



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년04월05일
 (11) 등록번호 10-1723434
 (24) 등록일자 2017년03월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01) *G01N 33/569* (2017.01)

(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A23L 33/13 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2016-0069604

(22) 출원일자 2016년06월03일

심사청구일자 2016년06월03일

(56) 선행기술조사문헌

US20070286854 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

재단법인 한국파스퇴르연구소

경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16 (삼평동)

(72) 발명자

민지영

서울시 서초구 동광로 22 나길 40

이지혜

경기도 성남시 분당구 불곡북로35번길 7, 102호 (정자동)

신동조

경기도 성남시 수정구 모란로93번길 4-1, 103호 (태평동)

(74) 대리인

특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 9 항

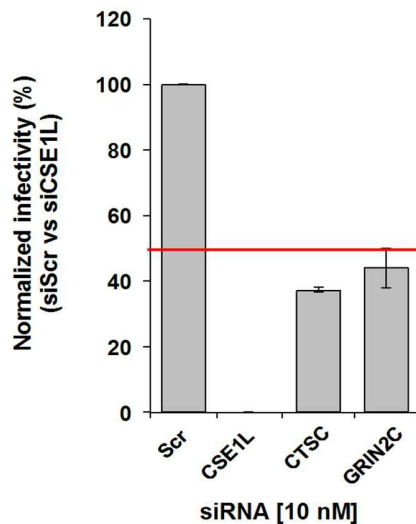
심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 인플루엔자 바이러스의 복제에 관여하는 신규 인간 유전자 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 인플루엔자 바이러스의 복제에 관여하는 신규 인간 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 인플루엔자 바이러스의 복제에 관여하는 CTSC 유전자의 발현 억제제, CTSC 단백질의 활성 억제제 또는 이의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 예방 또는 개선용 건강기능식품, CTSC 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하여 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스제를 스크리닝하는 방법 및 항바이러스제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

- A61K 39/395 (2013.01)
- C12Q 1/701 (2013.01)
- G01N 33/56983 (2013.01)
- A23V 2002/00 (2013.01)
- A23V 2200/30 (2013.01)
- A61K 2039/505 (2013.01)
- C12Q 2600/136 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2013M3A9B5076486
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단 (National Research Foundation of Korea)
연구사업명	원천기술개발사업 (부처사업명 (대))바이오·의료기술개발사업 (사업명 (중))차세대신약기
반기술개발사업 (세부사업명 (소))	
연구과제명	High-throughput 표현형 분석기술을 기반으로 한 siRNA microarray chip 플랫폼 개발/최적
화 및 유용 유전자 발굴	
기 여 율	1/1
주관기관	재단법인한국파스퇴르연구소
연구기간	2013.12.26 ~ 2018.12.25

명세서

청구범위

청구항 1

CTSC(Cathepsin C) 유전자의 발현 억제제로서 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 CTSC 유전자의 siRNA를 유효성분으로 포함하는, A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) 및 A/EM/Korea/W152/2006 (H7N7)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 A형 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 CTSC 유전자는 상기 인플루엔자 바이러스의 복제에 관여하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

CTSC(Cathepsin C) 유전자의 발현 억제제로서 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 CTSC 유전자의 siRNA를 유효성분으로 포함하는, A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) 및 A/EM/Korea/W152/2006 (H7N7)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 A형 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 8

(a) 항바이러스용 후보물질을 CTSC 유전자를 발현하는 분리된 시료에 처리한 다음, 상기 CTSC 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준이 상기 시료를 처리하지 않은 대조군 시료의 수준보다 낮은 경우, A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) 및 A/EM/Korea/W152/2006 (H7N7)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 A형 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스제로 선택하는 단계;를 포함하는 항바이러스제의 스크리닝 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 CTSC 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 단계는 역전사효소 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 중합효소반응(competitive RT-PCR), 실시간 역전사효소 중합효소반응(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 유전자 칩에 의하여 측정되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 CTSC 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 단계는 상기 CTSC 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 이용하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 CTSC 유전자의 단백질의 수준을 측정하는 단계는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 12

CTSC 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) 및 A/EM/Korea/W152/2006 (H7N7)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 A형 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스제의 스크리닝 키트.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트, 경쟁적 RT-PCR 키트, 실시간 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인 것을 특징으로 하는 스크리닝 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인플루엔자 바이러스의 복제에 관여하는 신규 인간 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 인플루엔자 바이러스의 복제에 관여하는 CTSC 유전자의 발현 억제제, CTSC 단백질의 활성 억제제 또는 이의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 예방 또는 개선용 건강기능식품, CTSC 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하여 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스제를 스크리닝하는 방법 및 항바이러스제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현재 인플루엔자 약물은 두 가지 단백질, 즉, M2 이온 채널(ion channel) 및 뉴라미다아제(neuraminidase)만을 타겟으로 하며, 두 가지 단백질 모두 바이러스 유전자 산물이다. 불행히도, 현재 상기 두 가지 종류의 약물에 대한 내성이 광범위하게 퍼져 있어 유행성 인플루엔자 및 전세계적 유행성 인플루엔자 예방을 위한 신규한 항바이러스 약물에 대한 요구가 시급한 실정이다. 감염 동안 바이러스 복제를 조절하는 숙주 인자(host factor)는 현재 약물에 대한 내성의 발달을 가능하게 하는 인플루엔자 바이러스 유전자의 높은 돌연변이율을 결여시키는 뚜렷한 특징을 가지기 때문에 매력적인 항바이러스 타겟으로 고려되어 왔다.

[0003] 한편, CTSC(Cathepsin C) 유전자는 면역 체계의 세포에서 많은 세린 프로테이나아제(serine proteinase)의 활성화를 위한 주요 조정자(central coordinator)로 여겨지는 리소좀 시스테인 프로테이나아제(lysosomal cysteine proteinase) 및 펩티다아제 C1 패밀리(peptidase C1 family)의 멤버를 코딩한다. 선택적 스플라이싱(splicing)은 다수의 전사 변이체를 야기하며, 이들 중 적어도 하나는, 단백질 가수분해로 처리되어 디설파이드 결합 이량체를 형성하는 중쇄 및 경쇄를 생성하는 프레프로단백질(preproprotein)을 코딩한다. 프로펩타이드의 일부는 성숙한 효소(mature enzyme)의 안정화 및 폴딩(folding)을 위한 분자내 샤페론(intramolecular chaperone)으로 작용한다. 이 효소는 활성을 위해 염소 이온을 필요로 하며 글루카곤을 분해할 수 있다. 코딩된 단백질에서의 결함은 수장족 저각화증(palmoplantar keratosis) 및 치주염을 특징으로 하는 상염색체 열성 질환(autosomal recessive disorder), Papillon-Lefevre 증후군의 원인으로 밝혀졌다. 그러나, 인플루엔자 바이러스와 관련하여 CTSC의 기능에 대해서는 알려진 바가 없다.

[0004] 선행기술문헌으로 Karlas A 등의 Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication(Nature 463:818-822, 2010)에서는 인플루엔자 바이러스 복제에 중요한 숙주인자로 *GRIN2C* 유전자 등을 포함한 다양한 유전자를 제시한 바 있으나, *CTSC* 유전자가 인플루엔자 바이러스에 중요한 역할을 한다는 것 대해서는 전혀 언급된 바가 없다.

[0005] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스제 개발을 위한 신규 타겟을 탐색하기 위해 예의 노력한 결과, 인간의 CTSC 유전자가 인플루엔자 바이러스의 복제에 요구되는 중요한 숙주 인자(host factor)로 작용하여 이의 발현 또는 활성을 억제하는 경우, 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료에 효과

적임을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 CTSC(Cathepsin C) 유전자의 발현 억제제, CTSC 단백질의 활성 억제제 또는 이의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 CTSC(Cathepsin C) 유전자의 발현 억제제, CTSC 단백질의 활성 억제제 또는 이의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 항바이러스용 후보물질을 CTSC 유전자를 발현하는 분리된 시료에 처리한 다음, 상기 CTSC 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준이 상기 시료를 처리하지 않은 대조군 시료의 수준보다 낮은 경우 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스제로 선택하는 단계;를 포함하는 항바이러스제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 CTSC 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스제의 스크리닝 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상술한 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 CTSC(Cathepsin C) 유전자의 발현 억제제, CTSC 단백질의 활성 억제제 또는 이의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 인플루엔자 바이러스는 A형 인플루엔자 바이러스일 수 있다.
- [0012] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 CTSC 유전자는 인플루엔자 바이러스의 복제에 관여할 수 있다.
- [0013] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 CTSC 유전자의 발현 억제제는 CTSC 유전자의 안티센스, 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 및 microRNA로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0014] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 siRNA는 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 활성 억제제는 CTSC 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머일 수 있다.
- [0016] 본 발명은 또한, CTSC(Cathepsin C) 유전자의 발현 억제제, CTSC 단백질의 활성 억제제 또는 이의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한, (a) 항바이러스용 후보물질을 CTSC 유전자를 발현하는 분리된 시료에 처리한 다음, 상기 CTSC 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준이 상기 시료를 처리하지 않은 대조군 시료의 수준보다 낮은 경우 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스제로 선택하는 단계;를 포함하는 항바이러스제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 CTSC 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 단계는 역전사효소 증합효소 반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 증합효소반응(competitive RT-PCR), 실시간 역전사효소 증합효소반응(real time quantitative RTPCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 유전자 칩에 의하여 측정될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 CTSC 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 단계는 상기 CTSC 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 이용하 수 있다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 CTSC 유전자의 단백질의 수준을 측정하는 단계는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용할 수 있다.
- [0021] 본 발명은 또한, CTSC 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 인플루엔자 바이러스

에 대한 항바이러스제의 스크리닝 키트를 제공한다.

[0022] 본 발명의 바람직한 실시시에 따르면, 상기 키트는 RT-PCR 키트, 경쟁적 RT-PCR 키트, 실시간 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명은 CTSC 유전자가 인플루엔자 바이러스의 복제에 중요한 숙주인자로 작용한다는 것을 규명한 바, 본 발명의 CTSC 유전자를 이용하여 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 건강기능식품, 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스제의 스크리닝 방법 및 스크리닝 키트를 제공할 수 있다.

[0024] 본 발명에서 신규 타겟으로 사용되는 CTSC 유전자는 감염 동안 바이러스 복제를 조절하는 숙주인자(host factor)로서, 현재 약물에 대한 내성의 발달을 가능하게 하는 인플루엔자 바이러스 유전자의 높은 돌연변이율을 결여시키는 뚜렷한 특징을 가지기 때문에 종래에 내성이 보고된 항바이러스제를 대체할 수 있는 신규 항바이러스제 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 rPR8 NS1-GFP 바이러스로 감염된 인간 폐 상피 A549 세포를 나타내는 사진으로, 화살표는 rPR8 NS1-GFP 바이러스에 감염된 세포를 나타낸다.

도 2는 GFP가 태그된 NS1A 단백질을 발현하는 재조합 인플루엔자 A 바이러스를 이용한 이미지 기반 어세이(image-based assay) 결과를 나타내는 사진으로, 각각 음성 대조군(scramble)과 양성 대조군(siCSE1L 및 siNXF1)을 나타낸다.

도 3은 전체 인간 유전체의 광범위한 초고속 siRNA 스크리닝(whole human genome-wide high throughput siRNA screening)의 개요를 나타낸 개략도이다.

도 4는 본 발명의 분석 프로그램을 이용한 세포 감염력을 측정된 결과로, 윗줄은 공초점 현미경으로부터 수득한 사진이고, 아래줄은 본 발명의 이미지 분석 프로그램을 사용하여 분석된 사진이다.

도 5는 본 발명의 스크리닝 방법을 이용하여 확인된 CTSC 유전자에 대한 siRNA로 형질전환된 세포의 감염력을 스크램블 siRNA로 형질전환된 세포(음성 대조군, 감염력 100%) 및 siCSE1L로 형질전환된 세포(양성 대조군, 감염력 0%)에 대해 정규화하여 나타낸 그래프로, 붉은색 선은 선별 기준($\geq 50\%$ 억제)을 나타내며, 바(bar)는 2회 평균 \pm SD을 보여준다.

도 6은 H7 조류 인플루엔자 바이러스(H7N7)에 대한 siCTSC의 바이러스 복제 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0027] 상술한 바와 같이, 현재 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스제의 내성이 광범위하게 퍼져 있어 유행성 인플루엔자 및 전세계적 유행성 인플루엔자 예방을 위한 신규한 항바이러스 약물에 대한 요구가 시급한 실정이다.

[0028] 이에 본 발명에서는, 인간의 CTSC 유전자가 인플루엔자 바이러스의 복제에 요구되는 중요한 숙주 인자로 작용하여 이의 발현 또는 활성을 억제하는 경우, 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료에 효과적임을 확인하고, CTSC(Cathepsin C) 유전자의 발현 억제제, CTSC 단백질의 활성 억제제 또는 이의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공함으로써 상술한 문제의 해결방안을 모색하였다. 본 발명에서 신규 타겟으로 사용되는 CTSC 유전자는 감염 동안 바이러스 복제를 조절하는 숙주인자로서, 현재 약물에 대한 내성의 발달을 가능하게 하는 인플루엔자 바이러스 유전자의 높은 돌연변이율을 결여시키는 뚜렷한 특징을 가지기 때문에 종래에 내성이 보고된 항바이러스제를 대체할 수 있는 신규 항바이러스제 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명은 CTSC(Cathepsin C) 유전자의 발현 억제제, CTSC 단백질의 활성 억제제 또는 이의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0030] 본 발명의 약학적 조성물은 인플루엔자 바이러스, 바람직하게는 A형 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료에 효과적이며, 상기 A형 인플루엔자 바이러스의 종류로는 A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) A/EM/Korea/W152/2006

(H7N7), A/EM/Korea/W266/2007 (H7N4), A/California/07/2009 (H1N1), A/Udorn/307/72 (H3N2) 등이 있으나, CTSC 유전자의 발현 또는 단백질의 활성을 억제하여 복제가 억제되는 바이러스라면 특별히 제한하지 않는다.

- [0031] 상기 용어 "CTSC"는 "Cathepsin C"의 약어로, CTSC 유전자에 의해 코딩된 단백질의 결함은 수장족 저각화증 (palmoplantar keratosis) 및 치주염을 특징으로 하는 상염색체 열성 질환(autosomal recessive disorder), Papillon-Lefevre 증후군의 원인으로 밝혀졌으나, 인플루엔자 바이러스와 관련하여 CTSC의 기능에 대해서는 알려진 바가 없다.
- [0032] 상기 CTSC 유전자 및 단백질 서열은 NCBI와 같은 공지된 데이터베이스에서 얻을 수 있다. 구체적으로, CTSC 유전자 서열은 NCBI 데이터베이스의 Gene Accession NM_001814로 개시된 것일 수 있으며, CTSC 단백질 서열은 NCBI 데이터베이스의 NP_001805.3로 개시된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 본 발명에서는 상기 CTSC 유전자가 인플루엔자 바이러스의 복제에 중요한 숙주인자로 작용한다는 것을 처음으로 규명하여 상기 유전자의 발현 또는 단백질의 활성을 억제함으로써 인플루엔자 바이러스 감염을 효과적으로 치료할 수 있다는 것을 확인하였다.
- [0034] 본 발명의 일실시예에서는 GFP가 태그된 NS1A 단백질을 발현하는 재조합 인플루엔자 A 바이러스(rPR8 NS1-GFP)를 제조한 후(도 1), 이를 이용하여 이미지 기반 어세이(Image-based assay)를 통해 전체 인간 유전체의 광범위한 초고속 siRNA 스크리닝(whole human genome-wide high throughput siRNA screening)을 수행하였다(도 3).
- [0035] siRNA 초고속 스크리닝(HTS)을 통해 선별된 유전자의 억제 효과를 비교하기 위해, 음성 대조군으로 비특이적인 스크램블 siRNA(Scramble)를 사용하였고 인플루엔자를 조절하는 중요한 숙주인자로 밝혀진 인간 CSE1L(chromosome segregation 1-like)과 인간 NXF1(nuclear RNA export factor 1)을 타겟팅하는 siRNA를 양성 대조군으로 사용하여 이미지 기반 어세이(image-based assay)를 최적화하였다(도 2).
- [0036] 각각의 개별적인 인간 유전자의 녹다운(knockdown) 효과는 내부(in-house) 이미지 분석 프로그램을 이용하여 감염력(GFP를 발현하는 세포의 수/총 세포의 수)을 계산함으로써 측정되었고(도 4), 강력한 Z-스코어 분석과 각 플레이트 상에서 양성 대조군(sicSE1L, 0% 감염율) 및 음성 대조군(Scramble, 100% 감염율)과의 비교를 통해 인플루엔자 A 바이러스의 복제에 대해 50% 이상의 억제 효과를 야기하는 인간 유전자 CTSC를 동정하였으며, 그 결과는 도 5와 같다.
- [0037] 도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 CTSC 유전자를 타겟으로 하는 siRNA는 종래에 인플루엔자 바이러스 복제에 중요한 인간 유전자로 공지된 GRIN2C를 타겟으로 하는 siRNA 보다 우수한 감염 억제율을 나타낸다는 것을 확인하였다. 이를 통해, 본 발명의 CTSC 유전자의 발현을 억제하는 것은 GRIN2C 유전자의 발현을 억제하는 것 보다 효과적으로 인플루엔자 바이러스 감염을 치료할 수 있을 것으로 판단된다.
- [0038] 나아가 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명의 CTSC 유전자를 타겟으로 하는 siRNA는 H7 조류 인플루엔자 바이러스(H7N7)의 복제 또한 억제하는 것으로 확인되었다. 따라서, CTSC 유전자의 발현을 억제하는 것은 조류 인플루엔자 바이러스 감염 증상을 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0039] CTSC의 서열을 바탕으로 CTSC의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 설계할 수 있으며, 상기 서열은 이러한 설계에 있어 일정 정도 변형이 가능하다. 본 기술 분야의 당업자라면 이러한 인위적인 변형에 의해 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 보다 더 구체적으로는 98%의 상동성이 유지되는 서열 역시 사용할 수 있음은 자명하다.
- [0040] 본 발명에서 사용되는 용어 "CTSC 유전자의 발현 억제제"는 CTSC의 발현 또는 활성을 감소시키는 물질을 통칭하는 의미로 사용되며, 보다 구체적으로는 CTSC의 발현을 전사 수준 또는 단백질 수준에서 감소시키는 모든 물질을 포함할 수 있다. 상기 CTSC 발현을 억제하는 물질은 CTSC을 표적으로 하여 CTSC의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 화합물, 핵산, 펩타이드, 바이러스 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터 등 형태에 제한없이 사용 가능하다.
- [0041] 구체적으로, 상기 CTSC 유전자의 발현 억제제는 CTSC 유전자의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 및 microRNA로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA, RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해

하는 작용을 한다.

- [0043] 본 발명에서 용어 "작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA)"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knockdown) 방법으로서 또는 유전자치료 방법으로 제공된다.
- [0044] 구체적으로, 상기 siRNA는 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 용어 "짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA)"은 목적유전자에 대한 siRNA 염기서열의 sense 와 상보적인 nonsense 사이에 3-10개의 염기 링커를 연결하는 올리고 DNA를 합성한 후 플라스미드 벡터에 클로닝하거나 또는 shRNA를 레트로바이러스인 렌티바이러스(lentivirus) 및 아데노바이러스(adenovirus)에 삽입하여 발현시키면 루프가 있는 헤어핀 구조의 shRNA (short hairpin RNA)가 만들어지고 세포 내의 Dicer에 의해 siRNA로 전환되어 RNAi 효과를 나타내는 것을 말한다. 상기 shRNA는 siRNA에 비해 비교적 장기간 RNAi 효과를 나타낸다.
- [0046] 이러한 발현 억제제는 당업계에서 통상적으로 사용되는 기술에 따라 당업자가 CTSC 유전자의 발현 억제를 유도하도록 용이하게 설계될 수 있다.
- [0047] 또한, 상기 CTSC 단백질의 활성 억제제는 CTSC 유전자로부터 발현되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0048] 이러한 항체는 다클론 항체, 단일클론 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 상기 항체의 단편들도 본 발명의 항체에 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체, 및 인간 항체 등도 포함하며, 신규한 항체 외에 이미 당해 기술분야에서 공지된 항체들도 포함될 수 있다. 상기 항체는 CTSC 유전자로부터 발현되는 단백질을 특이적으로 인식하는 결합의 특성을 갖는 한, 2개의 중쇄와 2개의 경쇄의 전체 길이를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체의 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명에서 용어 "앵타머(Aptamer)"는 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)이다. 앵타머는 고유의 높은 친화성(보통 pM 수준)과 특이성으로 표적분자에 결합할 수 있다는 특성 때문에 단일 항체와 비교가 되고, 특히 "화학항체"라고 할 만큼 대체 항체로서의 높은 가능성이 있다.
- [0050] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"이란, 상기 조성물을 개체에 투여하여 인플루엔자 바이러스의 감염을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"란, 상기 조성물을 인플루엔자 바이러스 감염 개체에 투여하여 감염 증상이 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.
- [0051] 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 율활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 의약 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 향산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 율활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 약학적 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성화 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구 내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 유효성분의 유효량은 감염의 예방 또는 치료 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 감염의 종류, 감염의 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, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예컨대, 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여시, 본 발명의 저해제는 1일 1회 내지 수회 투여시, 유효성분이 화합물일 경우 0.1mg/kg~10g/kg, 폴리펩타이드, 단백질 또는 항체일 경우

0.1ng/kg~10g/kg, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNAi, miRNA일 경우 0.01ng/kg~10g/kg의 용량으로 투여할 수 있다.

- [0053] 본 발명은 또한, CTSC(Cathepsin C) 유전자의 발현 억제제, CTSC 단백질의 활성 억제제 또는 이의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0054] 상기 식품의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 비제한적인 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.
- [0055] 본 발명의 상기 건강기능식품이 음료 조성물인 경우, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비제한적인 예로 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 수크로오스와 같은 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 들 수 있다. 상기 첨가되는 추가 성분의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.
- [0056] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강 기능 식품 조성물은 천연 과일 주스, 과일 음료 또는 야채 음료 등의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 사용되거나 2 이상을 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가물의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.
- [0057] 본 발명은 또한, (a) 항바이러스용 후보물질을 CTSC 유전자를 발현하는 분리된 시료에 처리한 다음, 상기 CTSC 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준이 상기 시료를 처리하지 않은 대조군 시료의 수준보다 낮은 경우 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스제로 선택하는 단계;를 포함하는 항바이러스제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0058] 인플루엔자 바이러스 감염을 예방 또는 치료할 수 있는 후보물질의 부재 하에 CTSC 유전자를 발현하는 세포에서 본 발명의 CTSC의 수준을 측정하고, 또한, 상기 후보물질의 존재 하에서 본 발명의 상기 CTSC의 수준을 측정하여 양자를 비교한 후, 상기 후보 물질이 존재할 때의 CTSC의 발현 수준을 상기 후보물질의 부재 하에서의 수준보다 감소시키는 물질을 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 치료용 항바이러스제로 예측할 수 있다.
- [0059] 상기 CTSC 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 단계는 CTSC 유전자 mRNA의 수준을 측정하는 제제로 측정될 수 있으며, 상기 제제는 시료에 포함된 CTSC의 발현 여부를 확인하는 방법에 사용되는 제제를 의미하고, 바람직하게는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), 유전자 칩 분석법 등의 방법에 사용되는 표적 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브가 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [0060] 본 발명에서 사용되는 용어 "프라이머"란, 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다.
- [0061] 본 발명에서 사용되는 용어 "프로브"란, 유전자 또는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하는데, 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고, 보다 용이하게 검출하기 위하여 라벨링될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0062] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체 (예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)

로의 변형이 있다. 핵산은 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기, 예를 들면, 단백질(예: 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그날 펩타이드, 폴리-L-리신 등), 삽입제(예: 아크리딘, 프소랄렌 등), 킬레이트화제(예: 금속, 방사성 금속, 철, 산화성 금속 등), 및 알킬화제를 함유할 수 있다. 본 발명의 핵산 서열은 또한 검출 가능한 시그날을 직접적으로 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다. 표지의 예로는 방사성 동위원소, 형광성 분자, 바이오틴 등이 있다.

[0063] 본 발명에서 사용되는 용어 "단백질의 수준을 측정하는 단계"란 CTSC 유전자로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 구체적으로는, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다.

[0064] 본 발명에서, "항체"란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 CTSC 유전자의 발현으로 생성된 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. CTSC 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 것은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다.

[0065] 다클론 항체는 CTSC 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 중 숙주로부터 제조 가능하다.

[0066] 단일클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method)(Kohler 및 Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제할 수 있다.

[0067] 또한 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.

[0068] 상기 항체를 이용하여 이와 결합한 표적 단백질의 양을 확인하기 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0069] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

[0070] 세포 배양

[0071] 본 발명에서 사용한 인간 폐 상피 A549 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Catalog No. CCL-185TM)로부터 구매하여 사용하였으며, Dulbecco's Modified Eagle Medium - high glucose (DMEM-HG)에 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% 페니실린&스트렙토마이신을 포함한 배지에서 배양하였다.

[0072] 녹색 형광 단백질을 발현하는 재조합 A형 인플루엔자 바이러스의 제조

[0073] 본 발명에 사용된 녹색 형광 단백질을 발현하는 재조합 인플루엔자 바이러스(A/Puerto Rico/8/34)는 Adolfo Garcia-Sastre 박사(Professor in Department of Microbiology and Director of the Global Health & Emerging Pathogens Institute at Mount Sinai School of Medicine in New York)로부터 입수하였으며, 개략적인 제조방법은 다음과 같다. 인플루엔자의 유전자 중 nonstructural protein 1 (NS1 protein)을 코딩하고 있는 NS1 유전자의 오픈리딩프레임 (Open Reading Frame; ORF) 뒤에 녹색형광단백질을 코딩하는 GFP 유전자를 융합(fusion) 하여 NS-GFP 유전자 절편을 만든다. 이 유전자 절편은 세포내에서 발현될 수 있도록 만든 DNA 플라스미드에 삽입되게 된다. NS-GFP 유전자 절편을 포함한 DNA 플라스미드는 NS 유전자 이외의 인플루엔자 바이러스

의 7개 유전자 (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M)를 포함하는 각각의 7개 플라스미와 함께 형질주입 (transfection)방법을 통해 세포내로 이입된다. 세포내에서 이들 플라스미드들은 기반의 역유전학적 (reverse genetics) 기술을 통해 재조합 인플루엔자 바이러스를 생성한다.

실시예 2

[0074] rPR8 NS1-GFP 바이러스를 이용한 이미지 기반 에세이

[0075] 인간 폐 상피 A549 세포를 상기 실시예 1에서 제조된 rPR8 NS1-GFP 바이러스로 10시간 동안 감염시켰다. 세포를 고정하고 세포 핵을 염색하였다. 감염된 세포는 20× 배율의 공초점 형광 이미징 시스템(confocal fluorescence imaging system, Evotec Technologies High-Throughput Cell Analyzer Opera, Perkin Elmer, USA) 상에서 이미지화하고, 내부 IM(in-house image mining) 플랫폼으로 분석하였다.

[0076] 도 1에 나타난 바와 같이, NS1-GFP와 핵은 각각 녹색 및 붉은색으로 시각화되었고, 화살표는 rPR8 NS1-GFP 바이러스 감염 세포를 나타낸다.

[0077] 본 발명에서는 siRNA 초고속 스크리닝(HTS)을 통해 선별된 유전자의 억제 효과를 비교하기 위해, 음성 대조군으로 비특이적인 스크램블 siRNA(Scramble, Dharmacon)를 사용하였고 인플루엔자를 조절하는 중요한 숙주인자로 밝혀진 인간 CSE1L(chromosome segregation 1-like)과 인간 NXF1(nuclear RNA export factor 1)을 타겟팅하는 siRNA(Dharmacon)를 양성 대조군으로 사용하여 이미지 기반 어세이(image-based assay)를 최적화하였다.

[0078] 이후, 전술한 바와 같이 rPR8 NS1-GFP 바이러스로의 감염 후 세포 고정 및 염색을 수행한 후 20× 배율의 공초점 형광 이미징 시스템 상에서 이미지화하고, 내부 IM 플랫폼으로 분석하였다. 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 CSE1L 및 NXF1를 녹다운시키는 것은 GFP가 태그된 바이러스 NS1A 단백질의 발현을 효과적으로 차단하였다.

실시예 3

[0079] 인간 유전체의 광범위한 초고속 siRNA 스크리닝

[0080] RNA 간섭(RNA interference, RNAi) 기술은 숙주 병원체 관계를 이해하는데 강력한 도구이다. 본 실시예에서는 인간 세포에서 인플루엔자 바이러스의 복제에 필요한 숙주인자를 확인하기 위해 도 3의 개략도에 나타난 바와 같이 유전체의 광범위한 siRNA 초고속 스크리닝(HTS)을 사용하였다.

[0081] HTS에 대한 관독을 위해, 상기 실시예 1에서 제조된 재조합 인플루엔자 A 바이러스 (rPR8 NS1-GFP)를 사용하였고, 실시예 2의 이미지 기반 어세이를 사용하여, 인간 폐 상피 A549 세포에서 18,055개의 표시된 유전자(유전자당 4개의 siRNA pool)를 타겟팅하는 약 72,000개의 siRNA로 구성되는 전체 인간 유전체의 광범위한 siRNA 라이브러리(Dharmacon, #GU-105005, Human ON-TARGETplus siRNA Library - Whole Genome)를 스크리닝 하였다.

[0082] 384 웰 플레이트에 10μl의 siRNA를 첨가한 후 형질감염 시약(transfection reagent)을 포함하는 용액을 5μl씩 각 웰에 분주한다. 실온에서 20분동안 방치한 후, A549 세포를 30μl씩 384 웰 플레이트에 분주한다. 48시간 후, 형질감염된 A549 세포를 rPR8 NS1-GFP 바이러스로 10시간 동안 감염시킨다. 개별적인 siRNA로 형질감염된 A549 세포는 파라포름알데하이드로 고정되며 동시에 세포핵 염색 시약인 Hoechst 33342 (Thermo Fiusher Scientific)을 통해 염색된다. rPR8 NS1-GFP 바이러스로 감염시키기 48시간 전에 개별적인 siRNA로 형질감염된 A549 세포는 바이러스 감염력을 모니터링하기 위해 감염 10시간 후 고정 및 염색되었다.

[0083] 각각의 개별적인 인간 유전자의 녹다운(knockdown) 효과는 내부(in-house) 이미지 분석 프로그램을 이용하여 감염력(GFP를 발현하는 세포의 수/총 세포의 수)을 계산함으로써 측정되었다(도 4).

[0084] 강력한 Z-스코어 분석과 각 플레이트 상에서 양성 대조군(sicSE1L, 0% 감염율) 및 음성 대조군(Scramble, 100% 감염율)과의 비교를 통해 인플루엔자 A 바이러스의 복제에 대해 50% 이상의 억제 효과를 야기하는 유전자 인간 유전자를 동정하였으며, 그 결과는 도 5에 나타난 바와 같다.

[0085] 또한, 본 발명의 CTSC 유전자를 타겟으로 하는 siRNA는 종래에 인플루엔자 바이러스 복제에 중요한 인간 유전자로 공지된 GRIN2C를 타겟으로 하는 siRNA 보다 우수한 감염 억제율을 나타낸다는 것을 확인하였다. 이를 통해, 본 발명의 CTSC 유전자의 발현을 억제하는 것은 GRIN2C 유전자의 발현을 억제하는 것보다 효과적으로 인플루엔자 바이러스 감염을 치료할 수 있을 것으로 판단된다.

[0086] 본 실시예에서 사용된 CTSC 및 GRIN2C를 타겟으로 하는 siRNA의 서열은 다음 표 1 같다.

표 1

[0087]

Gene Symbol	Sequence
CTSC	GCUUUGAGAUUGUGUUGAA (서열번호: 1)
	GCACCUAUCUUGACCGUCU (서열번호: 2)
	CAACUGCUCGGUUAUGGGA (서열번호: 3)
	GUAGUGGUGUACCUUCAGA (서열번호: 4)
GRIN2C	GAGCAUGGCGUCCUAUACA (서열번호: 5)
	UCAGAAGUGUGAGUUAUCA (서열번호: 6)
	CGCAGUAACUACCGUGACA (서열번호: 7)
	CAAGAGCAAUACAUCGACA (서열번호: 8)

실시예 4

[0088]

A형 인플루엔자 바이러스의 아형(subtype)에 대한 복제 억제 효과

[0089]

본 실시예에서는 CTSC 유전자를 타겟으로 하는 siRNA로 인해 상기 유전자의 발현억제가 스크리닝에 사용된 A형 인플루엔자 바이러스인 rPR8 NS1-GFP 이외에도 다른 아형 (subtype) 바이러스 복제에 억제효과를 보이는지 확인하기 위해 H7 조류 인플루엔자 바이러스(A/EM/Korea/W152/2006, H7N7)를 이용하여 추가 실험을 실시하였다.

[0090]

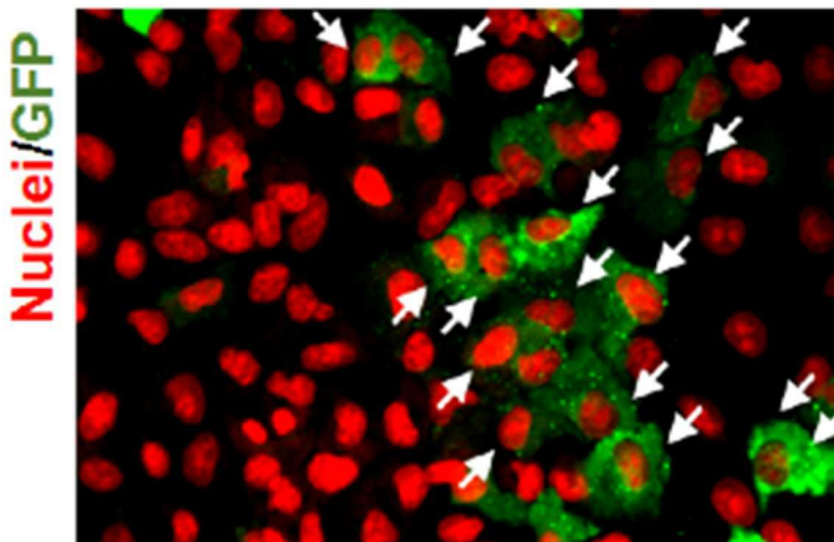
H7 조류인플루엔자 바이러스의 감염정도는 바이러스 단백질인 nucleoprotein (NP)에 특이하게 결합하는 항체를 사용한 면역형광법 (immunofluorescence assay)을 통해 이미지화 하였다. 감염력 (NP를 발현하는 세포의 수/ 총 세포의 수)은 내부 이미지 분석 프로그램을 이용하여 측정하였다. 측정된 감염력은 음성 대조군 (scramble, 100% 감염율)으로 정규화 (normalization)하여 막대 그래프로 나타내었다.

[0091]

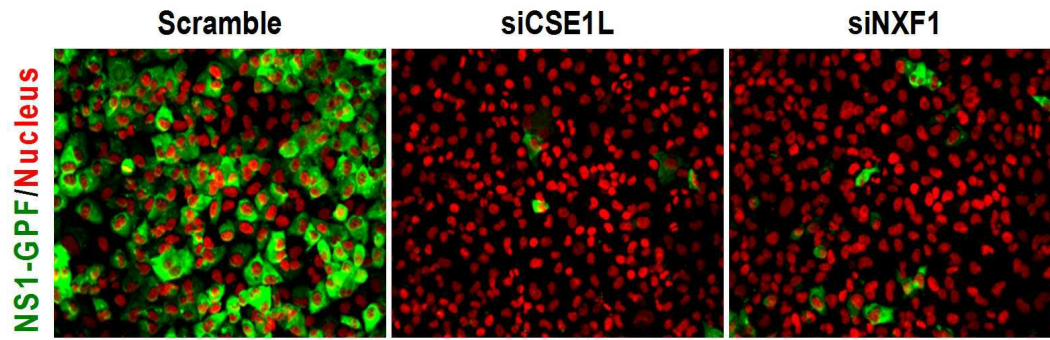
그 결과 도 6에 나타난 바와 같이, CTSC 유전자의 발현 억제에 의해 A형 인플루엔자 바이러스의 H7N7 아형의 복제를 20% 정도 억제하는 것을 확인하였다. 따라서, CTSC 유전자 발현의 억제를 통해 H7 조류 인플루엔자 바이러스의 감염을 유의적으로 예방 또는 치료할 수 있음을 확인하였다.

도면

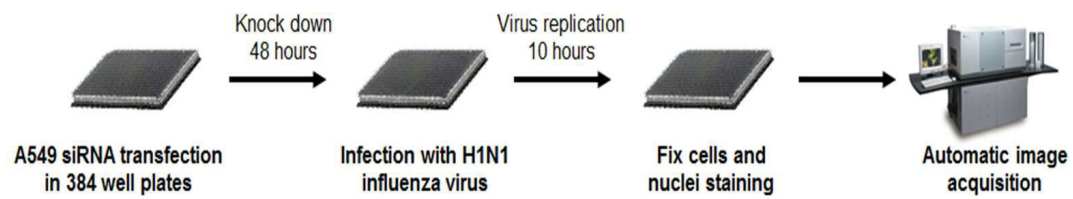
도면1



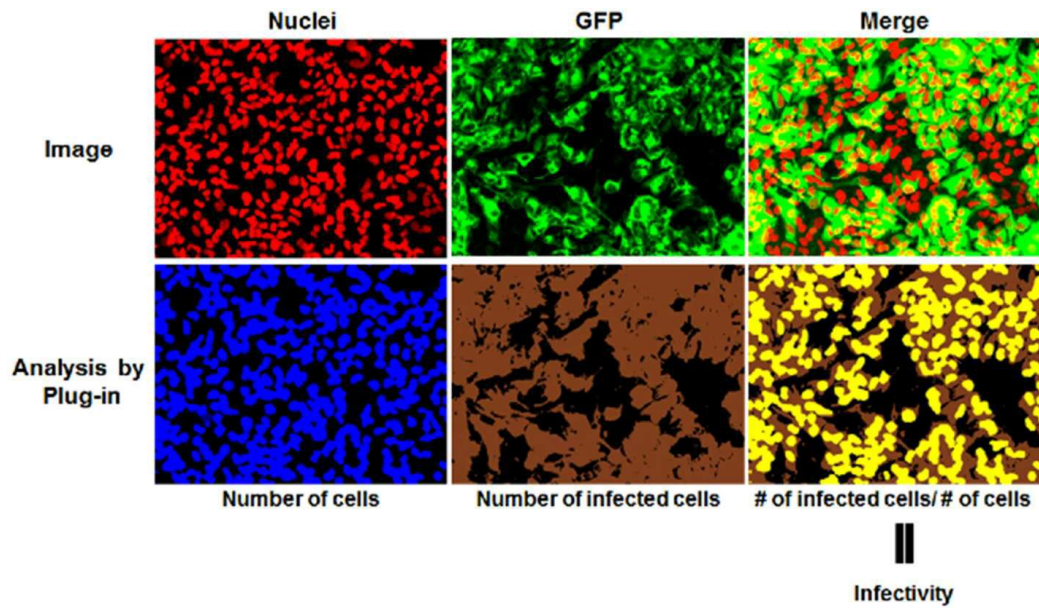
도면2



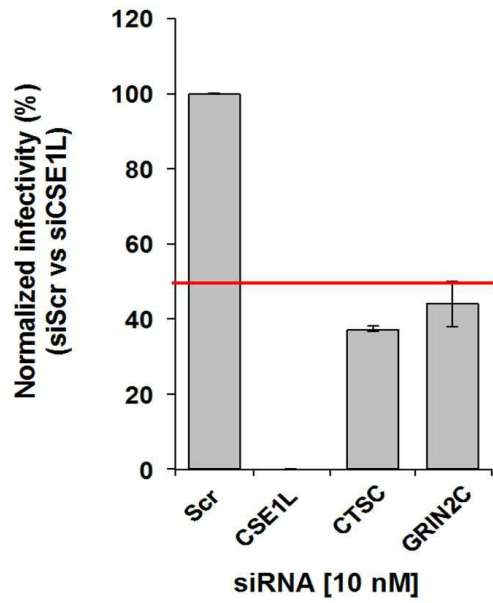
도면3



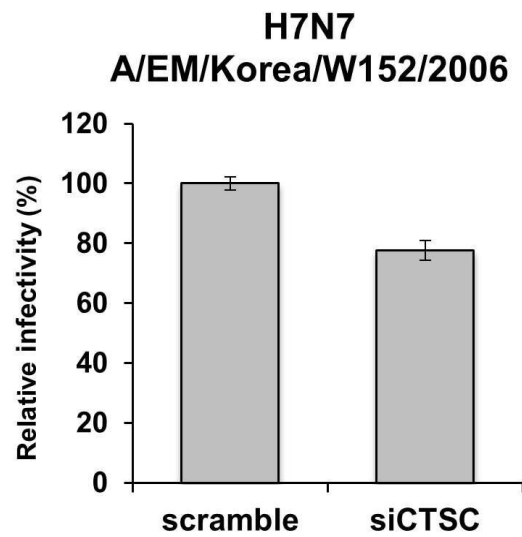
도면4



도면5



도면6



서열목록

- <110> Institut Pasteur Korea
- <120> Novel human gene crucial for the replication of influenza virus and use thereof
- <130> 1060769
- <160> 8
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 19

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CTSC siRNA
 <400> 1
 gcuuugagau uguguugaa 19
 <210> 2
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CTSC siRNA
 <400> 2
 gcaccuaucu ugaccugcu 19

 <210> 3
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CTSC siRNA
 <400> 3
 caacugcucg guuauggga 19
 <210> 4
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CTSC siRNA
 <400> 4
 guaguggugu accuucaga 19
 <210> 5
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GRIN2C siRNA
 <400> 5
 gagcauggcg uccuauaca 19

<210> 6
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GRIN2C siRNA
 <400> 6
 ucagaagugu gaguuauca 19
 <210> 7
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GRIN2C siRNA
 <400> 7
 cgcaguaacu accgugaca 19
 <210> 8
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GRIN2C siRNA
 <400> 8
 caagagcaau acaucgaca 19