용하여 정제하였다. 상기 DNA를 정량하고, DNA를 Applied Biosystems 자동화된 서열분석기 373A 및 적당한 프로토콜을 사용하여 서열분석하였다.

<645>

JC 혈청을 사용하는 Y5 라이브러리의 상기-기술된 스크리닝은 표 17에 제시된 포지티브-가닥 클론의 DNA 서열분석 및 정제를 초래하였다. 포지티브-가닥 클론은 서열번호 14에 제시된 HGV 서열의 5' 내지 3' 번역에 상응한다 -- 폴리단백질리딩 프레임.

<646>

표 17

클론	혈청 스크리닝	삽입서열 크기 (염기쌍)	삽입서열 크기 (아미노산)	핵산 서열번호	엔코딩된 단백질 서열번호
Y5-10	JC	210	62	64	65
Y5-12	JC	333	94	66	67
Y5-26	JC	303	93	68	69
Y5-5	JC	153	36	70	71
Y5-3	JC	162	44	72	73
Y5-27	JC	288	86	74	75
Y5-25	JC	165	36	76	77
Y5-20	JC	165	19 <sup>1</sup>	78	79
Y5-16	JC	234	56	80	81

<648>

<sup>1</sup> 본 클론은 이중 삽입서열을 함유하고, 클론 삽입서열중 nt 69 내지 126는 HGV 서열과 상응한다.

<649>

이러한 클론은 HGV의 추정 NS5 단백질내에 2개의 면역원성 영역을 나타냈다. 서열번호 14와 같이 제시된 서열에 관한 이러한 두 영역은 6636 내지 6821 위치 및 7278 내지 7385 위치이다.

<650>

또한, PNF 2161 혈청을 사용하는 Y5 라이브러리의 스크리닝은 표 18에 제시된 하기의 네가티브-가닥 클론의 DNA 서열분석 및 정제를 초래하였다. 네가티브-가닥 클론은 서열번호 14에 제시된 HGV 서열에 상보적인 서열의 5' 내지 3' 번역에 상응한다.

<651>

표 18

클론	혈청 스크리닝	삽입서열 크기 (염기쌍)	삽입서열 크기 (아미노산)	핵산 서열번호	엔코딩된 단백질 서열번호
Y5-50	PNF 2161	349	104	82	83
Y5-52	PNF 2161	119	20 <sup>1</sup>	84	85
Y5-53	PNF 2161	250	33 <sup>2</sup>	86	87
Y5-55	PNF 2161	143	20 <sup>3</sup>	88	89

&lt;653&gt;

표 18 (계속)

클론	혈청 스크리닝	삽입서열 크기 (염기쌍)	삽입서열 크기 (아미노산)	핵산 서열번호	엔코딩된 단백질 서열번호
Y5-56	PNF 2161	366	110	90	91
Y5-57	PNF 2161	231	65	92	93
Y5-60	PNF 2161	151	38	94	95
Y5-63	PNF 2161	125 <sup>4</sup>	25	96	97

&lt;655&gt;

<sup>1</sup> 본 클론은 이중 삽입서열을 함유하고, 상기 클론 삽입서열중 nt46 내지 nt105는 HGV 서열에 상응한다.

&lt;656&gt;

<sup>2</sup> 본 클론은 이중 삽입서열을 함유하고, 상기 클론 삽입서열중 n19 내지 118은 HGV 서열에 상응한다.

&lt;657&gt;

<sup>3</sup> 본 클론은 이중 삽입서열을 함유하고, 상기 클론 삽입서열중 nt70 내지 126은 HGV 서열에 상응한다.

&lt;658&gt;

<sup>4</sup> 본 삽입서열은 뉴클레오티드 19 내지 35의 추가의 비-HGV 서열을 함유한다.

&lt;659&gt;

이러한 모든 서열은 PNF 2161 혈청을 사용하여 단리시킨 원래의 HGV 클론 470-20-1의 일부를 함유한다.

&lt;660&gt;

Y5 라이브러리로부터의 추가 에피토프 클론을 하기와 같이 단리시켰다. Y5 라이브러리를 실시예 13에 기술된 방법을 이용하여 HGV-감염된 혈청 J21689 및 T56633를 사용하여 스크리닝하였다. 400개 이상의 포지티브 플라크를 수득하고, 이는 이러한 HGV 감염된 두 혈청 모두에 의해 인식된 강한 면역원성 서열의 존재를 나타낸다. 이러한 포지티브 플라크중 10개를 정제시키고, DNA를 서열분석하였다. DNA 서열분석으로부터 수득된 결과를 표 19에 나타냈다.

&lt;661&gt;

표 19

클론	HGV VAR	혈청	START*	STOP
Y5-114-1A	PNF	J21689	6636	6827
Y5-114-2B	PNF	J21689	6678	6935
Y5-121-19A	PNF	T56633	6678	7063
Y5-121-11A	PNF	T56633	6636	6917
Y5-121-12A	PNF	T56633	6636	6959
Y5-121-15A	PNF	T56633	6636	6917
Y5-121-16A	PNF	T56633	6636	6989
Y5-121-17A	PNF	T56633	6636	7082
Y5-121-20A	PNF	T56633	6636	6929
Y5-121-18A	PNF	T56633	6636	6896

&lt;663&gt;

\* start/stop 위치는 서열번호 14에 관해 주어진다.

&lt;664&gt;

이러한 라이브러리의 스크리닝으로부터 이전에 수득된 것들 갖는 상기 서열의 비교는 이러한 클론이 모두 이전에 단리된 에피토프 클론 Y5-10에 함유된 동일한 에피토프(들)임을 나타낸다. 상기 클론중 2개인 Y5-114-2B 및 Y5-121-19A를 이의 5' 말단이 이전에 관찰된 클론 Y5-10, Y5-12, 및 Y5-26의 start 보다 NS5a의 카복시 말단에 14개 아미노산이 더 연속하여 위치한다는 사실에 의해 구별된다. 상기 클론중 어느 것도 클론 Y5-10에서 관찰된 3' 말단 내부에 이것의 3' 말단을 가지지 않는다. 이와 같이, 이러한 에피토프의 최소 서열은 아미노산 서열 (서열번호 272)에 포함되어 있다.

&lt;665&gt;

B. ENV 라이브러리로부터의 항원성 클론.

&lt;666&gt;

상기 ENV 라이브러리를 HGV 혈청인 J21094로 스크리닝했다. 이러한 혈청(J21094)는 제 1세대 (c-100) HGV 시험을 기초로하여 HCV 포지티브로서 확인되었다. 최초 J21094 혈청 샘플 및 후속하여 수득된 J21094 샘플의 PCR에 의한 및 다른 HGV 항원을 사용한 후속 시험은 혈청에 대한 공급원 개체가 HCV 감염되었음을 확정하였다. HGV 핵산의 존재에 대한 증거를 470-20-1 및 NS5 프라이머 세트를 사용하는 PCR 분석을 통해 수득하였다.

&lt;667&gt;

많은 파아지 클론을 J21094 혈청과 면역반응성 있는 것으로 확인했다. 상기 파아지를 플라크 정제시키고, 서열분석하였다. 상기 클론중 7개 (Q7-12-1, Q7-16-2-2, Q7-15-2, Q7-17-2-1, Q7-19-1, 및 Q7-19-2-1)는 동일한 삽입서열을 함유한다. Q7-12-1에 대한 뉴클레오티드 서열을 서열번호 143 (폴리펩티드 서열, 서열번호 144)로서 제시하였다.

<668> 바로 앞에 기술된 방법에 의해 수득되는 1개의 추가적인 클론인 Q7-16-1은 Q7-12-1과 같은 5' 말단을 가지지만, 3' 말단에서는 26개의 아미노산 만큼이 짧았다.

<669> C. NS3 라이브러리로부터의 항원성 클론.

<670> F9/R9 파아지 및 F10/R0 파아지의 1:1 혼합물을 하기 혈청을 사용하여 스크리닝했다: PNF 2161, J21689 및 E57963. 상기 J21689 및 E57963은 모두 PCR (다중 프라이머를 사용하는)에 의해 HCV 및 HGV에 동시-포지티브인 것으로 시험되는 혈청이다. 각 면역스크리닝을 10개의 플레이트중에서 또는 약 150,000 개의 파아지중에서 수행했다. 이러한 스크린에서 확인된 일부 면역침전성 클론은 하기와 같다.

<671> 클론 Y12-10-3 (폴리뉴클레오타이드 서열, 서열번호 145; 폴리펩티드 서열, 서열번호 146)은 J21689 혈청과 이것과의 면역반응성에 의해 확인된다. 상기 클론은 HGV NS3로부터 88개의 아미노산 삽입 서열을 발현시킨다.

<672> 클론 Y12-15-1 (폴리뉴클레오타이드 서열, 서열번호 147; 폴리펩티드 서열, 서열번호 148)은 E57963과 이것의 면역반응성에 의해 확인된다. 상기 클론은 HGV의 NS3 단백질로부터의 64개의 아미노산 삽입서열을 발현시킨다. 이러한 서열은 클론 Y12-10-3에 대해 5' 의 약 70개의 아미노산에 위치한다.

<673> D. NS2 라이브러리로부터의 항원성 클론.

<674> 다중 포지티브 플라크를 HGV-포지티브 혈청 T56633을 사용하여 NS2 라이브러리를 스크리닝함으로 써 단리하였다. 후속하여, 이러한 플라크중의 11개를 정제시키고, DNA를 서열분석하였다. 이러한 플라크 내에 함유된 삽입서열의 위치 (서열번호 14에 대해)를 표 20에 나타냈다.

표 20

클론	HGV VAR	혈청	START*	STOP
Q9-18-5	PNF	T56633	3071	2778
Q9-18-3	PNF	T56633	2951	2745
Q9-20-4	PNF	T56633	3002	2745
Q9-18-2	PNF	T56633	2990	2745
Q9-20-8	PNF	T56633	3062	2745
Q9-20-5	PNF	T56633	2972	2787
Q9-17-1	PNF	T56633	2990	2745
Q9-19-3	PNF	T56633	2982	2745
Q9-19-1	PNF	T56633	2982	2745
Q9-19-5	PNF	T56633	2984	2745
Q9-20-2	PNF	T56633	3027	2745

<677> \* 본 표에서, 위치는 서열번호 14에 대해 주어진다. 클론의 실제 서열은 지시된 단편의 상보서열이다.

<678> 모든 면역클론은 동일한 오픈 리딩 프레임 (ORF)의 일부를 발현시킨다. 이러한 리딩 프레임은 폴리단백질을 엔코딩하는 서열에 상보적인 HGV 폴리뉴클레오타이드 가닥에 의해 엔코딩된다. 이러한 ORF는 서열번호 14에 상보적인 서열의 nt 6322 내지 6865이다. 이러한 ORF에는 159개의 아미노산 단백질을 생성시키는 상보적인 가닥의 nt 6388에 위치된 번역 개시 부위로서 작용할 수 있는 메티오닌이 있다.

<679> 모든 11개의 서열분석된 클론에 공통인 최소 아미노산 서열은 nt 6342 내지 6606 (서열번호 14의 상보적인 가닥에 대해)에 위치한다. HGV-PNF 2161의 네가티브 가닥 영역에 의해 엔코딩된 아미노산 서열을 서열번호 273으로서 제시하였다.

<680> 면역반응성 네가티브 가닥 영역의 서브클로닝 및 후속 웨스턴 블롯 분석을 하기에 기술하였다.

<681> E. VNS5a 라이브러리로부터의 항원성 클론.

<682> VNS5a 라이브러리로부터의 약  $1.5 \times 10^5$  개의 파아지를 플레이트팅하고, 후속하여 실시예 13에 기술된 방법을 이용하여 HGV-포지티브 혈청 J29374로 스크리닝하였다. J29374를 사용하는 VNS5a 라이브러리의 면역스크리닝은 다중 포지티브 플라크의 단리를 초래하였다. 이러한 플라크중 6개를 정제시키고, 후속하여 DNA 서열분석하였다. 수득된 DNA 서열의 원래의 균주는 SISPA 링커 서열이 클론의 5' 내지 3' 말단에 존재함에 의해 결정될 수 있다. 수득된 클론의 start 및 stop의 위치(서열번호 14에 대해) 및 이것의 공급원 혈청을 표 21에 요약하였다.

&lt;683&gt;

표 21

클론	HGV 변이체 공급원	형질	START*	STOP
Q11-14-2	AH0591	J29374	6525	6749
Q11-16-1	E21-A	J29374	6432	6935
Q11-10-2	T56633	J29374	6579	6710
Q11-18-2	T56633	J29374	6579	6758
Q11-22-1	T56633	J29374	6576	6680
Q11-9-1	T56633	J29374	6531	6851

&lt;685&gt;

이러한 모든 클론은 클론 Q11-22-1과 공통인 서열 (서열번호 274)을 함유한다. 이러한 아미노산 서열은 Y5-10 에피토프의 최소 서열에 대해 5' 에 연속하여 위치한다. 이와 같이, 이것은 HGV NS5a중의 추가의 특이한 에피토프 (Y5-10 및 Y5-5와 함께)를 규정한다. 이러한 3개의 HGV 변이체의 관찰된 아미노산 서열과 PNF-2161 및 JC 단리물 서열의 비교를 통해 아미노산 치환은 거의 없는 것으로 밝혀졌다.

&lt;686&gt;

## 실시에 14

&lt;687&gt;

## 면역반응성 클론의 추가 특징화

&lt;688&gt;

A. 서브클로닝.

&lt;689&gt;

1. Y5 클론.

&lt;690&gt;

클론 Y5-10, Y5-16 및 Y5-5를 발현벡터인 pGEX-HisB내로 서브클로닝시키기 위해 선택했다. 이러한 클론의 말단에서 외래 링커 서열을 분리시키는 PCR 프라이머를 디자인하였다. 이러한 프라이머를 또한 (i) 각 삽입서열의 5' 말단 (코딩 서열에 대한)에서의 NcoI 부위, 및 (ii) 각 삽입서열의 3' 말단에서의 BamHI 부위에 삽입시켰다. 이러한 프라이머 (표 22 참조)를 이용하는 경우에, DNA 단편을 순수한 플라스미드 2 µl로부터 증폭시켰다.

&lt;691&gt;

표 22

클론	프라이머 세트
Y5-10	Y5-10-F1 서열번호 99
	Y5-10-R1 서열번호 100
Y5-16	Y5-16F1 서열번호 101
	470ep-R3 서열번호 102
Y5-5	Y5-5-F1 서열번호 103
	470ep-R3 서열번호 102

&lt;693&gt;

증폭을 하기와 같이 수행했다: 94℃에서 1분간, 50℃에서 1.5분간 및 72℃에서 2분간의 30사이클. 증폭 후에, 생성된 DNA를 "WIZARD PCR" 스핀 컬럼을 사용하여 정제시키고, 샘플을 50 µl 중에서 용리시키고, NcoI 및 BamHI를 사용하여 하룻밤동안 분해시켰다. 각 효소를 제한 엔도뉴클레아제 분해에서 최소 30 유닛으로 사용했다 (NcoI, 베링거 만하임; BamHI, Promega).

&lt;694&gt;

상기 분해된 PCR 단편을 NcoI 및 BamHI로 분해시킨 발현벡터 pGEX-HisB에 하룻밤 동안 연결시켰다. 연결된 플라스미드의 각 세트를 각각 사용하고, 열 충격 프로토콜 (Ausubel, et al.; Maniatis, et al.)을 이용하여 대장균 균주 W3110을 형질전환시켰다. 형질전환체를 100 µg/ml의 암피실린을 함유하는 LB 플레이트상에서 선별하고, 내성 콜로니를 100 µg/ml의 암피실린을 함유하는 LB 2ml에 접종시켰다. 비-재조합 sj26/his 단백질을 발현시키는 배양물을 또한 제조하였다.

&lt;695&gt;

37℃에서 하룻밤 동안 접종시킨 후에, 배양물을 신선한 LB + 암피실린의 2ml내에 1/10 희석시키고, 37℃에서 추가 1시간 동안 성장시켰다. IPTG를 최종 농도 0.2mM 까지 첨가하고, 배양물을 37℃에서 3 시간 동안 더 성장시켰다. 상기 세균을 원심분리에 의해 펠릿화시키고, 세균 펠릿을 100 µl의 PBS중에서 재현탁시켰다. 펠릿에, 100 µl의 2X SDS 샘플 완충액 (0.125M의 Tris, pH 6.8, 10%의 글리신, 5%의 β-메르캅토에탄올, 2.3%의 SDS)을 첨가한다. 생성되는 용해질을 볼텍스시키고, 5분간 100℃ 까지 가열하였다. 각 용해질의 분취액 (15 µl)을 12%의 아크릴아미드 SDS-PAGE 겔상에 로딩하였다.

&lt;696&gt;

상기 발현된 단백질을 전기영동에 의해 크기-분별화시켰다. 분리된 단백질을 표준 기술 (Harlow, et al.)을 이용하여 겔로부터 니트로셀룰로오스 필터로 이동시켰다. 발현된 단백질을 함유하는 추가 겔을 쿠마쉬 블루 단백질 염색법을 사용하여 염색했다.

&lt;697&gt;

플라스미드 Y5-10, Y5-5 및 Y5-16을 함유하는 형질전환체는 현저한 양의 정확한 크기의 재조합 융합 단백질을 발현시켰다. 재조합 융합 단백질의 동정은 sj26 (Sierra BioSource, Gilroy, CA)과 특이적으로 면역반응성인 유린 모노클로날 항체를 사용하는 웨스턴 블롯 (상기에서 제조된)을 인큐베이션시킴으로써 확인했다.



- <698> 선택된 콜로니가 적당한 삽입서열을 함유한다는 추가의 확인은 하기와 같이 수득되었다. 각 콜로니에 대한 파아지 용액을, 접종시킨 재조합 클론을 추정적으로 발현시키는 소량의 세균을 함유하는 이쑤시개를 사용하여 40  $\mu$ l의 TE 용액을 접종시킴으로써 제조했다. 5  $\mu$ l의 샘플을 각 용액으로부터 취하고, 개별적으로 PCR 증폭시켰다.
- <699> 상기 증폭은 적당한 정방향 프라이머, (예를 들면, 추정적으로 Y5-10을 발현하는 콜로니에 대해 Y5-10 F) 및 플라스미드 pGEX-HisB의 클로닝 부위에 대해 3'에 위치한 서열에 상동인 역방향 프라이머 (서열번호 104)를 사용했다. 상기 PCR 증폭은 하기와 같은 25사이클이다: 94°C에서 1분간, 50°C에서 1.5분간 및 72°C에서 2분간. 추가 분석을 위해 선택된 모든 콜로니는 이러한 조건하에서 다른 명백한 밴드가 없이 정확한 크기의 DNA 밴드를 생성시켰다.
- <700> Y5-10, Y5-16, 및 Y5-5 삽입서열 (sj26-his 융합 단백질로서 발현됨)로부터 발현되는 항원의 면역반응성을 하기와 같이 결정하였다. 상기와 같이 제조된 미정제 용해질의 분취액 (15  $\mu$ l)을 12%의 아크릴아미드겔을 사용하는 SDS-PAGE에 의해 크기-분별화시켰다. 상기 단백질을 니트로셀룰로오스 필터상에서 전기-블롯팅("NOVEX MINICELL MINIBLOT II" San Diego, CA)시켰다. 그 후에, 상기 필터를 하기 혈청중의 하나와 개별적으로 인큐베이션시켰다: JC, PNF2161 및 네가티브 대조구로서 슈퍼 노말 혈청 4 (SN4) (R05072). 부가하여, 1개의 필터를 항-sj26 모노 클로날 항체 (RM001; Sierra BioSource)와 함께 인큐베이션시켰다.
- <701> 예측된 바와 같이, Y5-10, Y5-5 및 Y5-16 삽입서열에 의해 엔코딩된 항원을 발현시키는 세균에 의해 생성된 재조합 단백질은 모두 JC 혈청과 반응하였다. PNF2161 또는 SN4 혈청과는 반응성이 관찰되지 않았다. 모든 단백질은 항-sj26 모노클로날 항체에 대한 이들의 반응성에 의해 결정된 바와 같이 유사한 수준으로 발현되는 것으로 나타났다. Y5-5 및 Y5-10 엔코딩된 단백질을 추가 정제를 위해 선택했다.
- <702> Y5-5 및 Y5-10-함유 pGEX-HisB 벡터를 함유하는 대장균을 배양하고, 융합 단백질의 발현을 상기에 기술된 바와 같이 유도시켰다. 상기 세포를 2mM의 PMSF를 함유하는 PBS중에서 1500psi에서의 프렌치 프레스(French Press)를 이용하여 용해시켰다. 상기 미정제 용해질을 스피닝시켜 세포 찌꺼기를 제거하였다. 상층액을 글루타틴 친화성 컬럼상에서 높은 흐름속도로 로딩시키고, 컬럼을 10 컬럼 부피의 PBS로 세척했다. Y5-5 및 Y5-10 융합 단백질을 10mM의 글루타티온을 함유하는 10mM의 Tris pH 8.8로 용리시켰다.
- <703> 각 융합 단백질 샘플을 완충액 A (8M의 우레아를 함유하는 10mM의 Tris pH 8.8)로 1/10 희석시키고, 니켈 충전된-킬레이팅 "SEPHAROSE" 고속 흐름 컬럼상에 로딩시켰다. 각 컬럼을 추가의 오염물질이 용리되지 않을 때까지 완충액 A로 반복적으로 세척하였다. 상기 융합 단백질을 완충액 A중에서 이미다졸의 구배를 이용하여 용리시켰다. 이미다졸 구배를 20 컬럼 부피중에서 0 내지 0.5M의 이미다졸로 진행시켰다. 상기 단편을 수집하였다.
- <704> 단편의 세트를 각각 12%의 폴리아크릴아미드겔을 사용하는 표준 SDS PAGE에 의해 분석했다. Y5-5 및 Y5-10 융합 단백질-함유 단편의 푸울을 개별적으로 제조했다.
- <705> 도 8A 내지 8D는 하기 샘플 ( $\mu$ g/레인)의 웨스턴 블롯 분석의 결과를 나타낸다: 레인 1, Y5-10 항원 1.6  $\mu$ g; 레인 2, Y5-10 항원 0.8  $\mu$ g; 레인 3, Y5-10 항원 0.4  $\mu$ g; 및 레인 4, Y5-10 항원 0.2  $\mu$ g. 사람 혈청 JC (도 8A) 및 슈퍼 노말 2 혈청(도 8B)을 1:100으로 희석시켰다. 항-GST 마우스 모노클로날 항체인 RM001 (도 8C)를 1:1000으로 희석시켰다. 도 8D는 SDS-PAGE에 의해 해상되고, 니트로셀룰로오스막 상으로 이동되고, Ponceau S 단백질 염색법 (Kodak, Rochester, NY; Sigma)으로 염색되는 Y5-10 항원을 보여준다. 화살표는 Y5.10 항원의 위치를 나타낸다. 이러한 결과는 Y5-10이 특이적으로 N-(ABCDE) 사람 혈청 JC와 면역반응성이 있음을 증명한다.
- <706> 도 9A 내지 9D는 하기 샘플의 웨스턴 블롯 분석의 결과를 나타낸다: 레인 1, Y5-5 항원, 3.2  $\mu$ g; 레인 2, Y5-5 항원 1.6  $\mu$ g; 레인 3, Y5-5 항원 0.8  $\mu$ g; 레인 4, Y5-5 항원 0.4  $\mu$ g; 레인 5, Y5-5 항원 0.2  $\mu$ g; 레인 6, GE3-2 항원 0.4  $\mu$ g; 및 레인 7, Y5-10 항원 0.4  $\mu$ g. 사람 혈청 JC (도 9A), T55806 (도 9B) 및 슈퍼 노말 2 혈청 (도 9C)를 1:100으로 희석시켰다. 항-GST 마우스 모노클로날 항체인 RM001을 1:1000으로 희석시켰다. 화살표는 항원 Y5.5, GE3.2 및 Y5.10의 위치를 나타낸다. 이러한 결과는 Y5-5 항원과 JC 혈청과의 특이적인 면역반응성을 나타낸다. 또한, 항원 GE3-2 및 Y5-10은 T55806과 반응성이 있다. 그러나, Y5-5 항원은 HGV-포지티브 혈청 T55806과 반응성이 없다.
- <707> Y5-10 항원을 또한 SDS 폴리아크릴아미드겔 전기영동에 의해 크기-분별화시켰다. 상기 겔을 coomassie blue 단백질 염색법을 이용하여 염색했다. 상기 겔을 레이저 밀도계를 사용하여 점도에 대해 스캐닝했다. Y5-10 융합 단백질의 순도는 약 95% 이었다.
- <708> 2. ENV 클론.
- <709> 면역클론인 Q7-12-1은 본래 HGV 포지티브 혈청 J21094를 사용하는 ENV 에피토프 라이브러리를 스크리닝함으로써 단리되었다. 서열-특이적인 프라이머를 사용하여, Q7-12-1  $\lambda$ gt11 클론내에 함유된 HGV 삽입서열을 단리시켰다. 상기 Q7-12-1 삽입서열을 절제시키고, pGEX-Nde내로 클로닝하였다. 상기 삽입서열의 서열을 DNA 서열분석(서열번호 275)에 의해 확인했다.
- <710> 3. NS3 클론.
- <711> 면역클론인 Y12-15-1은 본래 HGV 포지티브 혈청 E57963를 사용하는 NS3 에피토프 라이브러리를 스크리닝함으로써 단리되었다. 서열-특이적인 프라이머를 사용하여, Y12-15-1  $\lambda$ gt11내에 함유된 HGV 삽입서열을 단리하였다. 상기 Y12-15-1 삽입서열을 절제시키고, pGEX-Nde내로 클로닝하였다. 삽입서열의 서열을 DNA 서열분석(서열번호 276)에 의해 확인했다.
- <712> 면역클론 Y12-10-3은 본래 HGV 포지티브 혈청 J21689를 사용하는 NS3 에피토프를 스크리닝함으로써 단리되었다. 서열-특이적인 프라이머를 사용하여 Y12-10-3  $\lambda$ gt11 클론내에 함유된 HGV 삽입서열을 단리하였다. 상기 Y12-10-3 삽입서열을 절제시키고, pGEX-Nde내로 클로닝하였다. 선택된 클론에 의한 융합

단백질의 생성을 DNA 서열분석 (서열번호 277)에 의해 확인했다.

#### 4. NS2 클론.

서열번호 14의 NS2 영역의 서열에 상보적인 서열로부터 유래된 다중 네가티브 가닥 면역클론을 단리하였다. 네가티브 가닥의 HGV에 의해 엔코딩된 2개 이상의 현재 ORF가 존재한다. 클론의 Q9 연속물에 의해 나타나는 이러한 ORF중 제 1 ORF는 상기에 기술되어 있다. 이러한 ORF중 제 2 ORF는 서열번호 14의 상보서열의 nt 6723 내지 7359에 위치하고, 또한 nt 6774에서 5' 메티오닌을 가진다. 상기의 제 2 ORF는 162개의 아미노산 단백질을 엔코딩한다.

이러한 2개의 네가티브 가닥 ORF 모두의 서열의 선택된 일부를 발현벡터인 pGEX-Nde내로 클로닝하였다. 이러한 모든 서브클론은 적당한 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하는 PNF 2161 SISPA 재료의 PCR 증폭에 의해 수득되며, 이와 같이 이들은 HGV-PNF 2161 변이체의 서열을 함유한다. 표 23은 명칭, ORF의 크기 및 서열번호 14의 상보서열에 대한 위치를 나타낸다.

표 23

명칭/ORF	ORF	NT로부터 (ATG)	NT 까지
5' NEG ORF	159 AA	6388	6865
3' NEG ORF	162 AA	6722	7258
NORF-F1/R1	3'	7107	7259
NORF-F4/R1	3'	6900	7259
NORF-F4/KR2	3'	6901	7172
NORF-F2/R1	3'	6744	7259
NORF-KF2/R4	5'	6684	6865
NORF-KF1/R2	5'	6881	6742
NORF-F3/R2	5'	6389	6742
NORF-F2/R3	3'	6744	6899
K3P-KF2/KR1	5'	6684	6772
	3'	6744	6791

상기 표의 처음 2라인은 서열번호 14의 상보서열에 대한 NS2 영역의 5' 내지 3' 네가티브 가닥 ORF의 위치를 확인시킨다. 남아있는 라인들은 모든 9개의 클론에 의해 발현된 특이적인 뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 수 개의 클론이 ORF의 추정적인 HGV 개시 메티오닌에 대해 5'에 위치한 아미노산을 발현시키는 것이 주목된다. 또한, 상기 표에 기재된 마지막 클론인 K3p-KF2/KR1은 5'ORF의 지시된 일부 다음에 3' ORF의 지시된 일부를 발현시키는 키메라이다.

후속하여 모든 DNA 단편을 pGEX-Nde내로 클로닝하였다. 또한 클론을 함유하는 삽입서열을 확인했다.

#### 5. NS5a 클론.

표 24는 많은 NS5a 클론 및 이것이 상응하는 서열번호 14의 영역을 기재하고 있다.

표 24

명칭	HGV 공급원	START	STOP
EXY10-F2	PNF	6416	6827
EXY10-F3	PNF	6537	6827
Q11-F1-R1	T56633	6537	6680
Q11-F1-R2	T56633	6537	6827
Q11-F2-R1	T56633	6576	6680
Q11-F2-R2	T56633	6576	6827
Y5-12	PNF	6633	6917
EXY12	PNF	6918	6977
EXY10F14	PNF	6822	6977

이러한 서열은 엔코딩된 단백질 항원의 발현을 위해 벡터 pGEX-Nde내로 클로닝하였다.

B. 선택된 HGV 서브클론의 웨스턴 블롯 분석.

<726> 상기에 기술된 2개의 네가티브 및 포지티브 가닥의 구성물의 반응성을 결정하기 위하여, 다양한 HGV 서브클론을 발현시키는 세균으로부터의 완전한 세포 용해질을 본질적으로 실시예 13B에 기술된 바와 같이 제조했다. 그 후에, 발현된 단백질의 분취액을 SDS-PAGE에 의해 분별화시키고, 단백질을 니트로셀룰로오스 필터에 이동시키고, 필터를 HGV-포지티브 또는 대조구 혈청 (예를 들면, 항-SJ26 MAB RM01)으로 프로빙하였다. 상기 블롯을 적당한 리포터 항체와 함께 인큐베이션시켰다.

<727> 시험되는 HGV 단백질에 대하여, 단백질 NORF-F3/R2에 대한 명백한 면역반응성을 HGV 혈청인 J21689 및 T56633을 사용하여 검출했다. 상기 NORF-F3/R2 서브클론은 네가티브 가닥 에피토프 클론의 Q9 연속물에 의해 또한 엔코딩된 아미노산 서열을 발현시킨다. HGV 혈청인 T56633과의 관찰된 강한 반응성은 이러한 HGV의 네가티브 가닥의 영역의 면역반응성을 확인시킨다. NORF-F3/R2 단백질에 대한 반응성은 HGV 네가티브인 개개의 R04316으로부터의 혈청 또는 모든 5개의 시험되는 다른 HGV 네가티브 슈퍼노말 혈청과는 관찰되지 않는다.

<728> 추가 블롯은 5' 네가티브 가닥 ORF의 1/2에 위치한 카복시 말단의 아미노산을 발현시키는 다른 주요 5' ORF 클론 NORF KF2-R4는 HGV-포지티브 혈청 T56633과 반응하지 않음을 나타낸다. 상기에 기술된 Q9 에피토프 클론의 위치와 관련된 이러한 관찰은 상기 네가티브 가닥의 이러한 일부의 면역원성 에피토프가 상기에 묘사된 55개의 아미노산 (서열번호 273)내에 함유됨을 시사한다. 이러한 서열이 J21689를 포함하는 다른 HGV 항혈청에 의해 인식된다는 사실은 이러한 서열에 대한 면역원성이 HGV 감염된 개체중에서 비교적 광범위하게 퍼져있음을 나타낸다.

<729> 또한, Y12-10-3 단백질을 갖는 명백한 면역원성이 HGV-감염된 혈청인 J21689, J29374 및 E57693에서 관찰되었다. 이러한 반응성의 특이성은 IPTG에 의한 Y12-10-3 단백질 발현 유도의 부재하에서 HGV 항혈청인 J29374 또는 E57963과의 면역반응성이 관찰되지 않음으로써 추가적으로 뒷받침된다. Y12-10-3에 대한 반응성은 시험되는 모든 7개의 슈퍼노말 혈청에서는 관찰되지 않았다.

<730> 실시에 15

<731> 다가 항원 HGV 진단적 검정법

<732> 상기에 기술된 에피토프 클론이 모든 HGV PCR-포지티브 혈청과 반응성이 없는 것으로 나타나더라도, 이러한 클론중 많은 클론은 이들이 시험되는 HGV 감염된 혈청의 실질적인 분획과 반응한다. 추가적으로, 이러한 단백질은 HGV-네가티브 혈청과의 실질적인 교차 반응성은 나타내지 않았다. 따라서, 이러한 단백질중 수 개를 조합하여 단백질의 개별 반응성이 합쳐지는 진단적 검정법을 구성할 수 있다. 그러한 검정법은 HGV-포지티브 혈청의 검출에 대해 비교적 고감도를 가지고, HGV-네가티브 혈청과는 비교적 낮은 백그라운드 반응성을 가지는 것으로 예측된다.

<733> 그러한 검정법에 유용한 전형적인 에피토프/항원은 비제한적으로 NORF-F3/R2(NS2-Neg 가닥), Y12-10-3 (NS3), Q11-F2-R1 (NS5a), Y5-10 (NS5a), Y5-5 (NS5a), Q11-F2-R2 (NS5a의 2개의 에피토프를 조합함)을 포함한다.

<734> 이러한 검정법을 위하여, 전형적으로 다른 HGV-포지티브 혈청의 세트를 인식하는 다른 특이한 에피토프를 함유하는 개개의 항원을 선택한다.

<735> 또한, 그러한 항원은 전형적으로 HGV-네가티브 혈청과는 현저히 반응하지 않는다. 본 발명의 안내에 따라서, 추가의 유용한 면역원성 클론을 분리할 수 있다.

<736> 다가-항원 진단적 검정은 많은 포맷을 택할 수 있다. 한 가지 구체예의 경우에, 상기 검정은 니트로셀룰로오스 스트립 또는 다른 편리한 고체상 포맷상의 개별적인 위치에서 각각의 5 HGV 단백질 및 대조구 단백질을 고정화시키는 것을 수반할 수 있다. 다른 방법으로서, 예를 들면 HGV-융합 단백질의 비-바 이러스 일부는 SDS PAGE 및 후속 웨스턴 블롯 분석 동안에 쉽게 구별가능한 위치로 자연스럽게 이동하도록 삽입 또는 결실중 하나에 의해 변형될 수 있다. 그 후에, 스트립을 시험 혈청중에서 인큐베이션시킨다. 결합된 항체를 검출한 후에, 혈청은 (i) 이것이 반응성이 있는 항원의 숫자 및 (ii) 면역학적 반응의 세기를 기초로하여 기록될 수 있다. 비-HGV 대조구 단백질에 대한 반응성은 혈청을 분류될 수 없게 한다. 모든 HGV 단백질과의 비반응성은 혈청을 HGV-네가티브로서 분류한다.

<737> ELISA-기초 스크리닝 검정법은 단일 반응에서 정제된 항원 단백질을 조합함으로써 또는 2개 이상의 반응성 에피토프를 단일 단백질 (예를 들면, HGV 모자이크 폴리펩티드)을 발현시키는 단백질 구성물을 제조합함으로써 구성할 수 있다. 모자이크 폴리펩티드를 구성하는 방법은 본원에 기술되어 있다. 상기에 기술된 Q11-F2-R2 구성물은 사실 단일 폴리펩티드 사슬에서 2개의 개별적인 에피토프를 엔코딩하는 "매트릭스 단백질"을 나타낸다. 웨스턴 블롯 검정법은 그러한 ELISA 스크리닝 시험에 대한 확인 검정법으로서의 역할을 할 수 있다.

<738> 다른 방법으로서 또는 부가하여, E2, NS5a 및 NS3와 같은 전장 HGV 단백질을 단일 반응 구역내에 위치시킬 수 있다. 그러한 단백질과 반응성이 있는 혈청은 또한 웨스턴 블롯 검정법에 의해 HGV 포지티브인 것으로서 확인할 수 있다.

<739> 실시에 16

<740> 거대한 HGV 폴리펩티드의 발현

<741> A. 대장균중의 거대한 HGV 항원의 발현

<742> 1. 클로닝 및 발현.

<743> 형태적 HGV 에피토프 (작은 오버래핑 HGV 구성물 또는 파아지 라이브러리 스크리닝에 의해 포함되지 않음)를 확인하기 위하여, 보다 거대한 HGV 단백질 구성물을 절단 부위의 예측 (Bazan, et al., 1989; Chambers, et al., 1990b; Grakoui, et al., 1993; Kyte and Doolittle, 1982)을 기초로 하여 pET-21a(+) 벡터(Novagen, WI)내에서 생성시켰다. 개별적인 HGV 단백질 구성물을 pGEX 벡터내로 클로닝되는

HGV 서열과 유사한 방법으로 생성시켰다.

<744> 간단하게, 선택된 HGV 서열을 HGV(+) 사람 혈청 공급원으로부터 HGV 서열 특이적인 프라이머를 사용하여 RT-PCR 증폭시켰다. 상기 프라이머를 pET 벡터내에서 클로닝 조작에 적당한 제한 부위를 함유하도록 조작하였다. 목적 코딩 서열을 전형적으로 벡터내의 EcoRI 부위 및 HindIII 부위 사이에 삽입시켜, T7.태그 선도 서열을 갖는 5' 프레임내 융합 및 6량체 히스티딘 서열을 갖는 3' 프레임내 융합을 생성시킨다. T7.태그 (11개의 아미노산)은 항-T7.태그 모노클로날 항체 (Novagen, WI)를 사용하여 융합 단백질을 검출하였다. 융합 단백질의 카르복실 말단에서의 상기 히스티딘 6량체는 고정화된 금속 이온 친화성 크로마토그래피를 사용하여 단백질의 정제가 가능하도록 한다.

<745> HGV 단백질을 적당하게 분해된 pET-21a (+) 벡터내로 연결시켰다. 연결된 생성물을 수용성 대장균 (HMS174; Novagen, WI)내로 형질전환시켰다. 형질전환된 HMS174로부터의 플라스미드 DNA를, 삽입된 분자를 플랜킹하는 pET-21a(+) 벡터 서열과 상동인 HGV 서열의 존재에 대해 프라이머 T7F (서열번호 157) 및 T7R (서열번호 158)를 사용하는 PCR에 의해 분석했다. 상기 PCR 생성물의 크기는 삽입서열 크기 + 벡터로부터 유래된 약 260bp 였다.

<746> 각 구성물에 대하여, PCR 결과는 삽입 서열의 존재를 확인한다. 적당한 삽입서열을 갖는 형질전환체를 선택하고, HGV 삽입서열을 갖는 플라스미드 DNA를 제조하고, HGV 단백질의 발현을 위해 HMS174 (DE3) 수용성 대장균 (Novagen, WI)내로 도입시킨다.

<747> HGV 단백질의 발현을 1mM의 IPTG를 사용하여 유도시켰다. T7.태그 융합 단백질의 발현을 쿠마쉬 블루 염색된 겔상의 예측된 크기의 단백질의 출현에 의해 모니터링하였다. 상기 융합 단백질의 발현을 항-T7.태그 항체 (Novagen, WI)를 사용하는 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인했다. pET-21a(+) 벡터내에서 발현되는 HGV 단백질을 표 25에 나타냈다. 발현된 서열의 개시점 및 종결점은 서열번호 14에 대해 주어진다. GE-Cap의 아미노산 서열을 서열번호 185에 나타내었다.

<748> 표 25

명칭	도메인	혈청 공급원	Start	End	HGV aa	크기(KDa)
GE-Cap	캡시드	T55806	271*	480*	70	11
GE-E1a	E1	PNF	594	1148	185	24
GE-E2	E2/NS1	PNF	1149	2183	345	41
GE-NS2b	NS2b	PNF	2904	3254	117	16
GE-NS3	NS3	PNF	3255	5081	609	70
GE-NS4a	NS4a	PNF	5082	6083	334	40
GE-NS4b	NS4b	PNF	6084	6536	151	20
GE-NS4	NS4	PNF	5082	6536	485	57
GE-NS5a	NS5a	PNF	6537	7529	331	39
GE-NS5b	NS5b	PNF	7530	9044	505	59

<750> \* 이러한 서열은 서열번호 178에 대해 주어진다.

<751> 도 12는 T7.태그 모노클로날 항체를 사용하는 웨스턴 블롯 분석에 의해 설명되는 각 HGV 단백질의 발현을 도시한다. 도 12에서의 레인은 하기와 같다: 레인 1, 예비-염색된 분자량 마커 (Bio-Rad); 레인 2, 비유도된 GE-Cap 용해질; 레인 3-11, GE-Cap, E1a, E2, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS4 및 NS5b 용해질의 각 IPTG 유도된 용해질. 레인 12는 1μg의 정제된 NS5a를 함유한다. 각 항원의 위치는 화살표 헤드로 마크된다. 도 12에 도시된 바와 같이, 모든 HGV 단백질은 대장균내에서 발현된다.

<752> 2. pET 벡터내에서 발현되는 HGV 단백질의 웨스턴 블롯 분석

<753> pET 벡터내에서 발현되는 HGV 단백질의 웨스턴 블롯 분석을 대장균의 완전한 세포 용해질 및 예비-흡수된 혈청을 사용하여 실시예 11C내에서 기술된 바와 같이 수행했다. 이러한 분석의 결과는 수 개의 pET HGV 단백질이 HGV-네가티브 사람 혈청과는 면역반응성이 없고 HGV-포지티브인 사람 혈청과 특이적으로 면역반응성이 있음을 증명한다. 상기 GE-NS5a-3 단백질은 JC, T55806, T56633, J21689, E57963 및 R0001을 포함하는 웨스턴 블롯 분석상의 수 개의 HGV (+) 혈청과는 면역반응성이 있다. 이러한 혈청중에서, T55806, J21689 및 E57963은 HCV 동시-포지티브이다(PCR 분석에 의한). GE-NS2b-1 또는 GE-NS5a-3은 모두 시험되는 수 개의 HGV 네가티브 혈청과는 면역반응성이 없다.

<754> 도 10A 내지 10F는 항원인 GE-NS2b 및 GE-NS5a3의 반응성을 조사하는 일련의 웨스턴 블롯 실험의 전형적인 결과를 도시한다. 도 10A 내지 10F의 각 블롯에서의 레인은 하기와 같다: 레인 1, 비유도된 GE-NS2b 용해질; 레인 2, IPTG 유도된 GE-NS2b 용해질; 레인 3, 비유도된 GE-NS5a 용해질; 및 레인 4, IPTG 유도된 GE-NS5a 용해질. 각 블롯을 사람 혈청 또는 마우스 모노클로날 항체와 함께 인큐베이션시켰다: 도 10A, J29374; 도 10B, J21689; 도 10C, T56633; 도 10D, T43608(슈퍼 노말 혈청), 도 10E, 항-T7.태그; 및 도 10F, 쿠마쉬 염색된 겔. 사용된 혈청 또는 모노클로날 항체는 각 블롯 위에 표시되어 있다. 사람 혈청을 1:100으로 희석시키고, 항-T7.태그 마우스 모노클로날 항체를 1:1000으로 희석시켰다.

<755> 상기에 기재된 혈청에 부가하여, 추가 HGV-PCR 포지티브 혈청을 GE-NS5a를 사용하여 스크리닝하였다. 이러한 모든 분석의 결과는 GE-NS5a 항원과 다중 HGV-감염된 혈청과의 반응성을 증명한다. GE-NS5b



는 HGV(+) 혈청 JC 및 T55806과는 면역반응성이 있지만, 시험되는 HGV(-) 네가티브 혈청과는 면역반응성이 없다. 도 13A 내지 도 13E는 항원 GE-NS5b의 반응성을 조사하는 일련의 웨스턴 블롯 실험의 결과를 도시한다. 도면의 각 블롯에서의 레인은 하기와 같다: 레인 1, 예비-염색된 분자량 마커 (Bio-Rad); 레인 2, 비유도된 GE-NS5b 용해질; 레인 3, IPTG 유도된 GE-NS5b 용해질.

<756> 각 블롯을 사람 혈청 또는 마우스 모노클로날 항체와 함께 인큐베이션시켰다. 도 13A, 항-T7.태그 모노클로날 항체; 도 13B, JC; 도 13C, T55806; 및 도 13D, T43608 (슈퍼 노말 혈청). 도 13E는 쿠마쉬 염색이다.

<757> 도 14A 내지 14D는 항원 GE-E2의 반응성을 조사하는 일련의 웨스턴 블롯 실험의 결과를 도시한다. 도 14A 내지 14D 각각에서의 레인은 하기와 같다: 레인 1, 예비-염색된 분자량 마커 (Bio-Rad); 레인 2, 비유도된 GE-E2 용해질; 레인 3, IPTG 유도된 GE-E2 용해질. 각 블롯을 사람 혈청 또는 마우스 모노클로날 항체와 함께 인큐베이션시켰다: 도 14A, 항-T7.태그 모노클로날 항체; 도 14B, 3831781; 및 도 14C, T43608 (슈퍼 노말 혈청). 도 14D는 쿠마쉬 염색이다. 사용된 혈청 또는 모노클로날 항체는 각 블롯 위에 표시되어 있다. GE-E2 단백질은 HGV-포지티브 혈청 3831781과는 면역반응성이 있지만, 슈퍼 노말 혈청 T43608 (각각 도 14B 및 14C)과는 면역반응성이 없다.

<758> 항원 GE-Cap 및 GE-NS4a는 또한 HGV(+) 혈청 J21689와 면역반응성이 있다.

<759> B. 곤충 세포에서의 보다 거대한 HGV 항원의 발현.

<760> 재조합 baculovirus를 사용하는 단백질의 발현은 (i) 고수준의 재조합 단백질의 발현, 및 (ii) 효율적인 단백질 전좌 및 변형을 포함하는 보다 고등 진핵 시스템의 장점을 제공한다. 이러한 시스템은, 예를 들면 HGV E1, E2 및 NS2a와 같은 전좌된 단백질의 발현에 특히 유용하다.

<761> 1. 클로닝 및 발현.

<762> 스포돔테라 프루기페르디아(*Spodoptera frugiperda*) 곤충 세포 배양물인 Sf21 및 오토그라파 칼리포르니카(*Autographa californica*) 핵 폴리헤드로시스 바이러스 "BACULOGOLD" (Pharmingen, San Diego, CA)를 HGV 폴리펩티드의 발현에 사용했다. 설정된 프로토콜은 곤충 세포 배양 및 바쿨로바이러스 플라스미드 전달 벡터와 선형화된 바쿨로바이러스 DNA (King, 1992)의 동시-트랜스펙션에 의한 재조합 바쿨로바이러스의 생성에 사용한다. 통상의 기술을 바쿨로바이러스 플라스미드 전달 벡터 (Maniatis, et al.; Sambrook, et al.)의 구성에 사용한다.

<763> 상기 바쿨로바이러스 전달 벡터인 pAcYM1 (King, et al., 1992)는 히스티딘 6량체를 코딩하는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드를 벡터의 BamHI 클로닝 부위 (벡터는 pAcYMIH로 명명됨)내로 연결시킴으로써 변형시켰다. 종결 코돈 (TAA)을 히스티딘 6량체 뒤에 위치시켰다. 이것은 발현되는 단백질의 카르복시-말단상에 히스티딘 6량체를 제공한다. pAcYMI 모벡터의 BamHI 클로닝 부위는 pAcYMIH내에서 무손상된 상태로 존재하고, 히스티딘 6량체를 갖는 프레임내의 다양한 유전자를 클로닝시키는데 사용할 수 있다. 상기의 히스티딘 6량체는 발현된 단백질 (Janknecht, et al., 1991)의 신속하고 효율적인 정제법을 제공한다.

<764> 제 2 바쿨로바이러스 전달 벡터인 pVT-Bac을 발현되는 단백질의 카르복시-말단상에 히스티딘 6량체를 제공하는 유사한 방법으로 변형시켰다. pAcYMI 벡터와 같은 pVT-Bac은 강력한 후기 폴리헤드린 프로모터를 함유한다. 부가하여, pVT-Bac은 발현되는 단백질의 효율적인 전좌를 확인하는 강력한 곤충 전좌 시그널 서열을 제공한다 (Tessier 등, 1991). 상기 pVT-Bac 벡터는 히스티딘 6량체에 대한 이중-가닥 올리고뉴클레오티드 코딩을 벡터의 BamHI 클로닝 부위 (pVT-Bach 벡터를 생성함)내로 연결시킴으로써 변형시켰다. 상기 pVT-Bac 모벡터의 BamHI 클로닝 부위는 수득된 pVT-Bach 벡터내에서 무손상된 상태로 존재하고, 이는 곤충의 선도 서열 및 히스티딘 6량체 서열을 갖는 프레임내의 클로닝 유전자를 클로닝시키는데 사용할 수 있다.

<765> 다양한 HGV 유전자를 코딩하는 DNA 단편을 역전사 PCR에 의해 수득했다. HGV 게놈의 영역을 예측된 절단 부위 (Bazan, et al., 1989; Chambers, et al., 1990b; Grakoui, et al., 1993; Kyte and Doolittle, 1982)에 따라 선택한다. 하기 프라이머쌍을 PNF2161 공급원 핵산을 사용하는 RT-PCR 증폭 반응에서 사용하였다: E1, 서열번호 242, 서열번호 243; E2B (HGV 시그널 서열), 서열번호 244, 서열번호 245; E2C (곤충 시그널 서열), 서열번호 246, 서열번호 247; NS2a, 서열번호 248, 서열번호 249; NS2b, 서열번호 250, 서열번호 251; NS3, 서열번호 252, 서열번호 253; NS4a, 서열번호 254, 서열번호 255; NS4b, 서열번호 256, 서열번호 257; NS5a, 서열번호 258, 서열번호 259; NS5b, 서열번호 260, 서열번호 261; 및 E1-E2-NS2a, 서열번호 262, 서열번호 263.

<766> 증폭된 DNA 단편을 BamHI 또는 BglII 엔도뉴클레아제로 분해시키고, BamHI으로 절단시킨 pAcYMI, pAcYMIH, pVT-Bac 또는 pVT-Bach 벡터로 클로닝하였다. NS5b의 카르복시-말단에서의 소수성 서열 뿐만 아니라 E1 및 E2 카르복시-말단 앵커를 코딩하는 서열을 결실시켜, 후속 단백질 정제를 용이하게 했다.

<767> HGV 서열을 함유하는 재조합 바쿨로바이러스 플라스미드 전달 벡터를 선형화된 바쿨로바이러스 DNA로 동시-트랜스펙션시키고, 재조합 바이러스를 X-gal (King, et al., 1992)의 존재하에서 백색 포커스로서 선별했다. 재조합 바이러스를 2회 플라크-정제시키고, 증식시켰다. Sf21 세포의 단일층을 세포당 다수의 5 p.f.u.로 재조합 바쿨로바이러스로 감염시키고, 27°C에서 60시간 동안 인큐베이션시켰다. 상기 세포를 PBS로 세척하고, TNN 완충액 (50mM의 Tris-HCl pH 8.0, 150mM의 NaCl, 0.5%의 "NONIDET-P40")중에 용해시켰다. 봉입체를 14k에서 5분간 세포 샘플을 스피닝시킴으로써 분리하였다. 상기 봉입체를 단백질 해리 완충액 (10%의 2-메르캅토에탄올, 10%의 SDS, 25%의 글리세롤, 10mM의 Tris-HCl pH 6.8, 0.02%의 브로모페놀 블루)중에서 재현탁시키고, 100°C에서 10분간 인큐베이션시켰다.

<768> 단백질 발현 패턴을 SDS-PAGE에 의해 분석했다. 단백질을 0.1%의 SDS-18% PAGE에 의해 분리시키고, 쿠마쉬 브릴리언트 블루로 염색하였다. 대부분의 HGV 단백질을 고수준으로 발현시키고, 쿠마쉬 블루 염색된 겔상에서 용이하게 검출할 수 있다. NS5a 및 NS2a 폴리펩티드를 <sup>35</sup>S 메티오닌 단백질 표지화 (King, et al., 1992)에 의해 검출했다.



<769> HGV E2 단백질 글리코실화를 하기와 같이 조사했다. Sf21 세포를 재조합 baculovirus로 감염시키고, 상기와 같이 진행시켰다. 단백질을 0.1%의 SDS-12% PAGE에 의해 분리시키고, "IMMOBILON-P"막 (Millipore, Bedford, MA)상에 전기블롯팅시키고, 만노오스 잔기에 특이적인 갈란투스 니발리스 (*Galanthus nivalis*) 응집소 (베링커 만하임 DIG Glycan differentiation kit)와 반응시켰다. 자체의 시그널 서열로 발현되는 상기 HGV E2 단백질을 광범위하게 글리코실화시키고, 이는 예측된 E2 시그널 서열이 그 자체로서 기능할 수 있음을 나타낸다.

## <770> 2. 면역형광 검정 분석.

<771> SF21 곤충 세포를 상기에 기술된 바콜로바이러스-HGV 구성물로 감염시켰다. 세포를 취하고, 1.5K rpm으로 3분간 스펀시키고, 1X PBS중에서 세척하고, 다시 스펀시켰다.

<772> 면역형광 검정 (IFA) (King, et al., 1992)에 대하여, 세포를 PBS중에서 재현탁시키고, 세포가 슬라이드의 웰중에서 서브-컨플루언트 막을 형성하도록 유리슬라이드의 웰내에 층을 형성시켰다. 상기 슬라이드를 공기-건조시켰다. 상기 세포를 예냉시킨 70°C의 아세톤으로 10분간 고정시키고, PBS로 5분간 재수화시켰다. 과량의 PBS를 블롯팅에 의해 제거하였다. 상기 고정된 세포를 1시간 동안 하기 "블로킹" 완충액으로 처리하였다: 40mM의 Tris-HCl pH 7.5, 3%의 염소 혈청, 1%의 BSA, 1%의 탈지유 및 0.1%의 젤라틴.

<773> 그 후에 1차 항체를 고정된 세포에 첨가하였다. 1차 항체는 일련의 사람 HGV-포지티브 혈청 및 포지티브 대조구인 모노클로날 항체를 포함한다. 사용 전에, 혈청을 곤충 세포 용해질을 사용하여 비-특이적인 단백질에 대해 예비-흡착시켰다. 예비-흡착을 4°C에서 하룻밤 동안 수행하였다. 비감염된 SF21 세포를 네가티브 대조구로서 사용했다. 선택된 1차 항체 (혈청)의 첨가 후에, 슬라이드를 2시간 동안 인큐베이션시키고, 그 후에 PBS로 수 회 세척하고, 과량의 완충액을 제거했다. 그 후에, 플루오레세인과 컨주게이션된 2차 항체 (0.5μg/ml conc.)를 슬라이드상의 샘플에 첨가하였다. 2차 항체에 대한 인큐베이션 시간 및 온도는 1차 항체에서와 동일하다. 인큐베이션 후에, 슬라이드를 PBS중에서 세척하고, 커버 슬립을 장착하였다. 그 후에, 세포의 형광을 형광 현미경을 사용하여 결정하였다.

<774> 이러한 분석의 결과는 하기와 같다. HGV 항원인 E1-E2-NS2a를 발현하는 세포는 4/10 HGV-포지티브 혈청과는 면역반응성이 있고, 추가적인 2/10 혈청과는 약한 면역반응성이 있다. E1을 발현하는 세포는 1/10 혈청과 약한 면역반응성이 있다. E2를 발현하는 세포는 3/10 혈청과 면역반응성이 있고, 1/10 혈청과 약한 면역반응성이 있다. HGV 항원을 함유하는 세포는 모두 슈퍼노말 대조구 혈청과는 면역반응성이 없다.

## <775> 3. 바콜로 바이러스내에서 발현되는 HGV 단백질의 웨스턴 블롯 분석

<776> 재조합 바콜로 바이러스 감염된 Sf21 곤충 세포내에서 발현되는 HGV 단백질의 웨스턴 블롯 분석을 또한 수행했다. 봉입체를 상기에 기술된 바와 같이 제조하고, 웨스턴 블롯 분석하였다. 웨스턴 블롯 분석을 예비-흡착된 혈청을 사용하여 수행했다. 분석 결과는 E2 단백질 (내인성 HGV 시그널 서열을 갖는 제 1 변이체인 E2B 및 곤충 시그널 서열을 함유하는 제 2 변이체인 E2C)이 HGV(+) 혈청 3831781과 면역반응성이 있음을 증명한다.

<777> 도 15A 내지 15D는 바콜로 항원인 E2B 및 E2C의 반응성을 조사하는 일련의 웨스턴 블롯 실험의 결과를 도시한다. 도 15A 내지 15D의 각 블롯내의 레인은 하기와 같다: 레인 1, 예비-염색된 분자량 마커 (Bio-Rad); 레인 2, E2B 용해질; 레인 3, E2C 용해질; 레인 4, β-갈락토시다아제 용해질. 각 블롯을 사람 또는 토끼 혈청과 함께 인큐베이션시켰다: 도 15A, 토끼 항-E2 항체; 도 15B, 3831781(HGV-PCR-포지티브 혈청); 도 15C, 3838857 (HGV-네가티브 혈청). 도 15D는 쿠마쉬 염색을 도시한다. 사용된 혈청 또는 토끼 항체는 각 블롯 위에 표시되어 있다. 사람 혈청은 1:100으로 희석시키고, 토끼 혈청은 1:1000으로 희석시켰다.

<778> 또한, 곤충 세포에서 발현되는 HGV 항원인 NS2b 단백질은 J21689와 면역반응성이 있다. 이러한 결과는 pET 발현된 HGV 단백질을 사용해 수득된 결과와 일치한다.

## <779> C. 백시니아에서의 거대 항원의 발현.

### <780> 1. 클로닝 및 발현.

<781> HGV 게놈의 다양한 영역을 발현을 위해 백시니아 바이러스 게놈내로 통합시켰다. 전형적인 HGV 폴리펩티드 발현법이 도 16에 주어진다. 백시니아 바이러스내에 발현된 HGV (PNF 2161 변이체) 단백질은 도 16에 개략적으로 도시된다. 전장 폴리단백질은 예측된 단백질 영역을 나타내는 빈 박스에 의해 그려진다 (확대 및 축소된 것 아님): C = 고염기성 단백질, 4A = NS4A, 4B = NS4B, 5a = NS5A, 5b = NS5B. 누클레오타이드 위치를 갖는 개개의 박스 (폴리단백질 아래)는 백시니아 바이러스에서의 발현을 위한 HGV의 전형적인 영역을 나타낸다. 박스내의 숫자는 재조합 바이러스의 학명을 의미한다. 바이러스 #1은 HGV 염색 T55806 (서열번호 185)의 고염기성 단백질로부터 유래된다.

<782> 재조합 바이러스의 2세트를 생성시켰다. 제 1 세트는 HGV cDNA (도 16, 단편 #1 내지 #9)의 서열분석을 기초로한 개개의 단백질 도메인에 상응하는 HGV 서열을 함유한다. 제 2세트는 다중 단백질 도메인에 전장 HGV 게놈 (도 16, #10, #11, #14)이하로 걸쳐있는 HGV 서열을 함유한다.

<783> HGV 게놈의 다양한 영역을 백시니아 발현 벡터의 다중클로닝 부위내로 클로닝하였다. 고수준의 유도성 발현을 위해 세균성 파아지 T7 시스템 및 대장균 lac 억제물질을 포함하는 재조합 백시니아 바이러스 발현 시스템을 사용한다 (Fuerst, 1986; Elroy-Stein, 1989; Alexander, 1992; Moss 등). 따라서, 재조합 단백질은 이소프로필 베타-D-티오갈락토시드 (IPTG)와 같은 유도물질의 존재하에서만 발현된다. 직접 클로닝 및 PCR은 모두 플라스미드 구성을 위해 사용한다. PCR의 경우에, 백시니아 벡터로의 클로닝에 적당한 제한 엔도뉴클레아제 부위를 개별 DNA 단편의 증폭에 사용되는 프라이머내에 혼입시켰다.

<784> 폴리히스티딘 표지를 발현된 단백질의 정제에 사용하기 위한 HGV의 개별 도메인을 커버하는 모든

클론내에 혼입시켰다. HGV-PCR 증폭 생성물을 적당한 제한효소로 분해시키고, 백시니아 벡터내로 연결시킨다. 표적 HGV cDNA 단편을 상동 재조합 및 약물 (미코페놀산) 선별 (Falkner, 1988, Earl, 1991)을 통해 백시니아 바이러스 게놈내에 통합시켰다. 재조합 바이러스는 바이러스 스톱을 생성시키기 전에 4회 플라크 정제하였다.

<785> 누클레오타이드내의 각 클론의 길이는 표 16에 나타나 있다. 소형 클론 (#1 내지 #9)의 그룹은 HGV 에피토프 맵핑에 유용하다. 대형 클론 (예를 들면, #10, #11, 및 #14)은 HGV 폴리단백질 절단 부위를 실험적으로 맵핑하는 데에 또한 유용하다. 도 16에 도시된 클론에 부가하여, NS3 내지 NS5b의 다수의 도메인을 커버하는 추가 재조합 바이러스를 구성할 수 있다.

<786> 발현 플라스미드를 모 백시니아 바이러스로 감염시킨 포유동물 세포내에 트랜스펙션시켰다. CV-1 및 BS-C-1 세포를 10%의 우태아 혈청이 보충된 최소 필수 배지 (MEM)중에서 유지시켰다. 상기 세포를 트랜스펙션 (CV-1), 및 재조합 바이러스 선별과 증식 (BS-C-1)에 사용했다.

<787> 2. 재조합 단백질 발현의 평가.

<788> BS-C-1 세포를 IPTG의 존재 또는 부재하에서 7시간 동안 재조합 바이러스로 감염시킨 후에, 세포를 <sup>35</sup>S-메티오닌을 사용하여 1시간 더 표지시켰다 (Zhang, 1991). 간단하게,  $1 \times 10^6$  BS-C-1 세포를 재조합 바이러스를 사용하여 세포당 10개의 플라크 형성 유닛 (PFU)의 다중감염도(MOI)로 감염시키고, 그 후에 5mM의 IPTG의 존재 또는 부재하에서 추가 6시간 동안 배지로 보충하였다. 세포를 5mM의 IPTG의 존재 및 부재하에서 600ul의 2.5%의 투석된 우태아 혈청 및 60 uCi의 <sup>35</sup>S-메티오닌 ("TRAN <sup>35</sup>S-LABEL", ICN, Costa Mesa, CA)으로 보충된 메티오닌-비함유 배지로 펄스-표지시켰다. 그 후에, 표지된 세포를 100mM의 Tris pH8.0, 150mM의 NaCl, 및 1%의 "TRITON X-100"의 존재하에서 10분간 얼음상에서 용해시켰다. 핵을 스피ندا운시키고, 분석을 위해 상층액을 수집하였다.

<789> 세포 용해질을 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동 (Fling, 1986; Schagger, 1987)에 의해 분석했다. 겔은 형광사진 용액인 "AMPLIFY" (Amersham, Arlington Heights, IL)으로 처리하기 전에, 50%의 메탄올 및 10%의 아세트산으로 고정시켰다. 겔을 건조시키고, X-선 필름에 노출시켰다.

<790> 이러한 방법을 이용하여, 삽입서열 #4 내지 #11, 및 #14 (도 16)을 함유하는 바이러스에 의한 HGV 폴리펩티드의 발현이 확인된다. 다른 영역과 유사한 폴리펩티드의 발현은 유사한 방법으로 확인된다. 예를 들면, NS5a 구성물의 경우에, IPTG에 의한 유도 동안에, 46 KDa 단백질 표준물 바로 아래로 이동하는 특이한 폴리펩티드를 생성시킨다. 이러한 단백질은 IPTG 유도의 부재하에서의 감염에서는 나타나지 않으며, 이는 NS5a 재조합 단백질과의 단백질 동일성을 확정시킨다.

<791> 또한, 개별 바이러스 감염으로부터의 <sup>35</sup>S-Met 표지된 세포 용해질에 대해 HGV 영역-특이적인 항혈청 (예를 들면, 목적 영역으로부터의 단리된 HGV 폴리펩티드에 대해 성장시킨 토끼 항-혈청)을 사용하는 제한된 면역침전을 수행하여 재조합 바이러스로부터의 단백질 발현을 평가한다. 예를 들면, NS2, NS3, NS4B, NS5A 및 NS5B를 확인한다. 재조합 단백질 발현을 평가하는 다른 방법은 HGV-영역-특이적인 항혈청을 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하는 것이다.

<792> 전장 HGV 폴리단백질이 #14 바이러스 (도 16)에서 발현되는 경우에, NS2, NS3 및 NS5A의 프로세싱된 생성물은 HGV 영역-특이적인 항혈청을 사용하는 면역침전을 이용하여 검출하는데, 이는 폴리단백질 프로세싱을 평가하는 전장 HGV 클론의 유용성을 증명한다.

<793> 도 16에 도시된 방법과 유사한 발현법을 사용하여, 후보체 단백질/항원을 효모 또는 CHO 세포내에서 발현시킬 수 있다. 효모는 고수준의 발현, 경제적 작동, 및 상업적 제조를 위한 용이한 스케일-업을 제공한다. CHO 세포주는 대규모 단백질 제조를 위해 성장 배지내로 재조합 단백질을 분비시키고, 예를 들면 백신 개발에 유용한 정제를 가능하게 한다.

<794> 실시예 17

<795> HGV 엔코딩된 고염기성 단백질

<796> A. PNF 및 T55806으로부터 HGV의 번역에서 개시에 사용되는 메티오닌의 결정.

<797> HGV-PNF 2161 변이체내의 누클레오타이드 (nt) 459 (서열번호 14에 대해)에 위치한 메티오닌은 폴리단백질과 함께 프레임내에 존재한다. "캡시드" 영역은 32개 아미노산 길이로 나타난다. T55806과 같은 다른 HGV 단리물의 경우에, 캡시드 영역은 더욱 길어진다 (예를 들면, 약 83개 아미노산). nt 349 (서열번호 14에 대한)에 위치한 메티오닌은 폴리단백질 서열과 함께 프레임내에 존재하지 않지만, HGV-T55806 변이체내의 같은 위치에 있는 메티오닌은 폴리단백질과 함께 프레임내에 존재한다. HGV-PNF 2161내의 상기 위치에서 리드-트루 (read-through) 또는 리보솜 프레임 시프트가 존재함을 확인하기 위해서, 하기 실험을 수행한다.

<798> (i) HGV E1 영역의 업스트림에 위치한 모든 MET 코돈 (예를 들면, HGV-PNF 2161에서는, 6개의 MET이 있고, T55806에는 5개가 있음)을 갖는 HGV 게놈 서열, 및 (ii) 리드-트루의 리보솜 시프트의 발생을 결정하는 각 구성물에 대한 2개의 다른 3' 말단을 함유하는 구성물을 제조한다. 주어진 게놈 DNA에 대하여, 번역된 2개의 생성물 모두가 같은 크기인 경우에는, 이들이 종결 코돈에서 조기에 종결됨을 제시한다. 다른 한편, 리드-트루 또는 프레임시프트가 발생하는 경우에, 55개의 아미노산에 의해 구별되는 2개의 생성물이 예측된다.

<799> 변이체인 HGV-PNF 2161 및 HGV-T55806으로부터의 총 21개의 구성물을 pGEX 벡터내에서 서브클로닝하고, 유사한 단백질을 대장균내에서 발현시켰다. 생성되는 번역 생성물을 쿠마쉬 염색된 겔 및 모노클로날 항-GST 항체로 블롯팅시킨 웨스턴법에 의해 결정했다. 유도된 및 비유도된 샘플을 각 구성물에 대해 제조한다.

<800> 본 실험 결과는 단백질 생성물의 크기가 폴리단백질을 갖는 프레임내의 제 1 MET에서 개시되는

번역에 의해 예측된 결과와 유사함을 증명한다.

#### B. 다른 엔코딩된 고염기성 단백질.

피켓(Fickett)(1982)법을 사용하여, 잠재적으로 (i) 종래에 기술된 폴리단백질에 대한적이고, (ii) HGV-PNF 2161 및 HGV-JC 간의 보존을 나타내고, (iii) pH 10을 초과하는 예측된 등전점을 갖는 단백질을 잠재적으로 엔코딩하는 서열에 대한 게놈 서열인 HGV-PNF 2161 및 HGV-JC를 스캐닝했다. 이러한 2개의 잠재적 단백질을 확인하였다.

제 1 단백질은 HGV-PNF내에서는 628 내지 882 잔기 (서열번호 14에 대해)에 의해 엔코딩되고, HGV-JC내에서는 556 내지 810 잔기 (서열번호 182에 대해)에 의해 엔코딩된다. 이러한 단백질은 85개 아미노산 길이고, HFV94-1 및 JC9B 사이에 75% 이상의 상동성이 있고, 11.6-12.3의 예측된 pI를 갖는다.

제 2 단백질은 HGV-PNF내에서는 6844 내지 7125 잔기 (서열번호 14에 대해)에 의해 엔코딩되고, HGV-JC에서는 6772 내지 7053 잔기 (서열번호 182에 대해)에 의해 엔코딩된다. 이러한 단백질은 94개의 아미노산 길이고, HGV-PNF 2161 및 HGV-JC 사이에 88% 이상의 상동성이 있고, 12.4-12.7의 예측된 pI를 가진다.

이러한 전형적인 2개의 단백질은 잠재적으로 발현되는 HGV의 고염기성 단백질을 나타낸다.

#### 실시에 18

##### 추가된 HGV 단리물의 클로닝 및 진단용 프라이머의 디자인

#### A. HGV-PNF 2161의 cDNA 클론의 구성

PNF로부터의 거의 완전한 길이의 HGV 게놈의 cDNA 클론을 3개의 오버랩핑하는 PCR 생성물을 플라스미드 벡터인 pGEM3Z (Promega, Madison, WI)내로 클로닝시킴으로써 구성하였다. 이러한 구성에서 사용되는 PCR 생성물은 "SUPERSCRIPIT II"(Gibco/BRL, Gaithersburg, MD)를 사용하여 역전사시키고, 긴 표적 서열("rTth-XL" 중합효소 및 "XL PCR BUFFERS", Applied Biosystems, Foster City, CA)을 증폭시키는 반응 조건을 이용하는 PCR을 수행함으로써 수득한다. 이러한 "long-range" PCR 반응에 사용되는 상기 rTth 효소는 잘못-혼입된 뉴클레오타이드를 정정시키는 교정 활성 (예를 들면, 3' 내지 5' 엑소뉴클레아제 활성)을 가짐으로써, 고성능 pCR을 제공한다.

HGV 게놈을 구성하는 데에 사용되는 3개의 생성물은 (i) 프라이머 GV75-36FE (서열번호 228) 및 GV75-7064RLE (서열번호 229)를 사용하여 증폭시킨 내부의 6.7kb 생성물 (서열번호 14의 nt 2101 내지 8834), (ii) 28F (서열번호 230) 및 FV94-2864R (서열번호 231)를 사용하여 증폭시킨 2.8kb 5'-말단 생성물 (서열번호 14의 nt 38 내지 2899), 및 (iii) FV94-6439F (서열번호 232) 및 FV94-9331R (서열번호 233)를 사용하여 증폭시킨 2.9kb 3'-말단 생성물 (서열번호 14의 nt 6449 내지 9366)을 포함한다.

초기에, 6.7kb의 내부 단편을 "TA-벡터"인 pCRII내로 클로닝시켜 클론 HGV7를 생성시킨다. 후속하여, 6.1kb의 KpnI/EcoRI 단편을 HGV7로부터 분리시키고, KpnI/XbaI 분해된 2.8kb의 5'-말단 생성물 (프라이머는 인공적인 XbaI 부위를 함유함)과 결합시키고, XbaI/EcoRI 분해된 pGEM3Z내로 클로닝시킨다. HGV 게놈의 3' 일부의 약 0.6kb이 결합된 이러한 8.8kb 클론은 HGV-KEX-2로 명명된다. 거의 완전한 길이의 HGV 게놈을 구성하기 위하여, 상기 3'-말단 HGV 생성물을 NheI 및 EcoRI (프라이머 FV94-9331R은 인공적인 EcoRI 부위를 함유함)로 분해시키고, 3Z-HGV94-6으로 명명되는 9329 nt (서열번호 14의 38nt 내지 9366nt)의 클로닝된 HGV-PNF2161 서열을 생성시키는 NheI/EcoRI 분해된 HGV-KEX-2 플라스미드내로 클로닝시킨다. 3Z-HGV94-6의 완전한 서열은 서열번호 234로서 제시된다.

클론 3Z-HGV94-6을 사용하여 시험관내-전사된 완전한 길이의 HGV RNA 또는 이것의 일부를 생성시킨다 (예를 들면, SP6 중합효소를 사용하여). 상기 RNA 분자를 사용하여 사람 세포주를 트랜스펙션시켰다. 이러한 방법은 바이러스 게놈의 다양한 영역을 맵핑하고, 이것의 복제를 연구하고, 사람 세포내에서 HGV의 병원성 기작을 이해하기 위해 사용할 수 있다 (Rice 등, 1989; Sumiyoshi 등, 1992; Yoo 등, 1995).

#### B. JC 변이체의 클로닝.

1ml의 JC 혈청을 40,000 rpm으로 2시간 동안 회전시켰다 (Beckman, Spinco Rotor 70.1Ti). 생성되는 펠릿을 "TRIAGENT" (MRC, Cincinnati, OH)를 사용하여 추출하여, 3가지 상을 형성시켰다. 윗쪽 상은 RNA만을 함유한다. 이러한 상을 취하고, 에탄올 침전에 의해 RNA를 회수하였다.

HGV cDNA 분자를 2가지 방법에 의해 JC 샘플로부터 생성시켰다. 제 1방법은 특이적이고 네스팅된 (nested) 프라이머를 사용하는 JC 핵산 샘플의 증폭법(RT-PCR)이다. 상기 프라이머 서열은 PNF 2161 혈청으로부터 수득된 HGV 서열을 기초로 하였다. 프라이머의 선별에 사용되는 기준은 (i) 높은 G/C 함량을 갖는 영역, 및 (ii) 반복 서열을 갖지 않는 영역이다.

HGV cDNA 분자를 생성시키는 데에 사용되는 제 2방법은 HGV (PNF2161) 특이적인 프라이머를 사용하여 증폭시킨 후에, <sup>32</sup>P-표지된 올리고뉴클레오타이드 프로브로 HGV 특이적인 서열을 확인하는 것이다. 이러한 DNA 하이브리드화는 본질적으로 샘브룩(Sambrook) 등 (1989)에 의해 기술된 바와 같이 수행한다. PCR 유도된 클론을 (i) "TA" 벡터 (Invitrogen, San Diego, CA)내로 클로닝시키고, 벡터 프라이머 (TAR 및 TAF)를 사용하여 서열분석하거나 (ii) PCR 증폭 후에 직접 서열분석하였다. 2개의 프로브 및 프라이머 서열은 모두 PNF 2161 혈청으로부터 수득된 HGV 변이체를 기초로 한다.

이러한 2개의 방법은 JC 혈청으로부터 다수의 오버랩핑하는 HGV 단편을 생성시킨다. 이러한 각 단편을 클로닝시키고, 서열분석하였다. 상기 서열을 배열하여 서열번호 182 (폴리펩티드 서열, 서열번호 183)로서 제시된 HGV (JC-변이체) 컨센서스 서열을 수득하였다. HGV (JC-변이체) 바이러스의 각 영역의 서열은 3개 이상의 다른 오버랩핑하는 독립적인 클론으로부터의 일치치를 기초로 한다.

&lt;818&gt;

C. 다른 HGV 변이체.

&lt;819&gt;

HGV PNF 2161-변이체 및 JC-변이체 서열에 부가하여, 3개의 부분적인 HGV 단리물을 상기에 기술된 방법과 유사한 방법에 의해 혈청 BG34, T55806 및 EB20으로부터 수득하였다. 이러한 단리물의 부분 서열을 서열번호 176 (BG34 핵산), 서열번호 177 (BG34 폴리펩티드), 서열번호 178 (T55806 핵산), 서열번호 179 (T55806 폴리펩티드), 서열번호 180 (EB20-2 핵산) 및 서열번호 181 (EB20-2 폴리펩티드)로서 제시하였다.

&lt;820&gt;

D. 진단용 PCR을 위한 대안적인 프라이머.

&lt;821&gt;

PCR 프라이머 및 이에 상응하는 검정법의 발달은 전형적으로 보존 영역의 분석을 기초로 하는 HGV 게놈의 영역으로부터 유도될 수 있다. HGV-JC 변이체 및 HGV-PNF 2161 변이체의 비교를 기초로 하여, HGV의 5' 비번역 영역을 HGV 단리물을 검출하는 또 다른 PCR-기초 진단 시험의 개발을 위한 한 영역으로서 선택하였다. 2개의 전형적인 프라이머는 FV-94-22F (서열번호 124) 및 FV94-724R (서열번호 125)이다. 이러한 프라이머는 HGV 게놈의 약 728bp의 단편을 증폭시킨다.

&lt;822&gt;

서열분석을 HGV의 36개의 단리물 (PNF 2161 및 JC를 포함함, 표 26 참조)에 대해 이러한 2개의 프라이머를 사용하는 반응으로부터의 증폭 생성물에 대해 수행했다. 약 728bp 증폭 생성물의 약 400 bp의 영역 (서열번호 14의 nt 69 내지 469)을 다중 서열 정렬 (표 26)에 사용하고, 보존 영역 (하기 참조)을 추가로 결정하는데에 사용했다.

&lt;823&gt;

표 26

서열번호	혈청 코드	국가명	%ID PNF 2161
186	S59	영국	96.8
187	S368	영국	98.8
188	S309	영국	95.5
189	FZ	오스트레일리아	96
190	G21	그리스	97.8
191	G23	그리스	94.3
192	G59	그리스	93.6
193	E36	이집트	94
194	R38730	미합중국	94.8
195	G281	그리스	97.8
196	G157	그리스	94.3
197	G154	그리스	96
198	G213	그리스	94.8
199	G204	그리스	98.3
200	G191	그리스	94.8
201	G299	그리스	94.8
202	T56957	미합중국	95.3
203	C01698	미합중국	98.8
204	T27034	미합중국	93.5
205	E57963	미합중국	98.5

&lt;825&gt;

표 26 (계속)

서열번호	혈청 코드	국가명	%ID PNF 2161
206	R37166	미합중국	97.5
207	B5	독일	95.5
208	B33	독일	95.5
209	FH010	오스트레일리아	95
210	PNF2161	미합중국	100
211	JC	미합중국	96.3
212	7155	페루	89.8
213	7244	페루	89
214	K27	한국	89.5
215	K30	한국	89.5
216	T55875	미합중국	97.3
217	T56633	미합중국	93.5
218	EB20	이집트	94.1
219	T55806	미합중국	95.6
220	BG34	그리스	94.8
221	BE12	이집트	95

&lt;827&gt;

샘플내 HGV 단리물의 검출에 대한 증폭-기초 (예를 들면, PCR) 또는 프로브-기초 방법/검정법의 발달은 적당한 프라이머/프로브 서열의 선택을 포함한다. 이러한 검정법에 대한 2가지 기준은 HGV 서열에 대한 낮은 카피 민감성 및 특이성이다. 서열의 정렬 (바로 앞에 기술된 바와 같이)은 프라이머/프로브 선택 및 디자인의 지표가 될 수 있다.

&lt;828&gt;

프라이머를 선별하는 일부 기준은 하기와 같다: (i) 쌍을 갖는 정방향 및 역방향 프라이머는 서열에 현저하게 상보적이어서는 안되고, (ii) 프라이머는 2차 구조를 형성하는 현저한 자체 상보성 또는 잠재성을 가져서는 안된다. 이러한 조치는 프라이머 이량체 또는 올리고머를 생성시키는 잠재성을 최소화시킨다.

&lt;829&gt;

프라이머는 다른 단리물중에서 변이를 나타내지 않는 서열 영역으로부터 최적으로 디자인될 수 있지만, 공지된 단리물 발산을 설명하는데 있어서 혼합 염기 합성 또는 이노신과 같은 중성 염기를 혼합함으로써 적은 상동성을 갖는 영역으로부터도 또한 디자인될 수 있다. 하기 2개 군의 프라이머는 HGV 게놈의 검출을 위한 PCR-기초 검정법의 개발에 사용될 수 있는 프라이머의 예이다: 정방향 프라이머 서열번호 222, 서열번호 223 및 서열번호 224; 및 역방향 프라이머 서열번호 225, 서열번호 226 및 서열번호 227.

&lt;830&gt;

프라이머의 다양한 조합을 HGV 진단용 검정법의 개발에서 이용할 수 있다. 최적의 프라이머 조합은 실험적으로 결정되고, 이는 전형적으로 검정 민감성 및 특이성에 대한 고려를 제시한다. 이러한 고려는 하기를 포함한다: (i) 효율적인 증폭 및 생성물 검출의 용이함을 위한 100-300 bp의 PCR 생성물 길이; (ii) 10카피의 표적 HGV를 재현가능하게 검출하는 능력, 및 (iii) 다수의 HGV 변이체를 재현가능하게 검출하는 능력.

&lt;831&gt;

부가하여, 프로브 서열은 혼합 염기 또는 중성 염기 합성법으로 유사하게 디자인할 수 있고, 감소된 염중조건하에서 사용하여 다수의 HGV 변이체를 검출할 수 있다.

&lt;832&gt;

본 발명을 특정한 방법 및 구체예로 설명하였지만, 본 발명의 범위내에서 다양한 변형 및 변화가 이루어질 수 있음이 이해될 것이다.

### 산업상이용가능성

&lt;833&gt;

상기에 기술된 바와 같이, 본 발명의 HGV 항원은 백신 제조에서 사용될 수 있다.

&lt;834&gt;

또한, 본 발명의 폴리펩티드 항원에 대해 생성된 항원은 수동적 면역치료 또는 수동적 면역예방에 사용될 수 있다. 상기 항원은 항체의 치료적 투여에 사용되는 양과 유사한 양으로 투여될 수 있다. 예를 들면, 풀링된 감마 글로불린은 감염의 정착을 간섭하는 광견병, 홍역 및 B형 간염과 같은 다른 바이러스 질병의 초기 인큐베이션 동안에, 체중 1b 당 0.02 - 0.1 ml/1b로 투여된다. 이와 같이, HGV 항원과 반응성인 항체는 단독으로 투여되거나 HGV로 감염된 숙주에 대한 또 다른 항-바이러스 제제와 함께 수동 투여되어, 감염을 처리하는 숙주의 능력을 강화시킨다.

### (57) 청구의 범위



**청구항 1**

서열번호 14, 이의 상보적 서열 및 길이가 뉴클레오타이드 30개 이상인 이들의 연속 단편으로 구성된 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드와 70% 이상의 서열 동일성을 갖는 정제된 비A 비B 비C 비D 비E형 간염 바이러스(HGV) 폴리뉴클레오타이드로서, HGV가

- i) 감염된 영장류에서 상승된 혈청 알라닌 아미노트랜스퍼라제 농도의 생성,
- ii) A형 간염 바이러스(HAV), B형 간염 바이러스(HBV), C형 간염 바이러스(HCV), D형 간염 바이러스(HDV) 및 E형 간염 바이러스(HEV)와의 혈청학적 차이,
- iii) 플라비비리데(Flaviviridae) 바이러스과의 일원, 및
- iv) 서열번호 19와 선택적으로 하이브리드화될 수 있는 폴리뉴클레오타이드 영역을 포함하는 바이러스 게놈을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드.

**청구항 2**

제 1 항에 있어서, 비A 비B 비C 비D 비E형 간염 바이러스(HGV) 폴리펩티드를 엔코딩함을 특징으로 하는 DNA 폴리뉴클레오타이드.

**청구항 3**

제 1 항에 있어서, E2 폴리펩티드를 엔코딩함을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드.

**청구항 4**

제 3 항에 있어서, 서열번호 14의 염기 1149번 내지 염기 2183번의 영역내에 함유된 일련의 염기를 포함함을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드.

**청구항 5**

제 1 항에 있어서, 비A 비B 비C 비D 비E형 간염 바이러스(HGV) 게놈, 이의 cDNA 또는 상보적 서열과 특이적으로 하이브리드화되는 프로브를 포함함을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드.

**청구항 6**

샘플을 비A 비B 비C 비D 비E형 간염 바이러스(HGV) 폴리뉴클레오타이드의 존재에 대해 분석하기 위한 키트로서, HGV 폴리뉴클레오타이드와 특이적으로 하이브리드화되는 프로브를 포함하는 제 1 항에 따른 1종 이상의 폴리뉴클레오타이드, 및 HGV 폴리뉴클레오타이드와 프로브의 하이브리드화에 의해 형성된 HGV 폴리뉴클레오타이드/프로브 복합체의 존재를 검출하기 위한 시약을 포함하는 키트.

**청구항 7**

길이가 아미노산 10개 이상인 정제된 비A 비B 비C 비D 비E형 간염 바이러스(HGV) 폴리펩티드로서, HGV가

- i) 감염된 영장류에서 상승된 혈청 알라닌 아미노트랜스퍼라제 농도의 생성,
- ii) A형 간염 바이러스(HAV), B형 간염 바이러스(HBV), C형 간염 바이러스(HCV), D형 간염 바이러스(HDV) 및 E형 간염 바이러스(HEV)와의 혈청학적 차이,
- iii) 플라비비리데 바이러스과의 일원, 및
- iv) 서열번호 19와 선택적으로 하이브리드화될 수 있는 폴리뉴클레오타이드 영역을 포함하는 바이러스 게놈을 특징으로 하는 폴리펩티드.

**청구항 8**

제 7 항에 있어서, 항-HGV 특이적 항체를 함유하는 혈청과 면역반응함을 특징으로 하는 폴리펩티드.

**청구항 9**

제 7 항에 있어서, 폴리펩티드가 E2 폴리펩티드임을 특징으로 하는 폴리펩티드.

**청구항 10**

제 9 항에 있어서, 서열번호 14의 염기 1149번 내지 염기 2183번의 영역내에 함유된 일련의 염기를 포함하는 폴리뉴클레오타이드에 의해 엔코딩됨을 특징으로 하는 폴리펩티드.

**청구항 11**

비A 비B 비C 비D 비E형 간염 바이러스(HGV) 포지티브 혈청과 특이적으로 면역반응하는, 길이가 아미노산 10개 이상인 정제된 HGV 폴리펩티드 항원을 적합한 캐리어에 함유된 형태로 포함하는 HGV 면역원 조성물로서, HGV가

- i) 감염된 영장류에서 상승된 혈청 알라닌 아미노트랜스퍼라제 농도의 생성,
- ii) A형 간염 바이러스(HAV), B형 간염 바이러스(HBV), C형 간염 바이러스(HCV), D형 간염 바이러스(HDV) 및 E형 간염 바이러스(HEV)와의 혈청학적 차이,

iii) 플라비비리대 바이러스과의 일원, 및

iv) 서열번호 19와 선택적으로 하이브리드화될 수 있는 폴리뉴클레오티드 영역을 포함하는 바이러스 계통을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 12

서열번호 15의 폴리펩티드 또는 비A 비B 비C 비D 비E형 간염 바이러스(HGV)와 특이적으로 면역반응하는 이의 단편에 대해 제조된 정제된 항체 제제로서, HGV가

i) 감염된 영장류에서 상승된 혈청 알라닌 아미노트랜스퍼라제 농도의 생성,

ii) A형 간염 바이러스(HAV), B형 간염 바이러스(HBV), C형 간염 바이러스(HCV), D형 간염 바이러스(HDV) 및 E형 간염 바이러스(HEV)와의 혈청학적 차이, 및

iii) 서열번호 19와 선택적으로 하이브리드화될 수 있는 폴리뉴클레오티드 영역을 포함하는 바이러스 계통을 특징으로 하는 제제.

#### 청구항 13

제 12 항에 있어서, 항체가 폴리클로날 항체임을 특징으로 하는 제제.

#### 청구항 14

제 12 항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체임을 특징으로 하는 제제.

#### 청구항 15

비A 비B 비C 비D 비E형 간염 바이러스(HGV) 폴리펩티드 항원을 함유하는 생물학적 유체 샘플을 스크리닝하는데 사용되는 진단 키트로서,

제 12 항의 항-HGV 항체 제제, 및 폴리펩티드 항원이 항체에 결합하는 것을 검출하기 위한 리포터를 포함하는 키트.

#### 청구항 16

서열번호 14에 함유되어 있는 일련의 연속 뉴클레오티드로 구성된 비A 비B 비C 비D 비E형 간염 바이러스(HGV) 폴리뉴클레오티드를 조절 서열과 작동가능하게 결합된 형태로 포함하는 벡터로서, 폴리뉴클레오티드가 길이가 아미노산 10개 이상인 생성물을 엔코딩하며, HGV가

i) 감염된 영장류에서 상승된 혈청 알라닌 아미노트랜스퍼라제 농도의 생성,

ii) A형 간염 바이러스(HAV), B형 간염 바이러스(HBV), C형 간염 바이러스(HCV), D형 간염 바이러스(HDV) 및 E형 간염 바이러스(HEV)와의 혈청학적 차이,

iii) 플라비비리대 바이러스과의 일원, 및

iv) 서열번호 19와 선택적으로 하이브리드화될 수 있는 폴리뉴클레오티드 영역을 포함하는 바이러스 계통을 특징으로 하는 벡터.

#### 청구항 17

제 16 항에 따른 벡터로 형질전환된 숙주 세포.

#### 청구항 18

1종 이상의 항-HGV 항체와 특이적으로 면역반응하는 에피토프를 함유하는 항원을 면역반응을 일으키기에 충분한 양으로 포함하는 제7항에 따른 비A 비B 비C 비D 비E형 간염 바이러스(HGV) 폴리펩티드를 사용함으로써 HGV에 대한 항체를 생성시키기 위한 약제를 제조하는 방법으로서, HGV가

i) 감염된 영장류에서 상승된 혈청 알라닌 아미노트랜스퍼라제 농도의 생성,

ii) A형 간염 바이러스(HAV), B형 간염 바이러스(HBV), C형 간염 바이러스(HCV), D형 간염 바이러스(HDV) 및 E형 간염 바이러스(HEV)와의 혈청학적 차이,

iii) 플라비비리대 바이러스과의 일원, 및

iv) 서열번호 19와 선택적으로 하이브리드화될 수 있는 폴리뉴클레오티드 영역을 포함하는 바이러스 계통을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 19

제 7 항에 따른 폴리펩티드와 65% 이상의 서열 동일성을 갖는, 길이가 아미노산 15개 이상인 폴리펩티드.

#### 청구항 20

제 7 항에 따른 폴리펩티드의 제제.

#### 청구항 21

정제된 비A 비B 비C 비D 비E형 간염 바이러스(HGV)로서, HGV가

- i) 감염된 영장류에서 상승된 혈청 알라닌 아미노트랜스퍼라제 농도의 생성,
- ii) A형 간염 바이러스(HAV), B형 간염 바이러스(HBV), C형 간염 바이러스(HCV), D형 간염 바이러스(HDV) 및 E형 간염 바이러스(HEV)와의 혈청학적 차이, 및
- iii) 서열번호 19와 선택적으로 하이브리드화될 수 있는 폴리뉴클레오티드 영역을 포함하는 바이러스 게놈을 특징으로 하는 바이러스.

### 요약

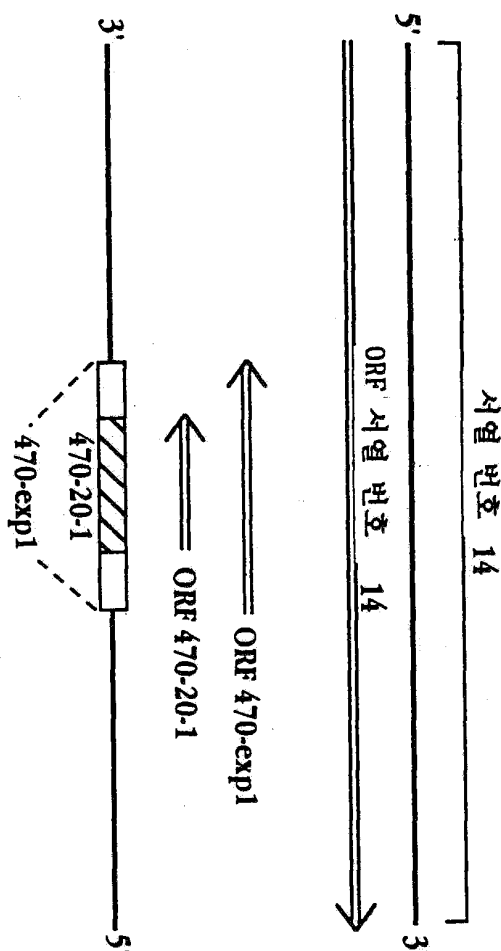
본 발명은, 본원에서 G형 간염 바이러스 (HGV)로 명명되는 비-A, 비-B, 비-C, 비-D 및 비-E형 간염 바이러스를 갖는 개체로부터의 혈청과 면역반응성이 있는 폴리펩티드 항원에 대한 것이다. 항원성 폴리펩티드를 위한 개방 리딩 프레임 서열을 코드화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 유사한 게놈-단편 클론을 제시한다. 본 발명의 항원은 백신 및 항체 제조물에서도 유용하다. 부가하여, 2개의 HGV 단리물의 전체 코딩 서열이 기재되어 있다. 본 발명은 샘플내에서 HGV를 핵산-기초해 검출하는 방법 및 HGV와 유사한 추가의 게놈 서열을 단리시키는 방법도 제시한다.

### 대표도

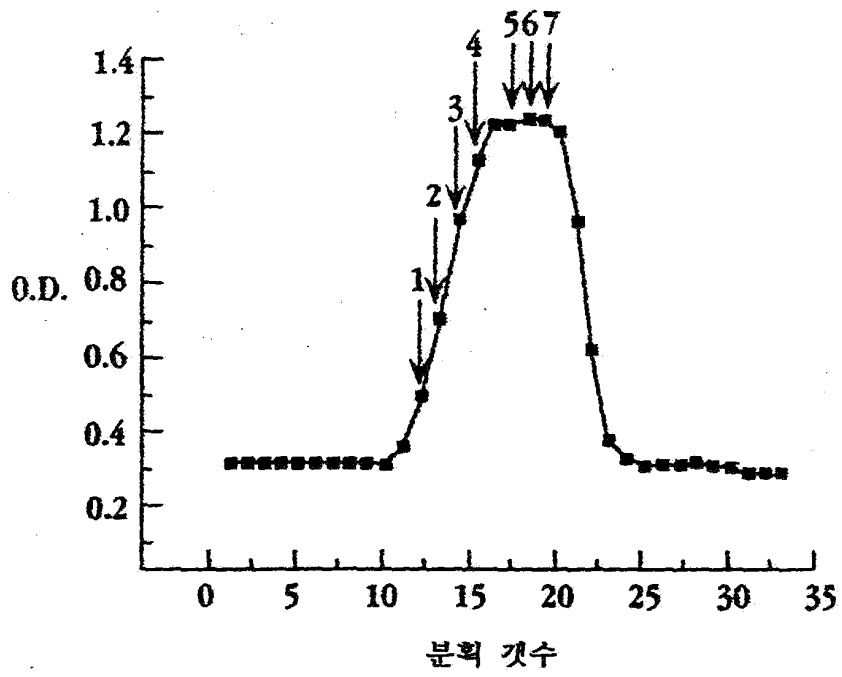
#### 도1

#### 도면

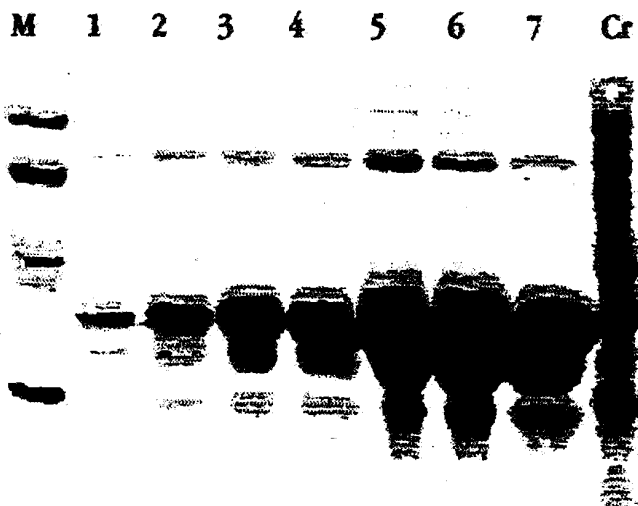
도면1



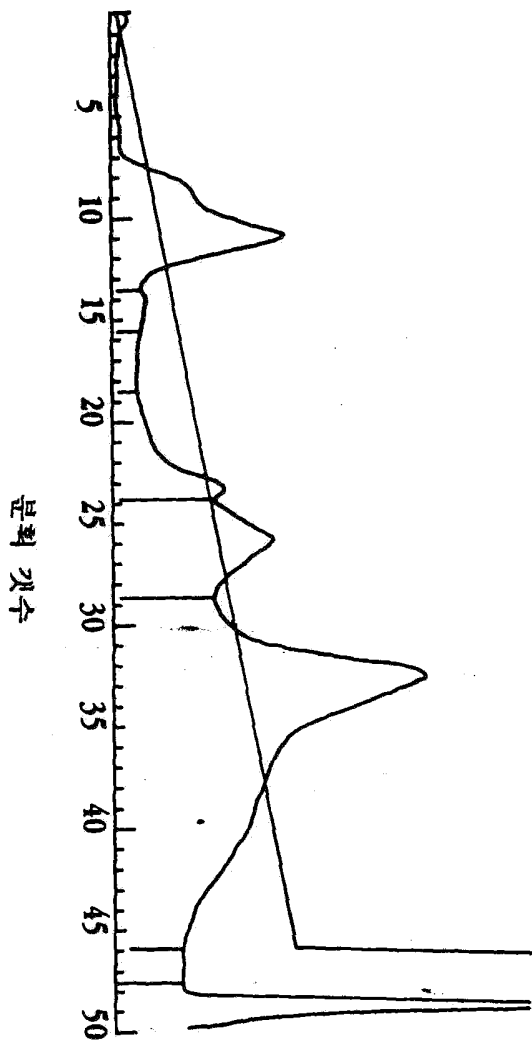
도면2



도면3



도면4a



도면4b

분획

미정제물 9 11 13 23 26 28  
8 10 12 14 24 27 29





도면4c

분획

	30	32	34	36	38	40	50
M	31	33	35	37	39	41	51

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

푸을

10 20 30

HGV

lwekktpcalcvdctcfDssteedvalet

HOCV

ykwvkqkpvvipgyegktplfglfdkvvkewdqfqnprvavsfDtkawDdtqvttndlelik  
3490 3500 3510 3520 3530 3540

40 50 60 70 80

HGV

el--yalaadhpewvrapgkyyasgtlwtpegvprgerycRSBGvltTsasNc-ltcyik

HOCV

diqkyfkkkwhkfiddltlmhmsevpvltadgevylrkqRg8GgpdTsagNsmInvlm  
3550 3560 3570 3580 3590 3600

90 100 110 120 130 140

HGV

vkaacervgl-----knvslllaGDDcllcerpvcdpsdalgralasgyacepsyha

HOCV

vyafceatgvpyksfdrvakihvcGDDgfliteralgEkfaskgvqillyeaqkprqkltg  
3610 3620 3630 3640 3650 3660

5a

[illegible]

도면6

## 트롬빈 절단

```

sj26
K S D L V P R G S M V S W D A D A R A P
1      11      21      31      41      51
CAAAATCGGATCTGGTTCGCGTGGTTCATGGTCTCATGGGACGCGGACGCTCGTGCGC
      C^CATGG (NcoI)

A M V Y G P G Q S V T I D G E R Y T L P
61      71      81      91      101      111
CCGCGATGGTCTATGGCCCTGGGCAAAGTGTACCATTTGACGGGGAGCGCTACACCTTGC
      AGC^GCT (Eco47III)
      NcoI 부위를 제거하기 위해 염기-돌연변이됨

H Q L R L R N V A P S E V S S E V S I D
121      131      141      151      161      171
CTCATCAACTGAGGCTCAGGAATGTGGCACCCCTCTGAGGTTTCATCCGAGGTGTCCATTG

I G T E T E D S E L T E A D L P P A A A
181      191      201      211      221      231
ACATTGGGACGGGAGACTGAAGACTCAGAACTGACTGAGGCCGATCTGCCGCCGGCGGCTG
      CTGAAG (Eco57I_16/14->)      GCC^GGC (NaeI)
      CTTCAG (-14/16_Eco57I)

A L Q A I E N A A R I L E P H I D V I M
241      251      261      271      281      291
CTGCTCTCCAAGCGATCGAGAATGTGCGAGGATTCTTGAACCGCACATTGATGTTCATCA
      CGAT^CG (PvuI)
      GAATGCN^ (BsmI)

E D C S T P S L C G S S R E M P V W G E
301      311      321      331      341      351
TGGAGGACTGCAGTACACCCTCTCTTTGTGGTAGTAGCCGAGAGATGCCTGTATGGGGAG
      CTGCA^G (PstI)

-----END-GE3-2>|
D I P R T P S P A L I G S H H H H H H Z <----- 주목
361      371      381      391      401      411
AAGACATCCCCGTACTCCATCGCCAGCACTTATCGGATCCCACCATCACCATCACCATT
      G^GATCC (BamHI)

|pGEX----->
N S S Z L T D D L P
421      431      441      451
AGAATTCATCGTGACTGACTGACGATCTACCT
      G^AATTC (EcoRI)

```

IMAC을 위한 폴리 His

주목

7A                      7B                      7C                      7D

형질                      JC                      PNF2161                      Supernormal 2                      RM001

GE 3-2  $\mu$ g/테인                      4                      2                      1                      0.5                      4                      2                      1                      0.5                      4                      2                      1                      0.5

142.9 —  
97.2 —                      —

50 —

← GE 3-2

35.1 —

29.7

21.9 —

도면7



8A

8B

8C

8D

형질

JC

Supernormal 2

RM001

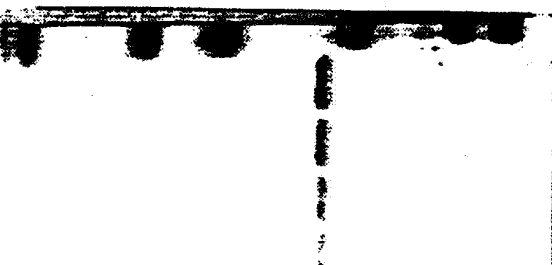
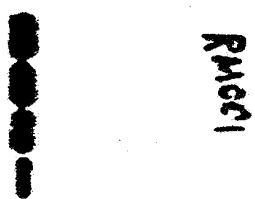
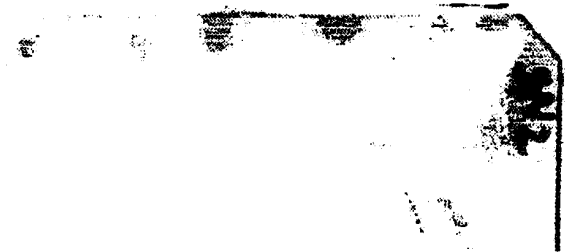
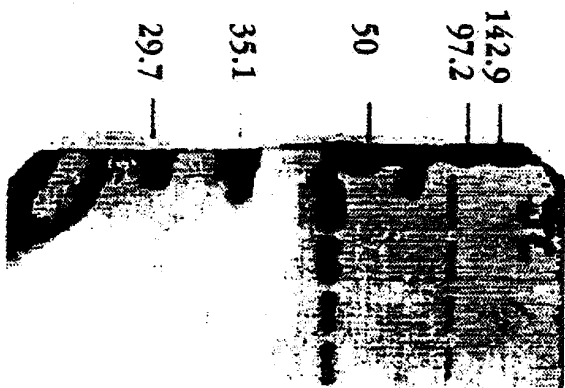
Ponceau 염색

Y5-10  $\mu$ g/레인 1.6 0.8 0.4 0.2

1.6 0.8 0.4 0.2

1.6 0.8 0.4 0.2

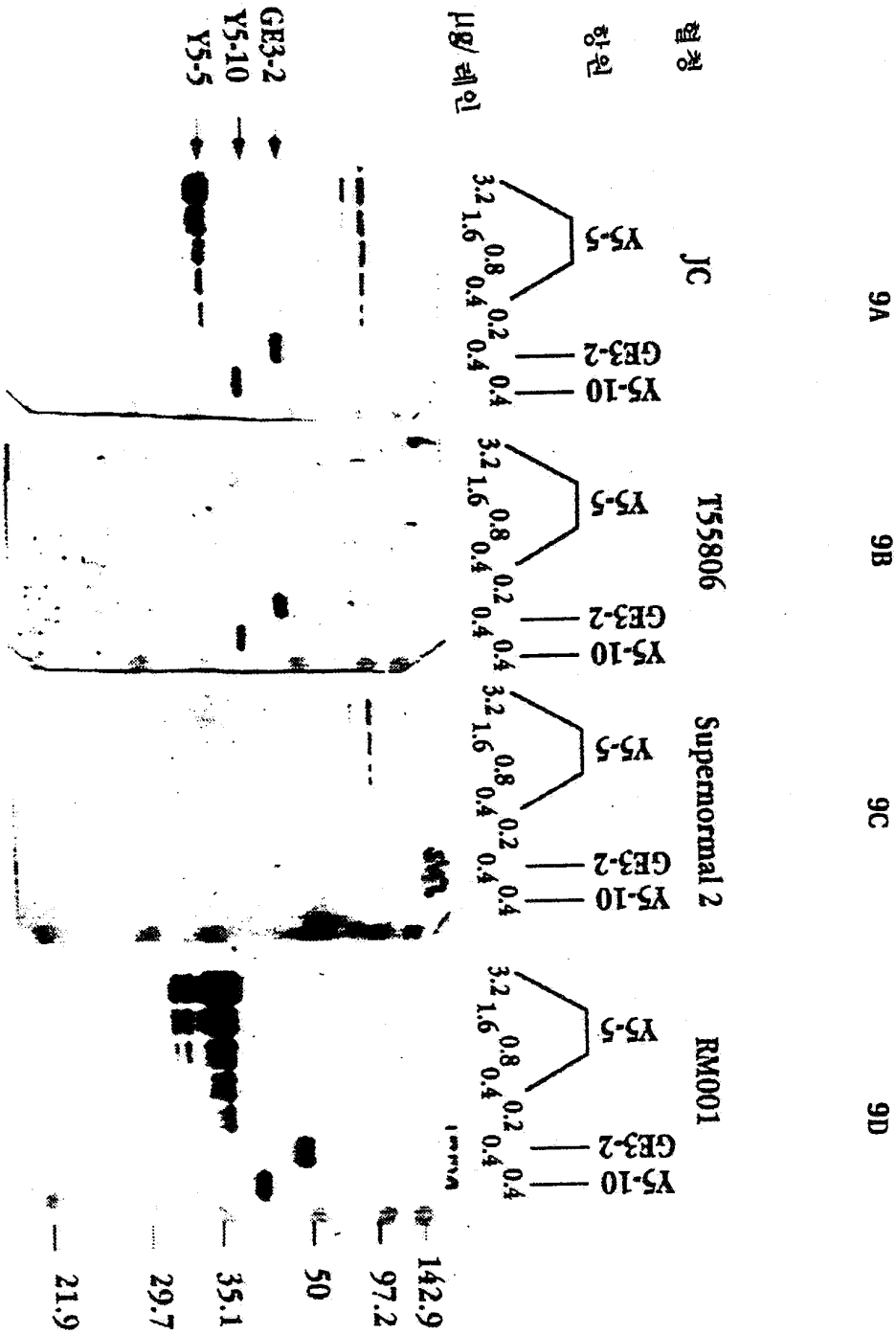
1.6 0.8 0.4 0.2



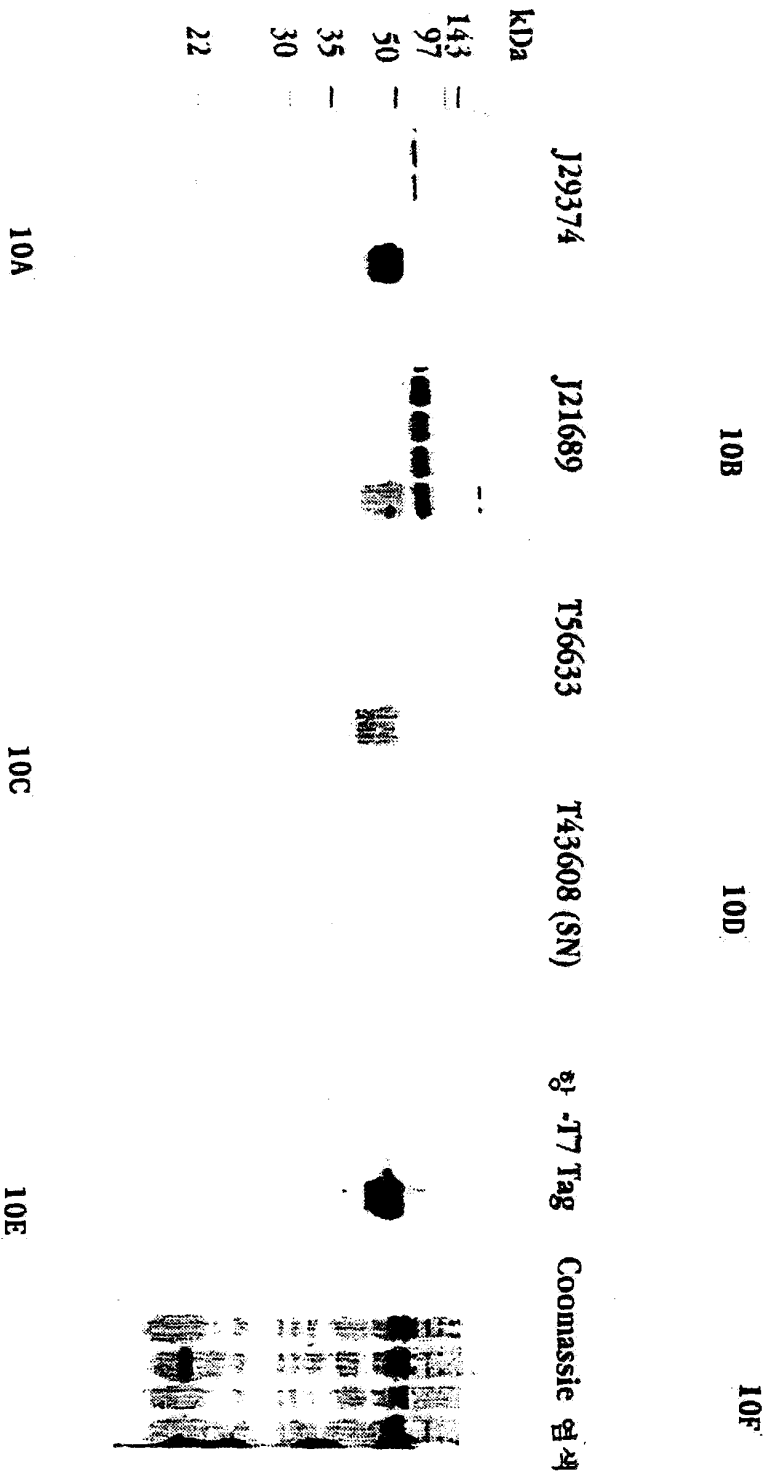
Y5-10

도면8

도면9

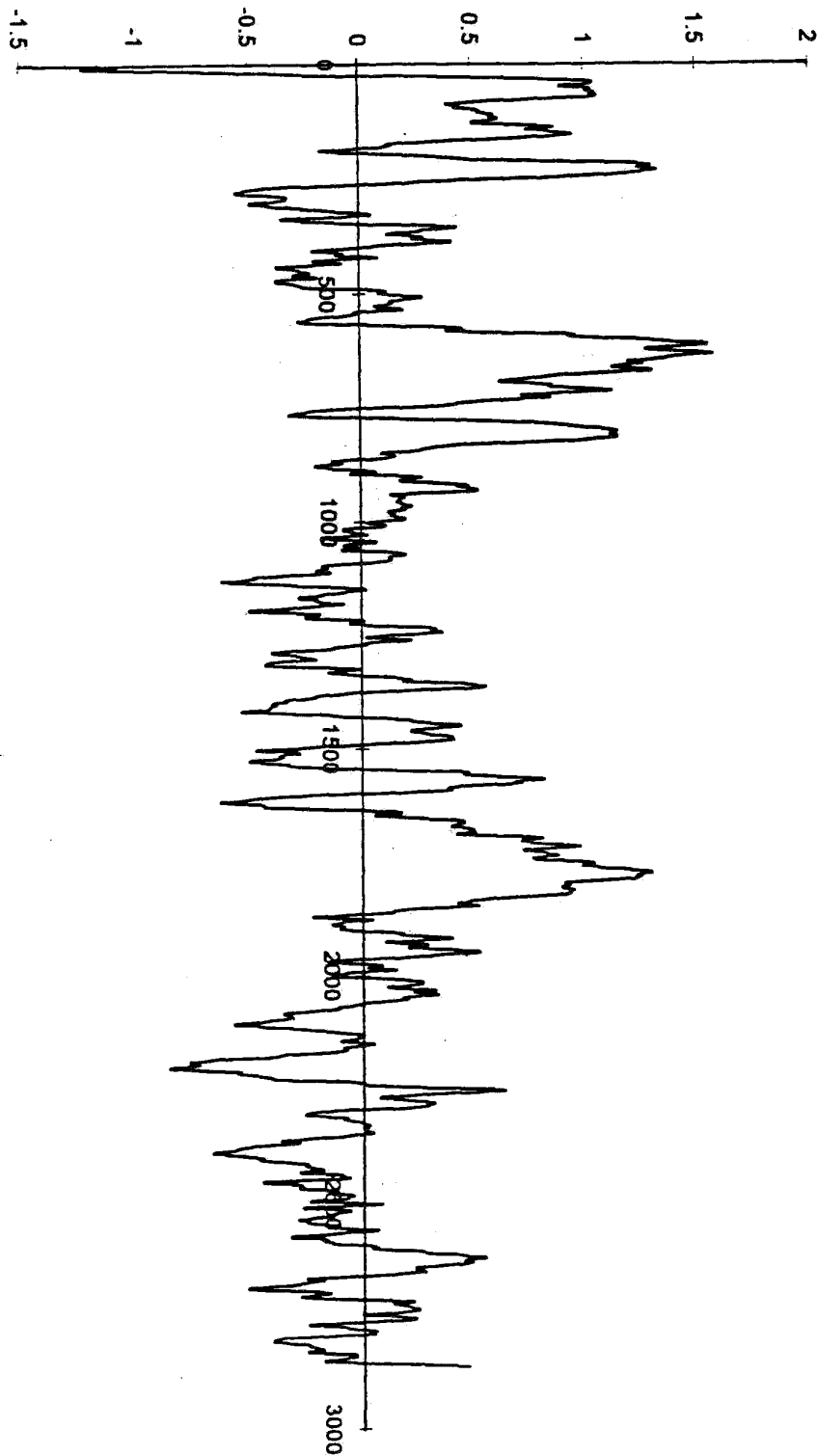


도면 10



## 도면11

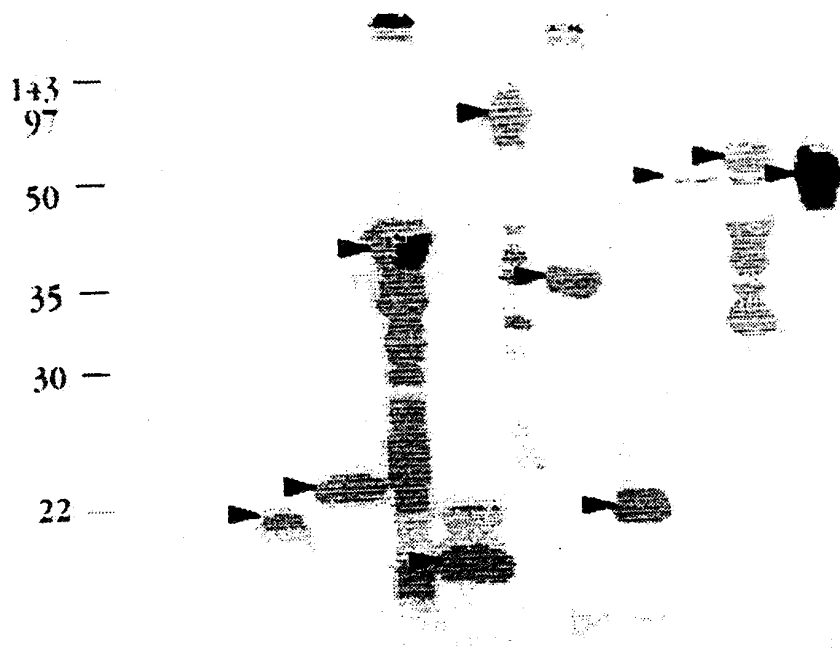
소수성 지수-상승은 소수성의 증가를 나타낸다



아미노산 위치

## 도면 12

kDa





도면 13



14B

14D

상 -T7

3831781

T43608

Coomassie 염색

kDa

143  
97

50

35

30

22

13

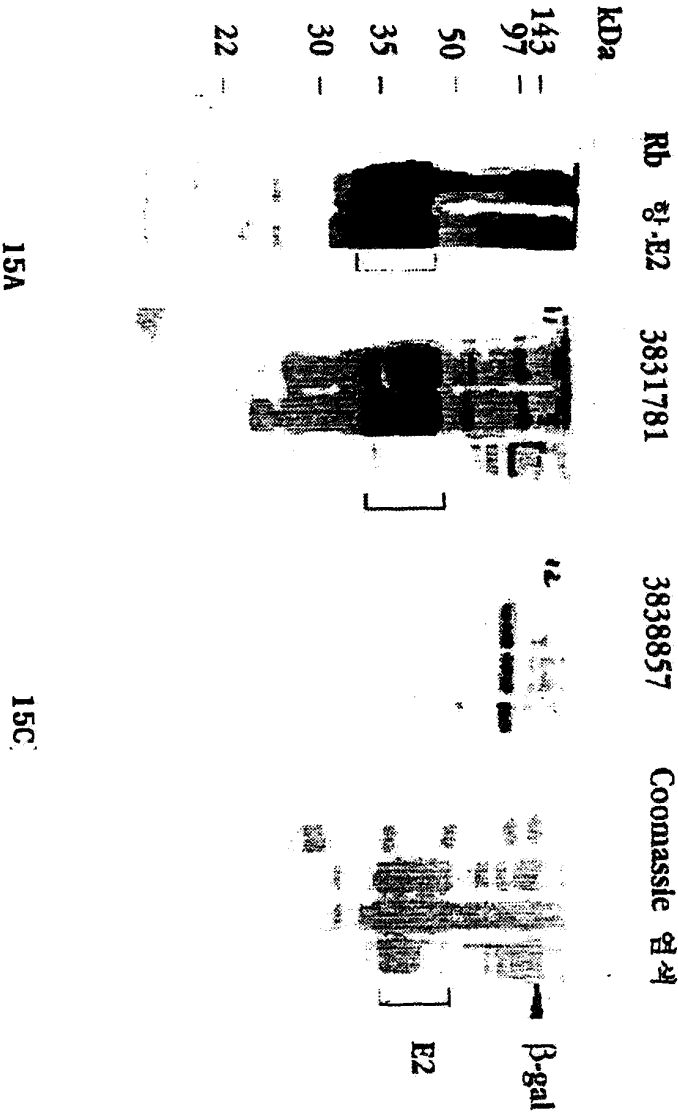
GE-E2

도면 14

14A

14C

도면 15



C	E1	E2	NS2	NS3	4A	4B	5A	5B
---	----	----	-----	-----	----	----	----	----

1

519-1149

2

1083-2315

459-1055

2a

1035-2177

3a

3

2316-3254

4

3255

5

5081

5082-6083

6

6084-6536

7

6537-7529

8

7530 9077

9

9077

459

14

2103

11

5432

459

2720

10

도면 16