



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0083358
(43) 공개일자 2015년07월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/245 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0003000

(22) 출원일자 2014년01월09일

심사청구일자 2014년01월09일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

김국성

대전 중구 충무로107번길 100, 109동 2302호 (대
흥동, 센트럴자이1단지)

송희정

대전 서구 둔산남로 127, 104동 1503호 (둔산동,
목련아파트)

강민웅

대전 중구 평촌로 93, 102동 1404호 (태평동, 쌍
용예가아파트)

(74) 대리인

특허법인다래

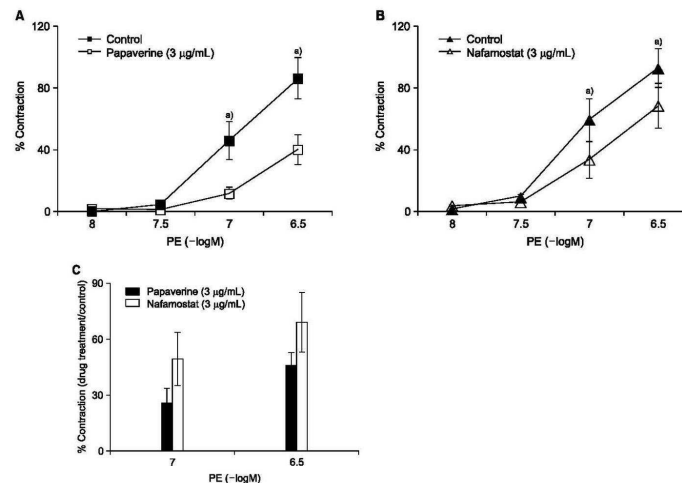
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 나파모스타트 메실레이트를 포함하는 혈관 내피 세포 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 나파모스타트 메실레이트(Nafamostat Mesilate)를 유효성분으로 포함하는 혈관 내피 세포 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 혈관 내피 세포의 TNF- α 에 의한 염증 반응 메커니즘을 차단함으로써 혈관 내피 세포의 항염증 효과를 가지며, 혈관 이완 효과를 나타냄으로써, 혈관 염증 질환 및 혈관 수축 억제를 위한 약학적 조성물로 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0023858

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원

연구과제명 아스피린과 Histone Deacetylase- 3에 의한 혈소판 eNOS 조절 연구 및 이를 활용한 심혈관계 질환 치료 기법 연구

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교(의대)

연구기간 2011.09.01 ~ 2014.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

나파모스타트 메실레이트(Nafamostat mesilate)를 유효성분으로 포함하는 혈관 내피 세포의 염증 억제용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 TNF- α 에 의해 유도되는 염증 생성 반응을 억제하는 것을 특징으로 하는 혈관 내피 세포의 염증 억제용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 조성물은 ICAM-1 및 VCAM-1 발현 억제 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 혈관 내피 세포의 염증 억제용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 조성물은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성 억제 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 혈관 내피 세포의 염증 억제용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 조성물은 p38 MAPK 발현 억제 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 혈관 내피 세포의 염증 억제용 약학적 조성물.

청구항 6

나파모스타트 메실레이트(Nafamostat mesilate)를 유효성분으로 포함하는 혈관 수축 억제용 약학적 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 조성물은 세포 사멸에 대한 혈관 내피 세포 보호 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 혈관 수축 억제용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 나파모스타트 메실레이트(Nafamostat Mesilate)를 유효성분으로 포함하는 혈관 내피 세포 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

나파모스타트 메실레이트(Nafamostat mesilate, NM)는 세린 프로테아제 저해제로서, 반감기가 5~8분으로 매우

짧으며, 분자량이 539.6 M로 낮아서 체외 순환을 통해 신체로부터 쉽게 배출될 수 있다는 특징이 있다. 나파모스타트 메실레이트는 혈액 응고제 IX, X, XIIa 및 VIIa에 작용하여 항응고 효과를 나타내는 것으로 알려져 있어, 혈전증 치료제 또는 항 응고제로 광범위하게 사용되고 있다.

[0003] 관상동맥우회술(CABG)에 있어서 수술 전후 시기 동안 이식 혈관을 최적의 상태로 유지하기 위하여 이식 혈관 보존 용액이 사용되며, 그 중 대표적인 약물이 파파베린(papaverine)이다. 파파베린(papaverine)은 아편알칼로이드의 일종으로, 평활근을 이완시켜 혈관근에 작용하여 혈관을 확대시키기 때문에 진정제, 혈관 확장제로 널리 사용되는 약물이다.

[0004] 최근 나파모스타트 메실레이트의 항염증 작용에 대한 연구가 시작되고 있으나, 혈관 내피 세포의 항염증 기전 및 혈관 이완 작용에 대한 정확한 메커니즘에 대해서는 밝혀진 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에, 본 발명의 목적은 혈관 내피 세포 항염증 및 혈관 이완 효과를 갖는 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 이를 위하여, 본 발명은 나파모스타트 메실레이트(Nafamostat Mesilate)를 유효성분으로 포함하는 혈관 내피 세포의 염증 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0007] 본 발명의 조성물은 TNF- α 에 의해 유도되는 혈관 내피 세포의 염증 생성 반응을 억제하는 것을 특징으로 한다. 보다 구체적으로 본 발명의 조성물은 TNF- α 에 의해 유도되는 ICAM-1 및 VCAM-1 발현 억제 효과, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성 억제 효과 또는 p38 MAPK 발현 억제 효과를 가지며, 이를 통해 혈관 내피 세포의 염증을 억제할 수 있다.

[0008] 또한, 본 발명은 나파모스타트 메실레이트(Nafamostat mesilate)를 유효성분으로 포함하는 혈관 수축 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명의 조성물은 세포 사멸에 대한 혈관 내피 세포 보호 효과를 갖는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 혈관 내피 세포의 TNF- α 에 의한 염증 반응 메커니즘을 차단함으로써 혈관 내피 세포의 항염증 효과를 가지며, 혈관 이완 효과를 나타냄으로써, 혈관 염증 질환 및 혈관 수축 억제를 위한 약학적 조성물로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 나파모스타트 메실레이트(Nafamostat mesilate, NM)의 화학식이다.

도 2는 HUVECs 시료에서 TNF- α 로 인해 유도된 ICAM-1 및 VCAM-1의 발현이 나파모스타트 메실레이트(NM)의 투여 농도에 따라 감소한다는 것을 나타내는 실험 결과이다.

도 3은 HUVECs 시료에서 활성산소종(ROS)의 생성이 TNF- α 로 인해 증가하는 반면, NM의 투여에 의해 감소한다는 것을 나타내는 실험 결과이다.

도 4는 HUVECs 시료에서 TNF- α 로 인해 유도된 p38 MAPK의 발현이 NM의 투여 농도에 따라 감소한다는 것을 나타내는 실험 결과이다.

도 5는 NM의 혈관 수축 억제 효과를 알아보기 위한 파파베린(A), NM(B)의 누적 수축 반응 곡선 및 대조군에 대

한 파파베린과 NM의 상대적 수축률(C)을 나타낸 그래프이다.

도 6은 세포 사멸에 대한 NM의 효과를 알아보기 위해 식염수(A), 파파베린(B), NM(C) 처리한 래트 가슴 대동맥의 TUNEL 분석 결과를 나타낸 사진이다(X400, 빨간 화살표가 TUNEL 양성 세포를 나타냄).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0013] 본 발명은 나파모스타트 메실레이트(Nafamostat mesilate)를 유효성분으로 포함하는 혈관 내피 세포의 염증 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명에 있어서 나파모스타트 메실레이트(NM)의 항염증 효과를 입증하기 위하여 HUVECs를 세포 시료로 사용하였으며, 세포 부착 분자인 ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) 또는 VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) 단백질의 발현 수준 변화, TNF- α 로 활성화된 HUVECs 세포 내 과산화물 활성 변화, 세포 내 염증 신호 전달 효소인 p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinases) 활성 변화를 측정하였다. 그 결과 본 발명의 약학적 조성물은 TNF- α 에 의해 유도되는 염증 생성 반응을 억제함으로써 항염증 효과가 있음을 알 수 있었으며, 본 발명의 조성물은 ICAM-1 및 VCAM-1 발현 억제(도 2), 활성산소종(ROS) 생성 억제(도 3) 및 p38 MAPK 발현 억제(도 4)를 통해 염증 생성 반응을 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [0015] 본 발명은 또한 나파모스타트 메실레이트(Nafamostat mesilate)를 유효성분으로 포함하는 혈관 수축 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명에 있어서 나파모스타트 메실레이트(NM)의 혈관 수축 억제 효과를 입증하기 위하여 SD 래트의 가슴 대동맥 조직의 수축/이완 반응 실험을 수행하였으며, 대조군에 비해서 혈관 수축 반응이 억제되는 효과(도 5)를 나타내었다.
- [0017] 또한 본 발명의 상기 약학적 조성물은 혈관 내피 세포에서 세포 사멸을 보호하는 효과(도 6)를 나타내었다.
- [0018] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 도포하여 사용할 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 바람직한 약제학적 제제는 정제, 경질 또는 연질 캡슐제, 액제, 현탁제 등과 같은 경구투여용 제제가 있으며 이들 약제학적 제제는 약제학적으로 허용 가능한 통상의 담체, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 조제할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 용량은, 환자의 상태, 연령, 체중, 심혈관의 손상 정도, 질환의 진행 정도 등의 다양한 요인에 따라 전문가에 의해 결정될 수 있지만 일반적으로는 성인 1kg 당 0.01 mg 내지 10 g, 바람직하게는 1 mg 내지 5 g의 용량으로 투여될 수 있다. 또, 단위 제형당 상기 약학적 조성물의 1일 용량 또는 이의 1/2, 1/3 또는 1/4의 용량이 함유되도록 하며, 하루 1 내지 6 회 투여될 수 있다. 그러나 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0020] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0021] **실시예 1. TNF- α 로 인해 유도된 ICAM-1 및 VCAM-1의 발현량 변화**
- [0022] Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)에 나파모스타트 메실레이트 (NM, nafamostat mesilate) 0.3 ~ 3 μ g/ml을 30분간 전처리한 후 TNF- α (3ng/ml)을 처리하여 12시간 동안 배양하였다. 12시간 후 HUVECs를 lysis시킨 후 웨스턴 블롯을 이용하여 ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) 및 VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)의 발현을 조사했다. Anti-ICAM-1과 anti-VCAM-1은 1:1000으로 5% 탈지유(skim milk)에 녹여 12시간 이상 반응시켰으며 2차 항체는 1:2500으로 희석하여 1시간 반응시켰다. 결과는 ECL 시약(Pierce, Rockford)을 이용하여 X-ray 필름으로 현상하였고, 이를 도 2에 나타내었다.
- [0023] 도 2에 나타난 바와 같이, ICAM-1 및 VCAM-1의 발현이 TNF- α 에 의해 유도되었으며, NM의 투여 농도에 따라 발

현량이 감소했다.

[0024]

실시예 2. TNF- α 로 인해 유도된 ROS의 생성량 변화

[0025]

ROS 생성량은 Amplex Red H_2O_2 assay kit (molecular probes)와 디하이드로에티디움 (dihydroethidium, DHE) 염색을 이용하여 측정하였다. 구체적으로, Amplex Red H_2O_2 assay 키트에 있는 반응액에 1.5×10^4 개의 HUVEC을 넣고 형광측정기(Thermo sci)를 이용하여 측정하였으며, DHE 염색은 상기 세포를 DHE $1 \mu M$ 로 $37^\circ C$ 에서 30분 동안 어두운 곳에서 배양한 뒤 PBS로 세척 후 형광 현미경(Olympus, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

[0026]

그 결과 도 3에 나타낸 바와 같이, TNF- α 로 인해 증가된 활성산소종(ROS)의 양이 NM 투여에 의해 감소되는 것을 알 수 있었다.

[0027]

실시예 3. TNF- α 로 인해 유도된 p38 MAPK의 발현량 변화

[0028]

HUVECs에 NM $3 \mu g/ml$ 을 30분간 전처리한 후 TNF- α $3 ng/ml$ 을 처리하여 0, 5, 15, 30, 60 분 동안 배양했다. 배양 후 HUVECs을 lysis시킨 후 웨스턴 블롯을 이용하여 p-p38 및 p38 MAPK의 발현을 조사했다. Anti-p-p38과 anti-p38은 1:1000으로 5% 탈지유(skim milk)에 녹여 12시간 이상 반응시켰으며, 2차 항체는 1:2500으로 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. 결과는 ECL 시약(Pierce, Rockford)을 이용하여 X-ray 필름으로 현상하였고, 도 4에 나타내었다.

[0029]

도 4에 나타낸 바와 같이, HUVECs 시료에서 p38 MAPK 발현량은 TNF- α 로 인해 증가되었다가, NM의 투여 농도에 따라 유의하게 감소된다는 것을 알 수 있었다.

[0030]

실시예 4. NM의 혈관 수축 억제 효과

[0031]

약 6주령의 수컷 SD 래트 ($n=6$)를 실험 전 12시간 동안 단식시키고, $80 ml/kg$ 케타민(ketamine)과 $12 ml/kg$ 자일라진(xylazine)을 복강 내 주사하여 마취시키고, 가슴 대동맥을 적출하였다. 적출한 가슴 대동맥은 $4^\circ C$ 의 변형시킨 Krebs-Henseleit 중탄산 완충 용액($100 mM NaCl$, $4.7 mM KCl$, $1.9 mM CaCl_2$, $1.2 mM MgSO_4$, $1.03 mM HK_2PO_4$, $23 mM NaHCO_3$, $11.1 mM$ glucose)이 담긴 용기에 넣고, 지방과 연결 조직을 제거한 후 혈관 내피 세포에 손상을 입히지 않도록 가슴 대동맥을 다듬어서 $5 mm$ 길이로 대동맥 절편을 잘랐다. 절단된 대동맥 절편의 양쪽 끝을 등장성 힘 변환기 (isometric force transducer; MultiMyograph 610M, Denmark)의 스테인리스 루프에 매달고, $7.5 ml$ 의 변형 Krebs-Henseleit 중탄산 완충 용액에 넣었다. 완충 용액은 $37^\circ C$ 를 유지하고, $95\% O_2$ 및 $5\% CO_2$ 를 공급하였으며, pH 7.4 를 유지시켰다. 등장성 힘 변환기에 설치된 절단된 대동맥 혈관에 점차적으로 장력(tension)을 가하였고, 장력 수준이 $2g$ 에서 안정적으로 유지되었을 때, 60분 동안 15분 간격으로 완충 용액을 교환한 후 평형 상태를 유지시켰다.

[0032]

대동맥 절편의 혈관 내피 세포의 건전성을 평가하기 위하여 상기 방법을 사용하였으며, 고농도의 $60 mM K^+$ 을 사용하여 가슴 대동맥의 수축 반응을 실험하였고, 수축 및 이완 측정에 대한 수치적 값으로 변환하여 사용하였다.

[0033]

가슴 대동맥의 수축/이완 능력을 측정한 후, 안정 상태가 될 때까지 완충 용액을 교환하였다. 그 후 대동맥 조각을 각각 파파베린 $10 \mu g/ml$ 또는 NM $10 \mu g/ml$ 로 전처리한 후, 페닐에프린(PE)에 대한 두 그룹의 수축 반응 결과를 측정하고 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0034]

도 5에 나타난 바와 같이, NM 처리군은 PE 농도가 $3 \times 10^{-8} M$ 일 때부터 명확한 수축 반응을 나타내기 시작한 반면, 파파베린 처리군은 $3 \times 10^{-7} M$ PE부터 수축 반응이 시작되었다. $3 \times 10^{-8} M$ PE 농도에서, 대조군에 비하여 파파베린 처리군이 12.5% , NM 처리군이 83.9% 의 수축 효과를 나타내었으며, $10^{-7} M$ PE 농도에서는, 대조군에 비하여 파파베린 처리군이 2.7% , NM 처리군이 39.2% 의 수축 효과를 나타내었다($P < 0.05$). $3 \times 10^{-7} M$ PE 농도에서는, 대조군에 비하여 파파베린 처리군이 7.0% , NM 처리군이 58.4% 의 수축 효과를 나타내었다($P < 0.05$). $3 \times 10^{-8} M$ 부터 $3 \times 10^{-7} M$ 사이의 모든 PE 농도 범위에서, 파파베린은 NM의 수축 효과에 비하여 통계

적으로 유의한 수준으로 감소하였다.

[0035] **실시에 5. 세포 사멸에 대한 NM의 효과 (TUNEL assay)**

[0036] 약 6주령의 150 ~ 170 g 수컷 SD 래트 (n=6)에 25% 우레탄을 4 ml/kg씩 복강 내 주사하여 마취시키고, 가슴 대동맥을 적출하였다. 적출한 가슴 대동맥은 2 cm 길이로 자르고, 각각의 조각을 식염수 용액, NM 용액 (10 μ g/ml) 또는 파파베린 용액(10 μ g/ml)에 1시간 동안 담가두었다. 그 후에 각각의 조각을 10% 포르말린 용액에서 3일 동안 고정시키고, 하기 조직병리학 실험에 사용하였다.

[0037] NM의 세포 사멸에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 상기 각 실험 용액으로 처리한 조직으로 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick ned labeling) 어세이를 실시하였다. TUNEL 어세이는 상용화된 ApopTag peroxidase 키트 (North Ryde, AU)를 사용하였다.

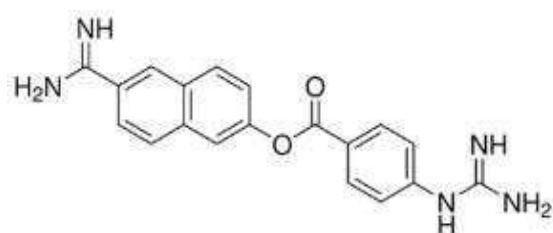
[0038] 대동맥 조직 슬라이드 위의 파라핀을 100% 자일렌으로 제거한 후, 100%, 95%, 70% 알코올로 각각 처리하고, 증류수로 세척하였다. 다음으로, 각 슬라이드를 PBST (Phosphate buffered saline + Tween 20) 용액에 10분 간 담갔다가, 30℃에서 1 : 200 으로 희석시킨 프로티나아제 K와 반응시켰다. 각 슬라이드를 증류수로 세척한 후 3% H₂O₂와 5분 간 반응시켜서 비특이적인 내생적 과산화 효소 반응을 중단시키고, PBST로 세척하였다. 다음으로, 슬라이드를 라벨링 완충액으로 5분 간 처리하였다. 50 μ L 라벨링 반응 혼합물 (TdT DNTP 1 μ L + 2가 양이온 (Mn⁺⁺) 1 μ L + TdT 효소 1 μ L + 라벨링 완충액 50 μ L)을 슬라이드에 떨어뜨렸고, 파라핀으로 덮은 후 4℃에서 24시간 동안 반응시켰다. 다음으로 각 슬라이드에 정지 완충액 처리를 하고 PBST로 세척한 후, 25℃에서 50 μ L 스트렙타비딘과 반응시킨 후 PBST로 세척하였다. 슬라이드에 색을 나타내기 위하여 DAB (diaminobenzidine) 용액을 사용하였으며, 대조 염색을 위해 메틸 그린 (methyl green)을 사용하였다. 그 후 슬라이드를 100% n-부탄올에 2분씩 2회 담그고, 자일렌으로 건조시킨 후 커버 슬라이드를 덮었다.

[0039] 상기 모든 실험 단계는 습도가 조절된 실험실에서 수행되었으며, 슬라이드는 완전히 건조시킨 후 현미경에 고정하여 관찰했다. 핵이 갈색으로 염색된 세포는 TUNEL 양성 세포로서 세포 사멸이 진행되었다는 것을 의미한다.

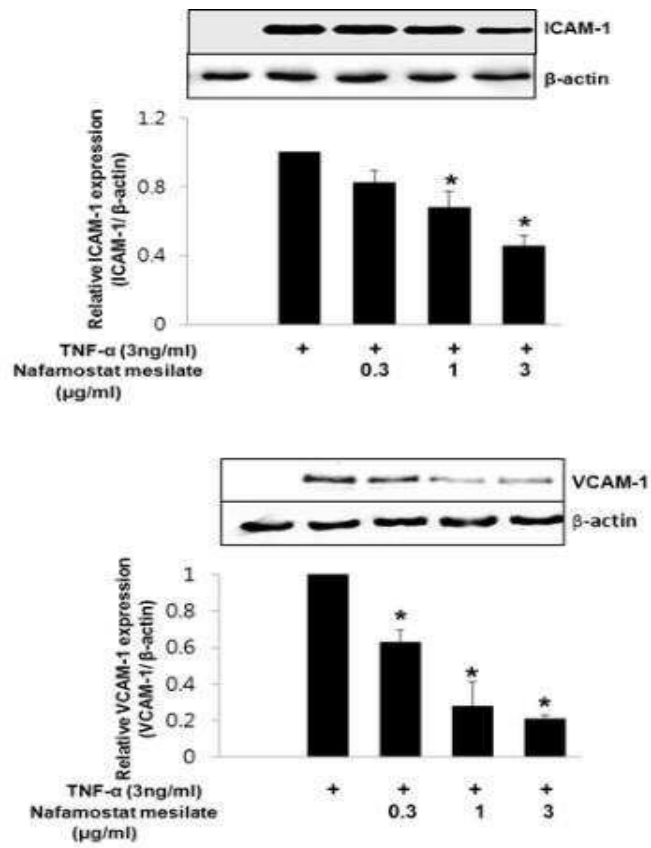
[0040] 도 6에서 알 수 있는 바와 같이 NM 처리군(B)에 비하여, 대조군(A) 및 파파베린 처리군(B)에서는 다수의 세포가 갈색으로 염색되어, TUNEL 양성 세포로 나타났다. 구체적으로, NM 처리군에서 대동맥 내막(intima) 및 중막(media)의 약 29%가 TUNEL 양성 세포로 나타난 반면, 식염수 처리군에서는 80%, 파파베린 처리군에서는 74%가 TUNEL 양성 세포로 나타났다. 이로부터 대조군 또는 파파베린 처리군에 비하여 NM 처리군에서 세포 내막 및 중막의 세포사멸이 덜 진행되었음을 알 수 있다.

도면

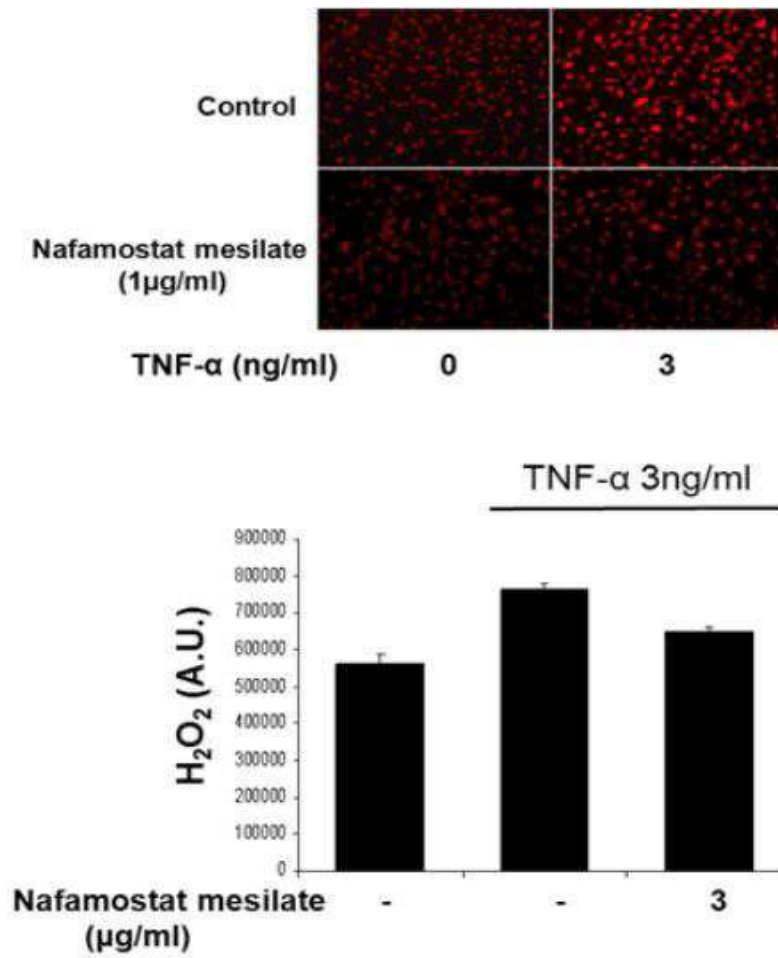
도면1



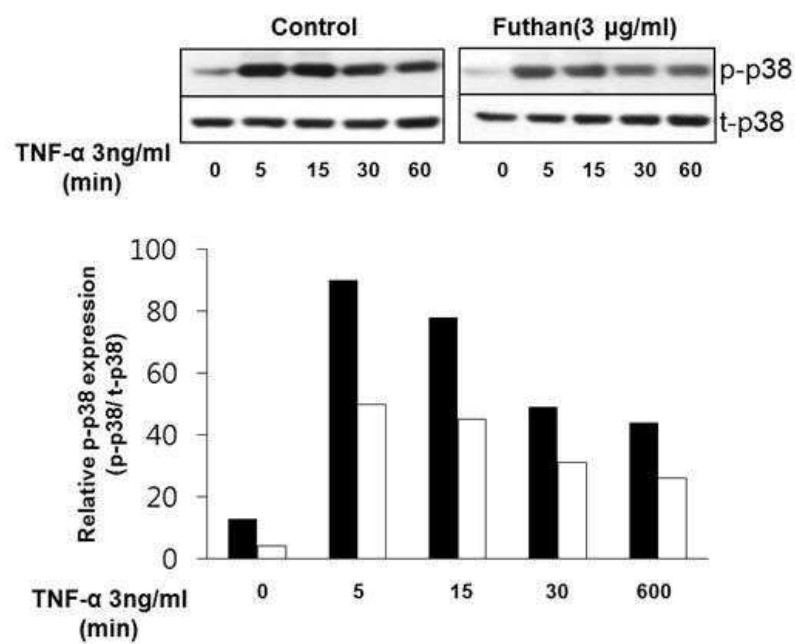
도면2



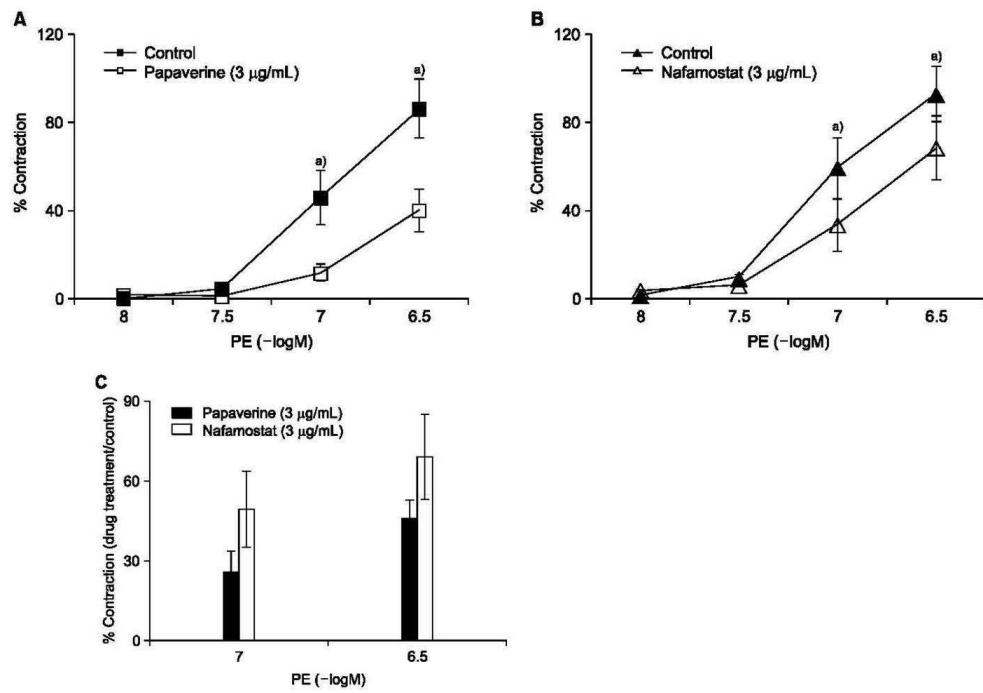
도면3



도면4



도면5



도면6

