(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년01월17일
(11) 등록번호 10-2351790
(24) 등록일자 2022년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/341 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61P 9/00 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/341 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2020-0016178
(22) 출원일자 2020년02월11일
심사청구일자 2020년02월11일
(65) 공개번호 10-2021-0101789
(43) 공개일자 2021년08월19일
(56) 선행기술조사문헌
ORG. LETT.,13(10), 2544~2547, 2011.04.15
KR1020090082739 A

(73) 특허권자
가톨릭관동대학교산학협력단
강원도 강릉시 범일로579번길 24(내곡동, 가톨릭관동대학교)
(72) 발명자
김성환
인천광역시 서구 심곡로100번길 국제성모병원 바이오융합연구원
(74) 대리인
특허법인다나

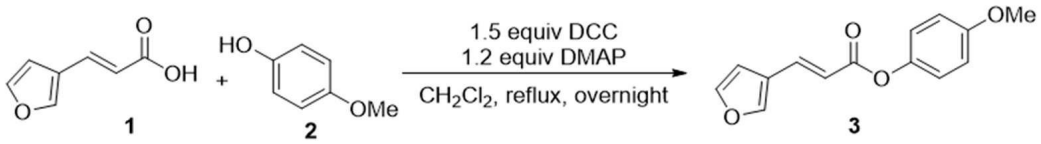
전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 **3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체를 포함하는 이상 증식성 혈관 질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체를 유효성분으로 포함하는 혈관 평활근 세포의 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체는 혈관 평활근 세포의 증식 및 이동을 효과적으로 억제하고, 평활근 세포의 증식과 관련된 유전자들의 활성화를 저해할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 9/00 (2018.01)
A61P 9/10 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/326 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

명 세 서

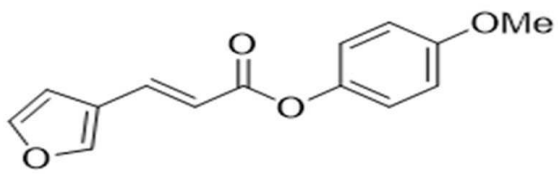
청구범위

청구항 1

하기 화학식 2로 표시되는 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈관 평활근 세포의 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,

상기 혈관 평활근 세포의 이상 증식성 질환은 동맥경화증, 허혈성 심장질환, 혈관협착증, 혈관재협착증, 말초혈관협착증 및 경혈관 동맥 성형술 후 발생하는 합병증으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 혈관 평활근 세포의 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 2]



청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 화학식 2의 화합물은 혈관 평활근 세포의 이동 또는 증식을 억제하는 것인, 혈관 평활근 세포의 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

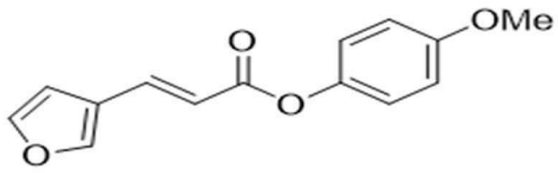
제5항에 있어서, 상기 혈관 평활근 세포의 이동 또는 증식은 EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) 또는 MMP(matrix metalloproteinase)의 활성을 억제하는 경로를 통해 이루어지는 것인, 혈관 평활근 세포의 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

하기 화학식 2로 표시되는 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈관 평활근 세포의 이상 증식성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물로서,

상기 혈관 평활근 세포의 이상 증식성 질환은 동맥경화증, 허혈성 심장질환, 혈관협착증, 혈관재협착증, 말초혈관협착증 및 경혈관 동맥 성형술 후 발생하는 합병증으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 혈관 평활근 세포의 이상 증식성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[화학식 2]



청구항 8

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체를 유효성분으로 포함하는 이상 증식성 혈관 질환, 구체적으로는 혈관 평활근 세포의 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 식생활의 서구화와 생활 패턴의 변화로 인해 각종 동맥경화증류, 심부전증, 심근경색증, 혈관협착증, 혈관재협착증, 협심증, 부정맥증, 심장질환증, 뇌졸중 및 말초혈관협착증 등의 혈관 질환 발병률이 급격히 증가하고 있다. 2018년 통계청이 발표한 사망원인 통계에 따르면, 한국인의 4대 사망 원인은 악성신생물 (암), 심장 질환, 폐렴, 뇌혈관 질환으로 사망 원인 중 2종이 혈관 질환과 관련이 있다. 특히 동맥 평활근세포 증식이 주원인으로 작용하는 관상동맥 경화로 야기되는 협심증, 죽상동맥경화증으로 인한 심근경색 등으로 사망하는 비율이 증가 추세에 있는 것은 심각한 사회문제가 아닐 수 없다.

[0004] 현재까지 혈관 질환을 치료하기 위해, 약물요법, 유전자 치료법, 스텐트 삽입술과 같은 경피적 관동맥 삽입술, 외과적인 관동맥 우회술 등의 재관류 요법 등이 시행 중에 있으나, 상기와 같은 수술요법은 효율성은 높지만 수술 후 약 3~6개월이 지나면 40%의 환자에게서 재협착(restenosis)이 일어난다는 단점이 있다. 즉, 스텐트 시술 등과 같은 외과적 수술로 인해 내피세포가 손상되는 경우에는, 정상적인 경우와는 다르게, 활성화된 혈소판에서 분비되는 혈소판 유래 성장인자(PDGF, platelet-derived growth factor)와 혈장 중에 포함되어 있는 다양한 사이토카인이 분비되어 혈관 평활근 세포의 증식, 이동, 단백질 합성능력 등의 급격한 변화를 유도하므로, 동맥내강이 좁아져서 동맥경화 또는 혈관 재협착에 이르게 된다(Ross, R., 1999; Sachinidis, A. et al., 1990).

[0005] 혈관 재협착을 예방하기 위한 방법으로서, 항응고제, 항혈소판제, 콜레스테롤 생합성 저해제, 엔지오텐신 전환효소 저해제(angiotensin converting enzyme inhibitors), 지질저하제 등의 약물이 사용되고 있으나, 만족할 만한 효과는 얻지 못하고 있는 실정이다.

[0006] 상기와 같은 환경에서 본 발명자들은 천연물에서 유래한 혈관 평활근 세포의 증식을 억제할 수 있는 물질을 연구, 발굴하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2009-0082739호

발명의 내용

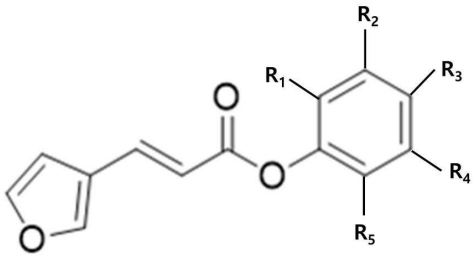
해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 혈관 평활근 세포의 이상 증식을 억제할 수 있는 천연물 유래의 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체를 이용하여 혈관 평활근 세포의 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈관 평활근 세포의 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] [화학식 1]

[0013] 

[0014] 상기 화학식 1에서,

[0015] R_1, R_2, R_4 및 R_5는 각각 독립적으로 수소 또는 C_1 내지 C_6 알킬이고,

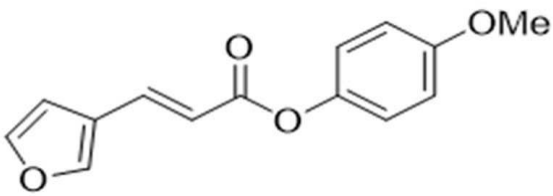
[0016] R_3은 및 수소, C_1 내지 C_6 알킬 및 C_1 내지 C_6 알콕시로 이루어진 군에서 선택된다.

[0017] 구체적으로, 상기 화학식 1에서 R_1, R_2, R_4 및 R_5는 수소이고, 상기 R_3은_하이드록시, C_1 내지 C_3 알킬 및 C_1 내지 C_3 알콕시로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 보다 바람직하게, 상기 화학식 1에서 R_1, R_2, R_4 및 R_5는 수소이고, 상기 R_3은 C_1 내지 C_3 알콕시일 수 있다.

[0018] 본 발명자들은 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 신호전달 경로를 통해 혈관 평활근 세포의 증식을 억제할 수 있는 물질을 연구한 결과, 동충하초 추출물에서 활성 물질로 4-메톡시페닐 (*E*)-3-(퓨란-3-일) 아크릴레이트 (4-methoxyphenyl (*E*)-3-(furan-3-yl) acrylate)를 확인하였다.

[0019] 본 명세서에 사용된 용어, "4-메톡시페닐 (*E*)-3-(퓨란-3-일) 아크릴레이트"는 하기 화학식 2의 구조를 갖는 화합물을 의미한다.

[0020] [화학식 2]

[0021] 

[0022] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 화학식 2의 화합물은 (E)-3-(3-furyl)prop-2-enoic acid를 페놀 유도체(도 1 참조)와 반응시켜 합성될 수 있다.

[0023] 본 발명에서, 상기 혈관 평활근 세포의 이상 증식성 질환은 동맥경화증, 허혈성 심장질환, 혈관협착증, 혈관재협착증, 말초혈관협착증 및 경혈관 동맥 성형술 후 발생하는 합병증으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 활성 물질을 합성하여 실험한 결과 손상된 혈관에서 신생혈관내막 형성이 억제되고, 타입 I 콜라겐-활성화된 혈관 평활근 세포에서 MMP-2 및 MMP-9의 활성화가 억제되며, COX-2의 발현 또한 억제되는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체는 혈관 평활근 세포의 이동 또는 증식을 억제하여 항-동맥경화 효과를 가지는 것을 알 수 있었다.

[0025] 본 발명에서, 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 상기 화학식 1의 화합물과 유리산이 함께 염을 형성하여, 산부가염으로서 존재할 수 있다. 상기 화학식 1의 화합물은 당해 기술분야에 공지된 통상의 방법에 따라 약제학적으로 허용되는 산 부가염을 형성할 수 있다. 상기 유리산으로는 유기산 또는 무기산을 사용할 수 있고, 상기 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 또는 인산 등을 사용할 수 있고, 상기 유기산으로는 구연산(citric acid),

초산, 젖산, 주석산(tartariac acid), 말레인산, 푸마르산(fumaric acid), 포름산, 프로피온산(propionic acid), 옥살산, 트리플루오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메탄술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 갈룩투론산, 엠본산, 글루탐산 또는 아스파르트산 등을 사용할 수 있다.

[0026] 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 상기 화학식 1의 화합물의 무기염으로 존재할 수 있다. 상기 화학식 1의 화합물은 당해 기술분야에 공지된 통상의 방법에 따라 약제학적으로 허용되는 무기염을 형성할 수 있다. 상기 무기염에는 알루미늄, 암모늄, 칼슘, 구리, 철, 리튬, 마그네슘, 망간, 칼륨, 나트륨, 또는 아연과의 염이 있으나 이에 한정되지 않으며, 암모늄, 칼슘, 마그네슘, 칼륨, 또는 나트륨염이 바람직하다.

[0027] 또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물을 포함한 용매화물을 모두 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분으로 상기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 것 이외에 약제의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화 하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0030] 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 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘(calcium carbonate), 슈크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 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, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0031] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여법이라면 어느 것이나 사용 가능하고, 전신 투여 또는 국소 투여가 가능하나, 전신 투여가 더 바람직하며, 정맥 내 투여가 가장 바람직하다.

[0032] 상기 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량 및 투여시기는 투여대상의 나이, 성별, 질병의 종류, 상태, 체중, 투여경로, 투여 횟수, 약의 형태에 따라서 달라질 수 있다. 일일 투여량은 약 0.1 내지 1000 ㎎/㎏이고, 바람직하게는 1 내지 100 ㎎/㎏ 이다. 상기 투여량은 질환이 종류, 암의 진행 정도, 투여 경로, 성별, 나이, 체중 등에 따라 적절히 증감될 수 있다.

[0033] 상기 본 발명에 따른 약학 조성물은 혈관 평활근 세포의 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료 효과를 얻기 위하여, 유효성분으로서 성인을 기준으로 1 일 총 투여량이 화합물로서 0.1 내지 1000 ㎎/㎏이 되도록 임의로 수회 나누어서 투여할 수 있다. 상기 투여량은 치료 또는 예방하고자 하는 질병의 종류, 질병의 진행 정도, 투여 경로, 성별, 나이, 체중, 건강상태 등에 따라 적절히 증감될 수 있다.

[0034] 상기 본 발명에 따른 약학 조성물은 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 화합물, 이의 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 전체 조성물 총 중량에 대해 약 0.0001 내지 10 중량%, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량%의 양으로 함유할 수 있다.

[0036] 본 발명의 다른 양상은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈관 평활근 세포의 이상 증식성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0037] 상기 식품 조성물은 실질적으로 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 사용하므로 혈관 평활근 세포의 이상 증식성 질환 치료용 약학 조성물과 중복되는 내용은 명세서의 과도한 기재를 피하기 위하여 생략한다.

[0038] 본 명세서에서 식품이란 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하고, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 건강기능식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제 등을 모두 포함하는 의도이다.

[0039] 본 발명의 식품 조성물은 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능식품 등의 유효성분으로 사용될 수 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스넥류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과실, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면스프 등)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 건강기능식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0040] 본 발명에서 건강기능식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체중조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다.

[0041] 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0042] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하지 않지만, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 100 중량부당 0 내지 2,000 중량부 범위에서 포함할 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 있어서, 상기 유효성분은 전체 식품 중량의 0.001 중량% 내지 99 중량%로 포함될 수 있으며, 음료 조성물에는 100 ㎖를 기준으로 0.002 g 내지 1000 g의 비율로 포함될 수 있다.

발명의 효과

[0045] 본 발명의 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체를 사용하면 혈관 평활근 세포의 이동 및 증식을 효과적으로 억제하고, 평활근 세포의 증식과 관련된 유전자들의 활성화를 저해할 수 있으므로 상기 유도체는 혈관 평활근 세포의 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 본 발명의 일 예에 따른 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체의 합성 과정을 개략적으로 나타낸다.

도 2는 본 발명의 일 예에 따른 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체의 ^{1}H 핵자기 공명 분석 결과를 나타낸다.

도 3은 본 발명의 일 예에 따른 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체의 ^{13}C 핵자기 공명 분석 결과를 나타낸다.

도 4는 동맥 평활근 세포에 다양한 농도의 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체를 처리한 후 세포 생존율을 확인한 결과를 나타낸다.

도 5는 경동맥이 손상된 랫트에 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체를 투여한 후 신생혈관내막 증식 정도를 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 동맥 평활근 세포의 단일층에 스크래치를 형성한 후 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체의 처리 농도에 따른 평활근 세포의 이동 수준을 확인한 결과를 나타낸다.

도 7은 동맥 평활근 세포에 다양한 농도의 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체를 처리한 후 EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer)의 활성화 수준(A 및 B), MMP (matrix metalloproteinase)의 활성화 수준(C 및 D)을 확인한 결과를 나타낸다.

도 8은 동맥 평활근 세포에 다양한 농도의 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체를 처리한 후 COX-2(cyclooxygenase-2) 활성화 수준을 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0050] **실험 방법**

[0051] **1. 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체 합성**

[0052] (*E*)-3-(3-furyl)prop-2-enoic acid (100 ㎎, 0.724 mmol; Sigma-Aldrich, 미국), 4-메톡시페놀 (180 ㎎, 1.45 mmol; 4-methoxyphenol, Sigma-Aldrich) 및 CH_2Cl_2 (0.7 ㎖)에 용해된 DMAP (106 ㎎, 0.869 mmol; 4-dimethylaminopyridine)를 실온에서 DCC(224 ㎎, 1.09 mmol; dicyclohexyl carbodiimide)에 첨가하였다. 상기 혼합물을 하룻밤 동안 교반하면서 환류시키고, 실온까지 냉각시켰다. 이후 상기 혼합물을 Et_2O (diethyl ether)로 세척하면서 실리카 겔로 여과하고, 여과액은 진공농축하여 조 생성물을 수득하였다. 상기 조 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 여과하여 4-메톡시페닐 (*E*)-3-(퓨란-3-일) 아크릴레이트 (4-methoxyphenyl (*E*)-3-(furan-3-yl) acrylate)를 수득하였다. 이하에서는 수득한 4-메톡시페닐 (*E*)-3-(퓨란-3-일) 아크릴레이트 유도체를 "3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체"로 기재한다.

[0053] 상기 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체의 핵자기 공명 분석 결과는 다음과 같다(도 2 및 도 3).

[0054] ^{1}**H NMR** ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.76 (d, *J* = 16.0, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.48 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 6.66 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.35 (d, *J* = 16.0 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H).

[0055] ^{13}**C NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 165.8, 157.1, 145.0, 144.6, 144.1, 136.4, 122.5, 122.3, 116.9, 114.4, 107.4, 55.5.

[0057] **2. 세포 배양**

[0058] 랫트 동맥 평활근 세포(Rat aortic smooth muscle cell; 이하, 혈관 평활근 세포로 기재함)는 론자(LONZA, 미국)로부터 구입하였고, 소 태아 혈청(이하, FBS로 기재함; Gibco, 미국)을 포함하는 DMEM으로 75 ㎠ 플라스크에서 배양하였다. 배양은 37℃, 5% CO_2 조건으로 수행하였다.

[0060] **3. 세포 증식 실험**

[0061] RaoSMC를 96-웰 플레이트에 $2x10^3$ 세포/웰 농도로 분주하고, 0.1% FBS를 포함하는 배지를 첨가하여 24시간 동안 배양하였다(혈청 결핍). 이후 다양한 농도의 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체 또는 10% FBS를 포함하는 배지를 처리하였다. 처리 후 CCK-8 assay kit (Dojindo, 일본)로 세포 증식 정도를 확인하고, 흡광도는 450 ㎚에서 측정하였다. 세포 증식 실험은 3번 반복하였다.

[0063] **4. 신생 혈관내막(neointima) 형성 실험**

[0064] 4주령, 250 g의 수컷 스프라그-다우리 랫트(대한-바이오링크, 대한민국)를 구입하여 케타민(10 ㎎/㎏; ketamine, 유한, 대한민국)과 자일라진 (5 ㎎/㎏; xylazine, 베이어 코리아, 대한민국)으로 마취시켰다. 왼쪽 경동맥을 노출시킨 후 2F Fogarty 풍선 카테터(Edwards Lifesciences, 캐나다)를 대동맥 아치의 외부 경동맥 지점에 삽입하였다. 이후 카테터에 공기를 불어넣어 약간의 저항을 만들어 내고, 이 과정을 3회 반복하였다. 샴(sham) 대조군은 풍선 삽입을 제외하고 동일한 절차를 수행하였다. 풍선 손상 후 3주 동안 비히클(식염수) 또는 0.05 ㎖의 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체(20 μM)를 정맥으로 매일 투여하였다.

[0066] **5. 헤마토실린&에오신 염색**

[0067] 동물실험이 종료된 후 랫트를 희생시키고, 경동맥 조직을 분리하여 4% 파라포름알데히드로 고정시켰다. 고정 후 24시간 이내에 경동맥 조직을 절단하여 OCT 컴파운드(Sakura Finetek USA, 미국)에 매립하고, 액체 질소로 급속 냉동시켰다. 냉동된 경동맥 조직은 경동맥 조직의 두께가 10 ㎛씩 증가하도록 절단하여 슬라이드 절편으

로 만들었다. 이후 절편을 헤마토실린&에오신으로 염색하여 광학 현미경으로 확인하고, 정상 및 신생 부위는 NIH 이미지로 측정하였다.

[0069] **6. 스크래치 상처 실험**

[0070] 스크래치 상처 실험은 이전에 보고된 방법(PLoS One 7, 2012, e41105)을 일부 변형시켜 수행하였다. 간략하게 혈관 평활근 세포를 최종 농도 10^5 세포/웰이 되도록 6-웰 플레이트에 분주하고, 37℃, 5% CO_2 조건에서 24시간 동안 배양하여 단일층을 형성시켰다. 멸균된 파이펫 팁으로 상기 단일층에 스크래치를 형성하고, 10% FBS, 100 U/㎖ 페니실린, 100 ㎎/㎖ 스트렙토마이신 (Gibco) 및 다양한 농도의 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체를 포함하는 저포도당 DMEM으로 배양하였다.

[0072] **7. 웨스턴 블롯팅**

[0073] 실험 종료 후 세포를 PBS로 1회 세척하고, 단백질 분해효소 칵테일 (GenDEPOT, 미국)과 인산가수분해효소 저해제 칵테일(Sigma, 미국)을 포함하는 용해 버퍼(150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris/HCl(pH 7.5) 및 2mM EDTA(pH8.0); 바이오세상, 대한민국)를 첨가하여 세포를 용해시켰다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology, 미국)로 결정하였다. 동일한 양의 단백질을 12% 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate, SDS)-폴리아크릴아미드 젤로 전기영동하고, 니트로셀룰로스 막(BioRad, 미국)으로 단백질을 이동시켰다. 이후, 상기 니트로셀룰로스 막을 5% (w/v) 무지방 건조 탈지유(skim milk)를 함유하는 TBS-T (TBS-트윈 20; 0.1% 트윈 20)로 1시간 동안 실온에서 블록킹하고, 1차 항체와 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 다음날 니트로셀룰로스 막을 TBS-T로 10분씩 3회 세척하고, HRP(horseradish peroxidase)와 결합된 2차 항체와 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 니트로셀룰로스 막을 세척하고, ECL 웨스턴 블롯팅 검출 시약(바이오세상)으로 단백질 밴드를 확인하였다. 단백질 발현 수준은 Davinch-K western image System (Lab plus, 대한민국)으로 결정하였다. EMMPRIN 항체는 Abcam (미국)에서 구입하였다.

[0075] **8. 역전사 PCR 및 분석**

[0076] 역전사(Reverse transcription) PCR은 이전에 보고된 방법에 따라 수행하였다(Korean Circ J. 2019 Dec; 49(12):1183-1195.). 간략하게, 세포로부터 RNA-stat(Iso-Tex Diagnostics, 미국)을 사용하여 총 RNA를 분리하고, 이를 주형으로 하여 Taqman Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, 미국)로 역전사를 수행하였다. 합성된 cDNA, 하기 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 수행하고, RNA 전사체 수준은 ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)으로 정량 분석하였다. 상대적 mRNA 발현은 GAPDH 발현으로 정규화시킨 후 계산하였다.

[0077] RT-PCR에 사용한 프라이머는 하기와 같다.

[0078] MMP-2, 전방향: 5'-GCGGATCCAGCGCCCAGAGAGACAC-3' (서열번호 1);

[0079] MMP-2, 역방향: 5'-TTAAGCTTCCACTCCGGGCAGGATT-3' (서열번호 2);

[0080] MMP-9, 전방향: 5'-TGGACGATGCCTGCAACGTG-3' (서열번호 3);

[0081] MMP-9, 역방향: 5'-GTCGTGCGTGTCCAAAGGCA-3' (서열번호 4);

[0082] COX-2, 전방향: 5'-TCCAATCGCTGTACAAGCAG-3' (서열번호 5);

[0083] COX-2, 역방향: 5'-TCCCCAAAGATAGCATCTGG-3' (서열번호 6);

[0084] GAPDH, 전방향: 5'-CTCCCAACGTGTCTGTTGTG-3' (서열번호 7); 및

[0085] GAPDH, 역방향: 5'-TGAGCTTGACAAAGTGGTCG-3' (서열번호 8).

[0087] **9. 통계 분석**

[0088] 모든 데이터는 최소 3번의 독립적인 실험에서 확인하여 평균±표준편차로 기재하였다. 통계적 유의성은 두 실험군 사이의 독립 표본(unpaired sample)에 대한 스튜던트 t-검정을 사용하여 결정하고, $p<0.05$이면 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

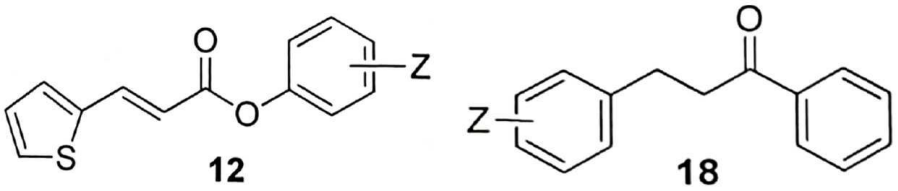
[0090] **실험 결과**

[0092] **1. 혈관 평활근 세포에 대한 항증식 효과 (인 비트로)**

[0093] 본 발명자들은 분취 크로마토그래피(prep-HPLC)에 의한 동충하초 추출물의 분별 공정을 통해 크로마토그램의 피크에서 일부 화합물을 확인하였고, 이들 화합물의 대량 생산이 어려웠기 때문에 구조 유도체를 설계하고 합성하였다(도 1). 이후 합성한 화합물의 효과를 확인하였다.

[0094] 상기 합성한 유도체를 혈관 평활근 세포에 72시간 동안 처리한 후 항증식 효과를 확인한 결과, 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체(#14) 처리에 의해 혈관 평활근 세포의 증식이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 구체적으로 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체를 50 μM 이상으로 처리하면 혈관 평활근 세포의 증식이 약 80% 이상 억제되었다. 반면, 비교군으로 사용한 동충하초에서 분리한 다른 화합물들(#12, #18)은 혈관 평활근 세포의 증식 억제 효과가 현저히 약한 것을 확인할 수 있었다(도 4).

[0095] 상기 #12, #18 화합물의 구조는 각각 다음과 같다.

[0096] 

[0098] **2. 항-죽상동맥경화성 효과 (인 비보)**

[0099] 경동맥을 손상시킨 랫트 모델에 3주 동안 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체를 투여한 후 신생혈관내막 증식(neointimal hyperplasia) 정도를 확인하였다. 그 결과, 식염수를 투여한 비히클군은 풍선 손상 후에 신생혈관내막 증식이 활발하게 일어난 반면, 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체(#14) 20 μM을 투여한 실험군은 신생혈관내막 증식이 현저하게 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 5).

[0101] **3. 혈관 평활근 세포의 이동 억제 효과**

[0102] 스크래치 상처 실험 결과, 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체(#14)의 처리 농도가 증가할수록 혈관 평활근 세포의 이동이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 6).

[0104] **4. EMMPRIN 및 MMP 활성화에 대한 효과**

[0105] 혈관 평활근 세포에 콜라게나제 타입 I (10 ㎍/㎖)과 다양한 농도의 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체(#14)를 처리한 후 EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer)의 활성화 수준을 웨스턴 블롯팅으로, MMP (matrix metalloproteinase)의 활성화 수준을 RT-PCR로 확인하였다.

[0106] 확인 결과, 콜라게나제 타입 I 처리에 의하여 EMMPRIN의 활성화 수준이 현저히 증가하나, 이러한 경향은 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체(#14) 처리에 의하여 억제되는 것을 확인할 수 있었다(도 7의 A 및 B).

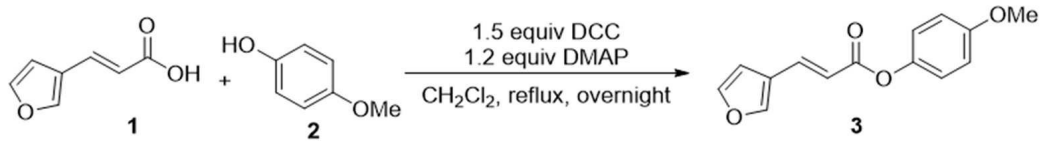
[0107] 또한, 콜라게나제 타입 I 처리에 의하여 MMP-2 및 MMP-9의 활성화가 증가하나, 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체(#14)를 처리하면 처리 농도에 의존적으로 MMP-2 및 MMP-9의 활성화가 감소하는 것을 알 수 있었다(도 7의 C 및 D).

[0109] **5. COX-2(cyclooxygenase-2) 활성화에 대한 효과**

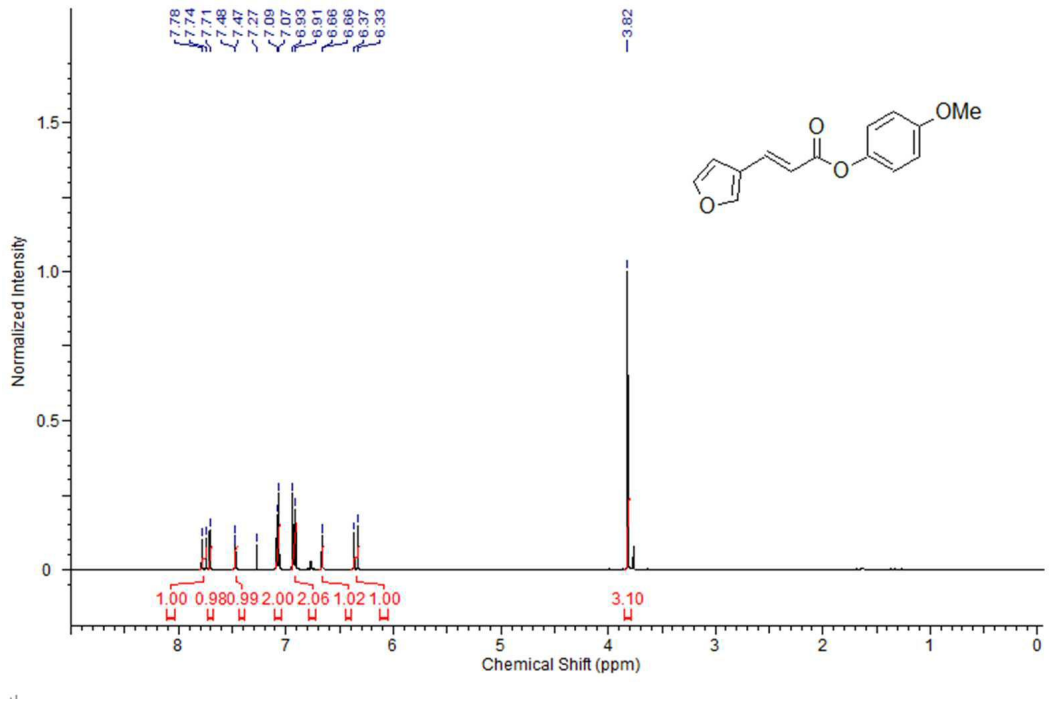
[0110] 일반적으로 COX-2 발현은 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 신호전달 경로와 연관이 있다(Bornfeldt et al., 1997; Dean et al., 1999). 따라서, 혈관 평활근 세포에 콜라게나제 타입 I (10 ㎍/㎖)과 다양한 농도의 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체(#14)를 처리한 후 COX-2 유전자의 발현 수준을 확인하였다. 그 결과, 콜라게나제 타입 I 처리에 의하여 COX-2 유전자의 발현 수준이 증가하나, 이러한 경향은 20 μM 이상의 3-퓨라닐 아크릴레이트 유도체 (#14) 처리에 의하여 반전되는 것을 확인할 수 있었다(도 8).

도면

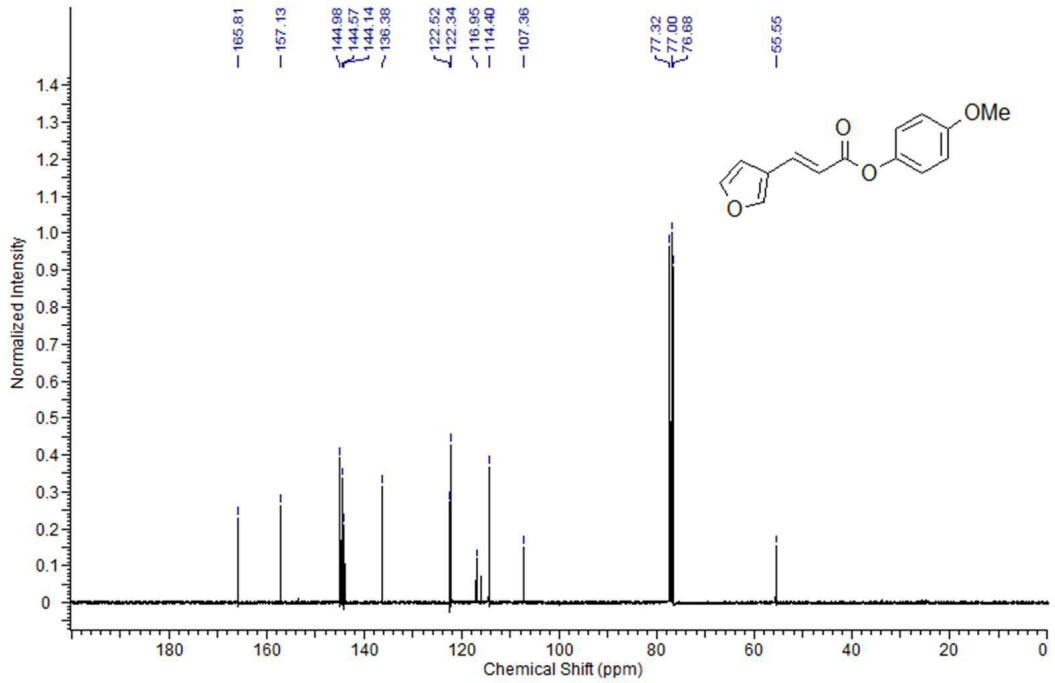
도면1


1.5 equiv DCC
1.2 equiv DMAP
CH_2Cl_2, reflux, overnight
1
2
3

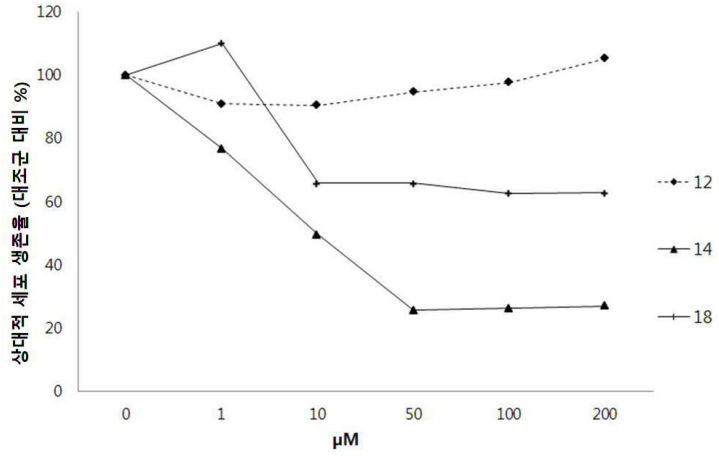
도면2


7.78
7.74
7.71
7.48
7.47
7.27
7.09
7.07
6.93
6.91
6.66
6.66
6.37
6.33
3.82
Normalized Intensity
Chemical Shift (ppm)
1.00
0.98
0.99
2.00
2.06
1.02
1.00
3.10

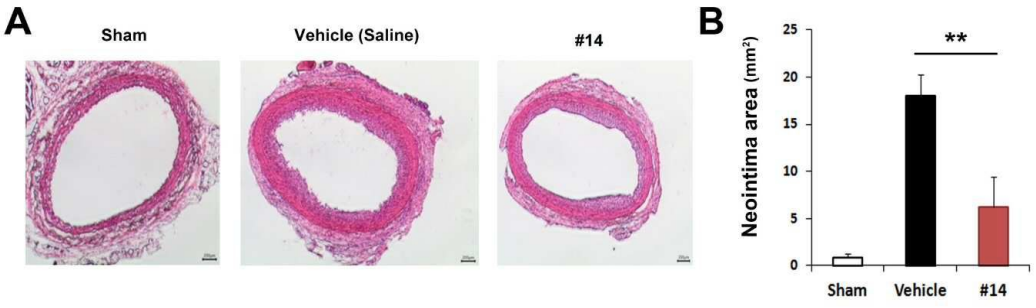
도면3


165.81
157.13
144.98
144.57
144.14
136.38
122.52
122.34
116.95
114.40
107.36
77.32
77.00
76.68
55.55
OMe
O
O
O
Normalized Intensity
Chemical Shift (ppm)

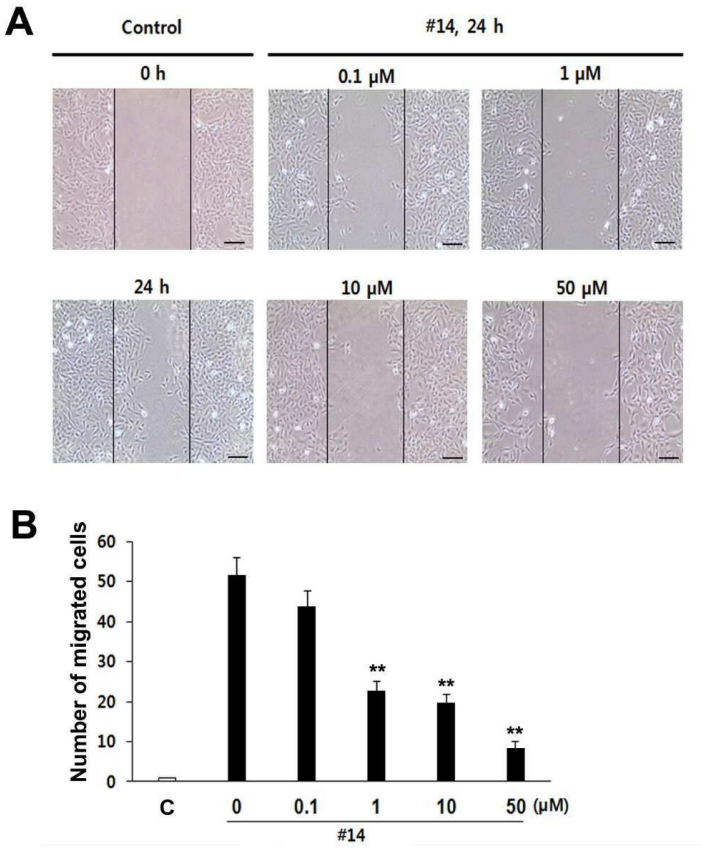
도면4


상대적 세포 생존율 (대조군 대비 %)
μM
12
14
18

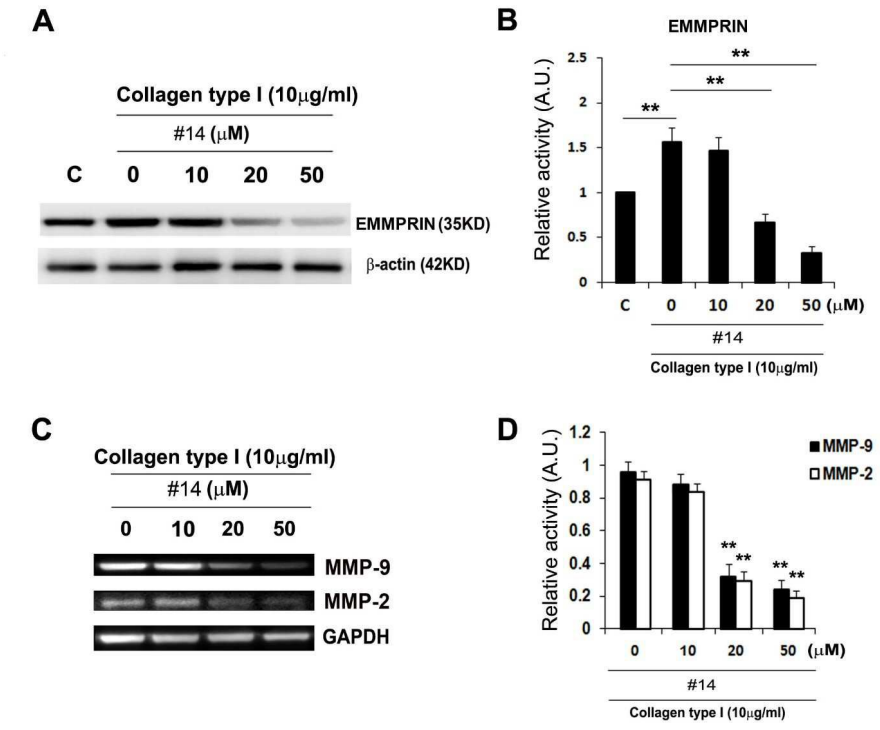
도면5


A
Sham
Vehicle (Saline)
#14
B
Neointima area (mm²)
**
Sham
Vehicle
#14

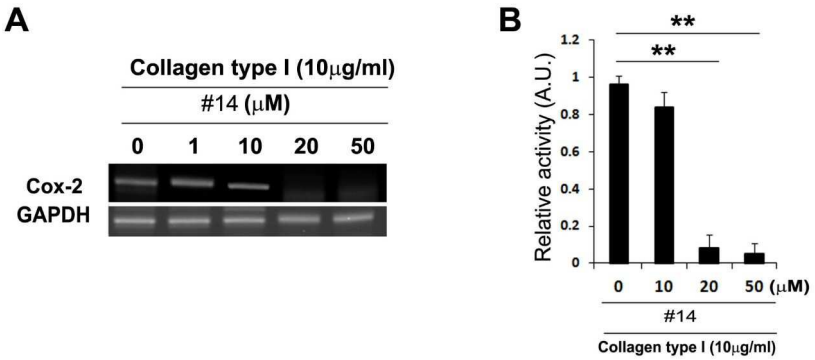
도면6


A
Control
#14, 24 h
0 h
0.1 μM
1 μM
24 h
10 μM
50 μM
B
Number of migrated cells
60
50
40
30
20
10
0
**
**
**
C
0
0.1
1
10
50 (μM)
#14

도면7


A
Collagen type I (10μg/ml)
#14 (μM)
C
0
10
20
50
EMMPRIN (35KD)
β-actin (42KD)
B
EMMPRIN
Relative activity (A.U.)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
**
**
**
C
0
10
20
50 (μM)
#14
Collagen type I (10μg/ml)
C
Collagen type I (10μg/ml)
#14 (μM)
0
10
20
50
MMP-9
MMP-2
GAPDH
D
Relative activity (A.U.)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
MMP-9
MMP-2
**
**
**
**
0
10
20
50 (μM)
#14
Collagen type I (10μg/ml)

도면8



서 열 목 록

<110> UNIVERSITY-INDUSTRY FOUNDATION, CATHOLIC KWANDONG UNIVERSITY

<120> Composition for Preventing or Treating Hyperproliferative Vascular Disorders Comprising Derivative of 3-furanyl acrylate

<130> P19U17C1593

<160> 8

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-2 forward primer

<400> 1

gcggatccag cgcccagaga gacac 25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-2 reverse primer

<400> 2

ttaagcttcc actccgggca ggatt 25

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-9 forward primer

<400> 3

tggacgatgc ctgcaacgtg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-9 reverse primer

<400> 4

gtcgtgcgtg tccaaaggca 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX-2 forward primer

<400> 5

tccaatcgct gtacaagcag 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX-2 reverse primer

<400> 6

tccccaaaga tagcatctgg 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH forward primer

<400> 7

ctcccaacgt gtctgttgtg 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH reverse primer

<400> 8

tgagcttgac aaagtggtcg 20