



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0113122
(43) 공개일자 2014년09월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7008 (2006.01) A61K 31/70
(2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0028091

(22) 출원일자 2013년03월15일

심사청구일자 2013년03월15일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

강남주

대구 북구 대학로 80, 농업생명과학대학 식품공학부 (산격동, 경북대학교)

김경현

서울 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호 (서초동, 삼풍아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

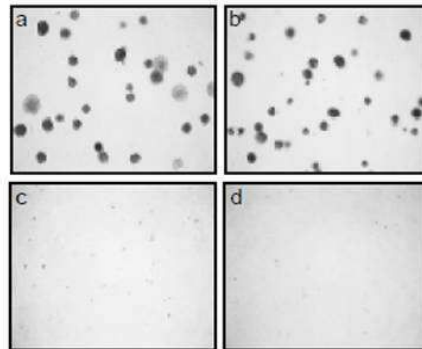
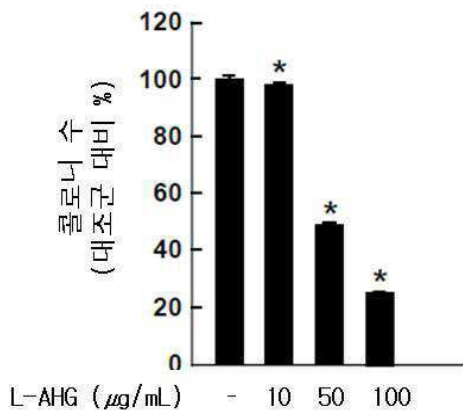
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 홍조류 유래의 한천으로부터 분리·정제한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 이용하여 대장암 세포의 세포사멸을 유도하고 대장암 세포의 성장을 저해함으로써 우수한 항암 효과를 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



a. 대조군
b. L-AHG 10μg/mL)
c. L-AHG 50μg/mL)
d. L-AHG 100μg/mL)

(72) 발명자

최인걸

서울 동작구 남부순환로263길 34, (사당동)

김영아

대구 북구 대학로 80, 농업생명과학대학 3호관
314호 (산격동, 경북대학교)

윤은주

서울 금천구 시흥대로 53, 14동 104호 (시흥동,
현대빌라)

이세영

경기 의왕시 호성로 48-7, 103동 1502호 (오전동,
진달래아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 112097031SB010

부처명 농림수산식품기술기획평가원

연구관리전문기관 연구지원부

연구사업명 농림기술개발사업

연구과제명 [주관]해조류 우무 유래 무수갈락토오스의 기능성 화장품 소재화

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

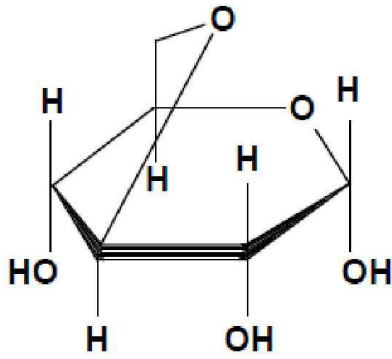
연구기간 2012.08.24 ~ 2013.08.23

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose)를 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 홍조류 유래의 한천에서 분리 및 정제한 것인 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 전처리 된 아가로오스에서 아가로올리고당을 제조하고, 상기 아가로올리고당과 아가로오스 분해효소 및 네오아가로바이오스 가수분해효소의 효소적 당화 과정을 거쳐 분리 정제한 것인 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스가 대장암 세포의 세포사멸(apoptosis)을 유도하고, 세포증식을 억제함으로써 대장암을 예방 또는 치료하는 것인 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

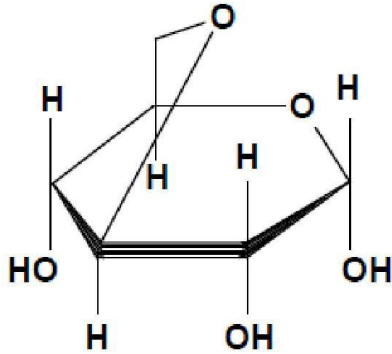
제1항에 있어서,

약학적으로 허용되는 담체를 더 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

하기 화학식 1로 표시되는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose)를 포함하는 대장암 예방 또는 개선용 건강기능식품:

[화학식 1]



청구항 7

제6항에 있어서,

3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 홍조류 유래의 한천에서 분리 및 정제한 것인 대장암 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 8

제6항에 있어서,

3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 전처리 된 아가로오스에서 아가로올리고당을 제조하고, 상기 아가로올리고당과 아가로오스 분해효소 및 네오아가로바이오스 가수분해효소의 효소적 당화 과정을 거쳐 분리 정제한 것인 대장암 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 9

제6항에 있어서,

대장암 예방 또는 개선용 건강기능식품은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스가 대장암 세포의 세포사멸(apoptosis)을 유도하고, 세포증식을 억제함으로써 대장암을 예방 또는 개선하는 것인 대장암 예방 또는 개선용 건강기능식품.

명세서

기술분야

본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 대장암 세포의 세포사멸 유도 및 세포증식 억제능을 통해 대장암을 예방, 개선, 또는 치료하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 대장암(colon cancer)은 미국에서 암과 관련된 사망의 주된 요인일 뿐 아니라, 2010년 미국에서 약 102,900명이 대장암으로 진단되고, 51,370명이 사망할 것으로 추정되는 암이다. 최근에는 서구화된 식습관으로 인해 아시아에서도 그 발병률이 증가하고 있는 추세이며, 관련된 요인으로서는 과도한 동물성 지방, 당분, 알코올 섭취와 섬유소, 항산화 비타민, 야채나 과일의 섭취 부족 등이 주요 원인으로 알려져 있다. 특히 동물성 지방과 육류를 많이 섭취하면 채소나 곡물 등의 섬유질 식품 섭취와는 달리 대변 양이 적고 내용물이 대장을 통과하여 배설되는 시간이 많이 걸린다. 또한 담즙산과 스테롤의 배설이 증가하며 대장 내에 존재하는 세균종의 구성에도 변화를 일으켜 이들 물질을 화학적으로 변화시키는 세균의 종류가 증가한다. 따라서 발암물질이 많이 생성되고 발암물질이 대장 내에 머물고 접촉하는 시간도 길어져서 대장암이 자주 발생하게 된다.

[0003] 대장암의 경우 혈관을 중심으로 많은 수의 세포들이 서로 덩어리진 형태로 성장하는 대표적인 고형암 세포로서 치료방법이 극히 제한적으로 완치가 어려운 암 중 하나이다. 즉, 덩어리진 대장암 세포의 중심부까지 약물이 제대로 투과하지 못하기 때문에 대장암 세포를 완전히 제거하기란 쉬운 일이 아니다(Kim, K *et al.*, (2005) *Korea J Gastroenterol.* 45, 277-284). 현재 약물로써 대장암을 치료할 수 있는 방법은 거의 없는 실정이고, 수술요법이나 방사선요법 등과 같은 외과적인 치료만이 대장암을 치료하는 제한적인 방법이며, 또한 이러한 치료법으로는 대장암의 완치가 어렵다(Lee, K. H *et al.*, (2004), *J Korean Surg. Soc.* 66, 199-204). 따라서 많은 연구자가 대장암 세포의 성장을 효과적으로 억제할 수 있는 방법을 개발함으로써 대장암 세포뿐만 아니라 대부분의 암세포의 성장을 효과적으로 억제하기 위해서 많은 연구를 수행하고 있다(Park, H. R *et al.* (2004), *J Natl. Cancer Inst.* 96, 1300-1310; Xu, R *et al.*, (2006), *Histol. Histopathol* 21, 867-872; Yun, I. M *et al.*, (2005), *Planta. Med* 71, 501-507).

[0004] 세포사멸(apoptosis)은 대부분의 항암제가 암세포의 증식억제 효과를 나타내는 중요한 작용기작으로, 세포 내부에 프로그램된 신호를 따라 여러 유전자 및 단백질들의 발현과 활성이 조절되어 일어나는 능동적인 죽음이다. 세포사멸은 생명체의 여러 정상적인 생리적 현상에서 쉽게 관찰된다. 예를 들면 세포사멸은 생명체의 초기 발생단계에서 관찰되는 여러 형태적 변화과정과 면역계 또는 신경계의 기능적 자가 조직화과정에서 중요한 역할을 담당한다. 또한, 성인이 된 이후에도 조직 항상성 세포 수의 조절, 손상된 세포의 제거, 감염에 대한 방어 기작으로서 필수적으로 작용한다. 세포사멸은 여러 질환들의 발병과정에도 깊이 관여하는데 비정상적인 세포사멸의 발생은 퇴행성뇌신경질환, 면역계 이상, 그리고 심장 혈관계질환 등의 원인이 될 수 있으며, 세포사멸의 비정상적인 억제는 암의 원인이 될 수 있다. 세포사멸이 정상적인 조절과정에서 벗어나 비정상적으로 발현하거나 억제되어 나타나는 질병을 좀 더 자세히 살펴보면, p53, p16와 Bcl-2 등의 유전자의 이상 발현에 의해 유도되는 암들, HIV, Herpes 및 독감 바이러스들은 여러 감염증, 그리고 당뇨, 류마티스 관절염, 다발성 경화증과 근 무력 등과 같은 자가면역 질환들이 있다. 이와 같이, 세포사멸은 생명체의 다양한 생리작용을 정상적으로 유지하는데 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 여러 질병의 발병과정에도 밀접한 관련이 있다. 개체를 구성하는 각 세포의 세포사멸은 유전적으로 손상을 입은 세포나 분화 자극제에 의해 부적절한 분화의 유도에 의한 종양의 발달을 막기 위해 이들 비정상적인 세포를 개체에서 제거하기 여러 수단, 즉 회복 불가능한 유전적 상처를 지닌 세포들을 개체에서 제거하기 위한 일반적인 수단이다. 이 개념은 일반적으로 사용되는 항암제가 암세포의 증식억제와 연관된 세포사멸 과정을 통해 암세포의 사멸을 유도한다는 사실에 의해 뒷받침되고 있다. 따라서 세포사멸 과정의 교란은 손상되거나 손상이 시작된 세포의 생존과 그들 세포의 성장을 유도하기 때문에 세포사멸의 억제는 암화과정에서 중요한 역할을 한다. 아울러 암예방 효과가 있는 물질들은 이러한 비정상적인 세포의 세포사멸을 유도하며, 이들에 의한 세포사멸의 유발은 최소한 그들의 암예방 활성과 연관되어 있음이 보고되었다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 상기 홍조류 유래 한천으로부터 분리·정제한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스가 암세포의 세포사멸을 유도하며 암세포의 증식을 억제하는데 탁월한 효과를 나타냄을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) 1. Eun Ju Yun *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012.06.08

발명의 내용

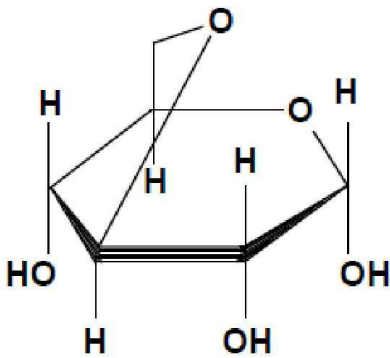
해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 이용하여 대장암을 예방 또는 치료하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose)를 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다:

[0009] [화학식 1]



[0010]

[0011] 본 발명은 또한 상기 화학식 1의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose)를 포함하는 대장암 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스가 대장암 세포의 성장을 억제하고, 암세포의 세포사멸을 유도함으로써 우수한 항암 활성을 나타내므로 대장암 예방, 치료, 또는 개선에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 종양 전환 억제 효과를 나타낸 것으로, 그림은 L-AHG 처리에 따른 대장암 세포의 콜로니 형성을 육안으로 관찰한 사진이며, 그래프는 형성된 콜로니의 수를 카운팅 하여 나타낸 것이다. 레인 1과 그림 a는 무처리 대조군, 레인 2와 그림 b는 L-AHG 10 $\mu\text{g/mL}$ 처리군, 레인 3과 그림 c는 L-AHG 50 $\mu\text{g/mL}$ 처리군, 레인 4와 그림 d는 L-AHG 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리군이다.

도 2는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 세포사멸 발생 효과를 나타낸 것으로, 유세포 분석기를 이용하여 sub-G1기의 세포수를 측정하여 나타낸 것이다. 레인 1은 무처리 대조군, 레인 2는 L-AHG 25 $\mu\text{g/mL}$ 처리군, 레인 3은 L-AHG 50 $\mu\text{g/mL}$ 처리군, 레인 4는 L-AHG 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리군이다.

도 3은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스가 세포사멸 관련 단백질의 발현에 미치는 효과를 나타낸 것으로, 웨스턴 블로팅을 통해 PARP 단백질, Bcl-xL, Bcl-2 및 Bax의 발현을 측정하여 나타낸 것이다.

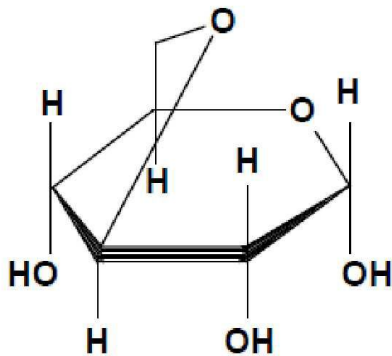
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0015] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose)를 포함하는 대

장암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다:

[화학식 1]



본 발명자들은 항암 효과가 있는 생리활성물질을 탐색하는 과정에서 홍조류 유래의 한천(agar)을 구성하고 있는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(L-AHG)에 주목하게 되었다.

본 발명의 일 구체예에 따르면, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 세포사멸을 억제하는데 관여하는 Bcl-2, Bcl-xL 단백질의 발현을 억제하고, Bcl-2 패밀리에 속하며, 세포사멸을 촉진하는 Bax 단백질의 발현을 증가시키며, 미토콘드리아 내에 존재하는 시토크롬 C(Cytochrome C)의 발현을 증가시키고, PARP 단백질의 분해를 증가시켰다.

즉, 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 대장암 세포의 세포사멸을 유도하며, 암세포의 세포증식을 억제함으로써 대장암의 예방, 개선, 또는 치료할 수 있는 것을 특징으로 한다.

따라서, 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 대장암의 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물로 사용할 수 있다.

상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 홍조류 바이오매스를 구성하는 대표적인 탄수화물 성분인 한천의 구성 단당으로, 화학적 합성을 통해 얻은 것을 사용하거나, 전처리 된 아가로오스에서 아가로올리고당을 제조하고, 상기 아가로올리고당은 아가로오스 분해효소 및 네오아가로바이오스 가수분해효소에 의한 효소적 당화 공정을 통해 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로 분해되며, 상기 효소적 당화 공정을 통해 얻은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 흡착크로마토그래피인 실리카젤 크로마토그래피와 바이오젤 P2 크로마토그래피를 이용하여 분리 정제하는 방법을 통해 얻을 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 효소적 당화 공정을 통해 분리 정제 하는 일 구현예로, 상기 전처리는 약산을 이용한 아가로오스의 가수분해일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

상기 약산은 아세트산(Acetic acid), 포름산(Formic acid), 숙신산(Succinic acid), 시트르산(Citric acid), 말산(Malic acid), 말레산(Maleic acid) 또는 옥살산(Oxalic acid) 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

상기 약산은 생산단가 및 약산 중화 후 생성되는 염의 분리를 고려하여 0.5 내지 60%(w/v)의 농도로 사용하는 것이 좋다. 보다 구체적으로 20 내지 40% (w/v)의 농도로 사용할 수 있다.

상기 아가로오스 및 약산의 반응은 40 내지 150℃의 온도 범위에서 100 내지 200 rpm의 조건으로 30분 내지 6 시간 동안 실시할 수 있다. 상기 범위 내일 경우 약산에 의한 아가로오스의 과분해산물을 최소화할 수 있다.

상기에서 전처리 후 생성된 아가로올리고당을 이당체를 생산하는 엑소-타입의 아가로오스 분해효소와 반응시켜 네오아가로바이오스를 생산하며, 네오아가로바이오스 가수분해효소와의 추가 반응을 통해 단당체인 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 생산한다.

상기 효소 반응은 20 내지 40℃의 온도 범위에서 0 내지 200 rpm 조건으로 30분 내지 7일 동안 실시할 수 있다.

상기 효소 반응을 보다 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

우선, 아가로올리고당을 분해하여 이당체인 네오아가로바이오스를 생산하는 아가로오스 분해효소는 아가로오스의 D-갈락토스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 사이의 β -1,4-글리코사이드 결합을 절단하는 효소(이하,

'Aga500D'라 함)를 사용할 수 있다.

- [0031] 상기 아가로오스 분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)의 배양물의 상등액 또는 상청액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다.
- [0032] 상기 아가로올리고당 및 아가로오스 분해효소의 반응은 20 내지 40℃의 온도 범위에서 0 내지 200 rpm 조건으로 30분 내지 7일간 실시할 수 있다. 보다 구체적으로, 25 내지 35℃의 온도 범위에서 100 내지 150 rpm 조건으로 1일 내지 4일 동안 실시할 수 있다.
- [0033] 상기 효소 반응을 통해 생산된 네오아가로바이오스는 네오아가로바이오스 가수분해효소에 의해 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로 분해된다.
- [0034] 상기 네오아가로바이오스 가수분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)의 배양물의 상등액 또는 상청액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다.
- [0035] 상기 네오아가로바이오스와 네오아가로바이오스 가수분해효소의 반응은 20 내지 40℃의 온도 범위에서 0 내지 200 rpm의 조건으로 30분 내지 7일 동안 실시할 수 있다. 보다 구체적으로 25 내지 35℃의 온도 범위에서 100 내지 150 rpm 조건으로 1일 내지 4일 동안 실시할 수 있다.
- [0036] 상기 네오아가로바이오스의 분해 산물에 대해 흡착 크로마토그래피인 실리카 젤 크로마토그래피 및 젤 투과 크로마토그래피인 바이오 젤 P2 크로마토그래피를 순차적으로 실시하여 대략 96%의 고순도의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 분리 정제할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다.
- [0038] 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함하며, 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0040] 한 양태로서, 본 발명에 따른 약학 조성물은 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있으며, 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로오스, 솔비톨 또는 텍스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 조성물은 전신계 또는 국소적으로 투여될 수 있으며, 이러한 투여를 위해 공지의 기술로 적합한 제형으로 제제화될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 불활성 희석제 또는 식용 담체와 혼합하거나, 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐에 밀봉되거나 또는 정제로 압형하여 투여할 수 있다. 경구 투여용의 경우, 활성 화합물은 부형제와 혼합되어 섭취형 정제, 협측 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다.
- [0042] 주사용, 비경구 투여용 등의 각종 제형은 당해 기술 분야 공지된 기법 또는 통용되는 기법에 따라 제조할 수 있다. 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 식염수 또는 완충용액에 잘 용해되므로 냉동 건조 상태로 보관한 후, 유효량의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등에 적합한 형태로 식염수 또는 완충액에 투여 직전에 용액으로 제제화하여 투여할 수도 있다.
- [0043] 본 발명의 약학 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. 예컨대, 본 발명의 조성물의 투여량은 성인에게 1일에 0.1 내지 1000 mg/kg의 양을, 바람직하게는 10 내지 100

mg/kg의 용량을, 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.

- [0044] 본 발명은 또한 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 대장암 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.
- [0045] 용어, "건강기능식품"이란 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과가 있는 것을 의미한다.
- [0046] 본 발명의 건강기능식품은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 우수한 대장암 예방 또는 개선 효과를 기대할 수 있어 매우 유용하다.
- [0047] 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 더 구체적으로 0.0001 내지 10 중량%로 첨가된다. 보다 구체적으로, 0.001 내지 1 중량%로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0048] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0049] 본 발명의 건강음료는 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토오스, 슈크로오스와 같은 이당류; 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 다당류; 또는 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르트름과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강음료 100 mL 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.
- [0050] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 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 함유할 수 있다.
- [0051] 그 밖에 본 발명의 건강기능식품은 천연 과일 주스, 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요한 진 않지만 본 발명의 건강기능식품 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0052] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0053] <실시예 1> 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 종양전환 억제 효과 측정
- [0054] 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 종양전환 억제 효과를 측정하기 위해서 소프트 아가 분석(soft agar assay)을 수행하였다.
- [0055] 3,6-안하이드로-L-갈락토오스가 암세포의 콜로니 형성에 미치는 영향을 평가하기 위해 사람 유래의 대장암 세포인 HCT-116세포(한국세포주은행, Korea)를 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 L-AHG와 함께 6-웰 플레이트에 씨딩(seeding)하여 37°C에서 일주일 동안 배양하였다.
- [0056] 일주일 후 현미경을 이용하여 콜로니 형성 정도를 사진으로 찍은 뒤 형성된 콜로니의 수를 카운팅 하여 나타내었다. 콜로니의 수는 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

$$\text{콜로니의 수 (\%)} = \left(\frac{\text{시료 첨가군의 콜로니 수}}{\text{무처리 대조군의 콜로니 수}} \times 100 \right)$$

[0057]

[0058]

도 1에 나타난 바와 같이, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 암세포의 종양전환을 농도 의존적으로 억제하였고, 특히 100 μ g/mL의 농도에서 탁월한 콜로니 형성 억제 효과를 나타내었다.

[0059]

<실시예 2> 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 세포사멸 발생 효과 측정

[0060]

3,6-안하이드로-L-갈락토오스에 의한 암세포의 세포사멸 유발 정도를 정량적으로 알아보기 위해서, 세포주기의 sub-G1기에 해당하는 세포, 즉 세포사멸 수의 정도를 프로피디움 요오드화물(propidium iodide, PI, SIGMA, MO, USA)염색을 통한 유세포 분석기를 이용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.

[0061]

구체적으로, 사람 유래 대장암 세포인 HCT-116세포(한국세포주은행, Korea)를 60mm-접시에 씨딩하고 FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 조건하에서 24시간 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 25, 50, 100 μ g/mL의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 함유한 배지로 교체하였고 동일한 조건하에서 세포가 웰의 바닥에 약 80% 이상 잘 때까지 배양하였다.

[0062]

총 5일간 배양한 후 PI를 이용하여 암세포의 DNA를 염색하였다. 이를 위해 PBS로 1번 세척한 후, 트립신(trypsin)을 이용하여 바닥에 부착된 세포를 회수하였다. 원심분리를 이용하여 세포 부유액을 차가운 인산 완충용액(PBS)으로 2회 세척한 후 70% 무수 에탄올(absolute ethanol)을 500 μ l를 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 이상 고정시켰다. 원심분리 후 무수 에탄올은 제거하고 PBS로 세척한 후 10 μ g/mL RNase 및 50 μ g/mL 프로피디움 요오드(propidium iodide)를 포함하는 1mL의 PBS 내에서 재현탁하였고, 암조건 37 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 인큐베이션 한 후, 유세포분석기를 사용하여 분석하였다. 각 데이터 파일에 대해 10,000 세포로부터 얻은 데이터를 수집하였다.

[0063]

도 2에 나타난 바와 같이, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 세포주기의 sub-G1기에 해당하는 세포를 증가시키는 것을 확인할 수 있었고, 특히 100 μ g/mL의 농도에서 뚜렷한 세포사멸 발생을 유도하였다.

[0064]

<실시예 3> 3,6-안하이드로-L-갈락토오스에 의한 세포사멸 관련 단백질의 발현 측정

[0065]

상기 실시예의 결과를 통해서 확인된 3,6-안하이드로-L-갈락토오스에 의한 HCT-116 세포의 세포사멸 유발 기작을 알아보기 위하여 웨스턴 블로팅(western blotting) 방법을 수행하였고, 세포사멸 유발 조절에 중요한 유전자들의 발현 변화를 확인하였다.

[0066]

Bcl-2는 암 유전자 단백질이지만 다른 암 유전자 단백질과는 달리 세포증식에 관여하지 않고 세포생존 조절, 즉 세포사멸을 억제하는 기능이 있으며, Bax는 Bcl-2 패밀리에 속하는 단백질로서, 세포사멸을 촉진하는 기능이 있다.

[0067]

3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 세포사멸 관련 단백질의 발현을 측정하기 위해 사람 유래 대장암 세포인 HCT-116세포(한국세포주은행, Korea)를 60mm-접시에 씨딩하고 FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 조건하에서 24시간 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 25, 50, 100 μ g/mL의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 함유한 배지로 교체하였고 동일한 조건하에서 세포가 웰의 바닥에 약 80% 이상 잘 때까지 배양하였다.

[0068]

총 5일간 배양한 후 웨스턴 블로팅을 수행하였다. 이를 위해 PBS로 2번 세척한 후, 세포용해액(lysis buffer)을 이용하여 바닥에 부착된 세포를 회수하여 14,000rpm에서 10분 동안 원심분리 하였다. 각각의 상층액을 취한 후 각 세포의 상층액의 단백질 농도를 BSA(bovine serum albumin)를 표준물질로 사용하여 단백질 분석 키트(protein assay kit, BIO-RAD, USA)로 그 사용방법에 따라 정량하였다.

[0069]

이렇게 만들어진 각각의 단백질(20~40 μ g)을 10% 겔 SDS(gel sodium dodecyl sulphate)-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)로 변성 분리하여 PVDF 막(membrane)에 100 mA로 2 시간 동안 전이시켰다. 그 후 5% 스킴 밀크(skim milk)를 함유한 TBS-T 용액에 담가 2 시간 동안 반응시켜 비특이적인 단백질들에 대한 블라킹(blocking)을 실시하고 TBS-T로 1회 세척하였다. 이때, 각 세포의 Bcl-2의 발현량을 알아보기 위한 항체로는 rabbit polyclonal anti-human Bcl-2 Ab(Cell signaling, USA), Bax의 발현량을 알아보기 위한 항체로는

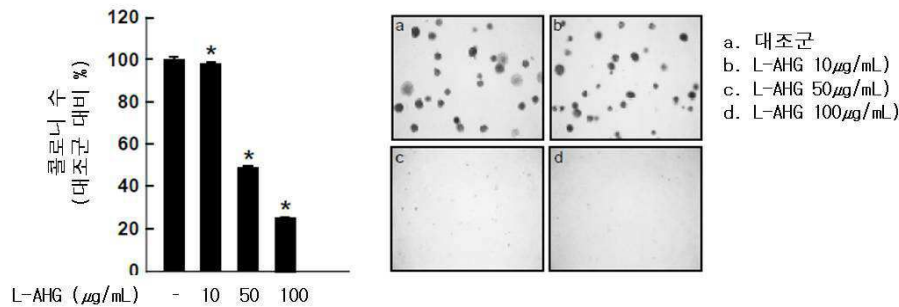
rabbit polyclonal anti-human Bax Ab(Cell signaling, USA), Bcl-xL의 발현량을 알아보기 위한 항체로는 rabbit polyclonal anti-human Bcl-xL Ab(Cell signaling, USA), PARP의 발현량을 알아보기 위한 항체로는 rabbit polyclonal anti-human PARP Ab(Cell signaling, USA), Cytochrome C의 발현량을 알아보기 위한 항체로는 rabbit monoclonal anti-human Cytochrome C Ab를 TBS-T 용액에서 1:1000 으로 희석하여 사용하였으며, 반응은 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 2차 항체로는 HRP가 결합된 anti-rabbit Ig G(Santacruz, USA)와 anti-mouse IgG(Santacruz, USA)를 1:5000으로 희석하여 이용하였으며, 반응은 상온에서 2 시간 동안 진행하였다. 그 후 다시 TBS-T로 4 회 세척하여 ECL 기질(Amersham™, UK)과 1~3분 동안 반응한 후 X-ray 필름에 감광시켜 각 세포의 세포사멸 관련 단백질의 발현 변화를 분석하였다.

[0070]

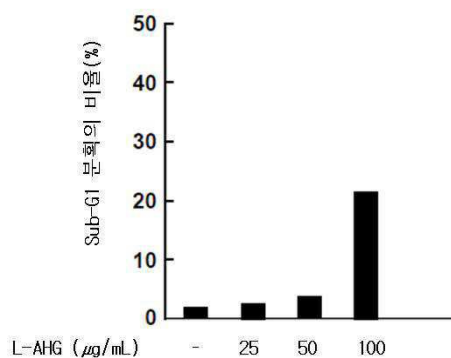
도 3에 나타난 바와 같이, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 PARP 단백질의 분해를 증가시켰으며, 미토콘드리아 내에 존재하는 단백질인 시토크롬 C의 발현을 농도의존적으로 증가시켰다. 또한, 세포사멸 유발 단백질인 Bax의 발현은 증가시키고 세포사멸 억제 단백질인 Bcl-2, Bcl-xL의 발현을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

도면

도면1



도면2



도면3

