

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0128711 (43) 공개일자 2014년11월06일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 48/00 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)	(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)	
(21) 출원번호 10-2013-0047469	(72) 발명자 황순봉 경기도 안양시 동안구 귀인로 237, 대림아파트 210동 1703호	
(22) 출원일자 2013년04월29일 심사청구일자 2013년04월29일	이한솔 경기 안양시 동안구 귀인로82번길 45-11, 201호 (호계동)	
	(74) 대리인 강성혜	

전체 청구항 수 : 총 3 항

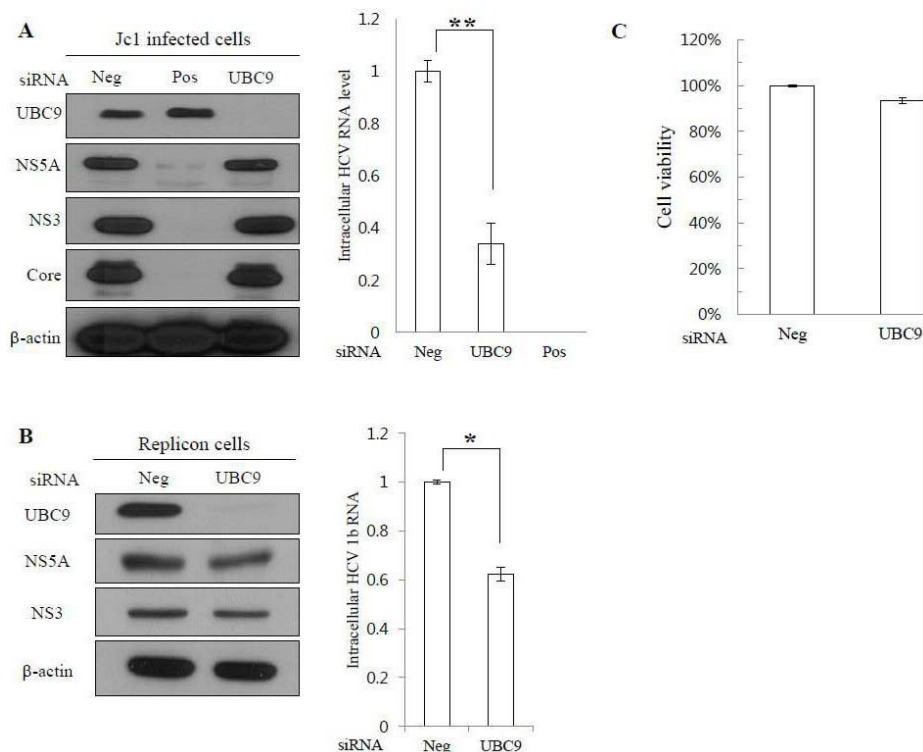
(54) 발명의 명칭 SUMO화 저해제 또는 탈SUMO화제를 포함하는 C형 간염 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

SUMO화는 타겟 단백질에 기능적 유연성을 제공한다. 바이러스는 자신의 증식을 위해 세포의 SUMO화 장치를 이용한다. 본 발명자들은 NS5A가 SUMO의 타겟 단백질을 밝혔다. NS5A SUMO화는 HEK293T 세포 및 Huh7.5 세포에서 확인되었다. NS5A는 SENP1 및 SENP2에 의해 탈SUMO화되었다. 맵핑 데이터는 HCV NS5A가 348 라이신 잔기에서

(뒷면에 계속)

대표도



SUMO화됨을 보여준다. 또한, NS5A SUMO화 및 인산화는 상호의존적 관계에 있어서 이들 두 가지 번역후 변형 간에 교신이 있음을 말해준다. 본 발명자들은 SUMO화가 유비퀴틴화를 저해함으로써 NS5A 단백질 안정성을 증가시킴을 밝혔고, SUMO화는 NS5B와의 단백질 상호작용에도 필요함을 밝혔다. 이 데이터들은 SUMO화 변형이 HCV 복제에 기여함을 암시한다. 실제로, UBC9 침묵화는 Jc1-감염 세포에서 HCV 복제를 손상시켰고, SUMO-결합 서브게놈 레플리콘 세포에서 HCV 복제 수준 또한 현저히 감소하였다. 종합하면, 이 데이터들은 HCV 복제는 NS5A SUMO화 변형에 의해 조절됨을 말해준다.

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

SUMO화 저해제 또는 탈SUMO화제를 포함하는 C형 간염 예방 및 치료용 약학 조성물

청구항 2

청구항 1에 있어서,

SUMO화 저해제는 SUMO(UBC9)에 대한 siRNA 및 TBB (4, 5, 6, 7-Tetrabromobenzotirazole) 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는, C형 간염 예방 및 치료용 약학 조성물

청구항 3

청구항 1에 있어서,

탈SUMO화제는 SENP1(SUMO 특이적 프로테아제 1), SENP2 (SUMO 특이적 프로테아제 2), SENP1을 암호화하는 유전자 및 SENP2를 암호화하는 유전자 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는, C형 간염 예방 및 치료용 약학 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 SUMO화 저해제 또는 탈SUMO화제를 포함하는 C형 간염 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0002]

배경기술

[0003] C형 간염 바이러스 (HCV)는 A형 및 B형이 아닌 간염의 주요 원인이다. C형 간염 바이러스 감염은 종종 만성 간염, 간경화 및 간암 (hepatocellular carcinoma; HCC)을 일으킨다. HCV는 플라비비리대 (Flaviviridae) 과, 헤파시바이러스 (Hepacivirus) 속에 속한다 (Giannini C, Brechot C. 2003. Cell Death Differ. Suppl 1:S27-38, Suzuki T. et al., 2007. Adv. Drug Deliv. Rev. 59:1200-1212, Lindenbach B.D. et al., 2005. Nature. 436:933-938). HCV 게놈은 양성-센스, 단일가닥의 9,600개의 RNA 염기로 이루어져 있고 단일 오픈 리딩 프레임 으로부터 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 단백질에 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. HCV가 만성화하는 병원균임에도 불구하고 아직까지 효과적인 백신이 개발되지 않았다. 최근의 표준적 치료법은 PEG가 결합된 인터페론- α 와 리바비린 (ribavirin)의 조합이다. 최근 두 가지 HCV NS3/4A 프로테아제 저해제인 보세프레비르 (boceprevir)와 텔라프레비르 (telaprevir)가 통용되고 있다. 그러나, 이들 항바이러스제는 부작용이 있고, 몇몇 HCV 유전자형에만 지속적인 반응을 나타낸다. 바이러스는 숙주의 번역후 변형을 이용하는 다양한 기작을 발전시켜왔으므로, HCV 단백질에서 번역후 변형의 새로운 타입을 확인하는 것은 HCV 복제 기작을 통찰하고 좀더 효과적인 치료전략을 개발하기 위한 대안이 될 수 있다.

[0004] 인산화, 당질화, 아세틸화, 메틸화, 아이소프레닐화, SUMO화 및 유비퀴틴화와 같은 번역후 변형은 역동적으로 단백질 활성을 조절하는데 널리 이용되어 왔다. SUMO (Small ubiquitin-related modifier 또는 small ubiquitin-like modifier)는 번역후 변형 단계에서 타겟 단백질에 공유결합한다 (Kim J.H. et al., 2006. Nat. Cell Boil. 8:631-639). SUMO는 타겟 단백질의 라이신 잔기에 공유결합하는 약 11.5 kDa의 분자이다. SUMO는 공통서열 모티프 Ψ KxE(여기에서 Ψ 는 소수성 잔기이고, x는 어떤 잔기라도 가능하다) 내의 기질 타겟 라이신에

결합한다 (Wilkinson KA, Henley JM. 2010. Biochem. J. 428:133-145). 인간 게놈에 의해 코딩되는 네 가지 SUMO 아이소폼은 다음과 같다: SUMO1/Smt3C, SUMO2/Smt3A, SUMO3/Smt3B 및 SUMO4 (Andreou AM, Tavernarakis N. 2009. Biotechnol. J. 4:1740-1752, Geiss-Friedlander R, Melchior F. 2007. Concepts in sumoylation: a decade on. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8:947-956). SUMO화는 하나의 E1 활성화 효소, 하나의 E2 결합효소 (Ubc9) 및 하나의 E3 연결효소에 의해 수행된다 (Andreou AM, Tavernarakis N. 2009. Biotechnol. J. 4:1740-1752). SUMO화는 단백질 턴오버, 세포내 위치 및 단백질 상호작용을 바꿈으로써 다양한 세포 기능을 조절할 수 있는 역동적이고 가역적인 과정이다. 주어진 시간에 SUMO화된 형태의 단백질은 단지 5~10%뿐이라고 보고된바 있다 (Bentz GL, Shackelford J, Pagano JS. 2012. J. Virol. 86:12251-12261). SUMO화된 단백질은 전사 조절, 핵-세포질간 이송, 단백질 안정성, 스트레스 반응, 신호전달 및 종양발생 및 진행에 관여한다 (Andreou AM, Tavernarakis N. 2009. Biotechnol. J. 4:1740-1752, Geiss-Friedlander R, Melchior F. 2007. Concepts in sumoylation: a decade on. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8:947-956, Johnson E.S. 2004. Annu. Rev. Biochem. 73:355-382). SUMO-1의 단백질 발현수준은 비종양성 간조직과 비교해서 간암에서 현저히 높은 것으로 보고되었다 (Guo W.H. et al., 2011. J. Cancer. Res. Clin. Oncol. 137: 533-541). 뿐만 아니라, 유비퀴틴화 및 SUMO화에 관여하는 유전자들 또한 간암세포에서 과발현되었다 (Lee J.S. et al., 2004. Gastroenterology. 127:S51-S55).

[0005] 또한, 많은 바이러스 단백질들이 SUMO에 의해 변형되며, SUMO화가 바이러스 증식과 관련되어 있다고 알려져 있다. SUMO-1에 의한 Epstein-Barr 바이러스 BZLF1 단백질의 SUMO화는 그 전사활성을 조절한다 (Murata T. et al., 2010. J. Biol. Chem. 285:23925-23935). SUMO-1의 Gag 폴리단백질 p6와의 공유결합은 HIV-1 복제에 불리하다 (Gurer C, Berthoux L, Luban J. 2005. J. Virol. 79:910-917). 로타바이러스는 바이러스 복제 및 바이러스 단백질 생산을 용이하게 하기 위해 세포 SUMO화 장치를 이용하였다 (Campagna M. et al., 2013. J. Virol. 87:807-817). SUMO-1이 결합된 간염 델타 바이러스의 S-HDAg는 게놈 RNA 및 mRNA 합성을 선택적으로 촉진하지만, 안티게놈 RNA 합성은 촉진하지 않는다 (Tseng C.H. et al., 2010. J. Virol. 84:918-927).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 종래 C형 간염 예방 또는 치료제의 문제점을 해결하고, 좀더 효과적인 C형 간염 예방 또는 치료제를 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명자들은 다른 HCV 단백질이 아닌 HCV NS5A 단백질이 SUMO화되며, 이 SUMO화는 NS5A 단백질의 348번 라이신 잔기에서 일어남을 밝혔다. NS5A의 SUMO화는 인산화와 관련되어 있다. SUMO화는 또한 NS5A의 단백질 안정성을 증가시킨다. 중요한 것은 SUMO화 시스템 침묵이 HCV 증식을 손상시켰다는 점이다. 본 발명자들은 최초로 HCV가 자신의 증식을 위해 세포의 SUMO화 장치를 이용했음을 밝혔다. SUMO화는 전사 활성화, 단백질 안정화, 핵-세포질간 위치화 (nuclear-cytosolic localization) 및 단백질-단백질 상호작용을 포함하는 많은 세포 과정에 관여하는 번역후 변형의 한 가지이다 (Johnson E.S. 2004. Annu. Rev. Biochem. 73:355-382, Hay R.T. 2005. Mol. Cell. 18:1-12, Buschmann T. et al., 2000. Cell. 101:753-762, Girdwood D.W.H et al., 2004. Seminars in Cell & Developmental Biology. 15:201-210).

[0008] 많은 바이러스들은 자신의 증식을 위해 숙주세포 SUMO화 장치를 이용한다 (Marusic M.B. et al., 2010. J. Virol. 84:11585-11589, Xu K. et al., 2011. J. Virol. 85:1086-1098, Wu C.Y. et al., 2011. J. Virol. 85:6618-6628). 작은 간염 델타 항체 (Small hepatitis delta antigen; S-HDAg)는 SUMO-1에 의해 변형된 다음 SUMO화된 S-HDAg는 HDV 게놈 RNA 및 mRNA 합성을 선택적으로 증대시켰다 (Tseng C.H. et al., 2010. J. Virol. 84:918-927). 로타바이러스의 바이로플라زم 단백질들 또한 바이러스 복제를 조절하기 위해 SUMO화된 (Campagna M. et al., 2013. J. Virol. 87:807-817). Epstein-Barr 바이러스는 자신의 이익을 위해 세포 SUMO화 시스템을 이용한다 (Murata T. et al., 2010. J. Biol. Chem. 285:23925-23935). 그러나, HCV 복제를 위한 SUMO화의 관련성은 아직까지 알려지지 않았다.

[0009] 본 발명자들은 다른 HCV 단백질은 그렇지 않고, NS5A가 HEK293T 세포 및 Huh7.5 세포 모두에서 세포 SUMO 변형

시스템을 이용하여 SUMO화됨을 밝혔다. 흥미롭게도, NS5A의 SUMO화는 Huh7.5 세포에서는 SUMO-1에 의해 주로 매개된 반면, HEK293T 세포에서는 SUMO-2에 의해 강하게 SUMO화되었다. 이는 두 개의 서로 다른 세포주 간에 SUMO 이형체 단백질 발현 수준의 차이에 기인하는 것으로 보인다. 또한, 본 발명자들은 NS5A SUMO화가 라이신 348 잔기에서 이루어짐을 밝혔다. 또, 본 발명자들은 K348R 변이의 분자량은 야생형 NS5A에 비하여 작음을 밝혔는데, 이는 다른 번역후 변형이 NS5A 분자량 변경에 영향을 미쳤을 가능성을 제시한다. NS5A가 인단백질이기 때문에, 본 발명자들은 K348R 변이와 야생형 NS5A 각각을 λ -포스파티드로 처리하여 단백질 분자량을 비교하였다. 실제로 탈인산화된 야생형 NS5A와 K348T 변이의 단백질 분자량은 같았다 (~50 kDa) (데이터 나타내지 않음). 이 결과는 SUMO화가 NS5A의 인산화와 관련되어 있음을 제시한다.

[0010] 많은 증거들은 SUMO화가 인산화 및 유비퀴틴화와 관련되어 있음을 보여준다. I κ B α 의 SUMO화가 단백질을 안정화시켜 신호에 의해 유도되는 NF κ B 활성화를 저해한 반면, 인산화는 I κ B α 의 SUMO화를 저해하여 유비퀴틴화를 유도하고 이어 프로테아좀-매개 분해를 유도하였다 (Desterro JM, Rodriguez MS, Hay RT. 1998. Mol. Cell. 2:233-239). 한편, 인산화는 RNF4의 결합을 막음으로써 전사인자 Sp1을 안정화하여 Sp1이 분해되는 것을 보호하는 반면, Sp1 SUMO화는 프로테아좀 분해의 대상이 되었다 (Wang Y.T. et al., 2011. J. Mol. Biol. 414:1-14). FEN1 단백질에서 인산화, SUMO화 및 유비퀴틴화는 세포 사이클을 정확히 진행시키기 위해 순차적으로 일어났다 (Guo Z. et al., 2012. Mol. Cell. 47:444-456). HCV에서 NS5A의 SUMO화는 인산화에 의해 양(+)으로 조절되었다. 본 발명자들은 SUMO화 수준이 인산화-결합 변이에서 현저히 감소하였고, 인산화 또한 SUMO-결합 NS5A 변이(K348R)에서 손상됨을 밝혔고, 이는 NS5A 단백질에서 SUMO화 및 인산화가 서로 관련이 있음을 제시한다. SUMO화는 또한 TBB 존재 하에 NS5A 발현 세포에서 현저히 감소하였다. 비록 SUMO화와 관련된 정확한 인산화 부위는 알려지지 않았지만, 이 데이터들은 NS5A의 인산화와 SUMO화 간에 교신이 있음을 제시한다. 많은 SUMO 기질들은 SUMO 공통 부위 및 프롤린-지시 인산화 부위 (YKxExxSP)를 포함하는 매우 보존적인 모티프를 가지고 있다. 이 매우 보존적인 모티프는 열충격 인자, GATA-1 및 모노사이트 강화인자 2의 인산화-의존적 SUMO화를 조절한다 (Hietakangas V. et al., 2006, PNAS. 103:45-50). 한편, 다른 연구팀은 기질의 인산화와 SUMO화 간의 교신은 그러한 모티프에 의존적이지 않음을 보고하였다 (Vanhatupa S. et al., 2008. Biochem. J. 409:179-185). NS5A가 몇몇 세포 단백질 카이네이즈에 의해 차등을 두어 인산화되기 때문에 (Huang Y. et al., 2007. Virology. 364:1-9), 본 발명자들은 다양한 세포 카이네이즈들이 간접적으로 NS5A SUMO화를 조절할 것이라는 가능성을 배제할 수 없다. 종합하면, NS5A의 SUMO화와 인산화 간의 교신은 HCV 복제에서 결정적인 역할을 수행한다.

[0011] 다음으로 본 발명자들은 NS5A 단백질 안정성 및 단백질-단백질 상호작용에 대한 SUMO화 관련 가능성을 연구하였다. 우리는 SUMO-결합 변이 NS5A 단백질이 빠르게 분해됨을 발견하였다. 뿐만 아니라, 야생형 및 SUMO가 제 기능을 하는 NS5A 변이와 비교하여 SUMO-결합 변이에서는 유비퀴틴화 수준이 증가하였음을 밝혔다. 이는 NS5A 단백질 안정성이 유비퀴틴화 공정 억제제를 통하여 SUMO화에 의해 조절됨을 제시한다. 본 발명자들은 다음으로 단백질-단백질 상호작용에 대한 NS5A SUMO화의 효과를 시험하였다. NS5A는 NS5B와 상호작용하여 HCV 복제 복합체를 형성하기 때문에 (Shirota Y. et al., 2002. J. Biol. Chem. 277:11149-11155), 본 발명자들은 NS5A 및 NS5B 간의 단백질 상호작용에 대한 SUMO화 효과를 연구하여 NS5B가 야생형 NS5A와 강하게 상호작용함을 확인하였다. 하지만, SUMO-결합 NS5A는 NS5B와 상호작용하지 않아 SUMO화가 단백질 상호작용에 중요한 역할을 수행함을 알 수 있었다. 이 데이터들은 SUMO화가 NS5A의 안정화를 증대시키며, 그 결과 NS5B와의 단백질 상호작용에 긍정적인 영향을 초래함을 말해준다.

[0012] HCV 복제에 대한 SUMO화의 영향을 알아보기 위해 본 발명자들은 야생형 HCV 레플리콘 또는 SUMO-결합 HCV 레플리콘이 들어있는 세포의 HCV RNA 수준을 분석하였다. 우리는 야생형 레플리콘 세포와 비교할 때 SUMO-결합 HCV 레플리콘 세포에서 HCV RNA 수준이 현저히 감소하였음을 밝혔다. 또한, 우리는 SUMO-결합 변이 (K348R)가 장기 간 배양조건에서는 야생형으로 지속적으로 되돌아감을 밝혔으며, 이는 SUMO화가 HCV 생존에 필수적일 수 있음을 암시한다. 이러한 이유로, 우리는 SUMO-결합 감염성 HCV 클론의 확립은 불가능함을 밝혔다. 종합하여, 우리는 최초로 HCV 복제가 NS5A의 SUMO 변형에 의하여 조절됨을 밝혔다. NS5A 단백질 안정 및 HCV 복제에 대한 SUMO 변형의 중요성을 고려할 때 SUMO화 경로는 HCV 증식 유지에 중요한 시스템을 보여준다. 그러므로, NS5A SUMO화는 HCV 치료제 또는 치료방법의 가능성 있는 타겟을 제공해줄 수 있을 것으로 기대된다.

[0013] 본 발명은 SUMO화 저해제 또는 탈SUMO화제 (deSUMOylation reagent)를 포함하는 C형 간염 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 상기 SUMO화 저해제는 특별한 제한은 없으나, 예컨대 SUMO(UBC9)에 대한 siRNA 및 TBB (4, 5, 6, 7-

Tetrabromobenzotirazole) 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 한다. SUMO(UBC9)에 대한 siRNA에 대해서는 구체적인 서열은 기재하지 않았지만, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이러한 siRNA 제조는 용이하므로, 구체적인 서열 및 제조방법의 기재는 생략한다.

- [0015] 상기 탈SUMO화제는 SENP1(SUMO 특이적 프로테아제 1), SENP2 (SUMO 특이적 프로테아제 2), SENP1을 암호화하는 유전자 및 SENP2를 암호화하는 유전자 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 한다.
- [0016] SUMO화 저해제는 SUMO(UBC9)에 대한 siRNA(Small Interfering RNA)일 수 있다. 상기 siRNA의 염기서열은 SUMO(UBC9) 유전자(mRNA)의 염기서열 중 연속된 19~23개의 연속된 염기서열일 수 있다.
- [0017] 상기 siRNA의 서열은 편의상 정방향 서열(sense strand)을 나타낸 것으로, 실제 유전자 억제효과를 나타내는 역방향 서열(antisense strand)과 함께 이중리보핵산쇄를 구성하게 된다.
- [0018] 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.
- [0019] 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.
- [0020] C형 간염 치료를 위해 사용되는 본 발명의 유전자 (mRNA 포함) 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.
- [0021] 상기 SUMO 저해제 또는 탈SUMO화제는 siRNA 외에도 상기 유전자의 발현을 억제하는 물질이면 어떤 것이든 가능하다.
- [0022] 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.
- [0023] 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.
- [0024] 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.
- [0025] 또한 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용되는 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0026] 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 개시

되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

- [0027] 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.
- [0028] 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.
- [0029] 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 SENP1 또는 SENP2 유전자인 경우 0.01ng/kg~10mg/kg, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 SENP1 또는 SENP2 유전자는 알려진 염기서열 중 하나 이상의 염기가 결실, 치환 또는 삽입된 염기서열일 수 있다.
- [0031] 상기 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.
- [0032] 본 발명에서 유전공학 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.
- [0033] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 방사선 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법 등과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0034] 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

- [0035] 본 발명자들은 NS5A가 SUMO의 타겟 단백질을 밝혔다. NS5A SUMO화는 HEK293T 세포 및 Huh7.5 세포에서 확인되었다. NS5A는 SENP1 및 SENP2에 의해 탈SUMO화되었다. 맵핑 데이터는 HCV NS5A가 348 라이신 잔기에서 SUMO화를 보여준다. 또한, NS5A SUMO화 및 인산화는 상호의존적 관계에 있어서 이들 두 가지 번역후 변형 간에 교신이 있음을 말해준다. 본 발명자들은 SUMO화가 유비퀴틴화를 저해함으로써 NS5A 단백질 안정성을 증가시킴을 밝혔고, SUMO화는 NS5B와의 단백질 상호작용에도 필요함을 밝혔다. 이 데이터들은 SUMO화 변형이 HCV 복제에 기여함을 암시한다. 실제로, UBC9 침묵화는 Jc1-감염 세포에서 HCV 복제를 손상시켰고, SUMO-결함 서브게놈 레플리콘 세포에서 HCV 복제 수준 또한 현저히 감소하였다. 종합하면, 이 데이터들은 HCV 복제는 NS5A SUMO화 변형에 의해 조절됨을 말해준다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1은 UBC9 침묵이 HCV RNA 복제를 손상시킴을 나타낸다. (A, B) Huh7.5 세포는 25 nM의 지시된 siRNA로 트랜

스펙션시킨 다음 24시간 후 Jc1으로 감염시켰다. 감염 2일 후 단백질 발현은 면역블랏분석으로 결정하였다 (A, 좌측 패널). 세포내 HCV RNA는 qPCR로 결정하였다 (A, 우측 패널). 레플리콘 세포는 음성 또는 UBC9 siRNA로 트랜스펙션시켰다. 72시간 후 세포 용균액은 지시된 항체로 면역블랏팅하였다 (B, 좌측 패널). 세포내 HCV RNA 수준은 qPCR로 결정하였다 (B, 우측 패널). 값은 두 번의 독립된 실험의 평균 $\pm$ 표준편차이다. 별표는 음성 siRNA로 처리한 세포와의 유의미한 차이를 나타낸다 (*, $P < 0.05$; **, $p < 0.01$). (C) Huh7.5 세포는 25 nM의 음성 또는 UBC9 siRNA로 트랜스펙션시켰다. 96시간 후 세포 생존율을 MTT 분석으로 평가하였다.

도 2는 NS5A가 SUMO-1 및 SUMO-2 양쪽 모두에 의해서 SUMO화됨을 보여준다. (A) HEK293T 세포는 각각 Xpress-표지된 SUMO-1,2,3의 부재 또는 존재 하에 지시된 플라스미드 (Myc-표지된 코어, NS3, NS4B, NS5A 및 NS5B) 및 Flag-표지된 UBC9으로 코트랜스펙션되었다. 36시간 후 세포를 모아 지시된 항체를 이용하여 면역블랏 분석하였다. 세포표는 SUMO화된 NS5A를 나타낸다. 화살표는 단일-SUMO 단백질을 나타낸다. (B,C) HEK293T 세포는 HCV 유전자형 1b (B) 또는 2a (C) 유래 Myc-표지된 NS5A 및 SUMO 발현 플라스미드로 코트랜스펙션되었다. 36시간 후, 세포 용균액은 항-Myc 항체로 면역침전되었고, 결합된 단백질은 항-Xpress 또는 항-Myc 항체로 면역블랏팅하였다. (D) Huh7.5 세포는 Myc-표지된 NS5A 및 SUMO 발현 플라스미드로 코트랜스펙션되었다. 36시간 후 세포 용균액은 지시된 항체로 면역블랏팅하였다 (좌측). 총 세포 추출액은 항-Myc 항체로 면역침전시켰고 결합된 단백질은 항-Xpress 또는 항-Myc 항체로 면역블랏팅하였다 (우측). (E) Huh7.5 세포는 서브게놈 HCV RNA (Con1)로 트랜스펙션하고 G418 함유 배지에서 5주 동안 배양하였다. 감염되어보지 않은 Huh7.5 세포 또는 HCV 레플리콘이 들어있는 세포를 모아 지시된 항체로 면역블랏팅하였다 (좌측 패널). 총 세포 추출액은 토끼 항-NS5A 혈청으로 면역침전하고, 결합된 단백질은 항-SUMO-1 또는 항-SUMO-2/3 항체로 면역블랏팅하였다 (우측 두 개의 패널). (F) Jc1으로 감염된 Huh7.5 세포는 72시간 후 모아 지시된 항체로 면역블랏팅하였다 (좌측). 총 세포 추출액은 토끼 항-NS5A 혈청으로 면역침전시키고 결합된 단백질은 지시된 항체로 면역블랏팅하였다 (우측 세 개의 패널).

도 3은 SENP1 및 SENP2에 의하여 NS5A가 탈SUMO화됨을 보여준다. Huh7.5 세포는 지시된 플라스미드로 코트랜스펙션되어 36시간 후 모았다. 단백질 발현은 항-Xpress, 항-Flag, 항-Myc 항-V5 및 항- β -액틴 항체로 각각 면역블랏 분석하여 확인하였다 (좌측 패널). 총 세포 추출액은 항-Myc 항체로 면역침전시켰고, 결합된 단백질은 항-Xpress 또는 항-Myc 항체로 면역블랏팅하였다 (우측 패널).

도 4는 NS5A에서 K348 잔기가 SUMO화되었음을 보여준다. (A) 야생형 및 변이형 NS5A의 모식도이다. NS5A 일차 서열에 보존적 Ψ KxE 모티프를 함유하는 두 개의 SUMO화 추정 부위, K139 및 K348은 SUMOsp 2.0 프로그램으로 결정하였다. 별표는 변이부위를 나타낸다. (B) 야생형 및 변이형 NS5A (각 라이신은 아르기닌 잔기로 대체되었다: K139R 및 K348R)의 SUMO화 분석은 실시예와 같이 수행하였다. (C) HEK293T 세포는 SUMO-2의 부재하 또는 존재하에 지시된 플라스미드로 코트랜스펙션시켰다. 세포는 36시간 후 모아 지시된 항체로 면역블랏팅하여 단백질 발현을 확인하였다 (좌측 패널). 총 세포 추출액은 항-Myc 항체로 면역침전하고 결합된 단백질은 항-Xpress 또는 항-Myc 항체로 면역블랏팅하였다 (우측 패널).

도 5는 SUMO화에 NS5A 인산화가 필수적임을 말해준다. (A) HEK293T 세포는 야생형 또는 변이형 (K139R, K348R) NS5A 발현 플라스미드로 트랜스펙션시켰다. (좌측) 단백질 발현은 지시된 항체로 면역블랏팅하여 확인하였다. (우측) 세포 용균액은 마우스 항-포스포세린 항체로 면역침전시킨 후 결합된 단백질은 항-Myc 항체로 면역블랏팅하였다. (B) 야생형 및 인산화-결합 돌연변이 (P mutant) NS5A의 모식도이다. (C) HEK293T 세포는 SUMO-2의 부재하 또는 존재하에 야생형 또는 P 변이 NS5A로 트랜스펙션시켰다. 세포 용균액은 36시간 후 모아 항-Xpress, 항-Myc 및 항- β -액틴 항체로 각각 면역블랏팅하였다 (좌측 패널). 총 세포 추출액은 토끼 항-NS5A 혈청으로 면역침전시키고, 결합된 단백질은 항-포스포세린 항체 (중간, 위쪽 패널) 또는 항-NS5A 항체 (중간, 아래 패널)로 면역블랏팅하였다. 또한, 총 세포 용균액은 항-Myc 항체로 면역침전시킨 다음, 결합된 단백질은 항-Xpress 항체 (우측, 위쪽 패널) 또는 항-Myc 항체 (우측, 아래 패널)로 면역블랏팅하였다. (D) HEK293T 세포는 Myc-표지된 NS5A 발현 플라스미드로 트랜스펙션시킨 다음 지시된 양의 TBB가 함유된 배지에서 배양하였다. 세포 용균액은 트랜스펙션 24시간 후 모은 다음 항-포스포세린 항체로 면역침전시킨 다음, 결합된 단백질은 항-Myc 항체로 면역블랏팅하였다. (E) HEK293T 세포는 Myc-표지된 NS5A 및 Xpress-표지된 SUMO로 코트랜스펙션시키고, 20 mM TBB가 함유된 배지에서 배양하였다. 단백질 발현은 지시된 항체로 면역블랏팅하여 확인하였다 (우측 삽입 패널). 세포 용균액은 항-Myc 항체로 면역침전시키고, 결합된 단백질은 항-Xpress 항체 또는 항-Myc 항체로 면역블랏팅하였다 (우측 패널).

도 6은 SUMO화가 유비퀴틴화를 저해함으로써 NS5A의 안정화를 조절함을 보여준다. (A) HEK293T 세포는 야생형 또는 변이형 NS5A로 24시간 동안 트랜스펙션시킨 후 지시된 시각에 100 μ g/ml의 CHX로 처리하였다. 그 후 총 세포 용균액은 항-Myc 항체 및 항- β -액틴 항체로 면역블랏팅하였다. (B) HEK293T 세포는 야생형 NS5A 또는 변이

형 NS5A 및 HA-표지된 유비퀴틴 플라스미드로 코트랜스펙션시켰다. NS5A와 유비퀴틴 단백질 발현은 지시된 항체로 면역블랏팅하여 확인하였다 (좌측 패널). 총 세포 추출액은 트랜스펙션 24시간 후 준비하여 항-Myc 항체로 면역침전시킨 다음, 결합된 단백질들은 항-Myc 항체 (우측, 위쪽 패널) 또는 항-HA 항체 (우측, 아래쪽 패널)로 면역블랏팅하였다. (C) HEK293T 세포는 야생형 또는 변이형 NS5A 발현 플라스미드로 트랜스펙션시켰다. 다양한 형의 NS5A에서 단백질 발현은 항-Myc 항체로 면역블랏팅하여 확인하였다 (좌측, 위쪽 패널). 세포 용균액은 트랜스펙션 36시간 후 모아 마우스 항-Myc 항체로 면역침전시키고, 결합된 단백질은 항-Myc 항체 (우측, 위쪽 패널) 또는 항-유비퀴틴 항체 (우측, 아래쪽 패널)로 면역블랏팅하였다. (D) HEK293T 세포는 야생형 또는 SUMO-결합 NS5A 발현 플라스미드로 트랜스펙션시켰다. 24시간 후 세포는 20 μ M MG-132와 함께 두 시간 동안 배양하였다. 그 후 총 세포 용균액은 항-Myc 항체로 면역침전시키고, 결합된 단백질은 유비퀴틴 항체를 이용하여 면역블랏팅하였다 (위쪽 패널). 면역침전 효율은 아래쪽 패널에서 확인하였다. (E) HEK293T 세포는 야생형 또는 SUMO-결합 NS5A 및 SUMO-2 발현 플라스미드의 양을 증가시켜가며 코트랜스펙션시켰다. 24시간 후, 세포는 20 μ M MG-132로 두 시간 동안 처리하였다. 세포 용균액은 항-Myc 항체로 면역침전시킨 후 결합된 단백질은 항-유비퀴틴 항체로 면역블랏팅하였다.

도 7은 SUMO화가 단백질-단백질 상호작용 및 HCV 복제를 조절함을 보여준다. (A) HEK293T 세포는 Myc-표지된 NS5A 및 Flag-표지된 NS5B의 야생형 또는 SUMO-결합 변이로 트랜스펙션시켰다. NS5A 및 NS5B 단백질 발현은 지시된 항체로 면역블랏팅하여 확인하였다 (좌측 패널). 총 세포 추출액은 36시간 후 모아 마우스 항-Flag 항체로 면역침전시킨 후 결합된 단백질은 항-Myc 항체 (우측, 위쪽 패널) 또는 항-Flag 항체 (우측, 아래쪽 패널)로 면역블랏팅하였다. (B) HEK293T 세포는 지시된 플라스미드로 코트랜스펙션시키고 항-Myc 항체로 면역침전시킨 다음, 결합된 항체는 항-Flag 항체 (맨 위쪽 패널) 또는 항-Myc 항체 (두 번째 패널)로 면역블랏팅하였다. 단백질 발현은 A (맨 아래 세 개의 패널)에 묘사된 것과 같이 확인하였다. (C) Huh7.5 세포는 야생형 또는 SUMO-결합 HCV 서브게놈 레플리콘 RNA로 전기천공하였다. 세포는 지시된 시간 간격을 두고 모아 qPCR로 세포내 HCV RNA 수준을 결정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에 의해 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0038] 플라스미드와 DNA 트랜스펙션

[0039] HCV NS5A (유전자형 1b)를 코딩하는 cDNA는 주형으로 pFK-I389neo/NS3-3'/NK5.1 (Lohmann V. et al., 2001. J. Virol. 75:1437-1449)를 이용하여 PCR로 증폭한 다음 pEF6/Myc-His (Invitrogen) 벡터의 *Xba*I 부위에 클론하였다. 각각 SENP1, SENP2 및 SENP3를 코딩하는 cDNA는 PCR로 증폭한 다음 pEF6/V5 발현벡터에 클론하였다. SUMO-1, SUMO-2 및 SUMO-3 플라스미드는 pCDNA4/Xpress-His 내로 클론하였고, pFlagCMV2-UBC9은 종래 기술 (Kim J.H. et al., 2006. Nat. Cell Boil. 8:631-639)과 같이 제조하였다. K139R 및 K348R 변이체 제조는 EZ 체인지 TM 부위-지정 돌연변이 키트 (Enzymomics)를 이용하여 수행하였다. 변이체 구조는 pEF6/Myc 발현 벡터 내로 서브클론하였다.

[0040] 세포 배양

[0041] HEK293T 세포는 10% 우태혈청 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 DMEM (Dulbecco's modified Eagles' medium)에서 37 °C로 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. Huh7.5 세포는 10% 우태혈청, 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 1% 비필수 아미노산이 보충된 DMEM (Dulbecco's modified Eagles' medium)에서 37 °C로 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. HCV 서브게놈 레플리콘 (유전자형 1b)이 들어있는 Huh7.5 세포는 10% 우태혈청, 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 1% 비필수 아미노산이 보충되고 G418이 존재하는 배지에서 배양하였다.

[0042] HCV Jc1 제조 및 바이러스 감염

[0043] 감염성 Jc1 바이러스는 종래기술에 따라 제조하였다 (Wakita T. et al., 2005. Nat. Medicine. 11:791-796). 간략히 설명하면, pFK-Jc1 플라스미드는 *Mlu*I 절단에 의해 Jc1 게놈의 3' 말단에 연결되었고, 페놀-클로로포름

추출에 의해 정제하였다. RNA 전사체들은 Promega T7 RiboMax 키트를 이용하여 제조하였고, RiboEX LS에 의해 정제되었다. 10 μ g의 인 비트로-전사된 게놈 Jc1 RNA는 0.4 cm 겹의 큐벳에서 7.5×10^6 Huh7.5 세포와 혼합한 후 Bio-Rad GenePulser II 전기천공기를 이용하여 270 V 및 950 μ F로 전기천공하였다. 세포는 완전배지 (10% FBS, 100 units/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민, 1 mM NEAA 및 10 mM HEPES를 함유한 DMEM)에 조심스럽게 옮긴 후 150 mm 디쉬에 옮겼다. 전기천공 4일 후 배양배지를 모아 0.45 μ m 시린지-탑 필터 (Millipore)를 통하여 필터링한 후 바이러스 저장용액으로 저장하였다. 바이러스 감염을 위해 세포를 PBS로 두 번 세척한 후 네 시간 동안 세포배양액에서 키운 HCV (HCVcc)와 함께 배양하였다. HCVcc 감염된 세포들은 PBS로 두 번 세척하고, 완전배지에서 배양하였다.

[0044] RNA 간섭

UBC9을 타겟으로 하는 siRNA (5'-GUUCUGCGCCACUCCUdTdT-3')들과, 공통 음성 대조군은 Bioneer에서 구입하였다. HCV의 5'NTR을 타겟으로 하는 siRNA (5'-CCU CAA AGA AAA ACC AAA CUU- 3')는 양성 대조군으로 이용하였다. siRNA 트랜스펙션은 Lipofectamine RNAiMax 제제를 이용하여 수행하였다 (Lim YS, Tran HT, Yim SA, Hwang SB. 2011. J. Virol. 85:8777-8788).

[0046] HCV RNA 분리 및 정량

세포내 및 세포외 RNA들 모두 HCVcc 감염된 세포, 세포배양배지 또는 레플리콘_세포로부터 RiboEX LS 제제 (GeneAll)를 이용하여 분리하였고, cDNA 합성키트 (TOYOBO)를 이용하여 역전사하였다. 모든 qPCR 실험은 iQ5 multicolor real-time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)으로 아래의 조건과 같이 수행하였다: 95℃에서 3분간 유지한 다음, 95℃에서 10초간, 55℃로 20초간 및 72℃에서 30초간을 한 사이클로 하여 40사이클을 수행하고, 60℃부터 95℃까지 10초마다 0.5℃씩 온도를 높여 71사이클을 수행하여 멜팅 커브에 이용하였다.

[0048] MTT 분석방법

대조군 siRNA로 처리한 세포 또는 타겟 특이적 siRNA로 처리한 세포의 숙주세포 생존율은 MTT 세포 증식 분석 (Sigma)을 이용하여 결정하였다.

[0050] 면역블랏 분석

25 mM Tris-HCl (pH7.8), 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 1 mM EDTA, 0.2 % SDS, 1 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 및 20 mM NEM (N-ethylmaleimide)이 함유된 용균 완충액에 세포를 넣어 용균시켰다. 총 세포 용균액은 SDS-PAGE를 수행하고 나이트로셀룰로스 막에 전기이동시켰다. TBS를 함유한 0.25% 트윈-20 (TBST)에 5% 탈지분유를 가하여 두 시간 동안 막을 블로킹시킨 후 각각 항-Myc, 항-NS5A, 항-Flag, 항-SUMO-1, 항-SUMO-2/3 및 항- β 액틴 항체와 같은 일차 항체와 함께 배양하였다. TBST로 두 번 세척한 후 막은 호스래디쉬 퍼옥시데이즈가 결합된 염소 항-마우스 항체 또는 염소 항-토끼 항체와 함께 실온에서 한 시간 배양하였다. 단백질을 ECL kit (Amersham Biosciences)를 이용하여 탐지하였다.

[0052] SUMO화 분석방법

SUMO화 분석방법은 다음과 같이 수행하였다 (Kim J.H. et al., 2006. Nat. Cell Boil. 8:631-639). 간단히 설명하면, HEK294T 세포 또는 Huh7.5 세포를 NS5A 발현 플라스미드 및 Xpress-표지된 SUMO-1, SUMO-2 및 SUMO-3로 각각 코트랜스펙션시켰다. 이를 후 프로테이즈 저해제 각테일이 보충된 용균 완충액으로 세포를 용균시킨 다음 20초간 음파처리하였다. 상층액은 4℃에서 30분간 원심분리 (15,000 x g)하여 분리하였다. 단백질 농도는 브래드포드 방법으로 결정하였다. 동량의 단백질은 지시된 항체로 면역침전하고 또 한 시간 동안 단백질 A/G 비드와 함께 배양하였다. 비드는 0.25% TBST로 세척하였다. 단백질은 SDS-PAGE 한 다음 지시된 항체로 면역블랏팅 하였다. 단백질은 ECL kit로 탐지하였다.

[0054] **통계 분석**

[0055] 데이터는 최소 두 번의 독립실험에 대한 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 통계 분석에 Student's *t* test를 이용하였다. p 값 < 0.05 은 통계적으로 의미있는 것으로 판단하였다.

[0056] **결과 1: 세포의 SUMO화 시스템은 HCV 복제에 관여한다.**

[0057] EBV Z 및 R 단백질과 인플루엔자 A NS1A 단백질을 비롯한 몇몇 바이러스 단백질들은 바이러스 복제 동안 SUMO 단백질에 의해 공유결합적으로 변형된다 (Hagemeier S.R. et al., 2010. J. Virol. 84:4383-4394, Marusic M.B. et al., 2010. J. Virol. 84:11585-11589, Xu K. et al., 2011. J. Virol. 85:1086-1098, Wu C.Y. et al., 2011. J. Virol. 85:6618-6628, Boggio R, Chiocca S. 2006. Curr. Opin. Microbiol. 9:430-436). UBC9은 SUMO화 시스템에서 필수적인 E2 결합 효소라고 보고된바 있다 (Hay RT. 2005. Mol. Cell. 18:1-12). 세포 SUMO화 시스템이 HCV 복제에 관여하는지를 알아보기 위해 HCV 감염된 세포에서 UBC9을 녹다운시킴으로써 SUMO화 체계를 손상시켰다. 도 1A와 같이, Jc1 감염된 세포에서 UBC9은 siRNA에 의해 효과적으로 침묵되었다. 반면, HCV 단백질 수준은 UBC9 침묵에 의하여 바뀌지 않았다. 염두에 둘 것은, UBC9 녹다운 세포에서 세포내 HCV RNA 수준이 현저히 감소하였다는 점이다 (도 1A, 우측 패널). HCV 레플리콘 세포에서 SUMO화 장치의 관련성을 더 연구하기 위해, HCV 서브게놈 레플리콘을 가진 Huh7 세포를 음성 siRNA 또는 UBC9 siRNA로 트랜스펙션시켰다. 도 1B는 UBC9 녹다운 레플리콘 세포에서 HCV 비구조 단백질 수준이 약간 감소함을 보여주었다. UBC9 녹다운 레플리콘 세포에서 세포내 HCV RNA 수준은 음성 대조군과 비교할 때 약 40% 감소하였음은 주목할 만하다. UBC9 녹다운이 세포생존율에 아무런 영향을 미치지 않았기 때문에 (도 1C), HCV RNA 수준 감소는 UBC9 침묵의 세포독성 효과에 기인하는 것이 아니었다. 이러한 결과들은 HCV 생애주기에서 SUMO화가 중요한 역할을 수행함을 제시한다.

[0058] **결과 2: HCV NS5A 단백질은 SUMO화된다.**

[0059] SUMO화가 HCV 복제에 관련되어 있기 때문에 본 발명자들은 HCV 단백질들이 SUMO화의 타겟이 되는지를 연구하였다. SUMOsp2.0 프로그램 (Ren J. et al., 2009. Systematic study of protein sumoylation: Development of a site-specific predictor of SUMOsp 2.0. Proteomics. 9:3409-3412), 본 발명자들은 HCV 단백질에서 SUMO화될 가능성이 있는 부위를 예측하였다 (표 1 및 2). 어떤 HCV 단백질이 SUMO화되는지를 결정하기 위하여, HEK293T 세포를 각각 Xpress-표지된 SUMO-1, 2, 3와 함께 HCV 단백질 발현 플라스미드 및 Flag-표지된 UBC9으로 코트랜스펙션시켰다. 도 2A와 같이, NS5A 트랜스펙션된 세포에서만 SUMO화된 단백질에 해당하는 부가된 고분자량 띠가 나타났다. NS5A의 SUMO화를 좀더 확인하기 위해 HEK293T 세포를 지시된 플라스미드로 코트랜스펙션시킨 후 항-Myc 항체로 면역침전시켰고, 결합된 단백질은 항-Xpress 항체로 면역블랏팅시켰다. 도 2B와 같이, 좀더 고분자량의 여러 개의 띠는 UBC9 및 SUMO-2 존재 하에 탐지되었다 (도 2B, 우측 패널). 이 고분자량 띠들은 항-Xpress 항체로도 탐지되어 이 띠들이 실제로 NS5A의 SUMO화된 단백질임을 보여준다 (도 2B, 좌측 패널). 본 발명자들은 또한 유전자형 2a 유래 NS5A도 UBC9 및 SUMO-2에 의하여 SUMO화됨을 밝혔다 (도 2C). 간세포에서 NS5A의 SUMO화를 좀더 설명하기 위해 Huh7.5 세포는 위에 기재된바와 같이 지시된 플라스미드로 코트랜스펙션시키고 세포 용균액은 항-Myc 항체로 면역침전시킨 후 결합된 단백질은 항-Xpress 항체로 면역블랏팅하였다. 도 2D는 SUMO-1, SUMO-2 및 SUMO-3 존재 하에서 고분자량 띠의 계단이 나타남을 보여주는데, 이는 NS5A 단백질이 간세포에서도 SUMO화됨을 나타내는 것이다. 흥미롭게도, NS5A는 Huh7.5 세포에서 SUMO-2보다는 SUMO-1에 의해서 좀더 많이 SUMO화되었다. 다음으로 본 발명자들은 HCV 복제의 맥락에서 NS5A가 SUMO화되는지를 조사하였다. 감염되어보지 않은 Huh7.5 세포 또는 HCV 서브게놈 레플리콘을 포함하는 세포를 토끼 항-NS5A 혈청으로 면역침전시킨 후 결합된 단백질을 항-SUMO-1 또는 항-SUMO-2/3 항체로 면역블랏팅하였다 (도 2E, 우측 두 개의 패널). 실제로, HCV 레플리콘 세포에서 NS5A는 SUMO-1에 의하여 강하게 SUMO화되었다. 본 발명자들은 Jc1으로 감염된 Huh7.5 세포에서 NS5A가 SUMO-1에 의하여 SUMO화됨을 확인하였다 (도 2F). 흥미롭게도, Jc1 감염된 세포에서 SUMO-2/3에 의한 NS5A SUMO화는 거의 탐지되지 않았다. 종합하면, 이들 데이터는 NS5A 단백질이 일시적 감염세포 및 HCV 감염 세포에서 SUMO화됨을 말해준다.

[0060] **결과 3: SENP1 및 SENP2는 NS5A 단백질의 탈SUMO화에 관여한다.**

[0061] 세포 단백질의 SUMO화 상태는 SUMO화 및 탈SUMO화 과정에 의해 균형을 맞춘다. 그리하여, 본 발명자들은 NS5A의 탈SUMO화에 관여하는 SENPs (sentrin-specific proteases)에 대해 살펴보았다. Huh7.5 세포는 지시된 플라스미드로 트랜스펙션시키고 단백질 발현을 항-Xpress, 항-Flag, 항-V5, 항-Myc 및 항-β-액틴 항체로 각각 면역블랏팅하여 확인하였다 (도 3, 좌측 패널). 총 세포 추출액은 항-Myc 항체로 면역침전시킨 후, 결합된 단백질들은 항-Xpress 또는 항-Myc 항체로 면역블랏팅하였다. 도 3 (우측 패널)과 같이, SUMO-1 및 SUMO-2에 의해 유도된 NS5A SUMO화는 SENP1 및 SENP2 프로테아제에 의해 사라졌다. 그렇지만, SENP3 존재 하에서는 NS5A SUMO화에 해당하는 고분자량 띠는 사라지지 않아, NS5A 탈SUMO화가 SENP1 및 SENP2에 의해 조절됨을 말해준다.

[0062] **결과 4: NS5A의 K348은 SUMO화 부위이다.**

[0063] 대부분의 SUMO화 단백질은 ΨKxD/E (Ψ는 소수성 아미노산 잔기, K는 타겟 부위, x는 아무 잔기나 가능하고, D/E는 아스파틱산 또는 글루타민산) 공통 모티프를 공유한다 (Bentz G.L. et al., 2012. J. Virol. 86:12251-12261, Hay R.T. 2005. Mol. Cell. 18:1-12). NS5A 단백질의 SUMO화 부위를 확인하기 위해 SUMOsp2.0 프로그램을 이용하여 추정 ΨKxD/E 모티프를 분석하였다. 유전형 1b 및 2a 모두에서 유래한 NS5A 단백질에는 다섯 개의 보존적 타겟 라이신 잔기가 있다 (표 3). SUMO화 부위를 좁히기 위해, 두 개의 변이체를 구축하였는데, 각각은 도메인 I 또는 도메인 II-III를 포함하며, 각 변이체의 SUMO화 가능성을 평가하였다. 비록 도메인 I은 네 개의 보존적 라이신 잔기를 함유하고, 도메인 II-III는 하나의 라이신 잔기를 함유하지만, 이들 변이체 NS5A 단백질은 전혀 SUMO화되지 않았다 (데이터 나타내지 않음). 따라서, 우리는 가장 보존성이 높은 두 개의 라이신 잔기 K139 및 K348을 아르기닌으로 바꾸어, 각각 K139R, K348R 변이체를 구축하였고 (도 4A), SUMO화 분석법을 수행하였다. 도 4B는 고분자량 띠의 존재에 의하여 증명되는바와 같이 K139R이 여전히 SUMO화됨을 보여주었다. 그렇지만, K348R은 더이상 SUMO화되지 않아 K348이 NS5A 단백질의 SUMO화 부위임을 말해준다. 비록 348 라이신 잔기를 보유하고 있지만 도메인 II-III 변이체에서 SUMO화가 탐지되지 않았다는 점은 주목할 만하다 (도 4C, 우측 패널). 이러한 결과는 NS5A 단백질 구조가 SUMO화 과정에 기여하는 것임을 암시한다. 실제로, SUMO화 결합 변이체는 야생형 NS5A와 비교하여 분자량이 감소하였고 (도 4C, 우측 패널의 레인 1 vs 레인 2), 반면 DII-III 및 DII-III K348R 변이체 모두에서는 분자량 변화가 없었다 (도 4C, 레인 3 vs 레인 4).

[0064] **결과 5: SUMO화는 NS5A 단백질 인산화에 의해 조절된다.**

[0065] 최근 아데노바이러스 종양단백질 인산화가 SUMO 변형에 영향을 미쳐 형질전환 활성을 조절한다는 것이 보고된바 있다 (Wimmer P. et al., 2012. Oncogene. doi:10.1038/onc.2012.187). NS5A는 인단백질이기에 때문에, SUMO 변형에 NS5A 인산화가 관여할 가능성을 연구하였다. 실제로, NS5A 야생형 및 K348R 변이체는 람다 포스포타이프 처리 후 SDS-PAGE 젤 상에서 비슷한 크기만큼 이동하였다 (데이터 나타내지 않음). 그리하여 본 발명자들은 야생형과 SUMO화 결합 변이체 사이에 NS5A 인산화 수준을 비교하였다. 지시된 플라스미드로 트랜스펙션된 HEK293T 세포들은 항-포스포세린 항체로 면역침전시킨 후 결합된 단백질들은 항-Myc 항체로 면역블랏팅하였다. 도 5A와 같이, 야생형 및 K139R 변이체 단백질은 모두 높은 수준으로 인산화되었으나, 반면 K348R 변이체는 HEK293T 세포에서 인산화되지 않았다 (우측 패널). SUMO화에 인산화가 요구되는지를 확인하기 위해 본 발명자들은 NS5A 인산화 변이체의 SUMO화 상태를 조사하였다. 이러한 목적으로, HEK293T 세포에 야생형 NS5A 또는 인산화 결합 변이체 NS5A (도 5B)와 SUMO-2를 함께 코트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 36시간 후 모은 총 세포 용균액은 단백질 발현을 확인하기 위해 지시된 항체로 면역블랏팅하였다 (도 5C, 좌측 패널). 위와 같이 처리된 HEK293T 세포 또한 항-NS5A 혈청 또는 항-Myc 항체를 이용하여 면역침전시킨 다음 결합된 단백질은 항-포스포세린 항체로 면역블랏팅하여 NS5A 인산화를 탐지하거나 (도 5C, 중앙 위쪽 패널), 항-Xpress 항체로 면역블랏팅하여 NS5A SUMO화를 탐지하였다 (도 5C, 우측 위쪽 패널). NS5A의 많은 인산화 부위 중 네 개의 주요 인산화 부위만 알라닌으로 변이시켰기 때문에 (도 5B), NS5A의 인산화 결합 변이체에서도 인산화 형태는 여전히 탐지되었다 (도 5C, 중앙 위쪽 패널 중 레인 2와 레인 5). 주목할 것은 인산화 결합 변이체에서 SUMO화 수준이 현저히 감소하였다는 점이다. 이 데이터들은 인산화가 NS5A 단백질 SUMO화 변형에 필수적임을 제시한다. SUMO화에 인산화가 필수적임을 좀더 증명하기 위해, 본 발명자들은 NS5A 단백질 발현 세포를 인산화 저해제로 처리한 후 NS5A 단백질의 SUMO화를 시험하였다. 이 목적을 위해 HEK293T 세포를 카제인 카이네이즈2 (CK2) 저해제인 TBB (4, 5, 6, 7-Tetrabromobenzotriazole) 20 μM로 처리하였다. 앞서 CK2에 의해 NS5A가 인산화됨이 보고된바 있다 (Dal Pero F. et al., 2007. J. Hepatol. 47:768-776). 도 5D와 같이, NS5A 인산화 수준은 TBB에 의해 투여량 의존적으로

감소하였다. 다음으로 본 발명자들은 NS5A 단백질 SUMO화 변형에 미치는 TBB의 영향을 조사하였다. Myc-표지된 NS5A 및 Xpress-표지된 SUMO-2로 코트랜스펙션된 HEK293T 세포를 CK2 저해제로 처리한 다음 세포 용균액을 항-Myc 항체로 면역침전시킨 다음, 결합된 단백질은 항-Xpress 항체로 면역블랏팅하였다. 도 5E는 TBB가 NS5A 단백질 SUMO화 수준을 현저히 감소시켰음을 보여준다 (우측 위쪽 패널의 레인 2 및 레인 3). SUMO화가 인산화 결합 변이체에서 감소되었고, 인산화 또한 SUMO 결합 변이체에서 녹아내렸기 때문에, NS5A 단백질에서 SUMO화는 인산화와 상호의존적이었다.

[0066] 결과 6: SUMO화는 NS5A 단백질 안정성을 조절한다.

[0067] 타겟 단백질 SUMO화는 핵-세포질 이동, 염색체 구조, 전사 활성, 단백질 안정성 및 단백질-단백질 상호작용과 관련이 있다 (Johnson E.S. 2004. Annu. Rev. Biochem.73:355-382, Hay R.T. 2005. Mol. Cell. 18:1-12, Buschmann T. et al., 2000. Cell. 101:753-762, Girdwood D.W.H. et al., 2004. Seminars in Cell & Developmental Biology. 15:201-210). 우리는 먼저 단백질 안정성에 대한 SUMO화의 영향을 조사하였다. Myc-표지된 야생형 NS5A 또는 NS5A SUMO 변이체로 트랜스펙션된 HEK293T 세포를 CHX (cycloheximide)로 처리하였다. 지시된 시각에 모은 세포 용균액은 항-Myc 항체로 면역블랏팅하였다. 도 6A와 같이, 야생형 및 SUMO-수용성 (competent) K139R NS5A 양쪽 모두의 단백질 수준은 CHX 처리 8시간 후까지 안정적으로 유지되었다. 그렇지만, SUMO-결합 K348R NS5A 단백질은 CHX 존재 하에서 빠르게 분해되었다 (반감기 <4h). 이는 타겟 단백질의 안정성이 유비퀴틴에 의해 조절됨을 암시한다. 이러한 가능성을 조사하기 위해, HEK293T 세포를 지시된 NS5A 발현 플라스미드와 HA-표지된 유비퀴틴 플라스미드로 코트랜스펙션시켰다. 36시간 후 세포 용균액을 모아 항-Myc 항체로 면역침전시킨 다음, 결합한 단백질은 항-HA 항체로 면역블랏팅하여 NS5A 단백질의 유비퀴틴화를 탐지하였다. 도 6B와 같이, SUMO-결합 K348R 변이체는 야생형 및 K139R 변이체와 비교하여 유비퀴틴화 수준이 증가하였다 (우측 아래 패널, 레인 4). 우리는 나아가 야생형 및 SUMO-수용성 K139R 변이체 NS5A와 비교하여 K348R 변이체에서 내생적 유비퀴틴화가 강하게 증가하였음을 확인하였다 (도 6C, 아래 패널, 레인 4). 이 데이터들은 SUMO화가 유비퀴틴화를 저해함으로써 NS5A 단백질 안정성을 증대시킨다는 것을 말해준다. 본 발명자들은 NS5A 단백질 SUMO화에 의해 유비퀴틴화가 조절되는지를 좀더 분석해보았다. 이를 위하여 HEK293T 세포를 빈 벡터, 야생형 NS5A, K348R NS5A 플라스미드로 각각 트랜스펙션시키고, 프로테아좀 저해제인 MG-132가 없는 상태 또는 있는 상태로 배양하였다. 도 6D는 MG-132 처리한 SUMO-결합 NS5A에서 프로테아좀 분해를 저해함으로써 유비퀴틴화가 두드러지게 증가하였음을 보여준다 (레인 6). 뿐만 아니라, 유비퀴틴화 수준은 MG-132 처리한 야생형 NS5A에서 SUMO 발현수준이 증가함에 따라 점차 감소한 반면 (도 6E, 레인 4), K348R 변이체에서는 SUMO 단백질 과발현에 의하여 유비퀴틴화 수준이 영향을 받지 않았다. 이 데이터들은 SUMO화가 유비퀴틴화 과정을 억제함으로써 NS5A 단백질 안정성에 중요한 영향을 미침을 분명하게 보여준다.

[0068] 결과 7: NS5A SUMO화는 단백질-단백질 상호작용 및 HCV 복제에 관여한다.

[0069] 다음으로 본 발명자들은 HCV 복제세포에서 신호전달 및 단백질-단백질 상호작용에 SUMO화가 관련되어 있을 가능성을 조사하였다. NS5A가 NS5B와 상호작용하여 복제 복합체 (replication complex)를 형성하기 때문에 (Shirota Y. et al., 2002. J. Biol. Chem. 277:11149-11155), NS5B와의 단백질 상호작용에 관한 NS5A SUMO화의 영향을 조사하였다. 도 7A와 같이, SUMO-결합 NS5A가 아닌, 야생형 NS5A는 NS5B와 상호작용하였다 (우측 위쪽 패널). 상반된 실험에 의해, 단백질-단백질 상호작용은 야생형 NS5A와 비교하여 SUMO-결합 변이체에서 현저히 손상되었음을 확인하였는데 (도 7B, 위쪽 패널), 이는 NS5A SUMO화 또한 단백질 상호작용에 관여함을 말해준다. 그렇지만, 본 발명자들은 인터페론- α 또는 TNF α 신호전달 경로에서 SUMO화가 아무런 역할도 수행하지 않음을 밝혔다 (데이터 나타내지 않음). 마지막으로, 본 발명자들은 HCV RNA 복제에 대한 SUMO화의 영향을 평가하였다. 야생형 서브게놈 HCV 레플리콘 RNA 또는 SUMO-결합 서브게놈 HCV 레플리콘 RNA로 전기천공한 Huh7.5 세포를 qPCR로 분석하여 세포내 HCV RNA 수준을 평가하였다. 도 7C와 같이, SUMO-결합 변이체 (K348R)의 HCV RNA 수준은 야생형에 비하여 30% 가량 낮았다. UBC9 녹다운 세포에서 HCV RNA 수준이 현저히 감소하였고 (도 1) HCV에서 NS5A가 유일한 SUMO화 타겟 단백질이었기 때문에, 모든 데이터들은 NS5A SUMO화가 HCV 복제에 중요한 역할을 수행함을 말해준다.

[0070] 아래 표 1은 HCV 유전형 1b (AF054250)에서 SUMO 예측부위, 표 2는 HCV 유전형 2a (AB047639)에서 SUMO 예측부

위를, 표 3은 HCV 유전형 1b (AF054250) 및 HCV 유전형 2a (AB047639)에서 NS5A의 SUMO 예측부위를 나타낸다.

표 1

Position	Peptide	Score	Type
2280 (NS5A)	KSRKFPS	2.456	TypeII: Non-consensus
2491(NS5B)	KEMKAKA	2.441	TypeII: Non-consensus
1239(NS3)	KSTKVPA	2.309	TypeII: Non-consensus
1399(NS3)	SKKKCDE	2.309	TypeII: Non-consensus
2111 (NS5A)	DNVKCPC	2.162	TypeII: Non-consensus
1741(NS4B)	TATKQAE	2.118	TypeII: Non-consensus
2320 (NS5A)	PPTKAPP	2.088	TypeII: Non-consensus
2631(NS5B)	KSKKCPM	2.044	TypeII: Non-consensus
2498(NS5B)	STVKAKL	1.971	TypeII: Non-consensus
410(E2)	ASQKIQI	1.941	TypeII: Non-consensus
1958(NS4B)	QLLKRLH	1.941	TypeII: Non-consensus
2439(NS5B)	EESKLPI	1.882	TypeII: Non-consensus
2330 (NS5A)	PRRKRTV	1.809	TypeII: Non-consensus
2954(NS5B)	TKLKLTP	1.75	TypeII: Non-consensus
10(core)	PQRKTKR	1.735	TypeII: Non-consensus
51(core)	ATRXXSE	1.691	TypeII: Non-consensus
940(NS2)	AFMKLGA	1.632	TypeII: Non-consensus
23(core)	QDVKFPG	1.618	TypeII: Non-consensus
2212 (NS5A)	PSLKATC	1.618	TypeII: Non-consensus
2493(NS5B)	MKAKAST	1.588	TypeII: Non-consensus
67(core)	PIPKARX	1.529	TypeII: Non-consensus
2570(NS5B)	QPEKGGR	1.529	TypeII: Non-consensus
2187 (NS5A)	ETAKRRL	1.5	TypeII: Non-consensus
2560 (NS5B)	IMAKSEV	0.611	TypeI: Ψ-K-X-E
715 (E2)	FAIKWEY	0.602	TypeI: Ψ-K-X-E

[0071]

표 2

Position	peptide	Score	Type
2115 (NS5A)	DNLKIPC	2.574	TypeII: Non-consensus
1403 (NS3)	SKKKCDE	2.309	TypeII: Non-consensus
1745(NS4B)	QASKQAQ	2.309	TypeII: Non-consensus
195(E1)	AQVKNTS	2.279	TypeII: Non-consensus
1243(NS3)	KSTKVPV	2.206	TypeII: Non-consensus
2519(NS5B)	AASKVSA	2.206	TypeII: Non-consensus
2654(NS5B)	AEKKDPM	2.147	TypeII: Non-consensus
2514(NS5B)	KDIKLAA	2.088	TypeII: Non-consensus
2623(NS5B)	ITQKL PQ	2.088	TypeII: Non-consensus
2321 (NS5A)	PPKKAPT	2.074	TypeII: Non-consensus
1602(NS3)	ARAKAPP	2.015	TypeII: Non-consensus
51(core)	TTRKTSE	1.985	TypeII: Non-consensus
2320 (NS5A)	PPPKKAP	1.985	TypeII: Non-consensus
2596(NS5B)	KGGKKPA	1.985	TypeII: Non-consensus
2977(NS5B)	TKLKLTP	1.882	TypeII: Non-consensus
2462(NS5B)	EEEKLPI	1.75	TypeII: Non-consensus
10(core)	PQRKTKR	1.735	TypeII: Non-consensus
67(core)	PIPKDRR	1.735	TypeII: Non-consensus
2485(NS5B)	TTSKSAS	1.662	TypeII: Non-consensus
2653(NS5B)	WAEKKDP	1.662	TypeII: Non-consensus
2583 (NS5B)	IMAKNEV	0.592	TypeI: Ψ-K-X-E
1760(NS4B)	SWPKVEQ	0.299	TypeI: Ψ-K-X-E

[0072]

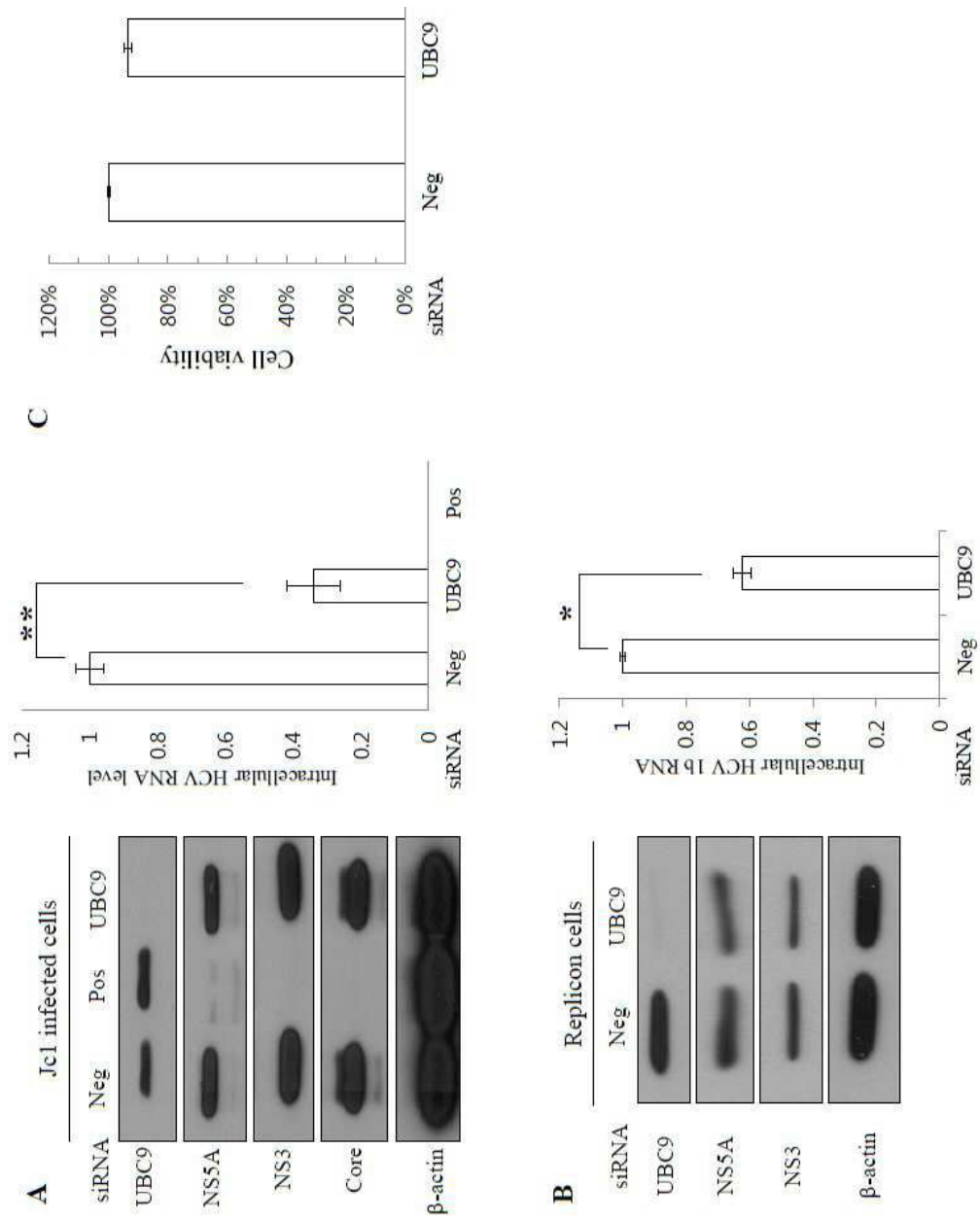
표 3

Position	Peptide	Score	HCV Subtype
20	TDFKNWL	1	2a
	TDFKTWL	1.353	1b
26	LTSKLFP	1.176	2a
	LQSKLLP	1.279	1b
139	DNLKIPC	2.574	2a
	DDVKCPC	2.162	1b
166	PTPKPFF	1.029	2a
	PACKPLL	1.485	1b
345	PPKKAPT	2.074	2a
348	PPAKAPP	2.088	1b

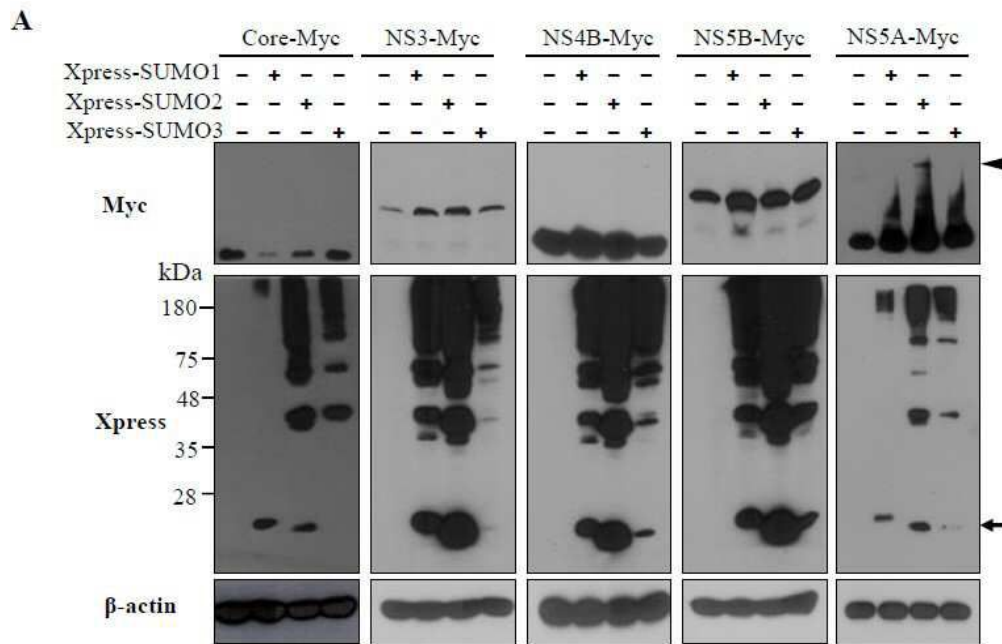
[0073]

도면

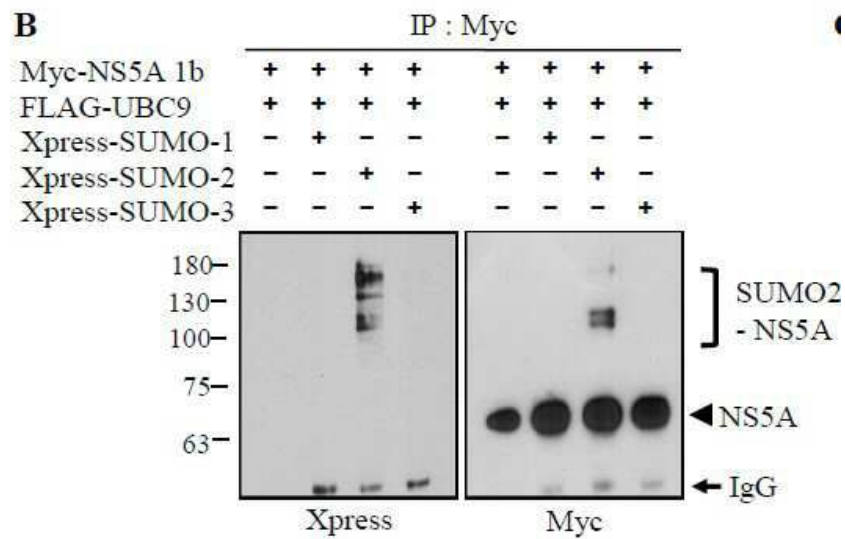
도면1



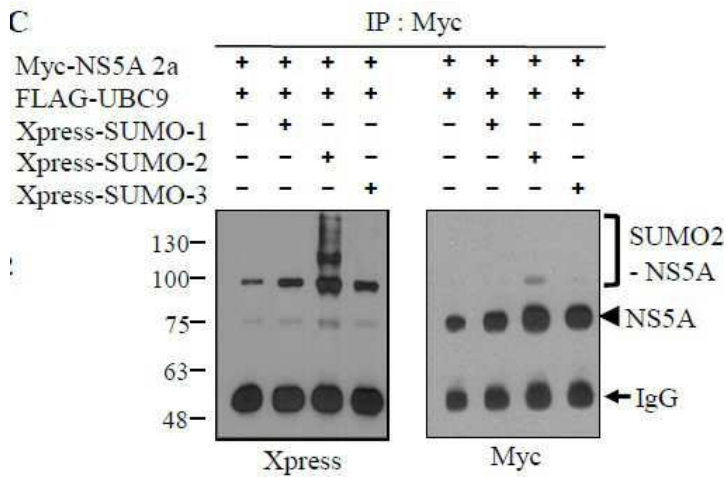
도면2a



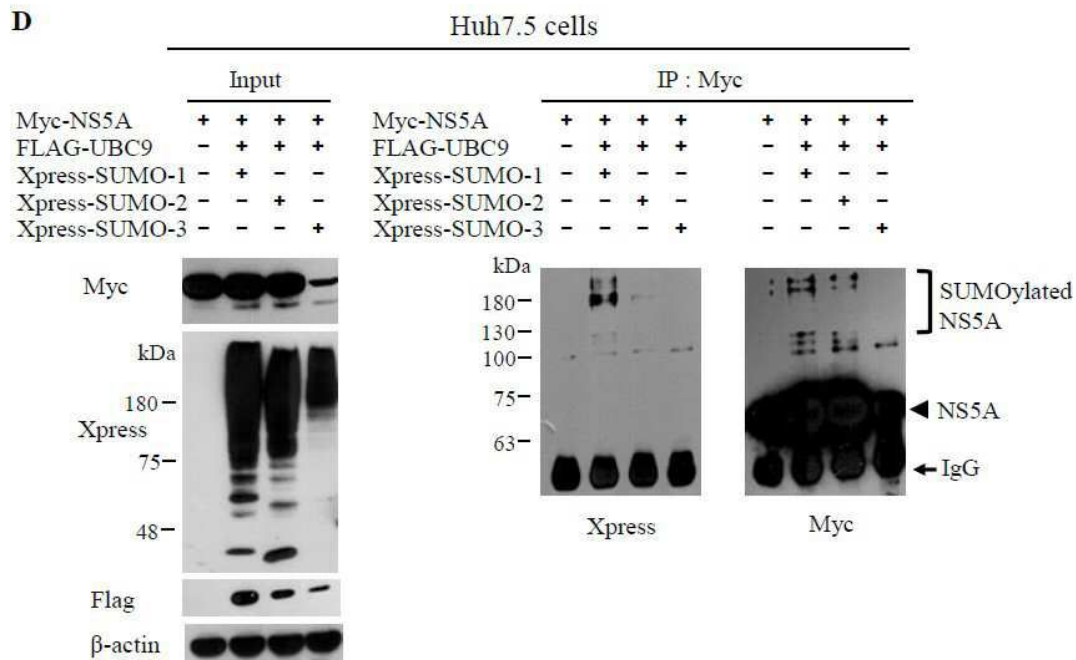
도면2b



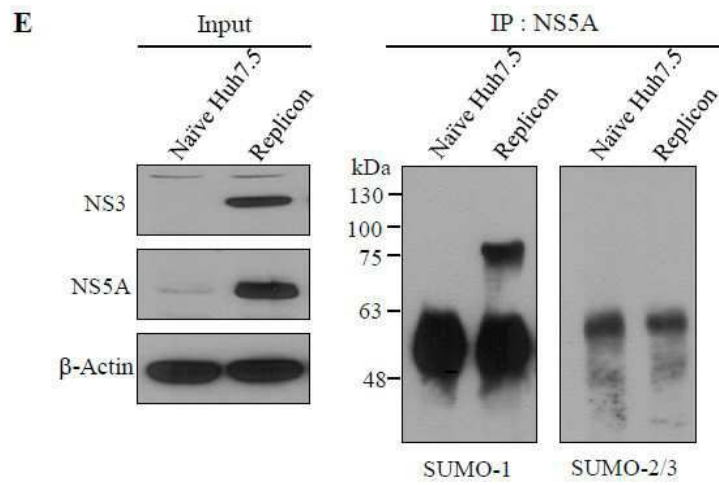
도면2c



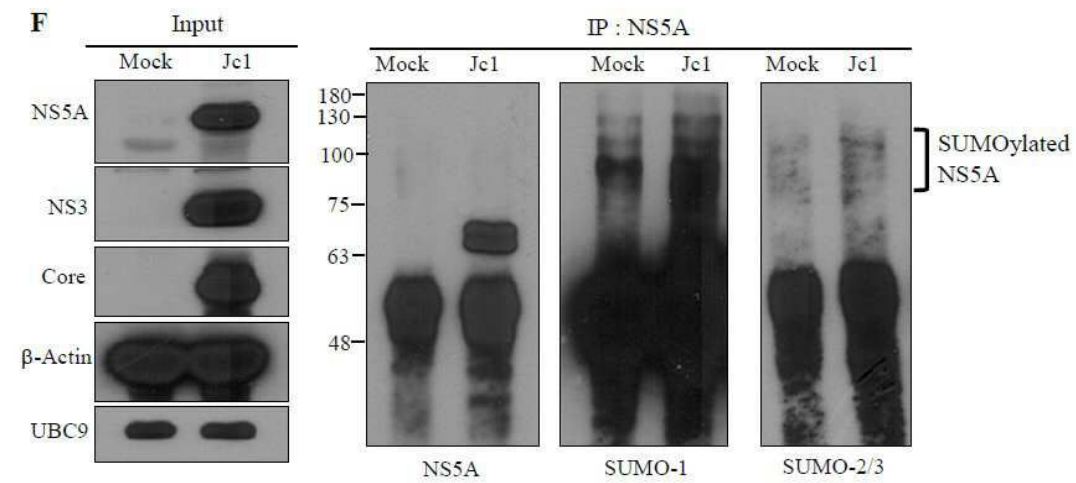
도면2d



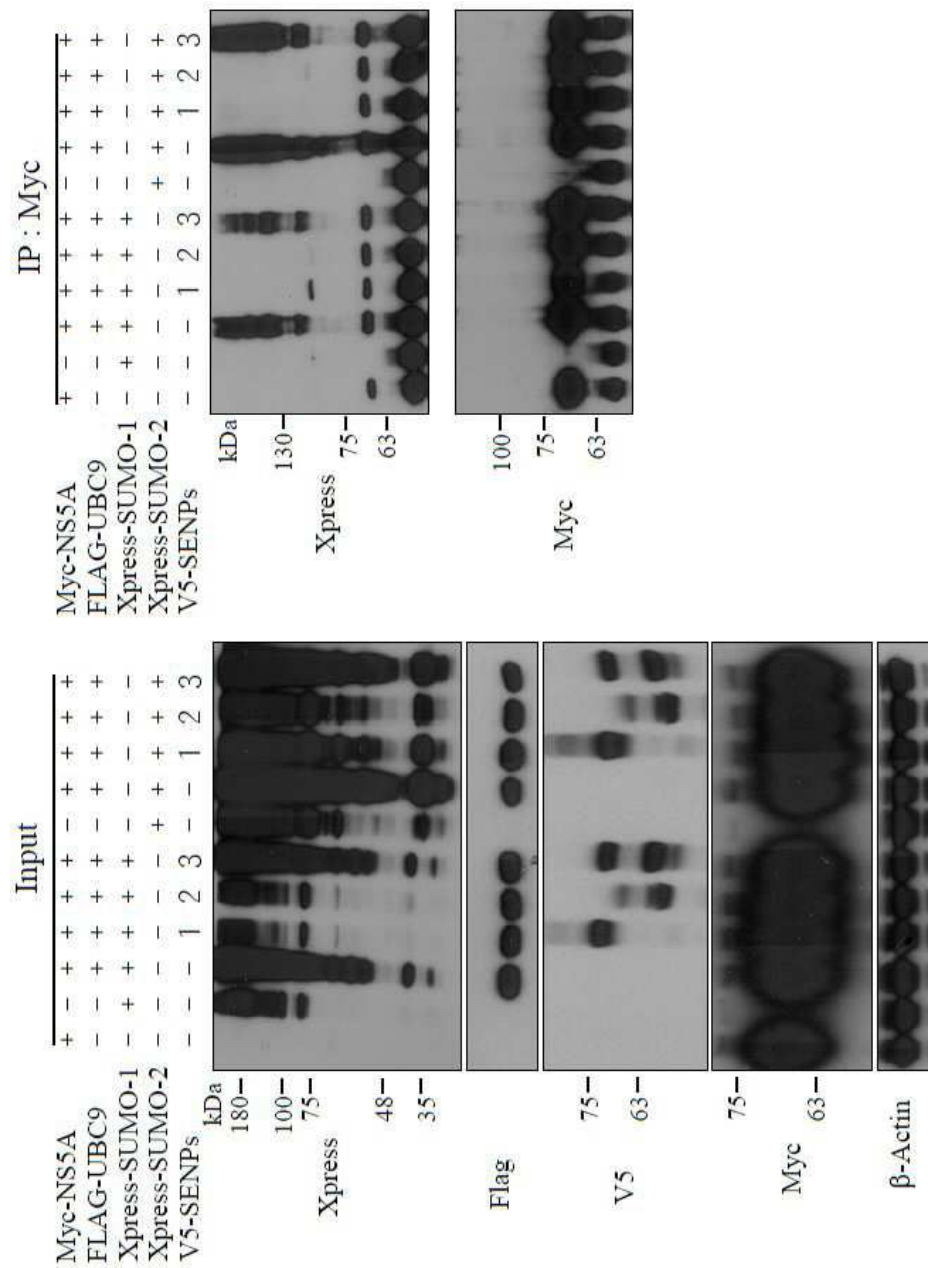
도면2e



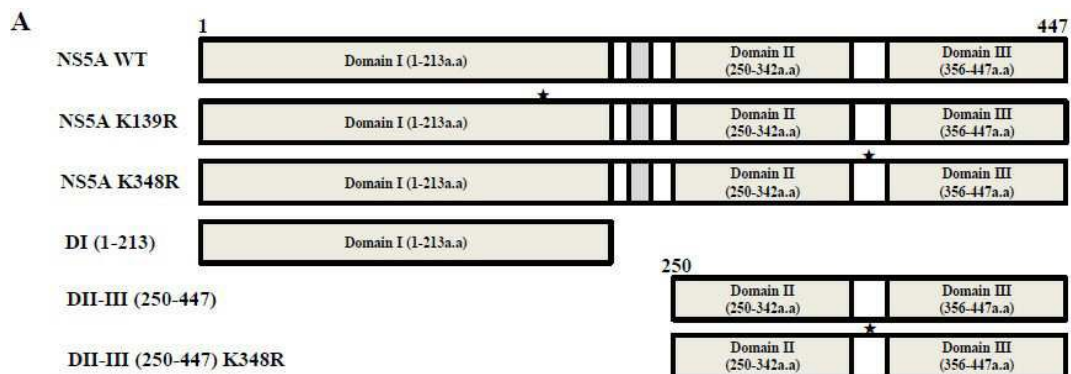
도면2f



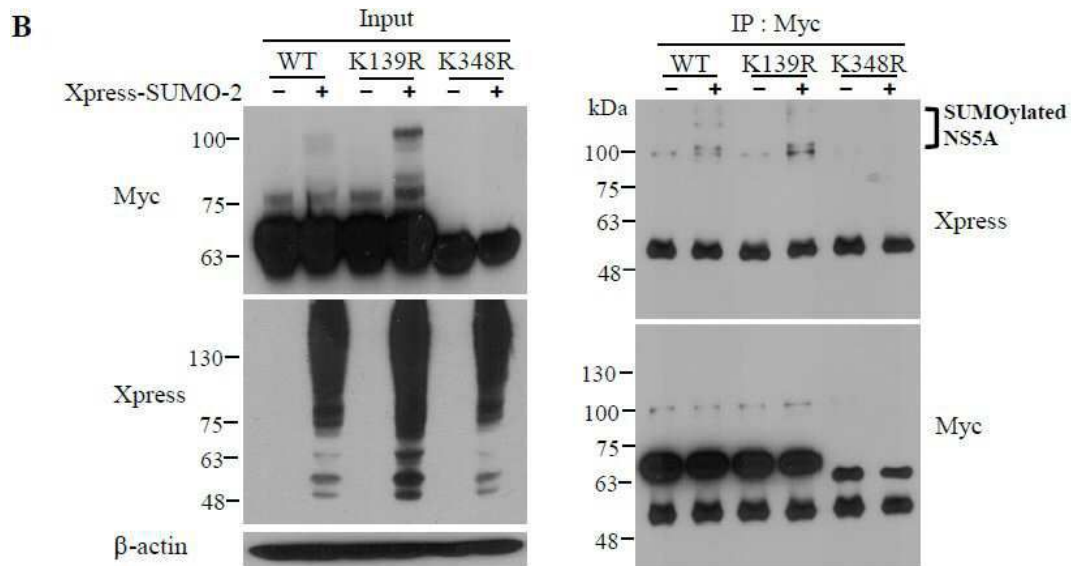
도면3



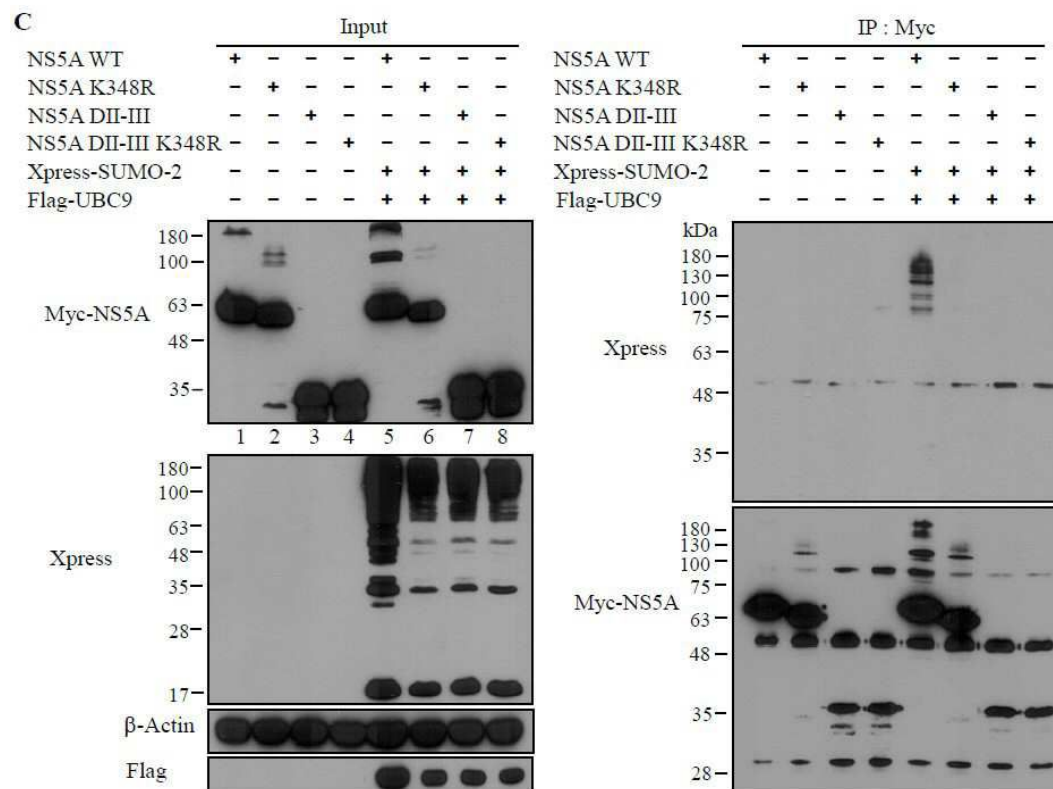
도면4a



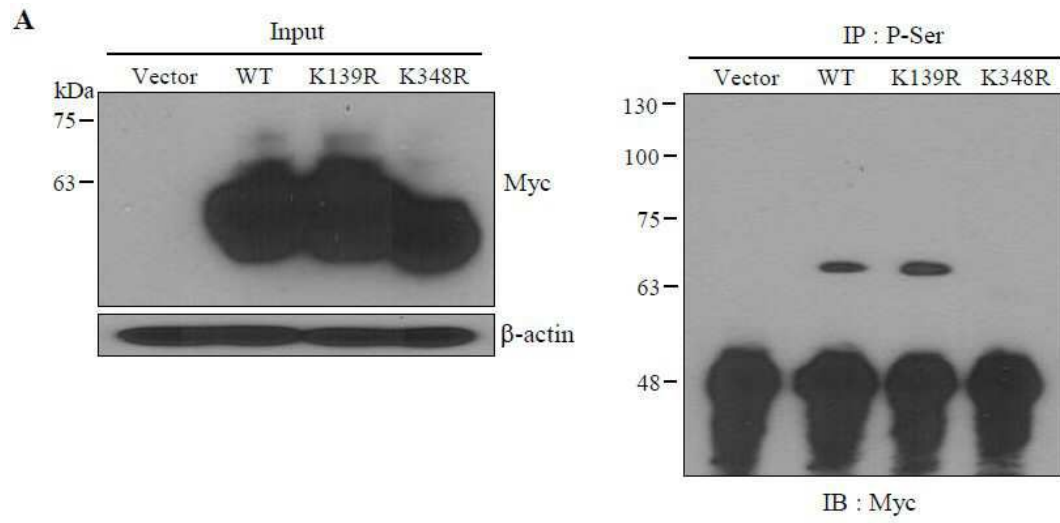
도면4b



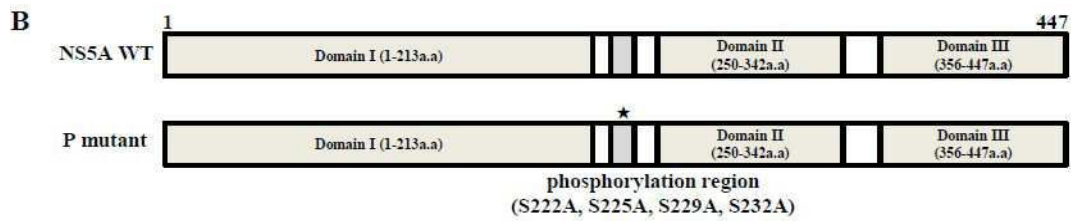
도면4c



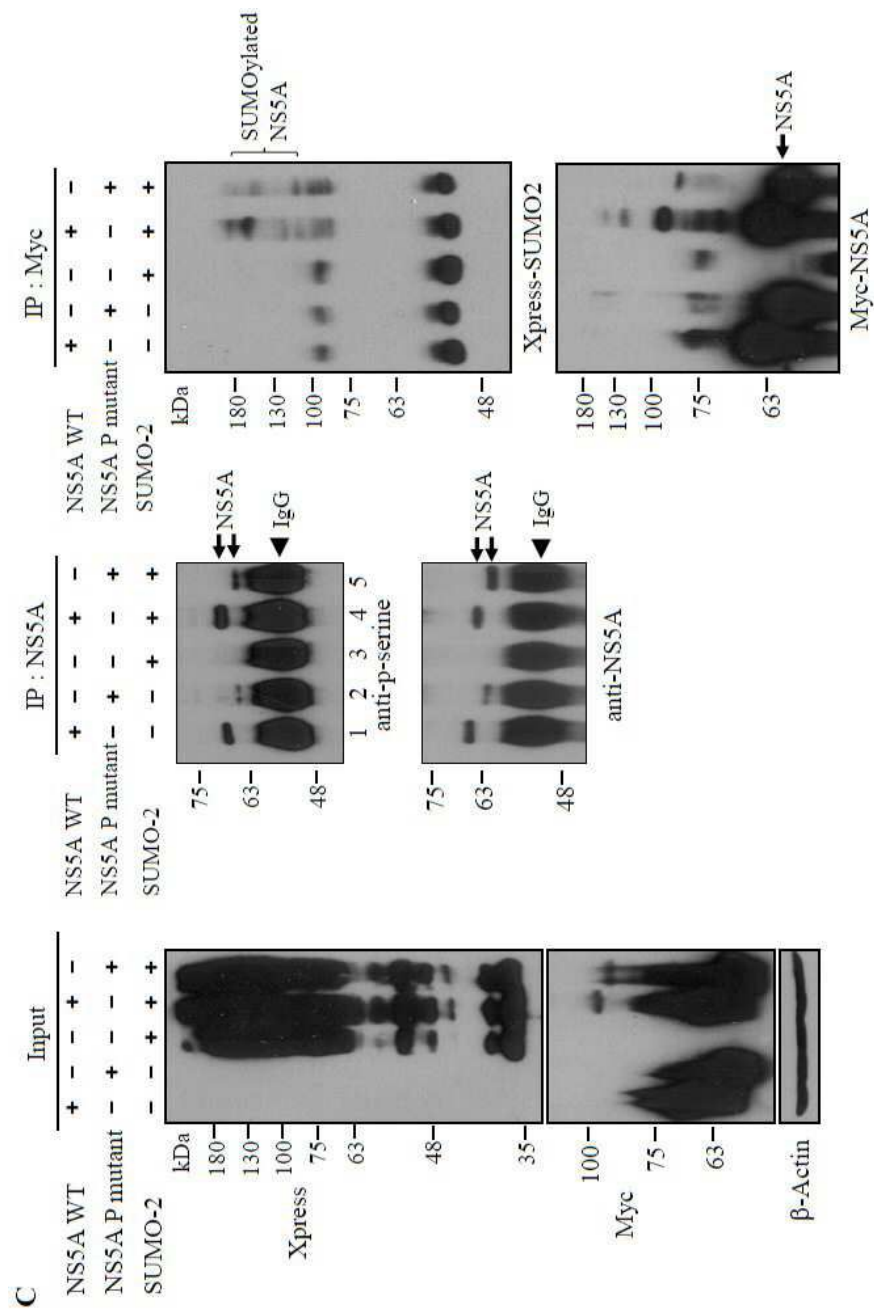
도면5a



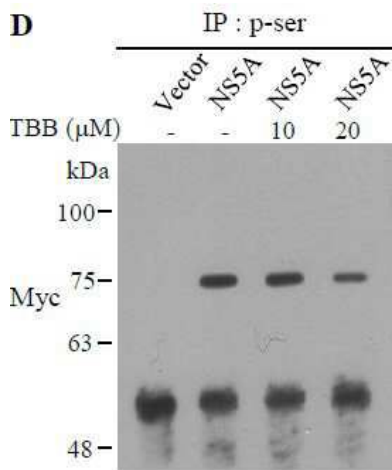
도면5b



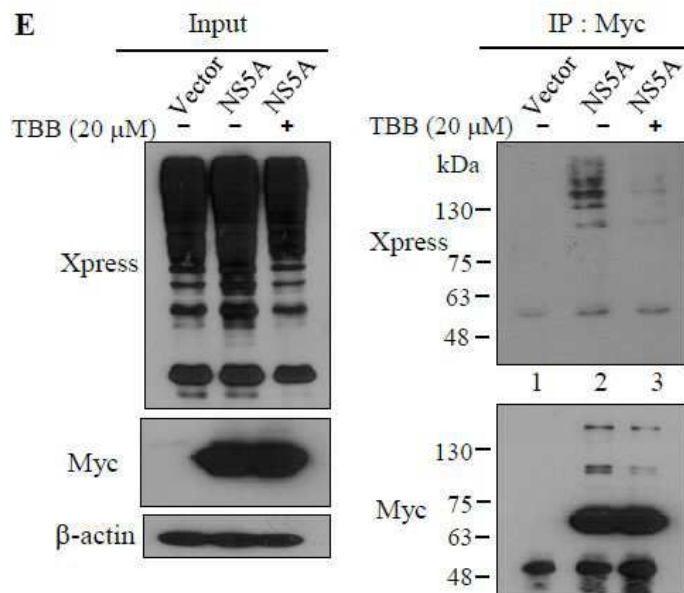
도면5c



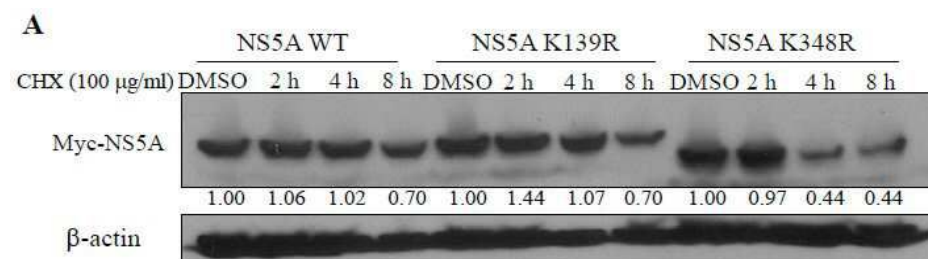
도면5d



도면5e

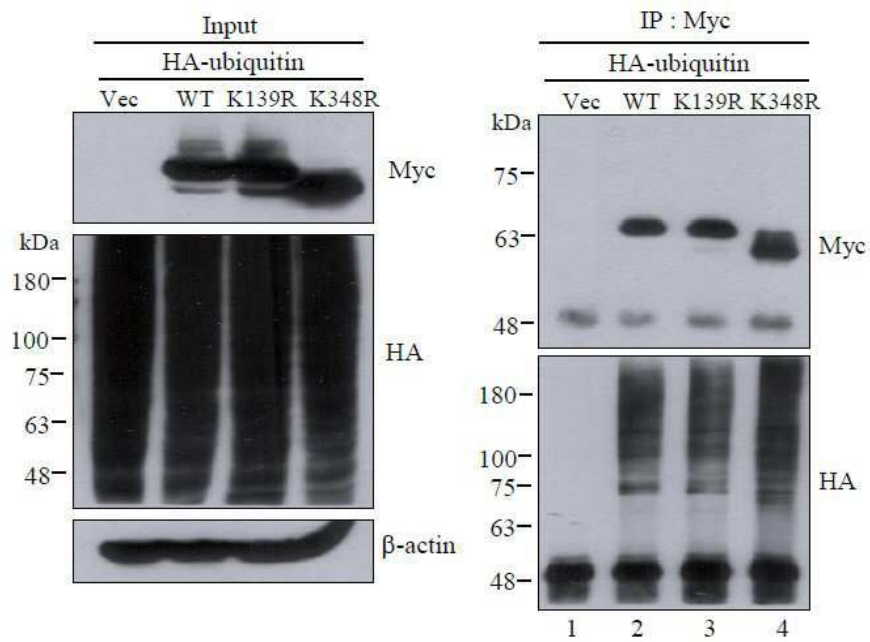


도면6a



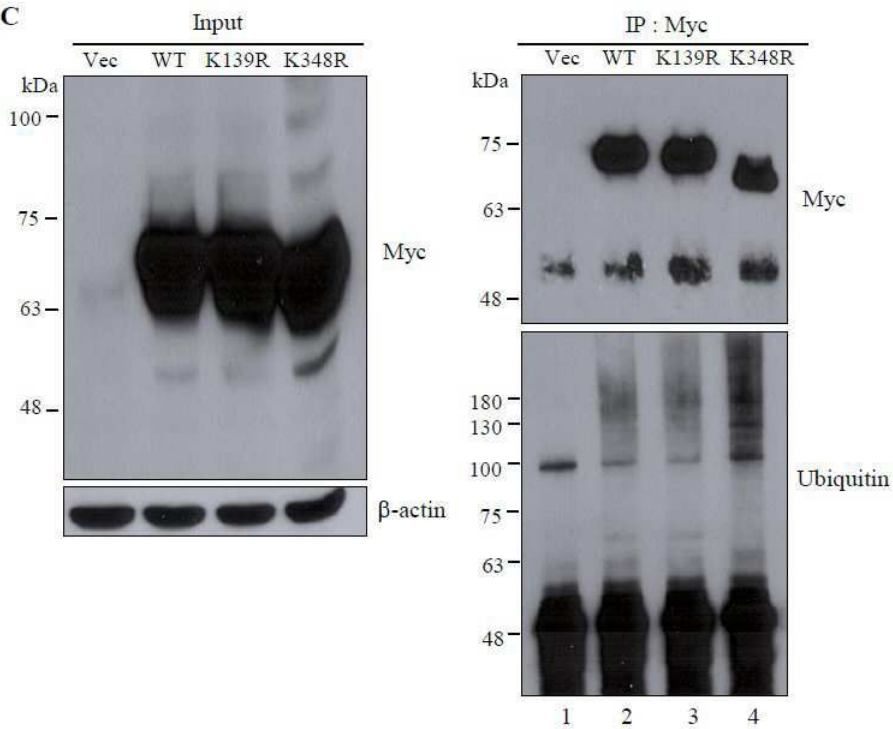
도면6b

B

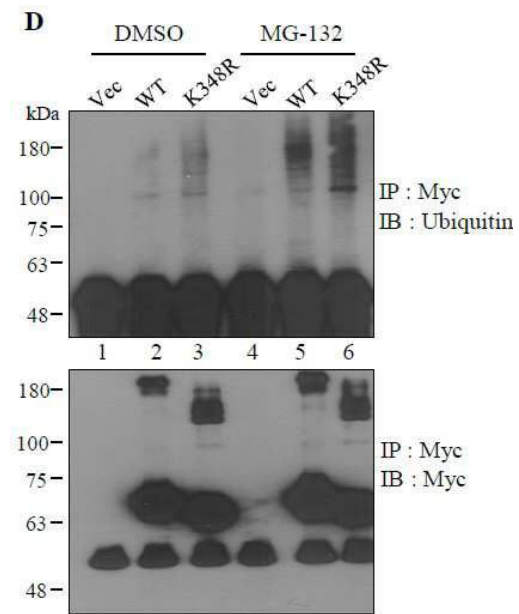


도면6c

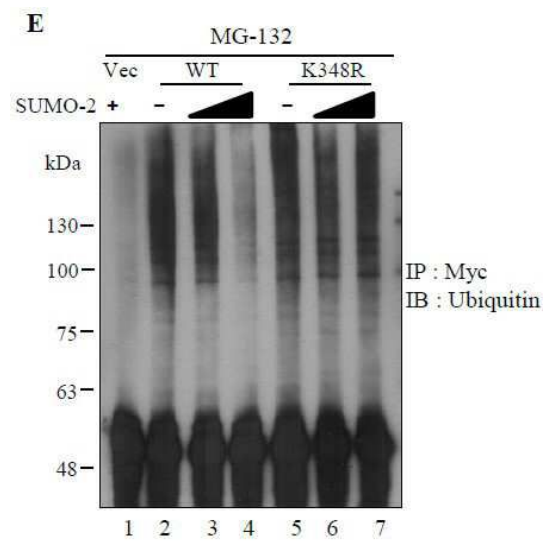
C



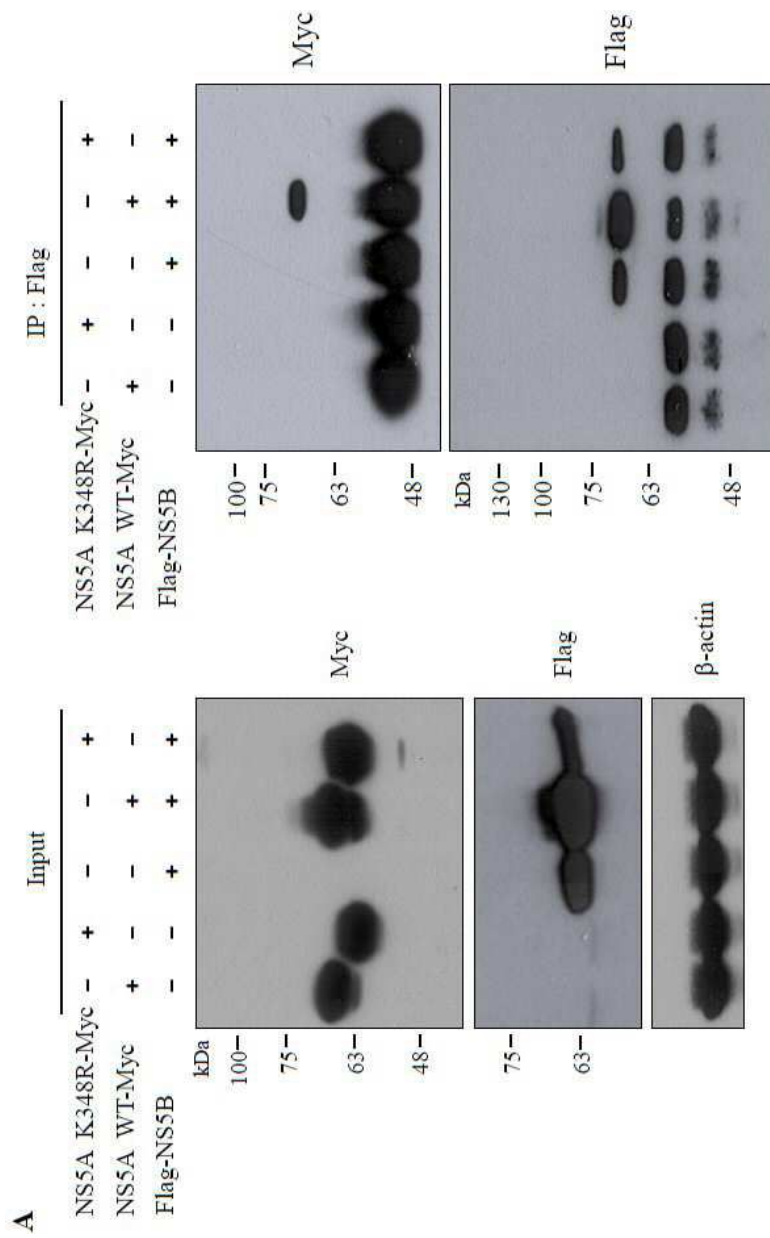
도면6d



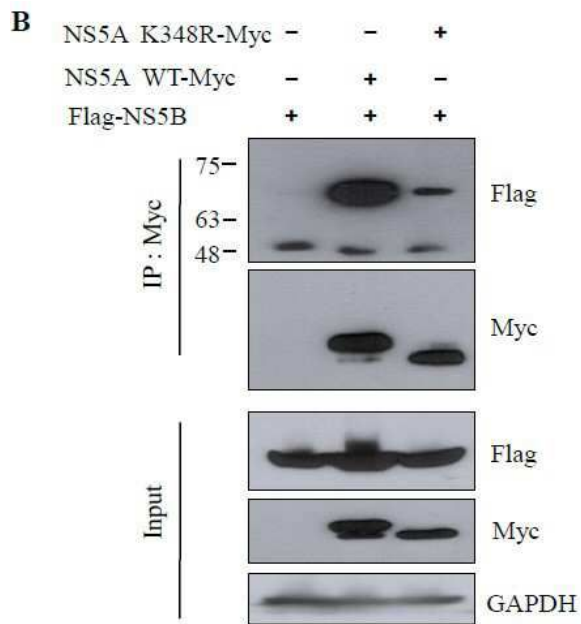
도면6e



도면7a



도면7b



도면7c

