(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년12월22일
(11) 등록번호 10-1811588
(24) 등록일자 2017년12월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/357 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61K 35/64 (2015.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/357 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0055028
(22) 출원일자 2017년04월28일
심사청구일자 2017년04월28일
(56) 선행기술조사문헌
CN102285958 A*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
대한민국(농촌진흥청장)
전라북도 전주시 완산구 농생명로 300 (중동)
경북대학교 산학협력단
대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김미애
전라북도 전주시 완산구 오공로 70, 우미린APT 104동 404호
황재삼
전라북도 완주군 이서면 출판로 25 에코르1 단지APT 102동 1003호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이성렬, 이한욱, 이성준

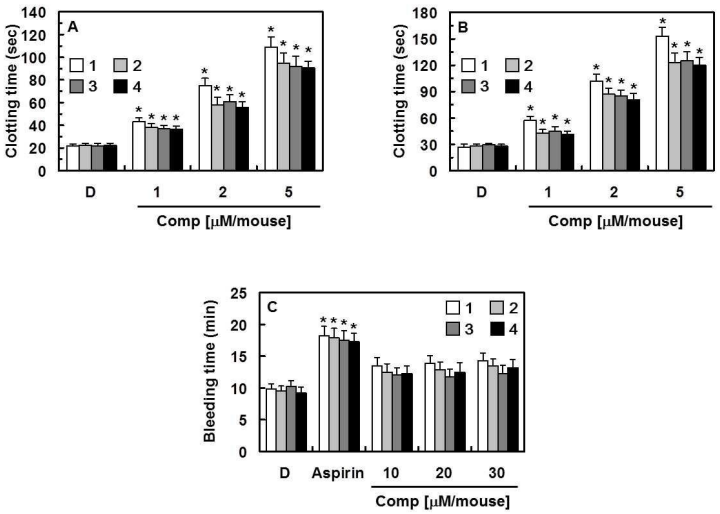
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 박수진

(54) 발명의 명칭 **벼메뚜기로부터 분리된 화합물을 함유하는 항혈전용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 벼메뚜기(*Oxya chinensis sinuosa*)부터 분리된 (2*R*,3*R*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-7-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 1), (2*R*,3*R*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-6-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 2), (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-디히드록이페닐)-3-아세틸아미노-6-(*N*-아세틸-2"아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 3) 및 (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-7-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 4)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 함유하는 항혈전, 항혈소판 또는 항응고용 조성물에 관한 것이다. 상기 화합물은 HUVEC에서 FXa의 억제를 통해 혈액 응고 경로를 억제하고, 생체내외에서 혈소판 응집을 억제하여, 이러한 혈액응고와 관련된 혈관 질환의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물 또는 건강기능식품으로서 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 35/64 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/326 (2013.01)

(72) 발명자
김성현
전라북도 전주시 완산구 오공로 71, 호반베르디움APT 104동 404호
배종섭
대구광역시 수성구 범어로 61, 101동 911호(범어동, 범어풀비체)
정성도
대구광역시 북구 동북로 37길 10
민가희
경상북도 칠곡군 북삼읍 인강 8길 20, 301동 302호(시티타운)
나민균
대전광역시 유성구 엑스포로 448 엑스포APT 208동 602호
이희승
대전광역시 서구 계백로1158번길 113, 203동 308호(가수원동, 은아아파트2단지)

(56) 선행기술조사문헌
JP2003252739 A
KR1020160001880 A
논문(Journal of Oleo Science, Vol. 51 (2002) No. 5 pp. 355-358)
논문(Insect Biochemistry, Volume 11, Issue 1, 1981, Pages 25-31)
논문(Tetrahedron, Volume 36, Issue 22, 1980, Pages 3249-3252)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ01084001
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 농업정책지원기술개발
연구과제명 곤충 유래 항혈전 및 혈행 개선 물질 탐색 및 기작 구명_곤충 유래 항혈전 유망 곤충 탐색 및 대량 추출법 개발
기 여 율 1/1
주관기관 국립농업과학원
연구기간 2015.01.01 ~ 2017.12.31

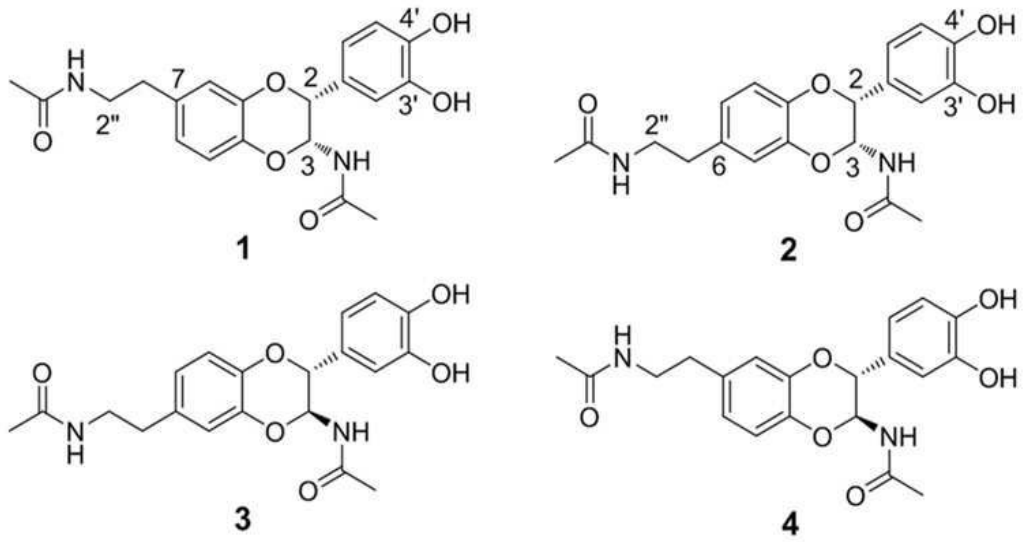
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 (2*R*,3*R*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-7-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 1), (2*R*,3*R*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-6-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 2), (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-디히드록이페닐)-3-아세틸아미노-6-(*N*-아세틸-2"아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 3) 및 (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-7-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 4)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 함유하는 것을 특징으로 하는 항혈전, 항혈소판 또는 항응고용 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화합물은 벼메뚜기(*Oxya chinensis sinuosa*)로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 항혈전, 항혈소판 또는 항응고용 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 조성물을 함유하는 것을 특징으로 하는 혈관질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 혈관질환은 혈전증, 동맥경화증, 고혈압, 협심증, 심근경색, 허혈성 심장질환, 심부전, 뇌경색, 뇌출혈 및 뇌졸중으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환인 것을 특징으로 하는 혈관질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항의 조성물을 함유하는 것을 특징으로 하는 혈관질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 혈관질환은 혈전증, 동맥경화증, 고혈압, 협심증, 심근경색, 허혈성 심장질환, 심부전, 뇌경색, 뇌출혈 및 뇌졸중으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환인 것을 특징으로 하는 혈관질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 벼메뚜기(*Oxya chinensis sinuosa*)로부터 분리된 화합물을 함유하는 항혈전용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 곤충은 지구상에서 가장 많은 수의 생물로서 80 % 이상을 차지하며, 전 세계적으로 950,000 종의 곤충이 보고된 바 있다(Science 2008, 322(5898), 52-53). 이 중에서 1,900 종 이상의 곤충이 식품으로 이용되고 있는 것으로 추산되는데, 식량 농업기구 (FAO) 등의 많은 단체나 국가에서 식용 곤충에 대한 연구가 활발하게 진행중이다. 세계에서 식품으로의 이용빈도가 가장 높은 곤충은 딱정벌레목 (Coleoptera, 31 %), 나비목 (Lepidoptera, 18 %), 벌목(Hymenoptera, 14 %), 메뚜기목(Orthoptera, 13 %), 노린재목(Hemiptera, 10 %) 등이며 나머지는 기타 곤충들(14 %)이 차지한다. 대부분의 식용 곤충은 대량사육을 통한 공급이 가능하고, 이로 인해 에너지원과 단백질원으로서 이용이 용이하다(Mol Nutr Food Res 2013, 57(5), 802-823). 또한 이러한 곤충은 식품 뿐만 아니라 의약 자원으로 알려져 있다. 예를 들어 벌목(Hymenoptera) *Pachycondyla sennaarensis*에서 추출한 독은 사염화탄소(CCl_4) 유래의 의한 콩팥독성에 대한 보호 활성이 있고(Oxid Med Cell Longev 2014, 763061), 노린재목(Hemiptera)의 굴깍지벌레과(Diaspididae) 종으로부터 분리되 카민과 레실린은 착색 첨가제와 고무 같은 생체재료로 사용되고, 벌목(Hymenoptera)이 생산하는 꿀은 여러 피부 질환 (세균 감염, 지루성 피부염 및 비듬 등)의 치료에 사용되며, 노린재목(Hemiptera)의 Coridius viduatus로부터 얻은 오일은 의약품의 피부 병변을 치료하는 데 사용된다(Complement Ther Med 2003, 11(4), 226-234 ;J Food Lipids 2004, 11(3), 179-189).

[0003] 벼메뚜기(*Oxya chinensis sinuosa*)는 오랫동안 아시아에서 식품으로 사용되어 왔고, 한국 식품의약품안전처(KFDA)에도 식용곤충으로 등록되어 있으며, 전통적으로도 기근퇴치 곤충으로 알려져 있으며, 기침, 백일해, 천식, 기관지염, 마비, 발작 등의 치료에 사용되어 왔다. 그러나 벼메뚜기에 함유되어 있는 유용 물질에 관한 체계적인 연구는 아직 미비한 실정이며 특히 항혈전 및 항혈소판 효과를 갖는 화합물에 대해서는 거의 알려진 바 없다.

[0004] 혈전 형성은 급성 관상동맥증후군, 심근경색, 부정맥, 심근경색증, 허혈성 뇌졸중과 같은 혈관질환의 결정적인 원인이 된다. 비정상적인 응고 과정에 기인한 혈전 형성은 종종 동맥 또는 정맥에서 관찰되고 감소된 혈류 도는 허혈을 야기할 수 있다. 혈전 형성은 혈액 세포벽 손상, 수용성 세포 부착, 응고 및 섬유소용해에 관련된다. 최근의 전세계적인 사망 주요원인은 혈관질환이며, 보다 구체적으로는 혈전증이라고 할 수 있다(N Am J Med Sci 2013, 5(4), 266-279; Chest 2004, 126(3 Suppl), 265S-286S). 죽상 동맥에서 혈소판 활성은 동맥 혈전증의 발달에 중요하며, 그러므로 혈소판 기능의 정확한 제어가 혈전증 이벤트를 예방하는데 필수적이다(N Engl J Med 2007, 357(24), 2482-2494). 대부분의 혈전 관련 질환의 치료에는 항응혈제(혈액 항응고제)를 이용한 치료가 필요한데, 상업적인 항응혈제로서 주로 사용되었던 헤파린은 60년 이상 동안 정맥의 혈전색전성 질환의 예방을 위해 사용되었다(JAMA 2014, 311(7), 717-728; Chest 1995, 108(4 Suppl), 258S-275S). 그러나, 헤파린은 피브린에 결합된 트롬빈의 억제 무능력, 선천성 또는 후천성 항트롬빈 결핍에서의 비효율, 혈소판 감소증의 발달, 치료 반응이 달성되지 않는 경우 혈전색전성 질환의 증가된 위험, 및 치료 범위가 초과되는 경우 출혈의 증가된

위험과 같은 부작용을 일으키는 것으로 보고된 바 있으며, 주로 동물로부터 추출되는 데 그 양이 극소량이어서 항응혈제로서의 이용 가능성이 매우 낮다(Chest 1995, 108(4 Suppl), 258S-275S; Glycobiology 2002, 12(10), 573-580).

[0005] 혈관 손상 반응에서 혈액 응고는 트롬빈 및 활성화된 응고 인자 X(activated coagulation factor X - FXa)가 핵심 역할을 하는 자이모젠(zymogen)의 활성화에 의해 시작된다. 프로트롬빈나아제 복합체는 세린 단백질, FXa 및 단백질 보조 인자(protein cofactor)인 Factor Va로 구성되는데, FXa는 프로트롬빈을 트롬빈으로 전환시켜 내재 및 외인성 경로를 연결하는 역할을 한다(Lancet 2000, 355(9215), 1627-1632). 항혈전제를 찾는 초기 연구에서는 혈전증에서 중심 역할을 하기 때문에 트롬빈 저해제를 개발하는 것이었으나, 여러 임상 연구를 통해 프로트롬빈에서 트롬빈으로 전환되는 과정이 트롬빈의 직접 저해제에 의해 차단되지 않는다는 사실이 밝혀졌다(Coron Artery Dis 1996, 7(7), 497-507; Circulation 1944, 90(4), 1624-1630). 생체 내에서 항혈전 효과를 얻기 위해서는 고농축의 트롬빈 저해제를 사용해야하며, 이는 항응고의 바람직하지 않은 결과를 초래하고 궁극적으로 출혈의 합병증을 증가시킬 수 있기 때문이다. 따라서, 혈전증의 치료를 위해 직접적인 트롬빈 저해제를 사용하기 보다 출혈 위험을 고려하여 트롬빈의 상류에 위치한 혈액 응고 인자를 선택적으로 억제하는 것이 더 안전할 수 있다. 이와 관련하여, FXa는 최근 새로운 항 혈전 제제의 표적으로 주목 받고 있는데(Int J Cardiol 2015, 178, 8-9; J Thromb Thrombolysis 2006, 21(1), 67-72), FXa의 억제는 일차적인 지혈을 위한 트롬빈의 기초 양을 유지하면서 트롬빈의 후속 생산을 약화시킨다는 장점이 있다. 또한 FXa의 선택적 저해가 혈전증의 억제에 있어서 헤파린 또는 직접 트롬빈 저해제의 적용보다 우수하다는 것이 입증된 바 있다(Cardiovasc Res 1994, 28(1), 78-85). 따라서 이러한 혈액 응고 경로를 방지하는 새로운 생리활성 화합물 및 약물에 대한 연구가 매우 필요하며, 효과적이면서도 안전한 항응혈제의 개발이 절실한 실정이다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 벼메뚜기부터 소분자 항응혈제를 발견하기 위해 노력한 결과, 벼메뚜기의 추출물로부터 4종의 화합물을 분리하였으며, 이들 화합물들이 활성화된 인자 X(activated factor X, FXa)의 생성을 억제시키고, 프로트롬빈 시간(prothrombin time, PT), 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간(activated partial thromboplastin time, aPTT)을 연장시키고 혈소판 응집과 혈전 용해에 대한 효과가 우수함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2016-0001880호 (발명의 명칭 : 항염증 활성을 갖는 벼메뚜기 추출물 및 이를 함유하는 조성물, 출원인 : 대한민국, 공개일 : 2016년01월07일)

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제10-2005-0079443호 (발명의 명칭 : 메뚜기에서 유래된 항암성 고분자 물질군의 제조방법, 출원인 : 김빛나, 공개일 : 2005년08월10일)

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Al-Waili NS, Topical application of natural honey, beeswax and olive oil mixture for atopic dermatitis or psoriasis: partially controlled, single-blinded study. Complement Ther Med 2003, 11(4), 226-234.

(비특허문헌 0002) Antman EM, Hirudin in acute myocardial infarction. Safety report from the Thrombolysis and Thrombin Inhibition in Myocardial Infarction (TIMI) 9A Trial. Circulation 1944, 90(4), 1624-1630.

(비특허문헌 0003) Bauer KA, New anticoagulants: anti IIa vs anti Xa--is one better? J Thromb Thrombolysis 2006, 21(1), 67-72.

(비특허문헌 0004) Berenbaum MR & Eisner T, Ecology. Bugs' bugs. Science 2008, 322(5898), 52-53.

(비특허문헌 0005) Dahlback B, Blood coagulation. Lancet 2000, 355(9215), 1627-1632.

(비특허문헌 0006) Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. N Engl J Med 2007, 357(24), 2482-2494.

(비특허문헌 0007) Ebaid H, Al-Tamimi J, Hassan I, Alhazza I, & Al-Khalifa M, Antioxidant bioactivity of Samsum ant (Pachycondyla sennaarensis) venom protects against CCL(4)-induced nephrotoxicity in mice. Oxid Med Cell Longev 2014, 763061.

(비특허문헌 0008) Fares A. Winter cardiovascular diseases phenomenon. N Am J Med Sci 2013, 5(4), 266-279.

(비특허문헌 0009) Hirsh J, Raschke R, Warkentin TE, Dalen JE, Deykin D, Poller L. Heparin: mechanism of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety. Chest 1995, 108(4 Suppl), 258S-275S.

(비특허문헌 0010) Loffredo L, Perri L, & Violi F, Myocardial infarction and atrial fibrillation: different impact of anti-IIa vs anti-Xa new oral anticoagulants: a meta-analysis of the interventional trials. Int J Cardiol 2015, 178, 8-9.

(비특허문헌 0011) Lynch JJ, Jr., et al. Maintenance of canine coronary artery patency following thrombolysis with front loaded plus low dose maintenance conjunctive therapy. A comparison of factor Xa versus thrombin inhibition. Cardiovasc Res 1994, 28(1), 78-85.

(비특허문헌 0012) Mariod A, Matthaus B, & Eichner K, Fatty acid, tocopherol and sterol composition as well as oxidative stability of three unusual sudanese oils. (Translated from English) J Food Lipids 2004, 11(3), 179-189 (in English).

(비특허문헌 0013) Noda N, Kubota S, Miyata Y, & Miyahara K, Optically active N-acetyldopamine dimer of the crude drug "Zentai," the cast-off shell of the Cicada, Cryptotympana sp. Chem Pharm Bull (Tokyo) 2000, 48(11), 1749-1752.

(비특허문헌 0014) Pereira MS, Melo FR, Mourao PA. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans. Glycobiology 2002, 12(10), 573-580.

(비특허문헌 0015) Rumpold BA & Schluter OK, Nutritional composition and safety aspects of edible insects. Mol Nutr Food Res 2013, 57(5), 802-823.

(비특허문헌 0016) Weitz JI, Hirsh J, Samama MM. New anticoagulant drugs: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. Chest 2004, 126(3 Suppl), 265S-286S.

(비특허문헌 0017) Wells PS, Forgie MA, Rodger MA. Treatment of venous thromboembolism. JAMA 2014, 311(7), 717-728.

발명의 내용

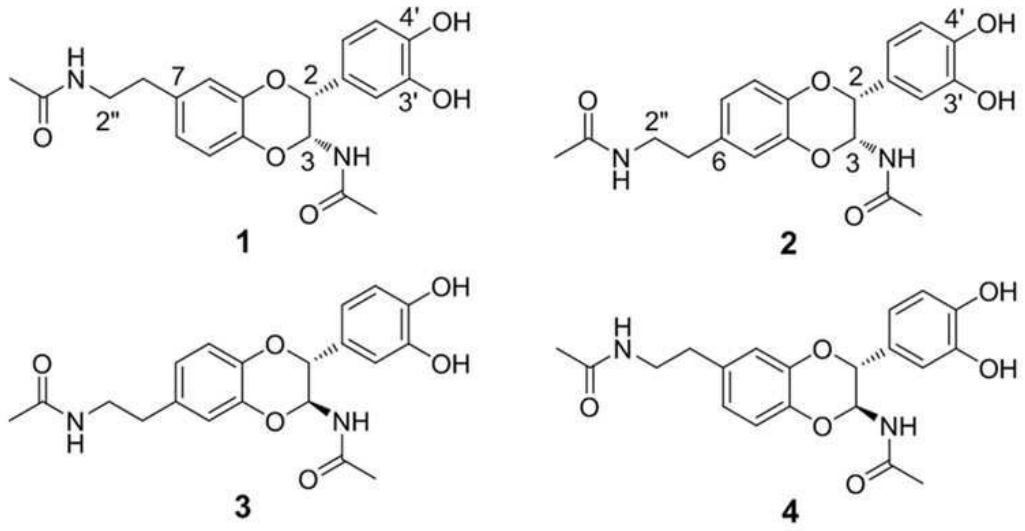
해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 벼메뚜기(*Oxya chinensis sinuosa*)로부터 분리된 화합물을 함유하는 항혈전용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 하기 화학식 1의 (2*R*,3*R*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-7-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 1), (2*R*,3*R*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-6-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 2), (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-디히드록이페닐)-3-아세틸아미노-6-(*N*-아세틸-2"아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 3) 및 (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-7-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 4)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 함유하는 항혈전, 항혈소판 또는 항응고용 조성물에 관한 것이다.

[0011] [화학식 1]



[0012]

[0013] 상기 화합물은 벼메뚜기(*Oxya chinensis sinuosa*)로부터 분리될 수 있다.

[0014] 본 발명은 또한 상기 조성물을 함유하는 혈관질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 혈관질환은 혈전증, 동맥경화증, 고혈압, 협심증, 심근경색, 허혈성 심장질환, 심부전, 뇌경색, 뇌출혈 및 뇌졸중으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환일 수 있다.

[0015] 이에 본 발명은 상기 조성물을 함유하는 혈관질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0016] 또 다른 양태에서 본 발명은,

[0017] (제1단계) 벼메뚜기(*Oxya chinensis sinuosa*) 추출물을 제조하는 단계; 및,

[0018] (제2단계) 상기 제1단계에서 제조한 벼메뚜기 추출물을 크로마토그래피하여 항응고 활성이 높은 화합물을 분리하는 단계;

[0019] 를 포함하는 상기 화학식 1의 (2*R*,3*R*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-7-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 1), (2*R*,3*R*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-6-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 2), (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-디히드록이페닐)-3-아세틸아미노-6-(*N*-아세틸-2"아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 3) 및 (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-7-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 4)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 분리하는 방법을 제공한다.

[0020] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0021] 상기 화학식 1의 화합물은 인간 제대정맥혈관내피세포(HUVECs)에서 aPTT 및 PT를 연장시키고 FXa를 억제하며, 트롬빈에 의해 촉매된 피브린 중합 및 혈소판 응집을 억제함으로써, 항혈전제, 항혈소판제 또는 항응고제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0022] 상기 화학식 1의 화합물은 벼메뚜기(*Oxya chinensis sinuosa*)로부터 분리된 화합물인 것을 특징으로 한다. 상기 화학식 1의 화합물은, 바람직하게는, (제1단계) 벼메뚜기(*Oxya chinensis sinuosa*) 추출물을 제조하는 단계; 및, (제2단계) 상기 제1단계에서 제조한 벼메뚜기 추출물을 크로마토그래피하여 항응고 활성이 높은 화합물을 분리하는 단계;를 포함하여 얻을 수 있다.

[0023] 상기 갈색거저리 유충의 추출물은 갈색거저리에 C1~C4 알코올 또는 이의 수용액을 용매로 가하여 추출할 수 있다. 상기 C1~C4 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 및 이소부탄올로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 상기 용매에는 화합물을 보다 효과적으로 추출하기 위해 아세트산이 0.1~5%(v/v)로 포함될 수도 있다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 (2*R*,3*R*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-7-(*N*-아세틸-2"-아미노에

틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 1), (2*R*,3*R*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-6-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 2), (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-디히드록이페닐)-3-아세틸아미노-6-(*N*-아세틸-2"아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 3) 및 (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-7-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 4)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 포함하는 혈관질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0025] 상기 약학적 조성물은 상기 화학식 1의 화합물을 포함하고, 약학적 조성물로서 사용하기에 적합한 담체 또는 운반체를 포함하는 형태로 제조될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 81, 카카오지, 타우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 화합물 또는 이를 함유하는 약학적 조성물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 mg 내지 1000 mg, 바람직하게는 0.01 mg 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 질환의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 (2*R*,3*R*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-7-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 1), (2*R*,3*R*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-6-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 2), (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-디히드록이페닐)-3-아세틸아미노-6-(*N*-아세틸-2"아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 3) 및 (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-7-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 4)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 혈관질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다. 여기서, 건강기능식품이란 일상 식사에서 결핍되기 쉬운 영양소나 인체에 유용한 기능을 가진 원료나 성분(기능성 원료)을 사용하여 제조한 것으로, 인체의 정상적인 기능을 유지하거나 생리기능 활성화를 통하여 건강을 유지하고 개선하는 식품으로 식품의약품안전처장이 정한 것을 의미하나, 이에 한정되지 않으며 통상적인 의미의 건강식품을 배제하는 의미로 사용된 것이 아니다. 본 발명의 건강기능식품에 상기 화학식 1의 화합물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능식품 중의 상기 화학식 1의 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취시에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품은 상기 화합물을 함유하는 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없다. 구체적으로, 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본

발명의 화합물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0027] 한편, 본 발명에서 혈관질환이란 혈액응고에 기인한 혈전증, 동맥경화증, 고혈압, 협심증, 심근경색, 허혈성 심장질환, 심부전, 뇌경색, 뇌출혈, 및, 뇌졸중에서 선택될 수 있으며, 가장 바람직하게는 혈전증, 심근경색 또는 뇌졸중일 수 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 벼메뚜기(*Oxya chinensis sinuosa*)로부터 분리된 (2*R*,3*R*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-7-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 1), (2*R*,3*R*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-6-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 2), (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-디히드록이페닐)-3-아세틸아미노-6-(*N*-아세틸-2"아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 3) 및 (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-7-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산 (화합물 4)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 함유하는 항혈전, 항혈소판 또는 항응고용 조성물에 관한 것이다. 상기 화합물은 HUVEC에서 FXa의 억제를 통해 혈액 응고 경로를 억제하고, 생체내외에서 혈소판 응집을 억제하여, 이러한 혈액응고와 관련된 혈관 질환의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물 또는 건강기능식품으로서 유용하게 사용할 수 있다. 또한 상기 화합물 1 및 2는 본 발명에서 처음 발견된 신규화합물로서, 항혈전 용도 이외에도 다양한 분야에 적용할 수 있다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1의 A~C는 화합물 1 내지 4에 대한 항응고 결과를 나타내며, 자세하게는 도 1A는 aPTT(activated partial thromboplastin time)의 *ex vivo* 결과, 도 1B는 aPTT의 *in vivo* 결과, 도 1C는 꼬리 출혈 시간 결과를 나타낸다(화합물 1 (white box), 화합물 2 (light gray box), 화합물 3 (dark gray box), 화합물 4 (black box), 이후의 모든 도면 막대 그래프에서 동일하게 표현, 각 도면에서 D는 화합물 무처리군[용매인 DMSO 0.2%]을 의미하며 이하 도면에서도 동일하게 표기됨, Comp:화합물).

도 2의 A~C는 화합물 1 내지 4에 대한 혈소판 응집 억제 결과를 나타내며, 자세하게는 각각 ADP(adenosine diphosphate)(도 2A), U46619(U)(도 2B), 트롬빈(Th)(도 2C)으로 유도된 혈소판 응집에 대한 화합물 1 내지 4의 반응 결과를 나타낸다.

도 3의 A~D는 화합물 1 내지 4가 농도 의존적으로 기질 S-2222에 대한 FXa의 촉매 활성을 억제하고 있음을 나타내는 Michaelis-Menten plot과 Lineweaver-Burk plot이며, 도 3E는 화합물 1 내지 4가 FXa의 생산을 억제할 수 있는 것을 나타내는 그래프이다.

도 4는 화합물 1 내지 4의 경동맥 혈전증 및 급성 혈전증 모델에 대한 효과를 보여주는 그래프로서, 도 4A는 혈전 형성에 대한 시간을 나타내며, 도 4B는 $FeCl_3$ 처리 60분 후에 혈전의 크기 점수(size score)를 나타낸다. 도 4C는 각 화합물을 정맥으로 투여한 후, 콜라겐(C)(500 ㎍/kg) 및 에피네프린(E)(50 ㎍/kg)의 혼합물을 마우스의 꼬리 정맥에 투여한 후 유도된 폐혈전으로 인한 사망률 변화를 보여준다.

도 5는 본 발명의 화합물 1 및 2의 HMBC( ) 상관관계 스펙트럼을 나타내는 그림이다.

도 6은 본 발명의 화합물 1 및 2의 CD 스펙트럼을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지도록, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0031] **<실시예 1. 벼메뚜기로부터 항혈전 화합물의 분리 및 물리화학적 성질 확인>**

[0032] **실시예 1-1. 벼메뚜기 추출물로부터 화합물 1~4의 분리**

[0033] 동결건조된 벼메뚜기(*Oxya chinensis sinuosa*, 5 kg, powder, 국립농업과학원 제공)를 1% 아세트산이 포함된 에탄올 용액으로 4회 환류추출하고(5 L × 4), 추출액을 감압농축하여 갈색의 에탄올 추출물을 얻었다(421.8 g). 에탄올 추출물(419 g)을 VLC (20 cm × 20 cm)로 분리하고, *n*-헥산:에틸 아세테이트 (100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 및 20:80 [v:v])의 순차적 농도구배 조건, 및, 클로로포름:메탄올 (100:0, 80:20, 60:40,

40:60, 20:80 및 0:100, [v:v])의 순차적 농도구배 조건으로 용출하여 12개의 분획물을 얻었다. TLC 프로파일에 따라, 12 개의 분획물을 6 개의 분획물 (Fr. A ~ Fr. F)로 통합시켜 얻은 분획물 중, Fr. D (35.7 g)을 VLC (20 cm × 20 cm)로 분리하고 n-헥산:에틸아세테이트(60:40 → 40:60, [v:v])의 조건, 및, n-헥산:에틸아세테이트 (100:0, 85:15, 75:25 및 50:50, [v:v])의 순차적 농도구배 조건, 클로로포름:메탄올(85:15, 80:20, 67:33, 50:50 및 0:100, [v:v])의 순차적 농도구배 조건으로 용출하여 6개의 소분획물 (Fr. D-1 ~ Fr. D-6)을 수득하였다.

[0034] 소분획물 Fr. D-5 (18.3 g)를 MPLC [column: C_{18} SNAP Cartridge KPC18-HS (340 g); mobile phase: 아세토니트릴:물 (10:90 → 60:40, [v:v], 8160 mℓ)] 조건에서 클로로포름 : 메탄올 (80:20 → 67:33, [v:v])로 용출하여 6개의 소분획물 (Fr. D-5-1 ~ Fr. D-5-6)을 수득하였다.

[0035] 소분획물 Fr. D-5-2 (1.9 g)를 분취-HPLC 컬럼(Phenomenex Kinetex C_{18} column, 250 × 21.2 mm, 5 μm) 조건에서 아세토니트릴 수용액(20~25%(v/v) 아세토니트릴, 0~70분)의 농도구배 조건에서 용출하여 화합물 3 (t_R 52 min, 331.2 mg), 화합물 4 (t_R 47 min, 389.2 mg)를 얻었다.

[0036] 신규 화합물 1 (t_R 43 min, 8.9 mg), 신규 화합물 2 (t_R 42 min, 13.6 mg)는 소분획물 Fr. D-5-2의 57분 째의 분획물 (35.8 mg)을 분취-HPLC 컬럼(Kinetex Biphenyl column : 250 × 21.2 mm, 5 μm)으로 분리한 것을 농도구배를 갖는 메탄올 수용액(30~80%)으로 60분 동안 용출하면서 분리되었다.

[0037] **실시예 1-2. 화합물 1~4의 물리화학적 성질 확인**

[0038] 다음으로는 상기 화합물 1 내지 4의 구조를 MS, 1D, 2D NMR, HMBC, CD 스펙트럼 결과를 통해 하기와 같이 분석하였는데, 특히 화합물 1~4의 ^{1}H NMR 및 ^{13}C NMR 결과는 하기 표 1 및 2에 표기하였고, HMBC, CD 스펙트럼 결과는 도 5 및 도 6에 나타내었다.

표 1

[0039] ^{1}HNMR Spectroscopic Data (600 MHz, methanol-d_4) for Compounds 1-4

	화합물 1	화합물 2	화합물 3	화합물 4
position	δ_H (J in Hz)	δ_H (J in Hz)	δ_H (J in Hz)	δ_H (J in Hz)
2	5.11, d (1.5)	5.09, d (1.0)	4.68, d (7.2)	4.69, d (7.1)
3	6.03, d (1.7)	6.03, d (1.3)	5.68, d (7.2)	5.67, d (7.1)
5	overlap	overlap	overlap	overlap
6	overlap			overlap
7		overlap	overlap	
8	overlap	overlap	overlap	overlap
4a				
8a				
1`				
2`	overlap	overlap	overlap	overlap
3`				
4`				
5`	Overlap	Overlap	overlap	overlap
6`	Overlap	Overlap	overlap	overlap
1``	2.71, t (7.2)	2.70, t (7.1)	2.69, t (7.3)	2.69, t (7.2)
2``	3.35, t (3.6)	3.35, t (5.5)	3.35, m	3.35, t, (7.1)
CH_3	1.92, s	1.90, s	1.91, s	1.90, s
	1.84, s	1.84, s	1.87, s	1.87, s

표 2

[0040] ^{13}C NMR Spectroscopic Data (150 MHz, methanol-d_4) for Compounds 1-4

	화합물 1	화합물 2	화합물 3	화합물 4
position	δ_C, type	δ_C, type	δ_C, type	δ_C, type
2	77.2, CH	77.1, CH	78.2, CH	78.3, CH
3	77.0, CH	77.2, CH	78.3, CH	78.3, CH
5	118.5, CH	118.7, CH	118.2, CH	117.9, CH
6	123.7, CH	134.8, C	134.3, C	123.2, CH
7	134.2, C	123.1, CH	123.1, CH	134.2, C
8	118.7, CH	118.5, CH	117.9, CH	118.1, CH
4a	140.9, C	143.3, C	143.5, C	142.2, C
8a	144.6, C	142.2, C	143, C	144.3, C
1`	128.2, C	128.2, C	128.8, C	128.8, C
2`	114.5, CH	114.5, CH	115.6, CH	115.6, CH
3`	146.6, C	146.6, C	146.5, C	146.5, C
4`	146.7, C	146.8, C	147.2, C	147.1, C
5`	116.2, CH	116.2, CH	116.1, CH	116.1, CH
6`	118.8, CH	118.8, CH	120.6, CH	120.6, CH
1``	35.8, CH_2	35.8, CH_2	35.8, CH_2	35.8, CH_2
2``	42.2, CH_2	42.2, CH_2	42.1, CH_2	42.1, CH_2
CH_3	22.6, CH_3	22.5, CH_3	22.6, CH_3	22.6, CH_3
	22.3, CH_3	22.3, CH_3	22.5, CH_3	22.5, CH_3
CO	174.1, C	174.1, C	173.3, C	173.3, C
	173.3, C	173.2, C	173.2, C	173.3, C

[0041]

[0042] 이러한 결과를 바탕으로 화합물 1~4에 대해 하기와 같이 설명한다.

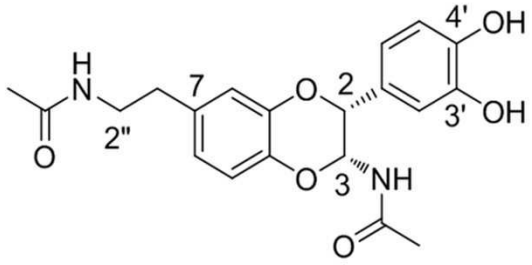
[0043] **화합물 1**

[0044] 화합물 1은 노르스름한 무정형 결정으로 분리되었다($[\alpha]_D^{23}$ - 21.5 (MeOH, *c* 0.1)).

[0045] ^{13}C-NMR 데이터와 HRESIMS(*m/z* 409.1376 $[M + Na]^+$, calcd. for $C_{20}H_{22}N_2O_6Na$ 409.1346) 결과를 기반으로 $C_{20}H_{22}N_2O_6$ 의 분자식을 갖는 것이 확인된다. 표 1 및 2에 개시된 ^{1}H-NMR과 ^{13}C-NMR 데이터는 이 화합물이 [Chem Pharm Bull (Tokyo) 2000, 48(11), 1749-1752]에서 확인된 화합물과 같은 전형적인 도파민 유도체인 것을 의미한다. ^{1}H-NMR 데이터는 방향족 영역에 2개의 ABX-타입 스핀 시스템 (δ_H 6.83~6.78, overlap)이 있고, 2개의 메틸렌 (δ_H 3.35, t, J = 3.6 Hz 및 2.71, t, J = 7.2 Hz), 2개의 메틴 (δ_H 6.03, d, J = 1.7 Hz 및 5.11, d, J = 1.5 Hz)이 있으며, OH과 NH 양성자에 기인한 추가 신호가 있음을 제시한다. ^{13}C-NMR 데이터는 12개의 신호가 있는 방향족 영역을 제시하는데 이 영역에 추가로 2개의 카보닐 그룹(δ_C 174.1, 173.3) 신호가 있음이 확인된다. H-2" (δ_H 3.35, t, J = 3.6 Hz) 및 C-7 (δ_C 134.2) 사이의 HMBC(heteronuclear multiple bond correlation) 크로스 피크는 C-7 위치에 *N*-아세틸아미노-2-에틸기가 있음을 의미하고, H-3 (δ_H 6.03, d, J = 1.7 Hz) 와 카보닐기 (δ_C 174.1) 사이의 HMBC 상관관계는 다른 *N*-아세틸아미드 그룹이 C-3 위치에 연결되어 있음을 암시한다. H-2'/H-6' (δ_H 6.83~6.78, overlap) 및 C-2 (δ_C 77.2) 사이의 HMBC 크로스 피크는 C-2 위치에 3',4'-디히드록시벤젠 고리가 있음을 뜻한다. 1,4-디옥산 고리의 H-2 및 H-3 입체구조는 [Chem Pharm Bull (Tokyo) 2000, 48(11), 1749-1752]에 보고된 화합물과는 다르다. H-2 및 H-3 ($J_{H-2/H-3}$ = 1.6 Hz)의 작은 커플링 상수는 2,3-*trans*-*N*-아세틸도파민 다이머 ($J_{H-2/H-3}$ = 7.3 Hz)와는 다른 것으로 확인되는데, 이는 화합물 1의 H-2 및 H-3의 구조가 *cis* 구조를 갖는 것을 의미한다. 또한 CD 스펙트럼 결과 분석을 통해 H-2 및 H-3의 절대적 구

조가 확인되었는데, 235 nm에서의 양성 코튼 효과(positive Cotton effect)는 화합물 1의 2*R* 구조를 나타낸다.

[0046] 따라서, 화합물 1은 하기의 구조를 갖는 화합물임이 확인되었고, 옥시아미드 A(oxyamide A)라 명명하였다.



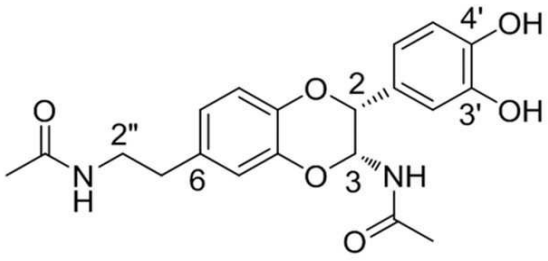
[0047]

[0048] : (2*R*,3*R*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-7-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산

[0049] (2*R*,3*R*)-2-(3',4'-dihydroxyphenyl)-3-acetylamino-7-(*N*-acetyl-2"-aminoethyl)-1,4-benzodioxane

[0050] **화합물 2**

[0051] 화합물 2는 노르스름한 무정형 결정으로 분리되었다($[\alpha]_D^{23}$ - 42 (MeOH, *c* 0.1)). *m/z* 409.1376(calcd. for $C_{20}H_{22}N_2O_6Na$ 409.1345)에서의 HRESIMS 데이터와 ^{13}C-NMR 데이터를 통해 화합물 2의 분자식은 $C_{20}H_{22}N_2O_6$ 로 판별되었다. ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR 스펙트럼 결과는 화합물 2의 구조가 *N*-아세틸아미노-2-에틸 잔기의 위치를 제외하고는 화합물 1과 유사함을 나타낸다. H-2" (δ_H 3.35, t, J = 5.5 Hz) 및 C-6 (δ_C 134.8) 사이의 HMBC 크로스 피크(cross peak)는 *N*-아세틸아미노-2-에틸 잔기가 C-6에 결합되어 있음을 나타낸다. H-3 (δ_H 6.03, d, J = 1.3 Hz) 및 C-4a (δ_C 143.3) 사이의 HMBC 크로스 피크는 H-2 및 H-3 사이가 *cis* 구조임을 나타내며, *trans* 이성질체는 HMBC 상관관계에서 확인되지는 않는다. ^{1}H-NMR 결과에서의 작은 커플링 상수($J_{H-2/H-3}$ = 1.2 Hz)로부터도 H-2 및 H-3 사이의 구조가 *cis* 구조임을 추론할 수 있다. H-2 및 H-3 위치의 절대적 구조는 CD 스펙트럼(positive Cotton effect at 235 nm)을 통해 2*R* 인 것으로 확인된다. 따라서 화합물 2는 하기의 구조를 갖는 화합물임이 확인되었고, 옥시아미드 B(oxyamide B)라 명명하였다.



[0052]

[0053] : (2*R*,3*R*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-6-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산

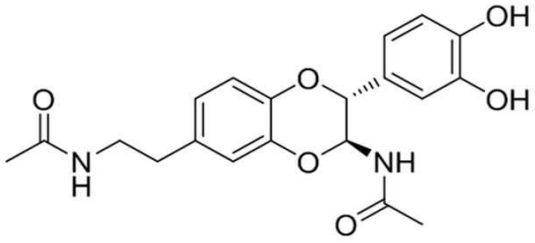
[0054] (2*R*,3*R*)-2-(3',4'-dihydroxyphenyl)-3-acetylamino-6-(*N*-acetyl-2"-aminoethyl)-1,4-benzodioxane

[0055] **화합물 3**

[0056] 화합물 3($[\alpha]_D^{23}$ - 38.2 (MeOH, *c* 0.1))도 노르스름한 무정형 결정으로 분리되었다. 분자량은 *m/z* 387 (calcd. $[M + H]^+$, *m/z* 387)에서의 ESIMS(electrospray ionization mass spectrometry) 양성자 전도 이온(proton adduct ion)으로부터 확인하였다. CD 스펙트럼 및 NMR 데이터를 확인한 결과, 화합물 3의 구조는 *N*-아세틸도파민 다이머 구조를 갖는다. H-2와 H-3 사이의 커플링 상수($J_{H-2/H-3}$ = 7.2 Hz)를 고려하면, H-2와 H-3의 상대 배열이 *trans* 구조인 것을 나타낸다.

[0057] 따라서 화합물 3은 하기의 구조를 갖는 화합물임이 확인된다(Chem Pharm Bull (Tokyo) 2000, 48(11), 1749-

1752).



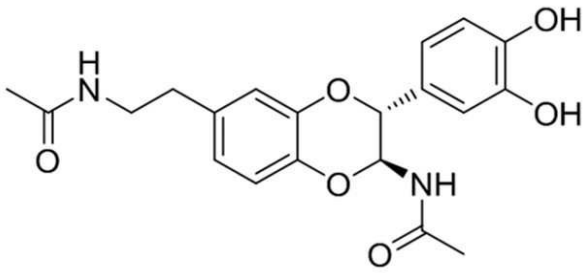
[0058]

[0059] : (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-디히드록이페닐)-3-아세틸아미노-6-(*N*-아세틸-2"아미노에틸)-1,4-벤조디옥산

[0060] (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-dihydroxyphenyl)-3-acetylamino-6-(*N*-acetyl-2"-aminoethyl)-1,4-benzodioxane

[0061] **화합물 4**

[0062] 화합물 4($[\alpha]_D^{23}$ - 36.2 (MeOH, *c* 0.1))도 노르스름한 무정형 결정으로 분리되었고, ESIMS 결과는 *m/z* 387에서 분자이온신호를 나타낸다(calcd $[M + H]^+$, *m/z* 387). 화합물 4의 NMR 및 CD 스펙트럼은 화합물 1과 비슷하지만, H-2 (δ_H 4.69, d, J = 7.1 Hz) 및 H-3 (δ_H 5.67, d, J = 7.1 Hz)의 화학적 이동이 화합물 1과 다르고, 화합물 4의 ^{1}H-NMR 데이터에서 관측된 커플링 상수값 ($J_{H-2/H-3}$ = 7.1 Hz)은 H-2 및 H-3의 상대적 입체배치가 *trans* 구조인 것을 나타낸다. 따라서 화합물 4는 하기 구조를 갖는 화합물임이 확인된다(Chem Pharm Bull (Tokyo) 2000, 48(11), 1749-1752).



[0063]

[0064] : (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-디히드록시페닐)-3-아세틸아미노-7-(*N*-아세틸-2"-아미노에틸)-1,4-벤조디옥산

[0065] (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-dihydroxyphenyl)-3-acetylamino-7-(*N*-acetyl-2"-aminoethyl)-1,4-benzodioxane

[0066] **<실시예 2. 인간 제대정맥혈관내피세포의 배양>**

[0067] 실험에 사용된 일차 인간 제대정맥혈관내피세포(primary human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)는 Cambrex Bio Science(Charles City, IA, USA)에서 획득하였고 공지된 방법(Bae JS, et al., *Am J Respir Crit Care Med* 2014, 189(7), 779-786; Ku SK, et al., *BMB Rep* 2014, 47(6), 336-341; Ku SK, et al., *Arch Pharm Res* 2014, 37(11), 1454-1463; Ku SK, et al., BMB Rep 2014, 47(7), 376-381)에 따라 유지시켰다. 구체적으로, 세포를 5% CO_2 대기 하에 37℃에서 성장 보충제(Cambrex Bio Science, Charles City, IA, USA)가 보충된 EBM-2 기본 배지에서 배양하였다.

[0068] **<실시예 3. 마우스의 준비 및 사육>**

[0069] 수컷 C57BL/6 마우스(6-7 주령, 무게 27 g)를 Orient Bio Co.(Sungnam, Republic of Korea)에서 구입하였고 12일간의 적응기간 후에 사용하였다. 마우스는 제어된 온도(20-25℃) 및 습도(40-45% 상대 습도) 및 12h:12h 명:암 주기 하에서 폴리카보네이트 우리 1개당 5마리씩 수용하였다. 마우스는 적응하는 동안 정상적인 설치류 펠렛 사료 및 임의대로 물을 공급하였고, 대한민국 경북대학교에 의해 발행된 '실험 동물의 관리 및 사용에 관한 가이드라인'(IRB No. KNU 2012-13)에 따라 처리하였다.

[0070] **<실시예 4. 분리된 화합물들의 응고 시간 분석>**

[0071] 각 화합물의 항응고 활성은 PT(prothrombin time) 및 aPTT(activated partial thromboplastin time) 분석을 이

용하여 테스트하였다.

[0072] 이를 위해 수컷 C57BL/6 마우스를 밤새 금식시킨 후 0.2% DMSO에 포함된 각 화합물을 i.v.로 투여하였다. 투여 15분 후에, 생체 외 PT 및 aPTT 측정을 위해, 동맥 혈액 샘플(0.1 ㎖)을 3.8% 시트르산 나트륨(1/10, v/v)에 빼내었다(*ex vivo* 실험 수행).

[0073] PT 및 aPTT는 트롬보타이머(Thrombotimer)(Behnk Elektronik, Norderstedt, Germany)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다. 먼저 마우스의 혈액을 실온에서 150 g에서 15분 동안 원심분리하였고, 원심분리액하여 얻은 상등액을 제거한 후 pellet을 희석하여 3000 rpm, 20 분간 원심분리한 후 얻은 상등액을 혈소판이 거의 없는 혈장을 얻었다. 상기 혈소판이 거의 없는 혈장(platelet-poor plasma)(90 ㎕)을 10 ㎕의 헤파린 또는 각 화합물과 혼합한 후 37℃에서 1시간 동안 인큐베이트하였다.

[0074] 이어서 aPTT 분석 시약(100 ㎕)(Fisher Diagnostics, Middletown, VA, USA)을 첨가한 후 혈장 샘플을 37℃에서 1분 동안 인큐베이트한 다음, 20 mM $CaCl_2$(100 ㎕)을 첨가하였고, 응고 시간을 기록하였다. aPTT 결과는 단지 초 단위로만 표시되었다. 통계적 분석의 경우, 결과는 중복해서 수행한 적어도 세 번의 독립적인 실험의 평균(SEM)의 평균 ± 표준편차로 나타내었다. $P < 0.05$를 통계학적으로 유의한 것으로 고려하였고 SPSS 소프트웨어(버전 14.0, SPSS Science, Chicago, IL, USA)를 이용하여 결정하였다.

[0075] PT 분석을 위해, 분리된 혈소판이 거의 없는 마우스 혈장(90 ㎕)을 10 ㎕의 각 화합물 저장 용액과 혼합한 후 37℃에서 1시간 동안 인큐베이트시켰다. PT 분석 시약(200 ㎕)(Fisher Diagnostics, Middletown, VA, USA)을 37℃에서 10분 동안 전배양한 후 첨가한 다음 응고 시간을 기록하였다. PT 결과는 초 단위로 표시되었다.

[0076] 한편, e*x vivo* 실험 수행과 마찬가지로 *in vivo* 실험을 수행하였다.

[0077] 이하, 모든 실험의 통계적 분석은 동일한 방법을 사용하였고 실험결과는 도 1A(aPTT - e*x vivo*) 및 도 1B(aPTT - *in vivo*)에 나타내었다. 이 때 PT 결과는 각 화합물과 대조군의 차이가 거의 없어 나타내지 않았다.

[0078] 상기 도 1A 및 도 1B를 참고하면, 마우스 생체 외에서 확인한 결과, 화합물 1 내지 4가 시험관 내 실험 결과에서와 같이 우수한 항응고 활성이 있음을 알 수 있다. * 화합물 1 (white box), 화합물 2 (light gray box), 화합물 3 (dark gray box), 화합물 4 (black box), 이후의 모든 도면 막대 그래프에서 동일하게 표현, 각 도면에서 D는 화합물 무처리군[용매인 DMSO 0.2%]을 의미하며 이하 도면에서도 동일하게 표기됨, Comp:화합물.

[0079] **<실시예 5. 분리된 화합물들의 꼬리 출혈 시간 분석>**

[0080] 시험관 내 결과가 생체 내에서도 유지되는지 확인하기 위해 꼬리 출혈 시간(*in vivo*)을 측정하였다. 이 때 꼬리 출혈 시간은 Dejana 등(*Thromb Res* 1979, 15(1-2), 191-197) 또는 Kim TH 등(*J Cell Biochem* 2012, 113(9), 2877-2883)에 의해 기재된 방법을 이용하여 측정하였다. 수컷 C57BL/6 마우스를 실험 이전 밤새 금식시킨 후, 각 화합물의 정맥(i.v.) 투여 1시간 후에 이 마우스의 끝 부분으로부터 2 ㎜에서 가로로 절개하였다. 각 화합물에 대한 비교군에는 아스피린(aspirin, 9 mg/kg for 30 min)을 처리하였다. 출혈 시간은 출혈이 멈출 때까지 시간 경과로서 정의하였고, 도 1C에 나타내었다.

[0081] 상기 도 1C를 참고하면, 화합물 1 내지 4(i.v. 주사)의 처리로 인해 꼬리 출혈 시간 또한 대조군(Control)과 비교하여 현저하게 연장되어 화합물 1 내지 4의 항응고 활성이 생체 내에서도 유지됨을 알 수 있다.

[0082] **<실시예 6. 분리된 화합물들의 혈소판 응집에 대한 효과 확인>**

[0083] 화합물 1 내지 4의 항응고 활성을 확인하기 위해, U46619(안정된 트롬복산 A2 아날로그/응집 작용제), ADP (adenosine diphosphate), 또는 트롬빈(thrombin)에 대해 촉매 혈소판 응집 분석을 수행하였다. 구체적으로, 시험관 내 혈소판 응집 분석은 Kim SY 등에 의해 보고된 방법(Kim SY, et al., *BMB Rep* 2011, 44(2), 140-145; Lee W, et al., *Arch Pharm Res* 2015, 38(5), 893-903)]에 따라 수행하였다.

[0084] 한편, 혈소판은 인간 혈액으로부터 분리하였다. 인간 혈액 샘플은 심혈관 질환, 알러지 및 지방 또는 탄수화물 대사 질환이 없고, 약물 치료를 받지 않는 10명의 건강하고 금식한 자원자(연령: 24~28세, 4명의 남성 및 6명의 여성)으로부터 아침에 채취하였다. 모든 대상자들은 연구에 참여하기 전에 동의서를 작성하였다. 대상자들은 중독성 물질 또한 항산화 식품 보충제를 사용하지 않았고, 그들의 식단은 균형(고기 및 채소)있게 하였다. 이들로부터 채취한 혈액을 실온에서 150 g에서 15분 동안 원심분리하였고, 원심분리액하여 얻은 상등액(혈소판 풍부 혈장:PRP)을 세포 수를 위한 혈구계산기(hemocytometer)를 이용하여 saline으로 희석함으로써(약 200배 희석) 1

$\times 10^9$ platelets/㎖의 농도로 조절하였다. 이렇게 얻은 혈소판을 1 mM $CaCl_2$의 존재 하에서 HEPES 완충용액(5 mM HEPES, 136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.42 mM NaH_2PO4, 2 mM $MgCl_2$, 5.6 mM 글루코즈, 0.1% BSA (w/v), pH 7.45까지)로 한번 세척하였다. 혈소판은 30분 동안 실온에서 방치한 후 사용하였다. 혈액응고 시점 측정을 위해서는 10 ㎖ 혈액 샘플을 사용하였다.

[0085] 이렇게 준비된 세척된 혈소판을 1, 3, 5 또는 10분 동안 DMSO에서 각 화합물을 표시된 농도로 인큐베이트하였고, 이어서 5분 동안 37℃에서 0.9% 식염수 용액에서 ADP (adenosine diphosphate, 10 μM), U46619 (6 μM) 또는 트롬빈(thrombin, 3 U/mL)에 의해 자극시켰다. 혈소판 응집은 응집검출계(aggregometer)(Chronolog, Havertown, PA, USA)를 이용하여 기록하였다.

[0086] 그 결과, 화합물 1 내지 4의 처리는 농도 의존적으로 ADP (도 2A, 10 μM), U46619 (도 2B, 6 μM)에 의해 유도된 인간 혈소판 응집을 농도 의존적으로 억제하는 것으로 확인되지만, 이들 화합물은 트롬빈(도 2C, 3 U/mL)에 대해서는 활성이 없는 것으로 나타난다(도 2에서 U는 U46619, Th는 트롬빈을 의미함).

[0087] **<실시예 7. 분리된 화합물들의 FXa 활성에 대한 효과 확인>**

[0088] TNF-α가 HUVEC을 자극하면, TF(tissue factor) 발현으로 유도된 FVIIa로 인해 FX의 활성이 일어난다(coagulation factor X가 activated coagulation factor X[FXa]로 변환). 이에 대해 화합물 1 내지 4의 활성으로 인한 FXa 억제효과를 확인하였다.

[0089] **실시예 7-1. FXa 억제 효과**

[0090] 화합물 1 내지 4의 응고 억제에 대한 메커니즘을 설명하기 위해, 트롬빈의 억제를 발색 기질을 이용하여 측정하였다. 이를 위해 7.5 mM EDTA와 150 mM NaCl를 함유하는 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)에 각 화합물을 용해하고, 37℃에서 2분간 반응한 후, 트롬빈 용액(150 ㎖, 10 U/㎖)을 더하고 다시 37℃에서 1분간 반응하였다. S-2222(FXa 기질, 150 ㎖, 1.5 mM) 용액을 바로 더해 분광광도계(spectrophotometer, TECAN, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 405 nm에서 20분간 흡광도를 확인하였다. 이 때, 흡광도-시간 커브(the absorbance-time curve)와 커브 경사(the slope of the curve)(V_i)는 효소와 활성이 존재하느냐를 대표하였다. 증류수가 대조군(the slope of curve V_0)으로 공급되었다. 저해 효과는 아래의 [반응식 1]을 통해 계산할 수 있다.

[0091] [반응식 1]

[0092] $\text{Inhibitory rate}(\%) = (V_0-V_i)/V_0 \times 100$

[0093] 이 때 억제 상수(K_i)는 각 화합물의 억제를 통해 결정되었다. Chromogenic substrate assay는 Labsystems IEMS (Cergy Pontoise, France) 마이크로 타이 터 플레이트 판독기를 사용하여 수행되었습니다. Ki 값은 Dixon의 방법에 따라 계산되었는데, 각각의 분석에서, 화합물은 억제 곡선을 얻기 위해 최소 7가지 농도로 2회 시험하였다.

[0094] 96-웰 마이크로 타이터 플레이트에서, 25 ㎕의 화합물, 억제제 용액 또는 완충액을 기질 50 ㎕에 첨가하여 혼합하였다. 이 플레이트를 37 ℃에서 1 시간 동안 둔 후, 마이크로 타이터 플레이트 판독기에 놓기 직전에 25 ㎕의 효소 용액을 첨가하였다.

[0095] 이 때의 반응기작에서, 기질의 가수 분해는 *p*-nitroaniline을 산출하며, 이는 연속적으로 405 ㎚에서 분광 광도계로 모니터링 되는데, 최대 초기 반응 속도를 계산하여 분당 밀리 펩타이드 밀도로 표현하였다. Curve fitting(Dixon plot of $1/V_{max}$ versus inhibitor concentration)을 선형 회귀 분석으로 수행하여 Ki 값을 계산하였다.

[0096] 화합물 1 내지 4에 대한 각 결과는 도 3A~D에 Michaelis-Menten plot과 Lineweaver-Burk plot으로 나타내었는데, 이 결과를 통해 화합물 1 내지 4는 농도 의존적으로 기질 S-2222에 대한 FXa의 촉매 활성을 억제하고 있음을 확인할 수 있고, 화합물 1 내지 4가 FXa의 아미돌리틱 활성(amidolytic activity)의 농도 의존적인 억제를 유도하는 것을 확인할 수 있다.

[0097] **실시예 7-2. HUVEC 표면에서 FXa의 생산 분석**

[0098] 96-웰 배양 플레이트에서 TNF-α(Abnova, Taipei, Taiwan)로 자극된(무혈청 배지에서 6시간 동안 10 ng/㎖) HUVEC의 융합 단층(10분 동안 각 화합물의 지시된 농도로 전배양된)을 항-TF IgG(25 ㎍/㎖)(Santa Cruz, CA,

USA)의 유/무 하에서 37℃에서 5분 동안 FVIIa(10 nM)를 포함하는 완충용액 B(5 mg/mℓ 소혈청 알부민[BSA] 및 5 mM $CaCl_2$가 보충된 완충용액 A[10 mM HEPES, pH 7.45, 150 mM NaCl, 4 mM KCl, 및 11 mM 글루코즈])에 반응시켰다. 이어서 최종 반응 혼합물 부피가 100 ㎕가 되도록 FX(175 nM)를 세포에 첨가하였고 이를 15분 동안 반응시켰다. 각 반응은 10 mM EDTA를 포함하는 완충용액 A를 첨가하여 정지시켰고 생성된 FXa의 양을 발색 기질을 이용하여 측정하였다. 405 nm에서의 흡광도의 변화를 마이크로플레이트 리더기(Tecan Austria GmbH, Grodig, Austria)를 이용하여 2분에 걸쳐서 모니터링하였다. 초기 발색 비율은 정제된 인간 FXa의 공지된 희석물로 제조된 표준 곡선을 이용하여 FXa 농도로 변환시켰다.

[0099] 그 결과, 화합물 1 내지 4가 FXa의 생산을 억제할 수 있는 것을 확인할 수 있으며, 이는 항-TF IgG를 처리한 결과와 일치한다(도 3E).

[0100] **<실시예 8. 분리된 화합물들의 동맥 혈전증 및 폐 혈전증 모델에서 생체내(*In Vivo*) 효과 확인>**

[0101] **실시예 8-1. 염화제이철($FeCl_3$)로 유도된 경동맥 혈전증 마우스 모델의 제조 및 분석**

[0102] 경동맥 혈전증 마우스 모델은 일반적으로 항혈소판 효과를 평가하기 위해 사용되어 왔다(Izuhara Y, et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008, 28(4), 672-677). 구체적으로, 염화제이철($FeCl_3$)로 유도된 혈전증 모델은 Izuhara Y 등에 의해 보고된 방법으로 수립하였다(Izuhara Y, et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008, 28(4), 672-677). 이를 위해 수컷 C57BL/6 마우스를 밤새 금식시킨 후 DMSO에 포함된 표시된 각 화합물을 정맥 주사에 의해 투여하였다. 그 다음에, 3% 이소플루란(Forane, Choongwae Pharma. Corp., Seoul, Korea)을 이용하여 마취시킨 후 0.1 mℓ의 0.1% 로다민 6G(Sigma)를 정맥으로 주사하였다. 고환 동맥(직경 200 μm)을 신중하게 노출시킨 후 0.25 mol/ℓ $FeCl_3$로 젖은 면사(직경 0.2 mm)를 외막 표면에 도포하였다. 5분 후, 면사를 제거한 후, 상처를 생리 식염수로 씻어내었다. 혈전 형성은 이전에 보고된 방법(Goto S, et al., J Am Coll Cardiol 2004, 44(2), 316-323)으로 3차원적 이미징으로 35℃에서 모니터링하였다. 혈전 형성의 크기 및 시간을 모니터링한 후, 결과는 다음과 같이 분류하였다: 혈전의 점수로서 혈전이 없는 것은 0; 작은 혈전(50 μm × 75 μm)은 1; 중간 크기의 혈전(100 μm × 150 μm)은 2; 큰 혈전(200 μm × 300 μm)은 3으로 표시하였는데, $FeCl_3$ 매개 내피 손상으로부터 큰 혈전에 의한 고환 동맥의 폐색까지의 시간을 측정하였다. 이 때, 혈전 형성 시간은 도 4A, 생성된 혈전의 크기는 도 4B에 나타내었다.

[0103] 그 결과, 대조군 마우스에서 $FeCl_3$ 처리 후 내피 손상을 보였고, 9.2±0.7 분에서 큰 혈전의 성장을 야기하였으며, 항혈소판 GP IIb/IIIa 억제제인 티로피반(tirofiban:Tiro)은 59.3±5.3 분까지 큰 혈전의 성장을 둔화시키는 것으로 확인되며, 화합물 1 내지 4도 혈전 생성 시간을 지연시키는 효과가 있음을 알 수 있다(도 4A). 또한 $FeCl_3$로 인해 유도된 내피 손상으로 인한 혈전 크기를 $FeCl_3$ 처리 60분 후에 측정한 바, 화합물 1 내지 4가 혈전 형성을 농도 의존적으로 감소시킴을 확인할 수 있다(도 4B).

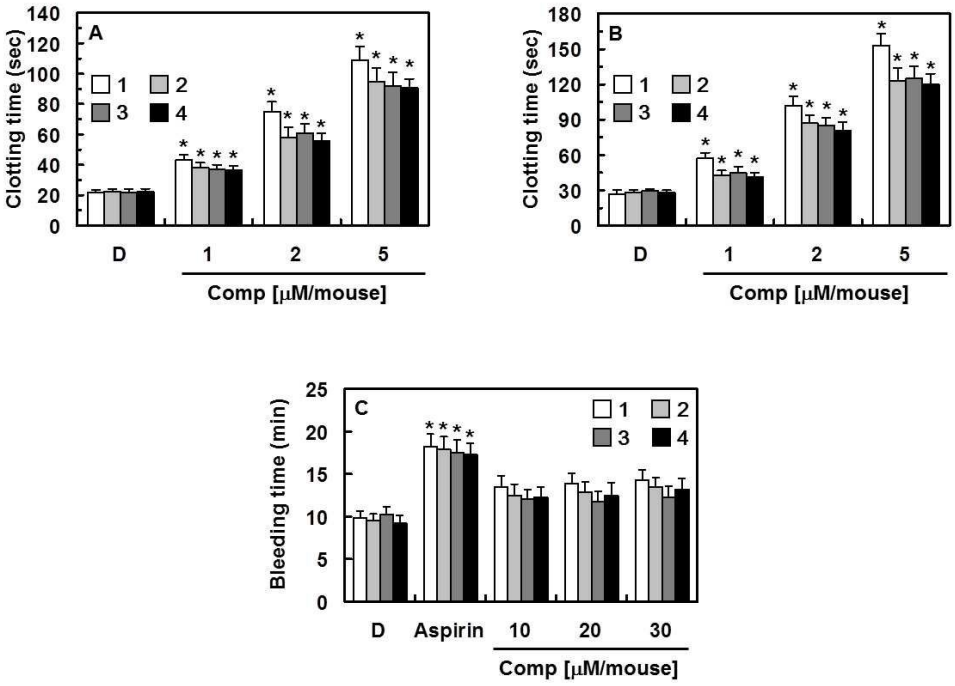
[0104] **실시예 8-2. 콜라겐 및 에피네프린의 조합에 의해 유도되는 급성 혈전증 마우스 모델의 제조 및 분석**

[0105] 수컷 C57BL/6 마우스를 밤새 금식시킨 후 20마리씩의 그룹으로 분류하였다. DMSO(D)에 현탁된 각 화합물을 정맥으로 마우스에 투여하였다. 에피네프린(50 ㎍/kg)에 콜라겐(500 ㎍/kg)을 더한 혼합물을 마우스의 꼬리 정맥에 주사하여 6시간 후에 급성 혈전증을 유도하였다. 각 마우스를 마우스가 마비되거나 죽거나 또는 급성 혈전 작용으로부터 회복되는지를 결정하기 위해 15분 동안 주의 깊게 관찰하였다. 통계 분석을 위해, 5개의 분리된 실험을 수행하였고 결과는 도 4C에 나타내었다.

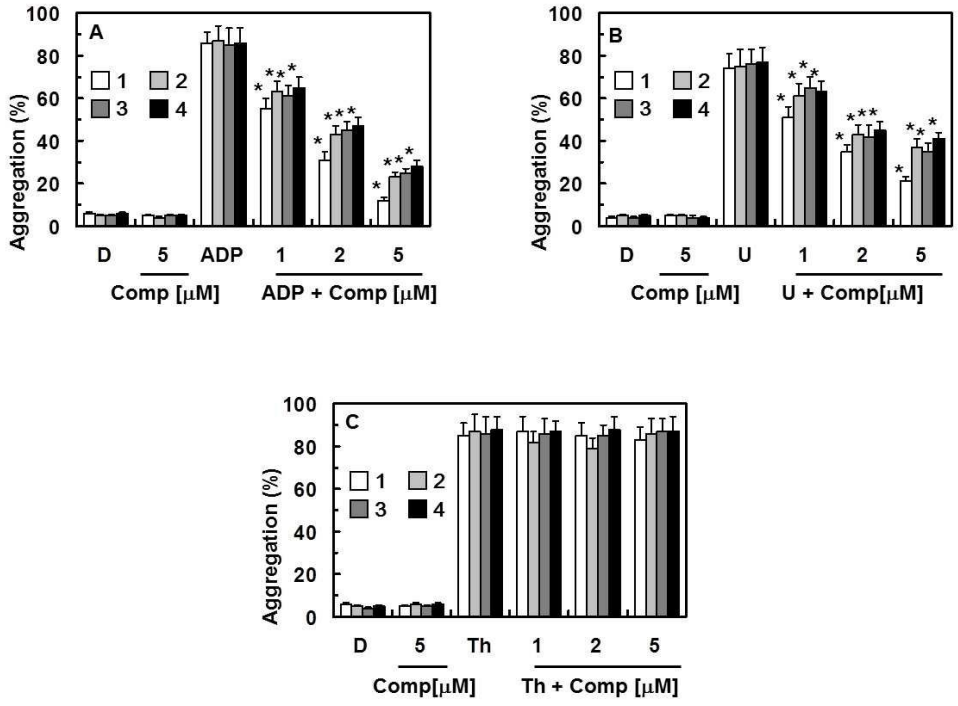
[0106] 도 4C를 참고하면, 급성 마비를 야기하는 거대한 폐 혈전증이 유발된 마우스에 콜라겐 및 에피네프린의 혼합물의 정맥 주사는 궁극적으로 갑작스런 사망(95%의 사망률)을 야기하는 것으로 확인되지만, 콜라겐(C) 및 에피네프린(E)과 함께 화합물 1 내지 4가 함께 처리된 군의 사망률은 콜라겐(C) 및 에피네프린(E)만을 처리한 군에 비해 농도 의존적으로 감소됨을 알 수 있다.

도면

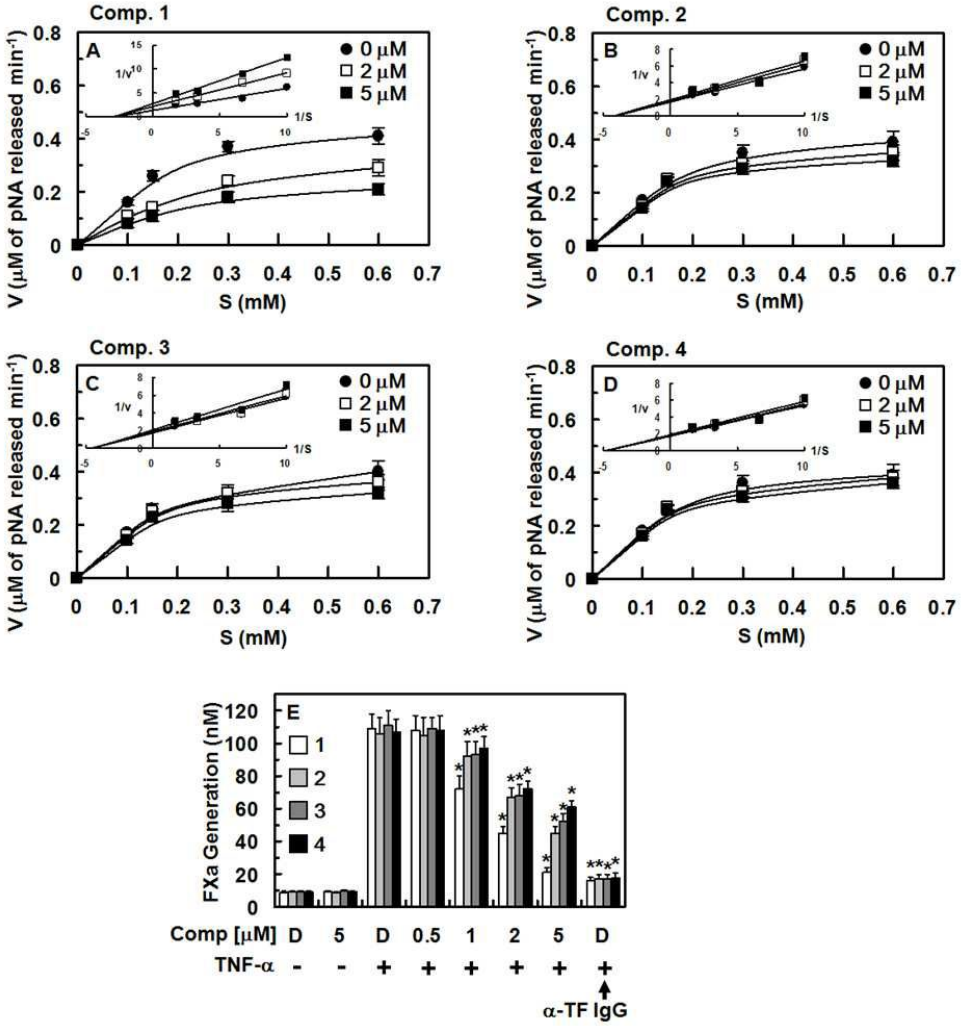
도면1


A
Clotting time (sec)
140
120
100
80
60
40
20
0
1
2
3
4
D
1
2
5
Comp [μM/mouse]
B
Clotting time (sec)
180
150
120
90
60
30
0
1
2
3
4
D
1
2
5
Comp [μM/mouse]
C
Bleeding time (min)
25
20
15
10
5
0
1
2
3
4
D
Aspirin
10
20
30
Comp [μM/mouse]

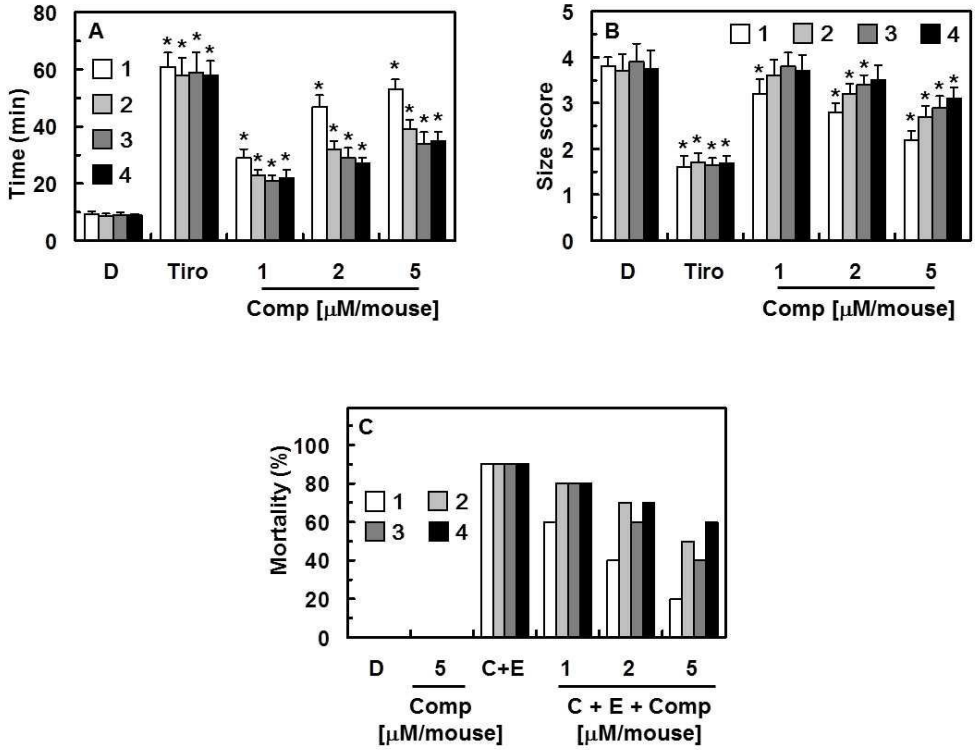
도면2


A
Aggregation (%)
100
80
60
40
20
0
1
2
3
4
D
5
ADP
1
2
5
Comp [μM]
ADP + Comp [μM]
B
Aggregation (%)
100
80
60
40
20
0
1
2
3
4
D
5
U
1
2
5
Comp [μM]
U + Comp[μM]
C
Aggregation (%)
100
80
60
40
20
0
1
2
3
4
D
5
Th
1
2
5
Comp[μM]
Th + Comp [μM]

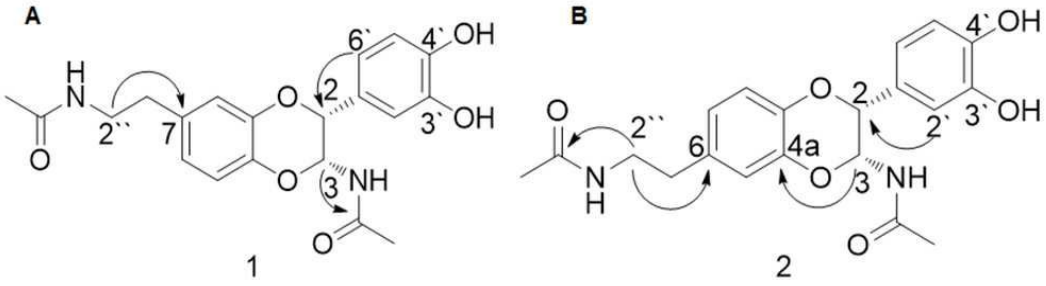
도면3


Comp. 1
A
0 μM
2 μM
5 μM
V (μM of pNA released min-1)
S (mM)
Comp. 2
B
Comp. 3
C
Comp. 4
D
E
FXa Generation (nM)
1
2
3
4
Comp [μM] D 5 D 0.5 1 2 5 D
TNF-α - - + + + + + +
α-TF IgG

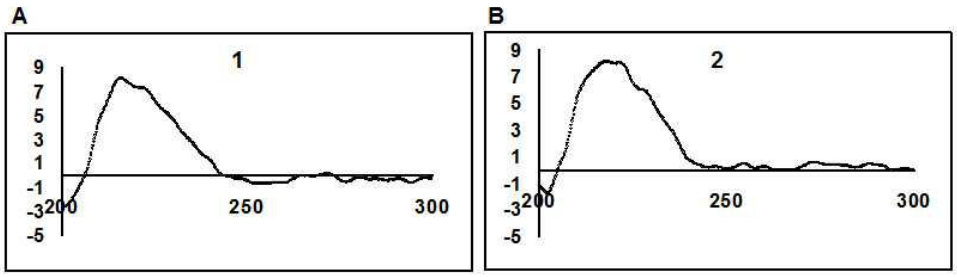
도면4


A
Time (min)
80
60
40
20
0
1
2
3
4
D
Tiro
1
2
5
Comp [μM/mouse]
B
Size score
5
4
3
2
1
0
C
Mortality (%)
100
80
60
40
20
C+E
Comp [μM/mouse]
C + E + Comp [μM/mouse]

도면5


A
B
1
2
OH
NH

도면6


A
B
1
2
200
250
300