(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0045804
(43) 공개일자 2012년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/19 (2006.01) *A61K 31/185* (2006.01)
A61K 36/185 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0107610
(22) 출원일자 2010년11월01일
심사청구일자 2010년11월01일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
정혜광
대전광역시 유성구 반석서로 98, 609동 1102호 (반석동, 반석마을6단지아파트)
황용필
대전광역시 유성구 문화원로 119, 707호 (봉명동, 봉명시티빌)
(74) 대리인
백경업

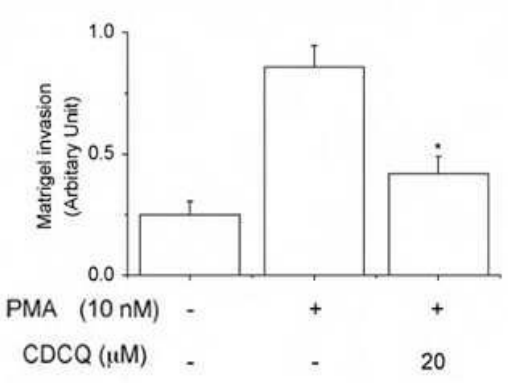
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 함유하는 암 전이 억제용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 함초 유래의 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid, CDCQ)을 함유하는 암 전이 억제용 약학 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 함초 유래의 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid, CDCQ)을 함유하는 조성물은 세포침투에 관여하는 세포 기저막 용해효소 MMP(matrix metalloprotease)-2 및 MMP-9(matrix metalloprotease-9)의 활성을 저해하고 암세포 전이를 억제시키는 효과가 뛰어나 암세포에 대한 전이를 억제시키는 의약품이나 암 전이 예방용 건강기능식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid)을 함유하는 것을 특징으로 하는 암 전이 억제용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 MMP-2(matrix metalloprotease-2) 또는 MMP-9(matrix metalloprotease-9)의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 암 전이 억제용 약학 조성물.

청구항 3

3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid)을 함유하는 것을 특징으로 하는 암 전이 예방용 건강기능식품.

청구항 4

제 1항의 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid)과 항암제를 유효성분으로 포함하는 항암 및 암전이 억제용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 항암제는 Busulfan, Chlorambucil, Cyclophosphamide, Melphalan, Nitrogen Mustard, BCNU(1,3-bis (2-chloroethyl)-1 nitrosourea), CCNU(1-(2-Chloroethyl)-3-Cyclohexyl-1-Nitrosourea), MeCCNU(1-(2-chloroethyl)-3-(4-methyl-cyclohexyl)-1-nitrosourea), Cisplatin, Ifosfamide, Cytarabine, Fluouracil(5-FU), Mercaptopurine(6-MP), Methotrexate(MTX), Actinomycin-D, Bleomycin, Daunorubicin, Adriamycin, Mitomycin-C, Vinblastine, Vincristine(Oncovin), Vindesine, VP-16(Etoposide), L-aspraginase, Dacarbazine(DTIC) 또는 Hydroxyurea 중에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 항암 및 암전이 억제용 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 함초 유래의 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid, CDCQ)을 함유하는 암 전이 억제용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0002] 더욱 상세하게는 암 전이(metastasis)를 억제시키는 데에 관여하는 세포 기저막 용해효소 MMP-2(matrix metalloprotease-2) 및 MMP-9(matrix metalloprotease-9)의 활성을 억제하는 효과를 갖는 함초 유래의 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid, CDCQ)을 유효성분으로 함유하는 암 전이 억제용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 인류 건강을 위협하는 악성종양, 즉, 암은 세계적으로 사망원인의 1, 2위를 차지하고 있으며 심혈관 질환 다음으로 서구사회에서 가장 일반적인 사망원인이다.

[0004] 현대사회의 인구의 노령화, 흡연인구의 증가 및 대기오염으로 인해 폐암이 증가하고 있으며 식생활의 서구화에 따른 고지방식의 섭취, 환경오염물질의 증가, 음주량의 증가 등으로 대장암, 유방암, 전립선 암 등이 지속적으로 증가 추세에 있다. 따라서 암의 조기예방 및 치료를 가능하게 하여 인류 건강의 증진, 건강한 삶의 질 향상 및 인류 보건 증진에 기여할 수 있는 항암 물질의 창출이 절실히 요구되고 있다.

[0005] 암세포가 다른 조직으로 전이되기 위해서는 암세포에서 분비되는 MMP-2(matrix metalloprotease-2) 또는 MMP-9(matrix metalloprotease-9)과 같은 단백질 가수분해효소가 기저막(base membrane)을 분해하고 내피세포를 통과하는 과정이 필요하다. 이러한 경로로 이동된 암세포는 혈관을 따라 이동하여 다른 조직의 세포에 붙은 후(세포 부착) 침투할 장소에서 세포의 기저막을 뚫고(세포 침투) 들어가서 전이를 하게 된다. 즉 이러한 일련의 과정 중 어느 하나가 차단되면, 암세포의 전이를 억제시킬 수 있는 항암효과를 기대할 수 있다.

[0006] 함초(*Salicornia herbacea,* 鹹草)는 우리나라 서해안 개펄에 자라는 한해살이 풀로 흔히 염초 또는 퉁퉁마디라고도 불리우며, 전체 모양이 산호를 닮았다 하여 산호초라고도 한다. 중국 최고의 의학책인 신농본초경에는 "함초"로, 일본의 대화본초에는 "신초(神草)" 또는 "복초(福草)", "염초(鹽草)"로 기록되어 있으며, 화농성 염증을 치료하고 갖가지 균을 죽이는 작용이 있어 민간요법 치료제로 널리 사용되어 왔다.

[0007] 함초는 몸 안에 쌓인 독소와 숙변을 없애고, 암, 자궁근종, 축농증, 고혈압, 저혈압, 요통, 당뇨병, 기관지천식, 갑상선 기능저하, 갑상선 기능항진, 피부병, 관절염, 신장염이나 갖가지 난치병에 탁월한 치료 효과를 지니고 있는 놀라운 약초라 알려져 있다. 또한 함초는 숙변을 제거하고 비만증을 치료하는 효과가 탁월하며, 혈액순환을 좋게 하고 피를 맑게 하며 혈관을 튼튼하게 하여 염증과 관절염으로 인한 수종 등의 치료에 이용되며, 먹는 화장품이라고 할 만큼 피부미용에 효과가 탁월하다.

[0008] 본 발명자들은 한국등록특허 제501833호, 한국등록특허 제569244호, 한국공개특허 2005-87418호 등을 통해 함초 유래의 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산이 항산화효과, 통풍치료, 항염증 효과 등이 있음을 이미 밝힌 바 있으며, 이 후로도 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산에 대해 지속적으로 연구를 하던 중, 본 발명에서 상기 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산이 암 전이 억제 효과가 있는 것을 확인하였다. 또한 암 전이 억제가 일어나는 암세포에서 MMP-2(matrix metalloprotease-2)와 MMP-9(matrix metalloprotease-9)의 발현이 억제되고, 상기 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 유도하는 것으로 알려진 MT-1-MMP(membrane-type matrix metalloproteinases)의 발현도 역시 같은 양상으로 발현이 억제되어 있는 것을 확인함으로 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

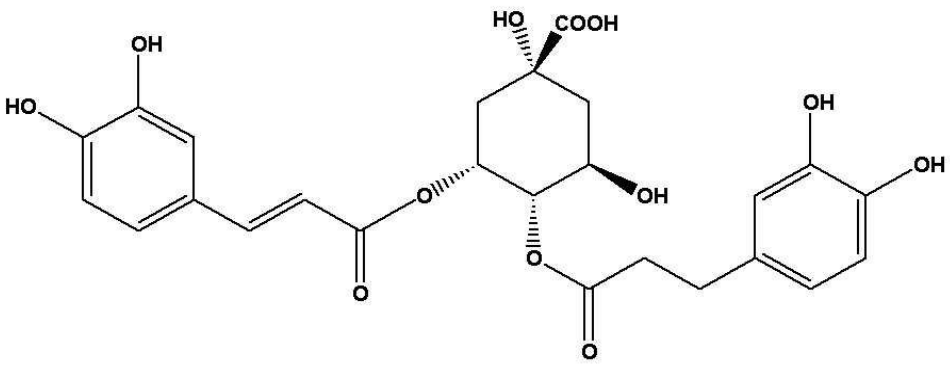
해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 암세포의 세포침투에 관여하는 세포 기저막 용해효소 MMP-2(matrix metalloprotease-2) 및 MMP-9(matrix metalloprotease-9)의 활성을 저해하여 암세포의 전이를 억제시키는 효과를 갖는 함초 유래의 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid, CDCQ)이 함유된 암 전이 억제용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid, CDCQ) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 전이 억제용 조성물인 것을 그 특징으로 한다.

화학식 1



[0011]

[0012] 본 발명은 함초(Salicornia herbacea)로부터 분리?정제된 클로로겐산 (chlorogenic acid) 계열의 카페오일(Caffeoyl) 화합물의 일종인, 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid, CDCQ)을 유효성분으로 포함하는 암 전이 억제용 조성물에 관한 것이다.

[0013] 상기 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산은 화학적으로 합성하거나 함초로부터 분리하여 수득할 수 있으며, 그 과정은,

[0014] 1) 건조된 함초를 메탄올로 추출하고 여과한 후 그 여액을 감압농축하여 메탄올 추출물을 얻는 단계;

[0015] 2) 상기 메탄올 추출물을 증류수에 현탁하고 에틸아세테이트로 진탕 추출하여 물층을 얻는 단계;

[0016] 3) 상기 물층을 흡착 크로마토그래피를 수행하여 메탄올 수용액으로 탈착하여 활성분획을 얻는 단계;

[0017] 4) 상기 활성분획을 감압 건조하여 산성조건에서 아세토나이트릴 수용액으로 로 고속액체크로마토그래피를 수행하여 정제함으로써 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 얻는 단계;

[0018] 를 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명에 따른 화합물은 함초로부터 쉽게 분리할 수 있을 뿐만 아니라 안정도도 높으므로 식품, 의약품의 첨가제로 이용할 수 있다.

[0020] 본 발명의 암전이 억제용 조성물은 하기에 나열된 통상적으로 사용되는 항암제와 함께 병용 투여되어 항암 및 암전이 억제용 치료제로 사용될 수 있다.

[0021] 상기 통상적으로 사용되는 항암제는 알킬화제제(alkylating agent) 항암제, 항대사제(antimetabolic agent) 항암제, 항암 항생제(antibiotics), 알칼로이드(vinka alkaloids) 계열의 항암제 등이 사용될 수 있다.

[0022] 상기 알킬화제제(alkylating agent) 항암제로는 Busulfan, Chlorambucil, Cyclophosphamide, Melphalan, Nitrogen Mustard, BCNU(1,3-bis (2-chloroethyl)-1 nitrosourea), CCNU(1-(2-Chloroethyl)-3-Cyclohexyl-1-Nitrosourea), MeCCNU(1-(2-chloroethyl)-3-(4-methyl-cyclohexyl)-1-nitrosourea), Cisplatin, Ifosfamide가 사용될 수 있다.

[0023] 또한 상기 항대사제(antimetabolic agent) 항암제로는 Cytarabine, Fluouracil(5-FU), Mercaptopurine(6-MP), Methotrexate(MTX)가 사용될 수 있으며, 상기 항암 항생제(antibiotics) 중에는 Actinomycin-D, Bleomycin, Daunorubicin, Adriamycin, Mitomycin-C 등이 사용될 수 있다.

[0024] 상기 알칼로이드(vinka alkaloids) 계열의 항암제 중에는 Vinblastine, Vincristine(Oncovin), Vindesine, VP-16(Etoposide)이 있으며, 이 외에 L-aspraginase, Dacarbazine(DTIC) 또는 Hydroxyurea 등도 본 발명의 암전이 억제용 조성물과 함께 사용될 수 있다.

[0025] 또한, 상기 항암제는 본 발명의 암전이 억제용 조성물과 병용 투여될 수 있는 항암제에 대한 예시일 뿐, 병용 투여될 수 있는 항암제는 이에 구애받지는 않는다.

[0026] 상기 화학식 1로 표시되는 본 발명의 화합물 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산은 당해 기술 분야에서 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용 가능한 염으로 제조될 수 있다.

[0027] 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오즈, 덱스트로즈, 수크로오즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오즈, 메틸 셀룰로오즈, 미정질 셀룰로오즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오즈 또는 락토오즈, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될

수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0028] 상기 화합물의 투여량은 치료 받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01㎎/㎏/일 내지 대략 2000㎎/㎏/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.1㎎/㎏/일 내지 500㎎/㎏/일이다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명의 화합물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 천연물 유래의 화합물로 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0029] 또한, 본 발명은 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 암 전이 예방용 건강기능식품을 제공한다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 상기 건강기능식품으로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스넥류, 면류, 아이스크림을 포함한 낙농제품, 스프, 이온음료 등을 포함한 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제를 포함한 영양 공급용 제품 등이 포함될 수 있다.

발명의 효과

[0030] 본 발명의 함초 유래의 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid, CDCQ)을 함유하는 조성물은 암 전이 억제 효과가 뛰어나 암세포에 대한 전이를 억제시키는 의약품이나 암 전이 예방용 건강기능식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산이 섬유육종세포의 증식을 억제하는 결과를 PMA(phorbol-12-myristate-13-acetate)의 존재 유무에 따라 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 2는 PMA로 인해 증가된 섬유육종세포의 세포침입(cell invasion)을 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산이 억제하는 것을 나타낸 그래프이다.

도 3은 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 처리로 인해 섬유육종세포의 세포이동(cell migration)이 억제되는 것을 나타낸 그래프이다.

도 4는 섬유육종세포에서의 MMP-2(matrix metalloprotease-2) 및 MMP-9(matrix metalloprotease-9)의 단백질 발현이 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 처리로 인해 감소되는 것을 나타내는 젤라틴 자이모그래피(상단의 청색 패널) 및 웨스턴 블롯(하단의 흰색 패널) 결과이다.

도 5는 MMP-2 및 MMP-9의 RNA 발현이 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 처리로 감소되는 것을 RT-PCR로 나타낸 결과이다.

도 6은 MMP-9의 RNA 발현이 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 처리로 감소되는 것을 리얼타임 PCR(real time PCR)로 나타낸 결과이다.

도 7은 MMP-2의 RNA 발현이 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 처리로 감소되는 것을 리얼타임 PCR로 나타낸 결과이다.

도 8은 MMP-9 프로모터 활성이 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 처리로 감소되는 것을 루시퍼라아제 어세이로 확인한 결과이다.

도 9는 MMP-2 프로모터 활성이 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 처리로 감소되는 것을 루시퍼라아제 어세이로 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다.

[0033] **<실시예 1 : 함초로부터 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 분리>**

[0034] 서해안 갯벌에서 채취한 함초 건조물 1.5kg를 쇄절하고 100% 메탄올로 3일 동안 추출하여 감압여과한 후, 그 여액을 60℃의 수조에서 감압농축하여 농축된 메탄올 농축액을 1ℓ의 증류수에 현탁하였다. 증류수에 현탁시킨 메탄올 추출물은 2ℓ의 에틸아세테이트로 진탕 추출하여 물층을 얻은 다음, 상기 물층을 60℃의 수조에서 감압농축하여 물층에 존재하는 에틸아세테이트를 제거하였다. 에틸아세테이트가 제거된 상기 물층을 증류수에 평형화된 다이아이온 에이치피 20 칼럼 크로마토그래피(Diaion HP-20 column chromatography)에 흡착시켜 물로 세척한 후에 메탄올 30% 용액으로 활성물질을 추출하여 활성분획을 얻었다. 이 후, 상기 활성분획을 감압농축하여 소량의 메탄올에 녹여 메탄올에 평형화된 세파덱스 엘에이치 20 칼럼(Sephadex LH-20 gel column chromatography)에서 전개시켜 활성분획을 얻었고, 그 분획을 YMC 젤 ODS 칼럼 크로마토그래피(YMC gel ODS column chromatography)에서 산성조건에서 20% 아세토나이트릴 수용액을 용매로 사용하여 고속액체크로마토그래피를 행하여 분리하였으며, 기기분석 결과 화학식 1과 같은 구조의 화합물, 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid, CDCQ)을 얻었다(Tungtungmadic acid, a novel antioxidant, from Salicornia herbacea, Arch. Pharm. Res. 28, 2005, 11221126).

[0035] **<실시예 2 : 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 세포증식 억제효과>**

[0036] 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 암세포에 대한 증식억제효과를 조사하기 위하여 10% FBS(fetal bovine serum)가 함유된 RPMI1640 배지에서 배양하던 섬유육종세포 HT-1080을 48-웰 플레이트에 각 웰당 1×10^5개/mℓ로 계대배양하였다. 이 후, 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 각 웰에 농도별로 넣고 PMA(Phorbol-12-myristate-13-acetate) 10nM의 존재 유무 하에 24시간 후의 세포증식 상태를 Roche에서 제조한 MTT 어세이 키트를 이용하여 확인하였고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0037] 도 1을 참조하면, 섬유육종세포인 HT-1080의 세포 증식율이 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산 처리 농도에 의존하여 억제되는 것을 확인할 수 있으며, 특히 PMA(Phorbol-12-myristate-13-acetate)를 처리한 군에서 더 큰 폭의 증식억제효과가 있는 것을 확인할 수 있다.

[0038] ※ PMA(Phorbol-12-myristate-13-acetate) : 세포의 초기 부착을 활성화하며, 종양성장을 촉진함

[0039] **<실시예 3 : 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 세포침투능 억제효과>**

[0040] 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 세포막 침투능 억제 효과를 조사하기 위하여 섬유육종세포 HT-1080을 혈청이 함유되지 않는 세포배양배지(serum free media)에서 인공 기저막(1:10으로 희석된 matrigel 50㎕)이 코팅이 되어있는 48웰 트랜스웰 챔버(48-well Transwell chamber)의 내부(inner cup)에 계대배양하였다. 이 후 PMA 10nM과 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산 20μM을 넣고 24시간 후의 세포침투 상태를 세포 고정(cell fixation) 후 염색(staining, 0.1% crystal violet in 20% ethanol)하여 계수하였으며, 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0041] 도 2를 참조하면, PMA만을 단독으로 처리한 세포에서는 세포막 침투가 활발히 진행되었음을 확인할 수 있지만, PMA와 함께 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산 20μM이 처리된 세포에서는 세포막 침투가 억제되어 있음을 확인할 수 있다.

[0042] **<실시예 4 : 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 세포 이동/부착 억제효과>**

[0043] 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 세포 이동/부착 억제효과를 확인하기 위하여 HT-1080 세포를 6-웰 플레이트에 계대배양 한 후 200㎕ 파이펫 팁(pipette tip) 끝을 사용하여 플레이트에 부착된 세포를 제거하고 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 농도별로 처리하였다. 6시간 후, HT-1080 세포의 이동 및 부착 정도를 현미경 관찰을 통하여 계수하였으며 도 3에 상기 결과를 나타내었다.

[0044] 도 3을 참조하면, HT-1080의 세포 이동/부착율이 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 처리로 억제되었음을 확인할 수 있다.

[0045] **<실시예 5 : 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 MMP-2 및 MMP-9의 효소활성 억제>**

[0046] 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산이 MMP-2 및 MMP-9의 효소활성을 억제하는 것을 확인하기 위해 PMA 10nM이 존재하는 상태에서 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 처리한 HT-1080 세포를 이용하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0047] **5-2. 젤라틴 자이모그래피와 웨스턴 블롯**

[0048] MMP-2와 MMP-9이 젤라틴을 분해하는 특성을 이용하여 젤라틴 자이모그래피(gelatin zymograpy)를 수행하였다. HT-1080 세포에서 PMA 10nM과 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산이 포함된 배지를 제거한 뒤, FBS(fetal bovine serum)가 제거된 세포배양배지에 24시간 둔 후, 상기 배지를 수거하여 비환원 샘플버퍼(non-reducing sample buffer)와 혼합한 뒤, 0.1% 젤라틴이 포함된 10% 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel)에서 전기영동하였다. 전기영동 이후, 상기 폴리아크릴아마이드 겔은 세척용 버퍼(2.5% TritonX-100, 50mM TrisHCl, pH 7.5)로 세척한 후, 37℃의 보존용 버퍼(50mM TrisHCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 5mM $CaCl_2$, 1mM $ZnCl_2$, 40mM NaN_3)에 24시간 두었다. 이 후, 0.25%(w/v)의 코마시 용액(Coomassie brilliant blue in 45%[v/v] methanol, 1%[v/v] acetic acid)에서 염색하여 MMP-2 및 MMP-9의 발현 정도를 확인하였고 이를 도 4에 나타내었다.

[0049] 웨스턴 블롯은 PMA 10nM와 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산이 처리된 HT-1080 세포를 수거하여 PBS(phosphate-buffered saline)로 세척하고, 100㎕의 세포용해버퍼(120mM NaCl, 40mM Tris, pH 8.0, 0.1% NP40)로 세포를 파쇄하여 단백질을 수득하였다. 상기 단백질은 40㎍씩 10% 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동하였고, PVDF 멤브레인으로 단백질을 전이시켰다. 이후, 1% BSA(bovine serum albumin) 용액으로 멤브레인을 블로킹(blocking)한 후, 3시간 동안 1차 항체를 반응하고 1시간 동안 2차 항체를 반응시켰다. 단백질 발현의 확인은 웨스턴 블로팅 디텍션 키트(western blotting detection kit, Pierce)를 이용하여 확인하였고, 이를 도 4에 나타내었다.

[0050] 도 4를 참조하면, 상단(청색 패널)의 자이모그래피 결과와 하단(흰색 패널)의 웨스턴 블롯 결과에서 PMA의 처리로 증가되어 있는 MMP-9의 단백질 발현이 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 처리로 인해 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있다. 또한 PMA의 처리로 MMP-2의 발현이 대조군보다 증가되지는 않았지만 카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 처리로 인해 MMP-2 역시 대조군에 비해 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있다.

[0051] **5-3. RNA 추출 및 RT-PCR**

[0052] MMP-2와 MMP-9의 RNA 발현을 확인하기 위해, HT-1080 세포의 총 RNA를 RNA 추출 키트(RNA extraction kit, Amersham Pharmacia)를 이용하여 수득하였으며 RT-PCR 비드 키트(RT-PCR Bead kit, Amersham Pharmacia) 이용하여 cDNA(complementary DNA)를 합성하였다. RT-PCR(semi-quantitative RT-PCR)의 조건은 30 싸이클(cycle), 94℃-30초, 56℃-30초, 72℃-1분으로 하였으며, RT-PCR 결과는 도 5에 나타내었다.

[0053] 도 5를 참조하면, 젤라틴 자이모그래피나 웨스턴 블롯의 단백질 발현 결과와 마찬가지로, PMA의 처리로 인해 증가되었던 MMP-9의 RNA 발현이 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 처리로 인해 현저하게 억제되는 것을 확인할 수 있다. 또한 MMP-2의 RNA 발현도 단백질 발현 결과와 마찬가지로 PMA의 처리로 대조군보다 증가되지는 않았지만 카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 처리로 인해 MMP-2의 RNA 발현 역시 대조군에 비해 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있다. 이 외에도, MMP-2 및 MMP-9의 발현을 유도하는 것으로 알려진 MT-1-MMP(membrane type 1 matrix metalloproteinases)의 발현도 역시 같은 양상으로 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있다.

[0054] **5-4. 리얼타임 PCR**

[0055] 상기 실시예 5-3에서 합성된 cDNA과 SYBR그린(SYBRGreen reporter dye)을 이용하여 리얼타임 PCR(real time PCR)을 수행하여, MMP-2 및 MMP-9의 RNA 발현을 확인하였다. 프라이머(primer)는 하기 조건으로 사용하였으며 이에 대한 결과는 도 6 및 도 7에 나타내었다.

[0056] MMP-2 : forward 5-AGT CTG AAG AGC GTG AAG-3

[0057] reverse 5-CCA GGT AGG AGT GAG AAT G-3

[0058] MMP-9 : forward 5-TGA CAG CGA CAA GAA GTG-3

[0059] reverse 5-CAG TGA AGC GGT ACA TAG G-3

[0060] GAPDH : forward 5-CCA CCC ATG GCA AAT TCC-3

[0061] reverse 5-TGG GAT TTC CAT TGA TGA CAA-3

[0062] 도 6의 결과를 참고하면, RT-PCR 결과와 마찬가지로 리얼타임 PCR에서도 PMA의 처리로 인해 증가되었던 MMP-9의 RNA 발현이 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 처리로 인해 현저하게 억제되는 것을 확인할 수 있다. 또한 도 7의 결과도 역시, PMA의 처리로 MMP-2의 RNA 발현이 대조군보다 증가되지는 않았지만 카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 처리로 인해 MMP-2의 RNA 발현 역시 대조군에 비해 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있다.

[0063] **5-5. 루시퍼라아제 어세이**

[0064] MMP-2 및 MMP-9의 프로모터(promoter) 활성을 확인하기 위해 48웰-플레이트에 HT-1080 세포를 배양한 후, FBS(fetal bovine serum)와 항생제가 포함되지 않는 세포배양배지를 6시간 동안 반응시켰다. 이 후, 야생형(wild type) 프로모터 WT-MMP-2(1μg, control vector: pGL3 vector) 또는 WT-MMP-9(1μg, control vector: pGL2 vector)를 포함하는 루시퍼라아제 리포터 벡터(luciferase reporter vector)를 HT-1080 세포에 리포펙타민 2000(lipofectamine 2000, invitrogen)을 이용하여 트랜스펙션(transfection)하고, 24시간 후 각 프로모터의 활성을 확인하였다. 유전자 주입 효율을 보정하기 위하여 β-갈락토시다제(pCMV-β-gal 0.5μg 사용함)의 활성을 측정(luminometer 이용, Luminoscan Ascent; Thermo Electron Co.)하여 MMP-2 및 MMP-9의 프로모터 활성을 보정하였으며 상기 결과는 도 8 및 도 9에 나타내었다. 루시퍼라아제 어세이 시스템은 트랜스펙션 24시간 후에 특정하였으며 Promega에서 제조한 키트를 이용하였다(dual-luciferase reporter assay system, Promega, Madison, WI, USA). WT-MMP-2 프로모터 벡터는 Dr. Etty N. Benveniste(University of Alabama, Birmingham, USA, Hongwei Qin and Etty N. Benveniste 1999)가 제공하였고, WP-MMP-9 프로모터 벡터는 Dr. W. Eberhardt(Klinikumder Johann Wolfgang Goethe-Universit, Frankfurt am Main, Germany, Eberhardt et al., 2002)가 제공하였다.

[0065] 도 8을 참조하면, PMA의 처리로 인해 증가되었던 MMP-9의 프로모터 활성이 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 처리로 인해 현저하게 억제되는 것을 확인할 수 있다. 또한 도 9를 참조하면, 단백질 및 RNA의 발현 결과와 마찬가지로 PMA의 처리로 인해 MMP-2 프로모터의 활성이 대조군보다 증가되지는 않았지만 카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 처리로 인해 MMP-2의 프로모터 활성 역시 대조군에 비해 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있다.

[0066] **<실시예 6 : 독성시험>**

[0067] **6-1. 경구투여**

[0068] ICR계 마우스(25g)를 10마리씩 5개의 군으로 나누어 본 발명에 따른 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 각각 2, 10, 20 및 50㎍/kg의 용량으로 경구 투여한 후 2주간 독성여부를 관찰한 결과, 5개의 군에서 모두 생존하였다.

[0069] **6-2. 복강투여**

[0070] ICR계 마우스(25g)를 10마리씩 4개의 군으로 나누어 본 발명에 따른 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 각각 2, 10, 20 및 50㎍/kg의 용량으로 복강 투여한 후 24시간 동안 독성여부를 관찰한 결과 4개의 군 모두 생존하였다.

[0071] 이상의 결과에서 본 발명의 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산은 급성독성이 거의 없음을 확인하였다.

[0072] **<사용예 1 : 약학적 제제예>**

[0073] **1-1. 정제의 제조**

[0074] 본 발명의 화합물 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산 200g을 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0075] **1-2. 주사액제의 제조**

[0076] 본 발명의 화합물 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 증류수에 용해시켜서 100㎖를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[0077] **<사용예 2 : 식품 제조예>**

[0078] **2-1. 조리용 양념의 제조**

[0079] 본 발명의 화합물 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 0.2~10 중량%로 하여 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

[0080] **2-2. 밀가루 식품의 제조**

[0081] 본 발명의 화합물 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 0.1~5.0 중량%로 하여 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0082] **2-3. 스프 및 육즙(gravies)의 제조**

[0083] 본 발명의 화합물 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 0.1~1.0 중량%로 하여 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0084] **2-4. 유제품(dairy products)의 제조**

[0085] 본 발명의 화합물 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 0.1~1.0 중량%로 하여 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0086] **<사용예 3 : 음료 제조예>**

[0087] **3-1. 야채쥬스 제조**

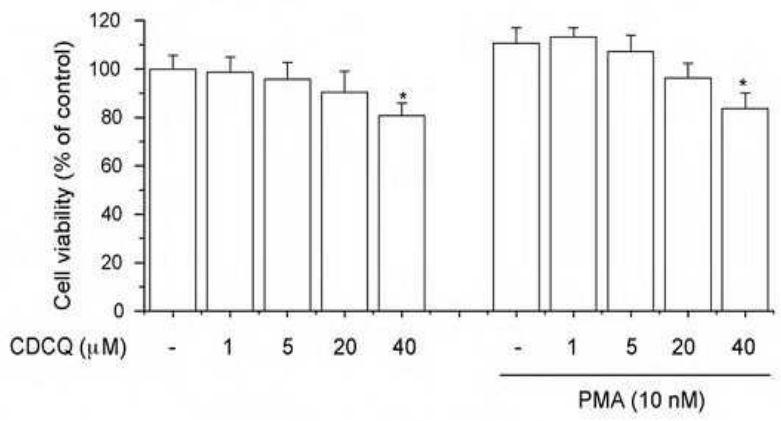
[0088] 본 발명의 화합물 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산 0.5g을 토마토 또는 당근 쥬스 1,000㎖에 가하여 건강 증진용 야채쥬스를 제조하였다.

[0089] **3-2. 과일쥬스 제조**

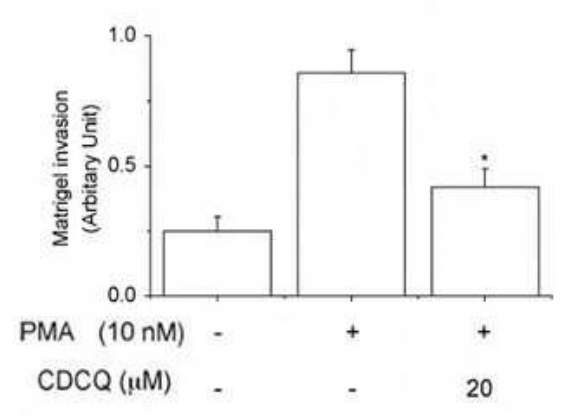
[0090] 본 발명의 화합물 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산 0.1g을 사과 또는 포도 쥬스 1,000㎖에 가하여 건강 증진용 과일쥬스를 제조하였다.

도면

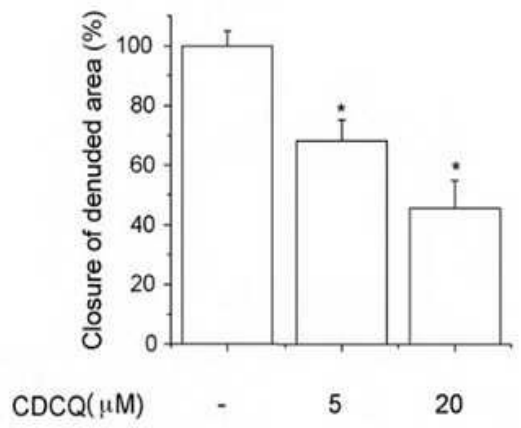
도면1



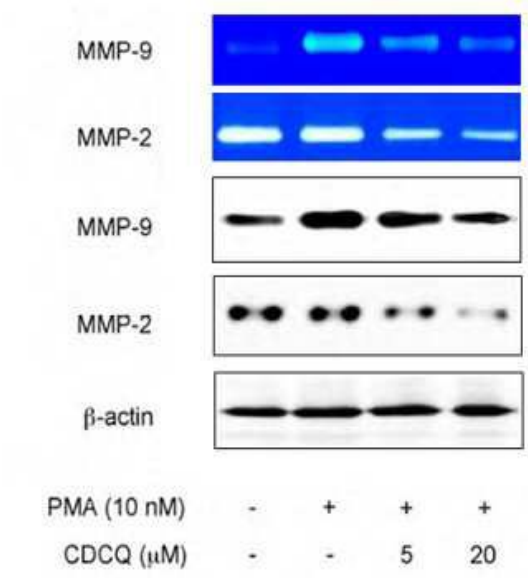
도면2


Matrigel invasion
(Arbitary Unit)
1.0
0.5
0.0
PMA (10 nM) - + +
CDCQ (μM) - - 20

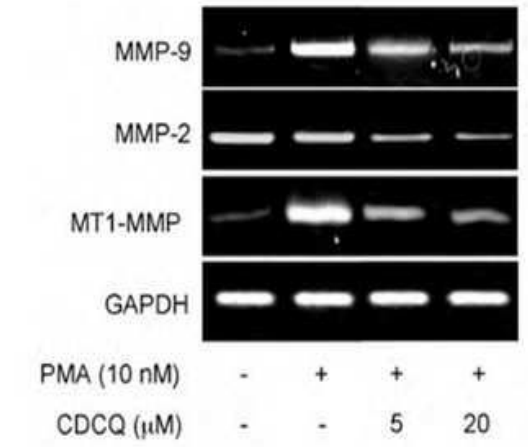
도면3


Closure of denuded area (%)
100
80
60
40
20
0
CDCQ(μM) - 5 20

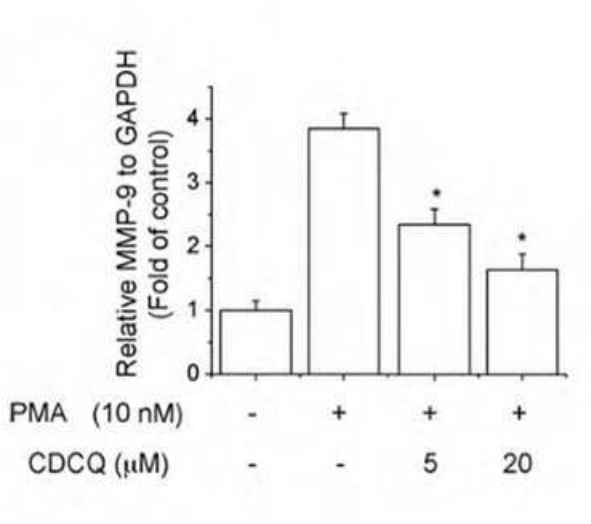
도면4


MMP-9
MMP-2
MMP-9
MMP-2
β-actin
PMA (10 nM) - + + +
CDCQ (μM) - - 5 20

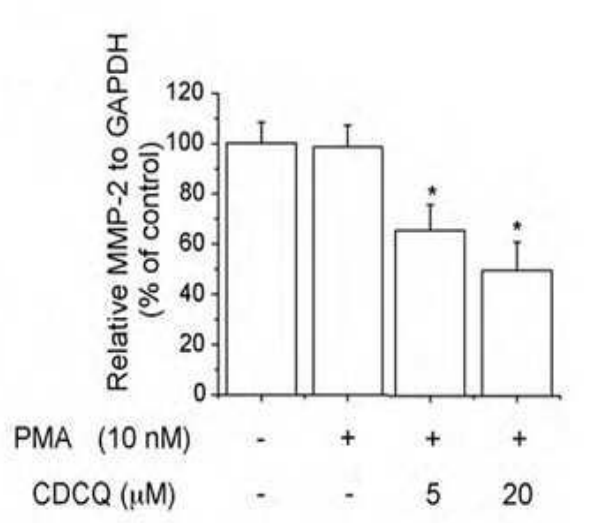
도면5


MMP-9
MMP-2
MT1-MMP
GAPDH
PMA (10 nM) - + + +
CDCQ (μM) - - 5 20

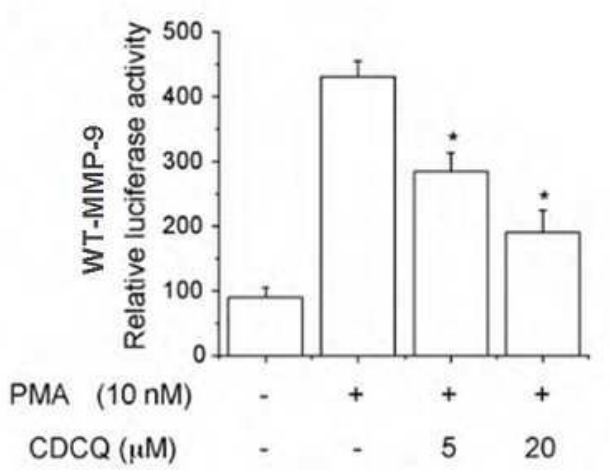
도면6


Relative MMP-9 to GAPDH
(Fold of control)
0
1
2
3
4
*
*
PMA (10 nM) - + + +
CDCQ (μM) - - 5 20

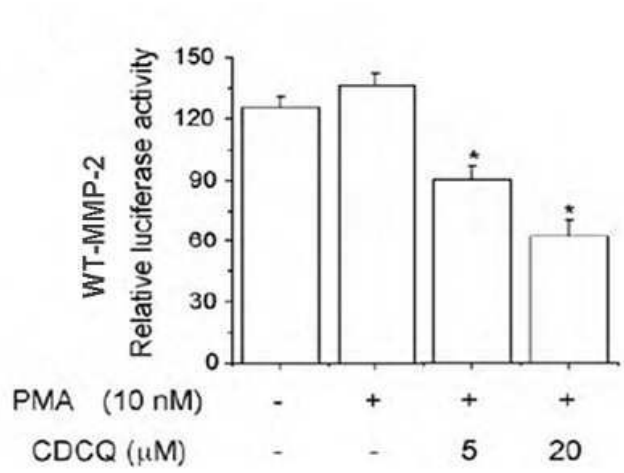
도면7


Relative MMP-2 to GAPDH
(% of control)
0
20
40
60
80
100
120
*
*
PMA (10 nM) - + + +
CDCQ (μM) - - 5 20

도면8


WT-MMP-9
Relative luciferase activity
500
400
300
200
100
0
PMA (10 nM) - + + +
CDCQ (μM) - - 5 20

도면9


WT-MMP-2
Relative luciferase activity
150
120
90
60
30
0
PMA (10 nM) - + + +
CDCQ (μM) - - 5 20