

Strategy for Developing Medical Arsenals by Modulation of Membrane Fusion Activity of Influenza Virus Hemagglutinin

Sangmoo Lee, Jin Il Kim, Ilseob Lee and Man-Seong Park*

Department of Microbiology, Center for Medical Science Research, College of Medicine, Hallym University,
Chuncheon, Gangwon-do, Korea

Influenza virus is a serious pathogen that burdens society with health care costs, and can lead to fatality. The virus is dealt with currently by vaccination and anti-influenza drugs. However, vaccines need to be improved towards safer and more efficient production formats, and drugs need to be constantly renewed to cope with resistances. That the neuraminidase inhibitors are only drugs currently available warrants urgent attention to an alternative anti-influenza target. In this paper we introduce studies on fusion activity of influenza virus hemagglutinin (HA), and discuss how to best utilize the knowledge for an improved vaccine development and an anti-influenza drug search. Potential application of mutations resulting in changes in fusion activity to cell culture optimized vaccine virus development and strategies to develop broad spectrum anti-influenza drugs through targeting the conserved fusion domain of the HA are discussed.

Key Words: Fusion inhibitor, Hemagglutinin, Influenza, Membrane fusion

인플루엔자바이러스는 *orthomyxoviridae* 과(family)에 속하는 바이러스로, 음성극성(negative-polarity)의 8개 단 일가닥 RNA를 갖는 바이러스이다. 그리고 인플루엔자 바이러스는 A, B, C형(type)으로 나뉘어지는데 주로 사람을 감염시키는 것은 A와 B형 바이러스이다. 인플루엔자 바이러스의 구조는 주로 구형으로 제일 바깥층에 외피(envelope)를 가지고 있다. 이 외피에는 표면단백질인 "스파이크" 형태의 hemagglutinin (HA)과 neuraminidase (NA)가 존재한다. 이 두 단백질의 항원성 차이에 의해 A형 인플루엔자바이러스의 아형(subtype)이 결정된다 (1). 현재 HA 단백질은 18개, NA 단백질은 11개의 아형이 존재하는 것으로 알려져 있다 (2).

지난 20세기에는 인플루엔자바이러스로 인해 3차례의 대유행(pandemic)이 발생하였다. 첫 번째 대유행은 1918년

H1N1 아형의 인플루엔자바이러스가 발생하여 약 5천만 명이 사망하였다. 두 번째 대유행은 1957년 H2N2 아형의 새로운 인플루엔자바이러스가 나타나 약 100만 명의 사망자가 발생하였다. 그리고 세 번째 대유행은 1968년 H3N2 아형이 새로이 나타나 약 100만 명의 사망자가 발생하였다 (3). 그리고 2009년 돼지기원의 신종 인플루엔자바이러스(2009 pandemic H1N1)가 발생하여 21세기 들어 첫 번째 대유행으로 기록되었으며 많은 사망자가 발생하였다. 그리고 매년 계절성(seasonal) 인플루엔자바이러스는 가을부터 겨울까지 유행하여 전 세계적으로 약 25만 명에서 50만 명의 사망자를 발생시키고 있다.

이와 같이 인류의 건강과 생명을 위협하는 인플루엔자바이러스 감염에 대한 가장 효과적인 방어책은 백신 접종(vaccination)과 항바이러스제의 사용으로 알려져 있

Received: December 2, 2013/ Revised: December 4, 2013/ Accepted: December 5, 2013

*Corresponding author: Man-Seong Park, Ph.D. Department of Microbiology, Center for Medical Science Research, College of Medicine, Hallym University, Chuncheon, Gangwon-do, 200-702, Korea.

Phone: +82-33-248-2632, Fax: +82-33-252-2843, e-mail: manseong.park@gmail.com

**This study was supported by grants from the Korea Healthcare Technology R&D Project of the Ministry of Health & Welfare (Grant No. A103001) and the Hallym University Specialization Fund (HRF-S-41).

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

다. 현재 인플루엔자 백신은 세계보건기구(World Health Organization, WHO)에서 매해 새로이 선정한 3종의 백신 균주를 혼합하여 생산되고 있으며 건강한 성인에서는 유의미한 예방효과를 보이고 있다. 그리고 현재 승인되어 사용되고 있는 대표적인 항인플루엔자 제제로는 NA 단백질을 표적으로 하는 NA 억제제(NA inhibitor, NAI)가 있다. NAI가 광범위하게 사용되기 이전에는 M2 단백질에 의해 형성된 이온 채널을 억제하여 항바이러스 효능을 나타내는 항바이러스제(M2 ion channel blocker)가 사용되었다. 그러나 M2 ion channel blocker는 광범위한 사용으로 현재 사람을 감염시키는 대부분의 인플루엔자 바이러스에 내성을 나타내고 있어 거의 사용되고 있지 않다. 현재 가장 많이 사용되고 있는 NAI로는 oseltamivir와 zanamivir가 있다. 그러나 이들 역시 내성 바이러스가 지속적으로 보고되고 있어 NAI와는 다른 작용기전을 갖는 항인플루엔자 제제의 개발이 시급한 실정이다 (4). 이에 본 논문에서는 현재 활발히 개발되고 있는 다양한 항인플루엔자 억제제들이 있지만 그 중에서도 바이러스 외피와 엔도솜(endosome) 막의 융합(membrane fusion)을 유도하는 HA 단백질을 표적으로 하는 항인플루엔자 제제에 대해 기술하고자 한다. 또한 HA 단백질의 막융합 활성이 어떻게 인플루엔자바이러스의 복제능력을 향상시켜 세포배양 기반 백신(cell culture-based vaccine) 생산 시스템에서 백신 생산성을 높일 수 있는지 그 가능성을 제시한 연구결과들에 대해서도 기술하고자 한다.

1. 인플루엔자바이러스 HA 단백질에 의한 융합 기작

인플루엔자바이러스의 HA 단백질은 숙주세포 감염 시 시알산(sialic acid) 수용체를 인식하여 숙주세포에 바이러스 입자를 부착(attachment)시키는 기능과 바이러스의 외피와 세포 내 엔도솜 막과의 융합을 유도하는 기능이 있다고 알려져 있다. 이 융합으로 바이러스 입자는 탈피(uncoating)되고 결국 유전자가 세포질 내로 방출된다. HA 단백질은 세포 내 단백분해효소(protease)에 의해 HA1과 HA2로 절단되는데 수용체 인식부위(receptor binding site)는 HA1에 존재하고, 융합에 관여하는 fusion peptide domain은 HA2에 존재한다(Fig. 1). HA 단백질 내 수용체 인식부위가 세포표면의 시알산에 결합하면 세포내이입(endocytosis) 과정을 통해 세포질 내로 유입된 바이러스

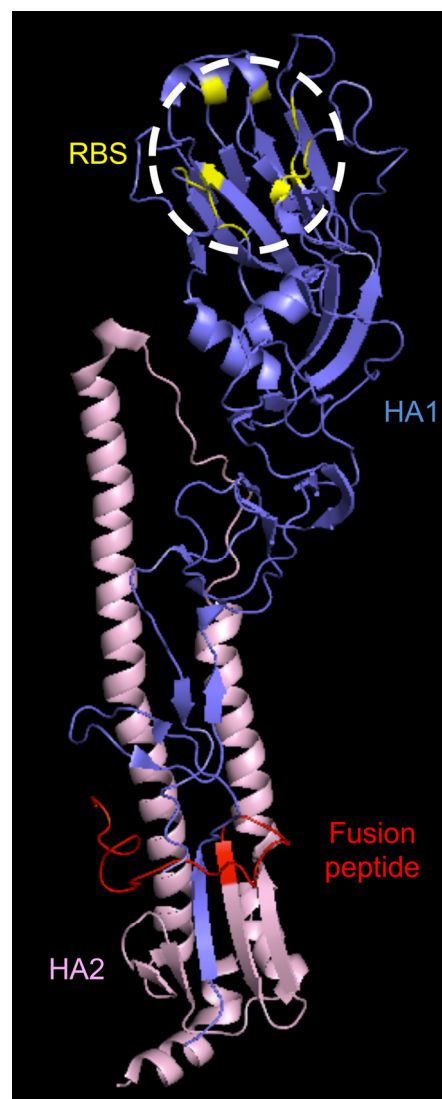


Figure 1. Structure of influenza hemagglutinin. Three-dimensional structure of influenza HA protein was represented using that of A/California/04/2009 (PDB ID: 3LZG) in a PyMOL software. HA domains and regions were specified by colors: slate blue, HA1; light pink, HA2; yellow, receptor binding site (RBS); and red, fusion peptide.

입자는 엔도솜 내에 존재하게 된다. 이 후 M2 단백질에 의해 형성된 이온채널을 통해 수소이온이 엔도솜 내로 이동하면 엔도솜 내 pH는 산성화(acidification) 된다. 이런 환경변화는 HA1 및 HA2 단백질의 구조적 변화(conformational change)를 유발하여 HA2 단백질에 존재하는 소수성 아미노산 분자로 이루어진 fusion peptide 부위가 바깥으로 노출된다. 이렇게 노출된 fusion peptide 부

위는 엔도솜 막으로 삽입되면서 바이러스 외피와 엔도솜 막과의 융합을 매개한다 (5).

2. HA2 단백질의 융합기능 상승을 통한 백신주 생산성 향상

현재 인플루엔자바이러스 백신은 대부분 유정란에서 생산되고 있다. 하지만, 유정란 기반 백신(egg-based vaccine) 생산 시스템은 유정란의 불안정한 공급, 알러지 반응, 백신 생산 후 생기는 대량의 폐기물 등의 문제점을 갖고 있어 이를 보완하는 하나의 대안으로 세포배양을 기반으로 한 백신(cell culture-based vaccine) 생산 시스템이 언급되고 있다 (6). 그러나 세포배양 기반 백신 역시 유정란 기반 백신에 비하여 생산성 및 비용적인 측면에서 비효율적이라는 것이 단점으로 제기되고 있다. 이러한 단점들을 극복하기 위한 하나의 방법으로 현재 HA 단백질에 의한 막 융합기능을 조절하는 연구들이 진행되고 있다. 즉 인플루엔자바이러스 HA 단백질의 아미노산을 융합 활성 효율이 향상되는 방향으로 변환시켜 최종적으로 바이러스의 증식 효율이 상승되어 백신 생산 효율을 강화하는 전략이다.

Murakami *et al.* 등은 PR8 바이러스를 Vero 세포에서 적응(adaptation) 시키기 위해 연속적으로 11회 계대배양하였다. 그리고 계대배양된 바이러스의 유전자 염기서열 변화를 확인하였다. 그 결과, HA2 단백질에는 N117D, NA 단백질은 N255Y, PB2 단백질은 D740N 돌연변이가 유발되는 것을 확인하였다. 그리고 이런 돌연변이들을 갖는 유전자재조합 바이러스를 제작하여 Vero 세포에서 야생형(wild type) PR8 바이러스(wtPR8)와 성장능(growth kinetics)을 비교 분석하였다. 그 결과, HA2 단백질 내 N117D 돌연변이를 갖는 바이러스(HA2 N117D)는 야생형 바이러스 보다 약 100~1,000배 더 높은 바이러스 역가(titer)를 보여 주었다. 이러한 N117D 돌연변이를 백신주 바이러스(vaccine seed virus)의 HA2 단백질에 적용한 결과 이 백신주 바이러스의 증식능력이 향상되는 것을 확인하였다. 그리고 wtPR8에 비해서 HA2 N117D 돌연변이를 갖는 바이러스는 산성조건이 더 낮아지지 않더라도 융합이 유도되는 것이 확인되었다. 즉 HA2 N117D 돌연변이를 가질 경우 융합에 필요한 산성조건이 되는데 필요한 시간이 단축되므로 더 빨리 유전자의 복제가 이루어져 더 많은 수의 RNA 유전체가 복제 될 수 있었다.

Table 1. Amino acids required for enhancing membrane fusion activity

HA region	Residue	Amino acids	Reference ^a
HA1	17	Y	(9)
HA2	109	D	(9)
HA2	111	T	(9)
HA2	114	N	(8)
HA2	117	N	(7)

^a See references for detailed information.

그러므로 HA2 N117D를 가진 인플루엔자바이러스는 세포에서 더 빠르게 융합이 유도되어 자손바이러스의 성장 효율이 더 극대화 될 수 있었다 (7).

이 외에도 H5N1 조류 인플루엔자바이러스의 HA1 단백질 내 Y23H, HA2 단백질 내 N114K의 돌연변이도 융합 활성의 상승 작용에 관여함이 Reed *et al.* 등에 의해 밝혀졌으며 (8), Thoennes *et al.* 등은 HA1 단백질의 17번, HA2 단백질의 111번 아미노산이 융합기능을 조절하는 역할이 있음을 보고하였다(Table 1) (9).

3. 세포막 융합기능이 있는 HA2 단백질을 표적으로 하는 항인플루엔자 제제의 개발

현재 사용되고 있는 항인플루엔자 제제는 인플루엔자 바이러스 NA 단백질의 기능을 억제하는 NAI에 국한되어 있다. 대표적으로 사용되고 있는 NAI는 oseltamivir와 zanamivir가 있다. 그러나 현재 이들의 광범위한 사용으로 이 제제들에 대한 내성바이러스의 출현이 지속적으로 보고되고 있어 NA 단백질 이외 다른 단백질을 표적으로 새로운 작용기전을 갖는 항인플루엔자 제제의 개발은 매우 시급한 실정이다 (10).

이에 새로운 항인플루엔자 제제를 개발하는 다양한 시도가 이루어 지고 있는데 그 중의 하나는 HA2 단백질의 fusion peptide domain에 결합 인플루엔자바이러스의 탈피를 억제하여 복제과정 초기에 바이러스의 증식을 억제할 수 있는 항인플루엔자 제제의 개발이다. 특히 HA 단백질의 줄기부위(stem region)는 receptor binding site가 있는 globular head 부위에 비해 비교적 돌연변이율이 낮아 이 부위의 유전자 염기서열들의 상동성은 매우 높다. 그러므로 이 부위를 표적으로 하는 범용(broad-spectrum)백신

및 항인플루엔자 제제의 개발에 많은 관심이 집중되고 있다 (11).

Ekier *et al.* 등은 HA2 단백질의 fusion peptide domain에 결합하여 다양한 인플루엔자바이러스들을 효과적으로 억제하는 CR6261 단클론항체(monoclonal antibody, mAb)를 개발하였다. 이 CR6261 mAb는 A형 인플루엔자바이러스 중에서도 그룹 1 (H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16)에 속하는 바이러스들에 더 효과적인 항바이러스 효능을 나타내었다. 그리고 H1 아형 및 H5 아형 인플루엔자바이러스에 대해 단백질분해효소 감수성 분석(protease susceptibility assay)을 진행한 결과, CR6261 mAb는 HA2 단백질의 fusion peptide domain에 결합 HA 단백질의 융합을 위한 구조적 변화(conformational change)가 일어나는 것을 방해하여 막 융합을 억제하는 것으로 밝혀졌다 (12). 이와 같은 연구결과를 토대로 현재 HA2 단백질의 융합기능을 억제하는 항체를 개발하여 범용 항인플루엔자 제제를 개발하는 연구들이 활발히 이루어지고 있다 (13~17).

그리고 위와 같은 항체가 아닌 화합물에서 융합기능을 억제하는 약물을 찾으려고 하는 시도들이 많이 이루어지고 있다. Pharmstandard라는 회사에서 개발하여 2005년이 후 러시아에서 판매되고 있는 Arbidol®은 현재 러시아와 중국에서만 허가되어 사용되고 있는 항인플루엔자 제제이다. Arbidol®은 indole 구조를 바탕으로 한 유도체로 항인플루엔자 효능을 갖게 된 것으로 알려져 있다 (18). Arbidol®은 인플루엔자바이러스의 융합기능을 억제하여 항바이러스 효능을 나타내는데 A형 및 B형 인플루엔자바이러스에 광범위한 효능을 나타내는 것으로 알려져 있다 (19, 20). 이외에도 HA 단백질 monomer 사이의 틈(interface)에 형성된 소수성 부위에 결합 막 융합을 저지하여 주로 인플루엔자바이러스 group 2 (H3, H4, H7, H10, H14, H15)에 광범위한 항바이러스 효능을 나타내는 tert-butyl hydroquinone (TBHQ) (21), 다양한 H1N1 바이러스에 항바이러스 효능을 나타내는 benzenesulfonamide의 유도체인 RO5464466 및 RO5487624 (22), 그리고 H5N1 조류 인플루엔자바이러스에 항바이러스 효능을 나타내는 CL-385319 등에 대한 연구결과들이 보고되었다 (23). 이와 같이 인플루엔자바이러스의 융합기능을 억제하여 항바이러스 효능을 나타내는 항인플루엔자 제제의 개발에 대한 관심이 증대되고 있어 향후 HA2 단백질을 표적으로 하는 항인플루엔자 제제의 개발 가능성은 점차 높아

질 것으로 기대된다.

결론

위에서 살펴본 것처럼 인플루엔자바이러스가 복제를 위해 외피를 벗는 융합과정은 바이러스의 증식에 매우 필수적이므로 이 융합기능을 조절하면 바이러스의 증식을 향상시키거나 아니면 바이러스의 증식을 억제할 수 있다. 현재 세포배양 기반 백신 생산 시스템의 낮은 백신 생산성으로 인한 백신 생산 비용증가 문제는 HA2 단백질 내 하나의 돌연변이로 더 빠른 시간에 융합 활성도를 상승시켜 바이러스의 증식을 높이는 전략으로 해결할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 CR6261 mAb와 같은 범용항체는 지속적으로 변신하는 특성을 갖는 인플루엔자바이러스에 효과적일 수 있으며, 대유행이 발발한 초기 아직 백신이 개발되지 못한 위급한 상황에서 효과적으로 사용될 수 있어 대유행을 대비한 하나의 효율적인 대비책이 될 수 있을 것으로 기대된다. 그리고 HA2 단백질을 표적으로 하는 화합물 기반의 신약개발은 항체보다는 좀 더 비용적인 측면에서 효과적으로 사용될 수 있다. 그러므로 HA 단백질의 융합기능 조절은 인플루엔자 감염을 억제하는데 필요한 백신 및 치료제 개발을 위한 새로운 전략이 될 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) Ye ZP, Pal R, Fox JW, Wagner RR. Functional and antigenic domains of the matrix (M1) protein of influenza A virus. *J Virol* 1987;61:239-46.
- 2) Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, *et al.* New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003657.
- 3) Park S, Kim JI, Park MS. Antiviral Agents Against Influenza Viruses. *J Bacteriol Virol* 2012;42:284-93.
- 4) Kim JI, Park S, Lee I, Lee S, Shin S, Won Y, *et al.* GFP-expressing influenza A virus for evaluation of the efficacy of antiviral agents. *J Microbiol* 2012;50:359-62.
- 5) Hamilton BS, Whittaker GR, Daniel S. Influenza virus-mediated membrane fusion: determinants of hemagglutinin fusogenic activity and experimental approaches for assessing virus fusion. *Viruses* 2012;4:1144-68.
- 6) Lee I, Kim JI, Park MS. Cell Culture-based Influenza Vaccines

- as Alternatives to Egg-based Vaccines. *J Bacteriol Virol* 2013; 43:9-17.
- 7) Murakami S, Horimoto T, Ito M, Takano R, Katsura H, Shimojima M, *et al.* Enhanced growth of influenza vaccine seed viruses in vero cells mediated by broadening the optimal pH range for virus membrane fusion. *J Virol* 2012;86:1405-10.
 - 8) Reed ML, Yen HL, DuBois RM, Bridges OA, Salomon R, Webster RG, *et al.* Amino acid residues in the fusion peptide pocket regulate the pH of activation of the H5N1 influenza virus hemagglutinin protein. *J Virol* 2009;83:3568-80.
 - 9) Thoennes S, Li ZN, Lee BJ, Langley WA, Skehel JJ, Russell RJ, *et al.* Analysis of residues near the fusion peptide in the influenza hemagglutinin structure for roles in triggering membrane fusion. *Virology* 2008;370:403-14.
 - 10) Park S, Kim JI, Lee I, Lee S, Hwang MW, Bae JY, *et al.* Susceptibility of human H3N2 influenza virus to oseltamivir in South Korea, 2009-2011. *J Microbiol* 2012;50:1067-70.
 - 11) Kim JI, Park MS. An Universal Approach to Getting Ahead for Influenza B Vaccines. *J Bacteriol Virol* 2012;42:363-7.
 - 12) Ekiert DC, Bhabha G, Elsliger MA, Friesen RH, Jongeneelen M, Throsby M, *et al.* Antibody Recognition of a Highly Conserved Influenza Virus Epitope. *Science* 2009;324:246-51.
 - 13) Cao Z, Meng J, Li X, Wu R, Huang Y, He Y. The epitope and neutralization mechanism of AVFluIgG01, a broad-reactive human monoclonal antibody against H5N1 influenza virus. *PLoS One* 2012;7:e38126.
 - 14) Dreyfus C, Laursen NS, Kwaks T, Zuijdgeest D, Khayat R, Ekiert DC, *et al.* Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses. *Science* 2012;337:1343-8.
 - 15) Ekiert DC, Wilson IA. Broadly neutralizing antibodies against influenza virus and prospects for universal therapies. *Curr Opin Virol* 2012;2:134-41.
 - 16) Oh HL, Akerström S, Shen S, Bereczky S, Karlberg H, Klingström J, *et al.* An antibody against a novel and conserved epitope in the hemagglutinin 1 subunit neutralizes numerous H5N1 influenza viruses. *J Virol* 2010;84:8275-86.
 - 17) Fleishman SJ, Whitehead TA, Ekiert DC, Dreyfus C, Corn JE, Strauch EM, *et al.* Computational design of proteins targeting the conserved stem region of influenza hemagglutinin. *Science* 2011;332:816-21.
 - 18) Brancato V, Peduto A, Wharton S, Martin S, More V, Di Mola A, *et al.* Design of inhibitors of influenza virus membrane fusion: synthesis, structure-activity relationship and *in vitro* antiviral activity of a novel indole series. *Antiviral Res* 2013; 99:125-35.
 - 19) Brooks MJ, Burtseva EI, Ellery PJ, Marsh GA, Lew AM, Slepishkin AN, *et al.* Antiviral activity of arbidol, a broad-spectrum drug for use against respiratory viruses, varies according to test conditions. *J Med Virol* 2012;84:170-81.
 - 20) Leneva IA, Russell RJ, Boriskin YS, Hay AJ. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. *Antiviral Res* 2009;81:132-40.
 - 21) Russell RJ, Kerry PS, Stevens DJ, Steinhauer DA, Martin SR, Gamblin SJ, *et al.* Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:17736-41.
 - 22) Zhu L, Li Y, Li S, Li H, Qiu Z, Lee C, *et al.* Inhibition of influenza A virus (H1N1) fusion by benzenesulfonamide derivatives targeting viral hemagglutinin. *PLoS One* 2011;6: e29120.
 - 23) Li R, Song D, Zhu Z, Xu H, Liu S. An induced pocket for the binding of potent fusion inhibitor CL-385319 with H5N1 influenza virus hemagglutinin. *PLoS One* 2012;7:e41956.