

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2010-0054272 (43) 공개일자 2010년05월25일
(51) Int. Cl. A61K 35/60 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2008-0113114 (22) 출원일자 2008년11월14일 심사청구일자 2009년11월13일	(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	

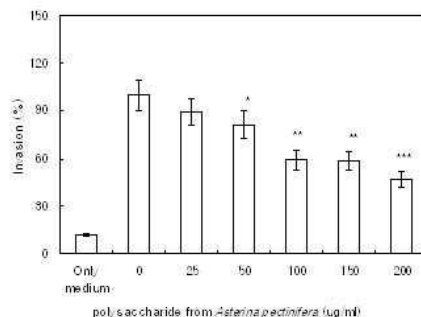
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 별불가사리 다당체 추출물을 유효성분으로 하는 유방암 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 별불가사리 다당체 추출물을 유효성분으로 하는 인체유방암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로 별불가사리 다당체 추출물은 인체실험결과 아로마타테이스효소(aromatase)활성을 억제하고 싸이클로옥시제에이스-2(COX-2)활성을 현저하게 저해하는 것이 확인되었으며, 이 밖에도 12-O-테트라디카노일포볼-13-아세테이트(TPA)-자극매트릭스(MMP)-9 활성을 저감시키므로써 인체 유방암을 예방 또는 치료용 조성물로서의 가치가 있음이 개시되었다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

별불가사리 다당체 추출물을 유효성분으로 하는 인체 유방암(MDA-MB-231세포)예방 및 치료용 조성물.

청구항 2

별불가사리 다당체 추출물을 유효성분으로 하는 인체유방암(MDA-MB-231세포)전이억제용 조성물.

청구항 3

별불가사리를 열수추출하여 원심분리한 다음 여과하고, 다시 에탄올을 첨가하고 24시간 4℃에 방치한 후 원심 분리하고 남은 침전물에 다시 증류수로 녹여 원심분리하고 얻은 상등액을 동결건조하여서 되는 인체유방암(MDA-MB-231세포)예방 및 치료 또는 전이억제용 다당체 추출물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 별불가사리(starfish)에서 추출한 다당체의 인체 유방암 세포의 전이억제효과를 확인하기 위하여 세포의 이동성과 침윤성 및 이와 관련된 단백질 분해효소 MMP-9의 활성화에 미치는 효과를 측정하는 생물의약 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 국민 경제의 발달로 인해 식생활이 서구화됨에 따라 우리 국민의 사망원인에서 암이 큰 비중을 차지하고 있다. 특히 여성의 경우 유방암의 발병률이 식생활의 서구화, 출산율과 모유수유 감소 및 환경의 변화 등으로 인해 수년동안 지속적으로 증가하고 있으며, 발병연령도 40~50대로 서구여성의 60~70대에 비해 낮은 추세를 보이고 있다. 암은 초기에는 비교적 치료가 가능하지만 전이(metastasis)가 일단 진행되면, 치료가 어려워 사망하게 된다. 그러므로 암의 치료에 있어서 암의 발생을 막는 것도 중요하지만 암의 진행단계를 차단시켜 전이를 예방하는 것 또한 중요하다.

[0003] 암의 전이는 암세포가 1차 조직에서 혈관이나 림프관을 통해 다른 부위나 장기로 이동하면서 일어나는 세포 진행의 형태로서 악성 암의 가장 큰 특징이다. 암세포가 침윤 (invasion) 및 전이를 위해서는 세포외기질 (extracellular matrix)과 기저막 (basement membrane)의 구성성분인 단백질 중합체의 분해가 이루어져야 하며, 특히 기저막의 주성분을 이루는 type IV collagen의 분해가 필수적이다. 세포외기질과 기저막의 주성분을 분해하는 matrix metalloproteinases (MMPs)는 아연의존적효소군으로서 종양의 침윤과 전이에 중요한 역할을 하는 효소군으로 알려져 있다. 따라서 MMP의 과다발현과 활성화는 생리적 조절이 정상적으로 되지 못하며, 암세포의 증식, 침윤, 전이, 종양 등을 활성화시키는 것으로 알려져 있으며, 그 중에서도 기저막의 주요성분인 type IV collagen을 분해하는 MMP-9이 암전이에 큰 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.

[0004] 그러나 지금까지 별불가사리에서 추출한 다당체의 인체 유방암세포의 전이억제효과 및 세포의 이동성, 침윤성, 이와 관련한 단백질 분해효소 MMP-9의 활성화 여부에 대하여는 전혀 개시된바 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0005] 따라서, 본 발명의 목적은 인체 유방암 예방 및 치료용 조성물로서 별불가사리의 다당류 추출물의 효능을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0006] 본 발명의 상기 목적은 별불가사리로부터 다당체추출물 시료를 제공하는 단계와;
 [0007] 유방암 세포 배양 단계와;
 [0008] 세포의 이동성을 확인하는 단계와;
 [0009] 세포의 침윤성을 측정하는 단계와;
 [0010] MMP-9의 활성을 확인하기 위하여 Gelatin Zymography를 실시하는 단계와;
 [0011] Western blot 분석하고 평가하는 단계를 통하여 달성하였다.

효 과

[0012] 본 발명 별불가사리 다당체 추출물은 유방암세포 MDA-M231에서의 세포이동저해효과가 있고, 세포의 침윤성이 감소될뿐만 아니라 MMP-9활성이 억제되고 MMP-9 단백질 발현이 억제되는 뛰어난 효과가 있다.
 [0013] 이하, 본 발명의 실시를 위한 구체적인 내용을 실시예를 통하여 상세히 설명한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0014] 별불가사리 다당추출물 시료의 제조

[0015] 별불가사리는 포항 앞바다에서 채집하여 물로 깨끗이 씻어 -20℃에 보관하였다. 별불가사리 다당추출물은 도 1과 같이 500g으로부터 0.7g을 추출하여 얻었다.

[0016] 세포배양

[0017] 계대 보존 중인 사람의 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포는 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 액체질소에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹여서 실험에 사용하였으며, 세포의 생존은 trypan blue dye exclusion 방법으로 확인하였다.

[0018] 세포의 이동성

[0019] Collagen (20 ug/ml)으로 코팅된 well에 MDA-MB-231 세포 (1×10⁶cells)를 37℃에서 24시간 동안 배양한 후 blue tip으로 동일한 굵기의 scratch를 내었다. 그리고 serum free RPMI 1640 배지로 3번 씻어낸 다음 150 nM TPA와 농도별 다당체 (0, 25, 50, 100, 150, 200 ug/ml)를 처리하여 배양 48시간 후에 세포의 이동성을 측정하였다.

[0020] 실험결과, 유방암세포 MDA-MB 231에서의 시료의 농도의존적 세포의 이동성(motility) 저해효과가 확인되었다.(도 2)

[0021]

[0022] 세포의 침윤성 측정

[0023] 세포의 침윤성은 Plater 등의 방법을 참고로 하여, matrigel matrix (BD Biosciences, USA)로 코팅된 8 μm-pores를 가진 24-well transwell cell culture chambers (Corning Inc., USA)을 사용하여 측정하였다. MDA-MB-231 세포는 1×10⁴ cells/well 씩 matrigel로 코팅된 insert chamber에 접종하여 37℃에서 24시간 동안

배양한 후 150 nM TPA와 농도별 다당체 (0, 25, 50, 100, 150, 200 ug/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 위층 chamber내의 배지를 제거하고, 100% methanol에 침지하여 membrane 아래표면을 고정시킨 다음 haematoxylin과 eosin Y로 염색하였다. 염색된 membrane은 멸균수로 세척하고 matrigel이 도포된 면을 면봉으로 깨끗이 닦아낸 다음 핀셋으로 membrane을 떼어내어 유리판에 고정하여 현미경 (100×)으로 관찰하고 침윤을 보이는 세포 수를 측정하였다.

[0024] 실험결과, 세포의 침윤성은 별불가사리 다당추출물을 농도별 (0~200 $\mu\text{g/ml}$)로 TPA와 함께 24시간 동안 처리하여 세포가 matrigel 아래로 이동한 세포의 수를 측정하여 별불가사리 다당추출물 무처리에 TPA를 처리한 대조군에 대한 비율로 나타내었다.(도 3) 별불가사리 다당추출물의 농도 0~200 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하였을 때 세포의 침윤성이 농도의존적으로 감소하였다. 암세포의 침윤과 전이에 있어서 중요한 단계는 세포외기질과 기저막의 주성분의 분해이며, 이는 단백분해효소에 의해 진행된다. 따라서 별불가사리 다당추출물의 농도별 처리로 침윤성이 농도의존적으로 감소되어 유방암 전이과정에도 영향을 미칠 것으로 판단되었다.

[0025] Gelatin zymography

[0026] MMP-9의 활성을 확인하기 위하여 Overall 등의 방법으로 gelatin zymography를 실시하였다. MDA-MB-231 세포를 5×10^5 cells/well로 6-well에 분주하여 24시간 배양한 후 남아있는 FBS를 제거하기 위해 serum free RPMI 1640 배지로 3번 씻어낸 뒤 150 nM TPA와 농도별 별불가사리 다당체 (0, 25, 50, 100, 150, 200 ug/ml)를 처리하였다. 24시간 동안 배양시킨 후 상층액을 취하여 계측한 세포수로 그 용량을 표준화하여 MMP-9 (gelatinase)의 활성을 측정하였다. 즉, 상층액을 10× nonreducing sample buffer[120 mM Tris-HCl, pH 6.8, 50% (v/v) glycerol, 4% (w/v) SDS, 28.8 mM 2-mercaptoethanol 0.2% (w/v) bromophenol blue]와 섞어 0.1% (w/v) gelatin이 포함된 10% SDS-PAGE gel에 전기영동하였다. 그 후 gel을 2.5% (v/v) Triton X-100에서 1 시간 동안 씻어낸 다음 gel을 developing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM CaCl_2 , 0.01% NaN_3)에 넣어 37 °C에서 24시간 동안 반응시키고 coomassie 염색과 탈색을 통해 MMP-9 활성 정도를 확인하였다.

[0027] 실험결과, 별불가사리 다당추출물을 처리하였을 때 TPA만 처리한 군에 비해 MMP-9 활성이 농도의존적으로 억제되는 것이 관찰되었다.(도 4a). 또한 별불가사리 다당추출물에 의하여 MMP-9 단백질 발현도 억제되었다.(도 4b). MMP-9는 세포의 기저막에 있는 단백질 중합체를 분해 하여 암세포의 침윤을 진행시키므로 MMP-9의 활성이 별불가사리 다당추출물의 처리에 의해 감소되었다는 것은 기저막 주된 성분의 분해 억제와 관련이 있으므로 침윤과정이 감소될 것으로 판단된다.

[0028]

[0029] Western blot 분석

[0030] MDA-MB-231 세포를 5×10^5 cells/well로 6-well에 분주하여 24시간 배양한 후 남아있는 FBS를 제거하기 위해 serum free RPMI 1640 배지로 3번 씻어낸 뒤 150 nM TPA와 농도별 다당체 (0, 25, 50, 100, 150, 200 ug/ml)를 처리하였다. 이를 24시간 동안 배양한 후 세포의 lysate를 준비하여 western blot 분석에 사용하였다. 즉 세포 lysate의 단백질을 전기영동으로 분리하고 20% 메탄올, 25 mM Tris, 192 mM glycine이 포함된 완충액을 사용하여 nitrocellulose 막으로 이동시켰다. 단백질이 이동된 막은 Ponceau 용액으로 이동유무를 확인한 후, 5% non-fat dry milk 용액으로 30분간 실온에서 반응하여 차단하였다. 그리고 차단용 완충액으로 희석한 1차 항체(anti-MMP-9 antibody)와 막을 2시간 반응시킨 후 Tris-Tween buffered saline (TTBS)을 사용하여 세척한 후 2차 항체와 2시간 반응시켰다. 그리고 alkaline phosphatase (AP) streptavidin을 1시간 동안 반응시키고 AP buffer로 세척하였다. 세척한 막을 4-nitro blue tetrazolium chloride (NBT)와 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)를 사용하여 band를 확인한 후 band의 두께를 비교하여 단백질 발현 유무 및 그 차이를 확인하였다.

산업이용 가능성

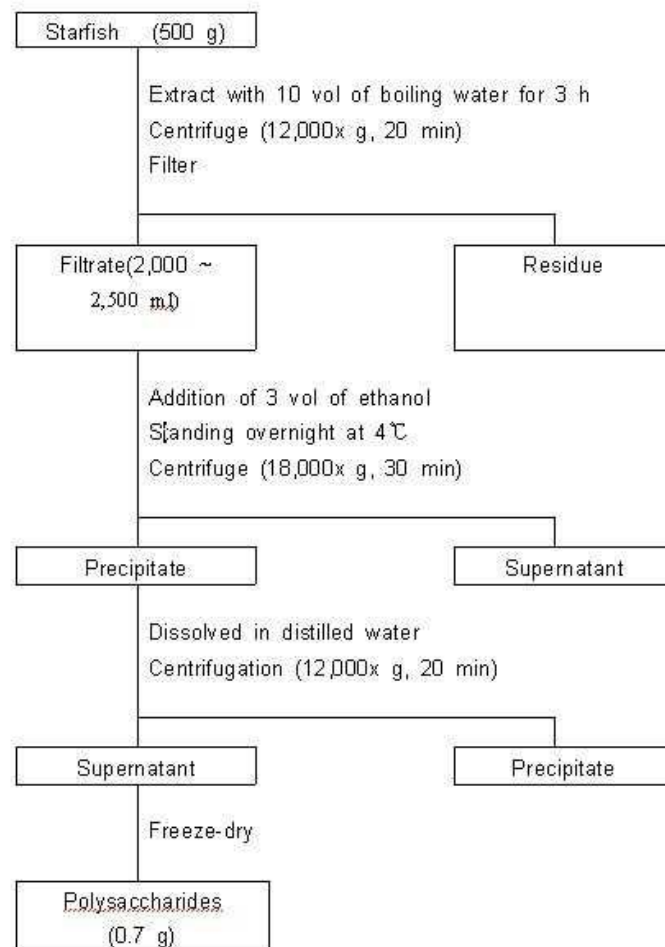
[0031] 본 발명은 이상 설명한 바에 의하여 명백한 바와 같이 별불가사리 다당추출물은 인체 유방암 예방 및 치료용으로 매우 유용한 것이므로 생물의약품산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

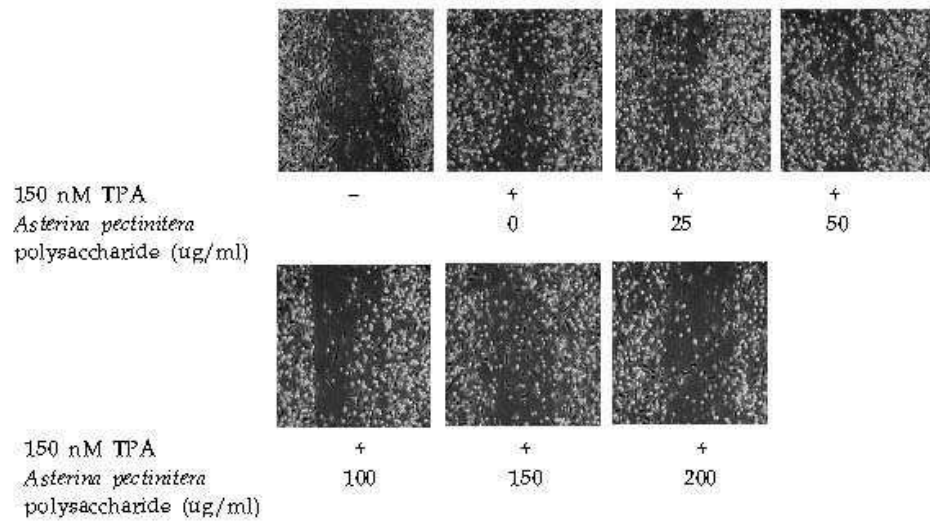
- [0032] 도 1은 본 발명 별불가사리 다당체추출물을 제조하는 공정도이다.
- [0033] 도 2는 본 발명 별불가사리 다당체추출물이 유방암세포 MDA-MB-231의 이동성을 나타내는 효과를 보인 사진이다.
- [0034] 도 3은 본 발명 별불가사리 다당체 추출물이 TPA가 유도하는 침윤성에 미치는 효과를 보인 그래프이다.
- [0035] 도 4a는 본 발명 별불가사리 다당체 추출물의 TPA-induced activity효과, 도 4b는 MMP-9의 단백질발현효과를 보인 westen blot분석 결과이다.

도면

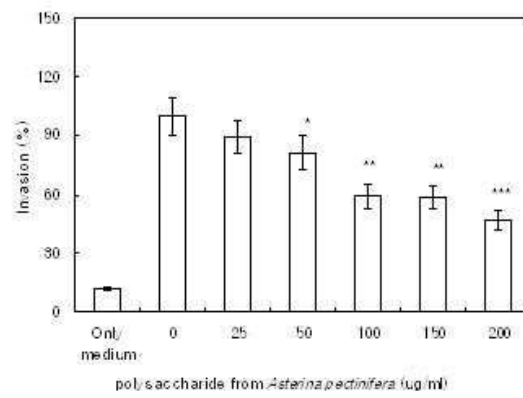
도면1



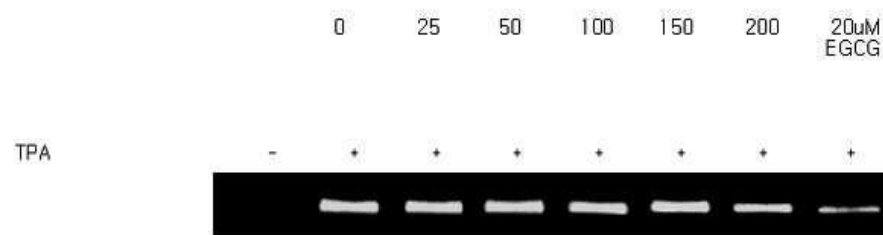
도면2



도면3



도면4a



도면4b

