

|                                                                                              |                                    |                                                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
|             | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A) | (11) 공개번호 10-2018-0043471<br>(43) 공개일자 2018년04월30일            |
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/713 (2006.01)<br>A61K 39/395 (2006.01) |                                    | (71) 출원인<br>한림대학교 산학협력단<br>강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)        |
| (52) CPC특허분류<br>A61K 48/00 (2013.01)<br>A61K 31/713 (2013.01)                                |                                    | (72) 발명자<br>황순봉<br>경기도 안양시 동안구 귀인로 237, 210동 1703호<br>(대림아파트) |
| (21) 출원번호                                                                                    | 10-2016-0136166                    | 임윤숙<br>경기도 안양시 동안구 흥안대로 155번길 29, 11동 4반 202호                 |
| (22) 출원일자                                                                                    | 2016년10월20일                        | 팜 민 뚜<br>경기도 안양시 동안구 관평로170번길 15                              |
| 심사청구일자                                                                                       | 2016년10월20일                        | (74) 대리인<br>강성혜                                               |

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 Rab32 억제제를 포함하는 C형 간염 예방 및 치료용 조성물

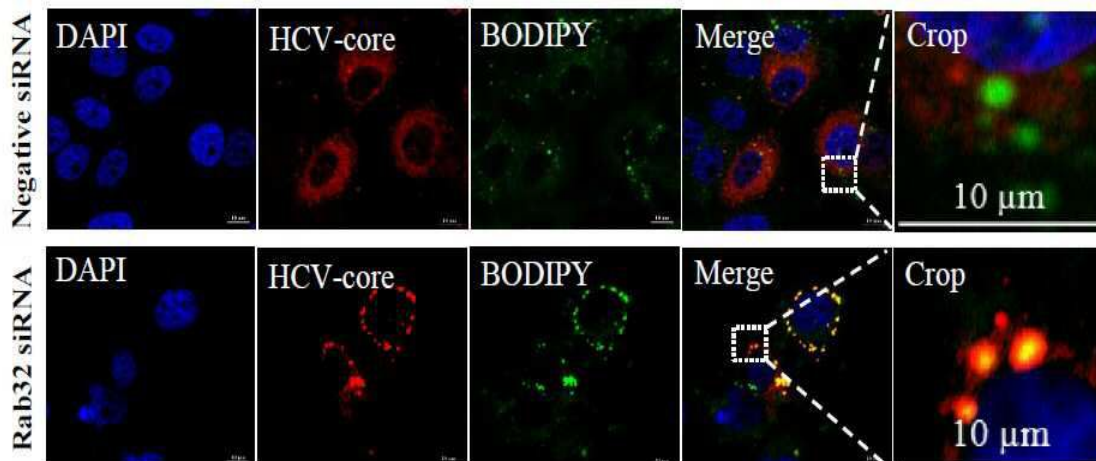
### (57) 요약

C형 간염 바이러스 (HCV)는 바이러스 증식에 있어서 숙주세포 인자에 매우 의존적이다. 대용량 차세대 서열결정 방법을 이용하여 본 발명자들은 숙주 전사체의 변화를 분석하고 HCVcc (cell culture-grown HCV) 감염 세포에서 상향조절되는 30개의 후보 유전자를 밝혔다. 이 후보 유전자들 중 Rab32를 선택하고 집중 연구하였다. Rab32는

(뒷면에 계속)

대표도 - 도8h

H



작은 GTPase로서, 다양한 세포 타입에서 다양한 세포 내 막 밀매 (membrane-trafficking)를 조절한다. 본 발명에서는 HCV 감염 세포에서 Rab32의 mRNA 및 단백질 수준이 모두 증가하였음을 밝혔고, HCV 감염이 주로 발현되는 GTP-결합 Rab32를 GDP-결합 Rab32로 바꾸어 Rab32의 공격성에 기여하고 그리하여 세포 분해기구를 덜 민감하게 만들었음을 밝혔다. 또한, GDP-결합 Rab32는 HCV 코어와 선택적으로 상호작용하여 코어를 바이러스 조립부위인 것으로 보이는 핵 주위 지역의 Rab32-유도 응집 구조 내로 위치하도록 하였다. RNA 저해기술을 이용하여 우리는 Rab32가 HCV 생애주기 중 다른 단계에는 필요하지 않으나 조립 단계에서 필요함을 밝혔다. 종합하면, 이 데이터 들은 HCV가 바이러스 조립을 용이하게 하기 위해 Rab32 활성을 조절함을 나타낸다.

(52) CPC특허분류

**A61K 39/3955** (2013.01)

**Y10S 514/894** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012026351

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 도약연구사업 (성과확산)

연구과제명 숙주세포인자를 타겟으로하는 C형 간염 치료기술 개발에 관한연구

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

Rab32 mRNA 발현 억제제를 포함하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 Rab32 mRNA 발현 억제제는 Rab32 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드임을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물. shRNA (short hair RNA) 및 siRNA (short interfering RNA)로 구성된 군 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 Rab32 mRNA 발현 억제제는 Rab32 유전자에 대한 shRNA (short hair RNA)임을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

#### 청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 shRNA는 서열번호 제32~41번 중 선택된 1종임을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 Rab32 mRNA 발현 억제제는 Rab32 유전자에 대한 siRNA (short interfering RNA)임을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

#### 청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 siRNA는 서열번호 제21, 22, 24~31번 중 선택된 1종임을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

#### 청구항 7

Rab32 단백질 활성 억제제를 포함하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

#### 청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 Rab32 단백질 활성 억제제는 Rab32 단백질에 결합하는 항체임을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

## 청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 Rab32 단백질에 결합하는 항체는 인간 Rab32 단백질 중 서열번호 42 내지 서열번호 97 중 어느 하나를 항원결정부위로 하여 생산된 것임을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

- [0001] 본 발명은 Rab32 억제제를 포함하는 C형 간염 바이러스 치료제에 관한 것으로서, Rab32를 표적으로 하는 siRNA를 이용한 실험에서 HCV 증식이 억제됨을 확인하여, HCV 치료제로서의 가능성을 확인하였다.

### 배경 기술

- [0003] C형 간염 바이러스 (Hepatitis C virus; HCV)는 간경화 및 간암을 포함하는 만성 간 질환의 주요 원인이다 (1). 최근 보고에 따르면 전세계 HCV 감염인구는 8천만명에 달하며, 해마다 35만명이 사망한다 (2, 3). HCV는 양성, 단엘가닥 RNA 유전체를 가지며, 길이는 약 9.6kb이고 약 3000개 아미노산으로 이루어진 큰 폴리프로테인을 코딩한다. 이 폴리프로테인은 전사후 숙주 및 바이러스 프로테이즈에 의해 절단되어 열 개의 폴리펩타이드가 되며, 여기에는 세 개의 구조 단백질 (코어, E1 및 E2)과 일곱 개의 비구조 단백질 (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B)이 포함된다 (4). 종래에는 PEG 결합된 인터페론  $\alpha$ 와 리바비린의 조합이 만성 C형 간염 치료의 표준 처방이었다. 최근에는 다양한 직접 작용하는 항바이러스제 (direct-acting antivirals; DAAs)가 높은 치료율로 HCV 치료에 이용된다. 그러나, 새로운 DAAs에 대한 지속적인 바이러스의 반응은 HCV 유전자형에 따라 매우 다양하며 (5), DAAs의 초고가는 전세계 HCV 환자 대부분에게 부담스러운 상황이다 (6). 뿐만 아니라, DAAs의 장기간 투여는 약물 저항성에 대한 낮은 유전적 장벽으로 인하여 약물 회피 돌연변이의 선택을 일으킬 수 있다 (7). HCV 증식과 발명은 주로 숙주 세포 기구에 의존하기 때문에, 숙주를 표적으로 하는 항바이러스제는 저항성에 대한 높은 유전적 장벽 및 전유전자형에 대한 항바이러스 활성 잠재력에서 장점을 나타낸다 (8).
- [0004] Rab32는 작은 GTPase의 Ras 슈퍼패밀리에 속하며, 이 슈퍼패밀리는 인간 유전체에 최소 60 개의 RAb 유전자를 포함하며, GDP-결합 형태 및 GTP-결합 형태 간의 변화를 통하여 막의 수송 조절에 중요한 기능을 수행한다 (9).
- [0005] 마우스 Rab32와 그 유사체 Rab38은 피부 멜라노사이트 착색과 트랜스골지 네트워크 조직의 조절에 관여하는 것으로 보고된바 있고, Rab32가 침묵하면 표적화가 잘못되어 티로시네이즈 및 티로시네이즈-관련 단백질 1을 포함하는 주요 멜라닌 생성 효소의 파괴를 초래한다 (10). 제노푸스 멜라노포레스 (Xenopus melanophores)에서 Rab32는 cAMP 의존적 단백질 카이네이즈 A 의존적 방식으로 멜라노솜 이동을 제어한다 (11). 대부분의 인간 조직에서 어디에서나 발현됨에도 불구하고 (12, 13), 비-멜라닌형성 세포 및 조직에서 Rab32의 정확한 기능은 거의 알려져있지 않다. 멜라노사이트가 아닌 COS7 및 WI-38 섬유아세포와 같은 세포에서 Rab32는 미토콘드리아와 같은 위치에서 발견되었다. 그 외에 Rab32는 PKA의 표적을 미토콘드리아 막 및 소포체 막으로 바꾸고 미토콘드리아 동역학 및 세포자기사멸 착수를 결정한다 (13, 14). 또한, Rab32는 HeLa 및 COS7 세포에서 자가소화작용 반응에 필수적인 것으로 알려진 바 있다 (15). 최근에는 Rab32가 재프로그래밍 과정 동안 지방 생합성 및 오토파고솜 형성을 증가시킨다는 사실이 보고되었다 (16). Rab32는 또한 마우스에서 급성 뇌 염증에 관여한다 (17). 뿐만 아니라, Rab32는 파킨슨병에서 LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2)와 상호작용하고 LRRK2 전이를 조절한다 (18). 지금까지 HCV-유도 발병에서 Rab32의 기능적 연관은 알려진바 없다.
- [0006] 본 발명에서는 HCV가 Rab32 발현을 상향조절하고 동시에 발현된 GTP-결합 Rab32를 GDP-결합 Rab32로의 전환을 유도함을 밝혔는데, 이는 Rab32 단백질의 응집을 초래하여 세포 분해기구에 대하여 덜 민감해지도록 한다. 본 발명자들은 나아가 GDP-결합 Rab32가 선택적으로 HCV 코어와 상호작용하여 코어를 바이러스 조립 부위와 유사한

핵 주위 지역의 Rab32-유래 응집된 구조 내부에 위치하도록 하였음을 밝혔다. 뿐만 아니라, 본 발명자들은 Rab32가 HCV 입자 조립에 특히 필수적임을 밝혔다. 종합하면, 이 데이터들은 HCV가 HCV 비리온 조립에 필수적인 코어 함유 구조를 생성하도록 Rab32 활성을 조절하는 것으로 보인다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

[0008]

- (비특허문헌 0001) Choo QL, Weiner AJ, Overby LR, Kuo G, Houghton M, Bradley DW. 1990. Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull* 46:423-441.
- (비특허문헌 0002) Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. 2014. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 61:S45-57.
- (비특허문헌 0003) Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. 2006. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 45:529-538.
- (비특허문헌 0004) Lindenbach BD, Rice CM. 2005. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 436:933-938.
- (비특허문헌 0005) McHutchison JG, Lawitz EJ, Shiffman ML, Muir AJ, Galler GW, McCone J, Nyberg LM, Lee WM, Ghalib RH, Schiff ER, Galati JS, Bacon BR, Davis MN, Mukhopadhyay P, Koury K, Novello S, Pedicone LD, Brass CA, Albrecht JK, Sulkowski MS. 2009. Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *N Engl J Med* 361:580-593.
- (비특허문헌 0006) Bansal S, Singal AK, McGuire BM, Anand BS. 2015. Impact of all oral anti-hepatitis C virus therapy: A meta-analysis. *World J Hepatol* 7:806-813.
- (비특허문헌 0007) Sarrazin C, Zeuzem S. 2010. Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 138:447-462.
- (비특허문헌 0008) Baugh JM, Garcia-Rivera JA, Gallay PA. 2013. Host-targeting agents in the treatment of hepatitis C: a beginning and an end. *Antiviral Res* 100:555-561.
- (비특허문헌 0009) Bock JB, Matern HT, Peden AA, Scheller RH. 2001. A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 409:839-841.
- (비특허문헌 0010) Wasmeier C, Romao M, Plowright L, Bennett DC, Raposo G, Seabra MC. 2006. Rab38 and Rab32 control post-Golgi trafficking of melanogenic enzymes. *J Cell Biol* 175:271-281.
- (비특허문헌 0011) Park M, Serpinskaya AS, Papalopulu N, Gelfand VI. 2007. Rab32 regulates melanosome transport in *Xenopus* melanophores by protein kinase A ( $c\beta$ /RII $\alpha$ ) recruitment. *Curr Biol* 17:2030-2034.
- (비특허문헌 0012) Bao X, Faris AE, Jang EK, Haslam RJ. 2002. Molecular cloning, bacterial expression and properties of Rab31 and Rab32. *Eur J Biochem* 269:259-271.
- (비특허문헌 0013) Alto NM, Soderling J, Scott JD. 2002. Rab32 is an A-kinase anchoring protein and participates in mitochondrial dynamics. *J Cell Biol* 158:659-668.
- (비특허문헌 0014) Bui M, Gilady SY, Fitzsimmons RE, Benson MD, Lynes EM, Gesson K, Alto NM, Strack S, Scott JD, Simmen T. 2010. Rab32 modulates apoptosis onset and mitochondria-associated membrane (MAM) properties. *J Biol Chem* 285:31590-31602.
- (비특허문헌 0015) Hirota Y, Tanaka Y. 2009. A small GTPase, human Rab32, is required for the formation of autophagic vacuoles under basal conditions. *Cell Mol Life Sci* 66:2913-2932.
- (비특허문헌 0016) Pei Y, Yue L, Zhang W, Wang Y, Wen B, Zhong L, Xiang J, Li J, Zhang S, Wang H, Mu H, Wei Q, Han J. 2015. Improvement in mouse iPSC induction by Rab32 reveals the importance of lipid

metabolism during reprogramming. *Sci Rep* 5:16539.

(비특허문헌 0017) Liang Y, Lin S, Zou L, Zhou H, Zhang J, Su B, Wan Y. 2012. Expression profiling of RabGTPases reveals the involvement of Rab20 and Rab32 in acute brain inflammation in mice. *Neurosci Lett* 527:110-114.

(비특허문헌 0018) Waschbusch D, Michels H, Strassheim S, Ossendorf E, Kessler D, Gloeckner CJ, Barnekow A. 2014. LRRK2 transport is regulated by its novel interacting partner Rab32. *PLoS One* 9:e111632.

(비특허문헌 0019) Lim YS, Tran HT, Park SJ, Yim SA, Hwang SB. 2011. Peptidyl-prolyl isomerase Pin1 is a cellular factor required for hepatitis C virus propagation. *J Virol* 85:8777-8788.

(비특허문헌 0020) Park C, Min S, Park EM, Lim YS, Kang S, Suzuki T, Shin EC, Hwang SB. 2015. Pim kinase interacts with Nonstructural 5A protein and regulates Hepatitis C virus entry. *J Virol* 89:10073-10086.

(비특허문헌 0021) Pham LV, Ngo HT, Lim YS, Hwang SB. 2012. Hepatitis C virus non-structural 5B protein interacts with cyclin A2 and regulates viral propagation. *J Hepatol* 57:960-966.

(비특허문헌 0022) Tedbury P, Welbourn S, Pause A, King B, Griffin S, Harris M. 2011. The subcellular localization of the hepatitis C virus non-structural protein NS2 is regulated by an ion channel-independent function of the p7 protein. *J Gen Virol* 92:819-830.

(비특허문헌 0023) Tran GV, Luong TT, Park EM, Kim JW, Choi JW, Park C, Lim YS, Hwang SB. 2015. Nonstructural 5A protein of Hepatitis C virus regulates Soluble Resistance-Related Calcium-Binding Protein activity for viral propagation. *J Virol* 90:2794-2805.

(비특허문헌 0024) Than TT, Tran GVQ, Son K, Park E-M, Kim S, Lim Y-S, Hwang SB. 2016. Ankyrin Repeat Domain 1 is up-regulated during Hepatitis C virus infection and regulates Hepatitis C virus entry. *Sci Rep* 6:20819.

(비특허문헌 0025) Stenmark H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:513-525.

(비특허문헌 0026) Tamura K, Ohbayashi N, Maruta Y, Kanno E, Itoh T, Fukuda M. 2009. Varp Is a Novel Rab32/38-binding Protein That Regulates Tyrp1 Trafficking in Melanocytes. *Mol Biol Cell* 20:2900-2908.

(비특허문헌 0027) Matto M, Rice CM, Aroeti B, Glenn JS. 2004. Hepatitis C virus Core protein associates with detergent-resistant membranes distinct from classical plasma membrane rafts. *J Virol* 78:12047-12053.

(비특허문헌 0028) Shanmugam S, Saravanabalaji D, Yi M. 2015. Detergent-resistant membrane association of NS2 and E2 during Hepatitis C virus replication. *J Virol* 89:4562-4574.

(비특허문헌 0029) Wileman T. 2006. Aggresomes and autophagy generate sites for virus replication. *Science* 312:875-878.

(비특허문헌 0030) Wileman T. 2007. Aggresomes and pericentriolar sites of virus assembly: cellular defense or viral design. *Annu Rev Microbiol* 61:149-167.

(비특허문헌 0031) Suzuki R, Tamura K, Li J, Ishii K, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T. 2001. Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology* 280:301-309.

(비특허문헌 0032) Shirakura M, Murakami K, Ichimura T, Suzuki R, Shimoji T, Fukuda K, Abe K, Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Nishijima M, Moriishi K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T, Howley PM, Miyamura T, Shoji I. 2007. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 81:1174-1185.

- (비특허문헌 0033) Afzal MS, Alsaleh K, Farhat R, Belouzard S, Danneels A, Descamps V, Duverlie G, Wychowski C, Zaidi N, Dubuisson J, Rouille Y. 2015. Regulation of core expression during the hepatitis C virus life cycle. *J Gen Virol* 96:311-321.
- (비특허문헌 0034) Lyn RK, Hope G, Sherratt AR, McLauchlan J, Pezacki JP. 2013. Bidirectional lipid droplet velocities are controlled by differential binding strengths of HCV core DII protein. *PLoS One* 8:e78065.
- (비특허문헌 0035) Syed GH, Amako Y, Siddiqui A. 2010. Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 21:33-40.
- (비특허문헌 0036) Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. 2007. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9:1089-1097.
- (비특허문헌 0037) Ngo HT, Pham LV, Kim JW, Lim YS, Hwang SB. 2013. Modulation of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3 by hepatitis C virus core protein. *J Virol* 87:5718-5731.
- (비특허문헌 0038) Shavinskaya A, Boulant S, Penin F, McLauchlan J, Bartenschlager R. 2007. The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J Biol Chem* 282:37158-37169.
- (비특허문헌 0039) Gentzsch J, Brohm C, Steinmann E, Friesland M, Menzel N, Vieyres G, Perin PM, Frentzen A, Kaderali L, Pietschmann T. 2013. Hepatitis C virus p7 is critical for capsid assembly and envelopment. *PLoS Pathog* 9:e1003355.
- (비특허문헌 0040) Sklan EH, Serrano RL, Einav S, Pfeffer SR, Lambright DG, Glenn JS. 2007. TBC1D20 is a Rab1 GTPase-activating protein that mediates hepatitis C virus replication. *J Biol Chem* 282:36354-36361.
- (비특허문헌 0041) Manna D, Aligo J, Xu C, Park WS, Koc H, Heo WD, Konan KV. 2010. Endocytic Rab proteins are required for hepatitis C virus replication complex formation. *Virology* 398:21-37.
- (비특허문헌 0042) Salloum S, Wang H, Ferguson C, Parton RG, Tai AW. 2013. Rab18 binds to hepatitis C virus NS5A and promotes interaction between sites of viral replication and lipid droplets. *PLoS Pathog* 9:e1003513.
- (비특허문헌 0043) Kondo H, Shirakawa R, Higashi T, Kawato M, Fukuda M, Kita T, Horiuchi H. 2006. Constitutive GDP/GTP exchange and secretion-dependent GTP hydrolysis activity for Rab27 in platelets. *J Biol Chem* 281:28657-28665.
- (비특허문헌 0044) Chen X, Ernst SA, Williams JA. 2003. Dominant negative Rab3D mutants reduce GTP-bound endogenous Rab3D in pancreatic acini. *J Biol Chem* 278:50053-50060.
- (비특허문헌 0045) Wu L, Xu D, Zhou L, Xie B, Yu L, Yang H, Huang L, Ye J, Deng H, Yuan YA, Chen S, Li P. 2014. Rab8a-AS160-MSS4 regulatory circuit controls lipid droplet fusion and growth. *Dev Cell* 30:378-393.
- (비특허문헌 0046) Kimura T, Kaneko Y, Yamada S, Ishihara H, Senda T, Iwamatsu A, Niki I. 2008. The GDP-dependent Rab27a effector coronin 3 controls endocytosis of secretory membrane in insulin-secreting cell lines. *J Cell Sci* 121:3092-3098.
- (비특허문헌 0047) Kim SJ, Syed GH, Siddiqui A. 2013. Hepatitis C virus induces the mitochondrial translocation of Parkin and subsequent mitophagy. *PLoS Pathog* 9:e1003285.
- (비특허문헌 0048) Moshe A, Gorovits R. 2012. Virus-induced aggregates in infected cells. *Viruses* 4:2218-2232.
- (비특허문헌 0049) Kleczkowski A, van K. 1961. Protection from proteolysis by aggregating the protein

isolated from tobacco mosaic virus. Biochim Biophys Acta 53:181-185.

(비특허문헌 0050) Gorovits R, Fridman L, Kolot M, Rotem O, Ghanim M, Shriki O, Czosnek H. 2016. Tomato yellow leaf curl virus confronts host degradation by sheltering in small/midsized protein aggregates. Virus Res 213:304-313.

(비특허문헌 0051) Neufeldt CJ, Joyce MA, Van Buuren N, Levin A, Kirkegaard K, Gale M, Jr., Tyrrell DL, Wozniak RW. 2016. The Hepatitis C virus-induced membranous web and associated nuclear transport machinery limit access of pattern recognition receptors to viral replication sites. PLoS Pathog 12:e1005428.

(비특허문헌 0052) Lu W, Ou JH. 2002. Phosphorylation of hepatitis C virus core protein by protein kinase A and protein kinase C. Virology 300:20-30.

(비특허문헌 0053) Majeau N, Bolduc M, Duvignaud JB, Fromentin R, Leclerc D. 2007. Effect of cAMP-dependent protein kinase A (PKA) on HCV nucleocapsid assembly and degradation. Biochem Cell Biol 85:78-87.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009]

따라서, 본 발명은 종래 C형 간염의 효과적인 치료제가 없었던 문제를 해결하고 C형 간염에 효과적이며, 저항성을 나타내지 않는 예방 및 치료제를 제공하려는 것을 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

[0011]

HCV의 생애주기는 숙주세포의 장치와 밀접하게 관련되어 있고, 따라서 숙주인자를 표적으로 하는 것은 항바이러스제 개발에 가능한 접근 방법을 제공한다. 본 발명에서는 Rab32가 바이러스 증식, 특히 HCV 생애주기의 조립 단계에서 결정적인 역할을 수행하는 새로운 숙주인자임을 밝혔다. RNA-seq 기술을 채용하여 HCVcc 감염세포에서 Rab32 발현이 상향조절됨을 확인하였다. Rab GTPase 패밀리 중 어떤 단백질들이 HCV 생애주기의 다양한 단계에 관여한다는 것이 보고된 바 있다 (40-42). Rab32는 인간 조직에서 흔히 발현되며 (12) PKA-매개 칼슘 신호전달, 자가세포사멸, 그리고 미토콘드리아 동역학, 지방 생합성 및 자가포식소체 (autophagosome) 형성을 포함하는 다양한 기능을 수행한다 (13-16). 그럼에도 불구하고 HCV 증식에서 Rab32의 기능적 연관성은 지금까지 밝혀지지 않았다. 본 발명에서는 HCV 감염이 전사 수준에서 Rab32 발현을 양의 방향으로 조절하며 HCV NS3가 이 상향조절에 주로 관련이 있음을 밝혔다 (데이터 나타내지 않음). 나아가 Rab32 녹다운이 바이러스 감염성을 현저히 손상 시킴을 밝혔다.

[0012]

Rab GTPase가 GDP- 및 GTP-결합 형태를 전환하여 특이적 활성을 결정하기 때문에, Rab32의 뉴클레오타이드 상태와 감염되지 않은 세포 및 HCV 감염세포 사이의 차이가 있는지를 알아보는 것이 중요하다. 멜라노사이트-특이적 마우스 Rab32는 주로 트랜스-골지 네트워크에 위치하여 주요 멜라닌 생성 효소의 이동을 조절한다 (10). 이와 대조적으로, 멜라노솜이 없는 HeLa 같은 다른 세포에서는 내생성 막-결합 Rab32가 소포체와 미토콘드리아를 구성하는 핵 주변 부위에 주로 존재하고, 따라서 다른 기능을 수행한다 (14). 마우스 VPS9-앵키린-반복 단백질의 첫 앵키린-반복 도메인이 GTP-의존적 Rab32-결합 단백질로서 기능하기 때문에, 멜라노사이트에서 GTP-결합 Rab32의 양을 정량하는데 이용되었다 (26). 역설적이게도, 본 발명자들은 Huh7 세포에서 인간 GDP-결합 Rab32가 VARP-ANKRD1과 반응하고 핵 주변 부위에 공존함을 밝혔다. 실제로, Bui 등은 멜라닌을 생성하지 않는 세포에서 GDP-결합 Rab32-T39N이 핵 주변 소포체와 미토콘드리아에 우선적으로 분포함을 보고한 바 있다 (14). VARP-ANKRD1 구조체를 이용하여 내생성 Rab32가 감염되지 않은 Huh7 세포 내에 Rab3D 및 Rab27의 경우처럼 GTP-결합 형태로 유지됨을 밝혔다 (43, 44). 흥미롭게도, Rab32는 HCV 감염에 반응하여 GTP-결합 형태에서 GDP-결합 형태로 전환한다. 비록 이 전환의 기저에 있는 기작은 아직 분명하지 않지만, HCV 코어는 Rab32 GDP-GTP 사이클에 관여하는 것으로 보이는데, 왜냐하면 코어가 라이소솜-의존적 방식으로 Rab32-GDP가 아닌 Rab32-GTP를 선택적으로 하향조절하기 때문이다 (데이터 나타내지 않음). 다른 시나리오는 GDP-결합 Rab32 상에 HCV 코어의 물리적 결합에 의한 것일 수 있는데, 이는 GDP-GTP 변환과정 중 GDP 배출을 저해할 수 있다.

[0013]

Rab8a 및 Rab27a와 같은 Rab GTPase의 GDP-결합형태는 특정 생물학적 기능에 긍정적인 효과를 발휘한다 (45,

46). HCV-유도 GDP-결합 Rab32가 생산되는 현상은 HCV 증식에서 그 기능적 중요성을 분석하도록 이끈다. COS-1 세포에서 GDP에 고정 결합된 Rab32의 과발현은 프로테아좀 (proteasome) 활성화에 영향을 미치지 않고 미체소관 형성중심에서 어그레솜 유사 구조가 형성되도록 한다 (15). GDP-결합 Rab32는 HeLa 세포에서 핵 주변 부위에 미토콘드리아가 클러스터를 형성하도록 한다고 보고된 바 있다 (13, 14). 본 발명에서는 Huh7 세포에서 Rab32-T39N 과발현이 미토콘드리아가 핵 주변으로 좀 더 응집하도록 하며, 핵과 가까이 결합한 Rab32 단백질의 분해를 유도함도 밝혔다. 중요한 것은 HCV 감염이 세포질의 작은 Rab32 응집체 형성을 유도했다는 점이다. 그리고, HCV-감염 Huh7 세포도 종래 보고 (47)된 바와 같이 세포핵 주위에 미토콘드리아를 응집시켰다 (데이터 나타내지 않음). 다양한 바이러스들이 바이러스 증식을 지원하기 위하여 바이러스 캡시드 단백질을 포함하는 세포내 응집체를 성장시키는 세포 리모델링을 유발하는 것으로 나타났다. 수두 바이러스, 아프리카 돼지열병 바이러스, 이리도바이러스 (iridoviruses) 및 피코디엔에이바이러스 (phycodnaviruses)는 어그레솜 경로를 강탈하는 반면, 인간 사이토메갈로바이러스와 허피스 심플렉스 바이러스는 캡시드 조립을 용이하게 하기 위해 캡시드 단백질, 미토콘드리아 및 열충격 단백질을 모아 바이러스 조립 구획을 생성하기 위해 어그레솜-유사 구조를 이용한다 (29, 30, 48). 그리하여, HCV-유도 Rab32-GDP 생성으로 유도된 핵 주변 응집체가 HCV 입자 조립에 필요한 조립 구획에 기여할 가능성이 제기되었다. 실제로, HCV 입자 생성은 빈 벡터로 트랜스펙션된 세포에서보다는 GDP-결합상태로 고정된 Rab32 (Rab32-T39N)으로 트랜스펙션된 세포에서 더 효율적이었다. 주목할 만한 것은 기능적 복합체 내의 바이러스 단백질은 응집된 구조에 은신하기 때문에 숙주 방어기작에 맞설 수 있다는 점이다 (48-50). 흥미롭게도, 본 발명에서는 GTP-결합 형태가 아닌 GDP-결합 Rab32가 HCV 코어와 특이적으로 반응하여 코어를 Rab32-유도 핵 주위 응집구조에 농축시켜 코어 단백질 발현 수준을 높임을 밝혔다. 본 발명자들의 가설은 또한 HCV 코어-관련 세제-저항성 막이 비리온 조립을 위한 플랫폼으로 기능할 수 있음을 보인 Shanmugam 등의 연구 결과 (28)와 잘 들어맞았다. Rab32가 MAM (mitochondria-associated membrane)에 위치하여 MAM 특성을 조절한다는 것은 앞서 보고된 바 있다 (14). MAM이 바이러스 조립 복합체를 위해 농축하기 때문에 (51), Rab32가 바이러스 조립 부위에 위치한다는 것은 그럴듯하다. 본 발명자들이 얻은 결과를 근거로, HCV 감염세포에서 Rab32-유도 응집체 구조가 바이러스 조립 구획을 구성할 것으로 예상했는데, 이는 바이러스 형태형성에 필수적인 코어 단백질을 농축하고 숙주세포 분해기구로부터 코어를 보호할 뿐 아니라 미토콘드리아 네트워크를 변경하여 이 과정에 필요한 에너지를 제공한다. 그러나, 이러한 가정을 확인하기 위해서는 좀 더 자세한 연구가 필요하다. 실제로, Rab32 침묵화는 HCV 증식과 HCV 세포내 감염성을 현저히 저해하였다. 뿐만 아니라, Rab32를 녹다운하면 클러스터를 형성한 지방소체의 표면에 코어가 유지되었고, 지방소체로부터 바이러스 조립부위의 코어의 이동에 있어서 결합에 관한 논란을 일으켰다. 본 발명자들은 바이러스 입자 조립의 손상이 지방소체 상의 코어 축적과 상관관계가 있음을 밝혔고, 이는 선행 보고 (39, 40)와 일치하였다. 이 모든 데이터들은 Rab32가 HCV 조립에 필수적임을 나타낸다.

[0014] 몇몇 연구에서 코어가 다른 PKA 인산화 부위를 가지고 있음을 밝혔다 (52, 53). 본 발명에서는 Rab32-T39N과 Rab32-L188P (PKA-결합 결합 돌연변이) 모두 코어와 반응하지만, Rab32-L188P 과발현이 코어 단백질을 세제-불용성 분획에서 근절하고 그리하여 바이러스 증식을 손상시킴을 밝혔다. 이러한 결과들은 PKA 신호전달뿐만 아니라 적절한 PKA 고정 (anchoring)이 코어 분포와 안정성 조절을 통해 HCV 증식에서 결정적인 역할을 수행함을 제시한다. 그러나, HCV 증식에 있어서 Rab32의 추정 PKA 고정화 활성화의 정확한 역할은 더 많은 연구를 필요로 한다. 종합하면, 본 발명자들은 Rab32가 HCV 입자 조립에 필수적인 숙주인자이며, 따라서 Rab32가 HCV 증식을 저해하는데 있어서 치료의 표적이 될 수 있음을 밝혔다.

[0016] 본 발명은 Rab32 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 Rab32 발현 억제제가 Rab32 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 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 Rab32에 대한 siRNA가 서열번호 21, 22, 24~31번 중 어느 하나임을 특징으로 한다. Rab32에 대한 siRNA는 Rab32 유전자 서열을 바탕으로 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 용이하게 제조할 수 있으며, 가능한 siRNA의 수는 제한이 없으며, 위 siRNA는 예시적인 기재일 뿐이다. 또한, Rab32 유전자에 대한 siRNA가 Rab32 유전자와 결합하여 Rab32의 발현을 저해할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명함을 밝혀둔다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 Rab32에 대한 shRNA가 서열번호 32~41번 중 어느 하나임을 특징으로 한다. Rab32에 대한 shRNA 또한 Rab32 유전자 서열을 바탕으로 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 용이하게 제조할 수 있으며, 가능한 shRNA의 수는 특별한 제한이 없으며, Rab32 유전자에 대한 shRNA가 Rab32 유전자와

결합하여 Rab32의 발현을 저해할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명함을 밝혀둔다.

- [0020] 또한, 본 발명은 상기 Rab32 단백질 활성 억제제가 Rab32 단백질에 결합하는 항체임을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 Rab32 단백질에 결합하는 항체가 인간 Rab32 단백질 중 서열번호 42 내지 서열번호 97 중 어느 하나를 항원결정부위로 하여 생산된 것임을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 Rab32 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.
- [0023] 본 발명의 조성물은 상기 Rab32 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.
- [0024] 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 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 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적절한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 조성물은 특히 등장 멸균 용액 또는 멸균수 또는 적절한 생리 식염수의 첨가에 따라 주사 가능한 용액의 조성을 위해 동결건조 조성물을 포함할 수 있다. 사용되는 유효성분의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 약 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 일 회 내지 수 회 나누어 투여될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 방사선 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법 등과 병용하여 사용할 수 있다.

### 발명의 효과

- [0028] 본 발명자들은 HCV 감염 세포에서 Rab32의 mRNA 및 단백질 수준이 모두 증가하였음을 밝혔다.
- [0029] 또한, 본 발명은 HCV 감염이 주로 발현되는 GTP-결합 Rab32를 GDP-결합 Rab32로 바꾸어 Rab32의 공격성에 기여하고 그리하여 세포 분해기구를 덜 민감하게 만들었음을 밝혔다.
- [0030] 또한, GDP-결합 Rab32는 HCV 코어와 선택적으로 상호작용하여 코어를 바이러스 조립부위인 것으로 보이는 핵 주위 지역의 Rab32-유도 응집 구조 내로 위치하도록 하였다.
- [0031] 또한, RNA 저해기술을 이용하여 Rab32가 HCV 생애주기 중 다른 단계에는 필요하지 않으나 조립 단계에서 필요함을 밝혔다.
- [0032] 종합하면, 이 데이터들은 HCV가 바이러스 조립을 용이하게 하기 위해 Rab32 활성을 조절함을 나타내며, siRNA 등 Rab32의 발현을 억제하면 HCV 증식이 억제됨을 밝혔다.
- [0033] 따라서, Rab32의 발현이나 단백질의 활성을 억제하면 HCV의 바이러스 조립 단계를 억제할 수 있으므로 Rab32의 발현 또는 활성 억제제는 HCV 치료 용도로 이용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1a 내지 도 1e는 Rab32가 HCV 감염에 의해 증가함을 나타낸다. (도 1a) Huh7.5 세포를 가감염 또는 HCV Jc1으로 네 시간 동안 감염시킨 후 Rab32의 mRNA 수준을 qRT-PCR로 지시된 시간에 분석하였다. d.p.i.: 감염 후 날짜 (days postinfection). (도 1b) 다양한 시각에 지시된 항체로 총 세포용균액을 면역블롯팅하였다. (도 1c)

총 세포 RNA는 각각 부모세대 Huh7, 유전자형 1b 유래 HCV 레플리콘 및 인터페론 (IFN)으로 처리한 세포에서 추출하였고, Rab32 mRNA 수준은 qRT-PCR로 분석하였다. (도 1d) Huh7, HCV 레플리콘 및 IFN-치료 세포에서 모은 총 세포 용균액은 지시한 항체로 면역블롯팅하였다. (1e) Rab32 프로모터 활성은 HCV 감염에 의해 상향조절된다. (위쪽) Rab32 프로모터 구조체의 개요도. (아래쪽) Huh7.5 세포를 가감염하거나 또는 Jc1으로 감염시켰다. 네 시간 후 세포를 Rab32-luc 프로모터 리포터 플라스미드로 트랜스펙션시켰다. 감염 48시간 후 루시퍼레이스 활성을 측정하였다. d.p.i.: 감염 후 날짜 수 (days postinfection). 데이터는 A, C 및 E 패널에 대하여 최소 세 번의 독립적인 실험에서 얻은 평균으로 나타났다. 별표는 대조군 값에 대하여 유의한 차이를 나타낸다 (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ).

도 2a 내지 도 2e는 Rab32가 HCV 증식에 필요함을 나타낸다. (도 2a) Huh7.5 세포를 지시한 20 nM의 siRNA로 48시간 동안 트랜스펙션한 후 네 시간 동안 가감염 또는 Jc1으로 감염시켰다. 감염 이틀 후, 세포내 RNA 수준을 qRT-PCR로 측정하였다. (도 2b) Huh7.5 세포를 상기 도 2a의 설명과 같이 처리한 후 총 세포 용균액을 지시한 항체로 면역블롯팅하였다. "Negative"는 관련이 없는 음성 siRNA를 나타낸다. "positive"는 Jc1의 5' 비번역부위 (NTR)를 표적으로 하는 HCV-특이적 siRNA를 나타낸다. (도 2c) Huh7.5 세포를 위 도 2a의 설명과 같이 처리하고, 세포의 HCV RNA 수준을 qRT-PCR로 정량하였다. (도 1d) 감염되지 않은 Huh7.5 세포를 위 도 2a의 설명의 배양상층액에서 모은 Jc1으로 감염시켰다. 감염 48시간 후 세포내 HCV RNA (왼쪽 패널)와 단백질 (오른쪽 패널) 수준을 측정하였다. (E) Huh7.5 세포를 40 nM의 지시한 siRNA로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 72시간 후, 세포 생존율을 WST 분석으로 결정하였다. 데이터는 세 번 이상의 독립적인 실험의 평균으로 나타낸다. 별표는 대조군 값과의 유의한 차이를 나타낸다 (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ).

도 3a 내지 3e는 감염되지 않은 Huh7 세포에서 Rab32가 주로 GTP-결합 형태임을 보여준다. (도 3a) 인간 VARP 및 Rab32 단백질 도메인 구조의 개략도이다. (도 3b) Huh7 세포에서 Rab32와 VARP-ANKRD1의 GDP- 및 GTP-결합 형태의 세포내 분포를 나타낸다. 유리 커버슬립 위에 시드된 Huh7 세포를 Flag-표지된 VARP-ANKRD1 및 V5-표지된 Rab32-T39N 또는 Q85L 발현 플라스미드로 코트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 36시간 후, 세포를 4% 파라포름알데하이드로 고정하고 항-V5 및 항-Flag 단일클론 항체를 이용하여 면역형광염색을 수행하였다. 이중 염색 결과는 통합된 이미지에서 Rab32-T39N 및 VARP-ANKRD1이 같은 위치에 있는 것을 노란 형광으로 보여주었다. 세포를 DAPI로 역염색하여 핵을 표지하였다 (파란색). (도 3c) (왼쪽 패널) GST-VARP-ANKRD1 단백질 정제. GST-VARP-ANKRD1 단백질을 *E. coli* BL21 (DE3)에서 발현하고, 글루타치온 세파로즈 4B 비드로 정제한 후 30 mM 환원형 글루타치온 함유 완충액으로 용출하였다. 정제된 단백질은 10% SDS-PAGE 상에서 분리하고 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색하였다. 기준물질로 BSA를 나란히 러닝하였다. (오른쪽 패널) VARP-ANKRD1은 GDP-결합 Rab32와 특이적으로 반응한다. Huh7 세포를 Flag-표지된 Rab32 발현 플라스미드로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 36시간 후, 80  $\mu$ g의 세포 용균액을 0.5 mM GTP  $\gamma$ S 또는 1 mM GDP로 30분간 37°C에서 처리하였다. 이후 세 시간 동안 4°C에서 40  $\mu$ l의 50% (v/v) 글루타치온 세파로즈 슬러리에 고정시킨 2 $\mu$ g의 GST-VARP-ANKRD1로 45분간 세포 용균액을 침전시켰다. 결합한 단백질을 항-Flag 단일클론 항체로 면역블롯 분석하여 탐지하였다. (도 3d) HEK293T 세포 (왼쪽 패널) 또는 Huh7 세포 (오른쪽 패널)를 각각 빈 벡터, Flag-표지된 Rab32-WT, Rab32-T39N, Rab32-Q85L 발현벡터로 일시적으로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 36시간 후, 총 세포 용균액을 GST 또는 GST-VARP-ANKRD1 단백질과 함께 배양하였다. 단백질 복합체는 4°C에서 45분간 글루타치온 비드와 함께 침전시켰다. 결합한 단백질은 항-Flag 단일클론 항체를 이용하여 면역블롯 분석하여 탐지하였다. (도 3e) HEK293T 세포 (왼쪽 패널) 또는 Huh7 세포 (오른쪽 패널)를 Flag-표지된 VARP-ANKRD1 및 빈 벡터, Flag-표지된 Rab32-WT, Rab32-T39N, Rab32-Q85L 및 Rab32-L188P 발현벡터로 각각 일시적으로 코트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 36시간 후, 총 세포 용균액을 항-Flag 단일클론 항체로 면역침전하였다. 결합한 단백질은 항-V5 단일클론 항체를 이용한 면역블롯 분석으로 탐지하였다.

도 4는 HCV 감염이 주로 발현된 GTP-결합 형태에서 GDP-결합 Rab32로 변환함을 나타낸다. Huh7 세포를 가감염 또는 Jc1으로 네 시간 동안 감염시켰다. 세포를 감염 후 지시된 날짜에 모아 세포 용균액을 4°C에서 세 시간 동안 글루타치온 세파로즈 4B 비드에 고정시킨 GST-VARP-ANKRD1로 침전시켰다. 결합한 Rab32 단백질은 항-Rab32 폴리클론 항체를 이용한 면역블롯 분석으로 탐지하였다.

도 5a 내지 도 5e는 Rab32가 HCV 감염 세포에서 응집체를 형성함을 보여준다. (도 5a) Rab32 야생형 및 돌연변이형의 용해도. Huh7 세포를 빈 벡터, Flag-표지된 Rab32-WT, Rab32-T39N, Rab32-Q85L, Rab32-L188P 발현벡터로 각각 일시적으로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 36시간 후, 실시예에 기재된 대로 총 세포 용균액을 세제에 용해되는 (S) 분획과 용해되지 않는 (I) 분획으로 분리하였다. 양 분획을 모두 항-Flag 단일클론 항체로 면역블롯 분석하였다. 칼넥신 (Calnexin)을 용해 분획의 마커로 이용하였다. (도 5b) Rab32의 T39N 및 L188P 돌연변이

는 Huh7 세포에서 매우 흔하다. Huh7 세포를 HA-표지된 유비퀴틴 및 빈 벡터, Flag-표지된 Rab32-WT, Rab32의 T39N, Q85L, L188P 발현 플라스미드로 각각 코트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 36시간 후에 총 세포 용균액을 모아 항-Flag 단일클론 항체로 면역침전하였다. 결합된 단백질을 항-HA 단일클론 항체를 이용하여 면역블롯분석으로 탐지하였다. 화살표는 IgG를 나타낸다. (도 5c) 불용성 Rab32는 세포 분해기구에 저항성이 높다. Huh7 세포를 Flag-표지된 Rab32-T39N 발현 플라스미드로 일시적으로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 36시간 후, 세포를 10 µg/ml의 CHX로 처리한 후 지시된 시각에 세포를 모았다. 총 세포 용균액을 세제-용해성 (S) 분획과 세제-불용성 (I) 분획으로 나누었다. 항-Flag 단일클론 항체를 이용하여 면역블롯분석으로 Rab32 단백질을 탐지하였다. 칼넥신 (Calnexin)을 용해성 분획의 마커로 이용하였다. (도 5d) Rab32-T39N 단백질을 발현하는 세포에서 어그레솜 (Aggresome)-유사 구조의 형성. 유리 커버슬립 위에 시드된 Huh7 세포를 V5-표지된 Rab32-WT, Rab32-T39N, Q85L 발현 플라스미드로 각각 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 30시간 후, 세포를 100 nM의 Mitotracker와 함께 40분간 배양하여 미토콘드리아를 염색하였다. 이후 세포를 4% 파라포름알데하이드로 고정하고 항-V5 단일클론 항체를 이용하여 면역형광염색하였다. 세포를 DAPI로 역염색하여 핵을 표지하였다 (파란색). 화살표는 Rab32의 핵 주위 응집구조를 나타낸다. 네모 상자 안을 더 확대한 이미지를 "Crop"에 나타내었다. (도 5e) HCV 감염 세포에서 내생성 Rab32를 불용성 분획에 침착함 (deposition). Huh7 세포를 가감염 또는 네 시간 동안 Jc1으로 감염시켰다. 감염 4일 후, 총 세포 용균액을 세제-용해성 (S) 분획과 불용성 (I) 분획으로 나누었다. 동량의 단백질을 지시된 항체를 이용한 면역블롯팅으로 분석하였다. 칼넥신 (Calnexin)을 용해성 분획의 마커로 이용하였다.

도 6a 내지 도 6d는 Rab32-GDP가 HCV 코어 단백질 발현을 상향조절하며 바이러스 증식을 용이하게 함을 보여준다. (도 6a) Huh7.5 세포를 네 시간 동안 가감염하거나 Jc1으로 감염시켰다. 감염 24시간 후, 세포를 지시된 Rab32 발현 플라스미드로 일시적으로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 48시간 후, 세포를 모아 총 세포 용균액을 지시된 항체로 면역블롯팅하였다. 평균화된 코어 단백질의 밴드 강도는 ImageJ로 정량화하였다. (도 6b) 감염되지 않은 Huh7.5 세포를 상기 도 6a의 설명과 같이 얻은 바이러스 함유 상층액으로 감염시켰다. 감염 48시간 후 세포를 모아 총 세포 용균액을 지시된 항체로 면역블롯팅하였다. 평균화된 코어 단백질의 밴드 강도는 ImageJ로 정량화하였다. (도 6c) Huh7 세포를 GFP-표지된 HCV 코어 및 벡터 또는 지시된 Rab32 발현 플라스미드의 다양한 구조체로 코트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 36시간 후, 형광세포분석기를 이용하여 GFP-표지된 HCV 코어의 면역형광을 분석하였다. GFP-양성 세포는 ImageJ를 이용하여 계수하였다. (도 6d) Huh7.5 세포를 Myc-표지된 HCV 코어 (왼쪽 패널) 또는 Myc-표지된 HCV NS5A (오른쪽 패널) 및 지시된 Rab32 발현 플라스미드의 다양한 구조체로 코트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 36시간 후 세포를 모아 총 세포 용균액을 지시된 항체로 면역블롯팅하였다. 평균화된 코어 단백질의 밴드 강도는 ImageJ로 정량화하였다.

도 7a 내지 도 7h는 Rab32-GDP가 선택적으로 HCV 코어에 반응하고 세제-불용성 분획에 농축됨을 나타낸다. (도 7a) Rab32는 선택적으로 HCV 코어에 반응하지만, 다른 HCV 단백질과는 반응하지 않는다. HEK293T 세포를 Myc-표지된 HCV 코어, NS3, NS4B, NS5A 및 NS5B 발현 플라스미드로 각각 일시적으로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 36시간 후 총 세포 용균액을 GST 또는 GST-Rab32 단백질과 함께 배양하였다. 단백질 복합체를 4°C에서 45분간 글루타치온 비드로 침전시켰다. 결합된 단백질은 항-Myc 단일클론 항체를 이용하여 면역블롯팅하여 탐지하였다. (도 7b) HEK293T 세포를 Flag-표지된 Rab32 및 빈 벡터, Myc-표지된 HCV 코어 또는 HCV NS5B 발현 플라스미드로 각각 코트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 36시간 후 총 세포 용균액을 항-Myc 단일클론 항체로 면역침전하였다. 결합된 단백질은 항-Flag 단일클론 항체를 이용한 면역블롯분석으로 탐지하였다. 화살표는 IgG를 나타낸다. (도 7c) Huh7.5 세포를 Jc1으로 네 시간 동안 감염시켰다. 감염 4일 후 총 세포 용균액을 IgG 또는 항-Rab32 폴리클론 항체로 면역침전시켰다. 결합된 단백질은 항-HCV 코어 또는 항-NS5A 폴리클론 항체로 면역블롯팅하여 분석하였다. 화살표는 IgG를 나타낸다. (도 7d) Huh7 세포를 가감염 (왼쪽 패널) 또는 Jc1 (오른쪽 패널)으로 네 시간 동안 감염시켰다. 감염 48시간 후, 세포를 유리 커버슬립에 시드하고 36시간 동안 배양하였다. 세포를 차가운 메탄올에 넣어 고정하고 항-Rab32 및 항-HCV 코어 폴리클론 항체를 이용하여 면역형광염색을 수행하였다. 세포를 DAPI로 역염색하여 핵을 표지하였다 (파란색). 화살표는 Rab32의 반점 구조를 나타낸다. "Merge"의 (-) 표시는 HCV-음성 세포를 나타낸다. (도 7e) HEK293T 세포 (왼쪽 패널) 또는 Huh7 세포 (오른쪽 패널)를 Myc-표지된 HCV 코어 및 빈 벡터, Flag-표지된 Rab32-WT, Rab-T39N, Rab32-Q85L, Rab32-L188P 발현 플라스미드로 각각 일시적으로 코트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 36시간 후, 총 세포 용균액을 항-Myc 단일클론 항체로 면역침전하였다. 결합된 단백질은 항-Flag 단일클론 항체로 면역블롯 분석하여 탐지하였다. 화살표는 IgG를 표시한다. (도 7f) GDP-결합 Rab32는 세제-불용성 분획으로 코어를 농축시킨다. Huh7 세포를 빈 벡터, Flag-표지된 Rab32-WT, Rab32-T39N, Rab32-Q85L, Rab32-L188P 발현 플라스미드로 각각 일시적으로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 24시간 후, 세포를 Jc1으로 네 시간 동안 감염시켰다. 감염 36시간 후 총 세포 용균액을 1% Triton X-100 용해성

(S) 및 불용성 (I) 분획으로 나누었다. 각 분획 내의 동량의 단백질을 지시된 항체를 이용하여 면역블롯 분석하였다. 칼넥신 (Calnexin)을 용해성 분획의 마커로 이용하였다. 코어 단백질의 밴드 강도는 ImageJ로 정량하였다. (도 7g) GDP-결합 Rab32는 HCV 코어와 같은 위치에 있었으나 GTP-결합 Rab32는 그렇지 않았다. Huh7 세포를 네 시간 동안 Jc1으로 감염시켰다. 감염 48시간 후, 세포를 V5-표지된 T39N 또는 Rab32의 Q85L 발현 플라스미드로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 36시간 후, 세포를 4% 파라포름알데하이드로 고정시키고 항-HCV 코어 폴리클론 항체를 이용하여 면역형광염색을 수행하였다. 이중 염색 결과는 HCV 코어와 Rab32-T39N이 주변 및 핵 주위 응집 구조에 공존함을 보여주는데, 이것은 "Crop" 이미지에 노란 형광으로 나타났다. 세포를 DAPI로 역염색하여 핵을 표지하였다 (파란색). (도 7h) Huh7 세포를 네 시간 동안 Jc1으로 감염시켰다. 감염 48시간 후, 세포를 빈 벡터 (위쪽 패널) 또는 V5-표지된 Rab32-WT (아래쪽 패널)로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 30시간 후, 세포를 1% Triton X-100 용액에 5초씩 네 번 담갔다. 세포를 4% 파라포름알데하이드로 고정하고 항-HCV 코어 폴리클론 항체와 항-V5 단일클론 항체를 이용하여 면역형광염색을 수행하였다. 겹친 이미지의 노란 형광은 세제-저항성 코어 및 Rab32가 같은 위치에 있음을 가리킨다. 세포를 DAPI로 역염색하여 핵을 표지하였다 (파란색). (-)는 HCV-음성 세포를 가리킨다. (+)는 Rab32-트랜스펙션된 세포를 표시한다. 화살표는 세제-저항성 코어를 가리킨다.

도 8a 내지 도 8h는 Rab32가 HCV 생애주기의 조립 단계에 관여함을 나타낸다. (도 8a) Huh7 세포를 20 nM의 지시된 siRNAs로 48시간 동안 트랜스펙션하였다. 이후 세포를 유전자형 2a (JFH-1) 유래 HCVpp로 감염시켰다. 감염 72시간 후, 바이러스의 도입은 루시퍼레이스 활성을 측정하여 결정하였다. 데이터는 세 번의 독립적인 실험에서 얻은 평균값으로 나타낸다. (도 8b) Huh7 세포를 20 nM의 지시된 siRNAs로 48시간 동안 트랜스펙션하였다. 세포를 0.2  $\mu$ g의 pRL-HL 및 0.3  $\mu$ g의  $\beta$ -갈락토시데이즈 발현 플라스미드로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 48시간 후, 세포를 모아 루시퍼레이스 활성을 측정함으로써 HCV-IRES 의존적 번역을 측정하였다. 데이터는 세 번의 독립적인 실험의 평균으로 나타내었다. (도 8c) 유전자형 1b 유래 HCV 레플리콘 세포 (위쪽 패널) 또는 유전자형 2a 유래 HCV 레플리콘 세포 (아래쪽 패널)를 40 nM의 지시한 siRNAs로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 72시간 후, 세포내 RNA 수준 (왼쪽 패널) 및 단백질 수준 (오른쪽 패널)을 분석하였다. 별표는 대조군과 비교하여 유의한 값을 나타낸다 (\*,  $P < 0.05$ ). (도 8d) Huh7 세포를 네 시간 동안 HCV Jc1으로 감염시켰다. 감염 60시간 후, 20 nM의 지시된 siRNAs로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 72시간 후, 세포내 RNA (왼쪽 패널) 및 단백질 (오른쪽 패널) 수준을 각각 qRT-PCR과 면역블롯팅으로 분석하였다. (도 8e) 상기 도 8d 설명의 세포 배양 상층액에서 모은 세포외 HCV RNA를 qRT-PCR로 정량하였다. (도 8f) 감염되지 않은 Huh7 세포를 상기 도 8d 설명의 실험 중 배양 상층액에서 거둔 Jc1으로 감염시켰다. 감염 48시간 후, 세포내 HCV RNA 수준 (왼쪽 패널) 및 단백질 수준 (오른쪽 패널)을 qRT-PCR 및 지시된 항체를 이용하여 분석하였다. 표준화된 HCV 단백질 밴드의 강도를 ImageJ로 정량하였다. (도 8g) Huh7 세포를 HCV Jc1으로 네 시간 동안 감염시켰다. 감염 60시간 후, 세포를 20 nM의 지시된 siRNA로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 72시간 후, 세포를 트립신으로 처리하고 얼리고 녹임을 반복하여 세포를 파괴하였다. Post-nuclear 상층액을 감염되지 않은 Huh7 세포를 감염시키는데 이용하였다. 감염 48시간 후, 세포내 HCV RNA 수준을 qRT-PCR로 분석하였다. 별표는 대조군과의 유의한 차이를 나타낸다 (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ). (도 8h) Rab32 침묵화는 지방 조직의 표면에 코어를 머물도록 하였다. Huh7 세포를 네 시간 동안 HCV Jc1으로 감염시켰다. 감염 48시간 후 세포를 20 nM의 음성 또는 Rab32-특이적 siRNA로 처리하였다. 트랜스펙션 48시간 후, 세포를 4% 파라포름알데하이드로 고정시키고 항-HCV 코어 폴리클론 항체를 이용하여 면역형광염색을 수행하였다. 지방 조직을 BODIPY (439/503)로 염색하여 시각화하였다. 또한, 세포를 DAPI로 역염색하여 핵을 표지하였다 (파란색).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명이 실시예의 기재에만 한정된 것이 아님은 본 발명이 속한 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0038] 플라스미드 구축

[0039] RiboEx (GeneA11)를 이용하여 Huh7 세포에서 총 RNA를 분리하였다. cDNA 합성 키트 (Toyobo)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이 cDNAs는 전장 인간 Rab32 및 ANKR1 (first ankyrin-repeat domain ( of human VARP (VPS9-ankyrin-repeat protein) (451-650 aa)을 증폭하기 위하여 사용하였다. PCR 산물은 p3XFlag-CMV-10 (Sigma-Aldrich) 또는 pGEX-4T-1 발현 벡터 (Amersham Biosciences)의 부위 내로 삽입되었고, Flag-표지된 Rab32 및 GST-표지된 VARP-ANKRD1 구성을 발생시켰다. Rab32는 단백질 발현을 위하여 pGEX-4T-1 벡터에 서브 클로닝하였다. Rab32의 돌연변이 T39N, Q85L 및 L188P는 PCR-based 돌연변이로 생성하고, 각각의 구조체는 플라스미드

p3XFlag-CMV-10 해당 효소 부위에 삽입하였다. Rab32의 야생형 및 돌연변이 모두 pEF6-V5-HisB 발현 벡터 (Invitrogen)로 서브클론되었고 V5-표지 구성을 발생시켰다. Rab32 프로모터 구조 (from -643 to +260 nt)는 Huh7 게놈 DNA로부터 증폭되고 pGL3-기본 벡터에 삽입하였다 (Promega). Myc-표지 HCV 코어, NS3, NS4B, NS5A 및 NS5B 플라스미드는 종래 기술에 기재된 대로 생산하였다 (19).

#### [0041] 세포 배양

[0042] 모든 세포주는 10% 우태혈청과 100 units/ml 페니실린-스트렙토마이신을 함유한 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 5% CO<sub>2</sub> 환경으로 37℃로 배양하였다. 유전자형 1b, 2a 및 IFN-치료 세포에서 유래한 HCV 서브게놈 레플리콘을 함유한 Huh7 세포는 종래기술 (19)과 같이 배양하였다.

#### [0044] 항체 및 시약

[0045] 항체는 다음과 같이 구입한다.: 마우스 다클론 항-Rab32 항체는 Abcam사에서 마우스 항-Flag 항체는 Sigma-Aldrich사에서, 마우스 항-c-Myc와 항-HA 항체는 Santa Cruz사에서, 마우스 anti-β-액틴 항체는 Sigma-Aldrich사 및 마우스 항-V5 항체는 Invitrogen사에서 구입하였다. HCV 코어, NS3 및 NS5A 항체는 종래기술에 기재된 대로 구입하였다 (20). 호스래디쉬 퍼옥시다제가 결합된 염소 항-토끼 항체 또는 염소 항-마우스 항체 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)를 이차항체로 사용하였다. GTP γS 및 GDP는 Sigma-Aldrich사에서 구입하였다.

#### [0047] 면역침전

[0048] HEK293T 또는 Huh7 세포는 표시된 발현 플라스미드로 트랜스펙션하였다. DNA 총량은 빈 벡터를 가하여 조정하였다. 트랜스펙션 36시간 후, 세포는 용균 완충액 내에서 모았다. 세포 용균액은 13,500 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 상층액을 지시된 항체와 함께 4℃에서 밤새 배양하였다. 단백질 복합체는 4℃에서 45분 동안 40 μl의 protein A 비드 (Sigma-Aldrich)로 침전시켰다. 비드는 세척 완충액으로 세 번 세척한 후 결합된 단백질은 면역 블랏 분석으로 탐지하였다.

#### [0050] GDP와 GTP 결합 분석

[0051] Huh7.5 세포를 Flag-표지 야생형 Rab32 발현 플라스미드로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 36시간 후, 세포를 용해 완충액 (50 mM Tris, (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% NP-40, 0.25% 디옥시콜린산 나트륨과 프로테아제 저해제)으로 용해시켰다. 세포 용해물의 80 μg에 10 mM EDTA (pH 8.0)를 보충하고, 0.5 mM GTP γS 또는 1 mM GDP를 37℃에서 30분 동안 처리하였다. 얼음 위에 샘플을 배치하고 60 mM MgCl<sub>2</sub>를 추가하고 반응을 종료하였다. 세포 용해물은 2 μg GST-VARP-ANKRD1를 추가하고 45분 동안 침전시키고, 4℃에서 3시간 동안 40 μl 50% (v/v) 글루타치온 세파로즈 4B 슬러리에 고정하였다. 결합된 단백질은 항-Flag 단일클론 항체를 사용하여 면역 블랏 분석하였다.

#### [0053] GST 융합단백질 정제

[0054] GST (glutathione S-transferase)-Rab32 및 GST-VARP-ANKRD1 융합단백질을 *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen)에서 발현하였다. 세포를 용해 완충액 (10 mM Tris, (pH 7.5) and 150 mM NaCl)에 5 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 μg/ml DNase, 10 μg/ml RNase 및 1 mM PMSF를 보충하여 용해시켰다. GST 융합단백질을 글루타치온 세파로즈 4B 비드 (Amersham Biosciences)를 이용하여 정제하고, 20 mM 트리스, (pH 8.5), 500 mM NaCl, 20 mM DTT 및 40 mM 환원된 GSH를 함유하는 완충액으로 용출하였다.

#### [0056] RNA 간섭

[0057] Rab32를 표적으로 하는 siRNAs (Rab32 siRNA #1, 5' -CUG AGA AUG GGU UAC AGA U (dTdT)-3' [센스] 및 5' -AUC UGU AAC CCA UUC UCA G (dTdT)-3' [안티센스]; Rab32 siRNA #2, 5' -CUA GUG GCU CUG UAA CUU A (dTdT)-3' [센스] 및 5' -UAA GUU ACA GAG CCA CUA G (dTdT)-3' [안티센스]) 및 범용 음성 대조군 siRNA를 Bioneer (한국)에서 구입하였다. JC1 바이러스의 5'-NTR (nontranslated region)을 표적으로 하는 siRNA (5'-CCU CAA AGA AAA ACC AAA CUU-3')는 양성 대조군으로 이용하였다 (21). siRNA 트랜스펙션은 제조자의 지시에 따라 Lipofectamine RNAiMax reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 수행하였다.

#### [0059] 세포 분리

[0060] 트리톤 X-100-용해성 및 -불용성 분획의 분리는 종래 기술 (22)을 약간 변형하여 수행하였다. 간략하게, Huh7

세포를 60-mm 접시에 넣고, PBS로 두 번 세척하고, 용해 완충액 (1% Triton X-100, 120 mM KCl, 30 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 및 10% 글리세롤, 프로테이즈 저해제 포함) 200  $\mu$ l에 넣고 용해하였다. 15분 동안 얼음에 배양한 후, 상등액을 4°C 용해성 분획 (soluble fraction)에서 5분 동안 500  $\times$  g에서 원심 분리하여 얻었다. 펠렛을 용해 완충액으로 두 번 세척 하고, 실온에서 5분 동안 SDS 완충액 (10 mM Tris, (pH 7.5), 1% SDS와 프로테이즈 저해제 포함) 50  $\mu$ l로 가용화하였다. 용해된 부분에 상기 RIPA 완충액 150  $\mu$ l를 첨가하고 30초 동안 불용성 분획 (insoluble fraction)에 초음파 처리하였다. 용해성 및 불용성 분획에서의 단백질의 양은 면역블롯방법으로 분석하였다.

[0062] **면역형광 분석**

[0063] Huh7 세포를 글라스 커버슬립에 시드하고 표시된 플라스미드로 트랜스펙션하였다. 표시된 시점에서 세포는 PBS로 두 번 세척하고, 실온에서 10분 동안 4% 파라포름알데히드가 함유된 PBS 또는 -20°C에서 20분 동안 차가운 메탄올에 고정하고, 다음으로 37°C에서 10분 동안 0.1 % 트리톤 X-100가 함유된 PBS로 투과하였다. PBS로 세 번 세척한 후, 고정된 세포는 실온에서 1시간 동안 3% BSA (bovine serum albumin) 함유 PBS로 블로킹하였다. 세포는 하루 동안 4°C에서 지시된 일차 항체와 배양하였다. PBS로 세 번 세척한 후, 세포는 TRITC (tetramethylrhodamine isothiocyanate)-결합된 당나귀 항-마우스/토끼 IgG 또는 FITC (fluorescein isothiocyanate)-결합된 염소 항-마우스/토끼 IgG로 상온에서 한 시간 동안 배양하였다. 세포는 핵을 표지하기 위해 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)로 역염색하였다. 미토콘드리아는 미토타커 (CMXRos; Molecular Probes) 100 nM로 37°C에서 40분 동안 염색하였다. 지방 소체를 실온에서 30분 동안 BODIPY (439/503) (Invitrogen)로 염색하여 시각화하였다. PBS로 세 번 세척한 후, 세포는 Zeiss LSM 700 레이저 공초점 현미경 시스템 (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY)을 이용하여 분석하였다.

[0065] **WST 분석**

[0066] 24-웰 플레이트 상에 시드된 약  $1.5 \times 10^4$  세포를 음성, 양성 및 Rab32-특이적 siRNAs로 트랜스펙션하였다. 세포 생존율은 WST (water-soluble tetrazolium salt)(Dail Lab)를 사용하여 종래 기술과 같이 결정하였다 (20).

[0068] **정량**

[0069] qRT-PCR (Quantitative real-time PCR)는 Rab32 프라이머: 5' - TGG GAC AGC AGG ACT CTG G -3' (센스) 및 5' - ACT CGG GTC ATG TTG CCA A -3' (안티센스)를 사용하여 종래 기술 (23)과 같이 결정하였다.

[0071] **통계 분석**

[0072] 데이터는 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다. 통계 분석을 위해 Student's t test를 이용하였다. 도면 설명에 언급한 것과 같이 별표는 유의한 차이가 있음을 나타낸다.

[0074] **결과 1: HCV가 감염되면 Rab32 수준이 증가한다.**

[0075] HCV 증식에서 필수적인 역할을 하는 숙주 인자를 확인하기 위하여 본 발명자들은 HCVcc 감염 세포에서 전 유전체에서 전사체의 변화를 규명하는 RNA-Seq 기술을 채용한 바 있다. qRT-PCR 분석을 수행함으로써, 본 발명자들은 HCV 감염시 30개의 숙주 인자가 현저히 발현됨을 밝혔다 (24). 본 발명에서 우리들은 Rab32를 선택하여 좀 더 자세하게 특징을 규명함으로써 이 단백질이 HCV 증식 조절에 기능적으로 관여하는지를 밝히고자 하였다. HCVcc-감염 세포에서 Rab32 발현이 증가함을 확인하기 위하여 Jc1-감염된 Huh7.5 세포에서 각기 다른 시점에 Rab32 mRNA 수준을 측정하였다. 기대한 대로, 가감염 세포와 비교하여 HCV-감염 세포에서는 Rab32 mRNA 수준이 현저히 증가하여 6일째에 두 배가 되었다 (도 1a). 이와 동일한 맥락으로, HCV 감염 동안 Rab32 단백질 수준은 비례하여 증가하였다 (도 1b). 또한, 본 발명자들은 유전자형 1b 유래 HCV 서브게놈 레플리콘 세포의 Rab32 수준을 시험하였고, HCV 레플리콘 세포에서 Rab32의 mRNA 수준 (도 1c) 및 단백질 발현 수준 (도 1d)이 부모세대 Huh7 세포 또는 IFN-처리 세포에 비하여 현저히 높음을 밝혔다. 이러한 데이터들은 HCV-감염세포에서 HCV 비구조 단백질이 Rab32의 상향조절에 책임이 있을 수 있음을 제시한다. 실제로, HCV NS3 과발현은 Rab32 mRNA 수준을 증가시켰다 (데이터 나타내지 않음). Rab32 전사 수준이 HCV 감염에 의해서도 조절되는지를 알아보기 위하여, Huh7.5 세포를 가감염하거나 Jc1으로 감염시켰다. 감염 네 시간 후, 세포를 Rab32 프로모터의 -643 nt 내지 +260 nt로 이루어진 luc 리porter 플라스미드로 트랜스펙션한 다음 이를 후 루시퍼레이스 활성을 분석하였다. 도 1e는 Rab32 프로모터 활성이 HCV-감염 세포에서 현저히 증가함을 보여준다. 또한, 이 데이터들은 HCV가 Rab32 유전자 발현을 상향조절함을 명확히 나타낸다.

[0077] **결과 2: Rab32는 HCV 증식에 필요한 숙주인자이다.**

[0078] HCV 증식에 Rab32가 기능적으로 관여하는지를 알아보기 위하여, Rab32를 표적으로 하는 두 개의 siRNA로 트랜스펙션한 Huh7.5 세포를 Jc1으로 감염시켰다. 감염 48시간 후, HCV RNA 및 단백질 수준을 측정하였다. 도 2a와 같이, Rab32 녹다운은 HCV RNA 수준을 현저히 억제하였다. 이와 동일한 맥락으로, Rab32 녹다운 세포에서 HCV 단백질 발현이 저해되었다 (도 2b). 본 발명자들은 나아가 배양 상층액의 세포외 HCV RNA가 Rab32의 침묵화를 현저히 감소시킴을 밝혔다 (도 2c). HCV 증식에서 Rab32의 역할을 좀 더 규명하기 위하여, 감염되지 않은 Huh7.5 세포를 첫 감염 배양 상층액에서 모은 Jc1으로 감염시킨 후 (도 2a), HCV RNA 및 단백질 수준을 분석하였다. 두 번째 감염 결과는 첫 번째 감염 결과와 일치하여 음성 대조군과 비교했을 때 Rab32 녹다운에 의하여 HCV RNA뿐만 아니라 단백질 수준도 현저히 감소했음을 보여주었다 (도 2d). 나아가 본 발명자들은 siRNA 처리가 세포생존율에 아무런 영향을 미치지 않았음을 보여주었고, 침묵화 효과가 Rab32에 특이적임을 확인하였다 (도 2e). 종합하면, 이 데이터들은 Rab32가 HCV 증식에 필요한 중요한 숙주인자임을 분명히 나타낸다.

[0080] **결과 3: Rab32는 감염되지 않은 Huh7 세포에서 주로 GTP 결합 형태로 존재한다.**

[0081] Rab GTPase는 GDP-결합 상태와 GTP-결합 상태를 오가며, 이 결합 상태는 GEFs (guanine nucleotide exchange factors)와 GAPs (GTPase activating proteins)에 의해 조절되고, 세포내 위치와 활성화에 영향을 미친다 (25). 따라서, 바이러스 감염세포와 감염되지 않은 간세포에서 Rab32 단백질의 뉴클레오타이드-의존적 기능을 연구하는 것이 중요하다. 마우스 펠라노사이트에서 Rab32의 뉴클레오타이드 상태는 GTP-의존적 방식으로 Rab32와 특이적으로 반응하는 ANKRD1 (first ankyrin-repeat domain)으로서 Varp (vacuolar protein sorting 9-ankyrin-repeat protein)를 이용하여 자주 측정하였다 (도 3a)(26). 그러나, 펠라노솜을 생산하지 않고 Rab32 세포내 분포가 다른 세포 (14, 15)에서 Rab32의 뉴클레오타이드 상태는 지금까지 잘 알려져 있지 않다. 이를 밝히기 위해 본 발명자들은 Huh7 세포에서 증폭된 VARP의 인간 ANKRD1 도메인 (VARP-ANKRD1)을 코딩하는 cDNA 클론을 구축하여 이것을 Rab32 뉴클레오타이드 상태를 시험하는데 이용하였다. 먼저, 우리는 Huh7 세포에서 Rab32의 GDP-고정 형태 (T39N) 또는 GTP-고정 형태 (Q85L)로 VARP-ANKRD1의 세포내 분포를 조사하였다. Rab32-T39N은 보존된 GTP-결합부위에서의 돌연변이로 인하여 GDP에 우선적으로 결합하는 반면, Rab32-Q85L은 고유한 GTPase 활성을 제거했기 때문에 GTP 형태를 영구적으로 GTP 형태를 띤다 (13). Rab32-L188P는 이차 구조의 붕괴로 인하여 PKA에 반응할 수 없다고 보고된 바 있다 (13). 본 발명자들은 Flag-표지된 VARP-ANKRD1이 작은 반점과 같은 구조에서 GDP-결합 Rab32와 같은 위치에 있음을 밝혔다 (도 3b, 왼쪽 패널). 반면, GTP-결합 Rab32는 세포 전체에 널리 분포하고 VARP-ANKRD1과 겹치는 신호가 없었다 (도 3b, 오른쪽 패널). 결과적으로, 본 발명자들은 인간 VARP-ANKRD1이 Huh7 세포에서 Rab32-GDP를 식별하여 인식한다고 간주하였다. 우리는 또한 VARP-ANKRD1을 가지고 GST-폴다운 분석법으로 Rab32의 뉴클레오타이드-의존적 결합 패턴을 확인하였다. 이를 위하여, GST-표지된 VARP-ANKRD1 융합 단백질을 *E. coli*에 유도하고 정제된 단백질은 10% SDS-PAGE로 분석하였다 (도 3c, 왼쪽 패널). Flag-표지된 Rab32를 함유하는 Huh7 세포 용균액을 GTP  $\gamma$ S 또는 GDP로 처리하고 세포 용균액을 GST-표지된 VARP-ANKRD1로 침전시켰다. 우리는 VARP-ANKRD1이 GDP-결합 Rab32와 특이적으로 반응하지만 GTP  $\gamma$ S-결합 Rab32와는 반응하지 않음을 밝혔다 (도 3c, 오른쪽 패널). 이와 일치하는 결과로서, HEK293T 및 Huh7 세포에서 GST-표지 VARP-ANKRD1은 Rab32-T39N을 특이적으로 포착하였으나, Rab32-Q85L 형태는 포착하지 않았다 (도 3d). 그리하여 본 발명자들은 VARP-ANKRD1이 GDP-결합 Rab32와 선택적으로 반응한다고 결론지었다. Huh7 세포에서 과발현된 야생형 Rab32 단백질은 GDP-결합 Rab32 (T39N)과 비교하여 VARP-ANKRD1과 거의 반응하지 않았음을 주목할 만하다 (도 3d, 아래 패널). Flag-표지 VARP-ANKRD1을 이용하여, 본 발명자들은 VARP-ANKRD1이 HEK293 세포에서 Rab32-WT, Rab32-T39N 및 Rab32-L188P와 함께 침전함을 확인하였다 (도 3e, 위쪽 패널). 그러나, Huh7 세포에서 야생형 Rab32와 VARP-ANKRD1 간의 반응은 탐지되지 않았다 (도 3e, 아래쪽 패널). 이 데이터들은 Rab32가 감염되지 않은 Huh7 세포에서 주로 GTP-결합 형태로 존재함을 의미한다.

[0083] **결과 4: HCV 감염은 Rab32의 GDP-결합 형태와 GTP-결합 형태 간 균형을 이동시킨다.**

[0084] HCV 감염세포에서 Rab32의 뉴클레오타이드 상태를 연구하기 위하여 Huh7 세포를 가감염시키거나 또는 Jc1으로 2일 및 4일간 감염시키고 내생 Rab32-GDP 수준을 정제한 GST-표지 VARP-ANKRD1로 분석하였다. 도 4를 보면, 가감염된 세포에서 내생 Rab32는 GST-표지 VARP-ANKRD1에 의해 침전되지 않았다 (양쪽 패널의 레인 3). 그러나, HCV 감염세포에서 내생 Rab32는 GST-표지 VARP-ANKRD1과 함께 침전하였다 (도 4의 양쪽 패널에서 레인 4). HCV 감염세포에서 VARP-ANKRD1과 Rab32 간의 독점적 상호작용을 감안하여, 본 발명자들은 HCV가 Rab32 총 단백질 발현 수준을 증가시킬 뿐 아니라 Rab32의 GDP-결합 형태와 GTP-결합 형태 간의 균형을 전환하여 GDP-결합 형태를 좀 더 생산하도록 함을 밝혔다. 그럼에도 불구하고, HCV 감염세포에서 Rab32의 뉴클레오타이드 상태 변환에 따르는

구체적인 기작을 밝히는 데는 좀 더 연구가 필요하다.

**[0086] 결과 5: HCV 감염 세포에서 Rab32는 응집체를 형성한다.**

**[0087]** Rab32의 뉴클레오타이드-의존적 기능은 멜라노솜아이트에서 광범위하게 연구되었는데, 여기서 Rab32는 트랜스-골지 네트워크에서 멜라노솜을 들어오는데 중요한 역할을 수행한다 (10, 26). 그러나, 멜라노솜을 생산하지 않는 세포에서 막과 결합한 내생성 Rab32는 이와 다른 기능을 나타낸다 (13-15). 본 발명에서 발명자들은 Huh7 세포에서 ER과 미토콘드리아 분획 내에서 내생성 Rab32가 많이 분포함을 관찰하였다 (데이터 나타내지 않음). 본 발명자들은 왜 HCV 감염이 주로 발현되는 GTP-결합 Rab32를 GDP-결합 형태로 바꾸는지를 알아보려고 하였다. COS-1 세포에서 Rab32-T39N 과발현이 반점-유사 및/또는 사슬-유사 응집체 형성 Rab32로 구성되는 어그레조-유사 구조를 형성하며, 이것은 돌연변이의 이차구조 변형에 의한 것이 아닌 것으로 보고된 바 있기 때문에 (15), 우리는 HCV 감염이 Rab32 단백질의 응집을 일으킬 것으로 예상하였다. 이러한 가설을 시험하기 위하여 먼저 1% Triton X-100에서 Rab32 단백질의 다양한 형태의 용해도를 시험하였는데, 이는 응집한 단백질들이 대부분 세제-저항성이기 때문이다. 칼넥신 (Calnexin)은 종래 보고된 바와 같이 용해성 분획의 마커로 이용하였다 (27, 28). 도 5a와 같이, 야생형 및 GTP-고정된 Rab32 단백질 (Q85L)은 주로 용해성 분획에서 발견된 반면, GDP-고정 T39N과 PKA와 잘 결합하지 못하는 Rab32의 L188P 돌연변이는 불용성 분획에 재배치되었다. 이 데이터들은 GTP-결합 상태에서 GDP-결합 상태로 변환에 따라 Rab32의 용해도가 감소함을 말해준다. 종래의 논문 (15)과 일치하게, 우리는 Huh7 세포에서 Rab32-T39N과 Rab32-L188P 단백질이 모두 폴리우비퀴틴화되어 있음을 관찰하였다 (도 5b). GDP-결합 Rab32의 용해성 분획과 불용성 분획의 단백질 반감기를 알아보기 위하여 Flag-표지된 Rab32-T39N 플라스미드를 과발현하는 Huh7 세포를 CHX (cycloheximide)로 처리하고 지시된 시각에 모았다. 세포를 분획하고 서로 다른 용해성 분획과 불용성 분획의 동량의 단백질을 면역블롯팅으로 분석하였다. 도 5c와 같이, 용해성 분획 내의 T39N 단백질은 점차 분해되었으나, T39N 단백질의 불용성 분획은 CHX 처리 조건 하에서 세포 분해에 매우 저항성이 높았다. 이 결과는 불용성 분획에서는 대부분 GDP-결합 형태의 Rab32가 있어서 숙주세포로부터 효소의 공격에 덜 민감해지도록 한다는 것을 말해준다. Rab32 단백질의 야생형과 돌연변이형의 세포 내 분포를 연구하기 위하여, V5-표지된 야생형 (WT), T39N, Q85L형 Rab32 발현 플라스미드로 Huh7 세포를 트랜스펙션하여 Mitotracker 및 항-V5 단일클론 항체를 이용한 면역형광법으로 분석하였다. 종래 연구결과 (15)와 일치하게 Rab32-T39N 발현 세포는 어그레조-유사 구조를 나타내는 것으로 보이는 집중된 분포를 형성하였으나, Rab32-Q85L 발현 세포는 그렇지 않았다 (도 5d). 흥미롭게도 우리는 Bui et al. (14)의 보고와 같이 미토콘드리아가 Rab32-T39N 단백질을 과발현하는 세포의 핵주위 부분에서 자주 그리고 매우 응축되어 있음을 관찰하였다. 최종적으로 본 발명자들은 가감염 및 Jc1 감염된 Huh7 세포 모두에서 내생성 Rab32 단백질의 용해도를 조사하였다. 기대했던 대로, Rab32는 가감염 세포의 세제-불용성 분획에서는 탐지되지 않았다 (도 5e, 라인 2). 이와 대조적으로, Jc1 감염세포에서 Rab32는 세제-용해성 분획에서도 발견되었고 (도 5e, 라인 3), 불용성 분획에서도 상당한 수준으로 존재하였다 (도 5e, 라인 4). 이러한 결과들은 HCV가 GDP-결합 Rab32의 형성을 촉진하여 HCV 감염 세포에서 Rab32의 응집에 기여함을 간접적으로 제시한다. 어떤 바이러스들은 바이러스 복제 및/또는 조립을 위하여 세포내 응집 단백질 구조를 이용하기 때문에 (29, 30), 본 발명자들은 HCV가 바이러스 증식에 유리한 세포내 환경을 만들기 위하여 Rab32의 응집 형태를 유도하는 것인지를 예상해 보았다.

**[0089] 결과 6: HCV 단백질 발현 수준은 Rab32의 T39N 돌연변이에 의하여 상향조절된다.**

**[0090]** HCV 증식에서 Rab32의 기능적 연관성을 연구하기 위하여, Huh7.5 세포를 가감염시키거나 Jc1으로 감염시킨 후 빈 벡터, Rab32 야생형 (WT), T39N, Q85L 및 L188P 돌연변이 발현 플라스미드로 각각 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 2일 후, HCV 단백질 수준을 지시된 항체를 이용한 면역블롯팅으로 분석하였다. 도 6a와 같이, Rab32의 다양한 구축물을 발현하는 세포에서 NS3와 NS5A를 포함하는 바이러스 단백질 수준은 벡터로 트랜스펙션한 대조군과 비교하여 변하지 않았다. 놀랍게도, 야생형 Rab32 또는 T39N을 발현하는 세포에서 코어 단백질 수준은 Rab32의 Q85L 또는 L188P 돌연변이를 발현하는 세포에 비하여 극적으로 높았다. 감염되지 않은 Huh7.5 세포를 패널 A에서 모은 바이러스 함유 배양 상층액으로 감염시키면, 2차 감염시 HCV 단백질 수준 또한 Rab32의 Q85L 또는 L188P 돌연변이를 발현하는 세포에 비하여 야생형 Rab32 또는 T39N을 발현하는 세포에서 더 높았다 (도 6b, 라인 2와 3 Vs. 4와 5). 이 데이터들은 GDP-결합 Rab32가 HCV 생산에 긍정적인 효과를 보여줄을 제시한다. 또한, 본 발명자들은 잘못된 PKA-고정 신호를 제공하는 L188P의 과발현이 HCV 증식을 현저히 억제하였음을 밝혔다 (도 6b, 라인 5). 종합하면, 이 데이터들은 HCV가 코어 단백질 발현을 증강하기 위하여 GDP-결합 Rab32를 상향조절하여 바이러스 증식을 용이하게 하고 Rab32의 PKA-고정 활성화는 이 조절에서 핵심적인 역할을 한다는 것을 제시한다. GFP-코어를 이용하여 우리는 Rab32-WT 또는 T39N을 발현하는 세포에서 코어 단백질이 상향조절되었으나, 반면 Rab32-L188P 발현 세포에서는 GFP 신호의 양이 최저였음을 밝혔다 (도 6c). 본 발명자들은 NS5A (오른쪽

패널)가 아닌 코어 단백질 (왼쪽 패널)이 Rab32-T39N에 의해 상향조절되었음도 확인하였으며 (도 6d), 다른 HCV 단백질이 아닌 코어 단백질 발현 수준이 Rab32-T39N에 의해 상승하였음을 관찰하였다 (데이터 나타내지 않음).

[0092] **결과 7: Rab32는 HCV 코어와 선택적으로 반응하며 코어를 세제-불용성 분획에 농축하였다.**

[0093] Rab32의 발현 수준과 활성이 HCV 증식과 코어 단백질 발현의 근본적인 변화를 유도한다고 가정하고, Rab32와 HCV 단백질의 상호작용 가능성을 알아보았다. 이를 위하여 E. coli에서 GST-표지 Rab32 단백질을 이용하여 GST-폴다운 분석을 수행하였다. 도 7a와 같이, Rab32는 다른 HCV 단백질과는 반응하지 않았으나 코어 단백질과는 선택적으로 반응하였다. 이 반응은 면역침전법으로 확인하였다 (도 7b). 나아가 HCV 감염 세포에서 코어 단백질이 내생성 Rab32와 반응하는지를 확인하였다 (도 7c). 이 데이터들은 HCV 감염 세포에서 Rab32가 코어와 같은 위치에 있음을 제시한다. 이 가능성을 연구하기 위하여, Huh7 세포를 가감염 또는 Jc1으로 감염한 다음 면역형광분석을 수행하였다. 내생성 Rab32와 HCV 코어는 세포질 내에 같은 위치에 있었고, 이는 노란 형광색으로 보인다 (도 7d, 오른쪽 패널). 노란 형광신호가 가감염 세포에서는 없는 Rab32가 세포 내에 있음을 나타내는 Rab32 단백질의 반점 구조와 겹쳐 있는 것은 주목할 만하다 (오른쪽 패널). 이 데이터들은 앞서 예측한 바와 같이 HCV 감염이 세포질 내 작은 Rab32 응집체 형성을 촉진하고 (도 5) Rab32가 HCV 코어 단백질과 특이적으로 반응함을 말해준다. 다음으로, 코어 단백질과 반응할 때 Rab32의 뉴클레오타이드-의존성에 대해 분석하였다. 이를 위하여 HEK293T 세포 (왼쪽 패널) 또는 Huh7 세포 (오른쪽 패널)를 Myc-표지 HCV 코어 및 Flag-표지 Rab32 발현 플라스미드의 다양한 구조체들로 코트랜스펙션하였다. 면역침전 데이터는 Q85L이 아닌 Rab32-T39N이 코어 단백질과 함께 면역침전함을 보여주었고 (도 7e), 이는 HCV 코어가 GDP-결합 Rab32와 특이적으로 반응함을 의미한다. 중요한 것은 Huh7 세포에서 미량의 야생형 Rab32만이 코어 단백질과 반응했다는 점이며 (도 7e, 아래 패널), 나아가 감염되지 않은 Huh7 세포에서 대부분의 Rab32 단백질이 GTP-결합 상태임을 확인하였다.

[0094] Q85L이 아닌 Rab32-T39N 발현이 Hsc70과  $\alpha$ -시누클레인 ( $\alpha$ -synuclein)을 포함하는 유비퀴틴화 단백질들이 세포질에서 미세소관 형성 중심 (microtubule-organizing center) 내의 어그레جوم-유사 구조로 재분배되도록 이끈다고 보고된바 있다 (15). 또한, HCV 코어 단백질은 유비퀴틴 라이게이즈 E6AP에 의해 유비퀴틴화되고 프로테아좀-의존적 경로에 의해 분해된다는 것이 알려져 있다 (31, 32). 최근 Afzal 등은 코어가 번역후 변형을 겪음으로써 자신의 분해를 저해하는 것으로 보인다고 보고한바 있는데, 번역후 변형은 코어 부분을 소포체막의 세제-저항성 마이크로도메인이 되도록 한다 (33). 그리하여 본 발명자들은 HCV-유도 GDP-결합 Rab32 생산이 코어를 Rab32-유도 응집구조로 농축되도록 함으로써 코어 안정화에 중요한 역할을 한다고 예상하였다. 이를 확인하기 위하여, 다양한 Rab32 구조체로 트랜스펙션한 Huh7 세포를 Jc1으로 감염시킨 다음 세포 용균액을 세제-용해성 및 불용성 분획으로 나누었다. 도 7f는 HCV가 감염되면 대부분의 야생형 Rab32 단백질이 세제-용해성 분획에서 불용성 분획으로 재분배됨을 보여주며 (레인 4), 나아가 HCV 감염이 Rab32의 뉴클레오타이드 상태를 우세한 GTP-결합 형태에서 GDP-결합 형태로 전환시킴을 확인하였다. 중요한 것은 단백질 용해도의 주요 변화가 코어 단백질에서 일어나며 다른 HCV 단백질에서는 일어나지 않는다는 점이다. 기대했던 대로 Rab32 야생형 및 T39N 모두의 전위 발현 (ectopic expression)이 백터 대조군과 비교할 때 각각 불용성 코어 단백질 수준을 1.64배 및 2.29배 증가시켰다 (도 7f, 레인 4와 6). 이 결과는 GDP-결합 Rab32가 코어와 반응하며, 코어를 세제-불용성 분획에 농축시킴을 말해준다. 주목할 만한 것은 코어와의 반응에도 불구하고, Rab32의 L188P 돌연변이를 발현하면 가장 낮은 수준의 세제-불용성 코어 단백질이 얻어지는데, 이는 PKA 신호전달뿐 아니라 Rab32의 PKA-고정 활성의 기능적 중요성을 말해준다. 본 발명자들은 면역형광분석법으로 Q85L이 아니라 Rab32-T39N을 과발현하는 세포에서 코어 단백질이 세포질 내 핵 근접 구조 (juxtannuclear structure)에 노란 알갱이 반점과 같이 축적되었다 (도 7g). 이 데이터는 GDP-결합 Rab32가 HCV 코어와 선택적으로 반응하고 코어를 Rab32 응집체에 농축함을 말해준다. 코어 단백질의 세제-저항성에 대한 Rab32 단백질의 효과를 입증하기 위하여, Jc1으로 감염된 Huh7 세포를 빈 백터 (위쪽 패널) 또는 V5-표지 야생형 Rab32 (아래쪽 패널)로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 30시간 후, 세포를 1% Triton X-100 용액에 짧게 담갔다가 꺼내어 면역형광분석을 수행하였다. 앞서 보고된 바와 같이 (27), 어느 정도의 코어 반점과 패치들은 세제 처리에 저항성을 나타내었다 (도 7h, 아래 패널의 화살표). 중요한 것은 코어 단백질이 세제-저항성 Rab32 상에 위치하며 Rab32 단백질을 발현하는 세포에서 높은 수준으로 축적되었고 (도 7h, 아래 패널), 반면, 이웃한 트랜스펙션되지 않은 세포에서는 코어 단백질의 작은 반점만 탐지되었다. 이 데이터는 불용성 Rab32가 세제로부터 코어 단백질을 보호하고, 따라서 좀 더 많은 코어 단백질들이 세제-불용성 분획에 축적됨을 보여준다.

[0096] **결과 8: Rab32는 HCV 생애주기의 조립 단계에 관여한다.**

[0097] HCV 코어 단백질은 HCV 입자 조립체의 플랫폼으로 추정되는 세제-저항성 막에 위치하는 것으로 나타났다 (27, 28). 또한, HCV 코어는 감염 세포의 지방소체 표면과 바이러스 조립에 필수적인 것으로 증명된 핵 주위 지역의

코어로 둘러싸인 지방소체 결집체에 위치한다 (34-36). 코어로 싸인 지방소체의 안정화는 어그레솜-유사 구조의 형성을 통해 매개될 수 있기 때문에 (29, 30), 우리는 HCV가 바이러스 조립을 위해 결집된 Rab32를 사용할 것이라고 가정하였다. HCV 생애주기에서 Rab32의 기능을 알아보기 위하여 종래 논문 (20)에 기재된 것과 같이 JFH-1 외피 당단백질을 이용하여 HCV 유사입자 (HCV pseudoparticle; HCVpp)의 도입 분석법을 수행하여 Rab32 침묵화가 HCVpp 도입에 아무런 영향을 미치지 않음을 밝혔다 (도 8a). 다음으로, Rab32가 HCV IRES (internal ribosome entry site)-매개 번역에 관여하는지를 연구하였다. 이를 위하여, Rab32 siRNA로 트랜스펙션한 Huh7 세포를 pRL-HL 및  $\beta$ -갈락토시데이즈 발현 플라스미드로 트랜스펙션한 후 (37) 루시페레이스 활성을 측정하였다. 또 우리는 Rab32가 HCV IRES-의존적 번역에 관여하지 않음을 밝혔다 (도 8b). 이후 Rab32가 HCV RNA 복제에 필요한지를 알아보았다. 이 질문에 답하기 위해 유전자형 1b 또는 유전자형 2a 유래 HCV 서브게놈 레플리콘 세포를 지시한 siRNA로 처리하여 Rab32 침묵화가 유전자형 1b 또는 유전자형 2a 유래 HCV 서브게놈 레플리콘 세포 모두 (도 8c)에서 눈에 띄는 효과가 없음을 밝혔다. 이 데이터는 Rab32가 HCV 생애주기의 늦은 단계에 관여함을 암시한다. Rab32가 HCV 생애주기의 늦은 단계에 필수적인가를 알아보기 위하여 Huh7 세포를 Jc1 바이러스로 감염시킨 후 음성 siRNA 또는 Rab32-특이적 siRNA 또는 양성 siRNA로 트랜스펙션하였다. 비록 Rab32 mRNA 수준이 siRNA 처리로 현저히 억제되었지만, 세포내 HCV RNA 수준 (왼쪽 패널) 및 단백질 수준 (오른쪽 패널)은 영향을 받지 않았다 (도 8d). 유사하게, Rab32는 세포 외 HCV RNA 수준에 아무런 영향을 미치지 않았다 (도 8e). 그러나, 감염되지 않은 Huh7 세포를 도 8d 실험의 배양 상층액에서 모은 Jc1으로 감염시켰을 때, 두 번째 감염에서 세포내 HCV RNA 수준은 Rab32 녹다운 세포에서 50%로 감소하였다 (도 8f, 왼쪽 패널). 같은 맥락으로, HCV 단백질 수준도 Rab32 녹다운 세포에서 현저히 감소하였으며 (도 8f, 오른쪽 패널), 이는 Rab32가 바이러스 조립 또는 방출에 관련되어 있음을 나타낸다. 이 가정을 증명하기 위하여 세포내 HCV 감염도를 측정하였다. 이를 위하여, Jc1으로 감염시킨 Huh7 세포를 지시된 siRNA로 트랜스펙션하였다. 72시간 후, 냉동과 해동을 여러 번 반복하여 세포를 파괴하였다. 이어 감염되지 않은 Huh7 세포를 세포 상층액으로 감염시킨 후 상대적 세포내 HCV 감염도를 qRT-PCR로 분석하였다. 도 8g와 같이, 세포내 HCV 감염도는 Rab32-녹다운 세포에서 현저히 감소하였다. 이 데이터들은 Rab32가 HCV 생애주기의 조립단계에 특이적으로 관련되어 있음을 제시한다. Rab32가 HCV 코어를 조립 부위로 모으기 때문에, 코어와 지방소체 분배에 대한 Rab32의 침묵화의 영향을 공촛점 분석으로 연구하였다. 종래 보고 (38, 39)와 일치하게, Jc1 코어 단백질은 음성 siRNA로 처리한 세포에서 낮은 코어-지방소체 연관 수준을 보이며 그물 모양의 염색 패턴을 나타내었다 (도 8h, 위쪽 패널). 주목할 것은 Rab32를 녹다운하면 코어가 무리를 이룬 지방소체의 표면상에 유지되도록 했다는 점인데, 이는 코어가 조립 부위로 이동하지 못하도록 함을 의미한다 (도 8h, 아래 패널). 종합하면, 본 발명자들은 Rab32가 HCV 입자 조립에 필수적인 숙주인자라는 강력한 증거를 제시했다.

[0099] 표 1은 본 발명의 실시예에서 사용한 프라이머의 목록이다.

[0100] 아래 표 2, 표 3 및 표 4는 각각 Rab32의 siRNA, shRNA와 항체 에피토프 서열을 나타낸다.

[0101] 표 2는 인간 Rab32 유전자에 대한 siRNA 중 센스 가닥을 예시한 것이다. 실제로는 siRNA는 센스 가닥에 상보적인 안티센스 가닥과 결합된 두 가닥 RNA이다. 그러나, 표 2에 제시된 것 외에도 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 Rab32의 siRNA 서열을 도출하는 것은 용이하며, Rab32 유전자에 대한 siRNA가 표 2에 제시된 서열에만 한정되는 것이 아님은 자명하다.

[0102] 표 3은 인간 Rab32 유전자에 대한 shRNA 서열을 예시한 것이다. 그러나, 표 3에 제시된 것 외에도 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 Rab32의 shRNA 서열을 도출하는 것은 용이하며, Rab32 유전자에 대한 shRNA가 표 3에 제시된 서열에만 한정되는 것이 아님은 자명하다.

[0103] 표 4는 Rab32의 항원결정부를 나타내는 것이다. 항 Rab32 항체는 종래에 알려진 항체생성 소프트웨어를 이용하여 이들 항원결정부 중 1종 이상에 대하여 결합하도록 이 기술분야의 통상의 기술자가 용이하게 생성할 수 있다.

표 1

| Construct                      | Primer | Primer sequence (5'→3')                   | Enzyme site  | Vector        |
|--------------------------------|--------|-------------------------------------------|--------------|---------------|
| Rab32 qPCR                     | Fw     | TGGGACAGCAGGACTCTGG                       |              |               |
|                                | Rw     | ACTCGGGTCATGTTGCCAA                       |              |               |
| Flag-Rab32-wt                  | Fw1    | TAATA <u>GAATTC</u> CATGGCGGGCGGAGGAGCC   | <i>EcoRI</i> | p3XFlag-CMV10 |
|                                | Rw1    | GCC <u>GGATCC</u> TCAGCAACACTGGGATTTGTTC  | <i>BamHI</i> |               |
| Flag-Rab32-T39N (mutagenesis)  | Rw1a   | TAGCGCTTGATGATGCTGTTCTTGCCACGCCA          |              |               |
|                                | Fw1a   | TGTGGGACATCGCGGGGCTGGAGCGATTGGCA          |              |               |
| Flag-Rab32-Q85L (mutagenesis)  | Rw1b   | ATGTTGCCAAATCGCTCCAGCCCCGCGATGTCC         |              |               |
|                                | Fw1b   | TGTGGGACATCGCGGGGCTGGAGCGATTGGCA          |              |               |
| Flag-Rab32-L188P (mutagenesis) | Rw1c   | TACAAGAATCTTCTCCACGGGGAACCGGGCAGC         |              |               |
|                                | Fw1c   | AGGAAGCTGCCCCGTTCCCCGTGGAGAAGATTTC        |              |               |
| GST-Rab32-wt (subcloning)      | Fw     | AT <u>GAATTC</u> ATGGCGGGCGGAGGAGCC       | <i>EcoRI</i> | pGEX-4T1      |
|                                | Rw     | AA <u>GCGGCCGC</u> TCAGCAACACTGGGATTTG    | <i>NotI</i>  |               |
| Rab32-V5 (subcloning)          | Fw     | TAATA <u>GAATTC</u> ATGGCGGGCGGAGGAGCC    | <i>EcoRI</i> | pEF6 V5-His B |
|                                | Rw     | CCGG <u>TCTAGA</u> CTGCAACACTGGGATTTGTTC  | <i>XbaI</i>  |               |
| Rab32 promoter                 | Fw     | GATC <u>ACGCGT</u> TCCGTCTTCGTTAAGTTC     | <i>MluI</i>  | pGL3-basic    |
|                                | Rw     | GCTA <u>AGATCT</u> CAGAGTCCTGCTGTCCCAG    | <i>BglII</i> |               |
| GST-VARP-ANKRD1                | Fw     | GC <u>GAATTC</u> CCCTCAGTTGTCACTCCATTCTCC | <i>EcoRI</i> | pGEX-4T1      |
|                                | Rw     | AA <u>GCGGCCGC</u> GCTGGAAGTGGAGGACTCTTG  | <i>NotI</i>  |               |
| Flag-VARP-ANKRD1 (subcloning)  | Fw     | AC <u>GAATTC</u> ACCCTCAGTTGTACAC         | <i>EcoRI</i> | p3XFlag-CMV10 |
|                                | Rw     | A <u>GGATCC</u> TTAGCTGGAAGTGGAG          | <i>BamHI</i> |               |

[0104]

표 2

|    | Target site | SiRNA Sequence            |
|----|-------------|---------------------------|
| 1  | 907         | CUG AGA AUG GGU UAC AGA U |
| 2  | 1028        | CUA GUG GCU CUG UAA CUU A |
| 3  | 248         | AGCACCUCUUAAGGUGCUGGUGAU  |
| 4  | 440         | GAUUUGGCAACAUGACCCGAGUAUA |
| 5  | 456         | CCGAGUAUACUACAAGGAAGCUGUU |
| 6  | 509         | GAAGUCCACAUUUGAGGCAGUCUU  |
| 7  | 511         | AGUCCACAUUUGAGGCAGUCUAAA  |
| 8  | 648         | CCAGGUGGACCAAUUCUGCAAAGAA |
| 9  | 736         | CGGUUCCUAGUGGAGAAGAUUCUUG |
| 10 | 737         | GGUCCUAGUGGAGAAGAUUCUUGU  |

[0105]

표 3

[0107]

|    | Target site | Oligonucleotide sequence (Top strand)                      |
|----|-------------|------------------------------------------------------------|
| 1  | 432         | 5'- CACCGCAGGAGCGATTGGCAACATCGAAATGTTGCCAAATCGCTCCTGC -3'  |
| 2  | 445         | 5'- CACCGGCAACATGACCCGAGTATACCGAAGTATACTCGGGTCATGTTGCC -3' |
| 3  | 446         | 5'- CACCGCAACATGACCCGAGTATACTCGAAAGTATACTCGGGTCATGTTGC -3' |
| 4  | 651         | 5'- CACCGGTGGACCAATTCTGCAAAGACGAATCTTTGCAGAATTGGTCCACC -3' |
| 5  | 654         | 5'- CACCGGACCAATTCTGCAAAGAACACGAATGTTCTTGCAGAATTGGTCC -3'  |
| 6  | 737         | 5'- CACCGGTTCTAGTGGAGAAGATTCCGAAGAATCTTCTCCACTAGGAACC -3'  |
| 7  | 753         | 5'- CACCGATTCTTGTAACCACCAAGCGAACTTTGGTGTTTACAAGAATC -3'    |
| 8  | 810         | 5'- CACCGCTAGATCAAGAGACCTTGAGCGAACTCAAGTCTCTTGATCTAGC -3'  |
| 9  | 832         | 5'- CACCGCAGAGAACAAATCCCAGTGTGAAACACTGGGATTGTTCTCTGC -3'   |
| 10 | 835         | 5'- CACCGAGAACAATCCCAGTGTGCCGAAGCAACTGGGATTGTTCTC -3'      |

표 4

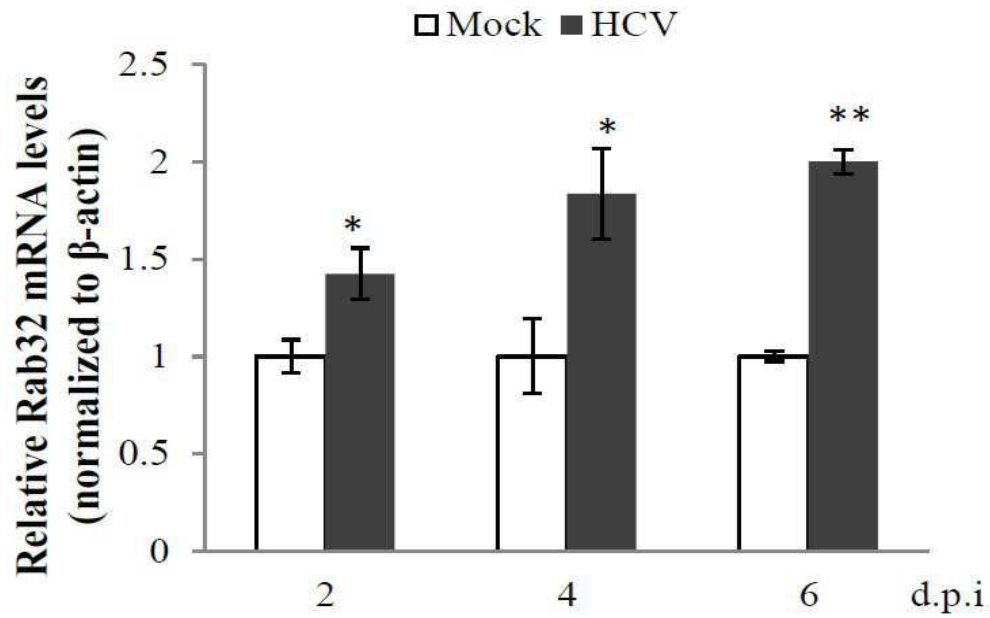
[0108]

| 위치  | 잔기 | 시작  | 끝   | 펩타이드     | 스코어   | 위치  | 잔기 | 시작  | 끝   | 펩타이드     | 스코어   |
|-----|----|-----|-----|----------|-------|-----|----|-----|-----|----------|-------|
| 4   | G  | 1   | 8   | MAGGGAGD | 4.1   | 154 | S  | 151 | 158 | SSQSPSQV | 4.55  |
| 5   | G  | 2   | 9   | AGGGAGDP | 4.888 | 155 | P  | 152 | 159 | SQSPSQVD | 4.988 |
| 6   | A  | 3   | 10  | GGGAGDPG | 5.338 | 156 | S  | 153 | 160 | QSPSQVDQ | 4.925 |
| 7   | G  | 4   | 11  | GGAGDPGL | 3.475 | 157 | Q  | 154 | 161 | SPSQVDQF | 3.025 |
| 8   | D  | 5   | 12  | GAGDPGLG | 3.475 | 160 | Q  | 157 | 164 | QVDQFCKE | 3     |
| 9   | P  | 6   | 13  | AGDPGLGA | 3.025 | 162 | C  | 159 | 166 | DQFCKEHG | 3.688 |
| 10  | G  | 7   | 14  | GDPGLGAA | 3.025 | 174 | S  | 171 | 178 | FETSAKDN | 4.388 |
| 17  | P  | 14  | 21  | AAAPAPET | 3.2   | 175 | A  | 172 | 179 | ETSAKDNI | 4.537 |
| 18  | A  | 15  | 22  | AAPAPETR | 3.462 | 176 | K  | 173 | 180 | TSAKDNIN | 4.438 |
| 19  | P  | 16  | 23  | APAPETRE | 4.175 | 179 | I  | 176 | 183 | KDNINIEE | 3.663 |
| 20  | E  | 17  | 24  | PAPETREH | 4.175 | 180 | N  | 177 | 184 | DNINIEEA | 3.213 |
| 86  | E  | 83  | 90  | AGQERFGN | 3.663 | 198 | S  | 195 | 202 | NHQSFENE | 3.663 |
| 112 | S  | 109 | 116 | SRSSTFEA | 3.7   | 199 | F  | 196 | 203 | HQSFPNEE | 3.763 |
| 113 | T  | 110 | 117 | RSSTFEAV | 2.425 | 200 | P  | 197 | 204 | QSFPNEEN | 4.375 |
| 122 | S  | 119 | 126 | KWKSDLDS | 3.15  | 201 | N  | 198 | 205 | SFPNEEND | 4.875 |
| 123 | D  | 120 | 127 | WKSDLDSK | 3.15  | 202 | E  | 199 | 206 | FPNEENDV | 3.6   |
| 124 | L  | 121 | 128 | KSDLDSKV | 3.938 | 203 | E  | 200 | 207 | PNEENDVD | 6     |
| 125 | D  | 122 | 129 | SDLDSKVH | 3.488 | 204 | N  | 201 | 208 | NEENDVDK | 6.45  |
| 144 | K  | 141 | 148 | LANKCDQN | 3.75  | 205 | D  | 202 | 209 | EENDVDKI | 4.575 |
| 145 | C  | 142 | 149 | ANKCDQNK | 5.613 | 206 | V  | 203 | 210 | ENDVDKIK | 4.313 |
| 146 | D  | 143 | 150 | NKCDQNKD | 6.6   | 210 | K  | 207 | 214 | DKIKLDQE | 3.5   |
| 147 | Q  | 144 | 151 | KCDQNKDS | 6.538 | 215 | T  | 212 | 219 | DQETLRAE | 4.237 |
| 148 | N  | 145 | 152 | CDQNKDSS | 6.637 | 216 | L  | 213 | 220 | QETLRAEN | 3.863 |
| 149 | K  | 146 | 153 | DQNKDSSQ | 7.213 | 217 | R  | 214 | 221 | ETLRAENK | 3.825 |
| 150 | D  | 147 | 154 | QNKDSSQS | 6.775 | 218 | A  | 215 | 222 | TLRAENKS | 3.663 |
| 151 | S  | 148 | 155 | NKDSSQSP | 6.288 | 219 | E  | 216 | 223 | LRAENKSQ | 3.763 |
| 152 | S  | 149 | 156 | KDSSQSPS | 6.225 | 220 | N  | 217 | 224 | RAENKSQC | 5.087 |
| 153 | Q  | 150 | 157 | DSSQSPSQ | 6.263 | 221 | K  | 218 | 225 | AENKSQCC | 4.737 |

도면

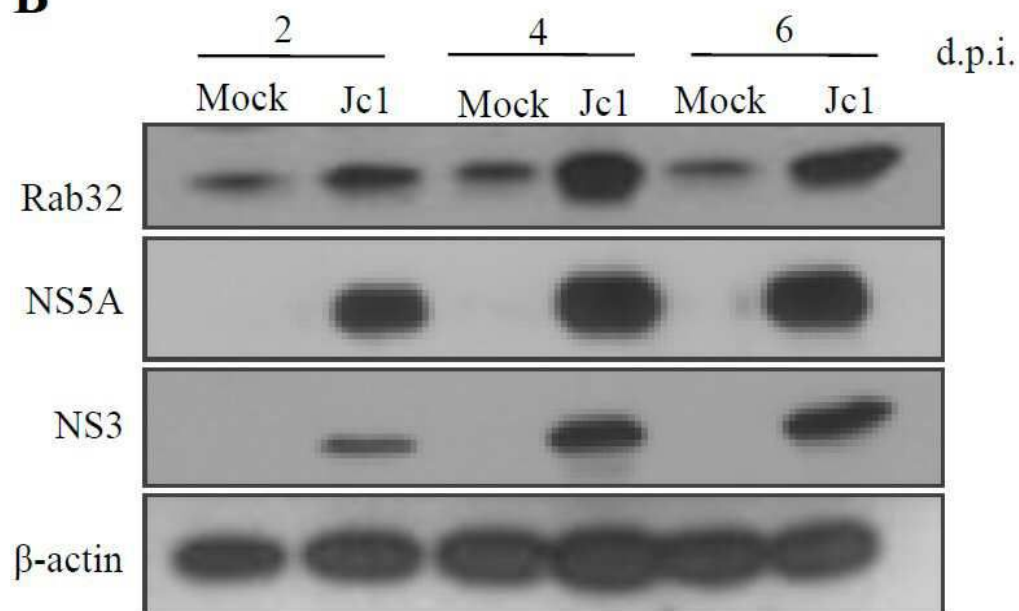
도면1a

**A**



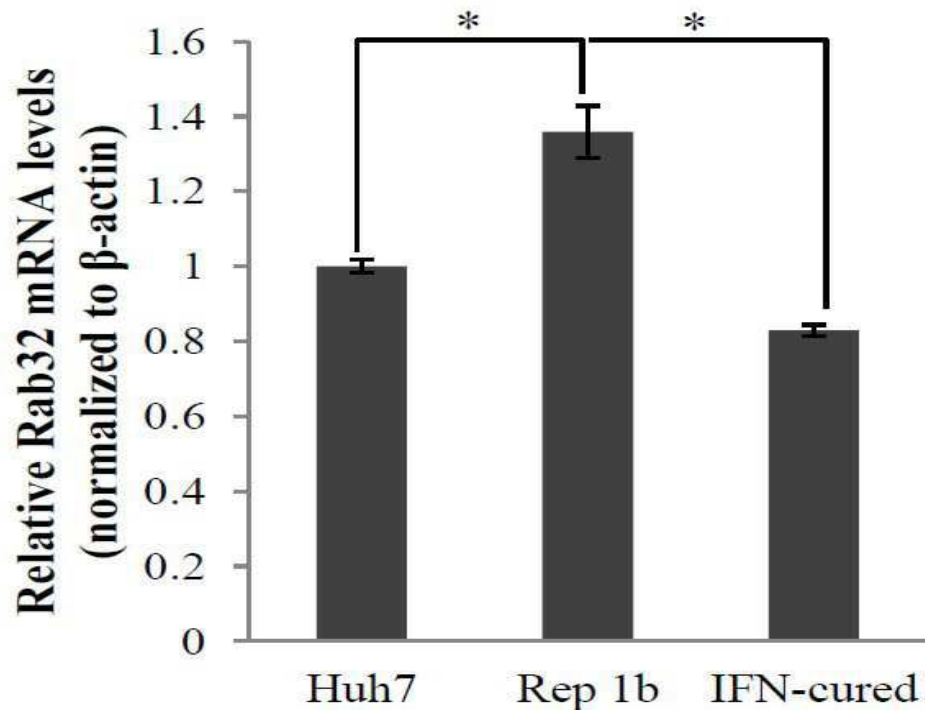
도면1b

**B**



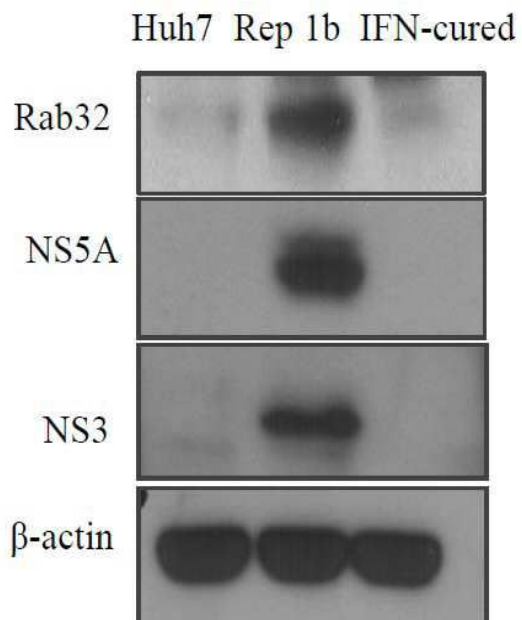
도면1c

**C**

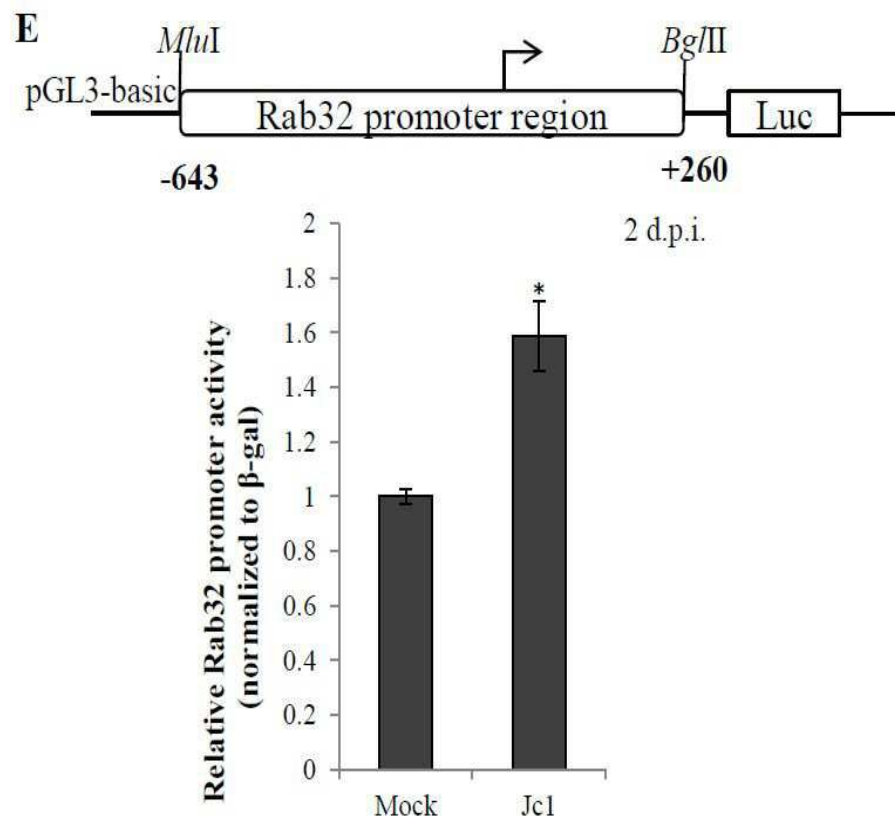


도면1d

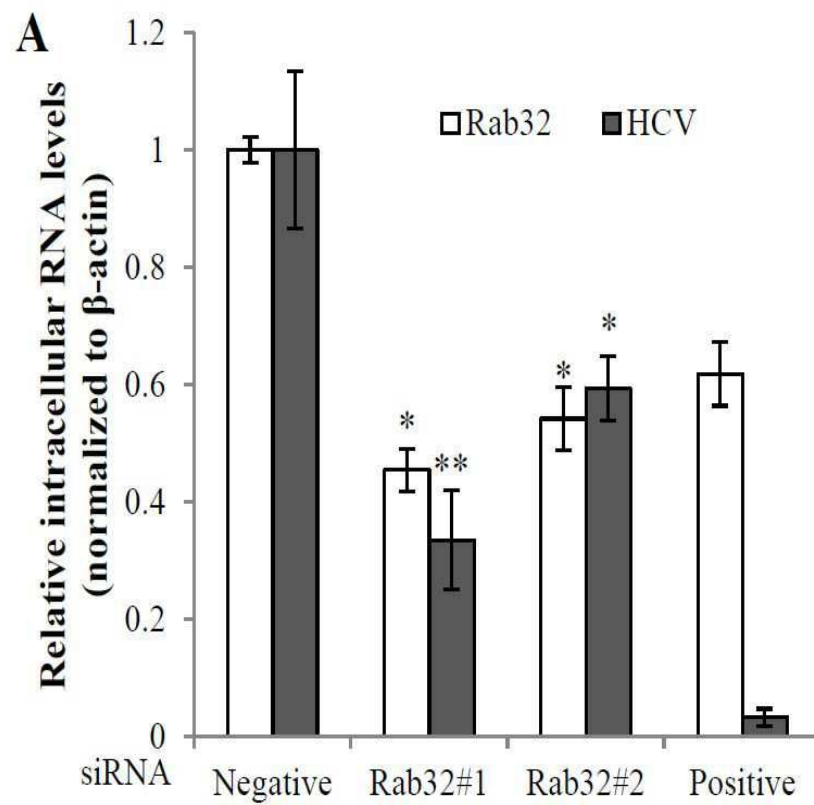
**D**



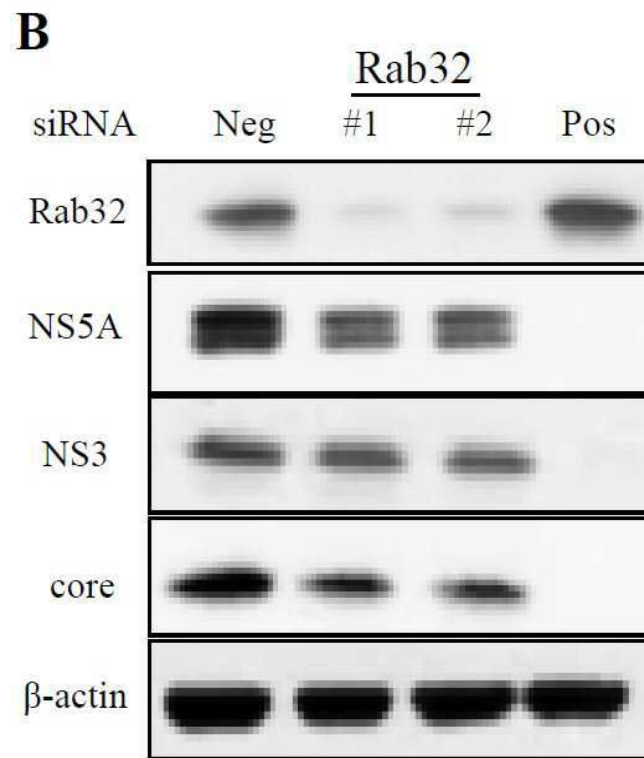
도면1e



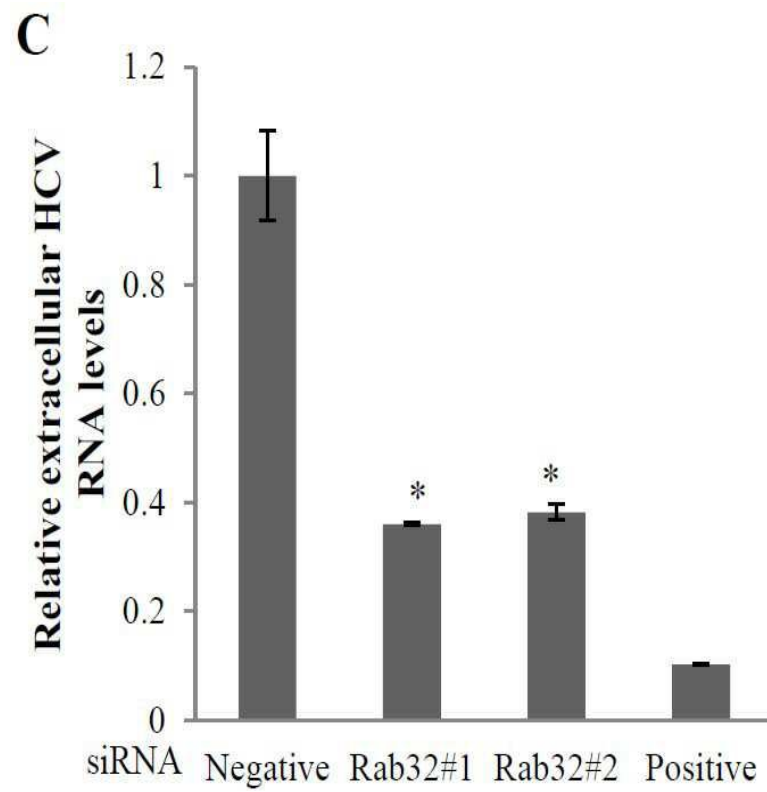
도면2a



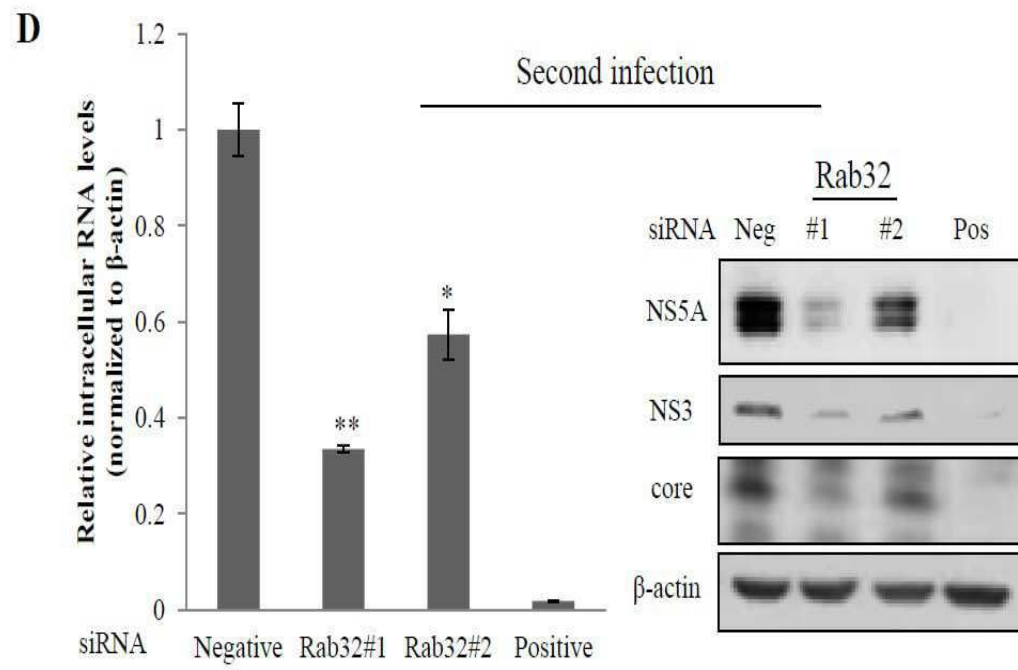
도면2b



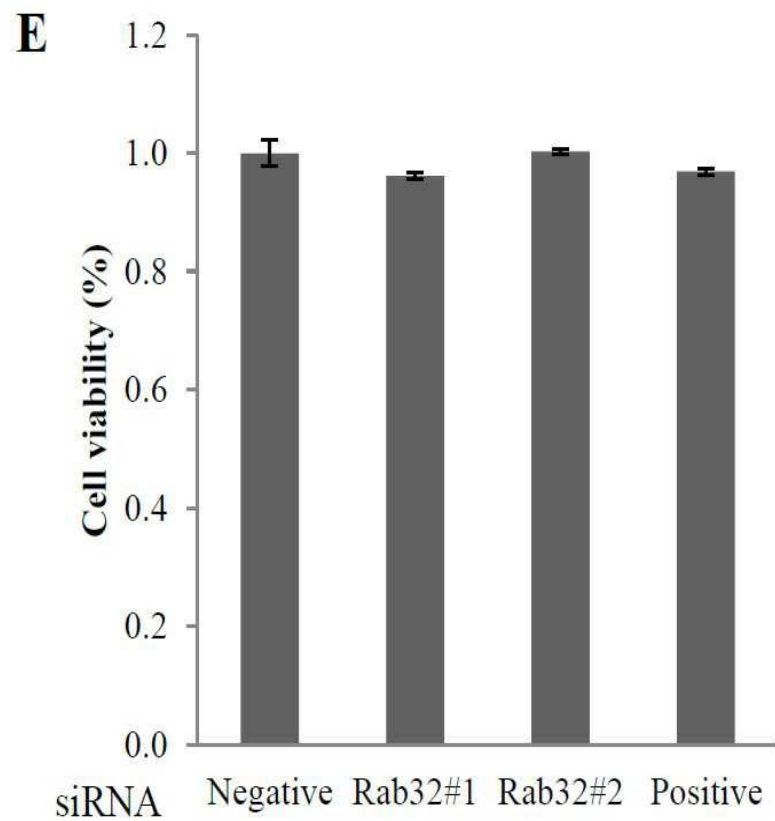
도면2c



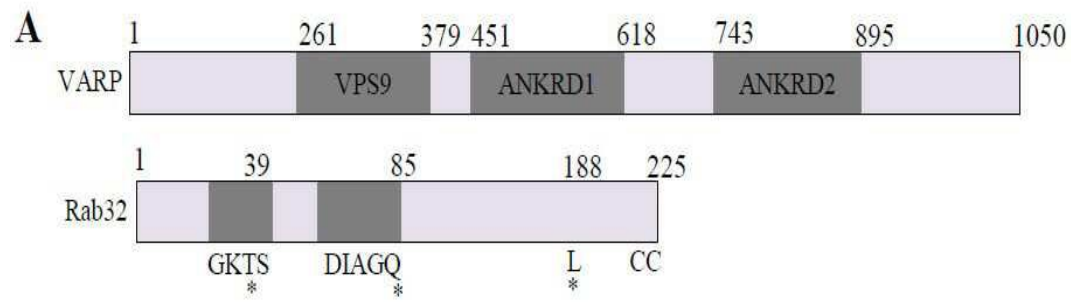
도면2d



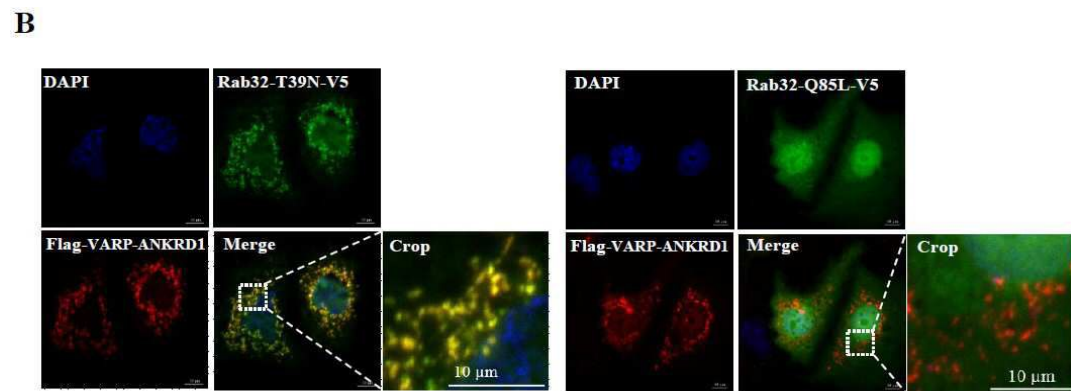
도면2e



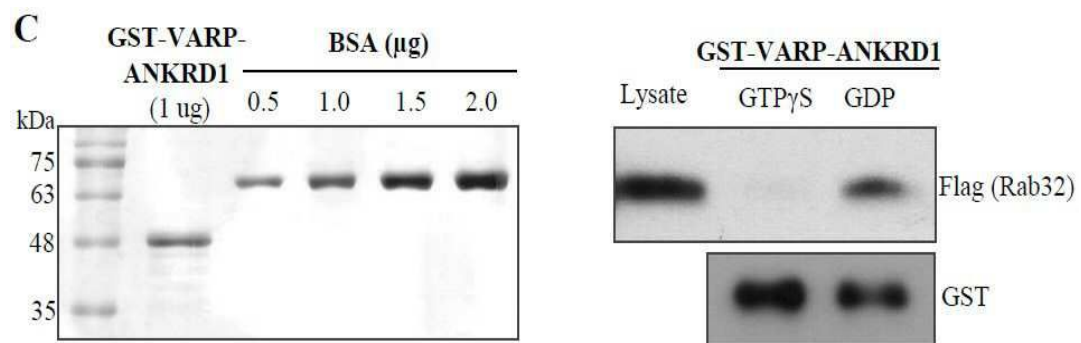
도면3a



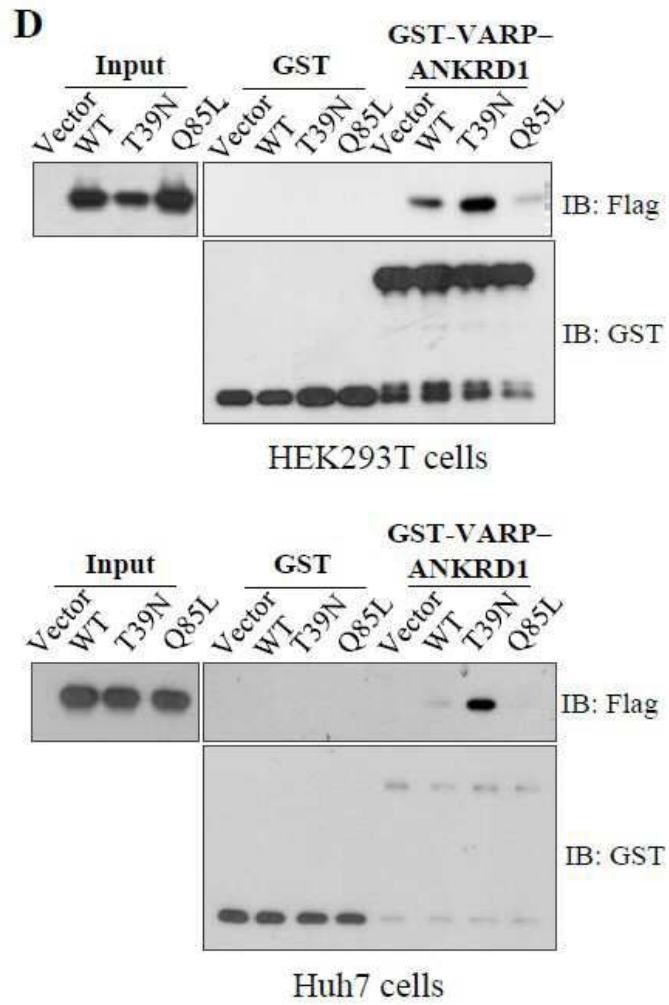
도면3b



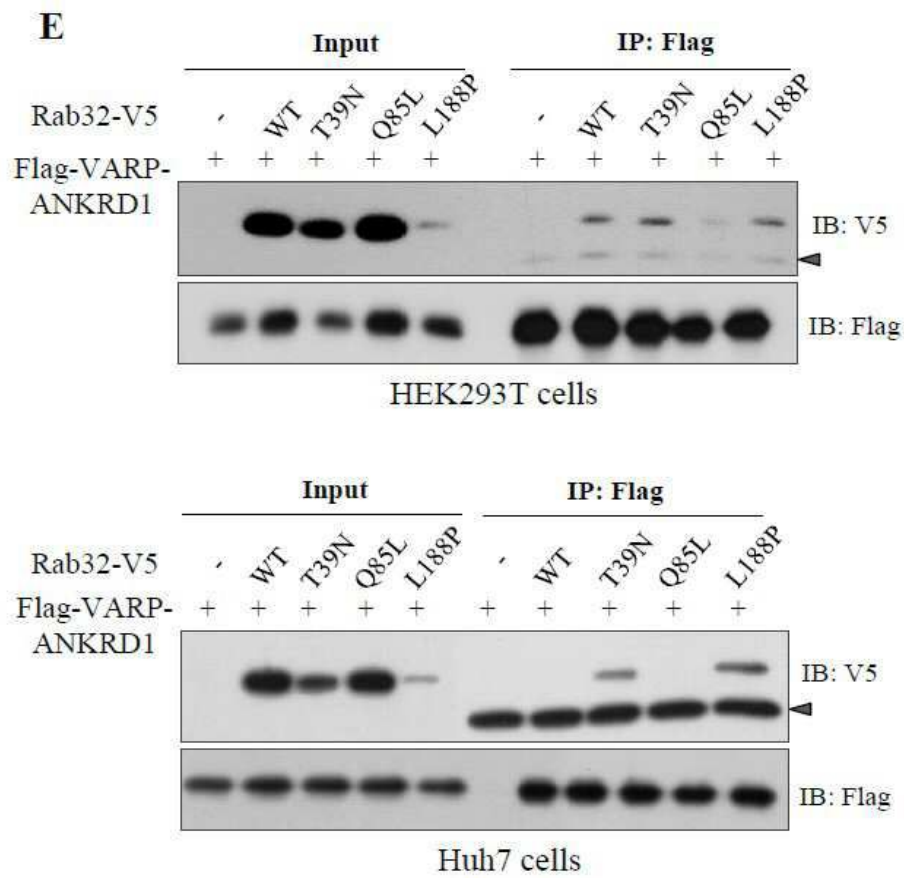
도면3c



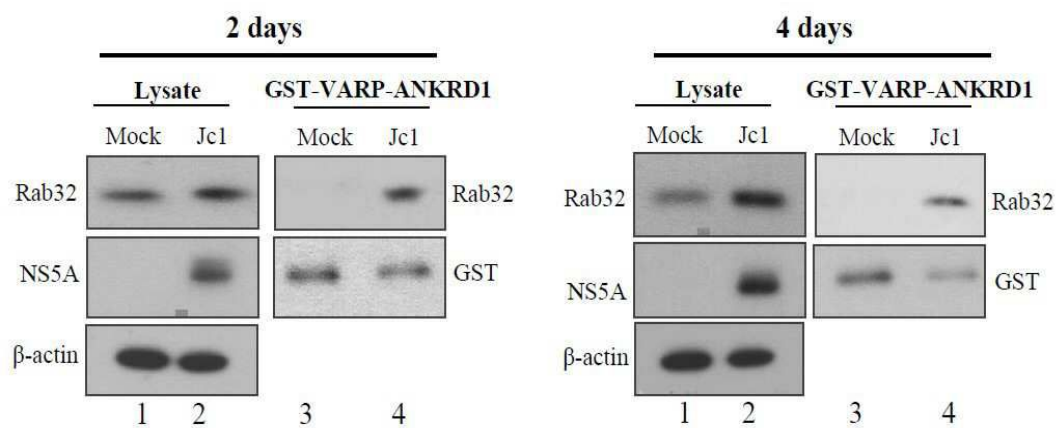
도면3d



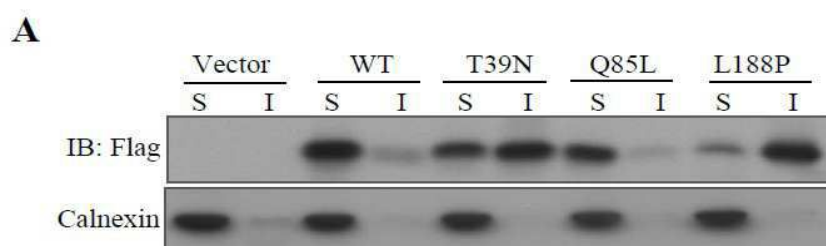
도면3e



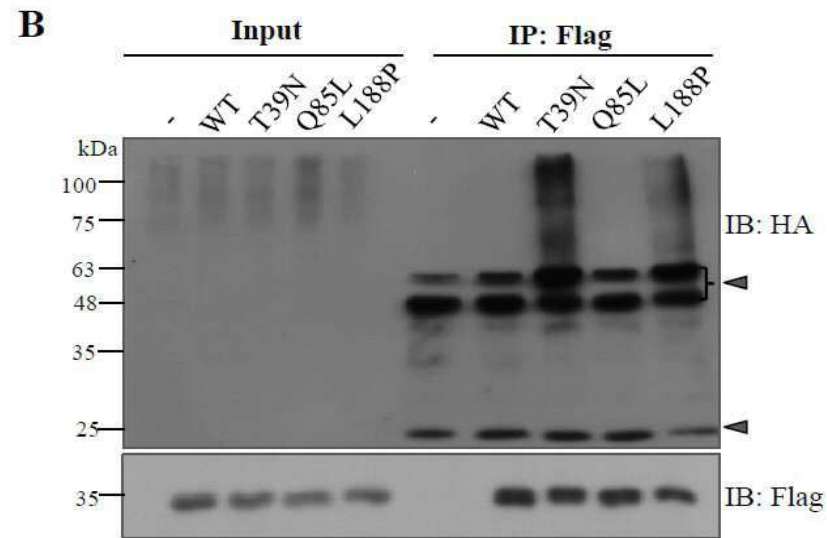
도면4



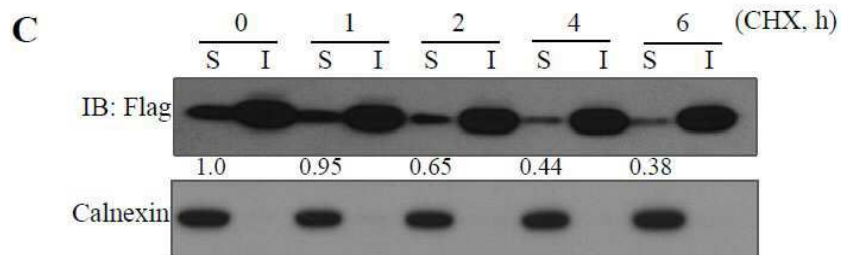
도면5a



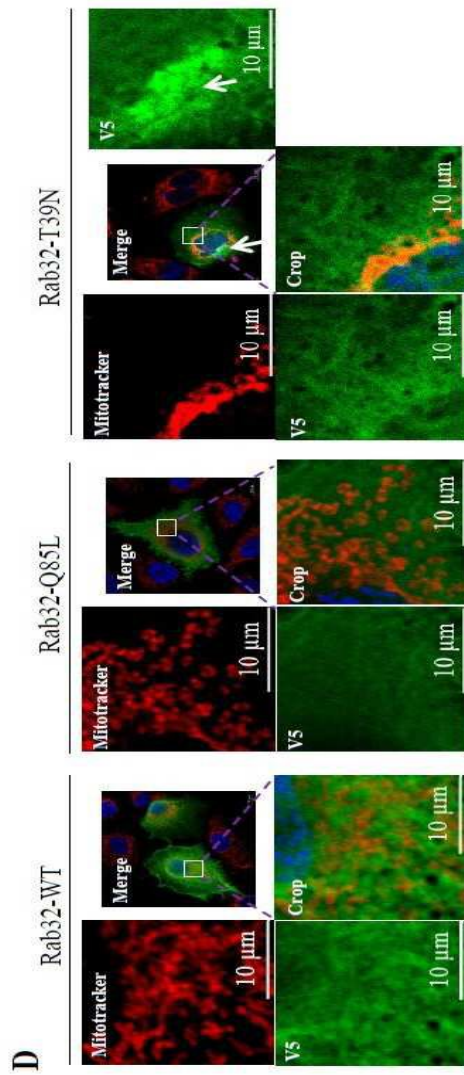
도면5b



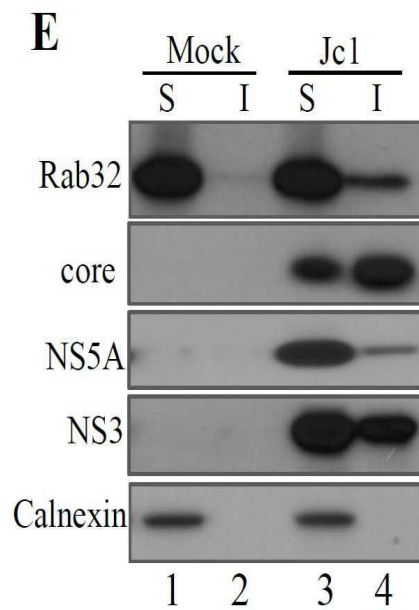
도면5c



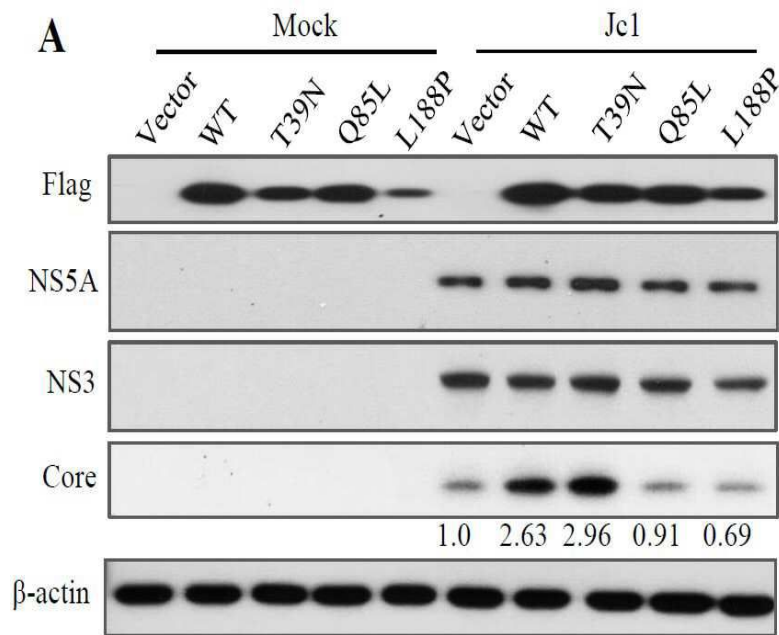
도면5d



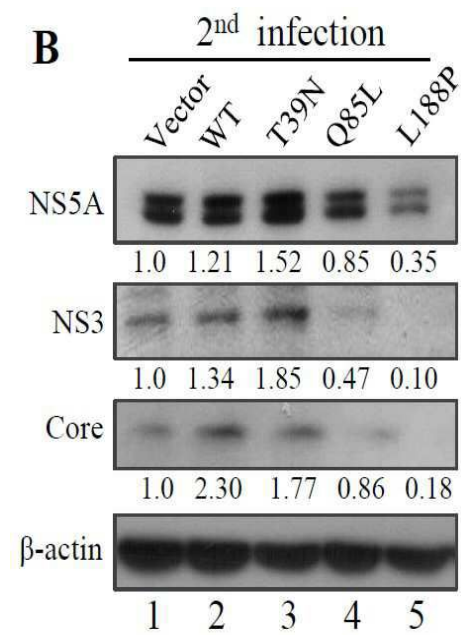
도면5e



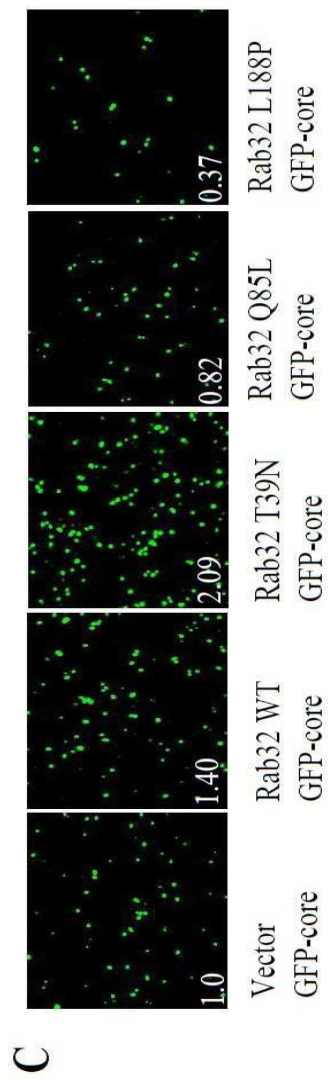
도면6a



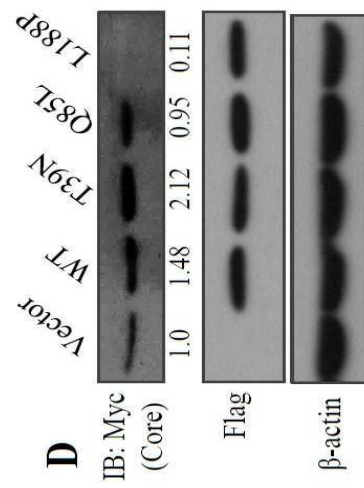
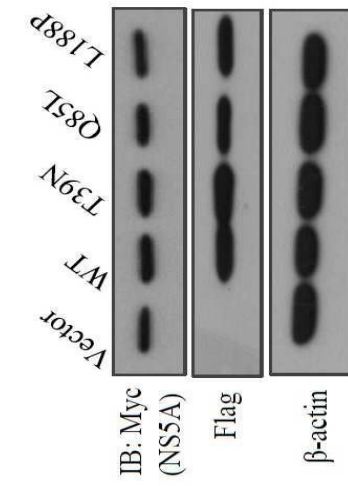
도면6b



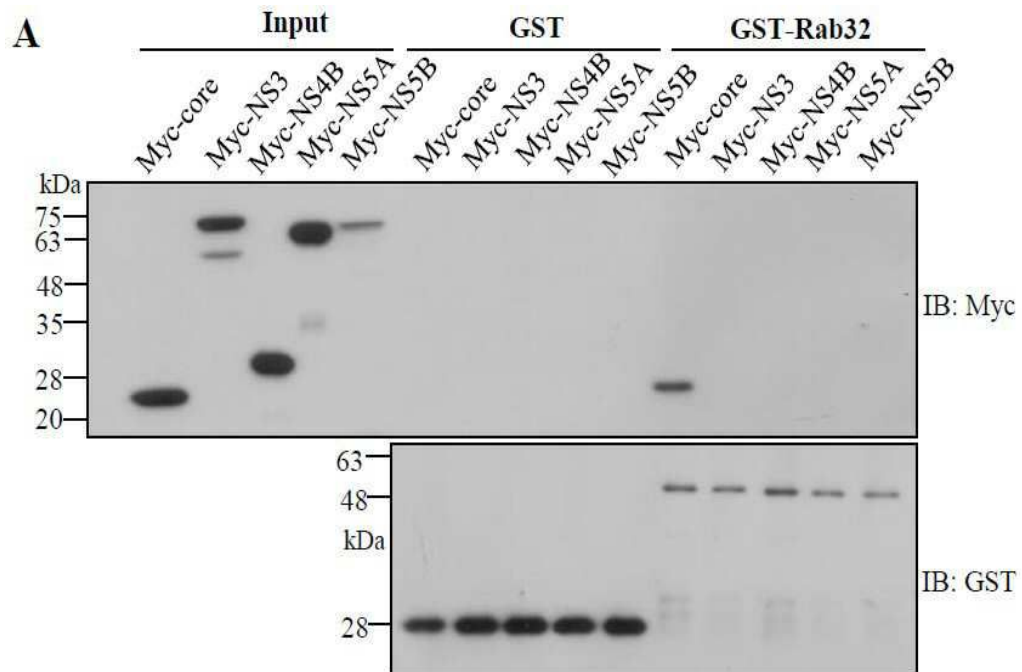
도면6c



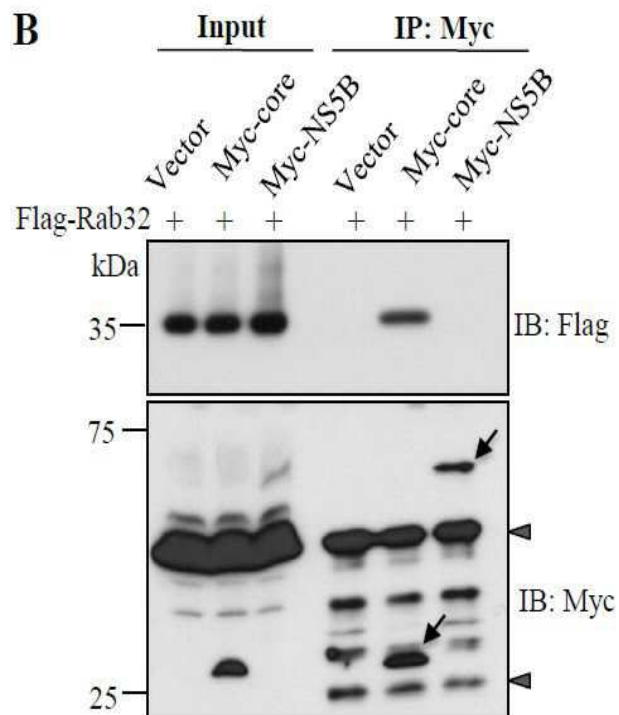
도면6d



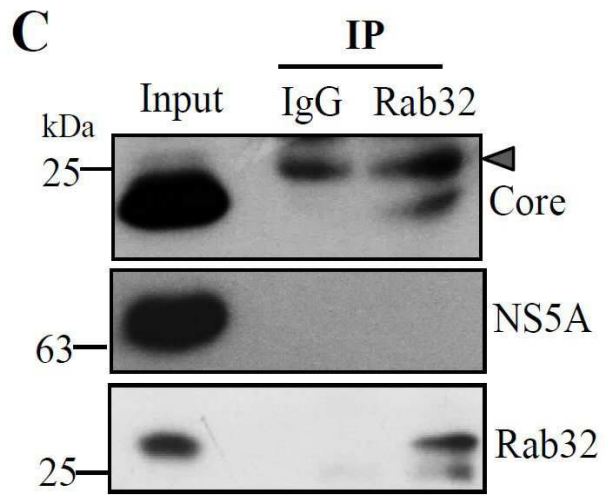
도면7a



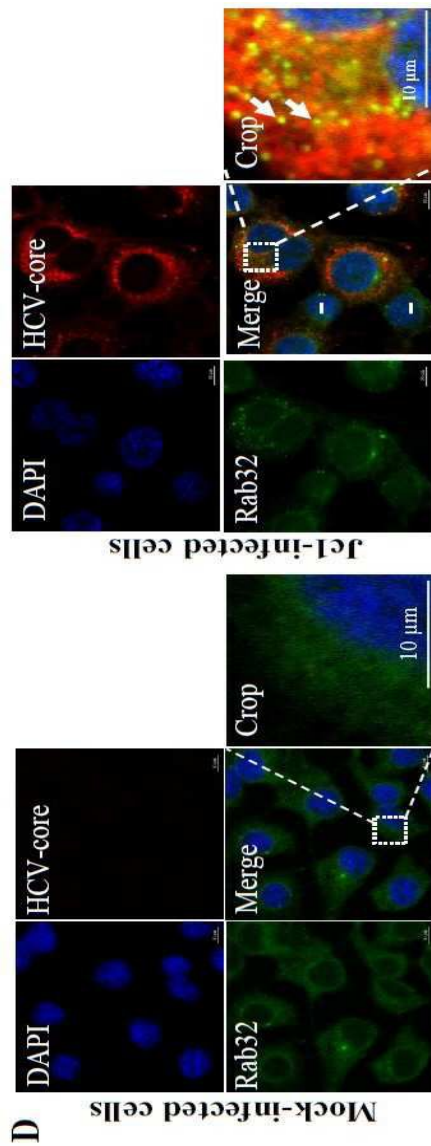
도면7b



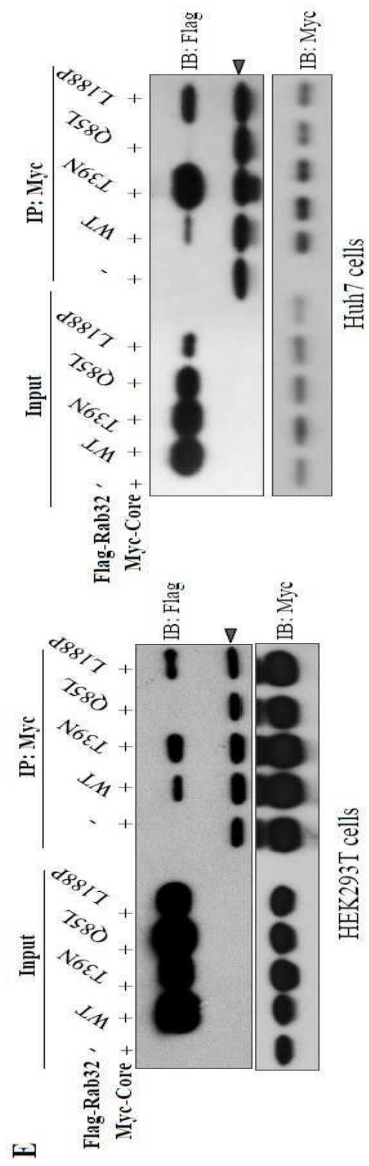
도면7c



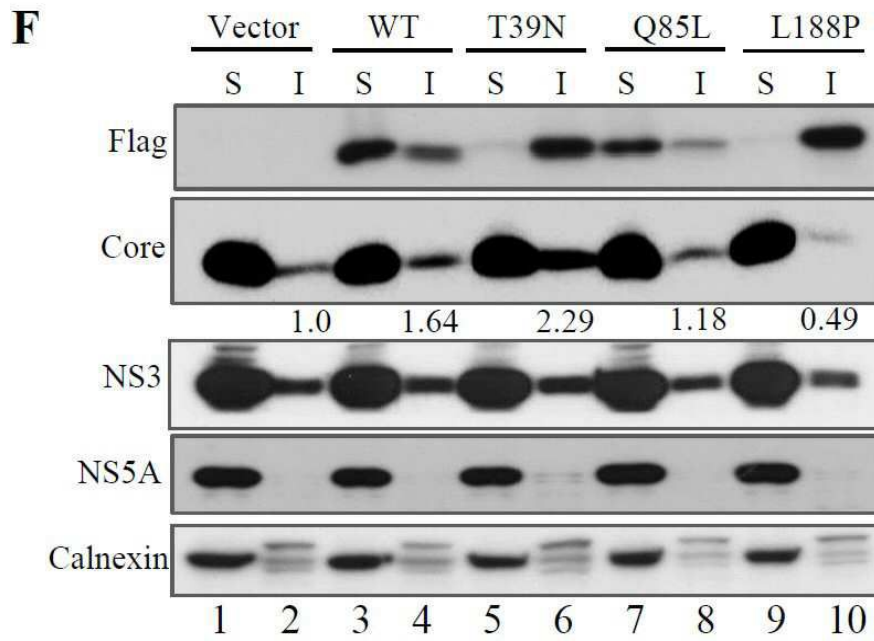
도면7d



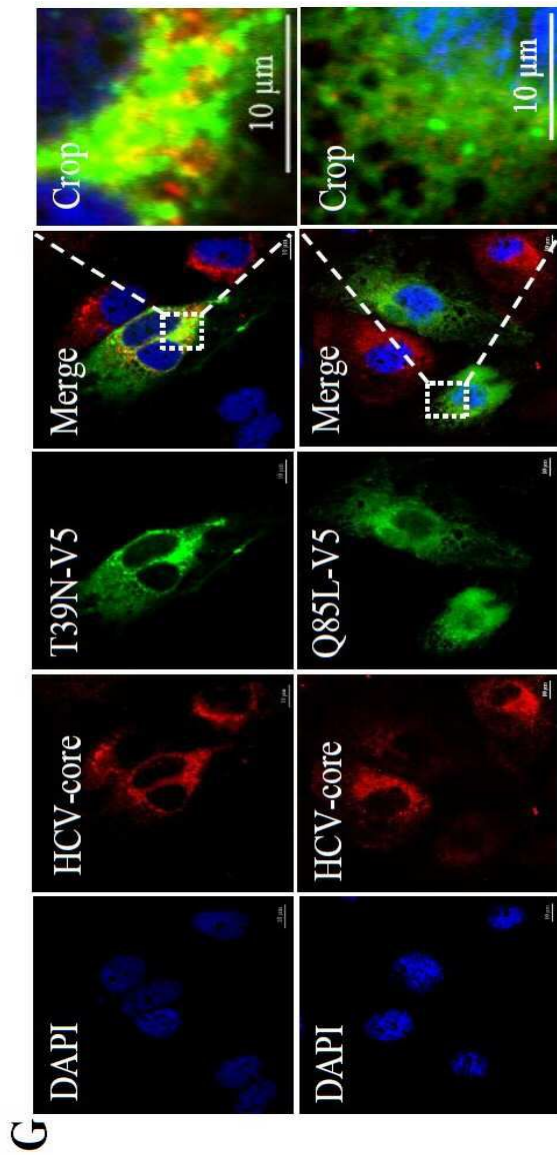
도면7e



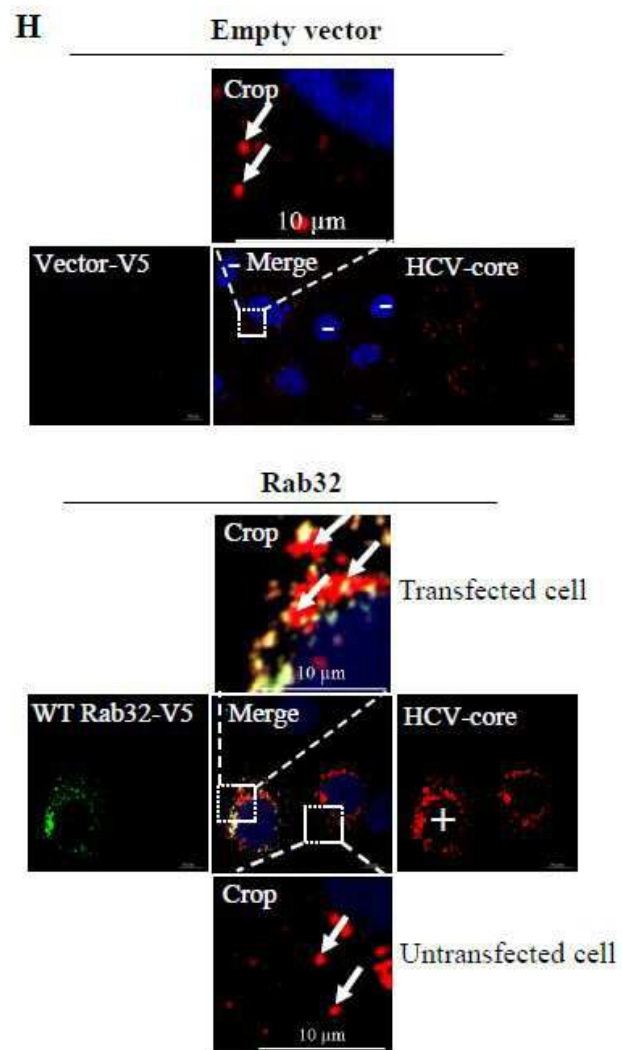
도면7f



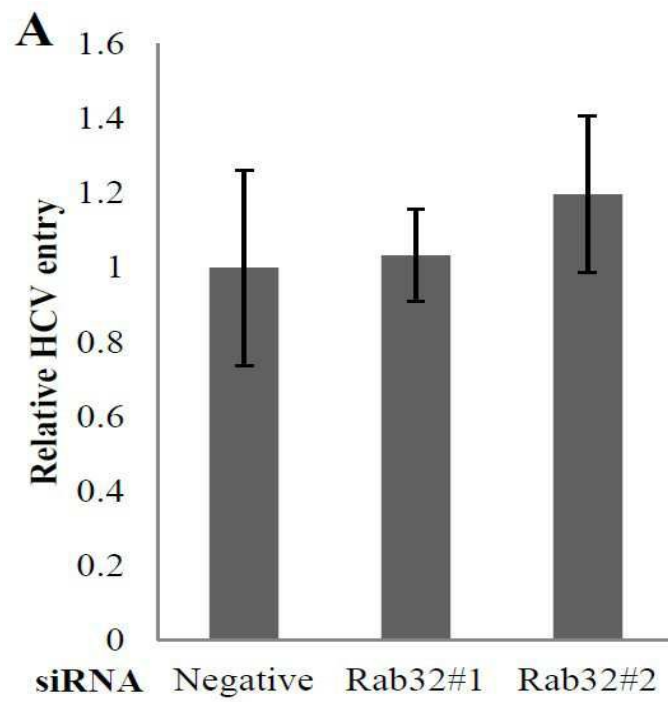
도면7g



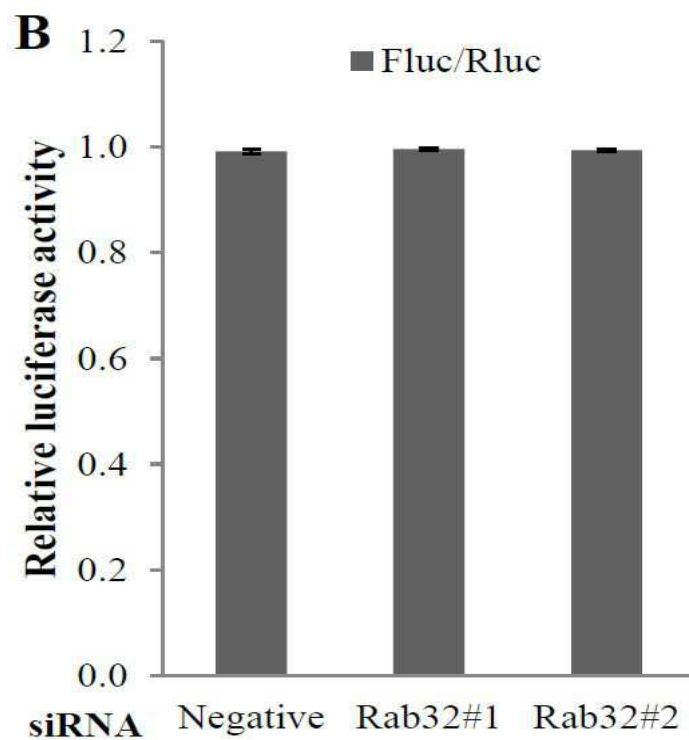
도면7h



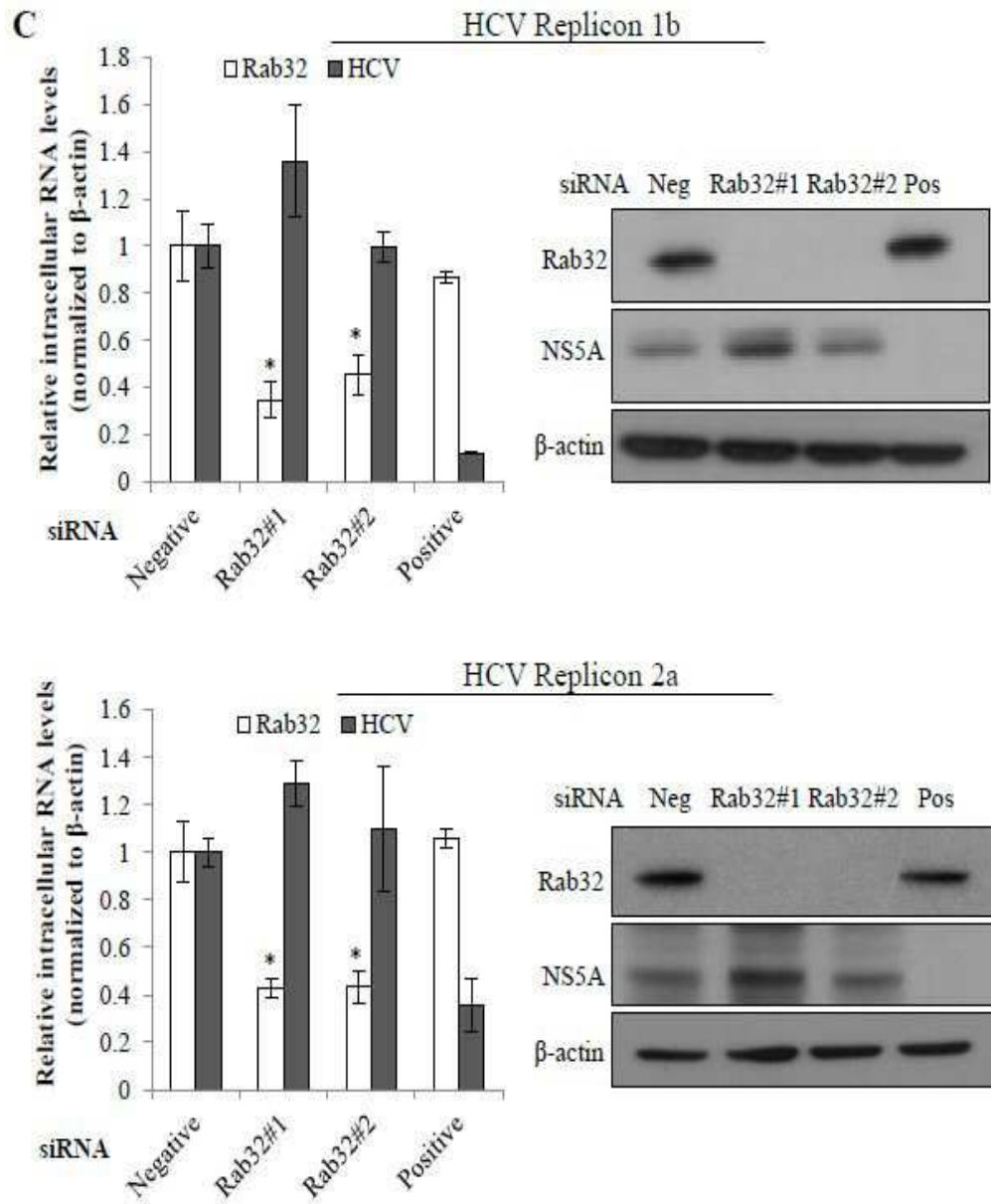
도면8a



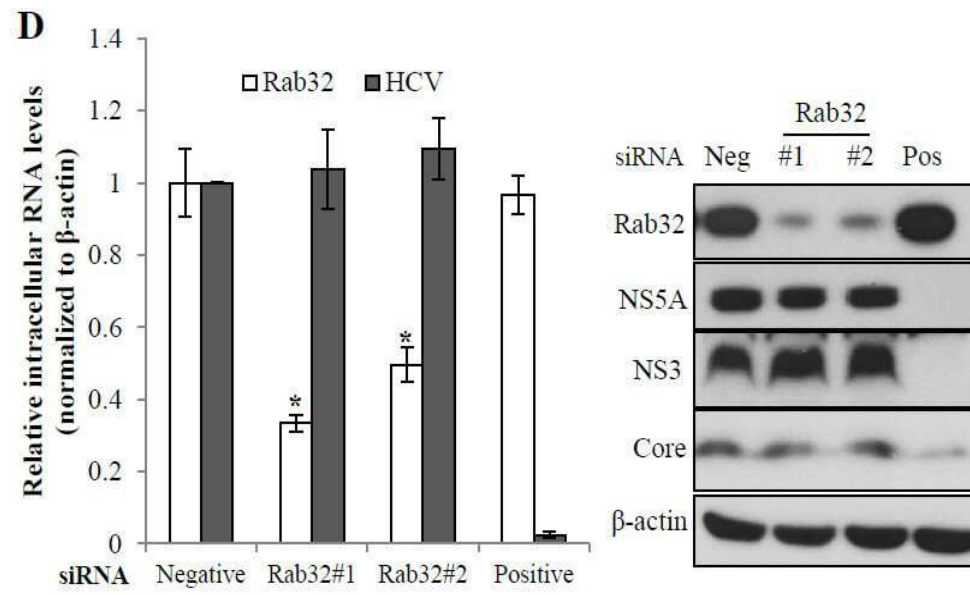
도면8b



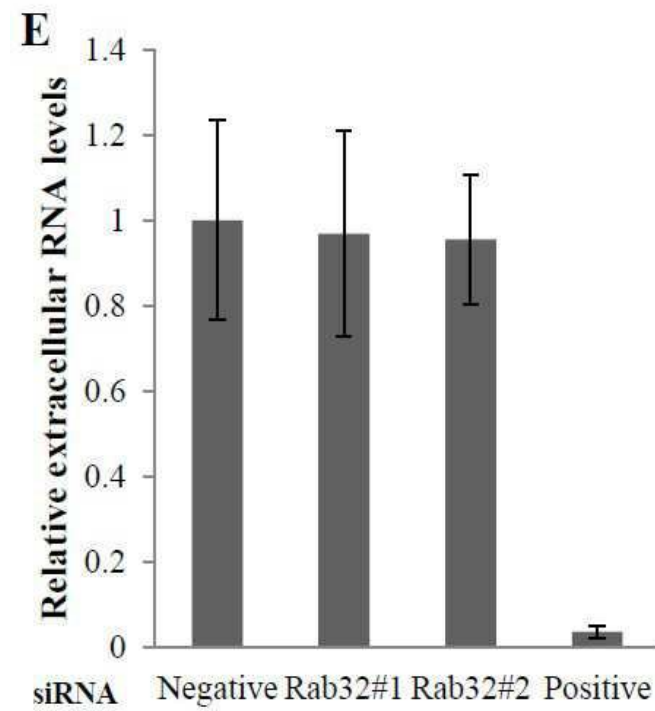
도면8c



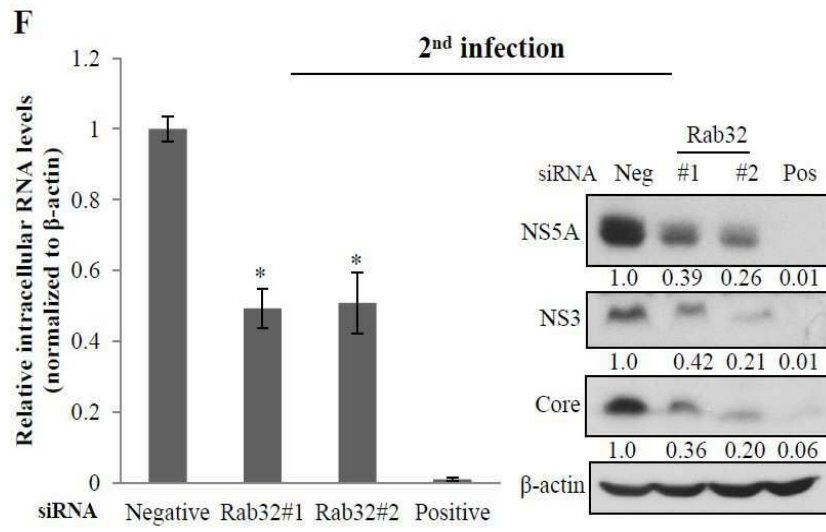
도면8d



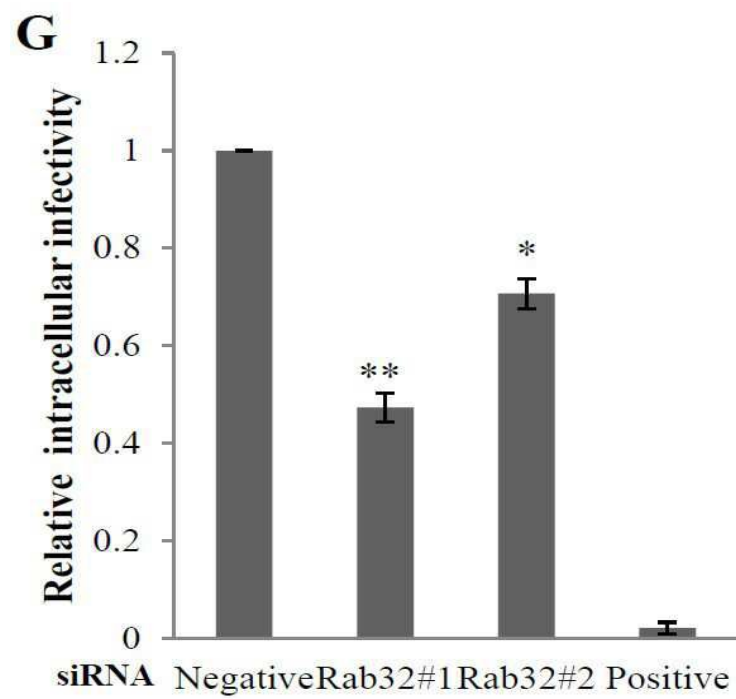
도면8e



도면8f

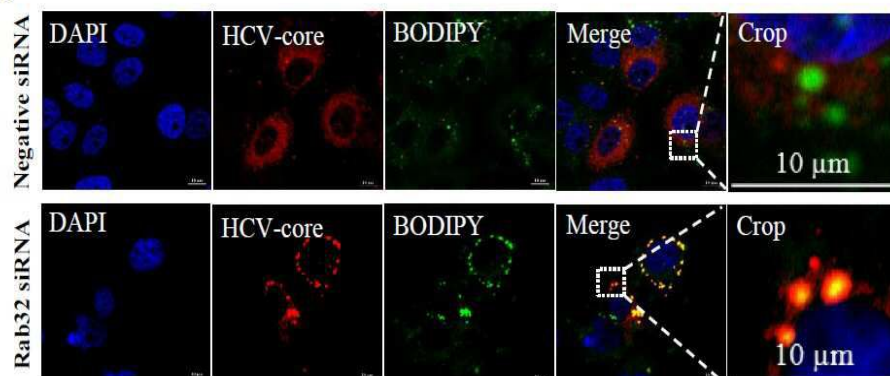


도면8g



도면8h

H



## 서열 목록

<110> Industry-Academic Corporation Foundation, Hallym University  
 <120> Pharmaceutical composition for prevention and treatment for  
 Hepatitis C containing Rab32 expression or activity inhibitors

<130> SBHwang-Rab32-161019

<160> 97

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

tgggacagca ggactctgg

19

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

actcgggtca tgttgccaa

19

<210> 3

<211> 30

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 3  
 taatagaatt ccatggcggg cggaggagcc 30  
 <210> 4  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 4  
 gccggatcct cagcaacact gggatttggt c 31  
  
 <210> 5  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 5  
 tagcgcttga tgatgctgtt cttgcccacg cca 33  
 <210> 6  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 6  
 tgtgggacat cgcggggctg gagcgatttg gca 33  
 <210> 7  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 7  
 atgttgccaa atcgctccag ccccgcatg tcc 33

<210> 8  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 8  
 tgtgggacat cgcggggctg gagcgatttg gca 33  
 <210> 9  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 9  
 tacaagaatc ttctccacgg ggaaccgggc agc 33  
 <210> 10  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 10  
 aggaagctgc ccggttcccc gtggagaaga ttc 33  
 <210> 11  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 11  
 atgaattcat ggcgggcgga ggagcc 26  
 <210> 12  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 12

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| aagcggccgc tcagcaacac tgggatttg    | 29 |
| <210> 13                           |    |
| <211> 29                           |    |
| <212> DNA                          |    |
| <213> Artificial Sequence          |    |
| <220><223> primer                  |    |
| <400> 13                           |    |
| taatagaatt catggcgggc ggaggagcc    | 29 |
| <210> 14                           |    |
| <211> 31                           |    |
| <212> DNA                          |    |
| <213> Artificial Sequence          |    |
| <220><223> primer                  |    |
| <400> 14                           |    |
| ccggtctaga ctgcaacact gggatttggt c | 31 |
| <210> 15                           |    |
| <211> 29                           |    |
| <212> DNA                          |    |
| <213> Artificial Sequence          |    |
| <220><223> primer                  |    |
| <400> 15                           |    |
| gatcacgcgt tccgtccttc gttaagttc    | 29 |
| <210> 16                           |    |
| <211> 29                           |    |
| <212> DNA                          |    |
| <213> Artificial Sequence          |    |
| <220><223> primer                  |    |
| <400> 16                           |    |
| gctaagatct cagagtcctg ctgtcccag    | 29 |
| <210> 17                           |    |
| <211> 32                           |    |
| <212> DNA                          |    |
| <213> Artificial Sequence          |    |

<220><223> primer  
 <400> 17  
 gcgaattccc ctcagttgtc actccattct cc 32  
 <210> 18  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 18  
 aagcggccgc gctggaagtg gaggactctt g 31  
 <210> 19  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 19  
 acgaattcac cctcagttgt cac 23  
 <210> 20  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 20  
 aggatcctta gctggaagtg gag 23  
 <210> 21  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> siRNA top strand  
 <400> 21  
 cugagaaugg guuacagau 19  
 <210> 22  
 <211> 19  
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rab32 siRNA top strand

<400> 22

cuaguggcuc uguaacuua

19

<210> 23

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Jc1 NTR siRNA top strand

<400> 23

ccucaaagaa aaaccaaacu u

21

<210> 24

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rab32 siRNA top strand

<400> 24

gauuuggcaa caugacccga guaua

25

<210> 25

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rab32 siRNA top strand

<400> 25

ccgaguauac uacaaggaag cuguu

25

<210> 26

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rab32 siRNA top strand

<400> 26

gaaguuccac auuugaggca gucuu

25

<210> 27

<211> 25  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Rab32 siRNA top strand  
 <400> 27  
 aguuccacau uugaggcagu cuuaa 25

<210> 28  
 <211> 25  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Rab32 siRNA top strand  
 <400> 28  
 ccagguggac caauucugca aagaa 25

<210> 29  
 <211> 25  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Rab32 siRNA top strand  
 <400> 29  
 cgguuccuag uggagaagau ucuug 25

<210> 30  
 <211> 25  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Rab32 siRNA top strand  
 <400> 30  
 gguuccuagu ggagaagauu cuugu 25

<210> 31  
 <211> 25  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Rab32 siRNA top strand  
 <400> 31

agcaccucuu caaggugcug gugau 25

<210> 32

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rab32 shRNA top strand

<400> 32

caccgcagga gcgauuuggc aacaucgaaa uguugccaaa ugcuccugc 50

<210> 33

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rab32 shRNA top strand

<400> 33

caccggcaac augacccgag uauaccgaag uauacucggg ucauguugcc 50

<210> 34

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rab32 shRNA

<400> 34

caccgcaaca ugacccgagu auacucgaaa guauacucgg gucauguugc 50

<210> 35

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rab32 shRNA

<400> 35

caccggugga ccaauucugc aaagacgaau cuuugcagaa ugguccacc 50

<210> 36

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

|                                                        |                     |    |
|--------------------------------------------------------|---------------------|----|
| <220><223>                                             | Rab32 shRNA         |    |
| <400>                                                  | 36                  |    |
| caccggacca auucugcaaa gaacacgaau guucuuugca gaauuggucc |                     | 50 |
| <210>                                                  | 37                  |    |
| <211>                                                  | 50                  |    |
| <212>                                                  | RNA                 |    |
| <213>                                                  | Artificial Sequence |    |
| <220><223>                                             | Rab32 shRNA         |    |
| <400>                                                  | 37                  |    |
| caccgguucc uaguggagaa gauuccgaag aaucuucucc acuaggaacc |                     | 50 |
| <210>                                                  | 38                  |    |
| <211>                                                  | 50                  |    |
| <212>                                                  | RNA                 |    |
| <213>                                                  | Artificial Sequence |    |
| <220><223>                                             | Rab32 shRNA         |    |
| <400>                                                  | 38                  |    |
| caccgauucu uguaaaccac caaagcgaac uuuggugguu uacaagaauc |                     | 50 |
| <210>                                                  | 39                  |    |
| <211>                                                  | 50                  |    |
| <212>                                                  | RNA                 |    |
| <213>                                                  | Artificial Sequence |    |
| <220><223>                                             | Rab32 shRNA         |    |
| <400>                                                  | 39                  |    |
| caccgctaga tcaagagacc ttgagcgaac tcaaggtctc ttgatctagc |                     | 50 |
| <210>                                                  | 40                  |    |
| <211>                                                  | 50                  |    |
| <212>                                                  | RNA                 |    |
| <213>                                                  | Artificial Sequence |    |
| <220><223>                                             | Rab32 shRNA         |    |
| <400>                                                  | 40                  |    |
| caccgcagag aacaaauccc agugucgaaa cacugggauu uguucucugc |                     | 50 |
| <210>                                                  | 41                  |    |
| <211>                                                  | 50                  |    |
| <212>                                                  | RNA                 |    |

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rab32 shRNA

<400> 41

caccgagaac aaaucccagu guugccgaag caacacuggg auuuguucuc

50

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human Rab32 antibody epitope

<400> 42

Met Ala Gly Gly Gly Ala Gly Asp

1 5

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human Rab32 antibody epitope

<400> 43

Ala Gly Gly Gly Ala Gly Asp Pro

1 5

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human Rab32 antibody epitope

<400> 44

Gly Gly Gly Ala Gly Asp Pro Gly

1 5

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 45

Gly Gly Ala Gly Asp Pro Gly Leu

1 5

<210> 46

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Gly Ala Gly Asp Pro Gly Leu Gly

1 5

<210> 47

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Ala Gly Asp Pro Gly Leu Gly Ala

1 5

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Gly Asp Pro Gly Leu Gly Ala Ala

1 5

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Ala Ala Ala Pro Ala Pro Glu Thr

1 5

<210> 50

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50  
Ala Ala Pro Ala Pro Glu Thr Arg  
1 5  
<210> 51  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400>  
> 51  
Ala Pro Ala Pro Glu Thr Arg Glu  
1 5  
<210> 52  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 52  
Pro Ala Pro Glu Thr Arg Glu His  
1 5  
<210> 53  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 53  
Ala Gly Gln Glu Arg Phe Gly Asn  
1 5  
<210> 54  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 54  
Ser Arg Ser Ser Thr Phe Glu Ala  
1 5  
<210> 55  
<211> 8

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 55

Arg Ser Ser Thr Phe Glu Ala Val

1 5

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Lys Trp Lys Ser Asp Leu Asp Ser

1 5

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Trp Lys Ser Asp Leu Asp Ser Lys

1 5

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

> 58

Lys Ser Asp Leu Asp Ser Lys Val

1 5

<210> 59

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Ser Asp Leu Asp Ser Lys Val His

1 5

<210> 60

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 60

Leu Ala Asn Lys Cys Asp Gln Asn

1 5

<210> 61  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 61

Ala Asn Lys Cys Asp Gln Asn Lys

1 5

<210> 62  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 62

Asn Lys Cys Asp Gln Asn Lys Asp

1 5

<210> 63  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 63

Lys Cys Asp Gln Asn Lys Asp Ser

1 5

<210> 64  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 64

Cys Asp Gln Asn Lys Asp Ser Ser

1 5

<210> 65  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400>  
 > 65  
 Asp Gln Asn Lys Asp Ser Ser Gln  
 1 5  
 <210> 66  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 66  
 Gln Asn Lys Asp Ser Ser Gln Ser  
 1 5  
 <210> 67  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 67  
 Asn Lys Asp Ser Ser Gln Ser Pro  
 1 5  
 <210> 68  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 68  
 Lys Asp Ser Ser Gln Ser Pro Ser  
 1 5  
 <210> 69  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 69

Asp Ser Ser Gln Ser Pro Ser Gln

1 5

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Ser Ser Gln Ser Pro Ser Gln Val

1 5

<210> 71

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Ser Gln Ser Pro Ser Gln Val Asp

1 5

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

> 72

Gln Ser Pro Ser Gln Val Asp Gln

1 5

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Ser Pro Ser Gln Val Asp Gln Phe

1 5

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74  
Gln Val Asp Gln Phe Cys Lys Glu  
1 5

<210> 75  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 75

Asp Gln Phe Cys Lys Glu His Gly  
1 5

<210> 76  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 76

Phe Glu Thr Ser Ala Lys Asp Asn  
1 5  
<210> 77  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 77

Glu Thr Ser Ala Lys Asp Asn Ile  
1 5  
<210> 78  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 78

Thr Ser Ala Lys Asp Asn Ile Asn  
1 5  
<210> 79  
<211> 8  
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400

> 79

Lys Asp Asn Ile Asn Ile Glu Glu

1 5

<210> 80

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Asp Asn Ile Asn Ile Glu Glu Ala

1 5

<210> 81

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Asn His Gln Ser Phe Pro Asn Glu

1 5

<210> 82

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

His Gln Ser Phe Pro Asn Glu Glu

1 5

<210> 83

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Gln Ser Phe Pro Asn Glu Glu Asn

1 5

<210> 84

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 84  
 Ser Phe Pro Asn Glu Glu Asn Asp

1 5

<210> 85  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 85

Phe Pro Asn Glu Glu Asn Asp Val

1 5

<210> 86  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400>

> 86

Pro Asn Glu Glu Asn Asp Val Asp

1 5

<210> 87  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 87

Asn Glu Glu Asn Asp Val Asp Lys

1 5

<210> 88  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 88

Glu Glu Asn Asp Val Asp Lys Ile

1 5

<210> 89  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 89  
 Glu Asn Asp Val Asp Lys Ile Lys  
 1 5

<210> 90  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 90  
 Asp Lys Ile Lys Leu Asp Gln Glu  
 1 5

<210> 91  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 91  
 Asp Gln Glu Thr Leu Arg Ala Glu  
 1 5

<210> 92  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 92  
 Gln Glu Thr Leu Arg Ala Glu Asn  
 1 5

<210> 93  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400>  
 > 93

Glu Thr Leu Arg Ala Glu Asn Lys

1 5

<210> 94

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Thr Leu Arg Ala Glu Asn Lys Ser

1 5

<210> 95

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Leu Arg Ala Glu Asn Lys Ser Gln

1 5

<210> 96

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Arg Ala Glu Asn Lys Ser Gln Cys

1 5

<210> 97

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Ala Glu Asn Lys Ser Gln Cys Cys

1 5