



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0079977  
(43) 공개일자 2012년07월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**A61K 35/56** (2006.01) **A61K 38/46** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2011-0001363  
 (22) 출원일자 2011년01월06일  
 심사청구일자 없음

(71) 출원인  
**건국대학교 산학협력단**  
 서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)  
 (72) 발명자  
**박표잠**  
 충청북도 충주시 연수동 605번지 연수아이파크아파트 102동 502호  
**김은경**  
 부산광역시 북구 화명신도시로 156, 롯데 낙천대 115동 905호 (화명동)  
**권혁주**  
 경기도 의왕시 청계동 휴먼시아청계마을아파트 305동406호  
 (74) 대리인  
**이은철**

전체 청구항 수 : 총 10 항

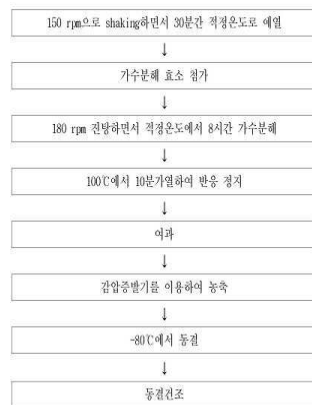
(54) 발명의 명칭 **바지락 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 항암제 조성물**

**(57) 요약**

본 발명은 바지락 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 항암제 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 바지락 단백질 가수분해물로부터 분리된 펩티드와 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 항암제 조성물 및 바지락 단백질 가수분해물의 제조방법과 상기 가수분해물로부터 펩티드를 분리 정제하는 방법에 관한 것이다.

상기와 같은 본 발명에 따르면 바지락 단백질 가수분해물, 상기 가수분해물로부터 분리, 정제된 항염 펩티드 및 상기 가수분해물을 포함하는 조성물은 항암제 활성을 가지므로 기능성 의약품 및 건강기능식품으로 이용될 수 있다.

**대표도 - 도1**



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009A0210002

부처명 해양수산부

연구사업명 수산특정연구개발사업

연구과제명 (3차년도)패류자원을 이용한 기능성 지질, Lyprinol 및 펩타이드의 산업화

주관기관 건국대학교산학협력단

연구기간 2009.09.20 ~ 2010.09.19

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

바지락 단백질 가수분해물로부터 분리된 펩티드를 유효성분으로 함유하는 항암제 조성물.

### 청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 바지락 단백질 가수분해물은

- (1) 동결건조된 바지락을 완충액 중에 용해시키는 단계;
- (2) 상기 용액에 단백질 가수분해 효소를 첨가하여 가수분해하는 단계;
- (3) 상기 가수분해물을 열수 중에서 가열하는 단계;
- (4) 상기 가열된 가수분해물을 필터, 농축 및 건조하는 단계;를 포함하는 방법으로 제조된 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

### 청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 (1) 단계의 완충액은 인산염 완충액(Phosphate buffer) 또는 글리신-염산 완충액(Glycine-HCl buffer) 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

### 청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 (1) 단계의 완충액의 pH는 1.0~10.0인 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

### 청구항 5

제 2항에 있어서,

상기 단백질 가수분해 효소는 플라보자임(Flavourzyme), 뉴트라제(Neutrase), 파파인(Papain), 펩신(pepsin), 트립신(Trypsin), 알파-키모트립신( $\alpha$ -Chymotrypsin), 알칼라제(Alcalase) 및 프로타맥스(Protamex)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

### 청구항 6

제 2항에 있어서,

상기 (2) 단계의 단백질 가수분해는 반응온도 25 ~ 70°C에서 반응시간 6~10시간으로 효소처리하는 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

### 청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 펩티드는

- (1) 바지락 단백질 가수분해물을 TFF(Tangetial Flow Filtration) 시스템에 의해 분자량별로 분리한 후 각획분의 생리 활성을 측정하는 단계;
- (2) 상기 분리된 획분 중 생리활성이 가장 뛰어난 획분을 크로마토그래피법으로 분리하는 단계;
- (3) 상기 분리된 각 획분의 생리활성을 측정하는 단계; 및
- (4) 상기 분리된 획분 중 생리활성이 가장 뛰어난 획분을 정제하는 단계;를 포함하는 방법으로 제조하며, 상기 (2) 내지 (4) 단계를 반복 실시하여 단일물질로 분리 정제하는 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

### 청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 (2) 단계는 이온결합 컬럼(DEAE-Sephacel)이 사용된 오픈 컬럼 크로마토그래피, 분취용 C<sub>18</sub> 컬럼(GROM-SIL 120 C<sub>18</sub>, 20 X 250 mm)이 장착된 고성능 크로마토그래피, 두 번의 분석용 C<sub>18</sub> 컬럼(GROM-SIL 120 C<sub>18</sub>, 4.0 X 250 mm)이 장착된 고성능 크로마토그래피를 이용하여 정제과정을 실시하는 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

### 청구항 9

제 1항 내지 제 8항의 어느 한 항의 조성물을 유효성분으로 함유하는 항암제.

### 청구항 10

제 1항 내지 제 8항의 어느 한 항의 조성물을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 바지락 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 항암제 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 바지락 단백질 가수분해물로부터 분리된 펩티드와 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 항암제 조성물 및 바지락 단백질 가수분해물의 제조방법과 상기 가수분해물로부터 펩티드를 분리 정제하는 방법 및 항암 효능을 갖는 바지락 단백질 유래 펩티드의 1차 구조 서열에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 해양생물은 종의 다양성과 더불어 서식환경의 특이성이라는 요인에 의하여 기존의 육상생물이 보유·생산할 수 없는 화학물질 및 생체 대사산물들을 함유하고 있으며, 이들의 생합성·분해에 관여하는 특이한 신종 효소와 보조인자들도 존재하고 있어서 신약물질과 새로운 생리 기능성 물질의 소재로서 관심이 집중되고 있다. 더욱이 육상생물을 대상으로 활발히 진행되어 왔던 선도물질의 탐색 및 개발이 한계에 이르기 시작함에 따라 자연히 해양생물로 관심대상이 전환되었다. 미국, 일본, 유럽 등과 같은 해양 선진국들에 의해서 현재까지 밝혀진 해양생물 유래의 항암성, 항산화성, 항곰팡이성, 항균성 및 항바이러스성을 나타내는 약리활성 물질들이 이미 다수 보고되어 있다. 또한 해양자원으로부터 식량자원의 생산에 관한 연구의 중요성도 점점 증가하고 있다.

[0003] 일반적으로, 패류(貝類)는 삼면이 바다로 둘러싸인 우리나라의 지역특성에 의해 연안지대에 다양한 종류가 서식하여 예로부터 중요한 식품자원으로 이용되어 온 것으로서, 1990년대 이후부터 패류의 인공양식이 보편화되면서 양식 생산의 비중이 90%를 상회하게 되고 그 생산량도 매년 증가함에 따라 어가의 소득증대 및 어촌지역의 고용창출효과 측면 외에도 보다 위생적이고 풍미가 좋은 원료를 안정적으로 공급함과 동시에 패류 특유의 풍미와 영양특성을 살린 고부가가치 가공기술이 수산업 발전을 위한 주요 관심대상이 되고 있다.

- [0004] 특히 최근에는 동식물 단백질을 각종 효소를 이용하여 가수분해시킨 가수분해물을 분리 정제하여 이들의 생리 활성 검토에 관한 연구가 진행되고 있다. 이 가수분해물들은 항산화 활성 및 혈압강하 작용이 있다는 것으로 밝혀지면서 피부노화방지 및 고혈압 등의 성인병 예방치료제로서도 이용 가능하다는 결과가 보고되고 있다. 또한, 단백질 가수분해물은 각종 가공식품이나 조미료, 샴푸, 화장품 등 기타 여러 분야에서 필수적으로 이용되고 있다.
- [0005] 그러나 국내에서는 거의 단백질의 산(acid) 가수분해물을 이용하고 있는 실정이며, 단백질을 산이나 알칼리로 가수분해 할 경우 트립토판(tryptophan), 시스테인(cysteine)과 같은 필수 아미노산이 손실될 뿐만 아니라 리지노알라닌(lysinoalanine)과 같은 독성이 있는 부산물이 생성되어 일본을 비롯한 선진국에서는 단백질의 산 가수분해물의 안전성 문제가 대두되고 있다.
- [0006] 암은 환경적 요인인 발암원들(carcinogens)에 의한 정상세포들의 변형으로 발생되고, 몸 안의 어느 부위에서도 발생할 수 있다. 암 세포는 일반적으로 성장인자의 신호에 대한 의존도가 낮아 세포증식이 조절되지 않고, 주변세포에 대한 접촉 저해가 없으며, 분화의 특징이 결여되어 있다. 그리고 안지오제닉 인자(angiogenic factor)를 분비하여 주위의 조직에 침투, 전이하는 특징을 갖는다.
- [0007] 대부분의 화학적 항암제들은 세포증식에 작용하여 효능을 발휘한다. 하지만 정상세포와 암세포의 증식제어의 차이에 기인한 것은 전무한 상태이므로, 암세포에 대한 선택성이 없어 정상세포에 오히려 독성을 나타내기 때문에 암세포에 대한 선택성이 우수하고 독성이 적으며 내성을 극복할 수 있는 새로운 항암제의 개발이 절실하다. 최근에는 인간에 효능이 뛰어나면서도 독성이 낮은 천연물로부터 항암성분의 탐색과 개발에 관심이 집중되고 있다.
- [0008] 이에 본 발명자들은 독성과 부작용이 없는 천연물 유래의 항암제를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 본 발명에 따른 바지락 단백질 가수분해물의 우수한 항암 효과를 확인하고 본 발명을 완성하였다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0009] 결국 본 발명의 주된 목적은 바지락 단백질 가수분해물로부터 분리된 펩티드를 유효성분으로 함유하고, 독성 및 부작용 없이 효과적인 천연 항암제 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 바지락 단백질 가수분해물의 제조방법 및 상기 가수분해물로부터 강력한 항암제 효과를 갖는 기능성 펩티드를 분리 정제하는 방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 바지락 단백질 가수분해물로부터 분리된 펩티드와 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 항암제 조성물 및 바지락 단백질 가수분해물의 제조방법과 상기 가수분해물로부터 펩티드를 분리 정제하는 방법에 관한 것이다.
- [0012] 본 발명은 바지락 단백질 가수분해물로부터 분리된 펩티드를 유효성분으로 함유하는 항암제 조성물을 제공한다.
- [0013] 상기 바지락 단백질 가수분해물은 잘게 분쇄한 동결건조된 바지락을 완충액에 용해시킨 후, 상기 용액에 단백질 가수분해 효소를 첨가한 뒤 교반시켜 가수분해 반응을 진행시킨 다음, 열수 중에서 가열하고 이를 필터, 농축 및 건조하여 제조된 것을 특징으로 한다.
- [0014] 또한, 상기 완충액은 인산염 완충액(phosphate buffer) 또는 글리신-염산 완충액(glycine-HCl buffer)이며, 상기 단백질 가수분해 효소는 플라보자임(Flavourzyme), 뉴트라제(Neutrase), 파파인(Papain), 펩신(pepsin), 트립신(Trypsin), 알파-키모트립신(α-Chymotrypsin), 알칼라제(Alcalase) 및 프로타맥스(Protamex)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 한다.
- [0015] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 가수분해 단계는 pH 1.0 ~ 10.0의 완충액 중에서 반응온도 25 ~ 70℃, 반응시간 6~10시간 동안 가수분해하는 것을 특징으로 하며 바람직하게는 상기 완충액의 pH가 2.0~8.0, 반응온도는

30~60℃ 반응시간 8시간 가열하고 감압증발기로 농축 후 동결건조시키는 것이 좋다.

[0016] 또한, 상기 바지락 단백질 가수분해물로부터 분리된 펩티드는 (1) 바지락 단백질 가수분해물을 TFF(Tangetial Flow Filtration) 시스템에 의해 분자량별로 분리한 후 각 획분의 생리 활성을 측정하는 단계; (2) 상기 분리된 획분 중 생리활성이 가장 뛰어난 획분을 크로마토그래피법으로 분리하는 단계; (3) 상기 분리된 각 획분의 생리활성을 측정하는 단계; 및 (4) 상기 분리된 획분 중 생리활성이 가장 뛰어난 획분을 정제하는 단계;를 포함하는 방법으로 제조하며, 상기 (2) 내지 (4) 단계를 반복 실시하여 단일물질로 분리 정제하는 것을 특징으로 한다.

[0017] 또한, 상기 (2) 단계에 있어서, 펩티드는 음이온 교환 컬럼(DEAE-Sephacel)이 사용된 오픈 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 분리한 후, 분취용 C<sub>18</sub> 컬럼(GROM-SIL 120 C<sub>18</sub>, 20 X 250 mm)이 장착된 고성능 크로마토그래피, 두 번의 분석용 C<sub>18</sub> 컬럼(GROM-SIL 120 C<sub>18</sub>, 4.0 X 250 mm)이 장착된 고성능 크로마토그래피를 이용한 정제과정을 거쳐 강한 항암 활성을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0018] 또한, 본 발명은 분리 정제한 펩티드를 Edman degradation 방법에 의해 PTH 분석컬럼을 이용하여 아미노산 서열을 분석하는 것을 특징으로 한다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 항암제 및 건강기능식품을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명의 바지락 단백질 가수분해물 및 이로부터 분리된 기능성 펩티드는 항암제와 더불어 노화 및 각종 질환의 억제 또는 치료를 위한 의약품, 건강보조제, 화장품, 식품, 식품 첨가제 등에 유용하게 이용될 수 있으며, 이에 의해 제한되지 않는다.

[0021] 또한, 본 발명의 바지락 단백질 가수분해물 및 이로부터 분리된 기능성 펩티드가 의약품으로 이용될 경우에는 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용되는 제형으로 제조될 수 있는데, 이렇게 이루어진 약학조성물을 권리범위로 포함한다. 또한 상기 약학 조성물을 항암제제로 사용하는 의약적 용도 역시 본 발명의 권리범위에 포함된다.

[0022] 상기 담체 또는 부형제로는 물, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 락토스, 프로필렌글리콜, 리퀴드, 파라핀, 생리식염수, 텍스트로스, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리ケート, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필라이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물류가 있으며, 이들은 1종 이상 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체 및 부형제는 모두 사용 가능하다. 또한 항암제 조성물을 약제화 하는 경우 통상의 충전제, 증량제, 결합제, 붕해제, 계면활성제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 더욱 포함할 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명의 바지락 단백질 가수분해물 및 이로부터 분리된 기능성 펩티드가 화장품으로 이용될 경우에는 주름개선 및 미백 기능성 화장품, 유연화장수, 영양화장수, 아이크림, 영양크림, 맛사지크림, 클렌징크림, 에센스 등의 제형으로 제조될 수 있으며, 각 제형의 화장품 조성물에 있어서, 단백질 가수분해물 및 기능성 펩티드를 포함하여 주름개선 및 미백 원료 또는 통상의 화장품 원료로서 이외의 성분들을 화장품의 제형 또는 사용 목적 등에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합 할 수 있다.

**발명의 효과**

[0024] 상기와 같은 본 발명에 따르면 바지락 단백질 가수분해물, 상기 가수분해물로부터 분리, 정제된 항암제 펩티드 및 상기 가수분해물을 포함하는 조성물은 항암제 활성을 가지므로 기능성 의약품 및 건강기능식품으로 이용될 수 있다.

[0025] 또한 본 발명의 바지락 단백질 가수분해물은 천연물 유래의 물질로써 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0026] 도 1은 바지락 단백질 가수분해물의 제조 공정을 나타낸 모식도이다.  
 도 2는 바지락 단백질 가수분해물의 항암 효과를 나타낸 것이다(1, 플라보자임; 2, 뉴트라제; 3, 프로타맥스; 4, 알칼라제; 5, 알파-키모트립신; 6, 파파인; 7, 트립신; 8, 펩신).  
 도 3은 바지락 단백질 가수분해물(알파-키모트립신)의 분자량별 항암 활성을 나타낸 것이다(>30,000 Da;

10,000 ~ 30,000 Da; 5,000 ~ 10,000 Da; 5,000 Da<).

도 4는 바지락 단백질 가수분해물(알파-키모트립신)의 분자량 10,000 ~ 30,000 Da에 해당하는 단백질을 음이온 교환 컬럼이 사용된 오픈 컬럼 크로마토그래피로 분리한 것을 나타낸 것이다.

도 5는 바지락 단백질 가수분해물(알파-키모트립신)의 분자량 10,000 ~ 30,000 Da에 해당하는 단백질을 음이온 교환 컬럼이 사용된 오픈 컬럼 크로마토그래피로 분리한 것을 동결건조하여 항암 활성을 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 바지락 단백질 가수분해물(알파-키모트립신)의 분자량 10,000 ~ 30,000 Da에 해당하는 단백질을 음이온 교환 컬럼이 사용된 오픈 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 효능이 입증된 분획물을 분취용 컬럼이 장착된 고성능 크로마토그래피를 이용하여 분리한 것을 나타낸 것이다.

도 7은 바지락 단백질 가수분해물(알파-키모트립신)의 분자량 10,000 ~ 30,000 Da에 해당하는 단백질을 음이온 교환 컬럼이 사용된 오픈 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 효능이 입증된 분획물을 분취용 컬럼이 장착된 고성능 크로마토그래피를 이용하여 분리한 것을 동결건조하여 항암 활성을 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 바지락 단백질 가수분해물(알파-키모트립신)의 분자량 10,000 ~ 30,000 Da에 해당하는 단백질을 음이온 교환 컬럼이 사용된 오픈 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 분취용 컬럼이 장착된 고성능 크로마토그래피를 이용하여 분리한 후 효능이 입증된 분획물을 분석용 컬럼이 장착된 고성능 크로마토그래피로 분리한 것을 나타낸 것이다.

도 9는 바지락 단백질 가수분해물(알파-키모트립신)의 분자량 10,000 ~ 30,000 Da에 해당하는 단백질을 음이온 교환 컬럼이 사용된 오픈 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 분취용 컬럼이 장착된 고성능 크로마토그래피를 이용하여 분리한 후 효능이 입증된 분획물을 분석용 컬럼이 장착된 고성능 크로마토그래피로 분리한 것을 동결건조하여 항암 활성을 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 바지락 단백질 가수분해물(알파-키모트립신)의 분자량 10,000 ~ 30,000 Da에 해당하는 단백질을 음이온 교환 컬럼이 사용된 오픈 컬럼 크로마토그래피로 분리하고 분취용 컬럼이 장착된 고성능 크로마토그래피를 이용하여 분리한 후 효능이 입증된 분획물을 분석용 컬럼이 장착된 고성능 크로마토그래피로 분리한 분획물을 다시 한 번 분석용 컬럼이 장착된 고성능 크로마토그래피로 분리한 것을 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 바지락 단백질 가수분해물(알파-키모트립신)의 분자량 10,000 ~ 30,000 Da에 해당하는 단백질을 음이온 교환 컬럼이 사용된 오픈 컬럼 크로마토그래피로 분리하고 분취용 컬럼이 장착된 고성능 크로마토그래피를 이용하여 분리한 후 효능이 입증된 분획물을 분석용 컬럼이 장착된 고성능 크로마토그래피로 분리한 분획물을 다시 한 번 분석용 컬럼이 장착된 고성능 크로마토그래피로 분리한 것의 항암 활성을 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0027] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0028] **실시예 1. 바지락의 단백질 가수분해물의 제조**

[0029] 본 실험에 사용된 바지락 시료는 여수 수산시장에서 구입하였고, 가수분해물을 제조하기 위해 -20℃에 저장하여 사용하였다. 잘게 분쇄한 동결건조 된 바지락을 0.1M 완충액 (buffer, pH 2.0~8.0)과 바지락 : 완충액 = 1 : 50(w/w)의 비율로 용해한 후, 30분간 150rpm에서 교반하면서 30~60℃로 예열한 다음, 단백질 가수분해 효소 : 바지락 = 1 : 50 (w/w)의 비율로 단백질 가수분해 효소, 플라보자임, 뉴트라제, 파파인, 펩신, 트립신, 알파-키모트립신, 알칼라제 및 프로타맥스를 첨가하여 8시간 동안 180rpm에서 교반하여 30~60℃에서 가수분해한 후, 100℃에서 10분간 가열하여 가수분해 반응을 종료시켰다.

[0030] 반응이 종료된 액은 왓만 필터 41번(Whatman filter No. 41)을 사용하여 필터한 후 감압증발기로 농축시킨 후, -80℃로 동결건조하여 바지락 단백질 가수분해물을 제조하였다. 이때 사용된 효소의 조성 및 반응 조건은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

효소	pH	온도(°C)	완충액
Papain	6.0	37.0	0.1 M PB
Pepsin	2.0	37.0	0.1 M GHB
Trypsin	8.0	37.0	0.1 M PB
$\alpha$ -Chymotrypsin	8.0	37.0	0.1 M PB
Flavourzyme	7.0	50.0	0.1 M PB
Alcalase	7.0	50.0	0.1 M PB
Protamex	7.0	50.0	0.1 M PB
Neutrase	7.0	50.0	0.1 M PB

[0031]

[0032]

단, 상기에서 PB는 인산염 완충액(Phosphate Buffer), GHB는 글리신-염산 완충액(Glycine-HCl Buffer)을 의미한다.

[0033]

**실험 예 1. 바지락 단백질 가수분해물의 항암 효과 측정**

[0034]

바지락 단백질 가수분해물이 암을 억제할 수 있는지를 전립선암 세포 PC3 (ATCC, CRL-1435)를 요오드 프로피디움(propidium iodide, PI)으로 염색해 측정하였다. 요오드 프로피디움은 자동세포사멸인 아포토시스를 측정하기 위해 자주 사용되는 형광색소로, DNA와 결합하므로 PI로 염색된 DNA양으로부터 세포사멸과 세포주기를 유추할 수 있었다.

[0035]

즉, 12-well plate에 적당량의 암 세포를 접종하고 24시간 뒤에 8종의 바지락 단백질 가수분해물(1, 플라보자임; 2, 뉴트라제; 3, 프로타맥스; 4, 알칼라제; 5, 알파-키모트립신; 6, 파파인; 7, 트립신; 8, 펩신) 0.5mg/ml을 처리한 후 37°C, CO<sub>2</sub> 인큐베이터에 24시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료되면 수확하여 4°C, 13,000rpm에서 3분간 원심분리 후 상층액을 버리고, 인산염 완충액 300 $\mu$ l를 첨가하여 잘 섞어 tween 20 0.5%가 함유된 차가운 에탄올 1ml을 첨가하여 4°C에서 고정하였다. 24시간 후, 4°C, 13,000rpm에서 3분간 원심분리 후 상층액을 버리고, 여기에 인산염 완충액 1ml을 첨가한 후 잘 섞어서 다시 4°C, 13,000rpm에서 3분간 원심분리하고, 상층액을 버린 다음, 여기에 RNase 10 $\mu$ g/ml이 포함된 요오드 프로피디움 용액(최종농도 50 $\mu$ g/ml) 300 $\mu$ l를 첨가하여 잘 섞어준 후 37°C에서 30분 염색하여 유세포 분석기(FACScan, BD Science, USA)에서 세포사멸과 세포주기를 측정하였다.

[0036]

그 결과, 전립선암에서 암세포 사멸효과와 세포 증식 억제 효과가 나타남을 확인하였으며 그 중 알파 키모트립신 가수분해물이 가장 높은 활성을 보여주었다(도 2참조).

[0037]

**실험 예 2. 바지락 단백질 유래 효소 가수분해물로부터 항암 펩티드 소재 분리 및 정제 I**

[0038]

바지락을 알파-키모트립신으로 가수분해시킨 가수분해물의 항암 펩티드를 분리 및 정제하기 위하여 멤브레인 사이즈에 따라 단백질을 분리, 정제하는 TFF 시스템을 이용하여 5,000 Da 미만, 5,000 ~ 10,000 Da, 10,000 ~ 30,000 Da, 30,000 Da 이상의 분자량별로 4개의 분획물로 구분하여 항암 활성을 측정하였다. 그 결과, 4개의 획분 중 10,000 ~ 30,000 Da의 크기에서 가장 높은 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다(도 3참조).

[0039]

**실험 예 3. 바지락 단백질 유래 효소 가수분해물로부터 항암 펩티드 소재 분리 및 정제 II**

[0040]

본 실험 예는 바지락 알파-키모트립신 가수분해물로부터 항암 펩티드를 얻기 위해 분리, 정제하는 두 번째 과정으로, TFF 방법에서 가장 우수한 항암제 활성을 나타낸 분획인 10,000 ~ 30,000 Da의 분획물을 음이온 교환 컬럼이 사용된 오픈 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 분리하였다.

- [0041] 오픈 컬럼 크로마토그래피는 액체 흡착제로 도포된 미세한 고체로 충전된 관이나, 흡착성 액체로 된 얇은 막으로 지지된 긴 모세관을 통해 분석할 액체나 기용체를 통과시켜 혼합물의 각 조성성분들이 관 속의 고정상과 상호작용에 의해 통과속도가 달라지는 것을 이용한 혼합물을 분리하기 위한 분석화학 기법의 하나이다. 본 실험에서는 음이온 교환에 적합한 컬럼을 사용하여 오픈 컬럼 크로마토그래피를 실시하였으며, 최종적으로 5개의 분획물을 얻었다(도 4참조). 각 분획물을 동결건조하여 항암 활성을 측정된 결과 도 5에서 보듯이 D 획분에서 가장 높은 활성을 나타내었다.
- [0042] **실험 예 4. 바지락 단백질 유래 효소 가수분해물로부터 항암 펩티드 소재 분리 및 정제 III**
- [0043] 본 실험 예는 바지락 알파-키모트립신 가수분해물로부터 항암 펩티드를 얻기 위해 분리, 정제하는 세 번째 과정으로, 오픈 컬럼 크로마토그래피를 사용한 위 실험 예 3에서 가장 우수한 항암 활성을 나타낸 분획인 분획물 D를 분취용 컬럼이 장착된 고성능 크로마토그래피를 이용하여 분리, 정제하였다.
- [0044] 고성능 크로마토그래피는 적당한 충전물이 균일하게 담긴 관(분리관) 안에서 기체 시료나 기체화한 액체 또는 고체 시료를 운반기체에 의해 전개시키되 분해하지 않고 기체인 상태로 통과시켜 각 성분을 분리시키는 방법인데, 본 실험에서는 분취용 컬럼을 장착하여 크로마토그래피를 실시하였으며, 최종적으로 3개의 분획물을 얻었다(도 6참조).
- [0045] 각 분획물을 동결건조하여 항암 활성을 측정된 결과 도 7에 보듯이, D-I 분획물에서 가장 높은 활성을 나타내었다.
- [0046] **실험 예 5: 바지락 단백질 유래 효소 가수분해물로부터 항암 펩티드 소재 분리 및 정제 IV**
- [0047] 본 실험 예는 바지락 알파-키모트립신 가수분해물로부터 항암 펩티드를 얻기 위해 분리, 정제하는 네 번째 과정으로, 상기 실험 예 4에서 얻은 분획물 D-I을 분석용 컬럼이 장착된 고성능 크로마토그래피를 이용하여 분리, 정제하였다.
- [0048] 최종적으로 2개의 분획물을 얻었으며(도 8), 각 획분을 동결건조하여 항암 활성을 측정된 결과 도 9에서 보듯이 D-I-i 분획물에서 가장 높은 활성을 나타내었다.
- [0049] **실험 예 6: 바지락 단백질 유래 효소 가수분해물로부터 항암 펩티드 소재 분리 및 정제 V**
- [0050] 본 실험 예는 바지락 펩신 가수분해물로부터 항암 펩티드를 얻기 위해 분리, 정제하는 다섯 번째 과정으로, 상기 실험 예 5에서 얻은 분획물 D-I-i를 다시 한 번 분석용 컬럼이 장착된 고성능 크로마토그래피를 이용하여 최종적으로 다시 한 번 더 분리, 정제하여 단일 분획물을 얻었으며(도 10), 그 결과 도 11에서 나타난 바와 같이 분획물의 항암활성 억제율은 36.8% 소거율을 나타내었다.
- [0051] **실험 예 7: 항암 활성을 갖는 펩티드 아미노산 배열 확인**
- [0052] 본 실험 예는 상기 실험 예 6에서 얻은 항암 활성을 갖는 펩티드의 아미노산 배열을 확인하기 위하여, Edman 분해법(Edman, P., *Acta Chemica Scandinavica*, 283-293, 1950)에 준하여 N-termina로부터 아미노산 배열을 분석하였다.
- [0053] 그 결과, 항암제 펩티드의 아미노산 배열은 각각 Ala-Val-Leu-Val-Asp-Lys-Gln-Cys-Pro-Asp으로 확인되었다(표 2참조).

표 2

Sequences (10 residues)
Ala-Val-Leu-Val-Asp-Lys-Gln-Cys-Pro-Asp

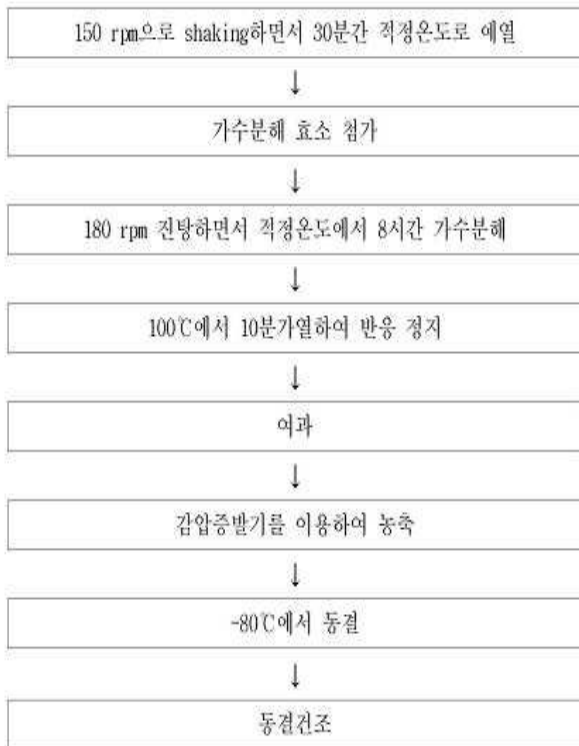
[0054]

[0055]

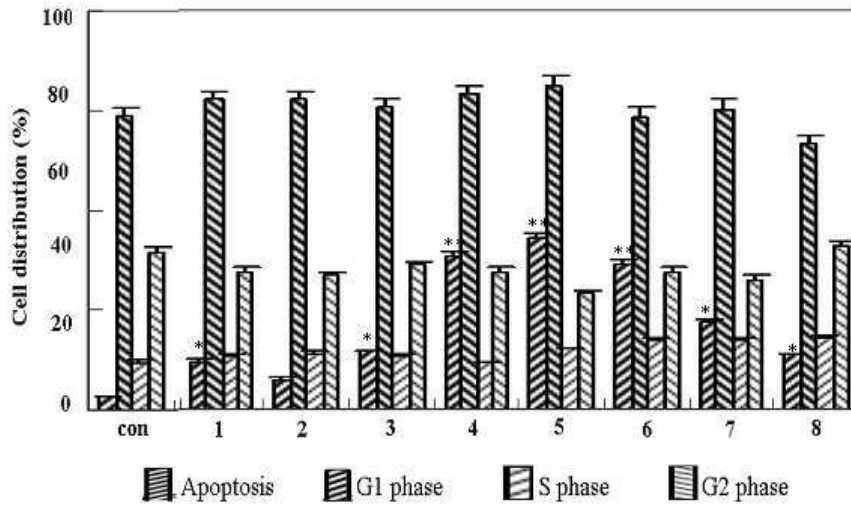
이상, 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 의하여 정의된다고 할 것이다.

**도면**

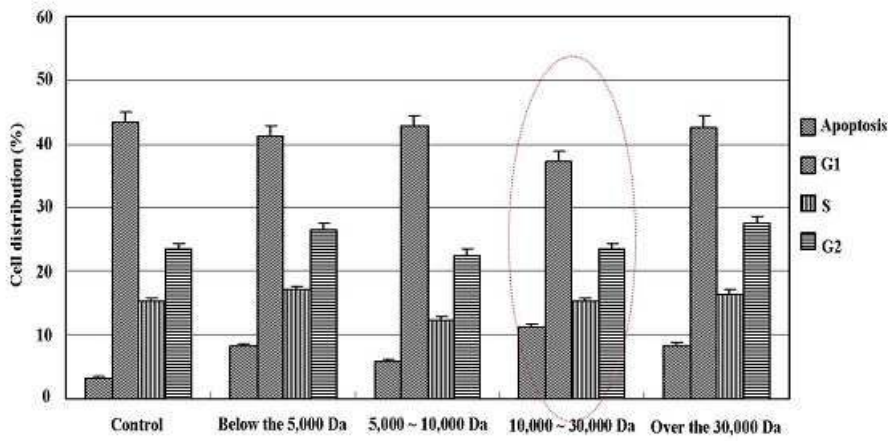
**도면1**



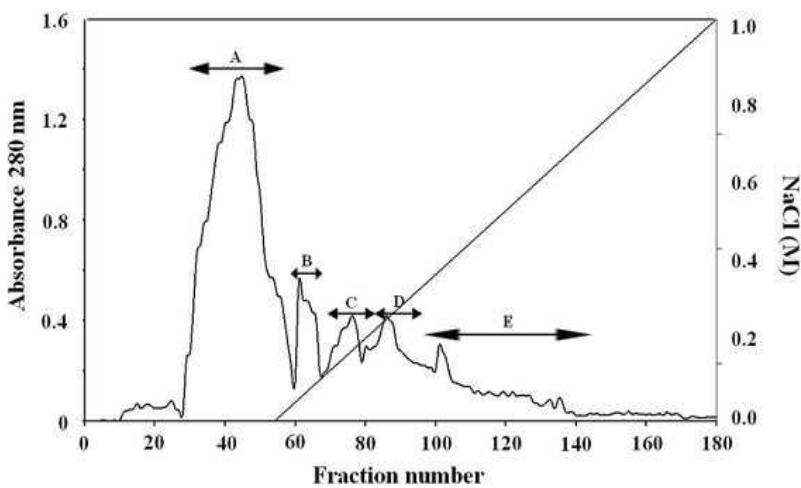
도면2



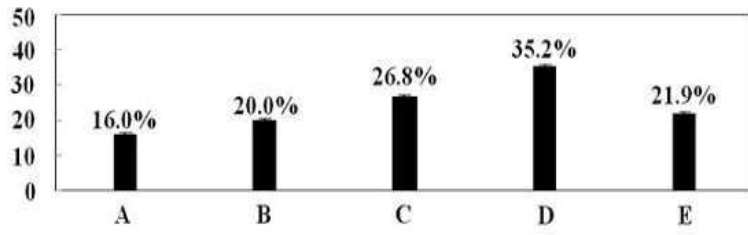
도면3



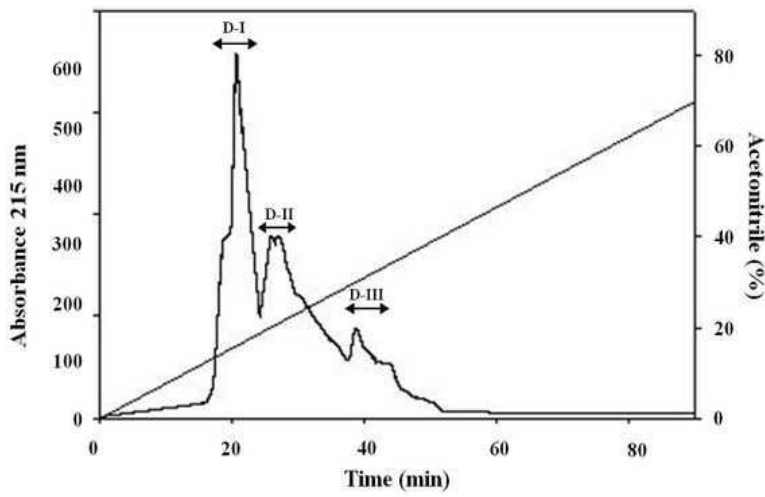
도면4



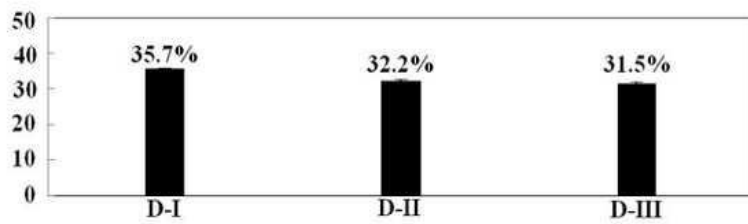
도면5



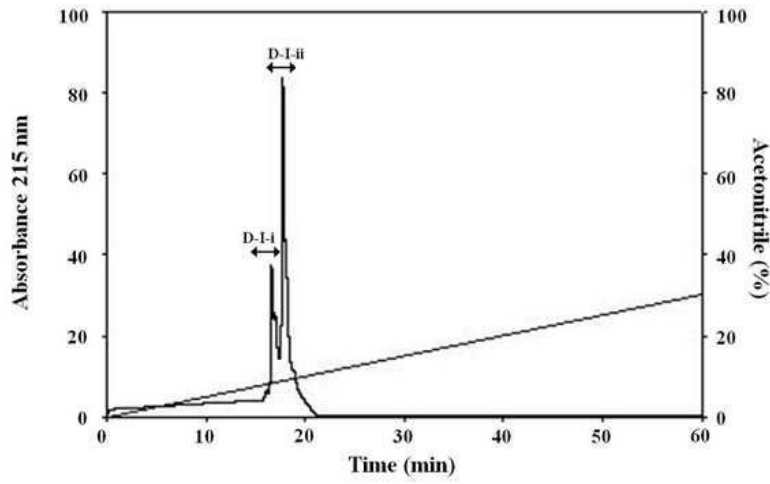
도면6



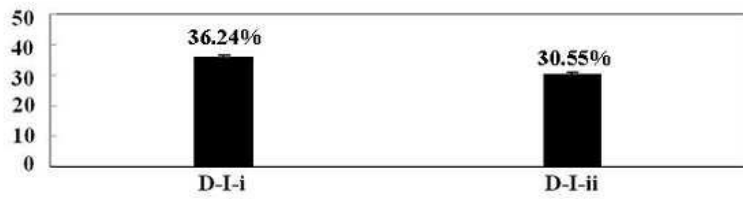
도면7



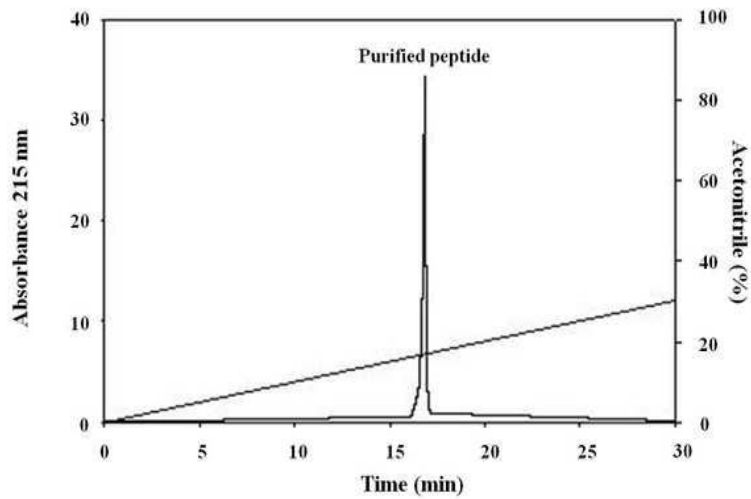
도면8



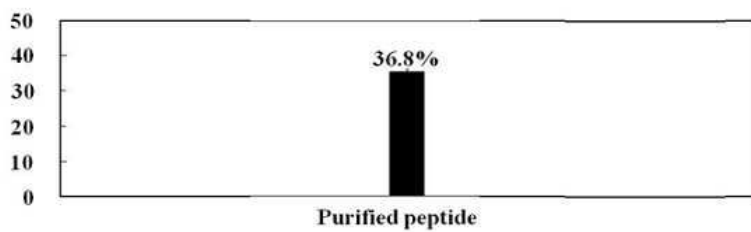
도면9



도면10



도면11



서열 목록

- <110> Konkuk University Industrial Cooperation Corp.
  - <120> Anticancer composition comprising enzymatic hydrolysates of  
Ruditapes philippinarum
  - <130> P10-E507
  - <160> 1
  - <170> KopatentIn 1.71
  - <210> 1
  - <211> 10
  - <212> PRT
  - <213> Tapes philippinarum
  - <400> 1
- Ala Val Leu Val Asp Lys Gln Cys Pro Asp
- 1                    5                    10