



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0002226
(43) 공개일자 2011년01월07일

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01) *A61P 31/12* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0059715

(22) 출원일자 2009년07월01일

심사청구일자 2009년07월01일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산 남구 무거2동 산29

(72) 발명자

주철현

서울특별시 광진구 구의3동 현대프라임아파트 9동 1302호

(74) 대리인

특허법인태백

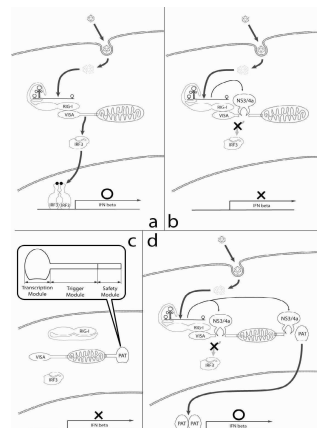
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 바이러스 증식 억제 재조합 단백질

(57) 요약

본 발명은 전사부(transcription module), 개시부(trigger module) 및 안전부(safety module)를 포함하여 이루어지는 바이러스 증식 억제 재조합 단백질에 관한 것으로, 상기 재조합 단백질은 바이러스의 감염이 없는 정상세포 내에서는 인터페론이 분비되지 않지만, 바이러스 감염이 되어 NS3/4a 단백질이 세포 내에 있을 경우 강력하게 인터페론을 분비할 수 있기 때문에 값비싼 인터페론을 장기간 전신 투여함으로써 야기되는 부작용을 줄일 수 있고 획득성 면역을 증가시키며, 저항성 돌연변이를 회피할 수 있을 뿐 아니라, 경제적으로 바이러스 감염 질환을 치료하고 예방할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R13-2008-023-01003-0

부처명 한국과학재단

연구관리전문기관

연구사업명 MRC

연구과제명 바이러스 유전자 응용치료법 개발

기여율

주관기관 울산대학교 의과대학

연구기간 2008년 09월 01일 ~ 2009년 08월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

전사부(transcription module), 개시부(trigger module) 및 안전부(safety module)를 포함하여 이루어지는 바이러스 증식 억제 재조합 단백질.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 전사부는 IRF7 단백질로부터 유래한 DNA 결합 도메인(DBD) 및 조절 도메인(RD)으로 구성되는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 DBD는 IRF7 단백질의 2 내지 151번째 아미노산으로 구성되며, 상기 RD는 IRF7 단백질의 468 내지 503번째 아미노산으로 구성되는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 개시부는 VISA 단백질로부터 유래한 C506 잔기를 포함하는 미토콘드리아 국제 도메인(MLS)인 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 MLS는 VISA 단백질의 183 내지 540번째 아미노산으로 구성되는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 안전부는 Rev 단백질로부터 유래한 핵 수출 도메인(NES)인 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 NES는 Rev 단백질의 75 내지 83번째 아미노산으로 구성되는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 재조합 단백질을 유효성분으로 포함하는 바이러스성 질환 치료용 백신조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 바이러스는 버나비리다에(Birnaviridae), 레트로비리다에(retroviridae), 칼리시비리다에(Caliciviridae), 피코나비리다에(piconaviridae), 아스트로비리다에(astroviridae), 플라비비리다에(flaviviridae), 토가비리다에(togaviridae), 및 아르테리비리다에(arteriviridae)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 바이러스성 질환 치료 또는 예방용 백신조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 바이러스는 A형 간염바이러스, C형 간염바이러스 및 콕사키 바이러스로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 바이러스성 질환 치료 또는 예방용 백신조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바이러스의 감염이 없는 정상세포 내에서는 인터페론이 분비되지 않지만, 바이러스 감염이 되어 NS3/4a 단백질이 세포 내에 있을 경우 강력하게 인터페론을 분비할 수 있는 바이러스 증식 억제 제조합 단백질에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 간 질환들 중 공공보건에 심각한 영향을 미치는 간염의 경우 술이나 약물 등 여러 원인에 의해 발병이 될 수 있지만 대부분 바이러스에 의해 발병이 되는 것이 대부분을 차지하는 것으로 알려져 있다.
- [0003] 간염 바이러스는 현재까지 A, B, C, D, E, F, G 6종이 규명이 되었는데 이 중 만성 간염을 일으키는 것으로 알려진 경우는 B와 C형 간염 바이러스로 알려져 있다. 만성 간염은 간경화와 간암으로 발전할 확률이 대단히 높은 질병으로 이를 예방하는 적절한 방법을 찾는 것이 중요하다.
- [0004] B형 간염 바이러스의 경우 오래전부터 그 존재가 알려져 있었고 적절한 예방접종에 의해 그 위험도가 많이 감소한 상태이고 실제로 감염자의 수가 꾸준히 줄고 있다. 하지만 C형 간염바이러스의 경우 아직까지 적절한 예방법이나 치료방법이 개발되지 못하고 있는 상태로 현재 세계적으로 감염자의 수가 점점 증가하고 있는 상태이다.
- [0005] Non-A, Non-B형 바이러스로 명명되어지던 C형 바이러스의 경우 배양의 어려움으로 인해서 오랫동안 그 존재가 발견이 되지 않고 있다가 1989년 분자생물학적 기법을 사용해 처음으로 그 유전자가 동정이 되었다. 전 세계적으로는 약 1억8천만의 감염자가 있는 것으로 WHO에서 추산하고 있으며 특정 지역에서만 높은 감염률을 보이지 않고 선진국과 개발도상국의 구분 없이 전 세계적으로 고른 분포를 보이며 3% 정도의 평균 감염률을 보인다.
- [0006] 이 바이러스의 가장 큰 특징이자 문제점은 감염자의 55-85% 정도가 만성 간염으로 진행하며 이들 중의 20% 이상이 간경변이나 간암으로 진행하게 된다. 특히 간암과 C형 간염과의 관계는 명백한 연관성이 있는 것으로 규명이 된 상태이다.
- [0007] 전술한 바대로 C형 간염 바이러스의 경우 현재 백신이나 치료제가 개발이 되지 못한 상황으로 감염자의 수가 세계적으로 증가하고 있는 추세이며 많은 감염자가 만성간염, 간경화, 간암으로 진행하게 되는 21세기의 가장 무서운 질병의 하나로 손꼽히고 있다. 또한 어떤 나라에서든지 인구의 1% 이상의 환자가 존재하므로 치료제의 시장규모가 천문학적인 바이러스성 질환으로 평가된다.
- [0008] 한편, 콕사키 바이러스(Coxsackie virus)는 소아의 인후 궤양성 수포증, 유행성 흉막통 등의 원인이 되는 바이러스로서, 미국의 콕사키에서 처음 발견되었다. 이 바이러스는 오염된 공기나 물, 보균자의 대변이나 침을 통하여 전염되는데, 근육통을 비롯하여 피부나 신경, 순환기, 호흡기 계통에 이상증세를 나타내는 것으로 알려져 있다.
- [0009] 가장 대표적인 질환이 5세 미만의 유아에게 자주 발병되는 수족구병과 포진성구협염으로, 이러한 질환은 특별한 치료를 하지 않아도 발진 부위를 깨끗이 유지해 2차 감염을 막고 충분한 휴식을 취하면 대개 자연 치유된다. 그러나 다른 질병이 있거나 허약체질인 경우에는 면역력이 떨어져 뇌막염이나 뇌염 등으로 악화될 수 있다. 또한, 아폴로눈병을 일으키는 바이러스도 이 콕사키바이러스로 알려져 있다.
- [0010] 이러한 바이러스성 질환에 대한 현재 알려진 유일한 치료법은 인터페론-알파와 리바비린(ribavirin)의 동시투여이다. 하지만 대략 절반 정도의 환자만 이러한 치료에 반응하고 치료를 중단하면 재발하는 경우가 흔한 문제가 있다. 또한 인터페론을 전신적으로 장기간 투여하기 때문에 발생하는 부작용이 심하고 가격이 비싸 큰 경제적 부담이 된다.
- [0011] 현재 많은 연구자들이 다양한 치료제를 개발하고 있으나 부작용과 바이러스의 특성으로 인한 내성 바이러스의 출현이 빈번해 실용화 된 것은 없는 상태이다. 최근에는 차선택으로 RNA interference를 이용한 치료법도 대두되고 있으나 이 접근법 역시 전신적 부작용과 간독성 등의 문제로 실용화의 가능성은 낮은 상태이다.
- [0012] 그러므로, 현재 C형 바이러스 또는 키콕스 바이러스 등에 의해 야기되는 바이러스성 질환에 대한 적절한 치료법은 없는 상태로서 기존의 것과는 다른 새로운 접근법이 필요한 상황이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0013] 상기 종래기술의 문제점을 극복하기 위하여, 본 발명자는 바이러스의 증식에 있어서 중요한 역할을 담당하는 인터페론 분비를 억제하는 NS3/4a 단백질의 기능을 역으로 이용하여 오히려 인터페론의 분비를 증가시킬 수 있다는 착안을 근거하여 본 발명을 완성하였다.
- [0014] 따라서, 본 발명의 목적은 바이러스 감염이 없는 정상 상태에서는 인터페론 분비가 되지 않는 반면, 바이러스 감염 시에는 강력하게 인터페론 분비를 활성화 하는 바이러스 증식 억제 재조합 단백질을 제공하는 데에 있다.
- [0015] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 단백질을 유효성분으로 포함하는 바이러스성 질환 치료 또는 예방용 백신조성물을 제공하는 데에 있다.

과제 해결수단

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 전사부(transcription module), 개시부(trigger module) 및 안전부(safety module)를 포함하여 이루어지는 바이러스 증식 억제 재조합 단백질을 제공한다.
- [0017] 상기 전사부는 IRF7 단백질로부터 유래한 DNA 결합 도메인(DNA binding domain; DBD) 및 조절 도메인(Regulatory domain; RD)으로 구성되며, 상기 DBD는 IRF7 단백질의 2번에서 151번째까지의 아미노산으로 구성되고, 상기 RD는 IRF7 단백질의 468번에서 503번째까지의 아미노산으로 구성된다.
- [0018] 상기 개시부는 바이러스 유도성 신호전달 어댑터(virus-induced signaling adaptor; VISA) 단백질로부터 유래한 C506 잔기를 포함하는 미토콘드리아 국재 도메인(Mitochondria localization signal; MLS)이며, 상기 MLS는 VISA 단백질의 183 번에서 540번째까지의 아미노산으로 구성된다.
- [0019] 상기 안전부는 Rev 단백질로부터 유래한 핵 수출 도메인(Nuclear Export Signal; NES)이며, 상기 NES는 Rev 단백질의 75번에서 83번째까지의 아미노산으로 구성된다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 재조합 단백질을 발현시킬 수 있는 발현백터를 제공한다.
- [0021] 즉, 해당 유전자를 당 분야에 공지된 미생물 발현용 벡터에 삽입하여 발현백터를 제조한 후, 이를 적절한 숙주 세포, 예를들어, 대장균 또는 효모 세포 등에 도입시킬 수 있다. 이렇게 형질전환된 숙주를 이용하여 본 발명에 따른 단백질을 대량 생산할 수 있다.
- [0022] 발현백터의 제작 시에는, 단백질을 생산하고자 하는 숙주세포의 종류에 따라 프로모터(promoter), 종결자(terminator) 등과 같은 발현조절서열, 자가-복제 서열 및 분비 시그널 등을 적절히 선택하고 조합할 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 재조합 단백질을 유효성분으로 포함하는 바이러스성 질환 치료용 백신조성물을 제공한다.
- [0024] 상기 바이러스는 버나비리다에(Birnaviridae), 레트로비리다에(retroviridae), 칼리시비리다에(Caliciviridae), 피코나비리다에(piconaviridae), 아스트로비리다에(astroviridae), 플라비비리다에(flaviviridae), 토가비리다에(togaviridae), 및 아르테리비리다에(arteriviridae)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다. 바람직하게는, 상기 바이러스는 A형 간염바이러스, C형 간염바이러스 및 콕사키 바이러스로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0025] 이하, 도 1을 참조하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0026] 본 발명은 HCV의 유일한 치료제로 알려진 인터페론이 감염된 세포 자체에서 바이러스의 단백질에 의하여 분비하도록 유도하는 단백질 변형체를 이용하는 것이다. 인터페론은 세포에 침입한 바이러스나 세균을 인지하여 분비되어 주변 세포나 인체가 감염에 방어하도록 대비시키는 역할을 하는 세포간 신호전달물질이다.
- [0027] 도 1a에 도시된 바와 같이, 바이러스가 외부에서 침입하게 되면 바이러스의 유전자가 복제되기 위하여 세포질로 빠져나오게 된다. 이때 세포질에 존재하는 바이러스 유전자 탐지 단백질인 RIG-I에 의해서 바이러스의 유전자 복제 중간체가 인지되게 된다. 이에 의해 활성화된 RIG-I는 중간 신호전달 단백질이면서 세포질의 미토콘드리아에 부착이 되어 있는 VISA에 결합하여 이를 활성화 시키게 된다. 활성화된 VISA는 특정 신호 단백질들의 연쇄반응을 통해 궁극적으로는 인터페론 분비 단백질인 IRF3을 활성화시킨다. 비활성화된 IRF3은 세포의 핵 내로 들어갈 수 없는 상태로 존재하고 있으나 활성화된 IRF3은 세포의 핵 내로 들어갈 수 있게 구조가 변형이 되게 된다. 핵 내로 들어간 IRF3은 인터페론 전사 유전자의 프로모터에 결합하여 인터페론의 합성을 시작하게 된

다. 발현이 증가하게 된 인터페론은 일련의 과정을 거쳐 세포 외부로 분비되게 되어 주변세포나 분비세포 자신에게 항 바이러스 유전자들의 발현을 촉진시켜서 바이러스의 증식 및 전파를 차단하게 된다.

[0028] 대부분의 병원성 바이러스는 자신의 증식과 전파를 위해 이러한 인터페론의 분비를 억제하는 다양한 기전을 가지고 있다. 특히, 도 1b와 같이, HCV 바이러스는 증식을 위해 필요한 여러 개의 바이러스 단백질을 합성하는데 그중 NS3/4a라는 단백질이 인터페론 분비를 억제하는 기전을 담당하게 된다. 이 NS3/4a 단백질은 인터페론 분비 신호전달에 중요한 역할을 담당하는 VISA를 절단하여 미토콘드리아에서 해리시킨다. 이처럼 해리된 VISA는 인터페론 분비 신호를 전달하지 못하게 되어 IRF3의 활성화가 차단되게 된다. 이처럼 바이러스는 NS3/4a의 작용에 의해 인터페론의 분비를 억제하여 증식과 주변세포로의 전파를 용이하게 하는 전략을 가지고 있다.

[0029] 따라서, 바이러스의 증식에 있어서 중요한 역할을 담당하는 인터페론 분비를 억제하는 NS3/4a 단백질의 기능을 역으로 이용하여 오히려 인터페론의 분비를 증가시키는 것이 본 발명의 주된 목적이므로, 다양한 기능을 재조합하여 만든 PAT 단백질을 설계하였다. PAT 단백질은 크게 두 가지의 특성을 필요로 한다. NS3/4a가 발현되지 않는 세포, 즉 바이러스의 감염이 없는 정상세포 내에서 인터페론의 분비가 되지 않을 것과 감염이 되어서 NS3/4a 단백질이 세포 내에 있을 경우 강력하게 인터페론을 분비하는 특성이다.

[0030] 전술한 특성을 가지기 위해, 도 1c와 같이 PAT 단백질은 인터페론 분비를 촉진하는 전사부(transcription module), NS3/4a 단백질에 의해 절단이 되는 개시부(trigger module), 그리고 정상세포에서 인터페론 분비를 예방하기 위해 세포 핵의 외부로 PAT 단백질을 배출하는 기능을 담당하는 안전부(safety module)로 결합이 되어 있다. 감염이 되지 않은 세포에서는 C 말단에 달려있는 NES에 의해서 핵 내부로 들어간 PAT 단백질은 신속하게 세포 밖으로 배출이 되게 된다. 세포질에 존재하는 대부분의 PAT 단백질은 MLS에 의해서 VISA와 마찬가지로 미토콘드리아에 결합하여 존재하게 된다.

[0031] 도 1d와 같이, 바이러스에 의해 감염된 세포에서는 전술한 바대로 바이러스의 NS3/4a 단백질에 의해 인터페론의 분비가 차단이 되어 있는 상태이다. 이러한 세포에서 PAT 단백질이 발현되게 되면 바이러스의 NS3/4a 단백질은 PAT 단백질의 MLS부분의 C 부분을 자르게 되고 연결되어 있던 DBD-RD부분은 해리되어 떨어져 나오게 된다. 이에 의해 DBD-RD 부분은 자유롭게 세포 핵 내로 이동하게 된다. 핵 내로 들어간 DBD-RD는 인터페론 유전자의 프로모터에 결합하게 되고 다량의 인터페론을 합성하여 분비하게 된다.

[0032] 또한, 본 발명에 따른 바이러스성 질환 치료 또는 예방용 백신조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등을 들 수 있다.

[0034] 상기 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0035] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제한다.

[0036] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0037] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로세라틴 등이 사용될 수 있다.

[0038] 상기 조성물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 또한, 이러한 조성물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0039] 상기 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular)주사에 의해 투여될 수 있다.

효 과

[0040] 본 발명에 따른 재조합 단백질은 바이러스의 감염이 없는 정상세포 내에서는 인터페론이 분비되지 않지만, 바이러스 감염이 되어 NS3/4a 단백질이 세포 내에 있을 경우 강력하게 인터페론을 분비할 수 있기 때문에 값비싼 인터페론을 장기간 전신 투여함으로써 야기되는 부작용을 줄일 수 있고 획득성 면역을 증가시키며, 저항성 돌연변이를 회피할 수 있을 뿐 아니라, 경제적으로 바이러스 감염 질환을 치료하고 예방할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0041] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 C형 간염 바이러스에 의해 인터페론의 분비를 촉진시키는 재조합 단백질에 관한 일실시예를 하기에 제시한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0042] <실시예 1> 세포 배양 및 형질감염

[0043] 293T 및 HeLa 세포는 10% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신으로 보강된 DMEM에서 배양하였다. 일시적 분석을 위하여, 각 플라스미드 DNA를 Transfectin(Biorad) 또는 칼슘 포스페이트(BD Biosciences)를 이용하여 293T 세포에 형질감염 시켜 이하 실험에서 사용하였다.

[0044] <실시예 2> 재조합 단백질 설계

[0045] C형 간염 바이러스에 의해 인터페론의 분비를 촉진시키는 재조합 단백질을 제작하기 위해서 그 기능들이 잘 규명된 부분들을 사용하였다. 인터페론 유전자의 프로모터에 결합하여 인터페론의 합성을 담당하는 전사부로서, IRF7 단백질의 DNA 결합 도메인(DBD; IRF7 단백질의 2번에서 151번째까지의 아미노산으로 구성됨)과 조절 도메인(RD; IRF7 단백질의 468번에서 503번째까지의 아미노산으로 구성됨)을 사용하였다.

[0046] 정상세포에서 이러한 DBD-RD가 세포 핵 내로 들어가는 것을 방지하기 위한 안전부로서, HIV의 Rev 단백질에 존재하고 있는 핵 수출 신호(NES; Rev 단백질의 75번에서 83번째까지의 아미노산으로 구성됨)를 사용하였다. 그리고 미토콘드리아에 위치하면서 NS3/4a 단백질에 의해 절단이 되도록 하기 위해 VISA의 미토콘드리아 국제 신호(MLS; VISA 단백질의 185에서 540번째까지의 아미노산으로 구성됨)를 사용하였다.

[0047] 설계된 재조합 단백질이 제대로 작동하는지 검증하기 위해 도 2a와 같이 각 기능 부위들의 다양한 결합을 통하여 다음과 같은 재조합 단백질들을 제작하였다.

[0048] A. DR: DBD와 RD만으로 이루어진 재조합 단백질로서, 세포 핵 내로 자유롭게 이동이 가능하기 때문에 발현과 동시에 항상 인터페론의 분비를 촉진시키게 된다. 양성 대조군으로 사용되었다.

[0049] B. DRL: DBD-RD와 MLS로 이루어진 단백질로서, 부분적으로 세포 핵 내부에도 존재할 수 있으나 MLS에 의해 대부분 미토콘드리아에 결합되어 있다가 NS3/4a 단백질에 의해 C(시스테인) 부분이 잘리게 되면 DBD-RD가 해리되어 핵 내로 들어가게 되어 인터페론의 합성을 시작하는 구조를 가지고 있는 재조합 단백질이다.

[0050] C. DRE: DBD-RD와 NES로 이루어진 단백질로서, NS3/4a 단백질의 존재 유무와 상관없이 NES에 의해서 항상 세포 핵 외부의 세포질에 위치하게 되어 DBD-RD가 인터페론의 합성을 하지 못하게 되는 구조를 가진 재조합 단백질이다. 음성대조군으로 사용되었다.

[0051] D. DRLE: DBD-RD, MLS 그리고 NES이 차례대로 결합 되어 있는 완전한 기능성 재조합 단백질로서, NS3/4a가 없는 상태에서는 세포 외부나 미토콘드리아에 존재하다가 NS3/4a 단백질에 의해서 C 부분이 절단이 되게 되면 DBD-RD가 해리되어 핵 내로 들어가 인터페론의 합성을 시작하게 된다.

[0052] E. DRLME: NS3/4a 단백질에 의해서 C 부분이 절단되는 것이 DRLE 단백질의 기능에 있어 중요하다는 것을 증명하기 위해서 절단 부분이 A(알라닌)로 치환되어 NS3/4a 단백질에 의해 절단되지 못하는 단백질로서, 이 단백질은 NS3/4a 단백질이 존재하더라도 C에서 A로의 변이 때문에 절단되지 못하여 DBD-RD가 해리되지 못하여 인터페론의 분비를 할 수 없다.

[0053] <실시예 3> 재조합 단백질 클로닝

- [0054] 제한 인식 부위를 먼저 확인하여 intra-coding 서열 절단을 배제하였다. 다클로닝 부위를 비절단 염기서열들 (Afl II, Nhe I, Eco RV, Xho I, Spe I, Hind III, Not I)로 합성하고, EF 프로모터와 SV40 폴리A 신호를 첨가하여 pIRES 벡터의 다클로닝 부위를 대체하였다. 합성된 서열은 코작 서열을 지닌 개시 코돈, 정지 코돈을 함유하였다. 프로모터에서 폴리A 신호의 단편은 pRL-CMV 벡터의 관련 영역에서 클로닝되었다. 최종 벡터는 남아 있는 클로닝을 위한 골격 벡터로 사용하였다.
- [0055] 본 발명의 재조합 단백질을 위한 모듈은 다음과 같은 위치를 포함한 프라이머를 지닌 클론 유전자로부터 증폭되었다. 즉, eGFP의 2에서 238까지의 GFP, IRF7의 2에서 151까지의 DBD, IRF7의 468에서 503까지의 RD, VISA의 501에서 540까지의 MLS 및 Rev의 75에서 83까지의 NES. 각 프라이머는 5' 말단에서 클로닝을 위한 제한 부위를 포함하였다. 증폭된 산물은 키트(Qiagen)로 세정되었고 관련 제한효소와 배양되었다. 이러한 산물은 키트(Qiagen)로 겔 정제되고, 설계 조합에 따라 라이게이션되었다. DRLmE는 oligonucleotide directed mutagenesis kit(Stratagene)를 이용하여 DRLE로부터 만들었다. NS3/4a는 pJEH-1 플라스미드(Doray)로부터 증폭하고 pcDNA5 및 eGFP 벡터에서 클로닝하였다.
- [0056] <실시예 4> 공초점 현미경 관찰
- [0057] HeLa 세포를 형질감염 24시간 전 10^4 세포/웰로 챔버 커버글래스에 분주하였다. 여기에 상기 재조합 단백질을 NS3/4a와 함께 또는 NS3/4a 없이 형질감염시켰다. 이 세포를 24시간에 Mitotracker(Molecular probe)로 염색하고 공초점 현미경(Leica, TCS SP2)으로 살아있는 상태를 관찰하였다.
- [0058] 그 결과, 도 2b와 같이 GFP 및 DR은 미토콘드리아에 국재되지 않으며, 심지어 NS3/4a와 관계없이 분포되었다. DRL은 미토콘드리아 국재 신호를 함유하며 Mitotracker와 함께 국재화되었다. 그러나, NS3/4a는 개시부를 절단하여 전사부가 미토콘드리아로부터 유리되도록 하기 때문에 NS3/4a에 의해 DRL은 DR과 동일한 패턴을 나타내었다. DRE는 사이토솔에서 국재되었고, NS3/4a에 의해 어떠한 국재 변화가 나타나지 않았다. DRLE는 미토콘드리아에 국재되었고, NS3/4a 발현에 의해 미토콘드리아로부터 유리되었다. DRLmE에서 NS3/4a의 표적 잔기가 시스테인에서 알라닌으로 변이되었다. DRLmE에서는 DRLE와 비교하면 NS3/4a 발현에도 불구하고 미토콘드리아에 국재되었다. 이러한 결과로부터, 재조합 단백질이 제대로 작동한다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0059] <실시예 5> 면역블로팅
- [0060] NS3/4a 프로테아제에 의한 재조합 단백질의 절단 프로파일을 검토하기 위하여, 항 GFP 및 항 IRF7 항체를 이용하여 웨스턴블롯을 검토하였다.
- [0061] 즉, 형질감염된 세포를 수확하고, 라이시스 완충액(50mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 0.5% NP-40, 및 프로테아제 억제제 콕테일[Roche])로 재현탁한 후, 4℃에서 10분 동안 배양하고, 12,000rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 면역복합체를 SDS 샘플 완충액(Sigma)으로 재현탁하고, SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 분리하며 폴리비닐리덴 디플루오라이드 멤브레인(Roche)에 이동시켰다.
- [0062] 이러한 멤브레인을 5% 탈지유를 함유한 인산 완충 생리식염수(PBS)로 30분 동안 브로킹하고, GFP 항체(Goat, Santa Cruz) 또는 IRF7(F-1) 항체(Mouse, Santa Cruz)로 1시간 동안 배양하며, PBST로 3회 세정하고, 호르세라디쉬 퍼옥시데이즈-접합 제2차 항체(rabbit anti goat IgG, Santa Cruz, rabbit anti mouse IgG, Gell signaling)로 1시간 동안 배양하며, PBST로 3회 세정하였다. 특이적 신호를 enhanced chemiluminescence system(Pierce) 및 ECL 장치(Fugi, LAS-4000)로 검출하였다.
- [0063] 그 결과, 도 3a와 같이 NS3/4a는 GFP, DR 및 DRE는 절단하지 않았다. 그러나, 전사부로 될 수 있는 DRL, DRLE, DRLmE에서는 더 빠른 이동 밴드를 나타내었다. 이는 이러한 단편들의 크기가 DR과 동일하기 때문이다. DLE 및 DRLE는 강한 더 빠른 밴드를 가진 동일 패턴을 나타내었지만, DRLmE에서는 더 느린 밴드가 훨씬 강하게 나타났다. 이는 돌연변이가 NS3/4a에 대한 기질로서의 효능을 감소시킴을 반영한다. NS3/4a의 효과는 IRF7의 DBD를 인식하는 항 IRF7 항체를 이용함으로써 보다 명확하게 볼 수 있었다.
- [0064] <실시예 6> 프로모터 발현실험
- [0065] 제작된 재조합 단백질들의 전사 기능을 정량적으로 확인하기 위해서 인터페론 알파4 프로모터를 루시페라제 유전자에 결합된 플라스미드를 이용해서 인터페론 분비의 정도를 간접적으로 정량하는 실험을 시행하였다.
- [0066] 즉, 293 세포를 형질감염 24시간 전 10^5 세포/웰로 24웰에 분주하였다. 이러한 세포를 pGL3/인터페론 $\alpha 4$ 프로모터 플라스미드 및 대조군으로 레닐라 루시페레이스(renilla luciferase) 플라스미드, pRL-SV40으로 형질감

염 시켰다. 형질감염 24시간 후, 듀얼 루시페레이즈 분석 키트를 이용하여 루시페레이즈 활성을 Luminometer(Bethold)로 측정하였다.

[0067] 도 3a와 같이, GFP의 경우 음성 대조군으로서 NS3/4a 단백질의 존재유무에 상관없이 인터페론의 발현 자극이 없었다. DR은 NS3/4a와 무관하게 프로모터를 자극하였다. DRL은 NS3/4a에 의해서만 자극되었다. DRE는 하강 수준에서 프로모터를 자극하지만, NS3/4a에 의해 추가적인 자극은 없었다. 이러한 결과로부터, NES만으로는 전사부가 핵으로 이동하는 것을 차단할 수 없다는 것을 알 수 있었다. DRLE는 혼자 발현되면 침묵하며, NS3/4a와 함께 발현될 때만 프로모터를 자극하였다. DRLmE는 NS3/4a 발현에 의해 자극되지 않았다.

[0068] 따라서, DRLE가 가장 효율이 좋고 뛰어난 재조합 단백질이라는 설계의도가 제대로 반영되고 있음을 알 수 있었다.

도면의 간단한 설명

[0069] 도 1은 NS3/4a에 의한 인터페론 발현 조절에 관한 전략을 나타낸 것이고,

[0070] 도 2a는 본 발명에 따라 설계된 재조합 단백질을 나타낸 것이고,

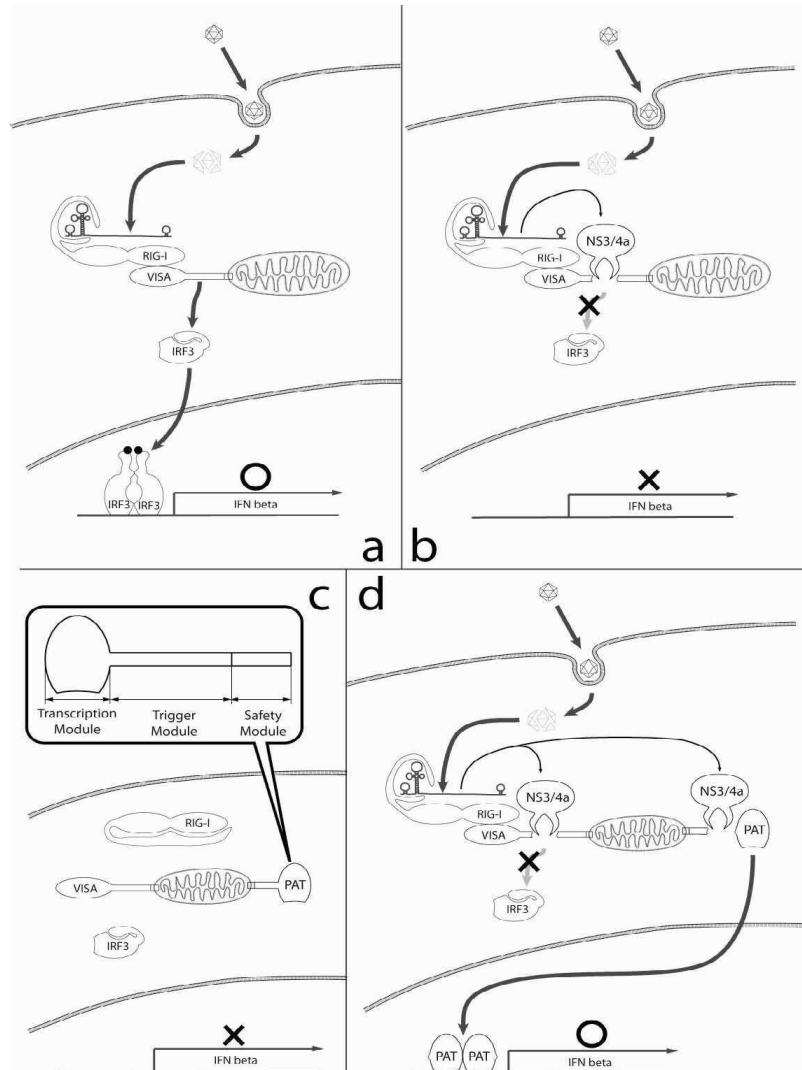
[0071] 도 2b는 본 발명에 따른 재조합 단백질의 NS3/4a에 의한 국제 변화를 나타낸 것이고,

[0072] 도 3a는 본 발명에 따른 재조합 단백질의 NS3/4a에 의한 커팅 프로파일을 나타낸 것이고,

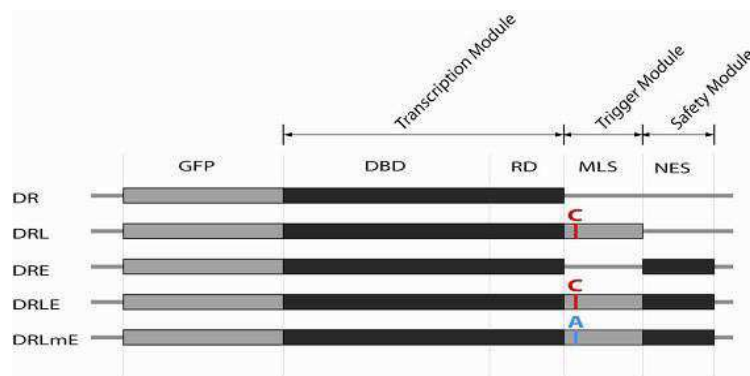
[0073] 도 3b는 본 발명에 따른 재조합 단백질의 기능을 프로모터 발현실험으로 검토한 것이다.

도면

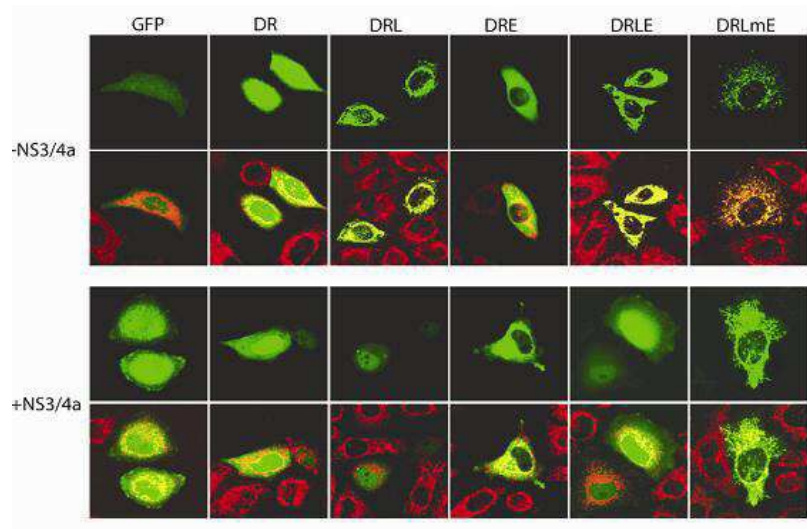
도면1



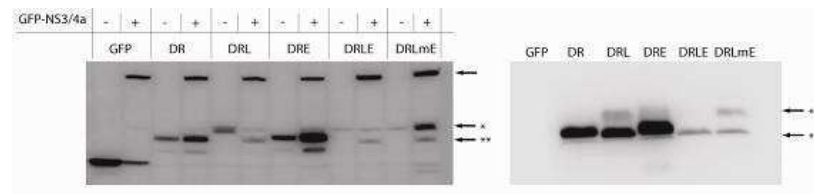
도면2a



도면2b



도면3a



도면3b

