

**간염바이러스질환치료제 개발**  
(생명현상 및 기능연구사업)

Development of Therapeutics for Infection  
of Hepatitis B and C Virus

주관연구기관 : (재)목암생명공학연구소

공동연구기관 : • 한미약품공업주식회사  
• Biomolecular Research  
Institute(호주)

과 학 기 술 부

# 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “간염바이러스 질환 치료제 개발”과제 의 보고서로 제출합니다.

2000. 7. 31.

주관연구기관명 : 재)목암생명공학연구소

주관연구책임자 : 정 수 일

연 구 원 : 민 미 경, 김 하 정

“ : 조 성 필, 김 미 현

“ : 오 재 택, 김 흥 태

“ : 박 준 상, 박 동 수

위탁연구자 : 류왕식(연세대학교)

협동연구기관명 : 한미약품중앙연구소

협동연구책임자 : 진 승 원

연 구 원 : 이 관 순, 권 세 창

“ : 신 훈, 최 인 영

“ : 정 성 엽

위탁연구자: 한진희(서울대학교)

협·공동연구기관명 : B.R.I.(호주)

협·공동연구책임자 : Peter Colman

# 요 약 문

## I. 제 목 : 간염 바이러스 질환 치료제 개발

## II. 연구목적 및 필요성

### 가. 최종목표

HBV 및 HCV의 구조 및 비 구조 조절 단백질들의 3차 구조의 분석을 통해 모든 종류의 HBV, HCV strain들에 치료효과를 보일 수 있는 값싸고 효과적이며 합리적으로 design된 약 및 치료제의 개발

### 나. 연구의 필요성

HBV와 HCV에 의한 감염은 급성 및 만성간염을 유발하며 이는 빈번히 간 경변 및 간 암으로 발전한다. 현재 전 세계적으로 약 3억 정도의 HBV 및 3억 정도의 HCV감염환자 있는 것으로 보고되고 있어 심각한 상황이다. HBV의 경우 효과적인 subunit vaccine 이 개발되어있어 지난 10여 년간 큰 효과를 보고 있으나 아시아와 아프리카에서의 변종바이러스 발생보고는 HBV의 완전한 박멸이 어려울 것임을 시사한다. 더욱이 이미 감염된 환자들에게는 현재 사용중인 백신이 아무런 역할을 하지 못한다는 점은 개선된 백신 및 치료제개발을 위한 많은 연구의 동기부여가 되고 있다.

HCV의 경우 유전자 변이가 무척 심하고 여러 가지 genotype의 바이러스가 한 환자에 존재할 수 있다는 사실로부터 효과적인 백신개발이 어려울 것임을 예측할 수 있어 심각한 사회문제가 되고 있다.

현재 HBV 및 HCV에 대한 효과적인 치료제는 없는 상태이므로 효과적인 치료제 개발이 시급한 실정이다.

**III. 연구개발의 내용 및 범위**  
**가. 연차별 연구목표 및 연구내용**

구분	연구 목표	연구 내용
1차년도 ('97)	<p>1. HBV 및 HCV의 여러 구조 및 비구조 단백질중 결정화 연구에 사용될 대상 단백질을 결정하기 위해 다양한 형태의 발현 벡터를 제조하고 발현 시킨 후 기능성 단백질에 대해서는 생화학적 특성분석을 시도함.</p> <p>2. HCV의 in vivo assay system 구축용 full length HCV제조를 위한 cDNA조각들을 얻는다.</p>	<p>1. HBV: X protein, preS1, preS2, DNA polymerase들을 E. coli, yeast, insect, mammalian expression system에서 수용성으로 발현하는 방법을 개발하고 polymerase의 경우 활성측정을 시도.</p> <p>HCV: core, E2, NS3 helicase, NS4B, NS5A, NS5B등을 E.coli, yeast, insect cell등에서 발현하고 생화학적 특성을 분석함.</p> <p>2. HCV의 full length genome을 얻기위해 5'UTR에서 NS5B까지의 7조각의 cDNA를 마련함.</p>
2차년도 ('98)	<p>1. HBV 및 HCV의 치료제 개발을 위한 대상 단백질 결정 및 대량생산 후 결정화 조건 검색.</p> <p>2. ORF을 맞춘 full length HCV genome 구축.</p>	<p>1. HBV:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 결정화에 사용될 순수 정제된 X단백질 및 PreS1, PreS2의 확보 및 결정화 연구</li> <li>- X단백질의 생물학적 활성 측정</li> <li>- Polymerase의 여러 기능성 domain을 곤충 세포에서 활성이 있는 상태로 발현</li> </ul> <p>HCV:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 결정화에 사용될 순수 정제된 E2단백질의 확보 및 post translational processing과 결정화 연구시작</li> <li>- 결정화에 사용될 순수 정제된 NS5B 단백질의 확보 및 활성측정과 결정화 연구시작</li> </ul> <p>2. HCV의 7조각 cDNA를 ORF이 맞게 연결하고 3'UTR은 oligomer합성으로 준비하여 ORF이 맞는 full length cDNA마련.</p>
3차년도 ('99)	<p>1. 2차년도까지의 연구에서 미흡했던 부분의 시도 및 실패했던 부분 재시도.</p> <p>2. HBV 및 HCV의 후보약제의 in vitro, in vivo system 개발</p>	<p>1. 기타</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- HCV core, metalloprotease 및 putative receptor인 CD81의 기능성 domain의 발현 및 정제</li> <li>- HBV X protein의 refolding을 통한 대량생산.</li> </ul> <p>2. HBV:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- X protein의 bio functional assay system 개발</li> <li>- Polymerase의 protein priming assay system 확립 및 구조 연구용 단백질 정제 시도</li> </ul> <p>HCV:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- HCV polymerase의 assay system 개발</li> <li>- HCV replication의 in vivo assay system 개발</li> </ul>

## 나. 추진전략 및 방법

다양한 전문성을 가진 팀들로 구성된 본 연구집단은 중요한 간 질환인 B형 간염(HBV)과 C형 간염(HCV)치료제 개발을 위해 합리적인 약물디자인(rational drug design)을 하기로 하였으며 이를 위해 전문성에 맞게 일이 분담되었다. 하지만 X-레이 결정구조분석 및 NMR(핵자기 공명법), 컴퓨터 모델링 및 화학합성에 전문성을 가진 호주 BRI 및 한미약품 중앙연구소 연구팀은 특정 단백질에 대한 결정이 만들어질 때까지 적절한 인력을 채용하여 분자생물학 및 생화학적 연구에 동참 하였다. 한국에 거주하는 연구팀들은 매달 research meeting을 가지고 연구결과들을 발표, 토론하였고, 호주에 거주하는 연구팀들과는 6개월마다 project meeting을 한국과 호주에서 번갈아 가며 개최하여 연구결과 토론뿐만 아니라 연구방향의 정책결정을 이루는 기회로 이용하였다.

1차년도에는 HBV 및 HCV의 구조 및 비 구조 단백질 중 중요성이 보고된 단백질들을 전부 대상으로하여 유전자 구조 및 발현 벡터의 변화 등을 시도하여 활성을 가진 단백질을 수용성으로 다량 생산하는 방법을 개발하였고 이를 통해

2차년도에는 HBV X, PreS1, PreS2, polymerase와 HCV의 E2, polymerase등으로 대상범위를 줄인 후 다량 발현하여 결정화연구를 시도하였다. 순수 정제된 이들 단백질을 결정화하기 위해 많은 연구가 수행되었으나 확인되지 않은 이유에 의해 microcrystal 까지만 얻고 이들을 키우는 데는 실패 하였다. 결정화 연구가 다양한 각도로 계속 진행되는 동안 이들 protein들의 생화학적 및 생물학적 기능분석연구가 이루어졌으며 이 연구를 통해

3차년도에는 합리적으로 디자인된 후보약제가 마련 되었을 때 분석 system으로 필수적인 HBV X protein biofunction assay system, HBV polymerase protein priming assay system, HCV E2-CD81 binding assay system, HCV polymerase assay system, HCV in vivo replication assay system등이 개발되어 여러 가지 HBV 및 HCV연구에 활용될 수 있는 다양한 assay system을 갖추게 되었다.

현재 결정화 연구를 위해서는 순수 정제된 대상 단백질들과 specific monoclonal antibody의 F(ab) fragment 또는 HCV E2의 경우 CD81의 ECII domain과의 co-crystallization을 시도하고 있으며 이제까지의 결정화연구를 통해 축적된 knowhow를 이용한 결정화가 빠른 시일 안에 이루어질 것을 기대한다.

## IV. 연구개발결과

### 가. 계획대비 달성도

번호	세부연구개발목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
1	순수정제된 HBV 및 HCV 단백질들을 활성이 있으면서 수용성인 형태로 확보	순수정제된 HBx, HBV preS1, preS2, HCVE2, HCV NS5B들을 활성이 있으면서 수용성인 형태로 20 - 30mg이상 확보	100%
2	HBx, HBV preS1, preS2, HCV E2, HCV NS5B의 결정화 연구	HBx, HBV preS1, preS2, HCV E2, HCV NS5B의 micro-crystal 제조	80%
3	ORF을 맞춘 full length HCV genome 제조	in vitro translation, processing이 가능한 full length HCV genome 및 replication이 가능한 mini-replicon 제조	100%
4	HBV에 대한 후보약제의 in vitro 및 in vivo assay system 개발	- HBx의 bio functional assay system 개발 - HBV polymerase의 protein priming assay system 개발	100% 100%
5	HCV에 대한 후보약제의 in vitro 및 in vivo assay system 개발	- HCV polymerase(NS5B)의 assay system 개발 - HCV replication의 in vivo assay system 개발	100% 100%

### 나. 대표적 성공사례

#### HBV

- 순수 정제된 수용성의 HBx protein의 다량 확보 기술
- HBV polymerase의 core particle encapsidation 및 polymerase protein priming assay system 확립
- HBx의 bio-functional assay system 확립

#### HCV

- 순수정제된 수용성의 HCV E2 및 NS5B protein의 다량 확보 기술
- HCV polymerase의 in vitro assay system 확립 및 응용
- HCV 3a type의 full length cDNA 및 replication 가능한 mini replicon 제조

#### 다. 기타 계획하지 않은 연구성과

- X-gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells
- HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signalling
- Hepatitis C virus nonstructural protein NS4B transforms NIH3T3 cells in cooperation with the Ha-ras oncogene
- Evidence that the 5'-end cap structure is essential for encapsidation of hepatitis B virus pregenomic RNA
- The E2 glycoprotein of hepatitis C virus, truncated by 34 amino acid residues at the C-terminus, binds to mammalian cells and interacts with the putative cellular receptor<sup>81</sup> if secreted from glycosylation mutant Chinese hamster ovary cell lines
- A structural model for the large extracellular loop of human CD81
- Development of a novel yeast secretion vector by a novel hybrid fusion peptide

#### V. 연구결과의 활용계획

합리적으로 디자인된 후보약제가 마련 되었을때 분석 system으로 필수적인 HBV X protein의 bio function assay system, HBV polymerase protein priming assay system, HCV E2-CD81 binding assay system, HCV polymerase in vitro assay system, HCV in vivo replication assay system등이 개발되어 여러 가지 HBV 및 HCV연구에 활용될 수 있고 실제 저해제의 screening에도 이용될 수 있다.

또 결정화 연구를 통해 축적된 knowhow를 본 연구를 통해 순수 정제되어 다량 확보된 단백질의 결정화 뿐 아니라 다른 단백질들의 결정화에도 적용될 수 있다.



# S U M M A R Y

The BRI-KHC collaborative project on hepatitis B (HBV) and hepatitis C (HCV) viruses commenced on August 1, 1996 with the major aims to produce cost effective, rationally designed drugs, which are effective against all strains of HBV and HCV, based on three-dimensional structure of virion and regulatory proteins of the viruses. The reasons for selecting HBV and HCV for this collaborative project were that HBV and HCV are major human pathogens worldwide. They cause acute and chronic hepatitis, which frequently develops into severe liver disease leading to cirrhosis and cancer of the liver. At present there are about 300 million people around the world chronically infected with HBV and almost the same number with HCV, for whom virtually no effective therapy exists. An effective subunit vaccine against HBV has been available during the last decade, but there have been several reports of the emergence of break-through strains in parts of Africa and Asia casting doubt on the future effectiveness of vaccination for total eradication. Moreover, the vaccine is of no use to people already infected with the virus. The quasispecies nature of HCV genome, multiple genotypes of the virus with divergences of 30% or more, and the presence of more than one genotype in the same patient, all suggest that it would be very difficult to develop an effective vaccine against HCV. These problems highlighted the need for development of effective therapeutic agents against these potentially fatal human viral pathogens. Since the BRI already had the specific expertise and experience in all disciplines, including molecular biology, protein chemistry, protein modeling, X-ray crystallography, NMR and synthetic chemistry, to produce anti-viral compounds, it was thought possible to achieve the aims of the hepatitis project in collaboration with the KHC.

With the above objectives in mind, the BRI and KHC have been working on several potentially important target proteins of HBV and HCV and the progress made on these proteins to date is described below:

## Hepatitis B Virus

The genome of HBV encodes four major proteins. The envelope consists of three distinct co-terminal proteins, namely pre-S1, pre-S2 and S, encoded by a single gene. The pre-S proteins represent potential attachment sites of HBV to hepatocyte, and are thus, involved in binding to the HBV receptor/s. The core protein is the principal protein of the viral nucleocapsid. The 3-end of the core open reading frame encodes an extremely basic segment that confers nucleic acid binding capacity on the protein. The third protein, polymerase, is active in replication and packaging of the virus. The fourth protein, the X protein (HBx), is a regulatory protein, which has a number of properties. Although each of these proteins are potential targets for developing anti-HBV compounds, only the pre-S and HBx were targeted by the BRI-KHC.

The X protein of HBV: The HBx is a promiscuous transcriptional activator and up-regulates a wide range of cellular and viral genes. Although the physiological relevance of HBx in viral replication and life cycle is still not completely elucidated, it is thought to be an important modulator of viral pregenome and mRNA transcription. HBx is shown to transactivate via intracellular signalling pathways, but it is also thought to bind to the basal transcriptional machinery directly. HBx is suggested to contribute to the pathogenicity of chronic hepatitis B and is a prime suspect as the causative agent of HBx-linked hepatocellular carcinoma (HCC). It is thought to initiate the development of HCC through its transactivation activities which it mediates through its interactions with cellular proteins and its enzymatic activities.

At the BRI, the HBx gene was PCR-amplified and cloned into several E coli- and yeast-based expression vectors. The protein was expressed as both an unfused protein and an N-terminal fusion protein to very high levels. Although the unfused protein

was found to be mostly insoluble, the fusion protein preparation contained some soluble protein and was purified to homogeneity without the use of denaturing solvents. The soluble purified protein thus obtained was not enough to set up crystallization trials. However, it was used to determine its enzymatic activities. The HBx was found to be a ATP-dependent AMP kinase. It also possessed ATP-GDP and GTP-GDP phosphodiester kinase activity as well as ATPase GTPase activities. A direct interaction of HBx with Ras was demonstrated using a kinase- labeled HBx. This reaction was found to be modulated by GDP, GTP and nonhydrolysable GTP analogs (Reference No. 5). Attempts were made to produce a large amount of soluble protein for structural studies by introducing a series of mutations in the HBx gene to replace some of the hydrophobic amino acid residues with hydrophilic ones. However, the attempts were unsuccessful. HBx is an extremely difficult protein to express in soluble form and none of the labs working on this protein have succeeded in obtaining the protein in large quantity for structural studies.

At the Mogam Institute, HBx was expressed in mammalian CHO and insect cells to obtain soluble protein for structural studies. All the colonies of the HBx-expressing CHO cells died apparently due to apoptosis, suggesting that these cells can not survive high level of HBx . Initial expression of HBx in insect cells produced onlyinsoluble protein. However, co-expression of HBx with mammalian chaperone Bip was found to produce some soluble protein in insect cells, but the protein could not be purified by ion exchange and immuno-affinity chromatography suggesting that the protein was not in correctly folded form. In functional studies performed at the Mogam it was shown that HBx activates Jak-STAT signalling through specific association with Jak1 tyrosine kinase. To determine if the previously identified functions of HBx are mediated through Jak1, it was found that: (i) HBx elevates Ap-1, SRE, CRE and NF-kB-dependent transcription through activation of Jak1, (ii) HBx induces tyrosine phosphorylation of Raf-1 through activation of Jak1, (iii) HBx stimulates GTP loading onto Ras through activation of Jak1, and (iv) Hbx stimulates cell proliferation through actvation of Jak1. These results indicated that HBx-mediated J'k1 activation is responsible for the activation of multiple

signalling pathway as well cell proliferation by HBx. In addition, a functional assay system was developed based on the HBx-Jak1 interaction. This assay system could be potentially useful to test the efficacy of inhibitors of HBV (Reference No.7). To test whether HBx induces apoptosis in liver cells, stable Chang liver cell lines, expressing HBx under the control of a tetracycline-inducible promoter, were established at the **Mogam Institute**. Induction of HBx in these cells in the presence of 1% calf serum resulted in typical apoptosis phenomenon such as DNA fragmentation, nuclear condensation, and fragmentation. Based on these results, it was proposed that HBx sensitizes liver cells to apoptosis upon HBV infection, contributing to the development of hepatitis and the subsequent generation of hepatocellular carcinoma (Reference No. 6).

At the Central Research Institute, Hanmi Pharm., the HBx was expressed in *E coli* as a thioredoxin fusion protein and was found to be present in mostly soluble form. However, the protein could not be purified to homogeneity. The purified preparations contained other proteins, which could not be separated by various chromatography techniques used. Attempts were then made to purify the protein under denaturing condition. Finally a procedure was devised which produces nearly homogeneous protein which remains in monomeric form even after storage at 40 C. This preparation was used for crystallization trials at the BRI, but it did not produce any crystal. Isoelectric focusing of the protein showed that it contains several isoforms although it gives a single band on SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions. The isoform heterogeneity of the protein may be the reason that it is not forming crystals. Attempts are presently being made to crystallize the protein after reduction and carboxymethylation and to co-crystallize with the F(ab) fragment of a HBx-specific monoclonal antibody.

The pre-S1 and pre-S2 proteins of HBV: The HBV envelope is made up of three related proteins called small (containing only S antigen), middle (containing S and pre-S2 antigens) and large (containing S, pre-S2 and pre-S1 antigens) proteins. The

pre-S domains are implicated in a number of functions. The domains are essential for viral assembly and infection process. The pre-S protein has important antigenic sites for both B cells and T cells. The pre-S1 interacts with the core particles and contains sequences that have been shown to specifically bind to hepatocytes. The N-terminal region of pre-S2 has been shown to be essential for virion export. These properties of the Pre-S proteins make them attractive targets to develop anti-HBV therapeutics.

At the BRI, the pre-S1-S2 (pre-S) region of the Large surface antigen of Hepatitis B virus strain *ayw2* was amplified from the full length clone pTKHH2 and cloned into a number of different *E coli* expression systems, with varying degrees of success. In pRSET (T7 promoter) and the related vector pTrcHis (trc promoter), which add an N terminal 6xHis tag for affinity purification, the expression levels were very low or the protein was insoluble. When expressed in pCYB (tac promoter) which adds a self cleaving C terminal intein+chitin binding domain tag, no free pre-S was recovered from the chitin affinity column following DTT induced on-column cleavage. Subsequent elution of the tag proved that expression had occurred, leading to the conclusion that the tag free Pre-S was insoluble.

Very high level soluble expression of pre-S was obtained using the pET32LIC vector (T7 promoter), which adds an N terminal thioredoxin tag and a 51 residues linker containing additional sequences for cleavage and detection. The fusion protein was successfully purified to 95% purity using IMAC (immobilised metal affinity chromatography) and anion exchange chromatography, and stabilised in 3% glycerol at 4 mg/ml. Conditions were established to cleave 90% of the fusion protein with enterokinase after 3 hours at 37C. However, no free pre-S could be recovered following IMAC to remove the cleaved tag. Ion exchange similarly failed to yield free pre-S. It was concluded that free pre-S is insoluble and precipitates on column during purification. The situation is complicated by the fact that the cleaved tag and the free pre-S are nearly identical in size (160 amino acids) and co-migrate on SDS gels, making analysis of cleavage products difficult. When the pre-S fusion protein was used for crystallization at 10 mg/ml concentration, it produced only

microcrystalline aggregates or pseudocrystals under most crystallization conditions, but appeared to form separate microcrystals under the conditions used to crystallize free thioredoxin. However, these crystals did not grow any further and therefore, were unsuitable for structure determination. Further constructs were then made with shorter linker regions with the view that the removal of this largely redundant region may improve the ability of the fusion protein to crystallize. A construct with a 15 residues-linker expressed well but the protein did not crystallize. The constructs with just 5 residues-linker or no linker did not express the protein.

Another construct was then made of only the pre-S1 domain using the pET32LIC vector. The purified fusion protein was cleaved by thrombin and the pre-S1 fragment isolated. However, this preparation also did not form crystals even at 20 mg/ml concentration. The tag-free pre-S1 showed very little structure as judged by its CD spectrum or one-dimensional NMR. This result is interesting since it was shown recently that the pre-S1 protein of duck hepatitis B virus, which binds to the C domain of its cellular receptor carboxypeptidase D with extraordinary affinity, does not show a defined tertiary structure when subjected to CD spectra and two dimensional NMR analyses (Reference No. 17).

The F(ab) fragment of a highly specific monoclonal antibody to pre-S1 protein was produced and molar ratio required for the formation of protein:antibody complex was determined. The complex was isolated by gel filtration chromatography and used for crystallization. However, also this complex did not form any crystal presumably due to low concentration of the preparation.

***The HBV DNA polymerase protein:*** The HBV synthesizes its DNA genome by reverse transcription of its pregenomic RNA. The HBV polymerase harbors both RNA-dependent and DNA-dependent polymerase activities. Therefore, the HBV polymerase is an attractive target for developing anti-HBV drugs. The polymerase contains four domains, namely terminal protein (TP), spacer (SP), reversetranscriptase (RT) and RNase H (RH).

The Yonsei University has been involved in the expression of the full-length and different domains of the HBV polymerase (Pol) for structural studies and to develop a polymerase assay to screen HBV inhibitors. All attempts to express the full-length protein or various combinations of the subdomains including TP-RT, RT only and RT-RH in E coli using different E coli-based fusion (MBP, TRX and GST) expression vectors resulted in insoluble proteins. Also, expression of the TP, RT and RH domains using the yeast secretary vector, pIL20GC, was unsuccessful. The full-length Pol and its various sub-domains were then expressed in insect cells using baculovirus vector. In small-scale suspension culture of Sf9 cells (0.5 L), an expression level of 250-500 1/L culture of soluble protein was obtained with the RT domain. Attempts will be made in the near future to obtain milligram quantity of the RT protein from large-scale suspension culture of insect cells for structural characterization.

In order to develop a polymerase assay for HBV, core particles with encapsidated polymerase were made via co-expression of HBV core and the full-length polymerase. Such core particles were found to be: (i) biochemically active as evidenced by endogenous polymerase assay, (ii) the negative strand RNA synthesis by Pol was initiated by protein priming, and (iii) the negative strand DNA synthesis was templated by epsilon element located at the 3-end of template RNA. Thus, it has been possible to produce HBV Pol that is biochemically similar to the native Pol found in infected liver cells in many aspects. These novel replication competent core particles would facilitate the screening of new anti-HBV drugs (Reference No. 3).

## **Hepatitis C virus**

The single strand, positive-sense HCV RNA is translated into a large polyprotein, which is then cleaved by host and viral proteases into at least ten polypeptides: C, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B. The core protein encapsidates the HCV RNA and E1 and E2 are envelope proteins, which are thought to

bind to host cell receptor/s before HCV infection takes place. Among the regulatory proteins, NS2-NS3 is a metalloprotease, NS3 a serine protease, a transcriptase and a helicase, NS4A a cofactor for the serine protease and NS5B an RNA-dependent RNA polymerase. The function of p7 is unknown while NS4B and NS5A are thought to be a part of the replication complex. The NS5A may also play a role in evasion of the interferon-mediated antiviral response. The HCV proteins targeted by the BRI-KHC are the core protein, the E2 protein, the metalloprotease, the NS4B protein and the polymerase.

*The HCV Core protein:* Apart from its structural role in encapsidating HCV genomic RNA, the core protein has been shown to modulate gene transcription, host cell growth and proliferation and has been implicated in pathogenesis of hepatocellular carcinoma. Since the current knowledge of HCV virion morphology and assembly is limited, the multifunctional nature of the HCV core protein makes it an attractive target for structural studies. At the BRI, a total of 20 constructs incorporating the core sequence alone, both as full-length protein (amino acids 1-191) and in the less hydrophobic, truncated form (amino acids 1-173), and core together with E1 and E2 of HCV strains 3a and 1b have been cloned into baculovirus and *Pichia pastoris* expression vectors. The objective of this cloning strategy is to identify constructs that will produce core - and potentially other HCV structural proteins in a form that can be readily purified for structural elucidation. High level expression of correctly processed core protein has been achieved in the baculovirus expression system. The subcellular localization of core has been determined by immunofluorescence and a number of purification strategies are being attempted to isolate this protein. Transmission electron microscopy studies are in progress in an attempt to detect in vivo assembly of HCV virus-like particles. If successful in obtaining core particles or virus-like particles from some of these constructs, attempts will be made to determine their structure by electron cryomicroscopy. Core particles and core protein will also be subjected to crystallization. The structure of the relatively small core protein can also be determined by NMR if soluble protein is obtained.



*The E2 protein of HCV:* HCV E2 appears to be a multifunctional protein. Apart from its structural role as a major envelope protein of the virus, it binds to target cells and the putative cellular HCV receptor, CD81. HCV E2 is largely responsible for evasion of the host immune system, may play a role in evasion of the interferon-mediated anti-viral response and possibly oncogenesis, and may be responsible for initiating auto-immune liver damage. Besides being a key antigen for developing an effective HCV vaccine, the above attributes of E2 make it an attractive target to develop anti-HCV drugs.

At the BRI, the ectodomain of HCV E2 from a type 3a strain, spanning amino acid residues 384 to 712 resulting in truncation of 34 residues at the C-terminus, was cloned into the mammalian vector pEE14. The construct also contained an N-terminal secretion signal and a C-terminal c-myc affinity tag. The recombinant pEE14/E2 was transfected into the wild type mammalian cell line CHO-K1 and its two glycosylation-deficient mutants, Lec3.2.8.1 (Lec3) and Lec8. Cell lines from stably expressing the protein from the three cell lines were generated and cloned. Clones expressing the protein at high level were selected by dot-blot analysis of cell culture supernatant and Western blotting following immunoprecipitation of the secreted proteins using protein A and an anti-c-myc monoclonal antibody. Clones expressing E2 at high levels were used to produce cell culture supernatant using large T-flasks. The E2 from the culture medium was purified by c-myc antibody-affinity chromatography with elution using a c-myc peptide. The protein was further purified by gel filtration chromatography on a Superdex S200 column. The glycoprotein eluted mainly as a single peak with a shoulder or sometimes a small peak preceding the main peak. The same elution profile was observed for the E2 proteins obtained from all the three cell lines except that the position of the peaks differed slightly with the CHO-K1/E2 eluting earlier, followed by the Lec/E2 and Lec3/E2, presumably due to their differing molecular weights. Analysis of fractions by SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions showed that the fractions preceding the small peak or shoulder contained E2 oligomers and trimers, those in the small peak and shoulder contained E2 dimers and those from the main

peak contained only monomeric E2. As most of the secreted E2 glycoprotein was present in the main peak, the majority of the expressed proteins from the three cell lines were in monomeric form. SDS-PAGE of the gel filtration-purified E2 proteins showed a molecular weight of approximately 52 kDa for Lec3/E2, 52-65 kDa for Lec8/E2 and 62-84 kDa for CHO-K1/E2.

When the E2 proteins expressed from the three cell lines were used in cell binding studies, the Lec8/E2 and Lec3/E2 were found to have high binding affinities to human T-cells, Jurkat while the CHO-K1/E2 showed very weak, but detectable, binding. The Lec8/E2 and Lec3/E2, but not CHO-K1/E2, bound to a protein of 25 kDa (presumably CD81) from the plasma membrane of T-cells, Jurkat and CEM. In addition, the Lec8/E2 and Lec3/E2 strongly bound to the second extracellular domain of a recombinant CD81 produced as a GST fusion produced at the BRI while the CHO-K1/E2 did not show any binding. The CD81 was reported recently to be a receptor of HCV. These observations suggested that the Lec8/E2 and Lec3/E2 are properly folded and contain the type of glycosylation (the Lec3/E2, in particular, with its high mannose content), which may closely mimic that of the native protein (Reference Nos. 4, 13).

To obtain large quantity of E2 proteins, the cells were grown in large fermenters and the protein purified to homogeneity from culture supernatant (more than 200 L from each of the three cell lines). Highly concentrated monomeric preparations of E2 proteins from the three cell lines were subjected to crystallization. Although small needle crystals were obtained from the CHO-K1/E2, which did not grow any further, the Lec3/E2 and Lec8/E2 did not form any crystal even up to concentrations of 33 mg/ml. It was surprising since the Lec3/E2 and Lec8/E2 have much less carbohydrate contents than the CHO-K1/E2.

Isoelectric focusing of E2 from the three cell lines showed that the proteins contain a large number of isoforms. The isoform heterogeneity of the Lec3/E2 was found to be not due to disulfide scrambling, deamidation or cyclization of amino acid residues or carbohydrate charge differences. Efforts were then made to isolate

the main isoform from the Lec3/E2 which has a pI value that is close to the calculated pI of the protein. A procedure was developed to isolate this isoform using Baby Flow (Gradipore), ion exchange and gel-filtration chromatography. The isoform was purified to near homogeneity, concentrated to 17 mg/ml and used for crystallization. However, this preparation also did not produce crystal.

It was observed recently that the Lec8/E2, when produced in roller bottles using GMEM medium, instead of spinner flasks and large fermenter, shows predominantly a single sharp band when subjected to isoelectric focusing although the pI value of this band is lower than the calculated pI of the protein. Nonetheless, the protein was produced from a large-scale culture in roller bottles using GMEM medium, purified and concentrated to 25 mg/ml and used for crystallization. This preparation also did not form any crystal.

Since the E2 protein has the potential to be highly glycosylated (10 consensus sites for N-linked glycosylation) and highly disulphide-bonded (18 cysteines), such post-translation modifications would be expected to be important to the structure of this protein and its suspected functions in the life cycle of HCV. To this end, Electrospray Ionization (ESI) and Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) mass spectrometry have been used to confirm that all 10 putative N-linked glycosylation sites of the recombinant E2 are occupied by glycans. The CHO-K1-expressed E2 was found to contain mostly sialylated complex glycans, but also at least 2 high mannose glycans which may represent buried regions of the protein which are inaccessible to golgi glycosylation enzymes. In contrast the E2 expressed from Lec3 cells contained exclusively high mannose glycans which may more closely mimic the expected high mannose conformation of the native viral E2 (Reference Nos. 14, 21, 22). Analysis of the E2 peptides using ESI and MALDI has allowed the determination of a number of disulphide bonds, which have been confirmed by Edman sequencing. Assignment of the remaining disulphides will facilitate structural modeling and determine if the protein has a single disulphide linkage arrangement.

The putative HCV receptor, CD81: It was shown recently that the E2 protein of HCV binds to the cell surface molecule CD81. The CD81 is expressed on various cell types including hepatocytes, T cells and B cells. The protein is composed of four transmembrane domains and two extracellular domains and belongs to the tetraspanin family of proteins. The binding of E2 was mapped to the second extracellular domain (EC II) of CD81.

At the BRI, the EC II domain of CD81, spanning amino acid residues 113 to 201, was PCR-amplified from a human liver cDNA. The gene was engineered to contain a cysteine residue at the N- and C-termini, so that it forms a loop. The PCR product was cloned into pGEX-2T as a GST fusion protein and pTrcHisB as an N-terminal His-tagged protein. The proteins were expressed in *E coli* and the products analyzed by reducing and non-reducing SDS-PAGE and Western blotting. The GST-CD81.ECII and His-CD81.ECII, both were found to exist in monomeric and oligomeric forms. Immuno-blot analysis demonstrated that HCV E2, with a truncation of 34 C-terminal residues and expressed in glycosylation-deficient mammalian CHO cell lines, Lec3 and Lec8, bind strongly to the unreduced GST-CD81.ECII and His-CD81.ECII, but only weakly with the reduced forms of these proteins. In contrast, the same size E2, expressed in the wild type CHO cell line, CHO-K1, did not show any binding to the CD81 proteins (Reference No. 4 and 13).

In order to obtain the EC II of CD81 which produces only monomeric form under non-reducing conditions, a construct of the gene, spanning amino acid residues 116 to 201 with no extra cysteine at the N- and C-termini, were made in an in-house temperature-inducible *E coli*-based expression vector, pPOW. The vector contains the pelB secretion signal, which directs the synthesized protein through the cytoplasmic membrane. An octapeptide FLAG-tag was fused to the C-terminus of the CD81 Protein to aid in purification. Initial experiments with the expression of this construct showed that the protein is being expressed at a very high level and is present in monomeric form under non-reducing conditions. Efforts are presently being made to obtain this protein in large quantity for its structure determination by NMR or

X-ray crystallography and for its co-crystallization with the E2 protein of HCV.

In the meantime a three-dimensional model of the extracellular II loop of CD81 has been constructed since information on the structural characteristics of this region would be useful towards understanding the functional properties of E2 and possibly for the design of inhibitors of E2. As there are no known structural homologues, the method of threading using pair potentials was used to identify the probable 3-dimensional fold of this loop as having a helical bundle topology. This was confirmed by performing secondary structure and solvent accessibility prediction by several methods and sequence motif searches. The constructed three-dimensional model of the second extra-cellular loop of human CD81 was analyzed in terms of its surface properties such as electrostatic potential, mutational variability, and hydrophobic patches.

The NS2/3 metalloprotease of HCV: The metalloprotease of HCV, which includes the NS2 protein and the serine protease domain of NS3 protein, is responsible for cleavage of the HCV polyprotein at the NS2/3 junction. Thus, the metalloprotease, like other HCV proteases, namely the serine protease, helicase and polymerase, is a major target for HCV therapy.

At the Seoul National University, the NS2/3 metalloprotease, with a mutation at the NS2/3 junction, was expressed using several E coli-based expression vectors, including pLysN, pTrxFus, pET Desb and pET-Trx. Majority of the protein expressed from these expression systems was found to be in insoluble fraction with only a very small proportion of the protein found to be soluble. Further studies are in progress to obtain the soluble protein in milligram quantity for crystallization trials.

At the Central Research Institute, Hanmi Pharm., a region required for the efficient cleavage of NS2/3 junction by the metalloprotease, comprising C-terminal 167 amino acid residues of NS2 and 214 N-terminal residues of NS3 proteins and containing amino acid substitution of the cysteine residue at amino acid position

117, was cloned into pET-32 vector. Also in this case the majority of the protein was present in insoluble fraction with only a very small proportion being in soluble fraction. However, the purified NS2/3 protein spontaneously degraded upon storage. These results suggest that the protein is not in proper conformation.

The NS4B protein of HCV: Except that it forms part of the replication complex, the role played by the NS4B protein in the life cycle of HCV is not clear at present. To elucidate its function, cellular changes in cells transfected with the coding region of NS4B were investigated at the **Mogam Institute**. The expression plasmid, pcDNANS4B, was constructed by inserting PCR-amplified NS4B of a HCV type 1b isolate into the mammalian expression vector pcDNA3.1. The pcDNANS4Bflag plasmid was made by fusion of the sequence encoding the FLAG-tag epitope sequence at the C-terminus of the NS4B protein-coding sequence. The pcDNANS4B plasmid was used to generate stable NIH3T3 transfectants and the pcDNANS4Bflag plasmid for indirect immunofluorescence analysis. The NS4B protein was found to be located in the cytoplasm, particularly in the perinuclear region of the transfected cells. The cells co-expressing HCV NS4B in cooperation with the Ha-ras gene showed loss of contact inhibition, morphological alterations, and anchorage-independent growth. These results demonstrated that HCV NS4B protein in association with the Ha-ras gene plays an important role in the malignant transformation of cells by HCV (Reference No. 9).

The HCV polymerase: The NS5B gene of HCV has been shown to possess an RNA-dependent RNA polymerase activity and is thus, believed to be an essential component in HCV RNA replication complex, hence a major target to develop anti-HCV drugs.

The NS5B gene from the BRIs HCV 3a, with a truncation of 20 amino acid residues from the C-terminus, was cloned by Hanhyo in their in-house vector pLysN and was found to express soluble fusion protein in high yield. The clone was sent to the BRI for large-scale fermentation and purification of the protein. The protein was purified from several 1 L E coli cultures using Ni-NTA resin. This purification

gave two bands on SDS-PAGE, one turned out to be of the fusion plus NS5B protein (83 kDa) and the other of the fusion protein itself (30 kDa) as determined by N-terminal sequencing. This preparation was then subjected to ion exchange chromatography, which resulted in clean separation of the two bands. The yield of the purified polymerase fusion protein was about 5 mg per liter culture. The purified protein was shown to possess RNA-dependent RNA polymerase activity (Reference Nos. 2 and 18). The protein was concentrated to about 6 mg/ml (the maximum concentration achieved) and used for crystallization. However, the fusion protein produced only small crystals, which could not be grown any bigger. Various attempts to increase the solubility and concentration of the fusion protein using different additives were unsuccessful. Also, attempts to cleanly cleave the fusion protein with enterokinase and isolate the fusion protein-free NS5B did not succeed. Four new constructs of NS5B gene were made by deleting the highly disordered N-terminal region of the LysN region and the enterokinase cleavage site to decrease the conformational flexibility of the fusion protein. The protein was expressed from each construct, purified, concentrated and used for crystallization. However, none of the proteins yielded crystals.

The NS5B gene with truncation of the 20 C-terminal residues was then cloned into the baculovirus expression vector pFastBacHTb at the BRI, which incorporated an N-terminal hexaHis tag. The protein was expressed in High5 and Sf9 insect cells at very high levels with 50% of the protein being in soluble fraction. Immunoblot analysis showed a major protein species of about 67 kDa, which is equivalent to the predicted molecular weight of NS5B, along with a smaller protein of 65 kDa detected using patient sera. Attempts at separating these bands by various chromatographic methods and purification of the protein in the presence of different protease inhibitors like E64, chymostatin and protease inhibitor cocktail exclusive for baculovirus expressed proteins were unsuccessful. Mass spectroscopy analysis of the two bands confirmed that they contain NS5B sequence, except that the first 60 residues at the N-terminus were not detected. The precise relationship between these proteins is not clear. A preparation containing this doublet was concentrated to 1

mg/ml and used for crystallization, but it did not form any crystal. Attempts to increase the solubility of the protein were unsuccessful.

At the Mogam Institute, the full-length NS5B gene from a type 1b isolate was expressed in insect cells using a baculovirus vector. However, the expressed protein was found to be insoluble. To enhance the level of expression and solubility, a new construct was made which had a deletion of 20 C-terminal residues. The protein was expressed in insect cells and purified by ion exchange and molecular sieve chromatography. Although the purified protein showed a single major band at 67 kDa in the SDS-PAGE, it showed some heterogeneity. Attempts to further purify the protein were unsuccessful. Polyuridylation assay of the purified NS5B showed that it has an UMP incorporation activity though it is very weak. Since this protein had a weak nucleotide incorporation activity, the nucleotide sequence of the four domains which are considered to play role in activity were analyzed. The results suggested that the type 1b HCV polymerase used by the Mogam Institute is naturally producing a very weak enzyme. Nonetheless, this preparation was used for crystallization at a concentration of about 2 mg/ml which produced only microcrystals.

At the Mogam Institute, the biochemical and enzymic characteristics of the HCV polymerase from type 3a isolate (pLysN-NS5B) produced by the BRI in E coli was further assessed. The polymerase was found to have the optimum reaction condition at 5 mM Mg<sup>2+</sup>, pH 8.0 and 30°C. The enzyme showed nucleotide incorporation profile which is time and dose dependent with a K<sub>m</sub> value of 4.5 M. Using the pLysN-NS5B an assay system has been developed at the Mogam Institute to screen putative inhibitors of HCV polymerase. Although the pLysN-NS5B polymerase from HCV type 3a is very active, the NS5B gene from several Korean HCV patient sera were cloned recently to find highly active HCV polymerase. Each clone was found to produce active enzyme. At present the Mogam Institute has polymerase assay systems for type 1b and 3a of HCV which would be useful to screen ant-HCV compounds (Reference Nos. 2 and 18).



Since the X-ray structure of the HCV type 1b polymerase was reported recently by three different labs, no further attempts will be made by the BRI and KHC to crystallize this protein.

Construction of a full-length cDNA clone of HCV type 3a: Since the replication of HCV is not efficient in cultured cells, it has been difficult to develop an assay system to screen candidate therapeutic drugs against the virus. Recently several groups have reported the construction of full-length clones of HCV-1a and HCV-1b. In order to develop our own drug assay system, it was decided that the Mogam Institute will make a full-length clone HCV-3a by joining the cDNA clones of this isolate representing each of the coding and 5 untranslated (UTR) regions generated by the BRI. Subsequently, through seven steps of overlap-extension PCR method, the pBR5U.NS5B plasmid, containing the cDNA of HCV 3a genome from the 5 UTR region to the NS5B gene was obtained. The 3 UTR region was synthesized using several oligomers based on the nucleotide sequence of type 1b and linked to the plasmid pBR5U.NS5B. The full-length cDNA was used in *in vitro* transcription-translation study to assess its replication properties. Negative strand specific RT-PCR showed that there was some negative strand RNA produced through replication. However, RNase protection assay for the negative strand RNA was unsuccessful despite many attempts. There are two possible explanations for these results. Firstly, there is very small amount of negative strand RNA produced due to lack of selection force for the transfected cells compared to normal host cells. Secondly the cDNA may code for defective viral enzymes such as protease, helicase or polymerase. To test these possibilities, three types of bicistronic, subgenomic replicons were constructed which have Neo and/ GFP selection markers under HCV IRES and HCV nonstructural protein coding regions under EMCV IRES. *In vitro* translation and immuno-precipitation studies showed cleaved proteins produced through post-translational processing. Furthermore, processing of three pieces of cDNA, using *in vitro* translation system, were examined and were found to produce nonstructural proteins. Thus, the full-length cDNA clone of HCV 3a appears to be properly synthesized. If further tests confirm that the full-length clone and the

replicons are replication competent, these clones will be used to screen anti-HCV compounds.

Conclusion and future directions: The HBx purified by the Central Research Institute, Hanmi Pharm. is the most soluble protein available to date for structural characterization. Further refinement in purification of this protein may lead to its crystallization. Similarly, we are able to produce large quantity of soluble pre-S1 protein of HBV. This protein will be used in the near future for interaction studies with the plasma membrane proteins of liver cells in order to find the HBV receptor. The RT domain of the HBV DNA polymerase has been expressed in soluble form by the group at the Yonsei University. This protein can be produced in milligram quantity for crystallization. The E2 protein of HCV, produced by the BRI in mammalian cells, appears to be the best so far in terms of its conformation and function. Up to 250 mg of this protein can be produced in one fermentation using the large fermenters employed by the BRI. It is planned to co-crystallize E2 from either Lec3 or Lec8 with the extracellular domain of a tag-free CD81, which has been obtained recently. Also, monoclonal antibodies to the E2 protein are currently being made and will be used for co-crystallization of the protein. In addition, a new construct of E2 lacking 85 amino acid residues from the C-terminus is presently being made as it has been shown by a number of labs recently that only such a truncated protein is properly folded based on its reactivity with conformation-sensitive monoclonal antibodies. This construct will be expressed in CHO-K1, Lec3 and Lec8 cells for their crystallization. Likewise, some of the 20 constructs of the HCV core gene being investigated by the BRI may also lead to protein preparations which may be amenable to structure determination by X-ray crystallography, NMR or electron cryomicroscopy. Although we are not pursuing crystallography of the NS5B protein of HCV, the **Mogam Institute** has developed polymerase assays for HCV type 1b as well as 3a, which would prove useful to screen anti-HCV drugs. In addition, the **Mogam Institute** has already made a full-length cDNA clone and replicons of HCV type 3a, which may prove potentially useful for screening anti-HCV drugs if it is confirmed that they are replication competent.

The Hepatitis project of the BRI-KHC is four years old, and a lot has been learnt and achieved on different proteins of HBV and HCV during this period. Rational drug design against viruses is a long-term project and requires concerted efforts in all the disciplines to reach the goal.

# C O N T E N T S

1. Introduction

2. Current Status of the Arts

3. Experimental Methods and Results

4. Achievement and Contribution to Related technology

5. Future Plans

6. References

# 목 차

제 1 장 서 론

제 2 장 국내외 기술개발현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 참고문헌

# 제 1 장 서론

## 1절. 연구개발의 필요성

### 1. 연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성

#### 가 기술적 측면

본 연구계획은 만성 간 질환을 유발하여 간경화 및 간암으로의 전이율이 유사바이러스에 비해 무척 높은 것으로 알려진, HCV의 감염에 대한 치료제를 통합적이고 합리적인 약품연구 개발 계획(rational drug design)을 통해 개발함을 목적으로 한다. 이 목적을 달성하기 위해서는 후보 화합물에 대한 광범위한 *in vitro* 및 *in vivo* 테스트를 위한 분자생물학과, 단백질화학, X-레이 결정구조 분석법에 의한 분자구조연구 및 NMR(핵자기 공명법), 컴퓨터 모델링 및 화학합성을 포함하는 넓은 범위의 과학분야가 참여되어야 한다. 따라서 이 과제의 수행과정을 통해 기 개발된 기술의 응용 및 새로운 기술의 개발이 이루어질 것이며 모든 범위의 기술들은 한국 및 호주에 의해 공유되게 된다.

#### 나 경제·산업적 측면

1998년에 발표된 WHO의 보고에 따르면 전 세계적으로 1억7000만여명이 HCV에 감염되어있고 감염율은 지역별로 많은 차이가 있어서 1%미만인 지역부터 20%이상인 지역까지 거의 전 세계적으로 분포되어있다. 우리나라의 경우 1 - 2%의 감염율을 가진 지역에 속하나 HCV에 일단 감염되면 80%이상만성으로 발전하고 이중 20%가 간경변으로 발전한 후 5%정도는 간암으로 발전한다고 알려져 있어 심각한 감염질환으로 알려져 있다. 1998년까지 사용된 HCV 감염에 대한 치료법은 alpha interferon(a-IFN)이 유일했고 최근에는 a-IFN과 ribavirin을 동시에 사용하고 있다. 하지만 a-IFN단독투여로는 약 25%의 치료효과를 볼 수 있고 a-IFN과 ribavirin동시투여에 의해서도 40%정도만의 치료효과를 볼 수 있어 더 나은 치료제 개발이 시급한 실정이다. 바이러스에 의해 유발되는 감염에 대한 치료제는 세계적으로 약 10억달러 이상의 잠재적인 시장규모를 가지고 있으며 연구된 물질에 대해 기대되는 경제적 보상은 판매액의 약 10%로 로열티가 추정되고 있다.

## 다 사회·문화적 측면

HCV는 인간에게 심각한 불행을 초래하는 중요한 질병원이며 전세계적으로 감염이 보고되고 있다. 우리나라의 경우는 정확한 통계치가 나와있지 않으나 호주의 경우 150,000명 정도가 현재 바이러스에 감염되어 있으며 매년 약 6-7000명의 호주인이 새로이 이 바이러스에 감염되고있다고 알려져 빠르게 확산되고있음을 보여주고 있다. 따라서 효과적인 방제가 이루어지지 않는다면 전세계적으로 중요한 건강상의 위험을 초래할 것이라는 것을 예측할 수 있다.

## 2절. 연구개발의 목표

- HCV 의 E2 단백질의 3차구조의 분석을 통해 모든 종류의 HCV genotype들에 치료효과를 보일 수 있는 값싸고 효과적이며 합리적으로 design된 치료제의 개발
- 약품에 대한 광범위한 특허권을 획득하며 전 세계적으로 상업화한다.

## 3절. 연구개발의 범위

가장 매력적인 치료제개발을 위한 target으로 평가되고있는 NS5B(RdRp)protein은 본 연구팀에서도 강한 활성을 가진 NS5B protein을 1b 및 3a type의 HCV에 대해 다 보유하고 있고 천연물 스크리닝을 통해 정확도 및 재현성이 확인된 assay system을 확보하고는 있으나 세계적으로 3팀에서 이미 crystal을 가지고 있고 이들 연구팀에서는 많은 인력과 자본을 투입하여 저해제 디자인과 합성 분석에 들어가 있음을 추정할 때 경쟁력이 떨어진다고 판단된다. 본 연구팀에서는 HBV의 X protein뿐 아니라 HCV의 E2 protein과 조절단백질의 삼차원적 구조에 기초하여 바이러스가 세포내로 들어가는 단계(감염)나 숙주세포 내에서 복제되는 단계를 특이적으로 저해하는 물질들을 구상, 합성하기 위해 모든 대상단백질의 대량생산, 정제, 생화학적 특성분석을 완료하였으며 이들 단백질들의 *in vitro* 또는 *in vivo* assay system도 구축하여 소유하고 있고 microcrystal형태로 crystallization 시켜놓고 있어 특이적 MAb 또는 receptor와 결합시킨 후 crystallization시도를 하여 crystal크기를 키우는 실험을 준비하고 있다. 특히 HCV E2의 경우 putative receptor인 CD81과 특이성을 가지고 강하게 반응하며 알려진 모든 genotype의 HCV patient sera와도 강하게 반응하는 형

태의 단백질을 세포밖으로 다량 분비하는 system을 glycosylation mutant CHO(Chinese Hamster Ovary) cell line 인Lec3.2.8.1(Lec3) 및 Lec8을 이용하여 개발하였으며 따라서 세포내에 존재하는 형태의 system으로 가지고 있는 다른 연구팀에 비해 강한 경쟁력을 가지고 있는 상태이다. 이와 더불어 본 연구팀에서는 정제된 E2 protein의 Electrospray Ionization(ESI) 과 Assisted Laser Desorption/Ionization(MALDI) mass spectrometry, Edman sequencing등을 통해 putative glycosylation site와 disulfide formation에 대한 정보를 축적해놓고 있어 structural modeling을 촉진시킬 수 있는 자료들도 가지고 있다.



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1절. 전체개요

Hepatitis C virus(HCV)는 C형 간염질환의 원인 미생물이며 1974년 non-A, non-B hepatitis virus로 인지되었고 그로부터 15년후인 1989년에 이르러 Chiron Co.의 연구팀에 의해 immuno-blind screening을 통하여 cDNA가 cloning되게되어 실체가 확인 되었다. 비록 HCV는 *in vitro* 배양방법이 개발되어있지는 않지만 최근 수년에 걸쳐 heterologous expression system을 이용하여 많은 특성들이 규명되었다. HCV는 9.6Kb의 길이를 가진 positive sense의 단일쇄 RNA를 genome으로 가지고있으며 3000여 아미노산으로 이루어진 한 개의 polyprotein으로 translation된다. 이 polyprotein은 숙주세포 및 바이러스자신의 protease에 의해 C, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B등 10개의 완성된 viral gene product로 나누어지게 되며 이중 C, E1 및 E2는 바이러스의 구조단백질이다. HCV의 core 단백질은 HCV genomic RNA를 encapsidation하는 구조적 역할을 할뿐 아니라 숙주세포의 gene transcription, growth 및 proliferation을 modulation하여 간암으로 발전하는데 역할을 할것으로 믿어지며 E1 및 E2 protein은 type1 integral transmembrane protein이며 cell surface로 가지 못하고 endoplasmic reticulum에 retention하는 것으로 알려져 있다. 특히 E2 protein은 바이러스의 주요 envelope protein으로서의 구조적 역할 외에 putative receptor인 CD81과 binding하며 host 의 immune system 및 interferon mediated anti-viral response로부터의 도피와 oncogenesis 또 autoimmune liver disease 을 일으키는등 multifunctional protein으로 알려져 있어 효과적인 HCV vaccine개발을 위한 주된 항원일 뿐 아니라 anti-HCV drug개발을 위한 매력적인 target으로 부상되고 있다. p7단백질의 기능은 알려지지 않았으며 NS2는 metallo-protease의 일부이며 NS3는 virus의 serine protease 이며 C-말단에는 RNA helicase domain을 가지고 있다. NS4A는 viral protease의 cofactor이며, NS4B는 oncogenic potential을 가진 것으로 본 연구팀에 의해 밝혀졌다. NS5A는 HCV가 interferon에 저항을 가지게 하는데 기능할 뿐 아니라 antiapoptotic function을 가지는 것으로 보고되었고 NS5B는 바이러스의 RNA dependent RNA polymerase로서 기능한다. HCV의 백신개발을 위해서는 미국의 Chiron Co.에서 이 바이러스와 숙주세포에 존재하는 receptor사이의 상호작용에 중요한 역할을 할 것이라 믿어지는 E1 및 E2 glycoprotein의 extracellular domain을 중심으로 많은 연구를 수행하여 왔으나 그 효과에 대해서는 바이러스의 의사종적(quasi species)특성과 지리적으로 다양한 종이 분포한다는 현실 때문에 큰 진전을 보지 못하고 있는 상태이다. 하지만 바이러스의

envelope protein과 human cell과의 binding을 저해할수 있는 농도의 envelope protein에 대한 항체가 chimpanzee에 존재할 경우 chimpanzee가 감염으로부터 치유된다는 보고와 E2의 N 말단부위에 있는 hyper variable domain(HVR1)이 주된 neutralization site라는 보고 또 E2 protein에대한 cellular immune response가 C형 간염바이러스의 감염으로부터의 예방 및 회복되는데 중요한 역할을 한다는 등의 연구보고 들이 꾸준히 발표되고 있어 가장 native한 형태의 E2 protein을 발현하려는 연구가 지속되어 왔다. 따라서 최근 Flinte(2000)등이 발표한 E2의 truncated soluble version이 세포내에 발현되었을 때 CD81 과 가장 강한 affinity를 보여준다는 보고는 glycan의 형태가 E2 protein이 biologically active한 형태로 존재하게 하는데 에 중요함을 시사하고 있다. HCV감염에 대한 치료제개발 을 위해서 연구가 이루어지고 있는 분야는 5'UTR 및 3'UTR에대한 antisense nucleotide를 개발하려는 분야와 NS3 protease, NS3 helicase, NS5B polymerase에 대한 저해제를 개발하 여 바이러스의 복제를 저해하려는 시도로 이루어지고 있으며 특히 이들 3가지 효소에 대해 서는 crystal structure가 밝혀져 전통적인 화합물 스크리닝 뿐 아니라 합리적 약물 디자인 에의해 치료제 개발도 활발히 이루어지고 있다. Crystal구조가 보고되어있는 protease의 경우 drug design에 중요한 catalytic pocket의 size가 너무작은 것으로 밝혀져 HIV protease의 저해제 개발에 성공했던 Merck사에서는 3 - 4년의 활발한 연구 후 정체상태에 있는 것으로 알려져 있고 helicase의 경우 치료제개발을 위한 많은 연구가 이루어지고 있을 것이나 눈에 띄는 보고는 아직 없는 상황이다.

## 2절. 연구사례의 조사

### 1 외국의 경우

현재까지 알려진 간염 바이러스중에서 만성간염을 유발하며 임상적으로 크게 문제가 되고 있는 C형 간염바이러스와 B형 간염바이러스의 항 바이러스제 개발연구에 관한 연구사 례를 다음의 세 가지 항목별로 기술하려한다:

(i) 증식모델연구, (ii) 항 바이러스 target, (iii) 항 바이러스제 연구.

#### (i) HCV 증식모델연구

C형 간염 바이러스 (HCV)는 많은 학자들이 HCV의 세포배양을 시도하고 있으나 아직 세 포배양이 되지 않으며, 더군다나 침팬지이외에는 감염되는 동물이 없다. 세포전이 (transfection)를 통한 HCV 증식재현도 많은 학자에 의해 시도되었으나 성공적이지 못했다.

예를 들면 일본학자들에 의해 세포주를 이용하여 환자혈청에 존재할 것이라 믿어지는 HCV의 감염 및 증식이 발표 되었고 (Shimizu et al., 1993) 또한, cDNA로부터 *in vitro*에서 합성된 HCV RNA의 감염성이 보고 되었으나(Yoo et al., 1995; Mizuno et al., 1995) 얻어지는 바이러스의 역가가 극히 낮다고 보고 되었다. 최근 Chimpanzee에서 hepatitis를 일으키는 infectious cDNA가 최초로 Rice 연구팀에 의해 만들어져 그 연구결과가 1997년 Science에 발표되었고, 그 후 유사한 보고가 2 - 3개 있어왔으나 효율성에서 개선된 cDNA replicon은 Bartenschlager연구팀에 의해 1999년 Science에 보고된 것이 그 다음이며 이 또한 virion을 얻기 위해 이용되기에는 효율성에서 많은 개선이 이루어져야 할 것으로 평가된다. 따라서 현재 기술수준에서의 최선의 노력은 HCV의 다양한 형태의 cDNA를 template로하여 active한 중합효소(NS5B protein)을 첨가하여 생화학적 반응을 유도한 후 가장 최적반응조건에서 이를 저해하는 물질을 탐색하고 또 효율성이 낮다하더라도 replicon을 이용한 *in vivo* test로 효능을 검증하는 것이 될 것이지만 앞으로 세포주에의 HCV 감염성이 효율적으로, 또 재현성 있게 얻어지게 되면 이 세포주는 항바이러스 연구에 매우 긴요하게 활용될 것이다.

#### (ii) 항HCV target

C형 간염바이러스는 아직 세포배양이 효율적으로 되지 않으므로 항바이러스연구에는 어려움이 많으나, 다행히 발현체계를 이용하여 바이러스의 증식의 일부를 생화학적으로 수행할 수 있으므로 이들을 target으로하여 항바이러스연구가 부분적으로 진행되고있다. C형 간염바이러스는 viral polymerase (NS5B)와 두개의 protease (NS2B metalloprotease and NS3 serine protease), 그리고 helicase (NS3) 등의 효소를 갖고 있으며 이들이 모두 C형 간염바이러스의 증식에 필수적이라고 믿어지고 있다. 특히, NS3 serine protease는 가장 먼저 생화학적 특성이 밝혀진 효소이며 (Lin et al., 1994) 그 후 NS5B RNA polymerase와 NS3 helicase의 생화학적 활성이 보고되어(Behrens et al., 1995) 현재 C형 간염바이러스에 대한 항바이러스의 target으로 여러 제약회사에서 연구중이며, 단백질의 x-ray 결정구조를 얻은후 rational drug design을 계획하고 있는 것으로 알려져 있다. 또한, NS2B metalloprotease도 metal이 active site에 필요하다는 점 때문에 효소학자들에게는 매력적인 항바이러스target이라고 할 수 있다 (Reed et al., 1995). 이 외에도 최근에는 HCV E2를 native한 형태로 다량 얻을 수 있게되고 또 HCV의 putative receptor도 밝혀지면서 E2 protein을 백신개발의 주된 항원으로서 뿐 아니라 감염초기단계 blocker로서 치료제로 개발할 수 있다는 판단아래 많은 연구가 집중되고 있다.

### (iii) 항HCV제 개발연구

NS3 serine protease와 helicase는 현재 C형간염바이러스에 대한 항바이러스의 target으로 여러 제약회사에서 연구중이다. 이들중에는 Vertex pharmaceutical, Chiron, Schering/Plough등이 있으며, 단백질의x-ray 결정구조를 얻은후 rational drug design을 계획하고 있는 것으로 알려져있다. 이외에 NS5B RNA polymerase도 1999년 10월-11월에 걸쳐 세 개 실험실에서 x-ray결정구조를 성공적으로 얻어 rational drug design의 기초를 마련하였으며 Viropharma(Malvern, PA)등에서는 RdRp를 저해할 수 있는 저분자화합물을 개발하고 있으며 최근에는 Chiroscience Group plc.와 공동연구를 시작한 것으로 알려져 있다. 또 바이러스의 envelope protein과 human cell과의 binding을 저해할수 있는 농도의 envelope protein에 대한 항체가 chimpanzee에 존재할 경우 chimpanzee가 감염으로부터 치유된다는 보고와, E2의 N 말단부위에 있는 hyper variable domain(HVR1)이 주된 neutralization site라는 보고, 또 E2 protein에대한 cellular immune response가 C형 간염바이러스의 감염으로부터의 예방 및 회복되는데 중요한 역할을 한다는 등의 연구보고 들이 꾸준히 발표되고 있어 E2를 치료제 개발의 target으로 하려는 연구가 최근들어 급증하고 있다.

### (iv) HBV 증식모델연구

Fox Chase Cancer Center의 Blumberg에 의해 1963년 HBV가 만성간염의 원인 바이러스로 알려진 이래, 지난 30년간 HBV의 구조적 또는 생물학적인 특성이 상당히 밝혀졌다. 그러나, 불행히도 지난 30여년간의 연구에도 불구하고 효과적인 치료제가 아직 개발되지 못했다. HBV에 대한 항바이러스제를 개발하는데 지금까지 가장 큰 장애가 된 것은 항바이러스 연구에 적합한 HBV증식의 *in vivo*와 *in vitro* assay 모델이 없다는 사실이다. 또한, HBV는 아직까지 cell culture에서 증식이 불가능하며 또한 침팬지이외는 감염이 가능한 동물모델이 없기때문에 항바이러스제개발 뿐 아니라 HBV의 복제기전의 molecular mechanism을 연구하는데는 어려움이 많았다. 다행히도 지난 10여년간 HBV와 유사한 유전적, 생물학적 특성을 갖는 hepadnavirus family에 속하는 animal virus가 알려지면서, 이들 동물모델을 이용하여 연구가 가능하게 되었다. 아직도 초기감염이 가능한 susceptible cell line은 알려진 것이 없으며, 또한 HBV의 DNA polymerase의 reverse transcriptase activity가 최근까지도 *in vitro* 에서 재현되지 못했었다.

#### (v) 항HBV target

일반적으로 가장 바이러스학자들이 선호하는 항바이러스 target은 viral polymerase이다. HBV의 DNA polymerase는 DNA polymerase 활성 뿐 아니라 역전사활성(RNA-directed DNA polymerase)도 갖고 있으므로 매우 매력적인 target이라고 할 수 있다. 이외에도, HBV의 X 유전자(transcriptional transactivator)가 HBV의 발암성과 긴밀히 관련이 있다는 결과가 문헌에 보고되어있어 X 유전자가 또한 항HBV target으로 주목을 받고 있다 (Wang et al., 1994; Kim et al., 1991).

#### (vi) 항HBV제 개발연구

HBV의 감염이 문제가 되지 않는 구미에서는 최근까지도 HIV 나 Herpes virus에 비하여 HBV에 대한 항바이러스제 개발에 대한 투자가 매우 미약했다. HBV와 HIV는 공히 역전사효소를 이용하여 바이러스의 유전자를 복제한다. 이러한 유사성 때문에 HIV연구에 많은 투자를 한 구미제약회사에서 HBV 저해제에도 관심을 갖게되었고, HIV 저해제로 발굴된 약물의 HBV 저해효과를 측정해왔다. 특히, 주목할 것은 최근에 HIV 저해제로 발굴된 Lamivudine (3TC)이 우수한 항HBV 저해효과가 있다고 보고되고 있으며, 현재까지의 Phase II trial 결과는 매우 고무적이다 (Schalm et al., 1995).

일반적으로, 항바이러스제 발굴전략은 단백질의 결정구조를 밝힌후 저해제를 설계하는 rational drug design approach와 chemical library로 부터 screening하여 lead compound를 발굴하는 screening approach가 있다. HBV의 DNA polymerase는 아직 결정구조가 밝혀져있지 않아서 rational approach는 현재 불가능하다. 또한, HBV가 transform된 세포주 (e.g., HepG2 2.2.15)를 이용한 drug screening이 가능하나, 이 assay의 sensitivity와 재현성에 문제가 있는 것이 보고되고 있다(Lampertico et al., 1991).

### 2 국내의 경우

#### 가. 항HCV제 개발연구

국내에서도 여러 연구실에서 NS3 serine protease를 C형 간염바이러스에 대한 항 바이러스의 target으로 연구중이다. 이들 중에는 포항공대의 장승기박사와 (Hahm et al., 1995) LG화학기술연구원의 이태규박사등이 있다. 또한, NS3 helicase에 관한 연구가 포항공대 한 장현 박사연구팀, 과학기술원의 최준호박사, 포항공대 오병하박사 연구실에서 수행되

고 있다. NS5B RNA dependent RNA polymerase의 경우 본 연구팀을 비롯한 한림대 황순봉 박사팀이 연구해 왔으며 HCV E2에 대한 연구는 포항공대 성영철박사팀에 의해 오랫동안 많은 연구가 수행되어 왔다.

#### 나. 항HBV제 개발연구

HBV 감염율이 세계 최고인 한국에서 간염바이러스에 대한 기초연구는 매우 미약하다. 이러한 미약한 기반에서 국내 제약회사에서 관심을 갖고 있었으나 지금까지의 성과는 기대에 미치지 못했다. 현재, 몇몇 제약회사에서 항HBV project를 수행하고 있으며 이들중에는 동아제약, 녹십자, LG화학, 중외제약등이 있다. 또한, 서울대학교의 노현모박사, 정구홍박사 (Lee et al., 1993) 그리고 생명공학연구소의 이영익박사 연구실에서 기초연구가 활발히 진행되고있다.

### 3 조사연구개발사례에 대한 평가

앞에서 기술하였듯이, HBV와 HCV에대한 항바이러스제 개발은 국내 뿐 아니라 세계적으로도 매우 미약했다고 할 수 있다. 따라서 항바이러스 연구에 필수적인 적합한 in vitro모델이 부족하였으며, 또한 x-ray 결정구조연구 등의 구조생물학도 최근들어 조금씩 밝혀지기 시작했다. 따라서 이러한 rational approach에 필수적인 기반기술이 어느정도 확립되어있는 BRI 연구팀과 분야별 전문성을 가진 국내연구진들이 협력하면 국제적으로 경쟁력있는 연구성과가 가능하리라 판단된다.

#### 가. 세부기술사항의 검토분석

##### (1) 국.내외 기술수준 비교표

간염바이러스에 대한 항 바이러스제 개발연구는 여러 분야의 전문인력이 협동하여야 가능한 과제이다. 구체적으로, 분자생물학, 생화학, 구조생물학, 의약화학, 신약평가등의 분야가 필요하다. 이 분야들은 대체적으로 국내에서도 선진국 수준의 연구가 진행되고 있으며 본 연구과제의 연구책임자들도 선진국 수준의 연구를 수행하고 있다.

##### (가) 외국의 경우

미국, 유럽, 일본 등의 선진국에서는 매년 몇가지의 신약이 개발되고 있으나, 그 이외의 국가에서는 신약개발성과가 매우 미약하다.

(나) 국내의 경우

국내에서는 아직 신약개발의 성과가 없으며, 아직까지 me-too 제품이 신약개발의 주종을 이루고있다.

(3) 기존 공정방법, 기술의 사례를 조사하여 다음 사항에 걸쳐 평가분석함

(가) 기술적인 평가 : 적용의 난이성, 기술수준 등

(나) 경제적인 평가 : 제조원가, 투자규모 등

(다) 산업기술에 미치는 파급효과 분석

(4) 주요관련기술의 검토

분자유전학기술: 국내에서도 선진국 수준의 분자유전학 기법이 수행되고 있다.

생화학기술: 국내에도 선진국 수준의 생화학 기법이 수행되고 있다.

구조생물학기술: 국내에도 몇 개의 대학과 연구소에 첨단 X-ray 장비와 고급인력이 있으며, 최근에 활발한 연구가 진행되고 있다.

신약평가기술: 국내의 신약개발분야중 가장 부족한 부분이지만 화학연구소등에는 선진국수준의 신약평가능력이 갖추어지고 있다.

상기와 같이 국내에서도 여러 기관에서 부분적으로 선진국 수준의 연구가 진행되고 있으며 연구를 수행할 과학자들이 있다. 그러나, 신약개발에 관한 각기 상이한 분야를 빠른 시일내에 integrate 할 수 있는 기관은 아직 없다고 사료된다. 이에 비해 호주 BRI는 상이한 여러 분야의 연구가 in-house로서 지난 10여년간 상호 상승적으로 진행한 경험이 있으며 (예: 독감치료제인 Relanza개발) 이점이 간염치료제를 조속한 시일내에 개발할 수 있는 가장 큰 potential이라고 생각한다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 HCV Replication assay system 구축 및 활용(목암)

#### 1. 연구수행 내용

##### 가. HCV NS5B 단백질의 발현과 이용

##### (1) LysN-NS5B 단백질의 발현 및 정제

plysN-NS5B $\Delta$ 를 HMS174(DE3) plysE에 transformation시킨 재조합 균주의 single colony를 LB media(containing ampicillin 50  $\mu$ g/ml and chloramphenicol 30  $\mu$ g/ml)에 접종 후 37°C에서 overnight 동안 배양하여 seed culture를 준비하였다. 이를 같은 조성의 LB media에 1/100 dilution 하여 OD 600에서 흡광도가 1.0이 될 때까지 37°C에서 배양한 후, IPTG를 1mM 되도록 첨가하여 4시간 더 배양하였다.

Cell을 원심분리로 수확한 후 2 volume의 buffer A에 resuspension 시켜 얼음 속에서 30분간 sonication 하였다. 분쇄물을 12,000rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 상층액에 30% 포화 농도가 되도록 ammonium sulfate를 가하여 다시 10,000rpm에서 25분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이 상층액을 buffer A에 대하여 dialysis 한 다음 UNO S6 column(Biorad)을 통과 시켰다. buffer A와 1M NaCl을 포함한 buffer A와의 gradient하에서 단백질을 분리하였고, 여기서 얻은 단백질 용액에 50% 포화 농도가 되도록 ammonium sulfate를 가하여 침전시켰다. 이 침전물을 buffer A에 녹여 Superdex 75(Pharmacia) 하에서 전개시켜 얻은 fraction을 50% 포화 농도의 ammonium sulfate solution으로 만들어 침전시켰다. 이를 buffer B에 녹여 dialysis에 의하여 ammonium sulfate를 제거하였다.

Buffer A : 50mM sodium phosphate (pH6.8), 100mM NaCl, 0.25M sucrose, 10% glycerol, 10mM DTT, 1mM EDTA, 0.1mM sucrose monolaurate, 0.02% NaAzide, Protease inhibitors

Buffer B : 50mM Tris-Cl (pH6.8), 100mM NaCl, 0.25M sucrose, 10% glycerol, 10mM DTT, 1mM EDTA, 0.1mM sucrose monolaurate, 0.02% NaAzide, Protease inhibitors

##### (2) LysN-NS5B 단백질의 효소 활성 분석

LysN-NS5B 단백질의 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) activity assay를 위하여, poly(A) (Pharmacia)를 template로, oligo(dT)<sub>12-18</sub> (Pharmacia)를 primer로 하는 polyuridylylation activity assay system을 사용하였다. 효소 활성 측정을 위한 표준 반응 조건은 다음과 같았다. 50mM Hepes (pH 8.0), 25mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 1mM EDTA, 10  $\mu$ M UTP, 2.0  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP, 50ng/ $\mu$ l actinomycin D (Sigma), 20  $\mu$ g/ml



rifamycin (Sigma), 10U RNasin (Gibco-BRL), 0.2  $\mu$ g purified LysN-fused NS5B, 100  $\mu$ g/ml poly(A), 10  $\mu$ g/ml oligo(dT)<sub>12-18</sub> 의 조성을 가진 20  $\mu$ l의 반응액을 30°C에서 120분간 반응시켰다. 이 반응액에 EDTA를 최종 농도 10mM가 되도록 첨가하여 반응을 중지시킨 후, 반응액 전체를 DE81 filter disc (whatman)에 얹어 공기 중에서 말렸다. 이 disc들을 0.5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 용액에서 3번, DW에서 1번, 100% ethanol에서 1번 씻어 공기 중에서 말린 후 liquid scintillation analyzer (PACKARD)에서 radioactivity를 측정하였다. 효소 활성에 대한 각 조건의 최적화 실험의 경우 별도로 조건을 명시하였다.

또한 poly(A)-dependent polyuridylylase 활성에 대한 negative control로서 oligo(dT)<sub>12-18</sub>를 oligo(dA)<sub>12-18</sub>로 대체한 사용한 반응액을 조성하여 사용하였으며, RdRp 활성에 대한 positive control로서 *E. coli* RNA polymerase의 RdRp 활성을 이용하였다.

기질 UTP에 대한 Km값을 구하기 위한 실험에서는 효소량 0.2  $\mu$ g으로 고정하고 UTP 이외의 기질인 poly(A), oligo(dT)<sub>12-18</sub>에 대해서는 그 양을 주어진 효소량에 포화 되도록 각각 2  $\mu$ g, 0.2  $\mu$ g으로 고정하여 사용하였다. UTP 농도는 0.5  $\mu$ M에서 50  $\mu$ M의 범위 내에서 7개 지점을 잡아 사용하였다. 사용한 반응 조건에서 생성물의 양은 반응 시간 10-120분 내에서 비례적인 증가를 보였으므로 각 UTP농도에서의 초기 속도는 반응 시간 60분에서의 값을 사용하였다.

### (3) *Actinomyces* culture broth를 이용한 HCV RdRp에 대한 inhibitor candidate의 screening

160 strains의 *Actinomyces*의 culture로부터 supernatant 원액을 polyuridylylation activity assay의 30  $\mu$ l standard reaction에 첨가하여 저해 정도를 알아보았다. 1차 screening을 통하여 0.1U에서 10%이하로 RdRp activity 저해시키는 12개를 선별한 후, 2차 screening을 통하여 다시 8개를 선택하였다. 이 8가지의 broth에 대한 butanol-extract를 이용하여 3차 screening을 수행하였다. Screening에 사용된 시료의 양은 원액 1  $\mu$ l로부터 유래된 culture broth의 양을 1U으로 정의하여 표시하였고, 저해 정도는 배양시키지 않은 culture media 혹은 methanol만을 assay에 첨가하였을때의 activity를 100%로 하여 상대적인 값으로 표시하였다. *Actinomyces* culture broth의 butanol extraction은 다음과 같이 진행되었다. 먼저 *Actinomyces* culture broth 0.5ml에 동일 volume의 butanol을 첨가하여 vortexing 한 후 8,000g에서 5분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 이 상층액과, 하층액에 대하여 이 과정을 2번 더 수행하여 얻은 상층액들을 모아 butanol을 날려 보낸 후, 적정 volume의 methanol에 녹여 assay에 사용하였다.

## 2. 연구수행 결과

### 가. HCV NS5B 단백질의 발현과 이용

#### (1) HCV NS5B 단백질의 RdRp activity

HCV NS5B 단백질(HCV 3a isolate)에 대한 효소 활성 분석을 위하여 수용성으로 발현 정제되는 형태인 LysN-NS5B 단백질을 이용하였다. 이 단백질은 95%이상의 purity로 정제되었으며 다음과 같은 assay에 의하여 RNA dependent RNA polymerase 활성을 가짐을 확인할 수 있었다.

효소 활성 분석에는 homopolymeric RNA, poly(A)와 oligodeoxyribonucleotide, oligo(dT)<sub>12-18</sub>를 template, primer로 사용하였다. 이 효소는 primer로서 RNA에 대한 특이성은 보이지 않음을 확인할 수 있었다. 다음으로 이 system을 이용하여 얻어진 UTP incorporation은 LysN-NS5B의 RdRp activity로부터 유래되었음을 확인하고자 다음과 같은 조건을 조성하였다. 반응액에는 정제시 유래되었을 수 있는 cellular DNA-dependent RNA polymerase와 DNA로부터에 대한 저해제로서 actinomycin D를, *E. coli*에서 유래한 RNA polymerase에 대한 저해제로서 rifamycin을 첨가하였다.

또한 별도로 primer를 oligo(dA)<sub>12-18</sub>로 대체한 반응을 준비하여 HCV NS5B 이외의 다른 UTP incorporation 활성을 가진 단백질에 의한 UTP incorporation 가능성을 보정하였다. TABLE 1에 도시되었듯이 primer를 oligo(dA)<sub>12-18</sub>로 대체한 반응에서는 background 수준의 incorporation 만이 검출된 반면, oligo(dT)<sub>12-18</sub>를 사용한 반응에서는 RdRp 활성에 대한 control인 *E. coli* RNA polymerase의 활성에 미치는 cpm치가 검출되었다. 한편, rifamycin이 첨가되고 primer로 oligo(dT)<sub>12-18</sub>가 사용된 반응에서 *E. coli* RNA polymerase는 그 활성을 거의 100% 저해 받는 반면, LysN-fused NS5B는 전혀 변화를 보이지 않았다. 이를 통하여 LysN-NS5B의 활성은 오직 HCV RdRp 활성으로부터 유래되었음을 알 수 있었다.

#### (2) HCV NS5B 단백질의 enzymatic characterization

NS5B 단백질은 HCV에서 replication을 담당하는 단백질로서 HCV 증식에 필수적이다. LysN-fused NS5B 단백질에서 RdRp 고유의 활성이 확인된 바 이를 이용하여 HCV 저해제를 탐색하고자 하였다. 이를 위하여 먼저 이 단백질을 대상으로 한 assay system 구축을 위하여 반응 조건들을 최적화하였다.

먼저, polymerase의 활성에 필수적인 divalent cation에 대한 요구도를 알아 보고자 Mg<sup>2+</sup>와 Mn<sup>2+</sup>에의 농도가 효소 활성에 미치는 영향을 조사하였다(Fig1). 5mM Mg<sup>2+</sup>에서 가장 높은 활성을 보였으며, Mn<sup>2+</sup>의 경우 최적 농도인 10mM에서 Mg<sup>2+</sup>의 62%에 해당하는 활성만을 보

여 주었다. 최적 반응 온도는 30°C(Fig2)였다.

다음은 kinetic constants를 결정하기에 앞서 효소량과 template-primer 간의 ratio를 먼저 결정하였다. Enzyme titration curve(Fig3A)를 통하여 효소량 0.1 µg-0.8 µg 범위 내에서 product의 비례적 증가가 나타남을 알 수 있었다. RdRp 반응과 같은 polymerase 반응의 경우, template-primer, NTP 등의 multiple substrate가 관여한다. UTP에 대한  $K_m$ 을 구하기 위해서는 template-primer가 주어진 효소에 포화되는 것이 필요하다. 이 포화 농도를 알기 위하여 0.2 µg의 고정된 효소량 하에서 template-primer titration을 수행하였다(Fig3B). Product의 양은 100 µg/ml 이상의 template-primer에서는 더 이상 증가하지 않았으며, 400 µg/ml 이상에서는 오히려 약간 감소하였다. 이러한 inhibition은 template-primer의 효소에의 nonspecific binding에 의한 것으로 사료된다. 위 실험에 근거하여 100 µg/ml의 poly(A)-oligo(dT)<sub>12-18</sub>, 0.2 µg의 효소량이 반응의 time course를 구하는데 사용되었다. Product의 양은 0.5 µM의 UTP 농도에서도 120분의 반응 시간에 비례적으로 증가하는 것으로 나타났다(Fig3C). 이에 근거하여 initial velocity는 60분까지의 product의 양으로 결정되었다. 0.5-50 µM의 UTP 농도에서의 7개 지점에서의 initial velocity가 측정되었고 이를 통하여  $K_m$ 는 3.4 µM로 결정되었다(Fig4).

LysN-fusion 단백질의 형태로 *E. coli*에서 발현, 정제된 NS5B 단백질 0.2 µg은 poly(A)와 oligo(dT)<sub>12-18</sub>를 사용한 이 assay system에서 RdRp의 고유의 활성만을 충분히 검출해 낼 수 있음이 밝혀졌다. 따라서 이를 candidate antiviral drug을 위한 RdRp inhibitor screening에 활용하고자 한다.

### (3) *Actinomyces* culture broth를 이용한 HCV RdRp에 대한 inhibitor candidate의 screening

1차 screening에서 0.1U에서 10%이하로 RdRp activity를 저해하는 것은 160종류 중 12가지였으며, 2차 screening을 통하여 이 중에서 전체 population의 5%가 되도록 8가지로 압축하였다. 대조군으로 저해 활성을 가지지 않은 4가지(75-120%로 RdRp activity를 저해시키는 경우)도 동시에 선별하였다. 대조군을 포함한 12가지 culture broth의 butanol-extract를 이용한 3차 screening에서도 저해 양상은 1, 2차에서와 유사하게 나타났다. 이 결과를 통하여 본 과제에서 확립된 assay system은 HCV RdRp 저해 대상 물질의 screening에 이용될 수 있음을 확인하였다.

Table 1. RdRp activity of LysN-fused NS5Ba

Template-primer	poly(A)-dependent polyuridylylation activity	
	LysN-fused NS5B (cpm)	<i>E. coli</i> RNA polymeraseb (cpm)
poly(A)-oligo(dT)12-18, (-) rifamycin	116,485	203,193
poly(A)-oligo(dT)12-18, (+) rifamycin	111,443	4,500
poly(A)-oligo(dA)12-18, (-) rifamycin	2,140	2,205

a RdRp reactions were performed under the standard condition as described in Materials and Methods except the conditions specified. Two types of enzyme were tested for three sets of condition.

b 0.1U of *E. coli* RNA polymerase was used in RdRp reactions as a positive control for RdRp activity.

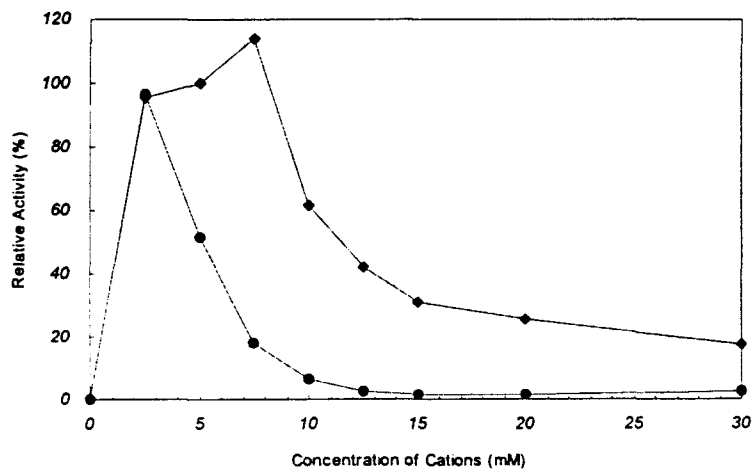


Fig.1. Effects of divalent cations on RdRp activity. Assays were performed in duplicate under the standard condition as described in Methods with the varying concentration of each salts. The enzymatic activity under the standard condition was set at 100%.

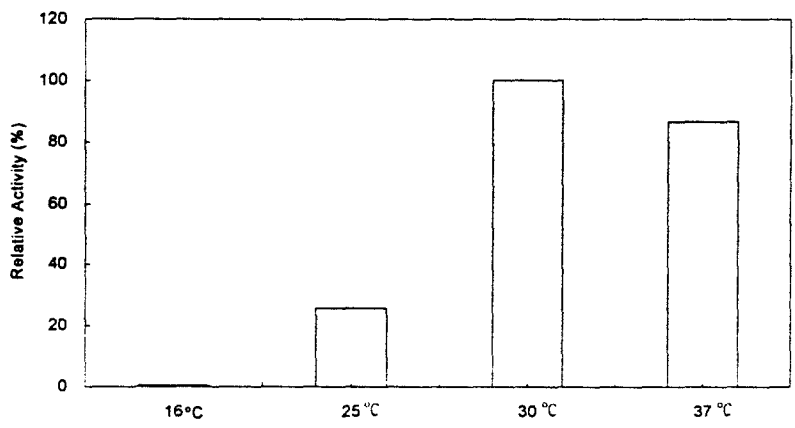
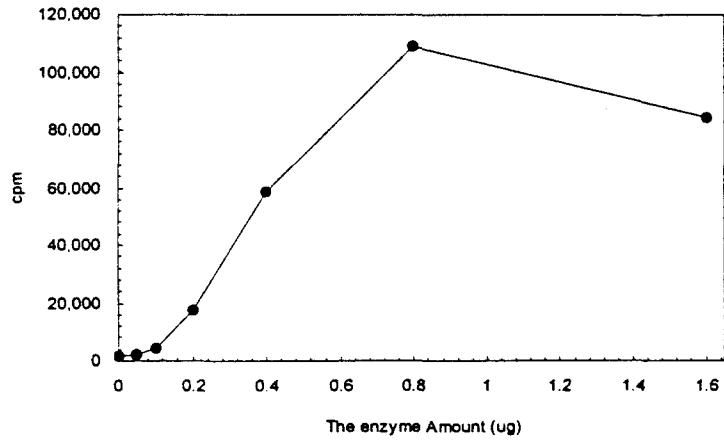
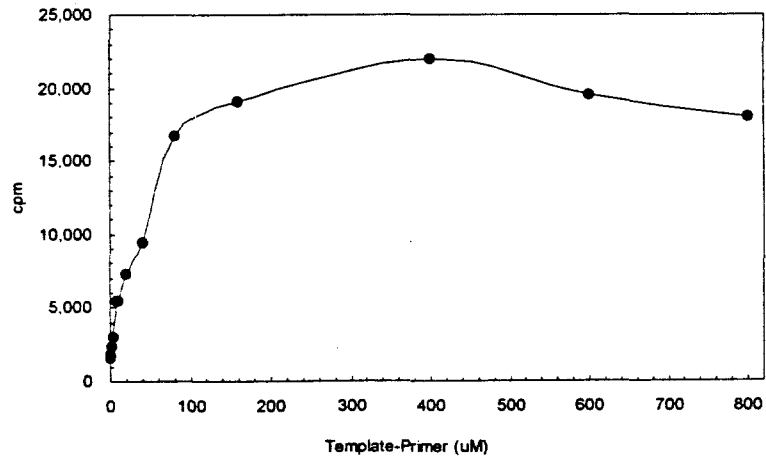


Fig.2. Effects of incubation temperature on RdRp activity. Assays were performed in duplicate under the standard condition as described in Methods with incubation temperature of 16,25,30,37°C. The enzymatic activity at 30°C was set at 100%.

(A)



(B)



(C)

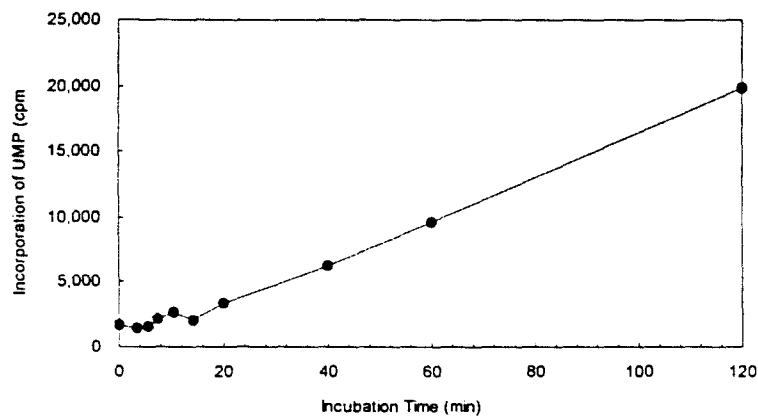
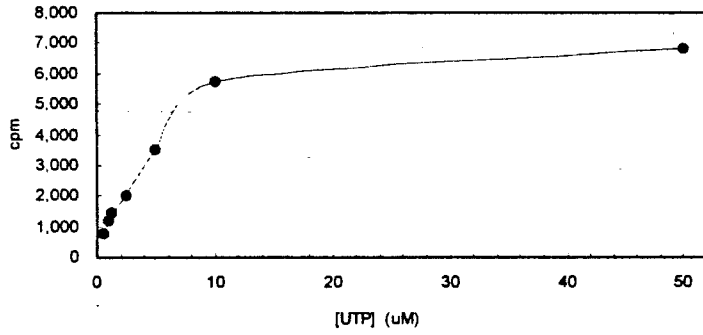


Fig.3. Determination of the ratio of template-primer to the enzyme and initial velocity of RdRp reaction. Assays were performed in duplicate under the standard condition as described in Methods except the varying parameters. (A) Effect of the enzyme amount. (B) Titration of template-primer. (C) The time course of RdRp reaction. The concentration of UTP used was  $0.5 \mu\text{M}$ .



(A)



(B)

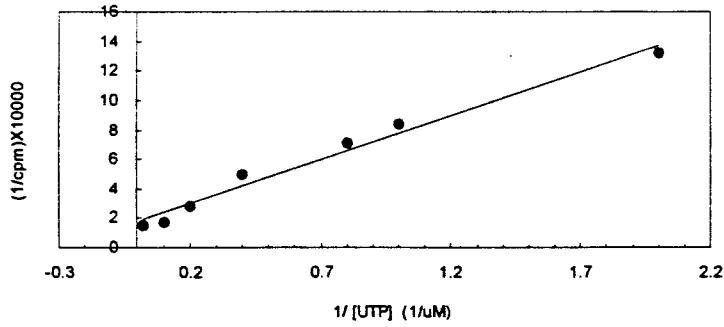


Fig.4. Determination of the  $K_m$  for UTP. Initial velocities ( $\nu_0$ ) of RdRp reaction were measured in duplicate under the standard condition as described in Materials and Methods with the UTP concentrations of 0.5, 1.0, 1.25, 2.5, 5, 10 and 50  $\mu\text{M}$ . The plot of [UTP] vs.  $\nu_0$  (A) was converted to the plot (B) by Lineweaver-Burk equation to estimate the  $K_m$ .

**Comparison of Inhibition Activity  
between BuOH-extracted Broths and Crude Broths**

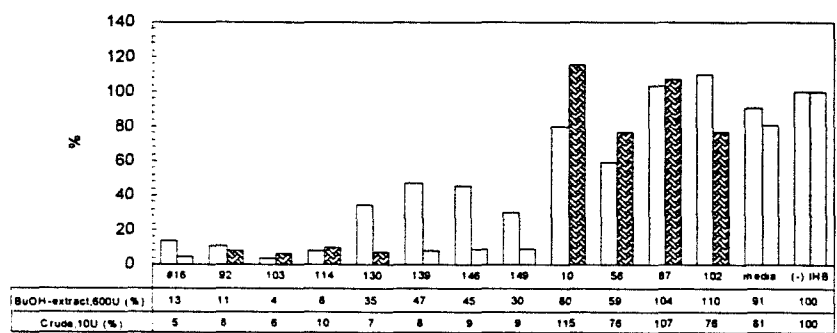


Fig.5. Comparison of inhibitory activity between buthanol-extraced broths and crude broths. Broths, #10,56,87,102 were used as negative controls for inhibitory activity.

## 제 2 절 HCV in vivo Replication assay system의 구축(목암)

### 1. 연구수행 내용

#### 가. 동물세포배양

Huh-7 cell line은 kanamycin, penicillin, streptomycin, 10% FBS를 첨가한 DMEM 또는 50 ng/ml epidermal growth factor, 1ng/ml glucagon, 10  $\mu$ l/ml insulin, 6.5 ng/ml somatostatin, 2 mM glutamin, 3.5  $\mu$ M hydrocortisone, 0.5  $\mu$ g/ml linoleic acid, 5  $\mu$ g/ml transferrin,  $1 \times 10^{-7}$  M  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $3 \times 10^{-8}$  M  $\text{H}_2\text{SeO}_3$ ,  $5 \times 10^{-8}$  M  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , penicillin, streptomycin, kanamycin을 포함하는 Ham's F-12 minimal medium에서 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ 의 조건하에서 배양하였다.

#### 나. HCV Replicon의 제조

##### (1) 전체 길이 HCV 3a cDNA 제조

호주 BRI연구소로부터 제공받은 HCV subtype 3a의 개개 cDNA clone들로부터 full-length cDNA를 제조하였다. 개개 cDNA clone은 3' UTR을 제외한 5' UTR, CORE, E1, E2, P7, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b를 서로간에 overlap되는 염기서열이 없이 expression vector 및 cloning vector에 cloning된 상태로 제공받았다. 각 cDNA들은 서로간에 homology가 없기 때문에 PCR방법을 사용하여 reading frame이 일치하도록 fusion하였다.

제조될 full-length cDNA clone의 길이가 약 9.6kb정도로 size가 크기 때문에 안정성을 고려하여 low-copy vector인 pBR322 plasmid를 변형하여 사용하였다. 변형된 cloning vector pBRSB는 pBR322 plasmid의  $\beta$ -lactamase gene과 origin of replicaton만을 포함하는 2.1kb의 *EcoRI*-*NdeI* fragment와 fusion된 cDNA를 cloning하는데 필요한 restriction enzyme site들로 구성된 multiple cloning site(MCS)로 구성되어진다. MCS는 합성 oligonucleotide들을 annealing하고 ligation하여 얻은 polylinker를 *EcoRI*-*NdeI* fragment와 ligation하여 제조하였다.

호주 환자혈청으로부터 HCV genome의 3UTR을 cloning하고자 여러 실험방법을 사용하였으나 원하는 clone을 확보할 수 가 없었기 때문에 oligomer를 이용하여 기존에 보고된 HCV-1b의 3UTR을 합성하였다.

약 270bp의 HCV-1b 3UTR 합성을 위하여 모두 5개의 48-mer내지 70-mer의 oligomer를 합성하였다. 각각 oligomer들은 sense 또는 antisense로 양끝에 서로 homology sequence를

두어 annealing될 수 있도록 제조하였다. 먼저 oligomer a와 b를 서로 annealing하고 extension하여 oligo DNA를 얻고 이 oligo DNA와 oligomer c를 template로 하여 PCR하였다. Oligo DNA의 sense strand의 3' end와 oligomer c의 3' end는 poly-UC stretch에 해당하는 부분으로 서로 homology sequence가 있기 때문에 random하게 annealing되고 extension될 수 있다. 이렇게 하여 얻은 clone들을 염기서열을 분석하여 약 55개 내지 70개 nucleotide로 구성된 poly-UC stretch를 갖는 3' UTR clone을 확인하였다.

5' UTR부터 NS5b까지의 cDNA fusion clone과 3' UTR clone은 pBRSB의 MCS에 cloning하여 pBR5U◆3UTR를 얻었다.

5' UTR 앞에는 T7 promoter를 도입하여 T7 RNA polymerase에 의한 in vitro transcription에 의하여 RNA transcript가 합성될 수 있도록 하였다.

## (2) Subgenomic replicon제조

5' UTR부터 3' UTR까지를 모두 포함하는 pBR5U◆3UTR plasmid의 core, E1, E2, p7, NS2를 제거하고 Neomycin resistance gene과 encephalomyocarditis virus (EMCV)의 internal ribosome entry site (IRES)를 치환한 pSPneo를 제조하였다.

이 subgenomic replicon은 HCV의 5' UTR에 의하여 Neomycin resistance gene이 발현되고 EMCV의 IRES에 의하여 HCV의 gene이 발현된다. Negative control로는 NS5B의 일부를 제거한 pSPneo/NS5B Δ를 제조하였다.

또한 pSPneo로부터 NS3부터 NS5a까지를 제거하여 HCV nonstructural gene으로는 NS5b만을 포함하는 pSPneo/NS5B를 제조하였고 또한 NS5b의 5' 말단에 LYSS 유전자의 5' 말단 일부를 결합시킨 pSPneo/lysN-NS5B를 제조하였다.

## (3) In vitro transcription

제조된 plasmid들로부터 RNA transcript를 얻기 위하여 먼저 3' 말단에 대한 제한효소를 처리하여 linearization하고 phenol extraction하여 정제하였다. 이를 electroelution하여 RNA transcription template로 사용하였다. Transcription반응은 NTP (2.5 mM) 10 μl, 10x Buffer 2.5 μl, linearized DNA (2 μg) 10 μl, RNase inhibitor (30-60 U.) 1 μl, T7 RNA polymerase (5-20 U.) 1 μl, D.W. 0.5 μl 를 첨가하여 37°C에서 2시간 방치하였고, RNA합성이 끝나면 phenol extraction 후에 3 M sodium acetate 10 μl 와 isopropyl alcohol 72 μl를 첨가하여 -70°C에서 30 분 간 놓아 두었다가 4°C, 12000 rpm에서 15 분 간 원심분리하여 얻은 RNA pellet을 70% ethanol로 washing하여 말리고 50 μl의 TE를 첨가하

여 녹였다.

#### (4) RNA transfection

In vitro transcription하여 얻은 RNA는 다음의 방법으로 Huh-7 cell line에 transfection하였다. 적절농도( $2-3 \times 10^5$ )의 세포를 35 mm dish에 접종하여 80% confluent하도록 DMEM (10% FBS+antibiotics) 1.5ml로 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양한다.

Transfection 직전에 배지를 OPTI-MEM 2ml로 교체하고, RNA-Lipofectamine complex가 준비될 동안 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양한다. RNA-Lipofectin complex는 polystyrene tube에 1ml의 OPTI-MEM 첨가 후 Lipofectin reagent 10-15  $\mu$ l, 2.5-5  $\mu$ g RNA를 넣어 준비한다. 각 dish의 배지를 RNA-Lipofectin complex로 교체하고, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 4시간 배양한다. 4시간 후 serum-free Ham's F-12 medium으로 교체하고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 조건하에서 배양하였다.

Electroporation법에 의한 RNA transfection은 Bio-Rad Gene pulser를 이용하여 0.4 cm cuvette에서 960  $\mu$ F, 300 V의 조건으로 진행하였다.

#### 다. In vivo Replication assay

##### (1) Strand-specific RT-PCR

Huh-7 cell로부터 total RNA 분리는 Trizol reagent (GibcoBRL)를 사용하여 수행하였다. 35 mm dish에서 자란 cell에 1 ml의 Trizol reagent를 넣어 수 회 pipetting한 후 1.5 ml tube로 옮기고 0.2 ml의 chloroform을 넣고 흔들고 5 분 정도 방치하였다. 4°C, 12000 rpm에서 15 분 간 원심분리하여 분리된 상층액을 새로운 1.5 ml tube로 옮기고 0.5 ml isopropanol을 첨가하고 4°C, 12000 rpm에서 15 분 간 원심분리하여 얻어진 pellet은 70 % ethanol로 2회 세척하고 실온에서 건조한 후 nuclease-free D.W.에 현탁시키고 Spectrophotometer를 사용하여 정량하였다.

cDNA합성을 위한 reverse transcription 반응은 Superscript first-Strand Synthesis System을 사용하여 수행하였다. 1-5  $\mu$ g의 RNA에 sense primer 10pmol, 10 mM dNTP mix 1  $\mu$ l를 포함하는 10  $\mu$ l의 혼합액을 65 °C에서 5 분 간 가열하고 얼음에 1 분 간 방치하였다. 10× RT buffer 2  $\mu$ l, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ l, 0.1 M DTT, ribonuclease inhibitor 1 $\mu$ l, Superscript II RT 1 $\mu$ l(50u)를 첨가하고 42°C에서 60 분 간 반응시켰다. 70°C에서 15 분 간 열을 가하고 얼음에 방치한 후 RNase H 1 $\mu$ l를 넣고 37°C에서 20 분 동안 반응시켜 RNA를 제거하였다.

(-) strand를 확인하기 위한 PCR반응은 reverse transcription에 의하여 얻어진 cDNA 5 $\mu$ l를 template로 사용하여 진행하였다.

## (2) In vitro translation of HCV 3a cDNA

### (가) DNA 조작

HCV cDNA로부터 polypeptide가 적절히 합성되는지를 조사하기 위하여 core부터 NS5b까지, core로부터 p7까지, NS2로부터 NS4b까지, NS5a로부터 NS5b까지의 partial cDNA를 먼저 pcDNA 3.1(+) (Invitrogen)로 subcloning하였다.

### (나) In vitro translation

In vitro translation은 Promega의 TNT Coupled Rabbit Reticulocyte Lysate System을 사용하여 수행하였다. 반응은 rabbit reticulocyte lysate 25  $\mu$ l, reaction buffer 2  $\mu$ l, T7 RNA polymerase 1  $\mu$ l, amino acid mixture (minus methionine) 1  $\mu$ l, [<sup>35</sup>S]-methionine 2  $\mu$ l, Ribonuclease inhibitor 1  $\mu$ l, DNA template 1 $\mu$ g을 포함하는 50 $\mu$ l 반응액에서 30 $^{\circ}$ C에서 90 분 동안 진행하였다.

## 2. 연구수행 결과

### 가. 전체 길이 HCV 3a cDNA 및 replicon들의 제조

HCV 각 유전자들을 PCR방법을 이용하여 서로 결합시켜 얻은 5' UTR로부터 NS5b까지의 fusion cDNA를 pBR322를 변형하여 만든 pBRSB에 subcloning시켰다. 3' UTR은 이미 보고된 HCV 1b의 sequence를 참조하여 합성하였고 NS5b의 뒤에 cloning시켜 HCV subtype 3a에 대한 full-length genomic cDNA를 제조하였고(Fig. 6) 이를 기반으로한 다양한 replicon들이 제조 되었다(Fig. 7).

HCV의 3UTR은 모두 3개의 region으로 구분되는데 NS5b뒤쪽의 약 30bp정도로 이루어진 부분과 poly-UC stretch, 그리고 highly conserved 98 nucleotide region으로 구성되어 있다.

Poly-UC stretch는 같은 genotype내에서도 size 변이가 심한 것으로 보고되고 있는데 20 nucleotide부터 100 nucleotide 이상으로 다양하다. 그러나 이러한 size 변이가 HCV의 replication에 어떠한 영향을 미치는 지 아직 밝혀지지 않았기 때문에 본 실험에서는 Shimotohno group에 의하여 보고된 HCV-1b의 3UTR sequence중에서 약 95개 nucleotide로 구성된 poly-UC stretch를 갖는 3UTR sequence를 선택하였다.

#### 나. Subgenomic replicon의 복제 능력 조사

pSPneo, pSPneo/NS5B  $\Delta$ , pSPneo/NS5B, pSPneo/lysN-NS5B를 template로 사용하여 in vitro transcription에 의하여 합성된 RNA transcript들은 OD<sub>260</sub>에서의 흡광도를 이용하여 정량한 후에 denaturing formaldehyde gel에서 full-length RNA양을 조사하였다(Fig. 8). 합성된 RNA는 lipofectin 또는 electroporation법에 의하여 liver cell line인 Huh-7 cell에 transfection하였다. Transfected cell은 growth factor로 보충된 serum-free Ham's F-12에서 계대배양하였다. 일정 기간동안 계대배양된 transfectant들에 대하여 도입된 (+) strand RNA로부터 HCV genome이 복제하는 과정에 생성되는 중간체인 (-) strand가 합성되었는지를 (-) strand-specific RT-PCR법을 사용하여 조사하였다.

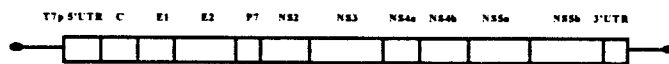
Transfection 초기의 transfectant들에 대한 (-) strand-specific RT-PCR에서는 transfection시에 도입된 RNA transcript들에 의한 nonspecific product들이 1차 PCR반응에서 관찰되어 (-) strand의 합성유무를 구별할 수 없었다. 그러나 일정기간 계대배양된 transfectant들로부터는 1차 PCR반응에서 관찰되지 않았고 2차 nested PCR에서 (-) strand 중간체에 의하여 생긴 것으로 추정되는 PCR product들을 얻을 수 있었다. lipofectin을 사용하여 tranfection시킨 Huh-7 transfectant들에 대하여는 20일 동안 배양한 세포에 대하여 조사하였고 electroporation법을 사용하여 transfection시킨 Huh-7 cell에대하여는 18일 동안 계대배양한 세포에 대하여 RT-PCR을 수행하였다. pSPneo, pSPneo/NS5B  $\Delta$ 로부터는 lipofectin transfection과 electroporation법 모두에서 (-) strand의 존재를 관찰할 수 없었다. 그러나 pSPneo/NS5B, pSPneo/lysN-NS5B로부터는 20일 계대배양한 lipofectin transfectant와 18일 계대배양한 electroporation transfectant들로부터 2차 nested PCR에서 (-) strand 중간체에 의하여 생긴 것으로 추정되는 PCR product들을 관찰할 수 있었다 (Fig. 9).

#### 다. HCV 3a cDNA로부터 polypeptide 합성 조사

HCV 3a cDNA로부터 온전한 길이의 polypeptide가 합성되는지를 조사하기 위하여 약 3kb 정도의 cDNA를 pcDNA 3.1에 subcloning(Fig. 10)하고 TNT rabbit reticulocyte lysate를 사용하여 in vitro translation을 진행하였다. 양성대조군으로는 62kDa 정도의 luciferase를 사용하였고 음성대조군으로는 template를 넣지 않은 반응액과 template로 pcDNA 3.1을 사용한 반응액을 사용하여 translation반응이 적절히 진행되었음을 확인하였다. 구조유전자를 발현하는 pcDNA/core $\blacklozenge$ p7으로부터는 구별이 되는 protein band를 관찰할 수 없었고 대신

넓게 퍼진 band만을 관찰할 수 있었는데 processing이 되지 않는 core-E1-E2-p7 polypeptide가 hydrophobic 성질을 지니어서 aggregation되어 SDS-PAGE gel에서 명확히 분리되지 않아 나타나는 것으로 사료된다. 이와 같은 현상은 HCV 전체 open reading frame을 발현하도록 한 pcDNA/core◆NS5B에서도 관찰되었다. pcDNA/NS2◆NS4B로부터는 NS3-NS4a-NS4b fusion polypeptide, NS4a-NS4b fusion peptide, NS3로 추정되는 product들을 관찰하였는데 viral protease NS2와 NS3가 적절히 발현되고 proteolytic activity를 유지하여 polypeptide processing이 진행되어 생성된 것으로 사료된다. pcDNA/NS5A◆NS5B로부터는 NS5A와 NS5B의 fusion product로 추정되는 약 125 kDa 정도의 band를 관찰할 수 있었다(Fig. 11).





**Fig 6. Genetic map of full-length HCV 3a cDNA**

pSPneo



pSPneo/NS5B



pSPneo/lysN-NS5B

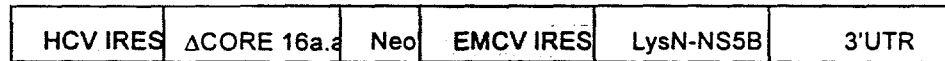
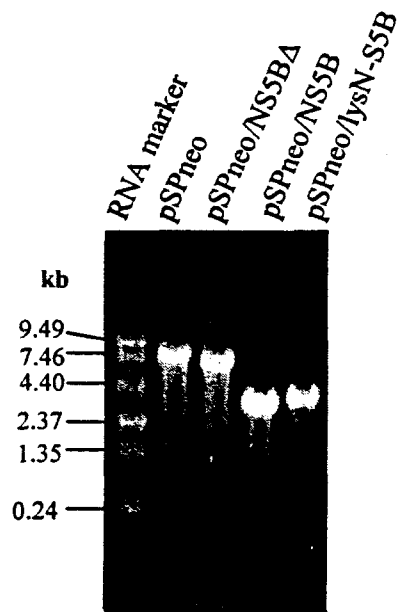
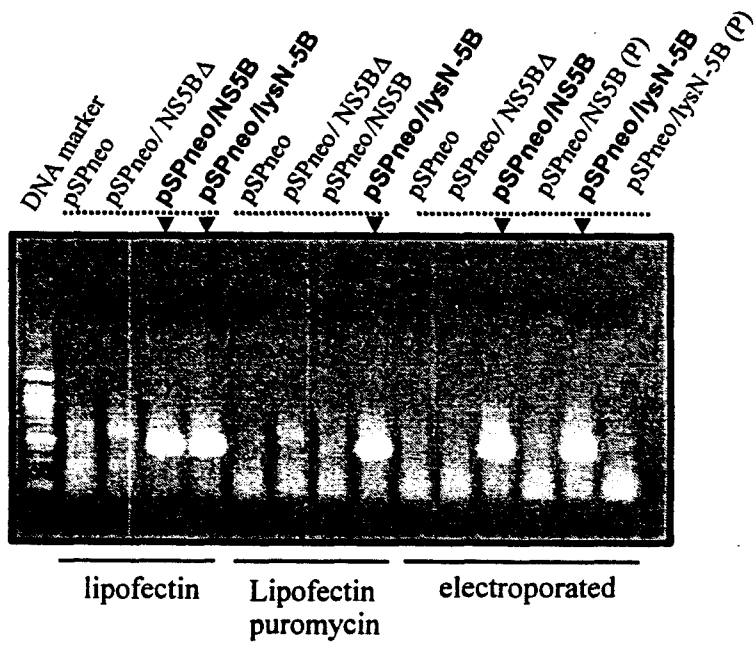


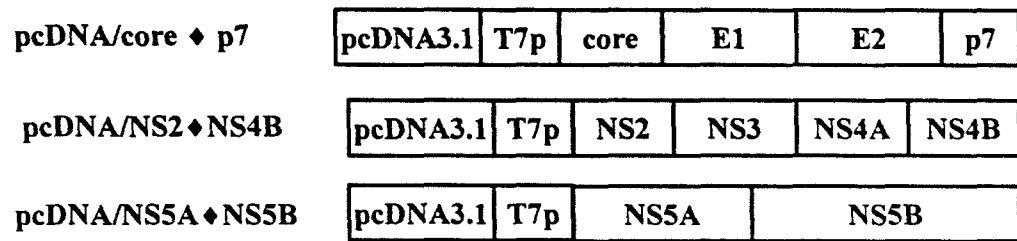
Fig 7. Genetic Map of HCV 3a Subgenomic Replicons



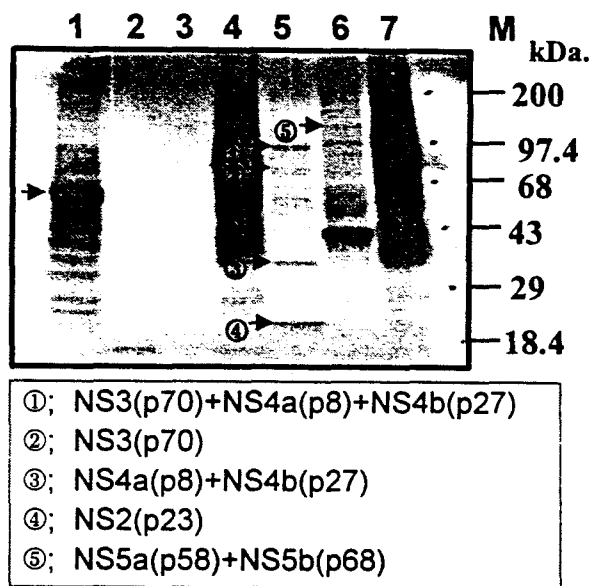
**Fig 8. In vitro transcription of Subgenomic Replicon**



**Fig 9. Negative-strand specific RT-PCR**



**Fig 10. Construction of partial cDNA clone for in vitro translation**



**Fig 11. In vitro translation of HCV cDNA**

lane 1; + control, luciferase 62 kDa M; prestained marker (GibcoBRL)  
 lane 2; -control, without template lane 3; - control, pcDNA3.1  
 lane 4; pcDNA/ core ♦ p7 lane 5; pcDNA/ NS2 ♦ NS4B  
 lane 6; pcDNA/ NA5a ♦ NS5B lane 7; pcDNA/ core ♦ NS5B

### 제 3 절 HCV의 recombinant NS5B와 viral RNA의 상호작용(목암)

#### 1. 연구수행 내용

##### 가. Purification of LysN

실험에 사용한 NS5B는 LysN과 His-tag에 fusion된 상태이며, 이를 LysN-NS5B라고 한다. 이 LysN-NS5B의 control protein인 His-tag fused LysN의 정제 과정은 다음과 같다. 37℃에서 overnight culture한 pLysN(pLysS)/BL21(DE3) cell을 1/100로 묽혀서 OD<sub>600</sub>이 0.4-0.6 범위에 들어갈 때까지 culture한다. 200ml에 해당하는 cell culture 산물을 4,000rpm에서 10min 동안 harvest하여 10ml의 extraction buffer(50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl)에 녹인다. 이를 sonication 한 후, 4℃, 12,000rpm에서 30min centrifugation한 supernatant를 2ml의 Metal Affinity Column(TALON)과 섞어서 실온에 20min 방치한다. 이를 10ml의 washing buffer(50mM sodium phosphate, 300mM NaCl, 5mM imidazole)로 2-3번 반복해서 씻어준다. 그리고, resin에 남아있는 His-tag fused LysN을 2ml의 elution buffer(50mM sodium phosphate, 300mM NaCl, 150mM imidazole)로 2번 elution한다. elution한 protein은 4℃에서 CE buffer(50mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 100mM NaCl, 5mM DTT, 1mM EDTA, 10% glycerol, 0.25M sucrose, 0.02% sodium azide)로 dialysis한 후, centricon으로 농축한다. protein의 농도는 Bradford method로 측정하였다.

##### 나. Preparation of nucleic acid

###### (1) PCR primer design

HCV 3a type의 필요한 gene을 얻기 위해서 PCR primer를 다음과 같이 고안하였다.

###### 5' primers

8760(+) : ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGA GGA GGT ACT ATT TC

9080(+) : ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GTC GCG GGG ACA CTC AGG

9406(+) : ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCT GGT AAG ATA ACA CTC CA

###### 3' primers

9636(-) : ACT TGA TCT GCA GAG AGG CCA GTA TC

9405(-) : TCA CCG AGC TGG CAG GAG AAA GAT G

9079(-) : TAT TGA GCT CTA CTG GAG AGT AAC

5' primer에는 cloning과정을 거치지 않고 PCR product를 바로 in vitro transcription 하기 위하여 모두 T7 promoter sequence를 삽입하였다.

## (2) PCR amplification and DNA purification

PCR의 template는 HCV genome이 부분적으로 cloning된 plasmid를 사용하였다. 각각의 primer를 combination하여 필요한 위치의 viral gene을 amplification하였다. PCR 반응은 95℃에서 1min denaturation, 45℃에서 45sec annealing, 그리고 72℃에서 45sec extension하였다. PCR product는 agarose gel에서 확인한 후, gel extraction kit(Qiagen)를 사용하여 정제하였다.

## (3) in vitro transcription and RNA labeling

정제된 PCR product는 T7 promoter를 지니고 있기 때문에, T7 MEGAscript kit(Ambion)을 이용하여 RNA를 대량 expression하였다. probe로 사용하기 위한 RNA의 in vitro transcription 반응에는 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP나 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP를 rNTP mix에 첨가하여 반응을 수행하였다. 이들 각각의 RNA는 urea-polyacrylamide gel에서 확인한 후 정제하였다. 정제된 RNA의 농도는 UV-spectrophotometer나 scintillation counter를 이용하여 결정하였다.

## 다. RNA와 protein의 상호작용

### (1) North-western

SDS-PAGE에서 protein을 분리한 후 nitrocellulose membrane으로 transfer한다. 이 membrane을 BSA로 blocking한 후, probe RNA와 binding buffer(10mM HEPES, pH 7.6, 0.3mM MgCl<sub>2</sub>, 40mM KCl, 5% glycerol, 1mM DTT)에서 30min간 실온에서 결합시킨다. 이를 binding buffer로 2-3번 washing한 후, membrane을 wrap으로 싸서 X-ray film에 exposure한다.

### (2) gel mobility shift assay

2 fmol의 probe RNA와 0.8 pmol의 protein을 20  $\mu$ l binding buffer에 첨가한다. 이때, competitor로 사용할 cold RNA의 양을 점점 증가시킨다. 이를, 30℃에서 15min 동안 결합시킨 후, acrylamide:bis = 70:1인 4% native gel에서 running한다. running buffer는 0.25X TBE이며, 과열되지 않도록 일정하게 낮은 current와 온도를 유지한다. 그리고, running buffer도 매 시간마다 새 buffer로 교환한다.

## 2. 연구수행 결과

HCV의 NS5B는 RNA dependent RNA polymerase로서의 기능이 오래 전부터 알려져 있었지만, 정제상의 어려움으로 인하여 연구에 많은 지연이 있어왔다. 하지만, 최근 들어 recombinant를 이용한 정제방법이 개발됨으로 인하여 in vitro에서의 분자생물학적 활성연구에 상당한 진전이 있었다.



NS5B가 효소로서의 기능을 하기 위해서는 일차적으로 substrate와 결합해야한다. 현재 까지 NS5B가 specific하게 결합할 것으로 보고된 ligand는 두 가지가 있는데, 하나는 자신의 coding region인 NS5B gene의 3' 말단 부위와, 다른 하나는 3' UTR의 poly(U)와 X RNA region일 것이라는 주장이 양립하고 있다.

본 실험에서는 두 region 모두를 포함하는 HCV의 RNA를 넓은 범위에서 점점 줄여가면서 NS5B에 강하게 결합하는 부위를 competition assay를 이용하여 찾았다. 이로부터, NS5B가 결합하는 부위는 자신의 coding region이며 최소한 두 군데 이상이 존재함을 알았다. 앞으로, HCV 전체 genome에 있어서 NS5B와 interaction하는 부위가 더 존재하는지 포괄적으로 연구해야 할 필요성이 있다. 이러한 연구로부터, HCV의 life cycle에 중요한 NS5B의 enzymatic mechanism을 밝혀내고, 또한 강력한 ligand의 발견은 inhibitor의 개발에 새로운 시작점이 될 수 있을 것이다.

#### 가. Protein identification

LysN을 정제하는 과정 중의 fraction과 정제된 LysN과 LysN-NS5B protein에 대하여 LysN antibody와 His antibody를 이용하여 western analysis를 수행하였다 (Fig. 12). 이로부터 정제된 protein이 각각 LysN과 LysN-NS5B임을 확인할 수 있었다. LysN은 비교적 purity가 높지만, LysN-NS5B는 SDS-PAGE상에서 다른 contaminant가 많이 존재하였다 (data not shown). 하지만, 이들 대부분이 intact한 protein의 cleavage form이고 major product로서 intact protein이 존재하기 때문에 enzymatic 활성 연구를 이 protein으로 진행하였다.

#### 나. Ligand RNA의 design

RNA-protein 상호작용 연구에 사용될 RNA ligand는 크게 두 영역을 기준으로 고안되었다 (Fig. 13). 하나는 coding region이며, 다른 하나는 uncoding region이다. coding region의 경우 거의 600nt의 size를 지니며, NS5B gene의 3'에 해당된다. 3' UTR은 염기 서열 상의 특징에 의하여 variable sequence, poly(U) 그리고 X RNA의 세부분으로 나뉜다.

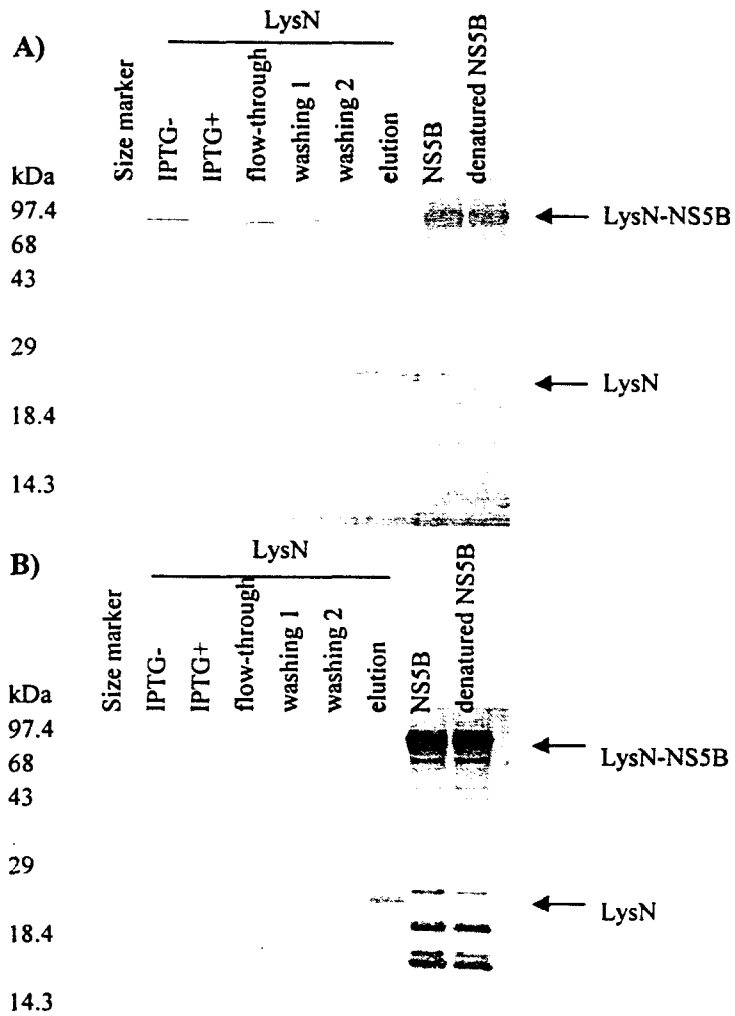
#### 다. North-western analysis

정제된 protein과의 specific한 결합성을 North-western analysis로 확인하였다 (Fig.14). 사용한 probe RNA(CR+3'UTR)와 LysN-NS5B는 강하게 결합하지만, control protein인 LysN이나 BSA는 전혀 결합하지 않음을 알 수 있다. 또한, SDS에서 denaturation된 LysN-NS5B 역시 denaturation 되지 않은 protein에 비하면 결합력이 떨어지지만, 상당

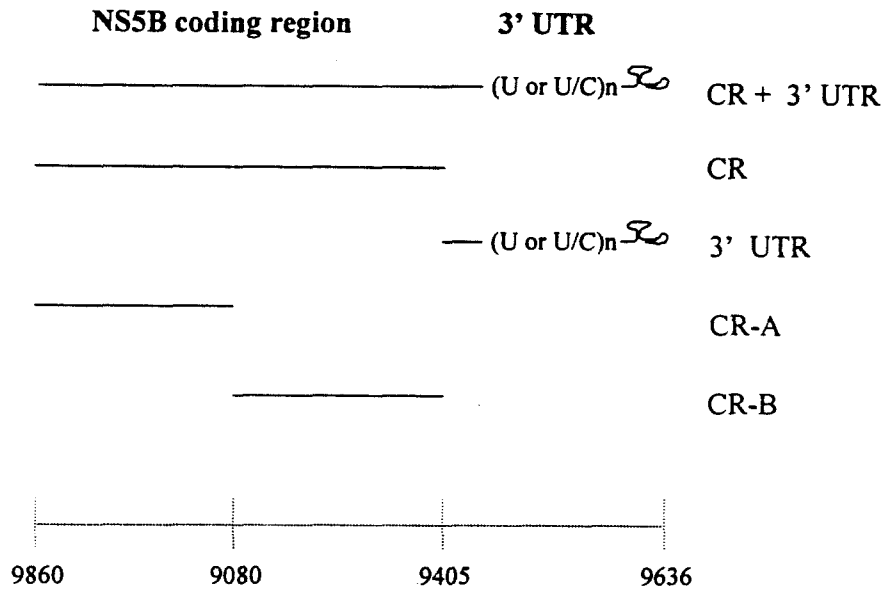
부분 결합력이 유지되는 것으로 보아 LysN-NS5B의 3차원적인 구조는 비교적 안정한 것으로 추정된다.

라. Gel mobility shift assay

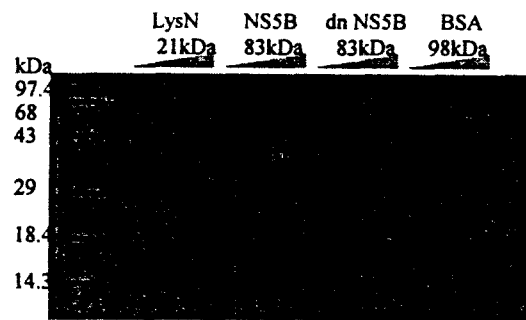
probe를 CR 또는 CR+3'UTR RNA를 사용하여 LysN이나 LysN-NS5B에 대하여 gel mobility shift assay를 수행하여 보았다 (data not shown). 이 결과에서 두 RNA의 LysN-NS5B에 대한 affinity는 별 차이를 보이지 않았다. 이로한 실험적 근거를 배경으로 하여, CR RNA를 probe로 하고 다양한 RNA를 LysN-NS5B에 대한 competitor로 작용하는 competition assay를 수행하였다 (Fig. 15). 이로부터, NS5B의 일부 coding region인 CR이 3' UTR보다 NS5B에 강하게 결합함을 알 수 있다. 또한 CR을 두 부분으로 나누어도 여전히 LysN-NS5B에 대한 결합성은 남아있다. 즉, CR내에서 최소 두 군데 이상의 LysN-NS5B 인식 부위가 있으리라고 추정할 수 있다.



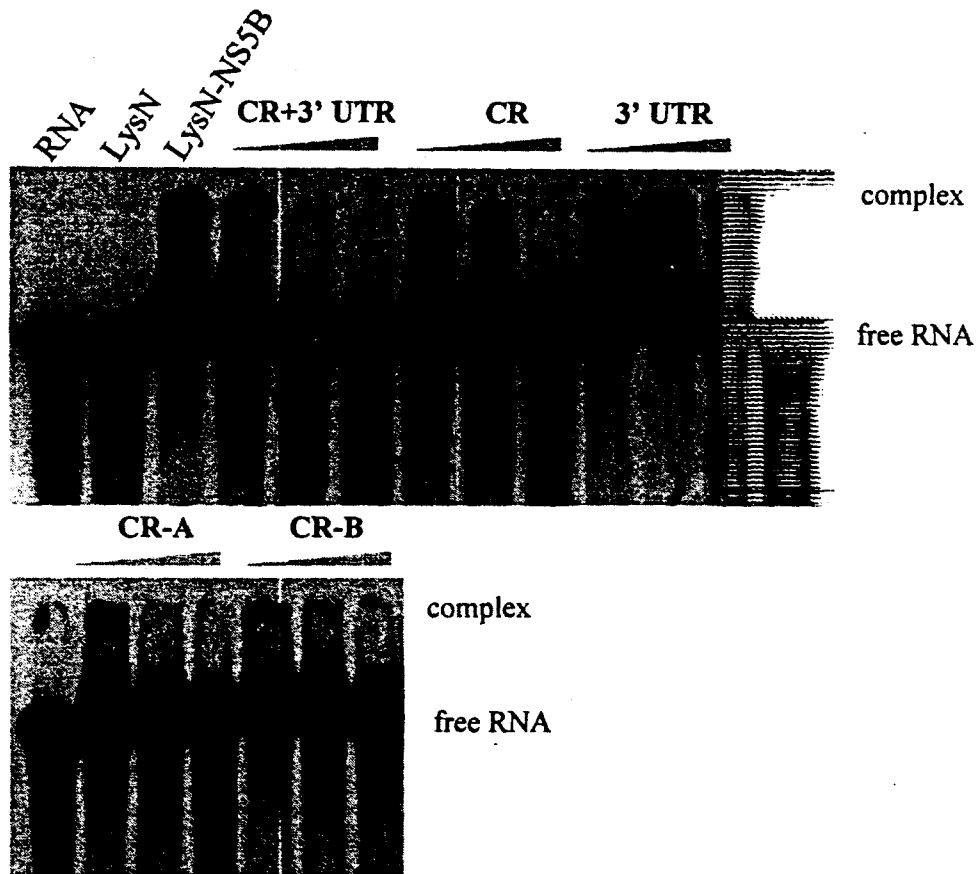
**Fig. 12 Western Analysis.** LysN의 전제과정중의 fraction을 SDS-PAGE 에서 western으로 확인하였다. Panel A)는 LysN antibody로 panel B)는 His antibody로 western한 것이다. LysN과 LysN-NS5B의 위치는 화살표로 표시하였다.



**Fig. 13 Ligand RNA Design.** Binding assay에 사용될 RNA ligand 는 크게 두 부분으로 분류되었다. 하나는 coding region과 다른 하나는 3' UTR이다. Coding region RNA는 정확한 결합부위를 결정 하기 위하여 더 세분화 되었다. HCV3a type의 genome 상의 위치를 아래 표시하였다.



**Fig. 14 North-western analysis.** 각각의 정제된 protein을 SDS-PAGE에서 분리하였다. NS5B는 LysN fused from을 의미하며, dn NS5B는 denaturation후에 SDS-PAGE로부터 분리 정제된 LysN-NS5B를 의미한다. 사용된 probe RNA는 internal labeling된 CR + 3' UTR RNA이다.



**Fig. 15 Competition assay.** Probe를 internal labeling된 CR RNA로 정하여 competition assay를 하였다. 각각의 mol 농도는 실험방법에 언급되어 있다. 각 competitor의 양은 probe에 비하여 1X, 5X, 10X를 사용하였다. Free RNA는 probe RNA를 의미하여, complex는 probe와 LysN-NS5B의 complex를 의미한다.

## 제 4 절 HBV X 및 HCV NS2/3 단백질의 발현 및 정제(한미약품)

### 1. 연구수행 내용

#### 가. Thio-X 단백질의 Refolding

앞선 연구개발로 가용성의 Thio-X 단백질이 대량으로 생산되었으나 그중 극히 일부만이 단량체의 Thio-x단백질로 정제되어 정제효율이 아주 낮았다. 이를 극복하기 위하여 본 연구팀에서는 발현조건을 바꾸어 불용성으로 발현시킨 뒤 각종 refolding조건을 검색하여 refolding 후 단량체 Thio-X 비율을 약 50%되는 조건을 찾아내어 결정제조용 시료를 준비하고자 했다.

#### 나. Refolding 한 단백질의 정제 및 결정용 시료제공

Refolding을 거친 시료는 농축 후 각종 이온 교환수지 크로마토그래피와 gel filtration정제 과정을 거쳐 정제하였다.

#### 다. 각종 발현 시스템에서 NS2/3단백질의 클로닝

NS2/3 protease의 발현을 위해 대장균 Thioredoxin 융합발현 시스템과 곤충세포 발현용 벡터를 제조하였다

#### 라. 제조된 클론의 발현 조건 탐색 및 정제

선별된 클론은 각각 대장균 숙주세포와 곤충세포에 형질전환시키고 배양온도, IPTG농도, Induction time등의 조건을 바꾸어 발현을 최적화시켰다.

최적의 발현조건을 검색한 후 Ni-NTA affinity column을 사용하여 정제하였다.

### 2. 연구수행 결과

#### 가. Thio-X 단백질의 Refolding

불용성으로 발현시킨 후 Redolding을 수행한 결과 29 kD의 단량체를 50% 정도 가짐을 2회의 superdex 75 column을 이용한 gel filtration 정제로 확인할 수 있었다. Refolding에 사용한 단백질의 농도 refolding 시간등의 조건에 따라 단량체 생산에 큰 차이를 보임을 그림 1의 각종 refolding 시료의 정제 profile에서 나타나고 있다.

#### 나. Refolding 한 단백질의 정제 및 결정용 시료제공

Refolding을 거친 시료는 ultrafiltration으로 약 2mg/ml의 농도로 준비하여 gel filtration chromatography를 시행하였다. 2회의 gel filtration 정제후 약 97%의 순도를 가지는 Thio-x 단백질을 정제할 수 있었으며 총 13 mg의 단백질을 2회에 걸쳐 호주에 제공해 결정제조에 사용하게 하였다.

#### 다. 각종 발현 시스템에서 NS2/3단백질의 클로닝

NS2/3 protease의 발현을 위해 대장균 Thioredoxin 융합발현 시스템과 곤충세포 발현용 벡터를 제조하였다. 클로닝한 부위는 NS2의 C말단 501 염기와 NS3의 N 말단 642 염기를 포함한다. 또한 117번째 시스테인 잔기를 알라닌으로 치환한 mutant 클론도 제조하였다. 대장균 발현 시스템에서는 T7 promoter에 의해 조절되게 하였으며 곤충세포 발현 시스템에서는 pIZ/V5 벡터를 사용해 바이러스 infection에 의한 발현이 아니라 plasmid 상태의 벡터를 가지는 stable한 곤충세포주를 제조하였다.

#### 라. 제조된 클론의 발현 조건 탐색 및 정제

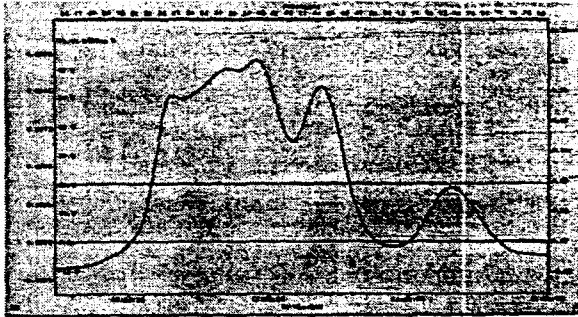
선별된 클론은 각각 대장균 숙주세포와 곤충세포에 형질전환시키고 배양온도, IPTG농도, Induction time등의 조건을 바꾸어 발현을 최적화시켰다. 곤충세포에서 NS2/3 단백질의 발현은 확인할 수 없었으며 대장균 발현 조건검색에서 50  $\mu$ M의 IPTG 농도와 3시간의 induction time에서 최적의 발현을 확인할 수 있었다. 발현된 NS2/3 단백질은 가용성과 불용성 상태 모두 존재함을 확인할 수 있었다.

최적의 발현조건을 검색한 후 2 L 배양시료로부터 정제를 진행하였다. 2 liter를 동일한 조건에서 발현하여(cell mass : 2.5 g) soluble condition의 lysis & sonication buffer(50 mM Sodium phosphate, 300 mM NaCl, 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 % NP-40, 10 mM imidazole, 1 mg/ml lysozyme, pH8.0)에서 cell을 disruption하고 pellet은, Solubilization buffer(8 M Urea/50 mM sodium phosphate/pH8.0)으로 solubilization을 하였다. 각각을 NI-NTA superflow(HPLC grade)에 loading하고 조건에 맞게 정제를 실시하였다. Soluble하게 발현되는 pET32/NS2&3도 native condition에서 정제가 되는 것을 확인할 수 있었으며, denaturative condition(insoluble)에서 purification됨을 확인 하였으며, spin colum보다 purity가 높아짐을 확인할 수 있었다. SDS-PAGE와 western blot으로 확인한 결과, affinity purification후 50 % 이상으로 정제가 되는 것을 확인할 수 있었으나, protease inhibitor존재하에 degraded product가 나오는 문제점이 있으며, 이는 발현시에 3시간 이상 발현을 진행 할 경우 발현량이 주는 것(spontaneous degradation)과 관

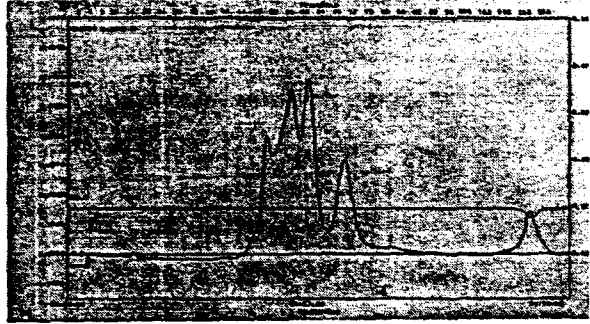


련이 있는 듯하다. non-reducing environment에서 NS2/3의 monomeric form을 확인할 수 있었으며 affinity purified sample과 함께 S-sepharose와 Q-sepharose에서 분리 정제를 실시 하였다.

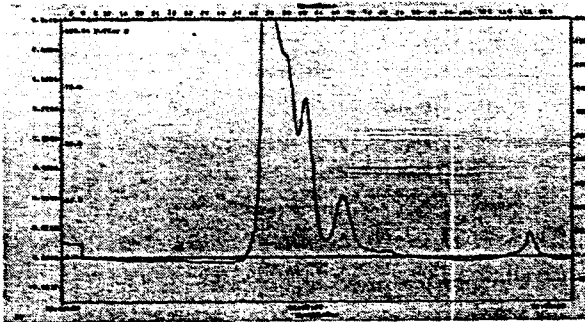
Refolding condition A



Refolding condition B



Refolding condition C



Refolding condition D

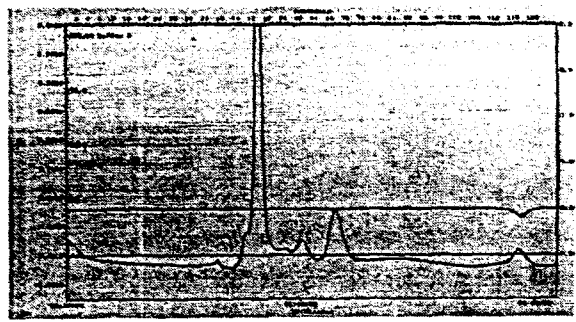
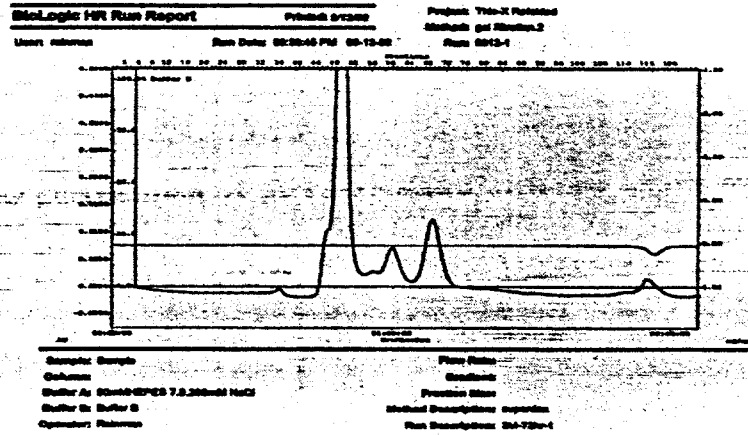


Fig. 1 Gel filtration profile of refolded Thio-X

가용화 조건을 변화시켜 29 kD 단량체 비중 50 % 생성조건 탐색 (그림 D)

A



B

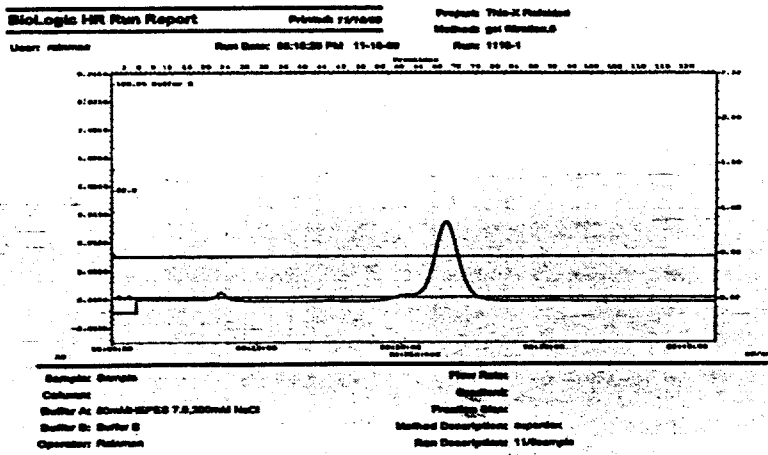


Fig.2 가용화 시료의 gel filtration 정제 profile.  
 (A) 1차 column 정제      (B) 2차 column 정제

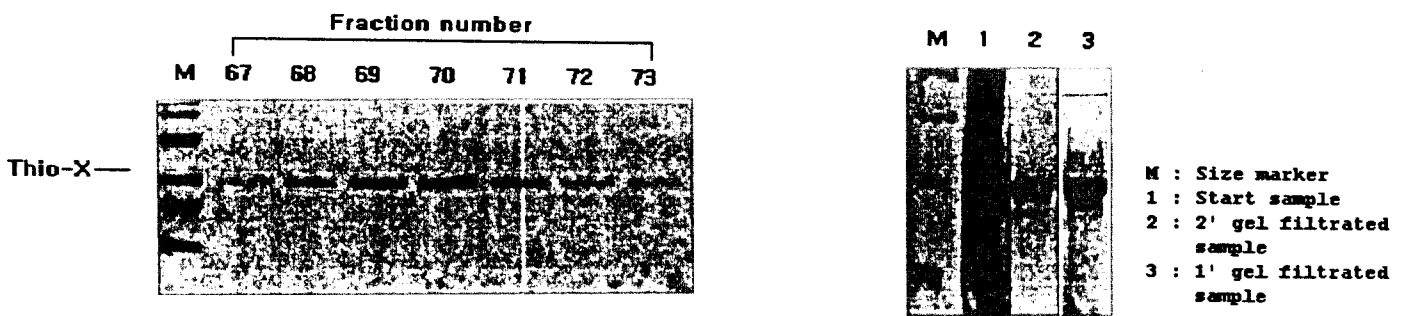


Fig. 3 정제된 Thio-X의 SDS-PAGE 확인.

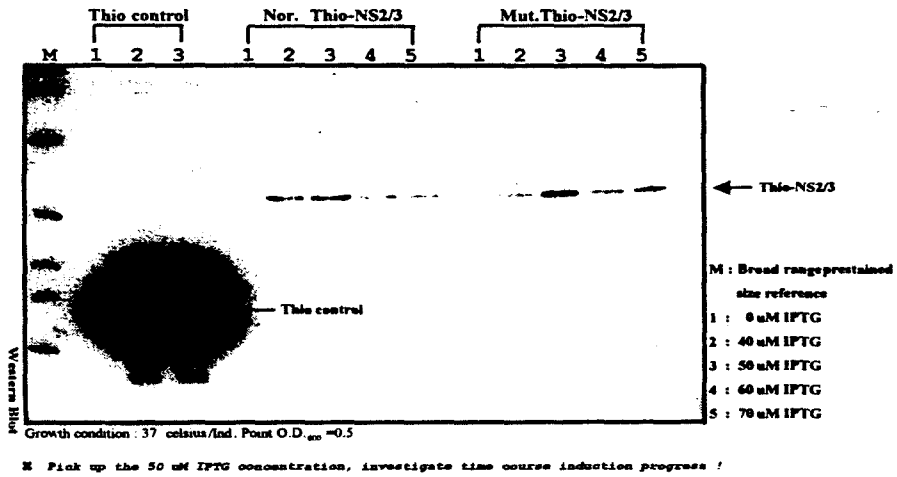


Fig. 4 NS2/3 최적 발현을 위한 IPTG 농도의 탐색

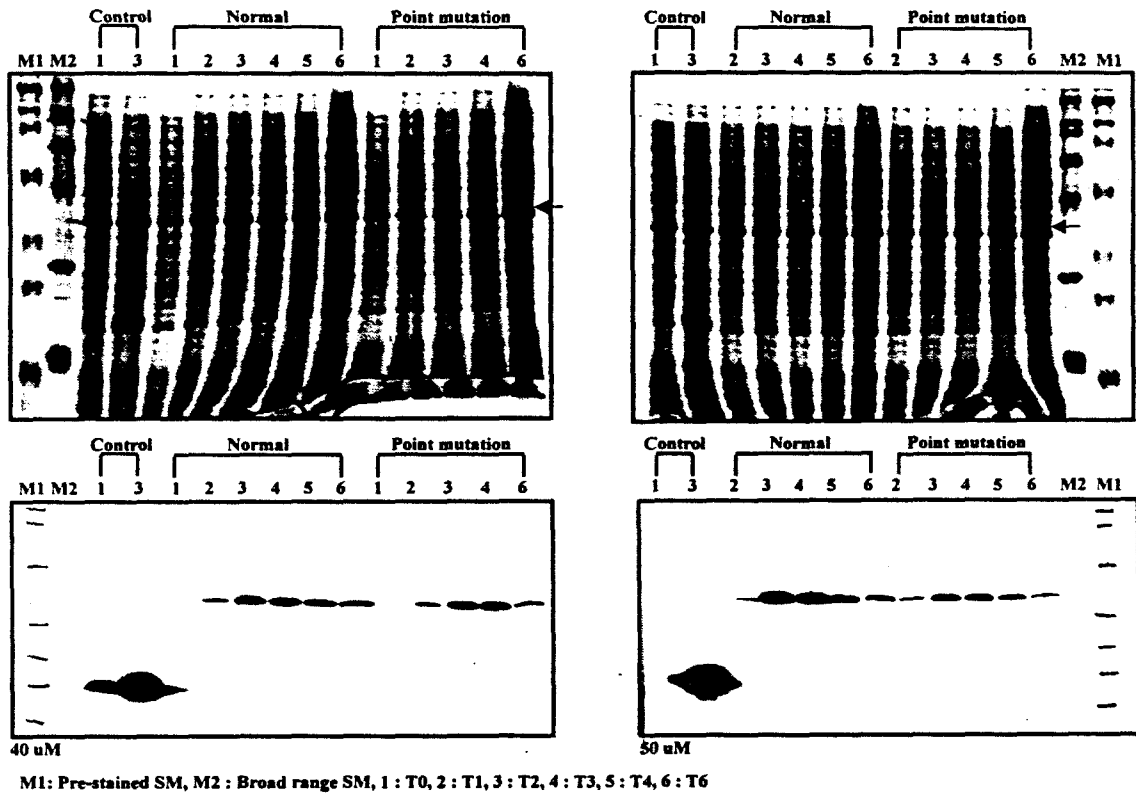


Fig. 5 Induction 시간에 따른 최적 발현 조건을 검색

**Solubility Test of pE132a(+)/HCVNS2-3 clone in large scale expression**

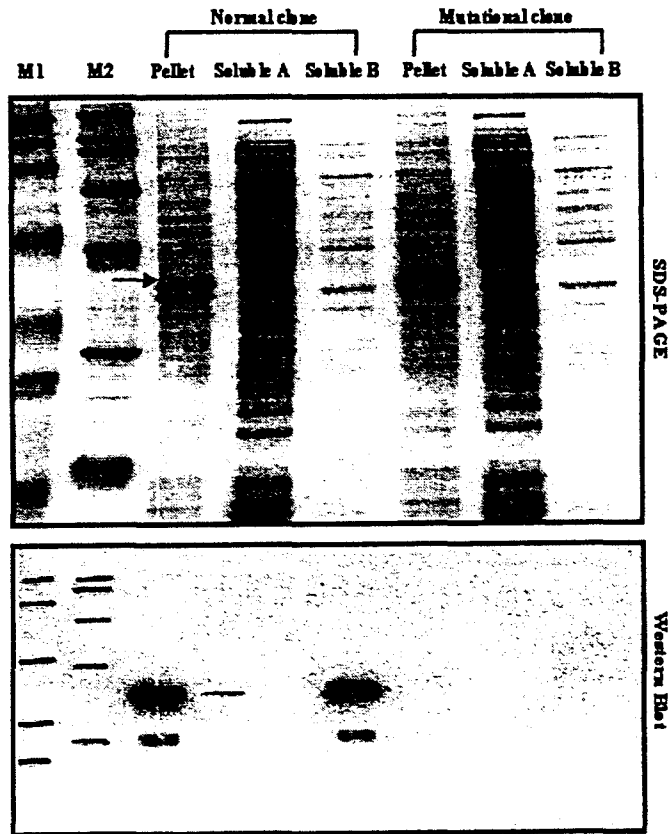


Fig.6 발현된 NS2/3단백질의 solubility test

NI-NTA affinity spin column purification of pE132a(+)-NS2/3 clone

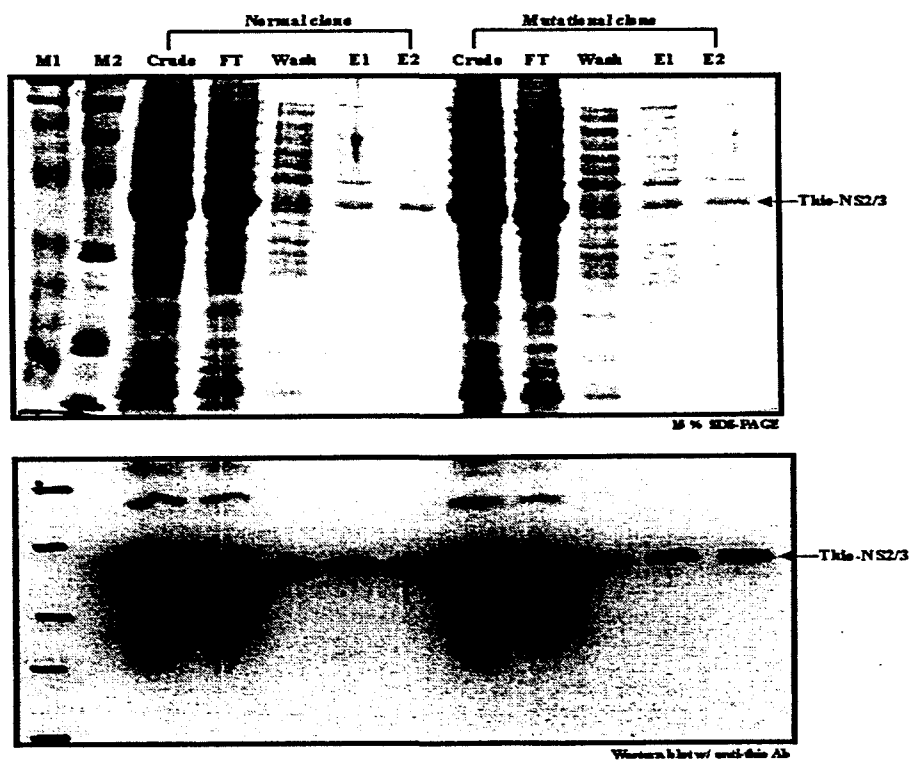


Fig. 7 발현시킨 NS2/3 단백질의 정제



Ni-NTA superflow purification of pET32/NS2&3 with use of it's own solubility

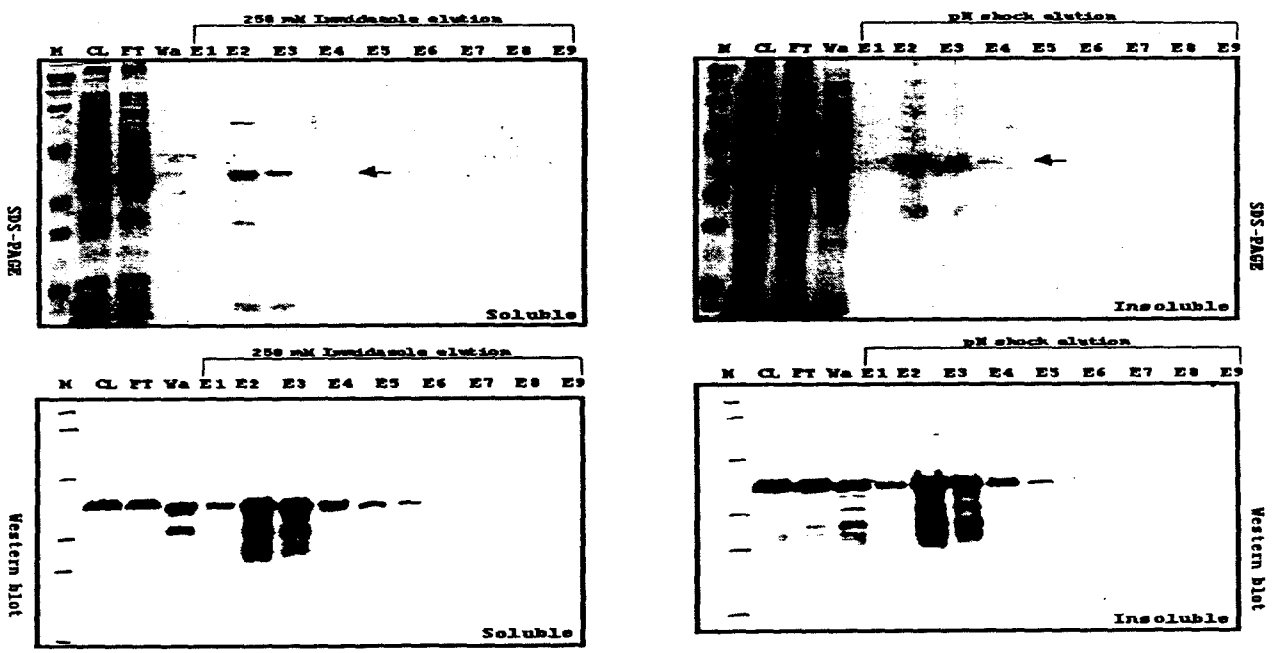


Fig. 8 Ni-NTA purification of Expressed NS2/3 protein

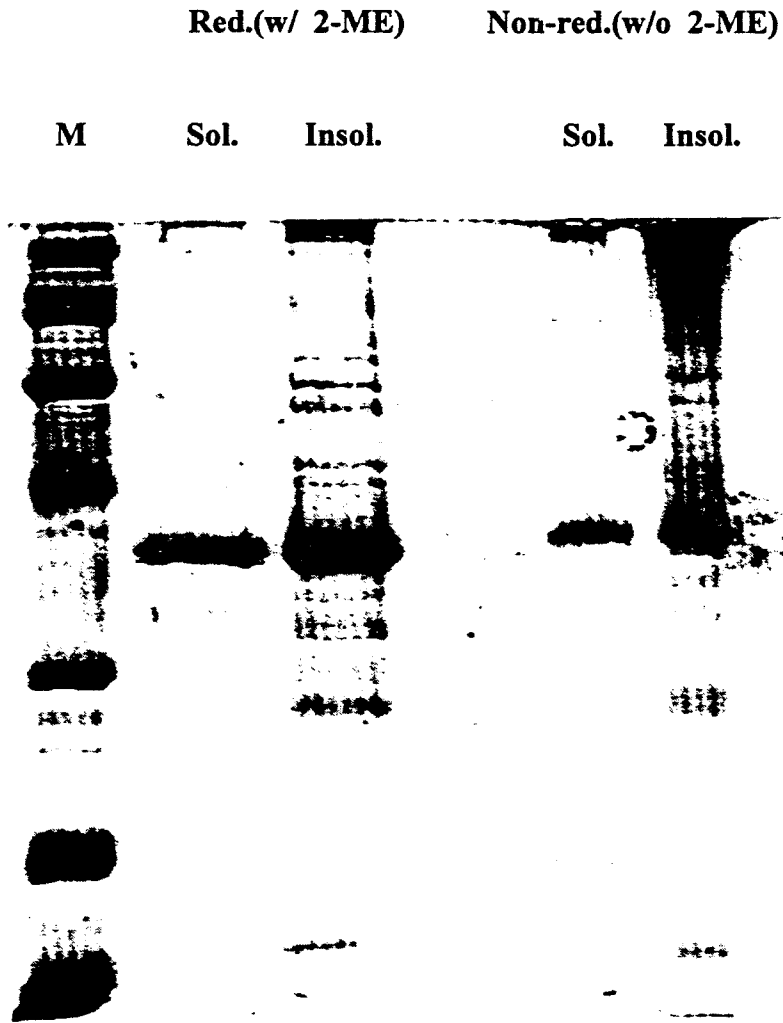


Fig. 9 Gel mobility test of affinity purified pET32-NS2/3 in non-reduced condition

## 제 5 절 HCV E2 단백질의 동물세포 발현, 구조 분석 및 생물학적 특성분석(BRI)

*The E2 protein of HCV:* HCV E2 appears to be a multifunctional protein. Apart from its structural role as a major envelope protein of the virus, it binds to target cells and the putative cellular HCV receptor, CD81. HCV E2 is largely responsible for evasion of the host immune system, may play a role in evasion of the interferon-mediated anti-viral response and possibly oncogenesis, and may be responsible for initiating auto-immune liver damage. Besides being a key antigen for developing an effective HCV vaccine, the above attributes of E2 make it an attractive target to develop anti-HCV drugs.

The ectodomain of HCV E2 from a type 3a strain, spanning amino acid residues 384 to 712 resulting in truncation of 34 residues at the C-terminus, was cloned into the mammalian vector pEE14. The construct also contained an N-terminal secretion signal and a C-terminal c-myc affinity tag. The recombinant pEE14/E2 was transfected into the wild type mammalian cell line CHO-K1 and its two glycosylation-deficient mutants, Lec3.2.8.1 (Lec3) and Lec8. Cell lines from stably expressing the protein from the three cell lines were generated and cloned. Clones expressing the protein at high level were selected by dot-blot analysis of cell culture supernatant and Western blotting following immunoprecipitation of the secreted proteins using protein A and an anti-c-myc monoclonal antibody. Clones expressing E2 at high levels were used to produce cell culture supernatant using large T-flasks. The E2 from the culture medium was purified by c-myc antibody-affinity chromatography with elution using a c-myc peptide. The protein was further purified by gel filtration chromatography on a Superdex S200 column. The glycoprotein eluted mainly as a single peak with a shoulder or sometimes a small peak preceding the main peak. The same elution profile was observed for the E2 proteins obtained from all the three cell lines except that the position of the peaks differed slightly with the CHO-K1/E2 eluting earlier, followed by the Lec/E2 and Lec3/E2, presumably due to their differing molecular weights. Analysis of fractions by SDS-PAGE under reducing and

non-reducing conditions showed that the fractions preceding the small peak or shoulder contained E2 oligomers and trimers, those in the small peak and shoulder contained E2 dimers and those from the main peak contained only monomeric E2. As most of the secreted E2 glycoprotein was present in the main peak, the majority of the expressed proteins from the three cell lines were in monomeric form. SDS-PAGE of the gel filtration-purified E2 proteins showed a molecular weight of approximately 52 kDa for Lec3/E2, 52-65 kDa for Lec8/E2 and 62-84 kDa for CHO-K1/E2.

When the E2 proteins expressed from the three cell lines were used in cell binding studies, the Lec8/E2 and Lec3/E2 were found to have high binding affinities to human T-cells, Jurkat while the CHO-K1/E2 showed very weak, but detectable, binding. The Lec8/E2 and Lec3/E2, but not CHO-K1/E2, bound to a protein of 25 kDa (presumably CD81) from the plasma membrane of T-cells, Jurkat and CEM. In addition, the Lec8/E2 and Lec3/E2 strongly bound to the second extracellular domain of a recombinant CD81 produced as a GST fusion produced at the BRI while the CHO-K1/E2 did not show any binding. The CD81 was reported recently to be a receptor of HCV. These observations suggested that the Lec8/E2 and Lec3/E2 are properly folded and contain the type of glycosylation (the Lec3/E2, in particular, with its high mannose content), which may closely mimic that of the native protein (Reference Nos. 4, 13).

To obtain large quantity of E2 proteins, the cells were grown in large fermenters and the protein purified to homogeneity from culture supernatant (more than 200 L from each of the three cell lines). Highly concentrated monomeric preparations of E2 proteins from the three cell lines were subjected to crystallization. Although small needle crystals were obtained from the CHO-K1/E2, which did not grow any further, the Lec3/E2 and Lec8/E2 did not form any crystal even up to concentrations of 33 mg/ml. It was surprising since the Lec3/E2 and Lec8/E2 have much less carbohydrate contents than the CHO-K1/E2.

Isoelectric focusing of E2 from the three cell lines showed that the proteins contain a large number of isoforms. The isoform heterogeneity of the Lec3/E2 was

found to be not due to disulfide scrambling, deamidation or cyclization of amino acid residues or carbohydrate charge differences. Efforts were then made to isolate the main isoform from the Lec3/E2 which has a pI value that is close to the calculated pI of the protein. A procedure was developed to isolate this isoform using Baby Flow (Gradipore), ion exchange and gel-filtration chromatography. The isoform was purified to near homogeneity, concentrated to 17 mg/ml and used for crystallization. However, this preparation also did not produce crystal.

It was observed recently that the Lec8/E2, when produced in roller bottles using GMEM medium, instead of spinner flasks and large fermenter, shows predominantly a single sharp band when subjected to isoelectric focusing although the pI value of this band is lower than the calculated pI of the protein. Nonetheless, the protein was produced from a large-scale culture in roller bottles using GMEM medium, purified and concentrated to 25 mg/ml and used for crystallization. This preparation also did not form any crystal.

Since the E2 protein has the potential to be highly glycosylated (10 consensus sites for N-linked glycosylation) and highly disulphide-bonded (18 cysteines), such post-translation modifications would be expected to be important to the structure of this protein and its suspected functions in the life cycle of HCV. To this end, Electrospray Ionization (ESI) and Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) mass spectrometry have been used to confirm that all 10 putative N-linked glycosylation sites of the recombinant E2 are occupied by glycans. The CHO-K1-expressed E2 was found to contain mostly sialylated complex glycans, but also at least 2 high mannose glycans which may represent buried regions of the protein which are inaccessible to golgi glycosylation enzymes. In contrast the E2 expressed from Lec3 cells contained exclusively high mannose glycans which may more closely mimic the expected high mannose conformation of the native viral E2 (Reference Nos. 14, 21, 22). Analysis of the E2 peptides using ESI and MALDI has allowed the determination of a number of disulphide bonds, which have been confirmed by Edman sequencing. Assignment of the remaining disulphides will facilitate structural

modeling and determine if the protein has a single disulphide linkage arrangement.

The putative HCV receptor, CD81: It was shown recently that the E2 protein of HCV binds to the cell surface molecule CD81. The CD81 is expressed on various cell types including hepatocytes, T cells and B cells. The protein is composed of four transmembrane domains and two extracellular domains and belongs to the tetraspanin family of proteins. The binding of E2 was mapped to the second extracellular domain (EC II) of CD81.

At the BRI, the EC II domain of CD81, spanning amino acid residues 113 to 201, was PCR-amplified from a human liver cDNA. The gene was engineered to contain a cysteine residue at the N- and C-termini, so that it forms a loop. The PCR product was cloned into pGEX-2T as a GST fusion protein and pTrcHisB as an N-terminal His-tagged protein. The proteins were expressed in *E coli* and the products analyzed by reducing and non-reducing SDS-PAGE and Western blotting. The GST-CD81.ECII and His-CD81.ECII, both were found to exist in monomeric and oligomeric forms. Immuno-blot analysis demonstrated that HCV E2, with a truncation of 34 C-terminal residues and expressed in glycosylation-deficient mammalian CHO cell lines, Lec3 and Lec8, bind strongly to the unreduced GST-CD81.ECII and His-CD81.ECII, but only weakly with the reduced forms of these proteins. In contrast, the same size E2, expressed in the wild type CHO cell line, CHO-K1, did not show any binding to the CD81 proteins (Reference No. 4 and 13).

In order to obtain the EC II of CD81 which produces only monomeric form under non-reducing conditions, a construct of the gene, spanning amino acid residues 116 to 201 with no extra cysteine at the N- and C-termini, were made in an in-house temperature-inducible *E coli*-based expression vector, pPOW. The vector contains the pelB secretion signal, which directs the synthesized protein through the cytoplasmic membrane. An octapeptide FLAG-tag was fused to the C-terminus of the CD81 Protein to aid in purification. Initial experiments with the expression of this construct showed that the protein is being expressed at a very high level and is present in

monomeric form under non-reducing conditions. Efforts are presently being made to obtain this protein in large quantity for its structure determination by NMR or X-ray crystallography and for its co-crystallization with the E2 protein of HCV.

In the meantime a three-dimensional model of the extracellular II loop of CD81 has been constructed since information on the structural characteristics of this region would be useful towards understanding the functional properties of E2 and possibly for the design of inhibitors of E2. As there are no known structural homologues, the method of threading using pair potentials was used to identify the probable 3-dimensional fold of this loop as having a helical bundle topology. This was confirmed by performing secondary structure and solvent accessibility prediction by several methods and sequence motif searches. The constructed three-dimensional model of the second extra-cellular loop of human CD81 was analyzed in terms of its surface properties such as electrostatic potential, mutational variability, and hydrophobic patches.

## The E2 Glycoprotein of Hepatitis C Virus

C-terminally truncated E2 (aa 384-712) secreted from mammalian cell line **CHO-K1** and its two glycosylation mutants **Lec8** and **Lec3**, and purified to near homogeneity as monomer.

Cell line	MW (kDa)	Carbohydrate	Microcrystals
CHO-K1	64.8	Complex	Yes
Lec8	53.1	Reduced complex	Yes
Lec3	52.9	High mannose	No

Carbohydrate content of Lec3-E2 may mimic that of the protein in native HCV virion.

Glycosylation pattern of CHO-K1 E2 and Lec3 E2 determined by mass spectrometry. Disulphide bond determination in progress.





## The E2 Glycoprotein of Hepatitis C Virus

Cell line	Binding to patient sera from all 6 HCV genotypes	Binding to Jurkat human T-cells	Binding to 25kDa plasma membrane protein (CD81) from Jurkat and CEM	Binding to recombinant CD81 second extracellular domain
CHO-K1	Strong	Weak	None	None
Lec8	Strong	Strong	Strong	Strong
Lec3	Strong	Strong	Strong	Strong

Lec3 and Lec8 E2 may prove useful for:

- Diagnosis.
- Vaccine candidate.
- Developing antiviral compounds against HCV.



## The E2 Glycoprotein of Hepatitis C Virus

Cell line	Binding to patient sera from all 6 HCV genotypes	Binding to Jurkat human T-cells	Binding to 25kDa plasma membrane protein (CD81) from Jurkat and CEM	Binding to recombinant CD81 second extracellular domain
CHO-K1	<b>Strong</b>	<b>Weak</b>	<b>None</b>	<b>None</b>
Lec8	<b>Strong</b>	<b>Strong</b>	<b>Strong</b>	<b>Strong</b>
Lec3	<b>Strong</b>	<b>Strong</b>	<b>Strong</b>	<b>Strong</b>

Lec3 and Lec8 E2 may prove useful for:

- Diagnosis.
- Vaccine candidate.
- Developing antiviral compounds against HCV.

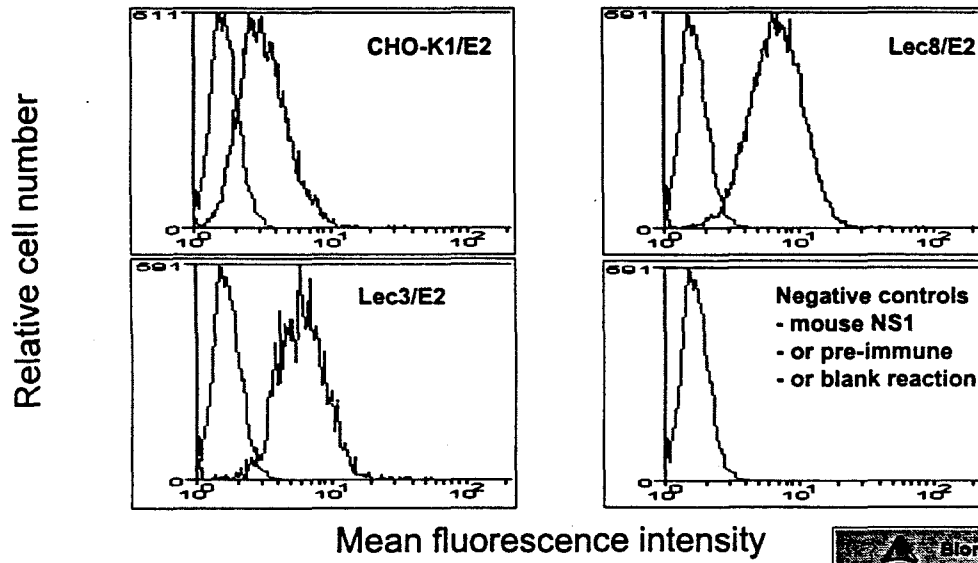


## **The PreS region of Hepatitis B Virus**

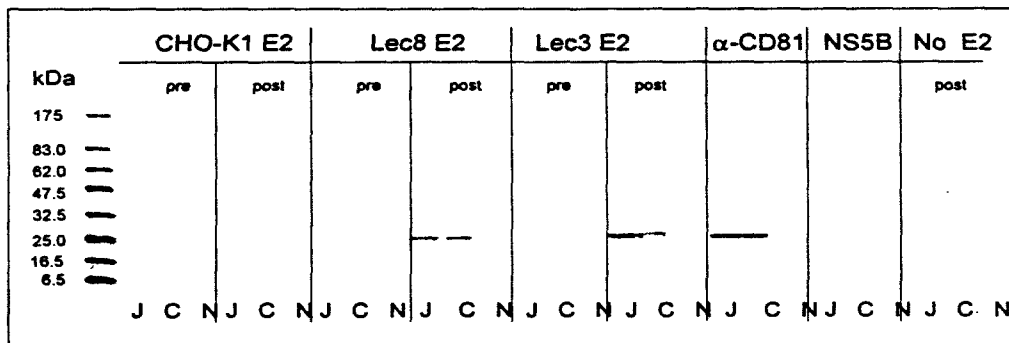
- Five different constructs made.
- Two expressed well and gave soluble protein.
- Thioredoxin-PreS1S2 formed microcrystals.
- PreS1 complexed with F(ab) and is in crystallisation trials.



## Lec3 and Lec8 E2 bind Jurkat Cells



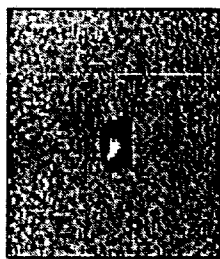
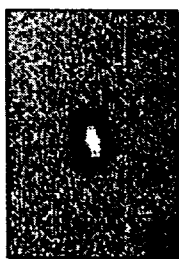
## Lec3 and Lec8 E2 interact with 25 kDa Membrane Protein



**pre** - pre-immune serum  
**post** - post-immune serum,  
**J** - human T cell lymphoma Jurkat,  
**C** - human T cell lymphoma CEM,  
**N** - mouse myeloma NS1,  
**No E2** - without an E2 incubation step.



## E2 Microcrystals



# 제 6 절 B형 간염 바이러스 증식의 in vitro 모델 연구 (연세대학교 생화학과)

위탁연구과제명: B형 간염바이러스 증식의 in vitro 모델 연구

## 제 1 장 서론

### ○ 연구개발 목표

본 연구에서는 만성 B형 간염의 원인 바이러스인 HBV 복제기전을 분자수준에서 이해하고, 복제 억제물질을 탐색하여 궁극적으로 만성 B형 간염의 치료제 개발에 기여하고자 연구를 수행하였다. 이를 달성하기 위해 HBV DNA polymerase를 곤충세포에서 발현하여 이를 biochemically active한 형태로 얻은 후, 이를 이용하여 HBV polymerase의 작용기전을 연구할 뿐 아니라 구조연구의 기반을 구축하려 하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 국내외 연구 현황

Hepadnavirus 유전자 복제의 기전을 탐구하는 실험 결과는 지금까지 주로 바이러스 DNA를 간 세포주에 전이한 후 복제 과정에 있는 DNA를 분석하여 얻어졌다. HBV DNA polymerase가 pregenomic RNA를 template로하여 바이러스 유전자를 합성하는 역전사과정에 관한 상세한 연구는 최근까지 활성이 있는 DNA polymerase를 얻을 수 없어서 많은 제약이 되어왔다. 최근에 Seeger등은 rabbit reticulocyte lysate를 이용하여 duck hepatitis B virus (DHBV)의 polymerase를 *in vitro* translation한 후 이 polymerase가 minus-strand DNA 합성의 첫 반응인 priming과 역전사반응을 할 수 있음을 보고하였다 (Wang et al., 1992). 또한 Lanford등은 벡쿨로바이러스 (baculovirus expression system)를 통하여 곤충세포에서 발현된 HBV polymerase가 활성이 있으며 exogenous template를 복제할 수 있음을 보고하였다 (Lanford et al., 1995; Lanford et al., 1997). 이러한 두 가지 업적은 HBV의 DNA polymerase의 생화학적, 또는 구조적 연구가 가능하게 했으며, 앞으로는 이 효소에 관한 연구가 매우 활발하게 이루어질 것으로

전망되며, 이는 결국 HBV의 항바이러스 개발을 한 걸음 진척시킬 것이다.

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### ○ 연구개발 내용

##### 1. Full-length polymerase의 곤충세포에서의 다량생산

본 과제를 통하여 본 연구실에서는 HBV polymerase를 subdomain별로 곤충세포에서 soluble protein으로 발현시키는데 성공하였다. epsilon을 포함한 P(HBV polymerase 전체 domain), PY(YMHD로 active site를 mutate시킨 full gene product), RT 또는 RTH (RT와 H) domain을 갖는 재조합 baculovirus를 제조하여 (Fig. 1B) 곤충세포에서 발현시켰다. RT와 RTH의 경우 발현된 양의 15% 및 1%의 soluble form으로 발현율을 나타내었으나, P의 경우, 총 발현율이 낮아 immunoblot을 통한 soluble fraction의 검출이 어려웠다.

#### Constructs of HBV DNA Polymerase in Baculovirus expression vectors

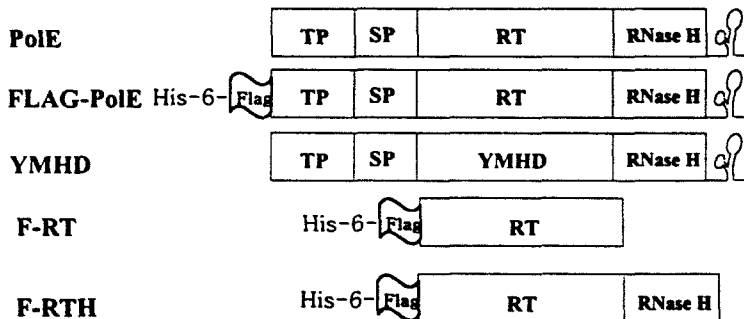


Figure 1.

##### 2. Flag-tag을 가진 HBV polymerase로의 발현

본 연구에서는 antibody를 이용한 immunoprecipitation 방법으로 정제하여 활성측정에 이용하기 위하여, 각 domain별 protein의 N-terminal에 flag-tag (-DYKDDDDK-)를 삽입한 recombinant baculovirus를 제조하였다 (figure 1C).

활성 측정에는 DNA-dependent 그리고 RNA-dependent DNA polymerase 활성을



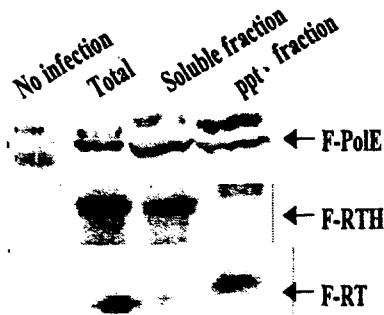
## 2. Flag-tag을 가진 HBV polymerase로의 발현

본 연구에서는 antibody를 이용한 immunoprecipitation 방법으로 정제하여 활성측정에 이용하기 위하여, 각 domain별 protein의 N-terminal에 flag-tag (-DYKDDDDK-)를 삽입한 recombinant baculovirus를 제조하였다 (figure 1C).

활성 측정에는 DNA-dependent 그리고 RNA-dependent DNA polymerase 활성을 primed된 exogenous한 template를 사용하여 측정할 수 있을 것이며, full-size polymerase의 경우, recombinant baculovirus 내에 이미 포함되어 있는 endogenous한 epsilon template를 이용하여, RNA-dependent DNA polymerase 활성 및 protein-priming 활성을 측정하였다.

Figure 2. Immunoblot assay of HBV DNA polymerase expressed in insect cells.

### Solubility test of HBV -Pol and domains expressed in insect cells



## 3. Protein-priming assay

HBV DNA polymerase는 역전사 반응의 개시반응을 매우 특이하게도 protein-priming으로 개시한다. 따라서, 이 반응은 발현된 HBV DNA polymerase 활성을 측정하는 유용한 방법이기도하다. 본 연구에서는 상기 도면의 protocol에 따라 protein-priming assay를 수행하였다

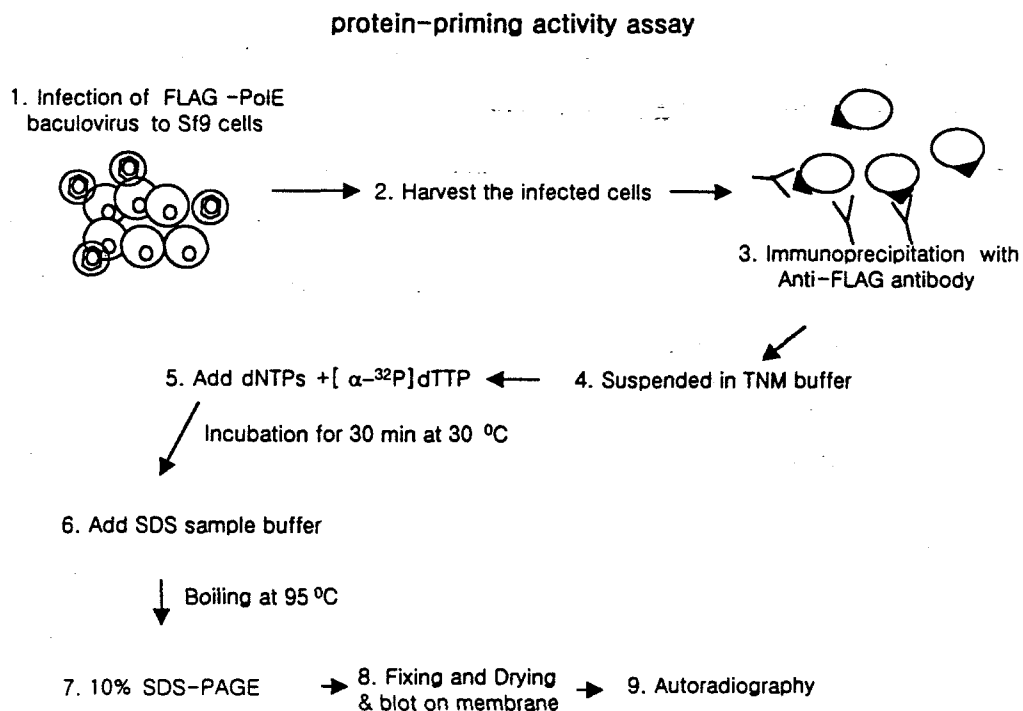


Figure 3. Procedure used for protein-priming assay of HBV DNA polymerase

**Protein- priming by HBV DNA polymerase**

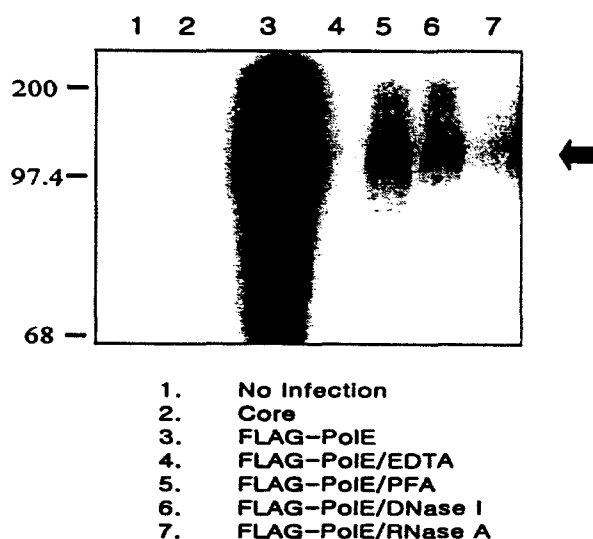


Figure 4. SDS-PAGE gel analysis of protein-priming activity of HBV DNA polymerase.

그림 4에서 보듯이, protein-priming으로 dNTP로 표지된 HBV DNA polymerase가 98kDa의 위치에 보였다. 이는 HBV DNA polymerase에 의한 protein-priming의 증거로서 곤충세포에서 발현된 HBV DNA polymerase가 활성이 있음을 말해준다. elongation inhibitor인 PFA는 protein-priming을 억제하지 못하였으며(lane 5), RNase 처리는 반응을 억제하였다. 이는 본 protein-priming의 template가 RNA 분자라는 증거이기도하다.

본 assay는 본 연구에서 발현한 HBV DNA polymerase가 매우 활성이 있으며 specific한 protein-priming 반응을 in vitro에서도 수행한다는 것을 알려준다. 향후, 본 assay는 항 HBV 억제제의 스크리닝에도 활용될 수 있을 것이다.

#### 제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

본 연구에서는 HBV polymerase의 곤충세포에서의 발현과 활성연구에 주력하며, large culture로 단백질의 발현을 증강시키고 정제하여, HBV polymerase의 구조연구에 주력하였다. 먼저 i) full-size HBV DNA polymerase의 soluble form으로의 발현을 유도하고, 다량생산 및 정제를 시도하였으며, ii) subdomain별 활성연구를 위해, immunoaffinity chromatography으로 단백질을 정제하도록 flag-tag를 가지고 있는 polymerase를 구축하여 발현하였다. 향후에 계속되는 연구는 HBV polymerase의 domain별 구조, interaction 및 활성에 대한 이해를 돕게 될 것이다. 향후, 본 연구실에서는 HBV polymerase의 활성 및 구조 연구에 주력할 예정이다. 이는 항바이러스제를 설계하는데 기반을 이루게 될 것이다.

#### 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

\* 추가연구의 필요성, 타연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술

본 연구로 HBV polymerase의 protein-priming assay를 확립하였으며 이 assay는 향후 항 HBV 억제제 스크리닝에 활용할 수 있을 것이다. 본 연구에서 획득한 baculovirus를 이용한 HBV DNA polymerase 발현체계는 구조연구에 필요한 단백질을 확보하는데 유용할 것이다. 향후, 본 연구실에서는 HBV polymerase의 구조 연구에 주력할 예정이다. 결국, 이는 본 연구실의 연구목표인

항바이러스제를 설계하는데 기반을 이루게 될 것이다.

## 제 6 장 참고문헌

### 참고문헌

Ganem, D, Varmus HE: The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu. Rev. Biochem.* 56:651-693, 1987.

Lanford, R. E. et al. (1995) Nucleotide Priming and Reverse Transcriptase Activity of Hepatitis B Virus Polymerase Expressed in Insect Cells. *J. Virology* 69: 4431-4439.

Lanford, R. E. et al. (1997) Transcomplementation of Nucleotide Priming and Reverse Transcription between Independently Expressed TP and RT Domains of the Hepatitis B Virus Reverse Transcriptase. *J. Virology* 71: 2996-3004.

Sells MA, Chen M, Acs G: Production of hepatitis B virus particles in hepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1005-1009 1987.

Wang GH, Seeger C: The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell* 71:633-670, 1992.

## 제 7 절 HCV Proteases 의 대량 발현 및 정제연구(서울대학교)

### 1. 연구수행 내용

가. *E. coli* Bacterial system을 이용한 HCV NS2/3 mut-1 단백질의 발현

C형 간염은 혈액공여자로 부터의 감염의 빈도가 매우 높고, 장기적으로는 간경화 또는 간암으로 발전하는 만성 질환으로 발전하는 만성질환으로 발전할 가능성이 높아 임상적으로 매우 중요한 질병이다. Hepatitis C virus는 non-A non-B 형 간염의 원인이 되는 인자이다. 이 바이러스는 Flaviviridae과에 속하는 바이러스로서, 각 구성 단백질은 약 9400 nucleotide의 single strand RNA로부터 번역된 polyprotein이 세포내의 signalase에 의해 절단되거나 virus의 genome에서 유래된 단백질 분해효소의 자가전단에 의해 형성되어 mature structure를 형성 한다.

Hepatitis C virus polyprotein의 2/3 지점에서의 절단은 NS2와 NS3의 N-terminal에서 coding되는 metallo protease에 이루어지는데, 이효소는 NS3에서 유래하여 non-structural protein의 절단에 관여하는 serine protease와는 구분된다. 바이러스의 polyprotein의 절단과 maturation에 관여하는 virus protease는 HIV의 치료제개발에서 보듯이 항바이러스 치료제개발에 중요한 목표가 되고 있다. 따라서 Hepatitis C virus의 metallo-protease와 serine protease의 3차원적 구조분석은 C형 간염치료제개발의 중요한 몫을 차지할 수 있다. 하지만 Hepatitis C virus의 다량 획득이 어렵고, cellular culture가 잘 이루어지지 않기 때문에 각 유전자를 여러 가지 숙주에 형질전환하여 다량의 단백질을 획득하는 연구가 이루어져야 한다. 따라서 이 연구에서는 Hepatitis C virus의 metallo-protease의 유전자를 이용하여 *E. coli*에서 그 function과 고유의 구조를 갖는 soluble protein을 대량 발현하고 순수분리하는 것을 목적으로 한다.

#### (1) pET-30a(+) vector를 이용한 HCV NS2/3 mut-1 protein 발현

##### (가) HCV NS2/3 mut-1 expression vector 제조

HCV NS2/3 mut-1 gene 이 들어 있는 pTrc HisA NS2/3 mut-1 vector를 BamHI과 EcoRI으로 절단하여 HCV NS2/3 mut-1 gene을 분리하였다. 그후 절단된 pET-30a(+) vector와 ligation하여 pET-30a(+)NS2/3 mut-1 plasmid를 제조 하였다 (Fig. 1).

##### (나) Competent Cell 제조 및 transformation

*E. coli* strain 으로 BL21(DE3)pLysS 를 사용했으며, 실험에서 사용한 방법은 Tbf method 로써 Mandel과 Higa가 제시한 CaCl<sub>2</sub> method의 변형이라 할 수 있다. 우선, competent

cell을 만들기 위해, *E. coli* BL21(DE3)pLysS 의 single colony를 5ml의 LB medium에 접종하여 37°C shaking incubator에서 밤새 키운후 이 배양액을 새로 만든 100ml의 LB medium에 재접종하여 37°C에서 약 2시간 정도 더 키웠다 ( $OD_{600}=0.5$ ). 원심분리한후, pellet에 40ml의 TbfI을 첨가하여 resuspension 하고 한시간후 두 번째 원심분리를 하여 생긴 pellet에 4ml의 TbfII를 첨가하여 resuspension을 하였다. 이렇게 만들어진 competent cell을 이용하여 transformation을 수행하였다. Fresh한 BL21(DE3)pLysS competent cell 0.1ml 에 ligation된 pET-30a(+)-NS2/3 mut-1을 첨가한후 30분간 얼음에 incubation 시킨후, 42°C에서 heat shock를 주었다. 0.8ml LB medium을 첨가한후 1시간 동안 37°C에서 배양하였다. 그중 0.1ml transformation mix를 kanamycin(50 $\mu$ g/ml)과 chloramphenicol (34 $\mu$ g/ml)이 포함된 LB agar plate에 spreading 하여, 밤새 37°C에서 키웠다. kanamycin과 chloramphenicol selection을 통해 얻은 colony들에서 plasmid DNA를 얻어, BamHI과 EcoRI restriction enzyme digestion을 통해 확인한후, NS2/3 mut-1 protein expression을 시도하였다.

#### (다) HCV NS2/3 mut-1 Protein의 발현

NS2/3 mut-1 protein을 발현하기 위해 LB medium을 사용 하였다.

pET-30a(+)-NS2/3 mut-1 colony를 kanamycin (50 $\mu$ g/ml)과 chloramphenicol (34 $\mu$ g/ml)이 포함된 5ml LB medium에서 접종하여 밤새 키운후 1/20으로 희석하여, 3시간 정도 키운후 ( $OD_{600}=0.5$ ), IPTG induction을 실시 하였다. 1mM IPTG를 첨가한후 3시간 동안 37°C shaking incubator에서 induction을 수행 하였다. Induction한 cell을 원심분리한후, cell pellet를 25mM Tris buffer (pH7.0)에 resuspension 한 다음 cell을 깨기 위해 sonication을 하였다. (20%, 3x30 sec). 그후 10,000xg에서 10분 동안 원심분리 하여 pellet와 supernatant를 분리하였다. 또한 pellet를 sample buffer로 resuspension 한후 각각의 fraction을 12% SDS-PAGE로 분석하였다 (Fig. 2).

#### (2) pTrxFus vector를 이용한 HCV NS2/3 mut-1 protein 발현

##### (가) HCV NS2/3 mut-1 gene cloning

HCV NS2/3 mut-1 gene을 cloning 하기 위해서, 5' primer와 3' primer 양 끝에 BamHI site와 SallI site를 각각 포함시켰으며, PCR을 이용하여, HCV NS2/3 mut-1 gene을 얻었다. pTrc HisA NS2/3 mut-1을 template로 사용하였으며 forward primer와 reverse primers 다음과 같았다.

Forward primer: GATCGATGGGATCCCCACTATAT

Reverse primer: CCAAVCTTCGTCGACCTAGCCGGT

PCR 조건은 94℃에서 5분동안 initial denaturation을 한후에, 94℃에서 1분, 50℃에서 1분, 72℃에서 1분30초씩 35회 반복하였으며, 72℃에서 10분간 final extension을 실시하였다. 이렇게 해서 얻은 PCR product를 pUC18 vector와 함께 BamHI과 Sall restriction enzyme 으로 처리하고 16℃에서 ligation을 하였다. 그리고, *E. coli* DH5  $\alpha$  strain에 transformation 한후 50mg/ml X-gal, 1mM IPTG와 100mg/ml of ampicillin이 포함된 LB medium agar plate에 spreading 하였다. White colony들에서 plasmid DNA를 얻어 BamHI과 Sall 으로 double digestion하여 selection 한후 sequencing을 하였다 (Fig. 3). 그결과, 확인된 HCV NS 2/3 mut-1 gene을 pBluescript SK(+) vector에 cloning 하였다.

(나) pTrxFus NS2/3 mut-1 expression vector 제조

HCV NS2/3 mut-1 protein을 *E. coli* GI698과 GI724 cell에서 발현 시키기 위해 얻어진 HCV NS2/3 mut-1 DNA와 pTrxFus vector를 BamHI과 Sall으로 처리한후, ligation하여 tryptophan-inducible expression vector pTrxFus NS2/3 mut-1을 제조 하였다 (Fig. 4).

(다) Competent cell 제조 및 transformation

*E. coli* strain으로 GI698과 GI724를 사용 하였으며, cell이 mid-log phase 까지 자란후 FSB solution으로 washing 하고 DMSO를 첨가 하는 방법을 사용했다. 우선, competent cell을 만들기 위해, *E. coli* GI698과 GI724의 single colony를 각각 5ml의 SOC(2% trypton, 0.5% yeast extract, 0.05% NaCl, 25mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM glucose) medium에 접종하여, 37℃shaking incubator에서 밤새 키운후 그중 2.5ml의 배양액을 새로 만든 250ml의 SOC medium에 재접종하여 37℃에서 2-3 시간 정도 더 키웠다 (OD<sub>550</sub>=0.6). 원심분리후, pellet에 1.3ml의 cold FSB solution을 첨가하여 resuspension을 하였다. 천천히 65 $\mu$ l의 DMSO를 한방울씩 첨가하여 얼음에 15분간 incubation 시킨후 똑같은 방법으로 65 $\mu$ l의 DMSO를 다시 첨가하고 얼음에 incubation 시켰다. 이렇게 해서 만들어진 competent cell을 이용하여 transformation을 수행하였다. Fresh 한 competent GI698과 GI724 0.1ml에 각각 ligation된 pTrxFus NS2/3 mut-1을 첨가한후 30분간 얼음에 incubation 시킨후, 42℃에서 90초동안 heat shock를 주었다. 0.8ml SOC medium을 각각

tube에 첨가한후 1시간동안 30℃에서 배양하였다. 그중 0.1ml transformation mix를 RMG-Amp(0.6% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% dextrose, 100µg/ml ampicillin, and 1.5% agar) agar plate에 spreading 하여, 밤새 30℃에서 키웠다. Ampicillin selection을 통해 얻은 colony들에서 plasmid DNA를 얻어 BamHI과 SalI restriction enzyme digestion을 통해 확인후, NS2/3 mut-1 protein expression을 시도하였다.

(라) TrxFus NS2/3 mut-1 protein 발현

TrxFus NS2/3 mut-1 protein을 발현 하기위해 RM(0.6% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% NaCl, 0.1% NH<sub>4</sub>Cl, 2% casamino acid, 0.01% MgCl<sub>2</sub> and 1% glycerol)medium 을 사용하였다. pTrxFus NS2/3 mut-1 colony를 ampicillin (100µg/ml)이 포함된 5ml RM medium에 접종하여 30℃에서 밤새 키운후, 이 배양액을 새로 만든 100ml RM medium에 재접종하여 3 시간 정도 키운후 (OD<sub>550</sub>=0.5), tryptophan induction을 실시하였다. 100µg/ml tryptophan을 첨가한후 3-4 시간 동안 30℃또는 37℃shaking incubator 에서 induction을 수행하였다. Induction 한 cell을 centrifugation을 한후, cell pellet을 깨기 위해 sonication을 하였다 (20%, 3X10 sec). 그후 10,000Xg에서 5분동안 원심분리 하여 pellet와 supernatant를 분리하였다. 또한 pellet를 sample buffer로 resuspension 한후 각각의 fraction을 12% SDS-PAGE로 분석하였다 (Fig. 5, 6). 또한 4L의 cell culture로 TrxFus NS2/3 mut-1 protein을 대량생산하기 위해, glass jar fermentor (model KF-5L, Korea Fermentor Co.)를 사용 했는데 agitation과 aeration은 각각 300rpm과 1v/v/min 정도 였으며, seed cultivation medium은 main cultivation medium의 5% (v/v)로 접종했다 (Fig. 7).

(마) 발현된 pTrxFus NS2/3 mut-1 protein의 Western blot analysis

원하는 시료의 SDS-PAGE를 행한후 이를 transfer buffer (25mM Tris base, 192mM glycine, 20% methanol)하에서 nitrocellulose membrane에 150mA의 전류를 1 시간 동안 가한후 3% 탈지분유 TBS-T (100mM Tris base, 0.9% NaCl, 0.1% Tween-20) 용액에 1시간 동안 incubation 했다. 그후 TBST (20ml)로 5분씩 2회 씻어준후 여기에 Anti-Thio antibody를 5000배로 희석한 TBST 용액을 가지고 1-2 시간 동안 반응 시킨후 TBST로 5분씩 2회 씻어준후 TBST에 1000배로 희석된 Horse radish peroxidase로 표지된 anti-mouse IgG linked whole antibody (from sheep) 에 1시간 동안 incubation 했다. 그후 nitrocellulose membrane을 TBST로 5분씩 2회 씻어주고 ECL detection reagent (Amersham Life Science) 1과 2를 1ml 씩 섞은 용액을 가한후 1분후에 반응을 중지하고 X-ray film에 expose 시켰다 (Fig. 8).



## 2. 연구수행 결과

### (1) pET-30a(+) Vector를 이용한 HCV NS2/3 mut-1 Protein 발현

본연구실에서는 HCV NS2/3 mut-1 protein을 대량발현 해서 soluble 한 HCV protein을 다량 얻고자 하였다. NS2/3 mut-1은 metallo-protease인 native 한 NS2/3에서 NS2와 NS3의 cleavage site인 leu-leu-ala이 delete된 일종의 mutant이다. 우선, T7 강력한 promoter, His-tag, 그리고 enterokinase site를 가지고 있는 pET expression system을 이용하기로 하였다. 맨처음 pET-30a vector를 이용하여 NS2/3 mut-1 protein을 발현시킨 결과, Fig.1에서 보듯이 IPTG induction에 의해 ~41kd molecular mass를 가진 NS2/3 mut-1 fusion protein이 발현 되었지만 대부분이 inclusion body로 얻어졌다. solubility를 증가 시키기 위해서 온도를 37℃에서 30℃, 25℃, 그리고 18℃까지 낮추어 induction을 시도해 보았지만 그결과는 부정적이었다. 그후 pET-32, pET-39등 여러종류의 vector들과 Origami와 BL21(DE3)Codon Plus-RIL등 여러종류의 숙주에 형질전환을 시도하여 보았지만 solubility 증가를 이끌어 내지는 못했다

### (2) pTrxFus Vector를 이용한 HCV NS2/3 mut-1 Protein 발현.

다음에는 solubility를 증가 시키기 위해서 ThioFusion expression system을 사용하기로 하였다. Thioredoxin fusion protein은 일반적으로 많은양이 발현되고 fusion 전에는 insoluble protein도 thioredoxin moiety에 의해서 solubility가 증가되는 경향이 있다고 한다. pTrxFus vector를 이용하여 NS2/3 mut-1 protein을 발현 시키기 위해서 NS2/3 mut-1 protein을 PCR에 의해 얻어서 sequencing을 하였다. 그결과, Fig. 3에서 보듯이 native한 NS2/3 sequence와 5군데가 불일치 하였고, 3개의 amino acid가 치환 된 것을 알게되었다.

Fig. 4에서와 같이 pTrxFus NS2/3 mut-1 expression vector가 제조 되었고, NS2/3 mut-1 N-terminal 앞에 thioredoxin과 enterokinase site가 나란히 연결 되어있다.

pTrxFus vector를 transformation 하는데 2종류의 *E. coli* strain GI698과 GI724가 사용 되었는데 이들은 isogenic 이지만 cI repressor 발현에 있어서 차이가 있다고 한다. GI698 strain은 fusion protein을 30℃이하에서 발현 시킬 때 사용되고, GI724는 30℃이상에서 발현 될 때 사용 되었다. Thioredoxin fusion NS2/3 mut-1 protein을 25℃, 30℃그리고 37℃에서 발현 시켰을 때, Fig. 5 - 6에서 볼수 있듯이 tryptophan을 첨가한후 시간이 경과 함에 따라 ~50kd protein 가 증가함을 볼수 있다. 비록 많은 양의 50kd protein 이 insoluble fraction에서 발현되었지만 (Fig. 5B, Fig. 6a), 소량의 50kd protein이 soluble한 fraction에서도 발현 되었다 (Fig. 5A, Fig. 6b). 특히 induction 온도가

25℃일 때 가장 많은 양의 soluble form과 insoluble form의 ~50kd TrxFus NS2/3 mut-1 protein이 발현 되었다 (Fig. 5). 그러므로, Thioredoxin fusion NS2/3 mut-1 protein의 발현은 낮은 온도에 의하여 최적화가 이루어 질수 있다고 생각된다. 또한 TrxFus NS2/3 mut-1 protein의 대량생산이 가능한지 실험해 보기 위하여 4L cell culture를 발효저를 이용하여 대량배양을 시도하여 보았다. Fig. 7에서 보듯이 ~50kd protein band가 tryptophan induction 한후 3시간 뒤에 soluble 한 fraction (Lane3)과 insoluble 한 fraction (Lane5)에서 발현되는 것을 볼 수 있다. 그러므로, TrxFus NS2/3 mut-1 fusion protein의 대량생산이 발효조를 이용해서 가능하다는 것을 알 수 있다.

Tryptophan 에 의해서 induction된 ~50kd protein이 과연 TrxFus NS2/3 mut-1 protein인지 확인하기 위해서 Western blot analysis를 실행하였다. Anti-Thio antibody (Invitrogen)는 순수한 monoclonal mouse IgG<sub>1k</sub> antibody로써 thioredoxin과 thioredoxin fusion protein을 인식 할 수 있다. 그래서 ~50kd protein이 들어있는 soluble fraction을 microcon으로 concentration을 해서 12% SDS-PAGE로 analysis를 한후 gel 하나는 Coomassie Brilliant Blue R250 staining 하고, 다른하나는 nitrocellulose membrane에 transfer 해서 Anti-Thio antibody를 primary antibody로 사용해서 Western blot analysis를 시도하였다. 그결과, Fig.8에서 보듯이 ~50kd protein band 와 Anti-Thio antibody가 인식한 band가 일치함을 알 수 있다. 그러므로, soluble NS2/3 mut-1 protein 이 TrxFus fusion protein으로 발현됨을 알 수 있다.

## 나. HCV NS2/3 mut-1 Protein 정제

### 1. 연구수행 방법

#### (1) pET-30a(+) NS2/3 mut-1 protein 정제

pET-30a(+) expression vector는 6개의 histidine을 가진 N-terminal His tag와 enterokinase cleavage site를 가지고 있다. 그러므로, histidine과 complex를 형성할수 있는 nickle-chelating affinity chromatography를 이용하여 resin에 binding 한 단백질을 imidazole step gradient로 용출 시키는 방법을 사용하여 정제하였다.

pET-30a(+) expression vector에 의해서 His-tag fusion NS2/3 mut-1 protein이 발현 되었는데, soluble form이 아닌 insoluble한 inclusion body로 발현 되었다 (Fig.1). 3시간동안 1mM IPTG로 induction 하고, cell culture를 7,000Xg에서 10분 동안 원심분리 한후, pellet을 ice-cold binding buffer (25mM Tris, pH 8.0) 로 resuspend 해서 sonication을 했다 (3X10sec). His-tag fusion NS2/3mut-1 protein이 insoluble

fraction이 inclusion body로 발현이 되므로 다시 20,000Xg에서 15분 동안 원심분리해서 생긴 pellet을 6M urea를 포함한 denaturing binding buffer에 resuspend 시키고, 얼음에 1시간 동안 incubation 시킨후 insoluble material을 제거하기 위해서 ultracentrifugation을 39,000Xg에서 20분 동안 하고, 0.45 $\mu$ m membrane을 사용해서 filter 한후 supernatant를 1ml His-trap column(Amersham Pharmacia Biotech)에 loading 하였다. sample loading 후, column을 binding buffer(10mM imidazole, 20mM phosphate, 0.5M NaCl, pH 7.5)로 washing 하고, 20mM imidazole을 포함한 binding buffer 15ml로 느슨하게 붙어있는 protein을 제거 하기위해서 다시 washing을 한다음, Elution buffer (500mM imidazole, 20mM phosphate, 0.5M NaCl, pH 7.5)로 elution을 하였다 (Fig. 9).

## (2) pTrxFus NS2/3 mut-1 protein의 정제

### (가) ThioBond Resin Affinity Chromatography

ThioBond resin(invitrogen)은 vicinal dithiols을 포함하는 protein을 affinity purification 하도록 특별히 design 되어있다. 이 ThioBond resin은 agarose-based support에 결합된 phenylarsine oxide (PAO)가 thioredoxin active site에 있는 dithiol과 반응하고 결합할수 있음을 이용한것이다.

우선, ThioBond resin을 20mM  $\beta$ -ME을 포함한 binding buffer (50mM sodium phosphate pH8.0, 100mM NaCl, 1mM EDTA)로 washing 하고 같은 buffer로 1시간 동안 activation 한다음,  $\beta$ -ME을 포함하지 않은 binding buffer로 washing 한후, 준비된 sample을 loading 하였다. Sample을 준비 하기 위해서는, tryptophan (100 $\mu$ g/ml)으로 induction 한후 3 시간 뒤에 4,000Xg로 10분 동안 원심분리 한후, final volume이 4ml 되게 pellet을 1mM  $\beta$ -ME 을 포함한 binding buffer에 resuspension 시켰다. 그후 sonication (3X10sec)과 10,000Xg로 10분 동안 원심분리 한후, loading 될 supernatant sample이 준비 되었다. 4ml의 준비된 sample을 ThioBond resin에 1 시간 동안 shaking 하면서 batch bind 시켰다. 그리고 column 밑을 열어서 buffer가 흘러 나오게하고 (flow through), 1mM  $\beta$ -ME을 포함한 binding buffer 4 bed volume으로 2회 washing 했다. 그후 각각 3 bed volume의 5, 10, 50, 100, 200, 500, 1000mM  $\beta$ -ME을 포함한 binding buffer로 elution을 하였다 (Fig. 10).

### (나) SP-Sephrose ion exchange chromatography

SP-Sephrose(Amersham Pharmacia Biotech.)는 strong cation exchanger resin 으로써 넓은 pH range (pH2-12)에서 fully charge 되어있다. Transformed cell의

overnight culture를 tryptophan (100 $\mu$ g/ml)으로 induction 한후 3 시간 뒤에 4,000Xg로 10분 동안 원심분리한후 pellet을 binding buffer(25mM sodium phosphate, 10% glycerol, 1mM EDTA)로 resuspension 시켰다. 그후 sonication(3X10sec)과 45,000Xg로 1시간 원심분리 한후 supernatant를 binding buffer로 equilibration 된 SP-Sepharose resin에 1 시간 동안 batch bind 시켰다. 그후 이 resin을 적당한 column에 packing 하였고 10 bed volume의 binding buffer로 washing 한후 0 - 1M NaCl gradient에 의해서 단백질들이 elution 되었다 (Fig.11).

#### (다) Superdex 75 Gel Filtration chromatography

Superdex 75(Amersham Pharmacia Biotech.) 는 Gel filtration resin 으로서 separation molecular weight range는 3,000 - 70,000 kd 이다.

우선, 300ml의 Superdex 75를 buffer A (25mM sodium phosphate pH 8.0, 10% glycerol)로 washing 하고, TrxFus NS2/3 mut-1이 elution되는 시점을 예측 하기 위해서, 5mg/ml의 bovine serum albumin (67kDa)과 5mg/ml의 ovalbumin (45kDa)(Amersham Pharmacia Biotech.)을 molecular mass standard로 사용 하였다. Transformed cell의 overnight culture를 tryptophan (100 $\mu$ g/ml)으로 induction 한후 3 시간뒤에 4,000Xg로 10분 동안 원심분리 한후 pellet을 buffer A로 resuspension 시켰다. 그후 sonication (3X10sec)과 원심분리 해서 얻은 pellet을 resuspension 한후 45,000Xg로 1시간 동안 초원심분리 하여 buffer A로 equilibration된 superdex 75에 supernatant를 loading하고 buffer A로 elution 하였다 (Fig.12).

SDS-PAGE 로 eluant들을 분석한후, TrxFus NS2/3 mut-1 protein이 들어있는 fraction들을 pool하여, Centriplus YM-10 (Amicon)으로 concentration 한후 4ml의 retentate를 50mM Sodium phosphate pH 8.0, 100mM NaCl, 10% glycerol, 그리고 0.2% TritonX-100로 equilibration된 ThioBond resin에 loading 하고 washing 한후 10, 50, 100, 200, 500mM  $\beta$ -mercaptoethanol로 step gradient를 사용해서 elution을 하였다. 그리고 eluant들을 12% SDS-PAGE로 분석하였다 (Fig.13).

## 2. 연구수행 결과

### (1) pET-30a(+) NS2/3 mut-1 정제

pET-30a(+) expression vector는 6개의 histidine을 가진 N-terminal His tag와 enterokinase cleavage site를 가지고 있다. pET-30a(+) expression vector를 사용해서 NS2/3 mut-1 protein이 발현될 때, NS2/3 mut-1 protein 뿐만 아니라 6개의 histidine을

가진 His tag도 발현됨을 알수있다. 그러므로, his-tag에 affinity를 가지고 있는 HisTrap이란 affinity column을 사용하여 단백질을 정제 할 수 있다. His Trap이 Ni<sup>2+</sup>로 charge 되면, 선택적으로 단백질 표면에 있는 histidine과 complex를 형성할수 있고 또한 imidazole에 의해 complex가 파괴 될 수도 있다. 그러므로, inclusion body로 발현된 His-tag fusion NS2/3 mut-1 protein을 6M urea로 용해시켜 HisTrap resin을 사용하여 정제 할수있었다.

Fig. 9에서 보듯이 1M imidazole elution에 의해 inclusion body로 발현된 curde His-tag fusion protein 에서 순수한 His-tag fusion NS2/3 mut-1 protein으로 정제 될 수 있음을 볼수가 있었다.

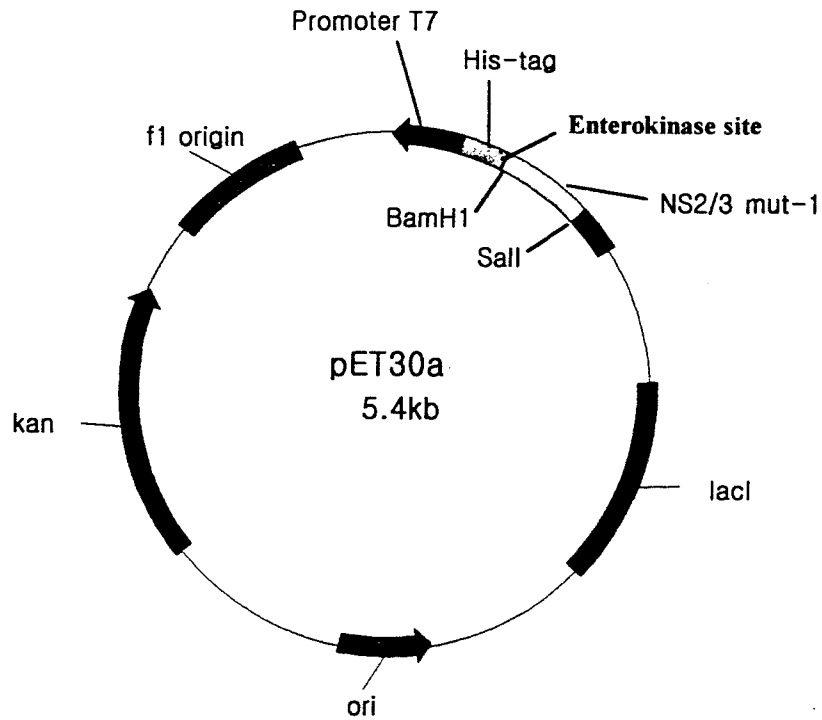
## (2) pTrxFus NS2/3 mut-1 protein 정제

ThioBond resin(invitrogen)은 vicinal dithiols을 포함하는 protein을 affinity purification 하도록 특별히 design 되어있다. pTrxFus vector를 이용해서 발현된 thioredoxin과 그의 fusion 단백질들은 vicinal dithiols들을 가지고 있다. 따라서 thioredoxin fusion protein들은 ThioBond resin에 가역적으로 결합되며, 다른 protein들은 씻겨 나가고, purified thioredoxin fusion protein은  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME)을 사용해서 elution 된다고 알려져있다. 그러나, Fig. 10에서 보듯이 발현된 soluble thioredoxin fusion NS2/3 mut-1을 ThioBond resin에 통과 시켰을때, 대부분의 protien들이 flow through와 wash에서 용출되었고,  $\beta$ -mercaptoethanol을 1000mM 포함된 eluant에서도 거의 단백질이 용출되지 않았다. 그러므로, 단백질들이 거의 ThioBond resin에 binding되지 않는 것을 볼수이다. ThioBond resin은 lipid나 oxidized dithiol과는 잘결합이 되지 않는다고 알려져 있다. 그러므로, NS2/3 mut-1 protein이 ThioBond resin에 binding 되지 않는 것은 NS2/3 mut-1 protein이 lipid rich한 membrane protein이기 때문이라 생각된다.

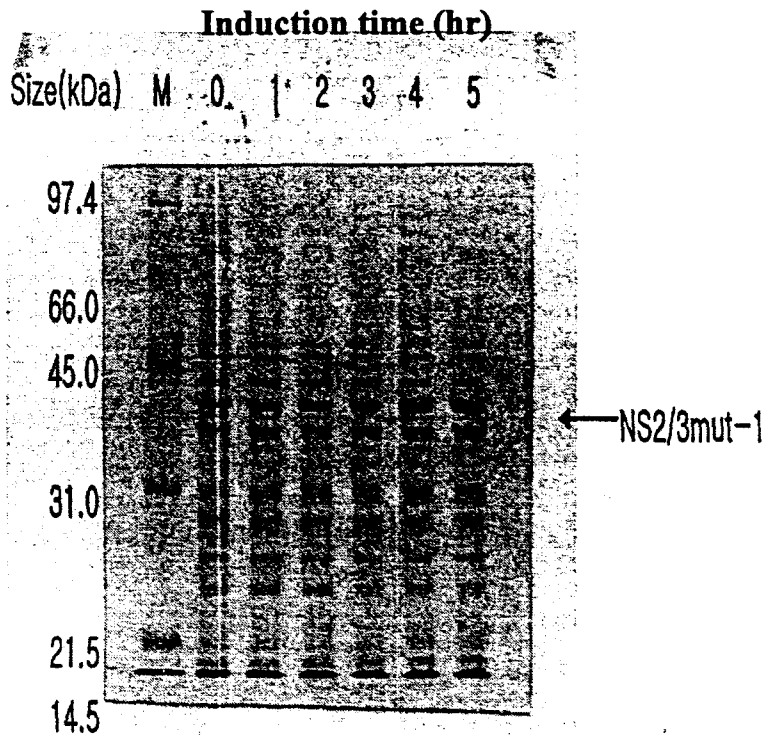
다음에는 strong cation exchanger인 SP-Sepharose resin에 binding 시켜 보았는데, Fig. 11에서 보듯이 이경우에도 대부분의 protein들이 pH의 변화에도 관계없이 flow through나 wash에서 대부분 용출됨을 알 수 있다. 그러므로, NS2/3 mut-1 fusion protein은 charge 변화에도 영향을 받지 않는 memtrane protein인 것 같이 생각된다. 이번에는 superdex 75를 이용해서 gel filtration chromatography를 시도해 보았다. superdex 75는 gel filtration resin으로써 separation mass range는 3,000 - 70,000kd라 알려져 있다. 그러므로, ~50kd인 TrxFus NS2/3 mut-1 protein이 분리 될 수 있으리라 기대해 보았으나 Fig. 12에서 보는 것 처럼 별로 separation의 성과가 없었다. 그리고 Fig. 13에서 보듯이

superdex 75 resin을 통과한 TrxFus NS2/3 mut-1 protein을 포함한 fraction pool을 ThioBond affinity chromatography에 시도해 보았지만, 이경우에도 대부분의 protein들이 ThioBond resin에 결합되지 못하고 flow through와 wash에 용출됨을 알 수 있다. 이렇게 여러가지 종류의 chromatography를 시도해 보았지만, 순수한 NS2/3 mut-1 정제에는 아직 도달하지 못하였다.

앞으로 가능하면, 다량의 inclusion body에서 정제된 NS2/3 mut-1 fusion protein을 enterokinase로 처리해서 fusion tag를 떼어내면 순수한 NS2/3 mut-1 protein을 얻을 수 있을 것이다. 이 NS2/3 mut-1 protein을 이용한 antibody column을 만든다면 soluble한 NS2/3 mut-1 protein을 정제할 수 있으리라 생각된다.



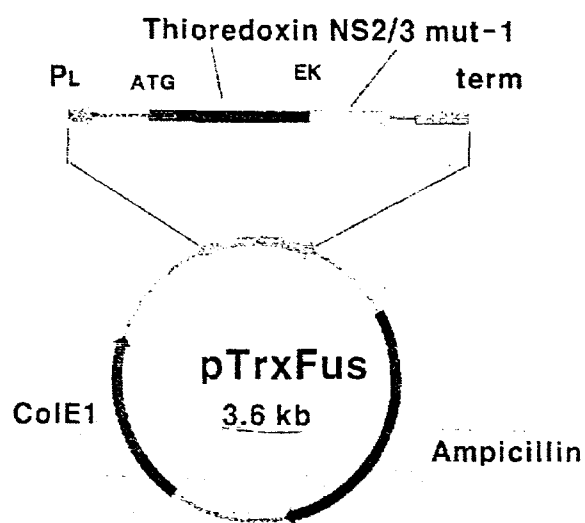
**Figure 1. Construction of pET-30a(+) NS 2/3 mut-1 Vector.** After restriction enzyme digestion with BamHI and EcoRI, NS2/3 mut-1 was ligated with pET-30a(+). His-tag and enterokinase site are located in front of NS2/3 mut-1.



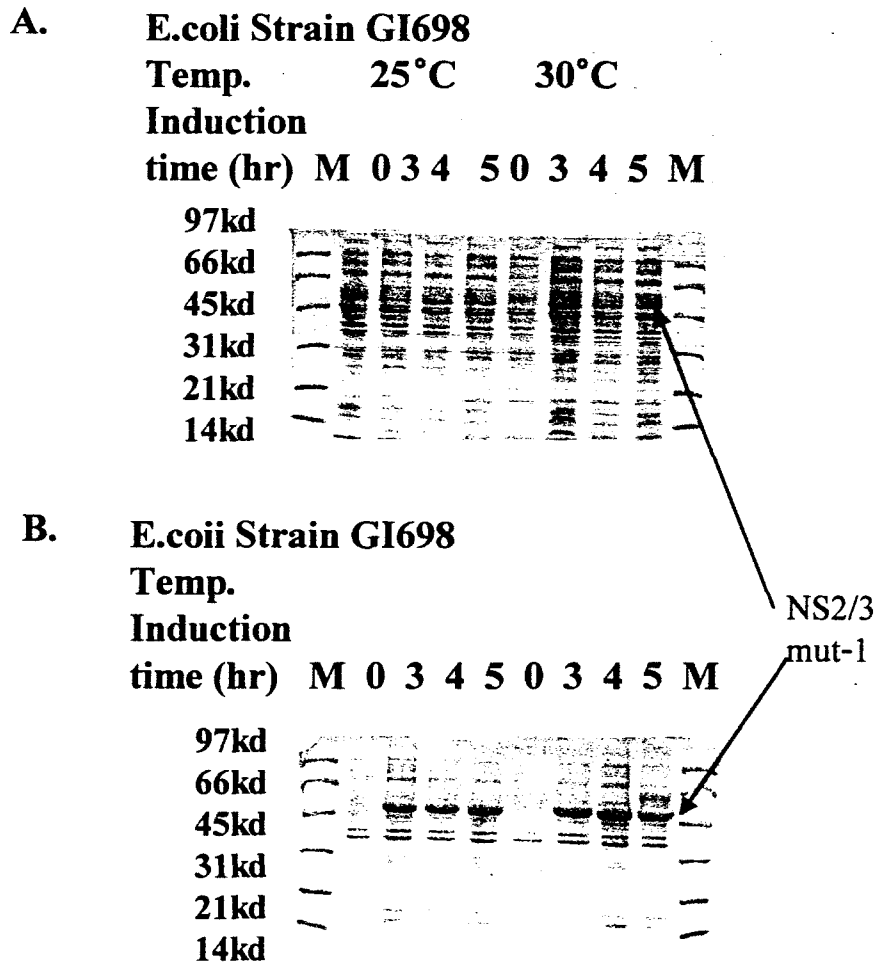
**Figure 2. Induction of NS2/3 mut-1 from E.coli DH5 $\alpha$  by addition of IPTG.** Induction was done by the addition of 1mM IPTG. Each pellet protein was analyzed by 12% SDS-PAGE  
M: Molecular mass marker



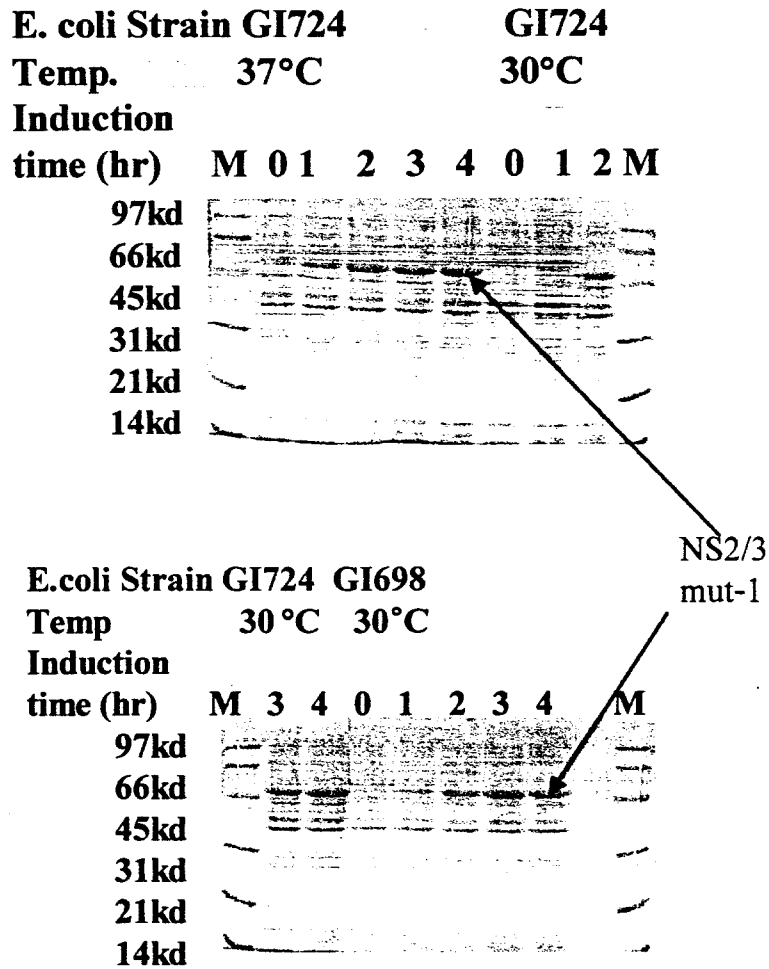




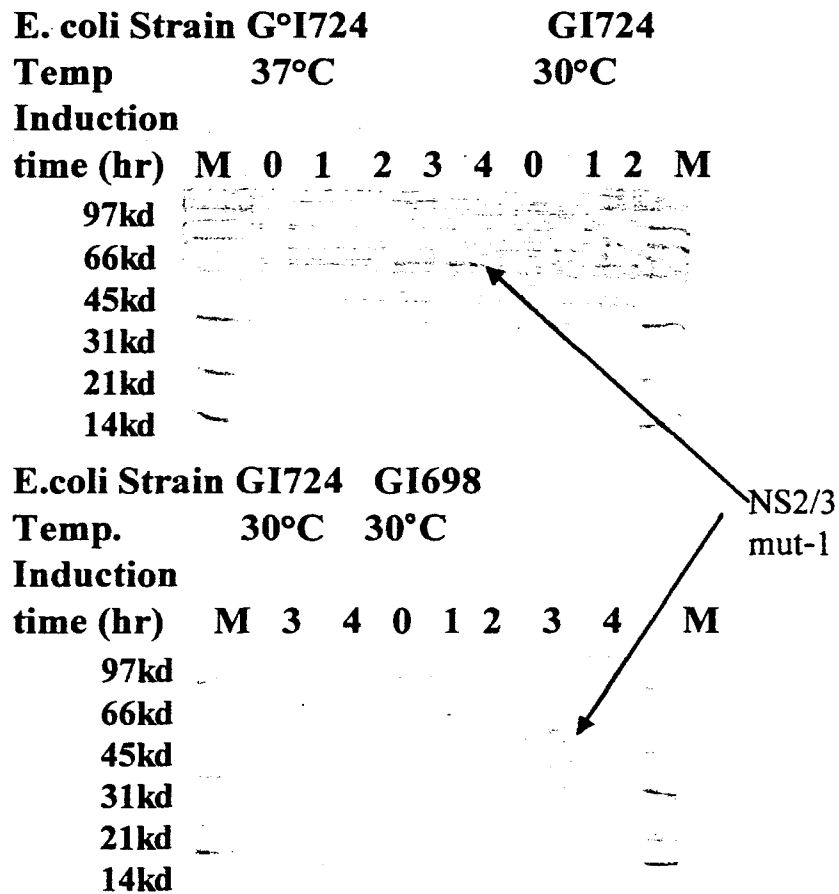
**Figure 4. Construction of pTrxFus NS2/3 mut-1 Vector.** After restriction enzyme digestion with BamHI and Sall, NS2/3 mut-1 was ligated with pTrxFus.



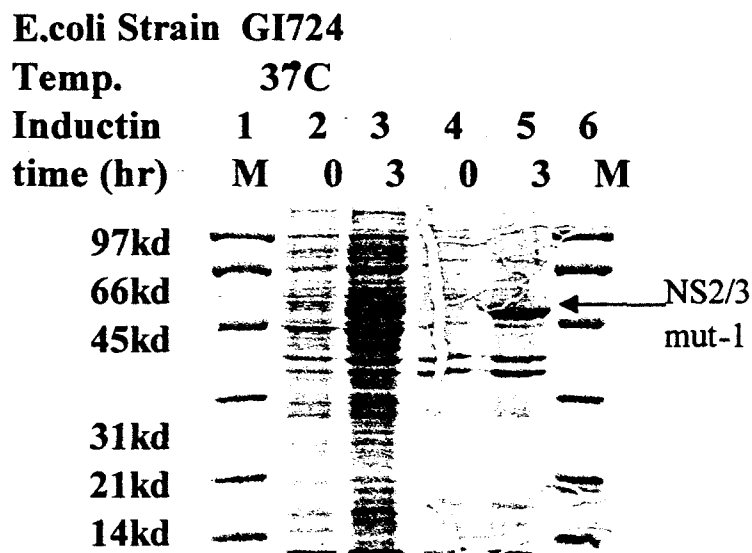
**Figure 5. Effect of Induction of NS2/3 Fusion Protein in E.coli GI698.** Panel A and Panel B indicate proteins in soluble fractions and insoluble fractions, respectively. These proteins were analyzed by 12% SDS-PAGE.



**Figure 6a. Effect of induction of pTrxFus NS2/3 mut-1 fusion protein in Insoluble fraction.** NS2/3 mut-1 fusion protein was expressed in GI724 at 37°C and 30°C as insoluble form. MW of NS2/3 mut-1 fusion protein is ~52kd.

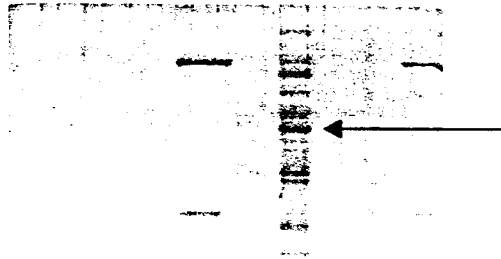


**Figure 6b. Effect of induction of pTrxFus NS2/3 mut-1 fusion protein in soluble fraction.** Soluble NS2/3 mut-1 fusion protein was expressed at 37°C and 30°C in E.coli GI698 and GI724. Induction was done by the addition of tryptophan (100µg/ml). MW of pTrxFus NS2/3 mut-1 fusion protein is ~ 52kd.



**Figure 7. Effect of Induction of pTrxFus NS2/3 mut-1 Fusion Protein in 4L Cell Culture Using Fermentor.** Soluble and Insoluble fractions were analyzed by 12% SDS -PAGE.  
 Lane 1: Molecular size marker  
 Lane 2: Soluble fraction before induction  
 Lane 3: Soluble fraction at 3hrs after induction  
 Lane 4: Insoluble fraction before induction  
 Lane 5: Insoluble fraction at 3hrs after induction  
 Lane 6: Molecular mass marker

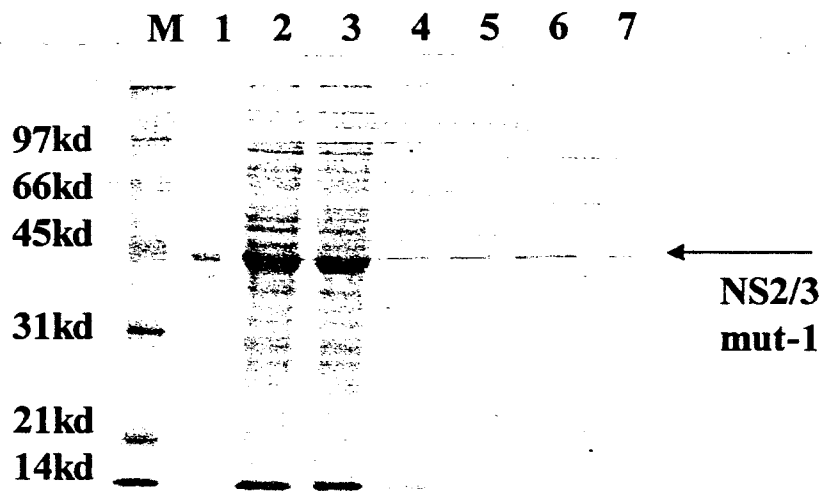
### Stained Gel



### Western Blot Analysis

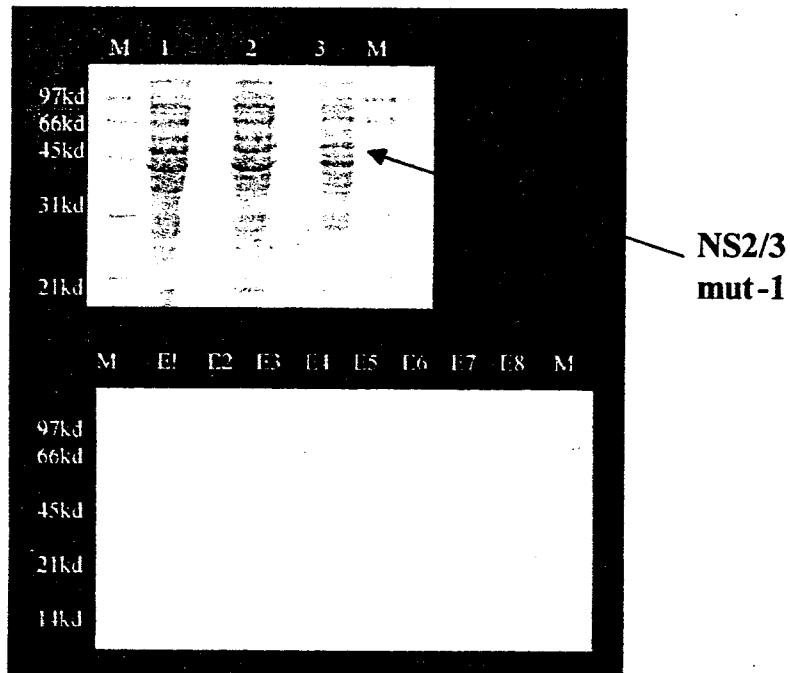


**Figure 8. Expression of pTrxFus NS2/3 mut-1 Proteins in GI724 at 37°C.** Proteins in soluble fraction were concentrated using microcon and used for analysis. Upper panel shows coomassie stained expressed proteins and lower panels shows Western blot analysis of expressed proteins. Arrow indicates expressed NS2/3 mut-1 fusion protein.

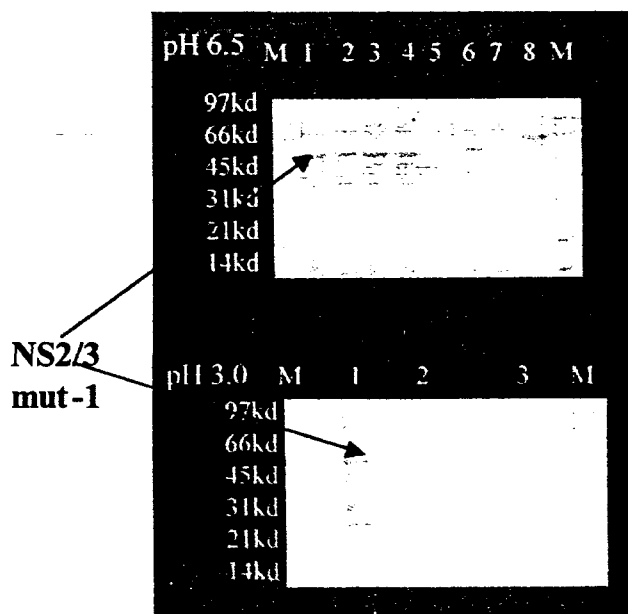


**Figure 9. Purification of NS2/3 mut-1 expressed in *E.coli* BL21(DE3)pLysS using His Bind chromatography.** NS2/3 mut-1 protein was expressed and found as inclusion body when 1 mM IPTG was added to cell culture. Solubilized NS2/3 mut-1 in 6M urea was purified using His Bind resin. M: Molecular mass marker, 1: Unsolubilized fraction, 2. Solubilized fraction in 6M urea 3: 1st Unbound fraction to His Bind resin 4:2nd Unbound fraction to His Bind resin 5: Washing fraction using 20mM imidazole solution 6: Eluted fraction using 1M imidazole solution. 7: Striped fraction using 400mM EDTA.





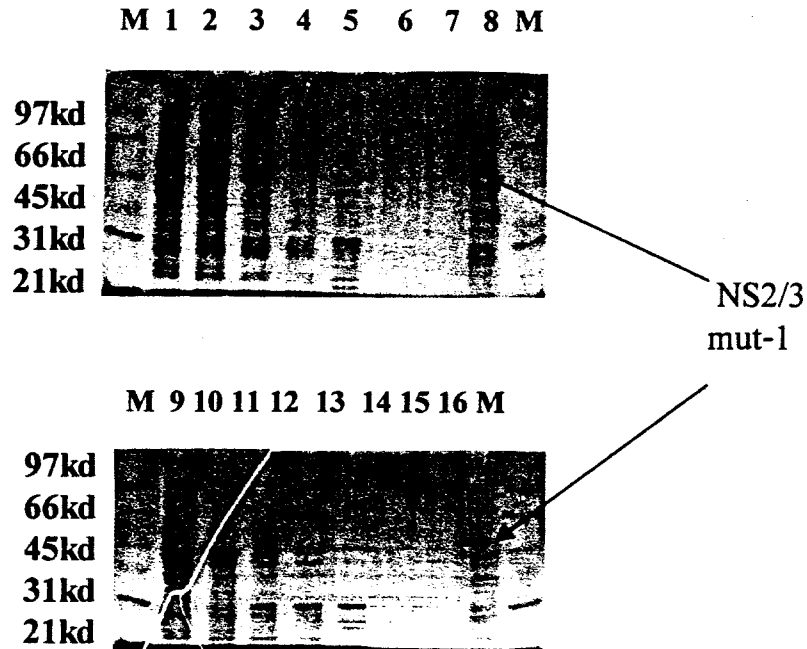
**Figure 10. ThioBond Affinity Chromatography.** Sample was loaded onto ThioBond resin , washed and eluted with buffers containing increasing concentration of  $\beta$ -mercaptoethanol. In upper panel, Lane1: loading sample, Lane2: flow through, Lane3: wash. In lower panel, E1- E8: eluant containing 1, 5, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, respectively.



**Figure 11. SP Sepharose Chromatography.**

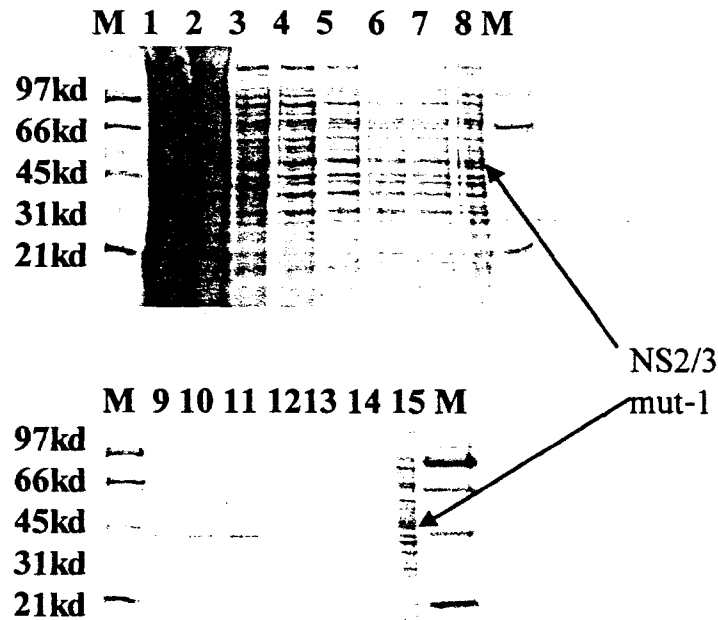
Sample was applied to SP Sepharose in batch wise, packed into the column , washed and eluted with 0 - 1M NaCl gradient.

In upper panel, elution buffer contained 50mM sodium phosphate, 10% glycerol, pH 6.5. Lane1: Loading sample, Lane2: Flow through , Lane3: Wash , Lane4: Fraction #1, Lane5: Fraction #6, Lane6: Fraction #12, Lane7: Fraction#16, Lane8: Fraction#24. In lower panel, elution buffer contained 50mM sodium phosphate, 10% glycerol, pH 3.0. Lane1: Loading sample, Lane2: Flow through, Lane3: Wash.



**Figure 12. Superdex 75 Gel Filtration Chromatography.**

After running with bovine serum albumin (67kDa), and Ovalbumin (45kDa) as standard molecular mass markers, the sample was loaded, washed, and eluted with 25mM sodium phosphate buffer containing 10mM glycerol, pH 8.0. at a flow rate of 0.6ml/min. M: molecular mass marker, Lane 1: fraction ( fr. ) #1 Lane 2: fr. #3, Lane 3: fr #5, Lane 4: fr.#7, Lane 5: fr. #9, Lane 6: fr.#11 Lane 7: fr. #13, Lane 8: unfractioned soluble sample, Lane 9: fr. #14, Lane 10: fr. #16, Lane 11: fr. #18, Lane 12: fr. #19, Lane 13: fr. #21, Lane 14: fr. #23, Lane 15: fr. #25, Lane 16: unfractioned soluble sample



**Figure 13. ThioBond Affinity Chromatography.**

After Superdex 75 gel filtration chromatography, the fractions containing NS2/3 mut-1 fusion protein were pooled together and applied to ThioBond resin for further purification.

M: molecular mass marker, Lane 1: supernatant after 1st centrifugation  
 Lane 2: supernatant after ultracentrifugation, Lane 3: loading sample,  
 Lane 4: flow through Lane 5: 1st wash, Lane 6: 2nd wash, Lane 7: 3rd  
 wash, Lane 8: unfractionated soluble protein, Lane 9-14: eluant containing  
 10, 20, 50, 100, 200, 500mM  $\beta$ -mercaptoethanol, respectively.

## 제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

### 가. 계획대비 달성도

번호	세부연구개발목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
1	순수정제된 HBV 및 HCV 단백질들을 활성이 있으면서 수용성인 형태로 확보	순수정제된 HBx, HBV preS1, preS2, HCVE2, HCV NS5B들을 활성이 있으면서 수용성인 형태로 20 - 30mg이상 확보	100%
2	HBx, HBV preS1, preS2, HCV E2, HCV NS5B의 결정화 연구	HBx, HBV preS1, preS2, HCV E2, HCV NS5B의 micro-crystal 제조	80%
3	ORF을 맞춘 full length HCV genome 제조	in vitro translation, processing이 가능한 full length HCV genome 및 replication이 가능한 mini-replicon 제조	100%
4	HBV에 대한 후보약제의 in vitro 및 in vivo assay system 개발	- HBx의 bio functional assay system 개발 - HBV polymerase의 protein priming assay system 개발	100% 100%
5	HCV에 대한 후보약제의 in vitro 및 in vivo assay system 개발	- HCV polymerase(NS5B)의 assay system 개발 - HCV replication의 in vivo assay system 개발	100% 100%

### 나. 대표적 성공사례

#### HBV

- 순수 정제된 수용성의 HBx protein의 다량확보 기술
- HBV polymerase의 core particle encapsidation 및 polymerase protein priming assay system 확립
- HBx의 bio-functional assay system 확립

#### HCV

- 순수정제된 수용성의 HCV E2 및 NS5B protein의 다량확보 기술
- HCV polymerase의 in vitro assay system 확립 및 응용
- HCV 3a type의 full length cDNA 및 replication 가능한 mini replicon 제조

### 다. 기타 계획하지 않은 연구성과

- X-gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells
- HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signalling
- Hepatitis C virus nonstructural protein NS4B transforms NIH3T3 cells in cooperation with the Ha-ras oncogene
- Evidence that the 5'-end cap structure is essential for encapsidation of hepatitis B virus pregenomic RNA
- The E2 glycoprotein of hepatitis C virus, truncated by 34 amino acid residues at the C-terminus, binds to mammalian cells and interacts with the putative

cellular receptor<sup>81</sup> if secreted from glycosylation mutant Chinese hamster ovary cell lines

A structural model for the large extracellular loop of human CD81

Development of a novel yeast secretion vector by a novel hybrid fusion peptide

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

합리적으로 디자인된 후보약제가 마련 되었을때 분석 system으로 필수적인 HBV X protein의 bio function assay system, HBV polymerase protein priming assay system, HCV E2-CD81 binding assay system, HCV polymerase in vitro assay system, HCV in vivo replication assay system등이 개발되어 여러 가지 HBV 및 HCV연구에 활용될 수 있고 실제 저해제의 screening에도 이용될 수 있다.

또 결정화 연구를 통해 축적된 knowhow를 본 연구를 통해 순수 정제되어 다량 확보된 단백질의 결정화 뿐 아니라 다른 단백질들의 결정화에도 적용될 수 있다.

## 제 6 장 참고문헌

- Aldrich CE, Coates L, Wu TT, Newbold J, Tennant BC, Summers J, Seeger C, and Mason WS: In vitro infection of woodchuck hepatocytes with woodchuck hepatitis virus and ground squirrel hepatitis virus. *Virology* 172:247-252, 1989.
- Behrens SE, L Tomei, and RD Francesco: Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J.* :12-22, 1995.
- Failla, C., L. Tomei, and R. de Francesco. An amino-terminal domain of the Hepatitis C virus NS3 protease is essential for interaction with NS4A. *J. Virol.* 69, 1769-1777. 1995.
- Flint, M., Dubuisson, J., Maidens, C., Harrop, R., Guile, G.R., Borrow and McKeating, J. A. Functional Characterization of Intracellular and Secreted Forms of a Truncated Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein. *J. Virol.* 74, 702-709
- Fourel, I., J. Saputelli, P. Schaffer, and W. Mason. 1994. The carbocyclic analog of 2'-deoxyguanosine induces a prolonged inhibition of duck hepatitis B virus DNA synthesis in primary hepatocyte cultures and in the liver. *J. Virol.* 68:1059-1065.
- Gerin, J: Antiviral agents for hepatitis B. *Hepatology* 14:198-199, 1991.
- Hahn, B., DS Han, SH Back, OK Song, MJ Cho, CJ Kim, K Shimotohno, and SK Jang. NS3-4A of Hepatitis C virus is a chymotrypsin-like protease. *J. Virol.* 69, 2534-2539. 1995.
- Heile, J. M., Fong, Y. L., Rosa, D., Berger, K., Saletti, G., Campagnoli, S., Bensi, G., Capo, S., Coates, S., Crawford, K., Dong, C., Wininger, M., Baker, G., Cousens, L., Chien, D., Ng, P., Archangel, P., Grandi, G., Houghton, M., and Abrignani, S. 2000. Evaluation of hepatitis C virus glycoprotein E2 for vaccine design: an endoplasmic reticulum-retained recombinant protein is superior to secreted recombinant protein and DNA based vaccine candidates. *J. Virol.* 74, 6885-6892
- Hirota, K., A. H. Sherker, M. Omata, O. Ykosuka, and K. Okuda. 1987. Effects of adenine arabinoside of serum and intrahepatic replicative forms of duck hepatitis B virus in chronic infection. *Hepatology* 7:24-28.
- Ishii, K., Y. Tanaka, C. C. Yap, H. Aizaki, Y. Matsuura, and T. Miyamura. 1999. Expression of hepatitis C virus NS5B protein: characterization of its RNA polymerase activity and RNA binding. *Hepatology* 29:1227-1235.
- Kolykhalov, A. A., Agapov, E. V., Blight, K. J., Mihalik, K., Feinstone, S.M., Rice C. M. 1997. Transmission of Hepatitis C by Intrahepatic Inoculation with Transcribed RNA. *Science* 277: 570-574
- Kruining, J., R. A. Heijtkink, and S. W. Schalm. 1995. Antiviral agents in hepatitis B virus transfected cell lines: inhibitory and cytotoxic effect related to time of treatment. *J. Hepatol.* 22:263-267.



- Lampertico P, Malter JS, Gerber MA: Development and application of an in vitro model for screening antihepatitis B virus therapeutics. *Hepatology* 13:422-426, 1991.
- Lanford RE, Notvall L, Beames B: Nucleotide priming and reverse transcriptase activity of hepatitis B virus polymerase expressed on insect cells. *J. Virol.* 69:4431-4439, 1995.
- Lin, C., BD Lindenbach, BM Pragai, DW McCourt, and CM Rice. Processing in the Hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J. Virol.* 68, 5063-5073. 1994.
- Lin, C., JA Thomson, and CM Rice. A central region in the Hepatitis C virus NS4A protein allows formation of an active NS3-NS4A serine proteinase complex in vivo and in vitro. *J. Virol.* 69, 4373-4380. 1995.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J.-O., Herian, U., Theilmann, L., Bartenschlager, R. Replication of Subgenomic Hepatitis C virus RNAs in a Hepatoma cell line. *Science* 285: 110-113
- Lohmann, V., F. Korner, U. Herian, and R. Bartenschlager. 1998. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J. Virol.* 249:108-119.
- Marion PL: Development of antiviral therapy for chronic infection with hepatitis B virus. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 168:167-183, 1991.
- Mizuno M, G. Yamada, T. Tanaka, K. Shimotohno, M. Takatani, and T. Tsuji: Virion-like structures in Hela G cells transfected with the full-length sequence of the hepatitis C virus genome. *Gastroenterology* 109:1933-1940, 1995.
- Petracca, R., Falugi, F., Galli, G., Norais, N., Rosa, D., Campagnoli, S., Burgio, V., Di Stasio, E., Giardina, B., Houghton, M., Abrignani, S. and Grandi, G. 2000 Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding. *J. Virol.* 74, 4824-4830
- Pugh JC, Summers JW: Infection and uptake of duck hepatitis B virus by duck hepatocytes maintained in the presence of dimethyl sulfoxide. *Virology* 172:564-572, 1989.
- Reed KE, A Grakoui, and CM Rice: Hepatitis C virus-encoded NS2-3 protease: cleavage-site mutagenesis and requirements for bimolecular cleavage. *J. Virol.* 69:4127-4136, 1995.
- Sakamuro, D., T. Furukawa, and T Takegami. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J. Virol.* 69, 3898-3896. 1995.
- Santolini, E., G. Migliaccio, and N la Monica. Biosynthesis and biochemical properties of the Hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 68, 3631-3641. 1994.
- Satoh, S., Y. Tanji, M. Hijikata, K. Kimura, and K. Shimotohno. The N-terminal region of Hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3) is essential for stable complex formation with NS4A. *J. Virol.* 69, 4255-4260. 1995.
- Schalm S. W., R. A. de Man, R. A Heijtink, and H. G. M. Niesters: New

nucleoside analogues for chronic hepatitis B. *J. of Hepatol.* 22:S52-S56, 1995.

Scullard GH, Andress LL, Greenberg HB, Smith HB, Smith JL, Sawhney VK, Neal EA, Mahal AS: Antiviral treatment of chronic hepatitis B infection: improvement in liver disease with interferon and adenine arabinoside. *Hepatology.* 1:228-232, 1981.

Seeger C, Summers J, Mason WS: Viral DNA synthesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 168:41-60, 1991.

Sells MA, Chen M, Acs G: Production of hepatitis B virus particles in hepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1005-1009, 1987.

Sells MA., Zelent AZ, Shvartsman M, and Acs G: Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions. *J. Virol.* 62:2836-2844, 1988.

Shimizu, YK, and H. Yoshikura. Multicycle infection of Hepatitis C virus in cell culture and inhibition by alpha and beta interferon. *J. Virol.* 68, 8406-8408. 1994.

Shimizu, YK, M. Hijikata, A. Iwamoto, HJ Alter, RH Purcell, and H. Yoshikura. Neutralizing antibodies against Hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. *J. Virol.* 68, 1494-1500. 1994.

Shimizu YK, RH Purcell, and H Yoshikura: Correlation between the infectivity of hepatitis C virus in vivo and its infectivity in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6037-6041, 1993.

Sureau C, Romet-Lemonne J, Mullins JI, and Essex M: Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell* 47:37-47, 1986.

Takikawa, S., Ishii, K., Aizaki, H., Suzuki, T., Asakura, H., Matsuura, Y and Miyamura, T. Cell fusion activity of Hepatitis C virus envelope proteins. *J. Virol.* 74, 5066-5074

Tanji, Y., M. Hijikata, Y. Hirowatari, and K. Shimotohno. Hepatitis C virus polyprotein processing: Kinetics and mutagenic analysis of serine proteinase-dependent cleavage. *J. Virol.* 68, 8418-8422. 1994.

Tsurimoto T, Fujiyama A, Matsubara K: Stable expression and replication of hepatitis B virus genome in an integrated state in a human hepatoma cell line transfected with the cloned viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:444-448, 1987.

Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J: Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* 47:451-460, 1986.

van Doorn, LJ, I. Capriles, G. Maertens, R. DeLeys, K. Murray, T. Kos, H. Schellekens, and W. Quint. Sequence evolution of the hypervariable region in the putative envelope region E2/NS1 of Hepatitis C virus is correlated with specific humoral immune responses. *J. Virol.* 69, 773-778. 1995.

Wang, C., P. Sarnow, and A. Siddiqui. A conserved helical element is essential for internal initiation of translation of Hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* 68,

7301-7307. 1994.

Wang GH, Seeger C: The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts a protein primer for viral DNA synthesis. Cell 71:633-670, 1992.

Yagnik, A. T., Lahm, A., Meola, A., Roccasecca, R. M., Ercole, B. B., Nicosia, A. and Tramontano, A. 2000. A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. Proteins 40, 355-366

Yoo, BJ, MJ Selby, J Choe, BS Suh, SH Choi, JS Joh, GJ Nuovo, HS Lee, M Houghton, and JH Han. Transfection of a differentiated human Hepatoma cell line (Huh7) with in vitro-transcribed Hepatitis C virus (HCV) RNA and establishment of a long-term culture persistently infected with HCV. J. Virol. 69, 32-38. 1995.