



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년05월18일
(11) 등록번호 10-1859641
(24) 등록일자 2018년05월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/357 (2006.01) A61K 31/4425 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/357 (2013.01)
A61K 31/4425 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0183454

(22) 출원일자 2016년12월30일

심사청구일자 2016년12월30일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020110036610 A*

US09422306 B2*

CN102106851 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

(72) 발명자

노종렬

서울특별시 강남구 삼성로 150, 103동 1204호(대치동, 한보미도맨션)

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 7 항

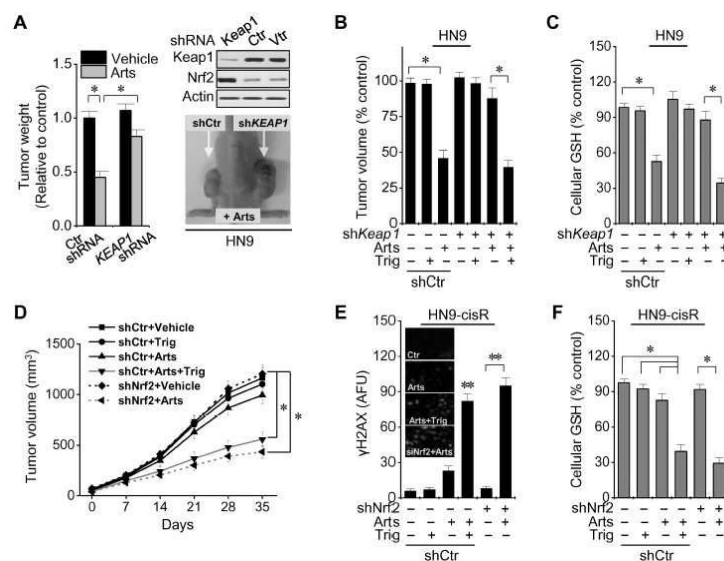
심사관 : 박수진

(54) 발명의 명칭 아르테미신 유도체 및 Nrf2 억제제를 포함하는 항암용 조성물

(57) 요약

본 발명은 아르테미신 또는 이의 유도체; 및 Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 억제제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 항암 보조제 및 항암 보조제 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 아르테미신 또는 이의 유도체; 및 Nrf2 억제제는 암 세포에서 페로토시스를 유발하여 암 세포의 선택적 사멸을 유도할 뿐만 아니라, 기존 항암제인 시스플라틴 저항성 암에 대해서도 항암 효과를 나타낼 수 있어 새로운 항암제로 유용하게 활용할 수 있다. 또한 아르테미신 또는 이의 유도체에 대한 저항성을 새롭게 스크리닝될 Nrf2 억제제를 통해 개선할 수 있으므로, 저항성에 대한 기존 항암제들의 한계를 극복한 새로운 복합 항암 제제로 활용될 수 있다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 48/00 (2013.01)

G01N 33/5044 (2013.01)

G01N 33/57496 (2013.01)

G01N 2333/90209 (2013.01)

G01N 2333/90241 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A1A15054540

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업(사업명(대))-개인연구지원사업(중견연구)(서업명(중))

연구과제명 Cisplatin 저항성과 정상조직 독성 극복을 위한 병용 치료제 발굴과 전임상

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2017.10.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

아르테수네이트 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및 Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 억제제를 포함하며,

상기 Nrf2 억제제는 안티센스, dsRNA, 리보자임, 앵타머, Nrf2 결합 단백질의 단편, 항체 또는 항체의 단편, 트리고넨린(trigonelline), 아스코르브산, 루테올린(luteolin), 오크라톡신 A(ochratoxin A), 크리신(chrysin), 브루사톨(brusatol) 및 ATRA (all-trans retinoic acid)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 암은 두경부암인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 암은 시스플라틴(Cisplatin), 카르보플라틴(Carboplatin) 및 네다플라틴(Nedaplatin) 으로 이루어진 군에서 선택된 백금 계열 항암제에 대해 저항성 암인 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 아르테수네이트 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 암세포에서 페로토시스(ferroptosis)를 유발하는 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 암은 페로토시스 저항성 암인 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 억제제를 포함하며,

상기 Nrf2 억제제는 안티센스, dsRNA, 리보자임, 앵타머, Nrf2 결합 단백질의 단편, 항체 또는 항체의 단편, 트리고넨린(trigonelline), 아스코르브산, 루테올린(luteolin), 오크라톡신 A(ochratoxin A), 크리신(chrysin),

브루사톨(brusatol) 및 ATRA (all-*trans* retinoic acid)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 아르테수네이트 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 대한 저항성 극복을 위한 항암 치료 보조용 조성물.

청구항 10

아르테수네이트 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 대한 저항성 암세포에 후보물질을 처리하는 단계; 및

상기 암세포에서 Nrf2, HO-1(Heme oxygenase-1) 또는 NQO1 (NAD(P)H quinone dehydrogenase 1) 의 발현 감소를 유발하는 물질을 선별하는 단계; 를 포함하는 아르테수네이트 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 대한 저항성 극복용 항암 보조제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아르테미신 또는 이의 유도체; 및 Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 억제제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 항암 보조제 및 항암 보조제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 의학 관련 기술이 급속도로 발전한 오늘날에 있어서도 암은 아직 완전히 인류에게 위협적인 질병 중 하나이며, 많은 사람들이 암 진단을 받고, 암 또는 그와 관련된 합병증으로 인해 사망하고 있다.

[0004] 특히 두경부암(Head and neck cancer)은 비강, 인두, 후두, 침샘, 갑상선 등의 조직에서 발생하는 암으로써, 세계적으로 발생빈도가 전 악성종양의 약 5% 정도를 차지하고 있다. 세계적으로 두경부암의 발생빈도는 점차로 증가하고 있으며, 이러한 두경부암의 치료를 위해서 현재 임상에서 사용되고 있는 항암제 중 가장 강력한 항암제인 시스플라틴이 사용되고 있음에도 시스플라틴에 대한 저항성이 지속적으로 유발되어 항암 치료에 한계점으로 지적되고 있다. 따라서 이를 대체할 수 있는 새로운 항암제에 대한 필요성이 매우 높다.

[0005] 시스플라틴은 두경부암 뿐만 아니라, 폐암, 유방암, 방광암, 위암, 자궁경부암, 골수종 등과 같은 다양한 종류의 암을 치료하는데 매우 효과적이라고 알려져 있다. 시스플라틴은 백금(platinum)을 함유한 중금속 화합물로서 백금 원자를 중심으로 2개의 염소 원자와 2개의 암모니아 분자가 cis-형으로 결합되어 있으며, DNA 가닥상의 인접한 2개의 구아닌(guanine)과 결합하여 인터스트랜드 크로스링크(interstrand crosslink)를 형성하여 DNA 합성을 억제한다. 즉, 암세포의 핵 내에 존재하는 DNA 이중나선 구조에 부착되어 DNA 복제를 저해하여 암세포 성장 및 증식을 억제하고 암세포를 제거하여 항암효과를 나타낸다. 그러나 시스플라틴은 그 내성으로 인해 임상적인 문제가 증가하고 있어 이를 대체할 수 있는 새로운 항암제 및 치료 방법에 관한 필요성이 있다.

[0006] 아르테미신 계열 약물은 아르테미시아 앤누아(Artemisia annua)의 잎으로부터 추출 및 단리된 세스퀴테르펜 락톤 엔도퍼옥사이드이고, 항말라리아 의약으로서 공지되어 있다. 아르테미시닌 및 이의 유도체는 아르테미시아 앤누아 엘(Artemisia annua L.)을 위한 우수 농산물 및 수집 제도(GACP)에 대한 WHO 논문에 기재되어 있다[참조: WHO 논문 2006]. 아르테미신은 항 말라리아 약물로 유명하나, 최근에는 결핵, 암, 뇌종양과 같은 새로운 의약 용도에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다. 그러나 아직까지 아르테미신 계열 약물의 새로운 의약용도에 대한 확립된 연구 및 기전이 많이 보고되지 않은 상황이며, 특히 이로부터 유발될 수 있는 저항성, 및 유발된 저항성 극복을 위한 방법에 대한 연구는 부족한 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 아르테미신 또는 이의 유도체의 항암 효과에 대하여 연구하던 중, 아르테미신 또는 이의 유도체가 암세포에서 페로토시스(ferroptosis)를 유발하며, 이에 대하여 저항성을 나타내는 경우 Nrf2 억제제를 병용투여함으로써 저항성을 용이하게 극복할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은, 아르테미신 또는 이의 유도체; 및 Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related

factor 2) 억제제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이며, Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 억제제를 포함하는, 아르테미신 또는 이의 유도체에 대한 저항성 극복을 위한 항암 치료 보조용 조성물을 제공하고, 저항성 극복을 위한 새로운 항암 치료 보조제를 스크리닝하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 아르테미신 또는 이의 유도체; 및 Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 억제제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한 본 발명은 Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 억제제를 포함하는, 아르테미신 또는 이의 유도체에 대한 저항성 극복을 위한 항암 치료 보조용 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 아르테미신 또는 이의 유도체에 대한 저항성 암세포에 후보물질을 처리하는 단계; 및 상기 암세포에서 Nrf2, HO-1, NQO1의 발현 감소를 유발하는 물질을 선별하는 단계; 를 포함하는 아르테미신 또는 이의 유도체에 대한 저항성 극복용 항암 보조제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명에 따른 아르테미신 또는 이의 유도체; 및 Nrf2 억제제는 암 세포에서 페로토시스를 유발하여 암 세포의 선택적 사멸을 유도할 뿐만 아니라, 기존 항암제인 시스플라틴 저항성 암에 대해서도 항암 효과를 나타낼 수 있어 새로운 항암제로 유용하게 활용할 수 있다. 또한 아르테미신 또는 이의 유도체에 대한 저항성을 새롭게 스크리닝될 Nrf2 억제제를 통해 개선할 수 있으므로, 저항성에 대한 기존 항암제들의 한계를 극복한 새로운 복합 항암 제제로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 아르테수네이트 처리에 따른 선택적인 암 세포 사멸 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다. 도 1의 A는 아르테수네이트 처리 농도에 따른 시스플라틴 저항성 암 및 감수성 암에서의 세포 사멸 효과, 도 1의 B는 두경부암 세포 및 정상 세포에서의 아르테수네이트 처리에 따른 세포 사멸 효과, 도 1의 C는 두경부암 세포 및 정상 세포에서의 아르테수네이트 처리에 따른 콜로니 형성 능력, 도 1의 D는 부모 세포 및 시스플라틴 저항성 세포에서 아르테수네이트의 항암 효과 비교 결과를 나타낸 도이다 (Arts : 아르테수네이트).
- 도 2는 아르테수네이트 및 DFO(deferoxamine), 항산화제 트롤록스(trolox) 병용처리에 따른 세포 수(A), 아르테수네이트 및 HTF (holo-transferrin), DFO, 트롤록스(trolox) 병용처리에 따른 시스플라틴 저항성 암세포에서의 상대적인 콜로니 형성 능력 (B) 및 세포 생존율 (C) 을 확인한 결과를 나타낸 도이다 (*는 아르테수네이트 단독 처리에 대한 $P < 0.01$).
- 도 3은 아르테수네이트 단독 또는 네크로스타틴-1 (Nec-1, 20 μ M), 페로스타틴 (Fer-1, 20 μ M), 및 트롤록스 (0.5 mM) 단독 또는 병용 처리에 따른 총 ROS 및 지질 ROS 수준을 확인한 결과를 나타낸 도이다 (*는 아르테수네이트 단독 처리에 대한 $P < 0.01$).
- 도 4는 시스플라틴 감수성 암 또는 저항성 암에서 아르테수네이트 처리에 따른 xCT, CD44, RAD51, p53, Nrf2, Keap1 의 단백질 발현의 변화 (A) 및 시스플라틴 저항성 세포에서의 아르테수네이트 처리에 따른 Nrf2-ARE 기전 관련 단백질 (Nrf2, Keap1, Ho-1, NQO1) 의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸 도 (B)이다. 또한 도 4의 C는 아르테수네이트 및 페로토시스 유도제인 에라스틴 (erastin) 또는 설파살라진 (SAS) 처리에 따른 Nrf2, Keap1, HO-1 의 발현 변화를 함께 확인한 결과를 나타낸 도이다 (* $P < 0.01$ relative to NT control).
- 도 5는 시스플라틴 저항성 암세포에서 아르테수네이트 및 에라스틴 처리에 따른 NFE2L2 (Nrf2) mRNA 의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다 (* $P < 0.01$ relative to NT control).
- 도 6은 시스플라틴 저항성 암세포에서 아르테수네이트 또는 에라스틴 처리에 따른 NRF2 발현 변화(A), NFE2L2 (Nrf2) 전사활성의 변화 (B), HMOX1 및 NQO1 mRNA 발현의 변화를 확인한 결과(C)를 나타낸 도이다 (* $P < 0.01$ relative to NT control).
- 도 7은 두경부암 세포에서 siKEAP1에 의한 KEAP mRNA 발현 억제 (A) 및 이에 따른 Nrf2 및 HO-1의 단백질 발현 억제(B) 및 세포수 변화(C)를 확인한 결과를 나타낸 도이다 (* $P < 0.05$ relative to control). (siCtr: siControl, Lipo: 리포펙타민).

도 8은 아르테수네이트와 siKEAP1, siNFE2L2(Nrf2) 및 트리코넨(trig) 병용처리에 따른 세포 생존율을 확인한 결과를 나타낸 도이다 (* $P < 0.05$ relative to control; * $P < 0.01$ between the groups.).

도 9는 시스플라틴 저항성 세포에서 아르테수네이트 및 트리코넨의 단독 또는 병용 처리에 따른 세포성 GSH 및 지질 ROS 수준을 측정된 결과를 나타낸 도이다 (* $P < 0.05$ relative to control; * $P < 0.01$ between the groups.).

도 10은 Nrf2 억제제에 의한 아르테수네이트 저항성 극복 결과를 확인한 도이다. 도 10의 A는 siNFE2L2 처리 및 siHMOX1 처리에 의한 NFE2L2(Nrf2)의 mRNA 수준의 감소, HMOX1의 mRNA 수준을 감소를 확인한 결과이다. 도 10의 B는 siNFE2L2 또는 siHMOX1과 트롤록스 단독 또는 병용 처리에 따른 아르테수네이트에 대한 감수성 변화를 세포 생존율로 확인한 결과를 나타낸 도이다.(* $P < 0.01$ relative to siCtrl, ** $P < 0.01$ relative to siNFE2L2 transfection.) 도 10의 C는 아르테수네이트와 Nrf2 억제제인 siNrf2 병용 처리에 따른 저항성 극복 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다. 도 10의 D 및 E는 각각 siNFE2L2와 아르테수네이트 처리에 따른 세포성 GSH 및 세포성 ROS 수준의 변화와 트롤록스 처리에 의한 차단 결과를 나타낸 도이다(* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared between groups).

도 11은 마우스에서 아르테수네이트와 Nrf2의 유전적 억제(shNrf2) 및 약학적 억제(트리코넨)가 철분 의존성 항암 효과를 유도하는 글루타치온 결핍 및 γ H2AX 형성 증가에 영향을 줄 수 있는지 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다. 도 11의 A는 KEAP1 shRNA 및 아르테수네이트 병용 처리에 따른 종양 무게의 변화 및 Nrf2 발현의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다(* $P < 0.05$ versus the shRNA control). 도 11의 B 및 C는 shKeap1과 아르테수네이트, 트리코넨의 단독 또는 병용 처리에 의한 종양 부피(B) 및 세포성 GSH의 변화(C)를 확인한 결과를 나타낸 도이다(* $P < 0.05$ compared between two groups). 도 11의 D는 트리코넨, 아르테수네이트, shNrf2의 단독 또는 병용 투여 실험군에 따른 종양 부피의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다. 도 11의 E 및 F는 시스플라틴 저항성 암에서 shNrf2, 아르테수네이트, 트리코넨의 단독 또는 병용 투여에 따른 세포에서 세포성 GSH 수준 및 γ H2AX 형성 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다. (* $P < 0.05$ compared between two groups; ** $P < 0.01$ relative to control or compared between two groups).

도 12는 본 발명에 따른 페로토시스 유발 기전을 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명은 아르테미신 또는 이의 유도체; 및 Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 억제제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명에 따른 아르테미신 또는 이의 유도체; 및 Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 억제제는 암 세포에서 페로토시스를 유발하여 암 세포의 선택적 사멸을 유도할 뿐만 아니라, 기존 항암제인 시스플라틴 저항성 암에 대해서도 항암 효과를 나타낼 수 있다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 아르테미신의 유도체는 암세포에서 페로토시스 활성을 통해 암세포의 선택적 사멸을 유도할 수 있는 물질이면 당 분야에 공지된 아르테미신의 유도체를 모두 제한없이 포함할 수 있으나, 바람직하게는 아르테미시닌(artemisinin), 히드로아르테미시닌 (Hydroartemisinin), 디히드로아르테미시닌 (Dihydroartemisinin), 아르테메테르 (artemether), 아르테에테르 (arteether), 아르테플렌(arteflene), 아르테수네이트(artesunate), 아르테수네이트 염, 디히드로아르테미시닌 프로필 카보네이트 (propylcarbonate dihydroartemisinin), 비스에테르 아르테린산 (bis- ether artelinic acid) 및 디히드로시디히드로아르테미시닌 (dihydroxydihydroartemisinin) 으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 본 발명에서는 바람직한 일 예로 아르테수네이트 (artesunate) 를 이용하였으며 아르테수네이트는 "Dihydroartemisinin-12- α -succinate" 또는 "Succinyl dihydroartemisinin" 또는 "Sodium artesunate" 또는 "Quinghaosu reduced succinate ester" 또는 "Butanedioic acid, mono((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-decahydro-3,6,9-trimethyl-3,12-epoxy-12H-pyrano(4,3-j)-1,2-benzodioxepin-10-yl)ester" 또는 "88495-63-0" 또는 "Artesunic acid" 라고도 불리며 실온에서 백색결정(White powder or crystal)으로 화학구조식은 $C_{19}H_{28}O_8$ 이고 분자량은 384.42082 g/mole 이다.
- [0020] 본 발명의 아르테미신 또는 유도체의 일 예인 아르테수네이트는 대표적인 항암제 중 하나인 백금 계열 항암제 시스플라틴 저항성 및 감수성 암세포 모두에서 우수한 항암 활성을 나타내며, 정상 세포에 대해서는 세포 사멸을 유도하지 않는 안전한 약물이다. 특히 본 발명의 아르테수네이트는 철 의존적 ROS 매개된 철분성 세포 사멸

(ferroptotic cell death), 즉, 페로토시스를 유발하여 암세포를 사멸하는 활성을 나타낸다. 또한 아르테수네이트 처리는 이를 처리한 암세포에서 총 ROS 및 지질 ROS 수준을 증가시키는 기전을 통해 항암 활성을 유도한다.

- [0021] 본 발명의 상기 Nrf2 억제제는 Nrf2의 활성을 억제하는 물질로, 유전적으로 Nrf2를 억제하는 물질, 또는 Nrf2 억제제의 활성을 저해하는 소분자를 제한없이 포함할 수 있다. Nrf2는 ARE (antioxidant response element)에 의해 조절되는 유전자의 전사적 활성화에서 주요한 역할을 수행하며, ARE에 의해 조절되는 유전자는 주로 항산화 효소를 코딩한다.
- [0022] 본 발명이 Nrf 억제제는 바람직하게는 Nrf2의 안티센스, dsRNA, 리보자임, 앵타머, Nrf2 결합 단백질의 단편, 항체 또는 항체의 단편으로 이루어진 군에서 선택된 1종이상 일 수 있다.
- [0023] 상기 "안티센스"는 NRF2를 코딩하는 mRNA에 상보적인 서열을 포함하는 핵산을 일컫는다. 안티센스는 DNA, RNA 또는 둘 다를 이루어질 수 있다. 안티센스는 타겟 NRF2의 mRNA에 100% 상보적일 필요는 없다. 안티센스가 엄격한 조건(Sambrook et al.1989) 하에서 특이적으로 혼성화할 수 있는 한, 비-상보적인 염기를 포함할 수 있다. 안티센스를 세포에 도입하였을 때, 이것은 타겟 폴리뉴클레오타이드에 결합하여 전사, RNA 프로세싱, 번역 또는 안정성을 저해한다. 안티센스는, 안티센스 폴리뉴클레오타이드 외에도, 변형된 백본을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 모방체, 및 3' 및 5' 말단 영역을 포함한다. 이러한 안티센스는, NRF2의 서열 정보로부터 적절하게 설계하여, 당해 기술 분야의 당업자에게 잘 알려져 있는 방법(예, 화학 합성법)을 이용하여 제조할 수 있다.
- [0024] "dsRNA"는, RNA 간섭(RNAi)에 의해 유전자 발현을 저해하는 이중 가닥 RNA 구조로서, siRNA(짧은 간섭 RNA) 및 shRNA(짧은 헤어핀 RNA)를 포함한다. dsRNA는, 타겟 유전자의 발현을 저해하는 한, 타겟 유전자의 서열과 100% 상동성을 가질 필요는 없다. dsRNA의 일부분은 안정화를 위해 또는 다른 목적(들)으로 DNA로 치환시킬 수 있다. 통상 siRNA는 21개 내지 23개의 염기로 구성된 이중 가닥 RNA이다. siRNA는, 당해 기술 분야의 당업자에게 잘 알려진 방법에 의해, 예컨대 화학 합성에 의해, 또는 천연 RNA의 유사체로서 제조할 수 있다. shRNA는 헤어핀된 구조를 가지는 RNA 단체이다. shRNA는 당해 기술 분야의 당업자에게 잘 알려진 방법, 예컨대 화학 합성에 의해, 또는 세포에 shRNA를 코딩하는 DNA를 도입하여 DNA를 발현시킴으로써, 제조할 수 있다. 본 발명에서 예시적으로 사용된 Nrf 억제제로서 siRNA 서열은 서열번호 1 및 2로 표시되는 siRNA 쌍, 서열번호 3 및 4로 표시되는 siRNA 쌍, 서열번호 15 및 16으로 표시되는 siRNA 쌍일 수 있고, shRNA 서열은 서열번호 19 및 20로 표시되는 shRNA 쌍, 서열번호 21 및 22로 표시되는 shRNA 쌍, 서열번호 23 및 24로 표시되는 shRNA 쌍일 수 있으며, 각각 이와 90 내지 99% 바람직하게는 95 내지 99% 상동성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.
- [0025] "리보자임"은 RNA 프로세싱 촉매 활성을 가지고 있으며, RNA 절단, 연결(pasting), 삽입 및 전이를 수행할 수 있다. 리보자임의 구조는 헤어헤드, 헤어핀 등을 포함할 수 있다.
- [0026] "앵타머"는 단백질과 같은 물질에 결합하는 핵산이다. 핵산의 형태는 이중 가닥 또는 단일 가닥일 수 있다. 앵타머의 길이는 타겟 분자에 특이적으로 결합할 수 있는 한 한정되지 않으며, 예컨대, 10 내지 200개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 10 내지 100개의 뉴클레오타이드, 더 바람직하게는 15 내지 80개의 뉴클레오타이드, 및 더욱 바람직하게는 15 내지 50개의 뉴클레오타이드로 이루어질 수 있다. 앵타머는 당해 기술 분야의 당업자에게 잘 알려져 있는 방법을 이용하여 선택할 수 있다. 예컨대, SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) (Tuerk, C. and Gold, L., 1990, Science, 249, 505-510)를 적용할 수 있다.
- [0027] "NRF2-결합 단백질의 단편"은 NRF2에 결합하여 NRF2를 저해하여 본래의 기능을 수행하는 것을 방해하는 단백질 절편이다. 예를 들어, NRF2-결합 단백질의 단편은, 이러한 단백질의 부분 펩타이드를 제조하고 NRF2에 결합하는 펩타이드를 선별함으로써, 수득할 수 있다. 또한, 이의 안정성을 향상시키거나 저해 활성을 강화하기 위해, 펩타이드를 적절하게 변형시킬 수 있으며, 펩타이드의 일부분에 아미노산 돌연변이를 도입할 수 있다.
- [0028] 본원에서, "항체의 단편"은 항체의 항원에 대한 활성을 보유하고 있는, 항체의 일부분(부분 단편) 또는 항체의 일부분을 포함하는 펩타이드이다. 항체의 단편은, F(ab')₂, Fab', Fab, 단쇄 Fv (이하, "scFv"로 약칭함), 이황화 결합된 Fv (이하, "dsFv"로 약칭함) 또는 그것의 폴리머, 이량체화된 V 영역 (이하, "다이아바디"로 약칭함), 또는 CDR을 포함하는 펩타이드를 포함할 수 있다.
- [0029] 또한 본 발명의 NRF2 억제제는 Nrf2의 활성을 억제할 수 있는 소분자 물질일 수 있으며, 바람직하게는 트리코넨린(trigonelline), 아스코르브산, 루테올린(luteolin), 오크라톡신 A(ochratoxin A), 크리신(chrysin), 브루사톨(brusatol) 및 ATRA (all-trans retinoic acid)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0030] 상기와 같은 본 발명의 Nrf2 억제제는 아르테미신 또는 이의 유도체에 대한 저항성을 나타내거나 감수성이 감소

한 암세포에서 아르테미신 또는 이의 유도체에 대한 감수성을 증가시키는 보조적 역할을 수행하는 물질로, 아르테미신 또는 이의 유도체와 함께 암세포에 처리되는 경우, 세포성 GSH 수준은 현저하게 감소시키고, γ H2AX 형성은 현저하게 증가시킬 수 있으며, 지질 ROS 축적을 촉진시킬 수 있으므로 아르테미신의 철분 의존적 항암 활성을 도와 암세포에서 페로토시스를 촉진시킬 수 있다.

[0032] 본 발명의 암은 아르테미신 또는 이의 유도체가 페로토시스를 통해 선택적 암세포 사멸을 유발할 수 있고 Nrf2 억제제의 병용 투여로 인하여 암세포의 저항성이 개선되는 모든 암종을 제한없이 포함할 수 있으나, 바람직하게는 두경부암일 수 있다. 본 발명에서 두경부암은 쇄골보다 상부에 발생하는 암종 중 갑상샘을 제외한 암을 총칭한다. 즉, 상악암, 인두암, 설암, 후두암 등을 포함하며 편평상피암일 수 있다.

[0033] 또한 본 발명의 아르테미신 또는 이의 유도체; 및 Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 억제제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 새로운 항암제로서, 기존 항암제에 대하여 내성 또는 저항성을 나타내는 암종에서 더욱 효과적인 항암제로 활용될 수 있다. 널리 사용되고 있으나 내성 또는 저항성이 문제되는 항암제의 예로는 백금 계열의 항암제가 있으며, 예컨대 시스플라틴, 카르보플라틴 및 네다플라틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 항암제 일 수 있다. 따라서 본 발명은 기존 항암제에 저항성을 나타내는 암종에 유용하게 사용될 수 있다.

[0034] 본 발명의 아르테미신 또는 이의 유도체는 암세포에서 페로토시스를 유발하는 것을 특징으로 한다. 용어 “페로토시스 (ferroptosis)”란 철분성 세포 괴사를 말하며 분자중의 철이온과 반응하여 활성 산소종을 생산하고 이를 통해 암세포를 사멸시키는 새로운 암세포 사멸 기전을 의미한다. 즉 아르테미신 또는 이의 유도체는 철 의존적인 활성 산소종의 발생과 과산화 지질의 축적을 유발하며 이를 통해 암세포의 선택적 사멸을 유도할 수 있다.

[0035] 따라서 본 발명의 아르테미신 또는 이의 유도체는 암세포에서 글루타치온을 감소시키거나 또는 활성 산소종을 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0036] 한편 본 발명의 암은 이제 제한적인 것은 아니나, 페로토시스 저항성 암일 수 있다. 이는 본 발명이 페로토시스 저항성을 극복하기 위한 보조 물질인 Nrf2 억제제를 일 구성 성분으로 포함하고 있기 때문이며, 페로토시스를 유발하여 항암 활성을 나타내는 아르테미신 또는 이의 유도체가 그 작용을 원활히 수행하기 어려운 페로토시스 저항성 암에 아르테미신 또는 이의 유도체와 함께 Nrf2 억제제를 투여함으로써 페로토시스 저항성 암의 감수성 또는 민감성을 증가시키고 항암 효과를 개선할 수 있는 특이적 우수성을 갖기 때문이다.

[0037] 따라서 본 발명은 또한 Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 억제제를 포함하는, 아르테미신 또는 이의 유도체에 대한 저항성 극복을 위한 항암 치료 보조용 조성물에 관한 것이다.

[0038] 본 명세서에서 사용된 용어, “항암 치료 보조용 조성물”은 항암제에 의한 치료와 병행하여 적용 시 항암제에 대한 암세포의 감수성을 증가시켜 항암치료의 효과를 상승적으로 증가시키는 조성물을 의미한다.

[0039] 따라서 상기 항암 치료 보조용 조성물은 저항성을 갖는 암 치료에 보조적으로 사용될 수 있으며, 항암 보조제로 항암제와 함께, 동시에 또는 순차적으로 투여 가능하다.

[0040] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함되며 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일, 식염수, PBS(phosphate buffered saline) 또는 배지 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유향제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0042] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 또는 피하 투여될 수 있고, 항암 치료를 위한 추가적인 성분을 포함하여 함께, 동시에, 순차적으로 사용할 수 있다.

[0043] 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 다양하게 처방될 수 있다.

[0044] 또한 본 발명은 아르테미신 또는 이의 유도체; 및 Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 억제제를 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 암 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

- [0045] 상기 개체는 인간을 포함한 포유류인 것이 바람직하며, 암 질환을 앓고 있거나, 앓았거나, 앓을 가능성이 있는 잠재적인 환자군도 모두 제한 없이 포함할 수 있다. 상기 아르테미신 또는 이의 유도체; 및 Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 억제제는 대상에게 약학적으로 유효한 양으로 전달될 수 있다.
- [0046] 또한 본 발명은 Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 억제제를 아르테미신 또는 이의 유도체와 함께 투여하는 단계; 를 포함하는 아르테미신 또는 이의 유도체에 대한 저항성 또는 내성 극복 방법; 또는 감수성 또는 민감성 증진 방법에 관한 것이다. 본 치료방법과 관련된 구체적인 기재는 앞서 설명된 기재와의 중복을 피하기 위하여 생략하였다.
- [0047] 또한 본 발명은 아르테미신 또는 이의 유도체에 대한 저항성 암세포에 후보물질을 처리하는 단계; 및 상기 암세포에서 Nrf2, HO-1, NQO1의 발현 감소를 유발하는 물질을 선별하는 단계; 를 포함하는 아르테미신 또는 이의 유도체에 대한 저항성 극복용 항암 보조제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0048] 본 발명에서는 시스플라틴 저항성 또는 민감성 암에서 아르테미신 또는 이의 유도체, 바람직하게는 아르테수네이트가 페로토시스에 의하여 항암 효과를 나타낼 수 있으나, 이와 같은 항암 활성은 페로토시스에 대하여 저항성을 유발하는 Nrf2-ARE 경로의 활성화에 의하여 다시 감소될 수 있음을 확인하였다. 이에 따라 Nrf2-ARE 경로의 억제 또는 차단이 아르테미신 또는 이의 유도체 처리에 의해 유발될 수 있는 저항성을 극복하기 위한 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다. 따라서, 아르테미신 또는 이의 유도체에 대한 저항성 암세포에서 Nrf2-ARE 경로를 억제 또는 차단할 수 있는 물질을 확인하는 경우, 이를 아르테미신 또는 이의 유도체에 대한 저항성 암세포에 대한 항암 보조제로 활용할 수 있다. 따라서 본 발명은 Nrf2, HO-1(Heme oxygenase-1), NQO1 (NAD(P)H quinone dehydrogenase 1)의 발현 감소를 유발하는 물질을 선별하는 단계를 통해 아르테미신 또는 이의 유도체에 대한 저항성 극복용 항암 보조제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0049] 상기 발현 감소는 전사 활성의 감소 또는 단백질 발현의 감소 등을 모두 포함하며, 이러한 감소는 당 분야에 알려진 전사체 또는 그로부터 코딩된 단백질의 양을 측정하는 모든 방법을 사용할 수 있다. 보다 구체적으로 면역침강법(immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학법(immunohistochemistry), RT-PCR, 웨스턴 블랏팅(Western blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정될 수 있으나 이에 한정하지 않는다. 또한, 활성 정도는 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정될 수 있으나 이에 한정하지 않는다.
- [0050] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0051] **실험 재료 및 방법**
- [0052] **세포주**
- [0053] HNC 세포주 (HN2-10) 및 SNU 세포주는 한국세포주 은행에서 구입하여 사용하였으며, STR(short tandem repeat) 기반 DNA 핑거프린팅 및 멀티플렉스 PCR에 의해 확인하였다. 상기 세포는 EMEM 배지 또는 10%의 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 배지에서 37℃ 조건으로 5% 이산화탄소 분위기 하에서 배양하였다. 정상 구강 각화세포 또는 섬유아세포들은 구강 수술을 수행한 환자로부터 얻었으며, in vitro 실험에 사용하였다. 세가지 종류의 시스플라틴 저항성 HNC 세포주 (HN3-cisR, HN4-cisR, 및 HN9-cisR) 들은 시스플라틴 농도를 증가시키면서 부모 HN3, HN4, 및 HN9 세포에 처리하는 과정을 통해 각각 얻었다. 시스플라틴 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)의 IC50은 부모세포에서 2.2 내지 3.5 μ M이며, 시스플라틴-저항성 HNC 세포에서는 25.5 내지 38.9 μ M 임을 세포 생존률 실험을 통해 확인되었다.
- [0055] **세포 생존률 실험**
- [0056] 아르테수네이트 (Sigma-Aldrich) 1 내지 100 μ M 노출, 트리곤넨린 (trigonelline) (Sigma-Aldrich) 100 μ M 노출, Nrf2 유전적 억제제 및 활성화제와의 조합에 의한 세포 생존률의 변화를 MTT, trypan blue exclusion, clonogenic assay를 통해 확인하였다. MTT 에세이를 위하여, 세포들을 4시간 동안 테트라졸리움 화합물 MTT(3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; Sigma-Aldrich)와 함께 배양하였고, 2시간 동안 가용화 완충액에서 배양을 수행하였다. 이후 흡광도를 SpectraMax M2 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. trypan blue exclusion 에세이는 0.4% 트리판 블루 염색을 통해 수행하였으며, 세포들을 혈구계수기로 계수하였다.

[0057] clonogenic 에세이는 0.5% 크리스탈 바이올렛 용액을 이용하여 수행하였으며, 콜로니 (>50 세포)를 배양 14일 이후 정량화하였다. 세포 사멸 어세이를 아넥신 V 및 Pi 염색을 이용하여 수행하였다. 양성 염색된 세포를 유세포 분석기 및 Cell Quest Pro software (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 계수하였고, 모든 어세이는 3회 반복 수행하였다. 약물 상호작용에 있어서 CI (combination index)는 시너지 상호작용으로 정의된 CI <1 을 이용하는 Chou-Talalay (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ, USA)를 이용하여 계산하였다.

[0059] 글루타치온 합성 및 ROS 측정

[0060] 다른 약물에 노출된 세포 용해물의 세포성 GSH 수준을 GSH colorimetric detection kit (BioVision Inc., Milpitas, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. HNC 세포 용출물의 상청액에서의 세포성 ROS 생성을 10 μ M 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) (cytosolic ROS; Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) 또는 2 μ M C11-BODIPY C11 (lipid peroxidation; Thermo Fisher Scientific) 첨가를 통해 30분 동안 37°C에서 측정하였다. 상기 ROS 수준은 FACSCalibur flow cytometer equipped with CellQuest Pro (BD Biosciences)를 이용하여 분석하였다.

[0062] RNA 간섭 및 유전자 형질감염

[0063] KEAP1 유전자의 침묵을 유도하기 위하여, 시스플라틴 감수성 HN9 세포를 분주하였다. NFE2L2 및 HMOX1 유전자의 침묵을 유도하기 위해서는, 시스플라틴-저항성 HN3- 및 HN9-cisR 세포들을 분주하였다. 세포를 24시간 후 10nM siRNA 또는 스크램블 대조 siRNA (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA)를 이용하여 형질감염시켰다. 안정적인 KEAP1 또는 NFE2L2 녹다운을 위하여, HNC-cisR 세포를 KEAP1 또는 NFE2L2 또는 대조군 shRNA (Transomic, Huntsville, AL, USA)를 포함하는 렌티바이러스 벡터를 이용하여 형질감염시켰다. 안정적인 형질감염이 수행된 세포들은 푸로마이신 2 μ g/ml 처리를 통해 선별하였다. siRNA 또는 shRNA는 유전자 침묵을 유도하며, 유전자 침묵에 의한 효과는 웨스턴 블랏팅 및 RT-PCR을 통해 확인하였다.

[0064] 본 발명에 사용된 siRNA 및 shRNA 서열은 다음과 같다.

표 1

siRNA 서열 정보

siRNA 종류	회사	번호	Forward	Reverse
NFE2L2 (Nrf2)	IDTDNA	1	5'- GUUACAACUAGAUGAAGAGACAGGT -3' (서열번호 1)	5'- ACCUGUCUCUUAUCUAGUUGUAAACUG -3' (서열번호 2)
		2	5'- GCAAGAUUUAGAUAUUUGAAAGAT -3' (서열번호 3)	5'- AUCUUUCAAUGAUCUAAAUCUUGCUC -3' (서열번호 4)
		3	5'- UCAACGAAAUGAUGUCCAAAGAGCA -3' (서열번호 5)	5'- UGCUCUUUGGACAUAUUUCGUUGAAG -3' (서열번호 6)
KEAP1	IDTDNA	1	5'- AGAACAGACUAACUAGUGUCUUUCA -3' (서열번호 7)	5'- UGAAAGACACUAGUUAGUCUGUUCUUU -3' (서열번호 8)
		2	5'- AGCGCUACGAUGUGGAAACAGAGAC -3' (서열번호 9)	5'- GUCUCUGUUUCCACAUCGUAGCGCUCC -3' (서열번호 10)
		3	5'- AGAGGAACGAGUGGCGAAUGAUCAC -3' (서열번호 11)	5'- GUGAUCAUUGCCACUCGUUCCUCUCU -3' (서열번호 12)
H01	IDTDNA	1	5'- AACAUUGUCUGAUAGUAGCUUGAAA -3' (서열번호 13)	5'- UUUAAGCUACUACAGACAAUGUUGU -3' (서열번호 14)
		2	5'- UAAACAACAUUGUCUGAUAGUAGCT -3' (서열번호 15)	5'- AGCUACUACAGACAAUGUUGUUAUU -3' (서열번호 16)
		3	5'- GGUCCUUACACUCAGCUUCUGGTG -3' (서열번호 17)	5'- CACCAGAAAGCUGAGUGUAAGGCCCA -3' (서열번호 18)

[0066] * IDTDNA = Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA; H01 = heme oxygenase 1.

표 2

[0068]

shRNA 서열 정보

shRNA 종류	회사	번호	Forward	Reverse
<i>NFE2L2</i> (Nrf2)	Tranomic	1	5'- TAGATCAGAAACATCAATGGGC-3' (서열번호 19)	5'- ACCCATGATGTTTCTGATCTA-3' (서열번호 20)
		2	5'- TTTCGTTGAAGTCAACAACAGG-3' (서열번호 21)	5'- ACTGTTGTTGACTTCAACGAAA-3' (서열번호 22)
		3	5'- TTGAGCTTCATTGAACTGCTCT-3' (서열번호 23)	5'- CGAGCAGTTCAATGAAGCTCAA-3' (서열번호 24)

[0070]

웨스턴 블랏팅

[0071]

세포들을 플레이트하고, 70% 컨플루언스까지 성장시켰으며, 그 후 약물 처리를 수행하였다. 세포들을 RIPA lysis buffer (Thermo Fisher Scientific), 4°C 조건에서 용해시켰다. 10-12% 겔 상 SDS-PAGE에 의해 총 50ug의 단백질이 용출되었고, 니트로셀룰로오스 또는 폴리비닐리덴 디플로라이드 막으로 이동시키고 일차 및 이차 항체를 이용하여 표지하였다. 웨스턴 블랏팅에는 하기 일차 항체들을 사용하였다: Nrf2, Keap1, NQO1, HO-1 (Abcam, Cambridge, UK), xCT, p53, RAD51, 및 CD44 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). β -actin (Sigma-Aldrich) 을 로딩 대조군으로 사용하였으며, 모든 항체는 1:500 내지 1:5000로 희석하였다.

[0073]

Nrf2 전사 활성화 분석

[0074]

Nrf2 의 전사활성은 제조사의 매뉴얼에 따라 Cignal Antioxidant Response Reporter kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) 를 이용하여 분석하였다.

[0076]

전임상 시험

[0077]

모든 동물 시험은 아산의 동물관리 및 사용위원회의 승인에 따라 수행하였다. 6주령의 athymic BALB/c 수컷 누드 마우스(nu/nu) 를 중앙 동물에서 구입하여 사용하였고, 대조군 또는 KEAP1 shRNA 형질감염이 수행되거나 수행되지 않은 HN9 세포 (5×10^6) 를 각각의 측면에 피하주사하였다. 세포 주입 후 명백한 결절을 갖는 마우스에 비히클, 아르테수네이트, 또는 트리코텔린 처리를 수행하였다. 안락사 후, 상기 종양들을 추출하고 각 그룹에서 이들을 비교하였다. 또다른 전임상 실험에서, 대조군 또는 NFE2L2 shRNA 형질감염을 갖거나 갖지 않는 HN9-cisR 세포 (5×10^6) 를 누드마우스의 측면에 피하 주사하였다. 중앙 이식 후 결절이 발견된 날부터, 상기 마우스들에 6가지 다른 처리를 수행하였다: shCtr+비히클, shCtr+트리코텔린, shCtr+아르테수네이트, shCtr+아르테수네이트+트리코텔린, shNrf2+ 비히클, shNrf2+아르테수네이트. 상기 아르테수네이트는 50 mg/kg daily로 경구 투여되었고 트리코텔린은 50 mg/kg daily로 경구투여되었다. 안락사 후, 종양들을 단리하고 세포성 GSH 측정 및 γ H2AX 형성에 대한 면역형광 염색을 수행하였다. Two-tailed Mann-Whitney U 시험법을 다른 처리군 사이의 통계적 유의성을 비교하기 위해 사용하였다.

[0079]

실시예 1. 아르테수네이트의 선택적 암 사멸효과 확인

[0080]

아르테수네이트가 시스플라틴 감수성 암 (HN3, HN4, HN9) 과 시스플라틴 저항성 암(HN3-cisR, HN4-cisR, HN9-cisR)세포에 대하여 선택적 암 사멸 효과를 나타낼 수 있는지 여부를 확인하기 위하여, 아르테수네이트 1 내지 100uM 처리에 따른 세포 생존율 분석을 수행하였으며, 그 결과를 도 1 에 나타내었다.

[0081]

도 1의 A 에 나타낸 바와 같이, 아르테수네이트는 용량의존적으로 시스플라틴 감수성 암 (HN3, HN4, HN9) 과 시스플라틴 저항성 암(HN3-cisR, HN4-cisR, HN9-cisR) 세포에 대하여 세포 사멸 효과를 나타냈다. HN9는 HN3나 HN4와 비교하여 아르테수네이트에 더 감수성을 나타내었고 모든 세포들은 100uM 농도에서 사멸하였다. 또한 도 1의 B에 나타낸 바와 같이 HNC 세포주와 정상 세포주에 대한 아르테수네이트의 감수성을 비교한 결과 HNC 세포주는 뚜렷하게 세포 생존율이 감소되었으나, 대부분의 정상 인간 구강 각화세포 (HOK) 및 구강 섬유아세포(HOF)는 50uM 의 아르테수네이트 처리에도 불구하고 세포 사멸 효과를 나타내지 않았다. 즉 이를 통해 아르테수네이트는 정상 세포에서는 세포 사멸을 유도하지 않고, 암 세포에 대해서 선택적인 세포 사멸을 유도할 수 있음을 확인하였다. 또한 도 1C에 나타낸 바와 같이 콜로니 형성 능력 (CFA)은 시스플라틴-감수성 HNC 세포에서는 뚜렷하게 감소하였고, 시스플라틴 저항성 HNC 세포에서도 감소를 나타내었다. 반면, 정상 세포에서는 콜로니 형성능력이 보존되었다. 또한 도 1D에 나타낸 바와 같이 비히클 또는 50uM 의 아르테수네이트 72 시간 처리 이후에 세포를 마이크로포토크라피로 관찰한 결과, 아르테수네이트 처리가 시스플라틴 저항성 또는 감수성 세포에서 세포

의 성장을 억제함을 추가적으로 확인하였다.

[0083] 실시예 2. 두경부 암에서의 아르테수네이트의 철분성 세포 사멸 (ferroptotic cell death) 유도 효과 확인

[0085] 2.1 세포수 및 콜로니 형성 억제 효과 확인

[0086] 아르테수네이트가 암세포 사멸을 유도하는 기전을 확인하기 위한 실험을 수행하였으며 HNC 세포에서 철 의존적 ROS-매개된 철분성 세포사멸, 즉 페로토시스를 유도한다는 것을 확인하였다. 보다 구체적으로 50uM 의 아르테수네이트를 시스플라틴 감수성 세포에 1 내지 4일 동안 처리하고 세포 수의 변화를 확인하였다. 상기 세포들은 전처리를 받지 않거나, HTF (holo-transferrin) 20ug/mL, 철 킬레이터 데페록사민(deferoxamine, DFO) 100 mM 또는 항산화제 트롤록스(trolox) 0.5mM 으로 전처리된 세포를 이용하였다. 세포수의 변화를 확인한 결과를 도 2의 A 에 나타내었다.

[0087] 또한 시스플라틴 저항성 HNC 세포들을 72시간 동안 아르테수네이트로 처리하고 콜로니 형성 효과를 확인하였으며, 아르테수네이트 처리와 함께 HTF, DFO, Trolox 처리를 병행하여 콜로니 형성 효과를 비교하였다. 결과를 도 2의 B 에 나타내었다. 도 2A 및 B 에 나타낸 바와 같이, 아르테수네이트는 세포와 콜로니의 수를 유의적으로 감소시켰으며, 아르테수네이트에 의한 콜로니 감소 효과는 DFO 및 항산화제인 트롤록스 처리에 의하여 반전되었다.

[0089] 2.2 세포 사멸에 대한 효과 확인

[0090] 아넥신 V 및 PI 염색 및 유세포 분석을 이용하여 세포 사멸에 대한 효과를 분석하였다. 세포 생존율을 72시간 동안 50uM 에 노출된 HN9 세포에서 세포성 ATP 수준을 측정함으로써 확인하였다. 기전확인을 위하여 HTF, DFO, 트롤록스 전처리된 세포군을 두었으며, 세포 사멸의 효과를 아르테수네이트 단독, HFT 또는 DFO 또는 트롤록스와의 조합에 대하여 확인하고 그 결과를 도 2C에 나타내었다. 도 2C에 나타낸 바와 같이, 아넥신 V-PI 염색 및 ATP 측정으로 확인된 세포 생존율은 아르테수네이트가 처리된 HNC 세포에서 뚜렷하게 감소하였다. 반면 DFO 및 트롤록스의 전처리는 ATP 수준을 회복하도록 하였고 세포 사멸을 감소시켰다.

[0091] 즉 세포 생존율은 holo-트랜스페린 (20ug/ml) 의 추가에 의해 추가적으로 감소하였으나, 이와 같은 효과는 철 킬레이터 데페록사민 (100mM) 또는 항산화제인 트롤록스 (0.5mM) 전처리에 의하여 뚜렷하게 차단되었다.

[0093] 2.3 총 ROS 및 지질 ROS에 대한 효과 확인

[0094] 네크로스타틴-1 (Nec-1, 20 μM), 페로스타틴 (Fer-1, 20 μM), 및 트롤록스 (0.5 mM) 와 함께 또는 단독으로 50uM 의 아르테수네이트를 처리한 HNC 세포에서 총 ROS 및 지질 ROS 수준 (DCF-DA 및 BODIPY C11 측정) 을 확인하고 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0095] 도 3에 나타낸 바와 같이 아르테수네이트 처리에 따른 총 ROS 및 지질 ROS 수준은 아르테수네이트 처리된 HNC 세포에서 유의적으로 증가하였으며, 이와 같은 효과는 페로스타틴-1(ferrostatin-1) (20 uM) 또는 트롤록스 (0.5mM) 과의 공동 배양으로 뚜렷하게 차단되었다. 그러나 네크로스타틴 -1 (20uM) 처리에 의해서는 차단되지 않았다.

[0097] 상기와 같은 결과를 종합하여, 아르테수네이트가 HNC 세포에서 철 의존적 ROS-매개된 철분성 세포 사멸 (ferroptotic cell death) 을 통한 세포 사멸을 유도한다는 것을 확인하였다.

[0099] 실시예 3. 아르테수네이트 처리에 따른 Nrf2-항산화 인자 경로 활성화

[0100] 상기 실시예 2를 통해 아르테수네이트가 HNC에서 철분성 세포 사멸 유도를 통해 암세포 사멸 효과를 나타냄을 확인하였다. 이러한 확인을 바탕으로 아르테수네이트에 대한 HNC 세포의 저항성과 관련된 기전에 대한 연구를 추가로 진행하였다. 보다 구체적으로 HN9 및 HN9-cisR 세포 및 시스플라틴 저항성 HNC 세포에 아르테수네이트를 10-25uM로 24시간 동안 처리하고 관련 단백질의 발현 변화를 웨스턴 블랏을 통해 확인하였으며, 그 결과를 도 4 에 나타내었다.

[0101] 도 4의 A 및 B 에 나타낸 바와 같이, 아르테수네이트는 HNC 세포의 철분성 세포사멸 동안 Nrf2 의 발현을 증가시켰다. 아르테수네이트의 처리는 xCT, RAD51, 및 Keap1 단백질의 수준을 감소시키나, p53 및 Nrf2 단백질의 수준을 HN9 및 HN9-cis9 세포에서 증가시켰다. 기본 Nrf2 수준은 시스플라틴-감수성 세포와 비교했을 때 시스플라틴-저항성 HNC 세포에서 더 높게 확인되었으며, 아르테수네이트 노출 후에 HNC세포에서 Nrf2, HO-1, 및 NQO1 은 활성화되었다.

- [0102] 이와 같은 활성화와 페로토시스의 관련성을 확인하기 위하여 HN9-cisR 세포에 대표적인 페로토시스 유도물질인 20uM 에라스틴 (erastin) 또는 2mM의 설파살라진 (sulfasalazine, SAS) 을 처리하고, Nrf2, Keap1, 및 HO-1 단백질 수준의 변화를 아르테수네이트 처리군과 비교하였다. 대조군으로 디메틸설파사이드 처리군 (NT) 을 이용하고 그 결과를 도 4의 C 에 나타내었다.
- [0103] 도4의 C에 나타난 바와 같이 아르테수네이트 처리는 페로토시스 유도제인 에라스틴 및 설파살라진에 의해서 나타내는 바와 같이, Keap1 을 감소시켰으며, Nrf2 및 HO-1을 증가시켰다. 즉, 아르테수네이트는 페로토시스를 유발하는 물질이나, 놀랍게도 Nrf2-항산화 인자(Nrf2-antioxidant response element) 경로를 활성화 시킴으로써 페로토시스에 대한 저항성이 유발될 수 있다는 문제점을 확인하였다.
- [0104] 또한 3가지 시스플라틴 저항성 HNC 세포에서 디메틸설파사이드, 아르테수네이트 (50uM), 에라스틴 (20uM) 24시간 처리에 따른 NFE2L2 (Nrf2) mRNA 수준을 측정하고 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0105] 도 5 에 나타난 바와 같이, Nrf2 mRNA 수준은 아르테수네이트 또는 에라스틴 처리를 하더라도 3가지 시스플라틴-저항성 HNC 세포에서 모두 변화되지 않았다.
- [0106] 상기와 같은 결과에 따라 Nrf2 가 전사활성 수준에서 조절되는지 여부를 확인하기 위한 실험을 수행하였으며, 이를 위하여 HNC 세포 핵 추출물에서의 Nrf2의 발현의 변화를 24시간 동안 50uM 아르테수네이트 또는 20uM 에라스틴 처리 후 확인하였다. 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0107] 도 6에 나타난 바와 같이, 아르테수네이트 또는 에라스틴으로 처리된 HNC 세포 핵 추출물에서의 Nrf2의 발현은 뚜렷하게 증가하여 전사활성이 증가되었음을 확인하였다 (A 및 B). 또한 시스플라틴 저항성 세포에서 HO-1 및 NQO1 mRNA 수준이 변화됨을 확인하였다 (C).
- [0109] 상기와 같은 결과는, 아르테수네이트의 처리가 암세포에서 Nrf2 발현을 전사활성 수준에서 증가시킬 수 있는 물질임을 나타내며, Nrf2-항산화 인자(Nrf2-antioxidant response element) 경로를 활성화시킴으로써 아르테수네이트에 대한 저항성을 유발할 수 있음을 보여준다.
- [0111] **실시예 4. Nrf2 억제에 따른 아르테수네이트 저항성 극복 확인 - in vitro**
- [0112] HNC 세포에 대한 아르테수네이트의 철분성 세포 사멸과 Nrf2의 활성화가 관련있는지 여부를 추가적으로 검증하기 위하여 KEAP1 유전자의 침묵을 통해 Nrf2-ARE 경로 활성화, 아르테수네이트에 대한 감수성 확인, Nrf 억제제 트리코넨린 처리에 의한 감수성 변화 확인 등을 확인하였다.
- [0114] **4.1 KEAP1 억제에 따른 아르테수네이트에 대한 감수성 감소 확인**
- [0115] 먼저, KEAP1 유전자의 발현을 억제하기 위하여 시스플라틴 감수성 HN9 세포를 siRNA 대조군(siCtr), 표 1에 표시된 siKEAP1 또는 siNrf2 억제제로 형질감염시킨 후, Keap1 mRNA 발현 변화, Nrf2-ARE 경로에 관여하는 단백질의 발현 변화 세포수 변화를 확인하였으며, 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0116] 도 7에 나타난 바와 같이, KEAP1에 대한 siRNA 형질감염은 KEAP1의 mRNA 발현을 감소시켰으며 (A), 그 결과 Nrf2 의 단백질 발현을 증가시키고 HO-1 의 단백질 발현을 증가시키는 등 Nrf2-ARE 경로를 활성화 시킴을 확인하였다. siKEAP-1 형질감염 군에 대한 아르테수네이트 처리는 Nrf2 의 단백질 발현을 더욱 증가시켰다(B). 또한 Keap1 침묵화된 HN9 세포에서는 아르테수네이트 처리된 후에도 HN9 세포의 수가 증가하여, 아르테수네이트에 대한 저항성이 증가하고 항암 효과가 감소된다는 것을 확인하였다(C) 이와 같은 결과는 KEAP1의 발현 억제가 Nrf2-ARE 경로를 활성화시키며, 결과적으로 아르테수네이트에 대한 저항성이 Nrf2-ARE 경로의 활성화를 통해 유도된다는 것을 보여준다.
- [0117]
- [0118] **4.2 Nrf2 억제제 처리에 따른 감수성 회복 및 기전 확인**
- [0119] Keap1 침묵화된 HN9 세포의 아르테수네이트에 대한 감소된 감수성이 Nrf2-ARE 경로와 연관이 있음을 확인하였으므로, Nrf2 억제제 트리코넨린 (trigonelline) (100uM) 을 이용한 복합 처리에 의해 감소된 감수성이 다시 회복될 수 있는지 여부를 확인하였고 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- [0120] 도 8에 나타난 바와 같이, siKEAP1 에 의한 KEAP1 침묵을 통해 유도되는 HN9 세포의 아르테수네이트에 대한 저항성은 siNFE2L2 처리에 따른 Nrf2 의 억제에 의하여 반전되었다. 또한 siKEAP1과 트리코넨린을 공동 처리한 처리군에서도 세포 생존율이 감소되어 KEAP1 침묵에 의한 아르테수네이트에 대한 감수성 억제가 Nrf2 억제제 처리

를 통해 반전될 수 있음을 확인하였다. 즉, Nrf2를 동시에 억제함으로써, 아르테수네이트에 대한 저항성 문제를 해소할 수 있을 것으로 기대된다.

[0121] 상기와 같은 감수성 회복 기전을 확인하기 위하여, 아르테수네이트와 Nrf2 억제제인 트리코넨린 처리에 따른 세포성 GSH 및 지질 ROS 수준을 확인하고 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0122] 도 9에 나타난 바와 같이, 시스플라틴 저항성 세포주에서 아르테수네이트 처리는 뚜렷하게 세포성 글루타치온 (GSH) 수준을 감소시켰으며, 지질 ROS 축적을 유발하였으며, 이러한 효과는 트리코넨린과의 공동-배양에 의하여 뚜렷하게 증가되었다. 이는 트리코넨린과의 공동 배양이 GSH 수준 감소 및 지질 ROS 축적의 축진을 도와 아르테수네이트의 철분의존적 항암 활성을 증가시키고 아르테수네이트가 유발하는 페로토시스에 대한 저항성을 극복할 수 있도록 돕는다는 것을 보여주는 결과이다.

[0124] **실시예 5. Nrf2-ARE 경로의 억제에 따른 아르테수네이트 저항성 극복 확인**

[0125] 앞서 실시예 4에서 Nrf2-ARE 경로가 아르테수네이트의 철분의존성 항암 활성에 대한 저항성 획득의 중요한 기전임을 확인하였으므로, 상기 경로를 억제하는 경우, 아르테수네이트에 대한 세포의 저항성이 개선될 수 있는지 여부를, 표 1에 나타난 Nrf2 및 HO-1 의 siRNA 를 이용한 유전자의 침묵을 통해 보다 구체적으로 확인하였으며, 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0126] 도 10에 나타난 바와 같이, Nrf2 및/또는 HO-1 유전자의 침묵은 아르테수네이트 노출 후 시스플라틴-저항성 HNC 세포의 세포생존율을 siRNA 대조군 세포보다 감소시킨다 (도 10A 및 B). 이와 같은 결과는 Nrf2 억제가 아르테수네이트에 대한 저항성을 극복하기 위한 중요한 인자가 될 수 있음을 확실하게 보여준다. 즉, 저항성 HNC가 siNrf2 로 형질감염된 HN3-cisR 세포에서, 상기 세포 생존율 및 세포성 GSH 수준은 유의적으로 감소되었고, 세포성 ROS 수준은 siRNA 대조군과 비교했을 때 뚜렷하게 증가하였다. 또한 이러한 효과는 항산화제 트롤록스의 전처리에 의하여 차단되었다 (도10 C 내지 E).

[0128] **실시예 6. Nrf2 억제에 따른 아르테수네이트 저항성 극복 확인 - in vivo**

[0129] HNC 세포에서의 Nrf2 유전적 또는 약학적 침묵의 효과를 in vivo 에서 시험하였다. 아르테수네이트-유도된 종양 성장 억제 효과가 KEAP1 억제에 의하여 감소되는지 여부를 종양 무게와 부피 측정을 통해 확인하였고, Nrf2 억제제인 트리코넨린의 공동 처리에 의해 저항성이 극복되는지 여부를 함께 확인하였다. HN3-cisR in vivo 실험을 위하여 50mg/kg 의 아르테수네이트 또는 트리코넨린을 경구로 매일 투여하였다.

[0130] 또한 마우스에서 아르테수네이트 및 Nrf2 의 유전적 억제(shNrf2) 및 약학적 억제 (트리코넨린) 가 철분 의존성 항암 효과를 유도하는 글루타치온 결핍 및 γ H2AX 형성 증가에 영향을 줄 수 있는지 여부를 표 2의 shRNA 서열을 및 트리코넨린 처리를 통해 확인하고 결과를 도 11에 나타내었다.

[0131] 도 11에 나타난 바와 같이, shRNA 대조군 마우스와 비교하여 Keap1 shRNA 형질감염된 HN9 세포로 처리된 누드 마우스에서 종양의 무게 감소 효과가 감소되었다 (A). 이와 같은 결과는 Keap1 이 억제되는 경우, Nrf2 의 활성화를 통해 철분의존성 항암효과가 감소한다는 앞서의 세포 실험 결과와 동일한 결과이다. 또한 Nrf2 억제제인 트리코넨린의 공동 처리는 Keap1-침묵, Nrf2 활성화된 HN9 세포를 갖는 마우스에서 in vivo 종양 성장 및 세포성 GSH 수준을 뚜렷하게 감소시켰다 (B 및 C).

[0132] Nrf2 억제제인 트리코넨린의 단독 처리는 종양의 부피를 뚜렷하게 감소시키지 못하였으나 아르테수네이트와 트리코넨린의 공동처리는 HNC 세포에서 종양의 부피를 유의적으로 크게 감소시켰다. 유사하게 유전적 Nrf2 억제를 위한 shNrf2 의 처리는 종양 부피를 뚜렷하게 감소시키지 못했으나, shNrf2 및 아르테수네이트를 함께 처리한 실험군에서는 종양 부피가 뚜렷하게 감소하였다 (D). 이러한 결과는 Nrf2 억제제가 아르테수네이트의 항암 활성을 돕는 보조제로 역할을 한다는 것을 나타낸다.

[0133] Nrf2 억제제와의 병용 투여가 유도하는 기전을 확인하기 위하여 HCN-9 cisR 세포에서 세포성 GSH 수준 및 γ H2AX 형성의 비교한 결과, 아르테수네이트 및 shNRF2 형질감염 또는 트리코넨린이 공동 처리된 마우스의 종양에서 세포성 GSH 수준은 현저하게 감소하였고 γ H2AX 형성은 현저하게 증가하여, 병용투여에 의해 페로토시스에 대한 저항성이 개선되어 세포 사멸을 유도할 수 있음을 확인하였다 (E, F).

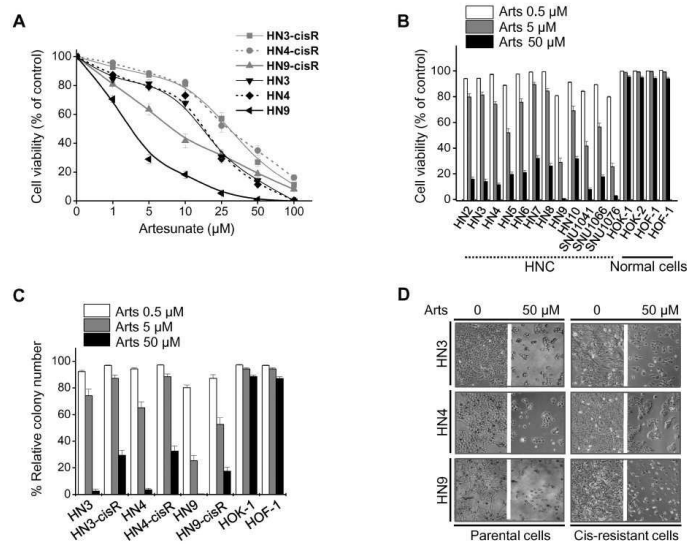
[0134] 이와 같은 결과를 종합하면, 아르테수네이트는 저항성 HNC 세포에서 아르테수네이트의 감수성을 γ H2AX 형성 및 GSH 결핍을 통해 유도함을 알 수 있고, Nrf2 억제제는 이와 같은 작용을 돕는 역할을 통해 아르테수네이트에 대한 저항성을 극복하도록 할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0135]

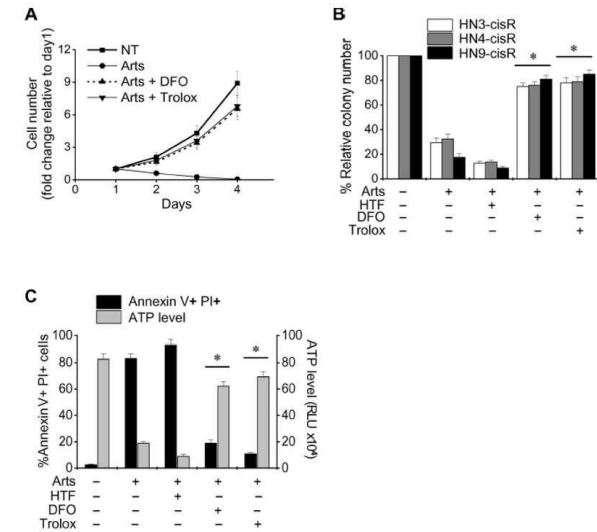
즉 페로토시스 저항성을 유발하는 Nrf2-ARE 경로의 차단을 위한 Nrf2 의 유전적 억제 또는 트리고넨린과 같은 Nrf 억제 소분자 물질의 처리는, 아르테수네이트 처리에 의해 유발될 수 있는 시스플라틴 감수성 또는 저항성 암세포에서의 페로토시스 저항성을 극복할 수 있도록 한다는 것을 알 수 있다.

도면

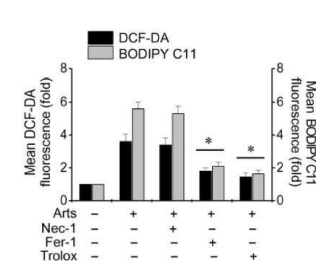
도면1



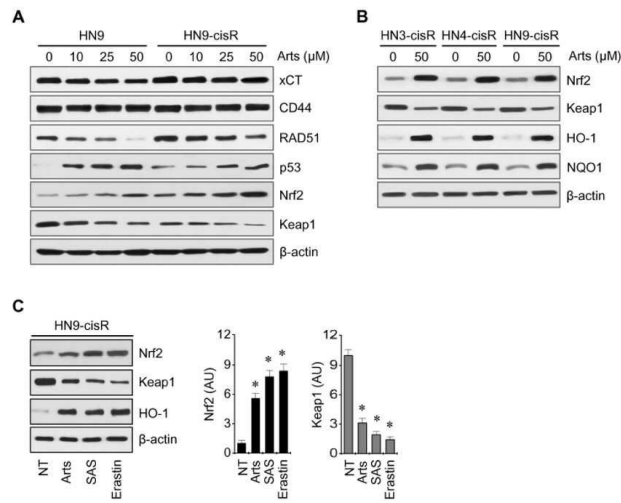
도면2



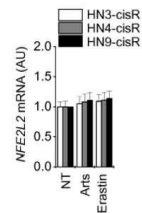
도면3



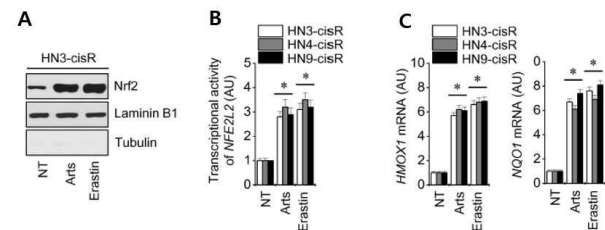
도면4



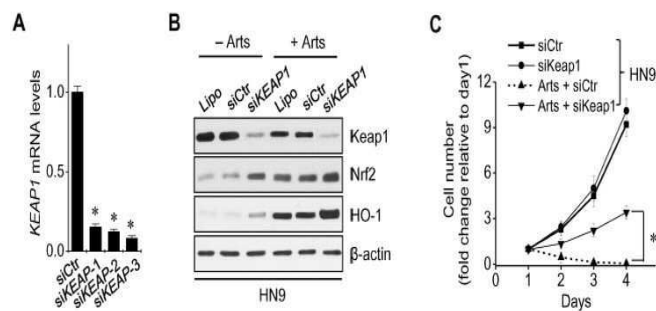
도면5



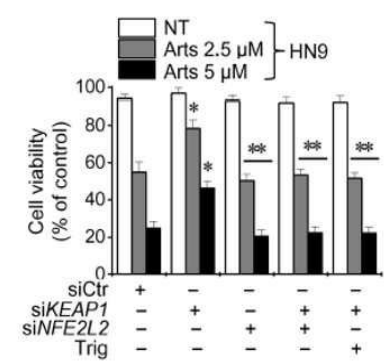
도면6



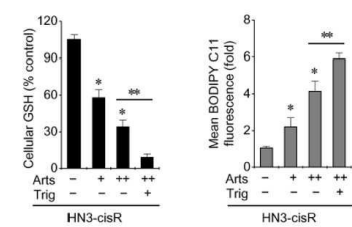
도면7



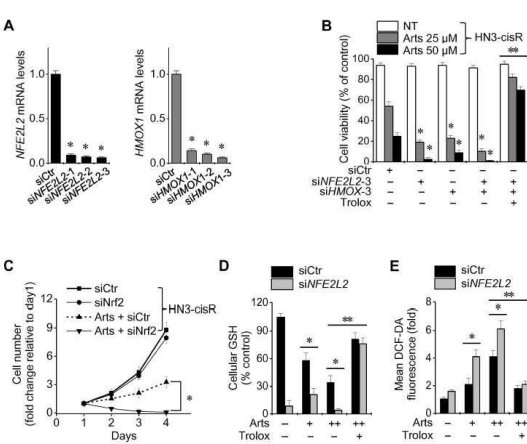
도면8



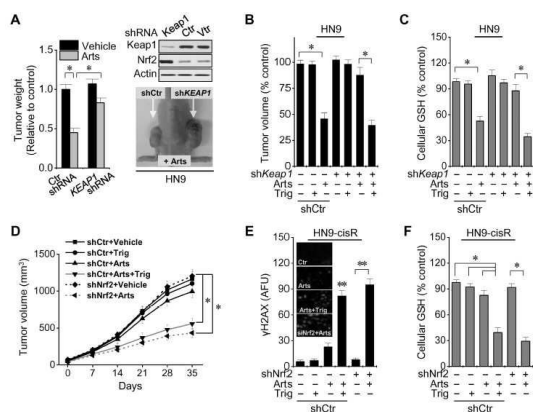
도면9



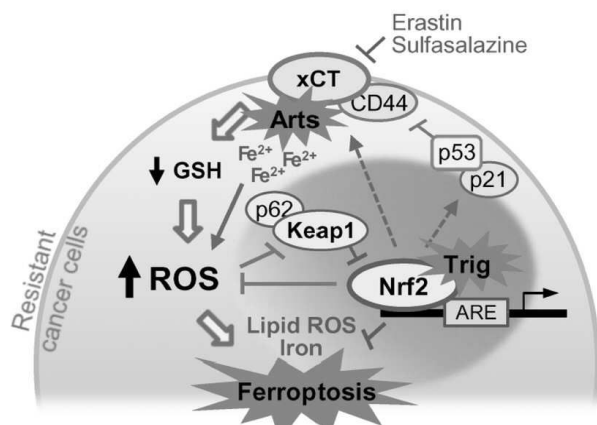
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- THE ASAN FOUNDATION
- <120> Anti-cancer composition comprising artemisin derivative and Nrf inhibitor
- <130> ASAN1-10
- <160> 24
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 25
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> NFE2L2 siRNA forward
- <400> 1

guuacaacua gaugaagaga caggt	25
<210> 2	
<211> 27	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> NFE2L2 siRNA reverse	
<400> 2	
accugucucu ucaucuaguu gaaacug	27
<210> 3	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> NFE2L2 siRNA forward	
<400> 3	
gcaagauuuu gaucuuuuga aagat	25
<210> 4	
<211> 27	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> NFE2L2 siRNA reverse	
<400> 4	
aucuuucaaa ugaucaaaau cuugcuc	27
<210> 5	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> NFE2L2 siRNA forward	
<400> 5	
ucaacgaaau gauguccaaa gagca	25
<210> 6	
<211> 27	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	NFE2L2 siRNA reverse	
<400>	6	
ugcucuuugg	acaucauuuc	guugaag
		27
<210>	7	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	KEAP1 siRNA forward	
<400>	7	
agaacagacu	aacuaguguc	uuuca
		25
<210>	8	
<211>	27	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	KEAP1 siRNA reverse	
<400>	8	
ugaaagacac	uaguuagucu	guucuuu
		27
<210>	9	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	KEAP1 siRNA forward	
<400>	9	
agcgcuacga	uguggaaaca	gagac
		25
<210>	10	
<211>		
	27	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	KEAP1 siRNA reverse	
<400>	10	
gucucuguuu	ccacaucgua	gcgcucc
		27
<210>	11	
<211>	25	

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KEAP1 siRNA forward
 <400> 11
 agaggaacga guggcgaaug aucac 25
 <210> 12
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KEAP1 siRNA reverse
 <400> 12
 gugaucuuu gccacucguu ccucucu 27
 <210> 13
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> H01 siRNA forward
 <400> 13
 aacauugucu gauaguagcu ugaaa 25
 <210> 14
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> H01 siRNA reverse
 <400> 14
 uuucaagcua cuacagaca auguugu 27
 <210> 15
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> H01 siRNA forward
 <400>
 > 15
 uaaacaacau ugucugauag uagct 25

<210> 16
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> H01 siRNA reverse
 <400> 16
 agcuacuauc agacaauguu guuuauu 27
 <210> 17
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> H01 siRNA forward
 <400> 17
 gguccuuaca cucagcuuuc uggtg 25
 <210> 18
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> H01 siRNA reverse
 <400> 18
 ugcucuuugg acaucauuuc guugaag 27
 <210> 19
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NFE2L2 shRNA forward
 <400> 19
 tagatcagaa acatcaatgg gc 22
 <210> 20
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NFE2L2 shRNA reverse
 <400> 20

acccattgat gtttctgac ta	22
<210> 21	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> NFE2L2 shRNA forward	
<400> 21	
tttcgttgaa gtcaacaaca gg	22
<210> 22	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> NFE2L2 shRNA reverse	
<400> 22	
actgttggtg acttcaacga aa	22
<210> 23	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> NFE2L2 shRNA forward	
<400> 23	
ttgagcttca ttgaactgct ct	22
<210> 24	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> NFE2L2 shRNA reverse	
<400> 24	
cgagcagttc aatgaagctc aa	22