



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0081610
(43) 공개일자 2017년07월12일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/404 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 31/4025 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 31/404 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-0083049(분할)</p> <p>(22) 출원일자 2017년06월30일
심사청구일자 2017년06월30일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2015-0063030
원출원일자 2015년05월06일
심사청구일자 2015년05월06일</p> | <p>(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
명창선
대전광역시 유성구 대학로 59 상그릴라플러스빌 1212
김영호
대전광역시 유성구 봉명로 48, 801동 302호(신한인스빌)
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
특허법인 공간</p> |
|--|--|

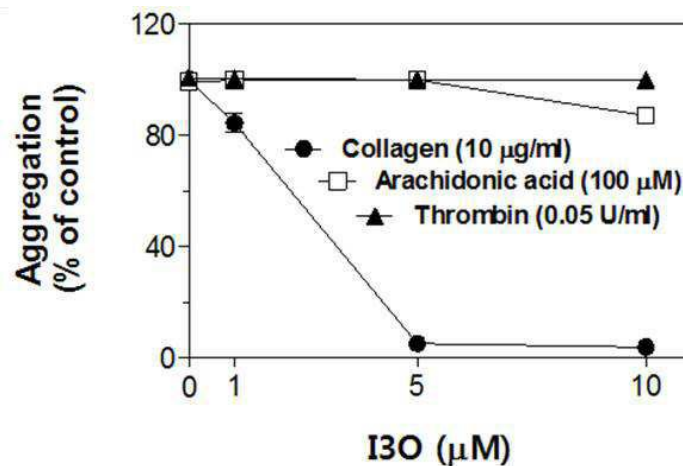
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 인디루빈-3'-모노심을 포함하는 항혈전용 조성물

(57) 요약

본 발명은 인디루빈-3'-모노심을 포함하는 항혈전용 조성물 및 혈전성 혈관재협착증 또는 혈전성 동맥경화증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 또한, 상기 인디루빈-3'-모노심은 혈소판 응집을 저해하는 효과가 우수하여 항혈전용 조성물이나 혈전성 혈관재협착증 또는 혈전성 동맥경화증의 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 31/4025 (2013.01)

(72) 발명자

장태수

경기도 수원시 영통구 도청로 65, 5411동 3303호(
이의동, 자연엔 힐스테이트)

이정진

충청남도 천안시 서북구 백석3로 91, 201동 1502
호(백석동, 백석그린빌2차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A2A01007664

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 혈관평활근세포의 apoptosis 표적인자(CIAPIN1)에 의한 이상증식억제 및 분자적 기전 연구

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

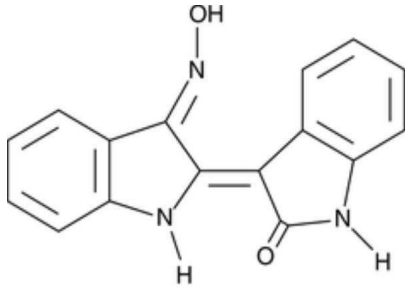
연구기간 2015.05.01 ~ 2018.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학구조를 갖는 인디루빈-3'-모노심(indirubin-3'-monoxime)을 포함하는 항혈전용 조성물.



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 인디루빈-3'-모노심은 혈소판 응집을 저해하는 것을 특징으로 하는 항혈전용 조성물.

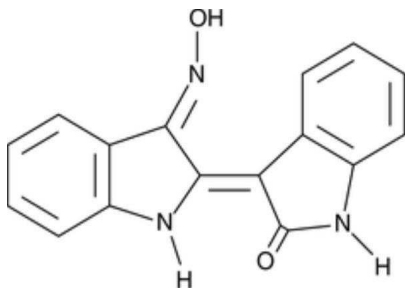
청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가하여 약제학적 투여형으로 제형화되는 것을 특징으로 하는 항혈전용 조성물.

청구항 4

하기 화학구조를 갖는 인디루빈-3'-모노심(indirubin-3'-monoxime)을 포함하는 항혈전용 건강기능식품.



청구항 5

제4항에 있어서,

상기 인디루빈-3'-모노심은 혈소판 응집을 저해하는 것을 특징으로 하는 항혈전용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

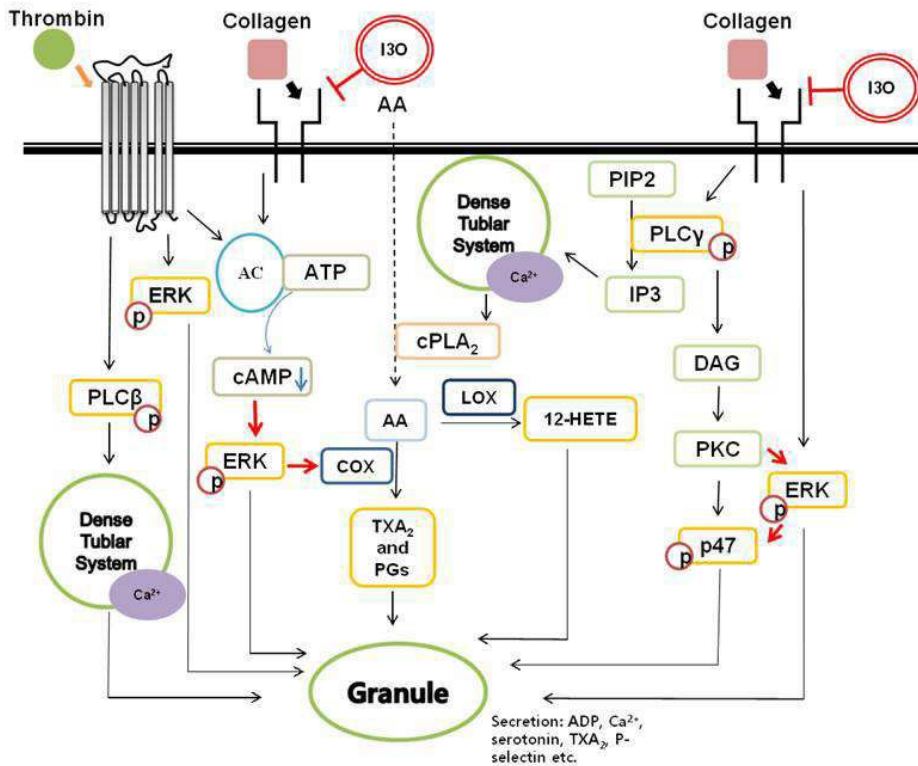
[0001] 본 발명은 인디루빈-3'-모노심을 포함하는 항혈전용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 혈액을 구성하는 혈장 및 혈구세포(혈소판)는 혈액 활동에 주로 관여하며, 이들은 혈류의 항상성을 유지하고 혈

관의 손상된 부위나 염증 부위에서 지혈과 보호를 통해 인체의 정상적인 기능을 유지시킨다. 그러나 여러 가지 원인에 의해 혈관벽이 과도하게 손상을 받는 경우, 혈소판은 콜라겐(collagen), 아라키돈산(arachidonic acid) 및 ADP(adenosine diphosphate) 등과 같은 자극에 의해 활성화되어 점착(adhesion), 방출(secretion) 및 응집(aggregation) 반응을 일으킨다. 상기 반응들은 지혈(haemostasis)에 관련되어 있으며, 혈전증(thrombosis) 등을 포함하는 순환계 질환의 발병에도 중요한 역할을 한다. 지혈은 원래의 형태가 파괴된 혈관으로부터 출혈을 막기 위한 기전으로 혈소판의 활성화 과정, 혈소판과 혈관성분과의 부착, 그에 수반된 혈액응고인자들의 복잡한 상호작용(하기 참고도 1 참고)을 거쳐 이루어지며 손상된 혈관을 복원하고 남은 혈관은 섬유소 분해 과정을 거쳐 제거된다(Harlan, J. M. et al., 1981).

[참고도 1]



그러나 혈소판 활성화에 의해 생긴 응집물이 혈류에 의해 떨어져 나가면 혈전이 되어 혈류를 따라 흐르다 미세 혈관을 막아 심근경색, 허혈 등의 혈행장애를 유발한다. 또한, 이 외에도, 혈전의 생성은 동맥경화, 심장질환 및 뇌졸중 등의 질환을 일으킬 수 있기 때문에, 최근에는 이러한 질환의 예방 및 치료를 위하여 항혈소판 응집 또는 항응고 활성이 우수한 치료제에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 혈소판 응집의 저해 활성을 갖는 항혈소판 물질들은 혈전증상의 재발방지 및 다양한 혈전관련 질환의 예방 및 치료에 있어 응용 가치가 크며, 현재 까지 사용되어지고 있는 항혈소판 약물로는 데오피린(theopylline), 몰시도민(molsidomin), 베라파밀(verapamil), 니페디핀(nifedipine) 등이 있다. 이들은 cAMP와 cGMP의 생성을 촉진하여 Ca^{2+} 의 동원을 억제하는 것으로 알려져 있다. 또한, 아스피린(aspirin), 이미다졸(imidazole), 인도메타신(indometacin) 등의 비스테로이드계 화합물들은 트롬복산 A_2 의 생성을 저해함으로써 항혈소판 작용을 가지는 약물들로 알려져 있다. 그러나 상기 약물들은 인체에 지혈 과다 억제, 불임, 소화기 장애, 혈전에 대한 선택성이 낮고 장기간 사용 시 체내에서 출혈을 일으키는 등의 여러 부작용을 나타내어 새로운 항혈소판 물질의 개발이 요구되어지고 있는 실정이다.

인디루빈은 인디고와 화학적 구조가 매우 유사한 적색을 나타내는 인디고이드 화합물이며, 일반적으로 쪽(polygonum tinctorium), 대청(isatis tinctoria) 등을 이용하여 청색염료인 인디고를 생산하는 과정에서 부산물로써 소량 만들어진다.

전통적으로는 한약인 당귀 룡휘 완(Danggui Longhui Wan)의 유효성분으로써 백혈병(Hoessel, R. et al., 1999; Zhen, Y. et al., 2007)에 대한 중국 한방 약초로 사용되어져 왔다. 또한, 최근에는 세포주기(cell cycle) 저해제로써 만성백혈병 치료제나 알츠하이머와 같은 퇴행성 신경질환 치료제 등의 약물로도 사용되고 있다(Suzuki, K. et al., 2005; Hoessel, R. et al., 1999).

[0008] 인디루빈은 그 모핵을 중심으로 인디루빈 옥심 유도체, 인디루빈 하이드라존 유도체, 인디루빈 N-아세틸 유도체, 인디루빈 아민 유도체 등 여러 유도체를 형성할 수 있다. 인디루빈의 유도체의 경우 항암활성(한국등록 특허 제588803호)에 대한 선행문헌이 개시되어 있으며, 특히 인디루빈-3'-모노심은 인디루빈보다 수용성이 더 높으며 CDKs(cyclin dependent kinases)의 저해(Hoessel, R. et al., 1999; Meijer, L. et al., 2003; Polychronopoulos, P. et al., 2004; Ferandin, Y. et al., 2006; Kameswaran, T. R. et al., 2009), 항염(Polychronopoulos, P. et al., 2004), 항암활성(Kim, J. K. et al., 2011; Ravichandran, K. et al., 2010; Perabo, F. G. et al., 2011), 혈관평활근세포의 증식 억제(Schwaiberger, A. V. et al., 2010), 간 기능 보호 작용(Varela, A. T. et al., 2010) 등의 다양한 약리학적 활성을 나타내는 것으로도 알려져 있으나, 현재까지 인디루빈-3'-모노심을 항혈전용 조성물이나 혈전성 혈관재협착증 또는 혈전성 동맥경화증의 치료제로 적용할 수 있음에 대해서는 보고되어 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제588803호, 암세포주에 항암활성을 지닌 인디루빈 유도체, 2006년 06월 05일, 등록.

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) Cuong, N. M. et al., Studies on the acetylation and NMR reassignment of indirubin derivatives, Nat. Prod. Res., 24(2), 99-105, 2010.

(비특허문헌 0002) Ferandin, Y. et al., 3'-Substituted 7-halogenoindirubins, a new class of cell death inducing agents, J. Med. Chem., 49(15), 4638-4649, 2006.

(비특허문헌 0003) Harlan, J. M. et al., Hemostasis, thrombosis, and thromboembolic disorders. The role of arachidonic acid metabolites in platelet-vessel wall interactions, Med. Clin. North. Am., 65(4), 855-880, 1981.

(비특허문헌 0004) Hoessel, R. et al., Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases, Nat. Cell Biol., 1(1), 60-67, 1999.

(비특허문헌 0005) Kameswaran, T. R. et al., Indirubin-3-monooxime induced cell cycle arrest and apoptosis in Hep-2 human laryngeal carcinoma cells, Biomed. Pharmacother., 63(2), 146-154, 2009.

(비특허문헌 0006) Kim, J. K. et al., Indirubin-3'-monooxime, a derivative of a chinese antileukemia medicine, inhibits angiogenesis, J. Cell. Biochem., 112(5), 1384-1391, 2011.

(비특허문헌 0007) Lee, J. J. et al., Antithrombotic and antiplatelet activities of fenofibrate, a lipid-lowering drug, Atherosclerosis, 206(2), 375-382, 2009.

(비특허문헌 0008) Meijer, L. et al., GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins, Chem. Biol., 10(12), 1255-1266, 2003.

(비특허문헌 0009) Perabo, F. G. et al., Antiproliferative and apoptosis inducing effects of indirubin-3'-monooxime in renal cell cancer cells, Urol. Oncol., 29(6), 815-820, 2011.

(비특허문헌 0010) Polychronopoulos, P. et al., Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases, J. Med. Chem., 47(4), 935-946, 2004.

(비특허문헌 0011) Ravichandran, K. et al., Effect of indirubin-3-monooxime against lung cancer as evaluated by histological and transmission electron microscopic studies, Microsc. Res. Tech., 73(11), 1053-1058, 2010.

(비특허문헌 0012) Schwaiberger, A. V. et al., Indirubin-3'-monooxime blocks vascular smooth muscle

cell proliferation by inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 signaling and reduces neointima formation in vivo, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 30(12), 2475-2481, 2010.

(비특허문헌 0013) Suzuki, K. et al., Indirubin, a Chinese anti-leukaemia drug, promotes neutrophilic differentiation of human myelocytic leukaemia HL-60 cells, Br. J. Haematol., 130(5), 681-690, 2005.

(비특허문헌 0014) Varela, A. T. et al., Indirubin-3'-oxime prevents hepatic I/R damage by inhibiting GSK-3 β and mitochondrial permeability transition, Mitochondrion, 10(5), 456-463, 2010.

(비특허문헌 0015) Zhen, Y. et al., Indirubin-3'-monoxime inhibits autophosphorylation of FGFR1 and stimulates ERK1/2 activity via p38 MAPK, Oncogene, 26(44), 6372-6385, 2007.

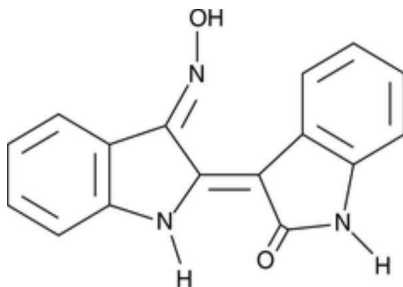
발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 인디루빈-3'-모노심을 포함하는 항혈전용 조성물 및 혈전성 혈관재협착증 또는 혈전성 동맥경화증의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다. 보다 더 자세하게는, 상기 인디루빈-3'-모노심이 혈소판 응집을 저해하는 효과가 우수한 것을 특징으로 하는 항혈전용 조성물이나 혈전성 혈관재협착증 또는 혈전성 동맥경화증의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 하기 화학구조를 갖는 인디루빈-3'-모노심(indirubin-3'-monoxime)을 포함하는 항혈전용 조성물에 관한 것이다.



- [0013]
- [0014] 상기 인디루빈-3'-모노심은 혈소판 응집을 저해하는 것을 특징으로 한다.
- [0015] 상기 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가하여 약제학적 투여형으로 제형화되는 것을 특징으로 한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 화학구조를 갖는 인디루빈-3'-모노심(indirubin-3'-monoxime)을 포함하는 혈전성 혈관재협착증 또는 혈전성 동맥경화증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0017] 또 다른 일면에 있어서, 본 발명은 상기 화학구조를 갖는 인디루빈-3'-모노심(indirubin-3'-monoxime)을 포함하는 항혈전용 건강기능식품에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명은 또한, 상기 화학구조를 갖는 인디루빈-3'-모노심(indirubin-3'-monoxime)을 포함하는 혈전성 혈관재협착증 또는 혈전성 동맥경화증의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.
- [0019] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0020] 본 발명은 상기 화학구조를 갖는 인디루빈-3'-모노심을 포함하는 항혈전용 조성물 및 혈전성 혈관재협착증 또는 혈전성 동맥경화증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 인디루빈-3'-모노심은 혈소판의 응집을 저해하는 효과를 지니며 바람직하게는 콜라겐성 신호 전달에 선택적으로 작용하여 혈소판의 응집을 저해하는 것을 특징으로 한다.
- [0021] 한편, 본 발명의 인디루빈-3'-모노심은 당해 기술 분야에서 통상적인 방법에 따라 합성될 수 있으며, 약학적으로 허용 가능한 염으로 제조될 수도 있다.

[0022] 또한, 상기 인디루빈-3'-모노심을 포함하는 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토스, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이이트, 칼슘 실리케이이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 인디루빈-3'-모노심에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0023] 본 발명의 인디루빈-3'-모노심을 포함하는 약학 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 인디루빈-3'-모노심을 포함하는 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 인디루빈-3'-모노심 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 건강기능식품을 제공한다. 상기 인디루빈-3'-모노심은 본 발명의 건강기능식품에 0.001~100 중량%로 하여 첨가될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 인디루빈-3'-모노심을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제 등이 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명은 인디루빈-3'-모노심을 포함하는 항혈전용 조성물 및 혈전성 혈관재협착증 또는 혈전성 동맥경화증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 또한, 상기 인디루빈-3'-모노심은 혈소판 응집을 저해하는 효과가 우수하여 항혈전용 조성물이나 혈전성 혈관재협착증 또는 혈전성 동맥경화증의 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 본 발명의 인디루빈-3'-모노심이 동맥혈전의 형성을 지연시키는 효과가 있음을 나타내는 폐색 시간의 측정 결과이다.

도 2는 본 발명의 인디루빈-3'-모노심이 혈소판의 응집을 저해하나(도 2A) 혈액 응고에는 영향을 미치지 않음(도 2B)을 나타내는 결과이다.

도 3은 본 발명의 인디루빈-3'-모노심이 콜라겐 조건에서 혈소판의 응집을 저해시키는 효과를 나타내는 결과이다.

도 4는 본 발명의 인디루빈-3'-모노심이 혈소판 표면 마커인 p-셀렉틴의 발현을 저해시키는 효과가 있음을 나타내는 결과이다.

도 5는 본 발명의 인디루빈-3'-모노심이 콜라겐(도 5A) 및 아라키돈산(도 5B) 조건에서 트롬복산 B₂의 형성에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

도 6은 본 발명의 인디루빈-3'-모노심(도 6A) 및 디아실글리세롤(도 6B)의 형성을 저해시키는 효과가 있음을 나타내는 결과이다.

도 7은 본 발명의 인디루빈-3'-모노심(도 7A)이 GPVI 발현을 저해시키는 효과가 있음을 확인하는 형광 현미경(도 7A) 및 유세포분석기(도 7B) 측정 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 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 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.
- [0029] <실시예 1. 인디루빈-3'-모노심의 합성>
- [0030] 인디루빈-3'-모노심(indirubin-3'-monoxime)은 [Cuong, N. M. et al., 2010]에 개시된 방법을 이용하여 합성하였다.
- [0031] 인디루빈이 풍부한 판람(*Strobilanthes cusia*) 잎 5kg을 실온에서 48~72시간 동안 120~150 ℓ의 물에 넣어 둔 후, 포대(cloth bag)로 여과하였다. 이후, 96°의 에탄올로 용해된 이사틴(isatin)을 더하고, NaOH로 pH 8.5~10.5가 되게 알칼리화(alkalized)한 뒤, 15~20분 동안 교반하였다. 상기 혼합물을 여과하여 인디루빈이 풍부한 크루드(crude) 상태의 분말을 얻었고, 에탄올로 용해한 NH₂OH(pH 10~12)를 넣어 90~120분 동안 80℃에서 교반하였다. 이후, 흡인여과기(buchner funnel)로 고온 여과를 3회 반복하였으며 다공성여과기(porous funnel, 3~5cm thick layer of silica gel)로 100~200mmHg의 압력 하에서 다시 여과하였다. 모든 여과물은 모아서 HCl로 pH 5.0~6.0이 되게 교반하면서 산성화 하였다.
- [0032] 상기 용액의 압력을 줄이면서 제거하였으며, 정제수로 희석 및 실온에서 1~2시간 방치하여 농축하였다. 이후, 여과 및 5~10%[v/v]의 에탄올로 세척하고 건조하여 크루드한 인디루빈-3'-모노심을 얻었으며, 0.5M의 NaOH로 용해하여 에틸아세테이트로 2~3회 반복 추출하였다. 상기 추출액을 정제수로 세척하고 Na₂SO₄를 더하여 오버나이트(overnight) 동안 40~45℃에서 감압농축하여 인디루빈-3'-모노심 분말을 얻었다. 상기 인디루빈-3'-모노심 분말은 85~96° 에탄올에 용해한 뒤, 수조(water tank)에 부어 1~2시간 30분 동안 교반하였다. 이후, 정제수로 여과 및 세척하고, 50℃에서 오버나이트로 건조하여 고순도의(>97%, by HPLC) 인디루빈-3'-모노심(I30)을 얻었다.
- [0033] <실시예 2. 인디루빈-3'-모노심의 물리화학적 구조 확인>
- [0034] 3-[1,3-dihydro-3-(hydroxyimino)-2H-indol-2-ylidene]-1,3-dihydro-2H-indol-2-one;
- [0035] m.p. : 145~146℃;
- [0036] C₁₆H₁₁N₃O₂ (M = 277g/mol) with >97% purity;
- [0037] ESI-MS *m/z* : 278 [M+H]⁺, 276 [M-H]⁻;
- [0038] ¹H-NMR (DMSO, 500 MHz), δ (ppm) : 13.46 (1H, s, N-OH); 11.73 (1H, s, H-1'); 10.70 (1H, s, H-1); 8.66 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-4); 8.24 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-4'); 7.40 (1H, m, H-6'); 7.40 (1H, m, H-7'); 7.13 (1H, dt, *J* = 1.0, 7.5 Hz, H-6); 7.03 (m, H-5'); 6.95 (1H, dt, *J* = 1.0, 7.5 Hz, H-5); 6.90 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-7);
- [0039] ¹³C-NMR (DMSO, 125 MHz), δ (ppm) : 170.9 (s, C-2); 151.3 (s, C-3'); 145.2 (s, C-2'); 144.8 (s, C-7'a); 138.3 (s, C-7a); 131.9 (d, C-6'); 127.9 (d, C-4'); 125.9 (d, C-6); 122.9 (d, C-4); 122.6 (s, C-3a); 121.4 (d, C-5'); 120.3 (d, C-5); 116.5 (C-3'a); 111.5 (d, C-7'); 108.8 (d, C-7); 98.9 (s, C-3).
- [0040] <실시예 3. 인디루빈-3'-모노심의 항혈소판 활성 확인>
- [0041] 본 발명의 실시예 1에서 분리한 인디루빈-3'-모노심이 혈소판에 미치는 영향을 확인하기 위해, [Lee, J. J. et al., 2009]에 개시된 방법을 이용하였다.
- [0042] 실시예 3-1. 동맥혈전 형성의 저해 효과 확인 - in vivo
- [0043] 본 발명의 인디루빈-3'-모노심이 동맥혈전 형성에 미치는 영향을 확인하기 위해, SD-랫드 수컷(Male Sprague

Dawley-rats, $n=7$, 250-300g, Sam-Tako Animal Co., Korea)에 실시예 1의 인디루빈-3'-모노심(130) 또는 양성 대조군인 아스피린(ASA, aspirin, Sigma Chemical Co., USA)을 20mg/kg/day로 3일 동안 경구 투여 하고, 펜토 바르비탈(pentobarbital) 50mg/kg으로 복강내주사를 통해 마취시켰다. 이후, 우측 경동맥(right carotid artery) 부분(segment)을 미주신경(vagus nerve)과 주변 조직이 없게 추출 및 절개하였고, 대동맥혈류는 혈류량 계(blood flowmeter, AD Instruments, Colorado Springs, USA)로 측정하였다. 동맥혈전의 형성은 프로브(probe) 근처 경동맥에서 50%[w/v] FeCl_3 로 포화된 필터 페이퍼(2-mm^2 Whatman no.1)로 래핑(wrapping)하여 10 분 동안 처리함으로써 산화적 혈관 손상을 유도하였다. 이후, 여과지를 제거하여 혈류량의 측정을 통해 폐색까지 발생하는 시간을 60분으로 여기고, 60분 동안 폐색 시간을 측정하여 도 1에 나타내었다.

[0044] 도 1을 참고하면, 인디루빈-3'-모노심이 혈액 내 혈소판의 응집을 저해하는 아스피린과 유사한 폐색 시간(occlusion time)을 나타내어, 동맥혈전의 형성을 지연시키는 효과를 확인 할 수 있었다.

[0045] 실시예 3-2. 혈소판 응집 및 혈액 응고 시간의 측정 - ex vivo

[0046] 먼저, ex vivo 시스템에서의 혈소판 응집을 측정하기 위해, SD-랫드 수컷에 실시예 1의 인디루빈-3'-모노심 또는 양성대조군인 아스피린을 20mg/kg/day로 3일 동안 경구 투여 하였다. 또한, 마지막 경구 투여 후 90분 쯤의 혈액을 채취하여 10분 동안 $180\times g$ 로 원심분리하여 PRP(platelet rich plasma)를 얻었고, 상기 PRP를 10분 동안 $2,100\times g$ 로 원심분리하여 PPP(platelet poor plasma)를 얻었다. 이때, 상기 PRP는 PPP로 4×10^8 혈소판/ml이 되게 조절하여 사용하였다. 이후, $10\mu g/ml$ 의 콜라겐(collagen, Chrono-Log Co., USA) 또는 $10\mu M$ 의 ADP(adenosine diphosphate, Chrono-Log Co., USA)로 혈소판 응집을 유도하였으며, 이는 혈소판 응집기(aggregometer, Chrono-Log Co., USA)로 측정하여 도 2A에 나타내었다.

[0047] 또한, ex vivo 시스템에서의 혈액 응고 시간을 측정하기 위해, APTT(activated partial thromboplastin time)와 PT(prothrombin time)를 실시하였다. 상기 PRP로부터 얻어진 PPP를 $37^\circ C$ 에서 7분 동안 반응한 뒤 $100\mu l$ 를 취하여 세팔린(cephalin, Instrumentation Laboratory Co., Italy) $50\mu l$ 와 혼합하였다. 이후 CaCl_2 이 첨가된 $100\mu l$ 트롬보플라스틴(thromboplastin, Instrumentation Laboratory Co., Italy) 또는 $100\mu l$ 의 폴리브렌(polybrene, Instrumentation Laboratory, Milano, Italy)을 더하여 혈액 응고를 유도하고, APTT 또는 PT 어세이를 각각 실시한 뒤 Automated Coagulation Laboratory 100 Instrument(Instrumentation Laboratory, Milano, Italy)로 측정하여 도 2B에 나타내었다.

[0048] 도 2를 참고하면, 본 발명의 인디루빈-3'-모노심은 혈소판 응집을 유도하는 ADP나 콜라겐의 첨가 시 혈소판의 응집은 저해시키지만, 혈액 응고 시간을 측정하는 APTT 또는 PT 어세이 결과 혈액 응고 시스템에는 영향을 미치지 않아 혈소판의 응집만 선택적으로 저해시킴을 확인 수 있다.

[0049] 실시예 3-3. 혈소판 응집 측정 - in vitro

[0050] In vitro 시스템에서의 혈소판 응집을 측정하기 위해, 뉴질랜드 흰 토끼(male New Zealand white rabbits, 2.5-3kg, Sam-Tako Animal Co., Korea)의 귀 동맥으로부터 혈액을 채취하였으며, 채취 직후 항응고 용액(0.8%[w/v] 구연산, 2.2%[w/v] 시트르산삼나트륨 및 2%[w/v] 텍스트로오스)에 넣었다. 상기 반응물을 10분 동안 $230\times g$ 로 원심분리하여 PRP를 얻었으며, PRP를 다시 15분 동안 $800\times g$ 로 원심분리한 뒤, 0.35%[w/v] BSA(bovine serum albumin)와 0.4mM EGTA(ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-tetraacetic acid)가 포함된 HEPES 버퍼(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid buffer: 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 1mM MgCl_2 , 5.6mM glucose, 3.8mM HEPES, pH 6.5)로 세척하여 혈소판을 분리하였다. 세척된 혈소판은 HEPES 버퍼(pH 7.35)로 재부유하고, 4×10^8 세포/ml이 되게 조절하여 $37^\circ C$ 의 혈소판 응집기에서 1,000rpm으로 교반하면서(stirring) 본 발명 실시예 1의 인디루빈-3'-모노심을 각 농도별(0, 5, $10\mu M$)로 더하였다. 3분 후, $10\mu g/ml$ 의 콜라겐이나 $100\mu M$ 의 아라키돈산(arachidonic acid, AA, Chrono-Log Co., USA) 또는 $0.05U/ml$ 의 트롬빈(thrombin, Chrono-Log Co., USA)을 첨가하여 혈소판 응집을 유도하고, 이에 대한 결과를 도 3에 나타내었다.

[0051] 도 3을 참고하면, 혈소판의 응집을 유도하는 아라키돈산이나 콜라겐의 첨가 시 본 발명의 인디루빈-3'-모노심은 선택적으로 콜라겐 조건에서만 혈소판의 응집을 농도 의존적으로 강하게 저해하는 효과를 나타냄을 확인할 수 있다.

[0052] 실시예 3-4. 혈소판 표면 마커 측정

[0053] 본 발명의 인디루빈-3'-모노심이 혈소판의 응집 시에 발현되는 혈소판 표면 마커인 p-셀렉틴(p-selectin)에 미

치는 영향을 확인하기 위해, 유세포분석기(flow cytometry) 방법을 사용하였다.

[0054] 먼저, 상기 실시예 3-2의 PRP는 본 발명 실시예 1의 인디루빈-3'-모노심과 함께 3분 동안 처리한 뒤, 10 μ g/ml의 콜라겐을 더하였다. 상기 처리된 PRP를 포름알데히드로 고정하고, FITC 랫드 항마우스 CD62P(FITC rat antimouse CD62P, Becton, Dickinson and Co., USA)로 염색한 뒤, FACSCalibur(Becton, Dickinson and Co., USA)로 p-셀렉틴을 측정하여 도 4에 나타내었다.

[0055] 도 4를 참고하면, 본 발명의 인디루빈-3'-모노심은 혈소판의 응집을 유도하는 콜라겐의 첨가 시, p-셀렉틴의 발현을 농도 의존적으로 저해하는 결과를 나타내어 혈소판 응집을 저해하는 효과가 우수함을 확인할 수 있다.

[0056] **실시예 3-5. 트롬복산 B₂ 형성의 저해 효과 확인**

[0057] 혈소판 응집 시 생성되는 트롬복산 A₂의 최종 대사산물인 트롬복산 B₂ 형성을 확인하기 위해, 먼저 인디루빈-3'-모노심(5 μ M 또는 10 μ M) 또는 양성대조군인 아스피린(100 μ M 또는 200 μ M)이 포함된 실시예 3-3의 세척된 혈소판을 3분간 처리 하였다. 상기 처리물에 10 μ g/ml의 콜라겐 또는 100 μ M의 아라키돈산을 첨가하고, 0.1M KCl 및 5mM의 인도메타신(indomethacin)이 포함된 2mM의 EGTA를 혼합한 뒤, ELISA 키트(enzyme-linked immunosorbent assay kit, Enzo life sciences, Inc.,)로 트롬복산 B₂의 수치를 측정하여 도 5A 및 5B에 나타내었다.

[0058] 도 5를 참고하면, 실시예 3-3의 결과와 동일하게, 본 발명의 인디루빈-3'-모노심이 콜라겐 조건에서는 트롬복산 B₂의 형성을 강하게 저해하나, 아라키돈산 조건에서는 아스피린과 달리 트롬복산 B₂ 형성에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 인디루빈-3'-모노심이 혈소판 활성화에 있어 선택적으로 콜라겐성 신호 전달(collagen-mediated signal transduction)에만 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. 또한, 콜라겐으로 활성화된 혈소판의 기전 중 아라키돈산 생성 단계를 기준으로, 하위기전 보다는 상위기전의 억제를 통해서 혈소판의 활성화를 억제한다는 것을 알 수 있다.

[0059] **<실시예 4. 디아실글리세롤 및 아라키돈산의 형성 저해 확인>**

[0060] 혈소판 응집 시, PLC γ 2 인산화에 의해 생성되는 디아실글리세롤(diacylglycerol, DAG) 및 디아실글리세롤의 분해로 생성되는 아라키돈산의 형성을 확인하기 위해, LSC(liquid scintillation counter)로 방사능을 측정하였다.

[0061] 먼저, 실시예 3-3의 PRP를 [³H]-아라키돈산(1 μ Ci/ml)과 함께 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분 동안 반응하고, [³H]-아라키돈산으로 표지된 혈소판(4 $\times$ 10⁸ 세포/ml)에 COX(cyclooxygenase)와 LOX(lipoxygenase)의 강력한 저해제인 BW755C(3-amino-1-[m-(trifluoromethyl)phenyl]-2-pyrazoline)를 100 μ M 더하였다. 상기 처리물에 실시예 1의 각 농도별 인디루빈-3'-모노심(0, 1, 5 및 10 μ M) 또는 아스피린(100 μ M)에 1mM의 CaCl₂를 더하여 37 $^{\circ}$ C에서 3분간 반응하고, 10 μ g/ml의 콜라겐을 더하여 혈소판 응집을 유도하였다.

[0062] 이후, 클로로포름/메탄올/염산(200/200/1[v/v/v])으로 반응을 종결하였으며, 리피드(lipid)를 추출 및 실리카겔 G 플레이트에서 석유 에테르/디에틸 에테르/아세트산(40/40/1[v/v/v])과 함께 TLC로 분리하였다. 각 리피드에 해당하는 면적을 제외한 뒤, LSC(liquid scintillation counter)로 방사능을 측정하여 도 6A 및 6B에 나타내었다.

[0063] 도 6을 참고하면, 본 발명의 인디루빈-3'-모노심은 도 5의 결과와 마찬가지로 콜라겐에 의한 혈소판 활성화 기전 중 아라키돈산 생성 기준 상위기전으로 아라키돈산 및 디아실글리세롤의 생성을 농도 의존적으로 저해시키는 효과가 우수함을 확인할 수 있다. 또한, COX 저해제로 알려진 아스피린은 음성 대조군으로서 COX 기전보다 상위기전인 아라키돈산과 디아실글리세롤의 생성에는 영향이 없는 것을 확인하였다.

[0064] **<실시예 5. GPVI의 형성 저해 확인>**

[0065] 혈소판 부착 응집에 중요한 역할을 담당하는 콜라겐 수용체인 GPVI(glycoprotein VI)의 면역 형광법 염색을 위해, 실시예 3-3의 토끼 혈소판에 실시예 1의 인디루빈-3'-모노심(농도별)을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 3분간 처리한 뒤, 10 μ g/ml의 콜라겐을 더하여 혈소판 응집을 유도하였다. 이후, 상기 반응액을 커버 슬립(cover slip)이 포함된 24 웰 플레이트에 4 $\times$ 10⁸ 혈소판/ml가 되게 넣어주고, PBS(phosphate buffered saline)에 용해된 2%[v/v] 파라포름알데히드로 실온에서 10분 동안 고정하였다. 이후, PBS에 용해된 BSA로 실온에서 1시간 동안 블로킹(blocking)하고 1차 항체인 항-GPVI(Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)로 염색한 뒤, Alexa Fluor 555가 결합된 2차

항체(Cell Signaling Technology Inc., USA)를 더하여 형광 현미경(TH4-200, Olympus Optical Co. Ltd., Japan)으로 관측하여 도 7A에 나타내었다.

[0066] 또한, 실시예 3-4의 p-셀렉틴(p-selectin) 측정과 동일한 방법이나 p-셀렉틴 항체 대신 1차 항체인 항-GPVI(Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)로 염색 후, Alexa Fluor 555가 결합된 2차 항체(Cell Signaling Technology Inc., USA)를 더한 뒤, 이를 측정하여 도 7B에 나타내었다.

[0067] 도 7을 참고하면, 본 발명의 인디루빈-3'-모노심이 콜라겐 수용체인 GPVI(glycoprotein VI)의 단백질 발현을 감소하는 효과를 나타내어, 항혈전용 조성물로서의 효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

[0068] <실시예 6. 독성실험>

[0069] 실시예 6-1. 급성독성

[0070] 본 발명의 인디루빈-3'-모노심을 단기간에 과량을 섭취하였을 때 급성적(24시간 이내)으로 동물 체내에 미치는 독성을 조사하고, 치사율을 결정하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 일반적인 마우스인 ICR 마우스를 20마리를 준비하였고, 각 군별로 10마리씩 배정하였다. 대조군에는 30% PEG-400만을 투여하고, 실험군은 본 발명의 인디루빈-3'-모노심을 1.0g/kg의 농도로 각각 경구 투여하였다. 투여 24시간 후에 각각의 치사율을 조사한 결과, 대조군과 상기 인디루빈-3'-모노심을 투여한 실험군에서는 모두 생존하였다.

[0071] 실시예 6-2. 실험군 및 대조군의 장기 및 조직 독성 실험

[0072] 장기 독성 실험은 C57BL/6J 생쥐를 대상으로 동물의 각 장기(조직)에 미치는 영향을 조사하기 위하여 본 발명의 인디루빈-3'-모노심을 1.0g/kg의 농도로 투여한 실험군과 용매만을 투여한 대조군의 동물들로부터 8주 후 혈액을 채취하여 GPT(glutamate-pyruvate transferase) 및 BUN(blood urea nitrogen)의 혈액 내 농도를 Select E(vital scientific NV, Netherland) 기기를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 간독성과 관계있는 것으로 알려진 GPT와 신장독성과 관계있는 것으로 알려진 BUN의 경우, 대조군과 비교하여 실험군은 별다른 차이를 보이지 않았다. 또한, 각 동물로부터 간과 신장을 절취하여 통상적인 조직절편 제작과정을 거쳐 광학현미경으로 조직학적 관찰을 시행하였으나 특이한 이상은 관찰되지 않았다.

[0073] <제제예 1. 약학적 제제>

[0074] 제제예 1-1. 정제의 제조

[0075] 본 발명의 인디루빈-3'-모노심 200g을 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0076] 제제예 1-2. 주사액제의 제조

[0077] 본 발명의 인디루빈-3'-모노심 1g, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100ml를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[0078] <제제예 2. 식품 제제>

[0079] 제제예 2-1. 조리용 양념의 제조

[0080] 본 발명의 인디루빈-3'-모노심을 조리용 양념에 1 중량%로 첨가하여 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

[0081] 제제예 2-2. 밀가루 식품의 제조

[0082] 본 발명의 인디루빈-3'-모노심을 밀가루에 0.1 중량%로 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0083] 제제예 2-3. 스프 및 육즙(gravies)의 제조

[0084] 본 발명의 인디루빈-3'-모노심을 스프 및 육즙에 0.1 중량%로 첨가하여 건강 증진용 스프 및 육즙을 제조하였다.

[0085] 제제예 2-4. 유제품(dairy products)의 제조

[0086] 본 발명의 인디루빈-3'-모노심을 우유에 0.1 중량%로 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0087]

제제예 2-5. 야채주스 제조

[0088]

본 발명의 인디루빈-3'-모노심 0.5g을 토마토주스 또는 당근주스 1,000ml에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

[0089]

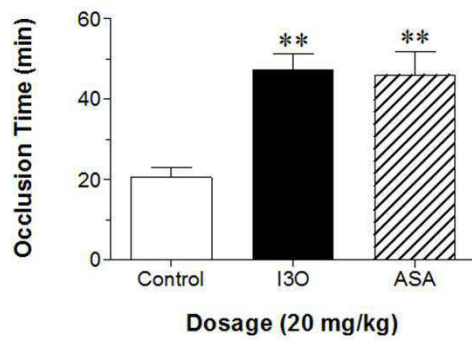
제제예 2-6. 과일주스 제조

[0090]

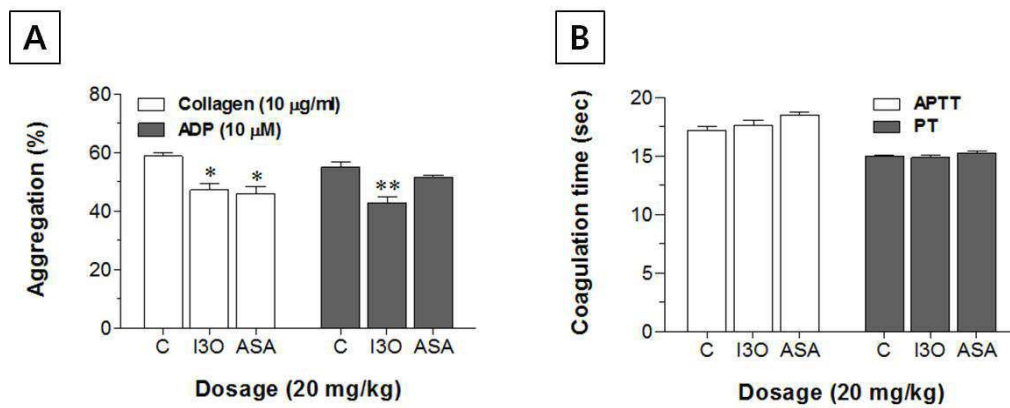
본 발명의 인디루빈-3'-모노심 0.1g을 사과주스 또는 포도주스 1,000ml에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

도면

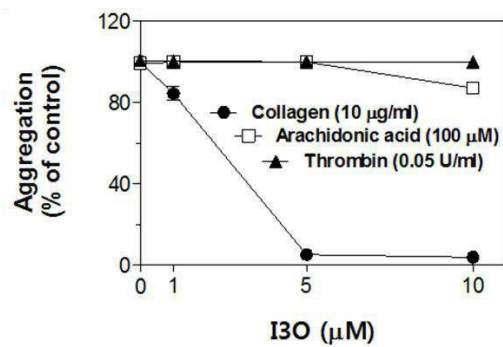
도면1



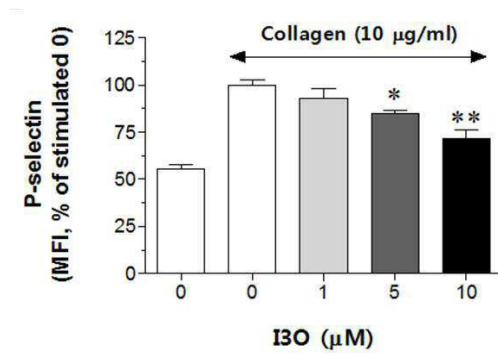
도면2



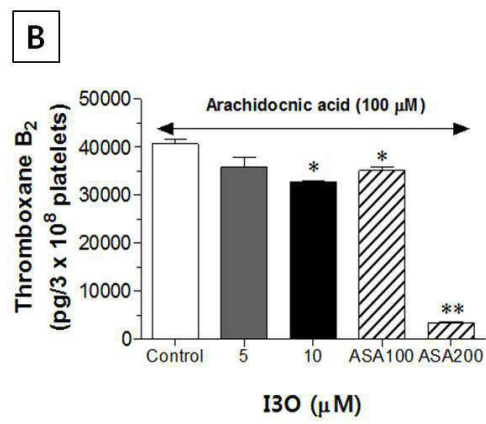
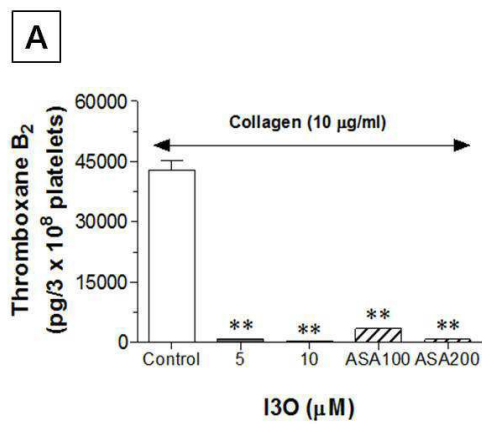
도면3



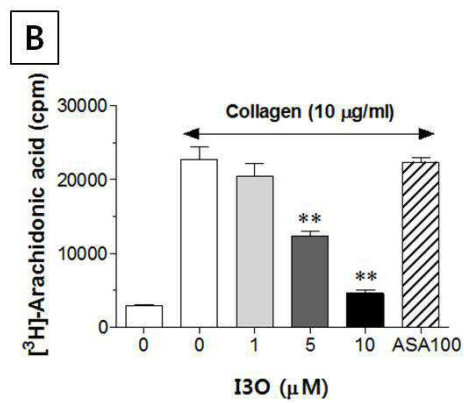
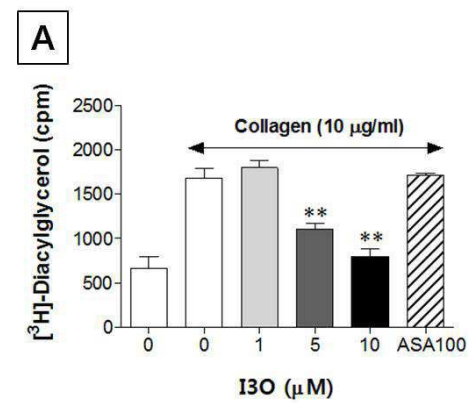
도면4



도면5



도면6



도면7

