



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0127861
(43) 공개일자 2016년11월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/30 (2006.01) A61K 31/353 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01) A61K 9/48 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A23L 33/10 (2016.08)
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2015-0058683
(22) 출원일자 2015년04월27일
심사청구일자 2015년04월27일

(71) 출원인
강원대학교산학협력단
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)
농업회사법인 주식회사 오설록농장
제주특별자치도 서귀포시 안덕면 신화역사로 446

(72) 발명자
정명근
강원도 삼척시 도계읍 장원길 33 203동 801호 (삼척도계LH2단지)

임정대
강원도 춘천시 지석로 29 퇴계주공5단지아파트
514동 1301호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
최규환

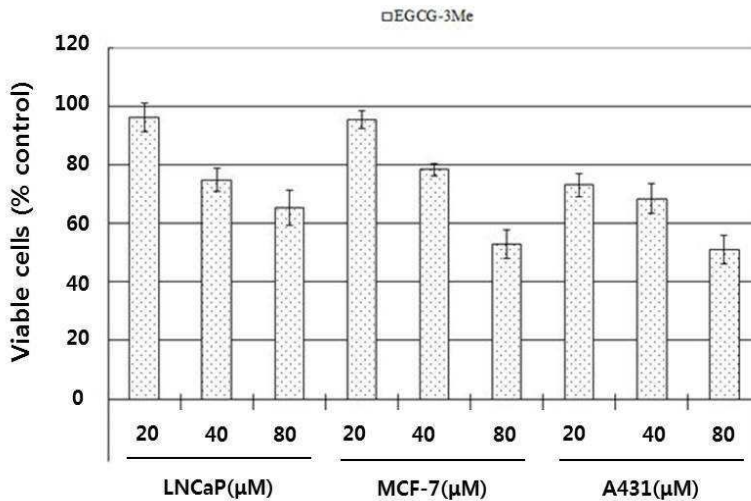
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 메틸화카테킨을 유효성분으로 함유하는 암세포의 성장억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 메틸화카테킨을 유효성분으로 함유하는 암세포의 성장억제용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 본 발명의 메틸화카테킨(EGCG-3Me)은 자외선에 의해 유도되는 MMP-1(Matrix metalloproteinase-1)의 단백질 발현을 억제하며, 암세포의 증식을 저해할 수 있으며, 특히, 메틸화카테킨이 피부암, 전립선암 및 유방암 세포의 증식을 억제하는 효과를 지니므로써, 암세포의 성장억제용 건강기능식품 또는 약학 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 31/353 (2013.01)
A61K 9/20 (2013.01)
A61K 9/48 (2013.01)
A23V 2200/308 (2013.01)
A23V 2250/02 (2013.01)
A23V 2250/21 (2013.01)
A23V 2250/2132 (2013.01)

이진호

제주특별자치도 서귀포시 안덕면 신화역사로 446

(72) 발명자

황영선

대구광역시 수성구 청호로 426, 103동 1001호 (범어동, 대구범어삼성쉐르빌)

이민석

제주특별자치도 제주시 원노형로 93 부영아파트 102동 704호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	R0000455
부처명	산업통상자원부
연구관리전문기관	산업기술평가원
연구사업명	제주권 광역연계협력사업
연구과제명	차나무의 신규차별화 기능성소재를 이용한 주름·미백 개선용 premium 화장품 개발
기 여 율	1/1
주관기관	농업회사법인 (주)장원
연구기간	2011.07.01 ~ 2014.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

메틸화카테킨 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 암세포의 성장억제용 건강기능식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 암은 피부암, 전립선암 또는 유방암인 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 메틸화카테킨은 녹차 잎으로부터 추출된 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 메틸화카테킨의 농도는 40 내지 100 μ M인 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 자외선에 의해 유도되는 MMP-1(Matrix metalloproteinase-1) 및 pro-MMP-1의 단백질 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 메틸화카테킨 이외에 갈릭산(gallic acid; GA), 갈로카테킨(galocatechin; GC), 에피갈로카테킨(epigallocatechin; EGC), 카테킨(catechin; C), 에피갈로카테킨갈레이트(epigallocatechin gallate; EGCG), 에피카테킨(epicatechin; EC), 갈로카테킨갈레이트(galocatechin gallate; GCG) 및 에피카테킨갈레이트(epicatechingallate; ECG) 중에서 선택된 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 8

메틸화카테킨 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 암세포의 성장억제용 약학 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 메틸화카테킨 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 조성물은 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

발명의 설명

기술분야

본 발명은 메틸화카테킨을 유효성분으로 함유하는 암세포의 성장억제용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 건강기능식품 또는 약학 조성물로 이용될 수 있는 메틸화카테킨을 유효성분으로 함유하는 암세포의 성장억제용

[0001]

조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 인간의 질병 중 암은 현대의학의 발달에도 불구하고 아직까지 치료에 어려움이 있는 질병으로, 그 발생 요인의 80~90%는 환경적 요인에 기인하고 이 중에서 30~60%가 식이 및 영양과 연관되어 있으며, 기타 다른 요인으로는 흡연, UV 및 X-ray와 같은 방사선 조사, 직업적 요인, 음주, 내인성 호르몬 등에 의해 유발된다고 알려져 있다. 이에 많은 연구자들이 암을 정복하기 위해 여러 방면으로 다양한 연구를 진행하고 있으며, 이러한 연구의 한 부분으로 식품이나 천연약제 중에서 암의 증식을 차단하거나 억제하는 성분을 생물체에서 찾으려는 노력이 이루어지고 있다.
- [0003] 식품 중에 포함된 대표적인 발암 저해작용을 갖는 성분들로 페놀, 인돌, 방향성 이소티오시아네이트, 메틸화 플라본, 쿠마린, 식물 스테롤, 셀레늄염, 단백질분해저해제, 아스코르브산, 토코페롤, 케로틴 등의 피토케미칼(phytochemical)이 알려져 있다. 이러한 피토케미칼들은 대부분 높은 항산화 활성을 가지고 있으며, 발암형성 초기단계에 영향을 주거나 발암물질이 목표부위에 도달하는 것을 막는 차단제(blocking agent)로 작용하거나 또는 최종 단계에 작용하여 암 발생을 방지한다.
- [0004] 한편, 카테킨(Catechin)은 화학구조상 플라바놀(flavan-3-ol)에 속해 있고 2번 위치의 치환기(catechol 혹은 pyrogallol)나 3번 위치의 galloyl기의 존재 유무에 따라 에피갈로카테킨갈레이트(epigallocatechin-3-gallate, EGCG), 에피갈로카테킨(epigallocatechin, EGC), 에피카테킨갈레이트(epicatechin-3-gallate, ECG), 에피카테킨(epicatechin, EC) 등으로 구분되어 진다. 이들 카테킨은 과산화지질 상승 억제 작용(Kinura et al., J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci., 37, 223-232 (1984)), 유지에서의 항산화 작용(Okuda, T. et al., Chem. Pharmacol. Bull., 31, 1625-1631(1983)), 항고혈압 작용, 항균 작용, 혈당상승 억제 작용, 콜레스테롤 상승 억제 작용, 항염증 작용(Fukuyo, M. et al., J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci., 39,495-500 (1986)) 등의 다양한 약리 작용을 가짐이 보고되어 있다.
- [0005] 한국등록특허 제0788331호에는 에피갈로카테킨 갈레이트 및 공액 리놀레인산을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 항암 조성물에 대해 개시되어 있고, 한국등록특허 제0633357호에는 에피갈로카테킨 갈레이트 및 코코아 추출물을 포함하는 항암제에 대해 개시되어 있다. 하지만, 본 발명의 메틸화카테킨을 유효성분으로 함유하는 암세포의 성장억제용 조성물에 대해서는 알려진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 메틸화카테킨을 유효성분으로 함유하는 암세포의 성장억제용 조성물을 제공하는 것이다. 본 발명의 메틸화카테킨(EGCG-3Me)은 자외선에 의해 유도되는 MMP-1(Matrix metalloproteinase-1)의 단백질 발현을 억제하며, 피부암, 전립선암 및 유방암 세포의 증식을 억제하는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 메틸화카테킨 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 암세포의 성장억제용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 메틸화카테킨 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 암세포의 성장억제용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0009] 본 발명은 메틸화카테킨을 유효성분으로 함유하는 암세포의 성장억제용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 메틸화카테킨(EGCG-3Me)은 자외선에 의해 유도되는 MMP-1(Matrix metalloproteinase-1)의 단백질 발현을 억제하며, 피부암, 전립선암 및 유방암 세포의 증식을 억제하는 효과를 지님으로써, 암세포의 성장억제용 건강기능식품 또는 약학 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0010] 도 1은 섬유아세포(HS68)에서 UVB에 의해 유도되는 MMP-1(Matrix metalloproteinase-1)의 단백질 발현 정도를 나타낸 결과이다.
- 도 2는 섬유아세포(HS68)에서 메틸화카테킨(EGCG-3Me)을 처리하였을 때, UVB에 의해 유도되는 MMP-1의 단백질 발현 억제 정도를 나타낸 결과이다. EGCG는 에피갈로카테킨갈레이트; EGCG-3Me는 메틸화카테킨이다.
- 도 3은 본 발명의 메틸화카테킨(EGCG-3Me) 처리에 따른 피부암, 전립선암 및 유방암 세포 증식의 억제활성을 나타낸 그래프이다. Control은 아무것도 처리하지 않은 음성 대조군; EGCG-3Me는 메틸화카테킨이다.
- 도 4는 본 발명의 메틸화카테킨(EGCG-3Me) 처리에 따른 피부암, 전립선암 및 유방암 세포 증식의 억제활성을 나타낸 광학현미경 사진이다. NT는 아무것도 처리하지 않은 음성 대조군; EGCG-3Me는 메틸화카테킨이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 메틸화카테킨 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 암세포의 성장억제용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 상기 메틸화카테킨은 EGCG-3Me(epigallocatechin-3-0-(3-0-methyl) gallate) 또는 EGCG-4Me(epigallocatechin-3-0-(4-0-methyl) gallate)이거나 이들의 혼합물일 수 있으며, 바람직하게는 EGCG-3Me(epigallocatechin-3-0-(3-0-methyl) gallate)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0013] 본 발명의 상기 암은 피부암, 전립선암 또는 유방암일 수 있으며, 바람직하게는 피부암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0014] 본 발명의 상기 메틸화카테킨은 녹차의 잎으로부터 분리하는 것이 바람직하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0015] 본 발명의 상기 조성물에 대하여 메틸화카테킨의 농도는 40 내지 100 μM일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물은 자외선에 의해 유도된 MMP-1 및 pro-MMP-1 단백질의 발현을 억제함으로써 암세포의 성장을 저해하는 것이 특징이다.
- [0017] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물은 상기 메틸화카테킨 이외에 갈릭산(gallic acid; GA), 갈로카테킨(gallocatechin; GC), 에피갈로카테킨(epigallocatechin; EGC), 카테킨(catechin; C), 에피갈로카테킨갈레이트(epigallocatechin gallate; EGCG), 에피카테킨(epicatechin; EC), 갈로카테킨갈레이트(gallocatechin gallate; GCG) 및 에피카테킨갈레이트(epicatechingallate; ECG) 중에서 선택된 하나 이상을 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 상기 건강기능식품 조성물은 암세포의 성장을 억제하기 위해 섭취할 수 있는 것이면 특별히 제한되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 건강기능식품 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 건강기능식품 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분은 그의 사용 목적에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 건강기능식품 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있다.
- [0021] 상기 건강기능식품의 종류에 특별한 제한은 없다. 상기 건강기능식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0022] 또한, 본 발명의 건강기능식품 조성물은 식품, 특히 기능성 식품으로 제조될 수 있다. 본 발명의 기능성 식품은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분 이외에 천연 탄수화물 또는 향미제를 추가 성분으로서 포함시킬 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등), 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등), 올리고당, 폴리사카라이드(예컨대, 텍스트린, 시클로텍스트린 등), 또는 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등)인 것이 바람직하다. 상기 향미제는 천연 향미제(예컨대,

타우마틴, 스테비아 추출물 등)와 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.

[0023] 상기 건강기능식품 조성물 이외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 더 함유할 수 있다. 이러한 상기 첨가되는 성분의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강기능식품 조성물 100 중량부에 대하여, 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0024] 또한, 본 발명은 메틸화카테킨 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 암세포의 성장억제용 약학 조성물을 제공한다.

[0025] 상기 염으로는 약학적으로 허용되는 것이면 특별히 한정되지 않으며, 예를 들어 염산, 황산, 질산, 인산, 불화수소산, 브롬화수소산, 포름산 아세트산, 타르타르산, 젯산, 시트르산, 푸마르산, 말레산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, 톨루엔술폰산, 나프탈렌술폰산 등을 사용할 수 있다. 산 부가염 이외에도, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 트리에틸아민, 3차-부틸아민과 같은 염기 부가염도 사용될 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명에 따른 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한 다양한 화합물 혹은 혼합물을 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 약학 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제에는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이 외에 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 위텡솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0028] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0029] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구 투여의 경우, 피부에 국소적으로 도포, 정맥 내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0030] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0031] **실시예 1. 메틸화카테킨(EGCG3-Me)의 MMP-1(Matrix metalloproteinase-1) 단백질 발현에 대한 억제효과**

[0032] 일반적으로 자외선에 노출되면 비타민 C와 E를 파괴하고 지질의 과산화를 일으켜 산화적 스트레스를 유도하여 핵산을 손상시키고 피부노화 및 피부질환을 유발시킬 뿐 아니라 MMPs(Matrix metalloproteinases)의 활성이 증가된다. 이 증가된 MMPs의 활성은 종양성 질환을 포함한 다양한 병리학적 상태와 관련이 있다. MMPs가 활성화되면 ECM(extracellular matrix)을 분해하는데, 이는 암세포의 증식과정에서 주된 역할을 한다. 따라서, 자외선에 의해 유도되는 MMP-1의 단백질 발현 증가를 억제함으로써 암세포의 성장을 저해할 수 있다.

[0033] 따라서, HS68 섬유아세포에 대하여 UVB(0, 50, 75, 100mJ/cm²)를 처리한 다음, 72시간 후에 MMP-1의 단백질 발

현 정도를 웨스턴 블롯 분석(western blot analysis)을 통하여 확인하였다. 그 결과, 도 1에 개시된 바와 같이 UVB를 조사하지 않은 군에 비하여 $50\text{mJ}/\text{cm}^2$ 를 조사한 군에서는 MMP-1 단백질 발현이 약 16배 증가하였으며, $75\text{mJ}/\text{cm}^2$ 를 조사한 군은 24배, $100\text{mJ}/\text{cm}^2$ 를 조사한 군은 36배의 MMP-1 단백질 발현이 증가하였다. 이러한 결과는 자외선에 노출되는 경우, MMP-1의 발현이 증가되어 ECM(Extracellular matrix) 단백질이 분해될 수 있음을 나타낸다. 또한, pro-MMPs는 구조적 변형이 일어나 아미노 말단 부위가 절단된 후 활성화되기 때문에 43kDa의 블롯(blots)은 MMPs 단백질의 활성 형태인 폼(form)이고, 55kDa의 블롯(blots)은 비활성화 형태인 프로폼(proform)에 해당된다. 본 실시예 1에서는 UVB 조사하였을 때, MMP-1의 비활성화 프로폼(proform) 및 활성화 폼(form)의 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다.

[0034] 또한, 본 발명의 메틸화카테킨(EGCG-3Me)을 처리하였을 때, UVB 조사에 따른 MMP-1 단백질의 발현 억제 정도를 확인하기 위하여 $250\text{ }\mu\text{M}$ 의 EGCG-3Me를 전처리하고 UVB를 조사한 다음, 72시간 후에 MMP-1의 단백질 발현량을 분석하였다. 그 결과, 도 2에 개시된 바와 같이 EGCG-3Me를 처리하는 경우에는 처리하지 않은 경우보다 MMP-1의 발현이 1/56로 감소하였으며, EGCG를 처리하는 경우 MMP-1의 발현이 1/28의 비율로 감소하여 EGCG-3Me이 EGCG보다 더 높은 단백분해(metalloproteinase) 저해활성을 보이는 것을 확인하였다. 또한, MMPs의 특성인 단백질가수분해 활성(proteolytic activity)을 젤라틴분해 활성(gelatinolytic assay)을 통하여 확인한 결과, 단백질의 발현 감소로 인하여 EGCG-3Me를 처리하지 않고 UVB를 조사한 군보다 EGCG-3Me를 처리한 군에서 클리어 존(clear zone)이 매우 낮은 밴드(band)를 형성하는 것을 관찰할 수 있었으며, EGCG-3Me를 전처리하는 경우, 단백질가수분해 활성(proteolytic activity)이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, EGCG-3Me의 처리에 따라 활성화된 MMP-1(form, 43kDa)뿐만 아니라 비활성화 된 MMP-1(proform, 55kDa)의 발현도 억제됨을 알 수 있었으며, 비활성화된 MMP-1의 발현 억제활성도 EGCG-3Me이 EGCG보다 우수한 경향을 보였다.

[0035] 따라서, 이러한 결과를 통하여 본 발명의 메틸화카테킨(EGCG-3Me)은 광노화에 따른 MMP-1의 단백질 발현 증가를 억제함으로써 ECM(extracellular matrix)의 분해를 저해하여 암세포의 성장을 억제할 수 있다.

[0036] **실시예 2. 메틸화카테킨(EGCG3-Me)의 암세포 증식에 대한 억제효과**

[0037] 녹차로부터 분리된 메틸화카테킨(EGCG-3Me)의 암세포의 생육 및 증식 억제에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 전립선암 세포주(LNCaP), 유방암 세포주(MCF-7) 및 피부암 세포주(A431)에 메틸화카테킨(EGCG-3Me)을 농도별(20, 40 및 $80\text{ }\mu\text{M}$)로 처리한 후, 세포 생존율(cell viability)를 측정하였다. 따라서, 상기 암 세포주들을 96-웰 플레이트(well plate)에 배양한 후에 EGCG-3Me를 농도별(20, 40 및 $80\text{ }\mu\text{M}$)로 처리하고 36시간 동안 배양하였다. 상기 배양 후에 $20\text{ }\mu\text{l}$ 의 MTS[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]와 PMS[electron coupling reagent phenazine methosulfate] 용액을 웰(well)에 넣어준 후, 1시간 동안($5\text{ }\text{CO}_2$, 37°C) 더 배양하였다. 이후, 비 방사성 세포 증식 측정기(Cell Titer 96 non-radioactive cell proliferation assay kit, Promega, Madison, WI)를 이용하여 각 배지 내의 세포 증식 정도를 분석하였으며, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) plate reader를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0038] 그 결과는, 도 3에 개시된 바와 같이 메틸화카테킨(EGCG-3Me)을 처리하였을 때, 전립선암, 유방암 및 피부암 세포주에서 EGCG-3Me의 농도 의존적으로 암세포 증식이 억제되는 것을 확인하였다.

[0039] 전립선암 세포주(LNCaP)에서는 $20\text{ }\mu\text{M}$ 의 EGCG-3Me를 처리하는 경우, 암 세포주의 증식 억제효과가 거의 나타나지 않았으나, $40\text{ }\mu\text{M}$ 에서 74.4%, $80\text{ }\mu\text{M}$ 에서 64.6%의 세포 생존율을 나타내었다. 즉, $80\text{ }\mu\text{M}$ 의 EGCG-3Me이 처리된 전립선암 세포주(LNCaP)에서는 35.4%의 암세포 증식이 억제된 것이다. 또한, 유방암 세포주(MCF7)에서도 전립선암 세포주(LNCaP)에서와 유사한 수준으로 암세포 증식이 억제되는 것을 확인하였다.

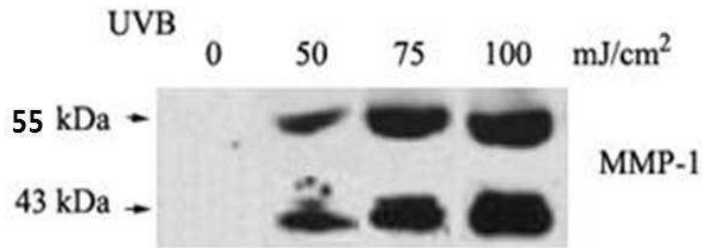
[0040] 특히, 피부암 세포주(A431)주에서 $20\text{ }\mu\text{M}$ 을 처리하는 경우에서도 약 27.2%의 세포생존이 감소된 72.8%의 세포 생존율을 나타내었으며, $40\text{ }\mu\text{M}$ 에서는 66.1%, $80\text{ }\mu\text{M}$ 에서는 52.6%의 세포 생존율을 나타내어 전립선암 세포주나 유방암 세포주보다 높은 암세포 증식억제 효능이 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 도 4에 개시된 바와 같이, 상기 각각의 암 세포주에 EGCG-3Me를 처리한 36시간 후, 각각의 웰 플레이트에 있는 세포 수를 광학현미경으로 본 결과, EGCG-3Me를 처리하지 않은 대조구에 비해 EGCG-3Me이 처리된 웰 플레이트의 암 세포수(viable cell)가 현저하게 감소한 것을 확인할 수 있었으며, 피부암 세포주인 A431에서 암세포 증식억제율이 가장 우수하였다.

[0041] 따라서, 본 연구의 결과를 바탕으로 메틸화카테킨(EGCG-3Me)은 피부암을 비롯한 다양한 암세포의 증식 및 증양

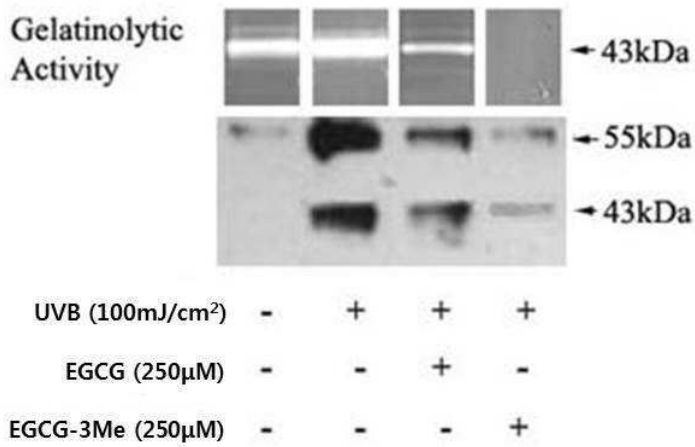
의 형성을 억제하는 효과가 우수하며, 암세포의 성장억제용 조성물에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

도면

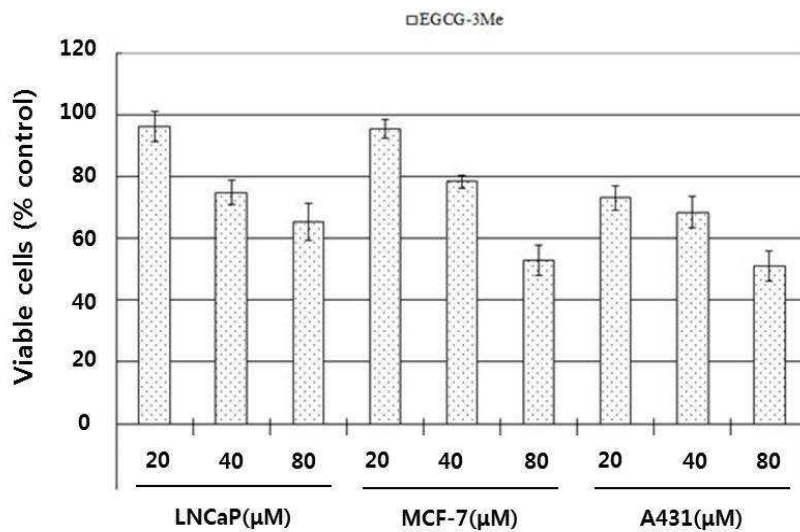
도면1



도면2



도면3



도면4

