



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2013-0051359  
 (43) 공개일자 2013년05월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 31/10* (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2011-0116653  
 (22) 출원일자 2011년11월09일  
 심사청구일자 2011년11월09일

(71) 출원인  
**건국대학교 산학협력단**  
 서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)  
 (72) 발명자  
**양영목**  
 충청북도 충주시 연수동 임광아파트 107-501  
**임은정**  
 경기도 구리시 검배로 154, 103동 101호 (토평동, 우남아파트)  
 (74) 대리인  
**특허법인 수**

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **MSM을 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 및 치료용 조성물**

**(57) 요약**

본 발명은 MSM을 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 MSM 단독 또는 MSM 및 죽염의 복합물을 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

**대표도** - 도6b



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011A0080018

부처명 농림부

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 질병저항성 경주마생산을 위한 유전자 및 단백질의 발굴과 조절 기전, 활성화 및 억제 물  
질개발과 기전규명

주관기관 건국대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2011.12.31

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

메틸설포닐메탄(methylsulfonylmethane) 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 암 예방 및 치료용 조성물.

**청구항 2**

제 1항에 있어서,

상기 암은 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 흑색종, 췌장암, 결장직장암, 신장암, 백혈병, 비-소세포 암종 및 폐암으로 구성된 군으로부터 선택된 암인 것을 특징으로 하는 암 예방 및 치료용 조성물.

**청구항 3**

제 1항 또는 제2항에 있어서,

상기 암은 유방암인 것을 특징으로 하는 암 예방 및 치료용 조성물.

**청구항 4**

메틸설포닐메탄(methylsulfonylmethane) 및 죽염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 및 치료용 조성물.

**청구항 5**

제 4항에 있어서,

상기 암은 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 흑색종, 췌장암, 결장직장암, 신장암, 백혈병, 비-소세포 암종 및 폐암으로 구성된 군으로부터 선택된 암인 것을 특징으로 하는 암 예방 및 치료용 조성물.

**청구항 6**

제 4항 또는 제 5항에 있어서,

상기 암은 유방암인 것을 특징으로 하는 암 예방 및 치료용 조성물.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 MSM을 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 MSM 단독 또는 MSM 및 죽염의 복합물을 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 암 또는 신생물은 신체의 어느 부위에서도 발생하는 악성의 신생 증식이다. 이는 세포의 조절되지 않는 증식을 특징으로 하며, 추정되는 세계적인 신규 발병율이 연간 약 6백만명에 이르는 커져가는 공중 보건 문제이다. 대부분의 국가의 경우, 암은 사망 원인으로서는 심장 질환에 이어 두 번째이다. 이는 신체의 임의의 장기에서 발생할 수 있지만, 유방, 후두, 장, 백혈구 등과 같은 일부 부위는 다른 부위 보다 공격당하기 쉬운 경향이 있다. 각각의 암은 특정 단계에서 분열하는 하나의 세포로부터 전파되며, 이는 이의 영역적 속박으로부터 자유로워져서, 무제한으로 증식하는 세포의 패밀리를 형성하여 종양의 형태로 출현한다.

[0003] 정상 세포가 종양 세포로 전이되는 동안, 종양 세포가 생물체내의 모든 정상 세포의 증식을 매우 정밀하게 지배하는 법칙과 거의 무관하게 이의 독자적인 활동을 결정할 수 있도록 하는 의미심장하고 유전성인 변화가 일어난다. 자율성으로서 알려져 있는 이러한 새롭게 획득된 특성은 종양 세포의 가장 중요한 하나의 특징인데, 이는 이러한 특징이 없는 경우에는 종양이 아니기 때문이다. 종양 세포의 또 다른 구별되는 특징은 완벽한 형태의 기능을 결여한다는 점이다.

- [0004] 암세포와 정상 세포 간의 차이점은 정상 세포와 비교하여 암세포가 a) 낮은 pH b) 보다 큰 자유 라디칼 특성 c) 종양 생성된 호르몬 펩티드 d) 종양 관련 항원 e) 보다 낮은 칼슘 이온 및 보다 높은 칼륨 이온 농도 f) 다양한 칼륨 이소토프 비 g) 상승된 양의 메틸화된 뉴클레오티드 h) 보다 높은 혈장 미세단백질 및 뮤코폴리사카라이드 농도 i) 외인성 아연에 대한 보다 높은 필요성 및 j) 높은 생체수 함량을 지닌다는 것이다.
- [0005] 식이, 환경, 특정 화학물질 또는 전자기 방사선 형태에 대한 직업적 노출과 같은 암의 총체적 원인 중 다수가 유행병학적 연구를 통해 밝혀졌다. 따라서, 현대 산업 사회에서 가능한 한에 있어서 이들 원인은 확인되고 환경으로부터 제거될 필요가 있다. 치료 연보를 참조하면, 암의 난국을 정복하기 위한 탐구는 항상 과학계의 대체로 모든 부문, 특히 천연물 화학자들을 매혹시켰다. 19세기 및 20세기에, 이러한 두려운 질병 배후의 구동력을 알아내기 위해 많은 연구가 수행되었을 뿐만 아니라 다수의 약물이 이러한 위협에 대항하기 위해 도입되었다.
- [0006] 한편, 유전적으로 이질적인 질환(heterogeneous disease)인 유방암은 여성에서 가장 일반적인 악성질환이다. 전 세계에서 매년 약 80만건의 새로운 사례가 보고되고 있으며(Parkin DM, et al., (1999). CA Cancer J Clin 49:33-64), 현재에도 유방 절제술이 의료 처치를 위한 최선의 선택이다. 1차 종양을 외과적 수술을 통해 제거하더라도, 진단시 검출하기 힘든 미세 전이(micrometastasis)로 인하여 국소 또는 원거리 부위에서 재발할 가능성이 있다(Saphner T, et al., (1996). J Clin Oncol, 14, 2738-46). 이러한 잔존 세포 또는 전암(前癌) 세포를 사멸시키기 위하여 수술 후에는 통상 보조치료(adjuvant therapy)로서 세포독성 약제(Cytotoxic agents)를 투여한다. 전통적인 화학 치료는 종종 경험에 의존하거나 대부분 조직학적인 발암 요소를 근거로 삼고 있다. 특정한 역학적 지식이 없는 상태에서는, 표적 지향적 치료제가 유방암에 대한 기반 치료에 쓰이고 있다. 타목시펜(Tamoxifen) 및 아로마타제 저해제(aromatase inhibitors)은 상기 표적 지향적 치료제의 대표적인 종류이며, 전이성 유방암 환자에서 보조제 또는 화학예방법으로서 사용하는 경우 효과적이라는 보고가 있다(Fisher B, et al., (1998). J Natl Cancer Inst, 90, 1371-88; Cuzick J (2002). Lancet 360, 817-824).
- [0007] 그러나, 상기 치료제는 에스트로겐 수용체를 발현하는 환자에서만 약물에 대한 감수성이 나타나지 않는다는 결점이 있다.
- [0008] 또한, 최근 폐경 후의 여성에서 장기간 타목시펜을 처방한 경우의 자궁 내막암 및 아로마타제 치료에 따른 골절 등의 부작용에 관한 고찰이 있었다(Coleman RE (2004). Oncology. 18 (5 Suppl 3), 16-20).
- [0009] 관련 선행특허로 대한민국 특허공개번호 제1020040072646호는 '암치료용 약초 화학 조성물'에 관한 것으로, 유방암, 자궁경부암, 신경모세포종, 결장암, 간암, 폐암, 구강암, 난소암 및 전립선암에 대하여 항암 활성을 나타내는, 세드루스 데오드라(Cedrus deodra)의 식물 추출물로부터 수득된 리그난의 신규한 상승작용성 조성물이 기재되어 있고, 상기 조성물은 9 내지 13 중량%의 (-)- 마타이레시놀, 75 내지 79 중량%의 (-)- 위크스트로몰, 7 내지 11 중량%의 디벤질부티로락톨 및 2.6 내지 3 중량%의 미확인 물질을 포함하고; 추가로, 리그난의 상승작용성 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체와 함께, 유방, 자궁경부, 신경모세포종, 결장, 간, 폐, 구강, 난소 및 전립선 조직으로부터 선택된 다양한 인간 암 세포주의 성장을 억제하는데 사용된다고 기재되어 있다.
- [0010] 다른 관련 선행특허로 대한민국 특허공개번호 제1020070103057호는 '암 치료를 위한 MDA-7을 포함하는 조성물'에 관한 것으로, 암 환자에게 흑색종 분화-관련 유전자 7 (melanoma differentiation-associated gene 7: MDA-7) 및 사이클로옥시게나제 2 (cyclooxygenase 2: COX-2) 억제제를 제공함을 포함하여, 암 환자를 치료하는 방법이 기재되어 있다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 신규 암 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

#### 과제의 해결 수단

- [0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 메틸설폰닐메탄(methylsulfonylmethane) 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 암 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.
- [0013] 또 본 발명은 메틸설폰닐메탄(methylsulfonylmethane) 및 죽염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

- [0014] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 암은 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 흑색종, 췌장암, 결장직장암, 신장암, 백혈병, 비-소세포 암종 및 폐암으로 구성된 군으로부터 선택된 암인 것이 바람직하고, 유방암인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0015] 본 명세서에서 사용한 바와 같이, 용어 "암"은 정상의 조절이 상실된 독특한 성향이 새로운 특성, 예컨대 조절되지 않은 성장, 분화의 결핍, 국소 조직 침습 및 전이를 초래하는 세포의 증식으로서 정의된다. 이의 예로는 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 흑색종, 췌장암, 결장직장암, 신장암, 백혈병, 비-소세포 암종 및 폐암 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0016] 본 명세서에서 사용한 바와 같이, 용어 "약학적 허용 담체"의 예로는 임의의 표준 약학적 담체, 예컨대 인산염 완충 염수 용액, 물, 에멀전, 예컨대 오일/물 또는 물/오일 에멀전 및 각종 유형의 습윤제 등이 있다. 또한, 이러한 용어는 사람을 비롯한 동물에 사용하기 위하여 한국 정부의 관리 기관에 의하여 승인되거나 또는 약전에 제시된 임의의 제제를 포함한다.
- [0017] 본 명세서에서 사용한 바와 같이, 용어 "치료"는 특이적 질병 또는 상태의 예방, 특이적 질병 또는 증상과 관련된 증상의 완화 및/또는 상기 증상의 예방 또는 배제를 포함한다. "예방"은 질환의 징후를 나타내지 않거나 또는, 질환과 관련하여 진행중인 병리학의 우려를 감소시키기 위한 질환의 초기 징후만을 나타내는 개체에게 투여하는 치료이다.
- [0018] "치료"는 이러한 징후를 감소시키거나 또는 배제시키기 위한 병리학적 징후를 나타내는 개체에게 투여하는 치료이다.
- [0019] 화합물의 "치료적 유효량"은 화합물을 투여하고자 하는 개체에게 이로운 효과를 제공하기에 충분한 화합물의 함량이다.
- [0020] 본 명세서에서 사용한 바와 같이, 용어 "치료하다"라는 것은 특이적 질환, 질병, 또는 상태의 예방, 또는 특이적 질환, 질병, 또는 상태와 관련된 증상의 완화 및/또는 상기 증상의 예방 또는 배제를 포함한다.
- [0021] 용어 "약학적 허용 염"은 본 발명의 화합물의 생물학적 효능 및 성질을 보유하고, 생물학적으로 또는 바람직하지 않은 염을 나타낸다. 다수의 경우에서, 본 발명의 화합물은 아미노 및/또는 카르복실 기 또는 이와 유사한 기의 존재에 의한 산 및/또는 염기 염을 형성할 수 있다.
- [0022] 약학적 허용 염기 부가 염은 무기 및 유기 염기로부터 생성될 수 있다.
- [0023] 무기 염기로부터 유도된 염의 예로는 나트륨, 칼륨, 리튬, 암모늄, 칼슘 및 마그네슘 염 등이 있으나, 이는 예로서 제시한다.
- [0024] 유기 염기로부터 유도된 염의 예로는 1차, 2차 및 3차 아민, 예컨대 알킬 아민, 디알킬 아민, 트리알킬 아민, 치환된 알킬 아민, 디(치환된 알킬) 아민, 트리(치환된 알킬) 아민, 알케닐 아민, 디알케닐 아민, 트리알케닐 아민, 치환된 알케닐아민, 디(치환된 알케닐) 아민, 트리(치환된 알케닐) 아민, 시클로알킬 아민, 디(시클로알킬) 아민, 트리(시클로알킬) 아민, 치환된 시클로알킬 아민, 이중치환된 시클로알킬 아민, 삼중치환된 시클로알킬 아민, 시클로알케닐 아민, 디(시클로알케닐) 아민, 트리(시클로알케닐) 아민, 치환된 시클로알케닐 아민, 이중치환된 시클로알케닐 아민, 삼중치환된 시클로알케닐 아민, 아릴 아민, 디아릴 아민, 트리아릴 아민, 헥테로아릴 아민, 디헥테로아릴 아민, 트리헥테로아릴 아민, 헥테로시클릭 아민, 디헥테로시클릭 아민, 트리헥테로시클릭 아민, 혼합된 디아민 및 트리아민(여기서 아민상의 치환체의 2 이상은 상이하며, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 시클로알킬, 치환된 시클로알킬, 시클로알케닐, 치환된 시클로알케닐, 아릴, 헥테로아릴, 헥테로시클릭 등임)의 염으로 구성된 군에서 선택되지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 아미노 질소와 함께 2 또는 3 개의 치환체는 헥테로시클릭 또는 헥테로아릴 기를 형성하는 아민도 포함된다. 아민의 적절한 예로는 이소프로필아민, 트리메틸 아민, 디에틸 아민, 트리(이소프로필) 아민, 트리(n-프로필) 아민, 에탄올아민, 2-디메틸아미노에탄올, 트로메타민, 리신, 아르기닌, 히스티딘, 카페인, 프로카인, 히드라바민, 콜린, 베타인, 에틸렌디아민, 글루코사민, N-알킬글루카민, 테오브로민, 푸린, 피페라진, 피페리딘, 모르폴린, N-에틸피페리딘 등이 있으나, 이는 단지 예로서 제시하는 것이다.
- [0025] 기타의 카르복실산 유도체, 예를 들면, 카르복스아미드를 비롯한 카르복실산 아미드, 저급 알킬 카르복스아미드, 디알킬 카르복스아미드 등은 본 발명의 실시예에 유용할 수 있는 것으로 이해하여야 한다.
- [0026] 약학적 허용 산 부가 염은 무기산 및 유기산으로부터 생성될 수 있다. 무기산으로부터 유도된 염의 예로는 염산 염, 수소화브롬산염, 황산염, 질산염, 인산염 등이 있다. 유기산으로부터 유도된 염의 예로는 아세트산, 프로피

온산, 글리콜산, 피루브산, 옥살산, 말산, 말론산, 숙신산, 말레산, 푸마르산, 주석산, 구연산, 안식향산, 신남산, 만델산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 살리실산 등 등이 있다.

- [0027] 한 구체예에 의하면, 본 발명의 화합물을 1 이상의 약학적 허용 담체와 혼합하여 약학적 조성물로 제제화될 수 있다. 이러한 제제는 표준 경로에 의하여 투여될 수 있다. 일반적으로, 상기 혼합물은 국소, 경피, 경구, 직강 또는 비경구 (예, 정맥내, 피하 또는 근육내) 경로로 투여될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 화합물을 경구 투여할 경우, 화합물은 액제, 분말, 정제, 캡슐 또는 로젠지로서 투여된다. 화합물은 정제, 캡슐, 로젠지 및 기타의 경구 투여 가능한 형태로 사용되는 1 이상의 통상의 약학적 첨가제 또는 부형제와 혼합하여 사용될 수 있다.
- [0029] 비경구, 보다 바람직하게는 정맥내 주사로 투여할 경우, 본 발명의 유도체를 염수 용액 및/또는 통상의 IV 용액과 혼합할 수 있다. 또한, 혼합물을 화합물의 지연 방출을 가능케 하는 생분해성 중합체에 혼입될 수 있으며,
- [0030] 한 구체예에서, 전달 비이클은 약물 전달을 희망하는 부위, 예를 들면 종양 부위의 부근에 착상된다. 본 발명에 사용하기에 적절한 생분해성 중합체는 당업자에게 공지되어 있으며, 예를 들면 문헌[Brem et al., J.Neurosurg. 74: 441-446 (1991)]에 상세하게 기재되어 있다.
- [0031] 활성 화합물의 투여량은 치료하고자 하는 상태, 특정의 화합물 및 기타의 임상적 요인, 예컨대 사람 및 동물의 체중 및 상태 및, 화합물의 투여 경로에 따라 달라진다. 본 발명은 사람 및 수의적 용도 모두에 대한 적용예를 갖는 것으로 이해하여야 한다. 사람에게의 경구 투여와 관련된 한 구체예에서, 약 0.1 내지 300 mg/kg/일, 또는 약 0.5 내지 50 mg/kg/일, 또는 약 1 내지 10 mg/kg/일의 투여량이 일반적으로 충분하다.
- [0032] 본 발명의 화합물 이외에, 본 발명의 조성물은 가용화제, 불활성 충전제, 희석제, 부형제 및 향미료를 포함할 수 있는 것으로 이해하여야 한다.
- [0033] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0034] 본 발명은 단일물질인 methylsulfonylmethane(이하, 'MSM'이라 함)을 주요 성분으로 하는 암질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0035] 또 본 발명은 단일물질인 methylsulfonylmethane 및 죽염을 주성분으로 하고, 약제학적으로 허용가능한 첨가제를 포함하는 암질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0036] 또한 본 발명은 사람의 유방암세포(MDA-MB 231)를 이식한 생쥐(이종 이식 동물)에서 MSM의 유방암(종양) 성장 억제 효과에 관한 분자의학적 기전을 규명하였다.

**발명의 효과**

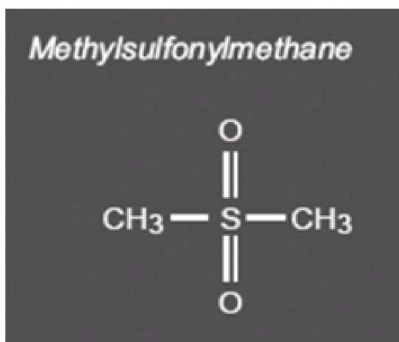
- [0037] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이, MSM과 MSM+죽염으로 처리한 군에서 용량-의존적 암 세포 성장을 저해하는 것을 확인할 수 있었으며,
- [0038] 300 mM 농도의 MSM이 사람 유방암 세포의 생존력을 감소시키고, 인산화 된 STAT3과 STAT5b, cyclin D1, IGF-1R, HIF-1 alpha, HSP 90 alpha, VEGF 및 VEGFR2 단백질 등의 발현수준을 억제시켰으며, 반면에 p53과 BRCA1과 같은 종양억제 단백질의 발현수준은 증가시킴을 확인하였고,
- [0039] MSM이 유방암에서 가장 중요한 3가지 목표 수용체(target receptors)인 ER-alpha(여성 호르몬 수용체), PR(프로게스테론 수용체), 및 Her2(인간 EGF 수용체)가 각각 과발현되는 3 종류의 유방암 세포종에서 3가지의 target 수용체들의 발현량을 현저히 감소시킴을 확인하였으며, 300 mM 농도의 MSM과 1% 죽염의 시너지 효과로 사람 유방암 세포의 생존력을 감소시키고, STAT3과 STAT5b, pIGF-1R, IGF-1R, VEGF 및 p53 단백질 등의 발현수준을 감소시킴을 확인하였다.
- [0040] 또한 종양 유발 동물 실험의 결과 약 30일 후 종양의 크기가 각각 100 mM MSM 그룹(1% MSM)에서 평균 30%, 300 mM MSM 그룹(3% MSM)에서 약 55%, 그리고 500 mM MSM 그룹(5% MSM)에서는 약 70%씩 감소하였고, 전체적으로 대조군과 비교할 때 모든 MSM을 처리한 그룹에서 사람 종양의 성장 속도가 둔화되었음을 알 수 있었고, 특히 500 mM MSM을 처리한 그룹에서 MSM을 먹인 후 25일째부터는 종양의 성장이 정지하는 효과를 나타내었다.
- [0041] 이상의 결과로부터 본 발명의 MSM 또는 MSM과 죽염의 조성물은 암 예방 또는 치료에 효과를 나타내므로 이들을 약학적 조성물로 응용할 수 있는 가능성을 가진다.

**도면의 간단한 설명**

- [0042] 도 1은 MSM과 MSM + 죽염 시너지에 의해서 인간 유방암세포의 생존능력이 농도 의존적으로 감소하며, 또한 인간 유방암세포에서 MSM에 의해 세포사멸이 일어남을 확인한 그림,
- 도 2는 MSM과 MSM+죽염 시너지에 의해서 인간 유방암세포에서 STATs, IGF-1R, VEGF, p53, BRCA, Brk 그리고 호르몬 리셉터들의 변화를 살펴본 그림,
- 도 3은 RT-PCR 실험을 통하여 인간 유방암세포에서 MSM 농도에 의한 VEGF와 IGF-1R의 mRNA발현을 살펴 본 그림,
- 도 4는 MSM에 의한 COS-7 세포에서 STAT5b/IGF-1R, STAT5b/ HSP90a, 그리고 STAT3/VEGF 프로모터의 활성을 조사한 그림,
- 도 5는 EMSA 실험을 통하여 MDA-MB 231 세포에서STAT5/IGF-1R 와 STAT3/VEGF의 결합활성을 측정한 그림,
- 도 6은 동물실험 결과 Xenograft Nude 생쥐에서 MSM의 인간 유방암 종양 성장 억제 효과 및 동물조직에서 MSM에 의한 IGF-I 유전자의 발현을 측정한 그림,
- 도 7은 MSM에 의해 전이성 유방암 세포인 MDA-MB 231 에서 세포이동 억제를 유도하는 것을 확인한 그림,
- 도 8은 면역조직화학(Immunohistochemistry) 방법으로 MSM에 의한 STAT5b, IGF-1R, STAT3 및 VEGF의 발현을 살펴 본 그림이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0043] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.
- [0044] 하기 화학식 1의 MSM은 (주)케어메딕스(대전시 유성구)에서 구입하여 사용하였다.



- [0045]
- [0046] [화학식 1]
- [0047] 실시예 1: 세포배양
- [0048] MDA-MB-231 인간 유방암세포를 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 10% FBS(fetal bovine serum), 2 mM 글루타민 및 100 U/ml 페니실린 및 스트렙토마이신이 포함된 L-15 배지에서 배양하였고, 다른 인간 유방암세포인 MCF-7, SK-BR3, T47-D 등을 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 10% FBS(fetal bovine serum), 2 mM 글루타민 및 100 U/ml 페니실린 및 스트렙토마이신이 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 또한, COS-7 원숭이 신장세포를 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 10% FBS(fetal bovine serum), 2mM 글루타민 및 100U/ml 페니실린 및 스트렙토마이신이 포함된 DMEM(Gibco-BRL, USA)에서 배양하였다.
- [0049] 상기 배양된 세포들은 실험시마다, 2.5×10<sup>5</sup> cells/ml 밀도로 적당한 배지에 재현탁하여 사용하였다.
- [0050] 실시예 2: MSM과 MSM+죽염의 시너지효과가 암세포의 생존능력에 미치는 영향 조사

- [0051] MSM이 암세포의 생존능력에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 다음과 같이 실험하였다.
- [0052] 먼저 96-웰 플레이트에 암 세포 주 MDA-MB 231과 SK-BR3 세포를 MSM의 다양한 농도(0, 100, 300 및 500 mM)에 따라 24 시간 동안 각각 처리하여 배양하고, 더불어 암 세포 주 MCF-7, MDA-MB 231과 SK-BR3 세포(한국 세포주 은행)를 MSM과 죽염(죽염종가 인산가)의 시너지 효과를 보기 위하여 MSM 300mM 에 죽염의 다양한 농도( 0, 0.2, 0.5 및 1 %)에 따라 24 시간 동안 각각 처리하여 배양한 다음, 생존해 있는 세포에만 활성을 띠어 염색(blue formazan)되는 MTT를 처리한 후 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 파쇄하고 세포 파쇄액을 얻었으며, 포르마잔 생산물은 각 웰에 DMSO를 첨가하여 용해시킨 후 550 nm에서 측정하였다. 상기 과정을 3번 반복 하였으며, 그 결과를 도 1a 및 b에 나타내었다.
- [0053] 도 1a 및 b에 나타낸 바와 같이, MSM과 MSM+죽염으로 처리한 군에서 용량-의존적 세포 성장을 저해하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0054] 실시예 3: MSM이 암세포의 세포사멸에 미치는 영향 조사
- [0055] MSM이 암세포(MDA-MB 231)의 세포사멸에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 다음과 같이 실험하였다.
- [0056] 이론상으로 세포가 죽을 때 세포막에 존재하고 있는 phosphatidic serin(PS)이 외부로 뒤집어져 돌출되는 것을 이용하여 PS과 annexin-V가 결합되는 것을 이용한 방법이다. PI의 경우에는 핵에 결합되는 물질인데 세포가 심하게 죽으면 세포막에 구멍이 생기고 핵이 외부에 노출되어 PI가 결합하게 되는 것이다.
- [0057] annexin-V/PI는 세포의 사멸상태를 상세하게 확인할 수 있다. 유방암 세포주 MDA-MB 231을 사용하여 MSM 600mM에서 세포사멸이 일어났음을 도 1c에서 확인하였다.
- [0058] 실시예 4: MSM과 MSM+죽염이 STATs, IGF-1R 그리고 p53 단백질 등의 발현에 미치는 영향 조사
- [0059] MSM에 의해 조절받는 다양한 단백질의 발현에 어떤 영향을 미치는지 조사하기 위하여, 하기와 같이 실험하였다.
- [0060] 본 발명에서 본 발명자들은 300 mM 농도의 MSM이 사람 유방암 세포의 생존력을 감소시키고, 인산화 된 STAT3과 STAT5b, cyclin D1, IGF-1R, HIF-1 alpha, HSP 90 alpha, VEGF 및 VEGFR2 단백질 등의 발현수준을 억제시켰으며, 반면에 p53과 BRCA1과 같은 종양억제 단백질의 발현수준은 증가시킴을 확인하였다(도 2a).
- [0061] 또한 본 발명자들은 MSM이 유방암에서 가장 중요한 3가지 목표 수용체(target receptors)인 ER-alpha(여성 호르몬 수용체), PR(프로게스테론 수용체), 및 Her2(인간 EGF 수용체)가 각각 과발현되는 3 종류의 유방암 세포종에서 3가지의 target 수용체들의 발현량을 현저히 감소시킴을 도 2b로 확인하였다.
- [0062] 또한 본 발명자들은 300 mM 농도의 MSM과 1% 죽염의 시너지 효과로 사람 유방암 세포의 생존력을 감소시키고, STAT3과 STAT5b, pIGF-1R, IGF-1R, VEGF 및 p53 단백질 등의 발현수준을 감소시킴을 도 2c에서 확인하였다.
- [0063] 실시예 5: MSM에 의한 IGF-1R 및 VEGF 유전자의 발현 감소 조사
- [0064] MSM에 의해 자극을 받은 인간 유방암세포(MDA-MB 231 cell과 SK-BR3 CELL)에서 IGF-1R와 VEGF의 전사 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 RT-PCR을 이용한 total RNA Semi-quantitative analysis를 하였다(도 3).
- [0065] 먼저, 인간 유방암 세포주 MDA-MB 231과 SK-BR3와 인간 방광암세포 T-24를 사용하여 MSM을 농도(0, 100 및 300 mM)에 따라 처리하고, 24시간 동안 배양한 것의 IGF-1R와 VEGF 유전자의 전사 mRNA를 실시간 중합효소 연쇄반응(PCR)을 수행하여 각각 측정하였다.
- [0066] 각 측정값은 상기  $\beta$ -액틴 mRNAs 수준을 정상화하여 3번 반복 측정하여 얻어졌다.
- [0067] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, MSM을 처리한 경우, IGF-1R와 VEGF 유전자 발현이 농도에 따라 감소한 것을 알 수 있었다.
- [0068] 실시예 6: MSM에 의한 VEGF, IGF-1R 및 HSP90a의 프로모터의 활성 조사



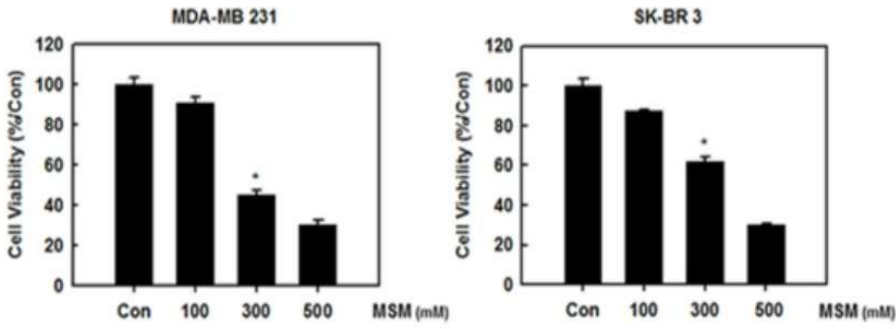
- [0069] STAT5b 단백질에 의해 IGF-1R 프로모터와 HSP90프로모터가 활성화되는지 여부를 조사하기 위하여, COS-7 cell을 사용하여 MSM과 MSM+죽염을 처리한 세포에서 STAT5b/IGF-1R(Dr. Honglin Jiang, Virginia Polytechnic Institute and State University, USA.) 및 STAT5b/HSP90 프로모터(Dr. Carrie Shemanko, Department of Biological Sciences, University of Calgary, 2500 University Drive NW, Calgary, AB, T2N 1N4, Canada)의 활성화 정도를 조사하였다.
- [0070] 구체적으로, MSM과 MSM+죽염을 처리한 세포에서 각각 STAT5b/IGF-1R 및 STAT5b/HSP90 프로모터의 활성화 정도를 상대적인 루시페라제 활성을 측정하여 비교하였다.
- [0071] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, MSM에 의해 STAT5b/IGF-1R 및 STAT5b/HSP90 프로모터의 활성이 감소되는 것을 알 수 있었다(도 4-a, -b, -d).
- [0072] 또한 STAT3 단백질에 의해 VEGF 프로모터가 활성화되는지 여부를 조사하기 위하여, COS-7 cell을 사용하여 MSM 처리한 세포에 MSM 처리에 의한 STAT3/VEGF 프로모터의 활성화 정도를 조사하였다.
- [0073] 구체적으로, MSM 처리한 세포에서 각각 STAT3/VEGF 프로모터의 활성화 정도를 상대적인 루시페라제 활성을 측정하여 비교하였다. 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, MSM에 의해 STAT3/VEGF 프로모터의 활성이 감소하였다(도 4-c).
- [0074] 실시예 7: STAT5b 단백질과 IGF-1R 유전자 간의 결합 부위 및 상호 결합력의 억제 조사
- [0075] MDA-MB 231 세포주에서 STAT5b 단백질 합성이 이루어지기 위해서는 반드시 특정 자극 물질이 필요하다. 상기 합성된 STAT5b 단백질은 핵 안으로 들어와 IGF-1R의 STAT5 binding site에 결합하여 활성을 나타내는데, STAT5와 IGF-1R 결합활성(binding activity)을 확인하고, 더불어 STAT3와 VEGF 결합활성(binding activity)을 확인하고자 EMSA(electrophoretic mobility shift assay, kit: Panomics, AY2002)를 실시하였다.
- [0076] MSM의 미치는 영향을 알아보기 위해 MSM 300 mM을 24 h 동안 처리하였다. 그 결과, MSM에 의해 시간에 따라 IGF-1R 유전자와 STAT5b 결합력과 VEGF 와 STAT3 결합력이 감소하는 것을 알 수 있었다(도 5a,b).
- [0077]
- [0078] 실시예 8: 동물실험 결과 Xenograft Nude 생쥐에서 MSM의 인간 유방암 종양 성장 억제 효과 및 동물조직에서 MSM에 의한 IGF-I 유전자의 발현 감소 조사
- [0079] 본 발명은 MSM 물질이 사람의 유방종양의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 다음과 같은 동물실험(xenograft)을 실시하였다.
- [0080] 즉, Balb/c 마우스종을 실험동물생산 전문업체((주)오리엔트바이오, 한국)로부터 구입하여 6주 동안 양 옆구리에 대표적인 사람 유방암세포주인 MDA-MB 231 세포를 주입하여 종양을 생성하고 주차에 따라 종양의 크기를 측정한다. 그 후에 MSM을 먹이지 않는 그룹(대조군)과 MSM을 먹인 그룹(MSM의 농도를 100, 300 및 500 mM씩으로 나누어)으로 나누어 각 그룹 당 5 마리씩 모두 20마리의 이중 간 이식된 생쥐(이종이식 생쥐; xenografted mice)를 이용하여 실험하였다.
- [0081] MSM을 3개의 농도(1, 3, 및 5% MSM)로 나누어 먹인 다음 처음엔 5일 간격으로(5일째, 10일째), 다음엔 3일 간격으로 종양의 크기(부피를 측정하는 공식에 의해서 단위는 mm<sup>3</sup>)를 측정하였다.
- [0082] 그 결과 약 30일 후 종양의 크기가 각각 100 mM MSM 그룹(1% MSM)에서 평균 30%, 300 mM MSM 그룹(3% MSM)에서 약 55%, 그리고 500 mM MSM 그룹(5% MSM)에서는 약 70%씩 감소하였다. 전체적으로 대조군과 비교할 때 모든 MSM을 처리한 그룹에서 사람 종양의 성장 속도가 둔화되었음을 알 수 있고,
- [0083] 특히 500 mM MSM을 처리한 그룹에서 MSM을 먹인 후 25일째부터는 종양의 성장이 멈추었다(도 6-a). 그 중 대표적인 동물의 종양의 모양과 크기를 대조군과 비교하여 나타내었다(도 6-b).
- [0084] 그 다음 마우스를 경추탈골하여 사람의 유방종양을 분리해낸 다음, 다음과 같은 실험방법으로 종양 조직에서의 여러 가지 종양억제 관련 지표를 측정하였다.
- [0085] ① Western blotting

- [0086] ② RT-PCR
- [0087] ③ Histology(H&E staining)
- [0088] ④ NE(핵 protein) 측정 등
- [0089] 또한 본 발명은 상기 STAT5b 단백질에 의해 IGF-1 유전자의 발현이 감소되는 정도를 조사하기 위하여, MSM을 투여한 nude mouse에서 적출한 조직으로부터 IGF-1 유전자 발현에 STAT5b 단백질이 필요한 것을 다음과 같이 확인하였다.
- [0090] 먼저 유방암 세포주 MDA-MB 231을 투입하여 nude mouse에 종양을 생성 후 적출하여 total RNA를 분리하고 IGF-1 유전자의 전사 mRNA를 실시간 증합효소 연쇄반응(PCR)을 수행하여 각각 측정하였다.
- [0091] 상기 실시간 PCR은 TaqMan 유전자 발현 분석(TaqMan Gene Expression Assays) 방법에 따라 인간 IGF-I 및  $\beta$ -액틴 mRNAs 에 대하여 ABI 7900 HT 실시간 PCR 시스템을 사용하여 이루어졌다. 각 측정값은 상기  $\beta$ -액틴 mRNAs 수준을 정상화하여 3번 반복 측정하여 얻어졌다. 별표(\*)는 ANOVA 테스트에 따라 통계적으로 유의한 (\*\*p<0.001) 발현 감소를 보여주고 있다(도 6c).
- [0092] 이는 우리나라와 같이 폐경 전 여성(50세 이하)에서의 유방암 발생율이 아주 높고(약 60% 이상 차지), 이러한 폐경 전 유방암 환자의 특징인 높은 혈중 IGF-1 농도나 종양 조직에서의 IGF-1 농도를 줄일 수 있다는 결과이다.
- [0093] 그리고, 동물실험 결과 이종간 이식 nude 생쥐의 인간 유방종양 조직의 단백질을 추출하여 실험한 결과 ER-a, STAT3 및 VEGF 단백질의 발현량이 300 mM MSM에 의해 감소되었다(도 6-d).
- [0094] 특히 STAT3 단백질의 발현이 현저히 억제됨을 확인하였다.
- [0095] 또한 동물 조직에서 RNA를 추출하여 RT-PCR을 실시한 결과 300 mM MSM에 의해 IGF-1R과 VEGF mRNA의 발현량이 현저히 감소함을 확인하였다(도 6-e). 이 이종이식 생쥐의 조직을 H&E staining 방법에 의하여 형태학적 변화를 관찰한 결과, 대조군의 종양 조직에서는 보이지 않는 괴사 현상이 MSM을 처리(300 mM, 500 mM)한 그룹의 종양 조직에서 상당히 진행되었음을 확인하였다(도 6-f).
- [0096] 실시예 9: MSM이 전이성 유방암세포(MDA-MB 231)에서 세포 이동 억제 유도
- [0097] 도 7에서 보면 MDA-MB 231 세포 (105 cells/ml) 를 DMEM 배지에서 키우다가 24시간후에 MSM을 넣은 배지와 넣지 않은 배지로 갈아주고 실험하였다. 도 7에서,
- [0098] Ai. MSM이 없는 MDA-MB 231 세포에서 24시간 후에 실시간 세포 이미지를 획득하였다.
- [0099] Aii. 200 mM MSM을 넣은 MDA-MB 231 세포에서 24시간 후에 실시간 세포 이미지를 획득하였다.
- [0100] Bi. MSM이 없는 MDA-MB 231 세포에서 72시간 후에 신경세포의 형태학적 변화를 실시간 세포 이미지로 획득하였다.
- [0101] Bii. 200 mM MSM을 넣은 MDA-MB 231 세포에서 72시간 후에 형태학적 변화가 없는 실시간 세포 이미지를 획득하였다.
- [0102] 실시예 10: 면역조직화학(Immunohistochemistry) 방법으로 MSM에 의한 STAT5b, IGF-1R, STAT3 및 VEGF의 발현 감소 확인
- [0103] 이종이식 생쥐 조직을 5 두께로 자른 다음 STAT3, STAT5b, VEGF, IGF-1R 특이적 1차 항체를 붙인 후, 2차 항체(Alexa Fluor 488 (rabbit)과 Alexa Fluor 594 (mouse))를 사용하여 검출하였다. STAT5b/IGF-1R 특이적 면역조직화학방법으로 핵 손상없이 STATb/IGF-1R level 이 감소함을 보여주는 결과를 얻었다(도 8-a).
- [0104] STAT3/VEGF 특이적 면역조직화학방법으로 핵 손상없이 STAT3/VEGF level 이 감소함을 보여주는 결과를 얻었다(도 8-b).

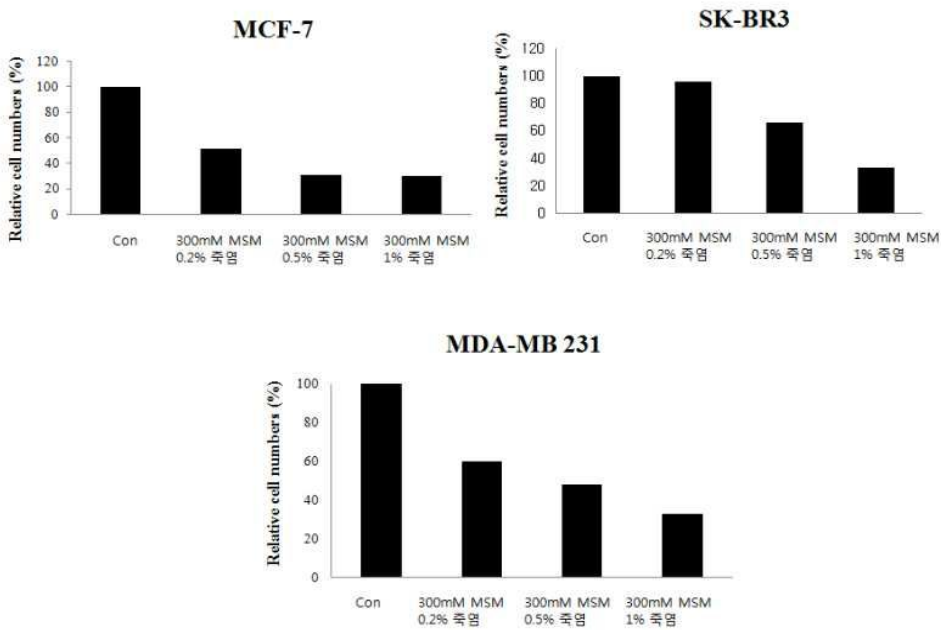
도면

도면1a

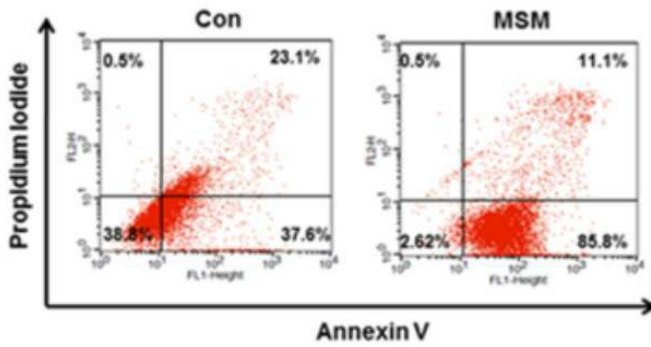
A.



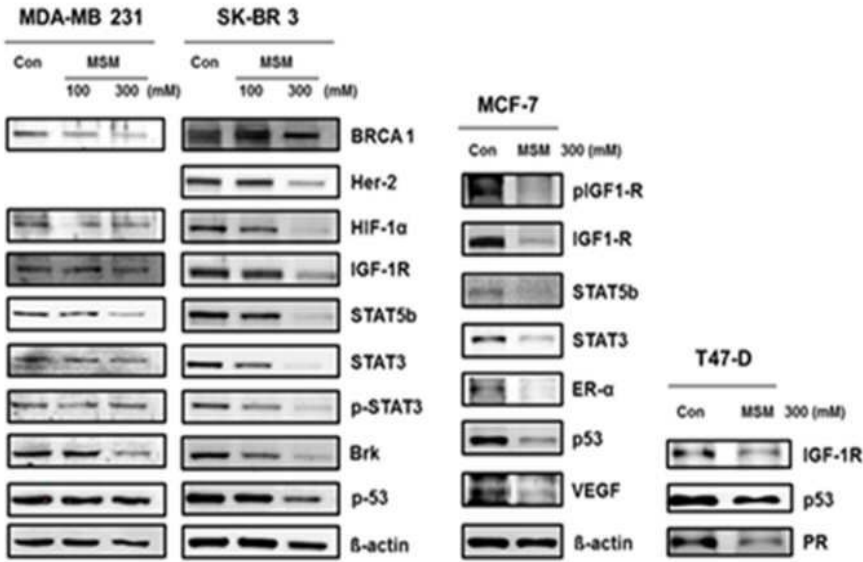
도면1b



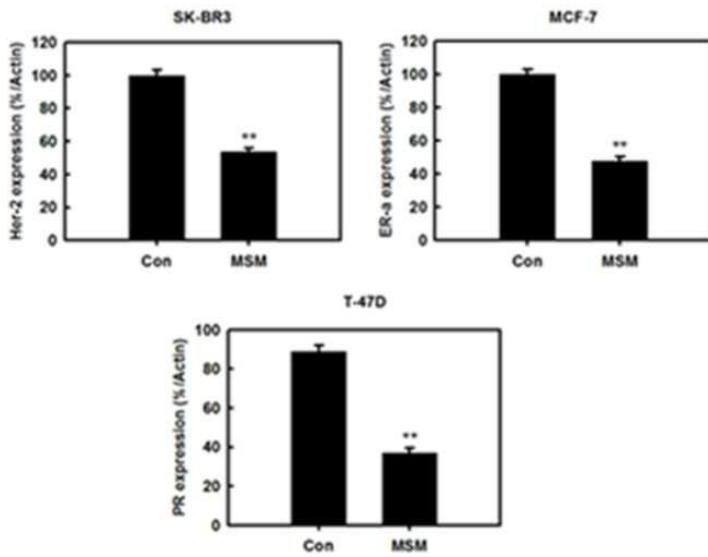
도면1c



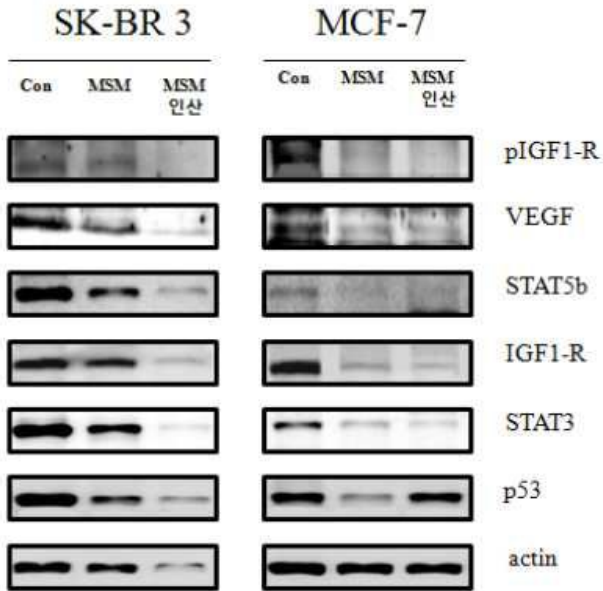
도면2a



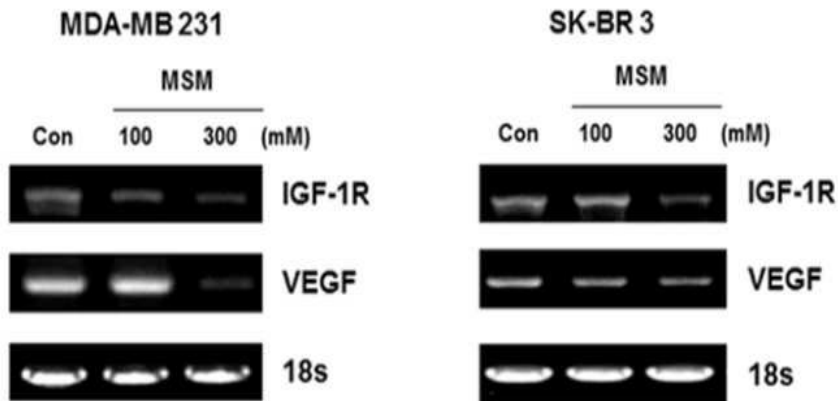
도면2b



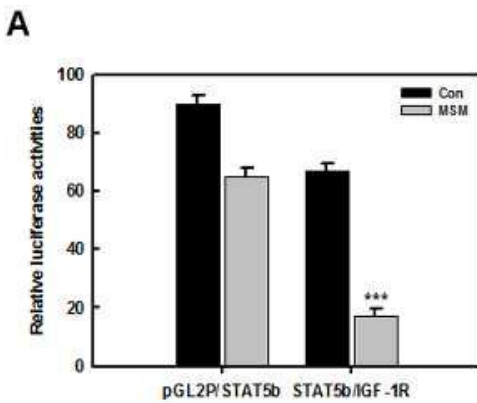
도면2c



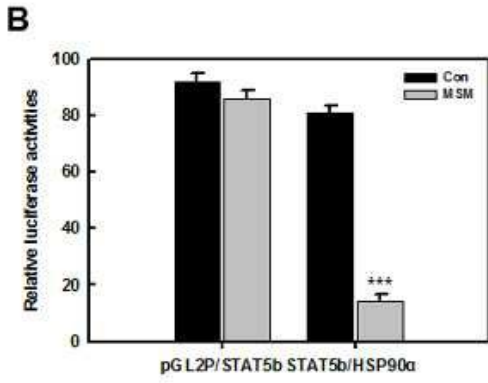
도면3



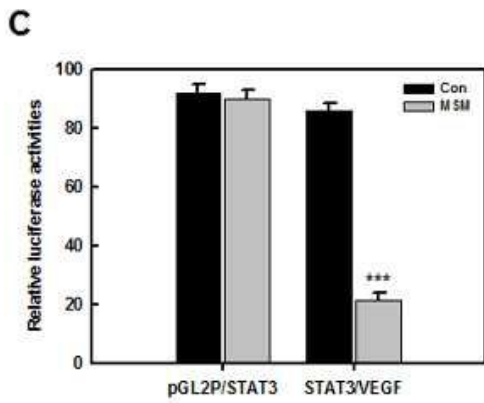
도면4a



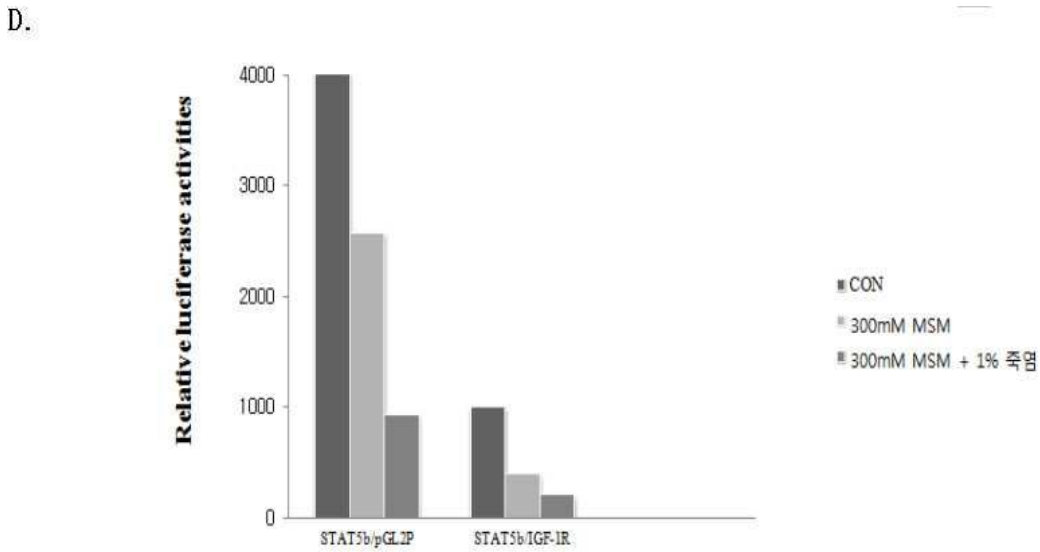
도면4b



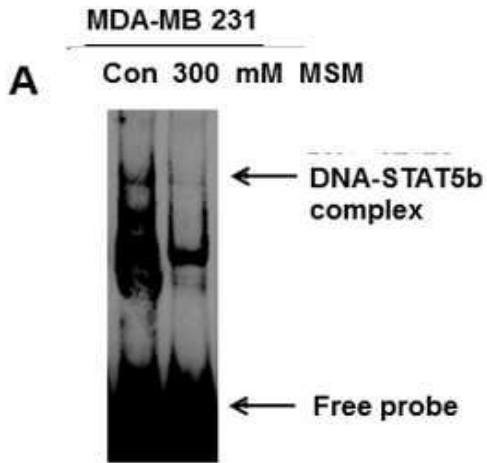
도면4c



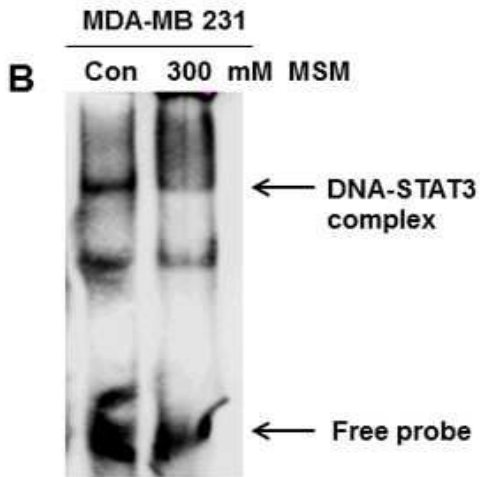
도면4d



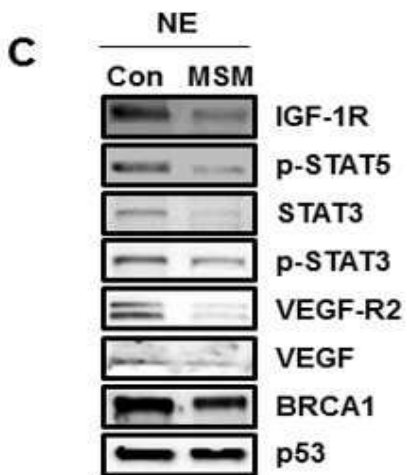
도면5a



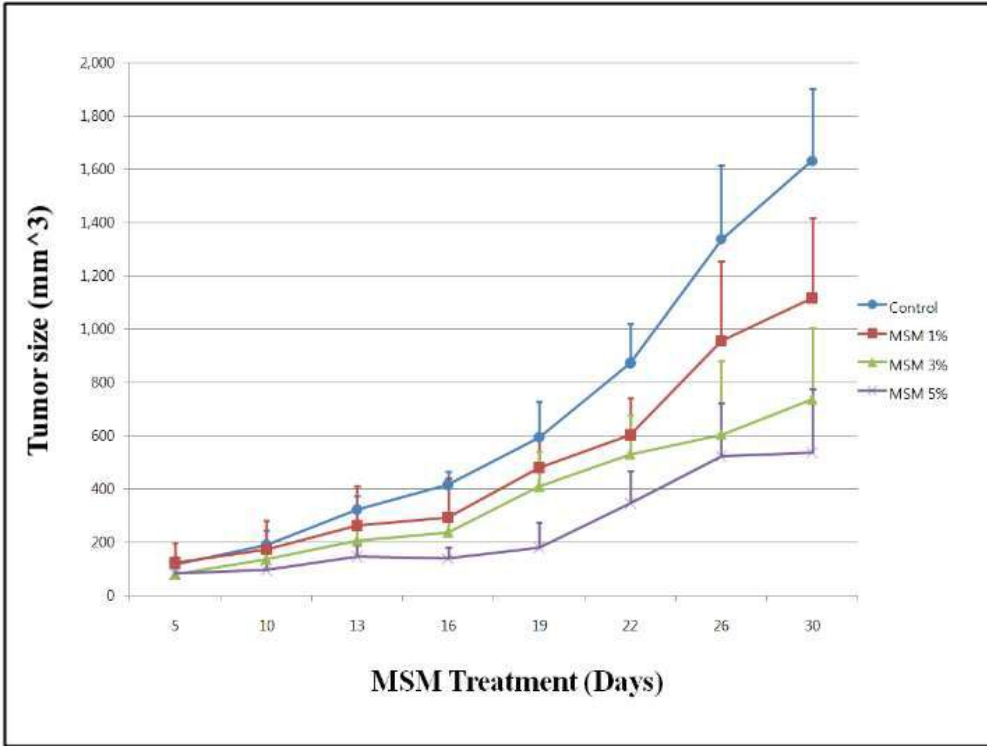
도면5b



도면5c



도면6a



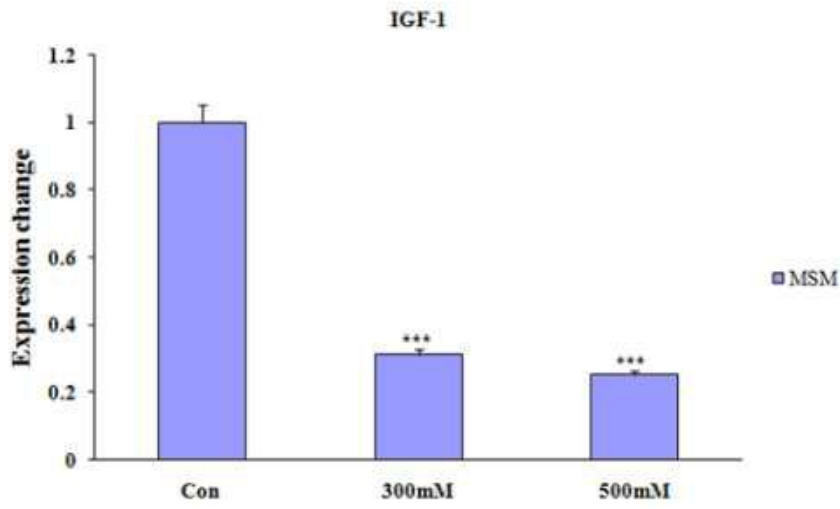
도면6b





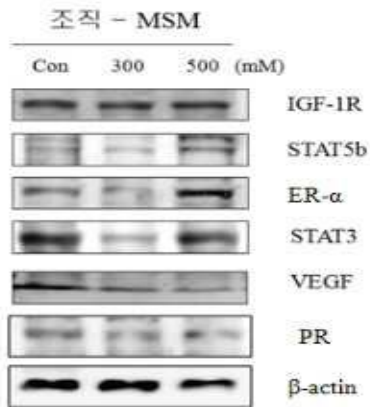
도면6c

C.



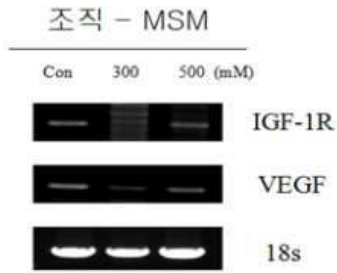
도면6d

D.



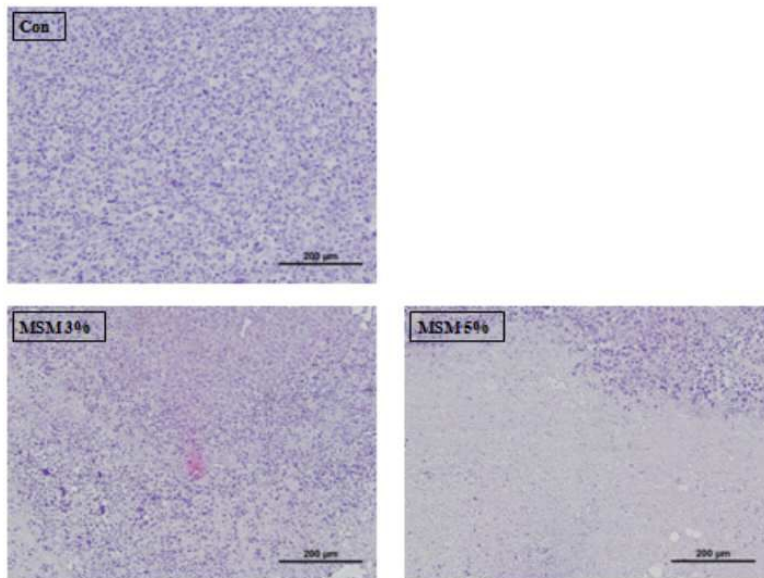
도면6e

E.

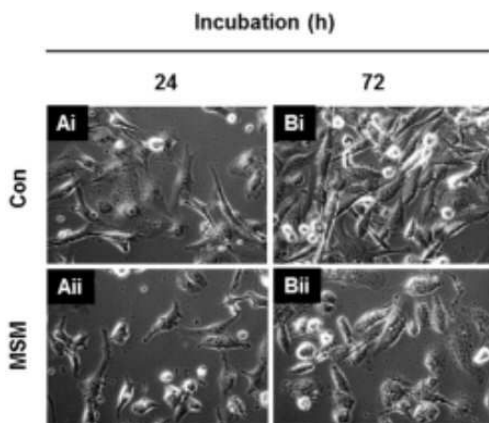


도면6f

F.

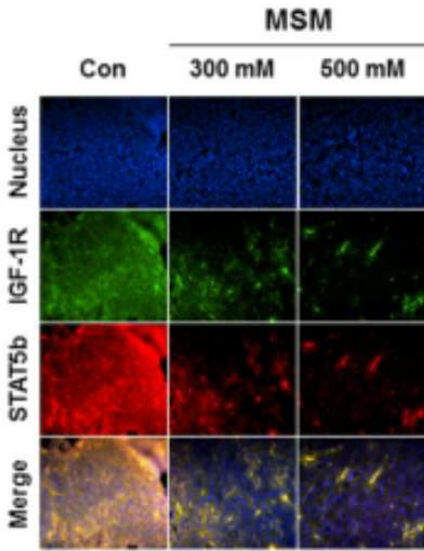


도면7



도면8a

**A**



도면8b

**B**

