



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0104449
(43) 공개일자 2012년09월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7028 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0009443

(22) 출원일자 2011년01월31일

심사청구일자 2011년01월31일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)

(72) 발명자

장병철

대구광역시 달서구 상화로58길 86, 105동 2001호
(도원동, 롯데캐슬레이크)

조정랑

대구광역시 서구 통학로49길 36-7 (비산동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김승진, 양부현

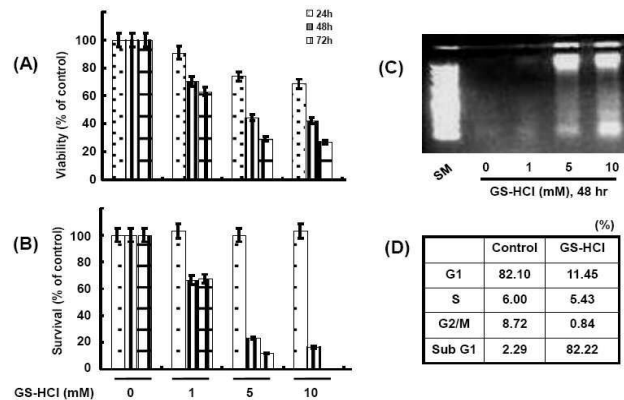
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 글루코사민을 유효성분으로 포함하는 구강편평세포암의 치료 또는 예방용 조성물

(57) 요약

본 발명은 글루코사민(glucosamine)을 유효성분으로 포함하는 구강편평세포암(oral squamous cell carcinoma)의 치료, 예방 또는 개선 용도의 조성물에 관한 것이다. 글루코사민은 구강편평세포암의 암세포의 증식을 억제하고, 세포사(apoptosis)를 강하게 촉진함으로써, 구강편평세포암에 대해 항암 활성을 갖는다. 따라서, 본 발명의 글루코사민은 구강편평세포암의 치료, 예방 또는 개선 용도의 약물 또는 기능성 식품 조성물의 활성성분으로서 개발될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

박유경

대구광역시 수성구 수성로39안길 16 (중동)

정창욱

대구광역시 북구 구리로 254, 현대아파트 103동
603호 (국우동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0028351

부처명 교육과학기술부

연구사업명 선도연구센터육성사업 (기초의학분야(MRC))

연구과제명 만성질환 예방 및 치료화학제 연구센터

주관기관 계명대학교 산학협력단

연구기간 2009.09.01 ~ 2011.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

글루코사민(glucosamine)을 유효성분으로 포함하는 구강편평세포암(Oral Squamous Cell Carcinoma, OSCC)의 치료 또는 예방용 억제학적 조성물.

청구항 2

글루코사민(glucosamine)을 유효성분으로 포함하는 구강편평세포암의 개선용 기능성 식품 조성물.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 글루코사민은 구강편평세포암의 암세포 증식을 억제하거나 세포사(apoptosis)를 유도하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 글루코사민은 구강편평세포암의 암세포에서 카스파제(caspase)-3의 활성화, Mcl-1(Myeloid cell leukemia sequence 1)의 발현 억제, 또는 HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1, α subunit)의 발현 억제 작용을 하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 억제학적 조성물은 치과구강용약의 형태로 제공되는 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 글루코사민을 유효성분으로 포함하는 구강편평세포암의 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 구강편평세포암(Oral squamous cell carcinoma, OSCC)은 가장 잘 알려진 구강내에서 발생하는 악성 암이다. 구강편평세포암은 신체 외형의 변화가 가장 심한 종류의 암이기 때문에, 격리를 촉진하고 일반적인 인지, 사회, 감정 또는 신체 기능을 손실시키는 등 환자에서 삶의 질을 떨어뜨린다(Zain, 2001). OSCC의 1차적 치료는 외과적 수술이나, 방사능 및/또는 화학치료법이 대체적 치료 수단으로 부각되고 있다(Vokes et al., 1993; Claus et al., 2002; Nakazawa et al., 2005). 특징적으로, 구강편평세포암의 암세포들은 악성의 마지막 단계에서 암치료 매개된 세포사(apoptosis)에 대해 매우 강한 내성을 갖는다. 따라서, 내성 메커니즘을 이해하고 극복하기 위한 연구 뿐만 아니라, 구강편평세포암의 예방 및/또는 치료 효율이 좋은 새로운 약물 또는 물질을 개발하는 것 또한 중요하다.

[0003] 글루코사민(glucosamine, GS)은 아미노모노사카라이드로서, 류마티스 관절염 및 골관절염에 대한 대체적 식이요법으로 사용되어 왔다. 이전의 인 비보 및 인 비트로 연구결과에 의하면, GS는 랫트에서 보조제 유발된 관절염에 대해 예방적 활성을 나타냈고(Hua et al., 2005), 장기간의 인간 임상 시험에서 골관절염상에 대해 심각한 증상-변형 효과를 야기하였으며(Reginster et al., 2001), COX-2, iNOS, MMPs, 및 IL-1 β 와 같은 많은 염증성

매개자의 발현 및/또는 활성을 억제한다고 보고되어 있다(Nakamura et al., 2004; 49 Largo et al., 2003). 그러나, 최근의 연구결과 GS가 전립선암(DU145), 유방암(MDA-MB-231), 혈액암(K562), 및 신경교종(U87-MG)을 포함하는 특정 타입의 인간 암세포에서 세포사(apoptosis)를 유발하고(Quastel and Cantero, 1953), 근육종을 포함하는 마우스에서 종양의 형성을 감소시킨다는 것이 입증되어 있다. GS가 상기와 같은 암세포에 대한 항-증식 효과 및 친-세포사 효과를 발휘하는 가능한 메카니즘으로는 DNA, RNA 및 단백질과 같은 거대분자의 합성 저해(Bekesi et al., 1969; Bekesi and Winzler, 56 1970; Bosmann, 1971), 세포주기중지(cell cycle arrest), 세포사 억제자 단백질 survivin의 발현감소, STAT-3 신호전달단백의 활성억제(Chesnokov et al., 2009), p70S6K 신호전달단백의 활성억제(Oh et al., 2007), 및 ER 스트레스-매개된 자식작용(autophagy)(Hwang and Baek, 2010) 등을 들 수 있다. 아직까지 GS-HCl과 인간 OSCC 세포사이의 관련성은 보고된 바 없다.

[0004] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 구강편평세포암(OSCC, Oral Squamous Cell Carcinoma)을 억제 또는 예방할 수 있는 물질을 개발하기 위해 연구 노력한 결과, 글루코사민(glucosamine)이 인간 구강편평세포암에서 암세포의 증식을 억제하고 세포사(apoptosis)를 촉진하는 활성을 가짐을 실험적으로 증명함으로써 이 물질이 구강암 치료 또는 예방 용도로 개발될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 글루코사민을 유효성분으로 포함하는 하는 구강암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물을 제공하는 것에 목적이 있다.

[0007] 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 글루코사민(glucosamine)을 유효성분으로 포함하는 구강편평세포암(oral squamous cell carcinoma)의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 글루코사민을 유효성분으로 포함하는 구강편평세포암의 개선용 기능성 식품 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명의 글루코사민은 구강편평세포암의 암세포 증식을 억제하거나 세포사(apoptosis)를 유도한다.

[0011] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명의 상기 글루코사민은 구강편평세포암의 암세포에서 카스파제(caspase)-3의 활성화, Mcl-1(Myeloid cell leukemia sequence 1)의 발현 억제, 또는 HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit)의 발현 억제 작용을 한다.

[0012] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 상기 약제학적 조성물은 치과구강용약의 형태로 제공될 수 있다.

[0013] 본 명세서 하기 실시예에서 입증되는 바와 같이 본 발명의 글루코사민은 구강편평세포암의 암세포 증식을 억제하고 세포사(apoptosis)를 촉진함으로써 구강편평세포암의 항암활성을 나타낸다. 구체적으로는, 글루코사민은 구강편평세포암의 암세포내에서 세포사를 유도하는 것으로 알려진 카스파제-3의 활성을 촉진한다. 또한, 글루코사민은 항-세포사(anti-apoptotic) 단백질인 Mcl-1(Myeloid cell leukemia sequence 1)와 HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit)의 발현을 억제함으로써 세포사를 촉진한다.

- [0014] 따라서, 본 발명의 글루코사민은 구강편평세포암에 의해 유도되는 구강암의 치료 또는 예방 용도로 사용될 수 있다.
- [0015] 본 발명의 조성물의 유효성분인 글루코사민은 글루코사민과 이의 약제학적으로 허용되는 염을 모두 포함한다. 글루코사민의 염은 예를 들어 글루코사민-염산(glucosamine-HCl) 또는 글루코사민-설페이트(glucosamine-sulfate)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0016] 본 발명은 (a) 글루코사민의 약제학적 유효량; (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 구강편평세포암의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있으며, 이러한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 멘톨 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0017] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 경구 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.0001-100 mg/kg(체중)이다.
- [0018] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 피부에 국소적으로 도포, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물이 구강편평세포암의 치료 또는 예방을 위해 적용되는 점을 감안하면, 본 발명 조성물의 투여는 구강내에 국소적으로 투여되도록 이루어지는 것이 바람직하다. 예를 들어, 본 발명의 조성물은 치과구강용약의 형태로 제공될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요기간 등을 고려하여 결정할 수 있으며 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명은 글루코사민을 유효성분으로 포함하는 구강편평세포암의 개선용 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 기능성 식품 조성물은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분으로서의 글루코사민 이외에 향미제 또는 천연 탄수화물을 추가 성분으로서 포함시킬 수 있다. 예를 들어, 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등); 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등); 올리고당; 폴리사카라이드(예컨대, 텍스트린, 시클로텍스트린 등); 및 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등)을 포함한다. 향미제로서 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등) 및 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0024] (i) 본 발명의 글루코사민은 구강편평세포암(Oral Squamous Cell Carcinoma)의 암세포에 대해 항증식 효과 및 세포사(apoptosis) 촉진 효과를 나타낸다.
- [0025] (ii) 글루코사민은 구강편평세포암의 치료, 예방 또는 개선용 조성물의 활성성분으로 개발될 수 있다.
- [0026]

발명의 효과

- [0027] 본 발명은 글루코사민(glucosamine)을 유효성분으로 포함하는 구강편평세포암(Oral Squamous Cell Carcinoma)

의 치료, 예방 또는 개선 용도의 조성물에 관한 것이다. 글루코사민은 구강편평세포암의 암세포의 증식을 억제하고, 세포사(apoptosis)를 강하게 촉진함으로써, 구강편평세포암에 대해 항암 활성을 갖는다. 따라서, 본 발명의 글루코사민은 구강편평세포암의 치료, 예방 또는 개선 용도의 약물 또는 기능성 식품 조성물의 활성성분으로서 개발될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028]

도 1은 글루코사민(GS-HCl)의 YD-8세포에 대한 항-증식 및 친-세포사(pro-apoptotic) 효과에 관한 것이다. 패널 A: YD-8 세포를 24, 48, 또는 72 시간 동안 GS-HCl과 함께 또는 GS-HCl 없이 배양하였다. 각각의 배양 시간에서 YD-8 세포의 생존율을 MTS 시약을 사용하여 측정하였다. 생존율 분석은 3회 반복하여 행하였다. 데이터는 3회 독립 실험의 평균 $\pm$ SE로 나타내었다. 패널 B: YD-8 세포들을 지시된 농도에서 24, 48, 또는 72 시간 동안 GS-HCl과 함께 또는 GS-HCl 없이 배양하였다. 각각의 배양시간에서 트립판블루(trypan blue) 염색제로 염색되지 않는 생존 YD-8 세포의 수를 현미경하에서 측정하였다. 세포 계수 분석은 3회 반복하여 수행하였다. 데이터는 3회 독립 실험의 평균 $\pm$ SE로 나타내었다. 패널 C: YD-8 세포를 지시된 농도의 GS-HCl과 함께 또는 GS-HCl 없이 48 시간 동안 배양하였다. 조건화된 세포로부터 핵 DNA를 추출하고, 1.7% 아가로스겔상에서 분석하였다. 사진은 3회 독립실험의 대표사진이다. SM, DNA 사이즈 마커이다. 패널 D: YD-8 세포를 GS-HCl (10 mM)과 함께 또는 GS-HCl 없이 48 시간 동안 배양하고, sub G1기 DNA 함량을 유세포분석기를 사용하여 평가하였다. 각각의 세포주기의 단계는 백분율(%)으로 표시하였다.

도 2는 YD-8 세포내에서 카스파제-3의 활성화에 대한 GS-HCl이 미치는 영향에 관한 것이다. 패널 A: YD-8 세포를 24 시간 동안 GS-HCl과 함께 또는 GS-HCl 없이 배양하였다. 전세포(whole cell) 용해물을 제조하고, 각각의 항체를 사용한 웨스턴 블로팅을 이용하여 프로카스파제-3(procaspase-3) 또는 PARP (카스파제의 다운스트림 인자)의 발현 수준을 분석하였다. 사진은 3회의 독립적인 실험의 대표 사진이다. 패널 B: YD-8 세포를 GS-HCl (10 mM)과 함께 또는 GS-HCl 없이 지시된 시간 동안 배양하였다. 각각의 배양시간에서, 전세포(whole cell) 용해물을 제조하고, 웨스턴 블로팅에 의해 프로카스파제-3 또는 PARP의 발현 수준을 분석하였다. 사진은 3회 독립적 실험의 대표사진이다.

도 3은 YD-8 세포에 장기간의 GS-HCl 처리가 Mcl-1, Bcl-2 및 HIF-1 α 의 발현 및/또는 활성화에 미치는 영향에 관한 것이다. 패널 A, B: YD-8 세포를 24 시간 동안 지시된 농도로 GS-HCl과 함께 또는 GS-HCl 없이 배양하였다. 전세포 용해물 및 총 RNA를 제조하고, 웨스턴 블로팅(패널 A) 및 RT-PCR(패널 B)을 행하여 Mcl-1, Bcl-2, XIAP, HIF-1 α 또는 액틴의 단백질 및 mRNA 수준을 측정하였다. 패널 A 및 B의 각각의 사진은 3회의 독립적인 실험의 대표 사진이다. 패널 C: YD-8 세포들을 1 μ g의 인간 HRE 프로모터-함유 루시퍼라제 DNA와 20 ng의 대조군 pRL-TK DNA로 24 시간 동안 공동-트랜스펙션하였다. 트랜스펙션된 세포들을 지시된 농도의 GS-HCl과 함께 또는 GS-HCl 없이 추가 4시간 동안 배양하였다. 전세포 용해물을 제조하고, 리포터 유전자의 활성 측정에 사용하였다. 데이터는 3회 독립 실험의 평균 $\pm$ SE로 표현하였다.

도 4는 YD-8 세포내에서 단기간의 GS-HCl 처리가 Mcl-1, HIF-1 α , I κ B- α , p53, eIF-2 α , p70S6K, 및 S6의 발현 및/또는 활성화에 미치는 영향을 측정한 결과이다. 패널 A-C: YD-8 세포를 GS-HCl (10 mM)과 함께 또는 GS-HCl 없이 2, 4, 또는 12 시간 동안 배양하였다. 각각의 시간에서, 전세포 용해물 및 총 RNA를 제조하고, 웨스턴 블로팅(패널 A) 및 RT-PCR(패널 B)로 분석하여, Mcl-1, HIF-1 α , I κ B- α , p53, 또는 액틴의 단백질 발현을 측정하고, Mcl-1, HIF-1 α , 또는 액틴의 mRNA 발현을 각각 측정하였다. 패널 A 또는 패널 B의 각각의 그림은 3회 독립실험의 대표사진이다. 패널 C: 패널 A에서와 동일한 전세포 용해물을 인산화된 eIF-2 α , p70S6K, 또는 S6의 수준과, 로딩 대조군으로서 사용된 액틴의 발현 수준을 측정하기 위해 웨스턴 블로팅 분석을 수행하였다. p-eIF-2 α , 인산-eIF-2 α ; p-p70S6K, 인산-p70S6K; p-S6, 인산-S6.

도 5는 YD-8 세포내에서 단기간의 GS-HCl에 의해 유도되는 Mcl-1 및 HIF-1 α 의 단백질 발현감소에 대한 프로테오솜(proteasomal), 카스파제(caspase) 또는 라이소솜(lysosomal) 억제자가 미치는 영향을 측정한 결과이다. 패널 A: YD-8 세포를 프로테오솜 억제자 MG132 or ZLLF 존재 또는 부존재하에서 1 시간 동안 전처리하고, 이어서, 각각의 억제자의 존재 또는 부존재하에서 GS-HCl(10 mM)과 함께 또는 GS-HCl 없이 추가 2 시간 동안 처리하였다. 전세포 용해물을 제조하고, 웨스턴 블로팅에 의해 Mcl-1 또는 HIF-1 α 또는 액틴의 발현수준을 분석하였다. 사진은 3회의 독립적인 실험의 대표사진이다. 패널 B: YD-8 세포를 pan-카스파제 억제자 z-VAD-fmk 또는 CQ, 라이소솜 억제자와 함께 또는 이들 없이 1 시간 동안 전처리하고, GS-HCl(10 mM)과 함께 또는 GS-HCl 없이, 각각의 억제자의 존재 또는 부존재하에서 2 시간 또는 4 시간 추가적으로 처리하였다. 전세포 용해물을

제조하고 웨스턴 블로팅에 의해 Mc1-1, 또는 HIF-1 α , 또는 액틴의 발현 수준을 분석하였다. 패널 A 및 B의 각 사진은 3회 독립적인 실험의 대표 사진이다.

도 6은 YD-8 세포내에서 Mc1-1 및 HIF-1 α 의 단백질 안정성에 미치는 GS-HCl의 영향을 측정한 결과이다. 패널 A: YD-8 세포들은 10% FBS를 포함하는 신선한 배지에서 4시간 동안 초기 배양하여 Mc1-1 단백질의 세포수준을 유도하고, 이어서, GS-HCl(10 mM)과 함께(lanes 2-7) 또는 GS-HCl 없이, 트랜스레이션을 차단하는 트랜스레이션을 억제자, 시클로헥사미드(cycloheximide, CHX)의 존재 또는 부존재하에서 지정된 시간(30, 60, 또는 120분)동안 처리하였다. 패널 B: YD-8 세포를 15, 30, 또는 60분의 상이한 노출시간을 제외하고는 동일한 실험 조건하에서 배양하였다. 각 시점에서, 전세포 용해물을 제조하고 조건화된 세포내에 잔존하는 Mc1-1(패널 A) 또는 HIF-1 α (패널 B)의 양을 측정하기 위해 웨스턴 블로팅을 행하여 분석하였다. 패널 A 또는 패널 B의 각 사진은 3회 독립실험의 대표사진이다.

도 7은 YD-8 세포내에서 GRP78, ER 스트레스 마커 단백질의 발현에 미치는 GS-HCl의 영향을 측정한 결과이다. 패널 A-B: YD-8 세포들은 GS-HCl과 함께 또는 GS-HCl 없이 지정된 용량으로 24 시간 동안 처리하였다. 전세포 용해물과 총 RNA를 제조하고, 웨스턴 블로팅(패널 A)과 RT-PCR(패널 B)를 행하여 GRP78 또는 p53의 단백질 및 mRNA의 발현수준을 각각 측정하였다. 패널 B: YD-8 세포들을 GS-HCl(10 mM)과 함께 또는 GS-HCl 없이 지정된 시간 동안 처리하였다. 각각의 시점에서 전세포 용해물과 총 RNA를 제조하고, 웨스턴 블로팅(패널 A)과 RT-PCR(패널 B)를 행하여 GRP78 또는 p53의 단백질 및 mRNA의 발현수준을 각각 측정하였다. 패널 A, B, C 또는 D의 각 사진은 3회 독립 실험의 대표 사진이다.

도 8은 YD-8 세포내에서 GS-HCl이 산화적 스트레스에 미치는 영향을 측정한 결과이다. 60 mm 세포 배양 디쉬내에서 4 mL 부피내에서 0.8×10^6 세포의 농도로 배양한 YD-8 세포들을 DCFH-DA으로 최종 농도가 20 μ M이 되도록 20분간 로딩하고, GS-HCl(10 mM)과 함께 또는 GS-HCl 없이 10, 30, 60 또는 120분간 처리하였다. 각 시점에서 YD-8 세포들을 회수하고 PBS으로 2회 세척한 후 PBS에서 현탁하였다. ROS 생성은 FACS Caliber flow cytometer(Becton Dickinson)을 사용하여 10,000 세포로부터의 DCF fluorescence intensity(FL-1, 530 nm)에 의해 측정하였다. 데이터 분석은 CellQuest program을 사용하여 행하였다. 형광은 히스토그램으로 표현하였다.

도 9는 YD-8 세포내에서 GS-HCl-유도된 DNA 단편화, 카스파제-3 활성화, 및/또는 PARP 절단에 대해 pan-caspase 억제자(z-VAD-fmk) 또는 항산화제(비타민 E, GSH, 알로푸리놀(allopurinol), 또는 DPI)가 미치는 영향을 측정한 결과이다. 패널 A: YD-8 세포들을 pan-카스파제 억제자 z-VAD-fmk (z-VAD, 100 μ M), 항산화제 비타민 E (Vit. E, 100 μ M), 환원제 글루타티온(GSH, 10 mM), NADPH 산화제 억제자 알로푸리놀(Allo, 20 μ M), 또는 크산틴(xanthine) 산화제 억제자 DPI (100 μ M)와 함께 또는 이들 없이 1시간 동안 처리하고, 이어서, 상기 각각의 억제자의 존재 또는 부존재하에서 GS-HCl(10 mM)과 함께 또는 GS-HCl 없이 배양하였다. 조건화된 세포로부터 핵 DNA를 추출하고, 1.7% 아가로스 젤상에서 분석하였다. 사진은 3회 독립실험의 대표 사진이다. SM, DNA 사이즈 마커. 패널 B: YD-8 세포들을 z-VAD-815 fmk (z-VAD, 100 μ M) 또는 Vit. E (100 μ M)의 존재 또는 부존재하에서 1 시간 동안 배양하고, 이어서, 상기 각각의 억제자의 존재 또는 부존재하에서 GS-HCl(10 mM)과 함께 또는 GS-HCl 없이 24 시간 동안 추가 배양하였다. 전세포 용해물을 제조하고, 웨스턴 블로팅에 의해 procaspase-3 또는 PARP의 발현수준을 분석하였다. 각 사진은 3회 독립적인 실험의 대표 사진이다.

도 10은 3가지의 상이한 인간 OSCC 세포주의 생존율에 대한 GS-HCl, GS-설페이트 또는 N-아세틸 GS가 미치는 영향을 측정한 결과이다. YD-8(패널 A), YD-10B(패널 B), YD-38(패널 C)의 3가지의 상이한 인간 OSCC 세포주를 GS-HCl, GS-설페이트(GS의 다른 형태의 염) 또는 N-아세틸 GS(GS 유도체)와 함께 또는 이들 없이 48 시간 동안 처리하였다. 생존한 세포들의 수는 현미경하에서 직접 계수하였다. 데이터는 3회 독립적 실험의 평균 $\pm$ SE 으로 나타내었다.

도 11는 소 치아 색깔에 미치는 GS-HCl의 영향을 측정한 결과이다. 패널 A: 소의 치아를 정제하고 3개의 그룹(n=2)으로 나누었다. 각 그룹은 PBS, 10 mM GS-HCl을 포함하는 PBS, 3 mg/ml 커피를 포함하는 PBS에 0, 12, 24, 30 일간 각각 침지시켰다. 각 시점에서 각 그룹의 소 치아를 10회 세척하고 사진 관찰한 후(패널 A), Color Reader CR-10 (Minolta, Japan)에 의해 색깔 변화를 측정하였다(패널 B). 소 치아 사이에서의 색깔 차이는 Δ e로 표시하고, 색깔 차이상의 유의성은 SPSS에 의해 결정하였다. 색깔 차이는 p 값이 0.05 미만인 경우에 유의성을 갖는 것으로 간주하였다. AU, 임의 유닛.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0030] 실시예

[0031] 실험방법

[0032] 1. 실험 재료

[0033] RPMI, 페니실린 및 스트렙토마이신은 GIBCO-BRL (Grand Island, New York)으로부터 구입하였다. FBS는 Hyclone (Logan, Utah)으로부터 구입하였다. 항-래빗 또는 마우스 2차 호오스래디쉬 퍼옥시다아제에 대한 항체, 및 ECL 웨스턴 검출 시약은 Amersham Biosciences (Little Chalfont, Buckinghamshire)으로부터 구입하였다. Bradford 시약은 Biorad (Hercules, California)으로부터 구입하였다. Procaspase-3, Mcl-1, 및 XIAP에 대한 항체들은 PharMingen (San Jose, California)으로부터 구입하였다. PARP에 대한 항체는 Roche Diagnostics (Mannheim, Germany)으로부터 구입하였다. [3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-5-(3-카르복시메톡시페닐)-2-(4-술포페닐)-2H-테트라졸리움] (MTS) 시약은 Promega (Madison, Wisconsin)로부터 구입하였다. N-벤질옥시카르보닐-Val-Ala-Asp-플루오로메틸케톤(z-VAD-fmk) 및 프로테이나아제(proteinase) 억제자 콕테일(100x)는 Calbiochem (Madison, Wisconsin)으로부터 구입하였다. Bcl-2, p-p70S6K, GRP-78, 및 IκB-α에 대한 항체들은 Santa Cruz Biotechnology (Delaware, California)으로부터 구입하였다. HIF-1α에 대한 항체는 BD Bioscience (San Jose, California)으로부터 구입하였다. p-S6 및 p53에 대한 항체들은 Cell signaling technology (Beverly, Massachusetts)으로부터 구입하였다. p-eIF-2α의 항체는 Epitomics (Burlingame, California)으로부터 구입하였다. 글루코사민-HCl (GS-HCl), 액틴(actin) 항체 및 다른 시약들은 Sigma (St. Louis, Missouri)으로부터 구입하였다.

[0034] 2. 세포배양

[0035] 3종의 인간 구강편평세포암 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 세포주 YD-8, YD-10B, 및 YD-38 (KCLB, 서울, 대한민국)은 10% 열-불활성화 FBS(fetal bovine serum), 100 units/ml 페니실린, 및 100 μg/ml 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI 배지를 사용하여 95% 습도조건 및 5% CO₂ 조건하에서 37℃에서 유지하였다.

[0036] 3. 세포증식 분석

[0037] YD-8 세포들을 GS-HCl로 처리하기 하루 전에 100 μL 부피내 1 X 10⁴ 세포의 농도로 96웰 플레이트에서 배양하였다. YD-8 세포들을 상이한 농도의 GS-HCl로 24, 48, 또는 72 시간 동안 배양하고, 각각 시점의 배양 후에 YD-8 세포들을 MTS (20 μL/웰)와 함께 37℃에서 1.5 시간 동안 인큐베이션하였다. 마이크로플레이트 리더를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. MTS-기초 세포증식 분석은 3회 반복하여 행하였다. 데이터는 3회의 독립적 실험의 평균 ± SE으로서 나타내었다.

[0038] 4. 세포계수 분석

[0039] YD-8, YD-10B, 또는 YD-38 세포들을 GS-HCl 처리 하루 전에 500 μL 부피내에서 1 X 10⁵ 세포의 농도로 24-웰 플레이트내에서 배양하였다. 세포들을 24, 48, 또는 72 시간 동안 상이한 농도의 GS-HCl로 각각 처리하였다. 각각의 시점에서, 트립판 블루(trypan blue) 염색으로 염색되는 생존 세포의 수를 현미경하에서 직접 계수하였다. 세포계수 분석은 3회 반복하여 행하였다. 데이터는 3회의 독립적 실험의 평균 ± SE로서 나타내었다.

[0040] 5. DNA 단편화 측정

[0041] 1 X 10⁶ 세포의 농도로 6-웰 플레이트에서 배양한 YD-8 세포들을 상이한 농도의 GS-HCl를 첨가하여 48 시간 동안

안 인큐베이션하였다. 이어서, YD-8 세포들을 회수하여, 세척하고, 완충액 [50 mM Tris (pH 8.0), 0.5% sarkosyl, 0.5 105 mg/mL proteinase K, 및 1 mM EDTA] 내에서 55℃에서 3 시간 동안 용해시키고, RNase A (0.5 µg/mL)을 첨가한 후, 55℃에서 18 시간 동안 추가 인큐베이션하였다. 용해물들을 10,000 X g 에서 20 분 간 원심분리하였다. 상등액내의 지놈 DNA는 중성 페놀-클로로포름-이소아밀알코올 혼합물의 동일한 부피로 추출하고(25:24:1), 1.7% 아가로스겔상에서 전기영동하여 분석하였다. DNA는 에티디움브로마이드(ethidium bromide)(0.1 µg/mL)으로 염색한 후 UV 조사하에서 시각화한 후 사진을 촬영하였다.

6. 전 세포(whole cell) 용해물의 제조

YD-8 세포를 GS-HC1 처리 하루 전에 2 mL 부피내에서 0.5×10^6 세포의 농도로 6-웰 플레이트내에서 배양하였다. YD-8 세포들을 GS-HC1의 상이한 농도로 48 시간 동안 처리하였다. 이어서, YD-8 세포들은 1 mM Na_3VO_4 및 1 mM NaF이 보충된 PBS으로 2회 세척하고, 세포용해 완충액 [50 mM Tris-Cl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 0.25% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, proteinase inhibitor cocktail (1x)]에 노출시켰다. 세포 용해물은 1.5 mL 튜브에 수집하고, 12,000 rpm, 4℃에서 20분간 원심분리하였다. 상등액을 회수하여 단백질 농도를 Bradford 시약으로 결정하였다.

7. 웨스턴 블로팅 분석 (Western blot analysis)

단백질(50 µg)은 SDS-PAGE(10%)에 의해 분리하고, 니트로셀룰로오스 멤브레인(Millipore)상으로 이전시켰다. 멤브레인은 0.05% (vol/vol) Tween 20이 보충된 TBS (10 mM Tris, 150 mM NaCl) [TBST]으로 세척하고, 5% (wt/vol)의 비-지방 건조우유를 포함하는 TBST으로 블로킹하였다. 멤브레인들은 Procaspase-3 (1:2,000), PARP 127 (1:2,000), XIAP (1:1,000), Mc1-1 (1:1,000), Bcl-2 (1:1,000), HIF-1α (1:1,000), GRP78 128 (1:1,000), IκB-α (1:2,000), p53 (1:2,000), p-eIF-2α (1:2,000), p-p70S6K (1:2,000), p-S6 129 (1:2,000) 또는 액틴 (1:5,000)에 특이적인 항체들로 4℃에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 멤브레인은 호오스래디쉬 퍼옥시 다아제에 결합된 2차 항체들에 상온에서 2 시간 동안 노출시켰다. 멤브레인들은 상온에서 TBST으로 세척하였다. 면역반응성은 ECL 시약으로 검출하였다. 액틴 단백질의 발현 수준에 의해 동등한 단백질 로딩을 평가하였다.

8. 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

처리 후에, YD-8 세포로부터의 총 세포 RNA를 RNazol-B(Tel-Test)을 사용하여 분리하였다. 총 RNA의 3 µg은 랜덤 헥사데옥시뉴클레오타이드 프라이머 및 역전사효소를 사용하여 역전사하였다. 단일쇄 cDNA는 다음의 프라이머를 사용한 PCR에 의해 증폭하였다:

Mc1-1 센스, 5'-ATCTCTCGGTACCTTCGGGAG -3';

Mc1-1 안티-센스, 5'-ACCAGCTCCTACTCCAGCAAC -3';

Bcl-2 센스, 5'-AGATGTCCAGCCAGCTGCAC -3';

Bcl-2 안티-센스, 5'-TGTGACTTCACTTGTGGCC-3';

XIAP 센스, 5'-CGTCGATTTTGTGATGCTCGTCA G-3';

XIAP 안티-센스, 5'-GAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATG-3';

HIF-1α 센스, 5'-CTCAAAGTCGGACAGCCTCA-3';

HIF-1α 안티-센스, 5'- CCCTGCAGTAGGTTTCTGCT-3';

GRP78 센스, 5'-GATCTGTTCCGGTCTACTATGAA -3';

GRP78 안티-센스, 5'-CTACAATCATCTTTTCTGCTG -3';

[0058] 액틴 센스, 5'-GGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3';

[0059] 액틴 안티-센스, 5'-GGTAGGAACACGGAAGGCCA-3'.

[0060] PCR 반응 조건은 다음과 같았다: 즉, Mcl-1의 경우, 95℃에서 45초간 변성, 56℃에서 45초간 어닐링, 및 72℃에서 45초간 연장의 25 사이클; Bcl-2의 경우, 94℃에서 30초간 변성, 52℃에서 60초간 어닐링, 및 72℃에서 2분간 연장의 30 사이클; XIAP의 경우, 94℃에서 35초간 변성, 54℃에서 40초간 어닐링, 및 72℃에서 30초간 연장의 30 사이클; HIF-1 α 의 경우, 95℃에서 30초간 변성, 59℃에서 30초간 어닐링, 및 72℃에서 30초간 연장의 25 사이클; 액틴(actin)의 경우, 95℃에서 30초간 변성, 56℃에서 30초간 어닐링, 및 72℃에서 30초간 연장의 25사이클. 액틴 mRNA의 발현 수준은 Mcl-1, Bcl-2, XIAP 및 HIF-1 α 의 상대 mRNA 발현의 평가를 위한 내부대조군으로 사용하였다.

[0061] 9. HIF-1 활성의 측정

[0062] HIF-1 활성의 측정을 위해, 루시페라아제 (luciferase) DNA 포함 human hypoxia responsive element (HRE) 프로모터 1 μ g과, 대조군 pRL-TK DNA 20 ng을 함께 LipoFectamine/Plus 시약을 사용하여 제조자에 의해 제공되는 지시서에 따라 10% FBS가 없는 배지 1 ml내에서 6-웰 플레이트내 1 X 10⁶ YD-8 세포/웰에 대해 4시간 동안 트랜스펙션하였다. 이어서, 10% FBS를 포함하는 배지 1 ml을 추가 20 시간 동안 조건화된 세포에 더 첨가하였다. 조건화된 세포는 지시된 농도에서 4 시간 동안 GS-HCl 존재하에서 또는 부존재하에서 처리하였다. 이어서, 조건화된 세포는 세척하고, 용해시킨 후, 루시페라아제 분석 키트를 사용하여 루시페라아제 활성을 측정하였다. 루시페라아제 활성은 대조군 pRL-TK의 발현으로 정상화시켰다.

[0063] 10. 세포내 ROS의 측정

[0064] ROS의 생성은 DCFH-DA를 기질로서 사용하여 유세포분석에 의해 측정하였다. 간략하게 설명하면, YD-8 세포를 60 mm 세포 배양 디쉬내에서 4 mL 부피내에서 0.8 x 10⁶ 세포의 농도로 하룻밤 배양하였다. YD-8 세포는 최종 농도가 20 μ M이 되도록 20 분간 DCFH-DA으로 로딩하고, GS-HCl(10 mM)의 존재 또는 부존재하에서 10분 내지 24 시간 동안 처리하였다. YD-8 세포를 회수하고 PBS로 2회 세정한 후, PBS에 현탁하였다. ROS의 생성은 FACS Caliber flow cytometer (Becton 172 Dickinson)을 사용하여 10,000 세포로부터 DCF 형광 강도(FL-1, 530 nm)에 의해 측정하였다.

[0065] 11. 단백질의 안정성 측정

[0066] Mcl-1 및 HIF-1 α 는 단기-존재성 단백질로 간주되고, 이들의 반감기는 세포내에서 상이하다. 따라서, Mcl-1 또는 HIF-1 α 의 단백질 안정성은 트랜스레이션 억제자인 시클로헥사미드(cycloheximide, CHX)를 사용한 상이한 농도 역학내에서 측정하였다. 간략하게 설명하면, Mcl-1의 경우, 2 mL 부피내의 0.5 X 10⁶ 세포의 밀도로 6-웰 플레이트내에 플레이팅된 YD-8 세포들을 CHX의 존재 또는 부존재하에서 GS-HCl(10 mM)으로 0, 30, 60 또는 120 분간 처리 또는 비-처리하였다. 각 시점에서, 전세포(whole cell) 용해물을 제조하고, 조건화된 세포내에 남아있는 각 단백질들의 양을 측정하기 위해 Mcl-1 또는 액틴에 대해 면역블로팅 분석을 수행하였다. HIF-1 α 단백질 안정성을 측정하기 위해, YD-8 세포들을 0, 15, 30 또는 60분의 처리시간을 제외하고는 Mcl-1의 경우와 동일한 실험조건에 노출시켰다. 각 시점에서, 전세포 용해물을 제조하고, 조건화된 세포내에서 남아 있는 각 단백질의 양을 결정하기 위해 HIF-1 α 또는 액틴에 대한 면역블로팅 분석을 행하였다.

[0067] 12. 서브 G1 단계 측정을 위한 유세포 분석

[0068] YD-8 세포들을 회수하고, PBS로 1회 세척하고, 얼음-냉각된 70% 에탄올내에서 고정시키고 4℃에서 저장하였다. 분석전에, YD-8 세포들을 PBS로 재세척하고, 100 μ g/mL RNase A, 50 μ g/mL 요오드화 프로피디움, 0.1%(w/v) 소듐 시트레이트(sodium citrate), 및 0.1%(v/v) NP-40을 포함하는 냉각시킨 요오드화 프로피디움 용액 1 mL에 현탁시키고, 암조건 얼음상에서 30 분간 추가 인큐베이션하였다. 유세포 분석기(FACS Caliber, 215 Becton Dickinson) 및 CellQuest 소프트웨어으로 유세포 분석을 실시하였다. 분석을 위해 대략, 15,000 세포들을 카운

팅하였다.

13. 치아 색 변화의 측정

치아색에 대한 GS-HCl의 영향을 확인하기 위해, 잘 정제된 소치아(cow tooth)를 3개의 그룹으로 나누었다(n=2). 각 그룹을 12, 24, 및 30일 간 PBS, 10 mM GS-HCl을 포함하는 PBS, 또는 30 mg/ml 커피를 포함하는 PBS에 각각 침지시켰다. 각 시점에서, 각 그룹의 소 치아를 10회 세척한 후 Color Reader CR-10 (Minolta, Japan)에 의해 색깔 변화를 측정하였다. 소 치아에서의 색깔 변화는 $\Delta e = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$ 으로 표시하였다. 차이의 유의성은 SPSS에 의해 결정하였고, 차이는 p 값이 0.05 보다 작은 값인 경우 유의한 것으로 간주하였다.

실험결과

1. GS-HCl은 YD-8 세포내에서 세포증식을 억제하고 세포사(apoptosis)를 유도한다

YD-8 세포의 증식 및 생존에 대한 상이한 농도의 GS-HCl의 영향은 각각 MTS 분석 및 세포 계수 분석에 의해 측정하였다. 도 1의 패널 A 및 패널 B에서 보여지는 바와 같이, GS-HCl 처리한 경우 농도 및 시간 의존적 방식으로 YD-8 세포의 증식이 억제되고 생존율이 감소하였다. 특히, 10 mM의 농도의 GS-HCl으로 48 시간 동안 YD-8 세포를 처리한 결과 증식과 생존을 각각 60% 및 88% 감소시켰다. 이어서, GS-HCl이 YD-8 세포의 세포사(apoptosis)에 미치는 영향을 세포사(apoptosis) 마커로 잘 알려진 핵 DNA 단편화 및 sub G1 세포군(population) 축적을 측정하여 결정하였다. 도 1의 패널 C에 나타나는 바와 같이, GS-HCl을 처리한 경우 농도 의존적 방식으로 지놈 DNA 단편화가 증가하였다. 10 mM 농도의 GS-HCl으로 48시간 처리한 경우 DNA 단편화가 강력하게 나타났다. 또한, FACS 분석 데이터에 의하면 10 mM 농도의 GS-HCl으로 48시간 처리한 경우 YD-8 세포의 sub G1 세포군의 축적이 높은 정도로 나타남을 확인할 수 있었다(도 1의 패널 D 참조). 이러한 결과는 GS-HCl이 YD-8 세포내에서 세포사(apoptosis)를 유도한다는 것을 명확히 보여주는 결과이다.

2. GS-HCl은 YD-8 세포내에서 카스파제(caspase)-3의 활성을 촉진한다

카스파제의 활성화는 세포사(apoptosis) 유도를 촉진하는 중요한 세포 이벤트이다. 따라서, 본 발명자들은 YD-8 세포내에서 GS-HCl 처리가 카스파제, 특히 카스파제-3의 활성화를 촉진하는 지를 측정하였다. GS-HCl에 의한 카스파제-3의 활성화는 GS-HCl 처리된 YD-8 세포내에서 카스파제-3의 비활성의 프로-형태 및 활성 형태(절단된 산물)의 양을 측정하여 진행하였다. 도 2의 패널 A에서 보여지는 바와 같이, 24시간 동안 GS-HCl을 처리하면 농도 의존적 방식으로 프로카스파제-3의 세포내 수준이 감소하였으나, 활성형(절단된) 카스파제-3의 수준은 증가하였다. 카스파제-3의 최대 활성화는 10 mM GS-HCl에 의해 유도되는 것으로 보였다. PARP는 카스파제의 다운-스트림 기질로 알려진 물질이다. 24시간 동안 GS-HCl로 처리된 YD-8 세포내에서 절단된 PARP의 세포주변이 용량-의존적 방식으로 증가하였다. GS-HCl(10 mM) 노출에 반응하는 카스파제-3 활성화 시간을 알아보기 위해 경시적 변화 시험을 수행하였다. 동역학 실험결과 YD-8 세포내에서 절단된 카스파제-3가 시간 의존적 방식으로 생성된다는 것을 알 수 있었다(도 2의 패널 B). 이러한 결과들은 GS-HCl이 YD-8 세포내에서 카스파제-3을 활성화시킨다는 것을 암시한다.

3. YD-8 세포내에서 GS-HCl으로 장기간 처리한 경우 Mcl-1 및 HIF-1a이 전사 수준에서 하향조절된다.

Bcl-2 및 IAP 패밀리의 일원은 항-세포사(anti-apoptotic) 단백질들이다. 특히, HIF-1a는 인간 구강상피세포암(OSCC) 세포내에서 생존 인자라는 것이 최근 규명되었다. 본 발명자들은 YD-8 세포내에서 GS-HCl이 Bcl-2 및 IAP의 패밀리와 HIF-1a의 발현을 조절할 수 있는 지를 조사하였다. 도 3의 패널 A 및 B (lane 1)에서 보여지는 바와 같이, 웨스턴 블로팅 및 RT-PCR 분석결과, YD-8 세포는 Mcl-1, Bcl-2, XIAP, 및 HIF-1a를 단백질 및 mRNA 수준에서 내재적으로 상당한 수준으로 발현하고 있었다. 그런데, YD-8세포에 대해 GS-HCl을 24시간 동안 노출시킨 경우 Mcl-1 및 HIF-1a의 발현이 단백질 및 mRNA 수준에서 농도 의존적 방식으로 하향-조절되었다(lane 2-4). 그러나, YD-8 세포내에서 Bcl-2 및 XIAP의 단백질 및 mRNA 발현은 GS-HCl으로 24시간 처리한 경우 적용된 농도 수준에서 변화가 없었다. HRE 프로모터에 의한 루시페라제(luciferase) 실험 분석의 경우, YD-8 세포내에서 GS-HCl에 의해 HIF-1a 전사 활성이 농도 의존적 방식으로 억제됨을 확인할 수 있었다(도 3의 패널 C 참

조). 상기 결과들은 GS-HC1으로 장기간(24 시간) 처리하면 YD-8 세포내에서 전사(transcription)의 하향조절에 의해 Mcl-1 및 HIF-1a의 발현이 특이적으로 억제된다는 것을 입증하고 있다.

4. YD-8 세포내에서 GS-HC1을 단기간 처리하면 Mcl-1 및 HIF-1a가 단백질 수준에서 하향조절되고, eIF-2a, p70S6K, 및 S6의 활성이 변경된다.

YD-8 세포내에서 단백질 및 mRNA 수준에서의 Mcl-1 및 HIF-1a의 발현 조절에 대한 GS-HC1의 경시적 영향을 알아보기 위해 시간대별 실험을 행하였다. 도 4의 패널 A에서 보여지는 바와 같이, 웨스턴 블로팅 결과, YD-8 세포에 GS-HC1 (10 mM)을 2시간의 단기간 노출시킨 경우 Mcl-1 및 HIF-1a 단백질의 발현이 감소되었고, 이러한 발현의 감소는 12시간 까지 유지되었다. Mcl-1 및 HIF-1a는 단수형 단백질로 간주된다. 또 다른 특이성을 검사하기 위해, YD-8 세포내에서 단기간 GS-HC1을 처리한 경우 또 다른 단수형 단백질인 Ikb-a 및 p53의 발현이 변경되는 지를 측정하였다. 그러나, YD-8 세포를 GS-HC1으로 각 시간별로 처리한 경우 Ikb-a 및 p53의 단백질 발현에는 영향이 없었다. 놀랍게도, RT-PCR 실험결과 각 시간에서 GS-HC1으로 처리한 경우 YD-8 세포내에서 Mcl-1 및 HIF-1a의 mRNA 발현에는 아무런 영향이 없었다. 본 발명자들은 GS-HC1의 단기간 처리에 반응하여 Mcl-1 및 HIF-1a 단백질의 세포내 수준이 감소한 것은 트랜스레이션(translation)의 차단에 기인한 것으로 추정하였다. 이를 확인하기 위해, YD-8 세포내에서 eIF-2a, p70S6K, 및 S6와 같은 트랜스레이션-관련된 단백질의 활성화에 대해 GS-HC1의 단기간 처리 효과를 조사하였다. YD-8 세포내에서 eIF-2a, p70S6K, 및 S6의 활성을 조절하는 GS-HC1의 능력은 eIF-2a의 증가된 인산화 수준(eIF-2a의 비활성 형태)와, p70S6K 및 S6의 감소된 인산화 수준(p70S6K 및 S6의 비활성 형태)에 의해 평가하였다. 도 4의 패널 C에서 나타난 바와 같이, GS-HC1으로 단기간 처리한 YD-8 세포내에서 eIF-2a의 인산화가 시간 의존적 방식으로 증가하였다. 반면에, GS-HC1을 단기간 노출시킨 경우 YD-8 세포내에서 p70S6K 및 S6의 인산화가 시간 의존적 방식으로 감소되었다.

5. GS-HC1의 단기간 처리에 의한 YD-8 세포에서의 Mcl-1 및 HIF-1a 단백질 발현의 하향-조절에 카스파제- 및 라이소좀-매개 단백질 분해 경로의 부분적 관여

트랜스레이션 조절에 부가하여, GS-HC1 처리에 의한 Mcl-1 및 HIF-1a의 단백질 수준의 하향 조절(down regulation)이 단백질 분해의 증가와 관련되어 있는 지를 조사하였다. 이를 위해 다음과 같은 약리학적 억제 실험을 수행하였다: 즉, YD-8 세포를 프로테오좀 억제자(proteasomal inhibitor) MG132 또는 ZLLF, 라이소좀 억제자(lysosomal inhibitor) CQ(cloroquinone), 또는 pan-caspase 억제자 z-VAD-fmk의 존재 또는 부존재하에 1 시간 동안 전처리하고, 상기 억제자들의 부존재 또는 존재 하에서 2 시간 또는 4 시간 동안 GS-HC1의 존재 또는 부존재로 처리하고, 조절된 세포내에서 Mcl-1 및 HIF-1a 단백질의 세포내 수준을 측정하였다. 도 5의 패널 A에서 보여지는 바와 같이, MG132 또는 ZLLF는 YD-8 세포내에서 2 시간의 GS-HC1의 처리에 의해 유도되는 Mcl-1 및 HIF-1a 단백질의 하향-조절을 막지는 못하였고, 오히려, 각각의 약물들은 YD-8 세포내에서 GS-HC1의 부존재하는 경우에 Mcl-1 및 HIF-1a 단백질의 발현을 강하게 상향 조절하였다. 그러나, 도 5의 패널 B에서 보여지는 바와 같이, CQ 또는 z-VAD로 처리한 경우, YD-8 세포내에서 2시간 및 4시간 GS-HC1 처리에 의해 유도되는 Mcl-1 및 HIF-1a 단백질의 하향 조절을 부분적으로 저해하였다. CQ 또는 z-VAD 단독 처리는, GS-HC1이 존재하지 않는 경우 Mcl-1 및 HIF-1a 단백질의 발현에 아무런 영향을 미치지 않았다. 상기 결과들은 YD-8 세포내에서 GS-HC1으로 단기간 처리한 경우 Mcl-1 및 HIF-1a 단백질의 하향조절은 라이소좀(lysosome)- 및 카스파제-매개된 단백질 분해 경로에 부분적으로 의존하며, 프로테오좀 경로(proteasomal pathway)에는 독립적이라는 것을 암시한다.

6. YD-8 세포에서 GS-HC1의 단기간 처리에 의해 유도되는 Mcl-1 및 HIF-1a 단백질의 하향조절은 단백질 턴오버(turnover)와 관련되어 있지 않다.

본 발명자들은 GS-HC1의 단기간 처리에 의한 Mcl-1 및 HIF-1a의 단백질 수준에서의 하향조절이 단백질 턴오버(protein turnover)의 증가에 의한 것인지를 확인하였다. 이를 위해, YD-8 세포를 트랜스레이션 차단하기 위한 트랜스레이션 억제자 CHX의 부존재(lane 1) 또는 존재(lanes 2-6)에서 GS-HC1과 함께(lanes 5-7) 또는 GS-HC1 없이(lanes 1-4) 처리하고, 조건화된 세포내에서 남아 있는 Mcl-1 및 HIF-1a 단백질의 양을 측정하였다(도 6의 패널 A 및 패널 B 참조). YD-8 세포내에서 트랜스레이션이 차단되었을 때, Mcl-1 및 HIF-1a 단백질이 빠르게 분해되었으나, GS-HC1의 존재하에서 단백질 분해는 가속화되지 않았다.

[0084] 7. GS-HC1은 YD-8 세포내에서 ER 스트레스를 촉발한다.

[0085] GS-HC1은 다양한 형태의 세포에서 ER(endoplasmic reticulum, 소포체) 스트레스를 유도하는 것으로 알려져 있다. GS-HC1이 YD-8 세포내에서 ER 스트레스를 유도하는 지를 확인하였다. YD-8 세포내에서 GS-HC1에 의해 유도되는 ER 스트레스의 정도는 ER 스트레스 조건하에서 세포내에서 발현이 크게 상향 조절되는 ER 샤프론(chaperone) 단백질 GRP78의 양에 의해 평가하였다(Li and Lee, 2006). 도 7의 패널 A 및 B에서 나타나는 바와 같이, GS-HC1으로 24 시간 처리한 경우, GRP78 발현이 단백질 및 mRNA 수준에서 농도 의존적 방식으로 증가하였다. 동역학적 연구 결과, GS-HC1(10 mM) 처리에 의해, GRP78 mRNA 유도는 4 시간에서 발생하였고, 12 시간 및 24 시간에서 GRP 단백질의 강한 상향조절이 관찰됨으로써, YD-8 세포내에서 GRP78 mRNA 및 단백질의 발현이 시간 의존적 방식으로 증가함을 확인하였다(도 7의 패널 C 및 패널 D 참조). 이러한 결과는 GS-HC1 처리에 의해 YD-8 세포내에서 ER 스트레스가 신속하게 유도된다는 것을 암시한다.

[0086] 8. GS-HC1은 YD-8 세포에서 세포내 ROS 수준을 증가시킨다.

[0087] 산화적 스트레스가 세포사(apoptosis)에서 매우 중요한 역할을 한다는 것을 고려하여, GS-HC1이 YD-8 세포내에서 산화적 스트레스를 유발하는지를 DCFH-기반 FACS 분석을 통해 확인하였다. YD-8 세포들을 GS-HC1의 존재 또는 부존재하에서 상이한 시간(10분 내지 24 시간) 동안 처리하여, 조건화된 세포내에서 세포내 ROS의 양을 측정하였다. 도 8에서 보여지는 바와 같이, GS-HC1을 10분간 처리한 경우 YD-8 세포내에서 ROS가 생성되었으나, 30분, 1시간 또는 2시간에서는 더 이상 ROS가 생성되지 않았다. 이러한 결과는 GS-HC1 처리에 의해 YD-8 세포내에서 ROS가 신속하게 생성된다는 것을 암시한다.

[0088] 9. YD-8 세포에서 pan-caspase 억제자인 z-VAD-fmk로 처리한 경우 GS-HC1 유도된 세포사(apoptosis)가 강하게 차단된다.

[0089] YD-8 세포내에서 GS-HC1 유도된 세포사(apoptosis)를 담당하는 세포 단백질 및/또는 인자를 조사하였다. 이를 위해 다음과 같은 약리학적 억제자 실험을 행하였다: 즉, YD-8 세포를 z-VAD-fmk, 비타민 E(Vit. E, 항산화제), 글루타티온(GSH, 환원제), 알로푸리놀(allopurinol, Allo, 크산틴 옥시다제 억제자), 또는 DPI (DPI, NADPH 옥시다제 억제자)를 1시간 동안 전처리하거나 또는 처리하지 않고, 조건화된 세포내에서 핵 DNA 단편화, 카스파제-3 활성화, 및 PARP 단편화를 측정하였다. 도 9의 패널 A에서 보여지는 바와 같이, z-VAD-fmk 처리에 의해 GS-HC1-유도된 세포사(지놈 DNA 단편화)는 나타나지 않았다(lane 3). 다른 저해자 또는 저해제들은 GS-HC1 유도된 세포사를 저해하지 않았다(lanes 4-7). 카스파제 저해자는 GS-HC1 유도된 카스파제-3의 활성화와 PARP 단편화를 차단하였는데, 이는 이들 약물의 효능이 우수함을 보여주는 것이다(도 9의 패널 B 참조). 상기 결과들은 카스파제의 활성화가 YD-8 세포내에서 GS-HC1 유도된 세포사가 중요한 역할을 한다는 것을 증명하는 것이다.

[0090] 10. 다양한 종류의 인간 OSCC 세포의 생존율에 미치는 GS-HC1, GS-설페이트 또는 N-아세틸 GS의 영향

[0091] GS-HC1, GS-설페이트, 또는 GS의 유도체인 N-아세틸 GS가 YD-8 세포와 다른 인간 OSCC 세포주인 YD-10B 및 YD-38의 성장에 대해 미치는 영향을 비교하였다. 도 10의 패널 A 내지 패널 C에 나타나있는 바와 같이(lane 2), GS-HC1(10 mM)이 가장 강하게 YD-8, YD-10B, 및 YD-38 세포의 성장을 각각 91%, 93% 및 83% 감소시켰다. 주목할만하게, GS-설페이트(10 mM)으로 처리한 경우 YD-8 또는 YD-10B 세포의 생존율이 40% 감소하였으나, YD-38 세포의 생존율은 83% 억제하였다. 그러나, N-아세틸 GS (10 mM)는 테스트한 모든 OSCC 세포주의 생존율에 영향을 미치지 않았다.

[0092] 11. GS-HC1은 소 치아의 색 변화에 영향을 미치지 않았다.

[0093] 소 치아의 색깔 변화에 대한 GS-HC1의 영향을 검사하였다. 이를 위해, 소 치아(n=2)를 PBS, 10 mM의 GS-HC1을 포함하는 PBS, 3 mg/ml의 커피(Nescafe Gold Blend)를 포함하는 PBS에 각각 0, 12, 24, 또는 30일간 침지하였다. 각각의 시간에, 조건화시킨 소 치아를 PBS로 세척하고, 각각 사진 및 색차 분석기를 사용하여 색깔의 변화를 분석하였다. 도 11a 및 도 11b에서 나타나는 바와 같이, 사진 관찰 및 색차 분석에 의하면, GS-HC1은 30일

간의 침지에 의해서도 소 치아에 색깔 변화를 일으키지 않았으나, 반면에 커피는 소 치아에 강한 어두운 색깔 변화를 일으켰다.

- [0094] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [0095] **참고문헌**
- [0096] Adams, J.M., Cory, S., 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.
- [0097] Břrdos, J.I., Ashcroft, M., 2005. Negative and positive regulation of HIF-1: a complex 582 network. *Biochimica et biophysica acta* 1755, 107??120.
- [0098] Bekesi, J.G., Bekesi, E., Winzler R.J., 1969. Inhibitory effect of D-glucosamine and other sugars on the biosynthesis of protein, ribonucleic acid, and deoxyribionucleic acid in normal and neoplastic tissues. *The Journal of biological chemistry* 244, 3766-72.
- [0099] Bekesi, J.G., Winzler, R.J., 1970. Inhibitory effectts of D-glucosamine on the growth of Walker 256 carcinosarcoma and on protein, RNA, and DNA synthesis.
- [0100] Cancer research 30, 2905-12. Bosmann, H.B., 1971. Inhibition of protein, glycoprotein, ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid synthesis by D-glucosamine and other sugars in mouse leukemic cells L5178Y and selective inhibition in SV-3T3 compared with 3T3 cells. *Biochimca et biophysica acta* 240, 74-93.
- [0101] Chesnokov, V., Sun, C., Itakura, K., 2009. Glucosamine suppresses proliferation of human prostate carcinoma DU145 cells through inhibition of STAT3 signaling. *Cancer cell international* 10, 9-25.
- [0102] Claus, F., Duthoy, W., Boterberg, T., De Gersem, W., Huys, J., Vermeersch, H., De Neve, 597 W., 2002. Intensity modulated radiation therapy for oropharyngeal and oral cavity tumors: 598 clinical use and experience. *Oral oncology* 38, 597-604.
- [0103] Cockman, M.E., Masson, N., Mole, D.R., Jaakkola, P., Chang, G.W., Clifford, S.C., Maher, E.R., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Maxwell, P.H., 2000. Hypoxia inducible factoralpha 601 binding and ubiquitylation by the von Hippel??Lindau tumor suppressor protein. *The 602 Journal of biological chemistry* 275, 25733??25741.
- [0104] Cohen, G.M., 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical journal* 326, 1-16.
- [0105] Deryugina, E.I., Quigley, J.P., 2006. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer metastasis review* 25, 9-34.
- [0106] Deveraux, Q.L., Reed, J.C., 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes & development* 13, 239-252.
- [0107] Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., Reed, J.C., 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388, 300-304.
- [0108] Emoto, Y., Manome, Y., Meinhardt, G., Kisaki, H., Kharbanda, S., Robertson, M., Ghayur, T., Wong, W.W., Kamen, R., Weichselbaum, R., Kufe, D.W., 1995. Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *The EMBO journal* 14, 6148-6156.
- [0109] Festjens, N., Mvan Gurp, M., van Loo, G., Saelens, X., Vandenabeele, P., 2004. Bcl-2 family members as sentinels of cellular integrity and role of mitochondrial intermembrane space proteins in apoptotic cell death. *Acta haematologica* 111, 7-27.

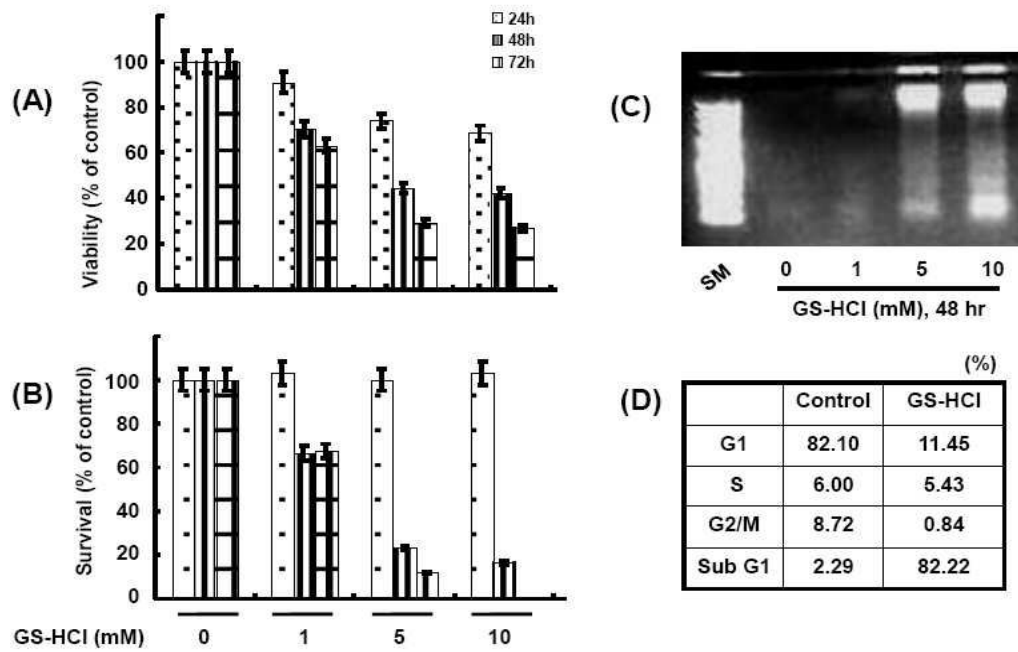
- [0110] Groenendyk, J., Michalak, M., 2005. Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. *Acta biochemica polonica* 52, 381-395.
- [0111] Gruber, M., Simon, M.C., 2006. Hypoxia-inducible factors, hypoxia, and tumor angiogenesis. *Current opinion in hematology* 13, 169-74.
- [0112] Hua, J., Suguro, S., Hirano, S., Sakamoto, K., Nagaoka, I., 2005. Preventive actions of a high dose of glucosamine on adjuvant arthritis in rats. *Inflammation research* 54, 127-32.
- [0113] Huang, L.E., Gu, J., Schau, M., Bunn, H.F., 1998. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7987-7992.
- [0114] Hwang MS, Baek WK., 2010. Glucosamine induces autophagic cell death through the stimulation of ER stress in human glioma cancer cells. *Biochemical Biophysics Research Communication* 399, 111-166.
- [0115] Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., Kaelin Jr., W.G., 2001. HIF alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292, 464-468.
- [0116] Jang, B.C., Paik, J.H., Jeong, H.Y., Oh, H.J., Park, J.W., Kwon, T.K., Song, D.K., Park, J.G., Kim, S.P., Bae, J.H., Mun, K.C., Suh, M.H., Yoshida, M., Suh, S.I., 2004. Leptomycin B-induced apoptosis is mediated through caspase activation and downregulation of Mcl-1 and XIAP expression, but not through the generation of ROS in U937 leukemia cells. *Biochemical pharmacology* 68, 263-274.
- [0117] Kirkland, R.A., Franklin, J.L., 2001. Evidence for redox regulation of cytochrome C release during programmed neuronal death: antioxidant effects of protein synthesis and caspase inhibition. *The Journal of neuroscience* 21, 1949-1963.
- [0118] Largo, R., Alvarez-Soria, M.A., Díez-Ortego, I., Calvo, E., Sánchez-Pernaute, O., Egido, J., Herrero-Beaumont, G., 2003. Glucosamine inhibits IL-1 beta-induced NF kappa B activation in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis and cartilage* 11, 290-8.
- [0119] Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., Earnshaw, W.C., 1994. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346-347.
- [0120] Lee, J.W., Bae, S.H., Jeong, J.W., Kim, S.H., Kim, K.W., 2004. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) alpha: its protein stability and biological functions. *Experinetal & molecular medicine* 36, 1-12.
- [0121] Li, J., Lee, A.S., 2006. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Current molecular medicine* 6, 45-54.
- [0122] Manicone, A.M., McGuire, J.K., 2008. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Seminars in cell & developmental biology* 19, 34-41.
- [0123] Nakamura, H., Shibakawa, A., Tanaka, M., Kato, T., Nishioka, K., 2004. Effects of glucosamine hydrochloride on the production of prostaglandin E₂, nitric oxide and metalloproteinases by chondrocytes and synoviocytes in osteoarthritis. *Clinical and experimental rheumatology* 22, 293-9.
- [0124] Nakazawa, M., Ohnishi, T., Ohmae, M., Chisoku, H., Yui, S., Iwai, S., Sumi, T., Fukuda, Y., Kishino, M., Yura, Y., 2005. Phase II study of a novel oral formation of 5-fluorouracil in combination with low-dose cisplatin as preoperative chemotherapy of oral squamous cell carcinoma. *International journal of clinical pharmacology research* 25, 115-122.
- [0125] Oh, H.J., Lee, J.S., Song, D.K., Shin, D.H., Jang, B.C., Suh, S.I., Park, J.W., Suh, M.H., Baek, W.K., 2007. D-glucosamine inhibits proliferation of human cancer cells through inhibition of p70S6K. *Biochemical and biophysical research communications* 360, 840-5.
- [0126] Oizumi, S., Isobe, H., Ogura, S., Ishida, T., Yamazaki, K., Nishimura, M., Kawakami, Y., Dosaka-Akita, H., 2002. Topoisomerase inhibitor-induced apoptosis accompanied by down-regulation of Bcl-2 in human

lung cancer cells. *Anticancer research* 22, 4029-4037.

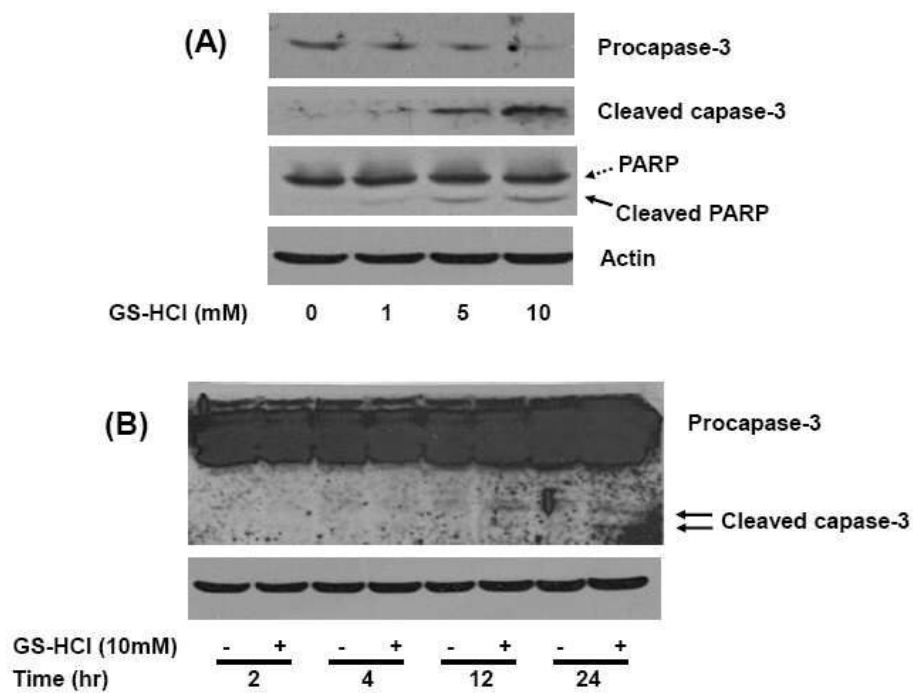
- [0127] Pardhasaradhi, B.V., Ali, A.M., Kumari, A.L., Reddanna, P., Khar, A., 2003. Phycocyanin-mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves down-regulation of Bcl-2 and generation of ROS. *Molecular cancer therapy* 2, 1165-1170.
- [0128] Quastel, J.H., Cantero, A., 1953. Inhibition of tumour growth by D-glucosamine. *Nature* 171, 252-4.
- [0129] Reginster, J.Y., Deroisy, R., Rovati, L.C., Lee, R.L., Lejeune, E., Bruyere, O., Giacovelli, G., 672 Henrotin, Y., Dacre, J.E., Gossett, C., 2001. Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomised, placebo-controlled clinical trial. *Lancet* 357, 251-6.
- [0130] Riedl, S.J., Salvesen, G.S., 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature* 676 reviews. *Molecular cell biology* 8, 405-13.
- [0131] Salceda, S., Caro, J., 1997. Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *The Journal of biological chemistry* 272, 22642-22647.
- [0132] Semenza, G.L., 2002. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends in molecular medicine* 8, 62-67.
- [0133] Shaw, T.J., Lacasse, E.C., Durkin, J.P., Vanderhyden, B.C., 2008. Downregulation of XIAP expression in ovarian cancer cells induces cell death in vitro and in vivo. *International journal of cancer* 122, 1430-1434.
- [0134] Shiozaki, E.N., Chai, J., Rigotti, D.J., Riedl, S.J., Li, P., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Fairman, R., Shi, Y., 2003. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Molecular cell* 11, 519-527.
- [0135] Sternlicht, M.D., Werb, Z., 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual review cell developmental biology* 17, 463-516.
- [0136] Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T., Poellinger, L., 2000. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *The EMBO journal* 19, 4298-4309.
- [0137] Ueda, S., Masutani, H., Nakamura, H., Tanaka, T., Ueno, M., Yodoi, J., 2002. Redox control of cell death. *Antioxidants & redox signaling* 4, 405-414.
- [0138] Vokes, E.E., Weichselbaum, R.R., Lippman, S.M., Hong, W.K., 1993. Head and neck cancer. *New England Journal of medicine* 328, 184-194.
- [0139] Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL., 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 5510-4.
- [0140] Wiener, C.M., Booth, G., Semenza, G.L., 1996. In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical and biophysical research communications* 225, 703 485-488.
- [0141] Wyllie, A.H., Kerr, J.F., Currie, A.R., 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology* 68, 251-306.
- [0142] Zain, R.B., 2001. Cultural and dietary risk factors of oral cancer and precancer-a brief overview. *Oral oncology* 37, 205-210.
- [0143] Zhang, B., Gojo, I., Fenton, R.G., 2002. Myeloid cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma. *Blood* 99, 1885-1893.
- [0144] Zhang, L., Liu, W.S., Han B.Q., Peng, Y.F., Wang, D.F., 2006. Antitumor activities of D-glucosamine and its derivatives. *Journal of Zhejiang University. Science. B* 7, 608-14.

도면

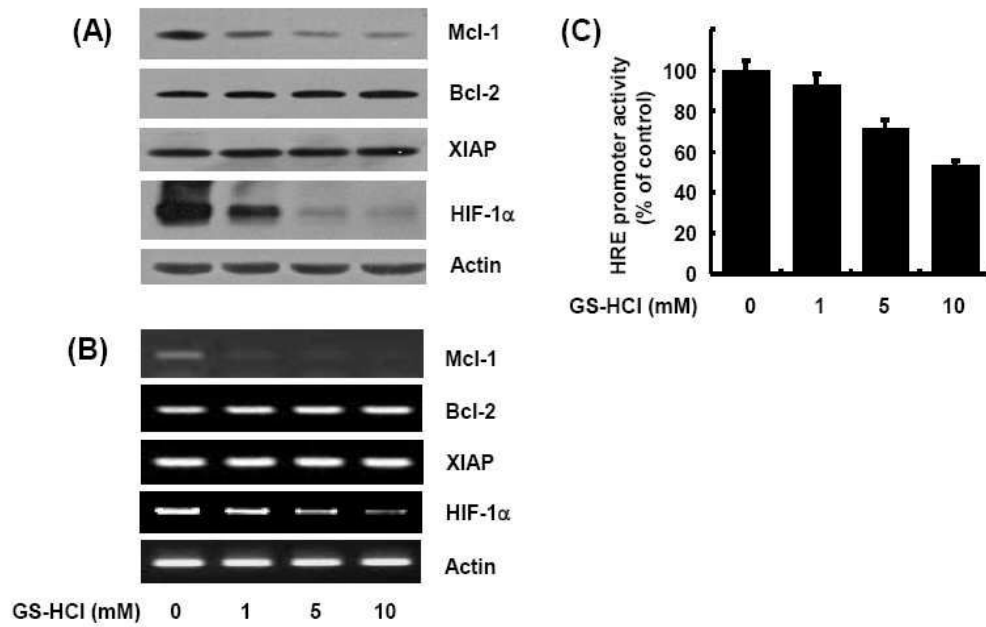
도면1



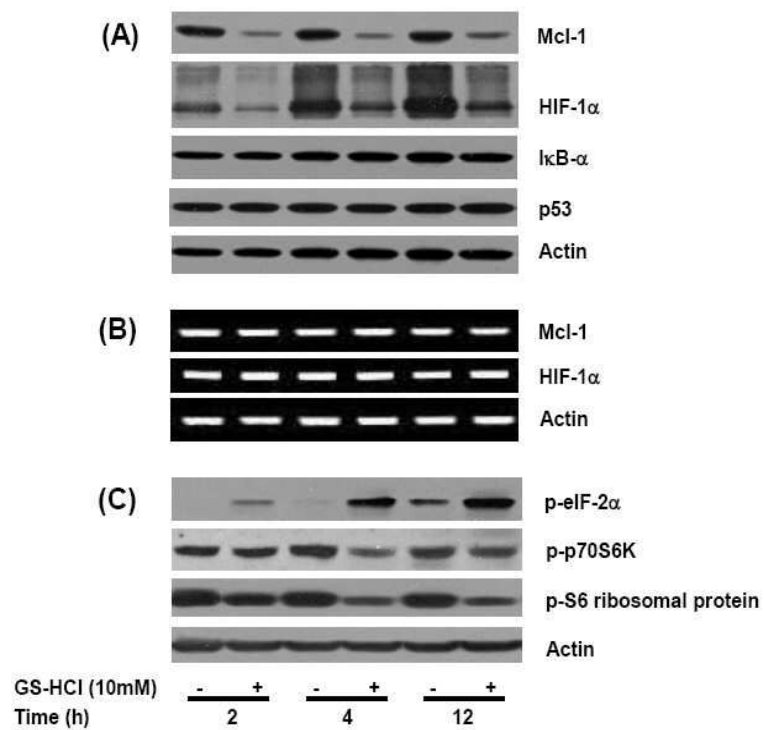
도면2



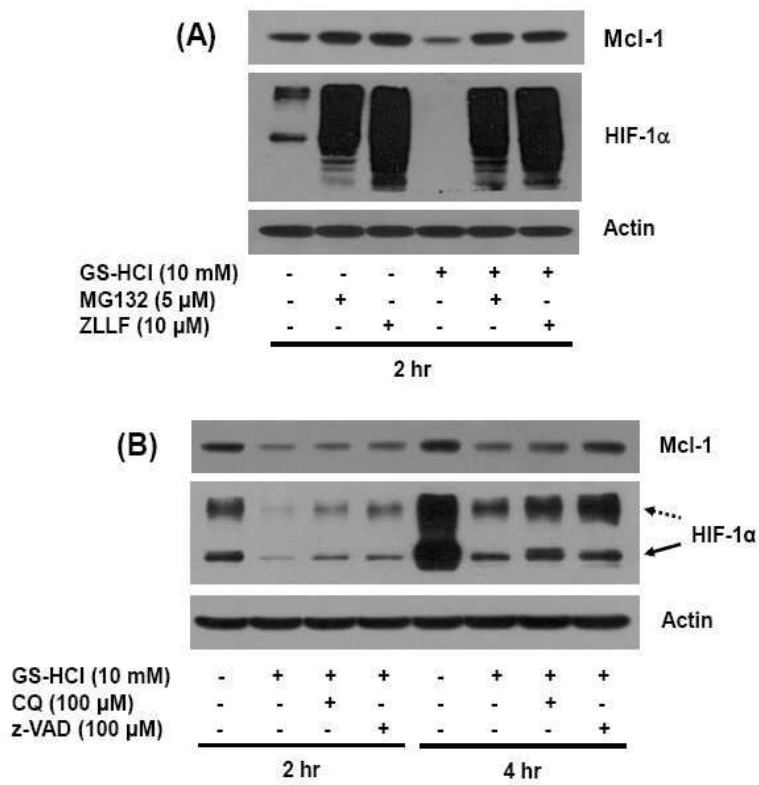
도면3



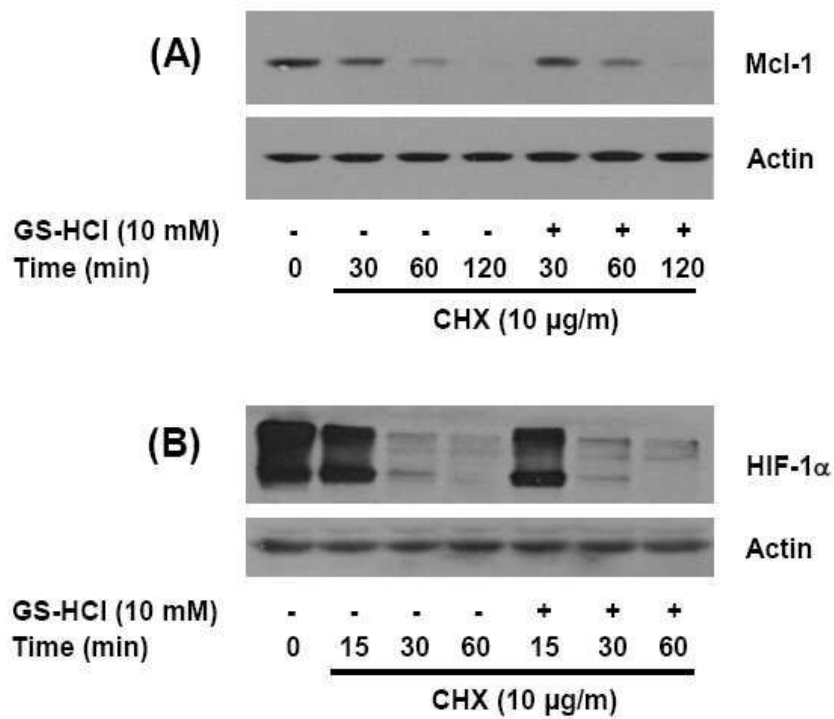
도면4



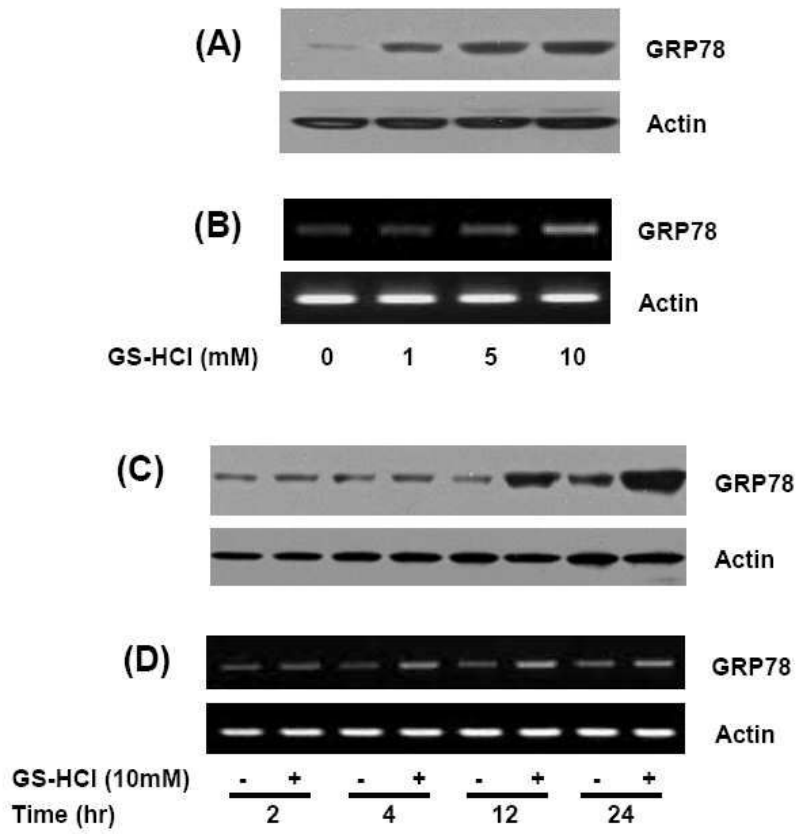
도면5



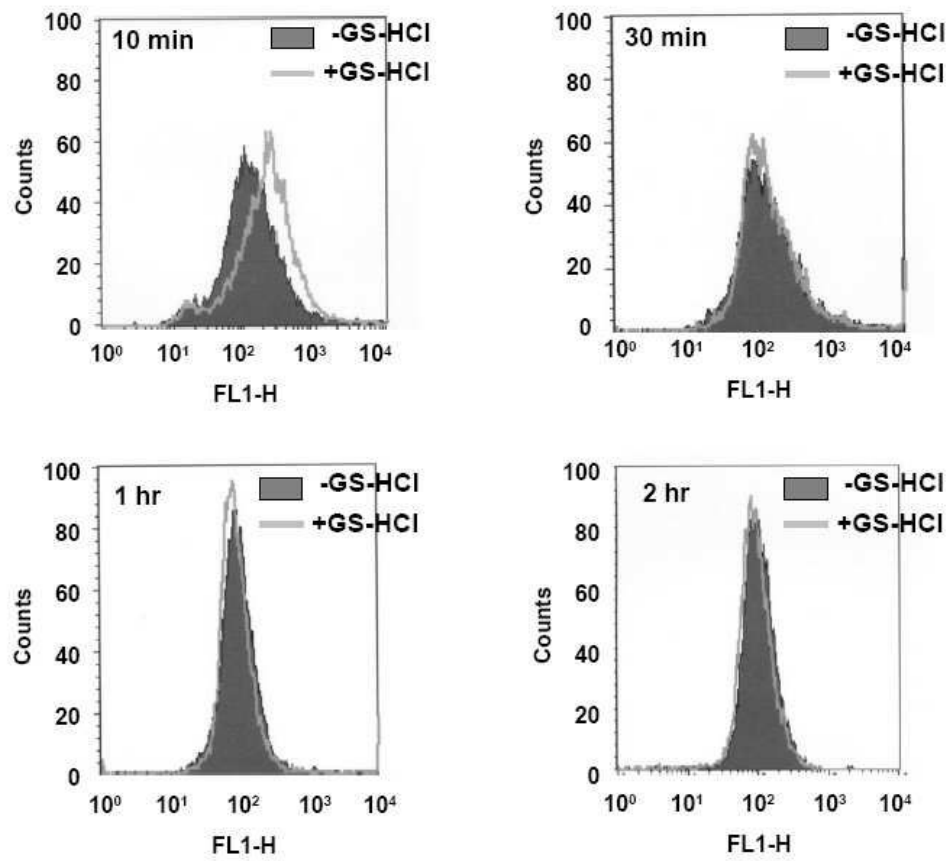
도면6



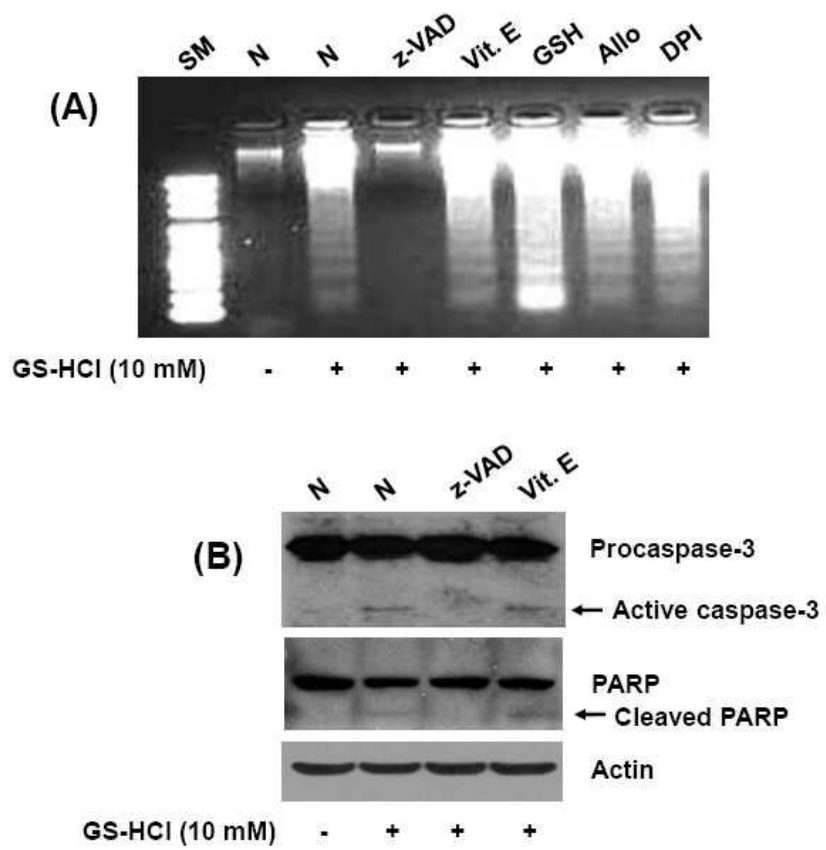
도면7



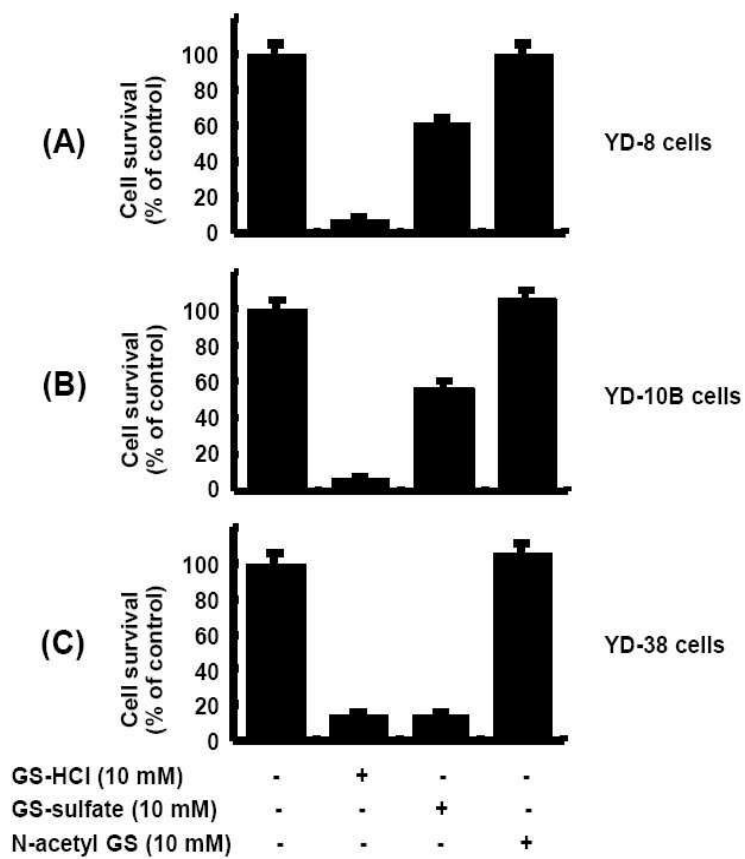
도면8



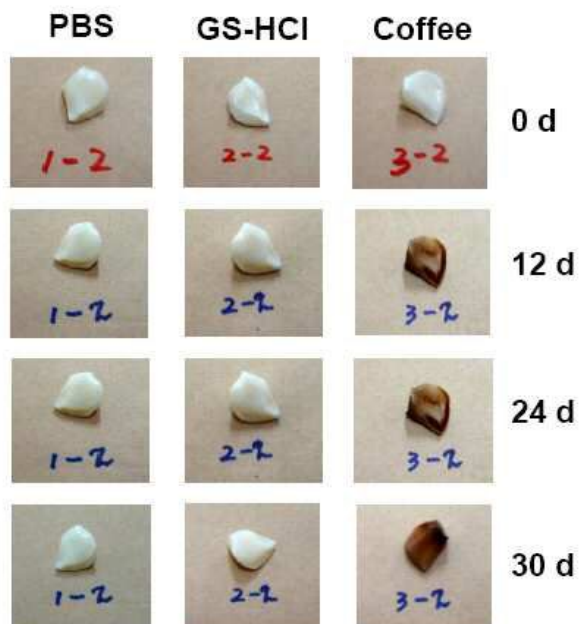
도면9



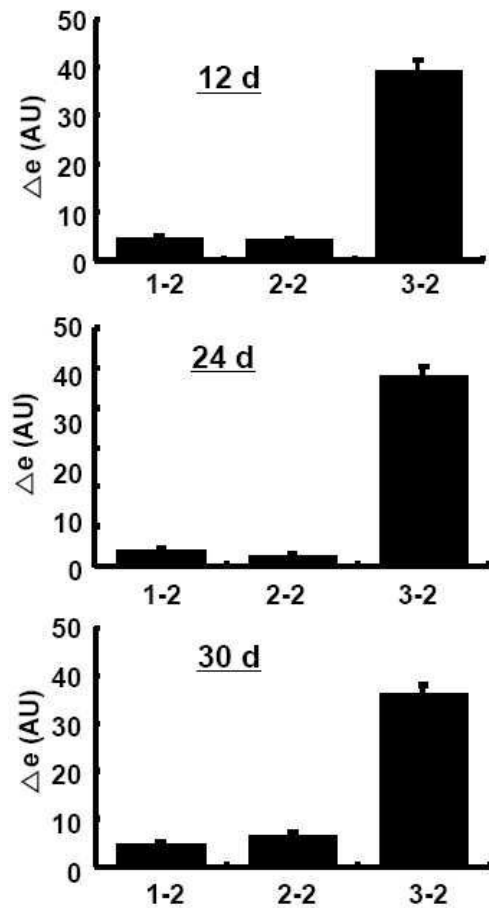
도면10



도면11a



도면11b



서열목록

<110> Keimyung University Industry Academic Cooperation Foundation

<120> Composition for Treating or Preventing Oral Squamous Cell
Carcinoma Comprising Glucosamine

<160> 12

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer for Mcl-1

<400> 1

atctctcggt accttcggga g

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer for Mcl-1

<400> 2

accagtcct actccagcaa c 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer for Bcl-2

<400> 3

agatgtccag ccagctgcac 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer for Bcl-2

<400> 4

tgttgacttc acttgtggcc 20

<210> 5

<211>

> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer for XIAP

<400> 5

cgtcgatttt tgtgatgctc gtcag 25

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer for XIAP

<400> 6

gaagcattta tcagggttat tgtctcatg 29

<210> 7

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer for HIF-1 alpha
 <400> 7

ctcaaagtcg gacagcctca 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer for HIF-1 alpha
 <400> 8

ccctgcagta ggtttctgct 20

<210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer for GRP78
 <400> 9

gatctgttcc ggtctactat gaa 23

<210> 10
 <211> 23

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer for GRP78
 <400> 10

ctacaactca tctttttctg ctg 23

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer for actin
 <400> 11

ggtgaaggtc ggtgtgaacg	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer for actin	
<400> 12	
ggtaggaaca cggaaggcca	20