



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0119803
 (43) 공개일자 2010년11월10일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) Int. Cl.
 <i>A61K 31/5575</i> (2006.01) <i>A61P 43/00</i> (2006.01)
 <i>A61P 19/08</i> (2006.01) <i>A61P 19/10</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2010-7021031</p> <p>(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년02월19일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2010년09월18일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/JP2009/053474</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2009/104807
 국제공개일자 2009년08월27일</p> <p>(30) 우선권주장
 61/029,713 2008년02월19일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 수캄포 아게
 스위스 체하-6300 주크 그라벤 5</p> <p>(72) 발명자
 우에노 류지
 미국 20854 메릴랜드주 몽고메리 포토맥 스탠모어
 드라이브 11025</p> <p>구노 사치코
 미국 20854 메릴랜드주 몽고메리 포토맥 스탠모어
 드라이브 11025</p> <p>(74) 대리인
 특허법인코리아나</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 줄기세포 성장을 조절하기 위한 프로스타글란딘 함유 조성물

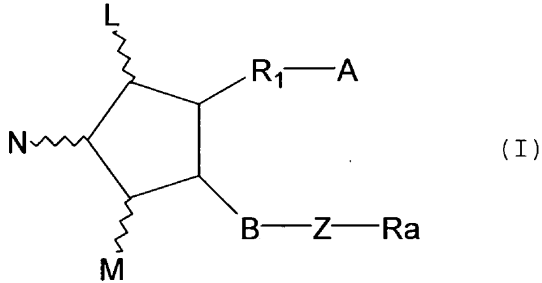
(57) 요약

한 구현예에서, 포유류 대상체의 줄기세포 증식 및/또는 분화를 조절하기 위한 프로스타글란딘 화합물 함유 조성물이 제공된다. 또 다른 구현예에서, 본원은 포유류 대상체의 줄기세포 증식 및/또는 분화를 조절하기 위한 프로스타글란딘 화합물을 포함하는 프로스타글란딘 화합물 함유 조성물로서, 이때 줄기세포가 본 발명의 조성물과 직접적 또는 간접적으로 접촉되는 조성물이다.

특허청구의 범위

청구항 1

포유류 대상체의 줄기세포 증식 및/또는 분화를 조절하기 위한 약학 조성물을 제조함에 있어 하기 화학식 (I)로 표시되는 프로스타글란딘 화합물의 용도:



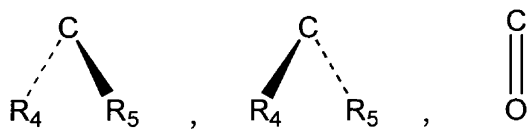
[식에서,

L, M 및 N은 수소 원자, 히드록시, 할로젠 원자, 저급 알킬, 히드록시(저급)알킬, 저급 알카노일옥시 또는 옥소로서, 이때 L 및 M 중 하나 이상은 수소 이외의 기이고, 5원 고리는 1개 이상의 이중 결합을 가질 수 있고;

A는 -CH₃, 또는 -CH₂OH, -COCH₂OH, -COOH 또는 이의 기능성 유도체이고;

B는 단일 결합, -CH₂-CH₂-, -CH=CH-, -C≡C-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH₂-, -CH₂-CH=CH-, -C≡C-CH₂- 또는 -CH₂-C≡C-이고;

Z는



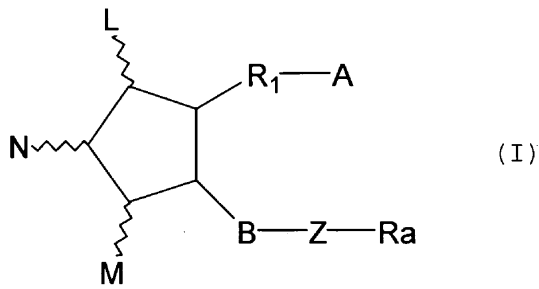
또는 단일 결합으로서, 이때 R₄ 및 R₅는 수소, 히드록시, 할로젠, 저급 알킬, 저급 알콕시 또는 히드록시(저급)알킬이며, R₄ 및 R₅는 동시에 히드록시 및 저급 알콕시는 아니고;

R₁은 포화 또는 불포화 2가 저급 또는 중급 지방족 탄화수소 잔기로서, 이는 비치환되거나 또는 할로젠, 알킬, 히드록시, 옥소, 아릴 또는 헤테로고리기로 치환되고, 지방족 탄화수소의 1개 이상의 탄소 원자는 임의로는 산소, 질소 또는 황으로 치환되고; 및

Ra는 비치환되거나 또는 할로젠, 옥소, 히드록시, 저급 알킬, 저급 알콕시, 저급 알카노일옥시, 시클로(저급)알킬, 시클로(저급)알킬옥시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로고리 또는 헤테로고리-옥시기로 치환된, 포화 또는 불포화 저급 또는 중급 지방족 탄화수소 잔기; 저급 알콕시; 저급 알카노일옥시; 시클로(저급)알킬; 시클로(저급)알킬옥시; 아릴; 아릴옥시; 헤테로고리; 헤테로고리-옥시임].

청구항 2

포유류 대상체의 줄기세포 증식 및/또는 분화를 조절하기 위한 약학 조성물을 제조함에 있어 하기 화학식 (I)로 표시되는 프로스타글란딘 화합물의 용도로서, 이때 상기 조절이 상기 줄기세포를 조성물과 접촉시킴으로써 구현되는 용도:



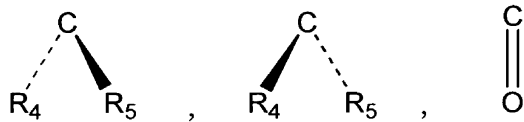
[식에서,

L, M 및 N은 수소 원자, 히드록시, 할로젠 원자, 저급 알킬, 히드록시(저급)알킬, 저급 알카노일옥시 또는 옥소로서, 이때 L 및 M 중 하나 이상은 수소 이외의 기이고, 5원 고리는 1개 이상의 이중 결합을 가질 수 있고;

A는 -CH₃, 또는 -CH₂OH, -COCH₂OH, -COOH 또는 이의 기능성 유도체이고;

B는 단일 결합, -CH₂-CH₂-, -CH=CH-, -C≡C-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH₂-, -CH₂-CH=CH-, -C≡C-CH₂- 또는 -CH₂-C≡C-이고;

Z는



또는 단일 결합으로서, 이때 R₄ 및 R₅는 수소, 히드록시, 할로젠, 저급 알킬, 저급 알콕시 또는 히드록시(저급)알킬이며, R₄ 및 R₅는 동시에 히드록시 및 저급 알콕시는 아니고;

R₁은 포화 또는 불포화 2가 저급 또는 중급 지방족 탄화수소 잔기로서, 이는 비치환되거나 또는 할로젠, 알킬, 히드록시, 옥소, 아릴 또는 헤테로고리기로 치환되고, 지방족 탄화수소의 1개 이상의 탄소 원자는 임의로는 산소, 질소 또는 황으로 치환되고; 및

Ra는 비치환되거나 또는 할로젠, 옥소, 히드록시, 저급 알킬, 저급 알콕시, 저급 알카노일옥시, 시클로(저급)알킬, 시클로(저급)알킬옥시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로고리 또는 헤테로고리-옥시기로 치환된, 포화 또는 불포화 저급 또는 중급 지방족 탄화수소 잔기; 저급 알콕시; 저급 알카노일옥시; 시클로(저급)알킬; 시클로(저급)알킬옥시; 아릴; 아릴옥시; 헤테로고리; 헤테로고리-옥시임].

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 조성물이 시험관 내 또는 생체 외에서 줄기세포와 접촉되는 용도.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기세포가 인간 기원 줄기세포의 줄기세포인 용도.

청구항 5

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기세포가 전구 세포인 용도.

청구항 6

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기세포가 배아줄기세포, 체줄기세포 또는 이의 조합인 용도.

청구항 7

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로스타글란딘 화합물이 16-모노 또는 디할로젠-프로스타글란딘 화합물인 용도.

청구항 8

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로스타글란딘 화합물이 15-케토-프로스타글란딘 화합물인 용도.

청구항 9

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로스타글란딘 화합물이 13,14-디히드로-16-모노 또는 디할로겐-프로스타글란딘 화합물인 용도.

청구항 10

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로스타글란딘 화합물이 13,14-디히드로-15-케토-프로스타글란딘 화합물인 용도.

청구항 11

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로스타글란딘 화합물이 13,14-디히드로-15-케토-16-모노 또는 디할로겐-프로스타글란딘 화합물인 용도.

청구항 12

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로스타글란딘 화합물이 13,14-디히드로-16-모노 또는 디플루오로-프로스타글란딘 화합물인 용도.

청구항 13

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로스타글란딘 화합물이 15-케토-16-모노 또는 디플루오로-프로스타글란딘 화합물인 용도.

청구항 14

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로스타글란딘 화합물이 13,14-디히드로-15-케토-16-모노 또는 디플루오로-프로스타글란딘 화합물인 용도.

청구항 15

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로스타글란딘 화합물이 13,14-디히드로-16-모노 또는 디할로겐-프로스타글란딘 E 화합물인 용도.

청구항 16

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로스타글란딘 화합물이 15-케토-16-모노 또는 디할로겐-프로스타글란딘 E 화합물인 용도.

청구항 17

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로스타글란딘 화합물이 13,14-디히드로-15-케토-16-모노 또는 디할로겐-프로스타글란딘 E 화합물인 용도.

청구항 18

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로스타글란딘 화합물이 13,14-디히드로-16,16-디플루오로-프로스타글란딘 E₁ 화합물인 용도.

청구항 19

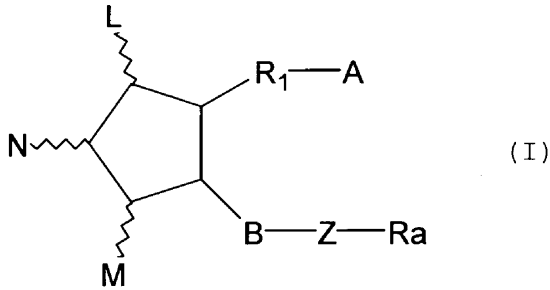
제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로스타글란딘 화합물이 13,14-디히드로-15-케토-프로스타글란딘 E₁ 화합물인 용도.

청구항 20

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로스타글란딘 화합물이 11-데옥시-13,14-디히드로-15-케토-16,16-디플루오로-프로스타글란딘 E₁ 화합물인 용도.

청구항 21

하기 화학식 (I)로 표시되는 프로스타글란딘 화합물을 포함하는 포유류 대상체의 줄기세포 증식 및/또는 분화를 조절하기 위한 조성물:



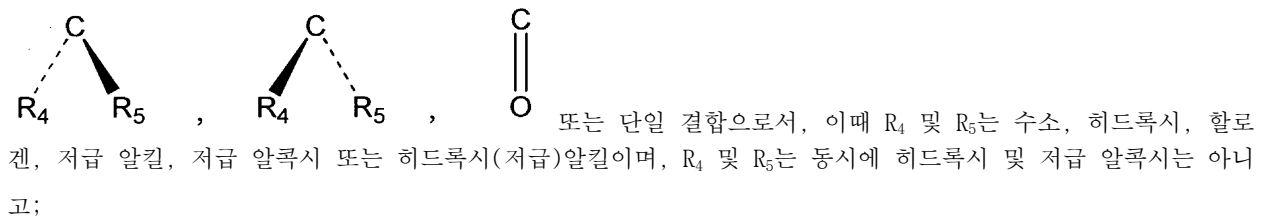
[식에서,

L, M 및 N은 수소 원자, 히드록시, 할로젠 원자, 저급 알킬, 히드록시(저급)알킬, 저급 알카노일옥시 또는 옥소로서, 이때 L 및 M 중 하나 이상은 수소 이외의 기이고, 5원 고리는 1개 이상의 이중 결합을 가질 수 있고;

A는 -CH₃, 또는 -CH₂OH, -COCH₂OH, -COOH 또는 이의 기능성 유도체이고;

B는 단일 결합, -CH₂-CH₂-, -CH=CH-, -C≡C-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH₂-, -CH₂-CH=CH-, -C≡C-CH₂- 또는 -CH₂-C≡C-이고;

Z는

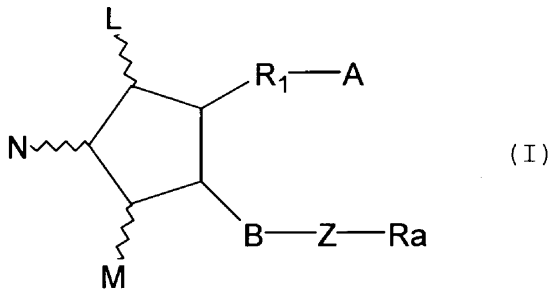


R₁은 포화 또는 불포화 2가 저급 또는 중급 지방족 탄화수소 잔기로서, 이는 비치환되거나 또는 할로겐, 알킬, 히드록시, 옥소, 아릴 또는 헤테로고리기로 치환되고, 지방족 탄화수소의 1개 이상의 탄소 원자는 임의로는 산소, 질소 또는 황으로 치환되고; 및

Ra는 비치환되거나 또는 할로겐, 옥소, 히드록시, 저급 알킬, 저급 알콕시, 저급 알카노일옥시, 시클로(저급)알킬, 시클로(저급)알킬옥시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로고리기 또는 헤테로고리-옥시기로 치환된, 포화 또는 불포화 저급 또는 중급 지방족 탄화수소 잔기; 저급 알콕시; 저급 알카노일옥시; 시클로(저급)알킬; 시클로(저급)알킬옥시; 아릴; 아릴옥시; 헤테로고리기; 헤테로고리-옥시임].

청구항 22

하기 화학식 (I)로 표시되는 프로스타글란딘 화합물을 포함하는 포유류 대상체의 줄기세포 증식 및/또는 분화를 조절하기 위한 조성물로서, 이때 상기 조절이 상기 줄기세포를 조성물과 접촉시킴으로써 구현되는 조성물:



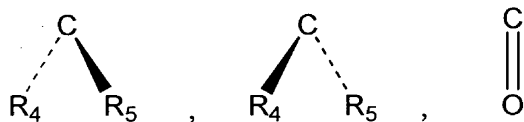
[식에서,

L, M 및 N은 수소 원자, 히드록시, 할로젠 원자, 저급 알킬, 히드록시(저급)알킬, 저급 알카노일옥시 또는 옥소로서, 이때 L 및 M 중 하나 이상은 수소 이외의 기이고, 5원 고리는 1개 이상의 이중 결합을 가질 수 있고;

A는 -CH₃, 또는 -CH₂OH, -COCH₂OH, -COOH 또는 이의 기능성 유도체이고;

B는 단일 결합, -CH₂-CH₂-, -CH=CH-, -C≡C-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH₂-, -CH₂-CH=CH-, -C≡C-CH₂- 또는 -CH₂-C≡C-이고;

Z는



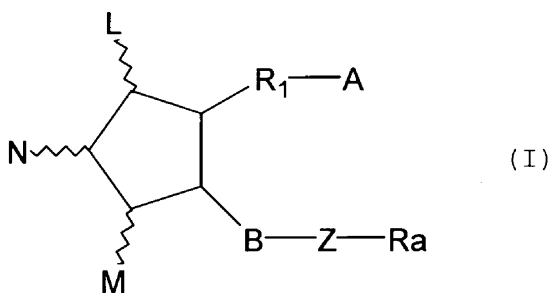
또는 단일 결합으로서, 이때 R₄ 및 R₅는 수소, 히드록시, 할로젠, 저급 알킬, 저급 알콕시 또는 히드록시(저급)알킬이며, R₄ 및 R₅는 동시에 히드록시 및 저급 알콕시는 아니고;

R₁은 포화 또는 불포화 2가 저급 또는 중급 지방족 탄화수소 잔기로서, 이는 비치환되거나 또는 할로젠, 알킬, 히드록시, 옥소, 아릴 또는 헤테로고리기로 치환되고, 지방족 탄화수소의 1개 이상의 탄소 원자는 임의로는 산소, 질소 또는 황으로 치환되고; 및

Ra는 비치환되거나 또는 할로젠, 옥소, 히드록시, 저급 알킬, 저급 알콕시, 저급 알카노일옥시, 시클로(저급)알킬, 시클로(저급)알킬옥시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로고리 또는 헤테로고리-옥시기로 치환된, 포화 또는 불포화 저급 또는 중급 지방족 탄화수소 잔기; 저급 알콕시; 저급 알카노일옥시; 시클로(저급)알킬; 시클로(저급)알킬옥시; 아릴; 아릴옥시; 헤테로고리; 헤테로고리-옥시임].

청구항 23

포유류 대상체의 줄기세포 증식 및/또는 분화의 조절 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에 하기 화학식 (I)로 표시되는 유효량의 프로스타글란딘 화합물을 투여하는 것을 포함하는 방법:



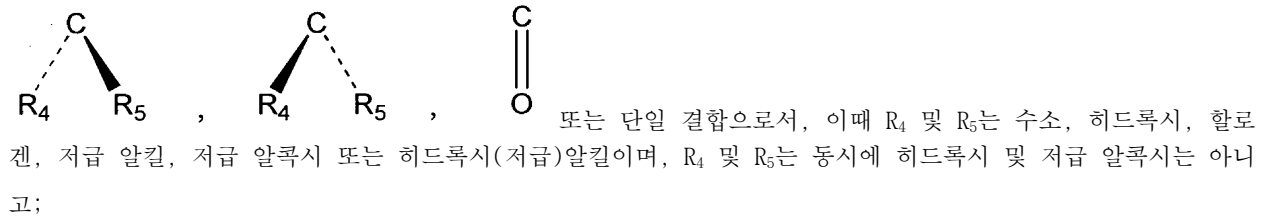
[식에서,

L, M 및 N은 수소 원자, 히드록시, 할로젠 원자, 저급 알킬, 히드록시(저급)알킬, 저급 알카노일옥시 또는 옥소로서, 이때 L 및 M 중 하나 이상은 수소 이외의 기이고, 5원 고리는 1개 이상의 이중 결합을 가질 수 있고;

A는 -CH₃, 또는 -CH₂OH, -COCH₂OH, -COOH 또는 이의 기능성 유도체이고;

B는 단일 결합, -CH₂-CH₂-, -CH=CH-, -C≡C-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH₂-, -CH₂-CH=CH-, -C≡C-CH₂- 또는 -CH₂-C≡C-이고;

Z는

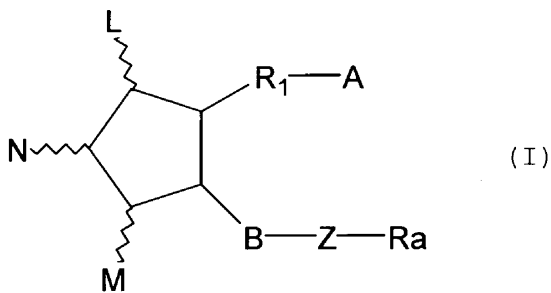


R₁은 포화 또는 불포화 2가 저급 또는 중급 지방족 탄화수소 잔기로서, 이는 비치환되거나 또는 할로겐, 알킬, 히드록시, 옥소, 아릴 또는 헤테로고리기로 치환되고, 지방족 탄화수소의 1개 이상의 탄소 원자는 임의로는 산소, 질소 또는 황으로 치환되고; 및

R_a는 비치환되거나 또는 할로겐, 옥소, 히드록시, 저급 알킬, 저급 알콕시, 저급 알카노일옥시, 시클로(저급)알킬, 시클로(저급)알킬옥시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로고리기 또는 헤테로고리-옥시기로 치환된, 포화 또는 불포화 저급 또는 중급 지방족 탄화수소 잔기; 저급 알콕시; 저급 알카노일옥시; 시클로(저급)알킬; 시클로(저급)알킬옥시; 아릴; 아릴옥시; 헤테로고리기; 헤테로고리-옥시임].

청구항 24

포유류 대상체의 줄기세포 증식 및/또는 분화의 조절 방법으로서, 상기 줄기세포를 하기 화학식 (I)로 표시되는 유효량의 프로스타글란딘 화합물과 접촉시키는 것을 포함하는 방법:



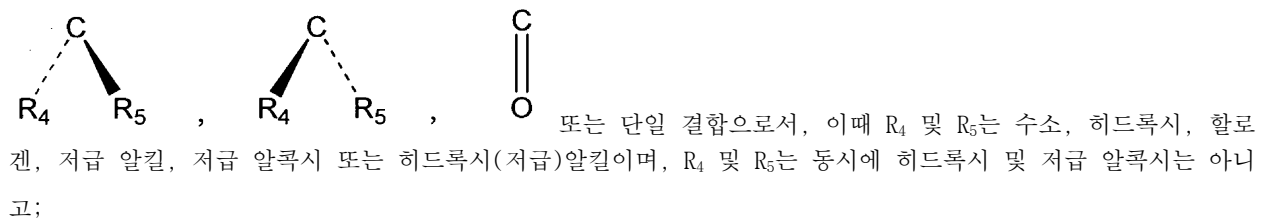
[식에서,

L, M 및 N은 수소 원자, 히드록시, 할로겐 원자, 저급 알킬, 히드록시(저급)알킬, 저급 알카노일옥시 또는 옥소로서, 이때 L 및 M 중 하나 이상은 수소 이외의 기이고, 5원 고리는 1개 이상의 이중 결합을 가질 수 있고;

A는 -CH₃, 또는 -CH₂OH, -COCH₂OH, -COOH 또는 이의 기능성 유도체이고;

B는 단일 결합, -CH₂-CH₂-, -CH=CH-, -C≡C-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH₂-, -CH₂-CH=CH-, -C≡C-CH₂- 또는 -CH₂-C≡C-이고;

Z는



R₁은 포화 또는 불포화 2가 저급 또는 중급 지방족 탄화수소 잔기로서, 이는 비치환되거나 또는 할로겐, 알킬, 히드록시, 옥소, 아릴 또는 헤테로고리기로 치환되고, 지방족 탄화수소의 1개 이상의 탄소 원자는 임의로는 산소, 질소 또는 황으로 치환되고; 및

R_a는 비치환되거나 또는 할로겐, 옥소, 히드록시, 저급 알킬, 저급 알콕시, 저급 알카노일옥시, 시클로(저급)알킬, 시클로(저급)알킬옥시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로고리기로 또는 헤테로고리-옥시기로 치환된, 포화 또는 불포화 저급 또는 중급 지방족 탄화수소 잔기; 저급 알콕시; 저급 알카노일옥시; 시클로(저급)알킬; 시클로(저급)알킬옥시; 아릴; 아릴옥시; 헤테로고리기로; 헤테로고리-옥시임].

명세서

기술분야

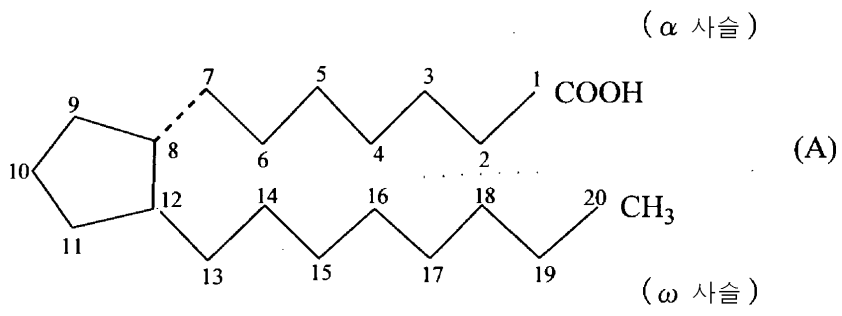
[0001] 본 발명은 줄기세포 성장을 조절하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 줄기세포는 복수의 전문화된 세포 유형 및 궁극적으로는 최종적으로 분화된 세포가 될 수 있는 미분화된 또는 미성숙한 세포이다. 이는 임의의 다른 세포들과는 달리, 필요한 경우 기본적으로 성숙한 세포 유형의 무한 공급이 생성될 수 있도록 스스로 재생할 수 있다. 이러한 자가 재생 능력으로 인해, 줄기세포는 조직 및 기관의 재생 및 복구에 치료학적으로 유용하다. 줄기세포는 다양한 임상 환경에서 혜택을 제공할 수 있는 잠재력을 가진다.

[0003] 줄기세포는 이의 분화 잠재력에 따라 만능성 (pluripotent) 및 다능성 (multipotent)으로 분류된다. 배아줄기세포 (ESC; Embryonic Stem Cell)는 유기체 내에서 거의 모든 세포 유형으로 분화될 수 있는 만능성 줄기세포로 알려져 있다. 골수 줄기세포와 같은 다능성 줄기세포는 성체에 존재한다. 이들은 성장 및 분화 잠재력이 제한적이기는 하나, 손상된 조직의 자가 복구에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 간주된다. 이러한 줄기세포의 장점들을 임상적 혜택으로 이어지도록 함에는, 원하는 세포 유형(들)으로의 효율적인 증식 및 분화, 장기 배양 시의 유전적 안정성 유지, 및 최종 생성물에 있어서의 잠재적 종양 형성성 ESC의 부재 확보를 포함하여 많은 과제들이 따른다. 저분자 화합물을 이용한 성장 및 분화의 조절은 이러한 문제에 관한 하나의 해결책이다.

[0004] 프로스타글란딘 (이하, PG(들)로 칭함)은 인간 또는 기타 포유동물의 조직 또는 기관에 포함되어 있는 유기 카르복실산 종류에 속하며, 광범위한 생리학적 활성을 나타낸다. 자연에서 발견되는 PG (1차 PG)는 일반적으로 하기 화학식 (A)로 표시되는 프로스탄산 골격을 가진다:



[0005]

[0006] 한편, 1차 PG의 합성 유사체 중 일부는 개질된 골격을 가진다. 1차 PG는 5원 고리 부분의 구조에 따라 PGA, PGB, PGC, PGD, PGE, PGF, PGG, PGH, PGI 및 PGJ로 분류되고, 또한 탄소 사슬 부분에 있어서의 불포화 결합의 개수 및 위치에 따라 하기와 같은 3가지 유형으로 분류된다:

- [0007] 기호 1: 13,14-불포화-15-OH
- [0008] 기호 2: 5,6- 및 13,14-이중 불포화-15-OH
- [0009] 기호 3: 5,6-, 13,14-, 및 17,18-삼중 불포화-15-OH.
- [0010] 아울러, PGF는 9번 위치의 히드록실기의 배열에 따라 α형 (히드록실기가 α-배열인 경우) 및 β형 (히드록실기

가 β -배열인 경우)으로 분류된다.

- [0011] PG는 다양한 약리학적 및 생리학적 활성, 예컨대, 혈관 확장, 염증 유도, 혈소판 응집, 자궁 근육 자극, 장 근육 자극, 항체양 효과 등을 가지는 것으로 알려져 있다.
- [0012] 몇몇의 15-케토(즉, 15번 위치에 히드록시 대신 옥소를 가짐)-PG 및 13,14-디히드로-(즉, 13번 및 14번 위치 사이에 단일 결합을 가짐)-15-케토-PG는 1차 PG의 대사 중에 효소의 활성화에 의해 천연 생성되는 물질로 알려져 있다.
- [0013] 그러나 프로스타글란딘 화합물이 줄기세포에 어떻게 작용하는지에 대하여는 공지되어 있지 않다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명은 포유류 대상체의 줄기세포 증식 및/또는 분화의 조절 방법으로서 이를 필요로 하는 상기 대상체에 유효량의 프로스타글란딘 화합물을 투여하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0015] 본 발명은 또한 포유류 대상체의 줄기세포 증식 및/또는 분화의 조절 방법으로서 상기 줄기세포와 유효량의 프로스타글란딘 화합물을 접촉시키는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0016] 본 발명은 또한 포유류 대상체의 줄기세포 증식 및/또는 분화를 조절하기 위한 조성물로서 프로스타글란딘 화합물을 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0017] 본 발명은 또한 포유류 대상체의 줄기세포 증식 및/또는 분화를 조절하기 위한 프로스타글란딘 화합물 함유 조성물로서, 이때 조절이 상기 줄기세포와 조성물을 접촉시킴으로써 야기되는 조성물에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명은 포유류 대상체의 줄기세포 증식 및/또는 분화를 조절하기 위한 약학 조성물의 제조에 있어 프로스타글란딘 화합물의 용도에 관한 것이다.
- [0019] 본 발명은 포유류 대상체의 줄기세포 증식 및/또는 분화를 조절하기 위한 약학 조성물의 제조에 있어 프로스타글란딘 화합물의 용도로서, 이때 조절이 상기 줄기세포와 조성물을 접촉시킴으로써 야기되는 용도에 관한 것이다.

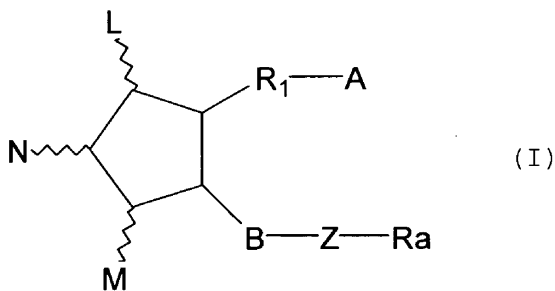
도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 시험예 2의 결과, 즉 당뇨병이 있는 마우스의 절제 상처 치료에 대한 화합물 A (11-데옥시-13,14-디히드로-15-케토-16,16-디플루오로-PGE₁) 연고의 효과를 나타낸 것이다.
연고 기재 (왼쪽 패널) 및 화합물 A 연고 (오른쪽 패널)로 처리한 동물의 피부 부위는 항-Ki67 항체로 염색하였다.
- 도 2는 시험예 3의 결과, 즉 간엽 줄기세포의 골아 세포 분화에 대한 (11-데옥시-13,14-디히드로-15-케토-16,16-디플루오로-PGE₁)의 효과를 나타낸 것이다.

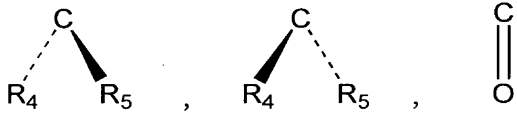
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본원에서 사용되는 프로스타글란딘 화합물의 명명법은 상기 화학식 (A)로 표시되는 프로스탄산의 번호 붙이기 체계에 기초한다.
- [0022] 화학식 (A)는 C-20 탄소 원자의 기본 골격을 나타내나, 본 발명이 이와 같은 수의 탄소 원자를 가지는 것들에 한정되는 것은 아니다. 화학식 (A)에서, PG 화합물의 기본 골격을 이루는 탄소 원자의 번호는 카르복실산 (1번이 됨)에서 출발하며, α -사슬의 탄소 원자들은 5원 고리를 향하여 2번 내지 7번이 되고, 고리 내의 것들은 8번 내지 12번이 되고, ω -사슬의 것들은 13번 내지 20번이 된다. α -사슬의 탄소 원자의 수가 감소하면, 번호는 2번 위치부터 시작하는 순서로 삭제되고; α -사슬의 탄소 원자의 수가 증가하면, 화합물은 카르복시기 (C-1) 대신 2번 위치에 각각의 치환기를 가지는 치환 화합물로서 명명된다. 마찬가지로, ω -사슬의 탄소 원자의 수가 감소하면, 번호는 20번 위치부터 시작하는 순서로 삭제되고; ω -사슬의 탄소 원자의 수가 증가하면, 20번 위치 이후의 탄소 원자는 치환기로서 명명된다. 화합물의 입체 화학은 달리 명시되지 않는 한 상기 화학식 (A)의 것과 동일하다.

- [0023] 일반적으로 용어 PGD, PGE 및 PGF는 각각 9 및/또는 11번 위치에 히드록시기를 가지는 PG 화합물을 나타내나, 본원에서 상기 용어들은 또한 9 및/또는 11번 위치에 히드록시기 이외의 치환기를 가지는 것들을 포함한다. 상기 화합물은 9-데히드록시-9-치환-PG 화합물 또는 11-데히드록시-11-치환-PG 화합물로 칭해진다. 히드록시기 대신 수소를 가지는 PG 화합물은 간단히 9- 또는 11-데옥시-PG 화합물로 명명된다.
- [0024] 상기된 바와 같이, PG 화합물의 명명법은 프로스탄산 골격에 기초한다. 그러나 화합물이 프로스타글란딘과 유사한 부분적 구조를 가지는 경우, "PG"의 축약형이 사용될 수도 있다. 따라서 α-사슬이 2개의 탄소 원자에 의해 연장된, 즉 α-사슬에 9개의 탄소 원자를 가지는 PG 화합물은 2-데카르복시-2-(2-카르복시에틸)-PG 화합물로 명명된다. 마찬가지로, α-사슬에 11개의 탄소 원자를 가지는 PG 화합물은 2-데카르복시-2-(4-카르복시부틸)-PG 화합물로 명명된다. 또한 ω-사슬이 2개의 탄소 원자에 의해 연장된, 즉 ω-사슬에 10개의 탄소 원자를 가지는 PG 화합물은 20-에틸-PG 화합물로 명명된다. 그러나 이러한 화합물들은 또한 IUPAC 명명법에 따라 명명될 수도 있다.
- [0025] 유사체 (치환된 유도체 포함) 또는 유도체의 예에는 α-사슬 말단의 카르복시기가 에스테르화된 PG 화합물; α-사슬이 연장된 화합물; 이의 생리학적 허용 가능 염; 2-3번 위치에 이중 결합 또는 5-6번 위치에 삼중 결합을 가지는 화합물, 3, 5, 6, 16, 17, 18, 19 및/또는 20번 위치에 치환기(들)를 가지는 화합물; 및 9 및/또는 11번 위치에 히드록시기 대신 저급 알킬 또는 히드록시(저급)알킬기를 가지는 화합물이 포함된다.
- [0026] 본 발명에 따르면, 3, 17, 18 및/또는 19번 위치의 바람직한 치환기에는 1 내지 4개의 탄소 원자를 가지는 알킬, 특히 메틸 및 에틸이 포함된다. 16번 위치의 바람직한 치환기에는 메틸 및 에틸과 같은 저급 알킬, 히드록시, 염소 및 플루오르와 같은 할로젠 원자, 및 트리플루오로메틸페녹시와 같은 아릴옥시가 포함된다. 17번 위치의 바람직한 치환기에는 메틸 및 에틸과 같은 저급 알킬, 히드록시, 염소 및 플루오르와 같은 할로젠 원자, 트리플루오로메틸페녹시와 같은 아릴옥시가 포함된다. 20번 위치의 바람직한 치환기에는 C1-4 알킬과 같은 포화 또는 불포화 저급 알킬, C1-4 알콕시와 같은 저급 알콕시, 및 C1-4 알콕시-C1-4 알킬과 같은 저급 알콕시 알킬이 포함된다. 5번 위치의 바람직한 치환기에는 염소 및 플루오르와 같은 할로젠 원자가 포함된다. 6번 위치의 바람직한 치환기에는 카르보닐기를 형성하는 옥소기가 포함된다. 9 및/또는 11번 위치에 히드록시, 저급 알킬 또는 히드록시(저급)알킬 치환기를 가지는 PG의 입체 화학은 α, β 또는 이의 혼합물일 수 있다.
- [0027] 또한 상기 유사체 또는 유도체는 1차 PG보다 사슬이 짧은 ω-사슬의 말단에 알콕시, 시클로알킬, 시클로알킬옥시, 페녹시 또는 페닐기를 가지는 화합물일 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 사용되는 프로스타글란딘 화합물은 하기 화학식 (I)로 표시된다:



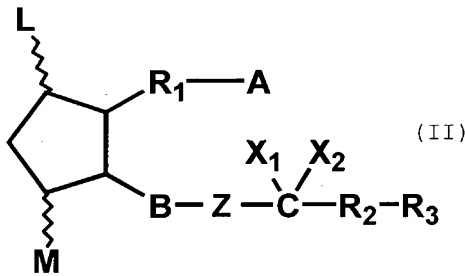
- [0029]
- [0030] [식에서,
- [0031] L, M 및 N은 수소, 히드록시, 할로젠, 저급 알킬, 히드록시(저급)알킬, 저급 알카노일옥시 또는 옥소로서, 이때 L 및 M 중 하나 이상은 수소 이외의 기이고, 5원 고리는 1개 이상의 이중 결합을 가질 수 있고;
- [0032] A는 -CH₃, 또는 -CH₂OH, -COCH₂OH, -COOH 또는 이의 기능성 유도체이고;
- [0033] B는 단일 결합, -CH₂-CH₂-, -CH=CH-, -C≡C-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH₂-, -CH₂-CH=CH-, -C≡C-CH₂- 또는 -CH₂-C≡C-이고;
- [0034] Z는

[0035]  또는 단일 결합으로서, 이때 R₄ 및 R₅는 수소, 히드록시, 할로젠, 저급 알킬, 저급 알콕시 또는 히드록시(저급)알킬이며, R₄ 및 R₅는 동시에 히드록시 및 저급 알콕시는 아니고;

[0036] R₁은 포화 또는 불포화 2가 저급 또는 중급 지방족 탄화수소 잔기로서, 이는 비치환되거나 또는 할로젠, 알킬, 히드록시, 옥소, 아릴 또는 헤테로고리기로 치환되고, 지방족 탄화수소의 1개 이상의 탄소 원자는 임의로는 산소, 질소 또는 황으로 치환되고; 및

[0037] R_a는 비치환되거나 또는 할로젠, 옥소, 히드록시, 저급 알킬, 저급 알콕시, 저급 알카노일옥시, 시클로(저급)알킬, 시클로(저급)알킬옥시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로고리기 또는 헤테로고리-옥시기로 치환된, 포화 또는 불포화 저급 또는 중급 지방족 탄화수소 잔기; 저급 알콕시; 저급 알카노일옥시; 시클로(저급)알킬; 시클로(저급)알킬옥시; 아릴; 아릴옥시; 헤테로고리기; 헤테로고리-옥시기임].

[0038] 본 발명에 사용되는 바람직한 화합물은 하기 화학식 (II)로 표시된다:

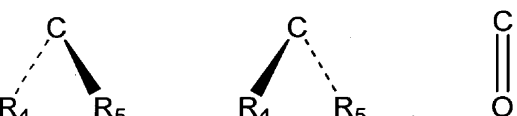


[0039] [식에서,
 [0040] L 및 M은 수소 원자, 히드록시, 할로젠, 저급 알킬, 히드록시(저급)알킬, 저급 알카노일옥시 또는 옥소로서, 이때 L 및 M 중 하나 이상은 수소 이외의 기이고, 5원 고리는 1개 이상의 이중 결합을 가질 수 있고;

[0041] A는 -CH₃, 또는 -CH₂OH, -COCH₂OH, -COOH 또는 이의 기능성 유도체이고;

[0042] B는 단일 결합, -CH₂-CH₂-, -CH=CH-, -C≡C-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH₂-, -CH₂-CH=CH-, -C≡C-CH₂- 또는 -CH₂-C≡C-이고;

[0043] Z는

[0044]  또는 단일 결합으로서, 이때 R₄ 및 R₅는 수소, 히드록시, 할로젠, 저급 알킬, 저급 알콕시 또는 히드록시(저급)알킬이며, R₄ 및 R₅는 동시에 히드록시 및 저급 알콕시는 아니고;

[0045] X₁ 및 X₂는 수소, 저급 알킬, 또는 할로젠이고;

[0046] R₁은 포화 또는 불포화 2가 저급 또는 중급 지방족 탄화수소 잔기로서, 이는 비치환되거나 또는 할로젠, 알킬, 히드록시, 옥소, 아릴 또는 헤테로고리기로 치환되고, 지방족 탄화수소의 1개 이상의 탄소 원자는 임의로는 산소, 질소 또는 황으로 치환되고;

[0047] R₂는 단일 결합 또는 저급 알킬렌이고; 및

[0048] R₃은 저급 알킬, 저급 알콕시, 저급 알카노일옥시, 시클로(저급)알킬, 시클로(저급)알킬옥시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로고리기 또는 헤테로고리-옥시기임].

- [0050] 상기 화학식에서, R₁ 및 R_a에 관한 정의에 있어 용어 "불포화"는 주사슬 및/또는 곁사슬의 탄소 원자들 사이에 단독으로, 분리되어, 또는 연속적으로 존재하는 1개 이상의 이중 결합 및/또는 삼중 결합을 포함하는 것을 의미한다. 일반적인 명명법에 따르면, 연속된 두 위치 사이의 불포화 결합은 두 위치 중 더 낮은 번호를 나타내는 것으로 표시되고, 두 말단 위치 사이의 불포화 결합은 두 위치 모두를 나타내는 것으로 표시된다.
- [0051] 용어 "저급 또는 중급 지방족 탄화수소"는 1 내지 14개의 탄소 원자 (곁사슬의 경우, 1 내지 3개의 탄소 원자가 바람직함), 바람직하게는 1 내지 10개, 특히 1 내지 8개의 탄소 원자를 가지는 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소기를 의미한다.
- [0052] 용어 "할로젠 원자"는 플루오르, 염소, 브롬 및 요오드를 의미한다.
- [0053] 명세서 전체에 걸쳐 용어 "저급"은 달리 명시되지 않는 한 1 내지 6개의 탄소 원자를 가지는 기를 포함하는 것을 의미한다.
- [0054] 용어 "저급 알킬"은 1 내지 6개의 탄소 원자를 포함하는 직쇄 또는 분지쇄 포화 탄화수소기를 의미하며, 예컨대, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, t-부틸, 펜틸 및 헥실을 포함한다.
- [0055] 용어 "저급 알킬렌"은 1 내지 6개의 탄소 원자를 포함하는 직쇄 또는 분지쇄 2가 포화 탄화수소기를 의미하며, 예컨대, 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌, 이소프로필렌, 부틸렌, 이소부틸렌, t-부틸렌, 펜틸렌 및 헥실렌을 포함한다.
- [0056] 용어 "저급 알콕시"는 저급 알킬-0-기를 의미하며, 이때 저급 알킬은 상기 정의된 바와 같다.
- [0057] 용어 "히드록시(저급)알킬"은 1개 이상의 히드록시기로 치환된 상기 정의된 바와 같은 저급 알킬, 예컨대 히드록시메틸, 1-히드록시에틸, 2-히드록시에틸 및 1-메틸-1-히드록시에틸을 의미한다.
- [0058] 용어 "저급 알카노일옥시"는 화학식 RCO-0-로 표시되는 기를 의미하며, 이때 RCO-는 상기 정의된 바와 같은 저급 알킬기의 산화에 의해 형성되는 아실기, 예컨대 아세틸이다.
- [0059] 용어 "시클로(저급)알킬"은 상기 정의된 바와 같은 저급 알킬기의 고리화에 의해 형성되는 고리기를 의미하나 3개 이상의 탄소 원자를 포함하며, 예컨대, 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸 및 시클로헥실을 포함한다.
- [0060] 용어 "시클로(저급)알킬옥시"는 시클로(저급)알킬-0-기를 의미하며, 이때 시클로(저급)알킬은 상기 정의된 바와 같다.
- [0061] 용어 "아릴"은 비치환 또는 치환 방향족 탄화수소 고리 (바람직하게는, 단환기), 예컨대, 페닐, 톨릴, 자일릴을 포함할 수 있다. 치환기의 예는 할로젠 원자 및 할로(저급)알킬이며, 이때 할로젠 원자 및 저급 알킬은 상기 정의된 바와 같다.
- [0062] 용어 "아릴옥시"는 화학식 ArO-로 표시되는 기를 의미하며, 이때 Ar은 상기 정의된 바와 같은 아릴이다.
- [0063] 용어 "헤테로고리기"는 임의로 치환된 탄소 원자, 및 질소 원자, 산소 원자 및 황 원자로부터 선택되는 1 또는 2 유형의 헤테로 원자 1 내지 4개, 바람직하게는 1 내지 3개를 가지는 5 내지 14원, 바람직하게는 5 내지 10원 고리인 단환 내지 삼환형, 바람직하게는 단환형 헤테로고리기를 포함할 수 있다. 헤테로고리기의 예는 푸릴, 티에닐, 피롤릴, 옥사졸릴, 이속사졸릴, 티아졸릴, 이소티아졸릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 푸라자닐, 피라닐, 피리딜, 피리다지닐, 피리미딜, 피라지닐, 2-피롤리닐, 피롤리디닐, 2-이미다졸리닐, 이미다졸리디닐, 2-피라졸리닐, 피라졸리디닐, 피페리디노, 피페라지닐, 모르폴리노, 인돌릴, 벤조티에닐, 퀴놀릴, 이소퀴놀릴, 퓨리닐, 퀴나졸리닐, 카르바졸릴, 아크리디닐, 페난트리디닐, 벤즈이미다졸릴, 벤즈이미다졸리닐, 벤조티아졸릴, 페노티아지닐이 포함된다. 상기의 경우 치환기의 예는 할로젠, 및 저급 알킬기로 치환된 할로젠이 포함되며, 이때 할로젠 원자 및 저급 알킬기는 상기된 바와 같다.
- [0064] 용어 "헤테로고리-옥시기"는 화학식 HcO-로 표시되는 기를 의미하며, 이때 Hc는 상기된 바와 같은 헤테로고리기이다.
- [0065] A에 관한 용어 "기능성 유도체"에는 염 (바람직하게는, 약학적 허용 가능 염), 에테르, 에스테르 및 아미드가 포함된다.
- [0066] 적절한 "약학적 허용 가능 염"에는 통상적으로 사용되는 무독성염, 예컨대 알칼리 금속염 (예컨대, 나트륨염 및 칼륨염), 알칼리 토금속염 (예컨대, 칼슘염 및 마그네슘염), 암모늄염과 같이 무기 염기를 갖는 염; 또는 아민

염 (예컨대, 메틸아민염, 디메틸아민염, 시클로헥실아민염, 벤질아민염, 피페리딘염, 에틸렌디아민염, 에탄올아민염, 디에탄올아민염, 트리에탄올아민염, 트리스(히드록시메틸아미노)에탄염, 모노메틸-모노에탄올아민염, 프로카인염 및 카페인염), 염기성 아미노산염 (예컨대, 아르기닌염 및 리신염), 테트라알킬암모늄염과 같이 유기 염기를 갖는 염 등이 포함된다. 이러한 염들은 통상적인 공정에 의해, 예컨대 상응하는 산 및 염기로부터 또는 염 교환에 의해 제조될 수 있다.

[0067] 에테르의 예에는 알킬 에테르, 예컨대, 메틸 에테르, 에틸 에테르, 프로필 에테르, 이소프로필 에테르, 부틸 에테르, 이소부틸 에테르, t-부틸 에테르, 펜틸 에테르 및 1-시클로프로필 에틸 에테르와 같은 저급 알킬 에테르; 및 옥틸 에테르, 디에틸헥실 에테르, 라우릴 에테르 및 세틸 에테르와 같은 중급 또는 고급 알킬 에테르; 올레일 에테르 및 리놀레닐 에테르와 같은 불포화 에테르; 비닐 에테르, 알릴 에테르와 같은 저급 알케닐 에테르; 에틸닐 에테르 및 프로피닐 에테르와 같은 저급 알키닐 에테르; 히드록시에틸 에테르 및 히드록시이소프로필 에테르와 같은 히드록시(저급)알킬 에테르; 메톡시메틸 에테르 및 1-메톡시에틸 에테르와 같은 저급 알콕시(저급)알킬 에테르; 페닐 에테르, 토실 에테르, t-부틸페닐 에테르, 살리실 에테르, 3,4-디메톡시페닐 에테르 및 벤즈아미도페닐 에테르와 같은 임의로 치환된 아릴 에테르; 및 벤질 에테르, 트리틸 에테르 및 벤즈히드릴 에테르와 같은 아릴(저급)알킬 에테르가 포함된다.

[0068] 에스테르의 예에는 지방족 에스테르, 예컨대, 메틸 에스테르, 에틸 에스테르, 프로필 에스테르, 이소프로필 에스테르, 부틸 에스테르, 이소부틸 에스테르, t-부틸 에스테르, 펜틸 에스테르 및 1-시클로프로필에틸 에스테르와 같은 저급 알킬 에스테르; 비닐 에스테르 및 알릴 에스테르와 같은 저급 알케닐 에스테르; 에틸닐 에스테르 및 프로피닐 에스테르와 같은 저급 알키닐 에스테르; 히드록시에틸 에스테르와 같은 히드록시(저급)알킬 에스테르; 메톡시메틸 에스테르 및 1-메톡시에틸 에스테르와 같은 저급 알콕시(저급)알킬 에스테르; 및 페닐 에스테르, 톨릴 에스테르, t-부틸페닐 에스테르, 살리실 에스테르, 3,4-디메톡시페닐 에스테르 및 벤즈아미도페닐 에스테르와 같은 임의로 치환된 아릴 에스테르; 및 벤질 에스테르, 트리틸 에스테르 및 벤즈히드릴 에스테르와 같은 아릴(저급)알킬 에스테르가 포함된다.

[0069] A의 아미드는 화학식 -CONR'R" (이때 R' 및 R"은 각각 수소, 저급 알킬, 아릴, 알킬- 또는 아릴-설폰닐, 저급 알케닐 및 저급 알키닐임)로 표시되는 기를 의미하며, 예컨대, 메틸아미드, 에틸아미드, 디메틸아미드 및 디에틸아미드와 같은 저급 알킬 아미드; 아닐리드 및 톨루이디드와 같은 아릴아미드; 및 메틸설폰닐아미드, 에틸설폰닐아미드 및 톨릴설폰닐아미드와 같은 알킬- 또는 아릴-설폰닐아미드를 포함한다.

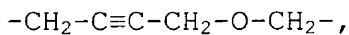
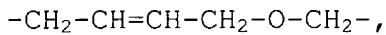
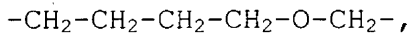
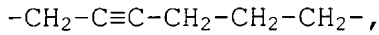
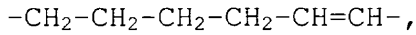
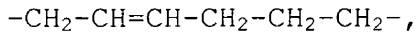
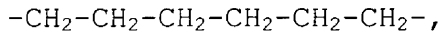
[0070] L 및 M의 바람직한 예에는 수소, 히드록시 및 옥소가 포함되며, 특히 M은 히드록시이고 L은 소위 PGE 유형의 5 원 고리 구조를 가지는 옥소이다.

[0071] A의 바람직한 예는 -COOH, 이의 약학적 허용 가능 염, 이의 에스테르 또는 아미드이다.

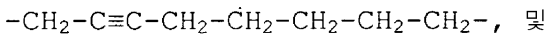
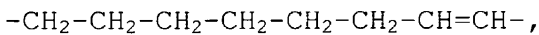
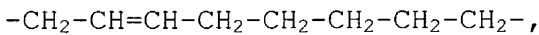
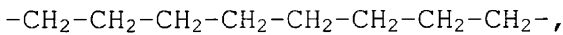
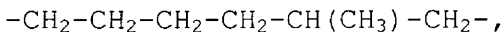
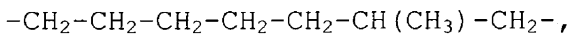
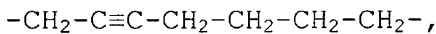
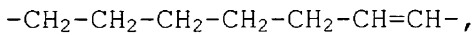
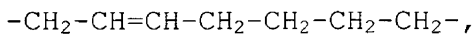
[0072] X₁ 및 X₂의 바람직한 예는 둘 모두 할로겐 원자, 보다 바람직하게는 플루오르 원자인 것 (소위, 16,16-디플루오로 유형)이다.

[0073] 바람직한 R₁은 1 내지 10개의 탄소 원자, 바람직하게는 6 내지 10개의 탄소 원자를 포함하는 탄화수소 잔기이다. 또한 지방족 탄화수소의 1개 이상의 탄소 원자는 임의로는 산소, 질소 또는 황으로 치환된다.

[0074] R₁의 예에는, 예컨대 하기의 기들이 포함된다:



[0075] $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-,$



[0076] $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-.$

[0077] 바람직한 R_a는 1 내지 10개의 탄소 원자, 보다 바람직하게는 1 내지 8개의 탄소 원자를 포함하는 탄화수소이다. R_a는 1개의 탄소 원자를 가지는 1 또는 2개의 측쇄를 가질 수 있다.

[0078] 바람직한 화합물은 화학식 (I)에서 R_a가 할로젠으로 치환되고/거나 Z가 C=O인 것, 또는 화학식 (II)에서 X₁ 및 X₂ 중 하나가 할로젠으로 치환되고/거나 Z가 C=O인 것을 포함한다.

[0079] 가장 바람직한 구현에는 프로스타글란딘 화합물이 11-데옥시-13,14-디히드로-15-케토-16,16-디플루오로-프로스타글란딘 E₁ 화합물인 것이다.

[0080] 상기 화학식 (I) 및 (II)에서 고리 및 α- 및/또는 ω-사슬의 배열은 1차 PG의 그것과 동일하거나 상이할 수 있다. 그러나 본 발명은 또한 1차 유형 배열을 갖는 화합물 및 비1차 유형 배열을 갖는 화합물의 혼합물을 포함한다.

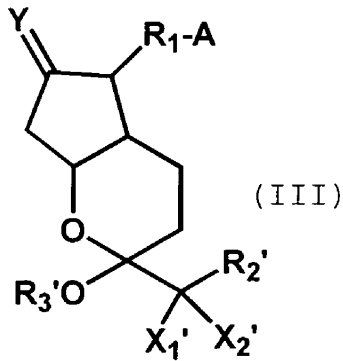
[0081] 본 발명에서, 13번 및 14번 위치 사이에 디히드로가, 15번 위치에 케토(=O)가 있는 PG 화합물은 11번 위치의 히드록시 및 15번 위치의 케토 사이의 헤미아세탈 형성에 의한 케토-헤미아세탈 평형에 이를 수 있다.

[0082] 예컨대, X₁ 및 X₂ 둘 모두가 할로젠 원자, 특히 플루오르 원자인 경우, 상기 화합물은 토토머 이성질체인 이환형 화합물을 포함하는 것으로 밝혀졌다.

[0083] 상기된 바와 같은 토토머 이성질체가 존재하는 경우, 두 토토머 이성질체의 비율은 분자의 나머지 구조 또는 존재하는 치환기의 종류에 따라 달라진다. 때로는 한 이성질체가 나머지 하나에 비해 우세하게 존재할 수도 있다. 그러나 본 발명은 두 이성질체를 모두 포함하는 것으로 간주되어야 한다.

[0084] 또한 본 발명에서 사용되는 15-케토-PG 화합물은 이환형 화합물 및 이의 유사체 또는 유도체를 포함한다.

[0085] 상기 이환형 화합물은 하기 화학식 (III)으로 표시된다:



[0086]

[0087] [식에서,

[0088] A는 -CH₃, 또는 -CH₂OH, -COCH₂OH, -COOH 또는 이의 기능성 유도체이고;

[0089] X₁' 및 X₂'는 수소, 저급 알킬, 또는 할로젠이고;

[0090] Y는

[0091] 이며, 이때 R₄' 및 R₅'는 수소, 히드록시, 할로젠, 저급 알킬, 저급 알콕시 또는 히드록시(저급)알킬이고, R₄' 및 R₅'는 동시에 히드록시 및 저급 알콕시는 아니고;

[0092] R₁은 포화 또는 불포화 2가 저급 또는 중급 지방족 탄화수소 잔기로서, 이는 비치환되거나 또는 할로젠, 알킬, 히드록시, 옥소, 아릴 또는 헤테로고리기로 치환되고, 지방족 탄화수소의 1개 이상의 탄소 원자는 임의로는 산소, 질소 또는 황으로 치환되고; 및

[0093] R₂'는 비치환되거나 또는 할로젠, 옥소, 히드록시, 저급 알킬, 저급 알콕시, 저급 알카노일옥시, 시클로(저급)알킬, 시클로(저급)알킬옥시, 아릴, 아릴옥시, 헤테로고리 또는 헤테로고리-옥시기로 치환된, 포화 또는 불포화 저급 또는 중급 지방족 탄화수소 잔기; 저급 알콕시; 저급 알카노일옥시; 시클로(저급)알킬; 시클로(저급)알킬옥시; 아릴; 아릴옥시; 헤테로고리; 헤테로고리-옥시이고;

[0094] R₃'는 수소, 저급 알킬, 시클로(저급)알킬, 아릴 또는 헤테로고리기임].

[0095] 아울러, 본 발명에서 사용되는 화합물이 이성질체의 존재 또는 부재와 무관하게 케토형에 기초한 화학식 또는 화학명으로 표시될 수 있는 한편, 상기 구조 및 이름이 헤미아세탈형 화합물을 배제함을 의미하는 것은 아니라고 간주되어야 한다.

[0096] 본 발명에서, 각각의 토토머 이성질체, 이의 혼합물, 또는 광학 이성질체, 이의 혼합물, 라세믹 혼합물, 및 다른 입체 이성질체와 같은 임의의 이성질체가 동일한 목적으로 사용될 수 있다.

[0097] 본 발명에서 사용되는 화합물들 중 일부는 USP No. 5,073,569, 5,166,174, 5,221,763, 5,212,324, 5,739,161 및 6,242,485에 개시된 방법에 의해 제조될 수 있다 (상기 인용된 참고 문헌들은 본원에 참고 문헌으로 포함되어 있음).

[0098] 본 발명의 구현에는 포유류 대상체의 줄기세포 증식 및/또는 분화의 조절 방법을 포함하며, 이는 이를 필요로

하는 대상체에 유효량의 프로스타글란딘 화합물을 투여하는 것을 포함한다.

- [0099] 포유류 대상체는 인간을 포함하는 임의의 포유류 대상체일 수 있다. 줄기세포 증식 및/또는 분화의 조절을 필요로 하는 대상체에는 조직 또는 기관이 손상되거나 결함이 있는 질병 또는 증상을 앓는 이들이 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예컨대, 포유류 대상체는 골다공증, 골절, 치조골 재생, 악성 빈혈 및 근이영양증을 앓는 이들일 수 있다. 따라서 본 발명은 또한 조직 또는 기관이 손상되거나 결함이 있는 질병 또는 증상의 치료 방법, 예컨대 골다공증, 골절, 치조골 재생, 악성 빈혈 및 근이영양증의 치료 방법을 제공한다.
- [0100] 화합물은 전신에 또는 국소적으로 적용될 수 있다. 화합물은 대체로 경구 투여, 비내 투여, 흡입 투여, 정맥내 주사 (주입 포함), 피하 주사, 직장내 투여, 질내 투여, 경피 투여 등에 의해 투여될 수 있다.
- [0101] 투여량은 동물의 종류, 연령, 체중, 치료해야 할 증상, 원하는 치료 효과, 투여 경로, 치료 기간 등에 따라 달라질 수 있다. 만족스러운 효과는 1일 당 0.00001~500 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.0001~100 mg/kg의 양으로 1일 당 전신 투여 1 내지 4회 또는 지속적 투여에 의해 취득될 수 있다.
- [0102] 화합물은 바람직하게는 통상적인 방식으로 투여하기에 적절한 약학 조성물로 제형될 수 있다. 조성물은 경구 투여, 비내 투여, 흡입 투여, 주사 또는 관류에 적절할 것일 수 있음에 더불어, 외용 제제, 좌제 또는 페서리일 수도 있다.
- [0103] 본 발명의 조성물은 생리학적 허용 가능 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 첨가제는 본 화합물과 함께 사용되는 성분, 예컨대 부형제, 희석제, 충전제, 용해제, 유희제, 보강제, 결합제, 분해제, 피막제, 캡슐화제, 연고 기재, 좌제 기재, 에어로솔화제, 유화제, 분산제, 서스펜션화제, 증점제, 강장제, 완충제, 진정제, 방부제, 향산화제, 교정약, 향미제, 착색제, 시클로덱스트린 및 생분해성 중합체와 같은 기능성 물질, 안정제를 포함할 수 있다. 상기 첨가제는 당업계에서 널리 공지되어 있으며, 일반적인 약학 참고 서적들에 기재된 것들로부터 선택될 수 있다.
- [0104] 본 발명의 조성물 내의 상기 화합물의 양은 조성물의 제형에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로 0.000001~10.0 %, 보다 바람직하게는 0.00001~5.0 %, 가장 바람직하게는 0.0001~1 %일 수 있다.
- [0105] 경구 투여용 고체 조성물의 예에는 정제, 트로키, 설하 정제, 캡슐, 환약, 분말, 과립 등이 포함된다. 고체 조성물은 하나 이상의 활성 성분을 하나 이상의 불활성 희석제와 혼합함으로써 제조될 수 있다. 조성물은 불활성 희석제 이외의 첨가제, 예컨대 유희제, 분해제 및 안정제를 추가로 포함할 수 있다. 정제 및 환약은 필요한 경우 장내 또는 위장내 필름으로 코팅될 수 있다. 이들은 2 이상의 층으로 둘러싸일 수도 있다. 또한 이들은 서방성 물질에 흡착되거나, 또는 마이크로캡슐화될 수 있다. 아울러 조성물은 젤라틴과 같이 용이하게 분해가능한 물질에 의해 캡슐화될 수 있다. 이는 또한 지방산 또는 이의 모노-, 디- 또는 트리글리세리드와 같은 적절한 용매에 용해되어 연질 캡슐이 될 수 있다. 설하 정제는 신속 작용성이 필요한 경우에 사용될 수 있다.
- [0106] 경구 투여용 액체 조성물의 예에는 에멀션, 용액, 서스펜션, 시럽 및 엘릭시르 등이 포함된다. 상기 조성물은 통상적으로 사용되는 불활성 희석제, 예컨대 정제수 또는 에틸 알콜을 추가로 포함할 수 있다. 조성물은 불활성 희석제 이외의 첨가제, 예컨대 습윤제 및 서스펜션화제와 같은 보강제, 감미료, 향미제, 향료 및 방부제를 포함할 수 있다.
- [0107] 본 발명의 조성물은 분사 조성물의 형태일 수 있으며, 이는 하나 이상의 활성 성분을 포함하며 공지의 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0108] 비내용 제조물의 예는 하나 이상의 활성 성분을 포함하는 수성 또는 유성 용액, 서스펜션 또는 에멀션일 수 있다. 흡입에 의한 활성 성분 투여에 있어, 본 발명의 조성물은 에어로솔을 제공할 수 있는 서스펜션, 용액 또는 에멀션 형태, 또는 건조 분말 흡입에 적절한 분말 형태일 수 있다. 흡입 투여용 조성물은 통상적으로 사용되는 추진제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0109] 비경구 투여를 위한 본 발명의 주사 가능 조성물의 예에는 무균의 수성 또는 비수성 용액, 서스펜션 및 에멀션이 포함된다. 수용액 또는 서스펜션에 관한 희석제에는, 예컨대 주사용 증류수, 생리 식염수 및 링거액이 포함될 수 있다.
- [0110] 용액 및 서스펜션에 관한 비수성 희석제에는, 예컨대 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에탄올과 같은 알콜, 및 폴리소르베이트가 포함될 수 있다. 조성물은 방부제, 습윤제,

유화제, 분산제 등과 같은 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 이는 여과 (예컨대, 박테리아 보유 필터 이용), 살균기와와의 조합, 또는 기체 또는 방사성 동위 원소 방사 살균에 의해 살균될 수 있다. 주사 가능 조성물은 또한 사용하기 전에 주사용 살균 용매에 용해시켜야 하는 살균 분말 조성물로서 제공될 수도 있다.

- [0111] 본 발명의 외용 제제는 피부과 및 이비인후과 분야에서 사용되는 모든 외용 제조물을 포함하며, 연고, 크림, 로션 및 스프레이를 포함한다.
- [0112] 본 발명의 또 다른 형태는 좌제 또는 폐서리로서, 이는 체온에서 연화되는 통상적인 기체, 예컨대 카카오 버터를 활성 성분에 혼합함으로써 제조할 수 있고, 흡수성을 향상시키기 위해 적절한 연화점을 가지는 비이온성 계면활성제를 사용할 수도 있다.
- [0113] 본 발명의 또 다른 구현에는 포유류 대상체의 줄기세포 증식 및/또는 분화의 조절 방법으로서, 상기 줄기세포를 유효량의 프로스타글란딘 화합물과 접촉시키는 것을 포함하는 방법이다.
- [0114] 상기 방법은, 예컨대 시험관 내 (in vitro) 또는 생체 외 (ex vivo)에서 배양 중인 세포에 사용될 수 있다. 예컨대, 줄기세포 또는 전구 세포는 배지 내에서 시험관 내 배양될 수 있고, 접촉 단계는 배지에 1개 이상의 프로스타글란딘 화합물을 1회 이상의 증식, 생존 및/또는 분화를 조절하기에 충분한 양, 예컨대 $1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ 의 양으로 첨가함으로써 야기될 수 있다. 본 발명에 따르면, 세포는 본 발명의 화합물 및 하나 이상의 줄기세포 조절자와 동시에 접촉될 수 있거나, 또는 세포는 순차적으로 접촉될 수 있다.
- [0115] 상기 줄기세포 증식 및/또는 분화 조절 방법은 줄기세포의 증식 및/또는 분화를 조절하기 위해 하나 이상의 줄기세포 조절자를 대상체에 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다.
- [0116] 본 발명의 방법은 줄기세포의 생체 외 증가 및/또는 분화를 촉진함으로써 이식 또는 투여에 적절한 세포 집단을 이를 필요로 하는 대상체에 제공하기 위해 사용될 수 있다. 줄기세포의 생체 외 증가는 다수의 질병 증상을 치료하기 위한 치료학적 지표가 된다.
- [0117] 줄기세포의 증식 및/또는 분화 조절 방법은 또한 조직 내 상주 줄기세포의 증식 및/또는 분화를 조절하여 질병이나 장애의 결과로 또는 수술이나 부상 등의 이후에 손상된 조직의 대체 또는 복구를 지원하기 위해 생체 내에서 사용될 수 있다.
- [0118] 줄기세포의 증식 및 뒤이은 분화를 조절하는 순차적 방법이 또한 고려될 수 있다. 예컨대, 줄기세포 집단은 세포를 프로스타글란딘 화합물과 직접적 또는 간접적으로 접촉시킴으로써 생체 외 증가될 수 있다.
- [0119] 본 발명의 방법은 재생 치료에 사용될 수도 있다. 증가된 세포 집단은 이어서 대상체에 투여되고, 제자리에서 줄기세포의 분화를 촉진하는 하나 이상의 줄기세포 조절자로 생체 내 처리된다. 다르게는, 대상체에 세포가 투여되기 전에 두 단계를 생체 외 수행할 수도 있다.
- [0120] 생체 내 및 생체 외 방법에 있어, 줄기세포는 자가 조직성, 동종 이형 또는 이종 발생성일 수 있다.
- [0121] 상기 방법의 치료학적 적용은 일반적으로, 예컨대 화학 치료 또는 방사선 치료 이후에, 근육 또는 피부 부상 이후에, 또는 질병 및 장애의 치료 또는 관리 중에 상실 또는 손상된 조직을 대체할 필요가 있는 상황에 제공된다. 예컨대, 상기 방법은 신경변성 장애, 예컨대 골다공증과 같은 퇴행성 골질환; 골절, 치조골 재생; 악성 빈혈 및 근이영양증의 치료, 관리 또는 예방에 사용될 수 있다.
- [0122] 본원에 사용되는 용어 "줄기세포 조절자"는 줄기세포 증식, 분화, 또는 증식 및 분화 둘 모두를 촉진 또는 저해할 수 있는 화합물을 의미한다.
- [0123] 본원에 사용되는 용어 "줄기세포"는 인간 기원 또는 비인간 포유동물 기원의 줄기세포를 포함하고, 하나 이상의 분화된 세포 유형으로 분화될 수 있는 세포를 의미한다. 줄기세포는 임의의 세포 유형으로 발생하는 능력을 가지는 만능성 줄기세포일 수 있거나, 또는 수개의 상이한 최종 분화 세포 유형으로 분화하는 능력을 가지며 특정 조직 또는 기관, 예컨대 혈액, 신경, 골격근, 심근, 골수, 피부, 소화관, 뼈, 신장, 간, 이자, 흉선 등으로부터 유래되는 다능성 줄기세포일 수 있다. 만능성 줄기세포는 일반적으로 배아줄기세포가 그 기원이며, 다능성 줄기세포는 체줄기세포, 예컨대 간엽 줄기세포, 골수 줄기세포, 지방 유래 줄기세포, 조혈 줄기세포, 상피 줄기세포 및 신경세포성 줄기세포를 포함한다. 본 발명에 따르면, 줄기세포는 바람직하게는 신경세포성 줄기세포, 상피 줄기세포 및 간엽 줄기세포일 수 있다.
- [0124] 본원에서 사용되는 용어 "전구 세포"는 특정의 세포 계통으로 발달되며 일련의 세포 분열에 의해 특정의 제한된

범위의 분화 세포 유형이 되는 세포를 의미한다. 전구 세포의 예는 근아세포가 있으며, 이는 오직 한 유형의 세포로만 분화할 수 있는 반면 그 자체로는 완전히 성숙하거나 완전히 분화되지 않은 것이다.

- [0125] 본원에서 세포와 관련하여 상호 교환적으로 사용되는 용어 "증식"은 세포 분열에 의해 동일 유형의 세포의 수가 증가하는 것을 의미한다.
- [0126] 본원에서 사용되는 용어 "분화"는 세포가 특정 기능에 관하여 전문화되는 발생 과정, 예컨대 초기 세포 유형과는 다른 형태학적 특성 및/또는 기능을 하나 이상 획득하게 되는 과정을 의미한다.
- [0127] 본 발명의 약학 조성물은 본 발명의 목적에 반하는 것이 아닌 한, 다른 약리학적 성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0128] 본 발명은 하기 시험예를 참조하여 보다 상세히 설명될 것이나, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0129] 시험예 1
- [0130] 손상된 뉴런 (neuron)에 대한 화합물 A (11-데옥시-13,14-디히드로-15-케토-16,16-디플루오로-PGE₁)의 효과를 시험하였다. 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라히드로피리딘 히드로클로라이드 (MPTP)를 10주령의 수컷 C57BL/6 마우스에 투여량 15 mg/kg으로 각 투여 간에 약 3시간 간격으로 1일 당 4회 2일 동안 (실험 제1일 및 제2일) 복강내 투여하여 뇌의 도파민성 뉴런을 파괴시켰다. 마지막 MPTP 투여가 있는 다음날 (제3일), 일부 MPTP-처리 마우스를 희생시켜 선조체 내의 티로신 히드록실라아제 (TH)-양성의 면역 염색 섬유의 면적을 측정함으로써 흑질 선조체의 도파민 뉴런의 퇴화 및 손실 정도를 평가하였다. 나머지 MPTP-처리 마우스는 화합물 A (11-데옥시-13,14-디히드로-15-케토-16,16-디플루오로-PGE₁) 또는 매개체를 마지막 MPTP 투여 있는 다음날부터 시작하여 5일간 (제3일 내지 제7일) 1일 당 2회 구강 투여하였다. 그 마우스들을 화합물 A 또는 매개체의 마지막 투여 있는 다음날 (제8일)에 목을 베고 두개골을 절개하여 뇌 전체를 제거한 후, 보우인 용액 (Bouin's fluid) (pH 3.5~4.0)에 담갔다. 선조체 (정수리점에서 0.74 mm 앞) 및 흑색질 (정수리점에서 3.08 mm 뒤) 정도의 뇌 부분을 잘라냈다. 탈수 이후, 그 조각들을 끼워 넣은 파라핀을 사용하였다. 정수리점 앞 0.74 mm 및 정수리점 뒤 3.08 mm의 각 조각으로부터 박편 (두께 약 6 μm)들을 제조한 후, 그 박편들을 TH 면역 염색에 사용하였다. 정수리점 뒤 3.08 mm의 우측 흑색질 치밀부 (SNC)의 TH-양성 면역 염색 세포 수를 ×20 현미경 대물렌즈가 달린 광학 현미경 OLYMPUS BH-2 (Olympus Corp.)를 사용하여 시각적 관찰에 의해 계산하였다. 선조체의 TH-양성 면역 염색 섬유의 면적을 측정함에 있어서는, 정수리점 앞 0.74 mm의 우측 꼬리 피각 (CPu)의 TH-양성 면역 염색 섬유에 대하여 ×40 현미경 대물렌즈가 달린 광학 현미경 OLYMPUS BH-2 (Olympus Corp.)으로 관찰한 상을 OLYMPUS MCD-350을 통해 컴퓨터에 저장하였고, 5 μm² 초과 TH-양성 섬유 면적을 상 분석기 Win ROOF (V5.6, Mitani Corp.)를 사용하여 측정하여 면적 1 mm² 단위로 표현하였다.
- [0131] 마지막 MPTP 투여가 있는 다음날 (제3일), MPTP-처리 마우스는 이미 선조체의 TH-양성 면역 염색 섬유의 면적 (0.0168±0.0029 mm²)에 있어 정상 마우스 (0.0758±0.0182 mm²)에 비해 상당한 감소를 나타냈고, 이에 따라 이 틀간의 MPTP 처리에 의해 제3일에 이미 흑질 선조체의 도파민성 뉴런의 퇴화 및 상실이 관찰되었다.
- [0132] 표 1에 제시된 바와 같이, 처리 기간 이후 (제8일), "MPTP + 매개체 (대조물)" 군에서는 "생리 식염수 + 매개체 (대조물)" 군에 비해 선조체에서 훨씬 더 작은 면적의 TH-양성 섬유가 관찰되었다. "MPTP + 매개체 (대조물)" 군의 상기 면적은 제3일에 MPTP-처리 마우스에서 관찰된 것과 유사하였다. 한편, "MPTP + 화합물 A (0.1 mg/kg)" 군 및 "MPTP + 화합물 A (1 mg/kg)" 군은 "MPTP + 매개체 (대조물)" 군에 비해 선조체에서 훨씬 더 큰 평균 면적의 TH-양성 섬유를 나타냈다.
- [0133] 표 2에 제시된 바와 같이, 흑색질에 있어 TH-양성 면역 염색 세포의 수는 화합물 A의 투여량에 비례하여 증가하였다.
- [0134] 상기 결과는 화합물 A가 손상된 뉴런을 회복시킴을 보여준다. 또한 결과는 화합물 A가 줄기세포의 증식 및 분화를 용이하게 하고 손상된 조직을 재생시킴을 나타낸다.

[0135] [표 1] MPTP-처리 마우스에 있어 선조체의 TH-양성 면역 염색 섬유 면적에 대한 화합물 A의 경구 투여 효과.

군	n	선조체의 TH-양성 면역 염색 섬유의 면적 (mm ²), 평균 ± S.E.
생리 식염수 + 매개체 (대조물)	10	0.1432 ± 0.0223
MPTP + 매개체 (대조물)	10	0.0117 ± 0.0029**
MPTP + 화합물 A 0.1 mg/kg	10	0.0465 ± 0.0102##
MPTP + 화합물 A 1 mg/kg	10	0.0444 ± 0.0092##

[0136]

[0137] [표 2] MPTP-처리 마우스에 있어 흑색질의 TH-양성 면역 염색 세포 수에 대한 화합물 A의 경구 투여 효과.

군	n	흑색질의 TH-양성 면역 염색 세포 (세포 수), 평균 ± S.E.
생리 식염수 + 매개체 (대조물)	10	54.1 ± 2.7
MPTP + 매개체 (대조물)	10	34.2 ± 5.0**
MPTP + 화합물 A 0.1 mg/kg	10	35.2 ± 5.0
MPTP + 화합물 A 1 mg/kg	10	44.4 ± 5.0

[0138]

[0139] 시험예 2

[0140] 절제 상처 치료에 대한 화합물 A (11-데옥시-13,14-디히드로-15-케토-16,16-디플루오로-PGE₁)의 효과를 시험하였다. 12주령의 암컷 당뇨병 (BKS.Cg-+Lepr^{db}/+Lepr^{db}/Jcl) 마우스의 등에 전층의 절제 상처 (1.5 x 1.5 cm)를 만들었다. 절제 상처를 구멍이 있는 필름 드레싱으로 덮었다. 각 시험 연고를 21G 피하 주사침이 달린 1-mL 1회용 폴리프로필렌 주사기에 넣고, 절제 상처를 덮고 있는 필름 드레싱 안으로 피하 주사침을 찔러 넣어 상처에 0.1 mL의 시험 연고를 적용하였다. 상기 적용은 절제 상처를 만든 날부터 21일 동안 하루 1회씩 수행하였고, 이때 절제 상처를 만든 날을 제1일로 정의하였다. 조직 검사를 위해, 6일 동안 각 시험 연고로 처리한 동물들로부터 절제 상처를 포함하는 피부를 수득한 후, 증식 세포의 표지 단백질인 Ki67에 대한 항체로 면역 염색하기 위해 제공하였다. 적용 이전 (제1일) 및 투여 제6일, 제8일, 제11일, 제13일, 제15일, 제18일, 제20일, 및 제22일에 각 절제 상처의 윤곽을 표시하였다. 표시된 절제 상처 면적을 구적계로 측정하였다. 제1일의 상처 면적의 비율을 100%로 하여 각 측정일의 상처 면적을 나타내고, 트래피조이드법을 사용하여 상처 면적 (%) - 시간 곡선(AUC) 아래의 면적을 계산하였다.

[0141] 연고 기재 군에 비해 화합물 A 연고 군에서는 표피의 증식 (Ki67-양성) 세포의 뚜렷한 증가가 관찰되었다 (도 1). 표피는 2가지 유형의 증식 세포, 즉 줄기세포 및 이의 전이 증폭 자손 (전이 증폭 세포)만을 포함하는 것으로 공지되어 있는 바, 본원의 결과는 화합물 A가 줄기세포의 증식 또는 이의 자손으로의 분화를 촉진시켰음을 나타내는 것이다.

[0142] 이러한 촉진 활성에 의해 화합물 A는 피부 상처 치료를 가속화한 것이다 (표 3).

[0143] [표 3] 당뇨병 마우스의 절제 상처 치료에 대한 화합물 A 연고의 효과.

군	농도	n	AUC _{제1일-제22일}
	마이크로-g/g		평균 ± S.E.
연고 기재	-	10	1168.8 ± 42.4
화합물 A 연고	10	10	965.4 ± 26.4**
화합물 A 연고	100	10	988.0 ± 22.0*

[0144]

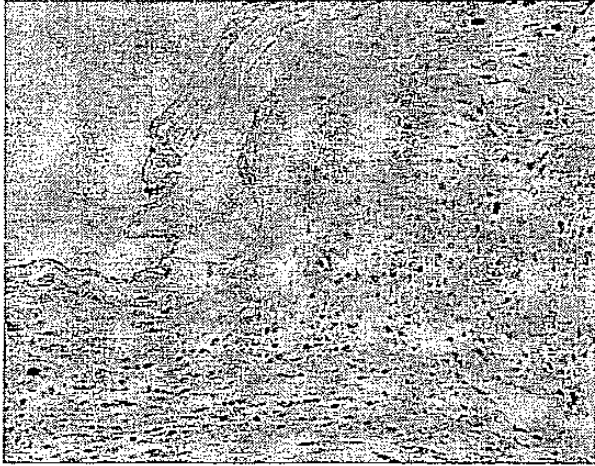
[0145] 연고 기재와 비교할 때, *p<0.05, **p<0.01

- [0146] 시험예 3
- [0147] 간엽 줄기세포의 골아세포 분화에 대한 화합물 A (11-데옥시-13,14-디히드로-15-케토-16,16-디플루오로-PGE₁)의 효과를 시험하였다.
- [0148] 방법
- [0149] 인간 골수 기증자 샘플을 수득하여 연구를 위한 간엽 줄기세포 (MSC)의 제조를 개시하였다. 이어서 조직 배양 플라스크 내에서 MSC를 증가시켰다. 사용 전에 -20°C에 동결 보관한 DMSO 중 화합물 A를 매질에 희석시켜 최종 농도가 각 웰 당 5nM, 10nM, 및 50nM이 되도록 하였다. 골아세포 분화에 대한 화합물 A의 효과를 측정하기 위해, 우선 MSC (1 x 10⁶/ml)를 24-웰 플레이트 내 배지에서 48시간 동안 배양하였다. 세포가 성장 표면에 부착되도록 한 후, 배지를 조심스럽게 제거하고 각 화합물 A 희석액 100 μl를 4개의 복제 웰에 첨가하였다. 이어서 골아세포 배지 (0.9ml)를 첨가하고 세포를 인큐베이션하였다.
- [0150] 본 연구에 있어서는, 2개의 다른 표지를 사용하여 골아세포 검출을 수행하였다. 이는 알칼리 포스파타아제 (AP) 및 오스테오칼신 (OC)이었다. 골아세포 검출에는 유세포 분석기가 필요하였다. 두 표지 모두 530nm 범위에서 형광을 방출하는 피코에리트린 (PE)에 결합된 것이었다.
- [0151] 배양한 지 14일 후, 배지를 제거하였다. 10 mM EDTA를 이용하여 37°C에서 15분간 인큐베이션함으로써 세포를 수득하였다.
- [0152] AP+ 골아세포의 검출을 위해 사용된 상기 세포를 10 μl의 항-인간 알칼리 포스파타아제-PE 항체와 함께 4°C에서 45분간 인큐베이션하였다. 인큐베이션 이후, 유세포 분석기에 의한 분석을 위해 세포를 4ml의 PBS로 1회 세정하고 약 400 μl의 PBS에 재현탁시켰다.
- [0153] 제2세트의 세포를 사용하여 오스테오칼신을 검출하였다. 우선 세포를 4% 파라포름알데히드에 10분간 고정시킨 후, 0.1% 사포닌을 함유하는 PBS에서 인큐베이션하여 투과화시키고, 세포를 항-인간 오스테오칼신-PE 단일 클론 항체의 존재 하에 어두운 곳에서 45분간 인큐베이션하는 동안 그 투과성을 유지시켰다. 유세포 분석기에 의한 분석을 위해, 세포를 2ml의 사포닌 함유 PBS로 세정하고 약 0.5ml의 PBS에 재현탁시켰다.
- [0154] 결과
- [0155] 도 2는 AP-PE 및 OC-PE를 모두 사용하여 검출한 바와 같은, 골아세포 분화에 대한 화합물 A의 효과를 나타낸다. 도 2는 평균 형광 강도를 나타낸다. AP-PE 표지는 화합물 A 투여량을 증가시키면 AP가 50 mM까지 증가됨을 나타냈다. 이러한 증가는 배경 또는 매개체 대조군에 관하여 수득되는 것을 상회하는 것이다. 따라서 화합물 A는 알칼리 포스파타아제의 형광 강도의 강화를 야기하며, 이는 MSC로부터의 골아세포 분화의 촉진을 나타내는 것이다.

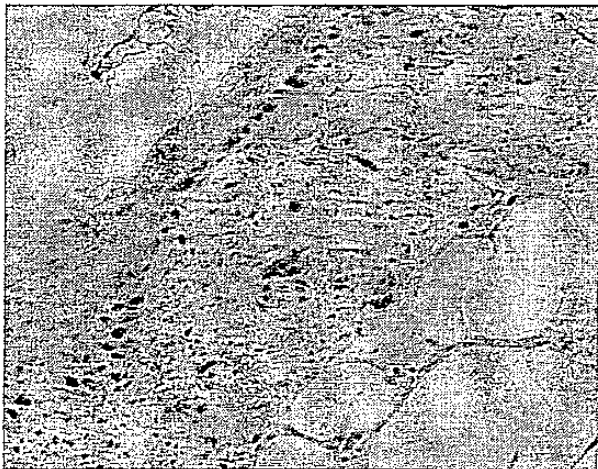
도면

도면1

연고 기재



화합물 A 연고



도면2

