(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0029597
(43) 공개일자 2013년03월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/60 (2006.01) *A61K 35/38* (2006.01)
A61K 35/37 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0092951
(22) 출원일자 2011년09월15일
심사청구일자 2011년09월15일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내
(72) 발명자
정원교
광주광역시 서구 풍암동 현대삼환아파트 104동 302호
천충길
전라남도 완도군 신지면 명사십리61번길 220, 조선대학교 해양생물연구교육센터
응구엔 반 띤
전라남도 완도군 신지면 명사십리61번길 220, 조선대학교 해양생물연구교육센터
(74) 대리인
이덕록

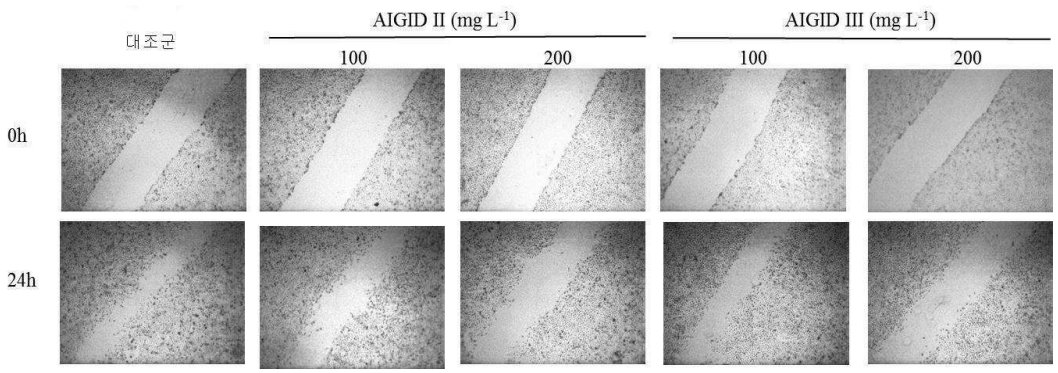
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 **MMP 활성 억제 효과를 갖는 전복 내장 위장관 소화가수분해물 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 MMP(Matrix metalloproteinases: 이하, 'MMP'라 함) 활성 억제 효과를 갖는 전복 내장 위장관 소화가수분해물(Abalone intestine gastro-intestinal digests: AIGID) 및 이를 유효성분으로 함유하는 MMP-2, MMP-9 활성 억제용 약학 조성물에 관한 것으로, 이들은 MMP 활성과 관련된 질환, 예컨대 암, 신경퇴행성, 심혈관 및 다양한 종류의 염증 질환을 포함한 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 유익한 효과를 갖는다.

대 표 도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	없음
부처명	농림수산식품부
연구사업명	수산기술개발사업 (현 수산실용화개발사업)
연구과제명	전복 소화분해시스템을 활용한 천연 항알러지 제품 개발
주관기관	농림수산식품기술기획평가원(IPET)
연구기간	2009.06.01 ~ 2012.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

매트릭스 메탈로프로테나아제(Matrix metalloproteinases, 이하 'MMP'라 함)-2 또는 MMP-9 활성 억제 효과를 가짐을 특징으로 하는 전복 내장 위장관 소화가수분해물(Abalone intestine gastro-intestinal digests: 이하 'AIGID'라 함).

청구항 2

제1항의 AIGID를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 MMP-2 또는 MMP-9 활성 억제용 약학 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 MMP(Matrix metalloproteinases: 이하, 'MMP'라 함) 활성 억제 효과를 갖는 전복 내장 위장관 소화가수분해물(Abalone intestine gastro-intestinal digests: 이하, 'AIGID'라 함) 및 이를 유효성분으로 함유하는 MMP-2, MMP-9 활성 억제용 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 AIGID가 MMP-2, MMP-9 활성 억제 효과를 가짐을 밝혀내고, 이를 유효성분으로 함유하여 암, 신경퇴행성 질환, 심혈관 질환 및 염증 질환의 예방 및 치료에 효과적인 약학 조성물을 제공하는 것이다.

배 경 기 술

[0002] 매트릭스 메탈로프로테나아제(Matrix metalloproteinases: MMP)는 세포외 매트릭스(extracellular matrix: ECM) 분해 및 종양의 침윤과 전이와 같은 각종 생물학적 및 병리학적 과정에서 중요한 역할을 하는 아연-의존적 엔도펩티다아제 일종이다. 아연-의존적 엔도펩티다아제는 사실상 모든 세포외 매트릭스 구성성분을 총괄하여 분해시킬 수 있는 28종 이상의 엔도펩티다아제를 갖는다. MMP는 최소 도메인 MMP, 단순한 헤모펙신(hemopexin) 도메인-함유 MMP, 젤라틴-결합 MMP, 푸린(furin)-활성화 분비 MMP, 비트로넥틴류(vitronectin-like) 삽입 MMP 뿐만 아니라 막-결합된 MMP인 I형 막관통(transmembrane) MMP, 글리코실-포스파티딜 이노시톨(inositol)(GPI)-연결된 MMP 및 II형 막관통 MMP의 8개 하위군으로 크게 분류된다. MMP는 사이토카인, 성장 인자, 호르몬 수용체 및 세포 부착 분자의 합성과 분비를 조절한다. 이들은 또한 성장과 발현, 형태형성(morphogenesis), 조직 변화(tissue remodelling), 혈관생성, 심혈관, 알레르기, 신경퇴행성 질병을 비롯하여 암 및 일련의 생리학적, 병리학적 경로에 관여한다. 따라서, 암, 신경퇴행성, 심혈관 및 다양한 종류의 염증 질환을 포함한 몇몇 중요 질병을 치료하는데 있어서 매트릭스 메탈로프로테나아제 억제제(MMPIs)의 개발은 광범위한 용도를 갖는다.

[0003] 젤라티나아제(MMP-2 및 MMP-9)의 활성은 악성 조직에서 지속적으로 발견되는 암 침윤 및 전이에서 중요한 기능을 한다. 상기 메탈로프로테나아제 하위군은 본래 IV 유형 콜라겐을 절단할 수 있는 능력때문에 IV형 콜라게나아제로 기재되었다. 이들은 피브로넥틴에 유사한 모티프(motif)를 닮은 젤라틴-결합 도메인을 갖는다.

[0004] 이 중 하나인 MMP-2 (젤라티나아제-A, 72 kDa IV 유형 콜라게나아제)는 고 전이성 뮤린(murine) 종양에서 본래 정제되었다. MMP-2는 피브로넥틴 도메인을 통해 I형 콜라겐에 결합하여, 자가분해(autolysis)로부터 안정화되고, 그 결과 활성이 제어된다. MMP-2 발현은 세포외 매트릭스 메탈로프로테나아제 유도체(inducer), 성장 인자, 사이토카인 및 호르몬에 따라 달라진다. Pro-MMP-2 활성화는 MT1-MMP 및 TIMP-2 분포를 필요로 한다. 한쪽 달팽이관 절제 이후에 MMP-2의 분포가 변하고 복부 달팽이관 핵에서 증가한다. MMP-2의 낮은 농도는 일반적으로 위험도가 높은 호르몬 수용체-음성 종양 환자에서 유리한 예후로 간주된다. MMP-2는 촉매 활성을 위해 단백질분해(proteolytic) 활성화를 필요로 하는 지모겐(zymogen)으로서, 인간 유방암을 비롯한 많은 암 모델 시스템의 침윤 및 전이에 광범위하게 관련되어 있다.

[0005] MMP-9 (92 kDa IV 유형 콜라게나아제, 젤라티나아제 B)는 인간 마크로파지 및 다핵 백혈구에서 생산된다. 이는 또한 내피세포 및 류마티스 관절염 활막내의 활액 섬유아세포 내에 편재되어 있다. MMP-9는 인간 정상 골조직

의 용골세포에 의해 발현되며, 골 변형에서 일정 역할을 하는 것으로 보인다. 성인의 완전 상아질모세포도 MMP-9를 발현하며, 치아 우식증 병소 및 타액에서 확인된다. 그러나, MMP-9는 인간의 치은 섬유아세포에 의해서는 발현되지 않는다. MMP-2와 마찬가지로, MMP-9는 I형 콜라겐, 젤라틴 또는 라미닌에 결합된 ECM에 존재할 수 있다.

[0006] 상기 MMP-2, MMP-9 활성을 억제하기 위해 본 발명에서는 전복을 이용하는데, 전복을 이용한 종래 산업상 용도로는, 대한민국 등록특허 제1009025390000호 '전복엑기스를 함유하는 기능성 음료조성물과 그 제조방법', 대한민국 특허출원 공개번호 제1020100011580호 '전복 내장 추출물을 유효성분으로 하는 면역 강화 조성물' 및 대한민국 등록특허 제1010274470000호 '전복추출물을 함유하는 화장품 조성물 및 이의 제조방법'이 알려져 있으나, MMP 억제 효과를 밝혀 항암 용도로 사용하는 것에 대하여는 전혀 알려진 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 제1009025390000호 (등록일: 2009.06. 05, 공개번호 제1020090032562호, 공개일: 2009.04.01)

(특허문헌 0002) 2. 대한민국 특허출원 공개번호 제1020100011580호 (공개일: 2010.02.03)

(특허문헌 0003) 3. 대한민국 등록특허 제1010274470000호 (등록일: 2011.03.30)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명에서는 AIGID의 MMP-2, MMP-9 활성 억제 효과를 밝히고자 한다.

[0009] 또한, 본 발명에서는 AIGID를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 MMP-2, MMP-9 활성 억제용 약학 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명에 사용되는 전복은 지구 북반구와 남반구의 온대 및 열대 해역에 서식하는 해양 일매패 복족강 연체동물(univalve gastropod molluse)이다. 본 발명에서 전복은 그 종류 및 생산지에 특별히 한정되지는 않으나, 바람직하게는 한국 완도산 전복이고, 더욱 바람직하게는 참전복(*Haliotis discus hannai*)이다. 참전복은 한국에서 중요한 수종이다.

[0011] 본 발명에 따르면, 전복을 끓이고 난 후의 부산물, 즉, 열수 추출물을 다양한 한외막을 갖는 한외막 시스템으로 분류하여 전복 내장 위장관 소화가수분해물의 다양한 분자량 분획물인 AIGID, AIGID I (> 100 kDa), AIGID II (100-10 kDa), AIGID III (10-5 kDa)이 제공된다.

[0012] 본 발명에 따르면, MMP-2 및 MMP-9이 생물 샘플 내에 존재하는지를 검출하기 위한 단순하고도 확실한 방법으로, MMP-2 및 MMP-9의 변성된 I형 콜라겐 분해능을 이용한다. 상기 방법은 젤라틴 자이모그래피(gelatin zymography)로도 알려져 있으며, 젤라틴으로 함침된 소듐 도데실 설페이트(SDS)-폴리아크릴아마이드 겔을 이용하여 생물학적 샘플내 젤라틴용해 활성을 확인한다.

[0013] 본 발명에서 사용되는 인간 섬유육종 세포주 HT1080은 부착(attachment), 침윤 및 전이에 관여된 세포외 매트릭스 단백질의 연구에 광범위하게 사용되는데, 본 발명에서는 HT1080 세포가 MMP-2 및 MMP-9 효소 모두를 생성하는 특성을 이용한다.

[0014] 종양 세포의 ECM으로의 침윤은 종양 전이 과정에서 중요한 단계이며, ECM에 종양 세포가 부착되는 것을 포함한다. 종양 세포 이동 및 침윤은 젤라티나아제 활성에 따라 달라진다. MMP-9 및 MMP-2는 ECM 분해로부터 발생되는, 종양 전이 과정에서 중요한 세포이다. MMP는 인간 암에서 많이 발현되고, 암 진행과 MMP 발현의 직접적인

관계가 많은 논문에서 잘 정립되어 있다. 펩신화된 인간 태반 IV형 콜라겐과 인간 HT1080 섬유육종 세포 간에 상호작용하여 세포 표면에서 proMMP-2를 활성화시킨다. 본 발명의 인공 기질 및 젤라틴 자이모그래피 실험에 의하면, AIGID II와 AIGID III가 MMP-2 및 MMP-9 억제 효과를 갖는다. 그 결과, PMA-처리된 HT-1080 세포에서, AIGID II 및 AIGID III은 MMP-9 프로모터(promoter)의 전사 활성화를 억제함으로써 MMP-2 및 MMP-9의 발현 증가 및 분비를 투여량 의존적으로 억제한다(도 5a와 도 5b 참조).

[0015] MMP-2 및 MMP-9 프로모터는 또한 전사 인자를 위한 NF-κB 부위를 함유한다. 종양은 높은 농도의 MMP 활성을 나타내므로, MMP 특이적 억제제가 추구되고 있다. 인간 섬유아세포 세포주 HT1080가 다량의 MMP-9 효소를 생산하는 반면, 정상 인간 섬유아세포는 거의 또는 전혀 효소를 분비하지 않는 것으로 보고되었다. HT1080 세포는 PMA 처리된 블랭크 군에 비해 MMP-2 및 MMP-9 둘다의 활성에 기반하여 자이모그래피를 강화시키지만, 본 발명 처리에 의하면 HT1080 세포에서의 MMP-2 발현은 PMA 처리 및 비처리 후의 MMP-9에 비해 더 낮게 된다(도 2, 도 3a 및 3b 참조).

[0016] 또한, 전사 인자의 NF-κB 계열은 대부분의 세포 유형에 존재하고, κB 부위로 표시되는 특이적 NF-κB 결합 부위가 매우 많은 유도성 유전자의 프로모터에서 확인되었다. NF-κB는 암에서 침윤, 전이, 아파토시스(apoptosis), 혈관형성(angiogenesis), 성장 및 증식을 비롯한 핵심 경로를 조절한다. NF-κB의 전사 인자는 HT1080 세포에서 포볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12myristate 13-acetate: PMA)와 같은 화학 자극물에 대한 반응으로 MMP-2 및 MMP-9 유전자 전사를 유발한다. NF-κB 활성은 여러 메커니즘을 통해 엄격하게 제어된다. 본 발명에 의하면 PMA-처리된 HT1080 세포에서 NF-κB의 인산화 및 p65 단백질의 분해가 투여량 의존적으로 억제된다(도 6a와 도 6b 참조). 상기 억제는 명백히 투여량 의존적 패턴을 따른다. 그러나, 이들은 NF-κB의 구성요소인 p50의 PMA-유도된 전좌(translocation)를 억제하지 않아서(도 6a와 도 6b 참조), AIGID II 및 AIGID III가 HT1080 인간 섬유육종 세포에서 NF-κB의 전사 하향 조절을 통해 MMP-2와 MMP-9을 억제함을 시사한다.

[0017] 본 발명의 약학 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화할 수 있다.

[0018] 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 약학 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오즈 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로즈 등을 포함하는 셀룰로즈류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다.

[0019] 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, 보습제, 겔제, 에어로졸 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다.

[0020] 본 발명의 AIGID는 바람직하게는 약학 조성물의 전체 중량에 대하여 0.01 내지 99.9중량%로 포함될 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따른 AIGID 및 이를 유효성분으로 하는 약학 조성물은 MMP 활성과 관련된 질환, 예컨대 암, 신경퇴행성, 심혈관 및 다양한 종류의 염증 질환을 포함한 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 유익한 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 10, 50, 100, 200, 400 mg/L 농도의 AIGID, AIGID I, AIGID II, AIGID III의 HT1080 세포 생존도에 대한 효과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 AIGID, AIGID I, AIGID II, AIGID III의 HT1080 세포내 MMP-2 및 MMP-9 활성화 및 발현 억제 효과를 젤라틴 자이모그래피로 나타낸 사진이다.

도 3a는 10, 100, 200 mg/L 농도의 AIGID II, AIGID III로 처리한 HT1080 세포내 MMP-2 및 MMP-9를 젤라틴 자

이노그래피로 나타낸 사진이고, 도 3b는 10, 100, 200 mg/L 농도의 AIGID II, AIGID III에서의 상대 MMP-2, MMP-9 발현율(%)을 나타낸 그래프이다.

도 4는 100, 200 mg/L 농도의 AIGID II, AIGID III의 HT1080 세포 이동에 대한 효과를 나타낸 사진이다.

도 5a는 10, 100, 200 mg/L 농도의 AIGID II, AIGID III로 처리시에 HT1080 내 MMP-2, MMP-9 및 β-액틴 단백질 발현을 웨스턴 블롯으로 나타낸 사진이고, 도 5b는 10, 100, 200 mg/L 농도의 AIGID II, AIGID III에서의 상대 MMP-2, MMP-9 발현율(%)을 나타낸 그래프이다.

도 6a는 10, 100, 200 mg/L 농도의 AIGID II, AIGID III로 처리시에 NF-κB 단백질 발현 억제를 확인하기 위해 p50 및 p65 단백질 발현 농도를 나타낸 전기영동 사진이고, 도 6b는 10, 100, 200 mg/L 농도의 AIGID II, AIGID III에서의 상대 p50, p65 발현율(%)을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명은 하기의 구체적인 실시예에 의해 보다 구체적으로 설명되나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 이에 한정되는 것이 아님이 당업자들에게 명백히 이해될 것이다.

[0024] 재료

[0025] 성체 활전복(*Haliotis discus hannai*)은 한국 완도에서 채집하였다. 둘베코 변형 이글 배지(DMEM), 트립신-EDTA, 소태아 혈청(FBS)은 깁코 비알엘, 라이프 테크놀러지스(Gibbco BRL, Life Technologies)(미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재)에서 입수하였다. HT1080 세포는 아메리칸 타입 오브 컬쳐 컬렉션(American Type of Culture Collection, 미국 버지니아주 매너새스 소재)에서 입수하였다. 웨스턴 블롯 분석에 사용된 일차 및 이차 항체는 MMP-2 (8B4, sc-13595), MMP-9 (H-129: sc-10737), NF-κB p65 (F-6: sc-8008), NF-κB P50 (D-6: sc-166588), β-액틴 (N-21: sc-130656), 고트 안티-래빗(goat anti-rabbit) IgG-HRP (sc-2004) 및 고트 안티-마우스 IgG1-HRP (sc-2060)이었고, 산타 크루즈 바이오테크놀러지, 잉크(Santa Cruz Biotechnology, INC)(미국 캘리포니아주)에서 구입하였다. MTT 시약, 젤라틴, 포볼 12-미리스테이트 13-아세테이트 (phorbol 12-myristate 13-acetate: PMA)는 시그마 케미칼 캄파니(Sigma Chemical Co.)(미국 미주리주 세인트 루이스 소재)에서 구입하였다. 세포 배양에 필요한 다른 모든 물질은 깁코 비알엘, 라이프 테크놀러지스에서 구입하였다.

[0026] 제조예 1: UF 막 생물반응기를 이용한 AIGID의 제조

[0027] 전복 내장 위장관 소화가수분해물(AIGID) 용액은 1 mol/L 락트산 550 mL과 함께 교반 하에 증류수에 분산시키고 증류수로 최종 부피를 10 L로 만들어 제조하였다. 포화 $NaHCO_3$ 용액을 사용하여 상기 용액의 pH를 5.5로 조정하였다. AIGID, AIGID I, AIGID II, AIGID III은 효소 반응기에 연결된 UF 막 반응기 시스템에서 분자량 별로 AIGID를 지속적으로 가수분해시켜 제조하였다. 다양한 UF 막을 갖는 한외 막 시스템에 의해 수득한 전복을 끓이고 남은 부산물(열수 추출물)의 MWCO 100 kDa, 10 kDa 및 5 kDa 분획물을 동결건조하고, -20℃에서 보관하였다.

[0028] 상기 샘플중 AIGID II, AIGID III을 질소 분위기 하에 24시간동안 110℃에서 HCl로 분해하였다. 자동 아미노산 분석기를 사용하여 페닐아이소티오시아네이트로부터 파생된 아미노산을 동정하고 계량하였다. 많은 단백질 공급원에서 파생된 펩타이드중 소수성이 증가된 펩타이드가 항산화 특성과 관련된 것으로 알려져 있으며, 히스티딘, 프롤린, 알라닌 및 류신을 비롯한 몇몇 아미노산이 유리 라디칼을 소거하는데 관여하는 것으로 보고되었다.

[0029] 시험관내 GI 분해 모델(SHGD)에 의한 AIGID II (100-10 kDa) 및 AIGID III (10-5 kDa)은 하기 표 1과 같았다.

표 1

	AIGD (10 mg kg^{-1})	
아미노산	AIGID II	AIGID III
Asp	6.95	5.95
Thr	4.07	4.66
Ser	1.75	2.38
Glu	13.57	16.17
Gly	2.97	5.68
Ala	11.35	10.55
Cys	5.45	4.40
Val	3.02	4.57
Met	1.85	0.50
Ile	2.25	3.54
Leu	4.83	6.99
Tyr	2.83	2.66
Phe	3.28	3.79
His	9.78	4.96
Lys	8.70	4.90
Trp	2.94	1.76
Arg	1.64	2.50
Pro	12.77	14.04
Total	100	100

[0030]

[0031] 상기로부터 알 수 있듯이, 전복 내장 위장관 소화가수분해물은 AIGID II와 AIGID III에 18종의 아미노산을 포함하고, 상이한 조성을 갖는다. 또한 AIGID II은 글루탐산(Glu), 프롤린(Pro), 알라닌(Ala), 히스티딘(His), 라이신(Lys) 및 아스파르트산(ASP)을 풍부하게 함유하고 있고, AIGID III은 글루탐산(Glu), 프롤린(Pro), 알라닌(Ala), 류신(Leu) 및 아스파르트산(Asp)을 풍부하게 함유한 것으로 나타났다.

[0032] 제조예 2: 세포 배양

[0033] 인간 섬유육종 세포주 HT1080를 5% CO_2 및 37℃ 가습 분위기 하에 10 cm 배양 접시에서 단층으로 배양하였다. 둘베코 변형 이글 배지(DMEM)를 HT1080 세포에 대한 배양 배지로 사용하고 10 % 소태아 혈청을 포함시켰다. 세포를 트립신-EDTA (0.05 %)로 처리하여 2일동안 계대배양하고, 5회 계대배양한 후에 실험에 사용하였다.

[0034] 실험예 1: MTT 분석에 의한 세포 생존도 결정

[0035] MTT 비색분석법에서는 가용성 테트라졸륨 염 [3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일) -2,5-다이페닐테트라졸륨 브로마이드](MTT)을 불용성 포르마잔 침전물로 변환시키는 생세포 능력을 결정한다. AIGID, AIGID I, AIGID II, AIGID III의 세포친화도(cytocompatible) 효과를 결정하기 위해, HT1080 세포를 약 1 x 10^4 세포/웰의 밀도로 96-웰 플레이트에 씨딩(seeding)하고, 혈청 존재하에 24시간동안 상이한 농도(10, 50, 100, 200, 400 mg/L)의 샘플과 함께 배양하였다. 배양 이후에, MTT 시약 50 μL을 각 웰에 첨가하고, 4시간 더 계속 배양하였다. 생세포에 있는 미토콘드리아의 숙시네이트 디하이드로게나아제는 배양동안에 MTT를 가시성 포르마잔 결정으로 전환시킨다. 이어서, 상기 포르마잔 결정을 DMSO에 용해시키고, 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 이용하여 540 nm에서 광학 밀도를 측정하였다. 상대 세포 생존도를 비처리된 블랭크 군과 비교하여 계산하였다. 상기 데이터는 3회 이상의 별개 실험의 평균값으로 표기하고, $p<0.05$를 유의한 것으로 간주하였다.

[0036] 그 결과, 도 1에서 알 수 있듯이, 본 실험예에서 사용되는 사용된 모든 AIGID는 테스트된 최고 농도(400 mg/L)

에서도 임의의 세포독성 효과를 나타내지 않았다.

[0037] 실험예 2: MMP-2, MMP-9의 젤라티나아제 활성 결정

[0038] 본 실험예에서는 MMP-2와 MMP-9의 젤라티나아제 활성을 젤라틴 자이모그래피에 의해 결정한다.

[0039] HT1080 세포를 24-웰 플레이트 상의 무혈청 DMEM 배지에서 배양하였다. 1시간 자극 이후에 200 mg/L 농도의 AIGID, AIGID I, AIGID II, AIGID III로 처리한 HT1080 세포에 PMA (최종 농도 10 mg/L)를 추가하였다. 36시간 후에, 조건화된 배지를 수거하고, 3,000 rpm으로 10분동안 원심분리하여 세포 잔해(cell debris)를 제거하였다. 농축 배지를 비환원 조건하에 가열 없이 0.15% 최종 농도 젤라틴이 되도록 함침시킨 10% 소듐 도데실 설페이트(SDS)-폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동시켰다. 전기영동 후에, 2.5 % 트리톤 X-100 용액으로 1시간 30분동안 세척하여 SDS를 겔에서 제거하고, 개발된 완충액 [50 mmol/L 트리스-HCl 완충액 (pH 7.5), 200 mmol/L NaCl, 5 mmol/L $CaCl_2.2H_2O$, 0.02 % Brif-35]에서 37 ℃로 배양하였다. 이어서, 상기 겔을 45 % 메탄올와 10 % 의 빙초산을 포함하는 1% 쿠마시에 블루 R-250 용액으로 착색시켰다. 30분 후에 겔을 10% 빙초산 용액, 40% 메탄올로 탈색시켰다. 분해 부분은 청색 배경 상에서 투명하게 나타나서, 젤라티나아제 위치를 나타낸다.

[0040] 도 2에서 알 수 있듯이, PMA-단독 처리 군에 비해 AIGID II 및 AIGID III는 HT1080에서 MMP-2 및 MMP-9 활성화에 대해 현저한 억제 효과가 명확히 관찰되었다. 그러나, AIGID 및 AIGID I의 경우에는 MMP-2 및 MMP-9 활성화 둘다에 대해서는 유의한 억제 효과가 관찰되지 않았다. 따라서, AIGID II 및 AIGID III을 후속 실험에서 사용하였다.

[0041] 또한, 10, 100 및 200 mg/L의 다양한 농도에서 AIGID II와 AIGID III가 HT1080 세포에서 분비된 MMP-2 및 MMP-9의 젤라틴분해(gelatinolytic) 활성에 영향이 있는지를 젤라틴 자이모그래피로 실험하였다.

[0042] 도 3에서 알 수 있듯이, MMP-2 및 MMP-9 활성은 100 및 200 mg/L 농도의 AIGID II 및 III AIGID의 존재하에 감소하였으며, 특히 200 mg/L 농도의 AIGID III는 AIGID II보다 MMP 활성을 크게 억제하는 것으로 나타났다.

[0043] 실험예 3: 세포의 이동 분석(migration assay)

[0044] 이동능(migration capacity)은 기저막을 통한 세포침윤의 필수조건이다. 본 실험예에서는 AIGID II 및 AIGID III이 손상된 공간에서 HT1080 세포 이동을 투여량 의존적으로 억제하여 종양 세포 이동을 억제하는지 여부를 확인한다.

[0045] 우선 세포 배양하여 세포를 6-웰 플레이트에 분주하였다. PBS로 세척한 후에 여러 농도의 AIGID II 및 III AIGID로 처리하고 첫번째 시간 포인트에서 사진을 촬영하였다. 24시간 후에, 세포는 완전 배지로 이동하였다. 상기 결과를 지정된 후속 시간 포인트에 현미경 상에서 관찰하였다.

[0046] 도 4에 나타난 바와 같이, 이동은 손상 부위를 가로질러 일어난다. 이를 명확히 하기 위해, 미토마이신(mitomycin) C로 예비처리된 세포를 이용하여 손상부 이동 분석을 실시하였다. 200 mg/L 농도의 AIGID II 및 AIGID III 둘다가 HT1080 세포 이동을 차단한 것으로 나타났다. 상기로부터, 무독성 범위의 AIGID II 및 III AIGID는 MMP 활성, 세포 이동, 운동성(motility) 및 침윤도를 현저히 감소시키는 것으로 결론내릴 수 있다.

[0047] 실험예 4: NF-κB 활성 결정을 위한 웨스턴 블롯 분석

[0048] NF-κB 활성에 대한 AIGID II 및 AIGID III의 효과를 p50 및 p65을 통해 확인하였다. p50 및 p65은 유전자 유도에 필요한 전사활성화(transactivation) 도메인을 함유하는 전사 인자 NF-κB의 2개 서브유니트(subunit)이다. 상기 유전자 발현의 하향 조절을 확인하기 위해 웨스턴 블롯 연구를 실시하였다.

[0049] 이를 위해, 배양된 세포를 수거하고, 이어서 RIPA 완충액 (50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 1 % 트리톤 X-100, 1 % 소듐 데옥시클레이트, 2 mmol/L EDTApH 8.0) 및 0.1% SDS)에서 용해(lyse)하여서, 세포 용해물의 단백질 농도를 BCA (bicinchoninic acid) 방법에 의해 결정하였다. 샘플을 10% SDS-폴리아크릴아마이드 겔 상에서 전기영동시켜 분리하고, 니트로셀룰로오즈 막으로 이동시켰다. 막을 TBST (20 mmol/L 트리스-HCl, pH 7.6, 136 mmol/L NaCl 및 0.1 % Tween-20)중 5% 탈지유로 블로킹(blocking)하고, 이어서 4℃에서 하룻밤동안 블로킹 제제에 있는 일차 항체(1:500 희석)와 함께 배양하였다. TBST로 세척한 후에, 상기 막을 2시간

동안 실온에서 이차 항체(1 : 5,000 희석)와 함께 배양하였다. 이어서, 상기 막을 TBST로 3회 세척하였다. 강화된 화학발광(chemiluminescence) 및 LAS-4000 영상화 시스템 (후지필름(Fujifilm), 일본)에 의해 밴드를 시각화하였다. MMP-2, MMP-9 단백질의 기저 수준은 β-액틴 단백질 농도를 분석하여 표준화하였다.

[0050] 도 6에서 알 수 있듯이, AIGID II 및 AIGID III 처리는 p65 단백질의 하향조절을 유도하는데, 이는 10, 100, 200 mg/L 농도의 AIGID II 및 AIGID III의 존재하에 관찰되었다. 또한, AIGID III는 200 mg/L 농도에서 AIGID II보다 p65 활성을 더 억제하는 것으로 나타났다. 그러나, 10, 100, 200 mg/L 농도에서 p50 발현에 대한 유의한 억제 효과는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 AIGID II 및 AIGID III이 NF-κB의 전사 하향 조절을 통해 MMP-2 및 MMP-9를 하향 조절함을 증명한다.

[0051] 실험예 5: MMP-2와 MMP-9 발현 결정을 위한 웨스턴 블롯 분석

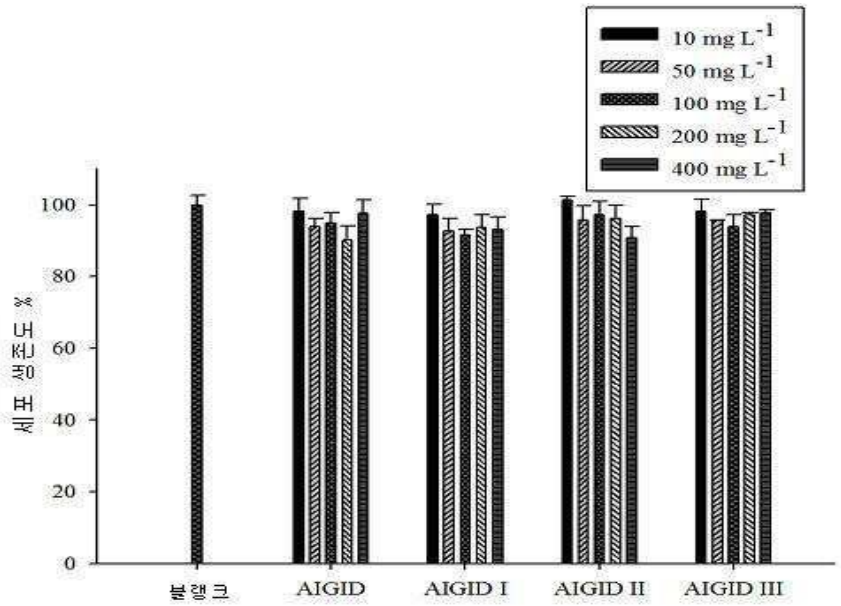
[0052] 상기 유전자 발현의 하향조절을 확인하기 위해 웨스턴 블롯 연구를 실시하였다. AIGID II 및 AIGID III의 결합 효과를 연구하기 위해 HT1080 세포에서 10, 100 및 200 mg/L의 다양한 농도에서 MMP-2와 MMP-9 모두의 단백질 발현 농도와 활성을 억제할 수 있다. 조건화 배지는 '재료 및 방법' 란에 기재된 바와 같은 웨스턴 블롯에 의해 MMP-2 및 MMP-9 단백질 농도 측정에 사용되었다. 도 5a와 도 5b에 도시된 바와 같이, MMP-2의 단백질 발현 농도는 MMP-9 및 PMA-단독 처리군에 비해 상대적으로 낮았다. 또한, 200 mg/L의 AIGID II 및 AIGID III 처리군 사이에서 MMP-2 및 MMP-3 단백질에 대한 유의한 억제 효과는 유사하였다.

[0053] 배합예 1: 정제의 제조

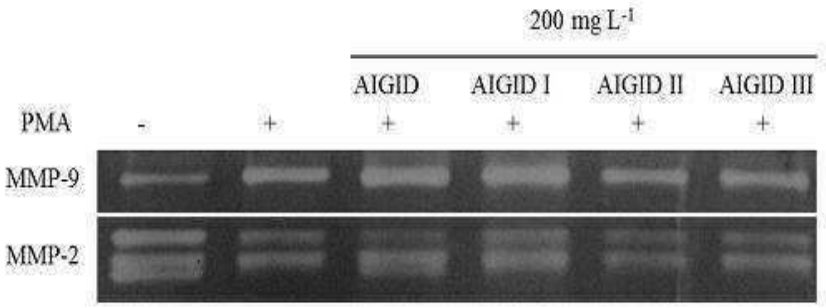
[0054] AIGID 25 mg을 락토오스 26 mg, 아비셀(미결정 셀룰로오스) 3.5 mg, 나트륨 전분 글리코네이트 1.5 mg 및 L-HPC(low-hydrosyprophylcellulose) 8 mg과 함께 U형 혼합기에 넣고 20분간 혼합하였다. 혼합이 완료된 후 마그네슘 스테아레이트 1 mg을 추가로 첨가하고 3분간 혼합하였다. 정량 시험과 항습도 시험을 거쳐 타정하고 필름 코팅하여 정제를 제조하였다.

도면

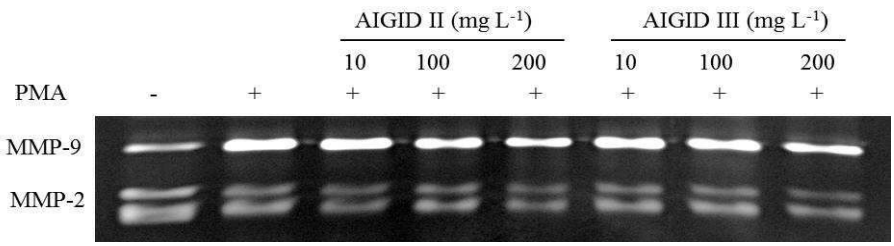
도면1



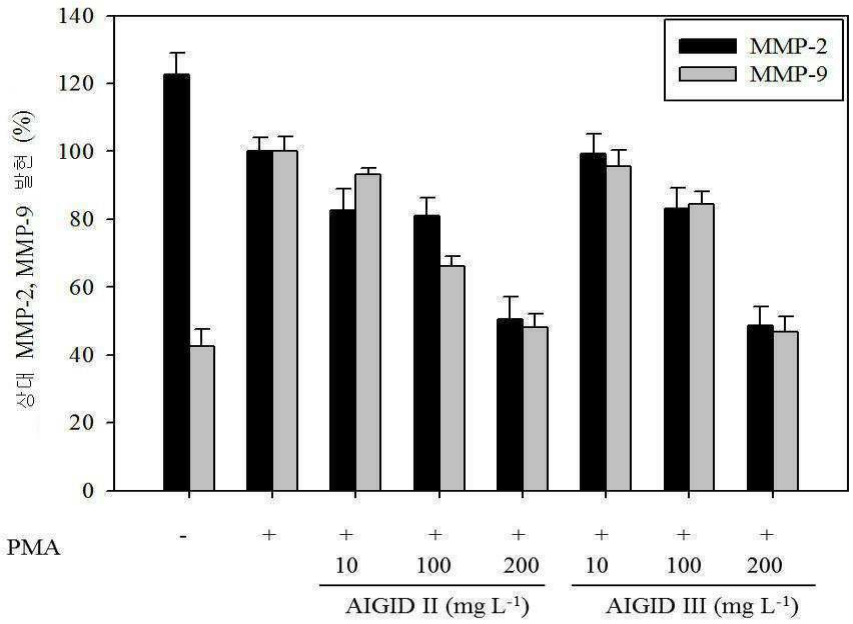
도면2



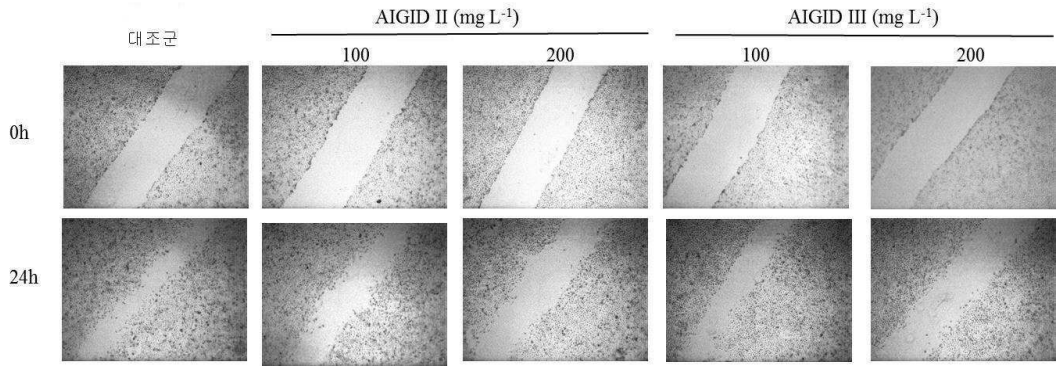
도면3a



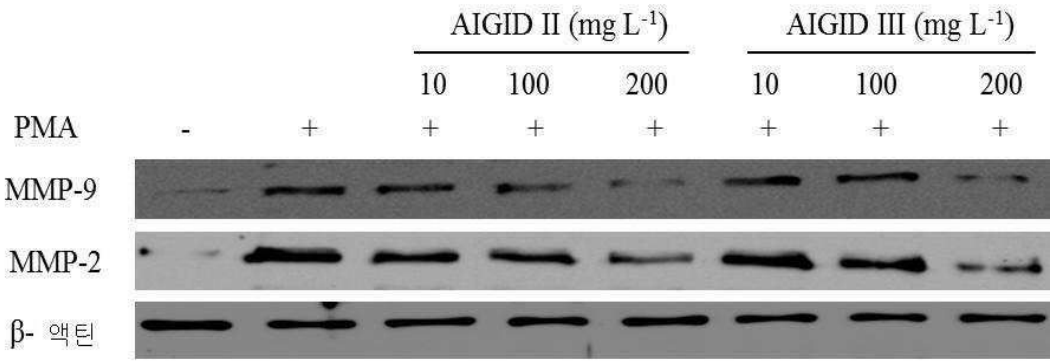
도면3b



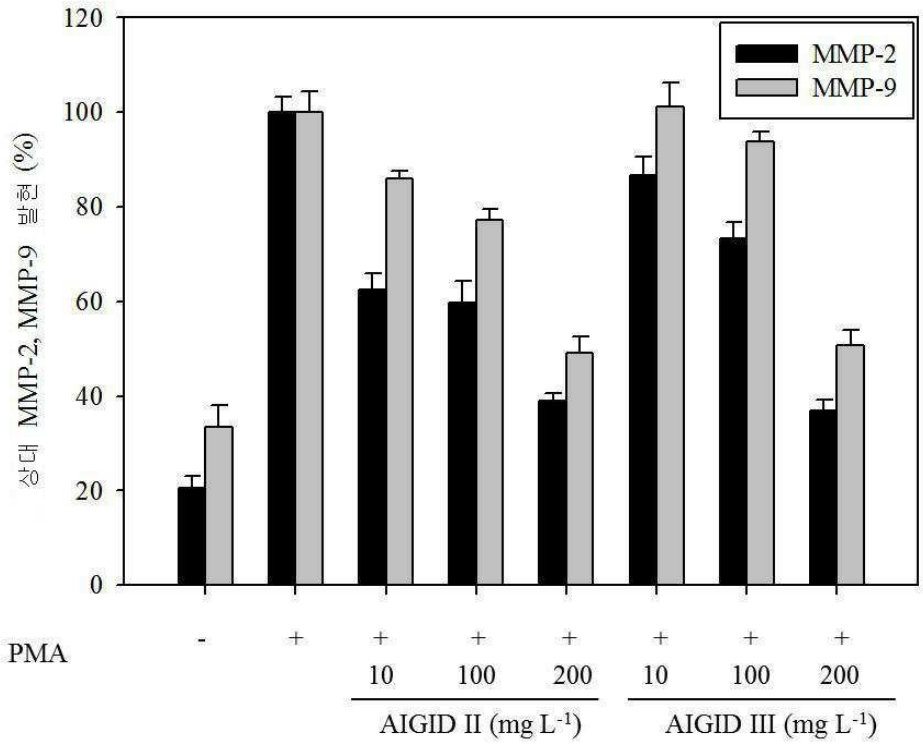
도면4


대조군
AIGID II (mg L-1)
100
200
AIGID III (mg L-1)
100
200
0h
24h

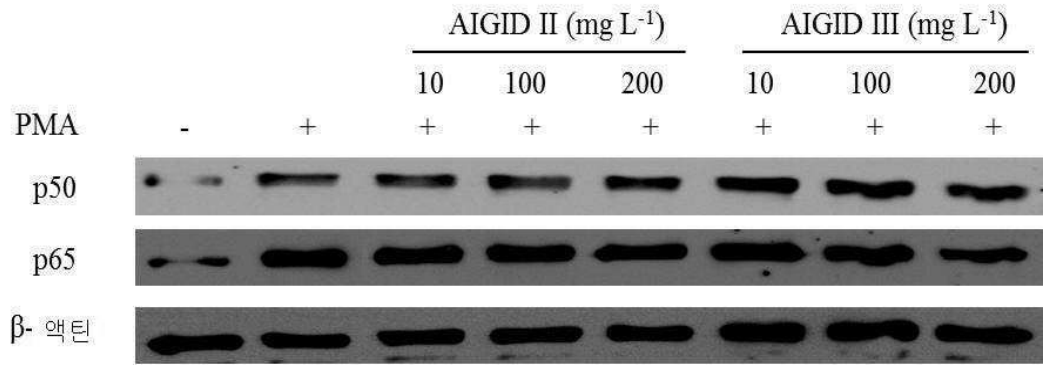
도면5a


AIGID II (mg L-1)
AIGID III (mg L-1)
10
100
200
10
100
200
PMA
-
+
+
+
+
+
+
+
MMP-9
MMP-2
β- 액틴

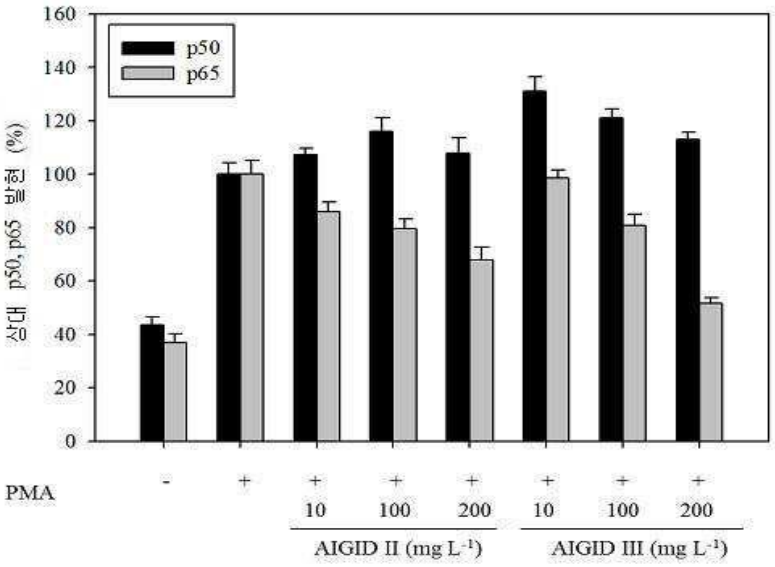
도면5b


120
100
80
60
40
20
0
상대 MMP-2, MMP-9 발현 (%)
MMP-2
MMP-9
PMA
- + + + + + + +
10 100 200 10 100 200
AIGID II (mg L-1)
AIGID III (mg L-1)

도면6a


AIGID II (mg L-1)
AIGID III (mg L-1)
10 100 200 10 100 200
PMA
- + + + + + + +
p50
p65
β- 액틴

도면6b


160
140
120
100
80
60
40
20
0
상대 p50, p65 발현 (%)
p50
p65
PMA
-
+
+
+
+
+
+
+
10
100
200
10
100
200
AIGID II (mg L-1)
AIGID III (mg L-1)