(19) 대한민국 지식재산처(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2026-0098865
(43) 공개일자 2026년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4439 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61K 8/49 (2006.01) *A61P 7/02* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/4439 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2025-0036760
(22) 출원일자 2025년03월21일
심사청구일자 2025년03월21일
(30) 우선권주장
1020240191803 2024년12월19일 대한민국(KR)

(71) 출원인
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
창동신
서울특별시 강남구 영동대로 22, 803동 3003호
장조아라
서울특별시 서초구 강남대로8길 16-6, 102동 402호
(74) 대리인
최우성

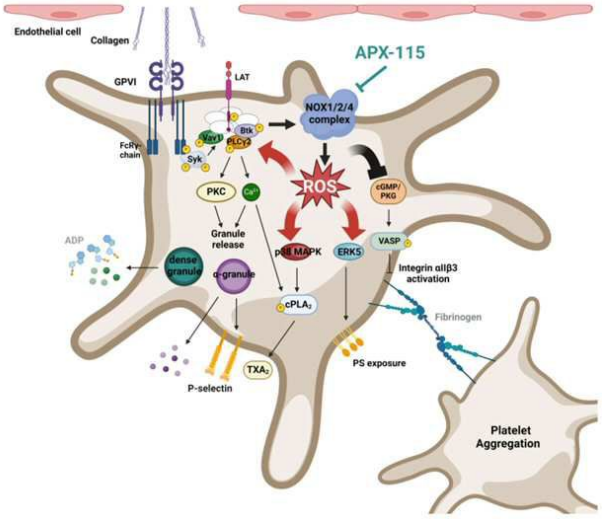
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **피라졸 유도체를 포함하는 혈전성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 화학식 1의 화합물 또는 이의 허용 가능한 염을 포함하는 혈전성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 및 이를 포함하는 혈행 개선용 건강기능식품 조성물 또는 화장료 조성물에 대한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물이 NOX1 및 NOX2를 동시에 억제함으로써, 혈소판의 응집 및 혈전 형성을 억제하는데 우수한 효과를 가짐을 확인하였다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 8/494 (2013.01)
A61P 7/02 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/326 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)
A61K 2800/74 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2340002209
과제번호 NRF-2022R1A6A1A03046247
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 대학중점연구소지원사업
연구과제명 서울대학교 종합약학연구소
과제수행기관명 서울대학교 산학협력단
연구기간 2022.06.01 ~ 2025.02.28

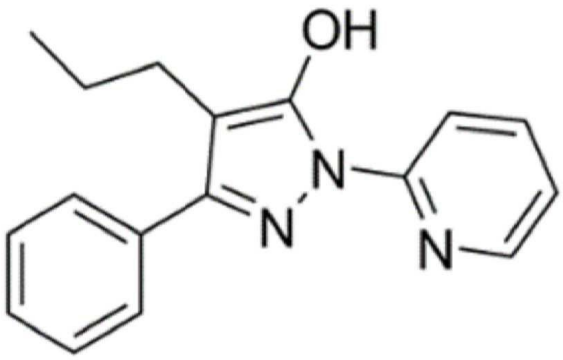
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 혈전성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물:

[화학식 1]



.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화합물은 피라졸(pyrazole) 유도체인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 혈소판의 활성화 또는 혈전의 형성을 억제하는, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 다음 특징 중 어느 하나 이상을 갖는, 조성물:

(a) 콜라겐 자극에 의한 혈소판의 ROS(reactive oxygen species) 생성 억제,

(b) GPVI 신호 전달 경로 억제,

(c) Syk, LAT, Vav1, Btk 및 PLCγ로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의의 타이로신 인산화 억제,

(d) 세포질 내 칼슘 이온 (Ca^{2+}) 농도 감소,

(e) P-selectin의 노출 또는 integrin $\alpha IIb\beta_3$ 활성화 억제,

(f) 혈소판의 콜라겐에 대한 부착 억제.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 콜라겐 또는 트롬빈 유도 혈소판 응집을 저해하는, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 혈액의 지혈작용을 저해하지 않는, 조성물.

청구항 7

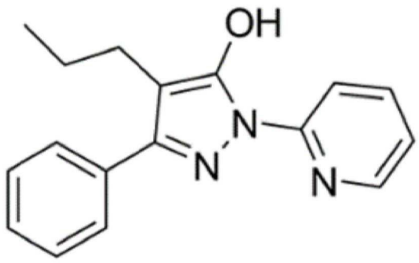
제1항에 있어서,

상기 혈전성 질환은 동맥혈전증, 정맥혈전증, 관상동맥혈전증, 심부정맥혈전증, 뇌동맥혈전증, 말초혈관혈전증, 동맥색전증, 정맥색전증, 신장색전증, 만성동맥폐색증, 혈전성 미세혈관병증, 폐경색, 뇌경색, 뇌색전증 및 혈전성 정맥염으로 구성되는 군에서 선택되는, 조성물.

청구항 8

하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 혈행 개선용 건강기능식품 조성물:

[화학식 1]



.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 조성물은 혈소판의 ROS 생성; 혈소판의 활성화; 또는 혈전의 형성;을 억제하는, 조성물.

청구항 10

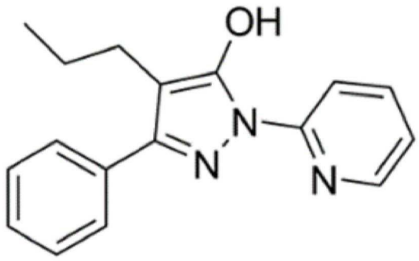
제8항에 있어서,

상기 조성물은 콜라겐 또는 트롬빈 유도 혈소판 응집을 저해하는, 조성물.

청구항 11

하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 화장품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 혈행 개선용 화장료 조성물:

[화학식 1]



.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 조성물은 혈소판의 ROS 생성; 혈소판의 활성화; 또는 혈전의 형성;을 억제하는, 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 조성물은 콜라겐 또는 트롬빈 유도 혈소판 응집을 저해하는, 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 개시는 피라졸 유도체를 포함하는 혈전성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 인체 구성성분으로 혈액은 산소, 영양분, 노폐물의 운반 기능과 완충작용, 체온유지, 삼투압 조절 및 이온 평형 유지, 수분 일정유지, 액성 조절 작용, 혈압의 유지 및 조절, 생체 방어 등 다양한 중요 기능들을 가지고 있다. 정상적인 혈액 순환은 체내에서의 혈액 응고 반응계와 혈전 용해 반응계가 상호 보완적으로 조절되면서 혈액 순환을 용이하게 하며, 이들 중 혈액 응고 반응계의 기작은 혈관벽에 혈소판이 점착, 응집하여 혈소판 혈전을 형성한 후, 혈액 응고계가 활성화되어 혈소판 응집괴를 중심으로 피브린 혈전이 형성되는 것으로 보고되어 있다.

[0004] 혈소판(Platelet)은 핵이 없는 가장 작은 혈액 세포로서 골수 내 전구체인 거핵구(megakaryocyte)로부터 파쇄되어 생성되며, 지름은 2~5 μm, 두께는 약 0.5 μm인 원반 모형의 세포이다. 생존 주기는 7~10일이고, 건강한 사람의 혈액 내 혈소판 수는 1.5 ~ 4×10^{9} platelets/mL이다. 혈소판은 비활성화 상태로 혈관 내에서 순환하다가, 혈관의 내벽 손상 시 노출되는 콜라겐 및 von Willebrand factor가 세포막에 존재하는 각각의 수용체를 통해 결합하면, 활성화가 시작되어 혈전(thrombus) 형성을 통해 지혈 과정에서 중심적인 역할을 담당한다. 혈소판의 수가 적거나 활성 작용이 저하되면 지혈이 원활히 이뤄지지 않으며, 수가 많거나 과도한 활성화는 손상되지 않은 정상적인 혈관 내에서도 혈전 형성을 유도하여 혈액순환을 억제하는 혈전증 (thrombosis)을 유발할 수 있다. 그러므로, 혈소판에 대한 활성 억제 물질 탐색 및 기전 연구는 혈전성 질환에 대한 예방 및 치료를 위해 중요한 의미를 갖는다.

[0005] 기존 혈전성 질환 치료제는 주로 혈소판 활성화 억제제(예: 아스피린, 클로피도그렐) 및 항응고제(예: 와파린, 헤파린)에 의존하고 있다. 이러한 약물들은 혈소판 응집 및 응고 과정을 억제함으로써 혈전 형성을 예방하지만, 출혈 위험과 같은 부작용을 수반하는 경우가 많다. 또한, 일부 기존 약물은 특정 효소나 수용체에 국한된 작용을 보여 다양한 원인에 따른 혈전 형성을 효과적으로 억제하지 못할 수 있다는 한계를 갖는다.

선행기술문헌

특허문헌

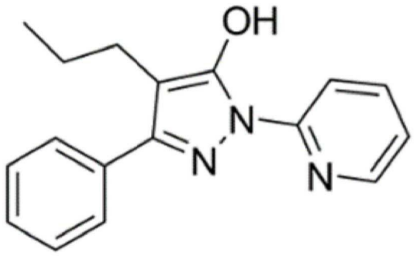
[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제 10-2024-0165212호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 일 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 혈전성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하고자 한다:

[0009] [화학식 1]



[0010] .

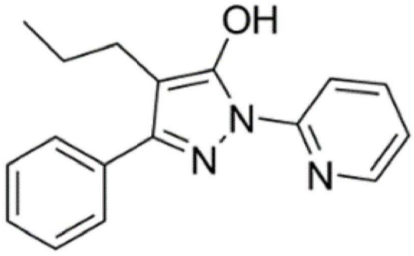
[0011] 다른 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 혈행 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하고자 한다.

[0012] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 화장품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 혈행 개선용 화장료 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 일 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 혈전성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있다:

[0015] [화학식 1]



[0016] .

[0017] 예시적인 일 구현예에서, 상기 화합물은 피라졸(pyrazole) 유도체일 수 있다.

[0018] 예시적인 일 구현예에서, 상기 조성물은 상기 화합물은 혈소판의 활성화 또는 혈전의 형성을 억제할 수 있다.

[0019] 예시적인 일 구현예에서, 상기 조성물은 다음 특징 중 어느 하나 이상을 갖는 것일 수 있다: (a) 콜라겐 자극에 의한 혈소판의 ROS(reactive oxygen species) 생성 억제, (b) GPVI 신호 전달 경로 억제, (c) Syk, LAT, Vav1, Btk 및 PLCγ2로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의의 타이로신 인산화 억제, (d) 세포질 내 칼슘 이온

(Ca^{2+}) 농도 감소, (e) P-selectin의 노출 또는 integrin αIIbβ$_3$ 활성화 억제, (f) 혈소판의 콜라겐에 대한 부착 억제.

[0020] 예시적인 일 구현예에서, 상기 조성물은 콜라겐 또는 트롬빈 유도 혈소판 응집을 저해할 수 있다.

[0021] 예시적인 일 구현예에서, 상기 조성물은 혈액의 지혈작용을 저해하지 않을 수 있다.

[0022] 예시적인 일 구현예에서, 상기 혈전성 질환은 동맥혈전증, 정맥혈전증, 관상동맥혈전증, 심부정맥혈전증, 뇌동맥혈전증, 말초혈관혈전증, 동맥색전증, 정맥색전증, 신장색전증, 만성동맥폐색증, 혈전성 미세혈관병증, 폐경색, 뇌경색, 뇌색전증 및 혈전성 정맥염으로 구성되는 군에서 선택될 수 있다.

[0023] 다른 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 혈행 개선용 건강기능식품 조성물을 제공할 수 있다.

[0024] 예시적인 일 구현예에서, 상기 조성물은 혈소판의 ROS 생성; 혈소판의 활성화; 또는 혈전의 형성;을 억제할 수 있다.

[0025] 예시적인 일 구현예에서, 상기 조성물은 콜라겐 또는 트롬빈 유도 혈소판 응집을 저해할 수 있다.

[0026] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 화장품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 혈행 개선용 화장료 조성물을 제공하고자 한다.

[0027] 예시적인 일 구현예에서, 상기 조성물은 혈소판의 ROS 생성; 혈소판의 활성화; 또는 혈전의 형성;을 억제할 수 있다.

[0028] 예시적인 일 구현예에서, 상기 조성물은 콜라겐 또는 트롬빈 유도 혈소판 응집을 저해할 수 있다.

발명의 효과

[0030] 본 발명의 조성물은 혈전성 질환의 예방 또는 치료 효과가 우수하다.

[0031] 본 발명의 조성물은 혈소판의 ROS 생성 억제 효과가 우수하다.

[0032] 본 발명의 조성물은 콜라겐 및 트롬빈 유도 혈소판 응집 억제 효과가 우수하다.

[0033] 본 발명의 조성물은 혈소판 응집과 혈전 형성을 억제하면서도 지혈 작용을 저해하지 않으므로, 환자에게 약물 투여 시 발생할 수 있는 출혈 위험을 감소시킬 수 있다.

[0034] 본 발명의 조성물은 혈행 개선 효과가 우수하다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 콜라겐에 의해 자극된 혈소판에서 APX-115의 항혈소판 작용 메커니즘을 요약한 이미지이다 (Btk, Bruton's tyrosine kinase; cPLA2, cytosolic phospholipase A2; GPVI, glycoprotein VI; LAT, linker for the activation of T cells; NOX, NADPH oxidase; PKC, protein kinase C; PKG, protein kinase G; PLCγ2, phospholipase Cγ2; PS, phosphatidylserine; PTP, protein tyrosine phosphatase; ROS, reactive oxygen species; sGC, soluble guanylate cyclase; Syk, spleen tyrosine kinase; TXA2, thromboxane; VASP, vasodilator-stimulated phosphoprotein).

도 2는 APX-115가 콜라겐 유도 혈소판 응집 및 ROS 생성을 억제할 수 있음을 보여주는 결과이다. (A) 건강한 기증자의 세척된 혈소판(5×10^8/mL)은 10분 동안 비어클 (vehicle; 0.5% DMSO) 또는 지정된 농도의 APX-115와 배양한 후, 10 μg/mL 콜라겐으로 자극되었다. 혈소판 응집은 탁도법으로 측정되었으며, 최대 응집의 백분율로 표현되었다. 상단 패널은 응집의 대표적인 추적을 보여준다. 정량적인 데이터는 네 명의 기증자로부터 얻은 평균 ± 표준편차이다. (B와 C) CM-H_2DCFDA 로딩 후(B) 또는 1 μM $DCFH_2$ 존재 하에(C), 세척된 혈소판은 A와 같이 처리되었다. 형광 변화는 일정한 교반 조건에서 형광 측정기로 측정되었다. 모든 상단 패널은 대표적인 추적을 보여준다. AU는 임의 단위이다. 모든 정량적인 데이터는 평균 ± 표준편차이다. 유의미성의 해당 p 값은 표시된

대로이다: **p < 0.01, ***p < 0.001.

도 3은 APX-115가 콜라겐 자극에 의한 GPVI 신호 전달을 억제할 수 있음을 보여주는 결과이다. 세척된 혈소판(5 X 10^8/mL)은 10분 동안 비어클 또는 지정된 농도의 APX-115와 배양한 후, 10 μg/mL 콜라겐으로 2분 동안 자극되었다. 혈소판 용해액은 면역 블롯 분석에 사용되어 pan-단백질 티로신 인산화(A) 및 비장 티로신 키나제(Syk), T 세포 활성화 연결 단백질(LAT), Vav1, 브루톤 티로신 키나제(Btk)의 인산화를 측정하였다(B). 왼쪽 패널은 대표적인 면역 블롯 분석을 보여주며, 분자량(kDa) 마커의 위치가 표시된다. 정량적인 데이터는 신호 강도의 평균 ± 표준편차이다. 유의미성의 해당 p 값은 표시된 대로이다: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

도 4는 APX-115가 콜라겐 유도 PLCγ활성화 및 Ca^{2+} 동원을 억제할 수 있음을 보여주는 결과이다. (A) 세척된 혈소판(5 X 10^8/mL)은 10분 동안 비어클 또는 지정된 농도의 APX-115와 배양한 후, 10 μg/mL 콜라겐으로 2분 동안 자극되었다. 혈소판 용해액은 면역 블롯 분석에 사용되어 PLCγ의 인산화를 측정하였다. 왼쪽 패널은 대표적인 면역 블롯 분석을 보여주며, 분자량(kDa) 마커의 위치가 표시된다. 정량적인 데이터는 신호 강도의 평균 ± 표준편차이다. (B와 C) Fluo-3-AM 로딩된 혈소판(5 X 10^8/mL)은 0.5 mM EGTA(B) 또는 1 mM 외부 $CaCl_2$(C)와 2분 동안 배양한 후, 비어클 또는 지정된 농도의 APX-115와 10분 동안 배양한 후, 10 μg/mL 콜라겐으로 자극되었다. Fluo-3 형광은 임의 단위(AU)로 모니터링되었다. 왼쪽 패널은 대표적인 추적을 보여준다. 정량적인 데이터는 Fluo-3의 최대 형광 강도의 평균 ± 표준편차이다. 유의미성의 해당 p 값은 표시된 대로이다: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

도 5는 APX-115가 콜라겐 유도 혈소판 과립 방출을 억제할 수 있음을 보여주는 결과이다. 세척된 혈소판(5 X 10^8/mL)은 10분 동안 비어클 또는 지정된 농도의 APX-115와 배양한 후, 10 μg/mL 콜라겐으로 5분 동안 자극되었다. (A) 혈소판 샘플은 루시페린-루시페레이스 시약을 사용하여 ATP의 발광을 감지하여 혈소판 밀집 과립 방출을 측정하였다. 정량적인 데이터는 평균 ± 표준편차이다. (B) 혈소판은 PE로 라벨링된 항-P-셀렉틴 항체(CD62P-PE)와 배양된 후 흐름 세포 분석을 통해 α 과립 방출의 지표로서 혈소판 표면에 P-셀렉틴의 발현을 모니터링하였다. 왼쪽 패널은 대표적인 히스토그램을 보여준다. 정량적인 데이터는 평균 ± 표준편차의 평균 형광 강도(MFI)이다. 유의미성의 해당 p 값은 표시된 대로이다: **p < 0.01, ***p < 0.001.

도 6은 APX-115가 콜라겐 유도 p38 MAPK/cPLA2/TXA2 생산 신호를 억제할 수 있음을 보여주는 결과이다. 세척된 혈소판(5 X 10^8/mL)은 10분 동안 비어클 또는 지정된 농도의 APX-115와 배양한 후, 10 μg/mL 콜라겐으로 자극되었다. (A와 B) 2분 자극 후, 혈소판 용해액은 면역 블롯 분석에 사용되어 p38 MAPK(A) 및 세포질 인지질 분해효소(cPLA2)(B)의 인산화를 측정하였다. 상단 패널은 대표적인 면역 블롯 분석을 보여주며, 분자량(kDa) 마커의 위치가 표시된다. 정량적인 데이터는 신호 강도의 평균 ± 표준편차이다. (C) 5분 자극 후, 반응 혼합물에서 분리된 상층액에서 트롬복산 B_2(TXB_2)의 농도를 ELISA 키트를 사용하여 측정하였다. 모든 값은 평균 ± 표준편차이다. 유의미성의 해당 p 값은 표시된 대로이다: *p < 0.05, ***p < 0.001.

도 7은 APX-115가 콜라겐 유도 ERK5 활성화 및 PS 노출을 억제할 수 있음을 보여주는 결과이다. 세척된 혈소판(5 X 10^8/mL)은 10분 동안 비어클 또는 지정된 농도의 APX-115와 배양한 후, 10 μg/mL 콜라겐으로 자극되었다. (A) 2분 자극 후, 혈소판 용해액은 면역 블롯 분석에 사용되어 ERK5의 인산화를 측정하였다. 왼쪽 패널은 대표적인 면역 블롯 분석을 보여주며, 분자량(kDa) 마커의 위치가 표시된다. 정량적인 데이터는 신호 강도의 평균 ± 표준편차이다. (B) 5분 자극 후, 혈소판은 annexin V-FITC와 배양된 후 흐름 세포 분석을 통해 포스파티딜세린의 혈소판 표면 발현을 모니터링하였다. 왼쪽 패널은 대표적인 점 그림을 보여준다. 정량적인 데이터는 annexin V 결합의 양성 비율의 평균 ± 표준편차이다. 유의미성의 해당 p 값은 표시된 대로이다: *p < 0.05, ***p < 0.001.

도 8은 APX-115가 콜라겐 유도 혈소판에서 통합체 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 활성화 신호 경로를 억제할 수 있음을 보여주는 결과이다. (A-C) 세척된 혈소판(5 X 10^8/mL)은 10분 동안 비어클 또는 지정된 농도의 APX-115와 배양한 후, 10 μg/mL 콜라겐으로 자극되었다. (A) 5분 자극 후, 혈소판은 FITC로 라벨링된 항-활성 통합체 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 항체(PAC1-FITC)와 배양된 후 흐름 세포 분석을 통해 혈소판 표면 통합체 $\alpha_{IIb}\beta_3$의 활성화를 모니터링하였다. 상단 패널은 대표적인 히스토그램을 보여준다. 정량적인 데이터는 평균 ± 표준편차의 평균 형광 강도(MFI)이다. (B) 2분 자극 후, 혈소판 용해액은 면역 블롯 분석에 사용되어 혈관확장자극 단백질(VASP)의 인산화를 측정하였다. 상단

패널은 대표적인 면역 블롯 분석을 보여주며, 분자량(kDa) 마커의 위치가 표시된다. 정량적인 데이터는 신호 강도의 평균 ± 표준편차이다. (C) 세척된 혈소판(5×10^8/mL)은 콜라겐 없이 비어클 또는 APX-115(30 μM)와 5분 동안 배양되었다. 혈소판에서 cGMP 농도는 ELISA 키트를 사용하여 측정하였다. 데이터는 평균 ± 표준편차이다. 유의미성의 해당 p 값은 표시된 대로이다: **p < 0.01, ***p < 0.001.

도 9는 APX-115의 혈소판 부착 및 혈전 형성에 대한 효과 (흐름 조건 하에서 in vitro) 및 동맥 혈전증과 지혈에 대한 효과 (in vivo)를 보여주는 결과이다. (A) $DiOC_6$로 라벨링된 혈소판(1×10^9/mL)은 10분 동안 비어클 또는 지정된 농도의 APX-115와 배양한 후, 일정한 전단률에서 콜라겐으로 코팅된 표면을 통과하도록 했다. 왼쪽 패널은 콜라겐에서 혈소판 부착 및 혈전 형성의 대표적인 이미지를 보여준다. 크기 바는 100 μm를 나타낸다. $DiOC_6$ 형광 양성 혈소판의 챔버 표면 커버리지는 정량화되었다. 정량적인 데이터는 비어클 대조군 표면 커버리지의 백분율로 평균 ± 표준편차이다. (B) APX-115(50 mg/kg 체중)를 경구 투여한 후 1시간이 지나, 20% w/v 염화철을 적용하여 경동맥 폐색을 유도했다. 폐색 시간은 통과 시간 초음파 흐름계로 측정되었다. 왼쪽 패널은 혈류의 대표적인 추적을 보여준다. 정량적인 데이터는 혈전 폐색까지의 시간을 평균 ± 표준편차로 표시한다. 각 막대 다이어그램의 점은 독립적인 관찰을 나타낸다. 유의미성의 해당 p 값은 표시된 대로이다: **p < 0.01, ***p < 0.001. (C) 쥐 꼬리 출혈은 B에서와 같이 1시간 후 APX-115 또는 비어클 투여 후 측정되었다. 정량적인 데이터는 출혈 시간의 평균 ± 표준오차이다. 각 막대 다이어그램의 점은 독립적인 관찰을 나타낸다. 유의미성의 해당 p 값은 표시된 대로이다: ns, p > 0.05 (유의미하지 않음).

도 10은 트롬빈 유도된 혈소판 응집에 대한 APX-115의 효과를 보여주는 결과이다. 건강한 기증자로부터 정제된 혈소판(5×10^8/mL)은 비어클(0.5% DMSO) 또는 지정된 농도의 APX-115와 10분 동안 처리한 후 0.1 U/mL 트롬빈으로 자극을 받았다. 혈소판 응집은 탁도 측정법을 이용해 평가하였으며, 빛의 투과율 변화로 백분율로 표현되었다. 왼쪽 패널은 대표적인 응집 트레이스를 보여준다. 정량화된 데이터는 평균 ± 표준편차로 제공된다. 통계적으로 유의한 p 값은 다음과 같다: **p < 0.01 및 ***p < 0.001.

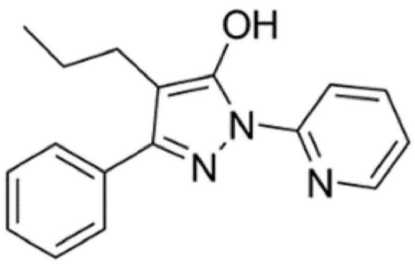
도 11은 선택적 NOX 억제제들이 혈소판 응집에 미치는 영향을 보여주는 결과이다. 건강한 기증자로부터 정제된 혈소판(5×10^8/mL)은 10분 동안 지정된 농도의 APX-115, ML171 또는 GSK2795039와 처리한 후 10 μg/mL 콜라겐(A) 또는 0.25 U/mL 트롬빈(B)으로 자극을 받았다. 혈소판 응집은 탁도 측정법을 이용해 평가되었으며, 최대 응집의 백분율로 표현되었다. 정량화된 데이터는 평균 ± 표준편차로 제공되며, n=3이다. 통계적으로 유의한 p 값은 다음과 같다: *p < 0.05 및 **p < 0.01, 비어클 대조군과 비교한 결과이다. 비교는 다중 비교를 위한 일원배치 분산분석(ANOVA) 후 보네페로니(Bonferroni) 수정 방법을 사용하여 이루어졌다. 시약 정보는 다음과 같다: ML171 (Cat# 175226), 트롬빈 (Cat# T6884), GSK2795039 (Cat# HY-18950) (MedChem Express, 프린스턴, NJ, 미국).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0039] 일 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 혈전성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있다:

[0040] [화학식 1]



[0041] .

[0042] 상기 화합물은 pan-NOX 억제제로서, 콜라겐에 의해 자극된 혈소판에서 NOX1/2/4 매개 ROS 생성을 억제하여 ROS

매개 신호 전달 경로를 차단하고, 궁극적으로 혈소판 활성화, 과립 방출 및 응집을 억제한다. 특히, 상기 화합물은 NOX1 또는 NOX2를 효과적으로 억제할 수 있다. 상기 화합물은 ROS에 의한 PTPs의 산화적 비활성화를 억제함으로써, 다음과 같은 작용을 한다: 1) 콜라겐 수용체 GPVI 신호 전달 경로 내에서 Syk, LAT, Vav1, Btk의 특정 티로신 인산화에 의한 활성화를 억제하여 PLCγ2, PKC, Ca^{2+} 동원 활성화를 감소시킨다; 2) ROS에 의한 p38 MAPK 활성화를 억제하여 세포질 PLA2의 인산화와 TXA2 생성 감소시킨다; 3) ROS에 의한 ERK5 활성화를 억제하여 응고촉진성 PS의 노출을 감소시킨다; 4) cGMP를 증가시켜 통합체 $\alpha_{IIb}\beta_3$의 활성화를 억제하고, PKG에 의한 VASP 인산화 수준을 증가시킨다.

[0043] 예시적인 일 구현예에서, 상기 화학식 1의 화합물은 APX-115일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 용어 "염"은 모 화합물(parent compound)의 바람직한 활성을 갖는 본 개시의 일 측면에 따른 염을 의미하며, 화합물이 적용되는 유기체에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는 염일 수 있다.

[0045] 상기 염은 화합물의 무기산염, 유기산염, 또는 금속염의 부가염을 말한다. 상기 무기산염은 염산염, 브롬산염, 인산염, 황산염, 또는 이황산염일 수 있다. 상기 유기산염은 포름산염, 초산염, 아세트산염, 프로피온산염, 젖산염, 옥살산염, 주석산염, 말산염, 말레인산염, 구연산염, 푸마르산염, 베실산염, 캠실산염, 에디실염, 트리클로로아세트산염, 트리플루오로아세트산염, 벤조산염, 글루콘산염, 메탄술폰산염, 글리콜산염, 숙신산염, 4-톨루엔술폰산염, 갈룩투론산염, 엠본산염, 글루탐산염, 메탄술폰산염, 에탄술폰산염, 벤젠술폰산염, p-톨루엔술폰산염, 또는 아스파르트산염일 수 있다. 상기 금속염은 칼슘염, 나트륨염, 마그네슘염, 스트론튬염, 또는 칼륨염일 수 있다.

[0046] 용어 "혈전성 질환"은 혈전(thrombus)이 혈관 내에서 비정상적으로 형성되어 혈액의 흐름을 방해하거나 차단하는 질환을 말한다.

[0047] 상기 약학 조성물은 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 약학적 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 함유할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 다양한 경구 투여제 또는 비경구 투여제 형태로 제형화할 수 있다.

[0048] 상기 경구 투여제는 예를 들면, 정제, 환제, 경질 및 연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 분제, 산제, 세립제, 과립제, 펠렛제 등이 있으며, 이들 제형은 유효 성분 이외에 계면 활성제, 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로오스 및 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및 폴리에틸렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로오스, 나트륨 카복시메틸셀룰로오스 및 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제 등의 약학적 첨가제를 함유할 수 있다. 상기 정제는 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다. 또한, 상기 비경구 투여제는 직장, 국소, 피하, 경피 투여형 제형일 수 있으며, 예를 들어 주사제, 점적제, 연고, 로션, 겔, 크림, 스프레이, 현탁제, 유제, 좌제(坐劑), 패취 등의 제형일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 상기 화합물 또는 이의 염의 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 약물의 1일 투여 용량은 투여하고자 하는 대상의 증상 진행 정도, 발병 시기, 연령, 건강 상태, 합병증 등의 다양한 요인에 따라 달라지지만, 성인을 기준으로 할 때 일반적으로는 상기 화합물 1㎍/kg 내지 200mg/kg, 바람직하게는 50㎍/kg 내지 50mg/kg을 1일 1 내지 3회 분할하여 투여할 수 있으며, 상기 투여량은 어떠한 방법으로도 본 명세서의 범위를 한정하는 것이 아니다.

[0050] 예시적인 일 구현예에서, 상기 화합물은 피라졸(pyrazole) 유도체일 수 있다. 예를 들어, 상기 피라졸 유도체는 3-Phenyl-4-propyl-1-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-5-ol 일 수 있다.

[0051] 예시적인 일 구현예에서, 상기 조성물은 혈소판의 활성화 또는 혈전의 형성을 억제할 수 있다.

[0052] 예시적인 일 구현예에서, 상기 조성물은 다음 특징 중 어느 하나 이상을 갖는 것일 수 있다: (a) 콜라겐 자극에 의한 혈소판의 ROS(reactive oxygen species) 생성 억제, (b) GPVI 신호 전달 경로 억제, (c) Syk, LAT, Vav1, Btk 및 PLCγ로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의의 타이로신 인산화 억제, (d) 세포질 내 칼슘 이온(Ca^{2+}) 농도 감소, (e) P-selectin의 노출 또는 integrin $\alpha IIb\beta_3$ 활성화 억제, (f) 혈소판의 콜라겐에 대한

부착 억제.

[0053] 예시적인 일 구현예에서, 상기 조성물은 NOX1 및 NOX2 경로를 동시에 효과적으로 억제할 수 있다.

[0054] 예시적인 일 구현예에서, 상기 조성물은 콜라겐 또는 트롬빈 유도 혈소판 응집을 저해할 수 있다.

[0055] 예시적인 일 구현예에서, 상기 조성물은 혈액의 지혈작용을 저해하지 않을 수 있다. 종래의 혈전증 치료 약물 중 항혈소판제는 혈소판의 응집을 억제하지만, 지혈 작용에 중요한 역할을 하는 혈소판 기능을 과도하게 억제하여 출혈 위험을 증가시키는 부작용을 동반하였다. 본 발명의 화학식 1의 화합물은 혈소판 응집과 혈전 형성을 억제하면서도 지혈 작용을 저해하지 않으므로, 환자에게 발생할 수 있는 출혈 위험을 감소시킬 수 있다.

[0056] 예시적인 일 구현예에서, 상기 혈전성 질환은 동맥혈전증, 정맥혈전증, 관상동맥혈전증, 심부정맥혈전증, 뇌동맥혈전증, 말초혈관혈전증, 동맥색전증, 정맥색전증, 신장색전증, 만성동맥폐색증, 혈전성 미세혈관병증, 폐경색, 뇌경색, 뇌색전증 및 혈전성 정맥염으로 구성되는 군에서 선택될 수 있다.

[0057] 다른 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 혈행 개선용 건강기능식품 조성물을 제공할 수 있다. 상기 화합물 및 염은 상기 설명한 바와 같다.

[0058] 용어 “혈행”은 혈액이 혈관을 통하여 신체의 각 부분으로 이동하는 것을 의미한다. 혈액은 신체의 각 조직으로 산소와 영양분을 공급하고, 세포에서 만들어낸 노폐물을 제거해 준다. 또한, 혈액은 호르몬을 작용부위로 운반하고, 외부 유해물질로부터 세포를 방어하며, 적당한 체온을 유지시켜주고, 지혈작용을 하는 등 신체 내 항상성을 유지시키는 역할을 한다. 따라서 원활한 혈액의 흐름은 신체기능을 유지하는 데 매우 중요하고, 혈행 장애는 상기 혈전성 질환의 발생 위험을 높일 수 있다.

[0059] 상기 건강기능식품 조성물에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 건강기능식품식품 조성물의 제형은 특별히 한정되지 않으나, 예를 들어, 정제, 과립제, 환제, 분말제, 드링크제와 같은 액제, 캐러멜, 겔, 바, 티백 등으로 제형화될 수 있다. 각 제형의 식품 조성물은 유효 성분 이외에 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승 효과가 일어날 수 있다.

[0060] 상기 건강기능식품 조성물은 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, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 식품 조성물들은 천연 과일 쥬스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않으나 일 구현예에 따른 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 50 중량부의 범위에서 포함되는 것이 일반적이다.

[0061] 예시적인 일 구현예에서, 상기 조성물은 혈소판의 ROS 생성; 혈소판의 활성화; 또는 혈전의 형성;을 억제할 수 있다.

[0062] 예시적인 일 구현예에서, 상기 조성물은 콜라겐 또는 트롬빈 유도 혈소판 응집을 저해할 수 있다.

[0063] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 화장품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 혈행 개선용 화장료 조성물을 제공하고자 한다. 상기 화합물, 염 및 혈행은 상기 설명한 바와 같다.

[0064] 상기 화장료 조성물의 외형은 화장품학 또는 피부과학적으로 허용 가능한 매질 또는 기제를 함유할 수 있다. 이는 국소 적용에 적합한 모든 제형으로, 예를 들면, 용액, 겔, 고체, 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀젼, 현탁액, 마이크로에멀젼, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는, 이온형(리포좀) 및 비이온형의 소낭 분산제의 형태로, 또는 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱의 형태로 제공될 수 있다. 이들 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 본 명세서에 따른 조성물은 또한 포말(foam)의 형태로 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸의 형태로 제조될 수 있다.

[0065] 상기 화장료 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정되는 바가 없으며, 예를 들면, 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 파우더, 바디로션, 바디크림, 바디오일 또는 바디에센스 등의 화장품으로 제형화될 수 있다.

[0066] 상기 화장료 조성물은 피부 외용제 조성물일 수 있다. 상기 피부 외용제는 피부 외부에서 도포되는 것이라면 무엇이든 포함될 수 있는 총칭으로서 다양한 제형의 화장품, 의약품이 여기에 포함될 수 있다.

[0067] 예시적인 일 구현예에서, 상기 조성물은 혈소판의 ROS 생성; 혈소판의 활성화; 또는 혈전의 형성;을 억제할 수 있다.

[0068] 예시적인 일 구현예에서, 상기 조성물은 콜라겐 또는 트롬빈 유도 혈소판 응집을 저해할 수 있다.

[0070] **실시예**

[0071] **1. 실험 재료 및 방법**

[0072] **1-1. 윤리적 선언**

[0073] 동물 실험은 서울대학교 동물 실험 윤리 위원회(IACUC 번호: SNU-220331-6-5)에서 검토 및 승인을 받았다. 건강한 자원봉사자로부터 인간 혈액 샘플을 채취하고 후속 실험 절차는 서울대학교 기관생명윤리위원회에서 검토 및 승인되었다. 승인된 프로토콜 번호는 2206/001-006이다. 모든 인간 참여자는 실험에 참여하기 전에 서면 동의를 받았다.

[0075] **1-2. 시약 및 항체**

[0076] APX-115 (제품번호: U109969; Achemblock, Hayward, CA, USA), $DCFH_2$ (제품번호: HY-D0940; MedChem Express, Princeton, NJ, USA), CM-H_2DCFDA (제품번호: C6827), DiOC6 (제품번호: D273), Fluo-3-AM (제품번호: F1242) (모두 Molecular Probes, Eugene, OR, USA), AEBSF (제품번호: A-540; Gold Biotechnology, St. Louis, MO, USA), aprotinin, NaCl, $NaHCO_3$ (제품번호: 0332, 0241, 0335) (모두 Amresco, Solon, OH, USA), $CaCl_2$, DMSO, EGTA, $FeCl_3$, glucose (제품번호: C5670, D8418, E4378, 31235, G7021), KH_2PO_4, Na_2HPO_4, Na_3VO_4, $Na_4P_2O_7$. $10H_2O$, NaF (제품번호: P5655, S9763, S6508, S6422, S7920), N,N-디메틸아세트아마이드, 파라포름알데히드, 프로스타글란딘 E1, 시트르산나트륨 (제품번호: D5511, P6148, P5515, S4641), Triton X-100, Tween 80, β-glycerophosphate(제품번호: T9284, P4780, G9422) (모두 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 콜라겐 (제품번호: 385; Chrono-Log, Havertown, PA, USA), 시트릭산 (제품번호: 4337; Duksan, 서울, 대한민국), EDTA, KCl, leupeptin, MgCl2 (제품번호: 75829, 74075, 78436, 75826) (모두 USB, Cleveland, OH, USA), FITC-라벨링된 annexin V (제품번호: 556419; BD Biosciences, San Jose, CA, USA), HEPES (제품번호: 11344041; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)는 각 회사에서 구매하였다.

[0077] 다음 항체들이 사용되었다: anti-phospho-Btk (Tyr^{551}) 항체 (제품번호: 44-1355G, Invitrogen, New York, NY, USA), anti-Btk (제품번호: sc-81238), anti-LAT (제품번호: sc-365626), anti-phospho-PLCγ(Tyr^{753}) (제품번호: sc-130252), anti-PLCγ(제품번호: sc-407), anti-Syk (제품번호: sc-1240), anti-VASP (제품번호: sc-46669), anti-phospho-Vav1 (Tyr^{174}) (제품번호: sc-101858) 항체들 (모두 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-phospho-cPLA2 (Ser^{505}) (제품번호: 2831), anti-cPLA2 (제품번호: 2832), anti-phospho-ERK5 (Thr^{218}/Tyr^{220}) (제품번호: 3371), anti-ERK5 (제품번호: 3372), anti-phospho-p38 MAPK (Thr^{180}/Tyr^{182}) (제품번호: 9211), anti-p38 MAPK (제품번호: 8690), anti-phospho-Syk (Tyr525/526) (제품번호: 2711), anti-phospho-VASP (Ser^{239}) (제품번호: 3114) 항체들 (모두 Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-phospho-LAT (Tyr^{200}) (제품번호: ab68139), anti-Vav1 항체 (제품번호: ab40875, 둘 다 Abcam, Cambridge, UK), anti-phosphotyrosine (4G10) 항체 (제품번호: 05-321) Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), anti-β항체 (제품번호: LF-PA0207) (Abfrontier, 서울, 대한민국), horseradish peroxidase로 라벨링된 goat anti-rabbit IgG 및 anti-mouse IgG (제품번호: 5220-0336, 5450-0011; 모두 Seracare Life Sciences, Milford, MA, USA), PAC1-FITC (제품번호: 340507) 및 CD62P-PE (제품번호: 555524) 항체 (둘 다 BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

[0079] **1-3. 인간 혈소판 준비**

[0080] 혈액은 건강하고 약물이 없는 자원봉사자들로부터 정맥천자 방법으로 채취되었으며, 항응고제인 산/시트르산/덱스트로스 용액이 포함된 튜브에 수집되었다 (제품번호: 364816) (Becton Dickson, Franklin, NJ, USA). 혈소판이 풍부한 혈장(PRP)은 150Xg에서 15분 동안 원심분리한 후 300Xg에서 10분 동안 추가로 원심분리하여 혈소판을 농축하였다. 혈소판 펠렛은 Tyrode's-HEPES 완충액 (10 mM HEPES [pH 7.4], 129 mM NaCl, 0.8 mM KH_2PO_4, 8.9 mM $NaHCO_3$, 2.8 mM KCl, 0.8 mM $MgCl_2$, 5.6 mM glucose), 2 mM EDTA, 10 % 시트르산/시트르산/덱스트로스 용액, 1 μM 프로스타글란딘 E1을 포함하는 용액에 현탁시킨 후 다시 원심분리하였다. 상층액은 버리고, 혈소판 펠렛을 Tyrode's-HEPES 완충액에 원하는 농도로 재현탁하였다. 별도로 명시되지 않는 한, 세척된 혈소판은 자극 전에 1 mM CaCl2로 2분 동안 처리하였다.

[0082] **1-4. 광학적 집합도법 (Light Transmission Aggregometry)**

[0083] 혈소판 집합은 1,000 rpm에서 지속적으로 교반하면서 37 °에서 4채널 집합기 (Chrono-Log, Havertown, PA, USA)를 사용하여 실리콘 처리된 유리 큐벳에서 측정되었다. 데이터는 Aggrolink 소프트웨어 (모델 번호: 700; Chrono-Log, Havertown, PA, USA)를 사용하여 수집되었다.

[0085] **1-5. 세포 내 ROS 및 세포질 Ca^{2+} 농도 측정**

[0086] CM-H_2DCFDA와 Fluo-3-AM을 사용하여 세포 내 ROS 및 Ca^{2+} 농도를 각각 측정했다. 세척된 혈소판(5×10^8/mL)은 PBS에 5 μM CM-H_2DCFDA 또는 1 μM Fluo-3-AM을 포함시켜 30분 동안 37℃에서 어두운 곳에서 인큐베이션한 후, 원심분리하여 Tyrode's-HEPES 완충액에 재현탁했다. 프로브가 처리된 혈소판(5×10^8/mL)은 형광측정기 큐벳에서 37℃, 1,000 rpm으로 지속적으로 교반하며 자극을 받았다. CM-DCF(495 nm에서 흡광/525 nm에서 방출) 또는 Fluo-3(488 nm에서 흡광/525 nm에서 방출)의 형광을 FP-8350 모델(Jasco, Tokyo, Japan) 형광분광광도계를 사용하여 측정했다. 초기 신호는 콜라겐 자극 전 20초 동안 기록되었으며, 이를 기저값으로 사용한 후 계속해서 측정했다. 각 샘플에 대해 형광 신호는 기저값에 대해 정규화했다.

[0088] **1-6. 세포 외 ROS 농도 측정**

[0089] 세척된 혈소판(5×10^8/mL)은 Tyrode's-HEPES 완충액에 1 μM $DCFH_2$를 포함시켜, 37℃에서 800 rpm으로 지속적으로 교반하며 형광측정기 큐벳에서 자극을 받았다. DCF(488 nm에서 흡광/525 nm에서 방출)의 형광은 위에서 설명한 대로 형광분광광도계를 사용하여 측정했다.

[0091] **1-7. 웨스턴 블로팅**

[0092] Thermomixer를 사용하여 37℃에서 1,000 rpm으로 지속적으로 교반하면서 자극한 후, 혈소판은 세포 추출 완충액 (20 mM HEPES [pH 7.0], 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% 글리세롤, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 20 mM β1 mM Na3VO4, 1 μg/mL leupeptin, 1 μg/mL aprotinin, 1 mM AEBSF)으로 용해되었다. 세포 파편은 12,500Xg에서 10분 동안 원심분리하여 제거했다. 단백질 농도가 조정된 세포 용해물의 동일 부피를 사용하여 특정 항체로 분석을 진행했다. 밴드 강도는 ImageJ 소프트웨어(NIH, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 분석했다.

[0094] **1-8. TXB2 ELISA**

[0095] Thermomixer를 사용하여 37℃에서 1,000 rpm으로 지속적으로 교반하면서 처리한 후, 반응은 5 mM EDTA와 200 μM Indomethacin을 추가하여 중단시켰다. 혈소판 반응 혼합물(5×10^8 혈소판/mL)은 즉시 30초 동안 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액에서 TXB2의 농도는 ELISA 키트(Cat# 501020; Cayman, Ann Arbor, MI, USA)를 사용하여 Cytation3 마이크로플레이트 분광광도계(BioTek, Burlington, VT, USA)로 측정했다.

[0097] **1-9. 유세포 분석 및 분석**

[0098] 형광 표지된 항체인 CD62P-PE(0.5 μg/mL), PAC1-FITC(0.5 μg/mL) 또는 annexin V-FITC(0.1 mg/mL)를 추가하여 각각 표면 P-selectin, 활성화된 통합체 αIIbβ및 PS 노출을 염색했다. 혈소판 혼합물은 37℃에서 5분 동안 어두운 곳에서 콜라겐으로 자극을 받았다. 각 샘플은 1% 파라포름알데히드로 고정하고 PBS로 희석했다. 모든 분석은 FACSCalibur 유세포 분석기(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하여 최소 $5x10^4$ 개의 세포를 샘플로 진행했다. 혈소판 집단은 전방 산란과 측면 산란 특성에 따라 식별되고 게이팅되었다. 데이터는 FlowJo 소프트웨어 10.9(FlowJo LLC, Ashland, OR, USA)를 사용하여 분석했다.

[0100] **1-10. ATP 방출 측정**

[0101] 혈소판은 흰색 평평한 바닥의 96웰 플레이트에서 인큐베이션한 후 콜라겐으로 자극을 받았다. ATP 생물발광 측정 키트(ab113849; Abcam, Cambridge, CB2 0AX, UK)의 Luciferin-luciferase 시약이 각 웰에 추가되었으며, 96웰 플레이트는 LB 960 Centro 마이크로플레이트 루미노미터(Berthold, Bad Wildbad, Germany)에 놓였다. 자동화된 프로토콜에 따라 샘플을 흔든 후, 30초 간격으로 5분 동안 루미네선스를 측정하고 기록했다.

[0103] **1-11. cGMP ELISA**

[0104] 혈소판 반응 혼합물(5×10^8 혈소판/mL)은 0.8 μm 크기의 원심 필터(Cat# VK01P042; Sartorius, Elk Grove, IL, USA)를 통해 10,000Xg에서 30초 동안 원심분리하여 상등액을 선택적으로 제거했다. 필터 막에 남은 혈소판은 0.1 M HCl에 1% Triton X-100을 포함시켜 용해시켰다. 용해된 샘플은 12,500Xg에서 10분 동안 원심분리하여 파편을 제거했다. 그 후 얻어진 상등액을 사용하여 분석을 진행했다. 상등액에서 cGMP 농도는 ELISA 키트(Cat# ADI-900-164; Enzo Life Sciences, Exeter, UK)를 사용하여 Cytation3 마이크로플레이트 분광광도계로 측정했다.

[0106] **1-12. 흐름 조건에서 혈소판 부착 및 혈전 형성 측정**

[0107] 세척된 혈소판(1×10^9/mL)은 1 μM DiOC6을 포함하여 37℃에서 10분 동안 인큐베이션했다. 콜라겐으로 코팅된 커버슬립(Cat# GG-12-Collagen; Neuvitro, Camas, WA, USA)은 병렬판 흐름 챔버(Chamlide CF, Live Cell Instrument, Seoul, Korea)에 장착되었다. DiOC6로 염색된 혈소판은 1000^{s-1}의 속도로 콜라겐 매트릭스를 통과하며 펌프 주입기(Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)를 사용해 샘플 1 mL가 소진될 때까지 흐르게 했다. 챔버에 남아있는 비부착 혈소판은 PBS로 세척했다. 혈소판 혈전과 부착된 혈소판은 4% 파라포름알데히드로 15분 동안 고정한 후 PBS로 세척하고 형광현미경(Ts2-FL, Nikon, Tokyo, Japan)을 사용하여 시각화했다. 5~10개의 다른 필드에서 대표 이미지를 촬영했다. 흐름 챔버 표면 커버리지는 ImageJ 소프트웨어(NIH, Bethesda, MD, USA)를 사용해 계산했다.

[0109] **1-13. 동맥 혈전증 평가**

[0110] 마우스(C57BL/6 J, 수컷)는 The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)에서 얻었고, 서울대학교의 특정병원체자유 동물 시설에서 사육되었다. 마우스는 표준 사료(Cat# 2018; Harlan Teklad, Madison, WI, USA)를 자유롭게 섭취했다. 10-11주 된 수컷 마우스를 세 그룹으로 나누었다. 마우스는 이전에 설명된 바와 같이 APX-115를 10% N, N-디메틸아세트아미드, 10% Tween 80 및 80% 증류 탈이온수에 용해시켜 10 mL/kg 체중 용량으로 경구 투여했다 [Joo, J. H. et al. A novel pyrazole derivative protects from ovariectomy-induced osteoporosis through the inhibition of NADPH oxidase. Sci Rep 6:22389; 2016]. 100 mg/kg 알팍사론(Jurox, Cat# 520400; New South Wales, Australia)과 10 mg/kg 자일라진(Rompun; Bayer Korea, Seoul, Korea)을 포함하는 복막 주사를 통해 마취한 후, 우측 경동맥을 노출시켰다. 경동맥 폐색은 이전에 설명된 방법에 따라 수행되었다 [Bonnard, T.; Hagemeyer, C. E. Ferric Chloride-induced Thrombosis Mouse Model on Carotid Artery and Mesentery Vessel. *J Vis Exp*:e52838; 2015.]. 경동맥의 폐색은 Perivascular Flowmeter(모델 TS420,

Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA)를 사용하여 혈류를 기록함으로써 측정되었다. Perivascular Flowprobe(모델 MA0.5PSB, Transonic Systems Inc.)는 경동맥에 놓이고, 절개를 통해 분리되었으며, 0.3~0.9 mL/s의 기준 혈류가 유지되도록 조정되었다. 혈관 손상은 APX-115 투여 1시간 후, 경동맥 근처에 20% $FeCl_3$로 포화된 1 X 1 mm 크기의 여과지를 적용하여 유도되었다. 3분 후 여과지를 제거하고 혈류를 측정했다. 초기 및 최종 데이터 포인트는 0.5초 간격으로 수집되었으며, 안정적인 폐색에 도달하는 데 걸린 시간을 계산했다. 폐색은 혈류가 30초 이상 0 mL/s로 감소했을 때 안정적이라고 판단되었다.

[0112] **1-14. 꼬리 출혈 시간 평가**

[0113] 마우스(C57BL/6 J, 수컷)는 The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)에서 얻었으며, 위에서 설명한 동맥 혈전증 측정을 위한 방법으로 APX-115를 투여하고 마취했다. 꼬리는 1.5 mm의 고정된 직경으로 절단되고, 나머지 부분은 37℃에서 미리 가온된 등장액에 담갔다. 출혈은 시각적으로 추적되었다. 출혈이 안정적으로 멈춘 시간을 기록했으며, 출혈이 멈춘 후 1분 이내에 재발하지 않으면 출혈이 멈춘 것으로 간주했다.

[0115] **1-15. 통계 분석**

[0116] 모든 실험군에 대해 평균값과 표준편차를 계산했다. 모든 실험에서 n은 독립적인 실험의 수를 나타낸다. 데이터는 두 그룹 비교를 위한 Student's t-test 또는 Mann-Whitney U test와 다수 그룹 비교를 위한 일원배치 분산분석(ANOVA) 후 Dunnett's test를 사용하여 분석했다. 데이터 분석은 GraphPad PRISM 소프트웨어 10(GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA)을 사용하여 수행했다. P값이 ≤0.05이면 통계적으로 유의미한 것으로 간주했다.

[0118] **2. 실험 결과**

[0119] **2-1. APX-115는 혈소판에서 콜라겐 유도 응집 및 ROS 생성을 억제한다.**

[0120] 본 실험에서 사용된 APX-115의 농도는 종래 연구와 실험적 검증을 바탕으로 선택되었다. 용량-반응 실험을 통해 APX-115는 인간 혈소판이 콜라겐에 의해 자극된 응집을 IC50 약 13.5 μM에서 억제함을 확인했다 (도 2A). 이러한 결과를 바탕으로 본 실험에서 APX-115의 농도를 콜라겐 자극 혈소판 응집에 미치는 영향을 연구하는 데 적합한 농도로 검증하였다.

[0121] NOX1과 NOX2 결핍이 마우스 혈소판의 트롬빈 유도 응집을 억제하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 발명자는 APX-115가 트롬빈에 의한 인간 혈소판 응집에 미치는 영향을 조사하였다. APX-115는 트롬빈 유도 혈소판 응집도 유의미하게 억제하였다 (도 10). 이러한 결과는 APX-115가 GPVI 및 GPCR 매개 혈소판 활성화를 억제할 수 있음을 시사한다. 그러나 인간 혈소판에서 콜라겐 자극에 의한 ROS 생성이 트롬빈, ADP, TXA2와 같은 GPCR 리간드로 자극했을 때보다 훨씬 높은 수준으로 증가한다는 사실을 감안하여, 본 발명자는 APX-115가 콜라겐 유도 혈소판 활성화와 기능에 미치는 영향을 추가로 조사했다.

[0122] APX-115가 콜라겐에 의한 혈소판 내 ROS 수준 상승에 미치는 영향을 평가하기 위해, 산화환원 민감성 형광 탐침인 5-(and 6)-클로로메틸-2',7'-디클로로디하이드로플루오레세인 디아세테이트(CM-H_2DCFDA)를 사용하였다 (도 2B). 콜라겐 자극은 인간 혈소판에서 ROS 생성을 유의미하게 증가시켰다. APX-115는 농도 의존적으로 콜라겐에 의한 혈소판 내 ROS 상승을 감소시켰다. 산화환원 민감성 및 세포막을 통과할 수 없는 탐침인 2',7'-디클로로디하이드로플루오레세인($DCFH_2$)을 사용하여 APX-115가 콜라겐 유도 세포 외 ROS 수준 상승에 미치는 영향도 조사했다 (도 2C). 콜라겐 자극에 의해 세포 외 ROS 생산이 유의미하게 증가한 것을 확인했다. APX-115는 농도 의존적으로 콜라겐에 의해 유도된 세포 외 ROS 상승을 예방하였다. 이 결과는 APX-115가 NOX 매개 ROS 생성을 차단하여 항혈소판 효과를 가질 수 있음을 시사한다.

[0124] **2-2. APX-115는 혈소판에서 콜라겐으로 자극된 GPVI 신호를 약화시킨다.**

[0125] 콜라겐 활성화된 GPVI는 비장 티로신 키나제(Syk)에 의해 T 세포 활성화 연결단(LAT) 티로신 잔기의 인산화를 촉진하고, 이는 Vav1, Bruton's 티로신 키나제(Btk), PLCγ와 같은 중요한 성분들과 함께 LAT 신호 복합체 형성

을 유도한다. 단백질 티로신 인산화는 GPVI 자극 신호 전달의 주요 특징이다. ROS에 의한 단백질 티로신 인산화 가수분해효소(PTPs)의 산화적 비활성화가 콜라겐 자극 혈소판에서 GPVI 신호 전달 경로를 증대시킬 수 있다. 본 발명자는 APX-115가 콜라겐 자극 혈소판에서 ROS 생성을 억제했음을 바탕으로 단백질 티로신 인산화에 미치는 영향을 조사하였다. 콜라겐에 의해 유도된 총 티로신 인산화 수준은 기준값과 비교하여 상당히 증가하였다 (도 3A). 혈소판이 APX-115(30 μM)로 전처리된 후 콜라겐 자극을 받았을 때 단백질 티로신 인산화가 억제되었다. 이는 APX-115가 NOX 의존적인 ROS 생성을 차단하여 PTPs가 산화적으로 비활성화되는 것을 방지할 수 있음을 시사한다. Syk, Vav1, Btk, PLCγ의 LAT 신호 복합체 내 결합은 주로 인산화된 티로신 잔기와 SH2 도메인 간의 결합 모듈에 의해 매개되며, 궁극적으로 PLCγ활성화를 유도한다. 본 발명자는 APX-115가 GPVI 신호 전달 경로의 활성화를 조절하는지 확인하기 위해 Syk, LAT, Vav1, Btk의 티로신 인산화 기반 활성화를 평가하였다. 인산화 특이 항체를 사용한 Western blot 분석은 콜라겐 자극이 Syk의 Tyr525/Tyr526, LAT의 Tyr200, Vav1의 Tyr174, Btk의 Tyr551에서 인산화를 증가시킨다고 나타냈다 (도 3B). 각 신호 단백질의 활성화는 해당 단백질의 티로신 인산화에 의존하며, 이는 개별 분자의 활성을 측정하는 데에도 사용할 수 있다. APX-115 처리 후 콜라겐 자극 혈소판에서 Syk, LAT, Vav1, Btk의 활성화가 티로신 인산화를 감소시킴으로써 선택적으로 억제되었다. 이러한 결과는 APX-115가 NOX 매개 ROS 생성을 차단하여 PTPs가 산화적으로 비활성화되는 것을 보호하고, 그로 인해 Syk, LAT, Vav1, Btk의 활성화를 억제할 수 있음을 시사한다.

[0127] **2-3. APX-115는 혈소판에서 콜라겐 유도 PLCγ활성화 및 Ca^{2+} 이동을 억제한다.**

[0128] 콜라겐 자극에 반응하여 PLCγ의 하류 표적인 Tyr753의 인산화는 Vav1과 Btk의 티로신 인산화 기반 활성화와 관련이 있으며, 이로 인해 PLCγ의 활성화가 증가한다. APX-115는 상류의 중요한 분자들을 차단하여, 콜라겐 자극 혈소판에서 PLCγ의 Tyr753 인산화를 조사할 수 있게 했다. 도 4A에서 보듯, APX-115는 콜라겐에 의해 유도된 PLCγ의 Tyr753 인산화를 예방했다. 이와 함께 본 발명자의 실험 결과는 APX-115가 Syk, LAT, Vav1, Btk의 활성화를 차단하여 NOX 매개 ROS 생성을 막음으로써 PLCγ활성을 감소시킨다는 것을 보여준다. PLCγ가 콜라겐 자극 혈소판에서 다이아실글리세롤과 이노시톨-1,4,5-트리스포스페이트(IP3)를 생성하면 PKC가 활성화되고, 세포질 내 Ca^{2+} 농도가 증가하여 세포 내 저장소에서 Ca^{2+}가 이동한다. 따라서 본 발명자는 Fluo-3-AM을 탐침으로 사용하여 세포질 내 Ca^{2+} 농도를 측정했다. 외부 Ca^{2+}가 없을 때 내부 저장소에서 Ca^{2+}가 방출되면서 세포질 내 Ca^{2+} 농도가 상승하는 것을 반영하므로, 세포질 내 Ca^{2+} 농도는 0.5 mM EGTA 존재 하에 평가되었다 (도 4B). APX-115는 내부 저장소에서 콜라겐 유도 Ca^{2+} 이동을 효과적으로 억제했다. 또한 APX-115는 외부 Ca^{2+}가 존재하는 조건에서도 콜라겐 유도 세포질 Ca^{2+} 상승을 성공적으로 예방했다 (도 4C). 이 결과는 APX-115의 항혈소판 작용이 Ca^{2+} 이동 및 PLCγ활성화의 조절에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

[0130] **2-4. APX-115는 콜라겐 유도 혈소판 과립 방출을 억제한다.**

[0131] 혈소판이 활성화된 후, 밀집 과립(dense-granules)과 α-과립(alpha-granules)에서 활성 물질의 방출은 혈소판 활성화를 강화하는 중요한 역할을 한다. 콜라겐 자극 혈소판에서의 과립 방출은 PLCγ에 의한 PKC 활성화 및 세포질 내 Ca^{2+} 증가로 촉진된다. 본 발명자는 APX-115가 PLCγ를 억제함에 따라 콜라겐 유도 과립 방출에 미치는 영향을 평가했다. ATP 방출 분석을 통해 혈소판 밀집 과립 방출을 평가하였다. 도 5A는 APX-115가 콜라겐으로 자극된 인간 혈소판에서 방출된 ATP의 양을 유의미하게 감소시킨다는 것을 보여준다. P-selectin은 혈소판 활성화 후 α-과립의 탈과립이 일어난 혈소판 표면에서 혈소판-백혈구 접촉을 촉진하는 부착 분자로 작용한다. PE로 표지된 항-P-selectin 항체(CD62P-PE)를 사용한 흐름 세포 분석에서 콜라겐이 혈소판 표면에서 P-selectin 발현을 증가시켰으며, 이는 APX-115에 의해 강력하게 억제되었다 (도 5B).

[0133] **2-5. APX-115는 혈소판에서 콜라겐 유도 p38 MAPK/cPLA2/TXA2 생성 신호 전달 활성화를 약화시킨다.**

[0134] 콜라겐 유도 혈소판 응집 과정은 2차 파동의 아고니스트인 TXA2에 의해 증폭된다. 세포질 인지질분해효소(cPLA2)는 콜라겐 자극 혈소판에서 TXA2 생성을 돕는 중요한 효소로, 세포막 인지질에서 아라키돈산을 방출하며, 그 활동은 p38 MAPK 의존적인 Ser505 인산화에 의해 증가한다. p38 MAPK의 활성화는 GPVI 자극 혈소

판에서 선택적인 NOX2 억제제나 NOX2의 조절 서브유닛인 p47phox 결핍에 의해 억제된다고 알려져 있다. 또한, 종래 연구에서는 GPVI 자극 혈소판에서 적절한 p38 MAPK 활성화와 후속 TXA2 합성이 NOX1에서 생성된 ROS에 의존한다고 보여졌다. 이에 본 발명자는 APX-115가 p38 MAPK의 cPLA2 활성화를 조절하는지 조사했다. 콜라겐 유도 혈소판 활성화는 p38 MAPK의 Thr180/Tyr182 인산화와 그 하류 단백질인 cPLA2의 Ser510 인산화를 초래한다. APX-115로 전처리한 경우 이러한 인산화가 현저히 감소했다 (도 6A와 6B). 그 다음으로 본 발명자는 TXA2의 안정적인 대사산물인 TXB2 생성에 대해 APX-115가 미치는 영향을 평가했다. 콜라겐 자극 혈소판에서 TXB2 생성은 APX-115에 의해 유의미하게 억제되었다 (도 6C). 이러한 결과는 APX-115의 항혈소판 작용이 ROS 의존적인 p38 MAPK/cPLA2/TXA2 생산 신호 전달 경로의 하향 조절에 일부 기인함을 시사한다.

[0136] **2-6. APX-115는 혈소판에서 콜라겐 유도 ERK5 활성화 및 PS 노출을 억제한다.**

[0137] 산화환원 민감성 MAP 키나제 ERK5는 활성화된 혈소판에서 NOX 매개 ROS에 의해 자극된다. 이는 응고촉진 인지질인 포스파티딜세린(PS)을 외부화하여 피브린 생성에 기여한다. 따라서 본 발명자는 APX-115가 ERK5가 PS 외부화 증가를 촉진하는 능력에 미치는 영향을 조사했다. 콜라겐 자극 혈소판에서 ERK5의 Thr218/Tyr220 인산화는 APX-115(30 μM)로 전처리 시 현저히 억제되었다 (도 7A). 그 다음으로, 흐름 세포 분석을 사용하여 PS 노출의 지표로서 혈소판에 결합하는 annexin V-FITC를 측정하여 APX-115가 혈소판 응고 반응에 미치는 영향을 평가했다. 콜라겐 처리 시 PS 노출이 현저히 증가했으나, APX-115 전처리에 의해 annexin V 양성 혈소판 비율이 감소하였다 (도 7B). 이러한 결과는 APX-115가 ROS 생성 감소 능력을 통해 ERK5 활성화를 차단하여 혈전성 질환에서 응고촉진 상태를 조절하는 데 기여할 수 있다는 가설을 뒷받침한다.

[0139] **2-7. APX-115는 혈소판의 인테그린 αIIbβ활성화를 위한 콜라겐 유도 신호 전달 경로를 억제한다.**

[0140] 혈소판 부착 및 응집은 인테그린 αIIbβ의 내부-외부 활성화에 의해 크게 영향을 받으며, 이로 인해 피브리노겐과 높은 친화력으로 결합하게 된다. GPVI 자극 혈소판에서 인테그린 αIIbβ활성화에 NOX 매개 ROS가 중요한 역할을 한다는 사실을 고려하여, 본 발명자는 APX-115가 αIIbβ내부-외부 신호에 미치는 영향을 평가했다. 흐름 세포 분석을 통해 FITC로 표지된 활성 인테그린 αIIbβ항체(PAC1-FITC)를 사용하여 APX-115가 콜라겐 유도된 αIIbβ의 활성화 변형을 억제하는지 확인했다 (도 8A). 인테그린 αIIbβ활성화를 조절하는 적응 분자인 혈관 확장제 자극 인산화 단백질(VASP)은 혈소판 활성화를 방지하는 중요한 역할을 한다. Triple NOX 결핍 마우스 혈소판은 휴식 상태에서 일관되게 더 높은 세포 내 cGMP 수준을 보였으며, 콜라겐 자극 조건에서는 VASP Ser239의 인산화 수준이 현저히 더 높았다. 또한, NOX에서 생성된 ROS가 혈소판에서 cGMP/PKG 신호 전달 경로를 차단한다는 것이 밝혀졌다. 따라서, APX-115가 VASP 인산화와 혈소판 내 cGMP 수준에 미치는 영향을 평가했다. 도 8B에서 볼 수 있듯이, 콜라겐 자극 후 VASP Ser239의 인산화가 현저히 감소했으며, APX-115를 추가함으로써 인산화가 눈에 띄게 감소했다. 또한, 정상 조건에서 30 μM 농도의 APX-115를 투여한 결과 혈소판 내 cGMP 수준이 3.7배 증가하는 변화가 나타났다 (도 8C). 이러한 결과는 ROS에 의해 조절되는 cGMP/PKG/VASP/인테그린 αIIbβ 신호 경로의 조절이 APX-115의 항혈소판 활성에 기여한다는 것을 시사한다.

[0142] **2-8. APX-115가 흐름 조건 하에서 혈소판 부착 및 혈전 형성에 미치는 영향과 in vivo에서의 동맥 혈전증 및 지혈 효과 확인**

[0143] 혈소판 부착과 응집의 주요 원인은 내피 손상 부위에서 하층 세포질 콜라겐에 노출되는 것이다. NOX1 또는 NOX2 결핍 마우스 혈소판은 전단력 하에서 콜라겐에 부착된 후 혈전 부피가 감소했다. 따라서 본 발명자는 콜라겐으로 덮인 흐름 챔버에서 전단력 하에 혈소판 부착과 혈전 형성을 조사했다. APX-115 처리된 혈소판에서는 안정적인 혈소판 부착과 고정된 콜라겐에서 혈전의 직경이 모두 감소했다 (도 9A). 이 결과는 APX-115가 전단력 하에서 혈전 성장을 방지하고 안정적인 혈소판 부착을 억제한다는 것을 보여준다. 마지막으로, APX-115의 혈소판 활성 억제 효과가 in vivo에서의 혈전증에 미치는 영향을 평가했다. $FeCl_3$에 의한 경동맥 폐색을 유도하여 동맥 혈전증 모델을 사용하여 혈전 발생에 대한 민감도를 조사했다. 도 9B에서 볼 수 있듯이, APX-115를 투여한 마우스는 비어클 대조군에 비해 경동맥 폐색에 대해 현저한 보호 효과를 보였다 (10.6 ± 1.5분 vs 15.9 ± 2.2분, n = 6, p = 0.0022). 본 발명자는 또한 APX-115가 지혈에 미치는 영향을 평가하기 위해 꼬리 출혈 시간 실험을 진행했다. 도 9C에서 보여지는 바와 같이, APX-115는 출혈 시간에 유의미한 영향을 미치지 않았다 (201.2 ± 48.1초 vs 197.0 ± 22.2초, n = 6, p = 0.9389). 이는 APX-115가 정상적인 지혈을 방해하지 않으면서 혈전증

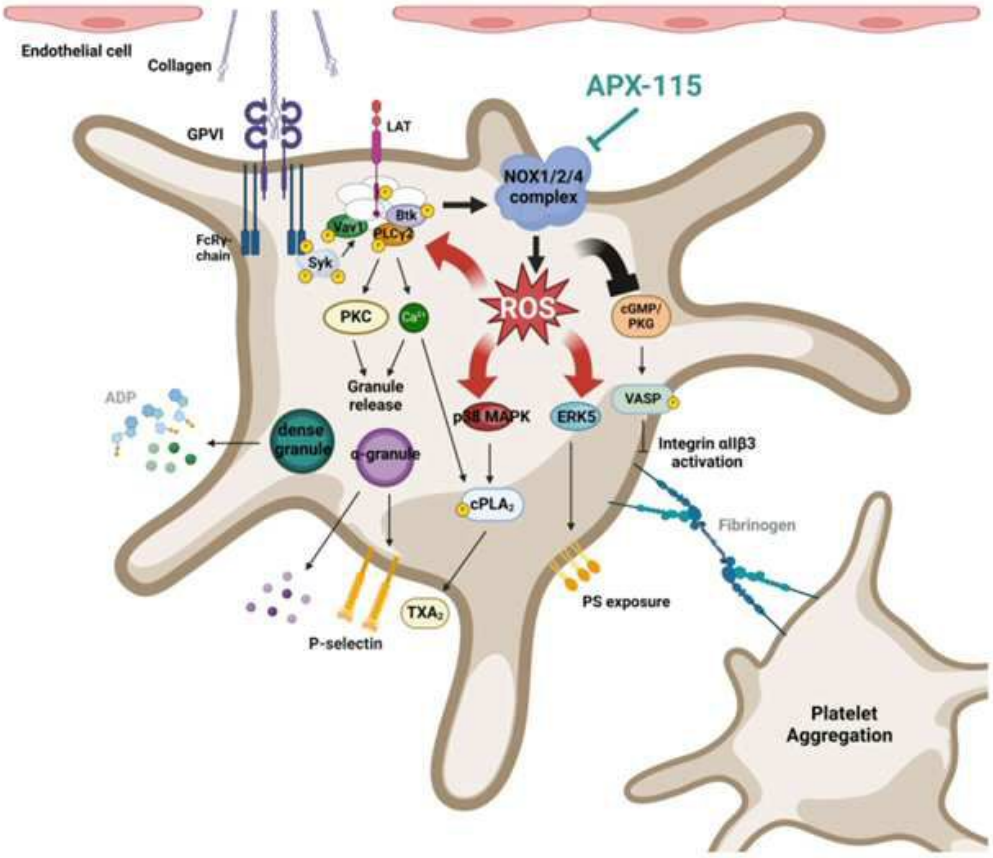
을 억제할 수 있음을 시사한다.

[0145] **2-9. 다른 NOX 억제제 대비 APX-115의 콜라겐 및 트롬빈 유도 혈소판 응집 억제 효과 확인**

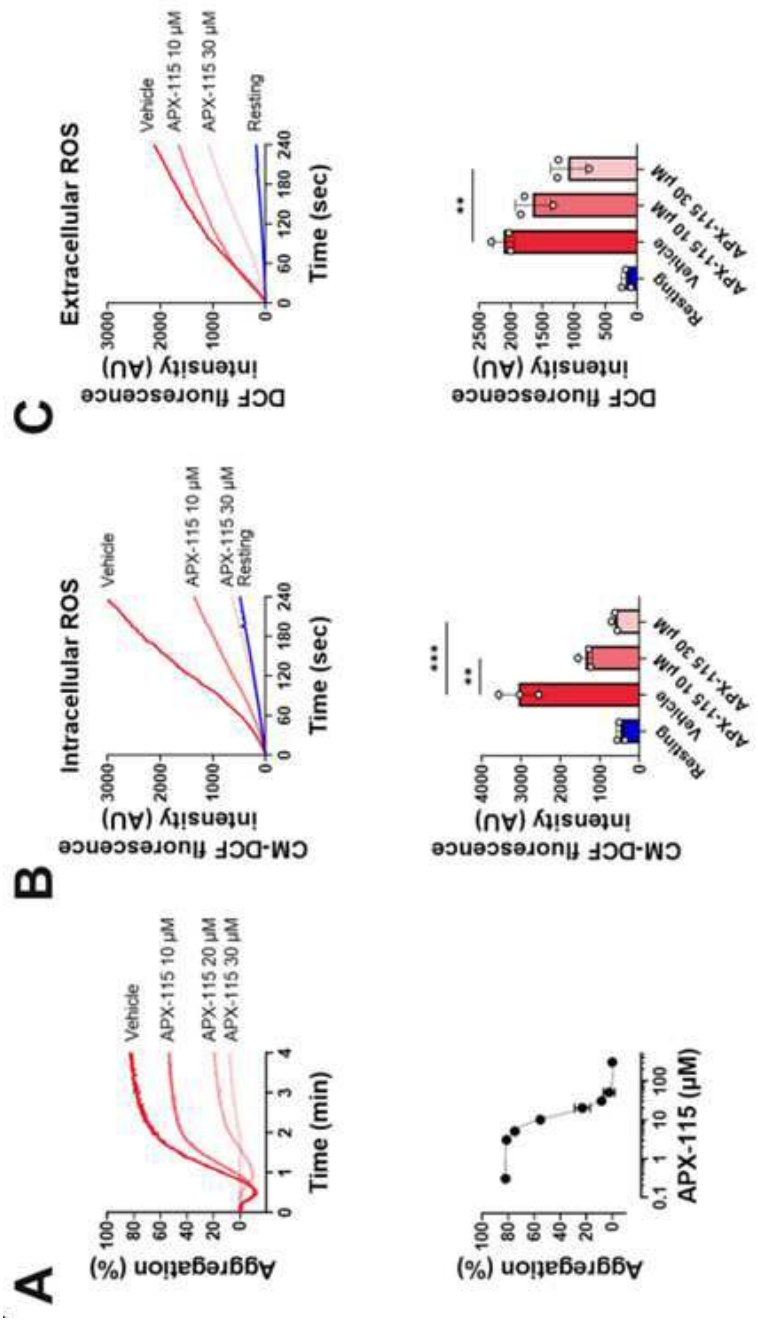
[0146] ML171 (NOX1-specific inhibitor)과 GSK2795039 (NOX2-specific inhibitor)의 비교 실험에서 APX-115는 두 자극(콜라겐과 트롬빈)에 대해 모두 우수한 억제 효과를 보였다. 이 결과는 APX-115의 다중 NOX isoform 억제 특성을 명확히 보여준다. 구체적으로, ML171은 콜라겐에 의해 유도된 혈소판 응집을 효과적으로 억제했으나 트롬빈에 대해서는 제한적인 효과를 나타냈고, 반대로 GSK2795039는 트롬빈에 의한 활성화를 억제하는데 비교적 약했다. APX-115는 이와 대조적으로, 콜라겐과 트롬빈 모두에서 NOX1 및 NOX2 경로를 효과적으로 억제하며 광범위한 효능을 입증했다. APX-115는 동형 특이적 억제제인 ML171(NOX1) 및 GSK2795039(NOX2)에 비해 더 광범위한 억제를 보였다(도 11A, 도 11B). ML171은 콜라겐 유도 응집을 강력하게 억제한 반면, GSK2795039는 덜 효과적이었다. APX-115는 콜라겐 및 트롬빈 유도 응집 모두에서 우수한 억제를 보였으며, 이는 범-NOX 억제 활동과 더 광범위한 치료적 잠재력을 강조한다.

도면

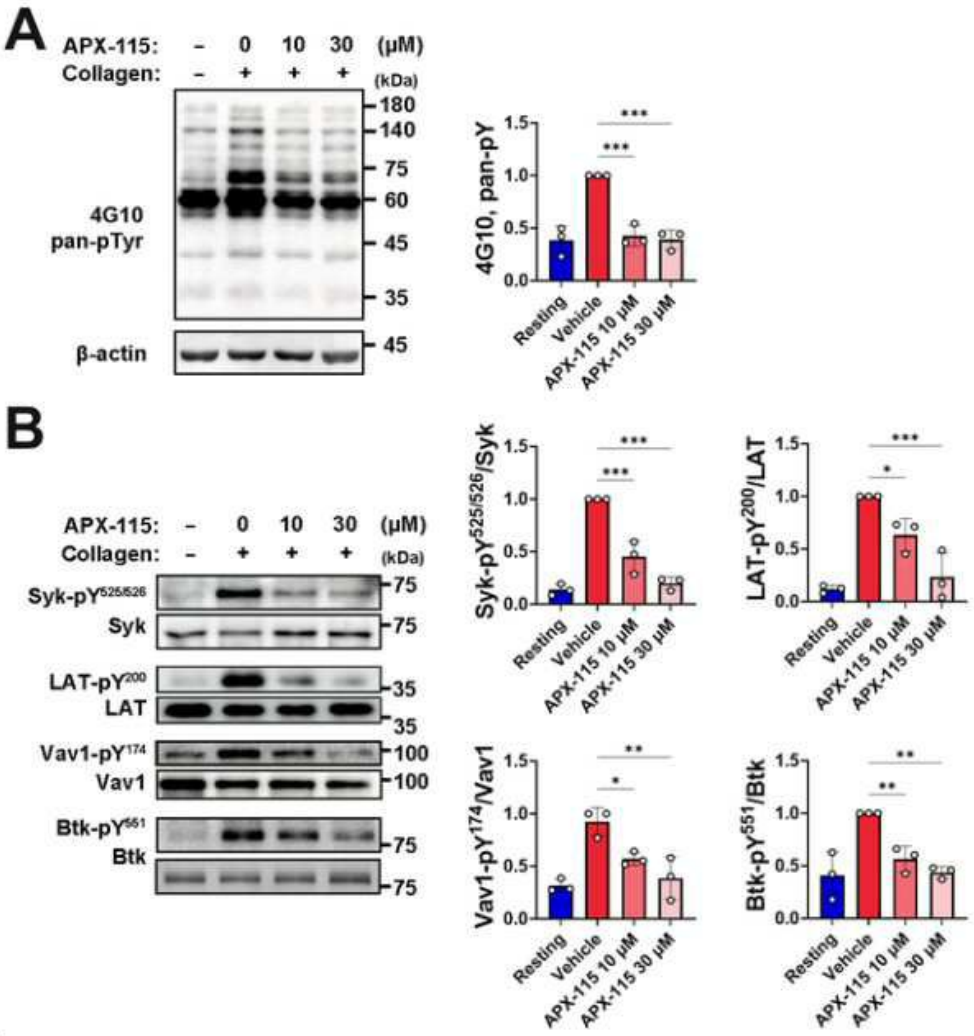
도면1



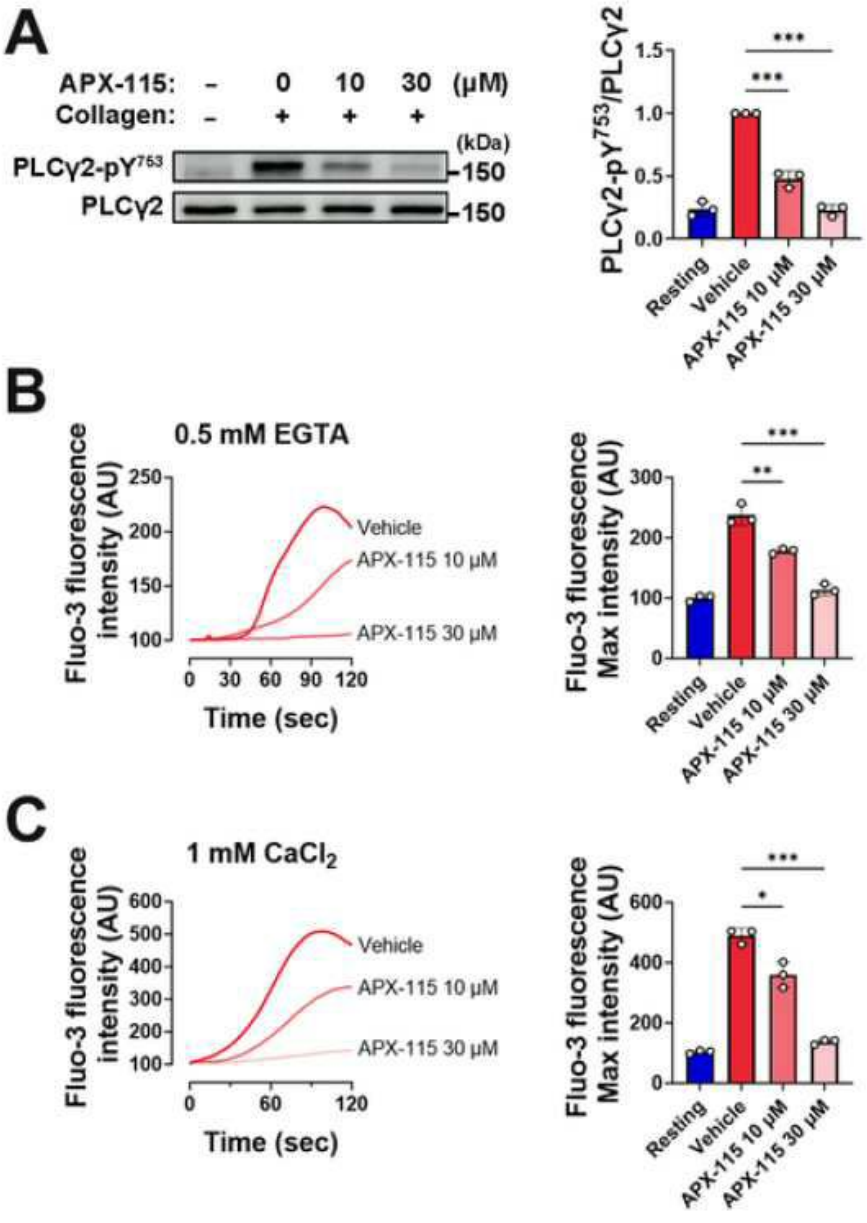
도면2


A
Aggregation (%)
Time (min)
Vehicle
APX-115 10 μM
APX-115 20 μM
APX-115 30 μM
APX-115 (μM)
B
Intracellular ROS
CM-DCF fluorescence intensity (AU)
Time (sec)
Vehicle
APX-115 10 μM
APX-115 30 μM
Resting
C
Extracellular ROS
DCF fluorescence intensity (AU)
Time (sec)
Vehicle
APX-115 10 μM
APX-115 30 μM
Resting

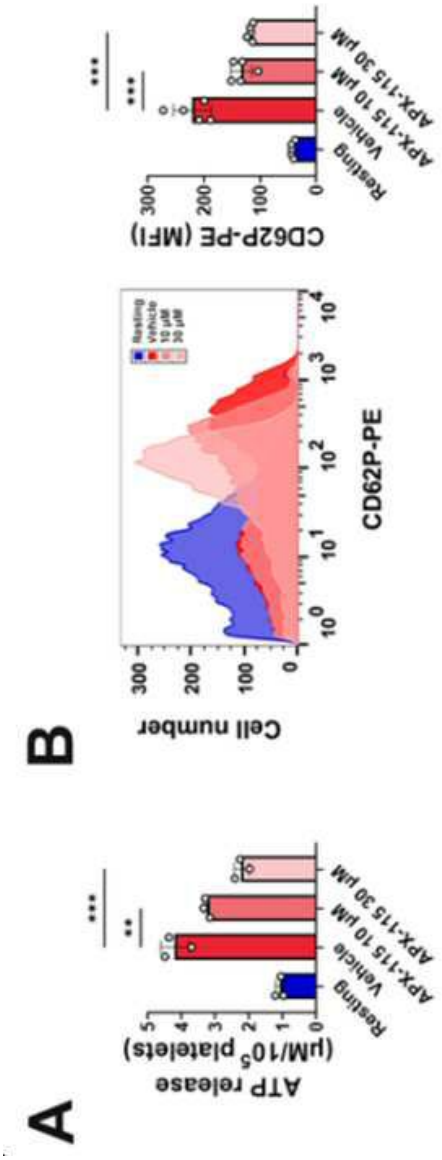
도면3


A
APX-115: – 0 10 30 (μM)
Collagen: – + + +
(kDa)
180
140
75
60
45
35
4G10
pan-pTyr
β-actin
45
4G10, pan-pY
Resting
Vehicle
APX-115 10 μM
APX-115 30 μM
B
APX-115: – 0 10 30 (μM)
Collagen: – + + +
(kDa)
Syk-pY525/526
Syk
LAT-pY200
LAT
Vav1-pY174
Vav1
Btk-pY551
Btk
75
35
100
Syk-pY525/526/Syk
LAT-pY200/LAT
Vav1-pY174/Vav1
Btk-pY551/Btk

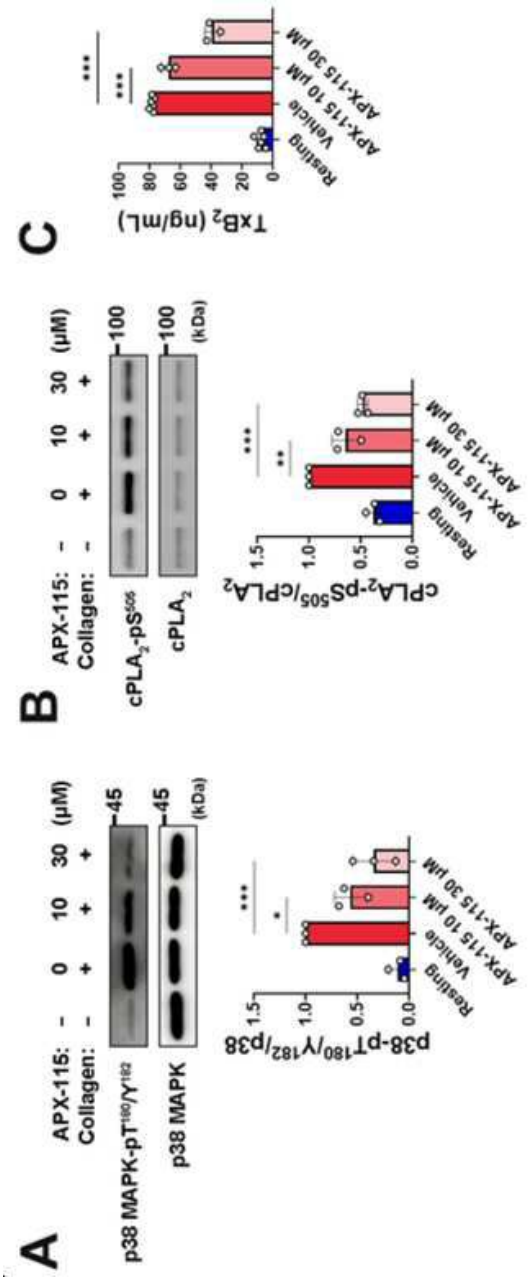
도면4


A
APX-115: – 0 10 30 (μM)
Collagen: – + + +
(kDa)
PLCγ2-pY753
PLCγ2
150
150
PLCγ2-pY753/PLCγ2
Resting
Vehicle
APX-115 10 μM
APX-115 30 μM
B
0.5 mM EGTA
Fluo-3 fluorescence intensity (AU)
Vehicle
APX-115 10 μM
APX-115 30 μM
Time (sec)
Fluo-3 fluorescence Max intensity (AU)
C
1 mM CaCl2
Fluo-3 fluorescence intensity (AU)
Time (sec)
Fluo-3 fluorescence Max intensity (AU)

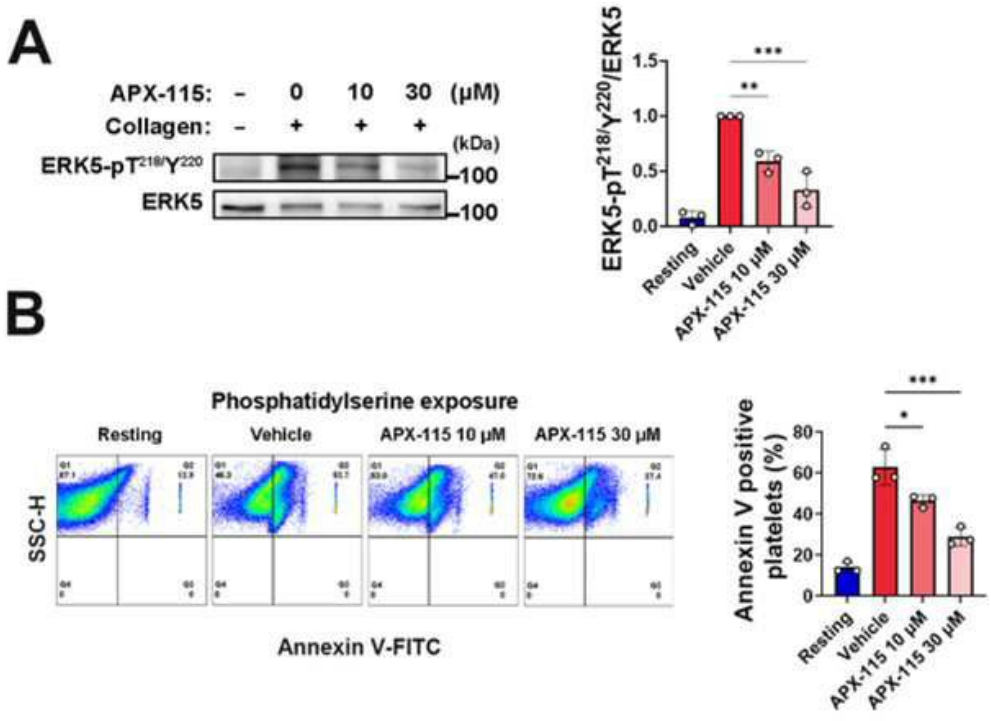
도면5


A
ATP release
(μM/10^5 platelets)
Resting
Vehicle
APX-115 10 μM
APX-115 30 μM
B
Cell number
CD62P-PE
CD62P-PE (MFI)

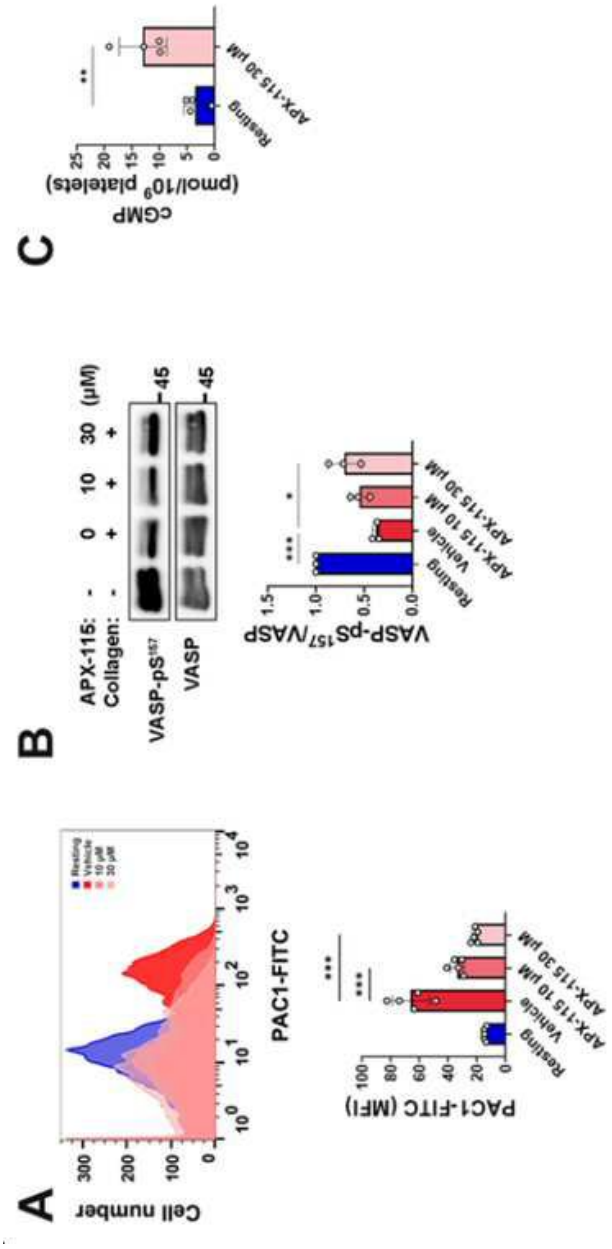
도면6


A
APX-115: - 0 10 30 (μM)
Collagen: - + + +
p38 MAPK-pT180/Y182
p38 MAPK
45
45
(kDa)
p38-pT180/Y182/p38
Resting
Vehicle
APX-115 10 μM
APX-115 30 μM
B
APX-115: - 0 10 30 (μM)
Collagen: - + + +
cPLA2-pS505
cPLA2
100
100
(kDa)
cPLA2-pS505/cPLA2
C
TxB2 (ng/mL)

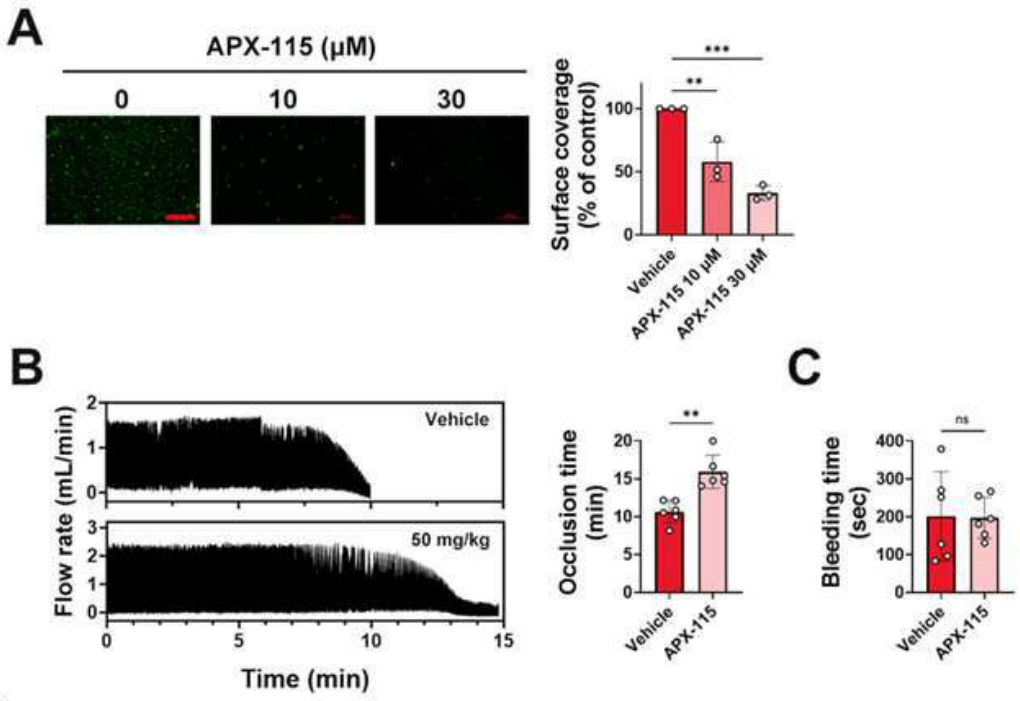
도면7


A
APX-115: – 0 10 30 (μM)
Collagen: – + + +
(kDa)
ERK5-pT218/Y220
100
ERK5
100
ERK5-pT218/Y220/ERK5
1.5
1.0
0.5
0.0
***
**
Resting
Vehicle
APX-115 10 μM
APX-115 30 μM
B
Phosphatidylserine exposure
Resting
Vehicle
APX-115 10 μM
APX-115 30 μM
SSC-H
Annexin V-FITC
Annexin V positive platelets (%)
80
60
40
20
0
***
*
Resting
Vehicle
APX-115 10 μM
APX-115 30 μM

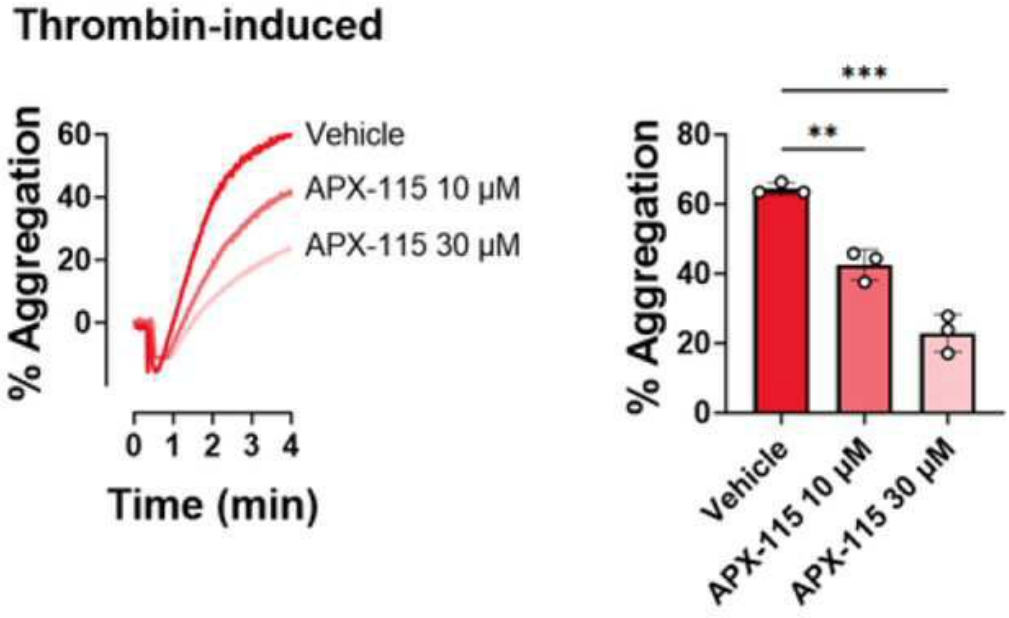
도면8


A
Cell number
PAC1-FITC
PAC1-FITC (MFI)
Resting
Vehicle
APX-115 10 μM
APX-115 30 μM
B
APX-115: - 0 10 30 (μM)
Collagen: -
VASP-pS157
VASP
45
45
VASP-pS157/VASP
C
cGMP
(pmol/10^9 platelets)
Resting
APX-115 30 μM

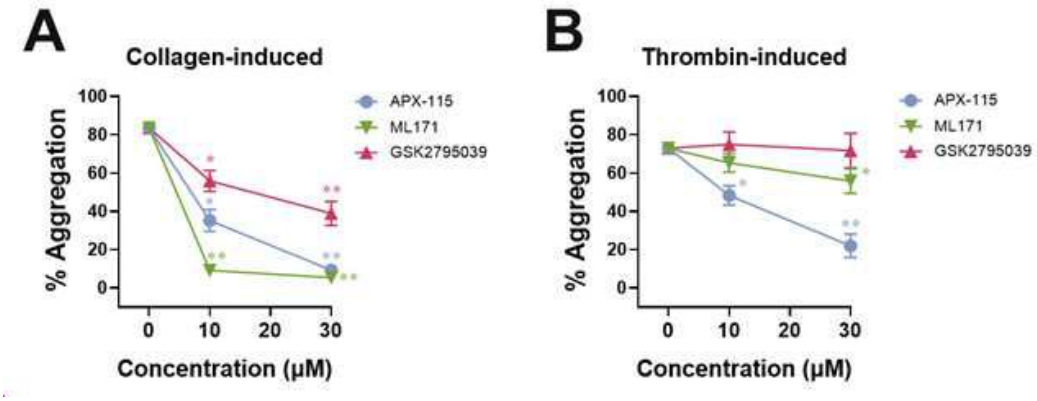
도면9


A
APX-115 (μM)
0
10
30
Surface coverage (% of control)
***
**
100
50
0
Vehicle
APX-115 10 μM
APX-115 30 μM
B
Flow rate (mL/min)
Vehicle
50 mg/kg
Time (min)
Occlusion time (min)
**
Vehicle
APX-115
C
Bleeding time (sec)
ns
Vehicle
APX-115

도면10


Thrombin-induced
% Aggregation
Vehicle
APX-115 10 μM
APX-115 30 μM
Time (min)
***
**
% Aggregation
Vehicle
APX-115 10 μM
APX-115 30 μM

도면11


A
Collagen-induced
% Aggregation
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
Concentration (μM)
APX-115
ML171
GSK2795039
B
Thrombin-induced
% Aggregation
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
Concentration (μM)
APX-115
ML171
GSK2795039