



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월09일

(11) 등록번호 10-1500017

(24) 등록일자 2015년03월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/18 (2006.01) *A61K 39/29* (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01) *G01N 33/569* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7005994

(22) 출원일자(국제) 2007년08월24일

심사청구일자 2012년08월22일

(85) 번역문제출일자 2009년03월24일

(65) 공개번호 10-2009-0053930

(43) 공개일자 2009년05월28일

(86) 국제출원번호 PCT/AU2007/001221

(87) 국제공개번호 WO 2008/022401

국제공개일자 2008년02월28일

(30) 우선권주장

2006904635 2006년08월25일 오스트레일리아(AU)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

Journal of Virology Vol. 77, No. 3, Pages
1856-1867(2003. 2.)

GenBank No. AF009606 (2009. 6. 18.)

전체 청구항 수 : 총 13 항

(73) 특허권자

더 맥파레인 버넷 인스티튜트 포 메디칼 리서치
앤드 퍼블릭 헬스 리미티드

오스트레일리아 3004 빅토리아주 멜버른 커머셜
로드

(72) 발명자

맥 카프리 캐슬린

오스트레일리아 빅토리아 3067 애보즈포드 찰스
스트리트 156

드러머 하이디

오스트레일리아 빅토리아 3046 글렌로이 프란 스
트리트 49

폼보리오스 판텔리스

오스트레일리아 빅토리아 3016 윌리엄스타운 베이
뷰 스트리트 112

(74) 대리인

김진희

심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **재조합 HCV E2 당단백질**

(57) 요약

본 발명은 HVR1 가변부, HVR2 가변부 및 igVR 가변부를 포함하는 HCV-E2 수용체 결합 도메인(Receptor Binding Domain; RBD)을 포함하는 C형 간염 바이러스(HCV)의 변형 E2 당단백질로서, 상기 가변부 중 하나 이상에서, 이 가변부의 적어도 일부는 가요성 링커 서열(flexible linker sequence)로 치환되는 C형 간염 바이러스(HCV)의 변형 E2 당단백질을 제공한다. 본 발명은 또한 변형 당단백질을 포함하는 조성물과 이를 사용하는 방법을 제공하기도 한다.

(30) 우선권주장

2006906090	2006년11월01일	오스트레일리아(AU)
2006906282	2006년11월10일	오스트레일리아(AU)

특허청구의 범위

청구항 1

(i) 원형(prototype) C형 간염 바이러스(HCV)-H77 폴리펩티드 서열의 전장 E2 서열 내의 384~410번 아미노산 잔기(HVR1 가변부);

(ii) 원형 HCV-H77 폴리펩티드 서열의 전장 E2 서열 내의 Cys459~Cys486 사이에 존재하는 아미노산 잔기(HVR2 가변부); 및

(iii) 원형 HCV-H77 폴리펩티드 서열의 전장 E2 서열 내의 Cys569~Cys581 사이에 존재하는 아미노산 잔기(igVR 가변부)

를 포함하는 HCV-E2 수용체 결합 도메인(Receptor Binding Domain; RBD)을 포함하는 변형된 C형 간염 바이러스(HCV) E2 당단백질로서,

상기 igVR 가변부의 적어도 일부는 결실되고, 상기 변형된 HCV E2 당단백질은 HCV를 중화시키는, 보존된 코어 부위에 대한 항체를 유도하는 것인 변형된 C형 간염 바이러스(HCV) E2 당단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 HVR1 가변부의 적어도 일부가 결실되는 것인 변형된 HCV E2 당단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 HVR2 가변부의 적어도 일부가 결실되는 것인 변형된 HCV E2 당단백질.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 당단백질이 HCV 수용체 CD81에 결합하는 것인 변형된 HCV E2 당단백질.

청구항 5

제1항에 있어서, 가변부의 적어도 일부가 결실되고 링커 서열로 치환되며, 상기 링커 서열은 20개 이하의 아미노산 잔기의 펩티드를 포함하고 Gly, Ser, Ala, Thr 및 Arg으로부터 선택되는 잔기를 포함하며, 경우에 따라

(a) 상기 링커 서열 또는 각각의 링커 서열은 Gly-Ser-Ser-Gly(GSSG) 서열을 포함하고/포함하거나;

(b) 상기 HVR1 가변부의 서열은, 이것이 링커 서열을 포함하도록 변형될 경우, Glu-Thr-His-Gly-Ser-Ser-Gly(ETHGSSG) 서열을 포함하는 것인 변형된 HCV E2 당단백질.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 변형된 HCV E2 당단백질을 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 함께 포함하는, HCV 감염을 예방 또는 치료하기 위한 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 애드ju반트(adjuvant)를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 변형된 HCV E2 당단백질을 포함하는, 환자의 HCV 감염을 예방 또는 치료하기 위한 제제.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 변형된 HCV E2 당단백질에 특이적으로 결합하는 분리된 항체.

청구항 10

제9항에 있어서, (a) 폴리클로날 항체, 또는 (b) 모노클로날 항체인 항체.

청구항 11

제9항에 따른 항체를 포함하는, 환자의 HCV 감염을 예방 또는 치료하기 위한 제제.

청구항 12

항체-항원 복합체의 형성을 가능하게 하는 조건 하에서, 환자로부터 유래한 생물학적 시료를 제9항에 따른 항체와 접촉시키는 단계, 및 상기 복합체를 검출하는 단계를 포함하고, 상기 복합체의 형성은 상기 시료 내 HCV의 존재를 나타내는 것인, 환자의 HCV 감염을 검출하기 위한 시험관내 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

- (a) 상기 항체는 검출 가능하게 표지되고/표지되거나,
- (b) 상기 생물학적 시료는 환자로부터 유래한 혈액과 같은 체액 시료인 시험관내 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 C형 간염 바이러스(HCV) 감염에 관한 신규하고 개선된 치료법에 관한 것이다. 본 발명은 특히, 재조합 HCV 다단백질(polyprotein)을 투여하는 것을 바탕으로 하는, HCV의 감염을 예방 및 치료하기 위한 백신 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

세계 보건 기구에 따르면, 전 세계 인구 중 약 1억7천만~2억 명 가량이 C형 간염 바이러스(HCV)에 감염된다고 한다. HCV가 어떻게 전이되는지 정부 차원에서 교육을 강화하고 있고 예방 프로그램도 있긴 하지만, HCV는 계속해서 퍼져나가고 있는 실정이다. HCV에 감염된 사람들 중 약 80%가 이 바이러스의 보균자이다. 오스트레일리아

의 경우, 매년 약 16,000명 정도가 새로 HCV에 감염된다고 보고되고 있는데, 이들은 대부분 약물 주사시 감염되는 것으로 알려져 있다. HCV는 혈액을 통한 바이러스 감염을 일으키는 원인인 바이러스 중 가장 흔한 바이러스로서, 상당 수의 사람들을 사망에 이르게 한다.

[0003] HCV는 발병자의 간과 임의의 면역 세포들을 감염시키는 것으로 알려져 있다. 결과적으로, HCV는 여타 유형의 간염보다도 중증 간질환 예를 들어, 섬유증, 간경화, 지방간 및 간 세포 암종(간암)을 빈번히 유발시킨다. HCV에 감염되었을 경우에는 간 이식이 필요하다. 일반적으로, 감염시에도 별다른 증상을 나타내지 않기 때문에, 감염의 급성기 때에는 종종 그냥 지나쳐버리기 쉬워서, 감염된 개체들 중 80%가 만성기로 진행되는 것으로 생각된다. 만성 감염은 면역 시스템이 바이러스에 대하여 적당한 면역 반응을 나타내지 못함으로 인해 유발된다.

[0004] 현재, HCV에 대한 백신은 존재하지 않으며, HCV를 치료할 수 있는 유일한 치료법은 항바이러스 약물과 약물의 조합을 개발하는 것에 의존하고 있다. 일반적으로, 항바이러스 약물 디자인은, 불능화 또는 억제될 수 있는 바이러스 단백질 또는 이 단백질의 일부를 동정하는 것을 바탕으로 한다. 경증 또는 중증 섬유증을 앓고 있는 환자를 치료하기 위한 최선의 방법으로서, 알파-인터페론과 리바비린을 함께 사용하는 방법을 포함한다. 알파-인터페론과 리바비린의 병용 요법의 항바이러스 효과는, 1회만 투여하더라도 혈중 HCV 수준을 급속하게 감소시킨다는 것이다. 그러나, HCV에 대한 통상의 알파-인터페론 치료법은 몇 가지 단점이 있다. 예를 들어, (i) 수주 또는 수 개월 동안 치료한 후 알파-인터페론 치료를 멈추면, 바이러스 부하(viral load) 수준이 급속하게 원래대로 돌아온다는 점; (ii) 알파-인터페론/리바비린을 사용하는 치료법은 심각한 부작용 예를 들어, 감기-유사 증상, 적혈구 수 또는 백혈구 수의 감소, 골수 억제(bone marrow suppression), 신경 정신과 질병 특히, 우울증과 빈혈을 유발시킨다는 점; (iii) 알파-인터페론은 체 내에 급속하게 흡수되어 제거되기 때문에, 치료 효과를 높이기 위해서는 환자에게 약물을 자주 투여해야 한다는 점; 그리고 (iv) 이와 같은 치료에 비용이 많이 든다는 점이 그것이다.

[0005] 전술한 단점들 중 일부, 특히, 상기 (iii) 항목에서 설명한 단점은, 알파-인터페론을 대상으로 폴리에틸렌 글리콜 분자를 인터페론에 부착시키는 '페그화' 과정을 진행시킴으로써 해결하였다. 페그화된 인터페론과 리바비린을 함께 투여하면, 인터페론의 반감기를 증가시키고 투여 횟수를 줄일 수 있으므로, 환자의 불편도 없앨 수 있다는 이점이 있다. 하지만, 이와 같은 치료법은 치료받은 환자의 50% 미만에서만 효과를 볼 수 있는 것으로 입증되었다. HCV 만성 환자의 수 증가로 인해, 예방용 및 치료용 백신을 개발할 필요가 있다.

[0006] HCV 감염을 성공적으로 막을 수 있는 백신을 개발하는 것은 쉽지 않다. 이와 같이 어려운 이유로서는, RNA 바이러스인 HCV는 유전적으로 불안정해서, 체 내 면역 반응을 회피하는 바이러스 돌연 변이가 고 비율로 발생할 수 있기 때문인 것으로 생각된다. 그러므로, 보존된 바이러스의 일부를 동정하는 것이 연구자들에게 있어서 최대의 도전 과제이다.

[0007] HCV는 플라비비리대(Flaviviridae) 군의 별도 속(해파시바이러스; Hepacivirus)으로 분류된다. HCV는 비-세포 변성 바이러스로서, 감염체를 신속하게 제거하거나 염증 반응을 일으켜 만성 감염 및 간 손상을 일으키는 면역 반응을 촉발시킨다. 급성 환자들 중 약 30%의 경우에는, 치료를 하지 않고서도 영구적으로 HCV RNA를 제거하는 자발적 감염 치유 현상이 일어나는데, 이는 곧, HCV에 대한 자연 면역(natural immunity)으로 인한 것으로서, 이러한 현상은 백신 개발의 장래에 있어서 고무적인 현상이라고 할 수 있다. 그러나, 이와 같은 HCV 감염의 결과를 결정하는 요인은 알려진 바 없다.

[0008] HCV 비리온(virion)은 약 9.5kb의 포지티브-센스 단일 사슬 RNA 게놈을 함유한다. 이 게놈은 3,010~3,030개의 아미노산으로 이루어진 하나의 다단백질을 암호화한다. 구조 단백질은 바이러스의 뉴클레오캡시드를 형성하는 코어 단백질과 2개의 외피 당단백질인 E1 및 E2를 포함한다. 최근에는, HCV 백신을 개발함에 있어서 HCV 외피 당단백질인 E1과 E2에 초점을 맞추고 있다. E1과 E2는 바이러스 부착과 도입을 매개하는 비리온 표면상의 이중 이량체와 비 공유 결합을 형성하며, 숙주 면역 반응에 대한 표적을 제공하는 것으로 파악되었다.

[0009] 최근의 연구에 따르면, 외피 당단백질인 E2는 CD4+ T 세포의 표면에 존재하는 CD81과 결합하는 것으로 밝혀졌다. 결합 과정에 있어서, E2는 그 형태를 신속하게 바꾼다. 아직까지, CD81의 결합 수준을 "원래의" 수준(wild-type level)으로 나타낼 수 있는, 적당한 변형 외피 당단백질을 제공할 수 있는 방법은 없다.

[0010] 본 발명의 명세서(청구의 범위 포함)를 통하여, HCV 외피 당단백질 E1 및 E2의 폴리펩티드 잔기들의 번호 매김 방식은 모두, 원형 HCV-H77 다단백질 서열(유전자 은행 승인 번호: AF 009606)을 바탕으로 한다. 당단백질 E1의 성숙한 형태의 것은 191번 및 383번 다단백질 잔기를 포함하며, 당단백질 E2의 성숙한 형태의 것은 384번 및

746번 다단백질 잔기를 포함한다.

- [0011] E2의 수용체 결합 도메인(RBD)은 384~661번 다단백질 잔기(E2₆₆₁)를 포함한다. E2₆₆₁ RBD의 재조합 형은 형질 감염된 세포로부터 효율적으로 분비되며, CD81 및 기타 세포 표면 분자와 상호 작용할 수 있다. E2 RBD는 2개의 가변부 즉, HVR1(384~410) 및 HVR2(474~482)를 함유한다.
- [0012] E2의 N-말단에 위치하는 가변부 1은 HCV 게놈 내 가장 가변적인 부위로서, 면역원성이 크고, 중화 도피 돌연 변이(neutralization escape mutation)를 신속하게 축적한다. HVR1 내 아미노산의 가변성 수준이 높긴 하지만, 바이러스 도입에 중요한 역할을 하는 기본 잔기들은 전체적으로 보존되어 있다.
- [0013] 가변부 2는 Cys-459~Cys-486이 축적하고 있는 부위의 내부에 위치한다. 원래는 7개의 잔기로 이루어진 서열인 것으로 밝혀졌지만, 상이한 HCV 유전자형으로부터 유래하는 E2 서열들을 비교한 결과, 상기 서열은 461~481번 잔기들에 까지 연장될 수 있음을 알 수 있다. HVR1과 비교하였을 때, HVR2의 서열은 HCV 감염 환자들 사이에 있어서 비교적 안정적이지만, 이 위치에 돌연 변이가 축적되면 인터페론-α 치료에 대한 반응성도 변화하는 것으로 파악된다.
- [0014] 본 발명에 이르게 한 연구에 있어서, 본 발명의 발명자들은, HCV의 6개의 주요 유전자형을 나타내는 E2 서열을 정렬하면, 유전자형 내에서는 비교적 보존되되, 아미노산 삽입과 결실로 인해 유전자형 간에서는 가변적인 부위 즉, 이전에는 규명되지 않았던, 570~580번 다단백질 잔기들 사이의 가변부가 존재함을 알아냈다. 그러므로, 570~580번 아미노산은 유전자형 간(intergenotypic) 가변부(igVR)인 것으로 파악된다. HCV의 6개 유전자형들 전부로부터 유래하는 해당 부위와, 이 부위 내부에 있는 분기성 분리부를 관찰한 결과, igVR에도 보존적 시스템인 잔기들(Cys-569 및 Cys-581)이 축적하고 있음을 알 수 있었는데, 이는 곧, 상기 서열들이 인위적 이황화물-매개 결합 루프를 형성한다는 것을 말해주는 것이다.
- [0015] 현재까지, 적응성 면역 반응 경로를 이용한 HCV 백신 치료법이 성공한 경우는 없었다. HCV 치료를 위하여 현재 행해지고 있는 치료법 및 실험 단계에 있는 치료법에 몇 가지 단점이 있다면, HCV 감염을 치료하기 위해 여전히 세포-매개 면역 반응을 제공할 필요가 있다는 점이다.
- [0016] 본 발명의 제1 목적은 HCV 감염을 예방 또는 치료하기 위한 면역 요법 수단을 제공하는 것이다. 본 발명의 제2 목적은 HCV 감염을 예방 또는 치료하기 위한 면역 요법 수단을 제공하는 것이다. 본 발명의 제3 목적은 변형된 E2 당단백질을 제공하는 것으로서, 이 당단백질은 HCV 감염에 있어서 천연 세포성 수용체와 '원래의' 결합 수준으로 결합한다.
- [0017] 국제 특허 출원 공보 WO 02/22155(하와이 바이오테크놀로지 그룹, 인코포레이티드; Hawaii Biotechnology Group, Inc.)에는, HVR1 부위가 결여되어 있으며, 숙주 세포 내에서 재조합 형으로서 발현될 때 성장 배지 중에 분비될 수 있는 절단형 HCV E2 다단백질에 관하여 개시되어 있다. 이 다단백질은 또한 662번 잔기 뒤에 C-말단이 결여되어 있을 수도 있다. 또한, 국제 특허 출원 공보 WO 03/022880(XTL 바이오파마슈티컬스 리미티드; XTL Biopharmaceuticals Ltd.)에는, HVR1 부위가 결여된 E2 단백질의 절단형에 관하여 개시되어 있다.
- [0018] 전술한 바는 본 발명의 분야에 소개할 목적으로 제시한 것이지, 당 업계에 일반적으로 알려져 있는 것으로 인정한다는 의미로 해석되어서는 안 된다. 본 명세서에 언급된 공보들에 관한 서지적 항들은 본 명세서의 말미에 제시되어 있다. 본 명세서에 있어서, 선행 기술에 관한 참고 문헌은 그 어떠한 것이라도, 그 문헌이, 일반적으로 알려져 있는 상식의 일부를 제시하는 것임을 인정하는 것이거나 또는 일반적으로 알려져 있는 상식의 일부를 제시하는 것은 아니며, 또한 그렇게 간주하여도 안 될 것이다.
- [0019] **발명의 개요**
- [0020] 본 발명의 명세서와 이에 첨부된 청구의 범위에 있어서, 내용에 달리 언급이 없는 한, "포함한다" 및/또는 그의 변형어 예를 들어, "포함하다" 또는 "포함하는"은, 언급된 정수나 단계, 또는 정수들이나 단계들의 군을 포함하되, 임의의 기타 정수나 단계, 또는 정수들이나 단계들의 군을 제외하는 것은 아님을 알게 될 것이다.
- [0021] 하나의 측면에서, 본 발명은 HCV-E2 수용체 결합 도메인(RBD) 예를 들어, HVR1, HVR2 및 igVR 가변부를 포함하는 변형 C형 간염 바이러스(HCV) E2 당단백질을 제공하는 것으로서, 상기 가변부의 하나 이상에서, 이 가변부의 적어도 일부는 가요성 링커 서열(flexible linker sequence)로 치환된다.
- [0022] 다른 측면에서, 본 발명은 HCV-E2 수용체 결합 도메인(RBD) 예를 들어, HVR1, HVR2 및 igVR 가변부를 포함하는 변형 C형 간염 바이러스(HCV) E2 당단백질을 제공하는 것으로서, 여기서, 상기 HVR2 가변부의 적어도 일부는 제

거되거나 또는 가요성 링커 서열로 치환된다.

- [0023] 또 다른 측면에서, 본 발명은 HCV-E2 수용체 결합 도메인(RBD) 예를 들어, HVR1, HVR2 및 igVR 가변부를 포함하는 변형 C형 간염 바이러스(HCV) E2 당단백질을 제공하는 것으로서, 여기서, 상기 igVR 가변부의 적어도 일부는 제거되거나 또는 가요성 링커 서열로 치환된다.
- [0024] 상기 광범위하게 기술된 변형 HCV E2 당단백질은 실질적으로 HCV 비리온의 야생형의 형태를 가지며, HCV 수용체 CD81과 형태 의존성 항체와 결합하는 능력을 보유하는 당단백질이다.
- [0025] 본 발명은 또한, 상기 광범위하게 기술된 변형 HCV E2 당단백질과, 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0026] 이러한 조성물은 바람직하게는 애주반트를 포함하는 백신 조성물로서 제형화될 수 있다.
- [0027] 또 다른 측면에서, 본 발명은 또한 환자의 체내에서 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하는데, 이 방법은, 상기 광범위하게 기술된 변형 HCV E2 당단백질을 유효량만큼 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0028] 이 측면에서, 본 발명은 환자의 체내에서 HCV 감염을 예방적 차원이나 치료적 차원에서 치료하는 방법을 포함하는데, 이 방법은, 상기 광범위하게 기술된 변형 HCV E2 당단백질을 유효량만큼 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0029] 또 다른 측면에서, 본 발명은 환자의 체내에서 면역 반응을 유도하기 위한 의약 내에 상기 광범위하게 기술된 변형 HCV E2 당단백질을 포함시키는 것, 또는 이 의약을 제조함에 있어서의 상기 당단백질의 용도를 제공한다.
- [0030] 이와 같은 추가의 측면에서, 본 발명은 환자의 체내에서 HCV 감염을 예방적 차원이나 치료적 차원에서 치료하기 위한 의약 내에 상기 광범위하게 기술된 변형 HCV E2 당단백질을 포함시키는 것, 또는 이 의약을 제조함에 있어서의 상기 당단백질의 용도를 제공한다.
- [0031] 또 다른 측면에서, 본 발명은 환자의 체내에서 면역 반응을 유도하기 위한 제제를 제공하는데, 여기서, 상기 제제는 상기 광범위하게 기술된 변형 HCV E2 당단백질을 포함한다.
- [0032] 이와 같은 추가의 측면에서, 본 발명은 환자의 체내에서 HCV 감염을 예방적 차원이나 치료적 차원에서 치료하기 위한 제제를 포함하는데, 여기서, 상기 제제는 상기 광범위하게 기술된 변형 HCV E2 당단백질을 포함한다.
- [0033] 본 발명은 또한 상기 광범위하게 기술된 변형 HCV E2 당단백질에 대해서 생성된 분리 항체를 제공한다. 이 항체는 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체일 수 있다.
- [0034] 이러한 측면에서, 본 발명은 또한 환자의 체내에서 HCV 감염을 예방적 차원이나 치료적 차원에서 치료하는 방법을 제공하는데, 여기서, 상기 방법은 전술한 항체를 유효량만큼 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0035] 본 발명은 또한 환자의 체내에서 HCV 감염을 예방적 차원이나 치료적 차원에서 치료하기 위한 의약 내에 전술한 항체를 사용하는 것, 또는 이 의약을 제조함에 있어서의 상기 항체의 용도를 제공한다.
- [0036] 이와 같은 측면에서, 본 발명은 환자의 체내에서 HCV 감염을 예방적 차원이나 치료적 차원에서 치료하기 위한 제제를 제공하는데, 여기서, 상기 제제는 전술한 항체를 포함한다.
- [0037] 뿐만 아니라, 본 발명은 환자의 체내에서 HCV 감염 여부를 검출하는 방법을 제공하는데, 여기서, 상기 방법은 항체-항원 복합체를 형성할 수 있는 조건 하에서 전술한 항체와 환자로부터 유래하는 생물 시료를 접촉시키는 단계, 그리고 상기 복합체를 검출하는 단계를 포함하며, 여기서, 상기 복합체의 형성 여부는 상기 시료 내 HCV의 존재를 나타내는 지표가 된다.

[0038] **도면의 간단한 설명**

- [0039] 도 1은 하나의 가변부 결실을 포함하는 E1E2의 세포 용해물 내 발현 및 이중 이량체화의 결과를 나타내는 것이다. 야생형(pE1E2), 하나의 가변부 결실을 포함하는 pE1E2 또는 공 벡터(empty vector)로 형질 감염된 293 T 세포의 대사 표지화된 세포 용해물을, i) 비환원 조건 및 ii) 환원 조건(β -머캅토에탄올 포함) 하에서, A. 항-E1E2 폴리클로날 항체(779), B. 항-E1 모노클로날 항체(A4), C. 항-E2 모노클로날 항체(A11) 및 D. 항-E2 형태 의존성 모노클로날 항체(H35)와 함께 면역 침전시켰다. 모든 시료들을 10~15% SDS-PAGE 구배 겔 상에서 전개하였다(방사 형광 분석기(phosphoimager)를 사용하여 가시화함). 이 데이터는 2회의 독립된 실험으로부터 얻어진 것이다.

- [0040] 도 2는 유전자형 1~6으로부터 유래하는 다양한 HCV E2 당단백질 서열의 ClustalX 정렬 결과를 나타내는 것이다. 2개의 인지된 초 변이부인 HVR1과 HVR2, 그리고 신규의 가변부 igVR을 강조하여 나타내었다(회색). 상기 HVR2와 igVR 부위에 측접하여 존재하는 보존 시스테인 잔기들과, E2 당단백질의 잔여 부분의 N-말단 부위에 고정되어 있는 것으로 추정되는 첫 번째 보존 시스테인 잔기도 표시하였다(굵은 글씨). CD81-결합 결정부 위치(박스 안에 표시)를 광범위하게 중화하는 항체 AP33에 대한 에피토프도 표시되어 있다. 가변부와 결합하는 N-결합 당화 위치도 나타내었다(나무 가지 표시). 예측 경막 도메인에는 밑줄을 쳐서 표시하였다.
- [0041] 도 3은 하나의 가변부 결실을 포함하는 E1E2 당단백질이 레트로바이러스 슈도타이핑된(pseudotyped) HIV-1 입자에 통합되었을 때의 결과를 나타내는 것이다. A. 대사 표지화된 HCV 당단백질 슈도타이핑된 HIV-1 입자를, 야생형(pE1E2), 하나의 가변부 결실을 포함하는 pE1E2 또는 공 벡터로 형질 감염된 293T 세포의 조직 배양액으로부터 펠릿화한 다음 용해하였다. E1E2 이중 이량체를, 형태 의존성 항-E2 모노클로날 항체 H53으로 면역 침전시켰다. 모든 시료를 비환원 조건 하, 10~15%의 SDS-PAGE 구배 겔 상에서 분리한 후, 방사 형광 분석기를 사용하여 가시화하였다. B. HIV-1 구조 단백질을 가공하여 레트로바이러스 슈도타이핑된 HIV-1 입자에 통합하였을 때의 결과. 용해된 대사 표지화 HCV 당단백질 슈도타이핑된 HIV-1 입자로부터 유래하는 HIV-1 구조 단백질 Pr55^{Gag}, p24^{CA}, p66^{RT} 및 p17^{MA}를, HIV-1 감염 개체로부터 유래하는 IgG(IgG14)를 사용하여 면역 침전시켰다. 모든 시료를 7.5~15%의 SDS-PAGE 구배 겔 상에서 분리한 후, 방사 형광 분석기를 사용하여 가시화하였다. 이 데이터는 2회의 독립된 실험으로부터 얻어진 것이다.
- [0042] 도 4는 하나의 가변부 결실을 포함하는 HCV 당단백질 슈도타이핑된 HIV-1 입자가 Huh7 세포에 도입되는 능력이 있는지를 나타내는 것이다. 벡터 NL4-3.LUC.R-E-와, 야생형(pE1E2), 가변부 내에 결실을 포함하는 pE1E2이나, 공 벡터 중 어느 하나가 공동으로 형질 감염된 293T 세포로부터 유래하는 조직 배양액을 사용하여, Huh7 세포를 3회 감염시켰다. 상기 Huh7 세포를 용해한 다음, 플루오스타(Fluostar)(발광 광학 단위로 맞춤)를 사용하여 루시퍼라제 활성(상대적 광 단위)을 측정하였다. 3회 감염에서 얻어진 결과의 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 이때의 데이터는 3회의 독립된 실험으로부터 얻어진 것이다.
- [0043] 도 5는 하나의 가변부 결실을 포함하는 HCV E1E2가 CD81-LEL과 결합하는 능력이 있는지를 나타내는 것이다. A. E2의 세포 내 형태가 CD81-LEL과 결합하는 능력. 야생형(pE1E2), 하나의 가변부가 결실된 pE1E2, 또는 공 벡터로 형질 감염된 293T 세포의 대사 표지화된 세포 용해물을, CD81 MBP-LEL(113~201번 잔기) 코팅된 효소 면역검정용 평판에, 2배씩 점진적으로 희석시키면서 도포하였다. 항-E2 형태 의존성 항체 H53과 토끼 항-마우스 호오스라디쉬 퍼옥시다제(HRP) 접합체를 사용하여, 결합되어 있는 E2를 검출하였다. 흡광도 수치(광학 밀도)를 450nm에서 판독하였으며, 이때, 620nm 백 그라운드는 공제하였다. B. 비리온-통합 E2 당단백질의 CD81-LEL에의 결합. 대사 표지화된 HCV 당단백질-슈도타이핑된 HIV-1 입자의 용해물을, CD81 MBP-LEL(113~201번 잔기) 코팅된 효소 면역검정용 평판에, 2배씩 점진적으로 희석시키면서 도포하였다. 결합되어 있는 E2를 A에서와 같이 검출하였다. 데이터는 2회의 독립된 실험으로부터 얻어진 것이다.
- [0044] 도 6은 변형된 단일 가변부 결실을 포함하는 E1E2의 세포 용해물 중 발현 및 이중 이량체화 결과를 나타내는 것이다. 야생형(pE1E2), 하나의 가변부가 결실되었고 연장된 링커를 가지는 pE1E2, 또는 공 벡터로 형질 감염된 293T 세포의 대사 표지화된 세포 용해물을, i) 비환원 조건 및 ii) 환원 조건(β -머캅토에탄올 포함) 하에서, A. 항-E1E2 폴리클로날 항체(779), B. 항-E1 모노클로날 항체(A4), C. 항-E2 모노클로날 항체(A11) 및 D. 항-E2 형태 의존성 모노클로날 항체(H53)으로 면역 침전시켰다. 모든 시료들을 10~15% SDS-PAGE 구배 겔 상에서 전개한 후, 방사 형광 분석기를 사용하여 가시화하였다. 이 데이터는 2회의 독립된 실험으로부터 얻어진 것이다.
- [0045] 도 7은 하나의 변형된 가변부 결실을 포함하는 E1E2 당단백질을 HCV 당단백질 슈도타이핑된 HIV-1 입자에 통합시킨 결과를 나타내는 것이다. A. 대사 표지화된 E1E2-슈도타이핑된 HIV-1 입자를, NL4-3.LUC.R-E-와 야생형(pE1E2), 하나의 가변부 결실을 포함하며 연장된 링커를 가지는 pE1E2 또는 공 벡터로 형질 감염된 293T 세포의 조직 배양액으로부터 펠릿화한 다음 용해하였다. E1E2 이중 이량체를, 형태 의존성 항-E2 모노클로날 항체 H53으로 면역 침전시켰다. 모든 시료를 비환원 조건 하, 10~15%의 SDS-PAGE 구배 겔 상에서 분리한 후, 방사 형광 분석기를 사용하여 가시화하였다. B. HIV-1 구조 단백질을 가공하여 HCV 당단백질-슈도타이핑된 HIV-1 입자에 통합하였을 때의 결과. 용해된 대사 표지화 E1E2-슈도타이핑된 HIV-1 입자로부터 유래하는 HIV-1 구조 단백질 Pr55^{Gag}, p17^{MA}, p24^{CA} 및 p66^{RT}를, HIV-1 감염 개체로부터 유래하는 IgG(IgG14)를 사용하여 면역 침전시켰다. 모든 시료를 7.5~15%의 SDS-PAGE 구배 겔 상에서 분리한 후, 방사 형광 분석기를 사용하여 가시화하였다. 이 데

이터는 2회의 독립된 실험으로부터 얻어진 것이다.

- [0046] 도 8은 하나의 변형된 가변부 결실을 포함하는 HCV 당단백질-슈도타이핑된 HIV-1 입자가 Huh7 세포에 도입되는 능력을 나타내는 것이다. 벡터 NL4-3.LUC.R-E-와, 야생형(pE1E2), 하나의 가변부 결실을 포함하고 연장된 링커를 가지는 pE1E2나, 공 벡터(pCDNA4) 중 어느 하나가 공동으로 형질 감염된 293T 세포로부터 유래하는 조직 배양액을 사용하여, Huh7 세포를 3회 감염시켰다. 상기 Huh7 세포를 용해한 다음, 플루오스타(발광 광학 단위로 맞춤)를 사용하여 루시퍼라제 활성(상대적 광 단위)을 측정하였다. 3회 감염에서 얻어진 결과의 평균 및 표준 편차를 계산하였다. p-값은 스튜던트 t-테스트를 이용하여 계산하였다. 이때의 데이터는 3회의 독립된 실험으로부터 얻어진 것이다.
- [0047] 도 9는 하나의 가변부가 1회 변형되어 결실된 E2가 CD81-LEL에 결합하는 능력을 가지는지 여부를 나타내는 것이다. A. 야생형(pE1E2), 하나의 가변부가 변형 결실을 포함하는 pE1E2나, 공 벡터(pCDNA4)로 형질 감염된 293T 세포의 대사 표지화된 세포 용해물을, CD81 MBP-LEL(113~201번 잔기) 코팅된 효소 면역 검정용 평판에, 2배씩 점진적으로 희석시키면서 도포하였다. 항-E2 형태 의존성 모노클로날 항체 H53과 토끼 항-마우스 호오스래디쉬 퍼옥시다제(HRP) 접합체를 사용하여, 결합되어 있는 E2를 검출하였다. 450~620nm(백 그라운드)에서의 흡광도 수치를 판독하였다. 이때의 데이터는 2회의 독립된 실험으로부터 얻어진 것이다. B. 바이러스 용해물 중 비리온-통합 E2 당단백질과 CD81-LEL의 결합. 대사 표지화된 E1E2-슈도타이핑된 HIV-1 입자의 용해물을, CD81 MBP-LEL(113~201번 잔기) 코팅된 효소 면역 검정용 평판에, 2배씩 점진적으로 희석시키면서 도포하고, 결합되어 있는 E2를 전술한 바와 같이 검출하였다. 흡광도 수치는 450~620nm(백 그라운드)에서 판독하였다. C. 상기 B.의 과정을 독립적으로 반복 실시.
- [0048] 도 10은 다수의 가변부 결실을 포함하는 E1E2의 미성숙형의 발현 및 이중 이량체화 결과를 나타내는 것이다. 야생형(pE1E2), 다수의 가변부 결실을 포함하는 pE1E2, 또는 공 벡터로 형질 감염된 293T 세포의 대사 표지화된 세포 용해물을, i) 비환원 조건 및 ii) 환원 조건(β -머캅토에탄올 포함) 하에서, A. 항-E1E2 폴리클로날 항체(779), B. 항-E1 모노클로날 항체(A4), C. 항-E2 모노클로날 항체(A11) 및 D. 항-E2 형태 의존성 모노클로날 항체(H53)으로 면역 침전시켰다. 모든 시료들을 10~15% SDS-PAGE 구매 겔 상에서 전개한 후, 방사 형광 분석기를 사용하여 가시화하였다. 이 데이터는 2회의 독립된 실험으로부터 얻어진 것이다.
- [0049] 도 11은 다수의 가변부 결실을 포함하는 E1E2 당단백질을 HCV 당단백질-슈도타이핑된 HIV-1 입자에 통합시켰을 때의 결과를 나타내는 것이다. 대사 표지화된 E1E2-슈도타이핑된 HIV-1 입자들, NL4-3.LUC.R-E-와, 야생형(pE1E2), 다수의 가변부 결실을 포함하는 pE1E2나, 공 벡터(pCDNA4) 중 어느 하나가 공동으로 형질 감염된 293T 세포의 조직 배양액으로부터 펠릿화하였다. E1E2 이중 이량체를 형태 의존성 항-E2 모노클로날 항체 H53으로 면역 침전시켰다. 모든 시료들을 비환원 조건 하에 10~15% SDS-PAGE 구매 겔 상에서 전개한 후, 방사 형광 분석기를 사용하여 가시화하였다. B. HIV-1 구조 단백질의 가공 및 HCV 당단백질-슈도타이핑된 HIV-1 입자에의 통합. 용해된 대사 표지화 E1E2-슈도타이핑된 HIV-1 입자로부터 유래하는 HIV-1 구조 단백질 Pr55^{Gag}, p17^{MA}, p24^{CA} 및 p66^{RT}를, HIV-1 감염 개체로부터 유래하는 IgG(IgG14)를 사용하여 면역 침전시켰다. 시료들을 환원 조건 하에 7.5~15%의 SDS-PAGE 구매 겔 상에서 분리시키고, 방사 형광 분석기를 사용하여 가시화하였다. 이 데이터는 2회의 독립된 실험으로부터 얻어진 것이다.
- [0050] 도 12는 다수의 가변부 결실을 포함하는 E1E2-슈도타이핑된 HIV-1 입자가 Huh7 세포에 도입되는 능력을 나타내는 것이다. HIV-1 반딧불이 루시퍼라제 벡터(NL4-3.LUC.R-E-)와, 야생형(pE1E2), 다수의 가변부 결실을 포함하는 pE1E2나, 공 벡터(pCDNA4) 중 어느 하나가 공동으로 형질 감염된 293T 세포의 조직 배양액을 사용하여 Huh7 세포를 3회 감염시켰다. 상기 Huh7 세포를 용해하고, 플루오스타(발광 광학 단위로 맞춤)를 사용하여 루시퍼라제 활성을 측정하였다. 3회 감염시켜 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 이 데이터는 3회의 독립된 실험으로부터 얻어진 것이다.
- [0051] 도 13은 다수의 가변부 결실을 포함하는 E2가 CD81-LEL과 결합하는 능력을 가지는지 여부를 나타내는 것이다. A. 야생형(pE1E2), 다수의 가변부 결실을 포함하는 pE1E2나, 공 벡터(pCDNA4)로 형질 감염된 293T 세포의 대사 표지화된 세포 용해물을, CD81 MBP-LEL(113~201번 잔기) 코팅된 효소 면역 검정용 평판에, 2배씩 점진적으로 희석시키면서 도포하였다. 항-E2 형태 의존성 모노클로날 항체 H53과 토끼 항-마우스 호오스래디쉬 퍼옥시다제(HRP) 접합체를 사용하여, 결합되어 있는 E2를 검출하였다. 450~620nm(백 그라운드)에서의 흡광도 수치를 판독하였다. B. 다수의 가변부 결실을 포함하는 E2 당단백질의 비리온-통합형이 CD81-LEL에 결합하는 능력. 대사 표지화된 E1E2-슈도타이핑된 HIV-1 입자의 용해물을, CD81 MBP-LEL(113~201번 잔기) 코팅된 효소 면역 검정용 평판에, 2배씩 점진적으로 희석시키면서 도포하였다. 결합되어 있는 E2를 전술한 바와 같이 검출하였다. 흡광도

수치는 450~620nm(백 그라운드)에서 관독하였다. 이 데이터는 2회의 독립된 실험으로부터 얻어진 것이다.

- [0052] 도 14는 하나의 가변부 결실 및 다수의 가변부 결실을 포함하는 E2 RBD(384~661번 잔기)의 세포 용해물 중 발현 결과를 나타내는 것이다. A. 야생형(E2-myc), 하나 또는 다수의 가변부 결실을 포함하는 E2-myc, 또는 공 벡터로 형질 감염된 293T 세포의 대사 표지화된 세포 용해물을, 항-E2 형태 의존성 항체인 H53으로 면역 침전시켰다. B. 하나의 가변부 결실 및 다수의 가변부 결실을 포함하는 E2 RBD(384~661번 잔기)의 상청액 내 분비. 야생형(E2-myc), 하나 또는 다수의 가변부 결실을 포함하는 E2-myc, 또는 공 벡터로 형질 감염된 대사 표지화 293T 세포 유래 상청액을, 항-E2 형태 의존성 항체인 H53으로 면역 침전시켰다. 모든 시료를 10~15%의 SDS-PAGE 구배 겔 상에서 분리시키고, 방사 형광 분석기를 사용하여 가시화하였다. 하나의 가변부 결실에 대한 데이터는 1회의 실험으로부터 얻어진 것이다.
- [0053] 도 15는 하나의 가변부 결실을 포함하는 E2 RBD(384~661번 잔기)가 CD81-LEL과 결합하는 능력을 가지는지 여부를 나타내는 것이다. A. 야생형(E2-myc), 하나의 가변부 결실을 포함하는 E2-myc, 또는 공 벡터로 형질 감염된 대사 표지화 293T 세포로부터 유래하는 세포 용해물을, CD81 MBP-LEL(113~201번 잔기) 코팅된 효소 면역 검정용 평판에, 2배씩 점진적으로 희석시키면서 도포하였다. 결합되어 있는 E2를, 항-E2 형태 의존성 항체 H53과 토끼 항-마우스 호오스라디쉬 퍼옥시다제(HRP) 접합체를 사용하여 검출하였다. 흡광도 수치는 450~620nm(백 그라운드)에서 관독하였다. B. 하나의 가변부 결실을 포함하는 분비형 E2 RBD(384~661번 잔기)가 CD81-LEL과 결합하는 능력. 야생형(E2-myc), 하나의 가변부 결실을 포함하는 E2-myc로 형질 감염된 대사 표지화 293T 세포로부터 유래하는 조직 배양액을, CD81 MBP-LEL(113~201번 잔기) 코팅된 효소 면역 검정용 평판에, 2배씩 점진적으로 희석시키면서 도포하였다. 항-E2 형태 의존성 항체 H53과 토끼 항-마우스 호오스라디쉬 퍼옥시다제(HRP) 접합체를 사용하여, 결합되어 있는 E2를 검출하였다. 450~620nm(백 그라운드)에서의 흡광도 수치를 관독하였다. 이 데이터는 1회의 실험으로부터 얻어진 것이다.
- [0054] 도 16은 다수의 가변부 결실을 포함하는 E2 RBD(384~661번 잔기)가 CD81-LEL과 결합하는 능력을 가지는지 여부를 나타내는 것이다. A. 야생형(E2-myc), 다수의 가변부 결실을 포함하는 E2-myc, 또는 공 벡터로 형질 감염된 대사 표지화 293T 세포로부터 유래하는 세포 용해물을, CD81 MBP-LEL(113~201번 잔기) 코팅된 효소 면역 검정용 평판에, 2배씩 점진적으로 희석시키면서 도포하였다. 흡광도 수치는 450~620nm(백 그라운드)에서 관독하였다. B. 다수의 가변부 결실을 포함하는 분비형 E2 RBD(384~661번 잔기)가 CD81-LEL과 결합하는 능력. 야생형(E2-myc), 다수의 가변부 결실을 포함하는 E2-myc 또는 공 벡터로 형질 감염된 대사 표지화 293T 세포로부터 유래하는 상청액을, CD81 MBP-LEL(113~201번 잔기) 코팅된 효소 면역 검정용 평판에, 2배씩 점진적으로 희석시키면서 도포하였다. 흡광도 수치는 450~620nm(백 그라운드)에서 관독하였다. 이 데이터는 1회의 실험으로부터 얻어진 것이다.
- [0055] 도 17은 전장 표면 발현 CD81에 E2-myc 단백질이 결합하는지 여부를 나타내는 것이다. 293T 세포로부터 생산된 동량의 단량체 분비형 E2-myc 단백질을, 전장 CD81을 암호화하는 벡터로 형질 감염된 CHO-K1 세포에 주입하였다. 결합되어 있는 E2-myc을 요드화된 9E10으로 검출한 후, 감마 카운터 내에서 측정하였다. 3회의 독립된 검정법의 평균 \pm 표준 오차. P값은, 이분산을 가정하는 스튜던트 t 테스트를 통하여, E2 Δ 23-myc E2 구조물과 비교하여 구하였다.
- [0056] 도 18은 인간의 형태 감수성 모노클로날 항체를 사용하여 E2-myc 및 E2 Δ 123-myc가 검출될 수 있음을 나타내는 것이다. 야생형(E2-myc) 및 E2 Δ 123-myc를 대사 표지화하였으며, E2의 3가지 면역원성 도메인(A, B 및 C)에 특이적인 형태 의존성 인간 모노클로날 항체의 "CBH" 패널로 면역 침전시켰다. 면역 침전된 단백질을 비환원 조건 하에서 10~15%의 폴리아크릴아미드 구배 겔 내 SDS-PAGE에 의해 분석한 후, 방사 형광 분석기 내에서 스캔하였다.
- [0057] 도 19는 하나의 가변부 결실과 다수의 가변부 결실을 포함하는 E1E2 다단백질을 개략적으로 나타낸 것이다. pE1E2 벡터는, E1과 E2의 C-말단에 경막 도메인을 포함하는 E1의 전장 H77c 서열(진한 회색) 및 E2의 전장 H77c 서열(연한 회색)과, 표시된 신호 펩티다제 절단 위치(화살표)를 보유하는 신호 펩티드를 암호화한다. E2 가변부(점 무늬 부분)와, HVR1에 인접하여 존재하는 보존 부위(빋금 친 부분)는, 표시된 바와 같이, 가요성 Gly-Ser-Ser-Gly(GSSG) 링커 모티프로 (각각 그리고 함께) 치환된다.
- [0058] 도 20은 중첩 연장 PCR 기법을 개략적으로 나타낸 것이다. 2개의 올리고뉴클레오타이드 쌍을 이용하여 HCV 당단백질 주형 서열(빋금 친 부분)로부터 가변부를 제거하였는데: 이때 사용된 올리고뉴클레오타이드 쌍은 각각 하나의 외부 프라이머와 하나의 내부 프라이머(도시한 바와 같이, HVR1에 인접하여 존재하는 5' 또는 3' 단편을 증폭함)를 함유한다. 내부 프라이머 서열은 Gly-Ser-Ser-Gly 링커 모티프(굵은 글씨)와, 5' 또는 3' 단편 각각

에 상보성인 짧은 '중첩' 서열을 도입한다. 이러한 서열들은 어닐링(annealing)되어, HVR1 결실 당단백질 서열을 증폭시키기 위한 외부 프라이머를 사용하는 PCR 증폭법의 제2 라운드에 있어서 주형을 형성한다.

[0059] 도 21은 하나의 변형 가변부 결실과 연장된 링터를 포함하는 HCV E1E2 당단백질을 개략적으로 나타낸 것이다. pE1E2 벡터는, E1과 E2의 C-말단에 경막 도메인(수직 줄무늬)을 포함하는 E1의 전장 H77c 서열(진한 회색) 및 E2의 전장 H77c 서열(연한 회색)을 암호화한다. 신호 펩티다제 절단 위치도 표시하였다(화살표). HVR1(con)에 인접하여 존재하는 보존 부위와 E2 가변부는 부분적으로 결실되며, 또한 가요성 Gly-Ser-Ser-Gly 링커 모티프로 치환된다.

[0060] 도 22는 하나의 가변부 결실 및 다수의 가변부 결실을 포함하는 E2 수용체 결합 도메인(E2 RBD₆₆₁)을 개략적으로 나타낸 것이다. pE2661 벡터는 384~661번 잔기를 암호화하는 E2 RBD(E2-myc)를 암호화한다. 가변부(점 무늬 부분)와, HVR1에 인접하여 존재하는 보존 부위(빋금 친 부분)는, 표시된 바와 같이, 짧은 가요성 Gly-Ser-Ser-Gly(GSSG) 링커 모티프로 각각 그리고 함께 치환되었다. myc 에피토프 태그(수직 줄 무늬 표시 부분)도 이와 같은 구성물의 C-말단에 도입되었다.

[0061] 도 23은 HCV 당단백질-슈도타이핑된 HIV-1 입자를 생성하는데 사용된 기법을 개략적으로 나타낸 것이다. E1E2를 암호화하는 HCV 당단백질 발현 벡터(pE1E2) 또는, 가변부 결실을 포함하는 pE1E2, 그리고 원래의 외피 유전자는 결합되어 있으면서 루시퍼라제 리포터 유전자는 함유하는 레트로바이러스 벡터(HIV-1 NL4-3.LUC.R-E-)를 293T 세포에 공동 형질 감염시켰다. 상기 세포 내에서 레트로바이러스 코어 단백질을 조립할 때, 상기 바이러스는 상기 세포의 원형질막으로부터 돌기를 형성(budding)하여, HCV E1E2 당단백질을 통합함으로써 외피를 형성하게 된다. 이러한 비리온은 이후 조립되어, Huh7 세포 내 감염 및 복제의 1 라운드를 수행하는데 사용된다. 이후, E1E2-매개 도입 수준을, 이와 같이 감염된 Huh7 세포 내 루시퍼라제 활성에 의해 정량한다.

[0062] 도 24는 E2-myc 및 E2 Δ123-myc 단백질이, HCV 감염된 개체로부터 얻어진 인간 혈청 패널에 의해 면역 침전되는 능력을 나타낸 것이다. 면역 침전된 단백질을 비환원 조건 하에 10~15%의 폴리아크릴아미드 구배 겔 내 SDS-PAGE로써 분석한 다음, 방사 형광 분석기로 스캔하였다. 각각의 레인 아래에는, HCV RNA 상태, 바이오래드 모노리사(BioRad Monolisa), 애봇 뮤렉스(Abbot Murex) 또는 카이런 RIBA 검정법(Chiron RIBA assays) 중 하나를 사용하여 검출된 HCV 특이적 항체의 존재 여부, 그리고 혈청 시료에 대한 50% 중화 항체 역가가 표시되어 있다. 분자량은 좌측에 표시되어 있다.

[0063] 도 25는 가변부 결실을 포함하는 E2-myc 단백질이 CD81의 대형 재조합 세포 외 루프와 상호 작용하는 능력을 나타내는 것이다. A. 야생형 E2-myc, E2 Δ12-myc, E2 Δ23-myc 및 E2-myc 단백질(CD81과의 상호 작용을 방해하는 돌연 변이 L441M 포함)이 야생형 재조합 MBP-LEL과 상호 작용하는 능력. E2-myc 단백질을 MBP-LEL 코팅된 효소 면역 검정용 평판 내에서 연속적으로 희석시켰다. 데이터는 2~7회의 독립적 실험을 수행하여 얻어진 값의 평균으로서, 야생형 E2-myc에 대한 평균 결합% ± 표준 편차로서 나타낸다. B. WT E2-myc, E2 Δ13-myc 및 E2 Δ123-myc이 야생형 재조합 MBP-LEL(직선) 또는 재조합 MBP-LEL(E2의 결합을 방해하는 F186S 돌연 변이를 포함)(점선)과 상호 작용하는 능력. 데이터는 2~7회의 독립적 실험을 수행하여 얻어진 값의 평균으로서, 야생형 E2-myc에 대한 평균 결합% ± 표준 편차로서 나타낸다.

[0064] 도 26은 가변부 결실을 포함하는 E2-myc 단백질이 전장 표면 발현 CD81과 상호 작용하는 능력을 나타내는 것이다. A. WT E2-myc, E2 Δ12-myc, E2 Δ23-myc 및 E2-myc 단백질이 전장 CD81 형질 감염 CHO-K1 세포와 상호 작용하는 능력. 야생형 또는 가변부 결실 E2-myc 단백질 희석액을 얼음 냉각된 인간 CD81 형질 감염 CHO-K1 세포에 주입하고, 이를 얼음 상에서 4시간 동안 항온 처리하였다. 이를 세척한 후, 1×10^6 CPM ¹²⁵I-9E10을 첨가한 다음, 평판을 실온에서 1시간 동안 항온 처리하고, 세척한 다음, 팩커드 오토 감마카운터(Packard Auto GammaCounter) 내에서 계측하였다. 데이터는 5회의 독립 실험으로부터 얻어진 야생형에 대한 평균 결합% ± 표준 오차로 나타났다. B. WT E2-myc, E2 Δ123-myc, E2 Δ13-myc가 전장 인간 CD81 형질 감염 CHO-K1 세포(직선) 또는 F186S-CD81 형질 감염 CHO-K1 세포(점선)와 상호 작용하는 능력. 데이터는 5회의 독립 실험으로부터 얻어진 야생형에 대한 평균 결합% ± 표준 오차로 나타났다.

[0065] 도 27은 하나 이상의 가변부 결실을 전혀 포함하지 않는(야생형) E2-his 단백질의 정제된 HCV E2 단백질 변이체의 4~20% 폴리아크릴아미드 구배 겔 내 SDS-PAGE 결과를 나타내는 것이다. 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie brilliant blue)로 염색하여 단백질을 가시화하였다.

[0066] 도 28은 E2-his 단백질의 블루-네이티브(blue-native) PAGE 분석 결과를 나타내는 것이다. 정제된 단백질(10 μg)을, 원래의 조건 하에, 5~15%의 폴리아크릴아미드 구배 겔 내에서 전기 영동시켰다. 전기 영동시킨 후, 상

기 겔을 밤새도록 탈색하고, 이를 리코 오디세이 스캐너(Licor Odyssey scanner)(680nm)로 스캔하였다. 단백질 표준의 이동 위치는 우측에 표시되어 있다.

[0067] 도 29는 정제된 E2-his 단백질의 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타내는 것이다. 정제된 단백질 시료를 대상으로 환원 SDS-PAGE를 수행한 다음, 전기 영동을 통하여 이를 니트로셀룰로스 막에 옮겼다. 비-형태 의존성 E2 특이 모노클로날 항체를 사용한 다음, 염소 항-마우스 면역 글로불린(알렉사플루어 680nm(Invitrogen)에 커플링됨)을 사용하여 E2 단백질을 검출하였다. 리코 오디세이 스캐너에서 면역 블롯을 스캔하였다. 분자량 마커는 좌측에 표시되어 있다(kDa).

[0068] 도 30은 HCV E2-his 단백질이 CD81 대형 세포 외 루프(CD81-LEL)의 재조합형과 결합하는 능력을 나타내는 것이다. 효소 면역 검정용 평판용, (A) CD81의 야생형 대형 세포 외 루프(113~121번 잔기)(CD81-LEL) 또는 (B) CD81-LEL의 E2 결합 위치에 F186S 돌연 변이를 포함하는 CD81-LEL과 융합된 말토스 결합 단백질로 코팅하였다. 평판용 소 혈청 알부민으로 차단한 후, 이를 2시간 동안 E2-his 단백질의 연속 희석액(5mg/ml의 소 혈청 알부민과 0.05% Tween20을 함유하는 PBS 50 μ l 중)과 함께 항온 처리하였다. E2 특이 모노클로날 항체와 토끼 항-마우스 면역 글로불린(호오스래디쉬 퍼옥시다제(Dako)에 커플링됨)을 사용하여, 결합되어 있는 E2-his 단백질을 검출하였다. 염산 테트라메틸벤지딘 기질을 사용하여 이 평판상의 반응을 진행시킨 다음, 여기에 1M HCl을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 450nm에서의 흡광도를 측정 한 후, 여기서 620nm에서의 백 그라운드를 공제하였다. 각각의 단백질에 대한 흡광도 수치를, 야생형 E2-his에 대한 최대 흡광도로 나눈 다음 여기에 100을 곱하여 결합 %를 계산하였다.

[0069] 도 31은 E2-his 단백질로 2회 면역화시킨 후 얻어진 마우스 혈청의 상동성 E2-his 항원에 대한 면역 반응성을 나타내는 것이다. E2-his 단백질을 96-웰 맥시소브(Maxisorb) 미세 역가 평판(Nunc)(갈란티스 니발리스(GNA) 락틴으로 예비 코팅) 상에 포착(capturing)시켰다. 면역 마우스 혈청의 연속 희석액을, 면역화에 사용된 포착 해당 E2 단백질 변이체와, 호오스래디쉬 퍼옥시다제에 커플링된 토끼 항-마우스 면역 글로불린으로 검출된 결합 면역 글로불린과 함께 항온 처리하였다. 염산 테트라메틸벤지딘 기질을 사용하여 이 검정 과정을 진행시킨 다음, 다시 여기에 1M HCl을 첨가하여 이 과정을 중지시켰다. 450nm에서의 흡광도 수치를 측정 한 후, 여기서 620nm에서의 백 그라운드를 공제하였다[플루오스타 평판 판독기(BMG technologies) 사용]. 각각의 혈청에 대한 항체 역가를 혈청 희석시와 같이 측정하였다(백 그라운드 흡광도의 5배). 각각의 면역원 군에 대한 역가의 최대 값(상부 오차 막대), 75 및 25번째 백분위 값(각각 박스의 윗변 및 아랫변), 중앙값(박스 내 수평선) 그리고 최소 값(하부 오차 막대)을 나타냈다.

[0070] 도 32는 E2 단백질 변이체로 2회 면역화한 후 얻어진 마우스 혈청의 E2-his(A) 및 E2 Δ 123-his(B) 항원에 대한 면역 반응성을 나타낸 것이다. E2-his 및 E2 Δ 123-his 단백질을 96-웰 맥시소브 미세 역가 평판상에 포착시키고, 각각의 혈청에 대한 항체 역가를 상기 도 31에 관하여 기술한 바와 같이 측정하였다. 각각의 면역원 군에 대한 역가의 최대 값(상부 오차 막대), 75 및 25번째 백분위 값(각각 박스의 윗변 및 아랫변), 중앙값(박스 내 수평선) 그리고 최소 값(하부 오차 막대)을 나타냈다.

[0071] 도 33은 E2-his 단백질로 3회 면역화한 후 얻어진 마우스 혈청의 상동성 E2-his 항원에 대한 면역 반응성을 나타낸 것이다. E2-his 단백질을 96-웰 맥시소브 미세 역가 평판상에 포착시키고, 각각의 혈청에 대한 항체 역가를 상기 도 31에 관하여 기술한 바와 같이 측정하였다. 각각의 면역원 군에 대한 역가의 최대 값(상부 오차 막대), 75 및 25번째 백분위 값(각각 박스의 윗변 및 아랫변), 중앙값(박스 내 수평선) 그리고 최소 값(하부 오차 막대)을 나타냈다.

[0072] 도 34는 E2 단백질 변이체로 3회 면역화한 후 얻어진 마우스 혈청의 E2-his(A) 및 E2 Δ 123-his(B) 항원에 대한 면역 반응성을 나타낸 것이다. E2-his 및 E2 Δ 123-his 단백질을 96-웰 맥시소브 미세 역가 평판상에 포착시키고, 각각의 혈청에 대한 항체 역가를 상기 도 31에 관하여 기술한 바와 같이 측정하였다. 각각의 면역원 군에 대한 역가의 최대 값(상부 오차 막대), 75 및 25번째 백분위 값(각각 박스의 윗변 및 아랫변), 중앙값(박스 내 수평선) 그리고 최소 값(하부 오차 막대)을 나타냈다.

[0073] 도 35는 E2 단백질 변이체로 3회 면역화한 후 얻어진 마우스 혈청의 Con1 E2_{RBD}-his(A) 및 JFH1 E2_{RBD}-myc(B) 항원에 대한 면역 반응성을 나타낸 것이다. Con1 및 JFH1 RBD 단백질을 96-웰 맥시소브 미세 역가 평판상에 포착시키고, 각각의 혈청에 대한 항체 역가를 상기 도 31에 관하여 기술한 바와 같이 측정하였다. 각각의 면역원 군에 대한 역가의 최대 값(상부 오차 막대), 75 및 25번째 백분위 값(각각 박스의 윗변 및 아랫변), 중앙값(박스 내 수평선) 그리고 최소 값(하부 오차 막대)을 나타냈다.

[0074] 도 36은 E2-his 단백질로 3회 면역화한 후 얻어진 마우스 혈청의 80% 중화 역가(\log_{10})를 나타내는 것이다. 열-불활성화된 면역 마우스 혈청의 연속 5배 희석액을, H77c HCV 당단백질-슈도타이핑된 HIV-1 루시퍼라제 리포터 바이러스와 함께 예비 항은 처리한 다음(37°C , 1시간), 여기에 48웰 조직 배양 평판 내 Huh7 세포 단일층을 4회 첨가하였다. 4시간 동안 항은 처리한 다음(37°C , 5% CO_2), 이 세포를 PBS로 세척하고, 배지를 교체하였다. 3일 더 항은 처리한 후(37°C , 5% CO_2), 이 세포를 용해한 후, 발광 광학 단위로 맞춘 플루오스타 내에서 검정된 루시퍼라제 활성을 발광 광학 단위로 보정하였다. 각각의 혈청의 중화 역가를 혈청 희석시와 같이 측정하였으며, 이 경우, 80% 중화 역가를, 배지만으로 예비 항은 처리한 HCV 당단백질-슈도타이핑된 HIV-1 루시퍼라제 리포터 바이러스의 80% 중화 역가와 비교하였다.

발명의 상세한 설명

[0075] 가변부 중 하나 이상, 특히, 본 발명의 발명자들에 의해 동정된 가변부 igVR이, 가변부의 적어도 일부를 제거 또는 결실시키고, 임의로는 링커 서열을 삽입함으로써 변형된 HCV 비리온의 변형 E2 코어 구조는, HCV의 다양한 균주에 대한 광범위한 중화 항체를 유도해낼 수 있는 백신으로서 유용하게 사용된다. 변형된 E2 당단백질의 HCV 수용체 CD81에 대한 결합 효율은 원래의(야생형) 수준이며, 변형된 E2 당단백질은, 효율적인 CD81 결합에 필요한 E2 엑토도메인(ectodomain)의 복합적인 형태상의 변화를 모의한 후, 세포에 침투하지 않고서 면역 반응을 개시함으로써 HCV 감염을 치료하는 수단을 제공한다.

[0076] 하나의 측면에서, 본 발명은 HCV-E2 수용체 결합 도메인(RBD) 예를 들어, HVR1, HVR2 및 igVR 가변부를 포함하는, 변형된 C형 간염 바이러스(HCV) E2 당단백질을 제공하는데, 여기서, 상기 가변부 또는 이 가변부의 적어도 일부 중 하나 이상은 가요성 링커 서열로 치환된다.

[0077] 다른 측면에서, 본 발명은 HCV-E2 수용체 결합 도메인(RBD) 예를 들어, HVR1, HVR2 및 igVR 가변부를 포함하는, 변형된 C형 간염 바이러스(HCV) E2 당단백질을 제공하는데, 여기서, 상기 HVR2 가변부의 적어도 일부는 제거되거나, 또는 가요성 링커 서열로 치환된다.

[0078] 또 다른 측면에서, 본 발명은 HCV-E2 수용체 결합 도메인(RBD) 예를 들어, HVR1, HVR2 및 igVR 가변부를 포함하는, 변형된 C형 간염 바이러스(HCV) E2 당단백질을 제공하는데, 여기서, 상기 igVR 가변부의 적어도 일부는 제거되거나, 또는 가요성 링커 서열로 치환된다.

[0079] 본원에서 "HVR1" 및 "HVR2" 가변부란 용어는, 2개의 가변부 즉, HVR1(384~410) 및 HVR2(461~481)를 나타내는 것으로서 이해할 수 있으며, 또한 본원에서 "igVR" 가변부란, 본 발명의 발명자들에 의해 동정된 유전자형 간 가변부 igVR(570~580)를 나타내는 것으로서 이해할 수 있다.

[0080] 본원에 사용된 "가요성 링커 서열(flexible linker sequence)"이란, 천연의 또는 "야생형의" 이황화 결합을 보유하도록 만들어주는, 특히, HCV CD81 수용체와 형태 의존성 항체에 결합하는 능력을 보유하도록 만들어주는, 변형된 당단백질 내 시스테인 잔기들 사이에 이황화 결합을 형성할 수 있도록 허용하는 짧고 가요성이 있는 폴리펩티드 서열을 의미하는 것이다. 적당한 링커 서열에 관하여는 문헌[George and Heringa, 2002, 및 Argos, 1990]에 상세히 기술되어 있으며, 이는 20개 이하의 아미노산 잔기 예를 들어, Gly 및 Ser으로 이루어질 수 있고, Gly, Ser, Ala, Thr 및 Arg, 더욱 구체적으로, Gly- 및 Ser-Ser-Gly(GSSG)으로 이루어진 서열 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함 및 함유할 수 있다. 적당한 링커 서열로서는 예를 들어, 다음과 같은 서열들을 포함한다.

[0081] $(\text{Gly})_2\text{-Ala-(Gly)}_2$, $(\text{Gly})_5$ 또는 $(\text{Gly})_8$ (Sabourin외 다수, 2007),

[0082] $(\text{Gly})_6$, $(\text{Gly})_7$ 또는 $(\text{Gly})_{10}$ (Yang and Gruebele, 2006),

[0083] Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (Dipti외 다수, 2006),

[0084] $(\text{Gly})_4$ (Anandarao외 다수, 2006),

[0085] Gly-Ala-Gly (Wyatt외 다수, 1995),

[0086] $(\text{Gly})_2\text{-Arg-(Gly)}_2\text{-Ser}$ (Bellamy-McIntyre외 다수, 2007),

[0087] $(\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Ser})_{n=3-4}$ (Arai외 다수, 2006), 및

- [0088] Ser-(Gly)₂-Ser-Gly (Bahrami 외 다수, 2007).
- [0089] 바람직한 서열은 본원에 개시된 서열 Gly-(Ser)₂-Gly이다. 적당한 폴리펩티드 링커 서열은 본 발명이 속하는 분야의 당 업자에 의한 통상의 실험을 통하여 선택할 수 있으며, 본 발명의 변형 HCV E2 당단백질은 본원에 개시된 특정 링커 서열에 제한되지 않는다는 것을 알게될 것이다. 어떠한 이론에도 국한되지 않을 때, HVR1, HVR2 및 igVR을 짧은 가요성 링커로 치환함으로써, 예를 들어, Cys-569와 Cys-581 사이의 이황화 결합 형성 특성 및 Cys-459와 Cys-486 사이의 이황화 결합 형성 특성, 그리고 보존된 E2 코어 도메인의 고유 폴딩(folding) 특성을 변형된 당단백질에 실질적으로 남길 수 있다.
- [0090] 본 명세서를 참고로 하였을 때, HCV E2 수용체 결합 도메인의 가변부 중 하나의 적어도 일부를 "결실"시킨다는 것은, 가변부 서열의 적어도 일부를 결실 또는 제거하고, 임의로는 결실된 서열을 대체할 수 있는 가요성 링커 서열을 삽입시키는 것을 의미하는 것으로 이해할 수 있다.
- [0091] 본 발명의 변형된 HCV E2 당단백질은 임의의 적당한 방법 예를 들어, 본원의 실시예에 기술되어 있는 바와 같이, 적당한 DNA 결실 구조물을 발현시켜, 변형된 당단백질을 재조합 생성물의 형태로 제조하는 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0092] 바람직하게, 코어 E2 수용체 결합 도메인의 제2 가변부 및 제3 가변부 즉, HVR2 및 igVR 중 하나 이상은 상기 부위 내에 존재하는 잔기 중 적어도 일부를 제거하고, 가요성 링커 서열을 삽입함으로써 변형된다. HVR2 부위 중 적어도 일부와, 기타 가변부 결실을 함께 결실시키면, E1E2 이중 이량체가 형성되는 것을 상당 수준 감소시킨다.
- [0093] 추가의 구체예에서, 3개의 가변부 전부는 이 부위 내에 존재하는 잔기 중 적어도 일부를 제거하고, 여기에 링커 서열을 삽입함으로써 변형된다.
- [0094] 이미 HVR1 및 HVR2의 결실을 포함하는 E2 당단백질로부터 유전자형간 가변부(igVR)를 결실시키면, HVR1 및 HVR2 만을 동시에 결실시켰을 때에 비하여, CD81과의 결합 특성이 개선된다.
- [0095] 본 발명의 발명자들은, 바이러스가 Huh7 세포에 E1E2-pp를 매개로 하여 도입하는데에는 HVR1, HVR2 및 igVR이 모두 필요하다는 사실을 알아냈다. HVR1, HVR2 및 igVR 중 적어도 각각의 결실을 포함하는 E1E2-pp는, 재조합 CD81 결합 수준이 원래의 수준과 같음을 알아냈다. 이는 곧, (a) HCV 비리온의 세포 결합 특성을 모의하는 능력과, (b) 면역 테코이(immune decoy)일 수 있는, 매우 가변적인 면역 우성 부위(immunodominant region)에 환자를 노출시키지 않고서도 면역 반응을 개시하는 능력이 상당 수준 개선됨을 의미하는 것이다.
- [0096] 바람직한 구체예에서, 상기 3개의 가변부는 모두 결실될 수 있으며, 또한 CD81-결합 위치를 구성하는 3개 이상의 불연속 결합 요소를 조립하는데 필요한 코어 E2 폴딩 도메인을 보유할 수 있다. 상기 HVR1, HVR2 및 igVR을 E2 수용체 결합 도메인으로부터 여러 가지 경우의 수로 결실시키는 것에 있어서 추가의 이점은, 면역원으로서 사용되기에 적당한 E2 코어 도메인의 가용성 형태가 얻어질 수 있다는 점이다.
- [0097] 본 발명은 또한 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 함께, 상기 광범위하게 기술된 바와 같은 변형 HCV E2 당단백질을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0098] 이와 같은 조성물은 백신 조성물, 바람직하게는 애쥬반트를 포함하는 백신 조성물로서 제형화될 수 있다.
- [0099] 통상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 완충액 또는 희석제가 본 발명의 백신 조성물에 포함될 수 있다. 일반적으로, 본 발명에 의한 백신 조성물은 변형 HCV E2 당단백질과, 임의로는 애쥬반트를, 하나 이상의 통상적인 약학적 허용 가능 담체 및/또는 희석제와 함께, 면역학적 유효량만큼 포함할 것이다. 애쥬반트에 관한 더욱 상세하되 독점적이지는 않은 목록은 문헌[Cox and Coulter, "Advances in Adjuvant Technology and Application", Animal Parasite Control Utilizing Biotechnology, Chapter 4, Ed. Young, W.K., CRC Press 1992, 및 Cox and Coulter, "Adjuvants - A Classification and Review of Their Modes of Action", Vaccine 15(3), 248-256, 1997]에서 살펴볼 수 있다. 본원에 사용된 "약학적으로 허용되는 담체 및/또는 희석제"로서는, 임의의 용매 및 모든 용매, 분산 매질, 수용액, 코팅제, 항 박테리아 제제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약학적으로 활성인 물질에 대한 이와 같은 매질 및 제제를 사용하는 것은 당 업계에 널리 공지되어 있으며, 이에 관하여는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Company, Pennsylvania, U.S.A]에 개시되어 있다.
- [0100] 또 다른 측면에서, 본 발명은 또한 환자의 체내에서 면역 반응을 유도해내는 방법을 제공하기도 하는데, 이 방

법은, 상기 광범위하게 기술된 변형 HCV E2 당단백질을 유효량만큼 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

- [0101] 이러한 측면에서, 본 발명은 환자의 체내에서 HCV 감염을 예방적 차원 또는 치료적 차원에서 치료하는 방법을 포함하는데, 이 방법은, 상기 광범위하게 기술된 변형 HCV E2 당단백질을 유효량만큼 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0102] 본원에 있어서, "치료"란 최광의의 의미인 것으로 이해할 수 있다. 그러므로, "예방적 차원의 치료"로서는 환자를 감염으로부터 보호하거나 또는 감염의 가능성을 줄여주는 치료를 포함한다. 이와 유사하게, 감염에 대한 "치료적 차원의 치료"란 용어는, 반드시 감염이 전부 나을 때까지 환자가 치료받는 것을 의미하는 것은 아니며, 감염의 증상이 완화되는 것과 감염의 중증도가 감소하는 것, 또는 감염이 완전히 나는 것을 포함한다.
- [0103] 본 발명의 변형 HCV E2 당단백질은 유효량만큼 투여된다. "유효량"이란, 적어도 원하는 반응을 부분적으로나마 얻는데 필요한 양, 또는 감염의 발생을 지연시키거나 진행을 막는데 필요한 양, 또는 감염의 발생과 진행을 중지시키는데 필요한 양을 의미한다. 상기 양은 치료받을 개체의 건강 및 신체적 조건, 치료받을 개체의 인종적 백 그라운드, 원하는 보호의 정도, 조성물의 제형, 의학적 상태에 관한 평가, 그리고 기타 관련 인자들에 따라서 달라진다. 상기 양은 통상의 실험을 통해서 결정될 수 있는 비교적 넓은 범위에 속할 것이 예측된다. 필요하다면, 유효량만큼을 1회 투여하거나 또는 수회에 걸쳐서 반복 투여할 수 있다. 투여된 실제 양은 치료받는 감염의 특성과 활성 면역원이 투여되는 비율에 따라서 결정될 것이다.
- [0104] 바람직하게, 환자는 인간이지만, 본 발명은 기타 포유동물 환자 예를 들어, 유인원과 실험실 실험 동물(예를 들어, 마우스, 토끼, 래트, 기니아 피그 등)의 치료 및/또는 예방까지도 확대된다.
- [0105] 본 발명에 의하면, 변형 HCV E2 당단백질은 비 경구 투여 경로에 의하여 환자에게 투여되는 것이 바람직하다. 비 경구 투여 경로로서는 (장 이외의) 소화관을 통하지 않는 임의의 투여 경로 예를 들어, 주사 및 주입 등에 의한 투여를 포함한다. 주사에 의한 투여 방법으로서, 예를 들어, 정맥(정맥 내 주사), 동맥(동맥 내 주사), 근육(근육 내 주사) 그리고 피부 아래(피하 주사)에 주사하는 것을 포함한다. 변형 HCV E2 당단백질은 또한 데포(depot) 또는 서방형 제형 예를 들어, 피하, 진피 내 또는 근육 내 투여형으로서 투여될 수 있으며, 이 경우 투여량은 원하는 약리학적 효과를 얻는데 충분한 양이다.
- [0106] 비 경구 투여용으로서 적당한 조성물은 편리하게, 수용체의 혈액과 등장성인 것이 바람직한 활성 성분의 멸균 수성 제제를 포함한다. 이와 같은 수성 제제는 적당한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하는 공지의 방법에 따라서 제형화될 수 있다. 멸균 주사 제제는 또한 무독성 비 경구-허용 희석제 또는 용매 중 멸균 주사 용액 또는 현탁액 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 및 젖산 중 용액일 수도 있다. 사용 가능한 허용 비이클 및 용매로서는, 물, 링거 용액, 적당한 탄수화물(예를 들어, 수크로스, 말토스, 트레할로스, 글루코스) 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 뿐만 아니라, 멸균 불휘발성 오일은 용매나 현탁 매질로서 편리하게 사용된다. 이러한 목적으로, 자극성이 적은 임의의 불휘발성 오일 예를 들어, 합성 모노글리세리드 또는 디글리세리드가 사용될 수 있다. 뿐만 아니라, 지방산 예를 들어, 올레산도 주사용 제제에 사용될 수 있다.
- [0107] 추가의 측면에서, 본 발명은 상기 광범위하게 기술된 바와 같은 변형 HCV E2 당단백질을, 환자의 체 내 면역 반응을 유도하기 위한 의약에 포함시키는 것, 또는 상기 의약 제조시 상기 당단백질의 용도를 제공한다.
- [0108] 추가의 측면에서, 본 발명은 상기 광범위하게 기술된 바와 같은 변형 HCV E2 당단백질을, 환자의 체 내 HCV 감염을 예방적 차원 또는 치료적 차원에서 치료하기 위한 의약에 포함시키는 것, 또는 상기 의약 제조시 상기 당단백질의 용도를 제공한다.
- [0109] 추가의 측면에서, 본 발명은 환자의 체내에서 면역 반응을 유도하기 위한 제제를 제공하는데, 여기서, 이 제제는 상기 광범위하게 기술된 변형 HCV E2 당단백질을 포함한다.
- [0110] 추가의 측면에서, 본 발명은 환자의 체내에서 HCV 감염을 예방적 차원 또는 치료적 차원에서 치료하기 위한 제제를 포함하는데, 여기서, 이 제제는 상기 광범위하게 기술된 변형 HCV E2 당단백질을 포함한다.
- [0111] 본 발명의 하나의 구체예에서, 적어도 igVR 부위 내 잔기가 결실되었으며, 그 부분이 가요성 링커 서열로 치환된 재조합 E2 당단백질은, 형태 의존성 항체에 의해 인지되는 특성이 개선됨을 알 수 있었다. 뿐만 아니라, '야생형' E2 당단백질을 사용하는 비교용 연구에 있어서, igVR 부위만을 변형시키고, HVR1 및 HVR2를 다양한 경우의 수로 변형시킬 경우, 야생형 당단백질에 접근하는 전장 CD81-LEL(인간 테트라스파닌 CD81의 대형 세포 외 루프)과 결합함을 알 수 있다.
- [0112] 본 발명의 발명자들은, 6개의 주요 유전자형 간에 다양한 E2 당단백질 서열을 정렬시키면, 560~581번 잔기 사

이에 새로운 제3의 가변부인 "igVR"이 확인됨을 알 수 있었다. "igVR"은 상이한 유전자형들 간에 최대의 가변성을 나타내므로, 엄밀히 말해서 초 변이 부위는 아니지만, 이는 유전자형 내에서는 비교적 보존되어 있기 때문에 면역 선택 압 하에 있는 것 같지는 않은 것으로 생각된다. 뿐만 아니라, 상기 서열은, 상기 부위 내에 위치하는 당화 위치를 변하게 하되 이 위치를 항상 유지하는, 일련의 삽입 또는 결실을 포함한다. 본 발명의 발명자들은 또한, 양 가변부 즉, HVR2와 "igVR"가 보존된 시스템인 잔기들에 축적하고 있음을 관찰하였으며, 이를 통하여, 이 부위들은 상기 잔기들 사이에 형성되는 이황화 결합에 의해 안정화된 용매-노출 루프를 형성할 수 있음을 제안하였다.

- [0113] 본 발명의 발명자들은 초 변이 부위가 E2 당단백질의 형태를 "개방(open)" 형 및 "폐쇄(close)" 형 사이에서 바뀔 수 있도록 만들어주는 가요성 용매-노출 서브 도메인을 형성함을 제안하였으며, 본 연구를 통해서 파악된 바에 의하면, 코어 E2 도메인 내에 위치하는 보존 CD81-결합 결정부를 노출함으로써, 상기 "개방" 형이 CD81과 더욱 잘 결합한다는 것을 알 수 있었다. 실제로, E2 당단백질 내에서 일어나는 형태 변화는 CD81-결합에 있어서 이미 관찰된 바 있다. 뿐만 아니라, E2 당단백질과 비-중화 항체가 결합하는 것으로 보아, 중화 항체에 대한 상기 E2 당단백질의 감수성이 감소함이 입증되었는데, 이는 비-중화 항체가 표면 노출 초 변이 부위의 가요성을 억제하여, E2 코어 도메인 내에 위치하는 보존 에피토프로의 접근을 차단하는 모델에서도 마찬가지이다.
- [0114] 그러므로, 이로써, 변형된 E2 코어 도메인은, HCV 복제시 당단백질 복합체의 표면에서 면역학적 데코이로서의 역할을 할 수 있는, 표면-노출 가변부에 의해 폐쇄되기도 하는, E2 당단백질 내 보존된 에피토프 예를 들어, CD81-결합 결정부에 대한 중화 항체의 생성을 유도하는 유력한 후보 백신을 만들어냄을 알 수 있다.
- [0115] 본 발명은 또한 상기 광범위하게 기술된 바와 같은 변형 HCV E2 당단백질에 대해 생성된 분리 항체를 제공하기도 한다.
- [0116] 본원에서 "항체"라는 용어는, 광범위하게, 변형 HCV E2 당단백질에 특이적으로 결합하는 모노클로날 및 폴리클로날 항체와, 이러한 항체들의 항원 결합 단편 예를 들어, 변형 HCV E2 당단백질에 대한 특이적 결합 활성을 보유하는 항체의 Fab, F(ab')₂, Fd 및 Fv 단편들을 포함하는 의미이다.
- [0117] 원하는 특이성을 가지는 항체(모노클로날 항체 및 폴리클로날 항체)는 당 업계에 널리 공지된 방법을 이용하여 생산될 수 있다[예를 들어, Harlow and Lane, "Antibodies, A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 참조]. 항체와 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법도 국제 특허 출원 공보 WO 02/22155에 개시되어 있다.
- [0118] 본 발명은 또한 환자의 체내에서 HCV 감염을 예방적 차원 또는 치료적 차원에서 치료하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 전술한 항체를 유효량만큼 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 그러므로, 이 방법은 환자의 수동적 면역 요법이라고 할 수 있다.
- [0119] 전술한 바와 같이, 본 발명은 또한, 환자의 체 내 HCV 감염을 예방적 차원 또는 치료적 차원에서 치료하기 위한 의약에 상기 항체를 포함시키는 것, 또는 상기 의약 제조시 상기 항체의 용도도 제공한다.
- [0120] 이러한 측면에서, 본 발명은 또한, 환자의 체내에서 HCV 감염을 예방적 차원이나 치료적 차원에서 치료하기 위한 제제를 제공하는데, 이 제제는 전술한 바와 같은 항체를 포함한다.
- [0121] 또한, 본 발명은 HCV 감염의 진단에 있어서 상기 광범위하게 기술한 항체의 용도를 제공한다. 이 측면에서, 본 발명은 환자의 체 내 HCV 감염 여부를 검출하는 방법을 제공하는데, 이 방법은, 항체-항원 복합체를 형성할 수 있는 조건 하에서, 환자로부터 유래하는 생물 시료와 전술한 바와 같은 항체를 접촉시키는 단계와, 상기 복합체를 검출하는 단계를 포함하며, 여기서, 상기 복합체가 형성되었음은 곧, 시료 중에 HCV가 존재한다는 지표가 된다.
- [0122] 바람직하게, 본 발명의 항체는 검출 가능하도록 표지화된다. 적당한 표지에 관하여는 당 업계에 널리 공지되어 있으며, 그 예로서는, 효소, 방사성 동위 원소, 형광 화합물, 콜로이드 금속 그리고 화학 발광 화합물, 인광 화합물, 그리고 생물 발광 화합물을 포함한다. 바람직하게, 생물 시료는 환자로부터 유래하는 체액 시료 예를 들어, 혈액 시료이다.
- [0123] 본 발명의 변형 HCV E2 당단백질은 또한 약물 발견 기술 예를 들어, 소 분자 스크리닝 기술에서도 사용될 수 있다.
- [0124] 본 발명은 이하 비 제한적인 실시예에 의해 더욱 상세히 설명된다.

실시예

실시예 1

본 실시예에서 사용된 재료와 방법에 관하여는 이하에 기술되어 있다.

1. E1E2 당단백질 구조와 기능에 있어서 각 가변부의 역할

다양한 가변 결실 돌연 변이의 결과를 이하 표 1에 요약하였다.

세포 내 E1E2 전구체의 폴딩 및 이중 이량체화

세포 내 E1E2 생합성에서 각각의 가변부들의 역할을 살펴보기 위하여, 하나의 가변부가 결실된 구조물로 형질 감염된 293T 세포의 대사-표지화된 세포 용해물을, E1 및/또는 E2 에피토프와 반응성인 항체로 면역 침전시켰다. 이러한 제제들을 비환원 조건 및 환원 조건 하에서 분석하여, 전술한 바와 같이, 공유-결합 응집체의 대형 세포 내 군집에 존재하는 비-공유 결합 E1E2 이중 이량체의 특성을 규명하였다.

폴리클로날 항-E1E2 항체(779)를 사용한 면역 침전을 통해서, E1 당단백질(약 30kDa) 및 E2 당단백질(약 70kDa)의 전체 세포 내 군집을 검출하여, 하나의 가변부가 결실된 각 구조물에 대해 생성된 다단백질로부터 효율적으로 발현 및 절단되는지 여부를 확인하였다(도 1의 A 참조). 돌연 변이체 E2 당단백질의 경우, 야생형의 경우보다 분자량이 가변적으로 작았다[HVR1con < HVR2 및 "igVR" < HVR1 < WT]. 이는 HVR1con 결실부 내에 존재할 것으로 예측되는 2개의 당화 위치(각각 HVR2와 "igVR" 결실부에 존재하되, HVR1 결실부에는 존재하지 않음)가 상실되었을 때와 같다(도 2). 그러나, 상기 E2 당단백질 주쇄의 분자량이 표 2에 예측된 바와 같음을 확인하는 데에는 이와 같은 E2 당단백질이 탈당되어야 한다. 약 100kDa 위치까지 이동한 밴드는 숙주 신호 펩티다제에 의해 절단되지 않은 E1E2 다단백질을 나타내며, 이 밴드는 하나의 HVR2 결실 구조물 및 "igVR" 결실 구조물 둘 다에 경우에 더욱 명확하다(도 1의 A). 이로써 HVR2와 "igVR" 돌연 변이체에 대해 관찰된 세포 내 E1 및 E2의 전체 수준이 감소하는데, 이는 곧, 이와 같은 결실로써 다단백질을 가공할 수 있음을 말해주는 것이다.

비-형태 의존성 항-E1 모노클로날 항체(A4)는, 환원 조건과 비환원 조건 하에서, 돌연 변이 구조물과 야생형 구조물 둘 다에 대한 E1 이중체(약 30kDa 및 약 27kDa)를 침전시켰다. 이 이중체는 앞서 관찰된 바와 같이, 대안적인 E1 당화 상태 또는 메신저 RNA의 스플라이싱된 아형(splicing isoform) 중 어느 하나에 해당된다. 뿐만 아니라, E1은, 비환원 조건 하에서 낮은 수준의 야생형 E2 당단백질과 공침되는 반면에, 환원 조건 하에서는 야생형 E2 당단백질과 돌연 변이 E2 당단백질 둘 다와 효과적으로 공침된다. 이는 곧, A4가 공유-결합된 세포 내 E1E2 복합체 내에 더욱 많이 노출된 E1 에피토프를 인지한다는 것을 말해주는 것이다.

비-형태 의존성 항-E2 모노클로날 항체(A11)를 통해서, 각각의 가변부 결실 구조물 전부에 대하여 세포 내 E2 당단백질이 발현됨을 확인하였다(도 1의 C). 그러나, HVR1con 또는 HVR1 결실을 포함하는 돌연 변이 E2 당단백질만이, 비환원 조건 및 환원 조건 하에서, 검출 가능한 양만큼의 E1을 공침시켰다. 이는 곧, HVR2 결실 및 "igVR" 결실이 각각 세포 내 E1E2 이중 이량체의 형성을 직접적으로나 간접적으로 방해함을 말해주는 것이다. 주의할 점은, 이와 같이 이중 이량체화가 감소하는 이유는, E2 당단백질 발현이 상기 양 돌연 변이체내에서 A11에 의해 원래의 수준만큼 관찰되는 것과 같이, HVR2 및 "igVR" 결실에 대해 관찰되는 저 분자량의 전체 세포 내 E1 및 E2로 인한 것이 아니라는 점이다. 뿐만 아니라, E2는 특히, 환원 조건 하에서, 일반적으로 낮은 수준의 E1을 공침시켰는데, 이는 곧, A11 에피토프가 세포 내 E1E2 이중 이량체 복합체내에서 부분적으로 폐쇄됨을 의미한다.

형태 의존성 항-E2 모노클로날 항체(H53)는 HCV 비리온의 표면상에 존재하는 원래의 E2를 인지하는 것으로 파악되므로, 이와 같이 E2 종과 공침하는 E1의 양은, 기능성 비-공유 결합 E1E2 이중 이량체의 형성 비율에 대한 훌륭한 지표가 된다. H53과의 면역 침전을 통해서, 가변부가 결실된 각각의 구조물 전부에 대하여 E2 당단백질이 세포 내 발현됨이 검출되었다(도 1의 D). 이는 곧, 삽입된 Gly-Ser-Ser-Gly 링커 모티프가, 이와 같은 E2 당단백질 내에서, 형태 의존성 에피토프를 제공하는데 필요한 원래의 E2 당단백질을 폴딩하는 고유의 특성을 보유하기에 충분한 가요성을 제공함을 말해주는 것이다. 그러나, HVR2 또는 "igVR" 결실을 포함하는 세포 내 E2 당단백질은 E1을 공침시키지 못하였는데, 이는 곧, 이와 같은 부위들이 비-공유 결합된 E1E2 이중 이량체의 세포 내 조립에 직접적으로 또는 간접적으로 필요함을 말해주는 것이다.

E1E2 당단백질의 성숙 및 슈도타이핑된 HIV-1 입자로의 통합

E1E2 당단백질의 성숙에 있어서 각각의 가변부의 역할을 관찰하기 위해, 전술한 바와 같이, 상기 복합체를 슈도

타이핑된 HIV-1 입자에 통합하여, 분리 경로를 통해 ER로부터 유리되어 이동할, 소량의 E1 및 E2를 증폭시켰다. 이와 같이 대사 표지화된 E1E2-슈도타이핑된 HIV-1 입자를 용해한 다음, 형태 의존성 항-E2 모노클로날 항체 (H53)와 HIV-1 감염된 개체로부터 유래하는 IgG(IgG14)로 면역 침전시켰다.

[0137]

IgG14를 이용한 면역 침전을 통하여, 하나의 가변부가 결실된 구조물 중 어느 것도 HIV-1의 구조 단백질인 Pr55^{Gag}, p17^{MA}, p24^{CA} 또는 p66^{RT}의 가공 과정 및 비리온과의 통합 과정에 영향을 미치지 않았음을 알 수 있었다 (도 3의 B). H53으로 면역 침전시킨 결과, 비리온-통합 E2 당단백질의 분자량 밴드가 퍼진 상태로 검출되었는데 (약 70~90kDa), 이는, 전술한 바와 같이, 이 당단백질이 다양한 복합체 유형 및 하이브리드 유형의 탄수화물 변형을 포함하는 성숙한 당단백질의 전형임을 말해주는 것이다(도 3의 A). 상이한 돌연 변이 E2 당단백질의 상대적 분자량은 보다 다양했는데(HVR1con < HVR2 및 "igVR" < HVR1 < WT), 이는 곧, 세포 내 데이터에 관하여 기술된 바와 같이, 결실 부위 내에 위치하는 당화 위치가 상실되었음을 말해주는 것이다. E2 밴드가 상당 수준 얇아진 HVR1con 결실 돌연 변이 당단백질을 제외한 모든 돌연 변이 E2 당단백질이, 대략 원래의 수준과 동일한 수준으로 E1E2-슈도타이핑된 HIV-1 입자에 통합되었다. 이는 곧, HVR1에 인접하여 존재하는 보존 부위가 E2 폴딩 과정, 성숙 과정 및 슈도타이핑된 HIV-1 입자로의 통합 과정을 종결하는데 필요함을 말해주는 것이다.

[0138]

H53과의 면역 침전을 통하여서도, 약 33kDa인 밴드와 약 31kDa인 또 다른 저 분자량 밴드까지 이동하는 단백질 종을 검출하였는데, 이는 곧, 비리온-통합된 E1 당단백질도 이중체로서 이동함을 말해주는 것이다(도 3의 A). 그러나, 2회의 독립된 실험을 통하여, 네거티브 대조군(공 벡터)의 경우 저 분자량 밴드는 비-특이적 밴드와 함께 이동하므로, 고 분자량 밴드만이 E1에 해당될 수 있다. 비리온-통합 E1 당단백질(약 33kDa)은 또한 세포 내 당단백질(약 30kDa)보다 더욱 천천히 이동하는데, 이는 곧, 앞서 관찰한 바와 같이, 분비 경로를 통해 이동할 때, 하나 또는 2개의 E1 당화 위치에서 부가적인 탄수화물 변형이 이루어졌음을 말해주는 것이다. 뿐만 아니라, 각각의 HVR2 및 "igVR" 결실을 포함하는 비리온-통합 E2 당단백질은 검출 가능한 수준으로 E1과 공침될 수 없었는데, 이는 곧, 기능성 E1E2 이중 이량체를 형성할 때 상기 가변부들이 직접적으로 또는 간접적으로 필요함을 말해주는 것이다.

[0139]

Huh7 세포로의 E1E2-매개 도입

[0140]

기능상 비 공유 결합된 E1E2 이중 이량체의 형성은 Huh7 세포로의 E1E2-매개 도입에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 파악된다. 바이러스 도입에 있어서 각각의 가변부의 역할을 관찰하기 위하여, 전술한 바와 같이, 하나의 결실 구조물을 사용하여 Huh7 세포를 감염시키는 E1E2-슈도타이핑된 HIV-1 입자를 생산하였다. 예상한 바와 같이, HVR1con이 결실되면, 상기 관찰된 바와 같이, 슈도타이핑된 HIV-1 비리온으로 E2 당단백질이 통합되는 것이 지연되므로, 절대로 도입될 수 없게 된다(도 4). 이와 유사하게, HVR2 및 "igVR" 결실로 인하여 기능성 E1E2 이중 이량체 복합체가 파괴되므로, 도입될 수 없게 된다. 그러나, HVR1이 결실되면, 야생형 이중 이량체 수준이 유지될 뿐만 아니라, E1E2 당단백질이 HIV-1 비리온으로 통합하는 것도 가능하기는 하지만, 이 HVR1 결실은 바이러스가 도입되는 것을 완전히 차단하는데, 이는 곧, 이 부위가 E1E2-매개 바이러스 도입에 직접적으로 기여할 수 있음을 말해주는 것이다.

[0141]

CD81-LEL 결합

[0142]

E2 당단백질은, 그것만으로도 CD81 수용체와의 결합을 매개하는데 충분하므로, 그것이 이중 이량체화 및/또는 바이러스 도입능을 상실하였을지라도, 세포 내 E2 당단백질 및 비리온-통합 돌연 변이 E2 당단백질 둘 다는 CD81의 대형-세포 외 루프(113~201번 LEL 잔기)와 결합하는 능력이 있음이 확인되었다. 이때의 확인 방법은, 전술한 바와 같이, 세포와 바이러스 용해물 둘 다를 대상으로 하여 고상 CD81 MBP-LEL(113~201번 잔기) 결합 검정법을 실시하는 단계를 포함한다. 여기서 얻어진 데이터는, 형태 의존성 항-E2 모노클로날 항체 H53과 침전될 때와, 비환원 조건 하에서 SDS-PAGE에 의해 관찰되는 바와 같이, 각각의 벡터로부터 발현된 단량체 E2의 양에 대해서 정규화하였다; 도 1의 D(세포 내) 및 도 3의 A(비리온-통합).

[0143]

결합 능이 완전히 상실된 것으로 판명된 HVR1con을 제외하고, 하나의 가변부 결실을 포함하는 세포 내 E2 당단백질 전구체 전부의 CD81-LEL 결합 수준은 원래의 결합 수준과 같았다(도 5의 A). 이는 곧, 삽입된 이는 곧, 삽입된 Gly-Ser-Ser-Gly 링커 모티프가, 이와 같은 HVR1, HVR2 및 "igVR" 결실 E2 당단백질 내에서, E2 CD81-결합 위치를 형성하는데 충분한 가요성을 제공함을 말해주는 것이며, 또한 이와 같은 각각의 가변부들은 이 기능을 수행함에 있어서 필요하지 않다는 것을 말해주는 것이기도 하다. 뿐만 아니라, HVR1에 인접하는 보존 부위(HVR1con)가 결여된 세포 내 E2 당단백질 전구체는, H53에 의해 인지되는 형태-의존성 에피토프를 유지함에도 불구하고, CD81-LEL 결합 위치를 형성할 수 없다는 것을 말해주는 것이기도 하다. HVR2 및 "igVR"이 둘 다 결실된 세포 내 형태의 것들은, 야생형에 비하여, 최대 CD81-LEL 결합 능이 훨씬 강화되었으나(도 5의 A), 이 형태

의 것들은 전반적인 결합 곡선을 거의 변형시키지 않았으므로, 이러한 가변부가 CD81-LEL 결합 능력을 조정하는지 여부를 측정하는데에는 추가의 독립된 실험을 수행할 필요가 있다.

[0144]

예상한 바와 같이, HVR1con 결실을 포함하는 비리온-통합 E2 당단백질은 CD81-LEL 결합을 매개할 수 없었는데, 이는 곧, 이 당단백질이 E1E2-슈도타이핑된 HIV-1 입자에 통합되는 비율이 낮아지며, 이것이 상기 세포 내 데이터를 반영한다는 사실을 말해주는 것이다(도 5의 B). 이와는 대조적으로, HVR1, HVR2 및 "igVR" 결실을 포함하는 비리온-통합 E2 당단백질은 모두 CD81-LEL 결합 능력의 수준을 원래의 수준 이상으로 유지하였는데, 이는 곧, 상기 돌연 변이 E2 당단백질은 돌연 변이 후 조차도 CD81-결합 위치를 보유함을 말해주는 것이다. 놀라운 점은, HVR1 결실을 포함하는 비리온-통합 E2 당단백질은, 야생형에 비하여, 최대 CD81-LEL 결합 능력이 더욱 강화되었으며, 또한 전체 결합 곡선에 있어서도 그 수준이 약 4배 증가하였다는 점이다(도 5의 B). 이로써, HVR1은 상기와 같은 기능을 수행하는데에는 필요하지 않지만, 비리온-통합 E2 당단백질 내 CD81-LEL 결합을 음으로 조정함을 알 수 있다. 동일한 유형의 결실을 포함하는 세포 내 E2 당단백질 전구체에서는 이와 같은 효과를 관찰할 수 없었는데(도 5의 A), 이는 곧, 앞서 관찰된 바와 같이, 분비 경로를 통하여 당단백질이 성숙할 때 진행되는 E1E2 폴딩 과정 및 이에 관여하는 CD81-결합 위치에 변화가 일어남을 말해주는 것이다.

[0145]

2. 연장 링커가 E1E2 당단백질 구조 및 기능에 미치는 효과

[0146]

세포 내 E1E2 전구체의 폴딩 및 이중 이량체화

[0147]

각각의 가변부 결실을 포함하는 E2 당단백질의 폴딩을 강화하기 위하여, 원래의 구조물에서 결실된 몇몇 보존 시스템인-인접 잔기들을 다시 도입하여 Gly-Ser-Ser-Gly 링커를 연장시켰다. 주목할만한 것은, 이와 같은 일련의 변형 결실 구조물들은, 상기 부위의 고도로 가변적인 특성으로 인해, HVR1 결실을 포함하지 않는다는 점이다. 맥동적 추적 대사 표지화(pulse-chase metabolic-labelling) 및 면역 침전법에 의하여, 이와 같은 구조물이 293T 세포 내에서 E1 및 E2 당단백질을 발현시키는지 여부와 이중 이량체를 형성하는지 여부에 대해 분석하였다.

[0148]

항-E1E2 폴리클로날 항체(779)를 사용하는 면역 침전법을 통하여, 각각의 연장된 링커 결실 구조물에 대해 생성된 다단백질로부터 E1 당단백질(약 30kDa)과 E2 당단백질(약 70kDa)이 세포 내 발현되어 절단된다는 것을 알 수 있었다(도 6의 A). 다단백질이 절단되면, HVR2link 및 "igVRlink" 구조물 내에서의 효율이 약간 떨어졌는데, 이는 곧, 이와 같은 결실로 인하여 다단백질의 가공에 영향을 미칠 수 있음을 말해주는 것이다. 연장된 링커는 원래의 구조물에서는 결실된 당화 위치를 대신할 수 없었으므로, 돌연 변이 E2 당단백질 또한 야생형의 경우보다 분자량(kDa)이 가변적으로 작았는데, 이러한 현상은 글리칸이 존재하지 않기 때문에 생기는 현상이다: HVR1conlink < HVR2link 및 "igVRlink" < WT. 그러나, 이와 같은 E2 당단백질을 탈당하는데에는 이 당단백질 주쇄의 분자량이 표 2에 예측된 바와 같음을 확인해야 할 것이다.

[0149]

항-E1 모노클로날 항체(A4)를 통하여, 연장된 링커 구조물 전부에 대해 E1 이중체(약 30kDa 및 약 27kDa)가 존재함을 확인하였다(도 6의 B). E1은 비환원 조건 하에서 야생형 E2 당단백질과 공침하는데 실패하였으나, 환원 조건 하에서는 돌연 변이 E2 및 야생형 E2 둘 다와 공침하였는데, 이는 곧, 비 공유 결합된 E1에 대한 A4 항체의 감수성이 낮다는 증거가 된다. 비 형태 의존성 항-E2 모노클로날 항체(A11)를 사용한 침전법을 통하여, 비록 HVR1conlink 결실만이 검출 가능한 양만큼의 E1을 공침시켰지만, 연장된 링커 구조물 각각에 대하여 야생형 E2 당단백질이 발현됨을 확인할 수 있었다(도 6의 C). 형태 의존성 모노클로날 항체(H53)는 또한, 연장된 링커 구조물 각각에 대한 세포 내 E2 당단백질을 원래의 수준으로 침전시켰는데, 이는 곧, 이 돌연 변이체들이, 이와 같은 형태 의존성 에피토프를 제시하는데 필요한 원래의 E2 당단백질의 고유한 폴딩 특성을 보유함을 말해주는 것이다(도 6의 D). 뿐만 아니라, 연장된 "igVR" 링커는 E1과의 공침 특성을 원래의 수준으로 회복하였는데, 이는 곧, 이와 같은 부가의 링커부가, 비 공유 결합된 E1E2 이중 이량체의 세포 내 조립에 직접적으로나 간접적으로 필요하다는 것을 말해주는 것이다. 그러나, 주의할 점은, 이러한 효과는 연장된 HVR2 링커 구조물에서는 관찰되지 않았다는 점이다.

[0150]

E1E2 당단백질의 성숙 및 슈도타이핑된 HIV-1 입자로의 통합

[0151]

연장된 링커가 E1E2 당단백질 성숙 과정 및 비리온 통합 과정을 변경시키는지 여부를 관찰하기 위하여, 변형된 단일 결실 돌연 변이를 E1E2-슈도타이핑된 HIV-1 입자에 도입하고, 이후, 용해한 다음, 전술한 바와 같이, 형태 의존성 항-E2 모노클로날 항체(H53) 및 HIV-1 감염된 개체로부터 유래하는 IgG(IgG14)와 면역 침전시켰다.

[0152]

IgG14를 사용한 면역 침전을 통하여, 변형된 단일 결실 구조물 중 어느 것도 HIV-1 구조 단백질의 가공 과정과 비리온과의 통합 과정에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다(도 7의 B). 또한, H53을 사용하여 침전시킨 결과,

비리온-통합 E2 당단백질의 분자량 밴드가 퍼진 상태로 검출되었는데(약 70~90kDa), 이는, 상기 당단백질이 성숙한 비리온-통합 E2 당단백질의 전형임을 말해주는 것이다(도 7의 A). 비리온-통합 돌연 변이 E2 당단백질은 또한 야생형 E2 당단백질에 비하여 분자량(kDa)이 근소하게 작았는데, 이는 세포 내에서의 데이터에서 알 수 있는 바와 같이, 1개 또는 2개의 당화 위치가 상실됨으로 인해 부여되는 특성이다. H53을 사용하여 침전시킨 결과, 원래의 HVR1con 결실 구조물에는 존재하지 않는 4개의 보존 시스테인-인접 잔기들을 재도입하였음에도 불구하고, HVR1conlink 결실을 포함하는 E2 당단백질의 비리온-통합 수준이 감소하였음이 확인되었다. HVR2link를 결실시킨 결과, 슈도타이핑된 HIV-1 입자에 통합된 E2 당단백질이 원래 수준으로 발현됨을 확인할 수 있었지만, 검출 가능한 양만큼의 E1과 공침하는 것은 실패하였는데, 이는 세포 내에서의 데이터를 반영하는 결과였다. 이와는 반대로, 연장된 "igVR" 링커를 포함하는 비리온-통합 E2 당단백질은 원래 수준의 E1과 공침하였는데, 이는 곧, 이 부위가 기능성 E1E2 이중 이량체 형성에 직접적으로 또는 간접적으로 필요함을 말해주는 것이다.

[0153] Huh7 세포로의 E1E2-매개 도입

[0154] 이와 같이 연장된 링커가 Huh7 세포로의 E1E2-매개 도입 과정에 관여하는지 여부를 관찰하기 위해서, 전술한 바와 같이, 변형 단일 결실 구조물을 사용하여 Huh7 세포에 감염시키기 위한 E1E2-슈도타이핑된 HIV-1 입자를 생산하였다. 예상한 바와 같이, HVR1conlink 및 HVR2link 결실 구조물 내 연장된 링커들은 어떠한 도입 활성도 회복하지 못하였는데, 이는 비리온에 통합될 돌연 변이 E2 당단백질이나 이중 이량체 각각의 경우에도 마찬가지였다(도 8). 그러나, 연장된 "igVR" 링커를 포함하는 비리온-통합 E2 당단백질은, 도입 활성을, 음성 대조군(공백터)에 비하여 상당 수준 회복하였는데(약 8배), 이는, E1과의 이중 이량체 형성시에 회복된 수준과 일치하였다. 그러나, 주의할 점은, "igVRlink" 결실 구조물의 도입 활성은 야생형의 도입 활성에 비하여 여전히 낮았다는 점이다(약 10배).

[0155] CD81-LEL 결합

[0156] 이와 같은 연장 링커들을 포함하는 세포 내 또는 비리온 통합 E2 당단백질의 CD81-LEL 결합 능이 변경되는지 여부를 관찰하기 위해서, 전술한 바와 같이, 세포 용해물과 바이러스 용해물 둘 다를 대상으로 고상 CD81 MBP-LEL(113~201번 잔기) 결합 검정법을 수행하였다. 여기서 얻어진 데이터를, H53을 사용하여 침전시킬 때 각각의 벡터로부터 발현된 일정량의 단량체 E2에 대해 정규화하고, 비환원 조건 하에서 SDS-PAGE에 의해 관찰하였다; 도 6의 D(세포 내) 및 도 7의 A(비리온 통합). 연장된 링커는 HVR2link 또는 "igVRlink" 결실을 포함하는 세포 내 E2 당단백질의 CD81-LEL과의 결합 능력을 변경시키는 것 같지는 않았지만, 원래의 HVR2 및 "igVR" 결실 구조물에 의해 나타나는 결합 능력은 원래의 수준 또는 그보다 약간 높은 수준임을 확인할 수 있었다(도 9의 A). 주의할 점은, HVR1conlink 결실을 포함하는 세포 내 E2 당단백질의 CD81-LEL 결합 능력, 음성 대조군(공백터)의 CD81-LEL 결합 능력에 비하여 약간 회복하였음을 확인하였는데, 이는 곧, 이 구조물에 재도입된 보존 시스테인-인접 잔기들이 CD81-결합 위치를 형성하는데 직접적으로 또는 간접적으로 영향을 미칠 수 있음을 말해주는 것이다. 그러나, HVR1conlink를 포함하는 비리온-통합 E2 당단백질은 CD81-LEL 결합 능이 훨씬 감소하였는데(도 9의 B), 이는 HIV-1 비리온으로의 통합이 지연되었기 때문이다. HVR2link 및 "igVRlink" 결실 구조물을 포함하는 비리온-통합 E2 당단백질의 바이러스 용해물 중 CD81-LEL 결합 능력은 유지되었으나, 2회의 독립된 검정 실험에 있어서 상대적 CD81-LEL 결합 능력과 관련된 결과들과는 불일치하였으므로(도 9의 B 및 C), 세 번째 독립 검정 실험을 통하여 이러한 결과를 확인할 필요가 있다.

[0157] **3. 다수의 가변부 결실이 E1E2 당단백질 구조와 기능에 미치는 효과**

[0158] 세포 내 E1E2 전구체의 폴딩 및 이중 이량체화

[0159] E1과의 이중 이량체화 및/또는 바이러스 도입이 일어나지 않았음에도 불구하고, 상기 관찰 결과들을 통하여, HVR1, HVR2 및 "igVR"는, 형태 의존성 모노클로날 항체 H53에 의해 인지되는 고유의 폴딩 특성과, CD81 수용체의 대형 세포 외 루프(LEL)와의 결합 특성을 파괴하지 않고서도, 세포 내 E2 당단백질 및 비리온-통합 E2 당단백질 둘 다를로부터 각각 결실될 수 있음을 알 수 있다. 이와 같은 가변부의 특성을 더욱 자세히 규명하고, 보존 E2 코어 도메인을 묘사하기 위하여, E1E2 당단백질에 다수의 결실을 도입하고, 이를 맥동성 추적 대사 표지화 및 면역 침전법에 의해 293T 세포 내에서 분석하였다. 항-E1E2 폴리클로날 항체(779)와의 침전을 통하여, 다수의 가변부 결실 구조물 각각에 대해 생성된 당단백질로부터 E1(약 30kDa) 및 E2(약 70kDa) 당단백질이 효율적으로 발현 및 절단됨을 알 수 있었다(도 10의 A). 이와 같은 돌연 변이 E2 당단백질은 또한 야생형 E2 당단백질보다 더 빨리 이동하였는데, 이는 각각의 HVR2 내 당화 위치가 상실되었고/상실되었거나 "igVR"이 결실되었기 때문이다: HVR1+2+igVR 및 HVR2+igVR < HVR1+2 및 HVR1+igVR < WT. 그러나, 이와 같은 당단백질의 주쇄 분자량이 표 3에 예측된 바와 같은지를 확인하기 위해서는 이와 같은 당단백질을 탈당할 필요가 있다. 항-E1 모노클로날

항체(A4)를 통하여, 가변부 결실 구조물 각각에 대해 제시되는 E1 이중체(약 30kDa 및 약 27kDa)를 검출할 수 있었다(도 10의 B). E1은 환원 조건 하에서 야생형 및 돌연 변이 E2 당단백질 둘 다와 공침하였는데, 이로써, 공유 결합된 E1E2 이중 이량체가 형성된다는 사실이 입증되었다. 또한, 비환원 조건 하에서는 야생형 E1E2 이중 이량체를 검출할 수 없었는데, 이는 곧, 비 공유 결합 E1 당단백질에 대한 A4의 감수성이 낮다는 것을 입증하는 것이다.

[0160] 이와는 반대로, 이러한 결실 구조물 각각에 대한 세포 내 E2 당단백질의 발현 수준이 원래의 수준과 같음이 입증되었음에도 불구하고, 비 형태 의존성 항-E2 모노클로날 항체(A11)를 통하여서는, 환원 조건 및 비환원 조건 하에서 E1과 공침하는, 다수의 가변 결실 포함 E2 당단백질을 검출할 수 없었다. 형태 의존성 항-E2 모노클로날 항체 H53은 또한 원래 수준의 돌연 변이 E2 당단백질을 침전시켰다(도 10의 D). 이는 곧, 다수의 가변부 결실이 도입되었음에도 불구하고, 삽입된 Gly-Ser-Ser-Gly 링커 모티프가 돌연 변이 E2 당단백질 내 이와 같은 형태 의존성 에피토프를 제시하는데 충분한 가요성을 제공함을 말해주는 것이다(도 10의 D). 이와 같은 돌연 변이 E2 당단백질은 또한, E1과의 이중 이량체화 특성이 소멸되는데, 이는, 앞서 관찰한 바와 같이, E1E2 이중 이량체 조립에 필요한 HVR2 및/또는 "igVR"이 존재하지 않음을 입증하는 것이다.

[0161] E1E2 당단백질의 성숙 및 슈도타이핑된 HIV-1 입자로의 통합

[0162] 다수의 가변부 결실이 E1E2 당단백질 성숙 과정을 변경시키는지 여부를 관찰하기 위하여, 전술한 바와 같이, 이와 같은 결실을 E1E2 슈도타이핑된 HIV-1 입자에 도입시켜 용해한 후, 형태 의존성 항-E2 모노클로날 항체 H53 및 HIV-1 감염된 개체로부터 유래하는 IgG(IgG14)와 면역 침전시켰다.

[0163] IgG14를 사용한 면역 침전을 통하여, 다수의 가변 결실 중 어느 것도 HIV-1 구조 단백질의 가공 과정과 비리온과의 통합 과정에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다(도 11의 B). 또한, H53을 사용하여 면역 침전시킨 결과, E2의 분자량 밴드가 퍼진 상태로 검출되었는데(약 70~90kDa), 이는, 상기 당단백질이 성숙한 비리온-통합 E2 당단백질의 전형임을 말해주는 것이며(도 11의 A), 다수의 가변부 결실을 포함하는 E2 당단백질이 원래의 수준으로 HIV-1 비리온에 통합될 것임을 입증하는 것이다. 이와 같은 돌연 변이 E2 당단백질은 또한 야생형 E2 당단백질에 비하여 약간 빨리 이동하였는데, 이는 세포 내 데이터에서 알 수 있는 바와 같이, HVR2 및/또는 "igVR" 결실시 1개 또는 2개의 당화 위치가 상실됨으로 인한 현상이다. 이로써, 다수의 가변부 결실을 포함하는 비리온-통합 E2 당단백질은 성숙한 이후에도 형태 의존성 H53 에피토프를 보유함을 알 수 있다. 또한, 이와 같은 돌연 변이 E2 당단백질 중 어느 것도 검출 가능한 양만큼의 E1과 공침하지 않았는데, 이는 세포 내에서의 데이터에서 관찰되는 바와 같았다.

[0164] Huh7 세포로의 E1E2-매개 도입

[0165] 예상한 바와 같이, 다수의 가변부 결실을 포함하는 E1E2 슈도타이핑된 HIV-1 입자는 Huh7 세포로의 도입이 불가능하였다(도 12).

[0166] CD81-LEL 결합

[0167] 이중 이량체화 및 E1E2-매개 바이러스 도입이 일어나지 않았음에도 불구하고, 전술한 바와 같이, 세포 및 바이러스 용해물 둘 다를 대상으로 고상 CD81 MBP-LEL(113~201번 잔기)을 수행하여, 다수의 가변부 결실을 포함하는 세포 내 E2 당단백질 및 비리온-통합 E2 당단백질이 CD81-LEL과 결합하는 능력을 가지는지 여부에 대해 관찰하였다. 여기서 얻어진 데이터를, H53과 침전할 때 각각의 벡터로부터 발현된 일정량의 단량체 E2에 대해 정규화하고, 비환원 조건 하에서 SDS-PAGE에 의해 관찰하였다; 도 10의 D(세포 내) 및 도 11의 A(비리온 유래).

[0168] 다수의 가변부 결실을 포함하는 세포 내 E2 당단백질은 모두, CD81-LEL과의 결합 능력을 원래의 수준만큼 나타냈음이 입증되었다(도 13의 A). 이로써, Gly-Ser-Ser-Gly 링커 모티프가 이와 같은 돌연 변이 E2 당단백질 내에서 전구체 CD81 수용체-결합 위치를 형성하는데 충분한 가요성을 제공함을 알 수 있다. 뿐만 아니라, HVR2 및 "igVR" 이중 결실을 포함하는 E2 당단백질(pE1E2 Δ23)은, 2회의 독립된 실험을 통하여, 최대 CD81-결합 능이 훨씬 강화됨이 입증되었다. 이는, HVR2 및 "igVR" 돌연 변이체 각각에서 관찰되는 효과와 동일하였으나, 이와 유사하게, 전체적인 결합 곡선은 증가하지 않았으므로, 이 효과에 대한 통계학적 유의성을 측정하는데에는 부가의 독립된 점검 실험이 필요하다.

[0169] 다수의 가변부 결실을 포함하는 비리온-통합 E2 당단백질은 모두 CD81-LEL 결합 능력을 유지하였는데(도 13의 B), 이는 곧, 삽입된 링커 모티프가 상기 당단백질 내에서 이 당단백질이 성숙된 이후에도 CD81-결합 위치를 제시하는데 충분한 가요성을 제공함을 말해주는 것이다. 이는 또한, HVR1, HVR2 및 "igVR"이 이러한 기능을 수행하는데 필요하지 않다는 것을 말해주는 것인데, 이는 곧, 각각의 가변부 결실에 대해 얻어진 세포 내 데이터를 통해

서도 알 수 있다. 중요한 사실은, 이러한 사실을 통하여, 3개의 가변 결실을 포함하는 E2 당단백질이 CD81-LEL 결합에 필요한 모든 구조 결정부와 기능 결정부를 포함하므로, 최소한의 E2 코어 도메인을 구성한다는 점이 입증된다는 것이다. 이와 같이 2개 및 3개의 가변부 결실을 포함하는 비리온-유래 E2 당단백질은 또한, 야생형에 비하여, 최대 CD81-LEL 결합 활성이 약간 감소하였거나 또는 증가하였음이 입증되었는데, 다만, 이 돌연 변이체들 중 어느 것도 결합 곡선상 수치들을 전체적으로 증가시키지 않았다.

4. E2 수용체 결합 도메인(E2 RBD_{661myc}) 구조 및 기능에 있어서의 가변부의 역할

폴딩 및 분비

전술한 결과들을 통하여, 상기 3개의 가변부를 동시에 결실시키면, 형태 의존성 모노클로날 항체 H53에 의해 인지되는 E2 당단백질의 고유 폴딩 과정, 또는 CD81-LEL과의 결합 능력을 방해하지 않음을 알 수 있는데, 이는 곧, 이 구조물이 E2 코어 도메인을 구성함을 말해주는 것이다. 그러나, 전장 E2 당단백질에 있어서, 경막 부위와 막-인접 부위가 둘 다 존재하면, 이와 같은 코어 E2 구조를 결정화하기 어렵게 될 것이다. 그러므로, 하나 및 다수의 가변부 결실 둘 다를, 가용성이면서 높은 수준으로 발현될 수 있는 E2 수용체 결합 도메인(E2 RBD_{661myc})에 도입하였다. 하나 및 다수의 가변부 결실을 포함하는 상기 E2 RBD_{661myc} 당단백질은 293T 세포 내에서 대사 표지화되었으며, 형태 의존성 항-E2 모노클로날 항체(H53)를 사용하여 면역 침전시켜 세포 내 단백질 및 분비된 단백질을 분석하였다.

H53은, 하나 및 다수의 결실 구조물 모두에 대한 세포 내 E2 RBD_{661myc}(약 50kDa)를 원래의 수준만큼 침전시켰는데, 이는 곧, 이와 같은 돌연 변이 당단백질 각각이 효과적으로 발현됨을 말해주는 것이다(도 14의 A). 이와 같은 세포 내 E2 RBD_{661myc} 당단백질은 또한 야생형에 비하여 분자량이 가변적으로 작았는데, 이는 전장 E1E2 이중 이량체의 경우에서 관찰되는 바와 같이, 결실된 부위 내에 위치하는 당화 위치가 상실되었기 때문이다. 그러나, 이와 같은 절단형 당단백질이 표 4에 예측되어 제시된 분자량을 가지는지 여부를 확인하기 위해서는 이 당단백질을 탈당시켜야 한다. 뿐만 아니라, H53은 침전되어 분자량 밴드(약 55~65kDa)가 퍼진 상태로 검출되었는데, 이는 E2 RBD_{661myc}이 분비형일 경우에도 마찬가지였으며(도 14의 B), 이는 곧, 분비 경로를 통한 이동 과정 중 다양한 복합형 및 하이브리드형 탄수화물 변형이 진행됨을 말해주는 것이다. 하나 및 다수의 가변부 결실을 포함하는 E2 RBD_{661myc} 모두는, 효율적으로 분비될 뿐만 아니라, 세포 내 데이터에서 확인할 수 있는 바와 같이 다양한 분자량(kDa)을 나타냈다. 이러한 결과들을 종합하여 봤을 때, 가변부는 E2 RBD_{661myc}로부터 (개별적으로, 그리고 여러가지 경우의 수로) 결실될 수 있으며, 형태 의존성 항-E2 모노클로날 항체 H53에 의해 검출되는 바와 같이, 세포 내 및 분비된 수용체 결합 도메인 둘 다의 고유한 폴딩 특성을 보유함을 알 수 있다.

CD81-LEL 결합

하나 및 다수의 가변부 결실을 포함하는 E2 수용체 결합 도메인이 CD81-LEL과 결합하는지 여부를 측정하기 위하여, 전술한 바와 같이, 세포 내 E2 RBD_{661myc} 용해물 및 분비된 E2 RBD_{661myc} 용해물 둘 다를 대상으로 고상 CD81 MBP-LEL(113~201번 잔기) 결합 검정법을 수행하였다. 이로부터 얻어진 데이터를, H53과 침전될 때 그리고 SDS-PAGE에 의해 관찰되는 바와 같이, 각각의 벡터로부터 발현된 단량체 E2의 양에 대해 정규화하였다; 도 14의 A(세포 내) 및 도 14의 B(분비).

하나의 가변부 결실을 포함하는 E2 RBD_{661myc}의 세포 내 형 및 분비형 둘 다는 CD81-LEL과 결합한다는 것이 확인되었는데, 이는 전장 E2 당단백질의 경우에서도 관찰되는 바이며, HVR1con이 결실되면 CD81-LEL 결합 능력이 완전히 상실되었다(도 15의 A 및 B). 하나의 HVR1 결실을 포함하는 E2 당단백질의 분비형은 또한, 야생형에 비하여, CD81-LEL과의 결합 능력이 더욱 강화되었는데, 이는, 전장 E2 당단백질의 성숙한 비리온-유래 형태의 경우에서 얻어지는 데이터를 통해서도 알 수 있었다. 중요한 점은, 3개의 가변부 결실(HVR1+2+igVR)을 포함하는 E2 RBD_{661myc}의 세포 내 형 및 분비형 둘 다는 CD81-LEL과의 결합 능력을 원래의 수준으로 보유한다는 점인데(도 16의 A 및 B), 이로써, 이와 같은 당단백질 중은 최소한의 또는 거의 최소한인 이2 코어 수용체 결합 도메인을 구성하는데 구조상 그리고 기능상 CD81-결합 결정부를 포함함을 확인할 수 있다.

5. HVR 동시 결실을 포함하는 E2 RBD_{661myc}와 세포 표면 발현 전장 CD81의 결합

다수의 HVR 결실을 포함하는 분비형 E2 RBD_{661myc} 단백질이 세포 표면 발현 전장 CD81과 결합하는 능력을 측정하

었다. CHO-K1 세포를 인간 CD81을 암호화하는 벡터로 형질 감염시켰다. 형질 감염시킨 후 48시간 경과시, 세포를 얼음에 넣고, 여기에 동량의 E2를 첨가하였다. 4시간 경과 후, 결합되어 있던 E2를 방사성 요드화 mAb 9E10으로 검출하였으며, 또한 결합되어 있던 E2의 양도 정량하였다. 그 결과(도 17)를 통하여, 야생형 E2 RBD_{661myc}과 ΔHVR2+igVR-결합 E2 RBD_{661myc}는 전장 CD81과 유사한 수준으로 결합하였음을 확인할 수 있다. 이와는 대조적으로, ΔHVR1+2-E2 RBD_{661myc}와 CD81의 결합 수준은 상당히 감소하였으며($p = 0.038$); 구조물 E2 Δ123-myc 내 igVR가 추가로 결실되면, 야생형 CD81 결합 활성이 회복되었다($p = 0.11$). 이 데이터를 통하여, E2의 CD81과의 결합 능력을 방해하지 않고서 3개의 가변부를 한꺼번에 결실시킬 수 있음을 알 수 있다. 재미있는 점은, E2 RBD₆₆₁로부터 HVR1과 HVR2를 한꺼번에 결실시켰을 경우에는 CD81과의 결합 능력이 감소하였지만, 이러한 결점은 igVR를 추가로 결실시킴으로써 보완되었다는 점이다.

[0179]

6. HVR 결실을 동시에 보유하는 E2 RBD₆₆₁이 인간의 형태 감수성 모노클로날 항체에 의해 인지되는 능력

[0180]

야생형 E2-myc 및 E2 Δ123-myc을 ³⁵S-Met/Cys로 방사능 표지화하고, 인간의 형태 감수성 모노클로날 항체 패널로 면역 침전시킨 다음(Keck와 다수, 2004), 이를 비환원 SDS-PAGE로 분석하였다. 이와 같은 형태 의존성 mAb의 패널은 E2-A, B 및 C의 뚜렷한 면역원성 도메인 3개를 나타내는 입체적 에피토프에 특이적이다(Keck와 다수, 2004). E2 Δ123-myc 단백질을 통하여, 야생형 E2-myc 단백질에 대한 유사 면역원성 프로필을 확인할 수 있었는데(도 18), 이는 곧, 3개의 가변부가 모두 결여된 E2-myc이, 이와 같은 E2의 뚜렷한 구조 도메인과 기능성 도메인 3개에 특이적인 입체적 에피토프를 보유함을 말해주는 것이다. 이 데이터는, 켈(Keck)와 다수에 의해 이미 제시된 데이터와 일치하는 것으로서, 이 도메인에 HVR1이 존재하지 않는다는 것을 입증해주는 것이다(Keck와 다수, 2004). 이 데이터는 HVR2와 igVR도 이 도메인에 존재하지 않는다는 것을 제안하는 관찰 결과에 까지 확대 적용된다.

[0181]

7. 검토

[0182]

본 연구 과정 중, E1E2 생합성, 이중 이량체화, CD81-결합 그리고 바이러스 도입에 있어서 이와 같은 부위들의 역할을 추가로 조사하기 위하여, 2개의 확인된 E2 가변부 즉, HVR1과 HVR2, 그리고 신규의 가변부인 "igVR"를 별도로 결실시켰다. 이와 같은 가변부 결실들을 포함하는 E2 당단백질 전부는 형태 의존성 모노클로날 항체 H53에 의해 인지된 야생형 당단백질의 고유한 폴딩 특성을 보유하는 것으로 파악되었다. HVR2 및 "igVR"은 또한, 이중 이량체화에 필요한 것으로 파악되며, 이들 3개의 가변부는 모두 바이러스 도입시 사전-CD81 결합 단계와 사후-CD81 결합 단계에서 필요하였다. 또한, 각각의 가변부 중 어느 것도 CD81-결합에 필요하지 않으며, 또한 상기 3개 가변부는 모두 CD81-결합 특성을 보유하는 E2 당단백질로부터 동시에 결실될 수 있음도 입증되었다.

[0183]

외피 당단백질인 E1과 E2는 HCV 게놈, 특히, 초 변이부 1(HVR1) - 매우 가변적이며, E2 당단백질의 N-말단에 위치하는, 약 27개의 아미노산으로 이루어진 서열 - 은 유전적 이질성이 가장 크다. 여기서, HVR1(387~408번 당단백질 잔기)이 결실되면, E1E2의 이중 이량체화 및 E1E2의 슈도타이핑된 HIV-1 입자로의 통합 활성이 둘 다 원래의 수준만큼 유지됨에도 불구하고, E1E2-매개 도입 특성이 상실됨을 알 수 있었는데, 이는 곧, 이 부위가 바이러스 도입에 직접적인 역할을 한다는 사실을 말해주는 것이다. 그러나, HVR1은 기능성 E1E2 이중 이량체 또는 E2 수용체 결합 도메인(E2 RBD_{661myc})이 CD81-LEL과 결합하는데 필요하지 않다는 사실도 알 수 있었는데, 이는 곧, HVR1이 바이러스 도입에 있어서 사전- 또는 사후-CD81 결합 단계에 관여한다는 것을 말해주는 것이다. 이는, HVR1(당단백질의 384~410번 잔기)이 결실되면, SR-B1 수용체와 E2가 결합할 수 없다는 이전의 연구 결과와 일치하는 것으로서, 이는 곧, 이 부위가 바이러스 도입시 필수적으로 이루어지는 SR-B1 접촉에 필요할 수 있음을 말해주는 것이다.

[0184]

그러나, 본 발명을 통하여 관찰된 결과는, Huh7 세포로의 도입을 (낮은 수준으로나마) 매개하는, HVR1이 결여된 HCV 슈도타이핑된 입자(HCVpp)를 입증하였던 기타 몇몇 연구의 결과와는 모순되는 것으로서, 이 부위가 바이러스 도입에 근본적인 역할을 수행한다는 결과와도 일치하지 않는 것이다. 또한, 고밀도 지단백(HDL), SR-B1의 천연 리간드가 존재할 때 관찰되었던 HCVpp 감염성은 HVR1이 결실될 경우에는 증강되지 않는다고 한다. 이는 곧, 이러한 효과가 HCV 입자와 HDL의 결합으로 인한 것인지 여부가 확인되지 않은 상태에서도, HVR1이 전술한 기능을 수행하는데 필수적이라기보다는 감염성을 증강한다는 것을 말해주는 것이다. 뿐만 아니라, 최근의 연구에 따르면, HVR1 내에 보존된 기본 잔기들 전부를 치환하면, 이 잔기들이 CD81-LEL 결합에 관여하거나 또는, HDL에 의한 SR-B1 결합 능력의 증가와 상관되어 있는 것으로 확인되지 않았음에도 불구하고, 상기 잔기들이 HCVpp 도입을 상당 수준 감소시킨다는 것이 파악되었다. 그러므로, 바이러스 도입 과정에 있어서 HVR1의 정확한 역할은 아

직 명확하게 밝혀지지 않은 상태이다.

[0185] 또한, 이전 연구에서와 마찬가지로, HVR1을 결실시키면 CD81-결합 능이 상당 수준 증가함을 알 수 있었다(약 4배 증가). 이를 통하여, HVR1은 E2 당단백질 내 보존된 CD81-결합 위치의 접근 가능성을 음으로 조정하되, 이와 같은 CD81과의 결합에는 필요하지 않음을 알 수 있다. 이러한 결과는, HVR1과 HVR2 사이에 위치하는 보존 CD81-결합 결정부인 G⁴³⁶WLAGLFY를 동정한 최근의 동정 결과와 일치한다. 뿐만 아니라, 광범위한 중화 항체인 AP33은 HVR1(다단백질의 412~423번 잔기)에 바로 인접하여 존재하는 보존 에피토프를 인지하고, CD81 및 일정 범위로 제공되는 E2 당단백질 사이의 상호 작용을 억제함도 입증되었다. 보존된 I⁴¹¹ 잔기를 포함하도록 HVR1 결실을 연장하면, CD81 결합 능력을 강화하지 않고, 오히려 약화됨을 알 수 있었는데, 이는 곧, 상기 부위가 상기 기능에 영향을 미친다는 것을 말해주는 것이다. 이와 유사하게, 이와 같이 인접하여 존재하는 보존 부위(HVR1con, 다단백질의 387~428번 잔기)를 포함하도록 HVR1 결실을 연장하면, CD81-결합 위치를 형성하는데 중요한, E2 당단백질의 폴딩 과정 및 성숙 과정을 방해한다는 사실이 입증되었다. 뿐만 아니라, 이와 같이 보존된 부위에 위치하는 잔기 W⁴²⁰은 CD81의 결합에도 관여한다는 사실도 입증되었다.

[0186] HVR1에 인접하여 존재하는 고도로 보존된 상기 부위의 위치는, 이와 같이 매우 가변성인 부위가, 바이러스 도입 과정을 매개하고, 숙주 면역 시스템에 대한 상기과 같은 보존 부위의 접근 가능성을 조정하는 2가지 기능을 모두 수행하여, 광범위한 중화 항체 예를 들어, AP33에 의하여 인지되는 것을 피하도록 한다는 것을 시사한다. 실제로, 이전의 연구를 통하여, HVR1이 결실되면 중화 항체와 혈청에 대한 외피 당단백질 복합체의 감수성이 증가함을 살펴본 바 있다. 그러므로, HVR1은 E2 당단백질의 보존된 코어 도메인의 외부에 존재하는 용매-노출 서브도메인을 형성한다는 것이 제안되었는데, 이는 HVR1 당단백질이 수용체 결합을 조정하는 역할과 면역 우성 반응을 유도하는 것과 맞아떨어진다. 이와 같이 제시된 보존 코어 도메인의 특성을 더욱 자세히 규명하기 위하여, 나머지 E2 가변부 즉, HVR2 와 "igVR"도 결실시켰다. HVR1을 결실시켰을 때 관찰되는 바와 같이, HVR2와 "igVR" 부위들이 각각 결여된 E2 당단백질들은 둘 다 형태 의존성 모노클로날 항체인 H53에 의해 검출되는 바와 같이, 야생형 당단백질의 고유한 폴딩 특성을 보유하였다.

[0187] 그러나, 흥미롭게도, HVR2와 "igVR" 둘 다 이중 이량체화에 필수적인 것으로 파악되므로, 이 부위들을 결실시키면 전체적으로 Huh7 세포로의 E1E2-매개 도입이 진행되지 않음이 입증되었다. 이로써, E2 당단백질 내 상기 부위들은 직접적인 이중 이량체 접촉에 관여하거나, 또는 이 기능에 간접적으로 작용하는 입체 장에 효과를 조정한다는 것을 알 수 있다. 그러므로, 이 부위들의 역할을 더욱 상세히 연구하기 위해서, 몇몇 보존된 시스테인-인접 잔기들을 HVR2 및 "igVR" 결실 구조물에 재도입하여 이 구조물의 링커 모티프를 연장시키고, E2 당단백질 폴딩을 강화하였다. HVR2에서는 이와 같은 효과가 관찰되지 않았지만, "igVR" 링커를 연장시켰을 경우, E1과의 이중 이량체화 수준은 원래의 수준으로 회복되고, E1E2-매개 도입은 상당 수준으로(약 8배) 회복되었음이 확인되었다. 이와 같은 관찰 결과는, 상기 부위로부터 상실된 5개의 글리신 잔기들 중 2개의 잔기가, Gly-Ser-Ser-Gly 링커 모티프를 도입하여 이 부위 내에서 총 5개의 아미노산만이 결실되도록 만듦으로써 추가로 보상될 경우, 비교적 길이가 짧은 "igVR" 결실의 경우에도 반영될 수 있다. 이중 이량체화에 있어서 "igVR" 링커의 역할은 또한 유전자형 간에 관찰되는 보존 현상과도 일치한다. 다만 주의할 점은, 연장된 "igVR" 링커 구조물은 도입 활성이 야생형에 비하여 감소하였으며(약 10배), 이는 아마도 이전에 HCVpp 도입을 감소시키는 것으로 관찰되었던, 이 부위 내 보존된 N-결합 당화 위치가 존재하지 않기 때문일 것이다.

[0188] 뿐만 아니라, HVR2 또는 "igVR" 결실을 포함하는 E2 당단백질은 CD81-결합 능력을 원래의 수준만큼 보유하였음을 알 수 있었는데, 이는 곧, HVR1에서 관찰된 바와 같이, 이 부위들이 상기 기능을 수행하는데 필요하지 않음을 말해주는 것이다. 이전의 연구를 통하여, HVR2를 표적화하는 모노클로날 항체는 CD81과 E2 당단백질의 결합을 억제한다는 사실을 파악하였으며, 또한 본 발명의 결과를 바탕으로 하였을 때, 이 항체들은 상기 부위와 인접하여 존재하는 G⁴³⁶WLAGLFY CD81-결합 결정부를 폐색시키는 입체 효과를 나타낼 수 있음에도 불구하고, 이 부위는 CD81-결합 결정부를 형성한다는 사실도 제안되었다. 그러므로, 이중 이량체화 및/또는 바이러스 도입이 진행되지 않음에도 불구하고, HVR1, HVR2 및 "igVR"은 모두, E2 당단백질이 가지고 있는 고유한 폴딩 특성에 악영향을 미치지 않고 E2 당단백질로부터 각각 결실될 수 있으며, 실제로, 3개의 가변부는 모두 CD81-결합 능력을 보유함과 동시에 결실될 수 있음을 추가로 확인하였다. 이는, 상기 가변부들이, 확인된 HCV 수용체인 CD81과 결합하는데 필요한 보존 구조 결정부 및 기능 결정부를 포함하는 E2 코어 도메인의 외부에 존재하는 용매-노출 서브도메인을 형성한다는 가설을 강력하게 뒷받침해주는 것이다.

[0189] 재미있는 사실은, HVR1 결실은 반드시 포함하고, 이와 아울러 HVR2 결실 또는 "igVR" 결실을 포함하는 E2 당단

백질은, 각각의 HVR1 결실에 대해 관찰되는 CD81-LEL 결합 능이 극적으로 강화되지 않았다는 사실이다. 이전의 연구를 통하여, 상이한 아종으로부터 유래하는 상응 서열과 HVR1과 HVR2가 치환되면, 각각의 HVR1 또는 HVR2 치환 중 어느 하나에 대해 관찰되지 않는 CD81 결합 능은 (도입된 균주 및 주요 균주에 따라서) 증가하거나 감소함이 입증된 바 있다. 이 데이터를 종합해보면, 상기 부위들 사이에서 분자 내 상호 작용이 일어나면 CD81-결합 능이 조정되며, 또한 이 부위들은 이와 같은 접촉을 허용하는 고유의 가요성 구조를 채택하게 될 것임을 알 수 있다. 이러한 사실은 또한, HVR1과 HVR2 사이에 위치하는 보존된 CD81-결합 결정부인 G⁴³⁶WLAGLFY⁴⁴³에 대해 최근에 행하여진 동정 결과와, HVR1과 (그 정도는 덜 하지만) HVR2 둘 다에 의해 유도된 면역 반응에 의해 뒷받침되는 것으로서, 이는 상기 HVR1과 HVR2가 세포 부착 과정에 있어서 기능을 조정할 수 있는 표면-노출 서브도메인으로서의 위치라는 사실과 맞아떨어지는 것이다. HVR1과 "igVR" 이중 결실에 대해 관찰되는 바와 동일한 효과를 통하여, "igVR" 부위도 이와 같은 협동 상호 작용에 관여할 수 있음을 알 수 있다.

[0190]

이와 같은 데이터를 설명해 줄 수 있는 하나의 가설에서는, 가변부가 가요성 용매-노출 서브 도메인 즉, E2 당단백질이 '개방' 및 '폐쇄' 형태 사이에서 변할 수 있도록 만드는 서브 도메인을 형성한다고 제안하고 있는데, 이 연구에 의하면, 상기 '개방' 형태는 코어 E2 도메인 내에 위치하는 보존 CD81-결합 결정부를 노출함으로써 CD81과 더 쉽게 결합할 수 있다고 한다. 실제로, E2 당단백질 내에서 일어나는 형태상의 변화는 CD81-결합 과정에서 이미 관찰된 바 있다. 뿐만 아니라, 비 중화 항체와 E2 당단백질이 결합한다는 사실을 통하여, 중화 항체에 대한 감수성이 감소한다는 것이 입증되었는데, 이는, 비 중화 항체가 이와 같이 표면-노출된 가변부의 가요성을 억제하여, E2 코어 도메인 내에 위치하는 보존 에피토프로의 접근을 차단한 모델의 경우와 일치한다. 그러므로, 변형된 E2 코어 도메인으로써, E2 당단백질 내에 존재하여, HCV 복제시 당단백질 복합체의 표면에서 면역학적 데코이로서 역할을 할 수 있는 표면-노출 가변부에 의해 폐쇄되는, 보존 에피토프 예를 들어, CD81-결합 결정부에 대한 중화 항체를 유도해내는 유효 후보 백신을 만들 수 있다는 사실을 알 수 있다.

[0191]

HVR2 및 "igVR" 결실을 포함하는 E2 당단백질 내에서 이중 이량체화가 일어나지 않음을 통하여, 하나의 형태의 의존성 모노클로날 항체인 H53에 의해 인지될 수 없는 당단백질에 형태상의 변화가 일어난다는 사실을 알 수 있다. 그러므로, 이와 같은 가변부들에 의해 매개되는 당단백질 구조 및 기능상의 미미한 변화까지도 관찰하기 위해, 이전에 E2 당단백질 내 3개의 주요 면역원성 부위를 동정하는데 사용되었던, 형태-의존성 항체 패널을 생산하였다. 그 결과를 통하여, 도메인 A, B 및 C에 대한 E2 RBD_{661myc} 모노클로날 항체는 3개의 가변부가 모두 한꺼번에 결실된 RBD에 대한 반응성 수준을 원래 수준만큼 유지한다는 사실을 알 수 있었다. 이로써, E2 Δ123-myc Δ123RBD 구조물은 원래 E2 RBD의 고유한 코어 도메인 폴딩 특성을 보유한다는 사실을 추가로 확인할 수 있다.

[0192]

8. 재료 및 방법

[0193]

가변부 결실 돌연 변이체의 구성

[0194]

백터

[0195]

E2 가변부 결실을 E1E2 이중 이량체에 도입하기 위하여, HCV계 발현 벡터인 pE1E2H77c를 제조하였다[Drummer와 다수, 2003]. 상기 pE1E2H77c 벡터는 전장 pCV-H77c(유전자형 1a) 감염성 클론으로부터 유래하는 DNA 서열[Yanagi와 다수, 1997] 즉, E1E2 당단백질의 165~746번 잔기를 암호화하는 DNA 서열을 함유한다[Drummer와 다수, 2003]. ER 표적화 및 당단백질 절단을 효율적으로 수행하기 위하여, 이 서열은 미성숙 코어 단백질의 C-말단에 위치하는 E1 신호 펩티드와, 전장 E1 및 E2 당단백질 서열 둘 다를 포함한다(도 19). 이 DNA 단편은, 포유동물 시스템 내에서 발현되는데 사용되는 번역 인핸서 서열과 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터 둘 다를 함유하는 pCDNA4HisMax 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)의 골격에 클로닝된다. 또한, 이 DNA 단편은 박테리아 세포 내 선별에 사용되는 암피실린 내성 유전자를 포함하기도 한다.

[0196]

CD81 개방 해독 틀을, 프라이머 5'-CCGAAAGCTTCCACCATGGGAGTGGAGGGCTGC-3' 및 5'-GGCTCTAGATTAGTACACGGAGCTGTCCG-3'를 사용하는 PCR에 의해 pcDM8-TAPA-1(Levy와 다수, 1998)30)로부터 증폭시켰다. PCR 생성물을 HindIII 및 XbaI(굵은 글씨로 표시함)을 사용함으로써 pcDNA3에 클로닝하여, 플라스미드 pcDNA3-CD81을 생산하였다.

[0197]

가용성 E2 수용체 결합 도메인(E2 RBD₆₆₁)내 가변부의 특성을 규명하기 위하여, HCV계 발현 벡터인 pE2661도 제조하였다[Drummer와 다수, 2002]. pE2661 벡터는 개시된 바와 같이, HCV 당단백질의 384~661번 잔기를 암호화하는 pCV-H77c DNA 서열을 함유한다[Drummer와 다수, 2006, 2002]. 이 서열은 CD81 및 SR-B1 수용체-결합 능을 보유하는 것으로 파악되는, E2 당단백질의 독립된 폴딩 서브 도메인을 암호화한다[Pileri와 다수, 1998,

Scarselli와 다수, 2002, Pileri와 다수, 1998]. 이 DNA 생산물을 pCDNA3 벡터(Invitrogen) 골격 즉, E1의 부재시에 ER 표적화 및 E2 RBD₆₆₁의 신호 절단이 효율적으로 이루어지도록 디자인된, 조직 플라스미노겐-활성 인자(tpa) 리더 서열의 C-말단에 클로닝하였다(E2-myc). 이 벡터는 또한 포유동물 세포 내에서 발현하는데 사용되는 CMV 프로모터와, 박테리아 세포 내에서의 선별을 촉진하는 암피실린 내성 유전자를 포함하기도 한다.

[0198] 중복 연장 PCR

[0199] 중복 연장 PCR은 DNA의 대형 분절의 결실을 촉진하는 2단계 기술이다(도 20)[Horton와 다수, 1989]. 제1 라운드에서, pE1E2H77c 벡터를, 각각의 가변부 결실을 전장 E1E2 다단백질에 도입하는데 사용되는 주형으로 사용하였다. 이 단계에서는 2개의 올리고뉴클레오타이드 쌍이 필요하였는데[Geneworks, Ann Arbor, MI, USA]; 각 쌍은 가변부의 상류(5') 또는 하류(3') 중 어느 하나의 서열을 증폭시키는데 관여하는 하나의 외부 프라이머 및 하나의 내부 프라이머를 함유한다. 내부 올리고뉴클레오타이드 프라이머를, Gly-Ser-Ser-Gly 링커와, 상응하는 5' 또는 3' 단편에 상보적인 짧은 중첩 서열을 도입하도록 디자인하였다(표 5). 이와 같이 생산하였으면, 상기 제1 라운드의 5' 및 3' PCR 생산물을 아가로스-겔 전기 영동법으로 분리 및 정제한 후, 이를 제2 라운드 PCR 반응에 첨가하였다. 제2 라운드를 통하여, 5' 및 3' 단편과 중첩하는 상보성의 서열로 이 5' 및 3' 단편을 어닐링시켜, 관련성 있는 외부 프라이머에 의한 연장 및 증폭 과정에 사용되는 주형을 형성하였다. 외부 프라이머는 또한 독특한 EcoRI/XbaI 제한 엔도뉴클레아제 위치를 포함하였는데, 이 위치는 주형 벡터로의 역 클로닝을 촉진하는 역할을 한다.

[0200] E1E2 가변부 결실 구조물

[0201] 표 5에 요약된바 및 도 20에 도시된 바와 같이, 하나의 가변부 결실을 이루는데 중복 연장 PCR 기술을 사용하였다. 주의할 점은, 이 부위를 더욱 자세히 연구하기 위해 2개의 대안적인 HVR1 결실 구조물인 HVR1 및 HVR1con을 디자인하였다는 점이다. HVR1 결실부는 다단백질의 387~408번 잔기 사이의 고도로 가변적인 분절이 결여되어 있는 반면에, HVR1con은 이 결실부를 연장시켜, 당단백질의 나머지 부분에 N-말단부를 고정하는 것으로 제안된, E2 내 제1 보존 시스테인 잔기(다단백질의 387~428번 잔기)에 인접한 부위를 포함하도록 만든다. HVR1의 제1 3아미노산(E³⁸⁴TH)도 이 구조물 내에 남겨두어, 당단백질 생합성시 E1과 E2 사이를 효율적으로 절단하도록 하였다. HVR2와 "igVR" 결실부는 각각, 다단백질의 460~485번 잔기와 570~580번 잔기들을 포함하였다.

[0202] E2 당단백질 폴딩을 강화하기 위하여, 중복 연장 PCR을 통해서 제2의 변형 단일 가변부 결실 구조물들을 생산하였다(도 21). 이 기술에서는, 표 2에 요약된바 및 도 21에 도시된 바와 같이, 원래의 구조물로부터 결실된 몇몇 보존 시스테인-인접 잔기들을 재도입하여, Gly-Ser-Ser-Gly 링커 모티프를 연장시키는, 변형 내부 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 이용하였다. 주목할 점은, 이와 같은 변형 ΔHVR1ink E1E2 시리즈는 상기 부위 내에 어떠한 보존 잔기들도 포함하지 않기 때문에, HVR1 결실 구조물을 포함하지 않는다는 점이다.

[0203] 최소 E2 코어 도메인에 관하여 설명하기 위해서, 다수의 HVR1, HVR2 및 "igVR" 결실을 E1E2 다단백질에 도입하였다(도 19 참조). 중복 연장 PCR을 이용하여 이와 같은 다수의 결실 구조물을 다시 생산하였으나, 표 3에 개략적으로 제시한 바와 같이, 야생형 pE1E2H77c 벡터 대신에, 주형으로서 관련 단일 또는 이중 가변부 결실 구조물을 이용하였다.

[0204] E2 RBD_{661myc} 가변부 결실 구조물(E2-myc)

[0205] 가용성 E2 수용체 결합 도메인(E2 RBD_{661myc}) 내에서의 하나 및 다수의 가변부 결실의 특성을 규명하기 위해서, 표준 PCR을 사용하여, 하나 및 다수의 가변부 결실을 포함하는 전장 E1E2 구조물로부터 다단백질의 384~661번 잔기들을 증폭하였다[표 4에 개략적으로 제시하였으며, 도 22에 도시함]. 이와 같은 PCR 생산물을 pE2661 벡터에 클로닝하는 것을 촉진하는, C-말단 myc 에피토프 태그와 독특한 NheI/XbaI 제한 엔도뉴클레아제 위치를 도입할 수 있도록, 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 디자인하였다.

[0206] 모든 PCR 반응들은, 표 6에 요약된 조건 하에서 익스팬드 하이 피델리티 PCR 시스템(Expand High Fidelity PCR system; Invitrogen)을 사용하는 바이오메트라 열 순환기(Biometra Thermocycler; Biometra, Goettingen, Germany) 내에서 수행하였다.

[0207] 아가로스-겔 전기 영동

[0208] TAE(0.001M EDTA 및 0.04M Tris-아세트레이트)를 포함하는 Bio-Rad 겔 탱크(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하는 아가로스-겔 전기 영동법으로 DNA 생산물을 분리하였다. TAE 중 1%(w/v)의 DNA-급 아가로

스에 브롬화에티듐($0.5\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가하여, UV 광선 하에서 DNA를 눈으로 확인할 수 있도록 하였다[Sambrook and Russel, 2001]. 오렌지 G 겔-로딩 염료[1% (w/v) 오렌지 G(Sigma, St Louis, MO, USA), 50% (v/v) 글리세롤]를 사용하여 DNA 시료 20%(v/v)를 구성하였다. 아가로스 겔을 100V, 23mA에서 30~40분 동안 전개하고, 1kb+DNA 마커(Invitrogen)를 기준으로, GelDOC 시스템(Bio-Rad)을 이용하여 DNA 단편의 크기를 확인 및 정량하였다. 이후, 제조자의 지침에 따라서, Mo Bio PCR 클린-업 키트(Mo Bio PCR Clean-up kit; Mo Bio, Carlsbad, CA, USA)를 사용하는 PCR 반응, 또는 Mo Bio 겔-스핀 키트(Mo Bio Gel-Spin kit; Mo Bio)에서 사용하는 아가로스 겔로부터, 확인된 DNA 생산물을 정제하였다.

[0209] DNA의 제한 엔도뉴클레아제 분해

[0210] 제조자의 지침에 따라서, 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs) 제한 엔도뉴클레아제로 모든 DNA를 분해하였다[New England Biolabs, Ipswich, MA, USA]. 임의의 분해된 벡터를 새우 알칼리성-인산화 효소(Invitrogen)를 사용하여 30분 동안 탈 인산화시켜(37°C), 자가 어닐링 활성을 감소시켰다.

[0211] 플라스미드 구조물의 결찰 및 형질 전환

[0212] T4 DNA-리가제 시스템(Invitrogen)을 사용하여, 분해된 삽입부와 벡터 DNA를 약 4:1의 비율로 결찰시키고, 이를 4°C 에서 16시간 동안 항온 처리하였다. 아세트산나트륨 침전법(3M 아세트산Na, pH5 및 100% 에탄올)(Sambrook 및 Russel, 2001)을 이용하여 DNA 결찰 생성물을 분리한 다음, 1시간 동안 멸균 증류수에 재 현탁하였다. 결찰 생성물을, 1mm 전기 천공 큐벳(BTX, Holliston, MA, USA) 및 유전자 펄스 전기 천공기(BioRad)(2.0V, 200Ω 및 $25\mu\text{F}$ 로 설정)를 사용하여, 20uL의 전기 천공 가능 DH10B 이.콜라이(*E.Coli*) 세포(New England Biolabs)에 형질 전환하였다. 이후, 전기 처리된 DH10B 세포를 루리아 버타니 배지(Luria Bertani Medium; LB)(1% (w/v) 트립톤, 0.5% (w/v) 효모 추출물, 0.5% (w/v) NaCl)에 옮긴 후, 이를 37°C 에서 1시간 동안 회복시켰다. 그 다음, 상기 세포를 LB-아가 평판(LB, 5%(w/v) 아가)($50\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 암피실린 포함) 상에 도말하고, 이를 37°C 에서 16시간 동안 항온 처리하여 형질 전환된 세포를 선별하였다[Sambrook and Russel, 2001].

[0213] 콜로니 PCR

[0214] 원하는 DNA 삽입부를 포함하는 형질 전환 콜로니들을 신속하게 스크리닝하기 위하여, 각각의 콜로니 PCR용 LB-아가 평판으로부터 약 20개의 콜로니들을 선별하였다[Sambrook and Russel, 2001]. 표 6에 특정된 조건 하에, 바이오메트라 열 순환기(Biometra) 내에서 Taq 중합 효소 시스템(Invitrogen)과 적당한 외부 프라이머를 사용하여 콜로니 PCR을 수행하였다. 전술한 바와 같이, 아가로스-겔 전기 영동법에 의해 포지티브 삽입부를 포함하는 콜로니를 동정하였다.

[0215] 플라스미드 DNA의 소규모 제조

[0216] 제조자의 지침에 따라서, 알칼리성 용해법 및 Mo Bio 미니-프랩 키트(Mo Bio)를 사용하여, 포지티브 콜로니들로부터 플라스미드 DNA의 소규모 제제를 생산하였다. 전술한 바와 같이, 제한 엔도뉴클레아제 분해 및 아가로스-겔 전기 영동법으로 삽입부를 확인하였다.

[0217] DNA 서열 결정

[0218] 마이크로몬 리액션 셋-업 프로토콜(Micromon Reaction Set-Up Protocol; Micromon, Victoria, Australia)에 따라서, 관련 서열 결정용 프라이머와 프리즘 바이오다이 종결 인자 믹스(PRISM BioDye Terminator Mix; 3.1 버전)(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여, 플라스미드 DNA 삽입부 서열을 확인하였다. 표 6에 개략적으로 제시한 조건 하에, 바이오메트라 열 순환기(Biometra) 내에서 모든 서열 결정 반응을 진행시키고, 생성된 DNA를 마이크로몬 리액션 클린-업 프로토콜(Micromon)에 따라서 제조하였다. 마이크로몬 서열 결정 장비에 설치된 3730S 유전자 분석기(Applied Biosystems) 내에서 서열 분석을 수행하였다.

[0219] 플라스미드 DNA의 대규모 제조 및 정량

[0220] 제조자의 지침에 따라서, 알칼리성 분해에 바탕을 둔 키아젠 미디-프랩 키트(Qiagen Midi-prep Kit; Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여, 확인된 클론으로부터 유래한 플라스미드 DNA를 다량으로 분리하였다. 페놀-클로로포름(1:1)을 이용하여 이와 같은 대규모의 플라스미드 DNA 제제를 정제하고, 이를 10,000xg에서 3분 동안 원심 분리시켜, DNA를 함유하는 상층을 얻어내었으며, 클로로포름(50% (v/v))을 사용하여 이 과정을 반복 실시하였다. 70°C 에서 30분 동안, 아세트산나트륨(10% (v/v))과 2.5 부피의 100% 에탄올을 사용하여, 정제된 DNA를 농축하였다. 10,000xg에서 15분 동안 원심 분리시킨 후, 70% 침전법에서 2회 세척한 다음, 이를 100uL의 TE 중에

제 현탁하여, DNA를 펠릿화하였다. 바이오포트미터(Biophotometer)를 사용하여 260nm에서 모든 DNA의 농도를 측정하였다(Eppendorf, Hamburg, Germany).

[0221] 본 연구를 수행하는 동안, 모든 박테리아 연구에서는 퀼도-진탕기(Ratek Instruments, Victoria, Australia) 또는 항온 처리기(Memmet, Schwabach, Germany)(37℃로 설정)를 사용하였다.

[0222] 생화학적 검정법 및 기능상 검정법

[0223] 세포 배양액

[0224] 본 연구에서는, 인간의 섬유 아세포 세포주로부터 유래한 293T 인간 배 신장 세포(HEK 293T)를 사용하여, 형질 감염 효율을 높이고, 세포 내 단백질 발현 수준을 개선하였다. 인간의 간세포는 HCV의 1차 표적 세포이므로, 인간 간세포 암종 세포주인 Huh7을 본 연구의 모델 간 세포 시스템으로 사용하였다. 뿐만 아니라, 상기 Huh7 세포주를 통하여, 서브 게놈(subgenomic) HCV 레플리콘은 HCVpp 도입에 대해 고도로 친화적이라는 사실뿐만 아니라, 세포 배양액 중에서 생장한 HCV(HCVcc)를 지지할 수 있음이 입증되었는데, 이는 곧, 상기 세포가 생체 내 HCV 친화성에 필요한 세포 내 인자 모두를 함유한다는 것을 말해주는 것이다[ZhongBartosch와 다수, 2005, Wakita와 다수, 2005, 2003a, Lindenbach와 다수, 2005b, Lohmann와 다수, 1999, LindenbachWakita와 다수, 2005a, Zhong와 다수, 2005, Bartosch와 다수, 2003a].

[0225] 모든 세포를 DMF10: 둘베코 최소 필수 배지(Dulbecco's minimal essential medium; Invitrogen), 10% (v/v) 열 불활성화 소 태아 혈청(Invitrogen), 2mM L-글루타민(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), 1M HEPES 완충 용액(Invitrogen), 겐타마이신(GE Healthcare) 그리고 2ug/ml의 미노사이클린-염산염(Sigma) 중에 넣어 두었다. 상기 세포들을, PBS-EDTA(포스페이트 완충 염수(PBS)-에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)) 중 0.025%(v/v) 트립신을 사용하여, 75cm² 또는 150cm²의 팔콘(Falcon) 플라스크(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 3~4일에 한 번씩 계대 배양하여, 단일층을 탈착시켰다. 모든 세포들을 서모 다이렉트 히트 CO₂ 항온 처리기(Thermo Direct Heat CO₂ incubator; 37℃, 5% CO₂)(Thermo, Waltham, MA, USA) 내에서 항온 처리하였다. 본 연구를 진행하는 동안, 전술한 바와 같이, 퓨젠6(FuGene6) 형질 감염 시약(Roche)을 사용하여, 모든 벡터들을 HEK 293T 세포(6-웰 배양 접시에 접종; Nalge Nunc, Rochester, NY, USA)에 형질 감염시켰다[Drummer와 다수, 2003].

[0226] 항체

[0227] 진 더비슨(Jean Dubuisson) 박사와 해리 그린버그(Harry Greenberg) 박사로부터 비 형태 의존성 항-E1 모노클로날 항체인 A4와 비 형태 의존성 항-E2 모노클로날 항체 A11을 기증받았다[Dubuisson와 다수, 1994]. 항-E2 형태 의존성 모노클로날 항체인 H53도 진 더비슨 박사로부터 기증받았다[Deleersnyder와 다수, 1997]. HCV 유전자형 1a 감염 개체의 혈장으로부터 정제된 항-E1E2 폴리클로날 항체 779가 생산되었다[Drummer and Pountourios, 비공개]. HIV-1 감염 개체로부터 유래하는 면역 글로불린 G(IgG14)와 항-myc 모노클로날 항체 9E10도 생산되었다[Drummer와 다수, 2002, Drummer와 다수, 2003]. E2 A, B 및 C의 3개의 명확한 면역원성 도메인을 제시하는 형태학상 에피토프에 특이적인 형태 의존성 인간 mAb 패널은 스티븐 펑(Steven Fong) 박사로부터 구하였다[Keck와 다수, 2004].

[0228] E1E2 슈도타이핑된 HIV-1 입자 도입 검정법

[0229] 이중 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 코어 입자에 의한 기능성 HCV 외피 당단백질의 통합 및 디스플레이(슈도타이핑(pseudotyping)이라 칭함)를 통하여, 전장 HCV 게놈에 돌연 변이를 도입하지 않고서도 돌연 변이 E1E2 당단백질을 특성 규명하는, 비교적 신속하고 간편한 방법을 제공할 수 있다[Drummer와 다수, 2003, Bartosch와 다수, 2003b~2003a, Drummer와 다수, 2003]. 이 기법은, E1E2 발현 벡터와, 원래의 외피 유전자가 결여되어 있으며, 리포터 구조물을 함유하는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 발현 벡터를 함께 형질 감염시키는 단계를 포함한다(도 23). 바이러스 코어 단백질이 세포 내에서 조립됨에 따라서, 바이러스는 원형질막으로부터 발아되는 방식으로 외피를 얻게 되고, 바이러스의 원래의 외피 복합체 대신에, 바이러스는 세포 표면에 존재하는 HCV 외피 당단백질을 통합하게 된다. 이와 같은 E1E2-슈도타이핑된 입자(HCVpp)는 E1E2-매개 감염 및 복제 과정을 1회 진행할 수 있으며, 감염된 세포 내 리포터 유전자의 활성을 측정함으로써 이 과정이 진행되었는지 여부를 정량할 수 있다. 이 연구를 수행함에 있어서, 인간의 면역 결핍 바이러스(HIV-1) 반딧불이 루시퍼라제 벡터인 HIV-1 NL4-3.LUC.R⁺E [He and Landau et al., 1995]를 사용하여, 전술한 바와 같이, Huh7 세포를 감염하는데 사용될 E1E2-슈도타이핑된 바이러스를 생산하였다[Drummer와 다수, 2003].

[0230] 293T 세포를 6-웰 배양 접시(Nalge Nunc) 내에 350,000 세포/웰의 밀도로 접종하고, 이 세포를 1 μ g의 NL4-3.LUC.R⁻E와, pE1E2H77c(야생형), p Δ HVR E1E2 또는 공 pCDNA4HisMax 벡터(음성 대조군) 중 어느 하나(1 μ g)로 공동 형질 감염시켰다. 3일 동안 항온 처리한 후, E1E2-슈도타이핑된 HIV-1 입자를 함유하는 조직 배양액을 수집하고, 미니사르트(Minisart) 0.45 μ m 시린지형 멸균 필터(Sartorius, Goettingen Germany)를 사용하여 여과하였다. 이후, 여과된 생성물을 사용하여, 48웰 배양 평판(Nalge Nunc) 내 30,000 세포/웰의 밀도로 접종하였던 Huh7 세포를 3회 감염시켰다. 37℃에서 4시간 동안 항온 처리한 다음, 접종물을 제거하고, 이 세포를 DMF10 중에서 3일 더 배양한 후, 세포 배양 용해 시약(Promega, Madison, WI, USA)으로 용해하였다. 세포 용해물로부터 세포 파편을 제거하여 투명하게 한 다음, 이를 백색의 96-웰 평판(BMG Labtech, Offenburg, Germany)에 옮겨서, 스테디-글로(Steady-Glo) 루시퍼라제 시약 시스템(Promega) 및 플루오스타(BMG Labtech)(발광 광학 단위에 맞춤)를 사용하여 루시퍼라제 활성을 분석하였다. 3회 감염시의 평균 루시퍼라제 활성(상대적 광 단위)를 계산하고, 이로부터 표준 편차를 계산하였다.

[0231] 방사성 면역 침전법(RIP)

[0232] 방사성 표지화

[0233] 세포 내 E1E2 생합성에 있어서 가변부의 역할을 분석하기 위하여, 6-웰 배양 접시(Nalge Nunc)에 500,000 세포/웰의 밀도로 접종한 293T 세포를, 2 μ g의 pE1E2(야생형), 하나 이상의 가변부 결실을 포함하는 pE1E2 또는 공 pCDNA4 벡터(음성 대조군)으로 형질 감염시켰다. 형질 감염시킨 후 24시간 경과시, 세포를 37℃에서 30분 동안, L-시스테인 및 L-메티오닌 결핍 DMF 10:DMEM(MP Biomedicals), 10% (v/v) 열 불활성화 소 태아 혈청(Invitrogen) 및 2mM L-글루타민(GE Healthcare) 중에서, 150 μ Ci Trans-³⁵S-표지/웰(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)로 맥동적 추적 대사 표지화하였다. 이후, 상기 세포들을 DMF10(37℃) 중에서 4시간 동안 추적한 다음, 이를 PBS 중에서 세척하고, 다시 RIP 용해 완충액(0.6 M KCl, 0.05 M Tris pH 7.4, 1mM EDTA, 0.02% 소듐 아지드, 1% Triton X-100) 중에서 용해하였다. 냉장 벤치-탑 원심 분리기(Heraeus, Hanau, Germany)(4℃, 10분) 내에서 원심 분리하여 잔류하고 있던 세포 파편들을 제거하여, 세포 용해물을 투명하게 하였다.

[0234] 성숙한 E1E2 이중 이량체를 슈도타이핑된 HIV-1 입자에 통합된 상태로 증폭시키기 위하여, 6-웰 배양 접시 내에 350,000 세포/웰의 밀도로 접종된 293T 세포를 1 μ g의 pNL4-3.LUC.R⁻E 및, pE1E2(야생형), 하나 이상의 가변부 결실을 포함하는 pE1E2 또는 공 pCDNA4 벡터(음성 대조군) 중 어느 하나(1 μ g)로 형질 감염시켰다. 형질 감염시킨 후 24시간 경과시, 37℃에서 16시간 동안, L-시스테인 및 L-메티오닌 결핍 DMF10 중에서 75 μ Ci Trans-³⁵S-표지/웰(Santa Cruz Biotechnology)로, 세포를 대사 표지화하였다. 이후, 조직 배양액을 수집하고, 이를 미니사르트 0.2 μ m 시린지형 필터(Sartorius)를 통하여 여과한 다음, 벡만(Beckman) L-90 한외 원심 분리기(SW41 로터, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)를 사용하여 25,000xg에서 2시간 동안 원심 분리하여(4℃), 수크로스 구배(PBS 중 25% 수크로스(v/v))를 통해 비리온을 증식시켰다. 상청액을 제거한 다음, RIP 용해 완충액 중에서 비리온을 용해하였다.

[0235] E2 수용체 결합 도메인(E2 RBD_{661myc})에 존재하는 가변부들의 역할을 규명하기 위하여, 6-웰 배양 접시(Nalge Nunc) 내 350,000 세포/웰의 밀도로 접종된 대사 표지화 293T 세포에, 2 μ g의 E2-myc(야생형), 하나 이상의 가변부 결실을 포함하는 E2-myc 또는 공 pCDNA3 벡터(음성 대조군)을 형질 감염시켰다. 형질 감염시키고 6시간 경과 후, 37℃에서 1시간 동안, 75 μ Ci Trans-³⁵S-표지/웰(Santa Cruz Biotechnology)로 세포를 맥동적 추적 대사 표지화하고, 이를 OptiMEM 혈청 환원 배지(Invitrogen) 중에서 16시간 동안 추적하여, 분리된 단백질을 추적시켰다. 이후, 이 조직 배양액을 수집하여, 이를 RIP 용해 완충액 중에서 용해한 다음, 40℃ 및 10,000 xg에서 원심 분리하여 상기 완충액을 투명하게 하였다. 세포 단일층은 PBS 중에서 세척하였으며, 이를 RIP 용해 완충액 중에서 용해하고, 진술한 바와 같이 투명하게 하였다.

[0236] 면역 침전법

[0237] 형태 감수성 기술로서 방사성 면역 침전법을 사용하여, 단백질의 발현에 대해 분석하였다. 상기 모든 단백질 제제들을, 관련 항체의 존재 하에서 BSA(Sigma)와 커플링된 세파로스(GE Healthcare)를 사용하여 예비적으로 투명하게 하였다(16시간, 4℃). 상기 BSA-세파로스를 8,000xg에서 10분 동안 펠릿화하여, 비 특이적 단백질 층을 제거하였다. 이후, RIP 용해 완충액 중에서 30%(v/v) 단백질-G 세파로스(GE Healthcare)를 사용하여 항체-결합 단백질을 함유하는 상청액을 침전시킨 다음(1시간, 실온), 진술한 바와 같이 원심 분리시켜 분리하고, 다시 RIP

세척 완충액(0.5 M NaCl, 0.05 M Tris pH 7.4, 1mM EDTA, 0.02% 소듐 아지드 및 1% Triton-X 100) 중에서 3회 세척하고, 다시 PBS중에서 1회 세척하였다.

[0238] SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동(SDS-PAGE) 단백질 분리 및 분석

[0239] 면역 침전물 전부를 시료 로딩 완충액(0.5M Tris pH 6.8, 5%(v/v) SDS, 10%(v/v) 글리세롤, 0.05%(w/v) 브로모페놀 블루) 중에 재 현탁하였다. 환원 조건(3%(v/v) β-머캅토에탄올 포함) 또는 비환원 조건(β-머캅토에탄올 부재) 하에서 세포 내 용해물을 전개시켜, 앞서 관찰한 바와 같이, 다량의 세포 내 공유 결합 E1E2 응집물 내에서 비 공유 결합 E1E2 화학종을 동정하였다[Dubuisson외 다수, 1994]. 바이러스 용해물 중 대사 표지화된 비리온-통합 E1E2를 비환원 조건 하에서 전개하였으며, 또한 환원 조건 하에서 HIV-1 구조 단백질도 전개하였다. 모든 시료를 100℃에서 5분 동안 변성시킨 후, 이를 미니프로틴(Miniprotean) II SDS-PAGE 시스템(BioRad)을 사용하는, 10~15%의 SDS-PAGE 폴리아크릴아미드 구배 겔 상에서 분리하였다(다만, IgG14 시료는 7.5~15% 구배 하에서 분리함)(예비적으로 염색한 광범위 단백질 마커(BioRad)를 기준으로 함). 100V, 23mA 및 1시간 30분 동안 1× 전극 완충액(0.2M Tris-HCl 및 2M 글리신) 중에서 전기 영동을 수행하였다. 이후, SDS-PAGE 겔을 10%(v/v) 아세트산 및 10%(v/v) 메탄올 중에 침지시켜, 이 시료를 고정하고, 진공 슬랩-겔 건조기(Hoefer Scientific, San Francisco, CA, USA)를 사용하여 80℃에서 건조시켰다. 광범위한 마커의 위치를 ³⁵S-Trans 표지(Santa Cruz Biotechnology)로 마킹한 다음, FLA-2000 방사성 영상화기 및 소프트웨어(Fuji Film, Tokyo, Japan)를 사용하여 단백질을 분석 및 정량하였다.

[0240] 고상 CD81-LEL 결합 검정법

[0241] CD81의 대형 세포 외 루프가, E2 당단백질 결합을 매개하는데 충분하고[Pileri외 다수, 1998, Petracca외 다수, 2000, Pileri외 다수, 1998], E2 상호 작용 위치를 형성하는 잔기들을 모두 함유하며, E2 상호 작용 위치를 형성하는 잔기들을 전부 함유한다는 사실을 입증하였다[Drummer외 다수, 2002]. 그러므로, 가변부 결실 돌연 변이체에서 CD81-LEL 결합 능력에 대해 신속하게 스크리닝하기 위하여, 본 발명자들은, 전술한 바와 같이, CD81 대형 세포 외 루프의 113~201번 잔기들에 결합된 말토스-결합 단백질(MBP)로 이루어진 키메라(MBP-LEL)를 사용하여, 고상 결합 검정법을 수행하였다[Drummer외 다수, 2002].

[0242] 간단히 말해서, 96-웰 맥시소브 효소 결합 면역 흡착 평판(Nalge Nunc)을, PBS 중 5μg/ml의 이량체 CD81 MBP-LEL로 코팅하고, 이를 4℃에서 16시간 동안 항온 처리하였다. 상기 MBP-LEL을 제거한 다음, 이를 BSA₁₀PBS(PBS 중 10mg/mL BSA(Sigma))와 함께 2시간 동안 37℃에서 차단하여, 비 특이적 결합을 감소시켰다. 이후 평판을 PBST(PBS 중 0.05% Tween-20(Sigma)) 중에서 4회 세척한 다음, BSA₅PBST(PBST 중 5mg/mL BSA) 중 2배 연속 희석액에 단백질 용해 제제 전부를 12회 첨가하였다. 평판을 실온에서 2시간 동안 항온 처리한 다음, 이를 다시 세척하고, 1시간 동안 형태 의존성 항-E2 모노클로날 항체 H53(BSA₅PBST 중 1:1000배 희석)을 사용하여, 결합되어 있던 E2에 대하여 프로빙하였다. PBST 중에서 더 세척한 다음, 제조자의 지침에 따라서, 토끼 항-마우스 면역 글로불린-호오스래디쉬 퍼옥시다제 접합체(DAKO)(BSA₅PBS/Tween 중 1:1000 희석)를 사용하여, 항체-결합된 E2 복합체를 검출하고, 테트라메틸벤지딘 기질(Sigma)과 함께 전개하였다. 결과로 얻어진 흡광도 수치(광학 밀도)를, 플루오스타(BMG technologies) 상에, 450~620nm(백 그라운드)에서 판독하였다. 이후, 형태 의존성 항체인 H53에 의해 확인된 데이터를 단량체 E2에 대해 정규화하고, 상기한 바와 같이 가시화 및 정량하였다.

[0243] E2^{myc}-CD81 세포 표면-결합 검정법

[0244] CHO-K1 세포를 12-웰 배양 평판에 1.25×10^5 세포/웰의 밀도로 접종하고, 24시간 경과시 이를 2μg의 pcDNA3-CD81으로 형질 감염시켰다. 형질 감염 후 48시간 경과시, 상기 CD81 형질 감염 CHO-K1 세포를 얼음 상에서 냉각시키고, 이를 야생형 또는 가변부 결실을 포함하는 E2-myc 단백질의 BSA₁₀PBS 중 연속 희석액과 함께 항온 처리하였다(얼음 상, 4시간). 이후, 상기 세포를 BSA₁₀PBS 중에서 2회 세척한 다음, 10^7 개의 CHO-K1 세포를 사용하여 사전 투명한 ¹²⁵I-Mab 9E10(10^6 cpm)과 함께 1시간 동안 항온 처리하였다. BSA₁₀PBS로 4회 더 세척한 다음, 상기 세포를 PBS 중 1% SDS 중에서 용해하고, 팩커드 오토-감마 카운터(Packard Auto-Gamma counter) 내에서 측정하였다.

표 1a

E1E2 다단백질과 myc 에피토프 태그를 포함하는 E2 수용체-결합 도메인 구조물(E2-myc)에 가변부 결실이 발생한 구조물로부터 얻어진 결과 요약

다단백질 돌연 변이체	결실	이중 이량체화 ¹		H53 인자	CD81-LEL 결합 ²	이중 이량체화 ¹		H53 인자	CD81-LEL 결합 ²	바이리스 도입 ³		CD81-LEL 결합 ²
		이중 이량체화 ¹ 세포내	세포외			이중 이량체화 ¹ 세포내	세포외			E1E2	E1E2	
pE1E2	야생형	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pE1E2 Δ1	HVR1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
pE1E2 Δ1con	HVR1 + 보존 부위	+	+	+	-	+	+	감소	-	-	-	-
pE1E2 Δ2	HVR2	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
pE1E2 Δ3	igVR	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
pE1E2 Δ1 conlink	HVR1 + 보존 부위 (연장된 링커 포함)	+	+	+	+	+	+	감소	-	-	-	-
pE1E2 Δ2 link	HVR2 (연장된 링커 포함)	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
pE1E2 Δ3 link	igVR (연장된 링커 포함)	+	+	+	+	+	+	+	+	+/	+/	+
pE1E2 Δ12	HVR1 및 2	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
pE1E2 Δ13	HVR1 및 igVR	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
pE1E2 Δ23	HVR2 + igVR	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
pE1E2 Δ123	HVR1, HVR2 +igVR	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	++

표 1b

E2 RBD 돌연변이체		세포내 E2 RBD _{Ka1myc}			분비된 E2 RBD _{Ka1myc}		
		+	+	+	+	+	+
E2-myc	아생형						+
E2 Δ1-myc	HVR1			++		+	++
E2 Δ1con- myc	HVR1 + 보존 부위			-		+	-
E2 Δ2-myc	HVR2			+/		+	+
E2 Δ3-myc	IgVR			+/		+	+
E2 Δ12-myc	HVR1 및 2			+/		+	-
E2 Δ13-myc	HVR1 및 IgVR			+		++	++
E2 Δ23-myc	HVR2 + IgVR			+		+	+
E2 Δ123-myc	HVR1, HVR2 + IgVR			++		+	+

1. +는 이량체화 수준이 아생형 E1E2의 이량체화 수준과 유사하였음을 나타냄.
 -는 이량체화가 확인되지 않았음을 나타냄.
 +/-는 이량체화 수준이 아생형 E1E2의 이량체화 수준에 비하여 감소하였음을 나타냄.
2. +는 CD81-LEL 결합 수준이 아생형 E1E2의 CD81-LEL 결합 수준과 유사하였음을 나타냄.
 -는 CD81-LEL 결합이 확인되지 않았음을 나타냄.
 +/-는 CD81-LEL 결합 수준이 아생형 E1E2의 CD81-LEL 결합 수준에 비하여 감소하였음을 나타냄.
3. +는 아생형에 비하여 결합 수준이 증가하였음을 나타냄.
 +는 바이러스 도입 수준이 아생형 E1E2일 때와 유사하였음을 나타냄.
 -는 바이러스 도입이 검출 가능한 만큼 관찰되지 않았음을 나타냄.
 +/-는 부분적 도입을 나타냄.

표 2

링커 서열을 포함하는 변형 단일 가변부 결실을 HCV E1E2 다단백질에 도입하는데 사용된
증폭 연장 PCR 기술 요약

pE1E2 구조물	주형 배터	제1라운드 PCR 생산물	외부 프라이머	내부 프라이머	RE 위치	에피토프 태그	PCR 생산물 (bp)	삽입부 크기 (bp)	MW (Da)
pE1E2 Δ1onlylink	pE1E2H7c	5'	5' ggg gga att cgg gca aca ggg aac ctt cct ggg 3'	5' gct ttc att gca att cca ggc cgt GCC GCT ACT ACC ggg ttc cgc ggc ggc 3'	EcoR I	무	716	1583	36482
	pE1E2H7c	3'	5' cgg tca agg tta cgc ctc cgc tgg gga tat ggg 3'	5' GGT AGT AGC GGC aag ggc tgg att tgc aat gga agc ctt aac aac 3'	XbaI	무	993		
pE1E2 Δ2 link	pE1E2H7c	5'	5' ggg gga att cgg gca aca ggg aac ctt cct ggg 3'	5' gga ggc cca gca gaa ggg GCC GCT ACT ACC aag ggc tgg gca gct ggc ca aac ctt ctt 3'	EcoR I	무	938	1614	38071
	pE1E2H7c	3'	5' cgg tca agg tta cgc ctc cgc tgg gga tat ggg 3'	5' GGT AGT AGC GGC ccc ttc tgc tgg cac tac ctt cca aga ctt tgc ggc 3'	XbaI	무	816		
pE1E2 Δ3 link	pE1E2H7c	3'	5' ggg gga att cgg gca aca ggg aac ctt cct ggg 3'	5' gca atc agt ggg gca ggc cca GCC GCT ACT ACC gaa ggc aca agg ggg cgc tcc gca ccc 3'	XbaI	무	1268	1656	39693
	pE1E2H7c	3'	5' cgg tca agg tta cgc ctc cgc tgg gga tat ggg 3'	5' GGT AGT AGC GGC tgg ctc tgc ccc aac gaa tgc ttc cgc 3'	XbaI	무	531		

대문자 및 밑줄 친 프라이머 서열은 각각 도입된 Gly-Ser-Ser-Gly 링커 모티프와 제한 엔도뉴클레아제 위치를 나타냄.

다수의 가변부 결실을 HCV E1E2 다단백질에 도입하는 데 사용된 증폭 연장 PCR 기술 요약

pIE2 구조물	주형 벡터	제1라운드 PCR 생성물	외부 프라이머	내부 프라이머	RE 위치	에피토프 태그	PCR 생성물 (bp)	삽입부 크기 (bp)	MW (Da)
pIE2 A12	pIE2 A2	5'	5' <u>ggg gga att cgg gca aca ggg aac ctt ctt ggc 3'</u>	5' <u>tgg gat cgg gcc gct act- acc ggg ttc cgc tgc gac 3'</u>	EcoRI	무	704	1545	35 697
	pIE2 A2	3'	5' <u>cgg tca aga tta cgc ctc cgc tgg gga tat ggg 3'</u>	5' <u>ggt agt agc gcc cag aac atc caa ctc atc aac acc 3'</u>	XbaI	무	981		
pIE2 A13	pIE2 A3	5'	5' <u>ggg gga att cgg gca aca ggg aac ctt ctt ggc 3'</u>	5' <u>tgg gat cgg gcc gct act- acc ggg ttc cgc tgc gac 3'</u>	EcoRI	무	704	1590	37 566
	pIE2 A3	3'	5' <u>cgg tca aga tta cgc ctc cgc tgg gga tat ggg 3'</u>	5' <u>ggt agt agc gcc cag aac atc caa ctc atc aac acc 3'</u>	XbaI	무	1041		
pIE2 A23	pIE2 A3	5'	5' <u>ggg gga att cgg gca aca ggg aac ctt ctt cgg 3'</u>	5' <u>gta ggc caa gca gcc gct act- acc ggc cgt ggc caa ctt ctc 3'</u>	EcoRI	무	932	1578	36 651
	pIE2 A3	3'	5' <u>cgg tca aga tta cgc ctc cgc tgg gga tat ggg 3'</u>	5' <u>ggt agt agc gcc tgc tgg cac tta ctt caa aga ctt tgg ggc 3'</u>	XbaI	무	810		
pIE2 A123	pIE2 A12	5'	5' <u>ggg gga att cgg gca aca ggg aac ctt ctt ggc 3'</u>	5' <u>gaa atc agt ggg gca gcc gct- act acc aac agt ggg cgc tta gaa caa 3'</u>	EcoRI	무	1256	1524	34 962
	pIE2 A12	3'	5' <u>cgg tca aga tta cgc ctc cgc tgg gga tat ggg 3'</u>	5' <u>ggt agt agc gcc tgc ccc aat gat tgc ttc cgc 3'</u>	XbaI	무	525		

대문자 및 밑줄 친 프라이머 서열은 각각 도입된 Gly-Ser-Ser-Gly 링커 모티프와 제한 엔도뉴클레아제 위치를 나타냄.

표 4

단일 및 다수의 가변부 결실을 E2 수용체-결합 도메인(384-661번 잔기)에 도입하는데 사용된 표준 PCR 기술 요약

E2- 구조물	주형 벡터	외부 센스 프라이머	외부 안티센스 프라이머	RE 위치	에피토프 삽입 부 태그	크기 (bp)	MW (Da)
E2 Δ1cont-myc	pE1E2 Δ1cont	5' cca gct acc gaa acc cac cgc agc agc ggc 3'	5' cag tca tga cta att cag acc ctc ttc tga gaa gaa tt tgg ttc agt acc ctc gga cct gtc cct ggc 3'	NheI/XbaI	myc	783	29,385
E2 Δ1-myc	pE1E2 Δ1	5' cca gct acc gaa acc cac cgc agc agc ggc 3'	5' cag tca tga cta att cag acc ctc ttc tga gaa gaa tt tgg ttc agt acc ctc gga cct gtc cct ggc 3'	NheI/XbaI	myc	843	31,623
E2 Δ2-myc	pE1E2 Δ2	5' cca gct acc gaa acc cac cgc agc agc ggc 3'	5' cag tca tga cta att cag acc ctc ttc tga gaa gaa tt tgg ttc agt acc ctc gga cct gtc cct ggc 3'	NheI/XbaI	myc	831	31,282
E2 Δ3-myc	pE1E2 Δ3	5' cca gct acc gaa acc cac cgc agc agc ggc 3'	5' cag tca tga cta att cag acc ctc ttc tga gaa gaa tt tgg ttc agt acc ctc gga cct gtc cct ggc 3'	NheI/XbaI	myc	876	33,139
E2 Δ12-myc	pE1E2 Δ12	5' cca gct acc gaa acc cac cgc agc agc ggc 3'	5' cag tca tga cta att cag acc ctc ttc tga gaa gaa tt tgg ttc agt acc ctc gga cct gtc cct ggc 3'	NheI/XbaI	myc	777	28,865
E2 Δ13-myc	pE1E2 Δ13	5' cca gct acc gaa acc cac cgc agc agc ggc 3'	5' cag tca tga cta att cag acc ctc ttc tga gaa gaa tt tgg ttc agt acc ctc gga cct gtc cct ggc 3'	NheI/XbaI	myc	822	30,624
E2 Δ23-myc	pE1E2 Δ23	5' cca gct acc gaa acc cac cgc agc agc ggc 3'	5' cag tca tga cta att cag acc ctc ttc tga gaa gaa tt tgg ttc agt acc ctc gga cct gtc cct ggc 3'	NheI/XbaI	myc	811	30,381
E2 Δ123-myc	pE1E2 Δ123	5' cca gct acc gaa acc cac cgc agc agc ggc 3'	5' cag tca tga cta att cag acc ctc ttc tga gaa gaa tt tgg ttc agt acc ctc gga cct gtc cct ggc 3'	NheI/XbaI	myc	756	27,964

밑줄친 프라이머 서열은 도입된 제한 엔도뉴클레아제 위치를 나타냄.

표 5

단일 가변부 결실을 HCV E1E2 다단백질에 도입하는데 사용된 증폭 연장 PCR 기술 요약

pE1E2 구조물	주형 벡터	제1라운드 PCR 생산물	외부 프라이머	내부 프라이머	RR 위치	에피토폭스 태그	PCR 생산물 (bp)	삽입부 크기 (bp)	MW (Da)
pE1E2 A1com	pE1E2H77c	5'	5' <u>ggg gga att cgg gca aca ggg aac ctt</u> cct ggc 3'	5' <u>gct ttc att gca gcc gct act acc</u> ggg ggc ttc cgc ggc gac 3'	EcoRI	무	704	1551	36 083
	pE1E2H77c	3'	5' <u>cag tct agc tta cgc ctc cgc ttg gga tat</u> ggg 3'	5' <u>ggt act agc gcc tgc aat gaa</u> agc ctt aac acc 3'	XbaI	무	981		
pE1E2 A1	pE1E2H77c	5'	5' <u>ggg gga att cgg gca aca ggg aac ctt</u> cct ggc 3'	5' <u>tgg gat ggt cgg gcc gct act acc</u> ggg ggc ttc cgc ggc gac 3'	EcoRI	무	704	1611	38 301
	pE1E2H77c	3'	5' <u>cag tct agc tta cgc ctc cgc ttg gga tat</u> ggg 3'	5' <u>ggt act agc gcc tgc aat gaa</u> cga ctt aac acc 3'	XbaI	무	1041		
pE1E2 A2	pE1E2H77c	5'	5' <u>ggg gga att cgg gca aca ggg aac ctt</u> cct ggc 3'	5' <u>ggt ggt cca gca gcc gct act</u> acc gca gct ggc cca cct ctc 3'	EcoRI	무	932	1599	37 386
	pE1E2H77c	3'	5' <u>cag tct agc tta cgc ctc cgc ttg gga tat</u> ggg 3'	5' <u>ggt act agc gcc tgc tgg cac</u> acc aca agg ggg cgc ttc gca cgc 3'	XbaI	무	810		
pE1E2 A3	pE1E2H77c	5'	5' <u>ggg gga att cgg gca aca ggg aac ctt</u> cct ggc 3'	5' <u>ggt act agc gcc tgc tgg cac</u> acc aca agg ggg cgc ttc gca cgc 3'	EcoRI	무	1256	1644	39 255
	pE1E2H77c	3'	5' <u>cag tct agc tta cgc ctc cgc ttg gga tat</u> ggg 3'	5' <u>ggt act agc gcc tgc ttc ctc act</u> gat tgc ttc cgc 3'	XbaI	무	523		

대분자 및 밀출된 올리고뉴클레오타이드 서열은 각각 도입된 Gly-Ser-Gly 링커 모티프와 제한 엔도뉴클레아제 위치를 나타냄.

표 6

증폭 효소 연쇄 반응(PCR) 증폭 반응 조건

중복: 제1 라운드 95℃ 2 분 "92℃ 30초 65℃ 30초 72℃ 2 분" (29회) 72℃ 10분	표준 95℃ 2 분 "92℃ 30초 55℃ 30초 72℃ 2 분" (29회) 72℃ 10분
중복: 제2 라운드 95℃ 2 분 "92℃ 30초 55℃ 30초 72℃ 4 분" (29회) 72℃ 10분	콜로니 94℃ 2 분 "94℃ 30초 55℃ 30초 72℃ 1 분" (29회) 72℃ 10분
	서열 결정 96℃ 1 분 "96℃ 20초 50℃ 15초 60℃ 4 분" (29회) 4℃ 10분

실시예 2

1. HCV-감염 개체로부터 생성된 혈청 패널로 프로빙된 E2-myc 및 E1Δ123-myc의 항원 구조

HCV-감염 개체로부터 생성된 혈청 패널을 사용하여, 생합성 표지화 E2-myc 및 E2 Δ123-myc의 전체적인 항원 프로필을 비교하였다(면역 침전법에 의함). 전술한 바와 같이[Gro11o와 다수, 2006], 상기 혈청을 H77c E1E2 슈도 타이핑된 레트로바이러스 입자에 대한 중화 항체의 존재 여부에 대해 스크리닝하였으며, 이 경우, 50% 중화 역가는 0~1,600이었다(도 24의 하부 패널). E2-myc의 항체 반응성 패턴(도 24, 상부 패널)은 E2 Δ123-myc의 항체 반응성 패턴(도 24, 중간 패널)과 거의 동일하였는데, 이는 곧, 2개의 단백질의 전체적인 항원 구조가 유사함을 말해주는 것이다.

2. E2-myc 야생형 및 변이체 단백질의 CD81 결합 특성

분비된 E2-myc 단백질이, HCV의 세포성 수용체 CD81의 대형 세포 외 루프(LEL)와 상호 작용하는 능력을 관찰하였다. 이 검정법에서는, CD81-E2-myc 결합 여부는 형태 의존성 E2 모노클로날 항체(H53)를 사용하여 ELISA(CD81의 대형 세포 외 루프(113~201번 잔기; "CD81-LEL")에 융합된 고상 말토스 결합 단백질 이용)를 통해 검출하였다. 가변부가 하나 이상 결실된 E2-myc 단백질의 CD81-LEL 결합 수준은 원래의 수준과 같았는데, 이는 곧, E2의 전반적인 폴딩은 결실에 의해 검출 가능할 정도로 영향받지 않음을 말해주는 것이다(도 15의 A 및 B). 이와는 대조적으로, LEL 결합 위치 돌연 변이(L441M)를 포함하는 E2 L441M-myc 단백질과, CD81-LEL 사이에는 결합이 일어나지 않았는데, 이는, 결합 검정법의 특이성을 확인시켜주는 것이다(도 25의 A).

3. E2-myc 야생형 및 변이체 단백질이, CHO-K1 세포 내에서 발현된 전장 CD81과 상호 작용하는 능력

전술한 바와 같이, 전장 CD81 발현 벡터로 형질 감염된 CHO-K1 세포를 이용하는 세포 표면 결합 검정법에 의해, E2-myc 단백질이 전장 CD81 수용체와 상호 작용하는 능력을 측정하였다[Drummer와 다수, 2002]. 분비된 E2-myc 야생형 및 변이체 단백질을 연속적으로 희석시키고, 이를 CD81-형질 감염된 CHO-K1 세포와 함께 얼음 상에서 항온 처리하였다. 세척한 다음, ¹²⁵I-표지화 모노클로날 항체 9E10(즉, C-말단 c-myc 에피토프 태그에 대해 유도됨)을 사용하여, 결합하고 있던 E2-myc 단백질을 검출하였다. L441M CD81 결합 위치 돌연 변이를 포함하는

E2 L441M-myc으로 인하여, 야생형 CD81-형질 감염 CHO-K1 세포와 결합하는 특성을 잃었으므로, 본 검정법의 특이성을 확인하였다(도 26의 A).

[0259] 도 26의 A와 B에 나타난 결과를 통하여, E2-myc, E2 Δ 23-myc, E2 Δ 13-myc 및 E2 Δ 123-myc는 CD81 결합 특성이 유사한 반면에, HVR1 + HVR2(E2 Δ 12-myc)이 결실된 경우에는, E2 Δ 23-myc($p < 0.035$)에 비하여 CD81 결합 특성이 약 50% 감소하였음을 알 수 있다. 이와는 반대로, (E2-myc의 결합 곡선과 동일한 결합 곡선을 나타내는) E2 Δ 13-myc 및 E2 Δ 123-myc의 CD81 결합 능력은 거의 동일하였는데($p = 0.62$), 이로써, HVR1과 HVR2가 E2 Δ 12-myc에 존재하지 않을 때 igVR이 존재하면 CD81 결합 기능이 제대로 발휘되지 못하는 것을 알 수 있었다. 비록 HVR1, HVR2 그리고 igVR이 E2 RBD₆₆₁의 코어 폴딩 특성에 필요한 것은 아니지만, 이 데이터는 igVR과 HVR1 및 HVR2 중 어느 하나 또는 둘 다 사이에서 일어나는, 기능상의 상호 작용을 설명해주는 데, 즉, CD81 결합 위치는 적당히 형성되거나 완전히 수용체에 접근할 수 있음을 말해주는 것이다.

[0260] 하나 및 다수의 결실이 일어난 E2-myc 구조물에 있어서 재조합 CD81-LEL과의 결합 특성이 변한다는 사실은 확인되지 않았지만(도 25의 A 및 B), 표면-노출 CD81과의 결합에 있어서의 차이점은 관찰되었는데(도 26의 A 및 B), 이는 아마도, 상기 E2-myc 구조물이 분리된 상태로 발현되었을 때와 원래의 테트라스파닌의 형태로 발현될 때 LEL 구조에 미묘한 차이가 생긴다는 것을 말해주는 것일 것이다.

[0261] 4. 재료 및 방법

[0262] 중화 검정법

[0263] 면역 혈청 및 대조군 인간 혈청이, HCV 당단백질-슈도타이핑된 HIV-1 루시퍼라제 리포터 바이러스에 의한 감염의 1 주기를 중화하는 능력을 다음과 같이 측정하였다. HEK-293T 단일층(6-웰 배양 접시의 웰 당 350,000개 세포)에 pE1E2 및 pNL4.3LUC.RE⁻ 플라스미드를 공동 형질 감염시켜, HCV 당단백질-슈도타이핑된 HIV-1 루시퍼라제 리포터 바이러스를 제조하였다(Drummer와 다수, 2003). 5% CO₂를 포함하는 가습 대기 중에서 3일 동안 항온 처리(37°C)한 다음, 배양 상청액을 0.45 μ m 멸균 시린지형 필터(Sartorius)로 여과하였다. 열-불활성화 면역 혈청과 대조군 인간 혈청의 연속 희석액을 HCV 당단백질-슈도타이핑된 HIV-1 루시퍼라제 리포터 바이러스와 함께 예비 항온 처리한 후(1시간), 48-웰 조직 배양 평판 내 4개의 Huh7 세포 단일층에 가하였다. 4시간 동안 항온 처리한 후(37°C, 5% CO₂), 세포를 PBS로 세척한 다음, 배지를 신선한 것으로 교체하였다. 3일 더 항온 처리(37°C, 5% CO₂)한 다음, 세포를 용해시키고, 이 용해물을 원심 분리시켜 투명하게 한 다음, 발광 광학 단위로 맞춘 플루오스타(BMG) 내에서 루시퍼라제 활성(Promega)에 대해 검정하였다. 혈청 희석 시와 같이 각 혈청의 중화 역가를 측정한 결과, 배지만을 넣고 예비 항온 처리한 HCV 당단백질-슈도타이핑된 HIV-1 루시퍼라제 리포터 바이러스에 비하여 50% 중화하였음을 알 수 있었다.

[0264] 방사성 면역 침전법

[0265] 6-웰 배양 접시 내에 500,000 세포/웰의 밀도로 접종한 293T 세포를, E2-myc 발현 벡터로 형질 감염시켰다(퓨젠 6(Roche) 사용). 형질 감염 후 24시간 경과시, L-시스테인 및 L-메티오닌 결핍 DMF10(DMEM [MP Biomedicals], 10%(v/v) 열-불활성화 소 태아 혈청[Invitrogen] 및 2mM L-글루타민[GE Healthcare]) 중에서, 상기 세포를 웰 당 150 μ Ci 트랜스-³⁵S-표지(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)가 되도록 표지화하였다. 세포 상청액을 수집한 다음, 표지화된 분비 단백질을 0.6 M KCl, 0.05 M Tris pH 7.4, 1mM EDTA, 0.02% 소듐 아지드, 1% Triton X-100로 조정하고, 관련 항체의 존재 하에서, 16시간 동안, BSA(Sigma)에 커플링된 CNBr-활성화 세파로스(GE Healthcare)로 예비 투명 처리하였다(4°C). 이후, 30%(v/v) 단백질-G 세파로스(GE Healthcare)를 사용하여, 투명 처리된 상청액 내에 존재하는 항체-항원 복합체를 면역 침전시킨 다음, RIP 세척 완충액(0.5M NaCl, 0.05M Tris pH 7.4, 1mM EDTA, 0.02% 소듐 아지드 및 1% Triton-X100) 중에서 3회 세척하고, 다시 PBS 중에서 1회 세척하였다. 면역 침전된 단백질을 대상으로 하여, 비환원 조건 하에 10~15%의 폴리아크릴아미드 구배 겔 내에서 SDS-PAGE를 수행한 다음, 방사성 영상화기로 스캔하여 가시화하였다.

[0266] E2-myc 단백질의 일시적 발현

[0267] 퓨젠 6(Roche)를 사용하여, HEK 293T 세포(6-웰 배양 평판의 웰 당 350,000개 세포)에 E2-myc 발현 벡터를 형질 감염시켰다. 형질 감염 후 8시간 경과시, 형질 감염 배지를 옵티멤(Optimem; Invitrogen)으로 교체하고, 5% CO₂를 함유하는 가습 대기 중에서 3일 동안 상기 세포를 항온 처리하였다(37°C). 상기 조직 배양액을 공극 크기 0.45 μ m인 필터를 통과시켜 투명하게 하고, 그 다음, 센트리콘 YM30 농축기(Centricon YM30 concentrators;

Amersham) 내에서 약 10배 농축하였다.

[0268] 제조합 CD81 대형 세포 외 루프(CD81-LEL) 결합 특성

[0269] 고상 효소 면역 검정법을 통하여, E2-myc 단백질이 HCV의 세포성 수용체인 CD81과 상호 작용하는 능력을 관찰하였다. 효소 면역 검정용 평판(Nunc Maxisorb®)을, CD81의 제조합 대형 세포 외 루프(113~201번 잔기)에 융합시킨 말토스 결합 단백질을 코팅하였다($5\mu\text{g}/\text{ml}$, PBS 중, 밤새도록, 4°C). 코팅 용액을 제거하고, 아무것도 결합하고 있지 않은 위치를, PBS 중 소 혈청 알부민($10\text{mg}/\text{ml}$)(BSA₁₀PBS)으로 차단하였다(실온, 1시간). 평판을 0.05% Tween 20을 함유하는 PBS(PBST)로 4회 세척하였다. 분비된 E2-myc 단백질을, 소 혈청 알부민 $5\text{mg}/\text{ml}$ 를 함유하는 PBS(BSA₅PBST) $50\mu\text{l}$ 중에 연속적으로 희석하고, 이를 2시간 동안 항온 처리하였다. E2 특이적 모노클로날 항체와, 호오스래디쉬 퍼옥시다제에 커플링된 토끼 항-마우스 면역 글로불린(Dako)을 사용하여, 결합하고 있던 E2-myc 단백질을 검출하였다. 염산테트라메틸벤지딘 기질을 사용하여 평판을 전개하고, 여기에 1M HCl을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 플루오스타 평판 판독기(BMG technologies) 내 450nm에서 흡광도 수치를 측정하고, 여기서 620nm에서의 백 그라운드 수치를 공제하였다.

[0270] CD81 결합 특성

[0271] CHO-K1 세포를 12-웰 배양 평판에 접종하고(1.25×10^5 세포/웰), 24시간 경과한 후 이를 $2\mu\text{g}$ 의 pcDNA3-CD81로 형질 감염시켰다. 형질 감염시킨 후 48시간 경과시, CD81이 형질 감염된 CHO-K1 세포를 얼음 상에서 냉각시키고, 야생형 E2-myc 또는 가변부 결실을 포함하는 E2-myc 단백질의 연속 희석액과 함께, BSA₁₀PBS 중에서 4시간 동안 항온 처리하였다(얼음 상 항온 처리). 이후, 상기 세포를 BSA₁₀PBS 중에서 2회 세척한 다음, 10^7 개의 CHO-K1 세포와 함께 얼음 상에서 2시간 동안 예비 투명 처리된 ^{125}I -MAb 9E10(10^6 cpm)과 함께 1시간 동안 항온 처리하였다. BSA₁₀PBS로 4회 더 세척한 후, 상기 세포를 PBS 중 1% SDS로 용해한 후, 팩커드 오토-감마 카운터에서 계수하였다.

[0272] 실시예 3

[0273] 1. 정제된 E2-his 야생형 및 변이체 단백질의 SDS-PAGE 분석

[0274] 환원 조건 하에서 SDS-PAGE를 수행하여, E2-his 야생형 및 변이체 단백질의 순도를 평가하였다. 도 27은 정제된 각각의 단백질 중에 대한 하나의 밴드를 나타내는 것이다. 각 단백질 중의 이동 속도는 가변부 결실이 몇 개 포함되어 있는지에 따라서 달랐다. 예를 들어, 3개의 가변부가 결여된 E2 Δ 123-his는 가장 빨리 이동하였다. E2에 당화가 일어났을 경우에는 단백질 밴드가 변진 상태로 나타났다.

[0275] 2. 정제된 E2-his 단백질의 블루-네이티브 PAGE(Blue-Native PAGE)

[0276] 블루 네이티브 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동을 이용하여, 정제된 E2-his 야생형 단백질 및 변이체 단백질의 올리고머화 상태를 분석하였다. 도 28은 단량체 및 이량체의 분자량에 해당하는 각각의 E2-his 단백질에 대한 2개의 주요 밴드를 나타내는 것이다.

[0277] 3. E2-his 단백질의 면역 검출

[0278] 웨스턴 블롯 분석법을 통하여, 비 형태 의존성 E2 특이 모노클로날 항체(H52)를 사용해서, 정제된 E2-his 야생형 단백질과 변이체 단백질을 검출하였다. 예측 분자량 위치까지 이동한 주요 단백질 종은, 각각의 E2-his 단백질 변이체인 것으로 확인되었다.

[0279] 4. E2-his 야생형 단백질 및 변이체 단백질의 CD81 결합 특성

[0280] 정제된 E2-his 단백질이, HCV의 세포성 수용체인 CD81의 대형 세포 외 루프(LEL)와 상호 작용하는 능력을 관찰하였다. 이 검정법에서는, CD81의 대형 세포 외 루프(113~201번 잔기; "CD81-LEL")에 융합된 고상 말토스 결합 단백질을 사용하는 ELISA를 통해, 형태 의존성 E2 모노클로날 항체(H53)를 사용하여 CD81-E2-his가 결합함이 확인되었다. 하나 이상의 가변부 결실을 포함하는 E2-his 단백질의 CD81-LEL 결합 수준은 원래의 수준과 같았는데, 이는 곧, 결실이 일어나더라도 E2의 전체적인 폴딩 특성은 검출 가능한 정도로 영향받는 것은 아님을 말해주는 것이다(도 30의 A). 이와는 대조적으로, E2-his 단백질과, E2 결합 위치 돌연 변이가 일어난 CD81-LEL(F186S) 사이에서는 결합이 일어나지 않았는데, 이는, 결합 검정법의 특이성을 확인시켜주는 것이다(도 30의 B).

- [0281] **5. E2-his 단백질 변이체를 사용하여 2회 면역화한 후에 생성된 마우스 혈청의 상동성 E2-his 항원에 대한 면역 반응성**
- [0282] E2-his 야생형과, 고상 "상동성 항원"(즉, 특정 마우스 군을 면역화하는데 사용된 항원)에 대한 변이체 단백질을 사용하여 2회 면역화한 후에 생성된 마우스 혈청의 면역 반응성을 ELISA로 관찰하였다. 상기 상동성 고상 항원에 대한 항체의 실질적인 결합 활성은, 백신 접종된 동물 각각에 의해 입증되었다(도 31). 이와는 반대로, 고상 E2-his 단백질에 대한 항체의 반응성은, 애주반트만으로 백신 접종된 마우스에서는 확인되지 않았으며, 또한 면역화 이전에 각각의 백신 접종 군으로부터 채취한 2개의 대조군 혈청(사전 채혈된 혈청) 각각에서도 확인되지 않았는데(데이터는 제시하지 않음), 이로써, E2-his 단백질을 투여받은 동물은 면역원에 특이적인 항체를 생성하였음을 알 수 있다.
- [0283] **6. E2-his 단백질 변이체로 2회 면역화한 후에 채취한 마우스 혈청의, E2-his 및 E2Δ123-his 항원에 대한 면역 반응성**
- [0284] 각각의 백신 접종 군으로부터 채취한 면역 혈청 중 항체가, (3개의 가변부를 포함하는) 고상 E2-his와 결합하는 능력을, (3개의 가변부가 결여된) 고상 E2 Δ123-his에 대한 항체의 반응성과 비교하였다(ELISA). 고상 E2-his에 대한 실질적인 결합 역가(도 32의 A)와 E2 Δ123-his에 대한 실질적인 결합 역가(도 32의 B)를, 모든 면역화 군에 대해 관찰하였다(다만, 애주반트만을 투여한 군은 제외; 데이터는 제시하지 않음).
- [0285] 결합 역가에 있어서 눈에 띄만한 차이점이 있는지 여부를 측정하기 위하여, 다양한 면역화 군에 대해 얻어진 항체 결합 역가의 통계학적 상관 비교 분석(pair-wise statistical analysis)을 수행하였다. 표 7은, E2-his 면역화 군에 대해 계산된 고상 E2-his에 대한 항체의 역가가, 다른 면역화 군에 대해 계산된 고상 E2-his에 대한 항체의 역가와 거의 차이가 없음을 보여주고 있다($p > 0.06$). 그러나, E2 Δ1-his 면역화 군 대 E2 Δ13-his, E2 Δ23-his 및 E2 Δ123-his ($p \leq 0.04$) 간에는, 고상 E2-his에 대한 항체 반응성이 통계학적으로 유의적인 차이를 나타냈다.
- [0286] 다양한 면역화 군의 고상 E2 Δ123-his에 대한 항체 결합 역가를 대상으로 통계학적 상관 비교 분석을 수행한 결과, E2 Δ123-his 면역화 군에 대한 항체 반응성이, E2-his 면역화 군에 대한 항체 반응성에 비하여 상당 수준 증가하였음을 알 수 있었다($p = 0.003$, 표 8). E2 Δ1-his, E2 Δ3-his, 그리고 E2 Δ12-his 면역화 군의 항체 반응성 대 E2-his의 항체 반응성은 통계학상 유의적으로 증가하였음이 관찰되었으며, 또한 E2 Δ2-his 면역화 군의 항체 반응성에 대한 E2 Δ1-his 면역화 군의 항체 반응성도 마찬가지로($p \leq 0.04$).
- [0287] **7. E2-his 단백질 변이체로 3회 면역화한 이후에 채취한 마우스 혈청의, 상동성 E2-his 항원에 대한 면역 반응성**
- [0288] E2-his 야생형 단백질과 변이체 단백질로 3회 면역화한 이후에 채취한 마우스 혈청의, 고상 "상동성 항원"(즉, 특정 마우스 군을 면역화하는데 사용된 항원)에 대한 면역 반응성을 ELISA로써 관찰하였다. 각각의 백신 접종된 동물에서는 상동성 고상 항원에 대한 항체의 실질적인 결합 활성이 입증되었지만(도 33), 면역화하기 이전에, 각각의 백신 접종 군으로부터 채취한(사전 채혈) 2개의 대조군 혈청 각각에서는 그러하지 않았다(데이터는 제시하지 않음). 뿐만 아니라, 고상 E2-his 단백질에 대한 항체의 반응성은 애주반트만으로 백신 접종된 마우스에서는 측정되지 않았는데(데이터는 제시하지 않음), 이로써, E2-his 단백질이 투여된 동물은 면역원에 특이적인 항체를 생성시킨다는 것을 알 수 있다.
- [0289] **8. E2-his 단백질 변이체로 3회 면역화한 이후에 채취된 마우스 혈청의, E2-his 및 E2Δ123-his 항원에 대한 면역 반응성**
- [0290] 각각의 백신 접종 군으로부터 채취한 면역 혈청 중 항체가, (3개의 가변부를 포함하는) 고상 E2-his와 결합하는 능력을, (3개의 가변부가 결여된) 고상 E2 Δ123-his에 대한 항체의 반응성과 비교하였다(ELISA). 고상 E2-his에 대한 실질적인 결합 역가(도 34의 A)와 E2 Δ123-his에 대한 실질적인 결합 역가(도 34의 B)를, 모든 면역화 군에 대해 관찰하였다(다만, 애주반트만을 투여한 군은 제외; 데이터는 제시하지 않음).
- [0291] 결합 역가에 있어서 눈에 띄만한 차이점이 있는지 여부를 측정하기 위하여, 다양한 면역화 군에 대해 얻어진 항체 결합 역가의 통계학적 상관 비교 분석을 수행하였다. 두 번째 면역화 이후에 얻어진 데이터와는 대조적으로, 표 9는, E2-his 면역화 군에 대해 계산된 고상 E2-his에 대한 항체의 역가가, 다른 면역화 군에 대해 계산된 고상 E2-his에 대한 항체의 역가보다 훨씬(6~7배) 높은 것을 보여주고 있다($p = 0.003 \sim 0.004$)[다만, E2 Δ123-his($p = 0.11$) 제외].

- [0292] 다양한 면역화 군의 고상 E2 Δ123-his에 대한 항체 결합 역가를 대상으로 통계학적 상관 비교 분석을 수행한 결과, E2 Δ123-his 면역화 군에 대한 항체 반응성이, E2-his 면역화 군에 대한 항체 반응성에 비하여 상당 수준 증가하였음을 알 수 있었다($p = 0.0007$, 표 10). E2-his의 항체 반응성 대 E2 Δ3-his, E2 Δ12-his, 그리고 E2 Δ23-his 면역화 군의 항체 반응성은 통계학적 유의적으로 상이하였음이 관찰되었으며, 또한 E2 Δ1-his 면역화 군 대 E2 Δ3-his, E2 Δ12-his, E2 Δ23-his 및 E2 Δ123-his 면역화 군($p = 0.009 \sim 0.022$)의 항체 반응성도 마찬가지로였다($p = 0.009 \sim 0.022$).
- [0293] 마지막으로, 고상 야생형 E2-his 항원(즉, HVR1, HVR2 및 IgVR 함유 항원)에 대한 각 면역화 군의 평균 결합 역가를, 고상 E2 Δ123-his 항원(즉, HVR1, HVR2 및 igVR이 결여되어 있으며, 보존된 당단백질 코어를 포함하는 항원)에 대한 결합 역가와 비교하였다. E2_{RBD}의 보존된 코어와 반응성인 항체를 생성하는 면역원의 상대적 능력을 측정하기 위하여, 이 분석을 수행하였다. 표 11은 E2-his 면역원에 의해 유도된 항혈청(약 4.4배 감소; $p = 0.0009$) 및 E2 Δ1-his 면역원에 의해 유도된 항혈청(약 2배 감소; $p = 0.005$)에 대한 고상 E2-his 항원에 비하여, 고상 E2 Δ123-his 항원의 항체 역가가 훨씬 낮음을 보여주는 것이다.
- [0294] **9. E2-his 단백질 변이체로 3회 면역화한 이후에 얻어진 마우스 혈청의, 고상 Con1 E2_{RBD}-his 및 JFH1 E2_{RBD}-myc 항원에 대한 면역 반응성**
- [0295] 면역 혈청과, 고상 Con1 E2_{RBD}-his(유전자형 1b) 및 JFH1 E2_{RBD}-myc(유전자형 2a) 항원의 면역 반응성을 비교하여, E2-his 야생형 단백질 및 변이체 단백질(유전자형 1a H77c 분리체로부터 유래)이, 교차-유전자형 반응성 항체를 유도하는 능력을 측정하였다(ELISA). 모든 면역화 군을 대상으로 하여, 고상 Con1 E2_{RBD}-his(도 35의 A) 및 JFH1 E2_{RBD}-myc(도 35의 B)에 대한 실질적인 결합 역가를 관찰하였다[다만, 애주반트만을 투여한 군은 제외, 데이터는 제시하지 않음].
- [0296] 다양한 면역화 군의 고상 Con1 E2_{RBD}-his에 대한 항체 결합 역가를 대상으로 통계학적 상관 비교 분석을 수행한 결과, E2 Δ2-his, E2 Δ3-his, E2 Δ12-his 및 E2 Δ123-his 면역화 군에 대한 결합 역가가, E2-his 면역화 군에 대한 결합 역가에 비하여 상당 수준 증가하였음을 알 수 있었다($p < 0.05$, 표 12). E2 Δ123-his 면역화 군에서 유도된 Con1 E2_{RBD}-his 결합 역가 또한, E2 Δ1-his 및 E2 Δ23-his에 의해 유도된 Con1 E2_{RBD}-his 결합 역가보다 훨씬 높았다.
- [0297] 이와는 대조적으로, 다양한 면역화 군의 고상 JFH1 E2_{RBD}-myc에 대한 항체 결합 역가를 대상으로 한 유사 통계학적 상관 비교 분석법을 통하여서는, 상기 군들의 결합 역가에 거의 차이가 없었음을 알 수 있었다(표 13). 이와 같이 유의성이 없음에도 불구하고, 상기 관찰된 성향 또한 본 분석법에서 명확하게 밝혀졌다.
- [0298] **10. 중화**
- [0299] 면역 혈청 및 대조군 마우스 혈청이, 상동성 H77c 균주 E1E2-슈도타이핑된 HIV-1 루시퍼라제 리포터 바이러스에 의한 감염 과정 중 한 주기를 중화하는 능력을 측정하였다. 열-불활성화 면역 혈청 및 대조군 마우스 혈청의 연속 5배 희석액을 E1E2-슈도타이핑된 HIV-1 루시퍼라제 리포터 바이러스와 함께 예비 항온 처리한 후(1시간), 이를 다시 Huh7 세포의 단일층과 항온 처리하였다(4시간). 상기 세포를 PBS로 세척하고, 여기에 신선한 배양 배지를 첨가한 다음, 3일 더 항온 처리하고 나서(37°C , 5% CO_2), 상기 세포를 용해하여 루시퍼라제 활성에 대해 검정하였다. 도 36은 각각의 혈청의 80% 중화 역가를 나타내는 것으로서, 이 경우, 상기 80% 중화 역가는 혈청 희석시와 같이 측정하였으며, 또한 상기 80% 중화 역가는, 배지만을 첨가하여 예비 항온 처리한 HCV 당단백질-슈도타이핑된 HIV-1 루시퍼라제 리포터 바이러스의 80% 중화 역가와 비교하였다. E2-his, E2 Δ123-his 및 E2 Δ23-his로 면역화된 마우스의 80% 이상은, E1E2-HIV-1 슈도타입에 대한 중화 항체를 생산하였는데, 이 경우, 평균 80% 중화 역가는 각각 908, 413 및 140이었다. 이와는 대조적으로, E2 Δ1-his 또는 애주반트만으로 면역화된 마우스 중 80% 이상은 80% 중화 활성을 나타내지 않았으며, 이 경우, 평균 80% 중화 역가는 각각 7과 26이었다(표 14).
- [0300] **11. 검토**
- [0301] 3개의 가변부 중 하나 이상이 결실된 E2-his 단백질은 상동성 항원에 대해 반응성인 항체를 유도할 수 있었다. 항체 반응의 특이성은, 면역 혈청이 비 변형 야생형 E2-his 단백질(3개의 가변부를 포함)과 반응하는 능력을, 상기 3개의 가변부를 전부 포함하지 않되, CD81 결합 능은 보유하는 코어 E2 폴딩 단위를 나타내는 E2 Δ123-his 단백질이 면역 혈청과 반응하는 능력과 비교함으로써 측정하였다. 이와 같은 분석을 통하여, E2-his 단백질

또는 HVR1이 결여된 E2(E2 Δ1-his)로 면역화된 마우스는 E2의 코어 도메인에 반응성인 항체를 거의 유도하지 않았음을 알 수 있었다. 이와는 대조적으로, HVR1 및 HVR2가 결여된 E2-his 단백질(E2 Δ12-his), HVR1과 igVR이 결여된 E2-his 단백질(E2 Δ13-his), HVR2와 igVR이 결여된 E2-his 단백질(E2 Δ23-his) 또는 3개의 가변부가 전부 결여된 E2-his 단백질(E2 Δ123-his)로 면역화된 마우스에서 생성된 항체는, 야생형 E2-his 항원 및 E2 Δ123-his 항원과 유사하게 반응하였다. 이는 곧, HVR2와 igVR이, E2에 내재하고 있던 보존 코어 도메인 내에 존재하는 에피토프에 항체가 접근하는 것을 방해할 수 있음을 말해주는 것이다. 이 가설을 테스트하기 위해, 유전자형 1b(Con1) 및 유전자형 2a(JF-H1)로부터 유래하는 HCV의 이중 분리 균주를 나타내는 E2_{RBD} 구조물을 합성하였다. 이와 같은 이중 E2_{RBD} 구조물에 대하여 세 번째 백신 접종한 이후에 채취한 마우스 혈청의 면역 반응성을 통하여, E2 Δ123-his, E2 Δ12-his, E2 Δ3-his, E2 Δ2-his로 면역화된 마우스는 유전자형 1b 분리체 Con1에 존재하는 에피토프에 대한 교차 반응성 항체의 수준이 훨씬 높았음을 알 수 있었다. 비록 유전자형 2a 분리 JF-H1의 E2_{RBD}에 대한 교차 반응성 항체도 유도되었지만, 면역원 군 간 결합 역가상 차이는 통계학상 유의적이지 않았으며, 이러한 성향은 전술한 관찰 결과와 유사하였다. 이와 같은 데이터는, 하나 이상의 가변부, 바람직하게는 HVR2 및/또는 igVR이 결실되면, E2-his 단백질이, 광범위한 중화 능력을 가지는 교차 반응성 항체를 유도하는 능력이 개선될 수 있다는 것을 시사하는 것이다.

[0302] 상동성 바이러스를 중화하는 면역 혈청의 능력은 HCV E1E2 슈도타이핑된 레트로바이러스 입자를 사용하여 관찰하였다. 이 데이터를 통하여, E2 Δ123-his 또는 E2 Δ23-his로 백신 접종된 마우스의 중화 항체 역가는, HVR1만이 결여된 E2-his로 백신 접종된 마우스의 중화 항체 역가에 비하여, 평균적으로 약 59배 및 20배 높았음을 알 수 있었다(p는 각각 0.11 및 0.002). 이전의 연구를 통하여, HVR1은 E1E2 당단백질 복합체의 면역 우성 부위를 알 수 있었다. HVR1 부위만이 결실되면, 중요한 유형-특이적 면역 우성 에피토프가 제거될 수 있다. 그러나, HVR1 결실 구조물 내에 HVR2 및/또는 igVR 부위가 존재하면, 내재되어 숨어있던 중화 에피토프를 차단할 수 있다. 그러므로, 야생형 E2-his 단백질에 의해 유도된 항체의 반응성은 주로 HVR1 부위에 대해 유도될 수 있는 것이지, 보존된 코어에 대해 유도될 수 있는 것이 아니다. 이는 부분적으로, (i) E2 코어 도메인에 반응성인 항체의 수준이 낮으며(도 34의 B), (ii) 교차 반응성 항체의 수준이 낮음(도 35의 A)을 통해서 알 수 있다.

[0303] 상기 데이터들을 종합해보면, HVR2 부위 및/또는 igVR 부위가 결실되면, 가변부 중 어느 것도 결여되지 않거나 HVR1만이 결여된 E2 RBD 구조물을 사용하는 것에 비해 훨씬 유리함을 알 수 있다. 적어도 HVR2 및/또는 igVR이 결여되고, 가능하게는 3개의 가변부 모두가 결여된 E2 RBD 단백질은, 유전자형에서 분기하여 나온 HCV 균주를 교차 중화(cross-neutralizing) 및 교차 유전자형 중화(cross-genotype neutralization)시킬 수 있는 항체를 생성할 것으로 생각된다. 하나 이상의 가변부가 결여된 E2 RBD 단백질은, HCV 감염을 예방 또는 치료하기 위한 치료적 차원 또는 예방적 차원의 백신 접종 기술에 사용되는 유용한 도구가 될 수 있다. 뿐만 아니라, 이와 같이 가변부가 결실된 E2 RBD 구조물은 또한, 치료용 및 예방용으로 사용되는 HCV를 중화하는 보존 E2 코어 부위에 대해 생성된 항체의 신규한 특이성을 유도하는데 유용할 수도 있다.

[0304] 12. 재료 및 방법

[0305] 포유동물 세포 내 야생형 및 변이형 HCV E2-his cDNA의 구성 및 암호화되어 분비된 단백질의 발현

[0306] HCV E2-his 변이체를 암호화하는 cDNA 발현 플라스미드의 제조

[0307] 진아트 AG(Geneart AG; Regensburg, Germany)를 사용하여, 야생형 E2 단백질 단편(384~661번 잔기; 균주 H77c)을 암호화하는 합성 유전자를 구성하였다. 인간의 트립시노겐 신호 펩티드(MNPLLLILTFVAAALA)를, 야생형 E2의 성숙한 단백질의 N-말단에 부착시켜(프레임 내 부착), 성숙한 다기능 펩티드가 발현 배지에 분비되는 것을 촉진하였다. N-말단 바로 앞에 코작(Kozak) 서열을 도입하여, 번역 개시 수준을 증가시키고, (His)₆ 서열을 인 프레임 상태로 부가하여, 추후, 고정 금속 친화성 크로마토그래피에 의해 분비된 단백질을 정제할 수 있도록 하였다. C-말단에 존재하는 His-tag의 뒤에 2개의 종결 코돈을 부가하여, 번역이 효율적으로 종결되도록 하였다. 이 구조물을 E2-his라 칭한다. E2-his cDNA의 코돈 선호도를 호모 사피엔스(*Homo sapiens*) 유전자의 코돈 편향도(codon bias)에 대해 적응시켰다. Xho I 제한 위치와 cDNA의 5' 말단에 존재하는 Nhe I 제한 위치를 3' 말단에 도입하여, 진아트 cDNA를, Nhe I-Xho I으로 분해한 pcDNA3.1(Invitrogen)에 절찰시켰다.

[0308] 가변부 중 하나 이상이 링커 서열로 치환된 E2-his 성숙 단백질의 7가지 변이체를 암호화하는 cDNA를, 제조자의 지침에 따라서 어큐프라임 Pfx DNA 중합 효소(Invitrogen)를 사용하는 표준적인 PCR 돌연 변이 유발 방법을 이용하여 구성하였다[이때 사용된 프라이머를 표 15에 제시함]. E2-his의 cDNA를 구성하는데 사용된 프라이머들의 조합을 표 16에 제시하였다.

- [0309] 구체적인 PCR 매개 변수들은 다음과 같았다: 95℃에서 2분간 변성 → 95℃에서 15초간, 64℃에서 30초간, 그리고 68℃에서 2분간 변성(18 회전) → 68℃에서 2분간 항온 처리.
- [0310] 진아트 야생형 E2-his cDNA를, E2-his 변이체 cDNA 전부에 대한 PCR 주형으로 사용하였다. 다수의 단편들을 연속적으로 중복 PCR시켜 각각의 결실 변이체를 구성하였다. 일단 각각의 cDNA가 다 만들어지면, 이를 Nhe I 및 Xho I으로 분해하고, 다시 이를 pcDNA3.1에 결합하였다. 키아젠 맥시 키트(Qiagen Maxi Kit)를 사용하여 플라스미드 DNA를 대규모로 제조하였다. 빅 다이 종결 인자 v3.1 순환 서열 결정기(Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing) 및 어플라이트 바이오시스템즈 자동화 서열 결정기(Applied Biosystems Automated Sequencer)를 사용하여, 양 사슬을 서열 결정함으로써 플라스미드 구조물 전부의 뉴클레오티드 서열을 확인하였다.
- [0311] 성숙한 야생형 및 변이형 E2 단백질의 서열은 다음과 같다:
- [0312] E2-his 성숙 단백질
- ETHVTGGNAGRRTAGLVGLLTPGAKQNIQLINTNGSWHINSTALNCNESLNTGWLGLFYQHKNSSGCPERL
ASCRRLTDFAQGWGPISYANGSGLDERPYCWHYPPRPGGIVPAKSVCGPVYCFTPSPVVVGTTDRSGAPTYSW
GANDTDVFLNNTRPPLGNWFGCTWMNSTGFTKVCGAPPCVIGGVGNNTLLCPTDCFRKHPEATYSRCGSGPW
ITPRCMVDYPYRLWHYPCTINYTIFKVRMYVGGVEHRLEAACNWTGERCDLEDRDRSE
- [0313]
- [0314] E2Δ1-his 성숙 단백질
- ETHQNIQLINTNGSWHINSTALNCNESLNTGWLGLFYQHKNSSGCPERLASCRRLTDFAQGWGPISYANGS
GLDERPYCWHYPPRPGGIVPAKSVCGPVYCFTPSPVVVGTTDRSGAPTYSWGANDTDVFLNNTRPPLGNWFG
CTWMNSTGFTKVCGAPPCVIGGVGNNTLLCPTDCFRKHPEATYSRCGSGPWITPRCMVDYPYRLWHYPCTINY
TIFKVRMYVGGVEHRLEAACNWTGERCDLEDRDRSE
- [0315]
- [0316] E2Δ2-his 성숙 단백질
- ETHVTGGNAGRRTAGLVGLLTPGAKQNIQLINTNGSWHINSTALNCNESLNTGWLGLFYQHKNSSGCPERL
ASCGSSGCWHYPPRPGGIVPAKSVCGPVYCFTPSPVVVGTTDRSGAPTYSWGANDTDVFLNNTRPPLGNWFG
CTWMNSTGFTKVCGAPPCVIGGVGNNTLLCPTDCFRKHPEATYSRCGSGPWITPRCMVDYPYRLWHYPCTINY
TIFKVRMYVGGVEHRLEAACNWTGERCDLEDRDRSE
- [0317]
- [0318] E2Δ3-his 성숙 단백질
- ETHVTGGNAGRRTAGLVGLLTPGAKQNIQLINTNGSWHINSTALNCNESLNTGWLGLFYQHKNSSGCPERL
ASCRRLTDFAQGWGPISYANGSGLDERPYCWHYPPRPGGIVPAKSVCGPVYCFTPSPVVVGTTDRSGAPTYSW
GANDTDVFLNNTRPPLGNWFGCTWMNSTGFTKVCGAPPCGSSGCPTDCFRKHPEATYSRCGSGPWITPRCMV
DYPYRLWHYPCTINYTIFKVRMYVGGVEHRLEAACNWTGERCDLEDRDRSE
- [0319]
- [0320] E2Δ12-his 성숙 단백질
- ETHQNIQLINTNGSWHINSTALNCNESLNTGWLGLFYQHKNSSGCPERLASCGSSGCWHYPPRPGGIVPAK
SVCGPVYCFTPSPVVVGTTDRSGAPTYSWGANDTDVFLNNTRPPLGNWFGCTWMNSTGFTKVCGAPPCVIGG
- [0321] VGNNTLLCPTDCFRKHPEATYSRCGSGPWITPRCMVDYPYRLWHYPCTINYTIFKVRMYVGGVEHRLEAACNW
TRGERCDLEDRDRSE
- [0322]
- [0323] E2Δ13-his 성숙 단백질
- ETHQNIQLINTNGSWHINSTALNCNESLNTGWLGLFYQHKNSSGCPERLASCRRLTDFAQGWGPISYANGS
GLDERPYCWHYPPRPGGIVPAKSVCGPVYCFTPSPVVVGTTDRSGAPTYSWGANDTDVFLNNTRPPLGNWFG
CTWMNSTGFTKVCGAPPCGSSGCPTDCFRKHPEATYSRCGSGPWITPRCMVDYPYRLWHYPCTINYTIFKVRM
YVGGVEHRLEAACNWTGERCDLEDRDRSE
- [0324]
- [0325] E2Δ23-his 성숙 단백질
- ETHVTGGNAGRRTAGLVGLLTPGAKQNIQLINTNGSWHINSTALNCNESLNTGWLGLFYQHKNSSGCPERL
ASCGSSGCWHYPPRPGGIVPAKSVCGPVYCFTPSPVVVGTTDRSGAPTYSWGANDTDVFLNNTRPPLGNWFG
CTWMNSTGFTKVCGAPPCGSSGCPTDCFRKHPEATYSRCGSGPWITPRCMVDYPYRLWHYPCTINYTIFKVRM
YVGGVEHRLEAACNWTGERCDLEDRDRSE
- [0326]

[0327] E2Δ123-his 성숙 단백질

ETHQNIQLINTNGSWHINSTALNCNESLNTGWLGLFYQHKFNSSGCPERLASCGSSGCWHYPPRPGIIVPAK
SVCGPVYCFPTSPVVGTTDRSGAPTYSWGANDTDVFLNNTRPPLGNWFGCTWMNSTGFTKVCGAPPCGSSG
CPTDCFRKHPEATYSRCGSGPWITPRCMVDYPYRLWHYPCTINYTIFKVRMYVGGVEHRLEAACNWTGERCD
LEDNRSE

[0328]

[0329] 세포 배양액

[0330] 프리스타일(FreeStyle)TM 293-F 세포(Invitrogen)를, 페니실린/스트렙토마이신/편지존(Invitrogen)이 보강된 프리스타일TM 발현 배지(Invitrogen) 중에서 배양하였다. 모든 세포를 8%의 CO₂ 포함 가습 항온 처리기(37℃) 내에 넣었다.

[0331] 일시적 단백질 발현

[0332] 제조자의 지침에 따라서, pcDNA3.1계 발현 플라스미드 및 293펙틴 형질 감염 시약(Invitrogen)으로 형질 감염함으로써, 프리스타일TM 293-F 세포 내에서 E2-his 단백질 각각을 일시적으로 발현시켰다. 총 부피 180mℓ인 세포를 최종 농도 1×10^6 생존 세포/mℓ이 되도록 형질 감염시킨 다음, 이를 멸균 진탕 플라스크(Corning)[회전 진탕기(IKA)에 장착, 150rpm으로 회전, 37℃의 가습 항온 처리기 사용, 8% CO₂ 대기 사용] 내에서 5일 동안 항온 처리하였다. 형질 감염 후 24시간 경과시, 상기 세포 배양액에 트립톤 N1(Organotechnie, France)을 보충하여, 최종 농도 0.5% v/v가 되도록 만들었다. 통상의 경우와 같이, 세포 배양액은 형질 감염 후 5일 경과시에 수집하였다. 4~20% Tris-글리신 SDS 폴리아크릴아미드 겔을 사용하여 세포 배양 상청액 시료를 전기 영동함으로써 단백질 발현 여부를 관찰하고, 쿠마시 블루 시약으로 염색하여 상기 단백질을 가시화하였다. 단백질 정제를 위해, 원심 분리(2500rpm)로 세포 배양액의 상청액을 수집하였으며, 이후, 이를 0.45 μM 필터(Nalgene)에 통과시킨 후 크로마토그래피를 수행하였다.

[0333] 발현된 야생형 HCV E2-his 단백질 및 변이 HCV E2-his 단백질의 정제

[0334] 여과 후, 세포 배양액의 상청액을 대상으로, 고정 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)[니켈 세파로스 사용]를 실시하여, 야생형 E2-his 단백질과 변이체 E2-his 단백질을 정제하였다.

[0335] 정제 과정을 이하에 기술하였다:

[0336] 1. 완충액:

[0337] Ni-MAC 완충액 A

[0338] 50mM NaH₂PO₄ pH 8.0

[0339] 300mM NaCl

[0340] 10mM 이미다졸

[0341] Ni-MAC 완충액 B (용출액)

[0342] 50mM NaH₂PO₄ pH 8.0

[0343] 300mM NaCl

[0344] 500mM 이미다졸

[0345] 2. 프로토콜:

[0346] 1. 이하 2~6번 과정은 4~8℃에서 수행하였다.

[0347] 2. 10mℓ의 폴리-프랩 컬럼(Poly-Prep columns; Bio-Rad) 내 1mℓ의 Ni 세파로스 6 패스트 플로우 수지(Fast Flow resins; GE Healthcare)를 5부피의 ddH₂O로 세척하였다.

[0348] 3. 이 컬럼을 10mℓ의 Ni-MAC 완충액 A로 평형화하였다.

[0349] 4. 시료를 상기 컬럼 상에 로딩하고, 이를 통과한 용출액(B/T)을 수집하였다.

- [0350] 5. 상기 컬럼을 10mL의 Ni-MAC 완충액 A로 세척하였다.
- [0351] 6. 5mL의 Ni-MAC 완충액 B(용출액) 및 1mL의 분획과 함께 단백질을 용출시켰다.
- [0352] 7. 96-웰 평판 방식 브래드포드(Bradford) 검정법과 쿠마시-염색 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동법(SDS-PAGE)을 통하여, 피크에서 용출된 분획을 동정하였다.
- [0353] 8. 피크에서 용출된 분획들을 풀링(pooling)하고 이를 4℃의 1X PBS 중에서 밤새도록 투석하였다.
- [0354] 9. 투석 후, 96-웰 평판 방식 브래드포드 검정법 및 1mg/mL의 BSA를 사용하여, 표준 곡선에 대한 단백질 농도를 측정하였다.

[0355] **포유동물 세포 내 Con1 E2_{RBD}-his 및 JFH1 E2_{RBD}-myc cDNA의 구성 및 암호화되어 분비된 단백질의 발현**

[0356] Con1 E2_{RBD}-his 및 JFH1 E2_{RBD}-myc을 암호화하는 cDNA 발현 플라스미드의 제조

[0357] Con1 E2(HCV Con1 다단백질의 384~661번 잔기; 유전자 은행 등록 번호 AJ238799) 및 JFH1 E2(HCV JFH1 다단백질의 384~665번 잔기; 유전자 은행 등록 번호 AB047369)를 암호화하는 cDNA를, 확장-Hifi 중합 효소(Expand-Hifi polymerase; Roche)를 사용하는 PCR에 의해 제조하고, 이때 사용된 프라이머를 표 17에 제시하였다. 정방향 프라이머는 cDNA의 5' 말단에 인-프레임 상태로 통합하는데 사용되는 NheI 제한 위치를 암호화하였다. 역방향 프라이머는 Con1 및 JFH1 cDNA 각각의 3' 말단에 인-프레임 상태로 부가하는데 사용되는 (His)₆ 및 c-myc 에피토프를 암호화하였는데, 상기 (His)₆ 및 c-myc는 둘 다 뒤에 TAG 번역 종결 코돈과 XbaI 제한 위치를 가졌다. 특이적인 PCR 매개 변수는 다음과 같았다: 95℃에서 5분간 변성 → 92℃에서 1분간, 55℃에서 1분간, 그리고 72℃에서 2분간 변성(30회전) → 72℃에서 10분간 항온 처리. cDNA를 벡터 pcDNA3 내에 존재하는 조직 플라스미노겐 활성 인자 신호 펩티드의 하류에 클로닝하여, 발현된 단백질의 분비를 촉진하였다. 빅 다이 종결 인자 v.3.1 순환 서열 결정기 및 어플라이드 바이오시스템즈 자동화 서열 결정기를 사용하여, 클로닝된 cDNA의 뉴클레오타이드 서열을 확인하였다.

[0358] Con1 E2_{RBD}-his 및 JFH1 E2_{RBD}-myc의 일시적 발현

[0359] 퓨젠 6(Roche)를 사용하여, HEK 293T 세포(6-웰 배양 평판의 웰 당 350,000개의 세포)를, Con1 E2_{RBD}-his 및 JFH1 E2_{RBD}-myc 발현 벡터로 형질 감염시켰다. 형질 감염 후 8시간 경과시, 형질 감염 배지를 옵티메(Invitrogen)으로 교체하고, 5% CO₂를 함유하는 가습 대기 중(37℃)에서 3일 동안 상기 세포를 항온 처리하였다. 상기 조직 배양액을 1500rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 투명하게 하고, 이 여과액을 공극 크기 0.45μm인 시린지형 필터에 통과시켰다.

[0360] **야생형 E2-his 단백질 및 변이체 E2-his 단백질의 생화학적 분석 및 기능 분석**

[0361] 블루-네이티브 PAGE

[0362] 블루 네이티브 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동법(BN-PAGE)을 실시하여, 정제된 E2-his 단백질의 올리고머화 상태를 분석하였다. 각각의 단백질 10μg을 10μL의 가용화 완충액과 1.5μL의 시료 완충액에 첨가하고, 이를, 4%의 스택킹 겔(stack gel)을 포함하는 5~15% 구배 분리 겔 상에 로딩하였다. 염료의 선두 부분이 스택킹 겔에 침투할 때까지 이 겔을 4℃ 및 100 볼트에서 전기 영동시켰다. 이후, 염료의 선두 부분이 겔의 하부로 이동할 때까지 전압을 200 볼트로 증가시켰다. 상층 용기에 0.01%의 서바 G(Serva G)를 함유하는 1× 캐소드 완충액을 이용하여 1시간 30분 동안 전기 영동을 수행한 다음, 서바 G를 함유하지 않는 1× 캐소드 완충액 중에서 1~1시간 30분 동안 전기 영동을 수행하였다. 하층 용기는 1× 어노드 완충액을 함유하였다. 전기 영동 후, 밤새도록 겔을 탈색한 다음, 오디세이 스캐너(680nm)에서 스캔하였다.

[0363] BN-PAGE에 사용되는 용액은 다음과 같다:

[0364] 폴리아크릴아미드 겔

[0365]

	4% 스택킹 겔	5% 분리 겔	15% 분리 겔
40% 아크릴아미드	0.299mL	0.262mL	0.787mL
3× 겔 완충액	1mL	0.7mL	0.7mL
75% 글리세롤		0.14mL	0.62mL
물	1.72mL	0.978mL	0

TEMED	6 μ l	2 μ l	2 μ l
5% 과 황산 암모늄	32 μ l	11 μ l	11 μ l

- [0366] 기타 용액:
- [0367] 3× 겔 완충액 150mM BisTris-HCl, .5M 6-아미노 카프론산, pH 7.0
- [0368] 10× 캐소드 완충액 0.5M 트리신, 150mM BisTris
- [0369] 5× 어노드 완충액 0.25M BisTris-HCl, pH 7.0
- [0370] 2× BisTrisACA 200mM BisTris-HCl, 1M 6-아미노 카프론산, pH 7.0.
- [0371] 시료 완충액 50mg 서바G, 500 μ l의 2× BisTrisACA, 400 μ l의 75% 수크로스 및 100 μ l의 물
- [0372] 가용화 완충액 0.5M 6-아미노-카프론산, 20mM BisTris, 2mM EDTA, pH 7.0, 1% Triton X-100, 10% 글리세롤
- [0373] 탈색 용액 10% 아세트산, 10% 메탄올, 80% 물.
- [0374] E2-his 단백질의 면역 검출법
- [0375] 정제된 E2-his 단백질 시료를 대상으로, 환원성 SDS-PAGE을 수행한 다음, 전기 영동에 의하여 이를 니트로셀룰로스 막에 옮겼다. 비 형태 의존성 E2 특이적 모노클로날 항체를 사용하고, 이후 알렉사 플루어 680nm (Invitrogen)에 커플링된 염소 항-마우스 면역 글로블린을 사용하여, E2-his 단백질을 검출하였다. 면역 블롯은 오디세이 검출 시스템 내에서 스캔하였다.
- [0376] CD81 결합 특성
- [0377] 고상 효소 면역 검정법을 이용하여, E2-his 단백질이, HCV의 세포성 수용체인 CD81과 상호 작용하는 능력을 관찰하였다. 효소 면역 검정용 평판(Nunc Maxisorb®)을, CD81의 재조합 대형 세포 외 루프(113~201번 잔기)에 융합된 말토스 결합 단백질로 코팅하였다(PBS 중 5 μ g/ml, 밤새도록, 4°C). 코팅 용액을 제거하고, 어느 것도 결합하고 있지 않은 위치들을, PBS 중 소 혈청 알부민(10mg/ml)(BSA₁₀PBS)으로 차단하였다(실온, 1시간). 평판을 0.05% Tween 20 함유 PBS(PBST)로 4회 세척하였다. 50ng의 E2-his 단백질을 50 μ l의 PBS(5mg/ml의 소 혈청 알부민 함유)(BSA₅PBST) 중에서 연속적으로 희석하고, 이를 2시간 동안 항온 처리하였다. E2 특이적 모노클로날 항체를 사용한 다음, 다시 호오스 래디쉬 퍼옥시다제(Dako)에 커플링된 토끼 항-마우스 면역 글로블린을 사용하여, 결합하고 있는 E2-his 단백질을 검출하였다. 염산 테트라메틸벤지딘 기질을 사용하여 평판 상의 반응을 진행하고, 다시 여기에 1M의 HCl을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 450nm에서 흡광도 수치를 측정하되, 620nm에서의 백 그라운드 수치는 공제하였다[플루오스타 평판 판독기; BMG technologies].
- [0378] 야생형 E2-his 단백질 및 변이체 E2-his 단백질의 마우스 내에서의 면역원성
- [0379] 면역화 과정
- [0380] 7~8주령의 암컷 Balb/c 마우스 10마리로 이루어진 군에, 정제된 E2-his 야생형 단백질 및 변이체 단백질(아이스코메트릭스(ISCOMATRIX)® 애주반트와 함께 제조)(Pearse and Drane, 2005)을 주입하여, 이 군을 면역화하였다(표 18). 각각의 마우스 투여물은, 10 μ g의 특이 단백질과 5 μ g의 아이스코메트릭스® 애주반트를 포함하였다(0.1ml 부피). 이 투여물을 3주의 간격을 두고 마우스에 3회 피하 투여하였으며, 첫 번째 투여 1일 전, 두 번째 및 세 번째 투여 후 1주일 경과시에 채혈하였다.
- [0381] 효소-결합 면역 흡착 검정법(ELISA)
- [0382] 면역 마우스 혈청이 항-E2 항체를 포함하는지 여부를 관찰하였다(ELISA). E2-his, Con1 E2_{RBD}-myc 또는 JFH1 E2_{RBD}-myc 단백질을 96-웰 맥시소브 미세 역가 평판(Nunc) 상에 포착하였다(갈란티스 니발리스(Galanthis nivalis; GNA) 렉틴 사용). 평판을 GNA 렉틴으로 코팅하였다(PBS 중 5 μ g/ml, 밤새도록, 4°C). 아무것도 결합하지 않은 위치들을, 100 μ l의 BSA₁₀PBS로 차단하였다(1시간, 실온). 이 평판을 PBST로 4회 세척한 후, 50 μ l의 BSA₅PBST 중 E2 단백질을 첨가하여, 이를 실온에서 1시간 동안 항온 처리하였다. 상기 평판을 PBST로 4회 세척

한 다음, 마우스 혈청의 연속 희석액(50 μ l 부피의 BSA₅PBST 중)을 첨가한 후, 이를 실온에서 1시간 동안 항온 처리하였다. 호오스래디쉬 퍼옥시다제에 커플링되어 있던 토기 항-마우스 면역 글로불린을 사용하여, 결합하고 있던 면역 글로불린을 검출한 후, 염산 테트라메틸벤지딘 기질을 사용하여 평판 상의 반응을 진행시키고, 다시 여기에 1M의 HCl을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 플루오스타 평판 판독기(BMG technologies)를 사용하여 450nm에서의 흡광도 수치와 620nm에서의 백 그라운드 수치를 측정하였다. 상기 흡광도에서 상기 백 그라운드 수치를 공제하여, 결합 곡선을 작성하였다.

[0383] 중화 검정법

[0384] 면역 혈청 및 대조군 마우스 혈청이, HCV 당단백질-슈도타이핑된 HIV-1 루시퍼라제 리포터 바이러스에 의한 감염 단계 중 1회의 주기를 중화하는 능력을 다음과 같이 측정하였다. HEK-293T 단일층(6-웰 배양 접시의 웰 당 350,000개 세포)을 pE1E2와 pNL4.3LUC.R-E- 플라스미드로 공동 형질 감염시켜, HCV 당단백질-슈도타이핑된 HIV-1 루시퍼라제 리포터 바이러스를 제조하였다[Drummer와 다수, 2003]. 5% CO₂를 함유하는 가습 대기(37℃)에서 3일 동안 항온 처리한 다음, 0.45 μ m의 멸균 시린지형 필터(Sartorius)를 사용하여 배양 상청액을 여과하였다. 열-불활성화된 면역 혈청과 대조군 마우스 혈청의 5배 연속 희석액을, HCV 당단백질-슈도타이핑된 HIV-1 루시퍼라제 리포터 바이러스와 함께 예비 항온 처리한 다음(1시간), 이를 48-웰 조직 배양 평판 내에 있는 4개의 Huh7 세포 단일층에 가하였다. 4시간 동안 항온 처리(37℃, 5% CO₂)한 후, 상기 세포를 PBS로 세척하고, 배지를 교체하였다. 3일 더 항온 처리(37℃, 5% CO₂)한 후, 상기 세포를 용해하고, 이 용해물을 원심 분리로 투명하게 한 다음, 플루오스타(BMG)(발광 광학 단위로 맞춤) 내에서 루시퍼라제 활성(Promega)을 검정하였다. 각각의 혈청의 중화 역가를 혈청 희석시와 같은 방식으로 측정한 결과, 배지와만 함께 예비 항온 처리된 HCV 당단백질-슈도타이핑된 HIV-1 루시퍼라제 리포터 바이러스의 80% 중화 역가와는 상이한 80% 중화 역가가 측정되었다.

표 7

2번째 백신접종 이후에 생성된 고상 E2-his 항원에 반응성인 항체의 역가에 관한 통계학적 상관 비교. p 값은 스튜던트 t 테스트를 이용하여 계산함 (면역원 군)

	E2 Δ 1-his	E2 Δ 2-his	E2 Δ 3-his	E2 Δ 12-his	E2 Δ 13-his	E2 Δ 23-his	E2 Δ 123-his
E2-his	0.06	0.96	0.25	0.26	0.37	0.6	0.08
E2 Δ 1-his		0.06	0.27	0.09	0.034	0.014	0.04

표 8

2번째 백신접종 이후에 생성된 고상 E2 Δ 123-his 단백질 항원에 반응성인 항체의 역가에 관한 통계학적 상관 비교. p 값은 스튜던트 t 테스트를 이용하여 계산함. (면역원 군)

	E2 Δ 1-his	E2 Δ 2-his	E2 Δ 3-his	E2 Δ 12-his	E2 Δ 13-his	E2 Δ 23-his	E2 Δ 123-his
E2-his	0.04	0.96	0.02	0.02	0.09	0.077	0.003
E2 Δ 1-his		0.04	0.09	0.12	0.06	0.06	0.17

표 9

3번째 백신접종 이후에 생성된 고상 E2-his 단백질 항원에 반응성인 항체의 역가에 관한 통계학적 상관 비교. p 값은 이분산을 가정한 스튜던트 t 테스트를 이용하여 계산함. (면역원 군)

	E2 Δ 1-his	E2 Δ 2-his	E2 Δ 3-his	E2 Δ 12-his	E2 Δ 13-his	E2 Δ 23-his	E2 Δ 123-his
E2-his	0.02	0.003	0.002	0.04	0.002	0.02	0.11
E2 Δ 1-his		0.1	0.021	0.58	0.44	0.9	0.17

표 10

3번째 백신접종 이후에 생성된 고상 E2 Δ 123-his 단백질 항원에 반응성인 항체의 역가에 관한 통계학적 상관 비교. p 값은 이분산을 가정한 스튜던트 t 테스트를 이용하여 계산함. (면역원 군)

	E2 Δ 1-his	E2 Δ 2-his	E2 Δ 3-his	E2 Δ 12-his	E2 Δ 13-his	E2 Δ 23-his	E2 Δ 123-his
E2-his	0.64	1	0.016	0.004	0.31	0.003	0.0007
E2 Δ 1-his		0.62	0.022	0.007	0.44	0.005	0.009

표 11

E2-his 항원 및 E2 Δ123-his 항원에 대해 3번째 백신접종 이후에 생성된 항체의 상대적 역가에 관한 통계학적 비교. p 값은 이분산을 가정한 스튜던트 t 테스트를 이용하여 계산함.

	(면역원 군)						
	E2 Δ1-his	E2 Δ2-his	E2 Δ3-his	E2 Δ12-his	E2 Δ13-his	E2 Δ23-his	E2 Δ123-his
E2-his에 대한 평균 항체 역가 ($\times 10^3$)	1.16	0.81	0.68	1.31	.71	1.19	1.54
E2 Δ123-his에 대한 평균 항체 역가 ($\times 10^3$)	0.56	0.51	1.15	1.11	0.71	1.19	1.54
p 값	0.005	0.045	0.06	0.46	1	1	0.0009

[0389]

표 12

3번째 백신접종 이후에 생성된 고상 Con1E2RBD-his 단백질 항원에 반응성인 항체의 역가에 대한 통계학적 상관 비교. p 값은 이분산을 가정한 스튜던트 t 테스트를 이용하여 계산함.

	E2-his	E2 Δ1-his	E2 Δ2-his	E2 Δ3-his	E2 Δ12-his	E2 Δ13-his	E2 Δ23-his	E2 Δ123-his
E2-his								
E2 Δ1-his	0.526							
E2 Δ2-his	0.0453	0.072						
E2 Δ3-his	0.043	0.061	0.883					
E2 Δ12-his	0.0123	0.091	0.926	0.797				
E2 Δ13-his	0.185	0.343	0.847	0.756	0.888			
E2 Δ23-his	0.173	0.568	0.284	0.238	0.217	0.534		
E2 Δ123-his	0.0123	0.028	0.259	0.325	0.197	0.251	0.0499	

[0390]

표 13

3번째 백신접종 이후에 생성된 고상 JFH1 E2RBD-myc 단백질 항원에 반응성인 항체의 역가에 대한 통계학적 상관 비교. p 값은 이분산을 가정한 스튜던트 t 테스트를 이용하여 계산함.

	E2-his	E2 Δ1-his	E2 Δ2-his	E2 Δ3-his	E2 Δ12-his	E2 Δ13-his	E2 Δ23-his	E2 Δ123-his
E2-his								
E2 Δ1-his	0.609							
E2 Δ2-his	0.148	0.511						
E2 Δ3-his	0.159	0.253	0.371					
E2 Δ12-his	0.305	0.549	0.861	0.48				
E2 Δ13-his	0.392	0.624	0.916	0.484	0.970			
E2 Δ23-his	0.123	0.287	0.492	0.652	0.705	0.702		
E2 Δ123-his	0.058	0.084	0.117	0.406	0.154	0.156	0.209	

[0391]

표 14

평균 80% 중화 항체 역가 및 통계학적 비교. p 값은 이분산을 가정한 스튜던트 t 테스트를 이용하여 계산함.

	(면역원 군)			
	E2-his	E2 Δ1-his	E2 Δ23-his	E2 Δ123-his
평균 중화 항체 역가	908	7	140	413
E2-his에 대한 p 값		0.044	0.08	0.29
E2 Δ1-his에 대한 p 값			0.002	0.11

[0392]

표 15

E2-his 단백질 변이체 DNA 서열의 제조에 사용된 프라이머

프라이머 명칭	프라이머 서열
HCV-1	5' TATAGCTAGCGCCACCATGAACCCCTGC 3'
HCV-2	5' CTGGATGTTCTGGTGGGTCTCGGCCAG 3'
HCV-3	5' GCCGAGACCCACCAGAACATCCAGCTG 3'
HCV-4	5' CGCTGCTGCCGAGGAGGCGAG 3'
HCV-4a	5' GTAGTGCCAGCAGCCGCTGCTGCCGAGGAGGCGAGCCTCTCGGG 3'
HCV-5	5' GGCAGCAGCGGCTGCTGGCACTAC 3
HCV-5a	5' CTCGCCTCCTGCGGCAGCAGCGGCTGCTGGCACTACCCCCCAGA 3'
HCV-6a	5' GTCGGTGGGGCAGCCGCTGCTGCCGAGGAGGGGCGCCACACA C 3'
HCV-7a	5' GCCCCCTCCCTGCGGCAGCAGCGGCTGCCCCACCGACTGCTTTAGG 3'
HCV-8	5' TCTGCTCGAGTTATCAGTGGTGATGGTGGTGG 3'
HCV-11	5' CTCTCGTTGCAGTTCAGGGCGGTGCTG 3'
HCV-12	5' CAGCACCGCCCTGAACTGCAACGAGAG 3'

[0393]

표 16

E2-his 단백질 변이체 DNA 서열의 제조에 사용된 프라이머 조합

E2 단백질	프라이머 조합
E2Δ1-his	HCV-1 HCV-3 HCV-8
E2Δ2-his	HCV-1 HCV-11 HCV-12 HCV-8
E2Δ3-his	HCV-1 HCV-6a HCV-7a HCV-8
E2Δ12-his	HCV-1 HCV-2 HCV-3 HCV-4 HCV-5
E2Δ13-his	HCV-1 HCV-6a HCV-7a HCV-8
E2Δ23-his	HCV-1 HCV-5a HCV-4A HCV-6A HCV-7A HCV-8
E2Δ123-his	HCV-1 HCV-6a HCV-7a HCV-8

[0394]

丑 17

Con1 E2_{RBD-his} 및 JFH1 E2_{RBD-myc} DNA 서열의 제조에 사용된 프라이머

E2 _{RBD} 구조물	프라이머 서열	RE 위치	에피토프 태그
Con1 E2 _{RBD} -his	정방향 프라이머 역방향 프라이머	NheI XbaI	
			His ₆
JFH1 E2 _{RBD} -myc	정방향 프라이머 역방향 프라이머	NheI XbaI	myc

⦿ 18

아이스코메트릭스(ISCOMATRIX)[®] 에쥬반트 항원과 함께 제조된 E2-his 야생형 및 변이체 단백질을 이용한 마우스의 면역화

군	단백질	아이스코메트릭스® 에 주반트
1	E2Δ1-his	+
2	E2Δ2-his	+
3	E2Δ3-his	+
4	E2Δ123-his	+
5	E2Δ12-his	+
6	E2Δ13-his	+
7	E2Δ23-his	+
8	E2-his	+
9	-	+

[0397]

참고 문헌:

1. Anandarao, R., S. Swaminathan, S. Fernando, A.M. Jana, and N. Khanna (2006), "Recombinant multiepitope protein for early detection of dengue infections". *Clin. Vaccine Immunol.* 13:59-67.
2. Arai, R., W. Wriggers, Y. Nishikawa, T. Nagamune, and T. Fujisawa, (2004), "Conformations of variably linked chimeric proteins evaluated by synchrotron X-ray small-angle scattering". *Proteins* 57:829-38.
3. Argos, P. (1990), "An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion". *J. Mol. Biol.* 211:943-58.
4. Bahrami, S., M. Duch, and F.S. Pedersen, (2007), "Ligand presentation on a synthetic flexible hinge in Moloney murine leukemia virus SU supports entry via a heterologous receptor". *Virology*, B363B:303-9.
5. Bartosch, B., Bukh, J., Meunier, J. C., Granier, C., Engle, R. E., Blackwelder, W. C., Emerson, S. U., Cosset, F. L. & Purcell, R. H. (2003a) In Vitro Assay For Neutralizing Antibody To Hepatitis C Virus: Evidence For Broadly Conserved Neutralization Epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 14199-204.
6. Bartosch, B., Dubuisson, J. & Cosset, F. L. (2003b) Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-Particles Containing Functional E1-E2 Envelope Protein Complexes. *J Exp Med*, 197, 633-642.
7. Bellamy-Mcintyre, A.K., C.S. Lay, S. Baar, A.L. Maerz, G.H. Talbo, H.E. Drummer, And P. Pountourios, (2007), "Functional Links Between The Fusion Peptide-Proximal Polar Segment And Membrane-Proximal Region Of Human Immunodeficiency Virus Gp41 In Distinct Phases Of Membrane Fusion". *J. Biol. Chem.* 282:23104-16.
8. Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., Rice, C. M. & Dubuisson, J. (1997) Formation Of Native Hepatitis C Virus Glycoprotein Complexes. *J Virol*, 71, 697-704.
9. Dipti, C.A., S.K. Jain, And K. Navin, (2006), "A Novel Recombinant Multiepitope Protein As A Hepatitis C Diagnostic Intermediate Of High Sensitivity And Specificity". *Protein Expr. Purif.* 47:319-28.

[0398]

10. Drummer, H. E., Boo, I., Maerz, A. L. & Pountourios, P. (2006) A Conserved Gly436-Trp-Leu-Ala-Gly-Leu-Phe-Tyr Motif In Hepatitis C Virus Glycoprotein E2 Is A Determinant Of Cd81 Binding And Viral Entry. *J Virol*, 80, 7844-53.
11. Drummer, H. E., Maerz, A. & Pountourios, P. (2003) Cell Surface Expression Of Functional Hepatitis C Virus E1 And E2 Glycoproteins. *Febs Lett*, 546, 385-90.
12. Drummer, H. E., Wilson, K. A. & Pountourios, P. (2002) Identification Of The Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein Binding Site On The Large Extracellular Loop Of Cd81. *J Virol*, 76, 11143-7.
13. Dubuisson, J., Hsu, H. H., Cheung, R. C., Greenberg, H. B., Russell, D. G. & Rice, C. M. (1994) Formation And Intracellular Localization Of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein Complexes Expressed By Recombinant Vaccinia And Sindbis Viruses. *J Virol*, 68, 6147-60.
14. George, R. A., And J. Heringa, (2002), "An Analysis Of Protein Domain Linkers: Their Classification And Role In Protein Folding". *Protein Eng.* 15:871-9.
15. Grollo, L., J. Torresi, H. Drummer, W. Zeng, N. Williamson, and D. C. Jackson, (2006). "Exploiting information inherent in binding sites of virus specific antibodies: design of an HCV vaccine candidate cross-reactive with multiple genotypes". *Antivir. Ther.* 11:1005-1014.
16. He, J. & Landau, N. R. (1995) Use Of A Novel Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reporter Virus Expressing Human Placental Alkaline Phosphatase To Detect An Alternative Viral Receptor. *J Virol*, 69, 4587-92.
17. Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989) Engineering Hybrid Genes Without The Use Of Restriction Enzymes: Gene Splicing By Overlap Extension. *Gene*, 77, 61-8.
18. Keck, Z. Y., Op De Beeck, A., Hadlock, K. G., Xia, J., Li, T. K., Dubuisson, J. & Fong, S. K. (2004) Hepatitis C Virus E2 Has Three Immunogenic Domains Containing Conformational Epitopes With Distinct Properties And Biological Functions. *J Virol*, 78, 9224-32.
19. Levy, S., Todd, S. C. & Maccher, H. T. (1998) Cd81 (Tapa-1): A Molecule Involved In Signal Transduction And Cell Adhesion In The Immune System. *Annu Rev Immunol*, 16, 89-109.

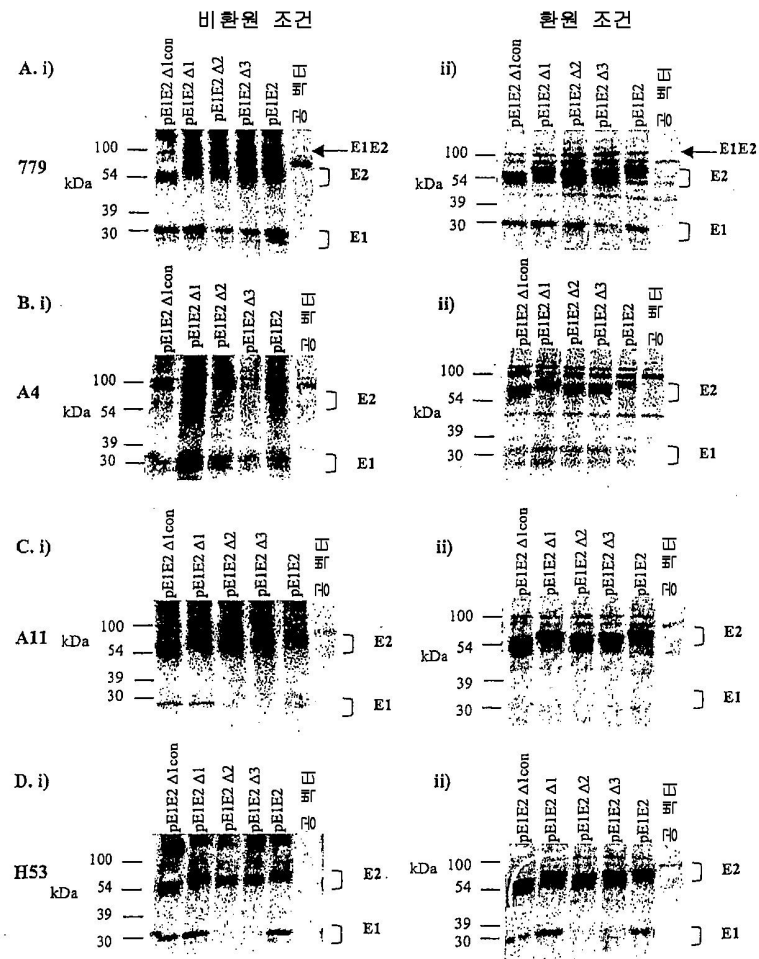
[0399]

20. Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wolk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., Maruyama, T., Hynes, R. O., Burton, D. R., Mckeating, J. A. & Rice, C. M. (2005) Complete Replication Of Hepatitis C Virus In Cell Culture. *Science*.
21. Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L. & Bartenschlager, R. (1999) Replication Of Subgenomic Hepatitis C Virus Rnas In A Hepatoma Cell Line. *Science*, 285, 110-3.
22. Petracca, R., Falugi, F., Galli, G., Norais, N., Rosa, D., Campagnoli, S., Burgio, V., Di Stasio, E., Giardina, B., Houghton, M., Abrignani, S. & Grandi, G. (2000) Structure-Function Analysis Of Hepatitis C Virus Envelope-Cd81 Binding. *J Virol*, 74, 4824-30.
23. Pearse, M.J. and Drane, D. (2005). "ISCOMATRIX® adjuvant for antigen delivery". *Adv. Drug Del. Rev.* 57:465-474.
24. Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G. & Abrignani, S. (1998) Binding Of Hepatitis C Virus To Cd81. *Science*, 282, 938-41.
25. Sabourin, M., C.T. Tuzon, T.S. Fisher, And V.A. Zakian, (2007), "A Flexible Protein Linker Improves The Function Of Epitope-Tagged Proteins In *Saccharomyces Cerevisiae*". *Yeast*, 24:39-45.
26. Sambrook, J. & Russel, D. (2001) *Molecular Cloning*, Cshl Press.
27. Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R. & Vitelli, A. (2002) The Human Scavenger Receptor Class B Type I Is A Novel Candidate Receptor For The Hepatitis C Virus. *Embo J*, 21, 5017-25.
28. Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R. & Liang, T. J. (2005) Production Of Infectious Hepatitis C Virus In Tissue Culture From A Cloned Viral Genome. *Nat Med*, 11, 791-6.
29. Wyatt, R., J. Moore, M. Accola, E. Desjardin, J. Robinson, And J. Sodroski, (1995), "Involvement Of The V1/V2 Variable Loop Structure In The Exposure Of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gp120 Epitopes Induced By Receptor Binding". *J. Virol*, 69:6723-33.

30. Yanagi, M., Purcell, R. H., Emerson, S. U. & Bukh, J. (1997) Transcripts From A Single Full-Length Cdna Clone Of Hepatitis C Virus Are Infectious When Directly Transfected Into The Liver Of A Chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 8738-43.
31. Yang, W.Y., And M. Gruebele, (2006). "Binary And Ternary Aggregation Within Tethered Protein Constructs". *Biophys. J.* 90:2930-7.
32. Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T. & Chisari, F. V. (2005) Robust Hepatitis C Virus Infection In Vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 9294-9.

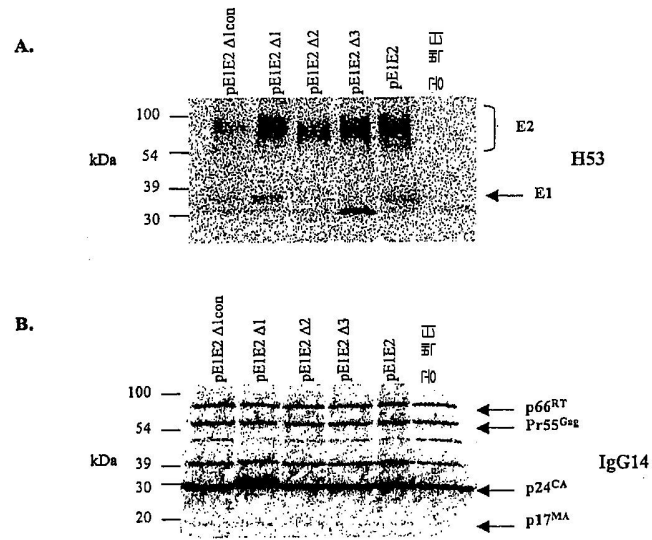
도면

도면1

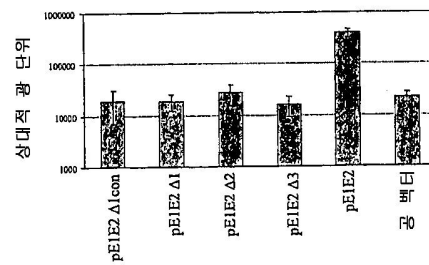


– 56 –

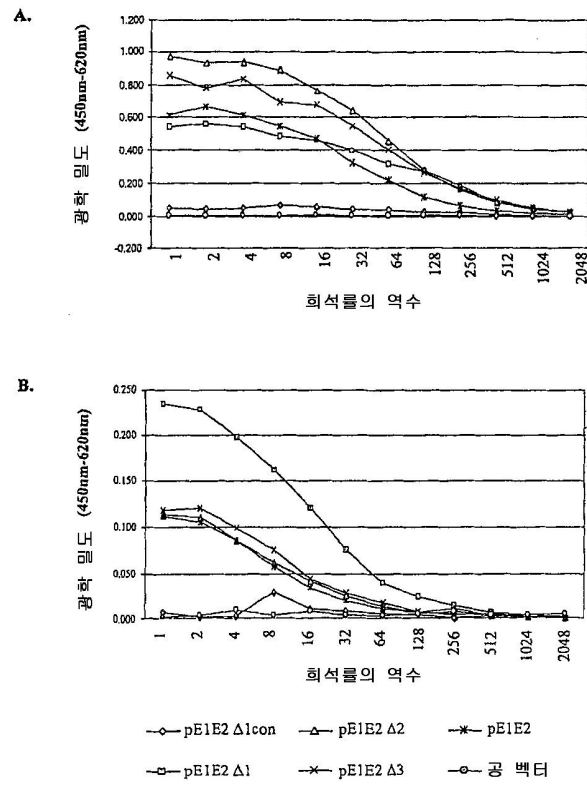
도면3



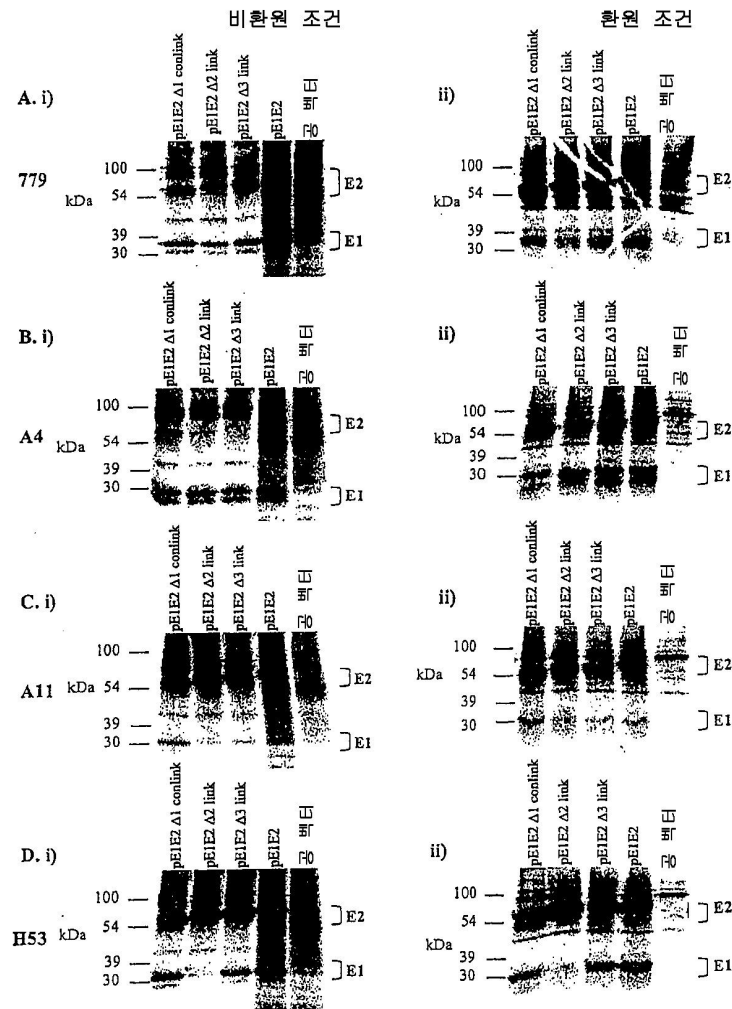
도면4



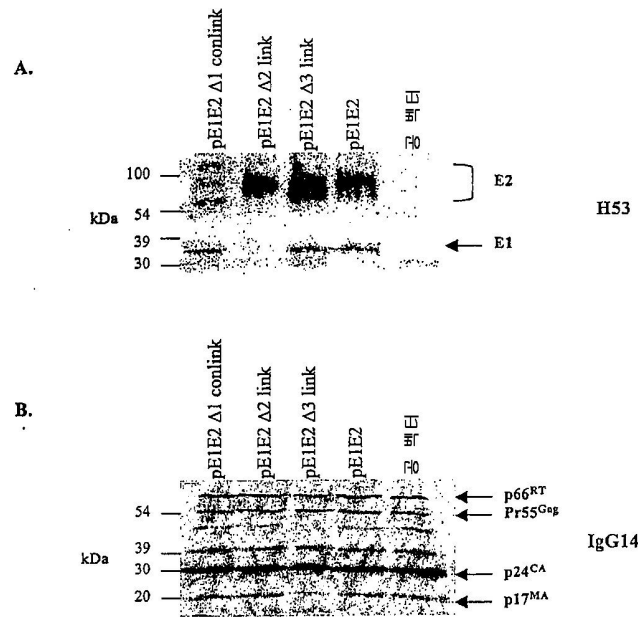
도면5



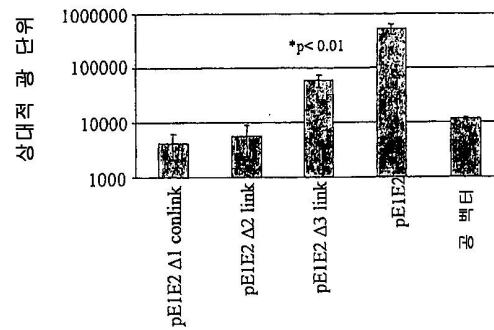
도면6



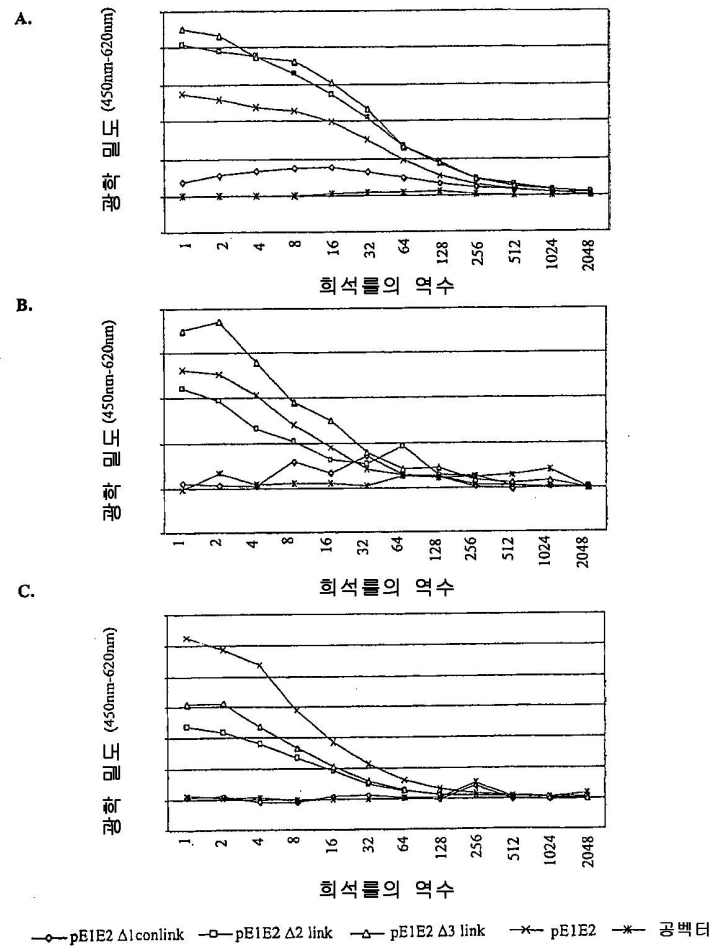
도면7



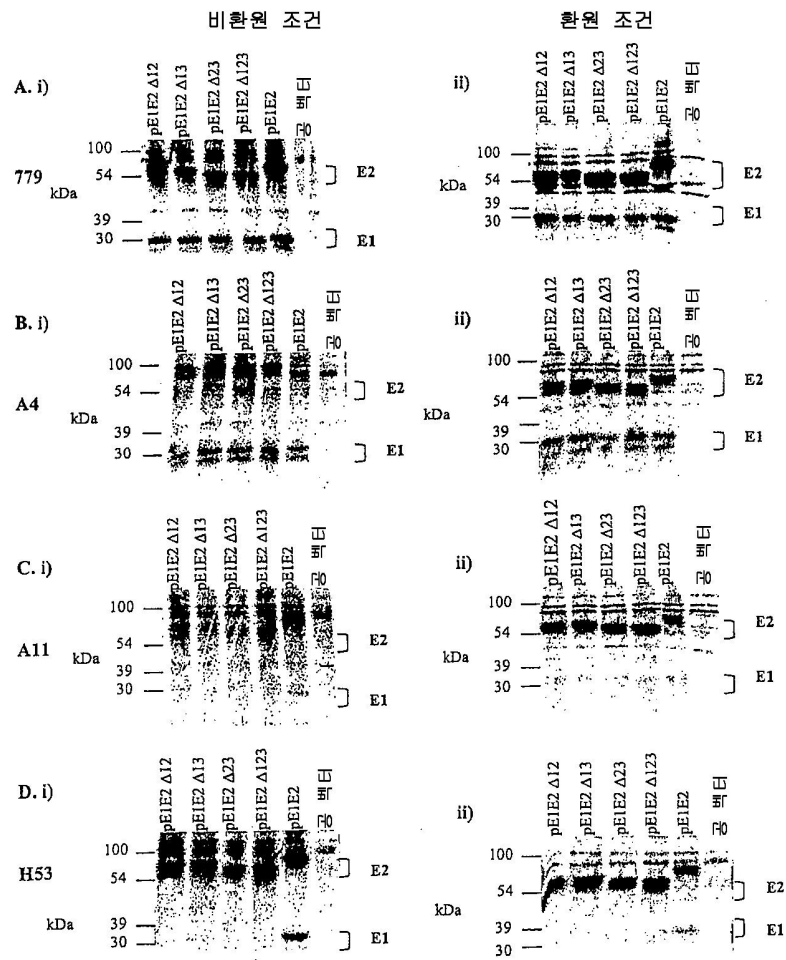
도면8



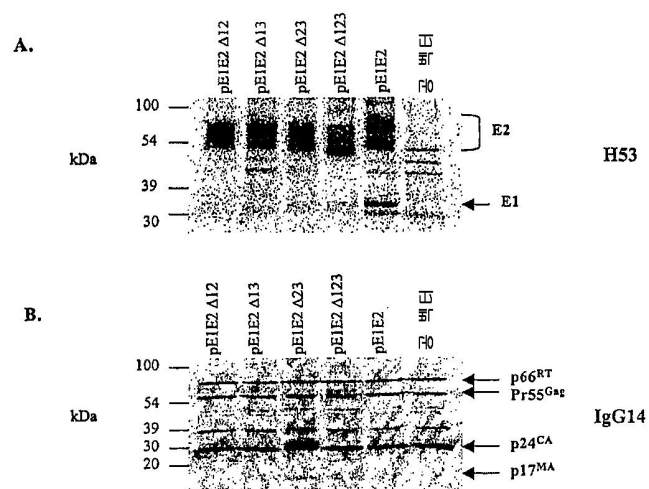
도면9



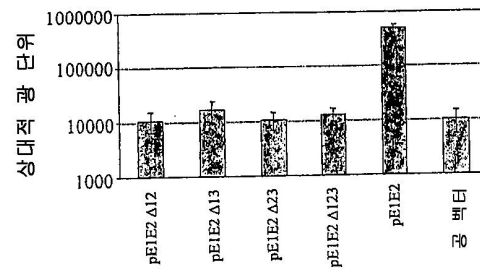
도면10



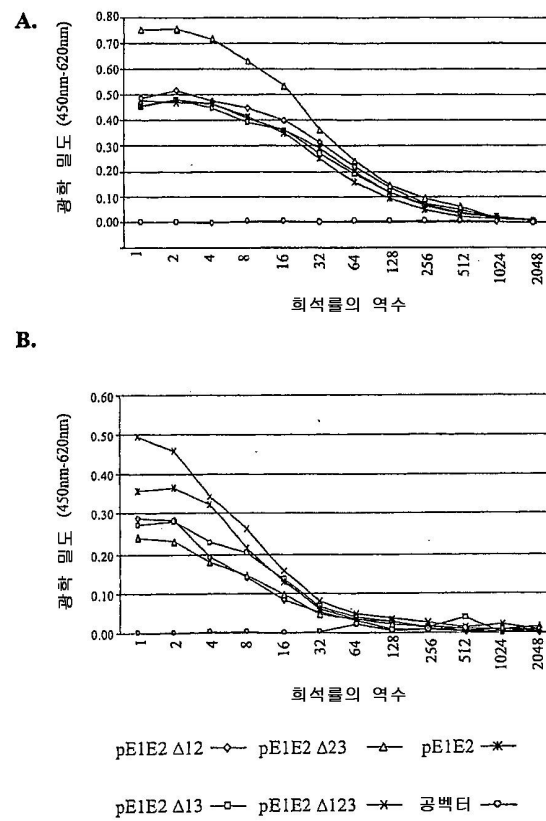
도면11



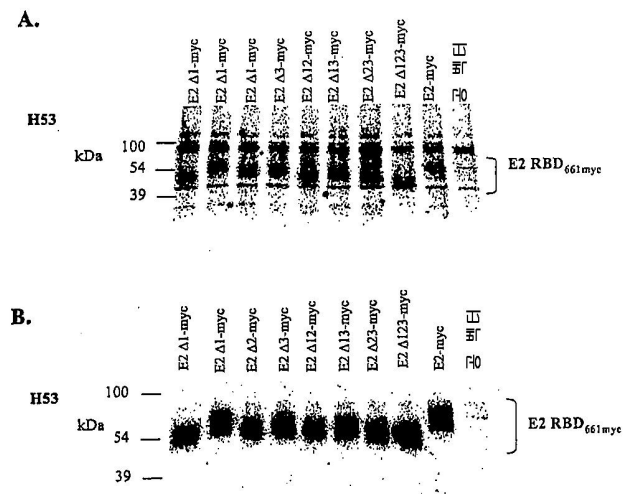
도면12



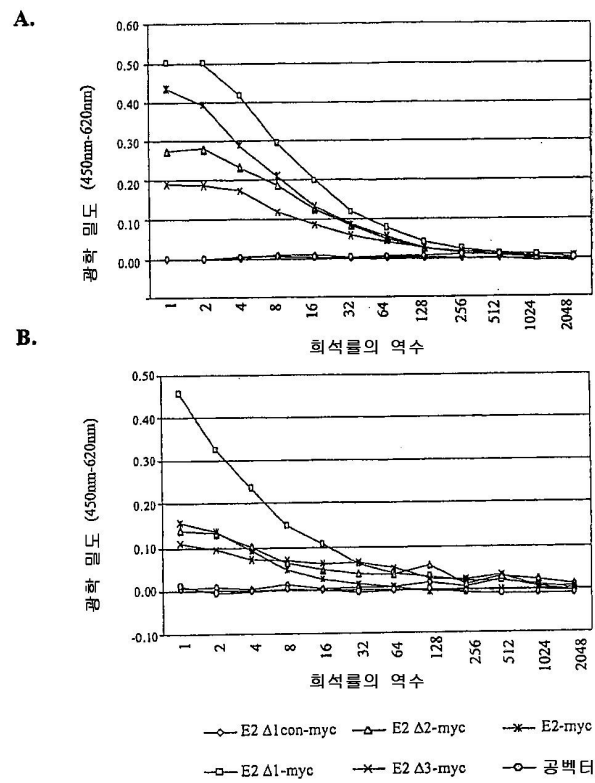
도면13



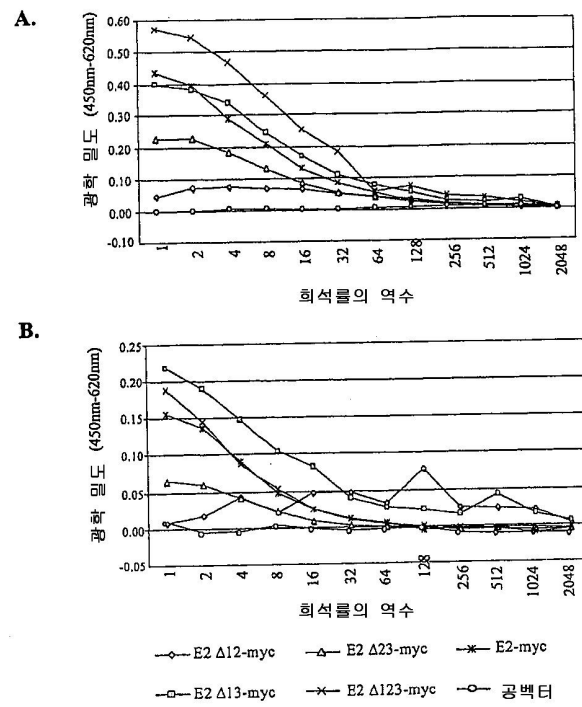
도면14



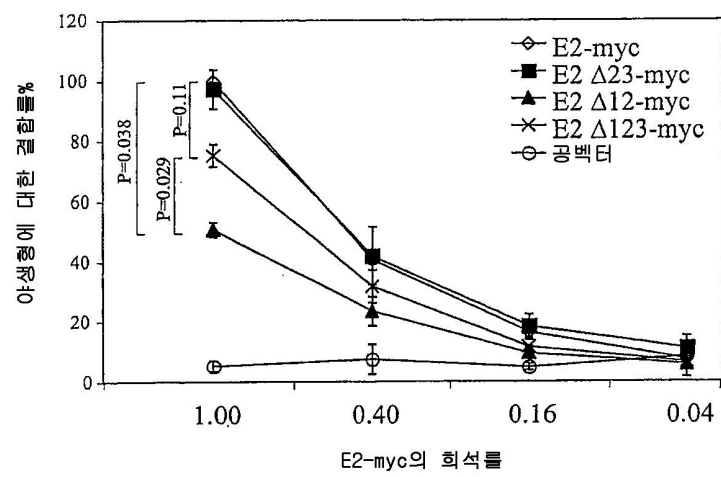
도면15



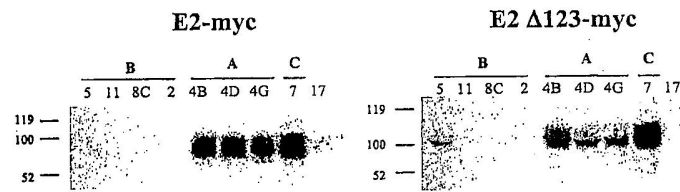
도면16



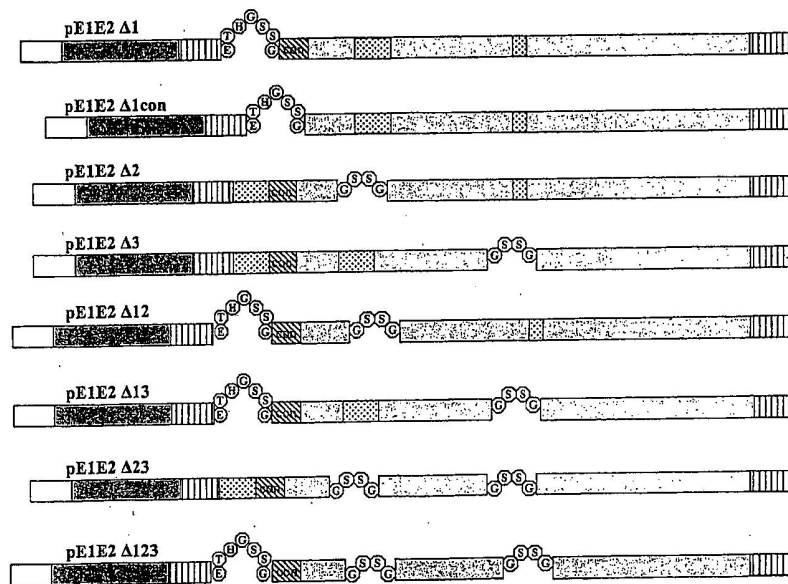
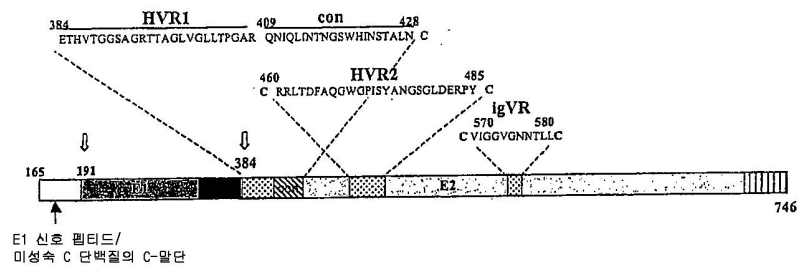
도면17



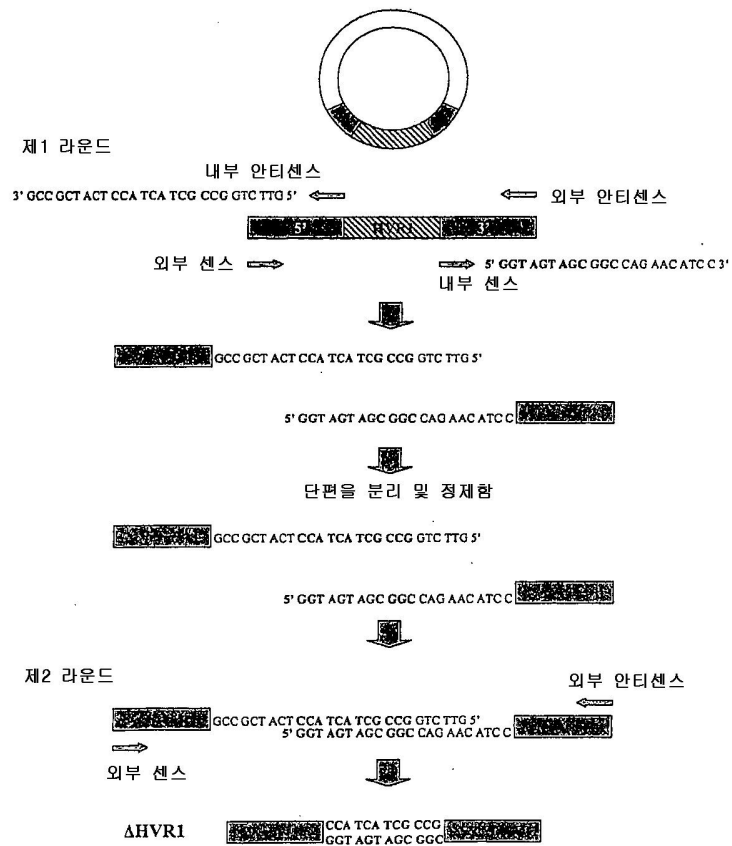
도면18



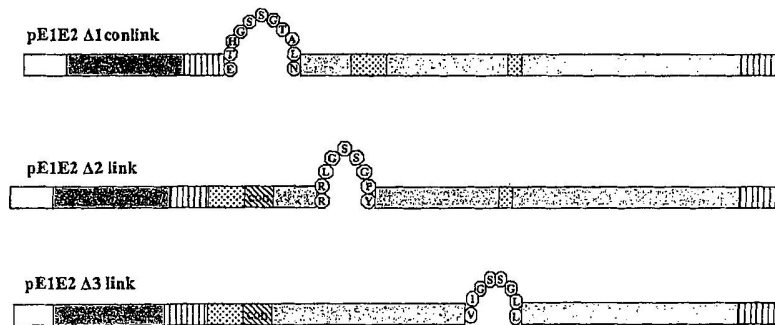
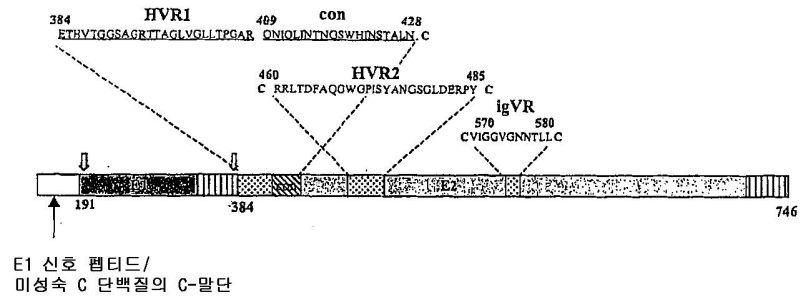
도면19



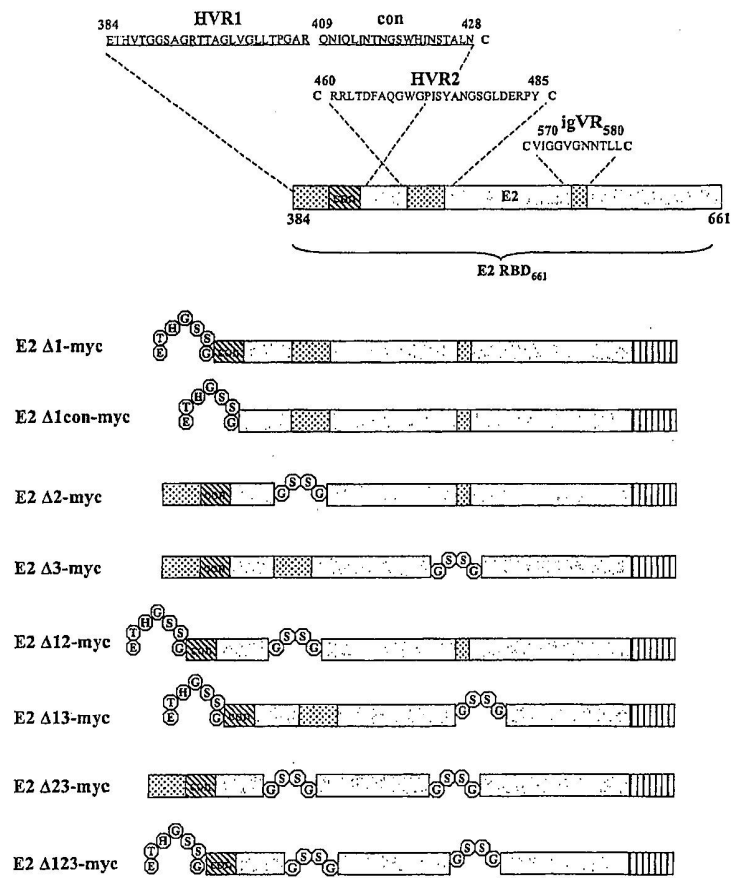
도면20



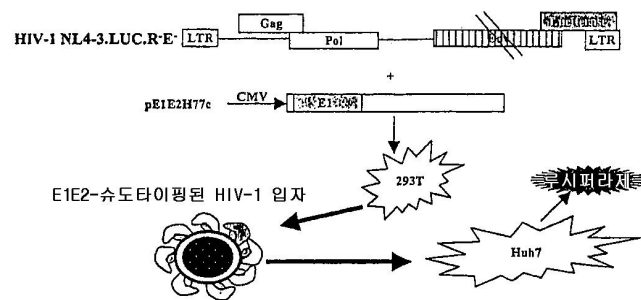
도면21



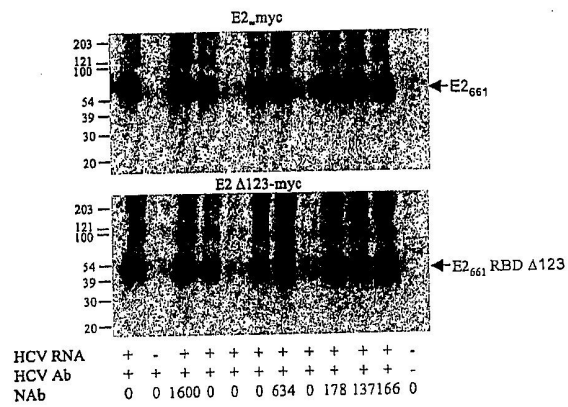
도면22



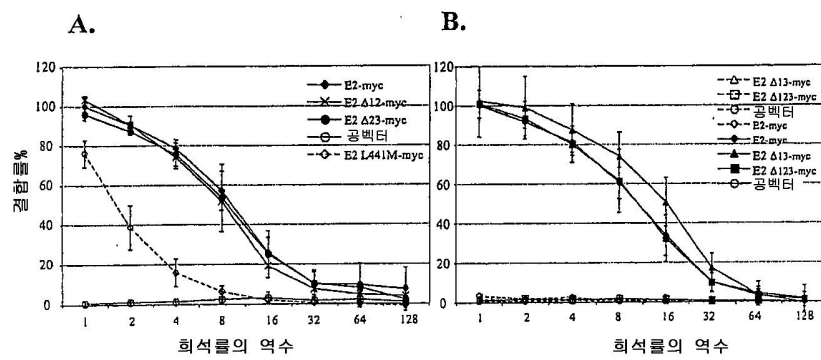
도면23



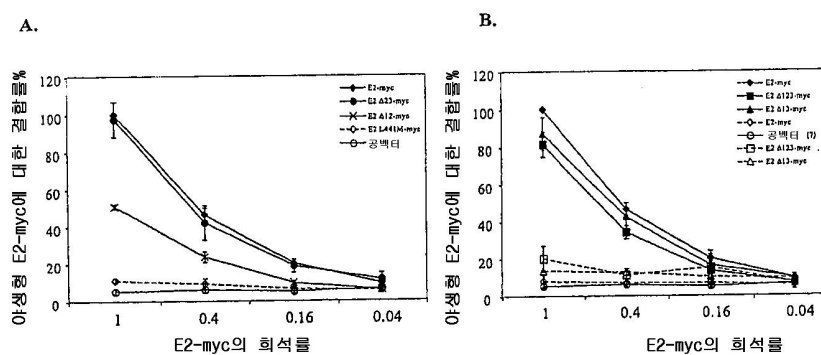
도면24



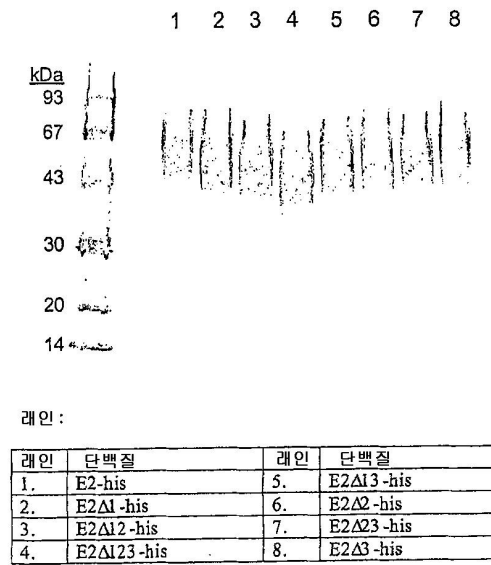
도면25



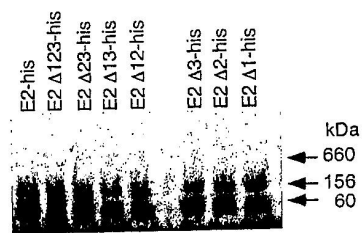
도면26



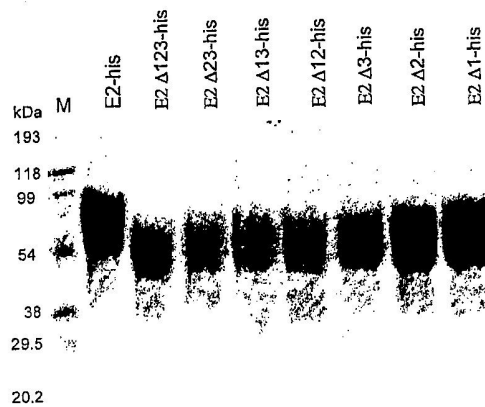
도면27



도면28

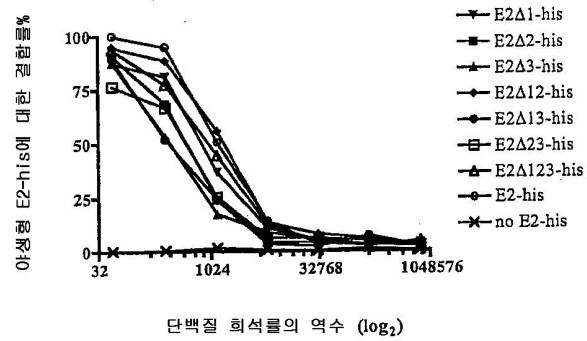


도면29

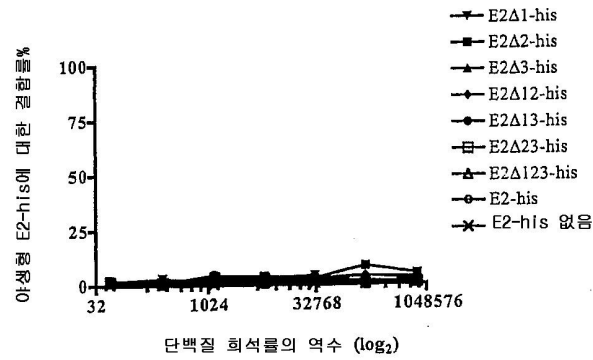


도면30

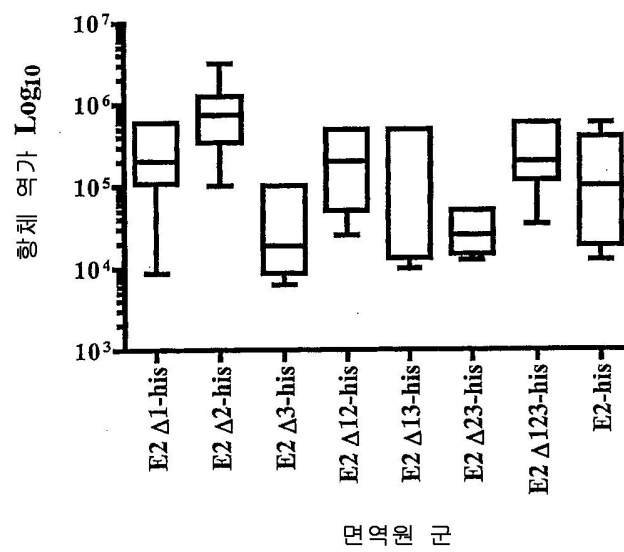
A.



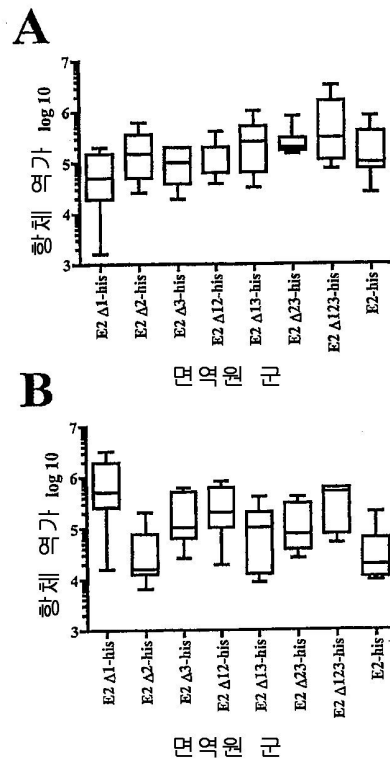
B.



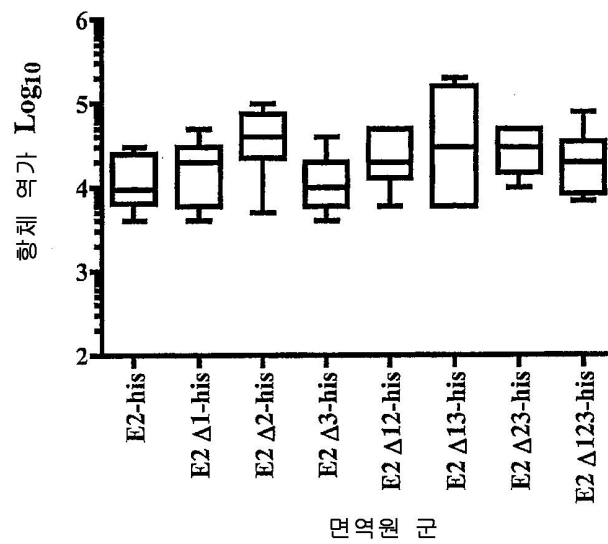
도면31



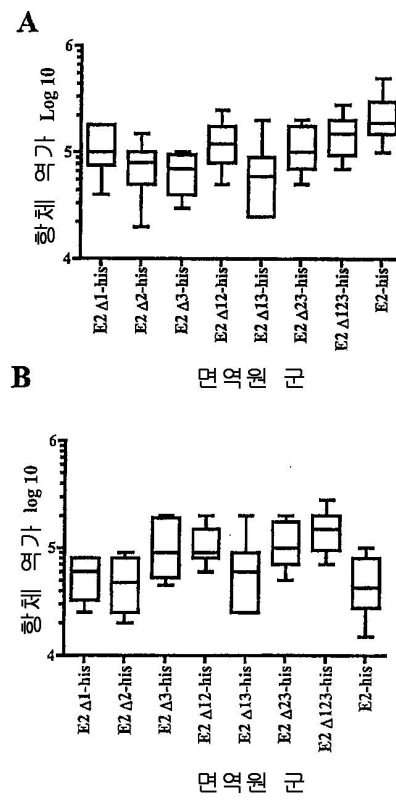
도면32



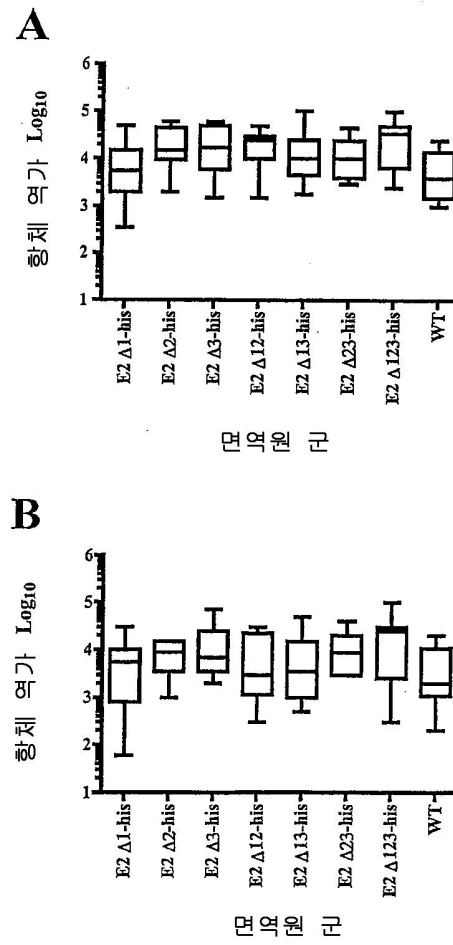
도면33



도면34



도면35



도면36

