



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0089381
(43) 공개일자 2020년07월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/44 (2006.01) A23L 33/12 (2016.01)
A23L 33/17 (2016.01) A61K 31/202 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)
G01N 33/50 (2017.01) G01N 33/573 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/44 (2013.01)
A23L 33/12 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0005876

(22) 출원일자 2019년01월16일

심사청구일자 2019년01월16일

(71) 출원인

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

이미옥

서울특별시 강남구 선릉로 221, 303동 102호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)

한용현

서울특별시 관악구 신림로 29길 8, 신림현대아파트 107동 509호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이명진

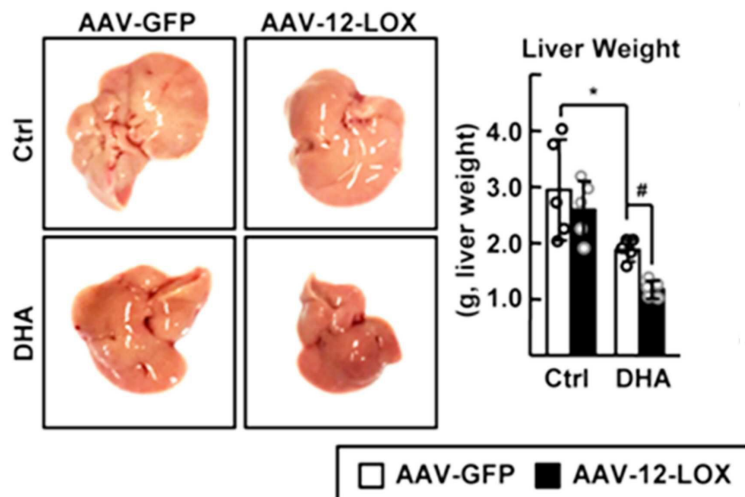
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 12-LOX 발현 촉진제를 포함하는 간 질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 도코사헥사에노산의 효과를 향상시켜 주는 12-LOX, 또는 12-LOX의 발현 촉진제를 유효성분으로 포함하는 조성물 등에 관한 것으로, 본 발명에 따른 12-LOX, 또는 12-LOX의 발현 촉진제는 도코사헥사에노산의 간 질환 개선, 예방, 치료 효과 등을 현저히 증가시킬 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A23L 33/17 (2016.08)
A61K 31/202 (2013.01)
A61K 48/005 (2013.01)
A61P 1/16 (2018.01)
G01N 33/5023 (2013.01)
G01N 33/573 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)
G01N 2333/90241 (2013.01)

(72) 발명자

구승희

서울특별시 강남구 도곡로78길 22대치삼성아파트
 103동 502호

김준석

서울특별시 성북구 길음로 33 818동 301호 (길음
 동, 래미안아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711068427
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
 연구과제명 Long noncoding RNA-기반 신규 지방간질환 타겟 발굴 및 치료 전략
 기 여 율 1/2
 주관기관 서울대학교
 연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711074264
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 집단연구지원
 연구과제명 생체지질 인터랙토믹스 연구센터
 기 여 율 1/2
 주관기관 서울대학교
 연구기간 2018.06.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

도코사헥사에노산(docosahexaenoic acid; DHA) 및 12-LOX(platelet type 12-Lipoxygenase)를 유효성분으로 포함하는, 간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 간 질환은 지방간증, 간 섬유화, 간경화, 비알콜성 지방간 질환, 및 비알콜성 지방간염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

도코사헥사에노산(docosahexaenoic acid; DHA), 및 12-LOX(platelet type 12-Lipoxygenase)의 발현 촉진제를 유효성분으로 포함하는, 간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 12-LOX의 발현 촉진제는 12-LOX의 발현량을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제 3 항에 있어서,

상기 12-LOX의 발현 촉진제는 12-LOX를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제 3 항에 있어서,

상기 간 질환은 지방간증, 간 섬유화, 간경화, 비알콜성 지방간 질환, 및 비알콜성 지방간염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 7

도코사헥사에노산(docosahexaenoic acid; DHA) 및 12-LOX(platelet type 12-Lipoxygenase)를 유효성분으로 포함하는, 간 질환의 개선 또는 예방용 식품 조성물.

청구항 8

도코사헥사에노산(docosahexaenoic acid; DHA), 및 12-LOX(platelet type 12-Lipoxygenase)의 발현 촉진제를 유효성분으로 포함하는, 간 질환의 개선 또는 예방용 식품 조성물.

청구항 9

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서,

상기 간 질환은 지방간증, 간 섬유화, 간경화, 비알콜성 지방간 질환, 및 비알콜성 지방간염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.

청구항 10

하기 단계를 포함하는 도코사헥사에노산(docosahexaenoic acid; DHA)과의 병용투여용 간 질환 치료제의 선별 방

법:

- (a) 세포를 배양하는 단계;
- (b) 상기 배양된 세포에 후보 물질을 처리하는 단계;
- (c) 상기 후보 물질이 처리된 세포의 12-LOX(platelet type 12-Lipoxygenase) 발현량을 측정하는 단계; 및
- (d) 상기 12-LOX의 발현량을 증가시킨 후보 물질을 선택하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 12-LOX, 또는 12-LOX의 발현 촉진제를 유효성분으로 포함하는 간 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 간은 체외에서 들어오는 물질 및 체내의 물질 대사에서 중추적인 역할을 담당하는 생체조직으로서, 최근에는 고열량 및 고지방 음식의 섭취가 현저히 증가되면서 간 질환의 발생이 증가되고 있는 추세이다. 이러한 간 질환에는 지방간증(hepatosteatosis), 간 섬유화(fibrosis), 간경화(cirrhosis), 비알콜성 지방간 질환(nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD), 비알콜성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis; NASH) 등이 있으며, 이 중 비알콜성 지방간 질환 및 비알콜성 지방간염은 단순 지방간증과 비교하여 훨씬 중증의 간질환을 의미하나 종종 혼용되어 사용되고 있다. 지방간증은 염증 반응 및 세포 손상을 동반하지 않을 때는 양성(benign) 장애일 가능성이 매우 높으나, 비알콜성 지방간염은 지방간증에 더해, 간 세포 손상 및 염증 반응이 존재하며, 경화증, 간 기능부진 등과 더불어 간암의 발생 위험을 급격히 증가시키기 때문에, 비알콜성 지방간염의 치료제에 대한 관심이 증가되고 있는 추세이다.

[0003] 최근에는 도코사헥사에노산(docosahexaenoic acid; DHA), 알파 리놀렌산(alpha-linolenic acid; ALA), 에이코사펜타에노산(eicosapentaenoic acid; EPA), 스테아리돈산(stearidonic acid; SDA), 에이코사테트라에노산(eicosatetraenoic acid; ETA) 등과 같은 오메가-3 지방산이 지질의 축적을 감소시켜, 지방간증을 감소시킨다는 연구 결과들이 발표되고 있으나, 임상시험에서 그 효과가 미비하여 치료제로 개발되고 있지 못하고 있는 실정이다. 따라서, 오메가-3 지방산의 치료 효능을 증가시켜줄 수 있는 물질이 있다면, 다양한 간 질환의 예방 및 치료에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 국내공개특허 10-2017-0140376

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, DHA의 효과를 향상시켜 주는 12-LOX, 또는 12-LOX의 발현 촉진제를 유효성분으로 포함하는 간 질환 개선, 예방 또는 치료용 조성물 등을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0006] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 도코사헥사에노산(docosahexaenoic acid; DHA) 및 12-LOX(platelet type 12-Lipoxygenase)를 유효성

분으로 포함하는 간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [0008] 또한, 본 발명은 도코사헥사에노산(docosahexaenoic acid; DHA), 및 12-LOX(platelet type 12-Lipoxygenase)의 발현 촉진제를 유효성분으로 포함하는 간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 도코사헥사에노산(docosahexaenoic acid; DHA), 및 12-LOX(platelet type 12-Lipoxygenase)를 유효성분으로 포함하는 간 질환 개선 또는 예방용 식품 조성물을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 도코사헥사에노산(docosahexaenoic acid; DHA), 및 12-LOX(platelet type 12-Lipoxygenase)의 발현 촉진제를 유효성분으로 포함하는 간 질환 개선 또는 예방용 식품 조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 간 질환은 바람직하게는 고열량 및/또는 고지방 음식의 과다 섭취로 인한 간 질환이며, 더욱 바람직하게는 지방간증, 간 섬유화, 간경화, 비알콜성 지방간 질환, 비알콜성 지방간염 등일 수 있으나, 도코사헥사에노산에 의한 개선, 예방, 또는 치료 효과를 가지는 질환이라면 이에 제한되지 않는다.
- [0012] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 12-LOX의 발현 촉진제는 바람직하게는 12-LOX의 발현량을 증가시킬 수 있는 물질이며, 더욱 바람직하게는 12-LOX를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터일 수 있으나, 12-LOX의 발현을 촉진시키는 물질이라면 이에 제한되지 않는다. 상기 12-LOX를 코딩하는 핵산은 바람직하게는 서열번호 2 또는 4의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산이며, 더욱 바람직하게는 서열번호 1 또는 3의 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드이나, 서열번호 2 또는 4의 아미노산 서열로 표시되는 12-LOX 단백질의 기능성 동등물도 본 발명의 권리범위에 포함되며, 상기 기능적 동등물이란, 아미노산의 부가, 치환, 또는 결실의 결과, 상기 아미노산 서열과 적어도 60 % 이상, 바람직하게는 70 % 이상, 더욱 바람직하게는 80 % 이상, 가장 바람직하게는 90 % 이상의 서열 상동성을 가지는 것으로서, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 실질적으로 동질의 활성을 나타내는 폴리펩티드를 의미한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 도코사헥사에노산(docosahexaenoic acid; DHA)과의 병용투여용 간 질환 치료제의 선별 방법을 제공한다: (a) 세포를 배양하는 단계; (b) 상기 배양된 세포에 후보 물질을 처리하는 단계; (c) 상기 후보 물질이 처리된 세포의 12-LOX(platelet type 12-Lipoxygenase) 발현량을 측정하는 단계; 및 (d) 상기 12-LOX의 발현량을 증가시킨 후보 물질을 선택하는 단계.
- [0014] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 후보 물질은 뉴클레오티드, DNA, RNA, 아미노산, 압타머, 단백질, 화합물, 천연물, 천연추출물, 벡터 등으로 제한이 없다.
- [0015] 또한, 본 발명은 도코사헥사에노산(docosahexaenoic acid; DHA) 및 12-LOX(platelet type 12-Lipoxygenase)를 유효성분으로 포함하는 조성물, 또는 도코사헥사에노산(docosahexaenoic acid; DHA), 및 12-LOX(platelet type 12-Lipoxygenase)의 발현 촉진제를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 간 질환의 치료 방법을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 도코사헥사에노산(docosahexaenoic acid; DHA) 및 12-LOX(platelet type 12-Lipoxygenase)를 유효성분으로 포함하는 조성물, 또는 도코사헥사에노산(docosahexaenoic acid; DHA), 및 12-LOX(platelet type 12-Lipoxygenase)의 발현 촉진제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 간 질환 치료 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명에 따른 12-LOX, 또는 12-LOX의 발현 촉진제는 도코사헥사에노산의 간 질환 개선, 예방, 치료 효과 등을 현저히 증가시킬 수 있기 때문에, 도코사헥사에노산과의 병용투여를 통하여 간 질환의 치료 효과를 현저히 증가시킬 수 있을 것으로 기대되며, 이를 통하여 실질적으로 간 질환의 치료뿐만 아니라, 예방, 개선 등의 목적을 위하여 폭넓게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 간염 환자에서의 12-LOX의 발현량을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 간염 환자의 간 조직에서 12-LOX의 발현량이 감소된 세포의 종류를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 12-LOX 저해제가 도코사헥사에노산의 간 질환 치료 효과에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 12-LOX 저해제가 도코사헥사에노산의 간 질환 치료 효과에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 12-LOX 발현 벡터 시스템의 제조 방법에 대한 개략도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 12-LOX 발현 벡터 시스템이 도코사헥사에노산의 간 질환 치료 효과에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 12-LOX 발현 벡터 시스템이 도코사헥사에노산의 간 섬유화 치료 효과에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 12-LOX 발현 벡터 시스템이 도코사헥사에노산의 간경화 치료 효과에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 12-LOX 발현 벡터 시스템이 도코사헥사에노산의 간 질환 치료 효과에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명에서는 12-LOX 단백질이 도코사헥사에노산의 간 질환 치료 효과를 현저히 향상시킬 수 있다는 것을 확인하였으므로, 12-LOX 단백질 자체로, 또는 12-LOX의 발현량을 증가시키는 물질을 도코사헥사에노산과 병용투여함으로써, 다양한 간 질환의 효과적인 치료제로서 사용될 수 있다.
- [0021] 본 명세서에 있어서, “재조합 벡터(recombination vector)”란 12-LOX를 발현시킬 수 있도록 제작된 벡터를 총칭하며, 바람직하게는 리포좀, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 바이러스 벡터 등을 포함하며, 더욱 바람직하게는 바이러스 벡터이나, 12-LOX를 체내에서 발현시킬 수 있는 벡터라면 이에 제한되지 않는다. 상기 바이러스 벡터의 예로는 아데노바이러스(adenovirus), 아데노부속바이러스(adeno-associated virus), 레트로바이러스(retrovirus), 렌티바이러스(lentivirus), 단순포진바이러스(herpes simplex virus), 알파바이러스(alpha virus) 등이 있다.
- [0022] 본 명세서에 있어서, “12-LOX의 발현 촉진제”란 12-LOX에 직접 또는 간접적으로 작용하여 12-LOX의 발현을 개선, 유도, 자극, 증가시키는 물질을 의미하며, 상기 물질의 종류에는 제한이 없다. 상기 물질이 12-LOX의 발현을 촉진시키는 기작은 특별히 제한되지 않으며, 일례로 전사, 번역 등의 유전자 발현을 증대시키거나, 비활성형을 활성형으로 전환시키는 기작으로 작용할 수 있다.
- [0023] 본 명세서에 있어서, “발현량 측정”이란 mRNA 및/또는 단백질의 발현 수준을 측정하는 것으로서, mRNA의 발현 수준을 측정하는 것은 생물학적 시료에서 12-LOX mRNA 존재 여부 및 발현 정도를 확인하는 것으로서, mRNA의 양을 측정함으로써 확인할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는, RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(northern blotting), DNA 마이크로어레이 칩 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 또한, 단백질의 발현 수준을 측정하는 것은 생물학적 시료로부터 12-LOX 단백질의 존재 여부 및 발현 수준을 확인하는 것으로서, 상기 12-LOX에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용해 단백질의 양을 확인하거나, 단백질의 활성을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏팅(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석법(radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크레로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로켓(Rocket) 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석(immunoprecipitation assay), 보체고정분석(complete fixation assay), FACS, 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 본 명세서에 있어서, “예방(prevention)”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 간 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0025] 본 명세서에 있어서, “치료(treatment)”란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 간 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0026] 본 명세서에 있어서 “개선(improvement)”이란, 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면, 증상의 정도를 적어도 감소시키는 행위를 의미한다. 이때 상기 본 발명의 조성물을 간 질환의 예방 또는 개선을 위하여 치료를

위한 약제와 동시에 또는 별개로 사용될 수 있다.

- [0027] 본 명세서에 있어서, “개체(individual)”란 본 발명의 조성물이 투여될 수 있는 대상을 말하며, 그 대상에는 제한이 없다.
- [0028] 본 명세서에 있어서, “약학적 조성물(pharmaceutical composition)”이란 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 유효제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.
- [0029] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 향응집제, 유효제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다. 본원에 사용된 용어 "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정직, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50 mg/kg 또는 0.001 내지 50 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서 식품 조성물은, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등에 사용할 수 있으며, 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 음료의 형태로 사용할 수 있다. 상기 식품 조성물은 건강기능식품 조성물을 포함한다. 상기 건강기능식품(health functional food)이란 인체에 유용한 기능을 가지는 원료나 성분을 사용해 제조 및/또는 가공되는 식품으로써, 일반적인 식품과 비교하여 그 성분에 특징이 있어, 보다 적극적인 건강 유지, 또는 목적 또는 기대 효과를 갖는 식품을 말한다. 이때, 식품 또는 음료 중의 도코사헥사에노산과 상기 12-LOX, 또는 12-LOX의 발현 촉진제의 양은, 일반적으로 본 발명의 식품 조성물의 경우 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물의 경우 100 mL를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 식품 조성물은 당업계에 통상적인 식품첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 충전제, 안정화제 등을 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 식품 조성물은 필수 성분으로서, 상기 도코사헥사에노산과 12-LOX, 또는 12-LOX의 발현 촉진제 외에 첨가되는 성분에는 특별한 제한은 없으며 통상의 식품과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린; 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물

100 mL당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0034] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0036] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0038] [실시예]

[0039] 실시예 1: 간염과 12-LOX와의 연관관계 확인

[0040] 간염(hepatitis)과 12-LOX(platelet type 12-Lipoxygenase)와의 연관관계를 확인하기 위하여, US Biomax Inc. 으로부터 구입한 인체 생검 슬라이드 시료(LV20812a)를 이용하여 간염 환자에서의 12-LOX의 발현량을 면역화학 염색법(immunohistochemistry; IHC)을 통하여 확인하였다. 보다 자세하게는, 간염 환자 슬라이드와 대조군인 정상인의 슬라이드(Normal)를 자일렌(Xylene) 용액에 5분씩 3회 담가 세척하고, 100 % 에탄올(Ethanol)에 3 분씩 3 회, 95 % 에탄올에 2 분씩 2 회, 70 % 에탄올에 2 분씩 2 회, 증류수로 2 분씩 2 회 담가두어 수화(hydration)시켰다. 수화 과정을 마친 슬라이드에 1 : 100으로 희석된 12-LOX 토끼 다중클론 항체(Novus Biologicals)를 처리하고 4 °C에서 16 시간 동안 반응시키고, 0.3 % 트리톤-X100이 첨가된 인산염완충용액(phosphate buffered saline; PBS)으로 세척하였다. 그리고 1 : 1,000으로 희석된 anti-rabbit IgG를 실온에서 30 분간 처리하여 반응시킨 후에, 다시 0.3 % 트리톤-X100이 첨가된 인산염완충용액을 이용하여 세척하였다. 그리고 1 % 헤마토실린 용액에 30 초 동안 담가두어 염색한 후에 증류수로 1 회 세척하고, 다시 0.25 % 염화수소(HCl)에서 1 초 반응시킨 후에 증류수로 세척하였다. 그리고 헤마토실린 매염제인 10 % 리튬카보네이트를 2~4 초간 반응시킨 후에 증류수로 세척하고, 95% 에탄올과 100% 에탄올을 이용하여 순차적으로 최종 탈수화 및 투명화 단계를 거친 후에 봉입(mounting) 하여 광학현미경으로 관찰하고 사진을 획득하였다. 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0041] 도 1에 나타난 바와 같이, 간염 환자의 간 조직 시료에서 12-LOX의 발현이 현저히 감소된 것을 확인하였다.

[0042] 또한, 간 조직 중 어떤 세포에서 12-LOX의 발현이 감소되는지 확인하기 위하여, 면역형광염색법을 실시하였다. 보다 자세하게는, CD68에 대한 항체인 Rat anti Mouse CD68(Santa Cruz)과 Invitrogen Green secondary antibody, 그리고 12-LOX에 대한 항체로 anti-12-LOX(Novus Biologicals)와 Invitrogen Red secondary antibody를 슬라이드에 처리하였다. 1차 항체는 4 °C에서 18 시간 동안 처리하였고, 2차 항체는 실온에서 2 시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 후에는 인산염완충용액으로 2회 세척하여 결합되지 않은 항체를 제거하고, DAPI(4'6-Diamidine-2'-phenylindole) 용액을 1분간 처리하여 핵을 염색하였다. 염색이 완료된 세포는 마운팅 용액으로 마운팅한 후에 형광현미경을 사용하여 발현 여부를 분석하였다. 형광값은 ImageJ를 이용하여 정량화하였으며, 이후 모든 실험 측정값은 평균 $\pm$ 표준편차(mean $\pm$ standard deviation)로 표시하였고, 통계적 분석은 GraphPad Prism program ver 5.0(GraphPad Software Inc.)을 이용하여 Student's t-test로 대조군과 실험군 간의 차이를 분석하였으며, p 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0043] 도 2에 나타난 바와 같이, 간염 환자의 간 대식세포에서 12-LOX가 감소되는 것을 확인하였다.

[0045] 실시예 2: 간염 개선과 12-LOX와의 연관관계 확인

[0046] 2.1. 12-LOX 활성 저해제와 DHA의 간염 개선 효과와의 연관관계 확인

[0047] 12-LOX와 도코사헥사에노산의 간염 개선 효과와의 연관관계를 확인하기 위하여, 일차적으로 마우스를 이용하여 실험을 진행하였다. 보다 자세하게는, 비알콜성 지방간염을 유도하기 위하여, 6-7 주령의 C57BL/6 마우스 수컷을 실온 및 습도가 조절되는 환경에 1주일 동안 적응시키고, 고지방 식이(조지방(crude fat) 60 % 함유)를 12

주간 제공하였다. 그리고 간염 개선 효과를 가지고 있다고 알려져 있는 DHA(docosahexaenoic acid) 5 mg/kg 및 /또는 12-LOX의 활성 저해제(inhibitor)인 바이칼레인(Baicalein) 5 mg/kg을 2 주간 1 일 1 회 복강 투여하였다. 그리고 마우스들을 마취하고 심장에서 채혈한 다음, 간을 적출하여 4 % 파라포름알데하이드 용액을 이용하여 고정하였다. 그리고 고정된 조직을 세척하고 탈석회(decalcification) 과정 및 탈수화 과정을 거친 후에 파라핀을 이용하여 파라핀 블록으로 제작하였다. 그리고 제작된 파라핀 블록을 3 μ m의 두께로 잘라 절편을 제작한 후에 60 $^{\circ}$ C 가열블락(Heating block)에 45 분간 놓아두어 탈파라핀을 진행하였다. 그리고 자일렌(Xylene) 용액에 5 분씩 3 회 담가 세척하고, 100 % 에탄올(Ethanol)에 3 분씩 3 회, 95 % 에탄올에 2 분씩 2 회, 70 % 에탄올에 2 분씩 2 회, 증류수로 2 분씩 2 회 담가두어 수화(hydration)시켰다. 수화 과정을 마친 파라핀 절편을 1 % 헤마토실린 용액에 30 초 동안 담가두어 염색한 후에 증류수로 1 회 세척하고, 다시 0.25 % 염화수소(HCl)에서 1 초 반응시킨 후에 증류수로 세척하였다. 그리고 헤마토실린 매염제인 10 % 리튬카보네이트를 2-4 초간 반응시킨 후에 증류수로 세척하였다. 이 후 에오신을 2 초간 처리하여 세포질을 염색한 뒤에 95 % 에탄올과 100 % 에탄올을 이용하여 순차적으로 최종 탈수화 및 투명화 단계를 거친 후에 봉입(mounting) 하여 광학현미경으로 관찰하고 사진을 획득하여 간 조직 내의 지방 축적 상태를 관찰하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0048] 도 3에 나타난 바와 같이, 고지질 식이와 DHA를 함께 투여한 실험군(DHA)에서는 간 조직 내에 지방이 축적되지 않았으며, 정상적인 간 형태를 보여주는 반면, 고지질 식이만을 제공한 대조군(Ctrl)과 고지질 식이와 DHA 및 바이칼레인을 병용투여한 실험군에서는 간 내에 지방이 많이 축적되었으며, 간 조직 또한 정상적인 형태가 아닌 것을 확인하였다.

[0049] 또한, 채취한 혈액을 이용하여 간내 중성지질(triglyceride; TG)의 농도는 EnzyChromTM Triglyceride Assay Kit(BioAssay System) 로 측정하고, 간독성 마커인 glutamic pyruvic transaminase(GPT)는 Fuji DRI-CHEM 3500s serum biochemistry analyzer (Fujifilm)를 이용하여 측정하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[0050] 도 4에 나타난 바와 같이, DHA를 투여한 실험군에서는 중성지질 및 GPT가 모두 유의성 있게 감소된 반면, DHA와 바이칼레인을 병용투여한 실험군에서는 모두 증가된 것을 확인하였다.

[0052] 상기 결과들을 통하여, DHA에 의한 간염 개선 효과가 12-LOX 활성 저해제에 의하여 유의성 있게 억제된 것을 확인하였으며, 이를 통하여 12-LOX가 DHA에 의한 간염 개선 효과에 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다.

[0054] 2.2. 12-LOX 발현용 바이러스 시스템 제작

[0055] 12-LOX의 과발현이 DHA에 의한 간염 개선 효과를 증진시키는지 확인하기 위하여, HEK293T 세포주에 AAV Helper-Free system(Cell biolabs)을 이용하여 제조사에서 제공되는 프로토콜에 따라 pAAV_RC, pAAV_Helper, 및 pAAV_12-LOX를 형질주입하였다. 12-LOX 서열은 서열번호 1의 염기서열을 이용하였고, 대조군으로는 GFP(green fluorescent protein)를 이용하였다. 형질주입된 벡터는 세포 내에서 rAAV_12-LOX가 자가조립되기 때문에, 이후 용해된 세포로부터 AAV_12-LOX 바이러스를 추출한 뒤 Heparin conjugated agarose beads를 이용하여 AAV_12-LOX를 정제하였다. 정제된 AAV_12-LOX는 표적 세포로 HEK293 세포주에 형질감염시키고, 표적 세포에서의 12-LOX 발현 여부를 웨스턴 블롯팅을 이용하여 확인하였다. 보다 자세하게는, 배양된 표적 세포를 차가운 인산염완충용액을 이용하여 세척하고, RIPA 버퍼를 이용하여 세포를 용해시킨 후에, 용해물을 10 % SDS-PAGE를 이용하여 크기별로 분리하고, 분리된 단백질을 PVDF 멤브레인으로 이동시켰다. 그리고 멤브레인은 블로킹 용액(5 % skim milk)에 침지시켜 1 시간 동안 반응시킨 후에, anti-12-LOX(Novus Biologicals) 또는 anti-actin(Santa Cruz)을 첨가하고 4 $^{\circ}$ C에서 16 시간 동안 반응시켰다. 그리고 secondary anti-rabbit IgG(Invitrogen)를 처리하고 1 시간 동안 실온에서 반응시킨 후에, ECL 용액을 이용하여 관찰하였다. 실험의 전반적인 개략도 및 웨스턴 블롯팅 결과는 도 5에 나타내었다.

[0056] 도 5에 나타난 바와 같이, AAV-12-LOX를 표적 세포에 형질입하면, 표적 세포 내의 염색체 내에 CMV_12-LOX 유전자를 삽입하여 표적 세포 내에서 12-LOX를 발현시킨다는 것을 확인하였다.

[0058] 2.3. 12-LOX 과발현과 도코사헥사에노산의 간염 개선 효과와의 연관관계 확인

[0059] 12-LOX와 간염 개선과의 연관관계를 확인하기 위하여, 실시예 2.1과 유사한 방법으로 C57BL/6 마우스 수컷에서

고지질 식이를 16 주간 제공하며, 비알콜성 지방간염을 유도하였다. 그리고 비알콜성 지방간염이 유도된 마우스에 실시예 2.2와 동일한 방법으로 제작된 AAV_12-LOX를 투여하여 12-LOX의 과발현을 유도하고, DHA 1 mg/kg을 3 주간 1 일 1 회 복강 투여하였다. 그리고 마우스들을 마취하고 심장에서 채혈한 다음, 간을 적출하여 사진을 찍고, 간의 무게를 측정하였다. 그 결과는 도 6에 나타내었다. 그리고 적출된 간은 4 % 파라포름알데하이드 용액을 이용하여 고정하고 세척한 뒤, 탈석회(decalcification) 과정 및 탈수화 과정을 거친 후에 파라핀을 이용하여 파라핀 블록으로 제작하였다. 그리고 제작된 파라핀 블록을 3 μ m의 두께로 잘라 절편을 제작한 후에 간 조직 내의 콜라겐 침착 정도를 확인하기 위하여 시리우스 레드(Sirius red)를 이용하여 염색을 실시하였다. 그 결과는 도 7에 나타내었다. 또한, 획득된 간 조직을 이용하여 간경화 마커인 α -SMA 및 TGF β 의 발현을 웨스턴 블롯팅을 이용하여 확인하였다. 웨스턴 블롯팅은 실시예 2.2와 동일한 방법으로 진행하였으며, 항체로는 anti- α -SMA(Abcam), anti-TGF beta 1(Santa Cruz), anti-12-LOX(Novus Biologicals) 및 anti-actin(Santa Cruz)을 이용하였다. 그 결과는 도 8에 나타내었다. 또한, 실시예 2.1과 동일한 방법으로 심장에서 채취한 혈액을 이용하여 간내 중성지방 및 GPT의 농도를 측정하였다. 그 결과는 도 9에 나타내었다.

[0060] 도 6에 나타난 바와 같이, 고지질 식이가 제공된 마우스에 DHA를 투여한 대조군(AAV-GFP)에서는 간의 무게가 약간 감소된 반면, DHA의 투여와 함께 12-LOX를 과발현시킨 실험군(AAV_12-LOX)에서는 간의 무게가 현저히 감소되었으며, 간의 형태도 정상에 가까운 것을 확인하였다.

[0061] 도 7에 나타난 바와 같이, 고지질 식이를 제공한 마우스에서는 콜라겐의 축적이 증가되었으며, DHA를 투여한 실험 군에서는 콜라겐의 축적이 약하게 감소된 것을 확인하였다. 그러나 DHA의 투여와 함께 12-LOX를 과발현시킨 실험군에서는 콜라겐의 축적이 현저히 감소된 것을 확인하였다.

[0062] 도 8에 나타난 바와 같이, DHA의 투여와 함께 12-LOX를 과발현시킨 실험군에서는 간경화 마커인 α -SMA 및 TGF β 의 발현이 현저히 감소된 것을 확인하였다.

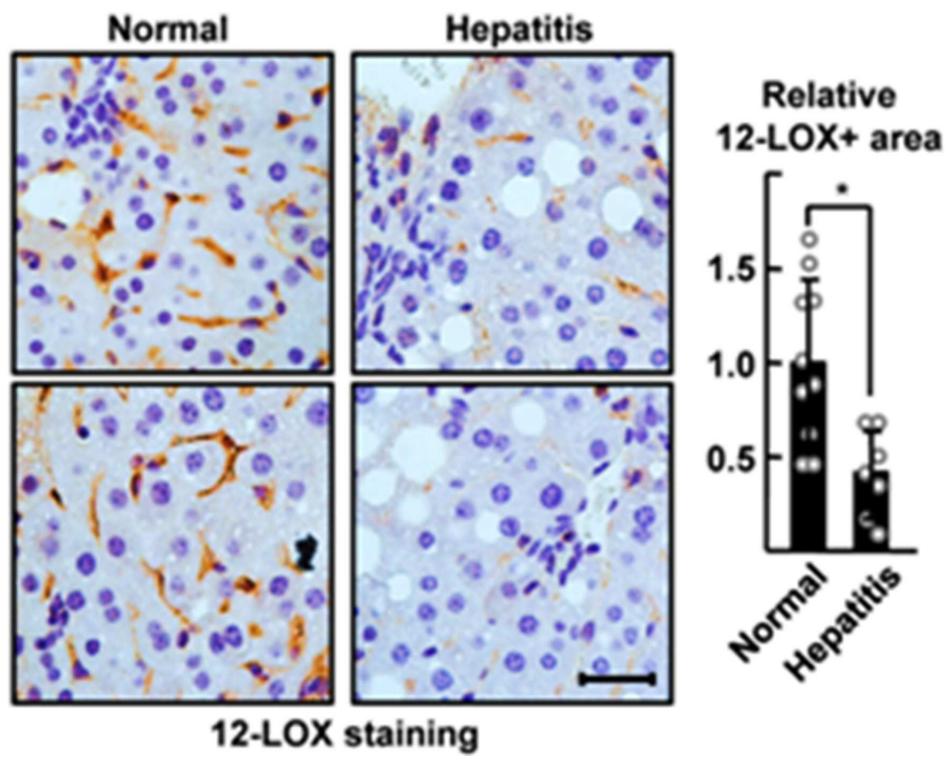
[0063] 도 9에 나타난 바와 같이, DHA의 투여와 함께 12-LOX를 과발현시킨 실험군에서는 DHA 단독 투여와 비교하여 중성지방 및 GPT의 농도가 유의성 있게 감소된 것을 확인하였다.

[0065] 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 12-LOX는 도코사헥사에노산의 간 질환 개선 효과, 예를 들어, 간섬유화, 간경화, 간염, 비알콜성 지방간염 등의 개선 효과를 현저히 향상시킬 수 있다는 것을 확인하였다. 기존에 도코사헥사에노산이 간에서 지질 축적을 억제하는 것이 확인되었으나, 인체를 대상으로 한 임상시험에서 그 효과가 미비하여 약물로 개발되지 못하였는데, 본 발명을 통해 12-LOX와 병용투여하는 경우 그 치료 효과를 현저히 증가시킬 수 있다는 것을 확인하였다. 이를 통하여, 도코사헥사에노산과 함께, 12-LOX 자체, 또는 12-LOX를 발현시킬 수 있는 치료용 벡터 시스템, 또는 12-LOX를 과발현하는 세포 치료제, 또는 12-LOX의 발현을 촉진시키는 물질을 병용투여함으로써 간 질환의 치료 효과를 현저히 증가시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

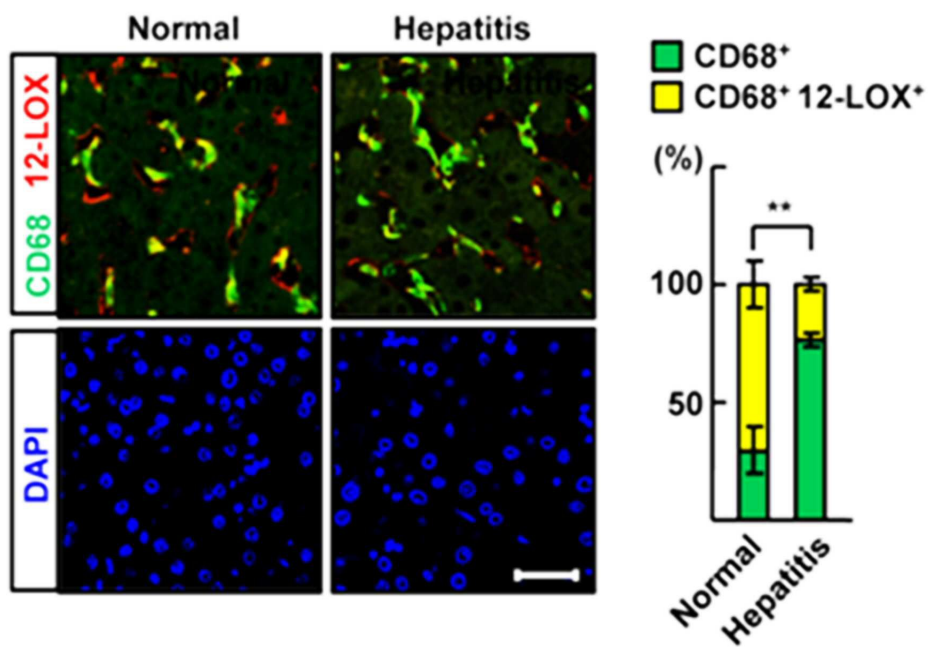
[0067] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

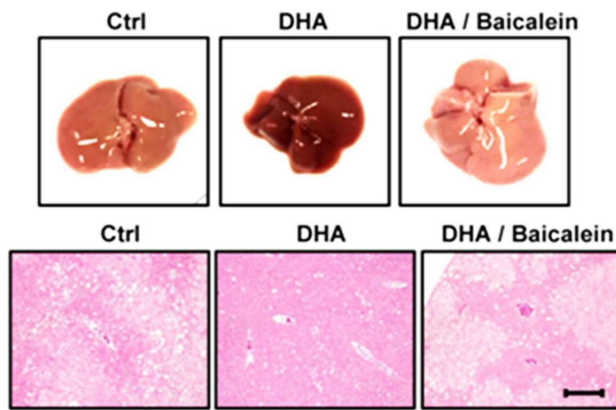
도면1



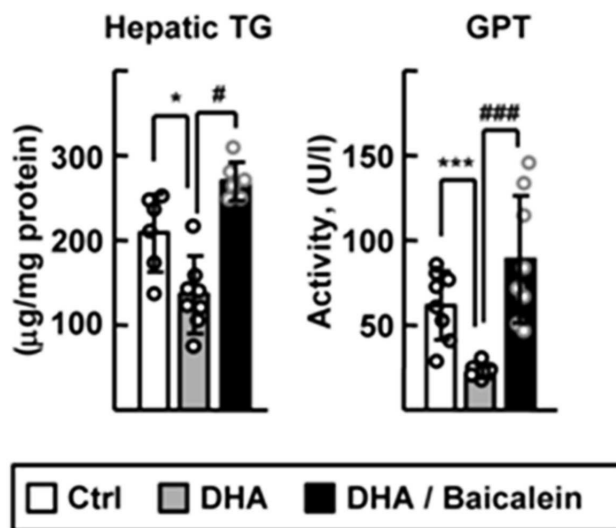
도면2



도면3

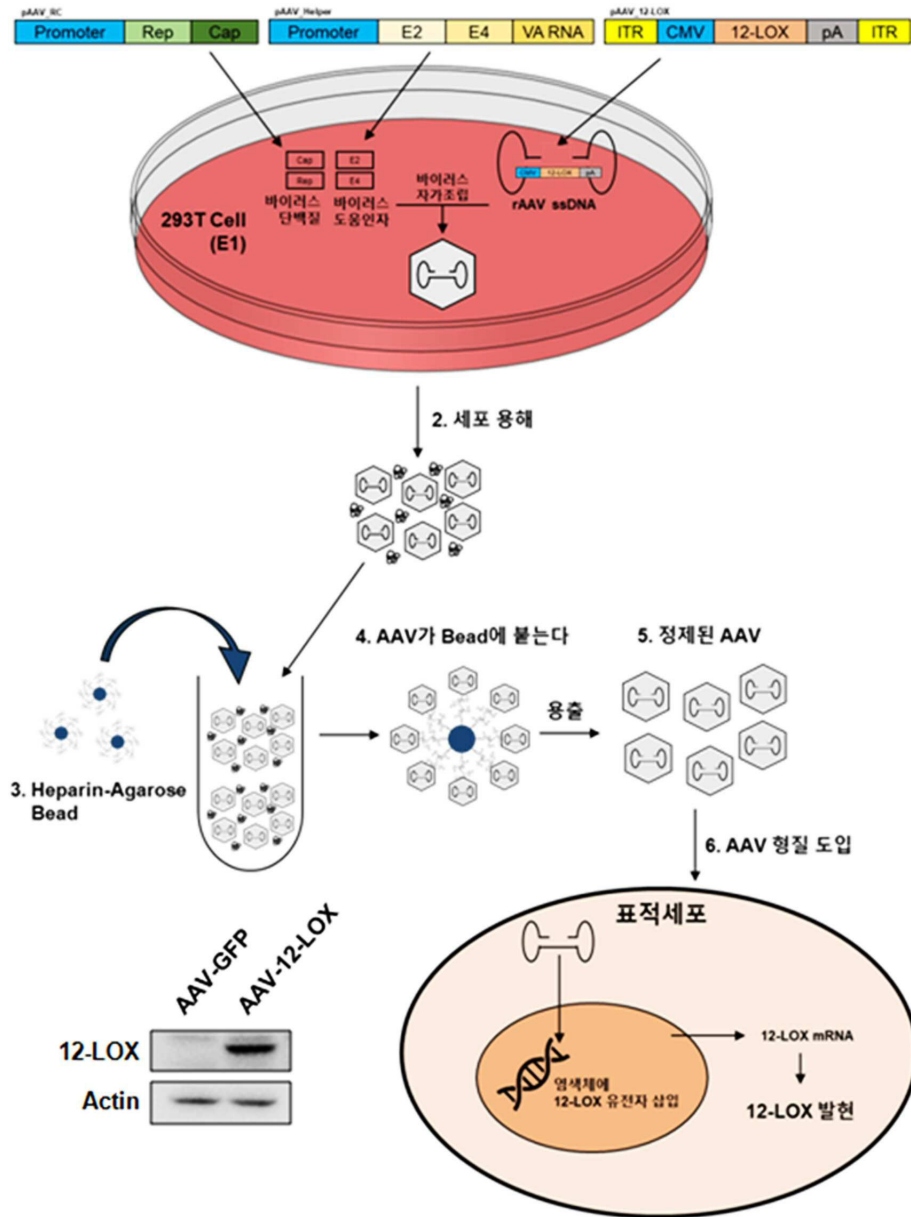


도면4

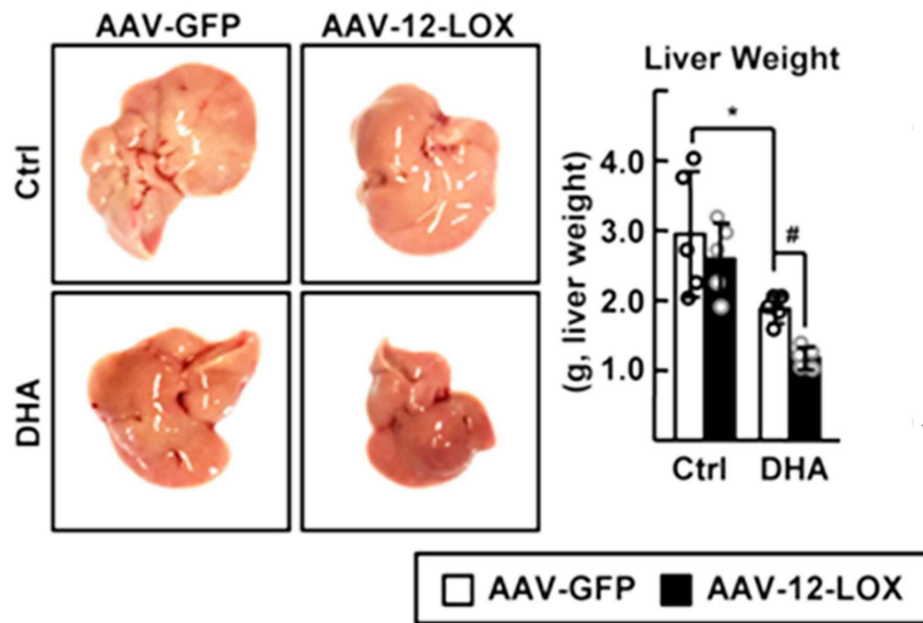


도면5

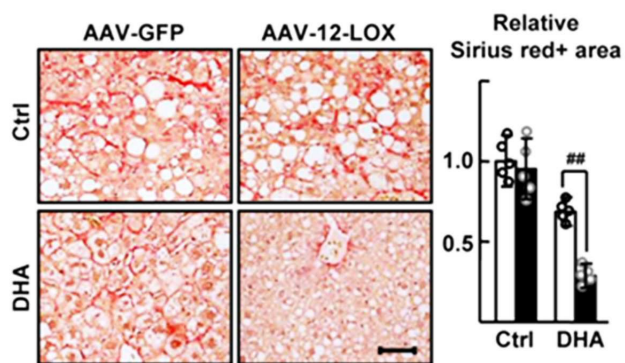
1. HEK293T 세포에 pAAV_RC / pAAV_Helper / pAAV_12-LOX 형질주입



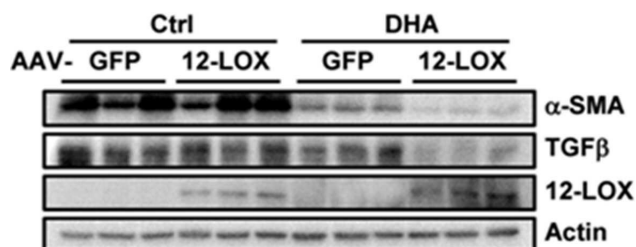
도면6



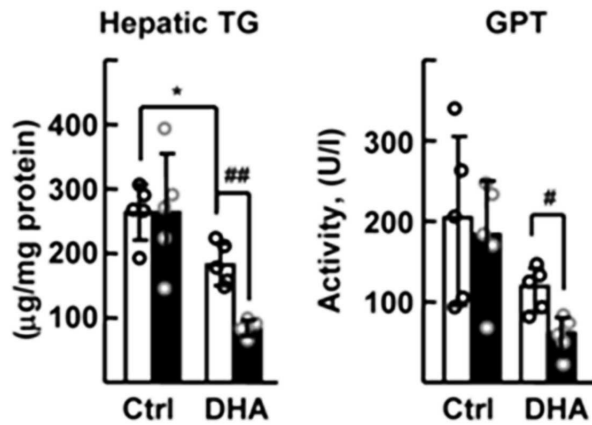
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Seoul National University R&DB Foundation
Korea University Research & Business Foundation
- <120> Composition for preventing or treating liver disease comprising a promoting agent for 12-LOX expression
- <130> MP18-275
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1992
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> mouse Alox12 cDNA insert sequence
- <400> 1

```

atgggccgct accgcgtccg tgtgttcact ggggcctggc tcttctccgg atccctcaac      60

ctagtgcgtt tgtggctggt tggggagcac cgggaggcga aactggagct gcaactgcgg      120
ccagcgcggg gcaaggagga ggagtttgac ttcgacgttc cggaggactt ggggccactg      180
cagtttgta aactgcacaa acagcacaca gtgtgtgatg acgcctggtt ctgcaacctc      240
atcacagttc aggggccggg gacaagtgca gaggccgtgt ttcctgcta ccgctgggtg      300
cagggagagg gaatcctgag cctcccggag gggacagccc gcctggcagg agacaatgcc      360
ttagatgtct tccagaagta tcgagaaaag gaactgaagg aaagacaaca gacctactgc      420
tgggccacct ggaagaagg cttacctcag acaatagcag cggactgtaa ggatgacctt      480

cttccaaata ttagattcca tgaggagaag agactggact ttgaatggac gttgaaggcg      540

```

ggggttcttg aaatgggcct caaacgtgtt tataccctcc tgagaagctg gaaccatctg 600
gaagactttg atcagatctt ctggggccag aagagtgcct tggccgagaa ggttcaccag 660
tgttggcagg aagatgaact ctttggctac cagtctctca atggcgccaa ccccatgctt 720
ttgagacgct ccacctctct gccctccaga ctggtactgc cctctgggat ggaggagctt 780
caagctcagt tggagaaaga actcaagaat ggatccctgt ttgaagctga ctttatcctg 840
ctggatggaa ttccagctaa tgtgatccga ggagaaccac agtacctggc tgccctctt 900

gtcatgctga ggatggaccc cgggtgggaag ctgctacca tggctatcca gattcagccc 960
cctaacccca gctccccagc tccaacactg ttcttgcct cggatcctcc acttgcctgg 1020
ctcttggcta agatctgggt ccgaaattca gatttccaac tgcaggagct ccaattccat 1080
ttgctgaaca cccatctggg ggctgaggtc atcgctgttg ccaccatgag atgcctccca 1140
ggactgcacc ctatcttcaa gctcctctgt ccacacatcc gttacactat ggaaattaac 1200
acgcgaagcc ggaccagct catctcagat ggaggaatat ttgatcaggt agtgagcaca 1260
ggtggaggcg gccatgttca gttgcttact cgggcagtgg ctgagctgac ttaccactcc 1320

ctctgtctc ctgatgatct ggctaaccga ggcctgtgta gaatcccaag tgctctctat 1380
gctcgggatg ctttacagct ctgggaagtc actgccaggt atgtgaagg gatggtccat 1440
ctcttctacc agagtgatga tattgtgagg ggagaccag agctgcagc ctggtgtcgg 1500
gagatcactg aagtggggct gtgccatgcc caggacagag gattccctgt ctcttccag 1560
tccccggctc agctctgcca ttctctcacc atgtgtgttt tcacatgcac tgcccagcat 1620
gctgccatca accagggcca gctggactgg tatggttggg tacctaagtc tccatgcaca 1680
atgaggatgc ctccgccac cagcaaggac gacgtgacga tggagaccgt gatggggtcg 1740

ctacctgatg tgcagaaggc ctgtcttcag atgactatca catggcacct gggtcgctg 1800
cagccagaca tggtaacctt aggacaccac acagaaaaat atttctcaga cccaaggacc 1860
aaagctgtgc tcagccaatt tcaagcagat ttggacaatt tggagaaaga gattacagcc 1920
cggaatgagc aacttgacct gccttatgaa tacctcaagc ccagccgcat agagaacagt 1980
atcaccatct ag 1992

<210> 2

<211> 663

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAV-mouse 12-LOX amino acid sequence

<400> 2

Met Gly Arg Tyr Arg Val Arg Val Val Thr Gly Ala Trp Leu Phe Ser
1 5 10 15
Gly Ser Leu Asn Leu Val Arg Leu Trp Leu Val Gly Glu His Arg Glu
20 25 30
Ala Lys Leu Glu Leu Gln Leu Arg Pro Ala Arg Gly Lys Glu Glu Glu
35 40 45
Phe Asp Phe Asp Val Pro Glu Asp Leu Gly Pro Leu Gln Phe Val Lys
50 55 60
Leu His Lys Gln His Thr Val Val Asp Asp Ala Trp Phe Cys Asn Leu
65 70 75 80
Ile Thr Val Gln Gly Pro Gly Thr Ser Ala Glu Ala Val Phe Pro Cys
85 90 95
Tyr Arg Trp Val Gln Gly Glu Gly Ile Leu Ser Leu Pro Glu Gly Thr
100 105 110
Ala Arg Leu Ala Gly Asp Asn Ala Leu Asp Val Phe Gln Lys Tyr Arg
115 120 125
Glu Lys Glu Leu Lys Glu Arg Gln Gln Thr Tyr Cys Trp Ala Thr Trp
130 135 140
Lys Glu Gly Leu Pro Gln Thr Ile Ala Ala Asp Cys Lys Asp Asp Leu
145 150 155 160
Pro Pro Asn Met Arg Phe His Glu Glu Lys Arg Leu Asp Phe Glu Trp
165 170 175
Thr Leu Lys Ala Gly Val Leu Glu Met Gly Leu Lys Arg Val Tyr Thr
180 185 190
Leu Leu Arg Ser Trp Asn His Leu Glu Asp Phe Asp Gln Ile Phe Trp
195 200 205
Gly Gln Lys Ser Ala Leu Ala Glu Lys Val His Gln Cys Trp Gln Glu
210 215 220
Asp Glu Leu Phe Gly Tyr Gln Phe Leu Asn Gly Ala Asn Pro Met Leu
225 230 235 240
Leu Arg Arg Ser Thr Ser Leu Pro Ser Arg Leu Val Leu Pro Ser Gly
245 250 255

Met Glu Glu Leu Gln Ala Gln Leu Glu Lys Glu Leu Lys Asn Gly Ser
260 265 270

Leu Phe Glu Ala Asp Phe Ile Leu Leu Asp Gly Ile Pro Ala Asn Val
275 280 285

Ile Arg Gly Glu Pro Gln Tyr Leu Ala Ala Pro Leu Val Met Leu Arg
290 295 300

Met Asp Pro Gly Gly Lys Leu Leu Pro Met Ala Ile Gln Ile Gln Pro
305 310 315 320

Pro Asn Pro Ser Ser Pro Ala Pro Thr Leu Phe Leu Pro Ser Asp Pro
325 330 335

Pro Leu Ala Trp Leu Leu Ala Lys Ile Trp Val Arg Asn Ser Asp Phe
340 345 350

Gln Leu Gln Glu Leu Gln Phe His Leu Leu Asn Thr His Leu Val Ala
355 360 365

Glu Val Ile Ala Val Ala Thr Met Arg Cys Leu Pro Gly Leu His Pro
370 375 380

Ile Phe Lys Leu Leu Val Pro His Ile Arg Tyr Thr Met Glu Ile Asn
385 390 395 400

Thr Arg Ser Arg Thr Gln Leu Ile Ser Asp Gly Gly Ile Phe Asp Gln
405 410 415

Val Val Ser Thr Gly Gly Gly Gly His Val Gln Leu Leu Thr Arg Ala
420 425 430

Val Ala Gln Leu Thr Tyr His Ser Leu Cys Pro Pro Asp Asp Leu Ala
435 440 445

Asn Arg Gly Leu Leu Arg Ile Pro Ser Ala Leu Tyr Ala Arg Asp Ala
450 455 460

Leu Gln Leu Trp Glu Val Thr Ala Arg Tyr Val Lys Gly Met Val His
465 470 475 480

Leu Phe Tyr Gln Ser Asp Asp Ile Val Arg Gly Asp Pro Glu Leu Gln
485 490 495

Ala Trp Cys Arg Glu Ile Thr Glu Val Gly Leu Cys His Ala Gln Asp

500 505 510
 Arg Gly Phe Pro Val Ser Phe Gln Ser Arg Ala Gln Leu Cys His Phe
 515 520 525
 Leu Thr Met Cys Val Phe Thr Cys Thr Ala Gln His Ala Ala Ile Asn
 530 535 540
 Gln Gly Gln Leu Asp Trp Tyr Gly Trp Val Pro Asn Ala Pro Cys Thr
 545 550 555 560
 Met Arg Met Pro Pro Pro Thr Ser Lys Asp Asp Val Thr Met Glu Thr
 565 570 575
 Val Met Gly Ser Leu Pro Asp Val Gln Lys Ala Cys Leu Gln Met Thr
 580 585 590
 Ile Thr Trp His Leu Gly Arg Leu Gln Pro Asp Met Val Pro Leu Gly
 595 600 605
 His His Thr Glu Lys Tyr Phe Ser Asp Pro Arg Thr Lys Ala Val Leu
 610 615 620
 Ser Gln Phe Gln Ala Asp Leu Asp Asn Leu Glu Lys Glu Ile Thr Ala
 625 630 635 640
 Arg Asn Glu Gln Leu Asp Leu Pro Tyr Glu Tyr Leu Lys Pro Ser Arg

645 650 655
 Ile Glu Asn Ser Ile Thr Ile
 660

<210> 3

<211> 2335

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mRNA sequence of human 12-LOX

<400> 3

cggtccct cgcctaagct gctggggggc gccatgggcc gctaccgcat ccgcgtggcc	60
accggggcct ggctcttctc cgggtcgtac aaccgcgtgc agctttggct ggtcgggacg	120
cgcggggagg cggagctgga gctgcagctg cgcccgccgc ggggcgagga ggaggagttt	180
gatcatgacg ttgcagagga cttggggctc ctgcagttcg tgaggctgcg caagcaccac	240
tggtggtgg acgacgcgtg gttctgcgac cgcatcacgg tgcagggcc tggagcctgc	300

gcggaggtgg ccttcccgctg ctaccgctgg gtgcaggcg aggacatcct gaggctgccc	360
gagggcaccg cccgcctgcc aggagacaat gctttggaca tgttccagaa gcatcgagag	420
aaggaactga aagacagaca gcagatctac tgctgggcca cctggaagga agggttaccc	480
ctgaccatcg ctgcagaccg taaggatgat ctacctcaa atatgagatt ccatgaggag	540
aagaggctgg actttgaatg gacactgaag gcaggggctc tggagatggc cctcaaacgt	600
gtttacacc tctgagctc ctggaactgc ctagaagact ttgatcagat ctctggggc	660
cagaagagtg ccctggctga gaaggttcgc cagtgtctggc aggatgatga gttgttcagc	720
taccagtacc tcaatgtgc caaccccatg ctgttgagac gctcgacctc tctgccctcc	780
aggctagtgc tgcctcagg gatggaagag ctctgggctc aactggagaa agaacttcag	840
aatggttccc tgittgaagc tgacttcac ctcttgatg gaattccagc caacgtgatc	900
cgaggagaga agcaatact ggctgcccc ctcttatgc tgaagatgga gccaatggg	960
aagctgcagc ccatggatc ccagattcag cctcccaacc ccagctctcc aacccaaca	1020
ctgttctgc cctcagacc cccacttgc tggctcctgg caaagtcctg ggtccgaaat	1080
tcagatttcc aactgcagc gatccagtat cacttctga acacgcacct ggtggctgag	1140
gtcatcgctg tgcaccat gcggtgcctc ccaggactgc acccatctt caagtctctg	1200
atccccata tccgtacac catggaatc aacaccggg cccggacca actcatctca	1260
gatggaggaa tttttgataa ggcagtgagc acagggtggag ggggccatgt acagttgctc	1320
cgctgggagg cagctcagct gacctactgc tcctctgtc ctctgacga cctggctgac	1380
cggggcctgc tgggactccc aggtgctctc tatgccatg atgctttacg gctctgggag	1440
atcattgcca ggtatgtgga ggggatctc cacctctct accaaaggga tgacatagt	1500
aagggggacc ctgagctgca ggcctgggtg cgggagatca cggaggtggg gctgtgccag	1560
gcccaggacc gaggtttccc tgtctcctc cagtccaga gteaactctg ccatttctc	1620
accatgtgcg tcttcactg cactgccag catgccga tcaaccaggg ccagctggac	1680
tggtatgcct gggctccctaa tgctccatgc acaatgcgga tgccccacc caccaccaag	1740
gaagatgtga cgatggccac agtgatgggg tcaactactg atgtccgca ggcctgtctt	1800
caaatggcca tctcatggca tctgagtcg cgccagccag acatggtgcc tctggggcac	1860
cacaaagaaa aatatttctc agggcccaag cccaaagctg tgctaaacca attccgaaca	1920
gatttgaaa agctggaaa ggagattaca gcccgaatg agcaactga ctggcctat	1980
gaatatctga agcccagctg catagagaac agtgtacca tctgagcct agagtgactc	2040
tacctgaag atttcacatc agctttagga ctgacattc tatctgaat ttcattgttt	2100
cctaaagtct ctgctgctaa ggctctattt cctccccag ttaaaccacc tacattagta	2160

tccactagc ccaggggagc agtaaacttt ctctgcaaag actagatcct tttttacgct 2220
 ttgcagaccg catagtcaact gtctcaacta ctgagctctc ctgctgcagc atgaaggcag 2280
 ccacagacaa catggaaatg agtgtgacta tgttccaata aaactttatg gacac 2335

<210> 4

<211> 663

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of human 12-LOX

<400> 4

Met Gly Arg Tyr Arg Ile Arg Val Ala Thr Gly Ala Trp Leu Phe Ser

1 5 10 15

Gly Ser Tyr Asn Arg Val Gln Leu Trp Leu Val Gly Thr Arg Gly Glu

20 25 30

Ala Glu Leu Glu Leu Gln Leu Arg Pro Ala Arg Gly Glu Glu Glu Glu

35 40 45

Phe Asp His Asp Val Ala Glu Asp Leu Gly Leu Leu Gln Phe Val Arg

50 55 60

Leu Arg Lys His His Trp Leu Val Asp Asp Ala Trp Phe Cys Asp Arg

65 70 75 80

Ile Thr Val Gln Gly Pro Gly Ala Cys Ala Glu Val Ala Phe Pro Cys

85 90 95

Tyr Arg Trp Val Gln Gly Glu Asp Ile Leu Ser Leu Pro Glu Gly Thr

100 105 110

Ala Arg Leu Pro Gly Asp Asn Ala Leu Asp Met Phe Gln Lys His Arg

115 120 125

Glu Lys Glu Leu Lys Asp Arg Gln Gln Ile Tyr Cys Trp Ala Thr Trp

130 135 140

Lys Glu Gly Leu Pro Leu Thr Ile Ala Ala Asp Arg Lys Asp Asp Leu

145 150 155 160

Pro Pro Asn Met Arg Phe His Glu Glu Lys Arg Leu Asp Phe Glu Trp

165 170 175

Thr Leu Lys Ala Gly Ala Leu Glu Met Ala Leu Lys Arg Val Tyr Thr

180 185 190
 Leu Leu Ser Ser Trp Asn Cys Leu Glu Asp Phe Asp Gln Ile Phe Trp

 195 200 205
 Gly Gln Lys Ser Ala Leu Ala Glu Lys Val Arg Gln Cys Trp Gln Asp
 210 215 220
 Asp Glu Leu Phe Ser Tyr Gln Phe Leu Asn Gly Ala Asn Pro Met Leu
 225 230 235 240
 Leu Arg Arg Ser Thr Ser Leu Pro Ser Arg Leu Val Leu Pro Ser Gly
 245 250 255
 Met Glu Glu Leu Arg Ala Gln Leu Glu Lys Glu Leu Gln Asn Gly Ser
 260 265 270

 Leu Phe Glu Ala Asp Phe Ile Leu Leu Asp Gly Ile Pro Ala Asn Val
 275 280 285
 Ile Arg Gly Glu Lys Gln Tyr Leu Ala Ala Pro Leu Val Met Leu Lys
 290 295 300
 Met Glu Pro Asn Gly Lys Leu Gln Pro Met Val Ile Gln Ile Gln Pro
 305 310 315 320
 Pro Asn Pro Ser Ser Pro Thr Pro Thr Leu Phe Leu Pro Ser Asp Pro
 325 330 335
 Pro Leu Ala Trp Leu Leu Ala Lys Ser Trp Val Arg Asn Ser Asp Phe

 340 345 350
 Gln Leu His Glu Ile Gln Tyr His Leu Leu Asn Thr His Leu Val Ala
 355 360 365
 Glu Val Ile Ala Val Ala Thr Met Arg Cys Leu Pro Gly Leu His Pro
 370 375 380
 Ile Phe Lys Phe Leu Ile Pro His Ile Arg Tyr Thr Met Glu Ile Asn
 385 390 395 400
 Thr Arg Ala Arg Thr Gln Leu Ile Ser Asp Gly Gly Ile Phe Asp Lys
 405 410 415

 Ala Val Ser Thr Gly Gly Gly Gly His Val Gln Leu Leu Arg Arg Ala
 420 425 430

Ala Ala Gln Leu Thr Tyr Cys Ser Leu Cys Pro Pro Asp Asp Leu Ala
435 440 445

Asp Arg Gly Leu Leu Gly Leu Pro Gly Ala Leu Tyr Ala His Asp Ala
450 455 460

Leu Arg Leu Trp Glu Ile Ile Ala Arg Tyr Val Glu Gly Ile Val His
465 470 475 480

Leu Phe Tyr Gln Arg Asp Asp Ile Val Lys Gly Asp Pro Glu Leu Gln
485 490 495

Ala Trp Cys Arg Glu Ile Thr Glu Val Gly Leu Cys Gln Ala Gln Asp
500 505 510

Arg Gly Phe Pro Val Ser Phe Gln Ser Gln Ser Gln Leu Cys His Phe
515 520 525

Leu Thr Met Cys Val Phe Thr Cys Thr Ala Gln His Ala Ala Ile Asn
530 535 540

Gln Gly Gln Leu Asp Trp Tyr Ala Trp Val Pro Asn Ala Pro Cys Thr
545 550 555 560

Met Arg Met Pro Pro Pro Thr Thr Lys Glu Asp Val Thr Met Ala Thr
565 570 575

Val Met Gly Ser Leu Pro Asp Val Arg Gln Ala Cys Leu Gln Met Ala
580 585 590

Ile Ser Trp His Leu Ser Arg Arg Gln Pro Asp Met Val Pro Leu Gly
595 600 605

His His Lys Glu Lys Tyr Phe Ser Gly Pro Lys Pro Lys Ala Val Leu
610 615 620

Asn Gln Phe Arg Thr Asp Leu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Ile Thr Ala
625 630 635 640

Arg Asn Glu Gln Leu Asp Trp Pro Tyr Glu Tyr Leu Lys Pro Ser Cys
645 650 655

Ile Glu Asn Ser Val Thr Ile
660