

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2010-0062141 (43) 공개일자 2010년06월10일
(51) Int. Cl. <i>A61K 31/722</i> (2006.01) <i>A61P 39/06</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2008-0120588 (22) 출원일자 2008년12월01일 심사청구일자 2008년12월01일	(71) 출원인 부경대학교 산학협력단 부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내 (72) 발명자 김세권 부산광역시 동래구 사직2동 쌍용예가아파트 125동 1402호 김문무 부산광역시 수영구 민락동 진로비치아파트 101동 206호 엄태길 경상남도 창원시 대방동 대동아파트 101동 301호 (74) 대리인 이덕록	

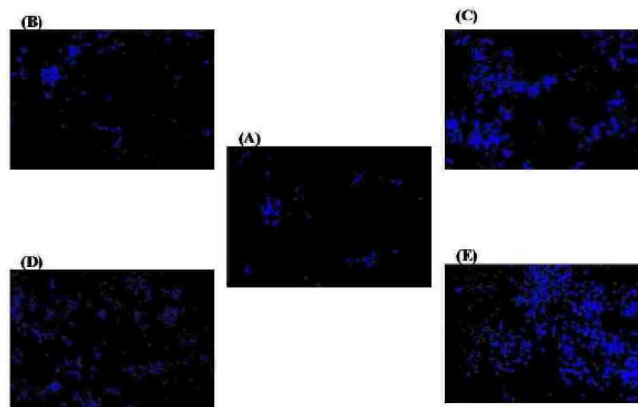
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 키틴 올리고당을 함유하는 항산화 활성 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 키토 올리고당을 함유하는 항산화 활성 약학 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 키토 올리고당은 최적 조건으로 키틴을 산 가수분해 시켜 제조되어, 이를 통해 직접 자유 라디칼 소거 효과를 가질 뿐만 아니라, 세포내 GSH 수준 증가를 촉진시켜 생존 세포 내에서 자유 라디칼에 의한 생물학적 분자 손상을 방지할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도12



특허청구의 범위

청구항 1

키토 올리고당을 유효성분으로 함유하는 항산화 활성 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서 상기 키토 올리고당이 1 내지 3 kDa의 분자량을 갖는 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

키토 올리고당을 유효성분으로 함유하는 항산화 활성 건강기능식품.

청구항 4

키토 올리고당을 30 내지 40℃의 온도에서 10 내지 12 N의 HCl로 0.5 내지 8 시간 동안 처리하여 가수분해시키는 것을 특징으로 하는 키토 올리고당(NA-COS)의 제조방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 키토 올리고당을 함유하는 항산화 활성 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 최적 조건으로 키토 올리고당을 산 가수분해시켜 제조한 키토 올리고당을 유효성분으로 함유하여 직접 자유 라디칼 소거 효과를 가질 뿐만 아니라, 세포내 GSH 수준 증가를 촉진시켜 생존 세포 내에서 자유 라디칼에 의한 생물학적 분자 손상을 방지할 수 있는 항산화 활성 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] N-아세틸-D-글루코사민(N-acetyl-D-glucosamine; GlcNAc)의 단일중합체, (1-4)-결합 2-아세트아미도-2-데옥시-D-글루칸[(1-4)-linked 2-acetamido-2-deoxy--D-glucan]인 키토 올리고당은, 균류의 세포벽과 갑각류 및 무척추동물의 외골격에 널리 분포하고 있으며(Ngo et al., 2008a), 다양한 공급원으로부터 생산되고 있다(Lavall et al., 2007; Abdou et al., 2008). 키토 올리고당은 그 유도체는 효소 저해 효과(Je and Kim, 2005; Ngo et al., 2008b), 면역자극(Seferian and Martinez, 2000), 항응혈(Vongchan et al., 2003), 항균(Chang et al., 2007), anticholesteremic, 항암(Kim et al., 2006) 및 상처-치료제(Freier et al., 2005)와 같은 다양한 용도에 잠재력 있는 중요한 생물학적 특성을 갖고 있다. 그러나 키토 올리고당은 수불용성 중합체이며, 이러한 특성은 이를 생체 시스템에 응용하는데 있어 주요한 제한 인자이다.

[0003] 키토 올리고당(NA-COS)은 화학적, 물리적 또는 효소적 작용제를 이용한 키토 올리고당의 가수분해 산물이며(Wang, et al., 2008), 이들은 수용성이다. 따라서 NA-COS는 in vitro 및 in vivo에 용이하게 이용할 수 있다. 더욱이, 다양한 분자량을 갖는 키토 올리고당이 한외여과 막에 의해 최초로 생산되었고, 지금까지 세포 시스템에서 키토 올리고당의 산화적 스트레스에 대한 활성은 거의 보고된 바 없다.

[0004] 생물학적 시스템에서, 산화제 형성과 내생 항산화 방어 기작 사이의 균형이 존재하여 세포 생존자를 반응성 산소종(ROS)의 산화로부터 보호한다. ROS는 산화적 스트레스 시에 과도하게 생성되고, 세포 또는 조직 손상을 야기시켜 상기 균형이 무너지는 경우 세포 사멸에 이르게 된다(Kang et al., 2005). 더욱이, ROS는 세포 성분의 산화 과정과 직접 또는 간접적 관계를 가지며, 다양한 질환, 예를 들어, 암, 관절염, 염증, 알츠하이머 병,

고혈압, 당뇨병 및 노화에 있어 중요한 역할을 한다(Calabrese et al., 2005; Je et al., 2004; Vajragupta et al., 2000).

[0005] 따라서 본 발명에서는 최초로 산화적 스트레스에 대한 상이한 분자량을 갖는(1-3kDa 및 1kDa 이하) 두 종류의 NA-COS의 효과를 RAW 264.7 세포에서 연구하고 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 따라서 본 발명의 목적은 키틴 올리고당의 항산화 활성에 대한 신규한 용도를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 키틴 올리고당을 유효성분으로 함유하는 항산화 활성 약학 조성물 및 건강식품을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0008] 상기와 같은 본 발명의 목적은 키틴을 이용하여 산 가수분해에 적절한 조건을 설정하여 키틴 올리고당을 제조하고, 이를 이용하여 마우스 대식세포를 처리하고, 막 단백질 산화 분석, 라디칼 매개 DNA 손상 측정, DCFH-DA에 의한 세포 ROS 측정 및 세포내 GSH 수준의 측정을 통해 키토 올리고당의 항산화 활성을 확인함으로써 달성되었다.

[0009] 본 발명은 키토 올리고당을 유효성분으로 함유하는 항산화 활성 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명에 따른 키토 올리고당은 1 내지 3 kDa의 분자량을 갖는 것이 바람직하다.

[0011] 본 발명에 따른 키틴 올리고당은 최적 조건으로서 키틴을 30 내지 40℃의 온도에서 10 내지 12 N의 HCl로 0.5 내지 8 시간 동안 처리하여 가수분해시키는 것이 가장 바람직하다.

[0012] 본 발명에 있어서, “유효성분”이라 함은 내재된 약리작용에 의해 그 의약품의 효능·효과를 직접 또는 간접적으로 발현한다고 기대되는 물질 또는 물질군(약리학적 활성성분등이 밝혀지지 않은 생약 등을 포함한다)으로서 주성분을 포함하는 것을 의미한다.

[0013] 본 발명의 키토 올리고당을 함유하는 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명의 조성물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명의 키토 올리고당을 유효성분으로 함유하는 항산화 활성 건강기능식품을 제공한다.

[0016] 본원에서 정의되는 “건강기능식품”은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, “기능성”이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0017] 본 발명의 항산화 활성 건강기능식품은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.01 내지 95 %, 바람직하게는 1 내지 80 % 중량백분율로 포함한다.

[0018] 또한, 항산화 활성을 위한 목적으로 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태인 건강기능식품으로 제조 및 가공이 가능하다.

[0019] 본 발명에 따르면, 산 가수분해 및 UF 막을 이용한 여과로 생산한 두 가지 NA-COS인 분자량 1-3 kDa인 NA-COS와 분자량 1 kDa 이하인 NA-COS가 세포독성을 나타내지 않았고, 세포 시스템에서 항산화 효과를 나타내었다, 이들

은 자유 라디칼을 소거하여 DNA 및 막 단백질의 산화를 감소시킬 수 있다. 더욱이, 이들은 직접 자유 라디칼 소거 효과를 가질 뿐만 아니라, 세포내 GSH 수준 증가를 촉진시킨다. 그 결과 NA-COS는 강력한 자유 라디칼 소거 효과를 가져 생존 세포 내에서 용량 의존적 방식으로 자유 라디칼에 의한 생물학적 분자 손상을 방지한다. 이들은 라디칼 유발 세포 시스템 손상의 조절을 통한 산화적 스트레스에 대한 소거제로서 사용할 수 있으며, 또 다른 응용을 기대할 수 있다.

효 과

[0020] 상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 키토 올리고당은 직접 자유 라디칼 소거 효과를 가질 뿐만 아니라, 세포내 GSH 수준 증가를 촉진시켜 생존 세포 내에서 자유 라디칼에 의한 생물학적 분자 손상을 방지할 수 있는 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0021] 이하에서 본 발명의 바람직한 실시형태를 실시예를 참고로 보다 구체적으로 설명한다. 하지만 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 실시예

[0023] 게 겹질로 제조된 키틴(탈아세틸화도 < 10%)을 금호 케미칼 프로덕츠사 (KEUMHO chemical products Co, LTD; Korea)에서 공여받았다. 형광 프로브 2', 7-디클로로플루오레신 디아세테이즈(DCFH-DA) 및 모노브로모비메인을 몰리큘라 프로브사(Molecular Probes Inc.; Eugene, OR, USA)에서 입수하였다. MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), 2,4-디니트로-페닐 하이드라진 시약, 아가로스 및 우테아혈청(FBS), 3,5-디니트로살리실산(DNS)을 시그마 케미칼사(Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO)에서 구입하였다.

[0024] 마우스 대식세포 RAW 264.7를 ATCC(American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA)에서 입수하였다. DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지, 페니실린/스트렙토마이신 및 세포 배양에 필요한 다른 재료들을 킵코 비알엘 라이프 테크놀로지(Gibco BRL, Life Technologies; USA)에서 입수하였다. 다른 모든 화학물질은 분석 등급 또는 상업적으로 입수가 가능한 최고 등급의 것이었다.

[0025] 모든 데이터의 비교는 언페어드 스튜던츠 t-테스트를 이용하여 3회 수행하였다. 0.05 이하의 P 값을 통계적으로 유의한 것으로 여겼다. 데이터는 평균 $\pm$ S.E.로 나타내었다.

[0026]

[0027] 실시예 1 : 3,5-디니트로살리실산 분석(DNS)

[0028] 상청액 3 mL와 1% DNA 3 mL를 혼합하고, 끓는 수조에서 10 분 동안 배양하여 적-갈색을 발현시켰다. 혼합 용액에 40% 포타슘 소듐 타르테이트 용액 1 mL를 가하여 색상을 안정화시켰다. 이어서, 575 nm에서의 흡수능을 기록하였다. 측정값을 일련의 GlcNAc 및 DNS 회색액(0-1 mg/mL)으로 제조한 표준 곡선에 보간하였다(Yu et al., 1998; Rojas Avelizapa et al., 1999).

[0029] 실시예 2 : HCl을 이용한 키틴 가수분해에 적절한 조건 결정

[0030] 우선, 가수분해에 적절한 HCl 농도 결정을 수행하였다. 40℃에서 7 시간 동안 4, 6, 8, 10, 12 N 농도 범위의 HCl에 키틴 100 g을 분산시켜 10% 키틴 용액을 제조하였다.

[0031] DNS(3,5-Dinitrosalicylic acid) 분석에 의한 키틴 가수분해 과정에서 방출된 환원당(GlcNAc)에 따라 적절한 HCl 농도를 계산하였다. 이어서 다양한 온도(30, 40, 50, 60 및 70 ℃)로 7 시간 동안 적절한 HCl 농도를 이용하여 적절한 온도를 결정하였다. 최종적으로, 상기의 적절한 조건들을 고정하고 가수분해 시간을 30 분에서 11 시간 까지 변화시켜 적절한 시간을 결정하였다. DNA 분석을 이용하여 각 30 분에서 환원당 함량을 측정하였다.

[0032] **실시예 3 : 키틴 올리고당(NA-COS)의 제조**

[0033] 키틴을 분쇄하여 분말화시키고, 반응기에 넣은 후, 12 N HCl (100g 키틴 및 1 L HCl)을 가하고, 40 °C에서 목 적하는 키틴 올리고당(NA-COS)의 분자량에 따라 다양한 시간 동안 교반하였다. 증류수를 가하여 반응을 중단 시킨 후, 가수분해 키틴 용액을 25% NaOH 용액으로 중화시키고, 10,000 g에서 원심분리하여 불용성 잔사를 제거 하였다. 이어서, 가수분해물을 분자량 컷오프(molecular weight cut off; MWCO)가 각각 3 kDa 및 1 kDa인 UF 멤브레를 이용하여 분리하였다. UF 막으로 두 가지 종류의 NA-COS인, MWCO 3 kDa 막은 통과하나 1 kDa는 통과 하지 못한 키틴 올리고당 NA-COS 1-3 kDa와 MWCO 1 kDa 막을 통과한 NA-COS <1 kDa를 제조하였다. 마이크로 아실라이저 G3(Micro Acilyzer G3; Asashi Kasei Corp., Japan) 또는 투석법을 이용하여 상청액을 탈염 및 정 제한 후, 용액을 분무건조하였다. 최종적으로 상이한 분자량의 황색 분말 키틴 올리고당을 수득하였다.

[0034] **실시예 4 : 기기 분석**

[0035] 스펙트럼 2000 FT-IR 분광계(Spectrum 2000 FT-IR spectrophotometer; Perkin Elmer, USA)을 이용하여 KBr 플 레이트 상에서 청정 신호로서 적외선 스펙트럼을 기록하고, JNM-ECP-400 (400 MHz or 100 MHz) 분광계(JEOL Japan) 상의 D2O 중에서 양성자 및 탄소 NMR (1H 및 13C NMR) 스펙트럼을 기록하였다. NA-COS의 분자량을 MALDI-TOF- MS 분광계로 측정하였다.

[0036] **실시예 5 : 세포 배양 및 생존력 측정**

[0037] 마우스 대식세포 (RAW 264.7)를 37°C, 5% CO₂, 및 95% 공기 중에서 10% (v/v) 우태아혈청 및 100 µg/mL 페니 실린-스트렙토마이신을 함유한 DMEM 배지에서 배양하였다. RAW 264.7 세포에 대한 두 가지 종류의 NA-COS의 세 포독성 수준을 한센 등(Hansen et al.; 1989)의 방법에 따라 MTT 분석법을 이용하여 측정하였다. 세포를 96- 웰 플레이트에서 5 x 10³ cells/well 밀도로 배양하였다. 24 시간 후, 세포를 신선한 배지로 세척한 다음, 다 양한 농도의 NA-COS로 처리하였다. 48 시간 배양한 후, 세포를 재세척하고, 50 µL의 MTT(5 mg/mL)를 가하고, 4 시간 동안 배양하였다. 최종적으로, DMSO (200 µL)를 가하여 형성된 포르마잔 염을 가용화시키고, GENios 마 이크로플레이트 리더기(TECAN Austria GmbH, Austria)를 이용하여 540 nm에서 광학밀도(OD)를 측정하여 포르마 잔 염의 양을 측정하였다. 생존 세포 비율을 대조군과 비교하여 %로서 계산하였다(처리된 세포의 OD x 100/ 블랭크군의 OD).

[0038] **실시예 6 : 막 단백질 산화 분석**

[0039] 카보닐기에 의한 단백질의 양을 측정함으로써 세포 막 단백질의 산화도를 분석하였다(Levine et al., 1990). 배양된 RAW 264.7 세포를 PBS로 3회 세척하고, 환원제를 포함하지 않은 용리 완충액 중에 용리시켰다. 세포 용 리물 분취액을 마이크로튜브로 옮기고, 다양한 농도의 NA-COS로 처리하였다. 37°C에서 30 분 동안 배양한 후, 0.1 mM Fe₃O₄ 및 2 mM H₂O₂를 혼합물에 가하고, 1 시간 동안 계속 배양하였다. 가용화된 단백질을 20% 트리클로 로아세트산 400 µL를 가한 후 원심분리하여 침전시켰다. 펠릿을 2N HCl 중의 0.2% 2,4-디니트로-페닐 하이드 라진에 재현탁시키고, 25°C에서 40 분 동안 정치시켰다. 단백질을 20% 트리클로로아세트산을 이용하여 재차 침 전시키고, 펠릿을 에탄올:에틸아세테이트(1:1 v/v) 용액으로 3회 세척하였다. 이어서, 이를 6N 구아니딘 하이드 로클로라이드 200 µL에 용해시키고, 37°C에서 15 분 동안 배양하였다. 1500 g에서 5 분 동안 원심분리한 후, UV/가시광선 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 370 nm에서 상청액의 흡수능을 보충용 블랭크에 대비하여 기록하였다. 2,4-디니트로페닐 하이드라진 시약 대신에 2N HCl 만을 이용하여 유사한 공정으로 블랭크 군을 제 조하였다. 단백질의 카보닐기를 대조군과 비교하여 나타내었다.

[0040] **실시예 7 : 라디칼 매개 DNA 손상 측정**

[0041] 약간 변형한 표준 페놀/프로테이나아제 K 과정(Sambrook & Russell, 2001)을 이용하여 RAW 264.7로부터 유전자 DNA를 추출하고, 이를 다양한 농도의 NA-COS로 전처리 하고, 밀른 등 (Milne et al.; 1993)의 펜톤 화학법을 이용하여 OH에 노출시켰다. 이를 위하여, 미리정한 농도의 시험 시료(또는 대조군으로서 동일한 부피의

증류수), 최종 농도의 FeSO_4 100 μL , 0.1 mM의 최종농도 HCl 및 유전자 DNA 5 μL 를 순서대로 가하여 DNA 반응 혼합물 40 μL 를 제조하였다. 이어서, 상기 혼합물을 실온에서 10 분 동안 배양하고, 10 mM의 최종농도 EDTA를 가하여 반응을 중단시켰다. 약 1 μL 의 DNA를 함유한 반응 혼합물의 분취액(20 μL)을 1% 아가로스 겔 상에서 40 분 동안 100 V로 전기영동시켰다. 이어서, 겔을 1 mg/mL 에티디움 브로마이드로 염색하고, AlphaEase 겔 이미지 분석 소프트웨어(Alpha Innotech, CA, USA)를 이용하여 자외선으로 시각화하였다.

[0042] **실시예 8 : DCFH-DA에 의한 세포 ROS 측정**

[0043] 산화-민감성 염료 2',7-디클로로플루오레신 디아세테이트(DCFH-DA)를 이용하여 세포내 반응성 산소종(ROS)의 형성을 검출하였다(Engelmann et al., 2005). 이를 위하여, 형광 마이크로타이터 96-웰 플레이트에서 배양한 RAW 264.7 세포를 암중에서 30 분 동안 HBSS (Hanks balanced salt solution) 중의 DCFH-DA 20 μM 로 표지하였다.

[0044] 이어서, 세포를 상이한 농도의 NA-COS로 처리하고, 추가로 1 시간 동안 배양하였다. 세포를 PBS로 3 회 세척한 후, 500 μM H_2O_2 를 가하였다. 세포 ROS에 의한 DCFH의 산화에 기인하여 2',7'-디클로로플루오레신(DCF)에서 방출된 형광 신호의 강도를 GENios 형광 마이크로타이터 리더기(Tecan Austria GmbH, Austria)를 이용하여 시간 의존적($\lambda_{\text{여기}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{방출}} = 528 \text{ nm}$)으로 검출하였다. 형광 강도 증가율이 최대가 된 후, 각 웰을 MTT 세포 생존력 분석법을 이용하여 세포 숫자에 맞도록 표준화시켰다. 처리 효과를 플로팅하고 대조군과 블랭크 군의 형광 강도와 비교하였다.

[0045] **실시예 9 : 세포내 GSH 수준의 측정**

[0046] 티올-염색용 시약으로서 모노브로모비메인(mBBR)을 이용하여 세포 글루타치온(GSH) 수준을 측정하였다(Poot et al. 1980). 이 실험을 위하여, RAW 264.7 세포를 형광 마이크로타이터 96-웰 플레이트에 1×10^7 cells/mL의 밀도로 파종하고, 정착시키고, 상이한 농도의 두 가지 종류 NA-COS로 30 분 동안 처리하였다. 이어서, 세포를 37 $^{\circ}\text{C}$ 암중에서 40 μM 의 mBBR로 30 분 동안 표지하였다. 염색 후, 상기에서 언급한 형광 마이크로타이터 리더기를 이용하여 mBBR-GSH 형광 강도를 측정하였다($\lambda_{\text{여기}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{방출}} = 465 \text{ nm}$). 세포 개체군의 평균 형광도 값을 플로팅하고, NA-COS 처리없이 배양한 세포군인 블랭크 군과 비교하였다.

[0047] 상기와 같은 실시예 1 내지 9를 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

[0048] **1. 키틴 올리고당(NA-COS) 생산을 위한 적절한 조건의 결정**

[0049] 배치 반응기에서 동일한 온도와 시간으로 10% 키틴 용액을 4 N 내지 12 N의 다양한 농도 범위의 HCl로 처리하여 키틴 올리고당 생산을 위한 적절한 조건을 결정하였다. 10% 키틴 올리고당 200 mL를 함유한 반응 혼합물을 40 $^{\circ}\text{C}$ 에서 7 시간 동안 교반하였다. 물 4 부피를 가하여 반응을 중단시켰다. 가수분해 수준을 DNA 분석법(Yu et al., 1998; Rojas Avelizapa et al., 1999)을 이용하여 키틴으로부터 방출된 환원당(*N*-acetyl glucosamine, GlcNAc)의 양으로 나타내었다. 환원당의 양을 mg/g 키틴으로 나타내었다. 그 결과, 적절한 HCl 농도는 12 N이었다(도 1 참조). 이 농도에서, 환원당의 함량이 최고였으며, 12 N HCl에 의한 키틴의 가수분해 수율을 약 99%의 가수분해도였다.

[0050] 배치 반응기에서 30 내지 70 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도 범위로 10% 키틴 용액을 적절한 농도(12 N)의 HCl로 처리하여 키틴 올리고당 생산을 위해 적절한 온도를 결정하였다. 10 % 키틴 용액을 함유한 반응 혼합물을 동일한 시간 및 조건에서 교반하였다. 도 2에 나타난 바와 같이, 환원당의 양이 40 $^{\circ}\text{C}$ 에서 최고로 증가하였다. 따라서 이 온도가 12 N HCl에 의한 산 가수분해에 적절한 것 이었다.

[0051] HCl에 의한 키틴 가수분해를 위해 적절한 시간을 결정하기 위해, 상기에서 결정한 적절한 조건(12 N HCl 농도 및 40 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도)에서 산 가수분해를 수행하였다. 그 결과, 환원당의 양이 가수분해 경과에 따라 증가하였고, 환원당의 함량은 8.0 시간에서 최고였으며, 이는 키틴이 완전히 가수분해되어 단량체를 형성하였음을 지지하는

것이다. 이어서, 환원당의 양이 감소되었고(도 3 참조), NA-COS 용액의 색상이 암갈색으로 변하였다. 이는 키틴 구조 중의 환원당(*N*-acetyl glucosamine or glucosamine)이 산화되었음을 보여주는 증거이다. 따라서 키틴 올리고당을 생산하는데 적절한 키틴 가수분해 시간은 0.5 내지 8 시간이다.

[0052] 2. 배양 시간에 따른 NA-COS의 분자량 측정

[0053] MALDI-TOF 질량 분광법을 이용하여 각 배양 시간에서 NA-COS의 분자량을 측정하였다. 이 실험은 다양한 시간 동안(1, 2, 3 및 4 시간) 40℃에서 12 N HCl 및 10% 키틴 용액으로 수행되었다. MALDI-TOF MS 스펙트럼이 테트라머 내지 헵타머 범위를 포함한 큰 분자량의 NA-COS의 주 피크와 다른 마이너 피크들을 보여주었다. 그러나 도 4 및 표 1에 나타난 바와 같이, 배양 시간에 따라 큰 분자량을 갖는 NA-COS, 예를 들어, 펜타머, 헥사머 및 헵타머의 주 피크는 감소하였고, 낮은 분자량을 갖는 NA-COS, 예를 들어, 트라이머 및 테트라머의 주 피크는 증가하였다. 3 kDa 및 1 kDa의 필터 크기를 갖는 UF 막을 이용하여 가수분해 용액을 분리한 후, 분자량 1-3 kDa 인 NA-COS(NA-COS 1-3 kDa)와 분자량 1 kDa 이하인 NA-COS(NA-COS < 1 kDa)를 수득하였다(도 5 참조).

[0054] 3. RAW 264.7의 세포 생존력에 대한 NA-COS의 영향

[0055] RAW 264.7 세포에 대한 NA-COS의 세포독성 효과를 측정하기 위하여, 세포를 상이한 농도의 NA-COS로 처리하였다. 세포 생존력 데이터는 분자량 1-3 kDa인 NA-COS(NA-COS 1-3 kDa)와 분자량 1 kDa 이하인 NA-COS(NA-COS < 1 kDa) 모두가 RAW 264.7 세포에 대해 비세포독성 효과를 나타낸다는 사실을 확인시켜 주었다(도 6 참조). 고농도의 NA-COS에서조차도 세포 생존력의 감소가 유의적이지 않았다. 따라서 두 가지 종류의 NA-COS를 본 발명의 추가 실험에 이용할 수 있었다.

[0056] 4. 막 단백질 산화의 저해

[0057] 단백질을 세포막 중 중요한 성분 중 하나로, 펜톤 반응 산물에 의한 단백질의 산화를, 산화된 단백질 마커로 확인되었으며 다양한 질환과 관련된 단백질 카보닐기(알데하이드 및 케톤)를 분석하여 측정하였다(Olszowski et al., 2003).

[0058] 반응성 산소종(ROS)인 세포막 중 단백질의 손상을 매개하고, 특히, 아미노산 라이신, 프롤린, 아르기닌 및 히스티딘이 산화적 공격에 고도로 취약하여 카보닐 잔기의 축적을 야기시키고, 이는 단백질 손상의 측정수단으로 이용된다(Levine et al., 1990). 더욱이, 단백질 산화 저해가 세포 통합성 및 표준 생물학적 기능을 유지하는데 중요한 역할을 할 수 있다. 따라서 산화 세포막 단백질에 대한 상이한 분자량의 두 가지 종류의 NA-COS 저해 효과 분석을 본 명세서에 기재된 방법에 따라 수행하였다. 마우스 대식세포막이 하이드록실 라디칼(OH)에 노출되었을 때 카보닐 잔기의 형성이 증가하였다. 도 7에 나타난 바와 같이, NA-COS 처리군 중 단백질 카보닐기가 산화 촉진된 세포막기(대조군)에서 보다 적었다. 단백질 카보닐기 함량을 통해, 대조군과 비교하여 NA-COS가 1000 µg/mL 농도에서 약 80% 저해할 수 있음이 나타났다(도 7 참조). 또한, NA-COS 1-3 kDa 가 NA-COS < 1 kD 보다 높은 막 단백질 산화에 대한 효과를 나타냈다. 배양 배지로 NA-COS를 도입시킴으로써 단백질 카보닐기 함량이 용량-의존적 방식으로 저해되었고, 단백질 산화 과정에 대한 저해 효과는 분자량에 의존하였다. RAW 264.7 세포에서 NA-COS가 그들의 분자량에 의존적으로 막 단백질의 산화를 저해할 수 있음이 본 발명을 통해 최초로 밝혀졌다.

[0059] 5. NA-COS의 DNA 보호 활성

[0060] 하이드록실 라디칼(OH)은 DNA 가닥을 산화적으로 절단시켜 개방된 나선형 형태 또는 이완된 형태를 만든다고 알려져 있다. 본 발명에서는 유전체 DNA를 RAW 264.7 세포에서 분리하여 DNA 산화적 손상에 대한 NA-COS의 보호 효과를 연구하였다. 100 µM Fe(II) 및 0.1 mM H₂O₂의 결합 효과를 이용하여 펜톤 반응에 의해 생성된 OH의 유전자 DNA의 통합성에 대한 효과를 NA-COS의 존재 또는 부재하에서 DNA 전기영동으로 관찰하였다. 반응 10 분 후, 단지 Fe(II)H₂O₂ 로만 처리된 대조군에서 거의 모든 DNA가 퇴화되었다. NA-COS 1-3 kDa 및 NA-COS <1 kDa 는 모두 DNA 산화적 손상을 유의적으로 저해하였음이 관찰되었다(도 8 참조). 모든 시험 농도의 NA-COS에서 DNA 손상이, DNA 밴드의 통합성을 기준으로 약 80% 저해되었다. DNA 산화에 대해 이러한 높은 활성으로 인하

여, 명확한 용량-의존적 효과는 관찰되지 않았고, 상이한 농도의 두 가지 NA-COS의 DNA 보호 효과는 비교할 수 없었다.

[0061] 본 발명의 결과는 NA-COS가, 본 발명자들의 종래의 보고(Ngo et al., 2008a)에 따라 DNA가 Fe (II)/H₂O₂에 의해 생성된 OH에 노출되었을 때 DNA의 산화적 손상을 방지할 수 있다는 사실을 명확히 설명한다. Fe²⁺는 H₂O₂의 전환을 촉매화하고, 이는 생물학적 시스템에서 OH 합성의 주요 경로이다. OH는 DNA 분자의 모든 성분과 고도로 반응하여 퓨린 및 피리미딘 염기를 손상시키고, 또한 데옥시리보오스 주쇄는 DNA 손상을 야기시킨다(Valko et al., 2007). 세포 DNA에 대한 자유 라디칼의 공격이 증가하는 경우, DNA가 보다 더 손상될 것이고, 이는 돌연변이, 암 및 노화와 관련될 것이다. 그러나 이러한 질환은 생존 세포 시스템에서 NA-COS의 DNA 산화에 대한 효과에 의해 방지될 수 있다. 본 발명에서의 아가로스 겔 전기영동의 결과를 기준으로, NA-COS는 DNA와 착물을 형성하지 않는다. 따라서 NA-COS의 직접 라디칼 소거 효과를 보다 명확히 확인하기 위한 분석을 수행하였다.

[0062] 6. NA-COS의 세포 라디칼 직접 소거 효과

[0063] 세포 자유 라디칼에 대한 NA-COS의 직접 소거 효과를 RAW 264.7 세포에 대해 측정하였다. 이를 위해, 세포를, 상기에 기술한 바와 같이 형광 프로브 2',7'-디클로로플루오레신 디아세테이트(DCFH-DA)로 표지하였다. 본 분석의 원리는 반응성 산소종(ROS)에 대해 특이적인 프로브인 DCFH-DA가 세포 막을 통해 확산되고 에스테라아제에 의해 효소적으로 가수분해되어 2',7'-디클로로플루오레신(DCFH)이 되고, 이는 ROS와 반응하여 형광 산물인 DCF를 형성하는 것이다. DCFH-DA 내지 DCFH가 세포 내에 트랩핑된 후, 세포를 H₂O₂로 30 분 동안 배양한 결과, DCF 형광 강도의 빠른 증가 세포내 라디칼에 의한 DCFH의 산화를 지시하였다(도 9 참조). 3 시간 동안 DCF 형광 강도를 모니터링한 결과 라디칼-매개 산화가 배양 시간에 따라 증가하였음이 나타났다.

[0064] 그러나 NA-COS를 사용한 전처리가 DCF의 형광 강도를 시간 의존적 방식으로 감소시켰다. 모든 농도의 NA-COS 1-3 kDa 및 NA-COS < 1 kDa (50, 100, 500 및 1000 µg/mL)가 대조군(NA-COS 없이 H₂O₂ 처리)과 비교하여 단지 30분의 배양 시간 이후에도 자유 라디칼 소거 활성을 나타내었다(도 9 및 10 참조). 라자팍세 등(Rajapakse et al.; 2007)의 보고에 따르면, 키토산 가수분해 올리고머인 키토올리고당(COS), 및 개질된 COS인 카복실화-COS가 용량- 및 시간-의존적 방식으로 강력한 항산화 활성을 나타낸다(Ngo et al., 2008a). 유사하게, 본 발명의 결과에서는, 이들의 항산화 활성이 다양한 농도의 NA-COS와는 상이하며, NA-COS가 1000 µg/mL 농도에서 다른 것들에 비해 보다 높은 자유 라디칼 소거 효과가 있음이 나타났다. 그러나 NA-COS 1-3 kDa가 NA-COS < 1kDa 보다 높은 항산화 활성을 지녔다. 이러한 결과는, 전자 스핀 공명 방법(electron spin resonance method; Je et al. 2004)을 이용하여 항산화 활성을 확인하고자 수행된 몇몇 최근 연구 결과와 유사하며, COS의 *n vivo* 약제학적 특성(pharmaceutical properties *in vivo*; Chae et al. 2005)는 이들의 분자량에 크게 의존한다. 따라서 본 발명에서는 NA-COS가 용량- 및 시간-의존적 방식으로 강력한 세포내 직접 라디칼 소거 효과를 가지며, NA-COS 1- 3 kDa가 NA-COS <1 kDa에 비해 보다 효과적으로 세포내로 도입되어 양성자를 효과적으로 공여할 수 있다는 사실을 제시한다.

[0065] 7. NA-COS 매개 세포내 글루타치온 수준 유도

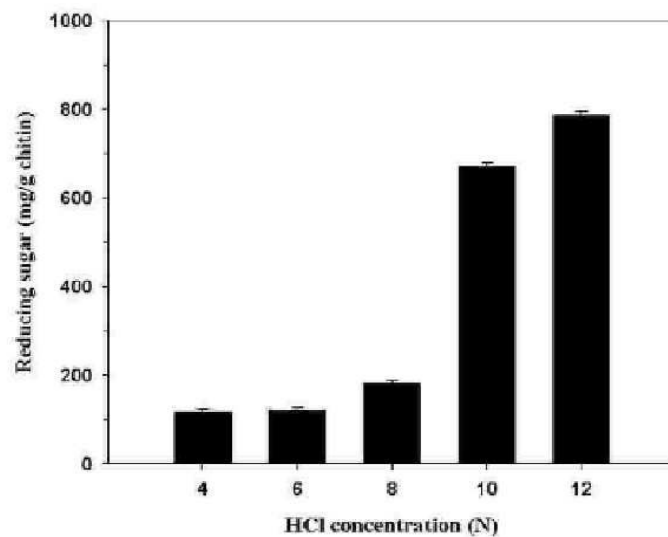
[0066] 세포 내의 유해 라디칼을 소거할 수 있다고 보고된 많은 항산화제의 효과가 글루타치온과 같은 주요 세포 환원제의 유도와 관련이 있음이 입증된 바 있다. 글루타치온은 트리펩타이드(GSH; L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine)로서, 세포내 산화환원 상태를 유지시키는데 있어 중요한 역할을 한다. 본 발명에서는 티올 반응성 형광 염료인 mBBR을 이용하여 세포 GSH 수준을 조절하는데 있어 NA-COS 1-3 kDa 및 NA-COS <1 kDa의 효과 분석을 수행하였다. 그 결과, GSH가 상이한 분자량의 두 가지 종류의 NA-COS의 존재 하에 mBBR-GSH 형광성을 통해 상향 조절되었고, 이들의 효과는 배양 시간(도 11 참조) 및 농도에 따라 증가하였다. 증가된 GSH 수준이 자유 라디칼을 제거하거나 독성물질과 공액화하여 세포 사멸을 보호한다고 하는 사실이 잘 알려져 있다(Sanchez-Reus et al., 2005). 그러나 짧은 배양 시간에서의 측정은 처리된 세포에서 GSH 수준의 유도를 개선시키지 못하였고, 2 시간 배양 이후에 명확히 증가하였다. 그 결과, 세포내 GSH 수준은 NA-COS 및 그들의 분자량에 의해 시간 및 용량-의존적 방식으로 약간 증가하였다. 더욱이 항산화 기작의 일부로서 항산화제의 작용에 의한 GSH 수준의 유지 및 개선이 주요한 측정되어야 할 인자이다. NA-COS에 의해 증진된 세포 GSH 수준을 도 12에 나타내었다.

도면의 간단한 설명

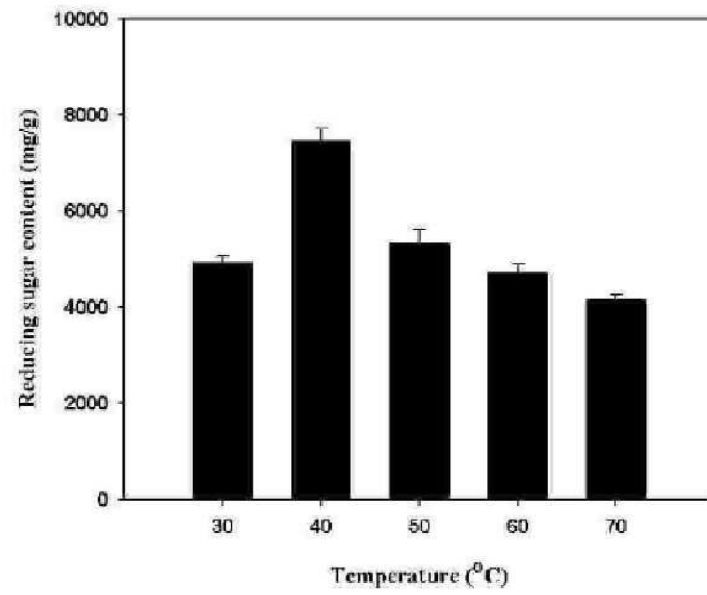
- [0067] 도 1은 키틴 가수분해에 대한 HCl의 농도 의존성을 나타낸 그래프이다.
- [0068] 도 2는 HCl에 의한 키틴 산 가수분해의 시간 의존성을 나타낸 그래프이다.
- [0069] 도 3은 배양 시간에 따른 키틴 가수분해를 나타낸 그래프이다.
- [0070] 도 4는 40℃에서 1, 2, 3 및 4 시간 동안 12 N HCl에서 키틴 올리고당의 MADI-TOF 질량 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- [0071] 도 5는 상이한 분자량에 따른 키틴 올리고당의 MADI-TOF 질량 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- [0072] 도 6은 RAW264.7 세포의 생존력에 대한 NA-COS의 세포독성 효과를 나타낸 도이다.
- [0073] 도 7은 세포 막 단백질 산화 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [0074] 도 8은 NA-COS에 의한 DNA 산화적 손상 보호를 나타낸 도이다.
- [0075] 도 9는 생산된 H₂O₂ 검출을 위한 화합물인 DCFH-DA에 의해 측정된 세포의 세포내 ROS 생산 수준을 나타낸 도이다.
- [0076] 도 10은 RAW 264.7 세포에서 NA-COS의 세포 라디칼 소거 활성을 나타낸 도이다.
- [0077] 도 11은 RAW 264.7 세포에서 GSH 수준의 조절에 대한 NA-COS의 효과를 나타낸 도이다.
- [0078] 도 12는 RAW 264.7 세포에서 NA-COS의 효과 발현을 나타낸 사진이다.

도면

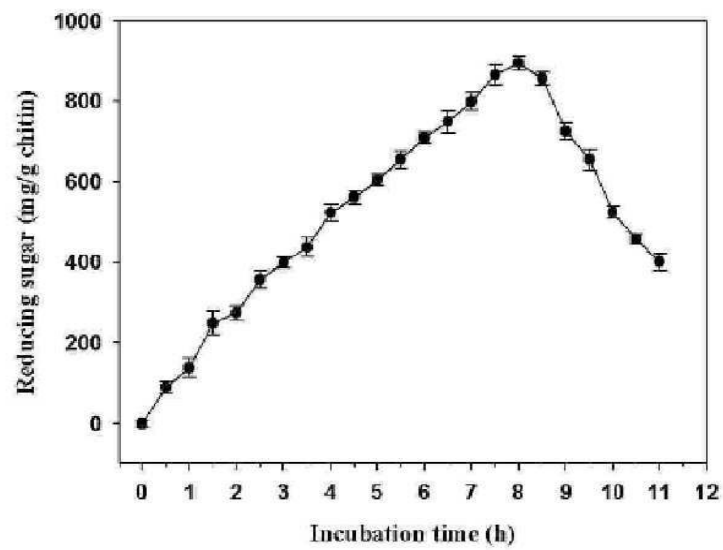
도면1



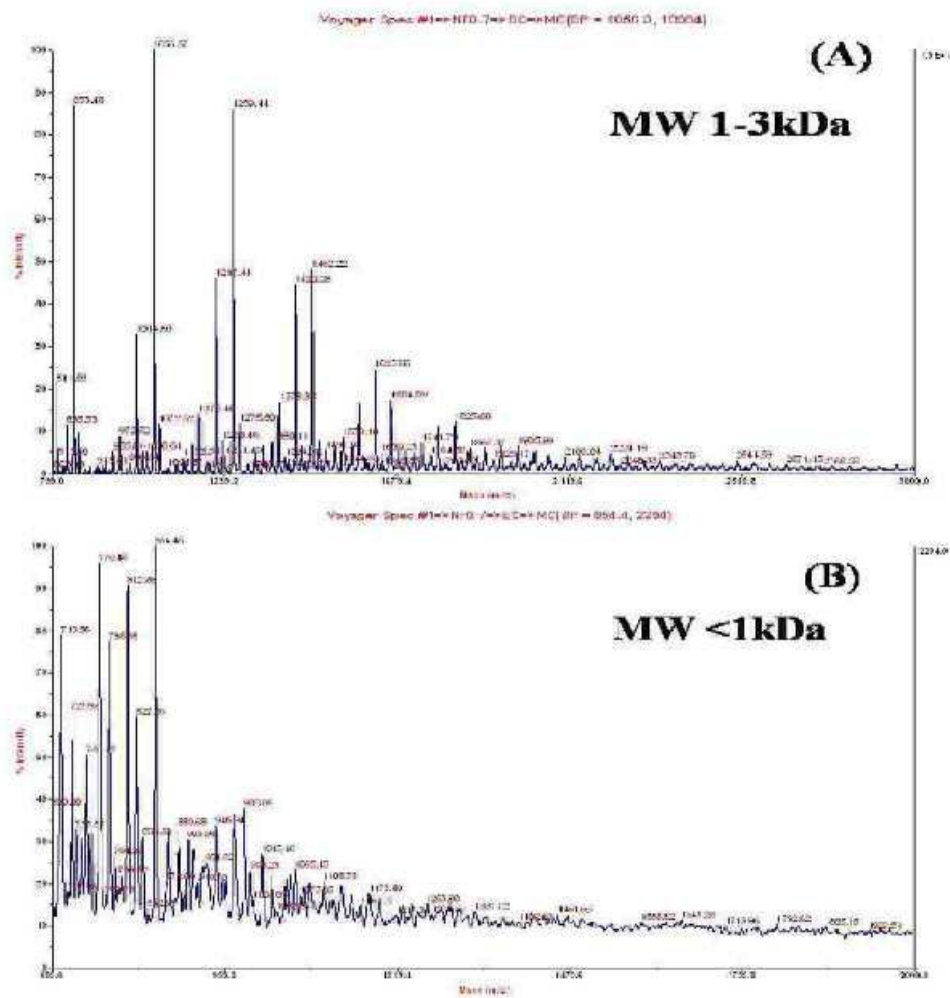
도면2



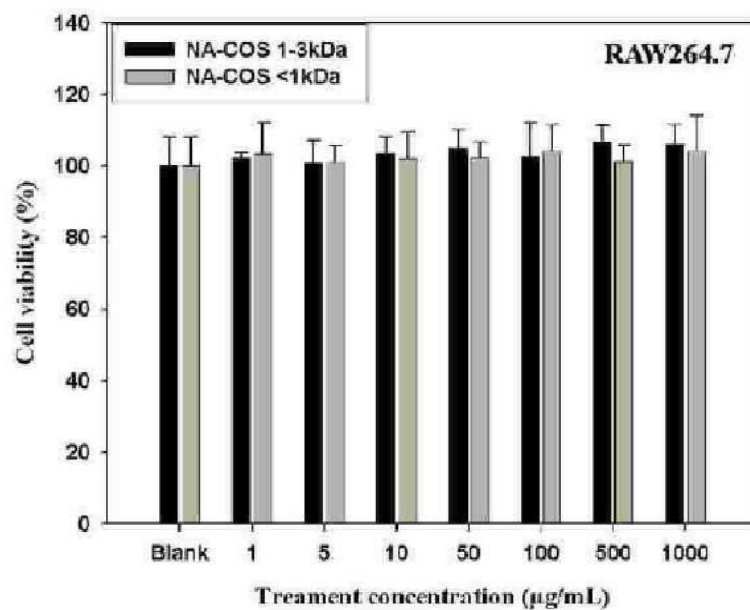
도면3



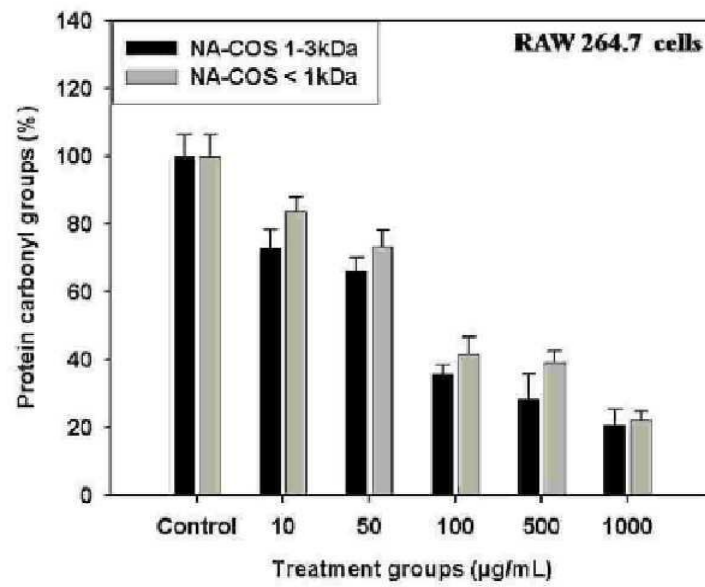
도면5



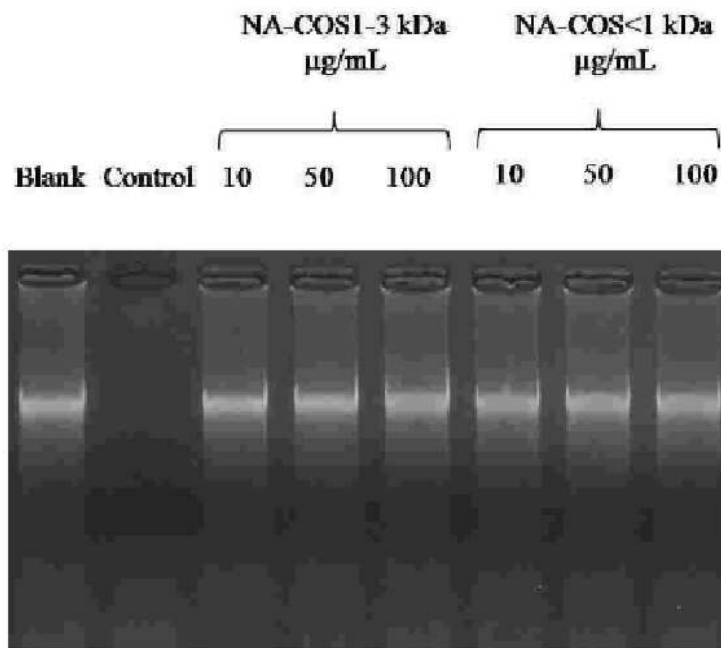
도면6



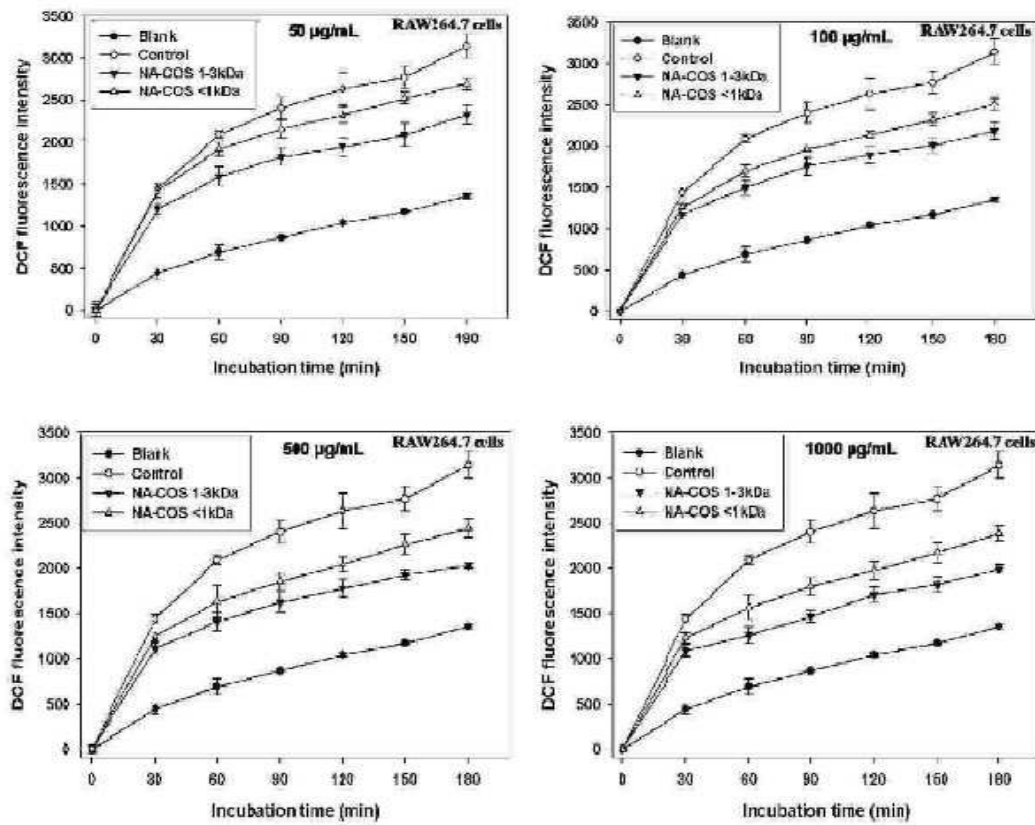
도면7



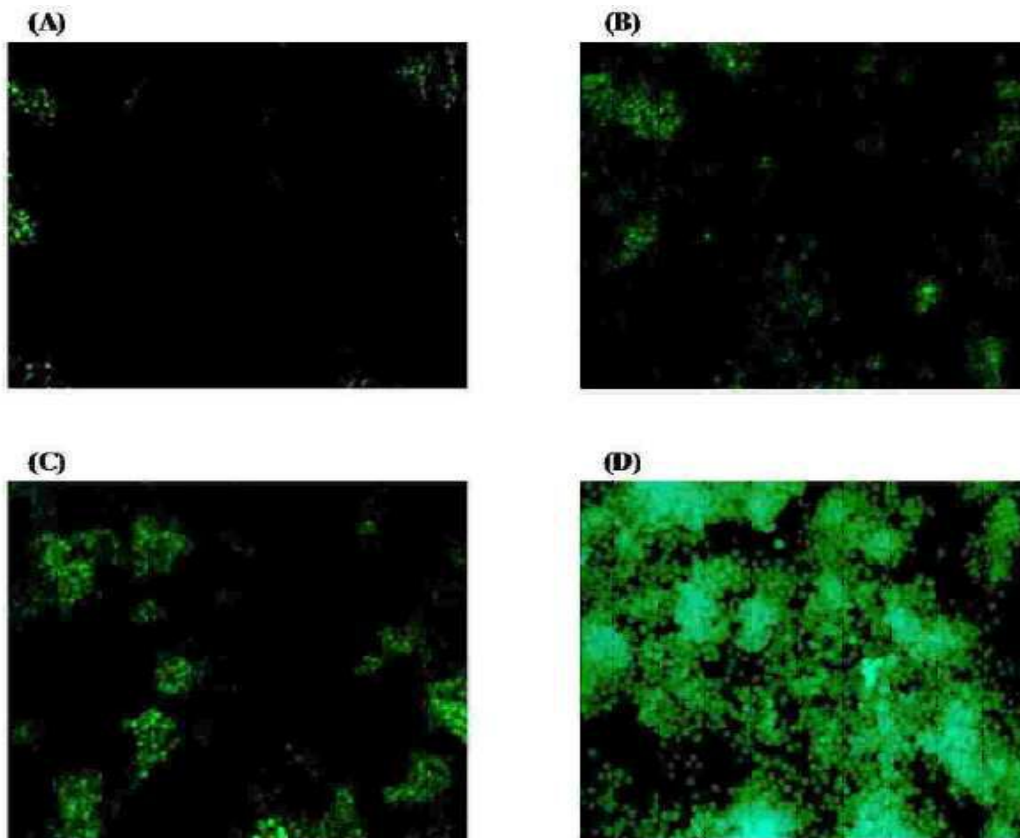
도면8



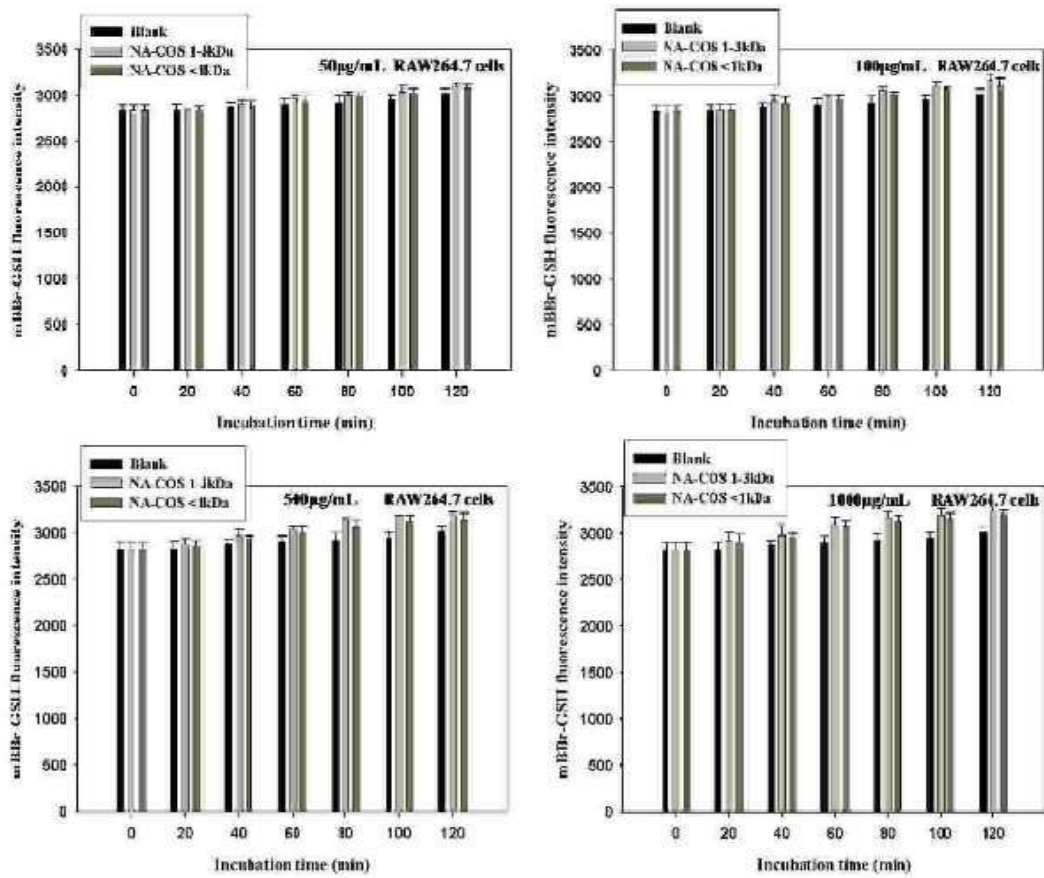
도면9



도면10



도면11



도면12

