(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0121462
(43) 공개일자 2007년12월27일

(51) Int. Cl.
C07H 5/06 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0056556
(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
비.이.피. 멘디스
부산시 남구 대연3동 599-1
(74) 대리인
이덕록

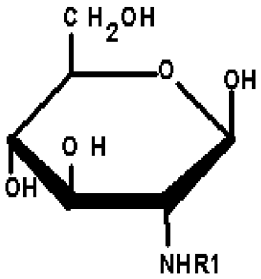
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 인간 섬유육종세포에서 메트릭스 메탈로프로테이나제-9의발현 및 활성을 억제하는 카복시화 글루코사민 화합물 및이를 함유한 메트릭스 메탈로프로테이나제-9 억제제

(57) 요 약

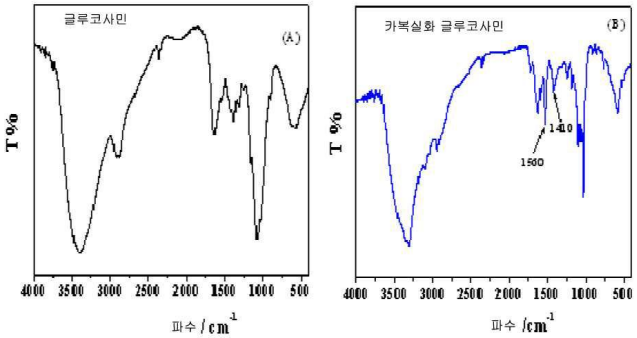
본 발명은 HT1080에서 MMP-9의 발현 및 활성을 억제하는 하기 화학식 1의 CGlc 화합물 및 이를 유효성분으로 함유한 MMP-9 억제제에 관한 것으로, HT1080중의 AP-1 발현을 억제함으로써 MMP-9의 발현 및 활성을 효과적으로 억제하여, 상처, 암전이, 류마토이드, 관절염, 염증, 부갑상선항진증, 당뇨병, 각막궤양, 골다공증, 위궤양, 외상, 여드름, 화상, 치주질환, 동맥경화 또는 골절의 치료에 효과적이다.

<화학식 1>



(상기 식에서, R1은 $COCH_2CH_2COO$-기이다.)

대표도 - 도1

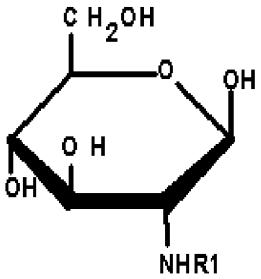


특허청구의 범위

청구항 1

인간 섬유육종 세포(HT1080)에서 메트릭스 메탈로프로테이나제-9(MMP-9)의 발현 및 활성을 억제하는 하기 화학식 1의 카복실화 글루코사민(CGlc) 화합물.

<화학식 1>



(상기 식에서, R1은 $COCH_2CH_2COO$-기이다.)

청구항 2

제1항에 따른 CGlc 화합물을 유효성분으로 함유하는 MMP-9 억제제.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 억제제가 산제, 정제, 캡슐제, 분말제, 연고조성물, 용액제, 젤, 페이스트, 첩포제, 과립상 형태로 제조되는 것을 특징으로 하는 MMP-9 억제제.

청구항 4

제3항에 있어서, MMP-9 활성과 관련된 질환의 상처, 암전이, 류마토이드, 관절염, 염증, 부갑상선항진증, 당뇨병, 각막궤양, 골다공증, 위궤양, 외상, 여드름, 화상, 치주질환, 동맥경화 또는 골절 치료용 MMP-9 억제 조성물.

명 세 서

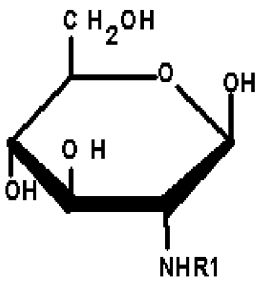
발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<6> 본 발명은 MMP-9 억제제로서 CGlc 화합물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 HT1080에서 MMP-9의 발현 및 활성을 억제하는 하기 화학식 1의 CGlc 화합물 및 이를 유효성분으로 함유한 MMP-9 억제제에 관한 것이다.

<7> <화학식 1>



<8>

<9> (상기 식에서, R1은 $COCH_2CH_2COO$-기이다.)

<10> 본 명세서 전반에 걸쳐 사용되는 용어 및 그의 약어 의미는 다음과 같고, 특별한 정의가 없는 것은 당업계에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는다.

<11> 메트릭스 메탈로프로테이나제 : matrix metalloproteinase, MMP

<12> 키복실화 글루코사민 : Caboxylated glucosamine, CGlc

<13> 인간 섬유육종 세포 : human fibrosacroma cells, HT1080

<14> 프로볼 12-미리스테이트 13-아세테이드 : phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA

<15> 소 태반 혈청 : fetal Bovine Serum, FBS

<16> DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

<17> 3-(4,5-디메틸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드 : 3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT

<18> 활성화 단백질-1 : Activator Protein-1, AP-1

<19> 세포외 메트릭스(ECM) 단백질의 단백질 가수분해는 각각 일반 조직의 리모델링 및 병적 조건과 관련이 있다고 알려져 있다. 일군의 주요 메트릭스 분해 효소를 지칭하는 MMP는 이들 구조적 단백질의 분해에 있어 중추적인 역할을 한다. MMP는 특정의 생화학 특성을 공유하나, 각각은 독특한 기질 특이성을 가지며, 현재까지 몇몇의 포유류 효소가 콜라겐, 스트레몰리신 및 젤라티나아제와 같은 일련의 특징지워진 효소로 동정되어 진 바 있고, 보다 최근에는 멤브레인형 MMP로 알려진 바 있다. 표준 생리학 프로세스하에서, MMP 발현 및 활성은 조심스럽게 조절되며, MMP 활성의 조절 손실은 몇몇의 질병과 연관이 있는 MMP 발현에 있어서 심각한 결론 및 일탈을 가져오는 듯 하다.

<20> 최근들어 MMP 억제제가 리모델링 및 과도한 세포외 메트릭스 분해를 특징으로 하는 질병을 치료하는데 중요한 신규 치료제 군으로 주목되고 있다. MMP 중에서 MMP-9(젤라티나아제 B, 92 kDa)가 MMP 중 중요한 구성원이며, 이는 모든 유형의 변성 콜라겐의 분열 및 천연 기저막 단백질의 분열에 관여한다.

<21> 몇몇 연구에서 악성 종양의 전이성 진행 동안 기저막 및 기질 조직중 ECM 성분의 단백질 분해를 필요로 하기 때문에 MMP-9 수준이 현저하게 상승되었음을 보여준바 있다. 인간 섬유육종 세포계인 HT1080 세포가 MMP-9 발현 및 활성을 연구하기 위한 모델로서 광범위하게 사용되고 있다. 다양한 다른 악성 종양과 유사하게, 이들 세포는 MMP-9을 최고 수준으로 발현시킨다. MMP-9 프로모터에 대한 연구가 MMP-9 프로모터의 전사가 주로 AP-1 전사 인자 결합 상호작용을 통해 매개됨을 확실하게 검증하였다. MMP-9 발현의 상승-조절을 방해하는 화합물이 전체 MMP-9 활성을 현저하게 감소시킬 수 있고, 현재 MMP-9 억제제를 동정하는 것이 관심사가 되고 있다.

<22> 초기의 MMP 억제제는 콜라게나아제에 의해 분열 위치에서 콜라겐의 아미노산 서열에 대한 지식으로 디자인된 펩타이드 유도체였다. 이들 분야의 진보에 따라, 의약 화학자들은 경구 활성이 우수하고 MMP에 대한 제약된 특이성을 얻는 것이 어렵기 때문에 펩타이드 억제제 이외의 것으로 촛점을 맞추고 있다.

<23> 그 결과, 다수의 비-펩타이드 억제제가 천연 생성물의 다량 집적화 스크리닝에 의해 발견된 바 있으며, 바람직한 화학적 관능기를 갖는 강력한 MMP 억제제가 합성되고 있다.

<24> 글루코사민은 키틴, 글리코프로테인 및 글리코사미노글리칸, 예를 들어, 히알루론산 및 헤파란 설페이트에서 발견된 아미노 모노사카라이드이다. 글루코사민의 의학적 효과를 연구하는 대부분의 임상 연구에서는 글루코사민 설페이트가 사용되고 있으며, 이들은 관절염 치료에 널리 사용되고 있다.

<25> 최근 들어 몇몇 연구 결과는 N-아세틸 글루코사민이 크론증 및 궤양성대장염과 같은 염증성 장질환의 치료에 대해 장래성을 보여주며, 글루코사민이 건강한 피부에 중요하다는 사실을 제시되고 있다. 그러나, 다른 글루코사민 유도체의 합성 및 이들의 타당한 생물학적 활성의 동정에 대한 보고서는 흔하게 찾아볼 수 없다.

<26> 본 발명자들은 글루코사민 하이드로클로라이드를 카복실화시킨 화합물이 인간 섬유육종 세포에서 MMP-9의 발현 및 활성을 억제시킬 수 있다는 사실을 밝혀내고, 이를 연구함으로써 본 발명에 이르게 되었다.

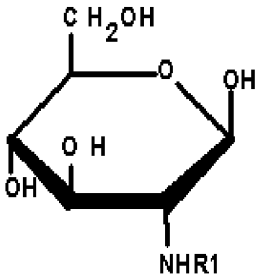
발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<27> 따라서, 본 발명에서는 글루코사민 하이드로클로라이드를 무수 석신산으로 카복실화시켜 카복실화 글루코사민 화합물을 합성하고, 이를 이용하여 HT1080에서 MMP-9의 발현 및 활성을 효과적으로 억제시킬 수 있다는 MMP-9 억제제를 제공함으로써 상기의 목적을 달성하였다.

발명의 구성 및 작용

<28> 본 발명은 HT1080에서 MMP-9의 발현 및 활성을 억제하는 하기 화학식 1의 CGlc 화합물을 제공한다.

<29> <화학식 1>



<30>

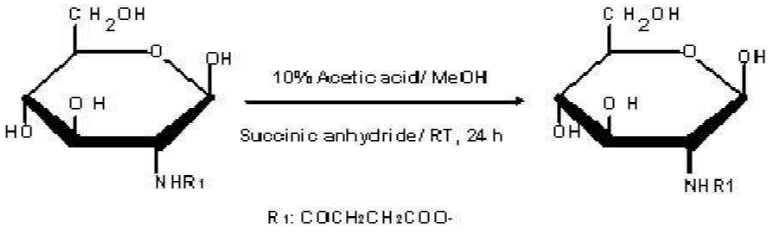
<31> (상기 식에서, R1은 $COCH_2CH_2COO$-기이다.)

<32> 또한, 본 발명에서는 상기 화학식 1의 CGlc 화합물을 유효성분으로 함유하는 MMP-9 억제제를 제공한다. 이러한 MMP-9 억제제는 산제, 정제, 캡슐제, 분말제, 연고조성물, 용액제, 젤, 페이스트, 첩포제, 과립상 형태로 제조될 수 있다.

<33> 또한, 본 발명은 상기 MMP-9 억제제의 의약학적 용도를 제공한다. 본 발명의 MMP-9 억제제을 사용하여 예방 및 치료할 수 있는 질환으로는 상처, 암전이, 류마토이드, 관절염, 염증, 부갑상선항진증, 당뇨병, 각막궤양, 골다공증, 위궤양, 외상, 여드름, 화상, 치주질환, 동맥경화 또는 골절 등이 있다.

<34> 본 발명의 CGlc 화합물은 하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이, 글루코사민을 화학적으로 개질시켜 얻어지며, 이러한 반응은 온화한 조건하에서 수행되어 구조적 변화에 역효과가 일어날 가능성은 배제된다.

<35> <반응식 1>



<36>

<37> 이와 같이, -OOC-CH2CH2CON-의 치환은 주로 조절된 환경하에서 일어난다. CGlc의 FT-IR 스펙트럼, 원소분석, ^{13}C NMR 및 ^{1}H NMR에 의해 -OOC-CH2CH2CO-기가 글루코사민으로 치환된 것을 확인할 수 있었다. Glc의 FT-IR 스펙트럼과 비교하여(도 1A 참조), CGlc의 스펙트럼에서 각각 카복실기의 대칭 및 비대칭 신장(각각 1560 cm-1 및 1410 cm-1)으로 신규한 기가 성공적으로 도입되었음을 확인할 수 있다(도 1B 참조).

<38> 원소 분석으로 얻은 데이터는 IR 스펙트럼에서 관찰된 새로운 구조적 특징을 구체화시키며, 하기의 표 1에 나타낸 바와 같이 계산된 원소 조성과 일치한다

<39> <표 1>

<40>

	탄소 함량(%)		수소 함량(%)		질소 함량(%)	
	분석치	측정치	분석치	측정치	분석치	측정치
Glc	33.48	33.42	6.61	6.54	6.49	5.51
CGlc	39.79	39.87	5.40	5.35	4.71	4.65

<41> 유도체의 ^{13}C NMR 스펙트럼 또한 FT-IR 스펙트럼과 일치하고, 카복실기가 CGlc로 치환되었음을 확인시켜 준다. Glc의 ^{13}C NMR 스펙트럼에서, 특징적인 피크(δ 93 ppm, C-1; δ 54 ppm, C-2; δ 69 ppm, C-3; δ 72 ppm, C-4; δ 76 ppm, C-5; δ 60 ppm, C-6)가 관찰되었다. CGlc는 Glc와 비교할 때, 몇몇의 새로운 화학적 이동을 보여주는데, 이는 δ 180 ppm, δ 177 ppm 및 δ 32 ppm(각각 카보닐 탄소 -COO, -CO 및 -CH2CH2-에 할당됨)에서 COCH2CH2COO-기에 할당될 수 있다. 또한, CGlc의 1H NMR 스펙트럼을 사용하여 Glc의 1H NMR[2.9, 3.2, 3.8 및 4.5(C-1-6)]과 비교하여 치환된 기들의 존재를 확인할 수 있다. δ 2.5 ppm에서 CGlc의 스펙트럼에 나타난 새로운 화학적 이동은 -COCH2CH2CO-기의 양성자에 할당되었다.

<42> PMA로 촉진된 조절 배지에서 MMP-9 매개 젤라티놀 활성의 억제를 분석하기 위하여, HT1080을 사용하였다. 세포들은 다양한 농도의 CGlc로 처리한 후, PMA로 촉진시키고 3 일 동안 배양하였다. 젤라틴 자이모그래피를 하기에 기술한 바와 같이 수행하였다. 도 2에 나타낸 바와 같이, 다양한 다른 악성 종양과 유사하게, 이들 HT1080 세포들은 보다 높은 수준으로 MMP-9을 발현시킨다. PMA를 HT1080 세포에 10 ng/mL 농도로 주입할 때, MMP-9의 활성은 대략 60% 증가하였다. 세포용해 구역의 크기 및 강도는 CGlc의 존재하에 현저하게 감소하였다. 더욱이, CGlc의 MMP-9 억제 효과는 농도 의존 패턴을 나타내었고, 500 ㎍/mL 농도에서 CGlc는 대략 60%의 MMP-9 억제율을 나타내었고, 이는 본 발명자들이 억제효과를 비교하기 위한 양성 대조군으로서 사용한 독시사이클라인(농도 10 ㎍/mL) 및 테트라사이클라인의 효과 보다 명확한 MMP-9 억제효과를 나타내었다. CGlc는 1 mg/mL의 농도에서 조차도 HT1080 세포에 대해 어떠한 독성도 나타내지 않았다(도 3A 및 3B 참조). 따라서, 생존력 데이터는 세포독성이 CGlc의 관찰된 MMP-9 억제 잠재력에 기여하지 않는 사실을 확인시켜 준다.

<43> HT1080 세포에서 PMA에 의해 촉진된 MMP-9 활성에 대한 CGlc의 억제 효과를 MMP-9용 기재로서 형광 결합 젤라틴 펩타이드를 이용하는 보다 민감한 형광 결합 젤라틴 소화 분석법(fluorescence conjugated gelatin digestion assay)을 이용하여 추가로 확인하였다. HT1080 세포를 배양하여 얻어진 CGlc 처리된 촉진 조절 배지에 존재하는 활성 젤라티나아제(MMP-9/-2)의 양을 형광 활성 결과로 분석하였다. PMA로 촉진된 젤라틴 자이모그래피에서 확인된 바와 같이, HT1080 세포는 주로 MMP-9을 분비하고, MMP-2를 포함하는 다른 젤라티나아제의 발현은 무시할 만 하였다. 따라서, 형광 강도의 차이는 주로 MMP-9의 활성에 기인한 것으로 파악된다. CGlc의 존재하에 얻어진 결과는 모두 자이모그래피 결과와 일치하였고, 여기서 CGlc 농도의 증가에 따라 투여량-의존적 MMP-9 억제가 확인되었다(도 4 참조). 500 ㎍/mL의 CGlc 농도에서, 상대 형광 활성은 66%까지 감소하혔고, CGlc를 100 ㎍/mL의 농도로 처리하였을 때 형광 강도는 약 50% 감소하였다.

<44> 이러한 결과를 전사 조절과 연관짓기 위하여, 본 발명자들은 MMP-9 프로모터 루시페라아제 구조체를 이용하여 MMP-9의 발현에 대한 CGlc의 효과를 분석하였다. PMA로 촉진된 대조 세포에서 높은(약 4배) 루시페라아제 활성이 관찰되었고, 이는 자이모그래피 결과와 일치하는 것이었다. 그러나, 500 ㎍/mL 농도의 CGlc로 처리된 세포에서 MMP-9 루시페라아제 리포터 유전자의 활성은 거의 3배 억제되었다(도 4A 참조). 100 ㎍/mL 농도의 CGlc에서 대략 50% 억제율이 얻어졌고, 억제율은 투여량-의존적 패턴을 따랐다. 본 발명자들은 CGlc의 MMP-9 전사 억제 효과가 AP-1 전사와 어떤 관계가 있는지 연구하였다. MMP-9의 프로모터 구역이 출발 사이트로부터 AP-1 결합 교감 사이트 업스트림을 포함하고, MMP-9의 전사 유도가 AP-1 전사 인자와 프로모터의 결합을 통해 실질적으로 매개된다는 사실을 나타내었다. 따라서, CGlc가 AP-1 전자 인자 결합을 방해함으로써 그의 효과를 발휘하는지 여부를 연구하기 위해, 본 발명자들은 세포를 루시페라아제 구조체를 함유한 AP-1 결합 사이트를로 트렌스펙션시켰다. PMA 촉진된 군의 리포터 활성은 대략 3 배 증가한 반면, 500 ㎍/mL 농도의 CGlc로 한 번 처리된 세포는 2 내지 3 배 감소되었다. 억제율은 투여량-의존적 패턴을 따랐다. 이상과 같이, CGlc는 AP-1 발현을 억제함으로써 MMP-9을 억제한다는 사실을 알 수 있다.

<45> 본 발명은 MMP-9 활성 및 발현을 억제할 수 있는 글루코사민 유도체의 활성을 최초로 밝혀냈다. 지금까지 동정되어 온 다양한 합성 및 천연 MMP 억제제는 목적하는 관능기의 존재로 인해 MMP 효소 활성을 직접 억제할 수 있었다고 입증되었다. 전사적 수준으로 효과를 나타낼 수 있는 화합물이 MMP-9 발현의 상향-조절을 방해하여 전

체 MMP 활성을 현저히 감소시킬 수 있기 때문에 강력한 억제제를 개발할 수 있는 가능성을 갖고 있다고 여겨진다. 따라서, CGlc는 잠재적인 합성 MMP-9 발현 억제제를 대표한다.

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

<47> <실시예>

<48> 숙신산 무수물을 포함하는 합성에 필요한 화학물질은 시그마 케미칼사(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로부터 입수하였다. HT1080 세포는 아메리칸 타입 오브 컬쳐 콜렉션(American Type of Culture Collection, Manassas, VA, USA)으로부터 입수하였다. 세포 배양 배지를 포함한 세포 배양에 필요한 모든 재료들은 깁코 비알엘, 라이프 테크놀러지(Gibco BRL, Life Technologies, USA)로부터 구입하였다.

<49> 페트아이티씨-젤라틴(FITC-Gelatin, CLN-100)은 콜라겐 테크놀러지 코포레이션(Collagen Technology Corporation, Tokyo, Japan)으로부터 입수하였다. MTT 시약, 젤라틴, 아가로스, 독시사이클린, PMA는 시그마 케미칼사(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

<50> N-카복시부티릴화 반응을 통상의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 글루코사민 하이드로클로라이드 2g을 증류수 10 mL에 용해시키고, 메탄올 15 mL를 가하면서 교반하였다. 동일한 몰비를 얻기 위해 정해진 양의 숙신산 무수물 1 g을 아세톤에 용해시키고, 상온에서 1 시간 동안 적가하였다. 혼합물을 4 시간 동안 교반하고, 탄산나트륨으로 pH를 9.0-10.0로 적정하면서 반응시켰다. 이어서, 용액을 정제하고 용리시켜 보풀보풀한 황색의 연한 고상 생성물을 수득하였다.

<51> 양성자 NMR (^{1}H NMR) 및 탄소 NMR (^{13}C NMR) 스펙트럼을 D20 분위기하에서 JNM-ECP-400 (400MHz) 스펙트로메터(JEOL, Japan)상에 기록하였다. 엘레멘타르 어날라이즈시스템(elementar analysesysteme, Elementar Vario, EL, USA)를 이용하여 ± 0.4%의 이론적 수치내에서 원소 분석(C, N 및 H)을 수행하였다. 스펙트럼 2000 FT-IR 스펙트로메터(Spectrum 2000 FT-IR spectrophotometer, Perkin Elmer, USA).에서 KBr 플레이트를 이용하여 적외선 스펙트럼을 기록하였다.

<52> HT1080를 10% 소 태야 혈청, 글루타민 2 mM 및 페니실린-스트렙토마이신 100 ㎍/mL이 보충된 DMEM중에서 배양하였다. 실험을 위하여, 세포를 트립신-EDTA에 부착시키고, 24-웰 또는 96-웰 플레이트에 각각 웰 당 7×105 and 1.5×105의 밀도로 도말하였다.

<53> 96-웰 플레이트에서 혈청 및 무혈청 배지로 배양된 동일한 수의 HT1080 세포(웰 당 4000 세포)를 다양한 농도의 CGlc로 24 시간 동안 처리하였다. 이어서, 생존가능한 세포에 의해 테트라졸리늄 염이 청색 포르마잔으로 변환되는 분광광도계(GENios® microplate reader, Tecan Austria GmbH, Austria)를 이용하여 MTT로 세포 생존력을 평가하였다.

<54> HT1080 세포중의 MMP-9 활성을 상기에서 기술한 바와 같은 젤라틴 자이모그래피에 의해 분석하였다. 이를 위해, 무혈청 DMEM 배지중의 HT1080 세포 대략 2x105 cells/mL를 24-웰 플레이트에 살포하고, 상이한 농도의 CGlc로 1 시간 동안 전처리하였다. PMA (10 ng/mL)로 처리하여 MMP-9 발현을 촉진시키고, 세포를 48 시간 동안 배양하였다. 세포 조절된 배지를 기질 겔 전기이동시켰다. 조절된 배지를 함유한 동일한 양의 단백질을 젤라틴 1 mg/mL이 주입된 10% (w/v) 폴리아크릴아미드 겔에 감소없이 적용하였다. 전기이동 후, 겔을 상온에서 2.5% 트리톤 X-100을 함유한 트리스-HCl (pH 7.5) 50 mM로 세척하고, 10 mM CaCl2, 50 mM 트리스-HCl, 및 150 mM NaCl을 함유한 자이모그래피 현상 완충제 내에서 37° C로 밤새 배양하였다. 이어서, 0.1% 용액으로 오염시켰다. 이러한 분석에서, 청색 배경에 대한 맑은 구역은 젤라틴소화 활성의 존재를 지시한다.

<55> 사이언스 이미지 시스템 LAS-3000중의 후지필름 이미지 리더 LAS-3000 소프트웨어(Fujifilm Image Reader LAS-3000 software in Science Image System, LAS 3000; Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 이용하여 겔의 이미지를 기록하였다. 멀티 게이지 V3.0 소프트웨어(Multi Gauge V3.0 software) 를 이용하여. 젤라틴소화 활성을 정량하였다.

<56> 24-웰 플레이트에서 배양한 HT1080 세포를 상이한 농도의 CGlc로 처리하고, 조절 배지를 13 000×g으로 원심분리하여 모은 후 PMA (10 ng/mL)로 처리하였다. 50 mmol/l 트리스-HCl 완충제(pH 7.5), 0.15 mol/l NaCl, 10 mmol/l CaCl2, 0.05% Brij 35를 함유한 0.02% NaN3 (TNC 완충제)중의 조절된 배지의 효소 활성을 기질로서 형광 결합 젤라틴 펩타이드(Collagen Technology Corporation, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

<57> 플루오로퀩타이드를 조절 배지에서 37° C로 20시간 동안 배양하고, 3% 아세트산을 가하여 반응을 중단시켰다. 제니오스 형광 마이크로플레이트 리더(GENios? fluorescence microplate reader, Tecan Austria GmbH, Austria)를 이용하여 495 nm (여기상태) 및 520 nm (방출상태)에서 형광 강도를 측정하였다.

<58> 10 cm 배양 접시에서 배양된 HT1080 세포를 리포펙타민 2000 시약(Lipofectamine™ 2000™ reagent, Invitrogen)에 의해 pGL3 루시페라아제 리포터 벡터(Promega, Madison, WI)를 함유한 MMP-9 프로모터 또는 루시페라아제 리포터 플라스미드(Colontech, Palo Alto, Canada)를 함유한 AP-1 결합 사이트로 일시적으로 트렌스펙션시켰다. 베타-갈라토시다아제 발현 벡터를 리포터 벡터로 공동-트랜스펙션시켜 트렌스펙션 효능을 내부 조절하는 역할을 하도록 하였다. 24-웰 플레이트에서 계대배양된 트렌스펙션 세포를 상이한 농도의 CGlc로 처리하였다. 이를 PMA로 촉진시킨 후, 세포를 24 시간동안 배양하였다. 세포를 냉 PBS로 한 번 세척하고, 200 ㎕/well 용리 완충제 (2 mM DDT 및 1% 트리톤-X 100을 함유한 25 mM 트리-HCl, pH 8.0)로 세정하였다. 세포 용리액의 분취액과 루시페라아제 기질(Promega)을 96-웰 플레이트에서 등량으로 혼합하고, 형광 마이크로플레이트 리더(luminescence microplate reader, Tecan Austria GmbH, Austria)를 이용하여 형광 강도를 측정하였다.

<59> ONPG 완충제로 베타-갈락토시다아제 활성을 측정하였다. 리포터 유전자 발현 수준을 PMA (10 ng/mL) 단독으로 촉진시킨 세포와 비교하여 비율로 측정하고, 상대 루시페라아제 활성으로 표현하였다.

<60> X-Gal 스테이닝 방법(X-Gal staining method)에 의해 트렌스펙션 효능을 측정하였다. 간략하게 설명하면, 트렌스펙트된 세포를 0.5% 글루타르알데하이드로 고정시키고, 20 mM $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$ 및 1 mM $MgCl_2$을 함유한 X-겔 용액으로 오염시켰다. 37° C 에서 24시간 동안 배양시킨 후, 트렌스펙트된 세포를 광학 현미경하에서 청색으로 시각화하였다.

<61> 데이터를 평균 ± 표준오차(n = 3)로 나타내었다. 스튜던츠 티-테스트(Student's t-test)를 이용하여 $P < 0.05$에서의 유의수준을 결정하였다.

발명의 효과

<62> 본 발명의 카복실화 글루코사민 화합물은 HT1080에서 AP-1 발현을 억제함으로써 MMP-9의 발현 및 활성을 효과적으로 억제하여, 상처, 암전이, 류마토이드, 관절염, 염증, 부갑상선항진증, 당뇨병, 각막궤양, 골다공증, 위궤양, 외상, 여드름, 화상, 치주질환, 동맥경화 또는 골절의 치료에 효과적이어서, 의약학적으로 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 (A) Glc 및 (B) CGlc의 FT-IR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

<2> 도 2는 HT1080 세포주에서 MMP-9의 젤라티놀 활성에 대한 CGlc의 효과를 나타낸 도이다.

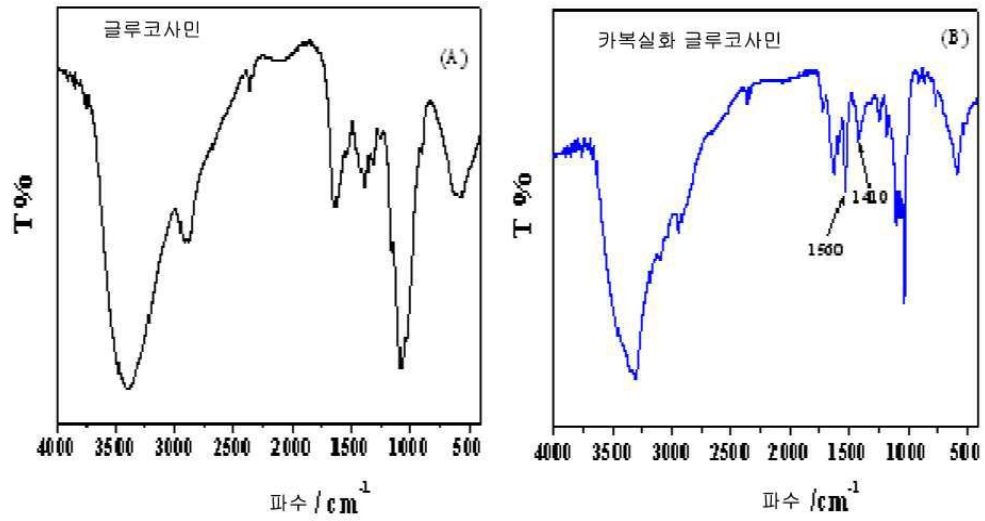
<3> 도 3은 (A) FBS의 존재 및 (B) 부재하에 CGlc의 세포독성 효과를 나타낸 것이다.

<4> 도 4는 형광 결합 젤라틴 소화 억제법(fluorescence conjugated gelatin digestion inhibition)에 의한 CGlc 처리된 HT1080 세포에서 MMP-9 활성을 측정한 것을 나타낸 것이다.

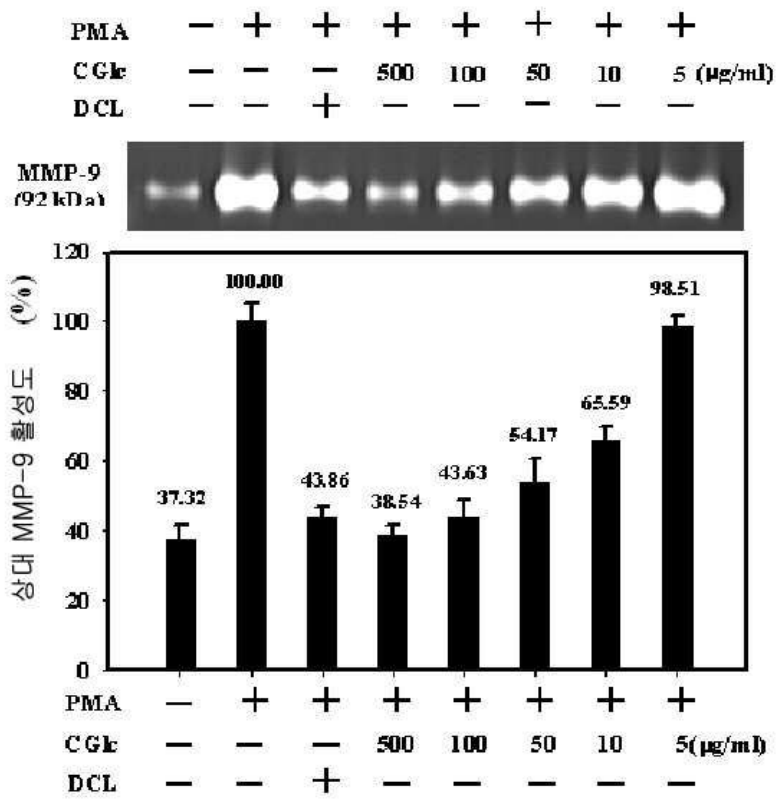
<5> 도 5는 각각 pGL3 리포터 벡터를 함유한 MMP-9 프로모터 및 루시페라아제 리포터 벡터를 함유한 AP-1 결합 사이트로 트랜스펙션된 HT1080 세포의 (A) MMP-9 프로모터 활성 (B) AP-1 전사활성에 대한 CGlc의 효과를 나타낸 것이다.

도면

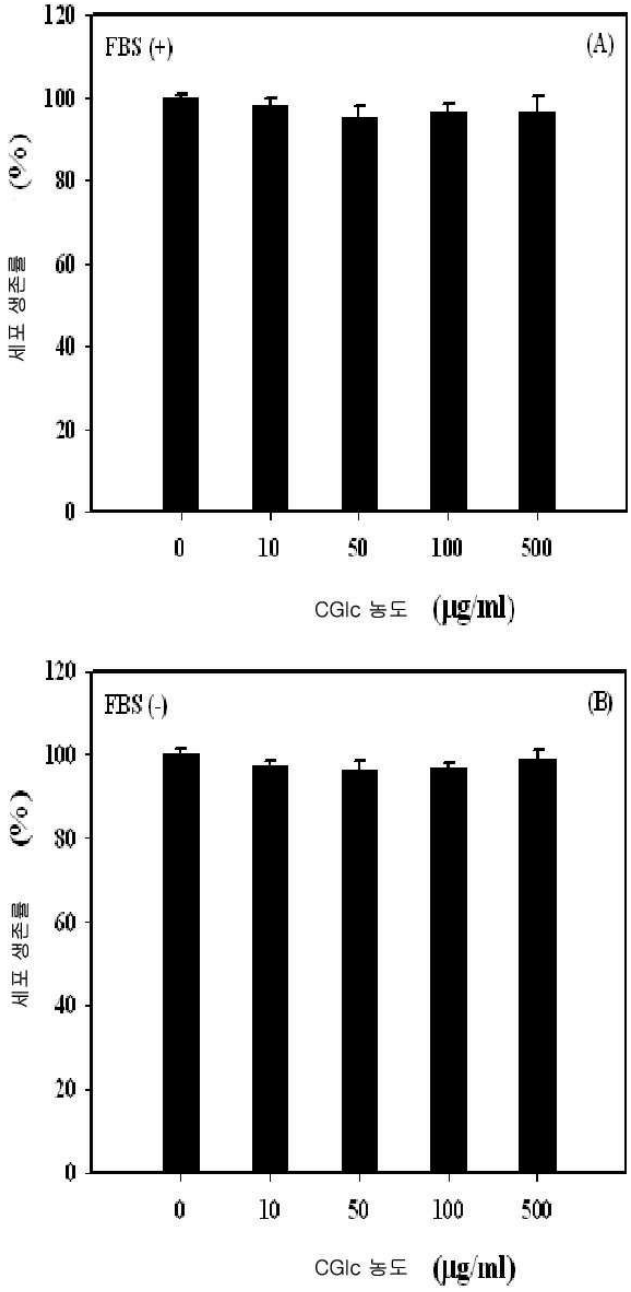
도면1


글루코사민
(A)
T %
4000 3500 3000 2500 2000 1500 1000 500
파수 / cm-1
카복실화 글루코사민
(B)
T %
1410
1560
4000 3500 3000 2500 2000 1500 1000 500
파수 /cm-1

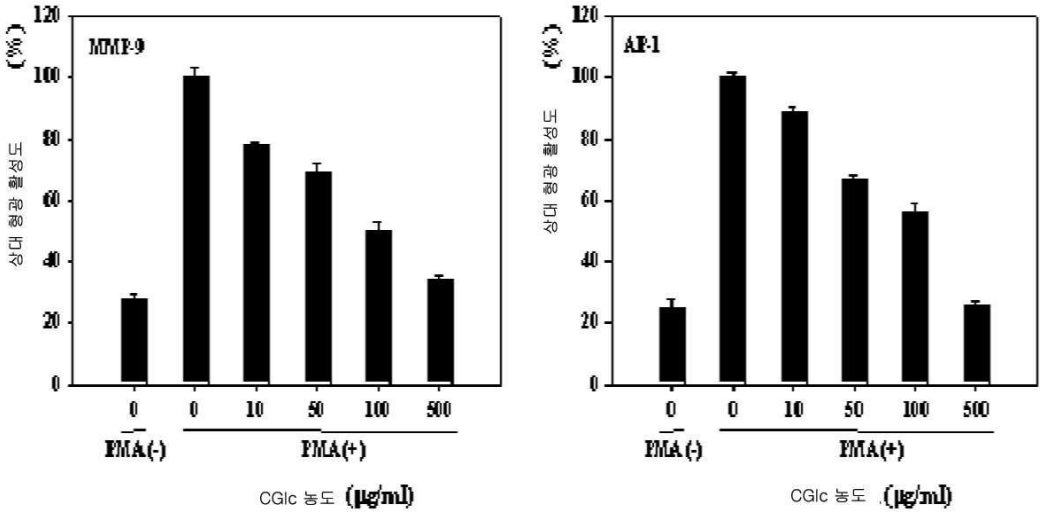
도면2


PMA − + + + + + + +
CGlc − − − 500 100 50 10 5 (μg/ml)
DCL − − + − − − − −
MMP-9
(92 kDa)
상대 MMP-9 활성도 (%)
120
100
80
60
40
20
0
100.00
98.51
65.59
54.17
43.86
43.63
38.54
37.32
PMA − + + + + + + +
CGlc − − − 500 100 50 10 5(μg/ml)
DCL − − + − − − − −

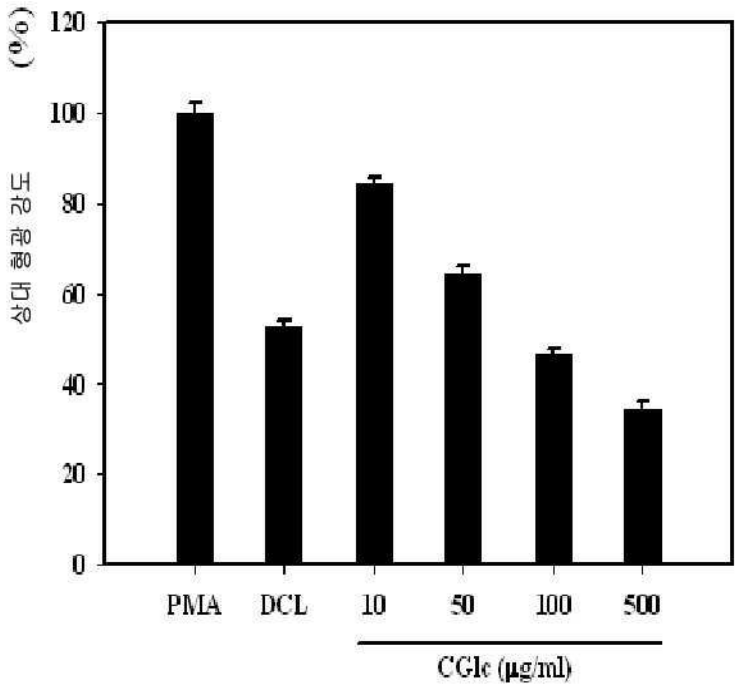
도면3


FBS (+)
(A)
세포 생존률 (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
10
50
100
500
CGlc 농도 (μg/ml)
FBS (-)
(B)
세포 생존률 (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
10
50
100
500
CGlc 농도 (μg/ml)

도면4


MMP-9
AP-1
상대 형광 활성도 (%)
0
20
40
60
80
100
120
0
0
10
50
100
500
PMA(-)
PMA(+)
CGlc 농도 (μg/ml)

도면5


상대 형광 강도 (%)
0
20
40
60
80
100
120
PMA
DCL
10
50
100
500
CGlc (μg/ml)