



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. (45) 공고일자 2007년07월27일
C07K 14/08 (2006.01) (11) 등록번호 10-0743580
(24) 등록일자 2007년07월23일

(21) 출원번호	10-2002-7004055	(65) 공개번호	10-2002-0065475
(22) 출원일자	2002년03월28일	(43) 공개일자	2002년08월13일
심사청구일자	2005년09월12일		
번역문 제출일자	2002년03월28일		
(86) 국제출원번호	PCT/IB2000/001393	(87) 국제공개번호	WO 2001/22916
국제출원일자	2000년09월28일	국제공개일자	2001년04월05일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 코스타리카, 도미니카, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨, 안티구와바부다, 알제리, 벨리제, 모잠비크,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 모잠비크, 탄자니아,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장 2,283,538 1999년09월30일 캐나다(CA)

(73) 특허권자 양 생 탕 콤파니 리미티드
중국 하이코우 진펄 인더스트리 준 진누 로드

(72) 발명자 응문혼
중국홍콩포크폴람로드퀸메리호스피탈패솔로지빌딩더유니버시티오브홍콩
콩테파트먼트오브마이크로바이올로지

임스탠리
중국홍콩포크폴람로드퀸메리호스피탈패솔로지빌딩더유니버시티오브홍콩
콩테파트먼트오브마이크로바이올로지

장지-중
중국홍콩포크폴람로드퀵메리호스피탈패솔로지빌딩더유니버시티오브홍
콩데파트먼트오브마이크로바이올로지

(74) 대리인 유미특허법인

(56) 선행기술조사문헌
Virus Genes. 7:95-109(1993)

심사관 : 박정용

전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 새로운 HEV 항원성 펩타이드 및 방법

(57) 요약

본 발명은 E형 간염 바이러스(HEV) 게놈의 ORF2 부위의 카르복시 말단 영역에서 유래된 고도 면역 반응성의 바이러스 펩타이드인 pE2에 관한 것이다. 새로운 pE2 펩타이드의 특징은 펩타이드의 모노머가 천연 형태의 호모다이머와 비공유적으로 상호작용하여 서로 회합하는 경우에만 나타나는 형태적 항원 결정인자를 갖는다는 점이다. 이 새로운 pE2 펩타이드는 현재 또는 과거에 HEV에 감염된 환자에서 얻은 혈청과 높은 반응성을 가진 것으로 검증되었다. 따라서, 이는 호모다이머가 HEV 캡시드 단백질의 특정한 구조적 특징을 모방할 수도 있다는 것을 시사한다. 또한, pE2 펩타이드의 항원 활성화는 자연에서 엄격한 형태를 가지는 것이므로, 펩타이드가 다이머 형태로 존재하는 경우에만 면역화학적 반응성을 나타낸다. 결과적으로, 항원 활성화는 다이머의 분해에 따라 손실되지만, 활성화는 모노머가 다이머를 형성하도록 결합하는 경우에는 복구된다. 또한, HEV 감염을 검출하고 진단하는 데 유용한 진단 방법 및 신규한 pE2 펩타이드가 활용되는 E형 간염 바이러스 감염을 예방하는 데 효과적인 백신 조성물의 용도도 또한 개시되어 있다.

특허청구의 범위

청구항 1.

SEQ ID NO:2로 정의된 아미노산 서열로 구성되는, 정제되고 분리된 펩타이드 pE2.

청구항 2.

제1항에 따른 아미노산 서열 및 이에 융합된 이종 아미노산 서열로 구성되는 재조합 융합 단백질.

청구항 3.

제2항에 있어서,

상기 이종 아미노산 서열이 글루타티온 S-트랜스퍼라아제를 코딩하는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 4.

화학적 합성 또는 재조합 DNA 발현에 의한, 제1항에 따른 pE2 펩타이드의 제조 방법.

청구항 5.

SEQ ID NO:1로 정의된 DNA 서열로 구성되는, 정제되고 분리된 핵산 분자인 E2.

청구항 6.

제1항에 따른 pE2 펩타이드를 코딩하는 DNA 서열로 구성되는, 정제되고 분리된 핵산 분자.

청구항 7.

SEQ ID NO:3으로 정의된 서열로 구성되는, 정제되고 분리된 핵산 분자.

청구항 8.

제5항 또는 제6항에 따른 핵산 분자를 함유하는 벡터로서, 상기 벡터는 적합한 숙주 세포 또는 미생물 내로 도입시, 상기 핵산 분자를 발현시킬 수 있는 벡터.

청구항 9.

제8항에 있어서,

상기 벡터가 플라스미드인 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 10.

제8항에 있어서,

상기 숙주 세포가 진핵세포인 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 11.

제10항에 있어서,

상기 진핵 세포가 *E.Coli*인 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 12.

제8항에 따른 벡터로 형질전환된 숙주 세포 또는 미생물.

청구항 13.

- 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드 또는 단백질을 코딩하는 핵산 분자를 적합한 숙주 세포 또는 미생물에서 발현시킬 수 있는 벡터 구조물 내로 삽입하는 단계;
 - 상기 숙주 세포 또는 미생물을 상기 벡터 구조물로 형질전환시키는 단계;
 - 상기 형질전환된 숙주 세포 또는 미생물을 배양하는 단계; 및
 - 상기 얻어진 펩타이드 또는 단백질 산물을 분리하고 정제하는 단계
- 를 포함하는, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드 또는 단백질의 제조 방법.

청구항 14.

- 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 pE2 펩타이드의 면역학적 유효량을 비-인간 포유류 숙주에게 주입하는 단계; 및
- 생산된 항체를 분리하고 정제하는 단계
- 를 포함하는, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 pE2 펩타이드에 대한, 정제된 항체의 제조 방법.

청구항 15.

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 pE2 펩타이드에 대한, 정제된 항체.

청구항 16.

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 pE2 펩타이드 및 제약학적으로 수용가능한 담체를 포함하는, E형 간염 바이러스(HEV)에 의한 감염에 대해 개체를 면역화하는 백신 조성물.

청구항 17.

삭제

청구항 18.

- SEQ ID NO:2로 정의되는 아미노산 서열로 구성되는, 정제되고 분리된 펩타이드인 pE2를 제공하는 단계;
- HEV 항체를 함유하는 것으로 의심되는 생물학적 테스트 샘플을 상기 pE2 펩타이드와 접촉시키는 단계;
- 상기 혼합물을 면역학적(항원-항체) 복합체를 형성시키기에 충분한 조건하에서 배양하는 단계; 및
- 혼합물에서의 면역학적 복합체의 존재는 테스트 샘플에서의 HEV의 존재를 나타내는 것으로, 상기 혼합물에 대하여 면역학적 복합체의 형성여부에 대하여 조사하는 단계를 포함하는, 생물학적 테스트 샘플에서 HEV 항체의 존재 또는 부재의 결정 방법.

청구항 19.

제18항에 있어서,

상기 생물학적 테스트 샘플은 인간 혈액, 혈청 또는 혈장인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20.

제18항 또는 제19항에 있어서,

상기 면역학적 복합체의 존재는, 반응이 일어나도록 하는 조건하에서 지시약과 함께 배양한 후에 결정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21.

제20항에 있어서,

상기 지시약은, 기질과 반응하여 착색된 산물을 형성하는 효소에 부착된 포유류의 항-인간 면역글로불린인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22.

SEQ ID NO:2로 정의된 아미노산 서열로 구성되는, 정제되고 분리된 펩타이드인 pE2; 및

상기 pE2 펩타이드를 함유하는 면역학적(항원-항체) 복합체를 검출할 수 있는 지시약을 포함하는, E형 간염 바이러스 (HEV)에 대한 항체 검출용 진단 테스트 키트.

청구항 23.

제22항에 있어서,

표준 대조군, 및

표본 희석물 및 세척 완충액 중 하나 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 진단 테스트 키트.

청구항 24.

제22항 또는 제23항에 있어서,

상기 pE2 펩타이드가 고체 지지체에 고정된 것을 특징으로 하는, 진단 테스트 키트.

청구항 25.

제24항에 있어서,

상기 고체 지지체가 적정 마이크로플레이트의 웰인 것을 특징으로 하는, 진단 테스트 키트.

청구항 26.

- 제15항에 따른 정제된 pE2 항체를 제공하는 단계;
- 상기 pE2 항체를 E2 항체 및 HEV 바이러스 입자를 함유하는 복합체를 형성시키는 조건하에서 생물학적 테스트 샘플과 함께 접촉시키고 배양하는 단계, 및
- 복합체의 형성은 테스트 샘플에서 HEV 바이러스 입자의 존재를 가리키는 것으로, 상기 혼합물을 상기 복합체의 존재에 대해 조사하는 단계를 포함하는, 생물학적 테스트 샘플에서 E형 바이러스 입자의 검출 방법.

청구항 27.

제26항에 있어서,

상기 pE2 항체에 의해 포획된 HEV 바이러스 입자의 존재는, 바이러스 RNA를 추출하고, 여기에 역전사 폴리머라아제 사슬연쇄 반응(RT-PCR)을 수행하여 결정되는 것을 특징으로 하는, 검출 방법.

청구항 28.

제15항에 따른 정제된 pE2 항체를 포함하는, 생물학적 테스트 샘플에서 E형 간염 바이러스(HEV) 분석물을 검출하기 위한 진단 시약.

청구항 29.

삭제

청구항 30.

제28항에 따른 진단 시약을 포함하는, 생물학적 테스트 샘플에서 E형 간염 바이러스(HEV)를 검출하기 위한 진단 테스트 키트.

청구항 31.

제30항에 있어서,

상기 정제된 pE2 항체가 고체 지지체에 고정된 것을 특징으로 하는, 진단 테스트 키트.

청구항 32.

삭제

청구항 33.

생물학적 테스트 샘플에서 E형 간염 바이러스(HEV) 항체의 존재 또는 부재를 결정하는 진단 시약으로,

제1항에 따른 pE2 펩타이드와 공통성이 있으며, pE2 펩타이드에 대한 항체에 의해 인식될 수 있는 하나 이상의 항원 결정 인자를 가지는 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 포함하는 진단 시약.

명세서

기술분야

본 발명은 E형 간염 바이러스(HEV)를 가진 중국인 균주의 게놈에서 클로닝된 면역반응성이 높은 바이러스 펩타이드인 pE2 및 HEV의 검출 및 진단을 위한 신뢰할 수 있는 진단 방법의 개발에 대한 이의 용도와 인간에서 HEV의 예방을 위한 백신 조성물에 대한 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

E형 간염 바이러스(HEV)는 장으로 전달된 간염의 원인으로 1983년에 처음 발견되었다(Balayan et al., 1983). 전체 길이의 바이러스 게놈은 1991년에 처음 클로닝되고 서열 결정되었고, 이것은 단일 가닥의 포지티브 센스의 언엔벨로프 RNA라는 것이 밝혀졌다(Tam et al., 1991). 비록 형태학적으로 Caliciviridae의 일원들과 비슷하지만(Bradley et al., 1988; Huang et al., 1992; Panda et al., 1989), 이것은 독특한 게놈의 조직을 가진다(Berke et al., 1997). 서열 분석에 의거하여, 7.2 kb의 바이러스 게놈은 3개의 오픈 리딩 프레임(ORF)(도 1)을 가지는 것으로 추측된다(Tam et al., 1991; Aye et al., 1992; Aye et al., 1993; Huang et al., 1992; Reyes et al., 1993). 바이러스의 비구조 단백질이 바이러스 게놈의 5' 말단에 위치한 ORF1에 의해 폴리프로테인으로 코딩되었다. ORF2는 이 게놈의 3' 말단에 위치하였고 주된 구조 단백질을 코딩하였다. ORF3의 5' 말단은 ORF1의 3' 말단과 하나의 염기에 중복이 있고 3' 말단은 ORF2의 5' 말단과 339개의 염기에 중복을 가진다. ORF3은 기능이 아직 알려지지 않은 다른 구조 단백질을 코딩하는 것으로 알려져 있다(Coursaget et al., 1993; Khudyakov et al., 1993; Khudyakov et al., 1994).

ORF2의 주요 HEV 구조 단백질의 아미노 말단과 카르복시 말단의 양쪽에서 유래된 절단된 재조합 펩타이드가 바이러스 유사 입자로 자체 조립될 수 있다는 것이 최근의 연구에서 밝혀졌다(Li et al., 1997). 비록 크기는 더 작지만 이들 바이러스-유사 입자는 감염성 바이러스의 캡시드 단백질과 형태적으로 유사하고 항원적으로 유사하였다(Li et al., 1997; Xing et al., 1999). 이러한 발견에 의거하여, 재조합 펩타이드가 바이러스-유사 입자로 조립되는 데에는 전체 길이의 HEV 구조 단백질이 감염성 바이러스 입자의 더 큰 캡시드로 조립하는 것과 비슷한 필요조건이 있을 것으로 예측된다. 특히, 이러한 발견은 ORF2에 의해 코딩된 구조 단백질만으로도 바이러스 캡시드로 자체 조립하기에 충분할 수 있다는 것을 제안한다. 또한, 아미노산 잔기 112번 내지 608번에서 얻은 전체 길이의 ORF 단백질의 도메인 내에서 캡시드 단백질의 형성에 관여하는 상호작용이 일어날 수도 있다는 것이 밝혀졌다(Xing et al., 1999). 12.35의 높은 등전점으로, 주요 구조 단백질의 아미노산 말단 도메인에 위치한 111개 길이의 아미노산 서열이 바이러스의 패키지에 관여하는 것으로 믿어진다(Britton and Heinz, 1990). 그러나 이러한 도메인은 바이러스 캡시드 자체의 조립에는 참여하지 않는다는 것이 분명하다. 주요 구조 단백질의 카르복시-말단 도메인은 바이러스 캡시드의 조립에는 바로 관여하지 않지만, Li 등(1997)은 이들 도메인의 적합한 단백질 가수분해 절단이 바이러스-유사 입자의 조립에 필수적이라는 것을 밝혀냈다.

E형 간염은 유행성 및 산발형 모두가 개발도상국에서 주로 발생한다. 1950년대 내지 1980년대에 발생된 E형 간염의 여러 대규모 발생은 하수로 오염된 식수에 의해 일어났다(Visvanthan, 1957; Wong et al., 1980; Myint et al., 1985; Belabbes et al., 1985; Hau et al., 1999). 감염은 통상 자기 한정적이지만 임신 중에 감염이 발생하는 경우, 심각한 합병증이 보고된 바 있다(Tsega et al., 1992; Dilawari et al., 1994; Hussaini et al., 1997). 바이러스 감염에 대한 처치에 사용되는 중요한 예방 전략은 HEV 환경 표본을 감시하고 검출하여 공중 보건과 환경적 보호를 보장하는 것이다. 그러나 바이러스 입자를 수집하고 농축하기 위해 현재 사용되는 전통적인 방법은 HEV의 잠재적인 공급원의 검사와 발견을 제한하는 몇 가지의 잘 알려진 단점이 있다. 현재 활용되고 있는 가장 보편적인 방법 중 2가지는 흡착과 원심분리이다.

흡수 방법에서 바이러스는 우선 미세구의 필터로 흡착되고 다량의 용리액으로 용리시켜 테스트 샘플로부터 농축된다. 그러나 이러한 기술은 바이러스의 검출을 방해할 수 있는 효소와 단백질과 같은 다양한 기타 용질을 효과적으로 농축할 수도 있다. 특히, 자연적으로 발생하는 무기 및 유기 용질은 표적 게놈의 증식에 유용한 핵산 폴리머라아제를 억제한다(예를 들면 역전사 효소 및 Taq 폴리머라아제)(Tsai et al., 1992; 1993). 테스트 샘플에서 뉴클레아제 및 프로테아제의 존재 가능성은 이들이 증식하기 전 바이러스 게놈을 분해하고, 따라서, 불명확한 결과를 초래한다. 또한, 다양한 단백질, 탄수화물 및 기타 유기 화합물은 핵산 폴리머라아제의 적절한 기능에 필수적인 뉴클레오타이드 및 마그네슘 이온과 결합할 수도 있지만 다른 용질은 이들 폴리머라아제에 궁극적으로 손상을 입힐 수 있는 독성 작용을 보일 수도 있다(Demeke 및 Adams, 1992; Imai et al., 1992; Kolk et al., 1992).

원심분리법에서는, 테스트 샘플을 균질화한 후 원심분리를 반복한다. 이 과정 중에, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 상층액에 첨가하고 다시 원심분리한다. 최종 펠릿을 완충액에서 재현탁하여도, 최종 농축물은 여전히 세포 배양, 역전사 및 폴리머라아제 연쇄 반응과 같은 진단 방법의 후속 단계를 방해할 수 있는 독성 물질을 함유한다. 결과적으로, 테스트 샘플에서 유래된 농축물이 세포팩스 컬럼에서의 겔 여과를 통해 독성성분을 제거하는 것이 필수적이다.

바이러스 감염을 막기에 유용한 중요한 다른 전략은 공공의 건강상 안정성과 보호를 보장하기 위해 HEV에 대한 면역화 백신의 활용이 있다. 그러나 생 약독화 또는 사멸된 바이러스 입자를 이용해 HEV 감염에 대한 백신을 개발하는 것은 배양세포 내에서 바이러스를 증식시키는 데 있어서의 어려움 때문에 실현되지 않았다. 다른 방안으로, 일부 재조합 HEV 펩타이드, 특히 바이러스 계놈의 구조 유전자로부터 유래된 재조합 HEV 펩타이드가 HEV 발병에 대한 예방을 제공하는 데 더욱 유망하다고 보여진다(Tsarev et al., 1994a; Tsarev et al., 1997). 약독화 바이러스와 비교하여 백신 제제에 재조합 펩타이드를 사용하는 데 있어서의 이점은 펩타이드의 생산이 더욱 효과적이고 정제가 더욱 편리하다는 것이다. 더욱이, 얻어진 백신은 임의의 무손상 생바이러스 입자를 함유할 수 있는 가능성이 있어서 감염의 잠재적인 위험을 피할 수 없다.

상기 관점에서, 상기에 기재된 단점을 필할 수 있을 뿐 아니라 생물학적 및 환경 표본에서 HEV를 검출하기 위한 더욱 민감한 분석을 제공할 수 있는 신뢰성 있는 HEV 검출 및 진단 방법의 필요성이 남아 있다. 본 발명에 따르면, 면역반응성이 높은 재조합 바이러스 펩타이드인 E형 간염 바이러스(HEV)인 pE2를 사용하는 진단 방법이 제공된다. 이 pE2는 계놈의 ORF2의 카르복시-말단 부위에서 유래하여 HEV로 현재 감염되었거나 과거에 감염되었던 환자로부터 얻은 혈청과 반응성이 매우 높은 것으로 검증된 것이다. 또한, pE2 펩타이드는 이의 아미노산 서열의 일부가 다른 HEV 분리주 중에서 고도로 보존되어 있기 때문에 E형 간염 바이러스와 항원적으로 관련된 것이다. 앞서 기재된 바와 이하 본 명세서에서 추가 설명되는 바와 같이, pE2 펩타이드의 항원 특성은 HEV 감염의 면역화 및 예방을 위한 백신으로서 우수한 후보체가 될 것이다. 따라서, 본 발명에 의해 새로운 pE2 펩타이드가 사용되는 E형 간염 바이러스의 감염을 예방하는 데 효과적인 백신 조성물 및 HEV 감염을 검출하는 데 유용한 진단 방법이 제공된다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 목적은 pE2 모노머가 다imer화하여 호모다imer를 형성한 후 나타나는 형태적 항원 결정인자(conformational antigenic determinant)의 존재에 기인하여, E형 간염 바이러스로 감염된 개인에서 얻은 혈청과 높은 면역 반응성을 가진 E형 간염 바이러스(HEV) 펩타이드인 E2를 제공하고자 하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 임상 테스트 샘플 및 생물학적 테스트 샘플에서 IgM 및 IgG 항체의 검출을 통해 HEV의 현재 감염 및 과거 감염을 검사하기 위한 개선되고 보다 신뢰할 수 있는 방법을 제공하고자 하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 테스트 샘플에서 HEV 입자를 효과적으로 배양하고 분리하고 농축할 수 있는 pE2 다imer에 대해 특이적으로 발생하는 항체를 이용한 공중 보건 및 환경 연구에서 HEV를 감시하고 검출하는 개선되고 보다 신뢰성 있는 진단 방법을 제공하고자 하는 것이다. 이것으로 다른 종래의 방법을 사용하는 것과 관련된 단점을 극복할 수 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 pE2 다imer를 포함하는 백신 조성물 및 HEV 감염의 면역화 및 예방을 위한 이의 용도에 관한 것이다.

표 1에 도시된 바와 같이, 뉴클레오타이드 서열 상동성의 비율은 상이한 HEV 분리주 중에서 77% 내지 100%로 다양할 수 있지만, 아미노산 서열 상동성이 높은 비율을 나타내는 점으로 볼 때, 이러한 변화는 자연적으로 일반적으로 보존되는 것이다. HEV의 상이한 분리주를 통해 밝혀진 바와 같이 HEV 계놈 내에서의 보존은 (1) pE2 펩타이드가 HEV의 구조 단백질의 중요한 기능성 도메인일 수 있고, (2) pE2 펩타이드를 사용한 진단 테스트는 HEV의 상이한 분리주를 검출하는 데 유용할 것이고, (3) pE2 펩타이드에서 제조된 백신은 상이한 HEV 분리주에 대한 예방책일 수도 있다는 것을 의미한다.

< 표 1 >

HEV 주요 구조 단백질의 보존 부위

균주	지역	서열 상동성(%)		참고문헌
		뉴클레오타이드	아미노산	
D11092	중국	100	100	Aye et al., 1992
D10330	중국	92.6	98.6	Aye et al., 1993
L25547	중국	94.1	99.5	Yin et al., 1994
M73218	버마	92.9	100	Tam et al., 1991
M74506	멕시코	78.2	94.3	Purdy et al., 1999
M80591	파키스탄	98.3	100	Tsarev et al., 1992

M94177	중국	98.6	99.5	Bi et al., 1992
X98292	인도	89.7	99	Donati et al., 1997
M74506	멕시코	78.2	94.3	Huang et al., 1992
AF035437	미국	76.7	92.9	Schlauder et al., 1998

본 발명에 따르면, E형 바이러스 (HEV) 게놈의 ORF2의 카르복시 말단 부위에서 유래된 면역 반응성이 높은 바이러스 펩타이드 pE2가 제공된다. 상기 pE2는 SEQ ID NO:2로 정의된 아미노산 서열을 포함한다. pE2 펩타이드의 특징은 자연적으로 호모다이머를 형성하기 위해 펩타이드의 모노머 사이에 비공유 상호작용에 의해서만 발견되는 형태적 항원 결정인자를 가진다는 것이다. 또한, 면역성이 높은 pE2 구조 단백질의 클로닝 및 발현 그리고 이의 정제 및 특장화는 본 명세서에 기재되어 있다.

HEV 펩타이드인 본 발명의 pE2는 앞에서 설명되어 있는 HEV 주된 구조 단백질의 도메인에서 유래된 것이다. ORE2 뉴클레오타이드 서열의 카르복시 도메인의 번역에 의해, pE2 펩타이드는 본래 전체 길이 단백질의 카르복시 도메인에 해당하는 길이인 267개의 아미노산 잔기일 것으로 예상된다. 유사한 펩타이드 지도작성 연구(Khudyakov et al., 1993; Khudyakov et al., 1994)를 근거로 할 때, 이 펩타이드는 아미노 말단과 카르복시 말단 모두에서 선형 에피토프를 함유할 것이라 예측되었다. 그러나 클로닝된 서열에서 틀이동 돌연변이는 번역을 본래 cDNA 서열의 상류에 위치한 새로운 종결 코돈에서 조기 종결시킴으로써 213개 아미노산 잔기 길이의 더 작은 펩타이드(도 2)로 대체된다.

pE2 펩타이드의 특장화에서는 바이러스-유사 입자의 자기 조립을 억제하는 카르복시 도메인이 효과적으로 제거된 카르복시 말단에서 절단이 있음이 나타났다. 결과적으로, pE2 펩타이드는 모노머로서 다이머화에 의해 서로 상호작용하여, 호모다이머를 천연적으로 생산한다. 또한, pE2 펩타이드가 HEV 인간 혈청에 의해 다이머 형태에서 강하게 인지되고 이것은 호모다이머가 HEV 캡시드 단백질의 특장한 구조적 특장을 모방할 수 있다는 것을 시사한다. 따라서, 이것은 다른 연구자에 의해 보고된 박테리아에 의해 발현된 HEV 펩타이드와 이것을 구별하기 위해 제공되는 pE2 펩타이드의 다이머화에 의해 유발된 형태적 항원 결정인자이다(Yarbough et al., 1991; Purdy et al., 1992; Li et al., 1994; Li et al., 1997). 이전에 보고된 HEV 펩타이드의 항원 활성화는 주로 해당하는 1차 구조체 내에 함유된 선형 에피토프의 존재에 대해 기여하지만, 본 발명의 pE2 펩타이드의 항원 활성화는 주로 호모다이머의 4차 구조에 관련된다. 따라서, pE2 펩타이드의 항원 도메인은 다른 유사한 형태적 항원 결정인자를 펩타이드 지도작성에 의해 예상되거나 이전에 개시된바가 없기 때문에 ORF2 부위의 아미노 말단 부위 내에 한정된 이전에 확인된 선형 에피토프와는 분명하게 다르다.

본 명세서에 제시되고 설명된 바와 같이, 항원 활성화의 2가지 상이한 유형이 새로운 pE2 펩타이드에서 나타났다. 첫 번째 유형의 항원 활성화는 지금까지 알려진 박테리아에 의해 발현된 HEV 항원 펩타이드와 관련된 활성화의 유형과 유사한 pE2 펩타이드의 모노머 형태와 관련이 있다(Yarbough et al., 1991; Purdy et al., 1992; Li et al., 1994). 이러한 유형의 항원 활성화는 수용액 중의 해당 펩타이드에 의해 예상되는 다양한 구조에 해당하는 2차 및 3차 구조에 의해 영향을 받을 수 있지만, 해당 펩타이드의 1차 구조에 위치한 선형 에피토프에 주로 기인한 것이다(Li et al., 1997). 그러나 pE2 펩타이드에 의해 밝혀진 2차 이상의 현저한 항원 활성화는 펩타이드의 다이머 형태와 관련되어 있고, 모노머 형태보다 면역 반응성이 높으므로 밝혀졌다. 실험적 연구에서는 HEV 반응성 인간 혈청에 존재하는 pE2 다이머에 대해 반응성인 항원의 수준은 종종 pE2 모노머에 대해 반응성인 항원 보다 훨씬 높은 수준에서 관찰되는 것으로 보고되었다. 이전에는 보고된 적이 없는 이러한 새로운 유형의 항원 활성화는 주로 pE2 호모다이머에 내재한 새로운 구조적 항원 결정인자에 주로 기인한다. 또한, 항원 활성화는 다이머의 분리에 따라 소멸되었다. 이러한 작용은 형태적 항원 결정인자와 관련된 항원 활성화가 호모다이머를 형성하기 위한 pE2 모노머 사이의 비공유적인 상호작용에 의해, 유발되는 pE2 펩타이드의 다이머 형태 또는 4차 구조와 관련 있음을 예시한다.

E2 DNA 서열

본 발명의 일 양태에 따르면, 구조적 펩타이드인 pE2를 코딩하는 정제된 핵산 분자인 E2가 제공된다. E2는 SEQ ID NO:1에 정의된 cDNA 서열 및 그의 상동 서열 또는 단편을 포함한다.

핵산 서열인 E2는 중국인의 HEV 균주 D11092(도 2)의 E형 간염 바이러스(HEV) 게놈의 ORF2 부위의 카르복시 말단에서 처음 분리되었다. 811개의 염기쌍을 포함하고 7127번 내지 7129번의 위치에 있는 정지 코돈을 포함하는 6326번 내지 7136번의 위치에 걸쳐있는 본래의 클로닝 서열은 우연하게 6857번 위치에있는 단일 염기쌍의 결실을 가진다. 이것은 아미노 PCR 증폭시 오류에 기인한 것 같다(도 2). 얻어진 틀이동 돌연변이는 새로운 종결 코돈(6966번에서 6968번의 위치)에서 뉴클레오타이드 서열의 번역을 조기 종결시킨다. 핵산 서열의 후속 번역으로 새로운 pE2 펩타이드와 새로운 E2 뉴클

레오타이드 서열(즉, SEQ ID NO:1)의 생성과 발견이 유도된다. 따라서, 도 2를 참조하면 새로운 E2 뉴클레오타이드 서열은 6326번에서 6968번 위치에 걸쳐 있으며, 여기서는 6968번 위치 이후의 새로운 정지 코돈의 하류에 위치하는 서열의 단편이 제거되어 있으며, 6957번 위치에서는 단일 염기쌍의 결실이 발생해 있다.

유전자 코드의 축퇴에 기인하여, 하나 이상의 코돈이 SEQ ID NO:2(즉, pE2)로 표현되는 서열의 임의의 주어진 아미노산 잔기를 코딩할 수 있으며, 이로써 SEQ ID NO:1(즉 E2)외에 다양한 핵산 서열이 생성될 수 있으며, 이는 pE2 펩타이드를 코딩할 수도 있다는 것을 당업자는 잘 이해할 것이다. 따라서, 본 발명은 SEQ ID NO:1에 대한 상보적인 핵산 서열을 포함하는 가능한 코돈 선택에 의거한 조합의 선택에 의해 만들어질 수 있는 각각의 모든 가능한 뉴클레오타이드 서열을 고려한 것이다. 이러한 조합은 pE2 펩타이드의 핵산 서열에 적용되는 표준 트리플렛 유전자 코드에 따라 만들어진 것으로 이러한 모든 변종은 특정하게 개시되는 것으로 간주된다.

또한, 예를 들면 치환, 삽입, 결실, 또는 확장을 포함하는 다양한 pE2 펩타이드 유도체 또는 항원 등가물이 만들어질 수 있다. 그 실질적인 결과는 pE2 펩타이드의 면역화학적 반응성을 변화시키지 않는다. 따라서, pE2 펩타이드의 면역학적 활성 유도체를 코딩하는 핵산 서열은 본 발명의 일부로 간주된다. 이러한 유도체를 제조하는 방법은 이미 당업자에 의해 인식되어 있을 것이다(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2판, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 미국 뉴욕주 Plainview, 1989). 본 발명에 따르면, pE2 펩타이드 또는 항원 등가물의 아미노산 서열을 코딩하는 모든 핵산 서열은 pE2를 발현하는 재조합 분자를 생성하는 데 이용할 수 있다.

pE2 아미노산 서열

본 발명의 다른 특징에 따르면, SEQ ID NO:2로 표현되는 아미노산 서열 또는 그의 상동 서열, 단편 또는 유사체를 포함하는 구조적인 HEV 펩타이드 항원인 pE2를 제공한다.

폴리펩타이드의 3차 구조를 결정하는 정보는 전적으로 아미노산 서열 내에서 함유된다는 것이 잘 확립되어 있다. 또한 특정한 형태적 에피토프를 한정하는 아미노산을 포함하는 서열의 일부가 분자의 길이에 따라 개입 서열에 의해 광범위하게 산포되어 있을 수 있다. 예상되는 폴리펩타이드의 3차(및 4차) 구조에 따라, 형태적 에피토프의 3차원 조합은 폴리펩타이드 1차 구조의 3차원 접힘에 기인하여 실제로 이들을 바른 형태를 가지도록 한다. 따라서, 아미노산 서열은 폴리펩타이드의 고도의 구조 조직화에 따라 아미노산 서열을 어느 정도 변경시킬 수 있고, 이는 에피토프의 형태적 구조 및 면역화학적 활성을 변경하지 않는다고 예상된다. 따라서, 다양한 에피토프를 한정하는 잔기의 군 사이에 위치하는 폴리펩타이드의 분획은 개입 서열 내에서의 잔기의 확장, 결실, 삽입 또는 치환에 따라 에피토프의 형태를 결정적으로 변경시키는 않을 것이다.

또한, 특정 에피토프를 한정하는 서열 내에 함유된 아미노산 잔기의 화학적 특징에 따라, 유사한 작용기를 가진 잔기로 치환하는 것은 에피토프의 면역화학적 반응성을 변경시키지는 않을 것이다. 이점에서, pE2 펩타이드의 면역화학적 반응성이 보존되어 항-pE2 항체에 의해 인식될 수 있다면, 다양한 아미노산 잔기가 결실되거나, 삽입되거나 다른 아미노산 잔기에 의해 치환되어 유도체를 생성할 수 있다. 물론, 관여된 특정 변경이 상이한 HEV 분리주 중에 균주-대-균주 변동을 다루는 것과 같은 이용에 이점을 제공하기도 한다(표 1). 또한, 본 발명의 범주 내에 고려되는 아미노산 치환은 치환 잔기의 화학적 상태가 본래 아미노산의 상태와 유사한 것이다. 아미노산은 일반적으로 이들의 작용기에 따라 유사한 화학적 특징을 가지는 것으로 알려졌고 따라서 Gly/Ala; Asn/Glu; Val/Ile/Leu; Ser/Thr; Lys/Arg; 및 Phe/Thr과 같은 조합을 포함한다. 따라서 HEV 항체에 대한 면역화학적 반응성이 보존된다면, pE2 펩타이드의 이들 유도체는 SEQ ID NO:2로 정의되는 아미노산 서열의 확장, 치환, 삽입 및/또는 결실을 포함할 수 있다. 2개의 펩타이드가 pE2 펩타이드에 대해 동일한 항체를 유발하는 것으로 인정된다면 등가의 면역화학적 반응성을 가지고 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 할 수 있다.

pE2 펩타이드의 생성

본 발명의 pE2 펩타이드는 관심의 입체구조의 에피토프를 제공하는 화학적 합성방법 및 재조합 DNA 방법을 포함하는 공지된 방법에 의해 생성될 수 있다. pE2 펩타이드를 제조하는 바람직한 방법은 숙주 세포에서 재조합 DNA를 발현시킨 후 펩타이드를 분리하고 정제하는 것이다. 본 발명에 따르면, pE2 펩타이드, 그의 펩타이드의 단편, 융합 단백질 또는 기능성 등가물을 코딩하는 핵산 서열을 적합한 숙주 세포에서 pE2 발현을 지시하는 재조합 DNA 분자에 이용될 수도 있다. 면역학적으로 활성인 pE2 펩타이드를 발현시키기 위하여, pE2를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열(즉, SEQ ID NO:1) 또는 기능성 등가물을 삽입될 코딩 서열의 전사 및 번역을 위한 필수 요소를 함유한 적합한 발현 벡터 내로 삽입한다. 선택된 숙주 세포에 따라, 발현 벡터는 통상 DNA 서열의 발현에 효과적인 DNA의 조절 인자를 함유하게 될 것이고, 통상 프로모터, 리보솜 결합자리, 번역 개시 및 정지 자리 및 전사 종결 자리를 포함한다.

따라서, 본 발명의 다른 특징에 따르면, HEV 게놈에서 cDNA 서열을 분리하는 단계, cDNA 서열을 적합한 숙주 세포 내에서 발현시킬 수 있는 발현 벡터로 삽입하는 단계, 상기 숙주 세포를 상기 발현 벡터로 형질전환시키는 단계; 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 pE2 펩타이드를 분리하고 정제하는 단계를 포함하는 본 발명의 pE2 펩타이드의 제조방법이 제공된다.

당업자에게 잘 알려진 방법을 이용하여 pE2 코딩 서열 및 적절한 전사 및 번역 조절자를 함유하는 발현 벡터를 만들 수 있다. 상기에서 기재된 바로 얻어진 소망하는 cDNA 서열은 공지된 표준 방법을 이용하여 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다 (Sambrook et al., 1989 및 Ausubel et al., 1989). 발현 벡터는 통상 제한 효소를 이용하여 절단하고 cDNA 서열을 두가닥 말단 또는 한가닥 말단 결찰을 이용하여 삽입한다. 일단 삽입이 일어나면 cDNA 서열이 이를 발현시키는 cDNA의 기능 요소의 제어하에 있도록, 발현 벡터 내에 편리한 위치의 제한 자리에서 절단을 통상 실시한다. 필요에 따라 숙주 세포의 형질전환 및 배양 및 펩타이드의 분리는 표준 기술을 이용하여 실시할 수 있다.

박테리아계에서, 다수의 발현 벡터를 발현시키고자 하는 펩타이드 또는 단백질용으로 의도된 용도에 따라 선택할 수 있다. 예를 들면 다량의 펩타이드 또는 단백질이 항체의 생산을 위해 필요한 경우, 용이하게 정제되는 융합 단백질의 고도의 발현을 지시하는 벡터가 바람직할 것이다. 본 발명의 관련된 특징에 따르면, pE2 펩타이드를 코딩하는 SEQ ID NO:1로 표현되는 핵산 서열인 E2를 함유하는 발현 벡터가 제공된다. 이때, 벡터는 핵산 서열인 E2를 발현시킬 수 있다. 발현 벡터는 *E.coli*와 같은 박테리아계에서 발현하는 것이 적합하지만, 다작용성 *E.coli* 클로닝 및 발현 벡터 pGEX(Promega, 미국 위스콘신주 MAdison)으로 제한되는 것은 아니다. 특정 벡터에서, pE2 코딩 서열은 이의 5'-말단에서 글루타미온 S-트랜스퍼라아제(GST)용 이형 서열을 가진 프레임 내의 3'-말단의 벡터 내로 결찰하여 얻어진 하이브리드 폴리뉴클레오타이드 서열은 융합 단백질로 발현된다. 일반적으로, 상기 융합 단백질은 가용성이고 용균된 세포로부터 글루타미온-아가로스 비드에 흡착시킨 뒤, 유리 글루타미온의 존재하에서 용리시켜 쉽게 정제할 수 있다. 이러한 시스템에서 제조된 단백질은 관심의 클로닝된 펩타이드가 트롬빈과 같은 적합한 프로테아제를 첨가함으로써 GST 성분으로부터 분리할 수 있도록 절단 자리를 포함하도록 고안된 것이다.

따라서, 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, SEQ ID NO:2로 표현되는 pE2의 HEV 펩타이드를 포함하는 융합 단백질인 GE2를 발현하는 플라스미드가 제공되고 이것은 글루타미온-S-트랜스퍼라아제(GST) 폴리펩타이드에 융합된다. SEQ ID NO:1로 표현되는 E2 핵산 서열은 pGEX₂₀ 발현 벡터내로 삽입되어 E2 뉴클레오타이드 서열의 오픈 리딩 프레임이 GST 오픈 리딩 프레임을 가진 틀내에 있도록 한다. 본 발명의 플라스미드는 7127번 내지 7129번 위치에 있는 정지 코돈을 가진 6326번 내지 7136번 위치에 있는 811개의 염기쌍 서열(도 2)을 포함한다. 그러나 아마도 PCR 증폭 오류에 기인한 6957 위치에 있는 단일 염기쌍 결실은 새로운 종결 자리(6966번 내지 6968번 위치)에서 뉴클레오타이드 서열의 번역을 조기 종결 시키는 틀이동 돌연변이를 초래하게 되어 새로운 pE2 펩타이드의 생성을 초래한다. 따라서, 새로운 E2 서열은 6957 위치에서의 단일 염기쌍 결실을 가지는 6326번 내지 6968번 위치에 걸쳐있게 되고 6968번 위치 뒤의 새로운 종결 코돈의 하류에 위치된 단편이 제거된다(도 2). 새로운 pE2 펩타이드를 코딩하는 클로닝된 E2 서열은 SEQ ID NO:1으로 확인된 642개의 염기쌍을 가진다.

GE2 단백질

분리된 융합 단백질인 GE2는 전체 GST 폴리펩타이드에 융합된 전체 pE2 펩타이드를 함유하며, 약 92 kD이다. 그러나 본 발명의 GE2 융합 단백질은 면역원성인 pE2 펩타이드의 이보다 작은 부분을 함유할 수 있고, 따라서 92 kD보다 작을 수 있다고 기대할 수 있다. 융합 단백질인 GE2는 본 명세서에서 pE2 아미노산 서열과 GST 또는 이중 단백질 서열 사이에 절단 자리를 함유하도록 조작하여 pE2 펩타이드는 트롬빈을 이용하여 글루타미온 세파로즈-4B 컬럼과 결합시키는 경우 이중 모이티로부터 절단하여 정제할 수 있다. 또한, 정제 및 특정화 목적 외에, GE2 폴리펩타이드는 또한 적합한 숙주 세포내에서 pE2 펩타이드의 발현을 지시하고 확인하는 데 유용하며, pE2 펩타이드의 에피토프에 특이적인 다중 클론성 항혈청 또는 단일 클론성 항체를 성장시키는 데 유용할 것이다. 즉, 분리된 GE2 폴리펩타이드로 포유류를 면역화하여 발생된 다중 클론성 항혈청 또는 단중 클론성 항체는 본 명세서에 기재된 바와 같이 생물학적 테스트 샘플에서 HEV 입자의 존재를 분석하는 데 유용하다.

pE2 진단 시약

본 명세서에서 제공된 형태적 pE2 펩타이드를 HEV 항체의 존재에 대해 생리적 테스트 샘플을 검색하는 데 사용되는 진단 분석에서 면역시약으로 채용하여, 실무자와 의료진에게 HEV 감염의 검출 및 진단을 도와줄 수 있다. 따라서, 본 발명은 pE2 펩타이드를 이용한 생물학적 테스트 샘플에서 항-HEV 항체를 면역화학적으로 검출하기 위한 방법을 제공한다. 필수

적으로, 항-HEV 항체를 검출하기 위한 포획 항체로서 pE2를 활용하도록 설정된 임의의 면역분석 포맷을 채용할 수 있다. 면역분석을 실시하는 방법은 종래에 잘 공지된 것이고 본 발명은 임의의 특정 면역분석으로 한정하고자 하는 것은 아니다. 동종 및 이종의 면역분석을 이용할 수도 있다.

일반적으로, HEV 항체를 함유하는 것으로 의심되는 생물학적 테스트 샘플은 반응이 일어나도록 하는 조건과 시간에서 pE2 펩타이드와 접촉시켜 배양한다. 바람직한 pE2 펩타이드는 적합한 고체 지지체에 부착된 것이다. HEV 항체가 테스트 샘플 내에 존재한다면, pE2 펩타이드와 면역학적 복합체(항원-항체 복합체)를 형성하는 고체 지지체에 부착될 것이다. 선택적으로, 고체 지지체를 완충용액으로 세척하여 결합되지 않은 임의의 성분을 제거하여, 특정 경우, 분석의 감도의 향상을 도울 수 있다. 세척후, 면역학적 복합체를 지시약과 반응시켜 제2 복합체를 형성할 수 있는 조건과 시간동안 배양한다. 면역학적 복합체는 분석의 포맷에 따라 다수의 알려진 기술에 의해 검출된다. 예를 들면 라벨 또는 신호-발생 성분(예를 들면 효소)과 복합체를 형성하는 항-포유류 면역글로블린의 접합체를 통상 지시약으로 사용한다. 면역학적 복합체의 존재는 테스트 샘플에서 HEV에 대한 항체의 존재를 확인시켜주고, 발생된 신호를 측정하여 결정된다. 많은 지시약을 이용하는 경우, 존재하는 항체의 함량은 일반적으로 발생된 신호에 비례한다. 테스트 샘플에서 면역학적 복합체의 존재는 예를 들면 자동 스캐닝 및 해석 장치를 이용하여 가시적으로 또는 기계적으로 검출할 수 있다.

적합한 고체 지지체는 실시된 면역분석 포맷의 형태에 따라 다르겠지만, 선택된 지지체의 종류가 합리적인 강도를 가지고 면역학적 복합체의 면역반응성을 억제하지 않고 신호-발생 성분으로부터 검출가능한 신호의 생성을 방해하지 않는 것이 바람직하다. 고체 지지체는 예로서 반응 트레이의 마이크로웰의 웰, 시험관, 시트, 플레이트, 슬라이드, 비드(예를 들면 폴리스티렌 또는 유리), 니트로셀룰로오즈 스트립, 막, 락텍스 입자와 같은 미립자, 유리, 플라스틱 및 기타의 칩을 포함한다.

면역학적 복합체의 형성을 탐지하는 수단으로 사용된 라벨 또는 신호-발생 성분은 침전 또는 색깔의 변화에 의한 가시적인 검출, 현미경에 의한 가시적 검출, 또는 분광기, 방사선 측정 등에 의한 자동 검출이 가능하다. 신호-발생 성분의 예로는 콜로이드성 금, 형광성 화합물, 발광 화합물, 발색단, 방사성 원소, 효소(예를 들면 알칼리 포스파타제, 양고추냉이 퍼옥시다제 및 베타-갈락토시다제) 및 강화 화합물(예를 들면 비오틴, 항티오딘 및 아비딘)을 포함한다.

따라서, 본 발명의 다른 특징은 생물학적 샘플에 존재하는 HEV 항체의 진단 또는 검색 방법을 제공하며, 다음 단계를 포함한다:

SEQ ID NO:2로 정의되는 아미노산 서열, 그의 상동 서열, 단편 또는 유사체를 포함하며, 고체 지지체 상에서 바람직하게 고정된 pE2 펩타이드를 제공하는 단계,

상기 pE2 펩타이드와 항-HEV 항체의 면역학적(항원-항체) 복합체를 형성하는 조건하에서 상기 pE2 펩타이드와 생물학적 테스트 샘플에 접촉시키고 배양하는 단계,

얻어진 혼합물로부터 미결합 성분을 가능한 제거하는 단계,

상기 얻어진 혼합물을 지시약과 함께 배양하는 단계, 및

상기 혼합물을 면역학적 복합체의 존재에 대해 시험하여 면역학적 복합체의 형성이 테스트 샘플 내에 E형 간염 바이러스(HEV)에 대한 항체의 존재를 나타내도록 하는 단계.

항-pE2 항체의 생성

pE2 펩타이드에 의해 나타난 높은 면역화학적 반응성에 기인하여, pE2 펩타이드에 대해 특이적으로 반응하는 항체가 본 발명의 해당 기술분야에 잘 알려진 기술에 의해 생산될 수 있다. 본 발명의 pE2 펩타이드의 형태적 항원 결정인자가 HEV 캡시드 단백질의 구조 특징과 유사하기 때문에, pE2 펩타이드는 다중 클론성 및 단일 클론성 항체 모두의 생산에 유용하다. 또한, pE2 펩타이드에 대한 이들 항체 또는 그의 단편은 바이러스성 입자 및/또는 항원의 분리 및 검색을 통해 HEV 감염에 대한 가시적인 면역시약으로 진단 테스트의 개발에 특히 유용하다. 따라서, 항-pE2 항체는 생물학적 샘플에서 HEV 항원의 존재를 검출하기 위한 면역분석 포맷 및 HEV 바이러스 입자의 소량의 샘플이 분리되고 농축될 수 있는 면역 포획 포맷을 포함하는 다수의 임상 진단 과정에 유용할 수 있다(Harlow and Lane, Antibodies: A laboratory Manual, 1988, Cold Springs Harbor Laboratory Press).

본 발명의 pE2 펩타이드에 대한 다중 클론성 항체가 바람직하다면, 선택된 비-인간의 포유류 숙주(예를 들면 마우스, 래트, 양, 토끼, 염소 등)에 선택적으로 담체와 결합된 펩타이드를 주사하여 면역 반응성을 촉진시키고 결과적으로 생산된 항

체를 회수하고 정제한다. 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면 포유류 숙주를 상기 기재된 바와 같이 GE2 폴리펩타이드와 함께 면역화하여 HEV 구조 에피토프를 생산한다. GE2 폴리펩타이드를 주사가능한 제형으로 투여하여 GE2 폴리펩타이드를 생리학적으로 수용가능한 희석제와 혼합한다. Freund의 완전 또는 불완전 아주번트와 같은 아주번트가 이 제형에 포함될 수 있다. 이 제형을 적합한 기간에 걸쳐 숙주에 주사하고 HEV 바이러스 항체를 분석하기 위해 적합한 간격을 두고 혈장 샘플을 채취한다. 적합한 수준의 활성이 얻어진 경우, 숙주의 혈액을 채취한다. 이후 면역친화성 크로마토그래피와 같은 표준 절차에 따라 혈장으로부터 항체를 회수하고 정제한다.

본 발명의 다일 클론성 항체가 바람직하지만, 다중 클론성 시스템과 같이 작용하는 다양한 단일 클론성 항체를 함유하는 시스템도 본 발명의 범주 내에 있다. HEV 구조적 에피토프에 대한 단일 클론성 항체는 당업자에 의해 본 발명의 GE2 폴리펩타이드를 이용하여 용이하게 생산할 수도 있다. 통상 하이브리도마로 알려진 영구 항체-생산 세포주를 이용하여 단일 클론성 항체를 생산하는 일반 방법론이 잘 알려져 있다. 하이브리도마는 항-pE2 항체를 생산하는 세포와 하이브리드 세포에 대한 장기간 조직 배양 안정성을 부여하는 영구 세포의 융합에 의해 생성될 수 있다. 하이브리드 세포주의 형성에서, 첫째 융합 파트너인 항체-생산 세포는 마우스 또는 래트와 같은 비-인간 포유류 숙주의 비장 세포일 수가 있고, 이것은 GE2 폴리펩타이드로 집종되는 것이다. 숙주에게 항체 반응을 일으키기에 충분한 시간 후, 항체-생산 세포가 제거된다. 마우스 또는 래트의 흑색종 세포주와 같은 영구화 세포주의 세포를 항체-생산 세포와 융합하고 얻어진 융합물을 원하는 단일 클론성 항체를 분비하는 하이브리도마와 같은 세포주를 동정하기 위해 선별하였다. 영구 세포와 항체-생산 세포의 융합은 표준 방법에 따라 달성할 수 있다(Kohler and Milstein (1975) Nature(London) 256, 495-497; Kennet, R., (1980) in Monoclonal Antibodies (Kennet et al., Eds. pp 365-367, Plenum Press, NY). 융합된 세포주를 배양하고 다중 클론성 항체를 회수하는 것과 유사한 방식으로 단일 클론성 항체를 배지로부터 항-pE2 항체의 생산에 대해 스크리닝하고 정제할 수 있다.

따라서, 본 발명의 추가의 특징에 따르면, SEQ ID NO:2로 표현되는 아미노산 서열 또는 그의 유사 서열, 단편 및 유사체를 가지는 형태적 HEV 펩타이드인 pE2의 유효량이 비-인간 포유류 숙주에게 주입되는 HEV 항체에 대한 정제된 항체를 생산하고 생산된 항체를 수집하는 방법이 제공된다. 본 발명의 바람직한 실시예에서, SEQ ID NO:2로 표현되는 아미노산 서열을 함유하는 제조용 융합 단백질인 GE2는 비-인간 포유류 숙주에 주입되어서 바람직한 항체를 생성한다.

포획 시약으로서 항-pE2 항체의 활용

본 발명의 pE2 펩타이드를 이용하여 발생 또는 성장시킨 단중 클론성 또는 다일 클론성 항체는 HEV 캡시드 단백질 또는 바이러스 입자의 존재를 검출하기 위한 포획 시약으로 생물학적 테스트 샘플에서 면역분석에서 사용할 수 있다. 필수적으로 항-pE2 항체를 포획 시약으로 활용하도록 고안된 임의의 면역분석 포맷을 채용할 수 있다. 면역분석을 실행하는 방법은 본 발명의 해당 기술분야에서 잘 알려진 것이고, 본 발명은 특정 면역분석법으로 한정하고자 하는 것은 아니다.

일반적으로, 본 발명의 pE2 펩타이드의 형태적 항원 결정인자는 HEV 캡시드 단백질의 구조 특징을 모방하기 때문에, 항-pE2 항체는 HEV 바이러스 입자를 분리하고 농축하는 면역 포획 방법에 이용하고, 이어서 바이러스 RNA를 추출하고 역전사 폴리머라아제 사슬연쇄 반응(RT-PCR)에 적용하여 검출할 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, HEV 바이러스 입자를 분리하고 농축하는 HEV 바이러스 면역 포획 방법이 제공된다. 이에 의해, 폴리스티렌 패들 또는 기타 적합한 고체 흡수재를 pE2 펩타이드에 대해 발생한 항형청으로 코팅한다. 이 방법은 바이러스 RNA의 추출 및 그 상에 RT-PCR, 바람직하게 내부의 폴리머라아제 연쇄 반응을 적용함으로써 측정되는 테스트 샘플 내의 소량의 바이러스를 검출하는 데 매우 효과적이다.

적합한 고체 지지체 또는 흡수재는 실시되는 면역분석 포맷의 종류에 따라 다르겠지만, 선택된 지지체의 종류가 합리적인 강도 및 면역학적 복합체의 면역반응성을 저해하지 않는 것이 바람직할 것이다. 고체 지지체는 예로서 반응 트레이의 마이크로웰, 시험관, 시트, 플레이트, 슬라이드, 비드(예를 들면 폴리스티렌 또는 유리), 니트로셀룰로즈 스트립, 막, 라텍스 입자와 같은 미립자, 유리, 플라스틱 및 기타의 칩을 포함한다.

따라서, 본 발명의 다른 특징은 생물학적 샘플에 있는 HEV 바이러스 입자(분석물)의 검출방법을 제공하며, 이 방법은 다음 단계를 포함한다:

SEQ ID NO:2로 정의되는 아미노산 서열을 지닌 pE2 펩타이드, 그의 상동 서열, 단편 또는 유사체에 대해 발생된 정제된 항체로서, 항-pE2 항체는 고체 지지체 상에 바람직하게 고정되는 것을 특징으로 하는 항체를 제공하는 단계,

상기 항-pE2 항체와 테스트 샘플 내에 존재할 수도 있는 임의의 HEV 분석물의 복합체 형성을 허용하는 조건하에서 상기 항-pE2 항체와 생물학적 테스트 샘플을 접촉시키고 배양시키는 단계;

얻어진 혼합물로부터 미결합 성분을 가능한 제거하는 단계, 및

상기 혼합물을 HEV 분석물의 존재에 대해 조사하는 단계.

진단 테스트 키트

본 명세서에 기재된 새로운 HEV 펩타이드, pE2 또는 항-pE2 항체를 HEV 감염을 검출하고 진단하는 데 이용되는 진단 키트의 형태로 포장할 수도 있다. 키트는 통상 개별 용기 내에 pE2 펩타이드 또는 항-pE2 항체를 면역시약으로 포함할 수도 있다. 또한, 사용된 면역시약 및 검출하고자 하는 HEV 분석물의 종류에 따라, 키트는 양의 대조 샘플, 음의 대조 샘플, 표지된 항-인간 항체 및 신호발생 시약(예를 들면 효소 라벨인 경우 효소 기질)과 같은 지시약을 라벨이 직접적으로 신호를 발생하지 않는 경우 부가적으로 포함할 수도 있다. 본 명세서에서 기재된 바와 같이, "별도 용기"라는 용어는 본 발명의 pE2 펩타이드 또는 pE2 항체를 고정된 경계 내에 고정할 수 있는 임의의 물질 및 진단 테스트 키트에 포함될 수 있는 기타 성분을 의미한다. 분석을 실시하는 방식은 통상 키트 내에 포함될 것이다. 상기 지시는 일반적으로 면역 시약 농도 또는 혼합하고자 하는 면역 시약과 샘플의 상대적인 함량, 면역시약/샘플 혼합의 기간, 온도, 완충 조건 등과 같은 적어도 한 가지 분석 방법 인자에 대해 기재한다.

바람직한 경우, 본 발명의 pE2 펩타이드 또는 pE2 항체는 통상 당업자에게 잘 알려진 수많은 활용가능한 기법이 존재하는 공유결합 또는 수동 흡착 기술에 의해 고체 지지체에 고정화된다. 본 발명의 pE2 펩타이드 또는 pE2 항체를 고정화하는 데 이점이 있는 고체 지지체도 역시 당업자에게 잘 알려져 있다. 적합한 지지체는 실시된 면역분석 포맷의 형태에 따라 다르겠지만, 선택된 지지체의 종류가 합리적인 강도를 가지고 면역학적 복합체의 면역반응성을 억제하지 않고 신호-발생 성분으로부터 검출가능한 신호의 생성을 방해하지 않는 것이 바람직하다. 고체 지지체는 예로서 반응 트레이의 마이크로웰의 웰, 시험관, 시트, 플레이트, 슬라이드, 비드(예를 들면 폴리스티렌 또는 유리), 니트로셀룰로즈 스트립, 막, 락텍스 입자와 같은 미립자, 유리, 플라스틱 및 기타의 칩을 포함한다.

지시약은 본 발명의 면역 시약과 포획된 HEV 분석물에 의한 면역 복합체의 형성을 가리킬 수 있는 라벨 또는 신호 발생하는 성분을 포함해야 한다. 진단 테스트 키트의 지시약은 용액, 분산액 또는 실질적인 건조 분말, 예를 들면 동결건조된 형태로 제공될 수 있다. 지시약이 신호발생 성분으로 효소를 이용한다면, 효소의 기질은 진단 테스트 키트의 별도의 용기에 제공될 수도 있다. 또한, 항원-항체 결합을 통한 면역학적 복합체의 형성을 탐지할 수단으로 사용된 라벨 또는 신호-발생 성분은 침전 또는 색깔의 변화에 의한 가시적인 검출, 현미경에 의한 가시적 검출, 또는 분광기, 방사선 측정 등에 의한 자동 검출이 가능하다. 신호-발생 성분의 예로는 콜로이드성 금, 형광성 화합물, 발광 화합물, 발색단, 방사성 원소, 효소(예를 들면 알칼리 포스파타제, 양고추냉이 퍼옥시다제 및 베타-갈락토시다제) 및 강화 화합물(예를 들면 비오틴, 항티오딘 및 아비딘)을 포함한다.

HEV 항체를 탐지하기 위한 키트의 예로서, 본 발명의 pE2의 예정된 함량을 반응 트레이의 마이크로웰로 고정화되어서 수 입 HEV 항체에 면역화학적으로 결합할 수 있다. 지시약은 인식될 표지된 포유류의 항-인간 항체일 수 있고 테스트 샘플에 존재할 수 있는 임의의 HEV 항체에 결합할 수 있다. 표지된 포유류의 항-인간 항체는 신호-발생 성분으로 효소를 이용하고 효소가 신호를 바로 발생하지 않는다면 효소의 기질이 부가적으로 제공될 수 있다.

백신

현재, 바이러스가 배양액 중에서 성공적으로 번식할 수 없기 때문에 약독화된 HEV 백신을 생산하는 것이 아직까지 가능하지 않았다. 현재까지 성장시킨 백신의 후보는 주요 구조 단백질이 발현된 진핵생물의 재조합 펩타이드이다(Tsarev et al., 1993a; Tsarev et al., 1994a). 약독화된 바이러스와 비교하여 백신 제형에 재조합 펩타이드를 사용하는 이점은 펩타이드가 더욱 효과적으로 생산되고 편리하게 정제될 수 있다는 점이다. 또한, 얻어진 백신은 살아있는 접촉성 바이러스 입자를 함유할 가능성이 없어 감염의 위험을 피할 수 있다.

pE2 펩타이드는 모노머 형태보다 다이머 형태에서 더욱 면역원을 가진다는 것이 밝혀졌다. pE2 펩타이드에 대해 발생된 항혈청에 대한 실험 연구에서, 다이머에 대한 항체 반응성의 수준은 모노머 형태에 대한 반응성 보다 상당히 높았다. 또한, HEV 항체 특이성의 광범위한 스펙트럼을 보이는 HEV 반응성 인간의 혈청과는 달리 pE2 항혈청은 HEV 항체 특이성의 제한된 스펙트럼을 지닌다. 그러나 분명하게, pE2 항혈청은 바이러스의 효과적인 면역 포획을 하는 능력으로 증명되는 바와 같이 HEV 입자를 인식하고 결합할 수 있다. 따라서 pE2 펩타이드와 바이러스의 다이머 형태 사이에 설정된 항원적 관계는 pE2 다이머가 HEV 캡시드 단백질과 관련된 형태학적이고 항원적으로 만드는 바이러스 캡시드의 특정 구조 특징을

모방한다는 것이다. 따라서, E형 간염 바이러스 캡시드와 pE2 단백질이 특정 항원 결정인자, 구체적으로 pE2 펩타이드의 다이머 형태와 관련된 새로운 형태적 항원 결정인자를 공유할 가능성이 높다. 이러한 논쟁은 펩타이드의 다이머 형태가 HEV 반응성 인간 혈청에 의해 강하고 공통적으로 인정된다는 발견과 일치하는 것이다.

pE2 호모다이머가 HEV 캡시드 단백질과 구조적이고 항원적으로 관련되는 것으로 나타난다는 관점에서, 이것은 박테리아에 의해 발현된 펩타이드가 HEV 감염에 대한 백신의 잠재적인 후보자가 될 수 있도록 한다. 또한, 상이한 HEV 분리주의 HEV 게놈 내의 상보성(표 1)은 pE2 펩타이드가 중국인의 분리주로부터 유래되는 한 멕시코 및 미국인으로부터 최근 분리된 대부분의 유전학적으로 분기하는 균주를 포함하는 다른 HEV 분리주에 대한 보호를 제공할 것 같다.

따라서, 본 발명의 다른 특징에 따르면, SEQ ID NO:2의 의해 정의되는 pE2 펩타이드 또는 그의 상동 서열, 단편 또는 유사체 및 면역화 후 E형 간염 바이러스에 의해 접종에 대해 포유류를 보호하는 제약학적으로 수용가능한 담체를 포함하는 백신 조성물이 제공된다.

또한, E형 간염 바이러스 감염에 대한 개인의 면역화용 백신의 용도가 제공된다. 이 경우, 백신은 면역학적 유효량의 pE2 펩타이드를 제약학적으로 수용가능한 담체와 함께 포함한다. 제약학적으로 수용가능한 담체는 당업자들에게 잘 알려져 있다(Arnson, R. (Ed.) Synthetic Vaccines 1:83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1987). 이들은 환자에게 펩타이드를 도입하기 위한 비히클로 사용하기에 적합한 액상 매질을 포함하지만 자체내에 구성물을 수용하는 개체에 유해한 항원의 생산을 유도해서는 안된다. 이러한 액상 매질의 예로는 식염수가 있다. 또한, 백신 제형은 면역 반응을 자극하여 백신의 효과를 증가시키기 위한 아쥘벤트를 포함할 수도 있다.

"면역학적 유효량"은 단일 투여 또는 시리즈 중 일부로서 대상에게 상기 정의된 바와 같은 치료에 효과적인 함량을 투여한다는 의미이다. 양은 치료하고자 하는 대상의 건강 및 신체 상태, 치료하고자 하는 대상의 중(예를 들면 비-인간 포유류, 영장류 등), 대상의 면역계의 항체를 합성하는 능력, 소망하는 예방 정도, 백신의 제형, 감염성 HEV 균주 및 기타 해당 인자에 따라 달라진다.

본 발명의 백신을 경구 및 비경구(예를 들면 정맥내, 피하 또는 근육내) 주사를 포함하는 백신의 투여를 위한 종래 방법으로 투여될 수 있다. 이들 치료는 백신 또는 기간에 걸쳐 복수의 투여로 이루어진다.

본 발명을 특징으로 하는 이들과 다른 이점 및 특징은 본 명세서에 첨부된 특허청구범위에 구체적으로 지적되어 있다. 본 발명, 이의 이점과 이의 사용에 의해 얻어진 대상을 더욱 잘 이해하기 위해, 첨부하는 도면 및 상세한 설명을 참조하여 본 발명의 자람직한 실시예를 설명하고 예시된다.

본 명세서에 기재된 바와 유사하거나 등가의 모든 방법 및 물질이 본 발명을 실시하거나 실험하는 데 사용할 수 있지만, 바람직한 방법, 장치 및 물질은 이하에 기재된다.

실시예

달리 정의하지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 동일한 의미를 가진다. 일반적으로 본 명세서에 사용된 학명 및 세포 배양, 분자 유전학 및 핵산 화학의 실험 과정은 이하에 기재된 바와 같이 잘 알려진 것이고 본 기술 분야에 통상 사용되는 것이다. 재조합 핵산, 세포 배양 및 형질전환에 사용하였다. 일반적으로, 효소 반응 및 정제 단계를 제작자의 지시에 따라 실시하였다. 기술 및 과정은 본 발명의 종래의 방법 및 다양한 일반 정보에 따라 실시하였다(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2판, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 뉴욕주 Plainview, 1989). 기재 전반에 사용된 바와 같이 달리 언급하지 않으면 다음의 의미를 가지는 것으로 이해해야 한다.

생물학적 테스트 샘플은 관심의 분석물의 공급원이 되는 개체의 신체의 성분을 의미한다. 테스트 샘플의 예로는 제한 없이 전혈, 혈청, 혈장, 뇌척수액, 백혈구, 내장의 분비물, 소변, 림프액과 같은 인간과 동물의 체액을 포함한다.

E2는 도 2에 표시된 중국인 HEV 균주(DDBJ 수탁 번호 제D11092)의 게놈의 6326 내지 6968의 위치에 이르는 클로닝된 cDNA 단편으로 6957 위치에서 단일 염기쌍의 결실을 함유한다(즉 SEQ ID NO:1).

pE2는 E2에 의해 코딩되는 펩타이드이다(즉, SEQ ID NO:2).

E3은 도 3에 표시된 중국인 HEV 균주(DDBJ 수탁 번호 제D11092)의 게놈의 5364 내지 5477의 위치에 해당하는 클로닝된 cDNA 단편이다.

pE3은 도 4에서 도시된 바와 같이 E3에 의해 코딩되는 펩타이드이다.

GE2는 pE2의 아미노 말단은 글루타티온 S-트랜스퍼라아제의 카르복시-말단에 연결된 융합 단백질이다.

GE3은 pE3의 아미노 말단은 글루타티온 S-트랜스퍼라아제의 카르복시-말단에 연결된 융합 단백질이다.

E형 간염 바이러스(HEV)는 칼시바이러스의 막과 형태학적으로 유사한 단일 가닥의 양의 RNA 바이러스이다. 간염의 산발적인 경우 또는 전염 발생을 유발하고 A형 간염 바이러스(HAV), B형 간염 바이러스(HBV), C형 간염 바이러스(HCV) 및 D형 간염 바이러스(HDV)와는 혈청학적으로 구별된다.

호모다이머는 2가지의 동일한 모노머의 결합에 의해 형성되는 분자이다.

상동 서열은 SEQ ID NO:1 또는 2로 각각 정의되는 E2 핵산 서열 또는 pE2 아미노산 서열과 적어도 80% 이상 더욱 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 가지는 핵산 서열 또는 아미노산 서열이다.

I. HEV 유전자 서열

도 2A 내지 2D 및 도 3에 표시된 HEV 유전자 서열은 각각 ORF2 및 ORF3의 부위에 해당한다. 도 4 및 5에 나타난 펩타이드 서열은 각각 ORF2 및 ORF3 부위에서 유도된 유전자 산물에 해당한다. 따라서, 나타난 유전자 서열 리스트는 다음과 같다.

SEQ ID NO:1는 ORF2에서 유래된 클로닝된 DNA 단편 E2의 핵산 서열이다.

SEQ ID NO:2는 펩타이드 pE2의 아미노산 서열이다.

SEQ ID NO:3은 하류 프라이머인 ORF2Rb(표 9 참조)의 핵산 서열이다.

II. HEV 펩타이드 pE2 및 pE3

HEV 게놈에서 얻은 pE2 및 pE3 펩타이드의 발현

HEV의 중국인 균주 D11093의 게놈 내에 위치한 ORF 서열의 3' 말단에서 114bp의 영역 및 ORF2의 3'말단에서 811 bp의 영역을 클로닝하고 역전사-폴리머라아제 사슬연쇄 반응(RT-PCR)에 의해 증폭시켰다. 결과적으로 이들 서열을 pGEX 벡터의 BamHI 및 EcoRI 클로닝 자리에 절찰시켰다. EcoRI 및 BamHI(도 6의 레인 2 및 3)로 각각 플라스미드의 분해에 의해 클로닝된 바이러스 유전자를 회수하고 서열 분석을 실시하였다. 바이러스 게놈 내의 5364 내지 5477 위치에 있는 114 bp 서열을 분석하였다. 3.9 kD의 MW를 가진 37 aa 펩타이드인 pE3를 특정화하는 것으로 예상된다. 6326번 내지 7136번 위치에는 811 bp 서열이 있지만, 분석에서는 아마도 PCR 증폭 오류에 기인한 6957번 위치에 단일 염기쌍의 결손이 나타났다. 얻어진 틀이동은 6968번 위치의 새로운 종료 코돈에서 핵산 서열의 번역을 조기에 종결시켜 초기에 예상된 267개의 아미노산 잔기 대신 23 kD의 MW를 가진 213개의 아미노산 길이를 가진 pE2 잔기가 예상보다 작은 펩타이드로 얻어졌다. 틀이동에 의해 생산된 pE2의 카르복시-말단에서 3가지 아미노산 잔기는 비-HEV 서열이다(SEQ ID NO:2).

도 2A 내지 2D 및 도 3에 도시된 뉴클레오타이드 서열은 각각 HEV의 중국인 균주(DDBJ 수탁번호 제D11092)의 ORF-2 및 ORF-3 부위에 해당한다.

도 4 및 6에 도시된 아미노산 서열은 각각 HEV의 중국인 균주(DDBJ 수탁번호 제D11092)의 ORF-2 및 ORF-3 부위에서 유래된 pE2 및 pE3에 해당한다.

ORF2 및 ORF3 특이적인 단백질의 특정화

HEV 게놈의 ORF-2 및 ORF-3 부위 모두에서 클로닝된 서열을 각각 글루타티온 S-트랜스퍼라아제(GST) 융합 단백질, GE2 및 GE3로서 발현하였다. 이 발현 시스템은 높은 바이러스 펩타이드의 수율을 제공하고 글루타티온 세파로즈-4B 시스템을 이용하는 경우 효과적으로 정제하였다. 이 방법은 1 리터의 세균 배양물로부터 정제된 GE2 2mg 및 GE3의 7 mg을 생산한다. 대안으로 세파로즈-4B에 결합된 GE2는 트로빈을 이용하여 용출할 수 있고, GST의 카르복시 말단에서 융합 단백질 분할하여 바이러스 펩타이드인 pE2를 분리한다. 이 과정으로 1리터의 세균 배양물로부터 정제된 pE2 펩타이드 약 1 mg을 생산하였다.

GE2 및 pE2의 정제된 제제는 SDS PAGE 및 웨스턴 블롯 방법으로 특정화되었다(도 7). 정제된 pE2 융합 단백질인 GE2 (레인 1 및 2), pE2 펩타이드(레인 3 및 4) 및 글루타티온 S-트랜스퍼라아제(GST) 융합 단백질(레인 5)에 GST-특이적 항혈청을 이용하여 (A) SDS PAGE 및 (B) GST-특이적 항혈청 및 (C) 풀린 인간의 HEV 반응성 인간 혈청을 이용한 웨스턴 블롯으로 분석을 실시하였다. 또한, GE2 및 pE2 펩타이드 샘플을 SDS 페이지(A) 및 웨스턴 블롯(B 및 C)에 의한 후속의 분석(레인 2 및 4)을 위해 100°C에서 3분간 가열하였다. 정제된 GE2를 92 kDa의 MW를 가진 다이머 형태의 주요 밴드(도 7A, 레인 1)로 분해하였지만, 샘플을 100°C에서 3분간 가열한 후 49 kDa 밴드(도 7A 레인 2)내로 분리되었다. GE2의 다이머 및 모노머 형태 모두는 해당 웨스턴 블롯(도 7B 레인 1 및 2)에서 GST 혈청에 의해 인식되었다. 이 제제의 미량 성분 중 하나인 49kDa의 GE2 모노머는 항-GST와만 반응성이고 인간의 HEV 반응성 혈청과는 반응성이 없었다(도 7C 레인 2). 따라서, GE2를 100°C에서 3분간 가열하는 경우, 49kDa 모노머는 주요 밴드가 되었지만 인간 HEV 혈청에 대한 항원성은 현저하게 감소되었다(도 7C 레인 2). 트롬빈으로 결합된 융합 펩타이드의 분해에 의해 정제된 pE2 펩타이드를 4 kDa의 다이머를 자연적으로 형성하고 또한 이것은 100°C에서 3분간 가열한 후 23 kDa 모노머로 분해된다(도 7A 레인 3 및 4). pE2의 다이머 또는 모노머 형태 중 어떤 것도 항-GST 혈청으로 인정되지 않았다(도 7B 레인 3 및 4). 또한, pE2의 다이머 형태만이 인간의 HEV 혈청과 반응성이었다(도 7C 레인 1 및 3).

ORF3(GE3)으로부터 발현된 정제된 GST 융합 단백질은 또한 SDS PAGE 및 웨스턴 블롯(도 8)에 의해 특정될 수도 있다. GE3 단백질은 30 kDa의 예상 MW를 가진 밴드로서 이동하는 모노머를 발생하였다. 웨스턴 블롯에서는 GE3이 GST 항혈청과 풀린 HEV 인간 혈청 모두에 반응성이라는 것이 나타났다. 그러나, pE2 및 GE3와는 달리, 항원 활성이 가열에 의해 영향을 받지 않은 것으로, GE3의 반응성은 모노머 형태와만 관련이 있었다. 따라서, 이러한 활성은 적어도 부분적으로 이전의 ORF3 특정화된 전체 길이의 단백질의 카르복시 말단에 대한 펩타이드 지도작성 연구에 의해 위치가 정해진 에피토프에 의한 것 같다.

III. pE2 및 이의 항원 활성

pE2 펩타이드는 자연적으로 호머다이머를 생성한다.

이전의 연구에서는 HEV 반응성 인간 혈청에 의해 인정되는 HEV 게놈의 ORF2에 의해 코딩되는 HEV 구조 단백질의 재조합 펩타이드를 기재하고 있다(Yarborough et al., 1991, Li et al., 1994). 구조 단백질의 길이에 걸쳐 겹쳐진 짧은 펩타이드를 이용하여 펩타이드 지도작성하는 기술에 의해, 이들 항원 펩타이드의 활성은 폴리펩타이드 길이에 따라 상이한 영역에 위치한 항원 결합 자리의 개수와 상태에 영향을 받는다. 선형의 에피토프를 참조하여, 이들 항원 결합 자리는 아미노산 서열에 의해 결정되는 바와 같은 아미노산의 1차 구조에 관한 것이다. 용액 내에 재조합 펩타이드에 의해 가정된 입체 구조는 2차 3차 구조에 의해 결정되는 것으로 항체에 대한 에피토프의 허용성에 영향을 미칠 것이므로 항원 활성을 감소시킨다.

본 발명의 재조합 pE2 펩타이드는 HEV 반응성 인간 혈청에 의해 인지될 수 있는 2가지 유형의 항원 활성을 나타낸다. 제1 유형의 항원 활성은 pE2 펩타이드의 1차 구조에 관한 것이고 제2 유형의 활성은 다이머 형태의 펩타이드에서 4차 구조에 관한 것이다. 제1 항원 활성은 pE2 펩타이드의 아미노산 서열 내에 함유된 선형 에피토프에 관한 것이고 웨스턴 블롯으로 확인된 바 및 이하에서 기재된 바와 같이 모노머 형태와 관련된 것이다. 그러나 제2 항원 활성은 자연에서 엄격한 형태를 가진 것으로 pE2 펩타이드의 모노머가 모노 다이머를 형성하도록 서로 회합한다. 따라서, 다른 HEV 재조합 펩타이드로부터 pE2 펩타이드를 구별하도록 하는 특별한 특징은 생리적 조건하에서 호모다이머(예를 들면 고급 올리고머)를 천연적으로 우세하게 형성한다는 것과 이 펩타이드의 항원 활성이 다이머 형태만에 의해 달성되는 pE2 펩타이드의 4차 구조로부터 발생하는 것으로 추측하는 입체구조의 항원 결정인자에 영향을 받는다. 또한, 항원 활성은 다이머의 분리에 따라 폐기되지만 활성은 모노머 형태로부터 다이머를 재구성함에 따라 복구될 수 있다. 따라서, 이러한 유형의 항원 활성은 HEV 게놈의 ORF2 부위로부터 유래된 재조합 펩타이드로 보고하고자 하는 종류 중 첫 번째인 것이다.

도 7에는 풀린 인간의 HEV 반응성 혈청이 pE2(즉 GE2) 및 정제된 pE2의 글루타티온 S-트랜스퍼라아제(GST) 융합 단백질의 다이머 형태에 대해 강한 반응성이라는 것이 나타나 있다. 정제된 GE2(레인 1 및 2) 및 정제된 pE2(레인 3 및 4)를

본 명세서에 기재된 바와 같이 생산하고 GST에 대해 발생된 항혈청을 이용하여 (A) SDS PAGE 및 (B) GST-특이적 항혈청 및 (C) 풀린 인간의 HEV 반응성 인간 혈청을 이용한 웨스턴 블롯에 의해 분석을 실시하였다. 또한, 라인 2 및 4에 나타난 샘플을 분석 직전에 3분간 100°C에서 가열하였다. 라인 2 및 4에서 나타난 샘플을 분석 직전에 100°C에서 3분간 가열하였다. 정제된 GST 샘플과 분자량의 마커의 혼합물을 라인 5 및 6에 각각 적하하였다. 가열되지 않은 샘플(도 7A 라인 1 및 3)에서, 융합 단백질인 GE2는 92 kDa의 대략 분자량의 다이머로서 주로 이동하고, pE2는 42 kDa의 대략 분자량의 다이머(도 7A 라인 3)로 주로 이동한다. 그러나 도 7A 라인 2 및 4에 나타난 바와 같이, 가열은 양 단백질의 다이머 형태를 49 kDa의 모노머인 GE2 융합 단백질 및 23 kDa의 모노머인 pE2 펩타이드로 각각 분해시킨다. 융합 단백질인 GE2는 웨스턴 블롯 후 다이머 형태 또는 모노머 형태이든 예상되는 바와 같이(도 7B 라인 5), GST뿐 아니라 GST에 대해 발생하는 항혈청(도 7B 라인 1 및 2)에 의해 인식된다는 것이 발견되었다. HEV 반응성 인간 혈청은 GE2 융합 단백질(도 7C 라인 1) 및 pE2 펩타이드(도 7C 라인 3)의 다이머 형태를 강하게 인지하였다. 100°C에서 3분간 샘플을 가열하여 GE2 융합 단백질과 pE2 펩타이드를 이들의 해당 모노머 형태로 분해시켰다. 그러나 이러한 분해는 HEV 반응성 인간 혈청이 GE2 단백질과 pE2 펩타이드(각각 도 7C 라인 2 및 4)의 모노머 형태를 인지하고 결합하지 못하게 하는 불능에 의해 지적되는 바와 같이 항원성 활성의 동반하는 손실과 관련이 있다.

pE2 모노머의 항원성을 평가하고 웨스턴 블롯에 의해 pE2 다이머의 항원성과 비교하였다(도 9). 정제된 pE2 펩타이드의 비가열되고 가열된 샘플의 동량을 혼합하였다. 혼합물을 4배 희석을 연속적으로 희석하고 라인 1 내지 6에 적하하였다. 전기영동 후, pE2의 양쪽 형태의 항원성을 이전에 도 7에서 사용된 1:200 희석으로 풀린 HEV 반응성 인간 혈청으로 측정하였다. 도 9에는 풀린 인간 혈청이 양의 반응을 나타내는 pE2 모노머의 최소량은 1,360 ng이었고, 이것은 동일 조건하에서 테스트한 경우 pE2 다이머에 대해 측정된 86 ng의 최소량 보다 약 16배 더 많은 양이다. 또한, pE2 다이머에 대한 반응의 강도는 pE2 모노머에 대한 반응의 강도보다 약 5배 강한 것으로 예상되었다. 따라서, 통합된 결과는 pE2와 관련된 항원 활성이 pE2 모노머의 항원 활성보다 대략 80배가 많다는 것을 설명한다. pE2 모노머의 항원 활성은 pE2 아미노산 서열의 1차 구조 내에 함유된 여러 가지 선형 에피토프에 기인한 것이다.

또한, 시판하는 HEV ELISA 키트(Genelabs Diagnostics Pte Ltd., 싱가포르)에 대해 양성을 보이는 18명의 인간혈청을 정제된 pE2의 샘플(반응마다 pE2의 각각의 형태에 대해 1360 ng)의 등가 혼합물에 대해 웨스턴 블롯으로 실험하였다. 시판 혼합물은 분석 전에 pE2 펩타이드의 다이머 형태를 보존하도록 방치하거나 또는 100°C에서 3분간 가열하여 pE2 다이머를 이의 모노머 형태로 분해한 것이다. 도 10에 나타난 결과에 따르면, 18개의 혈청 중 오직 8개 혈청만이 pE2 다이머와 모노머 모두에 대해 반응성이 있지만, 나머지 10개의 혈청은 pE2 다이머에 대해서만 반응성이 있었다. 모노머 형태와 비교하여 pE2 다이머에 대한 높은 항체 반응성은 다이머가 모노머보다 항원성에 있어 더욱 반응성이 높다는 것을 추가로 가리킨다.

도 11은 pE2 다이머에 고유한 항원 활성의 제2 유형이 다이머 또는 올리고머의 pE2 펩타이드 형태의 4차 구조에 관련되어 있다는 것을 나타낸다. 형태적 항원 결정인자에 대해, pE2 이외의 HEV 게놈의 ORF2 부위에서 유래된 재조합 펩타이드와 관련된 항원 반응성의 이러한 유형은 이전에는 알려지지 않은 것이다. SDS PAGE(A) 및 웨스턴 블롯 분석(B) 이전에 정제된 pE2의 분리 샘플을 4°C(라인 1); 20°C(라인 2); 37°C(라인 3); 및 45°C(라인 4)의 4가지 상이한 온도에서 1시간 동안 8M 유레아로 처리하였다. 또한, 후속하여 45°C에서 처리된 샘플의 일부를 하룻밤 투석하여 SDS PAGE와 웨스턴 블롯 분석 전에 유레아(라인 5)를 제거하였다. 웨스턴 블롯을 1:250의 희석율로 풀린 HEV 반응성 인간 혈청을 이용하여 실시하였다. SDS PAGE에 의해 얻어진 결과(도 11A)에서는 모노머 형태로 분해된 pE2 다이머가 가열 과정 동안 승온하여 증가시켜 pE2 다이머의 완전한 분리가 45°C에서 달성할 때까지 계속되었다는 것을 보여준다. 이러한 결과와 일치하여, 해당하는 웨스턴 블롯 분석(도 11B)에서는 pE2 다이머가 존재하는 샘플(즉, 라인 1 내지 3 및 라인 5)에서만 HEV 반응성 혈청이 모든 반응도를 나타낸다는 것을 보여준다. 대안으로, HEV 반응성 인간의 혈청은 pE2 펩타이드의 모노머 형태만을 함유한 가열된 샘플(즉, 라인 4)에 대해 반응성이 없다는 것을 보여준다.

이들 결과는 pE2의 모노머 형태에 대한 항체가 검출되지 않았기 때문에 생리적 조건하에서 호모다이머를 형성하도록 서로 자연적으로 회합한다는 것과 HEV 반응성 인간 혈청에 의해 인지되는 형태적 항원 결정인자가 이러한 다이머의 상호관계의 발생에 기인한 것 같다는 것을 제안한다. 따라서, pE2 다이머의 4차 구조에 의해 결정된 항원 활성의 2차 유형은 자연에서 엄격하게 형태를 가지고 pE2 펩타이드가 다이머 형태인 경우에만 기능을 가질 것 같다. 결과적으로, pE2 펩타이드의 다이머 형태의 분리는 입체 구조 항원 활성의 손실과 관련되어 있는 것으로 나타났다(즉, 도 11B 라인 4). 그러나 형태적 항원 활성은 pE2 모노머의 재회합에 따라 복구되어 PBS에 대한 유레아 처리된 샘플(도 11B 라인 5)의 하룻밤 투석 후 다이머를 형성할 수 있다.

HEV 감염에서 중요한 pE2 형태적 항원 결정인자

상기에 제시하고 설명한 바와 같이, HEV 반응성 인간 혈청에 의해 인식 가능한 2가지 유형의 pE2 항원 활성화와 관련하여, 다이머 형태의 형태적 항원 결정인자가 모노머 형태의 선형 에피토프보다는 자연 HEV 감염에서 더욱 중요한 역할을 담당하는 듯하다. 이는 웨스턴 블롯 분석의 결과(도 10), 총 18개의 HEV 반응성 인간 혈청 중에서 18개의 혈청 모두가 다이머 형태의 pE2 펩타이드의 다이머에 대해 반응성인 반면, 모노머 형태의 pE2 펩타이드에 대해서는 단지 8개의 혈청만이 반응성을 나타냈다. 도 9에 나타난 결과를 근거로 할 때에도, pE2 형태적 항원 결정인자의 전반적인 반응성이 모노머 내에 함유된 선형 에피토프의 반응성보다 약 80 이상 큰 것으로 추정되었다.

간염 발생 후 상이한 시기에 취한 비-A형, B형 및 C형 급성 간염을 가지는 96명의 환자 및 21명의 건강한 공여자로부터 채취한 혈청을 테스트하여 자연 HEV 감염에서 pE2 형태적 항원 결정인자의 역할을 추가로 평가하였다(표 2). 연구에 사용된 혈청은 홍콩의 Princess Margaret 병원에 입원한 비-A형, B형 및 C형 급성 간염 환자 또는 이 질환에 대한 과거 병력이 있는 환자들로부터 얻었다. 그 결과, pE2 특이성 IgG 항체는 비-A형, B형 및 C형 간염 환자 중에서 더욱 현저하게 퍼져 있는 것으로 나타났다. 이러한 차이는 HEV가 비-A형, B형 및 C형 간염의 공통 원인이라고 지적한 전염병학적 연구와 일치하였다. IgG 항체의 검출은 이들 환자의 일부가 현재 감염되었으며, 나머지 환자가 이 바이러스에 이미 감염되었을 수 있음을 시사한다. 건강한 공여자의 약 10%가 과거 이 바이러스에 감염되었던 적이 있으며, 이는 이들 혈액 샘플을 채취한 집단에서의 HEV 감염 수준과 일치한다.

표 2

웨스턴 블롯에 의한 인간 혈청 내에서의 HEV 항체 검출

항체 (IgG) 프로파일	혈청의 개수	
	비-A, B 및 C형 간염 환자	건강한 혈액 공여자
pE2		
+	56	3
-	40	18
총계	96	21

IV. pE2 및 GE3의 HEV 특이성 결정

pE2 다이머 및 pE3의 항원 활성화가 HEV 특이성인지를 확인하기 위하여, 비-A형, B형 및 C형 급성 간염을 가지는 환자 및 이 질환에 대한 병력이 있는 환자로부터 채취한 96개의 혈청 샘플 중 74개를 상용 HEV 특이성 ELISA를 통해 추가로 테스트하였다(표 3). 상용 테스트 및 pE2 또는 GE3 테스트 사이에서의 높은 일치율은 pE2 및 pE3의 HEV 항원 특이성을 입증한다.

< 표 3 >

상용 ELISA에 의한 pE2, GE3 및 IgG HEV 항체에 대한 IgG 항체의 검출

웨스턴 블롯	EIA		총계	총괄 * 일치율
	+	-		
pE2				
+	37	7	44	89.2%
-	1	29	30	
GE3				
+	30	0	32	89.2%
-	8	36	54	
총계	38	36	74	

* 총괄 일치율

= {일치된 결과를 갖는 표본의 개수/전체 표본의 개수} x 100%

V. IgG 및 IgM 항-HEV를 검출하기 위한 ELISA 구축

pE2 또는 글루타티온 S-트랜스퍼라아제 융합 단백질 GE3 중 하나의 정제된 제제를 이용해 개별적으로 마이크로플레이트를 코팅하여 2개의 개별적인 ELISA를 수행하였다. 이들 HEV 펩타이드의 제조 및 정제는 앞서 기재한 바 있다. 이들 제제의 순도를 42 kD의 pE2 다이머 및 30.4 kD의 GE3 융합 펩타이드의 상대 강도로 결정하여 이들이 그들 각 제제 내에서 전체 단백질의 89% 및 95%를 구성하도록 하였다(도 12, 좌측 레인). 웨스턴 블롯 결과, 대조군의 음성 인간 혈청(도 12, 흰색 원)이 아닌 HEV 양성의 인간 혈청과의 반응에 의해 나타난 바와 같이, 이들 펩타이드는 제제 내에서의 주된 항원인 것으로 확인되었다(도 12, 검은색 및 빗금친 원). 이러한 정제된 HEV 펩타이드 제제를 이용해 산출한 분석에 의한 이들 혈청의 역가는 웨스턴 블롯에 의해 결정된 바와 같이 해당 펩타이드에 대항하는 이들 혈청의 반응성과 상호 관련된 통상적인 결과를 나타내었다.

확장된 연구에서, 건강한 공여자 90명 및 현재 비-A형, B형 및 C형 급성 간염 환자 또는 이 질환에 대한 과거 병력이 있는 환자 96명으로부터 취한 혈청 표본에서 HEV IgG 항체의 수준을 측정하였다. 환자 개인의 항체 수준은 웨스턴 블롯에 의해 이미 결정된 바와 같이, 일반적으로 해당 바이러스 펩타이드에 대항하는 그들의 반응성과 상호 관련이 있었다(도 13). 웨스턴 블롯에 의해 측정된 반응성 혈청에 대해서 얻어진 OD값(도 13, 검은 막대)은 약한 반응성 혈청(도 13, 빗금 막대) 또는 비반응성 혈청(도 13, 흰색 막대)에서보다 높았다.

임계값을 웨스턴 블롯에 의해 명시된 비반응성 혈청의 평균 OD값 이상의 5 SD로 설정함으로써, pE2 반응성 또는 약한 반응성 혈청의 85.7%가 pE2 특이성 분석에 의해 양성 결과를 나타냈으며, GE3 반응성 혈청의 66.6%가 GE3 특이성 분석에 의해 양성 결과를 나타냈다. 웨스턴 블롯과 pE2 및 GE3 특이성 분석간의 총괄 일치율은 각각 91.7% 및 88.5%이었다. 웨스턴 블롯 결과를 기준으로, 두 ELISA 테스트 모두 100%의 특이성을 나타내었으며, 이러한 분석 및 웨스턴 블롯에 의해 얻어진 모순된 결과는 약한 반응성 혈청으로 한정되었다. 이러한 결과는 pE2 분석은 42 kDa의 pE2 다이머에 대해 특이적이며, GE3 분석은 30.4 kDa의 pE3 펩타이드에 대해 특이적임을 뒷받침한다. ELISA를 통해 측정하였을 때, IgG pE3 항체의 혈청 유병률(seroprevalence)은 HEV 환자의 경우에는 50%이었고 공여자의 경우에는 5.5%이었으며, IgG GE3의 혈청 유병률은 HEV 환자의 경우에는 22.9%이었고 공여자의 경우에는 1.1%이었다. 테스트 대상의 어느 군에서도 pE2 특이성 항체의 혈청 유병률이 GE3 특이성 항체보다 높았다. 이는 pE2가 두 항원 중 우성이며, 이들 항원 중 하나의 높은 유병률은 급성 간염과 관련되어 있음을 시사한다.

HEV 캡시드 단백질의 독특한 항원 도메인에 대한 항체 반응

추가적 비교를 위해, 96개 혈청 중 74개 혈청의 IgG 항체를 상용 테스트 키트(Genelab Diagnostics Pte Ltd., Singapore)를 이용해 추가로 테스트하였다. 상용 테스트 키트는 HEV의 미얀마인 및 멕시코인의 균주 각각의 ORF2 및 ORF3의 3' 말단에서 코딩된 42아미노산 펩타이드 및 33아미노산 펩타이드로 이루어지는 혼합물로부터 제조되었다(Yarborough 외, 1991). 상기에 기재한 바와 같이 pE3는 ORF3의 3' 말단에서 발현되는 38아미노산 펩타이드이기 때문에, 상용 테스트에 사용되는 ORF3의 33아미노산 펩타이드는 일부의 pE3(즉, GE3)에서 발견된다. 따라서, 상용 테스트에서 ORF3-특이성 펩타이드의 항원 특이성은 GE3의 특이성과 밀접한 관계가 있을 것으로 여겨진다. 한편, 상용 테스트에 사용되는 ORF2-특이성 펩타이드는 213아미노산 pE2 펩타이드의 카르복시-말단으로부터 좀 떨어진 하류에 위치한다. 따라서, 키트 내에 함유된 ORF2 펩타이드에 의해 부분적으로 결정되는 상용 테스트 키트의 항원 특이성은 본 발명의 pE2 펩타이드와 상이할 것으로 예상된다. ORF2 부위로부터 유래된 기준에 보고된 HEV 펩타이드와는 달리, pE2의 항원 활성은 주로 pE2 모노머가 서로 회합하여 호모다이머를 형성하는 경우에만 나타나는 형태적 항원 결정인자에서 기여한다.

웨스턴 블롯에 의해 밝혀진 바와 같이, 30개의 혈청은 이미 pE2 IgG 및 GE3 IgG(pE2+/GE+, 도 15의 a 및 d) 모두에 대해서 반응성인 것으로 테스트되었으며, 14개의 혈청은 pE2 IgG(pE2+/GE2-, 도 15의 b 및 e)에 대해서만 반응성이었고, 30개의 혈청은 어떠한 펩타이드에 대해서도 반응성이 없었다(pE2-/GE2-, 도 15의 c 및 f). 결과적으로, pE2 및 GE3 반응성 혈청에 대한 상용 분석에 의해 결정된 항체의 수준은 GE3 항체의 수준과 대등하게 변화하였으나(도 15의 a), pE2 특이성 항체의 수준과는 독립적이었다(도 15의 d). 이들 혈청 중 11개는 GE3에 대해 약한 반응성이었고, GE3 특이성 ELISA의 임계값 이하의 낮은 OD값을 나타냈다(도 15의 a). pE2에 대해서만 반응성을 나타내는 14개의 혈청 중 10개는 해당 항체를 상이한 수준으로 함유하는 것으로 나타났다. 14개 혈청 중 7개는 상용 분석에 의해 반응성이었다(도 15의 e). 그러나, 그들은 모두 GE3 특이성 ELISA에 의해 음성 결과를 나타냈다(도 15의 b). 나머지 혈청들은 어떠한 펩타이드에 대해서도 반응성을 나타내지 않았다. 그들 모두는 pE2 및 GE3 특이적 ELISA 모두에 의해 음성 결과를 나타냈으며, 하나를 제외한 모두가 상용 분석에 의해서도 음성 결과를 나타냈다.

3가지 분석에 의해 검출되는 HEV 항체의 스펙트럼을 표 4에 요약하였다. 그들의 개별적인 항원 특이성에도 불구하고, 33개의 혈청이 pE2 특이성 분석 및 상용 분석 모두에 대해 양성이었으며, 30개의 혈청은 두 분석 모두에 대해 음성이었으며, 이때 두 분석간의 총괄 일치율은 87.8%이었다. 마찬가지로, GE3 특이성 분석 및 상용 분석 사이의 총괄 일치율은 74.3%이었다. 조합된 세 분석 사이의 총괄 일치율은 66.2%이었다. 상용 분석에 의한 HEV 항체의 검출 빈도(47%)는 pE2 특이성 분석(50%)보다는 낮고 GE3 특이성 분석(29%)보다는 높았다. 개개의 혈청에 의해 나타난 항체 스펙트럼을 기준으로, 40개의 혈청 중 15개에서 상용 분석에 의해 검출된 항체는 GE3 특이성 분석에 의해 혈청을 테스트하는 경우에 비반응성이기 때문에 이러한 분석을 산출하는 데 사용되는 ORF2 특이성 펩타이드에 대해 특이적인 것들에 기여할 수 있다. 나머지 23개의 혈청은 상용 분석 및 GE3 특이성 분석 모두에 대해 양성이었으나, 이들 혈청도 상용 분석을 도출하는 데 사용되는 ORF2 특이성 펩타이드에 대한 항체를 함유한 경우에는 확인되지 않았다.

< 표 4 >

HEV 펩타이드에 대한 바이러스성 감염 환자의 혈청 반응 패턴
및 상용 ELISA 키트

pE2 ELISA	GE3 ELISA	Genelabs Kit	혈청의 개수 (n=74)
+	+	+	17
+	-	+	16
+	-	-	4
-	+	+	2
-	-	+	3
-	-	-	32
37 (50%)	19 (25.7%)	38 (51.3%)	유병률(%)
87.8%	74.3%	-	전체 일치율 (%) ¹

¹ 상용 ELISA 키트의 총괄 일치율(%) = {pE2 또는 GE3 특이성 분석 및 상용 분석에 대해 양성 결과 또는 음성 결과를 나타내는 혈청의 수/테스트된 혈청의 총수} x 100. 조합된 세 분석 사이의 총괄 일치율은 66.2%로 유사하였다.

VI. 현재 및 과거 HEV 감염에 있어서의 항체의 반응

HEV 환자 및 건강한 공여자로부터 채취한 혈청의 pE2 및 GE3 특이적 IgM 항체의 수준도 측정하였다. 예비 연구에서, 분석은 IgG 항체의 존재에 의해 영향받지 않은 것으로 나타났으며, 이는 항-인간 IgG의 존재 및 부재 시에 얻어진 결과가 본질적으로 동일한 것임을 시사한다. 따라서, 후속의 측정이 항-인간 IgG의 부재 하에서 이루어졌으며, 임계값은 90명의 공여자로부터 얻은 혈청의 평균 OD값 이상의 3 SD로 설정하였다. 도 14는 E형 감염이 발병한 시기의 환자로부터 취한 혈청 내의 pE2 및 GE3 항체의 일치율을 비교한 것이다. pE2 및 GE3 특이적 IgM 항체 및 GE3 특이적 IgG 항체가 E형 감염의 발병 후 초기에 얻어진 혈청 샘플에 주로 존재하였으나, pE2 특이적 IgG 항체는 발병과 관련이 없었다.

도 14에서와 같이 pE2 및 GE3 특이적 분석에 의해 측정된 HEV 항체의 수준을 기준으로, 테스트된 개체의 혈청 표본은 9개의 상이한 HEV 혈청학적 프로필을 나타냈다. 53명 환자의 혈청 전체가 현재 감염에 부합하는 5개의 혈청학적 프로필을 나타냈다(표 5, 프로필 1 - 5). 이들은 단지 pE2 IgM에 대해서만 반응성인 3개의 혈청(표 5, 프로필 1), 부가적으로 pE2 및 GE3 특이성 IgG 항체에 대해 반응성인 11개의 혈청(표 5, 프로필 2), 그리고 pE2 및 GE3 특이적 IgG 항체와 GE3 특이적 IgM 항체에 대해서도 반응성인 또 다른 3개의 혈청(표 5, 프로필 4)을 포함한다. 다른 혈청은 pE2 특이적 IgM 및 다양한 그 밖의 항체들에 대해 반응성이 있었다. 이들 샘플 중 16개가 E형 감염 발병 후 30일 이내에 채취된 것임을 유의한다. 다른 2명 환자의 혈청은 발병 후 60일 이후에 채취한 것이었다. 공여자들로부터 얻은 이들 혈청 및 기타 혈청은 아마도 E형 감염의 이전 삽화와 무관한 무증상 HEV 감염으로부터 기인했을 것이다. 다른 35명 환자의 혈청은 IgG 항체에 대해서는 양성이었으나 IgM 항체에 대해서는 음성인 과거 HEV 감염에 부합하는 혈청학적 프로필을 나타냈다(표 5, 프로필 6-8). 이들 혈청 중 27개는 pE2 특이성 IgG에 대해 반응성이었으며(표 5, 프로필 6), 7개도 GE3 특이적 IgG에 대해 반응성이었

으나(표 5, 프로필 7), IgM 항체에 대해서는 어느 것도 반응성이 아니었다(표 5, 프로필 6-8). 하나의 프로필에서 이들 항체 중 어느 것보다도 반응하지 않는 혈청을 나타냈다(표 5, 프로필 9). 그러나, 이들 혈청학적 프로필의 발생은 E형 간염의 발병 시기와 관련이 없었다. 현재 감염 프로필을 나타내는 대부분의 표본이 E형 간염의 발병 후 27일(중위수 = 13일) 이내에 채취되었으며, 다른 표본들은 발병 후 27일 이내에 채취한 날짜를 기재하였다. 과거 감염 프로필은 발병과 무관하였고, 이들 표본은 비반응성 혈청으로서 발병 후 유사한 비율로 축적되었다(중위수 = 50 및 40일).

< 표 5 >

HEV 감염의 혈청학적 프로필

동정된 프로필	IgM		IgG		공여자 No. of Sera (n=90)	Patients 혈청의 개수 (n=96)	Patients 발병 후 날짜(일)
	pE2	GE3	pE2	GE3			
1	+	-	-	-	0	3	9 - 15
2	+	-	+	+	0	11	5 - 27 (190,240)
3	+	+	-	-	1	1	8
4	+	+	+	+	0	3	7 - 14
5	-	+	+	+	0	1	18
총계(현재 감염)					1	18	중위수 = 13
6	-	-	+	-	5	27	5 - 430
7	-	-	+	+	0	7	9 - 40
8	-	-	-	+	0	1	18
총계(과거 감염)					5	35	중위수 = 50
9	-	-	-	-	84	42	중위수 = 40

저결합성 IgG 항-pE2 항체의 결정을 위한 ELISA

ELISA 방법을 추가로 적용하는 것은 pE2 다이머를 이용해 혈청 내 저결합성 IgG 항체를 결정하기 위한 것이다. 이는 4M 우레아의 존재 및 부재 하에서 혈청 표본을 적정하여 수행하였다. 저결합성 IgG 항체의 존재는 우레아 처리가 항체 수준을 4배 이상 현저하게 감소시킨 경우에 나타난다. 표 6은 저결합성 항체가 E형 간염의 발병 후 2주 이내에 채취한 환자의 혈청에서 배타적으로 검출되었으며, 이 항체가 후속하여 단계적으로 결합성 IgG 항체으로 교체되었음을 보여주고 있다. 따라서, 저결합성 IgG 항체의 일시적인 발생은 급성 E형 간염의 진단에 있어 이것을 잠재적으로 유용하게 한다.

< 표 6 >

발병 후 상이한 시점의 비-A형, B형 및 C형 간염 환자의 혈청 샘플에서

ELISA에 의한 저결합성 pE2 IgG 항체의 결정

pE2 IgG 결합성 테스트(사례)			
발병 후 날짜(일)	저-결합성	고-결합성	총계
0-7	3	0	3
8-14	3	3	6
15-21	3	0	3
22-84	0	12	12
>84	0	7	7
Total	9	22	31

VII. HEV RNA를 검출하기 위한 면역 포획 RT-PCR의 평가

상기에 기재된 인간 혈청의 반응성은 pE2 다이머가 HEV 캡시드의 특정한 구조적 특징을 모방한 것인 경우에 설명될 수 있다. 이러한 가능성을 테스트하기 위하여, pE2에 대항해 발생하는 항혈청이 HEV 입자의 면역 포획에 영향을 줄 수 있는지를 결정하는 실험을 수행하였다.

RT-PCR 프라이머의 특이성

본 연구에서, 2쌍의 다이머인 A5R/A3F 및 B5R/B3F(표 9)를 RT-PCR을 위해 선택하였다. HEV, HAV, 장내 바이러스 및 칼리시바이러스를 개별적으로 함유하는 표본을 이용해 직접 RT-PCR을 통해 이들 프라이머의 특이성을 평가하였다. 도 16은 HEV를 함유하는 표본이 RT-PCR 증폭 뒤에 203 bp HEV 서열의 예상 크기를 가진 특정 밴드를 나타냄을 보여준다.

pE2 다이머는 HEV의 구조적 특성을 모방한다.

pE2 다이머와 HEV 바이러스 입자 사이의 항원 관계는 pE2 펩타이드에 대하여 발생하는 항혈청으로 코팅된 폴리스티렌 패들을 이용한 면역 포획 실험을 통해 연구하였다. 사용된 항혈청은 100 µg의 정제된 pE2를 4회 투여하여 면역화한 뒤, pE2 다이머에 대한 반응성이 우수한 원숭이로부터 채취하였다. 항혈청은 pE2 모노머에 대해 약한 반응성이었으며, 다른 HEV 항원과 반응하지 않았다. 항혈청으로 코팅된 패들은 HEV 입자의 특이적 면역 포획에 효과적인 것으로 밝혀졌으며, 후속하여 결합된 바이러스는 "재료 및 방법"이라는 표제의 단락 하에 본 명세서에 기재된 역전사 중합효소 사슬연쇄 반응(RT-PCR)에 의해 검출되었다. 패들을 유사하게 반응시켰으나, HAV(레인 3), 칼리시바이러스(레인 4 및 레인 5) 및 엔테로바이러스(레인 6)를 포획하는 데는 실패하였다(도 16).

이러한 결과는 pE2 다이머가 항혈청을 다이머에 대해 우수한 반응성이 되도록 함으로써 HEV 입자의 효과적이고 특이적인 면역 포획을 일으킬 수 있는 HEV 바이러스 입자의 특정한 구조적 특징을 모방할 수 있다는 주장을 추가로 뒷받침한다. 임상, 식품 및 환경 샘플에서 HEV의 검출에 대한 면역 포획 분석법을 개발하는 이러한 발견의 적용은 이하에서 논의한다.

면역 포획 RT-PCR(IC-RT-PCR)

토끼에서 pE2에 대해 증가되는 항혈청을 HEV를 면역 포획하는 그들의 능력에 대해 테스트하였다. 항혈청 및 예비-면역 혈청으로 개별적으로 코팅한 폴리스티렌 패들을 바이러스의 포획을 위해 사용하였다. 포획된 입자 상에서 RT-PCR을 수행하였다. 항혈청은 HEV 입자를 보존 용액 바이러스의 5⁵ 희석수까지 포획할 수 있었으나(도 17의 a), 사전 면역화 혈청은 희석되지 않은 모액을 이용한 경우조차도 바이러스를 포획하지 못했다(도 17의 b).

상용 바이러스 RNA 검출 키트와 IC-RT-PCR의 비교

상기에 기재된 면역 포획 RT-PCR(IC-RT-PCR) 방법을 보편적으로 HEV 특이화 단백질인 pE2의 발현으로부터 유래된 항혈청의 안정된 공급원으로서의 활용으로 인해 공중의 건강 및 환경 감시를 위해 HEV를 검출하는 데 사용할 수 있다.

이하에 기재된 방법에서, HEV 입자의 면역 포획은 HEV RNA를 상용 키트(QIAamp Viral RNA Kit, QIAGEN)를 이용해 추출한 뒤에 수행하였으며, 그 사용 방법은 분자 생물학자들에게 숙지되어 있다. 상용 키트를 이용한 RNA 추출 효율은 간섭 없이 100%이며, 이론상 IC-RT-PCR은 32배 이상의 샘플 부피를 수용하기 때문에 직접 RT-PCR보다 32배 이상 민감할 것이다. 이 연구에서, 시딩(seeding) 바이러스는 5배 희석하여 예상 결과가 IC-RT-PCR이 RT-PCR보다 25배 이상 민감하도록 하였다.

본 연구에서는, 평수(plain water), 인간의 분변 표본 상층액 및 균질화된 갑각류 표본 상층액을 포함하는 3가지 유형의 HEV-시딩 표본을 준비하였다. 물 샘플, 갑각류(예를 들면, 굴) 샘플 및 분변 샘플에 동량의 HEV를 접종하였다. 접종된 샘플을 5배 연속 희석하고, 희석된 샘플의 일부를 공업적인(종래의) 방법 및 면역 포획 방법을 이용해 HEV의 존재에 대해 테스트하였다. 이들 표본으로부터 얻은 상대적인 HEV 포획 효율을 조사하고 결과를 표 7에 기재하였다. 이 결과에 따라, 면역 포획법은 HEV 검출에 대해 종래의 RT-PCR 방법에 비해 물 샘플에서는 25배, 분변 샘플 및 갑각류 샘플에서는 125배의 증가된 민감도를 나타내었다. 이러한 결과는 IC-RT-PCR이 상용 바이러스 RNA 키트보다 적어도 25배 이상 민감함을 시사한다. 물 샘플에서 발견된 증가된 민감도의 원인은 면역 포획 방법에 의해 테스트된 샘플의 부피가 종래의 RT-PCR 방법에 의해 테스트된 샘플 부피의 32배이기 때문이다. 게다가, 이러한 결과는 후속의 cDNA 합성을 위한 RNA의 추출을 억제하는 분변 및 갑각류의 상층액에 미지의 인자가 존재함을 시사하기도 한다. 이는 물 샘플은 검출을 저해할 수 있는 물질을 함유하지 않는 것으로 기대되기 때문에 물 샘플에서의 결과가 갑각류 및 분변 현탁액 샘플에서의 결과보다 현저히 높은 결과의 이유이다. 그러나, 분변 및 갑각류 샘플에서 관찰된 간섭은 종래의 RT-PCR 방법 이상으로 IC-RT-PCR을 사용하는 경우에 최소값으로 감소된다. 종래의 RT-PCR의 25배 과량으로 증가된 IC-RT-PCR 방법의 민감도는 면역 포획법에 의한 저해 물질의 제거에서 기인한다.

< 표 7 >

면역 포획-RT-PCR 및 종래의 RT-PCR 방법에 의한 상대적인 HEV 검출 효율

방법	물	분변 상층액	갑각류 상층액
IC-RT-PCR	1:3,125	1:125	1:125
종래의 RT-PCR	1:125	1 (희석 X)	검출되지 않음

검출 민감도는 바이러스 검출에 요구되는 제한된 샘플 희석수로서 표시된다.

결론으로서, 상용 RT-PCR 방법 및 IC-RT-PCR 방법 모두 물 샘플에 대해서는 분변 및 갑각류 샘플보다 낮은 민감도를 나타냈다. 그러나, 이러한 현상은 바이러스의 분해를 가능하게 가속할 수 있는 분변 및 갑각류 샘플 내의 일부의 미지 인자에 의해 초래될 수 있다. 한편, IC-RT-PCR 결과는 면역 포획 방법이 분변 및 갑각류 샘플 내의 미지 인자로부터 유래되는 간섭을 성공적으로 극복함을 시사하고 직접 RT-PCR을 이용하는 것 보다 125배 이상 민감하다는 것은 IC-RT-PCR이 임상 및 환경 감시기로서 실용적임을 추가로 암시한다.

VIII. HEV 예방에서 pE2의 역할

비-A형, B형 및 C형 간염 환자에 대한 이전의 연구 결과는 제조합 펩타이드인 pE2의 다이머 형태가 펩타이드의 모노머 형태의 다이머화에 의해 생성된 형태적 항원 결정인자의 노출을 통해 자연 HEV 감염에서 중요한 역할을 할 수 있음을 시사하였다.

비-A형 내지 C형 급성 간염 환자의 연구에서 이미 밝혀진 바와 같이, pE2의 다이머 형태는 자연 HEV 감염에서 더욱 중요한 역할을 수행하는 것으로 나타났다. pE2 특이성 IgM 항체는 보편적으로 급성 HEV 감염 중에 생성된다. 해당 IgG 항체도 결합성 증가를 동반하며 연장된 기간 동안 생성되어 지속한다. 또한, 그들은 바이러스에 의해 이전에 감염된 개체로부터 유래된 혈청 및 회복기 환자의 혈청에 존재하는 가장 우세한 HEV 항체였다. 이러한 결과는 pE2가 HEV에 대한 보호효과를 제공할 수 있으며, Macaque 원숭이의 실험 감염에서의 보호효과 연구에 의해 추가로 뒷받침된다. 더욱이, 이러한 결과는 또한 보호효과가 주로 선형 에피토프의 제시에 반하여 pE2 펩타이드의 다이머화를 통해 나타난 형태적 항원 결정인자로부터 기인함을 시사하며, 백신 개발을 위한 이론적 기초를 제공한다.

Macaque 원숭이 모델을 이용한 실험 감염에서의 보호효과 연구 결과, 정제된 pE2 펩타이드 제제를 이용한 면역화가 HEV 접종에 대해 동물을 보호함으로써 이를 영양류 백신 후보물로 만든다는 것이 밝혀졌다. 감염 용량은 개놈 용량에 근접한 것으로 밝혀졌으며, 실험 감염과 관련된 병리를 인간에서 자연 감염과 관련된 병리와 비교하였다(Tsarev 외, 1993b; Tsarev 외, 1994b). 박테리아적으로 발현된 펩타이드가 HEV에 대한 보호효과를 제공하는 지에 대한 명확한 증거를 얻기 위하여, 본 연구에 사용된 동물에게 적어도 10⁵ 개놈 당량의 HEV 바이러스 상동 균주를 함유하는 비교적 많은 용량을 접종하였다. 대조군 동물에서 발견된 분변 및 바이러스 함유 상태에서의 바이러스 분비는 면역화 동물에서 본질적으로 제외시켰다. 이들 동물 중 어느 동물도 접종 전에 이미 존재한 항-pE2 항체와 별개인 부가의 HEV 항체를 나타내지 않았다. 예 비 접종 혈청에 존재하는 항-pE2 항체는 그들의 모노머 형태보다 pE2 다이머 형태를 특이적으로 인식하는 것들이 우세하였고, 이는 대규모의 보호효과가 이러한 바이러스 펩타이드의 다이머화에 의해 발생한 형태적 항원 결정인자에 의한 것으로 추론된다. 이러한 논리와 부합하여, pE2 펩타이드의 연구 및 특장화는 아마도 이것들이 상호작용하여 HEV 캡시드를 형성하는 HEV의 주된 구조 단백질 내의 도메인을 포함한다는 것을 시사한다. 따라서, 바이러스 캡시드는 pE2 다이머화를 통해 생성된 것들과 동일 또는 유사한 형태적 항원 결정인자로 생성된다. 결론적으로, pE2 다이머에 대해 특이적인 항체는 자연 HEV 감염에 대한 우세한 항체 반응이다.

210 aa HEV 펩타이드인 pE2를 특징하는 뉴클레오타이드 서열을 보고된 뉴클레오타이드 서열과 비교하고, 원형 HEV 균주의 해당 부위 내의 아미노산 서열을 추정하였다. 210 aa 펩타이드는 HEV 게놈의 ORF2 내의 고도의 보존 부위에서 코딩된다(표 1). 면역화에 사용된 바이러스 펩타이드의 순도는 SDS PAGE로 평가하고(도 7의 a, 레인 3), 그들의 항원성은 인간 HEV 반응성을 이용한 면역 블롯을 이용해 평가한다(도 7의 c, 레인 3). pE2는 면역화에 사용된 정제된 제제에 존재

하는 단백질의 90% 이상을 구성한다. 다이머 형태는 HEV 반응성 인간 혈청에 의해 특이적으로 인식되나(도 7의 c, 라인 3), 23 kD의 모노머 형태는 인식하지 못한다(도 7의 c, 라인 4). 이러한 결과는 인간 혈청에 존재하는 항-HEV 항체가 주로 바이러스 펩타이드의 다이머화로부터 발생한 형태적 항원 결정인자에 대해 유도됨을 시사한다.

면역화

3마리의 시험용 원숭이(M1, M2, M3)를 주 단위로 100 µg의 정제된 pE2 다이머 제제를 4회에 걸쳐 근육내 투여하여 면역화하였다. 다른 3마리의 원숭이(M5, M6, M7)에게 플라시보를 수여하여 대조군으로 삼았다. 4회의 면역화 투여 후 2주 뒤에 동물들로부터 혈액을 채취하고 혈청을 정제된 pE2, GE3에 대한 웨스턴 블롯 및 상용 ELKISA 테스트를 이용해 테스트하였다. 이어서, 최종 면역화 투여 후 2주 뒤에 10⁵ 게놈 당량의 HEV 상동 균주를 동물들에게 접종하였다.

정제된 pE2 펩타이드로 제조된 ELISA를 이용해 면역화에 대한 항체 반응을 관찰하였다(도 18). 그 결과, 면역화는 3마리 동물(M1 - M3) 모두에서 바이러스 펩타이드에 대한 격렬한 항체 반응을 유도한 것으로 나타났다. 항체는 1차 면역화 후 1주일 뒤에 처음 검출되었고, 3차 투여를 수여하고 약 1주일 후에 최대 수준에 도달하였다. 대조군 동물은 검출 가능한 pE2 특이성 항체를 나타내지 않았다. 세 동물 모두에서의 이러한 격렬한 반응은 pE2가 강력한 면역원성을 시사한다.

바이러스 접종 직전에 얻어진 혈청의 HEV 특이성을 천연(즉, pE2 다이머) 및 정제된 열변성 pE2(즉, pE2 모노머)(도 19의 a, 라인 1 내지 4), 정제된 GE3 용합 단백질(도 19의 b)의 동일한 샘플에 대한 웨스턴 블롯, 그리고 HEV를 검출하기 위한 상용 ELISA(도 19의 c)를 통해 추가로 분석하였다. ELISA 분석은 ORF2 및 ORF3 특이화 단백질의 카르복시 말단의 아미노산 서열에 해당하는 2개의 합성 HEV 펩타이드의 혼합물로 제조된 ELISA이다. 제조자의 지침에 따라, 2개의 HEV 펩타이드를 이용한 분석 중 하나는 pE3(즉, GE3)과 유사하고, 다른 하나는 pE2에 인접하게 위치하나 이것과 중첩되지는 않는 HEV의 주된 구조 단백질의 카르복시 말단 부위에 해당한다.

도 19의 a는 4배 연속 희석한 혈청의 일부를 이용한 웨스턴 블롯에 의한 pE2 다이머 및 모노머에 대항하는 항체의 수준에 대한 측정값을 나타낸 것이다. M1 유래의 혈청은 1:4000(라인 1)과 1:256,000(라인 4)의 희석수 사이에서 테스트하였고; M2 유래의 혈청은 1:100(라인 1)과 1:6,4000(라인 4) 사이에서 테스트하였고; M3 유래의 혈청은 1:250(라인 1)과 16,000(라인 4) 사이에서 테스트하였다. 정제된 pE2 펩타이드의 다이머 및 모노머 형태의 등가의 제제를 이용해 블롯을 만들었다. 둘 중 한 형태에 대한 항체의 수준을 펩타이드의 각 형태에 대해 반응성인 혈청의 최대 희석수(임계 희석수)로 규정하였다. 그 결과, M1 유래의 혈청에서 다이머에 대한 항체의 수준이 1:64,000으로 나타났고, 이는 임계 희석수가 1:4,000인 모노머에 대한 항체의 수준보다 16배 높은 것이었다. M2 및 M3 유래의 혈청내의 다이머에 대한 항체의 수준은 각각 1:1,600 및 1:4,000이었는데, 이는 동일한 혈청내의 모노머에 대한 항체의 해당 수준보다 16배 및 4배 높은 것이었다. 면역화하기 전 세 동물로부터 채취한 혈청은 1:100의 혈청 희석수에서 검출 가능한 활성을 전혀 나타내지 않았다(도 19의 a, 라인 5).

도 19의 b는 1:100의 희석수에서 어떠한 혈청도 정제된 GE3에 대해 반응성이 없었음을 나타낸다. 동일한 혈청을 HEV 게놈의 ORF3에 의해 특이화된 단백질 및 주된 HEV 구조 단백질의 카르복시 말단에 해당하는 합성 펩타이드를 이용해 제조한 상용 ELISA를 통해 동일한 희석수에서 테스트하였다. 도 19의 c는 어떠한 혈청도 이들 HEV 펩타이드에 대항하는 검출 가능한 항체를 함유하지 않음을 보여준다. 대조군 동물 유래의 혈청도 상기에 기재된 방법을 이용해 유사하게 테스트하였으나, 이들 중 어느 혈청도 이러한 방법 중 어떠한 방법에도 의해서도 검출 가능한 HEV 항체를 나타내지 않았다.

따라서, 이러한 결과는 pE2 펩타이드가 원숭이에서 고도의 면역원성이며 격렬한 항체 반응을 유도할 수 있을뿐 아니라, 파우스, 래트, 양 또는 토끼와 같은 다른 포유류 숙주 내에서도 면역 반응을 촉진할 수 있음을 시사한다. 면역화에 대한 반응에서 생성된 항체는 pE2 다이머에 대해 우세한 반응성이었다. 임계 희석수로 결정되는 이들 항체의 수준은 모노머에 대한 항체의 해당 수준의 4 내지 16배였다. 이는 pE2 다이머가 모노머 형태보다 높은 수준으로 항체 생산을 유도하기 때문에 우세한 면역원임을 시사한다. 또한, 정제된 pE2를 이용한 면역화는 기타 상업적으로 활용 가능한 방법에 의해 검출 가능한 기타 HEV 항체의 생산을 유도하지 않았다. 따라서, 정제된 pE2에 대항해 증가된 항혈청은 pE2, 보다 구체적으로는 다이머 형태의 펩타이드에 대해 특이적이라고 추론할 수 있다.

또한, 모노머에 대한 임계 희석수 이상으로 희석된 항혈청은 모노머가 아닌 다이머에 대해서만 반응성일 수 있다. 면역학에서의 통상의 실무에 따라, 이러한 본 명세서에 기재된 접합한 희석을 통해 다이머에 대한 "단일 특이성"으로 만들어진 이러한 항혈청은 다이머와 모노머 유래의 다이머에 의해 발현된 형태적 항원 결정인자 및 그 내부에 함유된 선형 에피토프를 구별하는 데 사용될 수 있다.

HEV 접종

3마리의 시험군 동물(M1, M2, M3) 및 3마리의 대조군 동물(M5, M6, M7)에게 면역화 후 2주 뒤에 HEV의 상동 균주를 주기적으로 주사해 접종하였다. 접종 바이러스는 1986년에 중국에서 발발 시 근원적으로 분리하였고(표 1, 균주 D11092), 주사한 바이러스는 PCR에 의해 단위 용량당 10^5 HEV 당량일 것으로 추정되었다(도 20). 주사된 접종 바이러스의 영장류 주사 용량은 결정되지 않았다. 다른 연구자들에 의한 최근의 연구는 HEV의 영장류 감염 역가가 게놈 역가와 대략적으로 동일한 크기임을 밝혀내었다.

실험 감염 후, E형 간염 바이러스의 발생에 대해 동물을 매일 관찰하였다. 감염 전 그리고 감염 후 2일 간격으로 얻어진 샘플에서 바이러스 분비를 관찰하였다. 모세혈관 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 혈장 내 바이러스 부하의 측정을 위해 1주당 2회 간격으로 모세혈관 혈액 샘플을 채취하였다. ALT 수준의 측정을 위해 혈청 샘플을 채취하였다. 두 그룹의 동물들은 정상 ALT 수준을 가졌고 E형 간염의 증세를 나타내지 않았다. 이는 아마도 영장류에서 이전의 통과를 통해 바이러스가 약화되었기 때문이었다(Zhuang 외, 1992). 그럼에도 불구하고, 표 8에는 대조군 동물인 M5가 감염 후 5일 및 17일 뒤에 채취한 모든 분변 샘플에서 바이러스를 분비한 것으로 나타나 있다. 바이러스 분비는 다른 두 대조군 동물 M7 및 M8에서 7일에서 17일 뒤부터 10일 동안 지속되었다. HEV 게놈은 M7에서는 감염 후 9일 뒤에, M8에서는 감염 후 13일 뒤에 채취한 PBMC에서도 검출되었다. pE2 펩타이드를 이용한 면역화는 시험군 동물 중 M1 및 M2에서 바이러스 분비가 완전히 사라졌으며 제3의 시험 동물인 M3에서는 바이러스 분비를 감소시켰고, 바이러스 게놈은 세 동물로부터 채취한 혈장 또는 PBL 샘플 중 어디에서도 검출되지 않았다.

< 표 8 >

접종 후 바이러스 함유 상태 및 분변 내 HEV 분비

군	원숭이	접종후 날짜(일)									
		3	5	7	9	11	13	15	17	19	21
시험군	No. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	No. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	No. 3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
대조군	No. 5	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	No. 7	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
	No. 8	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-

HEV 게놈은 RT-PCR에 의해 모세혈관 혈액 단핵구에서 검출되었다. 혈장 샘플 중 어느 것도 검출 가능한 HEV 게놈을 함유하고 있지 않았다.

바이러스 접종 후 HEV 혈청변환(seroconversion)

바이러스 접종 전 및 접종하고 4주 뒤에 채취한 혈청 샘플 내에 존재하는 HEV 항체의 스펙트럼을 실험 방법에 따라 분석하고 상태를 도 19에 나타내었다. 도 21은 바이러스 접종 전 3마리의 대조군 동물(M5, M6, M7) 모두로부터 얻은 샘플이 처음 3회의 HEV 항체 분석에서 음성 결과를 나타냈음을 보여준다. 대조군 동물 M5에서 감염 후 7일 뒤에 HEV 혈청변환이 발생했다. 이는 발생일과 후속의 모든 경우에서 채취한 혈청에서 pE2 호모다имер 특이성 항체의 검출에 의해 입증되었다(도 21). 이들 모든 혈청 샘플은 상용 ELISA 테스트에 의해 HEV 항체에 대한 가능한 테스트 결과도 제공하였으며, 7일 및 14일 뒤에 채취한 연속적인 샘플은 정제된 GE3에 대해서도 반응성이었다. 감염에 대한 항체 반응의 광범위한 특이성 스펙트럼은 앞에 기재한 pE2 펩타이드를 이용한 면역화에 대한 항체 반응의 제한된 특이성 스펙트럼과 대조적이었다(도 21). 감염 후 14일 및 21일 뒤에 다른 대조군 동물인 M7로부터 채취한 혈청 표본은 pE2 다이머에 대해 약한 반응성이었으며, 상용 분석에서는 양성의 결과는 나타냈지만, ORF3 특이화 펩타이드인 GE3에 대해서는 어떠한 표본도 반응성을 나타내지 않았다. 나머지 대조군 동물인 M8은 감염에 대해 검출 가능한 항체 반응을 나타내지 않았다. 반면, pE2 항체의 경우를 제외한 면역화 동물들은 감염 후 다른 HV 항체를 획득하지 못했다(도 21).

면역화된 동물들(M1, M2, M3)로부터 얻은 혈청은 바이러스 접종 전에 이미 pE2 다이머에 대하여 반응성이었으며, 바이러스 접종 후 7일, 14일 및 28일 뒤에 세 동물로부터 채취한 후속의 샘플 내에 항체가 존재하였다. 그러나 대조군 동물과는 대조적으로, 면역화된 동물 중 어느 것도 바이러스 접종 후 부가의 HEV 항체를 획득하지 못했다(도 21의 a).

결론

이전의 연구는 HEV에 대한 적합한 동물 모델로서 리서스 원숭이를 확립시켰다. 감염 용량은 개놈 용량과 비슷하다는 사실을 발견하였으며(Tsarev 외, 1994b), 인간에서 실험 감염과 관련된 병리는 자연 감염과 관련된 병리와 비슷하였다(Tsarev 외, 1993b). 박테리아적으로 발현된 펩타이드가 HEV에 대한 보호 효과를 제공하는 지에 대한 명확한 증거를 얻기 위하여, 본 연구에 사용된 동물에게 적어도 10^5 개놈 당량의 HEV 바이러스의 상동 균주를 함유하는 비교적 다량을 접종하였다. 본 발명자들은 감염 결과, 분변 샘플 내 바이러스 분비가 3마리의 대조군 동물 모두에 의해 적어도 10일 동안 지속되었으며, PBMC 표본에서 바이러스 게놈의 검출에 의해 2마리 동물에서 일시적인 바이러스 함유 상태가 검출되었음을 발견하였다. 또한, 2마리의 동물에서 HEV 혈청변환이 감염과 동반되었다. 접종 바이러스는 영장류에서 이전의 통과에 의하여 약화되었으나, 대조군 동물 모두는 정상 ALT 수준으로 건강을 유지하였다.

정제된 pE2를 이용한 면역화는 모노머 형태 및 다이머 형태 모두에서 펩타이드에 대해 격렬한 항체 반응을 유도한다는 사실을 발견하였다. 다이머 반응성 항체의 수준은 모노머 특이성 항체의 해당 수준보다 실질적으로 높았다. pE2 반응성 항체는 면역화 동물에서 실험 감염을 예방하기 위하여 제공하였다. 면역화된 두 동물 및 제3 동물에서 분변 내 바이러스 분비가 사라졌으며, 분비 지속 기간은 대조군 동물에서 관찰된 10일 이상에서 1일로 감소한 것으로 밝혀졌다. 또한, 면역화된 동물 중 어느 동물도 PBMC 또는 혈장 표본에서 검출 가능한 바이러스 부하를 함유하지 않았고 pE2 특이성 항체와 무관하였으며, 이들 동물 중 어느 동물도 바이러스 접종 후 부가의 HEV 항체를 획득하지 못했다.

조합해 볼 때, 제조합적으로 발현된 pE2 펩타이드를 이용한 면역화는 HEV 상동 균주에 의한 영장류의 실험 감염을 방어하였으며 이러한 방어는 주로 pE2 펩타이드의 다이머 형태에 대한 항체로부터 기인한 것으로 추론된다. pE2는 Mexico(Huang 외, 1992) 및 U.S.A.(Schlauder 외, 1998)로부터 유전적으로 가장 분기된 분리주를 포함하는 상이한 HEV 분리주 사이에서 고도로 보존되어 있기 때문에, pE2 펩타이드는 다른 HEV 균주에 의한 감염에 대해서도 방어할 수 있다.

하기 실시예는 본 발명의 개념을 예시하기 위한 목적으로 제공된 것이며, 첨부된 청구범위에 의해 한정되는 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.

실시예

바이러스 균주: DDBJ 수탁번호 D11092의 중국 HEV 균주는 Beijing Medical University(P.R. China)의 H. Zhuang 교수로부터 기탁되었다(Aye 외, 1992). 이것은 Zhuang에 의해 제시된 방법(Zhuang 외, 1992)에 따라 E형 간염 환자로부터 채취한 분변 표본을 이용해 실험적으로 감염시킨 Macaque 원숭이의 담즙에서 채취되었다.

혈청: 상기에 기재된 바와 같이 사용된 96개의 혈청은 비-A형, B형 및 C형 급성 간염의 과거 병력 또는 현재 병력을 가지는 홍콩의 Princess Margaret 병원에 입원한 환자들로부터 얻었다. 표본들은 배설된 후 상이한 시간에 입원 중인 환자로부터 수집하였다.

실시예 1 - HEV 캡시드 유전자의 클로닝

HEV RNA 추출

바이러스 RNA를 QIAamp 바이러스 RNA 키트(QIAGEN GbmH, Hilden, Germany)를 이용해 제조자의 지침에 따라 실험적으로 HEV-감염시킨 Macaque 원숭이의 담즙으로부터 추출하였다. 정제된 RNA를 2부피의 이소프로판올(BDH Laboratory Supplies, England) 및 1/10부피의 3M NaAc(pH 6.4)(Sigma, USA)와 혼합하고, -20°C 에서 1시간 동안 그대로 방치하였다. 이후, 혼합물을 15,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 70% 에탄올(BDH Laboratory Supplies, England)을 이용해 펠릿을 1회 세척한 뒤, 역전사 완충액 내에서 재현탁하였다.

표적 서열의 RT-PCR

역전사를 위해, RNA 펠릿을 20 μl 의 RT 마스터 혼합물(4 μl 의 5xRT 완충액[Boeringer Mannheim]; 1.6 μl 의 2.5 mM dNTP; 0.2 μl 의 Avian Myeloblastosis 바이러스(AMV)[Boeringer Mannheim]; 0.625 μl 의 RNAsin[Boeringer Mannheim]; 1 μl 의 역방향 프라이머 E5R 또는 E3R(150 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)] 12.6 μl 의 RNase-비함유수)에 첨가하고, 42°C 에서 1시간 동안 배양하였다.

사용된 프라이머를 표 9에 기재하였다. E3R 및 E5R은 바이러스의 cDNA 단편을 제작하기 위하여 설계하였다. ORF2 및 ORF3의 3' 말단 부위에 해당하는 cDNA 서열을 프라이머쌍 ORF2F/ORF2Bb 및 ORF3F/ORF3R을 사용하여 각각 증폭시켰다. BamHI 및 EcoRI 제한자리를 함유하도록 이들 프라이머를 변형시켜 증폭된 cDNA 단편의 클로닝을 촉진하였다. 모든 프라이머는 Life Technologies(U.S.A.)에 의해 합성된 것이다.

6957번 위치에 단일 염기쌍 결실이 있는 6326번에서 7136번 위치에 걸쳐 있는 모체 cDNA 서열을 프라이머쌍 ORF2F/ORF2Ra를 이용하여 ORF2 부위로부터 클로닝하였다. 그러나, 새로운 E2 cDNA 서열(즉, SEQ ID NO: 1)은 6932번에서 6956번 뉴클레오타이드에 위치하는 동일한 상류 프라이머인 ORF2F 및 새로운 하류 프라이머인 ORF2Rb를 사용하여 동일한 부위로부터 클로닝할 수 있다. 새로 클로닝된 서열은 새로운 정지 코돈의 하류에 위치하는 서열이 제거된 것을 제외하고는 동일한 pE2 펩타이드(즉, SEQ ID NO: 2)를 코딩한다.

< 표 9 >

RT 및 PCR 프라이머

프라이머*	목적	위치	서열	효소자리
E3R	RT	5508-5529	5'-CGGGGAGTCAACATCAGGCACT-3'	
E5R	RT	7117-7140	5'-AAGCAAATAAACTATAACTCCCGA-3'	
ORF2F	Cloning	6326-6350	5'-GCTGGATCCAGCTGTTCTACTCTCGTCCCGTCG-3'	BamHI
ORF2Ra	Cloning	7117-7136	5'-GGCGAAATTCCAAATAAACTATAACTCCCGA-3'	EcoRI
ORF2Rb	Cloning	6932-6956	5'-GGCGAAATTCGGGGGGCTAAAACAGCAACCGCGGA-3'	EcoRI
ORF3F	Cloning	5364-5384	5'-CCGGGATCCGACCTCGTGTTCGCCAACCCG-3'	BamHI
ORF3R	Cloning	5457-5477	5'-CAGGAAATTCCTTAGCGGCGCGGCCCCAGCTG-3'	EcoRI
A3R	RT-PCR	4566-4586	5'-GGCTCACCGGAGTGTTCTTC-3'	
A5F	RT-PCR	4341-4362	5'-CTTTGATGACACCGTCTTCTCG-3'	
B3R	RT-PCR	4554-4575	5'-GTGTTTCTTCCAAAACCCTCGC-3'	
B5F	RT-PCR	4372-4392	5'-GCCGCAGCAAAGGCATCCATG-3'	

* 프라이머는 중국 HEV 분리주의 서열(DDBJ 수탁번호 D11092)을 참조하여 설계하였다. 비-HEV 서열은 밑줄 그어 놓았다.

45 μ l의 PCR 마스터 혼합물(5 μ l의 10xTaq 완충액)[Boeringer Mannheim]; 4 μ l의 2.5 mM dNTP 혼합물; 1.0 μ l의 각 프라이머(150 ng/ μ l); 1 μ l의 Taq DNA 폴리머라아제(1 U/ μ l)[Boeringer Mannheim] 및 33 μ l의 초고순도의 물에 5 μ l의 cDNA를 첨가하여 표적 서열 cDNA의 PCR 증폭을 수행하였다. PCR 혼합물을 50 μ l의 미네랄 오일로 오버레이하였다. 열 사이클 조건은 다음과 같다: 94°C에서 40초간 변성; 57°C에서 40초간 어닐링; 및 72°C에서 1분간 연장. 얻어진 PCR 산물을 각각 ORF2 및 ORF3 유래의 E2 및 E3로 지정하였다.

pGEX 플라스미드로의 클로닝

페놀-클로로포름을 이용해 PCR 산물을 추출한 뒤, 에탄올로 침전시켰다. BamHI 및 EcoRI(Boeringer Mannheim)을 이용해 E2 및 E3 산물 및 pGEX₂₀ 벡터를 분해시켰다. pGEX₂₀ 벡터는 홍콩 대학의 미생물학과의 Cao Liang 박사로부터 제공받았다. 이것은 BamHI, EcoRI, XhoI 및 ClaI 제한절단 인식 서열을 함유하는 다수의 클로닝 자리 5'-CCGCGTGGATCCGAAATTCCTCGATCGATTAG-3'를 가지는 pGEX 발현 벡터(Smith 외, 1988)의 유도체였다. 분해된 단편을 아가로스겔 상에서 분리하고, 겔로부터 밴드를 절단해 회수하여 전기-용리시킨 뒤, 에탄올을 이용해 침전시켰다. 이후, T4 리가아제(Boeringer Mannheim)를 이용해 E2 및 E3를 pGEX₂₀에 결합시켰다. 유전자 펄서(pulser) [BIO-RAD]를 이용해 재조합 플라스미드 pGEX₂₀-E2 및 pGEX₂₀-E3를 *E. Coli DH5a*로 형질전환시키고, 암피실린(100 μ g/ml)으로 LB 아가 플레이트(Sambrook 외, 1989) 상에 플레이팅하였다. 20개의 형질전환체의 콜로니를 플라스미드의 제조를 위해 취하였다. 후속하여, BamHI 및 EcoRI 분해를 수행하고, 예상된 삽입 자리를 가지는 재조합체를 선택하였다 (도 6). 본 연구에 사용된 모든 플라스미드는 QIAGEN 미니-플라스미드 키트[QIAGEN, Hilden, Germany]를 이용하여 제조하였다.

시퀀싱

ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction 키트[PERKIN ELMER]를 이용해 DNA 시퀀싱을 수행하였다. 그 결과, 811 bp의 E2 서열이 6326번-7136번 위치에 존재하였으며, 아마도 PCR 증폭 오류로 인하여 6957번 위치에 단일 염기쌍 결실이 존재하는 것으로 나타났다. 얻어진 프레임쉬프트는 6968번 위치에 새로운 정지 코돈에서 조기 종결되는 번역을 초래함으로써 23 kD의 MW를 가지는 213 aa의 예상 펩타이드보다 작은 크기가 생성될 것으로 예상되었다. E2 및 관련 단편의 위치를 도 1에 나타내었다.

실시예 2 - HEV 펩타이드의 제조 및 정제

GST 융합 단백질의 발현

제조할 플라스미드를 *E. coli* BL21로 형질전환시켰다. 2xYTA 배지(트립톤 16 g/l; 효모 추출물 10 g/l; NaCl 5 g/l; 암피실린 100 µg/l) 내에서 배양하기 위해 단일 콜로니를 취했다. 배양주(4 ml) 400 ml의 2xYTA 배지에서 하룻밤 동안 배양하고, OD₆₀₀이 ≥0.5가 될 때까지 28°C에서 배양하였다. 이소프로필 β-D-티오갈락토사이드(IPTG)[Pharmacia Biotech, U.S.A.](400 µl의 100 mM 용액)를 첨가하고 배양주를 5 내지 6시간 동안 배양하였다. Beckman J2-MC 회전자 JA-14 내에서 7,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 펠릿으로 만들었다.

정제

펠릿을 인산염 완충 염수(PBS: 0.8% NaCl; 0.02% KCl; 0.144% Na₂HPO₄; 0.024% KH₂PO₄, pH 7.0)로 1회 세척하고, 20 ml의 PBS로 재현탁한 뒤, SONIPREP 150[MSE](30초 작동; 30초 중단; 35 사이클; 동력 18 내지 22) 내에서 초음파 처리하였다. 초음파 처리 후, Triton-X100(Sigma, U.S.A.)를 첨가하여 최종 농도를 1%로 만들고 혼합물을 30분간 완만하게 교반하였다. 박테리아 용균물을 4°C에서 원심분리하고, 현탁물을 수집하였다. 글루타티온 세파로스-4B[Pharmacia Biotech, U.S.A.]를 이용하여 "GST Fusion Protein System Manual"에 따라 융합 단백질의 회분식 정제를 수행하였다. 용리 완충액(50 mM의 Tris-HCl 중의 10 mM의 환원된 글루타티온, pH 8.0)을 이용해 결합된 융합 펩타이드를 용리시키고, 각각 ORF2 및 ORF3의 cDNA 단편에 해당하는 GE2 및 GE3로 지정하였다.

벌크 매트릭스에 결합된 융합 단백질의 트롬빈 절단

트롬빈[Pharmacia Biotech, U.S.A.](1 U/µl 용액 5 µl) 및 95 µl의 PBS를 글루타티온 세파로스-4B에 결합된 100 µl 상부피의 GE2에 첨가하고, 22°C에서 16시간 동안 배양하였다. 원심분리를 통해 현탁물을 수집하고 매트릭스의 2회 세척 현탁액과 조합하였다. 이 트롬빈-절단 단백질을 pE2로 지정하였다.

실시예 3 - HEV 펩타이드의 동정

SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 분석

10%의 SDS-폴리아크릴아미드 겔을 표준 방법(Sambrook 외, 1989)에 따라 제작하였다. 펩타이드 표본(4 µg)을 겔 상에 로딩하고, Mingel Twin G42[Biometra, Germany]를 이용하여 100 볼트에서 3시간 동안 전기영동시켰다. 45 ml의 H₂O 및 10 ml의 차가운 아세트산 혼합물 중의 쿠마시 블루 R250으로 겔을 염색하였다.

웨스턴 블롯

SDS-PAGE 후, 겔 내의 단백질을 Mini-PROTEAN II Cell[BIO-RAD]를 이용해 100볼트에서 1시간 동안 0.45 µm의 니트로셀룰로오스 막[BIO-RAD, U.S.A.]으로 이동시켰다. 4°C에서 하룻밤 동안 1xPBS 중의 5%의 탈지 우유[Carnation, Nestle]로 차단한 후, 실온에서 E형 간염 환자로부터 수집한 통합된 혈청(1:500) 또는 기니아 피그로부터 채취한 항-GST 혈청(1:1000)과 막을 1.5시간 동안 반응시켰다. 매회 5분씩 PBS 중의 0.05% Tween^(R)₂₀으로 3회 세척한 후, 막을 실온에서 호스래디쉬 퍼옥시다아제(HRP)-접합 Protein-A[BIO-RAD, U.S.A.]와 추가 1.5시간 동안 반응시켰다. 다시 3

회 세척한 후, 실온에서 5 내지 10분 동안 30아미노-9-에틸 카르바졸[ACE Single Solution, ZTMED, U.S.A.]과 함께 막을 배양하여 양성 밴드를 전개시켰다. 상기에 기재된 혈청 및 접합체를 차단 완충액(1xPBS 중의 5% 탈지 우유[Carnation, Nestle])으로 희석하였다.

실시예 4 - IgG 및 IgM 항-HEV를 검출하기 위한 ELISA의 평가

혈청 공급원

홍콩의 Princess Margaret 병원에서 모집된 96명의 비-A형, B형 및 C형 간염 환자로부터 채취한 혈청을 연구하였다. 이들 96개의 혈청 중 74개를 상용 HEV 키트[Genelabs, Singapore]를 이용해 추가로 테스트하였다. 90명의 건강한 공여자로부터 채취한 혈청은 Queen Mary 병원으로부터 얻었다.

HEV 펩타이드 항원을 이용한 ELISA

폴리스티렌 미세적정 플레이트[Nunc, Denmark]의 각 웰을 0.063 µg/ml의 정제된 pE2 펩타이드(0.05 M 탄산나트륨 중의 6.3 ng/100 µl, pH 9.5) 또는 0.23 µg/ml의 GE3(0.05 M 탄산나트륨 중의 23.0 ng/100 µl, pH 9.5) 중 하나로 코팅하여 pE2 또는 pE3 중 하나에 대해 특이적인 분석물을 제조했다. 사용된 펩타이드의 농도는 미리 최적으로 결정하였다. 4℃에서 하룻밤 동안 배양한 후, 350 µl의 세척 완충액(PBS 중의 0.05% Tween^(R)₂₀)을 이용해 웰을 세척한 뒤, PBS 중의 소의 혈청 알부민(BSA)[Sigma, U.S.A.]을 이용해 4℃에서 24시간 동안 차단하였다. 플레이트를 세척 완충액으로 2회 세척하였다. 2벌의 웰에 1:100 희석된 0.1 ml의 혈청 표본을 첨가해 HEV 항체 수준을 결정하였다(희석제: PBS 중의 1% BSA, 0.2% Bronidox). 37℃에서 15분 동안 배양한 후, PBS 중의 0.05% Tween^(R)₂₀를 이용해 웰을 5회 세척하였다. 1:25,000 희석된 호스레디쉬 퍼옥시다아제(HRP)-접합 인간 IgM 특이성 항체[BIOSOURC]와 반응시켜 IgM 항체를 결정하고, 1:16,000 희석된 HRP-접합 단백질 A[BIO-RAD]와 반응시켜 IgG 항체를 결정하였다(희석제: PBS 중의 1% BSA, 0.2% Bronidox, 10% 수크로오스). 37℃에서 30분 동안 배양한 후, 웰을 5회 세척한 뒤, 100 µl의 TMB 기질(3,3',5,5'-테트라메틸벤자이딘)[Diesse, Italy]을 첨가하였다. 37℃에서 30분 동안 배양한 후, 0.3 M H₂SO₄를 이용해 반응을 중단시켰다. Anthos 2001 마이크로플레이트 판독기[ANTHOS LAB]를 이용해 450 nm에서 플레이트를 판독하였다. 개별적으로 수행된 테스트에서 얻어진 결과들을 비교하기 위하여, 참조용 혈청을 각각의 테스트 과정에 포함시키고, 각각의 테스트 과정에서 테스트 혈청을 이용해 얻은 OD값은 참조용 혈청을 이용해 얻은 값에 대하여 표준화하였다. 항-pE2 IgG 임계값을 웨스턴 블롯에 의해 미리 테스트된 비-반응성 혈청의 평균 OD값 이상의 3 SD로 설정하였다. 항-pE2 IgM 임계값을 건강한 혈액 공여자의 혈청의 평균 OD값 이상의 3 SD로 설정하였다.

pE2 IgG 결합성 테스트

혈청을 연속적으로 희석하고, 2벌의 웰에서 pE2-코팅 마이크로플레이트와 반응시켰다. 37℃에서 30분간 배양한 후, 웰을 세척한 뒤, 실온에서 PBS(대조군) 또는 4M의 우레아를 함유하는 PBS로 10분간 처리하였다. 플레이트를 세척한 뒤, 앞에서와 같이 HRP-단백질 A 접합체로 처리하였다.

실시예 5 - 웨스턴 블롯에 의해 검출된 IgG 항-pE2

혈청 공급원

실시예 4에 사용된 모든 혈청을 웨스턴 블롯 기법을 이용하여 재테스트하였다.

웨스턴 블롯

34 µg의 정제된 pE2를 70 mm 너비의 단일 라인 SDS-폴리아크릴아미드 겔에 로딩하고 100볼트에서 3시간 동안 전기영동시켰다. 전기영동 후, 펩타이드를 MINI-PROTEAN II Cell[BIO-RAD] 내에서 100볼트로 1시간 동안 0.45 µm의 니트로셀룰로오스 막[BIO-RAD, U.S.A.]으로 이동시켰다. 4℃ 하에 하룻밤 동안 차단 완충액 내에서 교반한 후, 막을 2 mm 스트립으로 절단하였다. 스트립을 1:250 희석된 각 혈청과 함께 개별적으로 1.5시간 동안 배양하였다. 이들을 세척 완충액 중에서 3회에 걸쳐 5분 세척한 뒤, 1:30,000으로 희석된 염소의 항-인간 IgG 알칼리금속 인산염 접합체[Sigma, U.S.A.]와 함께 실온에서 1.5시간 동안 배양하였다. 세척 후, BCIP/NBT 혼합물[Gibico BRL, U.S.A.]를 발색을 위해 첨가하고 스트립을 물에 넣어반응을 중단시켰다.

그 결과, ELISA에 의해 결정된 항체의 대부분은 모노머 형태가 아닌 pE2의 다이머 형태에 결합할 수 있는 것들에서 기인할 수 있었음이 확인되었다.

실시예 6 - 면역 포획 RT-PCR(IC-RT-PCR)

특정 토끼의 다중 클론 항체 제조

HEV에 대한 항체를 제조하기 위하여 사용된 항원은 글루타티온 S-트랜스퍼라아제 융합 단백질인 GE2로서 전개된 pE2 펩타이드이다. 2.5-3.0 kg 중량의 암컷 흰토끼를 100 μ g의 항원으로 면역화하였다. 제1 용량은 동부피의 완전 프로인트 아주번트를 함유하였다. 불완전 프로인트 아주번트는 10 내지 1일 간격의 스케줄로 후속 투여에 사용하였다. 특정 항체가 1:10,000 희석된 토끼 혈청에서 ELISA에 의해 검출 가능한 수준으로 증가하였을 때, 토끼에게 100 μ g의 PBS 중의 항원을 정맥내 추가 접종하였다. 추가 접종 후 4일 뒤에 심장 천자를 통해 혈액을 채취하였다. 특정 항체를 웨스턴 블롯 및 ELISA를 통해 평가하였다.

분변 현탁액의 제조

13개의 급성 E형 간염 환자의 분변을 First People's Hospital of Guangzhou에서 수집하였다. 실험적으로 HEV-감염시킨 3개의 원숭이 분변을 HEV 접종 당일부터 30일 뒤까지 수집하였다.

분변 표본(5 g)을 20 ml의 1xPBS와 혼합하고 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 혼합물을 1500 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 면역 포획을 위해 수집하였다.

감각류의 균질화 현탁액의 제조

64개의 감각류 표본은 홍콩 주변의 스트리트 마켓(street market)에서 수집하고 17개는 Department of Environmental Protection을 통해 수집하였다.

20 g의 감각류 육질을 완전히 혼합하고 균질물을 100 ml의 0.2 M 글리신-0.15 M NaCl 완충액(pH 9.5) 및 Cat-Floc의 보존용액 2ml(1% w/v)와 섞었다. 얻어진 혼합물을 교반하고 4°C에서 10분간 교반하였다. 이어서, 얻어진 혼합물을 100 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 현탁액을 면역 포획을 위해 수집하였다.

HEV 입자 시딩

HEV 입자를 함유하는 담즙은 Zhuang Hui 교수(Beijing Medical University)에 의해 기증된 실험용 HEV-감염 Macaque 원숭이로부터 수집하였다. 담즙을 PBS 중의 1% BSA로 200배 희석하고, 이것을 보존 용액으로 삼았다. 보존 용액을 5회 연속 희석하여 5⁰에서 5⁶로 희석하고, 검사용 용액(working solution)으로 삼았다. 검사용 용액을 각각 10 μ l씩 분취하여 5 ml의 물, 분변 현탁액 또는 감각류 현탁액 중 하나와 혼합하여 IC-RT-PCR 및 직접 RT-PCR 비교를 위한 HEV-시딩 표본을 제조하였다.

면역 포획

50 mM 탄산나트륨/중탄산나트륨 완충액(pH 9.6)으로 1:200배 희석된 항혈청을 코팅 용액으로 사용하였다. Nunc-Immuno 패들[Nunc, Denmark]을 시험관 내에서 37°C 하에 1 ml의 코팅 용액과 함께 4시간 동안 배양하여 코팅하였다. 항혈청을 제거하고 PBS 중의 2% 소의 혈청 알부민(BSA)으로 대체하고 패들을 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 이어서, 패들을 PBS 중의 0.05% Tween^(R)₂₀으로 세척한 뒤, 면역 포획을 위해 튜브로 옮겼다. 감각류 현탁액 또는 20% 분변 현탁액(4.5 ml)을 튜브에 첨가하고, 튜브를 4°C에서 하룻밤 동안 온화하게 교반하였다. 이어서, 면역-패들이라 명한 패들을 0.05%의 Tween^(R)₂₀으로 세척하고, RNA 추출을 위해 미세 원심분리 튜브로 옮기고 HEV RNA의 검출을 위해 내부(nested) RT-PCT를 수행하였다.

바이러스 RNA의 추출

RNase 비함유수(140 μ l) 및 AVL 완충액(560 μ l)을 면역-패들을 함유하는 튜브에 첨가하였다. 이어서, 바이러스 RNA를 "QIAgen Viral RNA Handbook"의 지침에 따라 추출하였다. 이후, 1부피의 이소프로판올 및 1/10부피의 2M 아세트산 나트륨(pH 4.6)을 정제된 RNA에 첨가하였다. 혼합물을 교반하고, -20°C에서 1시간 동안 그대로 방치한 뒤, 4°C에서 14,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 미리 냉각시킨 70% 에탄올을 이용해 펠릿을 1회 세척하였다. 에탄올을 주의 깊게 세척하고, 이것을 특정 cDNA로 역전사시키기 전에 펠릿을 실온에서 15분간 공기 건조시켰다.

역전사(RT) 및 내부 PCR

RT 및 PCR에 사용된 프라이머를 표 9에 기재하였다. 외부 프라이머쌍은 A5F 및 A3R이었고 내부 프라이머쌍은 B5F 및 B3R이었다.

RT-PCR: 각 프라이머 펠릿을 20 μ l의 RT 마스터 혼합물(4 μ l의 5xRT 완충액[Boeringer Mannheim]; 1.6 μ l의 2.5 mM dNTP; 0.2 μ l의 Avian Myeloblastosis 바이러스(AMV)[Boeringer Mannheim]; 0.625 μ l의 40 U/ μ l RNAsin [Boeringer Mannheim]; 1 μ l의 역방향 프라이머(A3) 및 12.6 μ l의 RNase-비함유수)와 혼합하였다. 42°C에서 1시간 동안 배양한 후, 45 μ l의 PCR 마스터 혼합물(5 μ l의 10xTaq 완충액[Boeringer Mannheim]; 4 μ l의 2.5 mM dNTP 혼합물; 1.0 μ l의 정방향 및 역방향 프라이머(150 ng/ μ l)(A3 및 A5); 1 μ l의 1 U/ μ l Taq DNA 폴리머라아제[Boeringer Mannheim] 및 33 μ l의 초고순도의 물에 5 μ l의 cDNA를 첨가하였다. PCR 혼합물을 50 μ l의 미네랄 오일로 오버레이하였다. DNA 열 사이클러 480(Perkin-Elmer Cetus) 내에서 증폭을 수행하였다. 이때, 사이클링 조건을 다음과 같다: 94°C에서 40초간 변성; 57°C에서 40초간 어닐링; 및 72°C에서 1분 20초간 연장. 총 35사이클 동안 프로세싱을 수행한 뒤, 72°C에서 최종 가동-연장을 수행하였다.

내부 PCR 및 앰플리콘 검출: 제1 PCR 산물 2 μ l을 프라이머가 B3 및 B5인 것을 제외하고는 제1 PCR과 동일한 조성을 함유하는 48 μ l의 PCR 마스터 혼합물에 첨가하였다. 5 μ l의 PCR 산물 및 50 bp의 DNA 래더[Gibco GRL]을 TBE 완충액 중의 2% 아가로스 겔에 로딩하고 100 볼트에서 30분간 전기영동시켰다. 0.5 μ g/ml의 에티뮴 브로마이드로 15분간 겔을 염색한 뒤, UV광 하에서 가시화하였다.

실시예 7 - HEV 예방에서 pE2의 역할

동물

야생 원숭이인 마카쿠스 원숭이를 1개월 동안 격리시킨 뒤, ALT 및 HEV 항체의 테스트를 위해 혈액을 채취하였다. 60 이상의 ALT/AST를 가지거나 IgG 항-HEV 양성인 원숭이를 연구에서 배제시켰다. 모집한 원숭이를 3개의 군으로 나누었는데, 그중 하나는 시험군이고 또 하나는 대조군이다. 각 군은 3마리의 동물로 이루어진다.

면역화

100 μ g의 정제된 pE2를 함유하는 용량을 주 단위로 4회 근육내 투여하여 시험군을 면역화하였다. 제1 투여량에는 동부피의 완전 프로인트 아췌번트가 함유되어 있다. 후속 투여에는 불완전 프로인트 아췌번트가 사용되었다. 대조군 동물에는 각각의 아췌번트와 함께 구성된 플라시보를 투여하였다. HEV 항체의 결정을 위해 주 단위의 혈청 표본을 채취했다. 특정 항체가 만족스러운 수준으로 유도된 경우, 동물에게 I/V 추가 접종을 수여하였다. 최종 면역화 후 2주 뒤에 10^5 개놈 당량의 HEV 상동 균주를 정맥내 주사하여 두 군의 동물을 접종하였다. 분변 표본을 2일 간격으로 수집하고 모세혈관 혈액 샘플을 주사 후 5주 동안 주 단위로 채취하였다. 혈장 및 모세혈관 단핵 혈구 세포(PMBC)를 피콜-하이파크 구배 원심분리(Kanof 외, 1998)를 이용해 분리하였다. 자동분석기(Model 7170, HITACHI, Japan) 내에서 새로 수집된 혈청 샘플에 대해 아미노산 트랜스퍼라아제(ALT) 수준을 결정하였다. HEV 항체 및 HEV 개놈의 결정을 위해 혈장 샘플을 저장하였다.

HEV 입자의 접종

최종 면역화 후 2주 뒤에 10^5 개놈 당량의 HEV 상동 균주를 정맥내 주사하여 두 군의 동물을 접종하였다.

영장류 검사

분변 표본을 2일 간격으로 수집하고 모세혈관 혈액 샘플을 주사 후 5주 동안 주 단위로 채취하였다. 혈장 및 모세혈관 단핵 혈구 세포(PMBC)를 피콜-하이파크 구배 원심분리(Kanof 외, 1998)를 이용해 분리하였다. 자동분석기(Model 7170, HITACHI, Japan) 내에서 새로 수집된 혈청 샘플에 대해 아미노산 트랜스퍼라아제(ALT) 수준을 결정하였다. HEV 항체 및 HEV 게놈의 결정을 위해 혈장 샘플을 저장하였다.

Beijing Medical University에 의해 제조된 상용 HEV ELISA 키트 및 정제된 pE2 펩타이드로 미세적정 플레이트를 코팅해 제조한 분석물을 이용해 HEV 항체의 수준을 결정하였다. 대략 0.5 μ g의 pE2 또는 100 μ g의 GE3를 70 mm 너비의 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔 상에 로딩한 웨스턴 블롯을 통해 정제된 바이러스 펩타이드에 대한 항체를 검출하였다. 전기영도 후, 바이러스 펩타이드를 니트로셀룰로오스 막으로 전기영동적으로 트랜스 블롯하였다. 막을 4°C에서 하룻밤 동안 5%의 탈지우유에서 교반하고 사용을 위해 2 mm 스트립으로 절단하였다. 호스래디쉬 퍼옥시다아제-접합된 Protein A (BIO-RAD, U.S.A.)를 제2 항체로서 1:2000 희석하여 사용하였다.

PMBC 및 혈장 중의 바이러스 RNA를 각각 QIAmp RNA 혈액 미니-키트 및 QIAgen Viral RNA 키트(QIAGEN, Germany)를 이용해 제조자의 지침에 따라 추출하였다. 정제된 바이러스 RNA를 역전사시킴 뒤, 내부 PCR을 통해 증폭시켰다. 역전사에 사용된 프라이머는 A3R이었다. 내부 프라이머 쌍은 A5F 및 A3R이었고, 내부 프라이머 쌍은 B5F 및 B3R이었다(표 9).

분변 표본에서의 HEV 검출을 위해 면역 포획 방법을 사용하였다. 폴리스티렌 패들(Nunc-Immuno 패들, Nunc, Denmark)을 37°C에서 1 ml의 1:100 과면역 토끼 항-pE2 혈청으로 4시간 동안 코팅하였다. 코팅된 패들을 PBS 중의 0.05% Tween^(R)₂₀으로 3회 세척하고, QIAgen Viral RNA 키트(QIAGEN, Germany)를 이용해 RNA 추출을 위해 청결한 튜브에 넣었다. 정제된 바이러스 RNA를 상기에 기재된 바와 같이 역전사시키고 증폭시켰다.

참고 문헌

- Arnon. R. 1987. Synthetic Vaccines. 1:83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fl.
- Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989.
- Aye, T.T., T. Uchida, X.Z. Ma, F. lida, T. Shikata, H. Zhuang and K.M. Win. 1992. Complete Nucleotide Sequence of a Hepatitis E Virus Isolated from the Xinjiang Epidemic(1986-1988) of China. Nucleic Acids Res. 20:3512.
- Aye, T.T., T. Uchida, X.Z. Ma, F. lida, T. Shikata, M. Ichikawa, T. Rikihisa, and K.M. Win. 1993. Sequence and Gene Structure of the Hepatitis E Virus Isolated from Myanmar. Virus Genes. 7:95-109.
- Balayan, M.S., A.G. Andjaparidze, S.S. Savinskaya, E.S. Ketiladze, D.M. Braginsky, A.P. Savinov, and V.F. Polescschuk. 1983. Evidence for a Virus in non-A, non-B Hepatitis Transmitted Via the Fecal-Oral Route. Intervirology. 20:23-31.
- Belabbes, E.H., A. Bourgurmouh, A. Benatallah, and G. lloul. 1985. Epidemic Non-A, Non-B Viral Hepatitis in Algeria: Strong Evidence for is Spending by Water. J. Med. Virol. 16:257-263.
- Beril, C., J.M. Crance, F. Leguyader, V. Ataire-Marchais, F. Leveque, M. Albert, M.A. Goraguer, L. Schwartzbrod, and S. Billaudel. 1996. Study of Viral and Bacterial Indicators in Cockle and Mussels. Marine Pollution Bulletin. 32:404-409.
- Berke, T., B. Golding, X. Jiang, W.C. David, M. Wolfaardt, A.W. Smith, and D.O. Matson. 1997. Phylogenetic Analysis of the Caliciviruses. J. Med. Virol. 52:419-424.
- Bi, S.L., M.A. Purdy, K.A. McCaustland, H.S. Margolis, and D.W. Bradley. 1994. The Sequence of Hepatitis E Virus Isolated Directly From a Single Source During an Outbreak in China. Virus Res. 33:98.

- Bradley, D.W. and M.S. Balayan. 1988. Virus of Enterically Transmitted non-A, non-B Hepatitis [letter]. *Lancet*. 1:819.
- Briton, M.A., and F.X. Heinz. *New Aspects of Positive-Strand RNA Virus*. American Society for Microbiology, Wahsington D.C., 1990.
- Coursaget, P., Y. Buisson, N. Depril, P.L. Canne, M. Chavaud, C. Molinie, and R. Roue. 1993. Mapping of Linear B Cell Epitopes on Open Reading Frames 2 and 3 Encoded Proteins of Hepatitis E Virus Using Synthetic Peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* 109:251-256.
- Demeke, T. and R.P. Adams. 1992. The Effects of Plant Polyseccharides and Buffer Additives on PCR Siotechniques. 12:332-334.
- Dilawari, J.B., K. Singh, Y.K. Chawla, G.N. Ramesh, A. Chauhan, S.R. Bhusnurmath, T.R.
- Sharma, and C.S. Sokhey. 1994. Hepatitis E Virus: Epidemiological, Clinical and Serological Studies of North Indian Epidemic. *Indian J. Gastroenterol.* 13:44-48.
- Donati, M.C., E.A. Fagan, and T.J. Harrison. 1997. Sequence Analysis of Full Length HEV Clones Derived Directly From Human Liver In Fulminant Hepatitis E In "Viral Hepatitis E and Liver Diseases" (M. Rizzetto, R.H. Purcell, J.L. Gerin, and G. Verme, Eds.), p.p. 313-316. Edizioni Minerva Medica, Torino. Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratoty Manual*, Cold Spring Harbor Lab., New York, 1988.
- Hau, C.H., T.T. Hien, N.T. Tien, H.B. Khiem, P.K. Sac, V.T. Nhung, R.P. Larasati, K. Laras, M.P. Putri, R. Doss, K.C. Hyams, and A.L. Corwin. 1999. Prevalence of Enteric Hepatitis A and E Viruses in the Mekong River Delta Region of Vietnam. *Am. J. Trap. Med. Hyg.* 60:277-280.
- Huang, C.C., D. Nguyen, J. Fernandez, K.Y. Yun, K.E. Fry, D.W. Bradley, A.W. Tam, and G.R. Reyes. 1992. Molecular Cloning and Sequencing of the Mexican Isolate of Hepatitis E Virus (HEV9). *Virology.* 191:550-558.
- Hussaini, S.H., S.J. Skidmore, P. Richardson, L.M. Sherraff, B.T. Cooper, J.G. O'Grady. 1997. Severe Hepatitis E Infection During Pregnancy. *J. Viral. Hepat.* 4:51-54.
- Imai, H., O. Yamada, S. Morita, S. Suehiro, and T. Kurimura. 1992. Detection of HIV-1 RNA in Heparinized Plasma of HIV- I Seropositive Individuals. *J. Virol. Methods.* 36:181-184.
- Kanof, E.M., P. Smith, and H. Zola. 1998. Isolation of Whole Mononuclear Cells From Peripheral Blood and Cord Blood. In "Current Protocols in Immunology" (J.E. Coligan, A.H. Kruisbeek, D.M. Margulies, E.M. Shevach, and W. Strober, Eds.), p.p. 7.1.1-7.1.3. John Wiley & Sons, Inc., Greene.
- Kennet, R., *Monoclonal Antibodies*, Kenneth et al., Eds., Plenum Press, New York, p.p. 365-367.
- Khudyakov, Y.E., M.O. Favorov, D.L. Jue, T.K. Hine, and H.A. Field. 1994. Immunodominant Antigenic Regions in a Structural Protein of the Hepatitis E Virus. *Virology.* 198:390-393.
- Khudyakov., Y.E., N.S. Khudyakov, H.A. Field, D. Jue, C. Starling, M.O. Favorov, K. Krawczynski, L. Polish, E. Mast, and H. Margolis. 1993. Epitope Mapping in Proteins of Hepatitis E Virus. *Virology.* 194:89-96.
- Khuroo, M.S. 1980. Study of an Epidemic of non-A, non-B Hepatitis. Possibiw of Another Human Hepatitis Virus Distinct From Post-Transfusion non-A, non-B Type. *Am.J. Med.* 68:818-824.
- Kohler and Milstein, 1975. *Nature* 256:495-497.

- Kolk, A.H., A.R. Schuitema, S. Kuijper, J. van Leeuwen, P.W. Hermans, J.D. van Embden, and R.A. Hartskeert. 1992. Detection of Mycobacterium Tuberculosis in Clinical Samples by Using Polymerase Chain Reaction and a Nonradioactive Detection System. *J. Clin. Microbiol.* 30:2567-2575.
- Krawczynski, K. 1993. Hepatitis E *Hepatology.* 17:932-941.
- Li, F., H. Zhuang, S. Kolivas, S.A. Locarnini, and D.A. Anderson. 1994. Persistent and Transient Antibody Responses to Hepatitis E Virus Detected by Western Immunoblot Using Open Reading Frame 2 and 3 and Glutathione S- Transferase Fusion Proteins. *J Clin. Microbiol.* 32:2060-2066.
- Li, F., J. Torressi, S.A. Locarnini, H. Zhuang, W. Zhu, X. Guo, and D.A. Anderson. 1997. Amino-Terminal Epitopes Are Exposed When Full-Length Open Reading Frame 2 of Hepatitis E Virus is Expressed in *Escherichia Coll*, but Carboxy- Terminal Epitopes Are Masked. *J Med Virol.* 52:289-300.
- Li, T.C., Y. Yamakawa, K. Suzuki, M. Tatsumi, M.A. Razak, T. Uchida, N. Takeda, and T. Miyamura. 1997. Expression and Self-Assembly of Empty Virus-Like Particles of Hepatitis E Virus. *J Virol.* 71:7207-7213.
- Myint, H., M.M. Soe, T. Khin, T.M. Myint, and T.M. Tin. 1985. A Clinical and Epidemiological Study of an Epidemic of Non-A, Non-B Hepatitis in Rangoon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34:1183-1189.
- Panda, S.K., R. Dafta, J. Kaur, A.J. Zuckerman, and N.C. Nayak. 1989. Enterically Transmitted non-A, non-B Hepatitis: Recovery of Virus-Like Particle From an Epidemic in South Delhi and Transmission Studies in Rhesus Monkey. *Hepatology.* 10:466-72.
- Purdy, M.A, K.A. McCaustand, K. Krawczynski, A. Tam, M.J. Beach, N.C. Tassopoulos, G.R. Reyes, and D.W. Bradley. 1992. Expression of a Hepatitis E Virus (HEV)-trpE Fusion Protein Containing Epitopes Recognized by Antibodies in Sera From Human Cases and Experimentally Infected Primates. *Arch Virol.* 123:335-349.
- Purdy, M.A., K.A. McCaustand, K. Krawczynski, J. Spelbring, G. R. Reyes, and D.W. Bradley. 1993. Preliminary Evidence That a trpE-HEV Fusion Protein Protects *Cynomolgus* Macaques Against Challenge With Wild-Type Hepatitis E Virus (HEV). *J. Med. Virol.* 41:90-94.
- Reyes, G. R., C. C. Huang, A.W. Tam, and M.A. Purdy. 1993. Molecular Organization and Replication of Hepatitis E Virus (HEV). *Arch. Virol. Suppl.* 7:15-25.
- Sambrook et al., *Molecular Cloning.- A Laboratory Manual*, 2 nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 1989.
- Schlauder, G.G., G.J. Dawson, J.C. Erker, P.Y. Kwo, M.F. Knigge, D.L. Smalley, J.E. Rosenblatt, S.M. Desai, and I.K. Mushahwar. 1998. The Sequence and Phylogenetic Analysis of a Novel Hepatitis E Virus Isolated From a Patient With Acute Hepatitis Reported in the United States. *J. Gen. Virol.* 79(Pt3):447-456.
- Smith, D.B., and K.S. Johnson. 1988. Single-Step Purification of Polypeptides Expressed in *Escherichia Coli* as Fusions With Glutathione S-Transferase. *Gene.* 67:31-40.
- Tam, A.W., M.M. Smith, M.E. Guerra, C.C. Huang, D.W. Bradley, K.E. Fry, and G. R. Reyes. 1991. Hepatitis E Virus (HEV): Molecular Cloning and Sequencing of the Full-Length Viral Genome. *Virology.* 185:120-131.
- Tsai, Y.L., C.J. Palmer, and L.R. Sangermano. 1993. Detection of *Escherichia Coli* in Sewage and Sludge by Polymerase Chain Reaction. *Appi. Environ. Microbiol.* 59:353-357.

- Tsai, Y.L. and B.H. Olson. 1992. Rapid Method for Separation of Bacterial DNA From Humic Substances in Sediments for Polymerase Chain Reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2292-2295.
- Tsarev, S.A., S.U. Emerson, G.R. Reyes, T.S. Tsareva, L.J. Legters, I.A. Malik, M. Iqbal and R.H. Purcell. 1992. Characterization of a Prototype Strain of Hepatitis E Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:559-563.
- Tsarev, S.A., T.S. Tsareva, S.U. Emerson, A.Z. Kapikian, J. Ticehurst, W. London, and R.H. Purcell, 1993a. ELISA For Antibody to Hepatitis E Virus (HEV) Based on Complete Open-Reading Frame-2 Protein Expressed in Insect Cells: Identification of HEV Infection in Pimates. *J Infect Dis.* 168:369-378.
- Tsarev, S.A., S.U. Emerson, T.S. Tsareva, P.O. Yarbough, M. Lewis, S. Govindarajan, G.R. Reyes, M. Shapiro and R.H. Purcell. 1993b. Variation in Course of Hepatitis E in Experimentally Infected Cynomolgus Monkeys. *J. Infect. Dis.* 167:1302-1306.
- Tsarev, S.A., T.S. Tsareva, S.U. Emerson, S. Govindarajan, M. Shapiro, J.L. Gerin, and R.H. Purcell. 1994a. Successful Passive and Active Immunization of Cynomolgus Monkeys Against Hepatitis E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:10198-10202.
- Tsarev, S.A., T.S. Tsareva, S.U. Emerson, P.O. Yarbough, L.J. Legters, T. Moskal, and R.H. Purcell. 1994b. Infectivity Titration of a Prototype Strain of Hepatitis E Virus in Cynomolgus Monkeys. *J. Med. Virol.* 43:135-142.
- Tsarev, S.A., T.S. Tsareva, S.U. Emerson, S. Govindarajan, M. Shapiro, J.L. Gerin, and R.H. Purcell. 1997. Recombinant Vaccine Against Hepatitis E., Dose Response and Protection Against Heterologous Challenge. *Vaccine.* 15:1834-1838.
- Tsega, E., B-G. Hanson, K. Krawczynky, and E. Nordenfelt. 1992. Acute Sporadic Viral Hepatitis in Ethiopia: Causes, Risk Factors and Effects of Pregnancy. *Clin. Infec. Dis.* 14:961-965.
- Visvanathan, R. 1957. Infectious Hepatitis in Delhi (1955-1956): A Critical Study, *Epidemiology. Indian J. Med. Res. (Suppl.)*. 45:1-30.
- Xing, L., K. Kato, T. Li., N. Takeda, T. Miyamura, L. Hammar, and R.H. Cheng. 1999. Recombinant Hepatitis E Capsid Protein Self-Assembles Into a Dual-Domain T = I Particle Presenting Native Virus Epitopes. *Virology* 265:35-45.
- Wong, D.C., R.H. Purcell, M.A. Sreenivasan, S.R. Prasad, and K.M. Pavri. 1980. Epidemic and Endemic Hepatitis in India: Evidence for Non-A, Non-B Hepatitis Virus Etiology. *Lancet.* 2:882-885.
- Yarbough, P.O., A.W. Tam, K.E. Fry, K. Krawczynski, K.A. McCaustland, D.W. Bradley, and G.R. Reyes. 1991. Hepatitis E Virus: Identification of Type-Common Epitopes. *J. Virol.* 65:5790-5797.
- Yin, S., R.H. Purcell, and S.U. Emerson. 1994. A New Chinese Isolate of Hepatitis E Virus: Comparison With Strains Recovered From Different Geographical Regions. *Virus Genes.* 9:23-32.
- Zhang, J.Z., M.H. Ng, N.S. Xia, S.H. Lau, X. Y. Che, T.N. Chau, S.T. Lai, and S.W.K. Im, (In Press). Conformational Antigenic Determinants Generated By Interactions Between a Bacterially Expressed Recombinant Peptide of the Hepatitis E Virus Structural Protein. *J. Med. Virol.*

산업상 이용 가능성

E형 간염 바이러스의 중국 균주의 계놈으로부터 클로닝된 고도의 면역반응성 바이러스 펩타이드인 pE2는 HEV의 검출을 위한 신뢰할 수 있는 진단 방법 및 진단 분석법의 개발에 매우 유용할뿐 아니라, 인간에서 HEV를 예방하기 위한 백신 조성물 및 백신 방법의 개발에도 유용하다.

도면의 간단한 설명

다음의 설명에서, 본 발명은 본 발명의 바람직한 실시예를 예시하는 다음과 같은 첨부된 도면을 참조하여 보다 상세하게 설명될 것이다.

도 1은 HEV 계놈 내에 오픈 리딩 프레임인 ORF1, ORF2 및 ORF3의 유전자 조직 및 pE2 및 pE3 펩타이드를 위한 코딩 영역의 대략적인 위치를 설명하는 도면이다.

도 2A 내지 2D는 중국인 HEV 균주(SSBJ 수탁번호 D11092)의 ORF2의 뉴클레오타이드 서열 및 그로부터 유도된 E2 단편을 나타낸다. 단일 염기쌍 결손은 박스에 의해 표시된다.

도 3은 중국인 HEV 균주(DBBJ 수탁 번호 D11092) 및 그로부터 유도된 E3 단편의 ORF3의 뉴클레오타이드 서열을 나타내는 도면이다.

도 4는 E2에 의해 코딩되는 pE2에 의해 코딩되는 pE2 펩타이드의 아미노산 서열을 나타내는 도면이다.

도 5는 E3에 의해 코딩되는 pE3 단백질의 아미노산 서열을 나타내는 도면이다.

도 6은 HEV 유전자 서열을 지니는 재조합 플라스미드의 특징을 나타내는 도면이다. HEV 계놈의 ORF2(레인 2)의 810 bp의 서열을 함유하는 821 bp 삽입물 및 ORF2(레인 3)의 114 bp 서열을 함유하는 124 bp의 삽입물은 BamHI 및 EcoRI에 의한 pGEX₂₀ 플라스미드의 절단으로 얻어진다. 이들 산물의 분자량을 마커(레인 1)과 비교하였다.

도 7은 ORF2로부터 발현된 정제된 HEV 재조합 펩타이드의 특징을 나타내는 도면이다. 정제된 pE2 용합 단백질, GE2(레인 1 및 2), pE2 펩타이드(레인 3 및 4) 및 글루타티온 S-트랜스퍼라아제(GST) 용합 단백질(레인 5)에 (A) SDS PAGE 및 (B) GST-특이적 항혈청 및 (C)풀(pool)된 인간의 HEV 반응성 인간 혈청을 이용한 웨스턴 블롯에 의해 분석을 실시하였다. 또한, GE2 및 pE2 펩타이드의 샘플을 SDS PAGE(A) 및 웨스턴 블롯(B 및 C)의 후속 분석(레인 2 및 4)을 위해 100°C에서 3분간 가열하였다. 이들 산물의 분자량을 마커(레인 6)와 비교하였다.

도 8은 HEV 계놈의 ORF3으로부터 발현되는 GST 용합 펩타이드인 GE3의 특징을 나타내는 도면이다. GE3 펩타이드(레인 1)를 100°C에서 3분간 가열(레인 2)하고 GST(레인 3)에 (A) PAGE 및 (B) GST 특이적 항혈청 및(C)풀된 인간 혈청을 이용한 웨스턴 블롯으로 분석을 실시하였다. 이들 산물의 분자량을 마커(레인 4)와 비교하였다.

도 9는 pE2 다이머의 항원 활성이 pE2 모노머의 항원 활성보다 약 80배 강하다는 것을 나타내는 도면이다. 1.3 내지 1,360 나노그램으로 등급이 매겨진 함량의 가열되거나 가열되지 않은 정제된 pE2의 등가의 샘플에 이하에서 설명될 도 10과 같이 웨스턴 블롯을 풀된 HEV 반응성 인간 혈청의 1:200 희석수를 이용하여 실시하였다. 풀된 혈청에 의해 탐지된 pE2 모노머의 최소량은 1,360 ng이고, 이것은 동일한 조건하에서 86 ng에서 검출된 pE2 다이머의 최소량보다 약 16배 많은 것이다. 제한된 농도에서 다이머에 대한 반응성은 모노머의 제한 농도에 대해 관찰된 반응성 보다 적어도 5배 이상 강한 것으로 예상된다. 따라서, 이들을 함께 고려하면, pE2 다이머의 항원 활성은 pE2 모노머보다 약 80배 더 강한 것으로 예측되었다.

도 10은 이의 다이머 및 모노머 형태의 재조합 pE2 펩타이드의 상이한 항원성을 나타낸다. 정제된 pE2의 1,300 나노그램을 함유하는 등가의 샘플을 100°C에서 3분간 가열하여 펩타이드의 다이머 형태를 이의 모노머 형태로 분해하였다. 가열된 샘플을 가열되지 않은 정제된 pE2의 샘플과 동일한 비율로 혼합하였다. 펩타이드의 23kDa의 모노머와 42kDa의 다이머 형태를 SDS PAGE에 의해 분리하고 막 상에 트랜스 블롯하였다. 막을 웨스턴 블롯 분석을 위해 락토모양으로 절단하였다. 1:50의 혈청 희석물로 한 실험에서 8개의 혈청은 pE2 모노머와 pE2 다이머 모두에 대해 반응성이 있지만, 다른 10개의 혈청은 pE2 다이머에 대해서만 반응성이 있었다.

도 11은 정제된 pE2 펩타이드에 4℃(레인 1), 20℃(레인 2), 37℃(레인 3), 및 45℃(레인 4)에서 1시간 동안 8M 유레아로 처리한 결과를 나타낸다. 45℃에서 1시간 동안 8M 유레아로 처리된 정제된 pE2의 등가 샘플을 1×PBS로 하룻밤 투석하였다(레인 5). 5개의 샘플에 풀린 HEV 반응성 인간 혈청을 이용하여 (A) PAGE 및 (B) 웨스턴 블롯을 실시하였다.

도 12는 ELISA에 의해 측정된 바와 같이 정제된 pE2 또는 GE3와 반응되는 인간 혈청의 3가지 유형에 존재하는 IgG 항체의 수준을 비교한 도면이다. 이들 혈청에 함유된 IgG 항체의 수준은 정제된 pE2 또는 GE3의 제형의 예상된 최적 농도로 코팅된 마이크로플레이트를 이용하여 적정함으로써 측정하였다. 펩타이드 제제를 SDS PAGE(좌측 레인)으로 분석하고 1:100 혈청 희석물로 웨스턴 블롯에 의해 실험하였다. 인간 혈청을 해당 재조합 펩타이드에 대해 강한 반응성(검은색 원), 약한 반응성(빛금된 원) 또는 무반응(흰색 원)을 나타냈다. 항체의 수준은 혈청 희석도의 역수로 정의하여 0.37의 컷오프 OD 값을 넘는 OD값을 제공하였다.

도 13은 ELISA에 의해 정제된 pE2 또는 GE3에 대해 강한 반응성(검은색 막대), 약한 반응성(빛금된 막대) 및 무반응(흰색 막대)으로 측정된 비-A형, B형 및 C형 간염 환자 96명으로부터 얻은 혈청에 함유된 IgG 항체의 분포 수준을 나타내는 도면이다. 각 혈청 표본을 웨스턴 브로팅으로 1:100 혈청 희석에 대해 실험하였고 정제된 pE2로 코팅된 마이크로플레이트를 이용한 ELISA에 의해 분석하였다. 항체의 수준은 OD값으로 분명하게 되었고 펩타이드에 대한 혈청의 반응성은 반응의 강도에 따라 평가하였다.

도 14 질병의 발병 후 HEV 항체의 시간에 따른 분포를 나타내는 도면이다. 비-A형, B형 및 C형 간염 환자 96명으로부터 얻은 혈청에서 pE2 특이적 (A) IgG 및 (B) IgM 및 pE3 특이적 (C) IgG 및 (D) IgM 항체를 각각의 HEV 펩타이드에 의해 생산된 ELISA에 의해 측정하였다. 결과를 이들 혈청을 채취한 때의 질병의 발생 경과시간에 따라 비교하였다. 컷오프 OD 값(점선)은 pE2 IgG에 대해 0.52이고, pE2 IgM에 대해 0.57이고, GE3 IgG에 대해 1.05이고, GE3 IgM에 대해 0.74이었다.

도 15는 독특한 HEV 특이성의 3가지 ELISA에 의한 항체를 측정한 결과를 나타낸다. 비-A형, B형 및 C형 간염 환자 96명 중 74명의 간염 환자로부터 얻은 혈청에서 HEV 특이 환자를 상업적으로 활용가능한 분석에 의해 추가로 시험하였다 (GeneLabs Diagnostic Pte Ltd., 싱가포르). GE3에 대한 특이성(A, B 및 C) 또는 pE2에 대한 특이성(D, E 및 F) 분석에 의해 얻어진 것과 결과를 비교하였다. 이전에 실시된 웨스턴 블롯에서는 32명의 혈청이 pE2 및 GE3(A 및 D)에 대해 반응성이 있고, 14명의 혈청이 pE2 단독(B 및 E)에 대해 반응성이 있고, 40명의 혈청이 이들 펩타이드(C 및 F) 중 어떤 것에 대해서 무반응이었다. 컷오프 OD값(점선)은 상업적 분석에 대해 0.6이고, pE2 특이성 IgG에 대해 0.52이고, GE3 특이성 IgG에 대해 1.05였다.

도 16은 정제된 pE2로 일으킨 항혈청으로 코팅된 폴리스티렌 패들에 의해 HEV를 특이적으로 면역 포획한 것을 나타내는 도면이다. 도 19에 기재된 동물 M1에서 얻은 항혈청을 1:100으로 희석하고 폴리스티렌 패들을 코팅하는 데 사용하였다. 패들을 HEV(레인 2), HAV(레인 3), 칼리시바이러스(레인 4 및 5) 또는 엔테로바이러스(레인 6)를 함유한 용액에서 하룻밤 별도로 침지하였다. 패들을 용액에서 제거하고 완충용액을 4회 교환하여 철저히 세척하였다. 패들에 결합된 RNA 패들을 추출하고 역전사하고 cDNA를 해당 바이러스에 대한 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하였다. 이들 산물의 분자량을 마커와 비교하였다(레인 1).

도 17은 도 18에 기재된 동물 M1에서 채취하여 HEV를 함유한 연속적으로 희석된 담낭의 4.5 ml 샘플과 반응시킨 (A) pE2-특이적 항혈청 또는 (B) 예비-면역 혈청 중 하나로 코팅된 폴리스티렌 패들을 이용한 HEV 면역 포획물을 나타내는 도면이다. 세척후, 패들에 결합된 HEV 입자를 RT-PCR로 탐색하였다. 이들 산물의 분자량을 마커와 비교하였다(좌측 레인).

도 18은 정제된 pE2에 의한 면역화에 반응하는 Macaque 원숭이에 의한 pE2 항체의 산물을 보여주는 도면이다. 3마리 원숭이(M1, M2 및 M3)에게 정제된 pE2 100 µg을 각각 4주마다 면역화하였다. 3마리의 대조군 원숭이(M5, M7 및 M8)에게 플라시보를 주었다. 면역화를 완료한 2주후, 2개의 동물군에게 HEV의 10⁵ 계승 등가 함량을 정맥내 주사하였고 7주 동안 추가로 동물을 관찰하였다. 혈청 샘플을 매주 채취하고 ELISA 테스트를 이용하여 pE2 항체의 존재에 대해 분석하였다.

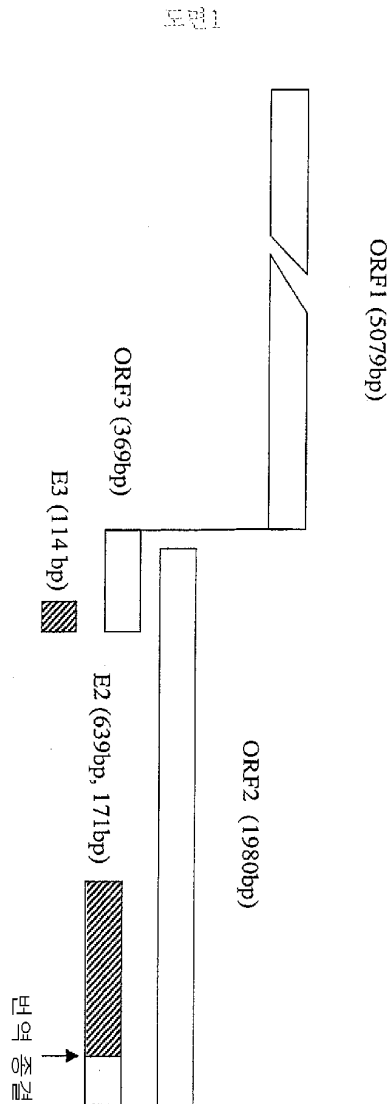
도 19는 정제된 pE2 펩타이드의 제제로 면역화하고 HEV 접종 전에 Macaque 원숭이로부터 채취한 혈청 내에 존재하는 HEV 항체의 스펙트럼을 나타내는 도면이다. 3마리의 성숙한 원숭이(M1, M2 및 M3)에게 정제된 pE2 100 µg을 함유한 제제를 매주 4회 주사하였다. 최종 주사 2주 후에 얻은 혈청을 4배로 연속하여 희석하고 정제된 pE2의 모노머(100℃에서

3분간 가열)와 다이머(비처리) 형태의 균등 혼합물에 대해 웨스턴 블롯에 의해 실험하였다. M1에서 얻은 면역 혈청을 1:400에서 1:256,000(라인 1에서 4)으로 4배 연속 희석하여 실험하고, M2에서 얻은 샘플을 1:100 내지 1:6,400으로 희석하여 실험하고, M3에서 얻은 샘플을 1:250 내지 1:1:16,000으로 희석하여 실험하였다. 예비-면역화된 혈청을 1:100에서 희석하여 음성 대조군(라인 5)(A)로 실험하였다. 디르 동물에서 얻은 예비면역 및 면역 혈청 모두와 양의 대조군 혈청인 P를 1:100으로 희석하여 pE3 펩타이드를 함유하여 30kDa의 GST 융합 단백질인 GE3에 대한 웨스턴 블롯 (B) 및 상업적 분석(Beijing Medical University, 베이징)을 이용하여 ELISA (C)에 의한 분석을 추가로 실시하였다. 제조자에 의해 권장된 ELISA의 컷오프 OD값을 점선으로 표시하였다.

도 20은 E형 간염 바이러스를 접종하는 게놈 함량을 나타내는 도면이다. 동물을 스톡 HEV의 1:100 희석물로 1ml로 접종하였다. 접종 바이러스의 게놈 함량은 "Materials and Methods"로 표제된 부분 하에서 이하에 기재된 바와 같이 바이러스 제형의 연속 희석된 수적으로 RT-PCR로 측정하였다.

도 21은 HEV 접종에 대한 항체를 나타내는 도면이다. HEV 접종 후 표시된 시간과 직전에 면역화된 동물군(M1, M2, M3)과 면역화되지 않은 대조군(M5, M7, M8)에서 혈장 샘플을 얻었다. 혈청 샘플 및 인간의 혈청 샘플의 양의 P 대조군, 및 음의 N 대조군을 정제된 pE2 및 GE3에 대해 웨스턴 블롯 및 상업적 분석(Genelabs Diagnostics Pte Ltd., 싱가포르)을 이용한 ELISA에 의해 실험하였다.

도면



도면 2a

```

v10      v      v      v      v
ORF2 5147 ATGCGCCCTCGGCCTATTTGCTGTTGCTCCTCATGTTTCTGCCTATGCT

v60      v      v      v      v
ORF2 5197 GCCCGCGCCACCGCCCGGTCAGCCGCTCTGGCCGCCGTCGTGGGCGGCGCA

v110     v      v      v      v
ORF2 5247 GCGGCGGTTCCGGCGGTGGTTTCTGGGGTGACCGGTTGATTCTCAGCCC

v160     v      v      v      v
ORF2 5297 TTCGCAATCCCCTATATTCATCCAACCAACCCTTCGCCCCCGATGTCAC

v210     v      v      v      v
ORF2 5347 CGCTGCGGCCGGGGCTGGACCTCGTGTTCGCCAACCGCCCGACCACTCG

v260     v      v      v      v
ORF2 5397 GCTCCGCTTGGCGTGACCAAGGCCAGCGCCCGCCGCTGCCTCACGTCGT

v310     v      v      v      v
ORF2 5447 AGACCTACCACAGCTGGGGCCGCGCCGTAACCGCGTTCGCTCCGGCCCA

v360     v      v      v      v
ORF2 5497 TGACACCCCGCCAGTGCCTGATGTTGACTCCCGCGGCCATCCTGCGCC

v410     v      v      v      v
ORF2 5547 GGCAGTATAACCTATCAACATCTCCCCTTACTTCTTCCGTGGCCACCGGT

v460     v      v      v      v
ORF2 5597 ACAAACTTGGTCTATACGCCGCTCCTCTTAGCCCACTTCTACCCCTCCA

v510     v      v      v      v
ORF2 5647 GGACGGCACCAATACTCATATAATGGCCACAGAAGCTTCTAATTATGCCC

v560     v      v      v      v
ORF2 5697 AGTACCGGTTGCTCGTGCCACAATTCGCTACCGCCCGCTGGTCCCAAC

v610     v      v      v      v
ORF2 5747 GCTGTTGGTGGCTACGCCATCTCCATCTCGTTCTGGCCACAGACCACCAC

v660     v      v      v      v
ORF2 5797 CACCCGACGTCGGTTGACATGAATCAATAACCTCGACGGATGTTTCGTA

v710     v      v      v      v
ORF2 5847 TTTTAGTCCAGCCCGGCATAGCCTCCGAGCTTGTTATCCCAAGTGAGCGC

```


도면2b

```

                v760      v      v      v      v
ORF2 5897 CTACACTACCGTAACCAAGGTTGGCGCTCTGTTGAGACCTCCGGGGTGGC

                v810      v      v      v      v
ORF2 5947 GGAGGAGGAGGCCACCTCTGGTCTTGTATGCTCTGCATACATGGCTCAC

                v860      v      v      v      v
ORF2 5997 CTGTAAATTCTTATACTAATACACCTTATACCGGTGCCCTCGGGCTGTTG

                v910      v      v      v      v
ORF2 6047 GACTTTGCCCTCGAACTTGAGTTCGCAACCTCACCCCGGTAATACCAA

                v960      v      v      v      v
ORF2 6097 CACGCGGGTCTCCCGTTACTCCAGCACTGCCCGTCACCGCCTTCGTCCGG

                v1010     v      v      v      v
ORF2 6147 GTGCAGATGGGACTGCCGAGCTTACCACCACGGCTGTACCCGCTTCATG

                v1060     v      v      v      v
ORF2 6197 AAGGACCTCTATTTTACTAGTACTAATGGTGTGCGGTGAGATCGGCCGTGG

                v1110     v      v      v      v
ORF2 6247 GATAGCGCTTACCCTGTTTAACTTGCTGACACCCTGCTTGGCGGTCTAC

                v1160     v      v      v      v
ORF2 6297 CGACAGAATTGATTTTCGTCCGGCTGGTGGCCAGCTGTTCTACTCTCGTCCC
E2      1      CAGCTGTTCTACTCTCGTCCC

                v1210     v      v      v      v
ORF2 6347 GTCGTCTCAGCCAATGGCGAGCCGACTGTTAAGCTTTATACATCTGTAGA
E2      22      GTCGTCTCAGCCAATGGCGAGCCGACTGTTAAGCTTTATACATCTGTAGA

                v1260     v      v      v      v
ORF2 6397 GAATGCTCAGCAGGATAAGGGTATTGCAATCCCGCATGACATCGACCTCG
E2      72      GAATGCTCAGCAGGATAAGGGTATTGCAATCCCGCATGACATCGACCTCG

                v1310     v      v      v      v
ORF2 6447 GGGAGTCTCGTGTAGTTATTCAGGATTATGACAACCAACATGAGCAGGAC
E2      122     GGGAGTCTCGTGTAGTTATTCAGGATTATGACAACCAACATGAGCAGGAC
    
```

도면2c

```

                v1360      v      v      v      v
ORF2 6497 CGACCGACACCTTCCCCAGCCCCATCGCGCCCTTTTCTGTCTCCGAGC
E2      172 CGACCGACACCTTCCCCAGCCCCATCGCGCCCTTTTCTGTCTCCGAGC

                v1410      v      v      v      v
ORF2 6547 TAATGATGTGCTTTGGCTTTCTCTCACCGCTGCCGAGTATGACCAGTCCA
E2      222 TAATGATGTGCTTTGGCTTTCTCTCACCGCTGCCGAGTATGACCAGTCCA

                v1460      v      v      v      v
ORF2 6597 CTTACGGCTCTTCGACCGGCCAGTCTATGICTCTGACTCTGTGACCTTG
E2      272 CTTACGGCTCTTCGACCGGCCAGTCTATGICTCTGACTCTGTGACCTTG

                v1510      v      v      v      v
ORF2 6647 GTTAATGTTGCGACCGGCGCGCAGGCCGTTGCCCGGTCACCTCGACTGGAC
E2      322 GTTAATGTTGCGACCGGCGCGCAGGCCGTTGCCCGGTCACCTCGACTGGAC

                v1560      v      v      v      v
ORF2 6697 CAAGGTCACACTTGATGGTCGCCCCCTTTCCACCATCCAGCAGTATTCAA
E2      372 CAAGGTCACACTTGATGGTCGCCCCCTTTCCACCATCCAGCAGTATTCAA

                v1610      v      v      v      v
ORF2 6747 AGACCTTCTTTGTCTGCGCTCCGCGGTAAGCTCTCCTTTTGGGAGGCA
E2      422 AGACCTTCTTTGTCTGCGCTCCGCGGTAAGCTCTCCTTTTGGGAGGCA

                v1660      v      v      v      v
ORF2 6797 GGTACTACTAAAGCCGGGTACCCTTATAATTATAACACCACTGCTAGTGA
E2      472 GGTACTACTAAAGCCGGGTACCCTTATAATTATAACACCACTGCTAGTGA

                v1710      v      v      v      v
ORF2 6847 CCAACTGCTCGTTGAGAATGCCGCTGGGCATCGGGTTGCTATTTCCACTT
E2      522 CCAACTGCTCGTTGAGAATGCCGCTGGGCATCGGGTTGCTATTTCCACTT

                v1760      v      v      v      v
ORF2 6897 ACACCACTAGCCTGGGTGCTGGTCCCCTCTATTTCGCGGTTGCTGTT
E2      572 ACACCACTAGCCTGGGTGCTGGTCCCCTCTATTTCGCGGTTGCTGTT
    
```

도면2d

```

                v1810      v      v      v      v
ORF2 6947 TTAGCCCCCTCTCCGCGCTAGCATTGCTTGAGGATAACCATGGACTACCC
E2      622 TTAGCCCCCTCTCCGCGCTAGCATTGCTTGAGGATAACCATGGACTACCC
                Stop code

                v1860      v      v      v      v
ORF2 6997 TGCCCGCGCCATACTTTTCGATGACTTCTGCCCGGAGTGCCGCCCCCTTG
E2      672 TGCCCGCGCCATACTTTTCGATGACTTCTGCCCGGAGTGCCGCCCCCTTG

                v1910      v      v      v      v
ORF2 7047 GCCTCCAGGGCTGTGCTTTTCAGTCTACTGTCGCTGAGCTTCAGCGCCTT
E2      722 GCCTCCAGGGCTGTGCTTTTCAGTCTACTGTCGCTGAGCTTCAGCGCCTT
                End of ORF2

                v1960      v      v      v      v
ORF2 7097 AAGATGAAGGTGGGTAAACTCGGGAGTTATAGTTTATTGCTTGTCGCC
E2      772 AAGATGAAGGTGGGTAAACTCGGGAGTTATAGTTTATTG

                v2010      v      v      v      v
ORF2 7147CCCTTCTTCTGTGCTTATTTCTCTTTTCTGCGTTCGCGCTCCCTGAAA

ORF2 7197 AAA
    
```

도면3

```

                v10      v      v      v      v
ORF3 5106 ATGAATAACATGTCTTTTGTGCGCCCATGGGTTCGCGACCATGCGCCCT

                v60      v      v      v      v
ORF3 5156 CGGCCTATTTTGCTGTTGCTCCTCATGTTTCTGCCTATGCTGCCCCGCC

                v110     v      v      v      v
ORF3 5206 ACCGCCCGGTCAGCCGCTGCGCCCGCTCGTGGGCGGCGCAGCGCGGTT

                v160     v      v      v      v
ORF3 5256 CCGGCGGTGTTTCTGGGGTGACCGGGTTGATTCTCAGCCCTTCGCAATC

                v210     v      v      v      v
ORF3 5306 CCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTCGCCCCGATGTCACCGCTGCGGC

                v260     v      v      v      v
ORF3 5356 CGGGGCTGGACCTCGTGTTCGCCAACCCGCCGACCACTCGGCTCCGCTT
E3      1      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
                GACCTCGTGTTCGCCAACCCGCCGACCACTCGGCTCCGCTT

                v310     v      v      v      v
ORF3 5406 GGCGTGACCAGGCCAGCGCCCCGCCCGTTCGCTCACGTCTAGACCTACC
E3      51      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
                GGCGTGACCAGGCCAGCGCCCCGCCCGTTCGCTCACGTCTAGACCTACC

                v360     v
ORF3 5456 ACAGCTGGGGCCGCGCCGCTAA
E3      101      ::::::::::::::::::::::::::::
                ACAGCTGGGGCCGCGCCGCTAA
    
```

도면4

```

                v10      v      v      v      v
pE2   1  QLFYSRPVVSANGEPTVKLYTSVENAQODKGIAPHDIDLGESRVVIQDY

                v60      v      v      v      v
pE2   51  DNQHEQDRPTSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAEYDQSTYGSSTGPVY

                v110     v      v      v      v
pE2  101  VSDSVTLVNVATGAQAVARSLDWTKVTLDGRPLSTIQYKTFVFLPLRG

                v160     v      v      v      v
pE2  151  KLSFWEAGTTKAGYPYNYNTTASDQLLVENAAGHRVAISTYTTSLGAGPV

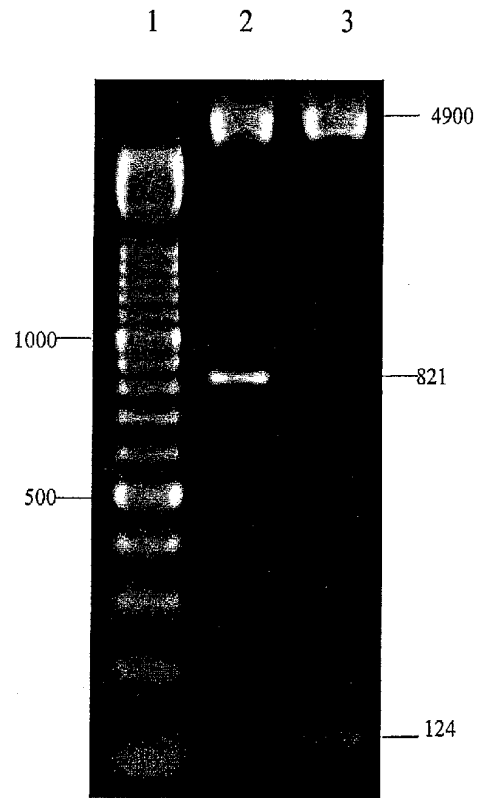
                v210
pE2  201  SISAVAVLAPPPR
    
```

도면5

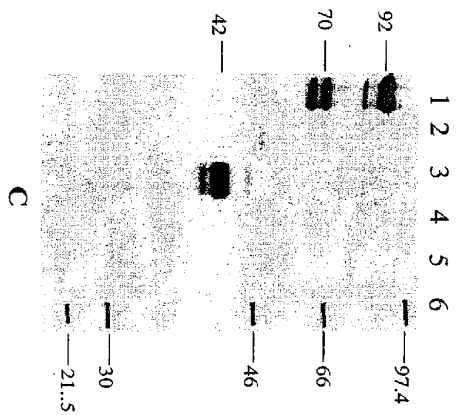
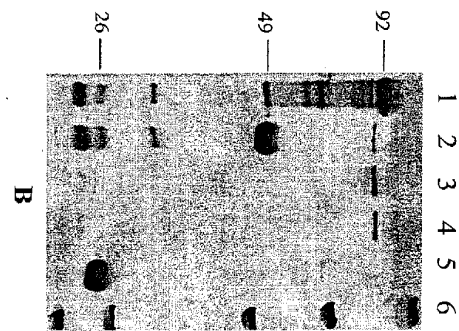
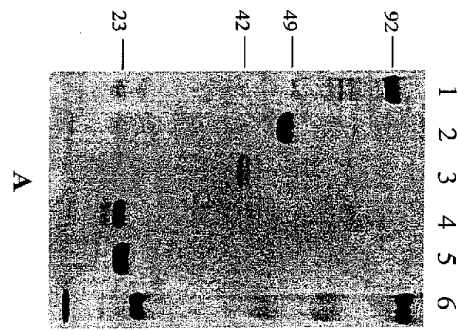
```

                v      v      v
pE3   1  DLVFANPPDHSAPLGVTRPSAPPLPHVVDLPQLGPRR.
    
```

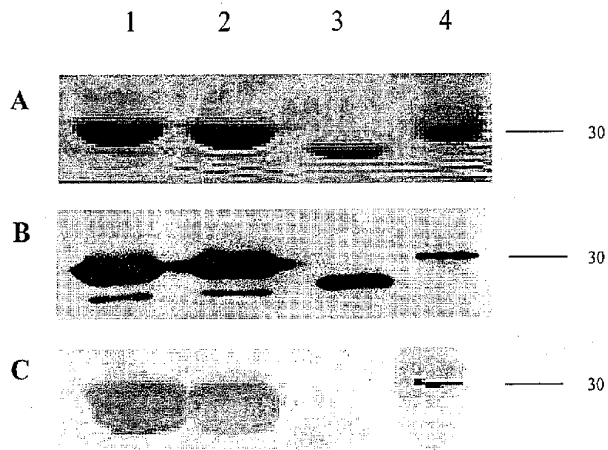
도면6



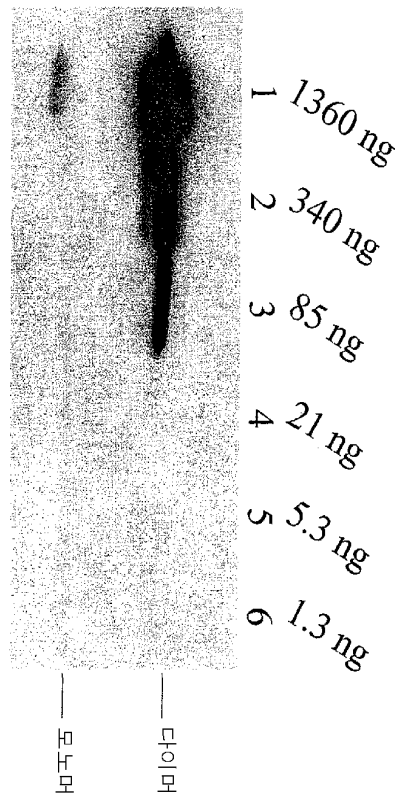
도판 7



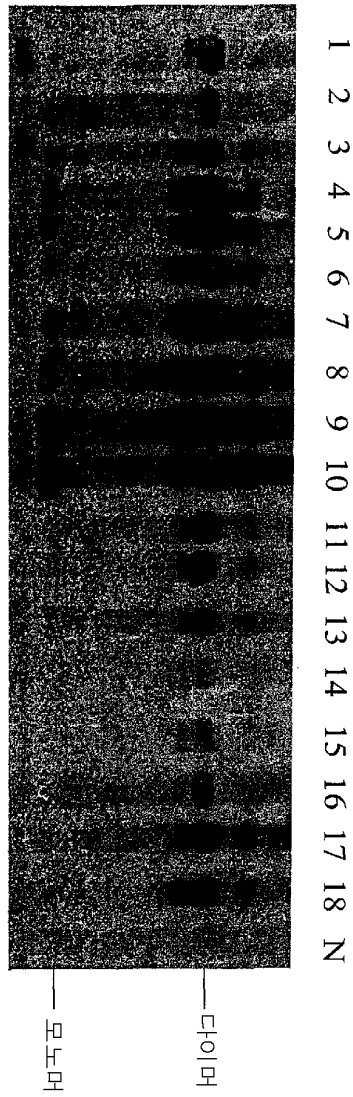
도판 8



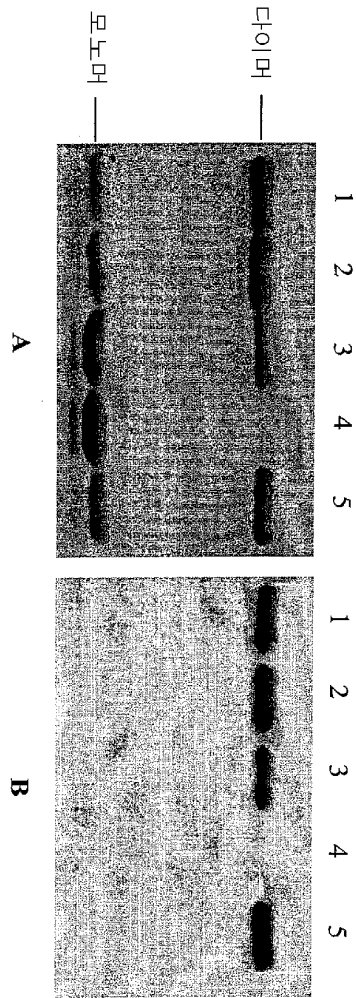
도면9



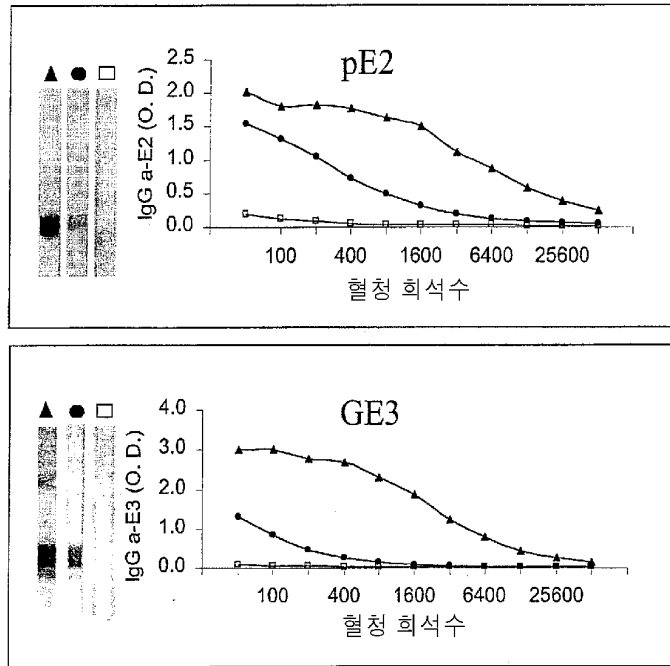
도면10



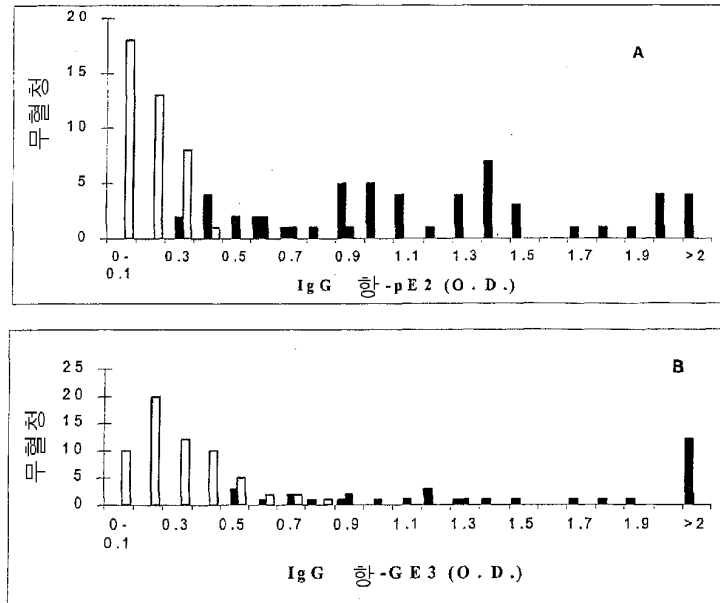
도면11



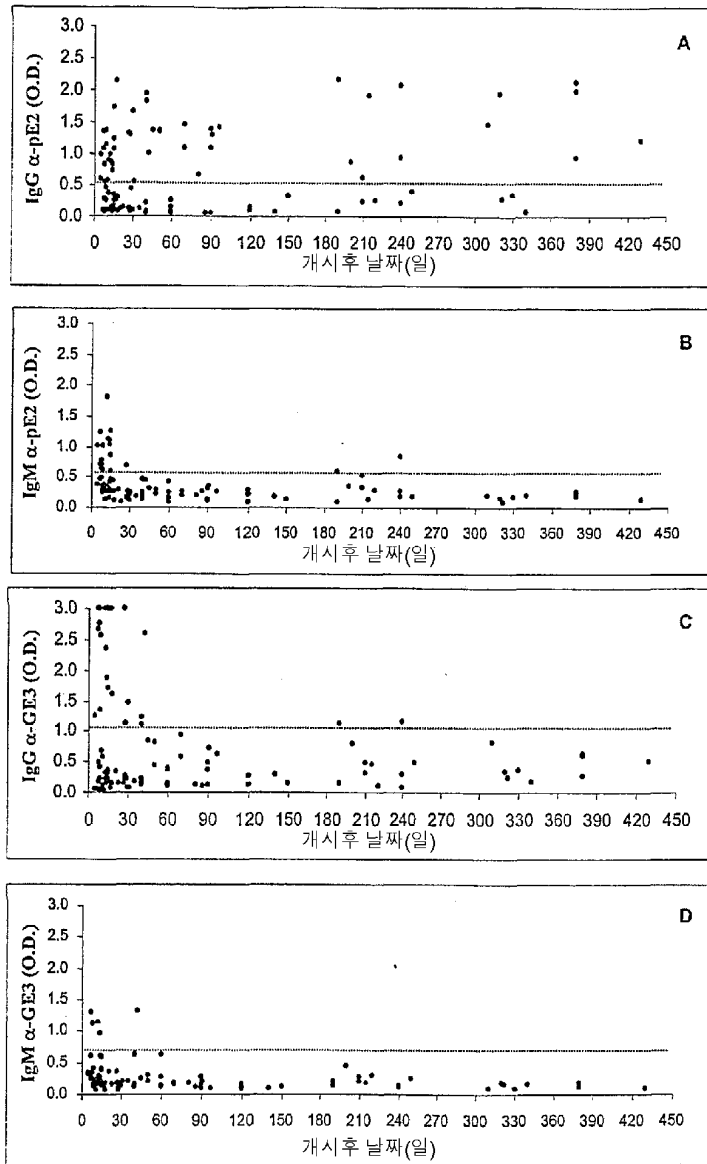
도면12



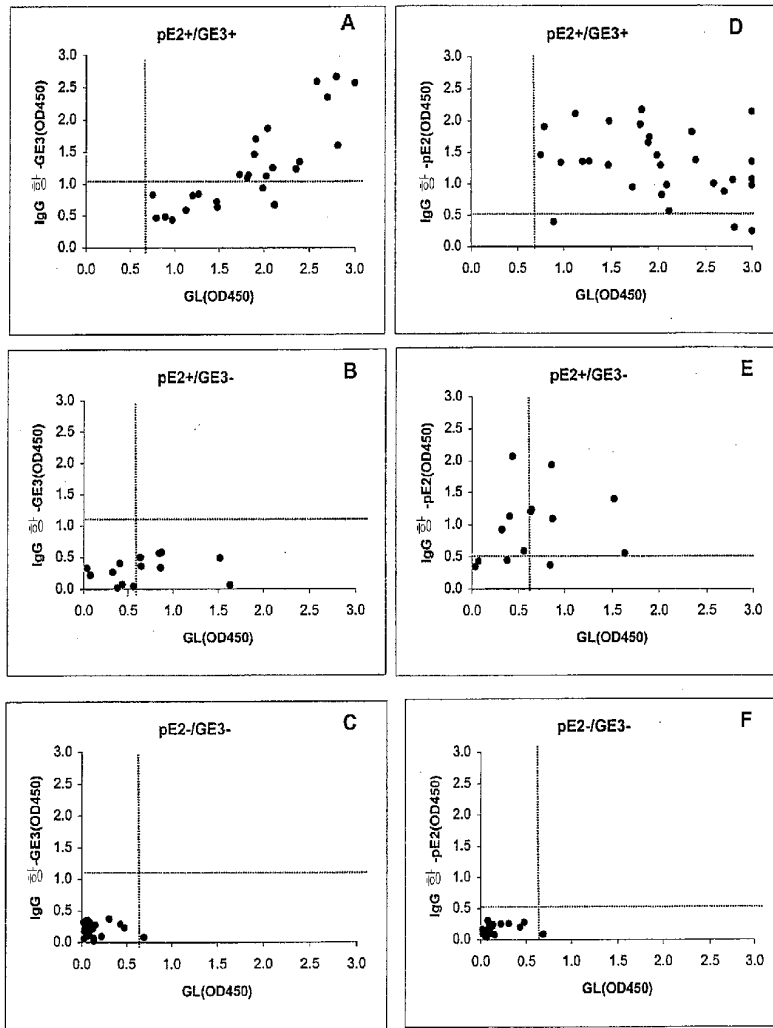
도면13



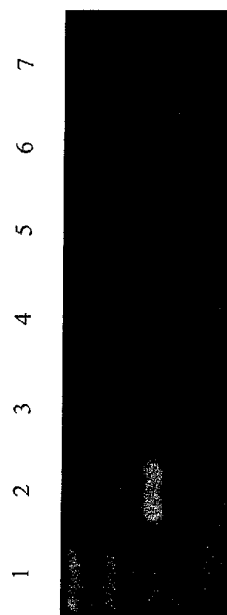
도면14



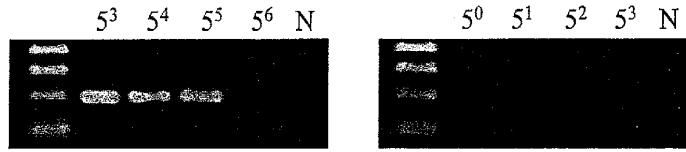
도면15



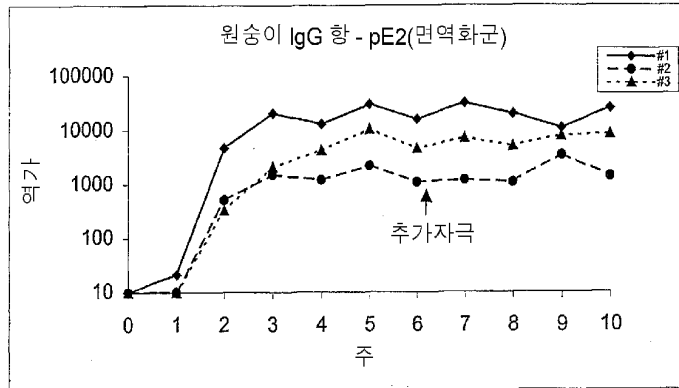
도면16



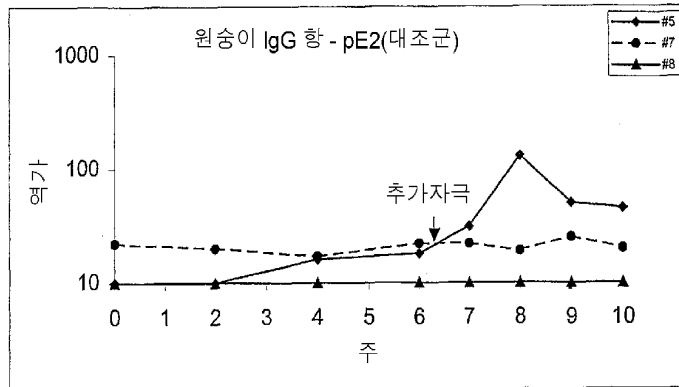
도면17



도면18

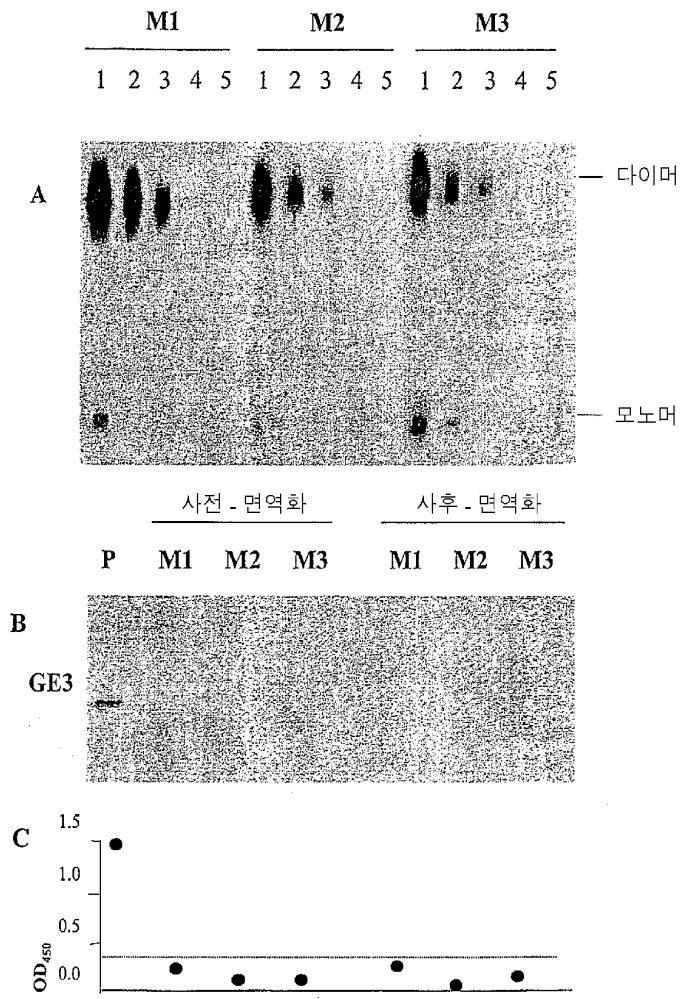


A

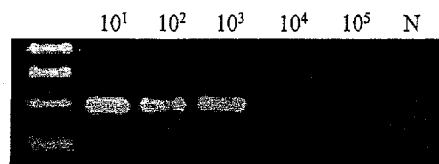


B

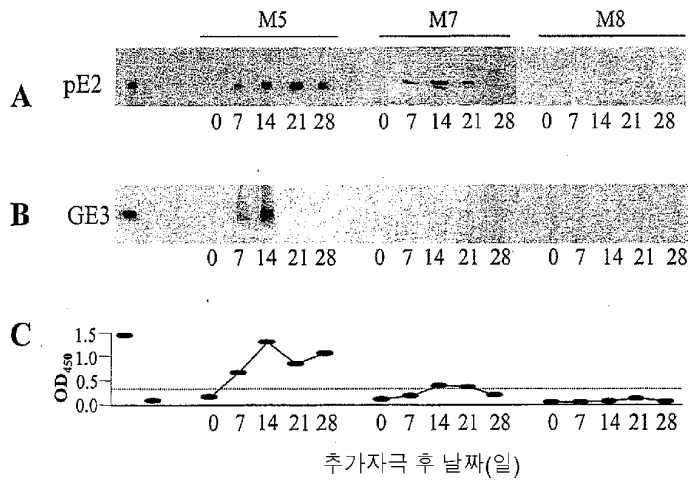
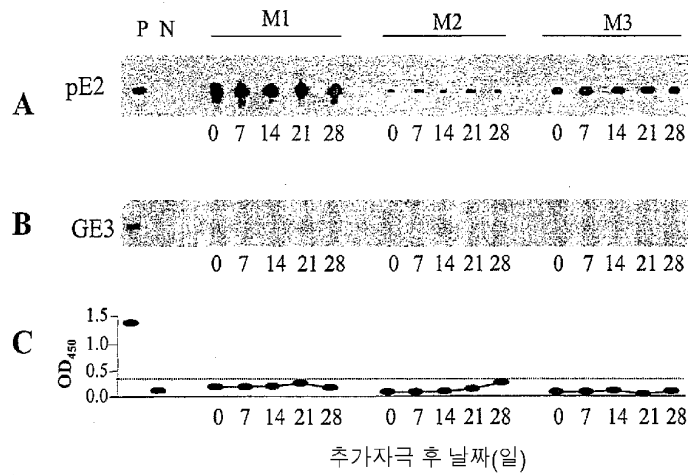
도면19



도면20



도면21



서열목록

<110> Yang Sheng Tang Company Ltd.
 <120> Novel HEV Antigenic Peptide and Method
 <130> IPP 020147 CN
 <150> CA 2,283,538
 <151> 1990-09-03
 <160> 3
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 642
 <212> DNA
 <213> Hepatitis E Virus, ORF2, Chinese Strain (DDBJ Accession No. D1 1092)
 <400> 1
 cagctgttct actctcgtcc cgtcgtctca gccaatggcg agccgactgt taagctttat 60
 acatctgtag agaatgctca gcaggataag ggtattgcaa tcccgatga catcgacctc 120
 ggggagtctc gtgtagttat tcadgattat gacaaccaac atgagcagga ccgaccgaca 180
 ccttccccag ccccatcgcg ccctttttct gtcctccgag ctaatgatgt gctttggctt 240

tctctcaccg ctgccgagta tgaccagtcc acttacggct cttcgaccgg cccagtctat 300
 gtctctgact ctgtgacctt ggtaaatgtt gcgaccggcg cgcaggccgt tgcccgtca 360
 ctcgactgga ccaaggtcac acttgatggt cgcccccttt ccaccatcca gcagtattca 420
 aagaccttct ttgtcctgcc gctccgcggt aagctctcct tttgggaggc aggtactact 480
 aaagccgggt acccttataa ttataacacc actgctagtg accaactgct cgttgagaat 540
 gccgctgggc attggggttc tatttccact tacaccacta gcctgggtgc tgggtcccgc 600
 tctatttccg cgggtgctgt tttagcccc cctccgcgct ag 642

<210> 2

<211> 213

<212> PRT

<213> Hepatitis E Virus, ORF2, Chinese Strain (DDBJ Accession No. D1 1092)

<400> 2

Gln Leu Phe Tyr Ser Arg Pro Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr
 1 5 10 15
 Val Lys Leu Tyr Thr Ser Val Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile
 20 25 30
 Ala Ile Pro His Asp Ile Asp Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Ala
 35 40 45
 Asp Tyr Asp Asn Gln His Glu Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala
 50 55 60
 Pro Ser Arg Pro Phe Ser Val Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu
 65 70 75 80
 Ser Leu Thr Ala Ala Glu Tyr Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr
 85 90 95
 Gly Pro Val Tyr Val Ser Asp Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr
 100 105 110
 Gly Ala Gln Ala Val Ala Arg Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu
 115 120 125
 Asp Gly Arg Pro Leu Ser Thr Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe
 130 135 140
 Val Leu Pro Leu Arg Gly Lys Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr
 145 150 155 160
 Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr Asn Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu
 165 170 175
 Leu Val Glu Asn Ala Ala Gly His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr
 180 185 190
 Thr Ser Leu Gly Ala Gly Pro Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu
 195 200 205

Ala Pro Pro Pro Arg

210

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> Hepatitis E Virus, ORF2, Chinese Strain (DDBJ Accession No. D1 1092)

<400> 3

ggcgaatccc tagcgcggag ggggggctaa aaca 34