



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년05월10일

(11) 등록번호 10-2664152

(24) 등록일자 2024년05월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) *C12N 7/00* (2006.01)
G01N 33/50 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0602 (2013.01)
C12N 5/067 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-0133546
(22) 출원일자 2019년10월25일
심사청구일자 2021년02월04일
(65) 공개번호 10-2020-0047417
(43) 공개일자 2020년05월07일
(30) 우선권주장
1020180128201 2018년10월25일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
J Hepatol., Vol.64, pp.S32-S40(2016)*
W02009048289 A2
Virology, Vol. 483, pp.218-228(2015)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
- (72) 발명자
이홍재
서울특별시 송파구 올림픽로 99 잠실엘스아파트
146동 2102호
김수기
서울특별시 송파구 양재대로 1218 올림픽선수촌아파트 309동 108호
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
파도특허법인유한회사, 이재영

전체 청구항 수 : 총 10 항

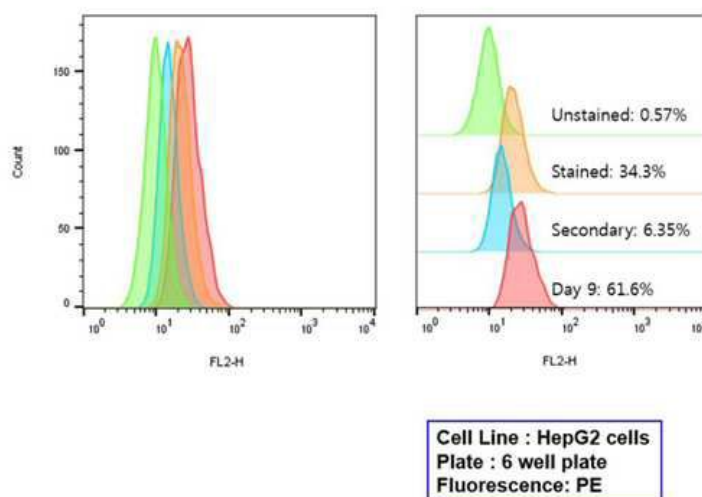
심사관 : 정이든

(54) 발명의 명칭 **외피 바이러스가 감염된 세포주의 제조 방법**

(57) 요약

본 발명은 바이러스가 감염된 세포주의 제조 방법에 관한 것으로, 상기 세포주의 제조 방법은 바이러스와 담즙산 또는 담즙산 유도체를 혼합하여 세포주의 배양액에 처리하기 때문에, 바이러스가 매우 높은 수준으로 감염된 세포주를 얻을 수 있다. 뿐만 아니라, 본 발명의 세포주의 제조 방법을 이용하면, 바이러스의 종 특이성과 특정 조직의 장기 친화성을 갖는 구축력에 의한 제한 없이 다양한 종과 장기로부터 유래된 세포주를 감염시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 7/00 (2013.01)

G01N 33/5008 (2013.01)

G01N 33/5067 (2013.01)

C12N 2510/04 (2013.01)

C12N 2730/10111 (2013.01)

C12N 2770/24211 (2013.01)

(72) 발명자

문재승

서울특별시 용산구 효창원로37가길 16, 2층 (용문동)

신보영

대구광역시 달서구 상화로 24, 101동 209호(대곡동, 대곡역 동화타운)

신진수

서울특별시 서대문구 연희로8길 5-10 스마트하우스 201호

이상규

서울특별시 강남구 압구정로29길 71, 10동 1004호(압구정동, 현대아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

지질막 이중층 (lipid bilayer)을 포함하는 외피 바이러스 (enveloped virus)와 담즙산 또는 담즙산 유도체를 혼합하는 단계; 및

상기 담즙산 또는 담즙산 유도체와 혼합된 상기 바이러스를 세포주의 배양액에 첨가하는 단계를 포함하는, 바이러스가 감염된 세포주의 제조 방법으로서,

상기 세포주는 생쥐로부터 유래된 간 세포주, 폐 세포주, 신장 세포주, 근육 세포주, 유방 세포주, 면역 T 세포주 및 생식기 세포주로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이고,

상기 담즙산 유도체는 케노데옥시콜산 (chenodeoxycholic acid), 디옥시콜린산 (deoxycholic acid), 리토콜린산 (lithocholic acid), 타우로콜린산 (taurocholic acid), 글라이코콜린산 (glycocholic acid), 타우로케노데옥시콜린산 (taurochenodeoxycholic acid), 글라이코케노데옥시콜린산 (glycochenodeoxycholic acid), 글라이코데옥시콜린산 (glycodeoxycholic acid), 타우로데옥시콜린산 (taurodeoxycholic acid), 글라이코리토콜린산 (glycolithocholic acid), 타우로리토콜린산 (tauroolithocholic acid) 및 뮤리콜린산 (muricholic acid)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 세포주의 제조 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 바이러스가 감염된 세포주의 제조 방법은 시험관내 (*in vitro*)에서 수행되는 것인, 세포주의 제조 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 지질막 이중층을 포함하는 외피 바이러스는 간염 바이러스 (Hepatitis virus)인 것인, 세포주의 제조 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 간염 바이러스는 HBV (Hepatitis B virus) 또는 HCV (Hepatitis C virus)인 것인, 세포주의 제조 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

지질막 이중층 (lipid bilayer)을 포함하는 외피 바이러스와 담즙산 또는 담즙산 유도체를 혼합하고, 상기 담즙

산 또는 담즙산 유도체와 혼합된 바이러스를 세포주의 배양액에 첨가하여 제조되는, 바이러스가 감염된 세포주로서,

상기 세포주는 생쥐로부터 유래된 간 세포주, 폐 세포주, 신장 세포주, 근육 세포주, 지방 세포주, 면역 T 세포주 및 생식기 세포주로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이고,

상기 담즙산 유도체는 케노데옥시콜산 (chenodeoxycholic acid), 디옥시콜린산 (deoxycholic acid), 리토콜린산 (lithocholic acid), 타우로콜린산 (taurocholic acid), 글라이코콜린산 (glycocholic acid), 타우로케노데옥시콜린산 (taurochenodeoxycholic acid), 글라이코케노데옥시콜린산 (glycochenodeoxycholic acid), 글라이코데옥시콜린산 (glycodeoxycholic acid), 타우로데옥시콜린산 (taurodeoxycholic acid), 글라이코리토콜린산 (glycolithocholic acid), 타우로리토콜린산 (tauroolithocholic acid) 및 뮤리콜린산 (muricholic acid)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 바이러스가 감염된 세포주.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 외피 바이러스는 간염 바이러스인 것인, 바이러스가 감염된 세포주.

청구항 11

제 9항의 바이러스가 감염된 세포주를 배양하는 단계; 및

상기 세포주에 바이러스성 질환의 치료 후보물질을 첨가하는 단계를 포함하는, 바이러스성 질환의 치료 후보물질의 스크리닝 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 바이러스성 질환은 바이러스성 간염인 것인, 바이러스성 질환의 치료 후보물질의 스크리닝 방법.

청구항 13

제 11항에 있어서,

상기 배양된 바이러스가 감염된 세포주와,

치료 후보물질이 첨가된 바이러스가 감염된 세포주 각각에서 바이러스의 게놈 또는 항원의 존재 여부를 확인하는 단계를 더 포함하는, 바이러스성 질환의 치료 후보물질의 스크리닝 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 배양된 바이러스가 감염된 세포주에 비하여, 상기 치료 후보물질이 첨가된 바이러스가 감염된 세포주의 바이러스의 게놈 또는 표면 항원의 존재 수준이 감소된 경우, 바이러스성 질환의 치료 물질로 선별하는 것인, 바이러스성 질환의 치료 후보물질의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바이러스가 감염된 세포주의 제조 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 지질막 이중층 (lipid bilayer)의 외피(envelope)를 포함하는 외피 바이러스가 감염된 세포주의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 숙주 세포에 감염될 수 있는 능력을 가지고 있는 바이러스 입자인 비리온 (virion)은, DNA 또는 RNA의 유전물질을 포함하는 중심부 유전체 (genome)와, 이와 같은 유전물질을 보호하는 역할을 하는 단백질 껍질인 캡시드 (capsid), 그리고 경우에 따라 외피 (envelope)를 더 포함하도록 구성되어 있다. 외피를 포함하는 바이러스 종류에는 DNA 바이러스인 헤르페스바이러스 (Herpesvirus), RNA 바이러스인 플라비바이러스 (Flavivirus),

그리고 레트로바이러스 (Retrovirus) 등이 존재한다.

- [0003] 한편, 간염을 일으키는 바이러스 (Hepatitis virus)는 외피가 있는 바이러스 (enveloped virus; B형, C형, D형)와, 외피가 없는 바이러스 (non-enveloped virus; A형, E형)로 구분될 수 있다. 전 세계적으로 감염율이 약 3억 5천만명 정도로 추정되는 B형 간염바이러스 (Hepatitis B virus, 이하 'HBV'라함)는 대표적인 외피를 포함하는 바이러스로서, 만성간질환의 주요 원인에 해당한다. 상기 HBV는 헤파드나바이러스 패밀리에 속하는 DNA 게놈을 갖는 바이러스로서, 급성 및 만성 간염을 유발한다. 특히 한국 및 중국에서 만성 감염자가 약 5 내지 8 %에 이르는 HBV 유병율은 현재, 백신의 개발로 어느 정도 저하되었지만 여전히 모체로부터 수직 감염에 따른 발생이 지속되어 만성 간염 환자가 상당수 존재하고 있는 현실이다. HBV의 만성 감염은 간염, 간경변 뿐만 아니라 간암을 유발하며, WHO의 조사에 따르면 약 80%의 간암은 만성 B형 간염이 원인인 것으로 확인될 정도로, 비 감염자에 비하여 HBV 감염자에서 약 300배 높은 수준으로 간암 발생빈도가 나타난다.
- [0004] 상기 HBV는 서로 유전자 염기서열이 약 8% 이상 다른 8개의 유전자형으로 분류하거나, HBV의 표면항원 (HBsAg) 두 곳의 항원결정부위 (d/y, w/r)를 중심으로 4종의 혈청형 (adw, adr, ayw, ayr 등)으로 구분된다. 상기 간염 바이러스의 숙주인 간은 면역 내성을 유도하기 때문에, 조직 적합성 복합체, 부정합 간 동종 이식의 경우에도 거부 반응 없이 생존할 수 있다.
- [0005] 한편, 상기 C형 간염 바이러스 (Hepatitis C virus, 이하 'HCV'라함)는 전세계적으로 약 1.7억명이 감염되어 있고, 주로 선진국에서 감염율이 높고, 문신, 마약 같은 약물 투여, 그리고 에이즈 감염과 연관성이 높으며, 대부분 만성 경과를 취하며 합병증으로 간경변과 간암을 일으킨다. HCV는 플라비비리데 패밀리에 속하는 헤파씨바이러스 (Hepacivirus)로 RNA 게놈 바이러스로서, 6가지 유전자형 (1 내지 6 형)과 각 유전자형마다 다양한 종류의 아형(subtype)으로 나누어진다. 이러한 HCV의 아형은 HCV에 감염된 환자에서 더욱 분화되어 여러 유전적 다양성 (genetic diversity)이 나타나는 유사종 (quasispecies)을 보인다.
- [0006] 만성 HBV 감염의 경우, 핵산 유도체 (nucleoside analog)를 경구 투여하여 바이러스의 증식을 억제시키거나, 감염된 환자에 인터페론을 주사하는 방식으로 치료하고 있다. 그러나, 상기 핵산 유도체는 인터페론에 비하여 그 치료 효과가 좋지만, 장기간 사용하는 경우 HBV 내성이 발생되며, 다른 약제에 대해서도 교차 내성이 발생할 수 있는 문제점이 존재한다. 또한, HCV 감염의 경우에는 1990년대 인터페론 단독 요법이 시도되었으나 치료 성공률이 10%에 불과하였다. 2000년대 들어서 페그인터페론 알파와 리바비린의 병합요법으로 치료 성공률이 약 50% 정도 향상되었으나, 약물에 의한 부작용이 심하여 실질적 치료에 어려움이 존재하였다. 최근 DAA (direct antiviral agent)의 개발되어, 이와 같은 약제를 3개월 내지 6개월 동안 경구 투여하는 경우에 부작용이 거의 없이 약 80 내지 90% 정도 치료 성공률을 얻을 수 있었다. 그러나, 상기 DAA 약제들은 매우 고가의 비용이 소요되므로 많은 환자들에게 치료의 장벽이 되고 사회적 비용의 막대한 손실을 가져온다는 문제점이 존재한다. 현재까지 개발된 HBV 및 HCV 치료제의 경우에는 바이러스를 궁극적으로 사멸시키는 것이 아닌, 증식을 억제시키는 것에 불과하다는 문제점 역시 존재한다.
- [0007] 이와 같이 HBV 및 HCV를 궁극적으로 사멸시킬 수 있는 약물을 개발하지 못하는 이유는 시험관 내 세포 배양 시스템으로 왕성하게 바이러스를 배양하는 방법이 부재하기 때문이다. 또한, 전통적으로 감염실험에 사용될 수 있는 마우스와 같이 작은 몸집을 갖는 소동물을 감염시킴으로써 동물 모델을 제작할 수 있는 방법이 전무한 실정이다.
- [0008] 이와 같은 실정으로 인하여 바이러스들의 감염 생활사 (life cycle)가 정확히 밝혀지지 못해 HBV의 경우 핵내 바이러스 유전체 복제 틀 (template)인 cccDNA를 파괴시킬 수 있는 메커니즘이 규명되지 못하고, 또한 HCV의 경우 감염 환자에서 유전적 다양성을 나타내는 유사종 (quasispecies)의 메커니즘이 규명되지 못해 완벽하고 이상적인 항바이러스제가 개발되지 못한 실정이다.
- [0009] 상기 HBV 및 HCV와 같은 지질막이중층의 외피를 포함하는 바이러스는 종 특이성 (species specificity 혹은 narrow host range)과 장기친화성 (organ tropism)을 나타내기 때문에, 이들 바이러스의 시험관 및 소동물 내 감염과 배양이 어려워 지금까지 바이러스의 치료제 개발에는 진전이 없었다. 따라서, HBV와 HCV를 포함하는 외피 있는 바이러스의 시험관내 및 소동물 감염모델은 그들 바이러스의 생활사와 병리 기작 (mechanism of life cycle and pathogenesis)을 밝혀줄 도구로 절실히 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 일 목적은 바이러스가 감염된 세포주 모델의 제조 방법과, 그에 의하여 제조된 세포주를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 바이러스가 감염된 세포주를 이용한 바이러스성 질환의 치료 후보물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명자들은 우선 세포주의 배양액에 담즙산 또는 담즙산 유도체와 외피 바이러스의 혼합물을 처리하면, 담즙산에 의해 기계적으로 상기 세포주의 지질막 이중층이 확장되고 (expanded) 세포막이 파괴되어 상기 바이러스의 중 특이성 및 조직 특이성과 무관하게 바이러스가 감염되는 사실을 확인하였다.
- [0014] 본 발명의 일 구현 예에서는 바이러스가 감염된 세포주의 제조 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 상기 세포주의 제조 방법은 지질막 이중층 (lipid bilayer)을 포함하는 외피 바이러스 (enveloped virus)와 담즙산 또는 담즙산 유도체를 혼합하는 단계; 및 상기 담즙산 또는 담즙산 유도체와 혼합된 상기 바이러스를 세포주의 배양액에 첨가하는 단계를 포함한다.
- [0016] 본 발명의 상기 "지질막 이중층을 포함하는 외피 바이러스"란, DNA 또는 RNA와 같은 유전물질을 포함하는 중심부 유전체 (genome)와, 이와 같은 유전물질을 보호하는 역할을 하는 단백질 껍질인 캡시드 (capsid); 및 지질막 이중층 (lipid bilayer)을 포함하는 외피 (envelope)로 구성된 외피 바이러스를 의미한다.
- [0017] 본 발명의 상기 외피 바이러스는 바이러스 자체를 구성하는 캡시드 이외에 지질막 이중층을 포함하는 외피를 더 포함하는 바이러스라면 모두 포함될 수 있고, 예를 들면, DNA를 유전물질로 하는 헤파드나바이러스 (hepadnavirus), 폭스바이러스 (Poxvirus), 헤르페스바이러스 (Herpesvirus) 등일 수 있고, 또는 RNA를 유전물질로 하는 코로나바이러스 (Coronavirus), 필로바이러스 (filovirus), 람도바이러스 (rhabdovirus) 아레나바이러스 (arenavirus), 플라비바이러스 (flavivirus), 그리고 레트로바이러스 (Retrovirus) 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 간염 바이러스 (Hepatitis virus)일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 HBV (Hepatitis B virus) 또는 HCV (Hepatitis C virus)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명의 상기 지질막 이중층을 포함하는 외피 바이러스가 감염된 세포주는, 상기 바이러스가 감염된 세포주, 예를 들면 세포주가 시험관 내에서 일정한 횟수 또는 기간 동안 계대배양되는 경우에도 그 세포주의 특성을 유지할 수 있는 것을 의미한다. 바람직하게 상기 세포주는 시험관 내에서 지속적으로 계대배양될 수 있도록 불멸화된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명의 상기 지질막 이중층을 포함하는 외피 바이러스가 감염된 세포주의 제조 방법은 상기 담즙산 또는 담즙산 유도체와 혼합된 상기 바이러스를 시험관 내 (*in vitro*)에서 배양된 세포주의 배양액에 첨가하는 단계를 포함한다. 종래에는 시험관 내에서 배양된 불멸화 세포주에 지질막 이중층의 외피를 포함하는 외피 바이러스에 의한 감염을 유도하기 어려웠으나, 담즙산 또는 담즙산 유도체를 바이러스와 혼합하여 배양액에 처리하는 경우 불멸화 세포주의 지질막 이중층이 확장되고, 세포막이 기계적으로 파괴됨으로써 시험관 내에서도 불멸화 세포주의 지질막 이중층을 포함하는 외피 바이러스에 의한 감염을 매우 효과적으로 유도할 수 있다. 이와 같은 효과에 의하여 상기 바이러스 감염 모델 세포주는 중 특이성과 특정 조직에 친화성을 갖는 특이성에 의한 제한 없이, 다양한 종 및 조직으로부터 유래된 세포주를 사용하여 제조될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 상기 담즙산은 인간의 경우, 간에서 콜레스테롤로부터 합성되는 1차 담즙산으로 콜린산 (choilic acid)과 케노데옥시콜산 (chenodeoxycholic acid)으로 나누어지며, 2차 담즙산은 대장에서 장내 세균에 의해 대사되어, 콜산이 디옥시콜린산 (deoxycholic acid) 또는 케노데옥시콜산이 리토콜린산 (lithocholic acid)으로 대사된다. 또한, 상기 담즙산은 간에서 글리신 (glycine)이나 타우린 (taurine)과 접합 (conjugation) 되어 타우로콜린산 (taurocholic acid)과 글라이코콜린산 (glycocholic acid) (이상 콜산 유도체, derivatives of cholic acid), 타우로케노데옥시콜린산 (taurochenodeoxycholic acid)과 글라이코케노데옥시콜린산 (glycochenodeoxycholic acid) (이상 케노데옥시콜산 유도체, derivatives of chenodeoxycholic acid), 글라이코데옥시콜린산 (glycodeoxycholic acid)과 타우로데옥시콜린산 (taurodeoxycholic acid) (이상 데옥시콜산 유도체, derivatives of deoxycholic acid), 글라이코리토콜린산 (glycolithocholic acid)과 타우로리토콜린산 (tauroolithocholic acid) (이상 리토콜산 유도체, derivatives of lithocholic acid)으로 변환될 수 있다. 한

편, 설치류의 2차 담즙산은 무리콜린산 (muricholic acid)이 존재한다.

- [0021] 본 발명의 상기 담즙산 또는 담즙산 유도체는 콜린산, 케노데옥시콜산, 디옥시콜린산, 리토콜린산, 타우로콜린산, 글라이코콜린산, 타우로케노데옥시콜린산, 글라이코케노데옥시콜린산, 글라이코데옥시콜린산, 타우로데옥시콜린산, 글라이코리토콜린산, 타우로리토콜린산 및 무리콜린산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 타우로케노디옥시콜린산 또는 타우로콜린산일 수 있고, 더욱 바람직하게는 HBV의 경우 타우로케노디옥시콜린산을 사용할 수 있고, HCV의 경우 타우로콜린산 또는 타우로케노디옥시콜린산을 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명의 상기 세포주는 정상 또는 암 조직으로부터 유래되어 시험관 내에서 계대배양될 수 있는 것으로서, 통상의 방법에 따라 불멸화 된 것일 수 있다. 상기 세포주는 예를 들면, 간 세포주, 폐 세포주, 신장 세포주, 근육 세포주, 유방 세포주, 면역 T 세포주 및 생식기 세포주로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있고, 바람직하게는 인간 또는 생쥐로부터 유래된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명의 상기 인간의 간으로부터 유래된 세포주는 HepG2 세포주 또는 Huh-7 세포주일 수 있고, 상기 생쥐의 간으로부터 유래된 세포주는 Hepa1c1c7 세포주 또는 H4-II-E 세포주일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 상기 인간으로부터 유래된 불멸화 세포주는 폐암 세포주인 SNU-1327 세포주, A549 세포주, 신장암 세포주인 A-498 세포주, 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포주, 면역 T 세포주인 Jurcat 세포주 및 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포주로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 상기 생쥐로부터 유래된 불멸화 세포주는 폐암 세포주인 LA-4 세포주, 신장암 세포주인 RAG 세포주, 유방암 세포주인 MTV/TM-011 세포주, 면역 T 세포주인 EL4 세포주 및 고환암 세포주인 LC540 세포주로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 다른 구현 예에서는 바이러스가 감염된 세포주를 제공한다.
- [0028] 본 발명의 상기 바이러스가 감염된 세포주는 상기 바이러스에 담즙산 또는 담즙산 유도체를 혼합하고, 상기 담즙산 또는 담즙산 유도체와 혼합된 지질막 이중층을 포함하는 외피 바이러스를 불멸화 세포주의 배양액에 첨가함으로써 제조될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 상기 바이러스가 감염된 세포주는 앞서 언급한 제조 방법에 의해 제조될 수 있기 때문에, 지질막 이중층의 외피를 포함하는 외피 바이러스, 담즙산 유도체, 불멸화 세포주, 제조 방법 등과 관련된 내용은 반복 기재에 따른 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 구현 예는 바이러스성 질환의 치료를 위한 치료 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0032] 상기 바이러스성 질환의 치료 후보물질의 스크리닝 방법은 본 발명에 따른 지질막 이중층을 포함하는 외피 바이러스가 감염된 세포주를 배양하는 단계; 및 상기 세포주에 바이러스성 질환의 치료 후보물질을 첨가하는 단계를 포함한다.
- [0033] 본 발명의 상기 스크리닝 방법에서 사용되는 바이러스가 감염된 세포주는 앞서 언급한 제조 방법에 의해 제조될 수 있기 때문에, 지질막 이중층을 포함하는 외피 바이러스, 담즙산, 담즙산 유도체, 세포주, 제조 방법 등과 관련된 내용은 반복 기재에 따른 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0034] 본 발명의 상기 바이러스성 질환이란, 바이러스의 감염에 의한 증상이 발현되는 질환으로서, 상기 바이러스가 친화성을 갖는 조직에 감염 일어나 상기 조직에 병적인 변화가 유도되는 것을 의미한다. 상기 바이러스성 질환은 조직의 병적인 변화를 일으키는 것이라면 모두 포함될 수 있고, 바람직하게는 바이러스성 감염일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 상기 바이러스성 간염은 바이러스 감염이 원인인 감염으로, 간염 환자의 86%를 차지하는 B형 간염과 12%를 차지하는 C형 간염이 존재한다. 상기 B형 간염은 출생 시, 어머니에 의해 감염된 수직 감염과, 출생 이후 감염되는 후천적 감염으로 나뉜다. 후천적 감염의 경우 95%가 감기와 비슷한 증상을 보이며 자연스럽게 완치되는 반면, 5 내지 10%의 감염자의 경우 완치되지 못하고 만성 감염으로 발전될 수 있다. 이와는 반대로 수직 감염의 경우에는 대부분 만성 감염으로 발전된다. 한편, C형 간염은 B형 간염에 비하여 비교적 적은 10 내지 15% 정도의 환자만이 병균을 스스로 개선시키며, 85 내지 90% 이상의 경우 만성 감염으로 발전하고, 이와 같은 만성 감염 환자 중 10 내지 20%는 20년 내지 30년 이내에 간경변이나 간암 등의 질병이 발병하게 된다.
- [0036] 본 발명의 상기 바이러스성 질환은 혈청학 검사를 통해 관련 항원과 항체를 확인하여 감염의 여부를 확인한다.

따라서, 본 발명의 상기 스크리닝 방법은 상기 배양된 바이러스가 감염된 세포주와, 바이러스성 질환의 치료 후보물질이 첨가된 바이러스가 감염된 세포주 각각에서 바이러스의 게놈 또는 표면 항원의 존재 여부를 확인하는 단계를 더 포함하여, 바이러스성 질환의 치료 후보물질의 치료 효과 여부를 확인할 수 있다.

[0037] 본 발명의 상기 바이러스가 감염된 세포주에 비하여, 상기 치료 후보물질이 첨가된 바이러스 감염 모델 세포주의 바이러스 게놈 또는 표면 항원의 존재 수준이 감소된 경우, 바이러스성 질환의 치료 물질로 선별할 수 있다.

[0038] 본 발명의 상기 바이러스 게놈 또는 항원의 존재 여부를 확인하는 단계는 단백질 또는 핵산 수준에서 확인될 수 있다.

[0039] 본 발명의 상기 단백질 또는 핵산 수준의 검출 방법은 공지된 것으로서, 예를 들면 항원-항체 반응, 표면 항원에 특이적으로 결합하는 기질, 핵산 또는 펩타이드 앵타머 등과의 반응을 통해 검출될 수 있다.

[0040] 본 발명의 상기 바이러스성 질환 중, 상기 B형 간염의 경우, 항원으로 표면 항원인 HBsAg 항원, 분비형 항원인 HBeAg 항원, 핵심 항원인 HBcAg 항원 등의 존재 여부를 공지된 검출 방법, 예를 들면 유세포분석법 (Fluorescence-activated cell sorting), ELISA, 웨스턴 블롯, TRFIA (Time-resolved fluorescence immunoassay), 면역조직화학 등의 방법에 의해 확인할 수 있고, 상기 HBV의 DNA의 존재 여부를 중합효소연쇄반응법, 실시간 중합효소연쇄반응법 등의 유전자 증폭 실험을 통해 검사할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명의 상기 C형 간염의 경우 HCV 중심부 단백질의 검출, 항-HCV 항체의 존재 여부를 공지된 검출 방법을 통해 확인할 수 있고, HCV의 RNA 존재 여부를 중합효소연쇄반응법, 실시간 중합효소연쇄반응법 등의 유전자 증폭 실험을 통해 검사할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0042] 본 발명에 따른 세포주의 제조 방법은 바이러스와 담즙산 또는 담즙산 유도체를 혼합하여 세포주의 배양액에 처리하기 때문에, 바이러스가 매우 높은 수준으로 감염된 세포주를 얻을 수 있다. 뿐만 아니라, 본 발명의 세포주의 제조 방법을 이용하면, 바이러스의 종 특이성과 특정 조직의 장기 친화성을 갖는 구축력에 의한 제한 없이 다양한 종과 장기로부터 유래된 세포주를 감염시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 인간의 간암 세포주인 HepG2에서 HBV의 HBcAg를 유세포 분석 (Fluorescence-activated cell sorting)을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 쥐의 간암 세포주인 Hepa1c1c7 세포주에서 HBV의 HBcAg를 유세포 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3 및 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 인간의 신장암 세포주인 A498 세포주 또는 쥐의 신장암 세포주인 RAG 세포주에서 HBV의 HBcAg를 유세포 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 5 및 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 인간의 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포주 또는 쥐의 유방암 세포주인 MTV/TM-011 세포주에서 HBV의 HBcAg를 유세포 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 인간의 면역 T 세포주인 Jurkat 세포주에서 HBV의 HBcAg를 유세포 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 인간의 자궁 세포주인 HeLa 세포주에서 HBV의 HBcAg를 유세포 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0046] 실시예

[0048] [준비예 1] 간염 바이러스 분리

- [0049] 원주 세브란스 병원 (윤리위원회 승인 번호 CR316312)으로부터 정상 혈청 (HBV (Hepatitis B virus) 및 HCV (Hepatitis C virus) 음성)과 간염 바이러스가 감염된 혈청 (HBV 또는 HCV 양성)을 분양 받았다.
- [0050] 20 g/L의 수크로즈, 50 mmol/L의 Tris-HCl (pH 7.5) 및 30 mmol/L의 NaCl이 포함된 완충 버퍼 (cushion buffer)가 3 ml 들어 있는 튜브에 상기 혈청 각각을 넣고, 이 혼합물을 220,000 g의 세기로 1시간 동안 원심분리하였다. 이후, 상기 튜브에서 상등액을 제거하고, HBV 또는 HCV를 회석하기 위해, 상기 튜브에 5 ml의 PBS (Phosphate-buffered saline) 용액을 넣었다. 그런 다음, 상기 회석액에 포함되어 있는 HCV의 RNA 및 HBV의 DNA를 로슈사 (Roche)의 COBAS TaqMan system을 이용한 Real-time PCR을 통해 측정하여 분리된 바이러스의 농도를 측정하였다.
- [0052] **[준비에 2] 세포주 배양**
- [0053] 실시예에서 사용된 세포주는 한국세포주은행에서 구입하였으며, 한국세포주은행에서 지정된 배양액과 배양 방법을 사용하여 세포 배양을 수행하였다.
- [0054] 설치류 세포주는 생쥐 C57L(The Jackson Laboratory, 미국)로부터 유래된 간암 세포주인 Hepalclc7 세포주 또는 H4-II-E 세포주, 신장암 세포주(RAG), 면역 T 세포주 (EL4), 고환암 세포주 (LC540) 및 폐 세포주(LA-4)를 사용하였다.
- [0055] 인간 세포주는 간암 세포주 (HepG2, Huh-7), 신장암 세포주 (A-498), 유방암 세포주 (MDA-MB-231), 폐암 세포주 (A549), 면역 T 세포주 (Jurcat) 및 자궁암 세포주 (HeLa)를 사용하였으며, 대조군으로 간 세포주인 PLC/PRF5 세포주를 사용하였다.
- [0056] 이때, 세포의 안정화를 위하여 해동 후 3차례 계대 배양 후 상기 세포들을 24시간 동안 배양한 뒤 간염 바이러스 감염을 수행하였다.
- [0058] **[실시예 1] 바이러스 감염 세포주 모델의 제조**
- [0059] 외피 바이러스 감염 세포주 모델의 제조를 위하여, 100 μ mol/L의 타우로케노디옥시콜린산 (taurochenodeoxycholic acid; 이하, 'tCDCA'라고 함)에, 상기 준비예 1에서 분리된 HBV (1×10^6 copies/ml/well of HBV)를 혼합하고, tCDCA 또는 타우로콜린산 (taurocholic acid; 이하, 'tCA'라고 함)에 상기 준비예 1에서 분리된 HCV(1×10^6 IU/ml/well of HCV)를 혼합하였다. 여기서, tCA와 혼합된 HCV는 쥐의 간 세포를 감염시키는데 사용하였으며, 그 외에는 모두 tCDCA를 사용하였다.
- [0060] 6웰 플레이트의 각각의 웰에 5×10^6 세포수/ml의 세포주 (HepG2, Huh-7, A549, A-498, MDA-MB-231, Jurcat, HeLa, Hepalclc7, EL4, H4-II-E, LA-4, LC540 또는 RAG 세포주)를 분주하고 24시간 동안 배양한 뒤에, 상기 HBV 또는 HCV가 혼합된 tCDCA 또는 tCA 용액을 첨가하고 24시간 동안 추가로 배양하였다. 여기서, 대조군으로는 tCDCA 또는 tCA 용액 없이 HBV 또는 HCV만을 첨가하였다. 이후, PBS (phosphate buffered saline) 용액으로 3회 세척하고, 상기 바이러스가 포함되지 않은 세포 배양액(DMEM)으로 교체하였다. 마지막으로 상기 세포 배양액에 100 μ mol/L의 tCDCA 또는 tCA를 처리하고 3일 동안 추가로 배양하는 과정을 통해 바이러스 감염 세포주 모델(이하, '감염 세포주'라고 함)을 제조하였다.
- [0062] **[실시예 2] HBV에 의한 감염 세포주 검증**
- [0063] 상기 실시예 1에서 HBV가 감염된 감염 세포주와, 그부터 수집된 배양액에서 HBsAg 및 HBV의 DNA가 존재하는 수준을 측정하였다. 여기서, HBsAg의 측정은 Elecsys HBsAg ECLIA 키트 (REF: 07251076119, 로슈, 스위스)를 이용하여, 제조사에서 제공한 실험 방법에 의하여 측정하였으며, 로슈의 COBAS TaqMan 시스템을 이용하는 전문 검사기관 (바이오지노코리아, 한국)에 의뢰하여 HBV의 DNA를 측정하였다.
- [0064] 또한, HBcAg이 존재하는 수준을 측정하기 위하여 anti-HBcAg 항체를 이용한 FACS 분석을 수행하였다. 구체적으로, 100 μ l/well의 anti-HBcAg 항체 (10E11) (cat no. MA1-7608; Thermo Fisher, 미국)를 마이크로 ELISA 플레이트에 넣고, 4 $^{\circ}$ C에서 밤새도록 반응시킨 뒤에, 200 μ l/웰의 1X ELISA/ELISPOT Diluent (Invitrogen, 미국)를 추가로 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 각각의 웰에, 상기 실시예 1에서 HBV가 감염된 감염 세포주들을 넣은 뒤 2시간 동안 반응시켰다. 그런 다음, 100 μ l의 1X ELISA/ELISPOT Diluent에 1: 30의 비율로 희석된 anti-HBcAg 항체 (10E11)를 상기 플레이트에 넣고, 1시간 동안 반응시킨 뒤, 100 μ l의 HRP가 결합된 anti-rabbit IgG와 함께 30분간 추가로 반응시켰다. HBcAg의 검출을 위해 FACSCalibur를 사용하여 그 결과를 하기 표 1 및 2에 나타내었다. 여기서, 양성 대조군으로 PLC/PRF5 세포주(HBV 표면 항원을 방출하는 인간 간 유래 세포

주)에서 HBsAg 및 HBcAg가 존재하는 수준을 측정하였다.

표 1

[0066]

	음성 대조 군*	PLC/PRF5**	HepG2	Huh-7	A498	MDA-MB-231	Jurkat	HeLa
HBcAg (Index)	미검출	32.7%	61.6%	69.8%	67.1%	87.4%	37.5%	89.6%
HBsAg (Index)	1.00 이하	71.49 ± 1.53	474.70 ± 176.30	26.02 ± 5.97	5.12 ± 0.19	169	1081 ± 329	61.35
HBV DNA (copies/ml)	58.2 이하	65,100 ± 9,098	3,590,000 ± 1,010,000	89,000 ± 1,836	73,500 ± 23,292	116	868,000 ± 88,963	359
* 음성 대조군: HepG2 세포주에 HBV 바이러스만을 처리한 군								
** 양성 대조군: 바이러스 및 tCDCA가 처리되지 않은 군								

표 2

[0068]

	대조군***	Hepalcl7	H4-II-E	RAG	EL4	LC540
HBcAg (Index)	미검출	77.1%	32.6%	76.6%	66.9%	-
HBsAg (Index)	1.00 이하	508.26 ± 107.6	22.73 ± 4.39	21 (744)	192.7 ± 30.60	3.06 ± 0.44
HBV DNA (copies/ml)	58.2 이하	7,036,667	73,000 ± 51,929	11,700 (622, 000)	673,000 ± 60,053	149,000 ± 29,866
*** 대조군: Hepalcl7 세포주에 HBV 바이러스만을 처리한 군						

[0070]

상기 표 1 및 표 2에서 보는 바와 같이, 인간의 간암 세포주인 HepG2 및 쥐의 간암 세포주인 Hepalcl7의 배양액에서 HBsAg 및 HBcAg가 검출되었으며, HBV의 DNA가 적어도 100 카피 수 이상이 존재하는 것을 확인하였다. 이와 마찬가지로, HBV의 HBcAg를 FACS를 통해 확인한 결과, 계놈 수준과 마찬가지로 tCDCA가 처리된 HBV가 상기 세포주들에 감염되어 있는 것을 확인하였다.

[0071]

뿐만 아니라, 인간 및 쥐의 간 이외의 다른 다양한 장기로부터 유래된 세포주(A498, MDM-MB-231, Jurkat, HeLa, H4-II-E, RAG, EL4 및 LC540)의 배양액에서도 HBsAg 및 HBcAg가 검출되었고, HBV의 DNA가 존재하는 것을 확인하였다.

[0072]

상기 결과를 통해, 담즙산 또는 담즙산 유도체와 HBV를 함께 세포 배양액에 처리하는 경우, 인간 및 쥐의 간암 세포주에 HBV가 감염되도록 유도할 수 있고, HBV가 갖는 종 특이성 (혹은 좁은 숙주 범위)과 장기 친화성을 제거하여 다양한 종과 간 이외의 다른 조직으로부터 유래된 세포주들의 감염을 유도할 수 있음을 알 수 있다.

[0074]

[실시예 3] HCV에 의한 감염 세포주 검증

[0075]

상기 실시예 1에서 HCV가 감염된 감염 세포주와, 그로부터 수집된 배양액에서 HCV 코어 및 HCV의 RNA의 존재 수준을 측정하였다. 구체적으로, 로슈의 COBAS TaqMan 시스템을 이용하는 전문 검사기관(바이오지노코리아)에 의뢰하여 HCV의 RNA를 측정하고, 그 결과를 하기 표 3 및 4에 나타내었다. 여기서, 대조군으로는 담즙산 유도체 없이 HCV만을 처리하였다.

표 3

[0077]

	대조군	HepG2	Huh-7	A549	A498	MDA-MB-231	Jurkat
HCV RNA (IU/ml)	15 이하	85.233	628.066	4550	610	605	3326.667

표 4

[0079]

	대조군	Hepalcl7	H4-II-E	EL4	LC540
HCV RNA (IU/ml)	15 이하	3430	197.33	1669	21.7

[0081]

상기 표 3 및 표 4에서 보는 바와 같이, 인간의 간암 세포주인 HepG2 세포주 및 쥐의 간암 세포주인 Hepalcl7 세포주의 배양액에서 HCV의 RNA가 적어도 1000 IU/ml 이상이 존재하는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라, 간 이외의 다른 기관으로부터 유래된 인간 및 쥐에서 유래된 세포주에서도 HCV의 RNA가 검출되는 것을 확인하였다.

[0082]

상기 결과를 통해 상기 결과를 통해, HBV의 결과와 마찬가지로, 담즙산 또는 담즙산 유도체와 HCV를 함께 세포 배양액에 처리하는 경우, 인간 및 쥐의 간암 세포주에 HCV가 감염되도록 유도할 수 있음을 알 수 있다. 나아가, HCV가 갖는 종 특이성 또는 좁은 숙주 범위와 장기 친화성을 제거하여 다양한 종과 조직으로부터 유래된 세포주들의 감염을 유도할 수 있음을 알 수 있다.

[0084]

상기 실시예 2 및 3에 기재된 결과들로부터 담즙산 또는 담즙산 유도체와 HBV 또는 HCV를 함께 처리하는 경우, 상기 담즙산 또는 담즙산 유도체에 의해 세포주의 지질 이중층이 확장되고, 세포막을 기계적으로 파괴함으로써 매우 효과적으로 간염 바이러스의 감염이 유도될 수 있음을 알 수 있다.

[0086]

[실시예 4] 생쥐 간암 세포주 유래 바이러스의 제조

[0087]

외피 바이러스 감염 동물 모델의 제조를 위하여, 100 μ mol/L의 tCDCA에, 상기 준비예 1에서 분리된 HBV (1×10^8 copies/ml/well of HBV) 또는 HCV(1×10^8 IU/ml/well of HCV)를 혼합하였다.

[0088]

6웰 플레이트에 1×10^5 세포수/ml의 Hepalcl7 세포주를 분주하고, 24시간 동안 배양한 뒤에, 상기 HBV 또는 HCV가 혼합된 tCDCA 용액을 첨가하고 24시간 동안 추가로 배양하였다. 여기서, 대조군으로는 tCDCA 용액만을 첨가하였다. 이후, PBS 용액으로 3회 세척하고, 상기 바이러스가 포함되지 않은 세포 배양액으로 교체한 뒤에 3일 동안 추가로 배양하였다. 그런 다음, 상기 준비예 1과 동일한 방법으로 상기 Hepalcl7 세포주로부터 수득된 배양액에서 바이러스들을 분리하였다.

[0089]

여기서, 상기 분리된 바이러스는 지질막 이중층의 외피가 Hepalcl7 세포주로부터 유래된 것으로 교체되어 있기 때문에, 생쥐 간암 세포주 유래 HBV (이하, 'cHBVcc'라함) 및 생쥐 간암 세포주 유래 HCV (이하, 'cHCVcc'라함)라 지칭하였다. 그런 다음, 상기 바이러스들의 농도를 코바스 택맨 시스템(COBAS TaqMan system, Roche, 스위스)을 이용한 실시간 PCR을 통해 확인하였다.

[0091]

[실시예 5] cHBVcc 및 cHCVcc의 바이러스 안정성

[0092]

교차 감염성을 확인하기 이전에 다양한 환경에서, 상기 실시예 4에서 얻은 cHBVcc 및 cHCVcc의 바이러스 안정성을 확인하였다.

[0093]

인간 혈청(Human serum, HS), 생쥐의 혈청(Mouse serum, MS) 및 세포주의 배양액에 상기 cHBVcc 또는 cHCVcc를 처리한 뒤, 상기 혈청 또는 배양액 내 존재하는 HBsAg 및 HBV의 DNA의 양을 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 측정하여, 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다. 여기서, 만성 간염 환자의 혈청을 대조군으로 사용하였다.

표 5

[0095]

	대조군	인간 혈청	생쥐 혈청	세포 배양액
HBsAg (Index)	2,897	음성(negative)	음성	음성
HBV DNA (copies/ml)	4.36×10^8	224,000	31,400	12,300

[0097]

상기 표 5에서 보는 바와 같이, 대조군과 비교하였을 때, 생쥐의 간암세포주로부터 유래된 지질막 이중층으로 교체된 cHBVcc의 표면 항원성이 음성이고, 유전체도 많이 감소되었으나, 최소 감염 농도 (Minimal infectious dose)를 훨씬 상회하는 수치에 해당하기 때문에, 상기 cHBVcc의 경우에도 바이러스의 외피 상태가 안정성을 나타내며, 인간 또는 생쥐와 같은 목적하는 동물을 매우 효과적으로 감염시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0099] [실시예 6] 동종 세포에서 바이러스의 교차 감염 확인

[0100] [6-1] cHBVcc 교차 감염 확인(1)

[0101] Hepalcl7 세포주에서 상기 실시예 4에서 얻은 cHBVcc의 교차감염성을 확인하였다. 구체적으로, 상기 실시예 4의 cHBVcc과 100 $\mu\text{mol/L}$ 의 tCDCA가 혼합된 혼합 용액(cHBVcc + tCDCA) 또는 cHBVcc를 Hepalcl7 세포주에 처리한 뒤, 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 HBsAg 및 HBV의 DNA를 측정하여, 그 결과를 하기 표 6에 나타내었다. 여기서 대조군으로는 상기 준비예 1에서 얻은 HBV(야생형 HBV)를 사용하였다.

표 6

[0103]

	야생형 HBV	HBV + tCDCA	cHBVcc	cHBVcc + tCDCA
HBsAg (Index)	음성	18.61	7.61	음성
HBV DNA (copies/ml)	음성	657	190,000	130,000

[0105] 상기 표 6에서 보는 바와 같이, 야생형 HBV를 처리한 경우에는 Hepalcl7 세포주에서 HBV에 의한 감염이 전혀 일어나지 않았으나, tCDCA를 혼합하여 처리한 경우에는 감염이 일어나는 것을 확인하였다.

[0106] 나아가, 지질막 이중층이 Hepalcl7 세포주로부터 유래된 것으로 교체된 cHBVcc를 처리한 경우에는 tCDCA가 존재하지 않는 경우(cHBVcc)에서도 Hepalcl7 세포주에서 cHBVcc에 의한 감염이 일어나는 것을 확인하였다.

[0107] 상기 결과를 통해, 담즙산 또는 담즙산 유도체가 존재하지 않는 환경에서도 담즙산 또는 담즙산 유도체를 이용하여 지질막 이중층의 외피가 교체된 바이러스는 동종의 다른 세포를 감염시킬 수 있고, 나아가 상기 세포와 유래가 같은 종에 해당하는 동물을 매우 효과적으로 감염시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0109] [6-2] cHCVcc의 교차감염성 확인(2)

[0110] Hepalcl7 세포주에서 상기 실시예 4에서 얻은 cHCVcc의 교차감염성을 확인하였다. 구체적으로, 상기 실시예 4의 cHCVcc과 100 $\mu\text{mol/L}$ 의 tCDCA가 혼합된 혼합 용액(cHCVcc + tCDCA) 또는 cHCVcc를 Hepalcl7 세포주에 처리한 뒤, 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 HCV의 RNA를 측정하여, 그 결과를 하기 표 7에 나타내었다. 여기서 대조군으로는 상기 준비예 1에서 얻은 HCV(야생형 HCV)를 사용하였다.

표 7

[0112]

	야생형 HCV	HCV + tCDCA	cHCVcc	cHCVcc + tCDCA
HCV RNA (IU/ml)	음성	3,403	1330	1330

[0114] 상기 표 7에서 보는 바와 같이, 야생형 HCV만을 단독 주입한 경우에는 Hepalcl7 세포주에서 야생형 HCV에 의한 감염이 전혀 일어나지 않았으나, tCDCA를 혼합하여 처리한 경우에는 감염이 일어나는 것을 확인하였다.

[0115] 나아가, 지질막 이중층이 Hepalcl7 세포주로부터 유래된 것으로 교체된 cHCVcc를 처리한 경우에는 tCDCA가 존재하지 않는 환경에서도 Hepalcl7 세포주에서 감염이 일어나는 것을 확인하였다.

[0116] 상기 결과를 통해, 담즙산 또는 담즙산 유도체가 존재하지 않는 환경에서도 담즙산 또는 담즙산 유도체를 이용하여 지질막 이중층의 외피가 교체된 바이러스는 이종 세포를 감염시킬 수 있고, 나아가 상기 세포가 유래된 종과 같은 동물을 감염시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0118] [6-3] 교차감염성 확인(3)

[0119] HepG2 세포주에 100 $\mu\text{mol/L}$ 의 tCDCA에, 상기 준비예 1에서 분리된 HBV (1×10^8 copies/ml/well of HBV) 또는 HCV (1×10^8 IU/ml/well of HCV)를 혼합한 용액을 넣은 뒤, 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 지질막 이중층의 외피가 교체된 HBV 및 HCV를 수득하였다. 그런 다음, 100 $\mu\text{mol/L}$ 의 담즙산이 혼합된 혼합 용액 (HBV + tCDCA 또는 또는 HCV + tCDCA)를 HepG2 세포주에 처리한 뒤, 상기 실시예 2 및 3과 동일한 방법으로 HBsAg 및 HBV의 DNA 양 또는 HCV RNA를 측정하여, 그 결과를 하기 표 8 및 9에 나타내었다.

표 8

	HBV	HBV+ tCDCA
HBsAg (Index)	5.99±0.89	4.67±0.58
HBV DNA (copies/ml)	48000±18504	76400±19552

표 9

	HCV	HCV + tCDCA
HCV RNA (IU/ml)	15 이하	182

상기 표 8에서 보는 바와 같이, tCDCA가 존재하는 조건하에서, HepG2 세포주로부터 유래된 지질막 이중층의 외피를 갖는 HBV에 의해 HepG2 세포주가 감염되어 HBsAg 및 HBV DNA가 검출되었다. 나아가, 상기 표 9에서 보는 바와 같이, HepG2 세포주로부터 유래된 지질막 이중층의 외피를 갖는 HCV에 의해 HepG2 세포주가 감염되어 182 IU/ml의 RNA가 존재하는 것으로 확인되었다.

상기 결과를 통해 담즙산 또는 담즙산 유도체를 이용하여 지질막 이중층의 외피가 교체된 바이러스는 동종 세포를 매우 효율적으로 감염시킬 수 있음을 알 수 있다.

[6-4] 교차감염성 확인(4)

HepG2 세포주에 100 μ mol/L의 tCDCA에, 상기 준비예 1에서 분리된 HBV (1×10^8 copies/ml/well of HBV) 또는 HCV (1×10^8 IU/ml/well of HCV)를 혼합한 용액을 넣은 뒤, 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 지질막 이중층의 외피가 교체된 HBV 및 HCV를 수득하였다. 그런 다음, 100 μ mol/L의 담즙산이 혼합된 혼합 용액 (HBV + tCDCA 또는 HCV + tCDCA)를 Hepalcl7 세포주에 처리한 뒤, 상기 실시예 2 및 3과 동일한 방법으로 HBsAg 및 HBV의 DNA 양 또는 HCV RNA를 측정하여, 그 결과를 하기 표 10 및 표 11에 나타내었다.

표 10

	HBV	HBV+ tCDCA
HBsAg (Index)	3.28±0.89	19.32±1.85
HBV DNA (copies/ml)	47000±13200	292000±38553

표 11

	HCV	HCV + tCDCA
HCV RNA (IU/ml)	15 이하	182.3

상기 표 10 및 11에서 보는 바와 같이, tCDCA가 존재하는 조건하에서, HepG2 세포주로부터 유래된 지질막 이중층의 외피를 갖는 HBV에 의해 Hepalcl7 세포주가 감염되어 HBsAg 및 HBV DNA가 검출되었다. 나아가, 상기 표 11에서 보는 바와 같이, HepG2 세포주로부터 유래된 지질막 이중층의 외피를 갖는 HCV에 의해 Hepalcl7 세포주가 감염되어 182.3 IU/ml의 RNA가 존재하는 것으로 확인되었다.

상기 결과를 통해 담즙산 또는 담즙산 유도체를 이용하여 지질막 이중층의 외피가 교체된 바이러스는 이종 세포를 감염시킬 수 있고, 나아가 상기 세포가 유래된 종과 다른 동물을 감염시킬 수 있음을 알 수 있다.

[6-5] 교차감염성 확인(5)

[0139] Hepa1c1c7 세포주에 100 $\mu\text{mol/L}$ 의 tCDCA에, 상기 준비예 1에서 분리된 HBV (1×10^8 copies/ml/well of HBV) 또는 HCV (1×10^8 IU/ml/well of HCV)를 혼합한 용액을 넣은 뒤, 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 지질막 이중층의 외피가 교체된 HBV 및 HCV를 수득하였다. 그런 다음, 100 $\mu\text{mol/L}$ 의 담즙산이 혼합된 혼합 용액 (HBV + tCDCA 또는 HCV + tCDCA)를 HepG2 세포주에 처리한 뒤, 상기 실시예 2 및 3과 동일한 방법으로 HBsAg 및 HBV의 DNA 양 또는 HCV RNA를 측정하여, 그 결과를 하기 표 12 및 표 13에 나타내었다.

표 12

[0141]

	HBV	HBV+ tCDCA
HBsAg (Index)	미검출	32.5 ± 1.85
HBV DNA (copies/ml)	15.8 이하	392000 ± 32203

표 13

[0143]

	HCV	HCV + tCDCA
HCV RNA (IU/ml)	15 이하	300

[0144] 상기 표 12에서 보는 바와 같이, tCDCA가 존재하는 조건하에서, Hepa1c1c7 세포주로부터 유래된 지질막 이중층의 외피를 갖는 HBV에 의해 HepG2 세포주가 감염되어 HBsAg 및 HBV DNA가 검출되었다. 나아가, 상기 표 13에서 보는 바와 같이, HepG2 세포주로부터 유래된 지질막 이중층의 외피를 갖는 HCV에 의해 Hepa1c1c7 세포주가 감염되어 300 IU/ml의 RNA가 존재하는 것으로 확인되었다.

[0145] 상기 결과를 통해 담즙산 또는 담즙산 유도체를 이용하여 지질막 이중층의 외피가 교체된 바이러스는 동종 세포를 매우 효율적으로 감염시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0147] [실시예 7] HBV 및 HCV 바이러스 감염 동물 모델의 제조 및 검증

[0148] 생쥐 C57L의 꼬리 정맥에 100 μl 의 양(1×10^8 genome equivalents)으로 상기 실시예 4에서 제조된 cHBVcc 또는 cHCVcc를 주입하고, 1주 동안 사육하여 바이러스 감염 동물 모델(이하, '감염 동물'이라 함)을 제조하였다. 여기서, 대조군으로는 100 μl 의 양으로 인간으로부터 유래된 야생형 HBV를 주입하였다.

[0150] [7-1] 혈청 내 바이러스 검사

[0151] 상기 감염 동물로부터 혈청을 수득한 뒤, 상기 혈청 내에서 HBsAg 및 HBV의 DNA가 존재하는 수준을 측정하였다. 여기서, 대조군으로는 인간으로부터 유래된 지질막 이중층의 외피를 갖고 있는 야생형 HBV를 사용하였다. 상기 HBsAg 및 HBV의 DNA와 HCV RNA의 측정은 상기 실시예 2 및 3과 동일한 방법으로 수행하여, 그 결과를 하기 표 14 및 15에 나타내었다.

표 14

[0153]

	대조군	mHBVcc
HBsAg	0.1 (negative)	1.2
HBV DNA (copies/ml)	58.2이하 (negative)	585

표 15

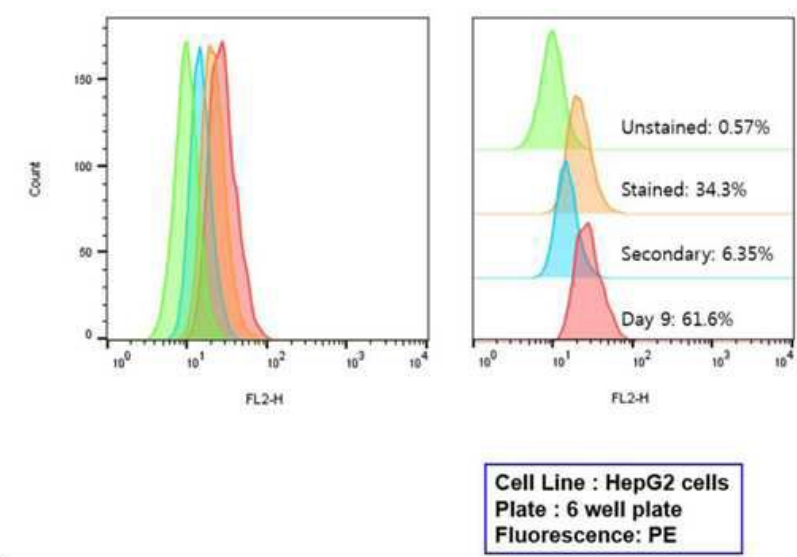
[0155]

	대조군	mHCVcc
HCV RNA (IU/ml)	15 이하	180

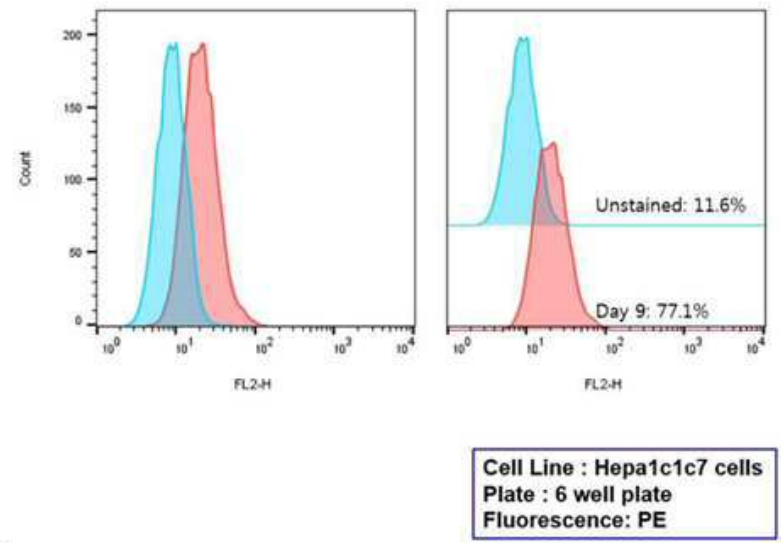
- [0157] 상기 표 14에서 보는 바와 같이, 감염 동물의 혈청 내 HBsAg의 양은 1.2 Index이었고, HBV의 DNA는 585 copies/ml가 존재하는 것으로 확인되었다. 또한, 상기 표 15에서 보는 바와 같이, 대조군의 HCV RNA는 15 IU/ml 이하인 반면, HCV DNA는 180 IU/ml로 확인되었다.
- [0158] 상기 결과를 통해, cHBVcc 및 cHCVcc의 주입을 통해 인간이 아닌 다른 종인 생쥐와 같은 소동물에 HBV의 감염이 일어날 수 있음을 알 수 있다.
- [0160] **[7-2] 간기능 검사**
- [0161] 상기 감염 동물에서, 바이러스 감염에 의한 간염이 발생되었는지 여부를 확인하기 위해, 혈청 내 ALT(alanine aminotransaminase)의 수치를 측정하는 간기능 검사를 이 분야의 통상의 방법에 의해 수행하였다.
- [0162] 그 결과, cHBVcc가 주입된 감염 동물의 ALT는 150 U/L로 측정되었다.
- [0163] 상기 결과를 통해, 정상 ALT 값이 34 이하의 값을 가지는 바, 감염 동물은 cHBVcc의 주입을 통해 쥐에 HBV가 감염될 수 있고, 이를 통해 상기 감염 동물에서 간염이 발생되었음을 알 수 있다.
- [0165] **[7-3] 조직검사**
- [0166] 상기 감염 동물의 간 조직을 적출한 뒤, 10%의 포르말린(formalin)을 이용하여 고정한 뒤, 파라핀에 매몰시켰다. 상기 파라핀에 매몰된 조직을 4 μ m의 두께로 자르고, 리하이드레이션과 파라핀을 제거하는 과정을 수행하였다. 그런 다음, 이를 이용하여 통상의 방법을 통해 H&E 염색을 수행하여, 그 결과를 도 9 내지 도 16에 나타내었다.
- [0167] 도 1 및 도 6에서 보는 바와 같이, 간실질부에 단핵구(임파구)의 침윤이 여러군데 증가되고, peri-portal area 에도 단핵구의 침윤과 풍선 모양의 덩어리가 발생된 것으로 보아 염증이 발생되었고, 인간의 급성 B형 간염의 조직학적 소견과 유사한 양상을 보임을 확인하였다.
- [0168] 도 7 및 도 8에서 보는 바와 같이, 회장의 용모에 단핵구(임파구)가 침윤되어 있음을 확인하였다.
- [0169] 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 cHBVcc에 의해 설치류를 감염시킬 수 있고, 이와 같은 감염은 간 조직뿐만 아니라, 신장 및 장골 조직에도 HBV의 감염에 의한 급성 염증이 유발될 수 있음을 알 수 있다.
- [0171] **[7-4] 면역염색검사**
- [0172] 상기 감염 동물의 간 조직을 적출한 뒤, 10%의 포르말린 (formalin)을 이용하여 고정한 뒤, 파라핀에 매몰시켰다. 상기 파라핀에 매몰된 조직을 4 μ m의 두께로 자르고, 리하이드레이션과 파라핀을 제거하는 과정을 수행하였다. 이후, HBV 코어 항원인 HBcAg 항체와 상기 조직을 반응시키고, 시각화될 수 있는 물질 (Biotin)이 결합되어 있는 2차 항체로 반응시켰다. 그런 다음, Hoechst 33258을 이용하여 15분 동안 염색한 뒤, 50% glycerol을 통해 마운팅하고 현미경으로 관찰하여, 그 결과를 도 9 내지 도 14에 나타내었다.
- [0173] 도 9 내지 도 14에서 보는 바와 같이, 간세포, 신장세포, 회장 용모 세포의 세포질이 갈색으로 염색된 것을 확인하였다.
- [0175] 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 동물 모델의 제조 방법은 인간으로부터 유래된 지방질 외피가 목적하는 동물 모델로부터 유래된 지방질 외피로 교체되기 때문에 종 특이성에 의한 제한 없이 임상적으로 유용하게 활용할 수 있는 동물 모델을 매우 효율적으로 제작할 수 있음을 알 수 있다.
- [0177] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

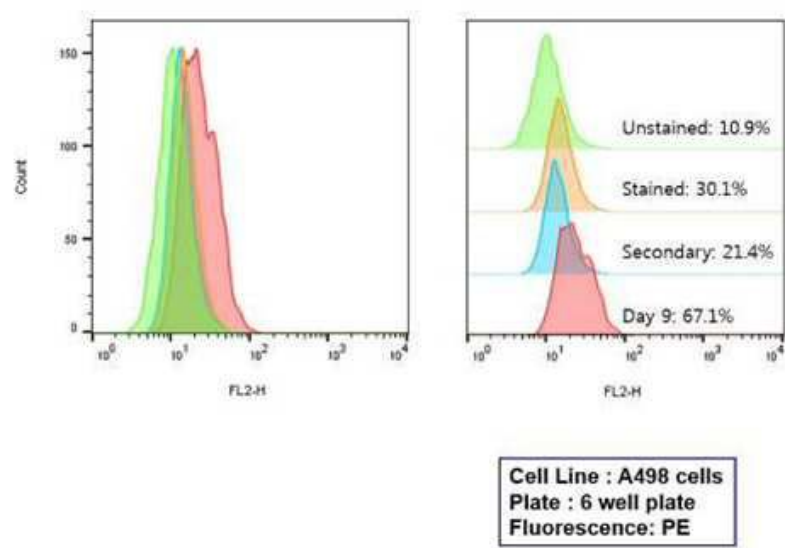
도면1



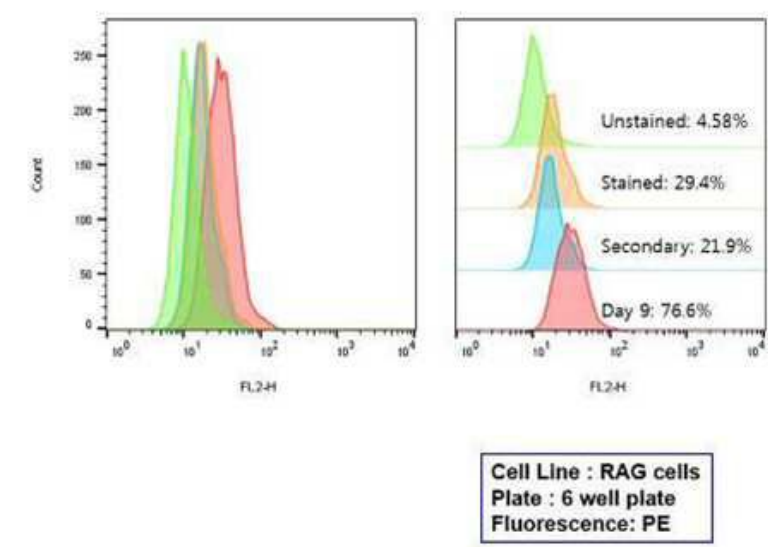
도면2



도면3

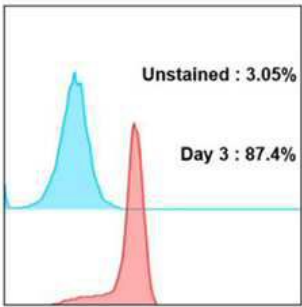


도면4



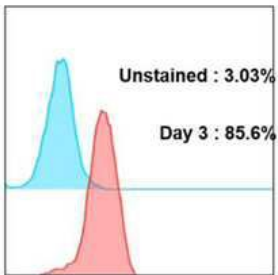
도면5

MDA

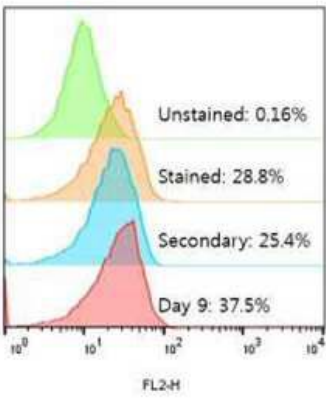
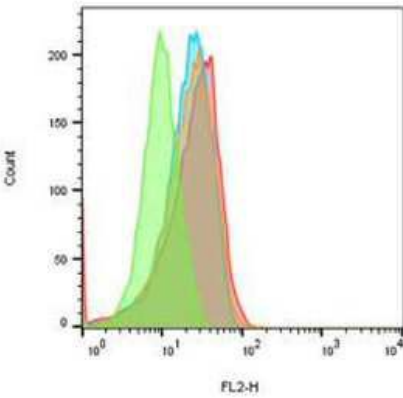


도면6

MTV



도면7



Cell Line : Jurkat T cells
Plate : 6 well plate
Fluorescence: PE

도면8

