



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0000910
(43) 공개일자 2010년01월06일

(51) Int. Cl.

A61K 36/232 (2006.01) *A61K 36/725* (2006.01)

A61P 9/08 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0060588

(22) 출원일자 2008년06월26일

심사청구일자 2008년06월26일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교

주식회사 비피도

강원 홍천군 홍천읍 상오안리 688-1

(72) 발명자

강영희

강원도 춘천시 옥천동 한림대학교 생명과학관
8513호

지근억

서울특별시 서초구 방배동 임광아파트 5-201

(뒷면에 계속)

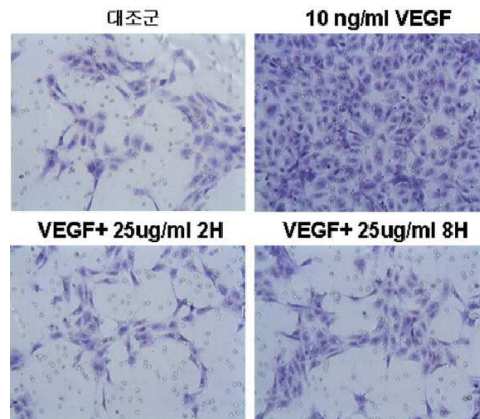
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 아스퍼질러스 시로우스미에 의해 생산된 당귀 및 대추바이오효환물질을 함유하는 혈관신생 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 아스퍼질러스 시로우스미(*Aspergillus usamii* var. *shirousamii*)에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질의 혈관신생 억제용 조성물에 관한 것이다. 좀 더 상세하게는 아스퍼질러스 시로우스미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질이 신생혈관 형성에 관련된 MMP 활성, 혈관내피세포 이동 및 관(tube) 형성을 억제할 수 있는 효과가 있어 이러한 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질을 함유하는 혈관신생 억제용 조성물을 제공한다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

신승용

강원도 춘천시 후평동 575-4 동산아파트 102-801

강상욱

강원도 춘천시 옥천동 한림대학교 생명과학관 851
2호

유현주

인천광역시 남동구 간석2동 191-1 인향아파트
2-102

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

없음

부처명

지식경제부

연구사업명

지역산업진흥사업

연구과제명

카이로이노시톨다당류 생산 비피더스 기반 기능성식품 개발

주관기관

(주)비피도

연구기간

2007년 05월 01일 ~ 2008년 04월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

아스퍼질러스 시로우스미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질을 함유하는 신생혈관 형성 저해제.

청구항 2

아스퍼질러스 시로우스미에 의해 생산된 대추 바이오전환물질을 함유하는 신생혈관 형성 저해제.

청구항 3

혈관신생 억제활성을 갖는 아스퍼질러스 시로우스미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질을 함유하는 혈관신생으로 인한 질환의 예방 및 치료용 약학조성물.

청구항 4

혈관신생 억제활성을 갖는 아스퍼질러스 시로우스미에 의해 생산된 대추 바이오전환물질을 함유하는 혈관신생으로 인한 질환의 예방 및 치료용 약학조성물.

청구항 5

아스퍼질러스 시로우스미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질을 함유하는 MMP 활성 억제용 조성물.

청구항 6

아스퍼질러스 시로우스미에 의해 생산된 대추 바이오전환물질을 함유하는 MMP 활성 억제용 조성물.

청구항 7

MMP 억제활성을 갖는 아스퍼질러스 시로우스미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질을 함유하는 과다한 MMP 활성화로 기인된 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 8

MMP 억제활성을 갖는 아스퍼질러스 시로우스미에 의해 생산된 대추 바이오전환물질을 함유하는 과다한 MMP 활성화로 기인된 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제 3항, 4항, 7항, 8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 질환은 류마티스성 관절염, 골관절염, 패혈증성 관절염, 동맥경화증, 재협착증, MMP-매개 골감소증, 중추신경계의 염증질환, 알츠하이머 질환, 피부노화, 각막레이양, 이상 창상 유합, 골질환, 단백뇨증, 복대동맥류 질환, 외상성 관절 손상에 따른 퇴행성 연골손실, 신경계의 수초탈락 질환, 간경변, 신사구체 질환, 배태막의 미성숙 파열, 염증성 장질환, 치근막 질환, 노화와 관련된 황반 변성, 당뇨병 망막병증, 증식성 유리체 망막병증, 미성숙 망막병증, 안과 염증, 원추 각막, 쇼그렌 증후군, 근시 안과종양, 각막이식 거부, 암의 침윤과 전이로 이루어진 그룹에서 하나이상 선택되는 약학조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 신생혈관 형성 저해효과를 갖는 아스퍼질러스 시로우스미(*Aspergillus usamii* var. *shirousamii*)에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 신생혈관 형성에 관련된 MMP 활성, 혈관내피세포 이동 및 관(tube) 형성을 억제할 수 있는 아스퍼질러스 시로우스미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질에 관한 것으로, 이들 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질을 함유하는 신생혈관 형성 억제제로 유용하게 사용될 수 있다.

배 경 기 술

- <2> 본 발명은 신생혈관 형성 (angiogenesis)에 대한 억제 활성을 갖는 아스퍼질러스 시로우사미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질을 함유하는 약학 조성물에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는, 신생혈관 형성에 관련된 MMP 활성, 혈관내피세포 이동 및 관(tube) 형성을 억제할 수 있는 아스퍼질러스 시로우사미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질을 함유하는 신생혈관 형성 억제용 조성물에 관한 것이다.
- <3> 일반적으로 혈관신생 (angiogenesis)은 신생혈관 형성 유도인자 (angiogenic factor)가 관여하는 일련의 과정에 의해서 발생되며, 배성장, 생식 (reproduction), 발달 (development) 및 상처 회복 (wound repair)과 같은 정상적인 과정에서 나타난다. 그러나 그 조절 메카니즘에 이상이 발생하는 경우에는 당뇨병성 망막증, 신생혈관성 녹내장(neovascular glaucoma), 류마티스성 관절염, 카포시 육종 (kaposi' s sarcoma), 건선 (psoriasis) 및 혈관종 (hemangiomas) 등의 심각한 질병들을 야기하게 된다.
- <4> 혈관신생이란 기존의 미세혈관으로부터 새로운 모세혈관이 형성되는 과정이다. 혈관신생이 정상적으로 일어나는 경우는 배아의 발생(embryonic development)시, 조직재생 및 상처치료, 주기적인 여성의 생식기 계통의 변화인 황체가 발달될 때이며 이러한 경우에도 엄격히 조절되어 진행된다(Folkman J and Cotran R; Int. Rev. Exp. Pathol., 16 , 207 - 248, 1976).
- <5> 새로운 혈관이 생기는 것은 엄밀한 의미에서 맥관형성(vasculogenesis)과 혈관신생으로 나누어진다. 맥관형성은 배발생 초기 장축중배엽에서 분화된 혈도로부터 발생하는 내피세포의 신생으로 정의된다. 단순 확산으로는 복잡한 형태를 위해 세포 증식을 빠르게 향상시키는 영양의 요구를 만족시킬 수 없는 시점에서 배아의 맥관 형성이 시작된다. 반면에 혈관신생은 기존 혈관으로부터 내피세포에서 나와 자라는 과정으로, 통상적으로 미세혈관의 말단 정맥 및 후모세혈관을 형성하게 된다. 성인의 경우 혈관내피세포는 상대적으로 잘 분열하지 않으며, 내피 분열 속도는 통상 수개월 내지 수년이다. 그러나 성인에서의 혈관신생은 호르몬 신호반응, 염증세포의 전혈관신생(pro-angiogenesis), 사이토카인의 방출, 세포외기질의 혈관 신생 매개물질을 방출하는 가수분해성 효소의 활성에 의하여 또는 혈관신생촉진 인자의 자극 등으로 필요에 따라 유발된다.
- <6> 신생혈관이 생성되는 과정은 매우 복잡하고 정교하나, 요약하면 다음과 같다. 첫째, 혈관신생을 위한 자극이 기존의 혈관에 전달되면 혈관이 팽대하고 막투과도가 증가한다. 둘째, 팽대된 혈관을 통하여 피브린(fibrin)이 혈관 밖으로 빠져나와 혈관 주위의 세포질 기질에 침적된다. 셋째, 기존 혈관의 기저막을 분해하기 위한 효소가 활성화되며, 넷째, 기저막이 파괴되어 그 사이로 내피세포가 혈관을 빠져나와 주위 세포의 기질에서 증식하고 이동한다. 마지막으로, 일렬로 배열한 내피세포들이 맥관을 이룸으로써 새로운 혈관을 생성하게 된다(Risau, W. (1997) Nature, 386 :671-674). 그러나 혈관신생이 자율적으로 조절되지 못하고 병적으로 성장함으로써 야기되는 질환들이 있다. 병리학적 상태에서 나타나는 혈관신생에 관련된 질환으로는 혈관종, 혈관섬유종, 혈관기형 및 심혈관 질환인 동맥경화, 혈관유착, 부종성 경화증이 있고, 혈관신생에 의한 안과 질환으로는 각막이식성 혈관신생, 혈관신생성 녹내장, 당뇨병성 망막증, 신생혈관에 의한 각막 질환, 반점의 변성, 익상편, 망막 변성, 후수정체 섬유증식증, 과립성 결막염 등이 있으며, 관절염과 같은 만성 염증성 질환, 건선, 모세관 확장증, 화농성 육아종, 지루성 피부염, 여드름과 같은 피부과 질환이 있으며, 특히나 암의 성장과 전이는 반드시 혈관신생에 관여한다(D'Amato RJ and Adamis AP; Ophthalmol., 102 , 1261-1262, 1995 ; Arbiser JL; J Am Acad Dermatol, 34(3), 486-497, 1996; O'Brien K.D. et al.; Circulation, 93(4), 672-682, 1996; Hanahan D and Folkman J; Cell, 86 , 353-364, 1996).
- <7> 비정상적인 혈관신생으로 인한 질환은 상기 여러 가지 질환의 발병이나 진행과정에 깊이 관련되어 있어 이들 질환의 예방 또는 치료를 위하여 혈관생성을 억제하는 물질을 찾아내려는 연구가 활발히 진행되고 있다.
- <8> 특히, 혈관신생이 일어나기 위해서는 기저막이 분해되는 과정이 수반되는데, matrix metalloproteinase (MMP)가족에 속하는 효소들은 기저막 성분을 분해하는 가장 대표적인 효소들이다. MMP가족에 속하는 효소는 현재까지 약 20가지가 알려지고 있다. MMP는 콜라겐, 프로테오글리칸 및 젤라틴과 같은 거대 생분자들을 분해시킬 수 있는 아연을 함유한 엔도펩티다아제 종류로서 콜라게나제(collagenase), 젤라티나제(gelatinase), 스트로멜리신(stromelysin) 및 막형 MMP(membrane type MMP)로 크게 분류된다. 이들은 모두 전구효소(proenzyme)의 형태로 발현된 후 일부분이 자체적으로 잘려나감으로써 활성화된다(Bond, J. S., et al.; Int. J. Biochem., 75 , 565-574, 1985; Chen, J. M., Chen, W. T.; Cell , 48 , 193-203, 1987).
- <9> 콜라게나제류는 삼중나선형 간질성 콜라겐과 젤라틴 등에 작용하며, 섬유아세포 콜라게나제(MMP-1), 호

중구 콜라게나제(MMP-8) 및 콜라게나제-3(MMP-13)의 3종류가 알려져 있다(Goldberg, G. I., et al.; J. Biol. Chem., 261, 6600-6605, 1986; Fini, M. E., et al.; Biochemistry, 26, 6156-6165, 1987; Hast, K. A., et al.; J. Biol. Chem., 265, 11421-11424, 1990; Freije, et al.; J. Biol. Chem., 269, 16766-16773, 1994).

<10> 젤라티나제는 변성 콜라겐과 제 IV, V, VII, X형 콜라겐을 분해하는 효소로, 섬유아세포가 분비하는 72 kDa 젤라티나제(젤라티나제 A, MMP-2)와 단핵 식세포가 방출하는 92 kDa 젤라티나제(젤라티나제 B; MMP-9)의 두 종류가 있으며, 특히 기저막의 주성분인 제 IV형 콜라겐에 특이하게 작용하는 것으로 알려져 있다(Murphy, G., et al.; Biochem. J., 258, 463-472, 1989; Stetler-Stevenson, W. G., et al.; J. Biol. Chem., 264, 1353-1356, 1989).

<11> 광범위한 단백질 분해 스펙트럼을 갖고 있는 스트로멜리신 종류에는 스트로멜리신-1(MMP-3), 스트로멜리신-2(MMP-10), 스트로멜리신-3(MMP-11) 및 매트릴라이신(MMP-7)이 있으며, 이외에도 메탈로엘라스타제(MMP-12)와 막형 MMP에 속하는 MT1-MMP (MMP-14), MT2-MMP(MMP-15), MT3-MMP(MMP-16) 등이 알려져 있다.

<12> MMP는 혈관신생에 관여할 뿐만 아니라 동맥경화증, 알츠하이머 질환, 골질환, 당뇨병, 복대동맥류 질환, 신경계의 수초탈락 질환, 간경변, 신사구체 질환, 배태막의 미성숙 파열, 염증성 장질환, 치근막 질환, 노화와 관련된 황반 변성과 같은 여러 가지 질환에서 과다하게 발현되는 것으로 알려져 있다 (Woessner JF Jr.; Annals NY Acad. Sci., 732, 11-21, 1994; Warner RL, et al.; Am. J. Pathol., 158, 2139-44, 2001; Stetler-Stevenson WG; Surg. Oncol. Clin. N. Am., 10, 383-92, 2001). 따라서 MMP 효소의 활성 저해제는 혈관신생억제제로 작용함과 다양한 MMP 매개 질환에 사용할 수 있으므로, 새로운 약제의 개발이 기대되고 있다.

<13> 최근에 혈관신생을 억제시켜서 혈관신생 관련 질환들을 치료하려는 노력이 경주되고 있으나, 현재까지 사용되는 완전한 약제는 없는 실정이다. 혈관신생 억제제는 보통 환자에게 장기적으로 투여하여야 하기 때문에 독성이 적고 경구투여가 가능한 것이어야 가장 이상적인 치료제로 사용할 수 있다. 따라서 혈관신생 억제제로서 독성이 미비한 약제의 개발이 요구되어지고 있다.

<14> 상기와 같은 문제점을 해결하고자 화합물질보다 상대적으로 독성이 적은 자연소재 추출물을 대상으로 혈관신생억제효과를 검색한 결과, 본 발명자들은 아스퍼질러스 시로우사미(*Aspergillus usami* var. *shirousamii*)에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질의 혈관신생 억제 효과가 탁월함을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<15> 상기 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 본 발명은 신생혈관 형성에 관련된 MMP 활성, 혈관내피세포 이동 및 관(tube) 형성을 억제할 수 있는 아스퍼질러스 시로우사미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질의 신생혈관 형성 억제용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

<16> 본 발명의 목적은 아스퍼질러스 시로우사미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질을 함유하는 신생혈관 형성 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

<17> 또한 아스퍼질러스 시로우사미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질은 신생혈관 형성에 관련된 MMP 활성, 혈관내피세포 이동 및 관(tube) 형성을 억제함으로써 신생혈관형성을 저해함을 특징으로 한다.

효 과

<18> 상술한 바와 같이, 본 발명의 아스퍼질러스 시로우사미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질은 신생혈관 형성을 억제하고, 인체에 부작용을 발생시키지 않으므로 이를 함유하는 조성물은 종양억제제, 전이억제제, 혈관신생에 의한 안과질환, 건선 등과 같은 혈관신생과 관련된 각종 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <19> 본 발명은 신생혈관 형성에 관련된 MMP 활성, 혈관내피세포 이동 및 관(tube) 형성을 억제할 수 있는 아스퍼질러스 시로우스아미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질을 함유하는 신생혈관 형성 억제용 조성물을 제공한다.
- <20> 또한, 본 발명은 신생혈관 형성 억제활성이 있는 아스퍼질러스 시로우스아미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질을 함유하는 신생혈관 과다형성으로 인한 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.
- <21> 또한, 본 발명은 아스퍼질러스 시로우스아미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질을 함유하는 MMP 활성 억제용 조성물을 제공한다.
- <22> 또한, 본 발명은 MMP 억제활성을 갖는 아스퍼질러스 시로우스아미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질을 함유하는 과다한 MMP 활성으로 기인된 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.
- <23> 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- <24> 본 발명의 당귀 및 대추 추출물은 여러 가지 방법으로 추출하거나 또는 구입하여 사용할 수 있다. 이 추출액을 농축하거나 건조시켜 당귀 및 대추 추출물을 수득한다. 또한 이미 시판되고 있는 건조엑스를 사용하는 것도 바람직하다.
- <25> 또한, 미생물로는 아스퍼질러스 시로우스아미를 단독으로 사용할 수 있지만, 반드시 여기에 한정되는 것은 아니다.
- <26> 또한, 본 발명은 아스퍼질러스 시로우스아미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질을 함유하는 MMP 활성 억제용 약학조성물을 제공한다.
- <27> 상기 약학조성물은 과다한 MMP 활성으로 기인된 혈관신생에 의한 질환의 예방 및 치료에 사용될 수 있다.
- <28> 본 발명의 약학적 조성물은 MMP 과다활성에 기인하는 신생혈관 형성에 의한 질환의 치료, 예를 들면 류마티스성 관절염, 골관절염, 폐혈증성 관절염, 동맥경화증, 재협착증, MMP-매개 골감소증, 중추신경계의 염증질환, 알츠하이머 질환, 피부노화, 각막궤양, 이상 창상 유합, 골질환, 단백뇨증, 복대동맥류 질환, 외상성 관절 손상에 따른 퇴행성 연골손실, 신경계의 수초탈락 질환, 간경변, 신사구체 질환, 배태막의 미성숙 파열, 염증성 장질환, 치근막 질환, 노화와 관련된 황반 변성, 당뇨병 망막병증, 증식성 유리체 망막병증, 미성숙 망막병증, 안과 염증, 원추 각막, 쇼그렌 증후군, 근시 안과종양, 각막이식 거부 등의 치료에 사용할 수 있다.
- <29> 본 발명에서는 아스퍼질러스 시로우스아미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질의 혈관신생 억제효과를 보기 위하여 혈관내피 세포를 이용한 세포이동 실험과 매트리지 실험을 통하여 관형성을 확인하였다.
- <30> 본 발명의 아스퍼질러스 시로우스아미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질을 포함하는 조성물은 단일제로 사용하거나 약효를 증강시킬 수 있는 다른 유효성분과 함께 복합제로 사용할 수 있다.
- <31> 이때 약제학적으로 허용 가능한 희석제를 포함하여 사용할 수 있으며, 희석제로는 식염수, 완충 식염수, 텍스트로스, 말토텍스트린, 물, 글리세롤, 에탄올 및 이의 복합물을 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다.
- <32> 본 발명의 아스퍼질러스 시로우스아미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질은 1종 이상의 약제학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 약학 조성물로 투여될 수 있다.
- <33> 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량 정도는 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물(예, 화학요법제)을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.
- <34> 또한 환자의 나이와 체중뿐 아니라 혈관신생에 의한 질환의 종류 및 질환의 정도에 따라 용량 및 투여방법이 달라지기는 하나 일반적으로 0.1 내지 100mg/kg 체중으로 투여할 수 있으며 1일 1~3회 투여하는 것이 바람직하다.
- <35> 본 발명의 약학조성물은 경구, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비측내, 흡입, 안구

내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

- <36> 비경구 투여는 정맥내, 근육내, 복강내, 흉골내, 경피 및 동맥내 주사 및 주입을 포함하는 투여 방식을 의미한다. 본 발명의 약학조성물의 비경구 투여는 바람직한 온도 하에 약제학적으로 허용 가능한 담체, 즉 사용되는 농도와 투여량에서 수용체에게 비독성이고 다른 제제 성분과 화합할 수 있는 것을 혼합하여 단위 투여량의 제형으로 조제하는 것이 바람직하다.
- <37> 또한 본 발명의 약학조성물의 제형은 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 제조한 제형은 경구용, 주사용, 도포용으로 사용할 수 있다. 상기 제형은 주사용 형태(용액, 현탁액 또는 유탁액)로 조제할 수 있고, 정제, 캡셀제, 연질캡셀제, 수액제, 과립제, 환제 등 경구용으로 조제하는 것이 가장 바람직하다.
- <38> 본 발명은 다음의 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명되나, 본 발명이 이에 의해 제한되지는 않는다.
- <39> (실시예 1) 미생물의 종류와 생장 조건
- <40> 실험에는 *Aspergillus usarii* var. *shirousamii* KCTC 6956를 구입하여 사용하였다(유전자은행, 대전). Malt Extract 배지 (Difco)에서 호기적인 조건으로 24° C에서 7일 동안 배양하였고, 이것을 다시 Malt extract 배지(Difco)에 계대배양한 후 당귀 또는 대추 추출물과 배양하거나 미생물 추출물을 만드는데 사용하였다.
- <41> (실시예 2) 조 미생물 효소의 제조
- <42> 배양한 세포를 원심분리로 수거한 후(4℃, 3,000 x g에서 30분) 50 mM 포스페이트 버퍼(pH 6.0)로 두 번 세척하였다. 상기 세포를 50 ml의 50 mM 포스페이트 버퍼로 현탁시킨 후 세포 파쇄기(Stansted fluid power, Essex, UK)로 파쇄하여 조 미생물 효소를 제조하였다.
- <43> (실시예 3) 당귀 및 대추 추출물의 제조
- <44> 당귀(*Angelica gigas* Naka) 및 대추(*Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder) 50 g에 10배의 물을 가하여 4℃에서 overnight하고 60℃에서 3시간 동안 열수추출을 수행하여 당귀 및 대추 추출물을 제조하였다.
- <45> (실시예 4) 미생물전환물질의 제조
- <46> 실시예 2에서 제조한 조효소액과 실시예 3에서 제조된 당귀 또는 대추 추출물을 1:1 (v:v)로 반응하고, 효소 불활성화를 위해 95℃에서 30분간 열처리한 후 0.22 필터로 멸균하였으며 여기에서 얻어진 32종의 미생물 전환물질을 실험에 사용하였다(도 1).
- <47> (실시예 5) 혈관내피세포 준비
- <48> 혈관내피세포(human umbilical vein endothelial cells)는 콜라게나제효소(collagenase typeIII, Worthington Biochemicals Co., Lakewood, NJ, USA)를 이용하여 분리하였고, 37℃, 95% O₂+5% CO₂ 배양 조건에서 일차배양하였다(Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. 1973. Clin Invest 52:2745-2756). 혈관내피세포의 진위 판별은 DiI(1,1'-di-octadecyl-3,3,3,3-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)의 형광물질(Molecular Probes Co., Eugene, OR, USA)로 표지된 아세틸화된 저밀도지단백의 축적 실험을 통하여 이루어졌다(Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR. 1984. J Cell Biol 99: 2034-2040).
- <49> (실시예 6) MMP (세포외기질 분해효소)의 억제효과- Gelatin zymography법
- <50> M199 배지에서 배양한 혈관내피세포에 50 ng/ml phorbol myristate acetate (PMA) 또는 32종류의 미생물 전환물질을 각각 50 /ml 씩 처리하여 24시간동안 배양한 후 배양액을 수거하여 0.1 % 젤라틴을 포함한 10% SDS-PAGE에서 전기영동하여 젤라틴 분해능이 있는 MMP-2의 활성을 측정하였다.
- <51> 도 1에서 알 수 있듯이 50 ng/ml PMA를 단독으로 처리한 경우 MMP-2의 활성이 증가하였으며, 여기에 실시예 4에서 얻은 32종의 미생물 전환물질을 50 /ml 농도로 처리한 경우 이들 중 아스퍼질러스 시로우스아미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질(2H) 및 대추 바이오전환물질(8H)이 특이적으로 MMP-2의 활성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.
- <52> (실시예 7) 세포독성 실험(Cytotoxicity)
- <53> 실시예 6에서 선발된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질이 세포독성을 가지고 있는지를 혈관내피세포에서 귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질의 세포독성 효과로서 측정하였다.
- <54> 측정시료에 대한 세포독성은 분광 MTT 실험(Scudiero D. A. et al., Cancer Res., 48 , 4827-4833,

1988)로 측정하였다. 즉, 24 well microtiter tissue culture plate (Falcon)에 혈관내피세포를 7×10^4 cells/ml로 분주한 후, 각각의 well에 측정시료를 처리한 다음, 일정시간 배양시킨 후, MTT 시료를 처리하여 formazan 형성시 이를 solubilization용액으로 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 하기 도 2에 나타내었다.

<55> 도 2에서 알 수 있듯이, 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질 모두 50 /ml 이하 농도에서 세포 독성이 전혀 나타나지 않았다.

<56> (실시예 8) 혈관내피세포의 이동 억제효과

<57> 젤라틴(gelatin)이 코팅된 8 μ m pore size의 transwell cell culture chamber에 혈관내피세포를 2시간 배양 후 10 ng/ml VEGF (혈관내피세포 성장인자)와 MMP-2 활성의 억제효과가 높았던 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질을 각각 25 /ml 씩 처리하여 24시간 배양한 후 polycarbonate filter를 통해 이동한 세포를 toluidine blue로 염색하여 관찰하였다.

<58> 도 3에서 알 수 있듯이 VEGF를 단독으로 처리한 세포군에서는 혈관내피세포의 젤라틴 분해활성이 증가하였고 혈관내피세포가 코팅된 젤라틴의 분해를 통해서 transwell 아래로의 이동이 현저히 증가하였다. 여기에 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질을 25 /ml 농도로 처리해주면 혈관내피세포의 이동이 현저하게 감소되는 것을 관찰할 수 있었다.

<59> (실시예 9) 혈관내피세포의 관(tube) 형성 억제효과

<60> 매트릭젤(Matrigel, BD Biosciences, Bedford, 미국)과 PBS를 1:1로 희석한 것을 24 well plate에 200 μ l 씩 코팅한 후 그 위에서 혈관내피세포를 2시간 동안 배양한 후 10 ng/ml VEGF를 단독 또는 25 /ml 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질을 처리하여 배양 후 2시간째 매트릭젤 상에서 혈관내피세포의 관형성이 억제되는지를 관찰하였다.

<61> 도 4에서 알 수 있듯이 10 ng/ml의 VEGF를 단독으로 처리하였을 경우 관 구조가 완전하게 형성되었으며 25 /ml 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질을 처리하였을 경우 관형성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

<62> 도 1은 32가지 미생물전환물질 중 MMP 억제효과를 가지는 물질을 선별하기 위하여 수행한 gelatin zymography이다. 여기에서 A-G는 다양한 미생물 균주를, H는 아스퍼질러스 시로우스아미 균주를 나타낸다. 또한, 2는 당귀 추출물을, 8은 대추 추출물을 나타낸다.

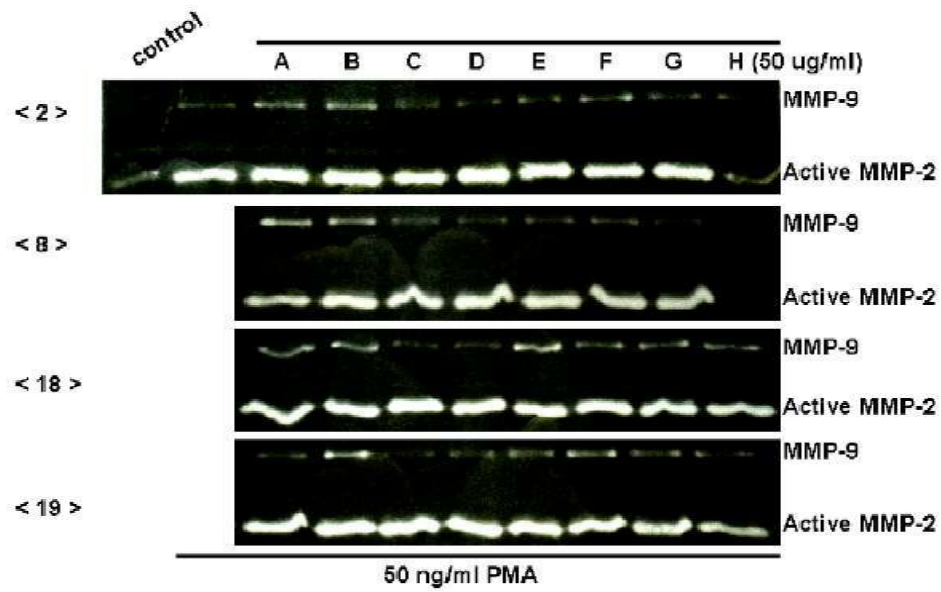
<63> 도 2는 선별된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질의 세포독성유무를 알아보기 위해 수행한 MTT 실험이다. 여기에서 2H는 아스퍼질러스 시로우스아미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질이고 8H는 아스퍼질러스 시로우스아미에 의해 생산된 대추 바이오전환물질이다.

<64> 도 3은 선별된 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질의 처리에 의해 혈관내피세포의 이동이 억제되는지 알아보기 위해 수행한 위치이동 (transmigration) 실험이다. 여기에서 2H는 아스퍼질러스 시로우스아미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질이고 8H는 아스퍼질러스 시로우스아미에 의해 생산된 대추 바이오전환물질이다.

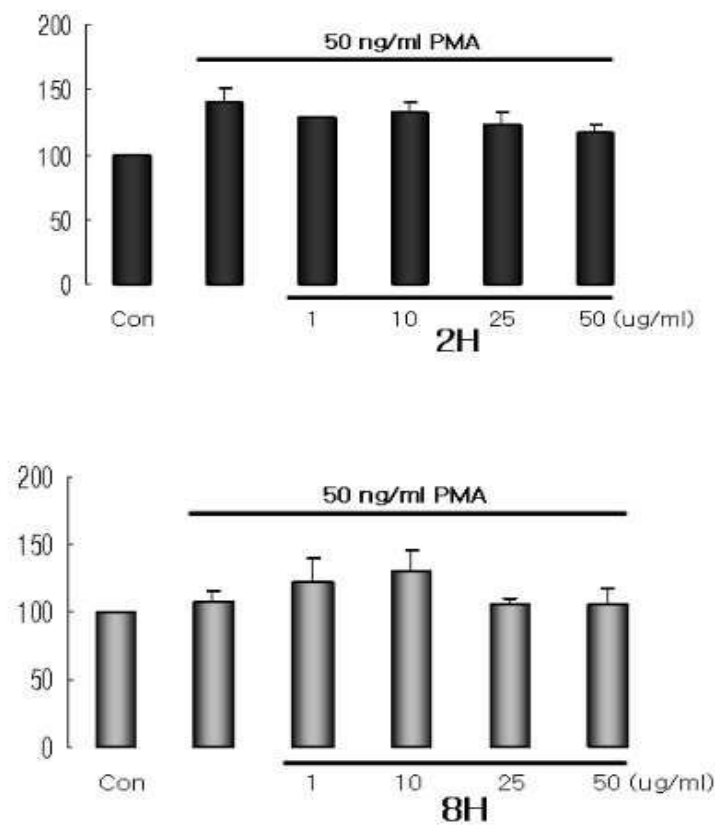
<65> 도 4는 VEGF 처리시 증가하는 관형성 작용을 당귀 바이오전환물질 및 대추 바이오전환물질이 억제하는지 알아보기 위하여 수행한 tube formation 실험이다. 여기에서 2H는 아스퍼질러스 시로우스아미에 의해 생산된 당귀 바이오전환물질이고 8H는 아스퍼질러스 시로우스아미에 의해 생산된 대추 바이오전환물질이다.

도면

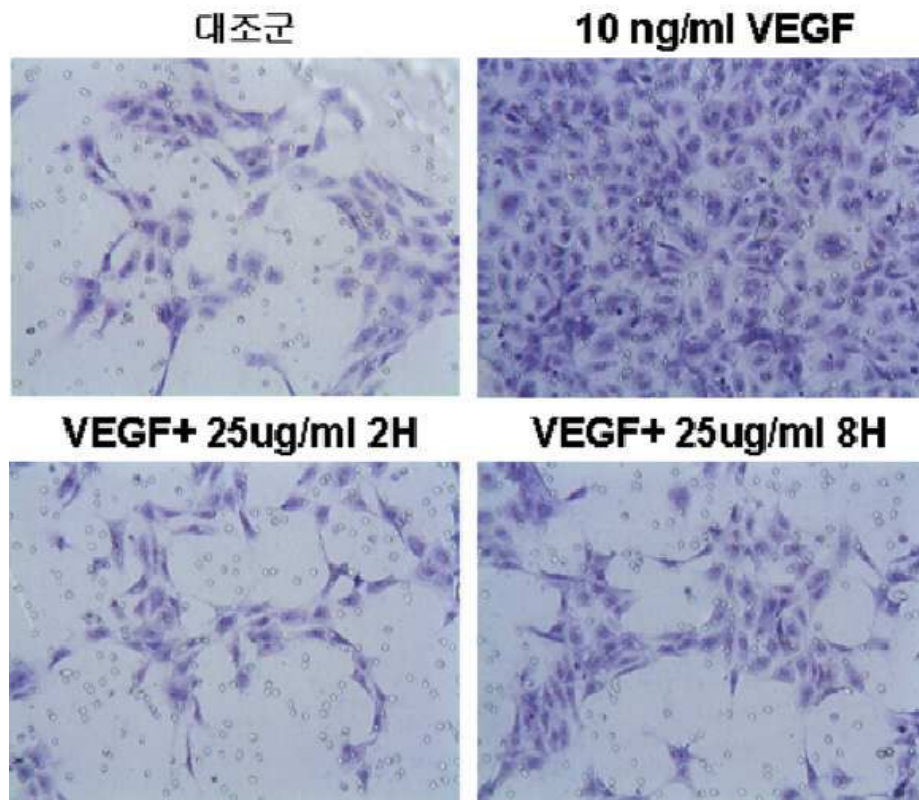
도면1



도면2



도면3



도면4

