



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0050188
(43) 공개일자 2010년05월13일

(51) Int. Cl.

A61K 36/03 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0109354

(22) 출원일자 2008년11월05일

심사청구일자 2008년11월05일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자

최영현

부산광역시 동래구 사직2동 쌍용예가아파트
107-2303

정영기

경상남도 김해시 장유면 대청리 푸르지오8차아파트
903-2001

김세권

부산광역시 동래구 사직2동 쌍용예가아파트
125-1402호

(74) 대리인

이덕록

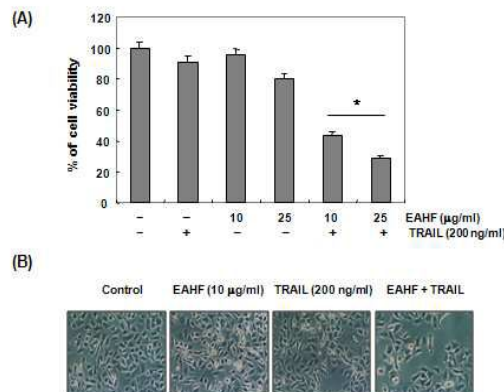
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) TRAIL 내성 암 세포 피해 활성을 갖는 톱 추출물

(57) 요약

본 발명은 TRAIL에 내성을 갖는 암 세포에 특이적으로 작용하는 톱 에틸 알코올 추출물(EAHF)의 항암 활성 약학 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따르면 톱 에틸 알코올 추출물(EAHF)은 TRAIL에 저항성을 가지는 암세포에서 Bax 및 카스파아제를 포함한 아포토시스 단백질의 상향조절 및 활성화를 통해 암세포를 TRAIL-매개 아포토시스에 민감화시켜 유의적인 아포토시스 유발능을 나타내기 때문에, EAHF와 TRAIL 결합 처리는 TRAIL 내성 암 세포 억제를 위한 효과적인 예방제 및 치료제를 제공할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

툽 추출물과 TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)을 유효성분으로 함유하는 항암 활성 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 툽 추출물이 툽 에틸 알코올 추출물(EAHF)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물이 TRAIL에 내성을 갖는 암 세포에 특이적으로 작용하는 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 TRAIL에 내성을 갖는 암 세포가 인간 위 선암종(AGS) 세포인 것을 특징으로 하는 조성물,

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물의 유효 성분이 10 내지 25 $\mu\text{g/L}$ 의 툽 에틸 알코올 추출물(EAHF)와 200 ng/mL의 TRAIL으로 구성된 것임을 특징으로 하는 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 툽 추출물의 신규 항암 활성 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 TRAIL에 내성을 갖는 암 세포에 특이적으로 작용하는 툽 에틸 알코올 추출물(EAHF)의 유효성분을 함유하는 항암 활성 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 종양 괴사인자-관련 아포토시스-유발 리간드[Tumor necrosis factor(TNF)-related apoptosis-inducing ligand; TRAIL]는 막 통과 단백질(transmembrane protein)로서, 이들은 세포내 사멸 영역을 통해 아포토시스 신호를 전달하는 막-결합 사멸 수용체에 결합함으로써 부대적 아포토시스 경로에 관여한다고 알려져 있다. 몇몇 세포 주에 있어서, TRAIL과의 세포 감수성은 세포막 TRAIL 수용체 및 카스파아제-8의 발현에 의존한다. 카스파아제-8은 TRAIL에 대응하여 활성화되고, 세포질로 방출되며, 여기서 프로테아제 캐스케이드를 개시시키고, 이는 카스파아제-3 및 -7을 포함한 작동체 카스파아제들을 활성화시킨다.

[0003] 종래 TRAIL을 이용하거나 TRAIL 유전자이입을 통한 새로운 암치료법의 개발이 시도되어 왔으며, 예를 들어 대한민국 특허출원 제10-2003-7015417호에 T R A I L 수용체에 면역특이적으로 결합하는 항체가 개시되어 있고, 대한민국 특허출원 제10-2004-0006450호에는 T R A I L을 이용하여 혈관신생을 억제시키는 방법이 개시된 바 있다.

[0004] 하지만, 인간 위 선암종(AGS) 세포주를 포함한 많은 종양 세포가 TRAIL의 아포토시스 효과에 내성을 획득한다는 몇몇 보고가 있어왔다. 아포토시스 유발성(proapoptotic) 단백질인 Bax로의 변성 및 IAP 군 인자의 발현의

증가가 TRAIL-매개 아포토시스에 대한 내성에 기여할 수도 있다. 최근 들어, 화학요법제들이 TRAIL-내성 세포에서 TRAIL-매개 상승작용적 세포독성을 민감화시킨다는 사실이 나타났다. 결론적으로, TRAIL-내성 암세포에서 TRAIL-유발 아포토시스를 민감화시킬 수 있는 작용제의 탐구가 매우 중요해지고 있다.

- [0005] 몇몇 역학적 연구들이 아시아 사회에서 중요한 식이 성분인 해초의 편재적인 소비가 몇 가지 유형의 암에 대한 보호 요소라는 사실을 제시한 바 있다. 종래의 연구결과들은 다양한 식용 해초 추출물이 화학적으로 유발된 종양발생에 대해 개시 및 증진 상태의 억제를 통해 억제 효과를 나타낸다는 사실을 보여주었다.
- [0006] 이들 중, 톳(*Hizikia fusiforme*)은 일종의 갈조류로서, 주로 한국, 일본 및 중국을 포함한 북서태평양의 온대 해양 지역에서 성장하며, 오랫동안 한약재 및 건강식품으로서 널리 이용되어 왔다.
- [0007] 톳의 생리활성과 관련하여, 대한민국 등록특허 제10-0739871호 “식용갈조류 톳 유래의 티로시나아제 억제 활성 플라보노이드 글리코시드 화합물”은 식용갈조류 톳 유래의 티로시나아제 억제 활성 플라보노이드 글리코시드 화합물에 관한 것으로, 식용갈조류 톳의 메탄올 추출물의 성분을 크로마토그래피를 실시하여 분리한 후 이들 성분 중에서 티로시나아제 억제 활성이 뛰어난 성분을 조사한 다음 이를 동정함으로써 강력한 티로시나아제 억제 활성을 가지는 플라보노이드 글리코시드 화합물을 얻을 수 있고 이를 화장품, 의약 및 농업 산업에서 티로시나아제 억제용 조성물로 활용할 수 있는 매우 뛰어난 효과가 있음이 개시되어 있다.
- [0008] 또한 대한민국 등록특허 제10-0397531호, 대한민국 특허출원 제10-2002-0083555호 등에 톳을 비롯한 갈조류 추출물의 면역증강 효과, 퇴행성 관절염 치료 활성 등의 효과가 개시되어 있다.
- [0009] 이와 같이 해초로부터 생활성 해양 천연 산물을 탐색하는 프로그램의 일환으로서, 본 발명에서는 다양한 인간 암 세포주에서 세포 성장을 저해하는 톳으로부터 몇 가지 추출물을 분리해내고, 이들 중, 톳 에틸 알코올 추출물(EAHF)이 비교적 강한 항증식 활성을 나타냄을 발견하였다. 그러나 이러한 추출물의 악성 세포, 특히 TRAIL-내성 암 세포에서의 분자적 메커니즘에 대한 연구는 현재까지 매우 열악한 실정인 바, 본 발명에서는 TRAIL-매개 아포토시스에 대한 EAHF의 민감화 효과를 연구하기 위한 모델 시스템으로서 TRAIL-내성 위 선암종 AGS 세포주를 이용하여, TRAIL 및 톳의 에틸 알코올 추출물의 조합을 이용한 처리가 TRAIL-내성 암세포를 치료하는데 안전하며, 효과적인 전략이 될 수 있다는 사실을 밝혀내고 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0010] 따라서 본 발명의 목적은 톳으로부터 에틸 알코올 추출물을 제조하고, TRAIL-내성 암 세포 치료에 있어서 톳 에틸 알코올 추출물의 신규 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 톳 추출물과 TRAIL을 유효성분으로 함유하는 항암 활성 약학 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명에 따른 톳 추출물은 바람직하게는 톳 에틸 알코올 추출물(EAHF)이나, 이에 제한되는 것은 아니며, 당업계에 공지된 다른 여러 가지 추출 방법으로 제조한 추출물일 수도 있다.
- [0013] 본 발명에 있어서, “유효성분”이라 함은 내재된 약리작용에 의해 그 의약품의 효능·효과를 직접 또는 간접적으로 발현한다고 기대되는 물질 또는 물질군(약리학적 활성성분 등이 밝혀지지 않은 생약 등을 포함한다)으로서 주성분을 포함하는 것을 의미한다.
- [0014] 상기 본 발명의 항암 활성 약학 조성물은 특히 TRAIL에 내성을 갖는 암 세포주에 특이적으로 작용하며, 특히 인간 위 선암종(AGS) 세포주에 세포독성 효과를 나타낸다.
- [0015] 본 발명에 따른 항암 활성 약학 조성물은 바람직하게는 10 μ g/mL 내지 25 μ g/mL 정도의 톳 에틸 알코올 추출물(EAHF)와 200 ng/mL의 TRAIL을 함유한다.
- [0016] 본 발명에서는 톳(*Hizikia fusiforme*)을 시중에서 구입하고, 이를 건조한 후, 에틸 알코올로 추출하여 톳 에틸 알코올 추출물(ethyl alcohol extract of *Hizikia fusiforme*; EAHF)을 제조하였다. 제조된 톳 에틸 알코올 추

출물(EAGH)를 동결 건조하여 얻은 분말을 이용하여 그 활성을 분석하였다.

- [0017] 본 발명에서는 종양괴사인자-관련 아포토시스-유발 리간드[Tumor necrosis factor(TNF)-related apoptosis-inducing ligand; TRAIL]에 내성을 갖는 암세포에서 본 발명에 따른 트 에틸 알코올 추출물(EAHF)의 효과를 알아보기 위하여, 인간 위암세포(AGS)를 EAHF, TRAIL, 또는 이들의 결합(EAHF + TRAIL)으로 처리하고, MTT 분석, 크로마틴 축합, DNA 분획화 및 세포 주기 분석을 수행하여 세포 생존력에 대한 트 에틸 알코올 추출물(EAHF)의 효과를 분석하였다.
- [0018] 그 결과 EAHF 단독 처리로는 AGS 세포에서 유의적인 성장 저해 및 세포 사멸을 유도하지 못하였고, TRAIL 단독 처리로도 약간의 세포 생존력 감소를 가져왔을 뿐이었다. 하지만, TRAIL과 다양한 농도의 EAHF의 조합으로 처리된 세포가 TRAIL 단독으로 처리한 것 보다 유의적으로 세포 생존력을 감소시켰고, EAHF + TRAIL로 공동처리된 AGS 세포가 대조군 세포와 비교하여 많은 형태학적 변화를 나타내었다. 특히, 세포 수축, 세포질 응집 및 세포 질성 필라멘트의 형성이 10 μ g/mL EAHF 및 200 ng/mL TRAIL로 처리된 세포에서 나타났다. 또한, AGS 세포에서 48 시간 결합 처리 후, EAHF와 TRAIL의 결합 처리가 응집된 염색질의 현저한 변화를 나타내었다.
- [0019] 또한 아가로스겔 전기영동은 결합 처리가 분획화된 DNA의 점진적인 축적을 유발시켰음을 지시하였고, 10 μ g/mL EAHF 및 200 ng/mL TRAIL을 이용한 결합 처리는 sub-G1 DNA를 가지는 세포의 빈도 증가를 가져왔으며, 이러한 결과는 TRAIL-내성 AGS 세포에서 EAHF가 TRAIL-매개 아포토시스를 유의적으로 촉진시켰음을 제시하는 것이다.
- [0020] 본 발명에서는 또한 EAHF와 TRAIL의 결합 처리가 Bcl-2 및(또는) IAP 단백질 군 인자들의 발현을 조절함으로써 아포토시스를 유발시키는지 여부를 조사한 결과, EAHF와 TRAIL의 결합 처리에 의해 아포토시스 촉진 Bax의 발현은 유의적으로 상향 조절된 반면, 항-아포토시스 Bcl-2 뿐만 아니라 Bcl-xL의 수준은 유의적으로 하향 조절되었다. 또한 IAP 군 단백질, 예를 들어 cIAP-1를 제외한 XIAP 및 cIAP-2의 수준은 10 μ g/mL EAHF 및 200 ng/mL TRAIL 처리 세포에서 하향 조절되었다.
- [0021] 본 발명에서는 또한 EAHF와 TRAIL로 처리된 AGS 세포에서 카스파아제-3, -8, 및 -9의 분열에 이은 PARP의 단백질 분해성 분열을 조사하기 위하여 AGS 세포에서 EAHF 및 TRAIL-매개 아포토시스 동안 다양한 카스파아제의 참여 여부를 시험한 결과, 웨스턴 블롯 분석으로부터 10 μ g/mL EAHF 및 100 ng/mL TRAIL 결합 처리는 TRAIL-내성 AGS 세포에서 카스파아제 및 PARP의 분열을 유의적으로 유발시켰다.
- [0022] 또한, 세포 유래 동량의 총 단백질을 함유한 세포 내용물을 대상으로 in vito 카스파아제 활성에 대해 분석한 결과, EAHF와 TRAIL의 결합 처리가 카스파아제-3, -8 및 -9 활성을 유의적으로 증가시켰으며, 이러한 결과는 EAHF와 TRAIL의 결합 처리가 적어도 부분적으로 카스파아제-의존 경로를 통해 AGS 세포에서 아포토시스성 사멸을 유발시켰음을 나타내는 것이다.
- [0023] 이와 같이 아포토시스에 대한 내성은 암의 화학요법적 처리에 대한 주요한 장애물이며, 종래 TRAIL이 다른 잠재적으로 중요한 신규 항암제를 대표함에도 불구하고, 최근의 연구들은 많은 암세포들이 TRAIL의 아포토시스 효과에 대해 내성을 나타냄을 보여주고 있다.
- [0024] 본 발명에 따른 트 에틸 알코올 추출물(EAHF)의 아포토시스 유발능은 EAHF를 악성종양과 대결하기 위한 잠재적으로 효과적인 예방제 및 치료제가 되도록 할 수 있다. 따라서 EAHF를 종래의 TRAIL과 결합한 처리가 화학요법 또는 TRAIL 단독 처리에 내성을 갖는 다양한 인간 암 치료를 위한 우수한 전략을 제공할 수 있을 것이다. 종합적으로 볼 때, 본 발명의 결과는 EAHF가 Bax 및 카스파아제를 포함한 아포토시스 단백질의 상향조절 및 활성화를 통해 세포를 TRAIL-매개 아포토시스에 민감화시킴을 제시한다.
- [0025] 결론적으로, 독성 투여량 이하의 EAHF와 조합한 TRAIL의 이용이, 상세한 메카니즘을 연구하기 위한 보다 상세한 연구가 필요한 것임에도 불구하고, 몇몇 TRAIL-내성 위암 세포를 안전하게 치료하기 위한 효과적인 치료적 전략을 제공할 수 있을 것이다.

효 과

- [0026] 본 발명에 따른 트 에틸 알코올 추출물(EAHF)은 TRAIL과 결합하여 Bax 및 카스파아제를 포함한 아포토시스 단백질의 상향조절 및 활성화를 통해 세포를 TRAIL-매개 아포토시스에 민감화시켜 유의적인 아포토시스 유발능을 나타내기 때문에, EAHF와 TRAIL 결합 처리는 TRAIL 내성 암 세포 억제를 위한 효과적인 예방제 및 치료제를 제공할 수 있는 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0027] 이하에서 본 발명의 바람직한 실시형태를 실시 예를 참고로 보다 구체적으로 설명한다. 하지만 본 발명의 범위가 이러한 실시 예에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 실시예

[0029] 본 발명의 실시 예에 있어서, MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide), DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) 및 PI (propidium iodide)를 시그마(Sigma; St Louis, MO)로부터 입수하였다. 카스파아제 활성 분석 키트는 알&디 시스템즈(R&D Systems; Minneapolis, MN)에서 입수하였다. 증강 화학발광(enhanced chemiluminescence; ECL)은 아메르삼(Amersham; Arlington Heights, IL)에서 구입하였다. RPMI 1640 배지 및 우태아혈청(FBS)은 각각 인비트로젠사(Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA) 및 킵코-BRL(GIBCO-BRL; Gaithersburg, MD)에서 구입하였다. 본 명세서에 특정하게 언급하지 않은 모든 다른 화학물질은 시그마로부터 구입하였다.

[0030] 한편, Bax, Bcl-2, Bcl-xL, XIAP, cIAP-1, cIAP-2, PARP, 카스파아제-3, 카스파아제-8 및 카스파아제-9에 대한 항체는 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA)에서 구입하였다. β -액틴에 대한 항체는 시그마로부터 입수하였다. 퍼옥시다아제-표지 동키 항-래빗 및 겁 항-마우스 면역글로불린(Peroxidase-labeled donkey anti-rabbit and sheep anti-mouse immunoglobulin)은 아메르삼에서 구입하였다.

[0031] 실시 예 1 : 톳 에틸 알코올 추출물(EAHF)의 제조

[0032] 톳은 대한민국 부산 지방 시장에서 구입하였다. 수돗물로 24 시간 동안 염분 및 모래를 제거하였다. 톳을 정제수로 조심스럽게 세정하고, 그늘에 5일 동안 정치시켰다. 건조된 톳을 80% 에틸 알코올로 10 mL/g 비율로 24 시간 동안 4℃ 냉장고에서 추출하였다. 추출물을 왓즈만 #29(Whatman #2) 필터를 통해 진공 여과하고, 동결 건조하여 건조 잔사를 얻은 후, -80℃로 정치시켰다. 분말을 수득하고, 이를 원료 용액으로서 100 mg/mL 농도의 디메틸 술폭사이드(DMSO)에 용해시키고, 분취액을 -20℃에서 보관하였다.

[0033] 실시 예 2 : 톳 에틸 알코올 추출물(EAHF)의 활성 분석

[0034] 상기 실시예 1에서 제조한 톳 에틸 알코올 추출물(EAHF)의 활성을 분석하기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다.

[0035] 1. 세포 배양 및 세포 생존력 분석

[0036] AGS 세포를 ATCC (American Type Culture Collection; Rockville, MD)에서 입수하여, 37℃에서 10% 열-비활성화 FBS, 2 mM 글루타민, 100 U/mL 페니실린 및 100 μ g/mL 스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640 배지 및 5% CO₂에서 배양하였다.

[0037] 세포 생존력 연구를 위하여, AGS 세포를 70% 컨플루언스로 배양하고, 지시된 농도의 EAHF, TRAIL, 또는 결합 처리(EAHF + TRAIL)로 처리하였다. 대조군 세포에 0.1% DMSO (비이클 조절) 함유 완전 배지를 48 시간 동안 보충하였다. 처리 후, 세포 생존력을 MTT 분석법으로 측정하였다.

[0038] 2. 핵 염색

[0039] EAHF 및(또는) TRAIL로 48 시간 동안 처리한 후, 세포를 배양하고, 빙냉 PBS 중에서 세척하고, PBS 중 3.7% 파라포름알데하이드로 실온에서 10 분 동안 고정시켰다. 고정된 세포를 PBS로 세척하고, DAPI 용액으로 실온에서 10 분 동안 염색하였다. 세포의 핵 형태를 청색 형광 현미경(Carl Zeiss, Germany)으로 조사하였다.

[0040] **3. DNA 분획 분석**

[0041] 세포를 EAHF 및(또는) TRAIL로 처리하고, 30 분 동안 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 및 0.5% Triton X-100을 함유한 완충액 중의 얼음 상에서 용리시켰다. 용해물을 볼텍싱 처리하고, 10,000 g에서 20분 동안 원심분리하여 세정하였다. 상청액 중의 분획화된 DNA를 동비의 중성 페놀 : 클로로포름 : 이소아밀 알코올(25 : 24 : 1, v/v/v)을 이용하여 추출하고, 에티디움 브로마이드(EtBr) 함유 1.0% 아가로스겔 상에서 전기영동으로 분석하였다.

[0042] **4. sub-G1 상의 측정을 위한 유세포 분석**

[0043] 세포를 배양하고, PBS로 한 번 세척하고, 빙냉 70% 에탄올 중에 고정하고, 4℃로 보관하였다. 분석 전에, 세포를 PBS로 다시 한 번 세척하고, 100 µg/mL RNase A, 50 µg/mL PI, 0.1% (w/v) 시트르산 소듐 및 0.1% (v/v) NP-40를 함유한 냉 PI 용액에 현탁시키고, 암 중에서 30 분 동안 추가로 배양하였다. 유세포분석기(flow cytometer; FACS Caliber, Becton Dickinson, San Jose, CA)를 이용하여 유세포 분석을 수행하고, 셀퀘스트 프로그램(CellQuest software)을 이용하여 적색 형광의 존재를 기준으로 상대 DNA 함량을 측정하였다.

[0044] **5. 단백질 추출 및 웨스턴 블롯 분석**

[0045] 세포를 배양하고, 빙냉 PBS로 한 번 세척하고, 80 µl 빙냉 용리 완충액(20 mM 자당, 1 mM EDTA, 20 µM Tris-HCl, pH 7.2, 1 mM DTT, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 5 µg/mL 켈스타틴 A, 10 µg/mL 류펩틴 및 2 µg/mL 아프로티닌) 중에서 2 분 동안 온화하게 용리시켰다. 상청액을 수집하고, 단백질 농도를 바이오-라드(Bio-Rad) 단백질 분석 키트(Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 측정하였다. 시료를 -80℃로 보관하거나, 면역분석에 즉시 이용하였다. 총 단백질 30 µg을 함유한 분취액을 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 상에서 분리하고, 지시된 1차 항체를 이용한 면역타본 분석을 위해 니트로셀룰로오스 막(Schleicher & Schuell, Keene, NH)으로 이송하였다. 퍼옥시다아제-공액화 2차 항체를 ECL 검출 시스템으로 검출하였다.

[0046] **6. 카스파아제 활성의 측정**

[0047] 제조자의 프로토콜에 따라 카스파아제-3, -8 및 -9 활성화 키트를 이용하는 비색 분석법에 의해 카스파아제 활성을 측정하였다. 상기 키트는 p-니트로아닐라이드(pNA)로 표지된 합성 테트라펩타이드를 이용한다. 간략하게, 세포를 보충된 용리 완충액 중에 용리시켰다. 상청액을 수집하고 디티오프레일 및 기질[카스파아제-3 용 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-pNA, 카스파아제-8 용 Ile-Glu-Thr-Asp (IETD)-pNA 및 카스파아제-9 용 Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-pNA]을 함유한 보충된 반응 완충액으로 37℃에서 배양하였다. 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 405 nm에서의 흡수능 변화를 측정함으로써 카스파아제 활성을 측정하였다.

[0048] **7. 통계적 분석**

[0049] 모든 데이터는 평균±SD로 나타내었다. 군들 간의 유의적 차이를 비쌍 스튜던츠 t-테스트(unpaired Student's t-test)를 이용하여 측정하였다. **p* < 0.05 값을 통계적 유의성의 표시로서 수용하였다. 본 명세서에 나타낸 모든 도면은 적어도 3회 이상의 독립적인 실험으로 얻은 것이다.

[0050] **실시 예 3 : AGS 세포에서 EAHF 및 TRAIL의 결합 처리에 의한 상승적인 아포토시스 유도**

[0051] 상기 실시 예 2에 기재한 바와 같이, 세포 생존력에 대한 EAHF, TRAIL, 또는 이들의 결합 처리(EAHF + TRAIL)의 효과를 분석하기 위하여, AGS 세포를 지시된 시약으로 처리하고, MTT 분석, 크로마틴 축합, DNA 분획화 및 세포 주기 분석을 수행하였다.

[0052] 그 결과 도 1A에 도시한 바와 같이, 48 시간 동안 10 또는 25 µg/mL EAHF 단독 처리로는 AGS 세포에서 유의적인 성장 저해 및 세포 사멸을 유도하지 못하였고, 200 ng/mL TRAIL 단독 처리로는 약간의 세포 생존력 감소를 가

저왔다. 주목할 만하게는, TRAIL과 다양한 농도의 EAHF의 조합으로 처리된 세포가 TRAIL 단독으로 처리한 것보다 유의적으로 세포 생존력을 감소시켰다(도 1A 참조). 또한, 역상 현미경에 의한 직접 관찰로부터, EAHF + TRAIL로 공동 처리된 AGS 세포가 대조군 세포와 비교하여 많은 형태학적 변화를 나타내었다.

[0053] 특히, 세포 수축, 세포질 응집 및 세포질성 필라멘트의 형성이 10 μ g/mL EAHF 및 200 ng/mL TRAIL로 처리된 세포에서 나타났다. 또한, AGS 세포에서 48 시간 결합 처리 후, EAHF와 TRAIL의 결합 처리가 응집된 염색질의 현저한 변화를 나타내었다(도 2A 참조). 그러나 10 μ g/mL EAHF 또는 200 ng/mL TRAIL 단독 처리는 48 시간 이후 핵 중에 어떠한 응집된 염색질도 유발시키지 않았다. 또한 아가로스겔 전기영동은 결합 처리가 분획화된 DNA의 점진적인 축적을 유발시켰음을 나타내었고, 이는 아포토시스와 연관된 내부뉴클레오솜 분열(internucleosomal cleavage)에 기인한 DNA 분획화의 전형적인 사다리 패턴을 나타내었다(도 2B 참조).

[0054] 또한 아포토시스 유도의 정량적 측정값을 얻기 위하여, 본 발명에서는 유세포 분석법을 이용하여 sub-G1 DNA 성분을 갖는 세포의 수를 조사하였다. 도 2C에 도시한 바와 같이, 10 μ g/mL EAHF 및 200 ng/mL TRAIL을 이용한 결합 처리는 sub-G1 DNA 성분을 갖는 세포의 유의적 축적을 가져온 반면, EAHF 또는 TRAIL 단독 처리는 그렇지 않았다. 이러한 결과는 TRAIL-내성 AGS 세포에서 EAHF가 TRAIL-매개 아포토시스를 유의적으로 촉진시켰음을 제시하는 것이다.

[0055] 실시 예 4 : AGS 세포에서 EAHF와 TRAIL에 의한 Bcl-2 군 단백질의 상승적인 조절

[0056] Bcl-2 및 IAP 단백질 군의 아포토시스 촉진(pro-apoptotic) 및 항-아포토시스 인자는 세포 생존력을 조절하는데 있어 중요한 역할을 한다. 이러한 단백질은 세포의 운명을 결정하기 위한 다양한 업스트림 생존 및 디스트레스 신호의 광범위한 배열을 방해한다. 따라서 본 실시 예에서는 상기 실시 예 2에 기재한 바와 같이, 결합 처리가 Bcl-2 및(또는) IAP 단백질 군 인자들의 발현을 조절함으로써 아포토시스를 유발시키는지 여부를 조사하였다.

[0057] 그 결과 도 3에 나타난 바와 같이, 이들 단백질의 수준은 10 μ g/mL EAHF 또는 200 ng/mL TRAIL 단독 처리에 대응하여 이들 단백질의 수준을 유의적으로 변화시키지 못하였다. 반대로, 결합된 처리에 의해 아포토시스 촉진 Bax의 발현은 유의적으로 상향 조절된 반면, 항-아포토시스 Bcl-2 뿐만 아니라 Bcl-xL의 수준은 유의적으로 하향 조절되었다. 또한 IAP 군 단백질, 예를 들어 cIAP-1를 제외한 XIAP 및 cIAP-2의 수준은 10 μ g/mL EAHF 및 200 ng/mL TRAIL 처리 세포에서 하향 조절되었다. 그러나 XIAP, cIAP-1 및 cIAP-2 발현 수준은 10 μ g/mL EAHF 또는 200 ng/mL TRAIL 단독 처리에 대응하여 비교적 변하지 않거나 약간 저해되었다.

[0058] 실시 예 5 : AGS 세포에서 EAHF 및 TRAIL에 의한 카스파아제 활성의 상승적-유발

[0059] 최근의 연구들은 카스파아제가 아포토시스성 자극에 의해 유발된 아포토시스의 매우 중요한 조절제라는 사실을 나타낸 바 있다. 따라서 본 실시 예에서는 상기 실시 예 2에 기재한 바와 같이, AGS 세포에서 EAHF 및 TRAIL-매개 아포토시스 동안 다양한 카스파아제의 참여 여부를 시험하기 위하여, 48 시간 동안 EAHF와 TRAIL로 처리된 AGS 세포에서 카스파아제-3, -8, 및 -9의 분열에 이은 PARP의 단백질 분해성 분열을 조사하였다.

[0060] 그 결과 도 4A에 나타난 바와 같이, 웨스턴 블롯 분석은, EAHF 또는 TRAIL 단독 처리는 카스파아제 및 PARP 분열에 약간 영향을 주거나, 전혀 영향을 주지 않았음을 나타내었다. 그러나 10 μ g/mL EAHF 및 100 ng/mL TRAIL 결합 처리는 TRAIL-내성 AGS 세포에서 카스파아제 및 PARP의 분열을 유의적으로 유발시켰다,

[0061] 이어서, 세포 유래 동량의 총 단백질을 함유한 세포 용리물을 in vito 카스파아제 활성에 대해 분석하였다. 도 4B에 나타난 바와 같이, EAHF와 TRAIL의 결합 처리는 카스파아제-3, -8 및 -9 활성을 유의적으로 증가시켰다. 그러나 EAHF 또는 TRAIL 단독 처리는 AGS 세포에서 이들의 활성에 영향을 끼치지 않았거나 단지 약간의 영향을 끼쳤다. 이러한 결과는 EAHF와 TRAIL의 결합 처리가 적어도 부분적으로 카스파아제-의존 경로를 통해 AGS 세포에서 아포토시스성 사멸을 유발시켰음을 나타내는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 세포 생존력에 대한 EAHF, TRAIL, 또는 이들의 결합 처리(EAHF + TRAIL)의 효과를 나타낸 도이다.

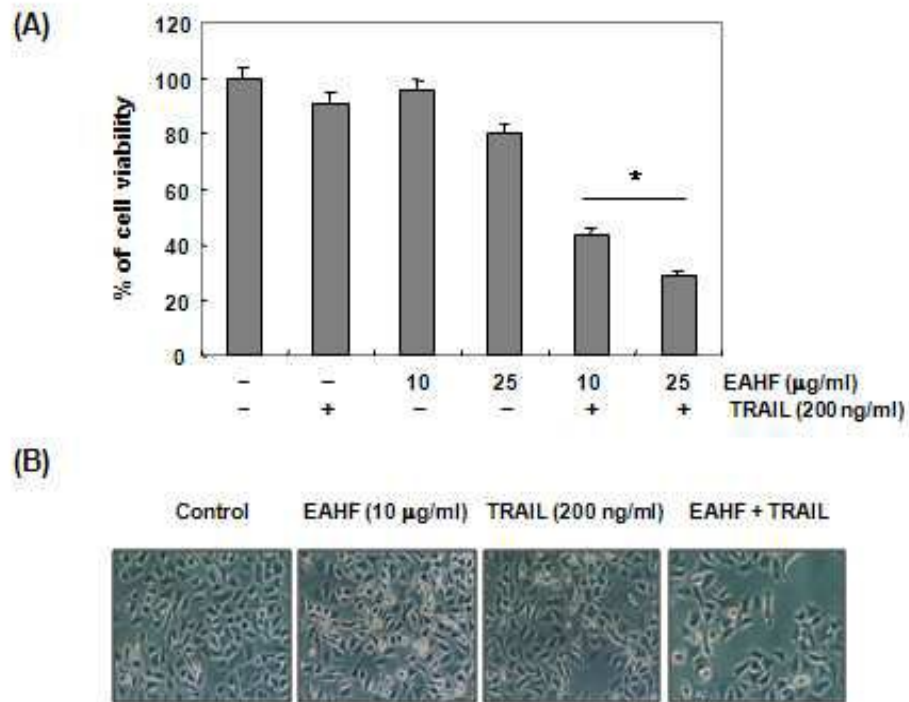
[0063] 도 2는 AGS 세포에서 EAHF와 TRAIL의 결합 처리로 나타난 염색질의 변화를 나타낸 도이다.

[0064] 도 3은 AGS 세포에서 EAHF와 TRAIL의 결합 처리에 따른 단백질 수준을 나타낸 도이다.

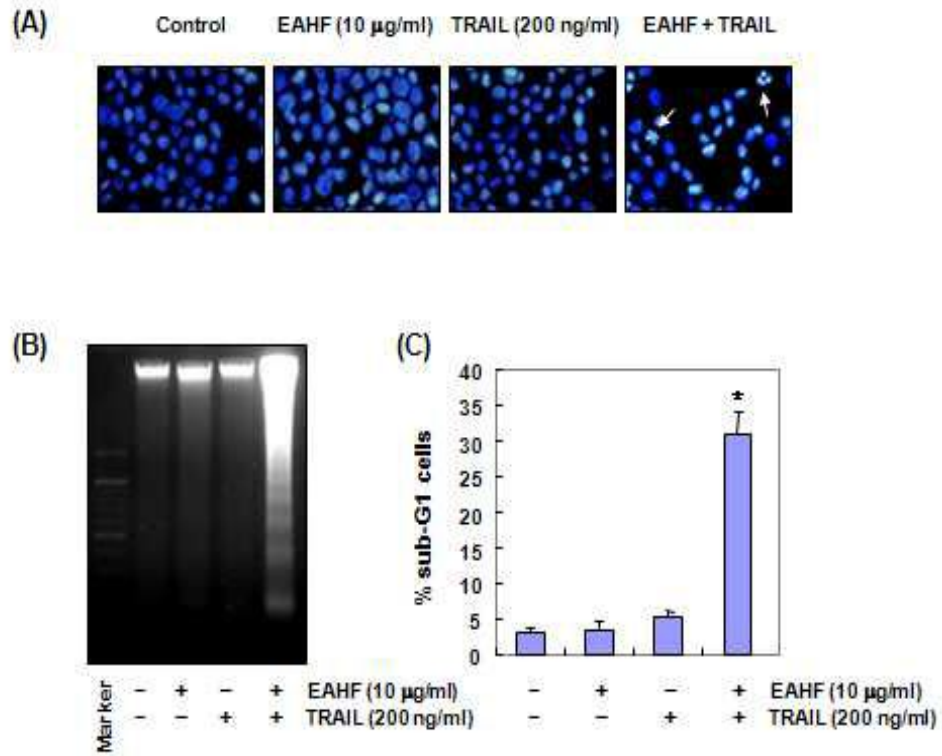
[0065] 도 4는 AGS 세포에서 EAHF와 TRAIL의 결합 처리에 따른 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 도이다.

도면

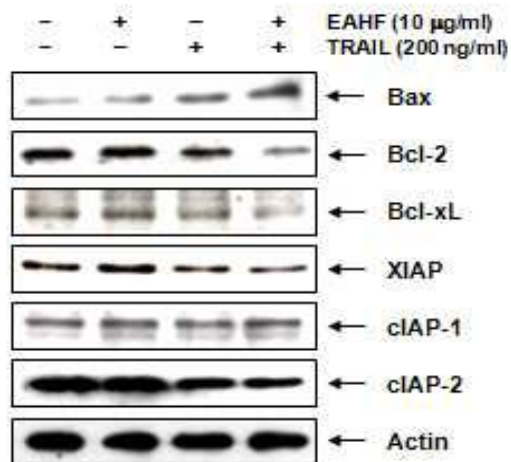
도면1



도면2



도면3



도면4

