



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0017282
(43) 공개일자 2011년02월21일

(51) Int. Cl.

A61K 31/47 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0074870

(22) 출원일자 2009년08월13일

심사청구일자 2009년08월13일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

장기철

경상남도 사천시 정동면 대곡리 255번지

김혜정

경상남도 진주시 주악동 금호아파트 101동 1302호

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 4 항

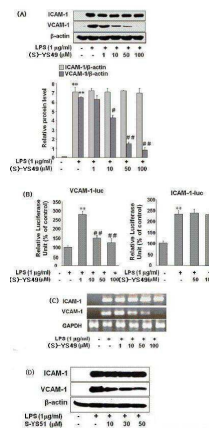
(54) 테트라하이드로이소퀴놀린 화합물을 포함하는 동맥경화증 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 YS49[1-(α -나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린] 및 YS51[1-(β -나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린] 중에서 적어도 하나 이상 선택된 테트라하이드로이소퀴놀린(tetrahydroisoquinoline) 화합물을 유효성분으로 포함하는 동맥경화증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 의하면, 상기 테트라하이드로이소퀴놀린 화합물은 PTEN을 활성화시켜 Akt의 인산화를 억제함으로써 LPS에 의해 유도되는 동맥 내피세포에서의 VCAM-1 발현만을 선택적으로 억제하여 효과적으로 동맥경화증을 예방 및 치료할 수 있다.

대표도 - 도1b



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 03-2009-0299

부처명 보건복지가족부

연구관리전문기관

연구사업명 보건의료기술 연구개발사업

연구과제명 면역/염증 상호반응 network 이해를 통한 동맥경화증 질환 치료제개발

기여율

주관기관 경상대학교

연구기간 2008년 05월 01일 ~ 2010년 04월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

YS49[1-(α -나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린] 및 YS51[1-(β -나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린] 중에서 적어도 하나 이상 선택된 테트라하이드로이소퀴놀린(tetrahydroisoquinoline) 화합물을 유효성분으로 포함하는 동맥경화증 예방 및 치료용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

복강내 투여용 제제로 제형화되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 테트라하이드로이소퀴놀린 화합테트라하이드로이소퀴놀린물은 VCAM-1의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 테트라하이드로이소퀴놀린 화합물은 단핵구세포의 혈관 내피세포로의 접착으로 인한 동맥경화증을 치료하는 것을 특징으로 하는 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 YS49 및 YS51 중에서 적어도 하나 이상 선택된 테트라하이드로이소퀴놀린 화합물을 유효성분으로 포함하는 동맥경화증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002]

동맥은 심장으로부터 공급되는 혈액을 인체의 모든 기관에 전달한다. 동맥벽은 탄력성이 있고 내면이 매끈하여 심장 박동에 따라 혈액의 흐름이 효과적으로 이루어지도록 되어 있다. 혈액 속에 여러 성분이 동맥벽에 영향을 미치는데, 콜레스테롤이 주도적인 역할을 한다. 콜레스테롤, 중성 지방 등은 동맥 벽안에 침착되어 벽이 두꺼워지고, 혈액이 통과할 수 있는 혈관 내강이 좁아지고 탄력성을 잃게 되어 심각하게는 혈관이 완전히 막히는 현상이 발생할 수 있다. 이러한 동맥에서 나타나는 질환을 동맥경화증(atherosclerosis)이라 하는데 심각한 심장질환이나 뇌질환 등으로 발전될 수 있다.

[0003]

동맥경화증은 콜레스테롤, 중성 지방 등이 동맥벽에 상처를 입혔을 때, 이 상처로 인하여 생기는 염증에서 비롯되는 병변이다. 동맥 경화는 대동맥과 심장 관상 동맥의 시작 부분, 그리고 머리로 가는 경동맥, 뇌동맥에서 잘 생기는데, 이러한 곳은 비교적 혈액이 많이 흐르기 때문에 그 영향으로 물리적 충격을 많이 받고 이러한 충격으로 상처를 입게 될 가능성이 높기 때문이다. 상처를 받은 동맥 내피 세포에 단핵세포(monocyte)가 접착되고 이 단핵세포는 내피의 밑으로 침투되어 대식세포(macrophage)로 전환된다. 혈액 속에 지방 성분이 많으면 대식세포가 이를 포획하여 거품세포(foam cell)로 바뀐다. 따라서 동맥경화증 환자는 이러한 대식세포나 거품세포가 다수 존재한다. 대식세포 등과 같은 백혈구는 염증 부위로 집중되어 염증을 없애는 역할을 하는데, 대식세포가 이러한 작용을 하는 과정에서 또 다시 동맥벽에 상처를 남기게 되고, 이 상처부위에 이차적인 지방 플라크가 형성되기 쉽다. 시간이 흐르면서 이러한 일이 반복되면 동맥벽이 좁아질 수 있으며, 혈액 응고, 심장질환, 뇌졸중 등의 질환이 발생할 가능성이 증가한다.

[0004] 상기된 동맥 내피세포로 단핵세포의 접착에는 ICAM-1(intracellular adhesion molecule-1), VCAM-1(vascular adhesion molecule-1), E-selectin과 같은 접착 분자의 발현이 요구된다. 따라서, 접착 분자의 발현 억제는 효과적인 동맥 경화 치료법이 될 수 있다. 그런데 최근, 동맥 내피 세포에서 VCAM-1이나 ICAM-1과 같은 접착 분자를 동시에 억제하는 것보다 VCAM-1의 선택적 억제가 동맥경화증의 치료에 더욱 중요한 것으로 보고되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0005] 이에, 본 발명자는 VCAM-1의 발현을 선택적으로 억제할 수 있는 물질을 발굴하던 중 YS49와 YS51과 같은 테트라하이드로이소퀴놀린 화합물이 PTEN을 활성화시켜 Akt의 인산화를 억제함으로써 VCAM-1의 발현만을 선택적으로 억제하여 동맥경화증을 예방 및 치료할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 YS49 및 YS51 중에서 적어도 하나 이상 선택된 테트라하이드로이소퀴놀린(tetrahydroisoquinoline) 화합물을 유효성분으로 포함하는 동맥경화증 예방 및 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0007] 본 발명의 유효성분은 YS49[1-(α -나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린] (또는 CKD712라고도 함) 및 YS51[1-(β -나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린] 중에서 적어도 하나 이상 선택되는 것이 바람직하다. 상기 화합물은 라세미체(racemate) 또는 (S)- 또는 (R)-에난티오머일 수 있으나, (S)-에난티오머에 비하여 (R)-에난티오머가 작용이 낮으므로 (S)-에난티오머가 보다 바람직하다. 상기 화합물들은 단독으로 또는 조합으로 본 발명의 조성물에 포함될 수 있다.

[0008] 또한, 본 발명에는 상기 테트라하이드로이소퀴놀린 화합물의 약제학적으로 허용된 염 또는 이들의 프로드러그(prodrug)가 포함될 수 있다.

[0009] 상기 테트라하이드로이소퀴놀린 화합물의 염은 약제학적으로 사용되는 통상의 염을 의미하며, 염의 제조에 사용되는 각종 산으로는 염산, 브롬산, 황산, 메탄술폰산, 프로피온산, 숙신산, 글루타르산, 시트르산, 푸마르산, 말레산, 타르타르산, 글루탐산, 글루콘산, 글루쿠론산, 갈락투론산, 아스코르브산, 카본산, 인산, 질산, 아세트산, L-아스파르트산, 락트산, 바닐릭산 및 하이드로 아이오딕산 등이 있다.

[0010] 전술된 바와 같이 본 발명에서는 상기 테트라하이드로이소퀴놀린 화합물의 프로드러그를 포함하는데, 일반적으로 이러한 프로드러그란 화합물의 작용성 유도체들로서, 생체에 들어가서 약효를 나타내기 위하여 쉽게 변화될 수 있어야 한다. 적당한 프로드러그 유도체들의 선택 및 제법에 대한 통상적 과정은 기존의 문헌에 기술되어 있다.

[0011] 상기된 YS49 또는 YS51 화합물은 ICAM-1의 발현에는 영향을 미치지 않는데 반해 VCAM-1의 발현은 억제할 수 있다. 이와 같이 YS49 또는 YS51 화합물이 VCAM-1의 발현만을 선택적으로 감소시키는 것은 PTEN을 활성화시켜 Akt의 인산화를 억제하기 때문이다. 따라서, YS49 또는 YS51 화합물은 동맥경화증을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.

[0012] 본 발명의 테트라하이드로이소퀴놀린 화합물을 함유하는 약제학적 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등 경구 투여용 제형, 멸균 주사용액, 좌제 및 경피 투여용 제제로 제형화하여 사용될 수 있다. 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 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 광물유를 들 수 있다. 필요에 따라 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용

하여 제형화한다.

[0013] 한 양태로서, 본 발명의 테트라하이드로이소퀴놀린 화합물은 경구 투여용 고상 제제로 제형화할 수 있다. 경구 투여를 위한 고상 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되는데, 이러한 고상 제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.

[0014] 다른 양태로서, 본 발명의 테트라하이드로이소퀴놀린 화합물을 함유한 약제학적 조성물을 경구 투여용 액상 제제로 제형화할 수도 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 이러한 액상 제제에는 통상적으로 사용되는 불활성 희석제 (예를 들면, 정제수, 에탄올, 리퀴드 파라핀) 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0015] 또 다른 양태로서, 본 발명의 테트라하이드로이소퀴놀린 화합물을 함유한 약제학적 조성물은 비경구, 바람직하게는 복강내 투여를 위한 제제로 제형화될 수도 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 멸균된 수용액으로는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 적절한 완충용액을 이용할 수 있으며, 비수성용제로, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 이용될 수 있다. 필요에 따라 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제를 이용할 수도 있다. 한편, 좌제의 경우에는 이의 통상적인 기재인 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0016] 상기와 같은 방법으로 제형화된 조성물은 유효량으로 경구 또는 비경구(경피, 피하, 정맥, 근육, 복강 등)를 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 상기에서 "유효량"이란 환자에게 투여하였을 때, 예방 또는 치료 효과를 나타내는 양을 말한다. 본 발명에 따른 조성물의 투여량은 투여 경로, 투여 대상, 연령, 성별, 체중, 개인차 및 질병 상태에 따라 적절히 선택될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있으나, 바람직하게는 1 μ g~100mg/체중kg/day, 보다 바람직하게는 10 μ g~10mg/체중kg/day의 유효량으로 투여될 수 있다.

효 과

[0017] 본 발명에 의하면, YS49 및 YS51 중에서 적어도 하나 이상 선택된 테트라하이드로이소퀴놀린 화합물은 PTEN을 활성화시켜 Akt의 인산화를 억제함으로써 VCAM-1의 발현만을 선택적으로 억제하여 동맥경화증을 예방 및 치료할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0019] <실시예 1: 재료 및 방법>

[0020] 1-1. 재료의 입수

[0021] 조직 배양 배지(Tissue culture medium) 199, FBS(fetal bovine serum), 항생제(페니실린/스트렙토마이신), 글루타민 및 콜라게나제는 Gibco-BRL(Rochville, MD)로부터 구입하였다. 항-ICAM-1, 항-VCAM-1 및 항- β -액틴 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Crus, CA)로부터 입수하였고; 항-p-PKC, 항-PKC, 항-p-p38, 항-p38, 항-p-Akt 및 항-Akt 항체는 Cell Signaling Technology(Beverly, MA)로부터 제공받았다. SB203580, SP600125, PD98059, LY294001 및 GF109203은 Calbiochem(SanDiego, CA)로부터 구입하였다. 그 외 모든 화합물은 Sigma-Aldrich(St Louis, MO)로부터 입수하였다.

[0022]

1-2. 세포 배양

[0023]

HUVEC은 Cascade Biologics(Portland, OR)로부터 입수하여 20% FBS(fetal bovine serum), 2mM L-글루타민, 5U/ml 헤파린, 100IU/ml 페니실린, 10 μ g/ml 스트렙토마이신 및 50 μ g/ml ECGS로 보충된 배지 199에서 배양하였다. 세포를 100mm 디쉬에 접종하여 습한 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. HUVEC을 100mm 디쉬에 1 x 10⁷ 세포의 밀도로 플레이트하였다. 계대수가 3 내지 6회인 세포를 이용하였다. U937 사람 단핵구세포는 KCLB(Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)로부터 입수하여 10% FBS, 2mM L-글루타민, 25mM HEPES, 25mM NaHCO₃, 100IU/ml 페니실린 및 10 μ g/ml 스트렙토마이신으로 보충된 RPMI 1640에서 배양하였다.

[0024]

1-3. 세포 생존율

[0025]

세포 생존율을 MTT 에세이로 측정하였다. 지수기 세포를 24구관에 1 x 10⁴ 세포/구로 접종하였다. 여러 처리 후, 5mg/ml MTT 용액의 20 μ l를 각 구에 첨가하고(0.1mg/구), 4시간 동안 정치배양하였다. 상층액을 흡인하고 각 구의 포르마잔 결정을 200 μ l의 디메틸 설펍사이드로 37℃에서 30분간 용해하고, 최적의 밀도를 570nm에서 Microplate Reader(Bio-Rad, Hercules, CA)로 리딩하였다.

[0026]

1-4. 웨스턴 블롯 분석

[0027]

세포를 회수하여 0.5% SDS, 1% NP-40, 1% 소듐 데옥시콜레이트, 150mM NaCl, 50mM Tris-Cl(pH 7.5) 및 프로테아제 억제제를 포함한 완충액으로 용균하였다. 각 시료의 단백질 농도는 BCA 단백질 에세이 키트(Pierce, Rockford, IL)를 이용하여 측정하였다. VCAM-1과 ICAM-1을 검출하기 위해, 총 단백질의 20 μ g을 10% 폴리아크릴아미드 겔에서 전기영동하였고, 포스포-PTEN, 포스포-Akt, 포스포-PKC 또는 포스포-p38을 검출하기 위해, 총 단백질의 30 μ g을 12% 폴리아크릴아미드 겔에서 전기영동하였다. 그리고, 상기 겔을 반건조 전기영동 트랜스퍼(semidry electrophoretic transfer)에 의해 PVDF(polyvinylidene difluoride) 멤브레인으로 15V에서 60-75분간 트랜스퍼하였다. 상기 PVDF 멤브레인을 하룻밤 동안 4℃에서 5% BSA(bovine serum albumin)으로 블로킹하였다. 세포를 5% BSA를 포함하는 Tris 완충 식염수/Tween20(TBS-T)에 1:500으로 희석한 일차 항체로 정치한 후 이차 항체로 실온에서 1시간 동안 정치배양하였다. 항-래비트 IgG가 이차 항체로 이용되었다(1% BSA를 포함하는 TBST에 1:5000으로 희석). 신호를 ECL(Amersham, Piscataway NJ)로 검출하였다.

[0028]

1-5. ICAM-1 및 VCAM-1 검출을 위한 RT-PCR

[0029]

HUVEC으로부터 총 RNA를 단일-단계 구아니딘 티오시아네이트-페놀-클로로포름 추출 과정에 의해 TRIzol 시약(Invitrogen, Carlsbad CA)을 이용하여 추출하였다. 역전사효소가 없는 음성 대조군을 이용하여 증폭이 잔류 게노믹 DNA로부터 계속 일어나지 않는다는 것을 검증하였다. PCR 증폭은 개시 mRNA의 100ng에 해당하는 cDNA에 대해, 특이적 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 이용하여 수행하였다. PCR 산물은 2% 에티뮴 브로마이드로 염색된 아가로스 겔에서 전기영동하였다.

[0030]

1-6. 형질감염

[0031]

VCAM-1-루시페라제 및 ICAM-1-루시페라제로의 일시적 형질감염은 Lipofectin(Gibco-BRL, Rockville, MD)을 이용하여 수행하였다. 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 5 x 10⁵ 세포를 형질감염 전날 60mm 플레이트에 플레이트하고 약 70% 콘플루언시까지 성장시켰다. 세포를 빈 벡터(pGL3 및/또는 pcDNA3) 또는 1 μ g의 VCAM-1-루시페라제 또는 ICAM-1-루시페라제+0.5 μ g의 pRL-TK-루시페라제로 형질감염시켰다. 4시간 동안 형질감염을 진행시켰다. 형질감염된 세포를 4ml의 1x PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)로 세척한 후 1 μ g/ml로 자극하였다. 세포를 회수할 때까지 혈청이 없는 배지 199에서 배양하였다. 각 시료별 루시페라제 활성은 pRL-TK 루시페라제 활성(Renilla luciferase activity)을 이용하여 표준화하였다.

[0032] 1-7. 루시퍼라제 에세이

[0033] 여러 처리 후, 세포를 차가운 PBS로 2회 세척하고 듀얼 루시퍼라제 키트(Promega, Madison, WI)에 포함된 용균 완충액으로 용균하고 TD-20/20 luminometer(Turner Designs, Sunnyvale, CA)를 이용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 루시퍼라제 활성을 측정하였다. 모든 형질감염은 3 반복으로 수행되었다. 데이터는 개뿔벌레(Firefly)와 Renilla 루시퍼라제 활성 간의 비율로서 나타내었다.

[0034] 1-8. siRNA 기술

[0035] 사람 VCAM-1, 사람 PTEN 및 스크램블(scramble)에 대한 siRNA(small interfering RNA)는 Santa cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)로부터 제공받았고 제조업자의 프로토콜에 따라 수행되었다.

[0036] 1-9. 단핵구세포 접착 에세이

[0037] 에세이 48시간 전에 HUVEC을 2구 챔버에 접종하였다. LPS로 자극하기 전에 배지를 교환하였다. U937 단핵구세포(3×10^7)를 2% FBS 및 10mg/ml의 형광 염료 BCECF/AM(Boehringer, Mannheim, Germany)를 포함하는 RPMI 1640 배지에 37°C에서 30분간 정치배양하였다. 형광으로 표지된 세포를 침전시킨 후 10mM HEPES 완충액을 포함한 배지 199(M199H)에 재현탁하였다(7.5×10^5 /ml). 로딩 세포를 첨가하기 전에 HUVEC을 M199H로 3회 세척한 후 37°C에서 정치배양하였다. 30분 후에, 세포 현탁액을 회수하고 HUVEC을 M199H로 세척하였다. 형광 이미지를 BH-2 올림푸스 현미경(Melville, NY)에 부착된 고해상 비디오 카메라(DXC-960MD; Sony)를 이용하여 선별하였다. 일차로 선별된 영역 내에서 너비 0.2mm의 이미지를 선택한 후 이 이미지의 면역반응성은 SigmaGel 1.0(Jandel Scientific, Germany)을 이용하여 측정하였다. 분석은 동일 영역에 대해 3회 반복하였고, 결과는 평균값으로 나타내었다.

[0038] 1-10. 생체내 LPS로의 자극

[0039] 24 마리의 7-8주령의 수컷 Sprague-Dawley 래트(체중 220-250g, Sam Tako Inc., Osan, Korea)를 무작위로 4개의 그룹으로 분류하였다: (1) 식염수 (i.p., n=6), (2) LPS (10mg/kg i.p., n=6), (3) LPS 플러스 (S)-YS49 (5mg/kg i.p., n=6), (4) LPS 플러스 (S)-YS49 (10mg/kg i.p., n=6) (20 mg/kg. i.p. n=4). (S)-YS49는 LPS 주입 1시간 전에 투여하였다. 6시간 후 래트를 케타민(30mg/kg)과 자일라진(6mg/kg)으로 마취시키고 흉대동맥을 회수하여 면역조직화학을 시행하였다.

[0040] 1-11. 면역조직화학

[0041] 면역조직화학은 공지된 바에 따라 실시하였다. 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 시료를 4% 파라포름알데히드로 고정하고 20% 수크로스에서 동결보호한 후 조직을 OCT 컴파운드(Sakura Finetsch Co., Tokyo, Japan)에 포매하고, 이소-펜텐에서 스냅-동결(snap-frozen)한 후 액체 질소에서 동결(prechill)하였다. 일련의 동결절편($10\mu\text{m}$)을 젤라틴이 코팅된 슬라이드에 봉입하고 10mM 소듐 스트레이트에서 3분간 끓였다. 절편을 1% BSA를 포함하는 0.1M TBS에서 2시간 동안 실온에서 블로킹한 후 4°C에서 하룻밤 동안 항체로 정치배양한 후 3회 세척하였다. 면역형광 조직화학은 FITC가 접합된 이차 항체(1:300)를 이용하여 수행하고 공초점 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

[0042] <실시예 2: 결과>

[0043] 2-1. (S)-YS49 및 (S)-YS51 화합물은 HUVEC에서 LPS에 의해 유도되는 ICAM-1이 아니라 VCAM-1을 억제함

[0044] MTT 에세이를 이용하여 확인한 결과, (S)-YS49와 (S)-YS51은 고농도에서만 약 56%의 세포 사멸율을 나

타내었다(도 1a의 A). LPS는 시간 의존적인 방식으로 VCAM-1 및 ICAM-1의 발현을 촉진하였다(도 1a의 B). (S)-YS49 또는 (S)-YS51 화합물의 전처리는 LPS로 자극된 HUVEC에서 ICAM-1이 아니라 VCAM-1의 발현량을 용량 의존적으로 감소시켰다(도 1b의 A 내지 D). (S)-YS49의 경우, VCAM-1 및 ICAM-1 루시퍼라제 활성에서도 유사한 결과가 확인되었다(도 1b의 B). 세포를 (S)-YS49 또는 (S)-YS51 화합물(100 μ M)로 8-12시간 동안 정치 배양하였을 때 세포독성이 나타나지 않았으므로, 그 후 모든 실시예에서 (S)-YS49 및 (S)-YS51 화합물은 8시간 동안 처리하였다.

[0045] 2-2. LPS에 의해 자극된 HUVEC에서 Akt, p38 및 PKC 신호전달 경로가 VCAM-1 및 ICAM-1의 상이한 조절에 관여함.

[0046] (S)-YS49 화합물이 접착 분자의 발현을 어떻게 서로 다르게 조절하는지 규명하기 위해, SP600125(JNK 억제제), SB203580(p38 억제제), PD98059(ERK1/2 억제제), LY294001(PI3K/Akt 억제제) 및 GF109203X(PKC 억제제)와 같은 약물학적 억제제를 이용하였다. 이들 중에서, PI3K/Akt, p38 및 PKC 억제제는 LPS로 처리된 세포에서 ICAM-1이 아니라 VCAM-1을 특이적으로 억제하였다(도 2A). LPS는 15-30분부터 Akt, p38 및 PKC를 활성화시켰다(도 2B). 도 2C에 나타난 바와 같이, (S)-YS49는 LPS로 활성화된 HUVEC에서 Akt 인산화를 유의적으로 억제하였지만, 포스포-p38 또는 포스포-pan-PKC의 양에는 영향을 미치지 않았다.

[0047] 2-3. HUVEC에서 LPS로 유도된 VCAM-1 및 ICAM-1의 발현에 대한 (S)-YS49 화합물의 상이한 조절에 PTEN이 관여함

[0048] PTEN은 PI3K/Akt 신호전달의 천연 음성 조절자이고, 이의 활성화는 그의 인산화 상태에 의존적이다. 이에, LPS로 처리된 세포에서 (S)-YS49 화합물이 PTEN 활성을 조절할 수 있는지 확인하였다. 도 3A에 나타난 바와 같이, (S)-YS49 화합물은 PTEN의 인산화를 유의적으로 억제하여 탈인산화에 의해 PTEN 활성을 상향조절하였다. 다음으로, PTEN의 상향조절이 (S)-YS49 화합물에 의한 p-Akt 및 VCAM-1의 억제 효과에 중요한지 여부를 조사하였다. siPTEN(small interfering PTEN RNA)으로의 형질감염은 도 3B에 나타난 바와 같이 PTEN의 발현을 감소시켰다. (S)-YS49 화합물은 HUVEC에서 LPS에 의해 유도되는 Akt의 인산화(p-Akt) 및 VCAM-1의 발현을 유의적으로 억제하였다. 그러나, siPTEN의 존재하에서 p-Akt 및 VCAM-1의 발현을 억제하지 못하였다(도 3C와 3D). 이는 (S)-YS49 화합물이 PTEN/PI3K/Akt 신호전달 캐스케이드의 타이트한 조절에 통해 VCAM-1의 발현을 하향조절한다는 것을 의미한다.

[0049] 2-4. 단핵구세포 접착에 대한 (S)-YS49 또는 (S)-YS51 화합물의 영향

[0050] 상기 결과로부터 (S)-YS49 또는 (S)-YS51 화합물이 활성화된 HUVEC에서 접착 분자의 발현을 억제할 수 있는 것으로 확인되었다. 따라서, 추가로 (S)-YS49 또는 (S)-YS51 화합물이 단핵구세포의 내피세포로의 부착을 조절할 수 있는지 조사하였다. 도 4a 및 4b에 나타난 바와 같이, (S)-YS49 또는 (S)-YS51 화합물은 LPS에 의해 자극된 HUVEC로 U937 세포의 접착을 유의적으로 억제하였다.

[0051] 2-5. LPS 투여된 래트 대동맥에서 VCAM-1 및 ICAM-1의 발현에 대한 (S)-YS49 화합물의 영향

[0052] 전술된 생체의 실험 결과를 확인하기 위해, 동물 실험을 수행하였다. Sprague-Dawley 래트를 (S)-YS49 화합물로 처리한 후 LPS로 6시간 동안 자극하였다. 도 5에 나타난 바와 같이 (S)-YS49 화합물(10 또는 20mg/kg)은 대동맥 내피세포에서 LPS에 의해 유도된 VCAM-1의 발현을 유의적으로 억제하였으나, ICAM-1의 발현에는 영향을 미치지 않았다.

도면의 간단한 설명

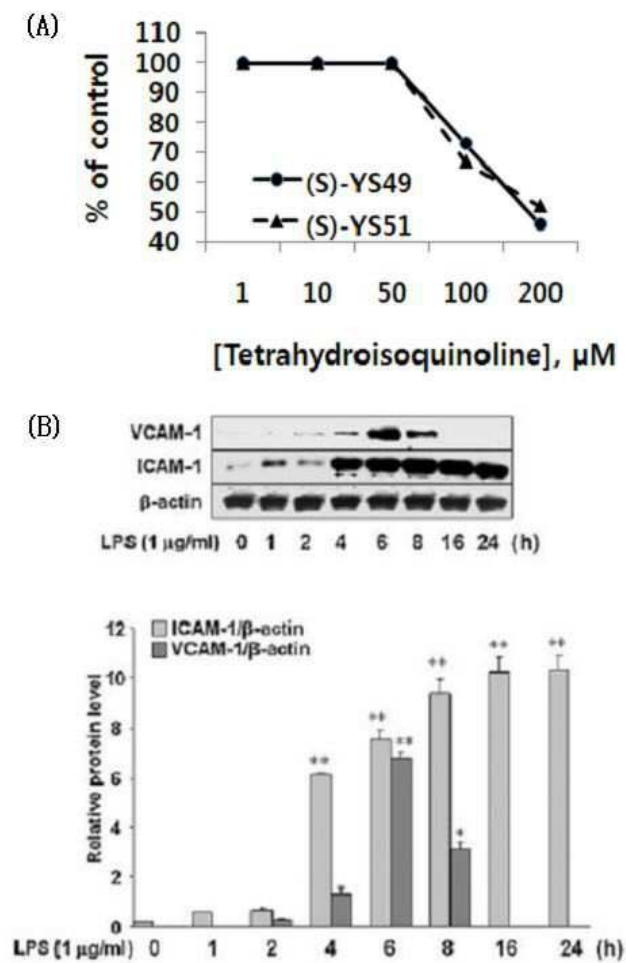
[0053] 도 1a의 (A)는 (S)-YS49 및 (S)-YS51이 HUVEC 세포 생존율에 미치는 영향을 나타낸 것이고, (B)는 LPS는 시간 의존적인 방식으로 VCAM-1 및 ICAM-1의 발현을 촉진함을 나타낸 것이다.

[0054] 도 1b의 (A) 내지 (E)는 HUVEC에서 LPS에 의해 유도된 VCAM-1, ICAM-1의 발현에 대한 (S)-YS49 및 (S)-YS51의 영향을 나타낸 것이다.

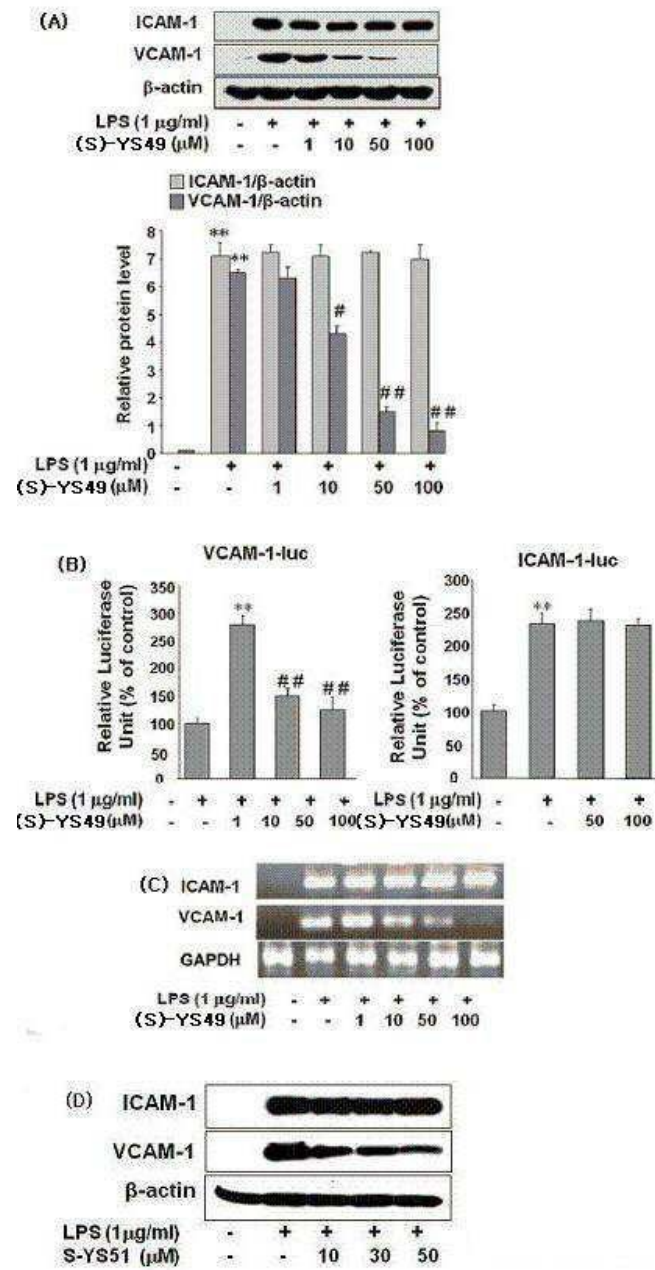
- [0055] 도 2는 LPS에 의해 유도된 HUVEC에서 (S)-YS49에 의해 매개된 VCAM-1의 억제 효과에 PI3k/Akt 경로가 관여함을 나타낸 것이다.
- [0056] 도 3은 LPS에 의해 유도된 HUVEC에서 (S)-YS49의 억제 효과에 PTEN이 관여함을 나타낸 것이다.
- [0057] 도 4a는 U937 단핵구세포의 HUVEC으로의 접착에 (S)-YS49의 억제 효과를 나타낸 것이다.
- [0058] 도 4b는 U937 단핵구세포의 HUVEC으로의 접착에 (S)-YS51의 억제 효과를 나타낸 것이다.
- [0059] 도 5는 LPS로 처리된 래트의 혈관에서 (S)-YS49에 의해 ICAM-1(A) 및 VCAM-1(B)이 서로 다르게 조절됨을 나타낸 것이다.

도면

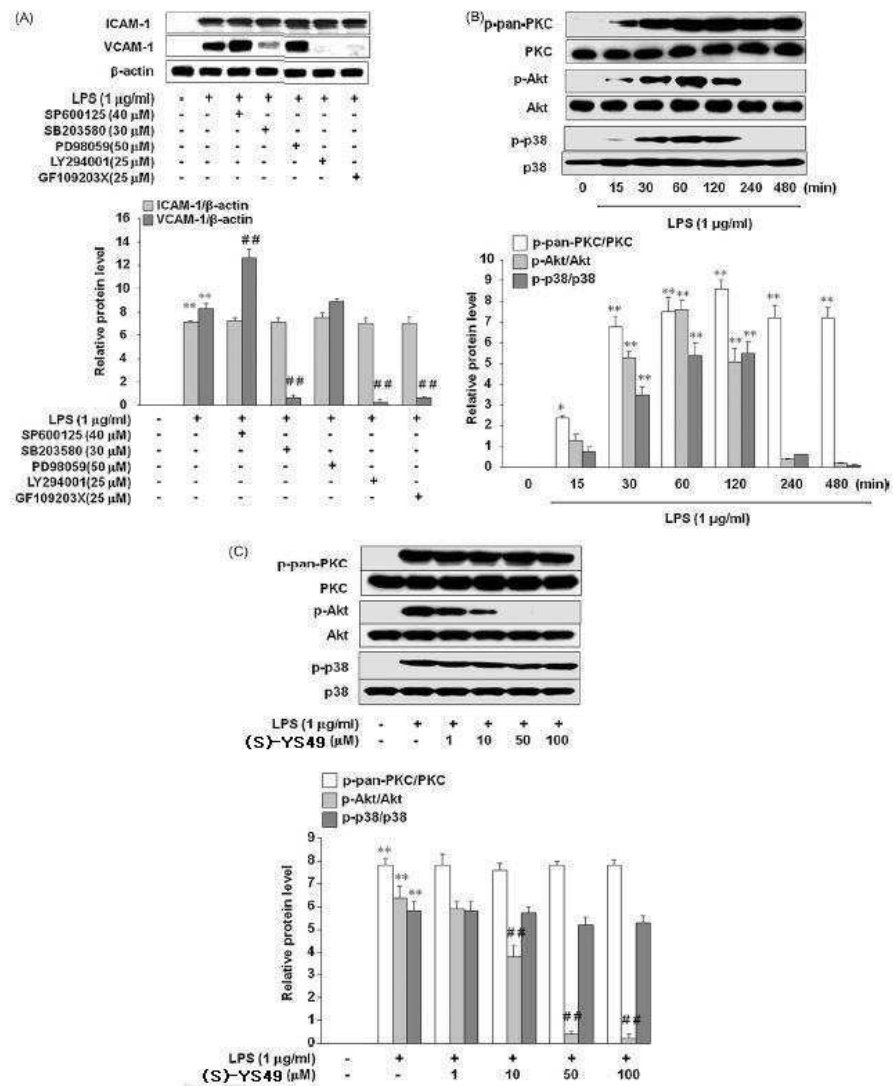
도면1a



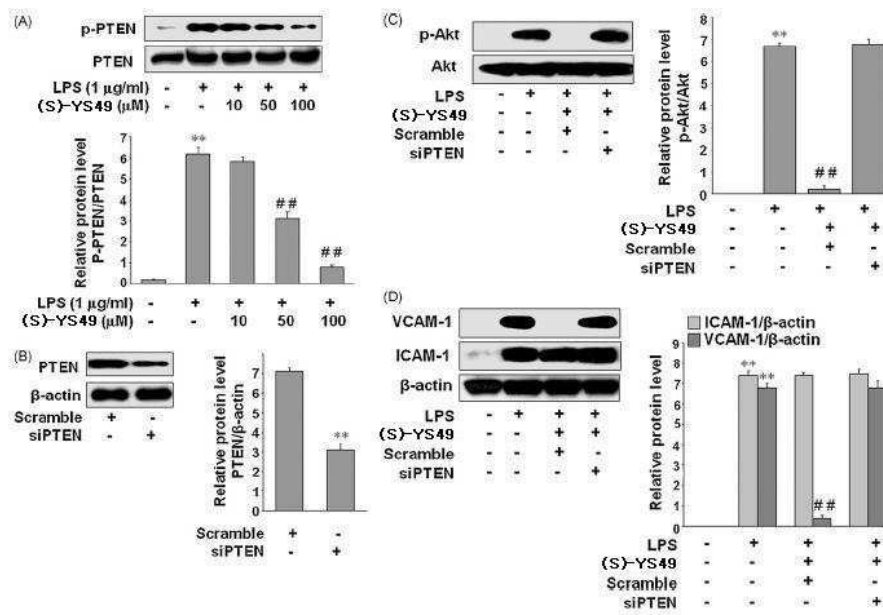
도면1b



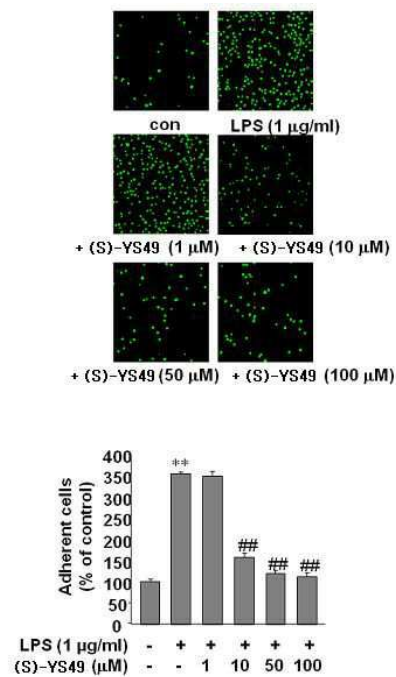
도면2



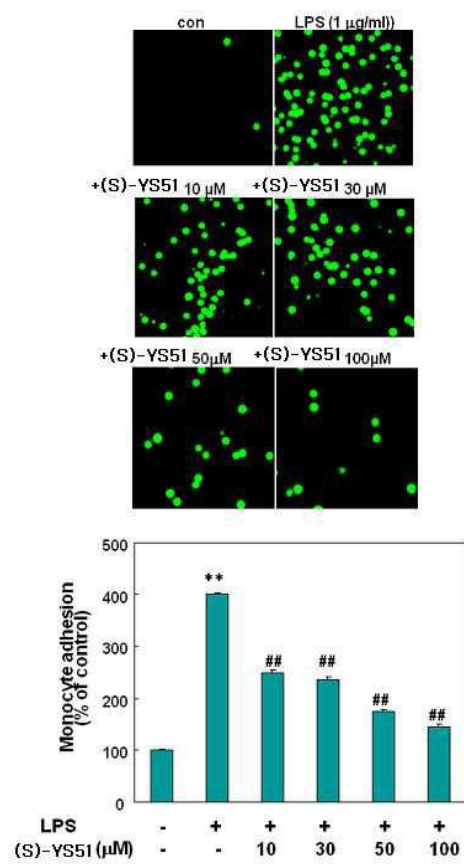
도면3



도면4a



도면4b



도면5

