(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0108002
(43) 공개일자 2016년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 48/00* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*A61K 48/00* (2013.01)
*A61K 39/395* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0031741
(22) 출원일자 2015년03월06일
심사청구일자 2015년03월06일

(71) 출원인
**한림대학교 산학협력단**
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
**황순봉**
경기도 안양시 동안구 귀인로 237, 210동 1703호 (대림아파트)
**박은미**
경기도 군포시 산본로198번길 34, 201호 (당동)
(74) 대리인
**강성혜**

전체 청구항 수 : 총 4 항

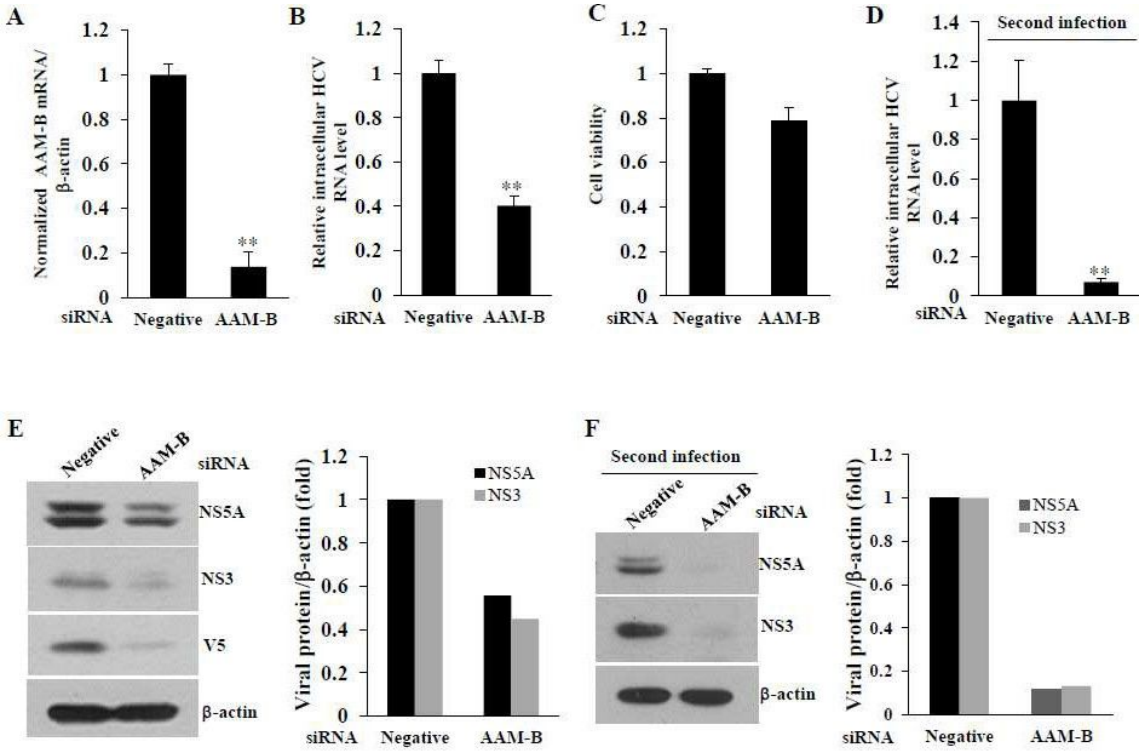
(54) 발명의 명칭 **AAM-B 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물**

## (57) 요 약

C형 간염 바이러스는 숙주 세포 지방 대사를 이용하여 감염성 바이러스 입자를 생산한다. HCV 증식에 관여하는 세포 인자를 찾기 위하여 본 발명자들은 HCVcc-감염 세포를 이용하여 지방대사와 지방소립 형성을 조절하는 숙주 유전자를 표적으로 하는 siRNA 라이브러리를 스크리닝하였다. 열 개의 후보 유전자 중 AAM-B를 암호화하는 유전

(뒷면에 계속)

## 대 표 도



자를 선택하고 특성을 규명하였다. siRNA-매개 AAM-B를 녹다운시키면 Jc1 RNA 전기천공 세포 및 Jc1-감염 세포 모두에서 감염성 HCV 입자 생산이 중단되었다. AAM-B 녹다운은 지방소립 형성에는 영향을 미치지 않았다. 뿐만 아니라, AAM-B는 NS4B C-말단 부분을 통해 NS4B와 상호작용하였다. 일시적 또는 안정한 AAM-B 발현을 이용하여 AAM-B가 세포질 내에서 NS4B와 같은 위치에 있음을 밝혔다. 면역형광 데이타는 AAM-B가 HCV 증식을 용이하게 하기 위해 NS4B를 지방소립 근처로 모집함을 보여준다. 종합하자면, 이들 데이타는 HCV가 NS4B를 통해 AAM-B를 조절하여 자신의 증식을 용이하게 함을 나타낸다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|---|---|
| 과제고유번호 | 없음 |
| 부처명 | 보건복지부 |
| 연구관리전문기관 | 한국보건산업진흥원 |
| 연구사업명 | 보건의료연구개발사업 |
| 연구과제명 | C형 간염바이러스에 의한 간질환 치료기술 개발연구 |
| 기 여 율 | 1/1 |
| 주관기관 | 한림대학교 산학협력단 |
| 연구기간 | 2014.11.01 ~ 2015.10.31 |

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

AAM-B 발현 저해제를 포함하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 AAM-B 발현 저해제는 AAM-B 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 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 siRNA는 서열번호 7번, 14번, 15번 및 16번 중 선택된 것임을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

### 청구항 4

AAM-B 단백질에 결합하는 항 AAM-B 항체를 포함하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것으로서, 좀더 자세히는 AAM-B 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0002] C형 간염 바이러스(Hepatitis C virus; HCV)는 만성 간질환의 주요 병인이다[1]. 만성 HCV 감염은 종종 간경화 및 간암 (hepatocellular carcinoma; HCC)을 포함한 중증 간질환을 일으킨다. 세계적으로 hcv에 감연된 인구는 약 1억7천만 명에 이른다[2]. HCV는 플라비비리대 (Flaviviridae) 과, 헤파시바이러스 (Hepacivirus) 속에 속하며, 양성 센스, 단일가닥 RNA를 갖는 피막형 바이러스이다[3]. HCV는 일곱 개의 주요 유전자형으로 분류되고, 각 유전자형은 많은 서브타입으로 나눌 수 있다. HCV 게놈은 9,600개의 RNA 염기로 이루어져 있고 단일 오픈 리딩 프레임으로부터 3010개의 아미노산을 코딩한다. 이 폴리단백질은 숙주 세포 및 바이러스 프로테이즈에 의해 세 개의 구조 단백질 (코어, E1 및 E2)과 일곱 개의 비구조 단백질 (p7, NS2 ~ NS5B)로 프로세싱된다[4]. NS4B( Nonstructural 4B)는 소포체 막에 위치한 소수성 27kDa 단백질이다[5]. NS4B는 세포질 내에 위치하는 N-말단과 C-말단을 가지며, 네 개의 막 관통 도메인(transmembrane domains)을 가진다. NS4B는 특이한 단일막 소포(single membrane vesicles)들로 막그물(membranous web) 형성을 유도한다. NS4B는 HCV 복제 복합체(HCV replication complex)의 구조체(scaffold)로 작용한다[6-8].

[0003] 세포 지질은 HCV 생애주기에 있어서 HCV 조립, 방출 및 감염성에 결정적인 역할을 수행한다[9]. 중성 지방을 저장하는 소기관인 지방소립(Lipid droplet, LD)은 HCV 입자 생성에 필수적이다[10]. 지방소립의 표면은 지방소립 유지와 기능의 조절에서 중요한 역할을 수행하는 다양한 단백질로 코팅되어 있다[11-12]. Rab18이 HCV NS5A와 상호작용하여 HCV 복제를 조절하고 HCV와 LD 간의 물리적 상호작용을 촉진함으로써 감염성 HCV 입자를 생산할

수 있다는 것이 보고된바 있다[13]. TIP47 또한 LD와 결합하여 HCV 복제를 조절한다[14-16]. AAM-B는 소포체 막에 고정된 28-kDa 막단백질이다. AAM-B는 최초에 차이니즈 햄스터 난소 K2 세포에서 LD와 결합된 단백질로 확인되었다[17]. AAM-B는 추정 메틸기 전이효소로 분류된다. AAM-B는 N-말단 도메인과 C-말단 도메인, 막근접 부분(juxtamembrane region) 및 메틸기전이효소의 추정 중앙 촉매 도메인(putative central catalytic domain for methyltransferase)으로 이루어져 있다. AAM-B의 N 말단 소수성 28 아미노산 서열은 소포체 막 내로 삽입되어 삽입된 부위를 LD로 이동시키는데 필수적이라고 보고된바 있다[18]. AAM-B는 기능성 소기관들을 형성하기 위해 다른 세포 단백질들을 LD로 모집한다[19].

[0004] 선행 연구들은 AAM-B가 LD-관련 단백질임을 나타낸다[17]. LD-관련 단백질들은 HCV 복제 및 HCV 입자 생산에 중요하다.

## *선행기술문헌*

### *비특허문헌*

[0005] (비특허문헌 0001) Choo Q, Kuo G, Weiner A, Overby L, Bradley DW, et al. (1989) Isolation of a cDNA clone derived form a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science 224:359-362.

(비특허문헌 0002) Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST (2013) Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to hepatitis C virus seroprevalence. Hepatology 57:1333-1342.

(비특허문헌 0003) Moradpour D, Penin F, Rice CM (2007) Replication of hepatitis C virus. Nat Rev Microbiol 5:453-463.

(비특허문헌 0004) Lindenbach BD, Rice CM (2005) Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. Nature 436:933-938.

(비특허문헌 0005) Hugle T, Fehrmann F, Bieck E, Kohara M, Krausslich HG, et al. (2001) The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. Virology 284:70-81.

(비특허문헌 0006) Gouttenoire J, Penin F, Moradpour D (2009) Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory. Rev Med Virol 20:117-129.

(비특허문헌 0007) Aligo J, Jia S, Manna D, Konan KV (2009) Formation and function of hepatitis C virus replication complexes require residues in the carboxy-terminal domain of NS4B protein. Virology 393:68-83.

(비특허문헌 0008) Paul D, Romero-Brey I, Gouttenoire J, Stoitsova S, Krijnse-Locker J, et al. (2011) NS4B selfinteraction through conserved C-terminal elements is required for the establishment of functional hepatitis C virus replication complexes. J Virol 85:6963-6976.

(비특허문헌 0009) Alvisi G, Madan V, Bartenschlager R (2011) Hepatitis C virus and host cell lipids: An intimate connection. RNA Biol 8:258-269.

(비특허문헌 0010) Martin S, Parton RG (2006) Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. Nat Rev Mol Cell Biol 7:373-378.

(비특허문헌 0011) Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, et al. (2007) The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. Nat Cell Biol 9:1089-1097.

(비특허문헌 0012) Fujimoto T, Ohsaki Y, Cheng J, Suzuki M, Shinohara Y (2008) Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. Histochem Cell Biol 130:263-279.

(비특허문헌 0013) 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 0014) Ploen D, Hafirassou ML, Himmelsbach K, Sauter D, Biniossek ML, et al. (2013) TIP47 plays a crucial role in the life cycle of hepatitis C virus. J Hepatol 58:1081-1088.

(비특허문헌 0015) Ploen D, Hafirassou ML, Himmelsbach K, Schille SA, Biniossek ML, et al. (2013) TIP47 is associated with the hepatitis C virus and its interaction with Rab9 is required for release of viral particles. Eur J Cell Biol 92:374-382.

(비특허문헌 0016) Vogt DA, Camus G, Herker E, Webster BR, Tsou CL, et al. (2013) Lipid droplet-binding protein TIP47 regulates hepatitis C Virus RNA replication through interaction with the viral NS5A protein. PLoS Pathog 9:e1003302.

(비특허문헌 0017) Liu P, Ying Y, Zhao Y, Mundy DI, Zhu M, et al. (2004) Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. J Biol Chem 279:3787-3792.

(비특허문헌 0018) Zehmer JK, Bartz R, Liu P, Anderson RG (2008) Identification of a novel N-terminal hydrophobic sequence that targets proteins to lipid droplets. J Cell Sci 121:1852-1860.

(비특허문헌 0019) Zehmer JK, Bartz R, Bisel B, Liu P, Seemann J, et al. (2009) Targeting sequences of UBXD8 and AAM-B reveal that the ER has a direct role in the emergence and regression of lipid droplets. J Cell Sci 122:3694-3702.

(비특허문헌 0020) Park CY, Jun HJ, Wakita T, Cheong JH, Hwang SB (2009) Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway. J Biol Chem 284:9237-9246.

(비특허문헌 0021) Nguyen LN, Lim YS, Pham LV, Shin HY, Kim YS, et al. (2014) Stearoyl coenzyme A desaturase 1 is associated with hepatitis C virus replication complex and regulates viral replication. J Virol 88:12311-12325.

(비특허문헌 0022) Ngo TH, 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 0023) Kato T, Date T, Murayama A, Morikawa K, Akazawa D, et al. (2006) Cell culture and infection system for hepatitis C virus. Nat Protoc 1:2334-2339.

(비특허문헌 0024) Park EM, Nguyen LN, LimYS, Hwang SB (2014) Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1 regulates hepatitis C virus propagation. FEBS Lett 588:1813-1820.

## *발명의 내용*

### *해결하려는 과제*

[0006] 본 발명은 종래 C형 간염의 효과적인 치료제가 없었던 문제를 해결하고 C형 간염에 효과적인 예방 및 치료제를 제공하려는 것을 목적으로 한다.

### *과제의 해결 수단*

[0007] 본 발명자들은 AAM-B 유전자 발현 저해가 HCV 증식을 손상시킴을 밝혔다. 그러나, AAM-B 녹다운은 지방소립 형성에 아무런 영향도 미치지 않았다. AAM-B는 NS4B 단백질과 상호작용하며, 같은 곳에 위치한다. 그러나, NS4B는 LD와 같은 곳에 있지 않았다. 대신, AAM-B는 주로 LD 내에 위치하며 LD 가까운 곳에 NS4B 단백질을 모집한다. 이 결과들은 HCV가 AAM-B를 이용하여 자신의 증식을 용이하게 함을 말해준다.

[0008] HCV는 자신의 증식을 위해 지질대사를 이용한다[9]. 본 발명자들은 HCV 증식에 필요한 숙주 유전자로서 AAM-B를 밝혔다. AAM-B는 소포체 막에 고정된 추정 메틸화전이효소이다. AAM-B는 LD-관련 단백질이다[19]. AAM-B의 N-말단 소수성 28개 아미노산 서열은 소포체 막에 삽입되는데 필요하며, 이 삽입된 부분을 LD로 이동시킨다[18]. AAM-B는 다른 단백질들을 지방소립으로 모집하여 기능성 소기관을 만든다[19]. 지방소립은 HCV 입자 생산에 필

수적인 소기관이다[10]. 지방소립-관련 단백질들은 HCV 복제 및 HCV 입자 생산에 필수적임이 보고된바 있다[13-16]. 지방소립 표면은 지방소립 유지 및 기능의 조절에 있어서 중요한 역할을 수행하는 다양한 단백질들로 덮여 있다[11-12].

[0009] 본 발명자들은 siRNA-매개 AAM-B 녹다운이 HCV 증식을 손상시킴을 밝혔다. AAM-B 침묵화는 세포 내 HCV RNA와 단백질 발현 수준에 영향을 미치지 않고 HCV 입자 조립 및 방출을 현저히 감소시켰다. 우리는 유전자형 1b 및 2a 유래 서브게놈 레플리콘 세포에서 HCV 복제 수준이 AAM-B 녹다운에 의해 변하지 않음을 확인하였다. 또한, AAM-B 녹다운에 의해 Jc1 RNA 전기천공 Huh7.5 세포 및 Jc1 감염 AAM-B 안정화 세포에서 세포 내 HCV RNA에는 영향이 없고 세포 외 HCV RNA 및 HCV 감염성 수준이 모두 극적으로 감소하였음을 밝혔다. HCV 생애주기 중 AAM-B가 어느 단계에서 필요한지를 밝히기 위해 Huh7 세포를 Jc1으로 감염시킨 후 AAM-B siRNA로 트랜스펙션시켰다. 유사하게, AAM-B 녹다운 세포에서 세포 내 HCV RNA 수준은 변하지 않았다. 그러나, AAM-B 녹다운 세포에서 방출된 HCV 입자의 세포외 HCV RNA 수준 및 감염성 수준은 현저히 감소하였다. 이러한 결과는 AAM-B가 HCV 생애주기 중 조립 및 방출 단계에 관여함을 말해준다. 실제로, 세포 내 HCV 입자의 감염성은 AAM-B 녹다운 세포에서 현저히 감소하였다.

[0010] 다음으로 본 발명자들은 AAM-B 녹다운이 지방소립 형성을 바꿀 수 있는지를 연구하였다. 면역형광 데이타는 AAM-B가 지방소립 형성에 영향을 미치지 않고 HCV 생산을 조절할 수 있음을 말해준다. 그리하여 우리는 AAM-B 매개 HCV 증식에서 바이러스 단백질이 관여할 가능성을 연구하였다. 본 발명자들은 AAM-B가 HCV NS4B 단백질과 특이적으로 상호작용함을 밝혔다. 뿐만 아니라, AAM-B는 NS4B와 같은 위치에 있었다. NS4B와 지방소립은 세포질에서 같은 위치에 있지 않았다. 오히려 NS4B는 지방소립 근처에 위치하였다. AAM-B가 지방소립 관련 단백질이기 때문에, 이는 AAM-B가 지방소립 근처로 NS4B를 모집하여 기능성 소기관 제조를 할 것임을 제시한다. 실제로, 본 발명자들은 앞선 연구에서 NS4B 단백질이 간 세포에서 SREBPs 및 FAS 단백질 발현 수준을 높이고 지방 축적을 유도함을 보고한바 있다[24]. 종합하면, 본 발명은 HCV 증식에서 AAM-B의 결정적인 역할을 조명하고 AAM-B가 C형 간염 치료제의 표적이 될 수 있음을 밝혔다.

[0011] 본 발명은 AAM-B 발현 또는 활성 저해제를 포함하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 AAM-B 발현 저해제가 AAM-B 유전자("METTL7A" 유전자라고도 불림; Gene ID 25840)의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, shRNA (short hairpin RNA) 및 siRNA (short interfering RNA)로 구성된 군 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 siRNA가 서열번호 7(5'-UGA UAU ACA ACG AAC AGA U-3'), 서열번호 14(5'-GGUUAAGAGCAGAGGUUUA-3'), 서열번호 15(5'-CAGUCGACUUUCAUAAUUA-3') 또는 서열번호 16(5'-AGUGUGAGCUGGCAGUUAA-3')임(註: 이 서열들은 두 가닥 RNA인 siRNA의 센스 가닥만을 나타낸 것이다. 실제로는 siRNA는 센스 가닥에 상보적인 안티센스 가닥과 결합된 두 가닥 RNA이다.)을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 그러나, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 서열번호 7, 14, 15 또는 16번 외에도 AAM-B를 타겟으로 하는 siRNA를 제조하는 것은 siRNA 서열생성 소프트웨어를 이용하면 용이하므로, AAM-B를 타겟으로 하는 siRNA가 상기 서열번호의 RNA 서열에만 한정되는 것이 아님은 자명하다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 AAM-B 활성 저해제가 AAM-B 단백질(GenBank No. CAD60207.1, 244aa; 서열번호 17번)에 결합하는 항 AAM-B 항체임을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 항 AAM-B 항체는 여러 회사에서 시판되고 있다. 이들 중 하나를 선택하거나 또는 항체 아미노산 서열을 제공하는 소프트웨어를 이용하여 항 AAM-B 항체를 합성하는 것은 이 기술분야의 통상의 기술자에게 용이하다.

[0015] 본 발명의 AAM-B 단백질의 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.

[0016] 본 발명의 조성물은 상기 AAM-B 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.

[0017] 본 발명에 있어서, AAM-B에 대한 억제제는 상기 유전자의 mRNA에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.

[0018] 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 생체 내뿐만 아니라 생체 외에서도 유전자-특이적 억제를 달성하기 위해 성공적으로 사용되어 왔다. 안티센스 뉴클레오타이드는 특정 DNA 또는 RNA 타겟에 대해 안티센스(또는 상보)인 짧은 길이의 DNA 합성 가닥(또는 DNA 아날로그)이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 타겟에 결합하고 전사, 번역 또는 스플라이싱의 단계에서 발현을 멈추게 함으로써 DNA 또는 RNA 타겟에 의해 인코드된 단백질의 발현을 막기 위해 제안되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 세포 배양 및 질병의 동물 모델에서도 성공적으로 이용되어 왔다(Hogrefe, 1999). 올리고뉴클레오타이드가 분해되지 않도록 더욱 안정하고 저항적이 되게 하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 또 다른 변형이 당업자에게 알려져 있고 이해된다. 여기서 사용된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 이중나선 또는 단일나선 DNA, 이중나선 또는 단일나선 RNA, DNA/RNA 하이브리드, DNA 및 RNA 아날로그 및 염기, 당 또는 백본(backbone) 변형을 지닌 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 올리고뉴클레오타이드는 안정성을 증가시키고 뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 증가시키기 위해 본 발명이 속하는 기술분야에 알려진 방법에 의해 변형된다. 이들 변형은 본 발명 분야에 알려져 있는 올리고뉴클레오타이드 백본의 변형, 당 부분의 변형 또는 염기의 변형을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다.

[0019] 또한, AAM-B에 대한 억제제는 상기 유전자의 siRNA (Small Interfering RNA)일 수 있다.

[0020] 즉, 상기 siRNA의 염기서열은 AAM-B 유전자(mRNA)의 염기서열 중 연속된 19~23개의 연속된 염기서열일 수 있다.

[0021] 상기 siRNA의 서열은 편의상 정방향 서열(sense strand)을 나타낸 것으로, 실제 유전자 억제효과를 나타내는 역방향 서열(antisense strand)과 함께 이중리보핵산쇄를 구성하게 된다.

[0022] siRNA는 세포 배양 및 생체 내에서 오래 지속되는 효과, 생체 내에서 세포를 트랜스펙션시키는 능력 및 혈청 내 분해에 대한 저항력의 측면에서 생체 내에서 특정한 유전자의 발현의 저해에 대해 매우 강한 약물이 되는 잠재력을 지닌다(Bertrand et al., 2002). siRNA의 전달 및 siRNA를 포함한 발현 컨스트럭트/벡터는 당업자에게 알려져 있다. 예를 들어, 미국 출원 제2004/106567 및 2004/0086884는 바이러스성 벡터, 비바이러스성 벡터, 리포솜 전달 운반체, 플라스미드 주입 시스템, 인공 바이러스 엔벨로프 및 폴리라이신 컨쥬게이트를 포함한 전달 메커니즘뿐만 아니라 많은 발현 컨스트럭트/벡터를 제공하고 있다.

[0023] siRNA는 상대적으로 낮은 농도로도 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의해 얻을 수 있는 효과와 동등하거나 높은 효과를 얻을 수 있기 때문에 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 대안으로 제시되고 있다(Thompson, 2002). siRNA의 이용은 질병의 동물 모델에 있어서 유전자 발현을 저해하는 데 대중성을 나타내고 있다. 당업자는 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 원하는 방식대로 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 siRNA를 합성하고 변형시킬 수 있다(Andreas Henschel, Frank Buchholz1 and Bianca Habermann (2004) DEQOR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs. Nucleic Acids Research 32(Web Server Issue):W113-W120 참조). 또한 당업자는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA를 지닌 발현 컨스트럭트/벡터에 유용한 조절 서열(예컨대, 구성적 프로모터, 유도성 프로모터, 조직-특이적 프로모터 또는 그의 결합)을 잘 이해하고 있다.

[0024] C형 간염 치료를 위해 사용되는 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA는 약제학적으로 허용되는 담체를 추가적으로 포함한 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 예를 들어 하나 이상의 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 덱스트린, 글리세롤, 에탄올뿐만 아니라 이들의 조합을 포함한다. 이러한 조성물은 투여 후 활성 성분의 빠른 방출, 또는 지속적이거나 지연된 방출을 제공하도록 제제화될 수 있다.

[0025] 상기 AAM-B 유전자의 저해제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA 외에도 상기 유전자의 발현을 억제하는 물질이면 어떤 것이든 가능하다. 따라서 종래 당해 기술 분야에서 상기 유전자의 저해제로 알려진 화합물 또한 이용 가능하다.

[0026] 본 발명은 또한 AAM-B 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 억제제를 포함하는 C형 간염 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명의 유전자를 억제하면 그에 따른 단백질의 발현이 억제되어 HCV 증식이 억제되는 것이므로, 상기 유전자의 단백질을 저해하면 HCV 증식을 억제할 수 있다.

[0027] 따라서 본 발명은 상기 단백질에 대한 억제제의 C형 간염 치료 용도를 제공한다. 본 발명에 있어서 C형 간염 치료는 C형 간염의 예방 및 억제를 포함한다.

[0028] 상기 단백질에 대한 억제제는 본 발명의 유전자로부터 발현된 AAM-B 단백질에 대한 항체일 수 있다. 상기 단백

질에 대한 단일클론 항체는 당업계에 통상적인 단일클론 항체 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있고, 시판되는 것을 사용할 수 있다. 또한, 단일클론 항체 대신에 상기 단백질을 인식하는 폴리클론 항체를 사용할 수도 있고 이는 당업계에 통상적인 항혈청 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있다.

[0029] 본 발명의 C형 간염 치료용 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용되는 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 단백질에 대한 억제제가 항체일 경우 약제학적으로 허용되는 담체는 결합 단백질의 저장 수명 또는 유효성을 증가시키는 습윤제 또는 유화제, 방부제 또는 완충액과 같은 최소량의 보조 물질로 구성될 수 있다.

[0030] 또한 본 발명의 C형 간염 치료용 조성물은 하나 또는 그 이상의 C형 간염 치료제와 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 C형 간염 치료용 조성물은 당업자에게 잘 알려진 화학요법약제(chemotherapeutic agent)를 추가로 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명의 C형 간염 치료용 조성물은 상기 유효 성분 외에도 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 포함할 수 있으며, 이러한 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 가용화제 등이 있다.

[0032] 또한 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용되는 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0033] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0034] 본 발명의 C형 간염 예방 및 치료용 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.

[0035] 본 발명의 C형 간염 예방 및 치료용 조성물은 정맥 내, 동맥 내, 복강 내, 근육 내, 동맥 내, 복강 내, 흉골 내, 경피, 비측 내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구 내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0036] 본 발명의 치료 방법에 있어서, "유효량"은 C형 간염을 억제하는 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 본 발명의 유효 성분의 "유효량"은 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 성인의 경우, 상기 유전자 또는 단백질의 억제제를 1일 1회 내지 수회 투여시, siRNA일 경우 0.01ng/kg~10mg/kg, 상기 유전자의 mRNA에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 경우 0.01ng/kg~10mg/kg, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10mg/kg, 상기 단백질에 대한 단일클론 항체일 경우 0.1ng/kg~10mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0037] 본 발명에 있어서, 상기 AAM-B 유전자는 알려진 염기서열 중 하나 이상의 염기가 결실, 치환 또는 삽입된 염기서열일 수 있다.

[0038] 상기 AAM-B 유전자의 siRNA 서열은 예시일 뿐 이에 한정되는 것이 아님은 당업자에게 자명하다. 상기 서열들에 대해 실질적인 서열 동일성 또는 실질적인 서열 상동성을 지닌 서열 또한 본 발명의 범주에 포함된다. 여기서 사용된 "실질적인 서열 동일성" 또는 "실질적인 서열 상동성"이라는 용어는 서열이 또 다른 서열과의 실질적인 구조적 또는 기능적 동일성을 나타냄을 표현하기 위해 사용된다. 이러한 차이는 예를 들어 다른 종 간의 코돈 용법의 고유의 변이에 기인한다. 2 이상의 다른 서열 사이의 유의적인 양의 서열 중복 또는 유사성이 있는 경우 이들 서열의 길이 또는 구조가 다르더라도 유사한 물리적 특성을 지니는 경우 구조적 차이는 무시할만한 정도가 된다.

[0039] 본 발명에서 유전공학적 기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)) 및 프레드릭 등의 문헌 (Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1, 2, 3, John

Wiley & Sons, Inc. (1994))에 개시되어 있는 내용에 의해 좀더 명확해진다.

[0040] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 방사선 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법 등과 병용하여 사용할 수 있다.

[0041] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0042] 아래 표 1은 AAM-B 단백질의 항원결정부위를 나타내는 것이다. 상기 항 AAM-B 항체는 이들 항원결정부위 중 1종 이상에 대하여 결합하도록 종래에 알려진 항체생성 소프트웨어를 이용하여 이 기술분야의 통상의 기술자가 용이하게 생성할 수 있다.

*표 1*

[0043]

| No. | Start position | End position | Peptide | Peptide length |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 4 | 48 | TIFILRLAIYILTFPLYLLNFLGLWSWICKKWFPYFLVRFTVIYN | 45 |
| 2 | 69 | 80 | SGKLSLLEVGCG | 12 |
| 3 | 86 | 99 | KFYPPGCRVTCIDP | 14 |
| 4 | 104 | 110 | EKFLIKS | 7 |
| 5 | 118 | 126 | QFERFVVAA | 9 |
| 6 | 131 | 151 | HQVADGSVDVVVCTLVLCSVK | 21 |
| 7 | 157 | 169 | LREVCRVLRPGGA | 13 |
| 8 | 172 | 180 | FMEHVAAEC | 9 |
| 9 | 187 | 202 | WQQVLDPAWHLLFDGC | 16 |

## *발명의 효과*

[0044] 본 발명에 따르면, AAM-B는 HCV 증식에 필요하나, HCV 생애주기의 복제단계에서 필요한 것은 아니며, AAM-B는 HCV 생애주기의 조립 및 방출 단계에 결정적인 역할을 수행한다. 또한, AAM-B는 지방소립 형성에 영향을 미치지 않고 HCV 입자 생산에 필요하다. AAM-B는 HCV NS4B 단백질과 상호작용하며, AAM-B는 대부분 지방소립에 존재하고, 지방소립 가까이에 NS4B를 모집한다.

[0045] 따라서, 본 발명에 의하면 AAM-B 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, shRNA (short hairpin RNA) 및 siRNA (short interfering RNA)나 또는 AAM-B 단백질에 대한 항체를 이용하여 AAM-B 발현을 억제하면, HCV 증식이 억제되어 C형 간염 치료제로서 유용할 것으로 기대된다.

## *도면의 간단한 설명*

[0046] 도 1은 HCV 증식에 AAM-B가 필요함을 나타낸다. (A) Huh7.5 세포를 20nM의 혼합 siRNA 또는 AAM-B 특이적 siRNA로 48시간 동안 트랜스펙션시킨 후 Jc1으로 네 시간 동안 감염시켰다. 감염 48시간 후 AAM-B mRNA 수준을 qPCR로 정량하였다. 별표는 음성 대조군과의 현저한 차이를 나타낸다(**, $p<0.01$). (B) (A)에서 분리한 총RNA를 이용하여 세포 내 HCV RNA 농도를 qPCR로 분석하였다. 별표는 음성 대조군과의 현저한 차이를 나타낸다 (**, $p<0.01$). (C) Huh7.5 세포를 지시한 siRNA로 트랜스펙션한 후 세포 생존율을 MTT 분석으로 평가하였다. (D) 감염되지 않은 Huh7.5 세포를 (A)에서 모은 상층액으로 감염시켰다. 감염 48시간 후 세포 내 HCV RNA 농도를 qPCR로 정량하였다. 별표는 음성 대조군과의 현저한 차이를 나타낸다 (**, $p<0.01$). (E) (왼쪽) AAM-B 안정적인 세포를 지시한 siRNA로 48시간 동안 트랜스펙션한 후 Jc1으로 네 시간 감염시켰다. 감염 48시간 후 총 세포 용균액을 모아 지시한 항체로 면역블랏팅하였다. (오른쪽) 바이러스 단백질의 띠 강도는 ImageJ 소프트웨어를 이용하여 정량하였고 음성대조군과의 상대량으로 표현하였다. (F) (왼쪽) 감염되지 않은 Huh7.5 세포를 (E)에서 모은 배양 상층액으로 감염시켰다. 감염 48시간 후 총 세포 용균액을 지시한 항체로 면역블랏팅하였다. (오른쪽) 바이러스 단백질의 띠 강도는 ImageJ 소프트웨어를 이용하여 정량하였고 음성대조군과의 상대량으로

표현하였다.

도 2는 HCV 생애주기의 복제 단계에 AAM-B가 관련이 없음을 나타낸다. 유전자형 1b 유래 HCV 서브게놈 레플리콘이 잠복한 Huh7 세포를 지시한 siRNA로 72시간 동안 트랜스펙션시켰다. AAM-B mRNA 수준 (A) 및 세포 내 HCV RNA 수준 (B)은 모두 qPCR로 정량하였다. HCV 단백질 발현 수준은 지시한 항체를 이용한 면역블랏팅으로 분석하였다(C). 유전자형 2a 유래 HCV 서브게놈 레플리콘이 잠복한 Huh6 세포를 지시한 siRNA로 72시간 동안 트랜스펙션시켰다. AAM-B mRNA 수준 (D) 및 세포 내 HCV RNA 수준 (E)은 qPCR로 정량하였다. 유전자형 2a의 HCV 레플리콘 세포에서 단백질 발현 수준은 지시한 항체를 이용한 면역블랏팅으로 분석하였다(C). 별표는 음성 대조군과의 현저한 차이를 나타낸다(**, $p<0.01$).

도 3은 AAM-B가 바이러스 입자 조합 및 HCV 생애주기의 방출 단계에 관여함을 나타낸다. (A,B) Huh7.5 세포를 인비트로 전사된 Jc1 RNA로 24시간 동안 전기천공한 다음 지시한 siRNA로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 48시간 후, AAM-B mRNA 수준(A) 및 HCV RNA 수준(B)을 qPCR로 정량하였다. (C) 감염되지 않은 Huh7.5 세포를 (A)에서 모은 배양 상층액으로 감염시켰다. 48시간 후 세포 내 HCV RNA 수준을 qPCR로 정량하였다. (D) AAM-B 안정화 세포를 Jc1으로 네 시간 동안 감염시켰다. 48시간 후 세포를 지시한 siRNA로 트랜스펙션시켰다. 그 후 AAM-B mRNA 수준(D) 및 HCV RNA 수준(E)을 qPCR로 정량하였다. (F) 감염되지 않은 Huh7 세포를 (D)에서 모은 배양 상층액으로 감염시켰다. 48시간 후 세포 내 HCV RNA 수준을 qPCR로 정량하였다. 별표는 음성 대조군과의 현저한 차이를 나타낸다(*, $p<0.05$;**, $p<0.01$).

도 4는 AAM-B가 지방소립 형성에 영향을 주지 않고 바이러스 입자 생산에 필요함을 나타낸다. (a) Huh7 세포를 Jc1으로 네 시간 감염시켰다. 48시간 후 세포를 지시한 siRNA로 트랜스펙션시켰다. 24시간 후 배양 배지를 신선한 배지로 교체하고 세포를 지시된 시각까지 더 배양하였다. AAM-B mRNA 수준(a), 세포 내 HCV RNA 수준(b) 및 세포 외 HCV RNA 수준(c)을 qPCR로 정량하였다. (d) 감염되지 않은 Huh7 세포를 (A)에서 모은 배양 상층액으로 네 시간 동안 감염시켰다. 48시간 후 세포 내 HCV RNA 수준을 qPCR로 분석하였다. (e) Huh7 세포를 Jc1으로 네 시간 감염시켰다. 48시간 후 세포를 음성 siRNA 또는 AAM-B 특이적 siRNA로 트랜스펙션시켰다. 지시한 시각에 세포를 모아 PBS로 두 번 씻었다. 세포는 세 번 연달아 동결-해동시켰고, 그런 다음 30분간 마이크로퓨즈에 넣어 원심분리하였다. 상층액은 세포 내 Jc1으로 이용하였다. 감염되지 않은 Huh7 세포는 상층액으로 네 시간 동안 감염시켰다. 48시간 후 세포 내 HCV 감염도를 qPCR로 측정하였다. 별표는 음성 대조군과의 현저한 차이를 나타낸다(*, $p<0.05$;**, $p<0.01$). (f) Huh7 세포를 네 시간 동안 Jc1으로 감염시켰다. 48시간 후 세포를 지시한 siRNA로 트랜스펙션시켰다. 세포를 고정시키고 BODIPY와 함께 한 시간 동안 실온에서 배양하였다. 세포를 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)로 역염색하여 핵을 표지하였다. 시료는 LSM 700 레이저 공촛점 현미경 시스템을 이용하여 면역형광염색을 분석하였다.

도 5는 AAM-B가 HCV NS4B 단백질과 상호작용함을 나타낸다. (a) HEK293T 세포를 V5-표지된 AAM-B 플라스미드와 Myc-표지된 HCV 단백질로 코트랜스펙션시켰다. 투입한 플라스미드의 단백질 발현은 항-Myc 항체(왼쪽 위) 또는 항-V5 항체(왼쪽 아래)를 이용한 면역블랏 분석으로 확인하였다. (오른쪽) 총 세포 용균액은 항-Myc 항체로 면역침전시킨 후 결합된 단백질은 항-V5 항체로 면역블랏팅하였다. (b) (왼쪽) HEK293T 세포를 V5-표지된 AAM-B 플라스미드 및 Myc-표지된 NS4B (유전자형 1b) 발현 플라스미드로 코트랜스펙션시켰다. 48시간 후, 총 세포 용균액을 항-V5 항체로 면역침전시킨 후 결합된 단백질은 항-Myc 항체로 면역블랏팅하였다. (오른쪽) 동일한 세포 용균액을 항-Myc 항체로 면역침전한 후 결합된 단백질을 항-V5 항체로 면역블랏팅하였다. (c) (위쪽) NS4B 야생형 단백질 및 돌연변이형의 개요도. (아래쪽) HEK293T 세포를 V5-표지된 AAM-B 및 Myc-표지된 NS4B 돌연변이 구조물로 코트랜스펙션시켰다. 총 세포 용균액을 48시간 후 모아 항-Myc 항체로 면역침전시킨 다음 결합된 단백질은 항-V5 항체로 면역블랏팅하였다. NS4B 야생형 및 돌연변이 단백질 발현은 항-Myc 항체를 이용한 면역침전 및 면역블랏 분석으로 확인하였다 (화살표). (d) AAM-B 안정화 세포는 일시적으로 벡터 또는 NS4B 발현 플라스미드로 트랜스펙션시켰다. 48시간 후, 세포를 4% 파라포름알데하이드로 고정시켰다. 세포를 PBS로 두 번 세척한 다음 항-NS4B 또는 항-AAM-B 항체와 함께 한 시간 동안 상온에서 배양하였다. 면역형광염색은 FITC-결합된 2차 항체 또는 TRICT-결합된 2차 항체를 이용하여 수행하였다. 삽입그림은 흰 네모로 표시된 부분을 확대한 것이다.

도 6은 AAM-B가 NS4B와 함께 지방소립 가까이에 위치함을 보여준다. (A) AAM-B 안정화 세포를 4% 파라포름알데하이드로 고정한 후 항-V5 항체와 함께 배양하여 AAM-B와 BODIPY를 탐지하였다. AAM-B는 세포질에서 지방소립과 같은 위치에 있었다. (B) 벡터 안정화 세포 또는 AAM-B 안정화 세포를 NS4B 플라스미드로 일시적으로 트랜스펙션시켰다. 48시간 후 세포를 4% 파라포름알데하이드로 고정하고 항-NS4B 항체 및 BODIPY와 함께 한 시간 동안 상온에서 배양하였다. LSM 700 레이저 공초점 현미경 시스템을 이용하여 시료를 면역형광염색 분석하였다. 핵

을 염색하기 위해 세포를 DAPI로 역염색하였다. 삽입그림은 흰 네모로 표시된 부분을 확대한 것이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0047] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0048] **플라스미드 구축**

[0049] RiboEx (GeneAll)를 이용하여 Huh7.5 세포에서 총 RNA를 분리하였다. cDNA 합성 킷트(Toyobo)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 cDNA를 합성하였다. 전장 AAM-B는 프라이머 셋트: (센스, 5'-ATGAATTCTATGGAGCTTACCATCTTT-3'; 안티센스, 5'-TCTCTAGACTTTTCACAGCATATCCATAG-3'; 각각 서열번호 1과 2)를 이용하여 증폭하였다. PCR 산물은 플라스미드 pEF6/V5-HisB (Invitrogen)의 *Eco*RI 및 *Xba*I 부위 내로 삽입되었다. Myc-표지된 NS4B 플라스미드는 종래기술과 같이 제조하였다[20]. NS4B 결손 돌연변이는 다음의 프라이머 셋트를 이용하여 구축하였다: (센스, 5'-ATGGATCCACCATGGCCTCACAACTTCCTTACATC-3'; 안티센스, 5'- ATGAATTCCACAGTATTGCTGCGCACACGACC-3' for M1 deletion mutant of NS4B; 각각 서열번호 3과 4); (센스, 5'-ATGGATCCACCATGCCCGCGATAGCATCATTGATG-3'; 안티센스, 5'- ATGAATTCCAGCATGGCGTAGAGCAGTCCTC-3' for M2 deletion mutant of NS4B; 각각 서열번호 5와 6). PCR 산물은 플라스미드 pEF6/Myc-His B의 *Bam*HI과 *Eco*RI 부위 내로 삽입되었다 . Myc-표지된 코어, NS3, NS5A 및 NS5B는 종래 기술에 기재된 바와 같다[21].

[0050] **세포 배양**

[0051] 모든 세포주는 10% 우태혈청과 1% 페니실린-스트렙토마이신을 함유한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 5% $CO_2$ 환경으로 37℃로 배양하였다. Huh7.5 세포는 10% 우태혈청, 1% 비필수 아미노산 및 1% 페니실린-스트렙토마이신이 함유된 DMEM에서 배양하였다.

[0052] HCV 서브게놈 레플리콘 세포는 10% 우태혈청, 1% 페니실린-스트렙토마이신 및 500㎍/㎖ G418이 함유된 DMEM에서 배양하였다.

[0053] **항체**

[0054] 항-c-Myc 항체와 항-β-액틴 항체는 Santa Cruz에서, 항-V5 항체는 Invitrogen에서, 항-HCV NS3 항체 및 항-HCV NS5A 항체는 논문[22]에 기재된 바와 같이 입수하였다.

[0055] **AAM-B 안정화 세포 제조**

[0056] V5-AAM-B를 안정적으로 발현하는 세포주를 확립하기 위해, Huh7 세포를 pEF6-V5-AAM-B 발현 플라스미드로 트랜스펙션하고 3주간 5㎍/㎖ 블라스티시딘(blasticidine) (Invitrogen)과 함께 배양하였다. 항-V5 모노클론 항체를 이용한 면역블랏 분석으로 단일 양성 콜로니를 선택하였다. 빈 벡터(pEF6B-V5 only)로 트랜스펙션한 Huh7 세포를 선택하여 대조군으로 이용하였다.

[0057] **HCVcc 제조**

[0058] HCVcc(Cell culture-derived HCV)를 종래 기술과 같이 제조하였다[23].

[0059] **MTT 분석**

[0060] siRNA로 트랜스펙션한 Huh7.5 세포를 MTT{3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide} (Sigma)로 37℃에서 두 시간 처리하였다. 세포생존율은 종래 기술과 같이 결정하였다[22].

[0061] **RNA 간섭**

[0062] AAM-B를 표적으로 하는 siRNA(5'-UGA UAU ACA ACG AAC AGA U-3'; 서열번호 7)를 Bioneer(Korea)에서 구입하였다. 범용 음성대조군 siRNA도 Bioneer에서 구입하였다. siRNA 트랜스펙션은 Lipofectamine RNAiMax 제제(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 제조자의 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0063] **면역블랏 분석**

[0064] 세포를 PBS(phosphate-buffered saline)로 두 번 세척하고 RIPA 완충액(50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1% NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM Na3VO4 및 1 mM PMSF) 내에서 15분간 얼음 위에서 용균하고, 12,000rpm으로 5분간 4℃로 원심분리하였다. 상층액에서 모은 동량의 단백질을 SDS-PAGE하고 나이트로셀룰로스 막에 전기이동시켰다. 막은 5% 탈지분유를 함유한 TBS/Tween (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20)에 한 시간 동안 넣어 블로킹하고 지시된 항체와 함께 배양하였다. 단백질은 ECL 킷트(Abfrontier)를 이용하여 측정하였다.

[0065] **정량적 실시간 PCR 분석**

[0066] RiboEX 제제 (GeneAll)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 세포로부터 총 RNA를 분리하였다. cDNAs 합성 킷트(Toyobo)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 cDNA를 합성하였다. 정량적 실시간 PCR은 다음의 프라이머를 이용하여 수행하였다: (센스) 5'-TTA GTA TGA GAG TCG TAC AGC CTC CAG-3' (서열번호 8) 및 (안티센스) 5'-GGC ATA GAG TGG GTT TAT CCA AGA AAG G-3' (서열번호 9) for HCV; (센스) 5'-TGA CAG CAG TCG GTT GGA GCG-3' (서열번호 10) 및 (안티센스) 5'-GAC TTC CTG TAA CAA CGC ATC TCA TA-3' (서열번호 11) for β-actin; (센스) 5'-CAC TTA AAT CAC TCC AAA GAA GAC- 3' (서열번호 12) 및 (안티센스) 5'-AAA TCT GAG CTG TTT AGA CTC A-3' (서열번호 13) for AAM-B. qPCR 실험은 CFX Connect realtime system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)을 이용하여 다음의 조건 하에서 수행하였다: 95℃로 15분, 그런 다음 95℃로 20초, 55℃로 20초 및 73℃로 20초를 40 싸이클. 60℃에서 95℃까지 10초마다 0.5℃씩 올리면서 녹는 점 커브를 그렸다.

[0067] **면역형광분석**

[0068] 글라스 슬라이드 상에 배양한 Huh7.5 세포는 4% 파라포름알데하이드로 30분간 상온에서 고정하였다. PBS로 두 번 세척한 다음, 고정한 세포는 0.1% Triton X-100이 함유된 PBS로 10분간 처리하여 침투가 용이하도록 하고 0.5% 소 혈청 알부민으로 한 시간 처리하여 블로킹시켰다. 세포를 일차 항체와 함께 4℃로 밤새 배양하였다. PBS로 세 번 세척한 후, 세포를 TRITC(tetramethylrhodamine isothiocyanate)-결합된 당나귀 항-토끼 IgG 또는 FITC(fluorescein isothiocyanate)-결합된 염소 항-마우스 IgG 및 1μM의 BODIPY(Invitrogen)으로 상온에서 한 시간 동안 처리하였다. 세포는 핵을 표지하기 위해 DAPI(4′,6-diamidino-2-phenylindole)로 역염색하였다. PBS로 두 번 세척한 후, Zeiss LSM 700 레이저 공초점 현미경 시스템(Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY)으로 세포를 분석하였다.

[0069] **면역침전분석**

[0070] HEK293T 세포를 V5-표지된 AAM-B와 Myc-표지된 코어, NS3, NS4B, NS5A 및 NS5B 각각으로 코트랜스펙션시켰다. DNA 총량은 빈 벡터를 가하여 조정하였다. 트랜스펙션 48시간 후, 세포를 모아 면역침전분석을 종래기술과 같이 수행하였다[22].

[0071] **통계 분석**

[0072] 데이타는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 통계 분석을 위해 Student's *t* test를 이용하였다. 별표는 유의한 차이가 있음을 나타낸다 (*, $P<0.05$; **, $P<0.01$).

[0073] **결과 1: AAM-B는 HCV 증식에 필요하다.**

[0074] 숙주세포 지방대사는 HCV 복제에 필수적이다. HCV 증식에 중요한 역할을 수행하는 지방대사 및 지방소립 형성에 관여하는 새로운 유전자를 확인하기 위해 본 발명자들은 HCVcc-감염 세포에서 siRNA 라이브러리 스크리닝을 수행한바 있다[24]. 숙주 유전자 10개의 후보 중 AAM-B를 선택하고 HCV 증식에서 그 기능적 관련을 연구하였다. 먼저 RNA 수준에서 siRNA-매개 AAM-B 녹다운 효율을 확인하였다(도 1A). AAM-B 발현 침묵화는 세포 내 HCV RNA를 현저히 감소시켰다 (도 1B). AAM-B 녹다운은 세포생존율에 아무런 영향을 미치지 않아서(Fig. 1C), siRNA 녹다운에 의한 HCV 복제의 손상은 세포 독성에 의해 일어나지 않았음을 말해준다. HCV 감염성에 대한 AAM-B 녹다운 효과를 살펴보기 위해, 감염되지 않은 Huh7.5 세포를 일차 HCV 감염세포에서 모은 배양 상층액으로 감염시켰다. 도 1D와 같이 세포 내 HCV RNA 수준은 현저히 감소하였고, 이는 HCV 감염성 또한 AAM-B 녹다운에 의해 강하게 손상되었음을 말해준다. 비록 AAM-B mRNA 수준을 qPCR로 정량하였지만, 항-AAM-B 항체의 몇몇 기원을 이용하여 내생 AAM-B 단백질을 탐지할 수 없었다. HCV 증식에서 AAM-B의 역할을 명확히 밝히기 위해 본 발명자들은 AAM-B 안정화 세포를 구축하고 HCV 단백질 수준에 대한 AAM-B 녹다운 효과를 시험하였다. AAM-B를 안정적으로 발현하는 Huh7 세포를 지시한 siRNA로 트랜스펙션시킨 후 Jc1으로 감염시켰다. 도 1E와 같이, HCV 단백질 발현 또한 AAM-B 녹다운에 의해 손상되었다. 감염되지 않은 Huh 7.5 세포를 E에서 얻은 배양 상층액으로 감염시키자 HCV 단백질 발현은 극적으로 감소하였고, 이는 HCV 감염성이 AAM-B 녹다운에 의해 손상됨을 다시 확인해주었다(도 1F). 이러한 결과는 AAM-B가 HCV 증식에 필요한 중요한 세포 인자일 가능성을 말해준다.

[0075] **결과 2: AAM-B는 HCV 생애주기의 복제단계에서 필요하지 않다.**

[0076] HCV 생애주기의 어느 단계에서 AAM-B를 필요로 하는지를 시험하기 위해 레플리콘 시스템을 이용하여 HCV 복제단계에서 AAM-B의 관련성을 시험하였다. AAM-B가 충분히 녹다운되었을 때(도 2A), 유전자형 1b 유래 서브게놈 레플리콘 세포에서 세포 내 HCV RNA 농도(도 2B)도 HCV 단백질 발현 수준(도 2C)도 변하지 않았다. 본 발명자들은 유전자형 2a를 품은 서브게놈 레플리콘 세포에서 AAM-B 녹다운(도 2D)이 HCV RNA(도 2E)와 HCV 단백질 발현(도 2F)수준에 아무런 영향이 없음을 확인하였다. 이러한 데이타는 HCV 생애주기의 복제단계에 AAM-B가 관여하지 않음을 나타낸다.

[0077] **결과 3: AAM-B는 HCV 생애주기의 조립 및 방출 단계에 관여한다.**

[0078] HCV 증식에서 AAM-B의 역할을 좀더 밝히기 위하여 Huh7.5 세포를 인비트로 전사된 Jc1 RNA로 전기천공하였다. RNA 전기천공 24시간 후 세포를 음성 siRNA 또는 AAM-B-특이적 siRNA로 트랜스펙션시켰다. 비록 siRNA 처리에 의한 녹다운으로 AAM-B mRNA 수준이 현저히 감소하였으나(도 3A), 세포 내 HCV RNA 수준은 AAM-B 녹다운으로 변하지 않았다(도 3B). 그러나, AAM-B 녹다운은 세포 외 HCV RNA 수준의 현저한 감소를 일으켰다(도 3B). 이 결과를 확인하기 위하여 감염되지 않은 Huh7.5 세포를 도 3A에서 모은 배양 상층액으로 감염시켰다. 도 3C와 같이, 세포 내 HCV RNA 수준은 현저히 감소하여 AAM-B 녹다운 세포에서 바이러스입자(virion) 방출이 손상되었음을 말해준다. 이 결과를 좀 더 증명하기 위해, AAM-B 안정화 세포를 이용하여 HCV 증식에 대한 AAM-B 녹다운 효과를 조사하였다. AAM-B 안정화 세포는 Jc1으로 감염시킨 다음 음성 siRNA 또는 AAM-B-특이적 siRNA로 트랜스펙션시켰다. 유사하게, AAM-B 녹다운 세포에서 세포 내 HCV RNA 수준은 변화가 없는 반면, 세포 외 HCV RNA 수준 및 HCV 감염성은 현저히 감소하였다(도 3D-F). 이러한 데이타는 AAM-B가 HCV 생애주기의 조립 및 방출 단계에 관여하며, 그리하여 HCV 증식에 결정적인 역할을 수행함을 제시한다.

[0079] **결과 4: AAM-B는 지방소립 형성에 영향을 미치지 않고 HCV 입자 생산에 필요하다.**

[0080] AAM-B가 HCV 입자 생산에 관여하는지를 좀 더 확인하기 위하여 Huh7 세포를 Jc1으로 감염시킨 후 음성 siRNA 또는 AAM-B-특이적 siRNA로 트랜스펙션시켰다. 24시간 후 배양배지를 신선한 배지로 갈고 지시한 시각에 세포와 배양 상층액을 모두 모았다. 도 4a는 siRNA 매개 AAM-B 녹다운이 AAM-B mRNA 수준을 충분히 억제함을 보여준다. 그럼에도 불구하고, AAM-B 녹다운 세포에서 세포 내 HCV RNA 수준은 변하지 않았다(도 4b). 반면, 세포 외 HCV RNA 수준은 AAM-B 녹다운 48시간 후 현저히 감소하였다(도 4c). HCV 감염성이 AAM-B 녹다운에 의해 영향을 받는지를 알아보기 위하여 감염되지 않은 Huh7 세포를 도 4a에서 모은 배양 상층액으로 감염시킨 후 세포 내 HCV RNA 수준을 qPCR로 측정하였다. 도 4d와 같이, 방출된 HCV 입자의 감염성은 AAM-B 녹다운 세포에서 지시된 시각

에 현저히 감소하였다. HCV 세포 내 감염성을 확인하기 위해, 방출된 HCV 입자로 접종한 세포를 반복하여 동결-해동시킨 후 상층액은 감염되지 않은 Huh7 세포를 감염시키는데 사용하였다. 도 4e와 같이, 세포 내 HCV 감염성은 AAM-B 녹다운 세포에서 현저히 감소하였다. 이러한 데이타는 AAM-B가 감염성 HCV 입자 생산에 필요함을 말해준다. 지방소립이 HCV 생산에 중요한 소기관이기 때문에[11], 본 발명자들은 지방소립 형성에 AAM-B가 관여하는지를 연구하였다. 도 4f와 같이, AAM-B 녹다운은 지방소립 형성을 변화시키지 않았고, 이는 AAM-B가 지방소립 형성에 영향을 주지 않으면서 HCV 증식을 조절함을 말해준다.

[0081] **결과 5: AAM-B는 HCV NS4B 단백질과 상호작용한다.**

[0082] HCV 증식에서 AAM-B의 기능적 연관성이 바이러스-숙주 단백질 상호작용을 통해 매개되는 것인지를 밝히기 위하여 V5-표지된 AAM-B 플라스미드와 다양한 Myc-표지된 HCV 단백질 발현 플라스미드로 HEK293T 세포를 코트랜스펙션시켰다. 48시간 후, 총 세포 단백질을 항-Myc 항체로 면역침진시킨 후 결합된 단백질은 항-V5 항체로 면역블랏팅하였다. 도 5a와 같이, AAM-B는 HCV NS4B 단백질과만 상호작용하였다. 이 결과를 확인하기 위하여, Myc-표지된 NS4B 플라스미드와 V5-표지된 AAM-B 플라스미드로 코트랜스펙션한 HEK293T 세포를 항-V5 항체로 면역침진시키고, 결합된 단백질은 항-Myc 항체로 면역블랏팅하였다. 도 5b와 같이, AAM-B는 NS4B와 특이적으로 상호작용하였다(왼쪽 패널). 역실험(Reciprocal experiment)을 수행하여 AAM-B와 NS4B 간의 단백질 상호작용을 입증하였다(도 5b, 오른쪽 패널). NS4B에서 AAM-B와 결합하는 부위를 정확히 알아내기 위하여 NS4B 결손 돌연변이를 구축하였다(도 5c, 위쪽 패널). HEK293T 세포는 AAM-B와 다양한 NS4B 결손 구축물로 코트랜스펙션시켰고, 결합 도메인은 면역침전 분석으로 결정하였다. 도 5c(아래쪽 패널)와 같이, AAM-B는 NS4B 단백질의 C-말단 부분과 상호작용하였다. 인비트로 및 인비보 단백질-단백질 상호작용 데이타 모두 AAM-B가 NS4B와 같은 위치에 있음을 제시하였다. 이러한 가능성을 밝히기 위하여 AAM-B 안정화 세포를 벡터 또는 NS4B 발현 플라스미드로 일시적으로 트랜스펙션시키고 세포 내 위치를 공초점 현미경으로 시험하였다. 도 5d와 같이, NS4B와 AAM-B 모두 세포질 내에 존재하였고, 이중 염색 결과 황색 형광이 두 단백질이 같은 위치에 있음을 보여주었다.

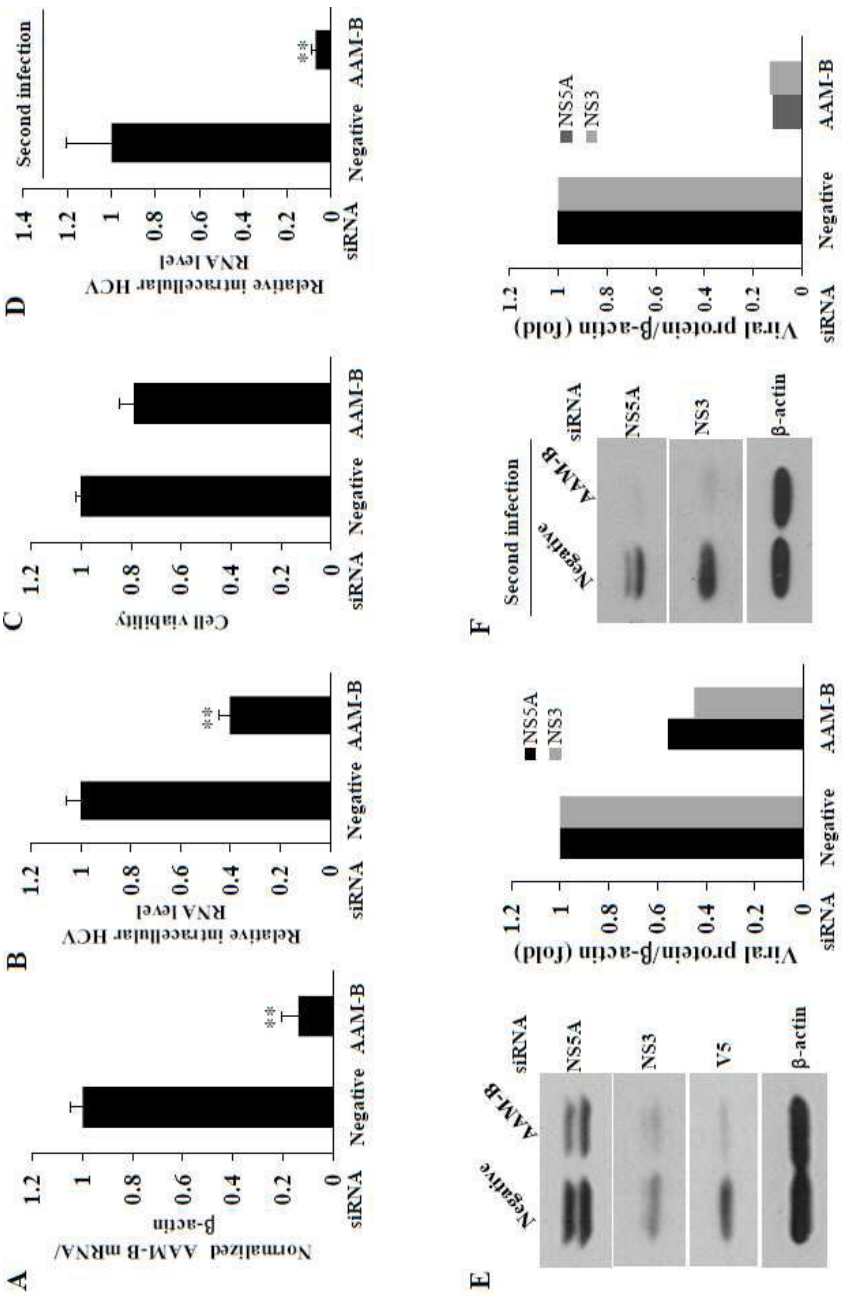
[0083] 맨더의 중복 계수(Manders' overlap coefficient) (0.834±0.113)로 NS4B와 AAM-B 단백질이 같은 위치에 있음을 다시 확인할 수 있었다.

[0084] **결과 6: AAM-B는 대부분 지방소립에 존재하고, 지방소립 가까이에 NS4B를 모집한다.**

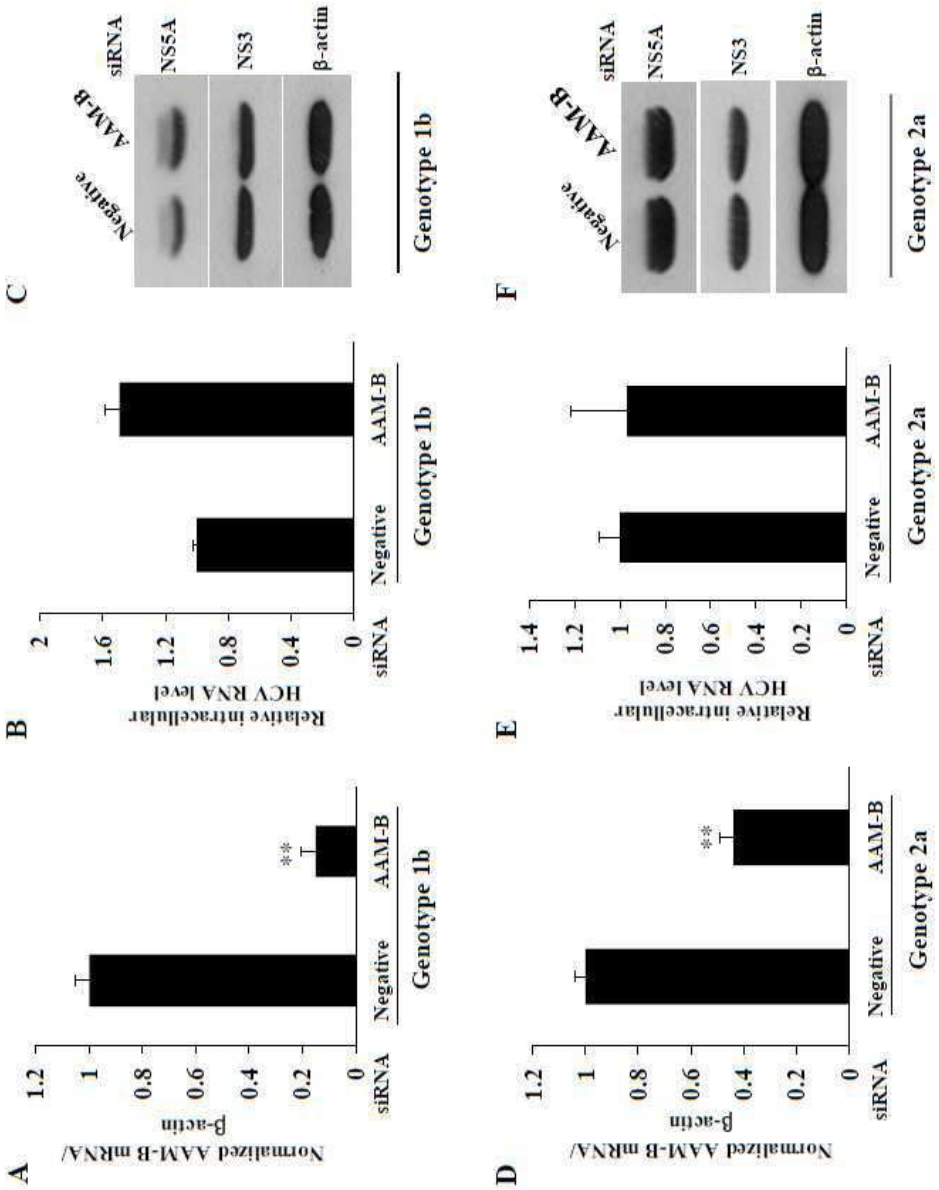
[0085] 지방소립은 HCV 입자 생성에 필수적인 소기관이다[10]. 지방소립 표면에 존재하는 코트 단백질은 HCV 입자 조립에 관여한다고 보고되었다[13-16]. 프로테옴 분석에 의하면, AAM-B는 차이니즈 햄스터 난소 K2 세포에서 지방소립-관련 단백질로 확인되었다[17]. AAM-B는 소포체 막에 삽입되어 있고, 삽입된 부위로부터 지방소립으로 이동하는 것으로 나타났다[18]. 뿐만 아니라, AAM-B는 다른 단백질들을 지방소립으로 끌어들이고 모집할 수 있다[19]. 이러한 이유로 본 발명자들은 AAM-B와 지방소립이 같은 곳에 있는지를 시험하였다. 실제로, AAM-B는 세포질 내에서 지방소립과 같은 위치에 있었다(도 6A). 지방소립이 AAM-B로 둘러싸여 있음은 주목할 만하다. AAM-B가 NS4B와 상호작용하기 때문에, 본 발명자들은 NS4B가 지방소립과 같은 위치에 있는지를 연구하였다. 이를 위해 벡터 안정화 세포 또는 AAM-B 안정화 세포를 NS4B 발현 플라스미드로 일시적으로 트랜스펙션시킨 다음 면역형광분석으로 어디에 위치하는지를 살펴보았다. 도 6B와 같이, NS4B는 벡터 안정화 세포 및 AAM-B 안정화 세포 모두에서 지방소립과 같은 위치에 있지 않았다. 그러나, NS4B는 AAM-B 안정화 세포에서 지방소립 가까이에 있었고, 벡터 안정화 세포에서는 그렇지 않았다. 이는 AAM-B가 NS4B를 지방소립 가까운 곳으로 모집하여 HCV 증식을 용이하게 하는 것으로 보인다.

도면

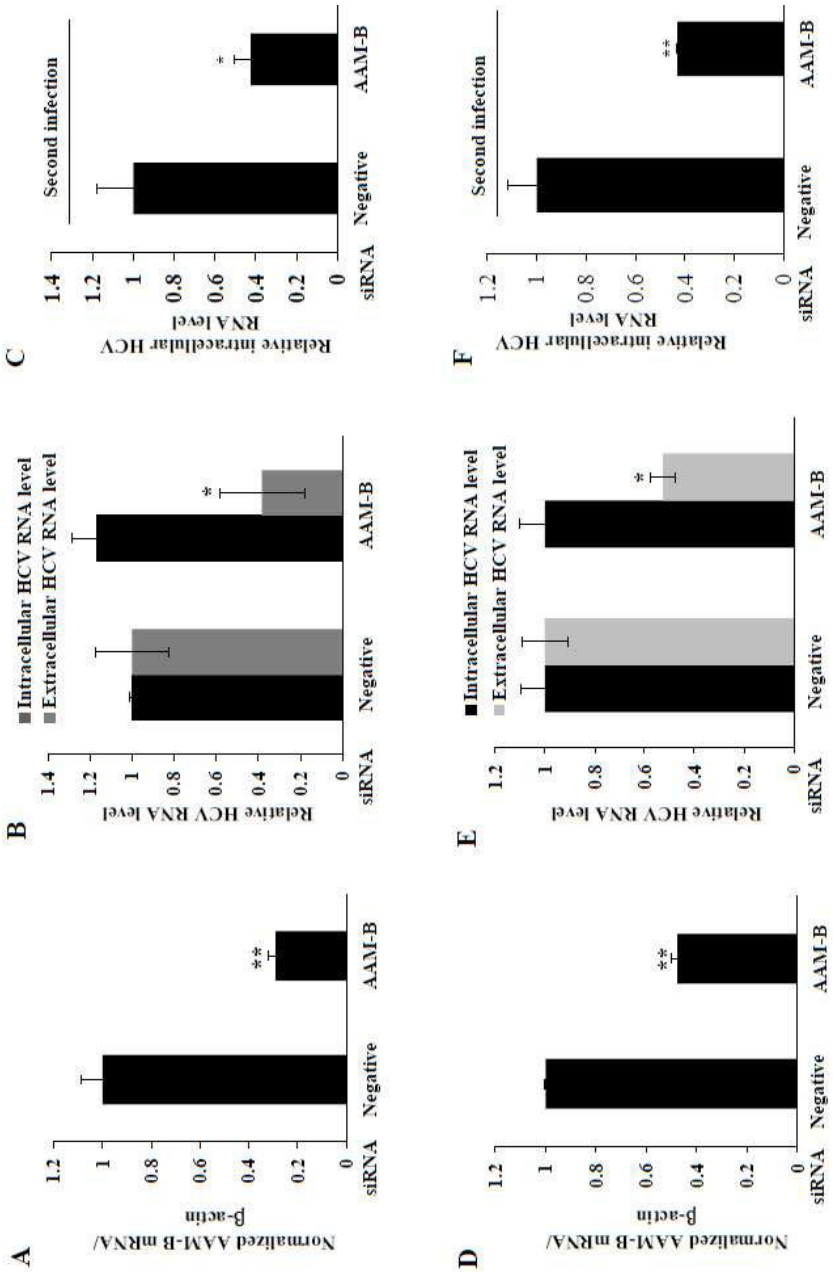
도면1


A
Normalized AAM-B mRNA/ β-actin
siRNA
Negative
AAM-B
B
Relative intracellular HCV RNA level
C
Cell viability
D
Second infection
Relative intracellular HCV RNA level
E
siRNA
Negative
AAM-B
NS5A
NS3
V5
β-actin
F
Second infection
Viral protein/β-actin (fold)
NS5A
NS3

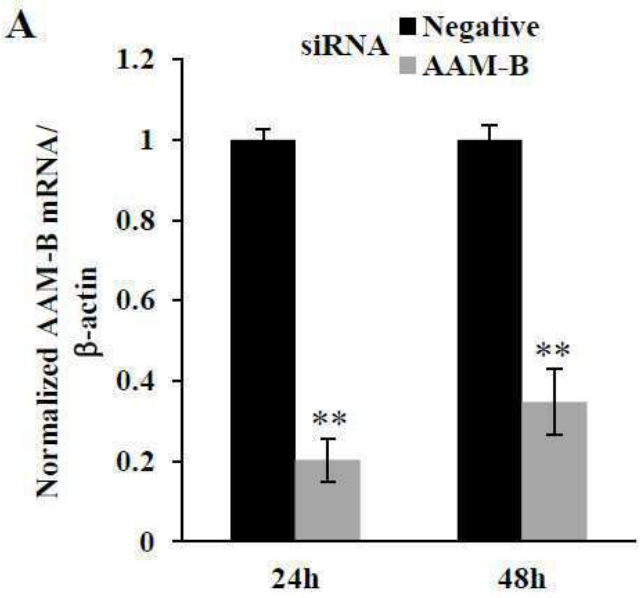
도면2


A
Normalized AAM-B mRNA/ β-actin
siRNA
Negative
AAM-B
Genotype 1b
B
Relative intracellular HCV RNA level
siRNA
Negative
AAM-B
Genotype 1b
C
siRNA
NS5A
NS3
β-actin
Negative
AAM-B
Genotype 1b
D
Normalized AAM-B mRNA/ β-actin
siRNA
Negative
AAM-B
Genotype 2a
E
Relative intracellular HCV RNA level
siRNA
Negative
AAM-B
Genotype 2a
F
siRNA
NS5A
NS3
β-actin
Negative
AAM-B
Genotype 2a

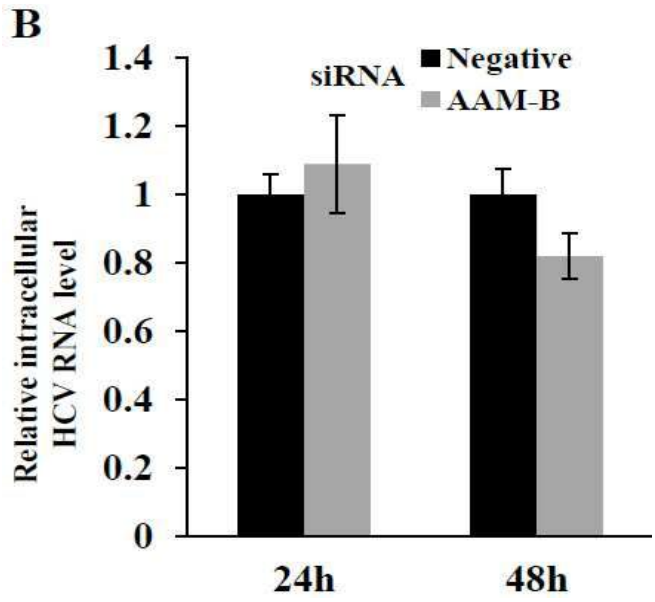
도면3


A
Normalized AAM-B mRNA/ β-actin
siRNA
Negative
AAM-B
B
Intracellular HCV RNA level
Extracellular HCV RNA level
Relative HCV RNA level
C
Second infection
Relative intracellular HCV RNA level
D
E
F

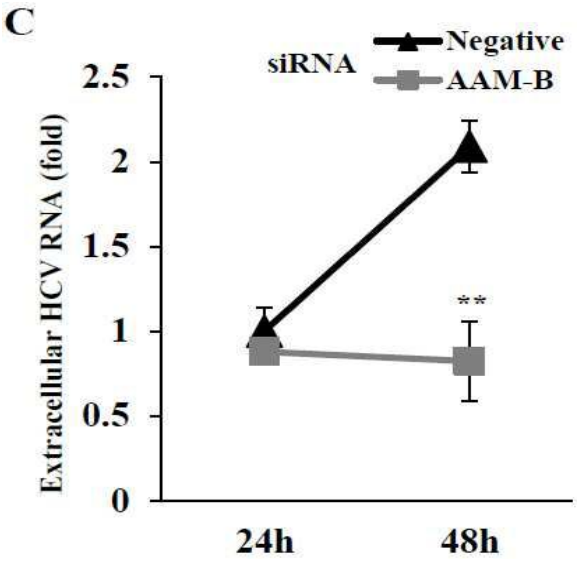
도면4a


A
siRNA
Negative
AAM-B
Normalized AAM-B mRNA/ β-actin
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
**
**
24h
48h

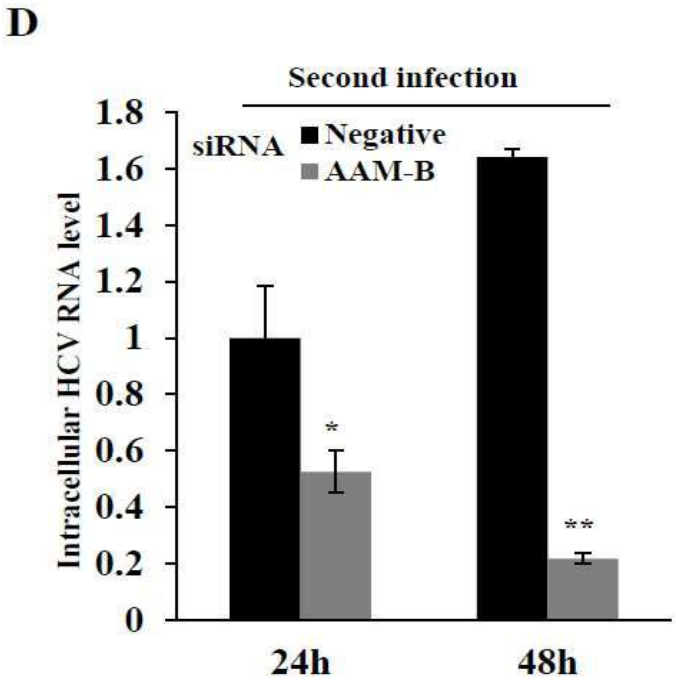
도면4b


B
siRNA
Negative
AAM-B
Relative intracellular HCV RNA level
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
24h
48h

도면4c

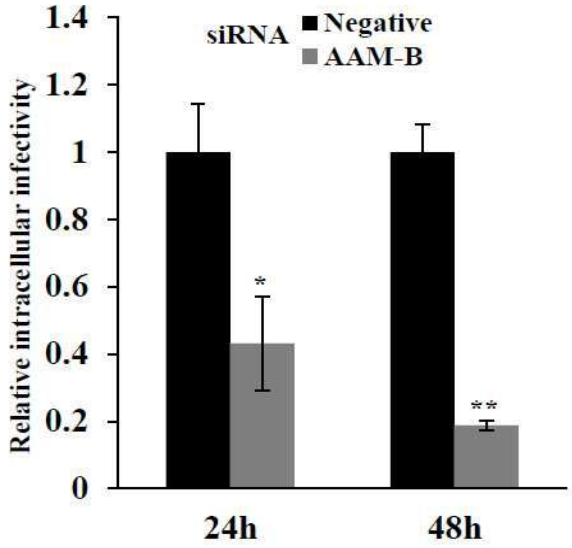

C
siRNA
Negative
AAM-B
Extracellular HCV RNA (fold)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
**
24h
48h

도면4d

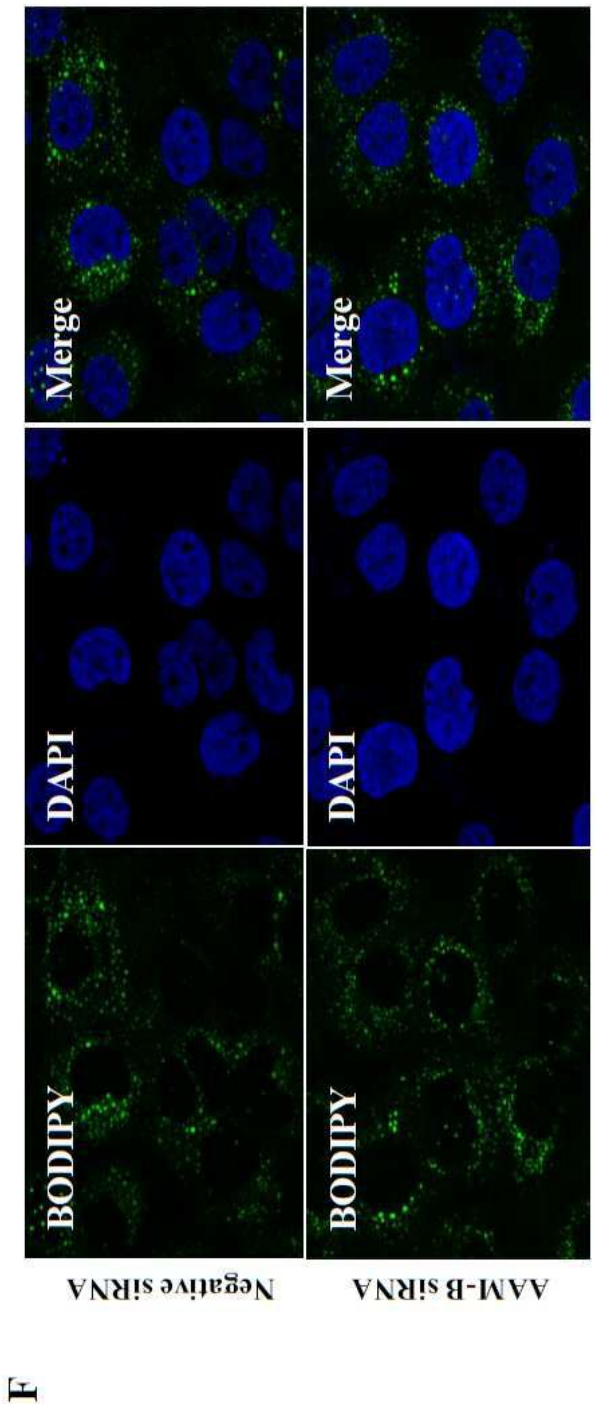

D
Second infection
siRNA
Negative
AAM-B
Intracellular HCV RNA level
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
**
24h
48h

도면4e

E

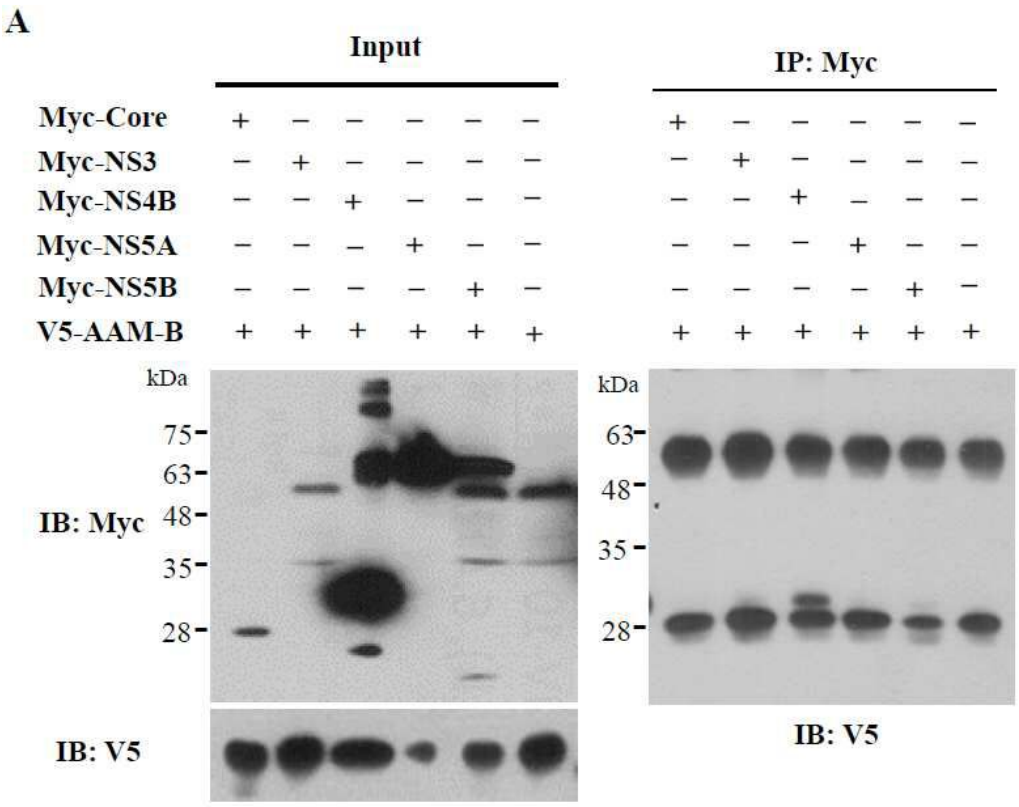

1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Relative intracellular infectivity
siRNA
Negative
AAM-B
*
**
24h
48h

도면4f

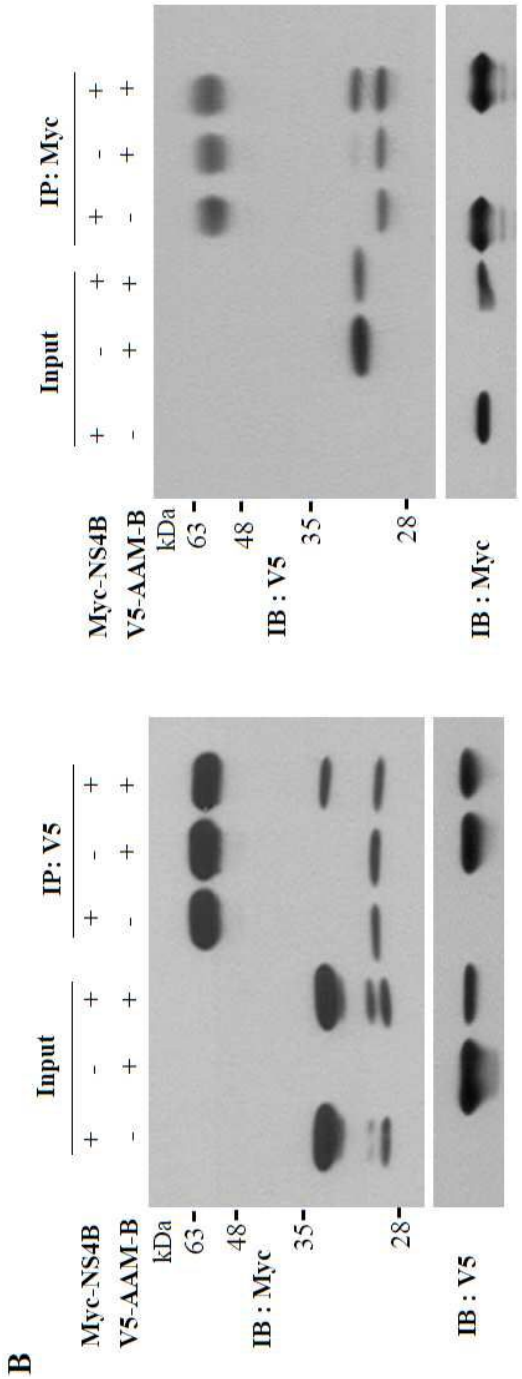

Merge
Merge
DAPI
DAPI
BODIPY
BODIPY
Negative siRNA
AAM1-B siRNA

F

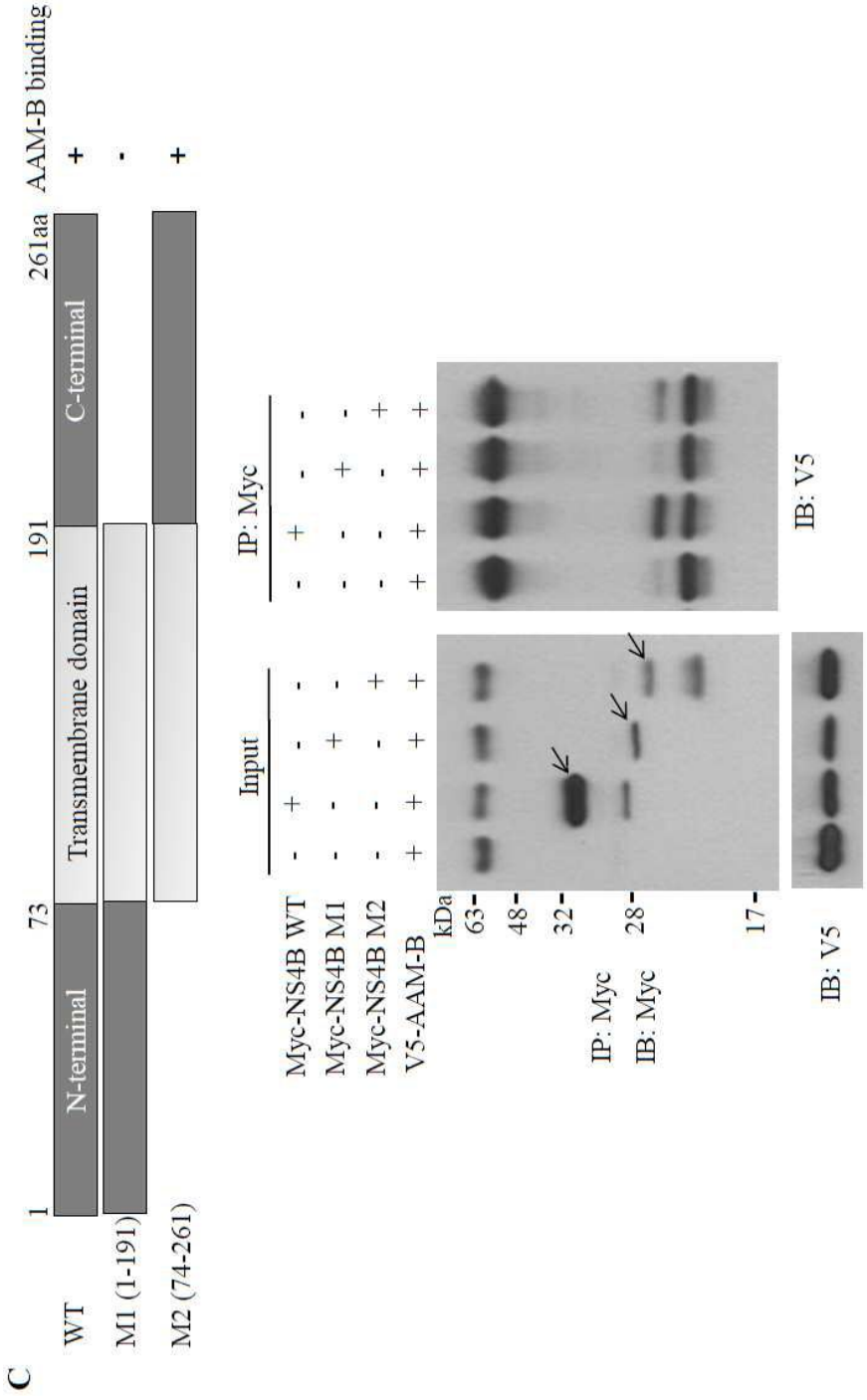
도면5a


A
Input
IP: Myc
Myc-Core
Myc-NS3
Myc-NS4B
Myc-NS5A
Myc-NS5B
V5-AAM-B
kDa
75
63
48
35
28
IB: Myc
IB: V5
kDa
63
48
35
28
IB: V5

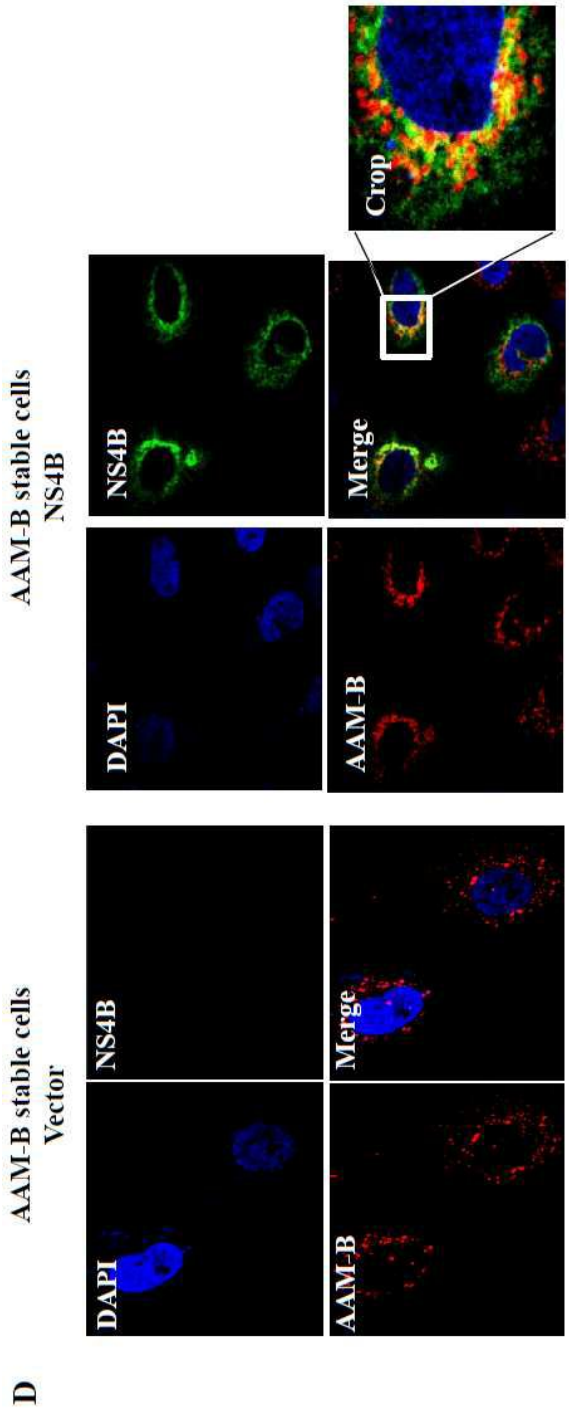
도면5b


B
Input
IP: V5
Myc-NS4B
V5-AAM-B
kDa
63
48
35
28
IB : Myc
IB : V5
Input
IP: Myc
Myc-NS4B
V5-AAM-B
kDa
63
48
35
28
IB : V5
IB : Myc

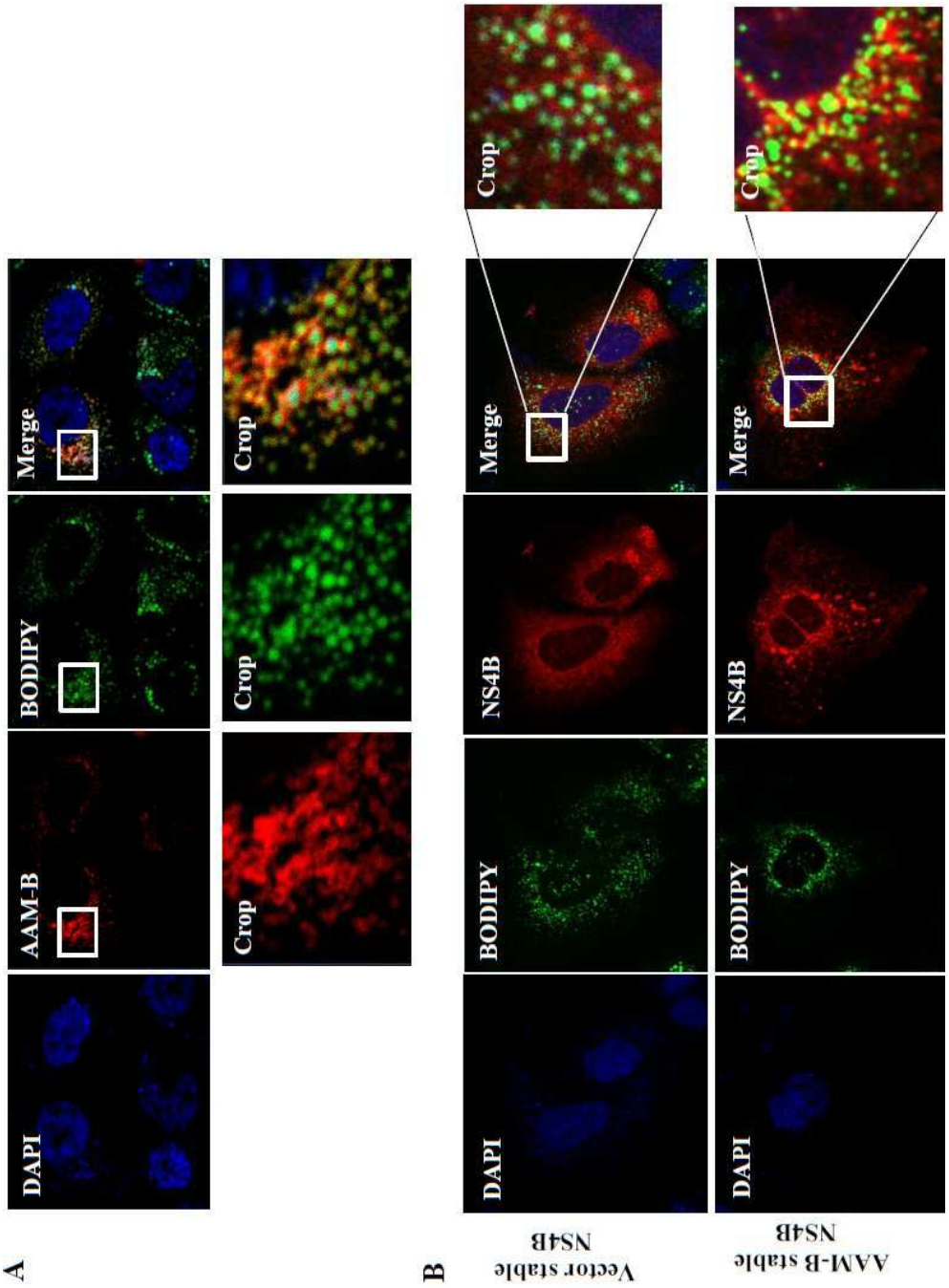
도면5c


C
1
73
191
261aa
AAM-B binding
WT
N-terminal
Transmembrane domain
C-terminal
+
M1 (1-191)
-
M2 (74-261)
+
Input
IP: Myc
Myc-NS4B WT
Myc-NS4B M1
Myc-NS4B M2
V5-AAM-B
kDa
63
48
32
28
17
IP: Myc
IB: Myc
IB: V5
IB: V5

도면5d


D
AAM-B stable cells
Vector
DAPI
NS4B
Merge
AAM-B
AAM-B stable cells
NS4B
DAPI
NS4B
Merge
AAM-B
Crop

도면6




서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Pharmaceutical composition for prevention and treatment for Hepatitis C containing AAM-B expression or activity inhibitor

<130> HallymU-SBHwang-AAMB

<160> 17

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer for AAM-B

<400> 1

atgaattcta tggagcttac catcttt 27

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer for AAM-B

<400> 2

tctctagact tttcacagca tatccatag 29

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer for M1 deletion mutant of NS4B

<400> 3

atggatccac catggcctca caacttcctt acatc 35

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer for M1 deletion mutant of NS4B

<400> 4

atgaattcca cagtattgct gcgcacacga cc 32

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer for M2 deletion mutant of NS4B

<400> 5

atggatccac catgcccgcg atagcatcat tgatg 35

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer for M2 deletion mutant of NS4B

<400> 6

atgaattcca gcatggcgta gagcagtcct c 31

<210> 7

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA targetting AAM-B

<400> 7

ugauauacaa cgaacagau 19

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer for HCV

<400> 8

ttagtatgag agtcgtacag cctccag 27

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer for HCV

<400> 9

ggcatagagt gggtttatcc aagaaagg 28

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer for b-actin

<400> 10

tgacagcagt cggttggagc g 21

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer for b-actin

<400> 11

gacttcctgt aacaacgcat ctcata 26

<

210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer for AAM-B

<400> 12

cacttaaatc actccaaaga agac 24

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer for AAM-B

<400> 13

aaatctgagc tgtttagact ca 22

<210> 14

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA targeting AAM-B

<400> 14

gguuaagagc agagguuua 19

<210> 15

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA targeting AAM-B

<400> 15

cagucgacuu ucauaauua 19

<210> 16

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA targeting AAM-B

<400> 16

agugugagcu ggcaguuaa 19

<210> 17

<211> 244

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Glu Leu Thr Ile Phe Ile Leu Arg Leu Ala Ile Tyr Ile Leu Thr
1 5 10 15

Phe Pro Leu Tyr Leu Leu Asn Phe Leu Gly Leu Trp Ser Trp Ile Cys
20 25 30

Lys Lys Trp Phe Pro Tyr Phe Leu Val Arg Phe Thr Val Ile Tyr Asn
35 40 45

Glu Gln Met Ala Ser Lys Lys Arg Glu Leu Phe Ser Asn Leu Gln Glu
50 55 60

Phe Ala Gly Pro Ser Gly Lys Leu Ser Leu Leu Glu Val Gly Cys Gly
65 70 75 80

Thr Gly Ala Asn Phe Lys Phe Tyr Pro Pro Gly Cys Arg Val Thr Cys
85 90 95

Ile Asp Pro Asn Pro Asn Phe Glu Lys Phe Leu Ile Lys Ser Ile Ala
100 105 110

Glu Asn Arg His Leu Gln Phe Glu Arg Phe Val Val Ala Ala Gly Glu
115 120 125

Asn Met His Gln Val Ala Asp Gly Ser Val Asp Val Val Val Cys Thr

130 135 140

Leu Val Leu Cys Ser Val Lys Asn Gln Glu Arg Ile Leu Arg Glu Val

145 150 155 160

Cys Arg Val Leu Arg Pro Gly Gly Ala Phe Tyr Phe Met Glu His Val

165 170 175

Ala Ala Glu Cys Ser Thr Trp Asn Tyr Phe Trp Gln Gln Val Leu Asp

180 185 190

Pro Ala Trp His Leu Leu Phe Asp Gly Cys Asn Leu Thr Arg Glu Ser

195 200 205

Trp Lys Ala Leu Glu Arg Ala Ser Phe Ser Lys Leu Lys Leu Gln His

210 215 220

Ile Gln Ala Pro Leu Ser Trp Glu Leu Val Arg Pro His Ile Tyr Gly

225 230 235 240

Tyr Ala Val Lys