



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년12월30일
 (11) 등록번호 10-1346552
 (24) 등록일자 2013년12월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/04 (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)
C12N 7/00 (2006.01) *G01N 33/569* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-0047596
 (22) 출원일자 2012년05월04일
 심사청구일자 2012년05월04일
 (65) 공개번호 10-2013-0124013
 (43) 공개일자 2013년11월13일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020120020067 A
 Gardner, Jason P., et al. PNAS, 100권, 8호,
 4498-4503페이지 (2003)
 조효손, 미생물학회지, 47권, 4호, 342-347
 페이지(2011)
 Lindenbach, Brett D. et al., Nature, 436권,
 7053호, 933-938페이지(2005)

(73) 특허권자
한국과학기술연구원
 서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
 (72) 발명자
이준석
 서울특별시 성북구 하월곡동 한국과학기술연구원
 과학자아파트 A-204
유영화
 서울특별시 강남구 도곡2동 개포럭키아파트 1-701
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 5 항

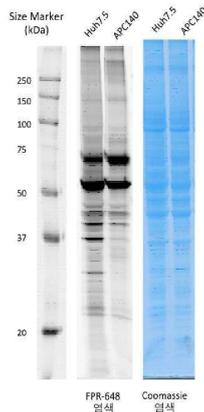
심사관 : 박정민

(54) 발명의 명칭 **헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포의 검출 방법 및 키트**

(57) 요약

본 발명은 형광 화합물을 이용하여 헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포와 정상세포를 구별하는 방법에 관한 것이다. 일 구체예에 따르면, 본 발명의 방법은 (E)-2-(((2E,4E)-5-(1-에틸-3,3-디메틸-5-술포-3H-인돌-1-이움-2-일)펜타-2,4-디엔-1-일)에텐)-3,3-디메틸-1-(8-옥소-8-((2-(비닐술포닐)에틸)아미노)옥틸)인돌린-5-술포네이트)에 결합하는 단백질 패턴을 비교하여 헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포와 정상세포를 구별하므로, 쉽고 빠르게 정확한 동정 결과를 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

한원석

경기도 광명시 광명4동 한진아파트 106-1511

윤창노

서울특별시 강남구 일원동 샘터아파트 108-106

이진각

경기도 화성시 봉담읍 수영리 672번지 신창아파트
1단지 106-503

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011K000710

부처명 교육과학기술부

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 고감도 형광 프로브 기반 감염성 병원균 신속 인지 기술 및 진단법 개발(2N34440)

기 여 율 1/1

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2011.07.01 ~ 2012.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

정상 간세포 및 헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포의 세포 추출물을 수득하는 단계;

상기 세포 추출물과 (E)-2-((2E,4E)-5-(1-에틸-3,3-디메틸-5-술폰-3H-인돌-1-이움-2-일)펜타-2,4-디엔-1-일이텐)-3,3-디메틸-1-(8-옥소-8-((2-(비닐술폰닐)에틸)아미노)옥틸)인돌린-5-술폰네이트를 접촉시키는 단계; 및

상기 접촉된 결과물을 전기영동하여 상기 세포 추출물의 단백질 패턴을 확인하는 단계를 포함하는 헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포의 검출 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 간세포는 Huh7.5 세포인 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 헤파티티스 C 바이러스는 HCV genotype 2인 것인 방법.

청구항 4

(E)-2-((2E,4E)-5-(1-에틸-3,3-디메틸-5-술폰-3H-인돌-1-이움-2-일)펜타-2,4-디엔-1-일이텐)-3,3-디메틸-1-(8-옥소-8-((2-(비닐술폰닐)에틸)아미노)옥틸)인돌린-5-술폰네이트를 포함하는 헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포 검출용 키트.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 헤파티티스 C 바이러스는 HCV genotype 2인 것인 키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 형광 화합물을 이용하여 정상 간세포 및 헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포를 구별하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 세포 동정은 감염성 질병 진단의 가장 중요한 과정 중의 하나이다. 기존의 세포 동정 방법은 많은 검사 종목과 특수 배지나 시약을 필요하고, 상용화된 동정 키트는 간단하고 비교적 빠른 결과를 얻을 수 있으나, 키트의 가격이 비싸며 제품에 따라서는 정확한 동정이 이루어지지 않을 수도 있다.

[0003] C형 간염 치료제 개발등에 사용되는 모델시스템으로 C형 간염 바이러스의 Replicon 시스템이 알려져 있다. 각 세포주 상태에 따라 단백질 중 형광 프로브와 공유 결합을 이룰 수 있는 단백질 군의 차이를 이용하여 감염된 세포주와 비교군 세포주를 구별하는 방법에 대해서는 아직까지 알려진 바가 없다.

[0004] 따라서, 본 발명에서는 형광 화합물을 사용하여 간단하고, 빠르며, 정확하게 정상 간세포 및 헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포를 서로 구별하는 방법을 제공하고자 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

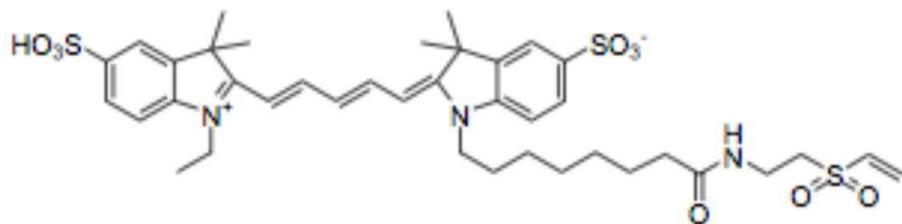
[0005] 일 구체예는 형광 화합물을 이용하여 정상 간세포 및 헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포를 서로 구별하는 방법에 관한 것이다.

[0006] 다른 구체예는 형광 화합물을 포함하는 헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포 검출용 키트에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0007] 일 양상은 정상 간세포 및 헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포의 세포 추출물을 수득하는 단계;
- [0008] 상기 세포 추출물과 (E)-2-((2E,4E)-5-(1-에틸-3,3-디메틸-5-술포-3H-인돌-1-이움-2-일)펜타-2,4-디엔-1-일이텐)-3,3-디메틸-1-(8-옥소-8-((2-(비닐술포닐)에틸)아미노)옥틸)인돌린-5-술포네이트를 접촉시키는 단계; 및
- [0009] 상기 접촉된 결과물을 전기영동하여 상기 세포 추출물의 단백질 패턴을 확인하는 단계를 포함하는 헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포의 검출 방법을 제공한다.
- [0010] 본 발명자들은 헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포와 정상세포를 서로 쉽게 구별할 수 있는 방법을 연구한 결과, 특정 형광 화합물이 헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포와 정상세포에서 서로 다른 단백질들에 결합하여 서로 다른 단백질 패턴을 나타낸다는 사실을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0011] 상기 방법은 먼저, 정상 간세포 및 헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포의 세포 추출물을 수득하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0012] 본 명세서에서 용어, "세포 추출물"은 구별하고자 하는 대상인 정상 간세포 및 헤파티티스 C 바이러스 내에 포함되어 있는 단백질 전체 집단을 의미하는 것으로 해석될 수 있다. 세포 추출물은 당업계에 널리 알려진 방법에 따라, 세포를 용해할 수 있는 키트를 이용하거나, 초음파를 이용하여 세포를 분쇄하고 원심분리를 통해 세포 내 단백체만 얻는 방법 등을 통해 수득할 수 있다.
- [0013] 본 발명은 헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포 또는 정상세포 내에 포함되어 있는 일부 단백질들과 특이적으로 결합하는 형광 화합물인 (E)-2-((2E,4E)-5-(1-에틸-3,3-디메틸-5-술포-3H-인돌-1-이움-2-일)펜타-2,4-디엔-1-일이텐)-3,3-디메틸-1-(8-옥소-8-((2-(비닐술포닐)에틸)아미노)옥틸)인돌린-5-술포네이트를 이용하는 것으로, 헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포와 정상세포를 서로 구별할 수 있다. 일 구체예에 따르면, 상기 간세포는 Huh 세포일 수 있으며, 예를 들어, 상기 세포 추출물은 Huh7.5 세포로부터 수득할 수 있다.
- [0014] 헤파티티스 C 바이러스(Hepatitis C Virus, HCV)는 플라비비리데(flaviviridae) 패밀리의 헤파시바이러스(hepacivirus)속에 속하며, 외피를 가진 외가닥의 RNA 바이러스이다. HCV는 간세포를 감염시켜 염증을 유발시키고, 간 손상을 초래하는 병원체로 알려져 있다. 상기 헤파티티스 C 바이러스는 6가지의 유전자형으로 구분되며, 예를 들어, HCV genotype 1, HCV genotype 2, HCV genotype 3, HCV genotype 4, HCV genotype 5 및 HCV genotype 6 타입일 수 있다. HCV는 예를 들어, HCV 2a, HCV 2b 및 HCV 2c와 같이 더욱 다양한 아종으로 구분될 수 있다. 일 구체예에 따르면, 상기 헤파티티스 C 바이러스는 HCV genotype 2일 수 있으며, 가장 바람직하게는 HCV 2a일 수 있다.
- [0015] 다음으로, 상기 세포 추출물과 (E)-2-((2E,4E)-5-(1-에틸-3,3-디메틸-5-술포-3H-인돌-1-이움-2-일)펜타-2,4-디엔-1-일이텐)-3,3-디메틸-1-(8-옥소-8-((2-(비닐술포닐)에틸)아미노)옥틸)인돌린-5-술포네이트를 접촉시키는 단계를 거치게 된다.
- [0016] 본 발명에서 사용되는 형광 화합물인 (E)-2-((2E,4E)-5-(1-에틸-3,3-디메틸-5-술포-3H-인돌-1-이움-2-일)펜타-2,4-디엔-1-일이텐)-3,3-디메틸-1-(8-옥소-8-((2-(비닐술포닐)에틸)아미노)옥틸)인돌린-5-술포네이트((E)-2-((2E,4E)-5-(1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfo-3H-indol-1-ium-2-yl)penta-2,4-dien-1-ylidene)-3,3-dimethyl-1-(8-oxo-8-((2-(vinylsulfonyl)ethyl)amino)octyl)indoline-5-sulfonate)는 하기 화학식 I의 화학식으로 나타낼 수 있다.

[0017] **화학식 I**



- [0018]
- [0019] 마지막으로, 상기 방법은 상기 접촉된 결과물을 전기영동하여 상기 세포 추출물의 단백질 패턴을 확인하는 단계를 거치게 된다.

[0020] 상기 형광 화합물은 상기 접촉된 결과물을 전기영동한 후, 상기 형광 화합물을 검출할 수 있는 스캐너를 이용하여 검출할 수 있으며, 상기 형광 화합물이 결합된 단백질 또는 상기 단백질의 패턴을 서로 비교함으로써, 헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포와 정상세포를 서로 구별할 수 있다.

[0021] 다른 양상은 (E)-2-((2E,4E)-5-(1-에틸-3,3-디메틸-5-술포-3H-인돌-1-이움-2-일)펜타-2,4-디엔-1-일이텐)-3,3-디메틸-1-(8-옥소-8-((2-(비닐술포닐)에틸)아미노)옥틸)인돌린-5-술포네이트를 포함하는 헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포 검출용 키트를 제공한다.

[0022] 일 구체예에 따른 헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포 검출용 키트는 (E)-2-((2E,4E)-5-(1-에틸-3,3-디메틸-5-술포-3H-인돌-1-이움-2-일)펜타-2,4-디엔-1-일이텐)-3,3-디메틸-1-(8-옥소-8-((2-(비닐술포닐)에틸)아미노)옥틸)인돌린-5-술포네이트 및 이를 안정화시킬 수 있는 버퍼 등을 포함할 수 있으며, 헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포와 정상세포를 서로 구별하는 용도로서 사용될 수 있다. 가장 바람직하게는, 상기 키트는 HCV genotype 2에 감염된 간세포, 가장 바람직하게는 HCV 2a에 감염된 간세포를 구별하기 위한 것일 수 있다.

발명의 효과

[0023] 일 구체예에 따르면, 본 발명의 방법은 (E)-2-((2E,4E)-5-(1-에틸-3,3-디메틸-5-술포-3H-인돌-1-이움-2-일)펜타-2,4-디엔-1-일이텐)-3,3-디메틸-1-(8-옥소-8-((2-(비닐술포닐)에틸)아미노)옥틸)인돌린-5-술포네이트에 결합하는 단백질 패턴을 비교하여 헤파티티스 C 바이러스가 감염된 간세포와 정상세포를 구별하므로, 쉽고 빠르게 정확한 동정 결과를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 일 구체예에 따른 방법에 의해 Huh7.5 세포주와 HCV 2a 감염 Huh7.5 세포주의 단백질 패턴을 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실험 방법 및 실험 결과

(1) 세포주의 배양

[0028] Huh7.5 세포주 (Cat#: APC49, Apath, inc.)와 HCV 2a 감염 Huh7.5 세포주 (Cat#: APC140, Apath inc.)의 단백체를 준비하기 위하여, 상기 세포주를 Apath inc.로부터 구매하였다. 세포는 Apath에서 제공하는 프로토콜을 따라 37°C, 5% CO₂ 조건으로 인큐베이터 내에서 배양하였다. Huh7.5 세포의 배양을 위해서 10% Fetal Bovine Serum(FBS), 0.01 mM non-essential amino acids(NEAA), 1X Penicilin/Streptomycin을 포함한 Dulbecco Modified Eagle Medium(DMEM) 배양액을 사용하였으며, HCV 2a 감염 Huh7.5 세포주는 10% FBS, 1X NEAA, 1 g/L G418, 1X Penicilin/Streptomycin을 포함한 DMEM 배양액을 사용하였다.

(2) 형광 화합물 처리 및 SDS-PAGE 이미지 분석

[0030] 상기 각각의 세포를 24시간 동안 배양한 후, 상기 세포가 배양액에 담긴 상태에서 DMSO 1%에 포함된 20 μM (E)-2-((2E,4E)-5-(1-에틸-3,3-디메틸-5-술포-3H-인돌-1-이움-2-일)펜타-2,4-디엔-1-일이텐)-3,3-디메틸-1-(8-옥소-8-((2-(비닐술포닐)에틸)아미노)옥틸)인돌린-5-술포네이트를 처리한 다음, 37°C, 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 1시간 동안 다시 배양하였다. 이후, 1X 트립신/EDTA를 처리한 다음, 원심분리 하여 상층액을 버리고, PBS 용액(pH 7.4)으로 2번 씻어 준 후, SigmaAldrich 사의 CellLytic™ M kit(Cat #: C2978)를 이용하여 단백질 혼합물 용액을 얻었다. 상기 단백질 혼합물 용액에 Laemmli 샘플 버퍼를 넣고, 95°C에서 2분 동안 가열한 다음, 15% SDS가 포함된 폴리아크릴아미드 겔에 로딩하여 전기영동(120V 20분, 이어서 180V 60분)한 후, 상기 형광 화합물로 표지된 단백질의 패턴을 형광 SDS-PAGE Scanner(Typhoon™ 9400, GE Health Science)로 확인하였다. 이때, (E)-2-((2E,4E)-5-(1-에틸-3,3-디메틸-5-술포-3H-인돌-1-이움-2-일)펜타-2,4-디엔-1-일이텐)-3,3-디메틸-1-

(8-옥소-8-((2-(비닐술폴닐)에틸)아미노)옥틸)인돌린-5-술포네이트의 표지 단백질 이미지는 Typhoon™ 9400 기기의 ex: 488 nm, em: 526-SP 조건에서 얻었다. 상기 각 세포주의 구별은 단백질 분자량(molecular weight) 측에 대한 패턴을 이용하였다.

[0031]

도 1에서 보는 바와 같이, SDS-PAGE 결과로부터 Huh7.5 세포와 HCV 2a 감염 Huh7.5 세포주에서 오른쪽 Coomassie 염색에서는 단백질의 정량적 차이가 분명하지 않으나, 왼쪽 형광 영상에서는 확인한 형광 표지 패턴의 차이가 나타남을 확인할 수 있었다.

도면

도면1

