

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0115845 (43) 공개일자 2012년10월19일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/722 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0033411 (22) 출원일자 2011년04월11일 심사청구일자 2011년04월11일	(71) 출원인 부경대학교 산학협력단 부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교) (72) 발명자 김세권 부산광역시 동래구 사직로 80, 쌍용예가아파트 125동 1402호 (사직동) 엄태길 부산광역시 해운대구 우동1로 111, 103동 702호 (우동, 협성그린파크) (74) 대리인 이덕록	

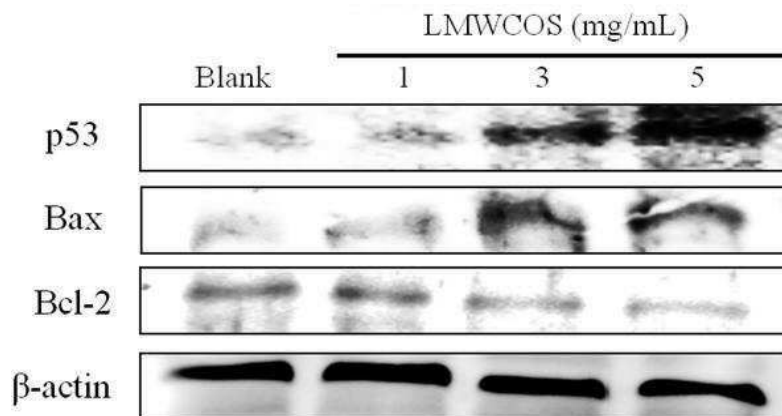
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 대장암 세포 증식 억제 활성을 갖는 키토올리고당

(57) 요약

본 발명은 대장암 세포 증식 억제 활성을 갖는 키토올리고당, 특히 1 내지 3 kDa의 저분자량 키토올리고당을 함유하는 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도4



특허청구의 범위

청구항 1

1 kDa 내지 10 kDa의 분자량을 갖는 키토올리고당을 유효성분으로 함유하는 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 키토올리고당은 1 kDa 내지 3 kDa의 분자량을 갖는 저분자량 키토올리고당인 것을 특징으로 하는 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

1 kDa 내지 3 kDa의 분자량을 갖는 저분자량 키토올리고당을 유효성분으로 함유하는 대장암 예방 또는 치료용 건강보조식품 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 대장암 세포 증식 억제 활성을 갖는 저분자량 키토올리고당을 함유하는 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대장암은 서구에서 암관련 사망의 가장 흔한 원인중 하나이다. 대장암은 아시아에서도 서구 식습관을 채택하는 사람이 증가함에 따라 늘어나고 있다. 역학 조사에 따르면, 경제 성장 및 식습관이 대장암 발병률과 관련되어 있다. 대장암 위험을 증가시키는 것으로 알려진 영양 측면에서의 여러 문제점은 적은 섬유질 섭취, 고지방 식이 및 적은 칼슘/미량영양소 섭취에 있다. 또한, 유전자 발현의 조절 역시 대장암 증가에 일조한다. 사이클로옥시게나아제-2(COX-2) 및 유도성 산화질소 신타아제(iNOS)의 과발현은 산발 결장 암종의 최대 90% 및 결장 샘종의 40%에서 발견된다. 비-스테로이드성 염증 약물(NSAID) 및 특이적 COX-2 억제제에 의한 COX-2 및 iNOS의 하향 조절은 대장암의 화학적 예방을 위한 임상 연구에 있다.

[0003] 키토산은 2-아세트아미도-2-디옥시-(1-4)-β-D-글루코피라노즈 및 2-아미노-2-디옥시-(1-4)-β-D-글루코피라노즈로 이루어진 2원 헥테로글리칸 계열이며, 알칼리 존재 하에서 디아세틸화에 의해 키틴으로부터 유도된다. 현재 키토산의 주요 용도는 슬러지 탈수, 식품 가공 및 금속 이온 킬레이트화에 집중되어 있다. 그러나, 최근에는 화장품, 약물 담체, 식품 보조제, 반투과성 막 및 약제와 같은 고부가가치 상품을 생산하는데 집중되고 있으며, 키틴 및 키토산을 이들의 올리고머로 전환하는 것에 대한 관심이 증가하고 있다. 키토산 올리고당(Chitosan oligosaccharides: COS)은 보다 낮은 점도 및 비교적 적은 분자량 크기를 가져서, 수용성이고 in vivo 시스템에서 흡수된다. 또한, 이들은 부가적인 기능적 특성을 갖는다.

[0004] 최근, 키틴, 키토산 및 COS의 항-종양, 항암 및 항-염증 효과에 대하여 문헌이 보고되었다. 예컨대, 대한민국 공개특허 제2002-0045289호 ‘수용성 키토산 올리고머 및 인터페론 감마를 함유한 면역기능강화제 조성물’에는 수용성 키토산 올리고머 및 IFN-γ를 함유하여 대식세포의 NO 생성을 증가시킴으로써 항암 효과를 나타낼 수 있는 약제학적 조성물이 기재되어 있고, 대한민국 공개특허 제10-2008-0040412호 ‘자궁경부암을 위한 치료용 조성물’에는 키토산이 사용된 리포솜에 항암제가 담지되어 있는 암 치료용 조성물이 기재되어 있으나, 대장암의 억제 및 아포토시스 COS의 유도는 아직까지 보고된 바가 없다. 본 발명자들은 HT-29 인간 대장암 세포에 대한 COS의 항-증식 효과를 밝혀내어 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 점들을 감안하여 안출된 것으로, 1 내지 10 kDa, 특히 1 내지 3 kDa의 분자량을 갖는 키토산

토올리고당을 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강보조식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 상기 목적은 MTT 분석을 통해 키토올리고당의 세포독성을 결정하고, 형광 현미경 분석, DNA 단편 분석 및 웨스턴 블롯 분석을 통해 키토올리고당의 대장암 세포의 아포토시스 및 증식 억제 효과를 확인함으로써 달성하였다.

발명의 효과

[0007] 본 발명은 저분자량 키토올리고당의 대장암 세포의 아포토시스 및 세포증식 억제 효과를 확인함으로써 대장암 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 뛰어난 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0008] 도 1은 MTT 분석에 의해 측정된 HT-29 세포 생존도에 있어서 여러 분자량의 COS의 효과를 나타낸 것이다. LMWCOS (A); MMWCOS (B); HMWCOS (C). 수치는 평균 $\pm$ SD ($n = 3$)로 나타났다.

도 2는 LMWCOS를 처리한 HT-29 세포의 형태학적 변화를 나타낸 것이다. 핵 상태는 100x 배율에서 형광 현미경으로 검출한 것이다.

도 3은 다양한 농도의 LMWCOS의 존재 하에서 실행한 DNA 단편 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 HT-29암세포에서 아포토시스 관련 단백질의 발현에 있어서 LMWCOS의 효과를 나타낸 것이다. β -액틴을 내부 표준으로서 사용하였다.

도 5는 HT-29암세포에서 카스파아제 단백질의 발현에 있어서 LMWCOS의 효과를 나타낸 것이다. β -튜불린을 내부 표준으로서 사용하였다.

도 6은 HT-29암세포에서 NF- κ B 패밀리 및 염증에 있어서 LMWCOS의 효과를 나타낸 것이다. β -튜불린을 내부 표준으로서 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] 이하, 본 발명을 실시예를 들어 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 이므로, 본 발명을 이에 한정하는 것으로 해석해서는 안 된다.

[0010] 물질

[0011] 고분자량 COS (HMWCOS, 5 내지 10 kDa), 중간분자량 COS (MMWCOS, 3 내지 5 kDa) 및 저분자량 COS (LMWCOS, 1 내지 3 kDa)와 같이 분자량이 상이한 3종류 COS를 키토 라이프 캄파니(Kitto Life Co., 대한민국 평택 소재)에서 입수하였다. RPMI 1640 배지, 우태아 혈청(FBS) 및 페니실린 G/스트렙토마이신 (10,000 U/mL)을 키포 비알엘, 라이프 테크놀로지스(Gibco BRL, Life Technologies(미국 뉴욕 소재)에서 입수하였다. HT-29 인간 대장암 세포를 아메리칸 타입 오브 컬처 컬렉션(American Type of Culture Collection, 미국 버지니아주 매너스 소재)에서 입수하였다. 웨스턴 블롯 일차 항체 및 이차 항체를 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology)에서 입수하였다. 세포 배양에 필요한 그 밖의 다른 물질은 키포 비알엘, 라이프 테크놀로지스에서 입수하였다.

[0012] 실시예 1. MTT 분석을 이용한 세포 배양 및 세포독성 결정

[0013] 5% CO₂를 갖는 가습 분위기 하에 37°C에서 100U/mL 페니실린, 100 μ g/mL 스트렙토마이신, 2mM 글루타민 및 10% FBS로 보충된 RPMI-1640 배지에서 HT-29 세포를 배양하고 유지하였다. 10% FBS로 보충된 DMEM 중에서 2×10^4

밀도로 세포를 96-웰 플레이트에서 24시간동안 배양하였다. 24시간 후에, 10 내지 50 mg/ml 농도의 키토산 올리고당 용액을 96-웰 플레이트에서 10배 희석되도록 고분자량 COS (HMWCOS, 5 내지 10 kDa), 중간분자량 COS (MMWCOS, 3 내지 5 kDa) 및 저분자량 COS (LMWCOS, 1 내지 3 kDa)를 첨가하여 처리하고, 숙시네이트 디하이드로게나아제 미토콘드리아 활성을 측정하는 3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸륨 브로마이드 (MTT) 분석을 이용하여 세포독성을 측정하였다. 배양 배지를 흡입시키고, MTT 용액(1mg/mL)을 각 웰에 첨가하고, 4시간 동안 배양하였다. 상기 배지를 흡입시키고, 자색 결정을 DMSO로 용해시켰다. Genios 다기능성 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 각 웰의 흡광도를 540nm에서 측정하였다.

[0014] 세포 독성에 대한 COS 효과를 비교하기 위해서 세포를 점증 농도의 COS에 24시간, 48시간 및 72시간동안 노출시키고, MTT 분석에 의해 세포 생존도를 조사한 후 결과를 도 1에 나타냈다. 점증 농도의 COS에 HT-29 세포를 노출시킨 경우에 대조군 세포에 비해 세포 생존도가 투약량- 및 시간-의존적으로 감소하였다. 세포를 파생물에 72시간 노출한 후에도 유의한 세포독성 효과가 나타나지 않았으므로, 48시간 노출에서의 세포독성 결과를 이용하여 비교 분석을 실시하였다. 72시간 동안 LMWCOS 처리는 2, 3, 4 및 5 mg/mL 농도 각각에서 약 66, 52, 40 및 27% 비율로 세포 생존도를 억제하였다. 72시간 동안 MMWCOS 처리는 2, 3, 4 및 5 mg/mL 농도 각각에서 약 75, 65, 56 및 41% 비율로 세포 생존도를 억제하였다. 72시간 노출 후에 HMWCOS는 2, 3, 4 및 5 mg/mL 농도 각각에서 약 82, 75, 68 및 58% 비율로 세포 생존도를 억제하였다. COS 중에서 LMWCOS는 세포 증식 억제에 대하여 가장 높은 활성을 나타내었고, MMWCOS 및 HMWCOS는 LMWCOS에 비해 낮은 억제 효과를 나타내었다.

[0015] 실시예 2. 형광 현미경 분석

[0016] LMWCOS의 관측된 세포독성 효과가 아포토시스 유도과 관련 있는지를 결정하기 위해서, HT-29 세포를 LMWCOS로 24시간 동안 처리하고, Hoechst 33258 염색을 실시하였다

[0017] 다양한 농도의 LMWCOS로 처리된 HT-세포를 PBS로 2회 세척하고, 실온에서 30분동안 PBS중 4% 파라포름알데하이드에 고정시켰다. 고정된 세포를 PBS로 세척하고, 그 형태 변화를 광학 현미경으로 식별하였다. 식별 후에, 세포를 형광 DNA-결합 염료인 Hoechst 33342(Sigma-Aldrich., St. Louis, USA) 1µg/ml로 염색하고, 실온에서 1시간 동안 배양하여서 핵 축합/응집을 밝혀내었다. Hoechst로 염색된 세포를 시각화하고, 형광 현미경(CTR 6000; Leica, 독일 베를린 소재) 하에서 사진 촬영한 후 결과를 도 2에 나타내었다.

[0018] 실시예 3. DNA 단편 분석

[0019] 세포(1 x 10⁶ 세포/mL)를 10cm² 조직 배양 플라스크에서 24시간 동안 증식시키고, 상이한 농도의 LMWCOS로 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후에, 세포층을 PBS로 세척하고, 트립신화하고, 3분 동안 1500 x g으로 원심분리하여서 세포 펠릿을 수득하였다. 상기 펠릿을 에펜도르프 튜브로 옮기고, 얼음중 세포 용해(lysis) 완충액을 이용하여 20분동안 용해시켰다. 혼합물을 원심분리하고, 상청액을 수거하였다. RNAs를 상청액에 첨가하고, 37°C에서 1시간동안 배양하였다. 이어서, 70% 빙냉 에탄올 2.5부피% 및 3M 암모늄 아세테이트 0.1부피%를 첨가하고, -20°C에서 밤새 배양하였다. 최종적으로, 혼합물을 3분동안 1500 x g으로 원심분리하고, DNA 펠릿을 취하였다. DNA를 TE 완충액에 용해시키고, 2% 아가로스 겔 상에서 1시간동안 100 V로 전기영동하여 분석하였다. 이어서, 상기 겔을 1 mg/mL 에티디움 브로마이드(EtBr)로 염색하고, AlphaEase(등록상표) 겔 이미지 분석 소프트웨어(알파 이노테크: Alpha innotech, 미국 캘리포니아주)를 사용하여 UV 광으로 시각화하였다(도 3).

[0020] LMWCOS로 처리된 HT-29 세포로부터 추출된 DNA의 아가로스 겔 전기영동에서 180 내지 200 b의 ladder로 비-무작위 단편이 점진적으로 증가하였다. 이러한 결과는 LMWCOS가 HT-29 세포의 아포토시스를 투약량 의존적으로 유도함을 의미하고, 이는 세포 생존도 감소와 일치한다. 따라서, LMWCOS가 HT-29 세포에서 아포토시스를 유도한다고 볼 수 있다.

[0021] 실시예 4. 웨스턴 블롯 분석

[0022] 세포를 RPMI-1640 배지에서 1 x 10⁴ 세포 밀도로 10cm² 세포 배양 접시에서 배양하고, 24 시간 동안 배양하였다. 세포를 상이한 농도의 LMWCOS로 72시간동안 처리하였다. 상기 세포를 RIPA 완충액(시그마-알드리치, 미국 세인트루이스주 소재)으로 용해시키고, 프로테아제 억제제 혼합액을 포함한 상청액을 2300 x g으로 10분 동안 원심분리하여 불용성 물질을 제거하였다. BCA 단백질 분석 키트(Thermo Science, 미국 록포드 소재)를 이용하여 상청액 중 단백질 농도를 결정하였다.

[0023] 동량의 세포 용해물을 10% SDS-PAGE 상에서 분석하고, 단백질을 면역블롯 니트로-셀룰로즈 막 상에 블롯팅하고, 0.1% 트윈(Tween) 20을 함유하는 TBS (TBS-T)중 5% BSA로 1시간 동안 블로킹하였다. 이어서, 일차 모노클로날 항체를 TBS-T(1:1000 희석)에 첨가하고, 밤새 배양하였다. 호스래디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase)에 결합된 이차 항체를 사용하여 단백질 결합을 검출하고, 화학발광 ECL 분석 키트(아머삼 파마시아 바이오사이언스(Amersham Pharmacia Biosciences), 영국 잉글랜드 소재)를 제조업체 설명서에 따라 사용하여 강화시키고, FUJIFILM LAS-3000 시스템(일본 도쿄 소재) 상에서 이미지화하였다. β -액틴 또는 β -튜불린 단백질의 농도를 분석하여서 단백질의 기저 수준을 표준화하였다.

[0024] 아포토시스 조절 단백질 발현 농도의 조정

[0025] Bcl-2 계열 단백질은 아포토시스 과정에서 복잡한 조절자 역할을 한다. LMWCOS 처리는 Bcl-2의 투약량 의존적 발현을 초래하고, Bax 단백질 발현은 투약량 의존적 방식으로 상향 조절되었다. LMWCOS가 HT-29 세포에서 p53 단백질 발현에 대해 조절 효과를 나타내지만(도 4), 이러한 결과는 LMWCOS의 항증식성 효과의 일부가 Bcl-2 경로의 하향 조절과 함께 p53 및 Bax의 상향 조절을 통해 아포토시스 유도과 관련되었음을 의미한다.

[0026] LMWCOS의 관찰된 항증식성 효과가 아포토시스 유도와 관련되었는지를 결정하기 위해서, HT-29 세포를 LMWCOS에 노출시키고, 카스파아제로 알려진 특이 시스테인 프로테아제로 활성화시켰다. LMWCOS 처리로 인해 프로-카스파아제-3, -8 및 -9의 하향 조절로 이어졌다. 후속적인 웨스턴 블롯 분석에 따르면, 활성화 카스파아제-3의 다운스트림 타겟인 PARP 단백질의 점진적인 단백질가수분해 절단이 LMWCOS 처리된 HT-29 세포에서 발생하였고, 이러한 절단은 농도 의존적인 방식으로 유도되었다. 이들 데이터는 LMWCOS가 HT-29 세포에서 아포토시스를 유도한다는 사실과 일치한다.

[0027] NF- κ B 의존적 반응 단백질에 대한 COS 1 내지 3 kDa의 효과

[0028] NF- κ B 계열은 세포 성장, 세포 증식, 세포 부착, 염증 및 세포 침윤에서 결정적인 역할을 한다. NF- κ B 활성화의 억제제 아포토시스 기동력(apoptotic impetus)에 다수의 세포주를 노출시킨다. 따라서, LMWCOS가 NF- κ B 활성화 및 NF- κ B-의존적 활성화 단백질의 억제와 관련된다(도 6). LMWCOS 처리는 p65의 발현 수준 감소를 전사 수준에서 투약량-의존 방식으로 유도하였다. NF- κ B(I κ B)의 저해제 및 NF- κ B의 업스트림 활성화 키나아제(upstream activating kinases)인 I κ B 키나아제(IKK)의 하향-조절 또한 LMWCOS로 처리한 후에 발견되었다.

[0029] 게다가, LMWCOS로 처리한 HT-29 세포에서 iNOS 및 COX-2의 발현 수준을 비교하였다. NF- κ B는 IAP과 같은 항-아포토시스 유전자 및 COX-2 및 iNOS와 같은 그 외 매개체를 포함하는 많은 유전자의 발현을 조절하는데 참여한다고 알려져 있다. LMWCOS의 항-증식성 및 아포토시스 효과는 NF- κ B 조절 유전자 발현의 저해에 의해 설명될 수 있다. 이러한 결과는 LMWCOS의 처리가 COX-2 및 iNOS와 같은 NF- κ B-조절 유전자 산물의 발현을 하향-조절한다는 것을 나타낸다.

[0030] 키토산 및 COS의 항암-활성은 이미 보고된 것으로 이러한 키토산 또는 COS의 기원은 주로 동물로부터 얻어진 것이다. 이전의 데이터들은 키토산 및 COS의 항-종양 효과에 대한 것에만 국한되어 있다. 본 발명에서는, 다양한 분자량의 COS의 HT-29 인간 대장암 세포의 성장을 저해 활성을 연구하였다. COS로 세포를 처리하면 HT-29 세포에서 세포 생존도를 투약량- 및 시간-의존 방식으로 저해하는 결과를 나타낸다. 게다가, LMWCOS는 가장 높은 생존도 저해 효과를 나타냈다. 일부 연구에서 탈아세틸화 정도 및 분자량과 같은 구조적 특성에 따라 COS의 항-종양 활성이 달라짐이 보고되었다. 그리고 또한, 유사한 결과가 세포내 시스템에서도 보고되었으나, 자세한 항-암 메커니즘은 여전히 불분명하다.

[0031] HT-29 세포주에서의 LMWCOS의 아포토시스 유도는 이미 보고된 것으로 이러한 키토산 또는 COS의 기원은 주로 동물로부터 얻어진 것이다. 아포토시스의 유도는 DNA 단편의 특정 패턴, 카스파아제의 활성화 (-3, -8 및 -9) 및 PARP의 절단에 의해 확인된다. 카스파아제의 순차적 활성화는 세포 내 특이 구조, 조절 및 DNA 재생 단백질을 분해하는 세포 아포토시스의 실행기에서 중요한 역할을 한다. 활성화된 카스파아제-9는 카스파아제-3와 같은 다른 다운스트림 카스파아제의 단백질분해 활성을 일으킨다. 카스파아제-3의 활성화는 PARP와 같은 주요 세포내 단백질의 절단을 야기할 것이다. 종양 억제 단백질 p53은 세포 주기 조절 단백질(사이클린, 사이클린 의존 키나아제 및 사이클린 의존 키나아제 저해제) 및 아포토시스 유도 단백질(Apaf1, Bad, Bax 및 Fas)의 조절에 관여하여, 세포운명(cell fate), 세포 성장 및 세포사에서 주요 역할을 수행한다. LMWCOS 처리는 프로-아포토시스 Bax 단백질 수준의 상향-조절 뿐만 아니라 항-아

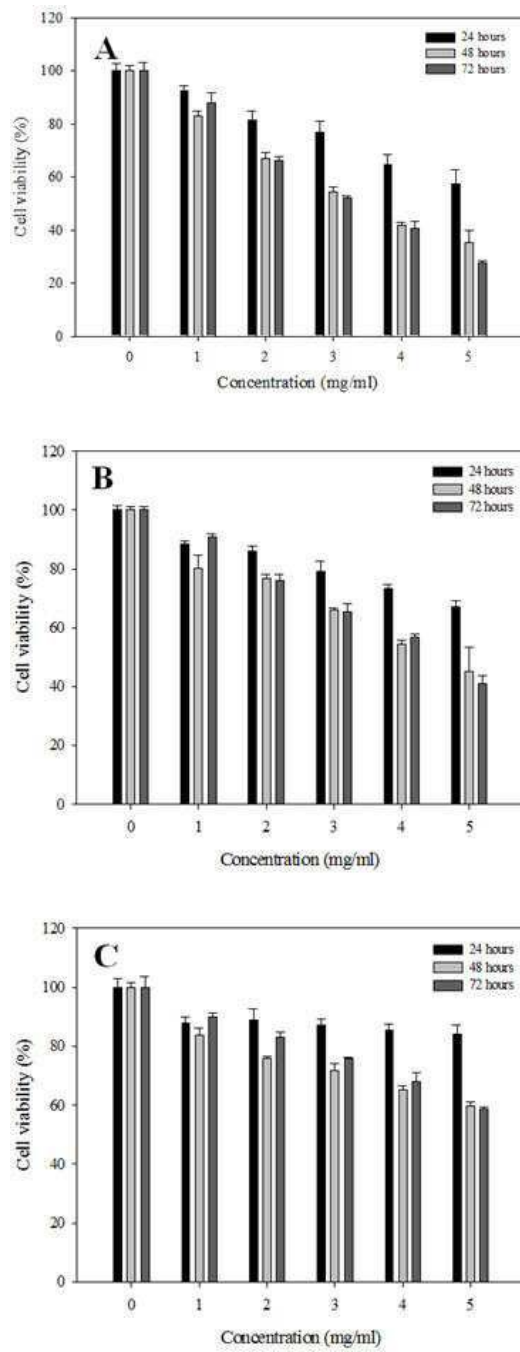
아포토시스 Bcl-2 단백질 수준의 하향 조절을 유도한다. 게다가, LMWCOS는 투여량-의존 방식으로 p53 단백질 수준을 상향-조절한다. 그러므로, 이러한 결과들은 LMWCOS가 p53의 유도, Bax의 활성화, Bcl-2의 저해, 카스파아제의 프로세싱 및 PARP의 절단을 통해 HT-29 인간 대장암 세포의 아포토시스를 유도한다는 것을 증명한다.

[0032] NF- κ B 조절 유전자는 종양 증식 및 전이에 중요한 유전자이다. 이러한 경로들의 확인은 화학저항 (chemoresistant) 메커니즘을 이해하고 신규한 항암 치료를 설계하는데 가장 중요한 것이다. NF- κ B는 아포토시스에 대항하는 보호 세포를 생산하는 유전자 (c-IAP, x-IAP, Bcl2, Bcl-xL etc)의 전사 조절에 의해 설명된다. 게다가, NF- κ B는 COX-2 및 iNOS와 같은 염증성 매개체를 포함하는 많은 유전자 산물을 조절한다. 본 발명에서, LMWCOS는 Bcl-2, COX-2 및 iNOS와 같은 NF- κ B 조절 단백질의 발현을 하향-조절시킨다. 이러한 단백질들은 IKK, I κ B 및 p65 발현 수준의 감소뿐만 아니라 NF- κ B 경로의 불활성화에도 관련되어 있다. 본 발명의 결과들은 HT-29 인간 대장암 세포에 대한 LMWCOS의 항암 효과가 NF- κ B 패밀리 및 NF- κ B 의존 시그널링의 저해를 통해 매개되어 세포 증식을 저해하고 아포토시스를 유도함을 나타낸다.

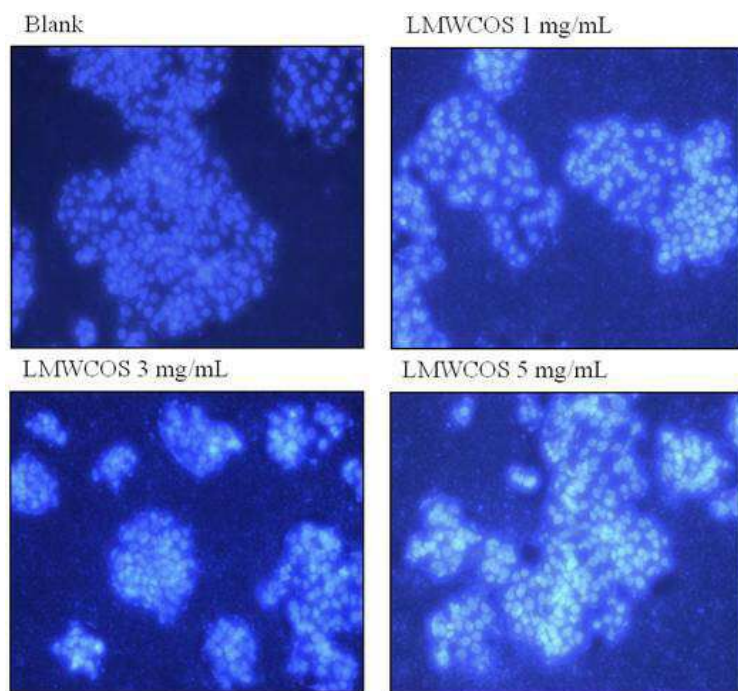
[0033] 결론적으로, 본 발명은 LMWCOS가 HT-29 인간 대장암 세포의 증식에 있어서 저해 효과를 갖는 것을 입증하였다. LMWCOS에 의한 아포토시스의 유도는 p53의 유도, Bax의 활성화, Bcl-2의 저해 및 카스파아제-3, 카스파아제-9와 같은 카스파아제의 프로세싱 및 PARP의 절단을 통해 확인되었다. 게다가, NF- κ B 의존 경로를 통한 아포토시스의 유도에도 관련되어 있음이 나타났다. 이러한 결과들은 LMWCOS가 인간 대장암 연구에 적용될 가능성이 있음을 제시하는 것이다.

도면

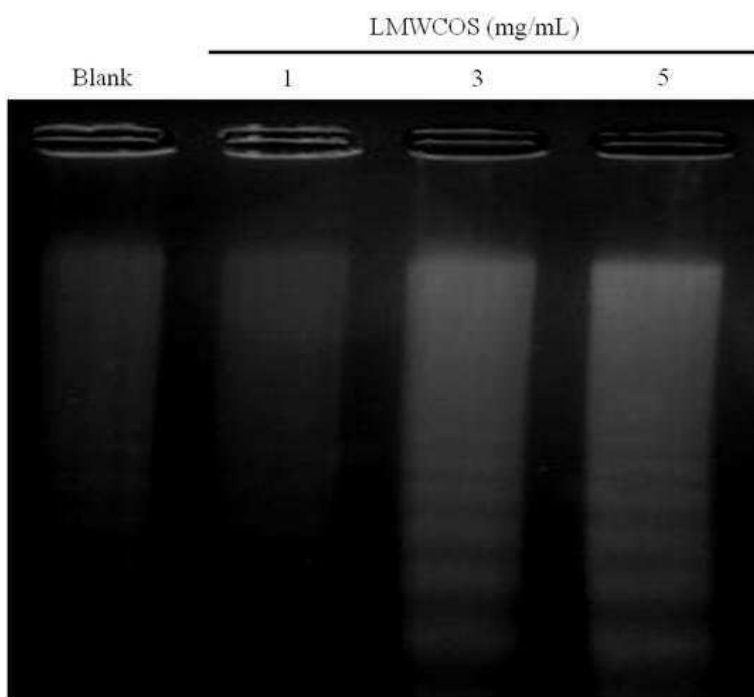
도면1



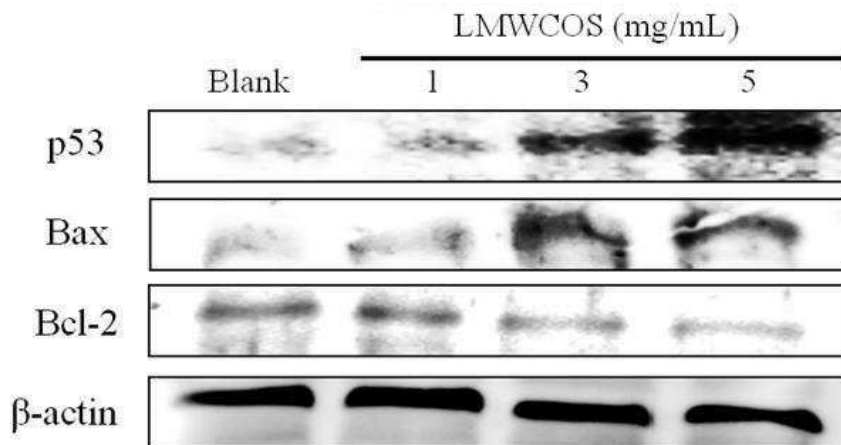
도면2



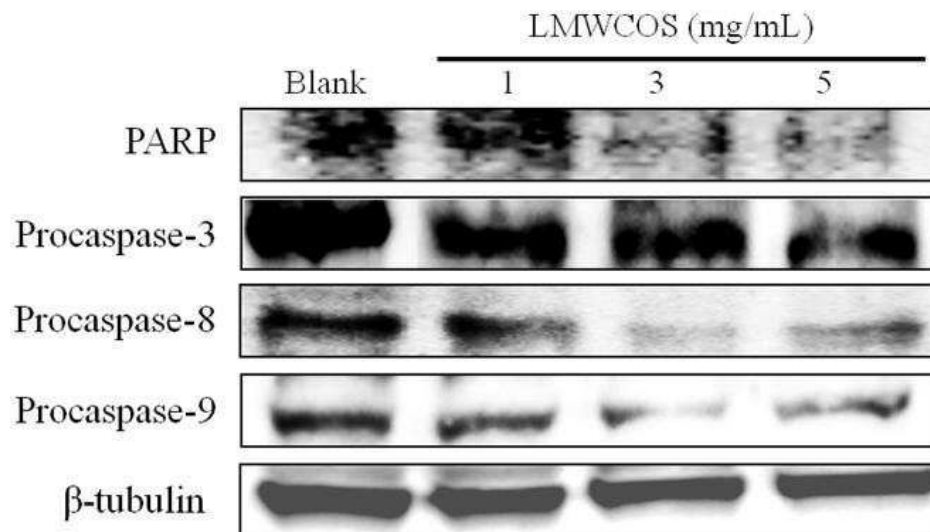
도면3



도면4



도면5



도면6

