(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.[6]
C12Q 1/70

(11) 공개번호 특2000-0075983
(43) 공개일자 2000년12월26일

(21) 출원번호 10-1999-7008068
(22) 출원일자 1999년09월06일
번역문제출일자 1999년09월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US1998/04226 (87) 국제공개번호 WO 1998/39487
(86) 국제출원출원일자 1998년03월05일 (87) 국제공개일자 1998년09월11일
(81) 지정국 AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다

EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄

EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 핀랜드 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투칼 스웨덴

OA OAPI특허 : 부르키나파소 베넹 중앙아프리카 콩고 코트디브와르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고

국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트레일리아 아제르바이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 중국 쿠바 체코 에스토니아 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 리투아니아 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽고 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 루마니아 러시아 싱가포르 슬로베니아 슬로바키아 타지키스탄 투르크메니스탄 터어키 트리니다드토바고 우크라이나 우즈베키스탄 베트남

(30) 우선권주장 60/038,596 1997년03월05일 미국(US)
(71) 출원인 유니버시티 오브 워싱톤 엘. 데이예를 카렌.

미국, 워싱톤 98105-4631, 시애틀, 엔이45 스트리트 1107, 슈이트 200

(72) 발명자 케츠,마이클쥐.

미국,와싱턴98122,시에틀,이스트웨슬러웨이3012

갈리,마이클제이쥬니어.

미국,와싱턴98272,몬레,에스.이.171번가15377

(74) 대리인 강명구

심사청구 : 없음

(54) 헤파타이티스 C 바이러스 복제를 선택적으로 저해하는 물질을 확인하기 위한 새로운 스크리닝 방법

요약

본 발명은 바이러스 감염에 대한 인터페론-유도된 새포 방어 기작을 무시하는 바이러스성 단백질을 선택적으로 방해하는 항-바이러스성 물질을 확인하는 신규한 방법을 제공한다. 스크리닝 방법은 인터페론 감응성 결정 부분을 포함하는 바이러스성 단백질과 인터페론-유도성 PKR 단백질 카이나제사이에 상호작용을 선택적으로 저해하는 물질을 확인하는 것이다.

대표도

도1a

명세서

기술분야

본 출원은 1997년 3월 5일자로 출원된 미국 예비 출원 60/038,596의 장점을 청구한다.

1. 개요

본 발명은 바이러스 감염에 대해 인터페론(IFN)-유도된 세포 방어 기작을 무효화시키는 바이러스 단백질을 선택적으로 간섭할 수 있는 항-바이러스 물질을 확인하는 신규한 방법에 관계한다. 특히, 본 발명은 인터페론 감응성 결정 부분(ISDR)을 포함하는 바이러스 단백질과 IFN-유도된 PKR 단백질 카이나제사이에

상호작용을 선택적으로 저해하는 물질을 확인하는 스크리닝 방법에 관계한다. 본 발명은 특히, ISDR를 포함하는 헤파타이티스 C 바이러스(HCV) 비-구조 5A 단백질(NS5A)과 IFN-유도된 PKR 단백질 카이나제 사이에 상호작용을 선택적으로 저해하는 물지를 확인하는 스크리닝 방법에 관계한다. 바이러스 ISDR 및 IFN-유도된 PKR 단백질 카이나제간에 상호작용으로 바이러스 감염과 싸우게되는 IFN-유도된 세포 방어 기작을 무효화하게 된다. 따라서, 본 발명의 검사 방법을 이용하여 확인된 물질은 항-바이러스 물질로 유용할 것이다.

배경기술

2. 배경

2.1. 바이러스 감염을 치료하기 위한 IFN 치료법

인터페론은 세포외 시그날을 제공하는 단백질로써, 면역 자극, 종양 저해 및 세포 복제 감소등을 포함하는 다양한 효과를 가진다. 인터페론은 Mx 단백질, 2'-5' 올리고아데닐화된 합성효소 및 RNase L을 포함하는 많은 유전자 생성물을 숙주 세포에서 생산하도록 유도한다(Sen et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:5017-5020; Sen et al., 1993, Adv. Virus. Res. 42:57). 또한, PKR 즉 cAMP-독립적인 세린/트레오닌 카이나제는 30개의 IFN-유도된 유전자 생성물중 가장 큰 것이다(Meurs et al., 1990, Cell 62:379-590). 이들 단백질은 바이러스 감염에 대해 보호 효과를 가지는 것으로 나타났기 때문에, 바이러스 감염을 치료하는데 있어서 IFN 치료법에 유익한 효과를 제공한다.

IFN-유도된 유전자 생성물은 많은 기작을 통하여 바이러스 감염에 대해 보호성 효과를 제공한다. 예를 들면, IFN-유도된 이중-가닥 RNA-의존성 효소인 2'-5'올리고아데닐화된 합성 효소는 세포 및 바이러스 RNAs를 절단하는 RNase를 활성화시켜, 피코르나바이러스 복제와 같은 바이러스 복제를 하지 못하도록 한다(Kumar et al, 1999, J. Virol. 62:3175-3181). IFN-유도된 이중 가닥 RNA-의존성 단백질 카이나제는 포스포릴화 및 해독 개시 인자인 eIF-2α의 α서브유닛을 비활성화시켜 바이러스 및 숙주 세포 단백질 합성을 저해한다. 또한, IFN는 바이러스의 라이프 사이클에서 여러 다른 단계에서 바이러스 저해 효과를 가진다. IFN는 헤파타이티스 B 바이러스 입자의 피복을 벗는 것을 저해하여, 바이러스 복제를 방해한다. IFN는 베시큘라 스토마티티스 바이러스가 세포로 침투하는 것을 저해한다(Whitaker-Dowling et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. 80:1083-1086). 또한, IFN는 센다이 바이러스[Sendai virus(Tomita et al., 1981, J. Gen. Virol. 55:289-295)]와 같은 바이러스에 의한 세포 융합을 저해한다.

IFN-유도된 세포 방어 기작의 유해한 효과를 저해하기 위해, 많은 진핵 바이러스는 IFN-유도된 단백질의 활성을 차단하는 기작을 가지도록 진화되었다. 대부분의 바이러스는 IFN-유도된 숙주 세포가 해독을 차단하도록 하는 것을 방해하는 RNA를 생산하는데, 예를 들면, 아데노 바이러스는 VAI RNA 분자를 만들고, 사람 면역 결핍 바이러스(HIV)는 TAR 부분을 만들고, Epstein-Barr 바이러스는 EBER-1 RNA 분자를 만든다(Katz et al., 1987, Embo. J. 6:689-697; McMillan et al., 1995, Virology 213:413-424; Carroll et al., 1993; Beattie et al., 1995, Virology 210:254-263; Beattie et al., 1991, Virology 183:419-422). 바시니아 바이러스 K3L 단백질과 같이 많은 바이러스는 IFN-유도된 PKR 단백질 카이나제에 결합하여 이를 저해한다(Gale Jr. et al., 1996, Mol. Cell. Biol. 16:4172-4181). P58과 같은 인플루엔자 순환세포 인자는 PKR 단백질 카이나제에 결합하여 이를 차단한다(Lee et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. 87:6208-6212; Lee et al., 1994, Mol. Cell. Biol. 14:2331-2342).

2.2. 헤파타이티스 C 바이러스

헤파타이티스 C 바이러스(HCV) 감염은 전세계적으로 중요한 만성적인 문제이다. 미국에서만도, 약 4백만이 HCV에 만성적으로 감염되어 있다. HCV는 헤파타이티스 A 또는 B가 아닌 주요 풍토성 물질로써 주로 감염된 혈액 및 혈액 생성물을 수혈에 의해 주로 전달된다(Cuthbert et al., 1994, Clin. Microbiol. Rev. 7:505-532; Mansell et al., 1995, Semin. Liver Dis. 15:15-32). 1990년 중반에 항-HCV 스크리닝이 도입되기 전에, 미국에서 수혈후 헤파타이티스가 된 경우에 80-90%가 HCV에 의한 것이었다. 현재, 주사용 약물을 이용하는 경우에 HCV 감염이 되는 가장 흔한 것으로 이 집단의 약 80%는 HCV에 양성이다. 출혈성 질환 또는 만성 신장 기능 이상 또는 혈액 또는 혈액 생성물에 빈번히 노출되는 집단에서 HCV 감염 위험률이 높다.

HCV에 급성 감염되는 경우에는 끊임없이 바이러스가 복제되어, 이들중 약 90%가 만성 헤파타이티스가 된다. 많은 환자에서, 만성적으로 HCV에 감염되는 경우에는 진행성 간 손상이 일어나고, 간경화가 발생된다. 공격성 감염을 입은 환자의 경우에, 일반적으로 10-20년이 소요되지만, 간경화는 2년이내에 발생될 수도 있다. 만성 HCV 환자의 50%에서, 간 손상은 간세포 암종으로 진행될 수도 있다. 일반적으로, 간세포 암종은 후기에 발생되는 것으로 이 것이 발생되는데에는 30년 이상이 걸릴 수도 있다(Bisceglie et al., 1995, Semin. Liver Dis. 15:64-69). 질병의 진행을 결정하는데 있어서, 바이러스 또는 숙주 인자의 관련 정도는 아직 밝혀진 바가 없다.

HCV는 양성-센스 단일 가닥 RNA 게놈(약 9.5kb)을 포함하는 외피형 바이러스이다. 이의 게놈 구조 및 바리온 성질에 기초하였을 때, HCV는 Flaviviridae 과(family; 여기에는 pestiviruses 및 flaviviruse도 포함된다)에 별도 속(genus)로 분류된다(Alter, 1995, Semin. Liver Dis. 15:5-14). 바이러스 게놈에는 긴 5' 해독안된 부분(UTR), 약 3011개 아미노산의 폴리프로테인을 인코드하는 긴 오픈 리딩 프레임, 짧은 3' UTR로 구성된다. 5' UTR은 HCV 게놈에서 가장 보존이 잘된 부분으로, 폴리프로테인 해독의 개시 및 조절에 중요하다. HCV 게놈의 해독은 내부 리보좀 출입으로 알려진 cap-의존성 기작에 의해 개시된다. 이와 같은 기작은 내부 리보좀 출입 부위(IRES)로 알려진 RNA 서열에 리보좀이 결합되는 것과 관련된다. 최근에 밝혀진 바에 따르면, RNA pseudoknot 구조는 HCV IRES의 필수적인 구조 요소라는 것이다. HCV 복제를 허용하는 신뢰성 있는 조직 배양 시스템이 아직 개발되지는 않았지만, 재조합 배시니아 바이러스 구조 및 전사/해독 시스템을 이용하는 등의 다양한 기술을 이용하여 바이러스 단백질이 확인되었다. 폴리프로테인 전구물질은 숙주 및 바이러스 프로테아제에 의해 절단되어 성숙한 바이러스 구조 단백질 및 비구조 단백질을 만든다. 바이러스 구조 단백질에는 뉴클레오캡시드 코어 단백질(C), 두 개

회피 당단백질, E1 및 E2를 포함한다. HCV는 또한 NS2-NS3 부분에 의해 인코드되는 두 개 프로테아제, 아연-의존성 금속프로테아제 및 NS3 부분에 의해 인코드되는 세린 프로테아제를 인코드한다. 이와 같은 프로테아제를 이용하여 폴리프로테인 전구물질의 특정 부분을 절단하여 성숙한 펩티드로 만든다. 비-구조단백질 5, NS5A의 카르복시 절반에는 RNA-의존성 RNA 폴리메라제를 포함한다. 나머지 비-구조 단백질, NS4A 및 NS4B의 기능 및 NS5A(비-구조 단백질 5의 아미노-말단 절반)의 기능에 대해서도 밝혀진 바가 없다.

세포 배양 시스템이 부족하기 때문에 HCV 복제 및 병인성을 이해하는 과정을 이해하는데 상당한 방해가 된다. 그 결과, HCV 감염에 대해 효과적인 항바이러스 전략이 개발되어야 한다. 현재 만성 HCV 감염을 치료하는 유일한 치료법은 알파 인터페론으로 치료하는 것이다. 그러나, HCV를 제거하는데 이 치료후에 환자의 50% 미만이 그 증세가 완화되었다(Hoofnagle et al., 1994; Lino et al., 1994, Intervirology 37:87-100). 상기에서 논의된 바와 같이, 인터페론 요법에 대한 반응 및 HCV 요법간에 상관관계가 있다(Enomoto et al., 1996, N. Engl. J. Med. 334:77-81; Enomoto et al., 1995, J. Clin. Invest. 96:224-230). 예를 들면, HCV-1b에 감염된 환자의 반응율은 40% 미만이다. 프로토타입 미국 유전자 형태, HCV-1a에 감염된 환자에서도 유사한 낮은 반응율이 보고된 바 있다(Hoofnagle et al., Lino et al, 1994, Intervirology 37:87-100). 대조적으로, HCV 유전자형태-2에 감염된 환자에서 반응율은 거의 80%에 가깝다(Fried et al., 1995, Semin. Liver Dis. 15:82-91).

유전자타입 1b의 NS5A 단백질의 별개 부분 아미노산 서열이 인터페론 감응성에 관련이 있다는 것으로 밝혀졌다(Enomoto et al., 1996, Enomoto et al., 1995). 이 부분을 인터페론 감응성 결정 부분(ISDR)으로 칭하는데, 이는 NS5A의 아미노산 잔기 237 내지 276(이는 폴리프로테인의 아미노산 2209 내지 2248; 이때 번호는 HCV-J의 것에 기초한 것임; HCV-1b의 게놈 서열은 완전히 결정됨-Enomoto et al., 1995)이 된다. 인터페론-저항성 균주(quasispecies가령, 인터페론 치료 전후 6개월간)는 프로토타입 HCV-1b의 것과 동일한 ISDR 서열을 가진다(Enomoto et al., 1996). 대조적으로, 인터페론-감응성 균주(HCV quasispecies는 인터페론 치료전에는 존재하나, 치료후 6개월 뒤에는 존재하지 않는다)는 ISDR내에 여러개의 아미노산이 치환된 부위가 발견되었다. 이 연구에서, ISDR내에 4개 내지 11개 아미노산이 치환된 것을 포함하는 HCV 분리물로 감염된 환자에서는 인터페론 치료에 대해 완전한 반응을 보였다. 대조적으로, 프로토타입 ISDR 서열에 감염된 환자(및 ISDR내에 1개 내지 3개 아미노산이 교환된 HCV 분리체에 감염된 환자의 87%)에서는 이 치료에 대해 반응을 나타내지 않았다. 인터페론에 대한 반응에 영향을 주는 HCV-1b의 ISDR 기작에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

3. 발명의 요약

본 발명은 바이러스 감염에 대해 인터페론(IFN)-유도된 세포 방어 기작을 방해하는 바이러스 단백질을 선택적으로 저해하는 항-바이러스 물질을 확인하는 새로운 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 인터페론 감응성 결정 부분(ISDR)을 포함하는 바이러스 단백질과 IFN-유도된 PKR 단백질 카이나제사이에 상호작용을 선택적으로 저해하는 물질을 확인하는 스크리닝 방법에 관계한다. 본 발명은 특히, ISDR를 포함하는 헤파타이티스 C 바이러스(HCV) 비-구조 5A 단백질(NS5A)과 IFN-유도된 PKR 단백질 카이나제 사이에 상호작용을 선택적으로 저해하는 물지를 확인하는 스크리닝 방법에 관계한다. 한 구체예에서, 본 발명은 PKR의 이량체화를 저해하는 바이러스성 단백질을 선택적으로 저해하는 물질을 확인하는 스크리닝 방법에 관계한다. 본 발명은 또한, PKR 단백질 카이나제의 NS5A 저해를 못하게 하는 수준으로 IFN 발현을 유도하는 내생 또는 외생 물질을 확인하는 스크리닝 방법에 관계한다. ISDR을 포함하는 바이러스성 단백질 및 IFN-유도된 PKR 단백질 카이나제 사이에 상호작용으로 바이러스 감염과 싸울 수 있는 IFN-유도된 세포 방어 기작을 무효로 하여, 이와 같은 상호작용을 간섭하는 것으로 확인된 물질은 항-바이러스 물질로 유용할 것이다.

본 발명은 출원인이 발견한 다음의 내용을 기초로 한다; (1) HCV 단백질 NS5A는 IFN-유도된 PKR 단백질 카이나제와 상호작용하여 이를 직접적으로 방해하고; (2) NS5A는 PKR 단백질 카이나제와 상호작용하여 저해하는데 ISDR를 요구한다.

본 발명은 또한, 여기에서 설명하는 스크리닝 방법에 의해 확인된 신규한 물질을 포함한다. 본 발명은 중재를 목적으로 ISDR을 포함하는 단백질을 이용하여 바이러스 감염을 치료하기 위한 치료법 및 제약학적 조성물에 관계한다. 본 발명은 특히, NS5A를 표적으로 하여, IFN 유도된 PKR 단백질 카이나제와 상호작용을 시켜, HCV 감염을 치료하는 치료법 및 제약학적 조성물에 관계한다.

이와 같은 약물은 현재 이용되는 약물보다 훨씬 효과적인데 그 이유는 이 약물들이 세포 과정을 간섭하지 않고, 대신에 바이러스 감염에 대한 세포 방어 기작을 저해하는 바이러스를 차단하기 때문에 유익하다. 이들 약물은 또한 부작용이 적은데, 그 이유는 숙주와 상동성을 가지지 않는 바이러스 단백질을 표적으로 하여, 숙주 세포에 손상을 주지 않기 때문이다. 따라서, 더 많은 약량을 이용하더라도 부작용을 최소화할 수 있다.

본 발명은 또한, 바이러스 복제를 저해하기 위해 다른 공지의 항-바이러스 물질과 본 발명에 의해 확인된 항-바이러스 물질을 복합하여 이용할 수 있는 것에 관계한다. 본 발명에 의해 확인된 물질은 IFN에 대한 바이러스 저항성을 감소시키는데 유용하여, HCV 감염을 위협하는 현재 IFN 치료법의 효과를 증가시키는데 유용하다.

3.1. 정의

여기에서 사용된 것과 같이, "ISDR" 또는 "인터페론 감응성 결정 부분"은 도 1A에 나타낸 것과 같은 아미노산 서열을 가지는 단백질 도메인 또는 이 서열의 임의 유도체 또는 이 서열을 가지는 단편 또는 펩티드의 도메인을 말하는 것으로, 이때 이들 유도체 또는 단편 또는 펩티드는 IFN에 저항성을 부여하는 활성을 가지거나 IFN 유도된 PKR 단백질 카이나제에 결합하는 활성을 가진다.

여기에서 설명하는 것과 같이, "PKR" 또는 "IFN-유도된 PKR 단백질 카이나제"는 인터페론에 의해 활성화되는 숙주 세포 단백질 카이나제로써, 흔히 p68 카이나제, P1, DAI, eIF-1 카이나제, PKR의 단편 또는 PKR에 상응하는 아미노산 서열을 가지는 단편 또는 펩티드가 된다.

여기에서 설명하는 것과 같이, "스크리닝" 또는 "스크리닝 방법"은 본 발명의 방법에서 상당수의 가능성이 있는 유용한 물질을 처리하는 과정을 말하는 것이다.

여기에서 사용된 바와 같이, "표적으로 하는"은 유전자 발현, 효소 활성을 차단 또는 방해 또는 다른 세포 또는 바이러스 인자와 상호작용을 차단 또는 방해하는 것을 의미한다.

여기에서 사용된 바와 같이, "HCV 감염을 치료 또는 방해"한다는 것은 숙주에서 HCV가 정립되는 것을 방해하거나, 숙주로 HCV가 절단되는 것을 저해하고, HCV 감염에 의한 질병의 증상을 제거하거나 완화시키는 것을 의미한다. 이와 같은 치료는 바이러스 적하량이 줄거나, 치사율 또는 질병율이 감소되는 경우에 치료요법으로 간주한다.

여기에서 사용된 바와 같이, "바이러스 감염을 치료 또는 예방하는"것은 숙주에서 HCV가 정립되는 것을 방해하거나, 숙주로 HCV가 절단되는 것을 저해하고, HCV 감염에 의한 질병의 증상을 제거하거나 완화시키는 것을 의미한다. 이와 같은 치료는 바이러스 적하량이 줄거나, 치사율 또는 질병율이 감소되는 경우에 치료요법으로 간주한다.

여기에서 사용된 바와 같이, "제약학적으로 수용가능한 담체"는 활성 성분의 생물학적 활성 효과를 간섭하지 않고, 화학적으로 비활성이고, 투여되는 환자에 독성이 없는 운반 매체를 말한다.

"치료요법제"는 바이러스 감염 치료 또는 질병의 치료를 돕는 적절하게는 항-바이러스성이 있는 임의 분자 화합물을 말한다.

도면의 간단한 설명

도 1(A)의 상판은 IFN-저항성 HCV 균주 J의 NS5A 원형 ISDR과 본 연구에서 이용된 HCV 균주 1a 및 -1b의 NS5A에서 이에 상응하는 부분의 아미노산 서열을 비교한 것이다. 하판은 본 발명의 NS5A구조에 포함된 HCV-1a 및 -1b의 447개 아미노산 단백질을 나타내는 HCV NS5A의 구조를 나타낸다. ISDR는 검게 표시하였고, 이는 HCV-1a에서 유도된 ISDR 구조이다. NS5A내에 아미노산 위치는 굵게 나타내었고, HCV 폴리프로테인내에 상응하는 위치는 정상 상태로 나타내었다.

(B)는 PKR의 구조를 나타낸 것이다. 조절 도메인내에 두 개 dsRNA 결합 모티프 위치는 검게 나타내었다. 촉매 부위는 아미노산 265-551까지이고, 여기에는 로마 수로 나타낸 11개 단백질 카이나제 촉매성 도메인 보존 부분이 포함된다(Hanks et al., 1988, Science 241:42-52). PKR-저해성 분자 아데노바이러스 VAI RNA, 백시니아 바이러스 K3L, P58^{IPK}가 상호작용하는 부분을 표시하였다(Katze et al., 1987, Embo J. 6:689-697; Gala Jr. et al., 1996, Mol. Cell. Biol. 16:4172-4181). 또한 NS5A-결합 부분도 표시하였다.

도 2에서는 In vitro 결합 분석을 한 것이다. 도 2에서는 In vitro 해독 생성물에서 [^{35}S]-메티오닌 라벨된 PKR의 자가방사사진(라인 1, 4, 7) 또는 대장균(E.coli) 추출물내에 GST 또는 GST-NS5A에 결합하여 선택된 부분을 나타내었다. PKR 아미노산 1-5S1(라인 2, 3); 1-242(라인 5, 6); 244-551(라인 8, 9)을 포함하는 결합 복합체는 글루타티온-아가로즈에서 선택하여 회수한다. 결합된 해독 생성물은 SDS 샘플 완충액에 용출시키고, 12.5% 아크릴아미드 SDS-PAGE에 의해 분리한다. 우측 화살표는 라인 8과 9에서 볼 수 있는 배경 밴드 이하로 이동된 PKR aa 244-251의 위치를 표시하는 것이다. 표준 분자량은 kDa(좌측)으로 나타낸다.

도 3은 이스트 2-이중 하이브리드 분석을 한 것이다. HCV-1b의 NS5A는 생체에서 PKR과 상호작용한다. HCV-1b의 전체 길이 wt NS5A는 GAL4 전사 활성화 도메인(AD)과 융합하여, 이스트에서 GAL4 DNA 결합 도메인(BD)(위치 2) 또는 BD-PKR 융합 구조 BD-PKR K296R 및 BD-PKR 98-551(각 위치 4, 8)과 공동 발현된다. 2-하이브리드 검사에서 기준 GAL4의 공동 발현에는 AD-벡터/BD-벡터(위치 1), AD-벡터/BD-PKR K296R(위치 3), AD-P58^{IPK}/BD-PKR K296R(위치 5), AD-벡터/BD PKR 98-551(위치 6), ADP58^{IPK}/BD-PKR 98-551(위치 7)이 포함된다. 트랜스펙트된 이스트는 +His배지(위) 및 -His 배지(아래)에 복제하여 플레이트 한다. -His에서 생장하였다는 것은 2-하이브리드 단백질 상호작용을 나타낸다.

도 4에서는 HCV-1a의 NS5A가 PKR 단백질 카이나제 촉매 도메인과 상호작용을 하였다. BD 단독(BD-벡터) 또는 HCV-1a(BD-NS5A)으로부터 BD-NS5A 융합 단백질을 발현하는 이스트에 지적한 AD-PKR 융합 구조 또는 기준 AD-벡터를 발현시키는 플라스미드를 공동 트랜스펙트시키고, +His 배지(좌) 및 -His 배지(우)에 복제하고, 생장을 검사하였다.

도 5에서는 in vitro에서 재조합 NS5A가 PKR 활성을 저해하였다. 정제한 고유 PKR(1.9 pmol)은 완충액으로 미리 침전시키고(라인 1) 또는 재조합 정제된 GST-NS5A(HCV 1a, 라인 2-5)의 양을 증가시키거나 또는 GST(라인 6-9)의 양을 증가시키고, 히스톤 H2a 기질 존재하에 in vitro에서 카이나제 활성을 검사하였다. 카이나제 반응을 종료한 후에, 인산화된 생성물은 12.5% SDS-PAGE로 분리하고, 말린 겔은 자가방사사진으로 관찰한다. 화살표는 PKR 및 히스톤의 위치를 나타낸다. 쥡된 GST-NS5A 또는 GST 단백질의 몰량은 0.2pmol(라인 2, 6); 0.4pmol(라인 3, 7); 0.8pmol(라인 4, 8); 1.2pmol(라인 5, 9)이다.

도 6에서는 이스트에서 NS5A가 PKR-중개된 생장 억제를 역전시킨다. 이스트 균주 RY1-1에 2m 이스트 발현 구조체 pYES2-NS5A(NS5A; HCV-1a 유래); pEMBLYex4K3L(백시니아 바이러스 K3L; 양성 기준) 또는 음성 기준 벡터 pEMBLYex4(pYex) 및 pYes2(pYes)를 트랜스팩션시킨다. 형질감염체는 탄소원으로 2% 덱스트로즈(SD, 좌측) 또는 10% 갈락토즈/2% 라피노즈(SGAL, 우측)를 포함하는 최소 합성 배지에 도말하고 생장을 기록한다. SGAL 플레이트는 5일간 생장시킨다.

도 7은 eIF-2α인산화반응을 분석한 것이다. 상기에서 제시한 이스트 추출물을 준비하고, 등전점 포커 및 면역블랏팅 분석을 실시한다. 단백질(20㎎)을 우선 등전점 포커스로 분리하고, 이를 니트로셀룰로오즈 막에 옮기고, 연속하여 이스트 eIF-2α에 특이적인 항-혈청으로 프로브시킨다. 화살표는 기준이 되는 포스포릴화된 eIF-2α(아래 밴드) 및 PKR에 의하여 포스포릴화되는 위치인 Ser 51에서 포스포릴화된 eIF-

2α(위 밴드)를 나타낸다. 레이wu 밀도측정계로 스캔하여 정량화한 전체에 대한 상대적인 포스포릴화된 eIF-2α의 수준을 나타내었다; 벡터 0.9%(라인 1); NS5A, 9.8%(라인 2); K3L, 11.7%(라인 3).

도 8에서는 PKR의 NS5A 결합 도메인(상측)을 나타낸다. 지적한 AD 및 BD 발현 구조체를 가지는 Hf7c 이스트 균주를 -His 배지(우측) 및 +His 배지(좌측)에 복제하고, 4일간 30℃에서 배양하여, 생장을 조사하였다. 면역블랏 분석으로 AD-PKR 및 BD-NS5A 1b-wt 구조체의 발현을 확인하였다. -His 배지에서 생장한 균주는 2-하이브리드 단백질 상호작용에 대해 양성으로 기록한다. (하측 부분). PKR의 구조를 나타낸 것이다. 두 개 dsRNA 결합 모티프(dsRBM) 및 11개 단백질 카이나제 촉매 도메인 보존 부분(로마 수)의 위치를 검게 나타내었다. 바이러스-인코드된 저해물질, 아데노바이러스 VA1, RNA, 백시니아 바이러스 K3L 및 HCV NS5A 단백질과 상호작용을 중개하는 PKR 부분을 밑줄로 표시하였다.

도 9에서는 NS5A가 PKR 이량체화를 방해하는 것을 나타낸 것이다. AG1688 E. coli에 CI-PKR K296R 및 GST(컬럼 1), GST-NS5A 1b-wt(컬럼 2), GST-K3L(컬럼 3), GST-NS1(컬럼 4)를 인코드하는 발현 플라스미드 복합체를 공동 트랜스펙션시키고, λKH54 파아지를 지시한 희석비로 혼합하고, 한천 배지를 포함하는 플레이트에 찍는다. 컬럼 5에는 CI-Rop 및 GST-NS5A 1b-wt 발현 플라스미드(기준)를 포함하는 대장균이 포함된다. 콜로니 형성은 CI-융합 단백질이 이량체화 되었다는 것을 나타낸다.

도 10에서는 NS5A의 PKR 결합 도메인을 나타낸다. 도 10A에서는 GAL4 DNA 결합 도메인-NS5A 융합 구조체의 구조를 나타낸다. NS5A 1b-wt로부터 결손 돌연변이를 준비하는데, 단 NS5A 1a-wt로부터는 △ISDR를 준비한다. ISDR 및 PKR-결합 부분은 흰색과 검정색 삼각형으로 각각 나타내었다. 말단 아미노산 위치는 원형 HCV J 폴리프로테인 서열에 기초하여 표시하였다. 도 10B는 AD-PKR K296 R를 가지는 이스트-2 하이브리드 검사 Hf7c 이스트에 지시한 BD-NS5A 결손 구조체로 공동 트랜스펙션시킨다. 30℃에서 3일간 -His 플레이트에 배양하였다. -His 배지에서 생장하였다는 것은 2-하이브리드 단백질 상호작용을 나타낸다. 도 10C는 면역 블랏 분석을 나타낸 것이다. 이스트 균주에서 준비한 추출물은 SDS-PAGE로 분리하고, 항-NS5A 단클론 항체(라인 1-6) 또는 항-BD 단클론항체(라인 7-9)를 이용하여 면역블랏 분석을 한다. 라인 1과 7에는 pGBT9 BD-벡터(기준)을 가지는 균주에서 준비한 추출물이 포함된다. 각 해당 라인에 표시한 구조체로 추출물을 확인한다. BD-NS5A 구조체 1973-2419는 우측에 나타낸 블랏에 양성 기준이 된다. 기준 단백질 위치는 kDa으로 표시하였다.

도 11에서는 NS5A-PKR 상호작용에서 ISDR 돌연변이의 효과를 나타낸 것이다. 도 11A에서는 이스트 2-하이브리드 검사를 나타낸 것이다. AD-PKR K296R(AD-PKR) 또는 AD 단독(AD-vector)을 인코드하는 pGAD425를 가지는 Hf7c 이스트 균주에 BD 단독(벡터), BD-NS5A 1a-wt, BD-NS5A-ΔISDR 또는 표 1에서 나타낸 ISDR 서열을 가지는 BD-NS5A 1b-wt 구조체의 동질유전자 세트를 인코드하는 pGBT9를 동공 트랜스펙션시켰다. -His 배지에서 생장하였다는 것은 2-하이브리드 단백질 상호작용이 있다는 것을 나타낸다. 도 11B는 면역블랏 분석을 나타내는 것이다. A에서 나타낸 균주에서 추출물을 준비하고, 항-AD 단클론 항체(좌측) 또는 항-BD 단클론 항체(우측)를 이용하여, 면역블랏 분석을 한다. 라인 1과 2에서는 각각 AD-벡터(v, 기준) 및 AD-PKR(PKR; 화살표)의 발현을 나타낸다. 라인 3-9에서는 각각 BD-벡터(V, 라인 3), BD-NS5AΔISDR(Δ, 라인 4), BD-NS5A 1a-wt(wt, 라인 5), BD-NS5A 1a-wt(wt, 라인 6), BD-NS5A 1b-2(2, 라인 7), BD-NS5A 1b-4(4, 라인 8), BD-NS5A 1b-5(5, 라인 9)의 발현을 나타낸다. 우측에 있는 화살표는 ΔISDR 및 전체 길이 BD-NS5A 구조체의 위치를 나타낸다. 단백질 표준의 위치는 kDa로 나타내었다.

도 12에서는 ISDR 돌연변이가 NS5A 기능을 제거한다는 것을 보여준다. 도 12A에서는 이스트 생장 검사를 나타낸다. 갈락토즈-유도성 URA3 발현 플라스미드 pYes-NS5A 1b-wt(1b-wt), pYes-NS5A 1b-2(1b-2), pYes-NS5A 1b-4(1b-4), pYes-NS5A 1b-5(1b-5) 또는 pYes 기준(벡터)를 가지는 RY1-1 이스트 균주의 세포 등가체를 연속적으로 희석하고, 덱스트로즈(SD) 또는 갈락토즈(SGAL)를 포함하는 배지에 점찍는다. 판넬은 30℃에서 5일 생장시킨 후에 콜로니 형성을 나타내는 것이다. 도 12B는 A에서 나타낸 이스트 균주에서 준비한 단백질 추출물의 면역블랏 분석을 나타낸 것이다. 항-PKR 단클론 항체, 항-NS5A 단클론 항체 또는 항-악틴(기준) 단클론 항체로 프로브시킨 동일 블랏의 결과를 나타낸다. 우측에 화살표는 PKR, NS5A 및 악틴의 위치를 나타낸다. 각 라인은 총 단백질 50㎍을 나타낸다.

도 13에서는 eIF-2α포스포릴화를 나타낸다. 이스트 eIF-2α감지는 항-이스트 eIF-2α 혈청으로 블랏을 프로브시켜 실행한다. 각 라인은 pYes(V, 라인 1), pYes-NS5A 1b-wt(1b-wt, 라인 2), pYes-NS5A 1b-2(1b-2, 라인 3), pYes-NS5A 1b-4(1b-4, 라인 4), pYes-NS5A 1b-5(1b-5, 라인 5), pYex-PKR A295-300[PKR A295-300(기준), 라인6]을 가지는 RY1-1 균주에서 준비한 단백질 20㎍을 나타낸다. 우측 화살표는 세린 51에서 PKR에 의해 인산화되는 아인산화된 eIF-2α(아래) 및 과인산화된 eIF-2α의 위치를 나타낸다.

도 14에서는 포유류 세포에서 ISDR 돌연변이가 NS5A-PKR 연합을 파괴한다는 것을 보여준다. Cos-I 세포에 PKR K296R, NS5A 또는 PKR K296R 및 벡터 기준을 인코드하는 CMV 발현 플라스미드로 공동 트랜스펙션시킨다. 추출물을 준비하고, 항-NS5A 단클론 항체(A) 또는 항-FLAG 수지(B)와 혼합한다. 도 14A에서는 기준 벡터(neo, 라인 1) 또는 NS5A 1a-wt(1a-wt, 라인 2), 주입 추출물(IP-input, 라인 3, 4)과 PKR K296R을 가지는 추출물에서 준비된 항-NS5A 면역복합체를 SDS-PAGE로 분리하고, 항-PKR(라인 1-3) 단클론 항체 또는 항-NS5A(라인 4) 단클론 항체를 이용하여 면역블랏 분석을 한다. 라인 3 및 4는 라인 2에서 나타낸 면역침전반응의 출발 물질을 나타낸다. 좌측에 수직 선은 이뮤노글로블린(Ig) 중쇄에 상응하는 넓은 밴드를 나타낸다. 표준 단백질 위치는 kDa으로 나타낸다. 도 14B에서는 제공 단백질(라인 1-3)의 면역블랏 분석 또는 벡터와 PKR K296R을 가지는 추출물과 혼합하여(neo, 라인 1, 4) 또는 항-FLAG 수지와 함께 FLAG-NAS5A 1b-wt(1b-wt, 라인 2, 5) 또는 FLAG-NAS5A 1b-5(1b-5, 라인 3, 6)를 혼합하여 회수한 단백질 복합체(라인 4-6)의 면역 블랏을 분석한 것이다.

도 15는 NS5A의 세포주와 종양 발현을 나타낸 것이다. NIH3T3 세포주 neo 5-10(neo, 라인 1), NS5A 5C6(5C6, 라인 2)에서 준비된 추출물의 면역블랏 또는 in vivo에서 유도된 NS5A 5C6 종양 세포(종양, 라인 3)에서 준비된 추출물의 면역 블랏을 나타낸다. 화살표는 NS5A의 위치를 나타낸다. 표준 단백질 위치는 kDa으로 나타낸다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 IFN-유도된 세포 방어 기작을 바이러스가 저해하는 것을 간섭할 수 있는 항-바이러스성 물질을 확인하는 새로운 방법에 관련된다. 본 발명은 또한 세포 PKR 단백질 카이나제와 ISDR 도메인을 포함하는 바이러스성 단백질의 상호작용을 표적으로 하는 항-바이러스성 물질을 스크리닝 하는 방법에 관련된다. 본 발명은 특히 HCV NS5A 및 IFN-유도된 PKR 단백질 카이나제 사이에 상호작용을 표적으로 하는 신규한 항-바이러스성 물질을 스크리닝하는 방법에 관련된다. 또 다른 구체예에서, 본 발명은 특히, PKR 이량화 반응의 HCVNS5A 저해를 표적으로 하는 항-바이러스 물질을 스크리닝하는 방법에 관련된다.

본 발명은 다음과 같은 출원인의 발견에 기초한 것이다; (1) NS5A의 ISDR 부분은 HCV의 IFN-저항성 표현형에 기능적으로 관련되었다; (2) ISDR 주변 추가 서열은 NS5A 및 PKR간에 상호작용에 필요하다; (3) NS5A은 단백질 카이나제 촉매 도메인 특히 아미노산 244-296과 직접적인 상호작용을 통하여 IFN-유도된 PKR을 억제한다; (4) PKR 아미노산 244-296는 이량체 도메인이고, NS5A는 이 도메인에 결합하여 PKR 이량체 형성을 방해하고; (5) ISDR 부분은 NS5A 및 PKR의 상호작용에 모두 필수적이고, 단백질 카이나제를 저해한다.

본 발명은 ISDR을 발현하는 바이러스 단백질과 PKR 단백질 카이나제와 같은 IFN-유도된 세포 단백질간에 상호작용을 표적으로 하는 신규한 항-바이러스 물질을 확인하는 스크리닝 검사에 관계한다. 본 발명은 또한 IFN-유도된 발현을 PKR 단백질 카이나제를 저해하는 NS5A를 무시할 정도로 유도하는 신규한 외생 또는 내생 물질을 확인하는 스크리닝 검사에 관계한다. ISDR 및 IFN-유도된 PKR의 상호작용으로 IFN-유도된 세포 방어 기작이 무효로되는데, 예를 들면, PKR의 이량체 반응을 저해하고, 따라서 ISDR를 포함하는 바이러스 단백질과 PKR의 상호작용을 간섭하는 화합물을 확인하는 본 발명의 방법을 이용하여 숙주의 해독을 중단시키는 바이러스의 능력을 저해하는 약물을 확인할 수 있다. 또한, 세포 PKR과 ISDR을 포함하는 바이러스 단백질과의 상호작용을 방해하는 화합물을 확인하는데 있어서, 본 발명의 방법은 바이러스 감염과 관련된 악성종양의 발생을 저해하는 물질을 확인할 수 있다. 바이러스에 의해 발현되는 단백질의 ISDR와 IFN-유도된 PKR사이에 상호작용을 간섭 또는 저해하는 물질을 스크린하는데에는 다양한 과정 및 기술이 이용된다. 이와 같인 확인된 물질은 바이러스에 감염된 숙주를 치료하는데 이용될 수 있고, IFN-저항성 바이러스에 효과적이다.

본 발명은 또한 여기에서 설명하는 스크리닝 방법에 의해 확인되는 신규한 물질을 포함하는 제약학적 조성물을 포함한다. 본 발명은 중재를 목적으로 하는 ISDR 단백질을 이용하여 바이러스 감염을 치료하는 치료법 및 제약학적 조성물에 관련된다. 본 발명은 또한 NS5A 및 IFN-유도된 PKR과의 상호작용을 이용하여 HCV 감염을 치료하는 제약학적 조성물 및 치료법에 관련된다. 이와 같은 치료법은 인터페론에 HCV의 민감성을 증가시키는 장점을 가지고 따라서 IFN과 복합하는 약물로 이용할 수 있다.

본 발명의 치료법은 또한, NS5A 및 IFN-유도된 PKR의 상호작용을 간섭하는 물질 또는 PKR의 NS5A 저해를 무시할 수 있을 정도로 IFN-발현을 유도할 수 있는 물질을 포함하는 복합 치료를 포함하는데, 적어도 한 가지 다른 치료 물질은 혼합물로써 동시에 투여하거나 또는 별도로 투여할 수 있고, 또는 연속적으로 치료하는 순환 과정에 포함될 수 있다. 순환 과정 치료에는 일정 시간동안 제 1 항-바이러스 물질을 투여하고, 연속적으로 투여를 반복하여, 치료제중 한가지에 저항성이 발생되는 것을 줄이는 것이다.

본 발명의 신규한 항-바이러스성 복합은 항바이러스 활성을 요구하는 약물의 효과량을 줄이고 따라서 독성이 감소될 뿐만 아니라 다양한 기작을 통하여 공격하기 때문에 절대적인 항-바이러스 효과가 개선되는 것이다. 유사하게, 신규한 항바이러스 복합은 단일 요법에 대한 바이러스 저항성이 발생되는 것을 배제하여 좀더 효과적인 치료를 제공한다. NS5A 및 PKR사이에 상호작용을 표적으로 하는 물질과 복합하여 이용할 수 있는 치료제에는 알파-IFN을 포함하는 공지의 다양한 치료제가 포함된다.

5.1. HCV 감염에서 HCV NS5A 및 IFN-유도된 PKR사이에 상호작용의 역할

본 발명은 다음과 같은 출원인의 놀라운 발견에 기초한다; (1) NS5A의 ISDR 부분은 HCV 균주의 IFN-저항성 표현형에 기능적으로 관련된다; (2) NS5A는 단백질 카이나제 촉매 도메인과 직접적인 상호작용을 통하여 IFN-유도된 PKR을 억제한다; (3) PKR 저해 및 NS5A와 PKR의 상호적용에는 ISDR이 필요하다. 이와 같은 발견은 단락 6, 7, 8, 9에서 구체예를 제공하고, 여기에서는 NS5A가 직접적인 상호작용을 통하여 PKR을 억제하는 것을 설명하는 생화학적 유전학적 과정을 복합하여 설명한다.

하기에서 설명하는 실시예에서는 in vitro GST 검사 및 in vivo 이스트 이중 하이브리드 검사를 이용하여 NS5A 및 PKR사이에 직접적인 상호작용을 설명하고, NS5A는 단백질 카이나제의 카르복실, 촉매 부분, 예를 들면, PKR의 이량체 형성 도메인인 아미노산 244-296에 적접적으로 상호작용하는 것으로 밝혀졌다. 정제된 재조합 NS5A는 in vitro에서 PKR 카이나제 활성을 저해하는 것으로 나타났다. 포유류 세포에서 공동트랜스펙션 연구에 따르면, NS5A는 in vivo에서 PKR의 이량체 형성을 방해하여, PKR 기능을 억제하고, PKR-중개된 eIF-2α포스포릴화반응을 저해한다. 또한, 이스트에서 발현되었을 경우에, NS5A는 PKR-유도된 천천히 생장하는 표현형을 저해하고, PKR의 천연 기질인 eIF-2α의 포스포릴화반응을 감소시킨다. 좀더 중요한 것은, ISDR이 부족한 NS5A 돌연변이는 PKR과 상호작용을 하거나 또는 단백질 카이나제 활성을 저해하는 능력이 없다는 것이다. 또한, HCV-1b 인터페론 감응성 균주내에서 발견된 다중 ISDR 돌연변이를 도입하면, 포유류 세포에서 NS5A가 PKR에 결합하는 능력이 제거된다는 것이다. 흥미로운 것은 단일 ISDR 점 돌연변이로도 NS5A의 PKR 조절 기능을 파괴할 수 있으나, PKR에 결합하는 능력은 유지된다. 실시예에서는 또한 세포주가 5를 과발현시키는 경우에, 세포주는 악성적으로 형질변환되고, 누드 생쥐에서는 종양의 원인이 된다. 이와 같은 결과는 처음으로, NS5A 유전자 생성물에 의해 PKR의 비활성화를 시키는 것이 HCV가 IFN의 항-바이러스 효과를 피하는 한 가지 기작이라는 것을 설명한 것이고, 따라서 이와 같은 상호작용은 HCV 항바이러스 치료법을 개발하는데 중요한 표적으로 작용하고, 또한 만성적인 HCV 감염으로 인한 악성종양을 치료하는 치료법에도 중요한 표적이 될 수 있다.

5.2. 스크리닝 검사를 위한 성분으로 HCV NS5A 및 PKR의 생산

본 발명은 NS5A 및 PKR사이에 상호작용을 표적으로 하는 화합물을 확인하는 스크리닝 검사에 관련되고, 특히 ISDR 및 PKR의 촉매 도메인사이에 상호작용을 표적으로 하는 화합물을 스크리닝하는 방법에 관련된다. 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명의 스크리닝 검사에 주요 성분으로는 바이러스성 NS5A 및 세포

PKR 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드를 인코드하는 뉴클레오티드 코딩 서열이 된다. 특히, 본 발명은 ISDR 및 PKR 단백질 카이나제의 촉매 도메인에 상응하는 펩티드 단편을 인코드하는 뉴클레오티드 코딩 서열을 포함한다. 본 발명은 또한 (a) 전술한 NS5A 또는 PKR 인코딩 서열 또는 이들의 상보체를 포함하는 DNA 벡터; (b) 숙주 세포에서 코딩 서열의 발현을 지시하는 조절 원소가 연합된 전술한 NS5A 또는 PKR 코딩 서열을 포함하는 DNA 발현 벡터; (c) 숙주 세포에서 코딩 서열의 발현을 지시하는 조절 원소가 연합된 전술한 NS5A 또는 PKR 코딩 서열을 포함하는 유전공학적으로 조작된 숙주 세포.

5.2.1. NS5A 및 PKR 코딩 서열

본 발명은 NS5A 단백질, NS5A 단백질의 펩티드 단편 및 NS5A 융합 단백질을 인코드하는 뉴클레오티드 코딩 서열을 포함한다. 적절한 구체예에서, 본 발명은 도 1A에 나타낸 것과 같은 ISDR 아미노산 서열을 인코드하는 뉴클레오티드 코딩 서열 및 이 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 또 다른 구체예에서 본 발명은 PKR과의 상호작용에 역시 필요한 ISDR의 카르복시 말단 서열을 인코드하는 뉴클레오티드 코딩 서열 및 이와 같은 뉴클레오티드 코딩 서열에 의해 인코드되는 아미노산 서열로 구성된 융합 단백질을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명은 HCCV의 IFN-감응성 균주내에서 발견되는 다중 ISDR 돌연변이를 인코드하는 뉴클레오티드 서열 및 이와 같은 ISDR 돌연변이로 구성된 펩티드 단편 및 융합 단백질을 포함한다.

본 발명은 또한 PKR 단백질 카이나제, PKR 단백질 카이나제의 펩티드 단편, PKR 단백질 융합 단백질을 인코드하는 뉴클레오티드 코딩 서열을 포함한다. 적절한 구체예에서, 본 발명은 PKR의 촉매 도메인을 인코드하는 뉴클레오티드 코딩 서열 및 PKR의 촉매 도메인을 인코드하는 융합 단백질을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명은 PKR 이량체형성 도메인 아미노산 244 내지 246으로 구성된 뉴클레오티드 코딩 서열 또는 펩티드 단편 및 PKR 아미노산 244 내지 296을 포함하는 융합 단백질을 포함한다.

융합 단백질을 인코드하는 뉴클레오티드에는 전체 길이 NSDR 또는 PKR, 절두형 단백질 또는 해독안된 단백질 또는 펩티드에 융합된 NSDR 또는 PKR의 펩티드 단편, 예를 들면, GST 또는 효소 또는 형광 단백질에 융합된 ISDR을 포함하나 이에 한정시키지는 않는다.

본 발명은 또한 (a) 전술한 NS5A 또는 PKR 단백질 카이나제 코딩 서열을 포함하는 DNA 벡터; (b) 코딩 서열의 발현을 지시하는 조절 원소가 연합된 전술한 NS5A 또는 PKR 단백질 카이나제 코딩 서열을 포함하는 DNA 발현 벡터; (c) 코딩 서열의 발현을 지시하는 조절 원소가 연합된 전술한 NS5A 또는 PKR 단백질 카이나제 코딩 서열을 포함하는 유전공학적으로 조적된 숙주 세포를 포함한다. 여기에서 이용된 것과 같이, 조절 원소에는 유도성 및 비-유도성 프로모터, 인헨서, 오퍼레이터 및 발현을 구동하고 조절하는 당분야에 공지된 다른 원소등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다. 이와 같은 조절 원소에는 열 쇼크 프로모터, 갈락토즈 유도성 프로모더와 같은 유도성 프로모터, 담배 모자이크 바이러스(TMV), 사이토메갈로바이러스 hCMV 바로 초기 유전자 또는 SV40 아데노바이러스의 초기 또는 후기 프로모터와 같은 바이러스성 프로모터, lac 시스템, trp 시스템, TAC 시스템, TRC 시스템, 파아지 A의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 부분, fd 코트 단백질의 조절 부분, 3-포스포글리세레이트 카이나제 프로모터, 산 포스포타제의 프로모터, 이스트 알파-메이팅 인자의 프로모터등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다.

5.2.2 NS5A 및 PKR 단백질 및 폴리펩티드

NS5A, PKR 단백질, 폴리펩티드, NS5A 및 PKR의 펩티드 단편, 돌연변이체, 절두형 또는 결손형 또는 ISDR 또는 PKR의 촉매 도메인을 포함하는 융합 단백질은 항체, IFN-유도된 세포 방어 기작의 바이러스성 회피에 관련된 다른 인자를 확인하는 등의 다양한 용도를 위해 만들 수 있다.

NS5A 및 PKR 코딩 서열에 돌연변이를 만들어서 선택된 숙주 세스템에서 발현, 대량화등에 더욱 적합한 단백질 및 펩티드를 만들 수 있다.

ISDR 및 PKR의 촉매 도메인을 포함하는 표적이 되는 절두형 또는 결손형 NS5A 또는 PKR 단백질의 하나 이상의 도메인에 상응하는 펩티드 뿐만 아니라 및 관련이 없는 단백질에 전체 길이의 NS5A 또는 PKR가 융합된 융합 단백질도 본 발명의 영역에 포함된다. 이와 같은 융합 단백질에는 NS5A 또는 PKR 단백질 또는 펩티드를 안정화시키고, in vivo에서 반감기를 연장시킨 IgFc 융합; 고형 서포트에 융합 단백질에 고정될 수 있도록 임의 아미노산 서열에 융합된 GST 융합 또는 안정한 표면에서 ISDR이 나타나도록 허용하는 임의 아미노산 서열에 융합된 GST 융합 또는 표적 기능을 하는 효소, 형광 단백질 또는 발광 단백질에 융합되는 것을 포함하나 이에 국한시키지는 않는다.

본 발명의 폴리펩티드 및 펩티드는 화학적으로 합성될 수도 있고(가령, Creighton 1983, Proteins; Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co., N.Y), NS5A 및 PKR 코딩 서열에서 유도된 많은 폴리펩티드는 NS5A 및 PKR 코딩 서열을 포함하는 핵산을 발현시키기 위해 당분야에 공지된 기술을 이용하여 재조합 DNA 기술에 의해 생산할 수도 있다. 이와 같은 방법은 5.2.1에서 설명한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 작제 및 적절한 전사 및 해독 조절 시그날을 만드는데에도 이용된다. 이와 같은 방법에는 예를 들자면, in vitro 재조합 DNA 기술, 합성 기술 및 유전자 재조합등이 포함된다. 예를 들면, Sambrook et al., 1989, supra, and Ausubel et al., 1989, supra.에서 설명하는 것을 이용한다. 또는, NS5A 또는 PKR 뉴클레오티드 서열을 인코드할 수 있는 RNA는 합성기와 같은 것을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 예를 들면, "Oligonucleotide Synthesis", 1984, Gait, M.J. ed., IRL Press, Oxford,에서 설명하는 기술을 이용한다.

다양한 숙주-발현 벡터 시스템을 이용하여 본 발명의 NS5A 및 PKR 뉴클레오티드 서열을 발현시킨다.

당분야에 공지된 방법을 이용하여 NS5A과 PKR 코딩 서열 및 적절한 전사/해독 조절 시그날을 포함하는 발현 벡터를 작제한다. 이와 같은 방법에는 in vitro 재조합 DNA 기술, 합성 기술 및 in vivo 재조합/유전자 복합 기술이 포함된다. 예를 들면, Maniatis et al., 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. and Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.에서 설명하는 것을 참고로 한다.

다양한 발현 벡터 시스템을 이용하여 NS5A와 PKR 코딩 서열을 발현시킨다. 여기에는 NS5A와 PKR 코딩 서

열을 포함하는 재조합 박테리오파아지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질변환된 박테리아와 같은 미생물; NS5A와 PKR 코딩 서열을 포함하는 이스트 발현 벡터로 형질변환된 이스트; NS5A와 PKR 코딩 서열을 포함하는 재조합 바이러스 발현 벡터(baculovirus)에 감염된 곤충 세포 시스템; 재조합 바이러스 발현 벡터(가령, 양배추 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)에 감염된 NS5A 및 PKR 시스템 또는 NS5A와 PKR 코딩 서열을 포함하는 재조합 플라스미드 발현 벡터(Ti 플라스미드)에 의해 형질변환된 또는 재조합 바이러스 발현 벡터(가령, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스)에 감염된 동물 세포 시스템등을 포함하나 이에 국한시키지는 않는다.

이와 같은 시스템의 발현 원소들은 이들의 강도 및 특이성이 다양하다. 이용되는 숙주/벡터 시스템에 따라, 구성 및 유도성 프로모터를 포함하는 적절한 전사 및 해독 원소가 발현 벡터에 이용될 수 있다. 예를 들면, 박테이라 시스템에서 클로닝할 경우에, 박테리오파아지 λ, plac, ptrp, ptac(ptrp-lac 하이브리드 프로모터)의 pL 및 이와 유사한 것이 이용되고; 곤충 세포 시스템에 클로닝하는 경우에, 베큘로바이러스 폴리헤드린 프로모터와 같은 프로모터를 이용되고; 식물 세포 시스템에서 클로닝하는 경우에, 식물 세포의 게놈에서 유도된 프로모터(예를 들면, 열 쇼크 프로모터; RUBISCO의 소단위용 프로모터; chlorophyll a/b 결합 단백질용 프로모터) 또는 식물 바이러스에서 유도된 프로모터(예를 들면, CaMV의 35S RNA; TMV의 코트 단백질 프로모터); 포유류 세포 시스템에서 클로닝하는 경우에는 포유류 세포의 게놈에서 유도된 프로모터(가령, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유류 바이러스에서 유도된 프로모터(가령, 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)등을 이용할 수 있고; NS5A 또는 PKR DNA 복사체를 많이 포함하는 세포주에서 발생되는 경우에는 적절한 선택 표식을 가지는 SV40-, BPV-, EBV-계 벡터를 이용한다.

박테리아 시스템의 경우에, 다수의 발현 벡터는 발현되는 NS5A 및 PKR의 사용 용도에 따라 적절하게 선택한다. 예를 들면, 다량의 NS5A 및 PKR가 항체 생산 또는 펩티드 라이브러리 스크리닝을 위해 생산되는 경우에, 바로 정제할 수 있는 다량의 융합 단백질 생성물을 발현할 수 있는 벡터를 이용하는 것이 바람직하다. 이와 같은 벡터에는 대장균(E. coli) 발현 벡터pUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO J. 2:1791) 및 pIN 벡터(Inouye & Inouye, 1985, Nucleic acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 264:5503-5509)가 포함되나 이에 국한시키지는 않고, 이때 NS5A 및 PKR 코딩 서열은 lac Z 코딩 부분의 프레임에 결찰되어, NS5A와 PKR 및 lac Z 하이브리드 단백질이 생산된다. pGEX 벡터를 이용하여 또한 글루타티온 S-트란스퍼라제(GST)와 융합 단백질인 외부 폴리펩티드를 발현시킨다. 일반적으로 융합 단백질은 가용성이고, 글루타티온-아가로즈 비드에 흡착시키고, 자유 글루타티온 존재하여 용출하여 용해된 세포로부터 용이하게 정제할 수 있다. pGEX 벡터는 트롬빈 또는 인자 Xa 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 고안되어, 원하는 클론된 폴리펩티드는 GST 부분으로부터 방출할 수 있다.

이스트에서, 구성 또는 유도성 프로모터를 포함하는 다수의 벡터를 이용한다. 이는 Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, 1988, Ed. Ausubel et al., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Ch. 13; Grant et al., 1987, Expression and Secretion Vectors for Yeast, in Methods in Enzymology, Eds. Wu & Grossman, 1987, Acad. Press, N.Y., Vol. 153, pp. 516-544; Glover, 1986, DNA Cloning, Vol. II, IRL Press, Wash., D.C., Ch. 3; and Bitter, 1987, Heterologous Gene Expression in Yeast, Methods in Enzymology, Eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y., Vol. 152, pp. 673-684; and The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, 1982, Eds. Strathern et al., Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II.를 참고로 한다.

장시간, 다량으로 재조합 단백질을 생산하기 위해서는 안정된 발현을 하는 것이 적절하다. 예를 들면, NS5A 또는 PKR를 안정적으로 발현시키는 세포주를 만드는 것이다. 본 발명의 적절한 구체예에서, NS5A 및 PKR를 안정적으로 발현시키는 이스트 세포를 조작할 수 있다. 이와 같은 세포주는 in vivo 시스템으로 작용하여, PKR의 NS5A 저해물질을 스크리닝한다. 바이러스 복제 원점을 포함하는 발현 벡터를 이용하는 것 보다는 이스트 숙주 세포를 적절한 발현 조절 원소(가령, 프로모터, 인헨서, 서열, 전사 종료물질, 폴리아데닐화부위등) 및 선택성 표식에 의해 조절되는 NS5A 및 PKR DNA를 형질도입시키는 것이다. 또한, 이와 같은 숙주 세포는 리포터 유전자를 인코드하는 DNA로 형질변환시키고, 이 유전자의 발현은 PKR 카이나제의 활성화에 반응하여 증가된다. 이와 같은 리포터 유전자는 β-갈락토즈 리포터 유전자에 융합된 GCN4 프로모터이다. 외부 DNA를 도입시킨 후에, 풍부한 배지에서 조작된 세포를 1-2일간 생장시키고, 그 다음 선택성 배지로 전환시킨다. 재조합 플라스미드에 있는 선택성 표식은 선택에 대해 저항성을 부여하여, 세포가 이들 염색체에 플라스미드가 안정적으로 결합되도록 하고, 세포주로 연장되도록 한다. 이와 같은 방법을 유용하여 이용하여 NS5A 유전자, PKR 유전자 및 PKR 단백질 카이나제의 활성화에 반응하여 발현이 증가되는 리포터 유전자를 발현시키는 세포주를 조작할 수 있다. 이와 같은 조작된 세포주는 특히 NS5A의 저해물질을 스크리닝하는데 유용하다.

여러 가지 선택 시스템이 이용될 수 있는데, 예를 들면, 허피스 심플렉스 티미딘 카이나제(Wigler, et al., 1977, Cell 11:223); 포스포리보실트랜스퍼라제(Szybalska & Szybalski,1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026); 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제(Lowy et al., 1980, Cell 22:817) 유전자는 tk^-, $hgprt^-$, $aprt^-$ 세포에 각각 이용된다. 또한, 항대사물질 저항성을 이용할 수 있는데, 예를 들면, 메토트렉세이트에 저항성을 제공하는 dhfr에 대한 선택(Wigler et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); 이코페놀산에 저항성을 제공하는 gpt(Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); 아미노글리코시드 G-418에 저항성을 부여하는 neo(Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1); 하이그로마이신 유전자에 저항성을 부여하는 hygro(Santerre, et al., 1984, Gene 30:147)등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다. 최근에는 추가 선택성 유전자에 대해 설명하고 있는데, 예를 들면, trpB은 세포가 트립토판대신에 인돌을 이용하도록 하는 것이고; hisD는 세포가 히스티딘대신에 히스티놀을 이용하도록 하는 것이고(Hartman & Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047); ODC(오르니틴 데카르복실라제)는 오르니틴 데카복실라제 저해물질, 2-(디플로로메틸)-DL-오르니틴 DFMO (McConlogue L., 1987, In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.)에 저항성을 제공하는 것이다. 본 발며은 또한, (a) 임의 외부 코딩 서열 또는 이의 상보체(가령 안티센스)를 포함하는 DNA 벡터; (b) 코딩 서열이 발현되도록 하는 조절 원소가 연합된 임의 외부 코딩 서열 또는 이의 상보체를 포함

하는 DNA 발현 벡터; (c) 숙주 세포에서 코딩 서열이 발현되도록 하는 조절 원소가 연합된 임의 외부 코딩 서열 또는 이의 상보체를 포함하는 유전공학적으로 조작된 숙주 세포를 포함한다. 여기에서 언급된 것과 같이, 조절 원소에는 유도성 및 비-유도성 프로모터, 인헨서, 오퍼레이터 및 발현을 구동하고 조절할 수 있는 당분야에 공지된 다른 원소등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다.

또한, 유전자-형 서열을 포함하는 기존의 알려지지 않은 ISDR은 단락 6.1에서 설명하는 PCR 프라이머를 이용하거나 원하는 유전자내에 아미노산 서열에 기초하여 고안된 두 개 축중 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용하여 PCR를 함으로써 분리할 수 있다. 반응의 주형은 ISDR을 포함하는 단백질을 발현시키는 것으로 보이는 바이러스에 감염된 세포주 또는 조직에서 준비한 mRNA를 역전사하여 수득한 cDNA이다.

PCR 생성물은 서브클로닝하여, 서열화하여, 증폭된 서열이 NS5A 또는 ISDR 유전자형 핵산 서열이라는 것을 확인한다. 그 다음 PCR 단편을 이용하여, 다양한 방법으로 전체 길이 cDNA 클론을 분리한다. 예를 들면, 증폭된 단편은 라벨하고, 이를 이용하여 박테리오파아지 cDNA 라이브러리를 스크리닝한다. 또는, 라벨된 단편을 이용하여, 게놈 라이브러리를 스크리닝한다.

PCR 기술을 또한 이용하여 전체 길이 cDNA 서열을 분리한다. 예를 들면, 적절한 세포 또는 조직원으로부터 표준 과정에 따라 RNA를 분리한다. 제 1 가닥 합성의 프라이밍을 위한 증폭된 단편의 대부분 5' 말단에 특이적인 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용하여 RNA에서 역전사 반응을 실행한다. 생성된 RNA/DNA 하이브리드에는 표준 말단 전이효소 반응을 이용하여 구아닌을 꼬리에 붙이고, 하이브리드는 RNAase H로 절단하고, 제 2 가닥 합성은 폴리-C 프라이머로 프라이밍한다. 따라서, 증폭된 단편의 cDNA 서열 상류를 용이하게 분리할 수 있다. 클로닝 방법은 Sambrook et al., 1989, supra.을 참고한다.

확인된 ISDR 서열이 정상 또는 야생형 유전자인 경우에, 이 유전자는 유전자의 돌연변이 대립형질을 분리하는데 이용된다. 돌연변이 대립형질은 공지의 또는 감염성을 제공하는 IFN-저항성 표현형을 가지는 것으로 제안된 바이러스로부터 분리할 수 있다. 돌연변이 대립형질 및 돌연변이 대립형질 생성물을 이용하여 in vitro 검사, 발현 시스템, 아래에서 설명하는 스크리닝 검사에 이용된다.

돌연변이 유전자의 cDNA는 PCR 및 당분야에 공지된 기술을 이용하여 분리한다. 이 경우에, 공지의 또는 돌연변이 대립형질을 가지는 것으로 가정된 조직으로부터 분리한 mRNA에 올리고-dT 올리고뉴클레오티드에 하이브리드하고, 역전사효소를 이용하여 새로운 가닥을 연장하여, 제 1 가닥 cDNA를 합성한다. 그 다음 제 2 가닥 cDNA는 정상적인 유전자의 5'말단에 특이적으로 하이브리드하는 올리고뉴클레오티드를 이용하여 합성한다. 이들 두 개 프라이머를 이용하여 PCR을 통하여 생성물을 증폭시키고, 적절한 벡터에 클론시키고, 당분야에 공지된 방법을 이용하여 DNA 서열을 분석한다. 정상 유전자에 대해 돌연변이 유전자의 DNA 서열을 비교하여, 돌연변이 유전자 생성물의 기능 상실 또는 변경의 원인이 되는 돌연변이를 확인할 수 있다.

또는, 게놈 또는 cDNA 라이브러리를 만들고, IFN에 저항성이 있는 바이러스에 감염된 세포로부터 DNA 또는 RNA을 이용하여 스크리닝함으로써, ISDR 또는 이의 돌연변이를 포함하는 유전자를 발현시킨다는 것을 확인한다. 정상 유전자 또는 임의 적절한 이의 단편을 라벨하고, 이를 프로브로 이용하여, 라이브러리에서 이에 상응하는 돌연변이 대립형질을 확인한다. 이 유전자를 포함하는 클론을 정제하고, 당분야에 공지된 방법에 따라 서열 분석한다.

또는, 돌연변이 대립형질을 가지는 것으로 알려진 또는 의심을 받는 개체에서 원하는 유전자를 발현시키는 IFN-저항성 바이러스에 감염된 세포 또는 조직으로부터 합성된 cDNA 또는 DNA를 이용하여 발현 라이브러리를 작제한다. 이와 같은 방식으로, 가상 돌연변이 조직에 의해 만들어진 유전자 생성물이 발현되고, 하기 5.3에서 설명하는 것과 같이 정상 유전자 생성물에 대해 만든 항체와 공유하여, 표준 항체 스크리닝 기술을 이용하여 스크리닝한다.(스크리닝 기술은 Harlow, E. and Lane, eds., 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.)을 참고로 한다. 돌연변이로 인하여 기능이 변경된 발현 유전자 생성물인 경우에(미스센스 돌연변이의 경우), 다클론성 항체 세트는 돌연변이 유전자 생성물과 교차 반응한다. 이와 같이 라벨된 항체와의 반응을 통하여 감지된 라이브러리 클론을 정제하고, 당분야에 공지된 방법에 따라 서열 분석을 한다.

5.2.3. 숙주 세포 및 발현 시스템

NS5A 및 PKR 코딩 서열을 포함하고, 생물학적으로 활성을 가지는 유전자 생성물을 발현시키는 숙주 세포는 다음과 같은 적어도 4가지 방법으로 확인된다; (a) DNA-DNA 또는 DNA-RNA 하이브리드 반응; (b) "marker" 유전자 기능의 유무; (c) 숙주 세포에서 NS5A 및 PKR 전사체의 발현을 측정하여 전사 수준을 평가; (d) 면역검사 또는 이의 생물학적 활성을 측정하여 유전자 생성물 감지.

첫 번째 방법은, 발현 벡터에 삽입된 코딩 NS5A 및 PKR 서열이 존재하는 것을 NS5A 및 PKR 코딩 서열 서열 또는 이의 일부 또는 이의 유도체에 상동성인 뉴클레오티드 서열로 구성된 프로브를 이용하여 DNA-DNA 또는 DNA-RNA 하이브리드 반응으로 감지할 수 있다.

두 번째 방법은, 특정 "표식" 유전자 기능의 유무(가령, 티미딘 활성, 항생체에 저항성, 메토트렉세이트에 저항성, 형질변환 표현형, 베큘로바이러스에서 합체 형성)에 기초하여 확인하고 선별할 수 있다. 예를 들면, NS5A 및 PKR 코딩 서열이 벡터의 표식 유전자내에 존재하는 경우에 NS5A 및 PKR 코딩 서열을 포함하는 재조합체는 표식 유전자 기능이 없는 것으로 확인할 수 있다. 또는, 표식 유전자는 NS5A 및 PKR 코딩 서열의 발현을 조절하는데 이용된 동일한 또는 상이한 프로모터의 조절하에서 NS5A 및 PKR 서열에 나란하게 위치한다. 유도 또는 선택에 반응하여 표식이 발현된다는 것은 NS5A 및 PKR 코딩 서열의 발현을 나타낸다.

세 번째 방법에서, NS5A 및 PKR 코딩 부분에 대한 전사 활성은 하이브리드 반응 검사를 이용하여 평가할 수 있다. 예를 들면, NS5A 및 PKR 코딩 서열 EH는 이의 특적 일부분에 상동성인 프로브를 이용하여 노던 블랏함으로써 분리 및 분석할 수 있다. 또는, 숙주 세포의 총 핵산을 추출하고, 이와 같은 프로브에 하이브리드 반응을 평가한다.

네 번째 방법에서, NS5A 및 PKR의 단백질 생성물의 발현은 웨스턴 블랏, 방사능면역 침전, 효소-연결된

면역검사등과 같은 면역검사에 의해 면역학적으로 확인할 수 있다. 그러나, 발현 시스템의 최종적인 성공 테스트는 생물학적으로 활성이 있는 NS5A 및 PKR 유전자 생성물을 감지하는 것이다. 숙주 세포가 유전자 생성물을 방출하는 경우에, 배양된 형질변환체 숙주 세포에서 수득된 무세포 배지를 NS5A 및 PKR 활성에 대해 검사한다. 유전자 생성물이 방출되지 않는 경우에, 이와 같은 활성에 대해 세포 용해물질을 검사한다. 어떠한 경우이건간에, 여러 가지 검사를 이용하여 NS5A 및 PKR 활성을 감지하는데, 예를 들면, 사이클로옥시게나제 활성은 외생 아라키돈산 기질을 첨가한 후(30μM, 15분 37℃), 프로스타글란딘 E_2이 메틸 옥시메이트 형으로 전환되는 것으로 배양 배지에서 결정된다. 이와 같은 이중 고리 유도체는 방사능면역검사(Amersham Corp의 키트 이용)를 이용하여 정량화한다.

조직 배양 세포, 포유류 세포, 이스트 세포, 조직 및 기관 추출물, 배 뿐만 아니라 전체 동물을 포함하나 이에 국한되지 않는 다양한 NS5A 및 PKR 세포 타입으로 여기에서 설명하는 유전자를 조작하여, 원하는 NS5A 및 PKR 세포를 얻는다. 본 발명의 구체예에서, 조작된 물질은 다음의 방법에 따라 선별되고 또는 형질전환체에 대해 스크리닝한다(가령, 도입된 유전자 구조에 결합 또는 합체되는 것).

형질변환 DNA에 존재하는 표식 유전자에 인코드된 형질에 대해 선택된 또는 조작된 물질을 선별 또는 스크리닝하여 형질변환된 세포, 조직 또는 동물을 확인하고 분리할 수 있다. 예를 들면, 형질변환 표식 유전자 구조체에 저항성을 제공하는 항생제 저해량을 포함하는 배지에서 조작된 세포를 생장시켜 선택한다. 또한, 본 발명의 재조합 핵산 구조에 존재할 수 있는 임의 볼 수 있는 표식 유전자(가령, β-글루코로니다제, 루시페라제, B 또는 C1 유전자)의 활성을 스크리닝하여 형질변환된 세포를 확인할 수 있다. 이와 같은 선별 및 스크리닝 방법은 당분야에 잘 공지되어 있다.

물리적 또는 생화학적 방법을 이용하여 본 발명의 유전자 구조체를 포함하는 세포 형질변환체를 확인할 수 있다. 이와 같은 방법에는 다음과 같은 것들이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다; 1)재조합 DNA 삽입체를 감지하고, 구조를 결정하기 위해 서든 분석 또는 PCR 분석; 2) 유전자 구조의 RNA 전사체를 감지하고, 검사하기 위한 노던 블랏, S-1 RNase 보호, 프라이머-연장 또는 역전사효소-PCR 증폭; 3) 효소 또는 리보자임 활성을 감지하는 효소적 검사 이때 유전자 생성물은 유전자 구조체에 의해 인코드된다; 4) 단백질 겔 전기영동, 웨스턴 블랏 기술, 면역침전 또는 효소-연결된 면역검사, 이때 유전자 구조체 생성물은 단백질이다; 5) 화합물의 생화학적 측정은 도입된 유전자 구조체의 발현으로 알 수 있다. 추가로 in situ 하이브리드반응, 효소 착색, 면역착색등을 이용하여 특정 세포, 기관 및 조직에서 재조합 구조체의 존재 및 발현을 감지할 수 있다. 이와 같은 검사를 실행하는 방법은 당업자에게 공지된 사실이다.

5.2.4. NS5A 또는 PKR 유전자 생성물의 정제

생물학적으로 활성이 있는 NS5A 또는 PKR를 상당한 수준으로 생산하는 세포가 일단 확인되면, 세포를 연장하고, 이를 이용하여 이들 단백질을 다량 생산한다. 유전자 생성물은 공지의 기술을 이용하여 정제하는데 이와 같은 기술에는 면역친화력 정제, 크로마토그래피 방법(HPLC 포함)등이 있으나, 이에 국한시키지는 않는다. 배양된 세포에 의해 유전자 생성물이 분비되는 경우에, 배양 배지로부터 NS5A 또는 PKR 폴리펩티드 또는 펩티드를 즉시 회수할 수 있다.

NS5A 또는 PKR 코딩 서열이 절단가능한 융합 단백질을 인코드하도록 조작된 경우에, 친화력 정제 기술을 이용하여 NS5A 또는 PKR를 정제할 수 있다. 예를 들면, 이형 펩티드 또는 단백질에 특이적인 항체를 이용하여, 고형 표면 또는 컬럼등에서 항구성 융합 단백질을 포집한다. 연결 부위를 절단할 수 있는 적절한 효소로 처리함으로써 NS5A 또는 PKR 부분을 방출할 수 있다.

폴리메라제 사슬 반응을 이용하여 cDNA 작제 용이, 트랜스펙션 및 발현된 단백질을 정제하면, 단백질의 물리적 역학적 성질을 규명하는데, 작지만 충분한 양의 NS5A 또는 PKR를 분리할 수 있다. 부위-직접적인 돌연변이형성 또는 자연 발생 돌연변이 서열을 이용하여, 단백질 기능에 대해 변형된 1차 구조의 효과를 결정할 수 있다. 절단가능한 아미노 단부앞에 NS5A 또는 PKR 도메인을 가지는 융합 구조체와 반대 배열을 가지는 구조체를 조작하여, 융합 구조체가 단백질의 생물학적 기능 및 능력을 일부 또는 전부 간섭하는지를 평가할 수 있다.

이와 같은 본 발명의 측면을 이용하여, NS5A 또는 PKR 서열 및 정제에 이용될 수 있는 결합 짝을 가지는 제 2 펩티드 또는 단백질(가령, 면역친화력 컬럼을 이용하는 경우에 항원)사이에 효소 절단 부위 또는 임의 절단 기질을 만들 수 있다.

5.3. NS5A 단백질에 대한 항체

NS5A 유전자 생성물에 대한 항체는 본 발명의 범위에 속하는데, 여기에는 ISDR와 같은 한가지 이상의 NS5A 유전자 생성물 에피토프를 특이적으로 인지할 수 있는 항체가 포함된다. 이와 같은 항체에는 다클론성 항체, 단클론성 항체(mAbs), 체약화된 또는 키매라 항체, 단일 사슬 항체, Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생산되는 단편, 항-이디오타입(anti-Id)항체, 상기에서 언급된 것중 임의 에피토프-결합 단편등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다. 이와 같은 항체는 혈액 혈장 및 혈청등을 포함하나 이에 한정되지 않는 생물학적 시료에서 NS5A 유전자 생성물을 감지하는데 이용할 수 있다. 또는, NS5A 유전자 생성물 활성을 저해하는 방법에 항체가 이용될 수 있다.

특정 항원에 상동성인 항체 집단인 단클론 항체는 배양물에서 연속 세포주에 의해 항체 분자 생성을 할 수 있는 항체 생산 기술에 의해 얻을 수 있다. 여기에는 Kohler 및 Milstein의 하이브리도마 기술(1975, Nature 256:495-497; and U.S. Patent No. 4,376,110); 사람 B-세포 하이브리도마 기술(Kosbor et al., 1983, Immunology Today 4:72; Cole et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030); EBV-하이브리도마 기술(Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)등을 포함하나 이에 국한되지는 않는다. 이와 같은 항체에는 IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, 이의 아류등을 포함하는 임의 면역글로블린이 된다. 본 발명의 mAb를 생산하는 하이브리도마는 in vitro 또는 in vivo에서 배양한다.

또한, "키매라 항체(chimeric antibodies")(Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851-6855; Neuberger et al., 1984, Nature, 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature, 314:452-454)를 생

산하는 기술이 이용될 수 있는데, 이는 적절한 생물학적 활성을 가지는 사람 항체 분자에서 유래한 유전자에 적절한 항원 특이성을 가지는 생쥐 상체 분자를 접합시켜 만드는 것이다. 키메라 항체는 생쥐 mAb에서 유래된 가변 부분 및 사람 면역글로블린 항상 부분을 가지는 것과 같이 다른 생물종에서 유도된 상이한 부분을 가지는 분자이다.

또는, 단일 사슬 항체를 생산하는데 설명된 기술(U.S. Patent 4,946,778; Bird, 1988, Science 242:423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; and Ward et al., 1989, Nature 334:544-546)을 이용하여 NS5A 유전자 생성물에 대한 단일 사슬 항체를 만든다. 단일 사슬 항체는 아미노산 다리를 통하여 Fv 부분의 중쇄 및 경쇄 단편을 연결하여, 한 개의 사슬 폴리펩티드를 만드는 것이다.

특이적인 에피토프를 인지하는 항체 단편은 공지의 기술을 이용하여 만들 수 있다. 예를 들면, 이와 같은 단편에는 항체 분자를 펩슨으로 처리하여 만들어지는 $F(ab')_2$ 단편; $F(ab')_2$의 단편에서 이황화 결합을 환원시켜 만들어지는 Fab 단편등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다. 또는, Fab 발현 라이브러리를 작제하여(Huse et al., 1989, Science, 246:1275-1281), 원하는 특이성을 가지는 단클론 Fab 단편을 신속하고 용이하게 확인할 수 있다.

5.4. NS5A 및 IFN-유도된 PKR의 상호작용을 선택적으로 저해하는 물질을 확인하기 위한 스크리닝 검사

본 발명은 ISDR을 포함하는 바이러스 단백질과 이들 단백질이 IFN-유도된 PKR 단백질 카이나제와의 상호작용을 표적으로 하는 물질을 in vitro 및 in vivo에서 스크리닝하는 방법에 관계한다.

해독시에 바이러스 효과를 파괴하거나 또는 조절하는 능력을 가지는 가능성이 있는 물질을 스크리닝하는 방법은 NS5A이 직접적으로 PKR와 상호작용하고, PKR의 촉매성 도메인이 이와 같은 상호작용에 필요하다는 출원인의 발견에 기초하여 고안된 것이다. 바이러스 효과를 파괴하거나 또는 조절하는 능력을 가지는 가능성이 있는 물질을 스크리닝하는 방법은 NS5A가 PKR 이량체 형성 도메인, 아미노산 244-296에 결합하여, PKR 기능을 저해하거나 억제한다는 출원인의 발견에 기초한 것이다. 원리에 따르면, 당분야에 공지된 많은 방법을 이용하여, 이들 성분사이에 상호작용을 간섭하는 것을 감지한다. 따라서, 테스트 물질에 반응하여 PKR 단백질 카이나제의 촉매 활성의 활성화로 PKR의 NS5A 저해를 간섭하는 물질 능력을 설명한다.

바이러스에 감염된 고유 세포에 테스트 물질을 첨가하고, 이 성분에서 바이러스 효과를 설명하기 위해 정립된 과정으로 원하는 성분을 검사하는 방법으로 스크리닝을 실시한다. 또는, in vitro 해독 반응에 테스트 물질을 첨가하고, 정립된 분석을 진행하는 것으로 스크리닝을 할 수 있다. 또 다른 방법으로는, 상기에서 설명하는 방법으로 서로 상호작용하는 것으로 확인된 정제된 또는 부분적으로 정제된 성분을 이들간에 상호작용이 정상적으로 일어날 수 있는 환경하에 두고, 이때 테스트 물질을 함께 할 수도 있으며, 상호작용을 분석하기 위해 정립된 기존 과정을 이용하여 테스트 물질의 영향을 평가한다. 이와 같은 방법에서, 정제된 또는 부분적으로 정제된 성분은 감염안된 세포 및 감염된 세포의 추출물을 분취하여 준비하고, 또는 이들은 클론된 유전자 또는 cDNA 또는 이의 단편을 발현시키고, 발현된 물질을 정제하여 얻을 수 있다.

광범위한 in vitro 선별 방법내에는 테스트 물질을 스크리닝하는데 편리하고 유용한 몇 가지 형태의 방법이 있다. 여기에는 두 가지 이상 성분간에 결합 상호작용을 측정하는 방법; 상호작용하는 성분중 하나가 효소인 경우에 효소의 활성을 측정하는 방법; 성분중 한가지를 조절할 수 있는 조건하에서 "리포터" 단백질 가령, 효소 또는 다른 감지가능한 또는 선별가능한 단백질의 발현 또는 활성을 측정하는 방법등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다.

두 가지 이상 성분사이에 결합 상호작용은 다양한 방법으로 측정한다. 한 가지 방법은 용이하게 감지할 수 있는 라벨을 성분중 하나에 라벨하고, 다른 성분과 함께 정상적으로 상호작용이 일어나는 조건에 두고, 결합안된 라벨 성분으로부터 결합된 라벨 성분을 분리하는 분리 단계를 실행하고, 결합된 성분의 양을 측정하는 것이다. 이 물질이 존재하는 경우에 결합된 라벨 성분의 양과 이 물질이 없는 조건에서 결합된 양을 비교하여, 결합 반응에 포함된 테스트 물질의 효과를 결정한다.

이와 같은 과정에서 분리 단계는 다양한 방식으로 실행된다. 한 가지 방법에서, 라벨된 성분에 대한 결합 짝을 결합 반응 전에 고형상에 고정시키고, 결합안된 라벨 성분은 결합 반응후 고형상을 세척한 후에 제거한다. 고형사에 결합 짝이 부착시키는 것은 당분야에 공지된 다양한 방법을 이용하여 실시하는데, 예를 들면, 화학적 교차연결, 플라스틱 표면에 비-특이적인 흡착, 고형상에 부착된 항체와 상호작용, 결합짝에 부착된 리간드(버이오틴) 및 고형상에 부착된 리간드-결합된 단백질(예를 들면, 아비딘 또는 스테렙토아비딘)과의 상호작용등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다.

또는, 라벨된 성분이 용액에서 결합짝과 상호작용을 한 후에 분리 단계를 실시한다. 라벨된 성분과 이의 결합 짝사이에 크기 차이를 이용하여, 분리가 된다면, 한외여과 필터를 통하여 결합 반응 생성물을 통과시키면 분리가 이루어지는데, 이때 필터의 구멍은 결합안된 라벨 성분은 통과시키나 이의 결합 짝 또는 짝에 결합된 라벨 성분은 통과시키지 않는다. 용액으로부터 라벨 성분의 결합 짝을 포집할 수 있는 물질을 이용하여 분리하는데, 예를 들면, 결합짝에 대한 항체, 결합짝에 이미 부착된 리간드와 상호작용할 수 있는 리간드-결합 단백질등이 있다.

각 경우에 효소의 특징에 따라 효소 활성을 특정하는 방법이 있다. 상기에서 언급한 것과 같이, 바이러스의 해독 효과에 관련된 다양한 효소 활성을 측정할 수 있는데, 예를 들면, 카이나제, 포스포타제, 글리코실라제, 데글리코실라제, 트랜스퍼라제, 리파제, 데옥시리보뉴클레아제, 리보뉴클레아제, 프로테아제, 합성효소, 폴리메라제 및 상기에서 언급한 다른 효소 활성등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다. 일반적으로, 효소 활성을 측정하는데에는 다른 물질 존재하에 반응 생성물을 측정해야 하는데, 흔히, 반응 기질로부터 반응 생성물을 구별하거나 분리한다. 반응 생성물을 측정하는데 이용되는 방법은 방사능활성 또는 다른 라벨 원자 또는 라벨 기의 전달 또는 결합 정도를 측정; 생성물의 농도를 분광광도계로 또는 발색계로 측정; 발광 또는 화학적 발광 반응으로 방출되는 광을 측정; 형광 생성물에서 발생되는 형광 측정; 면역검사, 다른 면역화학적 과정, 다른 경쟁성 결합 검사등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다.

상기에서 언급하는 임의 과정을 이용하여 효소 활성을 측정하고, 이로써 제 2 반응 생성물을 감지하거나 기질 또는 공인자로써 원하는 반응 생성물이 되는 반응을 감지한다.

반응 혼합물의 다른 구성분으로부터 생성물을 분리하지 않고 효소 반응 생성물을 감지할 수 있는 대부분 경우에, 예를 들면, 색을 띄지 않은 발색 기질은 색을 띄는 생성물이 되고, 또는 기질과 상이한 생성물의 흡수 스펙트럼을 가지고 이로써, 생성물의 흡수 파장을 선택할 수 있다. 원하는 생성물을 분리하지 않고 면역검사, 다른 면역화학적 과정 및 다른 경쟁성 결합 검사를 실시한다.

다른 경우에, 측정하기 전에 반응 혼합물의 다른 성분으로부터 생성물을 분리할 필요가 있다. 이와 같은 경우에, 필수적인 분리는 다양한 과정을 통하여 실시할 수 있는데, 예를 들면, 원심분리, 삼클로로아세트산 침전, 에탄올 침전, 황산암모니움 침전, 필터 결합, 다른 차등 침전, 겔 여과, 이온 교환 크로마토그래피, 수소성 상호작용 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 친화력 크로마토그래피, 차등 추출, 등전점 포커스, 전기영동, 등유속분리등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다.

해독시에 바이러스 효과에 복합된 효소 활성을 측정하는 방법에 추가하여, 바이러스 영향에 관련된 성분이 "reporter" 단백질(가령, 효소 또는 다른 감지가능한 또는 선별가능한 단백질)의 활성 또는 발현을 조절하는 방식을 확인하는 테스트 방법이 이용된다. 이 경우, 바이러스 효과에 카이나제가 연루된 경우에, 테스트 방법은 카이나제에 의한 특정 단백질의 포스포릴화반응이 이 단백질 또는 이 단백질에 의해 조절되는 일부 다른 단백질을 활성화시키는지 또는 저해하는지를 확인하는 것이다. 이스트의 경우에, GCN2 단백질(또는 GCN2 대신에 포유류 PKR 카이나제)에 의한 eIF-2α의 포스포릴화반응이 해독 새기를 방해하여, GCN4 단백질의 합성을 증가시키고, 이는 또 아미노산 생합성에 관련된 추가 다른 단백질의 합성을 유도한다. "Reporter" 단백질은 유전자 수준에서 GCN4 단백질에 융합되어, GCN2 또는 포유류 PKR에 의해 촉매되는 초기 포스포릴화반응에 의해 이들 리포터의 합성이 효과적으로 유도된다.

유사한 과정을 이용하여 해독시에 바이러스 효과에 관련되는 것으로 보이는 다른 다양한 성분의 활성을 테스트 물질을 조절하는 정도를 감지할 수 있다. 예를 들면, 프로테아제에서 테스트 물질의 효과는 프로테아제의 표적인 리포터 단백질의 생존 및 in vitro 반응을 모니터하는 것이다. 유사하게, 뉴클레아제에서 테스트 물질의 효과는 반응에 제공된 적절한 모양의 코딩 서열로부터 해독된 리포터 단백질의 in vitro 전사-해독 반응 또는 in vitro 해독 반응에서 나타나는 것으로 모니터한다.

이와 같은 검사에서 리포터로 이용하기에 적절한 단백질은 β-갈락토시다제, 루시페라제, β-글루??코로니다제, 클로람페니톨 아세틸 전이효소, 분비된 배 알칼리 포스포타제와 같은 용이하게 검사할 수 있는 효소; 호르몬, 사이토킨과 같은 면역검사에 바로 이용할 수 있는 단백질; 세포에서 선택적으로 생장에 장점을 제공하는 단백질 가령, 아데노신 디아미나제, 아미노-글리코시드 포스포트란스퍼라제(neo 유전자 생성물), 디하이드로폴레이트 환원효소, 하이그로마이신 B 포스포트란스퍼라제, 티미딘 카이나제(HAT 배지에 이용되는 경우), 산틴-구아니딘 포스포리보실트란스퍼라제(XGPRT)와 같은 단백질; 영양요구성이 없는 생합성 능력을 제공하는 단백질; 세포에서 생장에 나쁜 점을 제공하는 단백질, 가령, 비독성 기질을 티미딘 카이나제(브로모데옥시우리딘을 포함하는 배지에 이용하는 경우), 오로티딘-5'-포스페이트 데카복시라제(5-플로로오로틴산을 이용하는 경우)등과 같은 복성 생성물로 전환하는 효소; 리친, 콜레라 독소 또는 디프테리아 독소와 같은 독성이 있는 단백질등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다.

테스트 물질을 선택하는데 있어서 지금까지 설명한 대부분 방법은 in vitro 반응에서 두 가지 이상 성분 사이의 상호작용에 이들 물질의 영향을 검사하는 것이다. 상호작용 성분은 in vitro 반응보다는 세포내에서 또 다른 것과 접촉시킬 수도 있다. 이와 같은 방법에서, 성분 모두 또는 일부를 인코드하는 코딩 서열을 선택된 세포 형에 도입시킬 수 있다. 이와 같은 방법에서 코딩 서열에는 중합호쇼 연쇄 반응 또는 자연 RNAs 또는 전사된 RNA에 의해 증폭된 단편 또는 클론된 유전자 또는 cDNA 또는 이의 단편을 포함한다. 방법을 몇 가지로 다양하게 이용될 수 있다. 한 가지 변화에는, 제 1 성분에 대한 코딩 서열을 제 1 성분과 상호작용하는 성분을 포함하는 세포에 도입시킨다. 따라서, 바이러스 성분에 대한 코딩 서열은 문에의 바이러스에 의한 감염의 정상적인 표적이 되는 세포내에 도입시킨다. 코딩 서열이 도입된 세포내에 바이러스 성분의 효과를 차단할 수 있는 것을 선택하는 것으로 물질을 테스트한다. 또 다른 변화로는, 서로 상호작용할 수 있는 두 가지 이상 성분에 대한 코딩 서열을 세포내에 도입시키고, 이들 성분사이에 상호작용을 조절할 수 있는 능력에 대해 물질을 테스트하고, 이와 같은 상호작용은 목적에 적합하도록 정립된 과정에 따른다. 코딩 서열이 도입되는 세포는 문제의 바이러스에 의한 감염의 정상적인 표적이 되는 것이다. 또는 그리고 통상적으로, 세포는 이스트 세포와 같은 생장, 조절 및 테스트 실시가 용이한 것이 된다. 또한, 이들은 이형 세포에 해독 조절 기작을 제구성하는데 뚜렷한 장점을 가지는데, 이때 관련된 성분간에 상호작용은 정상적인 환경에서 이들 성분이 있는 경우보다 연구가 더 용이하다. 이스트 경우에, 특히, 강력한 유전학적 접근 방식은 고등 진핵세포에서 확인할 수 있는 이에 상응하는 유전자보다 더 신속하데 고등 진핵세포로부터 상동 유전자를 이스트에서 확인하고 분리할 수 있다.

전술한 내용으로부터, 당업자는 해독시에 바이러스 효과에 관련된 성분을 확인; 이들 성분간의 상호작용의 특징 조사; 이들 성분간에 상호작용을 조절 또는 제거하는 화합물을 선별하기 위한 스크리닝 테스트 실시등의 각 단계에서 다양한 방법을 선택할 수 있다는 것을 인지할 것이다.

다음은 본 발명에 유용한 특정 스크리닝 및 관련 과정의 상세한 설명을 제공한다. PKR 단백질 카이나제의 ISDR 저해를 발현시키는 바이러스 단백질을 간섭하는데 효과적인 물질을 스크리닝하는 방법을 설명한다. 한 실시예에서, 선택된 시스템에서 바이러스는 숙주 세포 인터페론-유도된 이중 가닥 RNA-활성화된 단백질 카이나제의 활성을 간섭하는 바이러스성 저해물질을 생산할 수 있다. 그러나, 상기에서 설명하는 것과 같이, 이 실시예는 본 발명에 한정시키는 것이 아니고, 본 발명을 설명하기 위함이다. 일반적인 방법에는 단백질 카이나제 활성화를 바이러스 저해물질이 효과적으로 간섭할 수 있는 조건하에서 단백질 카이나제, 바이러스성 저해물질 및 테스트할 화합물을 배양하고, 간섭에 대해 혼합물을 검사하는 것을 포함한다. 하기에서는 본 발명을 4 가지 일반적인 구체예로 설명한다.

5.4.1. in vitro 스크리닝 검사

한 실시예에서, PKR 단백질 카이나제에 결합할 수 있는 바이러스성 저해물질을 생산하고, 이중 가닥 RNA(dsRNA)를 이용하여 이의 활성을 차단할 수 있는 바이러스를 숙주 세포에서 복제하지 못하도록 하는데

효과적인 화합물을 스크리닝하는데 방법을 이용한다. 여기에서, 배양 단계에는 단백질 카이나제에 바이러스성 저해물질이 결합하는데 효과적인 환경하에 혼합물을 배양하는 것이 포함되고, 결합된 바이러스성 저해물질에 대한 단백질 카이나제를 검사하는 것이 포함된다.

배양은 용액상에서 실시하고, 검사 단계는 저해물질이 단백질 카이나제에 결합되는 경우에만 바이러스성 저해물질을 포함하는 필터를 통과시키는 단계가 포함된다.

또는, 단백질 카이나제는 고형상 및 리포터가 라벨된 바이러스성 저해물질에 결합될 수도 있고, 고형상에 결합된 리포터의 양을 측정하여 검사단계를 실행한다.

또는, 배양 단계는 바이러스성 저해물질에 결합되는 것 없이 단백질 카이나제가 자가포스포릴화되는 조건하에서 실시하고, 검사 단계는 PKR 카이나제의 포스포릴화정도를 결정하는 것이다.

둘째로, 배양 단계에는 바이러스성 저해물질 없이 PKR 카이나제를 효과적으로 활성화시키는 조건하에 혼합물을 배양하는 것이 포함되고, 검사 단계는 저해물질 존재하에 PKR 카이나제 활성을 검사하는 것이 포함된다.

배양은 정제된 또는 부분적으로 정제된 PKR 카이나제 준비물을 이용하여 실시하고, 검사 단계에는 카이나제의 자가포스포릴화반응 또는 카이나제에 제공되는 eIF-2α 또는 히스톤 기질의 포스포릴화를 측정하는 것이 포함된다.

또는, 배양은 PKR 카이나제를 포함하는 해독 혼합물에서 in vitro로 실시하고, 검사 단계는 특이적인 mRNA의 해독에 의해 생성되는 리포터 폴리펩티드의 양을 측정하는 단계가 포함된다. mRNA의 해독은 PKR 카이나제의 활성화에 의해 감소될 수 있고, 적절하게는 RNA의 5-해독안된 리더가 이스트 GCN4 유전자에서 유도된 경우에 키메라 RNA와 같이 해독이 증가될 수 있다.

세 번째 예로써, 단백질 카이나제 활성화를 차단하거나 활성화된 카이나제를 저해하기 위해 활성형으로 존재할 수 있는 숙주-세포 성분을 활성화시키는데 효과적인 바이러스성 저해물질을 생산하는 바이러스의 바이러스성 복제를 차단하는데 효과적인 성분을 스크리닝하는 방법을 이용한다. 여기에서 형성된 혼합물에는 숙주-세포 성분(활성형)이 포함되고, 배양 단계는 활성화된 성분이 없는 상태에서 단백질 카이나제가 활성화되는 조건에서 실시하고, 검사단계에는 단백질 카이나제 활성을 저해하는 혼합물을 검사하는 것이 포함된다. 또는, 형성된 혼합물에는 비-활성형의 숙주-세포 성분 및 숙주 세포 성분을 활성화시키는 바이러스성 저해물질이 포함되고, 배양 단계는 바이러스성 저해물질 및 활성화된 숙주-세포 성분 없이 단백질 카이나제가 활성화되는 조건하에서 실시하고, 검사 단계는 단백질 카이나제 활성을 저해하는데 대해 혼합물을 검사하는 것을 포함한다.

5.4.2. in vivo 스크리닝 검사

본 발명은 숙주 세포에서 바이러스성 복제를 저해하는데 효과적인 화합물을 확인하는 in vivo 스크리닝 방법에 관계한다. 이 검사는, 테스트 화합물을 첨가하는 숙주 세포는 단락 5.2에서 설명하는 것과 같이 NS5A 및 PKR 또는 이의 단편 모두를 발현하도록 만든다. 숙주 세포에서 PKR 및 PKR의 발현은 일시적인 유도성이거나 또는 구성적 또는 안정한 것이 된다. NS5A/PKR 상호작용을 간섭하는 테스트 화합물의 능력은 테스트 화합물을 숙주 세포에 첨가하고, 공지 기질의 PKR 카이나제 검사를 통하여 직접적으로 PKR 활성을 측정하거나 또는 활성화된 PKR 카이나제 존재에 의존성인 리포터 유전자를 공동 트랜스펙션시켜 간접적으로 PKR 활성을 측정한다. 본 발명의 스크리닝 방법을 위해, 다양한 숙주 세포를 이용할 수 있는데, 예를 들면, 조직 배양 세포, 포유류 세포, 이스트 세포 및 박테리아등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다. 각 세포형에는 고유의 장점 및 단점이 있다. 배양된 간 세포와 같은 포유류 세포는 본 발명을 실행하는데 적절한 세포 형태이나, 이와 같은 세포는 배양이 어렵다는 단점이 있다. 박테리아 및 이스트는 상대적으로 배양은 용이하나 포유류 세포와는 다른 단백질 프로세싱 과정을 가진다. in vivo 스크리닝 방법은 이스트 숙주 세포 발현 시스템을 참고로 하여 설명하나, 원리는 5.2에서 설명하는 것과 같이 임의 유전공학적으로 조작된 숙주 세포에 적용할 수 있다.

본 발명의 또 다른 구체예에서, 활성화된 PKR 카이나제 존재하에 리포터 폴리펩티드의 발현을 증가시키도록 만든 이스트 세포에서 바이러스성 또는 바이러스-활성화된 저해물질이 발현되고, 검사 단계에는 리포터 폴리펩티드의 증가된 발현에 대해 이스트 세포를 검사한다.

해독 조절에 관여하는 이스트 단백질중 하나는 단백질 GCN2이다. 단백질은 전하를 띄지 않는 tRNA의 결합에 의해 활성화되는 카이나제이고, 아미노산이 신속하게 공급될 때 축적된다. 개시 인자 eIF-2α의 알파 소단위를 포스포릴화하여 이스트에서 활성화된 단백질의 해독 수준을 저해한다. GCN2 활성화의 또 다른 결과는 이스트 GCN4 단백질의 생산이 증가되고 그 다음 아미노산 합성을 위한 대사 과정을 활성화시킨다.

in vivo 스크리닝을 위해 본 발명에서 이용되는 구조체는 조절된 프로모터의 조절하에서 GCN2 유전자가 포유류 PKR 유전자로 대체된 이스트 세포이다. 세포에는 또한 하기에서 설명하는 추가 변형이 포함된다. 이스트로 선택된 코딩 서열을 도입시키기 위한 표준 재조합 기술을 이용하여 이스트에 PKR 유전자를 도입할 수 있다. 간략하게 설명하면, PKR 유전자는 하향-조절되는 프로모터의 제어하에 두고, 하향-조절된 조건하에 세포 선택이 이루어진다. 이는 이스트 세포에서 PKR 단백질이 내생 dsRNA에 의해 구조적으로 활성화되기 때문에 실시하고, 너무 많이 발현되는 경우에, 활성화된 조건에서 세포 해독을 저해한다.

리포터 폴리펩티드의 생산이 활성화된 PKR 효소 존재에 따라 달라지는 경우에 리포터 폴리펩티드의 수준을 검사하여 PKR의 조절을 테스트하도록 만든다. 이와 같은 리포터는 GCN4 이스트 유전자에 융합된 β-gal 유전자에서 생산된다. 후자 유전자는 GCN2가 활성화되는 조건하에서 발현되기 시작하고, GCN2가 PKR 대체된 이스트 세포에서 PKR 포스포릴화 시스템의 조절하에 있다. 따라서, 활성화된 PKR이 존재함으로써 일반적으로 이스트의 해독을 정지시키나 융합된 GCN4/β-gal 단백질의 생산은 강화시킨다. β-gal 활성을 측정하여, 융합된 단백질의 발현을 용이하게 측정할 수 있다.

스크리닝 시스템은 PKR 단백질의 활성화에 의해 세포의 해독을 중단시키는 숙주 세포에 대해 바이러스 병

인성의 반대-방어을 차단하는데 효과적인 약물을 스크리닝하도록 되어 있다. 바이러스의 반대-방어에는 (a) PKR의 결합부위를 점령하고, dsRNA가 PKR에 결합하여, PKR를 활성화시키는 것을 저해하는 VA1, EBER-1, 또는 TAR 바이러스성 저해물질 RNA; (b) PKR의 활성화를 저해하는 또는 활성화된 효소를 비활성화시키는데 효과적인 세포 성분을 유도 또는 활성화시키는 인플루엔자 바이러스와 같은 바이러스의 능력; (c) PKR의 활성화 또는 활성을 차단하는 레오바이러스 σ3 단백질 또는 백시니아 바이러스 K3L 및 E3L 단백질과 같은 바이러스성 단백질; (d) PKR 카이나제를 분해하는 폴리오바이러스에 의해 이용되는 복합체와 같은 바이러스성 RNA와 세포 성분의 복합체등이 포함된다.

바이러스 저해물질의 경우에, 스크리닝에 이용되는 이스트 세포는 유도성 프로모터 조절하에 바이러스성 저해물질에 대한 유전자를 포함하도록 만든다. 바이러스성 저해물질이 발현되지 않는(그러나 PKR은 발현되는) 비-유도성 생장 조건하에서, PKR 단백질은 상기에서 설명하는 것과 같이 내생 dsRNA에 의해 활성화 되고, 활성화된 PKR이 존재하는지는 GCN4/β-gal 융합 단백질의 수준이 상대적으로 높은 것으로 확인한다. 생장 배지에 바이러스성 저해물질의 발현을 조절하는 유도성 프로모터에 대한 유도물질을 포함하는 유도성 생장 조건에서는, 바이러스성 저해물질이 존재하기 때문에 활성화된 PKR의 수준이 세포에서 낮고, 이는 GCN4/β-gal 융합 단백질의 수준이 상대적으로 낮은 것으로 확인한다. 바이러스성 저해물질에 대한 유도 조건하에서 GCN4/β-gal 융합 단백질의 측정된 수준에 이들의 효과를 평가하여 가능성이 있는 항바이러스성 물질을 테스트한다. 합성되는 융합 단백질이 상대적으로 높은 수준이 되는 물질을 선택하는데, 이 물질은 바이러스성 저해물질이 내생 이중-가닥 RNA에 의해 PKR의 활성화를 간섭하지 못하도록 한다.

바이러스에 의해 유도된 또는 활성화된 세포 성분이 PKR 카이나제의 활성을 방해하거나 또는 활성화된 카이나제를 저해하는 경우에, 이 세포 성분에 대한 유전자는 유도성 프로모터 조절하에 스크리닝에 이용된 이스트 세포에 둔다(상기에서 설명하는 바이러스성 저해물질 RNA 유전자 대신에). 그 다음 바이러스성 저해물질에 대해 설명한 것과 같이, 스크리닝에 이용한다. 따라서, 비-유도성 생장 조건하에서, 세포 성분이 발현되지 않고, GCN4/β-gal 융합 단백질이 상대적으로 높은 수준으로 존재한다는 것이 관찰되어, 내생 이중 가닥 RNA에 의해 활성화된 PKR가 존재한다는 것을 말하는 것이다. 유도성 생장 조건하에서는, GCN4/β-gal 융합 단백질의 수준이 더 낮은데, 이는 세포 성분에 의해 PKR의 활성 또는 활성화를 저해한다는 것을 말하는 것이다. 세포 성분에 대한 유도성 조건하에서 GCN4/β-gal 융합 단백질의 측정된 수준에 이들의 영향을 평가하여 가능성이 있는 항-바이러스 물질을 테스트하고, 물질은 합성되는 융합 단백질이 상대적으로 많이 존재하도록 하는 것이 선택된다.

PKR 카이나제를 분해하는 바이러스 성분 및 세포 성분사이에 유사한 방법을 채택한다. 이 경우에, 이스트 균주는 유도성 조건하에 세포 및 바이러스 성분에 대한 유전자를 모두 포함하도록 하고, 스크리닝은 상기에서 설명하는 것과 같이 실행한다.

다음의 실시예는 상기에서 설명하는 스크리닝 방법을 설명하는 것으로, 이에 국한하고자 하는 의도는 아니다.

5.5. HCV 치료에서 NS5A로 처리

다양한 기술 및 조성물을 이용하여, NS5A과 IFN-유도된 단백질사이에 상호작용을 저해하거나 이의 활성을 저해하는 NS5A를 표적하여, HCV 감염을 저해한다.

예를 들면, 본 발명에 따른 화합물은 NS5A 또는 ISDR에 대한 항체를 중화하는 것을 포함되나 이에 국한시키지는 않는 NS5A 및 IFN-유도된 PKR사이에 상호작용을 간섭하거나 저해하는 NS5A를 표적으로 하는 임의 화합물을 포함한다. 또 다른 화합물의 예로는 펩티드(가령, ISDR와 같은 IFN-유도된 PKR과 상호작용에 요구되는 NS5A의 부분을 나타내는 펩티드), 포스포펩티드, 작은 유기 또는 무기 분자 또는 항체(다클론성, 단클론성, 제액화된, 항-이디오타입, 키메라 또는 단일 사슬 항체, FAb, $F(ab')_2$, FAb 발현 라이브러리 단편, 이의 에피토프-결합 단편을 포함)등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다. 이와 같은 화합물의 투여 및 효과적인 약량을 결정하는 기술은 5.6에서 설명하고 있다.

또한, 본 발명에서 이용할 수 있는 화합물에는 NS5A 활성을 저해하는 세포내 약물-IFN-유도된 PKR이 NS5A와 상호작용하는 것을 방해하는 결쟁 리간드등이 포함된다.

본 발명에 따라 NS5A 및 IFN-유도된 단백질의 상호작용을 저해시키기 위해 유전자 요법 방법이 이용된다. NS5A의 상호작용을 저해하고, 특히 ISDR와 이의 세포 표적간에 상호작용을 방해하는 화합물은 안티센스, 리보자임 및 삼중 나선 분자등이 된다. 이와 같은 분자는 HCV-감염된 숙주 세포에서 표적 유전자, NS5A의 발현을 저해하도록 고안한다. 안티센스 리보자임 및 삼중 나선 분자의 생산 및 이용하는 기술은 당분야에 공지된 것으로 이는 도 1A에서 나타낸 것과 같은 ISDR의 아미노산 서열을 인코드하는 뉴클레오티드 서열을 가지도록 한다.

안티센스 RNA 및 DNA 분자는 표적 mRNA에 하이브리드시키고, 단백질 해독을 방해하여, mRNA의 해독을 직접적으로 차단한다. 안티센스 DNA의 경우에, 해독 개시 부위 예를 들면 관심이 있는 표적 유전자 뉴클레오티드 서열의 -10 내지 +10 부위에서 유도된 올리고데옥시뉴클레오티드가 적절하다.

리보자임은 RNA의 특이적으로 절단을 촉매하는 효소 RNA 분자이다(이는 R ossi, J., 1994, Current Biology 4:469-471를 참고로 한다). 리보자임 작용 기작은 상보적인 표적 RNA에 리보자임 분자의 서열 특이적인 하이브리드 및 엔도뉴클레아제 절단이 관계한다. 리보자임 분자 조성물은 표적 유전자 mRNA에 상보적인 한가지 이상의 서열을 포함하고, mRNA 절단에 대한 책임이 있는 공지의 촉매 서열이 포함된다. 이 서열은 미국 특허 5,093,246에서 잘 설명하고 있다. 본 발명의 범위내에서, 표적 유전자 단백질을 인코드하는 RNA 서열의 특이적이고 효과적인 엔도뉴클레아제 절단을 촉매하는 망치머리 모티프 리보자임 분자이다.

임의 가능성이 있는 RNA 표적내에 특이적인 리보자임 절단 부위는 GUA, GUU, GUC를 포함하는 리보자임 절단 부위에 대한 분자를 스캐닝하여 처음으로 확인되었다. 일단 확인된 후에, 절단 부위를 포함하는 표적 부위에 상응하는 15 내지 20개 리보뉴클레오티드의 짧은 RNA 서열은 부적절한 올리고뉴클레오티드 서열이

될 수 있는 2차 구조와 같은 예측되는 구조적 특징에 대해서도 평가할 수 있다. 리보뉴클레아제 보호 검사를 이용하여 상보적인 올리고뉴클레오티드에 하이브리드되는 이들의 근접성을 테스트하여, 추천된 서열의 적합성을 테스트한다.

전사를 저해하기 위한 삼중 나선 형성에 이용되는 핵산 분자는 단일 가닥이고, 데옥시뉴클레오티드로 구성된다. 이들 올리고뉴클레오티드의 기본 조성물은 Hoogsteen 염기 쌍 규칙에 따라 삼중 나선 형성을 촉진하도록 해야 하는데, 일반적으로 이중 나선의 한 가닥에 있는 상당한 크기의 퓨린 또는 피리미딘을 요구하는데, 생성된 삼중 나선의 세 개 연합된 가닥을 가로질러 TAT 및 CGC^+ 삼중체가 있다. 피리미딘-퓨린 분자는 이 가닥에 나란한 방향으로 이중 나선의 한 개 가닥의 퓨린이 풍부한 부분에 상보적인 염기를 제공한다. 또한, G 잔기를 포함하는 것과 같은 퓨린이 풍부한 핵산 분자를 선택한다. 이들 분자는 GC 쌍이 많은 DNA 이중나선과 삼중 나선을 형성하는데, 퓨린 잔기의 대부분은 표적이 되는 이중나선의 단일 가닥에 위치하여, 삼중나선에 세 개 가닥을 가로질러 GGC 삼중체가 형성된다.

또는 소위 "switchback" 핵산 분자를 만들어 삼중 나선 형성을 표적으로 하는 서열을 증가시킨다. 스위치백 분자는 5'-3' 또는 3'-5'로 번갈아 가면서 합성하여, 이중나선의 제 1 가닥와 염기 쌍을 이루어, 이중 가닥의 한 가닥에 퓨린 또는 피리미딘이 상당양으로 존재할 필요가 없게 된다.

여기에서 설명하는 안티센스, 리보자임 또는 삼중 나선 분자를 이용하여 돌연변이 유전자 발현을 저해하는 경우에, 정상적인 표적 유전자 대립형질에 의해 생성되는 mRNA의 전사(삼중나선) 또는 해독(안티센스, 리보자임)을 효과적으로 감소시키거나 저해하는데, 이때 존재하는 정상 표적 유전자 생성물의 농도는 정상 표현형의 경우에 필요한 것보다 낮다. 이와 같은 경우에, 실제 정상 수준의 표적 유전자 활성이 유지되도록 하기 위해, 여기에서 설명하는 유전자 치료 방법을 통하여, 정상적인 표적 유전자 활성을 나타내는 표적 유전자 폴리펩티드를 인코드하고 발현시키는 핵산 분자를 세포에 도입시키는데, 안티센스, 리보자임 또는 삼중나선 치료를 이용하는 경우에 민감성이 있는 서열은 포함되지 않는다. 또는, 표적 유전자가 세포외 단백질을 인코드하는 경우에, 요구되는 표적 유전자 활성을 유지하기 위해 정상적인 표적 유전자 단백질을 공동 투여하는 것이 바람직하다.

DNA 및 RNA 분자의 합성을 위해, 당분야에 공지된 방법으로 항-센스 RNA, DNA, 리보자임 및 삼중 나선 분자를 준비할 수 있다. 여기에는 고형상 포스포라미데이트 화학적 합성과 같은 당분야에 공지된 올리고데옥시리보뉴클레오티드 및 올리고리보뉴클레오티드를 화학적으로 합성하는 기술이 포함된다. 또는, 안티센스 RNA 분자를 인코드하는 in vitro 및 in vivo DNA 서열 전사에 의해 RNA 분자를 만든다. 이와 같은 DNA 서열은 T7 또는 SP6 폴리메라제 프로모터와 같은 적절한 RNA 폴리메라제 프로모터에 결합하는 다양한 벡터에 결합시킨다. 또는, 이용되는 프로모터에 따라 달라지는 유도성 또는 구조적으로 안티센스 RNA를 합성하는 안티센스 cDNA를 세포주로 안정하게 도입한다.

세포내 안정성 및 반감기를 증가시키는 수단으로 DNA 분자에 다양한 공지 방법으로 변형시키는 것을 도입한다. 가능한 변형 방법에는 분자의 5' 또는 3' 말단에 리보 또는 데옥시-뉴클레오티드의 인접 서열을 첨가하거나 또는 포스포로티오에이트를 이용하거나 또는 올리고데옥시리보뉴클레오티드 기본구조내에 포스포디에스테라제 결합대신에 2' O-메틸을 이용하는 것등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다.

5.6. 제약학적 조성물 및 투여 방법

본 발명은 중재를 목적으로 ISDR를 포함하는 단백질을 이용하여 바이러스 감염을 치료하기 위한 제약학적 조성물 및 치료법에 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 확인된 신규한 항-바이러스 물질을 이용하는 것을 포함한다. 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 확인된 신규한 항바이러스성 물질은 바이러스 감염을 치료하기 위한 다른 공지의 항바이러스 물질과 복합하여 이용할 수 있다.

5.6.1. NS5A 저해물질과 복합하여 이용될 수 있는 항바이러스성 물질

본 발명에 따르면, 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 확인된 신규한 항바이러스 물질을 항바이러스 효과를 강화시키기 위해 다른 치료제와 복합하여 이용한다. 적절하게는, NS5A 저해물질은 또 다른 항바이러스 물질과 복합하여 이용한다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, PKR의 NS5A 저해를 무시할 수 있는 수준으로 IFN 발현을 유도하는 물질을 또 다른 항바이러스 물질과 복합하여 이용할 수 있다. NS5A 저해물질과 함께 이용되는 추가 항바이러스성 물질에는 바이러스 복제에 관련된 상이한 표적 분자에 기능을 하는 물질, 예를 들면, 선호적으로 해독하는 것에 대한 저해물질; 바이러스 전달에 관련된 상이한 표적 분자에 작용하는 물질; 동일한 분자의 다른 위치에 작용하는 물질; 바이러스 저항이 일어나는 것을 저해하거나 감소시키는 물질등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다. 당업자는 상기 활성을 나타내는 다양한 항-바이러스 치료법을 알고 있다.

본 발명의 한 구체예에서, 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 확인된 신규한 항바이러스 물질은 IFN 치료와 복합하여 이용한다. 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 확인된 물질은 IFN 발현을 유도하는 내생 또는 외생 물질과 복합하여 이용할 수 있다. 또 다른 구체예에서, NS5A 저해물질은 선호하는 해독 저해제와 복합하여 이용하여, 바이러스 생명 과정에서 요구되는 두 개 다른 분자를 표적으로 한다.

상기에서 설명하는 항바이러스 치료와 복합하여 가능성이 있는 NS5A 저해물질의 치료 효과를 평가하기 위해, 당분야에 공지된 방법에 따라 항바이러스 활성에 대해 이들 복합물을 테스트한다.

본 발명의 화합물은 사람 환자에 단독으로 또는 HCV-감염과 관련된 다양한 질병을 치료 또는 완화시키는 약량에서 적절한 담체 또는 부형제와 혼합된 제약학적 조성물로 투여될 수 있다. 치료요법적으로 효과적인 약량은 HCV 감염을 저해하는데 충분한 화합물의 양을 말한다. 치료요법적으로 효과적인 약량을 단독으로 또는 HCV 감염 또는 연합된 질환을 치료하기 위한 다른 치료와 복합하는 부속 요법으로 투여할 수 있다. 본 출원의 화합물의 제조 기술 및 투여 기술은 "Remington's Pharmaceutical Sciences" Mack Publishing Co., Easton, PA, latest addition을 참고로 한다.

5.6.2. 투여 경로

적절한 투여 경로에는 구강, 직장, 경점막 또는 내장 투여; 근육내, 피하내, 골수내 주사등을 포함하는

장관외 수송 및 포막내, 직접 심실내에, 정맥내에, 복막내에, 비강내, 또는 안구내 주사 및 선택적으로 데포우 또는 지연 방출 조성물을 이용할 수 있다.

또한, 간을 표적으로 하는 리포좀과 같은 표적화된 약물 수송 시스템을 이용하여 본 발명의 물질을 투여할 수 있다. 리포좀은 간 세포를 표적으로 하여 간 세포에 의해 선택적으로으로 취해진다.

본 발명의 제약학적 조성물은 공지된 방법으로 제조되는데, 예를 들면, 통상적인 혼합, 용해, 당의정 제조, 부양, 에멸젼화, 포집화, 냉동건조 과정등이 이용된다.

본 발명에 이용되는 제약학적 조성물은 제약학적으로 이용되는 조제물로 활성 화합물을 처리할 수 있는 부형제 및 보조제로 구성된 한 가지 이상의 생리학적으로 수용 가능한 담체를 이용하여 통상적인 방식으로 제조한다. 적절한 조제 방법은 선택된 투여 경로에 따라 달라진다.

주사용으로는, 본 발명의 물질은 Hank 용액, Ringer 용액, 또는 생리학적 염 완충액과 같은 생리학적으로 적합한 완충액등의 수용액에서 조제한다. 경점막 투여를 하는 경우에, 침투해야할 장벽을 적절하게 투과할 수 있는 침투제를 조제물에 이용한다. 이와 같은 침투제는 당분야에 잘 알려져 있다.

경구 투여를 위해서는, 화합물은 당분야에 잘 공지된 제약학적 수용 가능한 담체와 활설 화합물을 복합시켜 제조한다.

이와 같은 담체는 환자에게 경구 투여할 경우에 본 발명의 화합물을 정제, 알약, 당의정, 캡슐, 액체, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁액등의 형태로 제조되도록 한다. 경구로 투여할 경우에 제약학적 조제물은 고형 부형제로 만들 수 있는데, 선택적으로는 생성된 혼합물을 연마하고, 적절한 보조제를 첨가한 후에 과립 혼합물을 처리하여, 정제 또는 당의정으로 만들 수 있다. 특히 적절한 부형제는 락토즈, 슈크로즈, 만니톨, 솔비톨과 같은 당과 같은 충진제; 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 트라가탄검, 메틸 셀룰로오즈, 하이드록시프로필메틸-셀룰로오즈, 카르복시메틸셀룰로오즈과 같은 셀룰로오즈, 폴리비닐피롤리돈(PVP)등이 포함된다.

화합물은 환약 주사 또는 연속적인 주입등의 방법으로 주사에 의해 장관외로 투여할 수 있도록 조제할 수 있다. 주사용 조제물은 단위 약형으로 제공되는데, 보존제를 첨가된 앰플 또는 다중 약물 형태가 된다. 조성물은 오일 또는 수용성 운반체에 현탁액, 용액 또는 에멸젼의 형태로 제공될 수 있고, 현탁, 안정화제 또는 분산제와 같은 조제 물질을 포함할 수 있다.

장관외 투여용 제약학적 조성물에는 물에 용해되는 형태의 활성 화합물의 수용액이 포함된다. 또한, 활성 화합물의 현탁액은 적절한 오일 주사용 현탁액으로 준비할 수 있다. 적절한 친지성 용매 또는 운반체에는 참깨 오일과 같은 지방 오일 또는 에틸 올레이트 또는 트리글리세리드와 같은 합성 지방산 에스테르 또는 트리글리세리드 또는 리포좀이 포함된다. 수용성 현탁액은 카르복시메틸 셀룰로오즈 나트륨, 소르비톨, 덱스트란과 같은 현탁액의 점성도를 증가시키는 물질이 포함된다. 선택적으로, 현탁액에는 고농도 용액을 준비할 수 있도록 화합물의 안정성을 증가시키는 적절한 안정화제 또는 물질을 포함한다.

또는, 활성 성분은 사용하기 전에 멸균된 발열물질이 없는 물과 같은 적절한 운반체로 재구성할 수 있는 분말이 될 수 있다.

화합물은 또한 통상적인 좌약 기초물질 가량 코코아 버터 또는 다른 글리세리드와 같은 좌약 또는 관장제와 같은 직장 조성물로 조제한다.

상기에서 설명하는 조제물에 추가하여, 화합물은 데포우 조성물로 조제할 수 있다. 이와 같은 장시간 작용할 수 있는 조제물은 이식(예를 들면, 피하 또는 근육내에) 또는 근육 주사를 통하여 투여한다. 따라서, 화합물은 적절한 고분자 또는 수소성 물질(예를 들면, 수용가능한 오일에 에멸젼 형태) 또는 이온 교환 수지 또는 용해성이 적은 염과 같은 잘 용해되지 않는 가용성 유도체와 함께 조제될 수 있다.

소수성 약물에 대한 운반체 또는 담체로는 리포좀 및 에멸젼이 잘 공지되어 있다. 디메틸설폭시드와 같은 특정 유기 용매를 이용할 수도 있지만, 상당한 독성이 있다. 또한, 치료제를 포함하는 고체 소수성 고분자 반투성 매트릭스와 같은 지연 방출 시스템을 이용하여 화합물을 운반할 수 있다. 다양한 지연 방출 물질이 정립되어 있고, 당분야에 잘 공지되어 있다. 이들의 화학적 특징에 따라 지연 방출 캡슐은 몇주 내지 최고 100일이상 동안 화합물을 방출한다. 치료제의 화학적인 특징 및 생물학적인 안정성에 따라 추가로 단백질 안정화제를 이용할 수 있다.

제약학적 조성물은 적절한 고체 또는 겔 상 담체 또는 부형제로 구성된다. 이와 같은 담체 또는 부형제로는 탄산칼슘, 인산 칼슘, 다양한 당, 전분, 셀룰로오즈 유도체, 젤라틴, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 고분자등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다.

NS5A 및 IFN-유도된 PKR사이에 상호작용의 저해물질로 확인된 본 발명의 대부분 화합물은 제약학적으로 수용가능한 짝이온과 함께 염으로 제공될 수 있다. 제약학적으로 수용 가능한 염은 염소산, 황산, 아세트산, 라틱산, 타르타르산, 말린산, 숙신산등의 많은 산; 또는 염기등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는 형태가 된다. 염은 이에 상응하는 자유 염기보다는 수용액 또는 다른 용액에서 더 안정한 경향이 있다. 제약학적 수용 가능한 염, 담체 또는 부형제는 당분야에 잘 공지되어 있고, 이는 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A.R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990에서도 참고할 수 있다. 이와 같은 염에는 나트륨, 칼륨, 리듐, 칼슘, 마그네슘, 철, 아연, 염화수소, 브로모하수소, 요도화수소, 아세테이트, 시트레이트, 타르타레이트, 말레이트등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다.

5.6.4. 효과적인 약량

본 발명에서 이용할 수 있는 적절한 제약학적 조성물에는 원하는 목적을 이룰 수 있는 효과량의 활성 성분이 포함된 조성물로 구성된다. 좀더 구체적으로는, 치료요법적으로 효과적인 양이란 치료할 개체에서 나타나는 증상을 완화시키거나 진행되는 것을 방지하는데 효과적인 양을 의미한다. 효과적인 약량을 결정하는 방법은 당업자의 능력으로써, 여기에서 제공하는 설명으로도 실행할 수 있다.

본 발명에 이용되는 임의 화합물의 경우에, 치료요법적으로 효과적인 약량은 세포 배양 검사로부터 우선 평가할 수 있다. 이와 같은 정보를 이용하여, 사람에서 유용한 약량을 좀더 정확하게 결정할 수 있다.

치료요법적으로 효과적인 약량은 환자에서 감염 강도를 감소시키거나 증상을 완화시키거나 또는 생존을 연장시킬 수 있는 화합물의 양을 말한다. 이와 같은 화합물의 독성 및 치료 효과는 세포 배양물 또는 실험 동물에서 표준 제약학적, 약리학적 독소 과정으로 결정하는데, 예를 들면, LD_{50}(집단의 50%를 죽이는데 소요되는 양) 또는 ED_{50}(집단의 50%를 치료하는데 효과적인 약량)을 결정한다. 독성 및 치료 효과사이에 약량 비율은 치료 지수가 되고, 이는 LD_{50} 및 ED_{50}의 비율로 나타낸다. 치료 지수가 클수록 적절한 화합물이 되는 것이다. 세포 배양 검사 또는 동물 연구에서 수득된 데이터를 이용하여 사람에서 이용할 수 있는 약량 범위를 결정한다. 각 화합물의 약량 범위는 독성이 거의 없는 또는 없는 ED_{50}을 포함하는 순환 농도 범위내에 있는 것이 바람직하다. 약량은 이용되는 약형, 투여 경로에 따라 이 범위내에서 다양하게 된다. 정확한 조제, 투여 경로 및 약량은 환자의 상태에 따라 개별 의사가 선택한다(Fingl et al., 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p. 1).

약량 및 투여 간격은 개별적으로 조절하여, 원하는 조절 효과 또는 최소 효과적인 농도(MEC)를 유지하는데 충분한 혈장에서 활성 물질을 제공한다. MEC는 각 화합물마다 다르지만, in vitro 자료를 이용하여 측정할 수 있는데, 예를 들면, 여기에서 설명하는 검사를 이용하여 HCV 감염의 50-90%를 저해할 수 있는데 필요한 농도가 된다. MEC를 얻는데 필수적인 약량은 개인 특징에 따라 그리고 투여 경로에 따라 달라진다. 그러나, HPLC 검사, 바이오검사 또는 면역검사를 이용하여 혈장 농도를 결정한다.

MEC 값을 이용하여 투약 간격을 결정한다. 화합물의 혈정 수준을 시간의 10-90%동안에 MEC이상으로 유지하도록, 적절하게는 30-90%, 가장 적절하게는 50-90%동안에 유지하는 섭생을 이용하여 투여한다.

국소 투여 또는 선택적인 수용을 하는 경우에, 약물의 효과적인 국소 농도는 혈장 농도와는 무관하다.

투여되는 조성물의 양은 치료를 받는 개체에 따라 달라지는데, 개체의 체중, 상태의 심각성, 투여 방식 및 의사의 판단에 따라 달라진다.

면역화 과정에서, 이용되는 미유노겐의 양 및 면역화 과정은 당업자가 결정하고, 개체의 면역 반응 및 항체 역가를 참고로 하여 투여한다.

5.6.5. 포장

원하는 경우에 조성물은 활성 성분을 포함하는 한가지 이상의 단위 약형을 포함하는 팩 또는 분재 장치로 제공된다. 팩은 예를 들면, 금속 또는 플라스틱 호일 즉, 발포 팩이 될 수도 있다. 투여 지시에 따라 팩 또는 분배장치를 수반할 수 있다. 필적가능한 제약학적 담체에 조제된 본 발명의 화합물로 구성된 조성물은 적절한 용기에 넣고, 특정 질환의 치료용으로 라벨을 붙인다.

실시예

6. 실시예 in vitro에서 NS5A 및 PKR의 상호작용

다음은 in vitro에서 인터페론-유도된 PKR와 HCV 단백질 NS5A의 연합을 설명하고, HCV NS5A가 카이나제와 물리적인 상호작용을 통하여 PKR의 활성을 직접적으로 억제한다는 가설을 테스트하였다.

6.1. 재료 및 방법

플라스미드 작제; 야생형 HCV IaNS5A 구조체를 만들기 위해, PCR로, 프라이머 A, 5'-GGAATTCGAGCTCGCCCG 및 프라이머 B, 5-'GCTCTAGAAGCACACGACATCTTC(EcoRI 및 Xbal 부위는 밑줄)를 이용하여 pSPns%(HCV-1a)로부터 완전한 NS5A 코딩부분을 증폭시켰다. 생성된 물질은 pCR2.1(Invitrogen)에 직접 클론하여, 플라스미드 pNS5A/CR2.1를 만든다. pNS5A/CR2.1으로부터 NS5A 코딩 부분은 EcoRI 단편으로 제거하여, pBD(Strategene)에 삽입하여, pBD-NS5A를 만들거나 또는 EcoRI-Xbal 단편으로 제거하여 pcDNA3.1/His 및 pYES2(Invitrogen)에 삽입시켜, 각각 pcDNA3.1/His-NS5A 및 pYES2-NS5A를 만든다. NS5A의 ISDR 결손 돌연변이을 만들기 위해, 각 N- 말단 및 C-말단 코딩 단편(각각은 ISDR이 결손됨)을 만든다. 아미노산 1-236을 인코드하는 N-말단 부분은 PCR에 의해 프라이머 A 및 프라이머 C, 5'-CCACTCGAGCGGACAGTTGGCTGG(Xhol 부위는 밑줄부분)를 이용하여 증폭시킨다. 아미노산 278-447을 인코드하는 C-말단 부분은 프라이머 B 및 프라이머 D, 5'-CCGCTCGAGTGGTGATTCTGGTCTC(Xhol 부위는 밑중 부분)을 이용하여 증폭시켰다. 생성된 PRC 생성물은 pCR2.1에 직접 클론시켜, 각각 pN/CR2.1 및 pC/CR2.1을 만든다. NS5A의 N-말단 부분은 pN/CR2.1에서 제거하여, pcDNA-3,1/His에 삽입시켜, pcDNA3.1/His-NS5A 1-236를 만든다. C-말단 코딩 단편을 전체 ISDR이 결손된 아미노산 278-447의 프레임에 융합된pcDNA3.1/His-NS5A 1-236의 Xho1 및 Xba1 부위에 삽입시켜, ISDR 결손 구조체를 만든다. pcDNA3.1/His-△ISDR에서 삽입체는 2μ이스트 발현 벡터인 pBD 및 pYES2에 서브클론시켜, 각각 pBD-△ISDR 및 pYES2-△ISDR를 만든다. HCV-1b에서 NS5A 코딩 부분을 얻기 위해, IFN 치료에 반응을 보이지 않은 환자의 유전자형 1b로부터 동의하에 구한 혈청 100㎕에서 바이러스 RN를 추출한다(Chomczynski and Sacchi, 1987, Anal. Biochem. 162:156-159). IFN에 대한 반응은 이전에 설명한 것과 같이, RT-PCR 및 bDNA 검사(Gretch et al., 1993, J. Clin. Micro. 31:289-291)에 의해 결정한다. 바이러스의 5' 해독안된 부분의 RFLP 및 유전자형-특이적인 PCR 분석 및 코어 단백질을 인코드하는 서열을 복합시켜, HCV 유전자형을 확인한다(Davidson et al., 1995, J. Gen. Virol. 76:1197-1204; Okamoto et al., 1992, J. Gen. Virol. 73:673-679). 프라임 올리고뉴클레오티드 5'GTGGTGACGCAGCAGAGAGT(HCV-J의 뉴클레오티드 7681-7700에 상응(Bukh et al., 1995, Semin. Liver Dis. 15:41-63)를 이용하여 역전사후에, 상류 프라이머 5'CAGCCTCACCATCACTCAGC (HCV-J의 nt 6256-6275에 상응)를 첨가하여 제1 라운드 PCR을 하여 바이러스성 cDNA를 합성하였다. NS5A를 직접 클로닝하기 위해, 제 1 라운드 PCR 생성물은 NS5A-특이적인 세트 올리고뉴클레오티드 프라이머 쌍인 5'CCTTCCATGGGCTCCGGCTCGTGGCTAAAG 및 5'ATCGGATCCTTAGGACATTGAGCAGCAGACGA (Ncol 및 BamH1 부위는 각각 밑줄함)를 이용하여, 추가 증폭시켰다. 제한효소 처리후에, 정제된 PCR 생성물은 pACT2(Clontech)에 상응하는 부분에 클론시켜, HCV-1b에 상응하

는 AD-NS5A 융합 단백질을 인코드하는 pAD-NS5A를 제공한다. HCV-1b의 ISDR 아미노산 서열 및 IFN 감응성사이에 관계는 아직 정확하게 결정되지는 않았지만, NS5A의 부분(aa 237-276)은 이전에 확인된 원형 IFN-저항성 ISDR 서열 및 HCV-1b NS5A(도 1a)과 아미노산 상동성이 상당히 크다(Enomoto et al., 1996, N. Engl. J. Med. 334:77-81; Enomoto et al., 1995, J. Clin. Invest. 96:224-230). PKR 플라스미드 PBD-PKR K296R, pAD-PKR 아미노산 구조체, K296R, 1-242, 244-551, 244-366, 367-551, pAD-P58^{IPK} wt의 구조에 대해서는 이미 설명된 바 있다(Gale, Jr. et al., 1996, Mol. Cell. Biol. 16:4172-4181). pET11A-PKR M7에서 1.6 kb NdeI/BamHI 단편을 회수하고 (Barber et al., 1995, Mol. Cell. Biol. 15:3188-3146), 이를 pGBT10(Gale, Jr. et al., 1996, Mol. Cell. Biol. 16:4172-4181)의 상응하는 부분에 클로닝하여, pBD-PKR 99-551를 작제한다. pEMBLYex4-K3L는 pEMBLYex4에 삽입된 백시니아 바이러스 K3L 유전자 전체를 포함하고, 이는 별도로 설명한다.

HCV-1a NS5 클론 pSPns5에서 BamHI 단편을 플라스미드 pGEX2T(Smith and Johnson, 1988, Gene 67:31-40)로 유입시켜, pGST-NS5A를 만들어서 GST-NS5A를 생산한다. 이 구조체는 글루타티온-s-전이효소 단백질과 같은 프레임에 용합된 NS5A 아미노산 1-427을 인코드한다. 이 연구에 이용된 모든 구조체의 뉴클레오티드 서열은 Applied Biosystems automated sequencer을 이용하여 이중 가닥 DNA 서열 분석으로 확인하였다.

in vitro에서 단백질 상호작용의 분석; pGEX2T 또는 pGST-NS5A를 가지고 있는 대장균(E coli)을 액체 배지에서 생장시키고, 배양 배지에 이소프로필 티오갈락토피라노시드를 첨가하여, GST 또는 GST-NS5A 발현을 유도한다. 박테리아는 수득하고, 전술한 것과 같이(Gale, Jr. et al., 1996, Mol. Cell. Biol. 16:4172-4181), 결합 분석을 위해 추출물을 준비한다. 결합 분석을 위해서는, GSTr 또는 GST-NS5A의 발현은 GST-특이적인 항혈청 또는 슈퍼옥시드 디스뮤타제-NS5 융합 단백질(anti-NS5; Chiron Corporation)에 특이적인 항혈청을 이용하여 면역블랏 분석으로 재조합 추출물에서 확인한다. in vitro 결합 분석을 위해 양성 재조합 추출물을 이용한다. Wt 사람 PKR 및 PKR 결손 돌연변이는 pcDNAIneo의 T7 프로모터로부터 in vitro에서 전사시키고, 이미 설명한 것과 같이(Katze et al., 1991, Mol. Cell. Biol. 11:5497-5505), [^{35}S]-메티오닌 존재하에 해독한다. in vitro 결합 분석을 위해, 각 해독 반응물에서 트리클로로아세트산 침전가능한 1 ×10^{5}를 대장균(E. coli; GST 또는 GST-NS5A를 포함) 추출물에 첨가하고, Gale, Jr. et al., 1996, Mol. Cell. Biol. 16:4172-4181에서 설명하는 것과 같이 처리한다. GST 또는 GST-NS5A에 결합되는 라벨된 단백질은 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 건조된 젤의 자가방사 사진으로 볼 수 있다.

PKR 기능의 in vitro 검사; PKR in vitro 카이나제 검사를 위해, 글루타티온-아가로즈 친화력 크로마토그래피를 이용하여, 대장균(E. coli) 추출물에서 GSTNS5A를 정제하였다. 고유 PKR은 IFN-처리된 사람 293 세포로부터(Galabru and Hovanessian, 1987, J. Biol. Chem. 262:15538-15544) 친화력을 이용하여 정제하였다. 모든 정제된 단백질의 농도는 표준으로 BSA를 이용하여 정량적으로 SDS-PAGE에 의해 평가한다. In vitro 카이나제 검사는 기본적으로 Tang et al. 1996, J. Biol. Chem.,에서 설명하는 것에 따라 실시하나, 히스톤 기질 및 [^{32}P]-$^{\gamma}$ATP을 첨가하기 전에 GST 또는 GST-NS5A 농도를 증가시키면서, PKR을 침전시키는 것이 다르다. 카이나제 반응 생성물은 SDS-PAGE를 이용하여 분리하고, 건조된 겔은 포스포릴화된 기질을 보기 위해 자가방사사진을 찍는다. 히스톤의 포스포릴화와 in vitro에서 PKR에 의해 정제된 eIF-2α사이에 정확한 상관관계가 있다는 것이 이미 설명된 바 있다(Katze et al. 1991, Mol. Cell. Biol. 11:5497-5505).

6.2. 결과

HCV-1a(도1)에서 수득한 NS5A를 이용하여 PKR와 직접적으로 상호작용하는 NS5A의 능력을 테스트하였다. 대장균(E. coli-(GST-NS5A))에서 글루타티온-S-전이효소(GST) 융합 단백질로 발현된 NS5A는 GST-pull down 검사에 따르면, in vitro에서 해독된 전체 길이 PKR와 특이적으로 상호작용하였다. 도 2에서 볼 수 있는 것과 같이, PKR aa 244-551은 GST-NS5A와 복합체를 형성하는데 필요 충분한 것이다. 따라서, 재조합 NS5A는 PKR과 in vitro에서 특이적으로 복합체를 형성하는데, 이는 단백질 카이나제 촉매 도메인-포함하는 PKR C-말단내에 있다.

7. 실시예; in vivo에서 PKR 카이나제 촉매 도메인과 NS5A의 상호작용

다음 실험은 in vivo에서 NS5A 및 PKR 사이에 상호작용을 결정하기 위해 실행하였다.

7.1. 재료 및 방법

in vivo에서 단백질 상호작용 분석; 단백질 상호작용을 분석하기 위해, 이중-하이브리드 검사에서, 사카로미세스 세르비시에(Saccharomyces cerevisiae) 균주 Hf7c(MATa ura 3-52 his 3-200 lys2-801 ade2-101 trp 1-901 lea2-3, 112 gal4-542 gal80-538 LYS2::GAL1-HIS3 URA3::(GAL4 17-mers)$_3$-cycl-lacZ)를 이용하였다(Fields and Song, 1989, Nature 340:245-246). 하기에서 설명하는 것과 같이, 이중-하이브리드 검사 및 이스트 검사를 위해, 지적한 발현 구조체를 리듐 아세테이트 방법으로 트랜스펙션시킨다. 이중-하이브리드 분석을 위해, 제조업자가 설명하는 것과 같이 항-AD 또는 항-BD 단클론 항체(Clontech)를 이용하여 면역블랏 분석으로 트랜스펙트된 이스트 클론에서 모든 AD- 및 BD-융합 단백질의 발현을 우선 확인한다. 이스트 균주 Hf7c에서, 히스티딘 합성은 2-하이브리드 단백질의 상호작용에 따라 달라진다. 따라서, 2-하이브리드 단백질 존재하에, 상호작용 균주는 히스티딘 결핍 배지에서 생장된다. 최근에 설명된 바와 같이(Gale, Jr. et al., 1996 supra), HIS 리포터 단백질의 합성을 이용하여, 2-하이브리드 단백질 상호작용을 검사한다. 초기 트랜스펙트된 것은 아미노산 Trp 및 Leu(+His 배지)가 부족한 SD 배지에서 선택된다. 트랜스펙트된 것은 연속하여, 아미노산 His, Trp, Leu(-His 배지)이 부족한 SD 배지에 도말하고, 3-6일간 생장시켜, 잔류 히스티딘 저장분을 사용하도록 한다. 콜로니는 다시 -His 배지에 도말하고, 3-7일 후에 생장을 기록한다. 액체 검사 및 형광발생 기질인 4-메틸룸벨리페릴-$^{\beta}$-D-갈락토시다제(MUG)(Cao and Geballe, 1994, Virology 205:151-160)를 이용하여, LacZ 발현을 측정함으로써, 2-하이브

리드 이스트 클론에 리포터 유전자 발현이 유도되었다는 것을 확인할 수 있다.

in vivo에서 NS5A 및 PKR의 기능을 결정하는데 이스트 생장 억제 검사; in vivo에서 NS5A 및 PKR 기능을 결정하기 위해, 사카로미세스 세르비시에(Saccharomyces cerevisiae) 균주 RY1-1(MATa ura3-52 leu2-3 leu2-112 gcn2△ trp1-△63 LEU2::(GAL-CYC1-PKR)$_2$를 이용하는데, 이는 LEU2 위치에 결합된 사람 PKR 2개 복사체를 가지는 것으로 갈락토즈 유도성 GAL1-CYC1 프로모터 조절하에 둔다(Romano et al., 1995, Mol. Cell. Biol. 15:365-378). 유도성 배지에서 생장시키는 경우에, 이 균주는 이스트의 eIF-2[illegible]의 PKR-중개된 포스포릴화에 의해 서서히 생장하는 표현형을 나타낸다. 항-PKR mab(Laurent et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4341-4345) 또는 재조합 NS5 단백질([illegible]-NS5)에 대해 생성된 항혈청을 이용하여 면역블랏 분석으로 단백질 발현을 확인할 수 있다. pYes 플라스미드에서 NS5A 및 △ISDR 구조체가 효과적으로 발현되었다. 또한, 두 가지 트랜스펙트된 균주에서 동일한 수준으로 효과적으로 발현된 PKR 수준에는 NS5A 및 △ISDR의 공동 발현이 효과를 가지지 못하는 것으로 밝혀졌다. RY1-1 트랜스펙턴트의 생장을 평가하기 위해, 이스트 콜로니를 우라실 결손 SD 배지 및 SGAL 배지(Romano et al. (Romano et al., 1995 supra))에 도말하였다. 콜로니를 도말한 후 3-7일 경에 생장을 측정하였다.

7.2. 결과

이 결과를 확인하고 연장시키기 위해, NS5A-PKR 상호작용 연구는 이스트 2-하이브리드 시스템을 이용하여 실행하는데, 2-하이브리드 단백질 상호작용의 양성으로 히스티딘 결손 배지에서 생장하는 것을 기록하였다. 비교를 위해, 기존에 설명된 P58^{IPK}-PKR 상호작용 평가도 포함된다(Gale, Jr. et al., 1996 supra). GAL4 활성화 도메인(AD-NS5A)에 융합된 HCV-1b 균주의 IFN 저항성 분리체에서 얻은 NS5A 전체 길이는 특히 비활성인 전체 길이 PKR 돌연변이, PKR K296R 및 절두형 돌연변이인 PKR 98-551에 특이적으로 상호작용하는데, 이들 각각은 GAL4 DNA 결합 도메인(BD)(도 2)에 융합되어 있다. BD-PKR 98-551은 제 1 dsRNA 결합 도메인이 부족하고, 이는 결합 dsRNA가 결손되었다(Barber et al., 1995, Mol. Cell. Biol. 15:3138-3146). 따라서, 세포 PKR 저해물질인 P58^{IPK}와 유사하게, HCV-1b NS5A는 PKR와 물리적으로 상호작용할 수 있다. 또한, 이 결과는 NS5A-PKR 상호작용이 dsRNA 중개하는 과정이 아니라는 것을 알 수 있다.

2-하이브리드 검사를 이용하여, in vivo에서 AD-PKR와 상호작용하는 HCV-1A 분리체의 BD-NS5A의 능력. 도 4에서 볼 수 있는 것과 같이, HCV 1a의 BD-NS5A는 -His 배지에서 생장을 결정하였을 때, 이스트 트랜스펙턴트에서 AD-PKR K296R와 특이적으로 상호작용하였다. 따라서, 독립적인 HCV-1a 및 HCV-1b 균주로부터 NS5A는 in vivo에서 PKR와 물리적으로 상호작용할 수 있다. PKR의 NS5A-상호작용 부분을 나타내기 위해, HCV 1a BD-NS5A 구조를 가지는 이스트에 일련의 AD-PKR 돌연변이체를 트랜스펙트시킨 것을 이용하였다. BD-NS5A는 PKR 촉매 도메인(PKR의 아미노산 244-366)에 특이적으로 상호작용하는데, AD-구조체 PKR 244-551와 PKR 244-366는 모두 -His 배지에서 생장을 중개하였다(도 4). PKR의 NS5A-상호작용 부분은 C-말단 184aa 및 N-말단 242aa에 독점적인데, 그 이유는 AD-PKR 367-551 및 AD-PKR 1-242를 가지는 이스트 공트랜스펙턴트는 -His 배지에서 생장하지 못하였다. 이 결과에서 HCV NS5A는 PKR 단백질 카이나제 촉매 도메인내에 구조와 상호작용한다는 것을 말하는 것이다. PKR의 NS5A 상호작용 부분(aa 244-366)에는 세포 PKR 저해물질인 P58^{IPK}(도 1B)(Gale, Jr. et al., 1996)와 상호작용하는 부분이 포함된다. 단백질 카이나제 촉매 도메인의 이 부분은 뉴클레오티드 결합 및 촉매에 공조적으로 기능을 한다(Hanks et al., 1988, Science 241:42-52; Bossemeyer, 1995, FEBS. Lett. 369:57-61; Taylor et al., 1993, Mol. Cell. Biol. 16:6295-6302).

8. 실시예; NS5A는 PKR 기능을 억제한다.

다음의 실시예는 NS5A-PKR 상호작용이 PKR 기능을 저해하게 하는 지를 결정하기 위해 실행하였다.

8.1. 재료 및 방법

in vitro에서 단백질 상호작용의 분석; pGEX2T 또는 pGST-NS5A를 가지고 있는 대장균(E coli)을 액체 배지에서 생장시키고, 배양 배지에 이소프로필 티오갈락토피라노시드를 첨가하여, GST 또는 GST-NS5A 발현을 유도한다. 박테리아는 수득하고, 전술한 것과 같이(Gale, Jr. et al., 1996, Mol. Cell. Biol. 16:4172-4181), 결합 분석을 위해 추출물을 준비한다. 결합 분석을 위해서는, GSTr 또는 GST-NS5A의 발현은 GST-특이적인 항혈청 또는 슈퍼옥시드 디스뮤타제-NS5 융합 단백질(anti-NS5; Chiron Corporation)에 특이적인 항혈청을 이용하여 면역블랏 분석으로 재조합 추출물에서 확인한다. in vitro 결합 분석을 위해 양성 재조합 추출물을 이용한다. Wt 사람 PKR 및 PKR 결손 돌연변이는 pcDNAIneo의 T7 프로모터로부터 in vitro에서 전사시키고, 이미 설명한 것과 같이(Katze et al., 1991, Mol. Cell. Biol. 11:5497-5505), [^{35}S]-메티오닌 존재하에 해독한다. in vitro 결합 분석을 위해, 각 해독 반응물에서 트리클로로아세트산 침전가능한 1 ×10^{5}를 대장균(E. coli; GST 또는 GST-NS5A를 포함) 추출물에 첨가하고, Gale, Jr. et al., 1996, Mol. Cell. Biol. 16:4172-4181에서 설명하는 것과 같이 처리한다. GST 또는 GST-NS5A에 결합되는 라벨된 단백질은 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 건조된 젤의 자가방사 사진으로 볼 수 있다.

PKR 기능의 in vitro 검사; PKR in vitro 카이나제 검사를 위해, 글루타티온-아가로즈 친화력 크로마토그래피를 이용하여, 대장균(E. coli) 추출물에서 GSTNS5A를 정제하였다. 고유 PKR은 IFN-처리된 사람 293 세포로부터(Galabru and Hovanessian, 1987, J. Biol. Chem. 262:15538-15544) 친화력을 이용하여 정제하였다. 모든 정제된 단백질의 농도는 표준으로 BSA를 이용하여 정량적으로 SDS-PAGE에 의해 평가한다. In vitro 카이나제 검사는 기본적으로 Tang et al. 1996, J. Biol. Chem.,에서 설명하는 것에 따라 실시하나, 히스톤 기질 및 [^{32}P]-[illegible]ATP을 첨가하기 전에 GST 또는 GST-NS5A 농도를 증가시키면서, PKR을 침전시키는 것이 다르다. 카이나제 반응 생성물은 SDS-PAGE를 이용하여 분리하고, 건조된 겔은 포스포릴화된 기질을 보기 위해 자가방사사진을 찍는다. 히스톤의 포스포릴화와 in vitro에서 PKR에 의해 정제된 eIF-2α사이에 정확한 상관관계가 있다는 것이 이미 설명된 바 있다(Katze et al. 1991, Mol.

Cell. Biol. 11:5497-5505).

8.2. 결과

재조합 NS5A 존재하에 PKR 활성을 in vitro에서 분석하였다. HCV-1a에서 재조합 GST-NS5A를 정제된 NS5A PKR와 배양하면, PKR 포스포릴화반응과 외생 히스톤 기질의 포스포릴화를 특이적으로 저해한다(도 5). 0.2pmol NS5A와 같은 소량도 1.8pmol PKR을 저해하는데 효과가 있다. 현재까지, PKR의 상대적으로 작은 비율이 활성이어서 일어나는 결과인지 또는 NS5A가 낮은 수준에서 기능을 하는 지에 대해서는 결정되지 않았다. PKR 활성의 상실은 PKR 분해 또는 ATP의 NS5A-중개된 가수분해 때문은 아니다. 또한, 우리의 in vitro 검사에서 PKR 및 히스톤 포스포릴화를 저해하는 것은 GST-NS5A 중개된 포스포타제 활성때문인 것으로 보이나, 이는 가능성이 적은 것으로 보이는데, 그 이유는 NS5A가 포스포타제 기능을 나타내는 임의 구조적 특징을 가지고 있지 않기 때문이다. GST 동량의 몰 수준도 PKR 활성에는 영향을 주지 않는다(도 5, 라인 6-9). 따라서, 다른 바이러스-코트된 PKR 저해 단백질의 작용과 유사하게, NS5A-PKR 상호작용의 직접적인 영향으로 NS5A는 in vitro에서 PKR의 기능을 특이적으로 저해한다.

이스트에서 PKR의 발현으로 PKR 활성의 직접적인 평가를 위한 in vivo 기능상 검사를 제공한다(Romano et al., 1995, Mol. Cell. Biol. 15:365-378). 이의 eIF-2α포스포릴화 활성을 통하여, PKR는 이스트에서 발현되는 경우에 생장이 억제된다. 일시 우성 저해성 PKR 돌연변이 또는 바이러스-코트된 PKR 저해성 단백질 가령, HIV Tat 또는 백시니아 바이러스 K3L와 함께 PKR가 공동 발현되면, PKR 저해 및 eIF-2α 포스포릴화가 동시에 감소되기 때문에, PKR-중개된 느린 생장 표현형으로 전환된다(Romano et al., 1995; McMillan et al., 1995; M. Kobayashi, E. Locke, J. Silverman. T. Ung and T. Dever, manuscript submitted). PKR 기능에 NS5A 효과를 평가하기 위해, 우리는 Romano et al. (1995)이 개발한 이스트 균주 RY1-1에서 GAL1 갈락토즈-유도성 프로모터 조절하에 NS5A를 발현하였다. RY1-1는 GAL1-CYC1 갈락토즈 유도성 프로모터 제어하에 2개의 사람 PKR 결합된 복사체를 가지고 있으며, 갈락토즈 배지에서 생장하였을 때, PKR-중개된 생장-억제 표현형을 유지한다. 비교하기 위해, GAL1-CYC1 갈락토즈 유도성 프로모터 제어하에서, 잘 알려진 특징을 가지는 백시니아 바이러스 PKR 저해물질을 가지는 RY1-1을 나란히 분석하였다(M. Kobayashi, E. Locke, J. Silverman, T. Ung and T. Dever, manuscript submitted). RY1-1 트랜스펙턴트의 생장 성질을 평가하여 NS5A 기능 검사를 시작하였다. 모든 트랜스펙턴트는 비-유도성 덱스트로즈(SD) 배지에서 효과적인 생장을 유지하며(도 6, 좌측), NS5A 또는 K3L을 가지는 것들만 PKR 발현 조건하에서 생장을 유지할 수 있었다(도 6, 우측). 벡터 조절된 트랜스펙턴트는 PKR 발현 수준이 높은 것과 연관된 생장 억제 활성과 일관되는 상당히 느린 생장 표현형을 나타내었다(도 6)(Romano et al., 1995). 이와 같은 결과는 이스트에서 NS5A가 PKR-중개된 생장 억제를 충분히 역정시킬 수 있다는 것을 말하고, 이는 NS5A가 직접적으로 PKR 기능을 억제한다는 것을 말하는 것이다. PKR 기능이 NS5A 존재하에서 억제된다는 거을 확인하기 위해, 우리는 RY1-1 트랜스펙턴트에서 eIF-2α 포스포릴화 수준을 검사하였다. K3L와 유사하게, NS5A가 발현되면, 벡터만을 가지는 기준 트랜스펙턴트에서 관찰되는 것보다 eIF-2α가 포스포릴화되지 않는 수준이 약 11배 증가되었다(도 7). 이들 세포에서 대부분 eIF-2α는 과포스포릴화된 상태를 유지하나, 이는 전반적인 eIF-2α의 포스포릴화수준에서 상대적으로 작은 변화가 세포의 생장에 심각한 영향을 준다는 것을 설명하는 것이다. 이와 함께, 이와 같은 관찰로 PKR와 직접적인 상호작용을 통하여, NS5A는 in vivo에서 PKR의 기능을 억제하여, PKR 기질, eIF-2α의 포스포릴화 상태를 변화시키게 된다는 것을 말한다.

9. 실시예 ; PKR 기능을 NS5A가 억제하는 분자 기작

다음의 실험은 PKR을 NS5A가 조절하는데 있어서, NS5A-PKR 상호작용 기작 및 ISDR 돌연변이 영향을 결정하기 위해 실시하였다.

9.1. 재료 및 방법

플라스미드 pGBT10 및 pGAD425는 GAL4 DNA 결합 도메인(BD) 및 전사 활성화 도메인(AD)을 각각 인코드한다(Gale, Jr. et al., 1966 Mol. Cell. Biol. 16:4172 - 4181). pAD-PKR K296R, pAD-PKR 244-5515, pAD-PKR 244-296는 지적한 AD-PKR 융합 단백질 구조체를 인코드하고 이는 이미 설명된 바 있다(Gale, Jr. et al., 1996). 모든 pAD-NS5A 발현 구조체는 IFN-저항성 HCV-1b(NSSA 1b-wt)(Gale et al., 1997, Virology 230:217-227)의 임상적 분리체로부터 wt NS5A를 가지는 pAD-NS5A로부터 만들었다. 이스트 이중-하이브리드 단백질 상호작용 분석을 하기 위해, pAD-NS5A는 Nde1 및 BamHI 제한 효소로 절단하고, 전체 길이 NS5A(aa 1973-2419)를 인코드하는 1.4 kb 삽입체를 pGBT10의 이에 상응하는 부분에 클론하여 pBD-NS5A 1b-wt를 만든다. pBD-NS5A 1973-2361는 NS5A aa1973-2361의 BD-융합을 인코드하는데, 이는 pBD-NS5A 1b-wt의 Nde1/Sal 1 삽입체를 pGBT10에서 이에 상응하는 부분에 클로닝하여 만든다. pBC-NS5A 2120-2274는 NS5A aa 2120-2274의 BD-융합체를 인코드하는데, 이는 pBD-NS5A 1b-wt의 462bp EcoR1/BstY1 단편을 pGBT10의 EcoR1/BamHI 부분으로 결찰하여 작제한 것이다. pBD-NS5A 1973-2208, pBD-NS5A 2209-2274, pBD-NS5A 2180-2251는 각각 NS5A aa 1973-2208, 2209-2274, 2180-2251의 BD-융합체를 인코드하는 것으로, 표 3(상단)에 나타낸 제한효소부위가 연결된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용하여 이에 상응하는 pBD-NS5A 1b-wt 코딩 부분을 PCR 증폭시켜 만든 것이다. PCR 생성물은 플라스미드 제조업자가 설명하는 것과 같이 직접 pCR2.1(Invitrogen)에 클론하였다. NS5A aa 1973-2208 및 2209-2274를 인코드하는 PCR 생성물은 제한효소 Ndel/Sall 또는 EcoRI/Sall로 복합 절단하여, pCR2.1로부터 방출된다. 생성된 십입체 DNA는 pGBT10 및 pGBT9(Clontech)의 이에 상응하는 부위에 결찰하여, pBD-NS5A 1973-2208 및 pBD2209-2274를 만든다. NS5A aa 2180-2251를 인코드하는 PCR 생성물은 Nco/BamHI로 절단하여 pCR2.1로부터 방출시키고, 생성된 213bp 단편은 pAS2-1(Clontech)에 동일 부위에 결찰시켜, pBD-NS5A 2180-225 1를 얻는다.

PBD-[illegible] ISDR는 IFN 저항성 HCV-1a으로부터 NS5A의ISDR-결손 돌연변이를 인코드한다(Gale et al., 1997, Virology 230:217-227).

부위-직접적인 돌연변이생성(Chameleon Double-Stranded Site-Directed Mutagenesis Kit; Strategene)을 이용하여, HCV-1b의 IFN-감응성 균주에 상응하는 ISDR 돌연변이를 pBD-NS5A 1b-wt에 도입시킨다. 돌연변이 반응은 표 3(아래)에 나타낸 것과 같은 돌연변이 프라이머를 이용하여 제조업자가 설명하는 것대로 실행하였다. 주형 DNA는 5분간 100ehidptj 배양하여 변성시키고, 지적안 돌연변이성 프라이머 및 Scal를

StuI 선택성 프라이머 5'GTGACTGGTGAGGCCTCAACCAAGTC(StuI 제한효소 부위는 밑줄침)에 어닐링시켰다. T7 DNA 중합효소-프라이머 연장 생성물이 결찰되고, ScaI 제한효소로 절단하여, 프라이머가 인코드된 돌연변이를 선별하고, 이를 XlmutS 대장균(E. coli)(Stratagene)에 형질도입시켰다. 이와 같은 방법으로, 동질유전성 NS5A 구조체 세트가 NS5A 1b-wt와 동일하게(단, 지시한 돌연변이는 ISDR에 도입된 것이 차이가 있다) 작제되었다(표 1 참고). pBD-NS5A 1b-2 및 pBD-NS5A 1b-4는 PBS-NS5A 1b-wt으로부터 만들고, 이는 각각 돌연변이로써 단일(A2224V) 또는 다중(P2209L, T2214A, T2217G) ISDR를 인코드한다(표 1). pBD-NS5A-5는 ISDR 돌연변이 P2209L, T2214A, T2217G, A2224V를 인코드하고, 이는 A2224V 돌연변이를 pBD-NS5A-4에 도입시켜 만든다.

S. cerevisiae에서 NS5A을 발현시키기 위해, 전체 pBD-NS5A 1b-wt 삽입체 1.4kb를 PCR로 표 3(위)에 나타낸 제한효소-연결된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용하여 증폭시켰다. PCR 생성물은 pCR-Script(Stratagene)의 SrfI 부위에 클론시키고, HindIII로 처리하여 생성된 플라스미드를 방출시켰다. 겔-정제한 삽입체 DNA는 pYES2(Invitrogen)의 HindIII 부위에 클론하여, 갈락토즈-유도성 GALI 프로모터 조절하에서 NS5A를 발현시키는 pYES-NS5A 1b-wt를 만든다. pYES-NS5A 1b-2, PYES-NS5A 1b-4, pYES-NS5A 1b-5 작제는 pYES-NS5A 1b-wt의 1.1 kb SacII/SalI 단편을 pBD 구조체의 내부 SacII/SalI 단편으로 대체하여 만든다.

포유류 세포에서 NS5A를 발현시키기 위해, PYES-NS5A 1b-wt 및 pYES-NS5A 1b-5의 전체 1.4 kb NS5A 코딩 부분은 HindIII로 처리하여, 방출시켜,pFLAG-CMV2(Eastman Kodak Co.)의 HindIII 부분에 클론시킨다. 생성된 플라스미드 pFlagNS5A 1b-wt 및 pFlagNS5A 1b-5는 각각 CMV-초기 프로모터 조절하에서 전체 길이 wt와 8개 aa FLAG 에피토프 tag 서열의 N-말단에 융합된 돌연변이 NS5A(FLAG-NS5A)를 인코드한다. pYES2-NS5A(Gale et al., 1997 Virology)의 1.4 kb HindIII/XbaI 삽입체를 pcDNA1NEO에서 이에 상응하는 부위에 클론시켜, pNeo-NS5A 1a-wt를 작제한다. pNeo-PKR K296R는 전체 길이의 비활성 사람 PKR K296R 돌연변이를 인코드한다(Barder et al., 1993 J. Biol. Chem. 170:17423-17428). pGST-NS5A 1b-wt 를 작제하기 위해, pAD-NS5A(Gale et al., 1997 Virology 230:217-227)의 1.4 kb NcoI/XhoI 삽입체 DNA를 분리하고, 3'에 들어간 말단은 Klenow 중합효소(Sambrook et al., 1989 Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor Press)를 이용하여 채운다. 생성된 블런트 말단 DNA는 GST 단백질을 인코드하는 플라스미드의 인프레임에 NS5A 코딩 부분이 융합된 pGex-2TK(Pharmacia Biotech)의 SmaII 부위에 클론한다. pGST-K3L는 88개 aa 백시니아 바이러스 K3L 단백질의 GST 융합체를 인코드한다. pGST-NS1는 인플루엔자 바이러스 NS1 단백질의 GST 융합체를 인코드한다. pcI168에서 파아지 λcI 리프레서의 N-말단 132 aa와 촉매 활성이 없는 PKR K296R를 융합하여 pcI-PKRK296R를 만든다. 각 새로운 구조체의 전체 서열은 디데옥시뉴클레오티드 서열 분석(Applied Biosystems)을 이용하여 확인하였다.

세포 배양 및 트랜스펙션

NIH3T3, Cos-1 세포(ATCC) 및 종양에서 유도한 세포주는 (Tang et al., 1996 J. Biol. Chem 271: 28660-28666)에서 설명하는 것과 같이, 10% 태아 송아지 혈청을 포함하는 Dulbecco 변형 Eagle 배지(DMEM)에서 생장시켰다. 일시적인 트랜스펙션을 위하여, Tang et al., 1996 J. Biol. Chem. 271-28660-28666에서 설명하는 것과 동일한 DEAE-덱스트란/클로로퀴논 방법으로 Cos-1 세포에 발현 플라스미드 복합체를 도입시키거나 제조업자(Qiagen)가 설명하는 것과 같이 Superfluent 트랜스펙션 시약을 이용하여 도입시켰다. 각 트랜스펙턴트는 다음에서 설명하는 것과 같이 각 발현 플라스미드 5㎍으로 공동 트랜스펙트된 약 6 × 10^5 세포가 준합류된 25㎠ 배양물로 구성된다; pcDNA1neo/pNeoPKR K296R; pNeoNS5A1a-wt/pNeoPKR K296R; pFlag/pNeoPKR K296R; pFlagNS5A1b-wt/pNeoPKR K296R; pFlagNS5A 1b-5/pNeoPKR K296R. 세포는 트랜스펙션후에 48시간에 수득하고, 추출물은 설명한 것과 같이 면역침전 또는 면역블랏 분석을 진행하였다. PKR 저해성 단백질 $P58^{IPK}$ 을 안정적으로 발현시키는 NIH3T3 세포주에 대해서는 이미 설명된 바 있다(Barber et al., 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. 91:4278-4282). 벡터 조절 NIH3T3 세포 주 또는 NS5A 1a-wt를 발현시키는 세포주는 DEAE-덱스트란/클로로퀴논 방법을 통하여 각각 3-10㎍ pcDNA1neo 또는 pNeoNS5A 1a-wt를 세포에 트랜스펙트시켜, 유도하였다. 트랜스펙트된 세포는 600㎍/㎖ 네오마이신 유사체 G418를 포함하는 생장 배지에서 선별하였다. 약물-저항성 클론을 분리하여, 연장시키고, NS5A의 안정된 발현에 대해 테스트하였다. 이와 같은 방법에 의해, NS5A를 높은 수준으로 또는 낮은 수준으로 발현시키는 몇 개 클론을 분리하였다. 추가 분석을 위하여, 두 가지 대표적인 클론을 선택하였는데, 5C6(높은 발현 수준) 및 4A1(낮은 발현 수준)이 된다.

단백질 분석

20㎖ 액체 배양물에서 세포를 수집하고, 냉수로 세포를 한번 씻은 후에, 차가운 이스트 용해 완충액[40mM PIPES (pH 6.6), 100 mM NaCl, 1mM DTT, 50 mM NaF, 37 mM [illegible]-글리세로포스페이트, 120 mM $MASO_4$, 10 mM 2-아미노퓨린, 15 mM EDTA, 0.2 mM 페닐메틸설포닐플로라이드(PMSF)]에 현탁시키고, 이스트 추출물을 준비하고,Gale, Jr. et al., 1996 Mol. Cell. Biol.16: 4172-4181에서 설명하는 것과 같이 유리 비드 방법으로 용해시킨다. 3T3, Cos-1 및 종양에서 유도된 세포 추출물은 Tang et al., 1996 J. Biol. Chem. 271:28660-28666에서 설명하는 것과 동일하게, 완충액 I[50 mM KCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20% 글리세롤, 0.5% Triton X-100 units/아프로티닌㎖, 1mM PMSF, 20 mM Tris (pH 7.5)]네서 준비하였다. 추출물은 12,000 xg에서 4℃ 원심분리하여 정제하고, 상청액은 수득하여 -70℃에 저장하였다. 제조업자(BioRad)가 설명하는 것과 같이, BioRad Bradford assay를 이용하여 세포 추출물 단백질 농도를 결정하였다.

이미 설명한 것과 같이, 세포 추출물에서 25-50㎍ 총 단백질을 면역블랏 분석하여 단백질 발현을 결정하였다. 단백질은 SDS-PAGE를 이용하여 분리하고, 니트로셀룰로오즈 막에 옮긴다. NS5A에 특이적인 1차 단클론성 항체(anti-NS5A) 사람 PKR(anti-PKR(Laurent et al., 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. 82:4341-4345) FLAG 에피토프(anti-FLAG; Eastman Kodak Co.), GAL4 활설화 도메인 또는 GAL4 DNA-결합 도메인[각 anti-AD, anti-BD(Clontech)]로 막에 프로브시켜, 결합된 단백질을 감지한다. 단백질은 강화된 화학발광 물질(ECL) 및 자가방사사진으로 볼 수 있다. 단백질 절하에서 가능한 오류를 조절하기 위해, 블랏은 악틴-특이적인 단클론성 항체(anti-악틴; ICN)으로 프로브시킨다.

2×10^6 트랜스펙트된 Cos-1 세포를 나타내는 추출물로 면역침전을 실행하였다. 추출물(150 ㎕)은 얼음상에서 해동시키고, 단백질 G-아가로즈 비드(Boehringer Mannheim)로 4℃에서 1시간동안 배양하여 미리 정제한다. 상청액은 4℃ 원심분리(12,000 xg)에 의해 회수하고, anti-NS5A(1:500) 또는 antiFLAG M2-affinity gel(Eastman Kodak Co.)과 혼합하는데, 최종 용적이 600㎕ 완충액 I이 되도록 하고, 4℃에서 2 hr 또는 16 hr동안 각각 배영한다. 항-NS5A 면역복합체는 완충액 I로 평형을 이룬 단백질 G-아가로즈 비드로 추가 배양하여 회수한다. 면역복합체는 각각 1㎖ 얼음 냉각된 완충액 1로 5회 세척한다. Anti-FLAG M2-친화력 겔 면역복합체는 냉각 TBS[50 mM Tris(pH 7.5)]로 3회 세척하고, 제조업자(Eastman Kodak Co.)가 설명하는 것과 같이 경쟁성 FLAG 펩티드로 용출시킨다. 면역복합체는 원심분리에 의해 회수하고, SDS-샘플 완충액으로 희석시키고, 100℃에서 5 min간 배양하였다. 면역침전 생성물은 12% 아크릴아미드/SDS 겔에서 전기영동에 의해 분리하고, 상기에서 설명하는 것과 같이 면역블랏 분석을 진행하였다.

eIF-2α의 등전점 포커스의 경우에, 이스트 균주는 2% 덱스트로즈(SD)를 포함하는 우라실-결손 합성 배지에서 16시간동안 생장시키고, 2% 라피피오즈 및 10% 갈락토즈(SGAL)을 포함하는 우라실-결손 합성 배지로 OD_{600}가 0.4가 되도록 희석시키고, 추가로 30℃에서 4-9 hr동안 생장시킨다. 이스트 추출물은 면역블랏 분석을 위해 설명한 것과 같이 준비하였다. 단백질(16㎍)은 수직 등전점 포커스(Dever et al., 1993 Proc. Hatl. Acad. Sci. 90:4616-4620)에 의해 분리하였고, 니트로셀룰로오즈 막에 브랏시켰다. 이스트 eIF-2α에 특이적인 토끼 다클론성 항혈청을 이용하여 면역블랏 분석으로 eIF-2α를 감지하였다. 이와 같은 실험에서, 산성이 적은 염기성-포스포릴화된 eIF-2α형의 수준이 증가되었는데, 이는 세린 51에서 PKR에 의해 포스포릴화되는 과포스포릴화된 eIF-2α의 수준이 동시에 감소었다는 것을 말한다(Dever et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. 90:4616-4620; Romano et al. 1995 Mol. Cell. Biol. 15:365-378). 전체에 대해 염기성 포스포릴화된 eIF-2α의 수준은 스캐닝 레이져 밀도계로 정량화하고, 각 샘플에 대해 총 eIF-2α비율로 나타낸다.

이스트 방법

이스트 2-하이브리드 검사의 자세한 내용은 Gale, Jr. et al., 1996에서 설명하고 있다. 이 검사는 2-하이브리드 단백질 상호작용의 지시물질로써 히스티딘-결손 배지에서 이스트 균주 Hf7c(Clontech)의 생장을 지원하는 His 리포터 유전자를 특이적으로 유도하는 것을 이용한다. 사카로미세스 세르비시에(Saccharomyces cerevisiae) 균주 Hf7c[MATa ura 3-52 his 3-200 lys2-801 ade2-101 trp 1-901 lea2-3, 112 gal4-542 gal80-538 LYS2::GAL1-HIS3 URA3::(GAL4 17-mers)3-CYC1-lacZ]는 GALA AD-융합 구조 및 BD-융합 구조를 가지는 2μTrp1 및 Leu2 발현 플라스미드로 형질변환시켰다. 형질변환된 균주는 트립토판 및 루이신이 결손된 SD 배지(+His)에 도말하였다. 30℃에서 3일 후에, 균주는 트립토판, 루이신, 히스티딘이 결손된 SD 배지(-His)에 도말하고, 30℃에서 3-6일간 생장시켰다. 생성된 히스티딘-고갈된 콜로니는 +His 및 -His 배지에 복제하여 도말시키고, 30℃에서 3-5일간 배양시켰다. -His 배지에서 특이적인 생장이 있는 것은 2-하이브리드 단백질 상호작용에 양성으로 기록하였다.

in vivo에서 PKR 및 NS5A 기능을 결정하기 위해, wt 또는 돌연변이 NS5A Ura3 발현 플라스미드를 S. Cerevisiae 균주 RY1-1 (MATa ura3-52 leu2-3 leu2-112 gcn 2△ trp1-△63 LEU2::(GAL-CYC1-PKR)$_2$ (Romano et al., 1995)에 형질도입시켰??다. 이 균주는 이스트 eIF-2α 카이나제 GCN2가 부족하고, 갈락토즈 유도성 GAL/CYC1 하이브리드 프로모터 조절하에서 LEU2 위치에 wt 사람 PKR이 결합된 두 개 복사체를 가진다. SGAL 배지에서 생장시켰을 때, PKR이 발현되고, 세린 51에서 내생 eIF-2α이 포스포릴화되기 때문에, 이는 mRNA 해독이 저해를 받았고, 생장이 억제되었다는 것이다(Dever et al., 1993; Romano et al, 1995). 역으로, wt NS5A가 공동발현되면, 이 시스템에서 PKR 기능과 연합된 이들 독성 효과는 억제되고, 균주는 NS5A 기능을 공동 발현하여, SGAL 배지에서 생장하게 된다(Gale et al., 1997). 지적한 NS5A 발현 구조체를 가지는 RY1-1 균주를 비-유도성 우라실-결손 SD 배지에 도말라고, 3일간 30℃에서 배양시켰다. 한개 콜로니를 선택하여, 우라실-결손 액체 SD 배지에서 16시간동안 30℃에서 배양시켰다. 각 배양물 한 방울씩은 OD_{600}에서 0.2가 되도록 정상화시키고, 멸균 H_2O으로 10배씩 증가시키면서 연속적으로 희석하였다. 각 희석물 2㎕를 중복하여 우라실-결손 SD 배지 및 SGAL 배지에 제공하고, 30℃에서 3-6일간 배양시켰다. 균주는 SGAL 배지에서 높은 희석 생장에 대해 기록하는데, 이는 PKR의 NS5A-중개된 억제를 나타낸다PKR (Gale et al., 1997).

이량체형성 중단 검사

PKR의 이량체형성 중단을 측정하는 검사는 기존에 설명된 바 있다(Hu, 1990 Science 250: 1400-1403; Hu, 1995 Structure 3:431-433). 이 검사는 대장균에서 pcI-PKR K296R로부터 발현된 cI-PKR K296R 융합 단백질의 이량체형성 상태의 지시물질로써 파아지 λ-중개된 세포 용해에 감응성을 이용한다. pcI-PKR K296R는 p15A ori 조절하에서 복제되어, pGEX 벡터 시리즈(Smith et al. 1988, Gene 67, 31-40)를 포함하는 colEi ori를 가지는 플라스미드에 필적하는 낮은 복사체 리플리콘이다. c1-PKR K286R 및 지적한 GST-융합 단백질을 공동 발현시키는 대장균 균주 AG1688(Hu, 1990)를 파아지 λcI-결손 돌연변이 cI857KH54(Hu, 1990)에 의해 중개되는 세포 용해에 저항성이 있는 지에 대해 평가하였다. AG1688 E. coli는 10mM $MgSO_4$ 및 0.2% 말토즈가 보충된 루리아(Luria) 배지로 된 액체 배양물에서 중간-로그 상태까지 생장시켰다. 박테리아(2.5㎕ aliquots)는 10^2-10^6 플랏 형성 단위를 각각 가지는 λKH54를 연속적으로 10배 희석한 것 동량과 혼합한다. 박테리아-파아지 혼합물은 각각 항생제 한천 플락 형성 단위에 제공한다. 박테리아-파아지 혼합물은 0.1 mM 이소프로필티오-B-D 갈락코시드(IPTG)를 포함하는 항생제-한천 플레이트에 제공하여 융합 단백질을 인코드하고 있는 플라스미드의 발현을 유도한다. 플레이트는 대기중에서 건조시키고, 37℃에서 16시간 배양하여, cI857KH54-중개된 세포 용해에 저항성이 있는 지를 기록하는데, 이는 기능을 하는 cI-PKR K296R 동종이량체가 in vivo 에서 형성되는 것에 대해 지시자가 된다. 각 융합 단백질을 인코드하는 각 플라스미드의 발현은 면역블랏 분석으로 확인된다.

세포 생장 분석 및 종양형성능 검사

표 2에서 설명하는 것과 같이 트랜스펙트된 NS5A 또는 $p58^{IPK}$(기준)(Barber et al., 1994)을 구성적으로 발현하는 안정한 NIH3T3 세포 주의 생장 특징을 결정한다. 종양 표현형 분석을 위해, 멸균 상태에서 nu/nu 생쥐로부터 종양을 잘라내어, 인산완충염(PBS)으로 세척하고, 1-5㎜ 단편으로 잘게 자른다. 종양 단편은 1% 콜라게나제/0.1% Dispase(Gibco BRL) PBS용액에 우선 배양하고, Dounce vessel homogenizer로 혼합하여 균질하게 한다. 균질화된 종양은 2시간동안 37℃에서 배양시키고, 10분간 600xg에서 원심분리하고, 10% FCS가 보충된 새로 만든 DMEM에 재현탁시킨다. 세포 현탁물은 클론성 종양-유도된 세포주를 생성하기 위해 다중-웰 플레이트에 접종한다.

8.2. 결과

NS5A에 의한 PKR 조절 기작: 단백질 카이나제 이량체형성의 중단

다중 수준에서 PKR 정숙화, 활성화, 촉매 과정내에 특정 단계가 바이러스에 의해 조절된다. 이와 같은 단계에는 PKR 수준 조절, dsRNA-결합 과정의 제어, 단백질 카이나제 이량체형성, PKR 촉매 활성의 제어등이 포함되나 이에 한정되지는 않는다. 출원인이 설명하는 것과 같이, PKR에 NS5A의 결합은 PKR aa 244-355이 되는 넓은 PKR 촉매 도메인내에 있다. PKR를 NS5A-중개하는 조절과정을 이해하기 위해, 단백질 카이나제에서 NS5A-결합 도메인의 세포 기작을 연구하였다. 단백질 카이나제상에 NS5A-결합 도메인을 확인하기 위해, GAL4 DNA 결합 도메인(BD-NS5A 1b-wt)에 융합된 HCV-1b(1b-wt; 표 1 참고)의 IFN-저항성 분리체의 야생형(wt) NS5A를 이용하여 단백질 상호작용 분석을 실행하였다. 이스트 2-하이브리드 검사에서 GAL4 전사 활성화 도메인(AD)에 융합된 PKR 결손 돌연변이와 상호작용을 중개하는 이 구조체의 능력에 대해 테스트하였다. Hf7c His 리포터의 활성화로 인하여 히스티딘-결손(-His) 배지에서 공동-형질변환된 이스트가 생장하는 능역으로 2-하이브리드 단백질의 상호작용을 결정하였다. 각 구조체는 이에 상응하는 균주에서 효과적으로 발현되었다. 도 8을 참고로 하면, Hf7c 이스트 균주는 BD-NS5A 1b-wt와 AD-PKR(PKR K296R) 또는 AD-PKR결손 구조체를 공동 발현시키거나 또는 PKR 244-551 또는 PKR 244-296를 공동 발현시켜, -His 배지에서 모두 생장을 나타내는데, 이는 이들 균주내에 2-하이브리드 단백질 상호작용이 있다는 것을 설명하는 것이다. 따라써, PKR aa 244-296에 의해 정의된 NS5A 52aa 서열로 NS5A와 상호작용을 조절하는데 있어서 충분하다는 것이다. 이와 같은 결과는 aa244-296내에 PKR의 NS5A 결합 도메인이 PKR 이량체형성 도메인이하는 것이다.

대장균(E. coli)에서 파아지 λ-기초한 유전자 검사를 이용하여 in vivo에서 PKR 이량체형성을 간섭하는 NS5A 1b-wt의 능력에 대해 테스트하였다. 이 검사에서, 파아지 λCI 리프레스의 DNA-결합 도메인의 인프레임에 융합된 이량체형성 단백질은 λ 프로모터에 결합하는데 필요한 CI DNA-결합 도메인의 이량체형성을 증 중개하였다(Hu, 1995 Structure 3:431-433). 대장균(E. coli)에서 발현되는 경우에, 하이브리드 CI 리프레스는 λ 프로모터에 이량체형성 및 결합하여 λ 파아지의 CI-결손 돌연변이[λKH54;(Hu, 1990 Science 250:1400-1403)]에 의해 유도되는 세포 용애에 저항성을 조절한다. 이는 하이브리드 CI-리프레스를 발현시키는 λKH52-감염된 대장균(E. coli)내에 파아지 유전자 발현을 억제하게 된다. 역으로, 이 시스템에서 이량체형성 저해물질이 공동 발현되면, CI-이량체가 파괴되어, λ 유전자 억제가 방출되어, 대장균이 용해된다. CI DNA-결합 도메인(CI-PKR)의 N-말단에 융합된 전체 길이 비활성 PKR K296R이 발현되면 대장균(E. coli)에서 λKH54 감염시에 λ유전자를 충분히 억제하게 된다. 이는 도 9에서 설명하는 것으로 GST가 공동 발현되어도 CI-PKR-중개된 λ 유전자 억제에는 영향을 주지 않는데, 그 이유는 높은 농도의 파아지에 노출된 후에도 세포 용해에 저항성이 관찰되기 때문이다(도 9, 라인 1). 따라서, CI-PKR의 PKR 성분은 단백질 이량체 형성을 실행하고, in vivo에서 λ 유전자를 억제한다. λKH54-중개된 세포 용애에 대한 저항성은 CI-PKR 및 GST-NS5A를 공동 발현시키는 대장균에서 약 1000배 감소되었고(도 9에서 라인 1, 2를 비교), 이는 NS5A가 CI-PKR 이량체 형성 과정을 중단시킨다는 것을 나타내는 것이다. GST-NS5A 1b-wt의 효과는 CI-PKR에 특이적인 것으로 보인다. 따라서, NS5A는 in vivo 에서 PKR 이량체 형성과정을 특이적으로 중단시킨다.

또한, NS5A-중개된 PKR 이량체 형성 중단은 PKR 이량체형성 도메인에 국소화된 PKR에 NS5A 결합되는 표적 부위와 일치한다(도 8 참고). 또한, 백시니아 바이러스 K3L(GST-K3L; 라인 3) 및 인플루엔자 바이러스 NS1(GST-NS1; 라인 4)[각각 PKR 기질(Craig et al., 1996 J. Biol. Chem. 271-24526-24533; Gale, Jr. et al., 1996 Mol. Cell. Biol. 16:4172-4181) 및 -dsRNA 상호작용(Katze et al., 1991)의 표적이 됨]을 포함하는 PKR의 다른 바이러스 저해물질을 인코드하는 GST 구조체는 대장균이 CI-PKR을 공동 발현시키는 경우에 λKH54-중개된 세포 용해에 저항성을 가지는데 영향을 주지 못하였다. 따라서, NS5A는 PKR 성숙화, 활성화 및 촉매 기능 과정에 중요한 성분인 PKR 이량체형성을 중단시켜, PKR 기능을 억제하는 PKR 저해물질의 새로운 종류가 되고, 신규한 항바이러스 물질을 확인하는 스크리닝 검사의 주요 표적이 된다.

9. 실시예: NS5A, PKR 조절 및 IFN 감응성: ISDR의 정의

최근 분자 전염병학 연구에서는 HCV-1b의 IFN-저항성 균주의 HCV 게놈에 보존 부분으로 ISDR이 확인되었다. 출원인은 HCV 유전자형 1a 및 1b의 IFN-저항성 균주에서 NS5A가 PKR에 결합하여 in vivo에서 단백질 카이나제 기능을 억제할 수 있고, 이는 NS5A ISDR에 따른 과정이라는 것라고 결정하였다. NS5A 1b-wt에 동질유전성 NS5A ISDR 변이체를 이용하여, 출원인은 ISDR내에 돌연변이가 in vivo에서 NS5A의 PKR-조절된 성질을 제거한다는 것을 설명하였다.

9.1. NS5A의 PKR 상호작용 도메인의 확인 : ISDR는 NS5A-PKR 복합체 형성에 필요조건이나 충분조건은 아니다.

NS5A-PKR 상호작용의 상세한 구조적 설명하기 위해 이 상호작용에서 ISDR의 역할을 결정하기 위해 이스트 2-하이브리드 검사를 이용하였다. 전제 길이 또는 BD-NS5A 1b-wt의 결손 돌연변이(도 10A; 표 1 참고)를 인코드하는 TRP1 플라스미드를 AD-PKR를 인코드하는 LEU2 플라스미드를 가지는 이스트 균주 Hf7c에 도입시킨다. 모든 구조체는 공동 형질변환된 균주에서 효과적으로 발현되었다(도 10C). 각 BD-NS5A 구조체 및 AD-PKR 또는 AD-벡터(상호작용-음성 기준)를 가지는 균주는 ??두 히스티딘을 포함하는 배지에서 생장하였다. 상호작용-음성 기준 균주는 -His 배지에서 생장하지 못하였는데, 이는 설명된 상호작용의 특이성을 설명하는 것이다. 중요한 것은 NS5A의 ISDR-포함 66개 aa 부분NS5A은 in vivo 에서 PKR와 복합체를 형성하는데 필요하다는 것이 밝혀졌다(도 10). NS5A N-말단 236아미노산 만으로는 AD-PKR과 상호작용

하는데 충분하지 않다는 것이다. 이는 -His 배지에서 이 구조체를 가지는 균주가 생장할 수 없는 것으로 판단한다(도 10B). 또한, NS5A aa 2180-2251를 인코드하는 ISDR-포함 구조체는 AD-PKR에서 발현되었을 때 -His 배지에서 생장을 지원하지 못하였다. 역으로, BD-NS5A 구조체 1973-2419, 1973-2361, 또는 2120-2274를 가지는 이와 같은 균주는 -His 배지에서 생장을 하였는데, 이는 2-하이브리드 단백질 상호작용을 나타내는 것이다. 이와 같은 분석에 의해, NS5A의 PKR-결합 부분은 ISDR 및 인접하는 C-말단의 26개 아미노산으로 구성된 66개 아미노산 부분내에 있다는 것이다(도 10B, 하측). 따라서, ISDR는 NS5A-PKR 상호작용에 필요조건이나 충분조건은 아니다.

9.2. NS5A-PKR 상호작용은 ISDR의 서열에 따라 달라진다.

NS5A이스트 2-하이브리드 검사를 이용하여 NS5A 및 PKR 사이에 in vivo 복합체 형성에 ISDR의 영향을 검사하였다. 일련의 NS5A 발현 플라스미드는 야생형(wt) 및 IFN-저항성 및 HCV의 감응성 균주에 상응하는 ISDR 변이체를 인코드한다. 무작위하게 할당된 ISDR 돌연변이 보다는 부위-직접적인 돌연변이 형성을 이용하여 NS5A의 ISDR 변이체를 작제하는데, 이는 HCV의 IFN-감응성 균주의 ??미상 분리체내에서 이미 확인된 정의된 돌연변이를 기초로 한다(Enomoto et al., 1996 N. Eng J. Med. 334:77-81). 표 1에서 나타낸 이와 같은 돌연변이는 IFN-저항성 HCV에서 미리 분리한 NS5A 1b-wt의 ISDR내에 도입시켰다(Gale et al., 1997). 일련의 동질유전성 NS5A 구조체, 1b-2, 1b-4, 1b-5는 IFN-저항성 HCV로부터 원형 ISDR 서열에 2개, 4개, 5개 아미노산이 변화된 것을 각각 포함하도록 작제하였다. 이와 같은 구조체는 NS5A 1b-wt의 서열과 동일한데, 단, ISDR내에는 정의한 돌연변이를 가지고, 따라서, HCV-1b NS5A 기능에 특이적인 ISDR 돌연변이 효과를 결정할 수 있다. 표1에서는 원형 IFN-저항성 HCV-J(Kato et al., 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9524-9528)의 ISDR 서열 및 IFN-반응성을 각 wt 및 돌연변이 NS5A 구조체에서 이에 상응하는 분리체에서 결정된 IFN에 대한 반응성 및 ISDR 서열과 비교하였다.

전체 길이 1b-wt NS5A 및 동질유전성 ISDR 변이체를 인코드하는 BD-NS5A 구조체(표 1)는 AD-PKR 또는 AD-조절 벡터를 인코드하는 플라스미드를 가지는 Hf7c 이스트내로 형질도입시켰다. 추가 기준으로, AD-PKR 및 HCV-1a NS5A 구조체 BD-1a-wt(양성 기준) 또는 BD-△ISDR(음성 기준)을 인코드하는 플라스미드를 가지는 균주도 나란히 평가하였는데, 후자의 것은 이에 상응하는 1a-wt 구조체의 완전한 ISDR가 부족하다(Gale et al., 1997). 생성된 이스트 균주는 +His 및 -His 배지에 복제시킨다. 도 11에서 볼 수 있는 것과 같이, 모든 균주는 +His에서 생장하였다. 그러나, BD-NS5A 구조체 1b-wt, 1b-2, 1a-wt 기준을 발현시키는 균주는 -His 배지에서 생장하였는데, 이는 이와 같은 구조체가 in vivo에서 PKR에 결합할 수 있다는 것을 의미한다. ΔISDR 기준과 유사하게, BD-NS5A, 1b-4, 1b-5의 ISDR 변이체는 AD-PKR와 상호작용하지 못하였는데, 그 이유는 이들 구조체를 포함하는 균주가 -His 배지에서 생장하지 못하기 때문이다(도 11A). 면역블랏 분석에 따르면, 모든 BD-NS5A 구조체 및 AD-PKR 구조체는 공동-형질변환된 이스트에서 효과적으로 발현되었다(도 11B). 따라서, ISDR 서열이 상이한 동질유전성 NS5A 구조체는 in vivo에서 PKR와 차등적으로 상호작용하였다. 한개 ISDR 점 돌연변이(NS5A 1b-2)를 도입시키도 NS5A-PKR 상호작용를 제거하지 못하였다. 역으로, 다중 ISDR 돌연변이는 PKR와 복합체를 형성하는 것을 제거하였다(도 11A). 따라서, PKR에 NS5A가 결합하지 못하는 것은 IFN-감응성 HCV와 연합된 ISDR내에 다중 돌연변이 때문이다.

9.3. ISDR 돌연변이는 NS5A 기능을 제거한다.

NS5A는 단백질 카이나제와 직접적인 상호작용을 통하여 PKR의 기능을 억제한다(Gale et al., 1997b). 다중 ISDR 돌연변이는 NS5A-PKR 복합체 형성을 중단시켰다(도 11). 따라서, PKR 기능을 조절하는 wt NS5A 및 ISDR 변이체의 능력을 in vivo에서 비교하였다. Gal 프로모터 조절하에 NS5A 구조체 1b-wt, 1b-2, 1b-4, 1b-5를 인코드하는 발현 플라스미드를 gcn2△S.cerevisiae 균주 RY1-1(Romano et al., 1995 Mol. Cell. Biol. 15:365-378)에 도입시켰다. 이 균주는 내생 GCN2 단백질 카이나제가 부족하고, 갈락토즈 유도성 GAL/CYC 하이브리드 프로모터 조절하에 wt 사람 PKR의 두 개 결합된 복사체를 가진다. 갈락토즈 배지에 두었을 경우에, PKR가 발현되고, eIF-2α상에 포스포릴화되어 세포 생장을 억제하였다(Romano et al., 1995 Mol. Cell. Biol. 15:365-378). 도 12A 에서 볼 수 있는 것과 같이, 각NS5A 발현 플라스미드 또는 발현 플라스미드만 가지는 균주는 세포 균질물을 유일한 탄소원으로 덱스트로즈를 포함하는 비-유도성 배지에서 연속적으로 도말하였을 때, 균등하게 생장하였다(좌측 판넬). 대조적으로, NS5A 1b-wt을 공동으로 발현시키는 균주만 유도성 배지에서 상당한 생장을 하였다(도 12A, 우측 판넬). 이 방법으로, PKR 및 NS5A 1b-wt를 공동 발현시키는 균주는 NS5A 1b-4 또는 1b-5 및 PKR을 공동 발현시키는 균주와 비교하였을 때, 갈락토즈 배지에서 생장시켰을 경우에 100배 이상 도말 효과가 나타났다. PKR 및 NS5A 1b-2를 공동 발현시키는 균주에서 약 10-100배 감소한 것과 같은 도말 효과가 감소된 것으로 나타났다(도 12A). 이것은 이 구조체가 이스트 2-하이브리드 검사에서 PKR에 결합할 수 있기 때문에 놀라운 것이다(도 11 참고). 이 결과는 1B-wt의 ISDR내에 한개 아미노산 점 돌연변이(A252V)를 도입시키면, NS5A-PKR 복합체 형성으로부터 PKR 억제를 푸는데 충분다는 것을 설명한다. HCV의 IFN-감응성 균주에 상응하는 다중 ISDR 아미노산 돌연변이로 인하여 동질유전성 NS5A 1b-wt과 연합된 생장-복원 표현셩이 상실된다. 이 결과는 NS5A 1b-wt가 in vivo에서 PKR의 해독 조절 능력을 억제하여, 세포 생장을 복원시키고, 단백질 합성을 촉진시킨다는 것이다. NS5A ISDR 변이체와 연합된 기능 상실되었다는 것은 ISDR내에 돌연변이를 도입시키면 NS5A의 PKR-조절 성질이 중단된다는 것을 말하는 것이다.

NS5A의 PKR-조절 기능 분석에서 ISDR 돌연변이의 효과를 결정하기 위해, in vivo 포스포릴화 PKR 기질인 eIF-2α에서 분석을 하였다. RY1-1 이스트 균주에서 PKR 기능을 억제하면, 세린 51에서 PKR에 의해 독점적으로 포스포릴화되는 eIF-2α의 과포스포릴화 형의 수준이 감소된다(Romano et al., 1995 Mol. Cell. Biol. 15:365-378). 일차원 등전점 포커스(IEF)를 이용하여, 세린 51 포스포릴화가 결여된, 산성이 적은 아-포스포릴화된 형으로부터 전기영동에의해 과포스포릴화된 eIF-2α형을 분리하였다(Dever et al., 1993). 도 10에서는 이스트 eIF-2α에 특이적인 항혈청으로 프로브시킨 도 12에 나타낸 RY1-1 균주에서 준비한 IEF 겔 추출물의 면역블랏을 나타낸 것이다. 기준으로는 삽입체가 없는 발현 플라스미드만을 가지는 균주에서 추출한 추출물(V, 라인 1) 또는 트랜스도미넌트-음성 PKR 돌연변이, PKR △295-300(도 12, 라인 6)을 이용하였다. PKR △295-300는 이스트에서 공동 발현되었을 때, wt PKR을 나타내어, 세린 51 포스포릴화 수준이 감소되고, 갈락토즈 배지에 도말하였을 경우에 세포 생장이 복원되었다(Romano et al., 1995). 도 13에서 볼 수 있는 것과 같이, NS5A 1b-wt 또는 PKR △295-300을 발현시키는 균주는 과-

포스포릴화되는 수준이 상당히 감소되었는데, 이는 벡터 기준 균주에 비해 하0포스포릴화된 eIF-2α 동소체가 동시에 증가되는 것으로 설명된다(라인 1,3 비교). 동질유전성 NS5A 변이체, 1b-2, 1b-4, 또는 1b-5를 발현시키는 균주는 벡터 기준 균주와 유사하게 eIF-2α 과-포스포릴화된 동소체를 우세하게 보유한다(도 13, 라인 3-5를 라인 1과 비교). 세린 51-포스포릴화된 eIF-2α의 각 수준은 갈락토즈 배지에서 각 균주의 생장 표현형에 상응하는데(도 12A), NS5A 1b-wt 발현으로 갈락토즈에서 생장되고, 세린 51-포스포릴화사 감소되었다. 이와 같은 표현형은 NS5A에 ISDR 돌연변이를 도입하면 역전된다. 이 결과는 IFN-감응성 HCV(표 1)에 반응하여 ISDR 돌연변이는 NS5A의 PKR-조절 성질을 차단할 수 있다는 것을 설명한다. 또한, 우리의 NS5A 1b-2 구조체 분석에서 관찰된 것과 같이(도 11, 12), NS5A-관련된 PKR 저해로부터 PKR-결합 사건이 분리되는 것은 NS5A 기능이 다중 수준에서 폐기되고, NS5A-PKR 복합체 형성을 차단하는 것에 국한되지 않는다.

9.4. 포유류 세포에서 ISDR 돌연변이에 의해 NS5A-PKR 상호작용이 중단된다.

포유류 세포에서 발현되었을 때, IFN-저항성 HCV의 NS5A는 PKR의 해독 조절 성질을 억제한다(Gale et al., 1997). 이스트 2-하이브리드(도 11) 및 성정 검사(도 12)에서 얻은 결과에서 볼 수 있는 것과 같이, 출원인은 포유류 세포에서 발생되는 NS5A에 의한 PKR 억제는 직접적인 NS5A-PKR 상호작용에 의해 비슷하게 중개된다고 가정하였다. 출원인은 NS5A 및 PKR가 포유류 세포에서 안정한 복합체를 형성하는지, ISDR 돌연변이가 복합체 형성에 어떤 영향을 주는 지를 결정하기 위해 연구하였다. wt 또는 NS5A의 ISDR 변이체 또는 전체 길이의 활성이 없는 사람 PKR을 인코드하는 플라스미드를 공동 트랜스펙트한 Cos-1 세포에서 공동 면역침전 연구를 실시하였다. 이 분석에서, IFN-저항성 HCV-1a(1a-wt), 1b-wt, 1b 동질유전성 돌연변이, 1b-5; 후자는 IFN-감응성 HCV에 상응(표 1참고)를 인코드하는 플라스미드를 이용하였다. 공동 트랜스펙트된 세포에서 준비한 면역블랏 분석에서는 모든 구조체가 트랜스펙션후 48시간이내에 효과적으로 발현되었다는 것을 설명한다(도 14). PKR은 1a-wt와 공동 트랜스펙트된 세포에서 항-NS5A 면역침전에 의해 회수되었고, FLAG-태그된 1a-wt를 가지는 세포에서 준비한 항-FLAG 면역침전물에서도 회수하였다(도 14A, 14B). 비교하면, Flag-tagged 1b-5의 면역침전물에서는 PKR가 감지되지 않았다(도 14의 라인 5, 6 비교). PKR 회수는 추출물에서 NS5A 존재에 따라 달라지는데, 그 이유는 wt NS5A가 부족한 추출물에서 준비한 NS5A-특이적인 면역침전물에서는 PKR를 감지하지 못하였다(도 10A, 10B에서 각 라인 1, 4). 이 결과에서 HCV-1a 및 HCV-1b의 IFN-저항성 균주의 NS5A는 포유류 세포에서 발현되었을 경우에, PKR와 안정적이고, 특이적으로 복합체를 형성한다는 것이다. 이스트 2-하이브리드 결과와 비슷하게(도 11), IFN-감응성 HCV에 상응하는 ISDR내에 돌연변이(표 1)는 포유류 세포에서 NS5A-PKR 상호작용을 중단시켰다. 이와 같은 결과와 이스트 균주에서 관찰된 것과 일치한다는 것(도 11 및 12)은 NS5A-PKR 상호작용 연구 및 PKR 기능에서 이와 같은 상호작용의 효과를 연구하는 살아있는 모델로 이스트 시스템을 확인하였다.

10. 실시예 : NS5A는 온코진 가능성을 가진다.

PKR 조절 과정이 세포 생장 조절에 연결되어 있기 때문에, 출원인은 NS5A에 의한 PKR 조절이 만성 HCV 감염과 악성종양 발생에 중요한 역할을 하는지에 의문을 가졌다. 이 연구에서, 온코진 형질변환은 PKR-의존성 eIF-2α 포스포릴화반응 억제 및 하향조절된 mRNA 해독을 통하여 발생되었다는 것이다. IFN-저항성 HCV의 NS5A는 PKR에 결합하고(도14), 포유류 세포에서 PKR의 해독-조절 성질을 억제하였다. 이스트 시스템의 결과에 따르면, NS5A는 PKR-중개된 eIF-2α 포스포릴화 억제를 통하여 생장-촉진 성질을 가진다는 것이다(도 12, 13). PKR의 NS5A 억제가 포유류 세포에 유사한 생장-촉진을 부여하는지를 확인하기 위해, CMV 초기 프로모터로부터 NS5A 1a-wt를 구조적으로 발현시키는 NIH-3T3 세포를 정립하였다. 이와 같은 세포 주 두 가지, NS5A 5C6 및 NS5A 4A1를 연구에 선택하였다. 면역 블랏 분석에 따르면, NS5A 5C6는 NS5A를 높은 수준으로 발현시키고(도 15), NS5A 4A1는 상당히 낮은 수준에서 NS5A를 발현하였다. 이들 세포주의 생장 성질을 검사하는데, 무흉선 nu/nu 생쥐에 주사하였을 때, 종양을 형성하는 능력이 있는지를 조사하였다(표 2). 분석에 기준으로, 다음의 기준 세포주가 포함된다; 빈 트랜스펙션 플라스미드(neo 5-10)에서 유사하게 유도한 NIH-3T3 세포 또는 PKR 저해성 단백질 $P58^{IPK}$을 과다발현시키는 이미 설명된 세포주 P58-20(Barber et al., 1994). P58-20 세포주와 유사하게, NS5A 5C6 세포는 배가 시간이 약 40% 감소되었고, neo 5-10 기준과 비교하였을 때, 세포 포화 밀도가 약 2.5-3배 증가되었다(표 2). NS5A를 낮게 발현하는 세포, NS5A 4A1의 생장 속도는 neo 5-10 기준과 비교하였을 때 큰 차이가 없었다. 그러나, 이들 세포는 기준 배양물과 비교하였을 때, 세포 포화 밀도에서 재생성이 2배 증가되었다(표 2). 따라서, NIH-3T3 세포에서 구성적으로 NS5A를 발현하는 것은 합류후 배양물에서 세포 분할을 지원하고, 이는 세포 생장 속도가 증가된 것이다. 이 결과는 악성적으로 형질변환된 P58-20 기준 세포의 표현형과 일치한다(Barber et al., 1994).

NS5A 세포주의 표현형의 특징을 조사하기 위해, in vitro에서 고정 독립적인 생장을 하는 이들 세포의 능력 및 무흉선 생쥐에서 종양을 형성하는 능력에 대해 평가하였다. P58-20 기준과 유사하게, 연성-한천 배지에서 생장시켰을 때, NS5A 5C6 세포는 콜로니를 형성하였고, neo 5-10 세포와 비교하였을 때 콜로니 형성 효율이 14배 증가되었다. 고정-독립적인 생장은 비록 상당히 낮은 수준이기는 하나, NS5A 4A1에서 관찰되는 것과 유사하다(표 2). 중요한 것은 NS5A 세포주는 모두 무흉선 생쥐에 주사한 후에 종양을 만든다는 것이다. NS5A 5C6 세포는 세포 주사후 17-25일의 잠복기를 가지면서 5/5 생쥐에 공격적으로 종양을 형성하였다. 우리는 NS5A 4A1를 제공받은 생쥐에서 종양 형성 잠복기가 상당히 길다는 것(22-44일)을 관찰하였다. 기준 P58-20 세포를 수용한 생쥐에서는 잠복기가 12-20일인 공격적인 종양 생장을 나타내었는데, 이는 기존 결과와 유사하다(Barber et al., 1994). NS5A 5C6(도 15) 및 4A1 생쥐에서 회수한 종양에서 준비한 종양-유도된 세포에서 NS5A 발현이 확인되었다. 또한, 이들 세포의 예비 검사에서 내생 eIF-2α 포스포릴화반응이 상당히 감소된 것으로 나타났는데, 이는 PKR의 NS5A-중개된 억제 결과와 일치한다. 이 연구에서는 IFN-저항성 HCV-1a에 상응하는 NS5A의 구성적인 발현으로 세포 생장 하향조절을 유도하고, NIH-3T3 세포에서 종양 형성을 유도할 수 있다는 것을 설명한다.

결과에 따르면, NS5A-관련된 PKR의 억제는 HCV가 IFN 치료에 어떻게 반응하는 지 그리고 이 과정이 만성 HCV 감염과 연관된 악성종양 발생에 어떻게 관련되는 지를 나타낸다. 따라서, 이와 같은 발견으로 NS5A의 PKR 이량체형성을 중단시키는 것을 저해하는 항-바이러스 물질을 확인하기 위한 스크리닝으로 만성

HCV 감염과 연관된 악성종양 발생을 저해할 수 있는 물질을 또한 확인할 수 있다.

많은 참고문헌을 언급하였고, 그 전문을 참고로 첨부한다.

본 발명은 여기에서 설명하는 특정 구체예에 한정시키지 않으며, 이 구체예는 본 발명의 개별 특징을 설명하기 위함으로, 기능적으로 등가의 방법 및 성분이 본 발명의 범위에 속한다. 또한, 여기에서 설명하는 것에 추가하여 다양한 변형도 가능하다는 것을 당업자는 인지할 것이다. 이와 같은 변형도 본 발명의 청구범위에 속한다.

[표 1]

ISDR 서열 및 이에 상응하는 동질유전성 NS5A 발현 구조체의 IFN 감응성

Name[a]	ISDR Sequence (aa 2209-2248)	IFN Response[b]	Reference
1b-pt	PSLKATCTTHHDSPDADLIEANLLWRQEMGGNITRV ESEN	R	(Enomoto et al., 1996)
1b-wt	----------R---------- ----	R	(Clements and Zink, 1996)
1b-2	----------R-----V---------- ----	R/S	(Enomoto et al., 1996; Zeuzem et al., 1997)
1b-4	L----A--GR---------- ----	S	
1b-5	L----A--GR-----V---------- ----	S	(Enomoto et al., 1996)
1a-wt	--------AN------E---------- ----	S	(Gale et al., 1997b)

[a]pt, HCV-J 원형 참고문헌(GenBank™ accession no. D90208); 야생형 모 HCV-1b 클론[GenBank™ 수탁번호 AF034151(NS5A 코딩 부분만)].

[b]R, IFN 저항성; S, IFN 감응성; R/S, 별도 연구에서 IFN 반응성으로 별개 보고됨. 1b-4에 상응하는 IFN-반응성 표현형에 대해서는 결정되지 않음. 그러나, 공개된 연구에 기초하여(Enomoto et al., 1996; Kurosaki et al., 1997), 우리는 이 서열은 IFN에 감응성이 있는 것으로 예측하였다.

[표 2]

NS5A를 발현하는 세포의 생장 성질

Clone[a]	Doubling time (hrs)[b]	Saturation density (cellsx10^3/cm^2)[b]	Cloning efficiency (%)[c]	Mice with tumors/total[d]	Latency (days)[d]
neo5-10	27.6±0.1	1.6±0.1	0	0/5	-
NS5A 5C6	17.7±0.6	4.0±0.2	14	5/5	17-25
NS5A 4A1	22.4±2.1	3.3±0.1	4	4/5	22-44
P58-20	17.3±1.5	3.7±0.2	15	5/5	12-20

[a]neo5-10 및 P58-20는 - 및 + 조절 세포주를 각각 나타낸다. NS5A 5C6 세포는 NS5A 4A1 세포보다 약 5배 정도 많은 수준으로 NS5A를 발현한다..

[b]세포는 10% 태아 소 혈청(FBS) 및 400㎍/㎖ G418을 포함하는 선택성 DMEM 배지에서 10^5 cells/55㎟ 배양 접시에 접종하였다. 세포는 매 24시간마다 수를 헤아리고, 합류후 4일에 배양물에서 총 세포수를 헤아려 포화 밀도를 측정하였다. 숫자는 4개 실험의 평균을 나타낸 것이다.

[c]5×10^2, 5×10^3, 10^4 세포는 20% FBS가 보충된 0.35% 한천/DMEM 용액에 현탁하고, 10% FBS가 보충된 0.7%한천/DMEM을 포함하는 6-웰 배양 접시에 이중으로 깐다. 클로닝 효과는 14일 후에 결정하고, 이는 도말한 총 세포수에 대해 관찰된 콜로니 수의 비율로 나타낸다. 콜로니는 4개 이상 세포의 별도 덩어리를 말하는 것이다.

[d]4-6 주령의 무흉선 누드 생쥐[*nu/nu* (Charles River)]에 우측 후부 사지에 2×10^6/PBS를 주사하였다. 생쥐는 병원균이 없는 우리에 가두고, 최고 100일간 관찰한다. 잠복기는 3㎜ 종양이 만들어지는 시간(날수)로 정의한다.

[표 3]

NS5A를 발현시키는 세포의 생장 성질

Construct[a]	Sense[b]	Antisense	nt
NS5A 1b-wt 1973-2419	5'TAAGCTTATGGGCT CCGGCTCGTGGCT	5'CAAGCTTGGATCCT TAGGACATTGAGC	6260-7598
NS5A 1973-2208	5'CATATGGGCTCCGG CTCGTGGCTA	5'GTCGACCGCAGACA ACTGGCTAGCTGA	6260-6965
NS5A 2209-2274	5'GAATTCCCTTCCTT GAAGGCAACATGC	5'ATCGGATCCTTATA CCACCTTATTCTCTGA	6966-7165
NS5A 2180-2251	5'CCTTCCATGGCCCA CATTACAGCAGAGACG	5'ATCGGATCCTTATA CCACCTTATTCTCTGA	6877-7094

Construct	Mutagenic Primer[c]	Mutation
NS5A 1b-2 NS5A 1b-5	5'GACTCCCCAGATGTTGACCTCATC	A2224V
NS5A 1b-4	5'TTGTCTGCGCTTTCCTTGAAGGCAGCATGCACT GGCCGTCACGAC	P2209L, T2214A,T2217G

[a]aa 및 nt 위치는 PCR-증폭된 부분에 상응한다. 숫자는 원형 HCV-J 서열 (Kato et al., 1990)에 기초한 것이다.

[b] 밑줄친 서열은 클로닝의 제한효소 부위를 말한다(명세서에서 설명한 것과 같음).

[c] 밑줄친 코돈은 지적한 아미노산 돌연변이를 나타내는 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

인터페론 감응성 결정 부분(ISDR)을 포함하는 바이러스성 단백질의 활성을 저해하는데 효과적인 신규한 항-바이러스성 물질을 스크리닝하는 방법에 있어서,

- PKR 단백질 카이나제, 바이러스성 단백질 및 테스트할 물질을 포함하는 혼합물을 배양하고;

- PKR 단백질 카이나제의 활성을 측정하고; 그리고

- 테스트하는 물질이 없는 경우에 PKR 단백질 카이나제 활성을 비교하는 것으로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 항-바이러스성 물질은 헤파타이티스 C 바이러스성 복제를 저해하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 바이러스성 단백질은 NS5A인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

인터페론 유도된 PKR 단백질 카이나제와 ISDR을 포함하는 바이러스성 단백질의 상호작용을 저해하는데 효과적인 신규한 항-바이러스성 물질을 스크리닝하는 방법에 있어서,

- ISDR 포함하는 단백질, PKR 단백질 카이나제, 테스트할 물질을 포함하는 혼합물을 배양하고;

- ISDR을 포함하는 단백질과 PKR 단백질의 결합을 측정하고; 그리고

- 테스트하는 물질이 없는 경우에 PKR 단백질 카이나제 활성을 비교하는 것으로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 바이러스성 단백질은 NS5A인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 4 항에 있어서, 항-바이러스성 물질은 헤파타이티스 C 바이러스성 복제를 저해하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, PKR 단백질 카이나제 및 ISDR을 포함하는 단백질은 활성화된 PKR 단백질 카이나제 존재하에 리포터 유의 발현을 증가시키도록 유전공학적으로 조작된 이스트 세포에서 발현되고, 테스트 물질의 유무하에서 리포터 유전자의 발현 수준을 측정하는 것으로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 리포터 단백질은 GCN4/β-gal 단백질에 융합된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

항-바이러스 물질을 스크리닝하는데 이용되는 이스트 세포에 있어서,

a) ISDR 부분을 포함하는 폴리펩티드를 발현시키고;

b) 인터페론-유도된 PKR 단백질 카이나제를 발현시키고; 그리고

c)PKR 단백질 카이나제의 활성화에 반응하여 리포터 유전자의 발현이 증가되도록 유전공학적으로 조작되는 것을 특징으로 하는 이스트 세포.

청구항 10

제 9 항에 있어서, ISDR을 포함하는 폴리펩티드는 NS5A인 것을 특징으로 하는 이스트 세포.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 리포터 단백질은 GCN4/β-gal 단백질에 융합된 것을 특징으로 하는 이스트 세포.

청구항 12

HCV에 감염된 세포에서 헤파타이티스 C 바이러스(HCV)의 복제를 저해하는 방법에 있어서, 세포에서 NS5A 및 PKR간에 상호작용을 간섭하는 물질의 효과량을 투여하는 것으로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

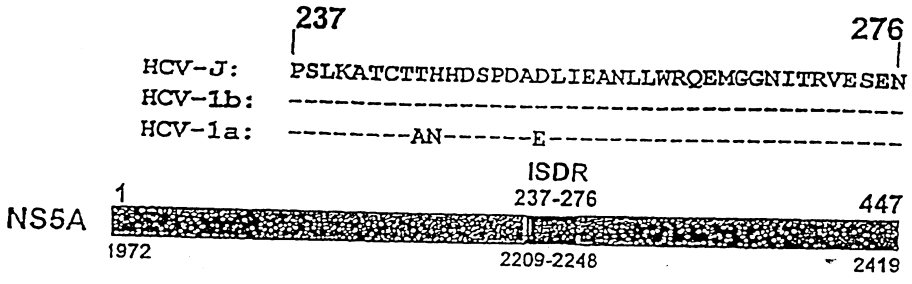
제 12 항에 있어서, 물질은 NS5A의 저해물질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

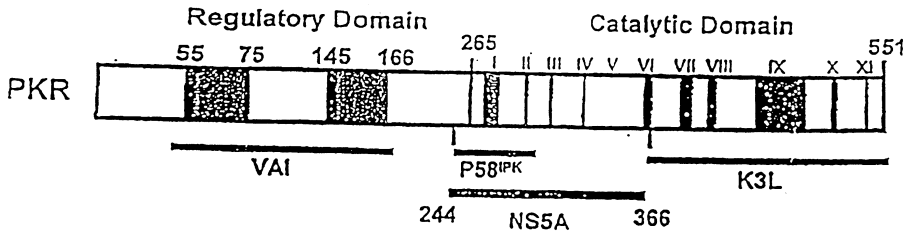
제 12 항에 있어서, 물질은 ISDR에 상보적인 안티센스 분자인 것을 특징으로 하는 방법.

도면

도면1a

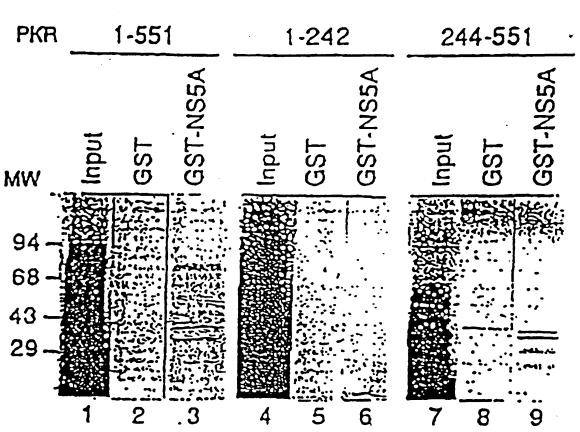


도면1b

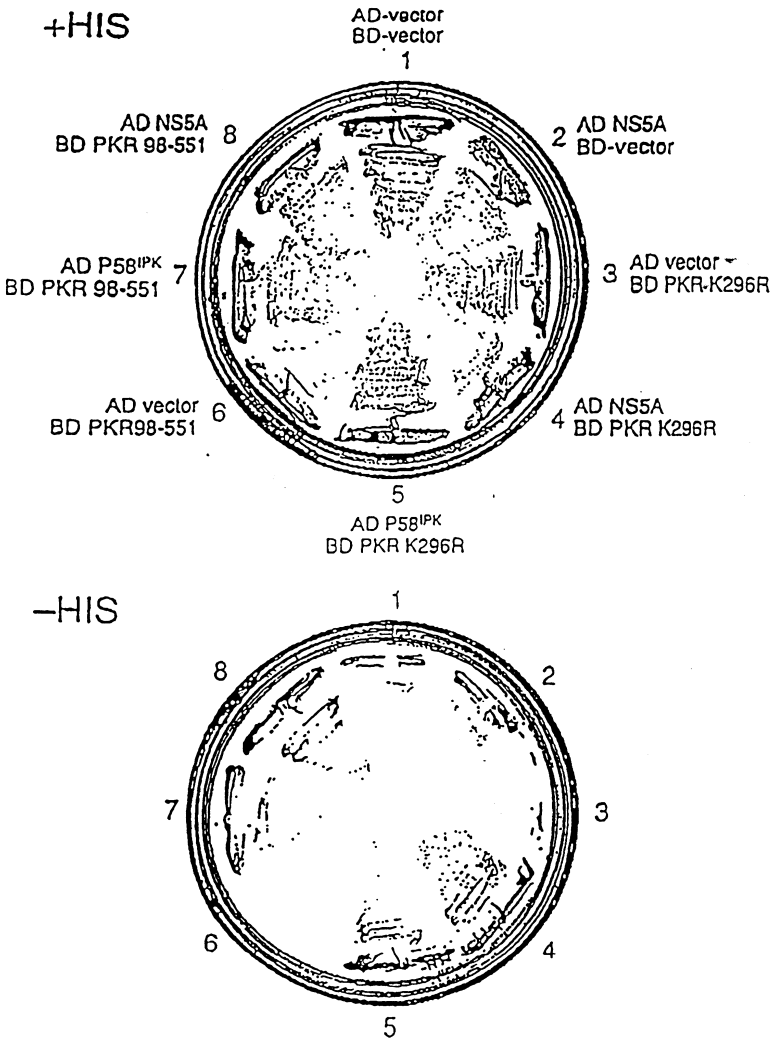


도면2

GST-NS5A Binds the PKR Protein Kinase Catalytic Domain *in Vitro*

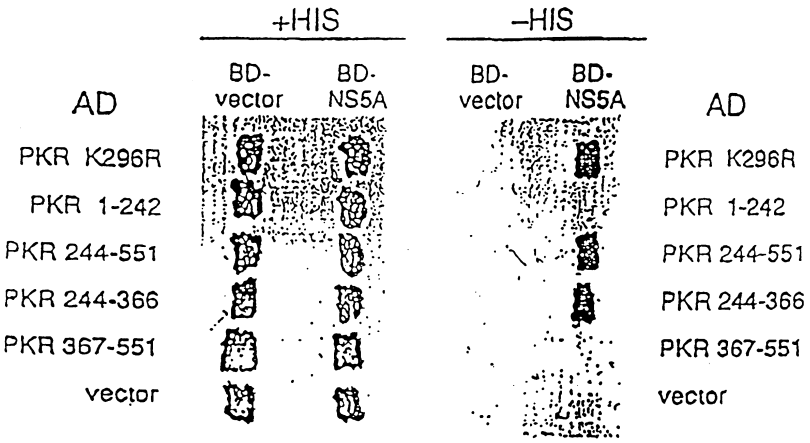


도면3

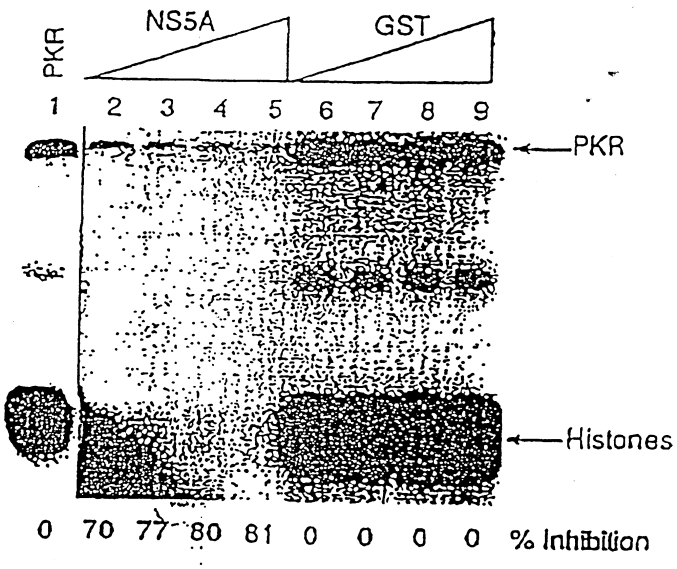


도면4

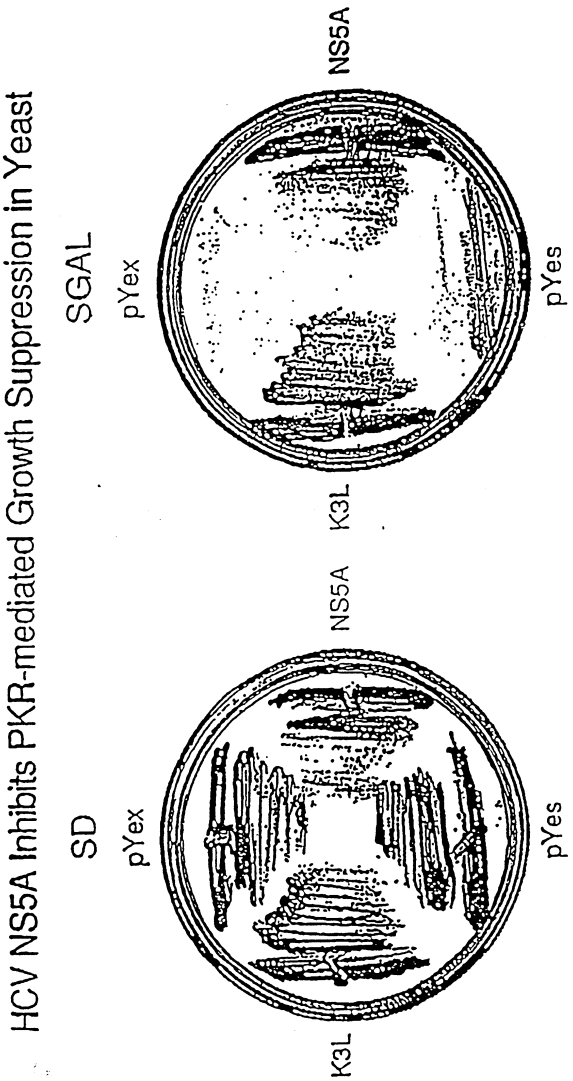
NS5A Interacts with the PKR Protein Kinase Catalytic Domain *in Vivo*



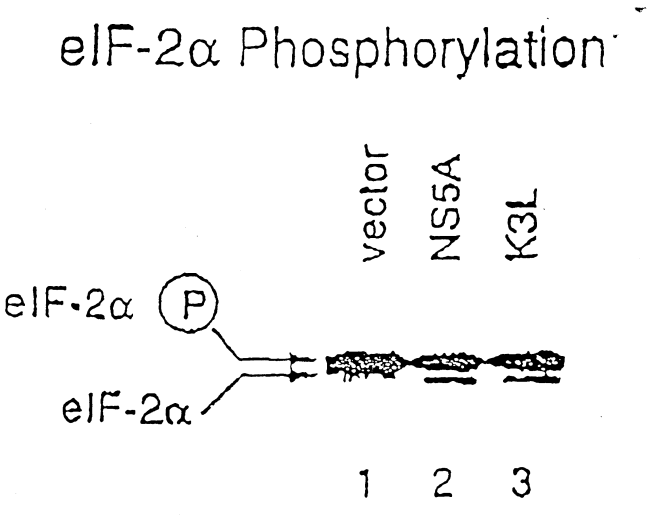
도면5


PKR
NS5A
GST
1 2 3 4 5 6 7 8 9
PKR
Histones
0 70 77 80 81 0 0 0 0 % Inhibition

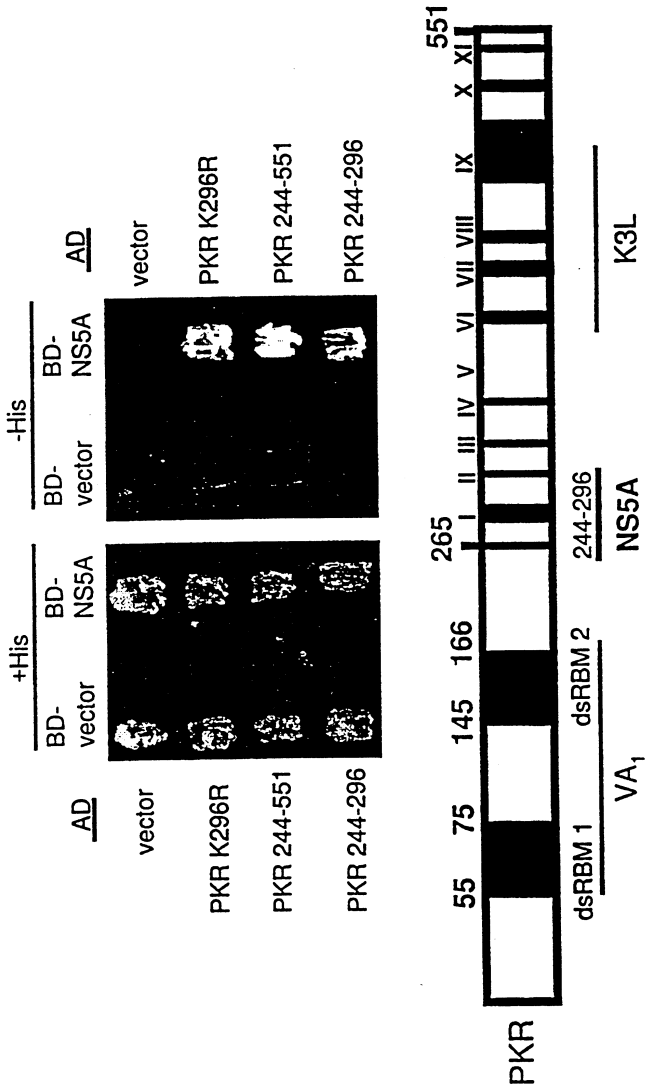
도면6


HCV NS5A Inhibits PKR-mediated Growth Suppression in Yeast
SGAL
SD
pYex
pYes
NS5A
K3L

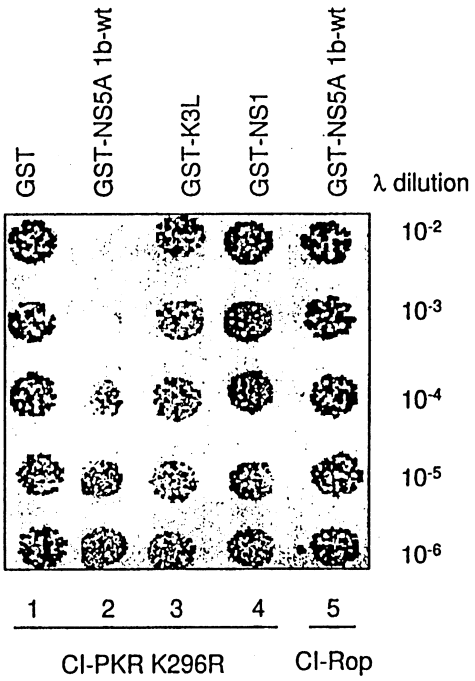
도면7


eIF-2α Phosphorylation
vector
NS5A
K3L
eIF-2α (P)
eIF-2α
1
2
3

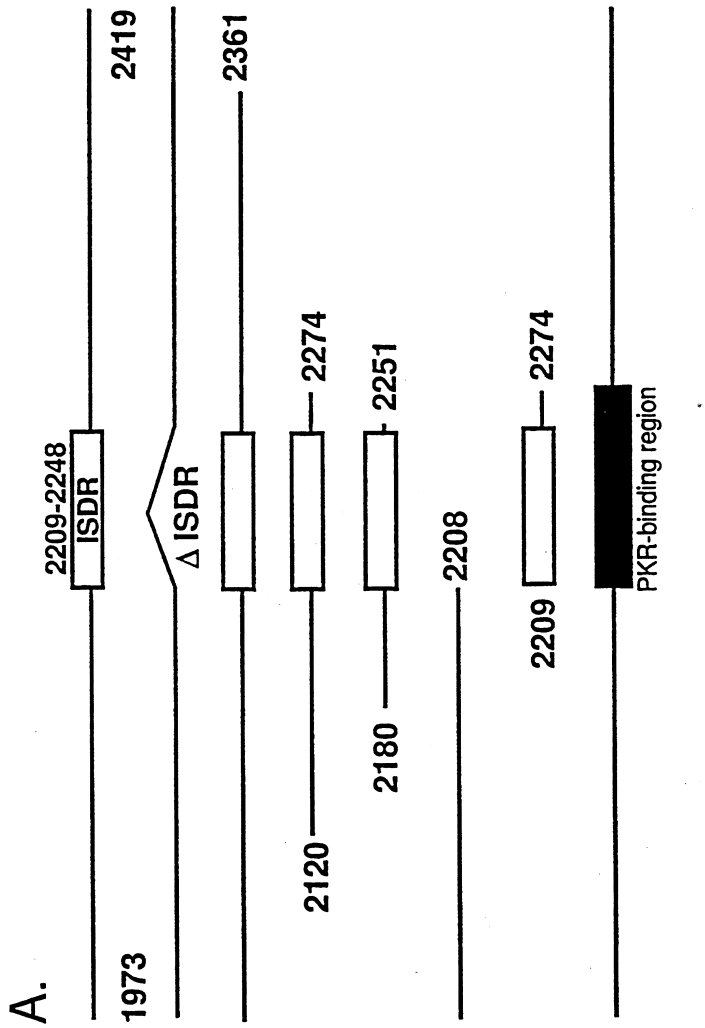
도면8


+His
-His
BD-vector
BD-NS5A
AD
vector
PKR K296R
PKR 244-551
PKR 244-296
PKR
55
75
145
166
265
551
I
II
III
IV
V
VI
VII
VIII
IX
X
XI
dsRBM 1
dsRBM 2
VA1
244-296
NS5A
K3L

도면9


GST
GST-NS5A 1b-wt
GST-K3L
GST-NS1
GST-NS5A 1b-wt
λ dilution
10-2
10-3
10-4
10-5
10-6
1
2
3
4
5
CI-PKR K296R
CI-Rop

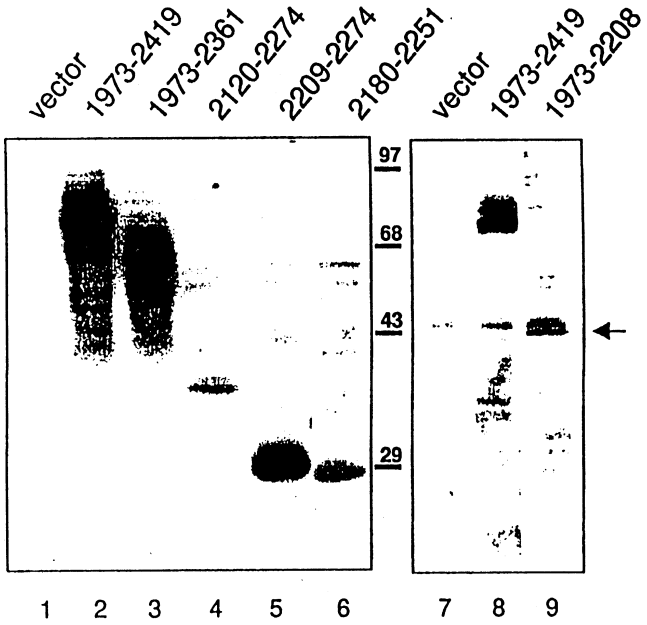
도면10a


A.
1973
2419
2209-2248
ISDR
Δ ISDR
2361
2120
2274
2180
2251
2208
2209
2274
PKR-binding region

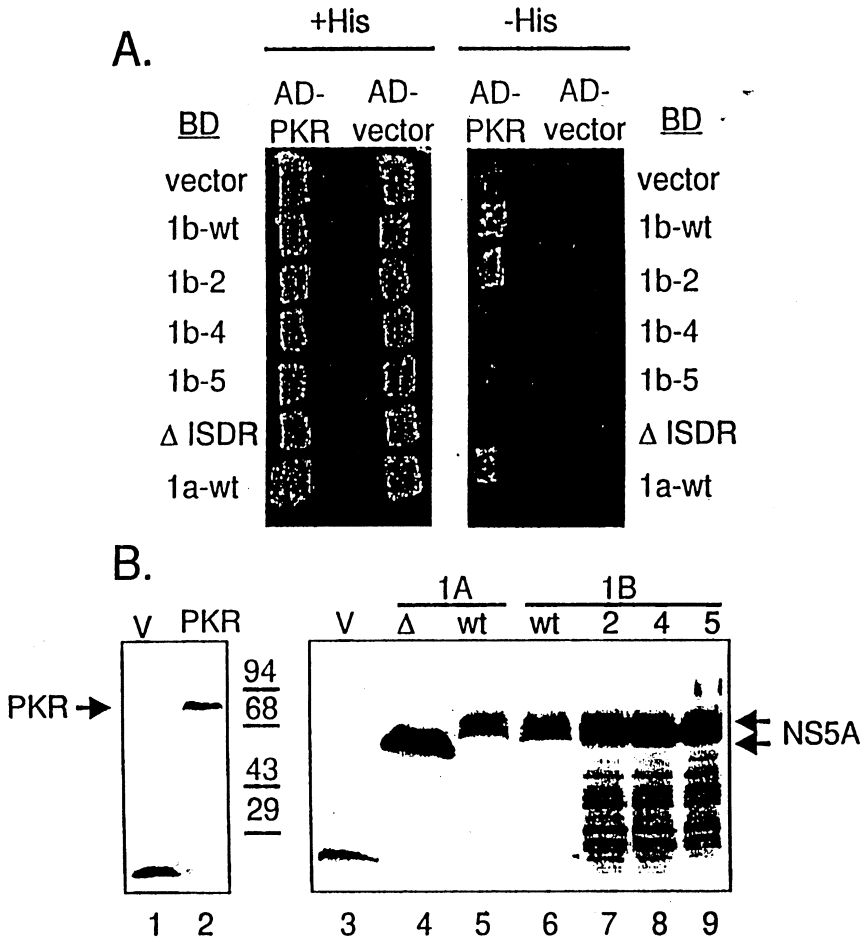
도면10b


2180-2251
2209-2274
1973-2208
2120-2274
1973-2419
1973-2361

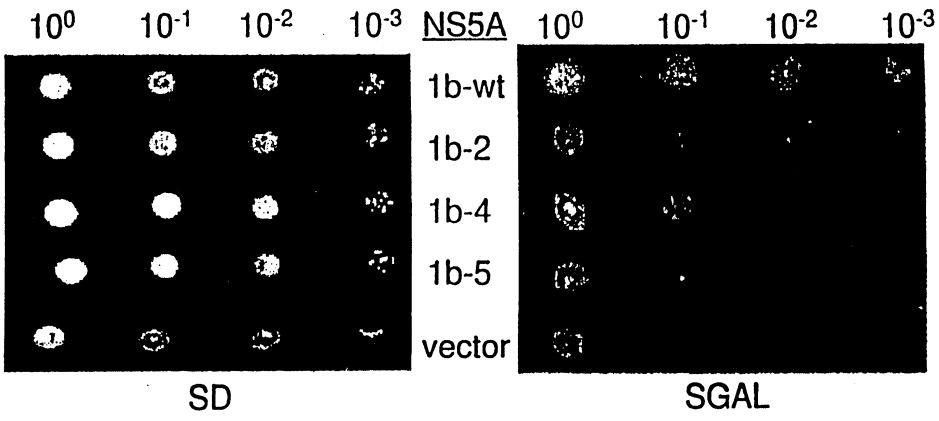
도면10c

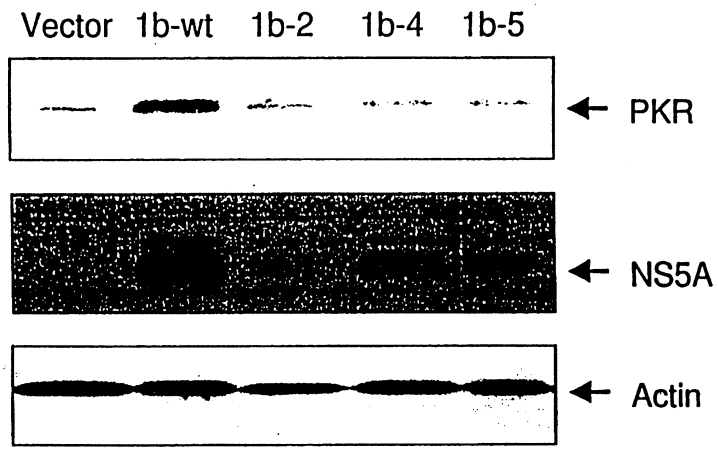

vector
1973-2419
1973-2361
2120-2274
2209-2274
2180-2251
vector
1973-2419
1973-2208
97
68
43
29
1 2 3 4 5 6 7 8 9

도면11

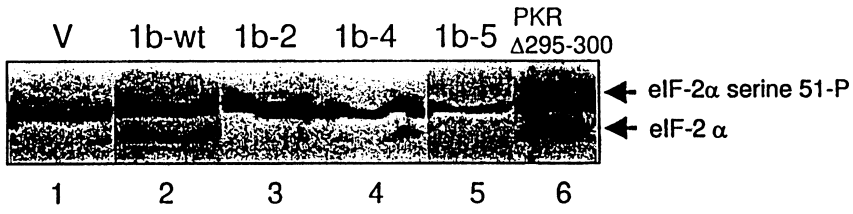

A.
+His
-His
BD
AD-PKR
AD-vector
AD-PKR
AD-vector
BD
vector
1b-wt
1b-2
1b-4
1b-5
Δ ISDR
1a-wt
B.
V
PKR
1A
1B
Δ
wt
wt
2
4
5
PKR
94
68
43
29
NS5A
1 2 3 4 5 6 7 8 9

도면12

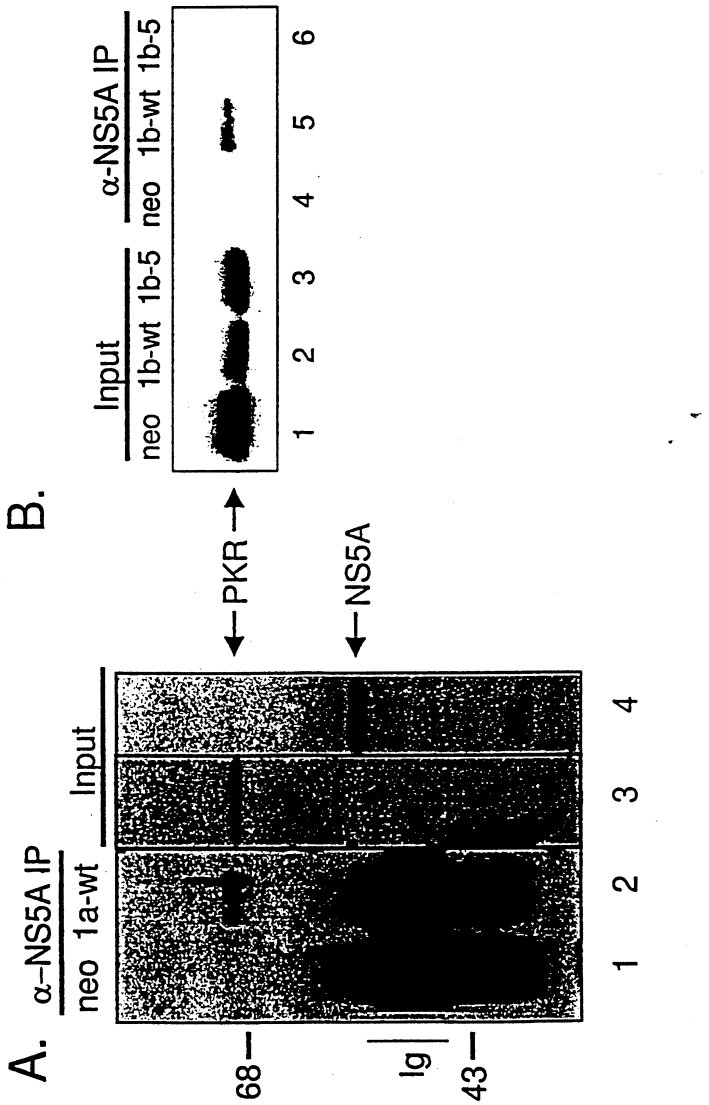

10⁰ 10⁻¹ 10⁻² 10⁻³ NS5A 10⁰ 10⁻¹ 10⁻² 10⁻³
1b-wt
1b-2
1b-4
1b-5
vector
SD
SGAL


Vector 1b-wt 1b-2 1b-4 1b-5
PKR
NS5A
Actin

도면13


V 1b-wt 1b-2 1b-4 1b-5 PKR Δ295-300
eIF-2α serine 51-P
eIF-2 α
1 2 3 4 5 6

도면14


A.
α-NS5A IP
neo
1a-wt
Input
68
Ig
43
1
2
3
4
B.
Input
neo
1b-wt
1b-5
α-NS5A IP
neo
1b-wt
1b-5
1
2
3
4
5
6
PKR
NS5A

도면15

