(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0121461
(43) 공개일자 2007년12월27일

(51) Int. Cl.
A61K 31/722 (2006.01) *A61K 31/715* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0056555
(22) 출원일자 2006년06월22일
심사청구일자 2006년06월22일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내
(72) 발명자
김문무
부산 수영구 망미2동 1136번지 수영강변3차 이편한세상아파트301동 401호
김세권
부산 부산진구 연지동 353-1번지 세동한신아파트105동 304호
(74) 대리인
이덕록

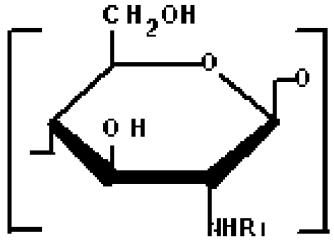
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 인간 피부 섬유아세포에서 메트릭스메탈로프로테이나제-2의 발현 및 활성을 억제시키는키토올리고사카라이드 화합물 및 이를 함유한 메트릭스메탈로프로테이나제-2 억제제

(57) 요 약

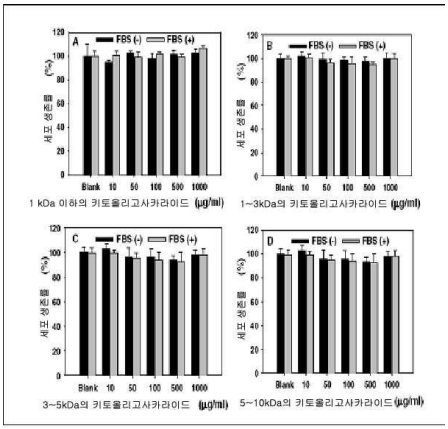
본 발명은 MMP-2의 발현 및 활성을 억제시키는 하기 화학식 1의 COS 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 MMP-2 억제제에 관한 것으로, 이들은 MMP-2 활성과 관련된 질환의 상처, 암전이, 류마토이드, 관절염, 염증, 부갑상선항진증, 당뇨병, 각막궤양, 골다공증, 위궤양, 외상, 여드름, 화상, 치주질환, 동맥경화 또는 골절 치료에 효과적이다.

<화학식 1>



(상기 식에서, R1은 $COCH_3$기이다)

대표도 - 도1

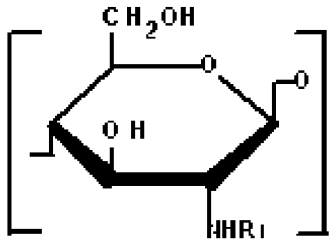


특허청구의 범위

청구항 1

인간의 피부 섬유아세포(HDF)에서 메트릭스메탈로프로테이나제-2(MMP-2)의 발현 및 활성을 억제시키는 하기 화학식 1의 키토올리고사카라이드(COS) 화합물.

<화학식 1>



(상기 식에서, R1은 $COCH_3$기이다)

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물의 분량이 1 ~ 5 kDa인 것을 특징으로 하는 COS 화합물.

청구항 3

제1항에 따른 COS 화합물을 유효성분으로 함유하는 MMP-2 억제제.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 억제제가 산제, 정제, 캡슐제, 분말제, 연고조성물, 용액제, 젤, 페이스트, 첩포제, 과립상 형태로 제조되는 것을 특징으로 하는 MMP-2 억제제.

청구항 5

제4항에 있어서, MMP-2 활성과 관련된 질환의 상처, 암전이, 류마토이드, 관절염, 염증, 부갑상선항진증, 당뇨병, 각막궤양, 골다공증, 위궤양, 외상, 여드름, 화상, 치주질환, 동맥경화 또는 골절 치료용 MMP-2 억제제.

명 세 서

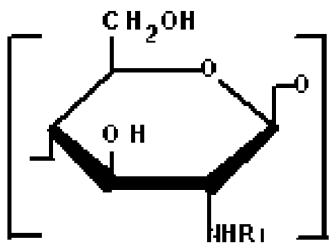
발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<7> 본 발명은 MMP-2의 억제제로서 COS 화합물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 HDF에서 MMP-2의 발현 및 활성을 억제시키는 COS 화합물 및 이를 유효 성분으로 함유한 MMP-2 억제제에 관한 것이다.

<8> <화학식 1>



<9>

<10> (상기 식에서, R1은 $COCH_3$기이다)

<11> 본 명세서 전반에 걸쳐 사용되는 용어 및 그의 약어 의미는 다음과 같고, 특별한 정의가 없는 것은 당업계에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는다.

<12> 메트릭스 메탈로프로테이나제 : matrix metalloproteinase, MMP

<13> 키토올리고사카라이드 : Chitooligosaccharides, COS

<14> 인간 피부 섬유아세포 : human dermal fibroblasts, HDF

<15> 프로볼 12-미리스테이트 13-아세테이드 : phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA

<16> 소 태반 혈청 : fetal Bovine Serum, FBS

<17> DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

<18> 3-(4,5-디메틸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드 : 3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT

<19> 세포외 메트릭스 : extracellular metrix, ECM

<20> 활성화 단백질-1 : Activator Protein-1, AP-1

<21> 무독성 생중합체인 키토산은 부분적으로 디아세틸화된 N-아세틸 글루코사민 중합체로서, 갑각류 및 절지동물의 외골격으로부터 유래된 키틴을 알칼리성 디아세틸화시켜 얻어진다. 이들은 항종양 활성, 항균 활성, 항돌연변이 활성 및 면역-증진 효능과 같은 생리학적 작용으로 인해 생물의학 및 화학 분야에서 상업적 용도에 상당한 주목을 받아왔다.

<22> 최근 들어, 상처 치료제, 항균제, 피부 이식 템플릿 및 약물 전달 부형제로서의 키토산의 용도에 대해 많은 관심이 집중되고 있다.

<23> 이러한 키토산의 부분적 탈수 생성물인 COS는 높은 용해성 및 비독성으로 인해 제약 및 의학적 용도에 있어 커다란 이점을 지니고 있다.

<24> 한편, MMP는 생리학적 조건하에서 섬유질화 또는 비섬유질화 콜라겐, 피브로넥틴, 라미닌, 엘라스틴 및 기저막 글리코프로테인과 같은 ECM을 소화시킬 수 있는 일군의 분비 또는 막투과 아연-엔도펩티다제이다.

<25> MMP는 ECM과 연계된 조직 형태 형성, 조직 회복 및 혈관신생의 생리학적 퇴화 뿐만 아니라, 만성 염증, 주름 형성, 관절염, 골다공증, 치주질환, 종양 침습 및 전이와 같은 과도한 ECM 퇴화로 특징지워지는 병리 증상에 있어 중요한 역할을 한다.

<26> 세포외 공간에서의 이러한 MMP의 활성 억제는 전이 및 주름 형성을 억제하기 위한 시도로서 광범위하게 연구되고 있다.

<27> 최근 들어, 몇몇의 MMP 억제제가 임상적으로 시험되고 있고, 이들 MMP 억제제 중 주요한 것으로는 합성 펩타이드, 화학적 개질된 테트라시클라인, 천연 원료로부터 분리된 바이오포스페이트 또는 화합물이 있다. 그러나, 이들 주요한 약물은 힘줄과 관절에서의 근골격 통증과 같은 부작용이 있는 것으로 보고된 바 있다.

<28> 종양 성장 및 침습에 MMP가 연루된다는 직접적인 증거는 각각 흑생종 종양 성장 및 혈관신생이 감소된 MMP-2 넉아웃 마우스(knockout mouse)에 대한 연구로써 밝혀진 바 있다.

<29> 상기 MMP중 MMP-2 (젤라티나아제 A, 72 kDa IV형 콜라제나아제) 는 분비된 엔도펩티다아제로서 기저막 콜라겐 IV를 포함한 세포외 메트릭스의 몇몇 성분을 가수분해시킬 수 있고, 종양 침습 및 전이와 관련되어 있다.

<30> 본 발명자들은 안전하고 유효한 MMP 억제제를 스크리닝하는데 노력을 경주하여 COS가 MMP-2 활성 및 발현을 억제할 수 있음을 밝혀내고, 이를 연구함으로써 본 발명에 이르게 되었다.

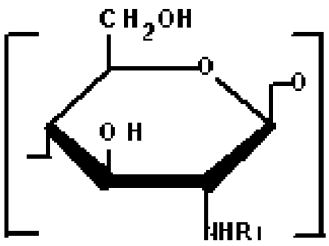
발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<31> 따라서, 본 발명의 목적은 키토산으로부터 COS 화합물을 동정하고, 이를 이용하여 HDF에서 MMP-2 발현 및 활성을 억제하는데 효과적인 MMP-2 억제제를 제공하는데 그 목적이 있다.

발명의 구성 및 작용

<32> 본 발명은 HDF에서 MMP-2의 발현 및 활성을 억제시키는 하기 화학식 1의 COS 화합물을 제공한다.

<33> <화학식 1>

<34> 

<35> (상기 식에서, R1은 $COCH_3$기이다)

<36> 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 COS 화합물을 유효 성분으로 함유하는 MMP-2 억제제을 제공한다. 이러한 MMP-2 억제제는 산제, 정제, 캡슐제, 분말제, 연고조성물, 용액제, 젤, 페이스트, 첩포제, 과립상 형태로 제조될 수 있다.

<37> 또한, 본 발명은 상기 MMP-2 억제제의 의약학적 용도를 제공한다.

<38> 본 발명의 MMP-2 억제제을 사용하여 예방 및 치료할 수 있는 질환으로는 상처, 암전이, 류마토이드, 관절염, 염증, 부갑상선항진증, 당뇨병, 각막궤양, 골다공증, 위궤양, 외상, 여드름, 화상, 치주질환, 동맥경화 또는 골절이 있다.

<39> 본 발명에서는 HDF에서 MMP-2 발현 및 활성에 대한 분자량이 상이한 COS의 억제 효과를 평가하였다. 분자량이 상이한 COS는 인간의 일반 세포에는 어떠한 세포독성 효과도 없는 것으로 나타났으며, 이는 COS가 대한민국에서 오랫동안 기능성 식품으로 섭취되어 왔다는 사실로부터도 지지되고 있는 사실이다. 광범위한 MMP-2의 특이성은 다양한 세포 활성을 조절하는 역할을 할 수 있다. COS가 HDF에서 MMP-2 발현 및 활성을 억제하는지 여부를 조사하기 위하여, 젤라틴 자이모그래프를 수행하였다. 이로부터 본 발명자들은 PMA 처리가 HDF에서 MMP-2 발현 및 활성을 촉진시킨다는 사실을 확인하였다. 더욱이, 이는 MMP-2가 N-말단 펩티다아제 도메인의 순차적 분열에 의해 활성화되는 잠재적 형태로 분비된다는 종래의 보고와도 상응하는 것이다.

<40> 또한, 본 발명에서는 분자량이 상이한 COS가 프로MMP-2의 활성을 억제할 수 있다는 사실을 밝혀내었다.

<41> 키토산은 아연이온에 효과적으로 결합하는 능력을 갖고 있으며 상업적인 킬레이트와 이온-교환 수지로서 사용되고 있다는 사실은 널리 알려져 있다. 따라서, 이러한 억제 효과는 MMP-2의 활성에 절대적인 아연이온에 대한 COS의 킬레이트화 능력에 기인한다고 할 수 있다.

<42> 본 발명자들은 COS가 HDF에서 MMP-2 단백질 발현을 억제할 수 있다는 사실도 밝혀내었다. 프로MMP-2 단일 클론 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석은 COS가 HDF에서 프로MMP-2 단백질 발현을 억제할 수 있음을 분명하게 보여준다. 또한, 3-5 kDa 의 COS는 프로MMP-2 단백질 발현에 대해 최고의 억제 효과를 나타내었고, 아이는 수회에 걸친 젤라틴 자이모그래피 분석 결과에도 상응하였다.

<43> 본 발명의 결과를 기준으로 하여, 본 발명자들은 HDF에서 COS에 의해 MMP-2 발현 및 활성을 억제할 수 있다는 사실을 확인하였다. MMP-2의 합성에서 전사 조절이 중요한 역할을 한다.

<44> 따라서, COS가 HDF에서 MMP-2 전사 활성에 영향을 미칠 수 있는지 여부를 조사하기 위해 pMMP-2-루시페라아제 구조체를 이용하는 리포터 유전자 분석을 수행하였다. 3-5 kDa의 COS가 HDF에서 MMP-2 전사 활성을 억제할 수 있고, 이는 RT-PCR 분석의 결과에 상응한다는 사실이 밝혀졌다. 이러한 결과는 c-fos 유전자 발현 수준이 3-5 kDa의 COS에 의해 감소될 수 있다는 점을 밝혀냄으로써 추가로 확인할 수 있다. MMP-2 유전자 프로모터는, MMP 유전자 군의 대부분의 요소들이 AP-1에 의해 조절되지 않음에 비해, 유지된 프록시말 AP-1 위치의 부재시에 주목할만하다.

<45> 결론적으로, 본 발명자들은 COS가 HDF에서 MMP-2 발현 및 활성을 억제한다는 실험적 증거를 제공하였다. 이러한 결과는 COS가 암전이 및 주름 형성과 같은 몇몇의 건강 문제점과 연관된 MMP-2의 방지 및 치료에 있어 중요한 역할을 할 수 있음을 제시한다.

<46> 이하 본 발명의 구성을 하기의 실시예를 통하여 구체적으로 설명한다. 하지만, 본 발명의 범위가 이러한 실시예로 한정되는 것은 아니다.

<47> <실시예>

<48> 재료준비

<49> 게 껍질 키틴으로 제조된 키토산 (디아세틸화도 93%; 평균분자량 280 kDa; 점도 13 cP)을 키토 라이프사[Kitto Life Co., Seoul, Korea]로부터 공여 받았다. 바실러스 에스피. [Bacillus sp., 35000 units/단백질 g) 유래 키토사나아제를 아미코겐사[Amicogen Co., Jinju, Korea]로부터 구입하였다.

<50> COS를 분획화 하기 위한 한외여과 멤브레인(UF) 반응기 시스템(Minitan) 및 멤브레인을 밀리포어사(Millipore Co., Bedford, MA, USA)로부터 구입하였다. DMEM, 트립신-EDTA, 페니실린/ 스트렙토마이신/ 암포테리신 (각각 10,000 U/mL, 10,000 ㎍/mL, 및 2,500 ㎍/mL) 및 FBS은 깁코 비알엘, 라이프 테크놀러지스(Gibco BRL, Life Technologies, NY, USA)로부터 획득하였다.

<51> 인간 피부 섬유아세포는 엘지 에이치지 & 씨엠 리서치 인스티튜트(LG HG & CM Research Institute, Daejeon, Korea)로부터 공여받았다. MTT 시약, 젤라틴, 아가로스, PMA 및 기타 재료들은 시그마 케미칼사(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

<52> <실시예 1> UF 멤브레인 바이오리엑터를 이용한 COS의 제조

<53> 키토산 100g을 증류수 1.0L에 분산시켜 1% 키토산 용액을 제조하고, 이를 1.0M 젖산 550mL와 함께 교반하고, 증류수를 가하여 최종 부피를 10 L 이상이 되게 하였다. 포화된 $NaHCO_3$ 용액을 사용하여 상기 용액의 pH를 5.5로 적정하였다. 키토사나아제(Bacillus sp., Amicogen Co.)가 고정되어 있는 고정 효소 컬럼 반응기에 연결된 UF 멤브레인 반응기 시스템내에서 키토산을 연속적으로 가수분해시켜 COS를 제조하였다.

<54> 상이한 분자량 컷-오프(MWCO; molecular weight cut-off)의 UF 멤브레인 네 개 (각각 MWCO는 10, 5, 3, 및 1 kDa임)를 이용하여 COS를 다섯 개의 상이한 분자량의 분획으로 분획하였다. 10, 5, 3 및 1 kDa 분자량 컷-오프 투석 멤브레인(Pierce Biotechnology Inc, Rockfod, IL, USA)을 이용하여 분획된 COS를 개별적으로 투석하고 동결건조시켰다.

<55> <실시예 2> 세포 배양

<56> 5% CO_2 및 37 ℃ 습윤 환경에서 10% FBS, 2 mM 글루타민 및 100 ㎍/mL 페니실린-스트렙토마이신이 공급된 적절한 배지를 이용하여 세포주를 단일층으로서 개별적으로 배양하였다.

<57> DMEM을 주로 인간 태아 피부에서 성장된 HDF용 배양 배지로 사용하였다. 세포를 트립신-EDTA로 처리함으로써 일주일에 3회 패시징시키고, 5회 패시징 후 실험에 사용하였다.

<58> <실시예 3> MTT 분석

<59> 통상의 MTT 법을 이용하여 HDF에 대한 COS의 세포 독성도를 측정하였다.

<60> <실시예 4> 젤라틴 자이모그래피

<61> 통상의 방법에 따라, COS의 존재 또는 부재하에 MMP-2 의 발현 및 활성을 측정하였다. 총 단백질 양이 동일한 조절 배지를 젤라틴 1.5 mg/mL을 함유한 각각의 폴리아크릴아미드 겔 용기에 적재하고, 비-환원 조건하에서 전기영동하였다. 목적에 따라, 각 실험 마다 상이한 양의 단백질을 사용하여 젤라틴 자이모그래피 분석을 수행하였다. 젤라티놀 대역(Gelatinolytic band)이 청색 배경에 대하여 깨끗한 구역으로 관찰되었고, 이미지마스터 소프트웨어(ImageMaster Software; Amersham Pharmacia Bioscience, NJ, USA)를 이용하여 이 대역의 강도를 평가하였다.

<62> <실시예 5> 웨스턴 블롯 분석

<63> 표준 공정에 따라 웨스턴 블롯팅을 실시하였다. 요약하면, HDF를 4 ℃에서 30 분 동안 50 mM 트리스-HCl, pH 7.5의 0.4% 노니데트(Nonidet) P-40, 120 mM NaCl, 1.5mM $MgCl_2$, 2 mM 페닐메틸술포닐 플루오라이드, 80 ㎍/mL 류펩틴, 3 mM NaF 및 1 mM DTT를 함유하는 용리 완충제에 용리시켰다. 세포 용리액 10 ㎍을 4-20% 노벡스 그래디언트 겔(Novex™ gradient gel; Invitrogen, USA)상에 녹이고, 니트로셀룰로오스 멤브레인상으로 전기이동시킨 후 , 10% 탈지 우유로 차단하였다. 화학형광(chemiluminescent) ECL 분석 키트(Amersham Pharmacia

Biosciences, NJ, USA)를 제조업체의 지침에 따라 이용하여 대용형 항-MMP-2 제1 단일 클론 항체 (Cat. No. MAB13405, Chemicon, CA, USA)로 프로-MMP-2 단백질을 검출하였다.

<64> 이미지마스터 소프트웨어(ImageMaster software;Amersham Pharmacia Biosciences, NJ, USA)를 이용하여 웨스턴 블롯 밴드를 정량하였다.

<65> <실시예 7> 트렌스펙션 및 리포터 유전자 분석

<66> HDF를 6개의 웰 플레이트에 식재하고 37 ℃에서 배양하였다. 약 70-80%의 컨플루언시(confluency)에서, 세포를 DMEM로 세척하고 5시간 동안 혈청 및 항생물질 없이 DMEM로 배양하였다. 이어 세포를 리포펙타민(Lipofectamine™) 시약(Invitrogen, USA)으로 웰 당 DNA 총량을 조절한 pGL3 리포터 벡터를 함유한 MMP-2 프로모터 1 ㎍ 및 pcDNA 3.1 300 ng 함유 DNA 혼합물로 트렌스펙션시켰다. 72 시간 배양한 후, 세포를 용리시키고, 루미노메터(luminometer; Tecan Austria GmbH, Austria)를 이용하여 루시페라아제 활성을 측정하였다.

<67> 루시페라아제 활성을 트렌스펙션 효율로 표준화시키고, 기질로서 o-니트로페닐 β-갈락토피라노사이드를 사용하여 β-갈락토시다아제 활성을 모니터링하였다. 데이터를 "평균±표준편차(n = 3)"로 나타내었다. 얻어진 값들을 스튜던츠 티-테스트(Student's t-test)를 이용한 대조군과 비교하여 통계적으로 분석하였다.

<68> <실시예 7> 역전사효소-폴리메라아제 연쇄 반응(RT-PCR: Reverse Transcriptase-Poltmerase Chain Reaction)

<69> RT-PCR을 수행하기 위하여, HDF로 제조한 전체 RNA 1 ㎍을 AMV 역전사효소(USB coporation, OH, USA)를 이용하여 역전사시켜 제1 cDNA 스트랜드를 합성하였다. 합성된 cDNA를 MMP-2 [포워드 프라이머(forward primer): 5'-GTGCTGAAGGACACACTAAAGAAGA-3', 리버스 프라이머(reverse primer): 5'-TTGCCATCCTTCTCAAAGTTGTAGG-3'), c-fos (포워드 프라이머: 5'- CTACGAGGCGT CATCCTCCCG- 3', 리버스 프라이머: 5'- AGCTCCCTCCTCCGGTTGCGGC AT-3') 및 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로게나아제 (G3PDH) (포워드 프라이머: 5'- TGAAG GTCGGTGTGAACGGATTTGGC -3', 리버스 프라이머: 5'- CATGTAGGCCATGAGGTCCACC AC -3')를 위한 몇쌍의 프라이머를 갖는 Taq(Thermus Acuaticus) 폴리메라아제 (USB corporation, OH, USA)를 이용한 PCR에서 템플릿으로 이용하였다. 이어서, PCR 생성물을 2% 아가로즈 겔상에 분리하고 EtBr(ethidium bromide) 염색에 의해 시각화하였다.

<70> <실시예 8> 통계적 분석

<71> 양방 독립적 스튜던츠 티-테스트를 이용하여 모든 데이터를 비교하였다. 0.05 미만의 P값이 통계적으로 의미있다고 여겨졌다. 데이터를 평균±SE로 표현하였다.

<72> <실시예 9> HDF의 증식에 대한 분자량이 상이한 COS의 효과

<73> MMP 억제 효과를 알아보기 위하여 MTT 분석을 수행하여 FBS의 존재 또는 부재하에서 표준 HDF에 대한 COS의 비세포독 농도를 검정하였다. 도 1에 도시한 바와 같이, 세포들은 분자량이 상이한(A; < 1 kDa, B; 1-3 kDa, C; 3-5 kDa, D 5-10 kDa) COS로 처리되었고, 세포 생존력은 24시간 후 MTT 분석에 의해 측정하였다. 데이터는 세 개의 독립적인 실험으로부터 평균치±SD 로 나타내었다. 본 발명의 COS는 FBS의 존재 또는 부재하에서 최고 시험농도(1,000 ㎍/mL)에서도 HDF에 대해 어떠한 세포독 효과도 나타내지 않았다.

<74> <실시예 10> 분자량이 상이한 COS의 농도 및 시간 의존성 MMP-2 억제 효과

<75> 상기의 결과를 기준으로 하여, HDF에서 MMP-2 발현 및 활성에 대한 분자량이 상이한 COS의 억제 효과를 검사하였다. 분자량이 상이한 COS로 처리된 HDF 조절 배지를 사용하여 젤라틴 자이모그래피를 수행하였다. 잠재적 형태의 MMP-2 (프로MMP-2)를 PMA 처리하여 활성 형태로 전환시켰다 (도 2 참조). PMA 100 ng/mL 로 촉진시켜 MMP 발현을 유도한 HDF를 혈청 없는 조건하에서 7시간 동안 분자량이 상이한 COS 50, 100 및 500 ㎍/mL로 처리하였다. 젤라틴 자이모그래피에 의해 측정한 바와 같이, 상부 패널은 조절된 배지중에서 MMP-2 활성을 나타낸다. 하부 패널은 PMA 처리군중에서 비교적 100% 활성으로 계산된 각 처리에 대한 각각의 상대 MMP-2 활성을 나타낸다. 데이터는 세 개의 독립적인 실험으로부터 평균치±SD 로 나타내었다. 50 ㎍/mL 이상의 모든 COS가 PMA 처리군과 비교하여 HDF에서 MMP-2 활성에 대해 뛰어난 억제 효과를 나타내었다. MMP-2에 대한 COS의 억제 효과를 명시하기 위하여, 시간 의존성 억제 효과를 조사하였다.

<76> 도 3에 도시한 바와 같이, PMA 100 ng/mL 로 촉진시켜 MMP 발현을 유도한 HDF를 혈청 없는 조건하에서 1, 3, 5 및 7일 동안 분자량이 상이한 COS로 처리하였다. 조절된 배지에서의 MMP-2 활성을 문헌에 기재된 바와 같이 젤

라틴 자이모그래피에 의해 측정하였다. 수치들은 식[상대 MMP-2 활성 (%) = (밴드의 강도 / 하루동안 얻은 밴드의 총 강도) × 100]을 이용하여 상대 MMP-2 활성으로 나타내었다. 일일의 결과를 독립적인 군으로 고려하였다. 데이터는 세 개의 독립적인 실험으로부터 평균치±SD로 나타내었다. PMA 처리로 인해 프로 MMP-2 활성이 비처리군에 비해 현억제졌다(P< 0.01). 더욱이, 프로MMP-2 활성은 각각 PMA 및 COS 처리군에서 배양 시간에 따라 1 kDa 이하로 명백하게 증가하였다. 그러나, 프로MMP-1 활성에 대한 1 kDa 이상의 COS의 억제 효과는 배양 시간에 따라 현저하게 증가하였다 (P< 0.01). 또한, 모든 COS 분자량 분획 중 3-5 kDa 분획이 프로MMP-2 활성에 대해 최고 억제 효과를 나타내었다.

<77> <실시예 11> 분자량이 상이한 COS의 HDF에서 MMP-2 단백질 발현 억제 효과

<78> 프로MMP-2의 단백질 발현 수준에 따른 분자량이 상이한 COS의 억제 효과를 검정하기 위하여, HDF에서 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 도 4에 도시한 바와 같이, 세포 용리물에 대한 웨스턴 블롯 분석을 지시한 바대로 MMP-2 단일 클론 항체의 대용형을 이용하여 수행하였다. 하부 패널은 상대 단백질 발현율(%)을 나타낸다. 수치들은 식[상대 단백질 발현율 (%) = (밴드의 강도 /총 밴드의 강도) × 100]을 이용하여 상대 단백질 발현율(%)로 나타내었다. β-액틴 단백질 발현율을 프로MMP-2 단백질의 표준화를 위한 대조구로 사용하였다. PMA 처리가 비처리군과 비교하여 프로MMP-2의 발현 수준을 현저하게 증가시켰다. 프로MMP-2단백질의 발현 수준은 PMA 처리군과 비교하여 분자량이 상이한 COS 처리로 인해 감소하였다. 분자량 3-5 kDa의 COS에서 최고 억제율이 관찰되었고, 이는 다른 분자량의 COS와는 현저하게 상이하였다(P< 0.01).

<79> <실시예 12> COS에 의한 HDF에서 MMP-2의 전사 활성 억제

<80> MMP-2-루시페라아제 유전자를 포함한 리포터 구성체를 이용하여 MMP-2의 전사 활성이 분자량이 상이한 COS에 의해 영향을 받는지 여부를 조사하였다. 도 5에 도시한 바와 같이, MMP-2의 전사 활성을 pMMP-2 리포터 벡터 및 pcDNA 3.1로 동시전이시킨 후HDF에서 루시페라아제 분석에 의해 측정하였다. 데이터는 세 개의 독립적인 실험으로부터 평균치±SD 로 나타내었다. 유의 수준을 스튜던츠 티-테스트를 이용하여 통계적으로 검정하였다(* 는 P < 0.01를 지시함). MMP-2 유전자의 전사 활성은 PMA로 처리된 대조군에서 비처리군과 비교해서 현저하게 증가하였다(P < 0.01). 그러나, PMA에 의해 유도된 MMP-2 유전자의 전사 활성은 COS로 처리함으로써 현저하게 억제되었다. 특히, 분자량 3-5 kDa의 COS는 MMP-2 유전자의 전사 활성에 대해 최고의 억제 효과를 보여주었다. MMP-2 유전자의 전사 활성에 대한 억제 효과는 COS의 농도가 증가함에 따라 증가하였다. 또한, 모든 COS는 100 ㎍/mL에서 MMP-2 유전자의 전사 활성을 현저하게 억제하였다(P< 0.05).

<81> <실시예 13> HDF중 MMP-2 및 c-fos의 유전자 발현에 대한 분자량이 상이한 COS의 효과

<82> MMP-2 유전자 발현에 대한 억제 효과를 확인하기 위하여, 분자량이 상이한 COS로 처리된 HDF로부터 제조된 전체 세포성 RNA를 이용하여 RT-PCR 분석을 행하였다. 도 6에 도시한 바와 같이, 세포들을 분자량이 상이한 COS 100 ㎍/mL으로 처리하고, 유전자 발현율을 RT-PCR에 의해 측정하였다. 상부 패널은 2% 아가로스 젤상에서 전기영동시킨 후의 MMP-2, c-fos 및 G3PDH 유전자의 PCR 생성물을 나타낸다. 하부 패널은 농도계량적으로 측정한 G3PDH로 표준화시킨 각각의 상대 유전자 발현 수준을 나타낸다. 수치들은 식[상대 단백질 발현율 (%) = (밴드의 강도 /총 밴드의 강도) × 100]을 이용하여 상대 단백질 발현율(%)로 나타내었다. 데이터는 세 개의 독립적인 실험으로부터 평균치 ± SD 로 나타내었다. 유의 수준을 스튜던츠 티-테스트를 이용하여 통계적으로 검정하였다(* 는 P < 0.01를 지시함).

<83> MMP-2 유전자 발현은 분자량 3-5 kDa의 COS에 의해 완전하게 억제되었다. 다른 군들 중에서는 MMP-2 유전자 발현에 있어 현저한 차이는 없었다. 또한, MMP-2 유전자 발현은 모든 MMP의 프로모터에 결합되어 있는 AP-1 전사 인자를 통해 조절된다.

<84> 이어서, COS가 AP-1에 대해 어떠한 억제 효과를 미치는지 여부를 조사하였다. 이로부터, 본 발명자들은 COS의 존재하에 AP-1 전자 인자의 일부분인 c-fos 유전자 발현을 시험하였다. 1kDa이상의 모든 COS는 c-fos 유전자 발현에 대해 억제 효과를 나타내었다. 더욱이, 최고의 억제 효과는 3-5 kDa의 COS에서 관찰되었다.

발명의 효과

<85> 본 발명은 COS 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 억제제를 제공함으로써 HDF에서 MMP-2 발현 및 활성을 효과적으로 억제시켜, MMP-2 활성과 관련된 질환의 상처, 암전이, 류마토이드, 관절염, 염증, 부갑상선항진증, 당뇨병, 각막궤양, 골다공증, 위궤양, 외상, 여드름, 화상, 치주질환, 동맥경화 또는 골절 치료에 효과적이어서, 의약적적으로 유용한 발명이다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 FBS의 존재 또는 부재하에 HDF의 생존력에 대한 분자량이 상이한 COS의 효과를 나타낸 도이다.

<2> 도 2는 처리 농도를 갖는 HDF에서 MMP-2 활성에 대한 분자량이 상이한 COS의 효과를 나타낸 도이다.

<3> 도 3은 배양 시간에 따른 HDF에서 MMP-2 활성에 대한 분자량이 상이한 COS의 효과를 나타낸 도이다.

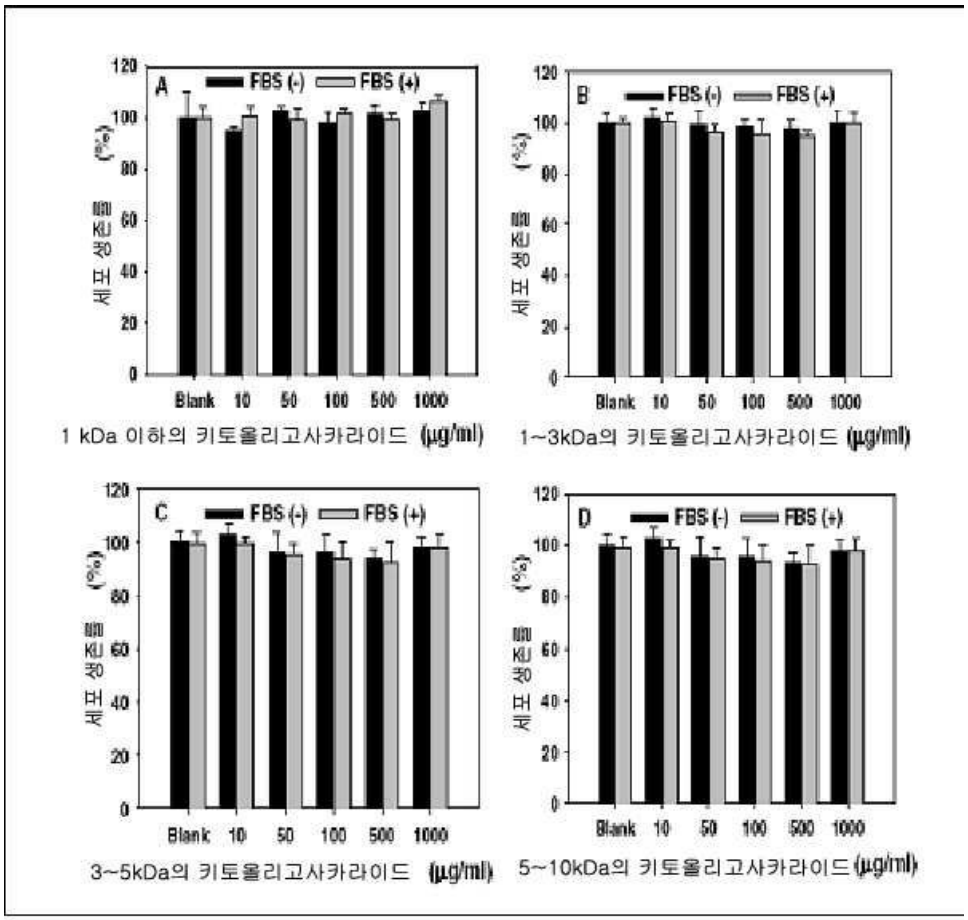
<4> 도 4는 분자량이 상이한 COS로 처리한 후 HDF에서 프로MMP-2 단백질 발현에 대한 웨스턴 블롯을 나타낸 도이다.

<5> 도 5는 HDF에서 MMP-2 프로모터 활성의 전사 활성에 대한 분자량이 상이한 COS의 효과를 나타낸 도이다.

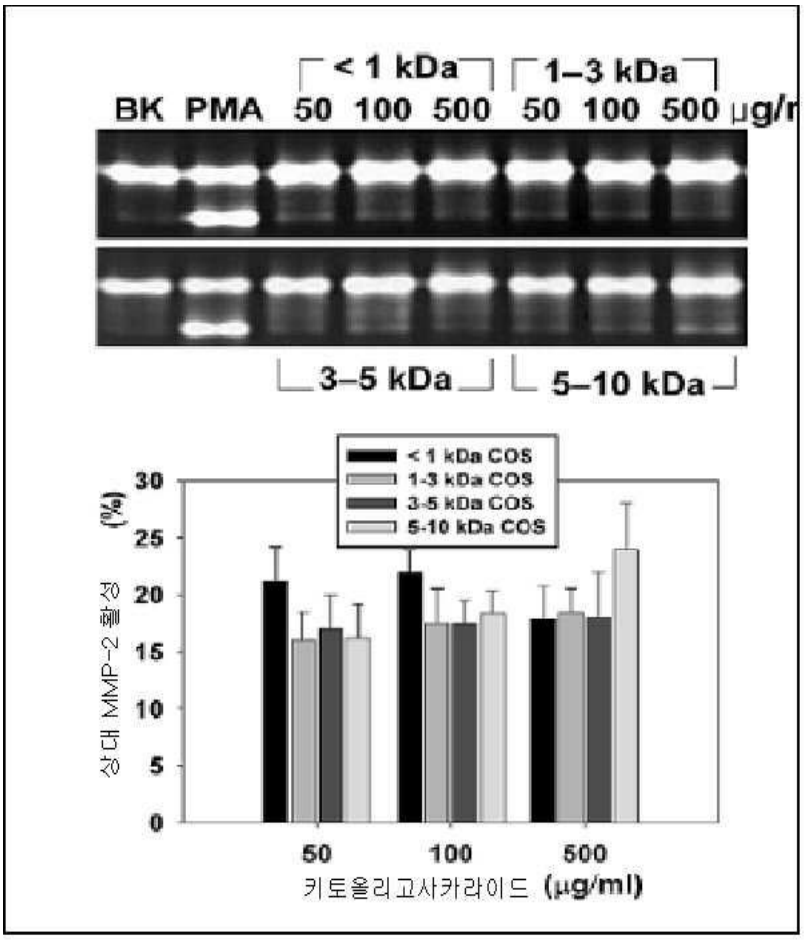
<6> 도 6은 HDF에서 MMP-2 및 c-fos 유전자 발현에 대한 분자량이 상이한 COS의 효과를 나타낸 도이다.

도면

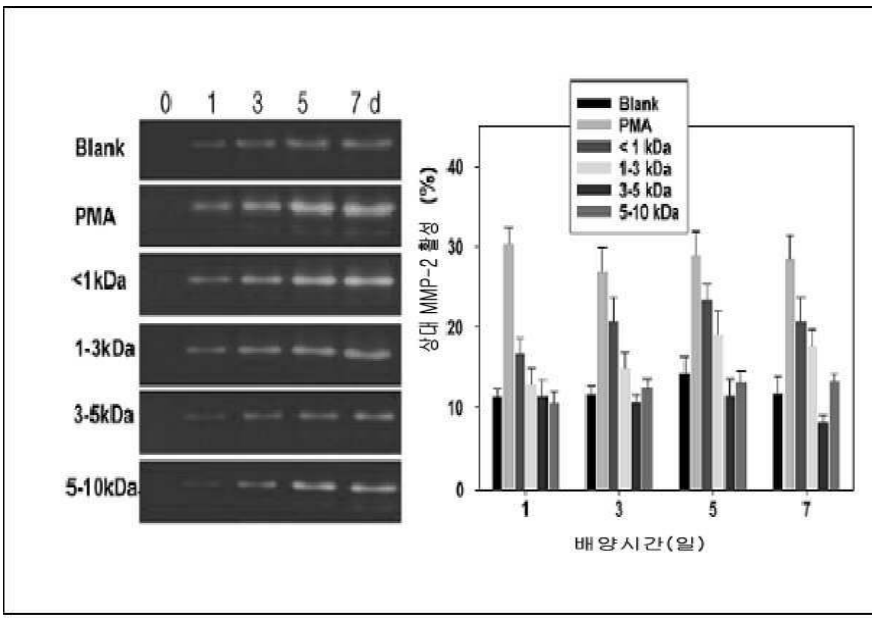
도면1



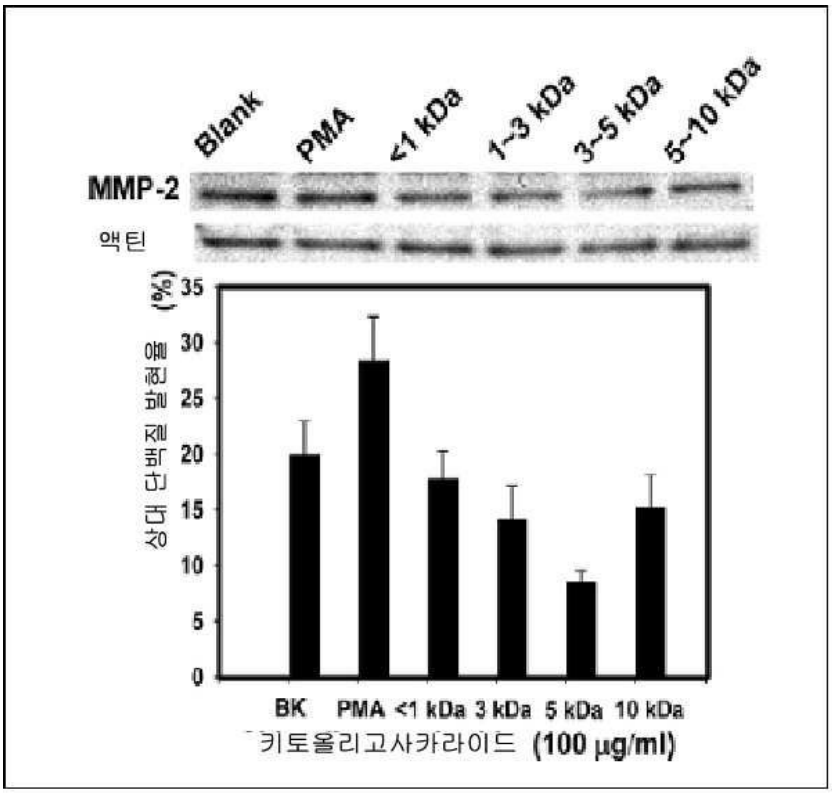
도면2


< 1 kDa
1–3 kDa
BK PMA 50 100 500 50 100 500 μg/r
3–5 kDa
5–10 kDa
< 1 kDa COS
1-3 kDa COS
3-5 kDa COS
5-10 kDa COS
상대 MMP-2 활성 (%)
30
25
20
15
10
5
0
50
100
500
키토올리고사카라이드 (μg/ml)

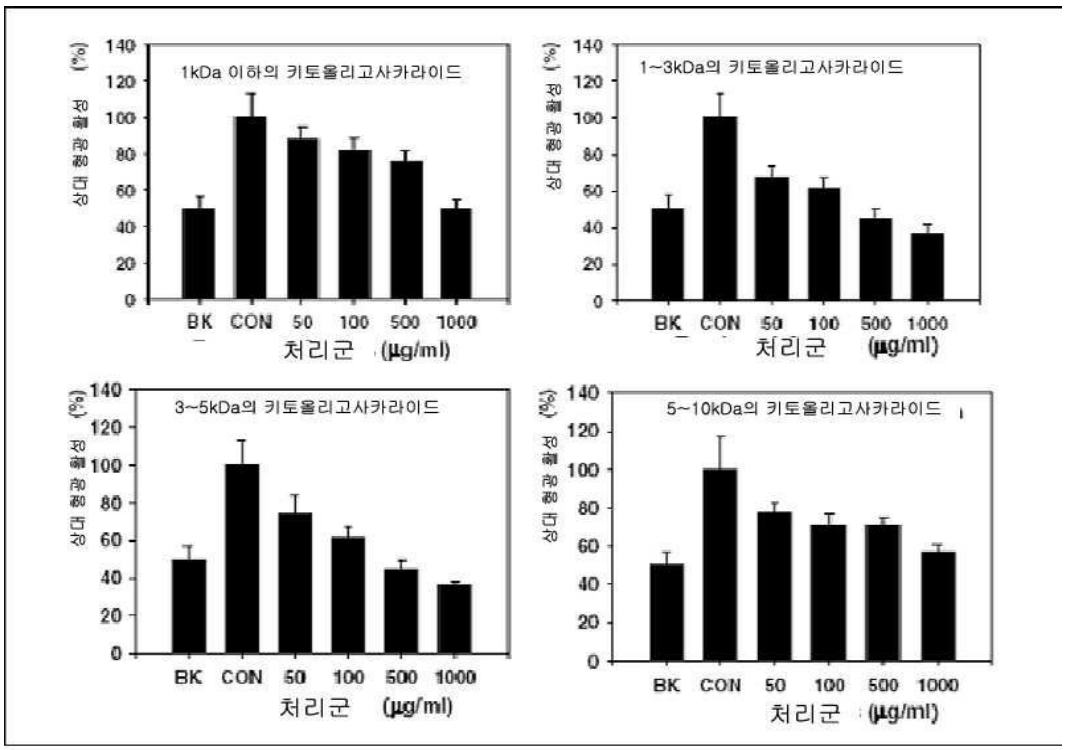
도면3


0 1 3 5 7 d
Blank
PMA
<1kDa
1-3kDa
3-5kDa
5-10kDa
Blank
PMA
< 1 kDa
1-3 kDa
3-5 kDa
5-10 kDa
상대 MMP-2 활성 (%)
40
30
20
10
0
1
3
5
7
배양시간(일)

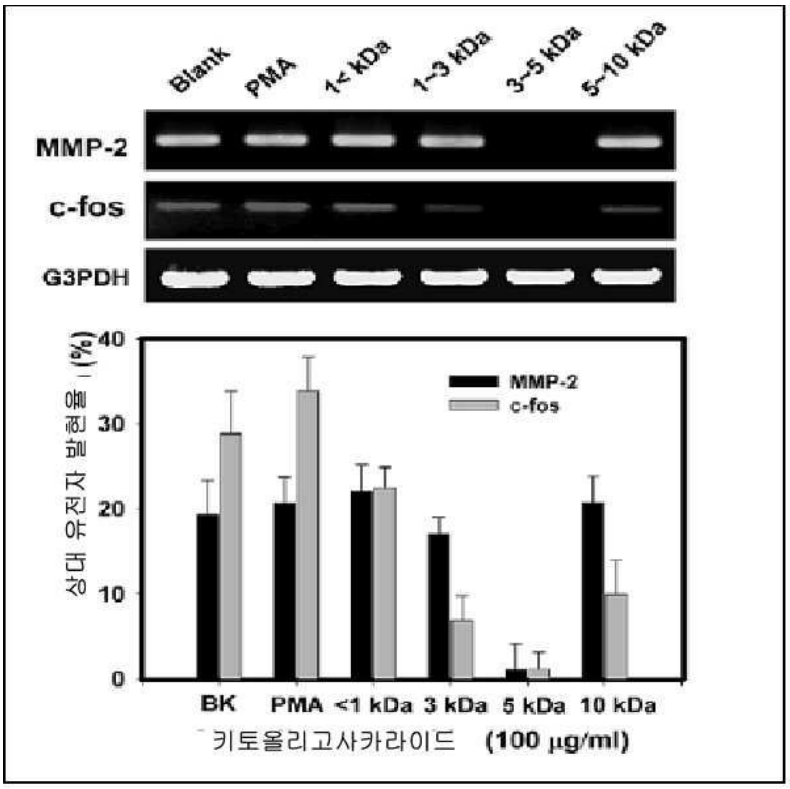
도면4


Blank
PMA
<1 kDa
1~3 kDa
3~5 kDa
5~10 kDa
MMP-2
액틴
상대 단백질 발현율 (%)
35
30
25
20
15
10
5
0
BK
PMA
<1 kDa
3 kDa
5 kDa
10 kDa
키토올리고사카라이드 (100 μg/ml)

도면5


1kDa 이하의 키토올리고사카라이드
1~3kDa의 키토올리고사카라이드
3~5kDa의 키토올리고사카라이드
5~10kDa의 키토올리고사카라이드
상대 형광 활성 (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
BK
CON
50
100
500
1000
처리군 (μg/ml)

도면6


Blank
PMA
1< kDa
1~3 kDa
3~5 kDa
5~10 kDa
MMP-2
c-fos
G3PDH
상대 유전자 발현율 (%)
40
30
20
10
0
MMP-2
c-fos
BK
PMA
<1 kDa
3 kDa
5 kDa
10 kDa
키토올리고사카라이드 (100 μg/ml)