



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0095095
(43) 공개일자 2012년08월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 7/01 (2006.01) C12N 15/51 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0014543

(22) 출원일자 2011년02월18일

심사청구일자 2011년02월18일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

황순봉

경기도 안양시 동안구 평촌동 898-2 초원마을 대림 210동 1703호

임윤숙

경기도 안양시 동안구 흥안대로155번길 29, 202호 (호계동)

(74) 대리인

강성혜

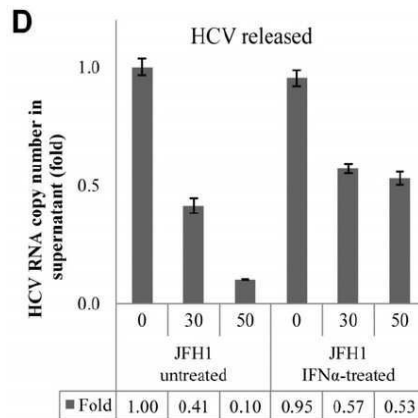
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 인터페론 알파 저항성 C형 간염 바이러스

(57) 요약

인터페론 알파를 이용한 만성C형간염환자의 치료가 실패하는 분자적 원인을 조사하기 위해 C형간염바이러스(HCV)중 인터페론 알파에 저항성을 보이는 클론을 확립하고자 JFH-1에 감염된 세포주 Huh7.5에 인터페론 알파를 낮은 농도로 장시간 처리한 후 100 U/ml의 인터페론 알파 처리농도에서 살아남는 클론을 선별하였다. 이 클론의 유전분석을 통해 비구조유전자5A(NS5A)의 C-말단쪽 코딩서열 4곳이 치환되어 변이가 일어난 것을 확인하였다. 그리고 이 네 군데의 변이를 야생형의 JFH-1에 주입함으로써 인터페론 알파에 저항성을 보이는 새로운 HCV 클론을 만들어 낼 수 있었다. 이러한 결과는 NS5A 단백질 4 곳의 아미노산 서열 변화가 인터페론 알파 저항성에 관여하며 새롭게 확립된 저항성 클론이 HCV 환자의 인터페론 알파 저항성 기작을 설명하는 도구가 됨을 말해주고 있다.

대표도 - 도3d



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2008-2004100
부처명	교육과학기술부
연구사업명	고빈도 돌연변이 바이러스 증식제어를 위한 기반기술 연구
연구과제명	C형 간염바이러스 증식제어 기술 개발
주관기관	한림대학교 산학협력단
연구기간	2008.08.01 ~ 2013.07.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	ROA-2007-000-20051-0
부처명	교육과학기술부
연구사업명	국가지정연구실(NRL)
연구과제명	C형 간염바이러스의 복제 및 신호전달 조절 타겟을 이용한 제어기술 개발
주관기관	한림대학교 산학협력단
연구기간	2007.07.01 ~ 2012.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

NS5A 단백질의 C-말단 부위에서 아미노산 서열 445, 458, 459 및 464의 변이를 포함하는 인터페론 알파 저항성 C형 간염 바이러스.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 변이는 A445P, E458Q, E459Q 및 V464L임을 특징으로 하는 인터페론 알파 저항성 C형 간염 바이러스.

청구항 3

NS5A 단백질의 C-말단 부위 중 아미노산 서열 445, 458, 459 및 464의 변이 여부를 확인하여 C형 간염 바이러스의 인터페론 알파 저항성을 판단하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 변이는 A445P, E458Q, E459Q 및 V464L임을 특징으로 하는 C형 간염 바이러스의 인터페론 알파 저항성을 판단하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 C형 간염 환자에게서 발생하는 인터페론 알파 저항성 메커니즘을 밝히기 위해 제조한 인터페론 알파 저항성 HCV 클론에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] C형 바이러스 간염은 세계적으로 1억 7천만 명이 감염 상태인 질병으로 중요한 보건의 문제로 인식되고 있다 [Moradpour, D. et al., (2007) Nat. Rev. Microbiol. 5, 453~463, Giannini, C. and Brechot, C. (2003) Cell Death Differ. 10, S27~S38, Suzuki, T. et al., (2007) Adv. Drug Deliv. Rev. 59, 1200~1212, Lindenbach, B.D. and Rice, C.M. (2005) Nature 436, 933~938]. HCV (Hepatitis C virus)는 플라비비리과 (Flaviviridae) 과, 헤파시바이러스 (Hepacivirus) 속에 속하며 양성-센스 RNA를 껍질로 싸고 있는 형태의 바이러스이다. 6개의 유전자 형태로 분류되며 다양한 아류형이 존재한다. 바이러스의 게놈은 커다란 폴리프로틴 전구체를 코딩하고 있는데 이 단백질 전구체는 번역후 수식을 통해 코어단백질, E1, E2의 세 구조단백질과 7개의 비구조단백질 (p7, NS2-NS5B)로 절단된다. HCV에 지속적으로 감염되어 있을 경우 만성간염의 원인이 되며 이는 간경화나 간암으로 발전하게 된다. 발병율이 높음에도 불구하고 HCV의 백신은 아직 개발되지 않았다. C형 만성간염의 유일한 치료법은 폴리에틸렌글리콜과 결합된 인터페론 알파를 매주 피하투여하고, 매일 구아노신 유사체 리바비린 (ribavirin)을 투여하는 것이다. 이 치료방법은 유전자형에 따라 지속적 바이러스 반응 (SVR; sustained virological response) 면에서 큰 차이를 보인다 [Hadziyannis, S.J., et al., (2004) Ann. Intern. Med. 140, 346~355]. 1형 유전자형에서는 50%, 2형 및 3형의 경우 70~80%의 SVR 값을 보인다. SVR은 치료 중에 검출할 수 있는 HCV RNA의 소실과 치료 후 6개월간 지속적으로 검출되지 않는 상태로 정의한다. 반면에 초기 바이러스 반응 (EVR; early virological response)은 치료 12주 후 2log10 이상의 바이러스 감소로 정의한다. EVR을 보이지 않는 환자들은 SVR도 보이지 않게 된다 [Ferenc, I.P. et al., (2005) J. Hepatol.

43, 425~433, Davis, G.L. et al., (2003) Hepatology 38, 645~652].

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 본 발명자들은 C형 간염 환자에게서 발생하는 인터페론 알파 저항성 메커니즘을 조사하기 위해 인터페론 알파 저항성 HCV 클론을 제조하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0004] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명자들은 C형간염바이러스 (HCV) 중 인터페론 알파에 저항성을 보이는 클론을 확립하고자 JFH-1에 감염된 세포주 Huh7.5에 인터페론 알파를 낮은 농도로 장시간 처리한 후 100 U/ml의 인터페론 알파 처리농도에서 살아남는 클론을 선별하였다. 이 클론의 유전분석을 통해 비구조유전자5A (NS5A)의 C-말단쪽 코딩서열 4곳이 치환되어 변이가 일어난 것을 확인하였다. 그리고 이 네 군데의 변이를 야생형의 JFH-1에 주입함으로써 인터페론 알파에 저항성을 보이는 새로운 HCV 클론을 만들어 낼 수 있었다. 이러한 결과는 NS5A 단백질 4 곳의 아미노산 서열 변화가 인터페론 알파 저항성에 관여하며 새롭게 확립된 저항성 클론이 HCV 환자의 인터페론 알파 저항성 기작을 설명하는 도구가 됨을 말해주고 있다.

[0005] 유전자형 2a에 해당하는 JFH-1은 현재 배양이 가능한 유일한 감염성 클론이며 [Wakita, T. et al., (2005) Nat. Med. 11, 791~796], 유전자형 2a 바이러스에 감염된 환자의 20~30%는 여전히 인터페론 알파가 듣지 않기 때문에 이 클론을 사용하였다. JFH-1에 감염된 huh7.5 세포주에 10 U/ml의 인터페론을 45일간 처리하고 그 후 45일간은 30 U/ml의 농도로 처리하였다. NS5A 단백질 C-말단 4 곳에서 서열변화가 일어났음을 확인하였다. 야생종을 이 변이 서열로 교체한 결과 인터페론 알파에 대해 야생종보다 높은 저항성을 보였다. 이러한 결과들로 보아 NS5A 단백질의 유전적 변화가 인터페론 알파 저항성 형질에 관여할 수 있음을 알게 되었다.

[0006] 본 발명자들은 C형 만성 간염환자에서 보이는 인터페론 알파의 저항성에 관련된 분자적 기작을 설명하기 위해 인터페론 알파에 저항성을 보이는 JFH-1 클론을 제작하였다.

[0007] 고농도의 인터페론을 장시간 처리하면 HCV가 모두 사라질 수 있으므로 JFH-1을 감염시킨 Huh7.5 세포주에 45일간은 10 U/ml 농도의 인터페론 알파를, 그 후 45일간은 30 U/ml 농도의 인터페론 알파를 넣어 배양하였다. 그 결과, 인터페론 알파의 처리와 관계 없이 여섯 군데 (S448W, S450W, S457P, D461N, T462P, C465G)에서 변이가 일어남을 알아내었다. 하지만, 인터페론 알파 처리군에서만 특이하게 NS5A 단백질의 C-말단 부위에서 4 군데 (A445P, E458Q, E459Q, V464L)의 변이가 발생하였다.

[0008] 이 네 변이 서열을 야생형의 JFH-1에 넣어 인터페론 알파에 대한 저항성을 조사하였다. 그 결과 이 네 곳의 변이를 갖고 있는 JFH-1은 야생종보다 인터페론 알파에 대한 큰 저항성을 보였다. 이 네 곳의 변이는 인터페론을 처리하지 않고 장시간 배양한 바이러스에서는 발견되지 않은 변이이기 때문에 이 변이가 인터페론 저항성을 획득하는데 관여하는 변이일 것으로 생각되었다. 특히 비처리군에서 나타났던 6군데의 변이는 인터페론 알파 저항성에 관여하지 않았다.

[0009] Namba 등은 기존에 인터페론 알파 저항성 형질을 나타내는 HCV 레플리콘을 확립하였으나 [Namba, K. et al., (2004) Establishment of hepatitis C virus replicon cell lines possessing interferon-resistant phenotype. Biochem. Biophys. Res. Commun. 323, 299~309], 본 발명에서는 HCV의 전체 게놈이 사용되었기 때문에 인터페론 알파의 저항성 기작을 연구하는데 있어 기존에 사용되었던 HCV 레플리콘 세포보다 본 발명에서 확립된 HCV 클론이 더 적합하다고 할 수 있다.

[0010] 기존의 연구에 따르면 HCV는 인터페론 알파의 신호를 조절하여 바이러스의 복제를 향상시킨다고 한다 [Bode, J.G. et al., (2003) FASEB J. 17, 488~490, Blindenbacher, A. et al., (2003) Gastroenterology 124, 1465~1475, Miller K. et al., (2004) J. Interferon Cytokine Res. 24, 391~402, Geiss, G.K. et al., (2003) J. Virol. 77, 6367~6375]. 하지만 ISG15의 발현이 인터페론 알파의 처리와 관련이 없는 것으로 보아 저항성 기작은 아마도 인터페론 알파 신호체계가 아닌 다른 기작을 통해 일어날 것으로 생각된다. 하지만 이를 설명하

기에는 더 많은 연구가 필요하다. 본 발명자들은 인터페론 알파에 저항성을 보이는 HCV 클론을 성공적으로 확립하였다. 저항성 클론에서 발생한 네 곳의 변이는 아마도 인터페론 알파에 의한 선택적 압력을 장시간 겪은 후 발생한 것으로 보인다. 이러한 변이 부위가 NS5A 단백질에만 국한되었다는 사실은 주목할 만하다. 이러한 변이 부위는 NS5A에서 인터페론의 민감성을 결정하는 부위 (Interferon sensitive determining region; ISDR)와 겹치지 않았기 때문에 ISDR 이외의 다른 요인이 인터페론 알파-저항성에 관여하는 것으로 생각된다.

[0011] 본 발명은 NS5A 단백질의 C-말단 부위에서 아미노산 서열 445, 458, 459 및 464의 변이를 포함하는 인터페론 알파 저항성 C형 간염 바이러스를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 변이가 A445P, E458Q, E459Q 및 V464L임을 특징으로 하는 인터페론 알파 저항성 C형 간염 바이러스를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 NS5A 단백질의 C-말단 부위 중 아미노산 서열 445, 458, 459 및 464의 변이 여부를 확인하여 C형 간염 바이러스의 인터페론 알파 저항성을 판단하는 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 변이가 A445P, E458Q, E459Q 및 V464L임을 특징으로 하는 C형 간염 바이러스의 인터페론 알파 저항성을 판단하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따르면, 인터페론 알파를 처리한 군에서만 특이하게 NS5A 단백질의 C-말단 부위에서 4군데 (A445P, E458Q, E459Q, V464L)의 변이가 발생한 인터페론 알파 저항성 HCV 클론을 확보하였다.

[0016] 본 발명의 인터페론 알파 저항성 HCV 클론은 C형 간염환자의 인터페론 알파 저항성 기작을 설명해주는 데 유용한 도구로 활용될 수 있으며, 효과적인 C형 간염 바이러스에 대한 약제 개발에 이용할 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명은 C형 간염 바이러스의 NS5A 단백질 C 말단 부위의 4군데 변이 여부를 확인함으로써 인터페론 알파 저항성인지를 파악하여 효과적인 치료 방법을 판단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1a, b는 90일간 인터페론 처리 후 저항성 HCV 클론의 동정을 나타낸 것이다. (1a) Huh7.5 세포에 JFH-1으로 감염시킨 후 두 그룹으로 나누었다. 한 그룹은 인터페론을 처리하지 않았고 다른 한 그룹은 45일간 10 U/ml의 농도로, 그 후 45일간은 30 U/ml의 농도로 인터페론 알파를 처리하였다. 인터페론 알파에 대한 민감성을 처리하기 위해 두 그룹에 2일간 인터페론 알파를 처리한 후 면역블랏을 이용하여 단백질 발현을 조사하였다. (1b) (1a)에서 얻은 세포 내 RNA를 실시간 RT-PCR로 조사하였다 (위 패널). 비처리군 (1-3 라인)과 처리군 (4-6 라인)을 표준화(normalize)하여 비교하였다 (아래 패널).

도 2a는 서열분석 지도이다. JFH-1 게놈을 겹치는 5조각으로 나눈 후 각 단편을 서열분석하였다. 사용된 프라이머를 나타내었다.

도 2b는 인터페론 알파 저항성 HCV클론의 게놈 분석 데이터이다. 시험군(인터페론 알파 처리군)과 대조군(인터페론 알파 비처리군) 세포로부터 세포내 RNA를 추출하였다. 서열이 겹치도록 5개의 단편을 얻어 76-9255까지의 조각을 증폭하였다. 원래 JFH-1, 시험군(처리군), 대조군(비처리군)의 서열을 비교하였다. 네모 상자로 표시한 부분은 인터페론 알파 저항성에 관여하는 변이이다 (위 패널은 뉴클레오타이드, 아래 패널은 단백질). 화살표는 인터페론 알파 처리와 무관하게 발생한 변이를 보여준다. "Original"로 표시한 서열은 원래 JFH-1의 서열이다.

도 3a, 3b, 3c, 3d는 새롭게 확립된 HCV 클론의 인터페론 알파 저항성 검증 데이터이다. (3a) Huh7.5세포를 비처리에서 발생한 6개의 변이와, 인터페론 알파 처리에서 발생한 10개의 변이를 포함한 RNA를 합성하여 감염시켰다. 4일 후 배양액에서 HCV의 존재를 RT-PCR로 확인하였다. (3b) Huh7.5 세포를 비처리 바이러스와 인터페론처리 바이러스로 감염시켰다. 감염 1일 후 세포들을 표시한 인터페론 알파 농도에서 2일간 배양하였다. 총 세포추출액과 NS5A항체, GAPDH항체를 이용하여 면역블랏을 수행하였다. (3c) (3b)에서 추출한 세포내 RNA를 RT-PCR로 분석하였다. 밴드의 강도는 Image J로 분석하였다. (3d) 세포배양액에서 얻은 HCV RNA를 실시간

RT-PCR로 분석하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 살펴본다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에 의하여 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0020] <실시예 1: 세포배양>

[0021] Huh7.5 세포는 10% FCS(Fetal Calf Serum) (Gibco), 비필수아미노산, 100 unit/ml의 페니실린/스트렙토마이신이 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)에서 배양하였다. 인터페론 알파 저항성 클론의 선별을 위해서 약 7.5×10^6 개의 Huh7.5 세포를 전기천공하여 JFH-1 RNA를 주입하였다. 이때 사용한 양은 10 μ g이다. 전기천공 2일 후 세포를 두 그룹으로 나누어 한 그룹은 인터페론을 처리하지 않고 배양하였고, 다른 그룹은 45일간 10 U/ml, 또 45일간 30 U/ml 농도의 인터페론 알파를 가하여 배양하였다. HCV의 존재는 NS5A 항체를 사용한 면역블랏을 통해 지속적으로 조사하였다.

[0022] <실시예 2: 바이러스 RNA의 전사와 감염>

[0023] JFH-1 RNA 계층은 종래 방법에 따라 만들어졌다 [Wakita, T. et al., (2005) *Nat. Med.* 11, 791~796]. 간단히 설명하면, pJFH-1 플라스미드를 *Xba*I로 절단하여 선형화하였다. RNA 전사체는 Promega T7 RiboMAX 발현 키트를 이용하여 만들었으며 Invitrogen Trizol LS로 정제하였다. 10 μ g의 합성된 JFH-1 RNA를 7.5×10^6 개의 Huh7.5 세포와 섞은 후 0.4-cm 크기의 큐벳을 이용하여, 300V, 975 uF에서 전기천공하였다. 이때 사용된 기기는 Bio-Rad Gene Pulser II 전기천공기(electroporator)이다. 그 후 세포를 배지 (10% FBS, 100 units/ml 페니실린/스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민, 1 mM NEAA 및 10 mM HEPES를 함유한 저농도 포도당 DMEM)에 조심스럽게 옮겨 넣고 37°C에서 배양하였다.

[0024] <실시예 3: 단백질 추출 및 면역블랏>

[0025] 세포를 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), 1% NP-40(nonidet P-40), 0.25% 소듐 디옥시콜린산(sodium deoxycholate), 1 mM Na_3VO_4 (sodium orthovanadate), 1 mM NaF(sodium fluoride), 1 mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride) 및 1mM β -글리세로인산(glycerophosphate)을 함유하는 RIPA 완충액에 넣어 얼음에서 15분간 반응하여 녹여 내었다. 단백질 농도는 Bradford 방법을 이용하여 측정하였다. 같은 양의 단백질을 SDS-PAGE 전기영동하여 나이트로셀룰로즈 막으로 이동시켰다. 이 막을 블로킹 완충액 {TBST(Tris buffered saline/Tween)} (20 mM Tris HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 및 0.05% Tween 20, 5% 무지방 분유)으로 1시간 동안 블로킹한 다음 1차 항체로 4°C에서 1시간 동안 처리하였다. TBST로 3회 세척한 후 상온에서 1시간 동안 2차 항체를 처리하였다. 단백질은 ECL 키트로 동정하였다 (Elpis Biotech Inc). 항 HCV 코어 항체는 발표된 논문 내용과 같다 [Choi, S.H., Park, K.J., Kim, S.Y., Choi, D.H., Park, J.M. and Hwang, S.B. (2005) Cterminal domain of hepatitis C virus core protein is essential for secretion. *World J. Gastroenterol.* 11, 3887-3892]. HCV NS3 및 NS5A의 항체는 안병윤 박사(고려대학교)를 통해 얻었다. ISG15와 GAPDH는 Santa Cruz Biotechnology에서 구매하였다.

[0026] <실시예 4: HCV RNA 정량>

[0027] 세포내 및 외부의 RNA를 트리졸 제제(Trizol reagent)(Invitrogen)를 이용하여 추출하였다. cDNA는 SuperScript VILO™ cDNA 합성 키트(Invitrogen)를 이용하여 역전사하여 합성하였다. 정량적인 실시간 PCR은 iQ5 multicolor Real-time PCR Detection system (Bio-Rad)과 HCV 5'NTR, β -액틴 특이적 프라이머를 이용하여 다음 조건에서 수행하였다. 95 °C에서 15분간 가열, 그 후 95 °C에서 20초, 55 °C에서 20초, 72 °C에서 20초 조건을 40사이클 수행, 60 °C 에서 0.5 °C씩 올려 10초간 유지하여 95 °C로 올리는 사이클을 71회 하였다. HCV 5'NTR 서열을 T-A벡터(RBC)에 클로닝하여 넣었으며 실시간 PCR의 표준물질로 사용하였다. 이 표준물질을

시험군과 병행하여 실험하였으며 RNA 절대적 카피수는 이 표준곡선에 근거하여 산정하였다.

<실시예 5: HCV 게놈 서열 분석>

HCV 게놈 서열 분석을 위해 세포 내 RNA를 JFH-1으로 감염된 Huh7.5 세포로부터 트리졸 제제(Invitrogen)를 이용하여 추출하였다. cDNA는 앞서 기술한 바와 같이 합성되었으며 PCR을 통해 76-9255 뉴클레오타이드 부분을 증폭하였다. PCR 산물은 아가로스 전기영동을 통해 정제하였으며 서열분석에 이용하였다.

결과 1: 세포배양시스템을 이용한 인터페론 알파저항성 HCV 클론의 동정

C형 간염 환자가 보이는 인터페론 알파 저항성 기작을 분자적으로 설명하기 위해 인터페론 알파 저항성 JFH-1 종(2a 유전자형)을 개발하고자 하였다. 전기충격을 주어 JFH-1 RNA로 Huh7.5 세포주를 감염시켰다. 감염 2일 후, 인터페론 알파를 10 U/ml의 농도로 처리하였다. 45일간 이틀마다 계대배양하였으며 이 기간 동안 인터페론 알파의 농도를 10 U/ml로 유지하였다. 그 후 45일간 30 U/ml로 올려서 처리하였다. 인터페론을 처리하지 않은 감염 세포주 Huh7.5를 대조군으로 삼았다. 지속적으로 배양하는 과정에서 HCV에 감염되었다는 사실은 NS5A 항체를 이용한 면역블랏법을 통해서 확인하였다 (결과제시안함). 이렇게 90일 동안 배양한 JFH-1 바이러스가 인터페론 알파에 민감성을 보이는지 조사하였다. 이를 위해 JFH-1을 감염시킨 Huh7.5 세포에 2일 동안 다양한 농도의 인터페론 알파를 처리하였다. 도 1a에서 보는 바와 같이 인터페론 알파는 HCV의 NS5A 단백질의 발현을 저해하였으며 이는 두 그룹(시험군, 대조군)에서 농도에 비례하여 나타났다. 하지만 90일 동안 인터페론 알파가 존재한 상태에서 배양되었던 JFH-1 바이러스에서는 그렇지 않았던 대조군보다 NS5A의 발현량이 증가한 것을 확인하였다 (도 1a, 4-6 라인). 이러한 결과는 NS3 항체 (도 1a, 두번째 패널의 4-6 라인)와 코어 항체 (결과제시안함)를 이용한 면역블랏을 이용하여 다시 한 번 확인할 수 있다. 즉 인터페론 알파에 미리 접했던 바이러스들은 고농도의 인터페론 알파에 저항성을 보였다 (도 1a, 라인 6). 또한 세포내 HCV의 RNA 양을 RT-PCR기법을 이용하여 조사하였다. 그 결과 대조군에서는 100 u/ml의 인터페론 알파에 의해 RNA가 완전히 제거되었다 (도 1b, 위 패널의 3 라인). 하지만 90일간 인터페론 알파에 노출시켰던 세포들에는 여전히 바이러스 RNA가 높은 농도로 존재하였다 (도 1b, 위 패널의 5-6 라인). 또한 90일간 인터페론 알파처리 조건에서 살아남았던 JFH-1 바이러스들은 인터페론 알파에 대해 저항성을 갖게 되었음도 확인되었다 (도 1b, 아래 패널의 5-6 라인).

결과 2: 인터페론 알파 저항성 바이러스의 NS5A에서 변이 발생

JFH-1의 유전체에서 발생한 변이가 인터페론 알파의 저항성에 관련되어 있는지 조사하기 위해 야생형 바이러스, 인터페론 알파를 처리한 바이러스와 처리하지 않은 대조군 바이러스간의 게놈을 비교분석하였다. 염기서열 76-9255번 사이의 게놈을 겹치는 5조각으로 나눈 후 각 단편을 서열분석하였다 (도 2a). 두 군(시험군, 인터페론 알파 비처리 대조군)의 세포로부터 RNA를 추출하였으며 cDNA를 이로부터 합성하였다. 5개의 단편을 서열분석한 후 분석된 염기서열과 아미노산서열을 원래 JFH-1서열과 비교하였다. 그 결과 NS5A의 C말단 코딩부분에서 10군데의 변이가 발생하였다. 다른 곳에서는 변이가 발생하지 않았다. 도 2b에 나타난 바와 같이 시험군과 비처리 대조군에서 공통적으로 6곳의 변이가 발생하였다 (S448W, S450W, S457P, D461N, T462P, C465G). 하지만 네 군데의 변이는 시험군에서만 발생하였다 (A445P, E458Q, E459Q 및 V464L). 따라서 이 네 군데의 변이가 인터페론 알파에 대한 저항성을 나타내는데 기여할 것이라 생각하였다.

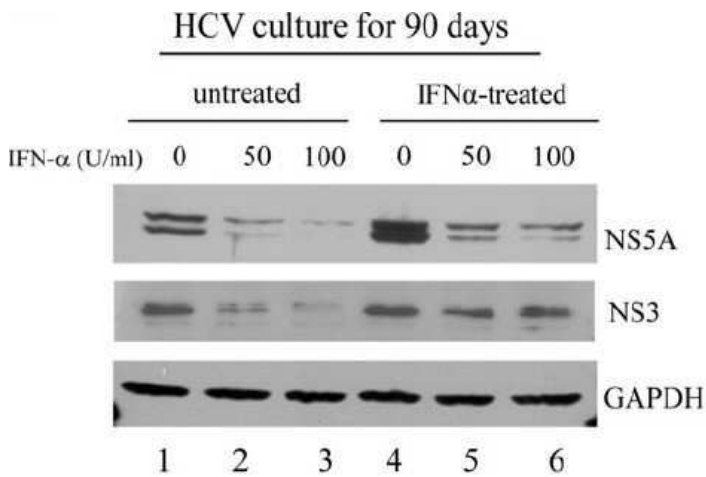
결과 3: 인터페론 알파 저항성 HCV 클론 확립

NS5A에서 발견된 변이가 인터페론 알파의 저항성에 관여하는지 확증하기 위해 이러한 변이가 야생종에서 발생하도록 하였다. 그 후 인터페론 알파를 처리한 세포와 처리하지 않은 세포로부터 RNA를 추출한 후 RT-PCR을 이용하여 4165-6258부분과 6117-7893부분을 증폭하였다. Assembly PCR을 수행하여 4165-7893부분의 단편을 얻을 수 있었다. 야생형의 pJFH-1플라스미드와 PCR에서 증폭된 단편을 *NsiI*과 *BsrGI*로 절단하였다 (도 2a). 변이 부분을 포함하는 PCR 산물들을 pJFH-1 플라스미드의 해당 부위에 삽입하였다. 이렇게 하여 생성된 재조합 플라스미드 벡터에는 인터페론을 처리하지 않은 플라스미드의 경우 6개의 변이와 인터페론을 처리한 플라스미드의 경우 10개의 변이가 포함되어 있다. 이렇게 새로 만들어진 JFH-1의 게놈이 HCV의 생산과 인터페론 알파

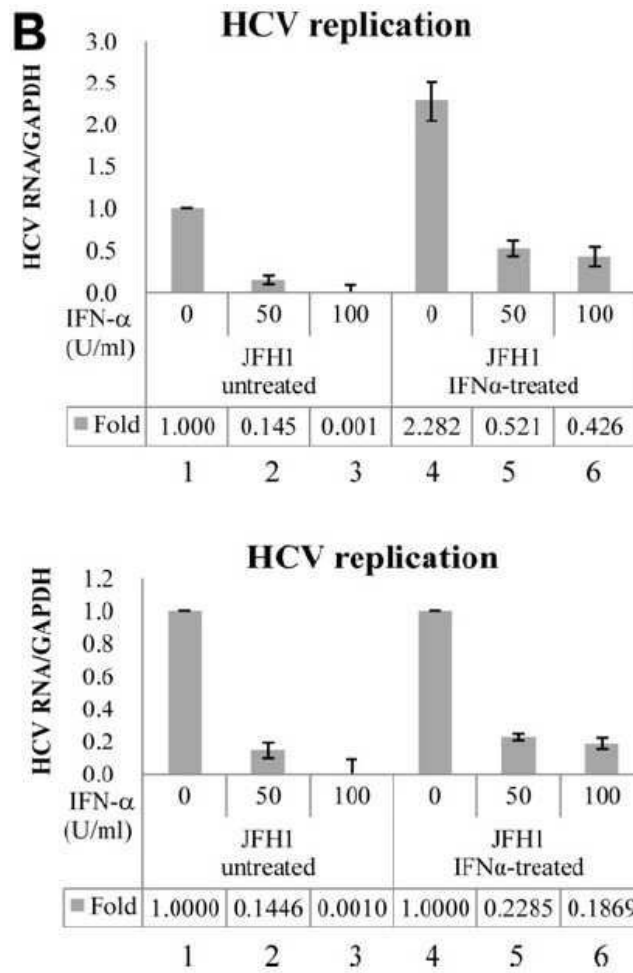
에 대한 감수성에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. HCV RNA 게놈은 in vitro에서 합성되어 Huh7.5 세포에 주입되었다. 도 3a에서 보는 바와 같이 인터페론을 처리한 게놈을 갖는 세포와 인터페론을 처리하지 않은 게놈을 갖는 세포 간에 HCV 생산수준의 차이는 발생하지 않았다. 시험군과 대조군 세포배양액에서 얻은 바이러스를 각각 모아 다시 Huh7.5세포주에 감염시켰다. 그 후 감염된 세포에 다양한 농도의 인터페론 알파를 처리하여 저항성을 측정하였다. 도 3b에서 보는 바와 같이 6개의 변이를 갖고 있는 HCV의 경우 인터페론 알파의 농도에 비례하여 감수성을 보였다. 하지만 10개의 변이를 갖고 있는 HCV의 경우는 높은 농도의 인터페론 알파에 대해서도 저항성을 보였다. 저항성은 NS5A의 양을 통해서 알 수 있었다. 이 결과는 다시 세포내 HCV RNA 양과 (도 3c) 세포의 HCV RNA 양을 비교하여 확증하였다 (도 3d). 인터페론 알파에 저항성을 보이는 바이러스의 경우 인터페론 알파의 신호전달체계가 변하였는지 조사하기 위해 ISG15의 발현수준을 면역블랏을 이용하여 조사하였다. 도 3b의 중간패널에서 보는 바와 같이 ISG15의 발현은 인터페론 알파의 농도에 비례하여 증가하였다. 하지만 대조군과 인터페론 알파 처리군 간에는 차이가 없었다. 이러한 결과로 보아 HCV는 인터페론 알파 신호체계 외의 다른 경로를 통해 저항성을 갖는 것으로 판단된다. 종합하면 인터페론 알파를 미리 처리한 HCV에서 보였던 4군데의 변이가 인터페론 알파의 저항성에 관여하는 것으로 생각된다.

도면

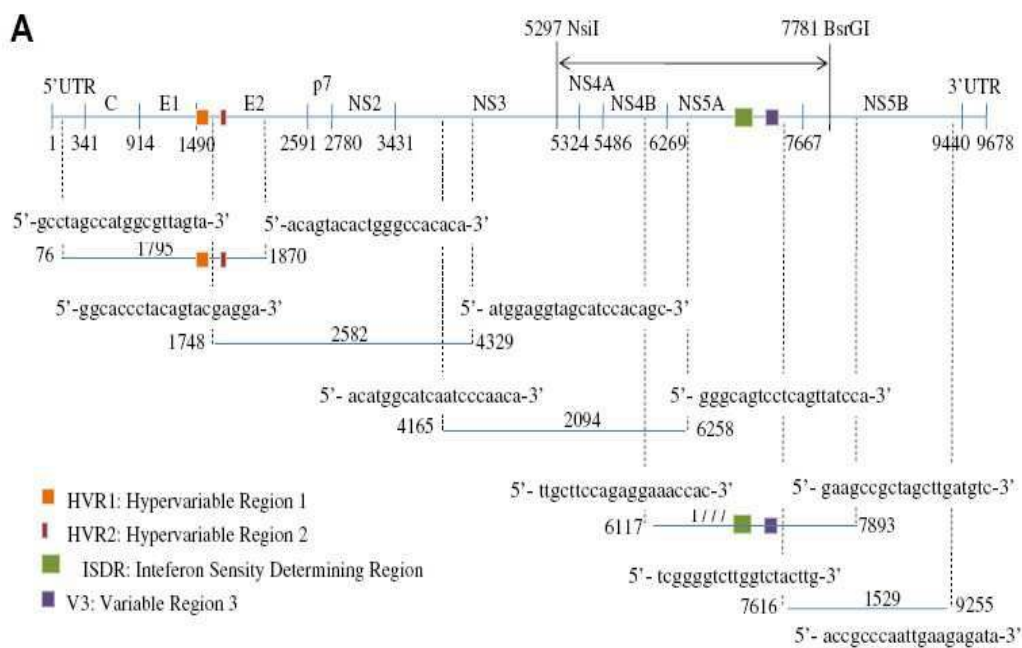
도면1a



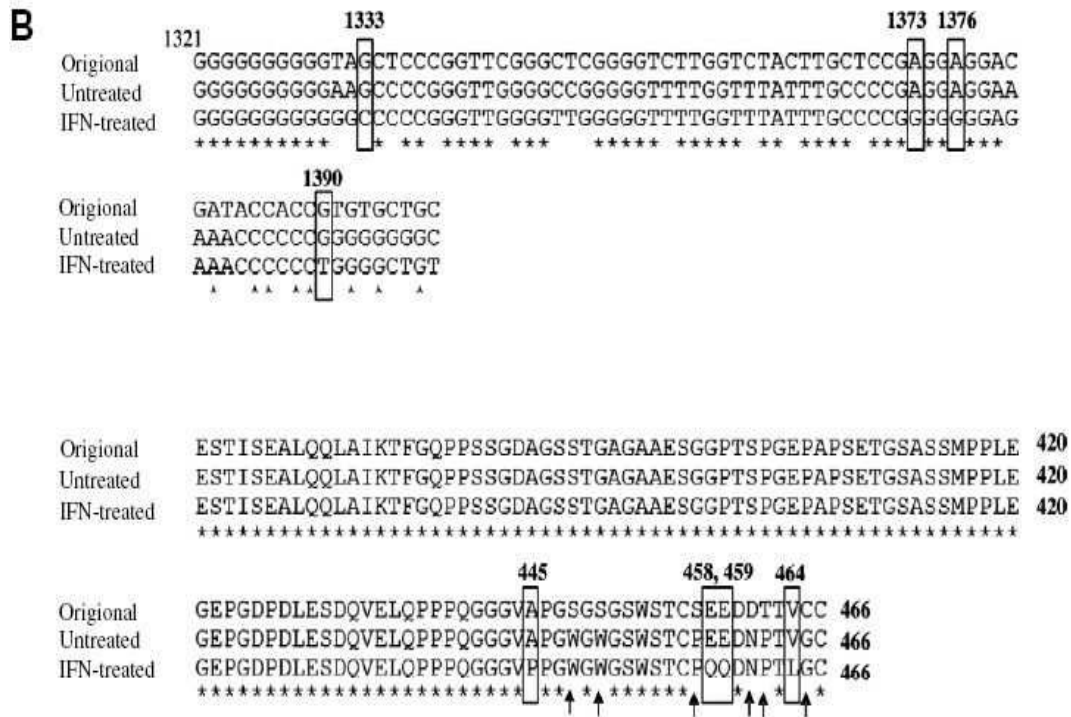
도면1b



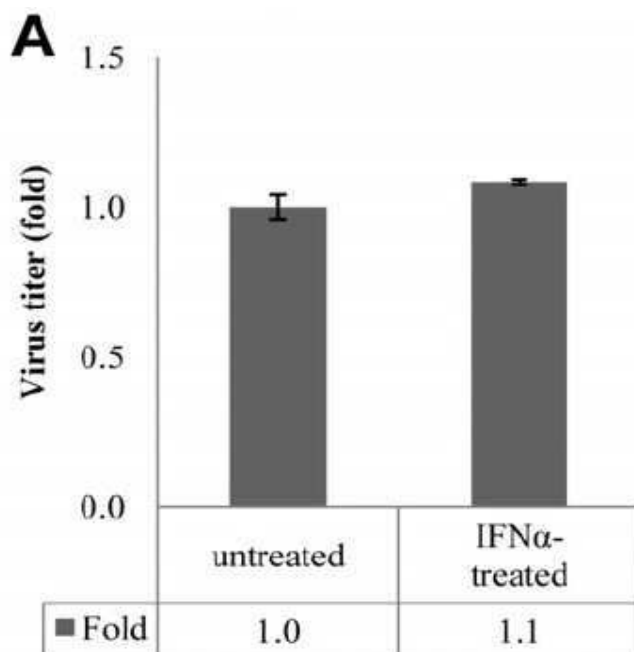
도면2a



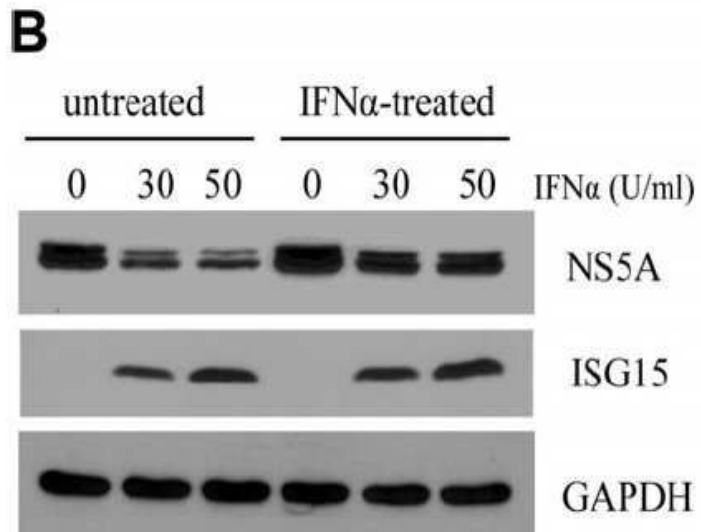
도면2b



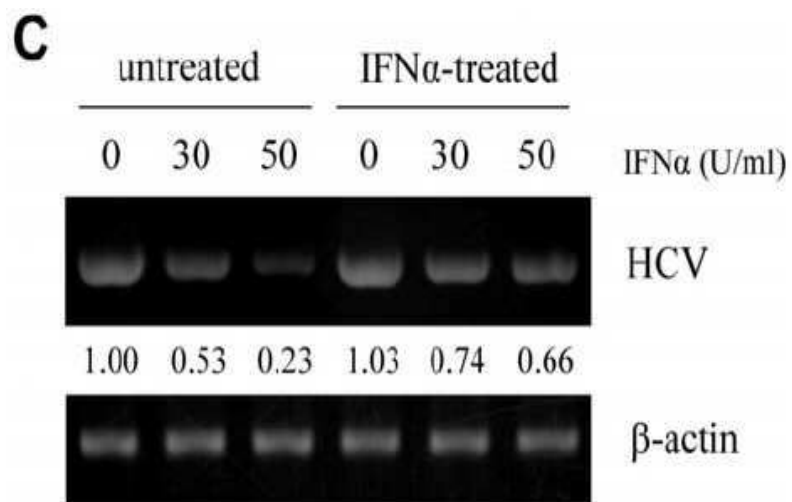
도면3a



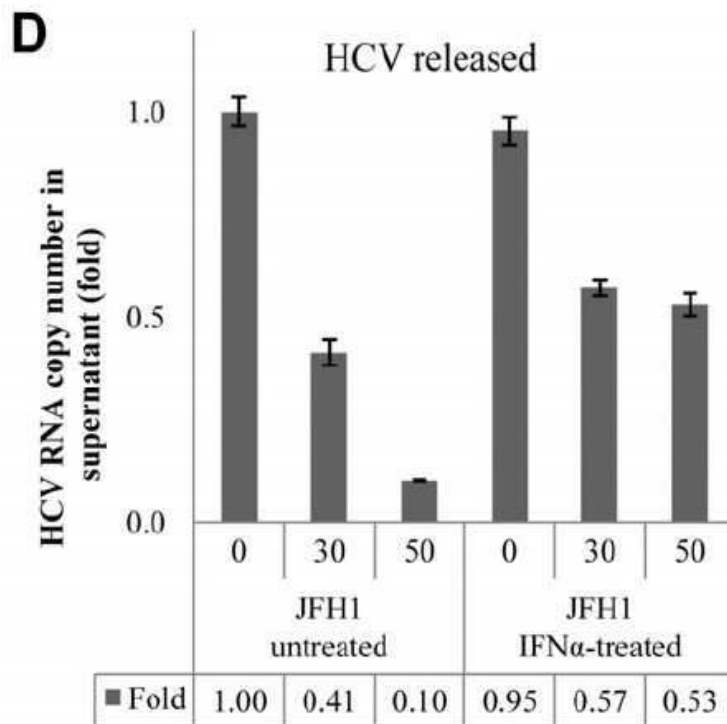
도면3b



도면3c



도면3d



서열 목록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Interferon alpha-resistant hepatitis C virus

<130> SBHWANG-IFN-HCV-1102

<160> 16

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

gcctagccat ggcgttagta

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

acagtacact gggccacaca	20
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 3	
ggcacccctac agtacgagga	20
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 4	
atggaggtag catccacagc	20
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 5	
acatggcatc aatcccaaca	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 6	
gggcagtcct cagttatcca	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	

<400>	7	
ttgcttccag aggaaccac		20
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	8	
gaagccgcta gcttgatgc		20
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	9	
tcggggtctt ggctacttg		20
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	10	
accgcccaat tgaagagata		20
<210>	11	
<211>	78	
<212>	DNA	
<213>	JFH-1 HCV genome 1321-1398	
<400>	11	
gggggggggg tagctcccg ttcgggctcg gggtcttggt ctacttgctc cgaggaggac		60
gataccaccg tgtgctgc		78
<210>	12	
<211>	78	
<212>	DNA	
<213>	Interferon a-untreated JFN-1 HCV genome 1321-1398	

<400> 12
 gggggggggg aagccccggg ttggggccgg gggttttggt ttatttgccc cgaggaggaa 60
 aaaccccccg ggggggggc 78
 <210> 13
 <211> 78
 <212> DNA
 <213> Interferon a treated JFN-1 HCV genome 1321-1398
 <400> 13
 gggggggggg ggcccccggt ttggggttgg gggttttggt ttatttgccc cgggggggag 60
 aaacccccct ggggctgt 78
 <210> 14
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> JFN-1 HCV aa 361-466
 <400> 14
 Glu Ser Thr Ile Ser Glu Ala Leu Gln Gln Leu Ala Ile Lys Thr Phe
 1 5 10 15
 Gly Gln Pro Pro Ser Ser Gly Asp Ala Gly Ser Ser Thr Gly Ala Gly
 20 25 30
 Ala Ala Glu Ser Gly Gly Pro Thr Ser Pro Gly Glu Pro Ala Pro Ser
 35 40 45
 Glu Thr Gly Ser Ala Ser Ser Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly
 50 55 60
 Asp Pro Asp Leu Glu Ser Asp Gln Val Glu Leu Gln Pro Pro Pro Gln
 65 70 75 80
 Gly Gly Gly Val Ala Pro Gly Ser Gly Ser Gly Ser Trp Ser Thr Cys
 85 90 95
 Ser Glu Glu Asp Asp Thr Thr Val Cys Cys
 100 105
 <210> 15
 <211> 106
 <212> PRT

<213> Interferon a untreated JFN-1 HCV aa 361-466

<400> 15

Glu Ser Thr Ile Ser Glu Ala Leu Gln Gln Leu Ala Ile Lys Thr Phe

1 5 10 15

Gly Gln Pro Pro Ser Ser Gly Asp Ala Gly Ser Ser Thr Gly Ala Gly

20 25 30

Ala Ala Glu Ser Gly Gly Pro Thr Ser Pro Gly Glu Pro Ala Pro Ser

35 40 45

Glu Thr Gly Ser Ala Ser Ser Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly

50 55 60

Asp Pro Asp Leu Glu Ser Asp Gln Val Glu Leu Gln Pro Pro Pro Gln

65 70 75 80

Gly Gly Gly Val Ala Pro Gly Trp Gly Trp Gly Ser Trp Ser Thr Cys

85 90 95

Pro Glu Glu Asp Asn Pro Thr Val Gly Cys

100 105

<210> 16

<211> 106

<212> PRT

<213> Interferon a untreated JFN-1 HCV aa 361-466

<400> 16

Glu Ser Thr Ile Ser Glu Ala Leu Gln Gln Leu Ala Ile Lys Thr Phe

1 5 10 15

Gly Gln Pro Pro Ser Ser Gly Asp Ala Gly Ser Ser Thr Gly Ala Gly

20 25 30

Ala Ala Glu Ser Gly Gly Pro Thr Ser Pro Gly Glu Pro Ala Pro Ser

35 40 45

Glu Thr Gly Ser Ala Ser Ser Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly

50 55 60

Asp Pro Asp Leu Glu Ser Asp Gln Val Glu Leu Gln Pro Pro Pro Gln

65 70 75 80

Gly Gly Gly Val Pro Pro Gly Trp Gly Trp Gly Ser Trp Ser Thr Cys

85 90 95

Pro Gln Gln Asp Asn Pro Thr Leu Gly Cys

100 105