(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0089006
(43) 공개일자 2011년08월04일

(51) Int. Cl.
A61K 31/7105 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0008787
(22) 출원일자 2010년01월29일
심사청구일자 2010년01월29일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
김성수
서울시 송파구 잠실4동 진주아파트 9동 411호
(74) 대리인
손민

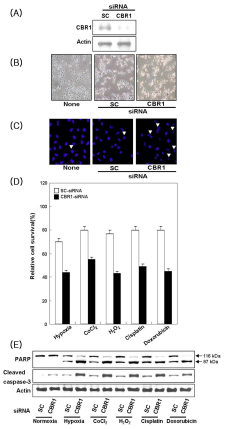
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) ＣＢＲ 1 억제제를 포함하는 간암의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 CBR 1(carbonyl reductase 1)의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 간암의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 CBR 1의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 간암에 대한 항암제 내성억제용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 간암에 대한 항암제 내성억제용 조성물 및 항암제를 포함하는, 간암의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20090091346
부처명 한국연구재단
연구관리전문기관
연구사업명 선도연구센터육성사업(기초의과학분야)
연구과제명 Cycolphilin A의 기능조절을 통한 항산화 치료제 개발
기여율
주관기관 경희대학교 산학협력단(활성산소에대한생체반응연구센터)
연구기간 2002년 09월 01일 ~ 2011년 08월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

CBR 1(carbonyl reductase 1)의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 간암의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 CBR 1의 발현을 억제하는 물질은 siRNA, shRNA 또는 안티센스 핵산인 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 3의 염기서열을 가지는 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 안티센스 핵산은 서열번호 5의 염기서열을 가지는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 CBR 1의 활성을 억제하는 물질은 항체 또는 화합물인 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 CBR 1의 활성을 억제하는 화합물은 하이드록시-PP(hydroxy-PP) 또는 하이드록시-PP-Me(hydroxy-PP-Me)인 조성물.

청구항 7

CBR 1의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 간암에 대한 항암제 내성억제용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 CBR 1의 발현을 억제하는 물질은 siRNA, shRNA 또는 안티센스 핵산인 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 3의 염기서열을 가지는 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 안티센스 핵산은 서열번호 5의 염기서열을 가지는 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 CBR 1의 활성을 억제하는 물질은 항체 또는 화합물인 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 CBR 1의 활성을 억제하는 화합물은 하이드록시-PP(hydroxy-PP) 또는 하이드록시-PP-Me(hydroxy-PP-Me)인 조성물.

청구항 13

제7항 내지 제12항 중 어느 한 항의 조성물 및 항암제를 포함하는, 간암의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 항암제는 메칠로에타민, 클로람부실, 페닐알라닌, 무스타드, 시크로포스파미드, 이포스파미드, 스트렙토조토신, 티오테파, 시스플라틴, 카보플라틴, 닥티노마이신, 독소루비신, 다우노루비신, 이다루비신, 미토산트론, 플리카마이신, 미토마이신, C 블레오마이신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 파클리탁셀, 도세탁셀, 에토포사이드, 테니포사이드, 토포테산 및 이리도테산으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CBR 1(carbonyl reductase 1)의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 간암의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 CBR 1의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 간암에 대한 항암제 내성억제용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 간암에 대한 항암제 내성억제용 조성물 및 항암제를 포함하는, 간암의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인간 카르보닐 리덕타제 1(carbonyl reductase 1, 이하 CBR 1)은 단쇄 디하이드로게나아제/리덕타제 계열(short chain dehydrogenase / reductase (SDR) family)에 속하며 편재해 있는 NADPH 의존효소이다. 277개의 아미노산 잔기로 구성되어 있으며 또한 내생적이며 생체이물적인 다양한 카보닐 화합물들을 포함하여 생물학적이고 약리학적으로 활성 기질 대다수에 촉매 작용을 미친다(Hoffmann F, Maser E. Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. Drug Metab Rev 2007;39:87-144.). CBR 1은 4-옥소논-2-에날 (ONE)와 같이 크게 반응하는 지질 알데하이드를 비활성시키며 DNA와 단백질을 조절할 수 있다(Oppermann U. Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2007;47:293-322.).

[0003] 인간 간암 세포는 빠르게 성장하는 동안 저산소증에 의해 유도되는 산화적 스트레스(oxidative stress)에 놓이게 된다. 저산소증은 유전자 조절과 특정 단백질의 전사 후 조절 작용 등을 통하여 혈관신생(angiogenesis), 적혈구생성, 해당과정과 같은 다수의 세포반응을 유도하는데, 저산소증에서 항상성 반응은 hypoxia-inducible factor (HIF)-1에 의해서 조절된다. HIF-1은 HIF-1α와 HIF-1β의 아단위로 구성된 동종이합체이다(Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. Science 1991;252:954-958.). HIF-1α와 HIF-1β는 저산소증과 성장 인자 자극에 반응하여 세포 내에서 민감하게 조절된다. 정상 산소 상태에서 HIF-1α는 두 개의 프롤린 잔기 (Pro402, Pro504)의 수산화 작용 후에 유비퀴틴화(ubiquitination) 및 프로테아좀 경로에 의해 빠르게 분해된다. 그러므로 HIF-1α는 보통 대부분 세포에서 검출되지 않을 정도로 남아 있다. 산소 농도가 감소할 때 HIF-1α 단백질 수준은 프롤린의 수산화작용이 봉쇄됨에 기인하여 현저하게 증가된다. 증가된 HIF-1α는 저산소증 유도 프로모터에

hypoxia-response elements (HREs; 5'-A/CGTG-3')가 결합함으로써 저산소증과 관련된 많은 유전자들을 전사 촉진시킨다. 인간 간암 중에서도 원발성 간암 (Hepatocellular carcinoma, 이하 HCC)은 가장 흔한 일차성 간암이다 (Rajagopal N. Aravalli, Clifford J. Steer,Erik N. K. Cressman. Molecular Mechanisms of Hepatocellular Carcinoma. Hepatology 2008;48:2047-2063.). HCC 세포들은 일반적으로 저산소 상태에 있으며, HIF-1에 의해 주로 조절되는 세포 방어 기작을 발달시켜서 세포사의 진행을 막는다.

[0004] HCC환자들을 위한 여러 치료방법들이 있지만 일반적으로 장기간 예후에는 효과적이지 않다. 수술은 보통 근치적 치료(curative treatment)로 여겨지기는 하나, 대부분 환자들은 경동맥 화학 색전 요법(transarterial chemoembolization, TACE)을 포함한 고식적 치료(palliative treatments)만을 받을 수 있는 실정이다 (Yamakado K, Nakatsuka A, Takaki H, Yokoi H, Usui M, Sakurai H. Early-stage hepatocellular carcinoma: radiofrequency ablation combined with chemoembolization versus hepatectomy. Radiology 2008;247:260-266.). 하지만, TACE 후에 초기 완화기를 갖는 HCC환자들의 전반적인 재발률은 매우 높기 때문에, HCC의 치료에 높은 효과를 가져올 수 있는 간암 치료용 조성물이 개발될 필요성이 있다.

[0005] 본 발명자들은 저산소 상태에서 간암 세포의 세포사를 저해하는 역할을 하는 것이 무엇인지 조사하였으며, 이와 같은 연구에서 CBR 1이 저산소 상태에서 상위조절되고 HIF-1α에 의해 활성화로 인해 과발현되어서 저산소증이나 항암제와 같은 스트레스 상태에 의해 유도된 세포사멸에 대항하여 암세포를 보호하는 역할을 한다는 것을 처음으로 밝히고, CBR 1이 간암 환자를 위한 치료 및 예방에 있어서 주요한 타겟 분자임을 확인하였으며, 이러한 CBR 1의 발현 또는 활성을 억제하는 물질이 간암세포사를 유도하여 간암을 치료할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 CBR 1(carbonyl reductase 1)의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 간암의 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 CBR 1의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 간암에 대한 항암제 내성억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또다른 목적은 상기 간암에 대한 항암제 내성억제용 조성물 및 항암제를 포함하는, 간암의 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 하나의 양태로서, CBR 1(carbonyl reductase 1)의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 간암의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0010] 본 발명에서 사용하는 용어, "CBR 1(carbonyl reductase 1)"이란 독성 카보닐 화합물, 특히 지질 과산화 산물에 대항하여 세포를 보호하는 기능을 하는 NADPH-의존적 옥시도리덕타제로서, 서열번호 1의 유전자 서열을 갖는 효소(Genbank Accession No. NM_001757)를 말한다. 종래에는 CBR 1에 관하여 생체이물적인 다양한 카보닐 화합물을 포함하여 활성 기질 대다수에 촉매작용을 하며, 마우스에서 펜에틸 아소티오시아네이트(phenethyl isothiocyanate), D3T, 설포로판(sulphorophane)을 포함하는 몇 가지의 유도자로서 반응하는 단백질로 알려져 있었으나, 간암의 치료 타겟이 될 수 있다는 것은 알려진 바가 없었다.

[0011] 본 발명에서 사용하는 용어, "CBR 1의 발현을 억제하는 물질"이란 CBR 1의 유전자 수준의 발현을 억제하는 물질로서, 바람직하게는 CBR 1 유전자에 특이적으로 결합하는 siRNA, shRNA 또는 안티센스 핵산을 말한다.

[0012] 본 발명에서 사용하는 용어, "siRNA"란 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 넉다운 방법으로서 또는 유전자 치료의 방법으로 제공될 수 있다.

[0013] siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는

염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 더욱 바람직하게는 20 내지 70염기이다. siRNA 말단 구조는 표적 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의해 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 또는 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3' 말단 돌출한 구조와 5' 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다. 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 또한 siRNA는 표적 유전자의 발현 억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA 분자 또는 인공의 RNA 분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단 구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중 사슬 RNA 일반의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도 있다.

[0014] 본 발명에서 사용되는 siRNA는 그 자체로 폴리뉴클레오타이드 페어링을 갖는 완전한 형태, 즉 시험관에서 siRNA를 직접 합성한 두 형질전환 과정을 거쳐 세포 안으로 도입되는 형태이거나, 생체 내에 투여된 후 이러한 형태를 갖도록 하나의 단일쇄 올리고뉴클레오타이드 단편과 이의 역방향(reverse) 상보물이 스페이서에 의해 분리된 단일쇄 폴리뉴클레오타이드로부터 유도될 수 있는 형태, 예를 들어 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-유도된 siRNA 발현 카세트를 형질전환 또는 감염(infection) 과정을 거쳐 세포 안으로 도입되는 형태일 수 있다. siRNA를 제조하고 세포 또는 동물로 도입하는 방법의 결정은 목적 및 표적 유전자 산물의 세포 생물학적 기능에 따라 달라질 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 siRNA는 서열번호 3으로 표시되는 서열을 가질 수 있다.

[0015] 본 발명에서 사용되는 용어, "shRNA" 는 siRNA의 고가의 생합성 비용, 낮은 세포 형질감염 효율로 인한 RNA 간섭 효과의 단시간 유지 등의 단점을 극복하기 위한 것으로 RNA 중합효소 Ⅲ의 프로모터로부터 아데노 바이러스, 렌티 바이러스 및 플라스미드 발현 벡터 시스템을 이용하여 이를 세포 내로 도입하여 발현시킬 수 있으며, 이러한 shRNA는 세포 내에 존재하는 siRNA 프로세싱 효소(Dicer or Rnase Ⅲ)에 의해 정확한 구조를 갖는 siRNA로 전환되어 목적 유전자의 사일런싱을 유도함이 널리 알려져 있다.

[0016] 본 발명에서 사용되는 용어, "안티센스 핵산"이란 특정 mRNA 의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 특징이 있다. 본 발명의 안티센스 서열은 CBR 1 mRNA에 상보적이고 CBR 1 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고, CBR 1 mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 핵산의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 8 내지 60 염기이고, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기이다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 안티센스 핵산은 서열번호 5로 표시되는 서열을 가질 수 있다.

[0017] 안티센스 RNA의 경우 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여하거나, 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 할 수 있다. 시험관에서 안티센스 RNA를 합성하는 한 예는 RNA 폴리머라제 I 를 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한가지 예는 인식부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 이런 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.

[0018] 본 발명에서 사용하는 용어, "CBR 1의 활성을 억제하는 물질"이란 CBR 1의 단백질 수준의 활성을 억제하는 물질로서, 바람직하게는 CBR 1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 화합물이다.

[0019] 본 발명에서 사용하는 용어, "항체"란 단일클론항체 및 이에 대한 카이메릭 항체, 인간화 항체 및 인간 항체를 모두 포함하는 것이고, 신규한 항체 외에 이미 당해 기술분야에서 공지된 항체들도 포함될 수 있다. 상기 항체는 CBR 1을 특이적으로 인식하는 결합의 특성을 갖는 한, 2개의 중쇄와 2개의 경쇄의 전체 길이를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체의 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), $F(ab')_2$ 및 Fv 등이 있다.

[0020] 또한, CBR 1의 활성을 억제하는 화합물로는 암세포의 저산소 상태에서 CBR 1 의 활성을 저해하는 역할을 수행하는 것이라면 제한없이 사용할 수 있으며, CBR 1 에 직접 작용하여 활성의 약화시키거나 기질 또는 리간드와의 결합을 방해하여 활성을 저해하는 화합물을 포함한다. 바람직하게는 하이드록시-PP(hydroxy-PP), 또는 하이드록시-PP-Me(hydroxy-PP-Me)이다.

[0021] 본 발명에서 사용하는 용어, "간암"이란 간에 일차적으로 발생하는 악성종양인 원발성 간암 또는 다른 장기에 발생한 암이 간에 전이되어 생기는 전이성 간암을 포함하는 개념이다. 원발성 간암의 예로는 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC), 담관상피암종(cholangiocarcinoma), 간모세포종(hepatoblastoma), 혈관육종

(haemangiosarcoma) 등을 포함하며, 바람직하게는 간세포암종(HCC)을 말하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명에서 사용하는 용어, "예방"이란 동물의 병리학적 세포(예를 들어 과다증식성 또는 신생물 세포)의 발생의 감소를 지칭한다. 예방은 완전할 수 있으며, 이는 예를 들어 개체 내에 병리학적 세포가 전혀 없는 경우이다. 예방은 또한 부분적일 수도 있으며, 이 경우에는 개체 내의 병리학적 세포의 발생이 본 발명을 사용하지 않은 경우에 발생하는 것보다 적은 상태를 의미한다.

[0023] 본 발명에서 사용하는 용어, "치료"란 간암의 하나 이상의 증상의 개선을 유발하거나, 증상의 진행을 저지하는 것을 의미하며 예를 들어 간암의 치료와 관련하여 바람직하게는, 종양 성장 속도를 감소시키거나, 종양 크기를 감소시키거나, 전이의 수를 감소시키거나, 종양 진행 시간을 증가시키거나, 환자의 생존 시간을 늘리는 것을 포함한다.

[0024] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 더 포함할 수 있다. 구체적으로, 경구 투여시에는 결합체, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조될 수 있다.

[0025] 본 발명에서 사용되는 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 경구 투여, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강 내 투여, 경막 내 투여가 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0026] 본 발명의 조성물의 유효 투여량의 범위는 성별, 체표면적, 질환의 종류 및 중증도, 연령, 약물에 대한 민감도, 투여경로 및 배출비율, 투여시간, 치료기간, 표적세포, 발현 수준 등 기타 의학 분야에 잘 알려진 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0027] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 CBR 1(carbonyl reductase 1)의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 간암에 대한 항암제의 내성억제용 조성물에 관한 것이다. 상기 CBR 1의 발현 또는 활성을 억제하는 물질은 상기에서 언급한 바와 같다.

[0028] 본 발명에 사용하는 용어, "항암제의 내성억제용 조성물"이란 화학 물질 항암제로 암을 치료시 상기 조성물이 없을 때보다 있을 때 항암제의 암세포에 대한 독성이 더 강화되거나 증가되는 것으로서, 항암제 내성 등 항암제에 대한 저항성이 줄어들고 항암제의 효과가 더 잘 발휘되는 것을 말한다. 본 발명에 있어서 CBR 1을 억제하는 물질은 항암제에 대해 암세포를 민감화시킴으로써, 항암제에 대한 암세포의 저항성을 줄이고 항암제의 효과를 높이는 기능을 한다.

[0029] 본 발명에서 "항암제에 대한 저항성"이란, 항암제 투여시 투여한 약물이 암세포를 사멸시키지 못하거나 사멸시키는 정도가 미비한 것을 말하는 것으로서 항암제 내성이 가장 빈번한 원인이다. 일반적으로 "항암제에 대한 내성" 이란, 항암제를 이용하여 암 환자를 치료할 때, 치료 초기부터 치료 효과가 없거나 초기에는 암 치료 효과가 있으나 계속적인 치료 과정에서 암 치료 효과가 상실되는 것을 의미한다. 이와 같이, 항암제를 암환자에게 계속 투여하면 점차적으로 효과가 감소하는 현상이 나타나는데, 이는 생체 내에서 항암제에 대하여 내성을 가지는 암세포가 출현하여 암의 화학요법을 곤란하게 하는 것에 기인하는 것이다.

[0030] 또다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 항암제의 내성억제용 조성물에 추가적으로 항암제를 포함하는, 간암의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0031] 본 발명에서 사용하는 용어, "항암제"란 암세포를 죽이기 위해 사용되는 모든 약제를 총칭하며, 대부분의 약제는 암 세포의 DNA의 복제, 전자, 번역 과정을 차단하게 된다. 본 발명의 조성물에 사용될 수 있는 항암제의 종류는 특별히 한정되지 않는다. 항암제는 암세포의 종류, 항암제의 흡수 속도(치료기간과 항암제 투여 경로), 종양의 위치, 종양의 크기 등의 항암제 선택시 고려하는 일반적인 원칙 하에 선택될 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서 사용될 수 있는 항암제는 DNA 알킬화제(DNA alkylating agent)인 메칠로에타민(mechloethamine), 클

로람부실(chlorambucil), 페닐알라닌(phenylalanine), 무스타드(mustard), 시크로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine: BCNU), 로무스틴(lomustine: CCNU), 스트렙토조토신(streptozotocin), 부설판(busulfan), 티오테파(thiotepa), 시스플라틴(cisplatin) 및 카보플라틴(carboplatin) 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명에서 사용될 수 있는 항암제는 항암 항생제(anti-cancer antibiotics)인 닥티노마이신(dactinomycin: actinomycin D), 독소루비신(doxorubicin: adriamycin), 다우노루비신(daunorubicin), 이다루비신(idarubicin), 미토산트론(mitoxantrone), 플리카마이신(plicamycin), 미토마이신(mitomycin) 및 C 블레오마이신(C Bleomycin) 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명에서 사용될 수 있는 항암제는 식물 알카로이드(plant alkaloid)인 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide), 토포테산(topotecan) 및 이리도테산(iridotecan) 등을 들 수 있다. 그러나 본 발명에서 사용될 수 있는 항암제는 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명자들은 다음과 같은 실험을 통하여 CBR 1이 간암의 치료 타겟이 될 수 있으며, 나아가 항암제 내성억제를 위한 타겟이 될 수 있음을 규명하였다.

[0033] 우선, CBR 1 단백질이 저산소증에서 유도되는지 조사하기 위해 정상세포 및 간암세포를 이용하여 웨스턴 블랏 및 RT-PCR을 수행한 결과, CBR 1이 저산소증에서 발현이 증가하고 상위 조절되는 것을 확인하였다(도 1).

[0034] 또한, 저산소증의 중요한 전사인자인 HIF-1α에 의해 CBR 1의 발현이 조절되는지 알아보기 위해 CBR 1 프로모터의 HRE에 대한 HIF-1α의 반응성을 확인하기 위한 루시퍼라제 활성도 분석법을 수행한 결과, 저산소 상태에서 CBR 1 HRE와 HIF-1α와 결합하는 것을 확인하였고 반대로 HIF-1α억제제를 처리한 경우에는 CBR 1 단백질의 수준이 감소함을 확인하였다(도 2). 이에 의해, 저산소증에서 생기는 전사작용에서 HIF-1α이 CBR 1의 발현을 조절한다는 것을 알 수 있었다.

[0035] 또한, 저산소상태, 항암제 등의 스트레스에 의해 유도되는 세포사멸사 정도를 측정한 결과 CBR 1이 과발현된 세포가 가장-형질전환(mock-transfectant) 세포보다 훨씬 더 생존함을 확인하였고(도 3), 이와 대조적으로 CBR 1이 암세포와 같이 과발현된 세포에서 CBR 1을 녹다운시켰을 때에는 스트레스 처리 후 세포 생존이 현저하게 감소한 것을 확인하여(도 4), CBR 1은 암세포를 세포사멸로부터 보호한다는 것을 확인하였다.

[0036] 상기와 같은 여러 스트레스로부터 CBR 1이 세포를 보호하는 분자적 기작을 찾기 위해 ROS를 측정한 결과, CBR 1을 녹다운시킨 세포와 형질전환시킨 세포에서 각각 가장 최고와 최저의 ROS 수준이 측정되어 CBR 1은 산화적 스트레스(oxidative stress)를 저하시켜 세포를 보호하는 것을 알 수 있었다(도 5).

[0037] 나아가, 저산소증과 항암제에 의해 유도되는 세포사에 대항하여 암세포를 보호하는 CBR 1의 역할을 더 알아보기 위해 간암세포인 HepG2 및 Hep3B에 CBR 1의 억제제인 하이드록시-PP 및/또는 하이드록시-PP-Me와 함께 항암제인 시스플라틴 및/또는 독소루비신을 단독처리하거나 혼합처리한 결과, HepG2와 Hep3B 모두에서 세포사를 현저하게 증진시키고, 대부분의 세포들이 생존하지 않는 것을 확인할 수 있었다(도 6). 따라서, 본 발명의 CBR 1 억제제를 포함한 조성물은 간암의 치료 타겟뿐만 아니라, 항암제 내성억제의 타겟이 될 수 있음을 알 수 있다.

[0038] 아울러, CBR 1의 임상적인 관련성을 알아보기 위해 CBR 1의 발현 수준을 인간 HCC 조직 샘플 및 정상 조직 표본에서 비교 측정한 결과, 78개의 HCC case 중 56개에서 CBR 1이 정상 조직에 비해 과발현된 것을 확인하였다(도 7).

발명의 효과

[0039] 본 발명은 간암세포를 세포사멸로부터 보호하는 기능을 새로이 밝힘으로써 CBR 1을 간암 환자를 위한 치료 및 예방에 있어서 주요한 타겟 분자로 하였으며, 본 발명에 따른 CBR 1의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는 조성물은 간암 세포사를 유도하여 간암을 치료 및 예방할 수 있고, 나아가 항암제와 병용투여시 간암에 대한 항암제 내성억제 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 저산소증에 반응하는 CBR 1의 전사 상의 상위조절을 나타낸 것이다. (A)는 웨스턴 블랏 분석법에 따른 결과이며, 전체 세포 용해물은 웨스턴 블랏 조건의 지시된 시간 동안 저산소증에서 노출시킨 후에 추출했다.

(B)는 RT-PCR 분석법에 따른 결과이며, 전체 RNA는 RT-PCR 조건의 지시된 시간 동안 저산소증에서 노출되거나 200μM $CoCl_2$로 처리한 Chang 세포와 HepG2 세포로부터 추출되었다. GAPDH는 loading control로서 사용되었다.

(C)는 Chang 과 HepG2의 CBR 1 mRNA에서의 감소율을 나타낸 것으로, 세포들을 9시간 동안 저산소증에서 노출시킨 후에 정상 산소나 저산소증 조건에서 지시된 시간 동안 5μg/ml 악티노마이신 D(actinomycin D)를 처리하여 배양시켰다. (D)는 실시간 정량 RT-PCR의 결과를 나타낸 것으로, 세포들은 12시간 동안 저산소증에서 배양됐으며 CBR 1 mRNA의 발현 수준의 양을 표시하였다. 데이터는 평균값 ± SE, n=3. *p < 0.01 에 대비하여 정상산소에서 처리되지 않은 HepG2세포를 나타내며, #p < 0.01에 대비하여 정상산소에서 처리되지 않은 HepG2세포를 나타낸다.

도 2는 인간의 CBR 1 프로모터에 대한 기능적 분석을 나타낸 것이다. (A)는 CBR 1 프로모터의 루시퍼라제 리포터(Luciferase reporter)의 구성을 나타내며, (B)는 루시퍼라제 리포터 분석법에 따른 결과를 나타낸다. (A)에서 보여진 각각의 루시퍼라제 리포터 구조체가 형질전환된 Chang 세포는 저산소증에 노출되거나 pcDNA3- HIF-1α와 함께 공동형질전환을 시켰다. 상대적인 루시퍼라제 활성도는 pGL3-Basic의 활성으로 비교하여 표현되었다. 데이터는 평균값 ± SE, n=3. *p < 0.01 에 대비하여 pGL3-CBR 1/1,000과 정상 산소 하에서 pGL3-CBR 1/350를 나타낸다. (C)는 EMSA의 결과를 나타내며, 핵 추출물은 12시간 동안 저산소증에 노출시킨 HepG2 세포로부터 준비되었으며 10μg의 핵 추출물을 ^{32}P-표지된 야생형이나 돌연변이된 올리고뉴클레오타이드 프로브에서 인큐베이션시켰다. 비교 실험을 위해서 비표지 야생형 프로브(Cold)의 100 배 molar excess가 반응 혼합물로서 포함되었다. (D)는 ChIP 분석법의 결과를 나타낸 것으로서 Input, 전체 input chromatin의 1:100 희석으로부터 증폭된 CBR 1: IgG, 비특이적인 IgG를 가진 면역침전법을 사용하였다. (E)는 deguelin 과 CBR 1 발현 상의 17-AAG에 의한 HIF-1의 억제 효과를 나타낸 것으로서, 세포들은 12시간 동안 100 μM deguelin 과 100 μM 17-AAG로 처리되었다. 엑틴은 loading control로서 분석되었다. (F)는 CBR 1의 발현에서 HIF-1αsiRNA의 효과를 나타낸 것으로, 세포들은 HIF-1α siRNA 이나 scrambled siRNA로 형질전환하였다. 세포들을 형질전환한 후 20시간 동안 일반적인 배지에서 배양했으며 그 다음 12시간 동안 저산소증에 노출시켰다.

도 3은 사멸 세포사에 관한 CBR 1의 효과를 나타낸 것이다. (A)는 웨스턴 블랏분석법을 나타낸 것으로, CBR 1의 발현 수준은 가장형(mock)과 야생형(wild type) CBR 1으로 안정된 형질전환(stably transfection)시킨 Chang 세포에서 확인하였다. (B)는 저산소증에 유도되는 세포사의 현미경 관찰 결과를 나타낸 것이며, (C)는 세포사멸 결과를 나타낸 것으로서, 정상 산소(None)나 저산소증에서 세포들은 Hoechst 33342로 염색되었으며 공초점 현미경으로 시각화시켰다. 화살표는 염색체 DNA의 절단을 나타낸다. (D)는 MTT 어세이 결과를 나타낸 것으로, 각각의 형질전환된 세포들을 저산소증, 200 μM $CoCl_2$, 100 μM H_2O_2, 80 μM 시스플라틴이나 0.1 μM 독소루비신으로 72시간 동안 처리하여 분석하였다. (E)는 PARP 와 caspase-3의 절단된(cleavage) 형태를 나타낸 것이다.

도 4는 세포사멸에 대한 녹다운된 CBR 1의 효과를 나타낸 것이다. (A)는 CBR 1의 발현 수준을 나타낸 것으로, CBR 1의 발현 수준은 scrambled되거나 CBR 1 특이적인 siRNA로 형질전환된 Chang 세포에서 확인되었다. (B)는 세포사멸을 유도하는 저산소증에서 현미경 관찰한 결과이며, (C)는 Hoechst 33342 염색법에 의한 결과이다. (D)는 MTT 어세이 결과를 나타낸 것이며, 세포들을 36시간 동안 각각의 조건에 노출시켰다. (E)는 PARP 와 caspase-3의 절단된 형태를 나타낸 것이다.

도 5는 CBR 1의 항산화 효과를 나타낸 것이다. (A)는 ROS 측정 결과를 나타낸 것으로, 각각의 형질전환된 세포들은 24시간 동안 저산소증의 유무에 따라 처리되었다. 그 다음 ROS 수준은 DCF-DA를 사용하여 flow cytometry로 측정하였다. 데이터는 평균값 ± SE, n=3. *p < 0.01 에 대비하여 저산소증에서 가장(mock) 세포를 나타낸 것이며, #p < 0.01 에 대비하여 저산소증에서 처리된 형질전환된 가장(mock) 세포이다. (B)는 웨스턴 블랏 분석법의 결과를 나타낸 것으로서, 샘플들은 24시간 동안 저산소증에서 세포로부터 준비되었다.

도 6은 HepG2 및 Hep3B 세포에서 CBR 1 억제제와 시스플라틴의 혼합 처리에 의한 세포 생존의 감소를 나타낸 것이다. (A)는 MTT 분석법의 결과를 나타낸 것으로서, 세포들은 76시간 동안 80 μM 시스플라틴 그리고 0.2 μM 독소루비신, 25 μM하이드록시-PP의 단독이나 혼합 처리되었다. 데이터는 평균값 ± SE, n=3. *p < 0.01 에 대비하여 HepG2 세포에서 시스플라틴, 독소루비신의 조건에서 하이드록시-PP 또는 하이드록시-PP-Me의 단독처리, **p < 0.01 에 대비하여 Hep3B 세포에서 시스플라틴, 독소루비신의 조건에서 하이드록시-PP 또는 하이드록시-PP-Me의 단독처리에 대한 결과이다. (B)는 PARP와 caspase-3의 절단된 형태를 나타낸 것이며, 엑틴은 로딩 컨트롤로 사용되었다.

도 7은 인간의 HCC 조직에서 CBR 1의 과발현을 나타낸 것이다. 면역조직화학염색법은 정상 간조직과 HCC 간조직

에서 CBR 1 발현의 높거나 낮은 각각의 수준을 나타낸다. 관찰한 10개 모두의 샘플이 정상 간조직과 HCC 간조직에서 CBR 1발현의 같은 유형을 보였지만 여기서는 오직 하나의 대표적인 결과만을 보여주었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0042] **실시예 1: 실험재료 준비**

[0043] DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)과 우태혈청(fetal bovine serum)은 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입했다. CBR 1의 항체는 Imgenex (San Diego, CA)에서 구입하였다. HIF-1α heme oxygenase-1 (HO-1), TRXr-1(thioredoxin reductase-1), NOS2(nitric oxide synthase 2), ALDH(aldehyde dehydrogenase), AR(aldose reductase), PARP, 엑틴 등의 항체들은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)에서 제공받았다. Hsp72, Hsp60, HNE(hydroxynonenal), MDA(malondialdehyde), acrolein Abcam (Cambridge, MA)에서 구입하였다. caspase-3의 항체는 Assay Designs (Ann Arbor, MI)에서 구입하였다. 시스플라틴, $CoCl_2$, 3-(4,5-디메틸티아솔-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드 (MTT), 독소루비신, 하이드록시-PP, 하이드록시-PP-Me, Hoechst 33342, H_2O_2, 악티노마이신 D Sigma Aldrich (St. Louis, MO)에서 구입하였다. pGL3-Basic과 pSV-β-gal 벡터 그리고 KpnI와 HindIII 같은 제한효소는 Promega (Madison, WI)에서 구입하였다. [Y-^{32}P] ATP는 Amersham Biosciences (Little Chalfont, UK)에서 구입하였다.

[0044] **실시예 2: 세포배양 및 저산소증**

[0045] 정상 간세포인 Chang 세포와 HCC 세포인 HepG2, Hep3B 세포들은 모두 10% ㅇ우태혈청이 첨가된 DMEM에서 배양했다. 저산소 상태는 0.1% O_2 의 저산소 챔버에서 이루어졌다.

[0046] **실시예 3: 안정한 세포주의 확립**

[0047] pcDNA3-CBR 1 야생형(3 μg) 이나 pcDNA3 (3 μg)은 OmniPOTER (QBIOgene, OH)를 사용하여 Chang 세포에 형질전환을 하였다. 안정한 형질전환(stable transfection)을 위해서 세포들은 한 달 동안 600 mg/m의 G418이 첨가된 선택적 배지에서 배양되었으며 약물 저항성이 있는 각각의 클론들을 추출하였고 선택적 배지의 사용으로 더 많은 증폭을 위하여 배양하였다.

[0048] **실시예 4: RNA 분리 및 역전사-중합효소 사슬 반응**

[0049] CBR 1의 mRNA 분석을 위하여 Trizol 용액(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 전체 RNA를 추출하였고 AMV 역전사효소 (Promega, Madison, WI) 와 Taq 중합효소를 이용하여 증폭시켰다. CBR 1 mRNA의 전사유전정보를 증폭시키기 위한 프라이머는 다음과 같다:

[0050] CBR 1 forward: 5'-GAATTCATGTCGTCCGGCATCCAT-3' (서열번호 6)

[0051] CBR 1 reverse: 5'-AGCTTTCACCACTGTTCAACTCTCTT-3' (서열번호 7)

[0052] **실시예 5: 실시간 정량 RT-PCR**

[0053] 사용한 프라이머 세트는 다음과 같다:

[0054] GAPDH forward, 5'-CATCGAGCACGGCATCGTCAC-3' (서열번호 8)

[0055] GAPDH reverse, 5'-TCGAAGTCCAGGGCGACATAG-3' (서열번호 9)

[0056] CBR 1 forward, 5'-AACAAGTTTGTGGAAGGATACAAAGAAGGGA-3' (서열번호 10)

[0057] CBR 1 reverse 5'-TGTTCAACTCCTTCTCTGAAACAAATTGTC-3' (서열번호 11)

[0058] 실시간 PCR 증폭을 위해 TaqMan Universal Mastermix (PE Applied Biosystemes, Branchburg, NJ)을 사용하였다. 계산법은 방정식: R (ratio) = 2-[ΔCT sample-ΔCT control]을 사용하는 "Delta-Delta method"에 기반하였다(Gao X, Campian JL, Qian M, Sun XF, Eaton JW. Mitochondrial DNA damage in iron overload. J Biol Chem 2009; 284: 4767-4775). 값은 처리집단의 배수 변화로써 표현하였다. GAPDH를 실시간 RT-PCR를 위한 대조군으로서 증폭하였다.

[0059] **실시예 6: 프로모터 분석 및 루시퍼라제 분석**

[0060] CBR 1 프로모터 서열은 Genomatix MatInspector(http://www.genomatix.de)를 사용해서 분석했다. 루시퍼라제 리포터 플라스미드의 제작을 위해 CBR 1 프로모터 서열의 1,000 bp가 PCR로 증폭되었다. 증폭된 단편은 KpnI, HindIII 자리가 있는 pGL3 basic vector (Promega, Madison, WI)에서 클로닝하였다. 돌연변이 분석을 위해서 HRE 자리는 PCR-based site-directed mutagenesis에 의해 돌연변이하였다. CBR 1 프로모터나 돌연변이된 HRE의 다양한 지역을 포함하는 루시퍼라제 리포터 제작을 위해 사용된 프라이머는 다음과 같다.

[0061] pGL3-CBR 1-1000 forward, 5'-CGGGTACCCACATCTGGA-3' (서열번호 12)

[0062] pGL3-CBR 1-1000 reverse, 5'-ATAAGCTTGCCGCTG AGCGCGCAGGC-3' (서열번호 13)

[0063] pGL3-CBR 1-350 forward, 5'-CCGGTACCGAATGGTTCT TCACT-3' (서열번호 14)

[0064] pGL3-CBR 1-350 reverse, 5'-ATAAGCTTGCCGCTGAGCGCGCAGGC-3' (서열번호 15)

[0065] pGL3-CBR 1-350M forward, 5'-CTTCACTGCCACGGGGGCAGCCAA-3' (서열번호 16)

[0066] pGL3-CBR 1-350M reverse, 5'-TTGGCTGCCCACGGGGCAGTGAAG-3' (서열번호 17)

[0067] Chang 세포들은 internal control plasmid인 pCMV-Lac (Promega, Madison, WI)과 함께 pGL3 basic-derived plasmid 0.2ug으로 공동형질전환하였다. 루시퍼라제와 β-gal의 활성도는(기재하지 않음) microplate reader (BIO-RAD)에서 세포용해물 50 μl를 사용하여 측정했다. 그리고 루시퍼라제 활성도는 종래 보고된 것처럼 β-gal 활성도에 기초하여 표준화했다(Haque M, Davis DA, Wang V, Widmer I, Yarchoan R. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus(human herpesvirus 8) contains hypoxia response elements: relevance to lytic induction by hypoxia. J virol 2003;77: 6761-6768.).

[0068] **실시예 7: 전기영동 이동도 검사(EMSA)**

[0069] EMSA는 CBR 1 야생형 프로모터, 5'-CTTCACTGCCACGTGGGCAGCCAA-3'; CBR 1- M, 5'-CTTCACTGCCAAAAGGGCAGCCAA-3'의 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 종래 설명되었던 것처럼 실행하였다(Choi KJ, Piao YJ, Lim MJ, Kim JH, Ha J, Choe W, et al. Overexpressed cyclophilin A in cancer cells reders resistance to hypoxia- and cisplatin-induced cell death. Cancer Res 2007;678: 3654-3662.). 프로브는 [Y-^{32}P] ATP로 표지되었다. 비교 실험(competition study)를 위해서 비표지된 100-fold molar oligonucloetide가 방사선 표지된 프로브를 첨가하기 전에 반응혼합물로 첨가되었다.

[0070] CBR 1-WT, 5'-CTTCACTGCCACGTGGGCAGCCAA-3' (서열번호 18)

[0071] CBR 1-M, 5'-CTTCACTGCCAAAAGGGCAGCCAA-3' (서열번호 19)

[0072]

[0073] **실시예 8: 크로마틴 면역침강법(ChIP)**

[0074] ChIP은 종래 설명되었던 것처럼 실행하였다(Kim J, Choi TG, Ding Y, Kim Y, Ha KS, Lee KH, et al. Overexpressed cyclophilin B suppresses apoptosis associated with ROS and Ca2+ homeostasis after ER stress. J Cell SCi 2008;121: 3636-3648.). 크로스-링크된 크로마틴이 HIF-1α에 대한 항체와 함께 면역침전법에서 사용되었으며 CBR-HRE는 5'-GAAGAAAACCCCTCAGAGAACC-3'과 5'-CTCGCCGGGGTGCGGAGCAGGCGG-3'인 프라이머를 사용하여 증폭시켰다.

[0075] CBR-HRE forward, 5'-GAAGAAAACCCCTCAGAGAACC-3' (서열번호 20)

[0076] CBR-HRE reverse, 5'-CTCGCCGGGGTGCGGAGCAGGCGG-3' (서열번호 21)

[0077] **실시예 9: RNA interference**

[0078] 각각의 CBR 1 (CBR 1-siRNA)이나 scrambled sequence (scrambled-siRNA)의 특이적인 siRNA는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO)로부터 준비하였다. siRNA (0.5 μg)는 OmniPOTER transfection 용액 (QBIOgene, OH)을 사용해서 형질전환시켰다. siRNA 타겟 서열은 다음과 같다.

[0079] CBR 1-siRNA sense, 5'-CACAGAAUUACUCCCUCUCUATT-3' (서열번호 3)

[0080] CBR 1-siRNA antisense, 5'-UAGAGGAGUAAUUCUGUGTT-3' (서열번호 4)

[0081] CBR 1-scrambled-siRNA 5'-UCCCAGAUAGAGACUUCAATT-3' (서열번호 22)

[0082] CBR 1-anti-sense, 5'-UUGAAGUCUCUAUCUGGGATT-3' (서열번호 5)

[0083] CBR 1의 siRNA-based interference에 대한 효율성은 실험으로 확인했다.

[0084] **실시예 10: MTT 분석법**

[0085] 실험은 12 웰 플레이트에서 수행하였다. 광학밀도는 마이크로플레이트 판독기 (Bio-Rad)로 550nm에서 측정하였다. 세포생존율은 시약이 처리되지 않은 세포에서 흡광도의 백분율에 의해 표현되었다.

[0086] **실시예 11: Hoechst 33342 염색법**

[0087] 세포들은 Hoechst 33342 로딩 다이(loading dye)와 함께 30분 동안 배양되었고 4 % 포름알데하이드 안에서 20분 동안 고정되었다. 차가운 PBS로 3번 세척 후, 염색된 세포들은 공초점 레이저 현미경 (META 510, Zeiss, Thornwood NY)을 사용하여 관찰하였다,

[0088] **실시예 12: 조직 샘플**

[0089] 78개의 간암 조직 샘플을 2003년과 2004년 사이에 수집하였고 포르말린과 파라핀으로 고정시킨 HCC 표본들이 이 연구에 사용되었다. 환자들은 수술 이전에 어떠한 치료도 받지 않았다. 헤마톡실린과 에오신으로 염색된 6μm의 절단면은 세 명의 병리학자들에 의해 각각 검토되었다. 조직 미세배열 블록(tissue microarray block)을 제작하기 위해 두 명의 병리학자들이 조직학적으로 절편을 선별했고 종양 세포 표본의 구역을 선별했다. 각각의 암 구역과 비암 구역으로부터 두 가지와 한가지의 조직 코어 샘플들은 영리적으로 사용하는 미세배열 기계(Beecher Intruments, Microarray Technologies, Silver Spring, MD, USA)를 이용해서 새로운 수용체 파라핀 블록(recipient paraffin block)에 넣어졌다.

[0090] **실시예 13: 면역조직화학**

[0091] 탈파라핀화(deparaffinization)되고 재수화(rehydration)시킨 조직은 1:1000으로 희석시킨 CBR 1의 단일클론항체(Imgenex, San Diego, CA)로 4℃에서 밤새 배양하였다. 면역염색 부분(immunostaining section)은 Dako EnVision Detection Kit (Dako, Denmark)를 사용하여 노출시켰다. 헤마톡실린과 에오신으로 염색된 부분은 조직의 구조적인 보전을 확실히 하여 실험하였다.

[0092] **실험결과**

[0093] **1. CBR 1은 저산소증에 의해 전사상에서 상위 조절(up-regulation)된다.**

[0094] CBR 1 단백질이 저산소증에서 유도되는지 조사하기 위해 우리는 특정한 시간 동안 저산소 상태의 조건에서

Chang 세포와 HepG2 세포를 이용해서 Western blot 분석법을 수행하였다. 도 1(A)에서 보듯이 저산소증에 노출한 지 3시간 후에 CBR 1의 빠른 증가를 발견하였고 12시간까지 계속해서 증가하였다. 저산소증에서 CBR 1의 mRNA 유도를 알아보기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 저산소증 하에서 CBR 1의 mRNA 수준이 확실하게 증가하는 것으로 나타난다 (도 1(B)). 저산소증의 mimicking agent인 $CoCl_2$는 저산소증과 같은 결과를 나타냈다.

mRNA 안정화의 가능성을 제거시키기 위해서 9시간 동안 저산소증에서 세포를 유지시켰으며 5 μg/ml의 악티노마이신 D를 처리하여 다른 12시간 동안 저산소증과 정상적인 산소조건에서 배양하였다. Actinomycin D는 CBR 1의 mRNA에 전사된 유전정보를 처음부터 끝까지의 합성(*de novo* synthesis)을 억제시키기 위해 사용된다. 도 1(C)에서 보듯이, CBR 1의 mRNA 반감기는 저산소증에서 CBR 1의 mRNA가 전사 수준에서 확실히 조절된다는 것을 가리키며 두 조건들에서도 유사하게 나타났다. 실시간-정량 RT-PCR 또한 저산소증에서 CBR 1 mRNA 수준이 현저한 증가를 보였다(도 1(D)).

[0095] **2. CBR 1 프로모터는 HIF-1α 전사인자에 의해 활성화된다.**

[0096] HIF-1 α은 저산소증에서 중요한 전사인자이다. 저산소증에 의한 CBR 1 mRNA 수준의 상위 조절(Up-regulation)은 우리에게 CBR 1 프로모터가 과연 hypoxia-responsive element (HRE)와 HIF-1 α 결합 부위를 갖는지에 대하여 찾도록 이끌었다. 먼저, CBR 1 유전자의 프로모터에 대한 생물정보학적 분석은 HRE의 공통서열(consensus sequence)를 찾기 위해서 수행하였다. 왜냐하면, HRE 서열은 HIF-1 α결합 부위 (HBS), 5'- A/CGTG - 3', 그리고 HBS의 down 혹은 upstream의 8-9개의 뉴클레오타이드로 이루어진 HIF-1 α ancillary sequence (HAS), GGCAGCCAA를 포함하기 때문에, 본 발명자들은 CBR 1 프로모터에서 두 가지 모두의 서열을 찾아 보았다. 그 결과, 본 발명자들은 CBR 1 개시코돈에서 -313 bp의 upstream에 위치해 있는 HBS와 HAS 모두를 포함하는 한 가지 유형의 HRE를 찾아내었다(도 2(A)). 저산소증 하에서 HRE에 대한 HIF-1 α의 반응성을 확인해 보기 위해 본 발명자들은 몇 가지의 루시퍼라제 리포터 구조체를 구상하였으며 저산소증 상태에서 루시퍼라제 활성도 분석법을 수행하였다(도 2(A)). 비어있는 pGL3-basic plasmid는 정상산소 또는 저산소증 조건, 어느 곳에도 루시퍼라제 활성도를 얻을 수 없었다. 반대로 pGL3-CBR 1-1,000 과 pGL3-CBR 1-350에서는 저산소증에서 루시퍼라제 활성도가 현저하게 증가됨을 보인 반면, HRE에서 5'-CGTG-3' 대신 5'-TATA-3'을 포함하는 pGL3-CBR 1-350M은 상당히 표준적인 적은 활성도를 보였다. HIF-1α와 공동형질전환한 실험 역시 같은 결과를 보였다(도 2(B)).

[0097] 다음으로, 본 발명자들은 저산소증에서 12시간 배양시킨 Chang 세포와 HepG2 세포들로부터 핵을 추출하여 EMSA 실험을 수행하였다. 야생형이나 HRE의 돌연변이 된 버젼을 포함한 올리고뉴클레오타이드를 실험에 사용하였다. HepG2에서 추출한 핵으로 인큐베이션된 야생형 올리고뉴클레오타이드에서는 돌연변이된 올리고뉴클레오타이드나 콜드 올리고뉴클레오타이드의 경쟁적 억제에서 어떠한 밴드도 탐지되지 않은 반면, 이동성변위(mobility-shift)가 된 밴드가 나타났다(도 2(C)). Chang 세포에서도 같은 결과가 나왔다(데이터 기재하지 않음). ChIP 분석법에서도 역시 CBR 1 HRE가 쉽게 HIF-1α와 결합한다 것을 보여준다(도 2(D)).

[0098] CBR 1 유도에 대한 HIF-1α의 더 나은 효과를 조사하기 위해 우리는 저산소증에서 12시간 동안 HIF-1α억제제인 deguelin 과 17-AAG를 Chang 세포와 HepG2 세포에 처리하고 나서 deguelin 과 17-AAG가 HIF-1α 단백질 수준과 마찬가지로 정말 CBR 1 단백질 수준을 감소시키는지 관찰하였다(도 2(E)). HIF-1 α의 녹다운(knockdown)을 위해 siRNA를 사용했을 때에도 위 억제제들과 같은 결과가 나타났다(도 2(F)). 이 모든 결과들에 기초하여 본 발명자들은 저산소증에서 생기는 전사작용에서 HIF-1α가 CBR 1 발현을 조절한다고 결론지었다.

[0099]

[0100] **3. CBR 1의 과발현은 저산소증, H_2O_2 그리고 세포사멸을 유도하는 시스플라틴, 독소루비신으로부터 세포를 보호한다.**

[0101] HIF-1 α는 고형종양세포의 성장과 생존에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 본 발명자들은 CBR 1이 HIF-1α의 활성을 통해서 저산소증에 의해 유도된다고 증명하였다. 따라서, 본 발명자들은 저산소증, $CoCl_2$, 시스플라틴, 독소루비신, 및H_2O_2 처리와 같은 산화적 스트레스(oxidative stress)를 포함하는 세포 내 스트레스 반응에서 CBR 1이 HCC 세포의 성장과 생존에 중요한 역할을 할지도 모른다는 가설을 세웠다. 시스플라틴과 독소루비신은 ROS의 발생을 통하여 어느 정도의 세포사멸을 유도한다고 알려져 있다. HepG2 세포에서 CBR 1을 과발현하는 안정된 세포주(stable cell line)을 만들기 어렵기 때문에, 본 발명자들은 HepG2 대신에 Chang 세포를 이용해서 CBR 1의 형질전환된 안정한 세포를 만들었다. CBR 1은 가장 형질전환(mock transfectant) 세포보다 안

정된 형질전환 세포에서 약 3배 더 높게 과발현 되었다(도 3(A)). 이러한 세포들을 72시간까지 저산소증에서 노출시켰을 때 CBR 1을 과발현하는 세포들이 가장 형질전환 세포보다 훨씬 더 생존하였다 (도 3(B)). Hoechst 33342 염색법 또한 유사한 결과를 보였다(도 3(C)).

[0102] $CoCl_2$, H_2O_2, 시스플라틴 그리고 독소루비신을 포함한 다른 스트레스에 대한 CBR 1의 효과를 보기 위하여 우리는 PARP 와 caspase-3 단백질의 cleavage와 같은 apoptotic marker를 확인하기 위해(도 3(E)) 웨스턴 블랏 분석을 한 것과 마찬가지로, MTT 분석법을 수행하였다(도 3(D)). 이러한 실험들을 위해서 세포들을 72시간 동안 같은 조건에서 처리했다. 이 모든 결과들은 위와 같이 과발현된 CBR 1은 스트레스에 의해 유도되는 사멸세포사(apoptotic cell death)로부터 세포를 보호한다는 것을 보여준다.

[0103] **4. 녹다운된 CBR 1은 저산소증, H_2O_2, 시스플라틴 ,독소루비신을 처리하면 세포사를 증진시킨다.**

[0104] 저산소증, H_2O_2, 시스플라틴, 독소루비신 처리에 반응하는 세포사에 관한 CBR 1의 더 나은 역할을 찾기 위해 우리는 CBR 1의 특이적인 siRNA를 사용하여 RNA interference 실험을 하였다. CBR 1의 특이적인 siRNA로 실험했을 때 CBR 1의 발현은 거의 완전히 억제되었으며 웨스턴 블랏 실험법으로 확인하였다(도 4(A)). 이런 실험들을 위해서 세포사율의 뚜렷한 차이를 위해 CBR 1이 과발현된 세포를 사용해서 76시간 보다는 36시간 동안에서 각각의 스트레스를 처리했다. 먼저 scrambled-siRNA와 CBR 1-siRNA을 형질전환한 세포들을 가지고 현미경에서 관찰하였다(도 4(B)). 또한, Hoechst 33342을 염색한 후 관찰하였다(도 4(C)). scrambled-siRNA과 비교했을 때, CBR 1 특이적인 siRNA는 세포 생존이 현저하게 감소했다. 다른 스트레스에 대해 MTT분석법(도 4(D))과 세포사멸 마커 탐지를 위한 웨스턴 블랏을 이용한 실험을 했을 때에도 같은 결과를 얻었다(도 4(E)).

[0105] **5. CBR 1은 산화적 스트레스를 저하시켜 세포를 보호한다.**

[0106] 위에서 설명했던 여러 스트레스로부터 CBR 1이 세포를 보호하는 분자적 기작(molecular mechanism)을 찾기 위해 우리는 먼저 저산소증에서 24시간 동안 노출시킨 후에 mock, wild type CBR 1, scrambled-siRNA, CBR 1 특이적인 siRNA가 형질전환된 세포에서 ROS를 측정했다. ROS 수준은 30분 동안 DCF-DA로 인큐베이션시킨 후에 측정했다. 기대했던 것처럼 각각의 CBR 1 특이적 siRNA, 야생형 CBR 1을 형질전환한 세포에서 최고와 최저의 ROS 수준이 측정되었다(도 5(A)). 이러한 측정들의 더 나은 증명을 위해, 본 발명자들은 heme oxygenase-1 (HO-1), thioredoxin reductase-1 (TRXr-1), nitric oxide synthase 2 (NOS2), Hsp72, Hsp60 과 같은 다양한 스트레스 반응성 단백질의 발현수준, 그리고 HNE, MDA , acrolein과 같은 지질과산화산물(lipid peroxidation product)의 발현 정도를 웨스턴 블랏 분석법으로 측정했다. 이 결과들은 산화적 스트레스 마커들이 야생형 CBR 1 세포에서는 감소했지만 CBR 1 특이적인 siRNA 세포에서는 증가된 것을 보여준다. 그리고 HNE를 해독시키는 것으로 알려져 있는 aldehyde dehydrogenase (ALDH) 과 aldose reductase (AR)등의 효소는 CBR 1이 과발현된 세포에서는 감소했지만 CBR 1이 녹다운된 세포에서는 증가하였다(도 5(B)).

[0107] **6. 하이드록시-PP, 하이드록시-PP-Me와 시스플라틴, 독소루비신을 혼합 처리할 때 HepG2와 Hep3B 세포에서 항암제 효과를 증진시킨다.**

[0108] 최근 하이드록시-PP과 하이드록시l-PP-Me는 CBR 1의 선택적인 억제제로서 보고되었다. 저산소증과 항암제에 의해 유도되는 세포사에 대항하여 보호하는 CBR 1의 역할을 더 알아보기 위해, 본 발명자들은 HepG2 및 Hep3B 세포에 하이드록시-PP-Me와 nonkinase target 억제제인 하이드록시-PP와 함께 시스플라틴과 독소루비신을 단독 처리하거나 혼합 처리하였다. 본 발명자들의 MTT분석은 80μM 시스플라틴과 0.2 μM 독소루비신을 25 μM 하이드록시-PP나 하이드록시-PP-Me로 72시간 동안 단독 또는 혼합 처리하였으며 하이드록시-PP-Me이 HepG2 와 Hep3B 두 세포 모두에서 시스플라틴 또는 독소루비신에 의한 세포사를 현저하게 증진시켰다(도 6(A)). 두 조건들이 혼합 처리되었을 때 대부분의 세포들이 생존하지 못했다. 웨스턴 블랏 분석 또한 하이드록시-PP 및 하이드록시-PP-Me이 시스플라틴과 독소루비신에 혼합 처리 되었을 때 PARP 와 caspase-3의 증가된 절단이 나타났다(도 6(B) top, middle). 기대했던 것처럼 p53이 결여된 Hep3B 세포는 HepG2 세포보다 사멸세포사에 대한 저항성이 있었다(도 6(A), (B) down). 본 발명의 이러한 결과는 CBR 1을 억제하는 것이 심각한 단계의 간암에서 타겟으로 사용할 수 있음을 나타내는 것이며, p53이 결여된 HCC에서도 항암제의 효과를 증진시킬 수 있음을 보여주는 것이다.

[0109] **7. CBR 1은 인간의 원발성 간암 조직에도 과발현된다.**

[0110] CBR 1의 임상적인 관련성을 알아보기 위해, CBR 1의 발현 수준을 인간 HCC 조직 샘플에서 측정했다. 10가지의 병리학적으로 확인된 HCC와 정상 조직 표본을 획득했고 CBR 1의 발현은 면역조직화학염색법(immunohistochemical analysis)을 통해서 비교되었다. CBR 1에 대한 강한 면역반응성은 78개의 HCC case 중 56개에서 암세포의 세포질에서 명확하게 드러났으며 이는 약 72%의 HCC case 에서 강한 CBR 1 염색을 보인다는 것을 나타낸다(표 1). 유사한 비발암 간세포는 CBR 1이 음성이었거나 약한 양성을 띠었다. 전형적인 CBR 1의 과발현은 도 7(A)에서 보여진다. 흥미롭게도 CBR 1의 발현 수준은 종양 등급(tumor grade)과는 관계가 없었다. 10개의 HCC 샘플에서 immunoblotting 분석법은 유사한 결과를 보여주었다(도 7(B)).

[0111] [표 1]

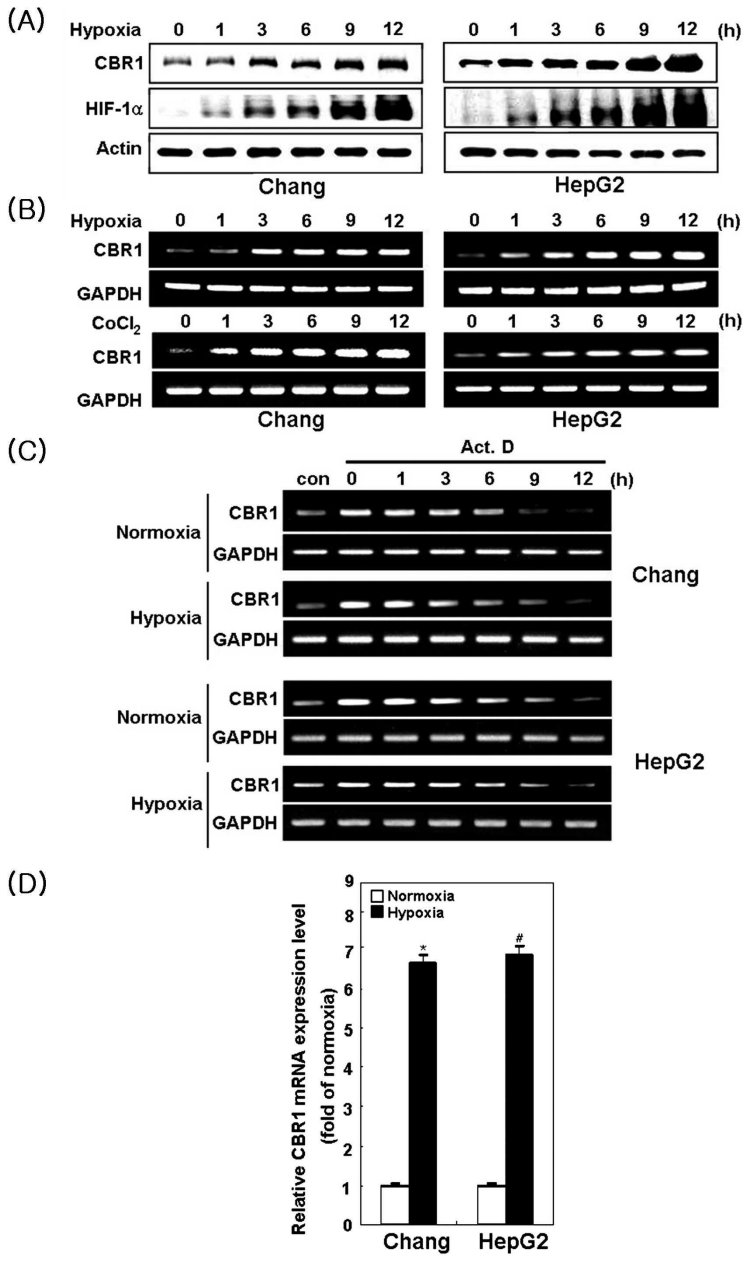
[0112] 78명의 환자에서 CBR 1의 관련 수준.

Grading	Gender	CBR1 expression (n=78)			
		-	+	++	+++
Grade I	M	0	0	7	0
	F	0	1	2	0
Grade II	M	4	4	8	2
	F	1	0	1	0
Grade III	M	3	3	16	7
	F	2	2	6	1
Grade IV	M	0	1	2	0
	F	0	0	0	0

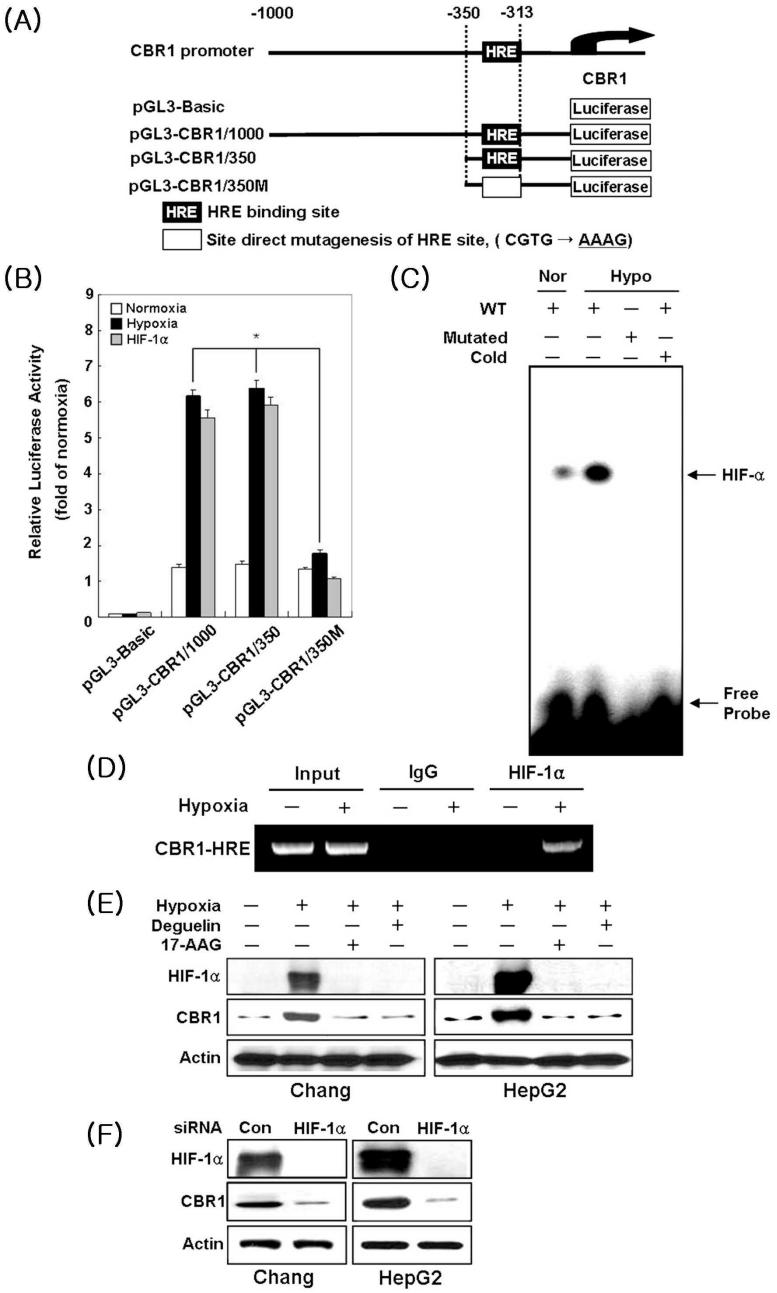
[0113] Note: 다변수 모델은 종양 등급, 성별, 병리학적 단계에서 조절되었다.

도면

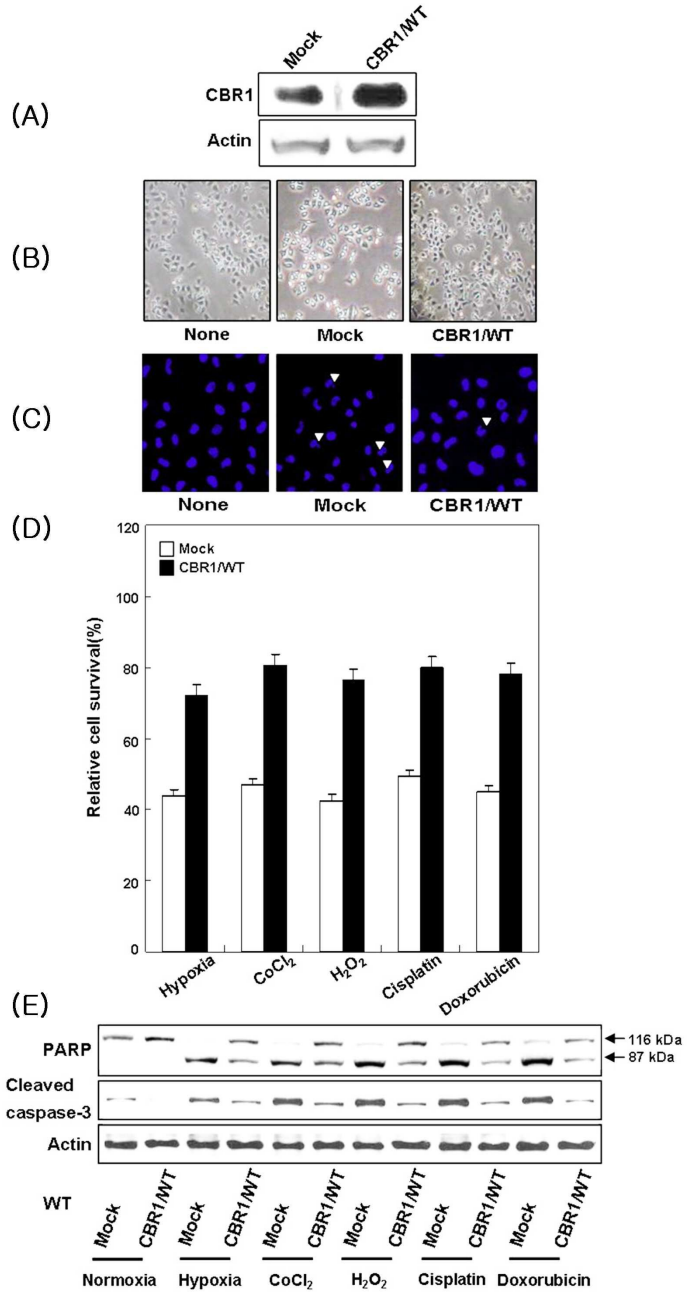
도면1


(A)
Hypoxia 0 1 3 6 9 12 0 1 3 6 9 12 (h)
CBR1
HIF-1α
Actin
Chang
HepG2
(B)
Hypoxia 0 1 3 6 9 12 0 1 3 6 9 12 (h)
CBR1
GAPDH
CoCl2 0 1 3 6 9 12 0 1 3 6 9 12 (h)
CBR1
GAPDH
Chang
HepG2
(C)
Act. D
con 0 1 3 6 9 12 (h)
Normoxia
CBR1
GAPDH
Hypoxia
CBR1
GAPDH
Chang
Normoxia
CBR1
GAPDH
Hypoxia
CBR1
GAPDH
HepG2
(D)
Normoxia
Hypoxia
Relative CBR1 mRNA expression level (fold of normoxia)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
*
#
Chang
HepG2

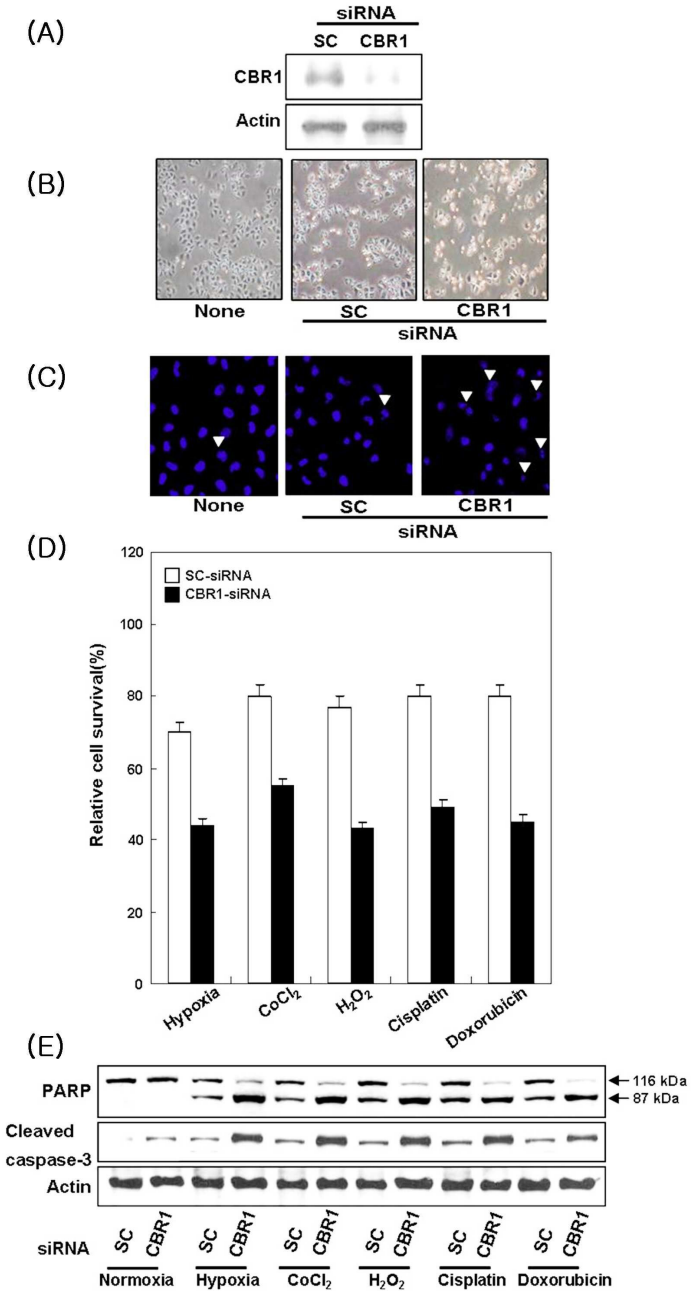
도면2


(A)
-1000
-350
-313
CBR1 promoter
HRE
CBR1
pGL3-Basic
pGL3-CBR1/1000
pGL3-CBR1/350
pGL3-CBR1/350M
Luciferase
HRE binding site
Site direct mutagenesis of HRE site, (CGTG → AAAG)
(B)
Normoxia
Hypoxia
HIF-1α
Relative Luciferase Activity (fold of normoxia)
pGL3-Basic
pGL3-CBR1/1000
pGL3-CBR1/350
pGL3-CBR1/350M
(C)
Nor
Hypo
WT
Mutated
Cold
HIF-α
Free Probe
(D)
Input
IgG
HIF-1α
Hypoxia
CBR1-HRE
(E)
Hypoxia
Deguelin
17-AAG
HIF-1α
CBR1
Actin
Chang
HepG2
(F)
siRNA
Con
HIF-1α
HIF-1α
CBR1
Actin
Chang
HepG2

도면3

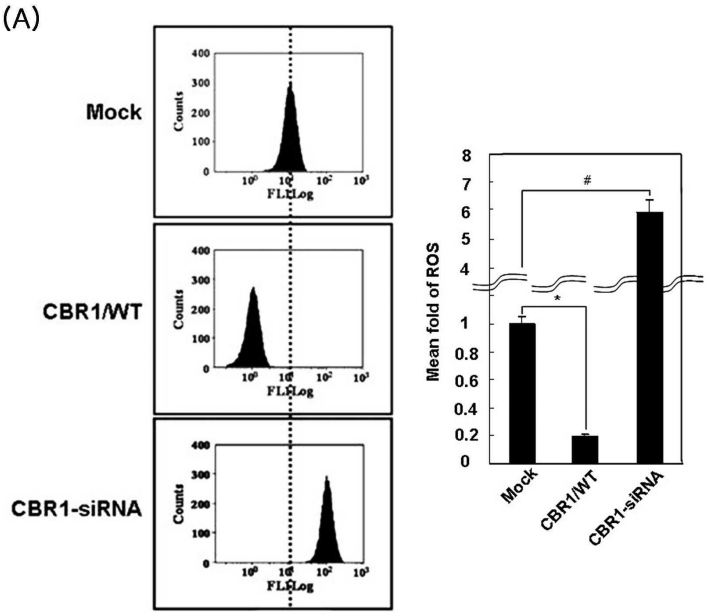

(A)
Mock
CBR1/WT
CBR1
Actin
(B)
None
Mock
CBR1/WT
(C)
None
Mock
CBR1/WT
(D)
Mock
CBR1/WT
Relative cell survival(%)
120
100
80
60
40
20
0
Hypoxia
CoCl2
H2O2
Cisplatin
Doxorubicin
(E)
PARP
Cleaved caspase-3
Actin
116 kDa
87 kDa
WT
Mock
CBR1/WT
Normoxia
Hypoxia
CoCl2
H2O2
Cisplatin
Doxorubicin

도면4

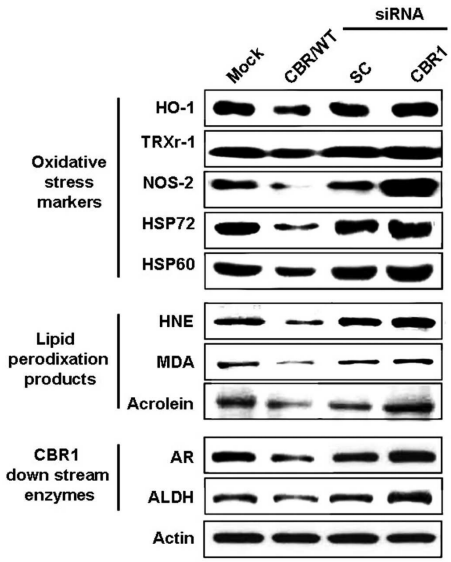

(A)
siRNA
SC
CBR1
CBR1
Actin
(B)
None
SC
CBR1
siRNA
(C)
None
SC
CBR1
siRNA
(D)
SC-siRNA
CBR1-siRNA
Relative cell survival(%)
120
100
80
60
40
20
0
Hypoxia
CoCl2
H2O2
Cisplatin
Doxorubicin
(E)
PARP
Cleaved
caspase-3
Actin
116 kDa
87 kDa
siRNA
SC
CBR1
Normoxia
Hypoxia
CoCl2
H2O2
Cisplatin
Doxorubicin

도면5

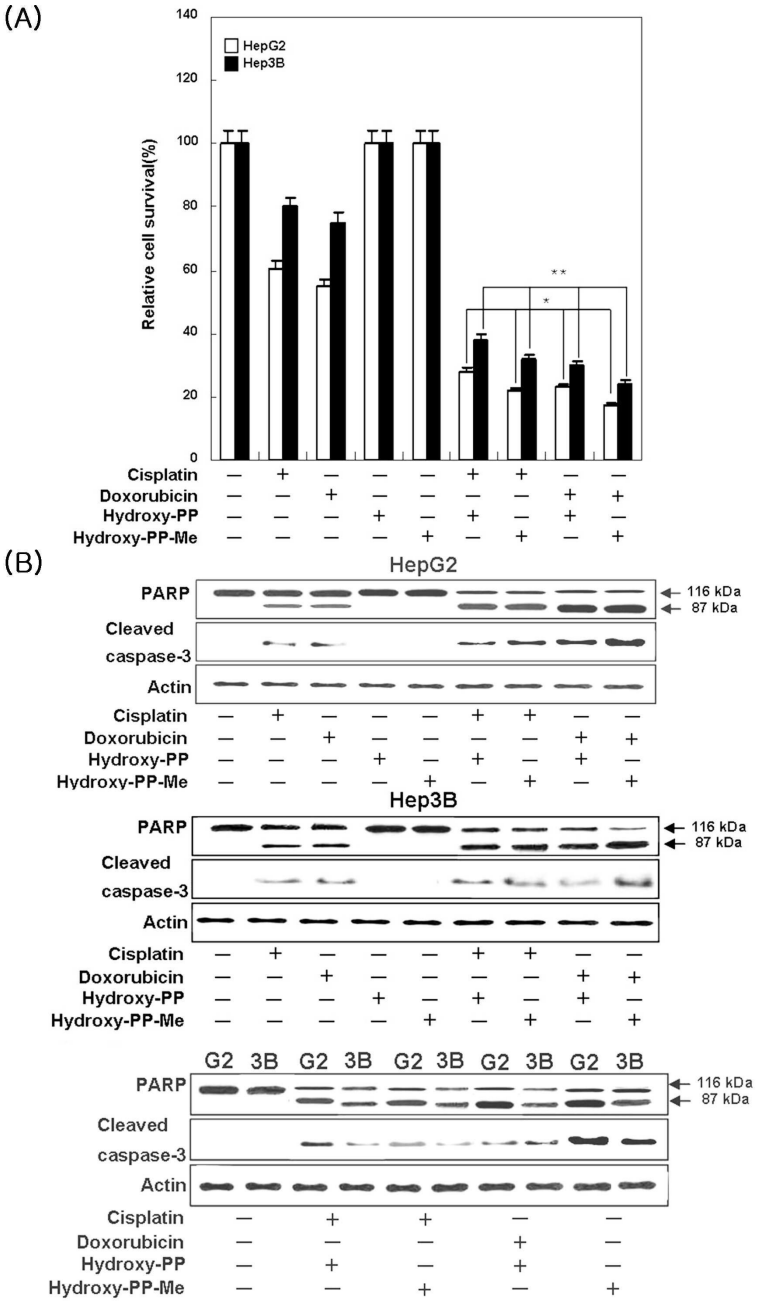
(A)


Mock
CBR1/WT
CBR1-siRNA
Counts
FL1-Log
Mean fold of ROS
Mock
CBR1/WT
CBR1-siRNA

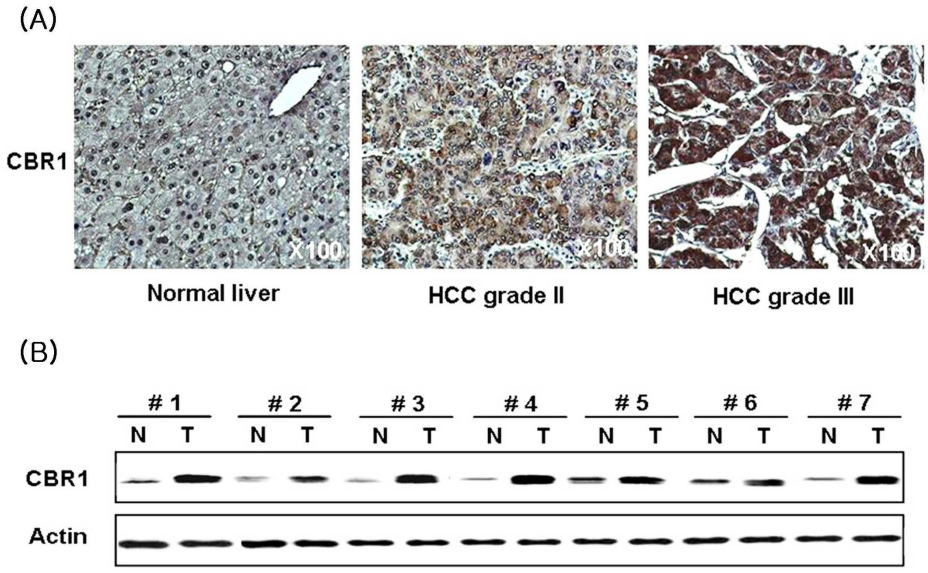
(B)


siRNA
Mock
CBR/WT
SC
CBR1
Oxidative stress markers
HO-1
TRXr-1
NOS-2
HSP72
HSP60
Lipid perodixation products
HNE
MDA
Acrolein
CBR1 down stream enzymes
AR
ALDH
Actin

도면6


(A)
HepG2
Hep3B
Relative cell survival(%)
140
120
100
80
60
40
20
0
**
*
Cisplatin
Doxorubicin
Hydroxy-PP
Hydroxy-PP-Me
(B)
HepG2
PARP
Cleaved caspase-3
Actin
116 kDa
87 kDa
Hep3B
G2 3B G2 3B G2 3B G2 3B G2 3B

도면7



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Composition for protection and therapy against liver cancer comprising carbonyl reductase 1 inhibitor

<130> PA100001/KR

<160> 22

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1245

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

cgggcgtgta acccacgggt gcgcgcccac gaccgccaga ctcgagcagt ctctggaaca 60

cgctgcgggg ctcccgggcc tgagccaggt ctgttctcca cgcaggtgtt ccgcgcgccc 120

cgttcagcca tgtcgtccgg catccatgta gcgctggtga ctggaggcaa caagggcatc 180

ggcttggcca tcgtgcgcga cctgtgccgg ctgttctcgg gggacgtggt gctcacggcg 240

cgggacgtga cgcggggcca ggcggccgta cagcagctgc aggcggaggg cctgagcccg 300

cgcttccacc agctggacat cgacgatctg cagagcatcc gcgccctgcg cgacttcctg 360

cgcaaggagt acgggggcct ggacgtgctg gtcaacaacg cgggcatcgc cttcaaggtt 420

gctgatccca cacccttca tattcaagct gaagtgacga tgaaaacaaa tttctttggt 480

acccgagatg tgtgcacaga attactccct ctaataaaac cccaagggag agtggtgaac 540

gtatctagca tcatgagcgt cagagcccttt aaaagctgca gcccagagct gcagcagaag 600

ttccgcagtg agaccatcac tgaggaggag ctggtggggc tcatgaacaa gtttgtggag 660

gatacaaaga agggagtgca ccagaaggag ggctggccca gcagcgcata cggggtgacg 720

aagattggcg tcaccgttct gtccaggatc cacgccagga aactgagtga gcagaggaaa 780

ggggacaaga tcctcctgaa tgcctgctgc ccagggtggg tgagaactga catggcggga 840

cccaaggcca ccaagagccc agaagaaggt gcagagaccc ctgtgtactt ggccctttg 900

cccccagatg ctgagggtcc ccatggacaa tttgtttcag agaagagagt tgaacagtgg 960

tgagctgggc tcacagctcc atccatgggc cccattttgt accttgtcct gagttggtcc 1020

aaagggcatt tacaatgtca taaatatcct tatataagaa aaaaaatgat ctcttatcaa 1080

ttagcactca ctaatgtact actaattgag caacctacgc actcagttga ctacgtaaat 1140

ctgtcaggtc ttttgtgatt tcctctgatg caggagagga aaaattgtaa ttgatgaaaa 1200

taatgaatga aaatcaacag atgaataaat ggttctttat aagtg 1245

<210> 2

<211> 277

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(277)

<223> amino acid sequence of CBR 1

<400> 2

Met Ser Ser Gly Ile His Val Ala Leu Val Thr Gly Gly Asn Lys Gly

1 5 10 15

Ile Gly Leu Ala Ile Val Arg Asp Leu Cys Arg Leu Phe Ser Gly Asp

20 25 30

Val Val Leu Thr Ala Arg Asp Val Thr Arg Gly Gln Ala Ala Val Gln

35 40 45

Gln Leu Gln Ala Glu Gly Leu Ser Pro Arg Phe His Gln Leu Asp Ile

50 55 60

Asp Asp Leu Gln Ser Ile Arg Ala Leu Arg Asp Phe Leu Arg Lys Glu

65 70 75 80

Tyr Gly Gly Leu Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Phe Lys

85 90 95

Val Ala Asp Pro Thr Pro Phe His Ile Gln Ala Glu Val Thr Met Lys

100 105 110

Thr Asn Phe Phe Gly Thr Arg Asp Val Cys Thr Glu Leu Leu Pro Leu

115 120 125

Ile Lys Pro Gln Gly Arg Val Val Asn Val Ser Ser Ile Met Ser Val

130 135 140

Arg Ala Leu Lys Ser Cys Ser Pro Glu Leu Gln Gln Lys Phe Arg Ser

145 150 155 160

Glu Thr Ile Thr Glu Glu Glu Leu Val Gly Leu Met Asn Lys Phe Val

165 170 175

Glu Asp Thr Lys Lys Gly Val His Gln Lys Glu Gly Trp Pro Ser Ser

180 185 190

Ala Tyr Gly Val Thr Lys Ile Gly Val Thr Val Leu Ser Arg Ile His

195 200 205

Ala Arg Lys Leu Ser Glu Gln Arg Lys Gly Asp Lys Ile Leu Leu Asn

210 215 220

Ala Cys Cys Pro Gly Trp Val Arg Thr Asp Met Ala Gly Pro Lys Ala

225 230 235 240

Thr Lys Ser Pro Glu Glu Gly Ala Glu Thr Pro Val Tyr Leu Ala Leu

245 250 255

Leu Pro Pro Asp Ala Glu Gly Pro His Gly Gln Phe Val Ser Glu Lys

260 265 270

Arg Val Glu Gln Trp

275

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CBR 1-siRNA sense

<220><221> misc_RNA

<222> (1)..(21)

<223> TT nucleotides are added in C-terminal of the sequence

<400> 3

cacagaauua cucccucucu a 21

<210> 4

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CBR 1-siRNA antisense

<220><221> misc_RNA

<222> (1)..(18)

<223> TT nucleotides are added in C-terminal of the sequence

<400> 4

uagaggagua auucugug 18

<210> 5

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CBR 1-anti-sense

<220><221> misc_RNA

<222> (1)..(19)

<223> TT nucleotides are added in C-terminal of the sequence

<400> 5

uugaagucuc uaucuggga 19

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for CBR 1

<400> 6

gaattcatgt cgtccggcat ccat 24

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for CBR 1

<400> 7

agctttcacc actgttcaac tctctt 26

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for GAPDH

<400> 8

catcgagcac ggcatcgtca c 21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for GAPDH

<400> 9

tcgaagtcca gggcgacata g 21

<210> 10

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for CBR 1

<400> 10

aacaagtttg tggaaggata caaagaaggg a 31

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for CBR 1

<400> 11

tgttcaactc cttctctgaa acaaattgtc 30

<210>

12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for pGL3-CBR 1-1000

<400> 12

cgggtaccca catctgga 18

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for pGL3-CBR 1-1000

<400> 13

ataagcttgc cgctgagcgc gcaggc 26

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> forward primer for pGL3-CBR 1-350

<400> 14

ccggtaccga atggttcttc act 23

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for pGL3-CBR 1-350

<400> 15

ataagcttgc cgctgagcgc gcaggc 26

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for pGL3-CBR 1-350M

<400> 16

cttcactgcc acgggggcag ccaa 24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for pGL3-CBR 1-350M

<400> 17

ttggctgccc acggggcagt gaag 24

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide for EMSA of CBR 1-WT

<400> 18

cttcactgcc acgtgggcag ccaa 24

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<

220><223> oligonucleotide for EMSA of CBR 1-M

<400> 19

cttcactgcc aaaagggcag ccaa 24

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for CBR-HRE

<400> 20

gaagaaaacc cctcagagaa cc 22

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for CBR-HRE

<400> 21

ctcgccgggg tgcggagcag gcgg 24

<210> 22

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CBR 1-scrambled-siRNA

<220><221> misc_RNA

<222> (1)..(19)

<223> TT nucleotides are added in C-terminal of the sequence

<400> 22

ucccagauag agacuucaa 19