



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0099486  
(43) 공개일자 2025년07월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/66 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)

A61P 13/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/66 (2013.01)

A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2023-0189256

(22) 출원일자 2023년12월22일

심사청구일자 2023년12월22일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

안효진

서울특별시 강남구 선릉로 8, 221동 504호 (개포동, 래미안블레스티지)

진보람

서울특별시 성북구 화랑로22길 24, 더힐스테이 401호

(74) 대리인

특허법인지담

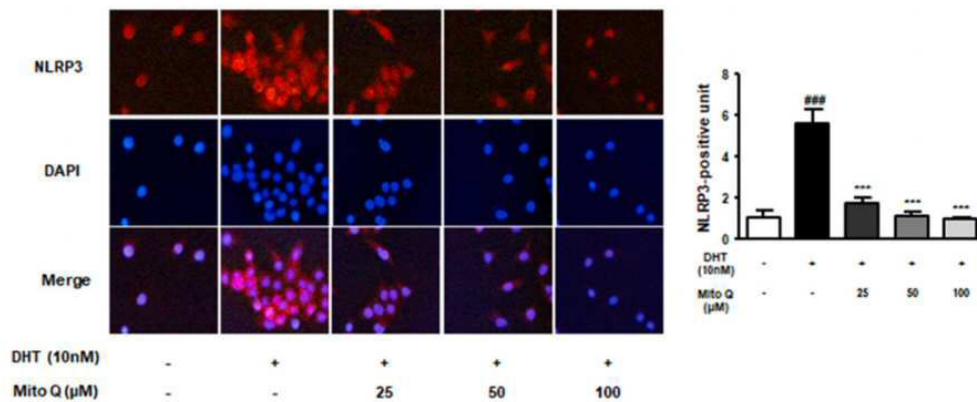
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 전립선 비대증 예방 또는 치료용 약학 조성물

### (57) 요약

본 발명은 전립선 비대증 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것으로, 본 발명은 미토퀴논(mitoquinone)을 유효성분으로 포함하여, AR 및 NLRP3 신호 전달 경로를 억제하여 병리학적 전립선 비대를 완화하고 항증식 및 항산화 효과가 있는 바, 전립선 비대증을 효과적으로 예방, 치료 또는 개선하는 데 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도2a



(52) CPC특허분류

**A61P 13/08** (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465040670

과제번호 HI21C2537010023

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 한의기반융합기술개발

연구과제명 가감내고환 유래 한약제제 HBX-6의 전립선 비대 신규 적응증 임상연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 경희대학교 산학협력단

연구기간 2023.06.01 ~ 2024.05.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

미토퀴논(mitoquinone) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 전립선 비대증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 미토퀴논은 25  $\mu$ M 이상 포함되는 것인, 약학 조성물.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 미토퀴논은 AR(androgen receptor) 및 NLRP3(NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3) 신호 전달 경로를 억제하는 것인, 약학 조성물.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 미토퀴논은 dihydrotestosterone(DHT) 유발 전립선 세포 증식을 억제하는 것인, 약학 조성물.

#### 청구항 5

미토퀴논(mitoquinone) 또는 이의 식품학적으로 허용되는 염을 포함하는 전립선 비대증 예방 또는 개선용 건강 기능식품.

#### 청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 미토퀴논은 25  $\mu$ M 이상 포함되는 것인, 건강기능식품.

#### 청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 미토퀴논은 AR(androgen receptor) 및 NLRP3(NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3) 신호 전달 경로를 억제하는 것인, 건강기능식품.

#### 청구항 8

청구항 5에 있어서, 상기 미토퀴논은 dihydrotestosterone(DHT) 유발 전립선 세포 증식을 억제하는 것인, 건강 기능식품.

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 본 발명은 전립선 비대증 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0003] 전립선은 고환, 정낭과 함께 생식기능을 담당하는 성 부속기관 중의 하나이다. 전립선은 남성 정액의 액체성분 중 약 1/3을 만들어내며, 상기 전립선액은 고환에서 만들어진 정자에 영양을 공급할 뿐만 아니라, 사정된 정액을 고화를 방지하여 정자의 운동성을 증가시킴으로써 정자의 수태능력을 돕는다. 또한, 전립선액은 알칼리성이기 때문에 여성 나팔관의 강산성을 중화시켜 나팔관에 도달한 정자가 무사히 난자와 수정할 수 있도록 돕는 등 정자활동에 중요한 매개체 역할을 한다.

[0004] 양성 전립선 비대증(Benign Prostate Hyperplasia; BPH)은 50대 이상의 남성에게 가장 흔한 질환이며, 하부요로증상을 수반함으로써 삶의 질을 떨어뜨린다. 전립선 비대증 발생의 가장 큰 유발인자로써 연령증가와 남성호르몬의 존재이다. 선천적으로 고환기능부전이 있거나 고환이 제거된 남자들은 전립선 비대증에 걸리지 않는 것으로 미루어, 그 유발인자로서 남성호르몬이 밀접하게 관여하고 있음을 알 수 있다. 그 외에도 인종과 환경, 식생활의 차이 등도 전립선 비대증 발생의 원인이 될 수 있다.

[0005] 전립선 비대증의 증상으로는 소변을 잘 참지 못하고 소변 줄기가 가늘고 힘이 없으며, 요기를 느껴도 한참을 망설이거나, 소변 후에도 느껴지는 잔뇨감 등이 있다. 특히, 야간에는 요기를 자주 느끼게 되어 잠을 설치는 경우가 많다. 이러한 증상은 서서히 오랜 기간에 걸쳐 진행되기 때문에, 단순히 노화의 증상만으로 치부하고 그냥 지나치기 쉽다. 그 결과, 수신증이나 요독증과 같은 심각한 상태로까지 발전되는 경우도 있다.

[0006] 한편, 전립선 비대증의 치료는 약물 요법, 비침습적 시술, 침습적 수술, 대체요법제제 등이 있다. 남성호르몬은 전립선에 있는 남성호르몬 수용체를 통해서 전립선의 성장, 발달 그리고 병적 상태에 깊이 관여한다. 전립선 비대증은 남성 호르몬에 의해 좌우되며 디하이드로테스토스테론(DHT)이 전립선에서 가장 중요한 남성호르몬이기 때문에 전립선 비대증에서도 중요한 역할을 한다. 최근에는 기존의 전립선 비대증과 남성형 탈모를 치료하기 위한 합성약물 치료법의 부작용과 단점을 보완하기 위해 생약요법이 많이 대두되고 있다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 합성 화학 물질에 비해 안전성이 확보된 천연 유래 물질을 대상으로 전립선 비대증에 대한 예방 또는 치료 활성을 갖는 조성물을 개발 하기 위하여 연구를 수행한 결과, 미토퀴논이 전립선 비대증 동물모델에 대해 우수한 예방 또는 치료활성을 가진다는 것을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2007-0099363호.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0010] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 전립선 비대증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 전립선 비대증 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

## 과제의 해결 수단

- [0015] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 일실시예는 미토퀴논(mitoquinone) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 전립선 비대증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 미토퀴논은 25  $\mu$ M 이상 포함되는 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 미토퀴논은 AR(androgen receptor) 및 NLRP3(NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3) 신호 전달 경로를 억제하는 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 미토퀴논은 dihydrotestosterone(DHT) 유발 전립선 세포 증식을 억제하는 것일 수 있다.
- [0019] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 다른 실시예는 미토퀴논(mitoquinone) 또는 이의 식품학적으로 허용되는 염을 포함하는 전립선 비대증 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

## 발명의 효과

- [0021] 본 발명은 전립선 비대증 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것으로, 본 발명은 미토퀴논(mitoquinone)을 유효성분으로 포함하여, AR 및 NLRP3 신호 전달 경로를 억제하여 병리학적 전립선 비대를 완화하고 항증식 및 항산화 효과가 있는 바, 전립선 비대증을 효과적으로 예방, 치료 또는 개선하는 데 유용하게 활용될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

## 도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 DHT로 자극된 RWPE-1 세포에서 MitoQ의 항산화 효과를 확인한 것이다. (1a) MitoQ의 분자 구조. (1b) CCK-8 분석을 통해 측정된 24시간 동안 표시된 농도에서 MitoQ 처리된 RWPE-1 세포의 생존 가능성. (1c) CCK-8 분석을 통해 측정된 24시간 동안 표시된 농도에서 DHT(10nM) 자극 및 MitoQ 하에서 RWPE-1 세포 증식. (1d) MitoQ(25, 50 및 100  $\mu$ M)로 처리된 DHT 자극 RWPE-1 세포에서 8OHdG의 발현. (1e) MitoQ(25, 50 및 100  $\mu$ M)로 처리된 DHT 자극 RWPE-1 세포에서 HO-1 및 GPX-1의 mRNA 발현. 결과는 평균  $\pm$  SD(n = 3)로 표시된다. ###p < 0.001 vs vehicle 그룹; \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs. DHT 자극 그룹. (1f) DHT 자극 MitoQ 처리 RWPE-1 세포(100  $\mu$ M)에서 MitoTracker<sup>TM</sup> 및 MitoSOX<sup>TM</sup> 발현; 0.6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 양성 대조군으로 사용하였다. (1g) MitoQ(25, 50 및 100  $\mu$ M)로 처리된 DHT 자극 RWPE-1 세포에서 카탈라제 및 SOD2 단백질 발현. 결과는 평균  $\pm$  SD(n = 3)로 표시된다. ###p < 0.001 vs vehicle 그룹; \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs. DHT 자극 그룹.
- 도 2는 DHT 자극 RWPE-1 세포에서 NLRP3 신호 전달 경로에 대한 MitoQ의 효과를 나타낸 것이다. (2a) MitoQ(25, 50 및 100  $\mu$ M)로 처리된 DHT 자극 RWPE-1 세포에서의 NLRP3 발현. (2b) MitoQ(25, 50 및 100  $\mu$ M)로 처리된 DHT 자극 RWPE-1 세포에서 NLRP3, PYCARD 및 IL-1 $\beta$ 의 mRNA 발현. 결과는 평균  $\pm$  SD(n = 3)로 표시된다. ###p < 0.001 vs vehicle 그룹; \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs. DHT 자극 그룹. (2c) RWPE-1 세포를 GFP 또는 NLRP3 siRNA로 형질감염시키고 DHT 유무에 관계없이 자극한 다음 NLRP3 siRNA로 형질감염시켰다. NLRP3 및 IL-1 $\beta$ 의 mRNA 발현은 형질감염된 RWPE-1 세포에서 추정되었습니다. ###p < 0.001 vs. GFP 그룹; \*\*\*p < 0.001 vs. DHT 자극 GFP 그룹; \$\$\$p < 0.001 vs. DHT 자극 NLRP3 siRNA 형질감염 그룹. (2d) NLRP3의 NACHT 도메인에 대한 분자 도킹 시뮬레이션은 Autodock Vina v1.1.2를 사용하여 수행되었다. (2e) MitoQ 처리된 RWPE-1 세포의 ATPase 활성을 DHT 자극 하에서 분석하였다. (2f) MitoQ(25, 50 및 100  $\mu$ M)로 처리된 DHT 자극 RWPE-1 세포의 ATP 수준. 결과는 평균  $\pm$  SD(n = 3)로 표시된다. ###p < 0.001 vs vehicle 그룹; \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs. DHT 자극 그룹. (2g) NLRP3 siRNA 또는 AR siRNA로 형질감염된 RWPE-1 세포에서의 NLRP3 및 AR mRNA 발현. ###p < 0.001 GFP 그룹과 비교; 분산 분석에 이어 Dunnett의 사후 테스트가 수행되었다.

도 3은 DHT 자극 RWPE-1 세포에서 AR 의존성 세포 증식에 대한 MitoQ의 억제 효과를 나타낸 것이다. (3a) MitoQ (25, 50 및 100  $\mu$ M)로 처리된 DHT 자극 RWPE-1 세포에서의 AR 단백질 발현. (3b) MitoQ(25, 50 및 100  $\mu$ M)로 처리된 DHT 자극 RWPE-1 세포에서 AR, 5 $\alpha$ -환원효소 및 PSA의 mRNA 수준. (3c) MitoQ(25, 50 및 100  $\mu$ M)로 처리된 DHT 자극 RWPE-1 세포의 PSA 단백질 수준. (3d) DHT 자극 하에서 100  $\mu$ M의 MitoQ 유무에 관계없이 NLRP3 siRNA로 형질 감염된 RWPE-1 세포에서 AR의 mRNA 발현 및 (3e) 100  $\mu$ M의 MitoQ 유무에 관계없이 AR siRNA로 형질 감염된 RWPE-1 세포에서 NLRP3의 mRNA 발현. 결과는 평균  $\pm$  SD(n = 3)로 표시된다. ###p < 0.001 vs. GFP 그룹; \*\*\*p<0.001 vs. DHT 자극 GFP 그룹; \$\$\$p < 0.001 vs. DHT 자극 NLRP3 siRNA 또는 AR siRNA 형질감염 그룹. (3f) AR의 분자 도킹 시뮬레이션은 Autodock Vina v1.1.2를 사용하여 수행되었다.

도 4는 BPH가 있는 쥐의 전립선 세포 증식에 대한 MitoQ의 효과를 나타낸 것이다. (4a) 각 실험 그룹의 대표적인 전립선 사진. (4b) 전립선 중량 대 체중(PW/BW) 비율은 실험이 끝날 때 계산되었다. (4c) PCNA에 대한 H&E 및 IHC 염색은 전립선 조직 절편을 사용하여 수행되었다. 각 그룹의 이미지는 Leica 현미경(원본 배율 = x40)을 사용하여 관찰되었다. (4d) Leica Application Suite 소프트웨어를 사용하여 전립선 조직의 상피 두께를 측정하였다. (4e) PCNA 양성 단위의 정도는 IHC 염색을 기준으로 측정되었다. (4f) qRT-PCR을 이용하여 각 실험군의 전립선 내 PCNA mRNA 수준을 정량화하였다. ###p < 0.001 Con 그룹과 비교; \*\*\*p < 0.001 BPH 그룹과 비교; 분산 분석을 수행한 후 Dunnett의 사후 테스트를 수행하였다.

도 5는 BPH가 있는 쥐의 산화 스트레스에 대한 MitoQ의 효과를 나타낸 것이다. (5a) 8-OHdG의 단백질 발현을 검출하기 위해 IF 분석을 수행하였다. (5b) IF 분석을 기반으로 8-OHdG 양성 단위의 정도를 측정하였다. (5c) MitoQ의 ROS 소거 효과는 ROS 분석을 사용하여 측정되었다. 전립선에서 ROS 양성 세포의 정도가 계산되었다. (5d) HO-1, SOD1 및 PGC1 $\alpha$ 의 mRNA 발현은 qRT-PCR을 사용하여 평가되었다. ###p < 0.001 Con 그룹과 비교; \*\*\*P<0.001 BPH 그룹과 비교; 분산 분석을 수행한 후 Dunnett의 사후 테스트를 수행하였다. (5f) BPH가 있는 쥐에서 카탈라아제와 SOD2의 단백질 발현. 결과는 평균  $\pm$  SD(n = 3)로 표시된다. ###p < 0.001 vs. vehicle 그룹; \*\*\*p<0.001 BPH 그룹과 비교.

도 6은 BPH가 있는 쥐의 NLRP3 신호 전달 경로에 대한 MitoQ의 효과를 나타낸 것이다. (6a) NLRP3 단백질 발현을 검출하기 위해 IF 분석을 수행하였다. (6b) NLRP3 양성 단위는 IF 분석을 기반으로 측정되었다. (6c) PYCARD 및 IL-1 $\beta$ 의 mRNA 발현은 qRT-PCR을 사용하여 평가되었다. (6d) NLRP3, 프로-카스파제 1, 절단된 카스파제 1 및 IL-1 $\beta$ 의 단백질 수준을 웨스턴 블롯팅을 사용하여 측정하였다. (6e) 상대 단백질 수준은  $\beta$  액틴(하우스키핑 유전자)의 수준으로 정규화되었다. ###p < 0.001 Con 그룹과 비교; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 BPH 그룹과 비교; 분산 분석을 수행한 후 Dunnett의 사후 테스트를 수행하였다.

도 7은 BPH가 있는 쥐의 안드로겐/AR 신호 전달 경로에 대한 MitoQ의 효과를 나타낸 것이다. (7a) 각 실험군의 혈청 내 DHT 수준을 ELISA 키트를 사용하여 측정하였다. (7b) 5 $\alpha$ -리덕타제 2 및 (7c) AR 및 SRC-1의 mRNA 수준을 qRT-PCR을 사용하여 정량화하였다. (7d) PSA 단백질 발현은 웨스턴 블랏을 사용하여 평가되었다. ##p < 0.01, ###p < 0.001 Con 그룹과 비교; \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 BPH 그룹과 비교; 분산 분석을 수행한 후 Dunnett의 사후 테스트를 수행하였다. (7e) BPH가 있는 쥐의 테스토스테론 수치. 각 실험군의 혈청 내 테스토스테론 수치는 ELISA 키트를 사용하여 측정되었다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

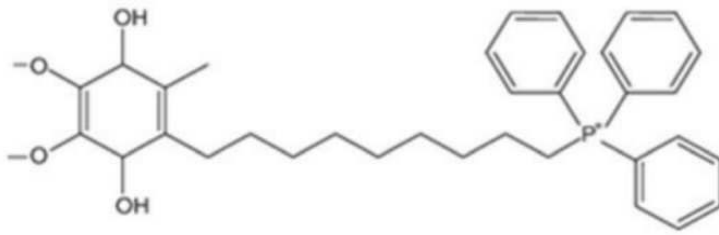
[0026] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0028] 본 발명은 전립선 비대증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0029] 본 발명은 미토퀴논(mitoquinone) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함한다.

[0030] 상기 미토퀴논은 하기 화학식 1로 표현되는 화합물이다(도 1a).

[0031] [화학식 1]



[0032]

[0033] 본원에서 사용된 “약학적으로 허용되는”이라는 용어는 건강한 의학적 판단의 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증이 없으며, 합리적인 이득/위험 비율에 상응하는, 인간의 조직과의 접촉에 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여형을 지칭하기 위한 것이다.

[0034]

상기 “약학적으로 허용되는 염”은 모 화합물이 그의 산 또는 염기 염을 제조함으로써 변형된, 개시된 화합물의 유도체를 의미한다. 예를 들어, 아민과 같은 염기성 잔기의 무기 또는 유기산 염; 카복실산과 같은 산성 잔기의 알칼리 또는 유기 염; 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 예를 들어 무독성 무기 또는 유기 산으로부터 형성된 모 화합물의 통상적인 무독성 염 또는 4 차 암모늄염을 포함할 수 있다. 예를 들어, 그러한 통상적인 무독성 염은 염산, 브롬산, 황산, 질산, 인산, 질산 등과 같은 무기산으로부터 유도된 염; 아세트산, 프로피오닉산, 석시닉산, 글리콜릭산, 스테아릭산, 락틱산, 말산, 타르타릭산, 시트릭산, 아스코빅산, 파모익산, 말레익산, 하이드록시말레익산, 페닐아세트산, 글루탐산, 벤조익산, 살리실산, 설파닐릭산, 2-아세트시벤조익산, 푸마릭산, 톨루엔설포닉산, 메탄설포닉산, 에탄 디설포닉산, 옥살릭산, 이세티오닉산, 등과 같은 유기산으로부터 얻어진 염을 포함할 수 있다.

[0035]

화합물의 약학적으로 허용되는 염은 통상적인 화학적 방법에 의해 염기성 또는 산성 잔기를 함유하는 모 화합물로부터 합성될 수 있다. 일반적으로, 이러한 염은 화합물의 유리산 또는 염기 형태를 물 또는 유기 용매 중 또는 이들의 혼합물 중 화학양론적 양의 적절한 염기 또는 산과 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 일반적으로 에테르, 에틸 아세테이트, 에탄올, 이소프로판올 또는 아세토니트릴과 같은 비수성 매질이 바람직하다. 적합한 염 목록은 Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, p. 1418에 개시되어 있으며, 그 개시 내용은 그 전체가 본원에 참고로 인용되어 있다.

[0036]

또한, 본 발명의 조성물은 미토키논의 약학적으로 허용되는 염 뿐만 아니라 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물 및 수화물을 모두 포함하고, 가능한 모든 입체이성질체도 포함할 수 있다.

[0037]

상기 미토키논은 예를 들어, 25 μM 이상, 50 μM 이상, 또는 100 μM 이상 포함되는 것일 수 있다. 상기 범위로 제한되는 것은 아니나, 조성물 내에 상기 농도로 포함되는 경우, 전립선 세포 증식 억제, 미토콘드리아 ROS 생성 억제를 통해 전립선 비대증 예방, 치료 또는 개선 효과가 극대화 될 수 있다.

[0038]

또한, 상기 미토키논은 AR(androgen receptor) 및 NLRP3(NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3) 신호 전달 경로에 관여하여 AR 및 NLRP3을 하향 조절함으로써, dihydrotestosterone(DHT) 유발 전립선 세포 증식을 억제하는 것일 수 있다.

[0039]

본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 더 포함하며, 이는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040]

본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다. 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 한편, 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 이에 한정되는 것이 아니며 1일 당 0.01-2000 mg/kg(체중)일

수 있다.

- [0041] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 정맥내 주입, 피하주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 적용되는 질환의 종류에 따라, 투여경로가 결정되는 것이 바람직하다.
- [0042] 본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0044] 본 발명은 전립선 비대증 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.
- [0045] 본 발명은 미토퀴논(mitoquinone) 또는 이의 식품학적으로 허용되는 염을 포함한다.
- [0046] 본 발명의 건강기능식품에 포함되는 화합물, 이의 작용기전, 효과에 관하여는 전술한 바와 같다.
- [0047] 본 발명의 건강기능식품은 전립선 비대증의 예방 또는 개선을 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 건강기능식품이라 함은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0049] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0050] 상기 식품 첨가물 공전에 수록된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0051] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 상기 화합물을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.
- [0052] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 상기 화합물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 상기 화합물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0053] 환 형태의 건강기능식품은 상기 화합물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.
- [0054] 과립 형태의 건강기능식품은 상기 화합물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.
- [0055] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.
- [0056] 상기 건강기능식품은 영양제의 용도로 경구 적용될 수 있으며, 적용 형태는 특별히 제한되지 않는다.
- [0058] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

- [0060] **재료 및 방법**
- [0061] 1. 세포 배양 및 시료 처리
- [0062] 정상적인 인간 전립선 상피 세포주인 RWPE-1은 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 입수하였다.
- [0063] RWPE-1 세포를 0.05 mg/mL 소 뇌하수체 추출물, 5 ng/mL 인간 재조합 표피 성장 인자 및 항생제-항진균 용액(Gibco®Big Cabin, OK, USA)이 보충된 각질세포 무혈청 배지에서 배양하였다. 세포는 37℃ 및 5% CO<sub>2</sub>의 습한 환경에서 배양되었다. 자가분비 안드로겐의 효과를 차단하기 위해 세포를 무혈청 배지에서 배양하였다. 생체 내에서 안드로겐에 의해 유도된 BPH를 모방하기 위해, 과증된 세포를 다양한 농도의 MitoQ(25, 50 및 100 μM) 유무 하에 72시간 동안 10nM DHT로 처리하였다.
- [0065] 2. CCK-8 assay
- [0066] 세포 생존율 및 증식은 Cell Counting Kit-8(CCK-8, Dojindo Molecular Technologies, Inc., D.C., USA)을 사용하여 측정하였다. RWPE-1 세포를 96-웰 플레이트(1x10<sup>5</sup> 개 세포/웰)에 시딩하고 24시간 동안 배양하였다. 다음 날 세포를 다양한 농도의 MitoQ(3.125-200 μM) 유무 하에 1시간 동안 전처리한 후 10nM DHT로 24시간 동안 자극하였다. 처리 후 CCK-8 용액을 각 웰에 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 생존 가능한 세포의 수는 Epoch 마이크로플레이트 판독기(Biotek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 모니터링하였다.
- [0068] 3. Immunofluorescence (IF)
- [0069] DHT 및/또는 MitoQ(25, 50 및 100 μM)로 처리한 RWPE-1 세포를 100% 메탄올에 고정하고 10% 정상 염소 혈청(Gibco®)으로 차단한 후 8-OHdG(Cat. sc-66036, Santa Cruz Biotechnology), NLRP3(Cat. No. NBP2-12446, Novus Biologicals) 및 AR(Cat. No. sc-7305)을 하룻밤 동안 처리하였다. 그런 다음 세포를 세척하고 FITC 결합 항마우스 또는 TRITC 결합 항토끼 2차 항체와 함께 배양하였다. 핵은 4',6-diamidino-2-phenylindole(Life Technologies)로 염색되었다. 이미지는 광학 현미경(ECLIPSE Ni-U, Nikon, Tokyo, Japan)을 사용하여 캡처되었다.
- [0070] 탈파라핀화 및 재수화 후, 쥐의 전립선 조직 슬라이드를 항마우스 8-OHdG 항체 또는 항토끼 NLRP3 항체와 함께 배양하고 각각 FITC 결합 항마우스 및 TRITC 결합 항토끼 2차 항체로 시각화하였다.
- [0071] Nikon X-Cite-Series 120 Q 현미경(Nikon, Japan)을 사용하여 슬라이드를 장착하고 감지하였다. 노출 매개변수는 각 샘플에 대해 동일하였다.
- [0073] 4. 미토콘드리아 활동 및 mtROS 수준 평가
- [0074] RWPE-1 세포를 처리 전날 1x10<sup>5</sup> 개 세포/웰의 밀도로 챔버 슬라이드에 플레이팅하였다. RWPE-1 세포를 10nM DHT 및/또는 100 μM MitoQ로 24시간 동안 처리하였다. 형광 염료와 함께 배양하기 전에 RWPE-1 세포를 0.6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 30분간 처리하였다.
- [0075] 미토콘드리아 활성 및 mtROS 수준은 세포를 MitoTracker™ Green FM 및 MitoSOX™ Mitochondrial SuperOxide Indicator(Invitrogen, MA, USA)와 함께 37℃에서 30분간 배양하여 측정하였다. 슬라이드를 장착하고 EVOS M5000 현미경(Invitrogen)을 사용하여 검출하였다.
- [0077] 5. 웨스턴 블롯 분석
- [0078] RWPE-1 세포와 쥐의 전립선 조직에서 총 단백질을 추출하고 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. AR에 대한 항체(Cat. No. sc-7305)는 Santa Cruz Biotechnology, Inc.(TX, USA)에서 구입하였다. Boster Biological Technology(CA, USA)는 전립선 특이 항원(PSA; Cat. No. PB9259)에 대한 항체를 제공하였다. 카스파제-3에 대

한 항체(Cat. No. #9661)는 Cell Signaling Technology에서 구입하였다. Novus Biologicals(CO, USA)는 NLRP3(Cat. No. NBP2-12446)에 대한 항체를 제공하였다. IL-1 $\beta$ 에 대한 항체(Cat. No. 2105)는 Abcam(Cambridge, UK)에서 구입하였다.

## 6. 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR) 분석

Easy-Blue®시약(iNtRON Biotechnology, Inc., 경기도, 한국)을 사용하여 총 RNA를 분리하고 제조사의 지시에 따라 cDNA로 전사시켰다. 올리고뉴클레오타이드 프라이머(표 1)는 Bioneer Corporation(대전, 한국)에서 구입하였다. qRT-PCR은 공지된 방식에 따라 수행되었다.

표 1

| Primer sequences.                             |                          |                           |
|-----------------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Gene name                                     | Sense primers            | Anti-sense primers        |
| Human <i>HO-1</i>                             | GAGGCCAAGACTGCGTTCC      | GGTGTTCATGGGTGAGCAGC      |
| Human <i>GPX-1</i>                            | AGTCGGTGTATGCCTTCTCG     | CGATGTCAGGCTCGATGTCA      |
| Human <i>NLRP3</i>                            | GGAGAGACCTTTATGAGAAAGCAA | GCTGTCTTCCTGGCATATCACA    |
| Human <i>PYCARD</i>                           | TGACGGATGAGCAGTACCAG     | GCTTCCGCATCTTGCTTGG       |
| Human <i>IL-1<math>\beta</math></i>           | TGGACCTCTGCCCTCTGGAT     | GGCAGGAACCCAGCATCTTC      |
| Human <i>AR</i>                               | GAGCCAGGTGTAGTGTGTC      | TCGTCCACGTGTAAGTTGCG      |
| Human <i>5<math>\alpha</math>-reductase 2</i> | GGGCTTTCCGAGATTTGGGG     | CCCTCCAGCACTTGCATTT       |
| Human <i>PSA</i>                              | ATAGGATTGCCAGGCAGAA      | CTAAGGGTAAAAGCAGGGAGAGAGT |
| Human <i><math>\beta</math>-actin</i>         | GGCCAGGTCATCACCATTGG     | CTTTGCGGATGTCCACGTCA      |
| Rat <i>PCNA</i>                               | GATCGCAGCGGTATGTGTCG     | CTGCTGGGACATCAGTTCGG      |
| Rat <i>HO-1</i>                               | GCGAAACAAGCAGAACCCAG     | GCCTCTGGCGAAGAACTCT       |
| Rat <i>SOD-1</i>                              | TTTGCACCTTCGTTTCCTGC     | TCCCAATCACACCACAAGCC      |
| Rat <i>PGC1<math>\alpha</math></i>            | CATGCAAAACCACCCACAG      | TGAGCACTGAGGACTTGCTG      |
| Rat <i>PYCARD</i>                             | CCATCCTGGACGCTCTTGAA     | GGTCTGTACCAAGTAGGGC       |
| Rat <i>IL-1<math>\beta</math></i>             | TGTGATGAAAGACGGCACAC     | TGTGCAGACTCAAACCTCCAC     |
| Rat <i>5<math>\alpha</math>-reductase 2</i>   | GGCAGCTACCAACTGTGACC     | CTCCGACGACACTCTCT         |
| Rat <i>AR</i>                                 | AGCTACCAAGCTCCTGGAT      | AAGGGAACAAGGTGGGTTTG      |
| Rat <i>SRC-1</i>                              | GAACCCACCTGCTTCTACC      | GACATTCTGCTGCATCTGCG      |
| Rat <i>GAPDH</i>                              | TGATTCTACCCACGGCAAGT     | AGCATCACCCATTTGATGT       |

## 7. siRNA의 형질감염

RWPE-1 세포를 4D-Nucleofector™ 시스템(Lonza, Basel, Switzerland)을 사용하여 siRNA(Bioneer Corporation) 또는 pmaxGFP™ 벡터로 형질감염시켰다. 다음 siRNA 뉴클레오타이드 서열이 사용되었다: NLRP3 siRNA, CGUGACAGUCCUUCUGGAA=tt(1-AS) 및 UUCGAGAAGACUGUCACG=tt(1-AA) 및 AR siRNA, CUCUCUUCACAGCCGAAGA=tt(6-AS)(전방) 및 UCUUCGCGUGAGAAGAGAG=tt(6-AA)(역). 4시간 동안 배양한 후, 세포를 MitoQ 100  $\mu$ M 존재 또는 부재하에 처리하였다. NLRP3 또는 AR 녹다운의 효과는 qRT-PCR을 사용하여 감지되었다.

## 8. 도킹 시뮬레이션

NLRP3의 NACHT 도메인의 결정 구조가 최근에 확인되었다. 구조는 Protein Data Bank(PDB ID: 7ALV)에서 다운로드되었다. 이 구조에는 강력한 디아릴설폰아미드 억제제인 RM5(PubChem CID: 10195003)가 포함되어 있다. AR(PDB ID: 2AMA)의 경우 DHT가 결합된 결정구조를 사용하였다. 도킹 시뮬레이션을 위한 검색 공간의 좌표와 크기는 NACHT 도메인의 RM5의 3차원 좌표 범위와 AR의 DHT 바인딩 사이트를 기반으로 결정되었다. 테스토스테론, DHT, MitoQ 및 RM5에 대해 AutoDock Vina v1.1.2를 사용하여 도킹 시뮬레이션을 수행하였다. 각 리간드의 결합 친화도는 최상의 결합 모드를 기반으로 예측되었으며 해당 결합 에너지는 kcal/mol로 계산되었다. 결합 에너지가 낮을수록 결합 친화력이 크다는 것을 나타낸다.

- [0090] 9. ATPase 분석
- [0091] RWPE-1 세포를  $1 \times 10^5$  개 세포/웰의 밀도로 접시에 파종하고, 다음날 무혈청 배지를 교체하였다. RWPE-1 세포를 10nM DHT 및/또는 MitoQ(25, 50 및 100  $\mu$ M)로 24시간 동안 처리하였다. ATPase 활성은 시판되는 키트(Abcam, MA, USA)를 사용하여 측정되었다. 제조사의 지시에 따라 세포를 ATPase 분석 완충액에서 균질화하고 4°C에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 사용하였다. 황산암모늄 용액(Thermo Fisher, MA, USA)을 사용하여 세포 용해물 중의 인산염을 제거하였다. 반응 혼합물과 ATPase 분석 현상액을 샘플에 첨가하고 Epoch 마이크로플레이트 분광광도계(BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 650nm에서 ATPase 활성을 측정하였다.
- [0093] 10. ATP 결정 분석
- [0094] RWPE-1 세포를 접시에  $1 \times 10^5$  개 세포/웰의 밀도로 접종하고 10nM DHT 및/또는 MitoQ(25, 50 및 100  $\mu$ M)로 24시간 동안 처리하였다. ATP 수준은 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay 키트(Promega, WI, USA)를 사용하여 결정되었다. ATP 이나트륨 염(Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA)을 사용하여 ATP 표준 곡선을 생성하였다.
- [0095] CellTiter-Glo® 시약을 샘플에 첨가하고 Epoch 마이크로플레이트 분광광도계(BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 발광성을 측정하였다.
- [0097] 11. 실험 동물 및 시료 처리
- [0098] 6주령 수컷 Sprague-Dawley 쥐( $n = 40$ ;  $200 \pm 20$  g)는 대한바이오링크(대전, 한국)에서 구입하였다. 동물은 우리당 4마리씩 무작위로 배정되었으며, 국립보건원이 정한 요건에 따라 상지대학교가 채택하고 공포한 실험동물의 관리 및 사용에 관한 지침에 따라 사육되었다. 모든 실험 프로토콜은 연구 시작 전에 상지대학교 동물보호사용위원회(IACUC)의 승인을 받았다(IACUC 동물 승인 프로토콜 #2018-18). 실험을 시작하기 전, 쥐를 1주일 동안 실험실 환경에 적응시켰다. 간략하게, 쥐를 무작위로 5개 그룹(그룹당  $n = 8$ )으로 나누었다: 그룹 1, 대조군(Con, 비히클이 포함된 정상 전립선: 100  $\mu$ L 옥수수유, sc); 그룹 2, BPH 유발 쥐(BPH, 옥수수유에 용해된 10mg/kg 테스토스테론 프로피오네이트); 그룹 3, Saw palmetto, 100 mg/kg/day, p.o.로 치료된 BPH 유발 쥐(Saw); 그룹 4, MitoQ, 5mg/kg/일, p.o.로 치료된 BPH 유발 쥐(Mito 5); 그룹 5, MitoQ, 25mg/kg/일, p.o.로 치료된 BPH 유발 쥐(Mito 25). 내인성 테스토스테론의 영향을 제거하기 위해 BPH 유발 그룹의 모든 쥐는 테스토스테론 프로피오네이트 투여 7일 전에 양측 고환 절제술을 시행하였다.
- [0099] 대조군의 쥐는 zoletil 50(복강내 주사, 10 mg/kg)을 사용하여 마취 후 고환을 제거하지 않고 절개하여 봉합하였다. 1주의 회복 기간 후, BPH 유발 그룹의 쥐에게 주말을 제외하고 4주 동안 테스토스테론 프로피오네이트 10mg/kg/일을 단독으로 또는 MitoQ 또는 Saw와 함께 피하 주사하였다. 최종 투여 24시간 후, 모든 쥐를 zoletil 50(i.p., 20mg/kg)으로 마취한 후 안락사시켰다. 심장 천자를 통해 혈액 샘플을 채취하고, 원심분리를 통해 혈청을 채취하여 -80°C에 보관하였다.
- [0101] 12. 조직학적 분석
- [0102] 각 그룹의 전립선 조직을 4% 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매하였다. 조직을 4  $\mu$ m 섹션으로 절단하였다. 조직학적 검사를 위해 절편을 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하였다. 이미지는 Leica DFC 295 현미경(Leica, Wetzlar, Germany)을 사용하여 획득하였다. 전립선 조직의 상피 두께는 Leica Application Suite 소프트웨어(LAS 버전 3.3.0, Leica Microsystems, Inc., Buffalo Grove, IL, USA)를 사용하여 측정되었다.
- [0104] 13. 면역조직화학(IHC)
- [0105] IHC는 포르말린 고정 파라핀 포매 샘플을 사용하여 수행되었다. 파라핀 블록을 4  $\mu$ m 두께의 섹션으로 절단하고 폴리 L-라이신 코팅 슬라이드 위에 올려 놓고 건조하였다. 건조된 슬라이드를 탈파라핀화한 후, 에틸렌디아민테

트라이아세트산(pH 9.0)을 사용하여 자동화 항원 회수기를 이용하여 20분간 항원 회수를 수행하였다. 절편에 대한 비특이적 결합은 22~25℃에서 2시간 동안 또는 4℃에서 하룻밤동안 적절한 일차 항체와 함께 배양하기 전에 15~20% 정상 염소 혈청(Gibco Life Technologies, NY, USA)에서 1시간 동안 배양하여 차단하였다. 2차 토끼 항체를 사용하여 1차 항체를 검출한 후 스트렙타비딘 태그가 붙은 양 고추냉이 퍼옥시다제(Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA)를 사용하여 검출하였다. 신호전달을 유도하기 위해 Diaminobenzidine(Sigma-Aldrich)을 사용하였고 대조염색제로 블루잉 시약(Ventana Medical Systems)을 사용하였다. IHC 슬라이드는 광학 현미경(Leica)을 사용하여 시각화되었고 Leica 소프트웨어를 사용하여 렌더링되었다. PCNA(Cat. No. sc-56)에 대한 항체의 IHC 염색이 수행되었다.

#### [0107] 14. ROS 분석

수컷 쥐를 안락사시킨 후 전립선 조직을 절제하였다. 유형 I 콜라게나제(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)로 처리하여 세포를 분리하였다. 일차 전립선 조직의 단일 세포를 Muse® Oxidative Stress Reagent 작업 용액과 혼합하였다. 세포를 37℃에서 30분 동안 배양한 후 Muse®세포 분석기(Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하여 검출하였다.

#### [0110] 15. DHT 및 테스토스테론 측정

DHT와 테스토스테론의 혈청 수준은 상용 ELISA 키트(Cusabio, TX, USA)를 사용하여 정량화되었다. 분석은 제조업체의 지침에 따라 수행되었다.

#### [0113] 16. 통계 분석

실험은 3회 반복 수행되었으며 결과는 평균±표준편차(SD)로 표시하였다. 통계적으로 유의미한 값은 분산 분석과 Dunnett's post hoc test 를 사용하여 결정되었다. 통계적 유의성은  $p < 0.05$ 로 설정되었다. GraphPad Prism 5를 사용하여 통계 분석을 수행하였다.

### [0116] 결과

1. MitoQ는 전립선 세포 증식을 억제하고 DHT 자극 RWPE-1 세포의 산화 스트레스를 억제한다.

BPH는 전립선 세포의 비정상적인 증식에 기초하므로 전립선 세포의 증식을 조절하는 것이 BPH에 효과적인 것으로 간주된다. RWPE-1 세포 증식은 25  $\mu\text{M}$  이상의 MitoQ 농도에 의해 억제되었다(도 1b). DHT 자극 하에서 RWPE-1 세포는 증식이 증가한 것으로 나타났으며 이는 6.25  $\mu\text{M}$  이상의 MitoQ로 처리하면 크게 억제되었다(도 1c). MitoQ의 항증식 효과는 25, 50 및 100  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 평가되었다. 다음으로, DHT로 자극된 RWPE-1 세포에서 산화적 스트레스의 지표인 8OHdG의 과발현이 관찰되었는데, 이는 MitoQ 처리로 현저하게 억제되었다(도 1d). 또한 HO-1과 GPX-1의 mRNA 수준은 비히클 그룹에 비해 DHT 그룹에서 유의하게 낮았다.

MitoQ 처리는 이러한 수준을 표준화했으며, 100  $\mu\text{M}$  MitoQ는 HO-1 및 GPX-1의 mRNA 수준을 크게 증가시켜 DHT로 자극된 전립선 세포에서 항산화 효과를 시사한다(도 1e). DHT 자극은 또한 RWPE-1 세포에서  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 통해 mtROS의 과잉 생산을 유도했는데, 이는 MitoQ 처리가 억제하였다(도 1f). mtROS에 의해 생성된 산화 스트레스를 조절하기 위해 미토콘드리아는 ROS 제거 시스템을 작동한다. 여기서 SOD(과산화물 제거효소)는 초과산화물 라디칼을  $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 변환하고 이는 카탈라아제에 의해 추가로 해독된다.

도 1g에서 볼 수 있듯이 MitoQ 처리는 DHT로 자극된 RWPE-1 세포에서 SOD2와 카탈라아제 단백질 발현을 크게 증가시켜 안드로겐으로 자극된 전립선 세포의 mtROS에 항산화 효과를 나타냈다.

2. MitoQ는 DHT로 자극된 RWPE-1 세포에서 NLRP3를 억제하여 항산화 효과를 발휘한다.

NLRP3 인플라마솜(inflammasome)은 전립선 세포 증식의 MitoQ 억제에 기초가 되는 신호 전달 경로를 밝히기 위

해 연구되었다.

[0124] MitoQ는 NLRP3 인플라마솜을 억제하여 mtROS를 억제하므로 DHT로 자극된 RWPE-1 세포에서 NLRP3 발현을 억제하는 것으로 가정되었다. NLRP3 단백질 발현은 RWPE-1 세포의 DHT 자극 하에서 증가한 반면, MitoQ는 이를 유의하게 억제하였다(도 2a). 또한, NLRP3, PYCARD 및 IL-1 $\beta$ 의 mRNA 발현은 DHT로 자극된 RWPE-1 세포에서 유의하게 증가한 반면, MitoQ 처리에서는 유의하게 감소하였다(도 2b). NLRP3 신호전달에 대한 MitoQ의 효과를 명확히 하기 위해 RWPE-1 세포를 NLRP3 siRNA로 형질감염시킨 다음 DHT로 자극하였다. RWPE-1 세포에서 NLRP3 mRNA 발현의 현저한 감소는 NLRP3 siRNA를 사용하여 확인되었다(도 2g). 녹색 형광 단백질(GFP)이 형질감염된 세포에서 DHT 자극은 NLRP3 및 IL-1 $\beta$  수준을 크게 증가시켰다. 대조적으로, NLRP3 siRNA 형질감염은 그 수준을 현저하게 억제하고 RWPE-1 세포에 대한 MitoQ의 효과를 중화시켰다(도 2c). 도 2d에 표시된 것처럼 MitoQ가 NLRP3의 NACHT 도메인에 직접 결합할 수 있는지 여부를 검증하기 위해 분자 도킹 시뮬레이션을 수행하였다. MitoQ, 테스토스테론, DHT 및 최근 확인된 억제제인 RM5가 NACHT 도메인에 도킹되었다. MitoQ는 -9.1kcal/mol의 친화력 값을 나타냈고, 테스토스테론과 DHT는 더 높은 결합 에너지 값(각각 -8.1 및 -8.4kcal/mol)을 나타냈다. 또한 RM5는 -9.0 kcal/mol의 더 높은 결합 에너지를 나타냈다. 4개의 리간드 중에서 MitoQ는 가장 강한 결합 리간드(가장 낮은 결합 에너지 = -9.1 kcal/mol)로 예측되었다. NACHT 도메인에 대한 RM5의 3D 결합 구조는 X선 결정학을 사용하여 결정되었으므로 도킹 시뮬레이션을 통해 예측된 MitoQ의 더 나은 결합 친화력은 MitoQ가 NLRP3의 NACHT 도메인에 대한 강력한 결합 리간드이기도 함을 의미한다.

[0125] ATPase 활성은 NLRP3 인플라마솜 활성화에 관여하기 때문에 DHT로 자극된 RWPE-1 세포에서 ATPase 활성에 대한 MitoQ의 억제 효과가 추정되었다(도 2e). ATPase 활성은 Vehicle 그룹보다 DHT 그룹에서 유의하게 높았으나 MitoQ 처리는 ATPase 특이적 활성을 유의하게 억제하였다. 또한 DHT로 자극된 RWPE-1 세포의 ATP 수준을 분석하였다.

[0126] DHT 자극은 ATP 수준을 크게 증가시키는 반면, MitoQ 처리는 용량 의존적으로 ATP 수준을 크게 감소시켰다(도 2f).

[0128] 3. MitoQ는 DHT 자극 RWPE-1 세포에서 AR 신호 전달 경로를 억제한다.

[0129] BPH는 전립선 세포의 안드로겐 의존성 비정상 증식을 기반으로 하기 때문에 안드로겐/AR 신호 전달을 조절하는 것이 BPH에 효과적인 것으로 간주된다. 도 3a에서 볼 수 있듯이 DHT 자극은 RWPE-1 세포에서 AR 과발현을 유도했으며 이는 MitoQ 처리에 의해 명확하게 억제되었다. 또한 AR, 5 $\alpha$ -reductase 2 및 PSA의 mRNA 수준은 DHT 자극 그룹에서 유의하게 증가한 반면 MitoQ 처리는 이를 현저하게 억제하였다(도 3b). DHT 자극은 또한 PSA 단백질 발현을 증가시켰는데, 이는 MitoQ에 의해 상당히 억제되었다(도 3c). AR은 테스토스테론에 의해 유발된 NLRP3 염증복합체 활성화 및 산화 스트레스에 기여한다. DHT 자극 전립선 세포에 대한 MitoQ의 효과에 대한 NLRP3 및 AR 신호 전달의 기여도를 siRNA를 사용하여 추가로 평가하였다. 도 3d에 도시된 바와 같이, DHT 자극은 GFP로 형질감염된 세포에서 AR 수준을 유의하게 증가시켰다. 흥미롭게도 NLRP3 siRNA transfection은 DHT 자극 하에서 AR 수준을 크게 증가시켰으며 이는 MitoQ 처리에 의해 현저하게 하향 조절되었다. 더욱이, DHT 자극은 GFP로 형질감염된 세포에서 NLRP3 수준을 유의하게 증가시켰다. AR siRNA transfection은 또한 NLRP3 수준을 크게 증가시키는 반면 MitoQ 처리는 이를 크게 억제하였다(도 3e). 이러한 결과는 DHT가 AR 및 NLRP3과 결합하여 이들의 발현을 증가시킬 수 있으며 MitoQ가 AR 및 NLRP3 모두의 억제제로 작용한다는 것을 시사한다. 다음으로, 분자 도킹을 통해 MitoQ와 AR의 직접 결합을 조사하였다. 도킹은 DHT 결합 AR 구조를 사용하여 수행되었다. 리간드의 도킹 친화도 값을 비교하기 위해 이 구조에 이미 결합된 DHT를 제거한 다음 다시 도킹하였다. DHT는 X선 결정학에서 나타난 모양과 매우 유사한 동일한 결합 부위에 도킹되었으며 -10.42 kcal/mol의 친화도 값을 나타냈다. 테스토스테론과 MitoQ는 결합 부위에 결합하는 것으로 확인되었으며 도킹 시뮬레이션에서 예측된 친화도 값은 각각 -9.94 및 -9.39 kcal/mol이었다(도 3f). 예측된 MitoQ 결합은 테스토스테론과 DHT의 결합보다 강하지 않았지만 DHT와 MitoQ 값의 차이가 매우 작았기 때문에(~1kcal/mol) AR에 결합하는 것처럼 보였다.

[0131] 4. MitoQ는 BPH가 있는 쥐의 전립선 비대 및 전립선 세포 증식을 완화한다.

[0132] 시험관 내에서 DHT 의존성 전립선 세포 증식에 대한 MitoQ의 억제 효과를 고려하여 테스토스테론 유발 BPH 쥐 모델에서 치료 효과를 평가하였다. 테스토스테론 주사로 인해 전립선이 비대해졌다. 매우 효과적인 항안드로겐인 Saw가 우리 실험 시스템에서 양성 대조군으로 사용되었다. MitoQ 5mg/kg과 25mg/kg을 투여하면 양성 대조군

에서 전립선 크기가 감소하였다(도 4a). BPH가 있는 쥐는 전립선 무게가 증가한 반면 Mito와 Saw 그룹의 쥐는 전립선 무게가 크게 감소한 것으로 나타났다(도 4b). 조직학적 분석에서는 두꺼워진 상피를 포함하여 BPH 그룹에서 증식성 패턴을 보인 반면, Saw와 MitoQ를 투여하면 조직학적 변화가 회복되고 두꺼워진 상피가 크게 감소하였다(도 4c 및 4d). 또한 MitoQ가 세포 증식 표지자 PCNA에 미치는 영향을 분석하였다. BPH 그룹은 Con 그룹과 비교하여 PCNA 단백질과 mRNA가 유의하게 과발현된 반면, Saw와 MitoQ의 투여는 이러한 과발현을 명확하게 억제하였다(도 4c, 4e, 4f). 특히 MitoQ 25의 세포 증식 억제 효과는 Saw에 비해 우수하였다.

[0134] 5. MitoQ는 BPH가 있는 쥐에게 항산화 효과를 나타낸다.

[0135] 초기 연구에서는 안드로겐 박탈 요법이 산화 스트레스를 감소시킬 수 있음이 입증되었다. 따라서 테스토스테론 유발 BPH 쥐 모델의 전립선 조직에서 산화 스트레스의 지표인 8-OHdG의 발현을 조사하였다. BPH 그룹의 8-OHdG 양성 염색 강도는 Con 그룹보다 유의하게 높았다. 대조적으로, 이 강도는 BPH 그룹보다 MitoQ 처리 그룹에서 상당히 낮았다(도 5a 및 5b). 테스토스테론 유발 BPH 쥐 모델에서 MitoQ가 항산화 효과를 발휘하는지 확인하기 위해 ROS 생성 정도와 전립선 조직의 항산화 효소 수준을 평가하였다.

[0136] 도 5c에 나타난 바와 같이, BPH 군에서는 Con 군에 비해 BPH 군에서 세포 내 ROS 생성이 유도된 반면, MitoQ 투여는 용량 의존적으로 ROS 생성을 유의하게 억제하였다. 또한 Con 그룹에 비해 BPH 그룹에서는 HO-1, SOD1 및 PGC1 $\alpha$ 의 mRNA 수준이 더 낮았다. 대조적으로, 이러한 수준은 MitoQ 투여에 의해 상향 조절되었지만 Saw에서는 상향 조절되지 않았다(도 5d). 도 5e에 도시된 바와 같이, BPH 그룹의 카탈라아제 및 SOD2의 발현은 Con 그룹에 비해 현저히 낮았다. 대조적으로, 이러한 발현은 BPH 그룹보다 MitoQ 처리 그룹에서 유의하게 더 높았다.

[0138] 6. MitoQ는 BPH가 있는 쥐의 NLRP3 신호 전달 경로를 억제한다.

[0139] 다음으로, BPH가 있는 쥐의 전립선 조직에서 NLRP3 인플라마솜의 관련성을 분석하였다. BPH는 NLRP3의 발현을 상향조절했는데, 이는 MitoQ 처리에 의해 역전되었다(도 6a 및 6b).

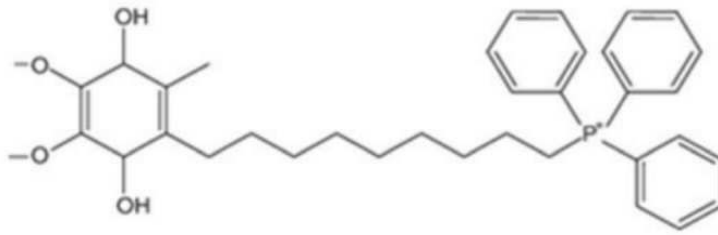
[0140] 도 6c는 또한 BPH에 의해 유도된 PYCARD 및 IL-1 $\beta$ 의 증가된 mRNA 수준이 MitoQ 투여에 의해 억제되었음을 보여준다. 도 6d 및 6e에 도시된 바와 같이, BPH 유도는 Con 그룹에 비해 NLRP3, 프로카스파제 1, 절단된 카스파제 1 및 IL-1 $\beta$ 의 단백질 발현을 증가시켰다. 그러나 MitoQ 처리는 이들 단백질의 과발현을 억제하였다. 이러한 결과는 NLRP3 신호 전달 경로의 조절을 통해 BPH에서 MitoQ의 보호 효과를 강력하게 뒷받침한다.

[0142] 7. MitoQ는 BPH가 있는 쥐에서 안드로겐 관련 마커의 발현을 억제한다.

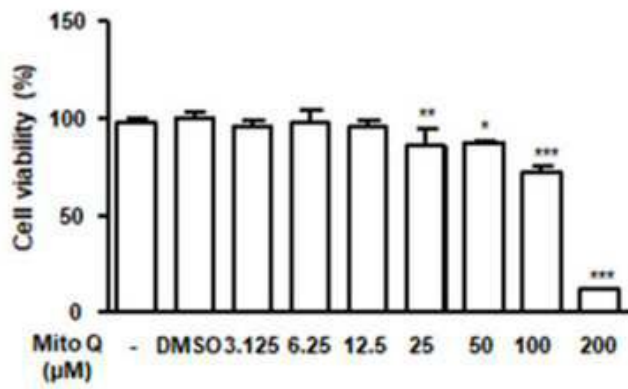
[0143] MitoQ 처리가 AR 및 5 $\alpha$ -환원효소 수준을 억제한 시험관 내 결과를 고려하여, BPH가 있는 쥐에서 안드로겐 신호 전달에 대한 억제 효과가 조사되었다. 도 7a에서 볼 수 있듯이 BPH 유도는 DHT 생산을 증가시키는 반면 MitoQ와 Saw 투여는 과잉 생산을 크게 억제하였다. 또한 BPH 유도는 순환 테스토스테론 수치를 크게 증가시켰으며, 이는 25mg/kg MitoQ가 크게 감소시켰다. 톱 투여로 BPH 쥐의 혈청 테스토스테론 수치가 증가하였다(도 7e). 도 7b 및 7c에서 볼 수 있듯이 Saw와 MitoQ 투여는 BPH 유도에 의해 강화된 5 $\alpha$ -reductase 2, AR 및 SRC-1의 mRNA 수준을 하향 조절하였다. 전립선 질환 진단용 바이오마커인 PSA의 단백질 발현은 BPH군에서 증가하였고, Saw와 MitoQ에서는 감소하였다(도 7d). 이러한 발견은 MitoQ가 안드로겐 신호 전달을 통해 BPH 진행을 억제한다는 것을 시사한다.

도면

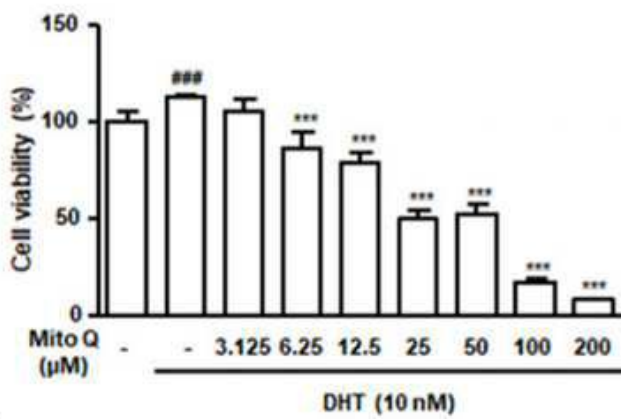
도면1a



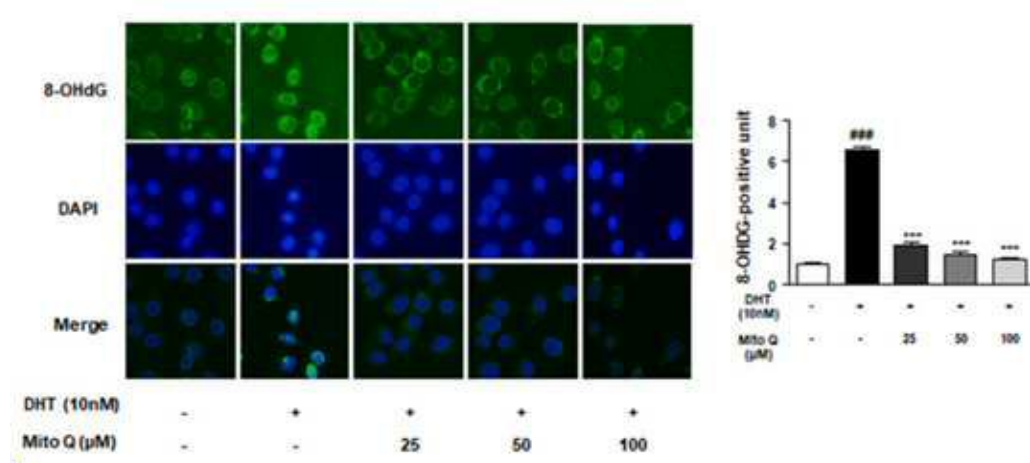
도면1b



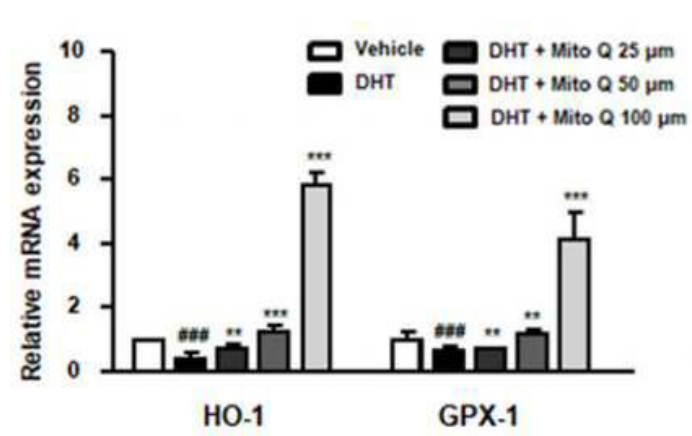
도면1c



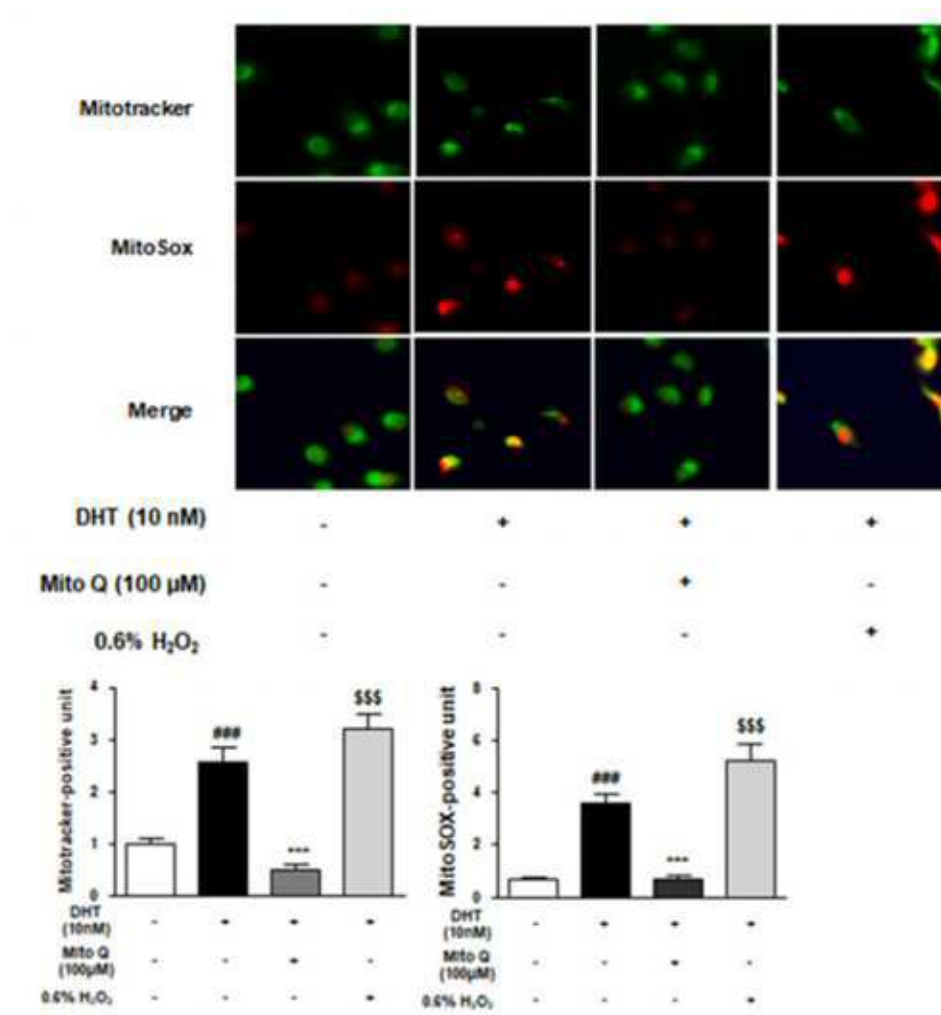
도면1d



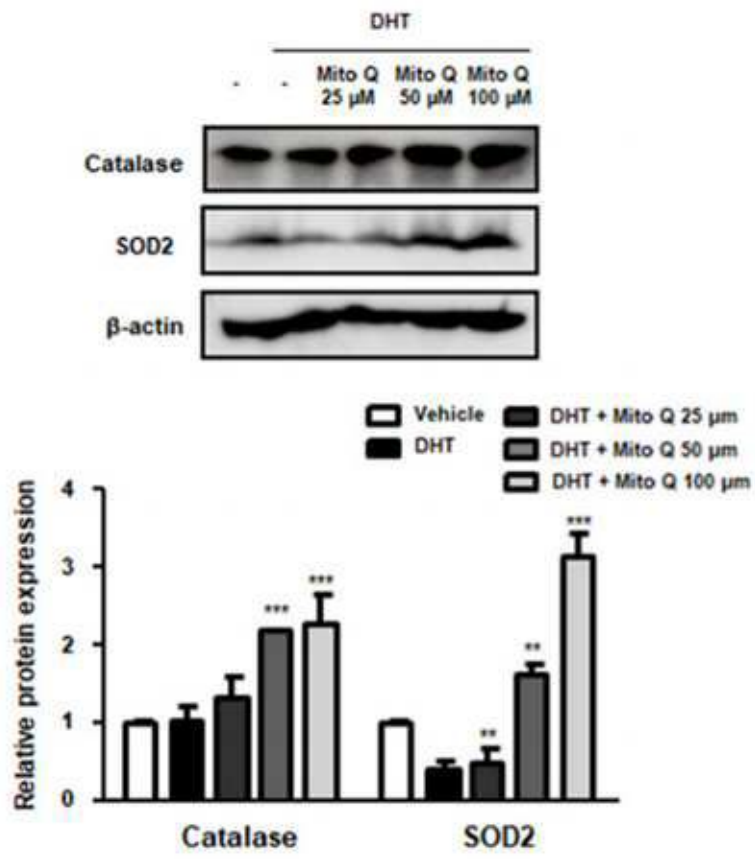
도면1e



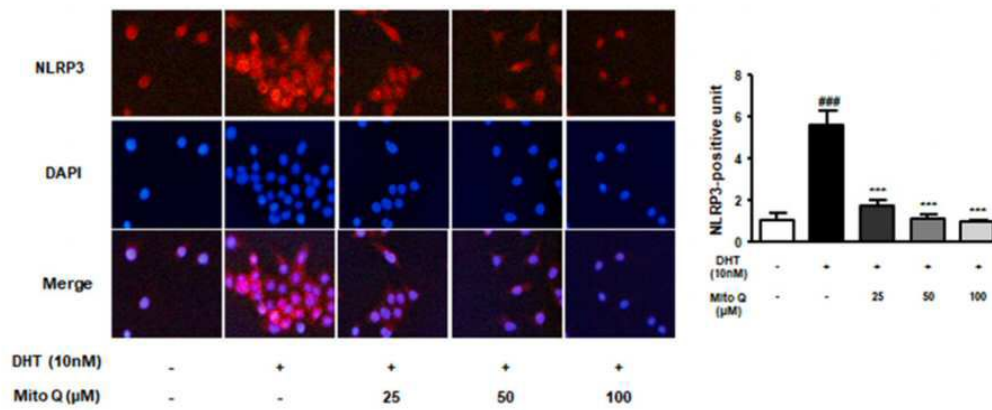
도면1f



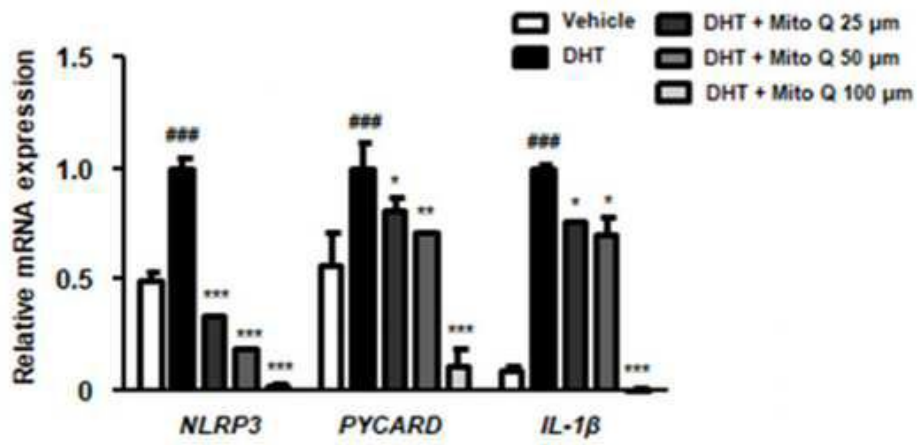
도면1g



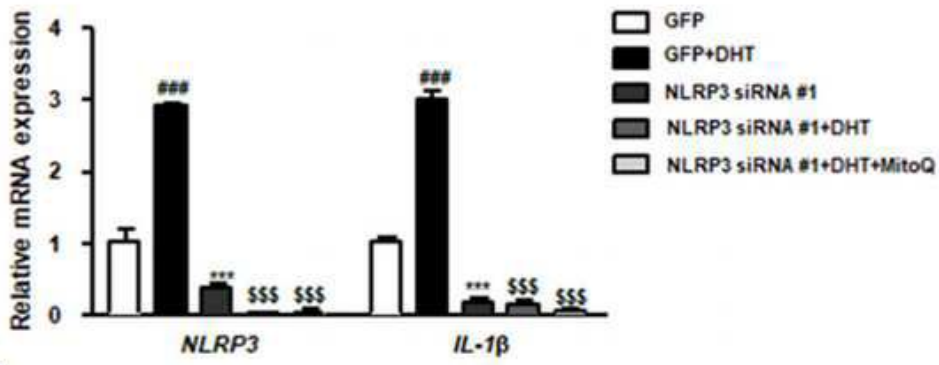
도면2a



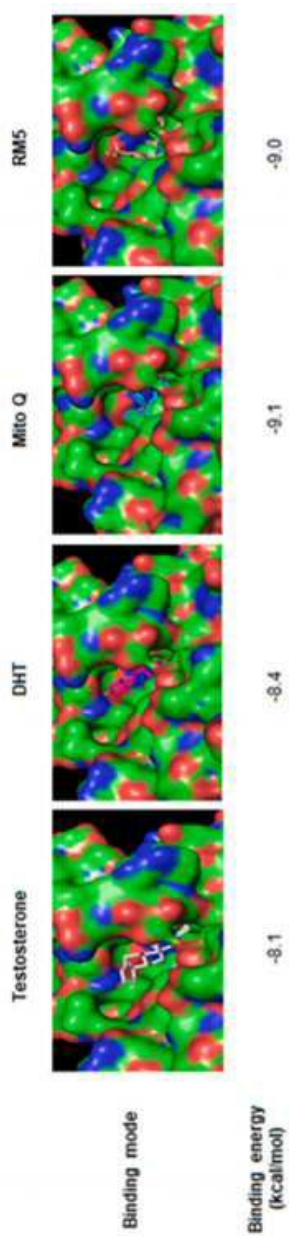
도면2b



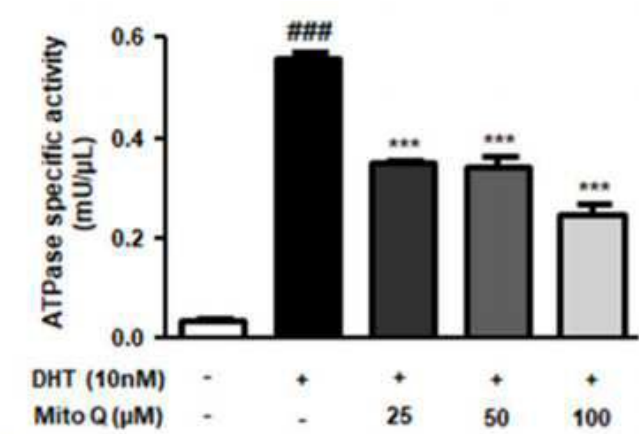
도면2c



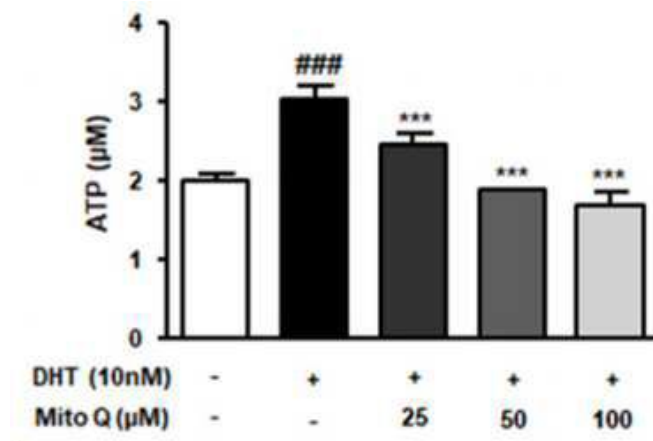
도면2d



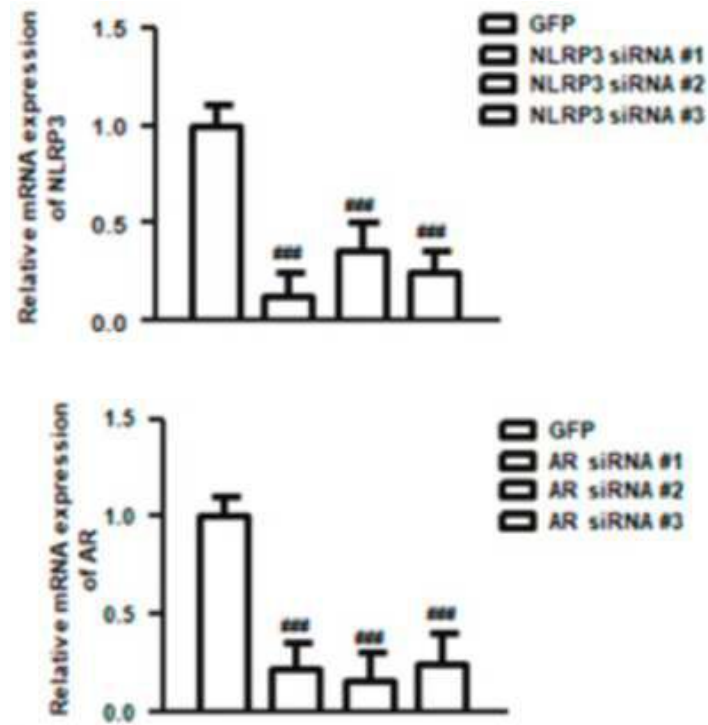
도면2e



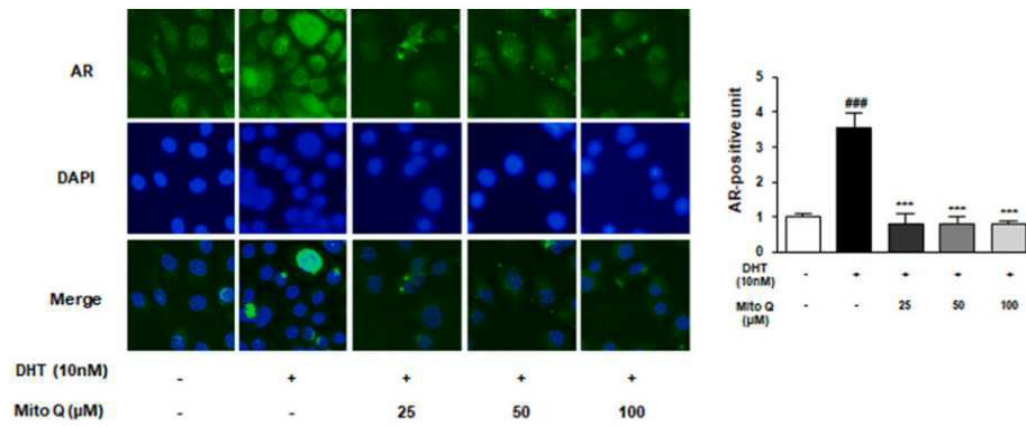
도면2f



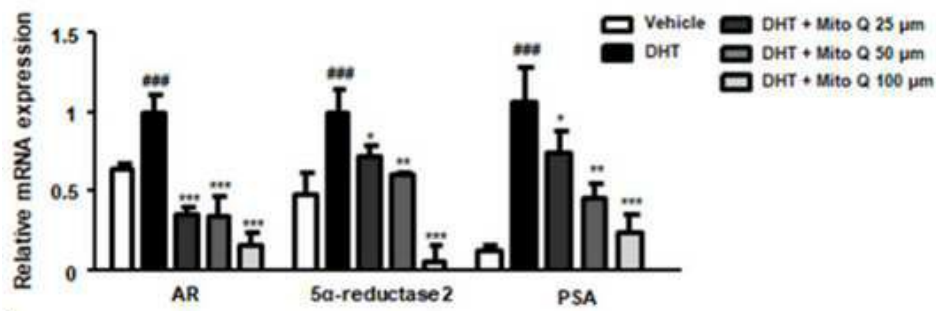
도면2g



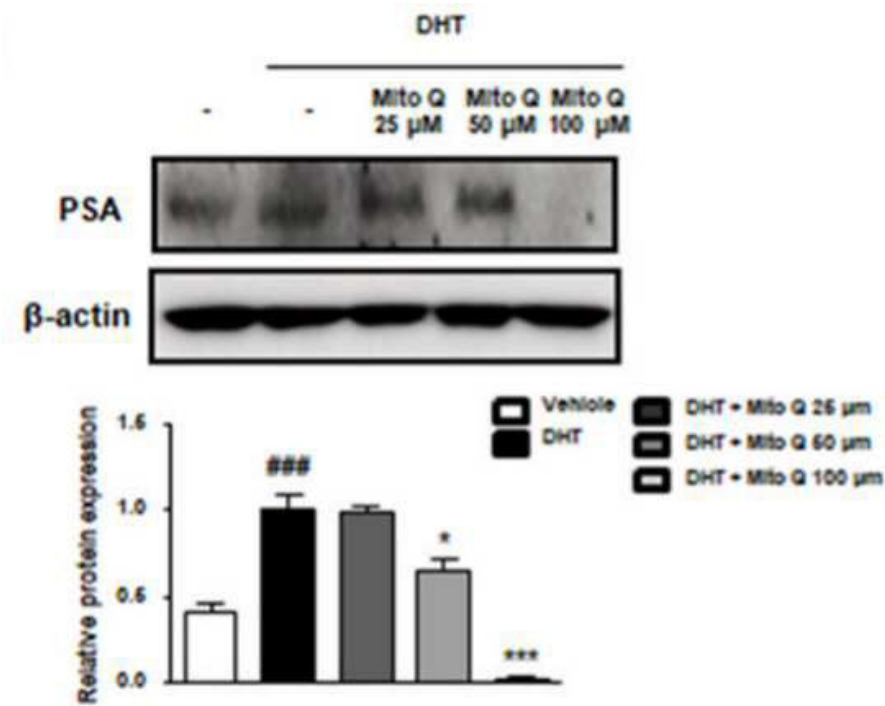
도면3a



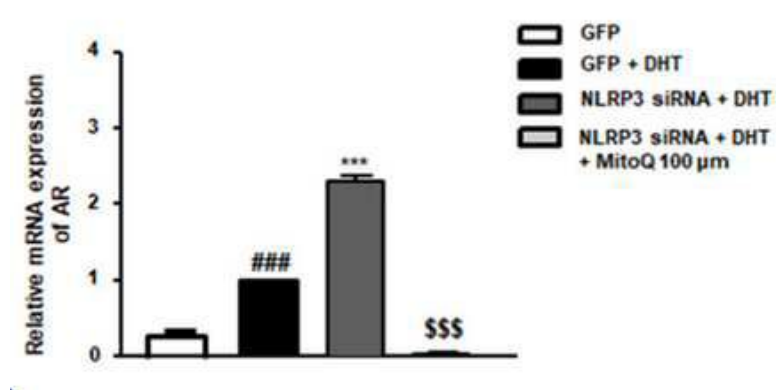
도면3b



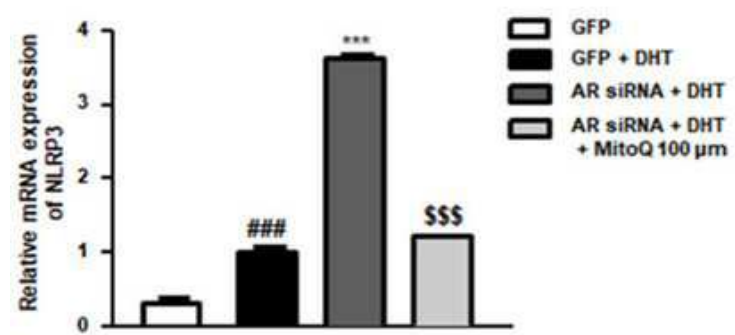
도면3c



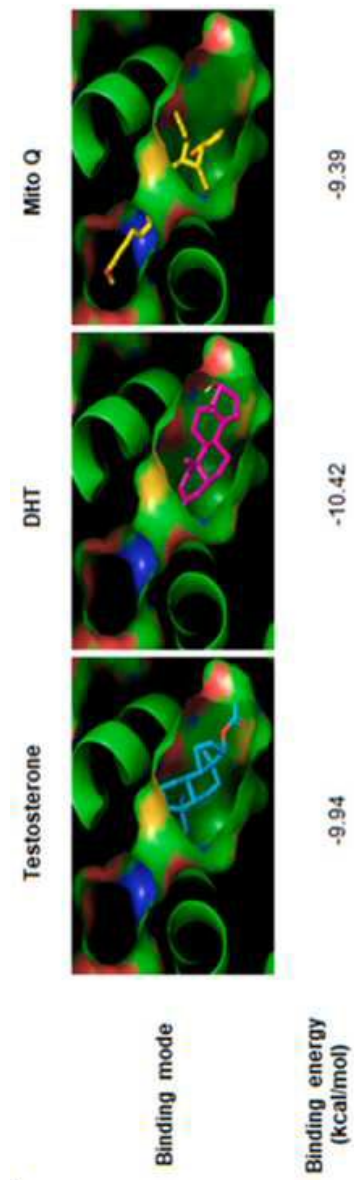
도면3d



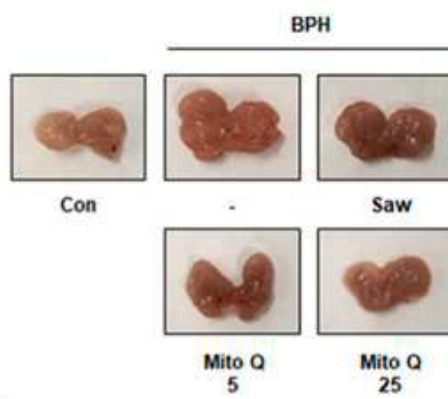
도면3e



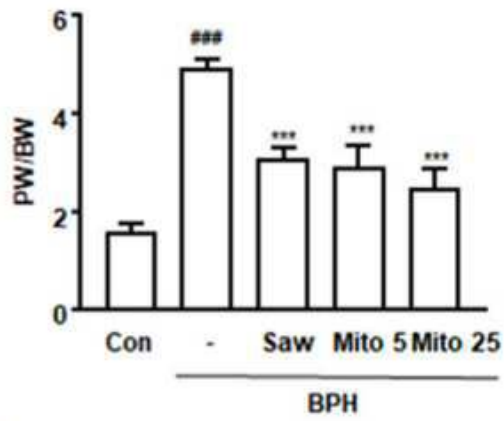
도면3f



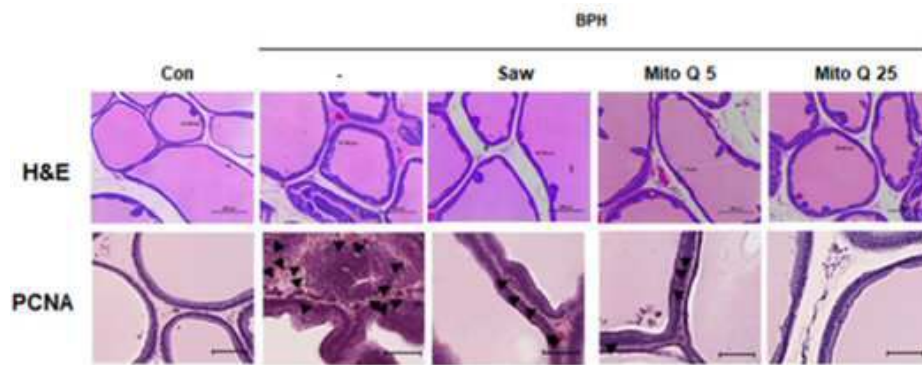
도면4a



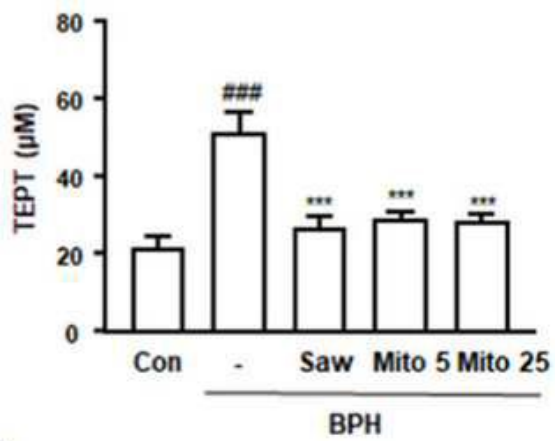
도면4b



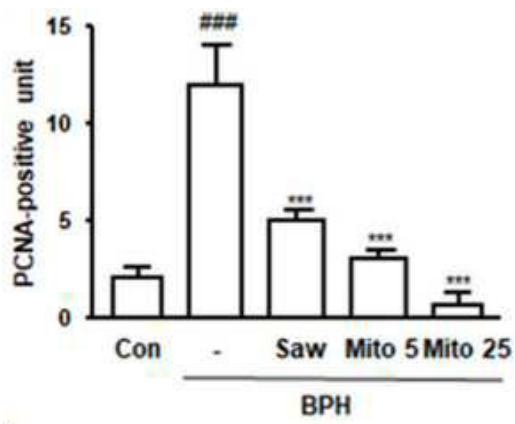
도면4c



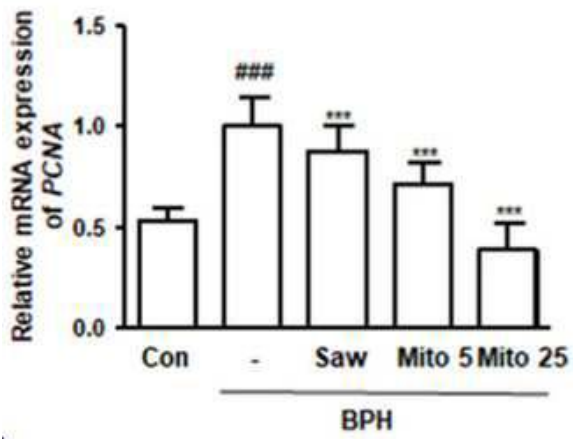
도면4d



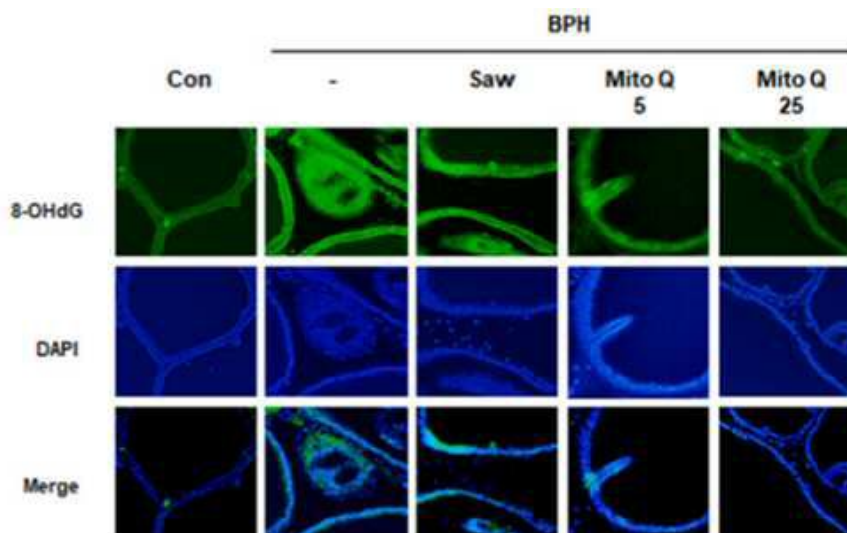
도면4e



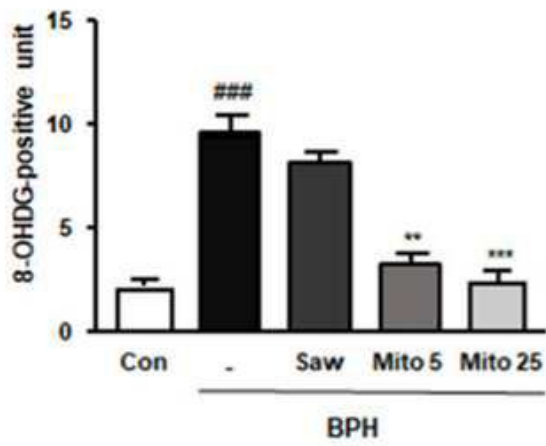
도면4f



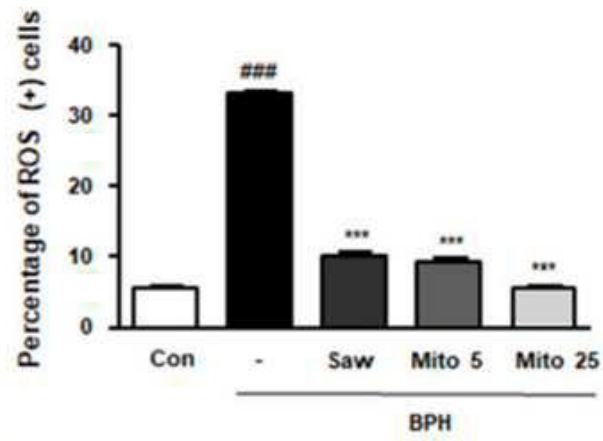
도면5a



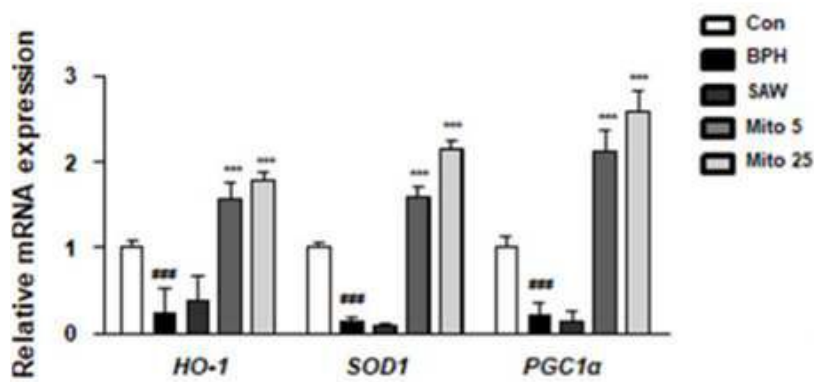
도면5b



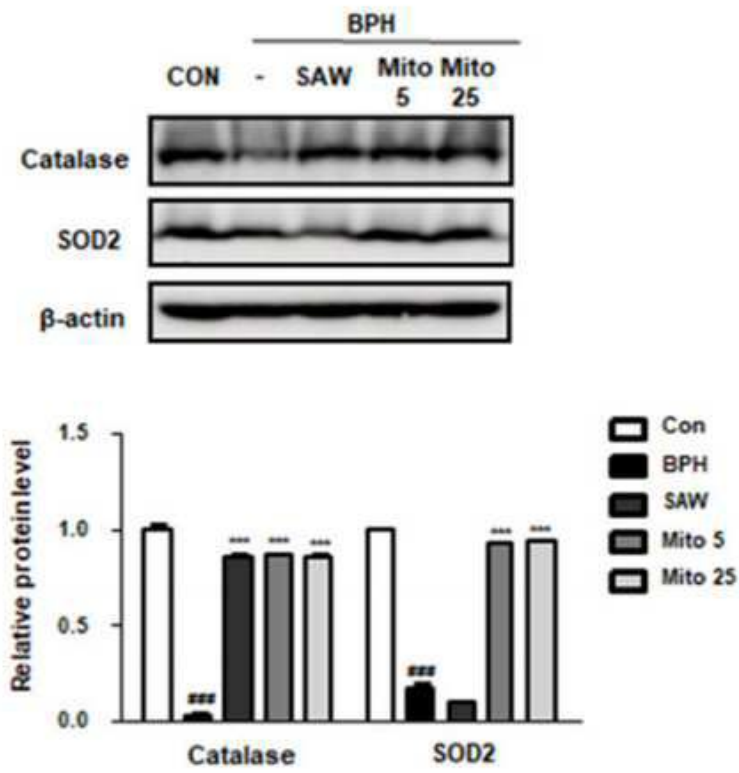
도면5c



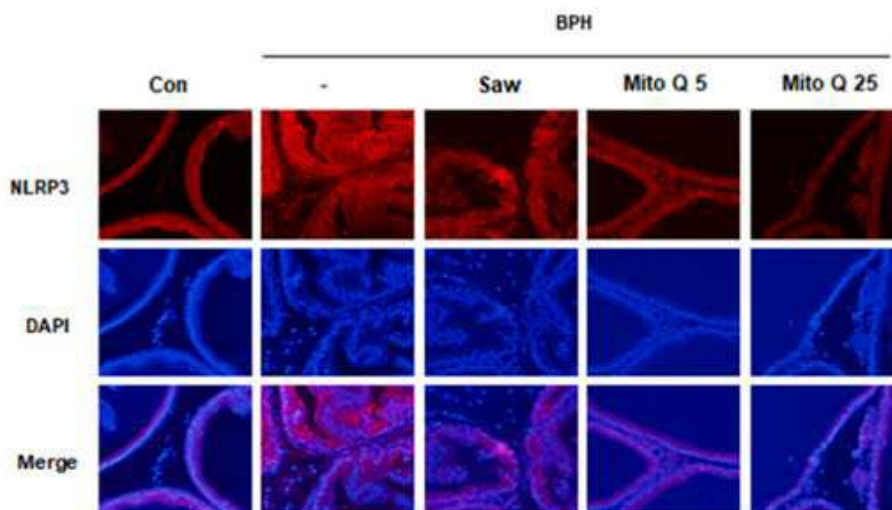
도면5d



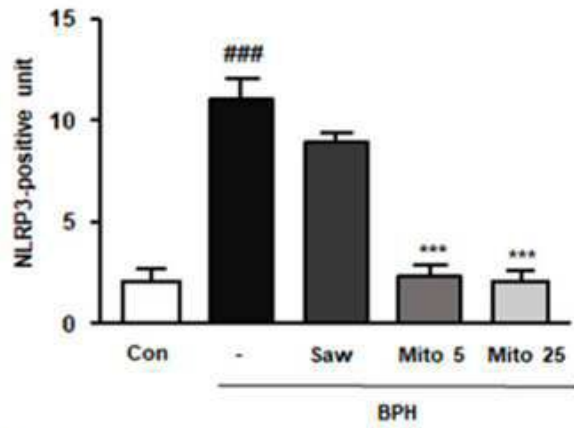
도면5e



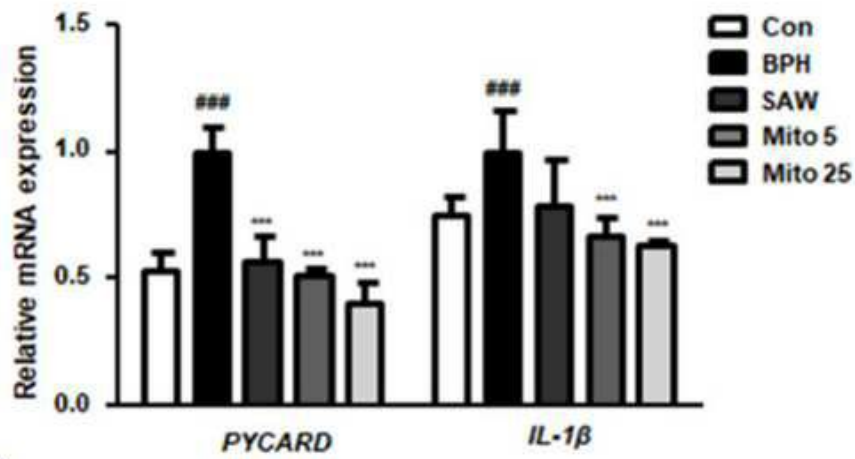
도면6a



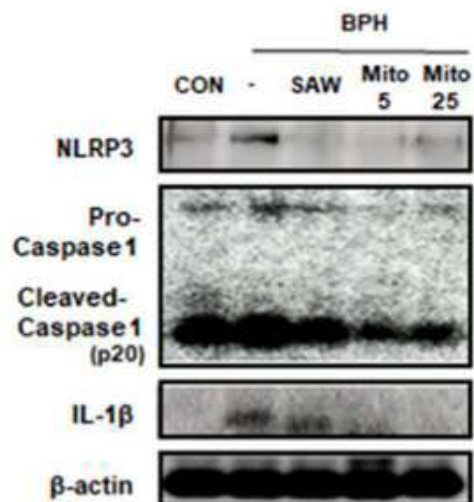
도면6b



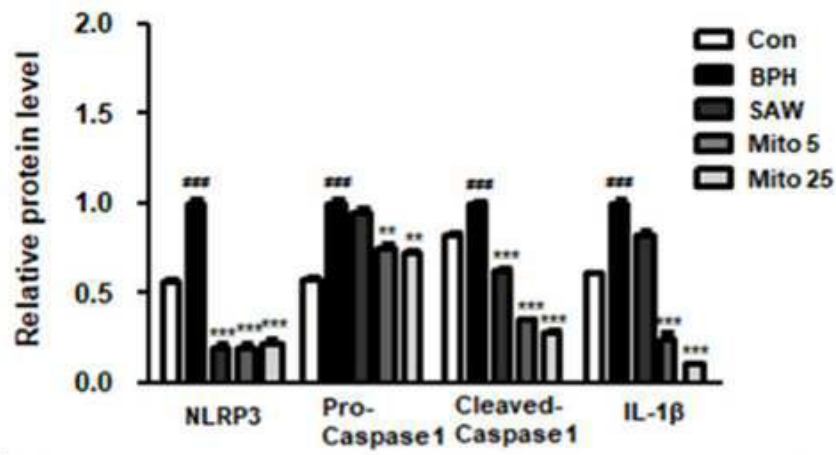
도면6c



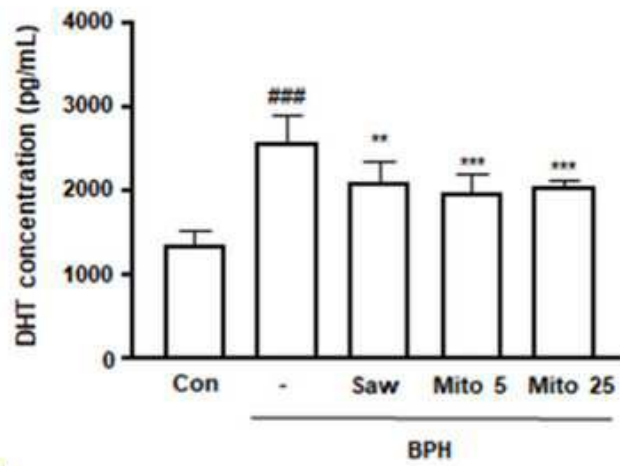
도면6d



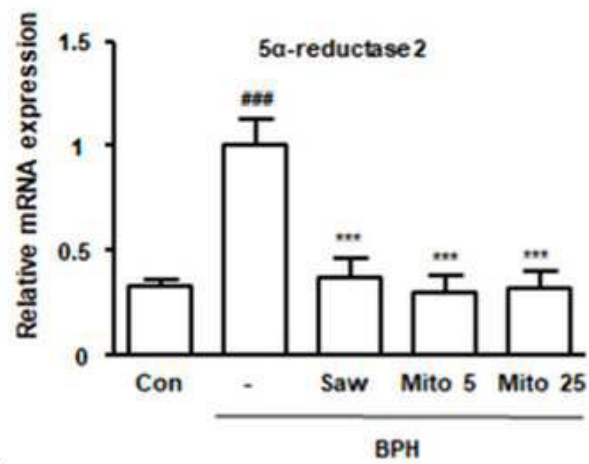
도면6e



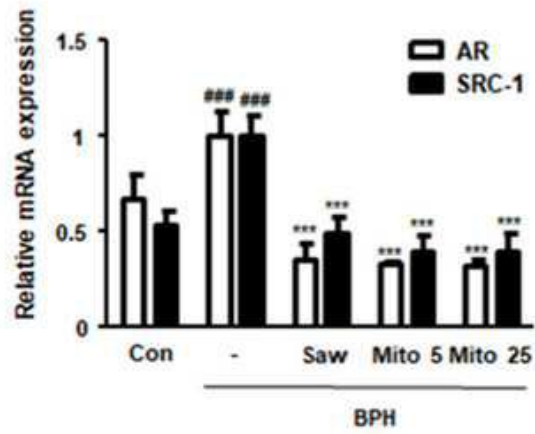
도면7a



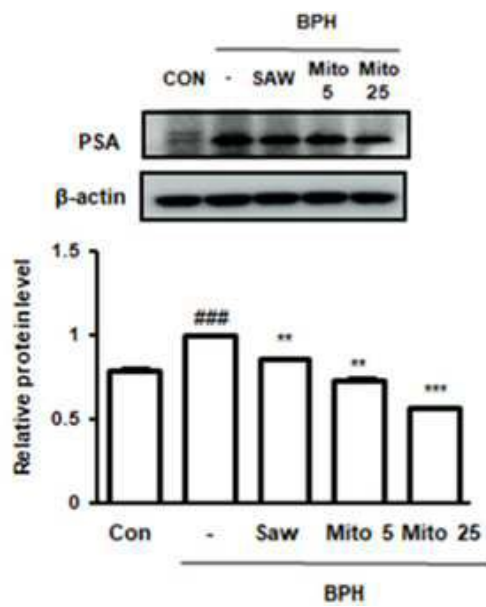
도면7b



도면7c



도면7d



도면7e

