



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0119022
(43) 공개일자 2021년10월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/192 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/192 (2013.01)

A61P 37/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2020-0035338

(22) 출원일자 2020년03월24일

심사청구일자 2020년03월24일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

최원재

경기도 광명시 광덕산로 26, 106동 3401호 (하안동, 광명 두산위브 트레지움)

김기윤

경기도 파주시 교하로 50, 208동 802호 (목동동, 산내마을2단지센트럴리움)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 5 항

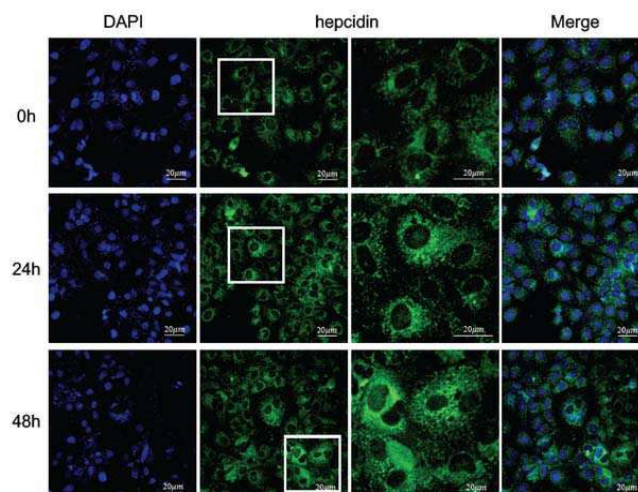
(54) 발명의 명칭 **헵시딘(Hepcidin) 발현 또는 활성증강제를 포함하는, 면역 증강용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 헵시딘 발현 또는 활성증강제를 포함하는 면역 증강용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 헵시딘(Hepcidin)의 발현 증진을 통한 인터페론 알파(Interferon- α , IFN- α)의 면역 반응 활성화를 통해 박테리아, 바이러스 등의 병원체 감염증을 치료 또는 치료 보조하기 위한 조성물 및 헵시딘의 발현 또는 활성이 증진된 후보물질을 면역 증강제로 선정하는 단계를 포함하는 면역 증강제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 조성물은 항균 단백질, 그 중에서도 헵시딘의 발현을 증대하여 인터페론 알파 면역반응을 활성화시켜 박테리아, 바이러스 등 병원체 감염증의 치료효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대되며, 상기 면역 증강제 스크리닝 방법에 의한 새로운 면역 증강제의 발견은 바이러스 질환의 치료에 유용하게 활용할 수 있을 것이다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

G01N 33/74 (2013.01)

G01N 2500/04 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711083958
과제번호	2017R1A2B2002289
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업/중견연구자지원사업
연구과제명	C형 간염바이러스 복제에 영향을 미치는 소포체 Membranous Web 메카니즘
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345315657
과제번호	2018R1A6A1A03025124
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야 기초연구사업 / 중점연구소 지원사업
연구과제명	경희대학교 의과학 연구소 / 활성산소 조절을 통한 만성 질병 예방 치료에 관한 연
구	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2018.06.01 ~ 2027.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

헵시딘의 발현 또는 활성 증강제를 포함하는 면역 증강용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 인터페론 알파 발현에 의하는 것인 면역 증강용 약학적 조성물.

청구항 3

a) in vitro 상에서 세포에 후보물질을 처리하는 단계;

b) 상기 세포에서 헵시딘 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및

c) 상기 후보물질 비처리군에 비해 상기 헵시딘 발현 또는 활성이 증진된 후보물질을 면역 증강제로 선정하는 단계를 포함하는 면역 증강제 스크리닝 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 후보물질은 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연물 추출물, 핵산 및 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 핵산은 siRNA, shRNA, microRNA, 안티센스 RNA, 앵타머(aptamer), DNA(locked nucleic acid), PNA(peptide nucleic acid) 및 모폴리노(morpholino)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 헵시딘(Hepcidin) 발현 또는 활성증강제를 포함하는 면역 증강용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 헵시딘(Hepcidin)의 발현 또는 활성 증진을 통한 인터페론 알파(Interferon- α , IFN- α)의 면역 활성화를 통해 박테리아, 바이러스 등의 병원체 감염증을 치료 또는 치료 보조하기 위한 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 선천적 면역 반응(innate immune response)은 특정한 병원체를 기억하지 않고 외부 인자의 침입에 즉각적으로 반응하는 면역 체계를 말한다. 면역력은 장기간 지속되지 않으며 포괄적인 방법으로 병원체를 처리하며 대식세포, 중성구와 같은 식세포 작용, 피부장벽, 항생물질들이 선천 면역에서 중요한 역할을 한다. 선천적 면역반응에 기여하는 생리학적 장벽은 온도, pH, 그리고 여러 용질과 세포와 연관된 분자들로 구성된다. 많은 종은 정상 체온이 병원체의 증식을 억제하기 때문에 쉽게 질병에 걸리지 않는다. 예를 들어 닭은 높은 체온이 세균의 증식을 저해하기 때문에 탄저병에 대해서 선천 면역을 가지고 있다. 이와 유사하게, 낮은 pH의 환경에서 살아남을 수 있는 미생물은 극소수이므로 위산도 생리학적인 선천 면역으로 작용한다.

[0003] 가용성 단백질인 리소자임, 인터페론, 그리고 보체(complement) 등을 비롯한 다양한 가용성 인자들 또한 선천 면역을 구성한다. 점액 분비물과 눈물 속에서 발견되는 가수분해 효소인 리소자임은 세균의 세포벽의 펩티도글

리칸 층을 부술 수 있다. 이는 특히 세포벽의 약 80-90%가 펩티도글리칸인 그람 양성균의 침입을 막는데 용이하다고 볼 수 있다. 병원체 중 바이러스등의 감염 시 바이러스 제거에 필요한 다수의 유전자를 발현시키고 선천면역뿐만 아니라 후천 면역 반응(adaptive immune response)의 개시를 유도하는 중요한 사이토카인인 인터페론은 체내 면역세포에서 분비가 되며 치료의 목적으로 주사를 통한 투여를 하기도 한다. 한 그룹의 단백질들로 구성된 인터페론은 바이러스에 감염된 세포로부터 만들어지며 인터페론의 많은 기능 중에는 근처 세포에 결합해서 항바이러스 상태를 유도하는 능력이 있다.

[0004] 한편, 헵시딘(Hepcidin)은 AMP(antimicrobial peptide) 계열의 하나로 철 상태, 저산소증, 산화 스트레스, 염증 및 감염에 의해 발현이 조절된다. 헵시딘은 HAMP 유전자에 의해 인코딩된 간 펩타이드 호르몬이며 순환계로의 철 유입의 주요 조절제로서 작용한다. 헵시딘 수치가 비정상적으로 높으면 대신세포와 간 세포의 철 포획으로 인해 혈청의 철수치가 감소하며 헵시딘 수치가 비정상적으로 낮으면 철의 과부하가 발생한다. 또한 이황화물이 풍부한 펩타이드 호르몬은 박테리아와 곰팡이에 대한 항균 작용을 가지고 있는 바 최근 간의 헵시딘은 C형 간염 바이러스(Hepatitis C Virus: HCV) 복제와 만성 C형 간염의 조절에 매우 관련이 있는 것으로 나타났다.

[0005] HCV 감염은 헵시딘의 발현을 억제하며, 합성 헵시딘펩타이드를 이용한 치료는 적어도 유전자형 1과 2의 경우 광범위한 항-HCV 활성을 가진다. 이러한 효과는 증가된 Hepcidin 발현을 통한 IFN 유도 유전자의 활성화와 연관이 있으나, (Iron regulator 643 Hepcidin exhibits antiviral activity against hepatitis C virus. *PLoS One*, 7(10)), 정확한 메커니즘과 인터페론 면역반응 활성화에 대해서는 전혀 보고된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 인터페론 면역반응 활성화 메커니즘에 대하여 연구를 진행한 결과, 헵시딘의 발현을 증진시키면 인터페론 알파의 mRNA 발현 및 세포 내 발생이 증진되고, 이를 통해 면역활성이 증감됨을 최초로 규명하였고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0007] 이에, 본 발명은 헵시딘 발현 또는 활성 증강제를 포함하는 면역 증강용 약학적 조성물의 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은

[0009] a) in vitro 상에서 세포에 후보물질을 처리하는 단계;

[0010] b) 상기 세포에서 헵시딘 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및

[0011] c) 상기 후보물질 비처리군에 비해 상기 헵시딘 발현 또는 활성이 증진된 후보물질을 면역 증강제로 선정하는 단계를 포함하는 면역 증강제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 헵시딘의 발현 또는 활성 증강제를 포함하는 면역 증강용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일 구현예로, 상기 조성물은 인터페론 알파의 발현을 증진시킬 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은

[0016] a) in vitro 상에서 세포에 후보물질을 처리하는 단계;

[0017] b) 상기 세포에서 헵시딘 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및

[0018] c) 상기 후보물질 비처리군에 비해 상기 헵시딘 발현 또는 활성이 증진된 후보물질을 면역 증강제로 선정하는 단계를 포함하는 면역 증강제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일 구현예로, 상기 후보물질은 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연물 추출물, 핵산 및 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 핵산은 siRNA, shRNA, microRNA, 안티센스 RNA, 앵타머(aptamer), DNA(locked nucleic acid), PNA(peptide nucleic acid) 및 모폴리노(morpholino)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명자들은 헵시딘 발현 또는 활성의 증강을 통해 인터페론 알파의 면역반응이 활성화됨을 관찰하였고, 이를 위한 헵시딘 발현 증강제로서 4-PBA가 효과적으로 작용함을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 조성물에 유효성분으로 포함될 수 있는 헵시딘 발현 또는 활성 증강제는 헵시딘의 발현 또는 활성을 증진시켜 인터페론 알파에 의한 면역반응을 활성화시킬 수 있는 바, 박테리아, 바이러스 등의 병원체 감염증 치료를 위한 다양한 조성물에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 헵시딘의 발현 또는 활성 증진 여부를 통한 면역 증강제스크리닝 방법은 새로운 치료제 개발에 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1a는 4-PBA에 의한 헵시딘의 단백질 발현 증가를 확인한 결과이다.
 도 1b는 4-PBA에 의한 헵시딘의 mRNA 발현 증가를 확인한 결과이다.
 도 1c 및 도 1d는 부형제 처리 조직에 비교해 4-PBA 처리된 조직에서의 헵시딘 발현 증가를 확인한 결과이다.
 도 1e는 4-PBA에 의한 헵시딘 3번 히스톤 단백질의 아세틸레이션 증가를 확인한 결과이다.
 도 1f는 4-PBA에 의한 전체 세포 용해물 내 H3K27에서의 히스톤아세틸레이션 증가를 확인한 결과이다.
 도 1g는 4-PBA에 의한 헵시딘 프로모터 부착 RNA 폴리머라아제 II 증가를 확인한 결과이다.
 도 2a는 4-PBA에 의한 Interferon Stimulated Response Element의 활성 증가를 확인한 결과이다.
 도 2b는 4-PBA에 의한 인터페론 알파의 mRNA 발현 및 세포 내 분비 증가를 확인한 결과이다.
 도 2c 및 2d는 인터페론 알파에 의해 발현이 유도되는 IFN 조절인자(*IRF1*, *IRF3*, *IRF7*), 단백질кина아제 R(*PKR*), 테트라트리코펩타이드 repeat1이 함유된 IFN 유도 단백질(*IFIT1*) 및 2'-5'-올리고아데닐레이트 합성효소 1(*OAS1*) 유전자들의 발현 증대를 나타낸 것이다.
 도 3a, 3b, 3c 및 3d는 헵시딘의 발현 억제에 따른 인터페론 알파 발현 변화를 확인한 결과이다.
 도 4a 및 4b는 HCV 레플리콘 기반 마우스 모델 확립을 확인한 결과이다.
 도 4c 및 4d는 4-PBA에 의한 NS5A 단백질 수준 감소를 확인한 결과이다.
 도 4e 및 4f는 헵시딘 발현의 억제 시 4-PBA 처리하여도 HCV 복제가 억제되지 않음을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0024] 본 발명은 헵시딘 발현 또는 활성 증강제를 포함하는 면역 증강용 약학적 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명에서 "헵시딘(hepcidin)"이란 인간에서 HAMP 유전자에 의해 코딩되는 단백질이며 포유 동물에서 철의 유입을 조절하는 주요 조절제이다. 헵시딘은 prepro-호르몬, pro-호르몬 및 호르몬으로서 존재하며, 32% 베타 시트 특성 및 4개의 이황화 결합에 의해 안정화된 헤어핀 구조를 갖는 단단히 접힌 폴리펩타이드이다.

[0026] 본 발명에서 사용되는 용어 "증강제"란 생명체의 각종 체내 능력을 증진하는데 쓰이는 약학 조성물을 의미하며, 대상 성분의 유전자 발현 또는 단백질 활성을 증대시키는 것을 포함한다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어 "면역"이란 생체의 내부환경이 외부인자인 항원에 대하여 방어하는 현상을 의미하며, 선천면역과 후천면역으로 구분된다. 선천면역은 외부물질이 감염되기 전부터 가지고 있는 자연면역(natural immunity)이며 인체의 물리적 방어체계인 피부, 점막 상피세포 및 점액 등을 침입하는 감염원에 신속하게 반응한다. 선천면역에 관여하는 구성성분은 항상 활성화되어 있거나 즉각적으로 활성화될 수 있는 상태이기 때문에 적응면역보다 신속하게 일어난다.

[0028] 본 발명에서 사용될 수 있는 "헵시딘 발현 또는 활성 증강제"는 헵시딘의 발현 또는 활성을 증진시키는 기능을

하는 물질이면 제한없이 사용될 수 있으며, 본 발명에서는 4-페닐부티르산(4-PBA)이 헵시딘의 발현을 증진시키는 물질임을 확인하였다.

- [0029] 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해 헵시딘 발현 또는 활성 증진을 통한 면역활성 증강 효과를 구체적으로 규명하였다.
- [0030] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는, HCV 복제가 구현되는 간암 세포주 및 마우스에 4-PBA를 처리함으로써 헵시딘의 발현이 증대하는 것을 확인하여 헵시딘의 발현 또는 활성을 증진시키는 4-PBA의 효능을 확인하였다(실시예 2 참조).
- [0031] 본 발명의 다른 실시예에서는, 헵시딘 발현 또는 활성 조절을 통한 면역 증강 기전을 확인한 결과, 4-PBA 처리를 통해 헵시딘의 발현이 증진되는 경우, 인터페론 알파의 발현이 증진되고, 반대로 헵시딘의 발현을 억제시킨 경우 인터페론 알파의 발현이 증가되지 않는 것을 확인하였다(실시예3 참조).
- [0032] 본 발명의 또다른 실시예에서는, 헵시딘의 발현 또는 활성 증가를 통한 면역증강으로 구체적인 치료 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, HCV 복제가 구현되는 Huh7.5-Con1 세포를 이식 받은 쥐에 4-PBA를 처리한 결과, HCV 복제가 생체 내에서 저해되는 것을 직접적으로 확인하였다(실시예 4 참조).
- [0033] 상기 실시예의 결과는 헵시딘의 발현 또는 활성을 증진시킬 수 있는 물질은 인터페론 알파의 발현을 증진시켜 면역활성을 유도할 수 있고, 이를 통해, 박테리아, 바이러스 등의 병원체 감염증 치료에도 효과적임을 시사한다.
- [0034] 본 발명에 따른 면역 증강제는 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능 한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제 등으로 제제화할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으나, 바람직하게는 경구투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료 또는 진단에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 진단하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성률 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 면역 증강제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0038] a) in vitro 상에서 세포에 후보물질을 처리하는 단계;
- [0039] b) 상기 세포에서 헵시딘(Hepcidin) 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및
- [0040] c) 상기 후보물질 비처리군에 비해 상기 헵시딘 발현 또는 활성이 증진된 후보물질을 면역 증강제로 선정하는 단계.

- [0041] 본 발명에서 사용되는 용어 "in vitro"란 조직배양에서와 같이 시험관 내에서 조직의 일부 및 유기체를 인공의 조건으로 실험하는 것을 의미한다. 생명체에게서 일어나는 반응이나 변화를 살아있는 생명체 내에서 직접 관찰하거나 조절하는 것은 상당히 까다로울 뿐더러, 반응에 영향을 줄 수 있는 변수가 매우 많아서 조작변인 이외의 요소를 일정하게 통제하는 것이 매우 어렵다. 반면 시험관 내부의 환경에서는 변인들을 쉽게 통제하는 것이 가능하며 관찰이 용이하기 때문에 실험을 보다 쉽게 수행할 수 있으므로 in vitro 상에서의 실험이 이용된다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 후보물질은 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연물 추출물, 핵산, 및 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으며, 상기 핵산은 siRNA, shRNA, microRNA, 안티센스 RNA, 앵타머 (aptamer), LNA(locked nucleic acid), PNA(peptide nucleic acid) 및 모폴리노(morpholino)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 상기 (b) 단계에서 상기 발현수준은 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay) 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있으나, 측정방법이 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 상기 (b) 단계에서 상기 활성수준은 헵시딘 히스톤 단백질의 아세틸레이션정도를 측정하는 것일 수 있으며, 이는 통상의 기술자가 공지된 방법을 통해 제한 없이 적절하게 수행할 수 있다.
- [0046] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0048] **[실시예]**
- [0049] **실시예 1. 실험준비 및 실험방법**
- [0050] **1-1. 정량적 실시간 역전사 중합 효소 반응 (qRT-PCR)**
- [0051] qRT-PCR은 ABI Prism 7300 실시간 PCR 시스템 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에서 Power SYBR Green PCR Master Mix를 이용하여 수행하였다. 증폭된 DNA의 완전성은 용융 온도를 결정하여 확인되었다. 발현 수준은 β -actin의 발현 수준으로 정규화하였다.
- [0053] **1-2. 세포 생존력의 결정**
- [0054] 세포 생존력은 lactate dehydrogenase (LDH)-release assays에 의해 측정하였다. LDH-release assays (Promega)가 제조사의 설명에 따라 동일한 조건 하에서 수행되었다. 각 값은 최소 9개 웰의 평균을 나타낸다.
- [0056] **1-3. 크로마틴 면역 침전 분석**
- [0057] 크로마틴면역침전(ChIP) 분석이 simpleChIP^R Enzymatic Chromatin IP 키트 프로토콜(cell signaling, MA, USA)에 따라 수행되었다.
- [0059] **1-4. 발광효소 분석**
- [0060] 발광효소 분석이 Renilla Luciferase Assay System kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용해 제조사의 설명에 따라 수행되었다.
- [0062] **1-5. 면역 블로팅**
- [0063] 단백질 분해 효소 억제제 각테일 (Calbiochem) 및 나트륨 마나데이트(NaVO₄)를 포함하는 용해 완충액 (50 mM

Tris-Cl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% NP- 40)으로 세포를 용해시켰다. 전체 용해물을 전기영동을 위해 10-14% SDS-PAGE 겔에 로딩하고 니트로셀룰로스 막으로 옮겼다. 막을 5% BSA로 1시간 동안 차단하고, 세척 후 1차 항체와 함께 4℃에서 밤새도록 배양하였다. 이후 2차 항체와 45분간 배양 후 향상된 웨스턴 블롯팅루미놀 시약 (Santa Cruz)에 의해 단백질을 시각화하였다.

[0065] 1-6. 면역 형광 분석

[0066] 세포를 24-웰 플레이트의 커버슬립에 시드하고 1일 후 지시된 대로 처리하였다. 배양 후세포를 실온에서 1시간 동안 4% 파라포름알데하이드로 고정시켰고 30분 동안 0.1%(v/v) NP-40으로 투과시켰다. 샘플은 인산염 완충 식염수 (PBS) 및 0.1%(v/v) 트리톤 X-100으로 세 번 세척하고 인산염 완충 식염수 내 1%(w/v) BSA 및 1%(v/v) 트리톤 X-100과 함께 배양하였다. 블로킹 후 샘플을 일차 항체와 함께 4℃에서 밤새 배양하였다. 3번 세척 후 세포를 빛으로부터 보호하면서 Alexa Fluor-488 또는 -546와 결합된 이차 항체 (Thermo Fisher Scientific)와 실온에서 1시간 동안 배양하였다.

[0068] 1-7. 면역 침전

[0069] 처리되거나 공동 형질 감염된 세포를 용해 완충제로 용해시키고 세포 용해물을 14,000 rpm에서 15분 동안 원심 분리하여 세척하였다. 용해물(2mg)은 항-hVAP-33 또는 항-NS5A 항체 (10 µg)과 함께 12시간 동안 4℃에서 배양되었다. 단백질을 A/G-결합 아가로스비드를 추가 후 5시간 동안 4℃에서 배양되었다. 비드는 1XTBST로 세 번 세척하였다. 면역펠티를 SDS-PAGE 샘플 완충액으로 비등시키고 전기 영동에 의해 분해시켰다.

[0071] 1-8. DNAs와 siRNAs 형질도입

[0072] 플라스미드와 siRNAs는 Xtreamgene HP (Roche, Swiss)를 이용해 제조사의 설명에 따라 형질도입되었다. Hepcidin-specific siRNA와 scrambled siRNA는 Dharmacon(Denver, CO, USA)에서 구매하였으며 Viromer BLUE (lipocalyx, Germany)를 이용하여 제조사의 설명에 따라 형질도입되었다.

[0074] 1-9. 세포 배양

[0075] HCV 유전자형 1b Huh7.5-Con 1 복제세포가 Apath (New York, NY, USA)에서 제공되었다. 세포는 습한 대기에서 (5% CO₂, 37℃) 2mM 비필수 아미노산, 100 U/mL 페니실린, 10% 소 태아 혈청 및 300 µg/mL 제네티신 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였다.

[0077] 1-10. Materials

[0078] 4-PBA와 4',6-디아미노-2-페닐인돌 (DAPI)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였으며 다클라타스비르 (DAV)는 MedChem Express (Monmouth Junction, NJ, USA)에서 구매하였다. 본 연구에 사용된 항체는 mouse anti-NS5A; Santa cruz (sc-65458), mouse anti-NS3; Santa cruz (sc-69938), mouse anti-a-actinin; Santa cruz (sc-17829), rabbit anti-hepcidin; abCAM (ab75883), rabbit anti-H3K9ac; abCAM (ab10812), rabbit anti-H3K27ac; abCAM (ab4729), mouse anti-RNA pol III; abCAM (ab817), rabbit anti-OSBP; proteintech (#11096-1-AP), rabbit anti-VAP-B; NOVUS (NBP1-89112), rabbit anti-hVAP-33; Santa cruz (sc-98890), rabbit anti-CypB; abCAM (ab16045), mouse anti-OCH1E5; mybiosource (MBS370077), rabbit anti-NS5A (For Immunohistochemistry); mybiosource (MBS485095), anti-grp78; Santa cruz (sc-13968), rabbit anti-PERK; Santa cruz (sc-13073), rabbit anti-IRE1a; Santa cruz (sc-20790), mouse anti-actin; Santa cruz (sc-8432)를 포함한다. 사용된 이차 항체는 goat anti-mouse IgG ; Invitrogen (M32607), goat anti-rabbit IgG; invitrogen (31460), Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG; Invitrogen (A-11034), Alexa Fluor488 goat anti-mouse IgG; Invitrogen (A-11001), Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG; Invitrogen (A-11005), Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG; Invitrogen (A-11012)이다.

[0080] 1-11. 전자 현미경

[0081] Huh 7.5-Con1 레플리콘 세포들을 1mM 4-PBA 또는 2 μ M DAV에서 24시간 동안 처리하고 인산염 완충액 (pH7.3)의 2.5% 글루타르알데하이드에 고정시켰다. 완충액에서 한 번 세척 후 세포를 동일한 완충액에서 1% 사산화오스뮴으로 고정하고 우라닐 아세테이트 포화 수용액으로 일괄적으로 염색하였다. 점진적 고농도의 에탄올에서 빠른 탈수 후 샘플은 Epon으로 침윤되고 내장되었다. 초박 절편을 구리 그리드 상에 절단 및 수집하고, 우라닐 아세테이트 및 납 시트레이트로 염색하여 120 kV에서 Tecnai G² Sprit Twin electron microscope (FEI, Hillsboro, OR, USA)로 관찰하였다. 이미지는 Digital Micrograph software (Gatan)를 이용한 US4000 charge-coupled device camera (Gatan, Pleasanton, CA, USA)로 디지털 캡처 하였다.

[0083] 1-12. 동물 실험

[0084] 국립암센터 임상시험 심사위원회 (서울시 고양구, reference no. NCC-15-249)의 동의 하에 동물 관리 및 실험 절차가 진행되었다. 동물 연구는 ARRIVE 지침 및 영국 약학 저널의 권고에 따라 보고된다. HCV 모델은 이미 기술한 대로 설정되었다. 즉, 남성 면역 결핍증 NOD/SCID 생쥐 (6주, 찰스 리버 연구소, 윌밍턴주, MA, USA)는 비원형 주사를 통해 HCV 복제 포함 Huh7.5-Con1 세포를 주입하였다. 마취 상태에서 세포 이식 및 수술 절차가 수행되었고 세포 이식 후 3주 후 세포 주입이 MRI 스캐닝에 의해 관찰되었다. 세포이식 7주 후 디메틸설폭사이드 또는 4-PBA가 폴리에틸렌 글리콜에 용해되어 복강 내 주사를 통해 매일 쥐에게 투여되었다. 처리 중 이틀에 한 번씩 체중을 측정하였다. 각 그룹은 5마리 동물로 구성되었으며 마지막 주입으로부터 7일 후 쥐의 간 조직이 분석을 위해 수집되었다. 수술과 주입이 수행되었고 동물들은 특정한 병원균이 없는 공간에서 처치받았다. 쥐는 일반 사료를 보급받고 특정한 병원균이 없는 조건에서 옥수수 더미와 함께 수용되었다.

[0086] 1-13. 면역 조직 화학

[0087] Dako REAL EnVision Detection System (Agilent Technologies, San Diego, CA, USA)를 이용해 면역학표식을 수행하였다. NS5A와 OCH1E5의 면역조직화학적 검출을 위해 샘플을 NS5A에 대한 모노클로날 항체와 함께 4°C에서 밤새 배양하였다. (1:500) 형광면역조직화학을 위해 탈파라핀화 및 재수화된 간 조직 부분들을 항-NS5A와 항- OCH1E5 항체와 함께 배양하였다. 샘플을 Fluoromount Aqueous Mounting배지 (시그마-알드리치)에 장착하고 다 초점 형광현미경으로 시각화하였다.

[0089] 1-14. 데이터와 통계 분석

[0090] 데이터와 통계 분석은 약리학의 실험 설계 및 분석에 관한 영국 약학 저널의 권장 사항을 준수하였다. 결과는 다섯 가지 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SEM으로 표현된다. 실험 설계에 따라 데이터는 t-테스트, 일원 또는 이원 분산 분석으로 분석되었다. 통계적 유의성 ($P < 0.05$)과 유의미한 분산 비동질성이 감지되지 않는 경우 분산분석에서 필요한 수준을 달성한 때, 사후 다중 비교 분석(Tukey's test)가 적용되었다. 통계 분석은 GraphPad Prism v.8.2.1을 이용해 수행되었다. $P < 0.05$ 에서 차이가 통계적으로 유의미한 것으로 간주되었다. 그룹 크기는 동일하도록 설계되었으며 항상 실험적 독립 반복 횟수를 나타내며, 각각은 고유한 생물학적 제제로 수행된다.

[0092] 실시예 2. 헵시딘 발현 증가 효과 검증

[0093] 헵시딘 발현 증강제로서 4-페닐부티르산(4-PBA)이 유효하게 작용하는지 확인하기 위하여, c형 간염 바이러스 유전자가 발현되는 간암 세포주 Huh7.5-Con 1에 1mM 4-PBA를 처리 한 후, 헵시딘 단백질 및 mRNA 발현 변화를 각각 면역 형광 염색과 qRT-PCR에 의해 확인하였다.

[0094] 그 결과, 도 1a 및 도 1b에 나타난 바와 같이, 4-PBA 처리에 따라 헵시딘 단백질 및 mRNA 발현이 증가되는 것을 확인하여, 4-PBA가 헵시딘 발현 증강제로 사용할 수 있음을 확인하였다.

[0096] 또한, 부형제를 처리한 쥐와 4-PBA 처리 쥐의 간을 이용하여 면역조직화학을 수행하였다. 그 결과, 도 1c 및 1d에 나타난 바와 같이, 부형제 처리 조직에 비해 4-PBA 처리된 간의 조직에서 헵시딘이 더 높게 발현됨을 확인할 수 있었다 (부형제: 0.07; 75mg/kg: 0.21; 150mg/kg: 0.32).

[0098] 한편, 추가적으로, 상기 현상의 메커니즘으로서 헵시딘 발현 증진이 헵시딘 유전자 자리에서 후생유전적 변경과 연관이 있는지 여부를 확인하기 위해, 4-PBA로 6, 12 또는 24시간 처리된 Huh7.5-Con1 세포유래 genomic DNA에 크로마틴면역 침전 (CHIP) qPCR 분석을 수행하였다. 그 결과, 도 1e에 나타난 바와 같이, 헵시딘 3번 히스톤 단백질의 9번, 27번 lysine 잔기의 아세틸레이션이 증가함을 확인하였다. 이와 더불어, 도 1f에 나타난 바와 같이, Huh7.5-Con1 세포에 4-PBA를 처리하여 전체 세포 용해물 내 H3K27에서 히스톤아세틸레이션이 증가함을 확인하였다.

[0100] 또한, 도 1g에 나타난 바와 같이, 4-PBA 처리를 통해 헵시딘 프로모터에 부착된 RNA 폴리머라이제 II의 증가도 확인할 수 있었다.

[0102] 실시예 3. 헵시딘 발현 또는 활성 조절을 통한 면역증강 기전 확인

[0103] 헵시딘의 발현 또는 활성 조절을 통해 면역활성 유도가 조절되는지 확인하기 위하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.

[0104] 먼저, Huh7.5-Con1 세포에 실시예 2를 통해 헵시딘 발현 증강제로 검증된 4-PBA를 1mM 처리하고 인터페론 반응의 변화를 확인하였다.

[0105] 그 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이, 4-PBA 처리에 따라 인터페론 반응 개시를 간접적으로 확인할 수 있는 Interferon Stimulated Response Element (ISRE)의 활성이 약 세 배 증가됨을 발광 효소 분석을 이용해 확인할 수 있었다. 또한, 도 2b에 나타난 바와 같이, 인터페론 알파의 mRNA 발현 및 세포 내로의 발생 및 분비도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 더욱이, 도 2c 및 도 2d에 나타난 바와 같이, IFN- α 에 의해서 발현 유도되어 병원체 제거에 관여하는 것으로 알려진 IFN 조절인자(*IRF1*, *IRF3*, *IRF7*), 단백질키나아제 R(*PKR*), 테트라트리코펩타이드 repeat1이 함유된 IFN 유도 단백질(*IFIT1*) 및 2'-5'-올리고아데닐레이트 합성효소 1(*OAS1*) 유전자들의 발현이 모두 증대되는 것을 확인할 수 있었다.

[0107] 다음으로, 인터페론의 반응증대에 헵시딘의 발현 또는 활성 증진이 관여하는지 재확인하기 위해, siRNA를 이용하여 헵시딘 유전자(HAMP) 발현을 억제한 후 4-PBA를 1mM 처리하고, 관련 유전자들의 발현 변화를 확인하였다.

[0108] 그 결과, 도 3a, 3b, 3c 및 3d에 나타난 바와 같이, 헵시딘 발현이 억제된 경우 4-PBA를 처리하여도 인터페론 반응이 증가하지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[0110] 실시예 4. 마우스 모델에서 면역활성에 의한 항바이러스 효과 확인

[0111] 상기 실시예 1 및 2에 의해 헵시딘 발현 증가를 통해 인터페론 알파를 발현하게 하는 것으로 확인된 4-PBA의 면역 활성 증강을 확인하기 위한 예로서, 4-PBA의 HCV 저해 효과를 평가하기 위해 Huh7.5-Con1 세포를 면역결핍 NOD/SCID 쥐에 이식하여 HCV 레플리콘 기반 마우스 모델을 생산하였다. 모델이 확립되었는지 확인하기 위해 수술 후 3주와 7주에 자기공명영상(MRI)과 해부학적 관찰로 간 형태를 검사하였다(도 4a 및 도 4b).

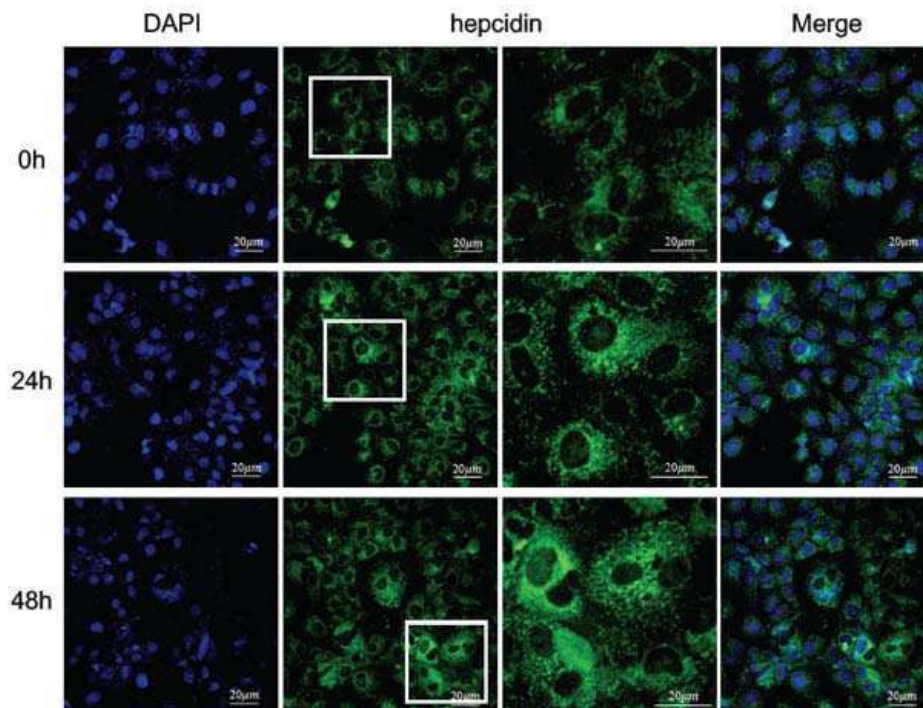
[0112] HCV 레플리콘 세포의 접종 7주 후 7일 간 매일 4-PBA(매개체+75 or 150 mg/kg)를 주입하였다. 4-PBA의 항바이러스 효과는 HCV NS5A의 면역조직화학 및 면역 형광 표지에 의해 평가되었으며, 이식된 Huh7.5-Con1 세포는 인간 간세포-특이적 항원 OCH1E5의 발현에 기초하여 확인되었다. 4-PBA의 잠재적 독성과 연관해 체중의 현저한 감소는 없었으나 4-PBA를 처리한 쥐는 매개체 주입 쥐와 비교해 OCH1E5-양성 영역에서 NS5A 단백질 수준의 현저한 감소를 나타내었다(도 4c 및 도 4d). 상기의 결과는 4-PBA가 HCV 복제를 생체 내에서 저해하는 강력한 증거를 제시한다.

[0113] 반대로 도 4e 및 4f와 같이, 헵시딘 발현이 억제된 Huh7.5-Con1 세포에 4-PBA를 처리한 경우 HCV복제가 억제되지 않는 결과를 확인할 수 있었다.

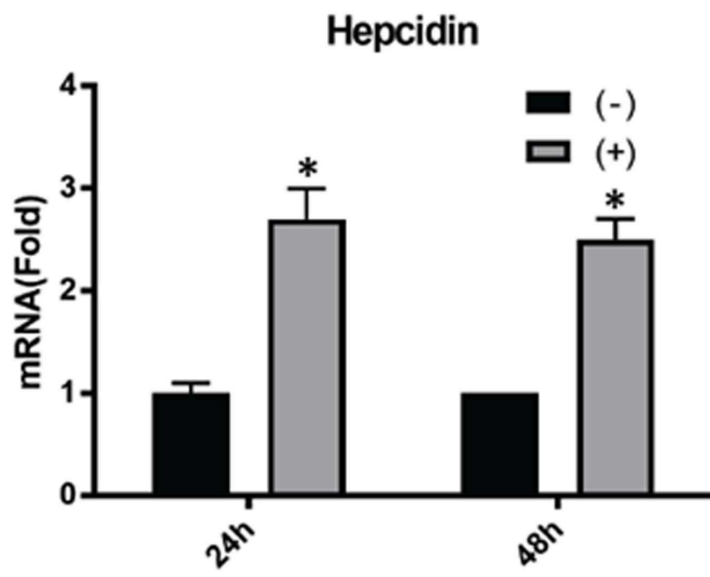
[0115] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

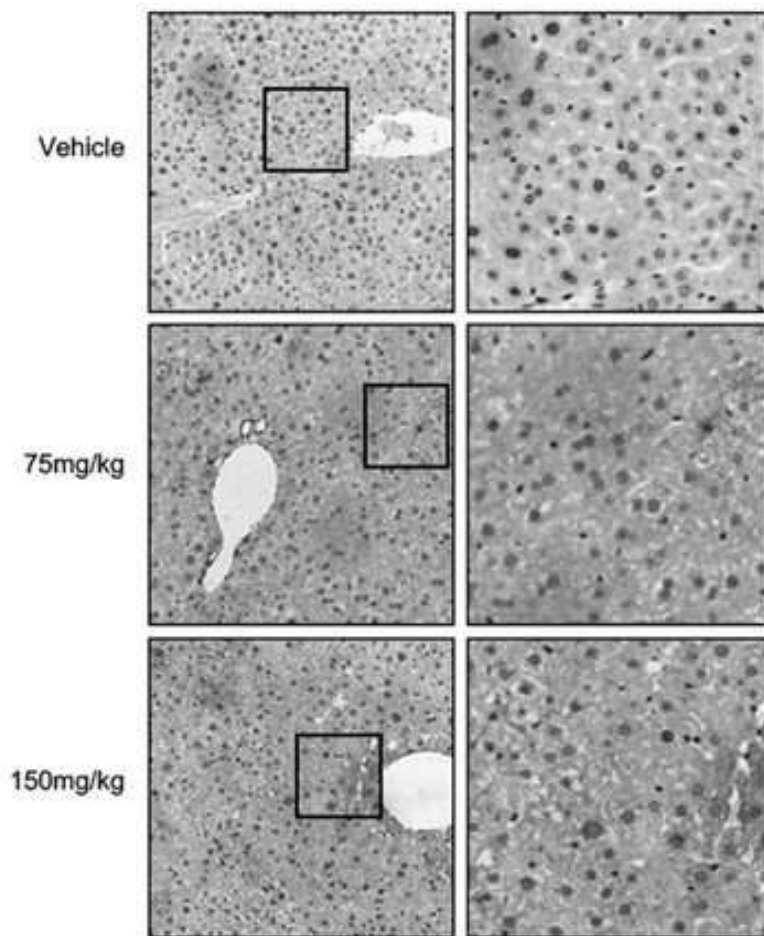
도면1a



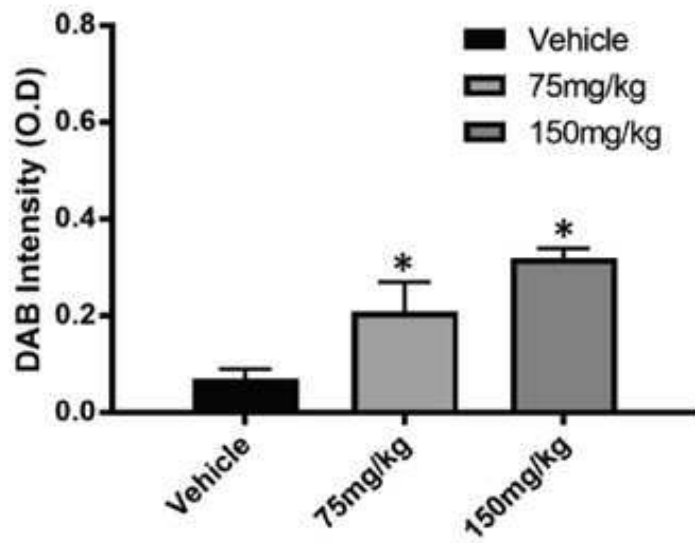
도면1b



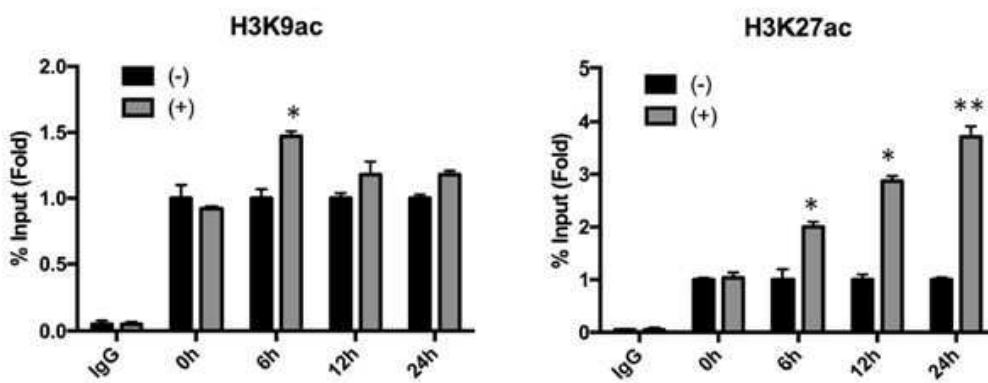
도면1c



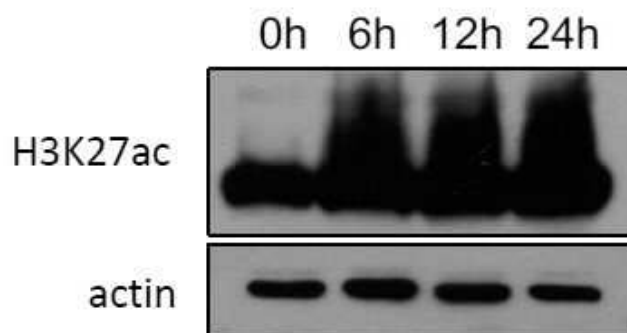
도면1d



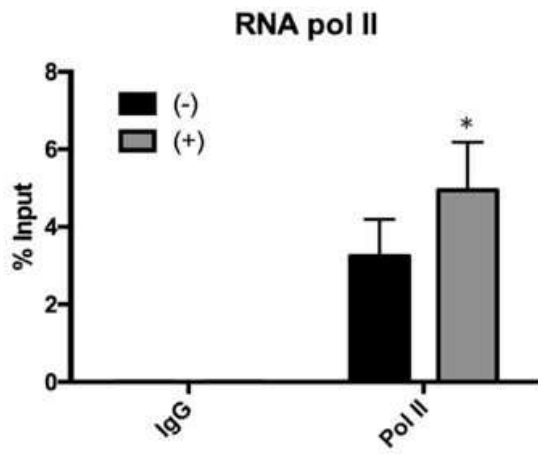
도면1e



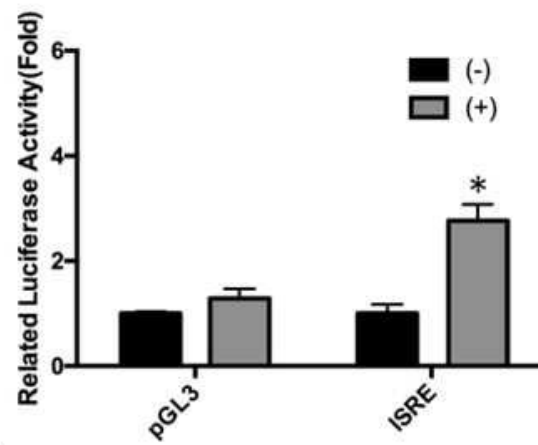
도면1f



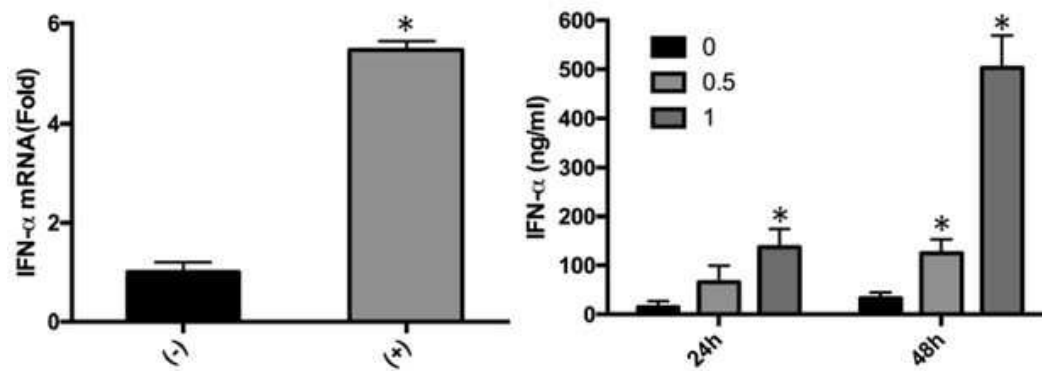
도면1g



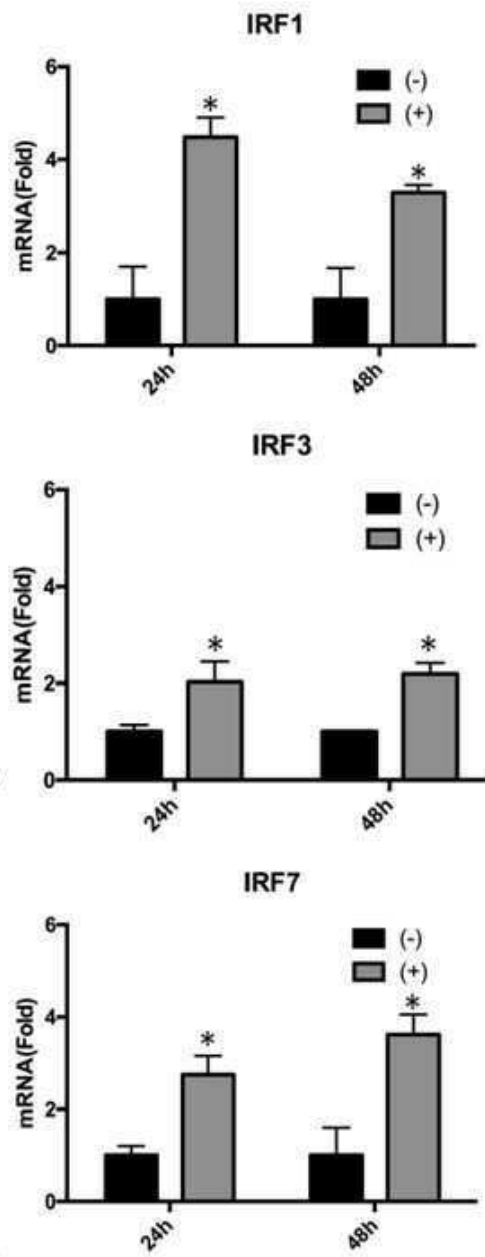
도면2a



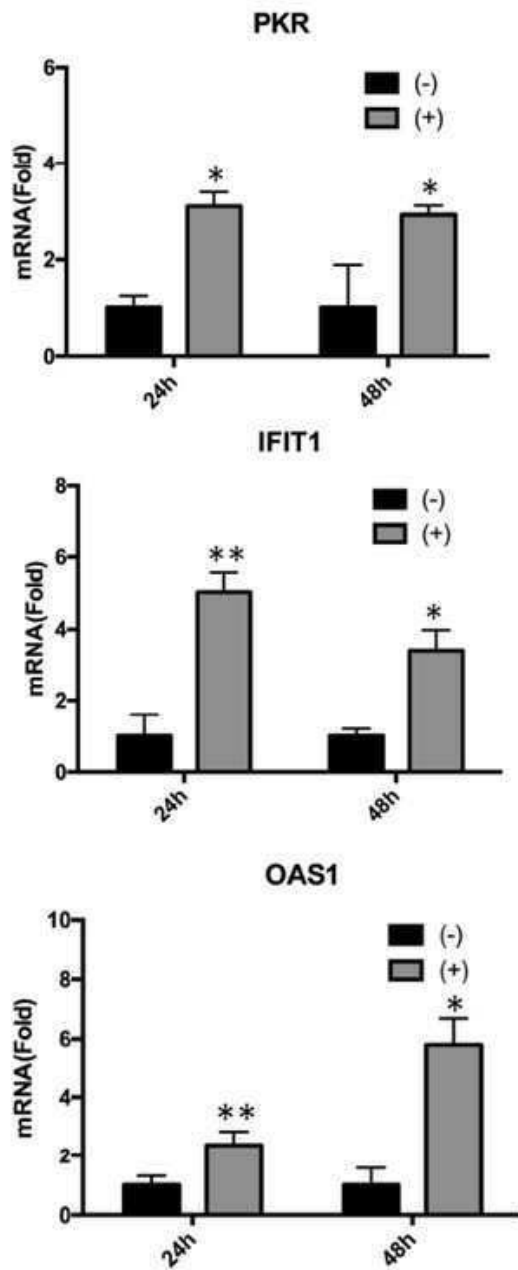
도면2b



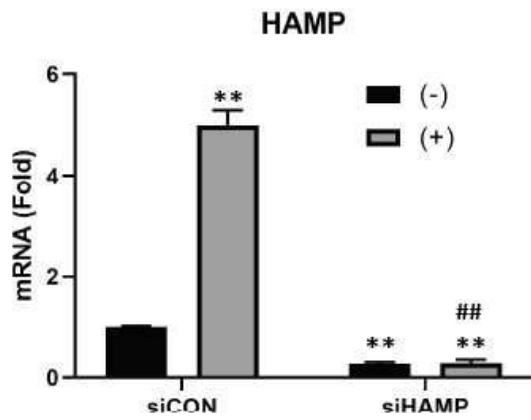
도면2c



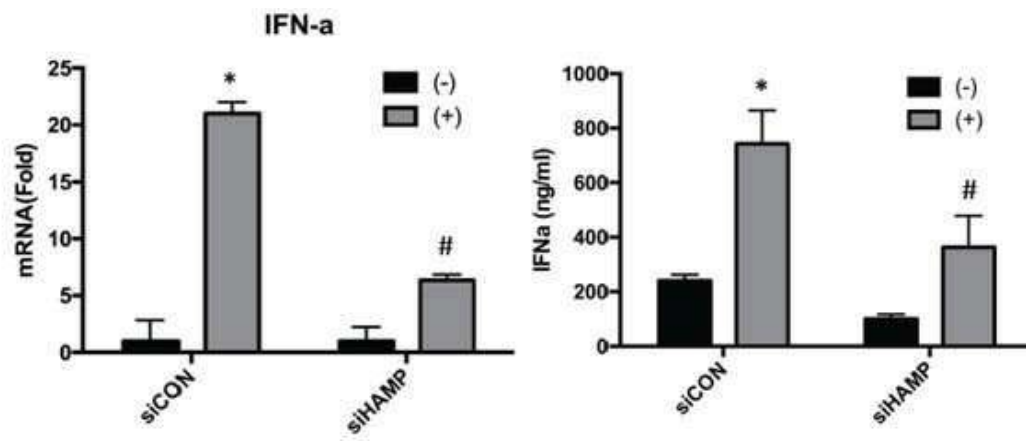
도면2d



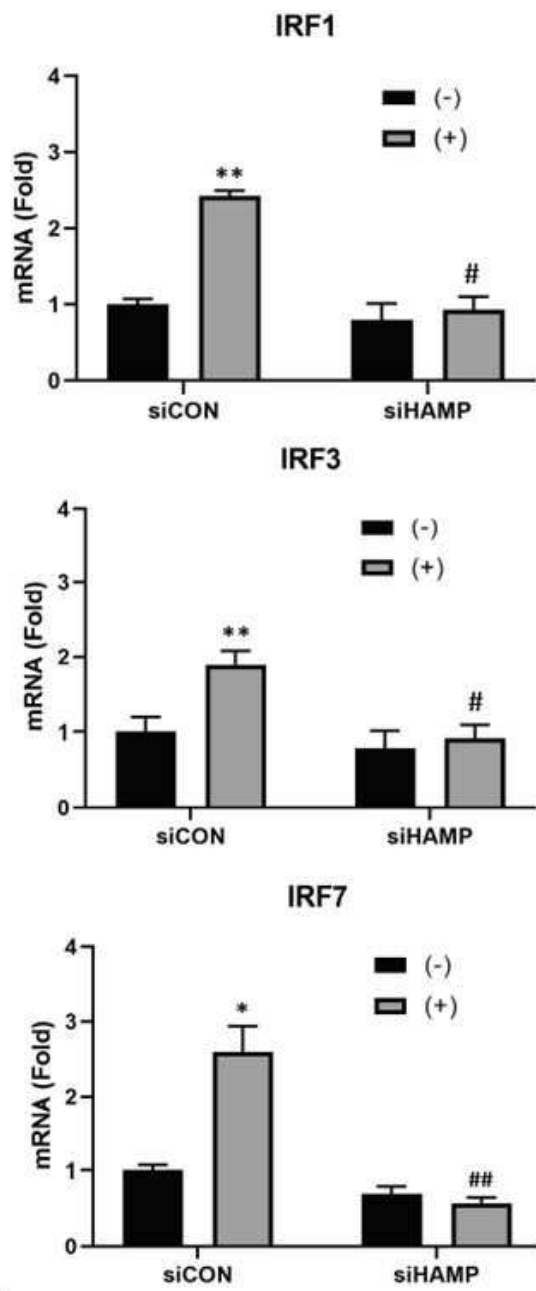
도면3a



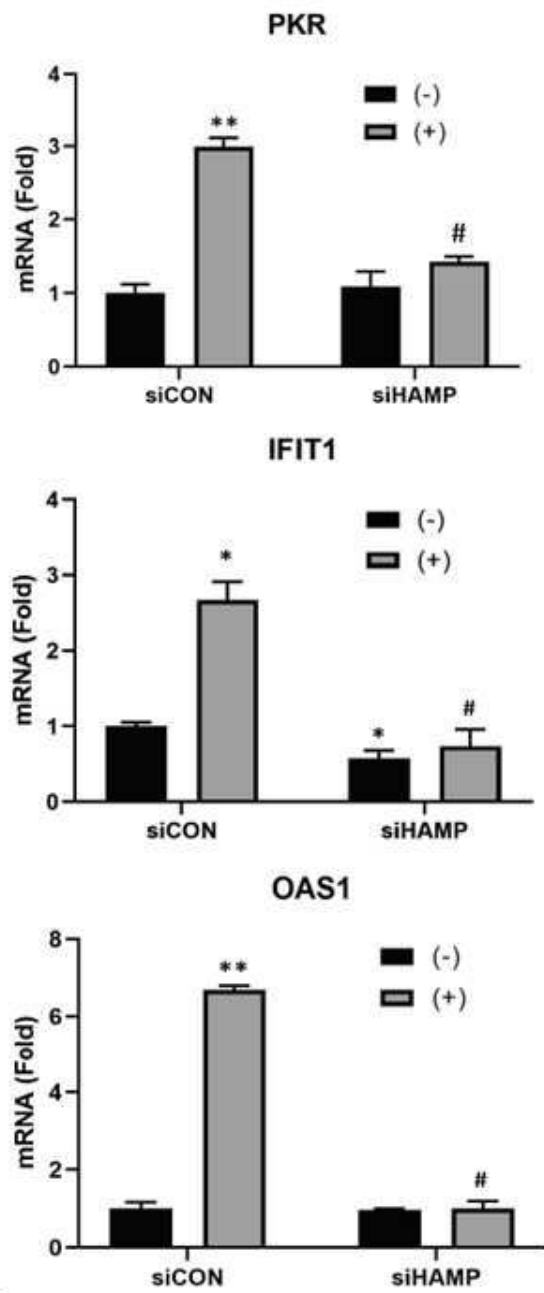
도면3b



도면3c



도면3d



도면4a

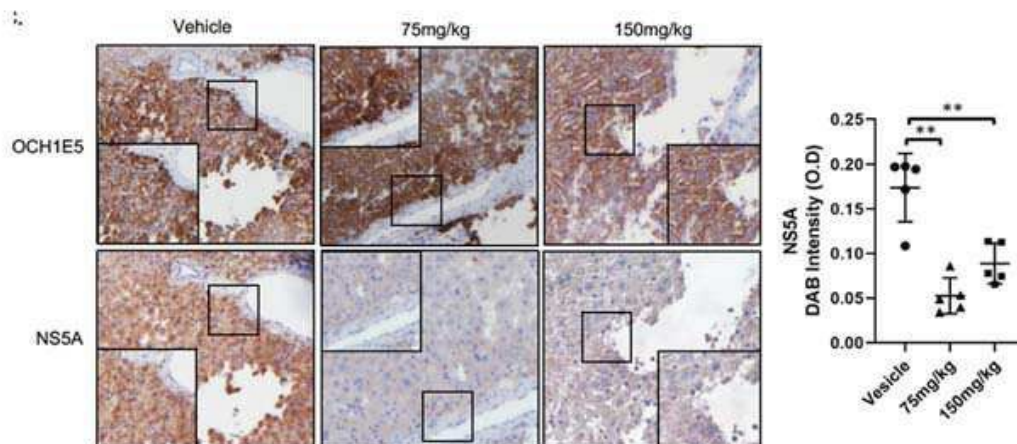


도면4b

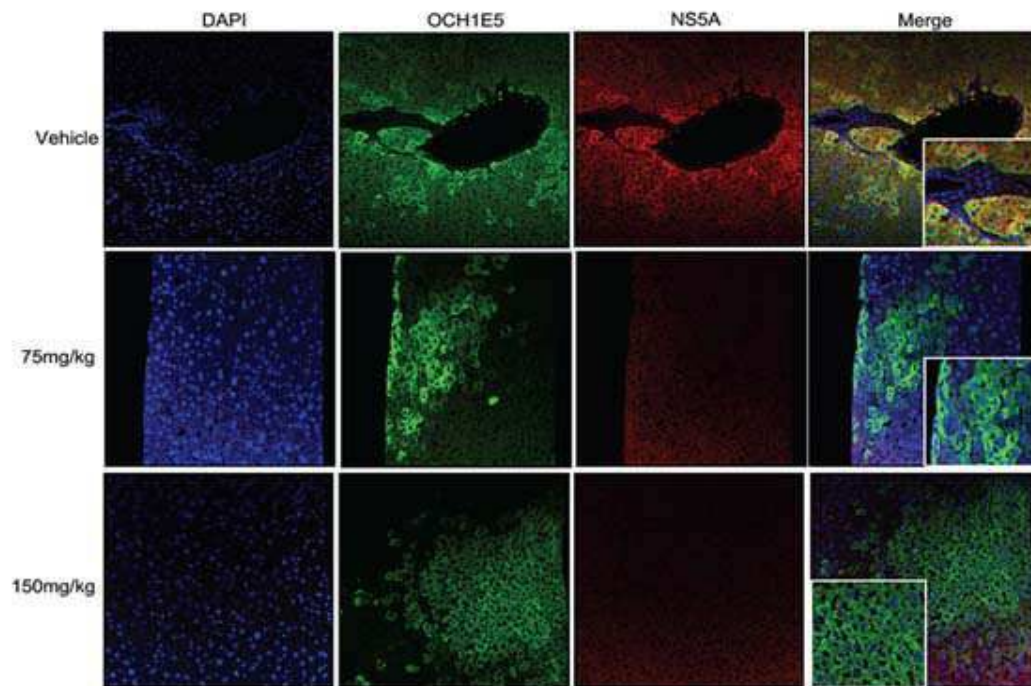


<7 weeks after surgery>

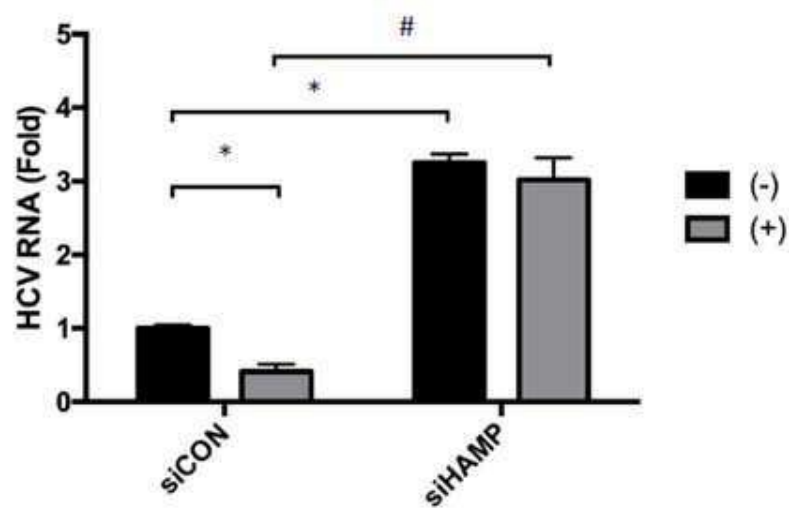
도면4c



도면4d



도면4e



도면4f

