



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0121460
(43) 공개일자 2007년12월27일

(51) Int. Cl.

C07H 15/00 (2006.01) C07H 13/02 (2006.01)
C07H 11/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0056554

(22) 출원일자 2006년06월22일

심사청구일자 2006년06월22일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자

김문무

부산 수영구 망미2동 1136번지 수영강변3차 이편
한세상아파트301동 401호

김세권

부산 부산진구 연지동 353-1번지
세동한신아파트105동 304호

알.피.엔.피. 라자팍세

카페티폴라 마와타, 반다라와타, 감파하, 스리랑
카

(74) 대리인

이덕록

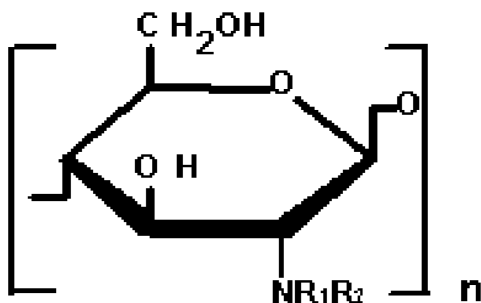
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 인간 섬유육종 세포에서 매트릭스 메탈로프로테이나제-9의 발현을 억제시키는 카복실화 키토올리고사카라이드 화합물 및 이를 함유한 매트릭스 메탈로프로테이나제-9 억제제

(57) 요약

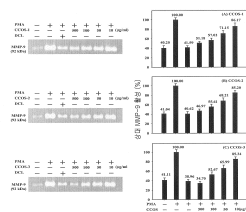
본 발명은 HT1080에서 MMP-9의 발현 및 활성을 억제하는 하기 화학식 1의 CCOS 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 MMP-9 억제제에 관한 것으로, 이는 HT1080내에서 MMP-9의 발현 및 활성을 효과적으로 억제하여 류머티즘성 관절염 및 골 관절염에서의 연골 및 골질 파괴, 뉴로-염증성 질환에서의 미엘린-기초 단백질의 퇴화, 위궤양에서의 조직 퇴화 및 침윤성 종양 성장 치료에 효과적이다.

<화학식 1>



(상기 식에서, R₁은 H 또는 COCH₃기이고, R₂는 COCH₂CH₂COO기이다.)

대표도 - 도5

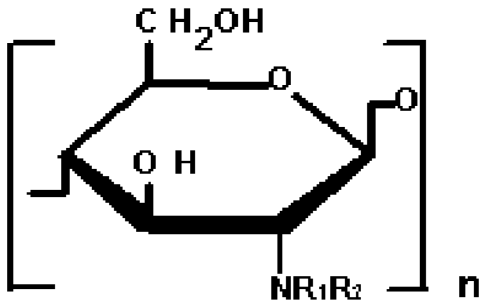


특허청구의 범위

청구항 1

메트릭스 메탈로프로테이나제-9 (MMP-9)의 발현 및 활성을 억제하는 하기 화학식 1의 카복실화 키토올리고사카라이드(CCOS) 화합물.

<화학식 1>



(상기 식에서, R₁은 H 또는 COCH₃기이고, R₂는 COCH₂CH₂COO기이다.)

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 CCOS 화합물은 카복시뷰티릴기의 치환수준이 40% 이하인 CCOS-1, 41% 내지 70%인 CCOS-2 또는 81%내지 100%인 CCOS-3로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 CCOS 화합물.

청구항 3

제1항에 따른 카복실화 키토올리고사카라이드(CCOS) 화합물을 유효성분으로 함유하는 메트릭스 메탈로프로테이나제-9(MMP-9) 억제제.

청구항 4

제3항에 있어서, 류머티즘성 관절염 및 골 관절염에서의 연골 및 골질 파괴, 동맥경화증, 재협착증, 골다공증, 중추신경계의 염증질환, 알츠하이머 질환, 피부노화, 각막장애, 이상 창상 유합, 골질환, 단백뇨증, 복대동맥류 질환, 외상성 관절손상에 따른 퇴행성 연골손실, 간경변, 신사구체 질환, 염증성 장질환, 치근막 질환, 노화와 관련된 황반 변성, 당뇨병 망막병증, 미성숙 망막병증, 안과 염증, 혈관신생, 암의 침윤과 전이, 뉴로-염증성 질환 위궤양에서의 조직 퇴화 및 침윤성 종양 성장의 치료용으로 사용되는 MMP-9 억제제.

명세서

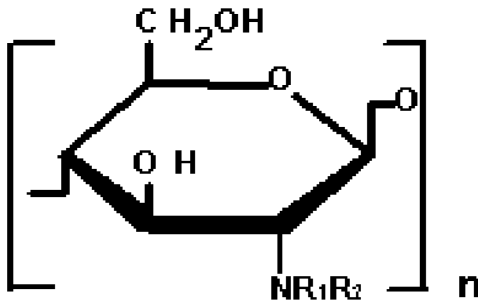
발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<9> 본 발명은 MMP-9 억제제로서 CCOS 화합물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 HT1080에서 MMP-9의 발현 및 활성을 억제하는 하기 화학식 1의 CCOS 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 MMP-9 억제제에 관한 것이다.

<10> <화학식 1>



<11>

<12> (상기 식에서, R₁은 H 또는 COCH₃기이고, R₂는 COCH₂CH₂COO기이다.)

<13> 본 명세서 전반에 걸쳐 사용되는 용어 및 그의 약어 의미는 다음과 같고, 특별한 정의가 없는 것은 당업계에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는다.

<14> 매트릭스 메탈로프로테이나제 : matrix metalloproteinase, MMP

<15> 카복실화 키토올리고사카라이드 : Carboxylated Chitoooligosaccharides, COS

<16> 인간 섬유육종 세포 : human fibrosarcoma cell, HT1080

<17> 프로볼 12-미리스테이트 13-아세테이트 : phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA

<18> 소 태반 혈청 : fetal Bovine Serum, FBS

<19> DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

<20> 3-(4,5-디메틸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드 : 3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT

<21> 세포외 매트릭스 : extracellular matrix, ECM

<22> 활성화 단백질-1 : Activator Protein-1, AP-1

<23> 세포외 매트릭스(ECM)는 기관계 내의 세포 및 조직의 구조적 통합성에 기여하는, 매우 조직화된 방식으로 어셈블링된 단백질 및 프로테오글리칸으로 구성된 다관능성 결합체이다. 구조적 지지체를 맥관구조에 제공하는 기저막은 IV형 콜라겐, 라미닌 및 피브로넥틴과 같은 ECM 분자로 구성되어 있다. 다양한 인자가 ECM 및 그가 지탱하는 조직의 통합성을 유지하는데 관여한다. 그러나, 특정한 생리학적 환경하에서, ECM은 조직의 구조가 손상되거나 파괴되도록 조절된다[특허출원 제2002-7015895호; 2002.12.23].

<24> MMP는 다양한 세포들로부터 분비된 일군의 아연-결합 프로테아제(metzincins)와 구조적으로 연관되어 있다. 이들은 ECM에서 폴리펩타이드 결합을 선택적으로 분열시키고, 결합 조직의 완전성을 유지하는데 필수적인 콜라겐, 아그레칸, 피브로넥틴, 프로테오글리칸 및 라미닌과 같은 구조 단백질을 재구성시킨다.

<25> 현재, 23 종 이상의 포유류 MMP가 그들의 기질 특이성 및 단백질 구조를 기준으로 젤라티나아제, 콜라게나아제, 스트로말리신 및 멤브레인-관련 MMP로서 동정되어 분류된 바 있다.

<26> 통상의 생리 기능에 있어, MMP 활성화는 배아, 골격 및 부속 기관의 발생, 상처 치료, 혈관신생 및 유선 퇴화의 과정과 관련되어 있다. 상기의 생리학적 현상을 수행하기 위하여, MMP 활성화는 활성화 MMP를 억제하거나 이들의 활성화 경로를 조절함으로써 내인성 메탈로프로테이나제 조직 억제제(TIMPs: Tissue Inhibitors of Metalloproteinase)의 자연적 생성에 의해 미세하게 조절된다. 그러나, MMP의 과도발현 및 불균형 활성화에 기인하여 병리학적 조직 퇴화 및 재구성이 발생하는 몇몇 질병 상태가 존재한다.

<27> 상기에서 제안된 MMP에 대한 이런 병리학적 역할에는 류머티즘성 관절염 및 골 관절염에서의 연골 및 골질 파괴, 뉴로-염증성 질환에서의 미엘린-기초 단백질의 퇴화, 위궤양에서의 조직 퇴화 및 침윤성 종양 성장이 포함된다. 따라서, MMP에 의해 매개되는 질환으로는 동맥경화증, 재협착증, MMP-매개 골감소증, 중추신경계의 염증질환, 알츠하이머 질환, 피부노화, 류머티즘성 관절염, 골관절염, 폐혈증성 관절염, 각막궤양, 이상 창상 유합, 골질환, 단백뇨증, 복대동맥류 질환, 외상성 관절손상에 따른 퇴행성 연골손실, 신경계의 수초탈락 질환, 간경변, 신사구체 질환, 배태막의 미성숙 파열, 염증성 장질환, 치근막 질환, 노화와 관련된 황반 변성, 당뇨병

망막병증, 증식성 유리체 망막병증, 미성숙 망막병증, 안과 염증, 원추각막 쇼그렌 증후군, 근시, 안과 종양, 각막이식 거부, 혈관신생, 암의 침윤과 전이 등이 있다.

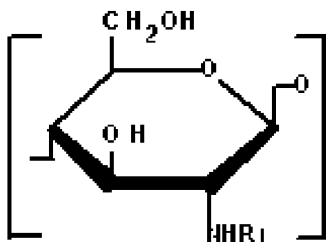
<28> 암에서 MMP-9(젤라티나아제 B, 92 kDa)는, 기저막중 IV형 콜라겐을 퇴화시켜 종양 주변 조직 구조의 손실을 촉진시키는데 독특한 능력이 있기 때문에 종양 성장, 혈관 신생 및 종양 전이에 주요한 역할을 한다고 여겨지고 있다. 따라서, MMP-9 발현이 증가되는 것은 많은 종양 세포에서의 종양 전이 잠재력이 증가되는 것과 관련이 있다.

<29> MMP-9 발현 조절에 기초가 되는 메카니즘은 주로 유전자 발현의 전사 활성화, 후-전사 조절, 전사 효율 및 후-전사 변이를 통한 자이로겐 활성화에 초점이 맞추어져 있다. 서열 분석이 밝혀진바 있으며, 몇몇의 잠재적 조절 구역이 기저에 포함되어, MMP-9 전사 반응을 유도하며, 대부분의 환경에서 전사 출발 위치와 관련된 -79 위치에서 AP-1 요소가 MMP-9 전사에 필요하다. AP-1 전사 인자는, PMA, 과산화 수소 및 종양 괴사 인자- α 와 같은 화학적 및 비화학적 자극제에 반응하여 MMP-9 유전자 전사를 유도한다. 따라서, MMP-9 발현의 조절은 종양 진행을 조절하는데 있어 상당히 중요하고, 선택적 MMP 억제제가 암에 대한 일군의 중요한 신규 목표가 될 수 있다.

<30> 초기의 MMP 억제제는 MMP의 결합 위치에서 콜라겐 구조를 최소화시키기 위해 합성된 펩타이드자극제(peptidomimetic)였다. 그러나, MMP의 불충분한 경구 생물활성 및 특이성 결여로 인하여, 화학자들은 비펩타이드성 MMP 억제제를 동정하기 위하여 노력을 경주해 왔다.

<31> 최근 들어, 갑각류 외골격으로부터 유래된 하기 화학식 2의 COS 및 이들의 유도체가 다양하게 보고된 생물학적 활성으로 인해 강력한 생물활성 물질로서 각광받고 있다. 그러나, COS 또는 이들의 유도체의 MMP 억제 효과에 대해서는 보고 된 바 없었다.

<32> <화학식 2>



<33>

<34> (상기 식에서, R1은 COCH₃기이다)

<35> 본 발명자들은 상기 COS를 화학적으로 변형시킨 CCOS에 의해 HT1080에서 MMP-9 발현 및 활성이 감소 조절될 수 있다는 사실을 밝혀내고, 이를 연구함으로써 본 발명에 이르게 되었다.

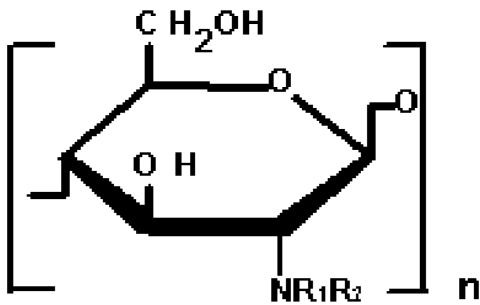
발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<36> 따라서, 본 발명은 CCOS를 동정하고, 이를 이용하여 HT1080에서의 MMP-9 발현 및 활성을 억제하는데 효과적인 MMP-9 억제제를 제공하는데 그 목적이 있다.

발명의 구성 및 작용

<37> 본 발명은 HT1080에서 MMP-9의 발현 및 활성을 억제하는 하기 화학식 1의 CCOS 화합물을 제공한다.

<38> <화학식 1>



<39>

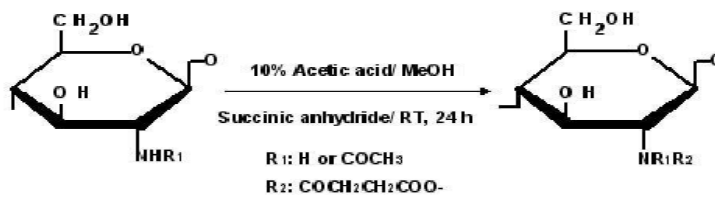
<40> (상기 식에서, R₁은 H 또는 COCH₃기이고, R₂는 COCH₂CH₂COO기이다.)

<41> 또한, 본 발명에서는 상기 화학식 1의 CCOS 화합물을 유효성분으로 함유하는 MMP-9 억제제를 제공한다.

<42> 또한, 본 발명은 상기 MMP-9 억제제의 의약학적 용도를 제공한다. 본 발명의 MMP-9 억제제를 사용하여 예방 및 치료할 수 있는 질환으로는 류머티즘성 관절염 및 골 관절염에서의 연골 및 골질 파괴, 뉴로-염증성 질환에서의 미엘린-기초 단백질의 퇴화, 위궤양에서의 조직 퇴화 및 침윤성 종양 성장, 특히 동맥경화증, 재협착증, MMP-매개 골감소증, 중추신경계의 염증질환, 알츠하이머 질환, 피부노화, 류머티즘성 관절염, 골관절염, 폐혈증성 관절염, 각막궤양, 이상 창상 유합, 골질환, 단백뇨증, 복대동맥류 질환, 외상성 관절손상에 따른 퇴행성 연골손실, 신경계의 수초탈락 질환, 간경변, 신사구체 질환, 배태막의 미성숙 과열, 염증성 장질환, 치근막 질환, 노화와 관련된 황반 변성, 당뇨병 망막병증, 증식성 유리체 망막병증, 미성숙 망막병증, 안과 염증, 원추각막 쇼그렌 증후군, 근시, 안과 종양, 각막이식 거부, 혈관신생, 암의 침윤과 전이 등이 있다.

<43> 본 발명의 CCOS는 하기 반응식 1에서와 같이 COS를 카복실화시켜 제조된다.

<44> <반응식 1>



<45>

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

<47> <실시예>

<48> 재료준비

<49> COS(아세트알도 27.9%, 분자량 6.0~7.0×10³kDa)는 키토 라이프사(Kitto. Life Co.; Seoul Korea)로부터 공여 받았다. 숙신산 무수물을 포함한 합성에 소요되는 모든 화학물질은 시그마 케미칼사(Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. HT1080 세포는 아메리칸 타입 오브 컬처 컬렉션(American Type of Culture Collection; Manassas, VA USA)로부터 획득하였다. 델벡코스 모디파이드 이글스 미디움(DMEM: Dubecco's Modified Eagle's Medium), 트립신-EDTA, 페니실린/스트렙토마이신, FBS 및 세포 배양에 필요한 다른 재료들은 깅코 비알엘(Gibco BRL), 라이프 테크놀로지스(Life Technologies, USA)로부터 구입하였다. FITC-젤라틴(CLN-100)은 콜라겐 테크놀로지 코퍼레이션(Collagen Technologies; USA)에서 구입하였다. MTT 시약, 젤라틴, 아가로즈, 디옥시시클린 및 PMA는 시그마 케미칼사에서 구입하였다.

<50> <실시예 1> CCOS의 합성 및 정제

<51> 본 발명자들이 종래 사용한 방법에 따라 COS를 N-카복실화시켰다. 여기에, COS 6.5g을 10% 아세트산 수용액 50mL에 용해시키고, 교반하면서 메탄올 15mL를 가하였다. 숙신산 무수물을 아세톤에 용해시키고, 상이한 양(2.2, 4.4 및 6.6g)을 상온에서 1 시간 동안 적가하여, 상이한 치환도의 카복실화 COS를 수득하였다(COS/무수물 몰비 증가에 따라 CCOS-1, CCOS-2 및 CCOS-3로 칭함). 혼합물을 4 시간 동안 교반하고, 탄산 나트륨을 이용하

여 pH를 9.0~10.0으로 유지하였다. 생성된 카복실화 COS를, 500 Da 분자량 차단 투석 멤브레인이 장착된 마이크로 아실라이저 G3(Micro Acylizer G3; Asahi Kasei Corp., Japan)를 이용하여 정제하고 냉동건조하였다.

<52> <실시예 2> CCOS 조직 확인

<53> CCOS의 조직을 검정하기 위하여, 양성자 NMR(^1H NMR)과 탄소 NMR(^{13}C NMR) 스펙트럼을 D_2O 분위기에서 JNM-ECP-400(400MHz) 분광계에 기록하였다. 엘레멘타르 어날라이제시스시스템(Elementar Analysesystem; Elementar Vario, EL, USA)을 이용하여 원소 분석(C, N 및 H)을 수행하였고, 그 값은 $\pm 0.4\%$ 의 이론적 수치내였다. CCOS를 TSP P100 장치가 장착된 바이오-겔 P-3000(Bio-Gel P-3000) 겔 투과 크로마토그래피 컬럼에 크로마토그래피하고, 이들의 강도와 함께 평균 분자량을 표준 풀루란(PullulanTM) 분자량 마커(5.9×10^3 , 2.28×10^4 및 4.73×10^4 Da) 및 굴절 지수 검출기(Sulphodex RI-71)에 의해 평가하였다. 스펙트럼 2000 FT-IR 분광계(Perkin Elmer, USA)를 이용하여 적외선 스펙트럼을 KBr 플레이트상에 기록하였다.

<54> <실시예 3> 세포 배양

<55> HT1080를 5% CO_2 및 37°C 의 습윤 환경으로 10% 소 태아 혈청, 글루타민 2mM 및 페니실린-스트렙토마이신 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 를 함유한 DMEM중에서 단일층으로 배양하였다. 실험을 위하여, 세포들을 트립신-EDTA로 떼어내, 24-웰 또는 96-웰 플레이트에 각각 웰 당 7×10^4 및 1.5×10^5 의 밀도로 도말하였다.

<56> <실시예 4> CCOS의 세포적합도 평가

<57> CCOS의 세포적합도를 평가하기 위하여, 96-웰 플레이트에서 배양한 HT1080 세포를 24 시간 동안 상이한 샘플 농도로 처리하였다.

<58> 세포 생존력을 종래에 기술된 바에 따라 MTT (3-4,5-디메틸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드) 방법에 의해 분광광도계(GENios[?] microplate reader, Tecan Austria GmbH, Austria)로 평가하였다. 데이터를 3 회 이상의 독립적인 실험으로부터의 평균값으로 나타내었고, $\$0.05$ 가 현저한 것으로 여겨졌다.

<59> <실시예 5> 젤라틴 자이모그래피에 의한 MMP 활성 측정

<60> CCOS 처리된 HT1080 세포에서의 MMP-9의 발현 및 활성을 상기에 기술한 바와 같이 젤라틴 자이모그래피에 의해 측정하였다. 이를 위하여, HT1080 세포를 FBS-없는 DMEM을 이용하여 24-웰 플레이트에 살포하고, 1 시간 동안 상이한 농도의 CCOS로 전처리하였다. PMA($10 \text{ ng}/\text{mL}$)로 MMP 발현을 촉진시키고, 36 시간 동안 배양을 지속하였다. 총 단백질 $50 \mu\text{g}$ 을 함유한 조절된 배지를 비-환원 조건하에서 젤라틴 $1.5 \text{ mg}/\text{mL}$ 을 함유한 10% 폴리아크릴아미드 겔상에서 전기이동시켰다.

<61> 전기이동 후, 폴리아크릴아미드 겔을 2.5% 트리톤(Triton) X[?]100을 함유한 50 mM 트리스-HCl (pH 7.5)로 세척하고, 10 mM CaCl_2 , 50 mM 트리스-HCl 및 150 mM NaCl을 함유한 전개 완충액중에서 37°C 로 밤새도록 배양하여 프로MMP를 MMP로 활성화시켰다. MMP에 의해 가수분해된 젤라틴 영역을 코마씨 블루 스테이닝(Coomassie Blue staining)에 의해 청색 배경에 대한 청정 구역으로 시각화하고, 덴시메트리(densitometry; Multi Gauge V3.0 software, Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)에 의해 대역의 강도를 평가하였다.

<62> <실시예 6> 형광-결합 젤라틴 분석에 의한 MMP 활성의 측정

<63> 24-웰 플레이트에서 배양한 HT1080 세포를 상이한 농도의 CCOS로 처리하고, PMA($10 \text{ ng}/\text{mL}$)로 처리한 후 조절된 배지를 $13,000 \times \text{g}$ 에서 원심분리하여 수집하였다. 기질로서 형광-결합 젤라틴 펩타이드(Collagen Technology Corporation, Tokyo, Japan)를 이용하여 프로MMP(1 mM , APMA 및 $50 \mu\text{mol}/\text{l}$ ZnSO_4 이용)를 활성화시켰으므로써, $50 \text{ mmol}/\text{l}$ 트리스-HCl 완충제 (pH 7.5), $0.15 \text{ mol}/\text{l}$ NaCl, $10 \text{ mmol}/\text{l}$ CaCl_2 및 0.05% Brij 35 함유 0.02% NaN_3 (TNC 완충제) 중에서 조절된 배지의 효소 활성을 측정하였다. 도 6에 도시한 바와 같이, MMP 발현을 유도시킨 HT1080 세포를 상이한 CCOS로 배양하고, 기질로서 형광-결합 젤라틴을 이용하여 조절 배지에서 MMP의 젤라틴 분해 활성을 검출하였다. 보다 낮은 형광 강도는 보다 낮은 MMP-9 활성을 지시한다.

<64> 플루오로로펩타이드를 35°C 에서 20 시간 동안 조절된 배지로 배양하고, 3% 아세트산을 가하여 반응을 중지시켰다. 제노이스 형광 마이크로 플레이트 리더(GENios[?] fluorescence microplate reader; Tecan Austria GmbH,

Austria)를 사용하여 495 nm (여기상태) and 520 nm (방출상태)에서 형광 강도를 측정하였다.

<65> <실시예 7> 감염 및 리포터 유전자 분석

<66> 10 cm 배양 접시에서 배양된 HT1080 세포를 리포펙타민(Lipofectamine™ 2000) 시약 (Invitrogen)으로 pGL3 루시페라아제 리포터 벡터(Promega, Madison, WI) 및 AP-1 결합위치-루시페라아제 리포터 플라스미드(Colontech, Palo Alto, Canada) 또는 β -갈락토시다아제 발현 벡터를 함유한 MMP-9 프로모터로 일시적으로 동시감염시켰다.

<67> 감염된 세포를 14-웰 플레이트로 2차 배양하고, 상이한 농도의 CCOS로 24 시간 동안 처리하였다. 세포를 냉 PBS로 1회 세척하고, 200 μ l/웰 용리 완충제 (25 mM 트리스-HCl, pH 8.0, 2 mM DDT 및 1% 트리톤-X 100 함유)로 세정하였다. 동량(20 μ L)의 세포 용리액 및 루시페라아제 기질(Promega)을 96-웰 플레이트에서 혼합하고, 형광 마이크로플레이트 리더(luminescence microplate reader; Tecan Austria GmbH, Austria)를 사용하여 형광 강도를 측정하였다. 루시페라아제 활성을 ONPG 완충제중에서 β -갈락토시다아제 발현 벡터에 의해 모니터링된 감염 효능으로 표준화시켰다. 리포터 유전자 발현 수준을, PMA(10 ng/mL) 단독으로 촉진시킨 세포와 비교하여, 비율로서 측정하였다.

<68> 감염된 세포를 X-Gal 염색법(X-Gal staining method)으로 시각화하였다. 간단하게 설명하면, 트랜스펙션된 세포를 0.5% 글루타르알데하이드로 고정시키고, 20 mM $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$ 및 1 mM $MgCl_2$ 를 함유한 X-Gal 용액으로 염색하였다. 37°C에서 24 시간 동안 배양한 후, 감염된 세포를 광학 현미경하에서 청색으로 시각화하였다.

<69> <실시예 8> 통계적 분석

<70> 데이터를 평균±표준 오차($n = 3$)로 나타내었다. 스튜던츠 티-테스트(Student's t -test)를 이용하여 $P < 0.05$ 에서의 유의 수준을 측정하였다.

<71> <실시예 9> CCOS의 합성 및 구조 동정

<72> COS 유도체의 관능적 특성은 주로 그들의 관능기 및 분자량에 의존한다. 저분자량 COS 유도체는 수성 매질에 쉽게 용해될 뿐만 아니라 다양한 용도에 바람직하다고 알려져 있다.

<73> 본 발명에서, 출발 물질로 사용된 COS의 분자량 및 아세틸화도는 각각 $6.0 \pm 7.0 \times 10^3$ kDa 및 27.29% 였다. 피라노즈 단위의 아미노 위치에 카복실기($COCH_2CH_2COO^-$)의 도입을 ^{13}C NMR, 1H NMR 및 FT-IR 스펙트럼을 이용해 평가하였다. 도 1에 도시한 바와 같이, 양 화합물중 피라노오즈 탄소의 화학적 이동은 NMR 스펙트럼 중 1-6으로 표지하였고, CCOS중 $-CH_2CH_2-$ 기의 존재는 δ 32 ppm에서의 화학적 이동에 의해 부여되었다. COS 및 CCOS의 ^{13}C NMR 스펙트럼에 따르면, δ 180 ppm, δ 176 ppm 및 δ 32 ppm (각각 카보닐기 $-COO$, $-CO$ 및 $-CH_2CH_2-$ 에 할당됨)에서 $-COCH_2CH_2COO^-$ 기의 신규한 화학적 이동을 관찰할 수 있었다.

<74> 또한, δ 102 ppm (C-1), δ 54 ppm (C-2), δ 61 ppm, (C-6) 및 δ 174 ppm (카보닐 탄소 $C=O$)에서 피라노즈 탄소를 나타내는 화합물에 대해 약간의 통상적인 화학 이동이 보여졌다. 도 2에 도시한 바와 같이, 1H NMR 스펙트럼 으로부터, δ 2.4 ppm에서 보여지는 신규한 화학적 이동에 의해 $-COCH_2CH_2CO-$ 기의 양성자를 나타내는 치환된 기의 존재가 추가로 확인되었다. 여기서, 화살표 머리는 δ 2.4 ppm에서 나타난 신규한 화학적 이동을 지시하며, 이는 치환된 $-COCH_2CH_2CO-$ 기의 양성자를 의미한다.

<75> 합성 동안 반응하는 숙시니칸하이드라이드/COS 비율에 따라, $-COCH_2CH_2CO-$ 기의 CCOS로의 치환 수준을 원소 분석 (데이터는 나타내지 않음)에 의해 40%이하 (CCOS?1), 41%내지 70%(CCOS-2) 및 71%내지 100% (CCOS-3)으로 평가하였다. 도 3에 나타난 바와 같이, 카복실기의 대칭 및 비대칭 신장 흡수의 증가된 흡수 강도(1560 cm^{-1} 및 1410 cm^{-1})에 의해 상이하게 치환된 CCOS의 FT-IR 스펙트럼으로 동일하게 증가된 치환이 확인되었다. 치환도의 차이는 카복실기의 대칭 및 비대칭 연장 흡수의 증가된 흡수 강도에 의해 증가한다(1560 cm^{-1} 및 1410 cm^{-1}).

<76> <실시예 10> CCOS의 세포적합성

<77> 세포 및 동물 모델에 높은 농도로도 적용할 수 있는 안전하고 세포적합성인 물질로서의 COS가 다양한 연구를 통

해 보고된 바 있다. 그러나, 약간의 화학적 변형에 의하여서도, 다소간의 생체적합성 차이를 예상할 수 있다. 따라서, MTT 세포 생존력 분석에 의하여, 상이한 정도의 $-COCH_2CH_2CO-$ 기로 치환된 CCOS의 세포독을 평가하였다. 도 4에 도시한 바와 같이, 상이한 농도의 CCOS로 HT1080 세포를 24 시간 동안 처리하고, 세포 생존력을 본 발명에 기술한 바와 같은 MTT 분석에 의해 평가하였다. 결과를 세가지 독립적인 실험의 평균±표준 오차로 나타내었다. CCOS는 FBS의 존재 또는 부재하에 500 μ g/mL에서조차도 HT1080 세포에 대해 어떤 현저한 세포독 효과도 나타내지 않았다.

<78> MMT 분석 결과를 기준으로, 본 발명자들은 MMP-9 발현 연구를 위해 상이한 농도의 CCOS를 선정하였다.

<79> <실시예 11> CCOS에 의한 HT1080 세포중 MMP-9의 발현의 억제

<80> MMP의 억제는 몇몇 생화학적 위치에서 가능하며, 암치료를 위하여 다수의 MMP 억제제가 동정되어져 있다. 이들 억제제는 몇몇의 생화학적 위치에서 MMP를 조절할 수 있으나, 이들 대부분은 효소 작용을 직접 억제시킬 수 있다. 그러나, 발현 수준에 작용하기 위한 잠재력을 갖는 화합물이 치료적 간섭에 대해 유인적 역할을 한다고 여겨진다.

<81> 본 발명자들은 본 발명에서 MMP 연구 모델로서 통상적으로 사용되는 HT1080 세포주를 선택하여 MMP-9 발현에 대한 CCOS의 효과를 평가하였다. 이를 위하여 선택된 농도의 CCOS를 배양된 HT1080 세포로 처리하고, 매우 강력한 종양 프로모터인 PMA로 MMP-9 유전자 발현을 촉진시켰다.

<82> 배양에 이어, 젤라틴 자이모그래피에 의해 분리된 MMP를 함유하는 조절된 배지의 MMP-9 활성을 평가하였다. 도 5에 묘사한 바와 같이, CCOS 처리된 세포는 PMA에 의해 MMP 발현을 촉진시키고, 조절된 배지중에서의 MMP의 젤라틴분해 활성을 10% 폴리아크릴아미드 겔을 함유한 젤라틴상의 전기이동에 의해 검출하였다. 시간경과에 따라 PMA (10 ng/mL)는 비-촉진 세포에 비해 MMP-9 발현을 약 60% 이상 증진시켰다. 이렇게 높아진 MMP-9 발현은 시험된 모든 CCOS 농도에 의해 용량-의존적 방식으로 현저하게 억제되었다(상이한 CCOS 100 μ g/mL에서 대략 50% 억제율). 더욱 흥미로운 점은, CCOS의 치환도가 MMP-9 활성을 억제시키는데 직접적인 관련이 있다는 점이며, $-COCH_2CH_2CO-$ 기의 치환도가 증가함에 따라 MMP-9 활성의 감소가 관찰되었다.

<83> 또한, 상기의 농도로부터 도출된 MTT 세포 생존력 연구는 세포적합성이 있으며, 관찰된 MMP-9 억제는 세포독의 영향에 기인한 것은 아니었다. 본 발명에서, 본 발명자들은 억제 효과를 비교하기 위해 양성 대조군으로서 잘 알려진 항암제인 독시시클라인(10 μ g/mL)을 사용하였고, CCOS-2/-3가 500 μ g/mL에서 다소 유사한 MMP-9 억제 효과를 가졌다. 따라서, 본 발명자들은 CCOS가 HT1080중의 MMP-9 활성에 대해 음성적 효과를 가져올 수 있다는 점을 제안할 수 있다.

<84> CCOS의 MMP-9 억제 효과를 추가로 확인하기 위하여, 보다 민감한 형광 젤라틴 펩타이드 분석을 수행하였다. 이 분석을 통해, 형광 결합 젤라틴 펩타이드를 MMP-9 용 기제로 사용하였고, CCOS 처리 HT1080 조절 배지로 배양하였다.

<85> 조절 배지에 존재하는 활성 젤라티나아제(MMP-9/-2)의 양에 따라, 형광 결합 젤라틴 펩타이드 상이하게 가수분해 되었고, 나타난 형광 활성은 분광학적으로 검출할 수 있었다. 본 발명의 처리 조건에 따르면, 젤라틴(gelatinase A, 72 kDa)을 가수분해시키는 또다른 MMP는 분명하게 발현되지 않았다. 따라서, 형광 강도의 차이는 주로 MMP-9의 활성에 기인한다고 추정할 수 있다. 따라서, 이러한 결과는 CCOS가 HT1080 세포중의 MMP-9 발현을 감소 조절하는 메커니즘에 의해 MMP-9 단백질분해 활성에 지속적 억제 효과를 미칠 수 있음을 제안한다.

<86> <실시예 12> CCOS에 의한 MMP-9 및 AP-1 전이 감소조절

<87> CCOS가 MMP-9 발현을 명확히 조절할 수 있는지 여부를 추가로 조사하기 위해, HT1080 세포를 루시페라아제 리포터 벡터 및 β -갈락토시다아제 발현 벡터를 함유한 MMP-9 프로모터로 동시감염(co-transfected)시키고, CCOS로 처리한 후 유전자 발현을 평가하였다. 도 7에 도시한 바와 같이, HT1080 세포를 pGL3 루시페라아제 리포터 벡터(Promega, Madison, WI) 및 β -갈락토시다아제 발현 벡터를 함유하는 MMP-9 프로모터로 일시적으로 co-transfected 시켰다.

<88> β -갈락토시다아제 유전자 발현에 의해 전사 효능을 표준화시킨 후, 루시페라아제 활성에 의해 CCOS 처리된 세포에서 MMP-9 유전자 발현을 평가하였다. MMP-9 유전자 발현은, 루시페라아제 유전자 발현의 감소로 확인된 바와 같이, CCOS에 의해 용량-의존적으로 억제되었다. 치환도가 증가된 CCOS는 MMP-9 유전자 발현을 감소-조절하는데 보다 큰 잠재력을 가졌으며, 이러한 관점에서 $-COCH_2CH_2CO-$ 의 중요성을 나타낸다.

- <89> 비교적 보다 높은 치환도를 갖는 CCOS-2 및 CCOS-3는 50-500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 낮은 치환도의 CCOS-1과 비교하여 유사한 효능으로 MMP-9 발현을 억제할 수 있다. 이들은 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 대조군과 비교하여 MMP-9 발현을 2배 감소시킴을 보여주었다. 그러나, 매우 낮은 농도(10 $\mu\text{g/mL}$)에서 상기 세가지 CCOS의 뚜렷한 차이점은 발견할 수 없었다. 이러한 결과는 자이모그래피 및 형광 펄타이드 분석으로부터 얻은 효소 활성 결과와 상응하였다. 따라서, 본 발명의 결과는 CCOS가 MMP-9 유전자를 전사적 감소-조절함으로써 MMP-9을 억제시킴을 확인시킨다.
- <90> MMP-9 유전자의 프로모터 위치에는, 유전자 발현을 조절하는 전사 인자의 몇몇 추정상 결합 위치가 존재한다. 이 프로모터는 스타터 위치로부터 -79 상류에 AP-1 결합 교감 위치를 포함하고, 상류는 또 다른 AP-1 결합 위치, AP-2 및 NF- κ B 결합 위치를 포함하는 조절 요소의 클러스터이다. 그러나, MMP-9 전사는 PMA의 존재하에서 종양 성장 및 전사적 활성 동안 주로 AP-1을 통해 조절된다는 사실이 통상적으로 공지되어 있다.
- <91> 또한, 몇몇의 전염성 증상 하에서, MMP-9 전사는 다양한 시그널링 경로를 통해 NF- κ B에 의해 조절될 수 있다. 따라서, CCOS가 MMP-9의 프로모터 구역에서 통상적으로 보고된 전사 인자 AP-1을 감소-조절할 수 있는지 여부를 평가하기 위하여, 그의 전사적 활성을 연구하였다.
- <92> 흥미롭게도, 도 8에 도시한 바와 같이, HT1080 세포를 AP-1 결합 위치-루시페라아제 리포터 플라스미드(Colontech, Palo Alto, Canada) 및 β -갈락토시다아제 발현 벡터로 일시적으로 공동감염시켰다. β -갈락토시다아제 유전자 발현에 의한 전사 효능을 표준화시킨 후, CCOS 처리된 세포에서 루시페라아제 활성에 의해 AP-1 유전자 발현을 평가하였다. CCOS는 MMP-9 유전자에서 관찰된 용량-의존적 방식과 유사하게 AP-1 유전자 발현을 억제하였다. 그러나, MMP-9에서와는 다르게, CCOS의 치환 변이는 AP-1 발현에 현저하게 영향을 끼치지 않았다. 따라서, 본 발명자들은 CCOS가 인간 섬유육종 세포에서의 유전자 발현을 전사적 감소-조절함으로써 MMP-9을 억제한다고 결론내릴 수 있다.

발명의 효과

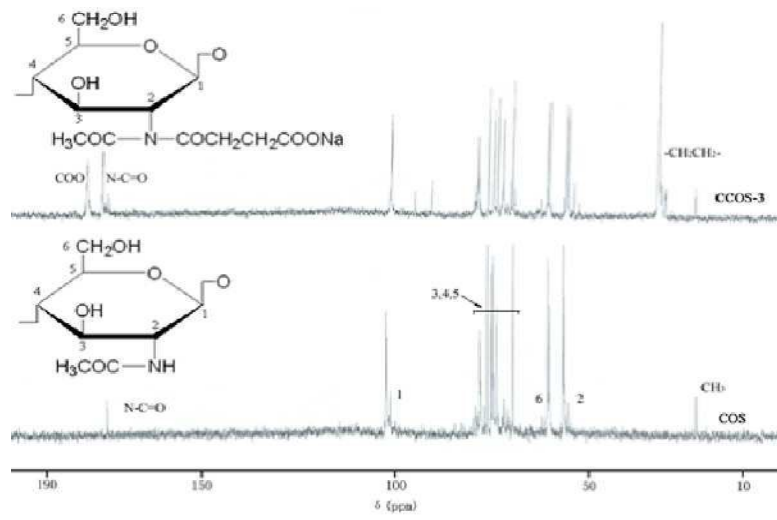
- <93> 본 발명의 MMP-9 억제제는 CCOS 화합물을 유효성분으로 함유하여 HT1080에서 MMP-9 발현 및 활성을 효율적으로 억제하여, 류머티즘성 관절염 및 골 관절염에서의 연골 및 골질 파괴, 뉴로-염증성 질환에서의 미엘린-기초 단백질의 퇴화, 위궤양에서의 조직 퇴화 및 침윤성 종양 성장의 치료에 효과적이어서, 의학학적으로 유용한 발명이다.

도면의 간단한 설명

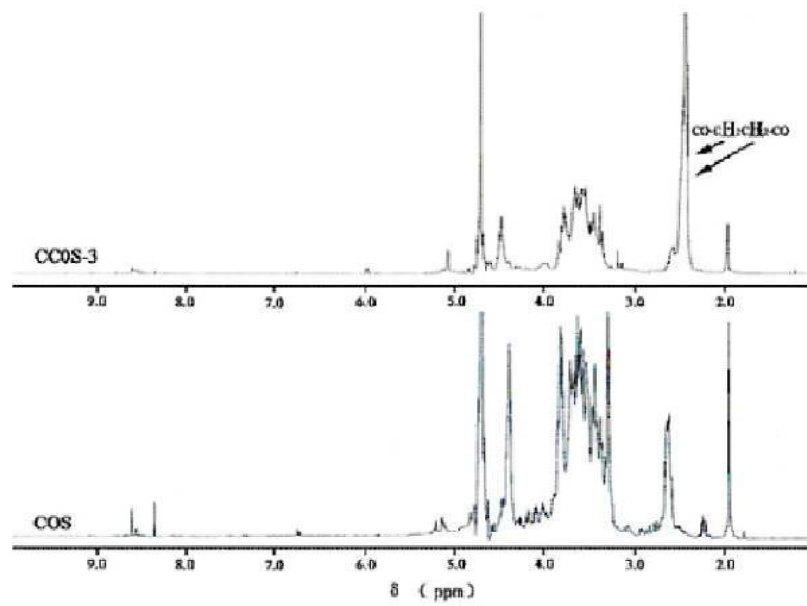
- <1> 도 1은 COS 및 CCOS-3의 ^{13}C NMR 스펙트럼 및 화학 구조를 나타낸 도이다.
- <2> 도 2는 COS 및 CCOS-3의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- <3> 도 3은 COS (A) 및 CCOS (B) FT-IR 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- <4> 도 4는 FBS의 부재(A) 및 존재(B)하에서 CCOS의 세포적합성 효과를 나타낸 도이다.
- <5> 도 5는 CCOS 처리된 HT1080 세포중의 MMP-9 발현 및 활성을 젤라틴 자이모그래피에 의해 평가한 것을 나타낸 도이다.
- <6> 도 6은 형광 결합 젤라틴 소화 분석에 의해 CCOS 처리된 HT1080 세포중의 MMP-9 활성을 검출을 나타낸 도이다.
- <7> 도 7은 HT1080 세포중 MMP-9 전사에 대한 CCOS의 효과를 나타낸 도이다.
- <8> 도 8은 HT1080 세포중 활성화 단백질-1(Activator Protein-1: AP-1) 전사에 대한 CCOS의 효과를 나타낸 도이다.

도면

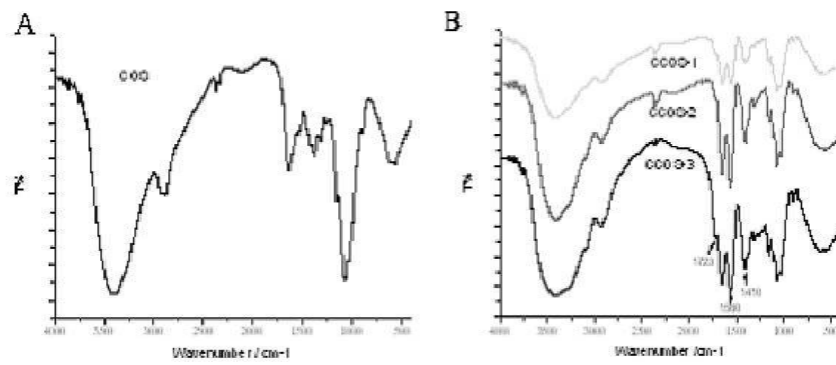
도면1



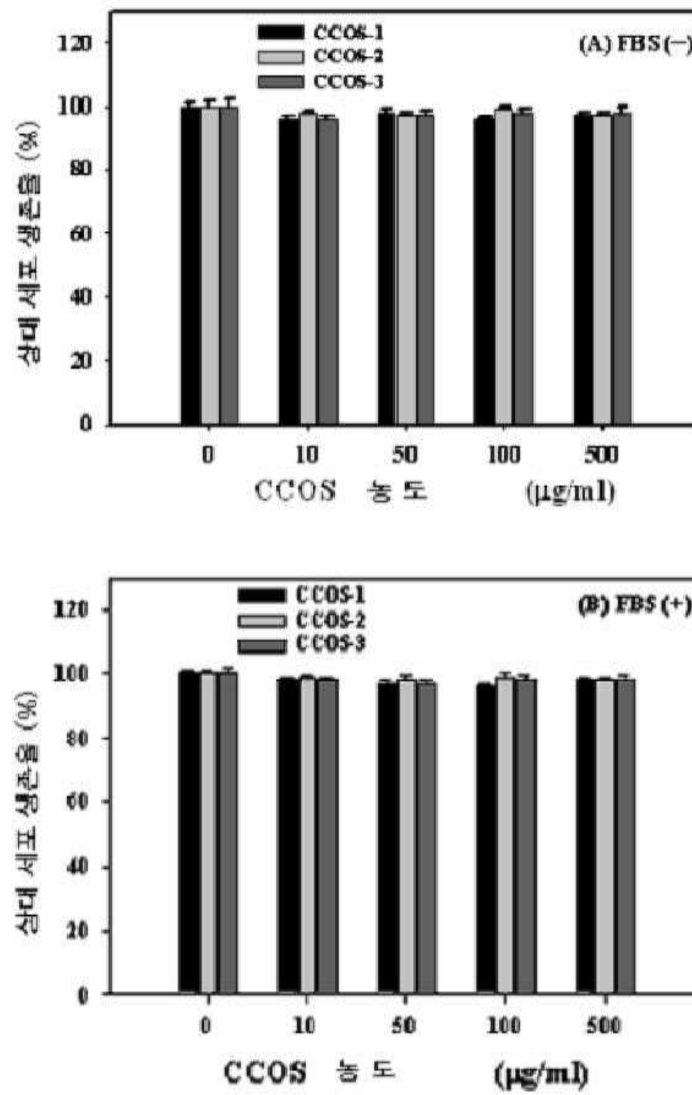
도면2



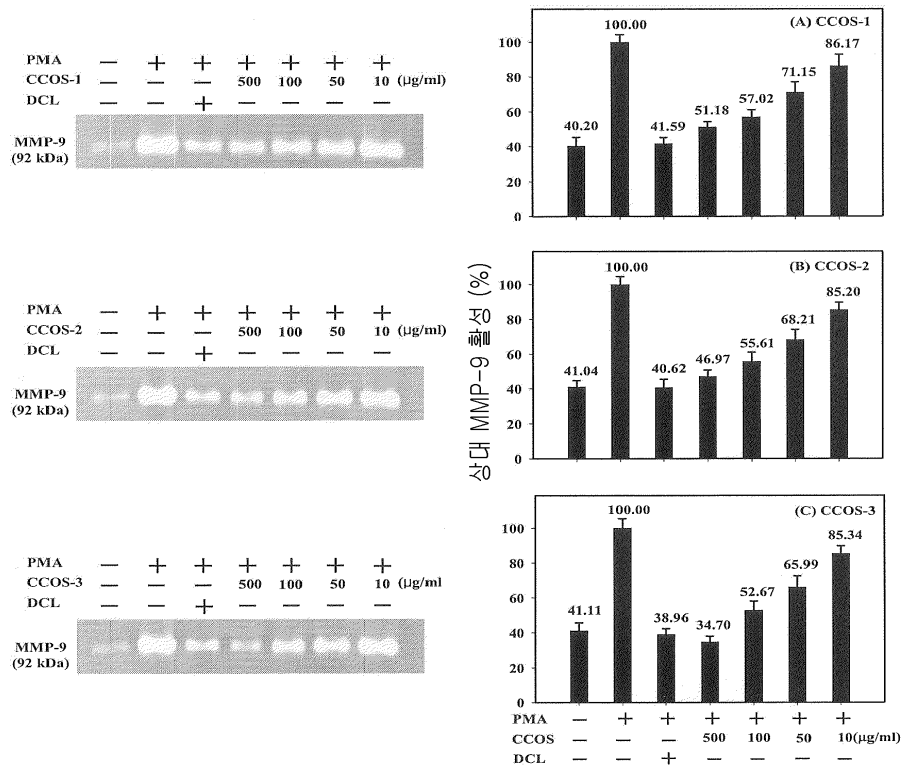
도면3



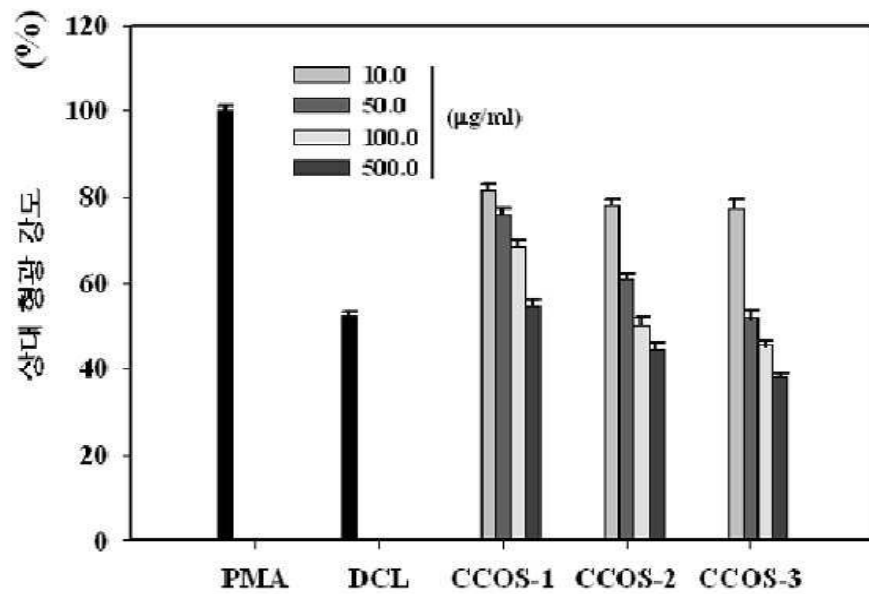
도면4



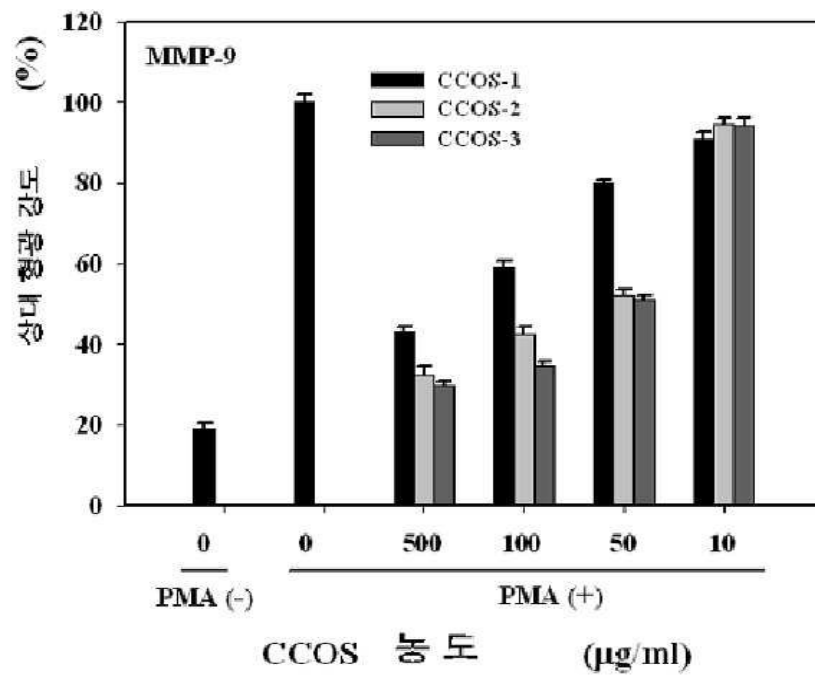
도면5



도면6



도면7



도면8

