(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0097602
(43) 공개일자 2022년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/09 (2010.01) *A61P 35/00* (2006.01)
B01J 19/08 (2015.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) *C12M 1/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0693 (2013.01)
A61K 41/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0187380
(22) 출원일자 2020년12월30일
심사청구일자 2020년12월30일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
구본석
대전광역시 서구 둔산북로 215, 12동 901호 (둔산동, 가람아파트)
정승남
대전광역시 서구 계백로 1426 써버스빌 904
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진동

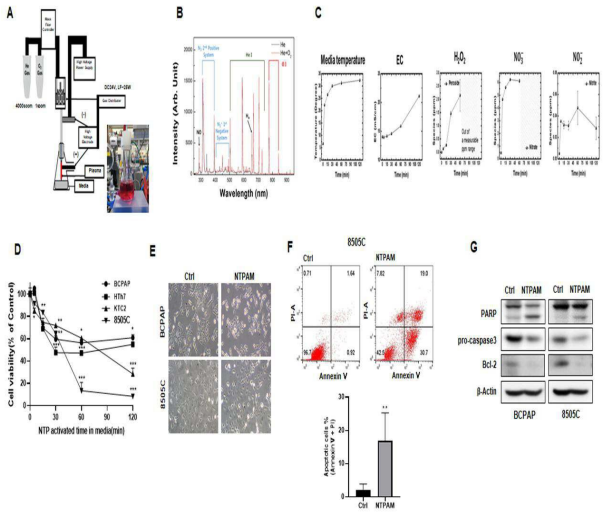
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **갑상선암 예방 또는 치료용 저온 플라즈마 활성화 배지 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 갑상선암의 예방 또는 치료용 저온 플라즈마 활성화 배지 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 저온 플라즈마 활성화 배지가 갑상선 암 세포에서 EGR1의 발현을 증가을 증가시켜, 암 세포 사멸을 효과적으로 유도할 수 있어, 갑상선 암 치료제 개발에 유용하다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
B01J 19/088 (2013.01)
C07K 14/4702 (2013.01)
C07K 16/18 (2013.01)
C12M 45/07 (2013.01)
C12N 2501/999 (2013.01)
(72) 발명자
장재원
대전광역시 도룡동 엑스포로 46-15 스마트시티 503동 3002호
류려화
대전광역시 중구 과례로 80, 2층 203호
오찬
전라북도 익산시 동서로61길 41, 102동 504호 (어양동, 현대아파트)

원호륜
서울특별시 서초구 나루터로 15길 37-6
강예은
대전광역시 중구 서운로 96-2 212동 203호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711112275
과제번호 2019R1A2C1084125
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 두경부암 유전체 분석 기반 치료저항성 분자표지자 패널 개발 및 환자유래 오가노이드 기반 치료반응 예측 플랫폼 확립
기 여 율 1/3
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2019.09.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345315406
과제번호 2018R1D1A1B07050825
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명 Whole Genome Sequencing 분석을 통한 두경부암 치료용 플라즈마 항암효과의 기전연구
기 여 율 1/3
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2018.06.01 ~ 2023.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465033097
과제번호 HR20C0025010021
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 연구중심병원 육성(R&D)
연구과제명 암대사 리프로그래밍 · 유전자 · 면역 치료 플랫폼 구축
기 여 율 1/3
과제수행기관명 충남대학교 병원
연구기간 2020.07.16 ~ 2028.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 저온 플라즈마 발생 장치에 캐리어 가스를 공급하는 단계; 및

(b) 세포를 포함하지 않는 배지의 수직 방향으로 10 내지 24 W의 전력을 방전하여 형성된 저온 플라즈마 제트를 90분 내지 150분 처리하여 저온 플라즈마 활성화 배지(Non-thermal plasma activation medium, NTPAM)를 제조하는 단계를 포함하는,

갑상선암의 예방 또는 치료용 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 (b) 제조하는 단계는 배지에 저온 플라즈마 제트를 120분간 처리하는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 3

제 1항에서 있어서,

상기 캐리어 가스는 산소 1 sccm(Standard Cubic Centimeter per Minute) 및 헬륨은 4 slpm(standard liter per minute)로 공급되는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 4

제 1항의 제조방법으로 제조된 갑상선암의 예방 또는 치료용 저온 플라즈마 활성화 배지(Non-thermal plasma activation medium, NTPAM).

청구항 5

제 4항의 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)를 포함하는 갑상선암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 조성물은 EGR1 항체 또는 EGR1 단백질의 발현을 증가시키는 제제를 더 포함하는, 조성물.

청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)는 정상 세포와 비교하여 갑상선 암 세포에서 미토콘드리아 기능 감소를 유도하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 8

제 5항에 있어서,

상기 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)는 EGR1 단백질의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 갑상선암 예방 또는 치료용 저온 플라즈마 활성화 배지(medium)의 제조방법 및 상기 제조방법으로 제조된 갑성선암 예방 또는 치료 효과를 갖는 저온 플라즈마 활성화 배지(medium), 이를 포함하는 조성물에 관한

것이다.

배 경 기 술

[0002] 갑상선암은 내분비계에서 가장 빈번한 종양(neoplasm) 이며 지난 수십 년 동안 사례 수가 급격히 증가하고 있다. 갑상선암은 조직병리학적 특징에 따라 여포세포에서 기원하는 유두암, 여포암, 역형성암(ATC) 등과 비여포 세포에서 기원하는 수질암, 림프종 등의 아형으로 구분된다. 유두 갑상선 암종(PTC)은 갑상선 암의 주요 형태로 전체 갑상선 악성 종양의 80%를 차지한다. 대부분의 PTC 환자는 예후가 좋고 사망률이 낮다. 그러나 PTC는 자주 림프절로 전이되고 결절 전이는 결과적으로 국소 재발률과 암 특이적인 사망률을 증가시킬 수 있다. 갑상선의 미분화 종양인 역 형성 갑상선 암종 (ATC)은 급속한 성장, 주변 조직의 광범위한 국소 침범 및 먼 기관으로의 전이로 인해 가장 공격적인 임상 행동을 보인다. 따라서 ATC는 갑상선 암종 중에서 가장 나쁜 예후를 보이며 전체 생존 기간의 중앙값은 2.5 ~ 6 개월에 불과하다. 따라서 갑상선암의 공격적인 특징을 예방할 수 있는 새로운 방법이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0003] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제 10-1520417 호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 해결하고자 하는 과제는 (a) 저온 플라즈마 발생 장치에 캐리어 가스를 공급하는 단계 및 (b) 세포를 포함하지 않는 배지에 수직 방향으로 10 내지 24 W의 전력을 방전하여 형성된 저온 플라즈마 제트를 90분 내지 150분간 처리하여 저온 플라즈마 활성화 배지(Non-thermal plasma activation medium, NTPAM)를 제조하는 단계를 포함하는, 갑상선암의 예방 또는 치료용 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)의 제조방법, 이를 이용하여 제조된 갑상선암의 예방 또는 치료용 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM), 및 이를 포함하는 갑상선암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] 상기 과제를 해결하기 위해 본 발명은 (a) 저온 플라즈마 발생 장치에 캐리어 가스를 공급하는 단계 및 (b) 세포를 포함하지 않는 배지의 수직 방향으로 10 내지 24 W의 전력을 방전하여 형성된 저온 플라즈마 제트를 90분 내지 150분간 처리하여 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)를 제조하는 단계를 포함하는 갑상선암의 예방 또는 치료용 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)의 제조방법을 제공한다.

[0006] 본 발명에서 상기 제조하는 단계는 배지에 저온 플라즈마 제트를 120분간 처리하는 것일 수 있다.

[0007] 본 발명에서 상기 저온 플라즈마 발생 장치는 배지가 충진되는 용기, 상기 용기와 수직으로 배치되는 플라즈마 발생부, 및 상기 용기에 캐리어 가스를 공급하기 위한 공급부를 포함할 수 있다.

[0008] 본 발명에서 상기 플라즈마 발생부는 외경 6mm, 내경 4mm의 석영관에 내부의 스테인리스 스틸 튜브 전극 및 외부의 접지링 전극을 포함할 수 있다.

[0009] 본 발명에서 상기 캐리어 가스는 산소 1 sccm(Standard Cubic Centimeter per Minute) 및 헬륨은 4 slpm(standard liter per minute)로 공급되는 것일 수 있다.

[0010] 또한 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 갑상선암의 예방 또는 치료용 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)를 포함하는 갑상선암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명에서 상기 조성물은 EGR1 항체 또는 EGR1 단백질의 발현을 증가시키는 제제를 더 포함할 수 있다.

[0013] 본 발명에서 상기 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)는 정상 세포와 비교하여 갑상선 암 세포에서 미토콘드리아

기능 감소를 유도하는 것일 수 있다.

[0014] 본 발명에서 상기 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)는 EGR1 단백질의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 갑상선암의 예방 또는 치료용 저온 플라즈마 활성화 배지(Non-thermal plasma activation medium, NTPAM) 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 갑상선 암 세포 사멸을 효과적으로 유도할 수 있어, 갑상선 암 치료제로 유용하게 활용 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 갑상선암 세포에 대한 저온 플라즈마 활성화 배지(Non-thermal plasma activation medium, NTPAM)의 세포사멸 효과에 관한 것이다. (A) 개발된 He 및 O_2 기반 NTP 시스템 및 계획에 대한 다이어그램과 NTP의 실험 설계 및 준비를 묘사한 그림이다. (B) 가스 흐름을 포함하는 저온 플라즈마 장치의 발광 스펙트럼(Optical Emission Spectra, OES) 측정결과이다. (C) 지속적인 저온 플라즈마 노출 후 배지 온도, 전기 전도도(Electrical Conductivity, EC), 산화질소(NO_3^-, NO_2^-) 및 과산화수소(H_2O_2)의 농도 측정결과이다. (D) 다양한 갑상선암 세포를 NTPAM으로 24시간 동안 처리하고 WST1 분석하여 세포 생존력을 분석하였다. (E) NTPAM 처리 후 BCPAP 및 8505C 세포의 세포형태 변화를 분석한 결과이다. (F) 세포사멸은 24시간 동안 NTPAM 처리 후 8505C 세포에서 AnnexinV/PI 유세포 분석한 결과이다. (G) Apoptotic 단백질은 NTPAM 처리 후 웨스턴 블롯 분석한 결과이다. 각각은 3개의 독립적인 실험을 나타낸다.

도 2는 NTPAM은 갑상선암 세포에서 미토콘드리아의 기능장애를 유도한다. (A) 각각 NTPAM을 처리하거나 처리하지 않은 Nthyori-3-1 및 BCPAP 세포의 전자현미경 관찰을 통해 이형 미토콘드리아를 평가하였다. (B) 각각 NTPAM을 처리하거나 처리하지 않은 Nthy-ori3-1, BCPAP 및 8505C 세포에서 측정된 산소소비율(Oxygen Consumption Rates, OCR)을 분석한 결과이다. (C) 각각 NTPAM을 처리하거나 처리하지 않은 Nthy-ori3-1, BCPAP 및 8505C 세포에서의 기저호흡 OCR을 분석한 결과이다. (D) 각각 NTPAM을 처리하거나 처리하지 않은 Nthy-ori3-1, BCPAP 및 8505C 세포에서 최대호흡 OCR을 분석한 결과이다. (E) Nthy-ori3-1, BCPAP 및 8505C 세포에서 각각 ATP 의존성 호흡 OCR을 분석한 결과이다. 각각은 3개의 독립적인 실험을 나타낸다.

도 3은 NTPAM이 EGR1을 갑상선종양형성의 조절자로 확인한 후 갑상선암 세포의 전사체 분석결과이다. (A) NTPAM을 처리하거나 처리하지 않은 BCPAP 및 8505C 세포의 상관관계 행렬이다. (B) NTPAM을 처리하거나 처리하지 않은 BCPAP 및 8505C 세포의 MDS 플롯이다. (C) BCPAP 세포 및 8505C 세포에서 NTPAM 처리 여부와 관계없이 $P < 0.05$ 인 미토콘드리아성 미접힘단백질반응(unfolded protein response, UPRmt)과 관련된 유의하게 변화된 유전자의 히트맵 분석 결과이다. (D) Benjamini-Hochberg에 의해 보정된 값이 0.05 미만인 유의한 농축 KEGG 분석의 총 갯수는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. (E) NTPAM 처리와 관련하여 BCPAP 세포에서 상위 10개의 상향조절된 경로 및 상위 10개의 하향조절된 경로이다. (F) Ingenuity pathway analysis(IPA)를 통한 BCPAP 및 8505C에서 NTPAM 처리와 관련된 상류 조절자이다. (G) BCPAP 세포에서 NTPAM 처리의 여부와 관계없이 $P < 0.05$ 인 EGR1과 관련된 유의하게 변화된 유전자의 히트맵 분석 결과이다. (H) TCHA 코호트에서 정상 샘플과 종양 샘플 사이의 log2 (EGR1의 TPM) 상자그림이다. (I) THCA 코호트에서 EGR1 발현과 관련된 무병 생존. TPM : 백만 분율 값(Transcripts Per Million value).

도 4는 NTPAM에 의해 유도된 EGR1은 갑상선암 세포 생존력에 미치는 영향을 분석한 것이다. (A) RNA-seq에서 NTPAM 처리 후 EGR1 발현의 변화를 분석한 결과이다. NPTAM 처리 후, EGR1 발현은 정량적 실시간 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 분석(B) 및 웨스턴 블롯 분석(C)에 의해 분석되었다. (D) 갑상선암 환자로부터 제공된 조직 샘플은 항-EGR1 항체를 사용한 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 분석되었다. (E) BCPAP 및 8505C 세포를 EGR1 벡터 또는 음성대조군 벡터로 48시간 동안 일시적 형질주입(transfection)시켰다. 세포계수 분석을 사용하여 세포증식을 분석하였다. (F) BCPAP 및 8505C 세포를 48시간 동안 EGR1-특이적 siRNA 또는 음성대조군 siRNA로 일시적 형질주입(transfection)시켰으며, 세포계수분석을 사용하여 세포증식을 분석하였다. 각각은 3개의 독립적인 실험을 나타낸다.

도 5는 NTPAM은 갑상선암 세포에서 ROS에 의해 유도된 EGR1의 조절을 통해 세포사멸을 유도함을 분석한 것이다. (A) BCPAP 및 8505C 세포를 NTPAM으로 지정된 시간 동안 처리하고 FACS 분석을 사용하여 미토콘드리아성 ROS를 측정하였다. BCPAP 및 8505C 세포는 NTPAM 처리 전에 30분 동안 NAC로 전처리하였다. (B) WST1 분석을 이용하여

세포 생존력을 평가하였다. (C) 또한 세포 용해물은 EGR1, PARP 및 β-액틴에 대한 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석 하였다. (D) BCPAP 및 8505C 세포는 농도 의존적 방식으로 NTPAM에 의해 처리되었고 세포 용해물은 EGR1에 대한 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석 하였다. (E) BCPAP 및 8505C 세포를 48시간 동안 EGR1 벡터를 이용하거나 이용하지 않고 형질주입(transfection)시킨 다음, 세포를 지시된 용량의 NTPAM으로 처리하였다. (F) BCPAP 및 8505C 세포를 48시간 동안 EGR1-특이적 siRNA를 이용하거나 이용하지 않고 형질주입(transfection)시킨 다음, 세포를 지시된 용량의 NTPAM으로 처리하였다. 각각은 3개의 독립적인 실험을 나타낸다.

도 6은 NTPAM은 갑상선암 세포에서 ROS/EGR1/GADD45α 경로를 분석한 결과이다. (A) RNA-seq에서 NTPAM 처리 후 GADD45α 발현의 변화이다. (B) NPTAM 처리 후 GADD45α는 정량적 실시간 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR) 분석 및 (C) 웨스턴 블롯 분석하였다. (D) EGR1 siRNA 또는 (E) EGR1 과발현 벡터를 형질주입(transfection)시키고 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. (F) EGR1 siRNA 또는 (G) EGR1 과발현 벡터를 GADD45 프로모터 WT 또는 GADD45 프로모터 P-2/3m과 함께 8505C 세포로 공동 형질주입(transfection)시켰으며, 형질주입 24시간 후 세포를 용해하고 루시페라제 활성을 루미노미터(FilterMax F5)로 측정하였다. (H) GADD45α 과발현 벡터 또는 (I) GADD45α siRNA를 8505C 세포로 형질주입(transfection)시켰으며, 세포 생존율 변화를 분석하였다. 각각은 3개의 독립적인 실험을 나타낸다.

도 7은 NTPAM은 생체 내 이종이식 모델에서 항암효과를 분석한 결과이다. FRO-luc 갑상선암 세포를 BALB/c-nude 마우스에 피하투여하고 3주 동안 매일 NTPAM을 처리하였다. (A) 생체 내 실험 설계의 개략도이다.(B) FRO-Luc 세포를 마우스에 주사한 후 IVIS 영상시스템으로 추적한 암세포의 최종 종양 이미지이다. (C) 종양 ROI의 발광을 분석한 결과이다. (D) 최종적인 종양의 이미지이다. (E) 최종적인 종양의 무게를 특정한 그래프이다. (F) EGR1 및 β-액틴은 면역조직화학 염색(Immunohistochemical staining) 분석결과이다. (G) NTPAM이 갑상선 암세포에서 ROS로 인한 산화적 스트레스를 유도하여 EGR1을 활성화하고, 이로 인해 GADD45α가 활성화 되어 세포사멸(Apoptotic cell death)를 유도함을 도식화한 것이다.

도 8은 NTPAM 처리를 하거나 하지 않은 갑상선암 세포의 전사체 분석한 결과이다. (A) BCPAP 세포 및 8505C 세포에서 NTPAM 처리 여부에 관계없이 $P < 0.05$ 이고 폴드 변화 > 2 의 기준을 충족하여 유의하게 변화된 유전자의 히트맵 분석결과이다. (B) NTPAM 처리와 관련하여 8505C 세포에서 상위 10개 상향조절경로 및 상위 10개 하향조절 경로 분석결과이다. (C) 8505C 세포에서 NTPAM 처리 여부에 관계없이 $P < 0.05$ 인 EGR1과 관련된 유의하게 변화한 유전자의 히트맵 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0019] 본 발명은 일 관점에서, (a) 저온 플라즈마 발생 장치에 캐리어 가스를 공급하는 단계 및 (b) 세포를 포함하지 않는 배지의 수직 방향으로 10 내지 24 W의 전력을 방전하여 형성된 저온 플라즈마 제트를 90분 내지 150분간 처리하여 저온 플라즈마 활성화 배지(Non-thermal plasma activation medium, NTPAM)를 제조하는 단계를 포함하는 갑상선암의 예방 또는 치료용 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)의 제조방법에 관한 것이다.

[0020] 상기 저온 플라즈마 발생 장치는 배지가 충진되는 용기, 상기 용기와 수직으로 배치되는 플라즈마 발생부, 및 상기 용기에 캐리어 가스를 공급하기 위한 공급부를 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명의 실시예에서 두 개의 전극(내부 스테인리스 스틸 튜브 전극과 외부 접지 링 전극)을 포함하고 있는 외경 6mm, 내경 4mm의 석영관으로 구성된 장치로부터 만들어진 저온 플라즈마 제트로 세포를 포함하지 않는 배지를 처리하여 저온 플라즈마 활성화 배지를 제조하였다. 이때 내부 튜브 전극은 가스 흡입구로도 작동한다. 캐리어 가스는 장치 내부에서 배지 표면을 향해 흐른다. 4 slpm의 헬륨과 1 sccm의 산소가 캐리어 가스로 사용하였다. 또한, 저온 플라즈마를 발생시키기 위해 전극에 연결된 고전압 증폭기를 이용하여 장치에 20kHz로 수 kV(a few kV) 강도로 전력을 공급하였으며, 방전 전력은 10 내지 24W 였다.

[0022] 따라서, 상기 플라즈마 발생부는 외경 6mm, 내경 4mm의 석영관에 내부의 스테인리스 스틸 튜브 전극 및 외부의 접지링 전극을 포함할 수 있다.

[0023] 또한, 상기 캐리어 가스는 산소 및 헬륨 가스를 포함한다.

[0024] 본 발명에서 상기 캐리어 가스는 산소 1 sccm(Standard Cubic Centimeter per Minute) 및 헬륨은 4 slpm(standard liter per minute)로 공급되는 것일 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명의 저온 플라즈마는 10 내지 24 W의 전력을 방전하여 형성된 것일 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명에서 상기 전력은 20kHz로 공급되는 것일 수 있다.

[0027] 본 발명의 실시예에서 저온 플라즈마 처리 시간이 증가함에 따라 갑상선암 세포의 생존 억제 효과가 증가하는 경향을 나타냈으나, 저온 플라즈마 처리 시간이 일정 수준 이상에서는 세포 생존 억제 효과의 유의한 차이가 없는 것을 확인하였다. 구체적으로 BCPAP, HTh-7 세포는 30분 이상 저온 플라즈마 처리한 NTPAM에서 세포 생존 억제 효과가 우수함을 확인하였으며, 8505C 세포는 60분 이상 저온 플라즈마 처리한 배지에서 세포 생존 억제효과가 우수하였고, KTC2 세포는 120분 이상 저온 플라즈마 처리한 NTPAM에서 세포 생존 억제효과가 가장 우수함을 확인하였다.

[0028] 따라서 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)는 갑상선암의 예방 또는 치료용으로 활용 가능하다.

[0029] 또한, 본 발명의 상기 제조하는 단계는 배지에 저온 플라즈마 제트를 30 분 이상 처리하는 것일 수 있으며, 구체적으로 90분 내지 150분, 더욱 구체적으로 120분간 처리하는 것일 수 있다.

[0030] 본 발명은 다른 관점에서 상기 제조방법으로 제조된 갑상선암의 예방 또는 치료용 저온 플라즈마 활성화 배지(Non-thermal plasma activation medium, NTPAM)에 관한 것이다.

[0031] 본 발명의 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)는 저온 플라즈마 발생 장치에 캐리어 가스를 공급하고, 세포를 포함하지 않는 배지의 수직 방향으로 10 내지 24 W의 전력을 방전하여 형성된 저온 플라즈마 제트를 90분 내지 150분간 처리하여 제조된 것을 특징으로 한다.

[0032] 본 발명의 실시예에서 24시간 동안 NTPAM를 처리한 후 갑상선암 세포주인 BCPAP, HTh-7, KTC2 및 8505C 세포의 생존율을 분석한 결과, NTPAM이 갑상선암 세포의 세포생존을 효과적으로 억제함을 확인하였으며, 이종이식 마우스 모델에서 갑상선암 세포에 대한 NTPAM 처리 효과를 분석한 결과, NPTAM은 종양 발달에 대한 억제효과를 보였다. NTPAM의 마지막 처리 이후, 대조군 배지 투여 그룹에 비해 NTPAM로 처리된 그룹에서 종양의 무게가 유의하게 감소됨을 확인하였다.

[0033] 즉, NTPAM가 갑상선 암을 효과적으로 억제하여 갑상선 암 예방 또는 치료용으로 활용 가능함을 확인하였다.

[0034] 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 저온 플라즈마 활성화 배지(Non-thermal plasma activation medium, NTPAM)를 포함하는 갑상선암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0035] 본 발명에서 상기 저온 플라즈마 활성화 배지에 관한 설명은 전술한 바와 같다.

[0036] 본 발명의 조성물은 저온 플라즈마 활성화 배지를 유효성분으로 포함하여 갑상선암 예방 또는 치료 효과를 나타낸다.

[0037] 본 발명의 실시예에서 NTPAM 희석 비율(1:4 및 1:3)에 따른 갑상선암 세포의 생존율 변화를 분석하였다. 구체적으로, BCPAP 및 8505C 세포를 48시간 동안 EGR1 과발현 벡터를 이용하거나 이용하지 않고 형질주입(transfection)시킨 다음, 세포를 희석된 NTPAM(1:4 및 1:3)으로 처리하고 세포 생존율을 분석하였다. 분석결과, 희석 이율 1:4의 NTPAM로 처리한 세포와 비교하여 1:3의 비율 NTPAM 로 처리한 세포가 세포 생존율이 낮아 암 세포에 대한 사멸 효과가 우수함 확인하였다. 또한, EGR1 과발현에 의해 NTPAM에 의한 암 세포 사멸 효과가 증진됨을 확인하였다.

[0038] 즉, NTPAM 및 EGR1 과발현 벡터로 형질도입한 갑상선암 세포에서 세포 생존 억제 효과가 NTPAM 단독 처리와 비교하여 우수함을 확인하였다.

[0039] 따라서 본 발명의 조성물은 EGR1 항체 또는 EGR1의 발현을 증가시키는 제제를 더 포함할 수 있다.

[0040] 본 발명의 실시예에서 EGR1이 갑상선암 세포의 증식을 억제하고 NTPAM에서 활성화되어 갑상선암 세포사멸을 매개하는 것을 확인하였다.

[0041] 본 발명에서 상기 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)은 EGR1의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.

[0042] 본 발명의 실시예에서 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM) 처리에 의해 갑상선암 세포주는 Nthy-ori3-1 세포에

비해 미토콘드리아의 기능이 감소됨을 확인하였다.

[0043] 따라서 상기 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)은 정상 세포와 비교하여 갑상선 암 세포에서 미토콘드리아 기능 감소를 유도하는 것일 수 있다.

[0044] 본 발명의 약학 조성물은 유효성분 이외의 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형체 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이때, 상기 조성물에 포함되는 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)는, 조성물 총 중량에 대하여 0.001 중량% 내지 99 중량%로, 바람직하게는 0.01 중량% 내지 50 중량%를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 상기 약학 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0046] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0047] 본 발명의 약학 조성물은 약학으로 유효한 양으로 투여할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0048] 본 발명의 약학 조성물은 갑상선암 예방 또는 치료을 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 것이든 적용 가능하다. 예를 들면, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간동물, 인간, 조류 및 어류 등 어느 것이나 사용할 수 있으며, 상기 약학 조성물은 비 경구, 피하, 복강 내, 폐 내 및 비강 내로 투여될 수 있고, 국부적 치료를 위해, 필요하다면 병변 내 투여를 포함하는 적합한 방법에 의하여 투여될 수 있다. 본 발명의 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치에 의해 결정될 수 있으며, 일반적으로 0.001 내지 1000 mg/kg의 양, 바람직하게는 0.05 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0051] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0053] **<재료 및 방법>**

[0054] **1. 세포주 및 재료의 준비**

[0055] 인간 갑상선암 세포주 BCPAP, HTh-7, KTC2, 8505C, FOR-luc 및 갑상선 정상 세포주 Nthy-ori 3-1은 박영주 실험실(서울대학교)으로부터 입수하였다. 모든 갑상선암 세포는 2020년 5월에 짧은 연쇄 반복 타이핑 방법(short tandem repeat typing method)에 의해 검증되었다. BCPAP와 HTh-7 세포는 고농도의 포도당이 함유되어 있는 둘베코 변형 이글 배지 (Dulbecco's Modified Essential Medium, DMEM)로 배양하였다. KTC2, 8505C, FRO-Luci 및 Nthy-ori3-1 세포는 RPMI(Roswell Park Memorial Institute) 1640 배지로 배양하였다. 모든 세포는 10% FBS(fetal bovine serum)와 100 units/㎖ 농도의 페니실린-스트렙토마이신(Gibco)를 첨가된 배지에서, 5% 이산화탄소의 가습조건으로 37℃ 온도로 배양하였다.

[0057] **2. 세포 증식 분석(Cell proliferation assay)**

[0058] 세포는 96 웰 플레이트에 1 웰 당 5×10^3 개의 밀도로 분주하였다. 처리 후에는 제조사의 프로토콜에 따라 세포 증식 시약인 WST-1을 이용하여 세포 생존도가 측정하였다. WST-1의 포마잔은 효소결합 면역흡착 분석법(Enzymelinked Immunosorbent Assay, ELISA) 판독기를 이용해 450nm에서 정량하였으며, 결과는 대조군 세포에 대한 백분율로 표시하였다.

[0060] **3. 세포 사멸 분석(Apoptosis Assay)**

[0061] 세포 사멸을 검출하기 위해 Annexin V-FITC(fluorescein isothiocyanate) 및 PI 염색을 수행하였으며, 제조사의 프로토콜에 따라 유세포분석기(Gallios BD, LSRFortessa X-20, Brea, CA) 및 Alexa FluorTM 488 Annexin V/Dead 세포 아폽토시스 키트(cell apoptosis kit)를 사용하여 세포를 평가하였다.

[0062] 간단히 말해서, 세포를 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)로 처리하고 24시간 동안 배양 한 후 수집하여 DPBS(phosphate-bufered saline)로 세척하고 Annexin V-FITC 및 PI로 염색하고 유세포 분석을 수행하였다. FlowJo software version 10(Tree Star, Ashland, USA)을 통해 세포를 FITC-/PI-(살아있는 세포), FITC+/PI-(초기 사멸세포), FITC+/PI+(후기 사멸세포) 및 FITC-/PI+(괴사 세포) 총 네 가지로 분류하여 백분율을 분석하였다.

[0064] **4. 저온 플라즈마 시스템(Experimental system specifications of NTP)을 이용한 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)의 제조**

[0065] 배지는 두 개의 전극(내부 스테인리스 스틸 튜브 전극과 외부 접지 링 전극)을 포함하고 있는 외경 6mm, 내경 4mm의 석영관으로 구성된 장치로부터 만들어진 저온 플라즈마 제트로 처리되었다. 내부 튜브 전극은 가스 흡입구로도 작동한다. 고전압 증폭기가 장치에 20kHz로 수 kV(a few kV) 강도로 전력을 공급한다. 방전 전력은 10 ~ 24W 범위에서 변화한다.

[0066] 플라즈마 제트는 플라스크의 배지 위에 수직으로 배치되고, 가스는 장치 내부에서 배지 표면을 향해 흐른다. 4 slpm의 헬륨과 1 sccm의 산소가 운반 기체로 사용되었는데, 플라즈마의 방출 스펙트럼은 강한 N, He 및 O 관련 광 방출을 보여주었다.

[0068] **5. 산소 소비율 (Oxygen Consumption Rate, OCR) 측정**

[0069] 산소 소비율(OCR)은 Seahorse XF-24 분석기를 사용하여 측정하였다. 간단히 말해서, 갑상선 세포는 XF-24 plate(well당 200㎕의 성장 배지와 4×10^4 개의 세포를 포함함)에 분주되고, 37℃/5% CO_2 인큐베이터에서 24시간 동안 유지하였다. 센서 카트리지는 Seahorse Bioscience 사의 교정용 완충액에 넣고 실험 전 24시간 동안 CO2가 존재하지 않는 인큐베이터에서 37℃ 온도로 배양되었다. XF 24 바이오센서 카트리지의 포트에 아래의 화합물들을 추가하였다.

[0070] 올리고마이신 A (20㎍/㎖) 및 ATP 합성효소(복합체V)의 저해제는 세포의 ATP 생산과 카보닐 시아나이드 엠-클로로 페닐 하이드라진(Carbonyl cyanide m-chloro phenyl hydrazine, CCCP, 최적농도 50μM)을 측정하기 위해 주

입하였다. 탈공역제(uncoupling agent)는 미토콘드리아 막전위의 파괴로 인한 최대호흡을 측정하기 위해 2차적으로 처리하였다. 미토콘드리아성 호흡(20μM)을 차단하고 비-미토콘드리아성 호흡을 계산하기 위해 복합체 I 저해제인 로테논이 주입하였다. OCR은 센서 카트리지에 의해 자동으로 기록되고 Seahorse XF-24 소프트웨어를 사용하여 계산되었다.

[0072] **6. 투과전자현미경(Transmission Electron Microscopy, TEM)**

[0073] 세포를 원심분리를 통해 펠렛화하고, 세포 펠렛을 4℃에서 0.1M 인산염 완충액(pH 7.4)의 2.5% 글루타르알데히드에 고정시켰다. 2시간 후, 펠렛을 0.1M 인산염 완충액으로 3회 헹구고 4℃에서 1~2시간 동안 1% 사산화오스뮴(osmium tetroxide)에 후고정한 다음 인산염 완충액으로 3회 세척하였다. 펠렛은 일련의 에탄올 용액을 통해 탈수되어 두 가지 변형된 프로필렌 산화물에 노출되었다. 탈수 과정 후, EMbed 812 수지와 프로필렌옥사이드의 2:1, 1:1 및 1:2 혼합물이 각각 1시간 동안 펠렛에 스며들었으며, 마지막으로 펠렛을 100% EMbed 812 수지에 끼워 넣었다.

[0074] 60℃에서 24~48시간 동안 중합한 후, 80nm 두께의 초박형 플라스틱 섹션을 라이카 EM UC6 초박편제작기(ultramicrotome)를 사용하여 실온에서 절단하고 200 메쉬의 탄소로 코팅된 그리드에 모았다. 그리드는 실온에서 각각 15분 및 5분 동안 2% 아세트산 우라늄(uranyl acetate) 및 1% 시트르산 납(lead citrate)으로 사후 염색하였다. 자이스(Zeiss) LEO912AB 120kV 투과전자현미경과 FEI Tecnai G2 Spirit Twin 120kV 투과전자현미경이 TEM에 사용하였다.

[0076] **7. 세포 내 ATP 분석**

[0077] BCPAP 및 8505C 세포를 60mm 플레이트에 웰 당 5×10^5 개의 밀도로 분주하였다. 다음날, 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)를 사용하거나 사용하지 않고 1시간 동안 세포를 처리하였다. 처리 후, 제조사의 프로토콜에 따라 생물발광 분석키트(Bioluminescence assay kit HS II)를 사용하여 세포 내 ATP 수준을 측정하였다.

[0079] **8. RNA 추출**

[0080] 전사체를 분석하고 차별발현유전자(Differentially Expressed Gene, DEG)를 분석하기 위해 갑상선암 세포에서 RNA를 추출하였다. 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)를 처리한 갑상선 세포 또는 대조군 세포를 분리하고 제조사의 프로토콜에 따라 easy-spin Total RNA 추출 키트를 사용하여 총 RNA를 추출하였다. 모든 실험은 깨끗한 환경에서 수행되었으며 장비는 사전에 오토클레이브을 이용하여 처리하였다. 추출된 RNA의 품질은 Agilent 2100 Bioanalyzer RNA Nano Chip을 이용하여 평가하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 TruSeq stranded mRNA Sample Preparation Kit v2(Illumina)를 이용하여 총 1㎍의 추출된 RNA로 RNA 라이브러리를 구성하였다. 라이브러리의 품질은 Agilent DNA 1000 키트를 이용하여 Agilent 2100 Bioanalyzer로 분석하였다. 모든 샘플은 평균적으로 3,800만 개의 페어드-엔드(paired-end) 100 염기쌍 리드를 산출하는 Illumina HiSeq 2500 platform 에서 시퀀싱하였다.

[0082] **9. 생물정보학 전사체 분석(Bioinformatic transcriptome analysis)**

[0083] TCGA의 모든 유두 갑상선 암종 (PTC) 게놈 데이터는 특정 포털(https://tcga-data.nci.nih.gov) 및 암 브라우저(https://genome-cancer.ucsc.edu)로부터 얻었다. PTC 환자(n = 500)의 mRNA 및 임상 매개변수로부터 유전자 발현 데이터를 분석하였다. 판독은 TopHat2 v2.1.5(https://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml)를 사용하여 UCSC Homo sapiens reference genome(GRCh37 / hg19)에 정렬하였다. 기본 TopHat 매개변수 옵션을 사용하였다. 비교그룹(대조군 대 NTPAM 처리) 간의 차별발현유전자(Differentially Expressed Gene, DEG) 프로파일을 분석하기 위해 Tuxedo 프로토콜이 사용하였다. 정렬된 판독문은 Cufflinks v2.2.1(https://github.com/cole-trapnell-lab/cufflinks)을 통해 처리되었으며, 이는 FPKM(fragments per kilobase of exon model per million reads mapped)에 기반을 두고 있으며, 편중되지 않고 정규화된 RNA-seq 조각 숫자를 사용하여 상대적인 스크립트 수준을 분석하였다. 유전자 트랜스퍼 포맷(Gene transfer format, GTF) 파일을 생성하여 각 샘플의 전사체 수준을 레퍼런스 GTF 파일의 수준과 정량적으로 비교하였다. 다음으로 Cuffdiff를 사용하여 각 그룹 간의 FPKM

차이를 계산하였다. False discovery rate-조정된 p값(< 0.05)은 벤자미니-호크버그 다중검정방법을 통해 계산하였다. NTPAM과 관련하여 유전자 세트를 비교하기 위하여 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)의 유전자 세트 모음은 Enrichr(https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/)으로부터 얻었다. 벤자미니-호크버그에 의해 보정된 값이 0.05 미만인 DEG 및 KEGG는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 히트맵은 PermutMatrix Version 1.9.3(http://www.lirmm.fr/~caraux/PermutMatrix/)을 이용해 분석하였다.

[0085] **10. 미토콘드리아 ROS 생산량 측정**

[0086] MitoSOX(Cat. # M36008, Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 미토콘드리아 과산화물을 평가하였다. 세포를 NTPAM 또는/및 NAC(2mM, 5mM)를 사용하거나 사용하지 않고 처리한 후 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 처리 후 HBSS에서 MitoSOX(5uM)로 15분 동안 세포를 염색하였다. 형광염색된 세포(1×10^4)를 유세포분석(Gallios BD, LSRFortessa X-20)으로 분석하고 FlowJo software version 10(Tree Star, Ashland, USA)을 사용하여 세포의 백분율을 분석하였다.

[0088] **11. 웨스턴 블롯 분석**

[0089] 세포는 150mM 염화나트륨, 1.0% Nonidet-P40, 0.5% 소듐 디옥시콜레이트, 0.1% 황산 도데실나트륨, 50mM Tris(pH 8.0) 및 단백질분해효소 저해제 혼합물(Roche Applied Science, Vienna, Austria)이 포함된 완충액에서 용해되었다. 전기영동은 앞서 설명한 대로 수행되었다. 항-PARP, 항-카스파제3, 항-Bcl-2), 항-EGR1, 항-β-액틴 (1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), 그리고 항-GADD45α, 항-GADD45β, 항-GADD45γ (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)의 일차 항체들이 웨스턴 블롯 분석을 위해 이용되었다.

[0090] 해당하는 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase)-결합된 이차 항체(1:1000; Santa Cruz Biotechnology)와 함께 배양한 후, 강화된 화학발광검출(enhanced chemiluminescence detection) 시약을 이용하여 면역 반응 밴드를 시각화하였다.

[0092] **12. RNA 추출 및 정량적 실시간 PCR**

[0093] TRIzol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 전체 세포의 RNA를 추출하였다. cDNA는 제조사의 지시에 따라 5㎍의 전체 RNA와 TOPscriptTMRT DryMIX(Enzynomics. Inc. Dajeon, Korea)로 합성되었다. 증폭은 SYBR Green qPCR Master Mix(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 수행되었다. PCR 프라이머 서열은 표 1과 같다.

표 1

[0094]

프라이머명	염기서열
EGR1-F	5' ATG ATC CCC GAC TAC CTG TTT -3' (서열번호1)
EGR1-R	5' AGT GGC AAA GGC CTT AAT-3' (서열번호2)
GADD45α-F	5' AGC AGA AGA CCG AAA G-3' 서열번호3)
GADD45α-R	5' GCC ACA TCT CTG TCG T-3' 서열번호4)
GAPDH-F	5'-ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG-3' 서열번호5)
GAPDH-R	5' TAG ACG GCA GGT CAG CT-3(서열번호6)

[0096] **13. 일시적 형질주입(transfection)(Transient transfection)**

[0097] 일시적 형질주입(transfection)은 siRNA 용도의 Lipofectamine RNAiMAX reagent(Invitrogen) 및 과발현 벡터 용도의 etPEI DNA transfection reagent(Polyplus, Illkirch-Graffenstaden, France)을 사용하여 세포가 60% 융합에 도달하면 제조사의 표준 프로토콜에 따라 수행하였다. EGR1과 GADD45α의 siRNA는 Santa Cruz Biotechnology로부터, 대조군용 siRNA는 Bioneer(Daejeon, Republic of Korea)으로부터 제공되었다. EGR1 및

GADD45α에 대한 과발현 벡터는 OriGene Technologies(Rockville, MD, USA)으로부터 제공되었으며, GADD45 WT-luc 및 GADD45 P-2/3m-luc는 addgene(Watertown, MA, USA)으로부터 제공되었다.

[0099] **14. 이종이식 종양 모델**

[0100] 마우스는 특정 병원체가 존재하지 않는 환경에서 유지되었으며, 동물실험 프로토콜을 승인한 충남대학교 IACUC(Daejeon, South Korea)의 지침에 따라 이용되었다. BALB/c-nude 마우스(6주령)는 Orient Bio(Seongnam, South Korea)으로부터 제공되었다. 루시페라제-발현성인 FRO 세포(FRO-luc)를 BALB/c- 누드마우스의 오른쪽 아래 옆구리에 피하 접종하였다. 10일 후 종양이 ~ 50㎜ 직경에 도달했을 때 마우스를 배지 대조군과 NTPAM 그룹으로 무작위로 나누고, 종양에 21일 동안 매일 100㎕의 배지 또는 NTPAM을 주입하였다. NTPAM를 마지막으로 주사한 후에, 안락사 시킨 마우스로부터 종양을 절제하여 웨스턴 블롯 분석에 사용하였다.

[0102] **15. 생물발광 이미지 및 생존 분석**

[0103] 갑상선 종양의 성장은 Lumina XRMS instrument(PerkinElmer)로 구성된 생체 내 영상 시스템(In Vivo Imaging System, IVIS)을 사용하여 생물발광 이미징을 통해 관찰되었다. 생체 내 라이브 영상의 검출을 위해 마우스에게 150mg/kg D-루시페린을 복강 내 투여하였다. 100% O2 조건에서 2% 이소플루란으로 마우스를 마취한 후, 생물발광 지표를 기록하며 사진 촬영하였다. 신호는 영상시스템에 등록된 리빙 이미지 소프트웨어(Caliper Life Sciences, Street Waltham, MA, USA)를 이용하여 발광 강도를 계산함으로서 분석 및 정량화되었다.

[0105] **16. 통계분석**

[0106] 데이터는 평균 ± 표준 편차로 표시되며, $P < 0.05$ 값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). SPSS statistical software for Windows, version 20 (SPSS, Chicago, IL, USA)이 모든 통계 분석에 이용되었다.

[0108] **<결과>**

[0109] **실시예1. 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)의 갑상선암 세포사멸 효과**

[0110] 갑상선암 세포주에서 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)의 세포사멸을 유도효과를 분석하였다. 플라즈마 시스템의 기술사양은 도 1A과 같다. 공기가스 흐름이 있는 저온 플라즈마 장치의 발광 스펙트럼은 발광분광 분석기에 의해 280nm에서 920nm 파장까지 측정되었다(도 1B).

[0111] 지속적으로 저온 플라즈마에 노출한 후에 온도, 전기 전도도, 과산화수소 및 산화질소(NO_3^- 및 NO_2^-)의 농도를 측정하였다(도 1C). 분석결과, 저온 플라즈마에 노출된 시간의 증가에 따라 온도, 전기 전도도, 과산화수소 및 산화질소(NO_3^- 및 NO_2^-)의 농도가 증가함을 확인하였다.

[0112] 액체 배지를 도 1A의 저온 플라즈마(NTP) 시스템에 노출시켜 제조한 저온 플라즈마 활성화 배지(Nonthermal Plasma-activated Medium, NTPAM)가 다양한 갑상선암 세포에서 항암효과를 나타내는지 확인하였다. 구체적으로 24시간 동안 NTPAM를 처리한 후 갑상선암 세포주인 BCPAP, HTh-7, KTC2 및 8505C 세포의 생존율을 분석하였다. NTPAM은 저온 플라즈마 처리 시간이 증가함에 따라 갑상선암 세포의 세포 생존력을 효과적으로 억제하였다(도 1D).

[0113] 저온 플라즈마 처리 시간이 증가함에 따라 갑상선암 세포의 생존 억제 효과가 증가하는 경향을 나타냈으나, 저온 플라즈마 처리 시간이 일정 수준 이상에서는 세포 생존 억제 효과의 유의한 차이가 없는 것을 확인하였다. 구체적으로 BCPAP, HTh-7 세포는 30분 이상 저온 플라즈마 처리한 NTPAM에서 세포 생존 억제 효과가 우수함을 확인하였으며, 8505C 세포는 60분 이상 저온 플라즈마 처리한 배지에서 세포 생존 억제효과가 우수하였고, KTC2 세포는 120분 이상 저온 플라즈마 처리한 NTPAM에서 세포 생존 억제효과가 가장 우수함을 확인하였다.

[0114] 이후 실험에서는 120분 이상 저온 플라즈마 처리하여 제조된 NTPAM를 사용하였다.

[0115] 도 1E는 BCPAP 및 8505C 세포에서 NTPAM 처리 후 세포 형태 변화를 분석한 결과이다. BCPAP 및 8505C 세포의 NTPAM 처리군은 대조군에 비해 세포사멸을 유의하게 증가하였다. 또한 NTPAM 처리는 caspase3 활성화 및 PARP 절단을 유발하는데, 이는 세포사멸 과정을 유도한다는 것을 의미한다(도 1F, G).

[0116] 이러한 결과는 NTPAM이 갑상선암 세포주에서 세포사멸을 유도함을 시사한다.

[0118] **실시예2. 저온 플라즈마 활성화 배지(NTPAM)의 미토콘드리아 기능저하 효과**

[0119] 갑상선암 세포주는 인간 갑상선 여포 상피에서 유래된 정상세포인Nthy-ori3-1 세포에 비해 미토콘드리아의 기능이 저하된다(미공개 자료). 따라서 암세포에서 NTPAM 처리의 효과가 정상 갑상선 세포와 다를 것이라는 가설을 설정하였다. 따라서 정상 갑성선 세포(Nthy-ori3-1 세포)와 갑상선암 세포(BCPAP 세포)에서 NTPAM 처리 후 형태학적 변화를 조사하였다.

[0120] BRAFV600E 돌연변이가 있는 유두상 갑상선암 세포주인 BCPAP 세포는 NTPAM 처리를 하지 않은 Nthy-ori3-1 세포와 비교했을 때, 파열된 크리스테(cristae)를 가진, 부풀고 비정상적인 미토콘드리아의 축적이 증가하였다. NTPAM 처리 후, BCPAP 세포에서 이형(dysmorphic) 미토콘드리아의 비율은 Nthy-ori3-1 세포에 비해 유의하게 증가하였다(도 2A). 이 결과는 NTPAM이 미토콘드리아성 스트레스를 유발했으며, 정상 갑상선 세포보다 갑상선암 세포에서 이러한 효과가 더 강력하다는 것을 시사한다.

[0121] 다음으로 NTPAM 처리 후 Nthy-ori3-1 세포, BCPAP 세포 및 8505C 세포의 산소 소비율을 비교하였다. NTPAM 처리 후 Nthy-ori3-1 세포에서 기저호흡 OCR, 최대호흡 OCR, ATP 의존성 호흡 OCR에는 유의한 변화가 없었다.

[0122] 그러나 갑상선암 세포주는 Nthy-ori3-1 세포에 비해 미토콘드리아의 기능이 감소된 것으로 나타났다(도 2B-E). 이러한 결과는 암세포에서 NTPAM의 효과가 더 큰 이유가 기준치의 정상세포에 비해 암세포에서 미토콘드리아의 기능이 감소하는 것과 관련 있을 것임을 시사한다.

[0124] **실시예3. NTPAM 처리 후 갑상선 암세포의 전사체 분석**

[0125] 인간 갑상선암에서 NTPAM의 주요 메커니즘을 확인하기 위해, NTPAM 처리를 하거나 하지 않고 갑상선암 세포의 전사체 분석을 수행하였다. 도 3A 및 3B와 같이, NPTAM 처리된 BCPAP 세포와 8505C 세포는 NPTAM 처리된 세포와 비교하여 양의 상관관계를 나타냈다. NTPAM 처리 후 변화된 유전자가 BCPAP 및 8505C 세포에서 유의하게 존재하였다(도 8A). 실시예2의 in vitro 데이터를 통해 NTPAM 처리 후 갑상선암에서 비정상적인 미토콘드리아가 축적되는 것을 확인하였다.

[0126] 따라서 인간 갑상선암에서 NTPAM 처리와 미토콘드리아성 비접힘 단백질 반응(unfolded protein response, UPRmt) 사이의 연관성을 확인하였다. 흥미롭게도, NTPAM 처리는 UPRmt와 관련된, 유전자의 유의미한 변화를 유발하였다(도 3C). NTPAM와 생물학적 프로세스 사이의 중요한 관계를 알아내기 위하여 통계학적 중요성을 가지는, 상당히 농축된 KEGG 분석을 수행하였다(도 3D). 도 3E 및 도 8B에서 볼 수 있는 바와 같이, BCPAP 세포 및 8505C 세포에서 상위 10개의 상향조절경로 및 상위 10개의 하향조절경로는 NTPAM 처리 후 BCPAP 세포에서 미토파지의 상향조절, 리보솜의 신생 및 피루브산 대사의 하향조절 또는 8505C 세포의 산화적 인산화를 보여준다.

[0127] BCPAP와 8505C 세포에서의 NTPAM 처리와 관련된 상류 조절자를 확인하기 위해 Ingenuity pathway analysis (IPA)를 분석하였다. 흥미롭게도, EGR1, DDIT 그리고 ATF4는 NTPAM 처리 후 BCPAP 세포와 8505C 세포 모두에서 전사 조절자를 확인하였으며, EGR1은 추가 연구를 위한 후보 유전자로 채택하였다(도 3F).

[0128] 다음으로 EGR1에 의해 조절되는 유전자 세트의 발현을 조사하였다. 도 3G와 도 8C에서 볼 수 있는 바와 같이, NTPAM은 EGR1 발현과 관련된 유전자의 유의한 차이를 유발하였다. PTC에서의 표현형과 관련된 EGR1 발현의 유용성을 평가하기 위해 TCHA 갑상선암 코호트(THCA)에서 EGR1의 발현을 조사하였다(도 3H). EGR1의 발현은 종양 샘플에 비해 정상 샘플에서 유의하게 더 높았다. 다음으로 EGR1 발현과 임상병리학적 특징 사이의 관계를 평가하기 위해 THCA 코호트의 샘플 500개와 관련된 임상병리학적 특징을 목록화하였다. 카이제곱검정과 피셔정확검정을 사용하여 EGR1 발현과 임상적 그리고 병리학적 매개변수의 상관관계를 평가하였다. 낮은 EGR1 발현은 남성 ($P = 0.034$), 종양 크기 ($P = 0.014$), LN 전이 ($P = 0.009$)를 포함한 여러 임상병리학적 매개변수와 유의하게 연관되었다. 또한 THCA 코호트를 사용한 무병 생존율은 EGR1 발현이 PTC의 표현형과 관련이 있음을 보여주었다(도 3I).

[0130] **실시예4. NTPAM의 갑상선 암에서 EGR1 활성화 효과**

[0131] EGR1은 종양세포의 유형에 따라 종양억제인자 또는 종양유전자로 기능할 수 있다. 그러나 갑상선암에서 EGR1의 역할은 명확하게 연구되지 않았다.

[0132] RNA-seq 분석 결과를 검증하기 위해(도 4A), BCPAP 및 8505C 세포에서 EGR1의 RNA 및 단백질 발현 수준을 조사하였다. EGR1 발현 수준은 NTPAM 처리된 세포에서 크게 증가하였다(도 4B 및 도 4C). 이후 동일한 갑상선암 환자에서 추출한 정상조직 및 종양조직에서 EGR1의 단백질 발현 수준을 조사하였다. EGR1의 낮은 발현은 정상조직에 비해 3개의 종양 샘플에서 검출되었다(도 4D).

[0133] EGR1이 갑상선의 종양 진행을 억제할 수 있다는 가설을 설정하였고, 갑상선암 세포의 증식에 대한 EGR1의 일시적 과발현 및 녹다운 억제 효과를 조사하였다. EGR1의 과발현 벡터를 BCPAP 및 8505C 세포에 일시적으로 형질주입(transfection)시켰으며, 세포증식을 세포계수를 이용하여 측정하였다. EGR1 과발현은 대조군과 비교하여 세포증식을 상당히 억제하였다(도 4E). EGR1 녹다운 억제의 효과를 조사하였다. 세포를 EGR1-특이적 siRNA 또는 음성대조군 siRNA로 일시적으로 형질주입(transfection)시키고 세포계수를 수행하였다. EGR1 과발현과는 대조적으로 EGR1 녹다운 억제는 세포증식의 증가를 유발하였다(도 4F).

[0134] 이러한 결과는 EGR1이 갑상선암 세포의 증식을 억제하고 NTPAM에서 활성화되어 갑상선암 세포사멸을 매개하는 것을 확인해준다.

[0136] **실시예5. 갑상선암 세포에서 NTPAM의 ROS 생성 유도 효과**

[0137] 다음으로 NTPAM이 갑상선암 세포에서 ROS 생산을 유도하여 암 세포 사멸에 기여하는 지 분석하였다. 미토콘드리아성 ROS는 NTPAM로 처리된 세포에서 빠르게 증가하였다(도 5A). 그리고 BCPAP 및 8505C 세포는 모두 일반적인 항산화 화학물질인 NAC로 전처리되어, NTPAM에 의해 유도된 세포 독성을 완화되는 것을 확인하였다(도 5B). NTPAM에 의해 유도된 ROS는 EGR1 유전자 발현을 증가 시켰고 NAC는 NTPAM에 의해 유도된 EGR1의 유도를 억제하였다(도 5C). 또한 NTPAM과 배지의 희석 비율(NTPAM: 배지 부피비, 0:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1)에 따른 갑상선암에서 EGR1 발현 변화를 분석한 결과, NTPAM 비율이 증가함에 따라 EGR1 발현이 증가하여 1:1의 비율로 혼합된 배지를 처리한 갑상선암 세포에서 EGR1 발현이 가장 높음을 확인하였다(도 5D).

[0138] 다음으로 NTPAM 희석 비율(1:4 및 1:3)에 따른 갑상선암 세포의 생존율 변화를 분석하였다. 구체적으로, BCPAP 및 8505C 세포를 48시간 동안 EGR1 벡터를 이용하거나 이용하지 않고 형질주입(transfection)시킨 다음, 세포를 희석된 NTPAM(1:4 및 1:3)으로 24시간 처리하고 세포 생존율을 분석하였다. 분석결과, 희석 이율 1:4의 NTPAM로 처리한 세포와 비교하여 1:3의 비율 NTPAM 로 처리한 세포가 세포 생존율이 낮아 암 세포에 대한 사멸 효과가 우수함 확인하였다. 또한, EGR1 과발현에 의해 NTPAM에 의한 암 세포 사멸 효과가 증진됨을 확인하였다(도 5E).

[0139] 또한, BCPAP 및 8505C 세포를 48시간 동안 EGR1-특이적 siRNA를 이용하거나 이용하지 않고 형질주입(transfection)시킨 다음, 희석된 NTPAM(1:4 및 1:3)으로 처리하고 세포 생존율을 분석하였다. 분석결과, NTPAM 처리에 의해 갑상선 암 세포 생존율이 감소됨을 확인하였으며, EGR1 siRNA에 의해 NTPAM 처리에 의해 감소한 갑상선 암세포의 세포 생존율이 증가됨을 확인하였다(도 5F). 이러한 결과는, EGR1이 갑상선암 세포에서 ROS 매개 세포사멸을 유도하기 위해 NTPAM에 의해 상향 조절되었음을 시사한다.

[0141] **실시예6. 갑상선암 세포에서 NTPAM의 ROS/EGR1/GADD45α 경로 조절**

[0142] EGR1은 종양억제인자인 PTEN의 발현을 직접 조절하는 것으로 보이는 전사인자 중 하나이다. EGR1은 또한 인간 흑색종 세포에서 p53의 조절에 관여하여 세포사멸을 유도하는 것으로 생각되어 왔다. 또한 EGR1은 UVB 스트레스 또는 비소와 같은 산화적 스트레스 동안 GADD45α 및 GADD45β 발현에 직접 결합하고 조절한다.

[0143] RNA-seq 결과에서 EGR1의 표적유전자가 NTPAM에 의해 상향조절되는 것을 확인하였다. 흥미롭게도, GADD45α는 BCPAP 및 8505C 세포에서 유의하게 상향조절되었지만 PTEN 및 P53에서는 그렇지 않았다(도 6A). GADD45α의 RNA 및 단백질 수준은 RNA-seq의 결과로 NTPAM 처리된 세포에서 증가하였다(도 6B, C). EGR1 특이적 siRNA를 사용한 형질주입(transfection)은 GADD45α를 하향조절한 반면, EGR1 과발현은 GADD45α 발현을 증가 시켰다(도 6D,

E).

[0144] GADD45α의 유도가 GADD45A 유전자의 프로모터에 대한 EGR1의 직접결합에 의해 매개되는지 확인하고자 인간 GADD45A 프로모터의 활성에 대한 EGR1의 효과를 조사하였다. EGR1 siRNA는 야생형 GADD45A 프로모터 구조물에 의해 루시페라제 활성을 감소시켰고 EGR1 과발현은 활성을 증가시켰지만 EGR1은 P-2/3 돌연변이 루시페라제 리포터 활성을 증가시키지 않았다(도 6F, G).

[0145] 따라서 GADD45A 프로모터에 대한 EGR1의 직접적인 DNA 결합은 GADD45A 프로모터의 전사촉진에 중요한 것으로 보인다. 또한 8505C 세포주에서 GADD45α의 역할을 조사하였다. GADD45α 과발현은 대조군에 비해 세포증식을 상당히 억제하였다. GADD45α 과발현과는 대조적으로, GADD45α 녹다운은 세포증식을 증가시켰다(도 6H, I). 이러한 결과는 NTPAM에 의해 유도된 ROS가 EGR1을 상향조절하고 EGR1은 전사조절을 통해 GADD45α의 발현을 증가시킨다는 것을 시사한다.

[0147] **실시예7. 마우스 모델에서 갑상선암에 대한 NTPAM의 항종양 효과**

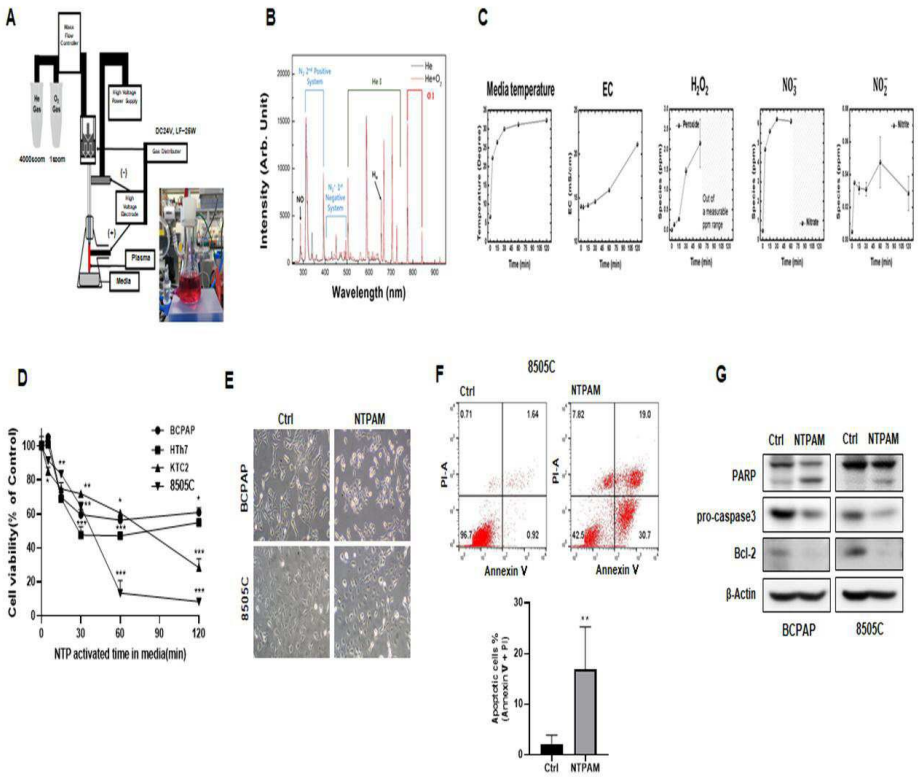
[0148] 확립된 이종이식 마우스 모델에서 갑상선암 세포에 대한 NTPAM 처리 효과를 확인하기 위해 생물발광 영상을 촬영하여 생체 내 종양세포 성장의 변화를 관찰하였다. FRO-luc 세포를 BALB/c-nude 마우스에 피하주사하고 3주 동안 NTPAM으로 처리하였다. 관심영역(The region of interest, ROI)은 주사 후 21일이 종료되는 시점에 측정하였다(도 7A). NTPAM으로 처리된 그룹의 ROI는 대조군에 비해 현저히 감소하였다(도 7B, C). NPTAM은 종양 발달에 대한 억제효과를 보였다. NTPAM의 마지막 처리 이후, 대조군 배지 투여 그룹에 비해 NTPAM로 처리된 그룹에서 종양의 무게가 유의하게 감소되었다(도 7D 및 E).

[0149] NTPAM이 생체 내에서 EGR1의 상향조절을 통해 갑상선암 세포사멸을 유도했는지 확인하고자, 웨스턴 블롯을 이용하여 EGR1의 분자 수준에서의 변화를 분석하였다. EGR1은 대조군에 비해 NTPAM 처리된 마우스 조직에서 유의하게 증가하였다(도 7F).

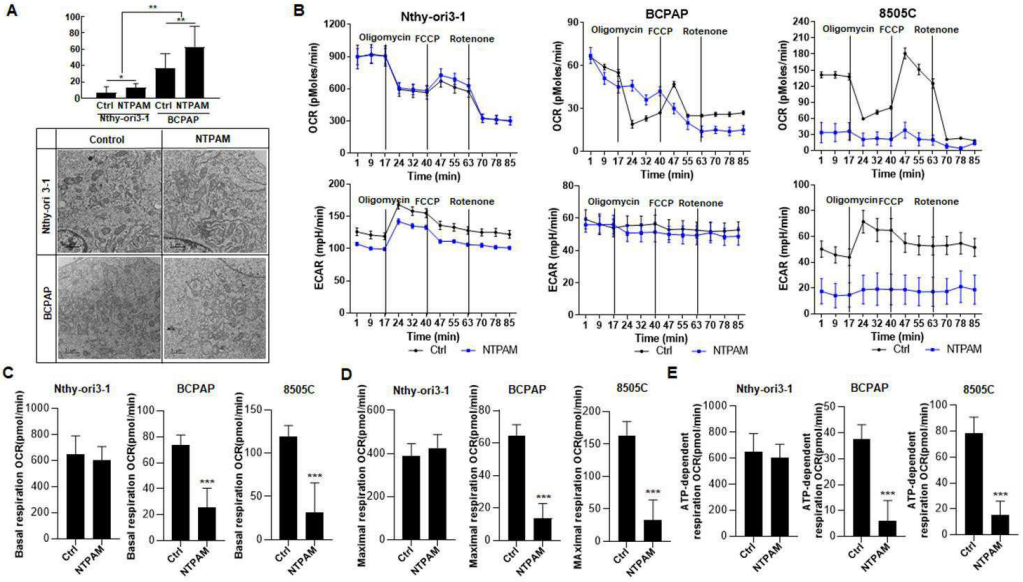
[0150] 이러한 결과는 시험관 내 단백질 발현 데이터의 결과와 일치하였다.

도면

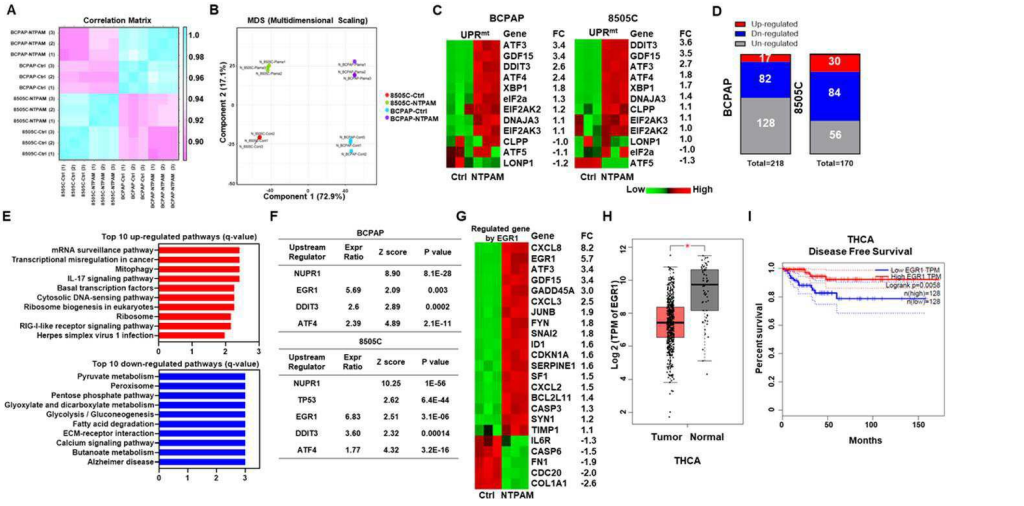
도면1



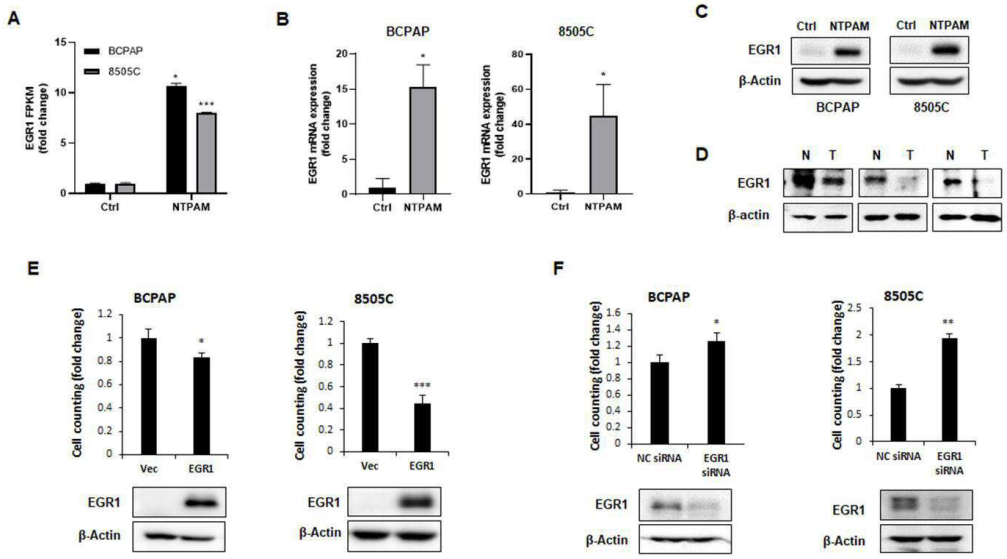
도면2


A
Ctrl NTPAM Ctrl NTPAM
Nthy-ori3-1 BCPAP
Control NTPAM
Nthy-ori 3-1
BCPAP
B
Nthy-ori3-1
BCPAP
8505C
Oligomycin FCCP Rotenone
OCR (pMoles/min)
ECAR (mpH/min)
Time (min)
Ctrl NTPAM
C
Basal respiration OCR(pmol/min)
D
Maximal respiration OCR(pmol/min)
E
ATP-dependent respiration OCR(pmol/min)

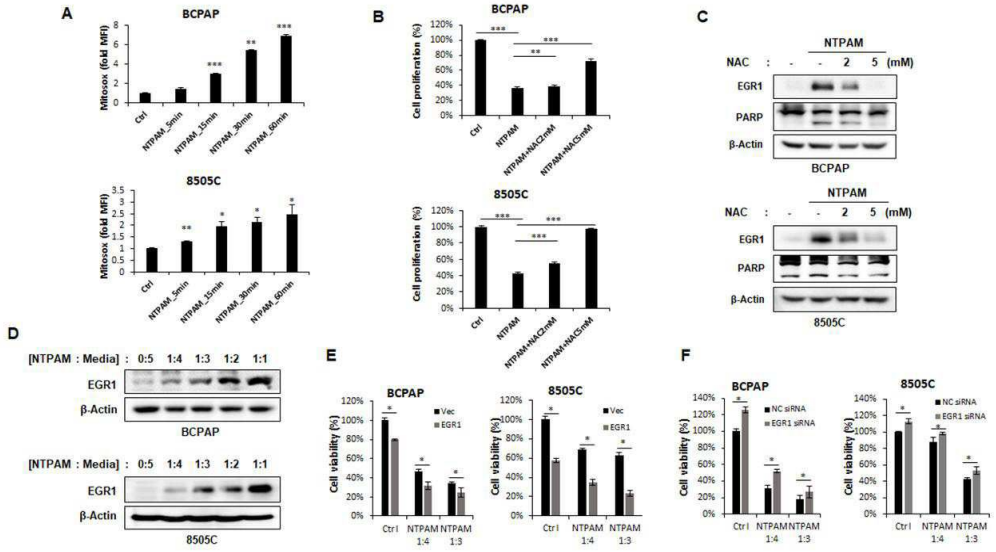
도면3


A
Correlation Matrix
B
MDS (Multidimensional Scaling)
Component 1 (72.9%)
Component 2 (17.1%)
8505C-Ctrl
8505C-NTPAM
BCPAP-Ctrl
BCPAP-NTPAM
C
BCPAP
8505C
UPRmt Gene FC
Ctrl NTPAM
Low High
D
Up-regulated
Dn-regulated
Un-regulated
Total=218
Total=170
E
Top 10 up-regulated pathways (q-value)
mRNA surveillance pathway
Transcriptional misregulation in cancer
Mitophagy
IL-17 signaling pathway
Basal transcription factors
Cytosolic DNA-sensing pathway
Ribosome biogenesis in eukaryotes
Ribosome
RIG-I-like receptor signaling pathway
Herpes simplex virus 1 infection
Top 10 down-regulated pathways (q-value)
Pyruvate metabolism
Peroxisome
Pentose phosphate pathway
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism
Glycolysis / Gluconeogenesis
Fatty acid degradation
ECM-receptor interaction
Calcium signaling pathway
Butanoate metabolism
Alzheimer disease
F
BCPAP
Upstream Regulator Expr Ratio Z score P value
NUPR1 8.90 8.1E-28
EGR1 5.69 2.09 0.003
DDIT3 2.6 2.89 0.0002
ATF4 2.39 4.89 2.1E-11
8505C
Upstream Regulator Expr Ratio Z score P value
NUPR1 10.25 1E-56
TP53 2.62 6.4E-44
EGR1 6.83 2.51 3.1E-06
DDIT3 3.60 2.32 0.00014
ATF4 1.77 4.32 3.2E-16
G
Regulated gene by EGR1 Gene FC
Ctrl NTPAM
H
Log 2 (TPM of EGR1)
Tumor Normal
THCA
I
THCA
Disease Free Survival
Percent survival
Months

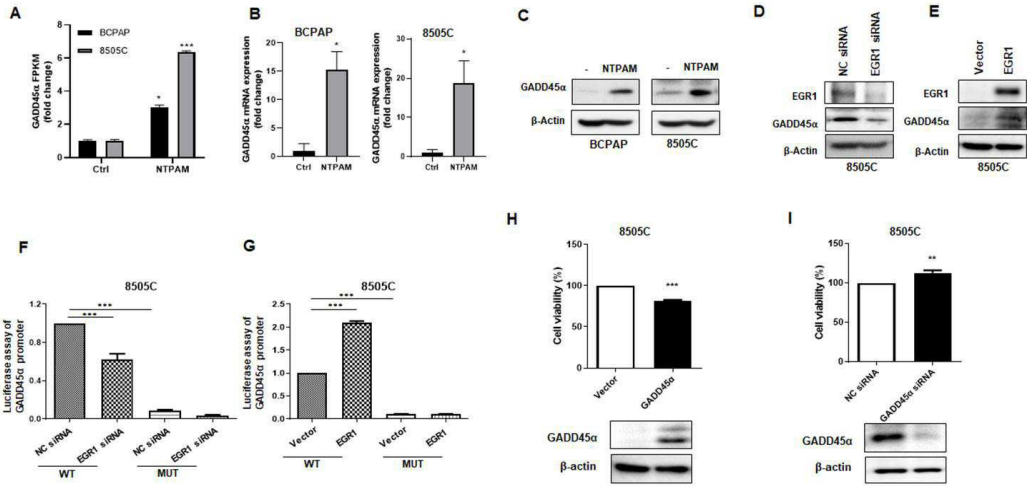
도면4


A
BCPAP
8505C
EGR1 FPKM (fold change)
Ctrl
NTPAM
B
BCPAP
8505C
EGR1 mRNA expression (fold change)
C
Ctrl NTPAM Ctrl NTPAM
EGR1
β-Actin
BCPAP
8505C
D
N T N T N T
EGR1
β-actin
E
BCPAP
8505C
Cell counting (fold change)
Vec
EGR1
EGR1
β-Actin
F
BCPAP
8505C
NC siRNA
EGR1 siRNA

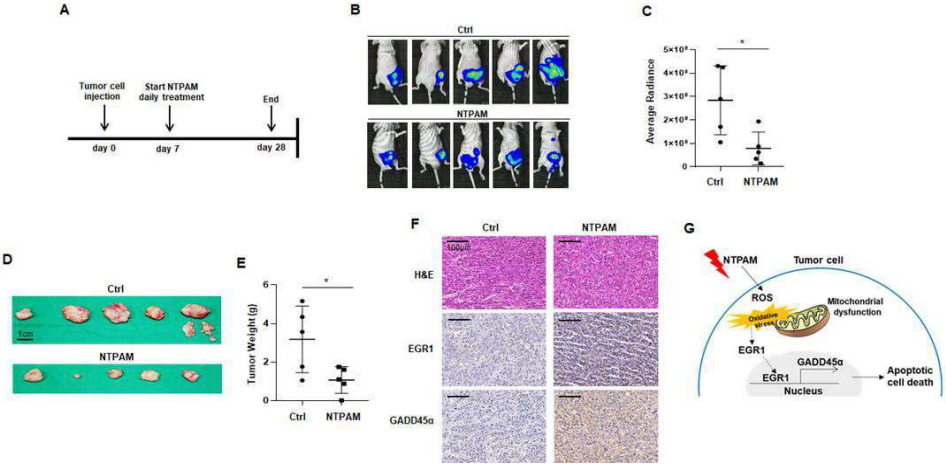
도면5


A
BCPAP
8505C
Mitosox (fold MFI)
Ctrl
NTPAM_5min
NTPAM_15min
NTPAM_30min
NTPAM_60min
B
BCPAP
8505C
Cell proliferation (%)
Ctrl
NTPAM
NTPAM+NAC1mM
NTPAM+NAC5mM
C
NTPAM
NAC : - - 2 5 (mM)
EGR1
PARP
β-Actin
BCPAP
8505C
D
[NTPAM : Media] : 0:5 1:4 1:3 1:2 1:1
EGR1
β-Actin
BCPAP
8505C
E
BCPAP
8505C
Cell viability (%)
Vec
EGR1
Ctrl
NTPAM 1:4
NTPAM 1:3
F
BCPAP
8505C
NC siRNA
EGR1 siRNA

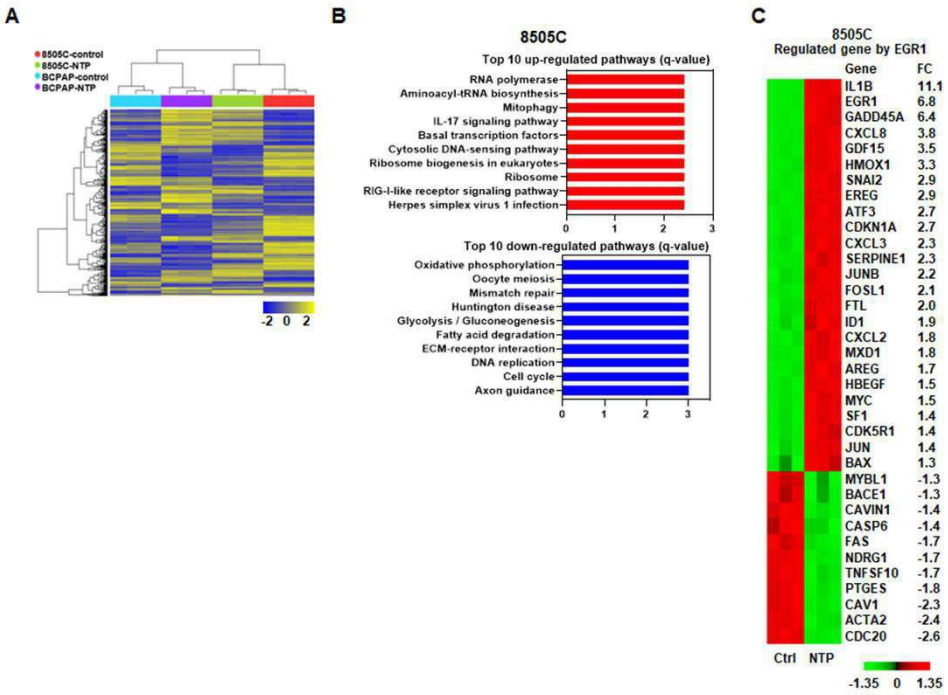
도면6


A
BCPAP
8505C
GADD45α FPKM (fold change)
Ctrl
NTPAM
B
BCPAP
8505C
GADD45α mRNA expression (fold change)
C
NTPAM
GADD45α
β-Actin
BCPAP
8505C
D
NC siRNA
EGR1 siRNA
EGR1
GADD45α
β-Actin
8505C
E
Vector
EGR1
F
8505C
Luciferase assay of GADD45α promoter
WT
MUT
G
8505C
H
8505C
Cell viability (%)
Vector
GADD45α
β-actin
I
8505C
Cell viability (%)
NC siRNA
GADD45α siRNA

도면7


A
Tumor cell injection
Start NTPAM daily treatment
End
day 0
day 7
day 28
B
Ctrl
NTPAM
C
Average Radiance
Ctrl
NTPAM
D
Ctrl
NTPAM
E
Tumor Weight (g)
Ctrl
NTPAM
F
Ctrl
NTPAM
H&E
EGR1
GADD45α
G
NTPAM
Tumor cell
ROS
Mitochondrial dysfunction
EGR1
GADD45α
EGR1
Nucleus
Apoptotic cell death

도면8



서 열 목 록

<110> Chungnam national university Industry-Academic Cooperation Foundation

<120> Non-thermal plasma activation medium for prevention or treatment of thyroid cancer and its manufacturing method

<130> DP20200298

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGR1-F

<400> 1

atgatccccg actacctgtt t 21

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGR1-R

<400> 2

agtggcaaag gccttaat 18

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GADD45a-F

<400> 3

agcagaagac cgaaag 16

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GADD45a-R

<400> 4

gccacatctc tgtcgt 16

<210> 5

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH-F

<400> 5

acccagaaga ctgtggatgg 20

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH-R

<400> 6

tagacggcag gtcagct 17