



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0043387
(43) 공개일자 2013년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/122 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A23L 1/29 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0107458

(22) 출원일자 2011년10월20일

심사청구일자 2011년10월20일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자

김세권

부산광역시 동래구 사직2동 쌍용예가아파트 125동
1402호

장첸

부산광역시 남구 용소로 45, 대연캠퍼스 해양바이
오프로세스연구단 (대연동, 부경대학교)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이덕록

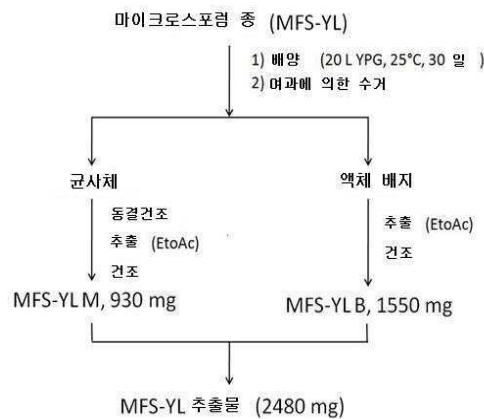
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 전이 억제 활성을 갖는 크리소파놀, 피지온 또는 에모딘, 및 이를 함유하는 기능성 건강식품 조성물

(57) 요약

본 발명은 홍조류 표면에서 분리되어 추출 분리된 크리소파놀, 피지온 또는 에모딘의 전이 억제 활성 및 이를 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 이들은 암 전이 억제 활성을 가지므로, 항암 보조용 기능성 건강식품 조성물로 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

이희봉

부산광역시 남구 용소로 45, 대연캠퍼스 해양바이오프로세스연구단 (대연동, 부경대학교)

이용신

부산광역시 남구 용소로 45, 대연캠퍼스 해양바이오프로세스연구단 (대연동, 부경대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 M2010-01

부처명 국토해양부(마린바이오프로세스연구단)

연구사업명 해양생명공학사업

연구과제명 해양생물 유래 생리활성 펩타이드의 임상평가를 통한 제품화 및 산업화

주관기관 부경대학교

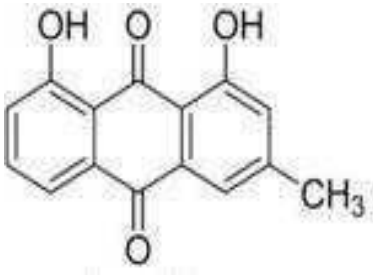
연구기간 2010.01.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

전이 억제 활성을 가짐을 특징으로 하는 하기 화학식 1의 크리스파놀 화합물:

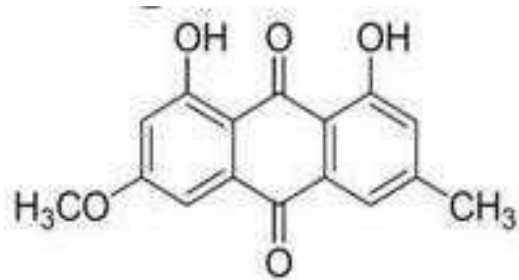
화학식 1



청구항 2

전이 억제 활성을 가짐을 특징으로 하는 하기 화학식 2의 피지온 화합물:

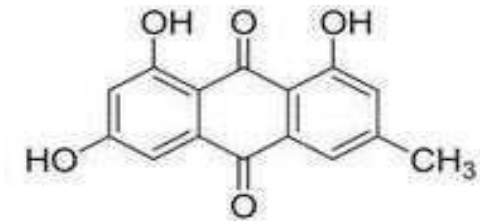
화학식 2



청구항 3

전이 억제 활성을 가짐을 특징으로 하는 하기 화학식 3의 에모딘 화합물:

화학식 3



청구항 4

제1항 내지 제3항중 어느 한 항에 있어서,

마이크로스포럼 종(Microsporium sp.)에서 유래된 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 5

제1항 내지 제3항중 어느 한 항에 따른 화합물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 항암 치료 보조용 기능성 건강식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 전이 억제 활성을 갖는 크리소파놀, 피지온 또는 에모딘, 및 이를 함유하는 기능성 건강식품 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 홍조류 표면에서 분리되어 추출 분리된 크리소파놀, 피지온 또는 에모딘의 전이 억제 활성 및 이를 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 암은 인류의 가장 위협적인 대상인데, 이는 암의 전이(metastasis) 때문이다. 전이는 암 사망율의 주요 원인으로, 일단 전이가 발생하면 암 세포는 신체의 다른 부위로 이동한다. 대부분의 정상 세포와 달리, 상기 전이 세포는 신체내의 다른 조직을 분리시키는 멤브레인(membrane)을 침투할 수 있다. 인접 조직으로 침윤된 후에, 암 세포는 혈관과 림프관, 또는 체강으로 유입하여, 2차 종양을 형성할 수 있다. 따라서, 암 전이의 지연은 효과적인 암 치료법이 될 수 있다.

[0003] 암전이 분자 메커니즘에 대한 집중적인 연구 결과, 전이 과정 동안의 몇몇 단계가 알려져 있다. 전이 과정 동안에 종양 세포는 다른 세포 및/또는 매트릭스 단백질에 부착된다. 부착 분자는 세포 부착에서 중심 역할을 한다. 세포외 기질(ECM) 배리어를 가로지르는 신생세포의 전좌(translocation)(침윤)는 전이 과정의 일부이다. 침윤을 위해서는 특이적 프로테이나아제에 의한 기질 단백질의 용해가 필요하다. 기질 구성성분을 비롯한 많은 요인들이 종양 세포 이동을 자극한다. 최종적으로, 종양 세포에 의한 2차 부위의 군체형성(colonization)에는 종양 세포 증식이 필요하다. 2차 부위에서 증식되도록 전이 세포를 자극하는 증식 인자가 밝혀졌다[Liotta et al., 1986; Lola and Graham, 1990; Zhang and Kim, 2009].

[0004] 매트릭스 메탈로프로테이나아제(MMP)는 전이 동안에 종양 세포를 보조하는 주요한 중요 분자로, 콜라게나아제(MMP-1, -8 및 -13), 젤라티나아제(MMP-2 및 -9), 스트로멜리신(MMP-3, -10 및 -11), 매트릴라이신(MMP-7, -26) 및 막-유형 MMP와 같은 5개 군으로 분류된다. MMP는 ECM 분해 및 암세포 침윤 사이에서 명확한 상관관계를 갖는 것으로 암 연구의 초기 단계에서부터 알려져 왔다. 특히, 악성 종양에서 MMP 활성은 하향 조절되고, 이는 좋지 못한 예후와 관련되어 있다. 높은 수준의 MMP 활성은 종양 증식, 침윤, 신생혈관형성, 염증과 관련되어 있으며, 비-가수분해적 방식으로 작용하기도 한다. 특히, MMP-2(젤라티나아제 A) 및 -9(젤라티나아제 B)는 악성 종양의 대부분에서 실질적으로 증가하는 전이에서 중요한 역할을 하는 것으로 증명되었다. 따라서, MMP-2 및 -9의 억제가 암치료에 효과를 가질 것이다.

[0005] 한편, 카텝신은 종양 세포 침윤 및 전이와 관련되어 있다. 카텝신의 발현 증가 및 그 억제제의 농도 감소가 유방암, 위암 및 전립선 암, 특히 공격적인 암 세포에서 관찰되었기에, 카텝신은 악성 종양의 생물학적 지표로 제시되어 왔으며, 상기 질환의 예후에 유용한 것으로 증명되었다. 또한, 카텝신은 암 진행에서 다양한 역할을 한다. 프로테아제의 카텝신 패밀리 구성원 중에서, 카텝신 B, D 및 L이 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 카텝신 B, L 및 D는 거의 모든 포유동물의 세포에 분포되어 있는 리소솜 시스테인(lysosomal cysteine) 및 아스파르트성 프로테이나아제이다. 카텝신 D는 유방 종양에서 효소적 불활성 프로-펩타이드를 통해 종양 증식을 촉진시키는 미토겐으로 작용하는 것으로 판단된다. 카텝신 D가 MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) 유방암 세포에 외인성 첨가되면 미토겐 활성을 나타낸다. 카텝신 D 발현이 안티센스 유전자 이동에 의해 하향 조절되면 인간 MDA-MB-231 유방암 세포에서 매트릭스 증식(Matrigel outgrowth) 및 실험적 폐 전이가 억제되는 것으로 보고되었다. 카텝신 D의 암세포 증식 및 종양 혈관생성에 대한 영향은 단백분해활성과 무관하기 때문에, ECM 침윤보다는 종양 증식에 더 필요한 것으로 판단된다. 카텝신 B 및 L은 기질 분해, 세포 이동 및 침윤에서 중요한 역할을 하는 것으로 판단되었다. 카텝신 B는 세포내에서 작용하고, 항암 세포에 침윤하거나 그의 기질을 분해시킨다. 카텝신 L은 ECM 분해에서 중요한 역할을 한다. 이들 억제제를 투여하면 암세포의 침윤 및 전이가 예방된다. 이는 암세포가 악성 질환으로 진행되기 위해서 다양한 카텝신이 조절되어야 함을 나타낸다. 따라서, 카텝신은 암 치료법의 타겟이 될 수 있다.

[0006] 핵인자-카파 B(NF- κ B) 및 단백질-1 활성화제 (AP-1)는 배 발생, 림프구 분화, 종양 형성 및 아포토시스(apoptosis) 뿐만 아니라 암 전이에 관련된 많은 유전자의 발현을 조정하는 주축 전사 인자이다. NF- κ B 및 AP-1 활성은 상이한 세포 시그널 형질도입(transduction) 캐스케이드를 통해 과다한 생리학적 및 환경적 자극에 의해 유도된다. NF- κ B 전사 단백질 패밀리는 c-Rel, p65 (RelA), RelB, p50(NF- κ B1) 및 p52(NF- κ B2)로 이루어진다. 이들 인자는 각종 활성 호모- 및 헤테로다이머에서 발견된다. p50 또는 p52 서브유닛과 p65로 이루어지며 유전자 유도에 필요한 전사-촉진 도메인을 함유하는 헤테로다이머(heterodimer)는 일반적으로 NF- κ B의

활성화 형태를 갖는다. NF- κ B의 활성화 형태 또는 불활성화 형태는 I κ B로 알려진 NF- κ B 단백질 억제제에 의해 조절된다. I κ B는 NF- κ B와의 상호작용에 의해 세포질에서 NF- κ B/I κ B 착물을 형성한다. NF- κ B의 활성화 형태는 핵에 유입되어서 표적 유전자의 프로모터 내의 동족 DNA 결합 부위에 결합함으로써 전사를 강화시킨다. AP-1 전사 인자 착물은 전사 조절 역학을 이해하기 위한 패러다임으로 기능한다. AP-1 활성화를 형질변환(transformation)에 관련시킨 많은 논문에도 불구하고, jun(c-jun, junB 및 junD) 또는 fos(c-fos, fosB, fra-1 및 fra-2) 유전자에서 아직까지 어떠한 돌연변이도 확인되지 않았다.

[0007] 미토겐-활성화된 단백질 키나아제(MAPK) 패밀리는 세포 표면으로부터 핵으로의 부착성 긴장성 시그널 뿐만 아니라 성장인자 수용체의 중개에서도 공통된 참여물질이다. MAPK 경로는 AP-1 구성성분의 농도를 증가시키거나 이들의 서브유닛의 인산화를 변형시킴으로써 AP-1 전사촉진에 영향을 줄 수 있다. 특징이 잘 분석된 3가지 MAPK 경로는 세포외-조절된 키나아제(ERK), c-Jun NH₂-말단 키나아제(JNK) 및 p38이다. MAPK는 증가된 전단 스트레스 및 기계적 강도와 같은 생리학 적 혈관생성 자극에 반응하여 활성화되고, 내피세포 증식의 개시, 세포골격 리모델링, 세포 부착성의 변형 및 세포 이동과 같은 다양한 다운스트림(downstream) 작용의 원인이 된다. 본 발명자들은 MMP-1 및 MMP-2의 내피세포 발현이 MAPK 효소 패밀리에 의해 조절된다고 가정하였다.

[0008] 매트릭스 메탈로프로테이나아제의 조직 억제제(TIMPs: Tissue inhibitors of matrix metalloproteinase)는 척추동물 결합 조직의 섬유아세포 및 마크로파지를 비롯한 많은 세포 유형 및 결합조직-유래의 배양 세포에 의해 분비되는 작은 단백질이다. TIMP는 결합 조직 세포에 의해 ECM으로 분비되는 콜라게나아제 및 다른 메탈로프로테이나아제(젤라티나아제 및 스트로멜라이신)의 화학량론적 억제제이다. 이들 프로테이나아제들은 함께 주요 ECM 구성성분 전부를 분해시킬 수 있으므로, 생체내(in vivo)에서 결합조직 교체(connective-tissue turnover)의 조절에서 중요한 역할을 한다.

[0009] RECK(Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs)는 간엽조직 및 신경관 변역대(marginal zone of the neural tube)에서 널리 발현되고, 큰 혈관에 근접한 혈관평활근세포에서 고도로 발현된다. RECK는 3가지 MMP 패밀리의 멤버, 즉, MMP-2, MMP-9 및 MMP1-4를 억제할 수 있다. 상기 MMP는 콜라겐 섬유를 분해(digestion)시키기 위해 단독으로 또는 결합하여 작용할 수 있고, RECK는 이러한 과정을 억제할 수 있다. RECK는 GPI-결합을 통해 막과 회합(association)된다. RECK는 상기 세포로부터 프로-MMP-9의 방출을 억제하고, 또한, MMP-14 및 MMP-2의 효소 활성을 억제하여서 활성 MMP-2의 생성을 감소시킨다.

[0010] MCF-7 세포는 1970년에 69세 백인 여성으로부터 분리한 유방암 세포주이다. MCF-7 세포는 세포질 에스트로겐 수용체를 통해 에스트라디올을 진행시킬 수 있고 돔(dome)을 형성할 수 있는 등 분화된 포유동물 상피의 여러 특징을 보유하고 있다. MCF-7 세포의 증식은 TNF- α 에 의해 억제된다. 유방 종양에서 카텝신 D는 미토겐으로 작용하고, 효소 불활성 프로-카텝신을 통해 종양 증식을 촉진하는 것으로 판단된다. MCF-7 유방암 세포에 카텝신 D를 첨가하면 미토겐 활성이 나타난다.

[0011] 최근, 천연물로부터 약학적 후보물질을 밝히기 위한 많은 연구가 실시되고 있으며, 해양 미생물은 신규한 약학적 활성 대사물질의 중요 공급원이다. 이들 해양 미생물중에서, 해양 균류는 생활성 2차 대사물질의 풍부한 공급원이다. 현재까지 4000여 종의 균류 대사물질이 보고되었으며, 5000 내지 7000의 분류학적 해양균류 종의 화학적 특성에 대하여 연구되었다.

[0012] 특히, 해양 균주인 마이크로스포럼 종(*Microsporium* sp.)은 각종 생물학적 기능을 갖는 것으로 보고되었는데, 본 발명자들은 상기 해양 균주로부터 크리스파놀, 피지온 및 에모딘을 추출 분리하였다.

[0013] 상기 화합물과 관련하여, 선행 기술중 대한민국 특허공개 제10-2003-0068634호(공개일: 2003.08.25, 등록번호 제1004243940000호, 등록일: 2004.03.12) '크리스파놀 또는 파리에틴을 유효성분으로 함유하는 식물원가루병 방제 조성물'에는 크리스파놀의 방제 용도가 기재되어 있고, 대한민국 특허공개 제10-2009-0123152호(공개일: 2009.12.02, 등록번호 제1009994580000호, 등록일: 2010.12.02) '피지온 글루코피라노사이드 또는 피지온을 포함하는 조골세포 활성 촉진용 약학 조성물'에는 피지온 화합물의 조골세포 활성 촉진 용도가 기재되어 있으며, 대한민국 등록특허 제1008125960000호(등록일: 2008.03.05) '천연 유래 화합물을 포함하는 피부보호 조성물'에는 아토피 피부 치료를 위한 활성 성분의 하나로써 에모딘을 기재하고 있으나, 이들 화합물의 항암 또는 전이억제 활성에 대하여 기재한 선행기술은 아직까지 보고된 바가 없다.

특허문헌

- [0014] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 특허공개 제10-2003-0068634호
(특허문헌 0002) 2. 대한민국 특허공개 제10-2009-0123152호
(특허문헌 0003) 3. 대한민국 등록특허 제1008125960000호

발명의 내용

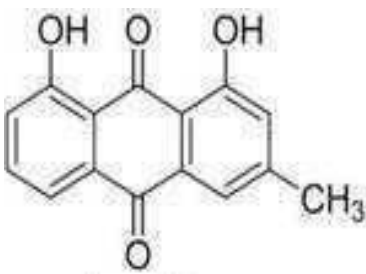
해결하려는 과제

- [0015] 본 발명의 목적은 소정의 해양 균류(marine-derived fungus)인 마이크로스포럼 종(*Microsporium* spp.)으로부터 전이 억제 활성을 갖는 천연물 유래 화합물, 보다 구체적으로는 크리소파놀, 피지온 및 에모딘을 제공하고, 이들의 생물학적 활성, 예컨대 세포 독성, 암세포 이동 및 침윤, 프로테아제 억제, 매트릭스 메탈로프로테이나아제(MMP-2 및 MMP-9) 발현 및 카텡신 억제 활성 결과를 제공하는 것이다. 또한, 상기 활성을 뒷받침하는 관련 메카니즘도 제공한다.

과제의 해결 수단

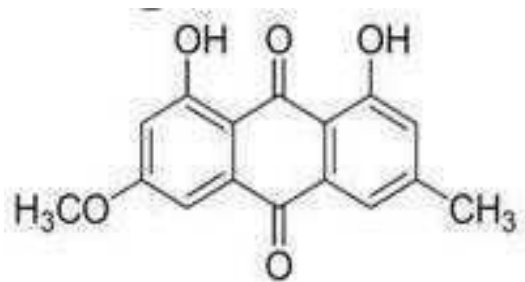
- [0016] 본 발명자들은 해양 미생물로부터 신규한 생물학적 활성의 천연물, 특히 전이억제 화합물을 제공하기 위해 해양-유래의 조류(algiculous) 균류인 마이크로스포럼 종(MFS-YL)의 생활성 구성성분에 대하여 연구하였다.
- [0017] 본 발명에 따르면, 홍조류 표면에서 분리한 마이크로스포럼 종을 실리카 겔 플래시 크로마토그래피에 의해 분획하여 총 13개의 분획물을 수득하고(도 3 참조), 옥타데실 작용기를 갖는 실리카 겔(ODS) 컬럼 크로마토그래피에 의해 각각의 분획물을 정제한 후에, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)시킴으로써 마이크로스포럼 종 추출물을 수득한다. 이어서, 일부 2차 대사물질을 분리한다. 이어서, 세포 생존도 분석 및 2D 세포 이동 어세이를 이용하여 분리 정제물에 있는 활성 화합물을 분석한 그 결과, 크리소파놀, 피지온 및 에모딘(이하, 상기 3가지 화합물을 '본 발명의 활성 화합물'이라 지칭함)으로 밝혀졌다. 이들의 수득 과정은 본원 명세서 실시예에 보다 상세히 기재되어 있다. 이들 활성 화합물의 화학식 및 구조식의 결정은 EI-MS 스펙트럼, 1D 및 2D NMR 및 분광분석을 비롯한 종합 분석에 근거한 것이며, 상기 크리소파놀(화학식 1), 피지온(화학식 2) 및 에모딘(화학식 3)의 구조식, EI-MS 스펙트럼 및 분광분석 결과는 하기와 같다:

화학식 1



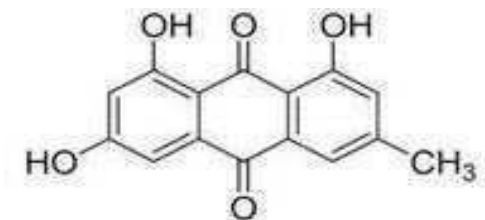
[0018]

화학식 2



[0019]

화학식 3



[0020]

[0021] 화합물 1: (크리소파놀 12.0 mg): 황색 결정질 화합물, EI-MS m/z: 254 [M]⁺.

[0022] ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 12.05 (1H, s, -OH), 11.93 (1H, s, -OH), 7.72 (1H, dd, J = 8.4, 7.6 Hz, H-6), 7.61 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-5), 7.55 (1H, d, J = 0.8 Hz, H-4), 7.22 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-7), 7.01 (1H, d, J = 0.8 Hz, H-2), 2.34 (3H, s, -CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 192.5 (C-9), 181.9 (C-10), 162.7 (C-8), 162.4 (C-1), 149.3 (C-3), 136.9 (C-6), 133.6 (C-10a), 133.2 (C-4a), 124.5 (C-2), 123.4 (C-7), 121.3 (C-4), 119.9 (C-5), 115.8 (C-8a), 113.7 (C-9a), 22.2 (-CH₃).

[0023] 문헌[Yang et al., 1998; Li et al., 2000; Karlina et al., 2006 Guo et al., 2011]에 기재된 데이터와의 비교로부터, 화합물 1은 크리소파놀이다.

[0024] 화합물 2: (피지온 10.0 mg): 황색 결정질 화합물, EI-MS m/z: 284 [M]⁺.

[0025] ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 12.31 (1H, s, -OH), 12.11 (1H, s, -OH), 7.62 (1H, br s, H-4), 7.36 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-5), 7.08 (1H, br s, H-2), 6.69 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-7), 3.94 (3H, s, -OCH₃), 2.47 (3H, s, -CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 190.8 (C-9), 182.0 (C-10), 166.5 (C-8), 165.2 (C-1), 162.5 (C-6), 148.5 (C-3), 135.2 (C-10a), 133.2 (C-4a), 124.5 (C-4), 121.3 (C-2), 113.7 (C-9a), 110.2 (C-8a), 108.2 (C-5), 106.8 (C-7), 56.1 (-OCH₃), 22.2 (-CH₃).

[0026] 문헌[Yang et al., 1998; Li et al., 2000; Guo et al., 2011]에 기재된 데이터와의 비교에 의해 화합물 2는 피지온으로 밝혀졌다.

[0027] 화합물 3: (에모딘 7.0 mg): 오렌지색 결정질 화합물, EI-MS m/z: 270 [M]⁺.

[0028] ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 7.50 (1H, d, J = 1.4 Hz, H-4), 7.04 (1H, d, J = 1.4 Hz, H-2), 7.03 (1H, d, J

= 2.4 Hz, H-5), 6.29 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-7), 2.40 (3H, s, CH₃-11); ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 189.5 (C-9), 184.7 (C-10), 176.4 (C-8), 167.6 (C-1), 163.3 (C-6), 148.2 (C-3), 136.4 (C-10a), 134.9 (C-4a), 125.0 (C-4), 121.3 (C-2), 115.5(C-9a), 115.2 (C-5), 110.1(C-8a), 107.3(C-7), 22.1(C-11).

[0029] 문헌[Yang et al., 1998; Li et al., 2000; Guo et al., 2011]에 기재된 데이터와 비교할 때, 화합물은 3에 모딘이다.

[0030] 본 발명의 활성 화합물은 100 μM 미만에서는 HT1080 세포 생존도에 대하여 유의한 영향을 나타내지 않으나, 보다 높은 농도(예컨대, 100 μM 및 200 μM)에서는 상대 세포생존도를 감소시키고, 시간 의존적인 방식으로 세포 생존도에 영향을 준다.

[0031] 또한, 본 발명의 활성 화합물의 활성은 MMP-2 및 MMP-9 발현, 세포독성 및 세포 이동, 침윤성, 세포 형태를 연구함으로써 결정된다. 또한, 본 발명의 활성 화합물의 MMP-2 및 MMP-9 조절 메커니즘도 제공된다. 또한, 본 발명의 활성 화합물의 카텡신 B, D 및 L의 mRNA 전사 및 단백질 발현에 대한 영향은 MCF-7 세포를 이용한 RT-PCR 및 웨스턴 블롯에 의해 평가한다. 또한, 본 발명의 활성 화합물의 카텡신 B, D 효소 활성 직접 조절능은 카텡신 B, D 어레이 키트를 통해 증명한다.

[0032] 본 발명의 활성 화합물은 다음과 같이 MMP-2 및 MMP-9 발현을 억제한다: AKT 인산화를 강하게 억제하고, TNF-α 처리 후에 HT1080 세포에서 IκBα-인산화 및 p65 핵 전좌(translocation) 둘다를 농도 의존적으로 억제한다. 본 발명의 활성 화합물은 TNF-α 처리 후에 HT1080 세포에서 TIMP-1 및 -2 발현을 하향 조절하고 RECK 발현을 상향 조절한다.

[0033] 본 발명의 활성 화합물에 의한 처리는 HT1080 세포 이동 및 침윤을 처리량 의존적인 방식으로 감소시키고, 본 발명의 활성 화합물의 높은 농도(예컨대, 50 μM) 처리는 HT1080 세포 이동을 유의하게 감소시키고 세포 침윤을 완전히 차단시킨다. 3D 배양 환경에서, HT1080 세포 브랜치(cell branch)는 본 발명의 활성 화합물 처리 후에 감소하고, 본 발명의 활성 화합물의 농도가 50 μM까지 증가할 때에 상기 브랜치는 사라지고 세포는 구형으로 변한다. 본 발명의 활성 화합물의 동일 농도인 경우에 에모딘이 가장 우수한 억제 효과를 나타낸다.

[0034] 또한, 본 발명의 활성 화합물의 카텡신(cathepsin) B, D 및 L mRNA 전사 및 단백질 발현에 대한 영향을 MCF-7 세포주에서 연구한 결과, 본 발명의 활성 화합물 처리시에 카텡신 B 및 L mRNA 및 단백질 수준이 MCF-7 세포에서 유의하게 상향조절된다.

[0035] 특히, 본 발명의 활성 화합물은 카텡신 B 효소 활성을 직접 억제하지 않고도 mRNA 및 단백질 수준에서 카텡신 B 및 L을 억제할 수 있는데, 이는 본 발명의 활성 화합물이 암세포의 이동, 침윤 및 전이를 억제할 수 있음을 의미한다.

[0036] 다만, 카텡신 D의 mRNA 및 단백질 수준은, 카텡신 B 및 L과 달리, 본 발명의 활성 화합물 처리에 의해 현저히 변경되지는 않으며, 카텡신 B 및 카텡신 D 효소 활성은 시판용 형광 카텡신 B 및 카텡신 D 어레이 키트를 사용한 본 발명의 활성 화합물의 시험 농도에서 유의하게 영향을 받지 않는다.

[0037] 카텡신 D는 마크로파지 염증 단백질 (MIP: macrophage inflammatory protein)-1α, MIP-1β 및 2차 림프조직 케모카인을 선택적으로 분해(digestion)하는데, 이는 카텡신 D가 항종양 면역 반응을 감소시킬 수 있음을 의미한다. 본 발명의 활성 화합물은 카텡신 D 효소 활성 및 mRNA 전사 및 단백질 발현에 영향을 주지 않는다.

[0038] 또한, 본 발명의 활성 화합물은 MCF-7 세포 이동을 억제할 수 있으며, 동일 농도에서 에모딘은 크리소파놀 및 피지온보다 큰 활성을 나타낸다. HT1080 세포에 비해, MCF-7 세포는 공격적인 이동 특징을 보이지 않았고, 일정 시간 후에 MCF-7 세포 이동은 HT1080 세포보다 명백하게 적는데, 이는 MCF-7 세포에서 MMP-2 및 MMP-9의 발현 부족에 기인한 것일 수 있다.

[0039] 본 발명의 활성 화합물은 암 세포에서 MMP-2/-9 및 카텡신 B/L을 억제함으로써 암전이 억제 효과를 갖는다.

[0040] 본원에서 정의되는 '건강식품'은 건강기능식품에 관한 법률 제 6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미한다.

[0041] 또한, 본원에서 정의되는 '유효성분'이라 함은 내재된 약리작용에 의해 그 의약품의 효능 및 효과를 직접 또는 간접적으로 발현한다고 기대되는 물질 또는 물질군(약리학적 활성성분 등이 밝혀지지 않은 생약 등을 포함함

다)으로서 주성분을 포함하는 것을 의미한다.

[0042] 본 발명의 활성 화합물, 즉, 크리소파놀, 피지온 또는 에모딘을 건강식품으로 사용할 경우, 상기 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0043] 본 발명에 따른 건강식품용 조성물은 본 발명의 활성 화합물 이외에 식품 제조 시 허용 가능성 첨가물을 혼합하거나, 기타 활성성분을 포함하여 당업자에게 자명한 통상의 형태(과자, 음료 등)로 제공될 수 있다.

발명의 효과

[0044] 본 발명에 따르면, 홍조류에서 유래된 크리소파놀, 피지온 및 에모딘은 암 전이 억제 활성을 가지므로, 항암 보조용 기능성 건강식품 조성물로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0045] 도 1은 해양 균주인 마이크로스포럼 종(Microsporium sp.)의 형태를 나타낸 사진이다.
- 도 2는 마이크로스포럼 균주(MFS-YL)로부터 전이억제 화합물을 추출하는 과정을 개략적으로 나타낸 것이다.
- 도 3은 마이크로스포럼 균주 추출물로부터 화합물 1 내지 4를 분리하는 과정을 개략적으로 나타낸 것이다.
- 도 4는 마이크로스포럼 종 추출물에서 분리된 분획물 F6 내지 F13의 HT1080 세포 생존도 영향을 나타낸 그래프이며, 상대 세포 생존도는 대조군(1% DMSO) 대비 계산하였다.
- 도 5는 HT1080 세포 생존도에 대한 상이한 농도의 크리소파놀의 세포독성 영향을 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 HT1080 세포 생존도에 대한 상이한 농도의 피지온의 세포독성 영향을 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 HT1080 세포 생존도에 대한 상이한 농도의 에모딘의 세포독성 영향을 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 HT1080 세포 이동에 대한 크리소파놀의 영향을 나타낸 이미지이다.
- 도 9는 HT1080 세포 이동에 대한 피지온의 영향을 나타낸 이미지이다.
- 도 10은 HT1080 세포 이동에 대한 에모딘의 영향을 나타낸 이미지이다.
- 도 11은 HT1080 세포 침윤에 대한 크리소파놀의 영향을 나타낸 이미지이다.
- 도 12는 HT1080 세포 침윤에 대한 피지온의 영향을 나타낸 이미지이다.
- 도 13은 HT1080 세포 침윤에 대한 에모딘의 영향을 나타낸 이미지이다.
- 도 14는 3D 배양 시스템에서 HT1080 세포 형태에 대한 크리소파놀의 영향을 나타낸 이미지이다.
- 도 15는 3D 배양 시스템에서 HT1080 세포 형태에 대한 피지온의 영향을 나타낸 이미지이다.
- 도 16은 3D 배양 시스템에서 HT1080 세포 형태에 대한 에모딘의 영향을 나타낸 이미지이다.
- 도 17은 크리소파놀의 MMP-2 및 -9 효소 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 18은 피지온의 MMP-2 및 -9 효소 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 19는 에모딘의 MMP-2 및 -9 효소 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 20은 HT1080 세포에서 MMP-2 및 -9의 TNF- α -유도 단백질 발현에 대한 크리소파놀 영향을 자이모그래피 분석한 이미지이다.
- 도 21은 HT1080 세포에서 MMP-2 및 -9의 TNF- α -유도 단백질 발현에 대한 피지온 영향을 자이모그래피 분석한 이미지이다.
- 도 22는 HT1080 세포에서 MMP-2 및 -9의 TNF- α -유도 단백질 발현에 대한 에모딘 영향을 자이모그래피 분석한 이미지이다.

도 23은 HT1080 세포에서 MMP-2 및 -9 mRNA 전사에 대한 크리소파놀의 억제 효과를 나타낸 이미지이며, 여기에서 GAPDH mRNA 발현 수준은 cDNA 합성에 사용된 동량의 RNA를 확인하기 위해 사용되었다.

도 24는 HT1080 세포에서 MMP-2 및 -9 mRNA 전사에 대한 피지온의 억제 효과를 나타낸 이미지이며, 여기에서 GAPDH mRNA 발현 수준은 cDNA 합성에 사용된 동량의 RNA를 확인하기 위해 사용되었다.

도 25는 HT1080 세포에서 MMP-2 및 -9 mRNA 전사에 대한 에모딘의 억제 효과를 나타낸 이미지이며, 여기에서 GAPDH mRNA 발현 수준은 cDNA 합성에 사용된 동량의 RNA를 확인하기 위해 사용되었다.

도 26은 HT1080 세포에서 MMP-2 및 -9의 TNF- α -유도 단백질 발현에 대한 크리소파놀 영향을 나타낸 이미지이며, 여기에서 β -액틴은 내부 대조군으로 사용되었다.

도 27은 HT1080 세포에서 MMP-2 및 -9의 TNF- α -유도 단백질 발현에 대한 피지온 영향을 나타낸 이미지이며, 여기에서 β -액틴은 내부 대조군으로 사용되었다.

도 28은 HT1080 세포에서 MMP-2 및 -9의 TNF- α -유도 단백질 발현에 대한 에모딘 영향을 나타낸 이미지이며, 여기에서 β -액틴은 내부 대조군으로 사용되었다.

도 29는 TNF- α -유도된 HT1080 세포에서 NF- κ B 신호화 경로에 대한 크리소파놀 억제 효과를 나타낸 것으로, 도 29a는 TNF- α -유도된 AKT 인산화에 대한 크리소파놀 억제 효과를 나타낸 것이고, 도 29b는 TNF- α -유도된 p65 핵 전화 및 I κ B α 분해에 대한 크리소파놀 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 30은 TNF- α -유도된 HT1080 세포에서 ERK, JNK, p38 인산화 및 AP-1 신호화 경로에 대한 크리소파놀 효과를 나타낸 것이다.

도 31은 HT1080 세포에서 RECK, 그리고 TIMP-1 및 -2의 TNF- α -유도된 단백질 발현에 대한 크리소파놀 효과를 나타낸 것이다.

도 32는 TNF- α -유도된 HT1080 세포에서 NF- κ B 신호화 경로에 대한 피지온 억제 효과를 나타낸 것으로, 도 32a는 TNF- α -유도된 AKT 인산화에 대한 피지온 억제 효과를 나타낸 것이고, 도 32b는 TNF- α -유도된 p65 핵 전화 및 I κ B α 분해에 대한 피지온 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 33은 TNF- α -유도된 HT1080 세포에서 ERK, JNK, p38 인산화 및 AP-1 신호화 경로에 대한 피지온 효과를 나타낸 것이다.

도 34는 HT1080 세포에서 RECK, 그리고 TIMP-1 및 -2의 TNF- α -유도된 단백질 발현에 대한 피지온 효과를 나타낸 것이다.

도 35는 TNF- α -유도된 HT1080 세포에서 NF- κ B 신호화 경로에 대한 에모딘 억제 효과를 나타낸 것으로, 도 35a는 TNF- α -유도된 AKT 인산화에 대한 에모딘 억제 효과를 나타낸 것이고, 도 35b는 TNF- α -유도된 p65 핵 전화 및 I κ B α 분해에 대한 에모딘 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 36은 TNF- α -유도된 HT1080 세포에서 ERK, JNK, p38 인산화 및 AP-1 신호화 경로에 대한 에모딘 효과를 나타낸 것이다.

도 37은 HT1080 세포에서 RECK, 그리고 TIMP-1 및 -2의 TNF- α -유도된 단백질 발현에 대한 에모딘 효과를 나타낸 것이다.

도 38은 MCF-7 세포에 대한 크리소파놀, 피지온 및 에모딘의 세포독성 효과를 나타낸 그래프이다.

도 39는 MCF-7 세포 이동에 대한 크리소파놀, 피지온 및 에모딘의 영향을 나타낸 이미지이다.

도 40은 카텡신 B 및 D에 대한 크리소파놀 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

도 41은 카텡신 B 및 D에 대한 피지온 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

도 42는 카텡신 B 및 D에 대한 에모딘 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

도 43은 MCF-7 세포에서 카텡신 B, D 및 L 전사에 대한 크리소파놀 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 44는 MCF-7 세포에서 카텡신 B, D 및 L 전사에 대한 피지온 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 45는 MCF-7 세포에서 카텡신 B, D 및 L 전사에 대한 에모딘 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 46은 MCF-7 세포에서 카텡신 B, D 및 L의 단백질 발현에 대한 크리스파놀 영향을 나타낸 것이다.

도 47은 MCF-7 세포에서 카텡신 B, D 및 L의 단백질 발현에 대한 퍼지온 영향을 나타낸 것이다.

도 48은 MCF-7 세포에서 카텡신 B, D 및 L의 단백질 발현에 대한 에모딘 영향을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 본 발명은 하기 실시예에 의해 보다 구체적으로 설명되지만, 이는 예시를 위한 것이며, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 의해 한정되지 않음이 당업자에게 명백히 이해될 것이다.

재료 및 장비

[0048] ^1H NMR (400 MHz) 및 ^{13}C NMR (100 MHz) 스펙트럼은 다이메틸 설펡사이드-d6 (DMSO-d6) 용매 피크(^1H 에서 2.50 ppm, ^{13}C NMR에서 39.5 ppm)를 내부 표준 물질로 사용하여 JEOL JNM-ECP 400 NMR 분광계 (JEOL, 일본 소재)에 기록하였다. 일부 시그널의 경우에는 화합물 이동(chemical shift)을 소수점 셋째 자리까지 근사치를 구하였다. 이는 육안 만으로는 스펙트럼 구분이 명확하지 않은, 매우 근접한 수치의 시그널을 구별하기 위함이다. EI-MS 스펙트럼은 JEOL JMS-700 분광계(JEOL, 일본 소재)에서 얻었다. 추출 유닛(동원 과학 주식회사, 대한민국)을 이용하여 MFS-YL 추출을 실시하였다. 증발기로는 Rotavapor(등록상표) II (BUCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland)을 사용하였다. 컬럼 크로마토그래피는 실리카 겔 60(230 내지 400 메시, 머크(Merck), 독일 소재), YMC*GEL ODS-A 12nm S-150um (YMC Co. Ltd, 일본 소재)에서 실시하였다. 박층 크로마토그래피(TLC)는 예비코팅된 Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ plates (0.25 mm)에서 실시하고, TLC 플레이트 상의 스폿(spot)은 UV 램프(254 및 365 nm) 하에서 검출하였다. UltiMate(등록상표) 3000 Rapid Separation LC (Dionex Co. 미국 소재)을 사용하여 화합물을 분리하였다. NMR 용매: DMSO-d6, CD₃OD (Cambridge Isotope laboratories, Inc. 중수소도 99.9%); CDCl₃ (Aldrich, 중수소도 99.8%), 유기 용매: *n*-헥산, EtOAc, CHCl₃, CH₂Cl₂, MeOH, EtOH, 아세톤, (Duksan Pure Chemical, 99.5%). 착색제: Se(SO₄)₂ (Sigma), 배양 배지: soytone (Acuamedia), 가용성 전분 (Duksan Pure Chemicals), 한천 분말 (Duksan Pure Chemical), *D*-만니톨 (Sigma, 98%), 효모 추출물 (Acuamedia), 펩톤(Acuamedia), *D*-(+)-글루코오스 (Yakuri), 글리세롤 (Sigma, 99%), 페니실린 G (Sigma)를 사용하였다.

[0049] 섬유육종 세포 (HT1080), 인간 유방암 세포(MCF-7 인간 유방암 세포)는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection:ATCC)에서 입수하였다.

세포 배양

[0051] 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection:ATCC)에서 입수한 인간 섬유육종 세포 (HT1080)는 가슴 배양기 중에서 5% CO₂ 하에 37℃에서 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum: FBS, 킵코, 미국 뉴욕 소재), 100 U/mL 페니실린, 100 mg/mL 스트렙토마이신으로 보충된 돌베코 변형 이글 배지(DMEM: 킵코, 미국 뉴욕 소재)에서 통상적으로 증식시켰다. 실험을 위해, 세포는 5회 이상 계대배양하고, 트립신-에틸렌 다이아민 테트라아세트산(트립신-EDTA)으로 분리하였다.

[0052] ATCC에서 입수한 MCF-7 인간 유방암 세포는 가슴 배양기 중에서 5% CO₂ 하에 37℃에서 10% 소태아 혈청(킵코, 미국 뉴욕 소재), 100 U/mL 페니실린, 100 mg/mL 스트렙토마이신으로 보충된 돌베코 변형 이글 배지(킵코, 미국 뉴욕 소재)에서 통상적으로 증식시켰다. 실험을 위해, 세포는 5회 이상 계대배양하고, 트립신-에틸렌 다이아민 테트라아세트산(트립신-EDTA)으로 분리하였다.

제조예 1: 추출물의 제조

[0054] 마이크로스포럼 중 균주(MFS-YL)는 2009년 대한민국 포항시 남구 구룡포에서 채집한 홍조류 표면에서 분리하고, 0.5% 효모 추출물, 0.5% 펩톤, 1% 글루코오스, 60% 해수(YPG)에서 25℃, pH 7.6으로 30일동안 배양(20 l)하고, 10% 글리세롤 YPG 배지에서 -75℃로 보관하였다. 연구를 위한 추가 배양은 20 mL 내지 대규모 스케일(1 l)의 YPG 배지 상에서 완료하였다. 상기 균류는 YPG 배지에서 pH 7.6으로 25℃로 30일동안

배양(20 l)하였다(도 2 참조). 배양된 균주는 세포 지방산 조성의 기체 크로마토그래피 결과에 근거할 때, 마이크로스포럼 종으로 확인되었다(대한민국 서울 소재의 한국 미생물 보존센터, 유사 지수 0.62). 액체 배지 및 균사체를 분리하고, 분리한 액체 배지 및 균사체를 에틸 아세테이트로 추출하여서 액체배지 추출물(MFS-YL B, 1550 mg) 및 균사체 추출물(MFS-YL M, 930 mg) 각각을 제공하였다. 추출물 둘다를 합하고, 전체 추출물(2480 mg)을 실리카 겔 플래시 크로마토그래피(n-헥산:EtOAc 및 CHCl₃: MeOH)로 분획하여서, 활성 화합물을 함유하는 F1 내지 F13의 13개 분획물을 수득하였다.

[0055] 실험예 1: 활성 화합물을 함유한 분획물의 결정 실험

[0056] 세포 생존도 어세이

[0057] HT1080 세포는 10% FBS를 함유하는 200 μ L중 5×10^4 세포/웰 밀도로 96-웰 플레이트에 씨딩(seeding)하였다. 씨딩한지 24시간 후에 배지를 제거하고, 세포를 인산염 완충액(PBS)으로 세척하고, 1% DMSO에 용해된 고 농도(50 μ g/mL) 또는 저 농도(10 μ g/mL)의 분획물 6 내지 13의 존재하에 또는 부재하에 DMEM와 함께 36시간동안 배양하고, 1% DMSO를 용매 대조군으로 하였다. 36 시간 후에, 3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸륨 브로마이드 (MTT) 용액 100 μ L를 각각의 웰에 첨가하고, 5% CO₂ 하에서 37°C로 4시간 더 배양하였다. 배지를 제거한 후에 DMSO 100 μ L를 첨가하여서 형성된 포르마잔 염을 용해시켰다. GENios(등록상표) 마이크로플레이트 리더(Tecan Austria GmbH, Austria)에 의해 540 nm 파장에서 광학 밀도(OD)를 측정하여 포르마잔 염의 양을 결정하였다. 상대 세포 생존도는 대조군(1% DMSO) 대비 계산하였다. 데이터는 3회 이상의 독자적인 실험의 평균 $\pm$ SD로 표기하였다.

[0058] 그 결과, 상대 세포 생존도는 F6 내지 F9의 각 분획물의 고 농도(50 μ g/mL) 및 저 농도(10 μ g/mL) 둘다에서 유의하게 영향을 받지 않았다. 그러나, 저 농도 및 고 농도의 F10 내지 F13 분획물은 상대 세포 생존도(대조군 대비 백분율)를 감소시킨 것으로 나타났다(도 4 참조).

[0059] 상처 치유 어세이에 의한 세포 이동에 대한 분획물의 영향

[0060] The Culture-Inserts (Ibidi GmbH, 독일 소재)를 이용하여서 세포 이동에 대한 분획물 영향을 평가하였다.

[0061] 10% FBS, 100 U/mL 페니실린, 100 mg/mL 스트렙토마이신으로 보충된 DMEM에 의해 5×10^5 세포/mL의 HT1080 세포 현탁액을 제조하였다. 70 μ L 세포 현탁액을 각 인서트 웰(insert well)에 적용하였다. 세포 분포가 불균질해지는 것을 막기 위해 상기 웰이 흔들리지 않도록 하였다. 세포를 37°C 및 5% CO₂에서 배양하였다. 살균 핀셋을 이용하여 적절한 세포 부착물(24시간)을 조심스럽게 제거한 후에, 사용한 웰을 세포 및 0.2% BSA를 포함한 무혈청 배지에 채웠다. 1% DMSO에 용해된 분획물 F6 내지 F13의 고 농도(F6 내지 F9: 50 μ g/mL) 또는 저 농도(F10 내지 F13: 10 μ g/mL)의 존재하에 또는 그 부재하에 세포가 36시간동안 각각 이동하도록 하고, 1% DMSO를 용매 대조군으로 사용하였다. 즉시(0 hr), 그리고 36시간 후에(36hr) 나머지 갭(remaining gap)의 사진을 촬영하고, 100 x 현미경(Leica Microsystems Wetzlar GmbH, 독일 소재)으로 관찰한 결과, F8과 F9는 세포 이동을 억제하는 것으로 나타났는데, F9가 F8에 비해 보다 강하게 억제하였다. F10 내지 F13 분획물 전부는 세포 이동의 억제 효과를 나타내었으나, F12 및 F13 군에서는 세포 양이 감소한 것으로 관측되었는데, 시험 농도에서 F12 및 F13은 HT1080 세포에서 세포독성을 나타낸 바 있다. 이에 근거하여, F9 내지 F11 분획물을 ODS 컬럼 크로마토그래피로 20ml 시험관에 H₂O : MeOH=1: 5 을 흘려서 3, 4번째에서 유의물질들을 확인한 후 이들로부터 HPLC (YMC ODS-A, MeOH)을 실시하여서 각각의 순수분리물을 최종 정제하였으며, 이로부터 크리스파놀, 피지온 및 에모딘 화합물이 확인되었다.

[0062] 실험예 2: HT1080 세포를 이용한 크리스파놀, 피지온 및 에모딘의 활성 실험

[0063] 세포 생존도(MTT) 어세이

[0064] 크리스파놀, 피지온 및 에모딘이 시험 농도에서 HT1080 세포에 대하여 임의의 독성 효과를 갖는지를 결정하기 위해서 세포 생존도 어세이를 실험하였다.

[0065] HT1080 세포는 10% FBS를 함유하는 200 μ L중 5×10^4 세포/웰 밀도로 96-웰 플레이트에 씨딩(seeding)하였다. 씨딩한지 24시간 후에 배지를 제거하고, 세포를 인산염 완충액(PBS)으로 세척하고, 1% DMSO에 용해된 상이한 농도(0 내지 200 μ M)의 크리소파놀, 피지온 및 에모딘의 존재하에 또는 부재하에 FBS-비함유 배지와 함께 24시간 또는 48시간동안 배양하였다. 24시간 또는 48시간 후에, 3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸륨 브로마이드 (MTT, 0.5 mg/mL 최종 농도) 용액 100 μ L를 각각의 웰에 첨가하고, 5% CO₂ 하에 37°C로 4시간 더 배양하였다. 배지를 제거한 후에 DMSO 100 μ L를 첨가하여, 형성된 포르마잔 염을 용해시켰다. GENios(등록상표) 마이크로플레이트 리더(Tecan Austria GmbH, Austria)에 의해 540 nm 파장에서 광학 밀도(OD)를 측정하여 포르마잔 염의 양을 결정하였다. 상대 세포 생존도는 대조군(1% DMSO를 함유하는 배지에서 증식된 세포) 대비 계산하였다. 데이터는 3회 이상의 독자적인 실험의 평균 $\pm$ SD로 표기하였다.

[0066] 그 결과, 모든 농도에 대한 얻어진 값은 대조군(1% DMSO)과 유사하였으며, 이는 크리소파놀, 피지온 및 에모딘이 HT1080 세포에서 유사한 세포독성 효과를 가짐을 나타낸다. 이들 화합물은 100 μ M 미만에서는 세포 생존도에 대하여 유의한 효과를 나타내지 않았으나, 고 농도(100 μ M 및 200 μ M)에서는 감소된 상대 세포 생존도(대조군 대비 백분율)를 나타내었다. 또한, 크리소파놀, 피지온 및 에모딘의 처리 이후에 세포 생존도는 시간 의존적으로 하향 조절되는 것으로 관찰되었다(도 5 내지 7 참조).

[0067] 상처 치유 어세이

[0068] 상처 치유 어세이를 위해 The Culture-Inserts(Ibidi GmbH, Germany)를 이용하였다. 5% 열-불활성화 FBS, 100 U/mL 페니실린, 100 mg/mL 스트렙토마이신으로 보충된 DMEM에 의해 5×10^5 세포/mL의 HT1080 세포 현탁액을 제조하였으며, 이는 24시간 이내에 confluent layer를 형성하였다. 각각의 인서트 웰에 70 μ L 세포 현탁액을 적용하였다. 세포 분포가 불균질해질 수 있으므로 흔들리지 않도록 하였다. 37°C 및 5% CO₂에서 배양하였다. 살균 핀셋을 이용하여 적절한 세포 부착물(24시간)을 조심스럽게 제거한 후에, 사용한 웰을 세포 및 0.2% BSA를 포함한 무혈청 배지에 채웠다. 1% DMSO에 용해된 크리소파놀, 피지온 및 에모딘의 상이한 농도(5 μ M, 10 μ M, 50 μ M)의 존재하에 또는 그 부재하에 세포가 이동하도록 하였다. 0.2% BSA 및 1% DMSO를 함유하는 배지에서 증식된 세포를 대조군으로 하였다. 즉시, 그리고 36시간 후에 나머지 갭(remaining gap)의 사진을 촬영하고, 100 x 현미경(Leica Microsystems Wetzlar GmbH, 독일 소재)으로 관찰하였다.

[0069] 그 결과, 크리소파놀, 피지온 및 에모딘 처리는 세포 이동을 처리량 의존적인 방식으로 감소시키고, 50 μ M의 크리소파놀, 피지온 및 에모딘은 HT1080 세포 이동을 유의하게 블로킹한 것으로 나타났다. 이들 3개 화합물 중에서, 에모딘이 동일 농도에서 다른 화합물보다 우수한 억제 효과를 나타내었다(도 8 내지 10 참조).

[0070] 시험관내 침윤 어세이

[0071] BD Matrigel(상표명) Basement Membrane Matrix (BD, Franklin Lakes, USA제)의 500 μ g/mL으로 코팅된 폴리비닐피롤리돈-비함유 폴리카보네이트 필터를 이용하여 트랜스웰 웰 챔버에 놓인 24-웰 트랜스웰 유닛(8 μ m 세공 크기)에 의해 시험관내 침윤 어세이를 실시하였다. 코팅된 필터를 PBS에서 완전히 세척하고, 사용 직전에 건조하였다. 세포를 침윤 챔버의 상부 구획에 놓고, 8시간동안 세포 부착되도록 한 후에, 1% DMSO에 용해된 상이한 농도(5 μ M, 10 μ M, 50 μ M)의 크리소파놀, 피지온 및 에모딘의 존재하에 또는 부재하에 0.2% BSA를 함유하는 FBS-비함유 배지에서 36시간동안 37°C로 5% CO₂에서 배양하였다. 0.2% BSA 및 1% DMSO를 함유하는 배지에서 증식된 세포를 대조군으로 하였다. 침윤 챔버의 하부 구획에는 10% FBS를 함유한 DMEM을 제공하였다. 배양 이후에, 필터 인서트를 상기 웰에서 제거하고, 면봉을 이용하여 필터 상부 측면의 세포를 제거하였다. 멤브레인의 하부 표면으로 침윤된 세포를 메탄올로 고정하고, 0.5% 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 10분동안 착색시켰다. 최종적으로, Leica DM6000B 현미경(Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany)을 이용하여 100 x 배율로 필터의 하부 측면으로 이동된 세포를 계수하여서 침윤성 표현형을 결정하였다. 조건에 따라 3가지 침윤 챔버를 이용하였다. 3개 필터로부터 3 이상의 명시야(bright field)에서의 세포 수의 평균값을 구하였다.

[0072] 그 결과, 크리소파놀, 피지온 및 에모딘 처리는 HT1080 세포 침윤을 처리량 의존적인 방식으로 감소시켰으며, 고 농도(50 μ M)의 크리소파놀, 피지온 및 에모딘은 HT1080 세포 침윤을 완전히 블로킹하는 것으로 나타났다(도 11 내지 도 13).

[0073] 3차원(3D) 배양에서 세포 형태

[0074] 3D 배양 시스템에서의 세포 형태 및 형태는 2D 시스템에서 관찰되는 것과 매우 상이하다. 3D 배양 모델은 문헌 [Mayer and Gustafson, 2000; Edelman and Keefer, 2005]에 DRLWO된 바와 같이 설정하였다. 즉, HT1080 세포 (1.5×10^3)를 BD Matrigel(상표명)Basement Membrane Matrix 및 즉, HT1080 세포(1.5×10^3)를 BD Matrigel (상표명)Basement Membrane Matrix 및 0.2% BSA를 함유한 5배 농축된 FBS-비함유 DMEM의 200 μ L/ml)와 함께 현탁시켰다.

[0075] 1% DMSO에 용해된 상이한 농도의 크리소파놀, 피지온 및 에모딘의 존재하에 또는 그 부재하에서 상기 세포 현탁액을 24-웰 플레이트에 첨가하고, 겔화될 때까지 37°C로 유지하였다. 0.2% 및 1% DMSO를 함유하는 배지에서 증식된 세포를 대조군으로 하였다. 이어서, 상기 플레이트를 36시간동안 37°C에서 배양하였다. 그 결과를 현미경(Leica Microsystems Wetzlar GmbH, 독일 소재)으로 100 x 배율로 관찰하였다.

[0076] 36시간 후에, 대조군(1% DMSO)으로 처리한 HT1080 세포는 3D 배양 환경에서 성상(stellate) 구조물을 형성하였고, 이들 구조물은 ECM(Extracellular Matrix)을 절단하는 MMP에 의해 콜라겐 매트릭스로 이동하였다. 이와 대조적으로, 크리소파놀, 피지온 및 에모딘-처리 세포에서는 분지체가 감소하였다. 상기 농도가 50 μ M에 이를 때, 이들 분지체는 사라졌으며, 세포는 구형 형상으로 변하였다. 상처 치유 어세이 결과와 유사하게, 크리소파놀 및 피지온에 비해 동일 농도의 에모딘이 보다 우수한 억제 효과를 나타내었다(도 14 내지 도 16 참조).

[0077] MMP-2 및 -9 효소 억제 어세이

[0078] MMP-2 및 MMP-9의 상대 효소 활성을 시판되는 MMP-2 및 MMP-9 어세이 키트(SensoLyte(등록상표) 490 MMP-2 Assay Kit *Fluorimetric*, SensoLyte(등록상표) 490 MMP-9 Assay Kit *Fluorimetric*)를 제조업체 프로토콜에 따라 사용하여 실시하였다. 즉, MMP-2 및 -9 효소를 함유하는 어세이 완충용액 50 μ L은 흑색 평V판의 96-웰에서 1mM 4-아미노페닐머큐릭 아세테이트(APMA)에 의해 활성화시켰다. 이어서, 1% DMSO에 용해된 상이한 농도의 크리소파놀, 피지온 및 에모딘으로 15분동안 37°C로 처리하였다. 대조군은 1% DMSO를 함유하는 배지에서 증식된 세포로 하였다. 이어서, MMP-2 또는 -9 기질 용액 50 μ L을 첨가하고, 상기 플레이트를 30 내지 60초동안 조심스럽게 진탕하여서 완전히 혼합시키고, 암실에서 1시간동안 37°C로 배양하였다. 최종적으로, 정지 용액(stop solution) 50 μ L을 첨가하고, 형광 강도(Ex/Em = 340 $\pm$ 30 nm/490 $\pm$ 30 nm)를 GENios(등록상표) microplate reader (Tecan Austria GmbH, 오스트리아)로 측정하였다. 각각의 수치는 3회 반복 실험의 평균값 $\pm$ SD로 표기하였다.

[0079] 크리소파놀, 피지온 및 에모딘은 MMP-2 및 -9에 대한 유의한 억제 효과를 나타나지 않았다. 에모딘은 100 μ M에서의 크리소파놀 및 피지온에 비해 약한 MMP-2 및 -9 억제 활성을 나타내었는데, 이러한 결과는 크리소파놀, 피지온 및 에모딘이 시험 농도에서 MMP-2 및 -9 활성을 직접적인 억제하지 않음을 나타낸다. 또한, 크리소파놀, 피지온 및 에모딘은 MMP의 직접 억제 효과로 인해 HT1080 전이를 감소시키지 않는 것으로 판단할 수 있다(도 17 내지 도 19).

[0080] 전체 단백질 농도의 측정

[0081] 로우리(Lowry) 방법을 이용한 단백질 함량의 측정: 세포 용해물(cell lysate)의 전체 단백질은 표준물로 소혈청을 이용하여 Peterson (1977)에 의해 변형된 로우리 방법(1951)에 따라 측정하였다. 본 단백질 농도 측정 결과는 하기 젤라틴 자이모그래피와 웨스턴 블롯에서 세포의 단백질을 녹여 이들의 농도를 측정하는데 이용되었다.

[0082] 젤라틴 자이모그래피(Gelatin Zymography)

[0083] 젤라틴 자이모그래피의 경우, HT1080 세포는 무혈청 배지를 이용하여 24-웰 플레이트에 씨딩하고, 1% DMSO에 용해된 상이한 농도의 크리소파놀, 피지온 및 에모딘으로 1시간동안 전처리하였다. 1% DMSO를 함유하는 배지에서 증식된 세포를 대조군으로 하였다.

[0084] MMP 발현은 종양괴사인자- α (TNF- α)(100 ng/mL)로 자극하고, 48시간동안 배양하였다. 배양 이후에, 조건화된

배지를 수거하고, 단백질 함량을 브래드포드 방법(Kim et al., 2010)에 의해 결정하였다. 단백질 함량을 표준화한 후에, 동량의 단백질을 비환원 조건하에서 1.5 mg/mL 젤라틴을 함유하는 10% 폴리아크릴아마이드 겔 상에서 전기영동시켰다. 전기 영동 이후에, 폴리아크릴아마이드 겔은 2.5% Triton X-100을 함유하는 50mM Tris-HCl (pH 7.5)로 세척하여서, 소듐 도데실 설페이트를 제거하였다. 이어서, 10 mM CaCl₂, 50 mM Tris-Cl 및 150 mM NaCl을 함유하는 발현 완충액(developing buffer)중에서 겔을 37℃로 밤새 배양하여서 MMP에 의해 젤라틴을 분해하였다. MMP에 의해 가수분해된 젤라틴 영역은 쿠마시에 블루 착색에 의한 청색 배경과는 다른 투명 영역으로 가시화되었으며, 사진을 촬영하였다(Multi Gauge V3.0 software, Fujifilm Life Science, 일본 소재).

[0085] 그 결과, MMP-2 및 MMP-9에 대한 단백질 발현은 크리소파놀, 피지온 및 에모딘에 의해 처리량 의존적인 방식으로 유의하게 억제되었다. 또한, RT-PCR 및 웨스턴 블롯 결과에 의하면, MMP-2 및 -9의 발현은 자이모그래피 분석과 다소 유사한 방식으로 크리소파놀, 피지온 및 에모딘에 의해 전사 수준에서 억제되었다(도 20 내지 도 22 참조).

[0086] RNA 전사 억제

[0087] 1% DMSO에 용해된 상이한 농도의 크리소파놀, 피지온 및 에모딘 및 대조군인 1% DMSO로 처리한 후에 HT1080 세포로부터 전체 RNA를 추출하고, 이어서 TNF- α 로 자극하고, 48시간 더 배양하였다. 세포를 1mL TRIzol(등록상표) 시약으로 용해시키고, 10 cm 직경의 디쉬에 첨가하고, 세포 용해물(cell lysate)을 여러 회 피펫팅하였다. 균질화된 샘플을 실온에서 2분동안 배양하였다. 이어서, 균질화된 샘플을 마이크로튜브로 옮기고, 여기에 0.2mL 클로로포름을 첨가하고, 15초동안 손으로 격렬하게 흔들고, 2분동안 실온에서 배양하였다. 이어서, 4℃에서 12,000 rpm으로 15분동안 샘플을 원심분리하였다. 상기 혼합물은 하부 적색의 페놀-클로로포름 상, 계면상 및 무색의 상부 수성 상으로 분리되었다. 상기 수성 상을 새로운 시험관으로 옮겼다. 아이소프로필 알코올과 1:1로 혼합함으로써 수성 상으로부터 RNA가 침전하였다. 혼합물을 볼텍싱(vortexing)하고, 4℃로 10분동안 유지한 후에 4℃에서 15분동안 12,000 rpm으로 원심분리하였다. 상청액을 제거한 후에, RNA 펠릿을 75% 에틸 알코올 1mL로 1회 세척하였다. 상기 샘플을 4℃에서 15분동안 12,000 rpm으로 원심분리한 후에 에틸 알코올을 제거하였다. 상기 절차의 마지막에, RNA 펠릿을 DEPC-H₂O에 현탁시키고, 사용시까지 -80℃로 보관하였다. RNA의 순도는 각 샘플의 광학 밀도를 GENios 마이크로플레이트 리더로 260 nm 및 280 nm에서 판독하여서 결정하였다.

[0088] 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

[0089] RT-PCR 분석의 경우에, 제조업체 지시에 따라 시판 키트(TaKaRa RNA PCR kit)를 이용하여 cDNA를 합성하기 위해서 전체 RNA를 역전사하였다. 이어서, RNA PCR 완충액, 2.5mM MgCl₂, 0.2 μ M 각각의 프라이머, TaKaRa Taq 폴리머라아제 2.5 유닛을 함유하는 반응 체적 50 μ L에서 PCR을 실시하였다. 샘플을 94℃에서 4분동안 예비 변성시키고, 이어서 94℃에서 1분, 55℃에서 30초 및 72℃에서 1분동안 25회 사이클로 증폭시키고, 이어서 72℃에서 최종 10분 연장 단계를 실시하였다. GAPDH용 프라이머는 5'-GTCAACGGATTGGTCGTATT-3' 및 5'-AGTCTTCTGGGTGG CAGTGAT-3'이었으며, 300 bp의 예상 증폭 생성물을 가졌다. MMP-2 프라이머는 5'-GTCAACGGATTGGTCGTATT-3' 및 5'-AGTCTTCTGGGTGG CAGTGAT-3'이었으며, 496 bp의 예상 증폭 생성물을 가졌다. MMP-9 프라이머는 5'-ATCCAGTTTGGTGTGCGGAGC-3' 및 5'-GAAGG GGAAGACGCACAGCT-3'이었으며, 552 bp의 예상 증폭 생성물을 가졌다.

[0090] 핵 및 시토졸 단백질의 추출 및 웨스턴 블롯 분석

[0091] 1% DMSO에 용해된 상이한 농도의 크리소파놀, 피지온 및 에모딘의 존재하에 또는 그 부재하에 HT1080 세포를 1 시간동안 예비 처리하고, 1% DMSO를 대조군으로 하고, 이어서 TNF- α 로 자극시키고, 48시간 더 배양하였다. 핵 및 시토졸 단백질의 분리 추출을 위해 제조업체 지시에 따라 CellLytic(상표명)NuCLEAR(상표명) 추출 키트(S26-36-23, Sigma-Aldrich Co., MO, USA)를 사용하였다. 용해 용액 (저장성 용해 완충액 500 μ L, 0.1M 디티오프로이톨(DTT) 5 μ L, 및 프로테아제 억제제 혼합물 5 μ L, 프로테아좀 억제제, MG132) 0.5mL를 이용하여 15분동안 얼음 위에서 용해시켰다. Igepal CA-630 용액 (4 μ L)을 첨가하고, 20초동안 볼텍싱하였다. 10,000 x로 10분동안 핵을 분리하고, 상청액(원형질 단백질)을 수거하였다. 침전된 핵을 추출 완충 믹스 (추출 완충액 98 μ L, 0.1M DTT 1 μ L 및 프로테아제 억제제 혼합물 1 μ L) 100 μ L으로 10분동안 용해시키고, 핵 단백질을 12% 소듐 도데실

설페이트 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 분리하고, 폴리비닐리덴 다이플루오라이드(PVDF) 멤브레인(Millipore, Bedford, MA)으로 전기이동(electro-transfer)시켰다.

[0092] Tris-buffered Saline with tween-20(TBS-T)(트리스 완충액 (TBS), pH 7.6, 0.2% 트윈-20 함유) 중 5% 탈지유로 블로킹한 후에, 상기 멤브레인을 일차 항원(Santa Cruz Biotechnology, Inc. 미국 소재)과 함께 1시간동안 배양하고, TBS-T로 세척한 후에 호스레디쉬 퍼옥시다아제-결합된 이차 항체(Santa Cruz Biotechnology, Inc. 미국 소재)로 배양하였다. 상기 반응성 시그널을 ECL 키트(PE Applied Biosystems)로 시각화하였다.

[0093] NF- κ B, I κ B, MAPK, AP-1, TIMP 및 RECK 발현에 대한 영향

[0094] AKT 인산화 및 MARK는 HT1080 세포에서의 TNF- α 처리 10분 후에 발생한 것으로 알려졌다 [Jin 등, 2008]. 따라서, 100 ng/mL TNF- α 에 의해 1시간동안 자극된 세포에서 AKT, NF- κ B, I κ B, 미토젠-활성화 단백질 키나아제(MAPK) 경로(ERK, JNK, p38), 단백질-1 활성화제(AP-1), 메탈로프로테이나아제의 조직 억제제(TIMF) 및 RECK(Reversion-inducing- cysteine-rich protein with Kazal motifs)의 발현에 대한 크리스파놀, 피지온 및 에모딘의 영향을 웨스턴 블롯에 의해 연구하였다.

[0095] 이를 위해, 세포를 1% DMSO에 용해된 다양한 농도의 크리스파놀 및 대조군인 1% DMSO로 1시간동안 전처리한 후에 1시간동안 TNF- α (100 ng/mL)로 1시간동안 자극시키거나 자극시키지 않았다. 인산화된 AKT를 HT1080에서 유도된 TNF- α 로 검출하고, 포스포-AKT는 TNF- α 처리에 의해 증가하였으며, 크리스파놀, 피지온 및 에모딘은 그의 증가를 억제하였다. TNF- α 처리는 포스포-I κ B α 를 유의하게 증가시켰다. 그 결과, TNF- α 는 핵에서 c-jun을 유의하게 증가시켰고, 크리스파놀, 피지온 및 에모딘은 인산화된 c-jun을 농도 의존적인 방식으로 감소시켰다. 어떠한 종류의 MARK가 크리스파놀, 피지온 및 에모딘-매개의 AP-1 AP-1 전이활성(transactivation) 억제에 관련되어 있는지를 결정하기 위해, ERK, JNK 및 p38 키나아제의 인산화에 대한 크리스파놀, 피지온 및 에모딘의 영향을 연구하였다. 크리스파놀, 피지온 및 에모딘은 p38 인산화없이 TNF- α 유래의 ERK 및 JNK 인산화를 억제하였다. 또한, TIMP-1 및 TIMP-2 발현은 크리스파놀, 피지온 및 에모딘으로 처리함으로써 농도 의존적으로 하향 조절된 반면, RECK 발현 수준은 명백하게 조절되지 않았다(도 29 내지 도 37 참조).

[0096] 실험예 3: MCF-세포를 이용한 크리스파놀, 피지온 및 에모딘의 활성 실험

[0097] 세포 생존도 어세이

[0098] 인간 유방암 세포(MCF-7) 세포는 10% FBS를 함유하는 200 μ L중 5×10^4 세포/웰 밀도로 96-웰 플레이트에 씨딩하였다. 씨딩한지 24시간 후에 배지를 제거하고, 세포를 인산염 완충액(PBS)으로 세척하고, 1% DMSO에 용해된 각 분획물의 고 농도(50 μ g/mL) 또는 저농도(10 μ g/mL)의 존재하에 또는 부재하에, 1% FBS를 함유하는 DMEM와 함께 36시간동안 배양하고, 1% DMSO를 용매 대조군으로 하였다. 36 시간 후에, 3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸륨 브로마이드 (MTT) 용액 100 μ L를 각각의 웰에 첨가하고, 5% CO₂ 하에서 37°C로 4시간 더 배양하였다. 배지를 제거한 후에 DMSO 100 μ L를 첨가하여서 형성된 포르마잔 염을 용해시켰다. GENios(등록상표) 마이크로플레이트 리더(Tecan Austria GmbH, Austria)에 의해 540 nm 파장에서 광학 밀도(OD)를 측정하여 포르마잔 염의 양을 결정하였다. 상대 세포 생존도는 대조군(1% DMSO) 대비 계산하였다. 데이터는 3회 이상의 독자적인 실험의 평균 $\pm$ SD로 표기하였다.

[0099] 그 결과, 크리스파놀, 피지온 및 에모딘의 실험 농도에 대한 값은 대조군(1% DMSO)과 유사하였으며, 이는 크리스파놀, 피지온 및 에모딘이 MCF-7 세포에서 유사한 세포독성 효과를 가짐을 나타낸다. 이들 화합물은 100 μ M 미만에서는 세포 생존도에 유의하게 영향을 나타내지 않았다. 그러나, 200 μ M 농도에서는 상대 세포 생존도(대조군 대비 백분율)를 감소시켰다(도 38).

[0100] 상처 치유 어세이

[0101] 상처 치유 어세이를 위해 The Culture-Inserts(Ibidi GmbH, Germany)를 이용하였다. 10% FBS, 100 U/mL 페니실린, 100 mg/mL 스트렙토마이신으로 보충된 DMEM에 의해 5×10^5 세포/mL의 MCF-7 세포 현탁액을 제조하였다. 각각의 인서트 웰에 70 μ L 세포 현탁액을 적용하였다. 세포 분포가 불균질해질 수 있으므로 흔들리지 않도록

하고, 37℃ 및 5% CO₂에서 배양하였다. 살균 핀셋을 이용하여 적절한 세포 부착물(24시간)을 Culture-Insert로부터 조심스럽게 제거한 후에, 사용한 웰을 세포 및 0.2% BSA를 포함한 무혈청 배지에 채웠다. 1% DMSO에 용해된 25 μM의 크리스파놀, 피지온 및 에모딘 및 대조군인 1% DMSO의 존재하에 세포가 이동하도록 하였다. 36시간 후에 갭(remaining gap)을 사진 촬영하였다. 그 결과를 200 x 현미경(Leica Microsystems Wetzlar GmbH, 독일 소재)으로 관찰하였다.

[0102] 그 결과, 25 μM의 크리스파놀, 피지온 및 에모딘이 MCF-7 세포 이동을 현저하게 블로킹하는 것으로 관찰되었다. 또한, 상기 3가지 화합물 중에서 25 μM의 에모딘이 크리스파놀, 피지온보다 큰 억제 효과를 갖는 것으로 관찰되었다(도 39).

[0103] 카텝신 B 및 D의 효소 활성 어세이

[0104] 카텝신 B 및 D의 상대 효소 활성을 시판용 카텝신 B 및 D 어세이 키트(SensoLyte(등록상표) 490 MMP-2 Assay Kit *Fluorimetric*, SensoLyte(등록상표) 490 MMP-9 Assay Kit *Fluorimetric*)를 제조업체 프로토콜에 따라 사용하여 실시하였다. 즉, 카텝신 B와 D, 그리고 1% DMSO에 용해된 다양한 농도의 크리스파놀, 피지온 및 에모딘 및 대조군인 1% DMSO를 함유하는 어세이 완충용액 50 μL을 흑색 평판의 96-웰에 처리하였다. 이어서, 카텝신 B 및 D 기질 용액 50 μL을 첨가하고, 상기 플레이트를 30초동안 조심스럽게 진탕하여서 완전히 혼합시키고, 암실에서 1시간동안 37℃로 배양하였다. 최종적으로, 형광 강도(카텝신 B에 대해서는 Ex/Em = 354 nm/442 nm, 카텝신 D에 대해서는 Ex/Em = 490 nm/520 nm)를 GENios(등록상표) microplate reader (Tecan Austria GmbH, 오스트리아)로 측정하였다. 50 Ac-LVK-CHO를 카텝신 B 억제제(최종 농도 50 nM)로 사용하고, 펩스타틴 A를 카텝신 D 억제제(최종 농도 40 μM)로 사용하였다. 각각의 수치는 3회 반복 실험의 평균값 ± SD로 표기하였다.

[0105] 그 결과, 크리스파놀, 피지온 및 에모딘에 의한 카텝신 B 및 D의 유의한 억제 효과는 없는 것으로 관찰되었다. 그러나, 억제제 대조군인 Ac-LVK-CHO (최종 농도 50nM) 및 펩스타틴 A (최종 농도 40 μM)는 카텝신 B 및 카텝신 D 각각에 대해 매우 명확한 억제 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 크리스파놀, 피지온 및 에모딘이 시험 농도에서 카텝신 B 및 D 활성을 직접적으로 억제할 수 없음을 나타낸다. 또한, 크리스파놀, 피지온 및 에모딘의 전이억제 활성은 카텝신의 직접 억제에 기인하지 않음을 나타낸다(도 40 내지 42 참조).

[0106] 역전사-PCR, 단백질 추출 및 웨스턴 블롯 분석

[0107] 각 샘플로부터의 전체 RNA를 트리졸(TRIZOL) 시약에 의해 분리하고, 역전사-PCR (RT-PCR)을 실시하였다. RT-PCR 분석의 경우에, 제조업체 지시에 따라 시판 키트(TaKaRa RNA PCR kit)를 이용하여 cDNA를 합성하기 위해서 전체 RNA를 역전사하였다. 이어서, RNA PCR 완충액, 2.5mM MgCl₂, 0.2 μM 각각의 프라이머, TaKaRa Taq 폴리머라아제 2.5 유닛을 함유하는 반응 체적 50 μL에서 PCR을 실시하였다. 샘플을 94℃에서 4분동안 예비 변성시키고, 이어서 94℃에서 1분, 55℃에서 30초 및 72℃에서 1분동안 25회 사이클로 증폭시키고, 이어서 72℃에서 최종 10분 연장 단계를 실시하였다. GAPDH용 프라이머는 5'-GTCAACGGATTGGTCGTATT-3' 및 5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'이었으며, 300 bp의 예상 증폭 생성물을 가졌다. 카텝신 B 프라이머는 5'-CACAACT-TCTACAACGTGG-3' 및 5'-GTAGATCTCGCCATGATG-3'이었으며, 591 bp의 예상 증폭 생성물을 가졌다. 카텝신 L 프라이머는 5'-GCGGATCCATGTATGAGGCCCCAGATCT-3' 및 5'-GTCGGTCGATG GGGTGACACGCTAGGCG-3'이었으며, 693 bp의 예상 증폭 생성물을 가졌다.

[0108] 10cm 디쉬에 있는 무혈청 배지중에 배양된 MCF-7 세포 1 x 10⁶ 세포를, 1% DMSO에 용해된 상이한 농도의 크리스파놀, 피지온 및 에모딘, 그리고 대조군인 1% DMSO로 36시간동안 처리하였다. 용해 완충액(저장성 용해 완충액 500 μL, 0.1M 디티오프레이톨(DTT) 5 μL, 및 프로테아제 억제제 혼합물 5 μL, 프로테아좀 억제제, MG132) 0.5mL를 이용하여 상기 세포를 15분동안 얼음 위에서 용해시켰다. 단백질을 12% SDS-PAGE에 의해 분리하고, PVDF 멤브레인(Millipore, Bedford, MA)으로 전기이동(electro-transfer)시켰다. Tris-buffered Saline with tween-20(TBS-T)(트리스 완충액 (TBS), pH 7.6, 0.2% 트윈-20 함유) 중 5% 탈지유로 블로킹한 후에, 상기 멤브레인을 일차 항원(Santa Cruz Biotechnology, Inc. 미국 소재)과 함께 1시간동안 배양하였다. 1시간동안 TBS-T로 세척한 후에 호스래디쉬 퍼옥시다아제-결합된 이차 항체(Santa Cruz Biotechnology, Inc. 미국 소재)로 배양하였다. 상기 반응성 시그널을 ECL 키트(PE Applied Biosystems)로 시각화하였다.

[0109] RT-PCR 및 웨스턴 블롯 결과에 따르면, 카텝신 B 및 L의 RNA 전사 및 단백질은 크리스파놀, 피지온 및 에모딘의

처리량 의존적인 방식으로 36시간동안 유의하게 억제되었다. 그러나, 카뎀신 D의 RNA 전사 및 단백질 발현은 크리소파놀, 피지온 및 에모딘이 36시간 처리 후에 명확한 변화를 나타내지 않았다(도 43 내지 도 48 참조).

[0110] 통계 분석

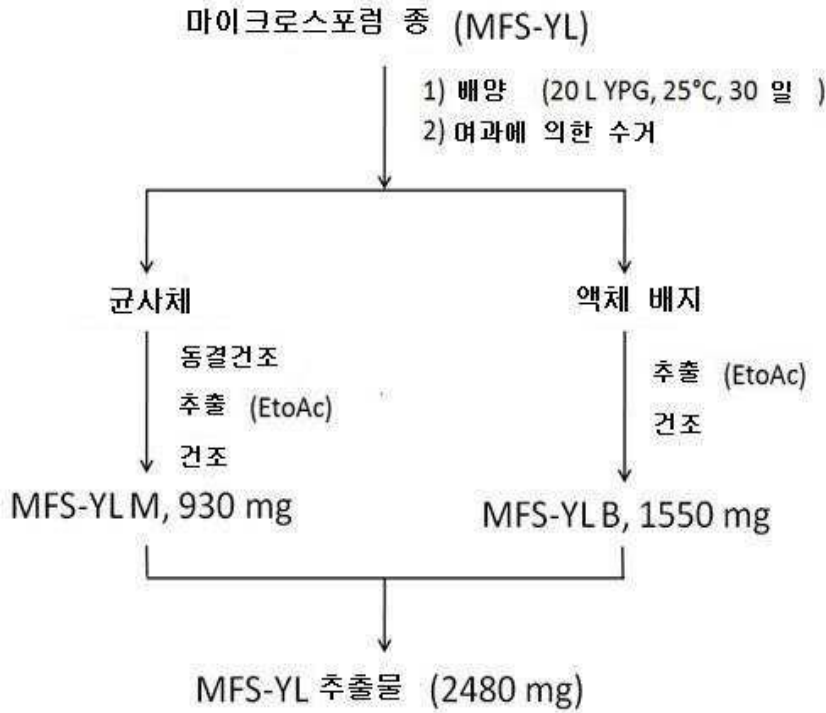
[0111] 모든 실험은 3회 이상 반복하였다. 모든 결과는 3회 반복 측정치의 평균값 $\pm$ 표준편차(SD)로 표기하였다. 통계적으로 유의한 차이는 SPSS 17.0 (Chicago, IL, 미국 소재)를 이용하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA test)에 의해 분석하였다. *는 대조군 대비 $P < 0.05$ 이고, **는 $P < 0.01$ 이다.

도면

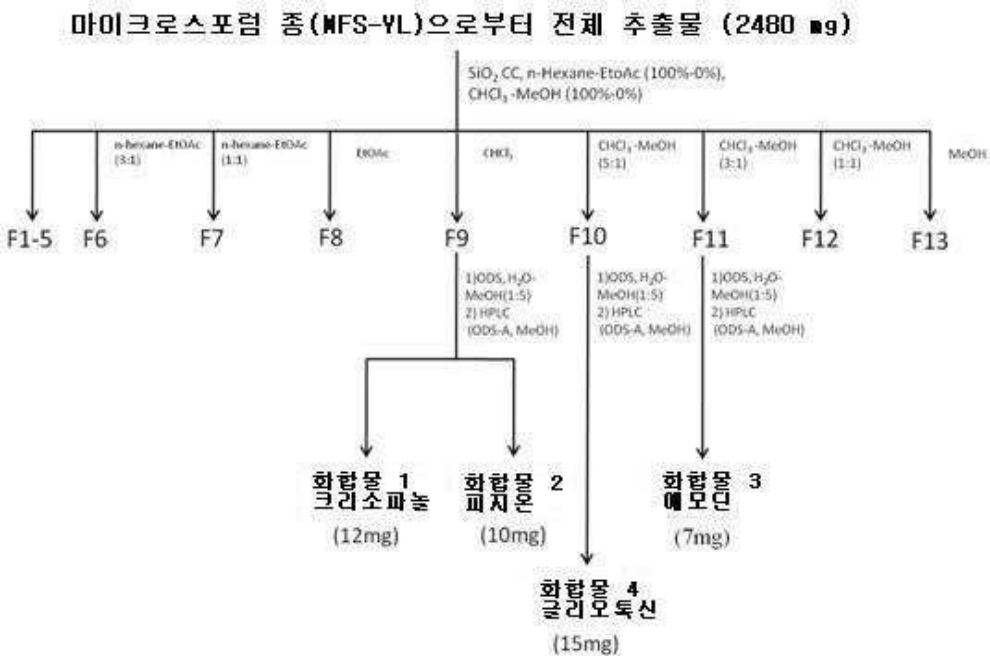
도면1



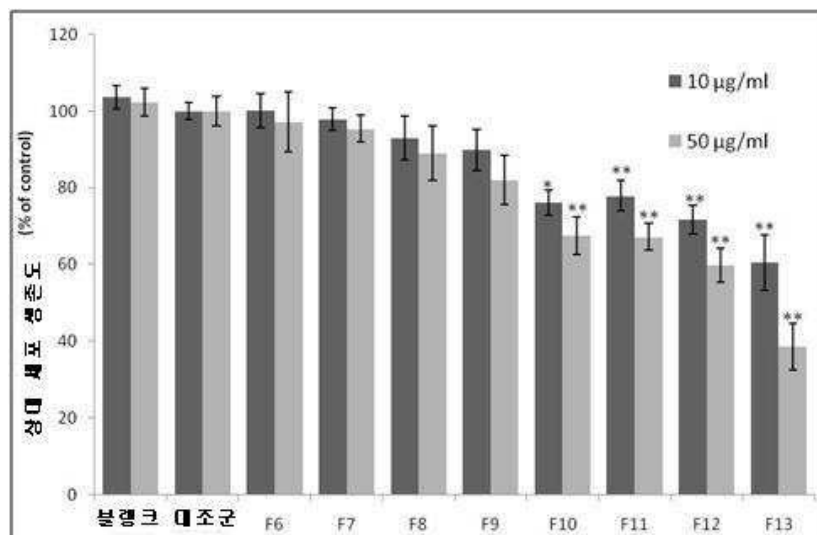
도면2



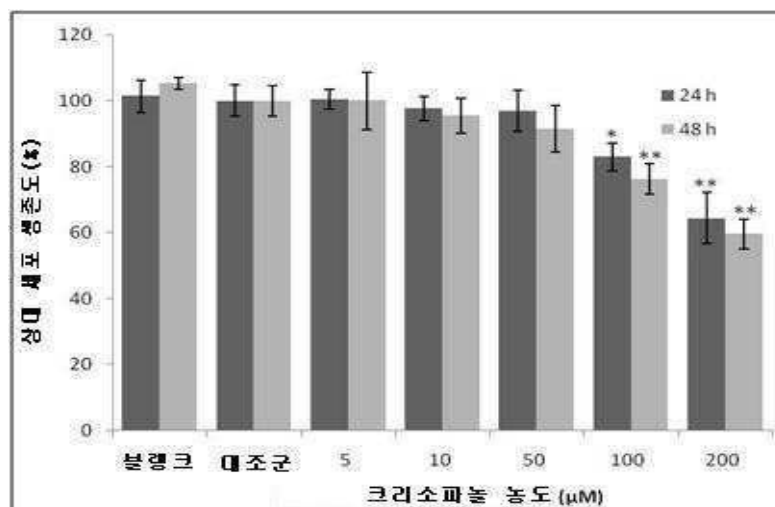
도면3



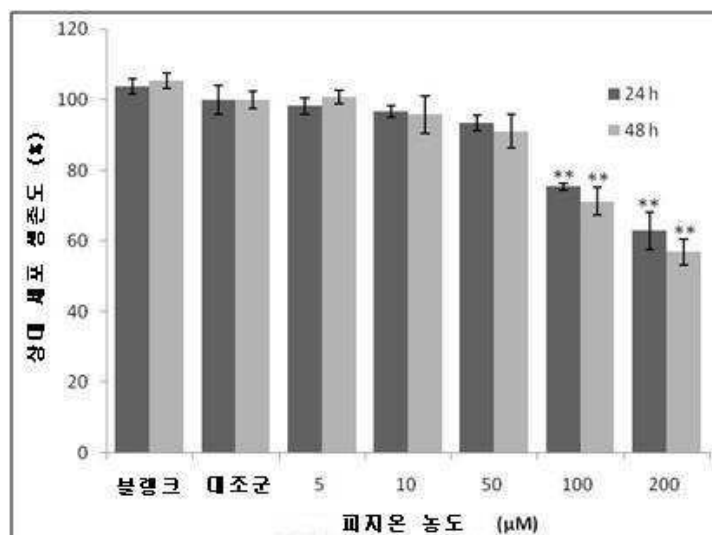
도면4



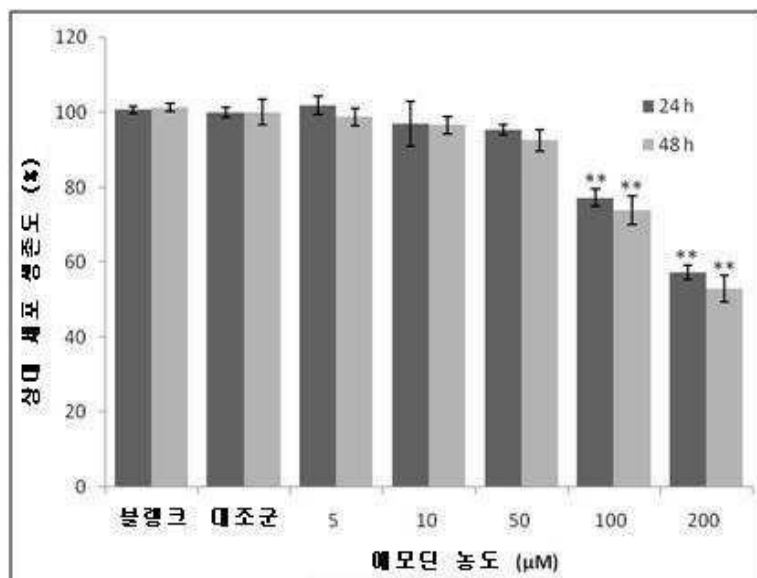
도면5



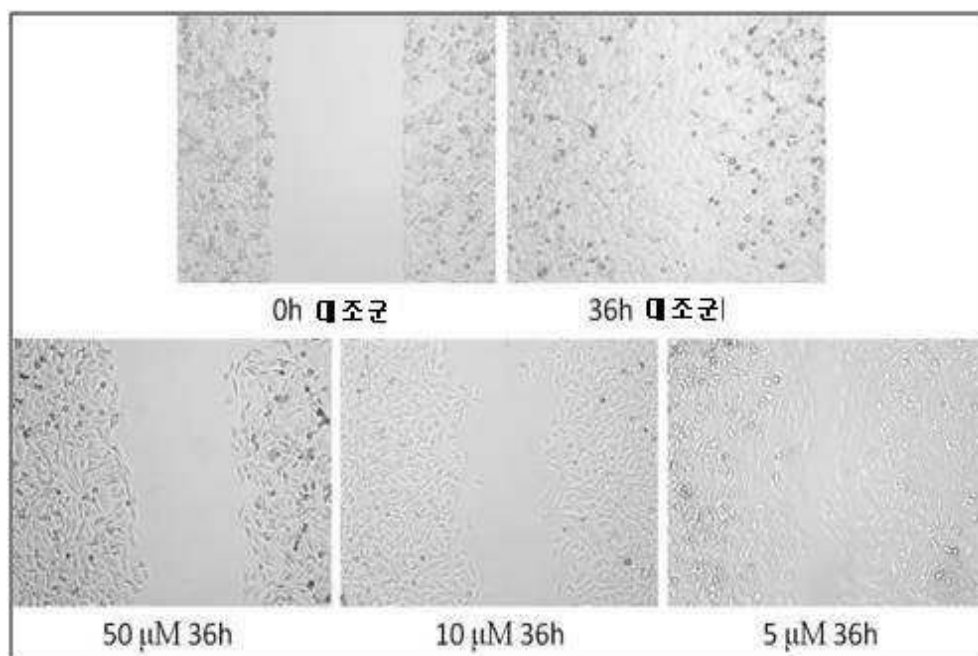
도면6



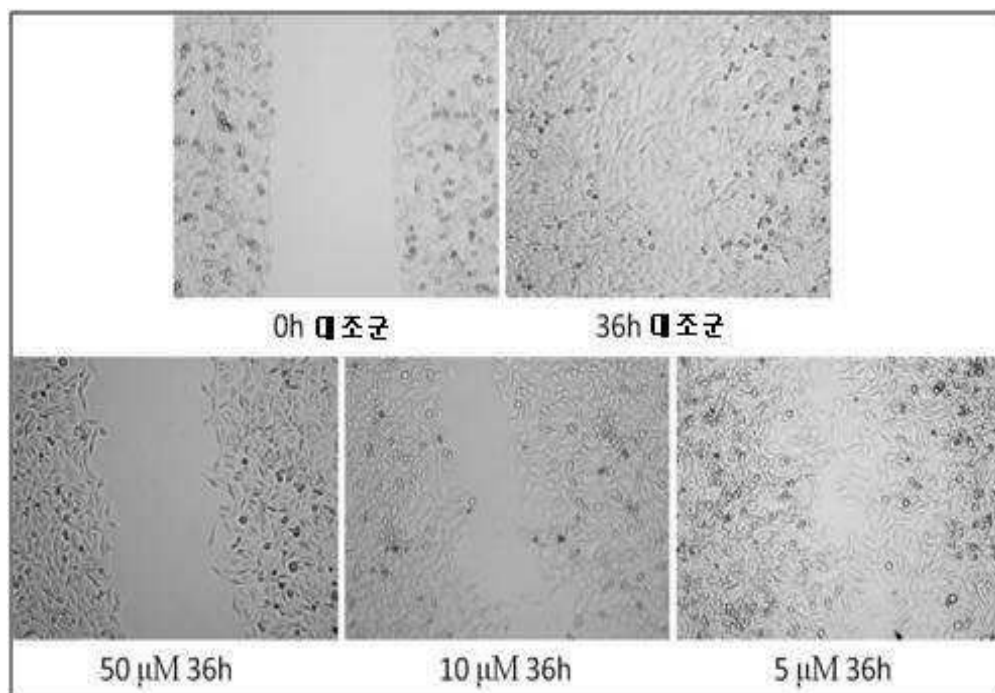
도면7



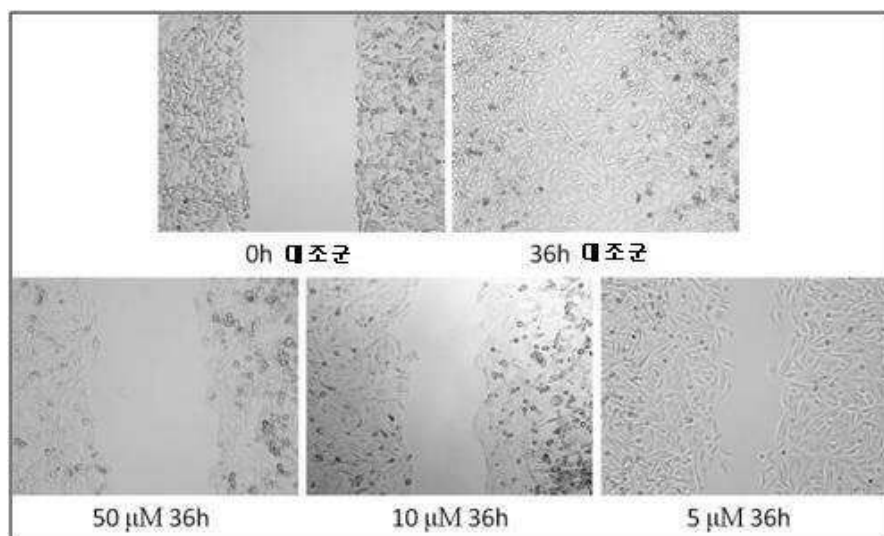
도면8



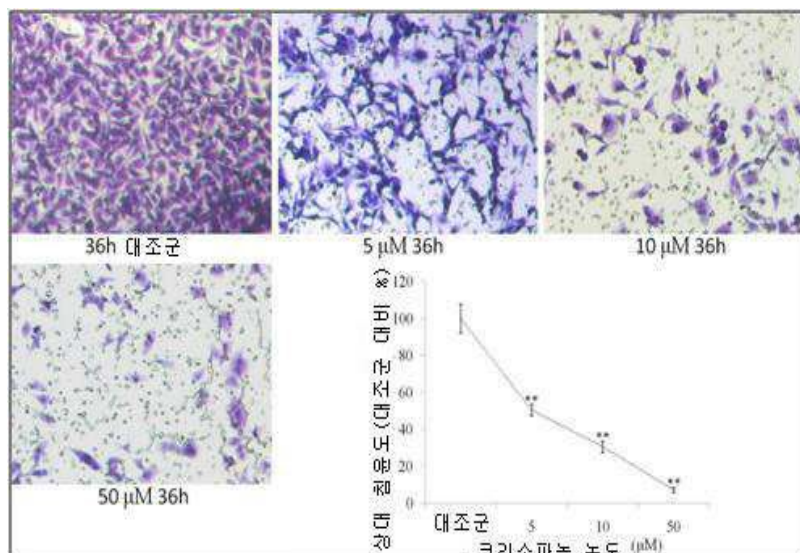
도면9



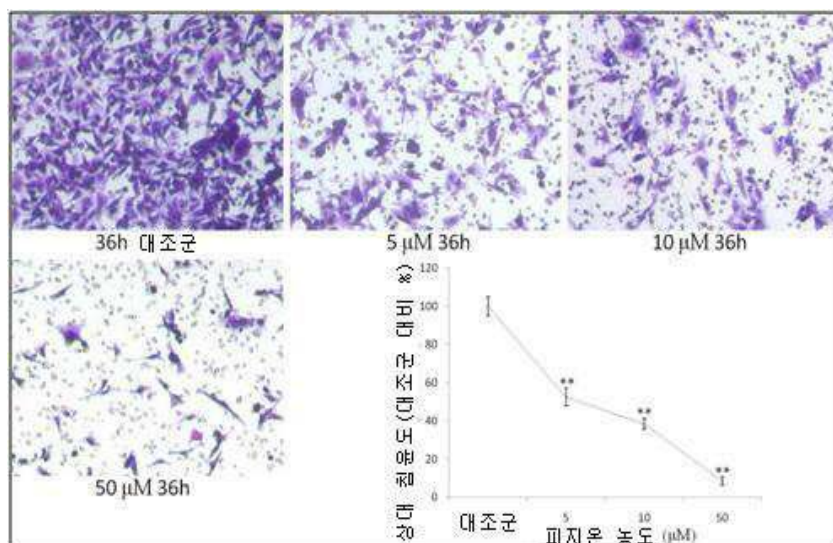
도면10



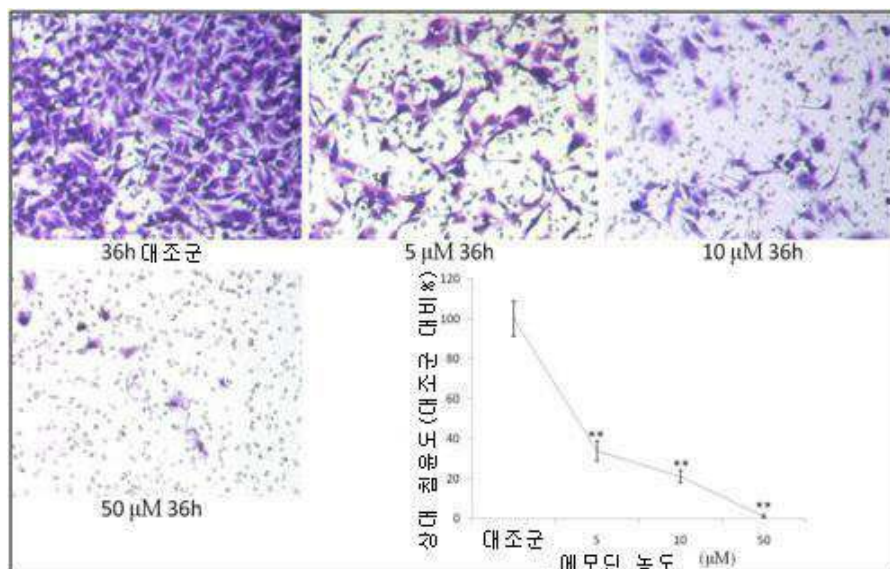
도면11



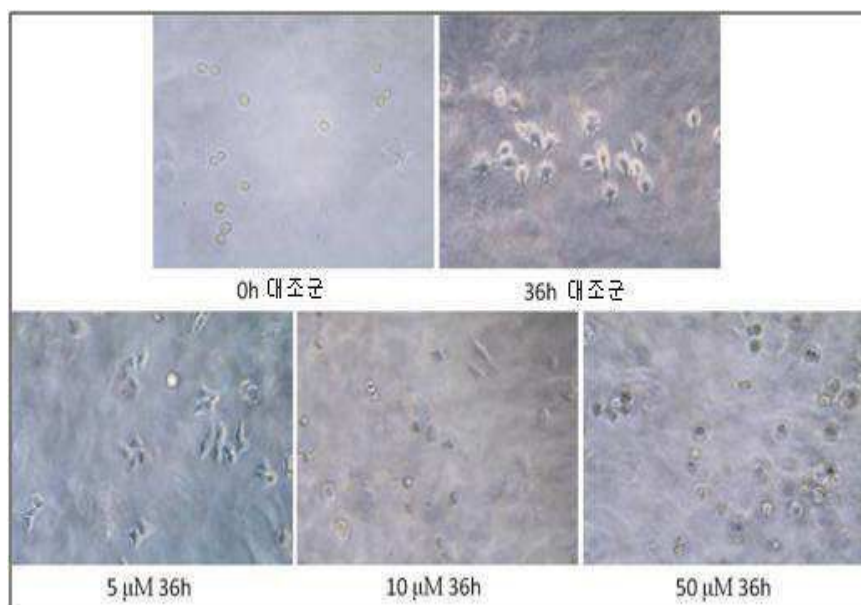
도면12



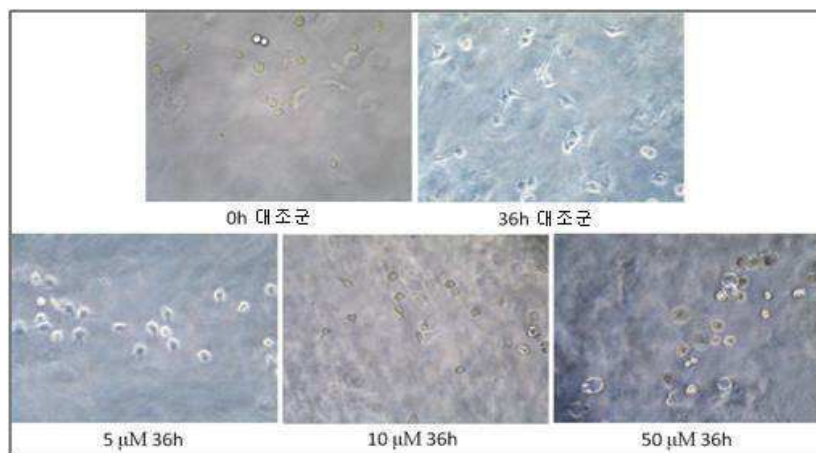
도면13



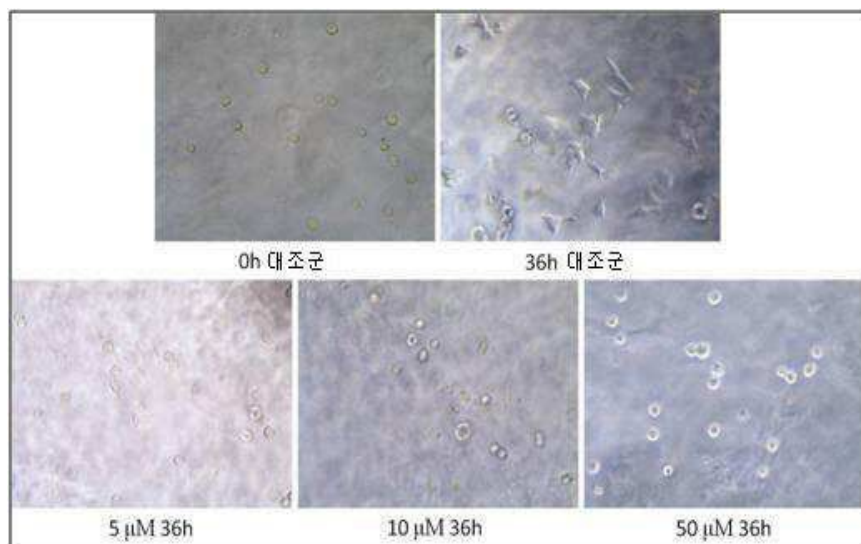
도면14



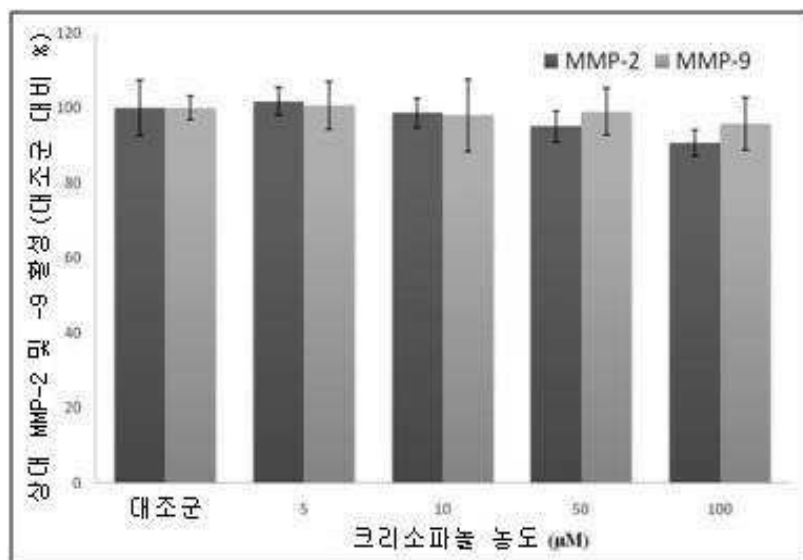
도면15



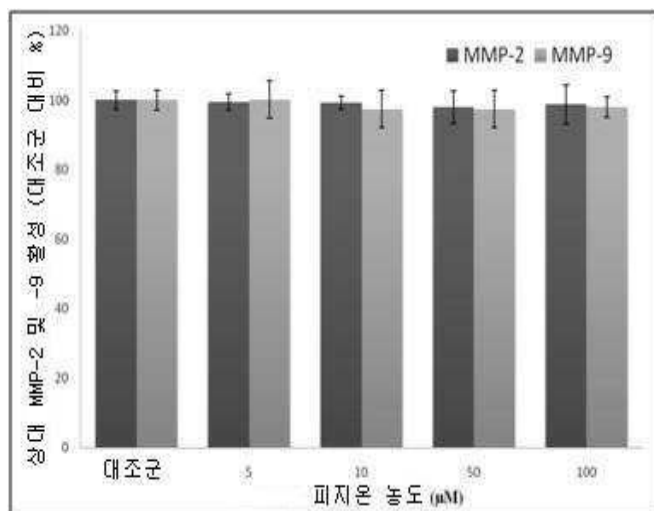
도면16



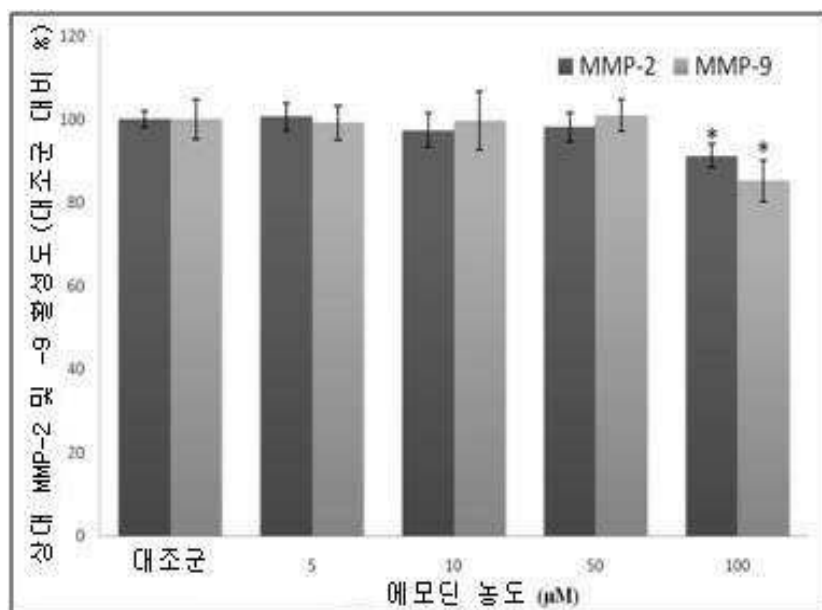
도면17



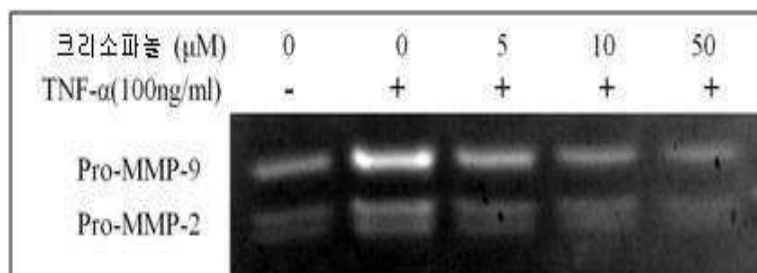
도면18



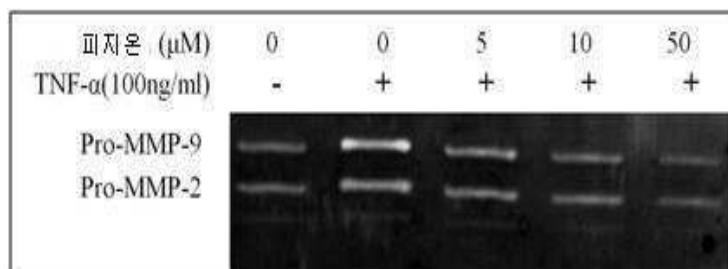
도면19



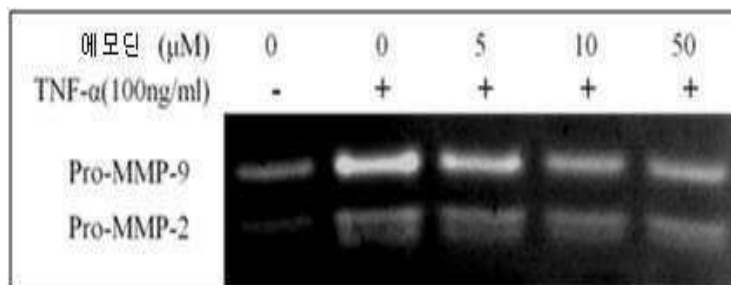
도면20



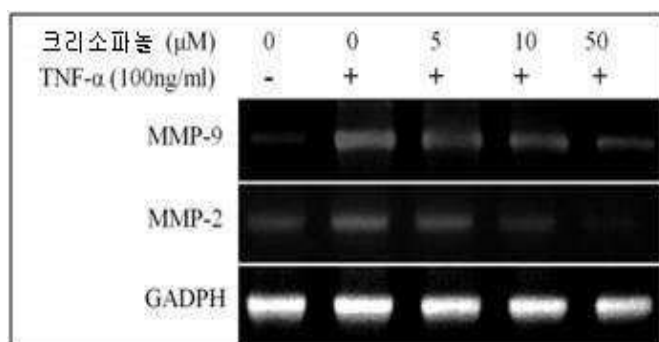
도면21



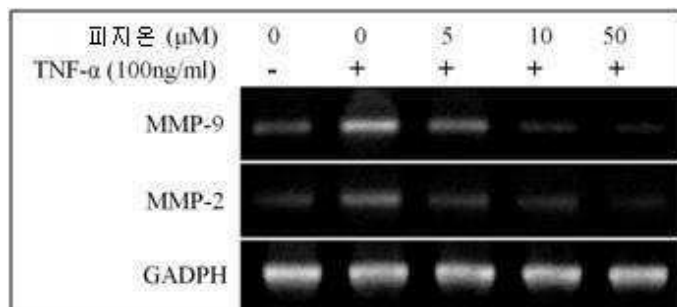
도면22



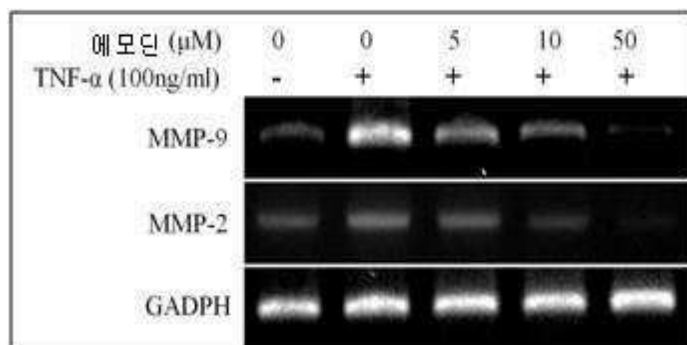
도면23



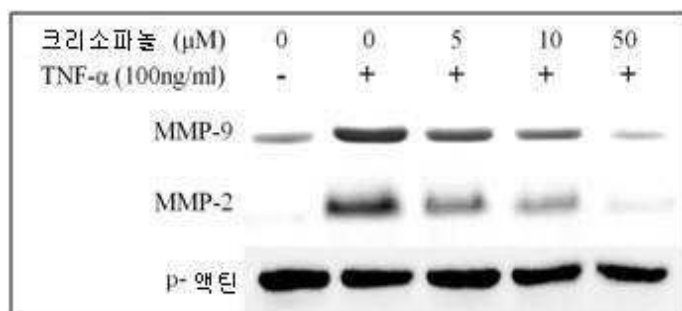
도면24



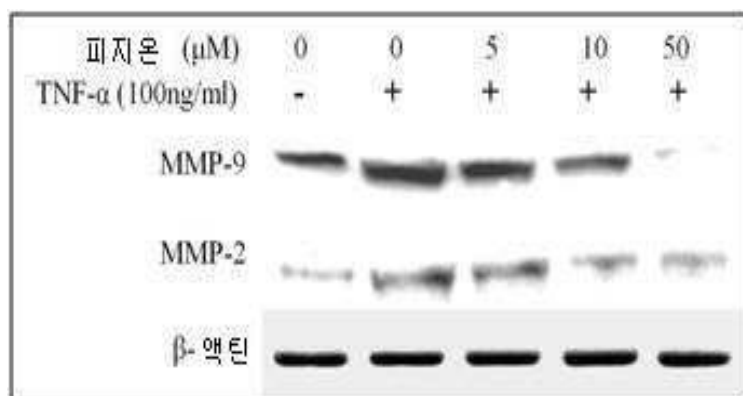
도면25



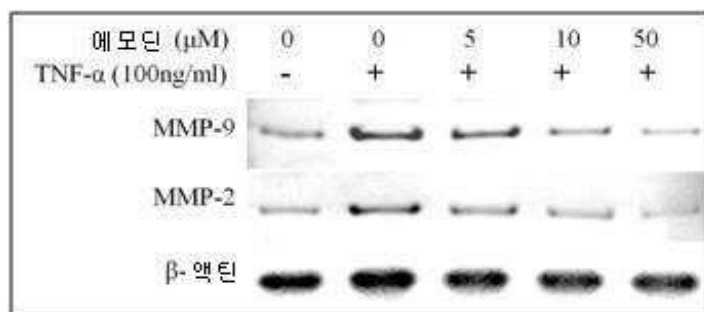
도면26



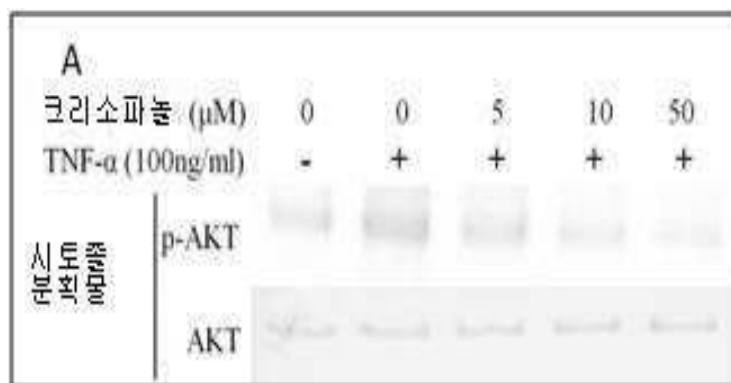
도면27



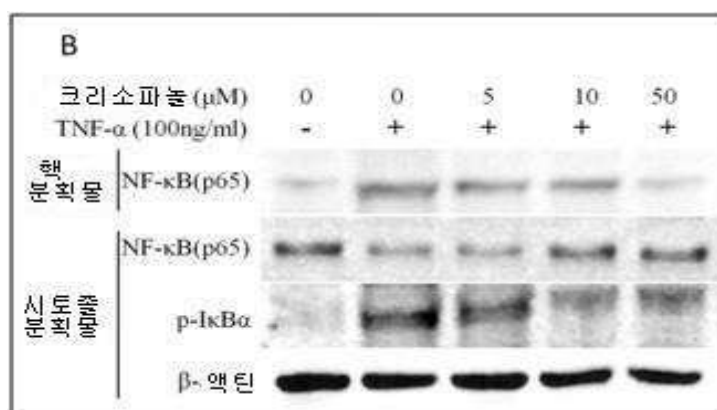
도면28



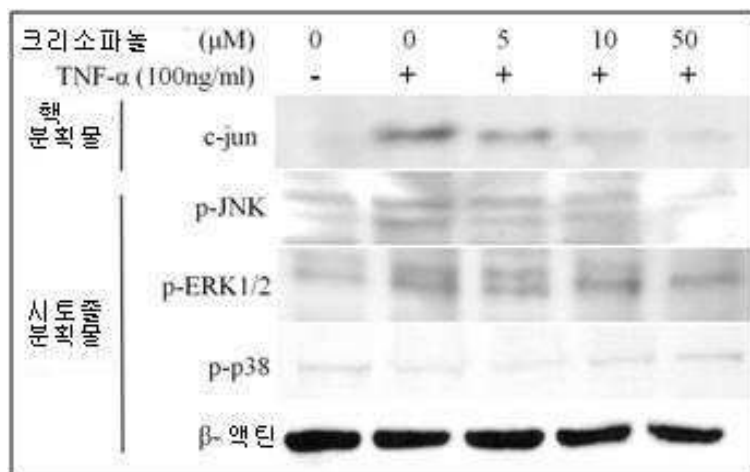
도면29a



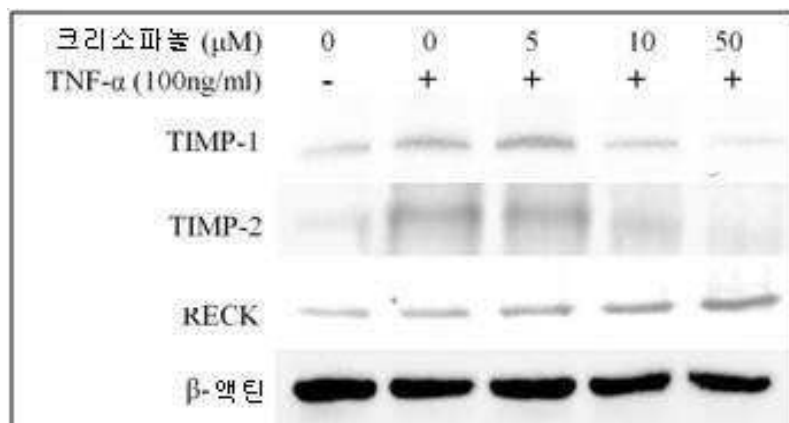
도면29b



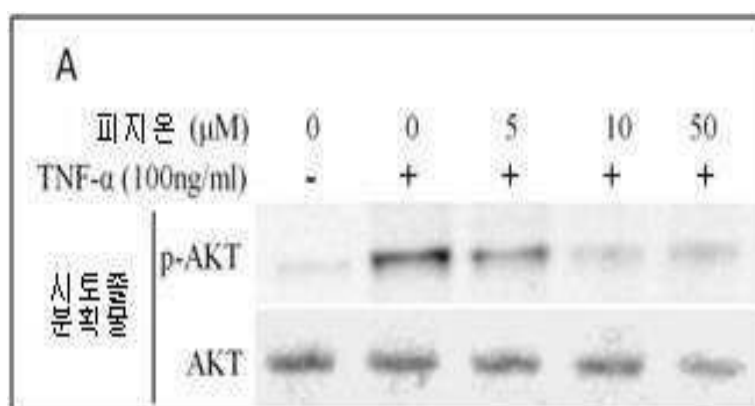
도면30



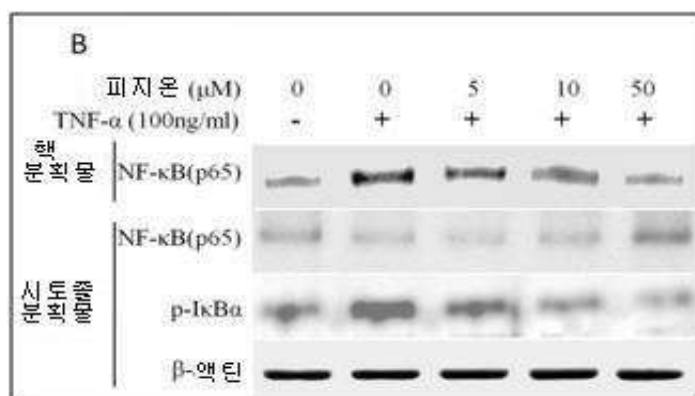
도면31



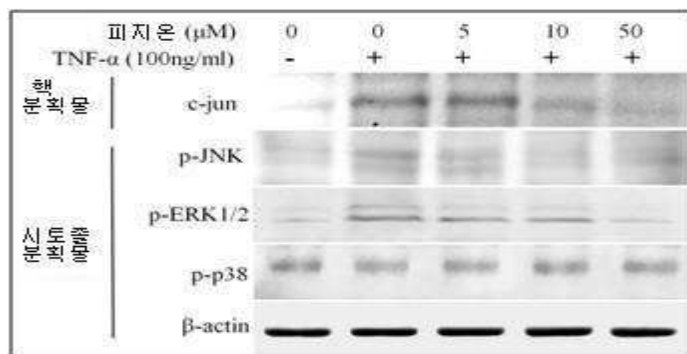
도면32a



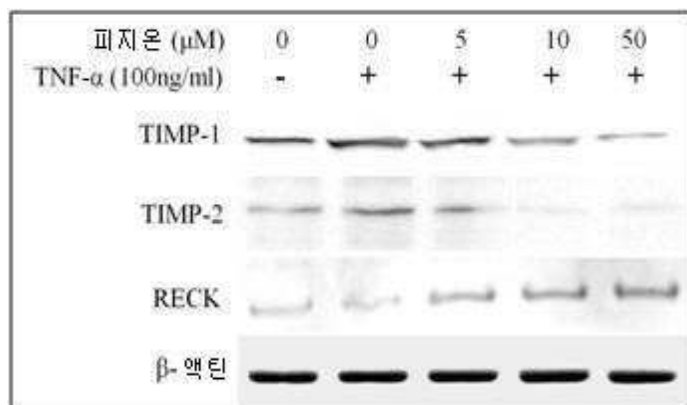
도면32b



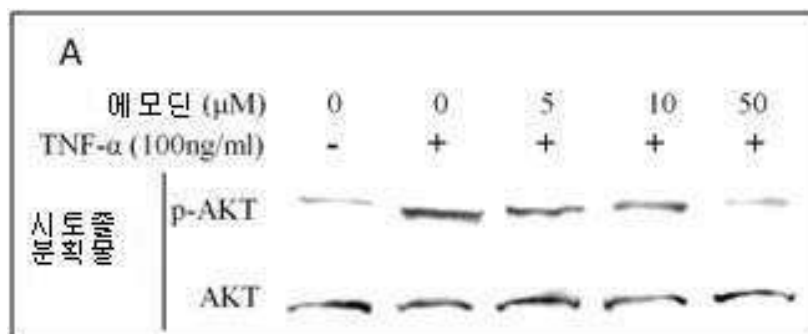
도면33



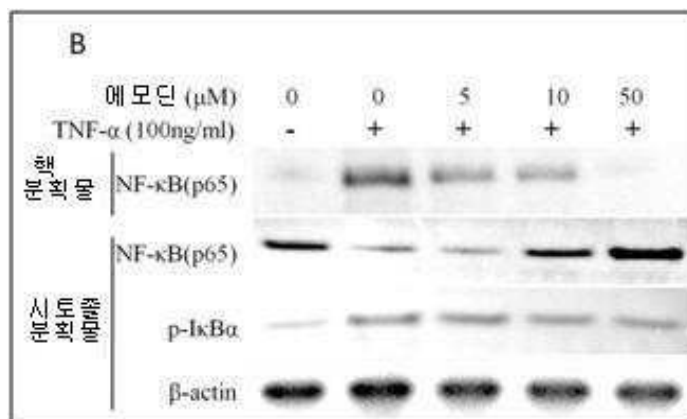
도면34



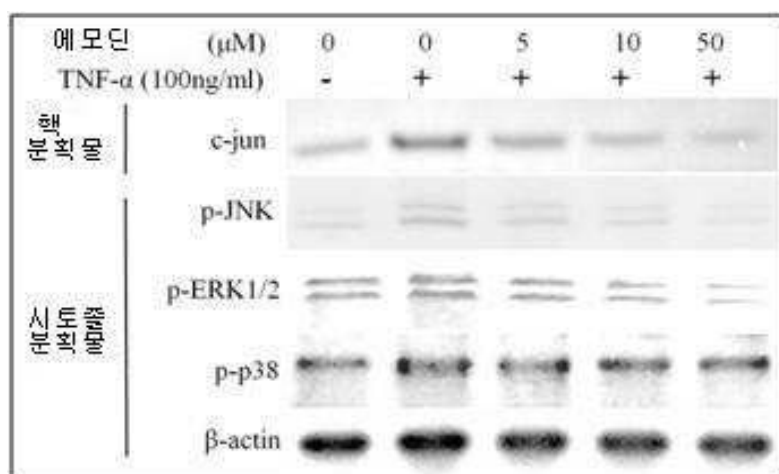
도면35a



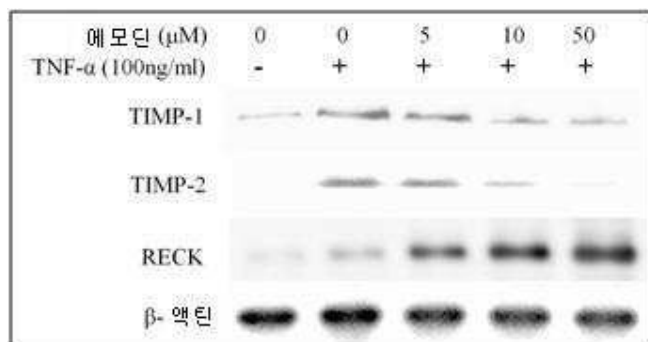
도면35b



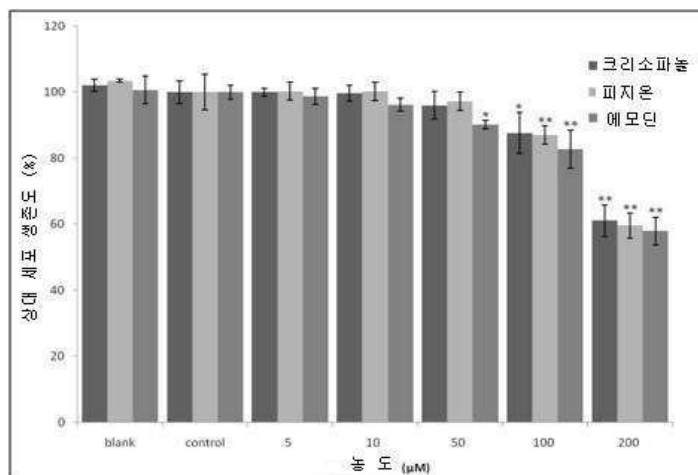
도면36



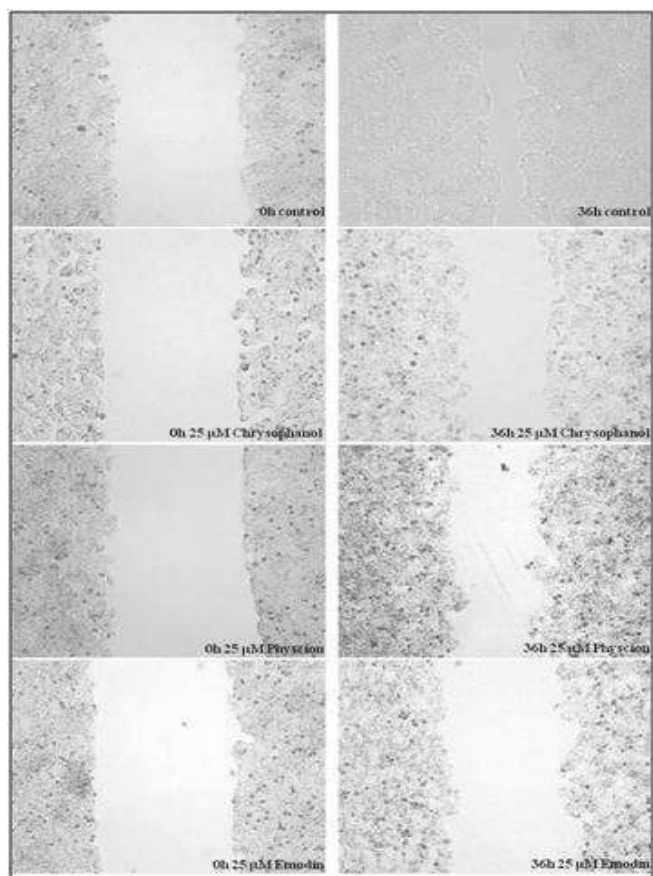
도면37



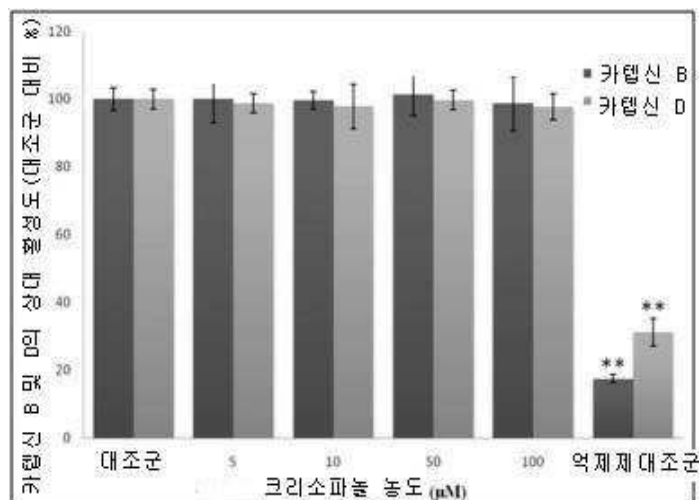
도면38



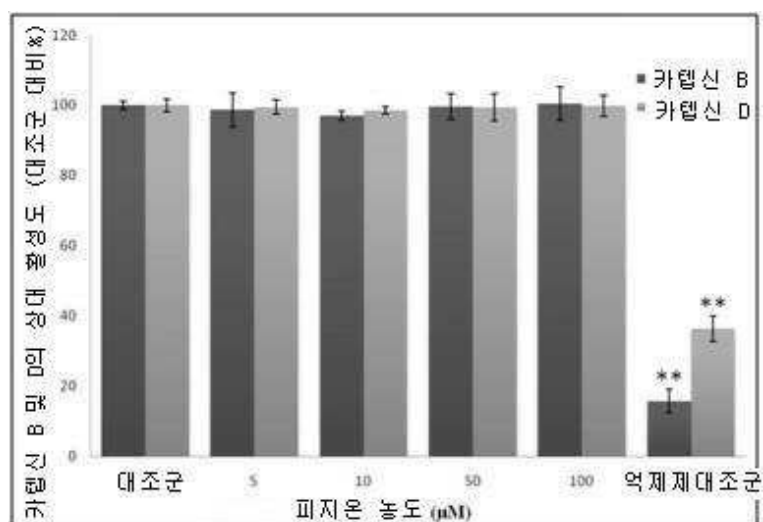
도면39



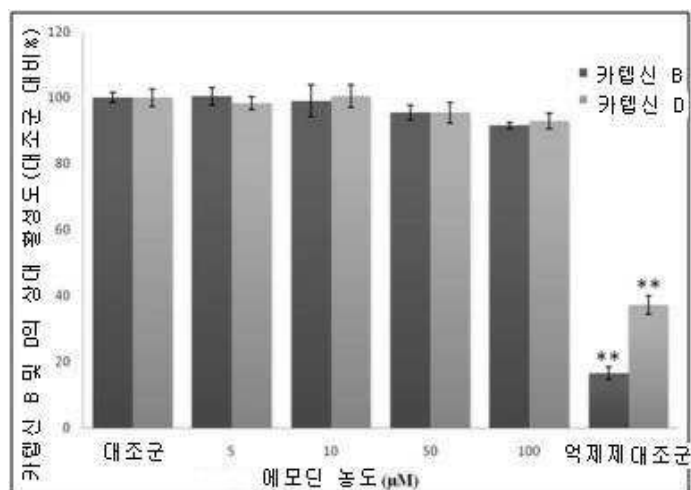
도면40



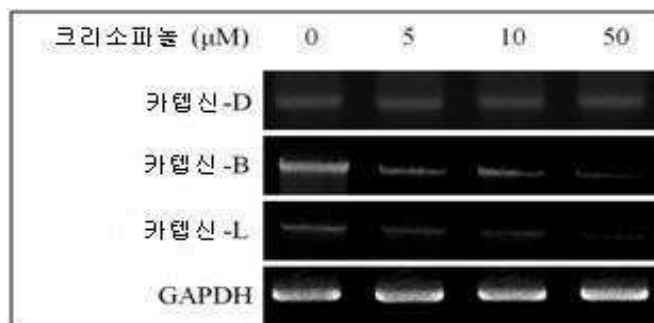
도면41



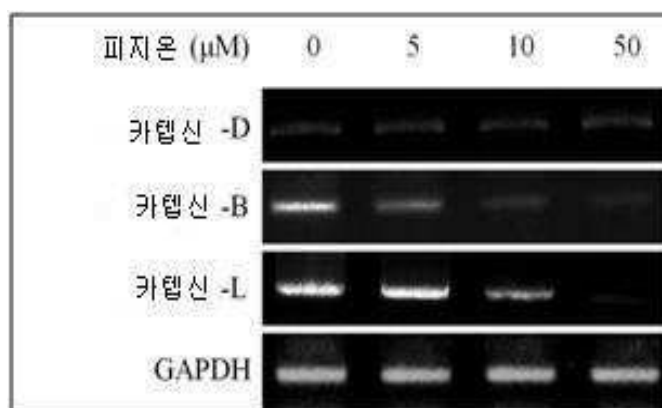
도면42



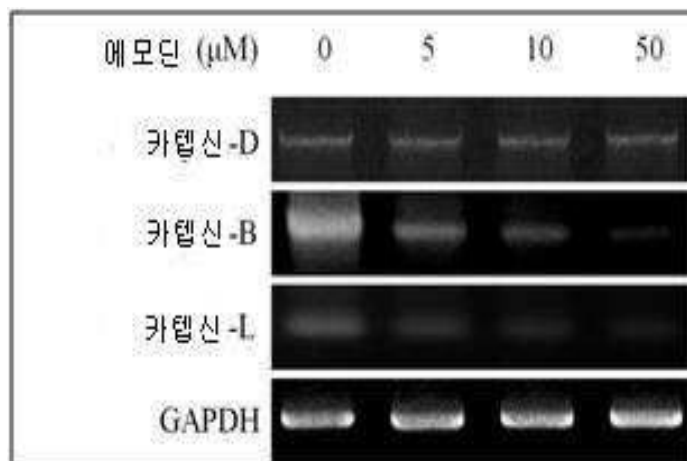
도면43



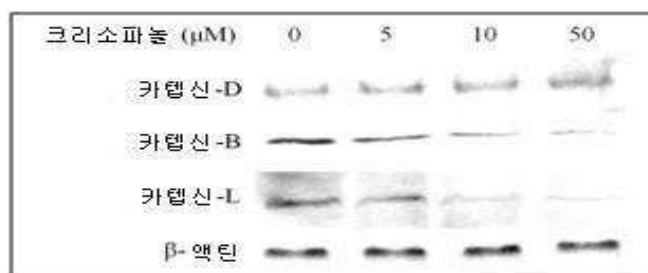
도면44



도면45



도면46



도면47



도면48

