



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0048014
(43) 공개일자 2018년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A23L 33/13 (2016.01)
A61K 39/395 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A23L 33/13 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0145048
(22) 출원일자 2016년11월02일
심사청구일자 2016년11월02일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
박현주
서울특별시 서초구 서초대로74길 30, 502동 902호 (서초동, 우성아파트)
오은택
서울특별시 서대문구 연희로39마길 6, 204호(홍은동, 홍은그린파크)
(74) 대리인
김순웅

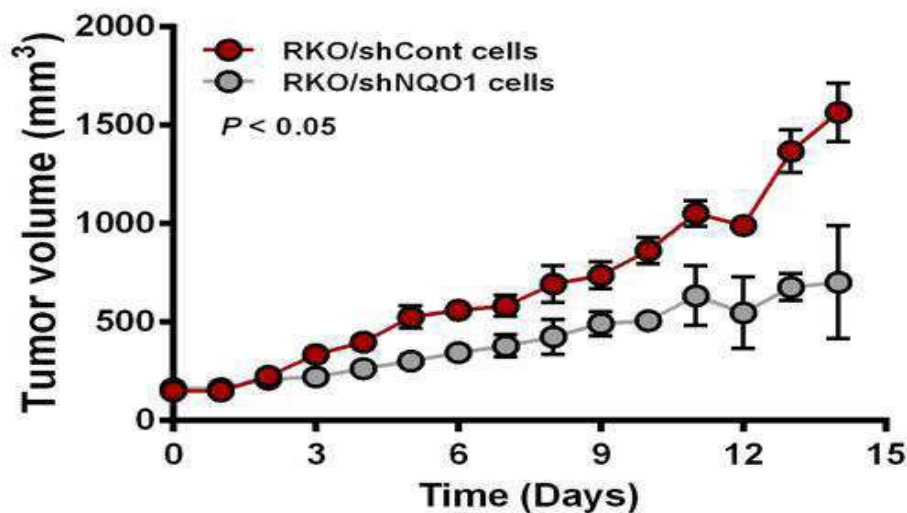
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 NQO1의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 치료 또는 예방용 조성물

(57) 요약

본 발명은 NQO1 유전자의 발현 억제제 또는 NQO1 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물, 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 NQO1의 발현을 억제하는 NQO1s 발현 또는 활성 억제제는, 암세포의 증식을 감소시키는 효과가 우수하므로, 암, 특히 대장암의 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)

A61K 39/39558 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

(72) 발명자

이재선

서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 22동 106호 (서초동, 삼풍아파트)

김홍석

경기도 용인시 기흥구 기흥로38번길 34, 203동 102호 (구갈동, 세종그랑시아)

김하경

경기도 수원시 권선구 당진로31번길 51-20, 104동 1502호 (당수동, 서수원1차쌍용스윗닷홈)

김찬우

경기도 고양시 일산동구 경의로 47, A동 412호 (백석동, 현대밀라트)

최정아

경기도 화성시 동탄숲속로 36, 883동 1803호 (능동, 동탄숲 속마을모아미래도2단지아파트)

김정환

충청남도 천안시 서북구 충무로 158-10, 109동 602호 (쌍용동, 선경해누리아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014R1A5A2009392

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원사업 기초의과학분야 (MRC)

연구과제명 저산소 표적 질환 연구센터

기 여 율 1/2

주관기관 인하대학교

연구기간 2014.05.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015M2B2B1068599

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원자력연구기반확충사업(원자력선진기술연구센터)

연구과제명 종양조직환경 타겟팅 바이오-나노 방사선 치료 기술 개발

기 여 율 1/2

주관기관 인하대학교

연구기간 2015.11.01 ~ 2020.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

NQO1(NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, Gene Bank 등재번호: NM_000903.2) 유전자의 발현 억제제 또는 NQO1 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 발현 억제제는 NQO1 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA(small interference RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 shRNA는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 활성 억제제는 NQO1 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체, 기질 유사체, 앵타머 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 암은 대장암(colon cancer), 위암(gastric cancer), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 간암(liver cancer), 혈액암(blood cancer), 뼈암(bone cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 피부암(skin cancer), 머리 또는 목암(head or neck cancer), 피부 또는 안구 흑색종(cutaneous or intraocular melanoma), 자궁육종(uterine sarcoma), 난소암(ovarian cancer), 직장암(rectal cancer), 항문암(anal cancer), 난관암(fallopian tube carcinoma), 자궁내막암(endometrial carcinoma), 자궁경부암(cervical cancer), 소장암(small intestine cancer), 내분비암(endocrine cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 부갑상선암(parathyroid cancer), 신장암(adrenal cancer), 연조직종양(soft tissue tumor), 요도암(urethral cancer), 전립선암(prostate cancer), 기관지암(bronchogenic cancer) 및 골수암(bone marrow tumor)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 7

NQO1(NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, Gene Bank 등재번호: NM_000903.2) 유전자의 발현 억제제 또는 NQO1 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

NQO1(NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, Gene Bank 등재번호: NM_000903.2) 유전자의 발현 억제제 또는 NQO1 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 전이 억제용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 NQO1의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 인류의 건강을 위협하는 최대의 질병 중의 하나로서, 세포가 일련의 돌연변이 과정을 거쳐, 무제한적이고 비조절적인 방식으로 증식하고 불사화되어 발생하는 질병이다. 암 발생의 원인으로는 화학물질, 바이러스, 세균, 전리방사선 등의 환경적 또는 외적 요인과 선천성 유전자 변이 등의 내적 요인을 들 수 있다.

[0003] 특히, 고형암의 경우, 암조직 내 세포들이 저산소, 산성화 및 영양소 결핍과 같은 미세환경에 쉽게 노출되며, 영양소, 성장인자, 산소 농도 및 pH 등의 증감이 암조직 내 세포와 세포, 세포와 기질간의 상호작용에 주요하게 작용한다. 고형암 내 미세환경 중 가장 중요한 요인인 저산소 환경은 혈관형성(angiogenesis) 과정을 통한 신생 혈관형성(neovasculature)과 연계가 되며, VEGF, angiopoietin 등과 같은 혈관형성 유도 인자의 증가와 angiostatin, endostatin 등과 같은 혈관형성 억제 인자의 감소에 의해 조절을 받는다.

[0004] 또한, 유전자 수준에서의 다양한 변이는 정상 세포가 악성종양으로 전이되는데 관여하는 다양한 형질들을 획득 하도록 원인을 제공하며, 이러한 세포 내 분자 신호 기전들은 암의 진단 및 치료를 위한 중요한 역할을 할 것으로 여겨진다.

[0005] 한편, NQO1(NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1)은 NAD(P)H를 보조인자로 사용하여 기질에 두 개의 전자를 전달하는 효소로서, 주로 퀴논계열 화합물을 기질로 사용하며, NAD(P)H:quinone oxidoreductase(EC1.6.99.2)는 DT-diaphorase, quinone reductase, menadione reductase, vitamin K reductase, 또는 azo-dye reductase 등으로 불린다.

[0006] 또한, NQO1은 위장관 상피세포, 전립선 상피세포 및 간세포에 다량 발현하며 CML을 포함하여 여러 종류의 암세포에서 높은 발현 정도를 나타내는 것으로 알려져 있으나, 대장암에서는 밝혀진 바가 없다.

[0007] 최근, 암과 관련된 다양한 생화학적 기전이 규명되고 그에 따른 치료제가 개발되어 오고는 있지만, 아직까지 암에 대한 근본적인 치료방법은 제시되지 않고 있다. 이에 따라, 암과 관련된 다양한 생체 내 분자를 동정하고 이를 표적으로 하는 치료제를 개발하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 NQO1가 과발현된 암세포의 증식을 저해하여 항암효과를 얻을 수 있는 치료 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, NQO1 억제제로서 NQO1-표적 뉴클레오티드를 처리하여 NQO1 유전자를 억제시켰을 때 암세포의 생존율이 유의하게 감소되는 항암 효과가 우수하게 달성됨을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 NQO1(NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1) 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 NQO1 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 데 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 NQO1 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 전이 억제용 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.
- [0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 NQO1(NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, Gene Bank 등재번호: NM_000903.2) 유전자의 발현 억제제 또는 NQO1 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 NQO1(NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, Gene Bank 등재번호: NM_000903.2) 유전자의 발현 억제제 또는 NQO1 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 암은 NQO1 유전자의 발현 수준; 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정한 경우 NQO1 유전자 또는 단백질의 발현 수준이 과발현되는 것이다.
- [0016] 본 발명의 NQO1가 과다 발현된 암을 표현하기 위해 사용된 용어 "과발현(overexpression)"은 적합한 발현 분석법을 통해 NQO1의 발현 수준을 측정한 경우에 있어서, 비교 대상 세포(예컨대, 해당 기관인 정상 대장 세포)의 NQO1 발현 수준에 비하여 2 배 이상인 것을 의미한다.
- [0017] 따라서, 본 발명의 조성물의 가장 큰 특징은 NQO1 유전자를 타겟으로 하여 상기 NQO1 유전자의 발현 수준 또는 상기 NQO1 단백질의 발현 또는 활성을 억제시키는 억제제를 도입하여 NQO1가 과발현된 암을 치료하거나 또는 전이를 억제시킨다는 것이다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 상기 억제제는 NQO1의 뉴클레오타이드의 발현 또는 NQO1 유전자 단백질의 활성을 억제하는 것을 모두 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 발현 억제제는 NQO1 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA(small interference RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상 일 수 있으며, 이에 제한되지 않으나, 가장 바람직하게는 siRNA(small interference RNA) 및/또는 shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA)일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 활성 억제제는, NQO1 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체, 기질유사체, 앵타머 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 siRNA는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 NQO1 siRNA(siNQO1)이고, 상기 shRNA는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 NQO1 shRNA(shNQO1)이다.
- [0022] 본 발명에서 목적으로 하는 항암 효과를 얻을 수 있는 한, NQO1 표적 뉴클레오타이드로서 각 siRNA 또는 shRNA를 다양하게 조합 또는 단독으로 하여 이용할 수 있다.
- [0023] 본 명세서에서 사용된 용어, "siRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다(참조: WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 01/29058, WO 99/07409 및 WO 00/44914). siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹-다운 방법으로서 또는 유전자 치료 방법으로 제공된다.
- [0024] 본 발명의 일 특정예에서, 본 발명의 siRNA 분자는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다. 또한, 상기 siRNA 분자는 센스 가닥(NQO1 mRNA 서열에 상응하는 서열)과 안티센스 가닥(NQO1 mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중쇄를 이루는 구조를 가질 수 있다.
- [0025] 상기 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 더욱 바람직하게는 20 내지 70 염기이다.
- [0026] siRNA 말단 구조는 NQO1 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3'-말단 돌출 구조와 5'-말단 돌출 구조 모두 가능하다.
- [0027] 본 발명의 siRNA 분자는, 자기-상보성 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오타이드 서열(예컨대, 약 5-15 nt)이 삽입된 형태를 가질 수 있으며, 이 경우 뉴클레오타이드 서열의 발현에 의해 형성된 siRNA 분자는 분

자 내 혼성화에 의하여 헤어핀 구조를 형성하게 되며, 전체적으로는 스템-앤드-루프 구조를 형성하게 된다.

- [0028] 이 스템-앤드-루프 구조는 인 비트로 또는 인 비보에서 프로세싱되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다.
- [0029] 본 발명의 siRNA는 생체 내 핵산 분해효소에 의한 빠른 분해를 막기 위해 화학적으로 변형된 형태일 수 있다.
- [0030] siRNA가 쉽게 분해되지 않도록 안정하고 저장적이도록 하기 위한 siRNA의 화학적 변형 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. siRNA의 화학적 변형에 가장 많이 사용되는 방식은 보라노포스페이트(boranophosphate) 또는 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 수식 방법(modification)이다.
- [0031] 본 명세서에서 사용된 용어, "shRNA(short hairpin RNA)"는 45 내지 70 뉴클레오타이드의 길이를 가지는 단일가닥의 RNA로서 타겟 유전자 siRNA 염기서열의 센스와 상보적인 nonsense 사이에 3-10개의 염기 링커를 연결하는 올리고 DNA를 합성한 후 플라스미드 벡터에 클로닝하거나 또는 shRNA를 레트로바이러스인 렌티바이러스(lentivirus) 및 아데노 바이러스(adenovirus)에 삽입하여 발현시키면 loop가 있는 헤어핀 구조의 shRNA가 만들어지고 세포 내의 dicer에 의해 siRNA로 전환되어 RNAi 효과를 나타낸다.
- [0032] 본 명세서에서 사용된 용어, "miRNA(microRNA)"는 21-25 뉴클레오타이드의 단일 가닥 RNA 분자로서, 타겟 mRNA의 파쇄 또는 해독단계에서의 억제를 통하여 진핵생물의 유전자 발현을 제어하는 조절물질이다. 이러한 miRNA는 두 단계의 프로세싱으로 이루어진다. 최초의 miRNA 전사체(primary miRNA)가 핵 안에서 Drosha라는 RNaseIII type 효소에 의해 70-90 염기 정도의 스템-루프 구조, 즉 pre-miRNA로 만들어지고, 이후 세포질로 이동하여 다 이서(Dicer)라는 효소에 의해 절단되어 21-25 염기의 성숙한 miRNA로 만들어진다. 이렇게 생성된 miRNA는 표적 mRNA에 상보적으로 결합하여 전사 후 유전자 억압자(post-transcriptional gene suppressor)로써 작용하며, 번역 억제와 mRNA 불안정화를 유도한다. miRNA는 다양한 생리학적 현상 및 질환에 관여한다.
- [0033] 본 명세서에서 사용된 용어, "안티센스 올리고뉴클레오타이드"란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA, 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 본 발명의 안티센스 서열은 NQ01 유전자에 상보적이고 NQ01 유전자 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고, NQ01 mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 핵산의 길이는 6내지 100 염기이고, 바람직하게는 8 내지 60 염기이고, 보다 바람직하게는 10 내 40 염기이다.
- [0034] 본 명세서에서 사용된 용어, "핵산 앵타머(aptamer)"는 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 앵타머는 소정의 표적 분자에 대하여 결합함으로써, 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 앵타머는 RNA, DNA, 수식(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 본 발명의 앵타머는 또한 직쇄상 또는 환상의 형태일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 대상 질환인 "암(cancer)"은 세포가 정상적인 성장 한계를 무시하고 분열 및 성장하는 공격적(aggressive) 특성, 주위 조직에 침투하는 침투적(invasive) 특성, 및 체내의 다른 부위로 퍼지는 전이적(metastatic) 특성을 갖는 세포에 의한 질병을 총칭하는 의미이다. 본 명세서에서 상기 암은 악성 종양(malignant tumor) 또는 악성 복수(malignant ascites)와 동일한 의미로도 사용된다.
- [0037] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 암은 대장암(colon cancer), 위암(gastric cancer), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 간암(liver cancer), 혈액암(blood cancer), 뼈암(bone cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 피부암(skin cancer), 머리 또는 목암(head or neck cancer), 피부 또는 안구 흑색종(cutaneous or intraocular melanoma), 자궁육종(uterine sarcoma), 난소암(ovarian cancer), 직장암(rectal cancer), 항문암(anal cancer), 난관암(fallopian tube carcinoma), 자궁내막암(endometrial carcinoma), 자궁경부암(cervical cancer), 소장암(small intestine cancer), 내분비암(endocrine cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 부갑상선암(parathyroid cancer), 신장암(adrenal cancer), 연조직종양(soft tissue tumor), 요도암(urethral cancer), 전립선암(prostate cancer), 기관지암(bronchogenic cancer) 및 골수암(bone marrow tumor)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상이며, 이에 한정되는 것은 아니나, 가장 바람직하게는 대장암이다.
- [0038] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 유효성분인 상기 억제제는 암세포 성장 및 생존율을 감소 또는 억제 시킴으로써 항암 효과를 나타낸다.
- [0039] 본 발명의 약학적 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.

- [0040] 본 명세서에서 사용된 용어, "약학적으로 허용되는 담체"는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미 세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히 드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하주 입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사 는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 약학적 조성물의 1일 투여량은 0.0001-1000 mg/kg이다.
- [0044] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있 는 방법에 따라, 약학적 유효량을 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 매질중 의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산 제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0045] 본 명세서에서 사용된 용어, "약학적 유효량(therapeutically effective amount)"은 투여되는 억제제의 양이 치료하고자 하는 질환인 암의 하나 또는 그 이상의 증상을 어느 정도 경감하는 것을 의미한다. 따라서, 약학적 유효량은, (1) 암의 진행속도를 역전시키거나 (2) 암의 그 이상의 진행을 어느 정도 금지시키게 하는 것을 의미 하며, (3) 암과 관련된 하나 또는 그 이상의 증상을 어느 정도 경감(바람직하게는, 제거)하는 효과를 가지는 양 을 의미한다.
- [0046] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 NQO1(NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, Gene Bank 등재번호: NM_000903.2) 유전자의 발현 억제제 또는 NQO1 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0047] 본 발명의 조성물은 암의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다. 본 발명에서, "건강기능 식품"이란, 암의 예방 및 개선, 생체방어, 면역, 병후의 회복 등 생체조절 기능을 가지는 식품을 말하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해해야한다.
- [0048] 본 발명의 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생 을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0049] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜 릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료 수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강 식품을 모두 포함한 다.
- [0050] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1g 이다.
- [0051] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채

음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0052] 본 발명의 식품 조성물은 상술한 억제제를 포함하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0053] 본 발명의 NQO1의 발현을 억제하는 NQO1s 발현 또는 활성 억제제는, 암세포의 증식을 감소시키는 효과가 우수하므로, 암, 특히 대장암의 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1은 대장암에서 NQO1 발현양과 HIF-1a 단백질 발현양의 상관성 분석 결과를 보여준다. 도 1a는 정상조직과 대장암 조직에서 NQO1의 발현양 분석 결과이고, 도 1b는 NQO1 발현양 증가에 따른 대장암 환자의 생존률 감소 변화 분석 결과이며, 도 1c는 NQO1 발현양 증가에 따른 HIF-1a 단백질의 발현양 증가 분석 결과이다.

도 2는 대장암에서 본 발명의 NQO1 표적 뉴클레오티드 처리에 의한 HIF-1a 발현양 분석 결과를 보여준다. 도 2a는 본 발명의 NQO1 표적 뉴클레오티드 및 NQO1 발현양 비교분석 결과이고, 도 2b는 다양한 대장암 세포에서 본 발명의 NQO1 표적 뉴클레오티드 처리에 의한 HIF-1a 발현양 감소 분석 결과이다.

도 3은 대장암에서 본 발명의 NQO1 표적 shRNA 처리에 의한 HIF-1a 단백질 안정성 분석 결과를 보여준다. 도 3a는 본 발명의 NQO1 표적 뉴클레오티드를 포함한 shRNA 기반 뉴클레오티드이고, 도 3b는 본 발명의 NQO1 표적 shRNA 처리에 의한 HIF-1a 유전자 발현 변화 분석 결과이며, 도 3c는 본 발명의 NQO1 표적 shRNA 처리에 의한 HIF-1a 단백질 안정성 분석 결과이다.

도 4는 대장암에서 본 발명의 NQO1 표적 뉴클레오티드 처리에 의한 HIF-1a 단백질 안정성 분석 결과를 보여준다.

도 5는 대장암에서 본 발명의 NQO1 표적 뉴클레오티드 처리에 의한 암 성장 감소 효과 분석 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0056] **실시예 1. 대장암환자 조직 데이터베이스에서 NQO1 발현 변화 분석**

[0057] 본 발명자들은 대장암에서 NQO1 발현 수준과 HIF-1a 단백질 발현 수준의 상관성을 분석하기 위하여, 대장암환자 조직 데이터베이스에서의 NQO1 발현 수준을 확인하였다.

[0058] 먼저, 도 1a에 나타난 바와 같이, NQO1은 정상세포와 비교하여 대장암세포에서 과발현된다는 것을 TCGA(The Cancer Genome Atlas) 데이터베이스에서 확인하였다.

[0059] 한편, 저산소 환경에서 발현양이 증가되는 HIF-1a는 대장암세포의 신생혈관기전, 방사선 및 항암제 저항성과 암 줄기세포의 생성 등에 관여하는 중요한 단백질이므로, 대장암에서 NQO1과 HIF-1a 단백질의 상관성을 분석하였다.

[0060] 그 결과, 도 1b 및 1c에 나타난 바와 같이, 대장암에서 NQO1의 과발현은 대장암환자의 생존률을 감소시키고, HIF-1a 단백질의 발현양 증가에 관여함을 확인하였다.

[0061] 따라서, NQO1은 대장암 진단에 필수적이며 대장암 치료를 위한 중요한 표적 인자임을 알 수 있다.

[0062] **실시예 2. NQO1-표적 뉴클레오티드의 제조 및 선별; 및 이에 의한 NQO1-표적 HIF-1a 단백질의 억제 효과 분석**

[0063] 본 발명자들은 NQO1 표적 뉴클레오티드에 의한 NQO1의 발현 수준 감소시 HIF-1a 단백질의 발현 수준 억제 및/또는 감소 효과를 확인하였다.

[0064] 먼저, 본 발명자들은 도 2a에 나타난 바와 같이, NQO1 표적 뉴클레오티드(siRNA) 총 5 종을 직접 제작하였고,

이들 중 가장 탁월하게 NQ01 발현 수준을 억제하는 siRNA로서 5 번(서열번호 1; 5'-CCGUACACAGAUACCUUGATT-3')을 선별하여 이후 실시예에 이용하였다.

[0065] 또한, 다양한 대장암 세포주들에 선별된 NQ01 표적 뉴클레오티드인 5번 siRNA(서열번호 1)(100 nM)를 리포펙타민과 혼합 후 처리하고 저산소 환경에서 2 시간동안 배양한 후 웨스턴 블롯팅 분석법을 실시하였다.

[0066] 보다 구체적으로, 산소 환경에서 2 시간동안 배양 후 수거한 대장암 세포를 라이시스 버퍼 (0.1%triton x-100, 단백질 분해 억제제가 포함된 PBS (phosphate buffered saline))에 현탁 후 소니케이션 (sonication) 방법으로 파쇄하였다. 파쇄한 샘플을 정량 후 샘플 버퍼에 혼합하여 끓여주었다. 준비된 샘플을 SDS-PAGE eletrophoresis 로 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 옮겨 준 후 2% skim milk로 1시간 동안 blocking하였다. 상기 membrane에 16 시간 동안 primary antibody를 처리하고 1시간동안 secondary antibody를 처리하였다. ECL solution을 이용하여 단백질의 발현 정도를 관찰하였다.

[0067] 그 결과, 도 2b에 나타낸 바와 같이, NQ01 표적 뉴클레오티드를 처리하지 않아 NQ01의 발현이 억제되지 않은 세포주에서는 HIF-1 α 의 발현양이 증가하는 반면, NQ01 표적 뉴클레오티드를 처리한 경우 HIF-1 α 의 발현양이 감소되는 것을 관찰하였다.

[0068] 따라서, 상기 결과는 NQ01 표적 뉴클레오티드에 의해 HIF-1 α 의 발현이 억제되었음을 나타낸다.

[0069] 실시예 3. NQ01 표적 뉴클레오티드에 의한 HIF-1 α 억제 효과 분석

[0070] 본 발명자들은 NQ01 표적 뉴클레오티드에 의한 NQ01의 발현 수준 감소시 HIF-1 α 가 어떠한 수준에서 조절되는지 확인하였다.

[0071] 먼저, 본 발명자들은 도 3a에 나타낸 바와 같이, 안정화된 세포주(stable cell line)를 제작하기 위해 5 번 siRNA 뉴클레오티드를 기반으로 한 shRNA 형태의 플라스미드(psh NQ01)(서열번호 2; 5'-TCGAGCCGTACACAGAACCTTGATTCAAGAGATCAAGTCTGTGTACGGTTTTTACGCGTA-3')를 직접 제작하였다. NQ01 표적 뉴클레오티드(siRNA 서열을 포함하는 shRNA, 서열번호 2)를 대장암세포에 처리하고 저산소 환경에 8 시간 동안 노출한 후 수거하여 RNA를 추출하고 cDNA 합성과 Realtime PCR을 실시하여 NQ01에 의한 HIF-1 α 유전자의 발현 변화를 관찰하였다.

[0072] 그 결과, 도 3b에 나타낸 바와 같이, NQ01 표적 뉴클레오티드(siRNA 서열을 포함하는 shRNA, 서열번호 2)에 의해 정상 및 저산소 환경에서 HIF-1 α 유전자 발현 수준에는 변화가 없음을 관찰하였다.

[0073] 또한, 도 3c에 나타낸 바와 같이, NQ01 표적 뉴클레오티드(siRNA 서열을 포함하는 shRNA, 서열번호 2)에 의해 HIF-1 α 단백질 안정성이 급격히 감소됨을 관찰하였다.

[0074] 따라서, 상기 결과는 NQ01 표적 뉴클레오티드(siRNA 서열을 포함하는 shRNA, 서열번호 2)가 HIF-1 α 단백질 안정성을 급격히 감소시킨다는 것을 나타낸다.

[0075] 실시예 4. NQ01 표적 뉴클레오티드에 의한 HIF-1 α 표적 유전자 발현 변화 분석

[0076] 본 발명자들은 NQ01 표적 뉴클레오티드에 의한 NQ01의 발현 수준 감소시 HIF-1 α 의 표적 유전자 발현 변화를 분석하였다.

[0077] 먼저, NQ01 표적 뉴클레오티드(siRNA 서열을 포함하는 shRNA, 서열번호 2)를 대장암세포에 처리하고 저산소 환경에 8시간 동안 노출한 후 수거하여 RNA를 추출하고 cDNA 합성과 Realtime PCR을 실시하여 NQ01 표적 뉴클레오티드(siRNA 서열을 포함하는 shRNA, 서열번호 2)에 의한 대표적인 HIF-1 α 의 표적 유전자인 PDK1, PGK1, LDHA의 발현 수준 변화를 확인하였다.

[0078] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, NQ01 표적 뉴클레오티드(siRNA 서열을 포함하는 shRNA, 서열번호 2)에 의해 저산소 환경에서 PDK1, PGK1, LDHA의 발현양이 감소됨을 관찰하였다.

[0079] 따라서, 상기 결과는 NQ01 표적 뉴클레오티드(siRNA 서열을 포함하는 shRNA, 서열번호 2)가 HIF-1 α 의 단백질 안정성 감소를 통해 HIF-1 α 표적 유전자 발현 감소에 영향을 미침을 나타낸다.

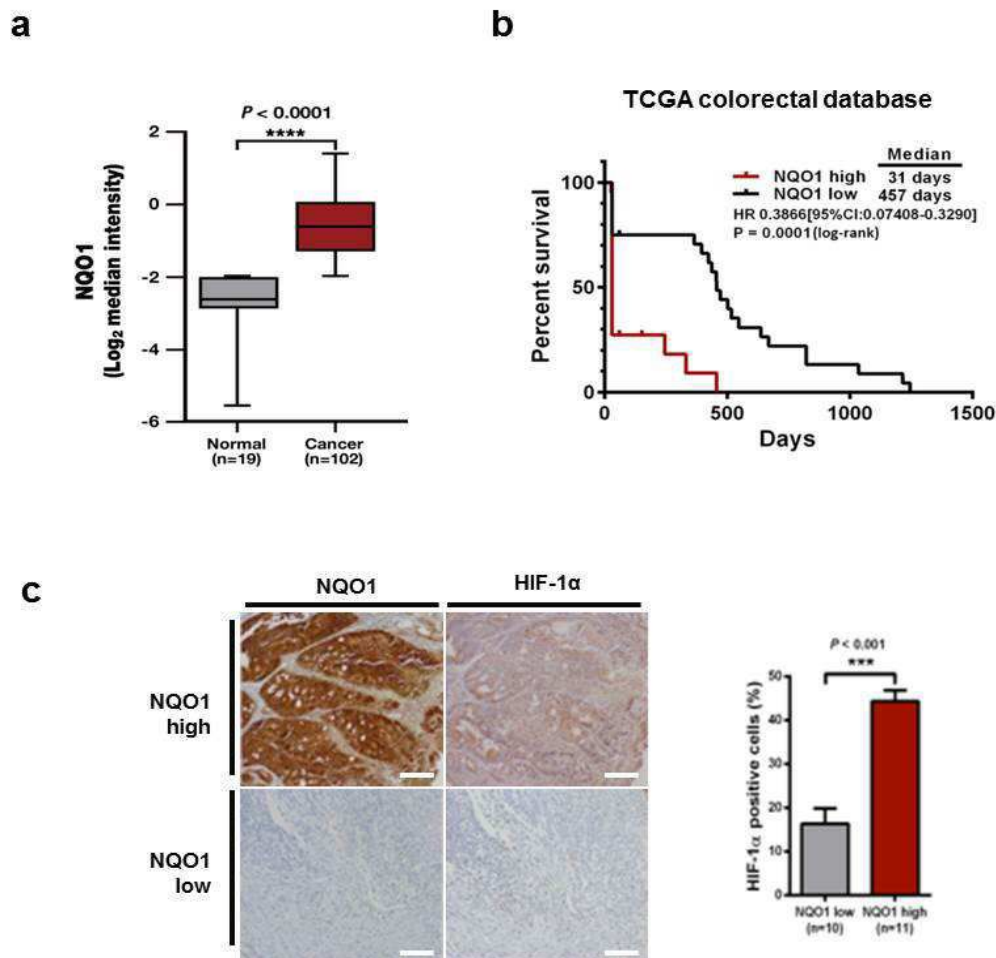
[0080] 실시예 5. NQ01 표적 뉴클레오티드가 대장암 성장에 미치는 영향 분석

[0081] 본 발명자들은 NQ01 표적 뉴클레오티드(siRNA 서열을 포함하는 shRNA, 서열번호 2)에 의한 NQ01의 발현 수준 감소시 대장암 성장에 영향을 미치는지의 여부를 확인하였다.

- [0082] 먼저, RKO 대장암 세포주를 이용하여 누드 마우스에 이식암 모델을 구축한 후 NQO1 표적 뉴클레오티드(siRNA 서열을 포함하는 shRNA, 서열번호 2) 처리에 의한 암의 성장 정도를 관찰하였다.
- [0083] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, NQO1 표적 뉴클레오티드(siRNA 서열을 포함하는 shRNA, 서열번호 2)에 의해 암 성장이 감소됨을 관찰하였다.
- [0084] 따라서, 상기 결과는 NQO1 표적 뉴클레오티드(siRNA 서열을 포함하는 shRNA, 서열번호 2)가 HIF-1 α 단백질 안정성 감소를 통해 대장암 성장률 감소에 영향을 미침을 나타낸다.
- [0085] 즉, 본 발명의 NQO1의 발현을 억제하는 siRNA 또는 shRNA와 같은 NQO1 표적 뉴클레오티드 형태의 NQO1s 억제제는, 대장암-특이 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

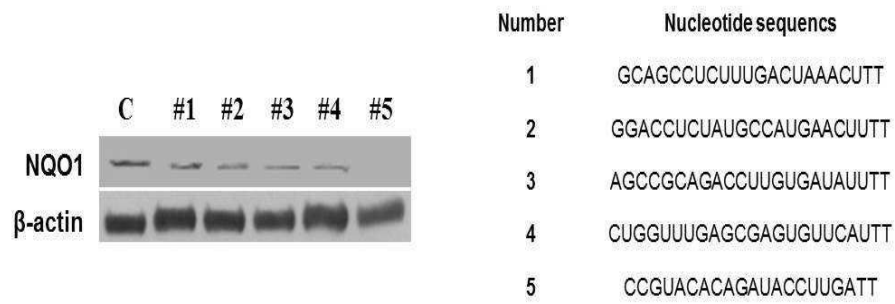
도면

도면1

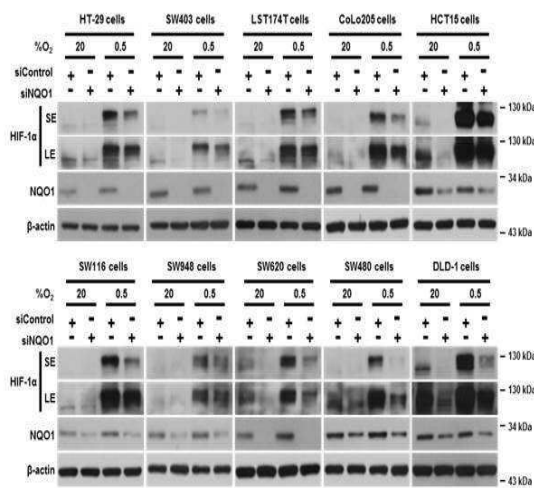


도면2

a



b

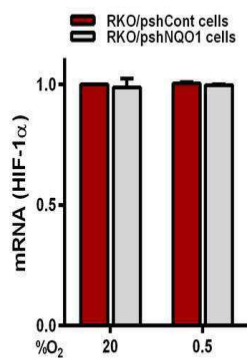


도면3

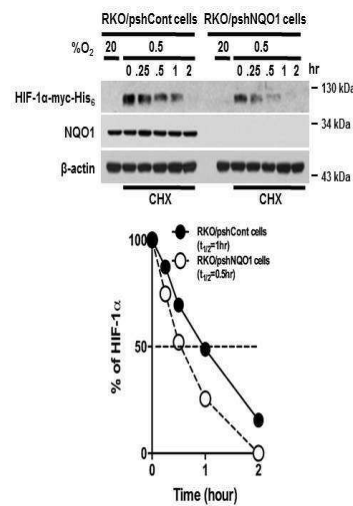
a

5'-TCGAGGCCGTACACAGAACCTTGATTCAAGAGATCAAGTTCTGTGTACGGTTTTTACGCGTA-3'

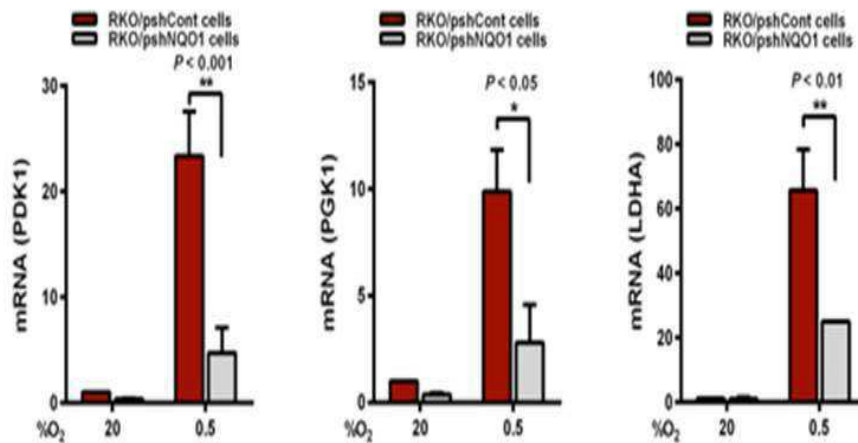
b



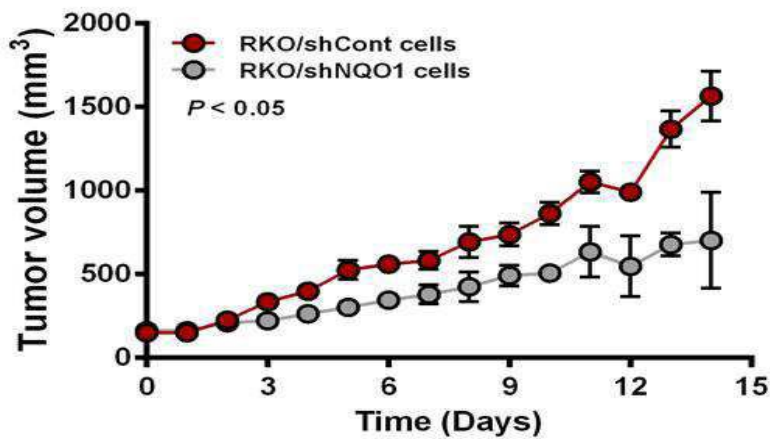
c



도면4



도면5



서열 목록

- <110> Inha University Research and Business Foundation
- <120> Compositions for Treating or Preventing Cancer Comprising Expression or Activity Inhibitors of NQO1
- <130> IU1-207p
- <160> 2
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> NQO1 siRNA

<400> 1
ccguacacag auaccuugat t 21
<210> 2
<211> 63
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223>
> NQ01 shRNA
<400> 2
tcgaggccgt acacagaacc ttgattcaag agatcaagtt ctgtgtacgg ttttttacgc 60
gta 63