

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2015-0115172 (43) 공개일자 2015년10월14일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 48/00 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)	(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)	(72) 발명자 황순봉 경기도 안양시 동안구 귀인로 237, 210동 1703호 (대림아파트) 박은미 경기도 군포시 산본로198번길 34, 201호 (당동)
(21) 출원번호 10-2014-0039766 (22) 출원일자 2014년04월03일 심사청구일자 2014년04월03일	(74) 대리인 강성혜	

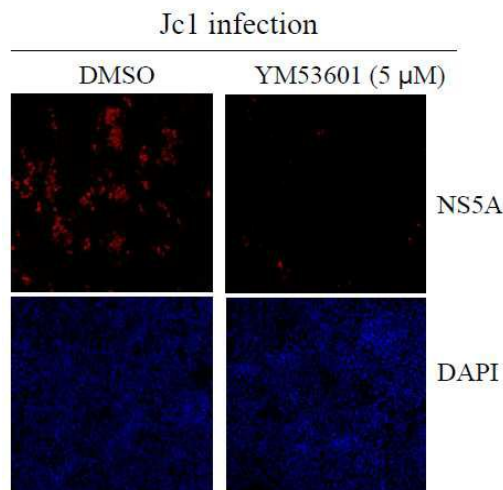
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 F D F T 1 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물

(57) 요약

C형 간염 바이러스 증식에 중요한 역할을 수행하는 지방 대사 및 지방 소체 형성에 관여하는 새로운 유전자를 확인하기 위하여 HCVcc 감염 세포를 이용하여 siRNA 라이브러리를 스크린하여 FDFT1 (farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1)을 암호화한 유전자를 선택하고 특성을 규명하였다. siRNA 매개 FDFT1 녹다운은 서브게놈 레플리콘과 HCVcc 감염 세포에서 모두 HCV 복제를 저해하였다. 뿐만 아니라, FDFT1 효소 활성 저해제인 YM-53601은 HCV 증식을 멈추게 하였다. HCV 감염은 FDFT1 단백질 수준을 증가시켰지만, FDFT1 mRNA 수준은 증가시키지 않았다. 이러한 결과들은 HCV가 그 자신의 증식을 용이하게 하기 위하여 FDFT1 단백질을 조절한다는 것을 암시한다.

대표도 - 도3d



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2008-2004100

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 도약연구사업

연구과제명 C형 간염바이러스의 복제 및 신호전달 조절 타겟을 이용한 제어기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2013.07.01 ~ 2014.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

FDFT1 (farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1) 발현 또는 활성 저해제를 포함하는 C형 간염 예방 및 치료용 억제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 FDFT1 발현 저해제는 FDFT1 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, shRNA (short hairpin RNA) 및 siRNA (short interfering RNA)로 구성된 군 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 억제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 siRNA는 서열번호 제1~4번임을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 억제학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 FDFT1 활성 저해제는 FDFT1 단백질에 결합하는 항 FDFT1 항체임을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 억제학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 FDFT1 활성 저해제는 YM-53601임을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 억제학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 C형 간염 예방 및 치료용 억제학적 조성물에 관한 것으로서, 좀더 자세히는 FDFT1 (Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1) 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

C형 간염 바이러스 감염은 종종 만성 감염, 간경화 및 간암 (hepatocellular carcinoma; HCC)을 일으킨다 [1]. C형 바이러스 감염은 세계적으로 1억 7천만 명이 감염 상태인 질병으로 중요한 보건의 문제로 인식되고 있다 [2]. HCV (Hepatitis C virus)는 플라비비리데 (Flaviviridae) 과, 헤파시바이러스 (Hepacivirus) 속에 속하며 양성-센스 RNA를 껍질로 싸고 있는 형태의 바이러스이다 [3]. HCV는 7개의 유전자 형태로 분류되며 다양한 아류형이 존재한다. HCV는 막 (envelope)이 있고 그 안에 9.6kb의 게놈이 선형이며 한 가닥 RNA 형태로 존재한다. HCV 게놈은 3,000 아미노산 이상의 긴 폴리프로테인 전구체를 코딩한다. 게놈은 5' 말단과 [Brown E.A. et al., *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 5041-5045; Chen P.J. et al., *Virology* 1992; 188: 102-113] 3' 말단에

[Kolykhalov A.A. et al., *J Virol* 1996; 70: 3363-3371; Tanaka T. et al., *J Virol* 1996; 70: 3307-3312] 비해독 부위 (Untranslated regions; UTRs)를 가지고 있고 3010개의 아미노산으로 이루어진 폴리프로틴 전구체를 코딩하며, 이 폴리프로틴 전구체는 10 개의 성숙한 단백질로 프로세싱된다. N-말단에 존재하는 코어단백질과 외피단백질 (E1, E2 및 p7)은 구조단백질들로 숙주세포의 시그널 절단효소에 의해 절단된다 [Hijikata M. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5547-5551; Matsuura Y. et al., *Virology* 1994; 205: 141-150; Lin C. et al., *J Virol* 1994; 68: 5063-5073]. 나머지 (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A 및 NS5B)들은 세린 프로테아제, RNA 헬리케이스 및 RNA-의존적 RNA 폴리머레이즈를 포함하여 다양한 효소활성을 가지는 비구조 단백질들로서, 바이러스의 단백질 분해효소에 의해 프로세싱된다 [Grakoui A. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10583-10587; Bartenschlager R. et al., *J Virol* 1993; 67: 3835-3844; Tomei L. et al., *J Virol* 1993; 67: 4017-4026] [4].

[0003]

HCV 감염은 종종 지방간을 동반하는데, 간세포에 지방 소체가 축적되는 것은 HCV 감염의 뚜렷한 특징이다. 유전자형 3으로 감염된 환자의 70% 이상, 그리고 다른 유전자형으로 감염된 환자의 50%가 합병증으로서 지방간을 동반한다 [5]. 세포의 지방은 HCV 조합, 방출 및 감염성에 기여하여 HCV 생애주기에서 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다 [6]. 뿐만 아니라, HCV는 비리온 조합과 방출을 증대하기 위하여 숙주세포 지방대사를 변조한다 [7-9]. 콜레스테롤은 트리글리세라이드와 함께 지방 소체와 리포단백질의 주요 구성요소이다 [10, 11]. 콜레스테롤 생합성은 웨스트 나일 바이러스, 일본 뇌염 바이러스 및 뎅기바이러스를 포함하는 플라비바이러스의 생애주기에서 중요하다 [12-14]. HCV 생애주기는 콜레스테롤 대사와 관련되어 있다 [15-17].

[0004]

FDFT1 (Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1)은 47 kDa의 막 관련 효소 [18-20]이고, 메발로네이트로부터 생산된 중간생성물을 비-스테롤 경로 또는 콜레스테롤 합성경로로 보내는데 결정적인 역할을 수행한다. FDFT1은 FPP (farnesyl diphosphate) 두 분자를 한 분자의 스쿠알렌으로 전환하는 두 단계의 반응에 촉매작용을 한다. 첫 번째 단계에서 한 분자의 무기 이인산 (inorganic diphosphate; PPi)과 하나의 양성자가 파네실 파이로포스페이트에서 제거되어 탄소 양이온 (carbocation)을 생성한다. 그런 다음 탄소 양이온과 인접한 파네실 파이로포스페이트 간의 이중결합 연결로 프리스쿠알렌 (presqualene)이 생성된다. 두 번째 단계에서 프리스쿠알렌으로부터 두 번째 ppi가 제거되고 NADPH에 의한 환원반응 이후 헤드-투-헤드 결합 (head-to-head linking)에 의해 스쿠알렌이 생성된다 [21-23]. FDFT1은 플라비비리데 (*Flaviviridae*) 패밀리의 몇몇 바이러스의 증식에 관여한다. FDFT1 저해제인 자라고직산 A (Zaragozic acid A)는 뎅기바이러스 복제를 저해할 수 있다 [14]. HCV 감염된 간에서 콜레스테롤 대사 관련 유전자들이 변경되었다는 보고도 있었다 [24, 25]. 그러나, FDFT1에 의해 활성화된 콜레스테롤 합성경로가 HCV 증식을 조절할 수 있는지는 알려져 있지 않다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005]

(비특허문헌 0001) [1] Choo,Q., Kuo,G., Weiner,A., Overby,L., Bradley,D.W., and Houghton,M.(1989) Isolation of a cDNA clone derived form a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 224, 359-362.

(비특허문헌 0002) [2] Mohd Hanafian, K., Groeger, J., Flaxman, A.D., and Wiersma, S.T. (2013) Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to hepatitis C virus seroprevalence. *Hepatology* 57, 1333-1342.

(비특허문헌 0003) [3] Moradpour, D., Penin, F., and Rice, C.M. (2007) Replication of hepatitis C virus. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 453-463.

(비특허문헌 0004) [4] Lindenbach,B.D.andRice,C.M.(2005) Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 436, 933-938.

(비특허문헌 0005) [5] Hui, J.M., Kench, J., Farrell, G.C., Lin, R., Aamarasinghe, D., Liddle, C., Byth, K., and Geroje, J. (2002) Genotype-specific mechanism for hepatic steatosis in chronic hepatitis C infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 17, 873-881.

(비특허문헌 0006) [6] Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2007) The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell. Biol.* 9, 1089-1097.

- (비특허문헌 0007) [7] Syed, G.H., Amako, Y., and Siddiqui, A. (2010) Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 33-40.
- (비특허문헌 0008) [8] Alvisi, G., Madan, V., and Bartenschlager, R. (2011) Hepatitis C virus and host cell lipids: An intimate connection. *RNA Biol.* 8, 258-269.
- (비특허문헌 0009) [9] Herker, E. and Ott, M. (2011) Uniquetitiesbetween hepatitisCvirusreplicationand intracellular lipids. *Trends Endocrinol. Metab.* 22, 241-248.
- (비특허문헌 0010) [10] Ikonen, E. (2008) Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9, 125-138
- (비특허문헌 0011) [11] Farese, R.V. Jr. and Walther, T.C. (2009) Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 139, 855-860.
- (비특허문헌 0012) [12] Mackenzie, J.M., Khromykh, A.A., and Parton, R.G. (2007) Cholesterol manipulation by West Nile virus perturbs the cellular immune response. *Cell Host & Microbe* 2, 229-239.
- (비특허문헌 0013) [13] Das, S., Chakraborty, S., and Basu, A. (2010) Critical role of lipid rafts in virus entry and activation of phosphoinositide 3'kinase/Akt signaling during early stages of Japanese encephalitis virus infection in neural stem/progenitor cells. *J. Neurochem.* 115, 537-549.
- (비특허문헌 0014) [14] Rothwell, C., Lebreton, A., Young, Ng.C., Lim, J.Y., Liu, W., Vasudevan, S., Labow, M., Gu, F., and Gaither, L.A. (2009) Cholesterol biosynthesis modulation regulates dengue viral replication. *Virology* 389, 8-19.
- (비특허문헌 0015) [15] Bassendine, M.F., Sheridan, D.A., Bridge, S.H., Felmlee, D.J., and Neely, R.D. (2013) Lipids and HCV. *Semin. Immunopathol.* 35, 87-100.
- (비특허문헌 0016) [16] Honda, A. and Matsuzaki, Y. (2011) Cholesterol and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatol. Res.* 41, 697-710.
- (비특허문헌 0017) [17] Aizaki, H., Morikawa, K., Fukasawa, M., Hara, H., Inoue, Y., Tani, H., Saito, K., Nishijima, M., Hanada, K., Matsuura, Y., Lai, M.M., Miyamura, T., Wakita, T., and Suzuki, T. (2008) Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 82, 5715-5724.
- (비특허문헌 0018) [18] Inoue, T., Osumi, T., and Hata, S. (1995) Molecular cloning and functional expression of a cDNA for mouse squalene synthase. *J. Biochem.* 108, 344-346.
- (비특허문헌 0019) [19] McKenzie, T.L., Jiang, G., Straubhaar, J.R., Conrad, D.G., and Shechter, I. (1992) Molecular cloning, expression, and characterization of the cDNA for the rat hepatic squalene synthase. *J. Biol. Chem.* 267, 21368-21374.
- (비특허문헌 0020) [20] Pandit, J., Danley, D.E., Schulte, G.K., Mazzalupo, S., Pauly, T.A., Hayward, C.M., Hamanaka, E.S., Thompson, J.F., and Harwood, H.J. Jr. (2000) Crystal structure of human squalene synthase. A key enzyme in cholesterol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 275, 30610-30617.
- (비특허문헌 0021) [21] Poulter, C.D. (1990) Biosynthesis of non-head-to-tail terpenes. Formation of 1'-1 and 1'-3 linkages. *Acc. Chem. Res.* 23, 70-77.
- (비특허문헌 0022) [22] Radisky, E.S. and Poulter, C.D. (2000) Squalene synthase: steady-state, pre-steady-state, and isotope-trapping studies. *Biochemistry* 39, 1748-1760.
- (비특허문헌 0023) [23] Jarstfer, M.B., Zhang, D.L., and Poulter, C.D. (2002) Recombinant squalene synthase. Synthesis of non-head-to-tail isoprenoids in the absence of NADPH. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 8834-8845.
- (비특허문헌 0024) [24] Fujino, T., Nakamuta, M., Yada, R., Aoyago, Y., Yasutake, K., Kohjima, M., Fukui, K., Yoshimoto, T., Harada, N., Yada, M., Kato, M., Kotoh, K., Taketomi, A., Maehara, Y.,

Nakashma, M., and Enjoji, M. (2010) Expression profile of lipid metabolism-associated genes in hepatitis C virus-infected human liver. *Hepatol. Res.*40, 923-929.

(비특허문헌 0025) [25] Nakamuta, M., Yada, R., Fujino, T., Yada, M., Higuchi, N., Tanaka, M., Miyazaki, M., Kohjima, M., Kato, M., Yoshimoto, T., Harada, N., Taketomi, A., Maehara, Y., Koga, M., Nishinakagawa, T., Nakashma, M., Kotoh, K., and Enjoji, M. (2009) Changes in the expression of cholesterol metabolism-associated genes in HCV-infected liver: A novel target for therapy. *Int. J. Mol. Med.*24, 825-828.

(비특허문헌 0026) [26] Ngo, T.H., Pham, L.V., Kim, J.W., Lim, Y.S., and Hwang, S.B. (2013) Modulation of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3 by hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 87, 5718-5731.

(비특허문헌 0027) [27] Kato, T., Date, T., Murayama, A., Morikawa, K., Akazawa, D., and Wakita, T. (2006) Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nat. Protoc.*1, 2334-2339.

(비특허문헌 0028) [28] Jiang, J. and Luo, G. (2009) Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *J. Virol.* 83, 12680-12691.

(비특허문헌 0029) [29] Singh, N. N. and Ramji, D. P. (2006) Transforming growth factor-beta-induced expression of the apolipoprotein E gene requires c-Jun N-terminal kinase, p38 kinase, and casein kinase 2. *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.* 26:1323-1329.

(비특허문헌 0030) [30] Ye, J., Wang, C., Sumpter, R. Jr, Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Gale, M. Jr. (2003) Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 15865-15870.

발명의 내용

해결하려는 과제

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

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명자들은 siRNA 매개 FDFT1 발현 knockdown이 HCV 증식을 손상시킴을 밝혔고, 뿐만 아니라 HCV 감염 세포에서 YM-53601이 HCV 증식을 저해함을 밝혔다.

[0008] 세포 지방대사와 콜레스테롤 생합성은 HCV의 조합, 방출 및 감염성에 기여하여 HCV 생애주기에서 중요한 역할을 수행한다 [8]. HCV 복제에 관여하는 지방 대사를 조절하는 주요 유전자를 알아보기 위하여 본 발명자들은 숙주 지방 대사의 주요 단계에 관여하는 단백질을 선택적으로 knockdown하는 siRNA들을 이용하였다. FDFT1을 목표로 하는 siRNA들은 Jc1 감염 세포에서 HCV 복제를 저해하는 것으로 밝혀졌다. FDFT1은 콜레스테롤 생합성 경로에서 결정적인 역할을 수행하는 효소이다. FDFT1은 비-스테롤 (non-sterol) 경로 또는 스테롤 합성경로에 파네실 이인산 (farnesyl diphosphate)을 보낸다. 활성화된 FDFT1은 파네실 이인산을 스쿠알렌으로 전환하는 반응에 촉매 작용을 함으로써 콜레스테롤 생합성을 용이하게 한다 [21-23]. 콜레스테롤 생합성 경로가 웨스트 나일 바이러스, 일본 뇌염 바이러스 (Japanese encephalitis virus) 및 뎅기바이러스 (denguevirus)를 포함하는 플라비바이러스 (*Flavivirus*)의 생애주기에 필요하다는 것이 보고된바 있다 [12-14]. HCV 증식에서 콜레스테롤 대사의 연관성 또한 보고된바 있다 [16,17]. HCV 복제는 숙주 단백질의 제라닐제라닐화 (geranylgeranylation)를 필요로 한다. HMG CoA 환원효소 저해제인 로바스타틴 (lovastatin) 처리에 의한 HCV 복제 교란은 파네솔 (farnesol)이 아닌 제라닐제라니올 (geranylgeraniol)을 외부로부터 보충하면 만회된다 [30]. 그러나, HCV 증식에서 콜레스테롤 대사의 자세한 메커니즘은 명확하게 알려져 있지 않은 상태이다.

[0009] 본 발명자들은 siRNA 매개 FDFT1 knockdown이 세포 내 HCV RNA 및 단백질 발현 수준을 현저히 감소시킴을 밝혔고, 뿐만 아니라, FDFT1 knockdown 세포에서 HCV 감염성이 현저히 감소함을 밝혔다. 이러한 결과들은 FDFT1이 HCV 증식에 필요함을 말해준다. HCV 증식에 FDFT1이 관여함을 좀 더 입증하기 위하여 본 발명자들은 FDFT1 효소 특이적

저해제인 YM-53601의 HCV 증식에 대한 효과를 시험하였다. 그 결과, FDFT1 저해제는 HCV 감염 세포에서 1 μ M 농도로 HCV 복제를 효과적으로 저해하였다. HCV의 감염성 또한 FDFT1 저해제 처리로 현저히 감소하였다. HCV 복제에 대한 YM-53601의 저해 활성은 면역형광분석법으로 더 입증되었다.

[0010] FDFT1이 HCV 생애주기의 바이러스 도입 단계에 관여하는지를 알아보기 위하여, Huh7.5 세포를 인 비트로-전사된 Jc1 RNA로 전기천공하고 YM-53601로 처리하였다. HCV RNA로 전기천공한 Huh7.5 세포에 YM-53601 처리는 세포 내 HCV RNA 수준, 단백질 발현 수준 및 HCV 감염성을 현저히 감소시켰다. 이 결과는 루시퍼레이즈 분석으로 확인하였다. 본 발명자들은 JFH1-luc RNA로 전기천공한 Huh7.5 세포에서 YM-53601 처리가 HCV 증식을 현저히 감소 시킴을 밝혔다. 또한, 본 발명자들은 FDFT1 녹다운이 서브게놈 레플리콘 세포에서 HCV RNA 수준을 현저히 감소 시킴도 밝혔다. HCV 서브게놈 레플리콘이 세포를 감염시키거나 또는 세포에서 조합된 수 없기 때문에, 이 데이터들은 FDFT1이 HCV 생애주기에서 복제 단계에 관여하는 숙주세포 인자임을 말해준다.

[0011] 본 발명자들은 또한 HCV 감염 세포에서 FDFT1 발현 수준이 증가함을 밝혔다. 두드러진 것은 FDFT1 mRNA 수준이 HCV 감염에 의하여 현저히 변화하지 않는다는 점이다. 이 데이터들은 HCV 감염이 FDFT1 단백질 수준을 안정화하여 그 자신의 증식을 용이하게 함을 말해준다. 종합하면, 이 데이터들은 HCV 증식을 위한 숙주세포 인자로서 FDFT1의 결정적인 역할을 말해주며, 따라서, FDFT1 저해제는 HCV 치료제로 이용할 수 있을 것이다.

[0012] 본 발명은 FDFT1 (Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1) 발현 또는 활성 저해제를 포함하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 FDFT1 발현 저해제가 FDFT1 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, shRNA (short hairpin RNA) 및 siRNA (short interfering RNA)로 구성된 군 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 siRNA가 서열번호 제1~4번임을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 그러나, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 서열번호 1, 2, 3, 4번 외에도 FDFT1을 타겟으로 하는 siRNA를 제조하는 것은 용이하므로, 상기 서열번호 1, 2, 3, 4번에만 한정되는 것이 아님은 자명하다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 FDFT1 활성 저해제가 FDFT1 단백질에 결합하는 항 FDFT1 항체임을 특징으로 하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0016] 본 발명의 FDFT1 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 C형 간염 예방 및 치료용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 유효성분을 0.0001 내지 50 중량%로 포함한다.

[0017] 본 발명의 조성물은 상기 FDFT1 단백질의 발현 또는 활성 억제제에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은 임상 투여시 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

[0018] 본 발명에 있어서, FDFT1에 대한 억제제는 상기 유전자의 mRNA에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.

[0019] 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 생체 내뿐만 아니라 생체 외에서도 유전자-특이적 억제를 달성하기 위해 성공적으로 사용되어 왔다. 안티센스 뉴클레오타이드는 특정 DNA 또는 RNA 타겟에 대해 안티센스(또는 상보)인 짧은 길이의 DNA 합성 가닥(또는 DNA 아날로그)이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 타겟에 결합하고 전사, 번역 또는 스플라이싱의 단계에서 발현을 멈추게 함으로써 DNA 또는 RNA 타겟에 의해 인코딩된 단백질의 발현을 막기 위해 제안되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 세포 배양 및 질병의 동물 모델에서도 성공적으로 이용되어 왔다(Hogrefe, 1999). 올리고뉴클레오타이드가 분해되지 않도록 더욱 안정하고 저항적이 되게 하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 또 다른 변형이 당업자에게 알려져 있고 이해된다. 여기서 사용된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 이중나선 또는 단일나선 DNA, 이중나선 또는 단일나선 RNA, DNA/RNA 하이브리드, DNA 및 RNA 아날로그 및 염기, 당 또는 백본(backbone) 변형을 지닌 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 올리고뉴클레오타이드는 안정성을 증가시키고 뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 증가시키기 위해 본 발명이 속하는 기술분야에 알려진 방법에 의해 변형된다. 이들 변형은 본 발명 분야에 알려져 있는 올리고뉴클레오타이드 백본의 변형, 당

부분의 변형 또는 염기의 변형을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다.

- [0020] 또한, FDFT1에 대한 억제제는 상기 유전자의 siRNA(Small Interfering RNA)일 수 있다.
- [0021] 즉, 상기 siRNA의 염기서열은 FDFT1 유전자(mRNA)의 염기서열 중 연속된 19~23개의 연속된 염기서열일 수 있다.
- [0022] 상기 siRNA의 서열은 편의상 정방향 서열(sense strand)을 나타낸 것으로, 실제 유전자 억제효과를 나타내는 역방향 서열(antisense strand)과 함께 이중리보핵산쇄를 구성하게 된다.
- [0023] siRNA는 세포 배양 및 생체 내에서 오래 지속되는 효과, 생체 내에서 세포를 트랜스펙션시키는 능력 및 혈청 내 분해에 대한 저항력의 측면에서 생체 내에서 특정한 유전자의 발현의 저해에 대해 매우 강한 약물이 되는 잠재력을 지닌다(Bertrand et al., 2002). siRNA의 전달 및 siRNA를 포함한 발현 컨스트럭트/벡터는 당업자에게 알려져 있다. 예를 들어, 미국 출원 제2004/106567 및 2004/0086884는 바이러스성 벡터, 비바이러스성 벡터, 리포솜 전달 운반체, 플라스미드 주입 시스템, 인공 바이러스 엔벨로프 및 폴리라이신 컨쥬게이트를 포함한 전달 메커니즘뿐만 아니라 많은 발현 컨스트럭트/벡터를 제공하고 있다.
- [0024] siRNA는 상대적으로 낮은 농도로도 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의해 얻을 수 있는 효과와 동등하거나 높은 효과를 얻을 수 있기 때문에 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 대안으로 제시되고 있다(Thompson, 2002). siRNA의 이용은 질병의 동물 모델에 있어서 유전자 발현을 저해하는 데 대중성을 나타내고 있다. 당업자는 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 원하는 방식대로 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 siRNA를 합성하고 변형시킬 수 있다(Andreas Henschel, Frank Buchholz1 and Bianca Habermann (2004) DEQOR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs. Nucleic Acids Research 32(Web Server Issue):W113-W120 참조). 또한 당업자는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA를 지닌 발현 컨스트럭트/벡터에 유용한 조절 서열(예컨대, 구성적 프로모터, 유도성 프로모터, 조직-특이적 프로모터 또는 그의 결합)을 잘 이해하고 있다.
- [0025] C형 간염 치료를 위해 사용되는 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA는 약제학적으로 허용되는 담체를 추가적으로 포함한 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 예를 들어 하나 이상의 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 텍스트린, 글리세롤, 에탄올뿐만 아니라 이들의 조합을 포함한다. 이러한 조성물은 투여 후 활성 성분의 빠른 방출, 또는 지속적이거나 지연된 방출을 제공하도록 제제화될 수 있다.
- [0026] 상기 FDFT1 유전자의 저해제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA 외에도 상기 유전자의 발현을 억제하는 물질이면 어떤 것이든 가능하다. 따라서 종래 당해 기술 분야에서 상기 유전자의 저해제로 알려진 화합물 또한 이용 가능하다.
- [0027] 본 발명은 또한 FDFT1 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 억제제를 포함하는 C형 간염 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명의 유전자를 억제하면 그에 따른 단백질의 발현이 억제되어 HCV 증식이 억제되는 것이므로, 상기 유전자의 단백질을 저해하면 HCV 증식을 억제할 수 있다.
- [0028] 따라서 본 발명은 상기 단백질에 대한 억제제의 C형 간염 치료 용도를 제공한다. 본 발명에 있어서 C형 간염 치료는 C형 간염의 예방 및 억제를 포함한다.
- [0029] 상기 단백질에 대한 억제제는 본 발명의 유전자로부터 발현된 FDFT1 단백질에 대한 항체일 수 있다. 상기 단백질에 대한 단일클론 항체는 당업계에 통상적인 단일클론 항체 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있고, 시판되는 것을 사용할 수 있다. 또한, 단일클론 항체 대신에 상기 단백질을 인식하는 폴리클론 항체를 사용할 수도 있고 이는 당업계에 통상적인 항혈청 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있다.
- [0030] 본 발명의 C형 간염 치료용 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용되는 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 단백질에 대한 억제제가 항체일 경우 약제학적으로 허용되는 담체는 결합 단백질의 저장 수명 또는 유효성을 증가시키는 습윤제 또는 유화제, 방부제 또는 완충액과 같은 최소량의 보조 물질로 구성될 수 있다.
- [0031] 또한 본 발명의 C형 간염 치료용 조성물은 하나 또는 그 이상의 C형 간염 치료제와 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 C형 간염 치료용 조성물은 당업자에게 잘 알려진 화학요법약제(chemotherapeutic agent)를 추가로 포함할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 C형 간염 치료용 조성물은 상기 유효 성분 외에도 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 포함할 수 있으며, 이러한 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택

제 또는 가용화제 등이 있다.

- [0033] 또한 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용되는 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0034] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 C형 간염 예방 및 치료용 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 죽, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 C형 간염 예방 및 치료용 조성물은 정맥 내, 동맥 내, 복강 내, 근육 내, 동맥 내, 복강 내, 흉골 내, 경피, 비측 내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구 내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 치료 방법에 있어서, "유효량"은 C형 간염을 억제하는 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 본 발명의 유효 성분의 "유효량"은 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 성인의 경우, 상기 유전자 또는 단백질의 억제제를 1일 1회 내지 수회 투여시, siRNA일 경우 0.01ng/kg~10mg/kg, 상기 유전자의 mRNA에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 경우 0.01ng/kg~10mg/kg, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10mg/kg, 상기 단백질에 대한 단일클론 항체일 경우 0.1ng/kg~10mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 FDFT1 유전자는 알려진 염기서열 중 하나 이상의 염기가 결실, 치환 또는 삽입된 염기서열일 수 있다.
- [0039] 상기 FDFT1 유전자의 siRNA 서열은 예시일 뿐 이에 한정되는 것이 아님은 당업자에게 자명하다. 상기 서열들에 대해 실질적인 서열 동일성 또는 실질적인 서열 상동성을 지닌 서열 또한 본 발명의 범주에 포함된다. 여기서 사용된 "실질적인 서열 동일성" 또는 "실질적인 서열 상동성"이라는 용어는 서열이 또 다른 서열과의 실질적인 구조적 또는 기능적 동일성을 나타냄을 표현하기 위해 사용된다. 이러한 차이는 예를 들어 다른 종 간의 코돈 용법의 고유의 변이에 기인한다. 2 이상의 다른 서열 사이의 유의적인 양의 서열 중복 또는 유사성이 있는 경우 이들 서열의 길이 또는 구조가 다르더라도 유사한 물리적 특성을 지니는 경우 구조적 차이는 무시할만한 정도가 된다.
- [0040] 본 발명에서 유전공학 기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)) 및 프레드릭 등의 문헌(Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1, 2, 3, John Wiley & Sons, Inc. (1994))에 개시되어 있는 내용에 의해 좀더 명확해진다.
- [0041] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 방사선 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법 등과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

발명의 효과

- [0043] 본 발명은 siRNA 매개 FDFT1 녹다운이 세포 내 HCV RNA 및 단백질 발현 수준을 현저히 감소시킴을 밝혔고,

FDFT1 녹다운 세포에서 HCV 감염성이 현저히 감소함을 밝혔다.

[0044] FDFT1 효소 특이적 저해제인 YM-53601의 HCV 증식에 대한 효과를 시험한 결과, FDFT1 저해제는 HCV 감염 세포에서 HCV 복제 및 HCV 감염성을 효과적으로 저해하였다.

[0045] 본 발명자들은 또한 HCV 감염 세포에서 FDFT1 발현 수준이 증가함을 밝혔다.

[0046] 따라서, 본 발명의 FDFT1 활성 또는 발현을 저해하는 물질은 HCV의 복제를 저해함으로써 C형 간염 예방 및 치료제로서 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 HCV 증식에 FDFT1이 필요함을 나타낸다. (A) Huh7.5 세포를 20 nM siRNA로 48시간 동안 트랜스펙션시킨 후 Jc1으로 네 시간 동안 감염시켰다. 감염 이틀째 배양 상청액을 모아 세포 외 HCV RNA를 qPCR로 정량하였다. 지방 대사와 지방 소체 형성을 조절하는 114개 유전자를 목표로 하는 siRNA 라이브러리 중 음성 대조군과 비교하여 HCV 생산을 두 배까지 감소시키는 10개의 siRNA들이 선택되었다. (B) Huh7.5 세포는 각각 20 nM의 음성 대조군, 양성 대조군 및 FDFT1 siRNA 중복부위 (duplex)로 48시간 동안 트랜스펙션시켰고, 그 후 Jc1으로 네 시간 동안 감염시켰다. 감염 2일째 총 세포 용균액을 지시한 항체로 면역블랏팅하였다. 음성 대조군, 스크램블 siRNA (scrambled siRNA); 양성 대조군, Jc1의 5'UTR을 목표로 하는 HCV 특이적 siRNA. (C) Huh7.5 세포를 지시한 siRNA로 48시간 트랜스펙션시키고 Jc1으로 네 시간 동안 감염시켰다. 감염 2일째 총 RNA를 분리하여 녹다운 효과를 확인하기 위해 FDFT1 및 ApoE mRNA 수준을 분석하였다. 별표는 음성 대조군과 비교할 때 현저한 차이를 나타내는 것을 의미한다 (**, $p < 0.01$). (D) (C)에서 분리한 RNA를 이용하여 qPCR로 세포 내 및 세포 외 HCV RNA 수준을 분석하였다. (E) 바이러스 감염성을 분석하기 위하여 Huh7.5 세포를 (C)에서 하비스트한 배양 상청액으로 네 시간 동안 감염시켰다. 48시간 후 세포 내 HCV RNA 수준을 qPCR로 측정하였다. 별표는 음성 대조군과 비교할 때 현저한 차이를 나타내는 것을 의미한다 (**, $p < 0.01$).

도 2는 네 개의 다른 siRNA에 의한 FDFT1 녹다운이 HCV 증식을 저해함을 나타낸다. (A) Huh7.5 세포는 음성 대조군, 양성 대조군 또는 네 개의 다른 FDFT1 siRNA로 48시간 동안 트랜스펙션시킨 후 Jc1으로 네 시간 동안 감염시켰다. 감염 2일째 FDFT1 mRNA를 qPCR로 분석하였다. (B) 상기 (A)와 같이 처리한 Huh7.5 세포에 대하여 qPCR로 세포 내 HCV RNA 수준을 분석하였다. 별표는 음성 대조군과 비교할 때 현저한 차이를 나타내는 것을 의미한다 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). (C) (왼쪽) Huh7.5 세포는 음성 대조군, 양성 대조군 또는 네 개의 다른 FDFT1 siRNA로 48시간 동안 트랜스펙션시킨 후 Jc1으로 네 시간 동안 감염시켰다. 감염 2일째 총 세포 용균액을 지시한 항체로 면역블랏팅하였다. (오른쪽) Image J 소프트웨어를 이용하여 바이러스 단백질의 띠 강도를 정량하였고, 대조군과 비교하여 상대적 양으로 나타내었다. (D) Huh7.5 세포를 (A)에서 하비스트한 배양 상청액으로 재감염시켰다. 감염 이틀째 총 세포 용균액을 지시한 항체로 면역블랏팅하였다. (E) Huh7.5 세포를 (A)에서 하비스트한 배양 상청액으로 48시간 동안 감염시킨 후 포커스 형성 단위 (focus forming units)를 측정하였다. 별표는 음성 대조군과 비교할 때 현저한 차이를 나타내는 것을 의미한다 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). (F) Huh7.5 세포에 네 가지 다른 FDFT1 siRNA들로 트랜스펙션시키고 세포 생존율을 MTT 분석법으로 분석하였다.

도 3은 FDFT1 저해제가 HCV 증식을 저해함을 나타낸다. (A) Huh7.5 세포를 Jc1으로 네 시간 동안 감염시킨 후 DMSO 또는 다양한 농도의 YM-53601을 함유한 배지로 처리하였다. 감염 이틀째에 세포 내 HCV RNA 수준은 qPCR로 정량하였다. 별표는 음성 대조군과 비교할 때 현저한 차이를 나타내는 것을 의미한다 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). 실험은 세 번씩 수행하였다. 오차 막대는 표준편차를 나타낸다. (B) Huh7.5 세포는 Jc1으로 네 시간 동안 감염시키고 아무 것도 처리하지 않거나 또는 지시한 농도의 YM-53601로 처리하였다. 감염 이틀째, 총 세포 용균액을 지시한 항체로 면역블랏팅하였다. (C) Huh7.5 세포를 상기 (B)에서 하비스트한 배양 상청액으로 48시간 감염시킨 후 포커스 형성 단위를 측정하였다. 별표는 DMSO 처리 대조군과 비교할 때 현저한 차이를 나타내는 것을 의미한다 (**, $p < 0.01$). (D) 유리 슬라이드 상의 Huh7.5 세포는 Jc1으로 네 시간 동안 감염시킨 후 DMSO 또는 YM-53601 (5 μ M)로 처리하였다. 처리한 다음 48시간 후 세포는 NS5A 항체로 간접 면역형광분석을 위하여 염색하였다. 세포는 핵을 표지하기 위하여 DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole)로 염색하였다. (E) Huh7.5 세포는 DMSO (담체) 또는 YM-53601로 96시간 동안 처리하였다. 세포 생존율은 MTT 분석으로 평가하였다.

도 4는 FDFT1이 HCV 생애주기의 복제 단계에 관여함을 나타낸다. (A) Huh7.5 세포는 인 비트로-전사된 Jc1 RNA로 24시간 동안 전기천공한 다음 YM-53601로 처리하였다. (왼쪽) 저해제 처리 이틀째에 세포 내 HCV 수준을 qPCR로 분석하였다. 별표는 DMSO 대조군과 비교할 때 현저한 차이를 나타내는 것을 의미한다 (**, $p < 0.01$). (오른쪽) 단백질 발현 수준은 지시된 항체를 이용하여 면역 블랏팅으로 분석하였다. (B) (왼쪽) Huh7.5 세포를

(A)에서 하비스트한 배양 상청액으로 48시간 감염시킨 후 포커스 형성 단위를 측정하였다. 별표는 DMSO 대조군과 비교할 때 현저한 차이를 나타내는 것을 의미한다 (**, $p<0.01$). (오른쪽) Huh7.5 세포를 (A)의 배양 상청액으로 감염시키고 감염 이틀째에 총 세포 용균액을 지시된 항체로 면역블랏팅하였다. (C) Huh7.5 세포는 JFH1-luc RNA로 전기천공하였다. 전기천공 후 이틀째에 세포를 YM-53601으로 처리하였다. 세포는 지시된 시간에 모아 루시퍼레이스 활성을 측정하였다. (D) JFH1-luc RNA로 전기천공한 Huh7.5 세포에 YM-53601의 양을 증가시켜가며 처리하였다. 저해제 처리 후 3일째에 세포를 모아 루시퍼레이스 활성을 측정하였다. 별표는 DMSO대조군과 비교할 때 현저한 차이를 나타내는 것을 의미한다 (**, $p<0.01$). (E) 유전자형 1b 또는 유전자형 2a 유래 HCV 서브게놈 레플리콘 세포를 음성 대조군 siRNA 또는 FDFT1 siRNA로 트랜스펙션시켰다. 72시간 후 HCV RNA 및 FDFT1 RNA 수준을 qPCR로 정량하였다. 별표는 음성 대조군과 비교할 때 현저한 차이를 나타내는 것을 의미한다 (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$).

도 5는 HCV 감염이 FDFT1 단백질 수준을 증가시킴을 나타낸다. (A) Huh7.5 세포는 Jc1으로 네 시간 동안 감염시켰다. 다양한 시각에 모은 총 세포 용균액을 지시된 항체로 면역블랏팅하였다. p.i.는 "감염 후"를 의미한다. (B) Huh7.5 세포를 Jc1으로 감염시켰다. FDFT1 mRNA 수준은 qPCR로 분석하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재범위로 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0049] 세포 배양

[0050] Huh7.5 세포는 10% 우태혈청, 1% 비필수 아미노산과 1% 페니실린-스트렙토마이신을 보충한 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 5% CO₂, 37 °C 조건으로 배양하였다. HCV 서브게놈 레플리콘 세포 (subgenomic replicon cells)는 10% 우태혈청과 500 µg/ml G418을 보충한 DMEM 배지에서 배양하였다.

[0051] 시약과 항체

[0052] FDFT1 저해제인 YM-53601은 Caymanchem (MI, U.S.A)에서 구입하였다. FDFT1 항체는 Epitomics사에서, β 액틴 항체는 Santa Cruz에서 구입하였다. HCV 코어, NS3 및 NS5A에 대한 항체의 구입처는 각각 명시하였다 [26].

[0053] HCVcc 생성

[0054] Jc1과 JFH1-Luc 구조체 (constructs)는 Dr. Ralf Bartenschlager에게서 제공받았다. HCV 유래 배양세포 (HCVcc)는 선행기술과 같이 제조하였다 [27].

[0055] MTT 분석

[0056] siRNA로 트랜스펙션되거나 FDFT1 저해제로 처리한 Huh7.5 세포는 MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide} (Sigma)와 함께 37 °C에서 두 시간 동안 배양하였다. 세포 생존율은 종래 방법에 따라 평가하였다 (Lim YS, Tran HT, Yim SA, Hwang SB. 2011. Peptidyl-prolyl isomerase Pin1 is a cellular 447 factor required for hepatitis C virus propagation. J. Virol. 85:8777-8788).

[0057] RNA 간섭

[0058] 본 발명자들은 지방 대사 및 지방 소체 (lipid droplet) 형성을 제어하는 114개의 유전자를 선택하였고, 이 유전자들을 목표로 하는 siRNA를 Dharmacon (Lafayette, CO)에서 구입하였다. 각 풀 (pool)은 동일한 목표 mRNA 서열의 다른 부분을 목표로 하여 디자인된 4 개의 siRNA 듀플렉스로 구성된다. 네 개의 siRNA 서열은 5'-GGAAGAGAUUUUAUCAUAGA-3' (서열번호 1), 5'-GUGUUUAAUCUCUGUGCUA-3' (서열번호 2), 5'-GUUUGAGCAGGUAUGUUA-3' (서열번호 3), 5'-CAACGCAGUGUCAUAUUU-3' (서열번호 4)과 같다.

[0059] 공통 음성 대조군 (universal negative control) siRNA와 Jc1의 5'UTR을 목표로 하는 siRNA (5'-CCUCAAGAAAAACCAACUU-3')를 양성 대조군으로 이용하였으며, 이것들도 Dharmacon에서 구입하였다. ApoE를 목표로 하는 siRNA (5'-AGACAGAGCCGGAGCCCGA-3') [28]는 바이오니아 (한국)에서 구입하였다. siRNA 트랜스펙션은 Lipofectamine RNAiMax 제제 (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 수행하였다.

[0060] 면역블랏 분석

[0061] 세포는 PBS (phosphate-buffered saline)로 두 번 세척하고 얼음 위에 놓인 RIPA 완충액 (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1% NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ 및 1 mM PMSF)으로 15분간 행군 다음 12,000 rpm으로 10분간 4 °C로 원심분리하였다. 상청액을 모으고 동량의 단백질을 SDS-PAGE 한 다음 나이트로셀룰로즈 막에 전기적으로 전달하였다. 막은 5% 탈지유가 들어 있는 TBS/Tween (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 500 mM NaCl, and 0.25% Tween 20)으로 한 시간 배양하여 블로킹하였고, 그런 다음 지시된 항체와 함께 배양하였다. 단백질은 ECL kit (Abfrontier)를 이용하여 탐지하였다.

[0062] 루시퍼레이즈 리포터 유전자 분석

[0063] Huh7.5 세포는 10 µg의 인 비트로 전사된 JFH1-luc RNA와 함께 전기천공하였다. 전기천공 48시간 후, 세포를 모아 Gloma 20/20 luminometer (Promega)를 이용하여 루시퍼레이즈 분석을 수행하였다 [26].

[0064] 정량적 실시간 PCR

[0065] RiboEX 시약 (GeneA11)을 이용하여 제조자의 지시에 따라 세포로부터 총 RNA를 분리하였다. cDNA 합성 키트 (Toyobo)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 cDNA를 합성하고 다음의 프라이머를 이용하여 정량적 실시간 PCR을 수행하였다: (HCV에 대한 센스 프라이머) 5'-TTA GTA TGA GAG TCG TAC AGC CTC CAG-3', (HCV에 대한 안티센스 프라이머) 5'-GGC ATA GAG TGG GTT TAT CCA AGA AAG G-3'; (β 액틴에 대한 센스 프라이머) 5'-TGA CAG CAG TCG GTT GGA GCG-3', (β 액틴에 대한 안티센스 프라이머) 5'-GAC TTC CTG TAA CAA CGC ATC TCA TA-3'; (FDFT1에 대한 센스 프라이머) 5'-ACCATC ATC CGT GAC TAT CTG-3', (FDFT1에 대한 안티센스 프라이머) 5'-CTT CTT AAC ATA CCT GCTGCT CCA A-3'; (ApoE에 대한 센스 프라이머) 5'-TTC CTG GCA GGA TGC CAG GC-3', (ApoE에 대한 안티센스 프라이머) 5'-GGT CAG TTG TTC CTC CAG TTC-3' [29]. 정량적 PCR은 IQ5 multicolor Real-time PCR Detection system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)을 다음의 조건으로 수행하였다: 95 °C에서 15분 배양 후, 95 °C로 20초, 55 °C로 20초, 72 °C로 20초를 40 사이클을 수행하고, 60 °C에서 95 °C까지 0.5 °C씩 온도를 올리면서 10초씩 71 사이클을 수행하여 녹는점 커브를 그렸다. 표준물질은 시료와 병행하여 러닝하였고, 절대 RNA 카피 수는 표준커브를 기준으로 하여 결정하였다.

[0066] 면역형광 분석

[0067] 슬라이드 글라스 위에서 배양한 Huh7.5 세포는 4% 파라포름알데하이드로 상온에서 30분간 고정시키고, 0.1% Triton X-100을 함유한 PBS로 10분간 처리하여 투과성을 높였다. 세포는 0.5% 우혈청 알부민으로 한 시간 동안 블로킹한 후 토끼 항-NS5A 항체로 4 °C에서 오버나잇 배양하였다. PBS로 세 번 세척한 후 세포는 TRITC (tetramethylrhodamine isothiocyanate)가 결합된 당나귀 항-토끼 IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories)로 한 시간 동안 상온에서 배양하였다. PBS로 세 번 세척한 후, 세포는 Zeiss LSM 700 레이저 공초점 현미경 시스템 (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY)으로 분석하였다.

[0068] **결과 1: FDFT1은 HCV 증식에 필요한 숙주인자이다.**

[0069] HCV 생애주기의 효율적인 조절에 있어 숙주세포의 지방대사는 필수적이다. HCV 증식에서 중요한 기능을 수행하는 지방 대사 및 지방 소체 형성과 관련된 숙주 유전자를 밝히기 위하여 본 발명자들은 114개의 유전자를 목표로 하는 siRNA 라이브러리 셋트를 제조하였다. 네 개의 다른 siRNA 서열의 혼합물은 과녁을 벗어난 효과 (off-target effects)를 최소화하기 위하여 이용되었다. HCVcc를 기초로 한 일차 스크리닝은 siRNA 라이브러리를 이

용하여 수행하였다. 각 스크린은 세 번 반복 수행하였다. 음성 대조군과 비교하여 평균 두 배로 HCV 입자를 방출하도록 바꾼 siRNA들은 히트(hit)로 선택되었다. 지방 대사를 목표로 하는 114 개의 siRNA 풀로부터 본 발명자들은 일차 스크리닝을 통해 히트 후보들을 확인하고 이차 스크리닝은 qPCR에 의한 HCV 복제 및 방출에 근거하여 수행하였다. 후보 유전자들 중, FDFT1 (스쿠알렌 합성효소라고도 알려짐)이 선택되었는데, 이것은 이 유전자를 침묵시키면 HCV 증식이 현저하게 손상을 입기 때문이었다 (도 1a). HCV 증식에 미치는 FDFT1의 효과를 확인하기 위하여 본 발명자들은 FDFT1 siRNA로 트랜스펙션시킨 세포에서 HCV 발현 수준을 시험하였다. 양성 대조군으로서 우리는 siRNA를 목표로 하는 HCV RNA의 5'UTR을 사용하였다. 도 1b와 같이, HCV 단백질 발현 수준은 양성 대조군 siRNA로 처리한 세포에서 극적으로 감소하였다 (레인 2). 마찬가지로, HCV 단백질 발현 수준은 FDFT1 녹다운 세포에서 현저히 감소하였다 (도 1b, 레인 3). 아포리포프로테인 E (apolipoprotein E; ApoE)가 감염성 HCV 입자의 형성에 관여하기 때문에 [28], 본 발명자들은 ApoE를 양성 대조군으로 이용하여 FDFT1이 HCV 조합에 관여하는지를 분석하였다. 먼저 mRNA 수준을 측정하여 siRNA 매개 FDFT1 및 ApoE 녹다운 효율을 입증하였다 (도 1c). 또한, qPCR을 수행하여 FDFT1 녹다운 세포에서 HCV RNA 수준을 분석하였다. 도 1d와 같이, 스크램블 siRNA 트랜스펙션된 세포와 비교하여 FDFT1 녹다운 세포에서는 세포 내 및 세포 외 HCV RNA 수준이 모두 현저히 감소하였다. 그러나, ApoE 녹다운 세포에서는 세포 외 HCV RNA 수준은 현저히 감소한 반면, 세포 내 HCV RNA 수준은 그렇지 않았다. 그럼에도 불구하고, 원래의 Huh7.5 세포가 도 1C에서 하비스트한 배양 상청액으로 감염되었을 경우 세포 내 HCV RNA 수준은 FDFT1과 ApoE 녹다운 세포에서 모두 현저히 감소하였다 (도 1e). 이 데이터들은 FDFT1이 HCV 생애 주기의 조합 및 방출 단계에 관여하지 않을 수도 있음을 암시한다. 과녁을 벗어난 효과(off-target effects)를 배제하기 위하여 본 발명자들은 HCV 복제에서 siRNA 풀로부터 네 개의 siRNA들의 개별적인 효과를 조사하였다. 음성 대조군, 양성 대조군 또는 네 가지 다른 개별 FDFT1 siRNA로 트랜스펙션된 Huh7.5 세포를 Jc1으로 감염시키고 녹다운 효과를 분석하였다. 도 2a는 네 개의 개별 siRNA들이 모두 FDFT1 mRNA 발현을 손상시킴을 보여주었다. 이 siRNA들로 Huh7.5 세포를 트랜스펙션시켰을 때 HCV 감염 세포에서 세포 내 HCV RNA 수준은 현저히 감소하였다 (도 2b). 본 발명자들은 또한 네 개의 siRNA 각각이 독립적으로 HCV 단백질 발현 수준을 손상시킴을 확인하였고, 나아가 FDFT1을 목표로 하는 siRNA의 특이성을 확인하였다 (도 2c). FDFT1 녹다운 세포에서 방출된 HCV 입자의 감염성을 시험하기 위해 Huh7.5 세포를 2a에서 하비스트한 배양 상청액으로 감염시켰다. 감염 2일째에 하비스트한 총 세포 용균액에 대하여 바이러스 단백질 발현 수준을 분석하였다. 도 2d와 같이, 바이러스 단백질 발현 수준 또한 약 80% 이상 감소하였다. 우리는 네 개의 siRNA 모두 각각을 처리한 경우 감염성 바이러스 입자 수준이 50% 이상 감소함을 보여주어 (도 2e), 이 siRNA들이 HCV 감염성을 손상시킴을 밝혔다. FDFT1 녹다운은 세포 생존율에 영향을 미치지 않았고 (도 2f), 이는 siRNA 녹다운에 의한 HCV 증식 손상이 세포 독성에 의한 것이 아님을 말해준다.

[0070]

결과 2: FDFT1 저해제는 HCV 증식을 저해한다.

[0071]

HCV 생애주기에서 FDFT1의 필요성을 좀 더 확인하기 위하여 HCV 증식에 대한 FDFT1 저해제인 YM-53601의 효과를 시험하였다. Jc1으로 감염된 Huh7.5 세포를 DMSO 또는 다양한 농도의 YM-53601로 처리하였다. 도 3a와 같이, HCV RNA 수준은 1 μ M의 저해제 처리로 현저히 감소하였고, 저해는 투여량 의존적으로 일어났다. 본 발명자들은 HCV 감염 세포에서 HCV 단백질 발현 수준이 FDFT1 저해제 투여량 의존적으로 감소함을 밝혔다 (도 3b). 저해제로 처리한 세포에서 방출된 HCV 입자의 감염성을 알아보기 위하여 Huh7.5 세포를 3A에서 하비스트한 배양 상청액으로 감염시킨 후 포커스 형성 분석방법으로 감염성을 결정하였다. 도 3c는 HCV 감염성이 YM-53601 투여량 의존적으로 현저히 감소함을 보여주었다. HCV 증식에서 FDFT1의 역할을 확인하기 위하여 Jc1 감염 세포를 이용하여 면역형광분석을 수행하였다. 도 3d와 같이, YM-53601 처리는 NS5A 발현에 의해 측정된 것과 같이 HCV 증식을 현저히 감소시켰다. 본 발명자들은 Huh7.5 세포에서 YM-53601 처리는 세포 독성을 야기하지 않음을 증명하였다 (도 3e). 종합하면, 이 데이터들은 FDFT1 효소 활성이 HCV 증식에서 결정적인 역할을 수행함을 말해준다.

[0072]

결과 3: FDFT1은 HCCV 생애주기의 복제 단계에 관여한다.

[0073]

HCV 생애주기의 도입 단계에서 FDFT1의 관련 가능성을 알아보기 위하여 RNA 트랜스펙션된 세포에서 YM-53601을 이용하여 FDFT1의 효과를 분석하였다. 인 비트로 전사된 Jc1 RNA로 전기천공된 Huh7.5 세포를 YM-53601로 처리하였다. 도 4a와 같이, 세포 내 HCV RNA와 단백질 발현 수준은 모두 FDFT1 저해제에 의해 현저히 감소하였다. 또한 본 발명자들은 도 4a에서 하비스트한 배양 상청액의 HCV 감염성을 알아보았고, FDFT1 저해제에 의해 HCV 감염성 또한 현저히 감소함을 확인하였다 (도 4b). 이러한 결과들은 FDFT1이 HCV 생애주기 도입 이후 단계에 관

여함을 나타낸다. HCV 복제에 FDFT1이 관여함을 확인하기 위하여 JFH1-Luc 리포터 구축물 (construct)로 루시퍼레이스 분석을 수행하였다. Huh7.5 세포는 JFH1-luc RNA로 전기천공한 후 YM-53601로 처리하였다. 도 4c는 루시퍼레이스 활성이 저해제 처리 48시간에 현저히 감소하였고, 이러한 저해 활성이 72시간에 좀 더 강해졌음을 보여주었다. 도 4d는 5 μ M의 YM-53601이 DMSO 대조군과 비교하여 루시퍼레이스 활성을 50% 억제하였고, 루시퍼레이스 활성은 투여량 의존적으로 감소하였음을 보여주었다. HCV 생애주기의 복제단계에 FDFT1이 관여함을 좀 더 살펴보기 위하여 HCV 서브게놈 레플리콘 세포를 음성 대조군 siRNA 또는 FDFT1 siRNA로 트랜스펙션시키고 qPCR로 HCV RNA 수준을 분석하였다. 도 4e와 같이, 유전자형 1b와 2a 양쪽 모두에서 유래한 서브게놈 레플리콘 세포에서 FDFT1 녹다운은 HCV RNA 수준의 현저히 감소를 초래하였다. HCV 서브게놈 레플리콘이 세포 내에서 감염성이 없거나 또는 조합될 수 없기 때문에, 이 결과는 FDFT1이 HCV 생애주기에서 복제단계에 관여함을 입증해준다.

[0074]

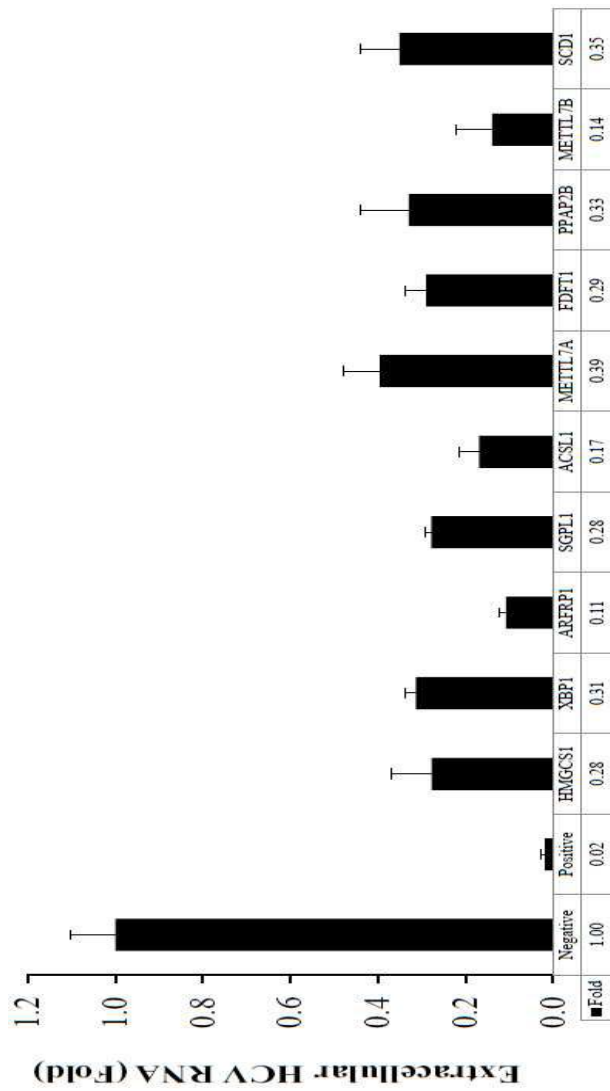
결과 4: HCV 감염은 FDFT1 단백질 수준을 증가시킨다.

[0075]

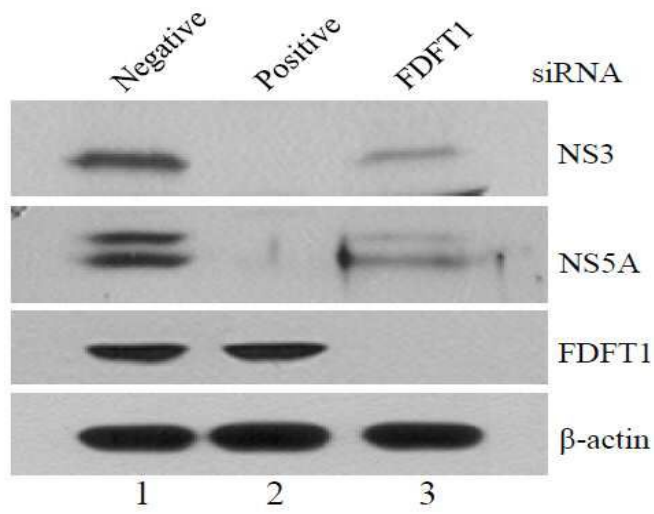
FDFT1 발현이 HCV 감염에 의해 변화되는지를 알아보기 위하여 Huh7.5 세포를 Jc1으로 감염시키고 감염 후 12일까지 FDFT1 단백질 발현 수준을 모니터링하였다. 도 5a와 같이, FDFT1 단백질 수준은 가감염 세포 (mock infected cell)와 비교하여 HCV 감염세포에서 4일째에 증가하였고 12일까지 높은 수준을 유지하였다. 도 5b는 FDFT1 mRNA 수준이 HCV 감염에 의하여 현저히 변화하지 않음을 보여준다. 이 데이터들은 HCV 감염이 FDFT1 단백질을 안정화하여 그 증식을 용이하게 함을 말해준다.

도면

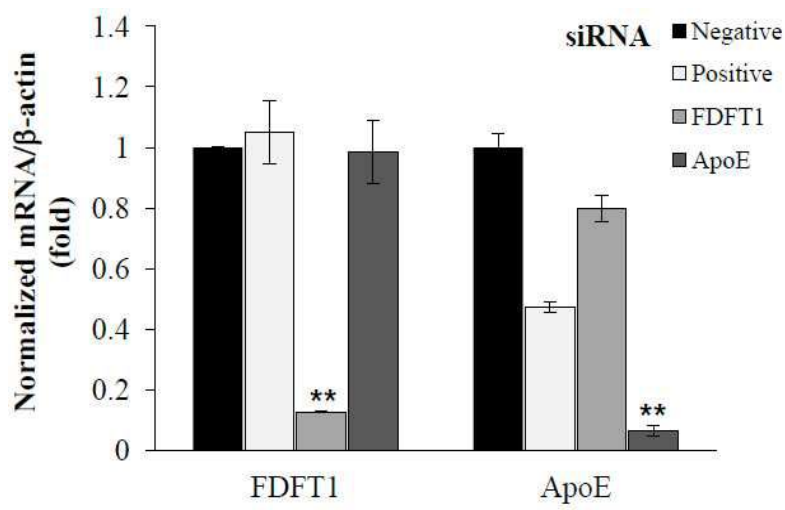
도면1a



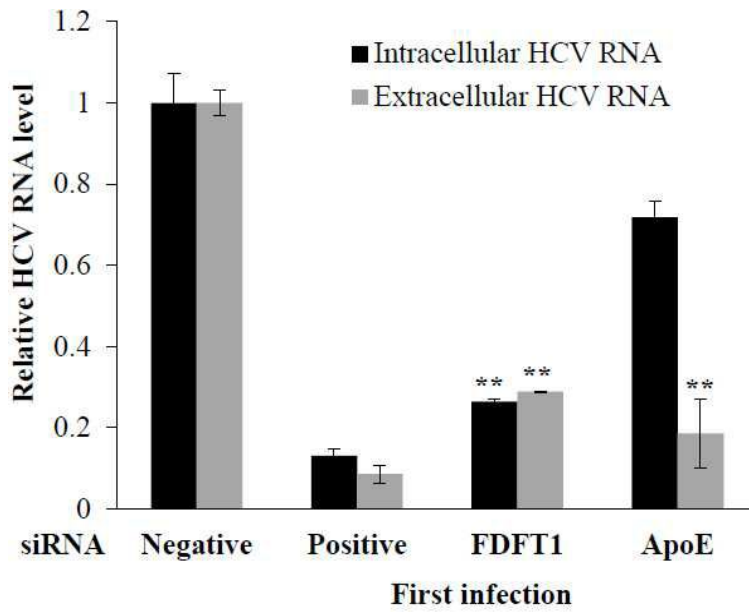
도면1b



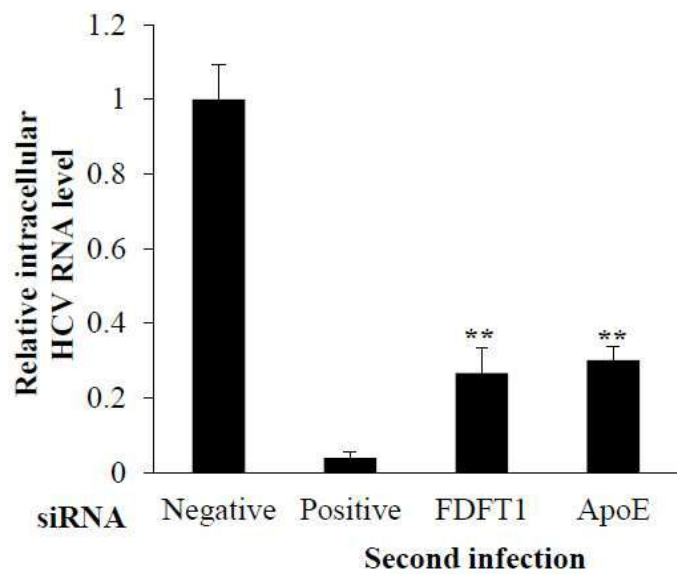
도면1c



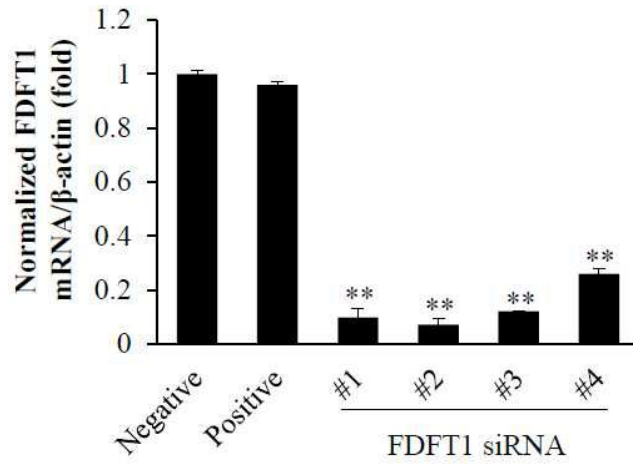
도면1d



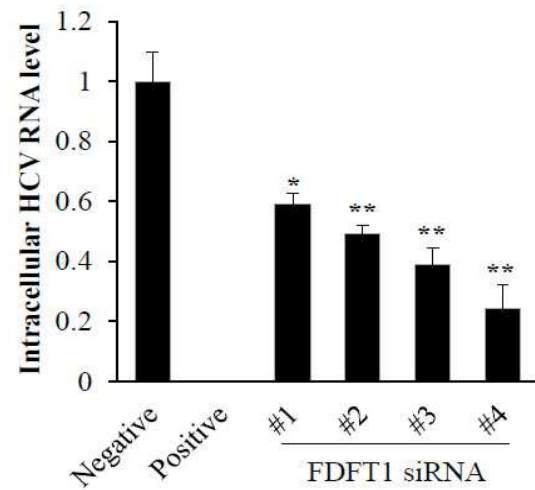
도면1e



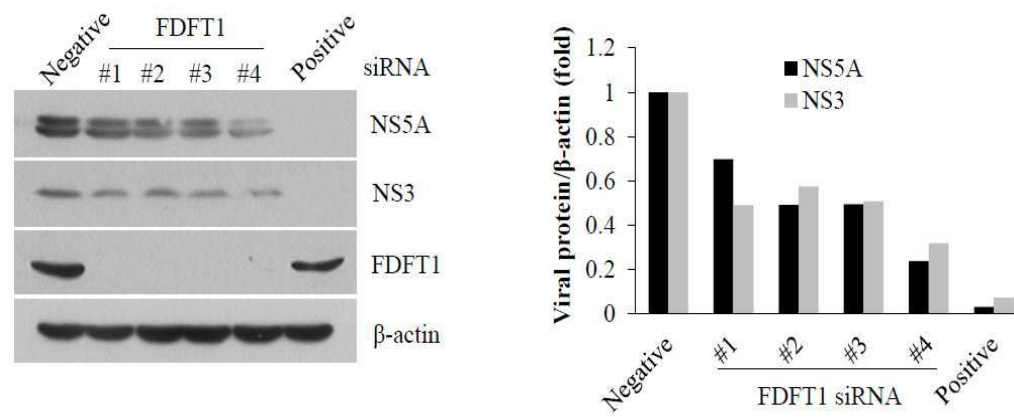
도면2a



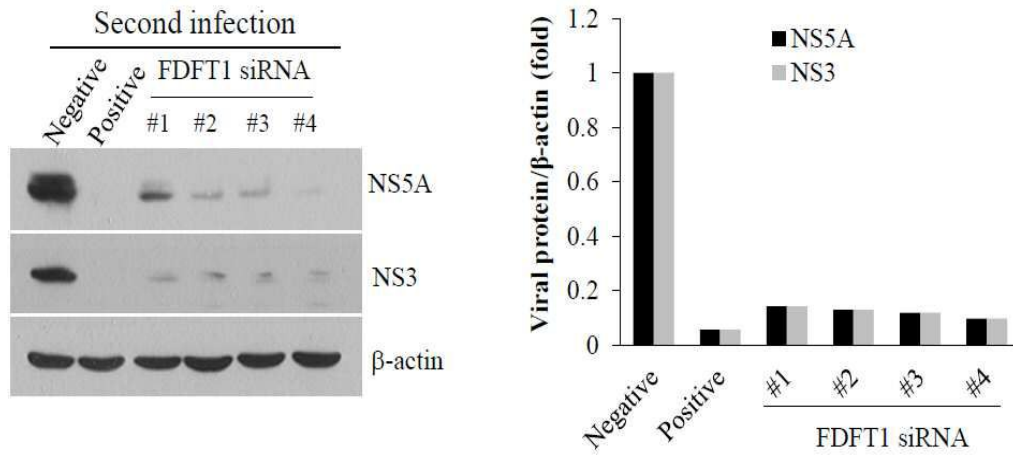
도면2b



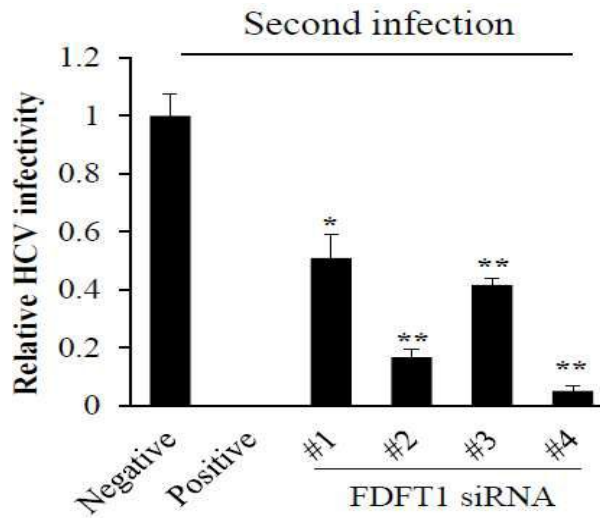
도면2c



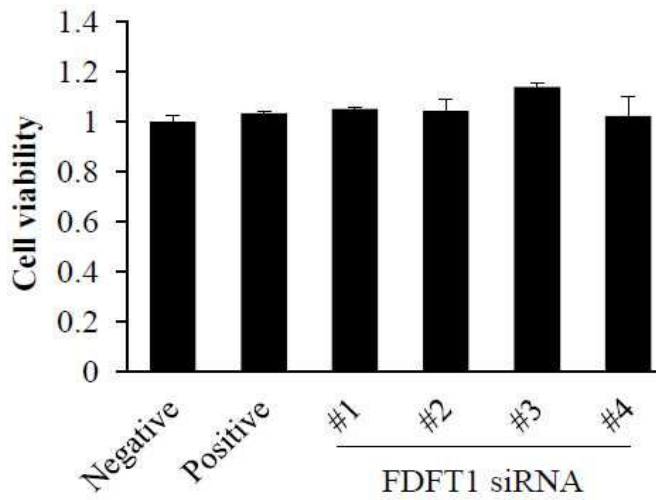
도면2d



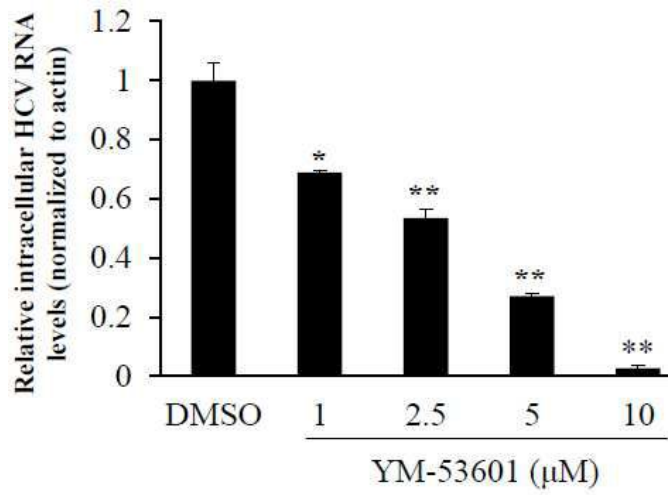
도면2e



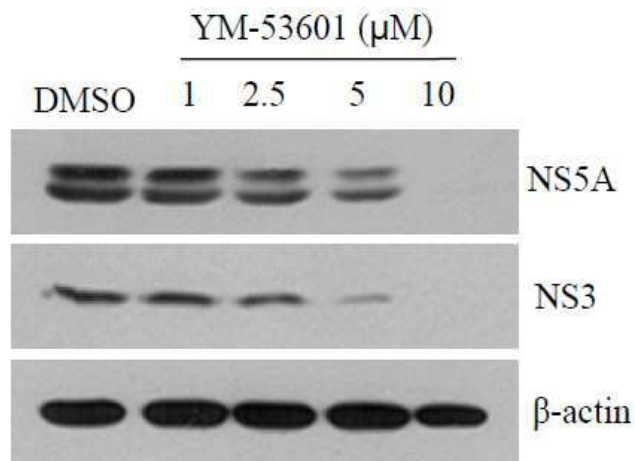
도면2f



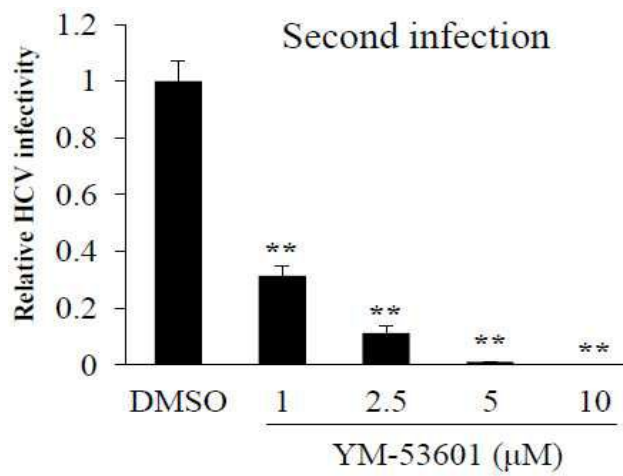
도면3a



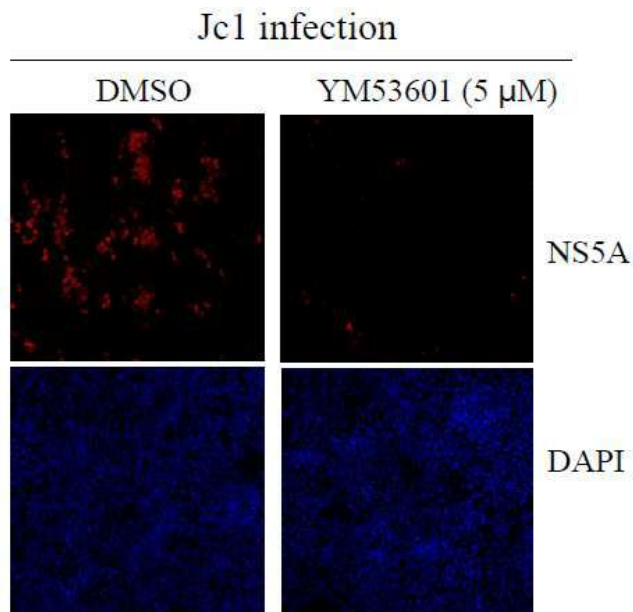
도면3b



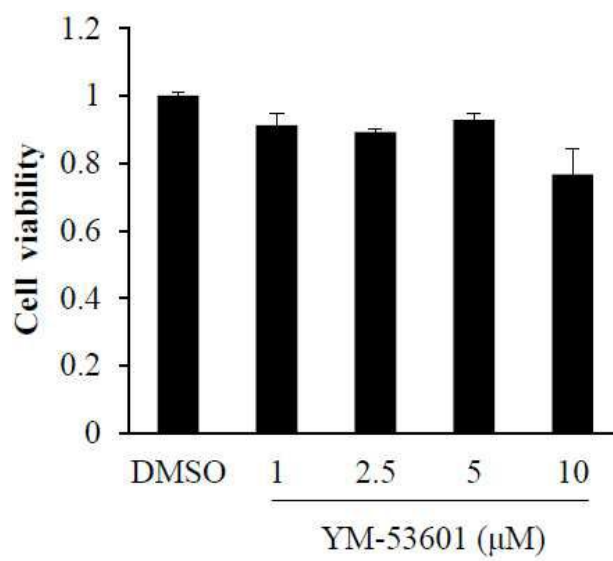
도면3c



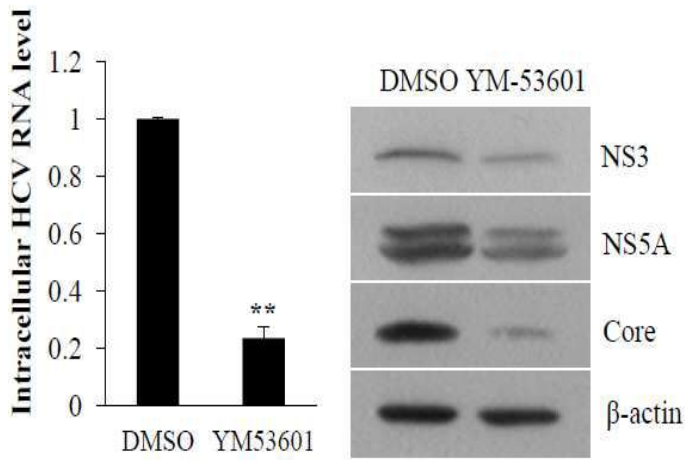
도면3d



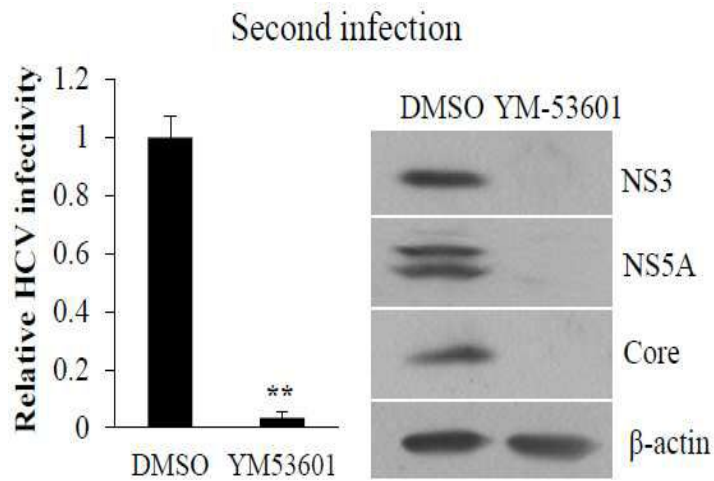
도면3e



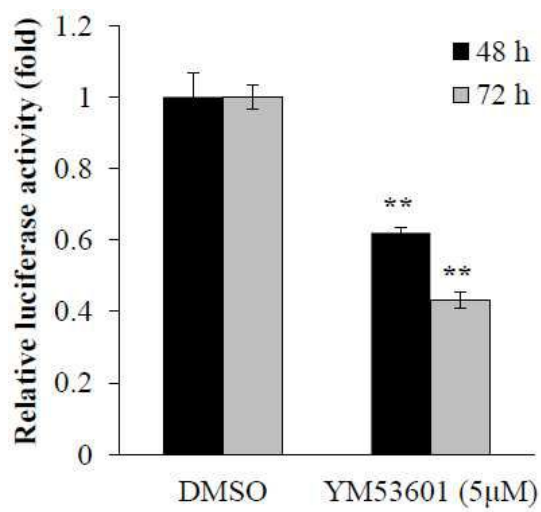
도면4a



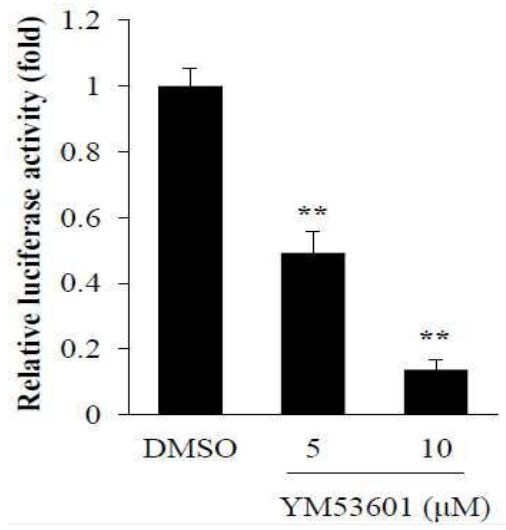
도면4b



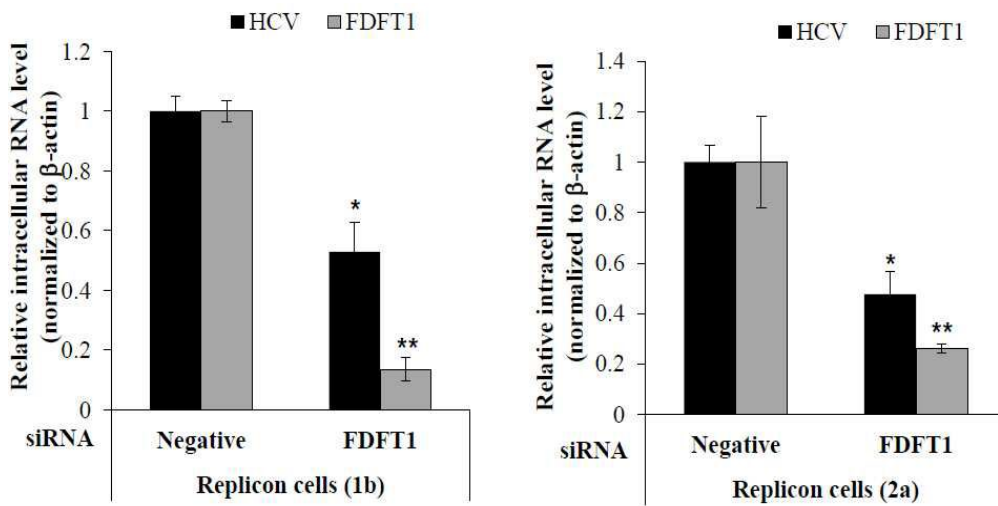
도면4c



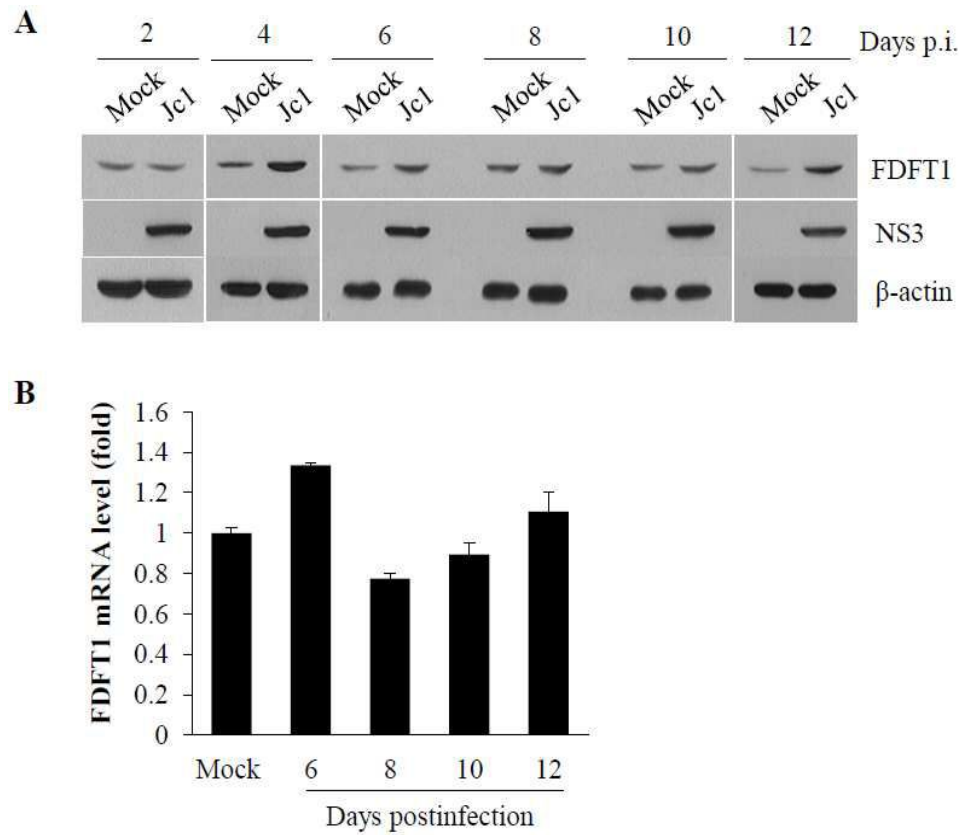
도면4d



도면4e



도면5



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperateion Foundation, Hallym University
- <120> Pharmaceutical composition for prevention and treatment for
Hepatitis C containing FDFT1 expression or activity inhibitor
- <130> HallymU-SBHwang-FDFT1
- <160> 14
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> siRNA
- <400> 1
- ggaagagauu uaucuaga
- <210> 2
- <211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 2

guguuuuacu ucugugcua

19

<210> 3

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 3

guuuggagca gguauguua

19

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 4

caacgcagug ugcauuuu

19

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 5

ccucaaagaa aaaccaaacu u

21

<210> 6

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 6

agacagagcc ggagcccga

19

<210> 7
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 7
 ttagtatgag agtcgtacag cctccag 27

<210> 8
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 ggcatagagt gggtttatcc aagaaagg 28

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 tgacagcagt cggttggagc g 21

<210> 10
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10
 gacttcctgt aacaacgcat ctcata 26

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer

<400>	11	
accatcatcc gtgactatct g		21
<210>	12	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	12	
cttcttaaca tacctgctgc tccaa		25
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	13	
ttcctggcag gatgccaggc		20
<210>	14	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	14	
ggtcagttgt tcctccagtt c		21