



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0054878
(43) 공개일자 2011년05월25일

(51) Int. Cl.

A61K 31/715 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 35/56 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0111673

(22) 출원일자 2009년11월18일

심사청구일자 2009년11월18일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자

손윤희

대구 수성구 수성동1가 613번지 신세계타운 2동 1202호

남경수

대구 남구 봉덕2동 1071번지 효성타운 106동 1107호

(74) 대리인

이덕록

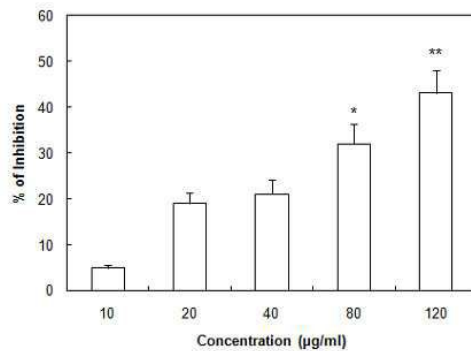
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 암세포의 산화질소 생성 억제용 다당류 추출물

(57) 요약

본 발명은 암세포의 산화질소(NO)생합성억제용 별불가사리 유래의 다당류 추출물에 관한 것으로 직장암세포 HT-29와 유방암세포 MCF-7, MDA-MB-231를 공시재료 TPA처리 후에 iNOS를 유도하고 활성 iNOS에 의해 생성된 산화질소(NO)를 측정된 결과 유의성 있는 산화질소생성 억제효과를 나타냈으므로 항암용 다당류로 사용할 수 있다.

대표도 - 도2



[보기] Data shown are mean values with bars indicating the SD of the mean (n=3). *p<0.05 and **p<0.01 compared with the control.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 없음

부처명 국토해양부

연구관리전문기관

연구사업명 해양생명공학사업

연구과제명 미용해양자원의 과도활용기술개발 및 산업화(해양동물유래 신규생리활성물질 및 생산공
정 개발)

기여율

주관기관 부경대학교

연구기간 2009년 1월 1일 ~ 2009년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

별불가사리 다당류물질을 유효성분으로 하는 직장암 또는 유방암 예방 및 치료용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 항암용 다당류에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 암세포의 산화질소 생성 억제용 별불가사리 유래의 다당류 추출물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 암발생은 정상세포가 외부의 발암물질원에 의해 다단계로 진행되며 크게 개시 (initiation), 촉진 (promotion), 그리고 진행 (progression)의 세 과정으로 진행된다. 이러한 다단계 과정으로 일어나는 암발생과정(carcinogenesis)은 여러가지 천연물 또는 화학적 화합물에 의해 억제되거나 지연될 수 있다. 특히 직장암은 산업화된 현대에서 발병률과 사망률이 높은 질병 중의 하나이며, 직장암 발생은 환경적요인의 영향을 많이 받므로 암예방 제제가 직장암 발생에 미치는 영향을 살펴보는 것은 매우 중요하다. 유방암은 여성에게 나타나는 가장 흔한 암으로 전 세계적으로 해마다 600,000 증례의 발병이 보고되고 있으므로, 암예방 연구에서는 여성건강 증진을 위해 유방암의 발병률과 사망률을 줄이기 위한 유방암 예방법의 개발에 중점을 두고 있다. Tamoxifen 같은 호르몬 조절제가 유방암 고위험군 여성의 침입성 및 비침입성 유방암의 발병을 감소시켰지만, 이러한 의약품 제제는 부작용이 있으므로 근래에는 천연물을 이용한 유방암 예방 및 치료제 개발이 매우 활발히 진행되고 있다.

[0003] Nitric oxide synthases (NOS)에 의해 촉매되는 반응의 아미노산 L-arginine에서 nitric oxide (NO)는 생성된다. 특히 유도성으로 칼슘 비의존적인 유도형 NOS (inducible isoforms of nitric oxide synthase, iNOS)는 적절한 자극에 의하여 대식세포, 호중구, 내피와 외피에서 발현되는 효소이다. iNOS 활성화에 의해 생성된 NO는 매우 반응성이 높으며 유리기(free radicals), 분자산소(molecular oxygen), 중금속등과 반응한다. 특히 세포간 NO는 nitrite나 nitrate, s-nitroso-thiols 또는 peroxynitrite를 형성하고, NO 대사물은 유전자 독성을 유발하고 여러 기전에 의하여 암 발생에 영향을 미친다. 즉, NO는 nitrosative deamination에 의해 DNA 손상, DNA strand breakage 또는 peroxynitrite에 의한 DNA 변성(nitration)을 일으킨다. 이러한 반응들은 발암성의 nitrosamines의 활성화, apoptosis와 DNA 수선 효소의 활성화 저해 또는 lipid peroxidation에 의한 DNA 손상과 관련이 있다.

[0004] 본 발명자들은 직장암 발생의 억제용 물질로서 DHA(대한민국 특허공개번호 제10-2008-33567호)와 키토산 올리고당(동 특허공개번호 제10-2008-77713호)을 개시한 바 있다. 대한민국 특허공개번호 제10-2008-61327호에는 ursodeoxycholic acid (UDCA)의 직장암 예방치료 효과가, 대한민국 특허공개번호 제10-2006-36058호에는 혈관 표적화제(VTA) 중 ZD6126물질의 직장암 예방치료 효과가, 그리고 대한민국 특허공개번호 제10-2002-18201호에는 폴립 또는 결장직장암의 치료용 EGFR키나제 억제제가 각각 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하고자하는 과제

[0005] 본 발명은 별불가사리 유래의 다당류 추출물이 직장암세포와 유방암세포에서 산화질소(NO)생성억제 효과를 측정, 제공하는 데 있다.

과제 해결수단

[0006] 불가사리 유래의 천연 다당류 물질의 산화질소(NO)생성 억제제로서의 효과를 제공하는 본 발명의 목적은 별불가사리 다당체 추출물을 제조하는 단계와; 상기 다당류 물질을 공시재료로하여 순수배양한 직장암세포주 HT-29와 유방암세포주 MCF-7 및 MDA-MB-231에 첨가하고 TPA를 처리하여 iNOS를 유도하여 배양 후 생성된 산화질소(NO)를 측정하고 암유발 억제효능을 평가하는 단계를 통하여 달성하였다.

효 과

[0007] 본 발명 별불가사리 유래의 다당류는 산화질소(NO) 생성억제효과가 있으므로 암세포 형성촉진을 억제하고 NO 또는 NO대사물에 의한 DNA독성을 억제하여 직장암 뿐만아니라 유방암 억제제로서 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0008] 별불가사리 다당추출물 시료의 제조

[0009] 별불가사리는 포항 앞바다에서 채집하여 물로 깨끗이 씻어 -20℃에 보관하였다. 별불가사리 다당추출물은 도1과 같이 500g의 시료로 0.7g을 추출하여 얻었다.

[0010] 세포배양

[0011] 계대보존 중인 사람의 직장암세포 HT-29와 유방암세포 MCF-7과 MDA-MB-231 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI 1640을 배양액으로 하여 CO₂ 배양기 (5% CO₂, 37℃)에서 배양하였고, 배양액은 3 또는 4일 간격으로 교환해 주었다. 이들 세포는 액체질소의 기체상태 (-150℃)에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹여서 실험에 사용하였으며, 세포의 생존은 trypan blue dye exclusion 방법으로 확인하였다.

[0012]

[0013] Nitric Oxide (NO) 생성

[0014] 직장암세포 HT-29와 유방암세포 MCF-7과 MDA-MB-231를 12-well plate의 각 well에 24시간 부착시킨 후 시료를 각 농도별로 가하고, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)를 처리하여 iNOS를 유도하였다. 이를 24시간 동안 배양한 후 기울여 배양 상층액을 회수하여 생성된 NO의 양은 Griess시약 (1% sulfanilamide, 0.1% N-naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid)을 사용하여 570 nm에서 그 양을 측정하였다.

[0015] 직장암세포 HT-29에서 별불가사리 다당추출물 (도1)은, 농도의존적으로 TPA에 의해 유도된 NO의 생성을 억제하였다. 특히 80 (p<0.05)과 120 $\mu\text{g/ml}$ (p<0.01) 농도에서는 통계적으로 유의성 있는 억제효과를 나타내었다(도2). 유방암세포 MDA-MB 231 세포에서도 별불가사리 다당추출물은 NO의 생성을 억제하였으며 20 (p<0.05), 40 (p<0.01), 80 (p<0.01)과 120 $\mu\text{g/ml}$ (p<0.005) 농도에서는 통계적으로 유의성 있는 억제효과를 나타내었고(도3), 유방암세포 MCF-7 세포에서도 별불가사리 다당추출물의 NO 생성 억제효과를 측정할 수 있었으며 특히 유방암세포에서 더 높은 억제효과가 있었다. NO가 조직치유와 관련된 angiogenesis에 중요한 역할을 하고, 혈관형성(vascularization)은 종양성장에 필수적이며 종양전이와 관계가 있으므로 NO는 종양촉진에 관여하는 것으로 알려져 있다. 세포에서의 NO는 직접 DNA를 변화시키든지 또는 G:T mismatch를 수선하는 thymine-DNA glycosylases의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있다. 또한 NO는 발암과정중 p53 돌연변이에 관여하고 tyrosine nitration에 의해 p53의 기능을 변화시킨다. 그러므로 별불가사리 다당추출물은 NO 생성 억제효과가 있으므로 종양형성 촉진을 억제하고, NO나 NO 대사물에 의한 유전자 독성을 억제하여 직장암과 유방암발생 억제효과가 있을 것으로 기대된다.

[0016] 통계학적 처리

[0017] 실험결과는 평균±표준편차 (standard deviation, SD)로 나타내었으며, 실험에 대한 유의성 검정을 위해 student's *t*-test를 수행하여 결과치는 *p* 값이 0.05 미만을 통계학적으로 의미있는 것으로 간주하였다.

산업이용 가능성

[0018] 본 발명의 별불가사리 유래의 다당류물질은 직장암 및 유방암 억제제로서 뛰어난 효과가 있으므로 이를 유효성분으로 하는 항암예방 및 치료제로서 사용할 수 있으므로 생물의약품산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도1은 본 발명 별불가사리 다당류 추출공정을 보인 다이어그램이다.

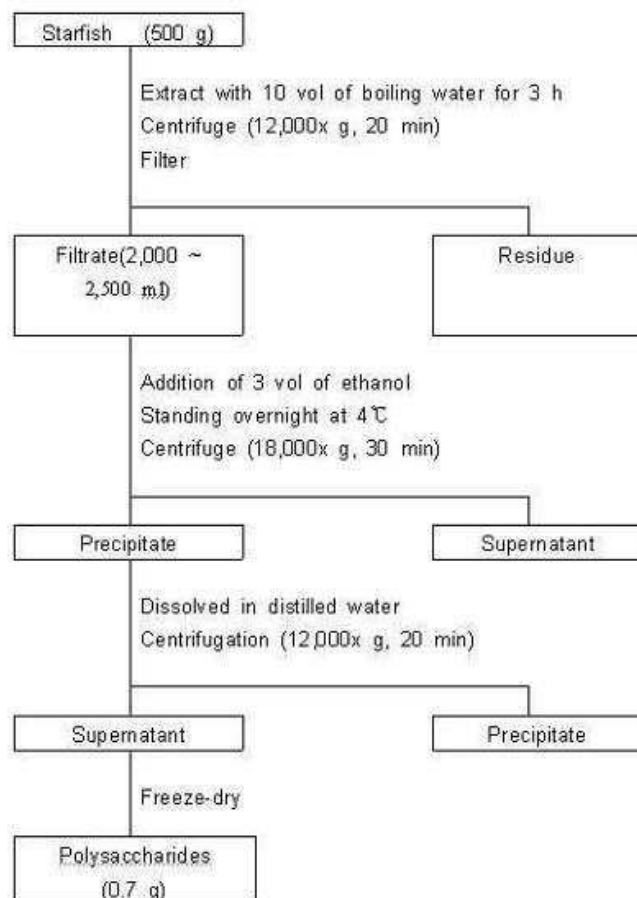
[0020] 도2는 본 발명 별불가사리 유래의 다당류물질이 직장암세포주 HT-29에서 TPA에 의해 유도된 산화질소(NO) 생성에 미치는 효과를 보인 그래프이다.

[0021] 도3은 본 발명 별불가사리 유래의 다당류물질이 유방암세포주 MDA-MB-231에서 TPA에 의해 유도된 산화질소(NO) 생성에 미치는 효과를 보인 그래프이다.

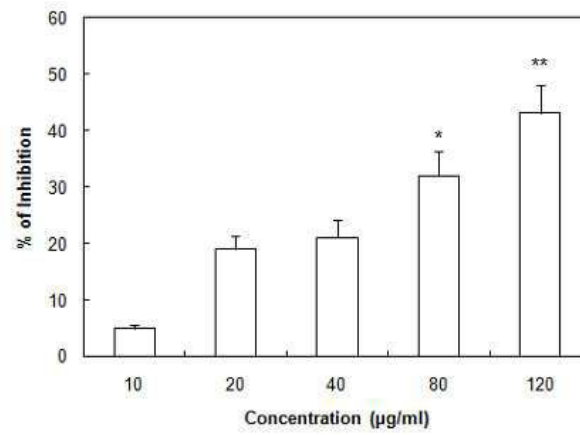
[0022] 도4는 본 발명 별불가사리 유래의 다당류물질이 유방암세포주 MCF-7에서 TPA에 의해 유도된 산화질소(NO) 생성에 미치는 효과를 보인 그래프이다.

도면

도면1

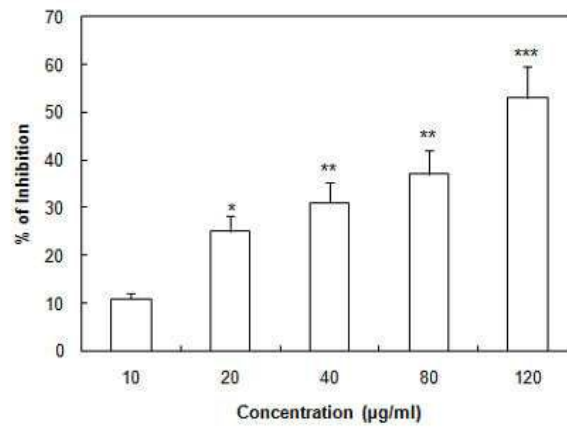


도면2



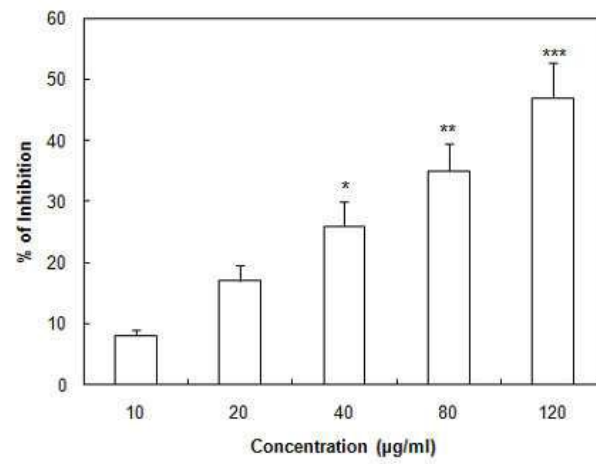
[보기] Data shown are mean values with bars indicating the SD of the mean (n=3). *p<0.05 and **p<0.01 compared with the control.

도면3



[보기] Data shown are mean values with bars indicating the SD of the mean (n=3). *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.005 compared with the control.

도면4



[보기] Data shown are mean values with bars indicating the SD of the mean (n=3). *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.005 compared with the control.