



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0054879  
(43) 공개일자 2011년05월25일

(51) Int. Cl.

A61K 31/715 (2006.01) A61K 35/56 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0111674

(22) 출원일자 2009년11월18일

심사청구일자 2009년11월18일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자

손윤희

대구 수성구 수성동1가 613번지 신세계타운 2동 1202호

남경수

대구 남구 봉덕2동 1071번지 효성타운 106동 1107호

(74) 대리인

이덕록

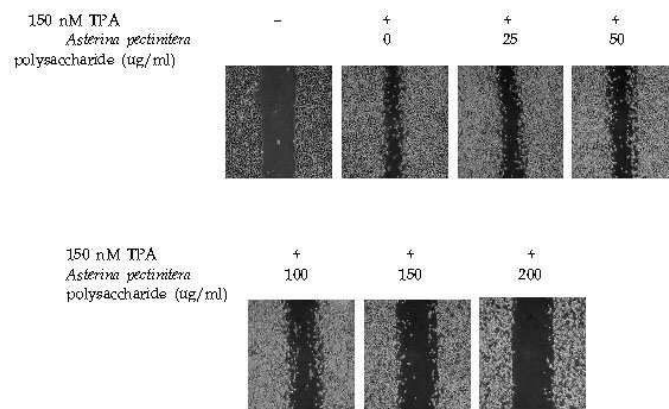
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 별불가사리 유래의 직장암 및 암전이 억제용 천연 COX-2 효소저해제

### (57) 요약

본 발명은 직장암 및 암전이 억제용 천연 COX-2효소 저해제에 관한 것으로, 계대보존 중에 있는 사람의 직장암세포주 HT-29를 순수배양한 것을 공시재료로 하여 TPA를 첨가하여 Cyclooxygenase-2(COX-2)를 유도하고 이를 재차 배양하여 PGE<sub>2</sub> 생성을 측정한 후 별불가사리 유래의 다당류물질이 COX-2 활성화에 미치는 영향을 분석한 결과 상기 다당류물질에 의해 농도의존적으로 억제됨과 동시에 상기 직장암세포주 HT-29의 이동성이 농도의존적으로 감소되고, MMP분비가 농도의존적으로 억제되는 뛰어난 효과가 있으므로 직장암 및 암전이 억제제로서 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 없음

부처명 국토해양부

연구관리전문기관

연구사업명 해양생명공학사업

연구과제명 미용해양자원의 과도활용기술개발 및 산업화(해양동물유래 신규생리활성물질 및 생산공  
정 개발)

기여율

주관기관 부경대학교

연구기간 2009년 1월 1일 ~ 2009년 12월 31일

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

별불가사리 유래의 다당류물질을 유효성분으로 함유하는 직장암 및 암전이 억제용 COX-2 효소저해제.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 기술분야

[0001] 본 발명은 별불가사리 유래의 직장암 및 암전이 억제용 천연 COX-2 효소저해제에 관한 것이다.

#### 배경기술

[0002] 암발생은 정상세포가 외부의 발암물질원에 의해 다단계로 진행되며 크게 개시 (initiation), 촉진 (promotion), 그리고 진행 (progression)의 세 과정으로 진행된다. 이러한 다단계 과정으로 일어나는 암발생과정(carcinogenesis)은 여러가지 천연물 또는 화학적 화합물에 의해 억제되거나 지연될 수 있다. 특히 직장암은 산업화된 현대에서 발병률과 사망률이 높은 질병 중의 하나이며, 직장암 발생은 환경적요인의 영향을 많이 받으므로 암예방 제제가 직장암 발생에 미치는 영향을 살펴보는 것은 매우 중요하다.

[0003] Cyclooxygenase (COX)는 prostanoids (prostaglandins, prostacyclins 과 thromboxanes) 합성을 위한 주요 효소이다. COX는 두 종류의 isoforms이 있는데, 그 중 하나인 COX-1은 대부분의 조직에서 구성성분으로 발현되고 일반적인 생리기능을 위해 prostaglandin (PG)을 생성하는 것으로 알려져 있다. 그러나 COX-2는 lipopolysaccharide (LPS), tumor promoters, oncogenes, 발암물질, mitogens, 호르몬, 사이토카인과 성장인자와 같은 여러종류의 자극에 반응하여 유도된다. 또한 COX-2는 유방암, 대장암, 전립선암등의 고형암에서 과대발현됨이 증명되었다.

[0004] 암의 전이는 암세포가 1차 조직에서 혈관이나 림프관을 통해 다른 부위나 장기로 이동하면서 일어나는 세포 진행의 형태로서 악성 암의 가장 큰 특징이다. 암세포가 침윤 (invasion) 및 전이를 위해서는 세포외 기질 (extracellular matrix)와 기저막 (basement membrane)의 구성성분인 단백질 중합체의 분해가 이루어져야 하며, 특히 기저막의 주성분을 이루는 type IV collagen의 분해가 필수적이다. 세포외기질과 기저막의 주성분을 분해하는 matrix metalloproteinases (MMPs)는 아연의존적효소군으로서 종양의 침윤과 전이에 중요한 역할을 하는 효소군으로 알려져 있다. 따라서 MMP의 과다발현과 활성화는 생리적 조절이 정상적으로 되지 못하며, 암세포의 증식, 침윤, 전이, 종양 등을 활성화시키는 것으로 알려져 있으며, 그 중에서도 기저막의 주요성분인 type IV collagen을 분해하는 MMP-9이 암전이에 큰 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. MMP 생성은 전이가능성이 더 높은 암세포의 지표가 되고 MMP 활성화의 촉진은 대장암에서 발견되어졌다.

[0005] 본 발명자들은 직장암 발생의 억제용 물질로서 DHA(대한민국 특허공개번호 제10-2008-33567호)와 키토산 올리고당(동 특허공개번호 제10-2008-77713호)을 개시한 바 있다. 대한민국 특허공개번호 제10-2008-61327호에는 우르소데옥시콜린산 (UDCA)의 직장암 예방치료 효과가, 대한민국 특허공개번호 제10-2006-36058호에는 혈관 표적화제(VTA) 중 ZD6126물질의 직장암 예방치료 효과가, 그리고 대한민국 특허공개번호 제10-2002-18201호에는 폴립 또는 결장직장암의 치료용 EGFR키나제 억제제가 각각 개시되어 있다.

[0006] 그러나, 지금까지 직장암 및 암전이 억제용 COX-2 효소저해제로서 부작용(side effect)이 없는 천연물질이 연구 보고 되거나 특허문헌으로 개시된바 없다.

#### 발명의 내용

#### 해결하고자하는 과제

[0007] 본 발명은 별불가사리 유래의 천연의 다당류물질이 직장암 발생과정에 관련된 Cyclooxygenase에 미치는 영향과

암전이 억제효과를 규명하고 그 결과를 제공하는 데 있다.

### 과제 해결수단

[0008] 본 발명의 상기 목적은 직장암 세포주 HT-29를 배양하는 단계와; COX-2 활성을 측정하는 단계와; 세포이동성과 MMP 를 분석하고 평가함으로써 달성하였다.

### 효 과

[0009] 본 발명 별불가사리 유래의 천연 다당류물질은 직장암 세포주 HT-29의 COX-2 효소활성을 농도의존적으로 억제하는 효과가 있고, 세포이동성을 감소시킬 뿐만 아니라, MMP 생성을 억제하는 효과가 있다.

### 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0010] 별불가사리 다당추출물 시료의 제조

[0011] 별불가사리는 포항 앞바다에서 채집하여 물로 깨끗이 씻어 -20℃에 보관하였다. 별불가사리 다당추출물은 도1과 같이 500g의 시료로 0.7g을 추출하여 얻었다.

[0012]

[0013] 세포배양

[0014] 계대보존 중인 사람의 직장암세포 HT-29는 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI 1640을 배양액으로 하여 CO<sub>2</sub> 배양기 (5% CO<sub>2</sub>, 37℃)에서 배양하였고, 배양액은 3 또는 4일 간격으로 교환해 주었다. 이들 세포는 액체질소의 기체상태 (-150℃)에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹여서 실험에 사용하였으며, 세포의 생존은 trypan blue dye exclusion 방법으로 확인하였다.

[0015]

[0016] COX-2 활성 측정

[0017] HT-29 세포의 최종수를  $5 \times 10^5$  cells/mL로 조정하여 12 well plate의 각 well에 2시간 부착시킨 후에 시료를 농도별로 처리하였다. 이를 37℃ CO<sub>2</sub> 배양기에서 다시 1시간 배양시킨 후 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)를 가하여 cyclooxygenase-2를 유도하였다. 이를 12시간 동안 배양한 후 배양 상층액을 회수하여 PGE2 Biotrak kit (Amersham Biosciences)를 이용하여 COX-2 활성 측정에 사용하였다. 즉, PGE2 Biotrak kit의 96 well plate에 이들 상층액을 50  $\mu$ l씩 가한 뒤, 희석한 mouse anti-PGE2 antibody를 50  $\mu$ l씩 넣었다. Peroxidase conjugated second antibody를 50  $\mu$ l씩 넣고 상온에서 2시간 배양하였다. Washing buffer로 4회 세척하고 기질시약을 150  $\mu$ l씩 가한 뒤, 상온에서 30분간 배양시키고 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 사용하여 반응을 정지시킨 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 450 nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

[0018] COX-2 효소활성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, 시료 처리 후 세포상층액으로 PGE2의 생성을 측정하였다. 도2에서 보는 바와 같이 별불가사리 다당추출물이 농도의존적으로 COX-2 효소활성을 억제하였다. 앞선 연구에 의하면 nude mice에 이식한 사람의 암세포가 indolemethacin (COX-1 저해제)에 의하여 억제되는 것이 관찰되었다. 그러나 indolemethacin은 COX-1 저해제이고 또한 합성제제는 위장장애의 부작용이 있으므로 부작용이 없는 천연물제재로서 선택적 COX-2 저해제의 개발이 매우 중요하다.

[0019] 세포의 이동성

[0020] Collagen (20 ug/mL)으로 코팅된 well에 HT-29 세포 ( $1 \times 10^6$  cells)를 37℃에서 24시간 동안 배양한 후

blue tip으로 동일한 굵기의 scratch를 내었다. 그리고 serum free RPMI 1640 배지로 3번 씻어낸 뒤 다음 150 nM TPA와 시료를 농도별로 처리하여 배양 48시간 후에 세포의 이동성을 측정하였다.

[0021] Wound healing assay로 암전이 억제효과를 관찰한 결과, TPA에 의해 HT-29 세포의 이동성이 증가하였고 별불가사리 다당추출물에 의하여 TPA에 의하여 증가한 세포의 이동성이 농도의존적으로 감소하였다(도3).

[0022] **MMP 분비**

[0023] 세포 ( $5 \times 10^5$  cells/well)를 6 well plate의 각 well에 24시간 부착시킨 후에 해시료를 농도별로 처리하여 37℃ CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 상층액을 ELISA 법으로 분비된 MMP를 정량분석으로 측정하였다.

[0024] 직장암세포 HT-29에서 별불가사리 다당추출물은 농도의존적으로 TPA에 의해 증가한 MMP 생성을 억제하였다(도4).

[0025] **통계학적 처리**

[0026] 실험결과는 평균±표준편차 (standard deviation, SD)로 나타내었으며, 실험에 대한 유의성 검정을 위해 student's *t*-test를 수행하여 결과치는 p 값이 0.05 미만을 통계학적으로 의미있는 것으로 간주하였다.

### 산업이용 가능성

[0027] 본 발명 별불가사리 유래의 다당류물질은 인체의 직장암 세포주 HT-29 세포의 COX-2 활성을 억제하고, 세포이동성을 감소시키며 MMP 생성을 억제하는 뛰어난 효과가 있으므로 직장암 및 암전이 억제제로서 부작용이 없는 천연물 제제로 사용할 수 있으므로 생물의약산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0028] 도1은 본 발명 별불가사리 다당류 추출공정을 보인 다이어그램이다.

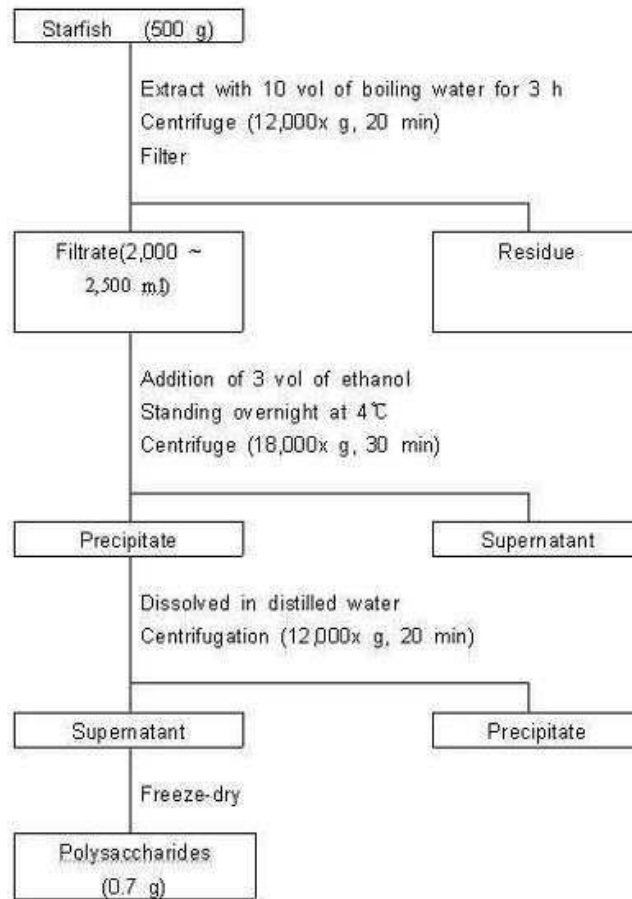
[0029] 도2는 본 발명 별불가사리 유래의 다당류물질이 인체의 직장암 세포주 HT-29 세포들의 COX-2 활성에 미치는 효과를 보인 그래프이다.

[0030] 도3은 본 발명 별불가사리 유래의 다당류물질이 인체의 직장암 세포주 HT-29 세포들의 이동성에 미치는 영향을 보인 그래프이다.

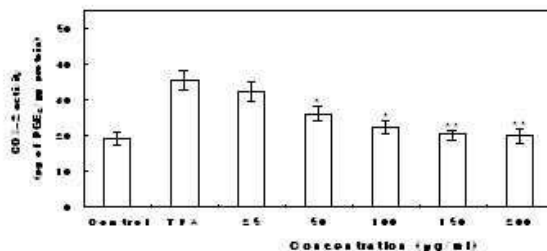
[0031] 도4는 본 발명 별불가사리 유래의 다당류물질이 인체의 직장암 세포주 HT-29 세포들에 의하여 MMP-2 분비수준에 미치는 효과를 보인 그래프이다.

도면

도면1

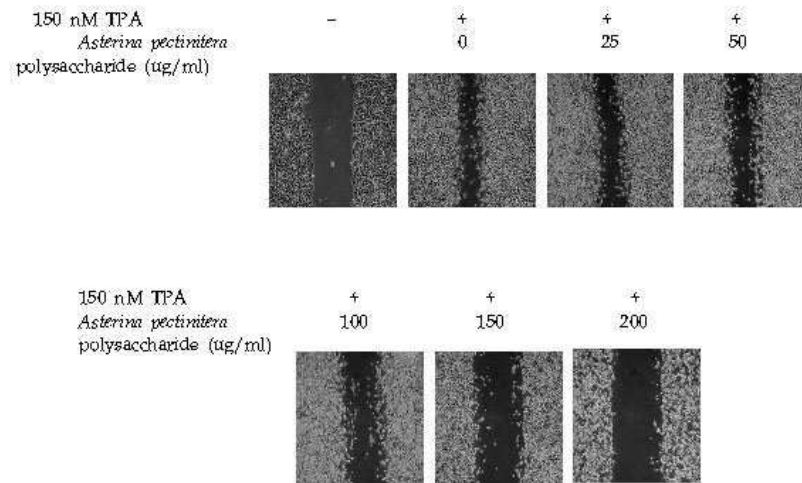


도면2



[보기] Data shown are mean values with bars indicating the SD of the mean (n=3). \*p<0.05 and \*\*p<0.01 compared with the control.

도면3



도면4

