



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0016109

(43) 공개일자 2018년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07J 7/00 (2006.01) *A61K 31/56* (2006.01)

A61K 8/63 (2006.01) *A61Q 19/02* (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01) *C07H 15/24* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07J 7/0005 (2013.01)

A61K 31/56 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0100099

(22) 출원일자 2016년08월05일

심사청구일자 2016년08월05일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

박제원

경기도 고양시 일산동구 위시티1로 7, 504동 904호 (식사동, 위시티블루밍5단지아파트)

(74) 대리인

이치영, 장제환

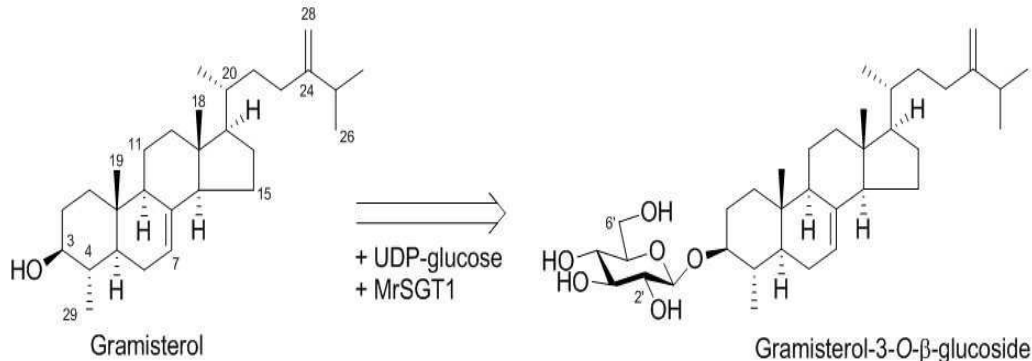
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **그라미스테롤 글루코사이드 화합물, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 그라미스테롤 글루코사이드 화합물, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 방선균 유래의 스테롤 당전이 효소가 대장균 내에 발현된 신규한 제조합 스테롤 당전이 효소(MrSGT1)을 이용하여 효소적 생합성된 그라미스테롤-3-*O*- β -글루코사이드는 생쥐 유관 혈액암 종양세포주 WEHI-3에 대하여 당 부가 전 원래 화합물인 그라미스테롤보다 상대적으로 향상된 항종양 효과, 멜라닌 세포주를 대상으로는 미백 성분인 알부틴과 유사한 피부 미백 활성 및 엘라스타제 효소 저해 활성을 통한 일부 피부 주름 개선 효과가 나타내므로, 혈액암 관련 질환의 예방 또는 치료 목적의 의약품으로의 활용이 가능하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 8/63 (2013.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
A61Q 19/08 (2013.01)
C07H 15/24 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ011066
 부처명 농촌진흥청
 연구관리전문기관 농촌진흥청 시스템합성농생명공학사업단
 연구사업명 차세대바이오그린21
 연구과제명 생합성 경로공학 기반의 토양 방선균 유전자원 활용 신규 당부가 항생물질 생산
 기 여 율 1/2
 주관기관 고려대학교 보건과학대학 바이오시스템의과학부
 연구기간 2016.01.01 ~ 2017.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A2A01002524
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 중견연구자지원(핵심연구)사업
 연구과제명 생합성 경로공학화 기반 아미노사이클리톨 신규 항생제 후보물질 디자이너
 기 여 율 1/2
 주관기관 고려대학교 보건과학대학 바이오시스템의과학부
 연구기간 2016.05.01 ~ 2018.04.30

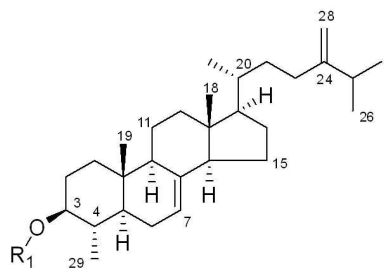
명세서

청구범위

청구항 1

화학식 1로 표시되는 그라미스테롤 글루코사이드 화합물, 이의 이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 R₁은 글루코스(glucose), 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose) 또는 갈락토스(galactose)임.

청구항 2

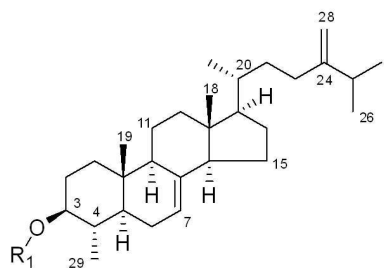
제1항에 있어서, 상기 그라미스테롤 글루코사이드 화합물은 그라미스테롤-3-*O*-β-글루코사이드인 것을 특징으로 하는 그라미스테롤 글루코사이드 화합물, 이의 이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭.

청구항 3

다음 단계를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 그라미스테롤 3-*O*-글루코사이드의 제조방법:

- 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 스테롤 당전이 효소(MrSGT1)의 존재하에 그라미스테롤 및 당 공여체를 반응시켜 하기 화학식 1로 표시되는 그라미스테롤 3-*O*-글루코사이드를 합성시키는 단계; 및
- 상기 합성된 그라미스테롤 3-*O*-글루코사이드를 회수하는 단계:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 R₁은 글루코스(glucose), 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose) 또는 갈락토스(galactose)임.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 당 공여체는 UDP-글루코스, UDP-갈락토스 또는 TDP-2'-데옥시글루코스인 것을 특징으로

하는 제조방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 그라미스테롤 글루코사이드 화합물은 그라미스테롤-3-O- β -글루코사이드인 것을 특징으로 하는 제조방법.

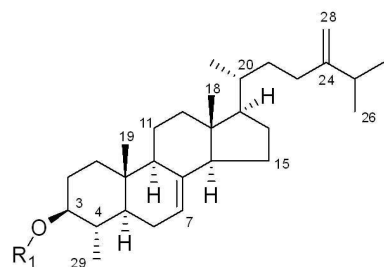
청구항 6

제3항에 있어서, 상기 (b) 단계는 역상 C18 고정상, 메탄올:아세트나이트릴:물:포름산 45:30~50:10~20:0.1~0.5(v/v/v/v) 혼합액 이동상 및 10~20분 유지시간 조건의 중압 액체 크로마토그래피 (Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC)를 이용하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 7

제1항의 화학식 1로 표시되는 그라미스테롤 글루코사이드 화합물, 이의 이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭을 유효성분으로 포함하는 혈액암 예방 또는 치료용 약학 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 R₁은 글루코스(glucose), 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose) 또는 갈락토스(galactose)임.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 그라미스테롤 글루코사이드 화합물은 그라미스테롤-3-O- β -글루코사이드인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

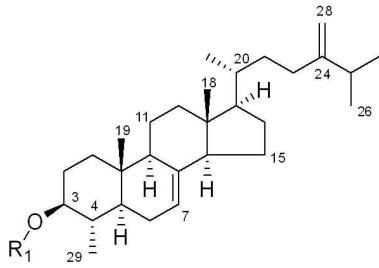
청구항 9

제7항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 10

제1항의 화학식 1로 표시되는 그라미스테롤 글루코사이드 화합물, 이의 이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭을 유효성분으로 포함하는 피부 미백 또는 주름 개선용 화장품 조성물:

[화학식 I]



상기 화학식 1에서 R₁은 글루코스(glucose), 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose) 또는 갈락토스(galactose)임.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 그라미스테롤 글루코사이드 화합물은 그라미스테롤-3-O-β-글루코사이드인 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 그라미스테롤 글루코사이드 화합물, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 방선균 유래의 스테롤 당전이 효소를 이용한 혈액암 항종양 활성과 피부 미백 및 주름개선 활성을 나타내는 그라미스테롤 글루코사이드 화합물, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 약학조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 식물 유래 피토스테롤(phytosterol)은 식물 세포막의 필수 구성성분으로 동물에서 생합성 되는 콜레스테롤(cholesterol)과 구조적으로 비슷하며, 최근에 다양한 생물학적 활성이 보고되어 건강기능식품, 화장품 및 제약 산업에서 주목받고 있다. 대표적인 피토스테롤로는 베타-시토스테롤(β-sitosterol), 캄페스테롤(campesterol) 및 스티그마스테롤(stigmasterol)등이 있으며, 식물유나 식물성 기름 등에 다수 함유되어 있다(Ostlund *et al.*, *Annu. Rev. Nutr.* 22:533-549, 2002). 1950년대 이후 피토스테롤의 콜레스테롤 저하 효과, 혈관신생 효과 등에 대한 보고와 연구가 진행되고 있으나, 체내 콜레스테롤 농도와 밀접한 협심증, 심근경색 및 뇌혈관 질환 등의 심혈관 질환에 대한 효과 및 그 기작은 과학적으로 실증된 바는 아직 없다(Weingartner *et al.*, *Eur. Heart J.* 30(4):404-409, 2009).

[0004] 피토스테롤의 구조적 변형을 통한 약리적 활성 증대 및 의약 후보물질로의 개발은 개량신약 뿐만 아니라 건강기능식품 개발의 주요 기술로서 인식되고 있으며, 그 중 하나는 그 화학구조 내 수산기(특히 C-3 위치)에 당 분자를 전이시킬 수 있는 스테롤 당전이 효소(sterol glycosyltransferase; 이하 SGT)를 이용한 효소적 제조방법이 있다. 이와 같은 특정 화합물의 당전이화는 원래 물질에 비하여 그 용해도 및 생체 적용시 흡수성을 보다 높여 줄 수 있어서, 건강기능식품 및 의약품의 제형 개량, 신규 제형 개발 및 프로드럭(prodrug)화에 도움을 줄 수 있다.

[0005] 스테롤 당전이 효소인 SGT는 CAZY(Carbohydrate Active enZymes) 데이터베이스 내 94종의 당전이 효소들 중에서 제1종(family 1)으로 구분되어 있으며, 현재까지 그 기능이 규명된 SGT 암호화 유전자들의 경우 대부분이 식물 유래이고(Madina *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1774:392-402, 2007; Warnecke *et al.*, *Plant Molecular Biol.* 35:597-603, 1997; Potocka *et al.*, *Acta Biochim. Polonica* 55:127-134, 2008; Debolt *et al.*, *Plant Physiol.* 151:78-87, 2009), 스테롤 당전이 효소 반응을 통하여 생합성되는 당부가 스테롤(sterol glucoside; 이하 SG)은 식물 외에도 미생물과 일부 동물에 두루 편재되어 있다. 이러한 당부가 스테롤은 트리테르페노이드(triterpenoid), 스테롤성 알칼로이드(steroidal alkaloids) 등을 포함하고 있으며, 대다수가 스테로이드 구조 내 3번 탄소에 위치한 수산기에 당이 결합한 구조이다.

[0006] 피토스테롤 중 하나로 곡류의 겉껍질(cereal bran), 채소유(vegetable oil), 과일씨유(fruit kernel oil) 혹은 사탕수수(sugarcane) 외피에 존재하는 것으로 알려진 그라미스테롤(gramisterol, 이후 GR)은 그 구조상 4번 탄소에 메틸기가 부가된 4-메틸스테롤(4-methylsterol)로 분류되고 있다(Jeong *et al.*, *Lipids* 10:634-640, 1975; Willuhn *et al.*, *Planta Med.* 46:99-104, 1982; Feong *et al.*, *J. Sep. Sci.* 37:1308-1314, 2014; Suttiarporn *et al.*, *Nutrients* 7:1672-1687, 2015). 최근에는 태국 라이스베리(riceberry) 중 쌀겨(rice bran)에서 추출된 GR이 혈액암(myelogenous leukemia)관련 종양 세포주 및 혈액암 생쥐 모델을 대상으로 하여 항종양(anti-tumor) 약리활성이 보고된 바 있다(Somitara *et al.*, *PLoS One* 11:e0146869, 2016). 또한, 동일 실험군을 대상으로 하여 면역 강화 활성(immune enhancing activity) 또한 보고되고 있다. 하지만, 현재까지 GR에 당이 부가된 그라미스테롤 글루코사이드(Gramisteryl glucoside, 이하 GRG)를 포함하는 3번 위치 수산기에 당이 부가된 GR 유도체는 보고된 바가 없으며, 마찬가지로 효소적 반응을 통한 그라미스테롤 당부가 화합물의 제조는 현재까지 알려진 바가 없다.

[0008] 본 발명자는 대한민국 특허출원 제10-2015-0104324호(발명의 명칭: 스테롤 당전이 효소를 이용한 스테롤 글루코사이드의 제조방법)를 통해 주요 피토스테롤 뿐만 아니라 해조류 유래 피토스테롤인 푸코스테롤(fucoesterol)에 당이 부가된 피토스테롤 유도체들의 생전환에 성공한 바 있다. 이를 위하여, 피토스테롤들을 기질로 하여 당전이 반응을 가능케 하는 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 방선균 유래 신규 당전이 효소(GT)의 발견, 효소적 반응을 통한 당부가 피토스테롤들의 생합성, 나아가 신규한 당부가 유도체인 푸코스테롤 글루코사이드를 원래 화합물인 푸코스테롤과 비교하여 항암 및 항당뇨합병증 등을 확인한 바 있다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 그라미스테롤(GR)을 기질로 하고 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 방선균 유래 재조합 당전이 효소(MrSGT1)를 활용하여 당이 부가된 그라미스테롤 유도체로서 GRG를 생합성한 결과, 혈액암 종양 세포주 WEHI-3에 대한 인비트로(in vitro) 항종양 활성과 인간 멜라노마(melanoma) 세포주 내 멜라닌 생합성에 대한 저해 활성 및 엘라스타제에 대한 저해활성을 비교함으로써 혈액암 항종양 활성을 지닌 동시에 피부 미백 효과가 우수하고 피부 주름개선이 가능함을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

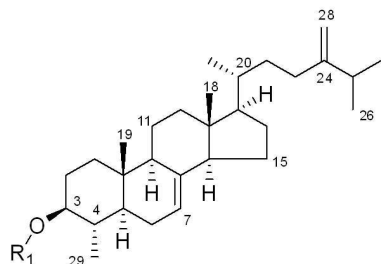
해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 혈액암 관련 세포주를 대상으로 인비트로 약리활성을 제공하는 한편 혈액암 종양 치료 목적으로 사용될 수 있는 당부가 그라미스테롤 유도체를 미생물 유래 재조합 당전이 효소(MrSGT1)의 생전환 방법에 의해 제조하여 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 화학식 1로 표시되는 그라미스테롤 글루코사이드 화합물, 이의 이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭:

[0014] [화학식 1]



[0015]

[0016] 상기 화학식 1에서 R_1 은 글루코스(glucose), 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose) 또는 갈락토스(galactose)이다.

[0017] 본 발명은 또한, (a) 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 스테롤 당전이 효소(MrSGT1)의 존재하에 그라미스테롤 및 당 공여체를 반응시켜 하기 화학식 1로 표시되는 그라미스테롤 3-*O*-글루코사이드를 합성시키는 단계; 및 (b) 상기 합성된 그라미스테롤 3-*O*-글루코사이드를 회수하는 단계를 포함하는 화학식 1로 표시되는 그라미스테롤 3-*O*-글루코사이드의 제조방법을 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한, 화학식 1로 표시되는 그라미스테롤 글루코사이드 화합물, 이의 이성질체 또는 약학적으로 허용 가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭을 유효성분으로 포함하는 혈액암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한, 화학식 1로 표시되는 그라미스테롤 글루코사이드 화합물, 이의 이성질체 또는 약학적으로 허용 가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭을 유효성분으로 포함하는 피부 미백 또는 주름 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따른 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 방선균 유래의 스테롤 당전이 효소가 대장균 내에 발현된 재조합 스테롤 당전이 효소(MrSGT1)를 이용하여 효소적 생합성된 그라미스테롤 글루코사이드는 혈액암 관련 세포주 대상으로 항종양 효과를 나타내므로, 혈액암 관련 질환의 예방 또는 치료 목적의 의약품으로 유용하다. 또한, 인간 멜라노마(melanoma) 세포주 내 멜라닌 생합성에 대한 저해 활성 및 엘라스타제에 대한 효소 저해활성을 나타냄으로써 피부 미백 및 피부 주름개선 목적의 화장품 조성물로 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 스테롤 당전이효소 MrSGT1의 효소 반응에 대한 모식도이다.

도 2는 당전이 효소반응을 통한 그라미스테롤 글루코사이드 화합물의 고압 액체 크로마토그래피-전자분무이온화-질량분석기 (HPLC-electrospray ionization-mass spectrometry) 기기 분석 결과를 나타낸 크로마토그램이다 (A: 열처리로 불활성화된 재조합 당전이 효소 MrSGT1, 기질 그라미스테롤 및 UDP-Glc의 반응 후 에틸아세테이트 (ethyl acetate) 추출액; B: 재조합 당전이 효소 MrSGT1, 기질 그라미스테롤 및 UDP-Glc의 반응 후 에틸아세테이트 추출액).

도 3은 그라미스테롤 글루코사이드 화합물 처리구 및 그라미스테롤 비교구의 생쥐 유래 혈액암 종양 세포주 WEHI-3에 대한 항종양 활성을 나타낸 그래프이다.

도 4는 그라미스테롤 글루코사이드 화합물과 양성 대조구인 알부틴의 인비트로 인간 멜라노마(melanoma) 세포주 내 멜라닌 생합성 저해 활성을 비교한 그래프이다.

도 5는 그라미스테롤 글루코사이드 화합물과 양성 대조구인 어슐릭산과 아스코르브산의 엘라스타제 효소 활성 저해 정도를 비교한 그래프이다.

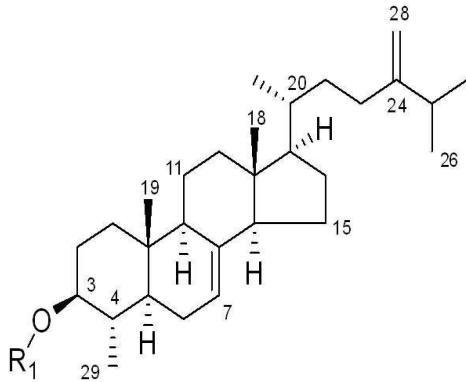
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0026] 본 발명은 마이크로모노스포라 로도랑지아 균주의 유전체(genome)로부터 GT 암호화 유전자를 분리하고, 이를 포함하는 재조합 발현 벡터 및 형질전환 대장균을 제작한 다음, 상기 발현된 스테롤 당전이 효소 MrSGT1에 그라미스테롤(GR) 및 핵산당(nucleotidyl sugar)인 우리딘 이인산 글루코스(uridine diphosphate glucose; 이하 UDP-Glc)를 당 공여체로 반응시켜 당이 부가된 GRG 화합물을 생합성하였다. 그 다음으로 질량분석기와 핵자기 공명 분광법(nuclear magnetic resonance spectrometry) 기기분석을 통하여 그 구조를 확인하였다.

[0028] 따라서, 본 발명의 일 관점은 화학식 1로 표시되는 그라미스테롤 글루코사이드 화합물, 이의 이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭에 관한 것이다.

[0029] [화학식 1]



[0030]

[0031] 상기 화학식 1에서 R₁은 글루코스(glucose), 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose) 또는 갈락토스(galactose)이다.

[0032] 또한, 본 발명의 다른 관점에서 (a) 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 스테롤 당전이 효소(MrSGT1)의 존재하에 그라미스테롤 및 당 공여체를 반응시켜 하기 화학식 1로 표시되는 그라미스테롤 3-O-글루코사이드를 합성시키는 단계; 및 (b) 상기 합성된 그라미스테롤 3-O-글루코사이드를 회수하는 단계를 포함하는 화학식 1로 표시되는 그라미스테롤 3-O-글루코사이드의 제조방법에 관한 것이다.

[0033] 본 발명에 있어서, 화학식 1로 표시되는 스테롤 글루코사이드는 그라미스테롤-3-O-β-글루코사이드인 것이 바람직하나, 부가된 당의 종류의 경우엔 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 화합물은 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 아세트산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈록투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산 등을 사용할 수 있다. 바람직하게는 황산을 사용할 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 화합물은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 포함할 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 화합물은 결정 형태 또는 비결정 형태로 제조될 수 있으며, 화학식 1의 화합물이 결정 형태로 제조될 경우, 임의로 수화되거나 용매화될 수 있다.

[0037] 본 발명에 있어서, 상기 당 공여체는 UDP-글루코스(Glc), UDP-갈락토스(Gal) 또는 TDP-2'-디옥시글루코스(deoxy-Glc)인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 부가되는 당의 종류로는 단당(mono-saccharide)의 경우에는 글루코스, 만노스(mannose), 갈락토스(galactose), 알로스(allose), 알트로스(altriose), 이도스(idose), 탈로스(talose), 프럭토스(fructose), 아라비노스(arabinose) 또는 자일로스(xylose)일 수 있으며, 그리고 아미노당으로는 N-아세틸-갈락토사민(N-acetyl-galactosamine), N-아세틸-글루코사민(N-acetyl-glucosamine), N-아세틸-뉴라미닉산(N-acetyl-neuraminic acid), 글루코사민(glucosamine) 또는 갈락토사민(galactosamine)일 수 있고, 이당(di-saccharide)의 경우에는 수크로스(sucrose), 셀로비오스(cellobiose), 말토스(maltose), 락토스(lactose), 트레할로스(trehalose), 겐티오비오스(gentiobiose) 또는 멜리비오스(melibiose)일 수 있으며, 삼당(tri-saccharide)의 경우엔 라피노스(raffinose) 또는 겐티아노스(gentianose)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 또한, 상기 (b) 단계는 역상 C18 고정상, 메탄올:아세트나이트릴:물:포름산 45:30~50:10~20:0.1~0.5(v/v/v/v) 혼합액 이동상 및 10~20분 유지시간(Retention time) 조건의 중압 액체 크로마토그래피(Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC)를 이용할 수 있으며, 바람직하게는 역상 C18 고정상, 메탄올:아세트나이트릴:물:포름산 45:40:14.8:0.2(v/v/v/v) 혼합액 이동상 및 15~16.6분 유지시간 조건에서 중압 액체 크로마토그래피를 이용할 수 있다.

- [0039] 본 발명은 당이 부가된 그라미스테롤 글루코사이드 유도체(GRG)의 생화학적 활성을 확인하고자 당부가 전의 원래 화합물 GR과 그 유도체 GRG의 생쥐 유래 혈액암 관련 종양 세포주를 대상으로 인비트로 항종양 활성을 검사하였으며, 포도당이 효소적으로 부가된 GRG 유도체의 혈액암 항종양 활성을 확인하였다.
- [0040] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서 화학식 1로 표시되는 그라미스테롤 글루코사이드 화합물, 이의 이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭을 유효성분으로 포함하는 혈액암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0041] 본 발명은 당이 부가된 그라미스테롤 글루코사이드 유도체(GRG)의 멜라노마 세포주 대상 인비트로 멜라닌 생합성 저해 활성을 검사하였으며, 포도당이 효소적으로 부가된 GRG 유도체의 미백 성분인 알부민 대비 유사한 멜라닌 생합성 저해 활성 혹은 피부 미백 활성을 나타내는 것을 확인하였다.
- [0042] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서 화학식 1로 표시되는 그라미스테롤 글루코사이드 화합물, 이의 이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭을 유효성분으로 포함하는 피부 미백 활성 개선용 화장품 조성물에 관한 것이다.
- [0044] 또한, 본 발명은 당이 부가된 그라미스테롤 글루코사이드 유도체(GRG)의 멜라노마 세포주 대상 인비트로 엘라스타제 효소 저해 활성을 검사하였으며, 포도당이 효소적으로 부가된 GRG 유도체의 일부 효소 저해 활성 혹은 피부 주름 개선 활성을 나타내는 것을 확인하였다.
- [0045] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서 화학식 1로 표시되는 그라미스테롤 글루코사이드 화합물, 이의 이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 개선용 화장품 조성물에 관한 것이다.
- [0046] 본 발명에 따른 약학 조성물은 의약적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물의 투여로 암 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물의 투여로 혈액암 질환 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.
- [0048] 본 발명의 상기 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 혈액암 관련 종양 세포주에 대하여 항종양 활성을 나타내어, 관련 암 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 약학적 조성물은 표준 약학적 실시예에 따라 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 담체, 보조제 또는 희석액 등의 첨가물을 함유할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 적어도 하나 이상 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 임상 투여시에 하기의 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제제화되어 투여될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0051] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질 캡셀제, 연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등의 제형일 수 있는데, 이들 제형은 유효성분 외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산의 마그네슘염, 스테아르산의 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 정제는 또한, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.
- [0052] 비경구 투여용 제형으로는 피하 주사, 정맥 주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사를 주입하는 방법에 의할 수 있다. 이때, 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여, 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 적어도 하나 이상 포함하고, 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하며, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.
- [0053] 또한, 본 발명의 화합물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강 상태 및 질환 정

도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 70kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.001 ~ 1,000mg/일이고, 바람직하게는 0.01 ~ 500mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

- [0055] 또한, 본 발명은 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 스테롤 당전이 효소(MrSGT1)에 관한 것이다.
- [0056] 본 발명은 상기 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.
- [0057] 본 발명에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 폴리뉴클레오티드는 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 균주 유래인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0058] 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터에 관한 것이다.
- [0059] 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드 또는 상기 발현벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물에 관한 것이다.
- [0060] 본 발명에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0061] 본 발명은 상기 미생물을 배양하여 스테롤 당전이 효소의 발현을 유도한 다음, 이를 회수하는 단계를 포함하는 재조합 스테롤 당전이 효소(MrSGT1)의 제조방법에 관한 것이다.
- [0062] 본원에서, "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수 개에서 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단 부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.
- [0063] 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환되어야 한다. 형질전환은 칼슘 클로라이드 방법 또는 전기천공법(electroporation) (Neumann, *et al.*, *EMBO J.*, 1:841, 1982) 등을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다. 본 발명에 따른 유전자의 과발현을 위하여 사용되는 벡터는 당업계에 공지된 발현벡터가 사용될 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 벡터는 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, pT7, pET/Rb, pGEX, pET28a, pET-22b(+) 및 pGEX로 이루어진 군으로부터 선택되는 대장균에 형질전환 가능한 다양한 벡터를 사용할 수 있다.
- [0064] 염기서열은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결(operably linked)" 된다. 이것은 적절한 분자(예를 들면, 전사 활성화 단백질)가 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서(enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.
- [0065] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질전환 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 재조합벡터 내에 포함되게 된다. 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 재조합벡터는 진핵 발현

숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

- [0066] 상술한 재조합 벡터에 의해 형질전환된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다.
- [0067] 물론 모든 벡터가 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담 없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다.
- [0068] 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 있어 상기 유전자를 숙주세포의 게놈 염색체에 삽입하여서도 상기과 같이 재조합 벡터를 숙주세포에 도입한 경우와 동일한 효과를 가질 것은 자명하다 할 것이다.
- [0069] 본 발명에서 상기 유전자를 숙주세포의 염색체상에 삽입하는 방법으로는 통상적으로 알려진 유전자조작방법을 사용할 수 있으며, 일 예로는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, 포스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 비바이러스성 벡터를 이용하는 방법을 들 수 있다.
- [0071] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0073] [실시예]
- [0074] **실시예 1: 마이크로모노스포라 로도랑지아 유전체로부터 SGT 암호화 유전자의 분리**
- [0075] 마이크로모노스포라 로도랑지아 균주로부터 유래한 스테롤 당전이 효소를 분리하기 위하여, 우선 마이크로모노스포라 로도랑지아 균주에서 분리한 유전체를 주형으로 사용하고, 기존 마이크로모노스포라 속에서 보고된 유전체의 염기서열을 기초로 하여 제작한 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머(primer)로 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 다음과 같이 실시하였다. N-터미널 프라이머는 하기 서열번호 1의 서열이고, C-터미널 프라이머는 하기 서열번호 2의 서열이다.
- [0076] [서열번호 1] 5'-GGCATATGATCCACGCGCAGCTTCCGGATG-3' (NdeI 제한위치)
- [0077] [서열번호 2] 5'-CGCTCGAGATTCGGCCTGCGCTCCACGTCCA-3' (XhoI 제한위치)
- [0078] 상기 균주의 유전체 DNA 및 상기 프라이머들을 Taq DNA 중합효소(Taq DNA polymerase)와 함께 혼합하여 전체 32 사이클의 PCR을 수행하였다(초기 불활성 98에서 5분, 52.8에서 69.3로 기울기 반응 후, 72에서 5분 동안 반응 후 종결). PCR 산물을 정제한 후, pGEMR-T 이지 벡터(pGEMR-T easy vector, Promega, Madison, WI, USA)에 접합한 다음, 대장균 XL1 블루(XL1 blue, Stratagene, La Jolla, CA, USA)에 42에서 45초간 열처리한 후, 형질전환을 수행하였다. 선발된 형질전환 대장균으로부터 T-이지 벡터를 분리, 정제한 후 그 염기서열(서열번호 3) 및 이로부터 유추한 아미노산 서열(서열번호 4)을 결정하였다. 전체 ORF의 염기서열은 1185bp이며, 그 번역 후 단백질은 394의 아미노산으로 구성(총 41.4kDa)되어 있다.
- [0080] **실시예 2: 대장균에서 재조합 스테롤 당전이 효소 MrSGT1의 발현**
- [0081] 상기 실시예 1의 T-이지 벡터를 NdeI과 XhoI 제한효소로 처리한 MrGT1 DNA 절편을, 동일한 제한효소들로 처리한 단백질 발현 벡터인 pET-28(a+)(Novagen, Madison, WI, USA)에 삽입한 후, 대장균 BL21(DE3)(Stratagene, La Jolla, CA, USA)에 형질전환시켰다. 이때, 형질전환체의 선발을 위하여 카나마이신 항생제 50 ppm을 사용하였다.
- [0082] 상기 재조합 대장균을 전술한 항생제와 최종 농도 1M의 소르비톨(sorbitol) 및 2.5mM 베타인(betaine)이 첨가된

LB 배지(Luria Bertani)에 1% 부피비로 접종한 후, 37에서 배양하였다. 이후, 최종 농도 0.5mM의 이소프로필-D-티오갈락토피라노사이드(isopropyl-D-thiogalactopyranoside, IPTG; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 광학농도(optical density) 0.6~0.8 사이로 성장이 확인될 때, 단백질을 발현을 유도시켜 재조합 대장균 균주를 20에서 24시간 추가 배양하였다. 배양 후 배양액을 2000rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수한 후, 50mM 인산나트륨 용액(lysis) 완충용액(300mM NaCl, 10mM imidazole, 10% glycerol, 1% Triton X-100)에 균체를 용해시키고, 초음파 분해(sonication)를 실시하였다. 그 다음, 12000rpm에서 20분간 냉장 원심분리하고, 상등액을 따로 모아 일부 시료를 12% SDS-PAGE로 분석하여 재조합 스테롤 당전이 효소 MrSGT1의 발현 정도를 확인하였다.

[0083]

발현이 확인된 재조합 단백질을 정제하기 위하여, 전술한 상등액을 50mM 인산 완충용액(0.3M NaCl, 20mM imidazole)으로 평형화된 탈론-금속 친화성 수지(Talon-metal affinity resin, Clontech, Mountain View, CA, USA)와 섞은 후 4에서 한 시간 동안 배양하였다. 2000rpm에서 5분간 냉장 원심분리한 후, 수지를 일회용 컬럼에 도입한 후, 수지 10배 용량의 20mM 이미다졸을 포함하는 인산 완충용액으로 세척하였다. 최종적으로 180mM 이미다졸을 포함한 인산 완충용액 3ml로 수지에 결합된 재조합 스테롤 당전이 효소 MrSGT1을 정제하였다.

[0085]

실시예 3: MrSGT1 재조합 효소 반응에 의한 그라미스테롤 글루코사이드 화합물의 생합성, 분리 및 정제

[0086]

기질로 사용되는 그라미스테롤(Leancare Ltd., Flintshire, 영국) 50mM을 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide; 이하 DMSO)에 용해시켜 반응 완충용액(50mM 인산 완충용액, 10mM 염화마그네슘)으로 최종 1mM의 농도가 되게 희석한 후, 스테롤 당전이 효소 MrSGT1 30 μ M와 핵산당 UDP-glc 2mM을 첨가하여 37에서 2시간 동안 당전이 효소 반응을 실시하였다(도 1). 반응 후, 동량의 에틸아세테이트를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 3000rpm에서 5분간 원심분리한 후의 상층 유기 용매층만을 모아서 진공건조를 실시하였다. 상기 추출물 내 목적 화합물의 생합성 여부를 확인하기 위하여 고압 액체 크로마토그래피-전자분무이온화-질량분석기(HPLC-electrospray ionization-mass spectrometry) 분석을 실시하였다. 이동상으로 메탄올:아세트나이트릴:물:포름산 45:40:14.8:0.2(v/v/v/v) 혼합액을 분당 150 μ l 속도로, 고정상 컬럼으로는 Acquity CSH C18(Waters, 50 x 1.0mm, 1.7 μ m; Milford, MA, USA)을 사용하여 분석하였다(도 2).

[0087]

한편, 상기 조추출물로부터 목적하는 당부가 그라미스테롤 화합물의 분리 및 정제를 위하여 하기 콤비플래시 Rf 중압 액체 크로마토그래피(MPLC) 시스템을 사용하였다. 역상(reverse-phase) C18 카트리지에 메탄올:아세트나이트릴:물:포름산 45:40:14.8:0.2(v/v/v/v) 혼합액을 이동상으로 분당 8ml의 속도로 흘러가는 MPLC 시스템에, 동일한 이동상 5ml에 용해시킨 전술한 조추출물을 주입한 후, 크로마토그램 상 검출된 피크를 자동 분취하였다. 개별 분획을 다시 감압하여 농축한 후, 이온트랩 질량 분석기(LCQ ion-trap mass spectrometer, ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA)로 질량 스펙트럼을 분석함으로써 목적하는 당부가 그라미스테롤 화합물을 분리하였다. 기질로 사용된 그라미스테롤은 MPLC 시스템 상 약 20.4분의 유지 시간으로 분취되었고, 목적하는 당부가 그라미스테롤 화합물은 기질보다 빠른 유지 시간인 15-16.6분으로 검출되었다. 상기 글루코스 당 부가 화합물 그라미스테롤 글루코사이드(GRG; 그라미스테롤 3-O-글루코사이드)는 4.3mg으로 최종 정제되었다.

[0088]

NMR 시료들은 200 μ l의 CD₃OD에 화합물을 용해시킨 후, 5mm 시게미 어드밴스드 NMR 마이크로튜브(Shigemi advanced NMR microtube, Sigma, St. Louis, MO)에 상기 용매를 방치시킴으로써 제조하였다. ¹³C NMR 스펙트럼은 배리언(Varian) INOVA 500 분광광도계를 이용하여 298K에서 획득하였고, 화학적 이동은 내부 준거로서 TMS를 이용하여 ppm으로 기록되었다. 모든 NMR 데이터 산출은 Mnova Suite 5.3.2 소프트웨어를 이용하여 수행하였고, 글루코스 부가 그라미스테롤(그라미스테롤 3-O-글루코사이드)의 ¹³C-NMR 스펙트럼을 기질로 사용한 그라미스테롤과 비교하였다(표 1).

표 1

[0089]

위치	그라미스테롤	그라미스테롤-3-O-β-글루코사이드
	δ_c	δ_c
1	36.9	37.2
2	30.1	28.3
3	76.4	90.3
4	41.3	39.6
5	52.1	52.3
6	31.7	31.8

7	117.5	117.5
8	139.4	139.4
9	50.0	50.0
10	42.7	42.6
11	21.2	21.2
12	39.6	39.6
13	45.3	45.2
14	56.4	56.5
15	23.8	23.7
16	27.7	27.6
17	56.7	56.8
18	14.2	14.2
19	14.6	14.7
20	36.3	36.3
21	19.6	19.6
22	34.1	34.1
23	31.4	31.4
24	156.8	156.7
25	33.9	34.0
26 & 27	21.7	21.7
28	105.3	105.3
29	13.2	13.5
1 ‘		110.2
2 ‘		74.3
3 ‘		76.8
4 ‘		71.6
5 ‘		81.4
6 ‘		62.3

[0091] 실시예 4: 그라미스테롤 글루코사이드 화합물의 생쥐 유관 혈액암 종양 세포주에 대한 항종양 활성 확인

[0092] 상기 실시예 3에서 생성된 그라미스테롤 3-*O*-글루코사이드 화합물의 항종양 활성을 검정하기 위하여, 생쥐 유관 혈액암(myelogenous leukemia) 종양 세포주인 WEHI-3를 대상으로 하여 MTT 방법으로 그 항암 활성을 확인하였다. 상기 종양 세포주에 대하여 비교군으로 상기 종양 세포주에 항암 활성이 이미 보고된 그라미스테롤을 동일 농도 구배로 사용하였다.

[0093] 우선, 상기 생쥐 유관 골수단핵구 혈액암 종양 세포주인 WEHI-3(ATCC, Rockville, 미국)를 활성화시켰다. 각각의 세포주를 100ppm 스트렙토마이신, 10ppm 페니실린, 1% glutamine 및 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI1640 배지에 5% 이산화탄소 대기 내, 37에서 배양을 실시하였다. 96-웰 마이크로 플레이트에 본 배양 1일째인 WEHI-3 세포들을 각 웰 당 1.5×10^5 수준으로 분주하고 비교군(그라미스테롤, GR) 및 실시예 3의 화합물(그라미스테롤 3-*O*-글루코사이드, GRG) 각각을 10% DMSO에 용해하여 최종 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 μ M 수준이 되도록 처리한 후, 추가적으로 하루 더 배양하였다. 배양 후에 원심 분리하여 상등액을 MTT 용액으로 교체하여 37에서 4시간 정색 반응을 실시하였고 최종 마이크로플레이트 리더(microplate reader)로 발색 정도를 정량화함으로써, WEHI-3 세포주에 대한 개별 IC₅₀(50% 세포주 성장 저해를 야기시키는 화합물의 농도)을 측정하였다.

[0094] 그 결과 도 3에 나타난 바와 같이, 비교군인 그라미스테롤은 혈액암 세포주 WEHI-3에 대하여 농도 구배에 따른 항종양 활성을 보여주고 있다. 24시간 배양에 따른 그라미스테롤의 IC₅₀은 약 2.61 μ M의 수치를 나타내었다. 한편, 처리군인 그라미스테롤 3-*O*-글루코사이드 화합물은 상기 혈액암 종양 세포주를 대상으로 원래 물질인 그라미스테롤보다 낮은 약 2.17 μ M의 IC₅₀ 수치를 나타내었다. 이를 통하여 당전이된 그라미스테롤 신규 유도체인 그라미스테롤 3-*O*-글루코사이드 화합물은, 원래 물질인 그라미스테롤보다 향상된 항종양 활성을 보이고 있음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 차이는 상대적으로 소수성이 강한 그라미스테롤의 화학구조에 당을 부가시킴으로서 원래 물질에 비하여 소수성이 약해진, 즉 분배계수(partition coefficient 혹은 logP)상 친수성으로 개선이 발생한 그라미스테롤 3-*O*-글루코사이드의 WEHI-3 세포막 투과도의 향상 때문으로 예상된다.

[0096] **실시예 5: 그라미스테롤 글루코사이드 화합물의 인간 멜라노마 세포주에 대한 멜라닌 저해 활성 확인**

[0097] 상기 실시예 3에서 생성된 그라미스테롤 3-*O*-글루코사이드 화합물의 멜라닌 생성 억제 활성을 검정하기 위하여, B16/F10 멜라노마(melanoma) 세포주를 사용하였다. 즉, 10% FBS를 함유하는 DMEM배지를 96 웰 플레이트에 2000 cell/well 수준으로 분주한 후 37에서 5% 이산화탄소 농도로 24시간 배양하였다. 배양 후 각각 2 μM 농도의 알파-MSH(α-melanocyte stimulating hormone)와 2 mM 농도의 테오필린(theophylline)을 포함하는 DMEM배지로 교체한 뒤 최종 50, 100, 300 및 500 μM 수준(DMSO용해)으로 순차적으로 희석한 그라미스테롤 3-*O*-글루코사이드를 하루 간격으로 3일간 세 번에 걸쳐서 처리하였다. 총 5일간 배양 후 배지를 우선 제거하고 0.25% 트립신-EDTA(Sigma)용액으로 처리하여 멜라노마 세포를 회수한 다음, 이를 10,000 rpm에서 10분간 냉장 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 회수된 세포들을 55에서 건조시킨 뒤 1 N 수산화나트륨 용액 100 μl를 첨가하여 세포 내 멜라닌을 녹이고 이를 인산 완충용액으로 희석하여 최종 475nm 마이크로플레이트 리더(Microplate reader, Molecular Devices)로 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 DMSO가 한편 양성 대조군으로는 300 μM 수준(DMSO용해)의 알부틴을 사용하였으며, 멜라닌 생합성 저해 활성을 하기 수학식 1로 환산하여 도 4에 막대 그래프로 나타냈다.

[0098] [수학식 1]

[0099]
$$\text{멜라닌생합성 저해 활성(\%)} = 100 - \left(\frac{\text{처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100 \right)$$

[0101] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 양성 대조군인 알부틴의 경우 멜라노마 세포주에 대한 멜라닌 생합성 저해 활성이 약 43%로 나타났고, 그라미스테롤 3-*O*-글루코사이드 화합물은 네 가지 다른 농도(50, 100, 300 및 500 μM)에서 농도 의존적으로 저해 활성이 약 16에서 56% 범위로 저해 활성을 보여주었다. 특히 양성 대조군 알부틴과 동일 농도인 300 μM에서 기존 미백제 성분인 알부틴과 유사한 멜라닌 생합성 저해 활성(약 43%)을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

[0103] **실시예 6: 그라미스테롤 글루코사이드 화합물의 엘라스타제 저해 활성 확인**

[0104] 상기 실시예 3에서 생성된 그라미스테롤 3-*O*-글루코사이드 화합물의 엘라스타제(elastase) 저해 활성 비교를 통한 주름개선 효과의 검정을 실시하였다. 엘라스타제는 돼지 췌장 유래의 엘라스타제(Sigma)를, 기질로는 N-succinyl-L-alanine-alanine-alanine-p-nitroanilide(Sigma)를 사용하여 25에서 20분 반응 후, 405nm 마이크로플레이트 리더(Microplate reader, Molecular Devices)로 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 어솔릭산(ursolic acid, Sigma)과 아스코르브산 2종을 그리고 음성대조군으로는 시료 용해용 DMSO를 사용하였다. 엘라스타제 저해 정도는 음성대조군 대비 흡광도 50% 감소시키는데 필요한 화합물의 농도(IC₅₀)로 표시하였다.

[0105] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 양성 대조군인 어솔릭산은 IC₅₀이 약 0.09 mM로 나타났으며, 한편 아스코르브산은 약 4.96mM로 나타났다. 그라미스테롤 3-*O*-글루코사이드 화합물은 IC₅₀이 약 0.22mM로 나타났다. 이를 통하여 당 전이된 그라미스테롤 3-*O*-글루코사이드는 강한 엘라스타제 저해 활성을 지닌 양성 대조군 어솔릭산보다는 낮으나 아스코르브산보다는 높은 엘라스타제 저해 활성을 보임으로써 어느 정도 주름 개선 효과가 있음을 보여주고 있다.

[0107] 이상의 결과에서 나타난 바와 같이, 기존 약리 활성 화합물의 당 전이에 의한 구조 변경을 통하여 기존 화합물을 개량화 할 수 있으며, 이러한 개량화로서 기존 약물의 대체 가능한 프로드럭(prodrug)화, 신규 제형(dosage form) 그리고 약리 활성이 진보된 의약품 원료로서의 활용 잠재성을 확인할 수 있었다.

[0108] 이에, 상기 실시예에서 생성된 화합물에 대하여 하기와 같이 제제화하였다.

[0110] 제제예 1 : 정제 (직접 가압)

[0111] 화합물 5.0mg을 체로 친 후, 락토스 14.1mg, 크로스포비돈(USNF) 0.8mg 및 마그네슘 스테아레이트 0.1mg을 혼합하고 가압하여 정제로 제조하였다.

[0113] 제제예 2 : 정제 (습식 조립)

[0114] 화합물 5.0mg을 체로 친 후, 락토스 16.0mg과 녹말 4.0mg을 섞었다. 폴리솔베이트 800.3mg을 순수한 물에 녹인 후, 이 용액의 적당량을 첨가하여 미립화하였다. 건조 후에 미립을 체질한 후, 콜로이달 실리콘 디옥사이드 2.7mg 및 마그네슘 스테아레이트 2.0mg과 혼합하였다. 상기 혼합물을 가압하여 정제로 제조하였다.

[0116] 제제예 3 : 분말과 캡슐제

[0117] 화합물 5.0mg을 체로 친 후에, 락토스 14.8mg, 폴리비닐 피롤리돈 10.0mg 및 마그네슘 스테아레이트 0.2mg과 함께 혼합하였다. 상기 혼합물을 캡슐 제조기를 사용하여 단단한 No. 5 젤라틴 캡슐에 채웠다.

[0119] 제제예 4 : 주사제

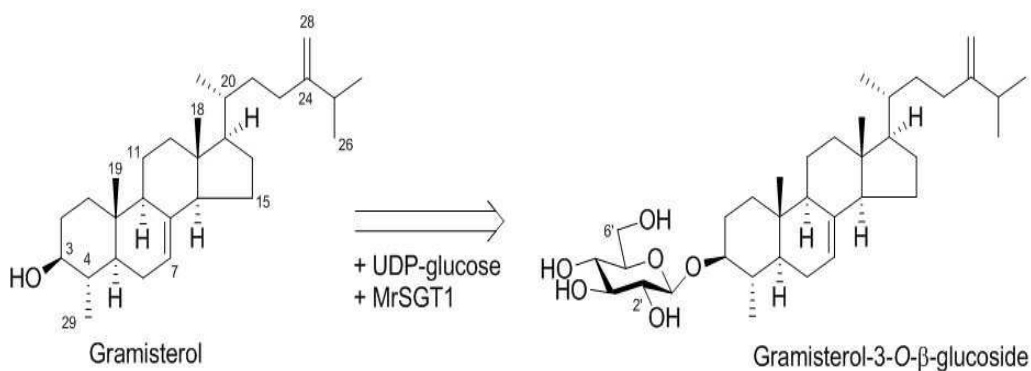
[0120] 활성 성분 100mg에 만니톨 180mg, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 26mg 및 증류수 2974mg을 함유시켜 주사제를 제조하였다.

[0122] 이상의 결과에 나타난 바와 같이, 기존 약리 활성 화합물의 당 전이에 의한 구조 변형 유도체 생전환을 통하여 기존 화합물을 개량할 수 있으며, 이러한 개량화로서 기존 약물의 대체 가능한 프로드럭화 및 신규 제형(dosage form)으로의 응용 가능성을 포함하는 의약품 및 의약품 원료로서의 활용 잠재성을 확인할 수 있다.

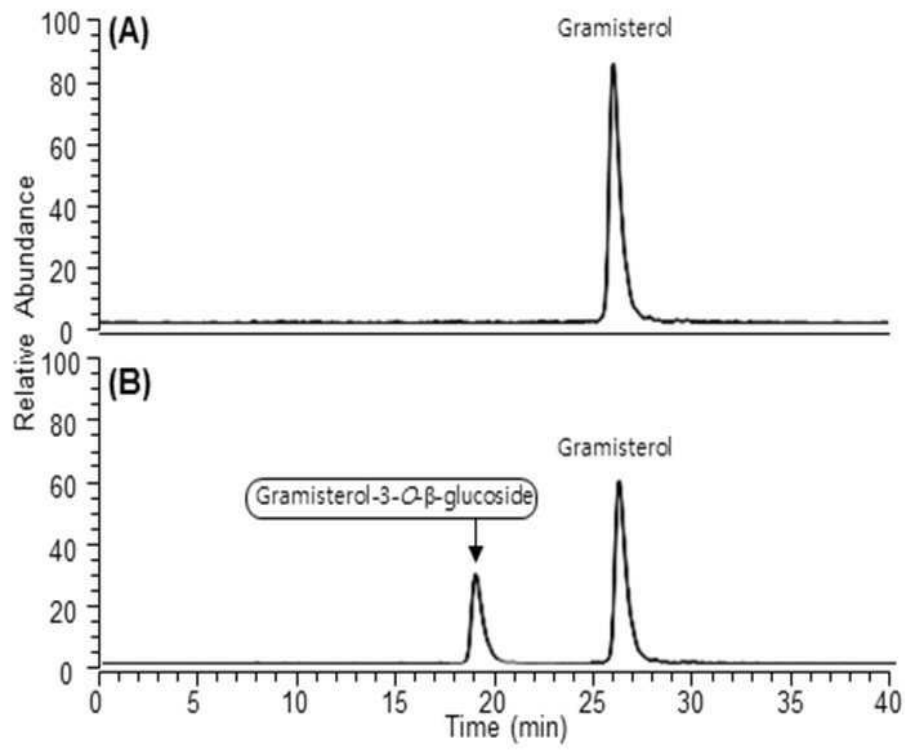
[0124] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

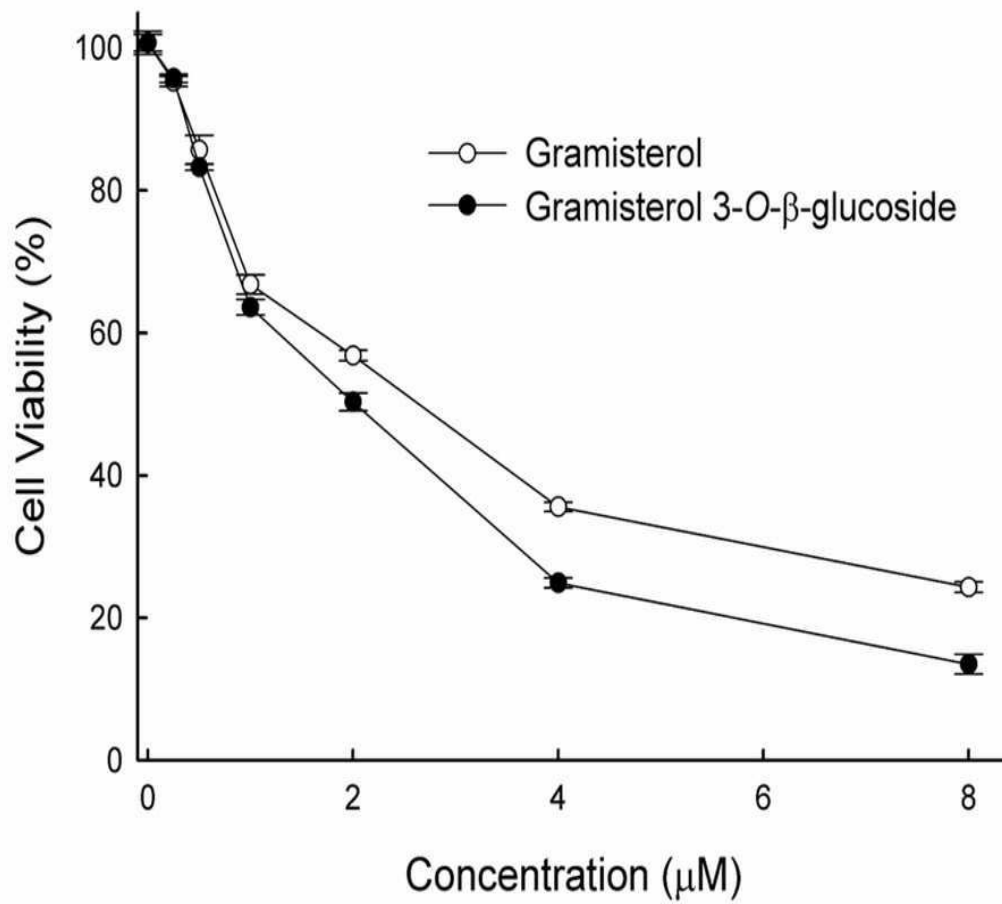
도면1



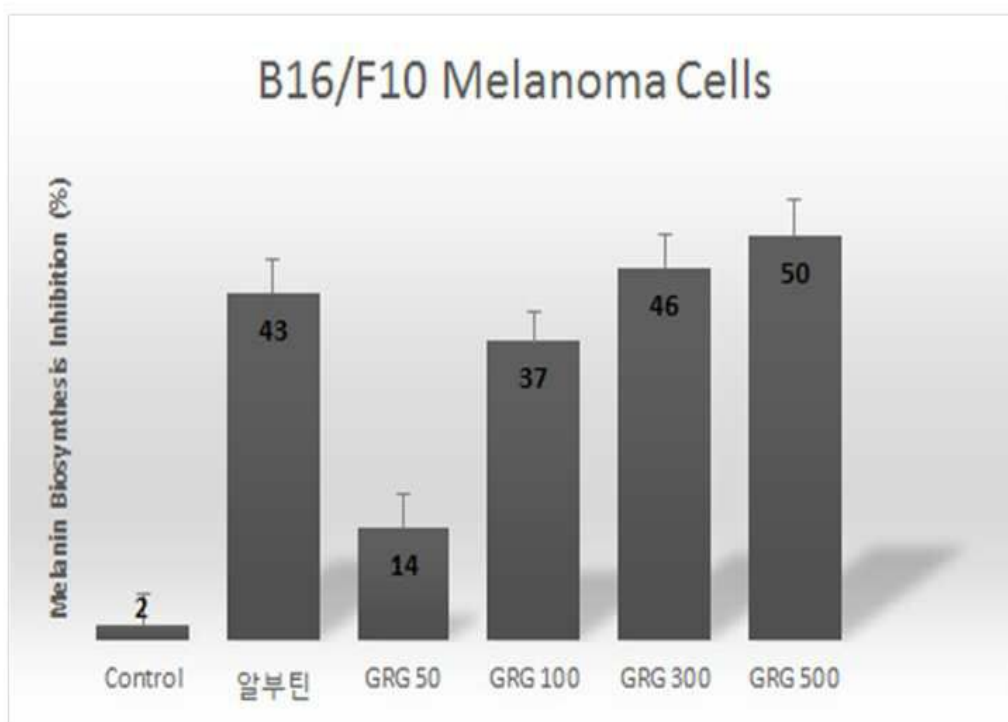
도면2



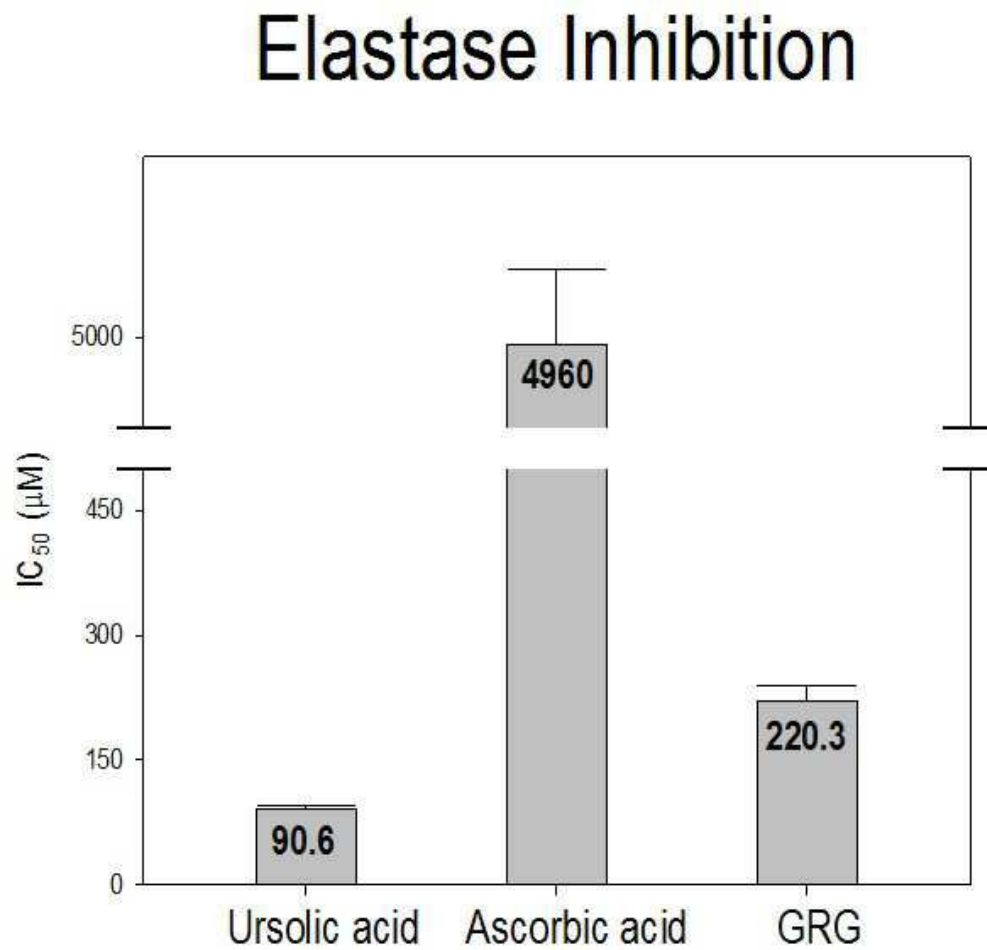
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Method for Preparing Sterol Glucosides Using Sterol
Glucosyltransferase
- <130> P15-B198
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 32
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> P1
- <400> 1

ggcatatgat ccacgcgcac gacttccgga tg

- <210> 2

32

<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	P2	
<400>	2	
cgctcgagat tcggcctgcg cctcccacgt cca		33
<210>	3	
<211>	1185	
<212>	DNA	
<213>	Micromonospora rhodorangea	
<400>	3	
atgcgcatcc tcatcgccac cgccggctcg cggggcgacg tggccccgta caccggcctc		60
ggcgcgggccc tgcggcgcg cgggtacgac gtggccgtcg ccacgaccga cacgttcgcc		120
cggatggtcc gggacgccc cctgggggttc cgccggctcc cggccgacac ccgcgccac		180
gcggggcgtgc gctccaaccg cgaggtcgtg cgcgcggccg gcgttcaccg cggaactggg		240
ccagggttc gccgacgcg cgtctcggag ggcacggacc tctgtctgt gtcgacgacc		300
accgcgccgc tggggtggct catcggcgag gcgacgggca tccggtccct cgggggtctac		360
ctccagccca ccgccccac cgccgacttc cgccggctcg tcaccggcgc gcgtccctg		420
ggcgcggtcg gcaaccgcac ggccggccgc ctggccctgc gcatggccga ccgatctac		480
gccgaggccg tcgcgggcct gcgggagcgg ctgtgcctgc cgccgtgtc cgcggccgcg		540
atgcgggcgc ggcaggagcg ggccggctgg cccgtcctgc acggcttcgg cacggccctc		600
gtcccgccgc cggccgactg gcgccccggc ctcgaggtcg tggggccgtg gtggccgcac		660
cacgacgccg gcgagcgct gccctcgaa ctcgaggact tcttgacgc gggaccgcg		720
ccggtcctgg tgggcttcgg cagcatggc gccggggacg gcgagcggt cagcgaactg		780
gcggtgcgcg cgctgcgcc cgccggcctc cgcggcatcc tccagtcgg caacgcctgc		840
ctcgcgccg agggcgacga cgtcctgacg gtcggcgacg tccccacgc cctcctgttc		900
ccccggctcg cggcggtggt gaccacgcg cgccggcacc agcgcgcga ccttcgggc		960
ggccgtcccc tcggtggcgg tcccggtgac cgccgaccag agccgttctg ggcgggccgg		1020
ctggcgccga tcggggccgc cccgccccg gtcccttca ccacgtgac cgcggacggg		1080
ctcgccggcg cctggggccg cgtcgtcggc gacgaggcgt acgcggggc ggccgagaag		1140
gccgccccgc acctggccgc ggaggacggc gccgcgcgcg tgtga		1185

<210> 4
 <211> 394
 <212> PRT
 <213> Micromonospora rhodorangea
 <400> 4

Met Arg Ile Leu Ile Ala Thr Ala Gly Ser Arg Gly Asp Val Ala Pro
 1 5 10 15
 Tyr Thr Gly Leu Gly Ala Ala Leu Arg Arg Ala Gly Tyr Asp Val Ala
 20 25 30
 Val Ala Thr Thr Asp Thr Phe Ala Arg Met Val Arg Asp Ala Gly Leu
 35 40 45
 Gly Phe Arg Arg Leu Pro Ala Asp Thr Arg Gly His Ala Gly Val Arg
 50 55 60
 Ser Asn Arg Glu Val Val Arg Ala Ala Gly Val His Arg Gly Thr Gly
 65 70 75 80
 Pro Gly Leu Arg Arg Arg Ala Val Ser Glu Gly Thr Asp Leu Leu Leu
 85 90 95
 Leu Ser Thr Thr Thr Ala Pro Leu Gly Trp Leu Ile Gly Glu Ala Thr
 100 105 110
 Gly Ile Arg Ser Leu Gly Val Tyr Leu Gln Pro Thr Ala Pro Thr Ala
 115 120 125
 Asp Phe Pro Pro Val Val Thr Gly Ala Arg Ser Leu Gly Arg Leu Gly
 130 135 140
 Asn Arg Thr Ala Gly Arg Leu Ala Leu Arg Met Ala Asp Arg Ile Tyr
 145 150 155 160
 Ala Glu Ala Val Ala Gly Leu Arg Glu Arg Leu Cys Leu Pro Pro Leu
 165 170 175
 Ser Ala Ala Ala Met Arg Ala Arg Gln Glu Arg Ala Gly Trp Pro Val
 180 185 190
 Leu His Gly Phe Gly Thr Ala Leu Val Pro Arg Pro Ala Asp Trp Arg
 195 200 205
 Pro Gly Leu Glu Val Val Gly Pro Trp Trp Pro His His Asp Ala Gly

210 215 220
 Glu Arg Leu Pro Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Asp Ala Gly Pro Arg
 225 230 235 240
 Pro Val Leu Val Gly Phe Gly Ser Met Ala Ala Gly Asp Gly Glu Arg
 245 250 255
 Leu Ser Glu Leu Ala Val Arg Ala Leu Arg Arg Ala Gly Leu Arg Gly
 260 265 270

 Ile Leu Gln Ser Gly Asn Ala Cys Leu Ala Ala Glu Gly Asp Asp Val
 275 280 285
 Leu Thr Val Gly Asp Val Pro His Ala Leu Leu Phe Pro Arg Leu Ala
 290 295 300
 Ala Val Val His His Ala Arg Arg His Gln Arg Arg Asp Pro Ala Gly
 305 310 315 320
 Gly Arg Pro Leu Gly Gly Gly Pro Gly Asp Arg Arg Pro Glu Pro Phe
 325 330 335
 Trp Ala Gly Arg Leu Ala Arg Ile Gly Ala Ala Pro Ala Pro Val Pro

 340 345 350
 Phe Thr Thr Leu Thr Ala Asp Gly Leu Ala Gly Ala Leu Gly Arg Val
 355 360 365
 Val Gly Asp Glu Ala Tyr Ala Arg Ala Ala Glu Lys Ala Ala Arg His
 370 375 380
 Leu Ala Ala Glu Asp Gly Ala Ala Arg Val
 385 390