(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0114290
(43) 공개일자 2008년12월31일

(51) Int. Cl.
C12N 15/51 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0063693
(22) 출원일자 2007년06월27일
심사청구일자 2007년06월27일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
안병윤
서울 용산구 이태원동 청화아파트 2동 709호
강주일
서울 성북구 안암동 5-1 고려대학교 생명공학원
(74) 대리인
손민

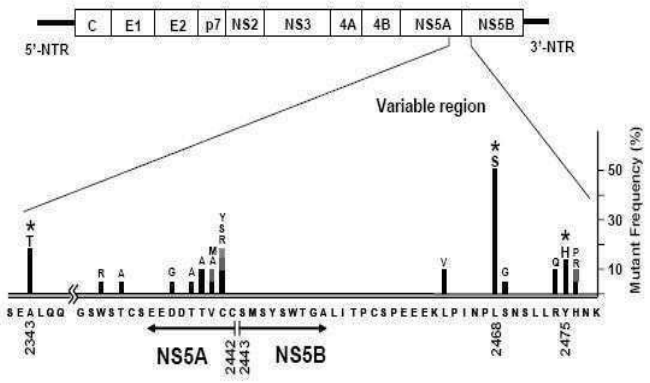
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 복제능 및 감염성이 증가된 새로운 C형 간염 바이러스변이주

(57) 요 약

본 발명은 복제능 및 감염성이 증가된 C형 간염 바이러스(HCV) 유전자형 2a JFH-1의 신규 변이주에 관한 것으로, 본 발명의 신규 변이주는 JFH-1의 NS5A 유전자 C-말단 또는 NS5B 유전자 N-말단의 특정 아미노산이 돌연 변이된 변이주이다. 본 발명에 따른 변이주는 세포 배양시 기존 HCV 바이러스에 비해 세포에 대한 독성은 완화된 반면 감염능과 복제능은 현저히 향상된 특징을 나타내며, 이로부터 생성된 바이러스 입자의 감염성 또한 높아 HCV에 의해 야기되는 질환의 치료약 개발 등에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

C형 간염 바이러스(HCV) 유전자형 2a JFH-1 게놈 RNA가 코딩하는 폴리프로테인의 아미노산 서열 중 제2340번 내지 제2442번 사이에 있는 아미노산 또는 제2460번 내지 제2480번 사이에 있는 아미노산 잔기 중 하나가 원래의 아미노산 잔기와는 다른 아미노산 잔기로 치환된 바이러스 변이주.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 제2343번의 알라닌이 쓰레오닌으로 치환되거나, 제2429번의 트립토판이 아르기닌으로 치환되거나, 제2431번의 쓰레오닌이 알라닌으로 치환되거나, 제2436번의 아스파르트산이 글리신으로 치환되거나, 제2438번의 쓰레오닌이 알라닌으로 치환되거나, 제2439번의 쓰레오닌이 알라닌으로 치환되거나, 제2440번의 발린이 알라닌이나 메티오닌으로 치환되거나, 제2441번의 시스테인이 아르기닌, 세린 또는 타이로신으로 치환되거나, 제2463번의 루이신이 발린으로 치환되거나, 제2468번의 루이신이 세린으로 치환되거나, 제2469번의 세린이 글라이신으로 치환되거나, 제2474번의 아르기닌이 글루타민으로 치환되거나, 제2475번의 타이로신이 히스티딘으로 치환되거나, 또는 제2476번의 히스티딘이 아르기닌, 프롤린 또는 루이신으로 치환된 것인 바이러스 변이주.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 제2468번 아미노산 잔기인 루이신이 세린으로 치환되거나 또는 제2476번 아미노산 잔기인 히스티딘이 루이신으로 치환된 것인 바이러스 변이주.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 제2468번 아미노산 잔기인 루이신이 세린으로 치환된 것인 바이러스 변이주(L2468S).

청구항 5

제 1 항에 있어서, 제2476번 아미노산 잔기인 히스티딘이 루이신으로 치환된 것인 바이러스 변이주(H2476L).

청구항 6

(a) HCV JFH-1 게놈 NS5A 유전자의 C-말단 또는 NS5B 유전자의 N-말단에 있는 특정 아미노산 잔기를 다른 아미노산 잔기로 치환하기 위해 상기 게놈 핵산 서열을 돌연변이시키는 단계와,

(b) 상기 돌연변이된 HCV JFH-1 게놈 유전자를 숙주세포에 도입하는 단계, 및

(c) 상기 돌연변이된 HCV JFH-1 게놈 유전자가 도입된 숙주세포를 배양하는 단계를 포함하는, 세포 배양시 높은 복제율 및 감염성을 가지는 HCV 변이주의 제조 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 숙주세포는 인간 간세포암 세포주 Huh-7 세포주인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 6 항 또는 제 7 항에 있어서, 상기 돌연변이는 HCV JFH-1의 게놈 RNA가 코딩하는 폴리프로테인의 아미노산 서열 중 제2343번의 알라닌을 쓰레오닌으로 치환하거나, 제2429번의 트립토판을 아르기닌으로 치환하거나, 제2431번의 쓰레오닌을 알라닌으로 치환하거나, 제2436번의 아스파르트산을 글리신으로 치환하거나, 제2438번의 쓰레오닌을 알라닌으로 치환하거나, 제2439번의 쓰레오닌을 알라닌으로 치환하거나, 제2440번의 발린을 알라닌이나 메티오닌으로 치환하거나, 제2441번의 시스테인을 아르기닌, 세린 또는 타이로신으로 치환하거나, 제2463번의 루이신을 발린으로 치환하거나, 제2468번의 루이신을 세린으로 치환하거나, 제2469번의 세린을 글라이신으로 치환하거나, 제2474번의 아르기닌을 글루타민으로 치환하거나, 제2475번의 타이로신을 히스티딘으로 치환하거나, 또는 제2476번의 히스티딘을 아르기닌, 프롤린 또는 루이신으로 치환하는 것인 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 돌연변이는 HCV JFH-1의 게놈 RNA가 코딩하는 폴리프로테인의 아미노산 서열 중 제2468번 아미노산 잔기인 루이신을 세린으로 치환하거나 또는 제2476번 아미노산 잔기인 히스티딘을 루이신으로 치환하는 것인 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

종래기술의 문헌 정보

<9> Abe, K., M. Ikeda, et al. (2007). "Cell culture-adaptive NS3 mutations required for the robust replication of genome-length hepatitis C virus RNA." Virus Res 125(1): 88-97.

<10> Bartenschlager, R., M. Frese, et al. (2004). "Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence." Adv Virus Res 63: 71-180.

<11> Best, S. M. and M. E. Bloom (2004). "Caspase activation during virus infection: more than just the kiss of death?" Virology 320(2): 191-4.

<12> Blight, K. J., A. A. Kolykhalov, et al. (2000). "Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture." Science 290(5498): 1972-4.

<13> Cai, Z., C. Zhang, et al. (2005). "Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells." J Virol 79(22): 13963-73.

<14> Ferrari, E., J. Wright-Minogue, et al. (1999). "Characterization of soluble hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in Escherichia coli." J Virol 73(2): 1649-54.

<15> Goh, P. Y., Y. J. Tan, et al. (2001). "The hepatitis C virus core protein interacts with NS5A and activates its caspase-mediated proteolytic cleavage." Virology 290(2): 224-36.

<16> Heller, T., S. Saito, et al. (2005). "An in vitro model of hepatitis C virion production." Proc Natl Acad Sci U S A 102(7): 2579-83.

<17> Kalamvoki, M., U. Georgopoulou, et al. (2006). "The NS5A protein of the hepatitis C virus genotype 1a is cleaved by caspases to produce C-terminal-truncated forms of the protein that reside mainly in the cytosol." J Biol Chem 281(19): 13449-62.

<18> Kalamvoki, M. and P. Mavromara (2004). "Calcium-dependent calpain proteases are implicated in processing of the hepatitis C virus NS5A protein." J Virol 78(21): 11865-78.

<19> Kato, T., T. Date, et al. (2003). "Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon." Gastroenterology 125(6): 1808-17.

<20> Kato, T., A. Furusaka, et al. (2001). "Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient." J Med Virol 64(3): 334-9.

<21> Lauer, G. M. and B. D. Walker (2001). "Hepatitis C virus infection." N Engl J Med 345(1): 41-52.

<22> Lesburg, C. A., M. B. Cable, et al. (1999). "Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site." Nat Struct Biol 6(10): 937-43.

<23> Lindenbach, B. D., M. J. Evans, et al. (2005). "Complete replication of hepatitis C virus in cell culture." Science 309(5734): 623-6.

<24> Lindenbach, B. D., P. Meuleman, et al. (2006). "Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A 16: 16.

<25> Lindenbach, B. D. and C. M. Rice (2005). "Unravelling hepatitis C virus replication from genome to

function." Nature 436(7053): 933-8.

<26> Lohmann, V., S. Hoffmann, et al. (2003). "Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture." J Virol 77(5): 3007-19.

<27> Lohmann, V., F. Korner, et al. (2001). "Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation." J Virol 75(3): 1437-49.

<28> Lohmann, V., F. Korner, et al. (1997). "Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity." J Virol 71(11): 8416-28.

<29> Lohmann, V., F. Korner, et al. (1999). "Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line." Science 285(5424): 110-3.

<30> Nelson, H. B. and H. Tang (2006). "Effect of cell growth on hepatitis C virus (HCV) replication and a mechanism of cell confluence-based inhibition of HCV RNA and protein expression." J Virol 80(3): 1181-90.

<31> Oh, J. W., T. Ito, et al. (1999). "A recombinant hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase capable of copying the full-length viral RNA." J Virol 73(9): 7694-702.

<32> Pietschmann, T., A. Kaul, et al. (2006). "Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras." Proc Natl Acad Sci U S A.

<33> Shimakami, T., M. Hijikata, et al. (2004). "Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon." J Virol 78(6): 2738-48.

<34> Shirota, Y., H. Luo, et al. (2002). "Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity." J Biol Chem 277(13): 11149-55.

<35> Simmonds, P. et al., (2005). "Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes." Hepatology 42: 962-973

<36> Wakita, T., T. Pietschmann, et al. (2005). "Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome." Nat Med 11(7): 791-6.

<37> Yamashita, T., S. Kaneko, et al. (1998). "RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region." J Biol Chem 273(25): 15479-86.

<38> Yi, M., Y. Ma, et al. (2007). "Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus." J Virol 81(2): 629-38.

<39> Yi, M., R. A. Villanueva, et al. (2006). "Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells." Proc Natl Acad Sci U S A 103(7): 2310-5.

<40> Zheng, Q. A. and D. C. Chang (1991). "High-efficiency gene transfection by in situ electroporation of cultured cells." Biochim Biophys Acta 1088(1): 104-10.

<41> Zhong, J., P. Gastaminza, et al. (2005). "Robust hepatitis C virus infection in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A 102(26): 9294-9.

<42> Zhong, J., P. Gastaminza, et al. (2006). "Persistent hepatitis C virus infection in vitro: coevolution of virus and host." J Virol 80(22): 11082-93.

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<43> 본 발명은 복제능 및 감염성이 증가된 새로운 C형 간염 바이러스(HCV) 변이주에 관한 것이다.

<44> C형 간염 바이러스(HCV)는 *플라비비리데(Flaviviridae)* 과(family)에 속하는 단일쇄 양성(+) 센스 가닥 RNA 바

이러스로, 급성 및 만성 간염을 유발하는 병원성 바이러스이다. 현재 전 세계적으로 약 1억 7천만 명이 넘는 사람들이 HCV에 감염되어 있으며, 이 중 약 50%가 만성 간염에 걸린 상태이고 이 중 약 20%는 10 년 내지 20 년에 걸쳐 간경화로 진행되는 것으로 보고되고 있다. 나아가 이들 중 일부는 간세포암으로 진전될 위험해 처해 있다(Lauer, G. M. and B. D. Walker (2001). "Hepatitis C virus infection." N Engl J Med **345**(1): 41-52).

<45> C형 간염 바이러스는 유전자형(genotype or serotype)에 따라 많은 종류로 구분될 수 있다. HCV의 유전자형을 구분하기 위한 대표적인 방법으로서 HCV 균주의 핵산 서열을 사용한 Simmonds 등에 의한 계통 분석적 방법에 따르면, HCV는 유전자형 1에서 6까지 여섯 가지 타입으로 구분될 수 있고, 나아가 이들 각 타입은 여러 아종(subtype; 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, 2k, 3a, 3b, 3k, 4a, 5a, 6a, 6b, 6d, 6g, 6h, 6k)으로 구분될 수 있다(Simmonds, P. et al., (2005). "Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes." Hepatology **42**: 962-973). 현재 다수의 HCV 유전자형에 대한 전체 게놈 핵산 서열이 밝혀졌으며(Choo et al., Science, (1989) 244, pp. 359-362; Kato et al., J. Med. Virol., (1992), pp. 334-339; Okamoto, H. et al., J. Gen. Virol., (1992) 73, pp. 673-679; Yoshioka et al., Hepatology, (1992) 16, pp. 293-299), 9.6kb 크기의 단일쇄 양성(+) 가닥 RNA 게놈에 3,010 여개의 아미노산으로 구성된 단일 오픈 리딩 프레임(ORF)을 코딩하고, 이는 하나의 큰 폴리펩티드로 번역된 후 바이러스 및 세포성 프로테아제에 의해 각각의 단백질로 (core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A 및 NS5B 단백질)로 분리된다(Lindenbach, B. D. and C. M. Rice (2005). "Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function." Nature **436**(7053): 933-8).

<46> 현재 C형 간염에 대한 주 치료법은 인터페론-α, 인터페론-β, 및 인터페론-α와 퓨린 뉴클레오시드 유도체인 리바비린(ribavirin)의 복합 요법 등이 수행되고 있다. 그러나, 이들 치료법이 이루어지더라도, 치료를 받은 환자의 약 60% 정도에서만 치료 효과가 나타났으며, 치료를 중단하는 경우, 효과를 나타낸 환자의 반 이상이 다시 재발병한다. 인터페론의 치료 효과는 HCV의 유전자형과 관련된 것으로 알려져 있으며, 유전자형 2a에 대한 치료 효과는 다소 높은 반면, 유전자형 1b에 대한 효과는 낮은 것으로 알려져 있다(Mori, S. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1992) 183, pp. 334-342).

<47> 선진국에서 높은 발병율을 나타내며 그리하여 종국적으로 심각한 결과를 초래하나 현재 그에 대한 상용적인 치료법이 없다는 점에서, C형 간염에 대한 효과적인 치료약 또는 예방약의 개발은 매우 중요하다. 따라서, HCV에 특이적인 화학요법 또는 백신 요법 및 항 HCV 약물 개발에 있어서의 진전이 매우 요망되고 있다. 항 HCV 약물 개발을 위한 타겟으로서, HCV 복제의 억제 및 HCV의 세포 감염의 억제를 고려할 수 있다.

<48> 1989년에 HCV가 발견된 이래, 세포 배양 시스템 내에서의 HCV의 증식 및 HCV에 의한 배양 세포의 감염이 어려웠으며 동물 실험의 경우도 오직 침팬지로만 제한되었기 때문에, HCV 복제 기작 및 HCV 감염 기작에 대한 연구에는 여전히 어려움이 있었다. 그 후 유전자형 1b HCV 바이러스의 복제에 필요한 일부 바이러스 유전자와 선별마커로 구성된 서브게놈 레플리콘(subgenomic replicon)이 인간 간암세포 Huh-7 세포주 배양에서 스스로 복제가 가능함이 보고되었다(Lohmann, V., F. Korner, et al. (1999). "Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line." Science **285**(5424): 110-3). 그러나, 이러한 합성 서브게놈 레플리콘 시스템은 바이러스 입자를 구성하는 구조단백질을 코딩하고 있지 않기 때문에 바이러스 입자를 생산하지는 못하는 문제점을 가지고 있다. 따라서, 세포 내에서 바이러스 RNA 복제에 관한 평가에만 국한될 뿐, 감염 세포 내에서의 HCV 입자의 형성과 세포 외로의 배출, 나아가 새로운 세포로의 감염성 등을 평가하지는 못하였다.

<49> 이후, 세포 배양 시스템에서 바이러스 입자를 생산하는 방법으로서, 서브게놈 레플리콘을 사용하지 않고 HCV의 전체 게놈 RNA를 이용하는 여러 방법이 보고되었으나(Lim SP. et al., Virology, 303(2002) pp. 79-99; WO05080575A1), 이들 방법에 따라 제조되는 바이러스 입자의 생산량이 낮거나 또는 생산된 바이러스 입자의 감염성 여부에 대해서는 구체적으로 보고되지 않았다. 이에, 최근 Wakita 등은 유전자형 2a 타입의 JFH-1의 전체 게놈 RNA 유전자를 Huh-7 세포주에 도입함으로써 상기 세포주 내에서 효율적인 바이러스 복제 및 높은 농도의 바이러스 입자 생성을 확인하였으며, 그러한 바이러스 입자의 감염성 또한 확인하였다(Wakita et al., Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome, Nature Medicine, vol. 11, Number 7, pp. 791-796, July 2005). 그 후, 다른 유전자형의 RNA 및 인터게놈타입(intergenotypic)을 이용한 키메라(chimeras) RNA에 의한 바이러스 입자의 형성도 보고되었다(Cai, Z., C. Zhang, et al. (2005) "Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells." J Virol **79**(22): 13963-73; Heller, T., S. Saito, et al. (2005) "An in vitro model of hepatitis C virion production." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(7): 2579-83; Lindenbach, B. D., M. J. Evans, et al. (2005) "Complete replication of hepatitis C virus in cell

culture." Science 309(5734): 623-65; Wakita, T., T. Pietschmann, et al. (2005) "Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome." Nat Med 11(7): 791-6; Zhong, J., P. Gastaminza, et al. (2005). "Robust hepatitis C virus infection in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A 102(26): 9294-9; Pietschmann, T., A. Kaul, et al. (2006). "Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras." Proc Natl Acad Sci U S A.).

<50> 이와 같이, 감염 세포 내에서의 HCV 입자의 형성과 세포 외로의 배출, 그리고 새로운 세포로의 감염 과정을 평가하는 실험 시스템의 제작이 가능하게 되었으나, 항 HCV 약물의 개발 및 연구를 위하여 여전히 HCV 입자의 고효율 생산 시스템 개발에 대한 요구가 있다.

<51> 한편, 세포 배양 시스템에서 생성되는 바이러스 입자의 농도(titer)가 아주 높지 않은 경우에도, 세포 배양물에서 배출되는 바이러스 입자는 인간 간이 이식된 침팬지 및 쥐에서 감염성을 나타내었다. Zhong 등은 세포 배양시 생성되는 바이러스 입자 농도의 향상은 JFH-1 RNA의 지속적인 복제를 가져오는 세포의 반복적 계대 배양(passage)에 의해 성취될 수 있다고 보고하였다(Zhong, J., P. Gastaminza, et al. (2006). "Persistent hepatitis C virus infection in vitro: coevolution of virus and host." J Virol 80(22): 11082-93). 이 점에서, 보다 높은 복제 허용성을 가진 Huh-7 세포의 특정 클론인 Huh-7.5.1 세포주의 이용은 현저한 효과를 나타내었다. 이러한 세포 기질에서는 몇몇 세포 배양 적응된 돌연변이 바이러스들이 발견되었는데, 이들은 JFH-1의 E2 유전자 내의 하나의 아미노산 돌연변이를 포함하거나(Zhong, J., P. Gastaminza, et al. (2006). "Persistent hepatitis C virus infection in vitro: coevolution of virus and host." J Virol 80(22): 11082-93), 유전자형 1a의 구조 유전자를 포함하는 JFH-1 키메라 내에서의 돌연변이(Yi, M., Y. Ma, et al. (2007). "Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus." J Virol 81(2): 629-38), 및 유전형 1b의 또 다른 종 내에서의 돌연변이를 포함한다(Abe, K., M. Ikeda, et al. (2007). "Cell culture-adaptive NS3 mutations required for the robust replication of genome-length hepatitis C virus RNA." Virus Res 125(1): 88-97).

<52> 그러므로, 바이러스 및 세포적 요소 모두가 배양시 바이러스의 복제 효율을 지배함을 알 수 있는바, 본 발명자는 유전자형 2a HCV인 JFH-1 균주의 게놈 RNA가 도입된 Huh-7 세포를 계대 배양하는 과정에서, Huh-7 세포 내에 유지된 JFH-1 게놈 RNA의 NS5A 유전자의 C-말단과 NS5B 유전자의 N-말단에 군집된 세포 배양 적응 돌연변이를 동정하였으며, 이들 변이주 중 일부가 돌연변이 되지 않은 친주인 JFH-1 바이러스에 비해 세포 배양 시스템 내에서 훨씬 높은 농도로 바이러스 입자를 생성할 뿐만 아니라, 이들 생성된 바이러스 입자가 새로운 세포로의 감염성을 나타내며 또한 감염된 세포에 대한 세포병변 효과가 친주에 비해 낮아서, 항 HCV 약물의 개발 및 연구를 위한 유용한 물질로 사용 가능함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<53> 따라서, 본 발명은 복제능 및 감염성이 증가된 C형 간염 바이러스(HCV) 유전자형 2a JFH-1의 신규 변이주를 제공하는 것을 그 목적으로 한다. 구체적으로, 본 발명에 따른 상기 신규 변이주는 JFH-1의 NS5A 유전자의 C-말단 또는 NS5B 유전자의 N-말단의 특정 아미노산이 돌연 변이된 변이주이다.

<54> 본 발명은 또한 세포 배양 시스템에서 증가된 복제능 및 감염성을 나타내는 본 발명에 따른 상기 변이주의 제조 방법을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

<55> 본 발명은 복제능 및 감염성이 증가된 C형 간염 바이러스(HCV) 유전자형 2a JFH-1의 신규 변이주에 관한 것으로, 특히 JFH-1의 NS5A 유전자의 C-말단 또는 NS5B 유전자의 N-말단의 특정 아미노산이 돌연변이되어 세포 배양시 현저히 향상된 복제능 및 그에 따라 생성된 바이러스 입자의 감염성이 높은 신규 HCV JFH-1 변이주 및 그의 제조 방법에 관한 것이다.

<56> 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 신규 HCV JFH-1 변이주는 JFH-1 균주의 게놈 RNA를 도입한 인간 간세포암 세포주 Huh-7 세포주를 계대 배양하는 과정에서 발견된 세포 배양 적응된 변이주로서, 이들 변이주는 친주인 JFH-1에 비해 세포 배양 시스템에서 바이러스 입자 생성 농도가 많게는 20 배 이상 증가된 복제능 및 감염성이 향상된 새로운 변이주이다.

<57> 바람직한 양태로서, 본 발명에 따른 변이주는 JFH-1 게놈 RNA의 NS5A 유전자의 C-말단 또는 NS5B 유전자의 N-말

단의 특정 아미노산 잔기가 변이된 변이주이며, 더욱 바람직하게는, NS5A 유전자의 C-말단 부위에 있는 하나의 아미노산이 변이된 변이주이거나 또는 NS5B 유전자의 N-말단 부위에 있는 하나의 아미노산이 변이된 변이주이며, 특히 바람직하게는 HCV JFH-1 게놈 RNA가 코딩하는 폴리프로테인의 아미노산 번호 제2340번 내지 제2442번 사이의 아미노산 잔기 중 하나가 다른 아미노산으로 치환된 것, 바람직하게는 제2343번의 알라닌이 쓰레오닌으로 치환되거나, 제2429번의 트립토판이 아르기닌으로 치환되거나, 제2431번의 쓰레오닌이 알라닌으로 치환되거나, 제2436번의 아스파르트산이 글리신으로 치환되거나, 제2438번의 쓰레오닌이 알라닌으로 치환되거나, 제2439번의 쓰레오닌이 알라닌으로 치환되거나, 제2440번의 발린이 알라닌이나 메티오닌으로 치환되거나, 또는 제2441번의 시스테인이 아르기닌, 세린 또는 타이로신으로 치환된 것을 포함하거나, 또는 제2460번 내지 제2480번 사이의 아미노산 잔기 중 하나가 원래의 아미노산 잔기와는 다른 아미노산 잔기로 치환된 것, 바람직하게는 제2463번의 루이신이 발린으로 치환되거나, 제2468번의 루이신이 세린으로 치환되거나, 제2469번의 세린이 글라이신으로 치환되거나, 제2474번의 아르기닌이 글루타민으로 치환되거나, 제2475번의 타이로신이 히스티딘으로 치환되거나, 또는 제2476번의 히스티딘이 아르기닌, 프롤린 또는 루이신으로 치환된 것을 포함하는 변이주이다. 더욱 특히 바람직한 것은 제2468번 아미노산 잔기인 라이신이 세린으로 치환된 변이주(L2468S) 또는 제2476번 아미노산 잔기인 히스티딘이 루이신으로 치환된 변이주(H2476L)이며, 이 중에서도 특히 L2468S 변이주가 더욱 바람직하다.

<58> 본 발명에 따른 상기 변이주는, 당해 분야에서 공지된 유전 공학 기술을 이용하여, 이미 알려져 있는 HCV JFH-1 게놈 유전자의 핵산 서열에서 해당 아미노산을 코딩하는 염기를 다른 아미노산을 코딩하는 염기로 돌연변이시키는 것을 포함하여 용이하게 제조할 수 있다. 보다 구체적으로, 유전자 조작 기술에 의하여 HCV JFH-1 게놈 유전자의 염기서열에서, 해당하는 아미노산 잔기를 코딩하는 코돈을 다른 아미노산 잔기를 코딩하는 코돈으로 치환시킨 후, 치환된 HCV JFH-1 게놈 RNA를 숙주세포에 도입하여 배양함으로써 제조할 수 있다. 바람직한 숙주세포로는 인간 간세포암 Huh-7 세포주이나, 본 발명은 반드시 이에 제한되지 않는다.

<59> 상기 코돈의 치환, 숙주세포로의 치환된 HCV JFH-1 게놈 RNA의 도입, 그리고 도입된 세포주의 배양 및 배양 조건 등에 관한 기술은 모두 당해 분야에 공지된 기술로부터 적절히 선택되어 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 또 다른 양태에서는 세포배양시 향상된 복제율 및 바이러스 감염성을 가져 항 HCV 치료약의 개발 및 연구 등에 용이하게 사용될 수 있는 본 발명에 따른 변이주의 제조 방법을 제공한다.

<60> 바이러스 복제의 효율은 세포적 요소 및 바이러스적 요소 모두에 의해 조절되는 것으로 알려져 있으며, HCV 서브게놈 레플리콘(replicon)을 이용한 이전의 연구는 서로 다른 계대(passage)에 있는 Huh-7 세포는 바이러스 복제성에 있어서 많게는 100 배까지 차이가 남을 보고하였다(Lohmann, V., S. Hoffmann, et al. (2003). "Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture." J Virol 77(5): 3007-19). 이와 관련하여, 증가된 복제율 및 감염성을 나타내는 서브게놈 및 게놈 레플리콘에서 세포 배양 적응된 변이주들이 발견되었는데(Bartenschlager, R., M. Frese, et al. (2004). "Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence." Adv Virus Res 63: 71-180; Yi, M., Y. Ma, et al. (2007). "Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus." J Virol 81(2): 629-38), 본 발명자들은 HCV JFH-1의 게놈 RNA가 도입된 Huh-7 세포주를 계속하여 계대 배양하는 동안, 기존에 밝혀지지 않았던 새로운 세포 배양 적응된 변이주들을 동정할 수 있었으며, 놀랍게도, 이들 새로운 변이주는 JFH-1 게놈 RNA 유전자 NS5A의 C-말단 또는 NS5B 의 N-말단에서 그러한 돌연변이가 집중적으로 일어났음을 확인하였다. 이와 같이 NS5A의 C-말단 또는 NS5B의 N-말단에서 돌연변이의 군집이 발생함을 발견한 것은 전혀 예측하지 못한 결과이며, 그 이유를 명확하게 설명할 수는 없다. 그럼에도 불구하고, 이들 변이주들, 특히 L2468S 및 H2476L은 반복적 계대 배양에서 관찰되는 감염성의 증가에 있어 중요한 근거를 제공하는 것으로 생각된다. 이들 두 변이주는 모두 NS5B의 N-말단 위치에서 돌연변이된 것으로, 친주인 JFH-1이나 다른 변이주에 비해 현저히 높은 바이러스 입자 생성 농도(titer) 및 낮은 세포독성으로 상당기간 지속적 감염성을 나타내었다.

<61> 세포 배양 적응된 돌연변이가 바이러스 감염성에 어떤 영향을 미치는지는 아직 잘 알려져 있지 않다. 장기간(전기천공 후 59일 이상) 동안 Huh-7.5.1 세포주에서 보유된 JFH-1의 E2 유전자 내에서 발견된 G451R 돌연변이의 경우 JFH-1에 비해 증가된 감염성을 보였으며 CD81 항체에 의한 감염 방해에 보다 낮은 감수성을 나타내었다(Zhong, J., P. Gastaminza, et al. (2006). "Persistent hepatitis C virus infection in vitro: coevolution of virus and host." J Virol 80(22): 11082-93). 그러나, G451R의 경우, 본 발명에 따른 변이주와는 달리 JFH-1 보다 더욱 가속화된 세포변성(cytopathic) 효과를 나타낸다. 상이한 유전자형으로부터의 구조 유전자들을 포함하는 JFH-1의 키메라들에서는 상이한 감염성이 관찰되었다(Pietschmann, T., A. Kaul, et al.

(2006). "Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras." Proc Natl Acad Sci U S A.). 전기천공 후 초기의 코어(core) 단백질 및 세포 내 RNA 수준은 비슷했지만, 코어 단백질의 분비량은 키메라들 사이에 매우 상이했으며, 이는 바이러스의 조립(assembly) 및 분비에 있어서의 구조 단백질의 상이한 활성을 의미한다. 본 발명자들은 처음에 본 발명에 따른 변이주들이 보다 높은 바이러스 RNA 복제 속도를 나타낼 것이라고 예측하였다. 이러한 일이 세포 내에서 일어날 가능성을 배제할 수는 없지만, 시험관 내 (in vitro) 결과는 그렇지 않음을 암시하였다. 대신, 본 발명자들은 세포독성(cytotoxic) 또는 세포증식억제(cytostatic) 효과의 경감(alleviation)이 바이러스의 확장 및 감염에 있어서의 현저한 가속화에 기여하는 것으로 분석하였다. 또한, 본 명세서에 첨부된 도 4를 참조하면, 감염성의 증가는 분비된 바이러스의 입자 수의 증가에 기초한다기 보다는, 분비된 바이러스 입자의 특정 감염성의 증가에 기초함을 나타낸다.

<62> 바이러스 감염 및 복제는 세포의 성장에 불리할 수 있다. 고효율의 복제는 조립되지 않은 바이러스 요소들의 축적을 야기하여 바이러스 입자의 조립 또는 세포 밖으로의 방출을 방해할 수 있으며, 이는 또한 세포의 소포체(ER: endoplasmic reticulumn) 스트레스 반응을 야기하거나 또는 감염된 세포의 세포사멸(apoptosis)까지도 야기할 수 있을 것이다. 이러한 점에서, 세포에 부담 또는 성장 불이익을 덜 주는 돌연변이는 배양액 내에서 바이러스의 증가가 보다 효율적으로 일어날 수 있도록 해 줄 것이다. 구체적인 기작이 어떠한 것인지를 떠나서, 본 발명에 따른 L2468S 균주의 경우 JFH-1에 비해 세포에 부담을 덜 주는 것으로 생각된다. H2476L 돌연변이의 경우, 서브게놈 JFH-1 내에서 처음 발견되었다는 사실 또한 주목할 만한데, 이는 JFH-1에 비해 약 3 배 정도 더 많은 콜로니를 형성하였다(Kato, T., T. Date, et al. (2003). "Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon." Gastroenterology 125(6): 1808-17). JFH-1 감염이 세포독성 효과를 야기하는지 또는 세포에 성장 불이익을 주는지에 대해서는 좀 더 연구가 필요하다.

<63> NS5A 단백질의 카스파제에 의한(Caspase-mediated) 절단이 보고되었다(Goh, P. Y., Y. J. Tan, et al. (2001). "The hepatitis C virus core protein interacts with NS5A and activates its caspase-mediated proteolytic cleavage." Virology 290(2): 224-36; Kalamvoki, M. and P. Mavromara (2004). "Calcium-dependent calpain proteases are implicated in processing of the hepatitis C virus NS5A protein." J Virol 78(21): 11865-78; Kalamvoki, M., U. Georgopoulou, et al. (2006). "The NS5A protein of the hepatitis C virus genotype 1a is cleaved by caspases to produce C-terminal-truncated forms of the protein that reside mainly in the cytosol." J Biol Chem 281(19): 13449-62). 그러나, 상기 연구에서는 HCV 복제로 인한 세포 사멸의 증거를 전혀 발견할 수 없었다. 카스파제에 의한 많은 바이러스 단백질의 활성화 또는 억제에서 볼 수 있듯이(Best, S. M. and M. E. Bloom (2004). "Caspase activation during virus infection: more than just the kiss of death?" Virology 320(2): 191-4), NS5A 단백질의 다양한 기능을 고려할 때, NS5A의 단백질 가수분해적(proteolytic) 절단은 NS5A 활성의 조절과 관련된 정상적인 프로세스일 것으로 생각된다. 그러나, 경감된 세포독성을 가지는 본 발명에 따른 돌연변이들에서 볼 수 있는 완화된 NS5A 절단은 NS5A의 절단이 세포독성의 결과일 수 있음을 제시한다.

<64> 본 발명의 실시예에서는 바이러스 감염의 조절에 NS5B가 중요함을 확인할 수 있다. NS5B에서의 하나의 아미노산의 치환이 어떻게 세포독성을 경감시키며, 따라서 감염성을 증가시키는지는 분명하지 않다. NS5B의 결정 구조(Lesburg, C. A., M. B. Cable, et al. (1999). "Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site." Nat Struct Biol 6(10): 937-43)에 의하면, 다른 유전자형의 서브게놈 레플리콘에서 발견된 여러 세포 배양 적응 돌연변이들과 유사하게, 본 발명에 따른 두 돌연변이 L2468S 및 H2476L은 효소 활성 부위로부터 먼 분자의 표면에 위치하는 것으로 보인다. 서브게놈 레플리콘의 콜로니 형성 효율을 약 1,000 배 정도 증가시키는 것으로 보고된 R884G와 같은 것들도 이러한 범주에 속한다(Lohmann, V., F. Korner, et al. (2001). "Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation." J Virol 75(3): 1437-49; Bartenschlager, R., M. Frese, et al. (2004). "Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence." Adv Virus Res 63: 71-180). L2468 및 H2476은 모든 HCV 유전자형에서 보존되어 있으며 생체 내에서 치환이 발견되지 않았다. RNA 복제의 촉매적 기능의 필수적인 특성으로 인하여, 세포 배양 적응된 돌연변이의 위치는 효소 활성 부위 밖에 있을 것이며, 또한 다른 단백질과의 잠재적 상호작용 위치 근처에 있을 것이다.

<65> 바이러스 감염성은 각 바이러스 단백질의 특성에 의해서만 조절되는 것이 아니라 단백질 사이의 복잡한 상호작용에 의해서도 조절될 것으로 생각된다. NS5A는 NS5B와 밀접하게 상호작용하는 바이러스 단백질 중 하나인 것으로 생각되고 있다(Shirota, Y., H. Luo, et al. (2002). "Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-

dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity." J Biol Chem 277(13): 11149-55). NS5A 및 NS5B의 상호작용은 바이러스 복제에 중요한 것으로 보고되었다(Shimakami, T., M. Hijikata, et al. (2004). "Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon." J Virol 78(6): 2738-48). NS5A의 C-말단 또는 NS5B 의 N-말단에 밀집한 돌연변이를 발견한 본원 발명은 이러한 보고와도 일치한다. 한편, 본 발명에서 NS5A 내에서 발견된 돌연변이는 ISDR 근처의 고인산화(hyperphosphorylation) 부위에 주로 있는 서브게놈 복제에서 발견된 돌연변이와는 상이하다(Blight, K. J., A. A. Kolykhalov, et al. (2000). "Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture." Science 290(5498): 1972-4).

<66> 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 자세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 예시일 뿐, 본 발명의 범위가 이로써 제한되는 것은 아니다.

<67> **(실시예)**

<68> **1. 재료 및 방법**

<69> (1) 세포 배양

<70> 인간 간세포암 Huh-7 세포는 25mM Hepes, 100 U/ml 페니실린 G, 100 μg/ml 스트렙토마이신 및 5% 우태 혈청이 보충된 Dulbecco 사의 수정된 Eagle 배지(DMEM; Invitrogen)에서 배양하였다.

<71> (2) 플라스미드 작제

<72> HCV 유전자형 2a JFH-1의 전체 게놈 RNA 염기 서열을 포함하고 있는 pJFH1 플라스미드는 T. Wakita 박사로부터 제공받았다(Takaji Wakita et al., Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome, Nature Medicine, Vol. 11, Number 7, July 2005).

<73> 본 발명에 따라 세포배양 적응된 바이러스에서 동정된 특정 돌연변이를 도입하기 위하여, pJFH1 플라스미드의 상응하는 서열 부분을 돌연변이 바이러스로부터 증폭된 서열의 *San*DI-*Rsr*II 이나 *Rsr*II-*Hpa*Ip 절편으로 교체하였다. 서브게놈 레플리콘 pSGR-JFH1-H2476L(Kato, T., T. Date, et al. (2003). "Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon." Gastroenterology 125(6): 1808-17) 내에서 동정된 H2476L 돌연변이는 *Spe*I-*Xba*I 절편들의 치환에 의해 pJFH1 내에 도입되었다. NS5B의 복제성 결여된 GND 돌연변이(Asp^{2760}→Asn)(Yamashita, T., S. Kaneko, et al. (1998). "RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region." J Biol Chem 273(25): 15479-86)는 두 단계 PCR 돌연변이 방법으로 제조되어 pJFH-1의 상응하는 *Hind*III 절편 부분에 치환되었다.

<74> (3) HCV RNA 합성 및 전기천공

<75> 바이러스 RNA의 전기천공은 공지된 방법(Lindenbach, B. D., M. J. Evans, et al. (2005). "Complete replication of hepatitis C virus in cell culture." Science 309(5734): 623-6; Wakita, T., T. Pietschmann, et al. (2005). "Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome." Nat Med 11(7): 791-6; Zhong, J., P. Gastaminza, et al. (2005). "Robust hepatitis C virus infection in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A 102(26): 9294-9)에 의해 수행되었다. 간단히 설명하면, pJFH1을 XbaI로 절단하고, 정확한 바이러스 RNA의 3' 말단을 생성하기 위해 멍빈핵산분해효소(mung bean nuclease)를 처리하였다. 이렇게 준비된 선형 DNA를 주형으로 하여 MEGAscript™ T7 kit (Ambion)를 사용한 인비트로 전사반응으로 HCV RNA를 합성하였다.

<76> 트립신 처리로 단일세포로 분리한 Huh-7 세포는 1 x 10^7cells/ml 농도로 헤페스(Hepes)-완충배지(2 mM Hepes, 15 mM potassium phosphate buffer, 250 mM mannitol, 1 mM $MgCl_2$, pH 7.2)에 재현탁시키고(Zheng, Q. A. and D. C. Chang (1991). "High-efficiency gene transfection by in situ electroporation of cultured cells." Biochim Biophys Acta 1088(1): 104-10), 세포현탁액 400㎕를 HCV RNA 20㎍으로 Gene Pulser® II RF module(Bio-Rad)을 사용하여 350V, 100% modulation, 40kHz RF 주파수 조건에서 1초 간격으로 5 번 5 msec 의 충격을 주어 전기천공하였다.

<77> (4) 바이러스의 서열 분석

<78> 바이러스 RNA는 HCV가 감염된 세포 또는 배양액으로부터 QIAamp® viral RNA mini kit(Qiagen)를 이용하여 추출해냈으며, Superscript™ II 역전사효소(Invitrogen)를 사용하여 cDNA로 전환하였다.

<79> 전체 HCV 게놈을 커버링하는 20개 절편들을 PCR에 의해 증폭하였으며, 바로 ABI 3100 genetic analyzer(Applied Biosystems)를 사용하여 서열 분석하였다.

<80> 서열의 5'과 3' 말단은 5'- 및 3'-RACE에 의해 결정되었다(Kato, T., A. Furusaka, et al. (2001). "Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient." J Med Virol 64(3): 334-9). 동일 염기의 반복에 의해 서열 분석이 어려운 일부 PCR 절편들은 pMD18-T 벡터(Takara)에 클로닝한 후 서열화하였다.

<81> (5) 항체 및 면역블로팅

<82> 항-NS5A 및 항-NS3 폴리클로날 항체는 E.coli에서 발현된 재조합 단백질로 토끼를 면역화하여 얻었다.

<83> 항-Hsp70(W-27) 및 항-PARP(H-250) 항체는 산타크루즈 바이오테크놀로지사로부터 구입하였다.

<84> 항-토끼 IgG(NA934V) 및 항-마우스 IgG(NA931V) 호스래디쉬 퍼옥시데이즈(horseradish peroxidase, HRP)가 컨쥬게이트된 항체는 GE Healthcare 것을 이용하였다.

<85> 면역블로팅을 위해 세포는 트리플 디터전트 라이시스 버퍼(10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.25% deoxycholate, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride) 내에 용해시켰다.

<86> 단백질은 변성폴리아크릴아미드 겔 상에서 분리시키고, 니트로셀룰로즈 막(Hybond ECL; Amersham Biosciencs) 위로 옮겼다.

<87> 블롯은 5% 스킴밀크를 함유하는 TBST 버퍼(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)로 희석시킨 1차 및 2차 항체로 순차적으로 반응시켰고, 화학발광시약(enhanced chemiluminescent reagent)(PicoWest SuperSignal ECL Substrate; Pierce)을 사용하여 발광시킨 후 x-ray 필름에 노출시켜 검출하였다.

<88> (6) 면역형광법 및 바이러스 적정법

<89> 전기천공, 즉 감염된 Huh-7 세포들은 커버 슬립 상에서 키운 후, 3.7% 파라포름알데하이드를 함유한 PHEM 버퍼(60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 10 mM EGTA, 2 mM $MgSO_4$, pH 7.0) 고정액으로 10 분 동안 고정시키고, 0.5% 트리톤 X-100을 포함한 PBS로 10 분 동안 처리하여 세포막의 투과도를 올린 후, 블로킹 버퍼(PBS containing 1% BSA and 0.1% Tween-20)로 10 분 동안 반응시킨다. 그 후 세포를 블로킹 버퍼 내에서 항-NS5A 토끼 폴리클로날 항체(1:1000으로 희석)와 함께 37℃에서 2시간 동안 반응시킨다. PBS로 세척 후, 세포를 FITC-컨쥬게이트된 염소(goat) 항-토끼 IgG(F1262,Sigma-Aldrich)를 블로킹 버퍼에 1:1000으로 희석하여 37℃에서 1 시간 동안 반응시킨다. 그 후, 핵을 염색하기 위해 PBS에 1 μg/ml 농도의 DAPI를 넣은 용액을 이용하여 세포를 1분 동안 염색시킨다. 커버 슬립은 PBS로 세척하고 말린 후, FluoroGuard™ 안티페이드 시약(Bio-Rad)을 사용하여 슬라이드 글라스 위에 마운트시키고, 형광현미경(Axioscope 2 plus; Carl Zeiss)으로 관찰하였다.

<90> 배양액 내의 감염성 바이러스의 타이터(적정농도, titer)는 $TCID_{50}$ 평가법으로 결정하였다. 96-웰 플레이트에서 70~80% 컨플루언시(confluency) 정도로 자란 Huh-7 세포에 5 배 계단 희석된 바이러스 스탁 50㎕를 배양액 내에 접종시켰다(각 희석액이 6개 well에 접종됨). 37℃에서 1시간 동안 바이러스 흡착 후, 100㎕의 새로운 배지를 보충하고, 세포를 3 일간 더 배양한다. 상온에서 20 분 동안 순수(absolute) 메탄올로 고정하고 면역 스테이닝한 후, NS5A 양성 세포들을 역광(inverted) 형광 현미경(Carl Zeiss 사 제품) 하에서 관찰했다. $TCID_{50}$은 Reed와 Muench의 방법을 사용하여 계산하였다.

<91> (7) 유세포 측정법

<92> 트립신 처리된 세포를 ml 당 2×10^6 개의 농도로 재현탁하고, 파라포름알데하이드가 2% 농도로 첨가된 PBS로 4℃에서 1 시간 동안 고정한 후, 0.2% 트윈-20을 포함하는 PBS로 상온에서 15 분 동안 처리하여 세포막의 투과도를 올렸다. 그 후 세포를 항-NS5A 항체가 1:500으로 희석된 염색 버퍼(PBS containing 1% BSA and 0.1% Tween-20)로 37℃에서 2 시간 동안 반응시킨다. 0.1% 트윈-20을 포함한 PBS로 세척 후, 세포를 FITC-컨주게이트된 염소 항-토끼 IgG(F1262; Sigma-Aldrich)가 1:500으로 희석된 염색 버퍼로 37℃에서 1 시간 배양한 후,

FACSCalibur flow cytometer(BD Bioscience)로 분석한다.

<93> (8) 노던블롯팅

<94> HCV RNA로 전기천공된 Huh-7 세포에서 추출한 전체 RNA 20 μg을 1% 포름알데하이드 아가로즈 젤에서 전개한 후, 양성 나일론 멤브레인(Nytran supercharge; Schleicher & Schuell)에 RNA를 흡착시킨 후 UV 크로스링커로 20,000 $\mu J/cm^2$에서 고정하였다. HCV RNA 탐지를 위한 [α-32P]dCTP표지탐침(Probe)은 NS5A 유전자 부위를 주형으로 한 random prime DNA labeling kit (Takara)를 사용하여 합성하였다. 멤브레인은 탐침을 포함한 보합용액(Hybridization solution; 7% SDS, 1 mM EDTA, 0.5 M sodium phosphate, pH 7.2)에 반응시킨 후 x-ray 필름에 감광시켰다.

<95> (9) 재조합 NS5B 단백질의 발현 및 정제

<96> 소수성 C-말단의 21개 아미노산 잔기가 결손된 NS5B 단백질은 pET-28a(Novagen)를 사용하여 *E. coli*의 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 균주에서 6개의 히스티딘 태그를 가지며 발현되었다. 단백질 발현은 1 mM의 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드(IPTG)를 25℃에서 6시간 처리하여 유도되었다. 재조합 단백질은 Ni-NTA 아가로즈 레진(Qiagen)을 사용한 금속 친화 크로마토그래피(metal affinity chromatography)를 사용하여 정제하고, 스핀 콘센트레이터(spin concentrator)(30 K MWCO; Vivascience)를 이용하여 농축시키고, 저장용 버퍼(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM dithiothreitol, 600 mM NaCl, 40% glycerol)에 넣어 -70℃에서 저장했다.

<97> (10) 인 비트로 RNA replicase (RdRp) 활성

<98> 인 비트로 상에서의 RNA replicase 활성 평가는 공지된 방법에 의한다(Lohmann, V., F. Korner, et al. (1997). "Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity." J Virol **71**(11): 8416-28; Oh, J. W., T. Ito, et al. (1999). "A recombinant hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase capable of copying the full-length viral RNA." J Virol **73**(9): 7694-702). 간단히 설명하면, 정제된 NS5B-ΔC21 단백질 0.5μg을 전체 길이(full-length) JFH1 RNA 500 ng과 함께 50 ㎕의 반응 용액(20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM $MgCl_2$, 1 mM 디티오쓰레이톨, 25 mM KCl, 1 mM EDTA, 20 U RNasin (Promega), 25 ug/ml 액티노마이신-D, 5 μCi [α-^{32}P]UTP (3000 Ci/mmol; Perkin Elmer), 50 μM cold UTP 및 500 μM 의 각 NTP들을 포함) 내에서 반응시켰다. 반응은 22℃에서 지시된 시간 동안 진행하고, 프로테아제 K(1 mg/ml 프로테나아제 K, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% SDS, 0.1 mg/ml 이스트 tRNA)를 이용하여 37℃에서 30 분 동안 분해시켜 반응을 종결하였다. 반응물은 동량의 산성 페놀/클로로포름을 사용하여 추출하고, RNA는 이소프로판올을 이용하여 침전시킨 후 1% 포름알데하이드/아가로즈 젤 상에서 분리시켰다. 겔은 나일론 막(Schleicher & Schuell) 상에서 건조시킨 후 엑스레이 필름에 노출시켰다.

<99> **2. 결과**

<100> (1) 장기간(long-term) 계대 동안의 HCV 감염 키네틱스(kinetics)

<101> 인 비트로 상에서 전사된 JFH1 RNA로 전기천공된 Huh-7 세포를 3~6 일 간격으로 5달 동안 계대 배양하였다. HCV 복제 세포는 항-NS5A 항체를 사용하여 각 계대마다 면역형광법으로 모니터링 하였으며, 그 결과를 도 1에 나타냈다. 전기천공 후 2 일째 되는 날의 전기천공된 세포의 35% 이하로 평가된 NS5A 양성 세포의 백분율은 10 일째 되는 날 가파르게 5% 근처로 감소하였으나, 이후 20 일 정도 동안에는 90% 이상으로 급격히 증가하였다. 이 첫 번째 증가 시기 동안에 일부 세포는 둥근 형상으로 배양액에 부유하였다. 그 후 NS5A 양성 세포의 백분율은 약 50% 정도까지 감소하였으나 그 이후 다시 100% 근처까지 다시 증가하였다. 이후 전체적으로 감염된 상태는 세포병변 효과가 전혀 없거나 또는 매우 미약한 정도로 지속되었다. 또 다른 세트의 시험에서는 첫 번째 피크는 관찰되었으나 이후 다시 피크에 오르지 않고 지속적으로 감소되는 양상을 보였다(데이타 보이지 않음).

<102> 본 발명자들이 관찰한 이러한 이상(biphasic) 감염 키네틱스는 JFH1-감염된 Huh-7.5.1 세포에서 보고된 것(Zhong, J., P. Gastaminza, et al. (2006). "Persistent hepatitis C virus infection in vitro: coevolution of virus and host." J Virol **80**(22): 11082-93)과 유사하였다. 그러나, 후자의 실험에서 관찰된 감염성의 빈도 및 극심한 변동 현상은 본 발명에 따른 시험에서는 관찰되지 않았다.

<103> (2) 배양-적응된 돌연변이의 동정

<104> JFH1 RNA로 전기천공된 세포의 장기간 배양 중 첫 번째 피크(전기천공 후 약 35 일 부근)에 다다랐을 때의 배양

액 상에 분비된 바이러스의 감염성을 확인하기 위하여 그 시점의 배양액을 정상 Huh-7 세포에 접종하여 바이러스가 전체 세포에 감염되는 속도를 확인하였다. 그 결과 바이러스의 확산 속도가 전기천공 초기에 수확된 바이러스 보다 더 우수함을 확인하였다(데이타 보이지 않음).

<105> 본 발명자들은 이 시점의 바이러스가 세포에서 더 빠른 확산 속도를 보이는 것은 증가된 감염성을 가지는 돌연변이 바이러스의 출현에 기인할 것으로 추측하였다. 이 시점에서의 배양 상청액내에서 감염성이 높은 바이러스만을 더 증폭시키기 위해 그 시점의 배양액을 새로운(naive) Huh-7 세포에 접종하여 전체적으로 감염시켰다. 이후 감염된 세포에서 RNA를 추출하고 이로부터 HCV RNA를 RT-PCR로 증폭한 후 PCR 산물을 바로 서열 분석하였다.

<106> 바이러스 게놈 전체에 걸쳐 전체적인 서열은 높은 수준으로 보존되어 있었으나, NS5A의 C-말단과 NS5B의 N-말단의 여러 위치에서 혼합된 염기 서열 신호들을 발견하였다. 각각의 돌연변이를 동정하기 위하여, 증폭된 DNA를 클로닝하고 각각의 클론들을 서열 분석하였다. 22 개 클론으로부터 상기 구역 내의 분산된 14 개 위치에서 18 종의 미스센스(missense) 돌연변이를 확인하였는데, 이 중 11 개는 NS5A의 C-말단에 위치하였고 7 개는 NS5B의 N-말단에 위치하였다(도 2 참조). 동정된 돌연변이 중 NS5B 내의 L2468S가 50% 라는 가장 높은 빈도를 보였으며, 그 다음이 NS5A 내의 A2343T(18%) 및 NS5B 내의 Y2475H(14%)였다.

<107> (3) 적응된 돌연변이의 감염성 확인

<108> 특정 돌연변이의 효과를 분석하기 위하여, 세 개의 빈도가 가장 높은 돌연변이들 A2343T, L2468S 및 Y2475H 각각을 JFH1 에 도입하여 각 RNA를 Huh-7 세포에 전기천공하였다. 상기 세 돌연변이 외에, NS5B의 복제능이 결여된 GND 돌연변이(Yamashita, T., S. Kaneko, et al. (1998). "RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region." J Biol Chem **273**(25): 15479-86) 및, 이전에 서브게놈 레플리콘의 NS5B에서 보고된 적응된 돌연변이 H2476L에 대해서도 동일하게 RNA 제작 및 전기천공을 수행하였다.

<109> 바이러스 확산은 면역형광 검정으로 모니터하였고(도 3A) 12 일 동안 매 3 일째마다 세포 계대에 NS5A 항체를 처리하여 유세포 분석(flow cytometry)으로 정량하였다(도 3B). GND를 제외한 모든 제작물에서 전기천공 후 초기에는 세포의 20 내지 50% 에서 NS5A를 발현하였다. JFH1, A2343T, 및 Y2475H의 감염 키네틱스는 전기천공 후 3 일 이후에 급격히 감소한 반면, L2468S 및 H2476L의 경우, 초기에 확산 정도가 다소 지연되었으나, 전체 세포의 약 80% 정도까지 바이러스 확산이 지속적으로 증가하였다. 전기천공 후 4 일째에 배양 상청액에 배출된 감염성 바이러스 입자의 농도는 L2468S에서 약 20,000 $TCID_{50}$/ml에 달했는데, 이는 JFH1의 약 20 배에 달하는 양이다(도 3C 참조). A2343T 및 Y2475H는 바이러스 배출 농도에 있어서 JFH1과 유사했으며 H2476L은 약 4배 가량 높은 정도를 나타내었다. 세포내에서의 RNA 복제 양상은 JFH1과 두 돌연변이(A2343T, Y2475H)에서는 초기에 급격히 복제가 가속화 되지만 3일 이후 급격히 감소하는 양상을 보였다. 반면 H2476L과 L2468S 돌연변이에서는 복제 속도가 다른 바이러스에 비해 느리게 나타나지만 꾸준히 증가하는 양상을 보이는 바, 이상의 양상은 면역형광분석에서 NS5A 양성 세포수의 증가 양상과 유사하다 (도 3D).

<110> 전기천공에 의해 생산된 바이러스의 감염성을 비교하기 위해 각각의 돌연변이 자손 바이러스를 동일 도스(15,000 $TCID_{50}$)로 Huh-7 세포(~5 X 10^5 세포)에 접종하여 비교하였다. 세포의 밀집도가 미치는 바이러스 복제 억제 효과를 최소화하기 위하여(Nelson, H. B. and H. Tang (2006). "Effect of cell growth on hepatitis C virus (HCV) replication and a mechanism of cell confluence-based inhibition of HCV RNA and protein expression." J Virol **80**(3): 1181-90), 감염된 세포는 24 시간 후에 1:4, 1:32 및 1:256 으로 분리하였고, 감염 후 3, 6 및 9일째 되는 날에 각각 유세포 분석 및 면역형광 검정에 의해 분석하였다. 비교를 위하여, JFH1으로 전기천공된 후 35 일째 수확된 배양 상청액도 분석에 포함시켰다. 전술한 실험에 비하여 감염 수준은 매우 낮으나, 전체적인 감염 키네틱스 및 돌연변이들 사이의 감염성에서의 차이는 전기천공 실험에서와 유사하였다(도 4 참조).

<111> 종합하면, 이들 결과는 L2468S 및 H2476L이 JFH1 및 다른 변이체들 보다 현저한 감염성의 증가를 가짐을 나타내며, 이는 L2468S와 같은 배양 적응된 돌연변이가 적어도 부분적으로라도 전기천공 실험(전기천공 후 35 일째에 있는 세포에서와 같이)에서의 바이러스 확장에서의 빠른 증가에 기여하였을 것이라는 본 발명자들의 추측을 뒷받침하는 것이다. 감염성 실험(도 4)은 배출된 입자의 특정 감염성에서의 증가로 인해 L2468S 및 H2476L의 감염성이 증가됨을 나타내는 것이다.

<112>

<113> (4) NS5B 단백질의 효소 활성

<114> L2468S 및 H2476L의 증가된 감염성이 NS5B 단백질의 효소 작용에 의한 것인지를 조사하기 위하여, JFH1, H2476L, L2468S, Y2475H 및 GND의 재조합 단백질들을 E.coli에서 발현시키고 전술한(Ferrari, E., J. Wright-Minogue, et al. (1999). "Characterization of soluble hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in Escherichia coli." J Virol 73(2): 1649-54) 바와 같이 정제하였다(도 5A 참조). RNA replicase (RdRp) 활성은 이전에 기술된 바(Lohmann, V., F. Korner, et al. (1997). "Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity." J Virol 71(11): 8416-28)와 같이 인 비트로에서 전체 길이 JFH1 RNA 주형으로 검정하였다.

<115> 새로이 합성된 RNA의 크기 및 강도(intensity)는 반응이 진행됨에 따라 증가하였다(도 5B 참조). 흥미롭게도, 세 개의 변이체 중 어떤 것도 RNA-의존적인 RNA 폴리머라제 활성이 JFH-1 보다 높지 않았으며, 이는 NS5B의 촉매 활성과 바이러스 감염성 사이에는 어떠한 연관 관계도 없음을 의미한다. RNA 산물들이 주형 RNA 보다 작기 때문에, 본 발명자들은 Oh 와 Ito 등(1999)에 의해 보고된 바와 같은 카피-백 프라임 합성(copy-back primed synthesis)이라기 보다는 드 노보(de novo) 타입의 반응일 것으로 생각한다.

<116> (5) 경감된 세포 독성 및 증가된 감염성의 확인

<117> 최근의 연구에서는 HCV, 특히 JFH-1이 세포 배양에서 세포병변을 일으킬 수 있다고 보고되었다(Zhong, J., P. Gastaminza, et al. (2006). "Persistent hepatitis C virus infection in vitro: coevolution of virus and host." J Virol 80(22): 11082-93). 따라서, 본 발명에 따른 돌연변이의 경우에도 약간의 세포병변 효과는 관찰되었다. 이러한 관찰을 구체화하기 위하여, 전기천공된 세포를 4일 동안 인큐베이션한 후 생존 가능한 세포를 계수하였다. 세포독성은 최초 세포 수의 배수로서 생존 가능한 세포의 총 수인 증가 배수(fold-expansion)로 표시된다. 놀랍게도, H2476L 및 L2468S는 약 3배의 증가 배수를 나타내었는데, 이는 복제-불능인 GND 균주 보다는 낮지만 JFH1 및 다른 두 변이체들 보다는 두 배 높은 수치이다(도 6 참조).

<118> 바이러스의 세포독성 특성을 더 이해하기 위하여, 전기천공된 세포에서의 바이러스 단백질의 발현을 면역형광 검정으로 검사하였다. 흥미롭게도, 적응된 돌연변이 사이에서 NS5A 단백질 발현에 있어 주목할 만한 차이점이 발견되었다. JFH1, A2343T 또는 Y2475H로 전기천공된 세포의 대다수는 NS5A 단백질이 강한 형광을 보이는 미립자 구조로 나타나며 종종 핵 주변부에 군집되어 있는 반면, H2476L 또는 L2468S로 전기천공된 세포 대부분은 세포질 전체에 걸쳐 균일하게 분산된 약한 형광이 나타났다(도 7A 참조). 실제로, 유세포 분석 결과 또한 L2468S와 H2476L을 가지는 세포는 NS5A의 평균 형광 강도가 각각 JFH1으로 전기천공된 세포의 40%와 56% 정도의 강도를 보였고 나머지 두 변이체의 경우 JFH-1과 유사한 강도를 나타내었다(도 7B 참조). 바이러스 감염성 및 바이러스 단백질 수준 사이의 이러한 역비례 관계 또한 증가된 감염성이 경감된 세포독성에 의한 것이라는 가설을 뒷받침해 준다. NS3 단백질 또한 유사한 패턴을 보였다(데이타 보이지 않음).

<119> 세포독성에 관해 좀 더 고찰하기 위하여, NS5A 단백질을 면역 블로팅으로 시각화하였다. 이전에 보고된(Goh, P. Y., Y. J. Tan, et al. (2001). "The hepatitis C virus core protein interacts with NS5A and activates its caspase-mediated proteolytic cleavage." Virology 290(2): 224-36; Kalamvoki, M. and P. Mavromara (2004) "Calcium-dependent calpain proteases are implicated in processing of the hepatitis C virus NS5A protein." J Virol 78(21): 11865-781; Kalamvoki, M., U. Georgopoulou, et al. (2006) "The NS5A protein of the hepatitis C virus genotype 1a is cleaved by caspases to produce C-terminal-truncated forms of the protein that reside mainly in the cytosol." J Biol Chem 281(19): 13449-62) 바와 같이, 약 58 kDa 크기의 단백질로부터 유래한 50, 39, 30 및 25 kDa 크기의 보다 작은 단백질 가수분해 산물들이 항-NS5A 항체와 반응하였다. 흥미롭게도, 그러한 절단 산물들은 H2476L에는 존재하지 않았으며, L2468S의 경우 아주 적은 양으로만 존재하였다(도 8 참조). NS5A는 세포사멸적(apoptotic) 자극에 의해 활성화된 세포질 카스파제에 의해 절단된다는 보고가 있었다(Goh, P. Y., Y. J. Tan, et al. (2001). "The hepatitis C virus core protein interacts with NS5A and activates its caspase-mediated proteolytic cleavage." Virology 290(2): 224-36; Kalamvoki, M. and P. Mavromara (2004) "Calcium-dependent calpain proteases are implicated in processing of the hepatitis C virus NS5A protein." J Virol 78(21): 11865-781; Kalamvoki, M., U. Georgopoulou, et al. (2006) "The NS5A protein of the hepatitis C virus genotype 1a is cleaved by caspases to produce C-terminal-truncated forms of the protein that reside mainly in the cytosol." J Biol Chem 281(19): 13449-62). 그러나, 세포성 폴리(ADP)-리보스 폴리머라제 (PARP) 단백질의 단백질 가수분

해적 절단은 본 실험에서는 검출되지 않았다. 또한, 세포성 DNA의 세포사멸적 단편들 또한 전혀 검출되지 않았다(데이타 보이지 않음). 따라서, NS5A 절단을 제외하면, HCV 감염에 의해 유도되는 세포사멸적 세포사에 대한 어떠한 명확한 증거도 관찰하지 못했다. 바이러스 NS3 및 세포성 Hsp70 단백질의 발현에 있어서 돌연변이 사이에서 큰 차이는 없었다.

발명의 효과

<120> 이상 자세히 설명한 바와 같이, 본 발명에서는 HCV 바이러스의 세포배양 적응된 새로운 변이주들을 동정하였는데, 이들은 기존 HCV 에 비하여 복제능 및 감염성이 향상된 변이주이다. 따라서, 본 발명에 따른 변이주는 HCV 바이러스의 복제 및 감염성에 관한 기작 연구 및 나아가 항 HCV 약물의 개발 및 연구에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 장기 계대(passage) 동안의 JFH-1 HCV의 감염 키네틱스(kinetics)를 나타내는 것으로서, 20㎍의 JFH-1 HCV RNA로 전기천공(electroporation) 되어 5 개월 동안 3-6 일 간격으로 계대 배양한 Huh-7 세포를 NS5A(녹색) 및 DAPI(파랑)에 대해 면역 형광으로 염색하여, 도 1A는 IPLab v3.6.5 이미지 분석 소프트웨어(Scanalyticss, Inc.)를 사용하여 전기천공 후 지시된 날짜(dpe)에 NS5A 양성 세포를 계수하여 백분율을 표시한 그래프이고, 도 1B는 도 1A의 그래프에서 화살표로 나타낸 시기의 세포 이미지를 나타낸다.

<2> 도 2는 세포배양 적응된 돌연변이를 나타내는 것으로서, 전기천공 후 35 일째에 수확된 배양 상청액으로 접종된 Huh-7 세포로부터 추출된 바이러스 RNA를 RT-PCR로 증폭하여 염기 서열 분석한 결과이다. 특히 NS5A 의 C-말단과 NS5B의 N-말단에 해당하는 핵산을 RT-PCR 법으로 증폭하고 클로닝하여 얻은 22 개의 독립적인 클론을 서열화하여 JFH-1과 상이한 염기를 가진 특정 돌연변이의 위치 및 빈도를 막대로 나타내었다. 도면의 아미노산 번호는 HCV 폴리프로테인의 아미노산 번호이다.

<3> 도 3은 돌연변이 바이러스의 복제성을 나타내는 것으로서, 도 3A는 돌연변이 HCV RNA로 전기천공된 Huh-7 세포를 3일 간격으로 1:8 분리율 (split ratio)로 계대 배양한 후 NS5A(녹색) 및 DAPI(파랑)에 대해 염색한 결과이고, 도 3B는 NS5A-양성 세포의 백분율을 유세포 분석에 의해 측정한 결과이며, 도 3C는 전기천공 후 4 일째의 배양 상청액 내의 감염성 바이러스의 농도를 $TCID_{50}$ 검정으로 측정한 결과이다. 도 3D는 전기천공 후 1, 3, 5 일째 세포내의 바이러스 RNA를 노던블롯으로 분석한 결과이다.

<4> 도 4는 자손 바이러스의 감염성을 나타내는 것으로서, 전기천공된 세포의 배양 상청액 중의 자손 바이러스를 동일 도스(dose)(15,000 $TCID_{50}$)로 Huh-7 세포(~5 X 10^5 세포)에 접종한 후, 도 4A는 상기 세포를 24 시간 후 1:4, 1:32 및 1:256의 희석율로 배양용기에 담아 각각 3, 6 및 9 일 동안 배양한 후 NS5A(녹색)에 대해 염색한 결과이며, 도 4B는 유세포 분석기로 NS5A-양성 세포의 백분율을 측정한 그래프로서, 여기서 JFH-1(D35)은 도 2에서 언급된 돌연변이 바이러스들을 포함하고 있는 배양 상청액이다.

<5> 도 5는 재조합 NS5B 단백질의 RNA 중합효소 활성을 나타내는 것으로서, 도 5A는 재조합 NS5B 단백질을 정제하여 10% 폴리아크릴아미드 젤에서 전기영동 후 쿠마시 브릴리언트 블루 G-250으로 염색한 결과를 나타내며, 도 5B는 재조합 NS5B 단백질의 RNA 중합효소 활성을 HCV RNA를 주형으로 하여 검정한 것으로서, 새로 합성되는 과정에서 방사선 동위원소로 표지된 RNA를 포름알데히드 아가로스 젤에서 전기영동 후 방사선 이미지를 분석한 결과이다. 왼쪽에는 RNA 크기 마커의 위치가 나타나 있다.

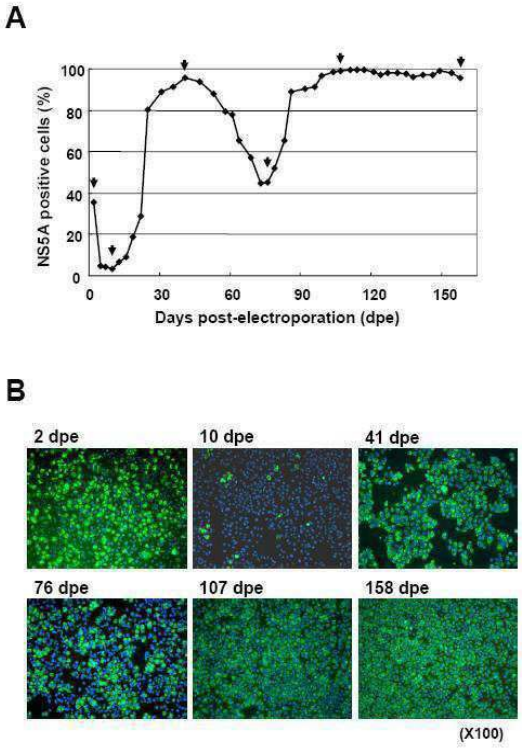
<6> 도 6은 HCV의 세포병변 효과를 나타내는 것으로서, 도 6A는 각 돌연변이의 RNA로 전기천공한 Huh-7 세포를 전기천공 후 4 일째에 촬영한 사진이고, 도 6B는 세포 성장 정도를 초기 세포 수에 대한 증가 배수(fold-expansion)로 나타낸 것이다.

<7> 도 7은 NS5A 단백질의 발현 수준 및 세포 내 위치를 나타내는 것으로서, 도 7A는 전기천공 후 3 일째에 NS5A 항체로 면역염색한 Huh-7 세포를 나타내고, 도 7B는 FACS에 의해 형광 강도를 분석한 결과를 나타낸다.

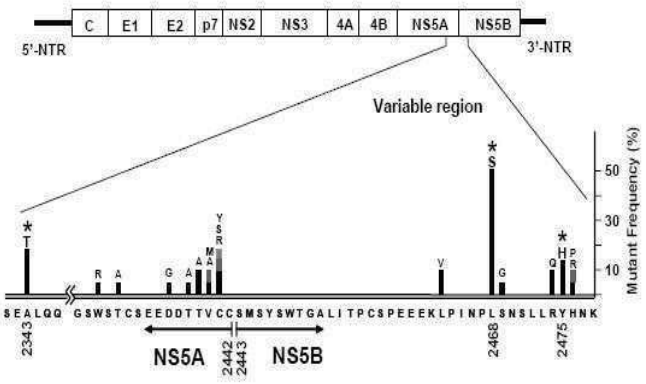
<8> 도 8은 단백질분해효소에 의한 NS5A 분해를 조사한 결과로서, 전기천공 후 3 일째에 Huh-7 세포의 용해물(45㎍ 단백질)을 NS5A, NS3, PARP 및 HSP70 단백질에 대해 면역블로팅으로 분석하였다. 각 단백질의 위치는 화살표로 표시하였고, NS5A의 주 분해 산물들은 별표로 표시하였다.

도면

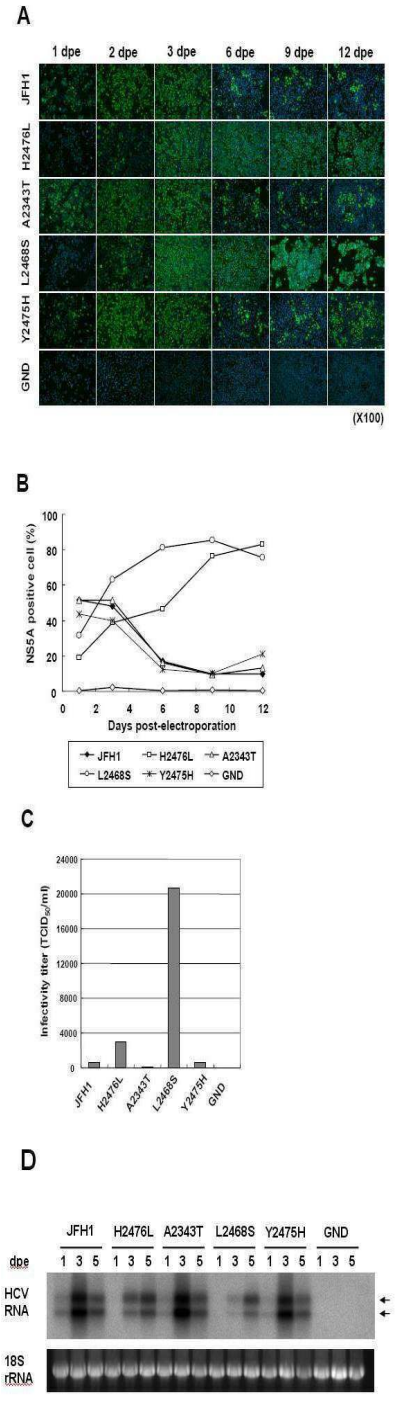
도면1


A
NS5A positive cells (%)
100
80
60
40
20
0
0
30
60
90
120
150
Days post-electroporation (dpe)
B
2 dpe
10 dpe
41 dpe
76 dpe
107 dpe
158 dpe
(X100)

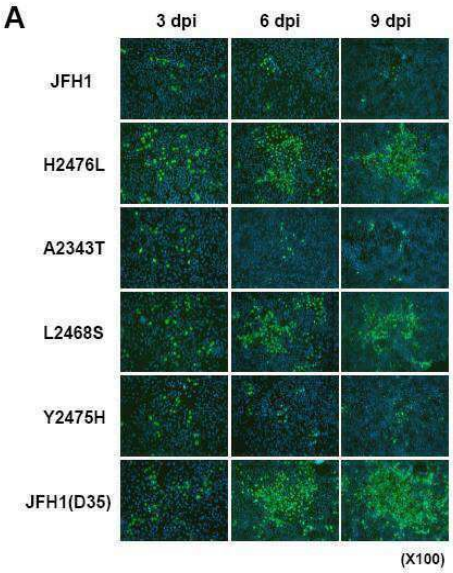
도면2

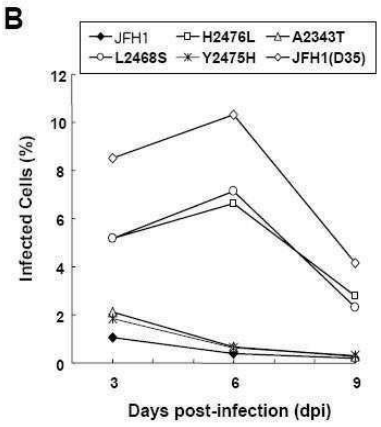

C
E1
E2
p7
NS2
NS3
4A
4B
NS5A
NS5B
5'-NTR
3'-NTR
Variable region
Mutant Frequency (%)
50
30
10
SEALQQ GSWSTCSEEDDTTVCCSMSYSWTGALITPCSPEEEKLPINPLSNSLLRYHNK
2343
2442
2443
2468
2475
NS5A
NS5B

도면3

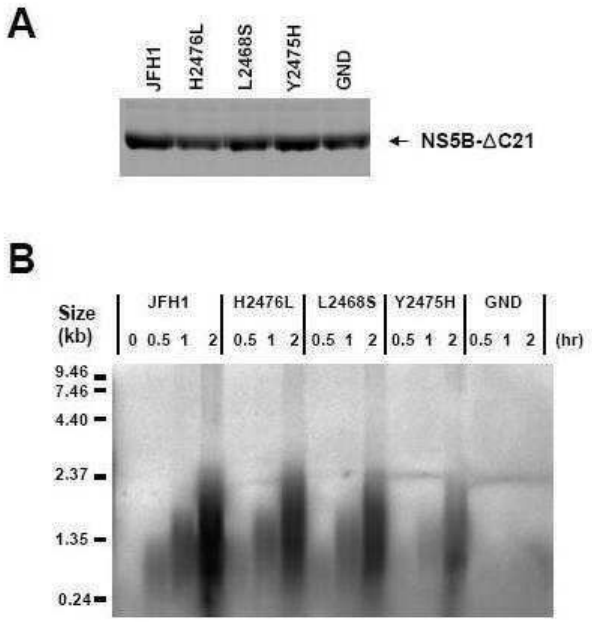

A
1 dpe
2 dpe
3 dpe
6 dpe
9 dpe
12 dpe
JFH1
H2476L
A2343T
L2468S
Y2475H
GND
(X100)
B
NS5A positive cell (%)
Days post-electroporation
JFH1
H2476L
A2343T
L2468S
Y2475H
GND
C
Infectivity titer (TCID50/ml)
D
dpe
HCV RNA
18S rRNA

도면4

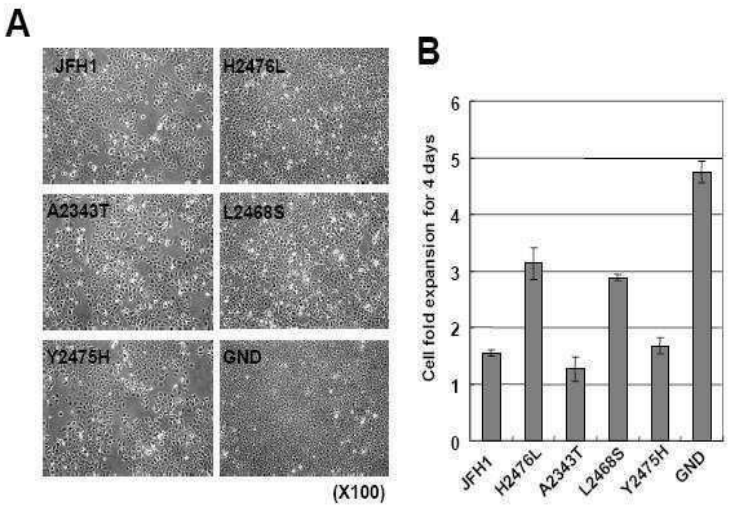

A
3 dpi
6 dpi
9 dpi
JFH1
H2476L
A2343T
L2468S
Y2475H
JFH1(D35)
(X100)


B
JFH1
H2476L
A2343T
L2468S
Y2475H
JFH1(D35)
Infected Cells (%)
12
10
8
6
4
2
0
3
6
9
Days post-infection (dpi)

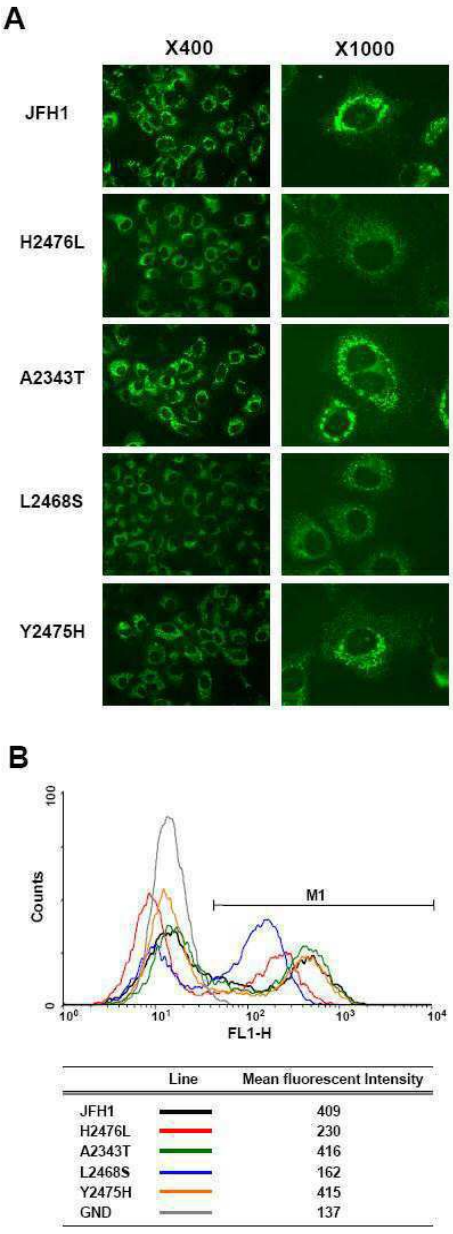
도면5


A
JFH1
H2476L
L2468S
Y2475H
GND
← NS5B-ΔC21
B
Size (kb)
JFH1
H2476L
L2468S
Y2475H
GND
0 0.5 1 2 0.5 1 2 0.5 1 2 0.5 1 2 0.5 1 2 (hr)
9.46
7.46
4.40
2.37
1.35
0.24

도면6

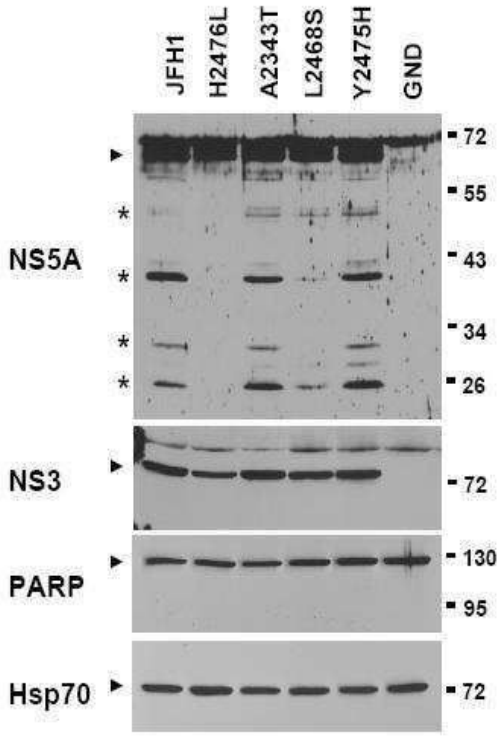

A
JFH1
H2476L
A2343T
L2468S
Y2475H
GND
(X100)
B
Cell fold expansion for 4 days
0
1
2
3
4
5
6
JFH1
H2476L
A2343T
L2468S
Y2475H
GND

도면7



Line	Mean fluorescent Intensity
JFH1	409
H2476L	230
A2343T	416
L2468S	162
Y2475H	415
GND	137

도면8


JFH1
H2476L
A2343T
L2468S
Y2475H
GND
NS5A
NS3
PARP
Hsp70
72
55
43
34
26
72
130
95
72