



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년07월18일
(11) 등록번호 10-1758718
(24) 등록일자 2017년07월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/404 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01) A61K 35/64 (2015.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/404 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0086702
(22) 출원일자 2016년07월08일
심사청구일자 2016년07월08일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020000005175 A
US4329347 A
Agricultural and Biological Chemistry, 1986,
50(11), pp. 2723-2727*
Pharmacological Reports, 2010, 62, pp.
689-695*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
대한민국(농촌진흥청장)
전라북도 전주시 완산구 농생명로 300 (중동)
경북대학교 산학협력단
대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교)
충남대학교 산학협력단
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 1 항

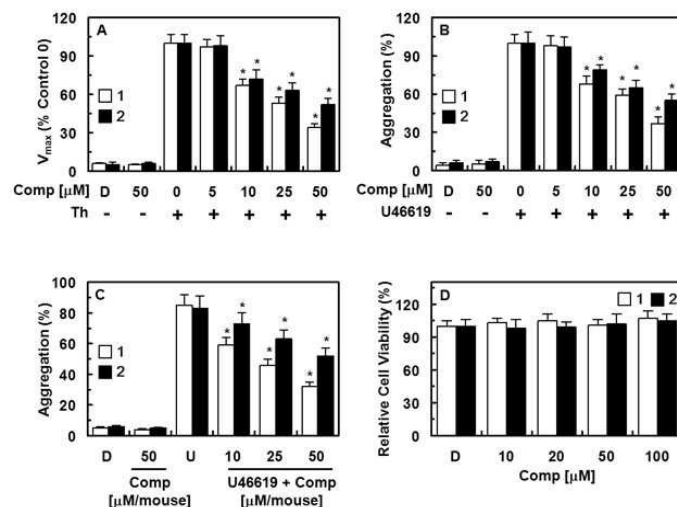
심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 흰점박이꽃무지 유충으로부터 분리된 화합물을 함유하는 항혈전용 조성물

(57) 요약

본 발명은 흰점박이꽃무지로부터 분리된 5-히드록시인돌린-2-온(5-hydroxyindolin-2-one, 화합물 1) 및 1-메틸-1,2,3,4-테트라히드로-β-카르볼린-3-카르복실산(1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline-3-carboxylic acid, 화합물 2) 중 1종 이상 선택되는 화합물을 함유하는 항혈전, 항혈소판 또는 항응고용 조성물에 관한 것이다. 상기 화합물은 HUVEC에서 FXa 및 트롬빈 생산의 억제를 통해 외인적 및 내인적 혈액 응고 경로를 억제하고, TNF-α에 의해 유도된 PAI-1의 분비를 억제하며, 생체내외에서 혈소판 응집을 억제하고, 단백질 키나제 C 및 칼슘 동원을 특이적으로 방지함으로써, 이런 혈액응고와 관련된 혈관 질환의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물 또는 건강기능식품으로서 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 31/437 (2013.01)

A61K 35/64 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/326 (2013.01)

A23V 2250/204 (2013.01)

Y10S 514/822 (2013.01)

(72) 발명자

윤은영

전라북도 전주시 완산구 오공로 71,
호반베르디움APT 107동 1202호

김성현

전라북도 전주시 완산구 오공로 71,
호반베르디움APT 104동 404호

배중섭

대구광역시 북구 대학로 80 경북대학교 약학대학
약학과 307-1호

나민균

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 208동 602호

이정인

전라남도 목포시 삼학로 363, 102동 902호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ01084002

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 농업정책지원기술개발

연구과제명 곤충 유래 항혈전 및 혈행 개선 물질 탐색 및 기작 구명_항혈전 및 혈행개선 효능평가 및
기작연구

기 여 율 1/1

주관기관 국립농업과학원

연구기간 2015.01.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

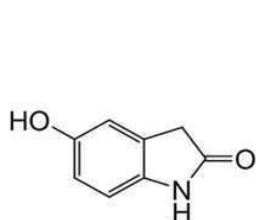
(제1단계) 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 유충을 에탄올로 추출하여 에탄올 추출물을 얻는 단계;

(제2단계) 상기 제1단계에서 얻은 에탄올 추출물을 물에 현탁한 후 *n*-헥산, 에틸 아세테이트 및 부탄올을 이용하여 순차적으로 분획하여 *n*-헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물과 물 잔사 분획물을 얻는 단계; 및,

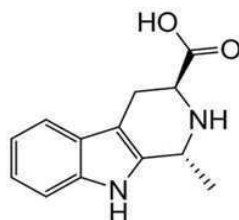
(제3단계) 상기 제2단계에서 얻은 각각의 분획물 중 항응고 활성이 좋은 분획물을 선택하여 크로마토그래피하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 하기 화학식 1의 5-히드록시인돌린-2-온(화합물 1) 및 (1*R*,3*S*)-1-메틸-1,2,3,4-테트라히드로- β -카르볼린-3-카르복실산(화합물 2) 중 1종 이상 선택되는 화합물을 분리 및 정제하는 방법.

[화학식 1]



화합물 1



화합물 2

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 유충으로부터 분리된 화합물을 함유하는 항혈전용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 혈전 형성은 심근경색증 또는 허혈성 뇌졸중과 같은 혈관질환의 결정적인 원인이 된다. 비정상적인 응고 과정에 기인한 혈전 형성은 종종 동맥 또는 정맥에서 관찰되고 감소된 혈류 또는 허혈을 야기할 수 있다. 혈전 형성은 혈액 세포벽 손상, 수용성 세포 부착, 응고 및 섬유소용해에 관련된다. 사망의 세계적인 주요 원인은 심혈관 질환이며, 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 활성화는 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). 따라서 혈액 응고를 방지하는 새로운 생리활성 화합물 및 약물에 대한 연구가 매우 필요하며, 효과적이면서도 안전한 항응혈제의 개발이 절실한 실정이다.

[0003] 흰점박이꽃무지는 민간 및 동의보감 등의 전통 한방의서에서 "제조" 또는 "굼벵이" 라는 속명으로 불리어지고 있는 딱정벌레목, 풍뎅이과, 꽃무지아과에 속하며, 크기는 17 내지 24센티미터의 초식성 곤충으로서, 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 및 시베리아 동부 지역에 서식하며, 5월에서 10월에 걸쳐 1 내지 2년에 1회 발생한다고 알려져 있다(고천[古川] 등, 원색곤충백과도감, 집양사[集英社], 동경[東京], 573-574(1977); 장지이[張芝利], 중국경제곤충지 28책, 초시목, 중국과학원 중국동물지 편찬위원회, 과학출판사(1984)). 흰점박이꽃무지 외의 꽃무지류(*Protaetia* spp.)로는 잔꽃무지, 참꽃무지, 검정꽃무지, 홀쭉꽃무지, 풀색꽃무지, 넓적꽃무지, 범꽃무지, 참넓적꽃무지, 점박이꽃무지, 애초록꽃무지, 만주점박이꽃무지, 큰자색호랑꽃무지 등이 있다. 흰점박이꽃무지는 3령의 성숙유충 상태로 월동하며, 성충은 주간에 활동하고 복숭아, 배 등의 성숙한 과일이나 옥수수, 상수리 나무 등의 즙액을 먹이로 하며, 항상 군집성이다. 또한, 이들의 유충은 퇴비나 건조더미 등의 유기물이 풍부한 부식성 토양속에서 서식한다. 살아 있는 식물의 지하부위는 별로 가해하지 않는 것으로 보고되어 있지만(장지이[張芝利], 중국경제곤충지 28책, 초시목, 중국과학원 중국동물지 편찬위원회, 과학출판사(1984)), 우리나라의 경우, 흰점박이꽃무지가 옥수수, 상추, 장미과의 과수류 5종, 굴나무류 2종, 탁나무류 2종, 잎갈나무류 2종, 참나무류 13종을 가해한다고 알려져 있기도 하다(조용섭, 한국 식물병·해충·잡초명감, 한국식물보호학회, 633(1986)). 흰점박이꽃무지는 오래전부터 간질환 등의 치료를 위한 한방 약재로서 이용되어 왔다. 또한, 최근에 유용한 생체 활성물질의 탐색 및 개발을 위한 곤충자원으로 크게 주목을 받고 있으며, 항생활성물질의 생산, 흰쥐(mouse)를 이용한 실험에서 알코올 과량섭취에 의해 손상된 간지질대사의 회복작용 등이 알려져 있으며 혈전용해성 효소에 대한 연구와 집쥐(rat)에서 사염화탄소의 투여에 의해 유도된 간독성에 대한 간보호효과를 나타내는 등 유용성이 확인된 바 있다.

[0004] 이에, 본 발명자들은 흰점박이꽃무지 유충으로부터 소분자 항응혈제를 발견하기 위해 노력한 결과, 흰점박이꽃무지의 에탄올 추출물로부터 5-히드록시인돌린-2-온(5-hydroxyindolin-2-one, 화합물 1) 및 1-메틸-1,2,3,4-테트라히드로- β -카르볼린-3-카르복실산(1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid, 화합물 2)을 분리하였으며, 이들 화합물들이 트롬빈 및 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 및 섬유용해 활성(fibrinolytic activity)이 우수함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) 고천[古川] 등, 원색곤충백과도감, 집양사[集英社], 동경[東京], 573-574(1977).

(비특허문헌 0002) 장지이[張芝利], 중국경제곤충지 28책, 초시목, 중국과학원 중국동물지 편찬위원회, 과학출판사(1984).

(비특허문헌 0003) 조용섭, 한국 식물병·해충·잡초명감, 한국식물보호학회, 633(1986).

(비특허문헌 0004) Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. N Engl J Med 2007, 357(24), 2482-2494.

(비특허문헌 0005) Fares A. Winter cardiovascular diseases phenomenon. N Am J Med Sci 2013, 5(4), 266-279.

(비특허문헌 0006) 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 0007) 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 0008) 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 0009) Wells PS, Forgie MA, Rodger MA. Treatment of venous thromboembolism. JAMA 2014, 311(7), 717-728.

발명의 내용

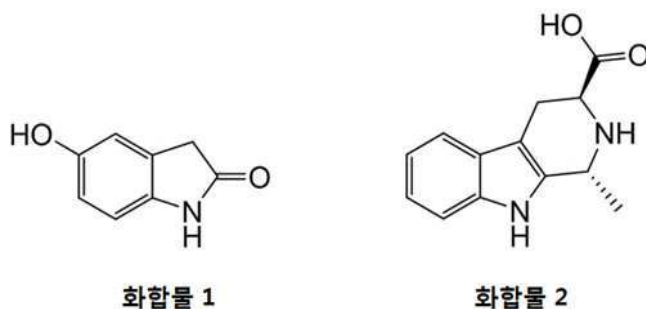
해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*) 유충으로부터 분리된 화합물을 함유하는 항혈전용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 하기 화학식 1의 5-히드록시인돌린-2-온(5-hydroxyindolin-2-one, 화합물 1) 및 1-메틸-1,2,3,4-테트라히드로- β -카르볼린-3-카르복실산(1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid, 화합물 2) 중 1종 이상 선택되는 화합물을 함유하는 항혈전, 항혈소판 또는 항응고용 조성물에 관한 것이다.

[0008] [화학식 1]



[0009]

[0010] 상기 화합물은 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 유충으로부터 분리될 수 있다.

[0011] 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.

[0012] 이에 본 발명은 상기 조성물을 함유하는 혈관질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

- [0013] 또 다른 양태에서 본 발명은,
- [0014] (제1단계) 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 유충을 에탄올로 추출하여 에탄올 추출물을 얻는 단계;
- [0015] (제2단계) 상기 제1단계에서 얻은 에탄올 추출물을 물에 현탁한 후 n -헥산, 에틸 아세테이트 및 부탄올을 이용하여 순차적으로 분획하여 n -헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물과 물 잔사 분획물을 얻는 단계; 및,
- [0016] (제3단계) 상기 제2단계에서 얻은 각각의 분획물 중 항응고 활성이 좋은 분획물을 선택하여 크로마토그래피하는 단계;
- [0017] 를 포함하는 상기 화학식 1의 5-히드록시인돌린-2-온(5-hydroxyindolin-2-one, 화합물 1) 및 1-메틸-1,2,3,4-테트라히드로- β -카르볼린-3-카르복실산(1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid, 화합물 2) 중 1종 이상 선택되는 화합물을 분리하는 방법을 제공한다.
- [0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0019] 본 발명의 상기 화학식 1의 화합물은 인간 제대정맥혈관내피세포(HUVECs)에서 aPTT 및 PT를 연장시키고 트롬빈 및 FXa를 억제하며, 트롬빈에 의해 촉매된 피브리린 중합 및 혈소판 응집을 억제하고, 폐색전증 모델 및 동맥 혈전증 모델 마우스에서 항혈전 효과를 증진시키며, 세포 내에서 PKC 활성화 및 칼슘 동원을 방지하고, t-PA에 대한 PAI-1의 비율을 감소시킴으로써, 항혈전제, 항혈소판제 또는 항응고제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 상기 화학식 1의 화합물은 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 유충으로부터 분리된 화합물인 것을 특징으로 한다. 상기 화학식 1의 화합물은, 바람직하게는, (제1단계) 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 유충을 에탄올로 추출하여 에탄올 추출물을 얻는 단계;
- [0021] (제2단계) 상기 제1단계에서 얻은 에탄올 추출물을 물에 현탁한 후 n -헥산, 에틸 아세테이트 및 부탄올을 이용하여 순차적으로 분획하여 n -헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물과 물 잔사 분획물을 얻는 단계; 및
- [0022] (제3단계) 상기 제2단계에서 얻은 각각의 분획물 중 항응고 활성이 좋은 분획물을 선택하여 크로마토그래피하는 단계;를 포함하여 얻을 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 5-히드록시인돌린-2-온(5-hydroxyindolin-2-one, 화합물 1) 및 1-메틸-1,2,3,4-테트라히드로- β -카르볼린-3-카르복실산(1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid, 화합물 2) 중 1종 이상 선택되는 화합물을 포함하는 혈관질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0024] 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 충전제, 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 스테arate 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, 동결 건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(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.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 5-히드록시인돌린-2-온(5-hydroxyindolin-2-one, 화합물 1) 및 1-메틸-1,2,3,4-테트라히드로- β -카르볼린-3-카르복실산(1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid, 화합물 2) 중 1종 이상 선택되는 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 적절하게 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 증진제(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.

[0026] 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

[0027] 본 발명은 흰점박이꽃무지 유충으로부터 분리된 5-히드록시인돌린-2-온(5-hydroxyindolin-2-one, 화합물 1) 및 1-메틸-1,2,3,4-테트라히드로- β -카르볼린-3-카르복실산(1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid, 화합물 2) 중 1종 이상 선택되는 화합물을 함유하는 항혈전, 항혈소판 또는 항응고용 조성물에 관한 것이다. 상기 화합물은 HUVEC에서 FXa 및 트롬빈 생산의 억제를 통해 외인적 및 내인적 혈액 응고 경로를 억제하고, TNF- α 에 의해 유도된 PAI-1의 분비를 억제하며, 생체내외에서 혈소판 응집을 억제하고, 단백질 키나제 C 및 칼슘 동원을 특이적으로 방지함으로써, 이런 혈액응고와 관련된 혈관 질환의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물 또는 건강기능식품으로서 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 유충으로부터 분리된 화합물 1 내지 5의 화학구조를 나타낸다.

도 2는 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 유충으로부터 분리된 화합물 1 및 2의 HMBC 상관관계($\rightarrow$) 및 COSY 상관관계(—)를 보여주는 그림이다.

도 3은 화합물 1 및 2의 피브린 중합, 혈소판 응집 및 세포독성에 대한 효과를 보여주는 그래프이다(화합물 1: 흰색 박스; 화합물 2: 검은색 박스; 이때, D는 비히클 대조군으로서 0.2% DMSO를 사용한 것이다): 도 3A는 트롬빈에 의해 촉매된 피브린 중합 정도를 보여주는 그래프이다; 도 3B는 시험관내에서 2 μ M U46619에 의해 유도된 인간 혈소판 응집 정도를 보여주는 그래프이다; 도 3C는 2 μ M U46619에 의해 유도된 마우스 혈소판 응집 정도를 생체외에서 모니터링한 결과를 보여주는 그래프이다; 도 3D는 MTT 분석을 이용한 세포 생존도를 보여주는 그래프이다. 한편, 도 3 이하의 도면에서 각 숫자는 화합물의 농도를 나타내며, D는 각 화합물군에 대한 비히클

대조군(화합물 무처리군)을 나타낸다.

도 4는 화합물 1 및 2의 경동맥 혈전증 및 급성 혈전증 모델에 대한 효과를 보여주는 그래프이다(화합물 1: 흰색 박스; 화합물 2: 검은색 박스; Tiro: 양성 대조군으로 티로피반을 사용한 것이다; 이때, D는 비히클 대조군으로서 0.2% DMSO를 사용한 것이다): 도 4A는 큰 혈전 형성에 대한 시간을 보여주는 그래프이다; 도 4B는 FeCl_3 처리 60분 후에 혈전의 크기 점수(size score)를 보여주는 그래프이다; 도 4C는 각 화합물을 정맥으로 투여한 후, 콜라겐(C, 500 $\mu\text{g/kg}$) 및 에피네프린(E, 50 $\mu\text{g/kg}$)의 혼합물을 마우스의 꼬리 정맥에 투여한 후 6시간 후에 관찰한 급성 혈전 변화를 보여주는 그래프이다.

도 5는 화합물 1 및 2의 PKC 활성 및 세포 내 칼슘 동원에 대한 효과를 보여주는 그림이다(화합물 1: 흰색 박스 또는 Comp 1; 화합물 2: 검은색 박스 또는 Comp2; 이때, D 또는 DMSO는 비히클 대조군으로서 0.2% DMSO를 사용한 것이다): 도 5A는 웨스턴블랏팅을 이용하여 MARCKS의 인산화를 측정된 결과를 보여주는 그림; 도 5B는 Fura-2가 로딩된 인간 혈소판에서 U46619(U) 첨가에 의한 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 증가 정도를 보여주는 그래프이다; 도 5C는 Fura-2가 로딩된 인간 혈소판에서 트롬빈(Th) 첨가에 의한 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 증가 정도를 보여주는 그래프이다.

도 6은 화합물 1 및 2의 트롬빈 및 인자 Xa의 비활성 및 생산에 대한 효과를 보여주는 그래프이다(화합물 1: 흰색 박스; 화합물 2: 검은색 박스; 흰색 썬클: 양성 대조군으로 아르가트로반 또는 리바룩사반을 사용한 것이다; 이때, D는 비히클 대조군으로서 0.2% DMSO를 사용한 것이다): 도 6A는 발색 분석(chromogenic assay)을 이용하여 트롬빈(Th)의 억제 정도를 보여주는 그래프이다; 도 6B는 발색 분석을 이용하여 인자 Xa(FXa)의 억제 정도를 보여주는 그래프이다; 도 6C는 HUVEC에 의한 트롬빈의 생산 정도를 보여주는 그래프이다; 도 6D는 HUVEC에 의한 인자 Xa(FXa)의 생산 정도를 보여주는 그래프이다.

도 7은 화합물 1 및 2의 PAI-1 및 tPA 분비에 대한 효과를 보여주는 그래프이다(화합물 1: 흰색 박스; 화합물 2: 검은색 박스; 이때, D는 비히클 대조군으로서 0.2% DMSO를 사용한 것이다): 도 7A는 TNF- α 유/무 하에서 배양된 HUVEC 배양액에서 측정된 PAI-1 농도를 보여주는 그래프이다; 도 7B는 TNF- α 유/무 하에서 배양된 HUVEC 배양액에서 측정된 tPA 농도를 보여주는 그래프이다; 도 7C는 TNF- α 로 활성화된 HUVEC에서 PAI-1/t-PA 비율을 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하 본 발명의 바람직한 실시 예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시 예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지도록, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0030] <실시예 1. 흰점박이꽃무지 유충으로부터 인돌 알칼로이드 화합물의 분리 및 물리화학적 성질 확인>

[0031] 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 유충의 에탄올 추출물로부터 도 1의 구조를 갖는 화합물 1 내지 5를 수득하였다.

[0032] 이를 위해, 흰점박이꽃무지 유충(5.17 kg)을 1%(v/v) 아세트산이 포함된 에탄올로 추출하여(5 $\ell \times 4$) 에탄올 추출액을 얻고, 상기 에탄올 추출액을 감압증류하여 갈색을 띠는 에탄올 추출물 968.0 g을 얻었다. 상기 추출물을 물에 현탁하고, *n*-헥산, 에틸아세테이트, 부탄올로 순차적으로 분획하여 *n*-헥산 분획물(400 g, PBS-1), 에틸아세테이트 분획물(10.0 g, PBS-2), 부탄올 분획물(47.3 g, PBS-3)과 물 잔사 분획물(510.0 g, PBS-4)을 얻었다.

[0033] 각 분획물을 HUVEC(human umbilical vein endothelial cells)을 이용하여 항응고 활성을 확인한 바, 에틸 아세테이트 분획물과 부탄올 분획물이 가장 좋은 결과를 나타내었다. 이에 에틸아세테이트 분획물(PBS-2)을 VLC(vacuum liquid chromatography)에서의 헥산/에틸아세테이트 5:1, 4:1, 2:1 및 1:1(v:v); 헥산/에틸 아세테이트/메탄올 1/1/0.2(v:v:v); 클로로포름/메탄올 7:1(v:v); 클로로포름/메탄올 5:1(v:v)의 농도구배 용리 조건 및 메탄올 세척조건을 이용하여 7개의 소분획물을 얻었다(PBS-2a ~ PBS-2g). 소분획물 PBS-2d(2 g)를 30%(v/v)~70%(v/v)의 메탄올 수용액 농도구배를 갖는 Kinetex Biphenyl 컬럼을 이용한 HPLC(헥산/에틸 아세테이트/메탄올 1:1/0.2(v:v:v)의 용리조건)를 통해 화합물 1(t_R , 22.0 min, 12 mg)을 얻었다.

[0034] 부탄올 분획물(47.8 g, PBS-3)은 9:1, 7:1, 6:1, 4:1, 2:1 (v:v)의 순차적인 농도차를 갖는 클로로포름/메탄올 (v:v)의 용리조건을 갖는 VLC를 통해 6개의 소분획물(PBS-3a ~ PBS-3-f)로 분획되었다. 또한 PBS-3f 소분획물

(20 g)로부터 20%(v/v)~50%(v/v)의 농도구배를 갖는 메탄올 수용액 용리조건을 이용한 MPLC를 통해 3개의 소분획물을 얻었다(PBS-3f-a ~ PBS-3f-c). 화합물 2(t_R , 58 min, 15 mg), 화합물 3(t_R , 57 min, 20 mg), 화합물 4(t_R , 53 min, 25 mg), 화합물 5(t_R , 35 min, 1 g mg)는 10%(v/v)~40%(v/v)의 메탄올 수용액 농도구배를 갖는 Kinetex Biphenyl 컬럼을 이용한 HPLC를 통해 PBS-3f-b (2 g) 소분획물로부터 분리되었다.

[0035] 다음으로서는 상기 화합물 1 내지 5의 구조를 MS, 1D, 및 2D NMR을 이용하여 하기와 같이 분석하였다.

[0036] 화합물 1은 흰색의 분말로 분리되었으며, 화합물 1의 1H NMR 및 ^{13}C NMR 결과는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0037]

Position	1H (J in Hz)	^{13}C , type
1	-	-
2	-	176.5, C
3	3.37 (s)	36.5, CH ₂
3a	-	127.9, C
4	6.78 (d, 2.1)	113.4, CH
5	-	153.5, C
6	6.65 (d, 8.3, 2.1)	114.4, CH
7	6.70 (d, 8.3)	110.3, CH
7a	-	136.9, C
-NH	9.08 (brs)	-
-OH	7.95 (brs)	-
1H NMR : 600 MHz, ^{13}C NMR : 150 MHz in Acetone- d_6		

[0038] 상기 표 1을 참고하여, 1H NMR 스펙트럼은 δ_H 6.78 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-3), 6.70 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-7), 6.65 (1H, dd, J = 8.3, 2.1 Hz, H-6)에서 ABX 회전 시스템을 갖는 세 개의 방향족 양성자와 δ_H 3.37(2H, s, H-3)에서 1개의 메틸렌 양성자가 있음을 보여준다. ^{13}C NMR 스펙트럼은 δ_C 153.5, 136.9, 127.9, 114.4, 113.4, 110.3의 6개의 방향족 탄소, δ_C 176.5의 카보닐 탄소, δ_C 36.5의 메틸렌 탄소가 있음을 보여준다. 마지막으로, δ_H 3.37 (H-3) 및 δ_C 176.5 (C-2)/136.9 (C-7a) 사이의 HMBC 상관관계를 통해 화합물 1이 5-히드록시인돌린-2-온(5-hydroxyindolin-2-one)의 구조를 갖는 것이 확인된다(도 2 참조).

[0039] 화합물 2는 갈색 분말로 분리되었으며($[\alpha]_D^{18}$ -112 (c 0.2, H₂O)), 화합물 2의 1H NMR 및 ^{13}C NMR 결과는 하기 표 2와 같다.

표 2

[0040]

Position	1H (J in Hz)	^{13}C , type
1	4.99 (dd, 13.7, 6.8)	47.6, CH
2	-	-
3	4.26 (dd, 9.2, 5.5)	52.9, CH
4	3.40 (dd, 16.4, 5.5) 3.12 (ddd, 16.4, 9.2, 0.9)	21.9, CH ₂
4a	-	104.6
4b	-	125.3
5	7.62 (d, 7.7)	118.1
6	7.27 (t, 7.7)	119.5
7	7.18 (t, 7.7)	122.4
8	7.47 (d, 7.7)	111.4
8a	-	136.2
9	-	-
9a	-	130.4

10	1.69 (d, 6.9)	17.4
-COOH	-	173.6
¹ H NMR : 600 MHz, ¹³ C NMR : 150 MHz in D ₂ O		

[0041] 상기 표 2를 참고하여, ¹H NMR 스펙트럼은 δ_H 7.62 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-5), 7.47 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-8), 7.27 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-6), 7.18 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-7)에서의 네 개의 방향족 양성자, δ_H 3.40 (1H, dd, $J = 16.4, 5.5$ Hz, H-4), 3.12 (1H, ddd, $J = 16.4, 9.2, 0.9$ Hz, H-4)에서의 1개의 메틸렌, δ_H 4.99 (1H, dd, $J = 13.7, 6.8$ Hz, H-1), 4.26 (1H, dd, $J = 9.2, 5.5$ Hz, H-3)에서의 2개의 메틴, δ_H 1.69 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-10)에서의 1개의 메틸 그룹을 통해 전형적인 트립토판 유도체의 시그널을 갖는 것을 보여준다. 결합상수(coupling constants)($J_{H-1/H-2}$ 13.7, 6.8 Hz and J_{H-3} and $H-2/H-4$ 9.2, 5.5 Hz)를 기반으로 하는 1R 및 3S로 인해 C-1 및 C-3 위치의 완전한 구조가 결정되는데(LI Guo qiang DZw, et al., *j chin pharmaceut sci.* 2004, 13, 81-86; Xiaomin Wang RL, et al., *Food Chem.* 2015, 187, 37-43), 이러한 ¹H NMR 및 ¹³C NMR 데이터를 통해 화합물 2가 (1R,3S)-1-메틸-1,2,3,4-테트라히드로- β -카르볼린-3-카르복실산((1R,3S)-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid) 구조를 갖는 것으로 확인된다(도 2 참조).

[0042] 화합물 3은 갈색의 분말로 분리되었다([α]_D¹⁸ -17 (c 0.2, H₂O)).

표 3

Position	¹ H (J in Hz)	¹³ C, type
1	4.52 (d, 6.2)	49.0, CH
2	-	-
3	3.63 (dd, 11.9, 4.4)	57.6, CH
4	3.17 (dd, 16.0, 4.4) 2.78 (m)	23.2, CH ₂
4a	-	106.7, C
4b	-	126.1, C
5	7.45 (d, 8.0)	118.0, CH
6	7.00 (m)	118.9, CH
7	7.09 (m)	121.4, CH
8	7.34 (d, 8.0)	111.2, CH
8a	-	136.4, C
9	11.08 (s)	-
9a	-	132.2, C
10	1.61 (d, 6.8)	16.9, CH ₃
-COOH	-	169.5
¹ H NMR : 600 MHz, ¹³ C NMR : 150 MHz in DMSO- <i>d</i> ₆		

[0044] 화합물 3의 NMR 스펙트럼은 화합물 2와 유사하다. 화합물 3의 입체화학구조는 결합 상수($J_{H-1/H-2}$ 6.2 Hz and J_{H-3} and $H-2/H-4$ 11.9, 4.4 Hz)에 기반하여 1S 및 3S의 구조를 가지며, 이를 통해 화합물 3이 (1S,3S)-1-메틸-1,2,3,4-테트라히드로- α -카르볼린-3-카르복실산((1S,3S)-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- α -carboline-3-carboxylic acid)(LI Guo qiang DZw, et al., *j chin pharmaceut sci.* 2004, 13, 81-86; Xiaomin Wang RL, et al., *Food Chem.* 2015, 187, 37-43)임이 확인된다(도 2 참조).

[0045] 화합물 4도 갈색의 분말로 분리되었으며([α]_D¹⁸ -17 (c 0.5, MeOH)), 화합물 4의 ¹H NMR 결과는 하기 표 4와 같다.

표 4

[0046]

Position	¹ H (J in Hz)
1	4.24 (d, 15.8) 4.15 (d, 15.8)
2	—
3	3.62 (dd, 9.9, 4.8)
4	3.15 (d, 16.9, 4.8) 2.81 (d, 16.9, 9.9)
4a	—
4b	—
5	7.44 (d, 7.7)
6	7.07 (d, 7.7)
7	6.99 (d, 7.7)
8	7.33 (d, 7.7)
8a	—
9	—
9a	—
-COOH	10.87 (s)
¹ H NMR : 600 MHz in DMSO-d ₆	

[0047]

상기 표 4를 참고하여 화합물 2 또는 3과 H-1의 메틸 그룹으로 인한 차이점이 있어 (3S)-1,2,3,4-테트라히드로- α -카르볼린-3-카르복실산((3S)-1,2,3,4-tetrahydro- α -carboline-3-carboxylic acid)(Xiaomin Wang RL, et al., *Food Chem.* 2015, 187, 37-43)의 구조를 갖는 것으로 판명된다.

[0048]

한편, 화합물 5도 갈색의 분말로 분리되었으며, 화합물 5의 ¹H NMR 결과는 하기 표 5와 같다.

표 5

[0049]

Position	¹ H (J in Hz)
1	—
2	3.47 (dd, 8.9, 3.9)
3	3.31 (dd, 15.1, 3.9) 2.91 (dd, 15.1, 8.9)
4	—
5	7.22 (d, 2.0)
6	10.96 (s)
6a	—
7	7.35 (d, 7.5)
8	6.97 (t, 7.5)
9	7.06 (t, 7.5)
10	7.57 (d, 7.5)
10a	—
¹ H NMR : 600 MHz in DMSO-d ₆	

[0050]

화합물 5의 입체화학구조는 결합 상수 ($J_{H-2/H-3}$ 8.9, 3.9 Hz)와 선광도 ($[\alpha]_D^{18}$ -50 (c 0.5 H₂O))에 기반으로 L-트립토판(L-tryptophane) (Xiaomin Wang RL, et al., *Food Chem.* 2015, 187, 37-43)인 것으로 확인된다.

[0051]

<실시예 2. 인간 제대정맥혈관내피세포의 배양>

[0052]

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% CO₂ 대기 하에 37℃에서 성장 보충제(Cambrex Bio Science, Charles City, IA, USA)가 보충된 EBM-2 기본 배지에서 배양하였다.

<실시예 3. 마우스의 준비 및 사육>

수컷 C57BL/6 마우스(6-7 주령, 무게 27 g)를 Orient Bio Co.(Sungnam, Republic of Korea)에서 구입하였고 12 일간의 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 펠릿 사료 및 임의대로 물을 공급하였고, 대한민국 경북대학교에 의해 발행된 '실험 동물의 관리 및 사용에 관한 가이드라인'(IRB No. KNU 2012-13)에 따라 처리하였다.

<실시예 4. 인간 혈장 및 혈소판의 분리>

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.

혈액은 시트르산 나트륨(0.32% 최종 농도)에서 수집하였고 혈장을 획득하기 위해 즉시 원심분리(2000 rpm × 15 min)하였다. 인간 혈소판은 Fares A 등에 의해 보고된 방법으로 제조하였다(Fares A. et al., *N Am J Med Sci* 2013, 5(4), 266-279; Weitz JJ, et al., *Chest* 2004, 126(3 Suppl), 265S-286S). 간략히, 혈소판 풍부 혈장 (PRP)을 실온에서 150 g에서 15분 동안 원심분리하여 얻었다. PRP는 세포 수를 위한 혈구계산기(hemocytometer)의 사용으로 1×10^9 platelets/ml의 농도로 조절하였다. PRP는 1 mM CaCl₂의 존재 하에서 HEPES 완충용액(5 mM HEPES, 136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.42 mM NaH₂PO₄, 2 mM MgCl₂, 5.6 mM 글루코즈, 0.1% BSA (w/v), pH 7.45까지)로 한번 세척하였다. 혈소판은 30분 동안 실온에서 방치하였다. 10 밀리리터 혈액 샘플은 혈액응고 시점 측정을 위해 사용하였다. 연구 프로토콜(KNUH 2012-01-010)은 경북대학교 병원(Daegu, Republic of Korea)의 기관감사위원회에 의해 승인되었다.

<실시예 5. 분리된 화합물들의 응고 및 출혈 시간에 대한 효과 확인>

실시예 5-1. 시험관내(In Vitro)에서 aPTT 및 PT 분석

각 화합물의 항응고 활성은 aPTT(activated partial thromboplastin time) 및 PT(prothrombin time) 분석 및 인간 혈장을 이용하여 테스트하였다. aPTT 및 PT는 트롬보타이머(Thrombotimer)(Behnk Elektronik, Norderstedt, Germany)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다. 구체적으로, 수혈된 정상 인간 혈장(90 μ l)을 10 μ l의 헤파린 또는 각 화합물과 혼합한 후 37℃에서 1시간 동안 인큐베이트시켰다. 이어서 aPTT 분석 시약(100 μ l)(Fisher Diagnostics, Middletown, VA, USA)을 첨가한 후 혈장 샘플을 37℃에서 1분 동안 인큐베이트시킨 다음, 20 mM CaCl₂(100 μ l)을 첨가하였고, 응고 시간을 기록하였다. PT 분석을 위해, 수혈된 정상 인간 혈장(90 μ l)을 10 μ l의 각 화합물 저장 용액과 혼합한 후 37℃에서 1시간 동안 인큐베이트시켰다. PT 분석 시약(200 μ l)(Fisher Diagnostics, Middletown, VA, USA)을 37℃에서 10분 동안 전배양한 후 첨가한 다음 응고 시간을 기록하였다. PT 결과는 초 단위로 표시되었고, INR(International Normalized Ratios)은 'INR = (PT 샘플/PT 대조군)^{ISI}, ISI = international sensitivity index'로서 표시되었다. aPTT 결과는 단지 초 단위로만 표시되었다. 통계적 분석의 경우, 결과는 중복해서 수행한 적어도 세 번의 독립적인 실험의 평균(SEM)의 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. P < 0.05를 통계학적으로 유의한 것으로 고려하였고 SPSS 소프트웨어(버전 14.0, SPSS Science, Chicago, IL, USA)를 이용하여 결정하였다. 이하, 모든 실험의 통계적 분석은 동일한 방법을 사용하였고 실험결과는 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

In vitro coagulant assay				
Sample	Dose	aPTT (s)	PT (s)	PT (INR)
Control	saline	23.7 $\pm$ 0.4	11.7 $\pm$ 0.4	1.00

화합물 1 (Comp 1)	5 μ M	23.8 $\pm$ 0.2	12.0 $\pm$ 0.3	1.06
	10 μ M	42.3 $\pm$ 0.4*	14.9 $\pm$ 0.5*	1.79*
	25 μ M	54.4 $\pm$ 0.5*	27.7 $\pm$ 0.6*	7.91*
	50 μ M	64.8 $\pm$ 0.4*	54.9 $\pm$ 0.4*	40.37*
화합물 2 (Comp 2)	5 μ M	23.3 $\pm$ 0.4	11.9 $\pm$ 0.4	1.04
	10 μ M	38.7 $\pm$ 0.3*	13.7 $\pm$ 0.6*	1.46*
	25 μ M	46.2 $\pm$ 0.7*	15.4 $\pm$ 0.4*	1.93*
	50 μ M	52.4 $\pm$ 0.5*	25.4 $\pm$ 0.5*	6.43*
화합물 3 (Comp 3)	25 μ M	23.8 $\pm$ 0.2	11.8 $\pm$ 0.2	1.02
	50 μ M	23.2 $\pm$ 0.4	11.9 $\pm$ 0.2	1.04
화합물 4 (Comp 4)	25 μ M	23.1 $\pm$ 0.3	11.7 $\pm$ 0.3	1.00
	50 μ M	23.4 $\pm$ 0.4	12.2 $\pm$ 0.3	1.11
화합물 5 (Comp 5)	25 μ M	23.8 $\pm$ 0.3	11.1 $\pm$ 0.3	0.88
	50 μ M	23.3 $\pm$ 0.5	11.5 $\pm$ 0.2	0.96
LMWH	10 IU/ml	31.5 $\pm$ 0.6*	12.2 $\pm$ 0.4	1.11
Heparin	0.5 mg/ml	57.8 $\pm$ 0.4*	26.7 $\pm$ 0.6*	7.24*
각 값은 평균 $\pm$ SEM(n=5)를 나타낸다. * 대조군과 비교하여 P<0.05				

[0062] 상기 표 6을 참고하면, 화합물 1 및 2의 처리로 인해 aPTT 및 PT가 화합물 처리 농도별로 증가하는 것으로 확인되어 화합물 1 및 2의 항응고 활성이 우수함을 알 수 있다. 그러나 화합물 3 내지 5는 시험관 내에서 응고 시간의 변화가 거의 없는 것으로 확인된다.

[0063] 실시예 5-2. 생체 외(Ex Vivo)에서 응고 시간 분석

[0064] 시험관 내 결과가 생체 외에서도 지속되는지 확인하기 위해 생체 외 응고 시간을 측정하였다. 이를 위해 수컷 C57BL/6 마우스를 밤새 금식시킨 후 0.5% DMSO에 포함된 각 화합물을 i.v.로 투여하였다. 투여 1시간 후에, 생체 외 aPTT 및 PT 측정을 위해, 동맥 혈액 샘플(0.1 ml)을 3.8% 시트르산 나트륨(1/10, v/v)에 빼내었다. 응고 시간은 하기 표 7에 기재하였다.

표 7

[0065]

Sample	Dose	aPTT (s)	PT (s)	PT (INR)
Control	saline	31.4 $\pm$ 0.4	12.2 $\pm$ 0.3	1.00
화합물 1 (Comp 1)	7.5 μ g/mouse	51.7 $\pm$ 0.6*	25.4 $\pm$ 0.5*	5.81*
	14.9 μ g/mouse	63.4 $\pm$ 1.2*	51.4 $\pm$ 1.4*	31.55*
화합물 2 (Comp 2)	11.5 μ g/mouse	44.6 $\pm$ 0.5*	14.3 $\pm$ 0.6*	1.46*
	23.0 μ g/mouse	51.7 $\pm$ 0.7*	24.2 $\pm$ 0.4*	5.17*
화합물 3 (Comp 3)	11.5 μ g/mouse	31.3 $\pm$ 0.6	12.4 $\pm$ 0.4	1.04
	23.0 μ g/mouse	31.5 $\pm$ 1.0	12.3 $\pm$ 0.6	1.02
화합물 4 (Comp 4)	10.8 μ g/mouse	31.8 $\pm$ 0.7	12.5 $\pm$ 0.5	1.06
	21.6 μ g/mouse	31.3 $\pm$ 0.5	12.6 $\pm$ 0.4	1.08
화합물 5 (Comp 5)	10.2 μ g/mouse	31.5 $\pm$ 0.4	12.4 $\pm$ 0.6	1.04
	20.4 μ g/mouse	31.1 $\pm$ 0.5	12.0 $\pm$ 0.7	0.96
각 값은 평균 $\pm$ SEM(n=5)를 나타낸다. * 대조군과 비교하여 P<0.05				

[0066] 상기 표 7을 참고하면, 마우스 생체 외에서 확인한 결과, 화합물 1 및 2가 시험관 내 실험 결과에서와 같이 우수한 항응고 활성이 있음을 알 수 있다.

[0067] 실시예 5-3. 꼬리 출혈(*In vivo*) 시간 분석

[0068] 시험관 내 결과가 생체 내에서도 유지되는지 확인하기 위해 꼬리 출혈 시간을 측정하였다(표 8). 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 꼬리 부분으로부터 2 mm에서 가로로 절개하였다. 출혈 시간은 출혈이 멈출 때까지 시간 경과로서 정의하였다. 15분이 넘는 출혈 시간은 15분 동안 지속되는 것으로 기록하였다. 마우스에 대한 평균 순환 혈액 부피는 72 ml/kg이고(Diehl KH, et al., *J Appl Toxicol* 2001, 21(1), 15-23), 사용된 마우스의 평균 중량은 27 g이기 때문에, 평균 혈액 부피는 2 ml이며, 각 화합물의 처리는 각각 대략 2.5 또는 5.0 μ M의 말초 혈액 농도와 같게 했다(화합물 1은 마우스 당 7.5 또는 14.9 μ g, 화합물 2는 마우스 당 11.5 또는 23.0 μ g).

표 8

[0069]

<i>In vivo</i> bleeding time (i.v. injection)			
Sample	Dose	Tail Bleeding time (s)	n
Control	Saline	30.5 $\pm$ 1.2	5
화합물 1 (Comp 1)	7.5 μ g/mouse	52.3 $\pm$ 1.0*	5
	14.9 μ g/mouse	69.6 $\pm$ 1.4*	5
화합물 2 (Comp 2)	11.5 μ g/mouse	41.2 $\pm$ 1.4*	5
	23.0 μ g/mouse	51.6 $\pm$ 1.2*	5
LMWH	20 IU/mouse	35.2 $\pm$ 0.8*	5
Heparin	1 mg/mouse	61.2 $\pm$ 1.0*	5

각 값은 평균 $\pm$ SEM(n=5)를 나타낸다. * 대조군과 비교하여 P<0.05

[0070] 상기 표 8을 참고하면, 화합물 1 및 2(i.v. 주사)의 처리로 인해 꼬리 출혈 시간 또한 대조군(Control)과 비교하여 현저하게 연장되어 화합물 1 및 2의 항응고 활성이 생체 내에서도 유지됨을 알 수 있다.

[0071] <실시예 6. 분리된 화합물들의 피브린 중합, 혈소판 응집, 및 세포 생존에 대한 효과 확인>

[0072] 실시예 6-1. 트롬빈-촉매 피브린 중합 분석

[0073] 인간 혈장에서 각 화합물이 트롬빈-촉매 피브린 중합에 미치는 영향을 확인하였다. 구체적으로, 트롬빈-촉매 피브린 중합은 주위 온도에서 분광광도계(TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 360 nm에서 탁도를 모니터링함으로써 20분 동안 매 6초에 측정하였다. 대조군 혈장 및 각 화합물과 인큐베이트된 혈장을 DMSO에 3번 희석한 후 트롬빈으로 응고시켰다(최종 농도: 0.5 U/ml). 각 흡수 곡선의 최대 중합 비율(V_{max} , Δ MOD/min)을 기록하였다(Nowak P, et al., *Thromb Res* 2007, 121(2), 163-174).

[0074] 인간 혈장에 화합물 1 및 2를 반응시킨 결과, 트롬빈(Th)을 촉매로 한 피브린 중합 최대 속도가 농도의존적으로 감소되는 것으로 확인된다(도 3A). 이 때 각 화합물 시료의 pH의 효과를 제거하기 위해, 모든 희석액은 50 mM TBS(pH 7.4)로 만들었고, 대조군으로서 DMSO(D)를 사용하였다. * 화합물 1(white), 화합물 2(black), 이후의 모든 도면 그래프에서 동일하게 표현.

[0075] 실시예 6-2. 혈소판 응집 분석

[0076] 화합물 1 및 2의 항응고 활성을 확인하기 위해, U46619(안정된 트롬복산 A2 아날로그/응집 작용제) 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. 세척된 인간 혈소판을 1, 3, 5 또는 10분 동안 DMSO에서 각 화합물을 표시된 농도로 인큐베이트시켰다. 이어서 5분 동안 37℃에서 0.9% 식염수 용액에서 U46619(2 μ M)에 의해 자극시켰다. 혈소판 응집은 응집검출계(aggregometer)(Chronolog, Havertown, PA, USA)를 이용하여 기록하였다. 또한, 생체 외 혈소판 응집 분석은 수컷 마우스를 밤새 금식시킨 후 DMSO에 포함된 각 화합물의 표시된 농도를 정맥(i.v.) 주사로 투여하였다. 24 시간 후, 240 μ l의 부피에서 혈소판 풍부 혈장(109 혈소판/ml)을 1000 rpm에서 연속적인 교반 하의 응집검출계

에서 1.5분 동안 37℃에서 인큐베이트한 다음 U46619(최종 농도 2 μ M)(Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA, USA)로 자극하였다.

[0077] 그 결과, 화합물 1 및 2의 처리는 농도 의존적으로 U46619(또는 U)에 의해 유도된 인간 혈소판 응집을 농도 의존적으로 억제하며(도 3B), 이런 시험관 내 결과는 생체 외 혈소판 응집 분석(i.v. 주사, 도 3C)에서도 확인된다(도 3C).

[0078] **실시예 6-3. 세포 생존율 확인**

[0079] 세포 생존율은 MTT 어세이를 이용하여 확인하였다. 이를 위해 HUVEC을 96-웰 플레이트에서 5×10^3 세포/웰의 농도로 배양을 시작하였고, 24시간 후, 세포를 새로운 배양액으로 세척하였으며, 시료로서 사용될 화합물들을 처리하였다. 48시간 후 1 mg/ml MTT 용액을 100 μ l씩 각 웰에 넣어주었고 4시간 동안 반응하게 하였다. 이후 150 μ l의 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 섞어주고 세포 내에 형성된 포마잔염이 잘 용해되게 하고, 마이크로플레이트 리더(microplate reader, Tecan Austria GmbH, Grodig, Austria)를 이용하여 용해된 액상의 흡광도를 540 nm에서 확인하였다.

[0080] 그 결과, 각 화합물은 24시간 동안 화합물을 처리한 HUVEC에서의 MTT 분석을 이용하여 확인된 바와 같이 10 μ M의 농도까지 세포 생존에 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있다(도 3D).

[0081] **<실시예 7. 분리된 화합물들의 동맥 혈전증 및 폐 혈전증 모델에서 생체내(In Vivo) 효과 확인>**

[0082] **실시예 7-1. 염화제이철(FeCl_3)로 유도된 경동맥 혈전증 마우스 모델의 제조 및 분석**

[0083] 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). 구체적으로, 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 μ m)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 μ m $\times$ 75 μ m)은 1; 중간 크기의 혈전(100 μ m $\times$ 150 μ m)은 2; 큰 혈전(200 μ m $\times$ 300 μ m)은 3으로 표시하였다. FeCl_3 매개 내피 손상으로부터 큰 혈전에 의해 고환 동맥의 폐색까지의 시간을 측정하였고, 혈전 형성 시간 및 생성된 혈전의 크기는 도 4에 나타내었다.

[0084] 그 결과, 대조군 마우스에서 FeCl_3 처리 후 내피 손상을 보였고, 8.5 ± 0.9 분에서 큰 혈전의 성장을 야기하였으며, 항혈소판 GP IIb/IIIa 억제제인 티로피반(tirofiban:Tiro)은 54.1 ± 5.7 분까지 큰 혈전의 성장을 둔화시키는 것으로 확인되며, 화합물 1 및 2도 이와 상응하는 결과를 나타냄을 알 수 있다(도 4A). 또한 FeCl_3 로 인해 유도된 내피 손상으로 인한 혈전 크기를 FeCl_3 처리 60분 후에 측정 한 바, 화합물 1 및 2가 혈전 형성을 농도 의존적으로 감소시킴을 확인할 수 있다(도 4B).

[0085] **실시예 7-2. 콜라겐 및 에피네프린의 조합에 의해 유도되는 급성 혈전증 마우스 모델의 제조 및 분석**

[0086] 수컷 C57BL/6 마우스를 밤새 금식시킨 후 10마리의 그룹으로 분류하였다. DMSO(D)에 현탁된 각 화합물을 정맥으로 마우스에 투여하였다. 에피네프린(50 μ g/kg)에 콜라겐(500 μ g/kg)을 더한 혼합물을 마우스의 꼬리 정맥에 주사하여 1시간 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 수행하였다.

[0087] 그 결과, 급성 마비를 야기하는 거대한 폐 혈전증이 유발된 마우스에 콜라겐 및 에피네프린의 혼합물의 정맥 주사는 궁극적으로 갑작스런 사망(90-95%의 사망률)을 야기하는 것으로 확인되지만, 콜라겐(C) 및 에피네프린(E)과 함께 화합물 1 및 2이 함께 처리된 군의 사망률은 콜라겐(C) 및 에피네프린(E)만을 처리한 군에 비해 농도 의존적으로 감소됨을 알 수 있다(도 4C).

[0088] <실시예 8. 분리된 화합물들의 단백질 키나제 C 활성 및 세포 내의 Ca^{2+} 이동에 대한 효과 확인>

[0089] 혈소판 응집을 조절하는 신호 경로에 대한 각 화합물의 민감도를 조사하였다. 작용제에 의한 혈소판 자극시, 포스포리파제 C(PLC)는 포스포티딜이노시톨 4,5-비스포스페이트를 디아실글리세롤 및 이노시톨-1,4,5-트리포스페이트로 가수분해하고, 이들은 각각 단백질 키나제 C(PKC)의 활성 및 세포질의 Ca^{2+} 의 증가를 촉진시킨다. PKC 및 Ca^{2+} 는 파립 분비 및 혈소판 응집의 최종 단계를 담당하는 수용체인 당단백질(GP) IIb/IIIa의 활성을 유도하기 위해 상승적으로 작용한다(Wei AH, et al., *Br J Haematol* 2009, 147(4), 415-430).

[0090] 실시예 8-1. 단백질 키나제 C 활성 분석

[0091] PKC 활성에 대한 각 화합물의 효과는 인간 혈소판에서 PKC의 주요 기질인 MARCKS의 인산화를 측정함으로써 결정하였다(Elzagallaai A, et al., *Blood* 2000, 95(3), 894-902). 구체적으로, 세척된 인간 혈소판을 DMSO 또는 각 화합물($5 \mu M$)과 $37^{\circ}C$ 에서 10분 동안 인큐베이션 한 후, 1분 동안 U46619($2 \mu M$) 또는 트롬빈($0.05 U/ml$)으로 자극시킨 다음, 혈소판 용해물에서 인산화-MARCKS를 웨스턴 블랏팅을 이용하여 검출하였다. 웨스턴 블랏팅은 다음과 같이 수행하였다. 전체 세포 추출물을 HUVEC의 용해에 의해 제조한 후 브래드포드 분석 방법을 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 동일한 양의 단백질은 SDS-PAGE(10%)로 분리한 후 이모빌론 막(Millipore, Billerica, MA, USA) 상에 밤새 일렉트로블랏팅하였다. 다음으로는 상기 막을 0.05% Tween 20을 포함하는 TBS($50 mM$ Tris-HCl, pH 7.5, $150 mM$ NaCl)에서 5% 저지방 우유 분말로 1시간 동안 차단시켰다. 이어서 실온에서 1.5시간 동안 phospho-MARCKS(Santa Cruz, CA, USA)로 인큐베이션 한 후, 겨자무과산화효소가 결합된 이차항체와 인큐베이션 한 다음, 제조사의 지시 및 기준에 보고된 바(Ku SK, et al., *BMB Rep* 2014, 47(6), 336-341)에 따라 ECL-검출을 수행하였다. 이 때 β -액틴(Actin, 1:1000, Santa Cruz, CA, USA)을 로딩 대조군으로 사용하였다.

[0092] 그 결과, 혈소판 응집을 방지하기 위해 요구되는 농도에서, 화합물 1 및 2 처리군이 대조군으로 사용된 DMSO 처리군에 비해 U46619 또는 트롬빈으로 각각 유도된 MARCKS 인산화를 억제함을 알 수 있다(도 5A).

[0093] 실시예 8-2. 세포 내의 Ca^{2+} 동원 분석

[0094] 세포 내 $[Ca^{2+}]_i$ 에서의 변화는 U46619 및 트롬빈으로 자극된 fura-2가 로딩된 혈소판에서 fura-2의 형광을 모니터링함으로써 측정하였다. 구체적으로, 혈소판의 세포 내 Ca^{2+} 동원($[Ca^{2+}]_i$)은 Wu CC 등에 의해 보고된 방법으로 측정하였다(Wu CC, et al., *Planta Med* 2007, 73(5), 439-443). 혈소판을 30분 동안 $37^{\circ}C$ 에서 fura-2/AM($3 \mu M$)으로 인큐베이션 하였다. 두 번 세척한 후, fura-2로 로딩된 혈소판을 5×10^7 혈소판/ml의 최종 농도에서 Ca^{2+} -free Tyrode's 용액에 현탁시켰다. 칼슘 $1 mM$ 을 혈소판 활성화제로 자극하기 1분 전에 fura-2로 로딩된 혈소판에 첨가시켰다. 형광(Ex 339 nm, Em 500 nm)을 형광광도계(TECAN, Mannedorf, Switzerland)로 측정하였다. $[Ca^{2+}]_i$ 는 Grynkiewicz 등(*J Biol Chem* 1985, 260(6), 3440-3450)에 의해 설명된 수학적식을 이용하여 산출하였다.

[0095] 그 결과, 화합물 1 및 2는 U46619 또는 트롬빈(Th)으로 유도된 $[Ca^{2+}]_i$ 에서의 증가를 현저하게 억제하는 것으로 확인된다(도 5B 및 도 5C).

[0096] <실시예 9. 분리된 화합물들의 트롬빈 및 FXa 활성에 대한 효과 확인>

[0097] TNF- α 가 HUVEC을 자극하면, TF(tissue factor) 발현으로 유도된 FVIIa로 인해 FX의 활성이 일어난다. 이에 대해 화합물 1 및 2의 활성으로 인한 트롬빈과 FXa 억제효과를 확인하였다.

[0098] 실시예 9-1. 트롬빈 활성 어세이

[0099] 화합물 1 및 2의 응고 억제에 대한 메커니즘을 설명하기 위해, 트롬빈의 억제를 발색 기질을 이용하여 측정하였다. 이를 위한 트롬빈 활성 어세이(Thrombin activity assay)는 다음과 같이 수행하였다. $7.5 mM$ EDTA와 $150 mM$ NaCl를 함유하는 $50 mM$ Tris-HCl buffer (pH 7.4)에 각 화합물을 용해하고, $37^{\circ}C$ 에서 2분간 반응한 후, 트롬빈 용액($150 ml$, $10 U/ml$)을 더하고 다시 $37^{\circ}C$ 에서 1분간 반응하였다. S-2238(트롬빈 기질, $150 ml$, $1.5 mM$) 용액을 바로 더해 분광광도계(spectrophotometer, TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 $405 nm$ 에서 120

초 동안 흡광도를 측정하였다. 또한 직접적인 트롬빈 억제제인 아르가트로반(argatroban)(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA)을 양성 대조군으로 사용하였다.

[0100] 그 결과, 화합물 1 및 2가 트롬빈의 아미돌리틱 활성(amidolytic activity)의 농도 의존적인 억제를 유도하여 트롬빈 활성을 직접적으로 억제함을 확인할 수 있다(도 6A).

[0101] 실시예 9-2. FXa 활성 분석

[0102] FXa 활성 어세이(Factor Xa activity assay)는 S-2222 대신 FXa(1 U/ ml)를 사용하는 것을 제외하고는 트롬빈 활성 어세이와 동일한 방법으로 측정하였다. 또한 직접적인 FXa 억제제인 리바록사반(rivaroxaban)(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA)을 양성 대조군으로 사용하였다.

[0103] 그 결과, 화합물 1 및 2가 FXa의 활성을 억제하는 것으로 확인된다(도 6B). 이런 결과는 항-트롬빈 분석 결과와 일치하는데, 이를 통해 화합물 1 및 2의 항-트롬빈 메커니즘이 피브리린 중합 및/또는 내인/외인 경로 억제를 통해 제시됨을 알 수 있다.

[0104] 실시예 9-3. HUVEC의 표면에서 트롬빈의 생산 분석

[0105] HUVEC에 의한 트롬빈 생산은 Dejana E 등에 의해 보고된 방법으로 정량하였다(Dejana E, et al., *J Cell Biochem* 2012, 113(9), 2877-2883; Bae JS. et al., *Food Chem Toxicol* 2011, 49(7), 1572-1577). 구체적으로, HUVEC을 10분 동안 각 화합물을 포함하는 50 mM Tris-HCl 완충용액, 100 pM FVa, 및 1 nM FXa의 300 μ l에 전배양한 다음, 1 μ M의 최종 농도로 프로트롬빈(Haematologic Technologies, Essex Junction, VT, USA)을 첨가하였다. 10분 후, 비치샘플(각 10 μ l)을 프로트롬빈 활성을 종료시키기 위해 웰 당 0.5 M EDTA 함유 TBS의 40 μ l를 포함하는 96-웰 플레이트로 옮겼다. 활성화된 프로트롬빈은 405 nm에서 S-2238(트롬빈 기질)(Chromogenix AB, Molndal, Sweden)의 가수분해의 비율을 측정함으로써 결정하였다. 표준 곡선은 정제된 트롬빈의 알려진 양으로 제조하였다.

[0106] 그 결과, 대조군(DMSO:D)에 비해 화합물 1 및 2가 트롬빈(Th) 생성을 농도 의존적으로 억제하는 것이 확인된다(도 6C).

[0107] 실시예 9-4. HUVEC의 표면에서 FXa의 생산 분석

[0108] 96-웰 배양 플레이트에서 TNF- α (Abnova, Taipei, Taiwan)로 자극된(무혈청 배지에서 6시간 동안 10 ng/ml) HUVEC의 용합 단층(10분 동안 각 화합물의 지시된 농도로 전배양된)을 항-TF IgG(25 μ g/ml)(Santa Cruz, CA, USA)의 유/무 하에서 37°C에서 5분 동안 FVIIa(10 nM)를 포함하는 완충용액 B(5 mg/ml 소혈청 알부민[BSA] 및 5 mM CaCl₂가 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 μ l가 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.

[0109] 그 결과, 화합물 1 및 2가 FXa의 생산을 억제할 수 있는 것을 확인할 수 있으며, 이는 항-TF IgG를 처리한 결과와 일치한다(도 6D).

[0110] <실시예 10. 분리된 화합물들의 PAI-1 및 t-PA 분비에 대한 효과 확인>

[0111] 혈관세포에서 TNF- α 는 PAI-I의 생산을 유도하여 섬유소 용해를 억제하며, t-PA 및 PAI-1 간의 균형의 변화는 혈소판 응집 및 섬유소 용해의 변화를 야기한다(Philip-Joet F, et al., *Eur Respir J* 1995, 8(8), 1352-1356; Schleef RR, et al., *J Biol Chem* 1988, 263(12), 5797-5803). 한편, TNF- α 는 t-PA 생산에 관해서는 유의적인 효과를 가지고 있지 않은 것으로 확인된다(Hamaguchi E, et al., *J Pharmacol Exp Ther* 2003, 307(3), 987-994).

[0112] TNF- α 자극과 화합물 1 및 2의 처리에 따른 PAI-1 분비 분석을 확인하기 위해, HUVEC을 18시간 동안 TNF- α 의 유/무 하에서 각 화합물을 포함하거나 포함하지 않은 배지에서 배양하였다. HUVEC 배양 상청액에서 PAI-1의 농도는 ELISA 키트(American Diagnostica, Inc., Stamford, CT, USA)를 이용하여 확인하였다. 그 결과, HUVEC에서 화합물 1 및 2의 처리로 인해 TNF- α 유도에 따른 PAI-1 분비가 억제되는 것으로 확인된다(도 7A).

[0113] 다음으로는 HUVEC에서 화합물 1 및 2가 t-PA의 분비에 미치는 효과를 확인하였는데, t-PA의 농도는 HUVEC 배양

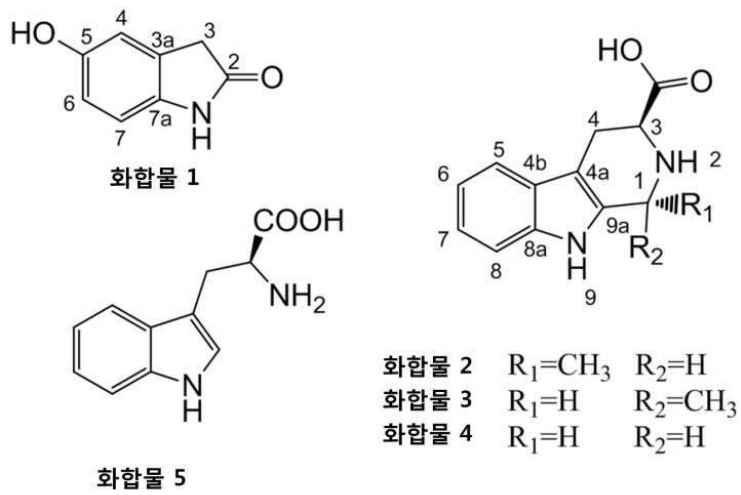
상청액에서 ELISA 키트(American Diagnostica, Inc., Stamford, CT, USA)를 이용하여 측정하였다.

[0114] 그 결과, HUVEC에서 화합물 1 및 2은 유도에 따른 t-PA의 분비에는 유의미한 영향을 주지 않는 것으로 확인되며 (도 7B), 화합물 1 및 2로 인해 PAI-1/t-PA 값 또한 저해됨을 알 수 있다(도 7C).

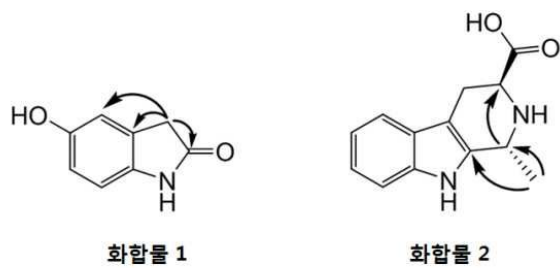
[0115] 상기와 같은 결과들은 화합물 1 및 2가 섬유소 용해 효과가 우수함을 반영한다.

도면

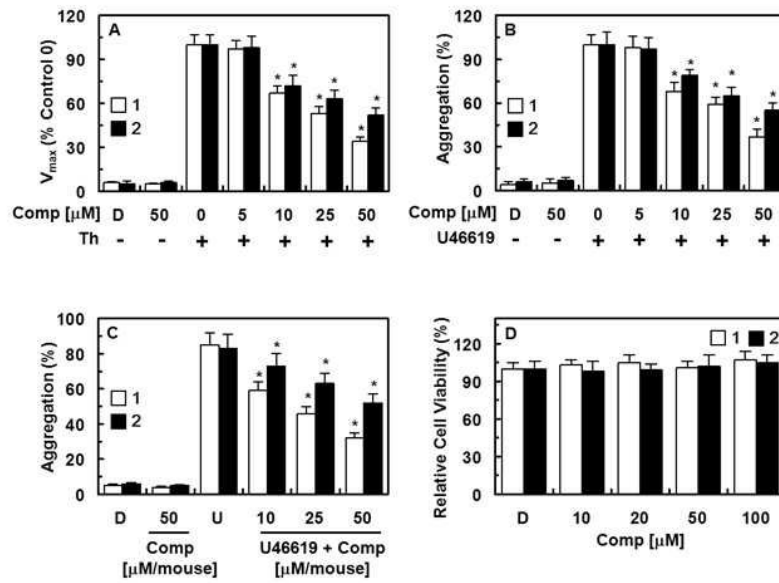
도면1



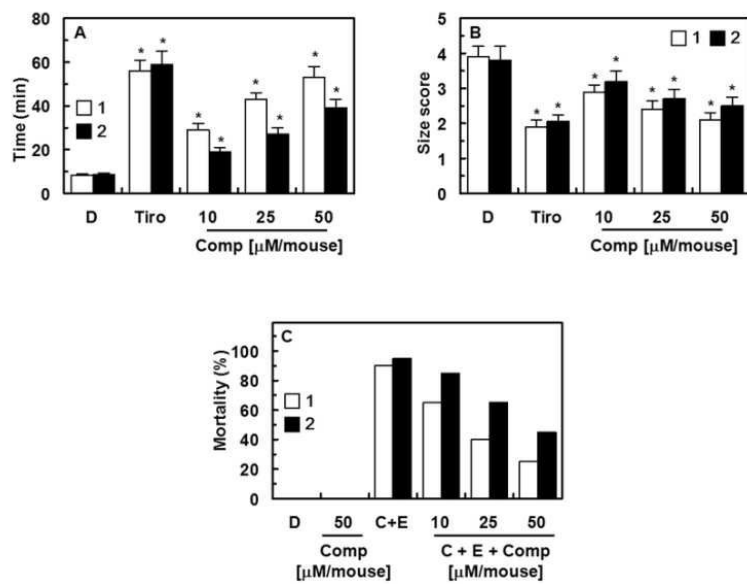
도면2



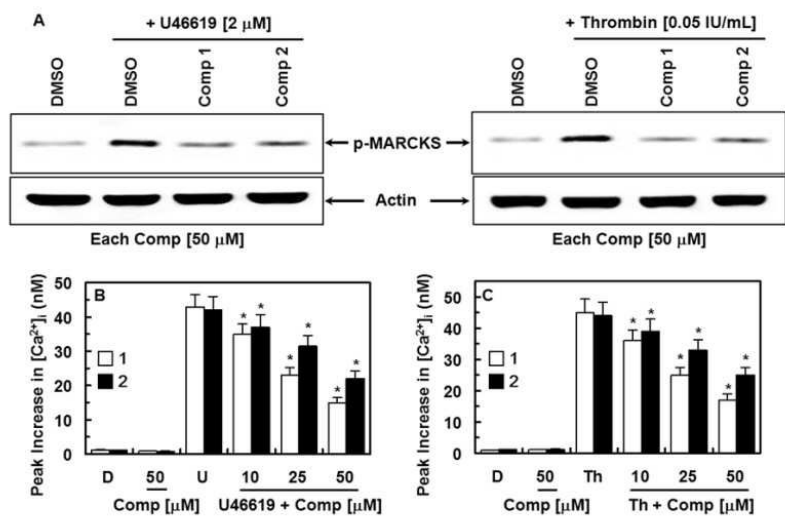
도면3



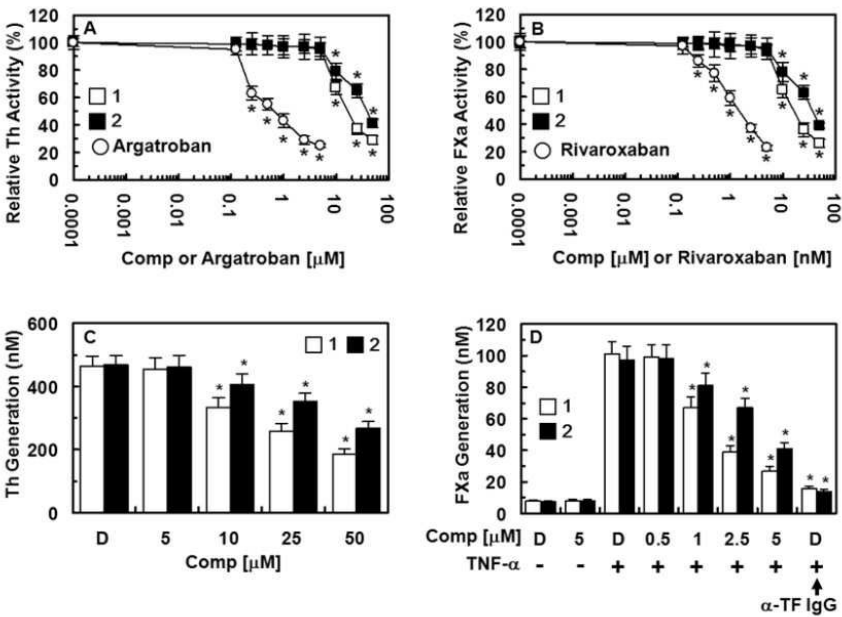
도면4



도면5



도면6



도면7

