 <b>(19) 대한민국특허청(KR)</b> <b>(12) 공개특허공보(A)</b>	<b>(11) 공개번호</b> 10-2011-0127086 <b>(43) 공개일자</b> 2011년11월24일
<b>(51) Int. Cl.</b> <i>C12Q 1/25</i> (2006.01) <i>G01N 33/15</i> (2006.01) <i>A61K 39/29</i> (2006.01) <i>A61P 31/12</i> (2006.01) <b>(21) 출원번호</b> 10-2011-0046803 <b>(22) 출원일자</b> 2011년05월18일 심사청구일자 2011년05월18일 <b>(30) 우선권주장</b> 1020100046484 2010년05월18일 대한민국(KR)	<b>(71) 출원인</b> <b>연세대학교 산학협력단</b> 서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교 <b>(72) 발명자</b> <b>류왕식</b> 서울특별시 양천구 목5동 904 신시가지아파트 414-201 <b>왕해봉</b> 서울시 양천구 목5동 904 목동아파트 414-201호 <b>류동균</b> 대전광역시 서구 월평동 298 갤러리빌 렉스 1203호 <b>(74) 대리인</b> <b>특허법인충현</b>

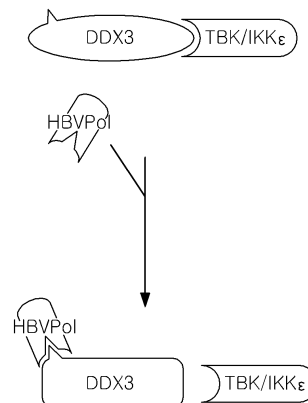
전체 청구항 수 : 총 15 항

#### (54) B형 간염 치료활성 물질의 스크리닝용 조성물 및 스크리닝 방법

##### (57) 요약

본 발명은 바이러스 분자 자체가 아닌 HBV 폴리머라제-DDX3 단백질간의 결합을 선택적으로 저해하는 물질을 스크리닝하는 것이므로 이를 회피하기 위한 내성을 갖는 돌연변이 바이러스의 발생 가능성이 매우 희박할 뿐 아니라 감염세포에만 특이적으로 형성된 표적본이므로 숙주세포에 대한 세포독성이 극히 낮을 것으로 기대된다. 특히 1년 이상 장기 치료를 요하는 만성 B형 간염의 경우 낮은 내성돌연변이 발생 및 세포독성은 현저하게 뛰어난 장점을 가진다.

**대표도** - 도16



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

a) HBV 폴리머라제를 코딩하는 염기서열을 제1 재조합 발현벡터; b) 인터페론 베타( $\text{IFN}\beta$ ) 프로모터 및 이에 작동가능하게 연결되며 인터페론 베타( $\text{IFN}\beta$ ) 프로모터의 활성을 측정하기 위한 리포터 유전자를 포함하는 제2 재조합 발현벡터;를 포함하는 B형 간염 치료활성 물질의 스크리닝용 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 c) 바이러스 감염 시 인터페론의 생성능을 갖는 동물세포를 포함하는 B형 간염 치료활성 물질의 스크리닝용 조성물.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 d) 인터페론 생성자극인자를 코딩하는 유전자를 포함하는 제3 재조합 발현벡터를 포함하는 B형 간염 치료활성 물질의 스크리닝용 조성물.

### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 인터페론 생성자극인자는 TRIF, RIG-I/MDA-5, IPS-1, TBK1/IKK $\epsilon$  분자로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 B형 간염 치료활성 물질의 스크리닝용 조성물.

### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 리포터 유전자는 E. coli  $\beta$ -갈락토시다아제(galactosidase), 루시페라아제(luciferase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase), 분비성 태반 알칼라인 포스파타아제(secreted placental alkaline phosphatase) 또는 클로람페니콜 아세틸트랜스페라아제(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)인 것을 특징으로 하는 B형 간염 치료활성 물질의 스크리닝용 조성물.

### 청구항 6

하기의 단계를 포함하는 B형 간염 치료활성 물질을 스크리닝하는 방법.

(1) 바이러스 감염 시 인터페론의 생성능을 갖는 동물세포에, HBV 폴리머라제를 코딩하는 염기서열을 제1 재조합 발현벡터 및 인터페론 베타( $\text{IFN}\beta$ ) 프로모터와 이에 작동가능하게 연결되며 인터페론 베타( $\text{IFN}\beta$ ) 프로모터의 활성을 측정하기 위한 리포터 유전자를 포함하는 제2 재조합 발현벡터를 트랜스펙션(transfection)하는 단계;

(2) 상기 동물세포에 인터페론생성 촉진물질을 첨가하는 단계;

(3) 상기 동물세포에 후보물질을 첨가하여 인터페론 베타( $\text{IFN}\beta$ ) 프로모터의 활성을 측정하는 단계; 및

(4) 상기 후보물질을 첨가하지 않은 경우에 비해 후보물질을 첨가한 경우  $\text{IFN}\beta$  프로모터의 활성이 증가한 후보물질을 선별하는 단계.

### 청구항 7

하기의 단계를 포함하는 B형 간염 치료활성 물질을 스크리닝하는 방법.

(1) 바이러스 감염 시 인터페론의 생성능을 갖는 동물세포에, a) HBV 폴리머라제를 코딩하는 염기서열을 제1 재조합 발현벡터, b) 인터페론 베타( $\text{IFN}\beta$ ) 프로모터와 이에 작동가능하게 연결되며 인터페론 베타( $\text{IFN}\beta$ ) 프로모

터의 활성을 측정하기 위한 리포터 유전자를 포함하는 제2 재조합 발현벡터 및 c) 인터페론생성 촉진물질과 인터페론 생성자극인자를 코딩하는 유전자를 포함하는 제3 발현벡터로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 물질을 트랜스펙션(transfection)하는 단계;

(2) 상기 동물세포에 후보물질을 첨가하여 인터페론 베타( $IFN\beta$ ) 프로모터의 활성을 측정하는 단계; 및

(3) 상기 후보물질을 첨가하지 않은 경우에 비해 후보물질을 첨가한 경우  $IFN\beta$  프로모터의 활성이 증가한 후보물질을 선별하는 단계.

#### 청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 인터페론생성 촉진물질은 폴리(I:C)인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 9

제6항에 있어서,

상기 (1) 단계에서, 인터페론 생성자극인자를 코딩하는 유전자를 포함하는 제3 재조합 발현벡터를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 10

제7항 또는 제9항에 있어서,

상기 인터페론 생성자극인자는 TRIF, RIG-I/MDA-5, IPS-1, TBK1/IKK $\epsilon$  분자로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 11

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 리포터 유전자는 E. coli  $\beta$ -갈락토시다아제(galactosidase), 루시페라아제(luciferase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase), 분비성 태반 알칼라인 포스파타아제(secreted placental alkaline phosphatase) 또는 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)인 방법.

#### 청구항 12

하기의 단계를 포함하는 B형 간염 치료활성 물질을 스크리닝하는 방법.

(1) 바이러스 감염 시 인터페론의 생성능을 갖는 동물세포에, HBV 폴리머라제를 코딩하는 염기서열을 제1 재조합 발현벡터, IRF3-GAL4 융합단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 제2 재조합 발현벡터 및 pFR 프로모터와 이에 작동가능하게 연결되며 pFR 루시페라아제를 코딩하는 염기서열을 포함하는 제3 재조합 발현벡터 및 인터페론 생성자극인자를 코딩하는 유전자를 포함하는 제4 발현벡터를 트랜스펙션(transfection)하는 단계;

(2) 상기 동물세포에 후보물질을 첨가하여 pFR 프로모터의 활성을 측정하는 단계; 및

(3) 상기 후보물질을 첨가하지 않은 경우에 비해 후보물질을 첨가한 경우  $IFN\beta$  프로모터의 활성이 증가한 후보물질을 선별하는 단계.

#### 청구항 13

제12항에 있어서,

상기 인터페론 생성자극인자는 TRIF, RIG-I/MDA-5, IPS-1, TBK1/IKK $\epsilon$  분자로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 14

HBV 폴리머라제를 발현하는 동물세포에 후보물질을 첨가하여 HBV 폴리머라제와 DDX3의 결합을 저해하는 후보물질을 선별하는 B형 간염 치료활성 물질스크리닝 시스템.

## 청구항 15

HBV 폴리머라제를 발현하는 동물세포에 후보물질을 첨가하여 HBV 폴리머라제와 DDX3의 결합을 저해하여 DDX3와 TBK1/IKK  $\epsilon$  와의 결합을 유도하는 후보물질을 선별하는 B형 간염 치료활성 물질스크리닝 시스템.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 B형 간염 치료활성 물질의 스크리닝용 조성물 및 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 B형 간염바이러스B의 폴리머라제가 인터페론 의 발현유도를 저해하는 기작을 규명하고 상기 기작을 통해 새로운 개념의 B형 간염 치료활성 물질을 스크리닝할 수 있는 스크리닝용 조성물 및 스크리닝 방법에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] B형 간염바이러스(Hepatitis B virus, HBV)는 급성 간염 뿐 아니라, 만성 간염을 일으키는 바이러스로서 현재 약 4억의 인구가 감염자인 임상적으로 매우 중요한 바이러스이다 (Seeger, Zoulim, and Mason, 2007). HBV는 DNA 바이러스이지만, RNA를 주형으로 HBV 폴리머라제(polymerase)가 가지고 있는 역전사 활성(reverse transcriptase activity)을 통하여 DNA 유전자를 복제하는 매우 특이한 복제기전을 갖는다. HBV의 게놈은 약 3.2k bp의 원형의 DNA 유전자를 갖고 있으며, 코아 단백질(C, core), 폴리머라제(P, polymerase), 표면항원(S, surface antigen), 그리고 X 단백질(HBx)의 네 개의 바이러스 단백질 유전자를 코드한다. 이러한 네 개의 바이러스 단백질 중에서 코아 단백질(C), 폴리머라제(P)는 B형 간염 바이러스의 유전자 복제에 필수적이다. B형 간염 바이러스는 레트로바이러스와 유사한 역전사 과정을 거쳐 DNA를 합성한다 (Nassal, 2008).

[0003] 인터페론 혹은 라미부딘 등의 뉴클레오사이드 유사체가 항바이러스제로 개발되어 사용 중이지만 부작용 및 내성바이러스의 생성 등으로 그 효과는 미흡하다. 따라서, 새로운 만성 B형 간염치료제의 개발이 절실하다 (Zoulim and Locarnini, 2009).

[0004] 한편, 바이러스 감염은 흔히 항바이러스 활성을 갖는 인터페론(interferons, IFN)의 발현을 유도하는 선천면역반응을 일으킨다. 최근, 바이러스의 침입을 인지하여 인터페론을 생성하는 세포기전이 비교적 상세히 규명되었다. 구체적으로, 세균이나 곰팡이와 마찬가지로, 세포에 진입한 바이러스도 소위 PRR(pattern recognition receptor)이라고 불리는 수용체들에 의해 인지된다(Akira, Uematsu, and Takeuchi, 2006; Pichlmair and Reis e Sousa, 2007). 흔히 바이러스 게놈을 구성하는 핵산물질이 PRR에 의해 인지되는 PAMPs(pattern-associated molecular patterns)로 작용한다. PRR은 크게 두 가계로 나뉜다. 우선, 첫 가계는 TLR(toll-like receptor)로서 TLR3, TLR7, TLR 8, TLR9 등을 포함하며 수지상 세포 등의 엔도솜에 위치한다. TLR에 의한 PAMPs의 인지는 IRF signaling 등의 신호전달과정을 활성화하여 IRF3/7, NF- $\kappa$ B 등의 전사인자를 활성화한다. 구체적으로, TLR은 TRIF(TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN $\beta$ )라는 어댑터 단백질을 채용하고, 이는 다시 TBK1/IKK  $\epsilon$  (TANK-binding kinase 1/I $\kappa$ B kinase- $\epsilon$  를 활성화하여 결국 전사인자인 IRF3/7의 인산화를 통해 인터페론의 발현을 유도한다 (Akira, Uematsu, and Takeuchi, 2006; Honda and Taniguchi, 2006).

[0005] 두번째의 PRR 가계는 RLR(retinoic-acid inducible gene I (RIG-I)-like receptors) 이라고 부르며, RIG-I 및 MDA-5(melanoma differentiation-associated gene 5)가 여기에 속한다 (Pichlmair and Reis e Sousa, 2007). TLR과 마찬가지로, RLR에 의한 바이러스 핵산의 인지는 IRF signaling 등을 활성화하여 IRF3/7, NF- $\kappa$ B 등의 전사인자를 활성화를 일으킨다. 특히, RLR은 어댑터인 IPS(IFN $\beta$ -promoter stimulator 1, 혹은 MAVS, VISA, 또는 Cardif 라고도 부른다)와의 결합을 통해TBK1/IKK  $\epsilon$  kinases를 활성화하고, 이는 다시 전사인자인 IRF3/7, NF- $\kappa$ B를 활성화한다 (Akira, Uematsu, and Takeuchi, 2006). 결국, 두 가계의 수용체 모두 IRF3 signaling의 effector kinase인 TBK1/IKK  $\epsilon$  kinases를 활성화시키고, 이 kinase가 IRF3, IRF7, NF- $\kappa$ B 등의 전사인자를 인산화하고 핵 이동을 촉진하면서 전사인자의 활성화하는 것이 핵심적인 측면이다.

[0006] 바이러스 감염에 대항하기 위해 세포는 선천면역기능을 작동하여 바이러스의 증식을 억제하고자 한다.

즉, 바이러스 감염을 인지한 후 IRF signaling의 활성화를 통해 인터페론을 발현하여 바이러스 증식을 억제하고자 한다. 그런데, HBV 감염은 다소 예외적이다. 침팬지 동물모델의 감염실험을 통해 선천면역에 관련된 유전자의 발현이 감지되지 않았다 (Wieland et al., 2004; Wieland and Chisari, 2005). 이 결과는 HBV감염은 선천면역시스템이 인지하지 못한다는 추정을 하게 되어 “스텔스바이러스(Stealth virus)”라고 불리기도 했다. 이러한 초기 보고와는 달리, 실제 HBV 감염에 대한 선천면역을 관찰한 보고들이 있다. 예를 들면, 초기감염 시, 선천면역유도의 특징인 자연살상세포(natural killer cell)의 반응이 급성감염 환자에서 관찰된 바 있다 (Fiscaro et al., 2009). 또한, HBV 감염에 민감한 세포주인 HepaRG 세포를 이용하여, HBV 감염이 강력한 선천면역반응을 유도하며 이 반응이 HBV DNA 복제를 저해함을 관찰한 바 있다 (Lucifora et al., 2010). 이상의 결과를 종합하여, 실제 HBV 감염 시, 선천면역반응이 강하게 유도되지만 바이러스 단백질이 이를 대항하여 저해한다고 추론할 수 있다.

[0007] 한편, DEAD-box RNA helicase는 인간게놈에 약 38개의 유전자가 발견된 큰 단백질 가계이다(Linder, 2006). DEAD-box RNA helicase는 세포 내에서 전사, RNA 스플라이싱, RNA 핵 방출, 번역 등의 다양한 RNA 대사에 작용한다 (Rocak and Linder, 2004). DEAD-box RNA helicase 가계에 속하는 DDX3도 다양한 RNA 대상에 관련됨이 보고된 바 있다.

[0008] 구체적으로 DDX3(GeneBank accession No. NM\_001356.3)는 다양한 바이러스의 생활사에서도 작용한다. 우선 인간면역결핍바이러스인 HIV(human immunodeficiency virus)의 증식에 작용한다. 구체적으로 Rev/RRE 경로에 작용하여 HIV RNA의 핵 방출에 필수적이다 (Yedavalli et al., 2004). 또한, DDX3는 C형 간염바이러스의 RNA 게놈증식에도 필수적으로 작용한다 (Ariumi et al., 2007; Owsianka and Patel, 1999). 한편, 이와는 대조적으로 최근 본 발명자는 DDX3는 HBV 폴리머라제와의 결합을 통해 HBV 게놈증식을 저해함을 보고한 바 있다 (Wang, Kim, and Ryu, 2009). 한편, RNA 대사의 관련성 이외에도, DDX3는 선천면역반응을 촉진함이 보고된 바 있다 (Schroder, Baran, and Bowie, 2008; Soulat et al., 2008). 구체적으로 DDX3가 IRF signaling의 effector kinase인 TBK1/IKK  $\epsilon$  와의 결합을 통해 TBK1/IKK  $\epsilon$  kinase 활성을 증폭함으로써 선천면역을 촉진하는 것이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 첫번째 해결하려는 과제는 내성변이 바이러스의 생성을 방지할 수 있는 새로운 개념의 B형 간염 치료활성 물질을 스크리닝할 수 있는 스크리닝용 조성물 및 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0010] 상기 첫번째 해결하려는 과제를 달성하기 위하여, 본 발명은 a) HBV 폴리머라제를 코딩하는 염기서열을 제1 재조합 발현벡터; b) 인터페론 베타(IFN $\beta$ ) 프로모터 및 이에 작동가능하게 연결되며 인터페론 베타(IFN $\beta$ ) 프로모터의 활성을 측정하기 위한 리포터 유전자를 포함하는 제2 재조합 발현벡터;를 포함하는 B형 간염 치료활성 물질의 스크리닝용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 c) 바이러스 감염 시 인터페론의 생성능을 갖는 동물세포를 포함할 수 있다.

[0012] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 d) 인터페론 생성자극인자를 코딩하는 유전자를 포함하는 제3 재조합 발현벡터를 포함할 수 있다.

[0013] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 인터페론 생성자극인자는 TRIF(GeneBank accession No. NM\_182919.2), RIG-I(GeneBank accession No. NM\_014314.3)/MDA-5, IPS-1, TBK1((GeneBank accession No. NM\_004180.2)/IKK  $\epsilon$  (GeneBank accession No. NM\_014002.3)분자로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0014] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 리포터 유전자는 E. coli  $\beta$ -갈락토시다아제

(galactosidase), 루시페라아제(luciferase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase), 분비성 태반 알칼라인 포스파타아제(secreted placental alkaline phosphatase) 또는 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)일 수 있다.

[0015]

[0016]

본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, (1) 바이러스 감염 시 인터페론의 생성능을 갖는 동물세포에, HBV 폴리머라제를 코딩하는 염기서열을 제1 재조합 발현벡터 및 인터페론 베타( $IFN\beta$ ) 프로모터와 이에 작동가능하게 연결되며 인터페론 베타( $IFN\beta$ ) 프로모터의 활성을 측정하기 위한 리포터 유전자를 포함하는 제2 재조합 발현벡터를 트랜스펙션(transfection)하는 단계; (2) 상기 동물세포에 인터페론생성 촉진물질을 첨가하는 단계; (3) 상기 동물세포에 후보물질을 첨가하여 인터페론 베타( $IFN\beta$ ) 프로모터의 활성을 측정하는 단계; 및 (4) 상기 후보물질을 첨가하지 않은 경우에 비해 후보물질을 첨가한 경우  $IFN\beta$  프로모터의 활성이 증가한 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 B형 간염 치료활성 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0017]

본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 인터페론생성 촉진물질은 폴리(I:C)일 수 있다. 본 발명의 실시예는 TLR3 수용체와 TLR3의 리간드인 폴리(I:C)의 경우만을 수행하였으나, 본 발명은 이에 제한되지 않고 다른 10 여종의 TLR 가계의 수용체와 그에 따른 다양한 리간드도 모두 포함된다. 예를 들면, TLR9 수용체와 TLR9의 리간드인 CpG DNA를 사용해도 본 발명의 효과는 동일할 것이다.

[0018]

본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 (1) 단계에서, 상기 동물세포에 인터페론 생성자극 인자를 코딩하는 유전자를 포함하는 제3 재조합 발현벡터를 더 포함할 수 있으며, 이 경우 보다 바람직한 것은 상기 인터페론 생성자극인자는 TRIF, RIG-I/MDA-5, IPS-1, TBK1/IKK $\epsilon$  분자로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0019]

본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 리포터 유전자는 E. coli  $\beta$ -갈락토시다아제(galactosidase), 루시페라아제(luciferase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase), 분비성 태반 알칼라인 포스파타아제(secreted placental alkaline phosphatase) 또는 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)일 수 있다.

[0020]

본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, (1) 바이러스 감염 시 인터페론의 생성능을 갖는 동물세포에, a) HBV 폴리머라제를 코딩하는 염기서열을 제1 재조합 발현벡터, b) 인터페론 베타( $IFN\beta$ ) 프로모터와 이에 작동가능하게 연결되며 인터페론 베타( $IFN\beta$ ) 프로모터의 활성을 측정하기 위한 리포터 유전자를 포함하는 제2 재조합 발현벡터 및 c) 인터페론생성 촉진물질과 인터페론 생성자극인자를 코딩하는 유전자를 포함하는 제3 발현벡터로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 물질을 트랜스펙션(transfection)하는 단계; (2) 상기 동물세포에 후보물질을 첨가하여 인터페론 베타( $IFN\beta$ ) 프로모터의 활성을 측정하는 단계; 및 (3) 상기 후보물질을 첨가하지 않은 경우에 비해 후보물질을 첨가한 경우  $IFN\beta$  프로모터의 활성이 증가한 후보물질을 선별하는 단계를 포함할 수 있다.

[0021]

[0022]

본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, (1) 바이러스 감염 시 인터페론의 생성능을 갖는 동물세포에, HBV 폴리머라제를 코딩하는 염기서열을 제1 재조합 발현벡터, IRF3-GAL4 융합단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 제2 재조합 발현벡터 및 pFR 프로모터와 이에 작동가능하게 연결되며 pFR 루시페라아제를 코딩하는 염기서열을 포함하는 제3 재조합 발현벡터 및 인터페론 생성자극인자를 코딩하는 유전자를 포함하는 제4 발현벡터를 트랜스펙션(transfection)하는 단계; (2) 상기 동물세포에 후보물질을 첨가하여 pFR 프로모터의 활성을 측정하는 단계; 및 (3) 상기 후보물질을 첨가하지 않은 경우에 비해 후보물질을 첨가한 경우  $IFN\beta$  프로모터의 활성이 증가한 후보물질을 선별하는 단계를 포함할 수 있다.

[0023]

본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, HBV 폴리머라제를 발현하는 동물세포에 후보물질을 첨가하여 HBV 폴리머라제와 DDX3의 결합을 저해하는 후보물질을 선별하는 B형 간염 치료활성 물질의 스크리닝 시스템을 제공한다.

[0024]

본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, HBV 폴리머라제를 발현하는 동물세포에 후보물질을 첨가하여 HBV 폴리머라제와 DDX3의 결합을 저해하여 DDX3와 TBK1/IKK $\epsilon$ 와의 결합을 유도하는 후보물질을 선별하는 B형 간염 치료활성 물질의 스크리닝 시스템을 제공한다.



- [0025] 이하, 본 발명에 사용된 용어를 설명한다.
- [0026] 용어 "바이러스 감염 시 인터페론의 생성능을 갖는"이라 함은 바이러스 감염에 의해 인터페론 발현이 촉진되어 인터페론을 생산하는 세포를 의미한다.
- [0027] 용어 "작동적으로 결합된"은 핵산 발현 조절 서열 (예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사를 조절하게 된다.
- [0028] 용어 " IFN $\beta$  프로모터"는 인터페론의 발현을 조절할 수 있는 DNA 서열을 의미한다. IFN $\beta$  프로모터는 IRF3/7 결합부위와 NF- $\kappa$ B 전사인자 결합부위로 구성된다.
- [0029] 용어 "리포터 유전자"는 예컨대 생물학적 활성 분석으로 용이하게 측정 가능한 발현 산물(효소 등)을 인코딩하는 DNA 분자를 의미한다.
- [0030] 용어 "pFR 프로모터"는 효모의 전사인자인 GAL4 결합부위를 갖는 프로모터로서 GAL4 의존성 전사를 측정하는 목적으로 널리 사용된다.
- [0031] 용어 "후보물질"은 HBV 폴리머라제와 DDX3와의 상호작용(interaction)을 저해하여 HBV 폴리머라제에 의한 인터페론 발현억제를 저해하여 인터페론발현의 원상회복이 기대되는 물질을 의미한다. 상기 후보물질은 예를 들어, 저분자량 유기화합물, 고분자량 유기화합물, 핵산분자(예컨대, DNA, RNA, PNA 및 앵타머), 단백질, 당 및 지질 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

### 발명의 효과

- [0032] 본 발명은 HBV 폴리머라제-DDX3 분자 간의 결합을 선택적으로 저해하는 물질을 스크리닝하는 것이므로 이를 회피하는 내성 돌연변이 바이러스의 발생가능성이 매우 희박할 것이다. 또한 HBV 폴리머라제와 DDX3 분자의 결합은 감염세포에만 특이적으로 형성된 표적본이므로 이 결합을 저해하는 물질의 세포독성은 극히 낮을 것으로 기대된다. 특히 1년 이상 장기간 치료를 요하는 만성 B형 간염의 경우 낮은 내성변이주 발생 및 세포독성은 항바이러스제로서의 뛰어난 장점이다.

### 도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1a 내지 도 1c 는 본 발명에 사용된 제조합 플라스미드의 개열지도이다. 구체적으로 도 1a는 HBV 폴리머라제 발현벡터(pcDNA-HBV Pol)의 개열지도로서 HBV ayw 유전자형(GenBank accession V01460)의 P 유전자가 pcDNA3.0 벡터(In Vitrogen Inc.)의 multiple cloning site에 삽입되어 CMV(cytomegalovirus) 초전기 프로모터로부터 발현된다. HBV 폴리머라제 유전자의 N-말단에 연결된 FLAG tag은 감지를 위해 삽입된 것이다. 도 1b는 HBx 단백질의 발현벡터(pCMV7- HBx)로서 HBV ayw 유전자형(GenBank accession V01460)의 X 유전자가 pCMV7 벡터(Sigma Inc.)의 multiple cloning site에 삽입되어 CMV(cytomegalovirus) 초전기 프로모터로부터 발현된다. X 유전자의 C-말단에 연결된 FLAG tag은 감지를 위해 삽입된 것이다. 도 1c는 코아단백질(Core)의 발현벡터(pcDNA-Core)로서 HBV ayw 유전자형(GenBank accession V01460)의 코아유전자가 pcDNA1/Amp 벡터(In Vitrogen Inc.)의 multiple cloning site에 삽입되어 CMV(cytomegalovirus) 초전기 프로모터로부터 발현된다.
- 도 2는 HBV 폴리머라제에 의한 인터페론생성 저해를 보여주는 결과로서, 도 2는 간암 세포주인 HepG2 세포에 IFN $\beta$  Luciferase 리포터 플라스미드와 HBV의 단백질 발현벡터를 각각 트랜스펙션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다. 또한, TLR signaling을 활성화하기 위해 poly(I:C)를 배지에 첨가하였고, TLR3 발현이 결핍된 HepG2세포의 기능을 보완하기 위해 TLR3 발현 플라스미드를 함께 트랜스펙션하였다.
- 도 3 ~ 4는 HBV 폴리머라제 발현 플라스미드의 양의 증가에 따른 인터페론생성 저해를 보여주는 결과로서, 도 3 간암세포주인 HepG2 세포에 poly(I:C)를 배지에 첨가해준 후, IFN $\beta$  Luciferase 리포터 플라스미드와 HBV 폴리머라제 발현 플라스미드를 각각 트랜스펙션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다. 도 4는 간암세포주인 HepG2 세포에 poly(I:C)를 트랜스펙션 한 후, IFN $\beta$

Luciferase 리포터 플라스미드와 HBV 폴리머라제 발현 플라스미드를 각각 트랜스팩션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다.

도 5는 HBV 폴리머라제 발현에 따른 IRF signaling 저해를 보여주는 결과로서, HepG2 세포에 poly(I:C)를 배지에 첨가하고, HBV 폴리머라제 발현 플라스미드를 트랜스팩션 한 후, 3일 후 세포를 수확하였다. 샘플을 SDS-PAGE로 전기영동한 후 인산화된 IRF를 인산화 IRF 항체를 이용해 웨스턴 블롯으로 탐지하였다.

도 6, 7은 HBV 폴리머라제 발현 플라스미드의 양의 증가에 따른 IRF3-luciferase 활성 감소를 보여주는 결과로서, 도 6은 HepG2 세포에 RIG-I 발현 플라스미드와 IRF3 Luciferase 리포터 플라스미드와 HBV 폴리머라제 발현 플라스미드를 각각 트랜스팩션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다. 도 7은 HepG2 세포에 TRIF 발현 플라스미드와 IRF3 Luciferase reporter 플라스미드와 HBV 폴리머라제 발현 플라스미드를 각각 트랜스팩션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다.

도 8 ~ 12는 HBV 폴리머라제의 표적이 IRF signaling의 TBK1/IKK $\epsilon$  분자임을 보여주는 결과로서, 도 8은 IRF signaling에 관여하는 분자들의 상호관계를 보여주는 것으로 특히 HBV 폴리머라제가 TBK1/IKK $\epsilon$ 의 활성을 촉진하는 DDX3를 표적함을 나타낸다. 도 9는 HepG2 세포에 TBK1 발현 플라스미드와 IRF3 Luciferase 리포터 플라스미드와 HBV 폴리머라제 발현 플라스미드를 각각 트랜스팩션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다.

도 10은 HepG2 세포에 IKK $\epsilon$  발현 플라스미드와 IRF3 Luciferase 리포터 플라스미드와 HBV 폴리머라제 발현 플라스미드를 각각 트랜스팩션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다.

도 11은 HepG2 세포에 IKK $\epsilon$  발현 플라스미드와 ISRE Luciferase 리포터 플라스미드와 HBV 폴리머라제 발현 플라스미드를 각각 트랜스팩션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다.

도 12는 HepG2 세포에 IRF3 발현 플라스미드와 ISRE Luciferase 리포터 플라스미드와 HBV 폴리머라제 발현 플라스미드를 각각 트랜스팩션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다.

도 13 ~ 15는 HBV 폴리머라제의 IRF signaling 저해에 대한 DDX3의 길항작용을 보여주는 결과로서, 도 13은 HepG2 세포에 TBK1 발현 플라스미드와 IRF3 Luciferase 리포터 플라스미드와 HBV 폴리머라제 발현 플라스미드를 각각 트랜스팩션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다. 이때, DDX3 발현 플라스미드의 양이 증가함에 따른 효과를 관찰한 것이다. 도 14는 HepG2 세포에 IKK $\epsilon$  발현 플라스미드와 IRF3 Luciferase 리포터 플라스미드와 HBV 폴리머라제 발현 플라스미드를 각각 트랜스팩션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다. 이때, DDX3 발현 플라스미드의 양이 증가함에 따른 효과를 관찰한 것이다. 도 15는 DDX3- IKK $\epsilon$  간의 상호결합을 조사하기 위하여 면역침전법(IP, immunoprecipitation)을 실시한 후 웨스턴블롯(IB, immunoblot)으로 침전된 단백질을 관찰한 것이다. HepG2 세포에 IKK $\epsilon$  및 DDX3 발현 플라스미드를 트랜스팩션한 후, anti-Flag antibody로 면역침전하고, anti-HA antibody로 웨스턴블롯하였다(lane 3). HBV 폴리머라제 발현 플라스미드를 트랜스팩션한 경우, 침전된 DDX3가 감소하였다(lane 4).

도 16은 본 발명의 한 특징에 따른 만성 B형 간염 치료제의 스크리닝 기작을 나타내는 개략도이다.

도 17은 후보물질 10종의 화합물을 처리에 따른 IFN $\beta$ -Luc reporter 에세이의 결과로서, HBV 폴리머라제 발현 플라스미드의 양이 증가함에 따라 루시퍼라제 활성이 감소하였다. 본 실시예에서 수행한 300여 종의 화합물이 모두 유사한 결과를 보였으므로 10종 화합물의 결과만을 예시하였다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

상술한 바와 같이, 종래의 B형간염 치료제는 바이러스 분자자체를 타겟으로 하므로 고빈도 돌연변이를 생성하는 바이러스의 특성상 내성변이주의 생성되어 치료효과가 제한적이었다.



- [0036] 이에 본 발명에서는 HBV 폴리머라제는 DDX3 단백질과 상호작용할 때 이미 결합된 TBK1/IKK  $\epsilon$  분자와 DDX3 단백질의 상호작용을 저해하여 그 결과 인터페론의 생산을 억제하여 선천면역을 억제하는 부반응을 초래하는 사실을 발견하고 이를 이용하여 B형 간염 치료물질을 스크리닝할 수 있는 조성물 및 스크리닝 방법을 개발하였다.
- [0037] 이를 통해, 첨가되는 치료제 후보물질이 HBV 폴리머라제-DDX3단백질간의 상호작용을 선택적으로 저해하는 물질인 경우 HBV 폴리머라제와의 상호작용이 저해된 DDX3단백질이 TBK1/IKK  $\epsilon$  분자와 결합하여 IRF signaling의 활성화를 유도하고 이를 통해 IFN  $\beta$  프로모터의 활성이 증가하며, 이러한 활성증가 반응을 보이는 치료제 후보물질은 B형간염 치료제로 활용할 수 있는 것이다.
- [0038] 이를 위하여, 본 발명의 바람직한 제1 실시예에 따르면, 1) 바이러스 감염 시 인터페론의 생성능을 갖는 동물세포에, HBV 폴리머라제를 코딩하는 염기서열을 제1 재조합 발현벡터 및 인터페론 베타(IFN  $\beta$ ) 프로모터와 이에 작동가능하게 연결되며 인터페론 베타(IFN  $\beta$ )의 활성을 측정하기 위한 리포터 유전자를 포함하는 제2 재조합 발현벡터를 첨가하고 트랜스펙션(transfection)하는 단계; (2) 상기 동물세포에 인터페론생성 촉진물질을 첨가하는 단계; (3) 상기 동물세포에 후보물질을 첨가하여 인터페론 베타(IFN  $\beta$ ) 프로모터의 활성을 측정하는 단계; 및 (4) 상기 후보물질을 첨가하지 않은 경우에 비해 후보물질을 첨가한 경우 인터페론 베타(IFN  $\beta$ ) 프로모터의 활성이 증가한 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 B형 간염 치료활성 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0039] 구체적으로, 1) 단계로서 바이러스 감염 시 인터페론의 생성능을 갖는 동물세포에 HBV 폴리머라제를 코딩하는 염기서열을 제1 재조합 발현벡터 및 IFN  $\beta$  프로모터와 이에 작동가능하게 연결되며 IFN  $\beta$  프로모터의 활성을 측정하기 위한 리포터 유전자를 포함하는 제2 재조합 발현벡터를 첨가하고 트랜스펙션(transfection)하는 단계를 포함한다.
- [0040] 먼저, 바이러스 감염 시 인터페론의 생성능을 갖는 동물세포는 DDX3 단백질을 발현하며, 이에 속하는 동물세포는 제한없이 사용될 수 있으나, 바람직하게는 HEK293, HeLa, HepG2 세포 등을 사용할 수 있다.
- [0041] 다음, 상기 동물세포에 HBV 폴리머라제를 코딩하는 염기서열을 제1 재조합 발현벡터를 첨가한다. HBV 폴리머라제는 동물세포내에 트랜스펙션되는 경우 동물세포의 DDX3와 상호작용하여, IFN  $\beta$  프로모터의 활성을 억제하는 역할을 수행한다. 한편, HBV 폴리머라제가 아닌 HBV 코어부분이나 기타 HBV의 다른 영역을 코딩하는 염기서열을 포함하는 경우에는 DDX3와 상호작용하여 IFN  $\beta$ 의 발현 및 IFN  $\beta$  프로모터의 활성을 억제하지 못하므로 반드시 HBV 폴리머라제를 코딩하는 염기서열을 제1 재조합 발현벡터를 첨가하여야 한다(실시예 1 참조).
- [0042] 한편 HBV 폴리머라제를 코딩하는 염기서열은 서열번호 1로 표시되는 염기서열일 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 다양한 HBV 폴리머라제를 사용할 수 있고, 나아가, 발현측정을 위하여 HBV 폴리머라제의 N-말단에 FLAG 서열 등을 추가하는 것 역시 당업자에게 자명하게 응용될 수 있을 것이다.
- [0043] 한편, 본 발명에 사용되는 모든 재조합 발현벡터들은 상용 또는 연구실에서 쉽게 구할 수 있는 플라스미드 내에 특정 염기서열을 삽입하거나 상용 또는 연구실에서 쉽게 구할 수 있는 재조합 플라스미드로서, 이의 제작방법은 통상의 재조합 발현벡터를 제작하는 방법에 따라 제작될 수 있으며, 이는 당업자에게 자명한 것이다.
- [0044] 다음, 동물세포에 IFN  $\beta$  프로모터와 이에 작동가능하게 연결되며 IFN  $\beta$  프로모터의 활성을 측정하기 위한 리포터 유전자를 포함하는 제2 재조합 발현벡터를 첨가한다. 본 발명에 사용될 수 있는 인터페론의 발현을 조절할 수 있는 프로모터(예를 들어 [Lin et al., Mol. Cell Biol. 20:6342(2000)]) 서열은 제한없이 사용될 수 있다. 본 발명의 제2 재조합 발현벡터에 사용될 수 있는 리포터 유전자로는 E. coli  $\beta$ -갈락토시다아제(galactosidase) [An et al., Mol. Cell. Biol. 2:1628 (1982)], 루시페라아제(luciferase) [De Wet et al., Mol. Cell. Biol. 7:725 (1987)], 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase) [Henthorn et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6342 (1988)], 분비성 태반 알칼라인 포스파타아제(secreted placental alkaline phosphatase) [Berger et al., Gene 66:1 (1988)] 및 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제(chloramphenicol acetyltransferase, CAT) [Gorman et al., Mol. Cell. Biol. 2:1044 (1982); Tsang et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 85:8598 (1988)] 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 이들 리포터 유전자는 상업적으로 구입이 가능하다. 바람직하게는 본 발명의 방법에서는 상기 리포터 유전자로서 루시페라아제를 사용할 수 있다.

[0045]

[0046]

본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 (1) 단계에서, 상기 동물세포에 인터페론 생성자극인자를 코딩하는 유전자를 포함하는 제3 재조합 발현벡터를 더 포함할 수 있다. 상기 인터페론 생성자극인자는 TRIF, RIG-I/MDA-5, IPS-1, TBK1/IKK $\epsilon$  단백질 분자로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 인터페론 생성자극인자는 인터페론 생성 촉진물질인 폴리(I:C)의 기능을 대체할 수 있는 단백질 분자이다. 또한 RNA 물질인 폴리(I:C)를 동물세포에 트랜스펙션하는 것 역시 가능하다.

[0047]

한편, HBV 폴리머라제 DDX3 단백질과 상호작용을 통해 이미 결합된 TBK1/IKK $\epsilon$  분자와 DDX3단백질의 상호작용을 저해하여 인터페론의 발현을 억제하여 선천면역을 억제하는 부반응을 초래하므로, 본 발명에 사용될 수 있는 인터페론 생성자극인자는 도 9를 중심으로 살펴볼 때 TBK1/IKK $\epsilon$  분자를 포함하여 그 이전의 인터페론 생성자극인자인 것이 바람직하며, 바람직하게는 상기 인터페론 생성자극인자는 TRIF, RIG-I/MDA-5, IPS-1, TBK1/IKK $\epsilon$ 으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 도 8에 개시되지 않은 인터페론 생성자극인자 역시 본 발명의 목적을 만족할 수 있다면, 사용될 수 있는 것이다.

[0048]

그 뒤, 상기 동물세포에 상술한 재조합 발현벡터들을 트랜스펙션(transfection)하게 되며 트랜스펙션의 방법은 통상적으로 알려진 방법을 사용할 수 있다.

[0049]

다음, (2) 상기 동물세포에 인터페론 생성촉진물질을 첨가한다. 인터페론 생성촉진물질이란 세포에 처리 시 TLR 혹은 RIG-I 등의 PRR 수용체에 인지되어 IRF 신호경로를 촉발하는 물질로서, 통상 이중가닥 RNA의 대체 핵산인 폴리(I:C), DNA 대체 핵산인 CpG 등이 사용된다. 본 발명에서는 폴리(I:C)를 사용했지만 이에 제한되지 않는다.

[0050]

다음, (3) 상기 동물세포에 후보물질을 첨가하여 IFN $\beta$  프로모터의 활성을 측정한다. 상기 후보물질은 HBV 폴리머라제와 DDX3와의 결합(binding) 또는 상호작용(interaction)을 저해하여 인터페론의 발현촉진 또는 IFN $\beta$  프로모터를 활성화하는 것으로 기대되는 물질을 의미한다. 상기 후보물질은 예를 들어, 저분자량 유기화합물, 고분자량 유기화합물, 핵산분자(예컨대, DNA, RNA, PNA 및 앵타머), 단백질, 당 및 지질 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0051]

IFN $\beta$  프로모터의 활성은 리포터 유전자의 발현 산물의 측정을 통해 확인할 수 있으며, 통상의 리포터 유전자 표준 방법을 사용하여 측정할 수 있다.

[0052]

그 뒤 (4) 상기 후보물질을 첨가하지 않은 경우에 비해 후보물질을 첨가한 경우 IFN $\beta$  프로모터의 활성이 증가한 후보물질을 선별하는 단계를 포함한다. 상술한 바와 같이 동물세포에 트랜스펙션되어 발현된 HBV 폴리머라제는 DDX3 분자와의 상호작용을 통해 바이러스 감염에 대항하는 인터페론의 유도를 차단하므로, 만일 첨가된 후보물질이 IFN $\beta$  프로모터의 활성을 증가시키는 경우에는 DDX3와 TBK1/IKK $\epsilon$  분자와의 결합을 저해하는 HBV 폴리머라제의 작용을 선택적으로 저해하는 것으로 해석될 수 있다. 이는 DDX3와 HBV 폴리머라제간의 결합 또는 상호작용을 저해하는 활성을 갖는 물질로 추정할 수 있으며, 이를 B형 간염 치료제로 활용할 수 있을 것이다.

[0053]

본 발명에 의한 스크리닝 시스템은 신약 개발에 있어, 고속처리 검색법(High-throughput Screening, HTS)에 사용될 수 있다. 고속처리검색법은 기존의 검색 단위를 소형화하거나, 반복작업을 자동화하여 종래의 검색법에 비해 질적, 양적인 면에서 월등한 결과를 얻을 수 있는 검색법이다. 검색의 형태로는 정제된 단백질 수용체에 대한 결합 친화도 검색, 효소 활성 검색, 혹은 세포 단위의 기능검색 등으로 나눌 수 있다.

[0054]

[0055]

본 발명의 바람직한 제2 실시예에 따르면, (1) 바이러스 감염 시 인터페론의 생성능을 갖는 동물세포에, a) HBV 폴리머라제를 코딩하는 염기서열을 제1 재조합 발현벡터, b) 인터페론 베타( $IFN\beta$ ) 프로모터와 이에 작동가능하게 연결되며 인터페론 베타( $IFN\beta$ ) 프로모터의 활성을 측정하기 위한 리포터 유전자를 포함하는 제2 재조합 발현벡터 및 c) 인터페론생성 촉진물질과 인터페론 생성자극인자를 코딩하는 유전자를 포함하는 제3 발현벡터로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 물질을 트랜스펙션(transfection)하는 단계; (2) 상기 동물세포에 후보물질을 첨가하여 인터페론 베타( $IFN\beta$ ) 프로모터의 활성을 측정하는 단계; 및 (3) 상기 후보물질을 첨가하지 않은 경우에 비해 후보물질을 첨가한 경우  $IFN\beta$  프로모터의 활성이 증가한 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 B형 간염 치료활성 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0056]

상기 제1 실시예와의 차이점을 중심으로 제2 실시예를 설명하면, 제1 실시예에서는 트랜스펙션 이후 폴리(I:C)와 같은 인터페론생성 촉진물질을 첨가하나, 제2 실시예에서는 이를 대신하여 (1) 단계에서 인터페론생성 촉진물질과 인터페론 생성자극인자를 코딩하는 유전자를 포함하는 제3 발현벡터로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 물질을 트랜스펙션(transfection)하는 구성을 더 포함하여 제1 실시예와 동일한 효과를 달성할 수 있다. 한편, 폴리(I:C)는 이중가닥 RNA의 대신 흔히 사용되는 핵산물질로 배지에 첨가하면 TLR의 리간드로 작용하는 반면 세포내로 트랜스펙션하면 RIG-I의 리간드로 작용하여 인터페론 생성을 촉진한다.

[0057]

본 발명의 바람직한 제3 실시예에 따르면, (1) 바이러스 감염 시 인터페론의 생산능을 갖는 동물세포에, HBV 폴리머라제를 코딩하는 염기서열을 제1 재조합 발현벡터, IRF3-GAL4 융합단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 제2 재조합 발현벡터 및 pFR 프로모터와 이에 작동가능하게 연결되며 pFR 루시페라제를 코딩하는 염기서열을 포함하는 제3 재조합 발현벡터 및 인터페론 생성자극인자를 코딩하는 유전자를 포함하는 제4 발현벡터를 트랜스펙션(transfection)하는 단계; (2) 상기 동물세포에 후보물질을 첨가하여 pFR 프로모터의 활성을 측정하는 단계; 및 (3) 상기 후보물질을 첨가하지 않은 경우에 비해 후보물질을 첨가한 경우  $IFN\beta$  프로모터의 활성이 증가한 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 B형 간염 치료활성 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0058]

여기에서 pFR 루시페라제를 코딩하는 염기서열을 포함하는 제3 재조합 발현벡터는 프로모터 부위에 GAL4 결합부위를 갖고 있어 GAL4 의존적으로 전사를 촉진하는 리포터 플라스미드를 의미한다.

[0059]

구체적으로 상술한 본 발명의 제1 실시예의 스크리닝 방법과는 인터페론 베타 프로모터와 이에 작동가능하게 연결되며 인터페론 베타 프로모터의 활성을 측정하기 위한 리포터 유전자를 포함하는 제2 재조합 발현벡터를 대신하여 IRF3-GAL4 융합단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 제2 재조합 발현벡터, IRF3 GAL4 의존성 pFR 루시페라제를 코딩하는 염기서열을 포함하는 제3 재조합 발현벡터를 첨가하는데 차이가 있다. 여기에서 IRF3-GAL4 융합단백질은 전사촉진인자 역할을 수행하고, GAL4 결합부위를 갖는 pFR 루시페라제 제3 재조합 발현벡터는 리포터 역할을 수행한다.

[0060]

한편, 본 발명의 바람직한 제4 실시예에 따르면 a) HBV 폴리머라제를 코딩하는 염기서열을 제1 재조합 발현벡터; b)  $IFN\beta$  프로모터 및 이에 작동가능하게 연결되며  $IFN\beta$  프로모터의 활성을 측정하기 위한 리포터 유전자를 포함하는 제2 재조합 발현벡터;를 포함하는 B형 간염 치료활성 물질의 스크리닝용 조성물을 제공하며, 이를 바이러스 감염 시 인터페론의 생성능을 갖는 동물세포에 첨가하고 이를 트랜스펙션한 후 후보물질을 첨가하여  $IFN\beta$  프로모터의 활성을 측정할 수 있다.

[0061]

[0062]

본 발명의 스크리닝 방법을 통해 스크리닝되는 항바이러스제는 현재 사용중인 뉴클레오사이드 유도체보다는 더욱 효과적인 것이다. 왜냐하면, 이들은 바이러스 단백질과 숙주단백질간에 결합으로 형성된 새로운 단백질 표면구조에 작용하여 단백질간의 결합형성을 억제하므로 이를 회피하는 돌연변이 바이러스가 생성될 가능성이 매우 희박하다. 더군다나, 본 발명이 제공하는 표적은 바이러스 감염세포에만 특이적으로 형성된 표적이므로, 본 스크리닝법으로 선별된 항바이러스 화합물은 숙주세포에 대한 독성은 낮은 것으로 기대된다. 이는 치료 효과를 얻기 위해서는 치료제를 1년 이상 장기복용해야하는 만성 B형 간염의 경우에는 현저한 장점이다. 더욱이, B형 간염바이러스의 증식을 저해함으로써 궁극적으로는 B형 간염바이러스의 제거하여 만성 B형 간염으로 인한 간 경변 및 간암을 예방할 수 있을 것이다.

- [0063] 또한, 본 발명에서 발굴한 항바이러스 활성물질은 기존의 항바이러스제와 병용투여로 사용할 수 있으며 또한 인터페론과도 병용투여 할 수 있을 것이다.
- [0064]
- [0065] 본 발명을 구체적인 실시예를 통하여 보다 상세히 설명한다.
- [0066] 본 발명에서 제공하는 항바이러스제 개발을 위한 측정법을 확립하기 위해 사용된 트랜스팩션 기술, luciferase 활성측정법, 면역침전법, 면역염색법은 문헌과 이 분야의 전문가들이 많이 사용하는 실험재료와 실험방법을 이용하였다.
- [0067] 본 발명에서는 다음과 같은 약어를 사용하였다:
- [0068] M (molar), mM (millimolar),  $\mu$ l (microliters), ml (milliliters),  $\mu$ g (micrograms), mg (milligrams), K bp (kilo base pairs), ORF(open reading frame), PCR (polymerase chain reaction), PEG (polyethylene glycol), HBV(hepatitis B virus), IFN(interferon), PRR(pattern recognition receptor), IRF(interferon regulatory factor), TRIF(TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN $\beta$ ), TBK(TRAF-associated NF- $\kappa$ B activator-binding kinase), I $\kappa$ B kinase- $\epsilon$  (IKK $\epsilon$ ), PAMP(pattern recognition molecular pattern), TLR(toll-like receptor), MDA-5(melanoma differentiation-associated gene 5), HIV(human immunodeficiency virus),
- [0069] <실시예 1> B형 간염바이러스(HBV) 폴리머라제에 의한 인터페론생성 저해를 보여주는 IFN $\beta$  Luciferase reporter assay
- [0070] 1-1. HBV 폴리머라제에 의한 IFN $\beta$  프로모터 활성억제
- [0071] 우선, HBV가 코드하는 코아단백질(core), 폴리머라제(Pol), X 단백질(HBx) 등 3개 바이러스 단백질이 인터페론 생성을 저해하는가를 조사하였다(도 1). 본 측정은 이미 문헌에 잘 알려진 인터페론 베타 프로모터 리포터인 IFN $\beta$  루시페라제 리포터를 활용하였다(Schroder, Baran, and Bowie, 2008).
- [0072] 구체적으로 세포는 HepG2 세포를 사용하였으며, 10% 우태아가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다. 트랜스팩션은 PEI(polyethylenimine)을 이용한 방법을 따랐으며, 직경 60 mm 플레이트에 약 12  $\mu$ g의 플라스미드 DNA를 트랜스팩션하였다(Ryu, Kim, and Ryu, 2008).
- [0073] 실험에 사용한 플라스미드는 각각 아래의 연구자에게 받은 것이다: IFN $\beta$ -Luc reporter (Bowie, Trinity College Dublin, Ireland). 한편, 아래의 플라스미드는 발명자의 연구실에서 기존에 사용하던 것이다.
- [0074] (1) HBV 폴리머라제 발현 플라스미드(Ryu, Kim, and Ryu, 2008)는 도 1a에 도시된 HBV 폴리머라제 발현 플라스미드의 개열지도를 가지며, 서열번호 1로 표시되는 HBV 폴리머라제를 코딩하는 유전자를 포함한다. 상기 HBV 폴리머라제 발현 플라스미드는 pcDNA3 플라스미드(InVitrogen Inc.)에 서열번호 1로 표시되는 HBV 폴리머라제를 코딩하는 유전자를 삽입하여 제작할 수 있다.
- [0075] (2) HBV 코아단백질 발현 플라스미드(Ryu, Kim, and Ryu, 2008)는 pcDNA3 플라스미드(InVitrogen Inc)에 HBV 코아단백질 유전자를 코딩하는 염기서열(서열번호 2)을 포함하며, 하기 도 1b에 도시된 개열지도를 가진다.
- [0076] (3) HBx 발현 플라스미드(Cha et al., 2004)는 pcDNA3 플라스미드(InVitrogen Inc)에 HBV X 유전자 부분을 코딩하는 염기서열(서열번호 3)을 포함하며, 하기 도 1c에 도시된 개열지도를 가진다.
- [0077] (4) HBV 폴리머라제의 YMHD 돌연변이 발현 플라스미드는 상기 HBV 폴리머라제와 동일하다. 단, 효소활성잔기인 YMDD motif의 아스파라긴산(D, aspartic acid) 잔기가 히스티딘(H, histidine) 잔기로 치환되어 효소활성을 상실한 HBV 폴리머라제를 발현하는 특징을 가진다.



- [0078] 리포터에세이는 24-well 플레이트에 아래의 플라스미드를 트랜스팩션 후 24시간 후에 세포를 수확한 후 제조사(Promega Inc.)의 방법에 따라 실시하였다.
- [0079] 구체적으로 간암 세포주인 HepG2 세포에 HBV의 단백질 발현벡터를 트랜스팩션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다. 이때, 선천면역의 주요 수용체인 TLR signaling을 활성화하기 위해 이중가닥 RNA의 대체물질인 poly(I:C)를 배지에 첨가하였다. 한편, TLR3 발현이 결핍된 HepG2세포의 기능을 보완하기 위해 TLR3 발현 플라스미드를 함께 트랜스팩션하였다 (Li et al., 2005).
- [0080] 도 2는 간암 세포주인 HepG2 세포에 IFN $\beta$  Luciferase reporter 플라스미드와 HBV의 단백질 발현벡터를 각각 트랜스팩션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다. 또한, TLR signaling을 활성화하기 위해 poly(I:C)를 배지에 첨가하였고, TLR3 발현이 결핍된 HepG2세포의 기능을 보완하기 위해 TLR3 발현 플라스미드를 함께 트랜스팩션하였다.
- [0081] 도 2의 실험결과에 의하면, HBV 폴리머라제가 IFN $\beta$  프로모터 활성을 약 10배 이상 재현성있게 억제함을 관찰하였다. 반면, 코아 및 X 단백질은 IFN $\beta$  프로모터 활성을 저해하지 않았다. 또한, HBV 폴리머라제의 활성부위인 YMDD motif의 돌연변이인 YMHD도 IFN $\beta$  프로모터 활성을 저해하였으므로 HBV 폴리머라제의 역전사활성은 IFN $\beta$  프로모터 활성저해에 필요하지 않음을 확인할 수 있다.
- [0082] <실시예 2> HBV 폴리머라제가 TLR3 및 RIG-I 수용체에 의한 인터페론발현 유도를 저해함을 보여주는 IFN $\beta$  Luciferase reporter assay
- [0083] 2-1. IFN $\beta$  프로모터 활성억제의 HBV 폴리머라제 농도 의존성.
- [0084] HBV 폴리머라제에 의한 IFN $\beta$  프로모터 활성억제를 좀더 확실히 규명하기 위해 HBV 폴리머라제 농도에 따라 IFN $\beta$  프로모터 활성이 어떻게 변화하는지 조사하였다.
- [0085] 구체적으로 세포는 HepG2 세포를 사용하였으며, 10% 우태아가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 5% CO $_2$  인큐베이터에서 배양하였다. 트랜스팩션은 PEI(polyethylenimine)을 이용한 방법을 따랐으며, 직경 60 mm 플레이트에 약 12 ug의 플라스미드 DNA를 트랜스팩션하였다 (Ryu, Kim, and Ryu, 2008). 실험에 사용한 플라스미드는 각각 아래의 연구자에게 받은 것이다: IFN $\beta$ -Luc reporter (Bowie, Trinity College Dublin, Ireland). 아래의 플라스미드는 제조사에서 구입한 것이다: HA-TLR3 (InvivoGen Inc). 한편, 아래의 플라스미드는 발명자의 연구실에서 기존에 사용하던 것이다: (1) HBV Pol 발현 플라스미드 (도 1a).
- [0086] 리포터에세이는 24-well 플레이트에 아래의 플라스미드를 트랜스팩션 후 24시간 후에 세포를 수확한 후 제조사(Promega)의 방법에 따라 실시하였다.
- [0087] 구체적으로, 상기 1-1의 실시예와 달리, HepG2 세포에 HBV 폴리머라제 발현벡터 플라스미드량을 2배수로 증가하면서 트랜스팩션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다(도 3).
- [0088] 도 3은 간암세포주인 HepG2 세포에 poly(I:C)를 배지에 첨가해준 후, IFN $\beta$  Luciferase reporter 플라스미드와 HBV 폴리머라제 발현 플라스미드를 각각 트랜스팩션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다. 그 결과, HBV 폴리머라제 농도에 비례하여 IFN $\beta$  프로모터 활성이 감소한 것을 알 수 있다.
- [0089] 2-2. HBV 폴리머라제에 의한 IFN $\beta$  프로모터 활성억제.
- [0090] HBV 폴리머라제에 의한 IFN $\beta$  프로모터 활성억제를 좀더 확실히 규명하기 위해, poly(I:C) 트랜스팩션

한 경우, HBV 폴리머라제 농도에 따라 IFN $\beta$  프로모터 활성이 어떻게 변화하는지 조사하였다.

[0091] 구체적으로, 세포는 HepG2 세포를 사용하였으며, 10% 우태아가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다. 트랜스팩션은 PEI(polyethylenimine)을 이용한 방법을 따랐으며, 직경 60 mm 플레이트에 약 12 ug의 플라스미드 DNA를 트랜스팩션하였다 (Ryu, Kim, and Ryu, 2008). 실험에 사용한 플라스미드는 각각 아래의 연구자에게 받은 것이다: IFN $\beta$ -Luc reporter (Bowie, Trinity College Dublin, Ireland). 한편, 아래의 플라스미드는 발명자의 연구실에서 기존에 사용하던 것이다: (1) HBV Pol 발현 플라스미드 (도 1a). 리포터에세이는 24-well 플레이트에 아래의 플라스미드를 트랜스팩션 후 24시간 후에 세포를 수확한 후 제조사 (Promega)의 방법에 따라 실시하였다.

[0092]

[0093] 도 4는 간암세포주인 HepG2 세포에 poly(I:C)를 트랜스팩션 한 후, IFN $\beta$  Luciferase reporter 플라스미드와 HBV 폴리머라제 발현 플라스미드를 각각 트랜스팩션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다.

[0094] 구체적으로 poly(I:C)를 배지에 첨가해준 도 3의 실시예와 달리, poly(I:C)를 트랜스팩션한 경우에는 poly(I:C)가 세포질에 위치하게 된다. 이 경우, TLR3 대신 RIG-I/MDA5 분자가 수용체로 작용한다 (Saito and Gale, 2008). 구체적으로, HepG2 세포에 HBV 폴리머라제 발현벡터 플라스미드량을 2배수로 증가하면서 트랜스팩션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다(도 4). 실험결과, HBV 폴리머라제 농도에 비례하여 IFN $\beta$  프로모터 활성이 감소하였다. 즉, HBV 폴리머라제는 TLR3 뿐 아니라 RIG-I/MDA5에 의해 활성화된 IRF signaling도 저해하였다.

[0095] <실시예 3> HBV 폴리머라제가 IRF signaling을 저해

[0096] 인터페론 유도는 IRF signaling을 통해 수행된다. 그런데, IRF signaling의 두 가지 주요 징표은 IRF의 인산화 및 IRF의 핵 이동이다. 따라서, HBV 폴리머라제에 의한 선천면역억제가 IRF signaling을 통해 일어나는가를 규명하기 위해 IRF 인산화를 조사하였다.

[0097] 3-1. HBV 폴리머라제에 의한 IRF 인산화 저해

[0098] HBV 폴리머라제에 의한 IRF 인산화 저해를 조사하기 위해, 간암세포주인 HepG2 세포에 poly(I:C)를 트랜스팩션 한 후, HBV 폴리머라제 발현여부에 따른 IRF 인산화를 IRF 인산화 특이항체를 이용하여 웨스턴 블롯으로 조사하였다.

[0099] 3-1.1 실험재료 및 방법

[0100] 세포는 HepG2 세포를 사용하였으며, 10% 우태아가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다. 트랜스팩션은 PEI(polyethylenimine)을 이용한 방법을 따랐으며, 직경 60 mm 플레이트에 약 12 ug의 플라스미드 DNA를 트랜스팩션하였다 (Ryu, Kim, and Ryu, 2008). 실험에 사용한 플라스미드는 아래의 연구자에게 받은 것이다: DDX3 (K.T. Jeang, National Institute of Health, USA). 아래의 항체는 각각 아래의 제조사에서 구입한 것이다: anti-IRF3 (Zymed Inc.), anti-phospho-Ser396-IRF3 (Cell Signaling Inc.). 웨스턴블롯은 표준방법을 준수하였으며, 구체적으로는 트랜스팩션 2일 후 세포를 1% NP-40가 포함된 완충용액(50 mM Tris-Cl [pH 7.4], 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40)으로 수확한 후 12% SDS-PAGE 겔로 단백질을 전기영동하고, 단백질을 PVDF membrane (Immobilon-P; Millipore)로 블롯팅 한 후, 항체로 탐지하였다.

[0101] 도 5는 HepG2 세포에 poly(I:C)를 배지에 첨가하고, HBV 폴리머라제 발현 플라스미드를 트랜스팩션 한 후, 3일 후 세포를 수확하였다. 샘플을 SDS-PAGE로 전기영동한 후 인산화된 IRF를 인산화 IRF 항체를 이용해 웨스턴 블롯으로 탐지하였다.

[0102] 실험결과, poly(I:C)를 트랜스팩션 한 후에는 인산화된 IRF가 탐지되었지만, HBV 폴리머라제가 발현된



경우에는 인산화된 IRF가 탐지되지 않았다(도 5). 이 결과는 HBV 폴리머라제가 IRF signaling을 저해함을 의미한다.

[0103] <실시예 4> IRF signaling에서 HBV 폴리머라제의 표적이 RIG-I 혹은 TRIF 분자의 하위임을 규명

[0104] HBV 폴리머라제에 의한 IRF signaling의 표적을 규명하기 위해, 상기의 poly(I:C) 대신 RIG-I 및 TRIF 분자를 발현하여 IRF signaling을 촉발한 후 HBV 폴리머라제에 의한 IRF signaling 저해를 조사하였다.

[0105] 4-1. RIG-I에 의해 활성화된 IRF signaling의 저해

[0106] RIG-I 분자를 발현하여 IRF signaling을 촉발한 후 HBV 폴리머라제에 의한 IRF signaling 저해를 조사하였다. 상기 도 4와는 달리, IRF3-luciferase 리포터 플라스미드를 이용하여 IRF signaling 저해를 조사하였다 (Schroder, Baran, and Bowie, 2008). 여기에서, IRF3-luciferase 리포터 플라스미드는 IRF3/7-GAL4 융합단백질 발현 플라스미드와 GAL4 의존성 프로모터를 갖는 pFR-luciferase 리포터 플라스미드의 조합을 의미한다.

[0107] 구체적으로, 세포는 HepG2 세포를 사용하였으며, 10% 우태아가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 5% CO2 인큐베이터에서 배양하였다. 트랜스팩션은 PEI(polyethylenimine)을 이용한 방법을 따랐으며, 직경 60 mm 플레이트에 약 12 ug의 플라스미드 DNA를 트랜스팩션하였다 (Ryu, Kim, and Ryu, 2008). 실험에 사용한 플라스미드는 각각 아래의 연구자에게 받은 것이다: IRF3-GAL4, IRF7-GAL4, pFR luciferase 리포터 플라스미드 (Dr. Bowie, Trinity College Dublin, Ireland), Flag-RIG-I (Dr. Fujita, Kyoto University). pFR luciferase 리포터 플라스미드는 GAL4 결합부위를 갖는 리포터 플라스미드로서 IRF3/7-GAL4 융합단백질이 GAL4 결합부위를 통해 결합하여 IRF3/7의 전사활성을 측정하게 고안된 리포터 플라스미드이다. 예를 들면, IRF3/7 프로모터 활성을 측정하기 위해서는 IRF3/7-GAL4 융합단백질 발현플라스미드와 pFR-luciferase 리포터 플라스미드를 함께 트랜스팩션하여 실시하였다 (Stack et al., 2005).

[0108] 구체적으로, HepG2 세포에 RIG-I 분자 발현 플라스미드와 IRF3-luciferase construct를 트랜스팩션하고, 또한 HBV 폴리머라제 발현벡터 플라스미드량을 점차적으로 증가하면서 트랜스팩션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다(도 6). 실험결과, HBV 폴리머라제 농도에 비례하여 IRF3 프로모터 활성이 감소하였다. 즉, 이 결과는 HBV 폴리머라제의 표적이 RIG-I 분자의 하위에 위치함을 의미한다.

[0109] 4-2. TRIF에 의해 활성화된 IRF signaling의 저해

[0110] TRIF 분자를 발현하여 IRF signaling을 촉발한 후 HBV 폴리머라제에 의한 IRF signaling 저해를 조사하였다. 상기 도 3과는 달리, IRF3-luciferase construct를 이용하여 IRF signaling 저해를 조사하였다 (Schroder, Baran, and Bowie, 2008).

[0111] 세포는 HepG2 세포를 사용하였으며, 10% 우태아가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 5% CO2 인큐베이터에서 배양하였다. 트랜스팩션은 PEI(polyethylenimine)을 이용한 방법을 따랐으며, 직경 60 mm 플레이트에 약 12 ug의 플라스미드 DNA를 트랜스팩션하였다 (Ryu, Kim, and Ryu, 2008). 실험에 사용한 플라스미드는 각각 아래의 연구자에게 받은 것이다: IRF3-GAL4, IRF7-GAL4, pFR luciferase reporter (Dr. Bowie, Trinity College Dublin, Ireland), Flag-TRIF (Dr. Akira, Osaka University).

[0112] 구체적으로, HepG2 세포에 TRIF 분자 발현 플라스미드와 IRF3-luciferase 플라스미드를 트랜스팩션하고, 또한 HBV 폴리머라제 발현벡터 플라스미드량을 점차적으로 증가하면서 트랜스팩션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다(도 7). 실험결과, HBV 폴리머라제 농도에 비례하여 IRF3 프로모터 활성이 감소하였다. 즉, 이 결과는 HBV 폴리머라제의 표적이 IRF

signaling에서 TRIF 분자의 하위에 위치함을 의미한다.

[0113] <실시예 5> IRF signaling에서 HBV 폴리머라제의 표적이 TBK1/IKKε임을 규명하는 결과

[0114] HBV 폴리머라제에 의한 IRF signaling의 표적을 규명하기 위해, 상기의 poly(I:C) 대신 TBK1/IKKε, IRF3 분자를 발현하여 IRF signaling을 촉발한 후 HBV 폴리머라제에 의한 IRF signaling 저해를 조사하였다. 구체적으로 실시예 5에서는 HBV 폴리머라제가 TBK1/IKKε 분자를 표적함을 보여준다.

[0115] 5-1. IRF signaling의 개념도

[0116] 도 8에 표시된 바와 같이, IRF signaling에 관여하는 신호전달 분자간의 상호관계는 이미 규명된 바 있다 (Bowie and Unterholzner, 2008). 특히, 본 발명과 관련된 것으로는 최근 DEAD-box RNA helicase인 DDX3가 TBK1/IKKε의 활성을 촉진한다고 보고된 바 있다 (Schroder, Baran, and Bowie, 2008; Soulat et al., 2008).

[0117] 5-2. TBK1에 의해 활성화된 IRF signaling의 저해

[0118] HBV 폴리머라제의 표적을 규명하기 위해, TBK1 분자를 발현하여 IRF signaling을 촉발한 후 HBV 폴리머라제에 의한 IRF signaling 저해를 조사하였다. 상기 도 4와는 달리, IRF3-luciferase construct를 이용하여 IRF signaling 저해를 조사하였다 (Schroder, Baran, and Bowie, 2008).

[0119] 세포는 HepG2 세포를 사용하였으며, 10% 우태아가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다. 트랜스팩션은 PEI(polyethylenimine)을 이용한 방법을 따랐으며, 직경 60 mm 플레이트에 약 12 ug의 플라스미드 DNA를 트랜스팩션하였다 (Ryu, Kim, and Ryu, 2008). 실험에 사용한 플라스미드는 각각 아래의 연구자에게 받은 것이다: IRF3-GAL4, IRF7-GAL4, pFR luciferase reporter (Dr. Bowie, Trinity College Dublin, Ireland), TBK1-Flag, (Dr. Fitzgerald, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA).

[0120] 구체적으로, HepG2 세포에 TBK1 분자 발현 플라스미드와 IRF3-luciferase 플라스미드를 트랜스팩션하고, 또한 HBV 폴리머라제 발현벡터 플라스미드량을 점차적으로 증가하면서 트랜스팩션한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다(도 9). 실험결과, HBV 폴리머라제 농도에 비례하여 IRF3 프로모터 활성이 감소하였다. 즉, 이 결과는 HBV 폴리머라제의 표적이 TBK1 분자이거나 혹은 이의 하위에 위치함을 의미한다.

[0121] 5-3. IKKε에 의해 활성화된 IRF signaling의 저해

[0122] HBV 폴리머라제의 표적을 규명하기 위해, IKKε 분자를 발현하여 IRF signaling을 촉발한 후 HBV 폴리머라제에 의한 IRF signaling 저해를 조사하였다. 상기 도 3과는 달리, IRF3-luciferase 리포터 플라스미드를 이용하여 IRF signaling 저해를 조사하였다 (Schroder, Baran, and Bowie, 2008).

[0123] 구체적으로, 세포는 HepG2 세포를 사용하였으며, 10% 우태아가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다. 트랜스팩션은 PEI(polyethylenimine)을 이용한 방법을 따랐으며, 직경 60 mm 플레이트에 약 12 ug의 플라스미드 DNA를 트랜스팩션하였다 (Ryu, Kim, and Ryu, 2008). 실험에 사용한 플라스미드는 각각 아래의 연구자에게 받은 것이다: IRF3-GAL4, IRF7-GAL4, pFR luciferase reporter (Dr. Bowie, Trinity College Dublin, Ireland), IKKε-Flag (Dr. Fitzgerald, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA).

[0124] 구체적으로, HepG2 세포에 IKKε 분자 발현 플라스미드와 IRF3-luciferase 리포터 플라스미드를 트랜스팩션하고, 또한 HBV 폴리머라제 발현벡터 플라스미드량을 점차적으로 증가하면서 트랜스팩션한 후,

luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다(도 10). 실험결과, HBV 폴리머라제 농도에 비례하여 IRF3 프로모터 활성이 감소하였다. 즉, 이 결과는 HBV 폴리머라제의 표적이 IKK  $\epsilon$  분자이거나 혹은 이의 하위에 위치함을 의미한다.

[0125] 5-4. IKK  $\epsilon$ 에 의해 활성화된 IRF signaling의 저해

[0126] HBV 폴리머라제의 표적을 규명하기 위해 다음에는 IKK  $\epsilon$  분자를 발현하여 IRF signaling을 촉발한 후 HBV 폴리머라제에 의한 IRF signaling 저해를 조사하였다. 상기 도 2와는 달리, IRF3-luciferase 리포터 플라스미드를 이용하여 IRF signaling 저해를 조사하였다 (Schroder, Baran, and Bowie, 2008).

[0127] 세포는 HepG2 세포를 사용하였으며, 10% 우태아가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다. 트랜스팩션은 PEI(polyethylenimine)을 이용한 방법을 따랐으며, 직경 60 mm 플레이트에 약 12 ug의 플라스미드 DNA를 트랜스팩션하였다 (Ryu, Kim, and Ryu, 2008). 실험에 사용한 플라스미드는 각각 아래의 연구자에게 받은 것이다: IKK  $\epsilon$ -Flag (Dr. Fitzgerald, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA). 아래의 플라스미드는 각 제조사에서 구입한 것이다: ISRE-luciferase construct (Stratagene Inc.).

[0128] 구체적으로, HepG2 세포에 IKK  $\epsilon$  분자 발현 플라스미드와 ISRE-luciferase 리포터 플라스미드를 트랜스팩션하고, 또한 HBV 폴리머라제 발현벡터 플라스미드량을 점차적으로 증가하면서 트랜스팩션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다(도 11). 실험결과, HBV 폴리머라제 농도에 비례하여 ISRE 프로모터 활성이 감소하였다. 즉, 이 결과는 HBV 폴리머라제의 표적이 IKK  $\epsilon$  분자이거나 혹은 이의 하위에 위치함을 의미한다.

[0129] 5-5. IRF3에 의해 활성화된 IRF signaling의 저해

[0130] HBV 폴리머라제의 표적을 규명하기 위해, TRIF 분자를 발현하여 IRF signaling을 촉발한 후 HBV 폴리머라제에 의한 IRF signaling 저해를 조사하였다. 상기 도 4와는 달리, ISRE-luciferase 리포터 플라스미드를 이용하여 IRF signaling 저해를 조사하였다 (Schroder, Baran, and Bowie, 2008).

[0131] 구체적으로 세포는 HepG2 세포를 사용하였으며, 10% 우태아가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다. 트랜스팩션은 PEI(polyethylenimine)을 이용한 방법을 따랐으며, 직경 60 mm 플레이트에 약 12 ug의 플라스미드 DNA를 트랜스팩션하였다 (Ryu, Kim, and Ryu, 2008). 실험에 사용한 플라스미드는 각각 아래의 연구자에게 받은 것이다: IRF3 (Dr. Bowie, Trinity College Dublin, Ireland). 아래의 플라스미드는 각 제조사에서 구입한 것이다: ISRE-luciferase construct (Stratagene Inc.).

[0132] 구체적으로, HepG2 세포에 IRF3 발현 플라스미드와 ISRE-luciferase 리포터 플라스미드를 트랜스팩션하고, 또한 HBV 폴리머라제 발현벡터 플라스미드량을 점차적으로 증가하면서 트랜스팩션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다(도 12). 그 결과, HBV 폴리머라제 농도에 비례하여 ISRE 프로모터 활성이 감소하였다. 즉, 이 결과는 HBV 폴리머라제의 표적이 ISRE 분자의 상위에 위치함을 의미한다.

[0133] <실시예 6> HBV 폴리머라제의 IRF signaling 저해에 대한 DDX3의 길항작용을 보여주는 결과

[0134] 상기 실시예5의 결과는 HBV 폴리머라제의 표적이 IRF signaling의 TBK1/IKK  $\epsilon$  분자임을 시사한다. 최근, DDX3가 IRF signaling의 effector kinase인 TBK1/IKK  $\epsilon$  serine kinase의 활성을 촉진한다고 보고된 바 있다 (Schroder, Baran, and Bowie, 2008; Soulat et al., 2008). 이는 HBV 폴리머라제의 IRF signaling 저해가 HBV 폴리머라제와 DDX3의 상호작용의 결과라고 추정할 수 있다. 실시예6에서는 상기 예측과 일치하는 실험결

과를 보여준다.

[0135] 6-1. DDX3의 HBV 폴리머라제에 대한 길항작용을 보여주는 결과 I.

[0136] DDX3의 발현이 HBV 폴리머라제에 의한 IRF signaling 저해를 회복시키는지 조사하였다.

[0137] 구체적으로 세포는 HepG2 세포를 사용하였으며, 10% 우태아가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다. 트랜스팩션은 PEI(polyethylenimine)을 이용한 방법을 따랐으며, 직경 60 mm 플레이트에 약 12 ug의 플라스미드 DNA를 트랜스팩션하였다 (Ryu, Kim, and Ryu, 2008). 실험에 사용한 플라스미드는 각각 아래의 연구자에게 받은 것이다: IRF3-GAL4, IRF7-GAL4, pFR luciferase reporter, IFN $\beta$ -Luc reporter (Dr. Bowie, Trinity College Dublin, Ireland), TBK1-Flag (Dr. Fitzgerald, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA), DDX3 (Dr. K.T. Jeang, National Institute of Health, USA).

[0138] 구체적으로, HepG2 세포에 TBK1 분자를 발현하여 IRF signaling을 촉발한 후 DDX3 발현 플라스미드의 양을 점차적으로 증가시키면서 이로 인한 HBV 폴리머라제에 의한 IRF signaling 저해를 조사하였다. 도 13은 HepG2 세포에 TBK1 발현 플라스미드와 IRF3 luciferase 리포터 플라스미드와 HBV 폴리머라제 발현 플라스미드를 각각 트랜스팩션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다. 이때, DDX3 발현 플라스미드의 양이 증가함에 따른 효과를 관찰한 것이다. 그 결과, DDX3의 발현에 비례하여 IRF3 프로모터 활성이 회복되었다. 즉, 이 결과는 DDX3가 HBV 폴리머라제에 의한 IRF signaling 저해에 대한 길항작용을 함을 의미한다.

[0139] 실시예 6-1과 달리, TBK1 대신, IKK $\epsilon$ 를 발현하여 IRF signaling을 촉발한 후 DDX3 발현 플라스미드의 양을 점차적으로 증가시키면서 이로 인한 HBV 폴리머라제에 의한 IRF signaling 저해를 조사하였다.

[0140] 세포는 HepG2 세포를 사용하였으며, 10% 우태아가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다. 트랜스팩션은 PEI(polyethylenimine)을 이용한 방법을 따랐으며, 직경 60 mm 플레이트에 약 12 ug의 플라스미드 DNA를 트랜스팩션하였다 (Ryu, Kim, and Ryu, 2008). 실험에 사용한 플라스미드는 각각 아래의 연구자에게 받은 것이다: IRF3-GAL4, IRF7-GAL4, pFR luciferase reporter (Dr. Bowie, Trinity College Dublin, Ireland), IKK $\epsilon$ -Flag (Dr. Fitzgerald, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA), DDX3 (Dr. K.T. Jeang, National Institute of Health, USA).

[0141] 도 14는 HepG2 세포에 IKK $\epsilon$  발현 플라스미드와 IRF3 Luciferase 리포터 플라스미드와 HBV 폴리머라제 발현 플라스미드를 각각 트랜스팩션 한 후, luciferase 활성을 제어군과 비교하여 측정하고 이를 제어군과 비교한 배수로 표시하였다. 이때, DDX3 발현 플라스미드의 양이 증가함에 따른 효과를 관찰한 것이다. 그 결과 실시예 6-1과 유사하게 DDX3의 발현에 비례하여 IRF3 프로모터 활성이 회복되었다(도 14). 즉, 이 결과는 DDX3가 HBV 폴리머라제에 의한 IRF signaling 저해에 대한 길항작용을 함을 의미한다.

[0142] 6-3. HBV 폴리머라제가 IKK $\epsilon$ -DDX3 결합을 저해함을 보여주는 결과.

[0143] 상기 실시예 6-1 및 6-2의 결과는 HBV 폴리머라제가 DDX3- IKK $\epsilon$  간의 상호결합을 차단하여 IRF signaling을 저해함을 예측하게 한다. 이 가설을 조사하기 위해 면역침전법을 수행하였다.

[0144] 세포는 HepG2 세포를 사용하였으며, 10% 우태아가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다. 트랜스팩션은 PEI(polyethylenimine)을 이용한 방법을 따랐으며, 직경 60 mm 플레이트에 약 12 ug의 플라스미드 DNA를 트랜스팩션하였다 (Ryu, Kim, and Ryu, 2008). 실험에 사용한 플라스미드는 각각 아래의 연구자에게 받은 것이다: IKK $\epsilon$ -Flag (Dr. Fitzgerald, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA), DDX3 (Dr. K.T. Jeang, National Institute of Health, USA). 면역침전법은 표준방법을 준수하였다 (Pyronnet et al., 1999), 구체적으로는 트랜스팩션 후 3일 후, 세포를 세포용해 완충액 buffer [50 mM Tris-

HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF, and 1% NP-40], 으로 수확한 다음, 세포용해 물에 먼저 단백질 G-아가로스 비드를 첨가, 배양, 원심분리하여 준비한다. 여기에 1차 항체인 anti-Flag 항체를 첨가, 배양, 원심분리하여 면역결합체를 수확한다. 수확한 면역침전물을 상기 용해완충용액으로 5번 이상 씻은 후, Laemmli 샘플액에 녹인 후 12% SDS-PAGE로 전기영동하여 분석한다.

[0145] 구체적으로, 세포에 DDX3 발현 플라스미드, IKK  $\epsilon$  발현 플라스미드를 트랜스팩션 한 후, 면역침전법을 통하여 DDX3- IKK  $\epsilon$  분자간의 상호결합을 확인하였다(도 15, lane 3). 한편, 상기 실험군에 HBV 폴리머라제 발현 플라스미드를 트랜스팩션한 경우, DDX3-IKK  $\epsilon$  간의 상호결합이 상당히 감소하였다(도 15, lane 4). 이 결과는 HBV 폴리머라제가 DDX3-IKK  $\epsilon$  분자간의 상호결합을 차단하여 IRF signaling을 저해함을 증명한 것이다(도 16).

#### [0146] <실시예 7> B형 간염치료 활성물질 스크리닝에 활용을 보여주는 결과

[0147] 상기 실시예2의 실험을 96 웰 플레이트에 실시하여 B형 간염치료 활성물질을 스크리닝하는 방법으로 사용할 수 있다.

[0148] 발명자의 연구실에서 확보한 약 300여 개의 유기 소분자를 포함하는 화합물라이브러리를 활용하여 아래의 방법으로 B형 간염치료 활성물질 스크리닝을 하였다. 본 화합물 라이브러리는 azaguanine-8, allantoin, acetazolamide, metformin hydrochloride, atracurium besylate, isoflupredone acetate, amiloride hydrochloride, amprolium hydrochloride, hydrochlorothiazide, sulfaguanidine 등을 포함한다.

[0149] 구체적으로 세포는 HEK293 세포를 사용하였으며, 10% 우태아가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다. 트랜스팩션은 PEI(polyethylenimine)을 이용한 방법을 따랐으며, 96 웰 플레이트에 IFN $\beta$ -Luc 리포터 플라스미드(Dr. Bowie, Trinity College Dublin, Ireland), TLR3 발현 플라스미드(InvivoGen Inc.), 도 1a의 개열지도를 갖는 HBV 폴리머라제 발현 플라스미드를 세포내에 트랜스팩션하였다. 이로부터 2일 후에, poly(I:C)를 약 12시간 배지에 처리한 후, 리포터에세이를 통해 루시페라제의 활성을 측정하였다. 리포터에세이는 96 웰 플레이트에 아래의 플라스미드를 트랜스팩션 후 24시간 후에 제조사(Victor 3 Inc.Perkin-Elmer Inc.)의 방법에 따라 실시하였다. 한편, IFN $\beta$  luciferase 리포터 플라스미드는 IFN $\beta$  프로모터 활성을 루시페라제 이용하여 편리하게 측정하게 고안되었으며 널리 알려진 플라스미드로서 구체적으로, IFN $\beta$  프로모터는 IRF3/7 결합부위와 NF- $\kappa$ B 결합부위로 구성되어 상기 두 전사인자의 활성화를 측정할 수 있다.

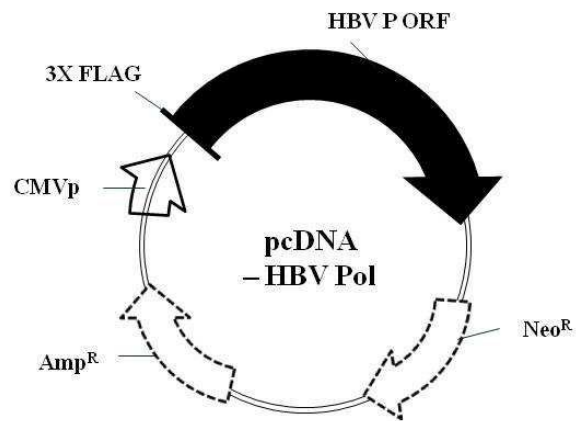
[0150] 구체적으로, 실시예 2의 도 3과 마찬가지로, HBV 폴리머라제 발현 플라스미드의 양이 증가함에 따라 루시페라제 활성이 감소하였다(도 17). 또한, 화합물 라이브러리의 화합물 #1~10을 처리한 경우, 루시페라제의 활성이 회복되지 않았다. 결국, 본 실시 예에서 조사한 300 여종의 화합물은 IFN $\beta$  프로모터 활성을 회복하지 못하였으므로 만성 B형 간염의 치료제로서의 활성은 없다고 판단된다. 본 실시 예는 만성 B형 간염바이러스 치료 활성물질 스크리닝의 예시의 목적으로서 기술한 것이다.

### 산업상 이용가능성

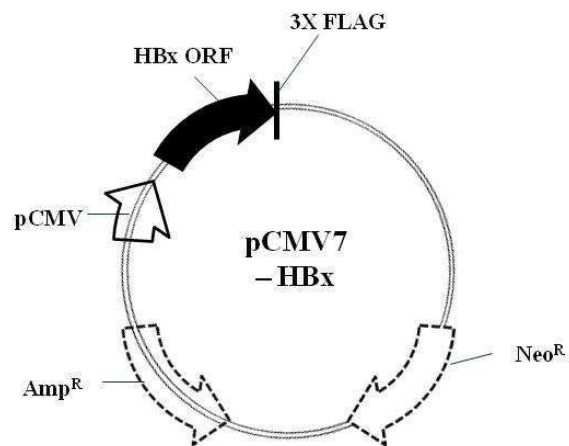
[0151] 본 발명에 의한 B형 간염 치료 활성물질 스크리닝 시스템을 이용하면 HBV 폴리머라제와 DDX3의 상호작용을 저해하여 선천면역(인터페론)의 분비활성을 유발시키는 약물을 용이하게 탐색할 수 있어 B형 간염의 치료제 개발 등에 유용하게 이용할 수 있다.

도면

도면1a

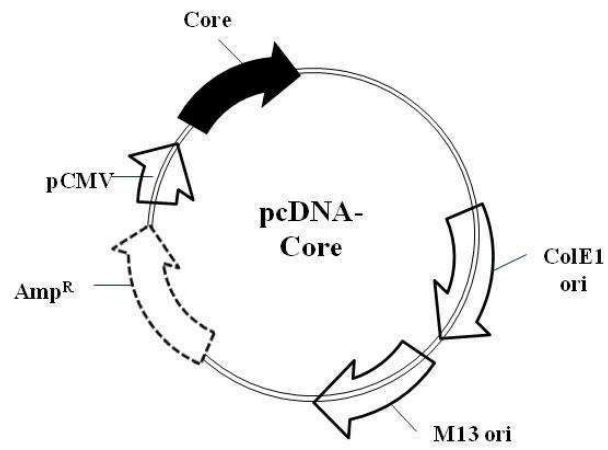


도면1b

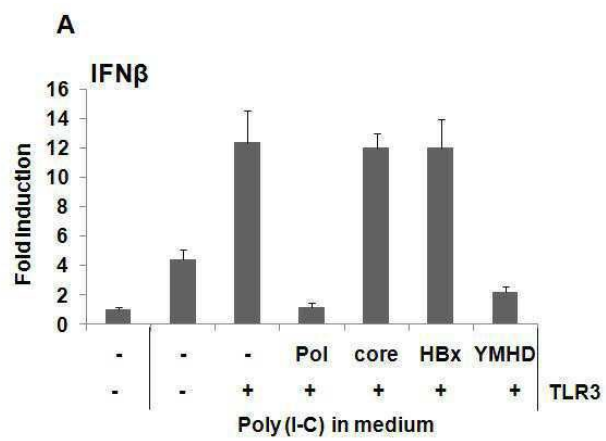




도면1c

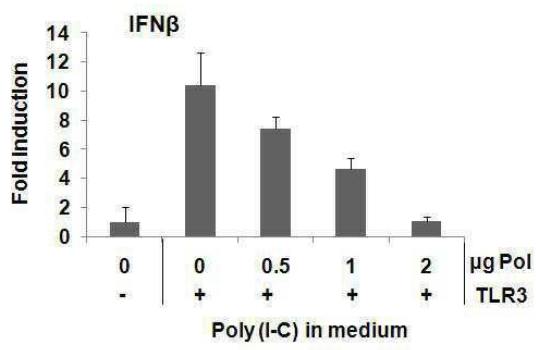


도면2



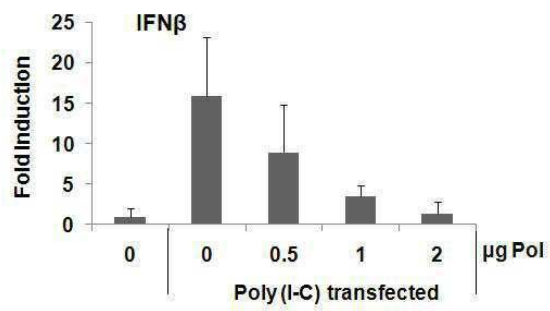
도면3

A



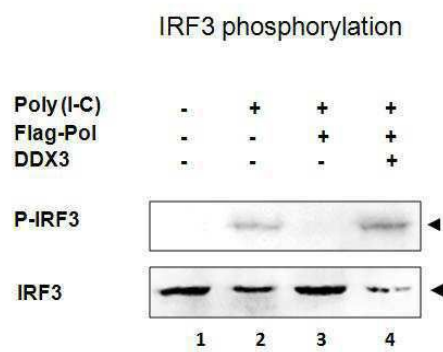
도면4

B

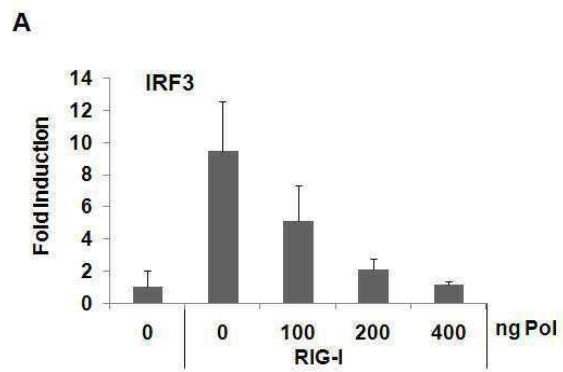


도면5

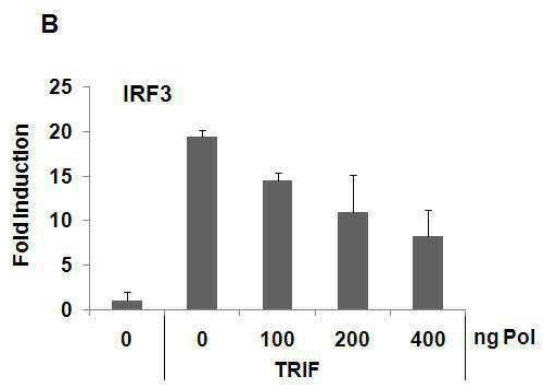
A



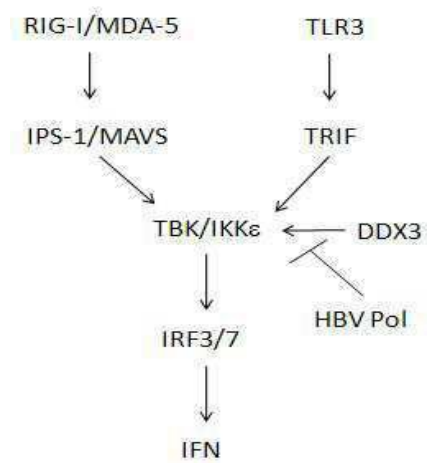
도면6



도면7

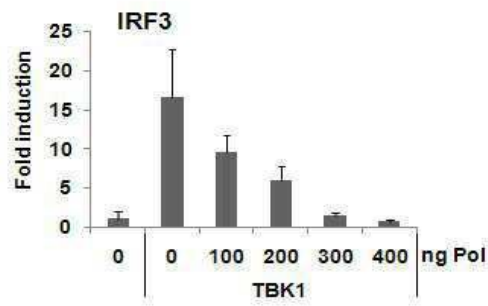


도면8



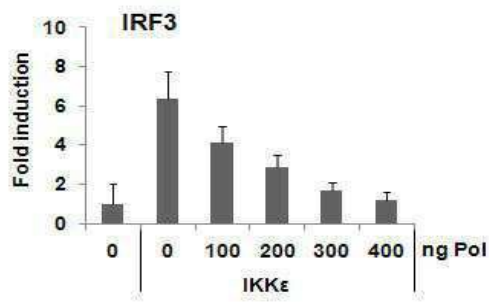
도면9

B



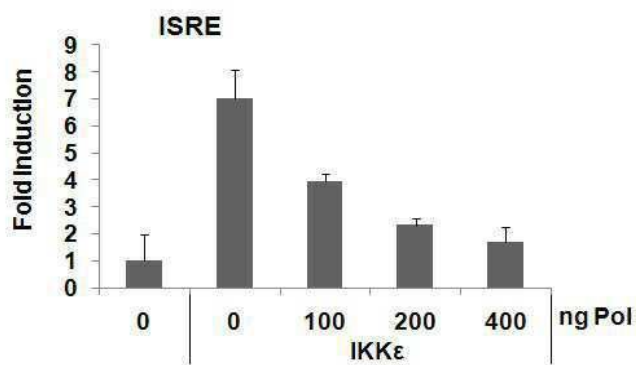
도면10

C

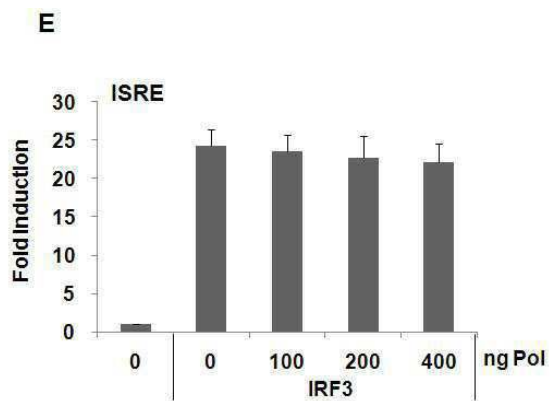


도면11

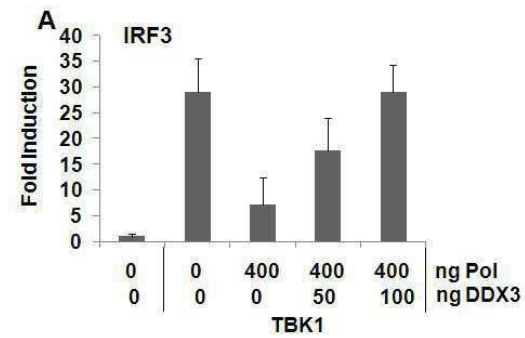
D



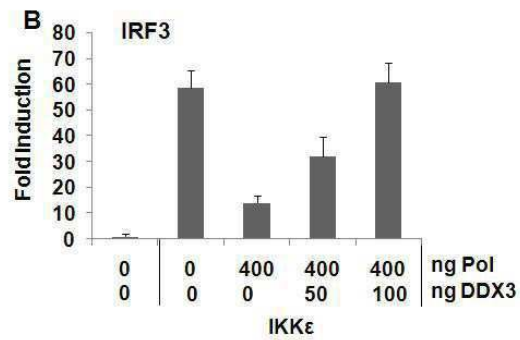
도면12



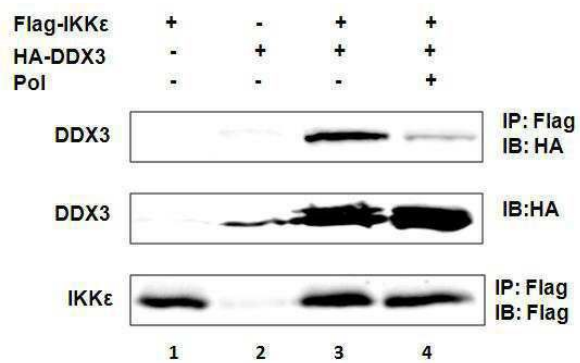
도면13



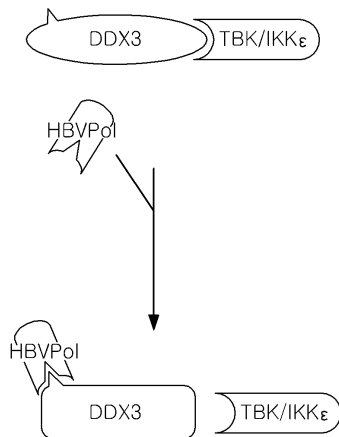
도면14



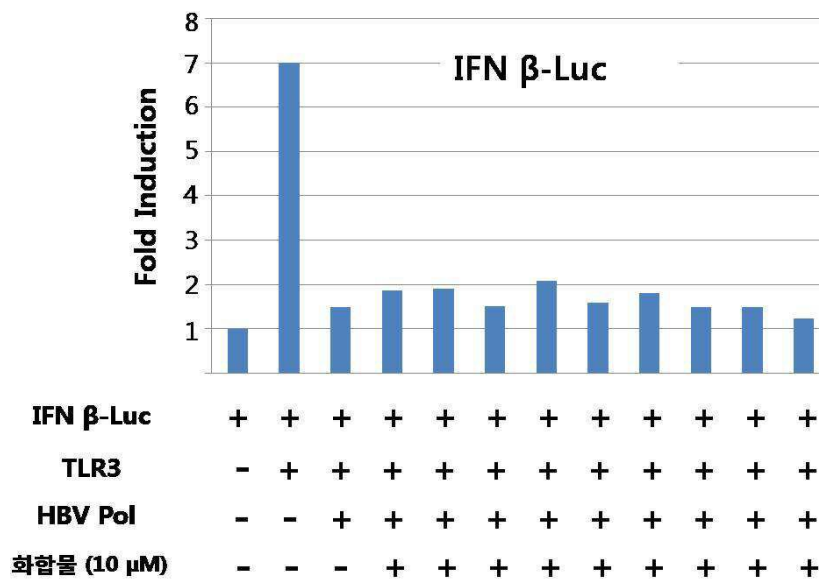
도면15



도면16



도면17



### 서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION Yonsei University
- <120> Screening methods of antiviral agents for the treatment of chronic hepatitis B virus infection and the compositions thereof
- <130> HPC2475
- <160> 3
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 2499
- <212> DNA



<213> Hepatitis B virus polimeraser

<400> 1

atgccctat cctatcaaca cttccggaga ctactgttgt tagacgacga ggcaggtccc	60
ctagaagaag aactccctcg cctcgacagac gaaggtctca atcgccgctg cgcagaagat	120
ctcaatctcg ggaatctcaa tgtagtatt ccttggactc ataaggtggg gaactttact	180
gggctttatt ctctactgt acctgtcttt aatcctcatt ggaaaacacc atcttttctt	240
aatafacatt tacaccaaga cattatcaaa aaatgtgaac agttttagg cccactcaca	300
gttaatgaga aaagaagatt gcaattgatt atgcctgccca ggttttatcc aaaggttacc	360
aaatatattac cattggataa ggggtattaaa ccttattatc cagaacatct agttaatcat	420
tacttccaaa ctagacacta ttacacact ctatggaagg cgggtatatt atataagaga	480
gaaacaacac atagcgctc attttgtggg tcacatatt cttgggaaca agatctacag	540
catggggcag aatctttcca ccagcaatcc tctgggattc tttcccgacc accagttgga	600
tccagccttc agagcaaaca ccgcaaatcc agattgggac ttcaatccca acaaggacac	660
ctggccagac gccacaagg taggagctgg agcattcggg ctgggtttca cccaccgca	720
cggaggcctt ttgggttga gccctcaggc tcagggcata ctacaaactt tgccagcaaa	780
tccgcctctt gcctccacca atcgccagtc aggaaggcag cctaccccgc tgtctccacc	840
tttgagaaac atcatcctc aggcctatgca gtggaattcc acaaccttc accaaactct	900
gcaagatccc agagttagag gcctgtattt cctgtctggt ggctccagtt caggaacagt	960
aaacctgtt ctgactactg cctctccctt atcgtcaatc ttctcgagga ttggggaccc	1020
tgcgtgaac atggagaaca tcacatcagg attcctagga ccccttctcg tgttacaggc	1080
ggggttttt ttgttgacaa gaatcctcac aataccgag agtctagact cgtggtggac	1140
ttctctcaat ttcttagggg gaactaccgt gtgtcttggc caaaattcgc agtcccaac	1200
ctccaatcac tcaccaacct cttgtcctcc aacttgcct gggtatcgct ggatgtgtct	1260
gcggcgtttt atcatcttcc tcttcactct gtgtctatgc ctcatcttct tgttggttct	1320
tctggactat caaggtatgt tgcccgtttg tctcttaatt ccaggatcct caacaaccag	1380
cacgggacca tgccggacct gcatgactac tgcctcaagga acctctatgt atccctcctg	1440
ttgtgtacc aaaccttcgg acggaaattg cacctgtatt cccatcccat catcctgggc	1500
tttcggaaaa ttcttatggg agtgggcctc agcccgtttc tcctggctca gtttactagt	1560
gccatttgtt cagtggttcg tagggctttc cccactgtt tggctttcag ttatatggat	1620
gatgtggtat tgggggcaaa gtctgtacag catcttgagt ccccttttac cgctgttacc	1680
aattttcttt tgtctttggg tatacattta aaccctaaca aaacaaagag atggggttac	1740

tctctaaatt ttatgggtta tgtcattgga tgttatgggt ccttgccaca agaacacatc	1800
atacaaaaaa tcaaagaatg ttttagaaaa ctctctatta acaggcctat tgattggaaa	1860
gtatgtcaac gaattgtggg tcttttgggt tttgtgccc cttttacaca atgtggttat	1920
cctgcgttga tgcctttgta tgcattgatt caatctaagc aggctttcac tttctcgcca	1980
acttacaagg cttttctgtg taaacaatac ctgaaccttt accccgttgc ccggcaacgg	2040
ccaggctctg gccaaagtgt tgcgtgacga acccccactg gctggggctt ggtcatgggc	2100
catcagcgca tgcgtggaac cttttcggct cctctgccga tccatactgc ggaactccta	2160
gccgcttggt ttgctcgcag caggcttgga gcaaacatta tcgggactga taactctgtt	2220
gtcctatccc gcaaataatac atcgtttcca tggctgctag gctgtgctgc caactggatc	2280
ctgcgcggga cgtcctttgt ttacgtcccg tcggcgctga atcctgcgga cgaccttct	2340
cggggctcgt tgggactctc tcgtccctt ctccgtctgc cgttcgacc gaccacgggg	2400
cgcacctctc ttacgcgga ctccccgtct gtgccttctc atctgccgga ccgtgtgcac	2460
ttcgcttcac ctctgcacgt cgcattggaga ccaccgtga	2499
<210> 2	
<211> 552	
<212> DNA	
<213> Hepatitis B virus	
<400> 2	
atggacatcg acccttataa agaatttga gctactgtgg agttactctc gtttttgctt	60
tctgacttct ttcttcagt acgagatctt ctagataccg cctcagctct gtatcgggaa	120
gccttagagt ctctgagca ttgttcacct caccatactg cactcaggca agcaattctt	180
tgtgtggggg aactaatgac tctagctacc tgggtgggtg ttaatttga agatccagcg	240
tctagagacc tagtagtcag ttatgtcaac actaatatgg gcctaaagtt caggcaactc	300
ttgtggtttc acatttcttg tctcactttt ggaagagaaa cagttataga gtatttggtg	360
tctttcggag tgttgattcg cactccteca gcttatagac caccaaatgc ccctatccta	420
tcaacacttc cggagactac tgttgtaga cgacgaggca ggtcccctag aagaagaact	480
ccctcgctc gcagacgaag gtctcaatcg ccgcgtcgca gaagatctca atctcgggaa	540
tctcaatggt ag	552
<210> 3	
<211> 462	
<212> DNA	

<213> Hepatitis B virus

<400> 3

atggctgcta ggctgtgctg ccaactggat cctgcgcggg acgtcctttg tttaacgtccc	60
gtcggcgtg aatcctgcgg acgacccttc tcggggtcgc ttgggactct ctggtcccct	120
tctcgtctg ccgttccgac cgaccacggg gcgcacctct ctttacgcgg actccccgtc	180
tgtgccttct catctgccgg accgtgtgca cttegttca cctctgcacg tcgcatggag	240
accaccgtga acgcccacca aatatgccc aaggtcttac ataagaggac tcttgactc	300
tcagcaatgt caacgaccga ccttgaggca tacttcaaag actgtttgtt taaagactgg	360
gaggagttag gggaggagat taggttaaag gtctttgtac taggaggctg taggcataaa	420
ttggtctgcg caccagcacc atgcaacttt ttcacctctg cc	462