



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0002911
(43) 공개일자 2010년01월07일

(51) Int. Cl.

C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0062968

(22) 출원일자 2008년06월30일

심사청구일자 2009년07월10일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

전길자

서울 영등포구 여의도동 광장아파트 10동 506호

임진경

서울특별시 양천구 목5동 목동신시가지아파트 40
2동 302호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

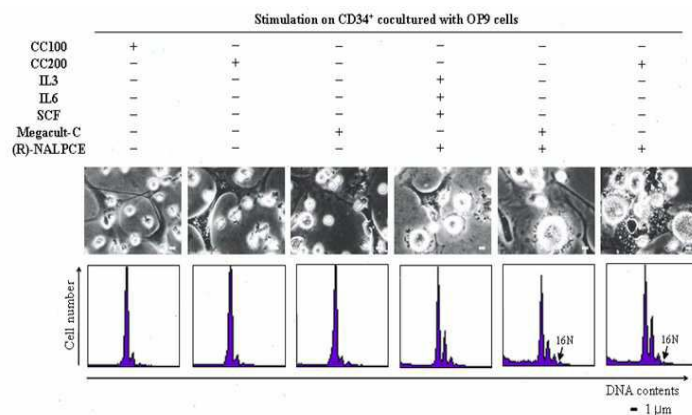
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) C D34 양성 조혈모세포를 거핵구 및 혈소판으로 분화 유도하는 방법

(57) 요약

본 발명은 CD34 양성 조혈모세포를 거핵구 및 혈소판으로 분화 유도하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 CD34 양성 표면 마커를 가지는 조혈모세포를 OP9세포와 공배양하고, 화학식 1의 화합물을 처리하는 단계를 포함하여 조혈모세포를 거핵구 및 혈소판으로 분화 유도하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

배윤수

경기도 성남시 분당구 분당동 34번지 셋별마을 라
이프아파트 102동 501호

김재상

서울시 광진구 광장동 위커힐아파트 53동 604호

한균희

경기도 화성시 반월동 신영동 현대아파트 209동
1702호

한소엽

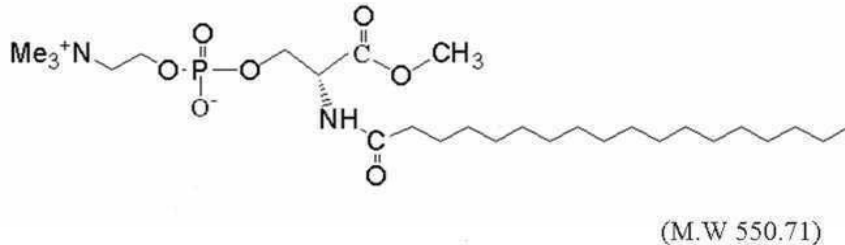
서울특별시 동작구 사당동 대림아파트 6동 1006호

특허청구의 범위

청구항 1

(a) CD34 양성 표면 마커를 가지는 조혈모세포를 OP9 세포와 공배양하는 단계; 및 (b) 하기 화학식 1의 화합물을 첨가하는 단계를 포함하는, CD34 양성 조혈모세포를 거핵구 및 혈소판으로 분화유도하는 방법.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조혈모세포는 제대혈, 골수 또는 말초혈액으로부터 유래된 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 단계 (a)에서 상기 공배양은 OP9 세포를 FBS를 포함하는 배양 배지에서 단일막으로 배양한 후, CD34 양성 표면 마커를 가지는 조혈모세포를 OP9 세포 위에 분주하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 CD34 양성 조혈모세포는 인간 유래인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 화학식 1의 화합물 농도가 10 내지 60 $\mu\text{g/ml}$ 인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, CD34 양성 조혈모세포로부터 분화된 거핵구는 CD41 또는 CD61의 발현율이 증가된 것을 특징으로 하는 방법.

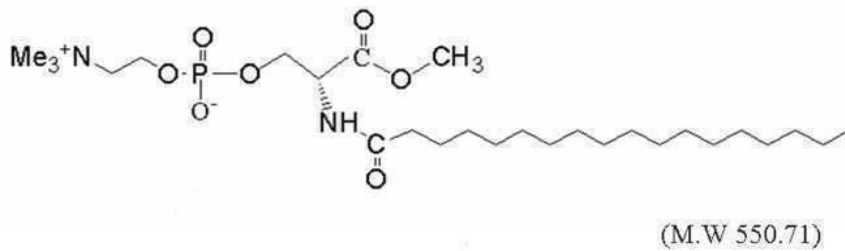
청구항 7

제1항에 있어서, 단계 (b)에서 인터루킨-3(IL-3), IL-6, IL-11, 백혈병억제인자(LIF), 에리트로포이에틴(EPO), SCF(stem cell factor), 트롬보포이에틴(TPO), CC100, CC200 및 메가컬트-C(megacult-C)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상을 추가로 첨가하는 방법.

청구항 8

하기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 함유하는, CD34 양성 표면 마커를 가지는 조혈모세포를 거핵구 및 혈소판으로 분화유도하기 위한 조성물.

[화학식 1]



청구항 9

제8항에 있어서, 상기 조성물은 인터루킨-3(IL-3), IL-6, IL-11, 백혈병억제인자(LIF), 에리트로포이에틴(EPO), SCF(stem cell factor), 트롬보포이에틴(TPO), CC100, CC200 및 메가컬트-C(megacult-C)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 10

제1항의 방법으로 수득된 거핵구 또는 혈소판을 포함하는 혈소판 감소증 치료제.

청구항 11

제8항의 조성물을 포함하는 혈소판 감소증 치료제.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 CD34 양성 조혈모세포를 거핵구 및 혈소판으로 분화 유도하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 CD34 양성 표면 마커를 가지는 조혈모세포를 OP9세포와 공배양하고, 화학식 1의 화합물을 처리하는 단계를 포함하여 조혈모세포를 거핵구 및 혈소판으로 분화 유도하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 혈소판은 생체의 지혈기구에 있어서 중요한 역할을 하는 혈구 성분이며, 지름이 2 내지 3 μ m이며, 혈액 1mm² 속에 약 30만 내지 50만 개 들어 있다. 점조성이 있고 형상은 조건에 따라 변하고, 손상조직에 점착 및 응집하는 동시에 세포 내 성분을 방출시켜 일련의 응고반응을 야기한다.

<3> 혈소판 조혈은 다능성 조혈 간세포로부터 유래하는 거핵구계 전구세포가 거핵아구를 경유하여 거핵구, 혈소판으로 분화되는 과정을 의미한다. 거핵구(거대핵세포) 형성 및 혈소판 생산의 조절은 마주르(문헌: Exp. Hematol., 15:248, 1987) 및 호프만(문헌: Blood, 74:1196-1212, 1989)에 의해 연구되었다. 예를 들어, 골수 다능성 간세포는 거핵구, 적혈구, 골수구 세포주로 분화된다. 거핵구 계의 인식가능한 초기 구성 일원 세포는 거대 적아구 세포이다. 이들 세포는 처음에는 호염기성 세포질 및 느슨하고 약간 망상인 염색질 및 수 개의 인을 포함하는 약간 불규칙한 모양의 한 개의 핵을 가지며, 세포 직경이 20 내지 30 μ m이다. 일정 시간 경과 후, 거핵구는 32개까지의 핵(다배체)을 포함하지만, 세포질은 성글고 미성숙한 상태로 남아 있다. 성숙과정이 진행되면서, 핵이 더욱더 소엽화하고 농축되며, 세포질은 양적으로 증가하고 더욱 호산성화 및 과립화된다. 이 계통의 가장 성숙한 세포에서는 세포 가장 자리에서 혈소판이 유리되는 광경을 관찰할 수 있다. 일반적으로 10% 미만의 거핵구가 적아 단계에 있으며 50% 이상이 성숙한다. 거핵구계에 통상 적용되는 형태학상 분류에 따르면 초기 형태의 거핵구, 중기 형태의 전거핵구 또는 호염기성 거핵구 및 말기 형태의 성숙한(호산성, 과립 또는 혈소판 생성) 거핵구로 구분할 수 있다. 성숙한 거핵구는 시누소이드형 공간으로 세포질의 필라멘트를 방사하는데 여기서 이들이 떨어져 나가 분절되어 개개 혈소판을 형성한다(Williams et al., Hematology, 1972).

<4> 혈소판 감소증(thrombocytopenia)은 골수세포 내에 존재하는 혈소판 전구세포인 거핵구 콜로니 형성 전구세포들이 파괴되어 혈소판의 수가 부족하게 됨으로써 유발되는 질병이다. 현재, 유전성 혈소판 감소증, 특발

성 혈소판감소성 자반병, 재생불량성 빈혈 등이 알려져 있으나, 임상적으로 중요한 혈소판 감소증은 방사선 전신조사 또는 조혈 억제 작용을 하는 약제에 의한 2차성 혈소판 감소증이다. 이러한 2차성 혈소판 감소증은 암 환자에게 실시되는 화학요법, 방사선요법, 골수이식 치료법 등에 의해 유발되며, 많은 경우에 있어서 골수 거핵구의 형성이 저조해지는 일이 발생하며, 환자의 예후의 회복을 지연시키며, 경우에 따라 출혈에 의한 사망을 일으키는 위험한 질병이다.

<5> 혈소판 감소증에 대하여 현재 가장 빈번히 사용되고 있는 치료법은 혈소판 수가 20,000개/ μ l 이상으로 유지되도록 혈소판을 수혈하는 것이다. 그러나, 이러한 방법은 혈소판 수혈에 필요한 혈액의 제공자가 부족하다는 문제점 이외에도 에이즈 바이러스 또는 간염 바이러스 등과 같은 혈액에서 유래한 감염원에 의한 감염 및 외래 혈소판의 수혈에 따른 면역반응의 유발 등과 같은 부작용이 있다.

<6> 따라서, 혈소판 조혈작용을 직접적으로 향진시킬 수 있는 물질을 개발하여, 이를 직접 환자에게 투여하거나, 다능성 조혈 간세포에 처리하여 혈소판으로 분화, 성장시켜 혈소판 수를 확보하는 것이 중요하다고 할 수 있다.

<7>

<8> 한편, 줄기세포는 인간의 몸을 구성하는 서로 다른 세포나 장기로 성장하는 일종의 모세포로, 간세포(幹細胞)라 불리기도 한다. 이 줄기세포에는 사람의 배아를 이용해 만들 수 있는 '배아줄기세포(복수기능줄기세포)'와 혈구세포를 끊임없이 만드는 골수세포와 같은 '성체줄기세포(다기능줄기세포)'가 있다. 성체줄기세포(Adult Stem cell)는 제대혈(태초혈액)이나 다 자란 성인의 골수와 혈액 등에서 추출해낸 것으로, 뼈와 간.혈액 등 구체적인 장기의 세포로 분화되기 직전의 원시세포다. 여기에는 조혈모세포(Hematopoietic Stem Cell)와 재생 의학의 재료로 각광받고 있는 중간엽줄기세포(Mesenchymal Stem Cell), 신경줄기세포(Neural stem cell) 등이 있다. 제대혈(태초혈액)은 조혈모세포를 다량 함유하고 있으며, 뼈속의 골수에서 발견되는 골수세포는 혈액 및 임파구를 생산할 수 있는 조혈모세포를 비롯하여 중간엽 줄기세포 등 여러 종류의 줄기세포를 가지고 있다. 이러한 줄기세포를 거핵구 및 혈소판으로 분화시킬 수 있는 물질을 개발하여, 이들 물질이나 이를 통해 분화된 혈소판을 혈소판 감소증 치료에 이용한다면, 환자의 면역반응이나 외부 오염원들을 배제시킬 수 있는 장점을 가질 수 있다.

<9> 이에, 본 발명자는 혈소판 조혈과 관련된 연구를 수행하던 중 본 발명의 화학식 1의 화합물이 CD34 양성 조혈모세포를 거핵구 및 혈소판으로 분화 유도하는데 효과적인 물질임을 밝혀내고, 본 발명을 완성하였다.

<10>

발명의 내용

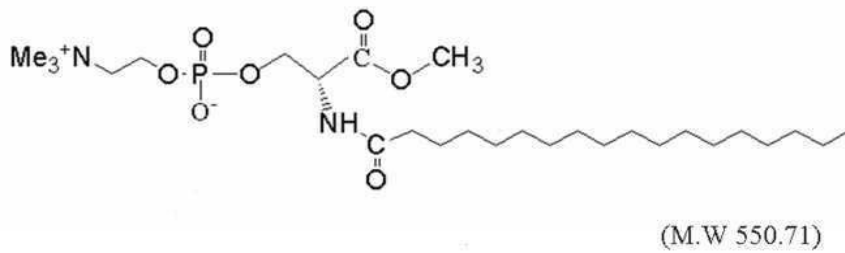
해결 하고자하는 과제

<11> 본 발명의 목적은 (a) CD34 양성 표면 마커를 가지는 조혈모세포를 OP9 세포와 공배양하는 단계; 및 (b) 화학식 1의 화합물을 첨가하는 단계를 포함하는, 조혈모세포를 거핵구 및 혈소판으로 분화유도하는 방법 및 이의 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<12> 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) CD34 양성 표면 마커를 가지는 조혈모세포를 OP9 세포와 공배양하는 단계; 및 (b) 화학식 1의 화합물을 첨가하는 단계를 포함하는 CD34 양성 조혈모세포를 거핵구 및 혈소판으로 분화유도하는 방법에 관한 것이다.

화학식 1



<13>

<14>

이하, 본 발명의 CD34 양성 조혈모세포를 거핵구 및 혈소판으로 분화유도하는 방법을 단계별로 설명한다.

<15>

본 발명에서 상기 단계 (a)는 CD34 양성 표면 마커를 가지는 조혈모세포를 OP9 세포와 공배양하는 단계로서 CD34+ 조혈모세포를 OP세포와 공배양시켜 거핵구 및 혈소판으로의 분화가 용이하도록 하는 단계이다.

<16>

본 발명에서 용어, "조혈모세포 (hematopoietic stem cell)"는 혈액을 구성하는 적혈구, 백혈구 및 혈소판 등의 혈액세포로 분화할수 있는 능력을 지닌 세포를 말한다. 조혈모세포는 미분화 상태에서 무한 증식능력(self-renewal capacity)과 더불어 특정한 분화유도 자극에 의해 다양한 혈액 세포로 분화될 수 있는 능력을 가진다. 본 발명의 조혈모세포는 인간(human), 원숭이(monkeys), 돼지(pigs), 말(horses), 소(cows), 양(sheeps), 개(dogs), 고양이(cats), 생쥐(mice), 토끼(rabbits) 등의 모든 동물로부터 유래할 수 있으며, 바람직하게는 인간 유래이며, 더욱 바람직하게는 인간의 골수, 말초혈액, 또는 제대혈 등에서 분리된 것일 수 있다.

<17>

또한, 본 발명의 조혈모세포는 CD34 양성 표면 마커를 가지는데, 여기서 'CD34 표면 마커'는 대표적인 원시 조혈 선조세포에 대한 마커로서, CD34 표면 마커를 가진다는 것은 세포가 CD34 항원 단백질을 발현한다는 것을 의미함과 동시에 조혈 선조세포임을 의미한다. CD34 항원은 분자량 116 kDa의 글리코포스포프로테인으로, 1번 염색체에 그 유전자가 존재하고 있으며, 정상 골수 세포의 1~2% 정도에서 발현되는데, 특히 초기 조혈 전구세포에서 흔히 발현된다. 이러한 CD34 양성('CD34+' 표기와 동일한 의미임) 조혈모세포는 대개 적혈구, 백혈구, 혈소판 등의 다양한 종류의 혈액세포로 분화가 가능하다.

<18>

본 발명에서 CD34 양성 표면 마커를 가지는 조혈모세포는 골수 또는 제대혈로부터 CD34+ 세포들을 직접 분리해서 사용하는 것이 바람직하며, 시판되는 인간 CD34+ 줄기 세포를 사용할 수도 있다. 골수 또는 제대혈로부터 CD34+ 조혈모세포를 분리하는 방법은 줄기세포액으로부터 목적의 표면 항원을 발현하고 있는 다능성 줄기세포를 수득하기 위해 사용되는 공지의 방법들인 소팅 기능을 가진 플로우 사이토미터를 사용한 FACS 법(Int. Immunol., 10(3):275, 1998), 자기비즈를 사용하는 방법, 다능성 줄기세포를 특이적으로 인식하는 항체를 사용한 패닝법(J. Immunol., 141(8):2797, 1998) 등을 이용할 수 있으며, 예를 들면, MACS 마그네토비드(magnetobead) 분리 시스템(Miltenyi Biotec GmbH Bergisch-Gladbach, Germany)을 사용하여 분리할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

<19>

본 발명에서 'OP9 세포'는 기조직(stromal) 세포로서, 발아기의(embryonic) 줄기세포가 다양한 계통(lineage)의 세포들을 만드는데 필요한 M-CSF(Macrophage-Colony stimulating factor)와 CSF-1(Colony Stimulating factor-1)가 부재되어 있으나, SCF(Stem Cell Factor)와 IL-6의 조혈세포로 분화 인자를 발현하는 세포를 말한다. F2(C57BL/6xC3H)-op/op 쥐의 신생 두개관에서 유래한 세포주는 OP9 세포의 예이다.

<20>

본 발명에서 용어 '공배양'은 다른 종류의 세포를 하나의 배양용기 내에서 함께 배양시킨다는 것을 뜻한다. 본 발명의 CD34 양성 조혈모세포 및 OP9 세포와의 공배양은 OP9 세포를 FBS를 포함하는 배양 배지에서 단일막으로 배양한 후, CD34 양성 표면 마커를 가지는 조혈모세포를 OP9 세포 위에 분주하여 함께 공배양하는 것이 바람직하다. 이때, OP9 세포는 배양 접시에 고루 분주, 배양되어 단일막 상태로 배양될 수 있도록 하는 것이 바람직하며, 예를 들면, 지름 40mm의 웰에 OP9 세포가 웰당 1×10^3 내지 1×10^7 개, 바람직하게는 웰당 1×10^4 내지 1×10^6 개를 6웰 배양 접시에 분주할 수 있다. 배양 시간은 OP9 세포가 배양접시의 바닥에 고루 분주되고, 단일막 상태로 될 수 있도록 18 내지 36시간, 바람직하게는 20 내지 28시간 배양할 수 있다.

<21>

본 발명에서 CD34+ 조혈모세포 배양에 사용되는 배지는 인 비트로(in vitro)에서 세포의 성장 및 생존을 지지할 수 있는, 당업계에 공지된 배양 배지를 사용할 수 있으며, 예를 들면, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI, F-10, F-12, α MEM(α Minimal

essential Medium), GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium), CCMM(cell culture minimum medium), Iscove's Modified Dulbecco's Medium 및 StemspanTM H3000 medium 등이 있으나, 이로 제한되지 않고 세포의 종류에 따라 배지 및 배양조건을 선택할 수 있다.

- <22> 본 발명의 구체적 실시예에서는 OP9 골수 지질 세포주를 웰당 1×10^5 개가 되도록 조절하여 6웰 배양접시에 분주하여 FBS, 페니실린/스트렙토마이신 및 탄산수소 나트륨이 공급된 α -MEM 배지에서 24시간 동안 배양한 후, 세포들이 단일막 상 상태로 고루 분포 되었는지 확인하고, CD34+ 조혈모세포를 웰당 3×10^5 개가 되도록 조절하여 각각의 웰 내 OP 세포 위에 분주하여 공배양시켰다.
- <23> 한편, 본 발명에서 상기 단계 (b)는 화학식 1의 화합물을 상기 단계(a)의 CD34 양성 조혈모세포에 첨가하여 배양함으로써, CD34 양성 조혈모세포를 거핵구 및 혈소판으로 분화유도하는 단계이다.
- <24> 본 발명의 화학식 1의 화합물은 N-스테로일-O-포스포콜린-D-세린 메틸 에스테르로서, 이의 제조방법은 대한민국 등록특허 제10-0398892호에 상세히 개시되어 있다. 본 발명에서 화학식 1의 화합물은 화합물 자체뿐만 아니라, CD34 양성 조혈모세포의 거핵구로의 분화능을 부여할 수 있는 범위 내에서, 화합물의 유도체를 포함하는 개념이다.
- <25> 용어 "분화"는 미분화세포가 추가의 발달 경로를 거쳐 특성화된 운명을 획득하는 과정을 가리키는 것으로, 본 발명에서는 미분화 상태의 CD34 양성 조혈모세포가 혈소판 생산력을 가지는 거핵구로 특성화되는 과정을 의미한다.
- <26> 본 발명에서 화학식 1의 화합물은 OP9 세포와의 공배양 상태인 CD34 양성 조혈모세포 위에 처리하는데, 상기 화합물의 배양액 내 농도는 CD34 양성 조혈모세포가 화합물에 의해 세포 독성을 나타내지 않는 범위 내에서, 거핵구로 분화될 수 있는 정도로 첨가할 수 있으며, 바람직하게는 10 내지 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 정도이며, 더욱 바람직하게는 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- <27> 또한, 본 발명의 단계 (b)에서 화학식 1의 화합물 이외에 조혈모세포를 거핵구 및 혈소판으로 분화시키는데 효과적인 공지의 물질을 추가로 첨가할 수 있다. 예를 들면, 인터루킨-3(IL-3), IL-6 및 IL-11 등의 사이토카인, 백혈병억제인자(LIF), 에리트로포이에틴(EPO), SCF(stem cell factor), 트롬보포이에틴(TPO), 및 메가컬트-C(megacult-C) 등을 첨가할 수 있다.
- <28> 한편, 본 발명의 단계(a) 및 단계(b)의 방법을 통해 CD34 양성 조혈모세포로부터 거핵구로 분화유도된 세포들은 거핵구의 생리학적 또는 면역학적 특징을 가지는데, 바람직하게는 거핵구 특이적인 표지 인자들의 유전자 발현 정도가 증가될 수 있다. 예를 들면, 거핵구에서 특이적으로 발현되는 수용체인 CD41 또는 CD61의 발현율이 증가된 특징을 가질 수 있다.
- <29> 또한, 본 발명의 방법에 의해 거핵구로 분화유도된 세포들은 혈소판 분비능을 가지는데, 예를 들면, 유사분열을 통한 배수체화 정도가 증대되어 다핵화되고, 세포의 크기가 증대되는 특징을 가질 수 있다. 또한, 이들 세포들은 혈소판이 유리되는 경계채널(demarcation channel)이 존재할 수 있다. 이러한 특징을 가지는 거핵구들은 이후 성숙과정이 진행되면서, 핵이 더욱더 소엽화하고 농축되며, 세포질은 양적으로 증가하고 더욱 호산성화 및 과립화되며, 최종적으로 성숙 세포 가장 자리에서 혈소판이 유리되게 된다.
- <30>
- <31> 본 발명의 구체적 실시예에서, CD34+ 조혈모세포에 화학식 1의 화합물과 조혈모세포 분화 유도물질로 알려진 CC100, CC200, IL-3, IL-6, TPO 및 SCF를 처리하여 분화유도시킨 결과, 화학식 1의 화합물로 처리된 세포는 세포질의 부피가 커지고 세포의 크기가 증가되어 거핵구와 유사한 형태학적 특징을 나타냈을 뿐만 아니라, 혈소판 분비능을 가지는 거핵구에 특이적으로 나타나는 특징인 유사분열을 통한 배수체화 정도가 증대되어 핵 수가 증가되는 결과를 확인하였다.
- <32> 또한, CD34+ 조혈모세포에 화학식 1의 화합물과 조혈모세포 분화 유도물질로 알려진 CC200 및 Megacult-C를 단독 또는 혼합하여 세포에 처리하여 분화를 유도한 결과, CC200이나 megacult-C 물질을 단독 처리했을 때에 비해 화학식 1의 화합물을 세포에 처리하여 분화시켰을 때, 거핵구 특이적 마커인 CD41 또는 CD61의 발현율이 높게 나타나는 것을 확인하였다. 이러한 결과들은 화학식 1의 화합물이 CD34+ 조혈모세포의 거핵구 분화능을 증대시켜 거핵구 및 혈소판으로의 분화를 효과적으로 유도한다는 것을 보여주는 것이다.
- <33> 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 함유하는, CD34 양성 표면 마커를 가지

는 조혈모세포를 거핵구 및 혈소판으로 분화유도하기 위한 조성물에 관한 것이다.

- <34> 본 발명의 거핵구 및 혈소판으로의 분화유도용 조성물은 CD34 양성 조혈모세포가 거핵구 및 혈소판으로의 분화능을 가지도록 하므로, 상기 조성물을 화학요법이나 방사선 요법 등에 의해 혈소판 형성능이 감소된 환자에게 직접 투여하여, 조혈세포의 혈소판 형성능을 향상시킴으로써, 혈소판 감소증 치료용 약제학적 조성물로서 이용될 수 있다.
- <35> 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 단계(a) 및 (b)를 포함하는 분화유도 방법을 통해 수득된 거핵구 및 혈소판을 포함하는 혈소판 감소증 치료제에 관한 것이다.
- <36> 본 발명의 방법으로 수득된 뛰어난 혈소판 생성능을 가지는 거핵구 및 이로부터 생성된 혈소판을 혈소판 감소증 치료를 위한 세포 치료제로 이용될 수 있다. 여기서 세포 치료제는 본 발명의 방법으로 수득된 거핵구 및 혈소판을 포함하는 약제학적 조성물을 포괄하는 의미이며, 이러한 조성물을 함유하는 약제학적 제제의 형태로 제공될 수 있다.
- <37> 본 발명의 약제학적 조성물은 제약학적으로 허용 가능한 하나 이상의 부형제, 예를 들면 충전제, 결합제, 붕해제, 유동 조절제, 윤활제, 당류, 감미제, 향료, 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 가용화제 및 완충제를 추가로 포함할 수 있다.
- <38> 또한, 이러한 약제학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 통상의 부형제 및 보조제를 포함하여 약학적 제제로 이용될 수 있으며, 이들의 비율 및 성질은 투여의 선택된 경로 및 표준의 약제학적 실행에 의해 결정된다. 본 발명의 약학적 조성물로 제조되는 약학적 제제는 생체 이용가능한 유효량으로 제형화하는 임의의 형태 또는 방식으로 환자에게 투여할 수 있다. 또한, 제형을 제조하는 당해 기술분야의 숙련가들은 치료되는 질환 상태, 질환의 단계, 환자의 연령, 성별 및 체중 등 기타 관련된 상황에 따라 적당한 형태 및 투여 방식을 용이하게 선택할 수 있다.
- <39> 본 발명에서 혈소판 감소와 관련된 질환은 백혈병, 골수 전이암(metastatic cancer), 혈액 및 골수 질환(예, aplastic anemia, primary myelofibrosis, myelodysplasia 등), 비타민 12 또는 엽산(folate) 부족, 또는 골수 손상에 의해 혈소판의 생산이 감소된 경우, 패혈증, 심장 판막 수술, 전신성 홍반성 루프스(S.L.E.), 림프종(lymphoma), 전염단핵구증(infectious mononucleosis) 등의 감염성 질환, 약물(예, 페니실린, 세파로스포린(cephalosporin), 티아지드(thiazide) 등)에 의해 혈소판이 파괴된 경우, 종양 또는 간경화(portal hypertension) 등으로 비장이 커짐으로써 혈소판 분포에 이상이 생긴 경우 등의 혈소판 감소증(thrombocytopenia)을 모두 포함한다.

효 과

- <40> 상기에서 기술한 바와 같이, OP9 세포와 CD34 양성 조혈모세포를 공배양하고, 화학식 1의 화합물을 처리함으로써 CD34 양성 조혈모세포의 거핵구 및 혈소판으로의 분화를 효과적으로 유도할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <41> 이하 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 다만, 이들 실시예는 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<42> 제조예 1. 화학식 1의 화합물의 제조

<43> 1-1. D-세린 메틸 에스테르 염산염의 합성

- <44> D-세린 47.7mmol을 메탄올 476ml에 용해시키고 염산가스로 포화시켜 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 용매를 증발시킨 후 메탄올과 에테르로 재결정하여 목적 화합물 L-세린 메틸 에스테르 염산염(수율:99%, 녹는점: 163 - 164℃, $[\alpha]_D^{25} = -4.3(c\ 1.8, EtOH)$)을 수득하였다. 합성된 화합물의 구조를 FTIR, 1H -NMR 및 ^{13}C -NMR에 의해 확인하였다.

- <45> FTIR (KBr, cm^{-1}) : 3349 O-H 피크, 2943 sp^3 C-H 피크, 1749 에스테르 카보닐 피크

- <46> 1H NMR(CD_3OD) : δ 4.07~4.10(1H, t, $J=3.9$ Hz), 3.38~3.93(2H, m), 3.79(3H, s) 메톡시 탄소 양성자(s: 단일선, d: 이중선, t: 삼중선, m: 다중선)

<47> ^{13}C NMR(CD3OD): δ 52.69, 55.10, 59.67, 168.37 카보닐 피크

<48> **1-2. N-스테로일-D-세린 메틸 에스테르의 합성**

<49> 상기 1-1에 기술된 화합물(1eq)을 디클로로메탄 257ml에 용해시키고 온도를 0℃로 저하시켰다. 여기에 N-메틸 몰포린(2.1eq), 스테아르산(1.1eq)과 1-히드록시벤조트리아졸(1.1eq), 1,3-디시클로헥실카르보디이미드(1.1eq)를 순차적으로 가하여 1시간 반응시킨 후 상온으로 하여 3시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 부산물인 디시클로우레아를 감압하에 거른 후 남은 용액을 농축시켰다. 칼럼 크로마토그래피(디클로로메탄: 아세톤=9: 1 → 7: 1)로 정제하여 목적 화합물 N-스테로일-D-세린 메틸 에스테르를 합성하였다(수율: 88%, 녹는점: 82-83℃, $[\alpha]^{25}_{\text{D}} = -15.7(\text{c } 2.0, \text{CHCl}_3)$). 합성된 화합물의 구조를 FTIR, ^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR에 의해 확인하였다.

<50> FTIR (KBr, cm^{-1}): 3310 O-H 피크, 2919 sp^3 C-H 피크, 1720 에스테르 카보닐 피크, 1650 아마이드 카보닐 피크

<51> ^1H NMR(CDC13): δ 0.83-0.88(3H, m) 스테아르산 말단 탄소 양성자, 1.23(28H, s) 탄화수소 양성자, 1.60-1.63(2H, m) 카보닐- β -탄소 양성자, 2.21-2.28 (2H, t, $J=7.6$ Hz), 2.52(1H, m) 히드록시기 피크, 3.78(3H, s) 메톡시 탄소 양성자, 3.93-3.94 (2H, d, $J=3.4\text{Hz}$), 4.64-4.70(1H, m), 6.36-6.39(1H, d, $J=6.5\text{Hz}$) 아마이드 질소 양성자

<52> ^{13}C NMR(CDC13): δ 14.1 스테아르산 말단 탄소, 22.7 탄화수소 탄소, 25.5 카보닐- β -탄소, 29.2, 29.3, 29.5, 29.7, 31.9

<53> 탄화수소, 36.5, 52.8 메톡시 탄소, 54.6, 63.7, 171.0 카보닐 피크, 173.8 카보닐 피크

<54> **1-3. N-스테로일-O-포스포콜린-D-세린 메틸 에스테르의 합성**

<55> 상기 1-2에 기술된 화합물(1eq)을 테트라히드로퓨란 260ml에 용해시키고 온도를 -10℃로 저하시켰다. 여기에 N-디이소프로필에틸아민(4eq)와 에틸렌클로로포스파이트(3eq)를 가하여 1시간 반응시켰다. 여기에 브롬(3eq)을 가하고 15분 반응시킨 후 물 86.6ml를 가하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 분리한 유기층을 증발시키고 디클로로메탄과 아세톤으로 재결정하였다. 이것을 0℃에서 클로로포름/이소프로판올/아세토니트릴(3:5:5, v/v/v) 87.5ml에 다시 용해시키고 40% 수용액상 트리메틸아민(3eq)를 가한 후 11시간 동안 반응시켰다. 칼럼 크로마토그래피(디클로로메탄: 메탄올: 물 = 3: 1: 0 → 2: 1: 0.1)로 정제하여 목적 화합물 N-스테로일-O-포스포콜린-D-세린 메틸 에스테르를 합성하였다(수율: 12%, $[\alpha]^{25}_{\text{D}} = +8.8(\text{c } 2.0, \text{MeOH})$). 합성된 화합물의 구조를 ^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR에 의해 확인하였다.

<56> ^1H NMR(CDC13): δ 0.90-0.93 (3H, m) 스테아르산 말단 탄소 양성자, 1.31(28H, s) 탄화수소 양성자, 1.63-1.65(2H, m) 카보닐- β -탄소 양성자, 2.27-2.33 (2H, t, $J=7.2$ Hz), 3.25(9H, s) 트리메틸아민 탄소 양성자, 3.65-3.67(2H, m), 3.77(3H, s) 메톡시 피크, 4.15-4.19(1H, m), 4.21-4.28(3H, m), 4.68(1H, m);

<57> ^{13}C NMR(CDC13): δ 13.5 스테아르산 말단 탄소, 22.8 탄화수소 탄소, 25.9 카보닐- β -탄소, 29.3, 29.5, 29.8, 32.1, 35.7, 51.9 메톡시 탄소, 53.7, 59.5, 65.1, 66.4, 170.6 카보닐 피크, 175.4 카보닐 피크

<58> **실시예 1. OP 세포 및 CD34+ 조혈모세포의 공배양**

<59> OP9 골수 기질 세포는 ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, MD)로부터 구입하였다. 체대혈 유래 CD34+ 조혈모세포 및 CD34+ 세포 배양을 위한 배지 StemSpan™ H3000는 STEMCELL Technologies Inc.(벤쿠버, 캐나다)로부터 구입하였다.

<60> OP9 골수 기질 세포주를 웰당 1×10^5 개가 되도록 조절하여 6웰 배양접시에 분주하여 20% 열-불활성화된 FBS, 0.5% 페니실린/스트렙토마이신 및 1.5 g/L 탄산수소 나트륨이 공급된 α -MEM 배지에서 세포들이 단일막 상태로 되도록 24시간 동안 배양하였다. OP 세포가 바닥에 단일막 상태로 고루 분주 되었는지를 확인하고, 배지를 CD34+ 조혈모세포 배양을 위한 StemSpan™ H3000로 바꿔준 후, CD34+ 조혈모세포를 웰당 3×10^5 개가 되도록 조절하여 각각의 웰 내 OP 세포 위에 분주한다.

<61> **실시예 2. 화학식 1의 화합물이 처리된 CD34+ 조혈모세포의 형태 변화 및 배수체화**

- <62> 제대혈 유래 CD34+ 조혈모세포가 화학식 1의 화합물 처리 시에 거핵구 및 혈소판의 특징적 형태로 분화하는지 확인하기 위해, 화학식 1의 화합물과 조혈모세포 분화 유도물질로 알려진 CC100, CC200, IL-3, IL-6, TPO 및 SCF를 세포에 처리하여 CD34+ 조혈모세포의 형태 변화 및 배수체화 정도를 실험하였다.
- <63> 상기 실시예 1을 통해 OP9 세포와 공배양된 CD34+ 조혈모세포 위에 각각의 물질들을 처리하였다. 조혈모세포 분화 유도물질 각각은 CC100(rhFlt-3 ligand 100ng/ml, SCF 100ng/ml, IL-3 20ng/ml, IL-6 20ng/ml), CC200(rhTPO 50ng/ml, rhSCF 50ng/ml, IL-3 10ng/ml), Megacult-C(TPO 5ng/ml, IL-3 1ng/ml, IL-6 2ng/ml), IL-3는 10ng/ml, IL-6는 20ng/ml, SCF는 50ng/ml, (R)-NALPCE는 35ug/ml의 농도로 배양 배지 내에 처리하였다.
- <64> 8일 후, 세포를 200배율로 사진 촬영하여 세포의 형태를 관찰하였다(도 1).
- <65> 또한, 세포의 배수체화 정도를 알아보기 위해 FACS(유세포 분류기) 분석하였다. 상기 세포를 모아 0.1% 사포닌을 포함하는 1x PBS에 재현탁시켰고, 10 mg/mL RNase A 및 프로피디움 요오드를 첨가하였다. 그 후에, 세포는 30분 동안 실온에서 배양하였다. 그리고 세포는 FACS 칼리부 유세포 분류기(FACS calibur flow cytometer) 및 Cell quest 소프트웨어로 분석하였다. 결과는 평균 $\pm$ SD (n = 3)로 나타내었다. 유사한 결과가 3회의 독립적인 실험으로부터 얻어졌다(도 1).
- <66> 도 1에서 보듯이, 다른 분화 유도 물질들에 비해 화학식 1의 화합물이 처리된 세포는 세포질의 부피가 커지고 세포의 크기가 증가되는 등의 거핵구와 유사한 형태학적 특징을 나타낼 뿐만 아니라, 혈소판 분비능을 가지는 거핵구에 특이적으로 나타나는 특징인 유사분열을 통한 배수체화 정도가 증대되어 핵 수가 증가되는 결과를 나타냈다.
- <67> 또한, 화학식 1의 화합물은 다른 분화 유도제들에 의한 거핵구 분화를 더욱 촉진시키는 것으로 나타났는데, 특히 CC200을 단독 처리하거나, 일부 자극을 이용한 분화 유도제인 megacult-C를 단독 처리했을 때에 비해 화학식 1의 화합물을 함께 처리했을 때 거핵구 및 혈소판으로의 분화가 더욱 촉진되는 결과를 보였다.
- <68> **실시예 3. 화학식 1의 화합물이 처리된 CD34+ 조혈모세포의 거핵구 및 혈소판으로의 분화 확인**
- <69> 제대혈 유래 CD34+ 조혈모세포가 화학식 1의 화합물 처리에 의해 거핵구 및 혈소판으로 분화하는지 확인하기 위해, 화학식 1의 화합물과 조혈모세포 분화 유도물질로 알려진 CC200 및 Megacult-C를 단독으로 또는 혼합하여 세포에 처리하여 분화를 유도한 후, 거핵구 특이적 마커인 CD41 또는 CD61의 발현 여부를 확인하였다.
- <70> 상기 실시예 1을 통해 OP9 세포와 공배양된 CD34+ 조혈모세포 위에 각각의 분화유도 물질을 CC200(rhTPO 50ng/ml, rhSCF 50ng/ml, IL-3 10ng/ml), Megacult-C(TPO 5ng/ml, (R)-NALPCE는 35ug/ml의 농도로 배양 배지 내에 처리하였다.
- <71> 8일 후 상기 배양액을 원심분리(1,000 rpm, 5분)하고 세포 덩어리를 PBS 완충용액으로 3회 씻은 후, 0.01% BSA가 첨가된 200 μ l의 PBS 완충용액에 20 μ l FITC-결합 마우스 항-인간 단일클론 41 항체(Fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated mouse anti-human monoclonal CD41 antibody, DAKOCycomation, Denmark) 또는 20 μ l FITC-결합 마우스 항-인간 단일클론 61 항체(Fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated mouse anti-human monoclonal CD61 antibody, DAKOCycomation, Denmark)를 처리하고 37°C에서 30분 동안 회전시켜 고루 형광 염색이 되도록 하였다. 염색이 끝나면 상기 형광 염색된 용액을 원심분리(1,000 rpm, 10분)한 다음, 세포 덩어리를 0.01% (BSA)이 첨가된 PBS 완충용액으로 3회 씻고, 셀퀘스트(Cellquest) 프로그램을 이용하여 유세포분석기(fluorescence-activated cell sorter, FACS Aria)로 형광의 염색된 정도를 측정하였다. 결과는 평균 $\pm$ SD (n = 3)로 나타내었다. 유사한 결과가 3회의 독립적인 실험으로부터 얻어졌다(도 2).
- <72> 도 2에서 보듯이, CC200이나 megacult-C 물질에 비해 화학식 1의 화합물을 세포에 처리하여 분화시켰을 때, 거핵구 특이적 마커인 CD41 또는 CD61의 발현율이 높게 나타났으며, CC200이나 megacult-C 물질을 단독처리시에 비해 화학식 1의 화합물을 함께 처리했을 때, CD41 또는 CD61의 발현율이 높게 나타났다. 이는 화학식 1의 화합물이 CD34+ 조혈모세포의 거핵구 및 혈소판으로의 분화능을 증대시키는 유용한 물질이라는 것을 보여주는 결과이다.

산업이용 가능성

- <73> 본 발명의 화학식 1의 화합물을 이용한 CD34 양성 조혈모세포를 거핵구 및 혈소판으로 분화유도하는 방법은 CD34 양성 조혈모세포의 거핵구 분화능을 증대시켜 거핵구 및 혈소판으로의 분화를 효과적으로 유도하므로, 화

학식 1의 화합물이나 이러한 방법으로 분화된 거핵구 및 혈소판을 약학적 제제의 형태로 제조하여 혈소판 감소 증 치료에 효율적으로 이용할 수 있다.

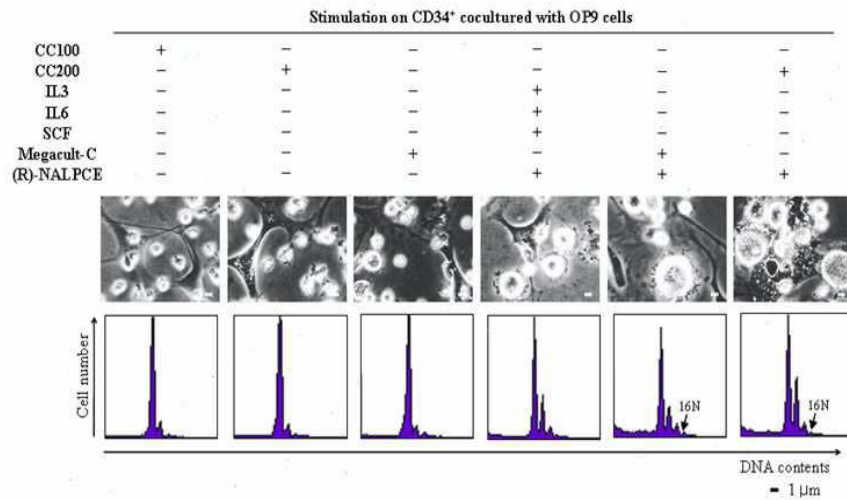
도면의 간단한 설명

<74> 도 1은 CD34⁺ 세포의 형태 변화를 관찰하기 위한 사진촬영 결과 및 배수체화정도를 측정하기 위한 FACS 분석 결과를 나타낸 것이다.

<75> 도 2는 OP9 골수 기질 세포와 공동배양된 CD34⁺ 세포의 CD41 및 CD61 발현 정도를 형광-활성화된 세포 분리기로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도면

도면1



도면2

