



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0056386
(43) 공개일자 2024년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/495 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61P 7/02 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/495 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0042989
(22) 출원일자 2023년03월31일
심사청구일자 2023년11월28일
(30) 우선권주장
1020220136450 2022년10월21일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
경북대학교 산학협력단
대구광역시 북구 대학로 80, 경북대학교내(산격동)
(72) 발명자
홍순준
서울특별시 강남구 선릉로 206, 105동 1403호(대치동, 동부센트레빌)
김충호
경기도 용인시 기흥구 동백5로 105번길 3-8
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인(유)화우

전체 청구항 수 : 총 8 항

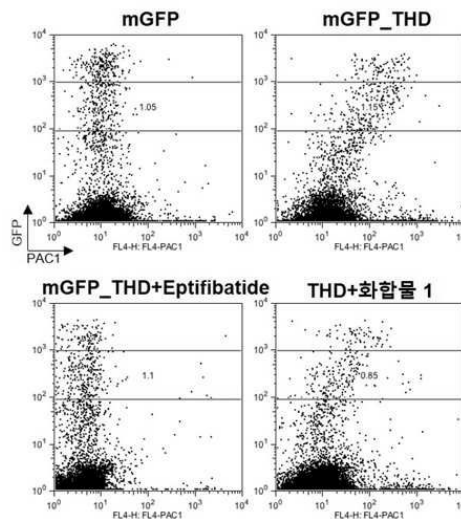
(54) 발명의 명칭 신규한 N-페닐-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 유도체 및 이의 약학적 용도

(57) 요약

본 발명은 N-페닐-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 유도체 및 이의 약학적 용도에 관한 것으로, 구체적으로, 항혈소판 활성을 가지는 신규한 N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드에 관한 것이다.

본 발명의 N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드는 당단백질(GP) IIb/IIIa의 활성화를 억제함으로써, 혈소판 응집을 저해할 수 있으므로, 혈전성 질환, 심혈관 질환의 예방, 개선 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 7/02 (2018.01)

A61P 9/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/326 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

(72) 발명자

김중호

서울특별시 성북구 화랑로 76, 102동 3504호(코업
스타클래스)

정중화

대구광역시 수성구 무열로 143

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711081534

과제번호 2018M3A9A8017949

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 신약타겟발굴 검증사업

연구과제명 Glycoprotein IIb/IIIa inside-out 신호전달을 타겟으로 한 새로운 기전의 항혈소판

제 발굴 및 효능 검증

기 여 율 1/1

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2018.04.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈소판 응집 억제용 약학적 조성물.

청구항 2

N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈전성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 혈전성 질환은 동맥혈전증, 정맥혈전증, 관상동맥혈전증, 심부정맥혈전증, 뇌동맥혈전증, 말초혈관혈전증, 동맥색전증, 정맥색전증, 신장색전증, 만성동맥폐색증, 폐경색, 뇌경색, 뇌출혈, 뇌색전증, 혈전성 정맥염, 및 심부전증으로 구성되는 군에서 선택되는 것인, 혈전성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 심혈관 질환은 고혈압, 허혈성 심장질환, 관상동맥질환, 협심증, 심근경색증, 동맥경화증, 뇌혈관질환 및 부정맥으로 구성되는 군에서 선택되는 것인, 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈소판 응집 억제용 식품 조성물.

청구항 7

N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈전성 질환의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물.

청구항 8

N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로

로 포함하는 심혈관 질환의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 N-페닐-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 유도체 및 이의 약학적 용도에 관한 것으로, 구체적으로, 항혈소판 활성을 가지는 신규한 N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 혈소판 응집은 뇌졸중, 관상 동맥 심장 질환 및 폐 혈전 색전증과 같은 다양한 심혈관 질환의 주요 원인 중 하나로 알려져 있다.
- [0004] 최근 몇 년 동안 항혈소판 요법이 증가하였으나, 상당한 비율의 고위험 환자는 여전히 이를 받지 못하고 있는 것으로 파악된다. 급성 심근경색증의 비정형적 증상은 고령자에서 흔히 나타나며, 이로 인한 진단의 불확실성 때문에 보통 고위험 환자에게는 처방되지 않는다.
- [0005] 항혈소판제는 그 기전에 따라 P2Y₁₂ 길항제, 세로토닌 길항제, COX 억제제, PDE 억제제 및 당단백질(GP) IIb/IIIa 길항제로 분류된다. P2Y₁₂ 길항제는 혈소판 응집을 유도하는 ADP 물질이 수용체에 결합하여 작용하는 것을 방지하여 혈소판 응집을 억제하며, 이에 속하는 약물로는 2015년에 승인된 클로피도그렐(clopidogrel)과 칸그렐러(cangrelor)가 있다. 세로토닌 수용체 길항제는 혈소판 응집에 관여하는 세로토닌의 작용을 방해하는 물질을 말하며, COX 억제제는 혈소판 응집을 촉진하는 트롬복산 A₂ 생성에 관여하는 효소인 사이클로옥시게나제를 억제하여 혈전 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다. 이에 속하는 아스피린은 저용량으로 장기간 사용할 경우 혈소판에서 트롬복산 A₂의 형성을 비가역적으로 차단하여 혈소판 응집에 대한 억제 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. PDE 억제제는 PDE3 효소에 의한 혈소판 활성을 억제하는 물질인 cAMP의 분해를 억제한다.
- [0006] 마지막으로 GPIIb/IIIa (또는 인테그린 α IIb β 3) 길항제 혈소판 세포막의 GPIIb/IIIa 복합체, 즉 활성화된 GPIIb/IIIa에 대한 피브리노겐의 결합을 차단하여 혈소판 상호작용 및 혈전 형성을 억제하는 새로운 종류의 항혈전제로서, 이에 속하는 약물로는 2016년에 승인된 압식시맙(abciximab) 및 티로피반(tirofiban)이 있다. 여러 대규모 시험으로 GPIIb/IIIa 억제제의 급성 관상동맥 증후군 환자에 대한 치료 효과가 확인되었으며, 이에 따라 GPIIb/IIIa 억제제는 급성 관상동맥 증후군 치료 약물의 주류로 자리잡았다.
- [0007] 혈소판이 활성화되면 혈소판의 GPIIb/IIIa 형태가 바뀌고, 이는 피브리노겐의 결합을 수용하여 혈소판 응집 및 혈전 형성을 초래한다. 기존의 GPIIb/IIIa 억제제는 경쟁적인 방식으로 피브리노겐의 결합을 직접 방해하여 혈소판 응집을 억제하지만, 두개내출혈, 후복막출혈, 혈소판감소증 등의 부작용이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 의료진과 환자에게는 미충족 의학적 요구가 존재하며, 효율적이지만 안전한 치료 옵션을 제공할 수 있는 작용방식을 가진 새로운 항혈소판제의 개발에 대한 필요성이 존재한다.
- [0008] 이러한 배경하에 새로운 항혈소판제 개발을 위한, 표적으로 탈린(talin)과 GPIIb/IIIa 간의 상호작용이 주목되었다. 탈린은 세포 골격 단백질로서, GPIIb/IIIa 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, GPIIIa의 꼬리에 결합하는 것으로 알려져 있다. 여러 연구에서 인테그린-결합 탈린 헤드 도메인의 과발현에 의해 GPIIb/IIIa가 활성화됨을 확인하였는데, 이는 GPIIIa-탈린 복합체 형성이 활성화로 이어질 수 있음을 시사한다. GPIIIa 결합을 매개하는 탈린의 F3 도메인은 GPIIIa 꼬리의 막-말단(membrane-distal, MD) 부분에 결합하며, GPIIIa 꼬리의 막-근위(membrane-proximal, MP) 나선에도 독특한 방식으로 결합한다. GPIIb/IIIa의 비활성화 상태를 유지하는 GPIIb와 GPIIIa의 막도메인(transmembrane domain)과 막 근위 부분의 상호작용은 MP 영역의 GPIIa의 돌연변이에 의해 중단되어 GPIIb/IIIa의 활성화를 야기하는바, 탈린-GPIIIa 상호작용은 GPIIb와 GPIIIa의 막도메인 및 막 근위 부분에서의 상호작용 저해를 통해 GPIIb/IIIa 활성화를 매개하는 것으로 보인다.
- [0009] 상기 기전을 바탕으로 항혈소판제로서 GPIIb/IIIa의 활성을 억제하는 저분자 화합물에 관한 연구들이 진행되고 있다.
- [0010] 본 발명자들은 신규한 생체동위원소(bioisosteric) 골격을 갖는 새로운 항혈소판제로서, N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드를 개발하고, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 한국 등록특허 제10-2209441호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명은 전술한 문제 및 이와 연관된 다른 문제를 해결하는 것을 목적으로 한다.
- [0014] 본 발명의 일 예시적 목적은 신규한 N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 및 이의 약학적 용도를 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 다른 예시적 목적은, N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈소판 응집 억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은, N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈전성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은, N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은, N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈소판 응집 억제용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은, N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈전성 질환 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은, N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은, N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈소판 응집 억제용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은, N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈전성 질환 예방, 개선 또는 치료용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은, N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환 예방, 개선 또는 치료용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은, N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈소판 응집 억제용 사료 조성물을 제공하는 것이다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은, N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈전성 질환 예방 또는 개선을 위한 사료 조성물을 제공하는 것이다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은, N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환 예방 또는 개선을 위한 사료 조성물을 제공하는

것이다.

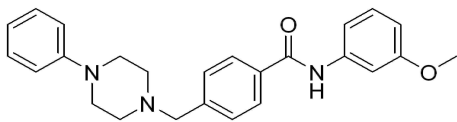
[0028] 본 명세서에 개시된 발명의 기술적 사상에 따라 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 문제점을 해결하기 위한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제는 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0030] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0031] 상기 목적을 달성하기 위한 일 양태로서, 본 발명은 N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다. 상기 N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드의

[0032] 화학식 구조는 하기와 같다.



[0033]

[0035] 본 발명에 있어서, N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드는 동일한 효능을 갖는 범위 내에서 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염의 형태를 포함한다. 이러한 염은 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염으로, 염기성염 또는 산성염일 수 있으며, 염기성염은 유기 염기염, 무기 염기염 중 어느 하나의 형태로 사용할 수 있으며, 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 리튬염, 마그네슘염, 세슘염, 아미늄(aminium)염, 암모늄염, 트리에틸아미늄염 및 피리디늄염으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0036] 이러한 염의 종류로는, 산성염으로, 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산, 이중 인산, 질산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레산, 말산, 푸마르산, 글루코산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 캄페르설폰산, 옥살산, 말론산, 글루타릭산, 아세트산, 글리콜산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산, 아스파르트산, 스테아르산 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 통상적으로 사용되는 다양한 무기산 및 유기산을 이용하여 형성되는 염이 모두 포함될 수 있다.

[0038] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 양태로서, 본 발명은 또한, N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 혈소판 응집 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0039] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 양태로서, 본 발명은 또한, N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 혈전성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0040] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 양태로서, 본 발명은 또한, N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 심혈관 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0041] 본 발명에 있어서, 상기 "혈전성 질환"은 동맥혈전증, 정맥혈전증, 관상동맥혈전증, 심부정맥혈전증, 뇌동맥혈전증, 말초혈관혈전증, 동맥색전증, 정맥색전증, 신장색전증, 만성동맥폐색증, 폐경색, 뇌경색, 뇌출혈, 뇌색전증, 혈전성 정맥염, 및 심부전증 등 각종 혈전증 및 이로부터 초래된 질환을 포함하며, 여기서, "혈전증"은 혈관에 혈전이 형성되어 순환계를 통한 혈액의 흐름을 저해시키는 것을 의미한다.

- [0042] 본 발명에 있어서, “심혈관 질환”은 고혈압, 허혈성 심장질환, 관상동맥질환, 협심증, 심근경색증, 동맥경화증, 뇌혈관질환, 부정맥 등을 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명에 있어서, “예방”은 본 발명 조성물의 투여로 심혈관 질환의 증상을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, 본 발명에서 “개선”은 본 발명의 조성물을 적용하여 심혈관 질환의 증상을 완화시키는 효과를 나타내는 것을 의미한다. 본 발명에서 “치료”는 본 발명의 조성물의 투여로 심혈관 질환의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0044] 본 발명의 약학조성물은 일 예로, 혈소판 당단백질 IIb/IIIa를 표적으로 하여 이의 활성화를 저해함으로써, 혈소판 응집 억제를 통해 심혈관 질환의 예방, 개선 또는 치료 효능을 가지고 있다.
- [0045] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체로 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다.
- [0046] 또한 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등을 포함할 수 있다. 또한, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다.
- [0047] 본 발명의 약학적 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 임의의 방법으로 투여할 수 있다. 예를 들어, 경구 또는 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구적인 투여방법으로는 이에 제한되는 것은 아니나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여일 수 있다.
- [0048] 본 발명의 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화할 수 있다. 제형화할 경우에는 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS (phosphate buffered saline)), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 충전제, 증량제, 결합제, 아췌반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제, 습윤제, 봉해제 또는 계면활성제, 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0049] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 또는 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 약학적 조성물과 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분(옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분 등 포함), 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 슈크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 텍스트로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로즈 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 예컨대, 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다.
- [0050] 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크(Talc) 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물 또는 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제 또는 보존제 등이 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉해제로 첨가할 수 있으며, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0051] 비경구적으로 투여하는 경우 본 발명의 약학적 조성물은 적합한 비경구용 담체와 함께 주사제, 경피 투여제 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법에 따라 제형화될 수 있다. 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 보다 바람직하게는, 적합한 담체로는 헥스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS 또는 주사용 멸균수, 10 % 에탄올, 40 % 프로필렌 글리콜 및 5 % 텍스트로스와 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0052] 경피 투여제의 경우 연고제, 크림제, 로션제, 겔제, 외용액제, 파스타제, 리니먼트제, 에어솔제 등의 형태가 포

함된다. 여기에서 '경피 투여'는 약학적 조성물을 국소적으로 피부에 투여하여 약학적 조성물에 함유된 유효한 양의 활성성분이 피부 내로 전달되는 것을 의미한다.

- [0053] 흡입 투여제의 경우, 본 발명에 따라 사용되는 조성물은 적합한 추진제, 예를 들면, 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체를 사용하여, 가압 팩 또는 연무기로부터 에어로졸 스프레이 형태로 편리하게 전달 할 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투약 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공하여 결정할 수 있다. 예를 들면, 흡입기 또는 취입기에 사용되는 젤라틴 캡슐 및 카트리지는 화합물, 및 락토즈 또는 전분과 같은 적합한 분말 기체의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화할 수 있다. 비경구 투여용 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975 Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기재되어 있다.
- [0054] 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 또는 생물학적 반응조절을 사용하는 방법들과 병행하여 사용될 수 있다.
- [0056] 이러한 본 발명의 조성물은, 이에 제한되는 것은 아니나, 약학적 조성물, 의약품 조성물, 식품(식품 첨가제 포함) 조성물, 사료(사료 첨가제) 조성물 등의 외용형태의 다양한 조성물의 형태로 구현될 수 있다.
- [0058] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 혈소판 응집 억제용 의약품 조성물을 제공한다.
- [0059] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 혈전성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 의약품 조성물을 제공한다.
- [0060] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 심혈관 질환의 예방, 개선 또는 치료용 의약품 조성물을 제공한다.
- [0061] 본 발명에서 사용되는 용어 "의약품"은 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것 및 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적 영향을 줄 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것을 제외한 물품을 의미하며, 일 구체예로 내복용 제제를 포함할 수 있으나 이에 제한되는 것이 아니며, 의약품의 제제화 방법, 용량, 이용방법, 구성성분 등은 기술분야에 공지된 통상의 기술로부터 적절히 선택될 수 있다.
- [0062] 본 발명의 의약품 조성물에는 상기 성분 외에 필요에 따라 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더욱 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제는 본 발명의 효과를 해하지 않는 한 제한되지 않으며, 예를 들어 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제, 윤활제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다.
- [0064] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 또한, N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 혈소판 응집 억제용 식품 조성물을 제공한다.
- [0065] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 또한, N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 혈전성 질환의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물을 제공한다.
- [0066] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 또한, N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 심혈관 질환의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물을 제공한다.

- [0067] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품을 포함한 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food), 식품 첨가제(food additives), 및 사료 등의 모든 형태를 포함하며, 인간 또는 가축을 비롯한 동물을 취식대상으로 한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.
- [0068] 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 일반 식품으로는 이에 한정되지 않지만 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(햄, 소시지 콘비이프 등), 빵류 및 면류(우동, 메밀국수, 라면, 스파게이트, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(버터, 치즈 등), 식용식물 유지, 마가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(된장, 간장, 소스 등) 등에 상기 유효성분을 첨가하여 제조할 수 있다.
- [0069] 또한, 영양보조제로는 캡슐, 정제, 환 등에 상기 유효성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 건강기능식품으로는 이에 한정되지 않지만 예를 들면, 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 건강음료로 음용할 수 있도록 액상화, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 상기 알릴 이소티오시아네이트를 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다. 또한, 혈소판 응집 억제, 혈전성 질환 또는 심혈관 질환에 효과가 있다고 알려진 공지의 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.
- [0070] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0072] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 혈소판 응집 억제용 사료 조성물을 제공한다.
- [0073] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 혈전성 질환의 예방 또는 개선을 위한 사료 조성물을 제공한다.
- [0074] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 심혈관 질환의 예방 또는 개선을 위한 사료 조성물을 제공한다.
- [0075] 본 발명에 있어서, 상기 사료 조성물은, 통상의 사료 형태로 제제화될 수 있고, 알려진 사료성분을 함께 포함할 수 있다. 또한, 사용되는 사료에 첨가제 형태로 가미되는, 사료첨가제로서도 사용될 수 있다. 본 발명의 사료첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당하며, 탄산수소나트륨(중조), 벤토나이트(bentonite), 산화마그네슘, 복합광물질 등의 광물질제제, 아연, 구리, 코발트, 셀레늄 등의 미량 광물질인 미네랄제제, 케로틴, 비타민 E, 비타민 A, D, E, 니코틴산, 비타민 B 복합체 등의 비타민제, 메티오닌, 리이산 등의 보호아미노산제, 지방산 칼슘염 등의 보호지방산제, 생균제(유산균제), 효모배양물, 곰팡이 발효물 등의 생균, 효모제 등이 추가로 포함될 수 있다.
- [0076] 본 발명의 사료 또는 사료첨가제는 포유류, 가금 및 어류를 포함하는 다수의 동물식이에 적용할 수 있다.

발명의 효과

- [0078] 본 발명에 따른 N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드는 당단백질(GP) IIb/IIIa의 활성화를 억제함으로써, 혈소판 응집을 저해할 수 있으므로, 혈전성 질환, 심혈관 질환의 예방, 개선 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0080] 도 1은 당단백질(GP) IIb/IIIa을 발현하는 세포주에 탈린을 과발현 시킨 후, N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드(화합물 1)에 따른 PAC1 결합 및 GPIIb/IIIa 활성화 저해 효과를 확인한 유세포 분석 결과이다.
- 도 2는 N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 (화합물 1)의 PAC1 결합 및 GPIIb/IIIa 활성화 저해 효과를 정량적으로 확인한 결과이다.
- 도 3은 N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 (화합물 1)의 농도별 처리에 따른 PAC1 결합 및 GPIIb/IIIa 활성화 저해 효과를 탈린(THD)을 과발현시킨 경우를 음성 대조군(기준값 100%)으로 설정하고, 엠티피바타이드를 처리한 경우를 양성 대조군(PAC1 결합 억제, 기준값 0%,)로 설정하여, 정량적으로 확인한 결과이다.
- 도 4는 화합물 1의 트롬빈-의존적 혈소판 퍼짐(spreading) 저해 효과를 혈소판 actin 염색을 통해 세포형광면역 염색으로 확인한 결과이다.
- 도 5는 정상인 혈액 샘플에 활성화제인 ADP 또는 TRAP과 함께 화합물 1을 처리한 후, PAC1 또는 p-selectin을 FACS로 확인하여 혈소판 응집력을 확인한 결과이다.
- 도 6은 정상인 또는 기존 항혈소판제 복용 환자의 혈액을 이용하여 ADP 또는 TRAP을 활성화제로 사용하고, 화합물 1을 처리한 후 흡광도를 측정하여 혈소판 응집력을 측정한 결과이다.
- 도 7은 아스피린 또는 클로피도그렐을 복용한 심혈관질환 환자 혈액 샘플에 ADP 또는 TRAP을 활성화제로 사용하고, 화합물 1을 처리한 후 PAC1을 FACS로 확인하여 혈소판 응집력을 확인한 결과이다.
- 도 8은 정상인 혈액 샘플에서 ADP를 활성화제로 사용하고, 화합물 1을 농도별로 처리하여 마이크로-응집에 의한 흡광도 변화를 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0081] 이하, 본 발명을 하기 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

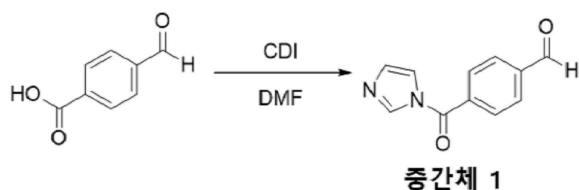
[0083] 본 발명의 신규한 N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 합성을 위한 중간체 제조

[0084] 분석방법

- [0085] 박막 크로마토그래피는 Merck 실리카겔 60 F254 플레이트(Merck, Kenilworth, NJ, USA)를 사용하여 수행했으며, 플래시 크로마토그래피는 Isolera(Biotage, Uppsala, Sweden)를 사용하여 자동으로 또는 Merck 실리카겔 60(0.040-0.063 mm, 230-400 메쉬, Merck, Kenilworth, NJ, USA)을 사용하여 수동으로 수행했다. ¹H- 및 ¹³C-NMR 스펙트럼은 JEOL-500(JEOL, Tokyo, Japan) 및 AVANCE-500(Bruker, Billerica, MA, USA) 분광계를 사용하여 기록되었고, ¹H- 및 ¹³C-NMR 화학적 이동은 TMS에 대한 백만분율(ppm) 단위로 보고되며, 잔류 용매 피크는 내부 기준으로 사용되었다. ¹H-NMR 데이터는 화학적 이동, 다중도(br, 광범위 신호; s, 단일선; d, 이중선; t, 삼중선; q, 사중선; quint, 오중선, m, 다중선 및/또는 다중 공명), 양성자 수 및 커플링 상수(Hz) 순서로 보고되었다.

- [0087] 중간체 1: 4-(1H-이미다졸-1-카르보닐)벤즈알데히드 (4-(1H-imidazole-1-carbonyl)benzaldehyde)

[0088] [반응식 1]

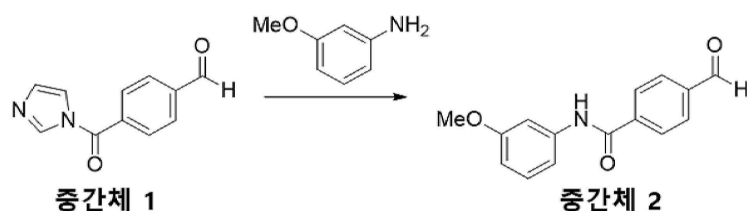


[0089]

[0090] 4-포르밀벤조산(150 mg)을 DMF(5 mL)에 용해시킨 다음, 1,1'-카르보닐디이미다졸(162 mg)을 조금씩 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 교반하여 중간체 1(4-(1H-이미다졸-1-카르보닐)벤즈알데히드)를 수득하였다.

[0091] **중간체 2: 4-포르밀-N-(3-메톡시페닐)벤즈아미드 (4-formyl-N-(3-methoxyphenyl)benzamide)**

[0092] [반응식 2]

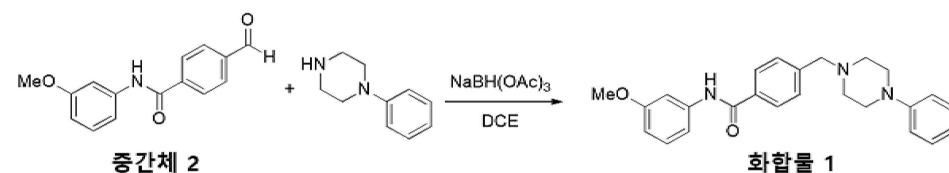


[0093]

[0095] 중간체 1을 포함하는 반응 혼합물에 m-아니시딘(135 mg)을 첨가하고, 8시간 동안 교반하였으며, 물로 퀀칭하였다(quenched). 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하고, 물로 세척하였다. 휘발성 물질을 감압하에 제거하고 잔류물을 MPLC로 정제하여 중간체 2(4-포르밀-N-(3-메톡시페닐)벤즈아미드)(221 mg, 87%)를 얻었다.

[0097] **실시예 1: N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 (화합물 1)**

[0098] [반응식 3]



[0100]

[0102] 1,2-디클로로에탄(5 mL) 내 중간체 2(111 mg) 및 1-페닐피페라진(81 mg)의 혼합물에 나트륨 트리아세톡시보로하이드라이드(148 mg)를 조금씩 첨가하였다. 혼합물을 밤새 교반하고, 1N NaOH 수용액으로 퀀칭하였다. 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하고, 물로 세척하였다. 휘발성 물질을 감압하에 제거하고 잔류물을 MPLC로 정제하여 N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드(화합물 1, 52 mg, 26%)를 얻었다: ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 9.10 (s, 1H), 8.21(d, 2H), 7.73 (dd, J = 8.3, 7.4 Hz, 1H), 7.73(t, 1H), 7.55-7.53 (m, 4H), 7.30 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.23 (dd, J = 5.5, 3.0 Hz, 1H), 7.17 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.92 (ddd, J = 8.1, 2.6, 1.0 Hz, 1H), 6.62 (t, 1H), 5.33 (s, 2H), 5.00 (dd, J = 12.0, 5.8 Hz, 1H), 4.74 - 4.56 (m, 2H), 4.56-4.39 (m, 2H), 3.49 (dd, J = 13.2, 6.6 Hz, 1H), 3.43-3.17 (m, 3H), 2.90-2.82 (m, J = 12.6 Hz, 1H), 2.80-2.76 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.18-2.14 (m, 1H), 1.61-1.45 (m, 10H), TLC(Rf 0.25, 25% EtOAc in n-hexane, 254 nm), LR-ESI-MS (367 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ESI)

- [0104] 실험예 1: 화합물 1의 활성화된 GPIIb/IIIa에 대한 PAC1 결합 억제효과
- [0105] 1.1. PAC1 결합 저해도 분석방법
- [0106] (1) 세포 배양 및 세포 접착 분석
- [0107] 인테그린 α IIb β 3(GPIIb/IIIa), A5를 발현하는 Chinese hamster ovary 세포주(이하, CHO 세포주)는 Mark Ginsberg 박사(University of California, San Diego)으로부터 제공받았으며, 10% FBS, 100U/mL 페니실린, 100 μ g/mL 스트렙토마이신, 2mM L-글루타민 및 비필수 아미노산이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 유지되었다.
- [0108] 세포 접착 분석은, 96웰 플레이트를 PBS(인산염 완충 식염수) 내 5-10 μ g/mL 피브리노겐으로 4℃에서 밤새 1차 코팅한 다음, 비-특이적 세포 접착을 방지하기 위해 PBS 내 2% BSA(소 혈청 알부민)으로 2시간동안 상온에서 추가 배양하여 블로킹하였다. 서브컨플루언트 세포를 트립신 처리로 분리하고 세포 현탁액을 DMEM으로 2회 세척하였다.
- [0109] 이러한 세포의 엘리쿼트(aliquots)을 피브리노겐으로 코팅된 96웰 플레이트의 웰에 첨가하고 합성된 3-(3-브로모페닐)-1-(4-클로로벤질)-1H-피라졸-5-아민의 존재하에 CO₂ 인큐베이터에서 37℃에서 0.5 내지 1시간 동안 배양하였다. DMEM으로 3회 세척한 후, 남아있는 세포는 제조사의 지시에 따라 Cell Counting Kit-8(Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD, USA)을 사용하여 정량하였다.
- [0110] (2) 화합물 1의 GPIIb/IIIa 저해성능 평가
- [0111] 합성된 N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드의 당단백질(Glycoprotein) IIb/IIIa(이하, GPIIb/IIIa) 저해 성능을 평가하기 위해, 인간의 GPIIb/IIIa를 발현하는 Chinese hamster ovary 세포주 (이하 CHO 세포주)에 활성화 형태의 탈린 (talín head domain, 이하 THD)과 소량의 green fluorescence protein (GFP)을 함께 형질감염시킨 세포주를 사용하였다. 형질감염시킨 세포주는 배양접시에서 떼어낸 후 배양액(DMEM)으로 세척 후 농도별 화합물 1과 PAC1 항체를 30분간 처리하였으며, 세척 후 알로피코시아닌 (Allophycocyanin)이 결합된 항-IgM 항체를 2차항체로 이용하여 염색하였다. 염색된 세포주는 유세포 분석으로 분석하여 형질감염 표지자로 사용된 GFP를 발현하는 세포에서의 PAC1 결합 정도를 평균 형광 정도(Mean Fluorescence Intensity, MFI)로 측정하고, 아래 식을 이용하여 농도별 화합물 1의 억제율(% inhibition)을 계산하였다. N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드에 대하여 2회 이상 독립실험을 수행하였다.
- [0112]
$$\text{억제율}(\% \text{ inhibition}) = 100 - \{(\text{화합물 1 처리한 샘플 MFI} - \text{엠티피바타이드(Epitifibatide) 처리 샘플 MFI}) / (\text{DMSO 처리 샘플 MFI} - \text{엠티피바타이드 처리 샘플 MFI})\} \times 100$$
- [0113] 위 계산식을 통해, 엠티피바타이드를 처리한 샘플은 GPIIb/IIIa와 PAC1 결합이 완전히 억제할 수 있는 양성대조군으로 % inhibition 값을 100%로, vehicle인 DMSO를 처리한 샘플은 탈린에 의한 PAC1 결합이 증가되었으나 어떠한 저해 효과도 보이지 않는 음성대조군으로 억제율(% inhibition) 값은 0%로 설정하였다.
- [0114] (3) 혈소판 활성화 표지자 발현수준 분석
- [0115] 정상인의 혈액을 이용하여 N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드(화합물 1)의 혈액응고 프로파일 및 혈소판 활성화 표지자 발현 및 백혈구-혈소판 응집능을 측정하였다. 정상인 그룹당 8명 이상의 환자 혈액에 대해 화합물 1은 0, 50 및 200 μ mol/L의 농도로 처리되었으며, ADP 또는 TRAP을 활성화제로 사용하여 FACS (Flow cytometry; 유세포 분석)를 수행하였다.
- [0116] 정상인 및 현재 기존의 항혈소판제 (아스피린 또는 클로피도그렐)를 복용하고 있는 환자들의 혈액을 이용하여 효과가 검증된 약물들의 기존의 항혈소판제에 의한 혈액응고 프로파일 및 혈소판 활성화 표지자 발현 및 백혈구-혈소판 응집능을 측정하였다. 일반 환자 및 현재 기존의 항혈소판제를 복용하고 있는 환자 그룹당 8명 이상의 환자 혈액에서 흡광도를 이용한 혈소판 응집력을 측정하였으며, 화합물 1은 0, 20 및 50 μ mol/L의 농도로 처리하였다.
- [0117] 기존의 항혈소판제 (아스피린 혹은 클로피도그렐)를 복용하고 있는 심혈관질환자들의 혈액을 이용하여 화합물 1의 기존의 항혈소판제에 의한 혈액응고 프로파일 및 혈소판 활성화 표지자 발현 및 백혈구-혈소판 응집능을 측정하였다. 기존의 항혈소판제를 복용하고 있는 환자 그룹당 7명 이상의 혈액에서 FACS를 이용한 혈소판 응집력을 측정하였다. 효과가 검증된 100 μ mol/L의 농도뿐만 아니라 기존의 농도보다 상대적으로 낮은 농도인 7.5 μ

mol/L를 추가하여 저농도의 유효/검증물질의 혈소판 응집력 저해효과를 비교하였다.

[0118] (4) 정상인 및 환자 혈액 샘플에서의 혈소판 응집능 분석

[0119] 전술한 혈소판 응집능 프로파일 분석뿐만 아니라, 화합물 1의 임상 약리 효능을 추가적으로 확인하기 위하여, 전혈을 사용하며 인체 내 반응을 잘 반영하는 분석법으로서, 혈소판 응집에 의하여 생성된 마이크로-응집(micro-aggregation)에 의한 흡광도 변화를 측정하였다. 정상인의 혈액에 활성화제를 처리하여 혈소판 응집을 유도하고, 시간에 따른 화합물 1의 마이크로-응집 저해 효과를 측정하였다. 마이크로-응집 수에 의한 흡광도 값을 약물 처리 전 (0 min)과 비교하여 정량화하므로 그래프의 Y축 값 (percentage of decline over time)이 커질수록 높은 마이크로-응집 저해 효과를 나타냄을 의미한다.

[0121] 1.2. PAC1 결합 억제효과 확인

[0122] 혈소판 응집에는 GPIIb/IIIa의 활성화가 필수적이고, GPIIb/IIIa의 활성화는 활성화된 GPIIb/IIIa와 선택적으로 결합할 수 있는 PAC1이라는 항체와의 반응성으로 판단이 가능하므로, 이는 유효/검증물질의 항혈소판 효과를 측정할 수 있는 지표가 된다. 따라서, GPIIb/IIIa를 발현하는 세포주에서 GPIIb/IIIa의 활성화 단백질인 탈린에 의한 PAC1 결합이 화합물 1의 처리에 의해 저해되는지 확인하고자 하였다.

[0123] 합성된 N-(3-메톡시페닐)-4-((4-페닐피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 (화합물 1)는 PAC1 결합에 대한 억제 활성을 나타내었으며, DMSO는 음성 대조군으로 사용되었다. 구체적으로 GPIIb/IIIa 발현 세포주에 탈린을 발현시킨 후, 화합물 1을 농도별로 처리하였을 때 PAC1 결합 저해도를 유세포 분석기로 분석하였다.

[0124] GPIIb/IIIa 발현 세포주에 탈린을 발현시킨 후, 엠티피바타이드 또는 화합물 1을 처리한 경우, PAC1 결합이 효과적으로 저해됨을 확인하였다(도 1 및 도 2).

[0125] 또한, 농도별로(200uM, 66.7uM, 22.2uM, 7.41uM) 화합물 1을 처리한 결과, 7.41uM, 22.2uM, 66.7uM의 농도에서는 PAC1 결합 및 GPIIb/IIIa 활성화 저해 효과가 거의 나타나지 않으나, 200uM 농도에서는 25% 이상 PAC1 결합 및 GPIIb/IIIa 활성화 저해 효과가 나타남을 확인하였다(도 3).

[0127] 실험예 2: 화합물 1의 트롬빈-의존적 혈소판 퍼짐(spreading) 저해 효과

[0128] 2.1. 혈소판-피브리노겐 결합 측정

[0129] (1) 혈소판 분리 및 퍼짐 분석(spreading assay)

[0130] 화합물 1이 GPIIb/IIIa를 활성화시키는 신호전달 과정에서 탈린의 상위단계에서 작용하여 활성화를 저해하는 경우에는, GPIIb/IIIa를 과발현시킨 세포주를 이용하여 화합물의 항혈소판 효과를 검증할 수 없다. 이를 극복하기 위하여 혈액은 건강한 기증자로부터 채혈하여 진행하였다. 혈소판 분리를 위해 건강한 기증자의 혈액 샘플을 3.2% 시트르산나트륨 완충액(BD, Franklin Lakes, NJ, USA)이 포함된 BD Vacutainer 튜브에 수집하고, 그 다음 혈액/구연산염 혼합물의 3mL 샘플을 875 μ L의 변형된 Tyrode 용액(140mM NaCl, 2.7mM KCl, 0.4mM NaH₂PO₄, 10mM NaHCO₃, 5mM 텍스트로오스, 10mM HEPES, pH 7.4), 175 μ L의 ACD 완충액(85 mM 시트르산나트륨, 65 mM 시트르산 및 104 mM D-글루코스, pH 4.4) 및 1 U/ μ L 아피라제에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 200g으로 원심분리하고 상청액(혈소판-풍부 혈장, PRP)을 1U/ μ L 아피라제 및 0.375mM 프로스타글란딘 E1으로 처리한 후 암실에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, PRP를 실온에서 5분 동안 700g에서 원심분리하고, 펠렛을 Walsh 완충액(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 1mM MgCl₂, 3.3mM NaH₂PO₄, 및 20mM HEPES, pH 7.4)에 재현탁시켰다. 혈소판 현탁액은 작용제(ADP 또는 트롬빈), 화합물 1 및/또는 비히클의 존재 하에 10 μ g/mL 피브리노겐으로 코팅된 커버 글라스에서 인큐베이션했다. 결합되지 않은 혈소판은 Walsh 완충액으로 세척하고 결합된 혈소판은 3.5% 포름알데히드로 고정하였으며 시각화를 위해 로다민-팔로이딘으로 염색했다.

[0131] 로다민(Rhodamine)이 결합된 팔로이딘(Phalloidin)으로 액틴을 염색 후, 염색된 혈소판의 형광 및 미분 간섭 이미징(differential interference contrast images)은 전하결합소자 카메라와 100x 오일 렌즈가 장착된 도립 형광 현미경(TI-E; Nikon, Tokyo, Japan)을 사용하여 촬영되었다. 관찰 결과, 화합물 1을 처리한 경우 트롬빈에 의해 유도된 혈소판 퍼짐효과가 효과적으로 저해됨을 확인하였다(도 4).

[0133]

실험예 3: 혈액 샘플을 이용한 혈소판 응집능 평가

[0134]

정상인 혈액 샘플에서 활성화제인 ADP 및 화합물 1을 처리한 후, PAC1과 p-selectin을 FACS로 확인한 결과, 화합물 1을 처리한 경우 대조군 대비 항혈소판능이 증가함을 확인하였다(도 5). 마찬가지로, 동일 활성화제에 대해 p-selectin을 FACS로 확인한 결과 역시 대조군 대비 항혈소판능이 증가함을 확인하였다. 활성화제로 TRAP을 사용한 경우에도 PAC1 및 p-selectin의 FACS 결과에서 화합물 1을 처리한 경우 통계적으로 유의성이 있는 항혈소판능의 증가, 즉 혈소판 응집이 감소됨을 확인하였다(도 5).

[0135]

정상인 혈액 샘플에서, 활성화제인 ADP 또는 TRAP과 화합물 1을 처리한 후, 흡광도로 혈소판 응집능을 측정된 결과, 활성화제로 ADP 또는 TRAP을 사용한 경우 모두 화합물 1에 의해 혈소판 응집이 농도별로 차이가 있었으나, 화합물 1을 20 $\mu\text{mol/L}$ 로 처리한 경우 대조군 대비 항혈소판능이 다소 증가함을 확인할 수 있었다(도 6A).

[0136]

또한, 항혈소판제를 복용하고 있는 환자 혈액 샘플에서 활성화제인 ADP 또는 TRAP과 화합물 1을 처리한 후, 흡광도로 응집능 시너지를 측정된 결과, 낮은 농도에서도 항혈소판능이 증가됨을 확인하였다. 즉 혈소판 응집의 감소를 확인하여 기존의 항혈소판제에 화합물 1을 추가적으로 투여할 경우 항혈소판능에 있어서 시너지 효과를 발휘할 수 있을 것으로 판단된다(도 6B).

[0137]

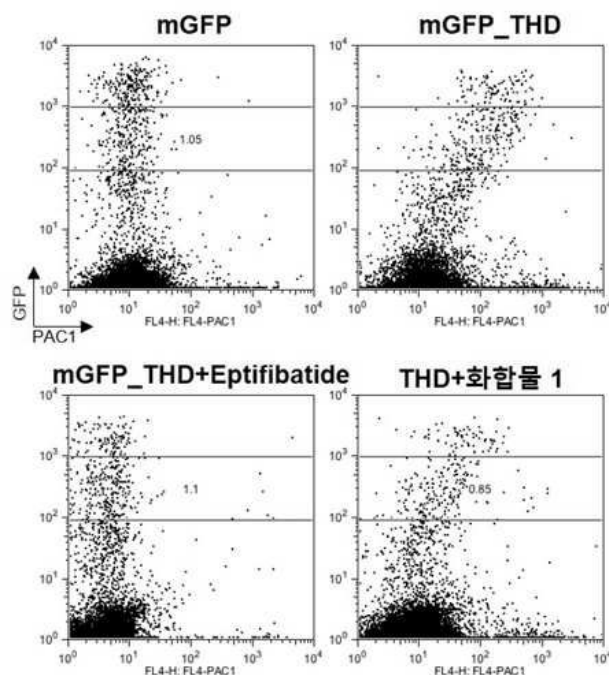
아스피린 또는 클로피도그렐 복용 심혈관 환자 혈액 샘플에 활성화제(ADP 또는 TRAP)과 화합물 1을 처리한 후, PAC1을 FACS로 확인한 결과, 정상인의 결과와 유사하게 화합물 1을 처리한 경우 혈소판 응집력 저해 효과를 나타냄을 확인하였다. 특히, ADP 또는 TRAP을 활성화제로 사용하여 아스피린 복용 환자 대상으로 화합물 1의 혈소판 응집력을 측정하였을 때, 저농도인 7.5 $\mu\text{mol/L}$ 에서도 혈소판 응집력 저해효과가 나타남을 확인하였다(도 7).

[0138]

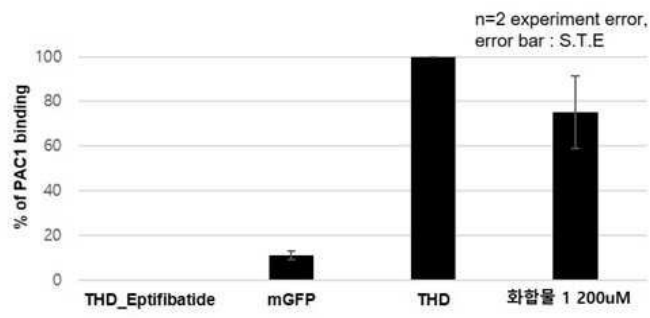
활성화제로 ADP를 사용하여 정상인의 혈액 내 혈소판의 마이크로-응집을 유도한 후, 화합물 1을 처리한 경우의 흡광도 변화를 측정된 결과, 생리식염수 (NS)를 처리한 군에 비하여 모든 농도에서 통계적으로 유의성 있는 저해효과를 나타냄을 확인하였다(도 8).

도면

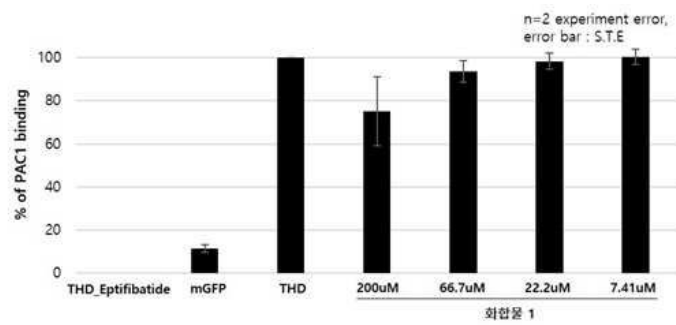
도면1



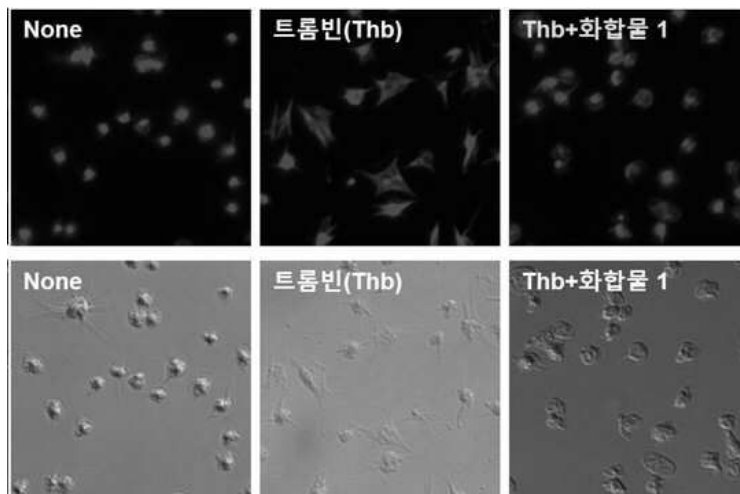
도면2



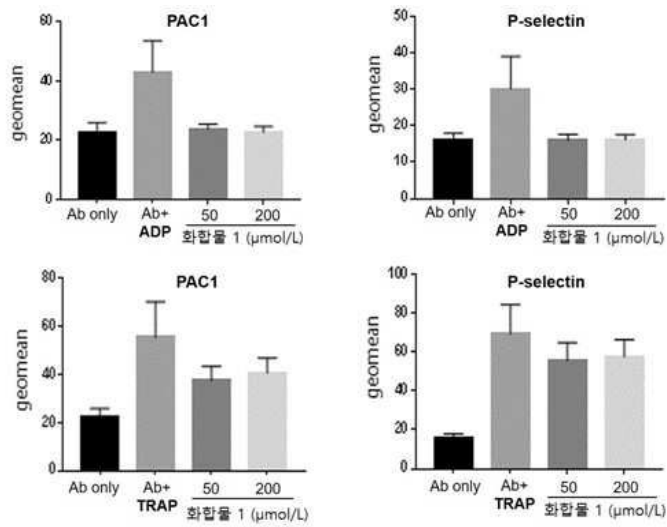
도면3



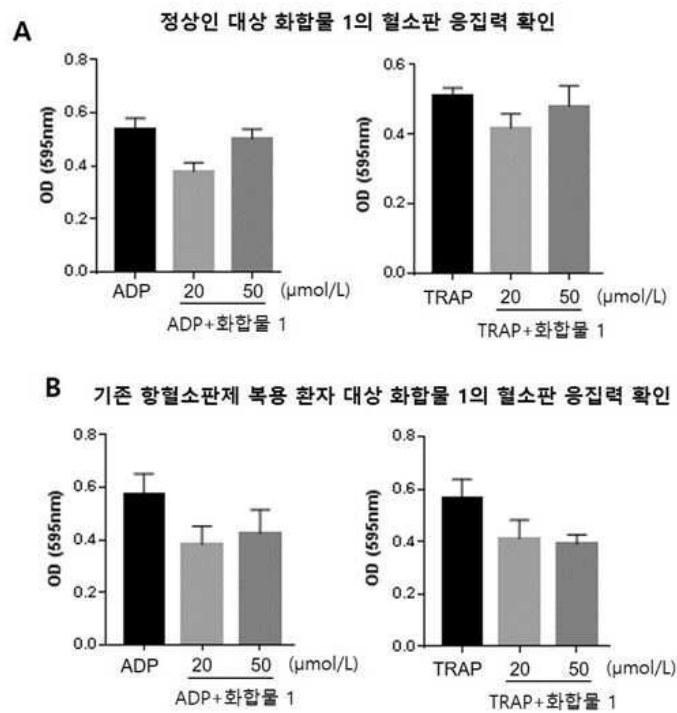
도면4



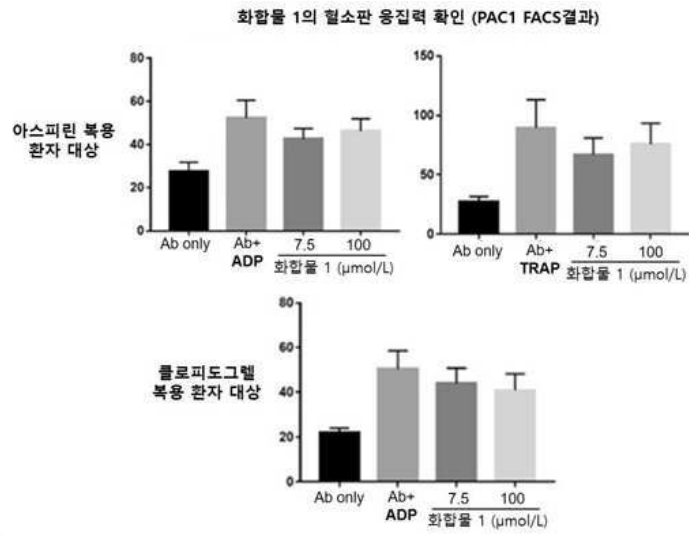
도면5



도면6



도면7



도면8

