



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0036210
(43) 공개일자 2009년04월14일

(51) Int. Cl.

A61K 36/47 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0101255

(22) 출원일자 2007년10월09일

심사청구일자 2007년10월09일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

송문정

서울 성북구 안암동5가 고려대학교자연계캠퍼스
생명과학대학서관 303호

조혜정

서울 성북구 안암동5가 고려대학교자연계캠퍼스
생명과학대학서관 L208호

이동호

서울 성북구 돈암2동 한진아파트 208동 1802호

(74) 대리인

김선애

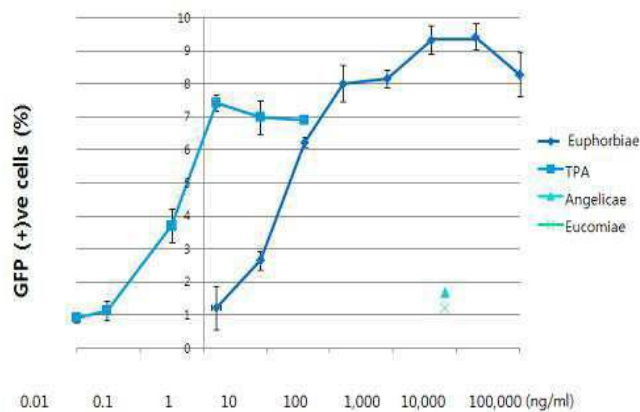
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 감마헤피스바이러스 재활성을 유도하는 감수 및 이를포함하는 억제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*; *Euphorbia kansui Liou ex Wang*)를 유효성분으로 포함하는 감마헤피스바이러스 재활성 유도 억제학적 조성물에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의하면, 잠복기 상태의 감마헤피스바이러스의 재활성을 유도하여 기존의 항헤피스 제제가 작용하도록 할 수 있을 뿐만 아니라 독성도 없는 천연물 질인 감수를 이용하므로, KSHV 및 EBV와 같은 감마헤피스바이러스 감염 종양 세포에서의 암용해성 바이러스 치료에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

감수(*Euphorbiae Kansui Radix*; *Euphorbia kansui Liou ex Wang*)를 유효성분으로 포함하는 감마허피스바이러스 재활성 유도 억제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 억제학적 조성물은 국소, 경구, 주사 또는 서방형 방출 투여형태인 억제학적 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 억제학적 조성물은 상기 유효성분과 조합으로 사용되는 억제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 억제학적 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 감마허피스바이러스는 카포시 육종 허피스바이러스 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; KSHV) 또는 엡스타인-바르 바이러스(Epstein-Barr virus; EBV)인 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 감마허피스바이러스 재활성을 유도하는 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*; *Euphorbia kansui Liou ex Wang*) 및 이를 포함하는 억제학적 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 감마허피스바이러스의 재활성을 유도하여 기존의 항허피스 제제가 작용하도록 할 수 있을 뿐만 아니라 독성도 없는 천연물질인 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*; *Euphorbia kansui Liou ex Wang*) 및 이를 포함하는 억제학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> KSHV는 가장 최근(1994)에 발견된 인체 감염 허피스바이러스로서 숙주에서 종양형성에 관여하는 감마허피스바이러스의 아과(subfamily)에 속한다 {Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS., **Science**. 266, 1865-9 (1994)}. KSHV는 AIDS 환자에서 제1의 호발성 악성 종양인 AIDS 관련 카포시 육종(Kaposi's sarcoma, KS)을 비롯한 classic KS, post-transplant KS 등 모든 임상적인 형태의 KS의 원인물질이다. 또한 KSHV는 AIDS 환자에서 발병하는 B 세포 림프종의 일종인 원발성 삼출성 림프종(primary effusion lymphoma)이나 다발성 캐슬만병(multicentric Castlemann's disease)과의 깊은 상관성도 밝혀져 이들 질환의 원인 바이러스로 여겨지고 있다. 또 다른 인체 감마 허피스바이러스인 엡스타인-바르 바이러스(Epstein-Barr virus, 이하 EBV) 역시, KSHV와 유사한 동류의 인체 감마허피스바이러스로서 코인두암종(Nasopharyngeal carcinoma), 버킷림프종(Burkitt's lymphoma), 호지킨림프종(Hodgkin's lymphoma), 위암종(Gastric carcinoma) 등의 다수의 암종의 발생의 원인 바이러스로 여겨지고 있다.
- <3> KSHV는 EBV와 마찬가지로, 대부분의 종양세포에서 잠복기 감염상태로 존재하며, 부분적으로(1-3%) 활성기(lytic cycle) 상태를 보이는 세포들이 공존한다. 활성기(lytic replication)의 바이러스는 감염세포에서 세포병변현상(cytopathic effect)을 일으켜 궁극적으로 세포사멸 등을 유도하게 된다. KSHV와 EBV는 재활성 조절에서도 유사한 기전에 의해 조절받고 있음이 제시되어왔다. 예를 들어, 기존의 감마 허피스바이러스의 재활성을 유도한다고 알려져 있는 물질인 포르볼레스터(phorbol ester) 화학물질인 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA 또는 TP A)나 소디움부틸레이트(Sodium butyrate)와 같은 물질은 KSHV와 EBV 각각의 잠복 감염 세포주에서 각각의 바이러스를 모두 재활성화시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.
- <4> 기존에 사용되고 알려져 있는 항 허피스바이러스제들은 모두 바이러스의 활성기 상태에서 발현되는 바이러스유전자산물을 타겟으로 하기 때문에, 잠복감염상태로 유지되는 KSHV 감염 종양세포들은 퇴치될 수 없어 바이러스

관련 종양 제어 방법으로는 한계가 있었다. 이러한 한계는 EBV 관련 종양에서도 마찬가지로 적용이 된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <5> 따라서 본 발명은 감마헤르페스바이러스의 재활성을 유도함으로써 활성기 상태의 바이러스를 통해 감염세포의 세포사멸을 유도하고, 기존의 항헤르페스 제제가 작용할 수 있도록 하여 종양세포를 파괴하는 새로운 개념의 암용해성바이러스 치료법을 구축, 활용하는 것을 목적으로 한다. 기존의 감마헤르페스바이러스의 재활성을 유도한다고 알려져 있는 물질로는 포르볼레스터(phorbol ester) 화학물질인 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA 또는 TPA)가 있는데, 이는 세포 내 다양한 신호전달 체계에 작용을 하여 종양을 형성할 수도 있는 독성 때문에 임상적으로 사용할 수 없다.
- <6> 따라서 본 발명은 천연화합물과 같은 생체 친화적으로 감마헤르페스바이러스의 재활성을 유도할 수 있는 천연물질 및 이를 포함한 억제학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- <7> 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제 해결수단

- <8> 본 발명자들은 감마헤르페스바이러스가 잠복감염되어 있는 원발성 삼출성 림프종 세포주(Primary effusion lymphoma cell line)에 감마헤르페스바이러스의 생활주기에서 가장 중요하고 강력한 조절 물질인 복제 및 전사 활성인자(replication and transcription activator, 이하 'RTA'라고 함)의 직접적인 조절을 받는 KSHV PAN RNA (polyadenylated nuclear RNA) 프로모터에 의해 발현되는 리포터를 도입하여 세포-기반 탐색시스템(cell-based screening system)을 확립한 후, 이 리포터 세포주를 이용하여 감마헤르페스바이러스의 재활성을 유도하는 천연물인 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*; *Euphorbia kansui* Liou ex Wang)를 발굴하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- <9> 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 감마헤르페스바이러스의 재활성을 유도할 수 있는 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*; *Euphorbia kansui* Liou ex Wang)를 유효성분으로 포함하는 억제학적 조성물을 제공한다.
- <10> 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- <11> 본 발명에서는 카포시 육종 헤르페스 바이러스(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; KSHV)의 PAN RNA (polyadenylated nuclear RNA) 프로모터; 및 상기 프로모터에 의해 발현되도록 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하는 유전자 구조체를 포함하는, 감마헤르페스바이러스가 잠복감염된 세포주에서 감마헤르페스바이러스의 재활성 유도 천연화합물을 탐색하기 위한 리포터 시스템을 이용한다.
- <12> 상기 리포터 유전자는 KSHV PAN RNA 프로모터에 의해 발현되도록 작동가능하게 연결될 수 있다면 다양한 공지의 리포터 유전자들이 이용가능하다. 예를 들어 형광단백질(GFP), 루시페라제, 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase), 또는 갈락토시다아제(galactosidase) 등이 있다. 바람직하게는 상기 리포터 유전자는 불안정화 녹색 형광 단백질(destabilized enhanced green fluorescent protein: 이하, 'dsEGFP'라고 함)이다. 상기 dsEGFP를 이용하면 리포터의 반감기가 짧아 십 만개-일 만개 정도의 작은 수의 세포수로도 유세포분석기(Fluorescence Activated Cell Sorter; 이하 'FACS'라고 함)를 이용하여 실시간 분석이 가능한 검색시스템을 확립할 수 있는 이점이 있다(도 1 참조).
- <13> 상기 KSHV PAN RNA 프로모터 및 dsEGFP는 공지된 서열에 기초하여 통상적인 방법에 따라 화학적으로 합성하거나 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의해 얻을 수 있다. 또한 상업적으로 얻을 수 있는 dsEGFP를 포함하는 유전자 구조체에 중합효소 연쇄반응(PCR)으로 얻어진 KSHV PAN RNA 프로모터를 삽입하는 클로닝방법으로 얻을 수 있다. 바람직하게는 상기 세포주는 환자에서 KSHV에 잠복감염된 상태로 분리된 원발성 삼출성 림프종(PEL) 세포주이다. 원발성 삼출성 림프종(PEL) 세포주 중에는 KSHV 단독 감염주와 KSHV와 EBV의 공동감염주가 있는데, KSHV 단독 감염 PEL 세포주가 더욱 바람직하다. 또, 다르게는 293 세포주, 인간 포피 섬유모세포(Human foreskin fibroblast; HFF), 텔로머라제 불멸화 미세혈관 내피(telomerase immortalized microvascular endothelium; TIME) 세포주 등에 감염성을 지닌 KSHV 바이러스를 직접 감염시킨 후 이들 세포주를 사용할 수 있다. 이들은 in vitro 세포배양상태에서 KSHV 감염 후 잠복감염을 형성하고 PEL 세포주와 비슷하게 TPA 등에 의해서 재활성화될 수 있는 특징을 공유한다. 이미 많은 연구가 진행되어있고 KSHV가 잠복감염상태로 존재하는 PEL 세포주가 사용 및 획득 용이하다.

- <14> KSHV 생활주기에서 가장 중요하고 강력한 조절 물질은 RTA로 알려져 있고, 이 RTA의 직접적인 조절을 받는 다운스트림 타겟(downstream target)으로 프로모터는 매우 활성이 높은 PAN RNA 프로모터이다 (Song, M. J., Li, X., Brown, H. J. and Sun, R. (2002) Characterization of the Interactions between Rta and the promoter of Polyadenylated Nuclear RNA by Rta in Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus/Human Herpesvirus 8 (KSHV/HHV-8), J. Virol, 76 (10), 5000-5013; Song, M. J., Brown, H. J., Wu, T.-T, and Sun, R. (2001) Transcriptional Activation of Polyadenylated Nuclear RNA by Rta in Human Herpesvirus 8/ Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus (HHV-8/KSHV), J. Virol, 75 (7), 3129-3140). 본 발명자는 PAN RNA 프로모터와 RTA의 매우 특이적인 반응에 대한 연구를 계속하여 KSHV의 자발성 재활성(spontaneous reactivation)에 관여하는 세포 신호 전달경로(cellular signaling pathway)에 관한 연구 수행을 위해 재활성 신호에 민감하게 반응할 수 있는 안정적 세포주를 개발하였다. 즉 PAN RNA 프로모터를 dsEGFP에 연결한 리포터 구조체를 가지는 안정적 세포주(BC-3G)를 구축하였다(Yu et al.(2007) Systemic identification of cellular signals reactivating Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. PLoSPathogen 3(3)). 나아가 본 발명자는 이 세포주를 이용하여 생체 친화적으로 KSHV의 재활성을 유도할 수 있는 천연화합물에 대한 스크리닝을 시도하여 HTS 검색 시스템으로서 타당성을 검증하였다(도 1 내지 도 3 참조).
- <15> 따라서 본 발명에서 상기 리포터 세포주에 KSHV의 재활성을 유도할 수 있는 천연물을 처리하면 RTA 프로모터가 활성화되어 내인성 바이러스 게놈(endogenous viral genome)으로부터 RTA 단백질의 발현이 유도되고, 이 RTA 발현에 반응하여, 코트랜스펙션된(cotransfected) 리포터 구조체 내의 PAN RNA 프로모터가 활성화되어, 리포터 활성을 측정할 수 있는 것이다.
- <16> 또한, 본 발명은 1) 카포시 육종 허피스 바이러스(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; KSHV)의 PAN RNA (polyadenylated nuclear RNA) 프로모터 및 상기 프로모터에 의해 발현되도록 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하는 유전자 구조체를 포함하는 감마허피스바이러스에 잠복감염된 형질전환 세포주를 제조하는 단계; 2) 상기 형질전환 세포주에 검색 대상 물질을 처리한 후 배양하는 단계; 및 3) 단백질의 발광정도를 측정하는 단계를 포함하는 감마허피스바이러스 재활성 유도 물질의 검색방법을 이용한다.
- <17> 상기 단계 1)에서 KSHV PAN RNA (polyadenylated nuclear RNA) 프로모터 및 상기 프로모터에 의해 발현되도록 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하는 유전자 구조체의 구축 및 이 구조체를 포함하는 형질전환 세포주의 제조는 유전자 재조합 기술 등 통상적인 방법에 따라 이루어질 수 있다(Yu et al.(2007) Systemic identification of cellular signals reactivating Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. PLoSPathogen 3(3)).
- <18> 상기한 감마허피스바이러스 재활성 유도 물질의 검색방법에 의해, 본 발명은 감수(Euphorbiae Kansui Radix; *Euphorbia kansui Liou ex Wang*)를 유효성분으로 포함하는 감마허피스바이러스 재활성 유도 약제학적 조성물을 제공한다.
- <19> 상기 약제학적 조성물은 상기 유효성분과 조합으로 사용되는 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약제학적 조성물로 제조될 수 있다. 또한, 상기 약제학적 조성물은 국소, 경구, 주사 또는 서방형 방출 투여형태로 제형화될 수 있다.
- <20> 상술한 바와 같이, 감수(Euphorbiae Kansui Radix; *Euphorbia kansui Liou ex Wang*)는 본 발명에 의한 감마허피스바이러스 재활성 유도 천연화합물의 검색방법을 이용하여 검출된 천연물로서 농도 의존적 활성 검사 및 세포 독성 실험을 통해 그 효능을 확인할 수 있었다(도 3 내지 도 5). 나아가 감수(Euphorbiae Kansui Radix; *Euphorbia kansui Liou ex Wang*)에 의한 KSHV 재활성 유도 효과를 분자생물학적 실험을 통해서도 확인할 수 있었다. 즉, 본 발명에 의한 감수(Euphorbiae Kansui Radix; *Euphorbia kansui Liou ex Wang*)는 리포터 수준에서뿐만 아니라 바이러스 수준에서도 감마허피스바이러스 재활성을 유도하여 바이러스 유전자의 발현과 바이러스 유전체 DNA 증식을 증가시키는 것으로 나타났다(도 6 참조).

효 과

- <21> 상술한 바와 같이, 본 발명은 잠복기 상태의 감마허피스바이러스의 재활성을 유도하여 기존의 항허피스 제제가 작용하도록 할 수 있을 뿐만 아니라 독성도 없는 천연물질인, 감수(Euphorbiae Kansui Radix; *Euphorbia kansui Liou ex Wang*)를 유효성분으로 포함하는 감마허피스바이러스 재활성 유도 약제학적 조성물을 제공할 수 있다.
- <22> 따라서 본 발명은 독성이 없는 천연물 자원을 활용한 KSHV 및 EBV와 같은 감마허피스바이러스 감염 종양 세포에

서의 암용해성 바이러스 치료분야에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <23> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 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.
- <24> **실험 재료 및 실험 방법**
- <25> **(1) 세포주/세포배양**
- <26> KSHV가 잠복상태로 감염되어 있고 TPA나 소디움부틸레이트(sodium butyrate)와 같은 자극에 의해 재활성이 가능한 PEL B세포주인 BC-3 및 KSHV의 PAN RNA 프로모터에 의해 발현되는 리포터 유전자(EGFP)를 포함한 BC-3G 세포주, 그리고 바이러스가 전혀 감염되어있지 않은 단분자층(monolayer) 세포주인 293T 세포를 계대배양하였다. 10% 우태혈청(fetal bovine serum), 페니실린(penicillin, 100U/ml)과 스트렙토마이신(streptomycin, 100 μ g/ml)이 첨가된 RPMI-1640 또는 Dulbecco's modified Eagle's medium을 사용하여 5% CO₂에서 배양하여 실험에 사용하였다. 리포터 세포주를 구축하기 위한 안정적 세포주(stable cell line)의 형성을 위해 퓨로마이신(puromycin) 저항유전자를 포함하는 플라스미드(plasmid)를 코-트랜스펙션(co-transfection) 시켰을 때는 퓨로마이신(puromycin) 항생제를 1-10 μ g/ml의 농도를 선택하여 처리한 뒤 얻어진 콜로니를 같은 농도로 유지시켰다.
- <27> **(2) FACS를 이용한 KSHV 리포터 분석(reporter assay)**
- <28> KSHV가 감염된 리포터 유전자를 포함한 BC 3G 세포주를 화학물질(chemical) 및 천연물을 처리하기 3-6 시간 전에 1.5×10^5 cells/well로 seed하여 배양하였다. 화학물질(Chemical)의 처리농도는 0.01-100 ng/ml로, 천연물의 처리농도는 0.01-100,000 ng/ml 농도로 처리하였다. 20시간 뒤 세포를 수거하여 1X PBS(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄)로 배지를 두 차례 세척(washing) 한 후 500 μ l의 1X PBS에 부유시켜 FACS Calibur (BD science)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 FACS 분석(analysis)을 실시하였다. 양성대조군으로는 TPA 같은 화학물질(chemical)에 의해 재활성이 유도된 BC 3G 리포터 세포를, 음성대조군으로는 어떠한 화학물질(chemical)도 처리하지 않은 BC 3G 세포와 희석에 사용된 DMSO를 처리한 BC 3G 세포와 재활성을 보이지 않는 천연물을 사용하였다.
- <29> **(3) KSHV 재활성 분석(reactivation assay) : 웨스턴블롯(western blot) 분석**
- <30> KSHV가 감염된 BC-3 세포를 화학물질(chemical) 및 천연물을 처리하기 3-6 시간 전에 1×10^6 cells/well로 seed하여 배양하였다. TPA은 20 ng/ml, 소디움부틸레이트(sodium butyrate) 3mM로 처리하고, 천연물은 20 μ g/ml로 처리하였다. 20 시간 뒤, 각각의 세포를 수거하여 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM PMSF, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin 과 10 μ g/ml pepstatin을 포함하는 용해버퍼(lysis buffer)에 용해(lyse)하고 96°C에서 5분 가열하여 변성(denature)시켰다. 각각의 시료마다 10^5 개에 해당하는 세포의 용해물(lysate)을 10% SDS-PAGE로 분획하고 니트로 셀룰로스막(nitrocellulose membrane, Amersham Pharmacia)에 15V 로 30분 동안 transfer하였다. KSHV RTA에 특이적인 항체 (1: 1000)과 KS 환자 혈청 (1:500; from Dr. Ren Sun, UCLA)을 이용해 수행하였다. 2차 항체로는 HRP-conjugated rabbit IgG 또는 human IgG항체를 사용하여 반응시키고 ECL (Amersham, GE healthcare)로 가시화하였다. 이때 각각의 항체는 0.5% tween 20와 5% skim milk 가 포함된 1X TBS-T buffer(20 mM Tris base, 137 mM NaCl)로 희석하였다. 양성 대조군으로는 TPA나 소디움부틸레이트(sodium butyrate)와 같은 화학물질(chemical)에 의해 재활성이 유도된 BC 3 세포를, 음성대조군으로는 어떠한 화학물질(chemical)도 처리하지 않은 BC 3 세포와 희석에 사용된 DMSO를 처리한 BC 3 세포와 재활성을 보이지 않는 천연물을 사용하였다.
- <31> **(4) KSHV 재활성 분석(reactivation assay) : 실시간(realtime) PCR 분석**
- <32> KSHV가 감염된 BC-3 세포를 화학물질(chemical) 및 천연물을 처리하기 3-6 시간 전에 1×10^6 cells/well로 seed하여 배양하였다. TPA은 20 ng/ml, 소디움부틸레이트(sodium butyrate) 3mM로 처리하고, 천연물은 20 μ g/ml로 처리하였다. 20 시간 뒤, 각각의 세포를 수거하여 총 세포 게놈 DNA(total cellular genomic DNA)를 추출하였다. 세포의 펠릿(pellet)에 TE 버퍼(buffer) 200 μ l로 부유시킨 후 2X 용해버퍼(lysis buffer) 200 μ l

와 10 mg/ml proteinase K 20 ul를 첨가하여 살짝 섞어준 다음 56℃에서 12 시간이상 반응시켰다. 400 ul의 P:C:I를 넣어 5분 동안 잘 섞어준 다음 4℃에서 9,000 rpm으로 10 분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액을 새 튜브에 옮겨서 400ul의 P:C:I로 두차례 더 반복하였다. 40 ul 3M 소디움아세테이트(sodium acetate, pH 5.2)와 100% 에탄올 1ml를 첨가하여 살짝 섞어준 다음 4℃에서 14,000 rpm으로 15 동안 원심분리하였다. 상등액을 버리고 70% 에탄올 1ml를 첨가하여 14,000 rpm으로 15 동안 원심분리하였다. 상등액을 버리고 DNA 펠릿(pellet)을 잠시 동안 건조시킨 후 50 ul TE 버퍼로 펠릿(pellet)을 녹인 후, 55℃에서 30분 동안 반응시켰다.

<33> 추출된 총 세포 게놈 DNA(total cellular genomic DNA) 50 ng을 취해 실시간(realtime) PCR을 시행하였다. 실시간(Realtime) PCR은 50℃에서 3분 동안 run한 뒤, 94℃ 에서 10초, 55℃에서 15초, 72 ℃에서 20초의 cycle을 45회 반복하였다. 매 cycle의 신장시간(extension time, 72℃ 반응) 후 실시간 형광정도를 1초간 읽어주도록 프로그램 하였다. 모든 PCR cycle이 끝난 후에는 65℃ 부터 90℃ 구역에서 한번에 0.3℃ 씩 온도를 증가시켜 매 1초간 형광정도를 읽어 줌으로써 PCR 결과물의 용해곡선(melting curve)을 확인하였다. 실시간(Realtime) PCR용으로는 KSHV의 유전체중 티미딘 키나아제(thymidine kinase) 유전자에 해당하는 tk-F (5 ‘-CGTAGCCGACGCGGATAA-3’ ; 서열번호 1), tk-R (5 ‘-TGCCTGTAGATTCGGTCCAC-3’ ; 서열번호 2)의 프라이머(primer) 셋트와 syber green master mix (Qiagen)를 이용하여 각 샘플에서 검출된 형광정도가 검출 역가(threshold)를 넘어가는 cycle수인 Ct 값(Ct value)을 측정하였다.

<34> (5) 세포 독성 실험 : MTT 분석(assay)

<35> KSHV가 감염된 BC 3 세포주를 화학물질(chemical) 및 천연물을 처리하기 3-6 시간 전에 5×10^4 cells/well로 seed하여 배양하였다. 화학물질(Chemical)의 처리농도는 0.01-100 ng/ml로, 천연물의 처리농도는 0.01-100,000 ng/ml 농도로 처리하였다. 20시간 뒤 10 ul MTT 용액(solution)을 첨가한 다음 37℃에서 3시간동안 배양시켰다. 3,000 rpm으로 10분 동안 원심분리 한 후, MTT 용액(solution)과 배지(media)를 제거하였다. 100ul의 DMSO를 첨가하여 펠릿(pellet)을 녹여주었다. 37℃에서 60rpm 으로 5분 동안 섞어준 다음 570nm의 흡광도에서 MTT 분석(assay)을 실행하였다.

<36> 실시예 1. KSHV 잠복감염 림프성 종양 세포주에서의 리포터 세포주(reporter cell line) 구축

<37> KSHV가 잠복감염되어 있는 원발성 삼출성 림프종 세포주(Primary effusion lymphoma cell line)에 KSHV의 RTA의 직접적인 조절을 받는 KSHV PAN RNA (polyadenylated nuclear RNA) 프로모터와 이 프로모터에 의해 발현되는 리포터로 불안정화 EGFP를 도입하여 세포-기반 탐색시스템(cell-based screening system)을 확립하였다(도 1 참조).

<38> 본 발명자들은 PAN RNA 프로모터를 불안정화 EGFP(dsEGFP)에 연결한 리포터 구조체(reporter construct)를 가지는 안정화된 세포주(stable cell line, BC-3G)를 미국 유니버시티 오브 캘리포니아, 로스앤젤레스의 Dr. Ren Sun 실험실에서 확보하였다(Yu et al.(2007)).

<39> 본 발명에 의한 세포-기반 탐색시스템은 천연물(natural product; NP) 처리에 의해 바이러스 유전체상의 RTA 프로모터가 활성화되면, RTA 단백질이 발현되는 KSHV 재활성 상태에서 RTA에 민감하고 강력하게 반응하는 리포터 플라스미드의 PAN RNA 프로모터를 통한 dsEGFP의 발현이 증가하는 것을 FACS를 통해 검색하였다(도 1 참조). 이때 양성대조군으로는 TPA를 사용하였다.

<40> 실시예 2. 본 발명에 의한 KSHV 세포-기반 탐색시스템을 이용한 후보 천연물질 발굴

<41> 상기 BC-3G 세포주를 활용하여 재활성을 유도하는 천연물질을 탐색하기 위하여 약 400여 종의 한약재 추출물(고려대학교 생명공학부 이동호 교수 실험실)을 이용하였다.

<42> 상기 BC-3G 세포주에 400여개의 한약재의 메탄올 추출물을 처리하고 20-24시간 후, KSHV의 재활성을 FACS를 이용하여 측정하였다. 그 결과를 도 2a 및 도 2b에 나타내었다. 도 2a에서 X 축은 처리한 각각의 천연물을 나타내고, Y축은 KSHV 바이러스 재활성화가 일어난 GFP(+) 세포들의 개체수(population) % 를 나타내었다. 탐색(screening)의 양성결과로 판정한 역가(threshold)은 빨간색 실선으로 표시하였다. 도 2b에서 X축은 GFP(+) 세포들의 %, Y축은 해당하는 값을 갖는 천연물의 수를 나타내었다. 처리한 천연물 중 390여개의 천연물이 1.0% 미만의 값을 나타내었고, 7개의 천연물만이 역가 이상의 값을 나타내었다.

<43> 실시예 3. KSHV 재활성을 유도하는 천연물의 효능 확인(HTS검색의 타당성 검증)

<44> 천연물 검색을 통해 발굴한 후보 물질에 대한 효능 확인 및 독성 실험을 수행하였다. 이때, 약리활성 실험으로

써 천연물의 농도(dose)에 따른 효능을 분석하여 HTS(High through-put screening)에서 발굴한 천연물의 효능이 농도-의존성(dose-dependency)을 갖는 지를 확인하고자 하였다.

<45> 실시예 2에서 발굴된 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*; *Euphorbia kansui Liou ex Wang*)의 천연 추출액을 0.01ng/ml - 100μg/ml의 약 10^8 배 농도 범위에서 BC-3G 세포주에 처리하고 20-24시간 후, KSHV의 재활성을 FACS를 이용한 리포터 분석(reporter analysis)을 통해 측정하였다. 양성대조군으로 사용한 TPA는 0.03 - 200ng/ml의 농도에서, 음성대조군으로 사용된 당귀(*Angelicae Gigantis Radix*)와 두충(*Eucomiae Cortex*)은 6.7 μg/ml의 농도에서 처리하고, 리포터 세포주의 GFP의 발현을 측정하였다. 모든 농도의 실험은 3회 반복(triplicate)으로 실험하였고, 각 측정치의 표준편차를 에러 바(error bar)로 나타내었다.

<46> 그 결과 도 3에 나타난 바와 같이 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*)의 활성은 농도 의존적인 S자형 그래프를 나타냈으며, 농도 의존적 KSHV 재활성 활성을 관찰할 수 있었다. 농도-효과 곡선(Dose-effect curve)에서 EC50(effect concentration 50)를 살펴보았을 때, 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*)의 경우 매우 뛰어난 활성을 나타냈으며, 양성 대조군으로 사용한 TPA의 경우는 상대적으로 낮은 농도에서도 높은 활성을 유지하고 있음을 확인할 수 있었으나, 1차 HTS에서 아무런 활성을 나타내지 않았던 다른 천연물인 당귀와 두충은 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*)가 높은 활성을 나타내는 고농도 처리시에도 mock 처리와 비슷하게 전혀 활성을 나타내지 않았다. 한편, 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*)의 활성은 TPA와 비교하였을 때 약 10-50배 정도의 효능(potency)의 차이를 나타내었다. 이는 TPA의 경우 단일 화합물(single compound)이고 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*)의 경우 정제되지 않은 성분의 복합체라는 것을 고려할 때, 천연물 속에 포함된 실제 활성을 나타내는 활성 화합물(active compound)의 활성은 TPA에 상당할 것이라고 사료되었다. 이러한 결과들은 본 발명에서 사용한 리포터 세포주를 활용한 HTS의 타당성을 입증하는 것이며, 이에 의해 발굴한 천연물인 감수의 성분에 농도 의존적으로 KSHV 재활성에 활성을 나타낸다고 평가할 수 있다.

<47> 실시예 4. KSHV 재활성을 유도하는 천연물의 세포독성 실험

<48> 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*)의 세포독성을 측정하기 위한, 세포생존을 분석법(cell viability assay)과 MTT 분석법 [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay]을 수행하였다.

<49> 다양한 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*)의 농도(ng/ml)로 KSHV가 잠복 감염된 PEL 세포주에 20-24시간 동안 처리한 후 수거하여 트리판블루(trypan blue) 염색법을 이용하여 살아있는 세포수를 측정하거나, MTT 시약을 처리한 후 흡광도를 측정하여 실험하였다(Mosmann, T., Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. J. Immunol. Meth. 1983, 65, 55-63).

<50> 그 결과를 도 4a 및 도 4b에 나타내었다. 각 그래프는 무처리(no treatment)를 100%로 하여 백분율로 나타내었다. 양성대조군으로 사용한 TPA는 40과 20ng/ml의 농도로 처리하였다. 각 농도별로 3회 반복(triplicate)으로 처리하고 표준편차(standard deviation)는 에러바(error bar)로 표시하였다. 도 4a는 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*)를 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 희석하였을 때의 실험결과를 나타내는데, TPA 처리군과 비슷한 정도의 세포독성이 관찰되었으나 농도 의존성이 매우 낮은 편이라서 천연물의 구성성분에 의한 특이적인 독성으로는 판단되지 않는다. 도 4b는 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*)를 메탄올로 녹여 실험한 결과를 나타내는데, DMSO 희석과는 달리 세포독성이 관찰되지 않았다.

<51> 실시예 5. 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*)에 의한 KSHV 재활성 유도의 분자생물학적인 확인 및 기전 확인

<52> KSHV 재활성을 유도하는 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*)의 활성이 리포터 수준에서 뿐만 아니라 실제 바이러스의 재활성 활성기(lytic cycle)를 유도하는지 분자생물학적인 기법을 사용하여 확인하였다.

<53> KSHV가 잠복감염되어 있으나 리포터가 들어있지 않은 모세포주(parental cell line)인 PEL 세포주에 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*) 추출물들을 20 ug/ml 농도로 처리하고 24시간 뒤, 세포를 수거하였다. 항-RTA 항체(anti-RTA antibody; upper panel)와 KS patient serum (middle panel; UCLA Dr. Ren Sun 실험실 제공)을 이용하여 웨스턴 블롯(western blot)을 수행하였다. 도 5에서 RTA-특이 밴드(RTA-specific bands)는 상부 패널(upper panel)의 위의 두 개의 밴드(band)로, KS patient serum에 의해 검출(detection)되는 KSHV 재활성 특이적인 밴드(band)는 중앙 패널(middle panel)의 단독 밴드로 검출되었다. 하부 패널의 항-튜불린(anti-tubulin)은 로딩 대조군으로서 사용되었다. 양성 대조군으로는 Na. butyrate과 TPA를, 음성대조군으로는 *Angelicae* (당귀)와 *Eucomiae* (두충)를 사용하였다.

<54> 그 결과 본 발명에 의한 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*) 처리로 양성대조군과 비교하여 비슷하거나 더 많은 양

의 RTA 단백질의 발현이 유도되는 것을 확인되었다. 또한, KS patient serum을 이용한 웨스턴 분석의 경우 KSHV 재활성에 의해 나타나는 특이적인 밴드가 양성 대조군으로 사용한 Na. butyrate과 TPA을 비롯하여 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*) 처리에 의해 나타나는 반면, 리포터 세포주에서 재활성 효과가 없었던 당귀나 두충의 처리군에서는 나타나지 않았다. 이때, RTA는 더블렛(doublet)으로 나타나는 데, 이는 RTA가 인산화(phosphorylation)의 번역 후 변형(post-translation modification)을 받기 때문이다.

<55> 또한, 리포터가 들어 있지 않은 모세포주인 BC-3 PEL 세포주에 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*) 추출물을 20 ug/ml 농도로 처리하고 24 시간 뒤, 세포를 수거한 후, 총 세포 게놈 DNA(total cellular genomic DNA)를 추출하여 티미딘 키나제(thymidine kinase; TK) ORF-특이적 프라이머(Yu et al.(2007) Systemic identification of cellular signals reactivating Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. PLoSPathogen 3(3))를 사용한 실시간 PCR(real-time PCR)을 수행하였을 때도 동일한 양상의 결과를 얻었다(도 6 참조). 이때 GAPDH를 내적 대조군(internal control)으로 사용하였고, fold activation은 DMSO 처리군의 값을 기준으로 $\Delta/\Delta Ct$ 방법(BioRad iCycler)을 활용하여 계산하였다.

<56> 상술한 바와 같은 결과는, 본 발명에 의한 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*)의 활성을 나타내어 본 발명은 새로운 개념의 암용해성바이러스 치료법 분야에 매우 유용한 발명이라 할 것이다.

<57> 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

<58> 도 1은 본 발명에 의한 KSHV 재활성을 유도하는 천연물 검색 시스템의 개요를 보인 도면이다.

<59> 도 2a 및 도 2b는 본 발명에 의한 KSHV 재활성을 유도하는 천연물 검색 시스템을 이용하여 400여 종의 천연물을 스크리닝한 결과를 보인 도면이다.

<60> 도 3은 본 발명에 의한 KSHV 재활성을 유도하는 감수(*Euphorbiae Kansui Radix*; 이하 *Euphorbiae*)의 농도 의존적 활성 검사 결과를 보인 도면이다.

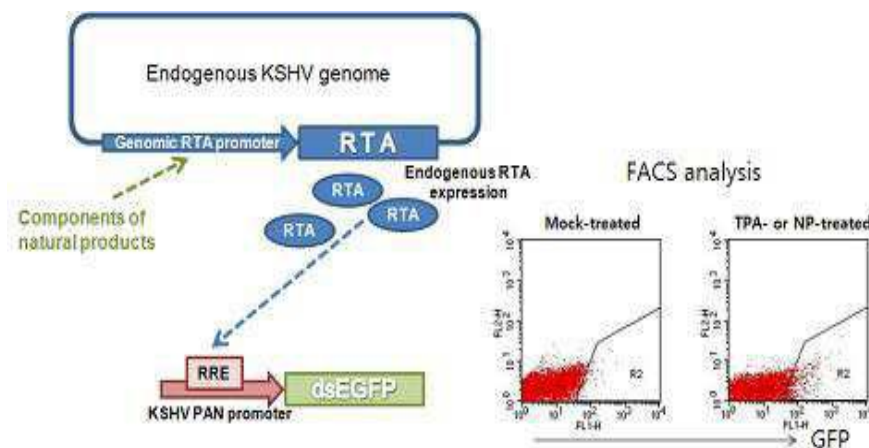
<61> 도 4a 및 도 4b는 본 발명에 의한 KSHV 재활성을 유도하는 감수(*Euphorbiae*)의 세포독성 검사 결과를 보인 도면이다.

<62> 도 5는 본 발명에 의한 KSHV 재활성을 유도하는 감수(*Euphorbiae*) 처리에 의해 KSHV 잠복감염 PEL 세포주에서 KSHV 바이러스 재활성 유도한 결과를 보인 도면이다.

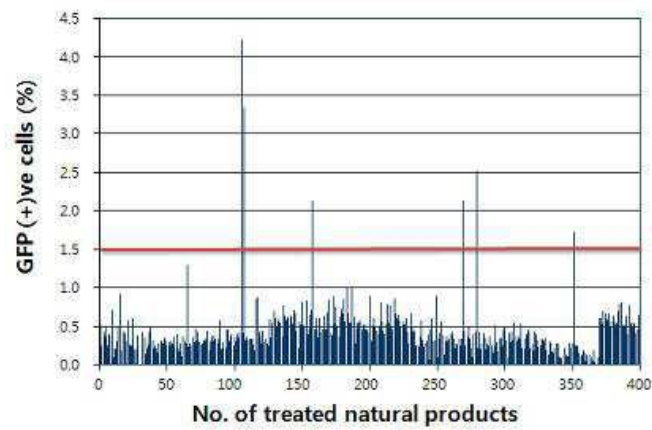
<63> 도 6은 본 발명에 의한 KSHV 재활성을 유도하는 감수(*Euphorbiae*) 처리에 의해 KSHV 잠복감염 PEL 세포주에서 KSHV 바이러스 재활성 유도하여 바이러스 DNA 복제가 증가한 결과를 보인 도면이다.

도면

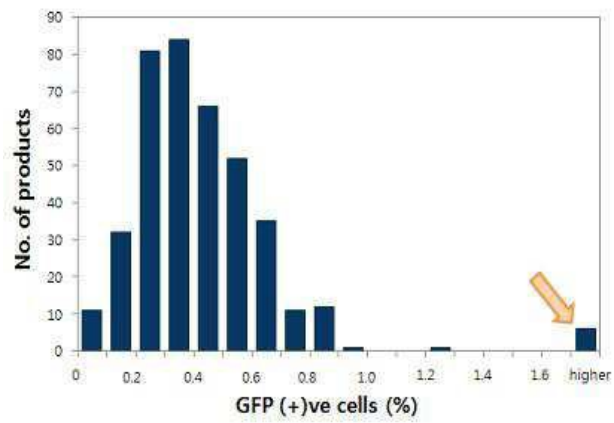
도면1



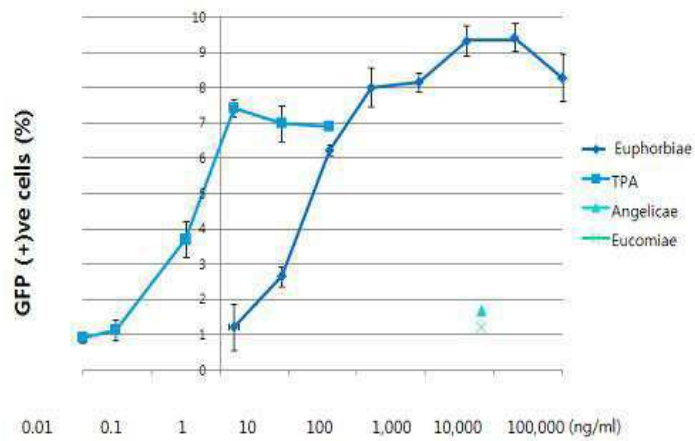
도면2a



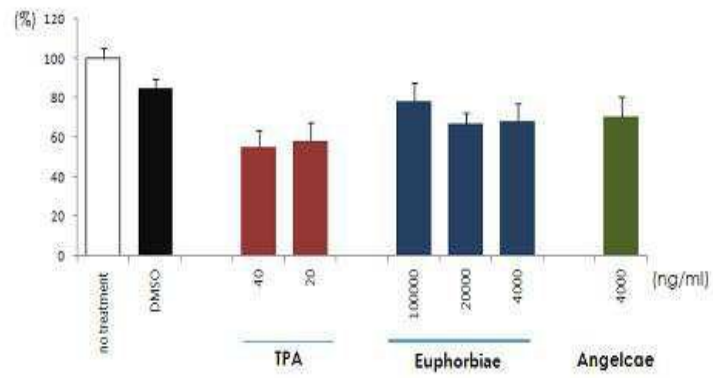
도면2b



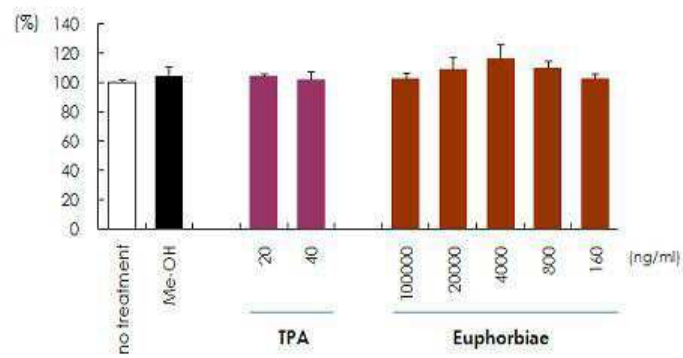
도면3



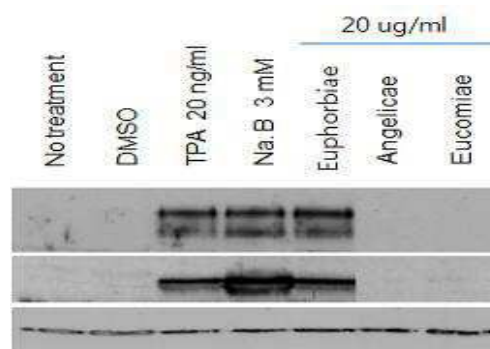
도면4a



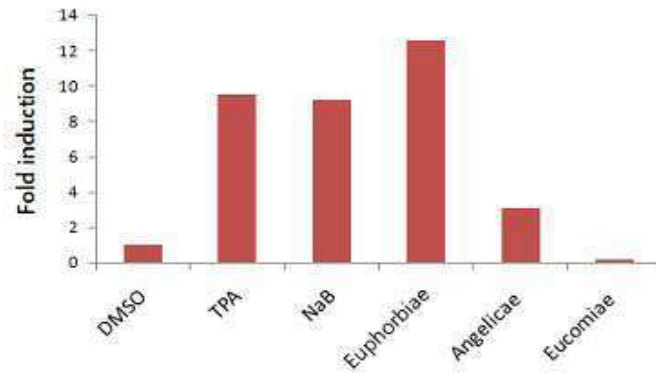
도면4b



도면5



도면6



서열 목록

<110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation
 <120> Euphorbiae Kansui Radix reactivating gammaherpesvirus and pharmaceutical composition containing the same

<130> P11-070827-03

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR PRIMER

<400> 1

cgtagccgac gcggataa

18

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR PRIMER

<400> 2
tgcctgtaga ttctgggtcca c

21