

|                                                                                                                  |                                                             |                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|                                 | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A)                          | (11) 공개번호 10-2014-0120446<br>(43) 공개일자 2014년10월14일 |
| <hr/>                                                                                                            |                                                             |                                                    |
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>A61K 48/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)<br>A61P 31/12 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01) | (71) 출원인<br>한림대학교 산학협력단<br>강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)      |                                                    |
| (21) 출원번호 10-2013-0036100                                                                                        | (72) 발명자<br>황순봉<br>경기도 안양시 동안구 귀인로 237, 대림아파트<br>210동 1703호 |                                                    |
| (22) 출원일자 2013년04월03일<br>심사청구일자 2013년04월03일                                                                      | 임윤숙<br>경기도 안양시 동안구 흥안대로 155번길 29, 11통<br>4반 202호            |                                                    |
|                                                                                                                  | (74) 대리인<br>강성혜                                             |                                                    |

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 MAPKAPK3 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물

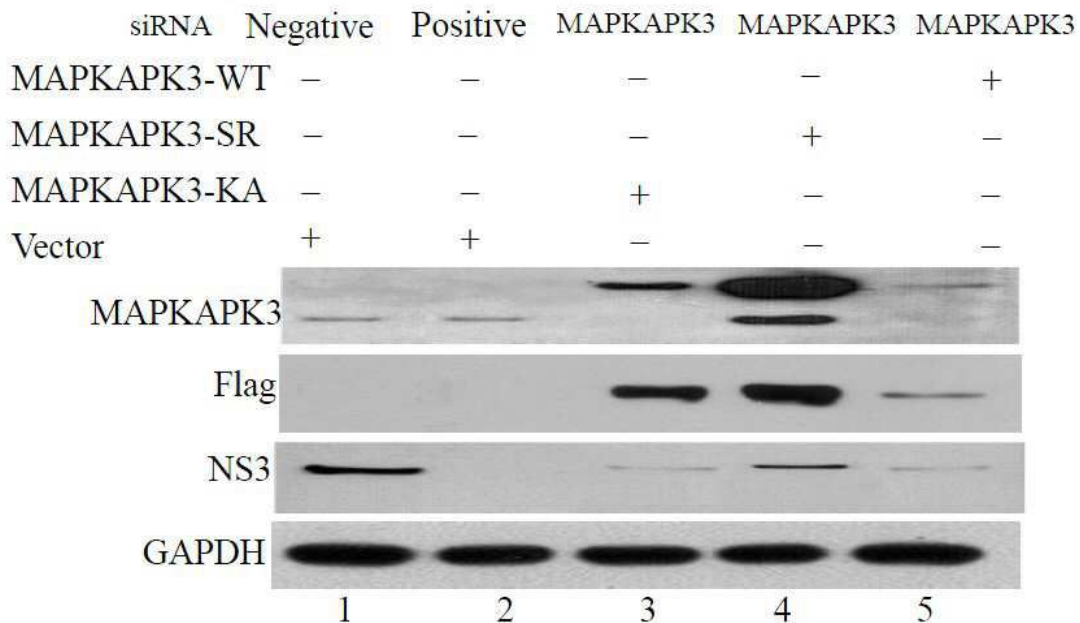
### (57) 요약

C형 간염 바이러스 (HCV)는 증식을 함에 있어서 숙주세포 단백질에 매우 의존적이다. HCV 증식에 관여하는 세포 인자를 확인하기 위해 탐침으로서 HCV 코어 단백질을 이용하여 단백질 마이크로어레이 분석법을 수행하였다. 마이크로어레이에 고정된 9,000여개의 숙주 단백질 중 약 100개의 세포 단백질이 HCV 코어와 상호작용하는 파트너

(뒷면에 계속)

대표도 - 도7h

## H



로 확인되었다. 이들 중 MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3)가 선택되었다. MAPKAPK3는 스트레스 및 성장 유도자에 의해 활성화되는 세린/트레오닌 단백질 카이네이즈이다. MAPKAPK3에 대한 HCV 코어의 결합은 인비트로 폴다운 분석법으로 확인하였고, 공동면역침전 분석법으로 재확인하였다. HCV 코어 단백질과 MAPKAPK3는 코어의 41~75 아미노산 잔기와 MAPKAPK3의 카이네이즈 도메인의 N-말단 반을 통해 상호작용하였다. 또한, MAPKAPK3의 RNA 및 단백질 수준은 HCV 서브게놈 레플리콘 세포 및 HCVcc-감염 세포에서 모두 급격히 증가하였다. MAPKAPK3 발현을 침묵시키면 단백질 및 HCV 감염도 수준은 모두 감소했지만, 세포내 HCV RNA 수준은 감소하지 않았다. 본 발명은 MAPKAPK3가 HCV IRES-매개 번역을 증대시키며 MAPKAPK3-의존적 HCV IRES 활성이 코어 단백질에 의해 좀더 증가함을 보여주었다. 이 데이터들은 HCV 코어 단백질이 그 자신의 증식을 용이하게 하기 위해 MAPKAPK3를 변형하는 것임을 제시한다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|          |                                          |
|----------|------------------------------------------|
| 과제고유번호   | 2012026351                               |
| 부처명      | 교육과학기술부                                  |
| 연구관리전문기관 | 한국연구재단                                   |
| 연구사업명    | 2012년도 도약연구사업                            |
| 연구과제명    | C형 간염바이러스의 복제 및 신호전달 조절 타겟을 이용한 제어 기술 개발 |
| 기 여 율    | 1/1                                      |
| 주관기관     | 한림대학교 산학협력단                              |
| 연구기간     | 2012.07.01 ~ 2013.06.30                  |

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3) 발현 또는 활성 저해제를 포함하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 MAPKAPK3 발현 저해제는 MAPKAPK3 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, shRNA (short hairpin RNA) 및 siRNA (short interfering RNA)로 구성된 군 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 siRNA는 서열번호 제1~2번임을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 MAPKAPK3 활성 저해제는 MAPKAPK3 단백질에 결합하는 항 MAPKAPK3 항체임을 특징으로 하는 조성물.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것으로서, 좀더 자세히는 MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3) 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] C형 간염 바이러스 (Hepatitis C virus; HCV)는 양성-센스, 단일사슬 RNA 게놈으로 이루어진 피막형 바이러스이다. HCV는 급성 또는 만성 감염을 일으키며, 종종 간경변 및 간세포암 (hepatocellular carcinoma; HCC)을 일으킨다 (Saito I. et al., 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87:6547-6549). HCV는 플라비비리데 (Flaviviridae) 과, 헤파시바이러스 (Hepacivirus) 속에 속한다 (Giannini C, Brechot C. 2003. Hepatitis C virus biology. Cell Death Differ. Suppl 1:S27-38). HCV 게놈은 9,600개의 염기로 이루어져 있고 단일 오픈 리딩 프레임으로부터 3010개의 아미노산을 코딩한다. 이 폴리단백질은 함께 번역 프로세싱되고, 구조 단백질 (코어, E1 및 E2)과 비구조 단백질 (p7, NS2 ~ NS5B)을 포함하여 10 개의 기능성 단백질로 바이러스 및 숙주 세포 프로테아제에 의해 번역후 프로세싱된다 (Lindenbach B.D. et al, 2005. Nature 436:933-938 ). 구조 단백질들은 바이러스 입자의 구조를 이루는 반면, 비구조 단백질들은 바이러스 게놈 복제에 관여한다.

[0003] HCV 코어 단백질은 바이러스 RNA 게놈을 감싸는 뉴클레오캡시드 단백질이다. 코어의 아미노산 서열은 6종의 HCV 유전자형에서 매우 보존적이다. HCV 코어는 다량체 (multimer) 및 자기조립 (self-assemble)을 형성하여 뉴클레오캡시드-유사 입자를 형성할 수 있다. 코어는 많은 세포 단백질과 상호작용하고 전사, 신호 전달, 세포 사이클, 지방증 (steatosis) 및 종양형성을 조절한다. 코어와 아포지단백질 AII 간의 상호작용은 코어와 지방 액적 간의 결합 및 간세포에서 지방축적을 유도한다 (Barba G. et al., 1997. Proc. Natl. Acad. 412 Sci. U.

S. A. 175:740-744, Shi S.T. et al., 2002. Virology 292:198-210). 또한, PPAR 알파 활성화는 마우스에서 HCV 코어 단백질-유도 간지방증 및 간암에 필수적이다 (Tanaka N. et al., 2008. J. Clin. Invest. 118:683-694). 실제로, HCV 코어는 간 발병 및 간암에 관여하는 다기능성 단백질로 알려져 있다.

[0004] Map-카이네이즈 (MAPK) 신호전달경로는 유전자 발현, 증식, 분화 및 면역반응을 포함하는 다양한 세포반응을 조절한다 (Dong C, Davis RJ, Flavell RA. 2002. Annu. Rev. 420 Immunol. 20:55-72). MAPKAPK2/MK2 및 MAPKAPK3/MK3와 같은 MAPK에 의해 활성화되는 단백질 카이네이즈 (MAPK-activated protein kinase; MAPKAPK) 패밀리는 MAPKs 캐스캐이드의 하류 타겟 (downstream target) 중 하나이다 (Gaestel M. 2006. Nat. Rev. Mol. 422 Cell. Biol. 7:120-130). MAPKAPK3 단백질은 세린/트레오닌 MAPKAPK 패밀리에 속한다. MAPKAPK3는 72% 염기와 75% 아미노산이 공통되는 MAPKAPK2와 밀접한 관계에 있다 (Sithanandam G. et al., 1996. Mol. Cell. Biol. 16:868-876). MAPKAPK3는 소세포 폐암 종양억제유전자 구역에 존재하는 MAP 카이네이즈-활성 단백질 카이네이즈로 규정되었다 (Sithanandam G. et al., 1996. Mol. Cell. Biol. 16:868-876). 지금까지 MAPKAPK3의 기능은 거의 알려져 있지 않다. MAPKAPK3는 인플루엔자 바이러스 감염에 의해 활성화된다는 것은 보고된바 있다 (Luig C. et al., 2010. FASEB J. 24:4068-4077). 또한, Tsukada 등은 최근 HCV 유전자형 1b로 감염된 환자에서 인터페론 치료와 관련있는 2개의 단일염기 다형성 (single-nucleotide polymorphism)이 MAPKAPK3에 존재함을 확인하였다 (Tsukada H. et al., 2009. Gastroenterology. 136:1796-433 1805.e6). 그러나, HCV 감염 세포에서 MAPKAPK3의 기능은 아직 분명히 밝혀지지 않았다.

[0005] 특허공개공보 10-2011-52642호는 피검체에서 MAPKAPK3 단백질 또는 폴리뉴클레오타이드를 검출하여 암을 검출하는 방법을 개시하고 있다. 그러나, 이 발명은 C형 간염과는 관련이 없다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 종래 C형 간염의 효과적인 치료제가 없었던 문제를 해결하고 C형 간염에 효과적인 예방 및 치료제를 제공하려는 것을 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

[0007] 본 발명자들은 HCV 코어 단백질과 상호작용하는 세포 단백질을 규명하기 위해 기능성 프로테오믹스를 이용하였다. 단백질 마이크로어레이 기술은 단백질-단백질, 단백질-인지질, 단백질-핵산 및 단백질-소분자 간의 상호작용을 분석하는 강력한 도구이다 (Satoh J. et al., 2006. J. Neurosci Methods. 152:278-288, Tripathi L.P. et al., 2010. Mol. Biosyst. 6:2539-2553). 단백질 마이크로어레이 분석법은 생물학적 기능 및 약물 탐색 연구에 중요하게 응용되는 빠르고, 체계적이고, 경제적이며 생산성이 높은 스크리닝 방법이다 (Fenner B.J. et al., 2010. Expanding the substantial interactome of NEMO using protein microarrays. PLoS One. 5:e8799, Hall D.A. et al., 2007. Mech. Ageing Dev. 442 128:161-167). 본 발명자들은 단백질 마이크로어레이 분석법을 이용하여 숙주세포 단백질과 상호작용하는 약 100 개의 HCV 코어 단백질을 확인하였다. 이들 코어 단백질 중 MAPKAPK3를 선택하여 성격규명하였다. MAPKAPK3로의 HCV 코어의 결합은 인비트로 풀다운 및 공동면역침전 분석법을 모두 이용하여 확증하였다. MAPKAPK3 발현 침묵은 단백질, 세포외 HCV RNA 및 HCV 감염률 수준을 낮추는 결과를 초래하였다. 이 데이터들은 MAPKAPK3가 HCV 증식에 관련되어 있음을 제시한다.

[0008] 본 발명은 MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3) 발현 또는 활성 저해제를 포함하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 MAPKAPK3 발현 저해제가 MAPKAPK3 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, shRNA (short hairpin RNA) 및 siRNA (short interfering RNA)로 구성된 군 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 siRNA가 서열번호 제1~2번임을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 그러나, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 서열번호 1, 2번 외에도 MAPKAPK3를 타겟으로 하는 siRNA를 제조하는 것은 용이하므로, 상기 서열번호 1, 2번에만 한정되는 것이 아님은

자명하다.

- [0011] 또한, 본 발명은 상기 MAPKAPK3 활성 저해제가 MAPKAPK3 단백질에 결합하는 항 MAPKAPK3 항체임을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0012] 본 발명의 Pin1 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 C형 간염 예방 및 치료용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 유효성분을 0.0001 내지 50 중량%로 포함한다.
- [0013] 본 발명의 조성물은 상기 MAPKAPK3 단백질의 발현 또는 활성 억제제에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은 임상 투여시 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.
- [0014] 본 발명에 있어서, MAPKAPK3에 대한 억제제는 상기 유전자의 mRNA에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0015] 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 생체 내뿐만 아니라 생체 외에서도 유전자-특이적 억제를 달성하기 위해 성공적으로 사용되어 왔다. 안티센스 뉴클레오타이드는 특정 DNA 또는 RNA 타겟에 대해 안티센스(또는 상보)인 짧은 길이의 DNA 합성 가닥(또는 DNA 아날로그)이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 타겟에 결합하고 전사, 번역 또는 스플라이싱의 단계에서 발현을 멈추게 함으로써 DNA 또는 RNA 타겟에 의해 인코딩된 단백질의 발현을 막기 위해 제안되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 세포 배양 및 질병의 동물 모델에서도 성공적으로 이용되어 왔다(Hogrefe, 1999). 올리고뉴클레오타이드가 분해되지 않도록 더욱 안정하고 저항적이 되게 하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 또 다른 변형이 당업자에게 알려져 있고 이해된다. 여기서 사용된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 이중나선 또는 단일나선 DNA, 이중나선 또는 단일나선 RNA, DNA/RNA 하이브리드, DNA 및 RNA 아날로그 및 염기, 당 또는 백본(backbone) 변형을 지닌 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 올리고뉴클레오타이드는 안정성을 증가시키고 뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 증가시키기 위해 본 발명이 속하는 기술분야에 알려진 방법에 의해 변형된다. 이들 변형은 본 발명 분야에 알려져 있는 올리고뉴클레오타이드 백본의 변형, 당 부분의 변형 또는 염기의 변형을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다.
- [0016] 또한, MAPKAPK3에 대한 억제제는 상기 유전자의 siRNA(Small Interfering RNA)일 수 있다.
- [0017] 즉, 상기 siRNA의 염기서열은 MAPKAPK3 유전자(mRNA)의 염기서열 중 연속된 19~23개의 연속된 염기서열일 수 있다.
- [0018] 상기 siRNA의 서열은 편의상 정방향 서열(sense strand)을 나타낸 것으로, 실제 유전자 억제효과를 나타내는 역방향 서열(antisense strand)과 함께 이중리보핵산체를 구성하게 된다.
- [0019] siRNA는 세포 배양 및 생체 내에서 오래 지속되는 효과, 생체 내에서 세포를 트랜스펙션시키는 능력 및 혈청 내 분해에 대한 저항력의 측면에서 생체 내에서 특정한 유전자의 발현의 저해에 대해 매우 강한 약물이 되는 잠재력을 지닌다(Bertrand et al., 2002). siRNA의 전달 및 siRNA를 포함한 발현 컨스트럭트/백터는 당업자에게 알려져 있다. 예를 들어, 미국 출원 제2004/106567 및 2004/0086884는 바이러스성 백터, 비바이러스성 백터, 리포솜 전달 운반체, 플라스미드 주입 시스템, 인공 바이러스 엔벨로프 및 폴리라이신 컨주게이트를 포함한 전달 메커니즘뿐만 아니라 많은 발현 컨스트럭트/백터를 제공하고 있다.
- [0020] siRNA는 상대적으로 낮은 농도로도 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의해 얻을 수 있는 효과와 동등하거나 높은 효과를 얻을 수 있기 때문에 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 대안으로 제시되고 있다(Thompson, 2002). siRNA의 이용은 질병의 동물 모델에 있어서 유전자 발현을 저해하는 데 대중성을 나타내고 있다. 당업자는 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 원하는 방식대로 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 siRNA를 합성하고 변형시킬 수 있다(Andreas Henschel, Frank Buchholz1 and Bianca Habermann (2004) DEQR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs. Nucleic Acids Research 32(Web Server Issue):W113-W120 참조). 또한 당업자는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA를 지닌 발현 컨스트럭트/백터에 유용한 조절 서열(예컨대, 구성적 프로모터, 유도성 프로모터, 조직-특이적 프로모터 또는 그의 결합)을 잘 이해하고 있다.
- [0021] C형 간염 치료를 위해 사용되는 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA는 약제학적으로 허용되는 담체를 추가적으로 포함한 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 예를 들어 하나 이상의 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 텍스트린, 글리세롤, 에탄올뿐만 아니라 이들의 조합을 포함한다. 이러한

조성물은 투여 후 활성 성분의 빠른 방출, 또는 지속적이거나 지연된 방출을 제공하도록 제제화될 수 있다.

- [0022] 상기 MAPKAPK3 유전자의 저해제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA 외에도 상기 유전자의 발현을 억제하는 물질이면 어떤 것이든 가능하다. 따라서 종래 당해 기술 분야에서 상기 유전자의 저해제로 알려진 화합물 또한 이용 가능하다.
- [0023] 본 발명은 또한 MAPKAPK3 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 억제제를 포함하는 C형 간염 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명의 유전자를 억제하면 그에 따른 단백질의 발현이 억제되어 HCV 증식이 억제되는 것이므로, 상기 유전자의 단백질을 저해하면 HCV 증식을 억제할 수 있다.
- [0024] 따라서 본 발명은 상기 단백질에 대한 억제제의 C형 간염 치료 용도를 제공한다. 본 발명에 있어서 C형 간염 치료는 C형 간염의 예방 및 억제를 포함한다.
- [0025] 상기 단백질에 대한 억제제는 본 발명의 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 항체일 수 있다. 상기 단백질에 대한 모노클론 항체는 당업계에 통상적인 모노클론 항체 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있고, 시판되는 것을 사용할 수 있다. 또한, 모노클론 항체 대신에 상기 단백질을 인식하는 폴리클론 항체를 사용할 수도 있고 이는 당업계에 통상적인 항혈청 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있다.
- [0026] 본 발명의 C형 간염 치료용 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용되는 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 단백질에 대한 억제제가 항체일 경우 약제학적으로 허용되는 담체는 결합 단백질의 저장 수명 또는 유효성을 증가시키는 습윤제 또는 유화제, 방부제 또는 완충액과 같은 최소량의 보조 물질로 구성될 수 있다.
- [0027] 또한 본 발명의 C형 간염 치료용 조성물은 하나 또는 그 이상의 C형 간염 치료제와 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 C형 간염 치료용 조성물은 당업자에게 잘 알려진 화학요법약제(chemotherapeutic agent)를 추가로 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 C형 간염 치료용 조성물은 상기 유효 성분 외에도 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 포함할 수 있으며, 이러한 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 가용화제 등이 있다.
- [0029] 또한 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용되는 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0030] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 C형 간염 치료용 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 C형 간염 치료용 조성물은 정맥 내, 동맥 내, 복강 내, 근육 내, 동맥 내, 복강 내, 흉골 내, 경피, 비측 내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구 내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 치료 방법에 있어서, "유효량"은 C형 간염을 억제하는 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 본 발명의 유효 성분의 "유효량"은 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 성인의 경우, 상기 유전자 또는 단백질의 억제제를 1일 1회 내지 수회 투여시, siRNA일 경우 0.01ng/kg~10mg/kg, 상기 유전자의 mRNA에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 경우 0.01ng/kg~10mg/kg, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10mg/kg, 상기 단백질에 대한 모노클로날 항체일 경우 0.1ng/kg~10mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 MAPKAPK3 유전자는 알려진 염기서열 중 하나 이상의 염기가 결실, 치환 또는 삽입된 염기서열일 수 있다.

- [0035] 상기 MAPKAPK3 유전자의 siRNA 서열은 예시일 뿐 이에 한정되는 것이 아님은 당업자에게 자명하다. 상기 서열들에 대해 실질적인 서열 동일성 또는 실질적인 서열 상동성을 지닌 서열 또한 본 발명의 범주에 포함된다. 여기서 사용된 "실질적인 서열 동일성" 또는 "실질적인 서열 상동성"이라는 용어는 서열이 또 다른 서열과의 실질적인 구조적 또는 기능적 동일성을 나타냄을 표현하기 위해 사용된다. 이러한 차이는 예를 들어 다른 종 간의 코돈 용법의 고유의 변이에 기인한다. 2 이상의 다른 서열 사이의 유의적인 양의 서열 중복 또는 유사성이 있는 경우 이들 서열의 길이 또는 구조가 다르더라도 유사한 물리적 특성을 지니는 경우 구조적 차이는 무시할만한 정도가 된다.
- [0036] 본 발명에서 유전공학적 기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)) 및 프레드릭 등의 문헌 (Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1, 2, 3, John Wiley & Sons, Inc. (1994))에 개시되어 있는 내용에 의해 좀더 명확해진다.
- [0037] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 방사선 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법 등과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

### 발명의 효과

- [0039] 본 발명에 따르면, MAPKAPK3는 유전자형 1b 및 2a 모두에서 유래한 HCV 코어와 상호작용한다. 또한, HCV 코어는 MAPKAPK3의 카이네이즈 도메인의 N-말단 반 및 코어의 41-75 아미노산 잔기를 통해 MAPKAPK3와 상호작용한다.
- [0040] 또한, 본 발명에 따르면, HCV는 MAPKAPK3 발현수준을 증가시키며, HCV 서브게놈 레플리콘 세포에서 MAPKAPK3를 녹다운시키면 HCV 단백질 발현수준이 억제된다.
- [0041] 또한, 본 발명에 따르면, MAPKAPK3 녹다운은 HCV 증식을 억제한다.
- [0042] 또한, HCV 코어 단백질과 MAPKAPK3 사이의 단백질 상호작용은 HCV IRES-매개 번역에 필수적이다.
- [0043] 따라서, 본 발명의 MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3) 활성 또는 발현을 저해하는 물질은 HCV의 복제를 저해함으로써 C형 간염 예방 및 치료제로서 유용하다.

### 도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1은 HCV 코어 단백질로 인간 단백질 마이크로어레이를 탐침한 것이다. (A,B) HCV 코어 단백질은 *E. coli*에서 발현시켜 단일 단계 Ni-NTA 아가로스 친화 크로마토그래피로 정제하였다. 다양한 농도의 정제된 단백질들은 SDS-PAGE로 분리한 후 쿠마시 브릴리언트 블루 (A) 또는 지시된 항체로 면역블랏팅 (B) 염색하였다. 우혈청 알부민은 참고 (reference)로 러닝하였다. (C) 코어-탐침 단백질 어레이의 빈도 히스토그램은 획득한 Z-스코어 범위를 보여준다. Z-스코어가 3 이상 ( $Z \geq 3$ )인 단백질 상호작용자들은 중요한 것으로 고려되었다. 스코어는 Invitrogen Protoarray version 5.2 소프트웨어를 이용하여 계산하였다. (D) 단백질 마이크로어레이에서 MAPKAPK3를 확인하였다 (좌측 패널). 양성 대조군과 음성 대조군도 나타내었다 (우측 패널).
- 도 2는 HCV 코어 상호작용자의 온톨로지 분석결과이다. 유전자 온톨로지는 각 코어 상호작용자에 대해 결정되었고, 세 표준 온톨로지 카테고리 각각에 대한 결과는 백분율로 표시하였다.
- 도 3은 HCV 코어 단백질과 MAPKAPK3의 상호작용을 나타낸다. (A) HEK293T 세포를 벡터 또는 Flag-표지된 MAPKAPK3로 일시적 트랜스펙션시켰다. 총 세포용균액을 트랜스펙션 36시간 후에 모아 *E. coli*에서 정제한 His-표지된 코어 단백질과 함께 배양하였다. 결합된 단백질은 Ni-NTA 비드로 침전시키고 항-Flag 단일클론항체 면역블랏팅 (IB)으로 탐지하였다 (위쪽). 코어 단백질은 항-코어 항체로 확인하였다 (아래쪽). (B) HEK293T 세포는 Flag-표지된 MAPKAPK3 및 유전자형 1b 또는 2a 유래 Myc-표지된 코어 발현 플라스미드로 코트랜스펙션시켰다. 48시간 후 세포 용균액은 항-Myc 단일클론항체로 면역침전 (IP)시키고, 결합된 단백질은 항-Flag 단일클론항체

로 면역블랏팅 (IB) 분석하여 탐지하였다 (위쪽). Flag-표지된 AMPKAPK3 및 Myc-표지된 코어의 단백질 발현은 항-Flag 단일클론항체 및 항-코어 폴리클론항체로 각각 면역블랏팅하여 확인하였다 (아래쪽). 별표는 IgG 중쇄를 나타낸다. (C) HCV 코어 단백질은 HCV 감염 세포 내에서 내생 MAPKAPK3와 상호작용한다. Huh7.5 세포는 10  $\mu$ g의 Jc1 RNA로 전기천공하였다. 전기천공 4일 후 모은 세포 용균액은 항-MAPKAPK3 항체 또는 대조군 IgG로 면역침전시켰다. 결합된 단백질은 MAPKAPK3 항체 (위쪽, 레인 3 및 4) 또는 항-코어 항체 (아래쪽, 레인 3 및 4)로 면역블랏팅하였다. 별표는 중쇄를 나타낸다. MK3는 MAPKAPK3를 나타낸다. (D) Huh7.5 세포는 가감염 또는 Jc1으로 네 시간 동안 감염시켰다. 48시간 후 세포는 4% 파라포름알데하이드로 고정하고 MAPKAPK3 (녹색)를 탐지하기 위해 항-MAPKAPK3 단일클론항체 및 FITC (fluorescein isothiocyanate)-결합된 염소 항-마우스 IgG를 이용하여 면역형광염색을 수행하였고, 코어 (적색)를 탐지하기 위해 토끼 항-코어 항체 및 TRITC-결합된 당나귀 항-토끼 IgG로 면역형광염색을 수행하였다. 이중염색은 합쳐진 이미지에서 MAPKAPK3와 코어의 공통위치를 황색 형광으로 보여주었다. 세포는 핵 (청색)을 표지하기 위해 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)로 염색하였다. (E) HEK293T 세포는 Myc-표지된 코어 및 Flag-표지된 MAPKAPK3 또는 Flag-표지된 MAPKAPK2로 코트랜스펙션시켰다. 48시간 후 세포 용균액은 항-Myc 단일클론항체로 면역침전시키고, 결합된 단백질은 항-Flag 단일클론항체로 면역블랏팅 분석하여 탐지하였다 (위쪽). Myc-표지된 코어의 단백질 발현은 항-코어 폴리클론항체로 면역블랏팅하여 확인하였다 (아래쪽). 별표는 IgG 중쇄를 나타낸다.

도 4는 HCV 코어 단백질이 코어의 41~75 아미노산 잔기 및 MAPKAPK3 카이네이즈 도메인의 N-말단 잔을 통해 MAPKAPK3와 상호작용함을 나타낸다. (A) HCV 코어 발현 플라스미드 야생형 및 변이체들의 모식도이다. aa는 아미노산을 말한다. (B) MAPKAPK3는 코어의 41~75 아미노산 잔기와 상호작용한다. HEK293T 세포는 Flag-표지된 MAPKAPK3 및 Myc-표지된 코어 발현 플라스미드로 코트랜스펙션되었다. 48시간 후 세포 용균액은 항-Myc 단일클론항체로 면역침전하고, 결합된 단백질들은 항-Flag 단일클론항체로 면역블랏팅하였다. Myc-표지된 코어와 Flag-표지된 MAPKAPK3의 단백질 발현은 같은 세포 용균액을 이용하여 항-Myc 또는 항-Flag 단일클론항체로 면역블랏팅함으로써 확인하였다. (C) MAPKAPK3 발현 플라스미드 야생형 및 변이체의 모식도이다. (D) HCV 코어는 MAPKAPK3의 카이네이즈 도메인 N-말단 부분과 상호작용한다. HEK293T 세포는 발현 플라스미드의 지시된 조합으로 코트랜스펙션시켰다. 48시간 후 세포 용균액은 항-Myc 단일클론항체로 면역침전하여, 결합된 단백질은 항-Flag 단일클론항체로 면역블랏팅하였다 (오른쪽 패널). 화살표는 결합된 단백질을 가리킨다. 별표는 IgG 중쇄 및 경쇄를 나타낸다. Myc-표지된 코어 및 Flag-표지된 MAPKAPK3 단백질 발현은 동일한 세포 용균액을 이용하여 토끼 항-코어 항체 또는 항-Flag 단일클론항체로 면역블랏팅하여 확인하였다

(좌측 패널).

도 5는 HCV가 MAPKAPK3 발현수준을 증가시킴을 보여준다. (A) 인터페론으로 치료한 세포 또는 서브게놈 레플리콘 세포에서 분리한 MAPKAPK3 mRNA를 qPCR로 정량하였다. 별표는 가대조군 값과의 유의미한 차이 (\*,  $p < 0.05$ )를 나타낸다. 오차 막대는 표준편차를 나타낸다. (B) 인터페론으로 치료한 세포 또는 서브게놈 레플리콘 세포에서 모은 총 세포 용균액은 지시한 항체로 면역블랏팅하였다. (C) Huh7.5 세포는 가감염 또는 HCV Jc1으로 네 시간 동안 감염시켰다. 96시간 후 MAPKAPK3 mRNA를 qPCR로 분석하였다. 두 번의 독립적 실험에서 얻은 데이터를 정량하였다. (D) 감염 96시간 후 모은 총 세포 용균액은 지시한 항체로 면역블랏팅하였다. (E) Huh7.5 세포는 가감염 또는 HCV JFH1으로 네 시간 감염시켰다. 96시간 후 MAPKAPK3 mRNA를 qPCR로 분석하였다. 두 번의 독립적 실험에서 얻은 데이터를 정량하였다. 별표는 유의미한 차이를 가리킨다 (\*\*,  $p < 0.01$ ). 오차 막대는 표준편차를 나타낸다. (F) 감염 96시간 후 총 세포 용균액을 모아 지시한 항체로 면역블랏팅하였다. (G) Huh7.5 세포는 벡터 또는 Myc-표지된 코어, NS3, NS4B, NS5A 및 NS5B 발현 플라스미드로 각각 일시 감염시켰다. 72시간 후 총 세포

용균액은 지시한 항체로 면역블랏팅하였다.

도 6은 MAPKAPK3 녹다운이 HCV 서브게놈 레플리콘 세포에서 HCV 단백질 발현 수준을 저하시킴을 보여준다. (A) HCV 서브게놈 레플리콘이 들어있는 Huh7.5 세포는 지시한 siRNA 구조로 트랜스펙션시켰다. 72시간 후 모은 총 세포 용균액은 지시한 항체로 면역블랏팅하였다. 띠 강도는 ImageJ 소프트웨어를 이용하여 정량하였다. (B, C) 총 RNA는 siRNA 트랜스펙션 72시간 후 세포에서 추출하여 MAPKAP2/3 mRNA (B) 또는 세포내 HCV RNA (C)를 qPCR로 정량하였다. "Negative": 범용 음성대조군 siRNA; "positive": HCV-특이적 siRNA; MK3, MAPKAPK3-특이적 siRNA; MK2, MAPKAPK2-특이적 siRNA. 별표는 음성대조군 값과의 유의미한 차이 (\*\*,  $p < 0.01$ )를 나타낸다. 실험은 2회 수행하였다. 오차 막대는 표준편차를 나타낸다.

도 7은 MAPKAPK3 녹다운이 HCV 증식을 억제함을 나타낸다. (A) Huh7.5 세포는 지시한 siRNA로

트랜스펙션하였다. 2일 후 세포는 Jc1으로 4시간 감염시킨 후 48시간 후에 세포 용균액을 모아 지시한 항체로 면역블랏팅하였다. 띠 강도는 ImageJ 소프트웨어로 정량하였다. (B) 세포내 HCV RNA는 감염 48시간 후 분리하여 qPCR로 분석하였다. (C) 이 세포들로부터 세포의 RNA를 분리하여 qPCR로 정량하였다. (D) Huh7.5 세포는 지시한 siRNA로 트랜스펙션하였다. 2일 후 세포를 JFH1으로 네 시간 동안 감염시킨 후 48시간이 지나 세포 용균액을 모으고 지시한 항체로 면역블랏팅하였다. (E) 48시간 후 Huh7.5 세포에서 총 RNA를 추출하였다. 세포내 및 세포의 HCV RNA를 qPCR로 정량하였다. 별표는 유의미한 차이 (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ )를 나타낸다. 실험은 3회씩 수행하였다. 오차 막대는 표준편차를 나타낸다. MK3, MAPKAPK3; MK2, MAPKAPK2. (F) (C)에서 모든 배양 상층액은 항원에 노출된 적이 없는 Huh7.5 세포 감염에 이용하였다. 바이러스 역가는 초점-형성 분석법으로 결정하였다. 별표는 음성대조군 값과의 유의미한 차이 (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ )를 나타낸다. (G) Huh7.5 세포는 50 nM의 지시한 siRNA들로 트랜스펙션시켰다. 4일 후 세포생존율을 MTT 분석법으로 결정하였다. "Negative": 범용 음성대조군 siRNA; "positive": HCV-특이적 siRNA; MK3, MAPKAPK3; MK2, MAPKAPK2. (H) Huh7.5 세포는 지시한 siRNA로 트랜스펙션시켰다. 48시간 후 세포를 Jc1으로 네 시간 동안 감염시키고 지시된 발현 플라스미드의 조합으로 트랜스펙션시켰다. 48시간 후 지시한 항체를 이용하여 세포 용균액을 면역블랏팅하였다. MAPKAPK3-WT, Flag-표지된 야생형 MAPKAPK3; MAPKAPK3-SR, Flag-표지된 siRNA-저항성 변이체 MAPKAPK3; MAPKAPK3-KA, Flag-표지된 siRNA-저항성 ATP 결합 결합 변이체 MAPKAPK3. 실험은 두 번씩 수행하였다.

도 8은 MAPKAPK3가 HCV IRES 번역을 증가시킴을 보여준다. (A) pRL-HL 플라스미드 모식도. (B) (좌측 패널) Huh7.5 세포는 벡터, Flag-표지된 야생형 MAPKAPK3, Flag-표지된 변이체 MAPKAPK3-KA로 각각은 pRL-HL 및  $\beta$ -갈락토시데이즈 발현 플라스미드와 함께 Myc-표지된 코어의 양을 점점 늘려가며, 또는 Myc-표지된 코어 없이 코트랜스펙션시켰다. 루시페레이즈 활성은 트랜스펙션 48시간 후 결정하였고,  $\beta$ -갈락토시데이즈로 표준화하였다. HCV IRES 활성은 FLuc/RLuc 비로 나타내었다 (좌측, 위쪽 패널). MAPKAPK3, MAPKAPK3-KA, 코어 및 액틴 단백질 발현은 지시한 항체로 동일 세포 용균액을 이용하여 확인하였다 (좌측, 아래쪽 패널). 별표는 유의미한 차이 (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ )를 나타낸다. 실험은 2회씩 수행하였다. 오차 막대는 표준편차를 나타낸다. (우측 패널) Huh7.5 세포는 pRL-HL 및  $\beta$ -갈락토시데이즈 발현 플라스미드와 함께 Flag-표지된 야생형 MAPKAPK3 없이 또는 양을 점차 증가시키면서 벡터 또는 Myc-표지된 코어로 코트랜스펙션시켰다. 루시페레이즈 활성은 트랜스펙션 48시간 후 결정하였고,  $\beta$ -갈락토시데이즈로 표준화하였다. HCV IRES 활성은 FLuc/RLuc 비로 나타내었다 (우측 위쪽 패널). 별표는 벡터 대조군과의 유의미한 차이 (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ )를 나타낸다. 실험은 두 번씩 진행하였고, 오차 막대는 표준편차를 나타낸다. 코어, MAPKAPK3-WT, MAPKAPK3-KA 및 액틴 단백질 발현은 지시한 항체로 동일 세포 용균액을 이용하여 확인하였다 (우측, 아래 패널). (C) HEK293T 세포는 지시한 발현 플라스미드 조합으로 코트랜스펙션시켰다. 48시간 후 세포 용균액은 항-Myc 단일클론항체로 면역침전하고, 결합된 단백질을 항-Flag 단일클론항체로 면역블랏 분석하여 탐지하였다. 동일 세포 용균액에서 Flag-MAPKAPK3, Flag-MAPKAPK3-SR, Flag-MAPKAPK3-KA, Myc-코어 및 액틴의 단백질 발현은 항-Flag 단일클론항체, 항-코어 폴리클론항체 및 항-액틴 항체로 각각 면역블랏분석하여 확인하였다. 별표는 IgG 중쇄 및 경쇄를 가리킨다. (D) (좌측 패널) Huh7.5 세포는 50 nM의 지시한 siRNA로 트랜스펙션시켰다. 24시간 후, 세포는 pRL-HL 및  $\beta$ -갈락토시데이즈 발현 플라스미드와 함께 siRNA 저항성 변이체 MAPKAPK3 (Flag-MAPKAPK3-SR)가 있는 상태 또는 없는 상태로 벡터 (하얀 막대) 또는 양을 달리한 Myc-표지된 코어 (흑색 막대)로 트랜스펙션시켰다. 루시페레이즈 활성은 트랜스펙션 48시간 후 결정하였고,  $\beta$ -갈락토시데이즈로 표준화하였다. HCV IRES 활성은 FLuc/RLuc 비로 나타내었다 (위쪽 패널). 실험은 두 번씩 수행하였다. 별표는 유의미한 차이 (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ )를 나타낸다. 오차 막대는 표준편차를 나타낸다. MAPKAPK3, MAPKAPK3-SR, 코어 및 액틴 단백질 발현은 지시한 항체로 동일 세포 용균액을 이용하여 확인하였다 (아래 패널). (우측 패널) Huh7.5 세포는 pRL-HL 및  $\beta$ -갈락토시데이즈 발현 플라스미드와 함께 Flag-표지된 MAPKAPK3-WT 및 pcDNA3 코어로 코트랜스펙션시켰다. 24시간 후 세포는 지시대로 벡터 또는 Myc-표지된 코어 변이체로 트랜스펙션시켰다. 루시페레이즈 활성은 트랜스펙션 36시간 후에 결정하였고,  $\beta$ -갈락토시데이즈로 표준화하였다. HCV IRES 활성은 FLuc/RLuc 비로 표현하였다 (우측, 위쪽 패널). 실험은 두 번씩 수행하였다. 별표는 유의미한 차이 (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ )를 나타낸다. 오차 막대는 표준편차를 나타낸다. ns, p값이 유의미하지 않았다. MAPKAPK3-WT, pcDNA3-코어, Myc-표지된 코어 변이체 및 액틴 단백질 발현은 지시한 항체로 동일 세포 용균액을 이용하여 확인하였다 (우측, 아래쪽 패널).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045]

아래에서는 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재범위에 의하여 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0046] 플라스미드 구축

[0047] HCV 코어 단백질의 cDNA를 제노타입 1b 유래 cDNA를 이용한 PCR로 증폭시켰다. PCR 산물은 pET21b 벡터 (Invitrogen)의 *Bam*HI 부위와 *Hind*III 부위 사이에, pCDNA3 (Invitrogen) 벡터의 *Hind*III 부위와 *Bam*HI 부위 사이에, 그리고 pcDNA4 벡터 (Invitrogen)의 *Bam*HI 부위 및 *Xba*I 부위 사이에 각각 끼워넣었다. HCV 코어 돌연변이체는 전장 코어를 주형으로 이용하여 구축하였다. MAPKAPK3 클로닝을 위해 Huh7.5 세포에서 추출한 총 RNA를 표 1의 프라이머로 RT-PCR하는데 이용하였다. PCR 산물은 플라스미드 p3XFlag-CMV10 (Sigma Aldrich)의 *Xba*I 부위 및 *Bam*HI 부위 사이에 끼워넣었다. 표 1의 프라이머를 이용하여 부위-특이적 돌연변이유발 (Enzymomics)에 의해 MAPKAPK3 결실 돌연변이체가 생성되었다. siRNA-저항성 돌연변이체 MAPKAPK3는 siRNA 결합부위에 네 개의 침묵 돌연변이를 함유한다. siRNA-저항성 비활성 돌연변이 (ATP-결합 결함 돌연변이) MAPKAPK3 (Ludwig S. et al., 1996, Mol. Cell. Biol. 16:6687-6697)를 제조하기 위해 siRNA-저항성 돌연변이체 MAPKAPK3에 K73A 치환 돌연변이가 도입되었다. Myc-표지된 NS3, NS4B, NS5A 및 NS5B 플라스미드는 종래 논문에 따라 제조하였다 (Lim Y.S. et al., 2011. Peptidyl-prolyl isomerase Pin1 is a cellular 447 factor required for hepatitis C virus propagation. J. Virol. 85:8777-8788). Flag-표지된 MAPKAPK2는 Jun-ichi Abe (University of Rochester) 박사가 제공해 주었다.

[0048] 항체

[0049] 항체들은 각각 다음의 구입처에서 구입하였다: MAPKAPK3 항체, GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 항체 및 Myc 항체는 Santa Cruz에서; Flag 항체 및 액틴 항체는 Sigma-Aldrich에서; HCV 코어 항체, NS3 항체 및 NS5A 항체는 논문의 기재와 같다 (Lim Y.S. et al., 2011. Peptidyl-prolyl isomerase Pin1 is a cellular 447 factor required for hepatitis C virus propagation. J. Virol. 85:8777-8788).

[0050] 마이크로어레이 탐침 제조

[0051] *E. coli*에서 발현된 HCV 코어 단백질은 Invitrogen Ni-NTA (nitrilotriacetic acid)-아가로즈 비드를 이용하여 정제하였다. 단백질은 폴딩 상태를 복원하고 -70 °C에 보관하였다.

[0052] 단백질 어레이 스크리닝

[0053] 단백질 마이크로어레이 스크리닝은 Invitrogen Protoarray 5.0 버전을 이용하여 수행하였다. 어레이는 블로킹 완충액 (50 mM HEPES pH 7.5, 25% 글리세롤, 0.08% triton X-100, 200 mM NaCl, 20 mM 환원된 글루타치온 및 0.1 mM DTT)로 4 °C에서 한 시간 동안 부드럽게 흔들면서 배양하였고, 그 후 120  $\mu$ l의 탐침 완충액 (0.1% Tween 20 함유 PBS)에 6  $\mu$ g의 정제된 HCV 코어 단백질을 희석시킨 것을 어레이에 가하였다. 4 °C로 1.5 시간 동안 배양한 후 어레이는 차가운 완충액으로 다섯 번 세척한 다음 항-V5-AlexaFluor 647 항체 (Invitrogen)로 4 °C에서 1.5 시간 처리하였다. 어레이는 건조한 후 Perkin Elmer Scanarray Ex-pressHT system과 Invitrogen Prospector version 5.2 소프트웨어를 이용하여 영상을 분석하였다. Z-스코어 경계값 (cutoff value) 3.0을 기준으로 중요한 상호작용을 확인하였다.

[0054] 세포 배양

[0055] 모든 세포주들은 10% 우태혈청 및 100 units/ml 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 37 °C 온도에서 배양하였다. 인터페론 처리한 것과 HCV 서브게놈 레플리콘 세포를 배양하였다 (Lim Y.S. et al., 2011. Peptidyl-prolyl isomerase Pin1 is a cellular factor required for hepatitis C virus propagation. J. Virol. 85:8777-8788).

[0056] 면역침전

[0057] HEK293T 세포는 4  $\mu\text{g}$ 의 Myc-표지된 코어 및 2  $\mu\text{g}$ 의 Flag-표지된 MAPKAPK3 또는 MAPKAPK2로 코트랜스펙션시켰다. DNA 총량은 빈 벡터를 가하여 맞추었다. 트랜스펙션 48시간 후 세포를 모아 면역침전 분석을 수행하였다 (Lim Y.S. et al., 2011. Peptidyl-prolyl isomerase Pin1 is a cellular factor required for hepatitis C virus propagation. J. Virol. 85:8777-8788).

[0058] **인비트로 풀다운 분석**

[0059] 약 1  $\mu\text{g}$ 의 정제된 코어 단백질을 30  $\mu\text{l}$ 의 Ni-NTA 아가로스 비드와 함께 4  $^{\circ}\text{C}$ 에서 한 시간 동안 부드럽게 교반하며 배양하였다. 비드는 완충액 (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8.0), 100 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1% 단백질 저해제 콕테일)로 세 번 세척하고 4  $^{\circ}\text{C}$ 에서 두 시간 동안 Flag-표지된 MAPKAPK3를 발현하는 세포 용균액과 함께 배양하였다. 세포는 용균 완충액으로 다섯 번 세척한 다음 결합된 단백질은 항-Flag 단일클론 항체를 이용하여 이뮤노블랏 분석하였다.

[0060] **이뮤노블랏 분석**

[0061] 동일한 양의 단백질을 SDS-PAGE에 로딩하고 나이트로셀룰로스 막에 전기이동시켰다. 막은 5% 탈지분유를 포함하는 TBS/Tween {20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 500 mM NaCl 및 0.25% Tween 20} 완충액으로 한 시간 동안 처리하여 블로킹한 다음 1% 탈지분유를 포함하는 TBS/Tween 내의 지시된 항체로 4  $^{\circ}\text{C}$ 에서 오버나잇 배양하였다. TBS/Tween으로 세 번 세척한 후 막은 TBS/Tween 내의 호스래디쉬 퍼옥시데이즈-결합된 염소 항-토끼 항체 또는 염소 항-마우스 항체 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)와 함께 실온에서 한 시간 동안 배양하였다. 단백질은 ECL kit (Amersham Biosciences)를 이용하여 탐지하였다.

[0062] **루시퍼레이즈 리포터 유전자 분석**

[0063] Huh7.5 세포를  $\beta$ -갈락토시데이즈가 있는 pRL-HL 플라스미드와 지시한 플라스미드로 코트랜스펙션시켰다. 48시간 후 세포를 모아 루시퍼레이즈 분석하였다 (Lim YS, Tran HT, Yim SA, Hwang SB. 2011. Peptidyl-prolyl isomerase Pin1 is a cellular factor required for hepatitis C virus propagation. J. Virol. 85:8777-8788).

[0064] **RNA 간섭**

[0065] MAPKAPK3를 타겟으로 하는 siRNA (sense 5'-GGAUCAACCAUUGAUGGU-3'; antisense 5'-ACCAUCGAUUGGUUGAUCC-3'), MAPKAPK2를 목표로 하는 siRNA (sense 5'-ACGAGCAGAUCAAGAUAAA-3'; antisense 5'-UUUAUCUUGAUCUGCUCGU-3') 및 공통 음성 대조군 (universal negative control)을 Bioneer (한국)에서 구입하였다. Jc1의 5'NTR을 목표로 하는 siRNA (5'-CCUCAAGAAAAACCAACUU-3')를 양성 대조군으로 이용하였다 (Lim YS, Tran HT, Yim SA, Hwang SB. 2011. Peptidyl-prolyl isomerase Pin1 is a cellular factor required for hepatitis C virus propagation. J. Virol. 85:8777-8788). Lipofectamine RNAiMax reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 siRNA 트랜스펙션을 수행하였다.

[0066] **포커스 형성 분석법 (Focus-forming assay)**

[0067] Huh7.5 세포를 4 웰 챔버 배양 슬라이드 (Millipore) 내의  $2 \times 10^4$  세포에 시딩하였다. 24시간 배양 후 세포는 HCVcc-감염된 세포에서 모든 세포 배양배지를 순차회석한 것을 이용하여 접종하였다. 접종 이틀 후  $\text{mL}$ 당 포커스 형성단위 {focus-forming units (FFU)}의 수를 결정하기 위해 세포내 코어 항체의 존재를 확인하기 위해 간접 면역형광법을 수행하였다 (Lim Y.S. et al., 2011. Peptidyl-prolyl isomerase Pin1 is a cellular factor required for hepatitis C virus propagation. J. Virol. 85:8777-8788).

[0068] **MAPKAPK 및 HCV RNA 정량**

[0069] HCVcc-감염된 세포, 세포배양배지 또는 레플리콘 세포에서 RiboEx LS reagent (Geneall Biotechnology)를 이용하여 총 RNA를 분리하고, ReverTra Ace kit (Toyobo)를 이용하여 역전사하였다. 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR) 실험은 iQ5 multicolor Real-time PCR Detection system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)을 이용하여 수행하였다 (Lim Y.S. et al., 2011. Peptidyl-prolyl isomerase Pin1 is a cellular factor required for hepatitis C virus propagation. J. Virol. 85:8777-8788).

# [0070] MTT 분석

[0071] Huh7.5 세포는 24 웰 플레이트 내의  $4 \times 10^4$  세포에 시딩하고 지시된 siRNA로 트랜스펙션하였다. 4일 후, MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide} 시약 (Sigma)을 세포에 가하고 37 °C에서 두 시간 동안 배양하였다. 세포 생존율은 종래 방법에 따라 평가하였다 (Lim YS, Tran HT, Yim SA, Hwang SB. 2011. Peptidyl-prolyl isomerase Pin1 is a cellular 447 factor required for hepatitis C virus propagation. J. Virol. 85:8777-8788)

# [0072] 면역형광 분석

[0073] 글라스 슬라이드 상에 배양한 Huh7.5 세포를 4% 파라포름알데하이드 함유 PBS로 실온에서 12분 동안 고정시켰다. PBS로 두 번 세척한 후, 고정된 세포는 0.1% Triton X-100으로 15분간 처리하여 투과성을 높인 후 0.5% 우혈청 알부민으로 두 시간 동안 블로킹하였다. 세포는 각각 마우스 항-MAPKAPK3 항체 및 토끼 항-코어 항체로 오버나잇 배양하였다. PBS로 세 번 워싱한 후 세포는 FITC-결합된 염소 항-마우스 IgG 또는 TRITC-결합된 당나귀 항-토끼 IgG로 두 시간 동안 실온에서 배양하였다. PBS로 세 번 세척한 후 세포는 Zeiss LSM 700 레이저 공초점 현미경 시스템 (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY)으로 분석하였다.

# [0074] 결과 1: 단백질 어레이를 이용한 HCV 코어와 상호작용하는 세포 단백질 확인

[0075] HCV 코어 단백질과 상호작용하는 세포 단백질을 확인하기 위해 코어 단백질을 정제하였다 (도 1A). 정제된 코어 단백질은 항-코어, 항-V5 및 항-His 항체를 이용하여 입증하였고 (도 1B), 약 9,000 개의 인간 단백질이 들어있는 인간 단백질 마이크로어레이 키트 (Invitrogen) 상의 스팟에 적용하였다. 통계적으로 중요한 상호작용자 후보들은 경계값으로 3 이상의 Z-스코어로 평균 스팟 강도를 측정하여 결정하였다 (도 1C). 스캔한 어레이 데이터 분석은 약 100개의 세포 단백질들이 HCV 코어 상호작용자로 확인되었음을 보여준다 (표 2 내지 표 5). MAPKAPK3은 후보자 히트의 하나로 확인되었고, 양성 대조군 히트 및 음성 대조군 히트를 도 1D에 나타내었다. 온톨로지 데이터는 추정 HCV 코어 상호작용자의 반이 유전자 조절, 세포 사이클, 증식 및 발생에 관여하는 단백질 및 핵 산결합 단백질을 밝혔다 (도 2).

# [0076] 결과 2: MAPKAPK3는 유전자형 1b 및 2a 모두에서 유래한 HCV 코어와 상호작용한다.

[0077] MAPK는 인플루엔자 바이러스 감염된 세포에서 친염증성 싸이토카인 조절에 관여하기 때문에 (Luig C, Kother K. et al., 2010. FASEB J. 24:4068-4077), HCV-감염된 세포에서 가능한 관계를 탐구하기 위해 MAPKAPK3를 선택하였다. 단백질 어레이 데이터를 증명하기 위해 본 발명자들은 *E. coli*에서 정제한 His-표지된 코어 단백질 및 Flag-표지된 MAPKAPK3를 발현하는 세포 용균액을 이용하여 인비트로 결합 분석법을 수행하였다. 도 3은 MAPKAPK3가 선택적으로 HCV 코어 단백질과 상호작용함을 보여준다. 공통면역침전 데이터는 MAPKAPK3가 유전자형 1b 및 2a에서 유래한 코어와 특이적으로 상호작용함을 확인하였다 (도 3B). 다음으로, 본 발명자들은 HCV 코어 단백질이 Jc1 RNA로 전기천공한 Huh7.5 세포에서 내생 MAPKAPK3와 상호작용하는지를 조사하였다. 전기천공 후 4 일째 얻은 세포 용균액은 항-MAPKAPK3 항체 또는 대조군 IgG와 면역침전시키고, 결합된 단백질들은 항-코어 항체로 면역블랏팅하여 분석하였다. 실제로, HCV 코어는 내생 MAPKAPK3 단백질과 상호작용하였다 (도 3C). 이 데이터들은 MAPKAPK3가 HCV 감염세포에서 코어와 같은 위치에 있을 것이라고 제시한다. 이 가능성을 조사하기 위해 가감염된 (mock-infected) 또는 Jc1으로 감염된 Huh7.5 세포를 면역형광 분석법으로 분석하였다. 예상대로 MAPKAPK3는 가감염된 세포의 핵과 세포질 모두에서 폭넓게 발현되었다 (도 3D). HCV 감염세포에서 MAPKAPK3는 주로 세포질에 축적되었다는 것은 주목할 만하다. 도 3C는 MAPKAPK3와 HCV 코어가 모두 황색 형광으로 보이는

세포질에 공통적으로 위치함을 보여준다. MAPKAPK3는 MAPKAPK2와 72%의 핵산 동일성 및 75%의 아미노산 동일성을 공유하여 MAPKAPK2와 밀접하게 관련이 있기 때문에 (Sithanandam G. et al., 1996. 3pK, a new mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase located in the small cell lung cancer tumor suppressor gene region. Mol. Cell. Biol. 16:868-876), 본 발명자들은 코어가 MAPKAPK2와도 상호작용할 수 있는지 의문을 갖게 되었다. 이러한 목적으로, Myc-표지된 코어 및 Flag-표지된 MAPKAPK3/MAPKAPK2로 코트랜스펙션된 HEK293T 세포를 항-Myc 항체로 면역침전한 후 결합된 단백질은 항-Flag 항체로 면역블랏팅하였다. 도 3E는 MAPKAPK2가 아니라 MAPKAPK3만 HCV 코어와 상호작용함을 보여준다. 실제로 MAPKAPK2는 단백질 마이크로어레이에서 코어 상호작용자의 후보로서 확인되지 않았다 (도 1D). 이러한 데이터를 종합할 때 MAPKAPK3는 인비트로와 인비보 모두에서 특이적으로 HCV 코어와 상호작용함을 알 수 있다.

[0078] **결과 3: HCV 코어는 MAPKAPK3의 카이네이즈 도메인의 N-말단 반 및 코어의 41-75 아미노산 잔기를 통해 MAPKAPK3와 상호작용한다.**

[0079] MAPKAPK3 결합에 관여하는 코어의 부위를 확인하기 위해 MAPKAPK3와 코어의 다양한 결실변이 간의 상호작용을 트랜스펙션-기반 공통면역침전 분석방법으로 결정하였다 (도 4A). 도 4B와 같이, MAPKAPK3는 aa M41-173을 포함하는 코어 돌연변이와는 상호작용하였지만, aa M76-173 코어 돌연변이와는 상호작용 하지 않았다. 이 결과는 코어의 aa 41-75가 MAPKAPK3와의 결합에 역할을 함을 말해준다. 다음으로, 본 발명자들은 코어 결합에 관여하는 MAPKAPK3의 부위를 결정하기 위해 MAPKAPK3의 다양한 도메인 변이체를 구축하였고 (도 4C), 위에 기재된 것과 같은 방법으로 결합 도메인을 결정하였다. 도 4D는 코어가 카이네이즈 도메인이 온전한 돌연변이와는 상호작용 하지만, MAPKAPK3의 카이네이즈 도메인의 C-말단 반만 있는 돌연변이와는 상호작용 하지 않음을 보여주며, 코어가 카이네이즈 도메인의 N-말단 반을 포함하는 부분을 통해 MAPKAPK3와 상호작용함을 말해준다.

[0080] **결과 4: HCV는 MAPKAPK3 발현수준을 증가시킨다.**

[0081] MAPKAPK3 발현 수준이 HCV에 의해 조절되는지를 알아보기 위해 레플리콘 세포에서 MAPKAPK3 mRNA 및 단백질 수준을 조사하였다. 도 5A와 같이, 레플리콘 세포에서 MAPKAPK3 mRNA 수준은 인터페론으로 치료한 세포에 비하여 현저히 증가하였다. 도 5B는 HCV 레플리콘 세포에서 MAPKAPK3 단백질 수준이 현저히 증가하였음을 보여준다. 본 발명자들은 가감염된 세포와 비교하여 MAPKAPK3 mRNA 및 단백질 수준이 Jc1-감염세포 (도 5C, 5D) 및 JFH1-감염세포 (도 5E, 5F) 모두에서 현저히 증가하였음을 밝혔다. 이 데이터들은 HCV 비구조 단백질이 MAPKAPK3 발현 상향조절에 역할을 함을 제시한다. 이 목적을 위해, Huh7.5 세포는 벡터 또는 Myc-표지된 코어, NS3, NS4B, NS5A 및 NS5B 각각으로 일시적으로 트랜스펙션되었다. 트랜스펙션 72시간 후 총 세포 용균액을 지시한 항체로 면역블랏팅하였다. 도 5G와 같이 다른 HCV 단백질은 제외하고 NS5A만이 투여량 의존적 농도로 MAPKAPK3 단백질을 증가시켰다. 종합적으로, 이 데이터들은 HCV가 MAPKAPK3 발현 수준을 증가시킴을 명확히 말해준다.

[0082] **결과 5: HCV 서브게놈 레플리콘 세포에서 MAPKAPK3 녹다운은 HCV 단백질 발현수준을 억제한다.**

[0083] HCV 복제에 대한 MAPKAPK3의 효과를 알아보기 위해 HCV 서브게놈 레플리콘 세포를 MAPKAPK3를 타겟으로 하는 siRNA 또는 지시된 대조군 siRNA로 트랜스펙션하였다. 도 6A는 레플리콘 세포에서 MAPKAPK3를 침묵시키면 NS3 및 NS5A 단백질 수준이 모두 극적으로 저하됨을 보여주었다. 주목할 것은 MAPKAPK3 siRNA의 억제활성이 양성 대조군 siRNA만큼 효과적이었다는 점이다 (도 6A, 레인 2 vs. 레인 3). MAPKAPK3 mRNA 녹다운은 qPCR로 확인하였다 (도 6B). 흥미롭게도 세포내 HCV RNA 수준은 MAPKAPK3 녹다운으로 변하지 않았다 (도 6C). 이 데이터들은 MAPKAPK3가 HCV 라이프 사이클의 번역 단계에 관여함을 제시한다.

[0084] **결과 6: MAPKAPK3 녹다운은 HCV 증식을 억제한다.**

[0085] HCV 증식에서 MAPKAPK3의 효과를 더 알아보기 위해 MAPKAPK3를 목표로 하는 siRNA 또는 지시된 대조군 siRNA로 트랜스펙션된 Huh7.5 세포를 Jc1으로 감염시켰다. 감염 48시간 후, 단백질 및 RNA 수준을 결정하였다. MAPKAPK3 침묵은 NS3 및 코어 단백질 수준 모두를 현저히 억제하였다 (도 7A). MAPKAPK3 siRNA의 억제활성은 양성 대조군 siRNA와 비슷한 수준임은 주목할 만하다 (도 7A, 레인 2 vs. 레인 3). 나아가, MAPKAPK2가 아니라 MAPKAPK3만이 특이적으로 HCV 단백질 발현을 저해하였다. 상기 레플리콘 세포에서와 같이, 세포내 HCV RNA 수준은 Jc1-감

염된 세포에서 MAPKAPK3 녹다운에 의해 영향을 받지 않았다 (도 7B). MAPKAPK3 발현 침묵은 세포의 HCV RNA 수준의 강력한 억제를 유발하였다 (도 7C). 본 발명자들은 또한 JFH1-감염세포에서 MAPKAPK3 녹다운이 HCV 단백질 및 세포의 HCV RNA 수준 모두를 현저히 저해함을 밝혔다 (도 7D 및 7E). 이 결과를 확인하기 위해, Huh7.5 세포를 도 7C에서 모은 Jc1으로 감염시키고 HCV 감염도를 결정하였다. 도 7F와 같이, MAPKAPK3 녹다운 세포에서 HCV 감염도는 현저히 억제되었다. siRNA 트랜스펙션이 세포독성을 유도하지 않기 때문에 (도 7E), HCV-감염세포에서 침묵 효과는 MAPKAPK3에 특이적이었다. MAPKAPK3 siRNA의 과녁을 벗어난 (off-target) 효과를 배제하기 위해, siRNA-저항성 MAPKAPK3 변이 및 siRNA-저항성 ATP-결합이 결합된 MAPKAPK3 변이를 제조하였다 (Ludwig S. et al., 1996. 3pK, a novel mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase, is targeted by three MAP kinase pathways. Mol. Cell. Biol. 16:6687-6697). 도 7F와 같이, siRNA-저항성 MAPKAPK3 변이의 외생적 발현은 HCV 단백질 발현을 구제한 반면 (레인 4), 야생형 MAPKAPK3 또는 ATP-결합에 결합이 있는 MAPKAPK3 변이는 그렇지 않았다. 종합적으로, 이 데이터들은 MAPKAPK3가 HCV 증식에 필요함을 말해준다.

[0086] **결과 7: 코어와 MAPKAPK3 사이의 단백질 상호작용은 HCV IRES-매개 번역에 필수적이다.**

[0087] HCV RNA 번역은 바이러스 RNA 5' UTR 내에 위치하는 IRES (internal ribosome entry site)에 의해 주로 매개된다 (Ji H. et al., 2004. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:16990-16995, Spahn C.M. et al., 2001. Science 291:1959-1962, Wang L. et al., 2011. J. Virol. 85:7954-64). MAPKAPK3 침묵은 세포내 HCV RNA 수준에는 아무런 영향을 미치지 않기 때문에 본 발명자들은 HCV 라이프사이클의 번역 단계에서 MAPKAPK3의 영향을 조사하였다. 이 목적으로 우리는 pRL-HL 구조를 이용하였다 (도 8A)(Honda M. et al., 2000. Gastroenterology 118:152-162). 실제로, MAPKAPK3 과발현은 HCV IRES 활성을 현저히 증대시켰다 (도 8B, 왼쪽 패널). 우리는 MAPKAPK3-의존적 HCV IRES-매개 번역이 코어 단백질에 의해 투여량 의존적으로 증가함을 관찰하였다. HCV IRES-매개 번역에 대한 MAPKAPK3의 효과를 확증하기 위해 ATP-결합 결합이 있는 MAPKAPK3 변이 (MK3-KA)를 이용하여 리포터 분석을 수행하였다. 도 8B (좌측 패널)와 같이, 비활성 MAPKAPK3 변이는 HCV IRES-매개 번역을 증대시킬 수 없었다. 이 데이터들은 MAPKAPK3가 HCV IRES-매개 번역에 관여함을 말해준다. HCV 코어가 HCV IRES 활성을 자극한다는 것은 이미 보고된바 있다 (Boni S. et al., 2005. J. Biol. Chem. 280:17737-17748, Lourenco S. et al., 2008. FEBS J. 275:4179-4197). 실제로, 코어 단백질 과발현은 벡터 대조군과 비교하여 HCV IRES 활성을 1.5배 증가시켰고, 코어-매개 IRES 활성은 MAPKAPK3에 의해 투여량 의존적으로 더욱 증대되었다 (도 8B, 우측 패널). 본 발명자들은 나아가 MAPKAPK3의 ATP-결합 결합 변이가 HCV 코어 단백질과 결합할 수 없음을 밝혔고 (도 8C), 이는 HCV 단백질 발현에 단백질 상호작용이 중요함을 말해준다. 다음으로, 우리는 HCV IRES-매개 번역에서 코어와 MAPKAPK3 간 단백질 상호작용의 기능적 관련성을 연구하였다. Huh7.5 세포를 음성 siRNA 또는 MAPKAPK3 siRNA로 트랜스펙션시킨 다음, 리포터 플라스미드와 함께 siRNA 저항성 변이 MAPKAPK3가 있거나 없는 상태로 세포를 빈 벡터 또는 코어 플라스미드로 트랜스펙션시켰다. 도 8D와 같이, 코어 단백질만 있는 상태에서 HCV IRES 활성은 투여량 의존적으로 증가하였다 (좌측 패널). MAPKAPK3 녹다운은 HCV IRES-매개 번역 활성을 손상시켰다. 그러나, siRNA-저항성 MAPKAPK3 변이의 발현은 IRES 활성을 회복시켰고, 이 활성은 코어 단백질에 의해 투여량 의존적으로 증대되었다 (도 8D, 좌측 패널). 따라서, HCV IRES 활성에 대한 코어의 효과는 MAPKAPK3-의존적이었다. 나아가, 우리는 결합능에 결합이 있는 코어 변이를 이용하여 HCV IRES-매개 번역에 대한 코어와 MAPKAPK3 간의 단백질 상호작용의 기능적 중요성을 평가하였다. 이를 위해 Huh7.5 세포를 리포터 플라스미드와 함께 야생형 MAPKAPK3 및 전장 코어로 코트랜스펙션시켰다. 세포는 코어 플라스미드의 다양한 변이 구조로 다시 트랜스펙션시켰다. 도 8D (우측 패널, 레인 2)와 같이, MAPKAPK3-의존적 HCV IRES 활성은 전장 코어 단백질에 의해 현저히 증가하였다. 경쟁 분석방법에서, M76-173을 제외한 모든 코어 변이체들은 야생형 코어와 MAPKAPK3 간의 단백질 상호작용을 효과적으로 왜곡하였고, 따라서 HCV IRES 활성에 손상을 주었다 (도 8D, 우측 패널). M76-173이 코어의 결합능에 결합이 있는 변이체이므로 (도 4B), 이 데이터들은 코어와 MAPKAPK3 사이의 단백질 상호작용이 HCV 증식에 결정적인 역할을 수행함을 말해준다.

표 1

| Primer       | Primer sequence                                            | Enzyme site    | Purpose                                                                           |
|--------------|------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Core-F       | ATCAACTAGTGATGAGCACGAATCCT                                 | <i>SpeI</i>    | Cloning of HCV core 1b type into pProEX HTa and pET21b+ vectors                   |
| Core-R       | ATTATCTAGAGCAACCGGGCAAGTT                                  | <i>XbaI</i>    |                                                                                   |
| Core-FpC3    | GCAAGCTTATGAGCACGAATCCTAAACC                               | <i>HindIII</i> | Cloning of HCV core 1b type into pCDNA3 vector                                    |
| Core-FpC3    | CGGGATCCTCAAGAGCAACCGGGCAA GTTC                            | <i>BamHI</i>   |                                                                                   |
| Myc-core-F   | GCGGATCCGAACAAAACTCATCTCAGA AGAGGATCTGATGAGCACGAATCCTAAACC | <i>BamHI</i>   | Cloning of HCV core 1b type into pCDNA4 vector                                    |
| Core-R       | CGTCTAGAAGAGCAACCGGGCAAGTTC                                | <i>XbaI</i>    |                                                                                   |
| MK3-F        | CGCTCTAGA ATGGATGGTGAAACAGCAG                              | <i>XbaI</i>    | Cloning of human MAPKAPK3 into p3XFLAG-CMV-10 vector                              |
| MK3-R        | ATGGATCC CTACTGGTTGTTGCAGCCC                               | <i>BamHI</i>   |                                                                                   |
| MK3 resist-F | ACCACCCCTGGATCAACCAGAGTATGGT AGTGCCACAGACCC                |                | Generation of siRNA-resistant mutant of MAPKAPK3                                  |
| MK3 resist-R | GGGTCTGTGGCACTACCATACTCTGGTT GATCCAGGGGTGGT                |                |                                                                                   |
| MK3 inact-F  | GACAGAAGTGTGCCCTGGCGCTCCTGTA TGACAGCC                      |                | Generation of siRNA-resistant inactive (ATP binding defective) mutant of MAPKAPK3 |
| MK3 inact-R  | GGCTGTCATACAGGAGCGCCAGGGCACACTTCTGTC                       |                |                                                                                   |
| 5'NTR-F      | TGAGTGTCGTACAGCCTCCA                                       |                | Quantitative real-time PCR                                                        |
| 5'NTR-R      | ACGCTACTCGGCTAGCAGTC                                       |                |                                                                                   |
| qActin-F     | TGACAGCAGTCGGTTGGAGCG                                      |                | Quantitative real-time PCR                                                        |
| qActin-R     | GACTTCCTGTAACAACGCATCTCATA                                 |                |                                                                                   |

[0088]

표 2

| Gene               | Gene product                                                                      | NCBI accession | Z-Score |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------|---------|
| <b>Kinase</b>      |                                                                                   |                |         |
| MAPKAPK3           | MAP kinase-activated protein kinase 3                                             | BC001662       | 3.89    |
| AURKA              | Aurora kinase A, transcript variant 2                                             | NM_003600      | 3.27    |
| VRK1               | Vaccinia related kinase 1                                                         | NM_003384      | 4.89    |
| CSNK2A2            | Casein kinase 2, alpha prime polypeptide                                          | NM_001896      | 4.47    |
| IPPK               | Inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase                                     | NM_022755      | 3.37    |
| STK6               | Serine/threonine-protein kinase 6                                                 | BC001280       | 3.23    |
| MAPKAPK5           | Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 5, transcript variant 1 | NM_003668      | 3.13    |
| RABEPK             | Rab9 effector protein with kelch motifs                                           | BC047023       | 3.09    |
| <b>DNA binding</b> |                                                                                   |                |         |
| PPARG              | Peroxisome proliferator-activated receptor gamma                                  | BC006811       | 3.51    |
| DUX3               | Double homeobox 3                                                                 | NM_012148      | 6.83    |
| NR4A1              | Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1, transcript variant 1             | NM_002135      | 4.65    |
| C17orf85           | Uncharacterized protein                                                           | NM_018553      | 4.00    |
| PIN4               | Protein (peptidylprolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting, 4                  | NM_006223      | 4.00    |
| DRAP1              | DR1-associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha)                              | NM_006442      | 3.82    |
| ZNF239             | Zinc finger protein 239                                                           | BC026030       | 3.64    |
| RAD51AP1           | RAD51 associated protein 1                                                        | BC016330       | 3.47    |
| CNOT8              | CCR4-NOT transcription complex, subunit 8                                         | NM_004779      | 3.26    |
| HMGN3              | high mobility group nucleosomal binding domain 3, transcript variant 2            | NM_138730      | 3.36    |
| TERF1              | Telomeric repeat binding factor (NIMA-interacting) 1                              | BC029378       | 3.28    |
| KLF3               | Kruppel-like factor 3 (basic)                                                     | BC051687       | 3.24    |
| MSL3L1             | Male-specific lethal 3-like 1 (Drosophila), transcript variant 2                  | NM_078630      | 3.21    |
| EBAG9              | Estrogen receptor binding site associated, antigen, transcript variant 1          | NM_004215      | 3.12    |
| FOS                | V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog                              | NM_005252      | 3.14    |
| HMGB2              | high-mobility group box 2                                                         | NM_002129      | 3.04    |

[0089]

표 3

| Gene                   | Gene product                                                                     | NCBI accession | Z-Score |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------|---------|
| <b>RNA binding</b>     |                                                                                  |                |         |
| ZRANB2                 | Zinc finger, RAN-binding domain containing 2, transcript variant 1               | NM_203350      | 6.18    |
| SART3                  | Squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 3                          | BC041638       | 3.70    |
| RPL23A                 | Ribosomal protein L23a                                                           | NM_000984      | 5.28    |
| EIF1AY                 | Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked                            | BC005248       | 5.34    |
| SRP19                  | Signal recognition particle 19kDa                                                | BC010947       | 3.93    |
| RPL22                  | 60S ribosomal protein L22                                                        | NM_000983      | 3.40    |
| SFRS9                  | Splicing factor, arginine/serine-rich 9                                          | NM_003769      | 3.31    |
| SFRS5                  | Splicing factor, arginine/serine-rich 5                                          | BC018823       | 3.31    |
| RPL29                  | 60S ribosomal protein L29                                                        | NM_000992      | 3.00    |
| RPL30                  | Ribosomal protein L30                                                            | NM_000989      | 3.14    |
| DDX55                  | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 55                                        | BC030020       | 3.10    |
| <b>Protein binding</b> |                                                                                  |                |         |
| EHHADH                 | Peroxisomal bifunctional enzyme                                                  | NM_001966      | 3.34    |
| CTTN                   | Cortactin, transcript variant 2                                                  | NM_138565      | 5.30    |
| CCNG1                  | Cyclin G, transcript variant 1                                                   | NM_004060      | 5.14    |
| WDR5                   | WD repeat domain 5, transcript variant 1                                         | NM_017588      | 4.56    |
| RPS28                  | 40S ribosomal protein S28                                                        | NM_001031      | 4.06    |
| GCC1                   | GRIP and coiled-coil domain-containing protein 1                                 | BC008902       | 3.88    |
| EPB41L4A               | Band 4.1-like protein 4A                                                         | NM_022140      | 3.95    |
| SPC24                  | SPC24, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)              | NM_182513      | 3.32    |
| PDAP1                  | PDGFA associated protein 1                                                       | NM_014891      | 3.35    |
| HDGFRP3                | Hepatoma-derived growth factor, related protein 3                                | NM_016073      | 3.58    |
| DYNC1H1                | Dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 1                                      | BC037854       | 3.46    |
| PSMD4                  | Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 4, transcript variant 2 | NM_153822      | 3.46    |
| FGF12                  | Fibroblast growth factor 12                                                      | BC022524       | 3.53    |
| UBD                    | Ubiquitin D                                                                      | NM_006398      | 3.42    |
| NOC2L                  | Nucleolar complex associated 2 homolog (S. cerevisiae)                           | BC003555       | 3.39    |
| SUDS3                  | Sin3 histone deacetylase corepressor complex component SDS3                      | BC093990       | 3.05    |
| DNAJC8                 | DnaJ homolog subfamily C member 8                                                | NM_014280      | 3.24    |
| CCNB3                  | Cyclin B3, transcript variant 2                                                  | NM_033671      | 3.15    |
| MAP2                   | Microtubule-associated protein 2, transcript variant 2                           | NM_031845      | 3.21    |
| INTS3                  | Integrator complex subunit 3                                                     | NM_023015      | 3.00    |
| OTUD6B                 | OTU domain containing 6B                                                         | BC029760       | 3.04    |
| SPANXN4                | Sperm protein associated with the nucleus on the X Chromosome N4                 | NM_001009613   | 3.07    |
| SERTAD1                | SERTA domain containing 1                                                        | BC002670       | 3.81    |

[0090]

표 4

| Gene                             | Gene product                                                                           | NCBI accession | Z-Score |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------|---------|
| <b>Calcium/metal ion binding</b> |                                                                                        |                |         |
| CALU                             | Calumenin                                                                              | NM_001219      | 3.55    |
| PPP2R3B                          | Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B", beta, transcript variant 2 | NM_199326      | 5.63    |
| ELOF1                            | Elongation factor 1 homolog (S. cerevisiae)                                            | NM_032377      | 4.47    |
| TRIM44                           | Tripartite motif-containing 44                                                         | NM_017583      | 4.44    |
| ASXL1                            | Additional sex combs like 1 (Drosophila)                                               | BC064984       | 4.01    |
| POLB                             | Polymerase (DNA directed), beta                                                        | NM_002690      | 3.30    |
| PCLO                             | Piccolo (presynaptic cytomatrix protein)                                               | BC001304       | 3.10    |
| JMJD2D                           | Jumonji domain containing 2D                                                           | NM_018039      | 3.13    |
| <b>GTPase/ATP/GTP binding</b>    |                                                                                        |                |         |
| HRAS                             | V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog                                     | BC006499       | 3.68    |
| UBE2S                            | Ubiquitin-conjugating enzyme E2S                                                       | BC004236       | 5.17    |
| SUPT16H                          | FACT complex subunit SPT16                                                             | BC021561       | 4.31    |
| TTL7                             | Tubulin tyrosine ligase-like family, member 7                                          | BC048970       | 3.38    |
| TBC1D22B                         | TBC1 domain family member 22B                                                          | NM_017772      | 3.21    |
| <b>Other</b>                     |                                                                                        |                |         |
| RPL39L                           | Ribosomal protein L39-like                                                             | NM_052969      | 4.39    |
| C20orf198                        | Chromosome 20 open reading frame 198                                                   | NM_139016      | 3.47    |
| PRR15                            | Proline rich 15                                                                        | NM_175887      | 3.32    |
| SPRR4                            | Small proline-rich protein 4                                                           | NM_173080      | 3.02    |
| GLIPR2                           | Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1                                  | NM_022343      | 4.00    |
| NOL7                             | Nucleolar protein 7, 27kDa                                                             | NM_016167      | 3.64    |
| IFRD2                            | Interferon-related developmental regulator 2                                           | BC001327       | 3.03    |
| CLIF4                            | CAP-GLY domain containing linker protein family, member 4                              | NM_024692      | 3.01    |
| DEXI                             | Dexamethasone-induced transcript                                                       | NM_014015      | 5.15    |

[0091]

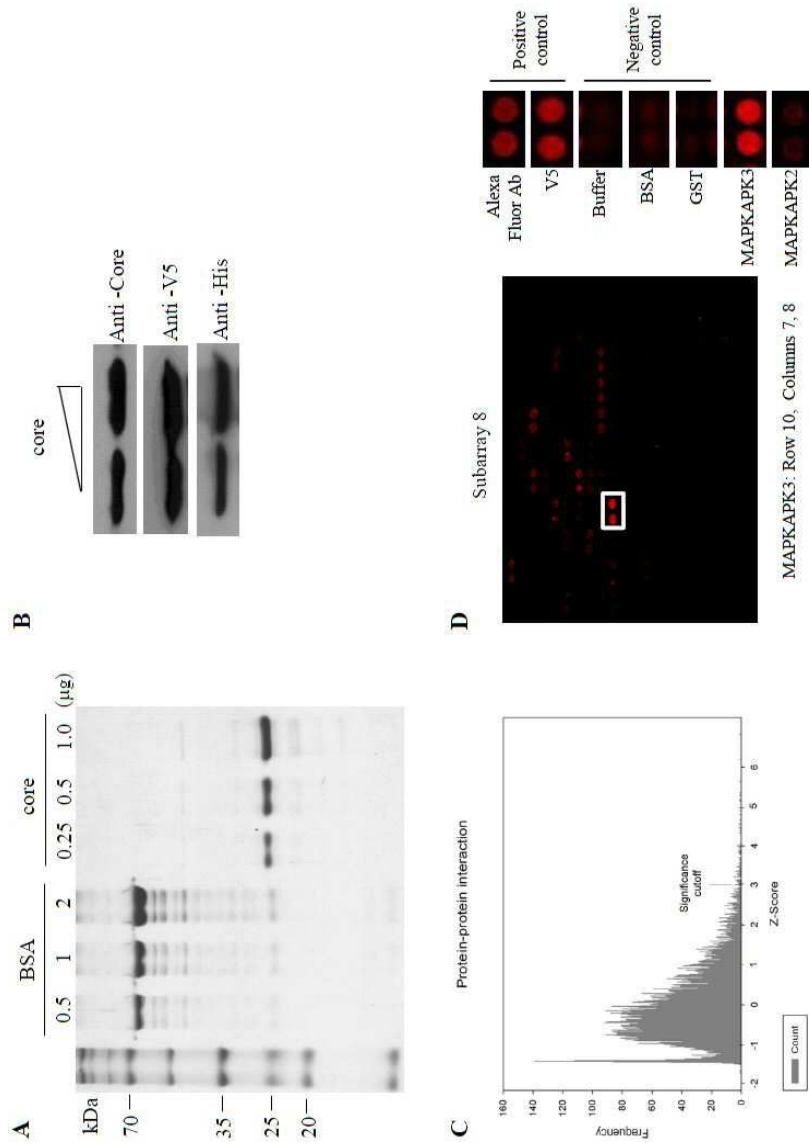
표 5

| Gene           | Gene product                                              | NCBI accession | Z-Score |
|----------------|-----------------------------------------------------------|----------------|---------|
| <b>Unknown</b> |                                                           |                |         |
| C11orf51       | Chromosome 11 open reading frame 51                       | NM_014042      | 4.79    |
| CCDC28A        | Coiled-coil domain-containing protein 28A                 | BC000758       | 4.56    |
| HSPC111        | Hypothetical protein HSPC111                              | BC040106       | 3.79    |
| C8orf33        | Chromosome 8 open reading frame 33                        | NM_023080      | 3.86    |
| VCY            | Variable charge, Y-linked 1B                              | BC056508       | 3.87    |
| C9orf9         | Chromosome 9 open reading frame 9                         | NM_018956      | 4.00    |
| LOC158812      | Spermatid nuclear transition protein 4                    | XM_088679      | 3.80    |
| C12orf41       | Chromosome 12 open reading frame 41                       | BC013900       | 3.86    |
| CCDC72         | Coiled-coil domain containing 72                          | NM_015933      | 3.84    |
| C7orf49        | Chromosome 7 open reading frame 49                        | NM_024033      | 3.70    |
| FAM126B        | Family with sequence similarity 126, member B             | NM_173822      | 3.56    |
| C13orf27       | Chromosome 13 open reading frame 27                       | NM_138779      | 3.47    |
| C11orf63       | Chromosome 11 open reading frame 63, transcript variant 2 | NM_199124      | 3.35    |
| FAM116B        | Family with sequence similarity 116, member B             | NM_001001794   | 3.27    |
| C1orf63        | Chromosome 1 open reading frame 63                        | NM_020317      | 3.35    |
| C1orf35        | Chromosome 1 open reading frame 35                        | NM_024319      | 3.12    |
| FAM71C         | Family with sequence similarity 71, member C              | NM_153364      | 3.00    |
| AMMECR1L       | AMME chromosomal region gene 1-like                       | NM_031445      | 3.21    |
| LRR48          | Leucine rich repeat containing 48                         | BC050419       | 3.11    |
| SLAIN2         | SLAIN motif family, member 2                              | BC031691       | 3.03    |
| C9orf71        | Chromosome 9 open reading frame 71                        | NM_153237      | 3.08    |
| C12orf45       | Chromosome 12 open reading frame 45                       | NM_152318      | 3.07    |

[0092]

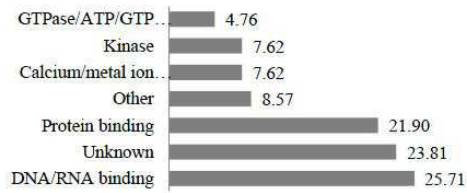
도면

도면1

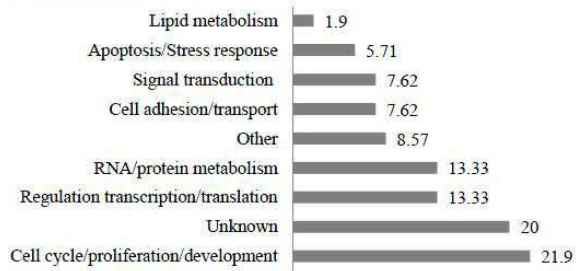


## 도면2

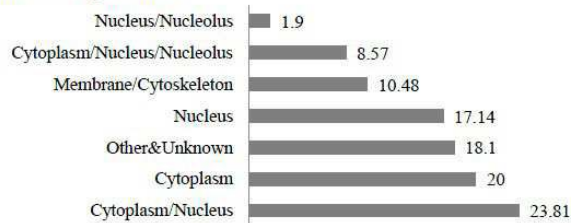
### A Molecular function



### B Biological process

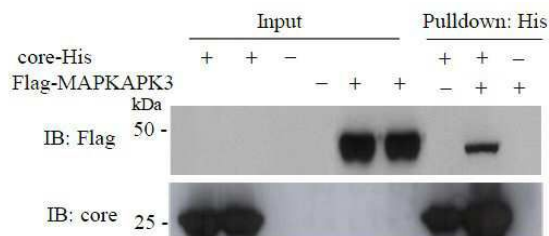


### C Cellular compartment



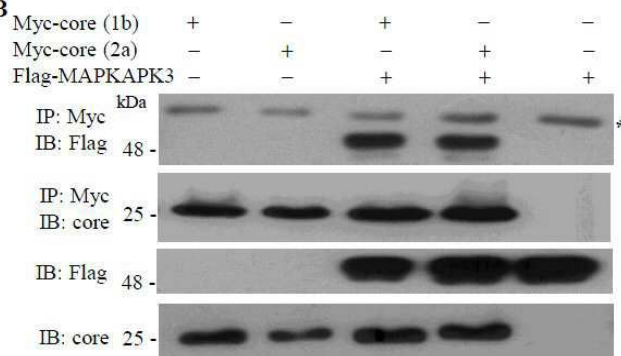
## 도면3a

### A

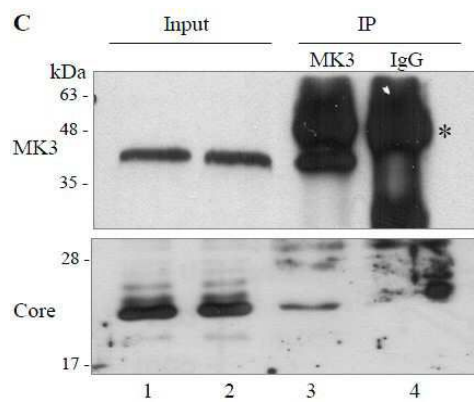


## 도면3b

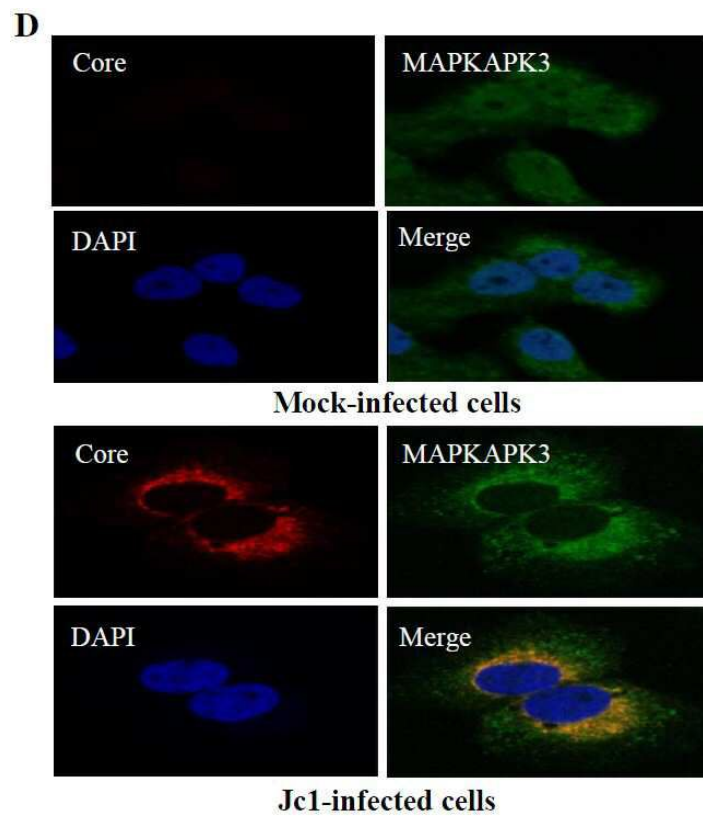
### B



도면3c

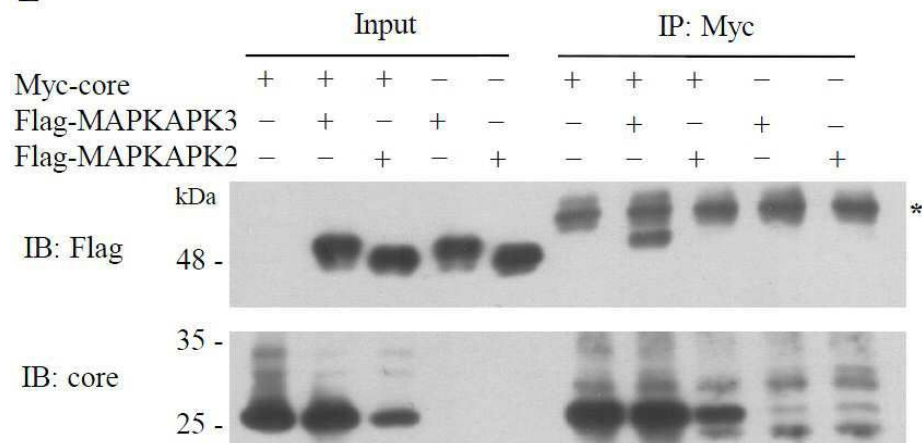


도면3d



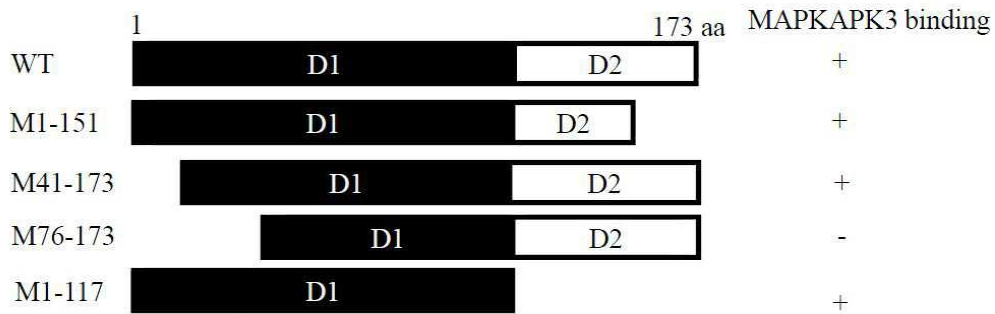
도면3e

**E**



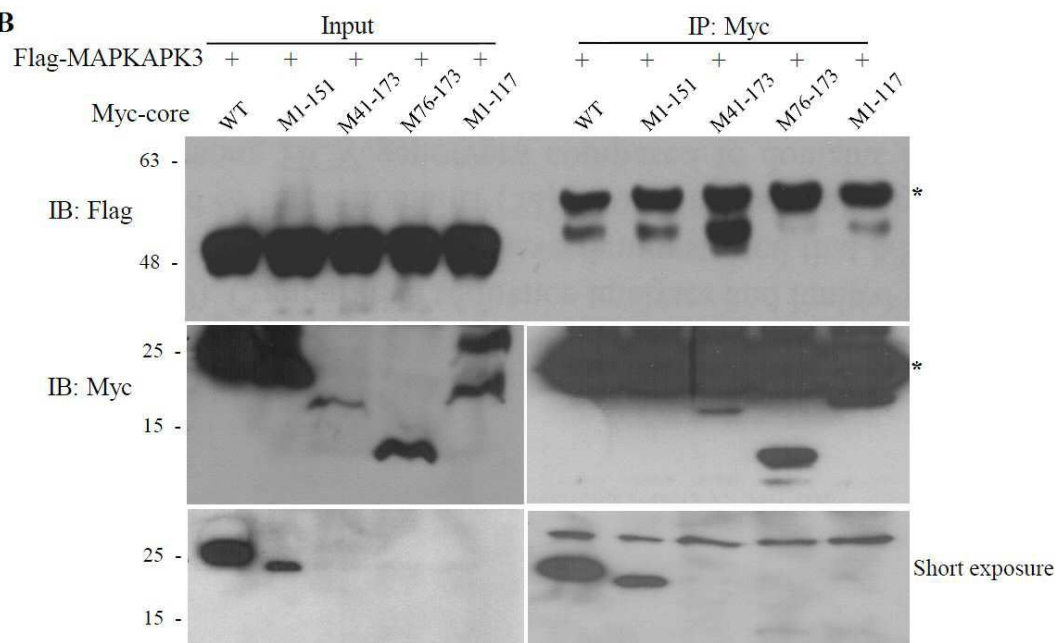
도면4a

**A**

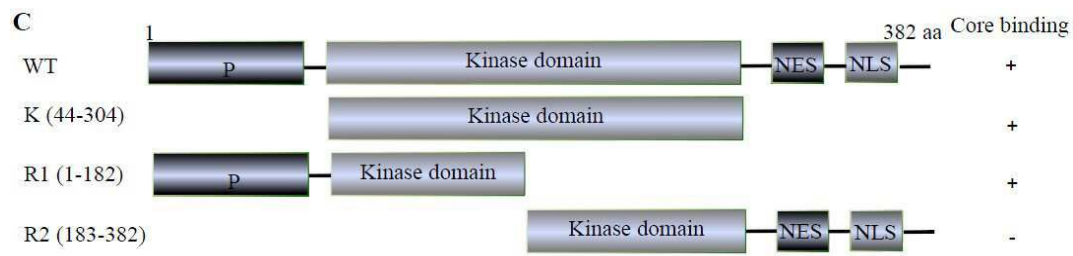


도면4b

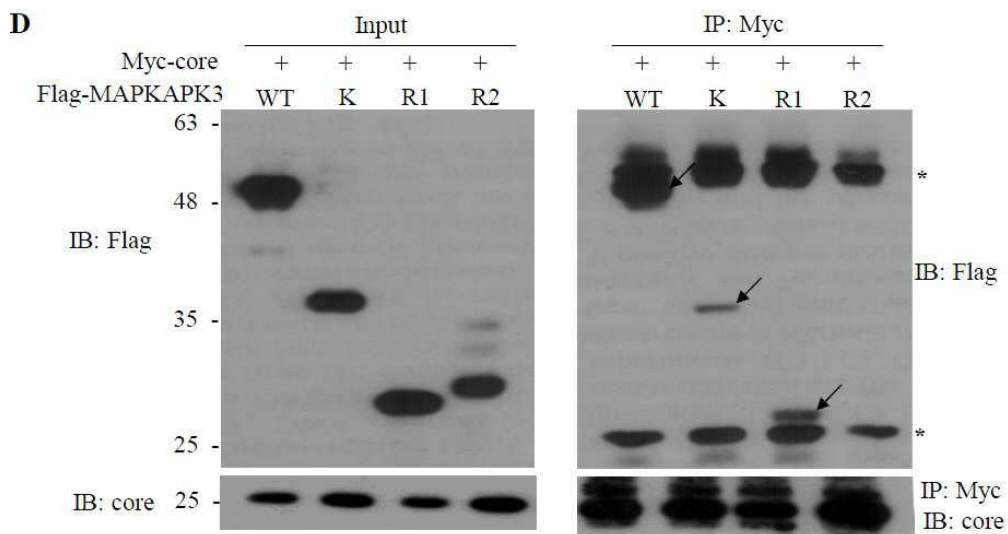
**B**



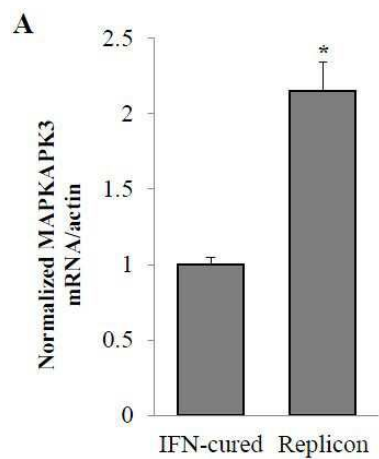
도면4c



도면4d

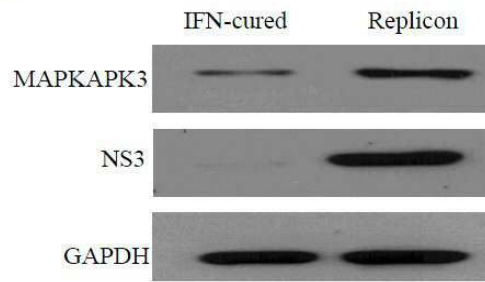


도면5a



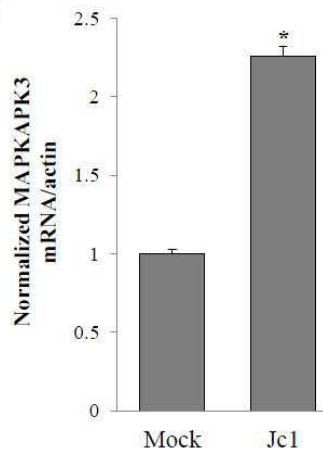
도면5b

**B**



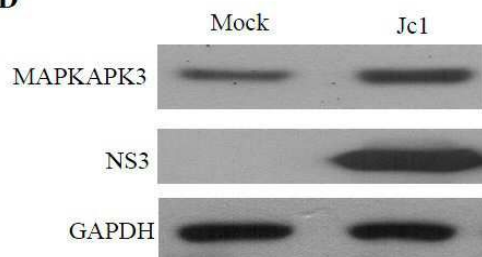
도면5c

**C**



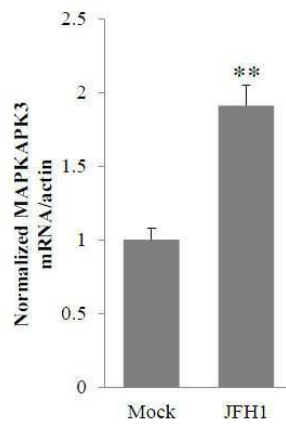
도면5d

**D**



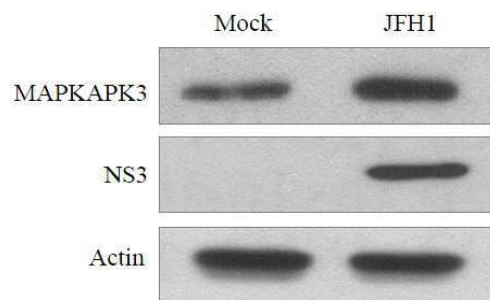
도면5e

**E**



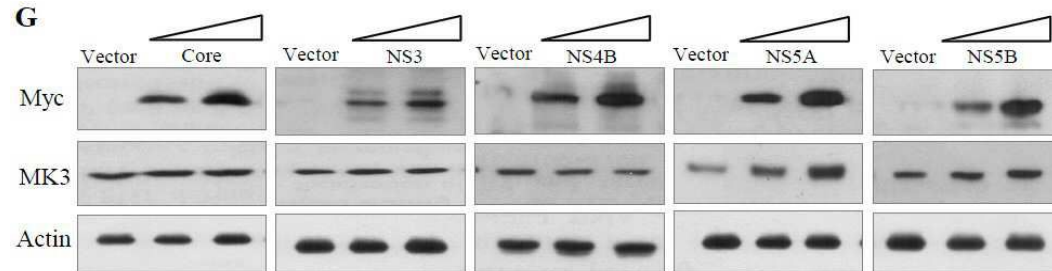
도면5f

**F**

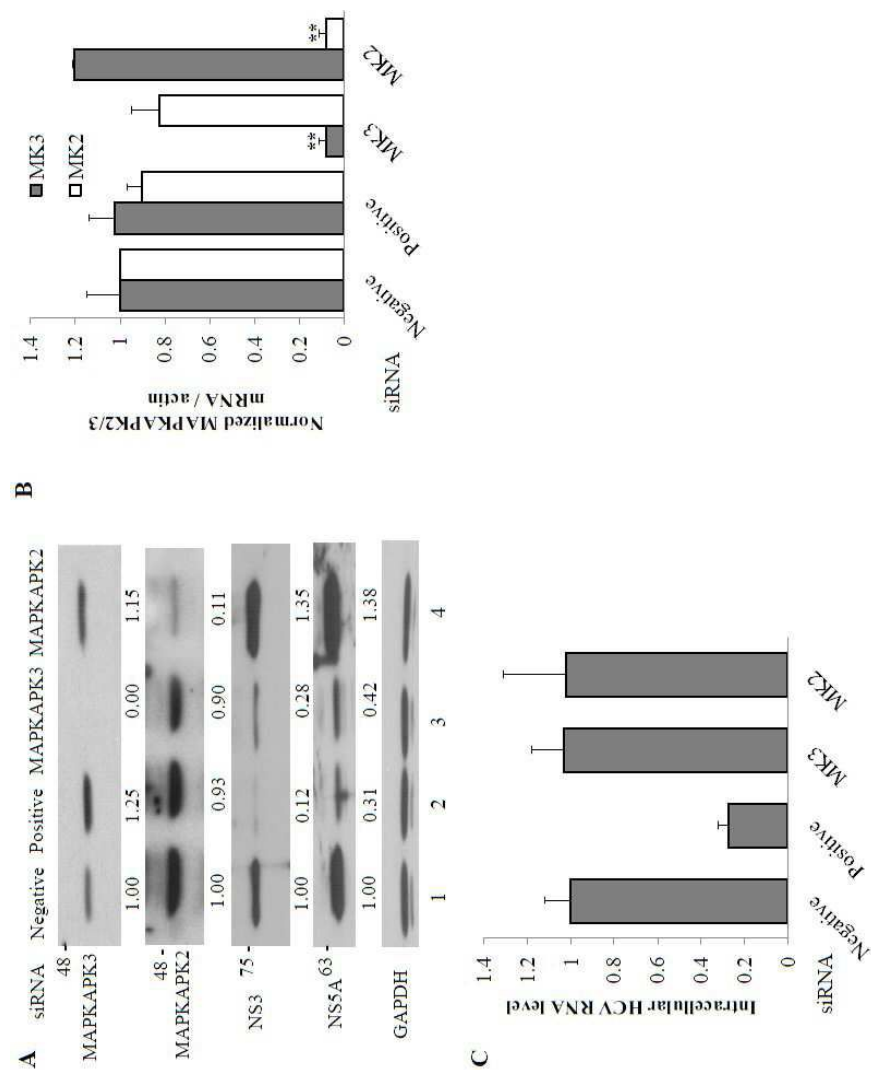


도면5g

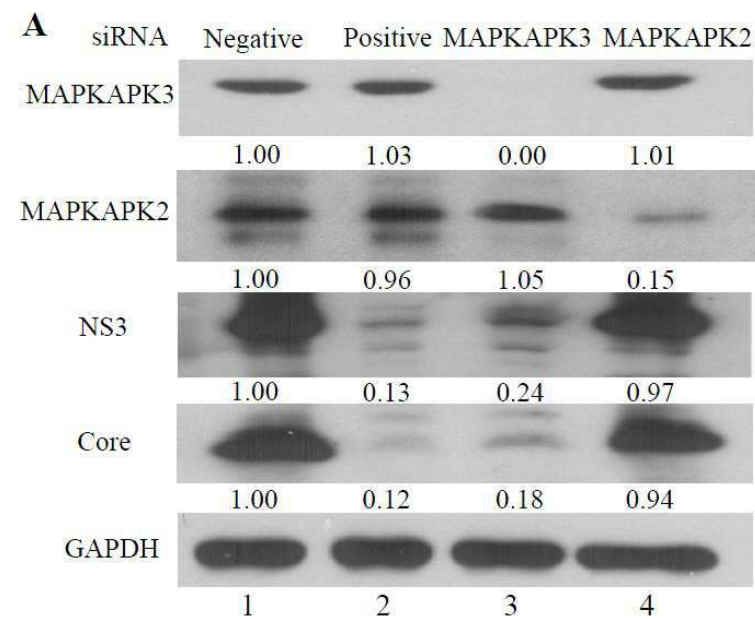
**G**



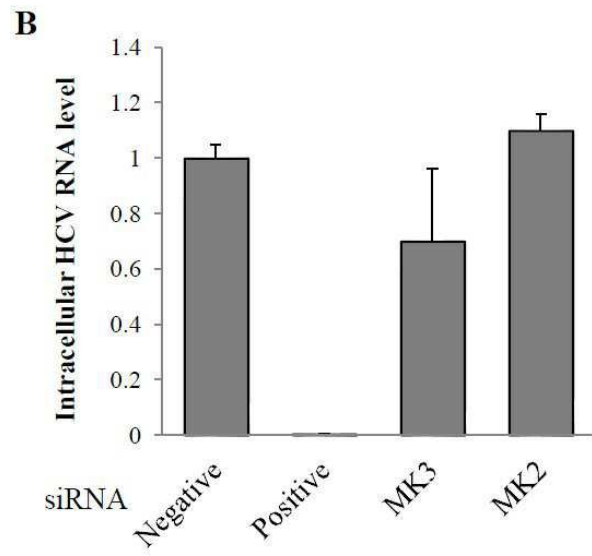
도면6



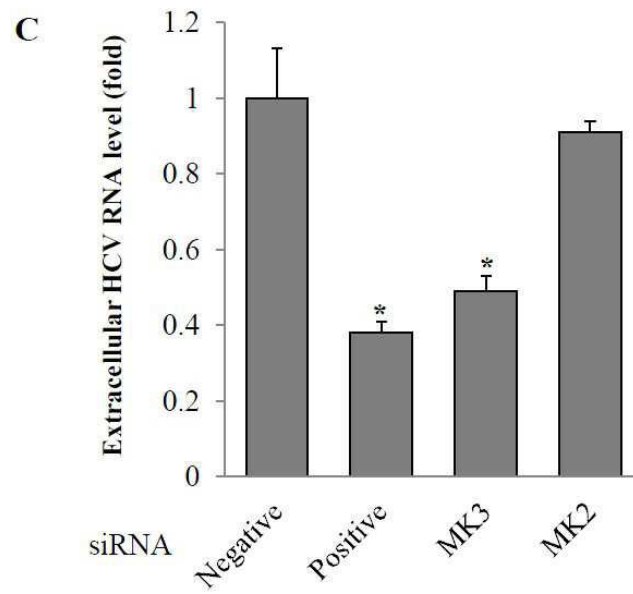
도면7a



도면7b

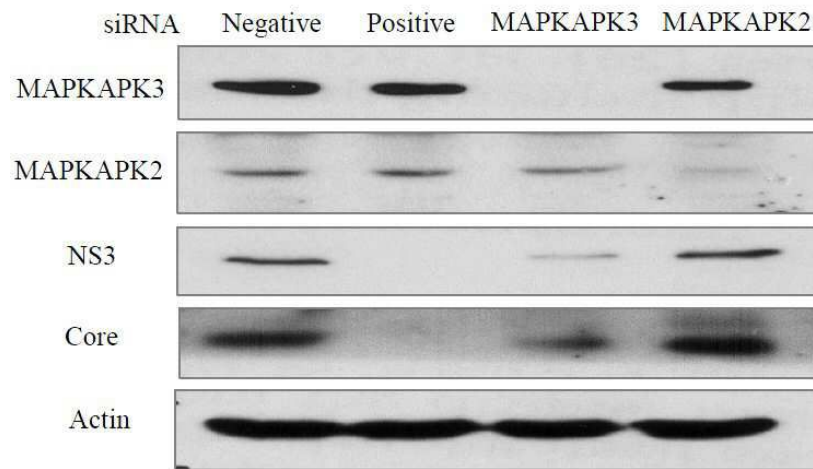


도면7c



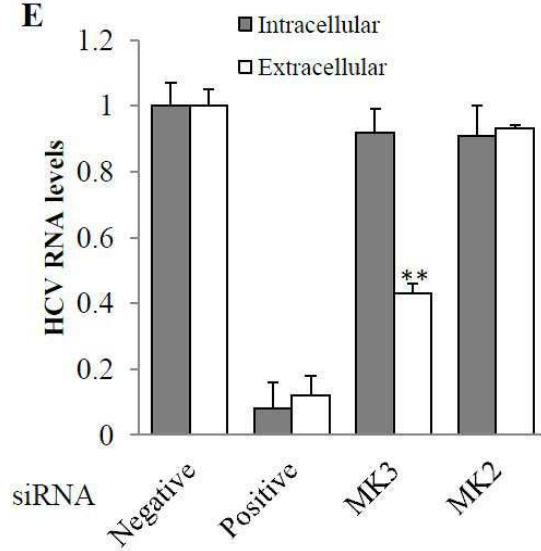
도면7d

**D**

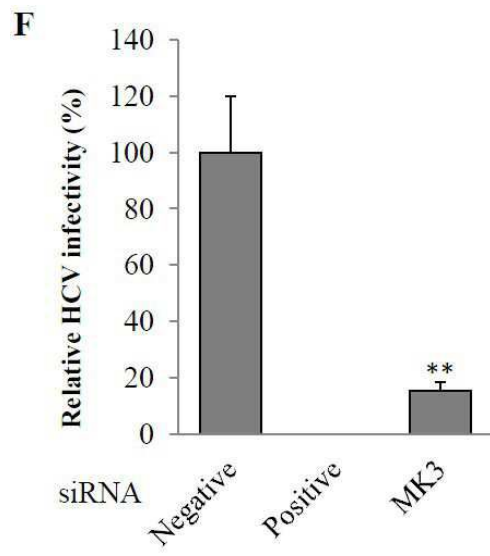


도면7e

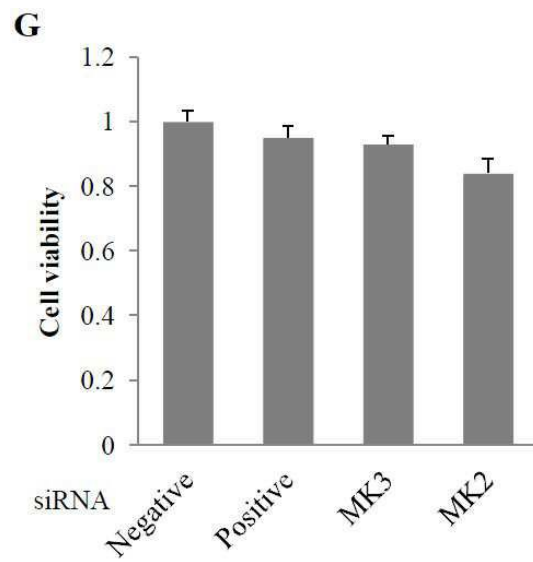
**E**



도면7f

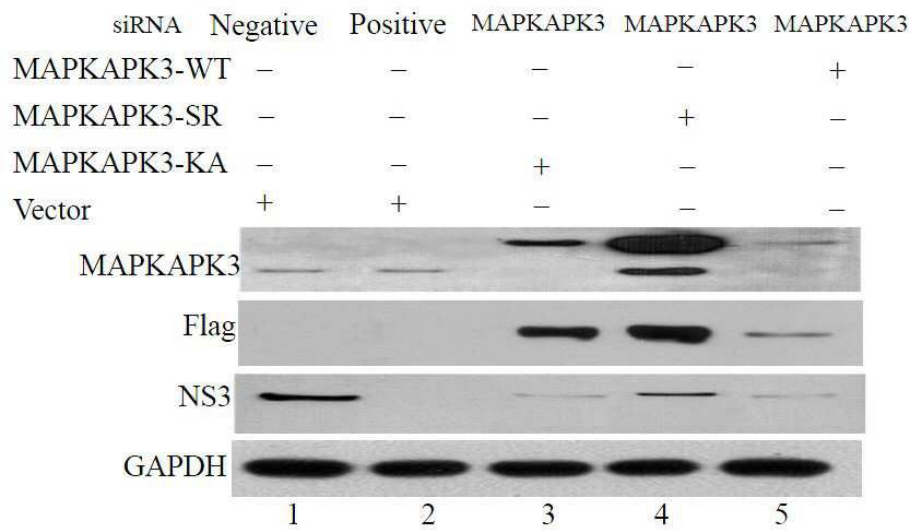


도면7g



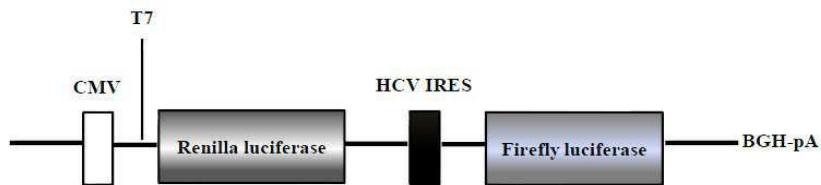
도면7h

H



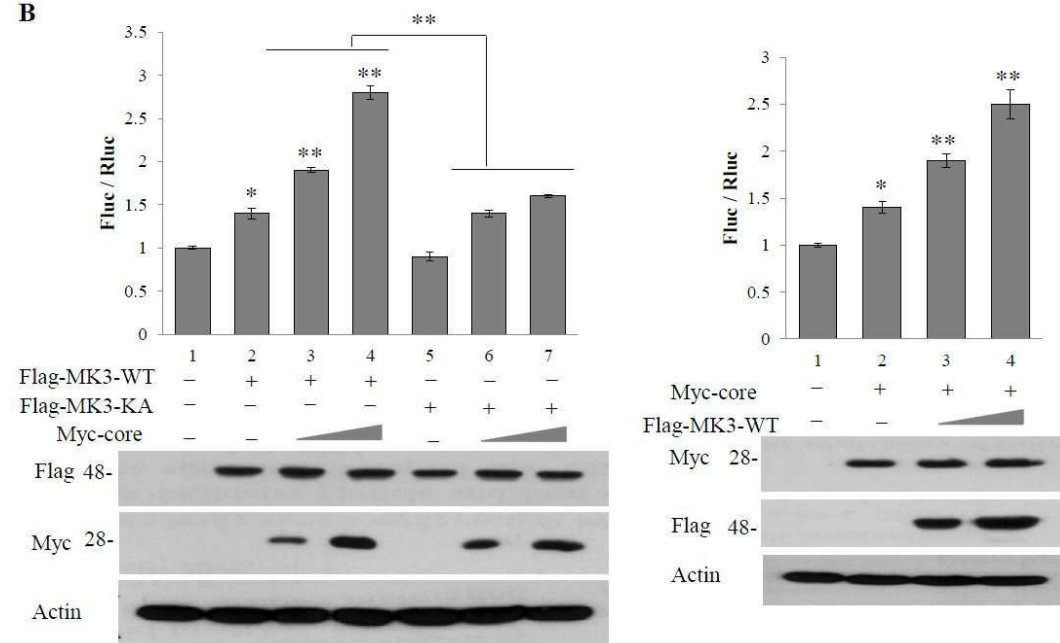
도면8a

A

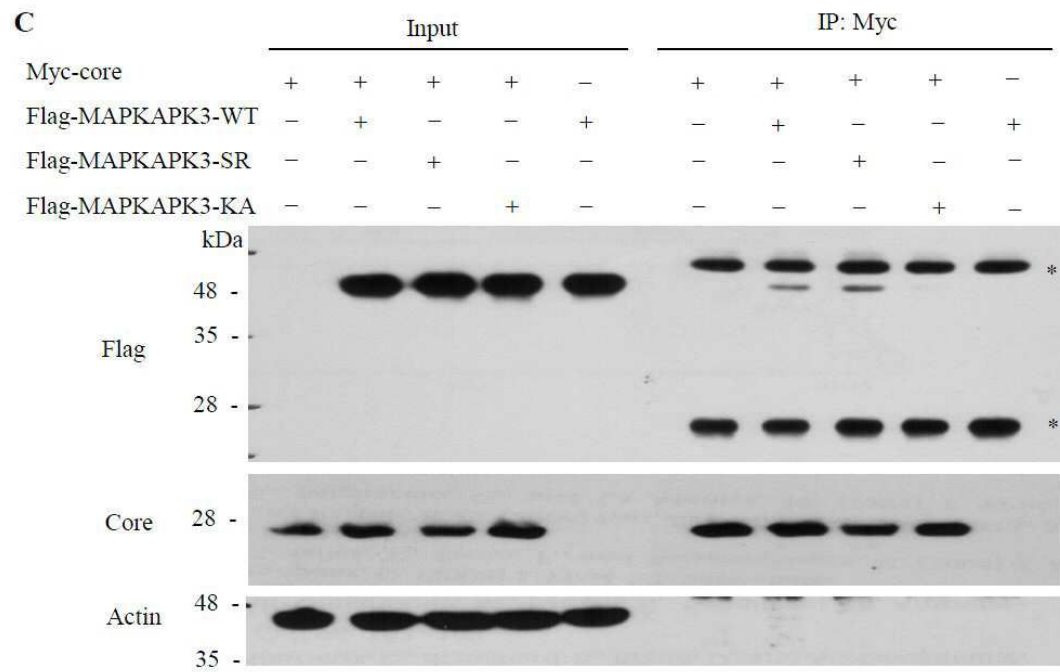


도면8b

B



도면8c





|                         |                               |    |
|-------------------------|-------------------------------|----|
| <400>                   | 1                             |    |
| ggaucaccca aucgauggu    |                               | 19 |
| <210>                   | 2                             |    |
| <211>                   | 19                            |    |
| <212>                   | RNA                           |    |
| <213>                   | Artificial Sequence           |    |
| <220><223>              | siRNA targetting MAPKAPK3     |    |
| <400>                   | 2                             |    |
| accaucgauu gguugauc     |                               | 19 |
| <210>                   | 3                             |    |
| <211>                   | 19                            |    |
| <212>                   | RNA                           |    |
| <213>                   | Artificial Sequence           |    |
| <220><223>              | siRNA targetting MAPKAPK2     |    |
| <400>                   | 3                             |    |
| acgagcagau caagauaaa    |                               | 19 |
| <210>                   | 4                             |    |
| <211>                   | 19                            |    |
| <212>                   | RNA                           |    |
| <213>                   | Artificial Sequence           |    |
| <220><223>              | siRNA targetting MAPKAPK2     |    |
| <400>                   | 4                             |    |
| uuuauucuuga ucugcucgu   |                               | 19 |
| <210>                   | 5                             |    |
| <211>                   | 21                            |    |
| <212>                   | RNA                           |    |
| <213>                   | Artificial Sequence           |    |
| <220><223>              | siRNA targetting 5'NTR of Jc1 |    |
| <400>                   | 5                             |    |
| ccucaaagaa aaaccaaacu u |                               | 21 |
| <210>                   | 6                             |    |
| <211>                   | 26                            |    |
| <212>                   | DNA                           |    |

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

atcaactagt gatgagcacg aatcct

26

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

attatctaga gcaaccgggc aagtt

25

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

gcaagcttat gagcacgaat cctaaacc

28

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

cgggatcctc aagagcaacc gggcaagttc

30

<210> 10

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

gcggatccga acaaaaactc atctcagaag aggatctgat gagcacgaat cctaaacc

58

<210> 11

<211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 11  
 cgtctagaag agcaaccggg caagttc 27  
 <210> 12  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 12  
 cgctctagaa tggatggtga aacagcag 28  
  
 <210> 13  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 13  
 atggatccct actggttggt gcagccc 27  
 <210> 14  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 14  
 accaccctg gatcaaccag agtatggtag tgccacagac cc 42  
 <210> 15  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 15

gggtctgtgg cactaccata ctctggttga tccaggggtg gt

42

<210> 16

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

gacagaagtg tgccctggcg ctctgtatg acagcc

36

<210> 17

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

ggctgtcata caggagcgcc agggcacact tctgtc

36

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

tgagtgtcgt acagcctcca

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

acgctactcg gctagcagtc

20

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 20

tgacagcagt cggttggagc g

21

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

gatttcctgt aacaacgcat ctcata

26