

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0000013 (43) 공개일자 2013년01월02일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/7088 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)	(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)	
(21) 출원번호 10-2011-0060148	(72) 발명자 황순봉 경기도 안양시 동안구 평촌동 898-2 초원마을 대 림 210동 1703호	
(22) 출원일자 2011년06월21일 심사청구일자 2011년06월21일	임윤숙 경기도 안양시 동안구 흥안대로155번길 29, 202호 (호계동)	
	(74) 대리인 강성혜	

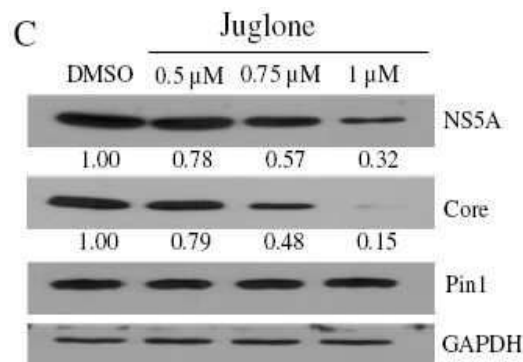
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 P i n 1 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물

(57) 요약

C형 간염 바이러스 (HCV) 생애 주기는 세포 인자에 매우 의존적이다. siRNA 라이브러리 스크리닝을 이용하여 HCV 증식에 관여하는 숙주 인자로서 Pin1 (peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase NIMA-interacting 1)을 동정하였다. 본 발명자들은 Pin1 발현을 침묵시키면 HCV 레플리콘 세포 및 HCVcc 감염된 세포 배양액에서도 HCV 복제가 감소함을 확인하였고, 반면 Pin1 과다발현은 HCV 복제를 증가시켰다. Pin1은 NS5A 및 NS5B 단백질 모두와 반응하였다. 그러나, Pin1 발현은 NS5B 단백질에 의해서만 증가하였다. Pin1의 결합 활성 및 아이소머레이즈 활성은 모두 HCV 복제에 필요했다. Pin1의 천연 저해제인 저글론은 Pin1과 HCV NS5A/NS5B 간의 단백질 상호작용을 저해함으로써 HCV 증식을 억제하였다. 이러한 결과는 Pin1이 HCV 증식을 조절하고 HCV-유도 간질환의 원인이 됨을 말해 준다.

대표도 - 도6c



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2008-2004100
 부처명 교육과학기술부
 연구사업명 고빈도 돌연변이 바이러스 증식제어를 위한 기반기술 연구
 연구과제명 C형 간염바이러스 증식제어 기술 개발
 주관기관 한림대학교 산학협력단
 연구기간 2008.08.01 ~ 2013.07.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 ROA-2007-0056700
 부처명 교육과학기술부
 연구사업명 국가지정연구실(NRL)
 연구과제명 C형 간염바이러스의 복제 및 신호전달 조절 타겟을 이용한 제어기술 개발
 주관기관 한림대학교 산학협력단
 연구기간 2007.07.01 ~ 2012.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1020290
 부처명 보건복지부
 연구사업명 암정복추진연구개발산업
 연구과제명 C형 간염바이러스의 복제에 관여하는 신규표적 발굴 및 기능 규명을 통한 새로운 치료기술

개발

주관기관 한림대학교 산학협력단
 연구기간 2010.06.01 ~ 2013.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

Pin1 (peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase NIMA-interacting 1) 발현 또는 활성 저해제를 포함하는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 Pin1 mRNA 발현 저해제는 Pin1 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, shRNA (short hairpin RNA) 및 siRNA (short interfering RNA)로 구성된 군 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 siRNA는 서열번호 제31~34번임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 Pin1 단백질 활성 저해제는 저글론 (juglone) 또는 다이펜타메틸렌 티우람 모노설파이드 (Dipentamethylene thiuram monosulfide)임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 Pin1 단백질 활성 저해제는 Pin1 단백질에 결합하는 항체임을 특징으로 하는 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것으로서, 좀더 자세히는 Pin1 (Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase NIMA-interacting 1) 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] C형 간염 바이러스 (Hepatitis C virus; HCV)는 전 세계적으로 약 2억명의 감염자가 있으며, 감염자의 대다수가 만성 감염으로 진행되어 간경화 및 간암으로 전이된다.

[0003] HCV는 플라비비리대 (*Flaviviridae*) 헤파시바이러스 (*Hepacivirus*) 속의 유일한 구성원이다 (Giannini, C., and C. Brechot. 2003. *Cell Death Differ. Suppl* 1:S27-38, Lindenbach, B. D., and C. M. Rice. 2005. *Nature* 436:933-938. Moradpour, D., F. Penin, and C. M. Rice. 2007. *Nature Rev. Microbiol.* 5:453-463,

Suzuki, T. et al. 2007. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59:1200-1212). HCV는 약 9.6 kb 길이의 양성-센스, 단일 가닥 RNA 게놈을 가진 외피 바이러스 (enveloped virus)이다. HCV 게놈은 단일 전구체 폴리프로테인을 코딩하는데, 이것은 숙주세포 및 바이러스의 프로테아제에 의해 절단되어 세 개의 구조 단백질 (코어, E1 및 E2)과 일곱 개의 비구조 단백질 (p7, NS2 ~ NS5B)이 된다. HCV가 매우 널리 퍼진 병원체임에도 불구하고, 유효한 예방 백신은 아직 없다. 최근의 표준적인 치료방법은 폴리에틸렌글라이콜이 결합된 인터페론- α 를 리바비린 (ribavirin)과 함께 투여하는 것이다. 그러나, 이 치료법은 부작용을 나타내며, 일부 환자에서만 지속적인 반응을 나타낸다. 따라서, HCV 관련 만성 간염에 좀더 효과적인 치료제가 요구되고 있다.

[0004] 펩타이드-프로릴 시스-트랜스 아이소머레이즈 NIMA-인터랙팅 1 (Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase NIMA-interacting 1; 이하 "Pin1")은 유사분열을 조절하는 분자로 스크린에서 처음 발견되었다 (Yaffe, M. B. et al., 1997. *Science* 278:1957-1960). Pin1은 163개의 아미노산으로 구성되고 N-말단의 WW 결합 도메인과 C-말단의 펩타이드프로릴 아이소머레이즈 도메인이라는 두 개의 기능성 도메인이 있다 (Lu, K. P., and X. Z. Zhou. 2007. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:904-916, Lu, P. J. et al., 2002. *J Biol Chem.* 277:2381-2384, Wulf, G. et al. 2005. *Nat. Cell Biol.* 7:435-441, Wulf, G. M. et al. 2001. *EMBO J.* 20:3459-3472). N-말단의 WW 결합 도메인은 Ser/Thr-Pro 모티프에 인산화된 특정 단백질에 결합하며, 반면 C-말단 아이소머레이즈 도메인은 결합된 펩타이드 결합의 시스-트랜스 (*cis-trans*) 이성화를 촉진한다. 이러한 구조적 변화는 많은 Pin1 기질의 인산화 상태, 세포내 위치, 단백질의 안정성 및 기능에 중대한 영향을 미친다. 따라서, Pin1은 세포주기 진행, 세포 증식, 전사 조절 및 신생물 형질전환 (neoplastic transformation)을 포함하는 여러 세포 활동에서 중요한 역할을 수행한다. Pin1은 종양, 알츠하이머병 및 천식 같은 질병과도 연관이 있다. Pin1은 간암 (hepatocellular carcinoma; HCC)을 비롯한 많은 인간 종양에서 과발현된다 (Lu, K. P. 2003. *Cancer cell* 4:175-180). Pin1은 50% 이상의 간암에서 과발현되는 것으로 알려졌다. Pin1이 과발현되는 모든 경우에는 β -카테닌 (β -catenin) 축적이 나타났고, 68%는 β -카테닌과 사이클린 D1의 축적이 동시에 나타났다 (Pang, R. et al. 2004. *Oncogene* 23:4182-4186). 뿐만 아니라, 형질전환되지 않은 인간 간 세포주에서 Pin1 과발현은 간세포의 형질전환을 이끌고, Pin1 발현을 억제하면 간암 종양발현이 억제된다 (Pang, R. W. et al. 2006. *J. Pathol.* 210:19-25). 최근에는 Pin1이 B형 간염 바이러스 X 단백질 (Hepatitis B virus X protein; HBx)의 특정 세린-프롤린 모티프와 상호작용하여 B형 간염 환자에서 간암발생을 증대시키는 것이 보고되었다 (Pang, R. et al., 2007 *Gastroenterology* 132:1088-1103).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 종래 C형 간염의 효과적인 치료제가 없었던 문제를 해결하고 C형 간염에 효과적인 예방 및 치료제를 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] C형 간염 바이러스 (HCV) 생애 주기는 세포 인자에 매우 의존적이다. 본 발명자들은 siRNA 라이브러리 스크리닝을 이용하여 HCV 증식에 관여하는 숙주 인자로서 Pin1 (peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase NIMA-interacting 1)을 동정하였다. 본 발명자들은 Pin1 발현을 침묵시키면 HCV 레플리콘 세포 및 HCVcc 감염된 세포 배양액에서도 HCV 복제가 감소함을 확인하였고, 반면 Pin1 과다발현은 HCV 복제를 증가시켰다. Pin1은 NS5A 및 NS5B 단백질 모두와 반응하였다. 그러나, Pin1 발현은 NS5B 단백질에 의해서만 증가하였다. Pin1의 결합 활성 및 아이소머레이즈 활성은 모두 HCV 복제에 필요했다. Pin1의 천연 저해제인 저글론은 Pin1과 HCV NS5A/NS5B 간의 단백질 상호작용을 저해함으로써 HCV 증식을 억제하였다. 이러한 결과는 Pin1이 HCV 증식을 조절하고 HCV-유도 간질환의 원인이 됨을 말해 준다.

[0007] 따라서, Pin1의 발현이나 활성을 억제하면 HCV의 증식을 저해할 수 있으므로 Pin1의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는 조성물은 C형 간염의 예방 및 치료제로서 사용할 수 있다.

[0008] 본 발명은 Pin1 (peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase NIMA-interacting 1) 발현 또는 활성 저해제를 포함하

는 C형 간염 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

- [0009] 또한, 본 발명은 상기 Pin1 발현 저해제가 Pin1 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, shRNA (short hairpin RNA) 및 siRNA (short interfering RNA)로 구성된 군 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 Pin1에 대한 siRNA가 서열번호 31~34 (서열번호 31: CCACAUCACUAACGCCAGC, 서열번호 32: GAAGACGCCUCGUUUGCGC, 서열번호 33: GAAGAUACCCGGACCAAG, 서열번호 34: GCUCAGGCCGAGUGUACUA) 중 어느 하나임을 특징으로 한다. Pin1에 대한 siRNA는 Pin1 유전자 서열을 바탕으로 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 용이하게 제조할 수 있으며, 가능한 siRNA의 수는 제한이 없으며, 위 네 개의 siRNA는 예시적인 기재일 뿐이다. 또한, Pin1 유전자에 대한 siRNA가 Pin1 유전자와 결합하여 Pin1의 발현을 저해할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명함을 밝혀둔다.
- [0011] Pin1에 대한 shRNA 또한 Pin1 유전자 서열을 바탕으로 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 용이하게 제조할 수 있으며, 가능한 shRNA의 수는 특별한 제한이 없으며, Pin1 유전자에 대한 shRNA가 Pin1 유전자와 결합하여 Pin1의 발현을 저해할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명함을 밝혀둔다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 Pin1 단백질 활성 저해제가 저글론 (juglone) 또는 다이펜타메틸렌 티우람 모노설파이드 (Dipentamethylene thiuram monosulfide)임을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.
- [0013] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 Pin1 단백질 활성 저해제가 Pin1 단백질에 결합하는 항체임을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.
- [0014] Pin1 저해제에 관해서는 국제특허공개 WO 2003074001호 및 미국특허공개 20040176912호에 Pin1 특이적 저해제 디자인 방법이 개시되어 있고, WO 2006040646호에는 Pin1 저해제로서 벤지미디아졸 (Benzimidazole) 또는 인돌 아마이드 (Indole amide)가 개시되어 있다. 또한, WO 2005027727호, US 20050239095호 등에는 Pin1 저해제를 종양 치료 용도로 사용하는 기술이 개시되어 있다. 즉, Pin1 저해제는 특별히 상기 예시된 저해제에만 한정되는 것이 아님을 밝혀둔다.
- [0015] 본 발명의 Pin1 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 C형 간염 예방 및 치료용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 유효성분을 0.0001 내지 50 중량%로 포함한다.
- [0016] 본 발명의 조성물은 상기 Pin1 단백질의 발현 또는 활성 억제제에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은 임상 투여시 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 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(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 조성물은 특히 등장 멸균 용액 또는 멸균수 또는 적절한 생리 식염수의 첨가에 따라 주사 가능한 용액의 조성을 위해 동결건조 조성물을 포함할 수 있다. 사용되는 유효성분의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 약 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 일회 내지 수회 나누어 투여될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 방사선 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법 등과 병용하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0020]

본 발명의 Pin1 (peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase NIMA-interacting 1) 활성 또는 발현을 저해하는 물질은 HCV의 복제를 저해함으로써 C형 간염 예방 및 치료제로서 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0021]

도 1은 Pin1이 HCV 복제에 필수적임을 보여주는 그래프이다. (1a) Huh7.5 세포를 20 nM의 siRNA로 48시간 동안 트랜스펙션한 다음 HCV Jc1으로 4시간 동안 감염시켰다. 감염 이틀 후 배양 상층액을 수집하여 세포의 HCV RNA를 qPCR로 정량하였다. 131개의 인간의 세포 주기 유전자를 타겟으로 하는 siRNA 라이브러리 중 음성 대조군에 비하여 HCV 생산을 두 배까지 증가 또는 감소시킨 13개의 siRNA가 선택되었다. (1b) Huh7.5 세포를 20 nM의 음성 (-), 양성 (+) 및 Pin1 siRNA 듀플렉스로 각각 48시간 동안 트랜스펙션시킨 다음 Jc1으로 4시간 동안 감염시켰다. 감염 이틀 후 HCV 감염도를 포커스 형성 측정법으로 결정하였다. (1c) Huh7.5 세포를 지시한 siRNA로 트랜스펙션시켰다. 96시간 후 세포 생존율을 MTT 측정법으로 평가하였다. (1d) (1b)에서 분리한 세포내 RNA (윗 패널) 및 Pin1 mRNA (아래 패널) 모두 qPCR로 분석하였다. (1e) (1b)에서 얻은 세포 용균액을 지시된 항체로 면역블랏팅하였다. (1f) Huh7.5 세포를 지시된 siRNA로 트랜스펙션시켰다. 이틀 후 세포를 Jc1으로 네 시간 동안 감염시킨 다음 3 μ g의 벡터 또는 야생형 Pin1 (Flag-Pin1 WT) 및 siRNA 저항성 Pin1 (Flag-Pin1 WT-SR)을 발현하는 플라스미드로 각각 트랜스펙션시켰다. 단백질 발현은 트랜스펙션 이틀 후 면역블랏 분석으로 결정하였다. (-), 일반 음성 대조군 siRNA; (+), 양성 대조군으로서 Jc1의 5' 비번역부위를 타겟으로 하는 siRNA. (1g) 서브게놈 레플리콘 세포를 96시간 동안 지시된 siRNA로 트랜스펙션시켰다. 단백질 발현은 면역 블랏 분석으로 결정하였다. 띠의 강도 정량은 이미지 J 소프트웨어를 이용하여 결정하였다. (1h) Huh7.5 세포를 인 비트로 전사된 HCV-Luc RNA로 트랜스펙션시켰다. 두 시간 후 세포를 음성, 양성 및 Pin1 siRNA로 각각 트랜스펙션시켰다. 루시퍼레이스 활성을 각 시간별로 측정하였다. 별표는 음성 대조군과 비교하여 유의한 차이 (* p <0.05, ** p <0.01)를 나타내는 것이다.

도 2는 Pin1 과다발현이 HCV 증식을 증대시킴을 나타내는 결과들이다. (2a) Huh7.5 세포를 Jc1으로 48시간 동안 감염시킨 후 2 μ g의 벡터 또는 Flag-Pin1 플라스미드로 일시적으로 트랜스펙션시켰다. 48시간 후 HCV RNA를 qPCR로 분석하였다. (2b) (2a)에서 모은 총 세포 용균액을 지시한 항체로 면역블랏하였다. (2c) 배양 상층액에서 분리한 세포의 RNA를 qPCR로 정량하였다. 실험은 두 번 실시하였다. 오류 막대는 표준편차를 나타낸다. (2d) 벡터 안정 세포 및 Pin1 안정 세포를 Jc1으로 감염시켰다. 48시간 후 세포내 HCV RNA를 qPCR로 정량하였다. (2e) 벡터 안정세포와 Pin1 안정 세포의 두 클론을 Jc1으로 감염시켰다. 48시간 후 총 세포 용균액을 지시한 항체로 면역블랏하였다. 띠의 강도 정량은 앞의 기체와 같이 수행하였고, 별표는 벡터 대조군과 대비하여 유의한 편차 (* p <0.05)를 나타내는 것이다.

도 3은 Pin1이 HCV NS5A 및 NS5B와 직접 상호작용함을 나타내는 결과이다. (3a) HEK293T 세포를 각각 Myc-NS4B, Myc-NS5A, Myc-NS5B로 트랜스펙션시켰다. 36시간 후 총 세포 용균액을 모아 정제된 GST 또는 GST-Pin1과 함께 배양시켰다. 복합체는 글루타치온 비드로 침전시키고 결합된 단백질을 항-Myc 항체로 면역블랏 분석하였다 (위 패널). GST 및 GST-Pin1의 단백질 발현은 항-GST 항체로 확인하였다 (아래 패널). (3b) HEK293T 세포를 지시된 발현 플라스미드의 조합으로 트랜스펙션시켰다. 36시간 후 세포 용균액을 항-Flag 단일클론항체로 면역침전 (IP)시킨 후 결합된 단백질을 면역블랏 (IB) 분석하였다 (위 패널). 같은 세포 용균액에서 Myc-NS4B, Myc-NS5A, Myc-NS5B 및 Flag-Pin1의 단백질 발현은 면역블랏 분석으로 확인하였다 (아래 패널). (3c) (왼쪽 패널) HCV 레플리콘에서 모은 총 세포 용균액을 Pin1 항체 또는 IgG로 면역침전시켰다. 결합된 단백질은 NS5A (위 패널) 또는 NS5B (아래 패널) 항체로 면역블랏하여 탐지하였다. (오른쪽, 위 패널) Huh7.5 세포를 10 μ g의 Jc1 RNA로 전기전공하고 3일간 배양하였다. 세포 용균액은 Pin1 항체 또는 IgG로 면역침전시켰다. 결합된 단백질은 NS5A 항체로 면역블랏하였다. (오른쪽, 아래 패널) 역으로, 위와 동일한 세포 용균액을 토끼 NS5A 또는 토끼 대조군 혈청으로 면역침전시켰다. 결합된 단백질은 Pin1 항체로 면역블랏하였다. 별표는 중재를 나타낸다. (3d) Huh7.5 세포를 HCV Jc1으로 네 시간 동안 감염시켰다. 이틀 후 세포를 Flag 표지된 Pin1 발현 플라스미드로 트랜스펙션시켰다. 24시간 후 세포를 4% 파라포름알데하이드로 고정시키고, Pin1 (녹색)을 탐지하기 위해 항-Pin1 단일클론항체 및 FITC 결합된 염소 항-마우스 IgG로 면역형광염색을 수행하고 NS5A (적색) 또는 NS5B (적색)을 탐지하기 위해 토끼 항-NS5A 또는 NS5B 항체 및 TRITC 결합된 염소 항-토끼 IgG로 면역형광염색을 수행하였다. 이중염색은 병합된 이미지에서 노란 형광색으로 Pin1과 NS5A가 동일위치화함을 보여준다. 세포는 표지된 핵에

대해 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)로 역염색되었다. 병합 이미지에서 하얀 네모는 잘라낸 부분을 나타낸다. (3e) HCV Jc1으로 감염된 Huh7.5 세포는 고정시켜 토끼 항-NS5A 항체와 함께 배양하고, 항-토끼 FITC 또는 항-토끼 TRITC 항체와 함께 배양하였다 (레인 1). Flag-Pin1 안정 세포는 고정시켜 마우스 항-Pin1 및 토끼 항-Flag 항체와 함께 배양한 후 항-마우스 TRITC 및 항-토끼 FITC 항체 (레인 2, 3)와 함께 배양하였다. NS5A (레인 4) 및 NS5B (레인 5)와 Pin1의 동일위치화는 맨더의 오버랩 계수로 정량하였다.

도 4는 NS5A가 아닌 NS5B가 Pin1 발현을 증대시킴을 나타내는 결과이다. (4a) (왼쪽 패널) Huh7.5 세포는 mock 또는 HCV Jc1으로 네 시간 동안 감염시켰다. 4일 후 총 세포 용균액을 모으고 지시된 항체로 면역블랏하였다. (중간 패널) 블랏 이미지를 스캔하고 단백질 픽셀 강도를 이미지 J 소프트웨어로 측정하였다. (오른쪽 패널) 총 RNA를 추출한 후 qPCR을 수행하여 Pin1의 mRNA 수준을 정량하였다. 두 개의 독립적인 실험 결과를 정량하였다. * $P < 0.05$, mock 대 HCV Jc1 감염 세포. (4b) (왼쪽 패널) 인터페론으로 치료한 세포 또는 서브게놈 레플리콘 세포에서 세포 용균액을 동량 모아 지시된 항체로 면역블랏하였다. (가운데 패널) 블랏 이미지를 스캔하고 단백질 픽셀 강도를 이미지 J 소프트웨어로 측정하였다. (오른쪽 패널) 총 RNA를 추출하여 qPCR을 수행하여 Pin1의 mRNA 수준을 정량하였다. 두 번의 독립적인 실험에서 얻은 결과를 정량하였다. * $P < 0.05$, 인터페론 치료한 세포 대 레플리콘 세포. (4c) Huh7 세포를 벡터, Myc-표지된 NS5A, Myc-표지된 NS5B로 각각 트랜스펙션시켰다. 48 시간 후 단백질 발현을 면역블랏 분석으로 결정하였다.

도 5는 HCV 복제에 Pin1의 결합 활성과 아이소머레이즈 활성이 모두 필수적임을 나타내는 데이터이다. (5a) Huh7.5 세포를 지시된 발현 플라스미드의 조합으로 트랜스펙션시켰다. 48시간 후 세포 용균액은 항-Flag 단일클론항체로 면역침전시킨 다음 결합 단백질을 면역블랏으로 탐지하였다 (위쪽 패널). 동일 세포 용균액 내의 단백질 발현은 지시된 항체로 입증하였다 (아래 패널). Pin1 WT-SR, siRNA 저항성 돌연변이 Pin1; Pin1 S16A-SR, siRNA 저항성 결합활성 결합 돌연변이 Pin1; Pin1 C113A-SR, siRNA 저항성 아이소머레이즈 불활성 돌연변이 Pin1. 별표는 IgG 중재를 나타낸다. (5b) Huh7.5 세포는 지시된 siRNA로 트랜스펙션시켰다. 이들 후 세포를 네 시간 동안 Jc1으로 감염시킨 다음 각각 2 μ g의 Pin1 WT, Pin1 S16A-SR, Pin1 C113A-SR 및 Pin1 WT-SR 발현 플라스미드로 트랜스펙션시켰다. 이들 후 분리시킨 세포내 RNA를 qPCR로 분석하였다. (5c) HCV 및 숙주세포의 단백질 발현 수준을 지시된 항체를 이용하여 면역블랏 분석하여 결정하였다. (5d) HCV 감염성에 대한 Pin1 돌연변이의 효과는 포커스 형성 평가법으로 결정하였다. 실험은 두 번씩 수행되었고 오류 막대는 표준편차를 나타낸다.

도 6은 저글론이 Pin1과 HCV 단백질 사이의 단백질 상호작용을 저해하여 HCV 복제를 억제함을 나타내는 데이터이다. (6a) Huh7.5 세포를 Jc1으로 감염시켰다. 하루 후 세포를 1일간 각기 다른 농도의 저글론으로 처리하였다. 세포 생존율을 MTT 법으로 평가하였다. (6b) (6a)에서 분리한 세포내 RNA를 qPCR로 분석하였다. (6c) (6a)에서의 단백질 발현을 면역블랏으로 분석하였다. (6d) (6a)에서 분리한 세포의 RNA를 qPCR로 정량하였다. 실험은 두 번씩 수행하였고, 별표는 DMSO (담체)에 대한 유의성 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) 있는 차이를 나타낸다. (6e) HEK293T 세포를 지시된 발현 플라스미드의 조합으로 트랜스펙션시켰다. 24시간 후 세포 용균액을 항-Flag 단일클론항체로 면역침전시켰고 결합된 단백질을 항-Myc 항체로 면역블랏 분석하여 탐지하였다 (위쪽 패널). 동일 세포 용균액에서 NS5A, NS5B 및 Pin1의 단백질 발현은 지시된 항체를 이용한 면역블랏 분석으로 확인하였다. (6f) Huh7.5 세포를 HCV Jc1으로 감염시킨 다음 24시간 후 Flag 표지된 Pin1 발현 플라스미드로 일시적으로 트랜스펙션시켰다. 24시간 후 세포를 DMSO (담체) 또는 1 μ M의 저글론으로 처리하였다. 시료는 고정시킨 후 항-NS5A 및 항-Flag 항체와 함께 배양하였다. 오버랩 계수는 면역형광 데이터를 이용하여 실시예의 기재와 같이 결정하였다. * $p < 0.05$.

도 7은 Pin1, CypA 및 CypB가 HCV 복제에 특이적으로 관여함을 나타내는 데이터이다. (7a) HEK293T 세포를 지시된 발현 플라스미드의 조합으로 트랜스펙션시켰다. 24시간 후 세포를 1 μ M의 저글론 또는 담체 (DMSO)로 24시간 동안 처리하였다. 그 다음 세포 용균액을 항-Pin1 다클론 항체로 면역침전시키고 결합된 단백질을 면역블랏 분석으로 탐지하였다 (위쪽 패널). 동일한 세포 용균액 내의 NS5A, NS5B, Pin1, CypA 및 CypB 단백질 발현은 지시된 항체를 이용한 면역블랏 분석으로 확인하였다 (아래 패널). (7b) Huh7.5 세포를 지시된 siRNA로 트랜스펙션시켰다. 이들 후 세포를 Jc1으로 4시간 동안 감염시킨 다음 2 μ g의 빈 벡터 또는 각 WT-SR, CypA 및 CypB 발현 플라스미드로 이틀간 트랜스펙션시켰다. 세포내 RNA를 분리하여 qPCR로 분석하였다. (7c) (7b)로부터 분리한 바이러스 단백질과 세포 단백질을 지시된 항체로 면역블랏 분석하였다. 띠의 강도는 실시예의 기재와 같이 정량하였다. (7d) 바이러스 역가는 포커스 형성 평가법으로 결정하였다. 실험은 두 번씩 수행하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 아래에서는 본 발명의 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.
- [0023] **플라스미드와 DNA 트랜스펙션**
- [0024] Myc-표지된 NS4B, Myc-표지된 NS5A 및 Myc-표지된 NS5B를 발현하는 플라스미드는 종래 논문에 개시되어 있다 (Choi, S. H., and S. B. Hwang. 2006. *J. Biol. Chem.* **281**:7468-7478, Park, C. Y., S. H. Choi, and S. B. Hwang. 2009. *J. Hepatol.* **51**:853-8640). 전장 인간 Pin1 cDNA를 pCNS-D2-Pin1 플라스미드 (21C Frontier Human Gene Bank)로부터 증폭한 다음 각각 GST-Pin1 및 Flag-Pin1을 발현하는 플라스미드를 제조하기 위하여 pGEX-4T1 (Amersham Biosciences) 및 p3XFlag-CMV10 (Sigma-Aldrich) 벡터에 각각 서브클론하였다. Pin1 돌연변이는 제조자의 지시에 따라 표 1의 프라임들을 이용하여 부위 지시 돌연변이 (site-directed mutagenesis; Stratagene)로 제조하였다. siRNA-저항성 돌연변이 Pin1은 siRNA 결합 부위에 두 개의 침묵 변이 (silent mutations)를 포함한다. siRNA-저항성 결합-결여 변이 Pin1 (Lu, P. J. et al. 2002. *J. Biol. Chem.* **277**:2381-2384) 및 siRNA-저항성 아이소머레이즈-비활성 변이 Pin1 (Winkler, K. E. et al. 2000. *Science* **287**:1644-1647)을 제조하기 위하여 siRNA-저항성 돌연변이 Pin1에 각각 S16A 및 C113A 치환 돌연변이를 도입하였다. 인간 CypA 및 CypB (성숙형)를 클로닝하기 위해 Huh7.5 세포에서 총 RNA를 추출하고 CypA-F/CypA-R 및 CypB-F/CypB-R의 프라이머로 RT-PCR을 수행하였다 (표 1). PCR 산물은 플라스미드 p3XFlag-CMV10의 *EcoRI* 및 *BamHI* 부위에 삽입되었다. DNA를 트랜스펙션 하기 위해 폴리에틸렌이민제 (polyethylenimine reagent, Sigma-Aldrich)를 이용하여 지시된 발현 플라스미드로 세포를 트랜스펙션하였다 (Park, C. Y. et al., 2009. *J. Hepatol.* **51**:853-864).
- [0025] **세포 배양**
- [0026] 모든 세포주는 10% 우태 혈청 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 함유된 DMEM (Dulbecco's modified Eagles' medium) 배지에서 5% CO₂ 조건으로 37°C에서 배양하였다. HCV 서브게놈 레플리콘 (유전형 1b) 세포 및 NS5A를 발현하는 안정적인 세포를 배양하였다 (Choi, S. H., and S. B. Hwang. 2006. *J. Biol. Chem.* **281**:7468-7478).
- [0027] **화학약품과 항체**
- [0028] Pin1의 천연 저해제인 저글론 (Juglone)은 Calbiochem에서 구입하였다. Pin1 항체는 Cell signaling and Santa Cruz에서, Flag 항체는 Sigma-Aldrich에서, GAPDH 및 Myc 항체는 Santa Cruz에서, 토끼 항-코어 및 NS3 항체는 고려대 안병윤 교수로부터 입수하였다.
- [0029] **HCV Jc1 제조 및 바이러스 감염**
- [0030] 감염성 HCV는 간단한 변이로 종래기술에 따라 제조하였다 (Kato, T. et al., 2006. *Nat. Protoc.* **1**:2334-2339, Pietschmann, T. et al., 2006. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:7408-7413). 간단히 설명하면, pFK-Jc1 플라스미드를 Jc1 게놈의 3' 말단에 *MluI* 절단으로 연결하고 페놀-클로로포름 추출 방법으로 정제하였다. RNA 전사체는 Ambion MEGAscript T7 kit를 이용하여 제조하였고, Invitrogen Trizol LS로 정제하였다. 인 비트로 전사된 게놈 Jc1 RNA 10 µg을 0.4-cm 큐벳에서 7.5×10^6 Huh7.5 세포와 혼합하고 Bio-Rad GenePulser II electroporator로 300 V 및 975 µF로 전기천공하였다. 세포는 완전 배지 (10% FBS, 100 units/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민, 1 mM NEAA 및 10 mM HEPES를 함유하는 저농도 글루코스 DMEM)에 조심스럽게 옮겨져서 150-mm 디쉬에 올려졌다. 24시간 후 배지는 신선한 완전배지로 교체되고 죽은 세포는 제거되었다. 전기천공 4일 후 배양배지를 수집하여 0.45-mm 시린지-타입 필터 유닛 (Milipore)으로 거른 다음 저장해 두었다가 바이러스 스톱으로 사용하였다. NS5B의 활성 부위 돌연변이를 포함하는 Jc1/GND 돌연변이는 RNA-의존 RNA 폴리머레이즈 활성을 소멸시키는데, 이 돌연변이를 병행하여 제조하였다. Jc1/GND 돌연변이 RNA로 트랜스펙션된 세포의 배양 상등액을 모아 상기 방법과 같이 제조하여 의사 감염 (mock infection)으로 이용하였다. 바이러스 감염 실험에서 세포는 PBS로 두 번 세척한 후 HCVcc로 네 시간 동안 배양하였다. HCVcc 감염된 세포는 다

시 PBS로 세척한 다음 완전배지에서 배양하였다.

[0031] **RNA 간섭 (RNA interference)**

[0032] 인간 세포 주기 조절 siRNA 라이브러리 (ON-TARGETplus™)는 Dharmacon (Lafayette, CO)에서 구입하였다. 이 라이브러리는 세포 주기를 조절하는데 결정적인 기능을 수행하는 유전자를 타겟으로 하는 131개의 siRNA 풀을 포함한다. 각 풀은 같은 타겟 mRNA 서열의 다른 부분을 타겟으로 하여 디자인된 4개의 siRNA 듀플렉스로 구성된다. SMARTpool siRNA가 100 nM 농도에서 트랜스펙션될 때 mRNA 수준에서 타겟 유전자의 최소 75%의 발현을 침묵시킨다고 Dharmacon 사에 의해 보증되었다. Pin1을 타겟으로 하는 siRNA들 (5' - GCU CAG GCC GAG UGU ACU A - 3')과 범용 음성 대조군 (universal negative control)은 Dharmacon에서 구입하였다. Jc1의 5' 말단 비번역구간 (non-translated region; NTR)을 타겟으로 하는 siRNA (5' - CCU CAA AGA AAA ACC AAA CUU -3')가 양성 대조군으로 이용되었다 (Randall, G. et al., 2007. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:12884-12889). siRNA 트랜스펙션은 Lipofectamine RNAiMax reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 수행되었다.

[0033] **HCV RNA 정량**

[0034] HCVcc 감염 세포, 세포 배양배지 또는 레플리콘 세포로부터 Trizol LS reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 세포내 및 세포외 RNA가 분리되었고 SuperScript® VILO™ cDNA synthesis kit (Invitrogen; Carlsbad, CA)를 이용하여 역전사되었다. iQ5 multicolor Real-time PCR Detection system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)을 이용하여 95 °C에서 15분 이후 95 °C에서 20초, 55 °C에서 20초, 72 °C에서 20초를 40 사이클의 조건으로 정량적 실시간 PCR (Quantitative real-time PCR ; qRT-PCR)이 수행되었다. 60 ~ 95 °C까지 매 10초마다 0.5 °C씩 승온하여 71 사이클 동안 용융 곡선을 그렸다. HCV 5' 비번역구간 서열은 T-A 벡터 (RBC)에 클론되어 qRT-PCR의 표준물질로 이용하였다. 표준물질은 시료와 나란히 전개하였고, 완벽한 RNA 복제 수가 표준곡선에 기초하여 결정되었다.

[0035] **바이러스 역가 결정 (Determination of virus titers)**

[0036] 200 µl 배양배지가 들어 있는 8-웰 챔버 배양 슬라이드 (Becton Dickinson/Falcon, Franklin Lakes, NJ) 내에 2×10^4 cells/well로 Huh7.5 세포를 시드하였다. 24 시간 배양한 다음 HCVcc 감염된 세포로부터 얻은 세포배양배지를 순차 희석하여 Huh7.5 세포를 접종하였다. 이를 후 포커스 형성 단위 (focus-forming units; FFU) 수를 결정하기 위하여 세포내 코어 항원의 존재를 확인하기 위한 간접 면역형광법을 수행하였다. NS5A에 대한 염색으로 확인된 감염 세포군은 단일 감염 포커스로 판단되었다. 바이러스 역가는 FFU/ml로 계산되었다.

[0037] **MTT 분석**

[0038] 숙주 세포 생존율은 세포 증식 분석 MTT 키트 (Roche)를 이용하여 결정하였다.

[0039] **Pin1 안정 세포 제조 (Generation of Pin1 stable cells)**

[0040] Flag-Pin1을 안정적으로 발현하는 세포주를 제조하기 위하여 Huh7 세포를 p3XFlag-CMV10-Pin1 발현 플라스미드로 트랜스펙션하고 300 µg/ml의 G418 존재 하에 4주간 배양하였다. 항-Flag 단일클론항체로 면역블랏 분석한 결과 단일 양성 클론을 얻었다. 빈 벡터 (p3XFlag-CMV10 only)로 트랜스펙션한 Huh7 세포는 위와 같은 방법으로 선택되어 대조군으로 이용되었다.

[0041] **면역블랏 분석 (Immunoblot analysis)**

[0042] 세포 용균액을 준비하여 면역블랏팅하였다 (Choi, S. H., and S. B. Hwang. 2006. *J. Biol. Chem.* **281**:7468-7478). 간단히 설명하면, 세포를 50 mmol/l Tris-HCl (pH 7.5), 150 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 1% Nonidet P-40, 10% 글리세롤 및 프로테아제 저해제 혼합물 (Roche)을 함유한 세포용균 완충액에 넣고 20분간 차

가운 상태에서 용균시켰다. 단백질 농도는 브래드포드 분석법으로 결정하였다 (Bio-Rad). 동량의 단백질을 10% 또는 12%의 SDS-PAGE로 전기영동하고 나이트로셀룰로스 막에 이동시켰다. 막은 5% 탈지유를 함유한 PBS로 한 시간 동안 블로킹하였고, 그리고 나서 실온에서 Tris-완충액 생리식염수/Tween (20 mmol/l Tris-HCl (pH 7.5), 500 mmol/l NaCl 및 0.05% Tween 20 함유) 내에서 지시된 항체와 함께 두 시간 동안 배양하였다. Tris-완충액 생리식염수/Tween으로 두 번 세척한 다음 막을 Tris-완충액 생리식염수/Tween에 녹인 호스래디쉬 퍼옥시데이즈-결합된 염소 항-토끼 항체 또는 염소 항-마우스 항체 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA)와 함께 한 시간 동안 실온에서 배양하였다. 단백질은 ECL kit (Amersham Biosciences)로 측정하였다.

[0043] **글루타치온 S-트랜스퍼레이즈 풀다운 분석 (pull-down assay) 및 면역공침전법 (coimmunoprecipitation)**

[0044] 글루타치온 S-트랜스퍼레이즈 (GST)-Pin1 융합 단백질을 발현시켜 정제하였다 (Choi, S. H., and S. B. Hwang. 2006. *J. Biol. Chem.* **281**:7468-7478). 인비트로 결합 및 면역공침전 분석법 (coimmunoprecipitation assays) 을 수행하였다 (Choi, S. H. et al., 2007 *Gastroenterology* **132**:343-357).

[0045] **공초점 현미경 (Confocal microscopy)**

[0046] 슬라이드 글라스 상에서 배양된 Huh7 또는 Huh7.5 세포를 4% 파라포름알데하이드 함유 PBS로 실온에서 30분간 고정시켰다. PBS로 두 번 세척한 후 고정된 세포들은 0.1% Triton X-100 함유 PBS로 5분간 처리하여 삼투 가능하게 만든 후 마우스 항-Pin1 항체, 마우스 항-Flag 항체, 토끼 항-NS5A 항체, 토끼 항-NS5B 항체로 각각 두 시간 동안 배양하였다. PBS로 세 번 세척한 후 세포는 플루오레세인 아이소티오시아네이트-결합된 염소 항-마우스 또는 항-토끼 IgG (American Qualex, San Clemente, CA) 및 테트라메틸로다민 아이소티오시아네이트-결합된 당나귀 항-토끼 또는 항-마우스 IgG (Jackson Immunoresearch Laboratories)로 한 시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.1% Triton X-100 함유 PBS로 두 번 세척하고, PBS로 세 번 세척한 다음 Zeiss LSM 700 레이저 공초점 현미경 시스템 (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, New York)으로 세포를 분석하였다. NS5A 및 NS5B와 Pin1의 동일위치화 (colocalization)를 정량하기 위하여 면역형광 데이터를 Zeiss LSM 700 소프트웨어 툴로 분석하였다. 이미지 임계값 (threshold)은 양쪽 채널에서 모두 얻어졌으며, 관심의 대상인 선택된 부분 (융합된 이미지의 노란 픽셀)에서 실제 동일위치화 정도는 오버랩 계수 (colocalization module, Carl Zeiss)를 이용하여 분석하였으며, 계수 0은 동일위치화가 일어나지 않았음을, 그리고 계수 1은 완전한 동일위치화를 의미한다. 10 개 이상의 세포들이 각 실험으로 분석되었다.

[0047] **루시퍼레이즈 복제 분석 (Luciferase replication assay)**

[0048] Huh7.5 세포를 10 μ g의 인비트로 전사 전장 (full-length) JFH-Luc RNA로 전기천공하였다. 전기천공 24시간 후 각각 20 nM의 음성, 양성 및 Pin1 siRNA 로 세포를 트랜스펙션하였다. siRNA를 트랜스펙션한 다음 24 시간, 48 시간 및 72 시간 후 세포를 모아 루시퍼레이즈 기능 분석을 수행하였다 (Choi, S. H., and S. B. Hwang. 2006. *J. Biol. Chem.* **281**:7468-7478).

[0049] **JEV (Japanese encephalitis virus; JEV) 감염**

[0050] BHK-21 세포를 모의 감염 또는 JEV로 감염시켰다 (Yun, S. I., Y. J. Choi, B. H. Song, and Y. M. Lee. 2009. *J. Virol.* **83**:7909-7930). 24시간 또는 48시간 후 총 세포 용균액을 수집하여 동량의 세포 용균액에 대해 토끼 항-JEV NS1 항체로 면역블랏팅하여 JEV 단백질 발현을 분석하였다.

[0051] **통계 분석 (Statistical Analysis)**

[0052] 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 통계 분석을 위해 Student's t test를 이용하였다. $p < 0.05$ 는 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

[0053] **결과 1: Pin1은 HCV 복제에 필수적인 세포 인자이다.**

[0054] HCV 복제와 번역은 숙주세포 주기에 매우 의존적이다 (Scholle F. et al., 2004. *J. Virol.* 78:1513-1524). HCV는 숙주세포 주기를 방해하고 숙주 단백질을 자신의 주기를 완성하는데 이용한다. HCV 복제에 필수적인 세포 단백질을 확인하기 위하여 본 발명자들은 HCVcc 감염된 세포내의 세포 주기를 조절하는 131개의 유전자를 타겟으로 하는 siRNA 라이브러리를 스크린하였다. Huh7.5 세포를 20 nM의 siRNAs로 48시간 트랜스펙션한 다음 HCV Jc1로 4시간 동안 감염시켰다. 감염 이틀 후 배양 상층액을 수집하여 qPCR로 세포외 HCV RNA를 정량하였다. 실험은 두 번씩 수행하였다. 범용 음성 대조군 siRNA와 비교하여 표준편차에 대하여 HCV 생산을 평균 두 배 증가 또는 감소시키며, 세포독성을 나타내지 않는 siRNA를 히트로 선택하였다. 131 siRNA 풀로부터 13개의 풀은 후보 히트로 확인되었다 (도 1a). 이와 같은 풀은 두 번째 스트린에서 재시험하였다. 세포 생존율은 MTT 분석으로 측정하였다. HCV의 5' 비번역구간을 타겟으로 하는 siRNA는 양성 대조군으로 이용하였다.

[0055] 후보 유전자 중 본 발명자들은 Pin1을 코딩하는 유전자를 선택하여 조사하였는데, 이는 이 유전자가 HIV 복제 (Watashi, K. et al., 2008. *J. Virol.* 82:9928-9936), HBV-매개 간암발생 (Pang, R. et al., 2007 *Gastroenterology* 132:1088-1103) 및 HTLV-1 악성 형질전환 (Jeong, S. J. et al., 2009. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381:294-299, Peloponese, J. M. Jr et al., 2009. *J. Virol.* 83:3238-3248)을 포함하여 많은 바이러스 감염에 관여하기 때문이다. Pin1 발현을 침묵시키는 것은 세포독성을 최소화 (도 1c)하면서 HCV 생산을 강력히 저해한다 (도 1b). Pin1을 필요로 하는 HCV 생명 주기가 어느 단계인지를 결정하기 위해 본 발명자들은 Pin1 녹다운 세포에서 세포내 바이러스 RNA를 정량하였다. 도 1d와 같이, siRNA 처리로 Pin1 mRNA 수준은 현저히 억제되었다. 그 결과, 세포내 HCV RNA 수준은 Pin1 녹다운 세포에서 현저히 감소하였다. 이러한 결과는 Pin1이 HCV 복제에 관여함을 가리킨다. HCV 복제에서 Pin1의 효과를 확인하기 위해 본 발명자들은 Pin1 녹다운 세포에서 바이러스 단백질 발현 수준을 조사하였다. 이미 잘 알려진 양성 대조군 siRNA는 NS5A 및 코어의 발현을 완전히 차단하였다 (도 1e의 레인 2). 유사하게, Pin1을 침묵시키면 HCV 단백질 발현이 저해되었다 (도 1e, 레인 3). Pin1 siRNA의 오프타겟 효과를 배제하기 위하여 siRNA-저항성 Pin1 돌연변이를 제조하였다. 도 1f와 같이, 야생형 Pin1이 아닌 siRNA-저항성 Pin1 돌연변이의 외인성 발현 (exogenous expression)은 HCV 단백질 발현을 회복시켰다 (레인 4). HCV 복제에서 Pin1의 역할을 HCV 서브게놈 레플리콘을 가진 Huh7 세포에서도 시험해 보았다. 도 1g는 HCV 레플리콘 세포에서 Pin1 녹다운이 NS5A 단백질 발현을 현저히 저해함을 보여준다. 레플리콘 세포에서 Pin1 수준이 음성 siRNA 처리와 비교하여 양성 siRNA 처리때 감소하였다는 것은 주목할 만하다. 바이러스 복제를 좀더 정확히 측정하기 위해 HCV 복제에 대한 Pin1 siRNA의 영향을 JFH-Luc 리포터 시스템으로 결정하였다. 도 1h와 같이, 루시퍼레이즈 활성은 Pin1 siRNA를 처리한 다음 24시간 후 점차 감소하였고, 음성 siRNA 대조군에 비하여 Pin1 siRNA로 트랜스펙션한 세포에서 48 내지 72시간 후 극적으로 감소하였다. 결국, 이들 데이터는 Pin1이 HCV 증식에 필수적임을 제시한다.

[0056] **Pin1 과다발현은 HCV 증식을 증대시킨다.**

[0057] Pin1을 침묵시키면 HCV 복제가 저해되기 때문에 본 발명자들은 Pin1 과다발현이 HCV 복제에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 추측하였다. 이러한 가능성을 판단하기 위하여 Jc1으로 48시간 동안 감염시킨 Huh7.5 세포를 Flag로 표지된 Pin1을 일시적으로 트랜스펙션시킨 후 48시간 경과한 다음 수확하였다. 그 결과 Pin1 과다발현은 HCV RNA (도 2a), 세포내 바이러스 단백질 (도 2b) 및 세포외 HCV RNA (도 2c) 수준을 증대시켰다. 본 발명자들은 백터 안정적인 세포와 비교하여 Jc1-감염된 Pin1 안정 세포 내에서 세포내 HCV RNA (도 2d) 및 단백질 (도 2e) 수준이 증가함을 밝혔다. 또한, 본 발명자들은 다른 Pin1 안정 세포에서 HCV RNA 및 단백질 수준이 모두 증대되었음을 발견하여 (결과는 나타내지 않음), 이러한 현상이 Pin1 안정 세포의 클론 선택에 의한 오류가 아님을 확인하였다.

[0058] **Pin1은 HCV NS5A 및 NS5B 단백질과 상호작용한다.**

[0059] Pin1은 일종의 펩타이드 프로릴 시스-트랜스 아이소머레이즈 (peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase; PPIase)의 파블린 (parvulin) 패밀리아다. 지금까지 연구되어온 PPIase 중 사이클로필린 A (Cyclophilin A; CyPA) 및 사이클로필린 B (Cyclophilin B; CyPB)는 HCV 복제에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 기술되었다 (Watashi, K. et al., 2005. *Mol. Cell* 19:111-122, Yang, F. et al., 2008. *J. Virol.* 82:5269-5278). 다른 PPIase와 마찬가지로 Pin1은 세린/트레오닌-프로린 모티프를 통하여 인산화된 단백질과 상호작용한다. CyPA 및 CyPB 모두

HCV NS5A 및 NS5B 단백질과 상호작용하기 때문에 (Chatterji, U. et al., 2010. *J. Hepatol.* **53**:50-56, Fernandes, F., I. U. Ansari, and R. Striker. 2010. *PLoS One* **5**:e9815, Liu, Z. et al., 2009. *J. Virol.* **83**:6554-6565, Watashi, K. et al., 2005. *Mol. Cell* **19**:111-122, Yang, F. et al., 2008. *J. Virol.* **82**:5269-5278), 우리는 Pin1이 NS5A 또는 NS5B와 상호작용을 통해 HCV 증식을 상향조절할 것이라고 예측하였다. NS5A 및 NS5B 모두 다양한 인산화된 세린/트레오닌-폴리인산화 모티프를 포함하는 인산화단백질이고, 따라서 양 단백질은 PPIase의 기질이 될 수 있다. 우리는 먼저 이.콜라이에서 발현된 GST 및 GST-Pin1 융합 단백질과 각기 HEK293T 세포에서 발현시킨 Myc-NS4B, Myc-NS5A 및 Myc-NS5B 단백질을 이용한 인 비트로 GST 폴-다운 분석으로 이러한 가능성을 시험하였다. Myc-표지된 NS4B, NS5A 및 NS5B를 각각 포함하는 HEK293T 세포 추출물은 GST 또는 GST-Pin1과 함께 배양하였다. 복합체는 글루타치온 비드와 함께 침전하였고, 결합된 단백질은 항-Myc 항체를 이용하여 면역블랏 분석하였다. 도 3a와 같이, NS5A 및 NS5B 단백질 모두 선택적으로 Pin1에 결합한 반면 (각각 레인 5, 6), GST 및 NS4B는 Pin1과 상호작용하지 않았다. 인 비트로 결과를 확인하기 위해 공면역침전 분석 (coimmunoprecipitation assay)을 수행하였다. Myc-표지된 NS4B, NS5A 및 NS5B 각각을 HEK293 세포에서 Flag-표지된 Pin1과 함께 발현시켰다. 세포 용균액은 항-Flag 단일클론항체로 면역침전시키고, 그리고 나서 항-Myc 단일클론항체로 면역블랏 분석하여 공침전된 단백질을 탐지하였다. 도 3b는 NS5A 및 NS5B 단백질 모두 Pin1과 생체 내에서 특이하게 상호작용함을 보여준다 (레인 6 및 7). 이러한 결과는 포유류 투-하이드리드 분석으로 확인하였고 (결과 나타내지 않음), NS5A 및 NS5B가 Pin1과 특이적으로 상호작용함을 재확인하였다. Pin1과 NS5A/NS5B 간의 단백질 상호작용을 좀더 설명하기 위하여 HCV 레플리콘과 HCVcc-감염된 세포를 이용하여 면역침전을 수행하였다. 도 3c와 같이, Pin1은 HCV 레플리콘 세포에서 NS5A/NS5B와 상호작용하였다 (왼쪽 패널). HCVcc-감염된 Huh7.5 세포에서 이와 같은 상호작용을 역면역침전 분석법으로 나타내었다 (오른쪽 패널). 인 비트로 및 인 비보 단백질/단백질 상호작용 결과는 모두 Pin1이 NS5A/NS5B와 동일위치에 있을 가능성을 제시한다. 이 가능성을 판단하기 위해 HCVcc-감염된 세포에서 Pin1과 HCV 단백질의 세포내 위치를 공촛점 현미경으로 시험하였다. 도 3d는 간세포 내에서 Pin1이 주로 핵에 위치하고 부분적으로 세포질에 위치하며, Pin1의 세포내 분포는 바이러스 단백질에 영향을 받지 않음을 보여준다. HCVcc-감염된 세포에서 NS5A 및 NS5B 단백질 모두 세포질에 위치하며 이중 염색 (dual staining)한 결과 NS5A 및 NS5B와 Pin1이 세포질 내에 노란 형광색으로 동일위치에 있음을 보여준다. 이 결과를 증명하기 위해 Pin1과 HCV 단백질들 간의 동일위치화를 Mander의 오버랩 계수로 정량화하였다 (Manders, E. E. M., F. J. Verbeek, and J. A. Aten. 1993. *J Microscopy* **169**: 375-382). 그 결과 NS5A를 두 개의 다른 탐침 (FITC 및 TRIRC)으로 표지하여 얻어진 NS5A의 오버랩 계수는 약 0.93이었다 (도 3e, 레인 1). Pin1이 주로 핵에 위치하고 일부가 세포질에 위치하기 때문에 두 개의 세포 구획에서 Pin1의 오버랩 계수를 결정하였다. 이중 염색 결과는 핵에서 Pin1의 오버랩 계수가 0.96 ± 0.27 (도 3e, 레인 2)이고, 세포질에서의 Pin1의 오버랩 계수가 0.89 ± 0.20 (도 3e, 레인 3)임을 나타낸다. Pin1/NS5A 및 Pin1/NS5B의 오버랩 계수는 각각 0.75와 0.74였으며, 이는 이 단백질들이 세포질에서 동일위치화되었음을 가리킨다 (도 3e, 레인 4와 5). 이들 결과는 Pin1이 인 비트로와 인 비보에서 NS5A 및 NS5B에 특이적으로 결합함을 나타낸다.

[0060] **NS5B는 Pin1 발현을 증대시킨다.**

[0061] Pin1은 간암을 비롯한 많은 종양에서 과다발현됨이 이미 보고된바 있다 (Lu, K. P. 2003. *Cancer cell* **4**:175-180). Pin1이 HCV 감염을 상향조절하는지를 조사하기 위해 HCV2 감염된 세포에서 Pin1 단백질 발현 수준을 시험하였다. 도 4a와 같이, 야생형 HCV 감염 세포에서는 감염 4일째 Pin1 단백질 발현 수준이 증가되었다 (왼쪽 패널). 단백질 픽셀 강도를 블랏 이미지 스캔하여 이를 확인하였다 (가운데 패널). 또한 본 발명자들은 야생형 HCV 바이러스 감염 세포에서 Pin1 mRNA 수준이 현저히 증가하였음을 밝혔다 (도 4a, 오른쪽 패널). 이 결과를 확인하기 위해 HCV 서브게놈 레플리콘 세포에서 Pin1 발현 수준을 시험하였다. 실제로 인터페론 치료한 세포와 비교할 때 레플리콘 세포에서는 Pin1의 단백질 및 mRNA 수준이 모두 현저히 상승하였다 (도 4b). 이러한 결과는 HCV 비구조 단백질이 Pin1 발현을 유도할 것임을 제시한다. Pin1이 NS5A 및 NS5B 단백질과 직접 결합하기 때문에, 우리는 NS5A 및 NS5B 단백질이 Pin1 유도를 일으킬 것이라고 추측하였다. 어느 단백질이 Pin1 증대를 유도하는지를 판단하기 위해 Huh7 세포를 Myc-표지된 NS5A 또는 Myc-표지된 NS5B 발현 플라스미드로 트랜스펙션한 다음 Pin1 수준을 면역블랏 분석하였다. 도 4c와 같이, Pin1 단백질 수준은 NS5B 단백질을 발현하는 세포에서는 현저히 증가하였다 (레인 3). NS5A의 단백질 발현 수준이 NS5B 발현 수준보다 높지만 (도 4c, 레인 2와 3), Pin1 단백질 수준은 NS5A 단백질에 의해서는 변화되지 않았다. 다른 양성 가닥 RNA 바이러스가 Pin1 발현을 증대시키는지를 시험하기 위해 JEV-감염된 BHK 세포를 연구하였다. JEV 감염은 토끼 항-JEV NS1 항체를 이용한 면역블랏 분석으로 확인하였다 (Yun, S. I., Y. J. Choi, B. H. Song, and Y. M. Lee. 2009. *J. Virol.* **83**:7909-7930). 그러나, JEV 감염은 Pin1 발현을 증대시키지 않았고 (결과 나타내지 않음), 이는 이러한 현상이 HCV에

특이적인 것임을 의미한다.

[0062] Pin1의 결합 활성 및 아이소머레이즈 활성은 HCV 복제에 필수적이다.

[0063] 위의 결과들은 Pin1과 HCV 단백질 간의 상호작용이 HCV 복제에 어떤 역할을 하는 것일까 하는 중요한 문제를 던져주었다. 답을 찾기 위해 본 발명자들은 siRNA 저항성 돌연변이 Pin1 (Pin1 WT-SR), siRNA 저항성 결합 활성 결합 돌연변이 Pin1 (Pin1 S16A-SR) 및 siRNA 저항성 아이소머레이즈 불활성 돌연변이 Pin1 (Pin1 C113A-SR)을 구축하였다. 먼저 NS5A 및 NS5B 단백질이 이들 Pin1 돌연변이와 상호작용하는지를 조사하였다. Huh7.5 세포는 지시된 발현 플라스미드의 조합으로 트랜스펙션시켰다. 48시간 후 세포 용균액을 항-Flag 항체로 면역침전시킨 다음 결합된 단백질을 항-Myc 항체로 면역블랏분석하여 탐지하였다. 도 5a와 같이, Pin1 S16A-SR은 더이상 NS5A 및 NS5B 단백질과 작용하지 않았고 (레인 4와 5), 반면 Pin1 C113A-SR은 결합 능력을 보유하고 있었다 (레인 6과 7). HCV 증식에 대한 Pin1의 결합 활성 및 아이소머레이즈 활성의 효과를 알아보기 위하여 Pin1을 녹다운시킨 Huh7.5 세포를 Jc1으로 감염시킨 다음 Pin1 WT, Pin1 S16A-SR, Pin1 C113A-SR 및 Pin1 WT-SR을 발현하는 플라스미드로 각각 트랜스펙션시켰다. HCV 감염된 세포에서 Pin1 WT-SR 과다발현은 Pin1 녹다운된 세포에서 세포내 HCV RNA (도 5b, 레인 6), HCV 단백질 (도 5c, 레인 6) 및 바이러스 역가 (도 5d, 레인 6)를 회복시켰다. 그러나, Pin1 녹다운된 세포에서 Pin1 S16A-SR 또는 Pin1 C113A-SR의 과다발현은 바이러스 RNA 및 단백질의 발현을 회복시켰고 (도 5b-d), 이는 Pin1의 결합 활성 및 아이소머레이즈 활성 모두가 HCV 증식에 필요함을 말해준다.

[0064] 저글론은 Pin1과 NS5A/NS5B 간의 단백질 상호작용을 방해하여 HCV 복제를 저해한다.

[0065] 저글론 (Juglone: 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone)은 Pin1의 천연 저해제로서 항염활성 및 항섬유증 (antifibrotic) 활성을 나타낸다 (Reese, S. et al., 2010. *Fibrogenesis Tissue Repair* 3:1-8). 저글론은 Pin1에 비가역적으로 결합한다. 높은 농도에서 저글론은 RNA 폴리머레이즈 I, II, III 활성을 저해하고 세포독성 효과를 나타낸다 (Chao, S. H. et al., 2001. *Nucleic Acids Res.* 29:767-773). Huh7.5 세포에 저글론을 최대 1 μ M까지 처리한 결과 MTT 분석한 결과 세포독성을 일으키지 않았다 (도 6a). 1 μ M의 저글론은 Huh7.5 세포에서 세포내 HCV RNA (도 6b), 단백질 (도 6c) 및 세포의 HCV RNA (도 6d) 수준에서 HCV 증식을 효과적으로 억제하였고, 저해 정도는 투여량 의존적으로 나타났다. 그렇지만, Pin1과 GAPDH 단백질 발현 수준은 저글론의 영향을 받지 않았다. HCV 저해에서 저글론의 역할을 좀더 자세히 살펴보기 위해 Pin1과 NS5A/NS5B 단백질 간의 단백질 상호작용에 대한 저글론의 효과를 연구하였다. 도 6e와 같이, 저글론은 Pin1과 NS5A, Pin1과 NS5B 간의 단백질 상호작용을 투여량 의존적으로 저해하였다. 1 μ M의 저글론이 Pin1과 HCV 단백질 간의 단백질 상호작용을 완전히 차단시키는 것은 주목할 만하다. 저글론의 저해 작용을 좀더 확실히 하기 위해, Jc1으로 감염된 Huh7.5 세포를 일시적으로 Flag 표지된 Pin1으로 트랜스펙션시키고 DMSO 또는 1 μ M의 저글론으로 처리하였다. 시료들은 고정시킨 다음 항-NS5A 및 항-Flag 항체로 배양시켰다. 맨더의 오버랩 계수로 Pin1과 NS5A의 동일위치화 수준을 정량화하였다 (Manders, E. E. M. et al., 1993. *J Microscopy* 169: 375-382). 도 6f는 Pin1과 NS5A의 동일위치화 수준이 저글론에 의해 현저히 감소하였음을 보여준다. 이러한 결과는 세포 Pin1과 바이러스 NS5A/NS5B 간의 단백질 상호작용이 HCV 복제에 결정적인 역할을 수행함을 말해준다.

[0066] Pin1과 CypA/CypB는 HCV 증식에 서로 다른 방식으로 관여한다.

[0067] PPIase의 다른 구성원들인 CypA 및 CypB 또한 NS5A 및 NS5B 단백질과 작용하고 HCV 복제에 중요한 역할을 수행하기 때문에 (Chatterji, U. et al., 2010. *J. Hepatol.* 53:50-56, Fernandes, F. et al., 2010. *PLoS One* 5:e9815, Liu, Z. et al., 2009. *J. Virol.* 83:6554-6565), 우리는 HCV 단백질과의 상호작용에서 Pin1 및 CypA/CypB 간에 경쟁관계가 있는지를 연구하였다. HEK293T 세포를 Myc 표지된 NS5A 및 NS5B, Flag 표지된 CypA 및 CypB 발현 플라스미드로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션된 세포는 저글론 또는 담체 (DMSO)로 처리하였다. 세포 용균액은 항-Pin1 항체로 면역침전시킨 후 결합된 단백질들을 항-Myc 항체로 면역블랏 분석하여 탐지하였다. 도 7a와 같이, 저글론은 내생 Pin1과 NS5A/NS5B 간의 단백질 상호작용을 완전히 저해하였다 (레인 1, 2). 그러나, 내생 Pin1은 저글론을 가하지 않은 조건에서는 NS5A 및 NS5B와 특이적으로 작용하였다 (레인 4, 5). 그렇지만, Pin1과 NS5A, Pin1과 NS5B 간의 단백질 상호작용은 외생 발현된 CypA (도 7a, 레인 6, 7) 또는 CypB (도 7a, 레인 8, 9)에 의해 저해되지 않았다. 본 발명자들은 Pin1 녹다운 세포에서 HCV 증식 기능 상실을 CypA/CypB가 보충할 수 있는지를 시험하였다. 지시된 siRNA로 트랜스펙션된 Huh7.5 세포를 Jc1으로 감염시킨 다음 Pin1

WT-SR, CypA, CypB 발현 플라스미드로 각각 트랜스펙션시켰다. 도 7b는 CypA도 CypB도 Pin1 녹다운 세포에서 HCV RNA 복제를 회복할 수 없음을 보여준다. 이는 단백질 수준 (도 7c, 레인 5, 6) 및 감염성 수준 (도 7d)에서 다시 확인되었다. 이러한 결과는 Pin1이 HCV 증식에 특이적으로 관여하고 있음을 암시한다.

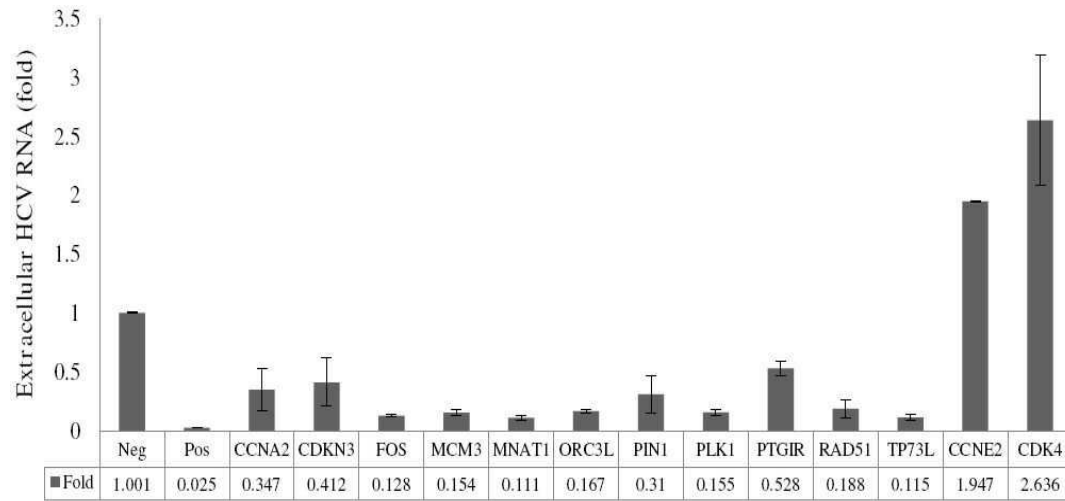
표 1

Primer	Primer sequence	Purpose
GST-Pin1-F	CGCGAATTCATGGCGGACGAG	Cloning of Pin1 into pGEX4T1 vector
GST-Pin1-R	TCCTCGAGTCACTCAGTGCG	
Flag-Pin1-F	GGAGAATTCAATGGCGGACGAG	Cloning of Pin1 into p3XFlag-CMV10 vector
Flag-Pin1-R	CCGGGATCCTCACTCAGTGCG	
AD-Pin1-F	AAGGATCCATGGCGGACGAGGA	Cloning Pin1 into pCMV-AD vector
AD-Pin1-R	CCGAATTCTCACTCAGTGCGGAG	
BD-NS4B-F	GGGATCCGCTCACAACCTTCTTAC	Cloning of NS4B into pCMV-BD vector
BD-NS4B-R	GCGAATTCTTAGCATGGCGTAGAGCAG	
BD-NS5A-F	GGAAGCTTGTCGGGCTCGTGGCTAA	Cloning of NS5A into pCMV-BD vector
BD-NS5A-R	AGTCTAGACTAGCAGCAGACGACATCC	
BD-NS5B-F	GCGAATTCTCAATGTCCTATACGTG	Cloning of NS5B into pCMV-BD vector
BD-NS5B-R	AGTCTAGACTATCGGTTGGGGAGCA	
5NTR-F	TGAGTGTCGTACAGCTCCA	Quantitative real-time PCR
5NTR-R	ACGCTACTCGGCTAGCAGTC	
qPin1-F	ATCAAGTCGGGAGAGGAG	Quantitative real-time PCR
qPin1-R	GCGTCTTCAAATGGCTTCT	
qGAPDH-F	CGCTCTGCTCCTCCTGTTC	Quantitative real-time PCR
qGAPDH-R	CGCCCAATACGACCAATCCG	
CypA-F	GCG AAT TCA ATG GTC AAC CCC A	Cloning of human Cyclophilin A into p3X-Flag-CMV10 vector
CypA-R	CGG GAT CCT TAT TCG AGT TGT CCA	
CypB-F	GCG AAT TCA CTG CTG CCG GGA OCT T	Cloning of human Cyclophilin B into p3X-Flag-CMV10 vector
CypB-R	CGG GAT CCC TAC TCC TTG GCG ATG	
Pin1-SR-F	TGAGCCGCACTCAGGAGAGTGTAATACTTCAAC	Generation of siRNA-resistant mutant of Pin1
Pin1-SR-R	GTTGAAGTAGTACACTCTCCCTGAGCTGCGGCTCA	
Pin1-S16A-F	GGAGAAGCGCATGGCCCGCAGCTCAGGC	Generation of binding defective mutant of Pin1
Pin1-S16A-R	GCCTGAGCTGCGGGCCATGCGCTTCTCC	
Pin1-C113A-F	TCACAGTTCAGCGACGCCAGCTCAGCCAAGGC	Generation of isomerase inactive mutant of Pin1
Pin1-C113A-R	GCCTTGGCTGAGCTGGCGTCGCTGAACTGTGA	

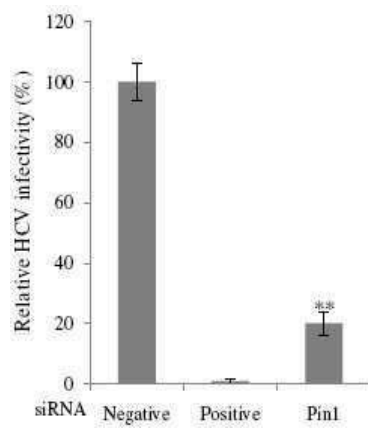
[0068]

도면

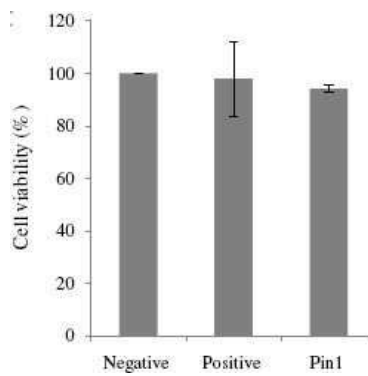
도면1a



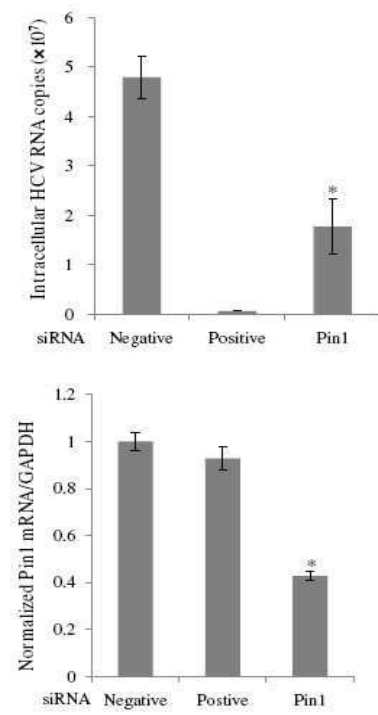
도면1b



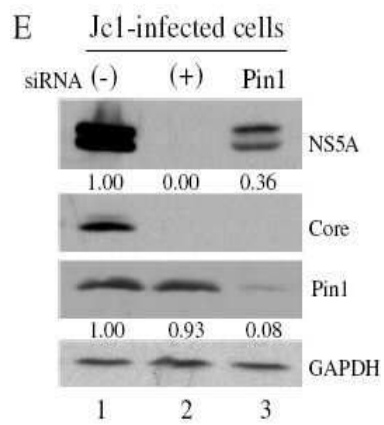
도면1c



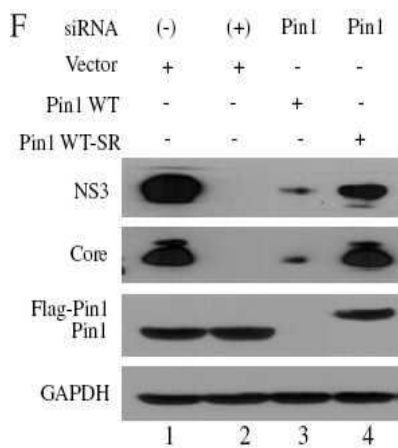
도면1d



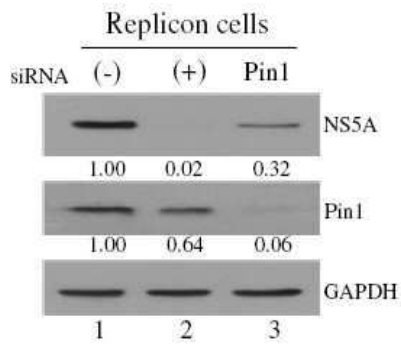
도면1e



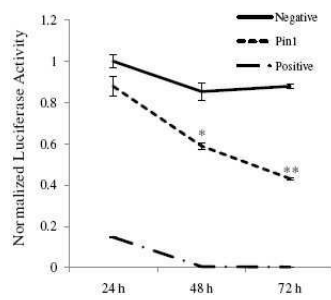
도면1f



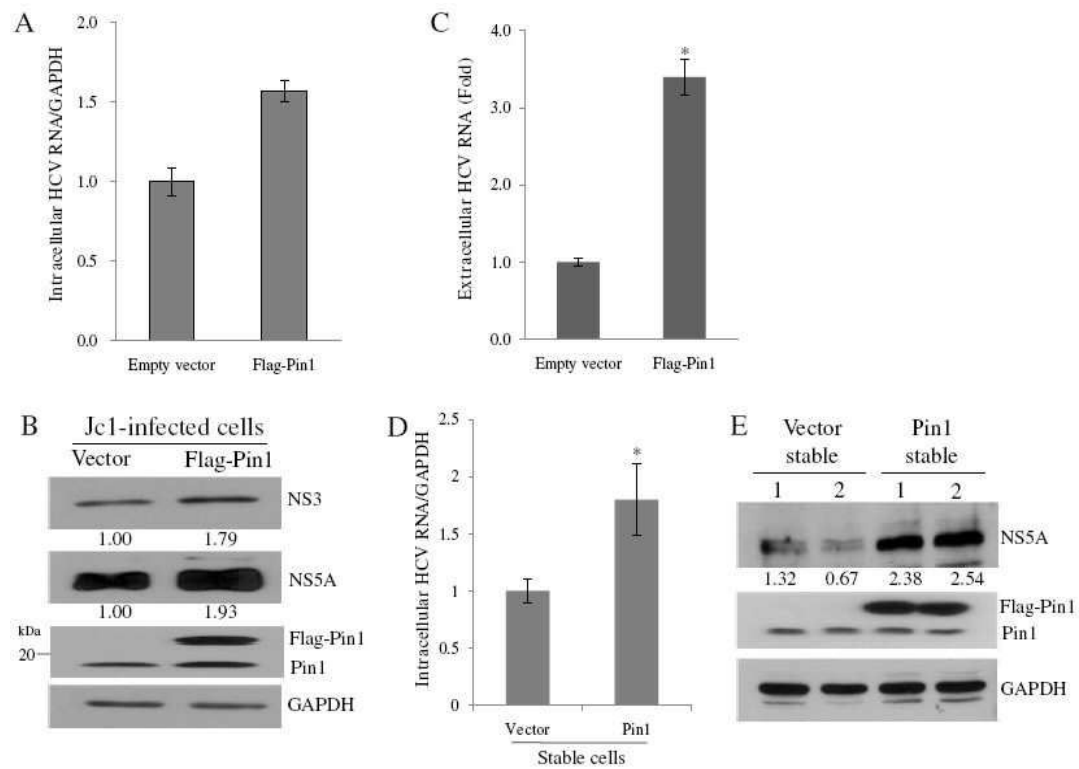
도면1g



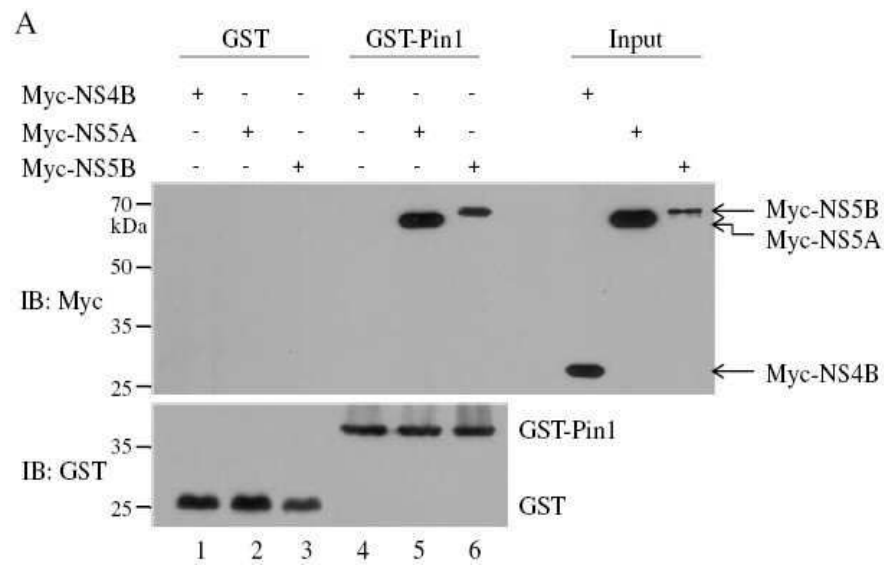
도면1h



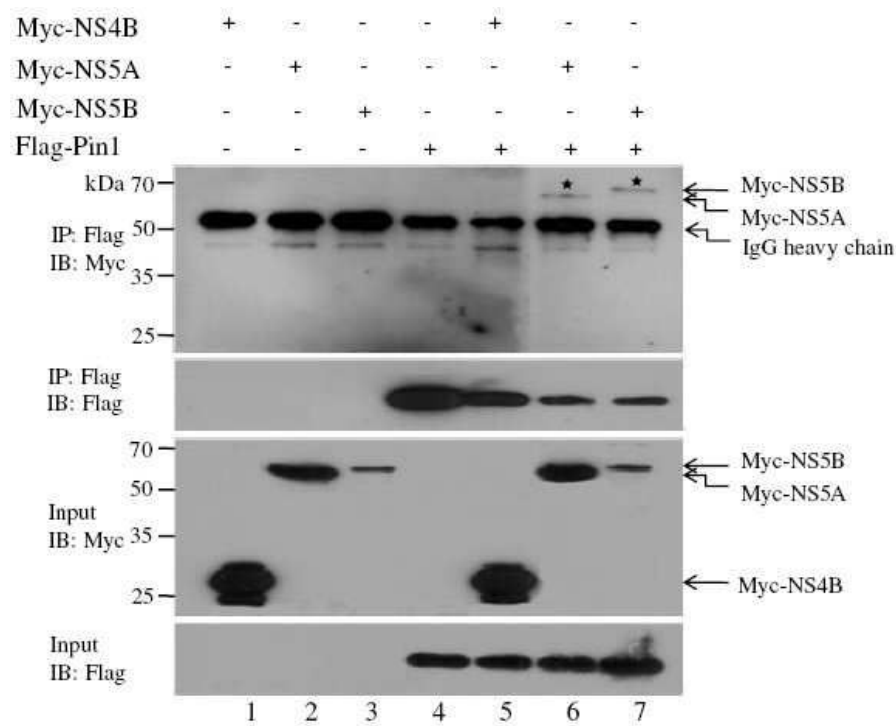
도면2



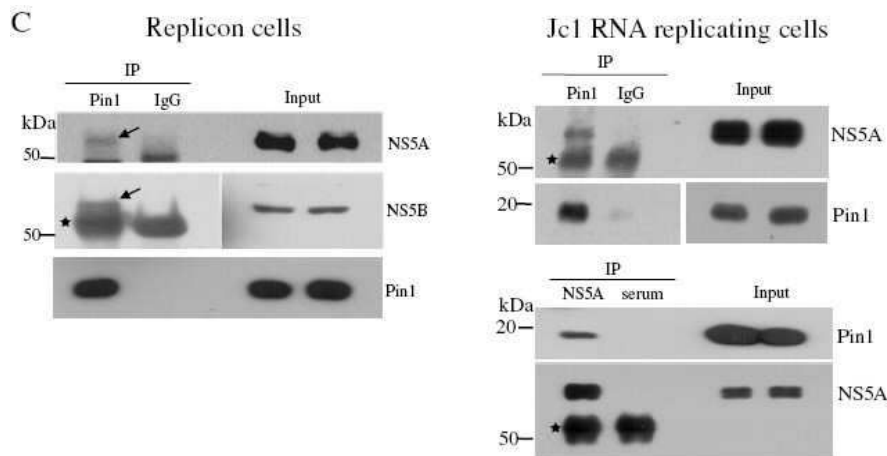
도면3a



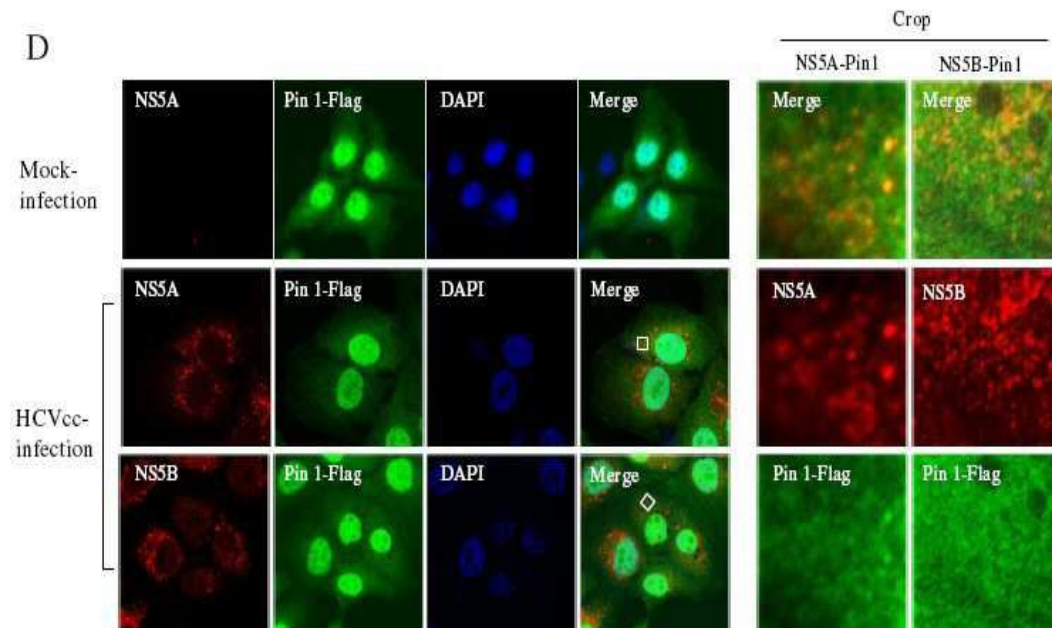
도면3b



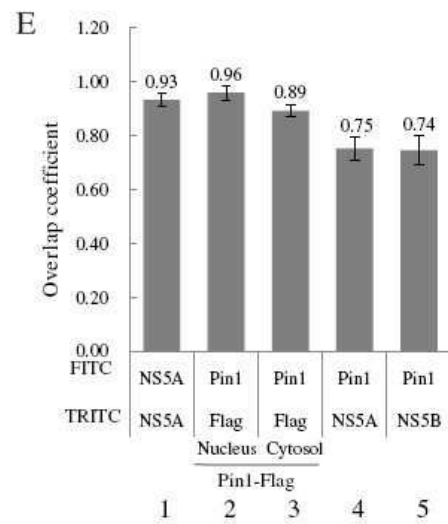
도면3c



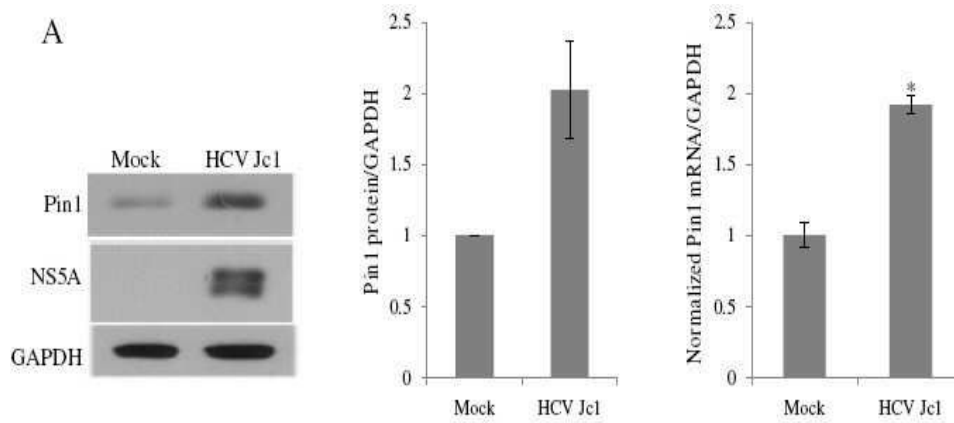
도면3d



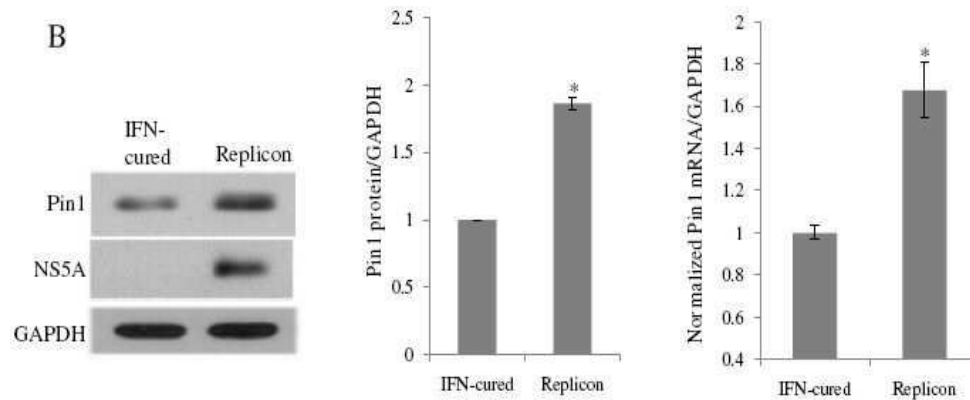
도면3e



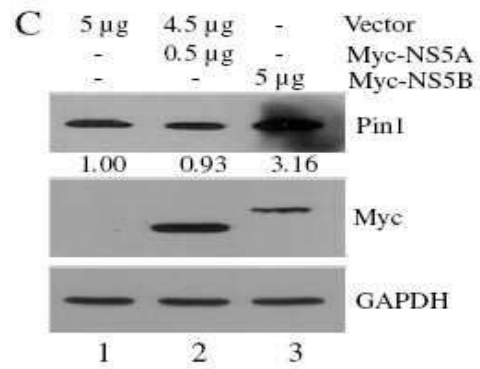
도면4a



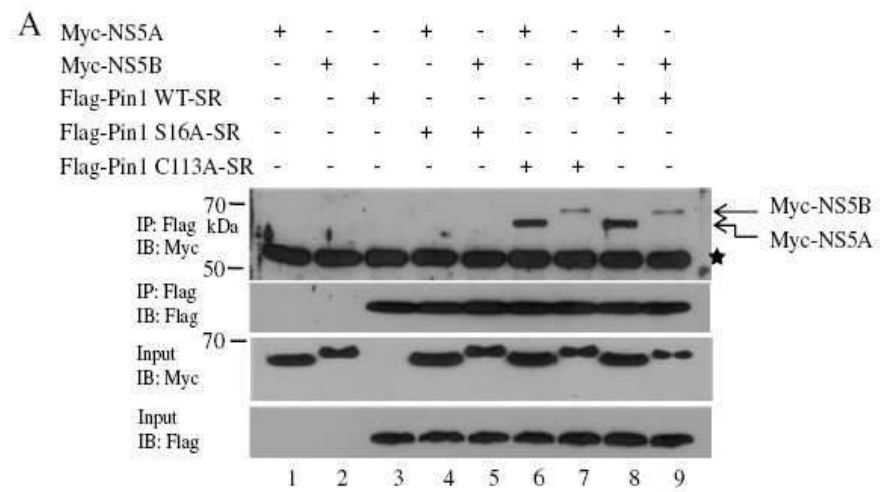
도면4b



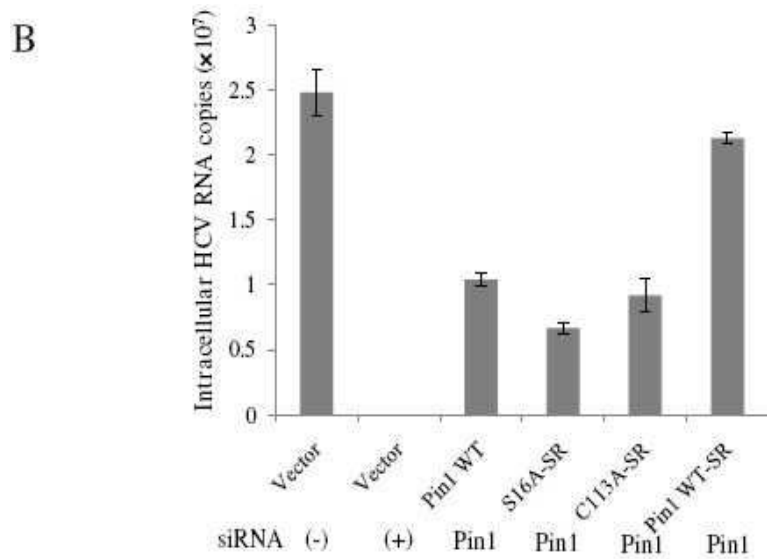
도면4c



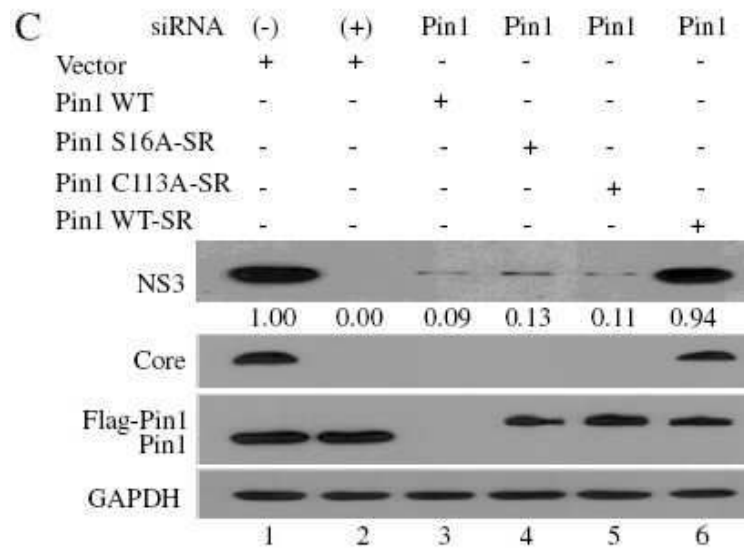
도면5a



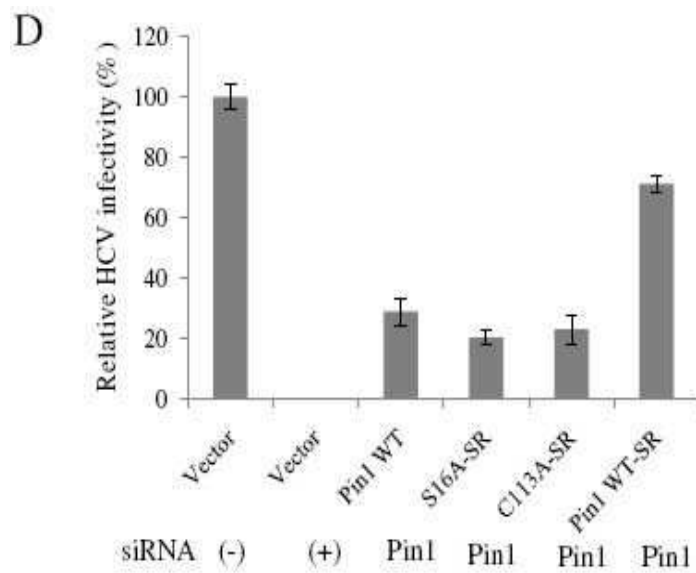
도면5b



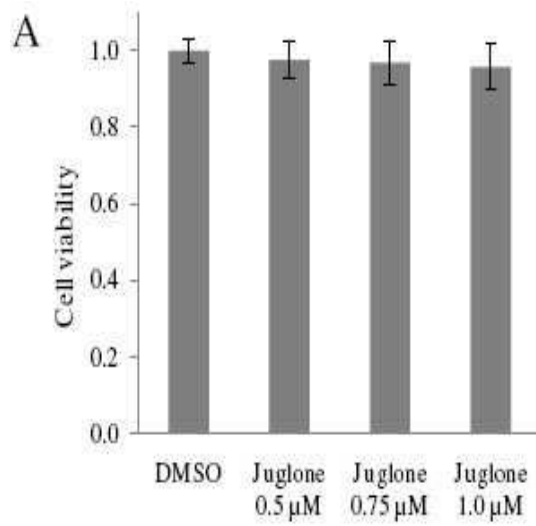
도면5c



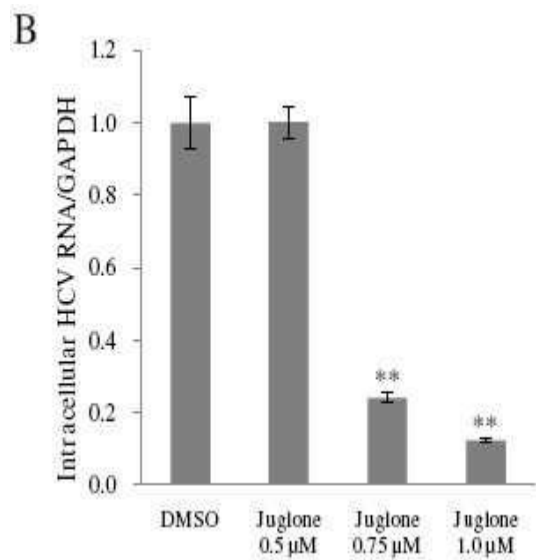
도면5d



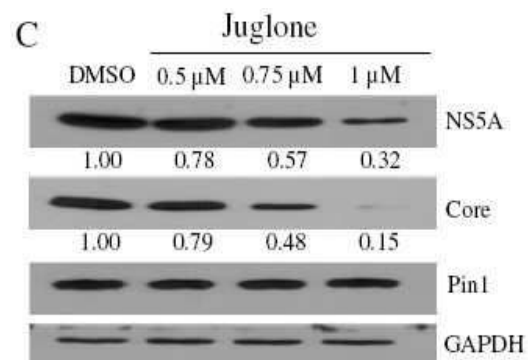
도면6a



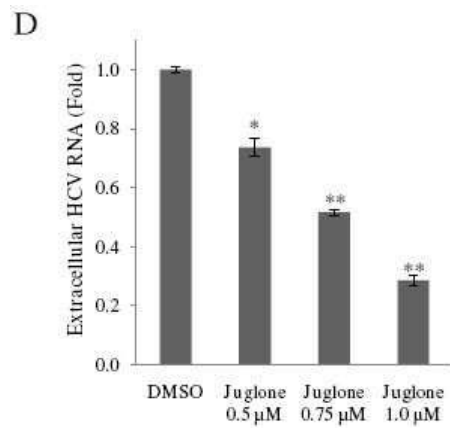
도면6b



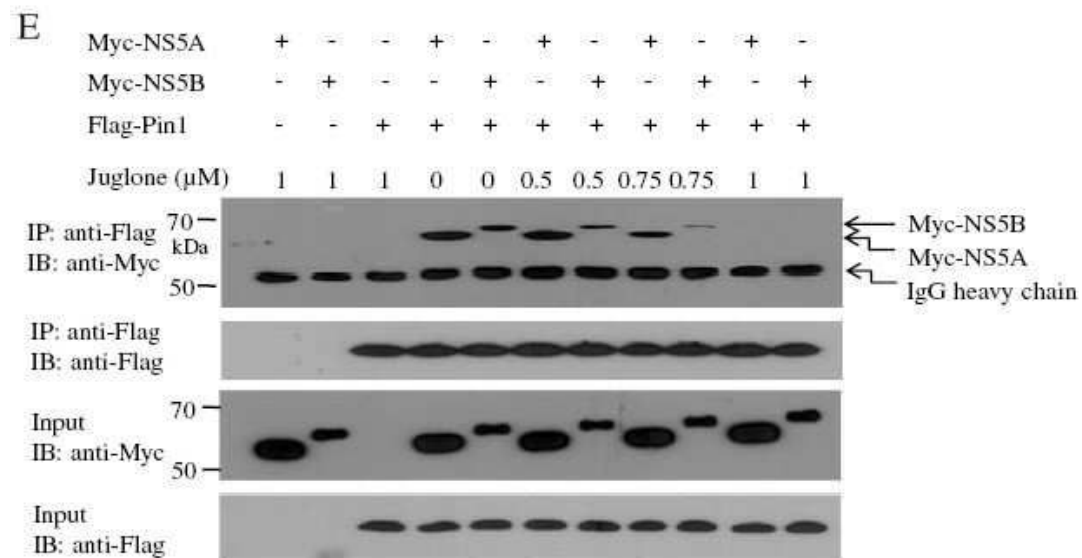
도면6c



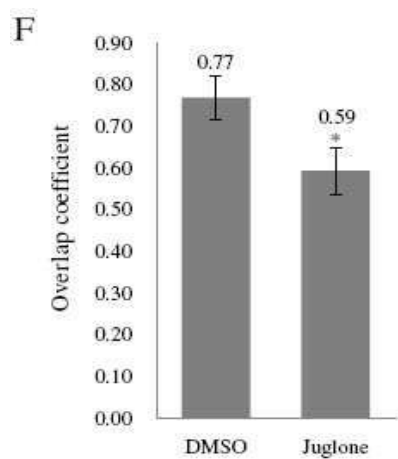
도면6d



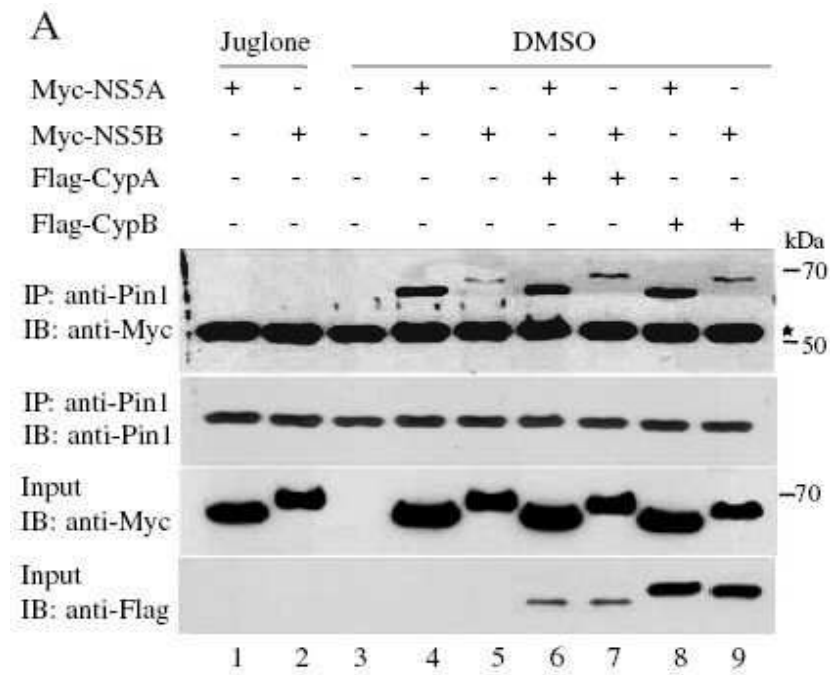
도면6e



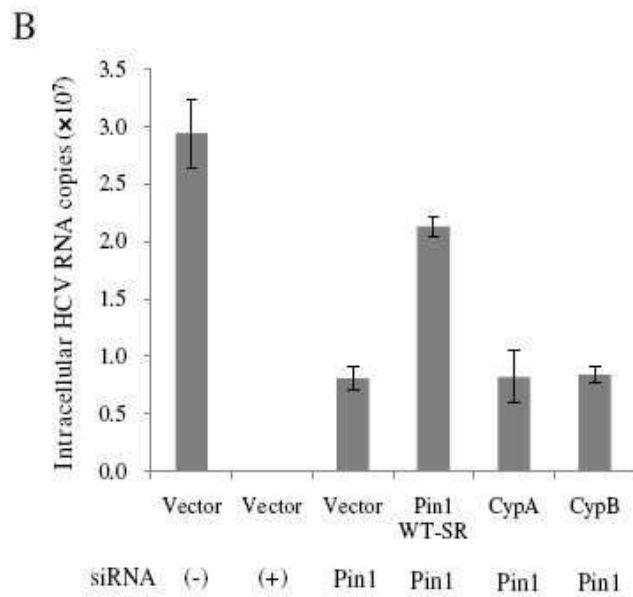
도면6f



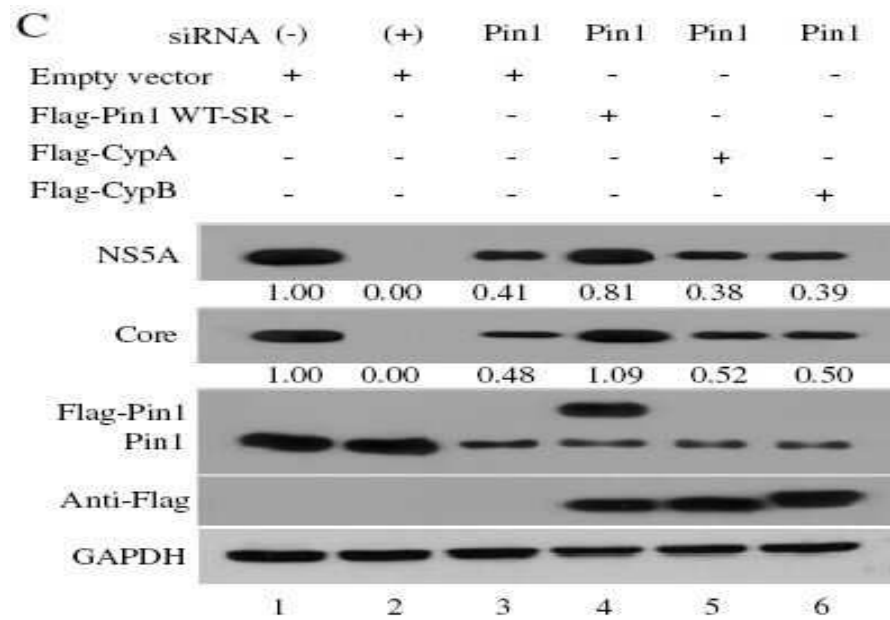
도면7a



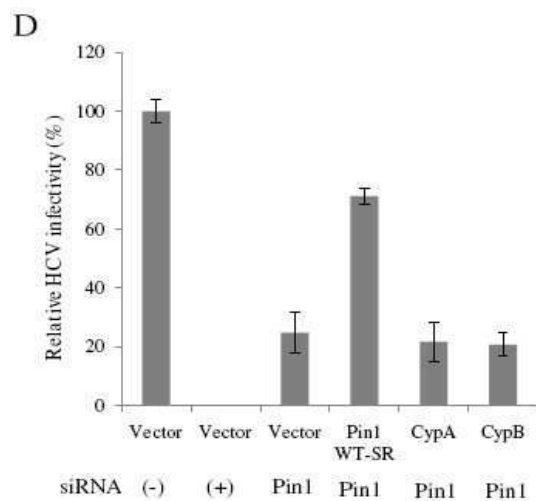
도면7b



도면7c



도면7d



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> Pharmaceutical composition for prevention and treatment for Hepatitis C containing Pin1 inhibitor
- <130> Hallym-SBHwang-Pin1
- <160> 34
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 19
- <212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 1

gcucaggccg aguguacua

19

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 2

ccucaaagaa aaaccaaacu u

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

cgcgaattca tggcggacga g

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

tccctcgagt cactcagtgc g

21

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

ggagaattca atggcggacg ag

22

<210> 6

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 ccgggatacct cactcagtgc g 21
 <210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 7
 aaggatccat ggcggacgag ga 22

 <210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 ccgaattctc actcagtgcg gag 23
 <210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 gggatccgcc tcacaacttc cttac 25
 <210> 10
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10

gcgaattctt agcatggcgt agagcag

27

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

ggaagcttgt ccggctcgtg gctaa

25

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

agtctagact agcagcagac gacatcc

27

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

gcgaattctc aatgtcctat acgtg

25

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

agtctagact atcggttggg gagca

25

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer
 <400> 15
 tgagtgtcgt acagcctcca 20
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 16
 acgtactcg gctagcagtc 20
 <210> 17
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 17
 atcaagtcgg gagaggag 18
 <210> 18
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 18
 gcgtcttcaa atggcttct 19
 <210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 19
 cgctctctgc tctctctgtt c 21
 <210> 20
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 20
 cgccaatac gaccaaacc g 21
 <210> 21
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 21
 gcgaattcaa tggtaaccc ca 22
 <210> 22
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 22
 cgggatacctt attcgagttg tcca 24

 <210> 23
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 23
 gcgaattcac tgctgccggg acctt 25
 <210> 24
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 24
 cgggatacctt actccttgga gatg 24
 <210> 25

<211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 25
 tgagccgcag ctcagggaga gtgtactact tcaac 35

<210> 26
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 26
 gttgaagtag tacactctcc ctgagctgcg gctca 35

<210> 27
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 27
 ggagaagcgc atggcccgca gctcagge 28

<210> 28
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 28
 gcctgagctg cgggccatgc gcttctcc 28

<210> 29
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 29

tcacagttca gcgagccag ctcagccaag gc	32
<210> 30	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 30	
gccttggtg agctggcgtc gctgaactgt ga	32
<210> 31	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> siRNA of Pin1	
<400> 31	
ccacaucacu aagccagc	19
<210> 32	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> siRNA of Pin1	
<400> 32	
gaagacgccu cguuugcgc	19
<210> 33	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> siRNA of Pin1	
<400> 33	
gaagaucacc cggaccaag	19
<210> 34	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> siRNA of Pin1	

<400> 34

gcucaggccg aguguacua

19