

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 6월 12일 (12.06.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/088292 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 38/16 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/011112
- (22) 국제출원일: 2013년 12월 3일 (03.12.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0140350 2012년 12월 5일 (05.12.2012) KR
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 306-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 김세미 (KIM, Semi); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이윤희 (LEE, Yunhee); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won-Hee); 135-080 서울시 강남구 역삼동 642-16 성지하이츠 2차 8층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

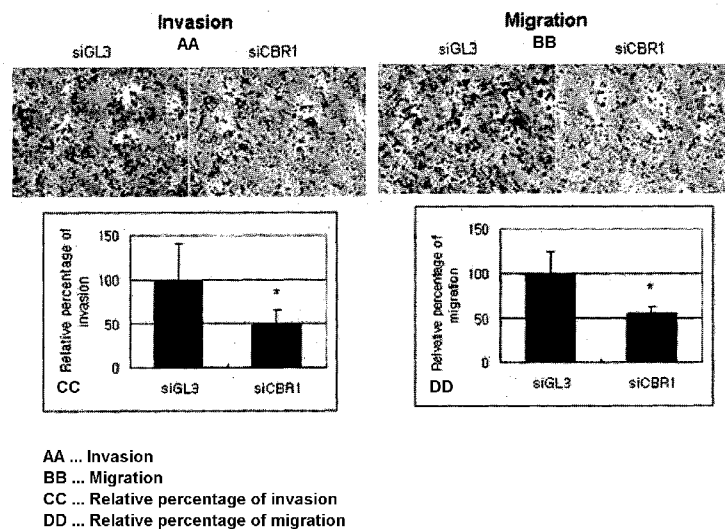
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING INHIBITOR OF EXPRESSION OR ACTIVATION OF CARBONYL REDUCTASE 1 PROTEIN FOR PREVENTING OR TREATING COLORECTAL CANCER OR INHIBITING METASTASIS OF SAME

(54) 발명의 명칭: 카르보닐 환원효소 1 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물



(57) Abstract: The present invention firstly validates a role of CBR 1 as a factor for inducing the growth and metastasis of colorectal cancer. It has been found that CBR 1 is overexpressed in a colorectal cancer cell line. Also, it has been found that cell growth, cancer cell invasion, cell mobility, substrate attachment, and cell signaling associated with FAK/c-Src are reduced by inhibiting the expression of CBR 1 in a colorectal cancer cell line. Therefore, a substance which inhibits the expression or activation of CBR 1 can be used to prevent and treat colorectal cancer.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



본 발명에서는 CBR 1의 대장암 성장 및 전이 유도 인자로서의 역할을 최초로 규명하였고, CBR 1이 대장암 세포주에서 과발현하고, 대장암 세포주에서 CBR 1의 발현을 저해한 결과, 세포성장, 암세포 침윤 및 세포이동성, 기질부착이 감소하고, FAK/c-Src 관련 세포신호전달이 감소함을 확인하였으므로, CBR 1의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 대장암 예방 및 치료에 사용할 수 있다.

【명세서】**【발명의 명칭】**

카르보닐기 환원효소 1 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물

5

【기술분야】

본 발명은 신규한 암 치료 표적인 카르보닐기 환원효소 1(carbonyl reductase 1) 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.

10

【배경기술】

대장암은 전 세계적으로 연간 100만 명의 환자가 발생하고 53만 명이 사망하는 난치성 질환으로, 노령화와 식이패턴의 변화에 따라 우리나라에서도 전체 암 발생의 12.7 %로 3위를 차지할 정도로 빠른 속도로 증가하고 있다. 현재 대장암에 효과적인 항암제로는 5-에프유, 유에프티, 카페시타빈(상품명: 젤로다)과 같은 플루오로피리미딘계 약물, 이리노테칸(상품명: 겐푸토) 및 옥살리플라틴과 같은 약물이 널리 이용되고 있으며, 미국, 유럽 등 세계 7대 제약시장에서 대장암 치료제 시장은 현재 9억 달러 규모에서 2017년 78억 달러로 급성장할 전망이다. 이러한 약물의 지속적인 사용은 내성의 증가 및 부작용을 나타낼 수 있다는 문제점을 항상 지니고 있어, 새로운 치료제의 개발 및 진단에 대한 연구가 필요한 시점이다.

15

현재 대장암의 진단 마커로 이용되고 있는 암태아성항원(CEA)은 태아 시기에 정상적으로 만들어지는 일종의 당단백질로, 정상적으로는 태어나기 전에 이 물질의 생산이 중단되기 때문에, 성인에게서 신생아보다도 더 높은 암태아성항원(CEA)의 수치가 나타난다면 이것은 대장암이나 다른 암이 있을 가능성이 있음을 제시하나, 이 수치는 간경변증, 간질환, 알코올성 췌장염 환자나 그리고 흡연자에게

20

25

서도 증가할 수 있어, 보조적으로 사용되고 있는 실정이다.

인간 카르보닐기 환원효소1(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.).

한편, CBR 1의 암세포에서의 기능은 불분명하거나, 혹은 종양 유형에 따라 다른 것이 알려져 있다. 예를 들면, 카르보닐기 환원효소 1(carbonyl reductase 1, 이하 CBR 1)은 백혈병 세포(leukemia cell)의 세포생존을 증가시키고(Jang et al., Cancer Res. (2012) 72(16); 1-11), 간암세포(liver cancer cell)의 사멸을 억제시키는(Tak et al., Journal of hepatology (2011)54:328-339) 기능이 보고된 바 있다.

반면, 자궁내막 선암 세포(endometrial adenocarcinoma cell) 및 자궁 경부 편평상피암 세포(uterine cervical squamous carcinoma cells)에서는, CBR 1의 발현억제에 의해 암세포 침윤이 증가하고, 전이억제인자인 E-캐드헤린(E-cadherin) 발현이 감소하며, CBR 1의 발현 유도에 의해 암세포 침윤이 감소함이 보고됨으로써,

CBR 1이 전이억제인자로서의 가능성이 제시되었다(Cancer Letters (2012) 323:69-76; Cancer Letters(2011) 311:77-84).

이와 같이, CBR 1의 암세포에서의 기능은 불분명하거나, 혹은 종양 유형에 따라 다른 것으로 보이며, 아직까지 CBR 1과 대장암과의 직접적인 연관성 및 대장
5 암에서의 기능은 보고된 바 없다. 특히, CBR 1의 대장암 세포 전이 조절기능을 규명한 용도는 현재 밝혀지지 않았다.

본 발명에서는 CBR 1의 대장암 성장 및 전이 유도 인자로서의 역할을 최초로 규명하였고, CBR 1이 대장암 세포주에서 과발현하고, 대장암 세포주에서 CBR 1
10 의 발현을 저해한 결과, 세포성장, 암세포 침윤 및 세포이동성, 기질부착이 감소하고, FAK/c-Src 관련 세포신호전달이 감소함을 확인하였으므로, CBR 1의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 대장암 예방 및 치료에 사용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

15 【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 카르보닐기 환원효소 1(carbonyl reductase 1, 이하 CBR 1) 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는, 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

20 또한, 본 발명의 목적은 CBR 1 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정하여 대장암을 진단하는 방법을 제공하는 것이다.

아울러, 본 발명의 또 다른 목적은 CBR 1 단백질의 발현 또는 활성 수준을 이용하여 대장암 치료제 또는 전이 억제제 후보 물질을 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 카르보닐기 환원효소 1(carbonyl reductase 1) 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는, 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

5 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다:

1) 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;

10 2) 상기 단계 1)의 발현 세포주에 대해 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 발현 정도를 측정하는 단계; 및

3) 상기 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 발현 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계.

15 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 대장암 발달 또는 전이의 모니터링 또는 진단의 정보를 제공하기 위한, 단백질의 발현 또는 활성 수준 측정 방법을 제공한다:

1) 피검 개체로부터 분리된 세포 또는 조직으로부터 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계;

2) 상기 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 발현 또는 활성 수준이 정상 대조군에 비해 감소한 피검 개체를 선별하는 단계; 및

20 3) 상기 선별된 피검개체가 대장암에 걸릴 위험 또는 암 전이 위험이 높은 것으로 판단하는 단계.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

25 본 발명은 카르보닐기 환원효소 1(carbonyl reductase 1) 단백질의 발현 또

는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는, 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 카르보닐기 환원효소 1(carbonyl reductase 1) 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 대장암에 걸린 개체에 투여하는 5 단계를 포함하는 대장암 예방방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 카르보닐기 환원효소 1(carbonyl reductase 1) 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 대장암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 대장암 치료 또는 전이 억제방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 대장암 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성 10 물로 사용하기 위한, 카르보닐기 환원효소 1(carbonyl reductase 1) 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 제공한다.

상기 카르보닐기 환원효소 1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

상기 서열번호 1의 아미노산 서열의 Gene ID는 873이고, NCBI Reference 15 sequence는 NM_001757, NP_001748이다.

상기 카르보닐기 환원효소 1의 발현 억제제는 카르보닐기 환원효소 1 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA, shRNA) 및 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

20 상기 카르보닐기 환원효소 1 단백질 단백질의 활성 억제제는 카르보닐기 환원효소 1 단백질에 상보적으로 결합하는 펩티드, 펩티드 미메틱스, 기질 유사체, 앵타머 및 항체로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

본 발명의 구체적인 실시예에서는 암세포주 및 CBR1 발현 벡터로 일시적으로 형질전환된 HEK293E세포에서 CBR 1 단백질의 발현을 확인하였고, 그 결과, 대부 25

분의 대장암 세포주에서 CBR1이 발현되는 것을 확인하였다(도 1 참조).

또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서는, CBR-1 발현억제에 의해 SW480 세포의 침윤(invasion) 및 세포 이동(migration)이 각각 51%, 45% 감소하는 것을 확인하였고(도 2 참조), 혈청이 존재하는 조건(with serum) 및 무혈청 조건(without serum)에서의 세포성장을 분석한 결과, 세포의 성장이 각각 48%, 32% 감소함을 확인하였으며(도 3 참조), 타입 I 콜라겐(collagen type I) 및 피브로넥틴(fibronectin)에의 세포부착을 분석하였을 때, 세포-기질 부착이 각각 53%, 53% 감소하는 것을 확인하였다(도 4 참조).

CBR-1 발현 억제에 의하여 FAK 및 c-Src의 인산화(phosphorylation)가 감소하는 것을 확인하였다(도 5A 참조). 따라서, CBR 1은 c-Src 신호 경로(signaling pathway)를 조절함으로써, 대장암세포 침윤 및 성장 등을 유도하는 기능을 하는 것으로 해석된다.

또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서는, SW480 세포에 siRNA로 본 발명자가 대장암 전이억제인자인 것을 검증한 C12orf59의 발현을 억제한 결과, CBR 1의 발현이 유도됨을 확인하였다(도 5B 참조). 따라서, C12orf59의 대장암세포 전이억제 효능은, CBR 1의 발현의 감소에 의해 매개될 가능성이 있음을 의미한다.

본 발명에서는 CBR 1이 대장암 세포주에서 과발현하고, 대장암 세포주에서 CBR 1의 발현을 저해한 결과, 세포성장, 암세포 침윤 및 세포이동성, 기질부착이 감소하고, FAK/c-Src 관련 세포신호전달이 감소함을 확인하였으므로, CBR 1의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물의 유효성분으로 사용할 수 있다.

본 발명의 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 유효성분을 0.0001 내지 50 중량 %로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 약학적 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적절한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

본 발명에서 사용되는 뉴클레오티드 또는 핵산은, 경구, 국소, 비경구, 비내, 정맥 내, 근육 내, 피하, 안 내, 경피 등의 투여를 목적으로 제조될 수 있다.

바람직하게는, 핵산 또는 벡터가 주사가 가능한 형태로 사용된다. 이에 따라서 특히 처리될 영역으로는 직접적인 주입을 위하여 주사 가능한 조성물을 위한 임의의 약학적으로 허용되는 매개체와 혼합될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 특히 등장 멸균 용액 또는 건조 특히 멸균수 또는 적절한 생리 식염수의 첨가에 따라 주사 가능한 용액의 조성을 가능케 하는 동결건조 조성물을 포함할 수 있다. 환자의 종양으로의 핵산의 직접적인 주입은 치료 효율을 감염된 조직에 집중시키도록 하므로 유리하다. 사용되는 핵산의 투여량은 다양한 파라미터, 특히 유전자, 벡터, 사용되는 투여 방식, 문제시되는 질병 또는 대안적으로 요구되는 치료기간에 의해 조절될 수 있다. 또한, 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설을 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량

은 약 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 1 회 내지 수회 나누어 투여하는 것이 바람직하다.

상기 약학적 조성물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 5 경막주사, 뇌혈관내 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제 10 제용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다:

1) 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 발현 세포주에 대해 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 발 15 현 정도를 측정하는 단계; 및

3) 상기 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 발현 정도가 피검물질을 처리하지 20 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계.

또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제 제용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다:

1) 카르보닐기 환원효소 1 단백질 및 C12orf59 단백질의 발현 세포주에 피 25 검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 세포주에 대해 카르보닐기 환원효소 1 단백질 및 C12orf59 단백질의 발현 정도를 측정하는 단계; 및

3) 상기 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 발현 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소하고, C12orf59 단백질의 발현 정도가 피검물질을 처리하 25 지 않은 대조군에 비해 증가하는 피검물질을 선별하는 단계.

상기 방법에 있어서, 단계 1)의 세포주는 대장 세포 또는 대장암 세포주일

수 있다.

상기 방법에 있어서, 단계 2)의 단백질의 발현 정도는 면역침강법 (immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직 화학, RT-PCR, 웨스턴 블롯(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것이 바람직하나 당업자에게 알려진 전사체 또는 그로부터 코딩된 단백질의 양을 측정하는 모든 방법을 사용할 수 있다.

또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다:

- 1) 카르보닐기 환원효소 1 단백질에 피검물질을 처리하는 단계;
- 2) 상기 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 활성 정도를 측정하는 단계; 및
- 3) 상기 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계.

상기 방법에 있어서, 단계 1)의 세포주는 대장 세포 또는 대장암 세포주일 수 있다.

상기 방법에 있어서, 단계 2)의 단백질의 활성 정도는 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나로 측정하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

아울러, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 대장암 발달 또는 전이의 모니터링 또는 진단의 정보를 제공하기 위한, 단백질의 발현 또는 활성 수준 측정 방법을 제공한다:

- 1) 피검 개체로부터 분리된 세포 또는 조직으로부터 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계;
- 2) 상기 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 발현 또는 활성 수준이 정상 대조

군에 비해 감소한 피검 개체를 선별하는 단계; 및

3) 상기 선별된 피검개체가 대장암에 걸릴 위험 또는 암 전이 위험이 높은 것으로 판단하는 단계.

또한, 본 발명은 피검체로부터 분리된 세포 또는 조직으로부터 카르보닐기
5 환원효소 1 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정하여 대장암을 진단하는 방법을 제공한다.

상기 방법에 있어서, 상기 피검 개체는 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 그보다 바람직하게는 쥐, 래빗, 기니아피그, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다.

10 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 세포주는 대장 세포 또는 대장암 세포주일 수 있다.

본 발명에서는 CBR 1이 대장암 세포주에서 과발현하고, 대장암 세포주에서 CBR 1의 발현을 저해한 결과, 세포성장, 암세포 침윤 및 세포이동성, 기질부착이 감소하고, FAK/c-Src 관련 세포신호전달이 감소함을 확인하였으므로, CBR 1의 발현
15 또는 활성 수준을 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보물질의 스크리닝 방법에 사용할 수 있다. 아울러, CBR 1의 발현 또는 활성 수준을 대장암 발달 또는 전이의 모니터링 또는 진단의 정보를 제공하기 위한, 단백질의 발현 또는 활성 수준 측정 방법에 사용할 수 있다.

20 아울러, 본 발명은 카르보닐기 환원효소 1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 대장암 진단용 키트를 제공한다.

상기 카르보닐기 환원효소 1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

상기 서열번호 1의 아미노산 서열의 Gene ID는 873이고, NCBI Reference
25 sequence는 NM_001757, NP_001748이다.

상기 키트에 사용될 수 있는 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 에피토프와 결합할 수 있는 단편 등을 포함한다. 상기 다클론 항체는 상기 펩티드 마커 중 어느 하나를 동물에 주사하고 해당 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 종래의 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 당업계에 알려진 어떠한 방법에 의해서든 정제될 수 있고, 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등 임의의 동물 중 숙주로부터 만들어질 수 있다. 상기 단클론 항체는 연속 세포주의 배양을 통한 항체 분자의 생성을 제공하는 어떠한 기술을 사용하여도 제조할 수 있다. 이러한 기술로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 하이브리도마 기술, 사람 B-세포 하이브리도마 기술 및 EBV-하이브리도마 기술이 포함된다 (Kohler G *et al.*, *Nature* 256:495-497, 1975; Kozbor D *et al.*, *J Immunol Methods* 81:31-42, 1985; Cote RJ *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 80:2026-2030, 1983; 및 Cole SP *et al.*, *Mol Cell Biol* 62:109-120, 1984). 또한, 상기 펩티드 마커 중 어느 하나에 대한 특정 결합 부위를 함유한 항체 단편이 제조될 수 있다 (Huse WD *et al.*, *Science* 254: 1275-1281, 1989). 상기과 같이 특정 서열을 갖는 펩티드에 대한 항체를 제조하는 방법은 당업자에게 자명한 일이다.

상기 키트에 사용될 수 있는 항체는 세척이나 복합체의 분리 등 그 이후의 단계를 용이하게 하기 위해 고형기질(solid substrate)에 결합될 수 있다.

상기 키트는 추가적으로 상기 펩티드 마커에 특이적으로 결합하는 검출용 항체를 포함할 수 있다. 상기 검출용 항체는 발색효소, 형광물질, 방사성 동위원소 또는 콜로이드 등의 검출체로 표지한 접합체(conjugate)일 수 있고, 상기 마커에 특이적으로 결합할 수 있는 2차 항체인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명에 있어서, 상기 키트는 추가적으로 효소와 발색 반응할 기질 및 결합되지 않은 단백질 등은 제거하고 결합된 펩티드 마커만을 보유할 수 있는 세척액 또는 용리액을 추가로 포함할 수 있다.

【유리한 효과】

본 발명에서는 카르보닐기 환원효소 1(carbonyl reductase 1, 이하 CBR 1)의 대장암 성장 및 전이 유도 인자로서의 역할을 최초로 규명하였고, CBR 1이 대장암 세포주에서 과발현하고, 대장암 세포주에서 CBR 1의 발현을 저해한 결과, 세포 성장, 암세포 침윤 및 세포이동성, 기질부착이 감소하고, FAK/c-Src 관련 세포신호 전달이 감소함을 확인하였으므로, CBR 1의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 대장암 예방 및 치료에 사용할 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 다양한 대장암 세포주에서 카르보닐기 환원효소 1(carbonyl reductase 1, 이하 CBR 1) 발현을 분석한 도이다:

pcDNA-CBR 1: HEK293E 세포에 CBR 1 발현 벡터를 일시적으로 형질전환(transient transfection)한 세포의 용해물(lysate).

도 2는 CBR 1의 발현 억제에 의한 대장암 세포주의 침윤(Invasion), 세포이동 분석(migration assay) 결과를 나타낸 도이다:

siGL3: 대조군 siRNA.

도 3은 CBR 1의 발현 억제에 의한 대장암 세포주의 세포성장 결과를 나타낸 도이다:

with serum: 혈청(serum)이 존재하는 조건; 및

without serum: 무혈청(serum-free) 조건.

도 4는 CBR 1의 발현 억제에 의한 세포-기질 접착(cell-matrix adhesion assay) 정도를 확인한 도이다.

도 5A는 CBR-1 발현 억제에 의한 FAK/c-Src 관련 세포신호전달의 감소를 확인한 도이다. 도 5B는 대장암세포에서 C12orf59의 발현 억제에 의한 CBR 1의 발현 증가를 확인한 도이다.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발
5 명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및 제조예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 세포주 배양

모든 인간 세포주는 American Type Culture Collection(USA)에서 제공받았
다. SW480, HCT116, HCT15, HT29, Colo205 세포주는 10% FBS, 페니실린-스트렙토
10 마이신, L-글루타민, 소듐 피루베이트가 포함된 RPMI1640(GIBCO, USA) 배지에서
배양하였다. WiDr, Caco-2 세포주는 10% FBS(fetal bovine serum: GIBCO, USA),
페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin), L-글루타민(L-glutamine), 소
15 뉼륨 피루베이트(sodium pyruvate), 비필수 아미노산(nonessential amino acids)이
포함된 MEM(minimal essential medium: GIBCO, USA) 배지에서 배양하였다.
HEK293E는 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포주는 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였
다. 여기서 SW480 sub는 본 발명자들이 SW480으로부터 얻은 부분집단
(subpopulation) 이다.

**<실시예 2> HEK293E 세포에 CBR 1 발현 벡터의 일시적인 형질전환
20 (transient transfection)**

pcDNA-CBR 1 벡터는 pcDNA(invitrogen) 벡터에 CBR 1 유전자를 도입하여 야
생형(wild type) CBR1 단백질이 발현되도록 제작하였다. 상기 제작된 pcDNA-CBR 1
벡터를 HEK293E 세포에 도입하여 일시적인 형질전환(transient transfection)을 하
였다.

25 구체적으로, HEK293E 세포에 pcDNA-CBR1 벡터를 Lipofectamine 2000 시약으

로 도입하고 48 시간 후에, pcDNA-CBR1 벡터가 도입된 HEK293E 세포를 RIPA buffer(10 mM Tris, pH7.2, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM NaF, 1 mM PMSF, complete protease inhibitor)으로 용해시키고 웨스턴 블랏 분석에 사용하였다.

5

<실시예 3> 암세포주에서 CBR 1 단백질의 발현 조사

암세포주 및 CBR 1 발현 벡터로 일시적으로 형질전환된 HEK293E세포에서 CBR 1 단백질의 발현을 확인하고자, 아래와 같이 웨스턴 블랏 분석(Western blot analysis)을 실시하였다.

10 상기 <실시예 1> 및 <실시예 2>에서 수득된 세포주를 RIPA buffer(10 mM Tris, pH7.2, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM NaF, 1 mM PMSF, complete protease inhibitor)에서 용해(lysis)하였다. 세포 용해물(Cell lysate)은 commercially available modified Bradford assay(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)로 정량하였다. 세
15 포 용해물(Cell lysate) 30 μ g을 SDS 시료 버퍼와 혼합하여 가열하였고, 8% SDS-PAGE 겔에 영동하였다. 분리된 단백질은 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)에 이동시키고, 5% 스킴 밀크 (skim milk)로 차단하였다. 이 후 anti-beta-actin(Santa Cruz), anti-CBR 1(Santa Cruz)와 함께 반응시켰고, 홀스레디쉬 퍼옥시데이즈(horseradish peroxidase)가 결합된 2차 항체와 반응시켰다. 이 후
20 ECL 키트(ECL Plus, Amersham, USA)를 제조사의 방법대로 처리하였다.

그 결과, 양성대조군(positive control)으로 사용한 야생형(wild type) CBR 1을 발현하는 pcDNA-CBR 1 벡터를 도입한 HEK293E 세포에서 CBR 1의 발현을 확인하였고, 대부분의 대장암 세포주에서 CBR 1이 발현되는 것을 확인하였다(도 1).

25

<실시예 4> 암세포주에 카르보닐기 환원효소 1(carbonyl reductase 1, CBR

1) 특이적 siRNA 형질전환

암세포주에서 과발현하는 CBR 1을 대장암 세포주인 SW480 세포에 siRNA 형질전환하여 CBR 1 발현을 억제하였을 때, 대장암 세포의 침윤, 세포 이동성, 세포-기질 부착 정도 및 FAK/c-Src 관련 세포신호전달 정도를 확인하고자 하였다.

구체적으로, 암세포주에 CBR 1 특이적 siRNA로 형질전환하는 방법은 아래와 같다. SW480 세포에 마이크로포레이션(microporation) 기법(Neon Transfection system, Invitrogen)을 제조업자의 지시대로 이용하여 형질전환(transfection) 하였다. 간략하게 설명하면, 세포를 수확한 뒤, PBS로 세척하고, R buffer에 3×10^5 세포/ $12 \mu\text{l}$ 의 농도로 재부유(resuspension)한 뒤, $40 \mu\text{M}$ siRNA $2 \mu\text{l}$ 를 첨가하고 마이크로포레이터(microporator) 기기를 이용하여 형질전환하였다. 48시간 후, 세포를 수확하여 침윤/세포이동성, 세포성장, 세포-기질부착 실험을 하거나, 세포를 용해(lysis)하여 western blot 실험을 수행하였다.

이때 사용한 CBR 1의 siRNA(5' -cacagaauuacucccucua-3' : 서열번호 2)는 에스티팜에서 주문제작하였다. C12orf59-siRNA(Dharmacon社)는 특허출원 제2011-0089601호에 서술되어 있는 것을 사용하였다.

<실험예 1> CBR 1의 발현 억제에 의한 대장암 세포의 침윤 및 이동성 억제 효과 확인

CBR 1의 발현 억제에 의한 암세포 침윤능 및 세포이동성의 변화를 분석하기 위하여, <실시예 4>와 같이 CBR 1-특이적 siRNA로 형질전환하였고, 대조군 siRNA (siGL3; sense strand 5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3': 서열번호 3, anti-sense strand 5'-UCG AAG UAC UCA GCG UAA GTT-3': 서열번호 4, 에스티팜)도 역시 <실시예 4>에 기재된 형질전환 방법으로 형질전환 하였고, 이때, 사용된 siRNA는 CBR-1 특이적 siRNA가 아닌 상기 서열번호 3 및 4로 구성된 siRNA이다. SW480 세포주를 형질전환(transfection)하고 48시간 뒤 침윤 분석(invasion assay) 및 세포

이동성 분석(cell migration assay)을 수행하였다.

침윤분석실험은, 구체적으로, 24-웰 트랜스웰 플레이트(8 μm pore size; Costar, 미국)의 다공성 막을 무혈청(serum free) 배지로 희석된 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 100 μl 매트릭젤(BD Biosciences, 미국)로 코팅하였고, 실온에서 1시간 동안 방치
5 하여 고형화시켜 실시하였다. 트랜스웰 플레이트의 하층은 화학유인물(chemoattractant)로서 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 콜라겐 타입 I (Sigma) 100 μl 를 이용하여 코팅하였다. 무혈청 배지에서 재부유한 3×10^4 개의 세포를 상층 챔버에 분주하였고, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 48시간 동안 배양하면서 상층 챔버에서 하층 챔버로 이동하도록 하였다. 이동하지 않은 세포는 상층 챔버의 표면에서 제거하였다. 하
10 층 챔버로 전이한 세포는 PBS에 녹인 3.7% 파라포름알데하이드로 고정하였고, 2% 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색하였다. 여분의 크리스탈 바이올렛 용액을 증류수로 세척한 뒤, 선택 면적($\times 100$)의 사진을 찍었고, 이동한 세포수는 5개의 선택 면적에서 계수하였다. 상기 계수된 수의 평균값을 구하고 상대적 %를 구하였다.

세포 이동성 실험은, 매트릭젤 코팅없이 1.5×10^4 개의 세포를 상층 챔버에
15 분주하여 수행하였다.

그 결과, CBR-1 발현억제에 의해 침윤(invasion) 및 세포 이동(migration)이 각각 51%, 45% 감소하는 것을 확인하였다(도 2).

<실험예 2> CBR 1의 발현 억제에 의한 대장암세포 성장 감소의 확인

20 CBR 1의 발현 억제에 의한 대장암세포 성장 감소를 확인하고자, 상기 <실시예 4>에서 서열번호 2의 siRNA로 형질전환한 SW480 세포를 수확하여 24-웰 플레이트(well plates)에 3×10^4 개의 세포를 분주하였다. 37°C, 5% CO₂ 조건에서 72시간 동안 배양한 후, 세포를 수확하여 세포의 개수를 계수하였다. 또한, 24-웰 플레이트에 세포를 분주한 지 24시간 후 무혈청 배지(serum-free medium)로 바꾸고
25 48 시간 후 세포를 수확하여 세포의 개수를 계수하였다.

대장암 세포주 SW480에 CBR 1-특이적 siRNA를 형질전환한 후, 혈청이 존재하는 조건(with serum) 및 무혈청 조건(without serum)에서의 세포성장을 분석한 결과, 세포의 성장이 각각 48%, 32% 감소하였다(도 3).

5 <실험예 3> CBR 1의 발현 억제에 의한 세포-기질 접착(cell-matrix adhesion assay) 정도 확인

세포-기질 부착은 암세포의 침윤 및 이동에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있기 때문에, <실시예 4>에 기재된 방법으로 CBR 1의 발현을 억제하고, 세포-기질 접착 정도를 확인하였다.

10 24-웰 플레이트를 5 $\mu\text{g/ml}$ Collagen type I 또는 10 $\mu\text{g/ml}$ fibronectin (500 μl) 로 코팅하고, 3% BSA 로 차단(blocking) 하였다. siRNA로 형질전환한 SW480 세포를 수확하여, 코팅한 24-웰 플레이트에 1×10^4 세포/웰로 분주하였다. 37°C, 5% CO₂ 조건에서 20 분 간 배양(incubation)한 후, PBS에 녹인 3.7% 파라포름알데하이드로 고정하였고, 2% 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색하였다. 여분의
15 크리스탈 바이올렛 용액을 증류수로 세척한 뒤, 선택 면적($\times 100$)의 사진을 찍었고, 기질(matrix)(collagen I 또는 fibronectin)에 접착한 세포의 개수를 계수하였다.

대장암 세포주 SW480에 CBR 1-특이적 siRNA를 형질전환한 후, 타입 I 콜라겐(collagen type I) 및 피브로넥틴(fibronectin)에의 세포부착을 분석하였을 때, 세포-기질 부착이 각각 53%, 53% 감소하는 것을 확인하였다(도 4).

20 <실험예 4> CBR-1 발현 억제에 의한 FAK/c-Src 관련 세포신호전달의 감소 확인

CBR1 녹다운(knockdown)에 의한 대장암세포 침윤, 세포이동성, 성장 감소에 대한 기작을 규명하기 위한 하나의 방법으로 세포내 주요 신호전달체계의 변화를
25 확인하였다.

SW480 세포에서 siRNA로 CBR 1의 발현을 억제한 후, <실시예 3>의 웨스턴 블랏 방법을 사용하여 FAK 및 c-Src의 인산화(phosphorylation) 정도를 확인하였다. 이때, 1차 항체는 <실시예 3>에 기재된 anti-beta-actin과 anti-CBR 1(Santa Cruz)과 더불어 anti-phospho-c-src(Cell signaling), anti-phospho-FAK(Y397), anti-c-src(Santa Cruz)를 사용하였다.

그 결과, CBR-1 발현 억제에 의하여 FAK 및 c-Src의 인산화(phosphorylation)가 감소하는 것을 확인하였다(도 5A). 따라서, CBR 1은 c-Src 신호 경로(signaling pathway)를 조절함으로써, 대장암세포 침윤 및 성장 등을 유도하는 기능을 하는 것으로 해석된다.

<실험예 5> 대장암세포에서 C12orf59의 발현 억제에 의한 CBR 1의 발현 증가 확인

C12orf59는 본 발명자가 기능을 검증한 대장암 전이억제인자이다(특허출원 제2011-0089601호). 상기 C12orf59과 CBR 1과의 관련성을 확인하고자, SW480 세포에 siRNA로 C12orf59의 발현을 억제하여, CBR 1의 발현 정도를 확인하였다.

SW480 세포에 siRNA로 C12orf59의 발현을 억제한 결과, CBR 1의 발현이 유도됨을 확인하였다(도 5B). 따라서, C12orf59의 대장암세포 전이억제 효능은, CBR 1의 발현의 감소에 의해 매개될 가능성이 있음을 의미한다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

카르보닐기 환원효소 1(carbonyl reductase 1) 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는, 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 카르보닐기 환원효소 1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 것을 특징으로 하는, 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 카르보닐기 환원효소 1의 발현 억제제는 카르보닐기 환원효소 1 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA, shRNA) 및 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물.

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 상기 카르보닐기 환원효소 1 단백질 단백질의 활성 억제제는 카르보닐기 환원효소 1 단백질에 상보적으로 결합하는 펩티드, 펩티드 미메틱스, 기질 유사체, 앵타머 및 항체로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물.

【청구항 5】

1) 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 세포주에 대해 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 발현 정도를 측정하는 단계; 및

5 3) 상기 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 발현 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계;

를 포함하는, 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보물질의 스크리닝 방법.

10 【청구항 6】

제 5항에 있어서, 단계 2)의 단백질의 발현 정도는 면역침강법 (immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직 화학, RT-PCR, 웨스턴 블롯(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것을 특징으로 하는 대장암 예방, 치

15 료 또는 전이 억제용 후보물질의 스크리닝 방법.

 【청구항 7】

1) 카르보닐기 환원효소 1 단백질에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 활성 정도를 측정하는 단계; 및

20 3) 상기 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계;

를 포함하는, 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보물질의 스크리닝 방법.

25 【청구항 8】

제 7항에 있어서, 단계 2)의 단백질의 활성 정도는 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나로 측정하는 것을 특징으로 하는 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보물질의 스크리닝 방법.

5

【청구항 9】

1) 카르보닐기 환원효소 1 단백질 및 C12orf59 단백질의 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 세포주에 대해 카르보닐기 환원효소 1 단백질 및 C12orf59 단백질의 발현 정도를 측정하는 단계; 및

3) 상기 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 발현 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소하고, C12orf59 단백질의 발현 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 증가하는 피검물질을 선별하는 단계;

를 포함하는, 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보물질의 스크리닝 방법.

【청구항 10】

1) 피검 개체로부터 분리된 세포 또는 조직으로부터 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계;

2) 상기 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 활성 수준이 정상 대조군에 비해 증가한 피검 개체를 선별하는 단계; 및

3) 상기 선별된 피검개체가 대장암에 걸릴 위험 또는 암 전이 위험이 높은 것을 판단하는 단계;

를 포함하는, 대장암 발달 또는 전이의 모니터링 또는 진단의 정보를 제공하기 위한, 단백질의 발현 또는 활성 수준 측정 방법.

【청구항 11】

피검개체로부터 분리된 세포 또는 조직으로부터 카르보닐기 환원효소 1 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정하여 대장암을 진단하는 방법.

5

【청구항 12】

카르보닐기 환원효소 1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 대장암 진단용 키트.

10

【청구항 13】

약학적으로 유효한 양의 카르보닐기 환원효소 1(carbonyl reductase 1) 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 대장암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 대장암 예방방법.

15

【청구항 14】

약학적으로 유효한 양의 카르보닐기 환원효소 1(carbonyl reductase 1) 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 대장암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 대장암 치료 또는 전이 억제방법.

20

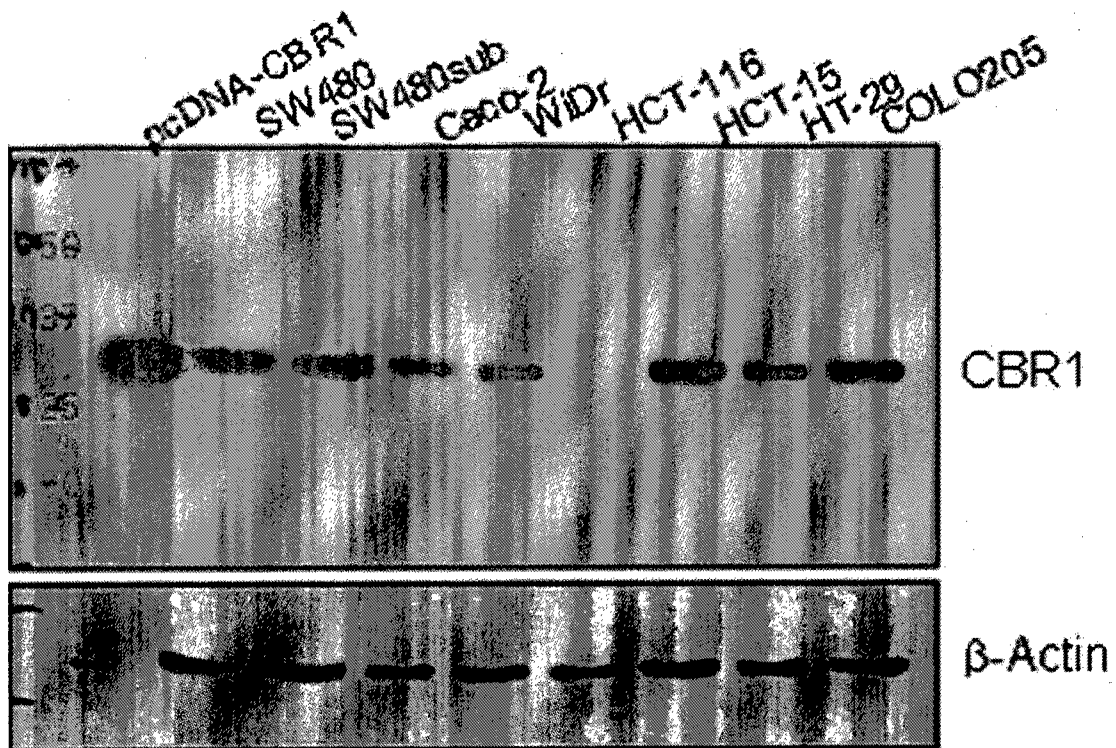
【청구항 15】

대장암 대장암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물로 사용하기 위한, 카르보닐기 환원효소 1(carbonyl reductase 1) 단백질의 발현 또는 활성 억제제.

25

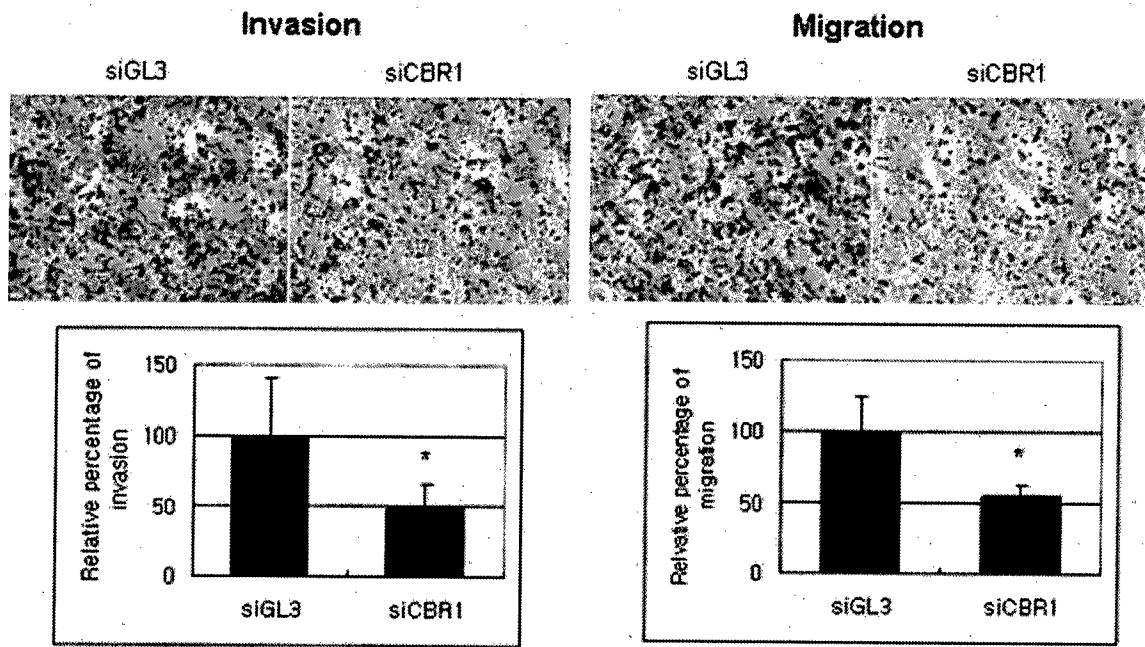
1/5

[도 1]



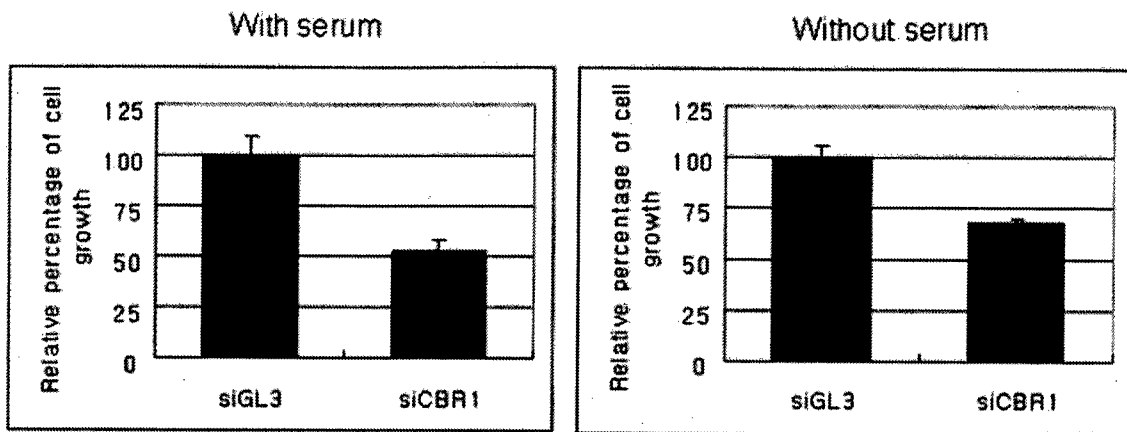
2/5

[도 2]



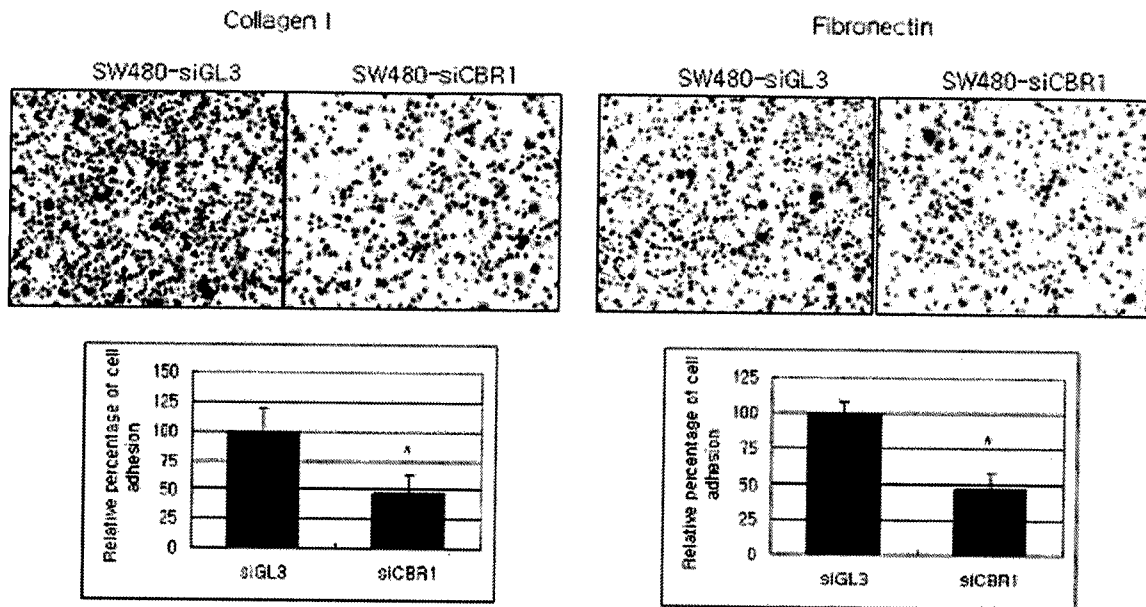
3/5

[도 3]



4/5

[도 4]

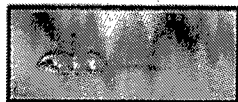


5/5

[도 5]

A

siGL3 siCBR1



CBR1



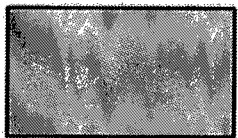
β-Actin



Phospho-c-Src



c-Src



Phospho-FAK



β-Actin

B

siGL3 siC12orf59



CBR1



β-Actin

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/011112**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 38/16(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61K 31/7105(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/16; C12Q 1/00; A61K ; A61K 38/17; G01N 33/574; A61K 48/00; A61K 31/7105

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: carbonyl group reductase 1, colorectal cancer, C12orf59

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 7960100 B1 (DOMON et al.) 14 June 2011 See abstract; columns 2-5, 12-30; and SEQ ID NOS: 587-588.	1-8,10,12,15
Y		9
Y	KR 10-1198714 B1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 12 November 2012 See abstract and claims 1-3, 5-13 and 15.	9
A	WO 2005-007085 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 27 January 2005 See abstract and pages 5434-5435, 5439-5440.	1-10,12,15
A	NCBI, GenBank accession no. NP_001748 (10 November 2012) See the entire document.	1-10,12,15
A	TAKEMASA et al., "Potential biological insights revealed by an integrated assessment of proteomic and transcriptomic data in human colorectal cancer" International Journal of Oncology, vol. 40, no. 2, pp. 551-559 (February 2012) See the entire document.	1-10,12,15
A	ZHU et al., "Proteins and an inflammatory network expressed in colon tumors" Journal of Proteome Research, vol. 10, no. 5, pp. 2129-2139 (2011) See the entire document.	1-10,12,15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 MARCH 2014 (07.03.2014)

Date of mailing of the international search report

10 MARCH 2014 (10.03.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/011112

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **11, 13-14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 11 and 13-14 pertain to a method for treatment of the human or to a diagnostic method, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/011112

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 7960100 B1	14/06/2011	US 2011-0296544 A1 US 2013-0067608 A1	01/12/2011 14/03/2013
KR 10-1198714 B1	12/11/2012	US 2013-0202560 A1 WO 2012-050303 A2 WO 2012-050303 A3	08/08/2013 19/04/2012 14/06/2012
WO 2005-007085 A2	27/01/2005	US 2005-0085472 A1 US 2009-0181988 A1 US 2012-0065154 A1 US 7429596 B2 WO 2005-007085 A3	21/04/2005 16/07/2009 15/03/2012 30/09/2008 09/09/2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/16(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61K 31/7105(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 38/16; C12Q 1/00; A61K ; A61K 38/17; G01N 33/574; A61K 48/00; A61K 31/7105

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 카르보닐기 환원효소 1, 대장암, C12orf59

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 7960100 B1 (DOMON 외) 2011.06.14. 요약; 컬럼 2-5, 12-30; 및 SEQ ID NOs: 587-588 참조.	1-8, 10, 12, 15
Y		9
Y	KR 10-1198714 B1 (한국생명공학연구원) 2012.11.12. 요약 및 청구항 1-3, 5-13, 15 참조.	9
A	WO 2005-007085 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2005.01.27. 요약 및 페이지 5434-5435, 5439-5440 참조.	1-10, 12, 15
A	NCBI, GenBank accession no. NP_001748 (2012.11.10.) 전체 문서 참조.	1-10, 12, 15
A	TAKEMASA 외, `Potential biological insights revealed by an integrated assessment of proteomic and transcriptomic data in human colorectal cancer` International Journal of Oncology, Vol.40, No.2, pp.551-559 (2012.02.) 전체 문서 참조.	1-10, 12, 15
A	ZHU 외, `Proteins and an inflammatory network expressed in colon tumors` Journal of Proteome Research, Vol.10, No.5, pp.2129-2139 (2011) 전체 문서 참조.	1-10, 12, 15

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2014년 03월 07일 (07.03.2014)

국제조사보고서 발송일

2014년 03월 10일 (10.03.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 11, 13-14
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 11 및 13-14는 사람의 치료방법 및 진단방법에 해당하므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 7960100 B1	2011/06/14	US 2011-0296544 A1 US 2013-0067608 A1	2011/12/01 2013/03/14
KR 10-1198714 B1	2012/11/12	US 2013-0202560 A1 WO 2012-050303 A2 WO 2012-050303 A3	2013/08/08 2012/04/19 2012/06/14
WO 2005-007085 A2	2005/01/27	US 2005-0085472 A1 US 2009-0181988 A1 US 2012-0065154 A1 US 7429596 B2 WO 2005-007085 A3	2005/04/21 2009/07/16 2012/03/15 2008/09/30 2005/09/09