



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. C12N 5/08 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2007년03월02일 10-0688261 2007년02월22일
--	-------------------------------------	--

(21) 출원번호 (22) 출원일자 심사청구일자	10-2005-0110104 2005년11월17일 2005년11월17일	(65) 공개번호 (43) 공개일자
----------------------------------	---	------------------------

(73) 특허권자 이화여자대학교 산학협력단
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자 전길자
서울시 영등포구 여의도동 광장 A 10-506

배운수
서울시 양천구 신정6동 목동신시가지Apt 1401-105

한소엽
서울시 동작구 사당3동 169-8 대림 A 6-1006

임진경
서울시 마포구 성산동 450 시영A 7-1106

조현진
서울시 마포구 창전동 신촌 태영아파트 109-1702

(74) 대리인 손민
허은순

(56) 선행기술조사문헌
Mol Cell Biol Vol. 6:1847-1850 (1986) Cell Cycle 3(6):722-724
* 심사관에 의하여 인용된 문헌

심사관 : 안규정

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 인간골수백혈병세포주에서 거핵구세포 및 혈소판으로의 분화 유도 방법

(57) 요약

본 발명은 (a) OP9 세포를 배양하는 단계; (b) 인간골수백혈병세포주를 OP9 세포 위에 분주하는 단계; 및 (c) 화학식 1의 화합물((R)-NALPCE 화합물)을 첨가하는 단계를 포함하는 인간골수백혈병세포주를 거핵구세포 및 혈소판으로 분화 유도하는 방법에 관한 것이다.

대표도

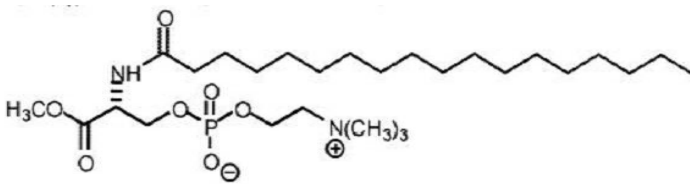
도 7

특허청구의 범위

청구항 1.

(a) OP9 세포를 배양하는 단계; (b) 인간골수백혈병세포주를 OP9 세포 위에 분주하는 단계; 및 (c) 하기 화학식 1의 화합물을 첨가하는 단계를 포함하는 인간골수백혈병세포주를 거핵구세포로 분화 유도하는 방법.

화학식 1



청구항 2.

제1항에 있어서, 단계 (a)에서 OP9 세포를 18 내지 36시간 동안 배양하는 방법.

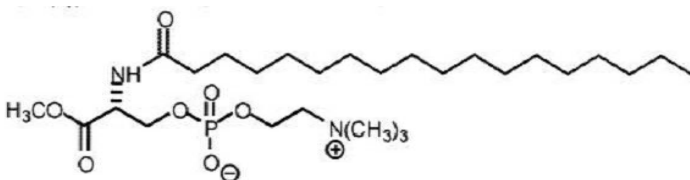
청구항 3.

제1항에 있어서, 화학식 1의 화합물의 농도가 10 내지 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 방법.

청구항 4.

OP9 세포 및 하기 화학식 1의 화합물을 포함하는 인간골수백혈병세포주의 거핵구세포(megakaryocyte)로의 분화 유도 조성물.

화학식 1



명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 (a) OP9 세포를 배양하는 단계; (b) 인간골수백혈병세포주를 OP9 세포 위에 분주하는 단계; 및 (c) 화학식 1의 화합물((R)-NALPCE 화합물)을 첨가하는 단계를 포함하는 인간골수백혈병세포주를 거대핵세포(거핵구세포) 및 혈소판으로 분화 유도하는 방법에 관한 것이다.

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. 성숙 과정이 진행되면서, 핵이 더욱 더 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).

혈소판은 혈액의 응고나 지혈작용에 중요한 역할을 하는데, 지름이 2 내지 3 μ m이며, 혈액 1mm² 속에 약 30만 내지 50만 개 들어 있다. 점조성이 있고 형상은 조건에 따라 변한다. 혈소판이 부족하면 출혈되기 쉽고, 특히 혈소판 감소증이 문제된다.

최근 과학기술의 진보와 더불어 현대 의학이 눈부시게 발달되었음에도 불구하고 현대인의 다양한 생활환경과 식생활의 변화 및 노령화 등 여러 가지 요인으로 인하여 새로운 난치병과 성인병이 꾸준히 증가하는 추세이다. 그 중에서도 현재 대한민국의 제1위의 사망 원인인 암 질환은 매년 증가하고 있다. 혈액과 관련된 암의 치료 목적으로 사용되는 화학요법 및 방사선 치료요법 등은 혈액관련 암세포 뿐만 아니라 일반 정성골수세포, 특히 조혈, 면역기능을 조절하는 조혈세포도 아울러 손상시켜 인체 내의 조혈기능과 면역기능을 마비시키는 것이 심각한 문제점으로 지적되어 오고 있다. 이러한 심각한 골수세포의 손상으로 인한 백혈구나 혈소판의 감소는 면역기능의 마비로 이어지며, 곧 사망하게 된다. 따라서, 백혈병, 재생불량성 빈혈, 선천성 간혈적 백혈구 감소증, 선천성 면역 조혈모세포 결여증, 악성혈액질환 등 혈액 관련 암 질환에서 조혈모세포원을 촉진 성장시켜 저하된 혈액세포의 조혈 면역기능을 향상시킬 수 있는 신물질 개발의 필요성이 절실히 요구되는 실정이다.

이에 본 발명자는 혈액세포의 조혈 면역기능과 관련된 연구를 수행하는 중 본 발명의 화학식 1의 화합물 ((R)-NALPCE) 및 OP9 세포를 이용하여 인간골수백혈병세포주의 거핵구세포 및 혈소판으로의 분화 유도능이 뛰어난 것을 밝혀내고, 본 발명에 이르게 되었다.

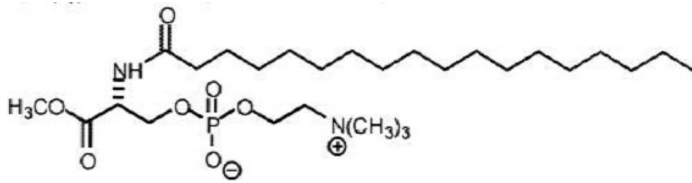
발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 (a) OP9 세포를 배양하는 단계; (b) 인간골수백혈병세포주를 OP9 세포 위에 분주하는 단계; 및 (c) 하기 화학식 1의 화합물을 첨가하는 단계를 포함하는 인간골수백혈병세포주를 거핵구세포 및 혈소판으로 분화 유도하는 방법 및 이의 조성물을 제공하기 위함이다.

발명의 구성

하나의 양태로서, 본 발명은 (a) OP9 세포를 배양하는 단계; (b) 인간골수백혈병세포주를 OP9 세포 위에 분주하는 단계; 및 (c) 하기 화학식 1의 화합물을 첨가하는 단계를 포함하는 인간골수백혈병세포주를 거대핵(거핵구)세포 및 혈소판으로 분화 유도하는 방법에 관한 것이다.

화학식 1



본 발명의 OP9 세포는 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.

본 발명에서 용어 "인간골수백혈병세포주"는 혈액 줄기세포(blood stem cell), 즉 골수성 줄기세포로 분화가 가능한 전구세포를 의미한다. 이 세포주는 단핵백혈구(monocyte), 호중구(neutrophil), 호산성구(eosinophil), 적혈구(erythrocyte), 대식세포(macrophage), 거핵구(거대핵)세포(megakaryocyte), 혈소판(thrombocyte)으로 분화가 가능한 세포이다. 구체적 실시에서 인간만성골수백혈병세포주의 하나인 K562 세포이다.

본 발명에서 용어 "분화"는 혈소판을 생산하는 능력이 있는 거핵구(거대핵)세포의 증가된 양이 인간골수백혈병세포주에서 유래되는 것을 의미한다.

본 발명의 화학식 1의 화합물(이하, (R)-NALPCE라 한다)은 *N*-스테로일-*O*-포스포콜린-*D*-세린 메틸 에스테르로서, 이의 제조방법은 대한민국 등록특허 제10-0398892호에 상세히 개시되어 있다.

인간골수백혈병세포주의 분화를 유도하는 물질로서 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate), TPA(12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate), 포볼 디부티레이트(phorbol dibutyrate), 갱글리오사이드 GM 3 및 (R)-NALPCE 등이 공지되어 있으며, 특히 PMA는 상기 인간골수백혈병세포주의 거핵아세포(megakaryoblast)로의 분화 초기단계에 관여하는 물질로서 널리 알려져 있으며, 가장 많이 사용되고 있는 물질이다. 이들 물질 중 PMA 화합물과 (R)-NALPCE 화합물의 인간골수백혈병세포주의 거핵구로의 분화능을 비교한 구체적 실시에서, 배양액으로 (R)-NALPCE 화합물이 존재하는 경우보다 PMA 화합물이 존재하는 경우 거핵구에 특이적인 수용체인 CD41 양성 세포 등의 발현률이 보다 우수하였다. 그러나, (R)-NALPCE 화합물이 OP9 세포와 함께 존재하는 경우에는 OP9 세포가 존재하지 않고 (R)-NALPCE 화합물이 단독으로 존재하는 경우보다 거핵구세포에 특이적인 수용체인 CD41 또는 CD61 양성 세포의 발현율이 5 내지 15% 이상 증가한 것으로 나타나 PMA 화합물의 분화유도능과 유사하였다. 특히, PMA 화합물에 의해 분화유도된 거핵구세포는 혈소판을 분비하지 못함에 비하여 본 발명에 의하여 분화유도된 거핵구세포는 다량의 혈소판을 분비하며, 이들 분비된 혈소판은 혈액 내의 혈소판과 형태학적 및 기능적으로 유사함을 나타내었다.

상기한 결과는, 본 발명의 OP9 세포 및 (R)-NALPCE 화합물을 함께 사용하는 경우에, 종래의 K562 세포 등의 인간골수백혈병세포주의 거핵구세포로의 분화를 유도하는 물질로 널리 알려진 PMA 화합물의 분화유도 능력과 유사한 우수한 분화유도 능력이 있으며, 본 발명에 의하여 다량으로 분화유도된 거핵구세포는 PMA 화합물에 의해 분화유도된 거핵구세포와 달리 혈소판을 분비할 수 있고, 이들 분비된 혈소판은 혈액 내의 혈소판과 유사한 특징을 가지고 있어 혈소판 감소증 등의 치료 목적에 경제적으로 이용할 수 있음을 의미한다.

하나의 구체적인 양태로서, (a) OP9 세포를 배양하는 단계; (b) 인간골수백혈병세포주를 OP9 세포 위에 분주하는 단계; 및 (c) 하기 화학식 1의 화합물을 첨가하는 단계를 포함하는 인간골수백혈병세포주를 거핵구세포 및 혈소판으로 분화 유도하는 방법에 관한 것이다.

상기 분화 유도 방법의 (a) 단계에서 OP9 세포는 배양접시에 고루 배양되도록 분주한다. 구체적 실시에서 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 배양접시에 분주하고, 이를 18 내지 36시간 배양, 바람직하게는 20 내지 28시간 배양하여 OP9 세포가 배양접시의 바닥에 고루 분주되도록 한다.

상기 분화 유도 방법의 (b) 단계에서 인간골수백혈병세포주를 OP9 세포가 고르게 분주되어 있는 배양접시에 분주한다. 인간골수백혈병세포주는 바람직하게 K562 세포이다.

상기 분화 유도 방법 중 (c) 단계에서 (R)-NALPCE 화합물을 상기 인간골수백혈병세포주 위에 처리한다. (R)-NALPCE 화합물은 농도가 5 내지 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이며, 바람직하게는 10 내지 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이다.

다른 하나의 양태로서, 본 발명은 OP9 세포 및 (R)-NALPCE 화합물을 포함하는 인간골수백혈병세포주의 거핵구세포(megakaryocyte) 및 혈소판으로의 분화 유도 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 분화 유도 방법에 의하여 분화유도된 거핵구세포가 분비하는 혈소판을 혈소판이 감소된 환자의 치료에 이용할 수 있다.

백혈병, 골수 전이암(metastatic cancer), 혈액 및 골수 질환(예, aplitic 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), 만성림프성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia), 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) 등에 본 발명에 의하여 분화유도된 거핵구세포에서 분비된 혈소판을 공지된 방법에 의하여 치료할 수 있다.

이하, 본 발명을 하기 실시예를 참조하여 더욱 구체적으로 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실예 1 : 화학식 1 화합물((R)-NALPCE)의 제조

1-1. D-세린 메틸 에스테르 염산염의 합성

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°C, $[\alpha]_D^{25} = -4.3(c 1.8, \text{EtOH})$)을 수득하였다. 합성된 화합물의 구조를 FTIR, $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 에 의해 확인하였다.

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

$^1\text{H NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: 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)

$^{13}\text{C NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 52.69, 55.10, 59.67, 168.37 카보닐 피크

1-2. N-스테로일-D-세린 메틸 에스테르의 합성

상기 1-1에 기술된 화합물(1eq)을 디클로로메탄 257mL에 용해시키고 온도를 0°C로 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 반응시켜다. 반응이 끝난 후 부산물인 디시클로우레아를 감압하에 거른 후 남은 용액을 농축시켰다. 칼럼 크로마토그래피(디클로로메탄: 아세톤=9: 1 $\rightarrow$ 7: 1)로 정제하여 목적 화합물 N-스테로일-D-세린 메틸 에스테르를 합성하였다(수율: 88%, 녹는점: 82-83°C, $[\alpha]_D^{25} = -15.7(c 2.0, \text{CHCl}_3)$). 합성된 화합물의 구조를 FTIR, $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 에 의해 확인하였다.

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

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: 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, $J=6.5\text{Hz}$) 아미드 질소 양성자

^{13}C NMR(CDCl_3): 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 탄화수소, 36.5, 52.8 메톡시 탄소, 54.6, 63.7, 171.0 카보닐 피크, 173.8 카보닐 피크

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

상기 1-2에 기술된 화합물(1eq)을 테트라히드로퓨란 260ml에 용해시키고 온도를 -10°C 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°C 에서 클로로포름/이소프로판올/아세트니트릴(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 $\rightarrow$ 2: 1: 0.1)로 정제하여 목적 화합물 *N*-스테로일-*O*-포스포콜린-*D*-세린 메틸 에스테르를 합성하였다 (수율: 12%, $[\alpha]_D^{25} = +8.8$ (c 2.0, MeOH)). 합성된 화합물의 구조를 ^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR에 의해 확인하였다.

^1H NMR(CDCl_3): 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);

^{13}C NMR(CDCl_3): 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

실험예 2 : 화합물 (R)-NALPCE의 세포 독성 실험

화합물 (R)-NALPCE가 세포에 독성을 미치는지 여부를 확인하기 위하여 인간만성골수성백혈병세포주인 K562세포에서 MTT (3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드) 분석을 시행하였다. K562 세포를 웰당 4×10^4 개가 되도록 조절하여 96웰 배양접시에 분주하고, 상기 분주한 세포에 화합물 (R)-NALPCE를 농도 의존적으로 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 배양 48시간 후에 MTT 용액을 각 웰에 $20\mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. 4시간 동안 37°C 에서 배양한 후 20% 소듐도데실설페이트(SDS) 용액(엔,엔-디메틸포름아미드와 증류수를 증류수를 1:1로 섞은 용액에 녹임)을 처리하고 16시간 동안 37°C 에서 항온한 후, 효소면역분석 리더(ELISA reader, Bio-Tek Instrument, Winiiski, VT)를 사용하여 파장 570nm에서 측정하였다. 이상의 실험을 3회 반복하였다. 이에 대한 결과가 도 1에 나타나 있다.

도 1에 나타난 바와 같이, 화합물 (R)-NALPCE는 인간골수백혈병세포주 K562세포에서 농도 10 내지 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하여도 세포 독성이 나타나지 않았다.

실험예 3 : 화합물 (R)-NALPCE에 의한 세포 성장 곡선

화합물 (R)-NALPCE가 세포의 성장에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 인간골수백혈병세포주인 K562 세포의 성장 곡선을 측정하였다. 상기 세포를 웰당 1×10^5 개가 되도록 조절하여 6웰 배양접시에 분주하고, 상기 분주한 세포에 화합물 (R)-NALPCE를 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 후 4일 동안 매일 세포수를 트리판 블루로 염색하여 측정하였다. 이에 대한 결과가 도 2에 나타나 있다.

거핵구로의 세포 분화가 진행되면 일반적인 세포증식과는 다른 성장 곡선을 보이게 되는데, 일반적으로 세포가 증식할 때 일어나는 세포질 분열과는 달리 거핵구로 분화가 진행될 때는 세포질 분열이 저지되고 핵내 유사분열이 진행되어 상대적으로 낮은 세포 성장 곡선을 갖는 것을 알 수 있었다.

실험예 4 : 화합물 (R)-NALPCE와 PMA의 세포 분화 비교 실험

K562 세포를 웰당 2×10^5 개가 되도록 조절하여 6웰 배양접시에 분주하고, 상기 분주한 세포에 화합물 (R)-NALPCE를 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 그리고 12-포볼미리스테이트-13-아세테이트(12-phorbol myristate-13-acetate, PMA, Calbiochem.)를 30nM 처리한 후 4일 동안 배양하였다. 상기 배양액을 원심분리(1,000 rpm, 10분)한 다음, 세포 덩어리를 0.01% 보바인

시럼 알부민(BSA)이 첨가된 PBS 완충용액으로 3회 씻고, 200 μ l의 0.01% 보바인 시럼 알부민(BSA)이 첨가된 PBS 완충용액에 10 μ l anti-CD41-플로레세인-5-이소싸이오시아네이트(fluorescein-5-isothiocyanate, FITC, Dako Chemicals, Carpinteria, CA), 20 μ l anti-CD16-사이-크롬(Cy-Chrome, Cy, BD Pharmingen), 10 μ l anti-클라이코포린 ACD235a-피코에리스틴(phycoerythrin, PE, Dako Chemicals, Carpinteria, CA), 20 μ l anti-CD14-알로피코시아닌(allophycocyanin, APC, BD pharmingen)을 처리하고 4℃에서 50분 동안 회전시켜 고루 형광 염색이 되도록 하였다. 염색이 끝나면 상기 형광 염색된 용액을 원심분리(1,000 rpm, 10분)한 다음, 세포 덩어리를 0.01% 보바인 시럼 알부민(BSA)이 첨가된 PBS 완충용액으로 3회 씻고, 셀렉스트(Cellquest) 프로그램을 이용하여 유세포분석기(fluorescence-activated cell sorter, FACS Aria)로 형광의 염색된 정도를 측정하였다. 이에 대한 결과가 도 3에 나타나 있다.

도 3에 나타난 바와 같이, PMA를 처리하였을 때 CD41(거핵구 특이적인 수용체), CD16(호중구 특이적인 수용체), CD14(단핵백혈구 특이적인 수용체)가 발현되었으며, 특히 CD41의 발현이 크게 증가하였다. 또한, (R)-NALPCE를 K562 세포에 처리한 경우에 CD41과 CD16 수용체가 특이적으로 발현되었다.

실험예 5 : 화합물 (R)-NALPCE에 의한 거핵구로의 분화 실험- 거핵구 특이적인 수용체 이용

K562 세포를 웰당 2×10^5 개가 되도록 조절하여 6웰 배양접시에 분주하고, 상기 분주한 세포에 화합물 (R)-NALPCE를 40 μ g/ml 처리한 후 일별 의존적으로 4일 동안 배양하였다. 상기 배양액을 원심분리(1,000 rpm, 5분)한 다음, 세포 덩어리를 0.01% 보바인 시럼 알부민(BSA)이 첨가된 PBS 완충용액으로 3회 씻었다. 200 μ l의 0.01% 보바인 시럼 알부민(BSA)이 첨가된 PBS 완충용액에 10 μ l anti-CD41-플로레세인-5-이소싸이오시아네이트(fluorescein-5-isothiocyanate, FITC, Dako Chemicals, Carpinteria, CA) 또는 20 μ l anti-CD61-피코에리스틴(phycoerythrin, PE, BD Pharmingen)을 처리하고 4℃에서 50분 동안 회전시켜 고루 형광 염색이 되도록 하였다. 염색이 끝나면 상기 형광 염색된 용액을 원심분리(1,000 rpm, 10분)한 다음, 세포 덩어리를 0.01% 보바인 시럼 알부민(BSA)이 첨가된 PBS 완충용액으로 3회 씻고, 셀렉스트(Cellquest) 프로그램을 이용하여 유세포분석기(fluorescence-activated cell sorter, FACS Aria)로 형광의 염색된 정도를 측정하였다. 이에 대한 결과가 도 4 및 도 5에 나타나 있다.

CD41과 CD61은 K562 세포가 거핵구로 분화될 때 특이적으로 발현되는 수용체로서, (R)-NALPCE를 처리한 경우 일별 의존적으로 CD41과 CD61 수용체의 발현이 증가되었다.

실험예 6 : 화합물 (R)-NALPCE와 OP9 세포의 존재 여부에 따른 거핵구 분화 결과

OP9 세포를 웰당 1×10^5 개가 되도록 조절하여 6웰 배양접시에 분주하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 OP9 세포가 배양접시의 바닥에 고루 분주된 것을 확인하고, K562 세포를 웰당 1×10^5 개가 되도록 조절하여 6웰 배양접시에 분주한 후, 상기 분주한 세포에 화합물 (R)-NALPCE를 40 μ g/ml 처리한 후 일별 의존적으로 4일 동안 배양하였다. 상기 배양액을 원심분리(1,000 rpm, 5분)한 다음, 세포 덩어리를 0.01% 보바인 시럼 알부민(BSA)이 첨가된 PBS 완충용액으로 3회 씻고, 200 μ l의 0.01% 보바인 시럼 알부민(BSA)이 첨가된 PBS 완충용액에 10 μ l anti-CD41-플로레세인-5-이소싸이오시아네이트(fluorescein-5-isothiocyanate, FITC, Dako Chemicals, Carpinteria, CA), 20 μ l anti-CD61-피코에리스틴(phycoerythrin, PE, BD Pharmingen)을 처리하고 4℃에서 50분 동안 회전시켜 고루 형광 염색이 되도록 하였다. 염색이 끝나면 상기 형광 염색된 용액을 원심분리(1,000 rpm, 10분)한 다음, 세포 덩어리를 0.01% 보바인 시럼 알부민(BSA)이 첨가된 PBS 완충용액으로 3회 씻고, 셀렉스트(Cellquest) 프로그램을 이용하여 유세포분석기(fluorescence-activated cell sorter, FACS Aria)로 형광의 염색된 정도를 측정하였다. 이에 대한 결과가 도 6에 나타나 있다.

화합물 (R)-NALPCE는 실험예 4와 같이 단독으로 K562 세포를 거핵구로 분화 유도시키지만, (R)-NALPCE가 OP9 세포 및 K562 세포와 동시에 배양된 경우에 CD41-양성인 세포의 수가 약 15% 정도 증대되어 K562 세포의 거핵구로의 분화 유도 효율이 증가함을 알 수 있었다.

실험예 7 : 화합물 (R)-NALPCE와 PMA 처리시 세포 분화

공지된 마우스 두개관에서 유래한 마우스 골수 기조직 세포주인 OP9 세포를 웰당 1×10^5 개가 되도록 조절하여 6웰 배양접시에 분주하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 OP9 세포가 배양접시의 바닥에 고루 분주된 것을 확인하고, K562 세포를 웰당 1×10^5 개가 되도록 조절하여 6웰 배양접시에 분주하고, 상기 분주한 세포에 화합물 (R)-NALPCE를 40 μ g/ml, PMA를 500pmole, 10nmole, 50nmole을 각각 처리한 후 일별 의존적으로 5일 동안 배양하였고, 광학현미경을 이용하여 세포의 형태를 200배로 관찰하였다. 이에 대한 결과가 도 7에 나타내었다.

도 7에 도시된 바와 같이, K562 세포에 (R)-NALPCE를 처리한 경우에는 일별 의존적으로 세포의 크기가 커지고, 혈소판과 유사한 핵이 없는 세포들이 관찰되었다. 그러나 PMA를 처리한 경우에는 낮은 농도인 500pmole인 경우에는 K562 세포를 분화시키지 못했고 대조군과 마찬가지로 증식되었다. 10nmole PMA처리군은 K562 세포의 크기는 커졌지만, (R)-NALPCE를 처리한 경우와는 다른 형태를 보였으며, 5일 및 수 일이 경과하여도 혈소판과 유사한 모양은 관찰되지 않았다. 50nmole PMA를 처리한 경우 K562세포는 대식세포로 분화가 진행되는 것을 관찰할 수 있었다. 즉, PMA는 (R)-NALPCE와 유사하게 CD41을 많이 발현시켰지만, 혈소판 유사세포는 생성시키지 못하였다.

실험예 8 : 화합물 (R)-NALPCE에 의한 혈소판 생성 관찰

상기 실험예 6과 동일하게 OP9 세포를 웰당 1×10^5 개가 되도록 조절하여 6웰 배양접시에 분주하여 24시간 배양한 후 OP9 세포가 배양접시의 바닥에 고루 분주 된 것을 확인하고, K562 세포를 웰당 1×10^5 개가 되도록 조절하여 6웰 배양접시에 분주하고, 상기 분주한 세포에 화합물 (R)-NALPCE를 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 후 일별 의존적으로 5일 동안 배양하면서 광학현미경을 이용하여 200배로 관찰하였다. 이에 대한 결과를 도 8에 나타내었다.

도 8에 도시된 바와 같이, K562 세포가 (R)-NALPCE를 처리하지 않은 경우 세포의 크기 변화가 전혀 없으나, (R)-NALPCE를 처리한 경우에는 일별 의존적으로 세포의 크기가 커지는 것을 확인 할 수 있었으며, 4일째부터는 혈소판과 유사한 핵이 없는 세포들이 관찰되었다.

실험예 9 : 화합물 (R)-NALPCE에 의해 분화된 세포의 피브리노젠 결합 실험

일반적으로 K562 세포와 같은 골수성의 선조세포에는 당단백질 IIb/IIIa 복합체가 적게 발현되고, 거핵구로 분화가 진행되면 세포의 크기가 커지면서 그 복합체의 수는 증가하게 되는데, 혈액 응고 과정에서 매우 중요한 요소인 피브리노젠은 활성화된 당단백질 IIb/IIIa 복합체(GP IIb/IIIa)에 결합하는 특징이 있어, 이를 이용하여 (R)-NALPCE에 의해 K562 세포의 거핵구 분화 정도를 조사하였다.

상기 실험예 7에서와 같이, OP9 세포를 웰당 1×10^5 개가 되도록 조절하여 6웰 배양접시에 분주하여 24시간 배양한 후 OP9 세포가 배양접시의 바닥에 고루 분주 된 것을 확인하고, K562 세포를 웰당 1×10^5 개가 되도록 조절하여 6웰 배양접시에 분주한 다음, 이들 분주한 세포에 화합물 (R)-NALPCE를 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 후 일별 의존적으로 5일째까지 배양하였다. 매일 (R)-NALPCE가 처리된 K562세포를 60mm 디쉬로 옮기고, 당단백질 IIb/IIIa 복합체를 활성화시키기 위해서 100nM PMA를 30분 처리한 후 분화된 세포들을 모으고, 이후 $50 \mu\text{l}$ 의 PBS로 세포를 잘 풀고 1mM MnCl_2 , 50mM 아데노신 디포스페이트, 50mM 에피네프린, PAR4 스톱빈 리셉터 활성화 아미노산 서열인 1mM AYPGFK(Peptron Inc. Korea)와 $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ FITC-피브리노젠(Alexa-468, Molecular Probe)을 넣어서 K562 세포를 37°C 에서 1시간 동안 활성화시키고, $450 \mu\text{l}$ PBS를 넣고 활성화된 K562 세포의 표면에 결합된 피브리노젠의 양을 셀퀘스트(Cellquest) 프로그램을 이용하여 유세포분석기(fluorescence-activated cell sorter, FACS Aria)로 형광의 염색된 정도를 측정하였다. 이에 대한 결과 도 9에 나타나 있다.

도 9에서 볼 수 있는 바와 같이, (R)-NALPCE에 의해 K562 세포가 거핵구로 분화되면서 당단백질 IIb/IIIa 복합체의 수는 증가하였으며, 따라서 당단백질 IIb/IIIa 복합체에 결합하는 피브리노젠의 형광이 일별 의존적으로 증가하는 것을 알 수 있다.

실험예 10 : 화합물 (R)-NALPCE에 의해 분화된 세포(거핵구, 혈소판)을 전자현미경으로 확인

OP9 세포를 웰당 1×10^5 개가 되도록 조절하여 6웰 배양접시에 분주하여 24시간 배양한 후, OP9 세포가 배양접시의 바닥에 고루 분주 된 것을 확인하고, K562 세포를 웰당 1×10^5 개가 되도록 조절하여 6웰 배양접시에 분주하였다. 이들 분주한 세포에 화합물 (R)-NALPCE를 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 후 일별 의존적으로 5일째 까지 배양하였다. 상기 배양액을 원심분리 (1,000 rpm, 5분)한 다음, 0.1M 포스페이트 완충액(pH7.4)로 조정된 2.5% 글루타르알데히드로 24시간 동안 전 고정하였다. 전 고정 후 원심분리(4,000 rpm, 10분)하여 세포 덩어리를 한쪽으로 모아서 덩어리 전체를 옮기고, 2차로 1% 오스미움 테트라옥사이드(0.1M PBS완충액, pH 7.4) 용액으로 1시간 동안 고정하였다. 후 고정한 표본을 완충액으로 세척한 후, 60, 70, 80, 90, 95 % 에탄올로 각 10분씩 탈수하고, 100% 에탄올로 10분씩 2회 탈수하고, 에폭시 수지에 표본을 끼워넣었다. 끼워 넣은 표본을 다이아몬드 칼을 사용하는 울트라마이크로톰(Richert-Jung, USA)으

로 1 μ m 두께로 잘라 1% 톨루이딘 블루로 염색하여 광학현미경으로 부위를 관찰하였다. 다시 60 내지 70nm의 초박절편을 만들어 1 내지 2% 우라닐 아세테이트와 1% 리드 사이트레이트로 차례로 염색하고, 전압을 75kV로 가속화시켰을 때 염색한 초박절편을 H-600 투과전자현미경 (Hitachi, Japan)으로 관찰하였다.

도 10에 도시된 바와 같이, (R)-NALPCE를 처리하여 분화된 K562세포를 투과전자현미경으로 관찰한 결과 핵을 2개 이상 가지고 있는 다핵핵 거대핵세포(거핵구)가 40% 이상 존재하였으며, 이 거핵구에는 혈소판이 분비되는 경계채널(demarcation channel)이 존재하였다. 이는 혈소판이 분비되기 전단계로서 거핵구가 성숙되어 있음을 보여준다. 또한 거핵구가 성숙된 후 분비하는 혈소판도 혈액에 존재하는 혈소판과 유사한 형태를 보였다.

실험에 11 : 화합물 (R)-NALPCE에 의해 분화된 K562세포에서 분비된 혈소판 유사세포의 활성 형태 관찰

OP9 세포를 웰당 1×10^5 개가 되도록 조절하여 6웰 배양접시에 분주하여 24시간 배양한 후, OP9 세포가 배양접시의 바닥에 고루 분주된 것을 확인하고, K562 세포를 웰당 1×10^5 개가 되도록 조절하여 6웰 배양접시에 분주하였다. 상기 분주한 세포에 화합물 (R)-NALPCE를 40 μ g/ml 처리한 후 일별 의존적으로 5일째 까지 배양하였다. 5일째부터는 다량의 핵이 없는 혈소판과 유사한 형태의 세포가 존재하였다. 이들 분화된 거핵구와 혈소판 유사 세포를 분리하기 위해 분화된 K562 세포들을 원심분리(500 rpm, 20분)하고 상층액을 취한 후, 상층액을 다시 원심분리(3,000 rpm, 10분)하여 혈소판 유사 세포를 얻을 수 있었다.

분리된 혈소판 유사세포의 형태를 관찰하고, 혈액에 존재하는 혈소판과 그 형태를 비교하기 위해 피브리노젠을 입힌 슬라이드를 사용하였다. 일반적으로 실험시 사용되는 슬라이드(POLY-PREP, Sigma, USA)에 20 μ g/ml 피브리노젠((R)-NALPCE 처리군)과 1% 보마인 시럼 알부민(control) 각각을 PBS용액에 녹여 2시간 동안 37 $^{\circ}$ C의 습기가 있는 항온기에서 슬라이드 표면에 입혔다(피브리노젠을 입힌 슬라이드). 이와 같이 제조된 슬라이드 위에 상기에서 분리한 분리된 혈소판 유사세포와 혈액에 존재하는 혈소판을 PBS에 잘 섞어서 올려 놓고 20분 경과 후 슬라이드 위에 각 분리된 세포가 붙게 되며, 이후 PBS를 제거하고 2% 파라포름알데히드 용액을 세포 고정을 위해 10분간 세포 위에 올려 놓았다. 10분 후 용액을 제거하고, 그 다음 0.1% 트라이톤 X-100용액을 10분간 올려놓아 세포에 구멍을 만들어서 염색하고자 하는 형광물질이 세포 안으로 용이하게 들어가게 하였다. 10분 후 용액을 제거하고 50 μ l의 PBS에 1mM MnCl₂, 50mM 아데노신 디포스페이트, 50mM 에피네프린, PAR 4 트롬빈 리셉터 활성화 아미노산 서열인 1mM AYPGFK(Peptron Inc., Korea) 등을 잘 섞어서 슬라이드 위에 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 올려놓아 분리된 세포들을 활성화시켰다. 1시간 후 용액을 제거하고 PBS로 부드럽게 세척한 후 마운팅 용액을 슬라이드 위에 한 방울 부드럽게 떨어뜨리고 커버 슬라이드로 덮은 다음 형광현미경으로 염색된 부위를 관찰하였다. 액틴 구조를 관찰하기 위해서는 주로 팔로이딘-플로레스세인-5-이소싸이오시아네이트(phalloidin-FITC, Alexa-468, Molecular Probe)가 사용되는데, 이 것을 PBS로 1:50의 비율로 희석시킨 후 슬라이드 위에 희석한 용액을 올려놓고, 37 $^{\circ}$ C 습기가 있는 항온기에서 1시간 동안 염색하였다. 염색 후 PBS 용액으로 슬라이드 위에 붙은 세포를 아주 부드럽게 3회 세척한 후 형광현미경(Axiovision, Zeiss)으로 400배로 관찰하였다.

혈소판은 아데노신 디포스페이트, 에피네프린, AYPGFK(Peptron Inc., Korea), PAR4 트롬빈 리셉터 활성화 아미노산 서열, 콜라겐 등에 의해서 활성화되는데, 도 11에 나타난 바와 같이, (R)-NALPCE에 의해 분화된 K562세포로부터 분비된 핵이 없는 세포들은 혈액에 존재하는 혈소판과 동일한 방식으로 활성화되고, 일단 활성화되었을 때에는 혈액에 존재하는 혈소판과 유사한 세포구조를 갖는다는 것을 알 수 있었다.

발명의 효과

상기에서 기술한 바와 같이, OP9 세포 및 (R)-NALPCE 화합물을 이용하여 인간골수백혈병세포주의 거핵구세포로의 분화를 효과적으로 유도할 수 있으며, 이들 거핵구세포에서 분비된 혈소판을 혈소판 감소증 등의 치료에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 (R)-NALPCE 화합물의 인간골수백혈병세포주에 대한 독성 실험을 나타낸다.

도 2는 (R)-NALPCE 화합물에 의한 인간골수백혈병세포주의 성장 곡선을 나타낸다.

도 3은 (R)-NALPCE 화합물과 PMA를 각각 인간골수백혈병세포주에 처리하였을 때 CD41, CD16, 글리코포린 A(glycophorin A) 및 CD14 수용체의 발현률을 비교한 것을 나타낸다.

도 4는 (R)-NALPCE 화합물의 인간골수백혈병세포주의 거대핵세포(거핵구세포)로의 분화 유도과 관련하여 시간 경과에 따른 CD41 수용체의 발현율을 나타낸다.

도 5는 (R)-NALPCE 화합물의 인간골수백혈병세포주의 거대핵세포(거핵구세포)로의 분화 유도과 관련하여 시간 경과에 따른 CD61 수용체의 발현율을 나타낸다.

도 6은 인간골수백혈병세포주의 거핵구세포로의 분화와 관련하여 (R)-NALPCE 화합물만 존재하는 경우와 OP9 세포와 함께 (R)-NALPCE 화합물이 존재하는 경우에 CD41 및 CD61의 시간경과에 따른 발현율의 차이를 나타낸다.

도 7은 (R)-NALPCE 화합물과 PMA의 인간골수백혈병세포주의 거핵구세포로의 분화 유도 능력을 비교하는 그림이다.

도 8은 OP9 세포 외에 (R)-NALPCE 화합물이 존재하는 경우에 인간골수백혈병세포주에서 분화된 거핵구세포의 시간 경과에 따른 혈소판 분비 정도를 나타내는 그림이다.

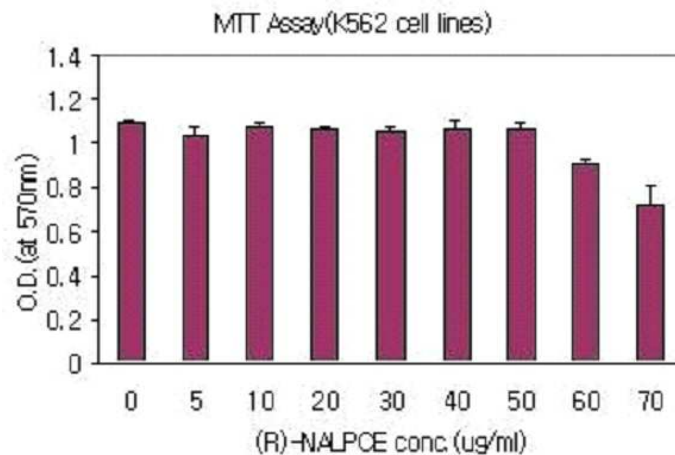
도 9는 OP9 세포 외에 (R)-NALPCE 화합물이 존재하는 경우 인간골수백혈병세포주에서 분화된 거핵구세포에서 피브리노겐의 당단백질 IIb/IIIa 복합체 결합 정도를 나타낸다.

도 10은 OP9 세포와 (R)-NALPCE 화합물에 의해 분화된 거핵구세포 및 이로부터 분비된 혈소판을 전자현미경으로 관찰한 그림이다.

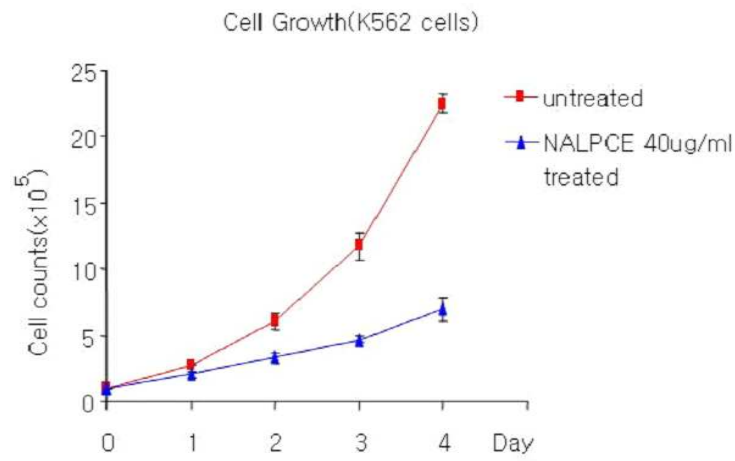
도 11은 OP9 세포와 (R)-NALPCE 화합물에 의해 K562 세포에서 분화된 거핵구세포로부터 분비된 혈소판 유사세포의 활성 형태를 관찰한 그림이다.

도면

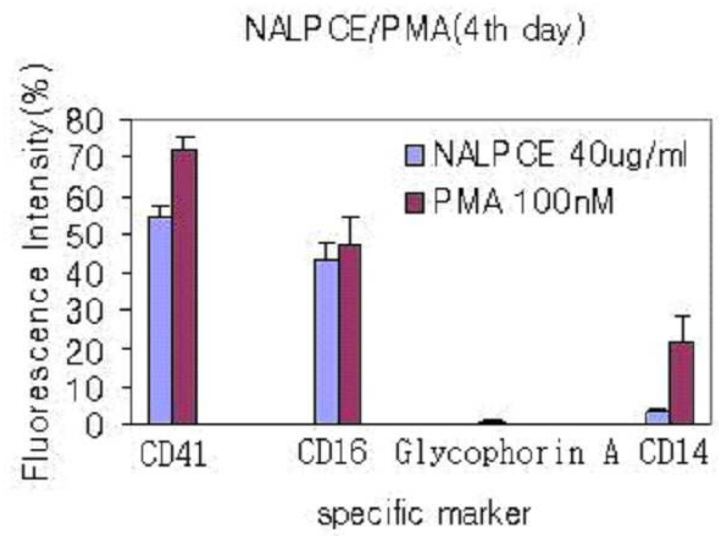
도면1



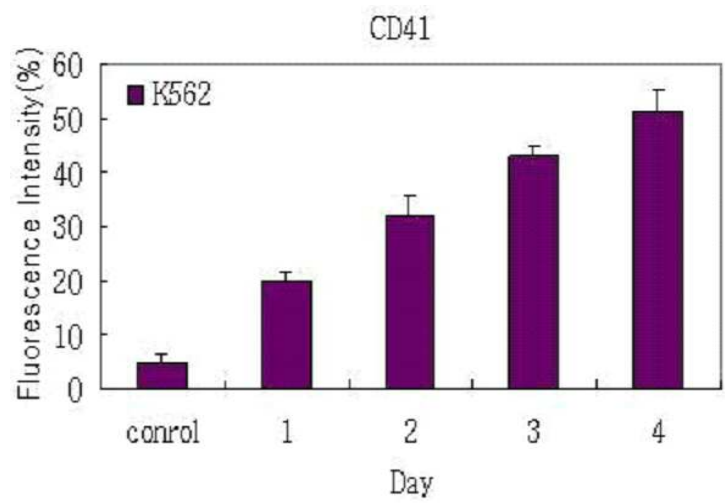
도면2



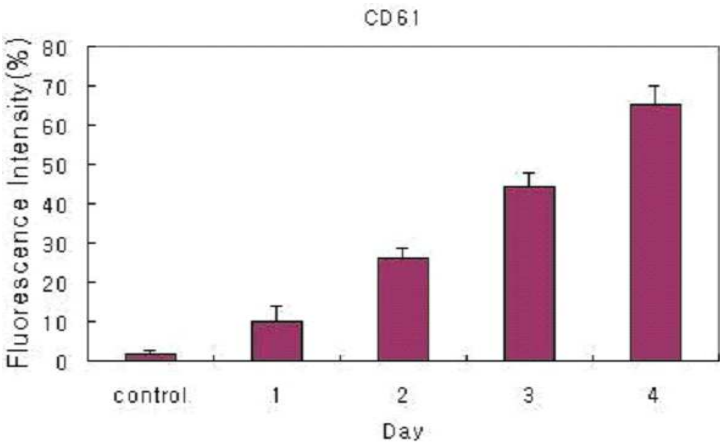
도면3



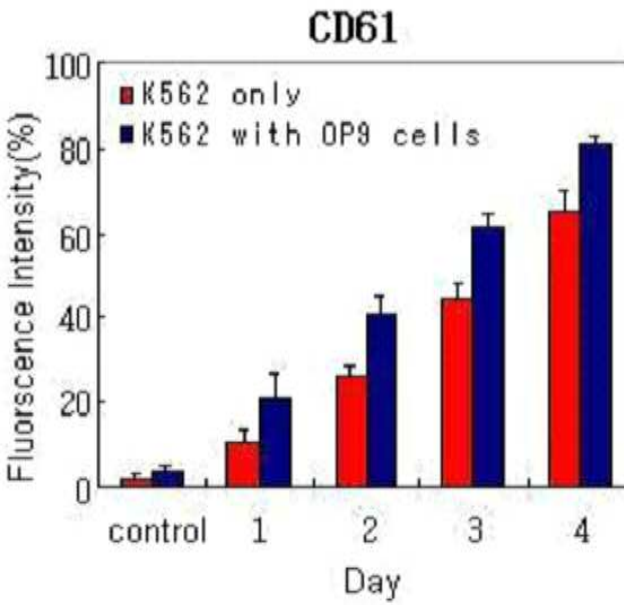
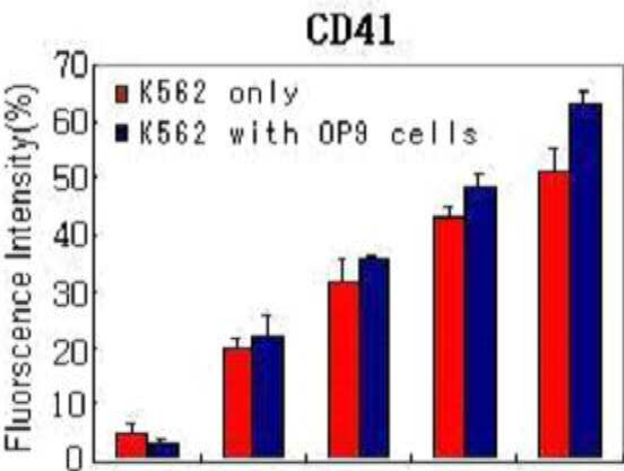
도면4



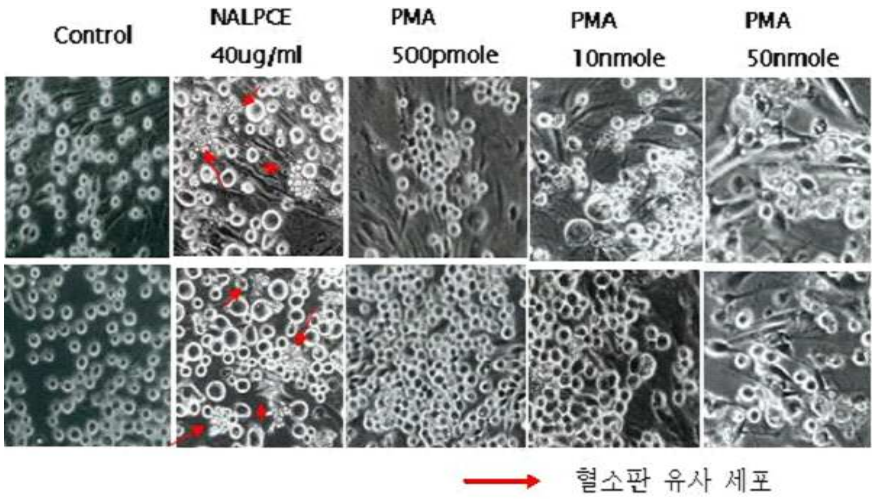
도면5



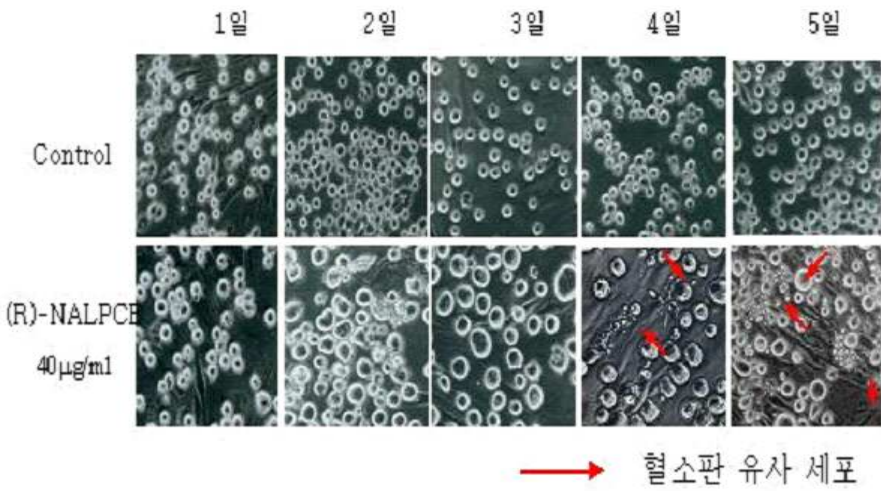
도면6



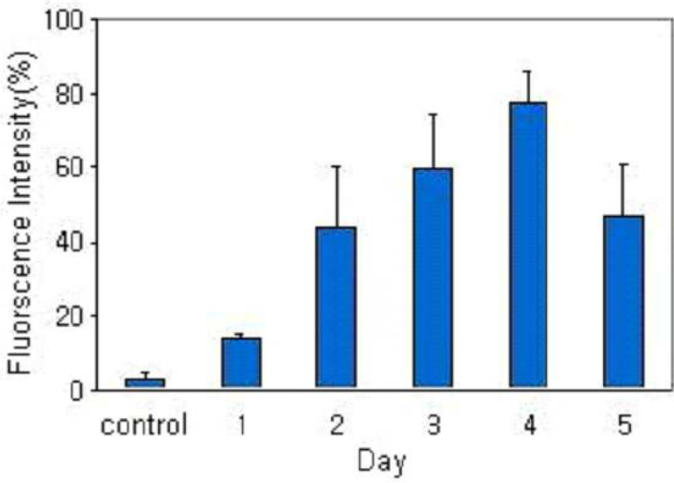
도면7



도면8

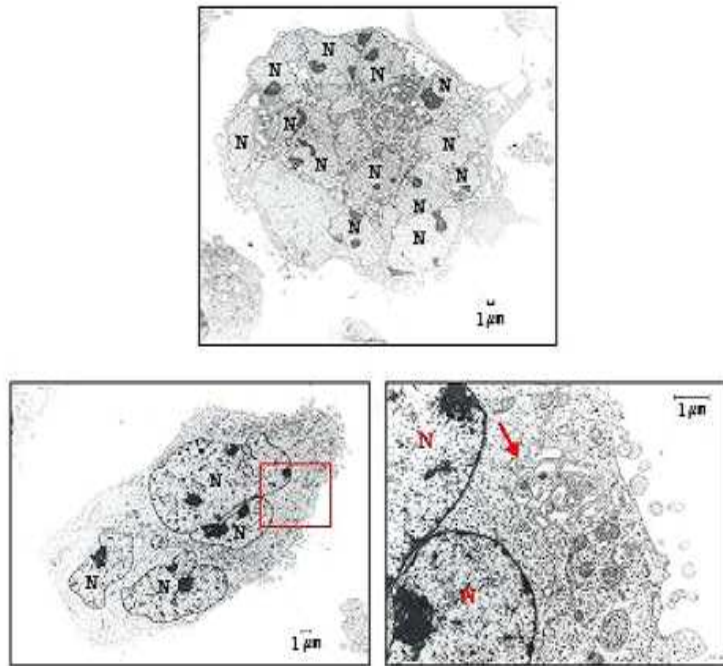


도면9



도면10

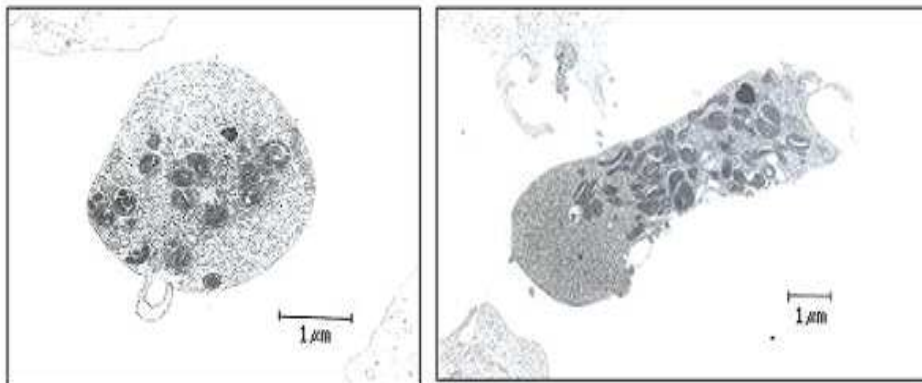
(R)-NALPCE에 의해 분화된 K562 세포



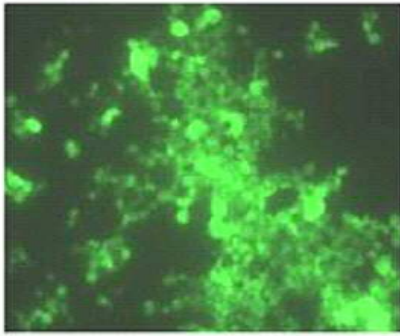
→ 경계채널(Demarcation Channel)

N : 핵(Nucleus)

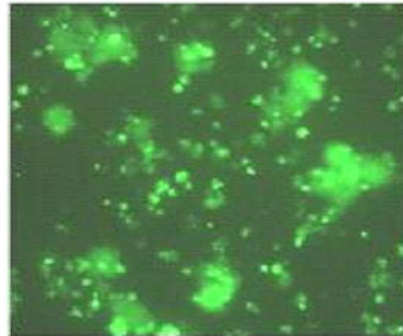
혈소판 유사 세포



도면11



혈액에 존재하는 혈소판



분화된 혈소판 유사 세포