(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0018478
(43) 공개일자 2014년02월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/7105* (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0083870
(22) 출원일자 2012년07월31일
심사청구일자 2012년07월31일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
황순봉
경기 안양시 동안구 귀인로 237, 210동 1703호 (평촌동, 초원대림아파트)
임윤숙
경기 안양시 동안구 흥안대로155번길 29, 202호 (호계동)
(74) 대리인
강성혜

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **사이클린 A2 저해제를 포함하는 C형간염 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

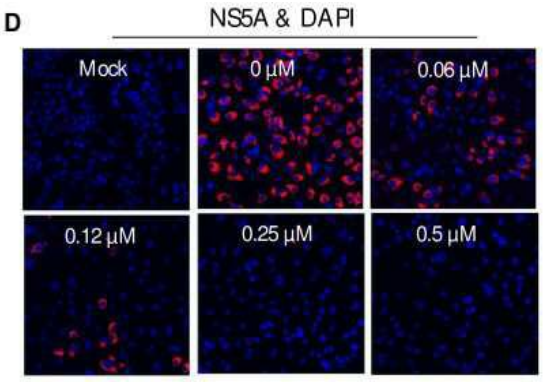
배경과 목적: C형 간염 바이러스 (HCV)는 증식에 숙주세포 단백질을 필요로 한다. HCV 증식에 필수적인 세포인자를 확인하기 위해 세포증식으로 성장한 HCV에 감염된 세포를 이용하여 세포 사이클을 타겟으로 하는 siRNA 라이브러리를 스크린하였으며, 사이클린 A2를 코딩하는 유전자를 선택하고 특성을 규명하였다. CycA2 비조절(deregulation)은 간암을 비롯한 여러 타입의 종양에 관련되어 있었다.

방법: HCV 증식에 미치는 CycA2의 효과는 siRNA 매개 녹다운 분석, 인비트로 및 인비보 단백질 결합 분석, 루시퍼레이즈 리포터 유전자 분석 및 면역블랏팅 분석으로 연구하였다.

결과: siRNA 매개 CycA2 감소는 HCV 서브게놈 레플리콘 세포 및 HCVcc 감염된 세포에서 모두 HCV 복제를 현저히 저해하였다. 또한, HCV NS5B는 인비트로와 인비보에서 CycA2와 특이적으로 상호작용하였다. 단백질 상호작용은 CycA2의 사이클린 박스와 NS5B의 팜 도메인을 통해 매개되었다. HCV NS5B의 팜 도메인의 R/HxL 모티프는 CycA2와의 단백질 상호작용을 매개하며, 이 상호작용은 HCV 복제에 필수적이다. 나아가, CycA2 저해 기능을 하는 천연식물의 산물인 틸로포린은 HCV 복제를 억제하였다.

결론: HCV는 자기 증식을 위해 NS5B 단백질을 통해 CycA2를 조절하며, 틸로포린은 HCV의 치료제로서 가능성이 있다.

대 표 도 - 도11d



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2012026351
부처명	교육과학기술부
연구사업명	도약연구사업
연구과제명	C형 간염바이러스의 복제 및 신호전달 조절 타겟을 이용한 제어기술 개발
기 여 율	1/3
주관기관	한림대학교 산학협력단
연구기간	2012.07.01 ~ 2013.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2008-20004100
부처명	교육과학기술부
연구사업명	미래기반기술개발사업
연구과제명	C형 간염 바이러스의 증식제어기술 개발
기 여 율	1/3
주관기관	한림대학교 산학협력단
연구기간	2011.08.01 ~ 2012.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	1020290
부처명	보건복지부
연구사업명	암정복추진연구개발사업
연구과제명	C형 간염 바이러스의 복제에 관여하는 신규 표적 발굴 및 기능 규명을 통한 새로운 치료기술 개발
기 여 율	1/3
주관기관	한림대학교 산학협력단
연구기간	2012.06.01 ~ 2013.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

사이클린 A2 mRNA 발현 저해제 또는 단백질 활성 저해제를 포함하는 C 형간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 사이클린 A2 mRNA 발현 저해제는 사이클린 A2 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, shRNA (short hair RNA) 및 siRNA (short interfering RNA)로 구성된 군 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 siRNA는 서열번호 제1~4번 중 선택된 1종임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 사이클린 A2 단백질 활성 저해제는 틸로포린임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 사이클린 A2 단백질 활성 저해제는 사이클린 A2 단백질에 결합하는 항체임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 항체는 CycA2의 사이클린 박스에 결합하는 항체임을 특징으로 하는 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 사이클린 A2 저해제를 포함하는 C 형간염 바이러스 치료제에 관한 것으로서, 사이클린 A2 저해제의 일종인 틸로포린을 이용한 실험에서 HCV 복제가 억제됨을 확인하여, HCV 치료제로서의 가능성을 확인하였다.

배 경 기 술

[0002] C형 간염바이러스 (Hepatitis C virus; HCV)는 1989년에 최초로 발견된 바이러스로 급성 또는 만성간염, 간경변 및 간암 (Hepatocellular acrcinoma; HCC) 등 간질환의 주요 원인 중 하나이다 [Choo Q, et al, Science 244:

359-362, Kiyosawa et al., Hepatology 1990; 12;671-675]. 세계인구의 약 3%가 만성적으로 HCV에 감염되었다. HCV는 플라비비리대 (Flaviviridae) 패밀리 내의 헤파시바이러스 (Hepacivirus) 속에 속하며, 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. 이 폴리프로테인은 소포체에서 숙주 프로테이즈 및 바이러스 프로테이즈에 의해 최소한 10개의 기능이 있는 단백질로 프로세싱된다. 코어단백질과 외피단백질 (E1, E2)은 구조단백질들로 숙주세포의 시그널 절단효소에 의해 잘리게 된다 [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]. 비구조 단백질 (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A 및 NS5B)들은 세린 프로테이즈, RNA 헬리케이스 및 RNA-의존적 RNA 폴리머레이즈를 포함하여 다양한 효소활성을 가지는 비구조 단백질들로서, 바이러스의 단백질분해효소에 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]. 상기 C형 간염바이러스는 매우 널리 퍼진 병원체임에도 불구하고, 아직까지 효과적인 치료제나 백신이 개발되지 못하고 있다. 현재 C형 간염바이러스의 치료를 위해서 인터페론-α를 단독 투여하거나 PEG가 결합된 인터페론-α를 리바비린 (ribavirin)과 병용하여 투여하는 방법이 사용되고 있다. 그러나, 이 약물 치료법은 제노타입 간에 현저한 치료효과의 차이를 나타낸다. 비록 HCV NS3/4A 프로테이즈의 저해제인 boceprevir (Victrelis™) 및 telaprevir (Incivek™)가 최근 미국식약청에서 승인 받았으나, 바이러스 단백질을 이용한 치료 전략은 HCV RNA 복제의 오류가 발생하기 쉬운 성향 때문에 충분히 성공적이지는 못하다. 따라서, HCV 라이프 사이클에 관련된 숙주 인자를 이용한 좀더 효과적인 치료법 개발이 절실히 요구되고 있다.

[0003] 여러 가지 증거들은 간세포에서 세포 사이클 비조절 (deregulation)이 악성 형질변환 및 종양 형성에 기여한다고 제시한다. HCV 코어 단백질, NS3, NS4B 및 NS5A 단백질은 종양유전자로의 형질변환을 강력하게 하는 것으로 보인다 [Banerjee A. et al., Viruses 2010;2: 2108-2133]. 이러한 HCV 단백질들은 세포 내 또는 트랜스제닉 마우스에서 안정적으로 발현될 때 세포 성장, 세포 사이클 비조절을 촉진한다. 그럼에도 불구하고, HCV 복제와 감염이라는 맥락에서 형질변환에 대한 증거는 없다. HBV와 달리, 간암의 진행에는 간경변에 앞서 HCV 감염이 요구되며, HCV 매개 간암은 면역 병원성과 관련이 있다. 그렇지만, 세포 사이클 조절에서 HCV의 정확한 역할은 여전히 불확실하다. HCV 복제 메카니즘을 좀더 자세히 통찰하기 위해서 세포 사이클 유전자를 타겟팅하는 siRNA 라이브러리를 이용하여 HCV 증식에 관여하는 인자들을 확인하였다.

[0004] 사이클린 A2(이하 발명의 상세한 설명 및 도면 등에서 "CycA2"와 혼용함)는 두 개의 다른 사이클린 의존적 카이네이즈 (cyclin-dependent kinases; CDKs)인 CDK1과 CDK2를 활성화할 수 있고, S 단계와 유사분열을 조절할 수 있는 세포 사이클 조절단백질이다. CycA2는 대부분 핵에 존재하고, HCV 복제가 일어날 때 소포체에 약간 존재한다 [Tsang W.Y. et al., J. Cell Biol. 2007;178: 621-633]. 간암을 비롯한 여러 타입의 종양에서 CycA2의 비조절이 탐지되었고, 그리하여 CycA2의 비조절이 암발생에 기여하는 것으로 보인다 [Yam C.H. et al., Cell Mol. Life Sci. 2002;59:1317-1326]. HBV 프리-S2 (Pre-S2)에 의한 CycA2 발현의 상향조절이 간세포에서 혹(nodule)의 증식을 유도한다는 보고가 있었다 [Wang H.C. et al., Hepatology 2005;41:761-770]. 나아가, HBV DNA의 삽입에 의한 사이클린 A 유전자의 붕괴는 간암과 관련되어 있다 [Wang J. et al., Nature 1990;343:555-557].

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 따라서, 본 발명은 종래 C형 간염의 효과적인 치료제가 없었던 문제를 해결하고 C형 간염에 효과적인 예방 및 치료제를 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명자들은 CycA2가 NS5B 단백질과 특이적으로 상호작용하며, 이것이 HCV 증식에 결정적인 역할을 함을 밝혔다. 또한, HCVcc 세포에서 저농도의 틸로포린이 HCV 증식을 현저히 저해하며, 틸로포린 존재 하에서 CycA2의 외생적 발현이 HCV 복제를 회복시킴을 밝혔다. 이러한 결과들은 CycA2가 HCV 증식에 결정적 역할을 수행하며 따라서 틸로포린을 HCV에 대한 치료제로 이용할 수 있음을 제시한다.

[0007] 따라서, CycA2의 발현이나 활성을 억제하면 HCV의 증식을 저해할 수 있으므로 CycA2의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는 조성물은 C형 간염의 예방 및 치료제로서 사용할 수 있다.

[0008] 본 발명은 CycA2 발현 또는 활성 저해제를 포함하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 CycA2 발현 저해제가 CycA2 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 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 CycA2에 대한 siRNA가 서열번호 1~4 중 어느 하나임을 특징으로 한다. CycA2에 대한 siRNA는 CycA2 유전자 서열을 바탕으로 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 용이하게 제조할 수 있으며, 가능한 siRNA의 수는 제한이 없으며, 위 4 개의 siRNA는 예시적인 기재일 뿐이다. 또한, CycA2 유전자에 대한 siRNA가 CycA2 유전자와 결합하여 CycA2의 발현을 저해할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명함을 밝혀둔다.

[0011] CycA2에 대한 shRNA 또한 CycA2 유전자 서열을 바탕으로 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 용이하게 제조할 수 있으며, 가능한 shRNA의 수는 특별한 제한이 없으며, CycA2 유전자에 대한 shRNA가 CycA2 유전자와 결합하여 CycA2의 발현을 저해할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명함을 밝혀둔다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 CycA2 단백질 활성 저해제가 틸로포린 (tylophorine)임을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0013] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 CycA2 단백질 활성 저해제가 CycA2 단백질에 결합하는 항체임을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 항체가 CycA2의 사이클린 박스에 결합하는 항체임을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 CycA2 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.

[0016] 본 발명의 조성물은 상기 CycA2 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.

[0017] 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포좀 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 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적정한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0018] 본 발명의 조성물은 특히 등장 멸균 용액 또는 멸균수 또는 적절한 생리 식염수의 첨가에 따라 주사 가능한 용액의 조성을 위해 동결건조 조성물을 포함할 수 있다. 사용되는 유효성분의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 약 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 일회 내지 수회 나누어 투여될 수 있다.

[0019] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 방사선 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법 등과 병용하여 사용할 수 있다.

[0020] HCV 복제는 숙주 세포인자에 매우 의존적이다. HCV가 RNA 복제의 고유한 특성으로 인해 유사종을 생성하기 때문

에 HCV에 대한 효과적인 치료제 개발은 아직 충분히 성공적이지 못한 상태이다. 따라서, HCV 증식에 관여하는 세포인자의 확인은 항HCV 치료법 개발에 새로운 전략을 제공할 수 있을 것이다. 본 발명자들은 siRNA 매개 CycA2 녹다운이 세포내 HCV RNA, 바이러스 단백질 및 세포외 HCV RNA 수준을 현저히 감소시킴을 밝힘으로써 CycA2가 HCV 증식에 필수적임을 제안하였다. 흥미롭게도 cyclin A1/B1 또는 CDK1/CDK2도 HCV 복제에 필수적이지 않았다 (도 14). 이는 CycA2가 HCV 복제에 특이적으로 관련되어 있으며, 이 역할은 다른 사이클린 패밀리의 멤버가 대체할 수 없음을 말해준다.

[0021] CycA2는 GST 풀다운 및 공통면역침전 분석으로 밝힌 바에 의하면 NS5B와 특이적으로 상호작용한다. CyvA2와 NS5B 간의 단백질 상호작용은 NS5B의 팜 도메인과 CycA2의 사이클린 박스를 통하여 매개된다. 바이러스 및 세포 단백질의 R/HxL 모티브들은 CycA2와의 상호작용에 필수적임이 제안된바 있다 [Wohlschlegel J.A. et al., Mol Cell Biol 2001;21:4868-4874]. 또한, 본 발명자들은 NS5B 팜 도메인의 R/HxL 모티브가 CycA2와의 단백질 상호작용을 매개함을 보여주었다. H254R 돌연변이가 CycA2와의 결합능력을 보유하고 있는 반면, H254A 돌연변이는 더이상CycA2와 결합하지 않음은 주목할 만 하다. 결과적으로 HCV 증식은 야생형과 비교할 때 H254A 돌연변이에서는 현저히 감소한다. 이는 CycA2와 NS5B 간의 단백질 상호작용이 바이러스 효고 활성을 조절하기 보다는 바이러스 복제의 효과를 높이는 양호한 세포내 환경을 만들 수 있음을 암시한다. Ranjith-Kumar 등에 의해 개발된 세포-기반 RNA-의존적 RNA 폴리머레이즈 분석 시스템 [Ranjith-Kumar C.T. et al., PloS One 2011;6:e22575]을 이용하여 본 발명자들은 CycA2가 NS5B의 효고 활성에는 아무런 영향을 미치지 않음도 밝혔다 (데이타 나타내지 않음). 또한, 본 발명자들은 siRNA 매개 CycA2 녹다운이 Huh7 세포에서 HCV 복제를 현저히 감소시킴을 증명했다. 이 데이타들은 CycA2와 NS5B 간의 단백질 상호작용이 HCV 복제를 증가시키는 세포내 환경을 조성한다는 개념을 지지한다. 이 경우 NS5B-CycA2 상호작용은 세포 증식을 활성화하여 CycA2에 의해 HCV 복제가 증대한다고 부분적으로 설명할 수 있을 것으로 기대되었다. 그러나, 만약 그렇다면 이 효과는 작고, HCV 복제가 Huh7 세포에서는 세포 성장에 의존적인 반면, Huh6 세포와 같은 다른 세포에서는 HCV 복제가 세포 성장에 독립적이기 때문에 Huh7 세포에 한정될 것이다 [Scholle F. et al., J Virol 2004;78:1513-1524, Windisch M.P. et al., J Virol 2005;79:13778-13793]. 실제로 본 발명자들은 HCV 감염된 Huh7.5 세포에서 NS5B와 CycA2 간의 단백질 상호작용에 의해 세포 사이클 진행이 변화되지 않음을 밝혔다 (도 9). 또한, 짧은 기간 동안 틸로포린을 처리하면 CycA2 발현과 HCV 복제를 저해하기에 충분하며, 반면 세포 성장에는 아무런 영향이 없었다. 따라서, HCV 복제에 미치는 NS5B-CycA2 상호작용의 다면발현성 효과를 결정하기 위한 연구의 필요성이 제기되었다.

[0022] 본 발명자들은 HCV 증식에 미치는 틸로포린의 영향을 평가하였다. 본 발명에서, 틸로포린은 HCV 감염된 세포에서 세포내 HCV RNA, 바이러스 단백질 및 세포외 HCV RNA 수준에서 HCV 증식을 현저히 억제하였다. 틸로포린은 CycA2 발현을 선택적으로 저해하였고, 낮은 투여량 (0.06 μM)의 틸로포린은 HCV 증식을 억제하기에 충분하였다. 또한, 틸로포린 존재 하에서 CycA2 과다발현은 HCV 복제를 실질적으로 회복시켰다. 이는 틸로포린이 여러 신호경로를 방해함으로써 HCV 복제를 저해할 수 있는 가능성을 나타낸다. 틸로포린은 iNOS (inducible nitric-oxide synthase) 및 사이클로옥시제네이즈-Ⅱ를 억제함으로써 항염증 활성을 발휘하는 것으로 보고되어 있다 [Yang C.W. et al., Mol Pharmacol 2006;69:749-758]. 몇몇 HCV 변종이 친염증성 유전자의 상향조절을 통하여 발병에 영향을 미칠 수 있으므로 이는 매우 흥미롭다. 종합하여, 본 발명자들은 CycA2가 NS5B와의 상호작용을 통하여 HCV 증식에 결정적인 역할을 수행함을 보여주었다. 나아가, 본 발명자들은 틸로포린이 HCV 증식을 저해하므로, HCV 치료제로서의 가능성이 있음을 보여주었다.

발명의 효과

[0023] siRNA 매개 CycA2 감소는 HCV 서브게놈 레플리콘 세포 및 HCVcc 감염된 세포에서 모두 HCV 복제를 현저히 저해하였다. 또한, HCV NS5B는 인비트로와 인비보에서 CycA2와 특이적으로 상호작용하였다. 단백질 상호작용은 CycA2의 사이클린 박스와 NS5B의 팜 도메인을 통해 매개되었다. HCV NS5B의 팜 도메인의 R/HxL 모티프는 CycA2와의 단백질 상호작용을 매개하며, 이 상호작용은 HCV 복제에 필수적이다. 나아가, CycA2 저해 기능을 하는 천연 식물의 산물인 틸로포린은 HCV 복제를 억제하였다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 사이클린 A2가 HCV 복제에 필요함을 나타내는 데이타이다. (A) Huh7.5 세포는 20 nM 음성 (Ne), 사이클린 A2 또는 양성 (Po) siRNA로 48시간 동안 트랜스펙션시킨 후 Jc1으로 네 시간 동안 감염시켰다. 이틀 후 HCV

감염성을 포커스 형성 분석방법으로 결정하였다. (B) Huh7.5 세포를 지시한 siRNA로 트랜스펙션 시켰다. 96시간 후 세포 생존율을 MTT 분석으로 결정하였다. (C) 세포 내 HCV RNA (좌측) 및 CycA2 mRNA (우측)을 패널 A에서 묘사한 대로 처리한 세포로부터 분리하여 qPCR로 분석하였다. (D) 총 세포 용균액을 항체로 면역블랏팅하였다. (E) 세포배양 상층액을 모아 세포 외 HCV RNA를 qPCR로 정량하였다. (F) 서브게놈 레플리콘 (제노타입 1b) 세포를 siRNA로 트랜스펙션 시키고, 96시간 후 단백질 발현을 면역 블랏 분석으로 결정하였다. Ne: 음성 대조군 siRNA; Po: 양성 대조군으로서 HCV의 5' NTR을 타겟으로 하는 siRNA. 별표는 유의미한 차이 ($p<0.05$)를 나타낸다.

도 2는 사이클린 A2가 HCV NS5B 단백질과 상호작용함을 나타내는 데이타이다. (A) HEK293T 세포는 Myc-NS5A 또는 Myc-NS5B로 트랜스펙션되었다. 48시간 후, 총 세포 용균액을 모아 GST 또는 GST-CycA2와 함께 배양하였다. 복합체는 글루타치온 비드와 함께 침전되었고, 결합된 단백질은 항-Myc 항체를 이용하여 면역블랏팅으로 분석하였다 (위쪽 패널). Myc-NS5A와 Myc-NS5B의 발현은 항-Myc 항체로 확인하였다 (중간 패널). GST와 GST-CysA2 단백질 발현은 항-GST 항체를 이용한 면역블랏팅으로 확인하였다 (아래 패널). (B) HEK293T 세포는 발현 플라스미드와의 조합으로 트랜스펙션되었다. 48시간 후 세포 용균액은 항-Myc 단일클론 항체로 면역블랏팅하였고, 결합된 단백질은 항-Flag 단일클론 항체로 면역블랏 분석하였다 (위쪽 패널). (C) HEK293T 세포는 Flag-CycA2 및 제노타입 1b의 Myc-NS5B 또는 제노타입 2a의 Myc-NS5B로 코트랜스펙션 되었다. 48시간 후 세포 용균액은 항-Myc 단일클론 항체로 면역침전시켰고, 결합된 단백질은 항-Flag 단일클론 항체로 면역블랏 분석하여 탐지하였다 (위쪽 패널). (D) HEK293T 세포는 Myc-NS5B 발현 플라스미드로 트랜스펙션되었다. 48시간 후 세포 용균액은 항-CycA2 폴리클론 항체로 면역침전되었고, 결합된 단백질은 항-Myc 단일클론 항체로 면역블랏팅하여 탐지하였다 (위쪽 패널). (E) IFN으로 치료하거나 또는 HCV 서브게놈 레플리콘 세포로부터 얻은 총 세포 용균액은 항-CycA2 폴리클론 항체로 면역침전시켰다. 결합된 단백질은 항-NS5B 단일클론 항체 (위쪽 패널) 또는 항-NS5A 폴리클론 항체 (중간 패널)로 면역블랏팅하여 탐지하였다. (F) Naive Huh7 세포 및 HCV 레플리콘 세포는 4% 파라포름알데하이드로 고정시키고 NS5B를 탐지 (녹색)하기 위해 항-NS5B 단일클론 항체, 항-CycA2 폴리클론 항체 및 FITC 결합된 염소 항-마우스 IgG와 함께 배양하였고, 토끼 항-CycA2 폴리클론 항체 및 TRITC 결합된 염소 항 토끼 IgG와 함께 배양하여 CycA2를 탐지하였다 (적색). 이중염색은 NS5B와 CycA2가 함께 있는 위치를 합친 영상 (Merge)에서 노란 형광색으로 나타내었다. 핵을 표지하기 위해 세포는 DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole)로 역염색하였다. 합친 영상의 박스 부분은 오른 쪽에 확대하였다 (crop). (G) HCV 레플리콘 세포를 고정하고 항-NS5B 단일클론 항체와 함께 배양하고, FITC- 또는 TRITC-결합된 항-마우스 항체와 함께 배양하였다 (막대 1번). HCV 레플리콘 세포를 고정하고 토끼 항-CycA2 폴리클론 항체와 함께 배양한 다음, FITC 또는 TRITC-결합된 항-토끼 항체와 함께 배양하였다 (막대 2번 및 3번). NS5B와 CycA2 (막대 4번)의 공통 위치는 Manders'의 오버랩 계수 (Manders' overlap coefficient)로 정량하였다 [Lim Y.S. et al., J. Biol. 2011;85:8777-8788].

도 3은 CycA2와 NS5B 간의 단백질 상호작용이 HCV 증식에 필수적임을 나타내는 데이타이다. (A) NS5B (제노타입 2a)에서 HxL의 야생형 및 돌연변이형의 아미노산 서열. (B) HEK293T 세포를 NS5B 발현 플라스미드 내의 HxL 모티프의 야생형 또는 돌연변이형 및 Flag-CycA2로 코트랜스펙션시켰다. 총 세포 용균액을 모아 48시간 후 항-Flag 단일클론 항체로 면역침전시켰고, 결합된 단백질은 항-Myc 단일클론 항체로 면역블랏하였다 (위쪽 패널). (C) Huh7.5 세포를 Jc1의 야생형 또는 HxL 돌연변이체의 RNA 10 ㎍으로 트랜스펙션시켰다. 4일 후 세포 외 HCV RNA를 세포배양 상층액에서 분리하여 qPCR로 정량하였다. (D) Naive Huh7.5 세포를 (C)에서 모은 Jc1의 야생형 또는 돌연변이형으로 가감염 (mock-infected) 또는 감염시켰다. 감염 이틀 후 모은 총 세포 용균액을 지시한 항체로 면역블랏팅하였다. (E) 패널 D에 기재된 대로 처리한 세포에서 감염 이틀 후 모은 배양 상층액과 세포외 HCV RNA를 qPCR로 정량하였다. (F) Naive Huh7.5 세포를 야생형 또는 Jc1의 HxL 돌연변이로 감염시켰다. 감염 이틀 후 세포를 고정하고 항NS5A 폴리클론 항체와 함께 배양하였다. PBS로 세척 후 시료를 FITC-결합된 염소 항-토끼 IgG와 함께 배양하였다. 핵을 레이블하기 위해 세포를 DAPI로 역염색하였다. 시료는 Zeiss LMS 700 레이저 공촛점 현미경 시스템으로 분석하였다. (G) NS5B 야생형과 돌연변이 모두의 폴리머레이즈 활성을 도 7E와 같이 분석하였다. 데이타는 두 번씩 세 번의 독립적인 실험에서 얻은 결과의 평균값이고, 오류 막대는 평균의 표준편차를 나타낸다. 별표는 유의한 차이를 나타낸다 ($p<0.05$).

도 4는 CycA2가 HCV 생애 주기의 게놈 복제 단계에 관련됨을 나타내는 데이타이다. (A) 본 발명에 이용된 구조체의 모식도이다. (B) Huh7.5 세포는 지시한 siRNA들로 트랜스펙션되었다. 24시간 후 세포는 0.5 ㎍의 pRL-HL과 0.5 ㎍의 β-갈락토시데이즈 플라스미드로 코트랜스펙션되었다. 트랜스펙션 48시간 후 모은 세포 용균액은 루시퍼레이즈 활성을 결정하는데 이용하였고, β-갈락토시데이즈 활성을 이용하여 정상화하였다 (normalize) (위쪽 패널). 면역블랏 분석으로 침묵 효과가 확인되었다 (아래 패널). GAPDH를 로딩 대조군으로 포함시켰다. (C) Huh7.5 세포를 0.5 ㎍의 pRL-HL과 0.5 ㎍의 β-갈락토시데이즈 플라스미드로 코트랜스펙션시켰다. 4시간 후 세

포를 지시된 양의 틸로포린 (tylophorine)으로 48시간 처리한 후 루시퍼레이즈 활성을 측정하였다. (D) Huh7.5 세포를 10 ㎍의 JFH1-luc RNA로 전기천공한 후 DMSO (담체) 또는 0.2 μM의 틸로포린과 함께 배양하였다. 병행 실험에서 인풋 RNA 번역을 결정하기 위해 세포를 10 ㎍의 JFH1-luc GNN으로 전기천공하였다. 세포를 지시된 시각에 모으고 루시퍼레이즈 활성을 측정하였다. 별표는 DMSO 대조군 활성과의 유의한 차이를 나타낸다 (Student's t test; *, P< 0.05; **, P <0.01).

도 5는 CycA2가 HCV NS5B 단백질과 NS5B의 팜 도메인과 CycA2의 사이클린 박스를 통해 상호작용함을 보여준다. (A) Flag-CycA2 및 돌연변이체의 모식도이다. aa: 아미노산. (B) CycA2는 사이클린 박스를 통해 NS5B와 상호작용한다. HEK293T 세포는 Flag-CycA1 발현 벡터의 Myc-NS5B 및 돌연변이체로 코트랜스펙션되었다. 48시간 후 세포 용균액은 항-Myc 단일클론 항체로 면역침전시켰고, 결합된 단백질은 항-Flag 단일클론 항체로 면역블랏팅시켰다 (좌측 윗쪽 패널). Myc-NS5B와 Flag-CycA2 단백질 발현은 항-Flag 또는 항-Myc 단일클론 항체로 면역블랏팅하여 확인하였다 (우측 패널). (C) Myc-NS5B와 돌연변이의 모식도이다. (D) CycA2는 NS5B의 팜 도메인과 상호작용한다. HEK293T 세포를 Flag-CycA2 및 Myc-NS5B 발현 벡터의 돌연변이형으로 코트랜스펙션시켰다. 48시간 후 세포 용균액은 항-Flag 단일클론 항체로 면역침전시켰고, 결합된 단백질은 항-Myc 단일클론 항체로 면역블랏팅하였다.

도 6은 NS5B의 팜 도메인의 RxL/HxL 모티프가 CycA2와의 단백질 상호작용을 매개함을 보여준다. (A) NS5B (제노타입 1b)의 RxL 모티프의 야생형과 돌연변이형을 나타낸다. (B) HEK293T 세포는 Myc-NS5B의 RxL 모티프의 야생형 또는 돌연변이형으로 트랜스펙션시켰다. 48시간 후 총 세포 용균액을 모아 GST 또는 GST-CycAs와 함께 배양하였다. 복합체들은 글루타치온 비드와 함께 침전되었고, 결합된 단백질은 항-Myc 항체를 이용하여 면역블랏팅으로 분석하였다 (윗쪽 패널). Myc-NS5B의 야생형 또는 돌연변이형의 발현은 항-Myc 항체로 확인하였다 (중간 패널). GST와 GST-CycA2 단백질 발현은 항-GST 항체를 이용한 면역블랏팅으로 확인하였다 (아래 패널). (C) HEK293T 세포를 Flag-CycA2 및 야생형 또는 RxL 돌연변이형 중 하나와 함께 코트랜스펙션시켰다. 48시간 후 세포 용균액을 항-Flag 단일클론 항체로 면역침전시켰고, 결합된 단백질은 항-Myc 단일클론 항체로 면역블랏팅시켰다 (윗쪽 패널). 동일한 세포 용균액 내에서 Flag-CycA2의 단백질 발현은 면역블랏 분석으로도 확인하였다 (아래쪽 패널). (D) NS5B (제노타입 2a) HxL 모티프의 야생형과 돌연변이형. (E) HEK293T 세포를 Flag-CycA2 및 Myc-NS5B 내의 야생형 또는 RxL 돌연변이형 중 하나와 함께 코트랜스펙션시켰다. 48시간 후 세포 용균액을 항-Flag 단일클론 항체로 면역침전시켰고, 결합된 단백질은 항-Myc 단일클론 항체로 면역블랏팅시켰다 (윗쪽 패널). 동일 세포 용균액 내에서 Flag-CycA2 단백질 발현을 면역블랏 분석으로 확인하였다 (아래 패널).

도 7은 HCV 증식에서 CycA2-결합 모티프의 역할을 나타낸다. (A) Huh7.5 세포는 Jc1의 야생형 또는 RxL 돌연변이형의 RNA 10 ㎍으로 트랜스펙션시켰다. 4일 후 총 세포 용균액을 모아 지시된 항체로 면역블랏팅 하였다. (B) 트랜스펙션된 세포의 배양 상층액을 모아 세포 외 HCV RNA를 qPCR로 정량하였다. (C) Naive Huh7.5 세포는 상기 (B)에서 모은 Jc1의 야생형 또는 돌연변이형으로 가감염 (mock-infected) 또는 감염시켰다. 2일 후 모은 총 세포 용균액을 지시된 항체로 면역블랏팅 하였다. (D) 배양 상층액을 모아 세포 외 HCV RNA를 qPCR로 정량하였다. (E) NS5B의 야생형 및 돌연변이형의 폴리머레이즈 활성을 분석하였다. 간단히 설명하면, HEK293T 세포를 IFNb-luc, Flag-RIG-I, β-갈락토시데이즈 및 다양한 NS5B 돌연변이체 플라스미드로 코트랜스펙션 시켰다. 24시간 후 세포를 용균하고 루시퍼레이즈 활성을 측정하고 β-갈락토시데이즈 활성으로 정상화시켰다. 데이타는 두 번씩 반복한 세 번의 독립적인 실험에서 얻어진 평균값이고, 막대는 평균에 대한 표준편차를 나타낸다. 별표는 유의한 차이를 나타낸다 ($p<0.05$).

도 8은 제노타입 1b의 NS5B RxL 모티프가 CycA2 상호작용 및 RNA 복제에 필요함을 나타내는 데이타이다. (A) 제노타입 1b의 NS5B RxL 모티프의 야생형과 돌연변이형의 아미노산 서열. (B) HEK293T 세포를 Flag-CycA2와 NS5B 발현 벡터의 야생형 또는 돌연변이형으로 코트랜스펙션시켰다. 총 세포 용균액을 48시간 후 모아 항-Myc 단일클론 항체로 면역침전시키고, 결합된 단백질은 항-Flag 단일클론 항체로 면역블랏팅하였다 (윗쪽 패널). (C) NS5B의 야생형과 돌연변이형의 폴리머레이즈 활성을 측정하였다. 데이타는 두 번씩 세 번의 독립적인 실험에서 얻어진 결과의 평균치이고, 막대는 평균에 대한 표준편차를 나타낸다. (D) 제노타입 1b의 야생형 (NS5B 내 RSL)과 돌연변이 구조 (NS5B 내 ASL)의 모식도이다. 두 플라스미드는 pFK-neo/NS3-3' 유래 반딧불이 루시퍼레이즈 유전자와 네오진을 교차 (replacing)하여 구축하였다 (Lohmann *et al*. J. Virol. 2001;75:1437-1449). (E) Huh7.5 세포는 야생형 또는 R254A 돌연변이-luc RNA 10 ㎍으로 전기천공하였다. 세포를 모아 루시퍼레이즈 활성을 측정하였다. 활성은 정상화하여 상대 밝기 단위 (relative light unit ;RLU)로 나타내었다. 데이타는 두 번씩 두 번의 독립적 실험에서 얻어진 결과의 평균값이다.

도 9는 CycA2와 NS5B 간의 단백질 상호작용이 HCV 감염세포 내에서 세포 사이클을 변화시키지 않음을 나타낸다. Huh7.5 세포는 GFP 표지된 Jc1 바이러스로 감염시켰다. 48시간 후 세포는 775% 에탄올로 두 시간 동안 고정시키고, RNase (2mg/ml)로 처리한 다음, 50 ㎍/㎖의 프로피디움 아이오다이드로 염색하였다. 시료는 나일론 메스 튜브 (BD biosciences)로 걸러 세포 응집체를 제거하고 FACSCalibur flow cytometer 29 (BD biosciences)로 분석하였다. (A) GFP-음성 또는 양성 세포를 GFP 신호를 바탕으로 게이팅으로 나누었다. 각기 만 개의 세포로 FlowJo software (TreeStar, San Carlos, CA)를 이용하여 세포 사이클을 분석하였다. 세포 사이클 분포는 데이타 (좌측 패널)와 같고, 각 세포 사이클 단계의 평균값은 두 번의 독립적 실험에서 얻은 것이고, 우측 패널에 나타내었다. (B) 복제 적합 세포 (GFP-양성 세포)의 수를 탐지하기 위해 각 시료에서 대조군으로서 가감염군을 이용하여 GFP-음성 세포를 게이팅하였다 (좌측 세 개의 패널). 야생형 및 H254A 돌연변이형의 복제 적합 세포는 우측 패널에 나타내었다. 데이타는 두 번씩 두 번의 독립적인 실험에서 얻어진 평균값이고, 별표는 유의한 차이점을 나타낸다 (Student's t test; **, P< 0.01).

도 10은 틸로포린이 레플리콘 세포에서 HCV 복제를 저해함을 나타낸다. (A) 서브게놈 레플리콘 (제노타입 1b)을 내포한 Huh 7 세포를 틸로포린으로 각각 48시간 및 72시간 동안 처리하였다. HCV와 CycA2의 단백질 발현은 면역블랏팅으로 분석하였다. (B) 레플리콘 세포의 세포 생존율은 틸로포린 처리 72시간 후 MTT 분석으로 결정하였다.

도 11은 틸로포린이 투여량 의존적으로 HCV 증식을 억제함을 나타낸다. (A) Huh7.5 세포는 Jc1으로 4시간 동안 가감염 또는 감염시킨 다음 다양한 농도의 틸로포린으로 48시간 동안 처리하였다. 세포 내 RNA를 세포에서 분리하여 qPCR로 분석하였다. (B) 총 세포 용균액을 모아 항체로 면역블랏팅하였다. (C) 배양 상층액을 A와 같이 처리하고 세포 외 HCV RNA를 qPCR로 정량하였다. (D) Jc1으로 감염 또는 가감염된 Huh7.5 세포에 틸로포린 양을 증가시키며 48 시간 처리하였다. 세포를 고정하고 토끼 항-NS5A 폴리클론 항체와 함께 배양하였다. PBS로 세척한 후 FITC 결합된 염소 항-토끼 IgG와 함께 배양하였다. 세포는 핵을 표지하기 위해 DAPI로 역염색하였다. 시료는 Zeiss LSM 700 레이저 공촛점 현미경으로 분석하였다. (E) Huh7.5 세포를 벡터 또는 Flag 표지된 CycA2로 트랜스펙션시켰다. 24시간 후 세포를 Jc1으로 네 시간 동안 감염시키고 DMSO 없이 또는 틸로포린 존재 (0.06 μM) 하에 배양하였다. 틸로포린 처리하고 24시간 후 세포 용균액을 모아 항체로 면역블랏팅하였다. (F) Huh7.5 세포를 10 ㎍의 JFH1-luc RNA로 24시간 동안 트랜스펙션시키고 벡터 또는 CycA2로 24시간 더 트랜스펙션시켰다. 세포를 DMSO 9담체) 또는 틸로포린으로 24시간 처리한 후 루시퍼레이즈 활성을 측정하였다. 데이타는 두 번의 독립적 실험의 평균값이다. 별표는 유의한 차이를 나타낸다 (p<0.05).

도 12는 틸로포린에 의한 HCV 복제 및 CycA2 발현 억제가 세포 성장 정지에 앞서 일어남을 나타낸다. (A) 두 개의 다른 농도를 이용하여 틸로포린을 처리하는 시간을 나타낸 다이어그램. (B) Huh7.5 세포는 DMSO 또는 틸로포린으로 지시된 시각에 처리하였다. 세포 증식은 MTT 분석으로 결정하였다. (C) Huh7.5 세포는 10 ㎍의 JFH1-luc RNA로 15시간 동안 트랜스펙션시킨 다음 DMSO 또는 틸로포린으로 지시된 시각에 처리하였고 루시퍼레이즈 활성을 측정하였다. 데이타는 두 번의 독립적 실험의 평균값이다 (좌측 패널) (*, P< 0.05; **, P <0.01). 좌측 패널에 묘사된 대로 처리한 Huh7.5 세포는 면역블랏팅하여 CycA2 발현 수준을 결정하였다 (우측 패널).

도 13은 HCV 복제에서 세포 성장 저해는 틸로포린의 효과에 근거한 메카니즘이 아님을 나타낸다. (A) 다이어그램은 틸로포린 처리 시간표를 나타낸다. Huh7.5 세포는 Jc1으로 네 시간 동안 감염시켰고 24시간 동안 투여량이 다른 틸로포린 존재 하에 배양하였고, 그 후 틸로포린을 제거하고 24시간 동안 더 배양하였다 (T1). Jc1으로 감염시킨 Huh7.5 세포를 투여량이 다른 틸로포린 존재 하에 48시간 동안 배양하였다 (T2). (B) 지시된 시각에 틸로포린 0.12 mM (좌측 패널) 또는 0.25 mM (우측 패널)에서의 세포 증식을 MTT 분석으로 탐지하였다. 데이타는 각기 두 번씩 세 번의 독립적인 실험의 평균값이며, 막대는 표준편차를 나타낸다. (C) Huh7.5 세포를 Jc1으로 네 시간 동안 감염시킨 후 (A)와 같이 처리하였다. 세포 용균액은 지시된 항체로 면역블랏팅하였다.

도 14는 다른 사이클린 또는 CDKs는 그대로 둔 채 CycA2만 유전자 침묵시키면 HCV 증식이 손상됨을 보여준다. Huh7.5 세포를 20 nM의 지시된 siRNAs로 48시간 동안 트랜스펙션시킨 후 HCV Jc1으로 네 시간 동안 감염시켰다. 감염 이틀 후 배양 상층액을 모아 세포외 HCV RNA를 qPCR로 정량하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재범위 내로 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0026] **플라스미드 구축**

[0027] HeLa 세포에서 제조한 cDNA를 이용하여 PCR로 전장 CycA2를 증폭시켰고, p3XFLAG-CMV10 (Sigma Aldrich)의 *Hin*dIII/*Eco*RI 부위에 클로닝하였다. GST-CycA2는 pGEX-4T-1 벡터 (Amersham Biosciences AB, Uppsala) 내로 서브클로닝하였다. CycA2와 NS5B 돌연변이는 PCR로 제조되어 p3XFLAG-CMV10와 pEF6B/His-Myc 발현 벡터에 각각 서브클론되었다. NS5B와 Jc1의 점 돌연변이체는 QuikChange II XL 부위 지시 돌연변이 킷트 (Stratagene)를 이용하여 구축되었다. pEF-BOS-Flag-RIG-I은 Dr. Takashi Fujita (Kyoto University, Japan)로부터 제공받았다.

[0028] **세포 배양 및 DNA 트랜스펙션**

[0029] 모든 세포주는 10% 우태혈청과 100 units/ml의 페니실린-스트렙토마이신이 함유된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 배양하였다. HCV 서브게놈 레플리콘 (제노타입 1b) 세포와 IFN 처리된 세포를 선행기술에 기재된 방법에 따라 배양하였다 [Park C.Y. et al., J. Hepatol. 2009;51:853-864]. DNA 트랜스펙션을 위해 ~ 5 x10^5 세포를 60-mm 디쉬에서 배양하고 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, Sigma-Aldrich)을 이용하여 발현 플라스미드로 트랜스펙션시켰다 [Park C.Y. et al., J. Hepatol. 2009;51:853-864].

[0030] **GST 풀다운 분석**

[0031] *E. coli* BL21 (DE) (Novagen)에서 발현된 글루타치온 S-트랜스퍼레이즈 (GST)-CycA2 융합단백질을 글루타치온-세파로즈 4B 비드로 정제하고, HEK293T 세포에서 발현된 Myc-NS5A 또는 Myc-NS5B와 함께 배양하고, GST 풀다운 분석을 수행하였다 [Park C.Y. et al., J. Hepatol. 2009;51:853-864].

[0032] **루시퍼레이즈 복제 분석**

[0033] 이중 루시퍼레이즈 리포터 분석을 위해 Huh7.5 세포를 20 nM의 지시된 siRNAs로 24시간 동안 트랜스펙션시킨 후 pRL-HL 플라스미드와 β-갈락토시데이즈 플라스미드로 함께 트랜스펙션시켰다 [Kang S.M. et al., FEBS Lett. 2011;585:3236-3244]. HCV 리포터 분석을 위해, Huh7.5 세포를 10 ㎍의 *in vitro* 전사된 JFH-Luc RNA로 전기천공한 후 지시된 시각에 틸로포린으로 처리하였다. 루시퍼레이즈 분석은 종래 기술과 같이 수행하였다 [Lim Y.S. et al., J. Virol. 2011;85:8777-8788]. pEF-BOS-Flag-RIG-I를 이용한 HCV NS5B의 세포 기반 RNA 의존적 RNA 폴리머레이즈 분석을 수행하였다 [Ranjith-Kumar C.T. et al., PloS One 2011;6:e22575]. 요약하면, 2.5x10^5 HEK293T 세포를 6-웰 플레이트에 시딩하고 지시된 플라스미드로 트랜스펙션시켰다. 틸로포린은 플라스미드 트랜스펙션 4시간 후 가하였다. 루시퍼레이즈 활성은 플라스미드 트랜스펙션 24시간 후 측정하였다.

[0034] **바이러스 감염도 측정 (Viral infectivity assay)**

[0035] 세포에서 방출된 감염성 바이러스 역가를 측정하였다 [Lim Y.S. et al., J. Virol. 2011;85:8777-8788]. Huh7.5 세포는 HCV로 감염시킨 다음 바이러스 감염을 모니터하였다. 바이러스 역가는 ㎖ 당 포커스 형성 단위 (focus-forming units; FFU)로 계산하였다.

[0036] **MTT 분석**

[0037] 약 1.5 x10^4 세포를 24-웰 플레이트에 시딩하고 해당 siRNAs로 트랜스펙션시켰다. 숙주세포 생존율은 MTT {3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide} (Sigma)를 이용하여 측정하였다.

[0038] **RNA 전사체 및 감염성 HCV 제조**

[0039] HCV RNA 전사체를 선행논문에 따라 제조하였다 [Lim Y.S. et al., J. Virol. 2011;85:8777-8788]. 간단히 설명

하면, HCV pFK-Jc1과 pFK-Jc1-GFP 플라스미드를 *Mlu*I 절단으로 이은 다음 페놀-클로로포름 추출로 정제하였다. 인비트로 전사는 RiboMAX™ T7 발현 시스템 (Promega)을 이용하여 수행하였다. RNA 전사체는 TRIzol®LS (Invitrogen)로 정제하였다. 인 비트로 전사된 게놈 Jc1 RNA 10 ㎍을 120 mM KCl, 0.15 mM $CaCl_2$, 10 mM 인산 칼슘, 25 mM HEPES, 2 mM EDTA, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM ATP 및 4 mM GSH를 함유한 400 ㎕의 cytomix 완충액 (pH 7.6)에 재현탁한 $7.5x10^6$ Huh7.5 세포와 0.4-cm 큐벳에서 혼합하고, 혼합액은 Bio-Rad GenePulser II 전기천공기를 이용하여 270 V, 950 μF로 전기천공하였다. 세포는 완전배지 (10% FBS, 100 units/㎖ 페니실린, 100 ㎍/㎖ 스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민, 1 mM 비필수 아미노산 [NEAA] 및 10 mM HEPES를 포함하는 저농도 글루코스 DMEM)에 조심스럽게 옮긴 다음 150-mm 디쉬에 놓았다. 24시간 후, 신선한 배지로 갈아주고 사멸 세포를 제거하였다. 전기천공 4일 후, 배양배지를 모으고 0.45-mm syringe-top filter unit (Milipore)로 여과한 다음 저장하였다. RNA 의존적 RNA 폴리머레이즈 활성을 파괴하는 NS5B 활성부위 돌연변이를 포함하는 Jc1/GNN 돌연변이체를 병렬로 제조하였다. Jc1/GNN 돌연변이 RNA로 트랜스펙션된 세포에서 모은 배양상층액을 기재된 대로 제조하여 가감염 (mock infection)에 이용하였다.

[0040] **면역침전 (Immunoprecipitation)**

[0041] HEK293T 세포를 각각 Flag-CycA2 2 ㎍, Myc-NS5A 2 ㎍ 및 Myc-NS5B 플라스미드 8 ㎍으로 트랜스펙션시켰다. 총 DNA 양은 빈 벡터를 가하여 일정하게 맞추었다. 트랜스펙션 48시간 후 세포를 모으고 용균 ELB 완충액 [50 mmol/ℓ HEPES (pH 7.6), 250 mmol/ℓ NaCl, 5 mmol/ℓ EGTA, 0.2% NP-40, 1 mmol/ℓ b-glycerophosphate, 1 mmol/ℓ NaF, 1 mmol/ℓ Na_3VO_4 및 1 mmol/ℓ phenylmethyl-sulfonyl fluoride]으로 용균시켰다. 세포 용균액은 얼음 위에서 25-게이지 바늘을 열 번 통과시켜 분쇄하였고, 13,000rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액은 항-Flag 항체 또는 항-Myc 항체와 함께 4℃로 오버나잇 배양하였다. 시료는 30 ㎕의 프로테인 A 비드 (Zymed Laboratories Inc.)와 함께 1.5시간 더 배양하였다. 비드는 세포 용균 ELB 완충액으로 네 번 세척하였고, 결합된 단백질은 SDS-PAGE로 분리하였으며, 나이트로셀룰로스 막으로 전이시켰고, 2차 항체로 면역블랏 분석하여 탐지하였다.

[0042] **면역블랏 분석**

[0043] 동량의 단백질을 SDS-PAGE 하고 나이트로셀룰로스 막에 전기전이시켰다. 막은 5% 탈지분유 함유 TBST 완충액 {Tris-buffered saline-Tween :20 mmol/liter Tris-HCl [pH 7.6], 500 mmol/liter NaCl 및 0.25% Tween 20}으로 한 시간 동안 블로킹하고, 1% 탈지분유 함유 TBST 완충액 내의 지시된 항체와 함께 4℃에서 오버나잇 배양하였다. TBST 완충액으로 세 번 세척한 후 1% 탈지분유 함유 TBST 내의 고추냉이 퍼옥시데이즈가 결합된 염소 항-토끼 항체 또는 염소 항-마우스 항체 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA)와 함께 한 시간 동안 실온에서 막을 배양하였다. 단백질은 ECL kit (Amersham Biosciences)로 탐지하였다.

[0044] **화학제품과 항체**

[0045] 틸로포린은 Enzo Life Science (영국)에서 구입하였고, CycA2, GAPDH 및 Myc에 대한 항체들은 Santa Cruz에서, GST 항체는 Cell signaling에서, Flag 항체는 Sigma Aldrich에서 구입하였다.

[0046] **통계 분석**

[0047] 데이타는 최소 두 번의 독립적 실험의 평균 ± 표준편차로 나타내었다. Student's *t* test는 Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA)을 이용하였고, 통계 분석에 이용하였다. < 0.05의 P 값은 통계학적으로 유의미하다고 판단된다.

[0048] **<결과>**

[0049] **결과 1: CycA2는 HCV 복제에 필수적이다.**

[0050] 먼저 HCVcc 감염 세포에서 세포 사이클을 조절하는 131개의 유전자를 타게팅하는 siRNA 라이브러리를 스크린하여 11개의 후보를 선발하였다 [Lim Y.S. et al., J. Virol. 2011;85:8777-8788]. 이 유전자들 중 CycA2를 코딩하는 유전자를 선택하여 규명하였는데, 이유는 CycA2 조절 완화가 마이러스 매개 간암 발생 및 악성 형질변환에 관련되어 있기 때문이다 [Yam C.H. et al., Cell Mol Life Sci 2002;59:1317-1326, Wang H.C. Hepatology 2005;41:761-770, Wang j. et al. Nature 1990;343:555-557]. CycA2 발현을 억제하면 세포 독성이 유도되지 않고 (도 1B) HCV 감염성이 현저히 저해된다 (도 1A). 도 1C는 CycA2 mRNA 수준이 siRNA 처리에 의해 강하게 억제되었음을 보여준다. 그 결과, 세포내 HCV RNA 수준도 CycA2 녹다운 세포에서 현저히 감소하였다. HCV 복제에 대한 CycA2의 효과를 좀더 확인하기 위해 CycA2 녹다운 세포에서 바이러스 단백질 발현 수준을 조사하였다. 유사하게, CycA2 발현을 침묵시키면 HCV 발현이 손상되었다 (도 1D, 레인 2). CycA2 녹다운 세포에서 HCV 생성을 좀더 시험하기 위해서, 세포외 HCV RNA를 qPCR로 정량하였다. 도 1E와 같이, CycA2 발현을 침묵시키면 HCV 생산이 강하게 저해받는다. HCV 복제에서 CycA2의 역할은 HCV 서브게놈 레플리콘을 포함하는 Huh7 세포에서 시험하였다. 본 발명자들은 HCV 레플리콘 세포에서 CycA2 녹다운은 바이러스 복제를 현저히 저해하였음을 밝혔다 (도 1F, 레인 2). 종합적으로, 이 데이타들은 CycA2가 HCV 복제에 필수적임을 말해준다.

[0051] **결과 2: CycA2는 HCV NS5B 단백질과 인비트로 및 인비보에서 상호작용한다.**

[0052] HCV가 증식에 CycA2를 필요로 하기 때문에 본 발명자들은 CycA2가 바이러스 단백질과의 상호작용을 통해 HCV 증식을 상향조절할 것으로 추측하였다. NS5A와 NS5B가 바이러스 복제 복합체의 필수 구성요소이기 때문에, 먼저 인비트로 GST 풀다운 분석으로 가능한 단백질 상호작용을 연구하였다. 도 2A는 GST 또는 NS5A는 CycA2와 상호작용 하지 않고, 선택적으로 NS5B에 결합함을 나타낸다. 인비트로 결과를 좀더 확인하기 위해 공통면역침전 분석을 수행하였다. 실제로, NS5A는 아니고 NS5B만 인비보에서 CycA2와 특이적으로 상호작용하였다 (도 2B, 레인 5). 또, 제노타입 1b 및 2a 유래 NS5B가 모두 CycA2와 상호작용함을 확인하였다 (도 2C, 레인 4와 5). 다음으로 NS5B가 내생 CycA2와 상호작용할 수 있는지를 공통면역침전 분석을 이용하여 조사하였다. 예상한 대로, NS5B 단백질은 내생 CycA2와 상호작용하였다 (도 2D, 상단 패널의 레인 4). 본 발명자들은 NS5A (도 2E, 중간 패널의 레인 4)가 아닌 NS5B (도 2E, 상단 패널의 레인 4)가 HCV 레플리콘 세포에서 내생 CycA2와 상호작용함을 밝혔다. 이러한 결과들은 NS5B가 CycA2와 같은 장소에 위치함을 암시한다. 이러한 가능성을 확인하기 위해 Naive Huh7 및 HCV 레플리콘 세포를 이용하여 면역형광분석을 수행하였다. 도 2F는 NS5B가 주로 세포질에 존재하며, 반면 CycA2는 세포질과 핵 모두에 존재함을 나타낸다. 이중 염색은 겹친 영상에서 노란 형광색으로 나타나며, 세포질에 CycA2와 NS5B가 같은 곳에 위치함을 보여준다. 이 결과를 확인하기 위해 Manders 오버랩 계수로 CycA2와 NS5B의 공존을 정량하였다 [Lim Y.S. et al., J. Virol. 2011;85:8777-8788]. NS5B를 TRITC 및 FITC로 레이블링한 NS5B의 오버랩 계수는 ~0.95였다 (도 2G, 1번 막대). CycA2가 주로 핵에 존재하고 일부 세포질에 존재하기 때문에 CycA2의 오버랩 계수도 결정하였다. 이중 염색 데이타는 핵에서 CycA2의 오버랩 계수가 0.96 (도 2G, bar 2)이고, 반면 세포질의 CycA2 오버랩 계수는 0.91 (도 2G, bar 3)임을 나타낸다. CycA2/NS5B의 오버랩 계수는 0.78이었고, 이는 이 단백질들이 세포질 내에 공존함을 나타낸다 (도 2G, bar 4). 또한, 본 발명자들은 CycA2의 사이클린 박스와 NS5B의 팜 도메인 (palm domain)을 통해 CycA2와 NS5B가 상호작용함을 밝혔다 (도 5). 종합하여 이 데이타들은 CycA2가 인비트로와 인비보에서 NS5B와 특이적으로 상호작용함을 보여준다.

[0053] **결과 3: CycA2와 NS5B 간의 단백질 상호작용은 HCV 복제에 필수적이다.**

[0054] CycA2와 상호작용하는 많은 세포 단백질 및 바이러스 단백질들은 공통적으로 RxL 모티프 (상기 x는 변수임)를 갖는다 [Chen J. et al., Mol Cell Bio 1996;16:4673-4682, Adams P.D. et al., Mol Cell Biol 1999;19:1068-1080, Ma T. et al., Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:382-387]. HCV 복제에서 NS5B와 CycA2 간의 상호작용의 기능적 타당성을 시험하기 위해 CycA2와의 상호작용을 위해 팜 도메인의 RxL 모티프에 어떤 아미노산이 필요한가를 시험하였다. GST 풀다운 분석과 공통면역침전 분석을 이용하여 제노타입 1b (RxL)와 제노타입 2a (HxL) 유래 NS5B 팜 도메인의 R/HxL 모티프가 모두 CycA2와의 결합에 책임이 있음을 밝혔다 (도 6).

[0055] NS5B와 CycA2 간의 상호작용은 HCV가 자신의 복제를 위해 NS5B를 통하여 CycA2를 납치할 가능성을 높여준다. 이 가설을 시험하기 위해 Jc1 게놈 백그라운드에 NS5B의 CycA2 결합 모티프 내로 알라닌 스캐닝 돌연변이 (alanine-scanning mutations)를 도입하였다. 그 결과 H254R 돌연변이는 야생형과 비교할 때 비슷한 수준의 바이러스 단백질과 세포외 RNA를 생산하였으나, RSL/AAA 돌연변이는 증식에서 결함을 나타내었는데, 따라서 바이러스 단백질과 RNA 생산을 탐지할 수 없었다 (도 7A-D). 그렇지만, RSL/AAA 돌연변이는 루시퍼레이즈 활성 손실

로 인해 RNA 합성에 심각한 결함이 있었다 (도 7E). RSL/AAA에서 알라닌 돌연변이의 부정적 효과를 배제하기 위해 RSL 모티프에 일련의 돌연변이체들을 구축하였다 (도 3A). 면역침전 데이타는 RSL 모티프의 치환이 CycA2의 결합 적합성을 훼손함을 확인시켜 주었다 (도 3B). 흥미롭게도 야생형과 비교하여 발현 수준은 현저히 감소하였음에도 불구하고, H254A 돌연변이체의 바이러스 증식 정합성은 여전히 유지되었다 (도 3C-F). H254A 돌연변이가 구조적 변화를 유도하기 때문에 NS5B 단백질의 접힘 구조가 붕괴되어 폴리머레이즈 활성이 파괴될 수 있다. 이러한 가능성을 배제하기 위해 pEF-BOS-Flag-RIG-I를 이용하여 H254A 돌연변이의 폴리머레이즈 활성을 분석하였다 [Ranjith-Kumar C.T. et al., PloS One 2011;6:e22575]. 도 3G와 같이, NS5B의 폴리머레이즈 활성은 H254A 돌연변이에 의해 손상되지 않았다. 이것은 NS5B와 CycA2 간의 단백질 상호작용이 HCV 복제를 증가시키기 위해 세포 환경을 조성함을 암시한다. NS5B의 R/HxL 모티프의 기능적 중요성을 좀더 확인하기 위해 제노타입 1b 레플리콘 골격에 R254A 돌연변이체를 구축하였고, CycA2 상호작용 및 RNA 복제에 대한 이 돌연변이의 효과를 연구하였다. 도 8과 같이, 이 돌연변이체는 결합 적합성은 상실했지만, 폴리머레이즈 활성은 보유하고 있었다. 그럼에도 불구하고 이 돌연변이체의 복제 적합성은 극적으로 감소하였고, 이는 NS5B와 CycA2 간의 단백질 상호작용이 HCV 제노타입 1b 복제에서 중심적 역할을 수행함을 말해준다. L256 돌연변이는 CycA2와의 결합 적합성을 훼손시킬 뿐 아니라 폴리머레이즈 활성도 손상시켜 이 HCV 돌연변이체는 더이상 증식할 수 없었음은 주목할 만하다. 종합적으로, 이러한 결과들은 CycA2와 NS5B 간의 단백질 상호작용이 HCV 증식에 결정적인 역할을 수행함을 제시한다. 다음으로 우리는 HCV 감염이 CycA2와 NS5B 간의 단백질 상호작용에 의존하여 세포 사이클 진행을 변화시킬 수 있는지 여부에 대해 질문을 던졌다. GFP-표지된 야생형 또는 GFP-표지된 H254A 돌연변이형으로 감염된 Huh7.5 세포에 대해 세포 사이클 분포를 분석하였다. 도 9와 같이, 야생형과 (CycA2와 상호작용하지 않는) H245A 돌연변이 HCV로 감염된 세포 간에 G1, S 및 G2/M 단계의 세포 수로 결정된 세포 사이클 분포에서 차이는 없었다. 뿐만 아니라, 이미 보고된 바 [Kannan R.P. et al., J. Birol. 2011;85:7989-8001]와 같이 야생형과 돌연변이 바이러스로 감염된 세포 모두 G2/M 단계의 세포 축적이 발생했고, 이는 세포 사이클 진행의 변화가 HCV 복제에서 NS5B와 CycA2 간의 단백질 상호작용의 주요 효과가 아님을 말해준다.

[0056]

[0057] **결과 4: 틸로포린은 HCV 증식을 저해한다.**

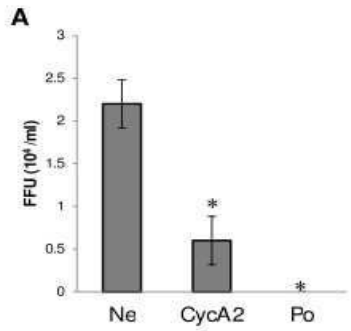
[0058] HCV 증식에 CycA2가 필요하다는 사실은 HCV 증식에 CycA2 저해제가 어떤 영향을 미칠지 의문을 던져주었다. 최근 Wu *et al.*은 틸로포라 인디카 (*Tylophora indica*)라는 식물에서 유래한 천연 화합물로서 CycA2 발현을 특이적으로 저하시키지만, 다른 사이클린과 CDKs들은 저하시키지 않는다고 보고하였다 [Wu C.M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009;386:140-145]. HCV 증식에 미치는 틸로포린의 영향을 알아보기 위해 HCV 레플리콘 세포를 각각 48시간 및 72시간 동안 투여량을 달리하여 틸로포린을 처리하였다. 도 10a와 같이, 세포내 HCV 단백질과 CycA2 수준은 투여량 의존적으로 감소하였다. 또한, 틸로포린은 MTT 분석으로 측정한 바와 같이, Huh7 세포에서 세포 독성을 유발하지 않았다 (도 10b). HCV 증식에 대한 틸로포린의 효과를 좀더 알아보기 위해 Jc1으로 감염된 세포를 다양한 농도의 틸로포린으로 처리하였다. 0.06 μM의 틸로포린이 세포내 HCV RNA (도 11a), 바이러스 단백질 (도 11b), 세포외 HCV RNA (도 11c) 수준에서 HCV 증식을 효과적으로 저해하는며, 이 저해는 투여량 의존적인 것으로 나타났다. HCV 증식에 대한 틸로포린의 저해효과는 공촛점 현미경으로 더 확인되었다 (도 11d). 앞선 연구에서 CycA2를 과다발현시키면 G1 단계에서 틸로포린에 의해 유도된 세포 사이클 진행억제를 구제할 수 있음이 보고된바 있다 [Wu C.M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009;386:140-145]. 그리하여, 본 발명자들은 CycA2를 과다발현시키면 틸로포린 매개 HCV 복제 저해를 회복할 수 있을지를 시험하였다. 실제로, CycA2 과다발현은 HCV 복제를 현저히 회복시켰고 (도 11e,레인 3 vs. 4), 이는 HCV 복제에 대한 틸로포린의 저해 효과가 CycA2를 매개로 한 것임을 말해준다. JFH1-luc 리포터 시스템을 이용하여 HCV 복제가 틸로포린 처리한 대조군 세포와 비교하여 약85% 억제되었음을 밝혔다 (도 11f). 그렇지만, HCV 복제는 외부로 CycA2를 발현하는 세포에서는 현저히 회복되었다 (50% vs. 85%). 이 데이타들은 틸로포린이 CycA2를 하향조절함으로써 HCV 복제를 억제함을 확인시켜주며, 이는 틸로포린 매개 HCV 저해의 새로운 메카니즘일 것이다. HCV 복제에 대한 틸로포린의 저해효과가 틸로포린 매개 세포 성장 억제에 의한 것인지 여부를 좀더 알아보기 위해 약물 제거 실험을 수행하였다 [Wu C.M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009;386:140-145]. 도 12와 같이, 틸로포린에 의한 HCV 복제 및 CycA2 발현의 손상은 세포 성장 저해보다 먼저 발생하였다. 뿐만 아니라, HCV 복제에 대한 틸로포린의 저해효과는 세포 성장에 대한 저해효과보다 좀더 뚜렷하였다 (도 13). 이 결과들은 틸로포린이 HCV 복제를 억제하는 효과가 세포 성장 저해 메카니즘에 의한 것이 아님을 제시하며, 또한, 틸로포린이 HCV 치료제로서 가능성이 있음을 말해준다.

[0059] **결과 5: CycA2는 HCV 라이프 사이클의 게놈 복제 단계에 관여한다.**

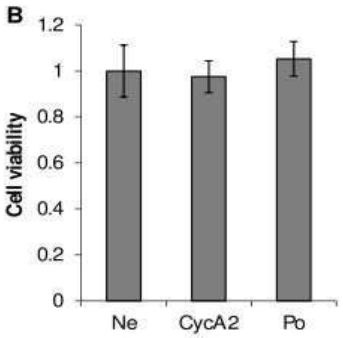
[0060] CycA2 녹다운이 HCV 증식을 상당히 저해하였기 때문에 본 발명자들은 CycA2가 HCV 라이프 사이클의 어느 단계에 관여하는지를 알아보기로 했다. 우리는 도 4a와 같은 두 개의 리포터 구축물을 이용하였다. SiRNA로 트랜스펙션된 Huh7.5 세포를 pRL-HL [Kang S.M. et al., FEBS Lett. 2011;585:3236-3244]과 β-갈락토시데이즈 플라스미드로 코트랜스펙션시킨 후 루시퍼레이즈 활성을 측정하였다. 우리는 CycA2의 녹다운이 HCV IRES 의존적 번역에 아무런 영향도 미치지 않음을 증명하였다 (도 4b). 마찬가지로, 틸로포린 처리도 HCV IRES 의존적 번역에 영향을 미치지 않음을 보여주었다 (도 4c). 이 결과들은 CycA2가 HCV 게놈 증폭에 관여할 수 있음을 암시한다. 이를 입증하기 위해 우리는 HCV IRES 의존적 번역에 의해 유전자 발현이 유도되는 JFH1-luc 리포터 플라스미드를 이용하였다. 이 구조체를 이용하면 게놈 번역을 게놈 RNA 복제에 앞서 모니터할 수 있다. 도 4d와 같이, 주입한 HCV 게놈 RNA의 최초 번역은 전기천공 다섯 시간 후 피크에 달했고, RNA 소멸이 시작될 때 감소하였다 (좌측 패널). 루시퍼레이즈 활성은 대조군 (DMSO)과 틸로포린 처리 세포 간에 차이가 없었으며, 이는 CycA2 하향조절자가 HCV IRES 의존적 번역에 아무런 영향을 미치지 않음을 말해준다. DMSO 또는 틸로포린을 좀더 오래 처리한 결과, DMSO 처리 세포 (전기천공 후 48시간)에서 루시퍼레이즈 활성이 상당히 증가함을 증명하였다. 그러나, 틸로포린 처리 세포에서는 복제에 결함이 있는 GNN 돌연변이로 트랜스펙션한 세포에서와 마찬가지로 루시퍼레이즈 활성이 지속적으로 상실되었다 (도 4d, 우측 패널). 이 결과는 HCV RNA 복제가 틸로포린에 의해 극적으로 저해됨을 보여주었다. 종합적으로, 이 결과들은 CycA2가 HCV 라이프 사이클에서 번역 단계가 아닌 게놈 복제단계에 관여함을 가리킨다.

도면

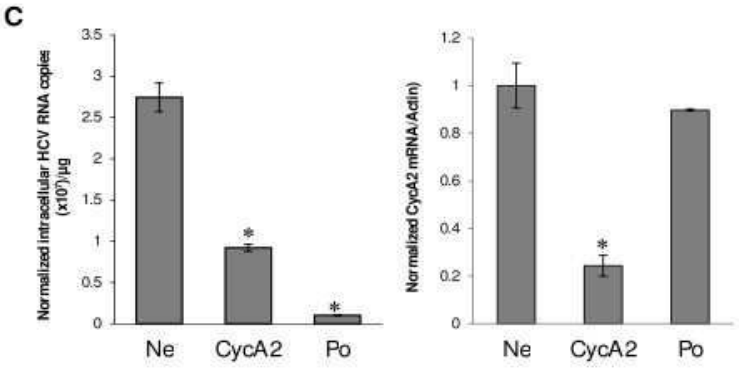
도면1a



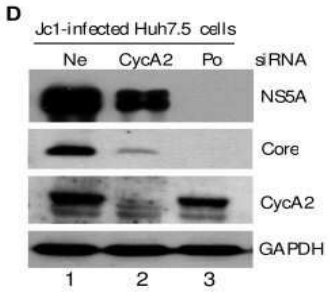
도면1b



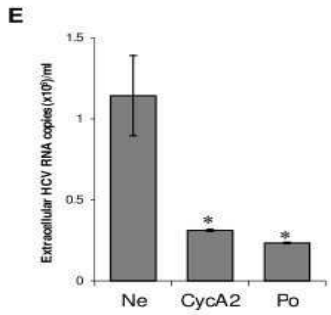
도면1c



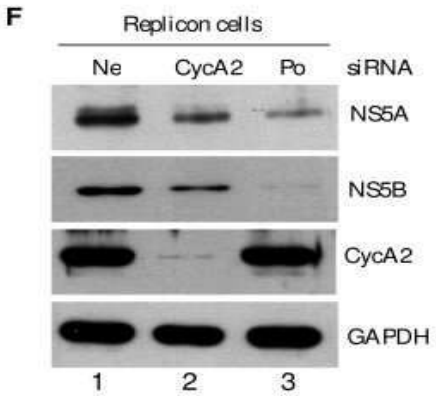
도면1d



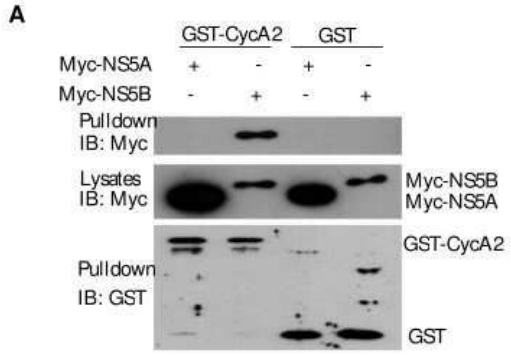
도면1e



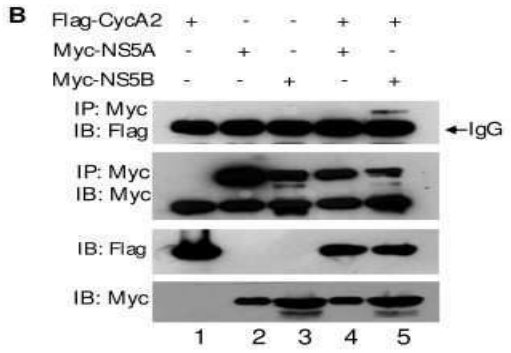
도면1f



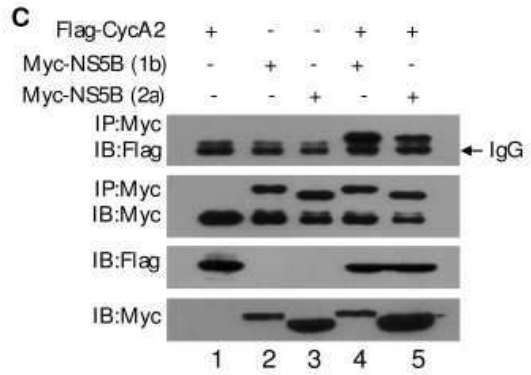
도면2a



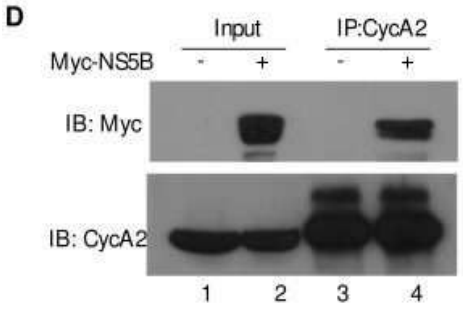
도면2b



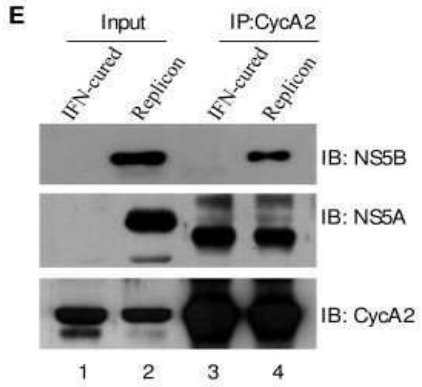
도면2c



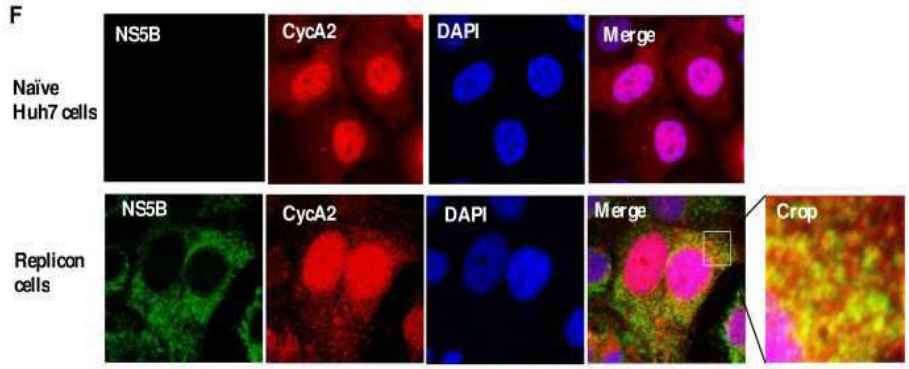
도면2d



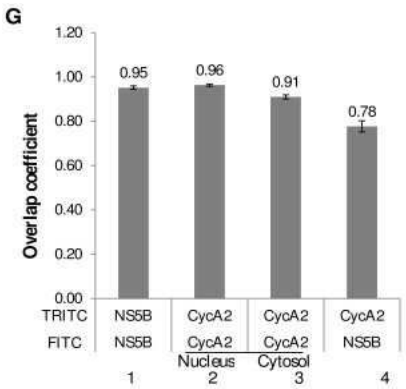
도면2e



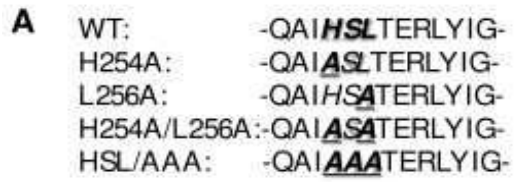
도면2f



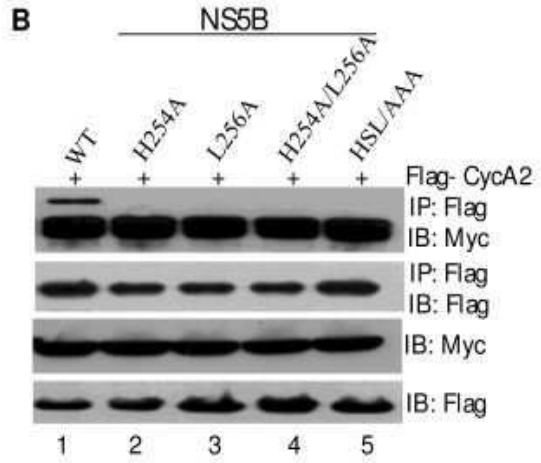
도면2g



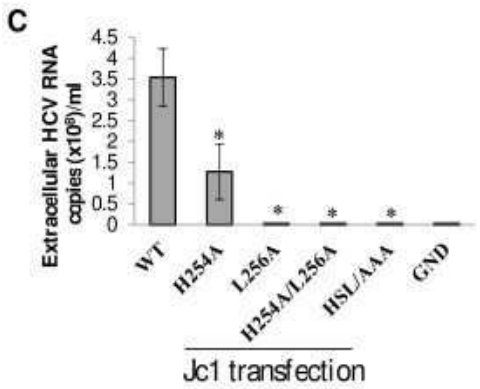
도면3a



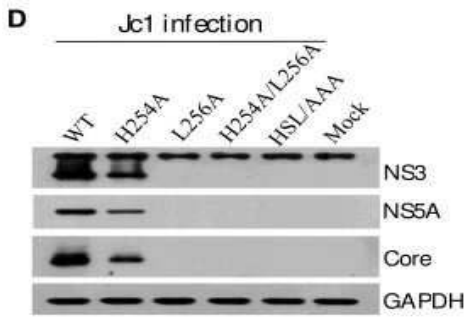
도면3b



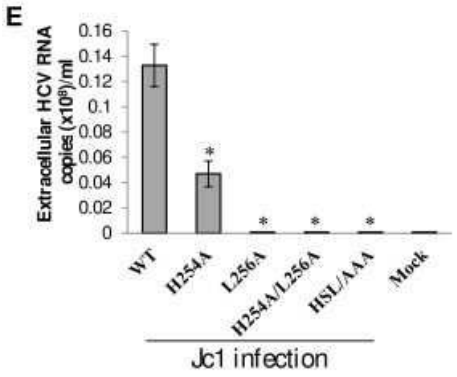
도면3c



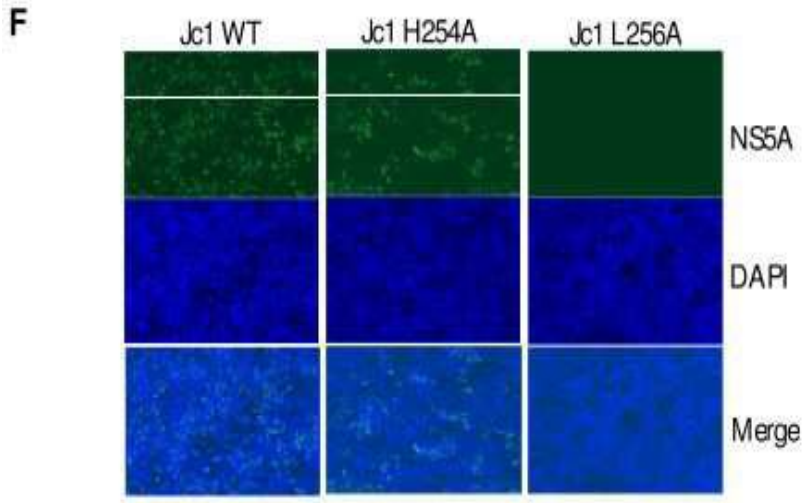
도면3d



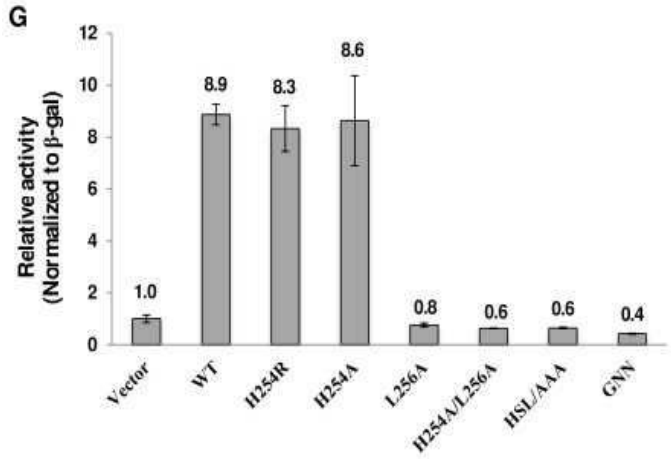
도면3e



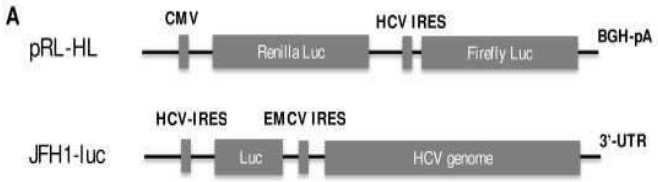
도면3f



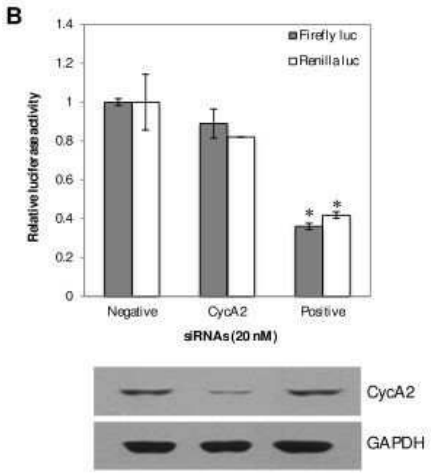
도면3g



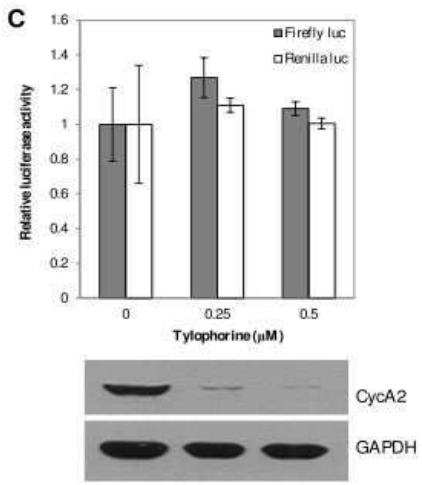
도면4a



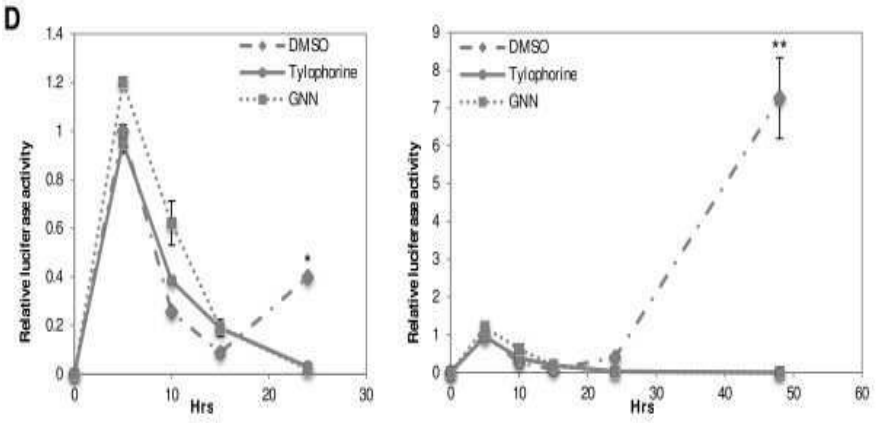
도면4b



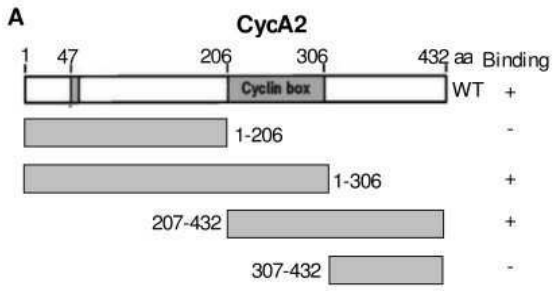
도면4c



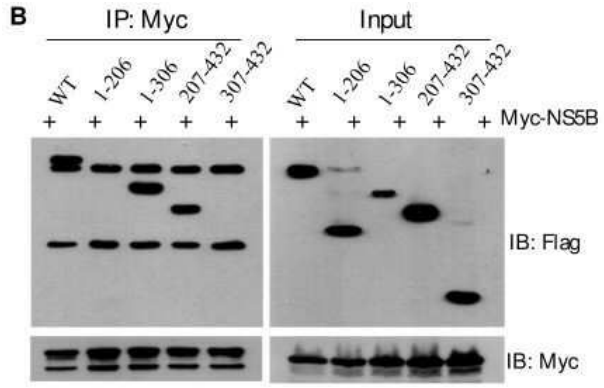
도면4d



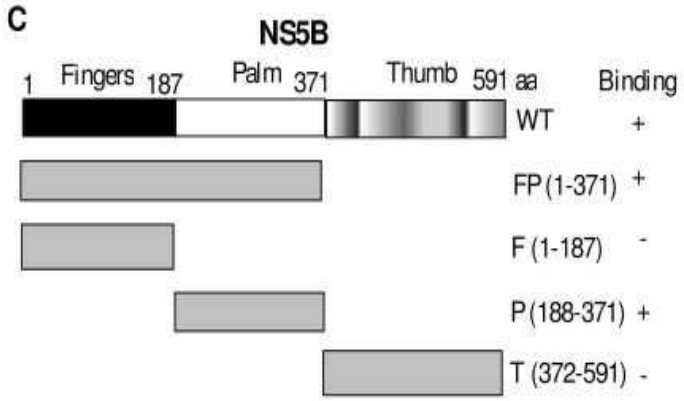
도면5a



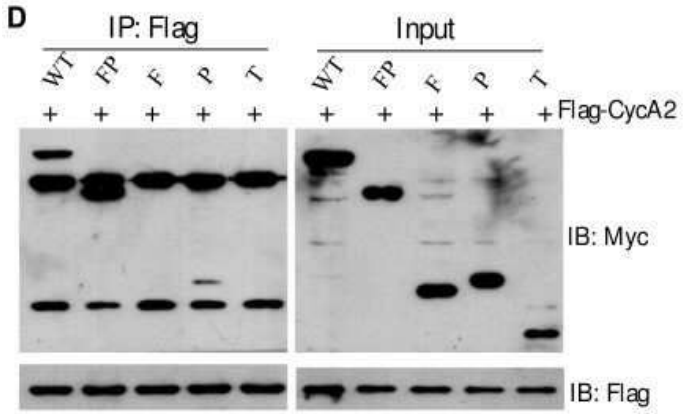
도면5b



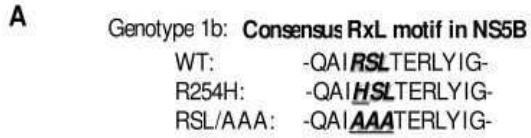
도면5c



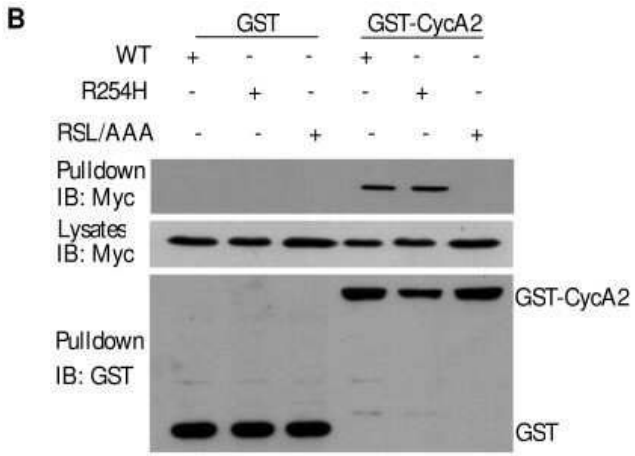
도면5d



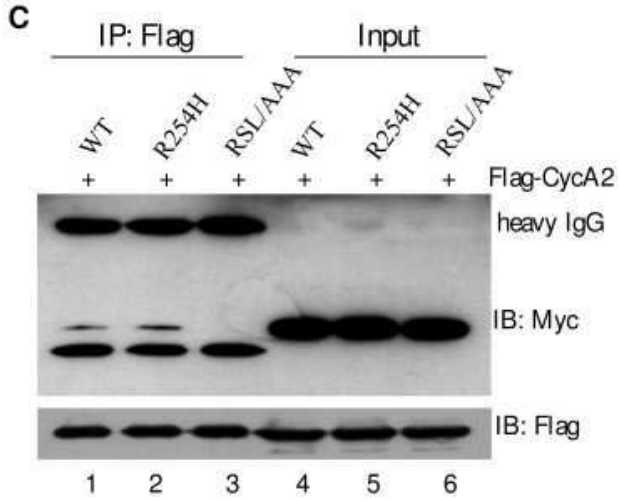
도면6a



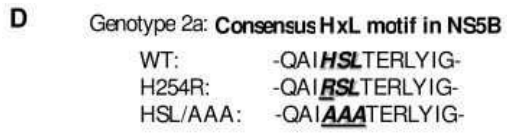
도면6b



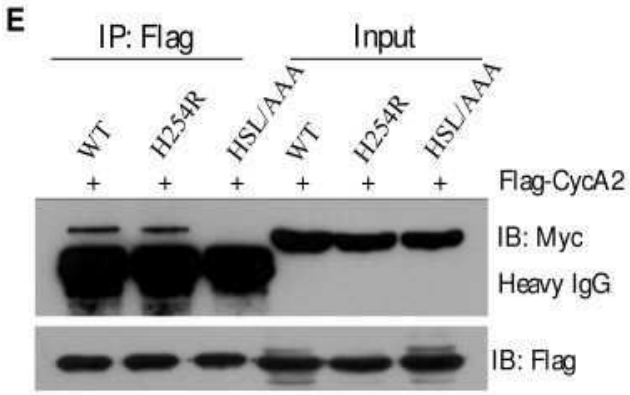
도면6c



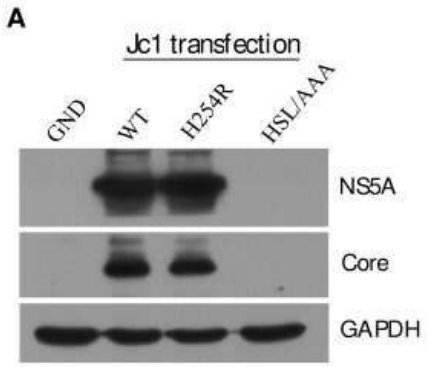
도면6d



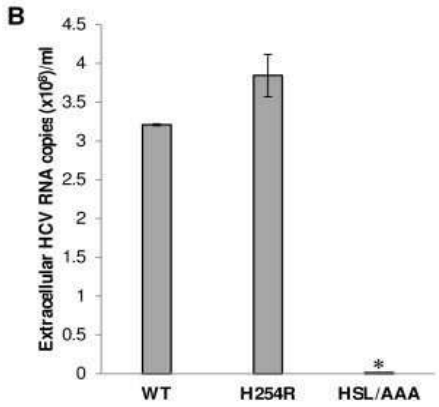
도면6e



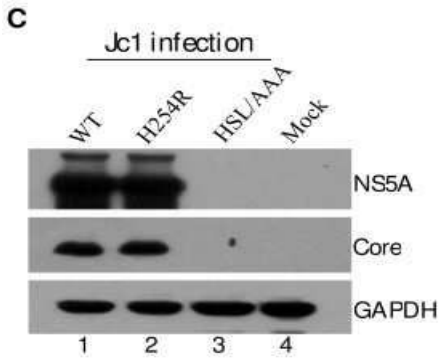
도면7a



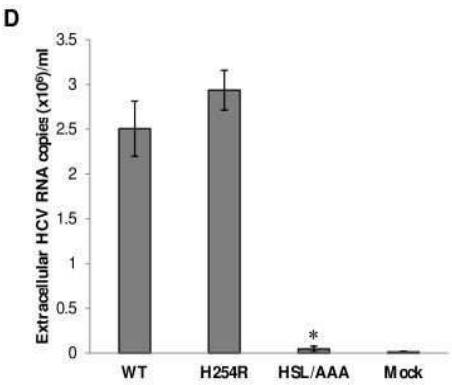
도면7b



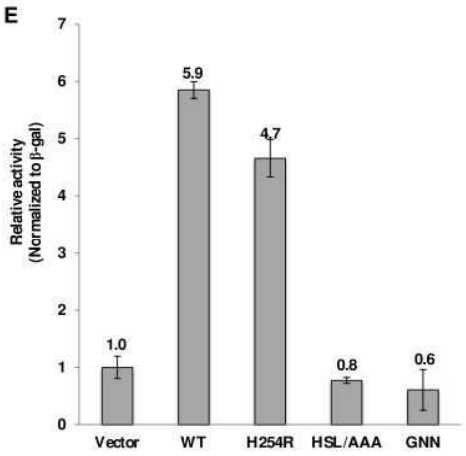
도면7c



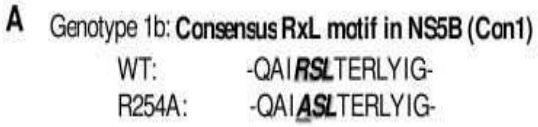
도면7d



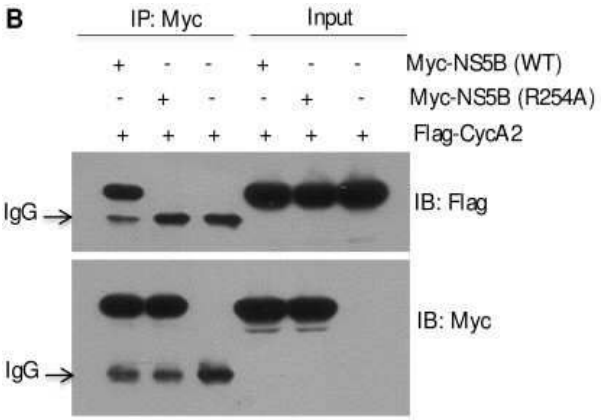
도면7e



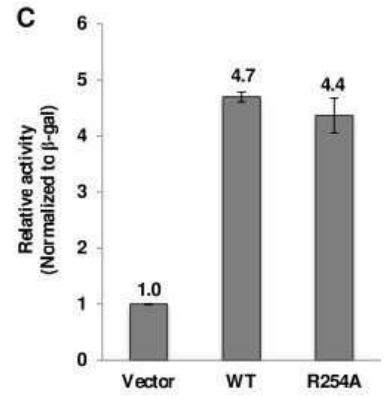
도면8a



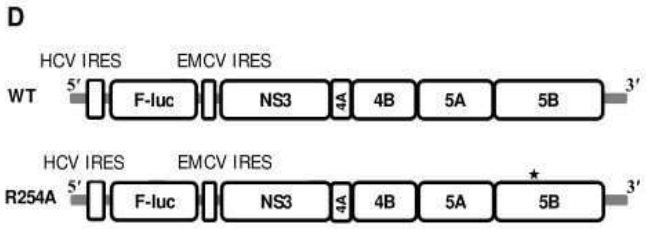
도면8b



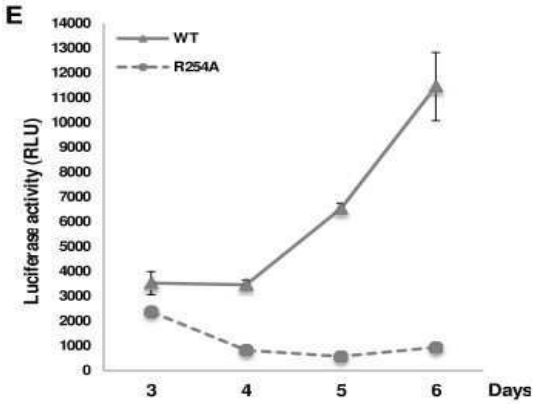
도면8c



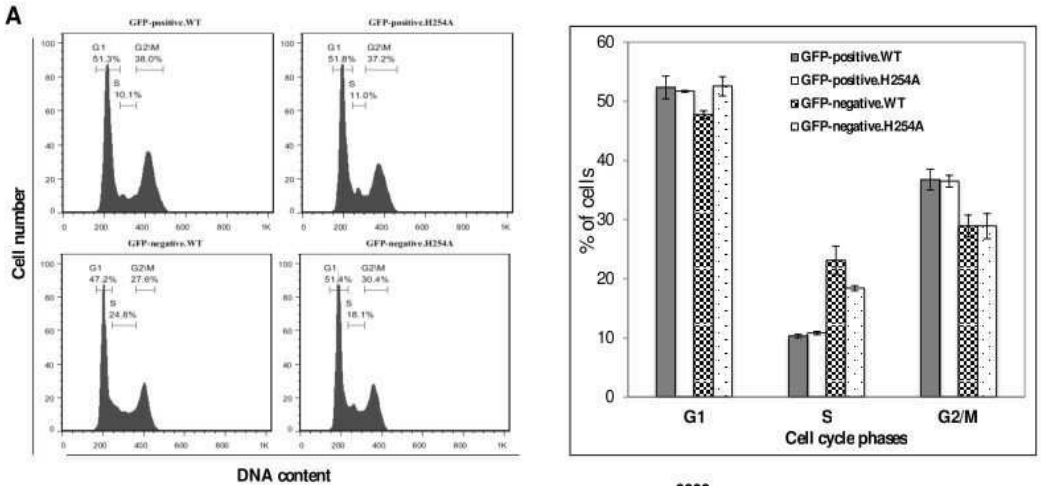
도면8d



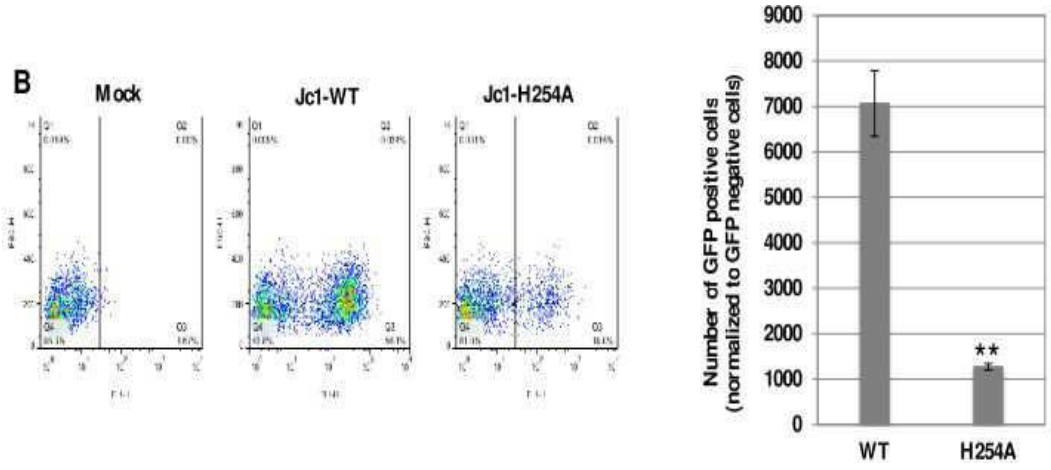
도면8e



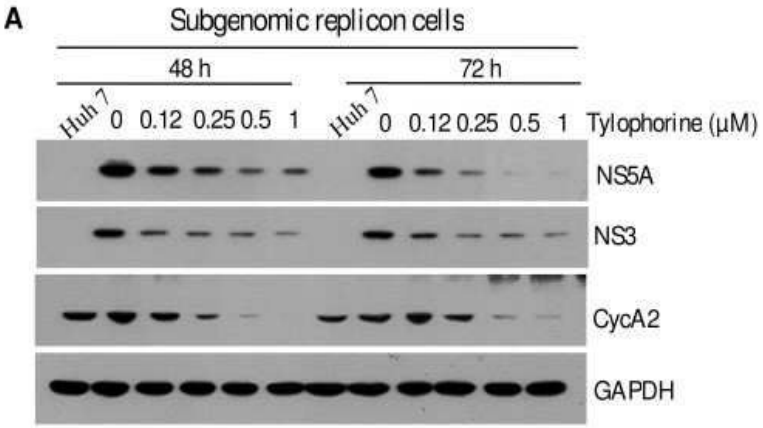
도면9a



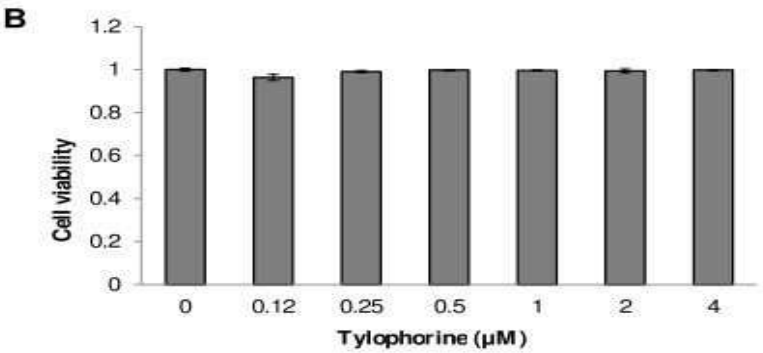
도면9b



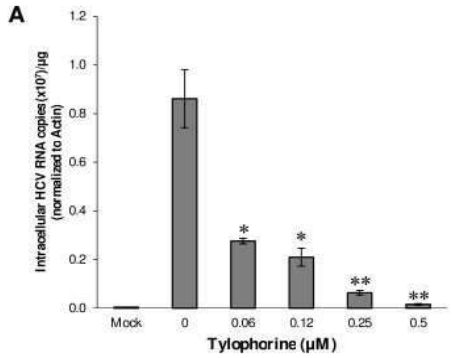
도면10a



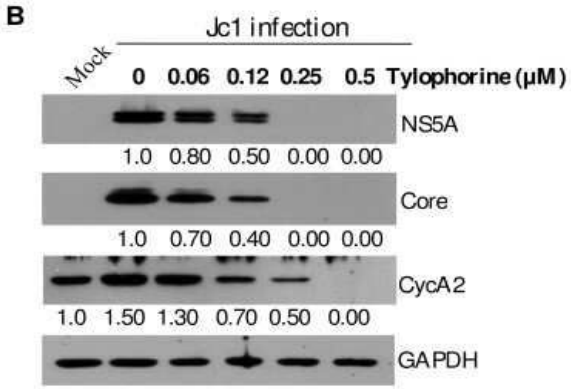
도면10b



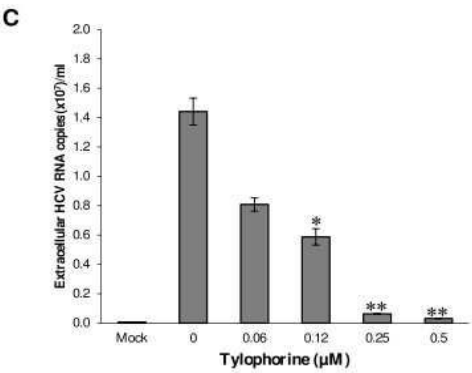
도면11a



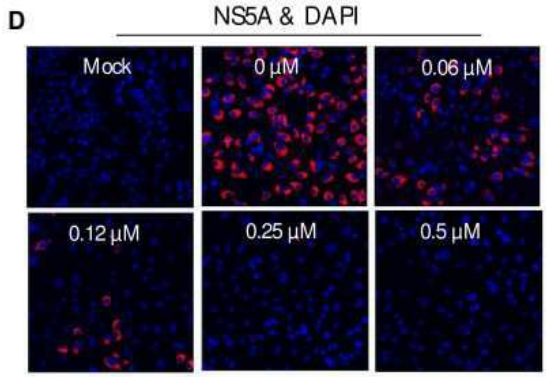
도면11b



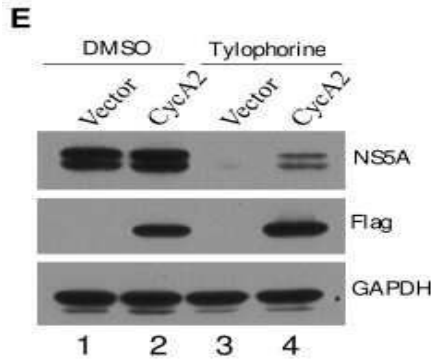
도면11c



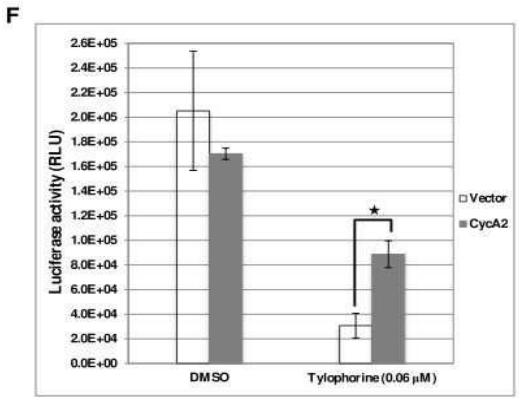
도면11d



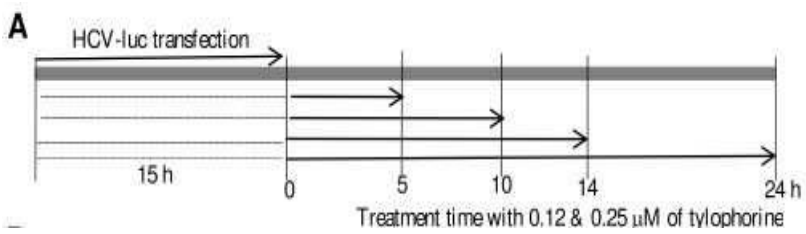
도면11e



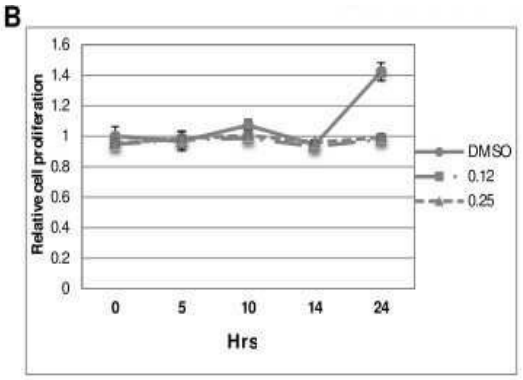
도면11f



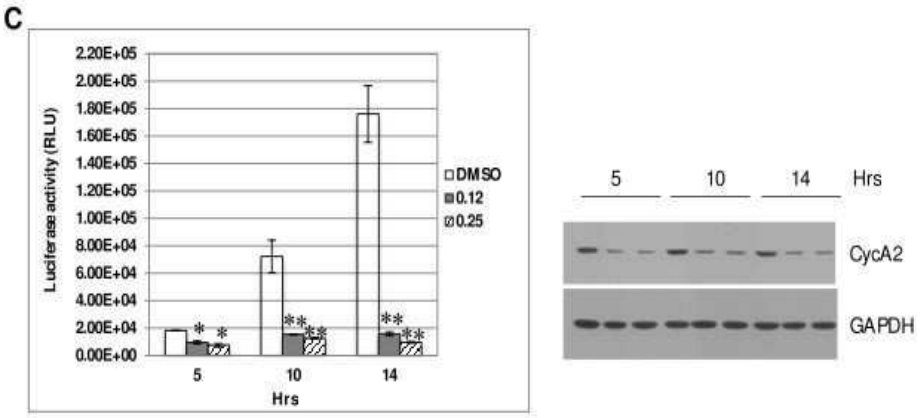
도면12a



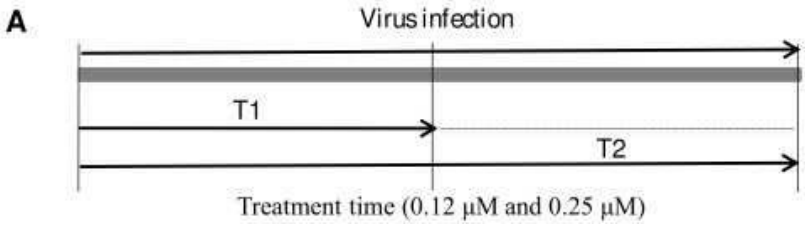
도면12b



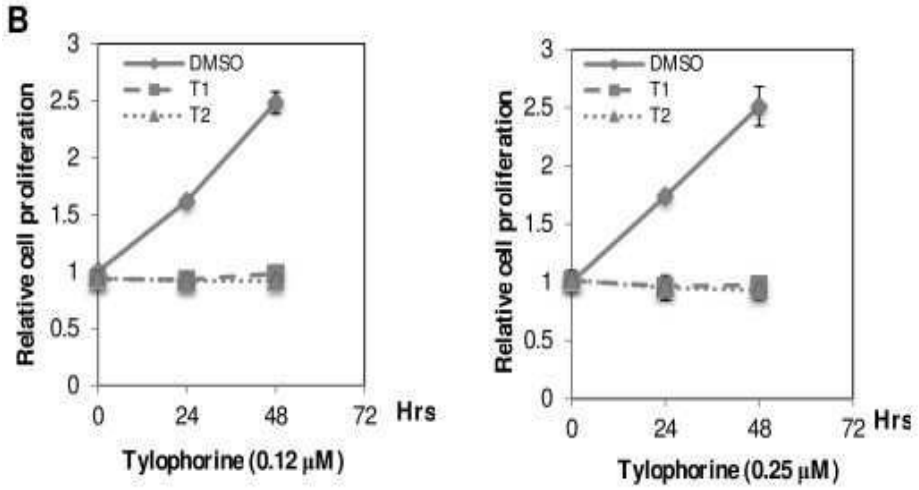
도면12c



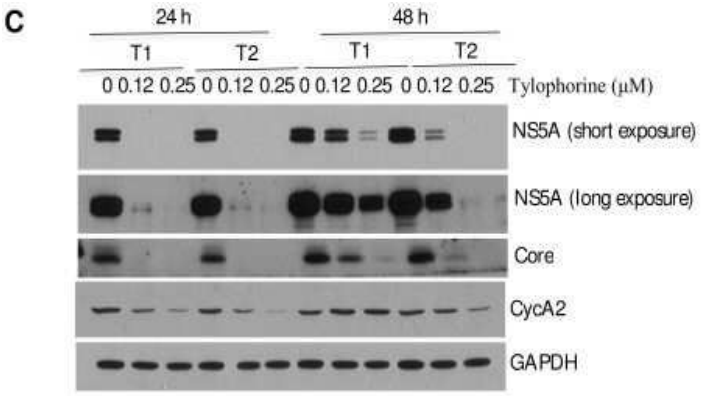
도면13a



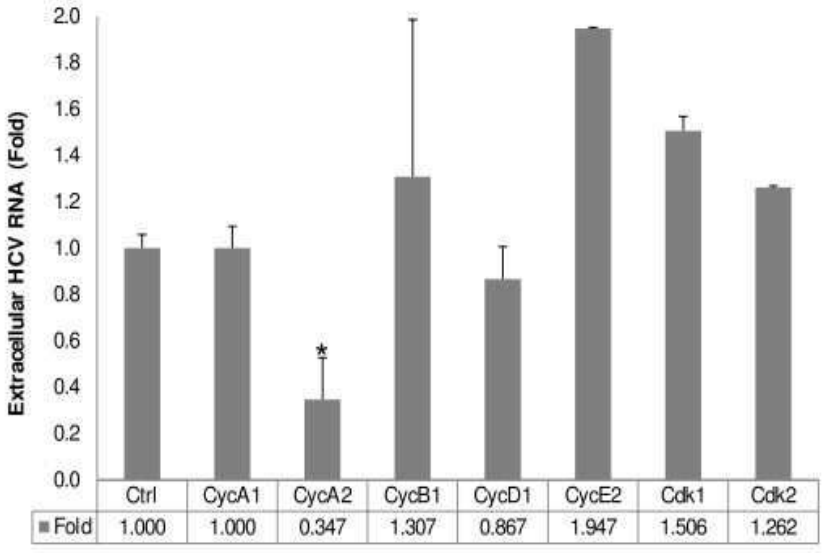
도면13b



도면13c



도면14



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Pharmaceutical composition for prevention and treatment for hepatitis c containing cyclin A2 expression or activity inhibitor

<130> hallym-Ilsong-SBHwang-CYCA2

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA of cycA2

<400> 1

ggaaauggag guuaaaugu 19

<210> 2

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA of cycA2

<400> 2

uagcagaguu uguguacau 19

<210> 3

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA of cycA2

<400> 3

augaggauau ucacacaua 19

<210> 4

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA of cycA2

<400> 4

ugauagaugc ugacccau 18