



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월24일
(11) 등록번호 10-1504722
(24) 등록일자 2015년03월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/37 (2006.01) A61K 36/07 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0067395
(22) 출원일자 2013년06월12일
심사청구일자 2013년06월12일
(65) 공개번호 10-2014-0145024
(43) 공개일자 2014년12월22일
(56) 선행기술조사문헌
KR100994173 B1
KR1020100020547 A
KR1020110111933 A

(73) 특허권자
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
(72) 발명자
이병호
대전광역시 유성구 어은로 57, 135-1303 (어은동, 한빛아파트)
오광석
대전광역시 유성구 배울2로 19, 905동 1301호 (관평동, 대덕테크노밸리9단지아파트)
(74) 대리인
특허법인 플러스

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 박제현

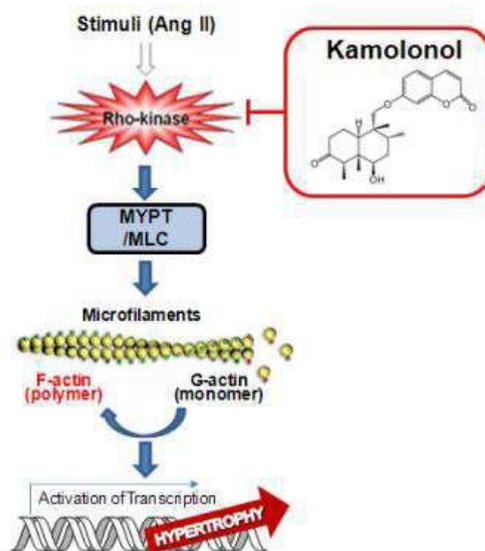
(54) 발명의 명칭 카모로놀 화합물을 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 카모로놀 화합물을 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 더 상세하기는 아위(Ferula assafoetida)로부터 분리된 추출물로서 카모로놀 화합물을 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물 및 카모로놀 화합물의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 카모로놀 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염은 로키나아제 저해효과가 우수하고 세포독성이 거의 없어 로키나아제를 매개로 하는 고혈압, 심부전, 심근경색 등 심혈관 질환의 예방 또는 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이정현

부산광역시 해운대구 선수촌로 58-1 (반여동)

서호원

대전광역시 중구 계백로1583번길 54 (유천동)

유시용

대전광역시 유성구 노은동로87번길 19 (노은동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10038744

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 지식경제기술혁신사업

연구과제명 (RCMS)Drug Repositioning 기술을 이용한 신약개발 활용시스템 구축

기여율 1/3

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2013.04.01 ~ 2014.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KK-1303-D0

부처명 산업기술연구회

연구관리전문기관 산업기술연구회

연구사업명 기관고유사업

연구과제명 시드형 유효물질 파이프라인 구축

기여율 1/3

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KK-1303-C0

부처명 산업기술연구회

연구관리전문기관 산업기술연구회

연구사업명 기관고유사업

연구과제명 염증/면역질환 치료제 후보물질 개발

기여율 1/3

주관기관 한국화학연구원

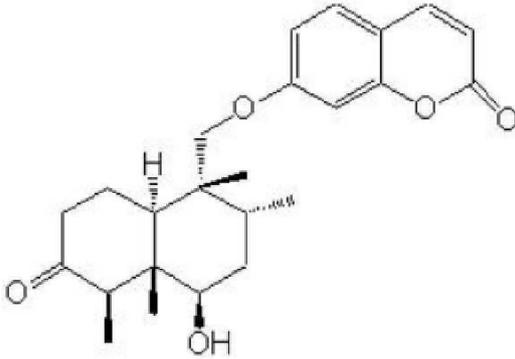
연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 카모로놀(kamolol) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 **심부전증**의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서 상기 화합물은 아위(*Ferula assafoetida*)로부터 추출 또는 분리되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화합물은 ROCK(Rho kinase)를 저해하는 것을 특징으로 하는 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

- a) 아위를 C1~C4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 추출물을 제조하는 단계;
- b) 상기 a)단계의 추출물을 여과하여 감압농축하는 단계;
- c) 상기 b)단계에서 얻은 추출물에 n-헥산, 다이클로로메탄 및 부탄올로 순차적으로 분획하는 단계;
- d) 상기 c)단계에서 얻은 다이클로로메탄 추출물을 크로마토그래피로 분리 및 정제하는 단계; 및
- e) 상기 d) 단계에서 얻어진 2번째 분획에 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 다시 수행하여 화학식 1의 카모로놀 화합물을 얻는 단계; 를 포함하는 카모로놀 화합물의 제조방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 추출하는 단계 a)에서 용매가 메탄올, 헥산, 다이클로로메탄, 부탄올 또는 이들의 혼합용매인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 다이클로로메탄 분획물을 크로마토그래피로 분리, 정제하는 단계 d)에서 이동상으로 다이클로로메탄, 메탄올, 헥산, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합용매를 이용하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 혼합용매는 다이클로로메탄과 메탄올의 혼합용매인 것을 특징으로 하는 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 카모로놀(kamololol) 화합물을 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 더 상세하게는 아위로부터 분리된 추출물로서 카모로놀 화합물을 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물 및 카모로놀 화합물의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 허혈성 심혈관계 질환은 비만, 고령인구의 증가, 관상동맥질환, 고혈압 및 환경요인에 의하여 유병률은 증가 일로에 있으며, 실제로 향후 20년간 허혈성 심혈관 질환 유병률은 우리나라 인구의 40%까지 증가할 것으로 추정되지만, 심부전, 심근경색을 치료하는 치료제는 고혈압 등 기저질환 치료제를 제외하고는 거의 전무한 상태이다.

[0003] 로키나아제 (Rho kinase, ROCK)는 액틴 세포골격 (actin cytoskeleton)의 조정을 통하여 세포의 모양과 운동성을 조절하는 인자로 인식되고 있으며, 최근에는 심혈관 분야와 관련하여 몇 가지 이유로 더 많은 관심을 끌고 있는 약리표적이다. 로키나아제는 혈관 평활근 수축기전 중 칼슘 (Ca²⁺)-비의존적 기전의 주된 조절인자로, 혈관활성물질 (angiotensin II, 5-HT, U11, Thromboxane A2 등) 관련 heterotrimeric G protein 수용체와 평활근 수축, 심장비대, 고혈압, 혈관 평활근세포의 증식 및 이동사이의 연결고리 mechanism이 보고되면서, 심부전, 협심증 및 고혈압을 포함한 심혈관치료제를 위해 주목받는 약리표적이 되고 있다. 로키나아제의 발현 자체는 염증반응을 일으키는 자극 (angiotensin II, IL-β, PKC/NF-κB)에 의해 직접 향진되며, 실제 실험동물과 인체에서 염증성 병변과 동맥경화성 병변부위에서 로키나아제 과발현 및 활성증대가 관찰되었다(도1). 특히 혈관 내피 세포의 기능부전, 혈관에서의 대식세포의 축적 및 혈관합병증 유발, 평활근세포의 수축반응 향진 및 스트레스 섬유증 유발 등 심혈관 질환의 다양한 병리학적 소인과의 상관관계가 증명되고 있다. 로키나아제 저해제 개발의 필요성으로는 현재까지 다양한 동물실험에서 로키나아제 저해제가 기존에 잘 알려진 약제의 기능 중에서 statin의 콜레스테롤 강하작용 만을 제외하고 여러 가지 약제들의 거의 대부분의 효과를 포함하는 작용을 보이는 것으로 밝혀지고 있다.

[0004] 현재 임상적으로 이용 가능한 로키나아제 저해제는 일본 Asahi Kasei Pharma사가 1995년 칼슘 감작제 (Calcium sensitiser)로 시판하였다가 추후 약리기전연구를 통해 ROCK 저해제로 밝혀진 파수딜 (fasudil) 뿐이다. 일본에서는 파수딜 정맥주사가 뇌혈관 수축의 치료에 이용되고 있으며, 파수딜 경구 약제가 일본과 미국에서 일부 임상 시험 중이다. 하지만, 아직 불안정형 협심증이나 심근경색증에 대해서는 연구가 필요한 실정이다.

[0005] 최근 연구경향은, 같은 계열의 AGG family인 PKA, PKC, RSK, MSK에 대한 선택성 높고, 로키나아제 저해 효과가 우수한 저해제 개발을 위한 노력으로, 로키나아제 아형-2 (Rho kinase subtype-2, ROCK2)의 ligand binding pocket과의 docking simulation을 통하여 pyridine, 1H-indazole, isopuinoлин과 tetrahydroisoquinoline과 같은 로키나아제 아형-2 저해제 개발을 연구 진행 중이다.

[0006] 카모로놀 (Kamololol)은 아위(*Ferula assafoetida*)에서 추출된 세스퀴테르펜 쿠마린 계열의 유효물질이다. 또한 카모로놀 또는 아위의 직접적인 로키나아제 아형-2의 저해작용 및 그에 따른 심근섬유증, 심부전 완화를 포함한 심혈관질환에 미치는 영향에 대해서는 아직 보고된 바 없다. 본 발명에서는 카모로놀 화합물이 우수한 로키나아제 아형-2에 저해능이 있음을 처음으로 발견하였으며, 본 발명자는 카모로놀이 심장세포에서 로키나

아제 아형-2 활성을 저해함으로써, 심근 섬유증, 혹은 심부전 질환 치료제의 유효성분으로 사용될 수 있다는 것을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제2010-0084812호, 2010. 7. 28. 공개

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Dastan D et al., Disesquiterpene and sesquiterpene coumarins from *Ferula pseudalliacea*, and determination of their absolute configurations. *Phytochemistry*. 2012 Jun;78:170-8

(비특허문헌 0002) Kim et al., 당귀 및 아위가 평활근 이완과 iNOS 발현에 미치는 영향. *대한한의학회지*. 2000, 21(2):60-67

발명의 내용

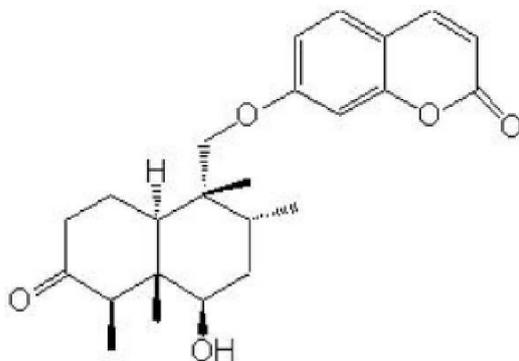
해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 천연물로부터 추출·분리화합물을 이용한 심혈관 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, 본 발명은 상기 화합물의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 카모로놀(kamololol) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] [화학식 1]



- [0013]
- [0014] 또한, a) 아위를 C1~C4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 추출물을 제조하는 단계;
- [0015] b) 상기 a)단계의 추출물을 여과하여 감압농축하는 단계;
- [0016] c) 상기 b)단계에서 얻은 추출물에 n-헥산, 다이클로로메탄 및 부탄올로 순차적으로 분획하는 단계;
- [0017] d) 상기 c)단계에서 얻은 다이클로로메탄 추출물을 크로마토그래피로 분리 및 정제하는 단계; 및

[0018] e) 상기 d) 단계에서 얻어진 2번째 분획에 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 다시 수행하여 화학식 1의 카모로놀 화합물을 얻는 단계; 를 포함하는 카모로놀 화합물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 카모로놀 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염은 로키나아제 저해효과가 우수하고 세포독성이 거의 없어 로키나아제를 매개로 하는 고혈압, 심부전, 심근경색 등 심혈관 질환의 예방 또는 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

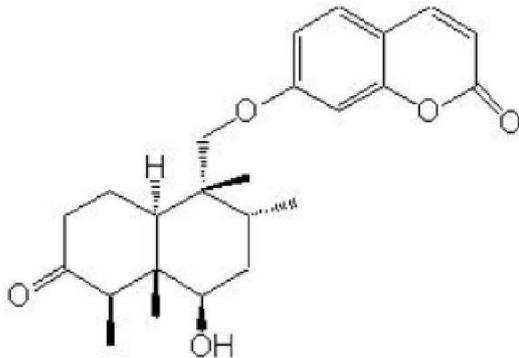
도면의 간단한 설명

[0020] 도1은 본 발명의 유효성분인 카모로놀의 작용기작을 도시한 그림이다.
 도2는 본 발명의 유효성분인 카모로놀의 1H-NMR 스펙트럼이다.
 도3은 본 발명의 유효성분인 카모로놀의 13C-NMR 스펙트럼이다.
 도4는 본 발명의 유효성분인 카모로놀의 다양한 농도에서의 로키나아제 아형-2의 활성 억제효과를 나타낸 그래프이다.
 도5은 본 발명의 유효성분인 카모로놀의 로키나아제 아형-2 저해에 따른 억제양식을 나타낸 그래프이다.
 도6는 본 발명의 유효성분인 카모로놀의 농도에 따른 안지오텐신 에 의해 유도된 MYPT 및 MLC의 인산화 억제효과를 나타낸 그래프이다.
 도7는 본 발명의 유효성분인 카모로놀의 농도에 따른 심장비대 억제효과를 나타낸 그래프이다.
 도8은 본 발명의 유효성분인 카모로놀의 액틴 스트레스 섬유질형성 억제효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
 [0022] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 카모로놀(kamololol, 7-[[[(1R,2R,4R,4aS,5R,8aS)-4-hydroxy-1,2,4a,5-tetramethyl-6-oxo-3,4,5,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalen-1-yl]methoxy]chromen-2-one) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0023] [화학식 1]



[0024]
 [0025] 본 발명에 따른 상기 카모로놀 화합물은 아위(*Ferula assafoetida*)로부터 추출 또는 분리될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 그러나, 아직까지 ROCK 매개 질환의 또는 심혈관질환과 관련된 활성은 보고된 바 없으며, 본 발명에서는 이들의 유효성분을 추출하여 심혈관 예방 또는 치료제로 이용한 것이다. 본 발명의 상기 화학식 1의 카모로놀 화합물은 아위로부터 추출·분리하거나 상업적으로 판매하는 것을 구입하거나 당업계에 알려진 방법으로 제조하여 사용할 수 있다.

[0027] 카모로놀 화합물은 ROCK(Rho kinase)를 저해함으로써 ROCK를 매개로 하는 심혈관 질환인 허혈성 심근, 허혈성 뇌질환, 비만에 의한 심혈관 질환, 허혈증, 고혈압성 심장질환, 판막질환, 심근증, 뇌졸중, 심장질환, 말초혈관

질환, 협심증, 심부전증, 관상동맥 심장병, 동맥경화, 심근경색 또는 부정맥 등의 질환을 예방 또는 치료할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0028] 또한, 본 발명은 a) 아위를 C1-C4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 추출물을 제조하는 단계;
- [0029] b) 상기 a)단계의 추출물을 여과하여 감압농축하는 단계;
- [0030] c) 상기 b)단계에서 얻은 추출물에 n-헥산, 다이클로로메탄 및 부탄올로 순차적으로 분획하는 단계;
- [0031] d) 상기 c)단계에서 얻은 다이클로로메탄 추출물을 크로마토그래피로 분리 및 정제하는 단계; 및
- [0032] e) 상기 d) 단계에서 얻어진 2번째 분획에 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 다시 수행하여 화학식 1의 카모로놀 화합물을 얻는 단계; 를 포함하는 제 1항의 카모로놀 화합물의 제조방법을 제공한다.
- [0033] 바람직하게는 상기 추출하는 단계에서 용매가 메탄올, 헥산, 다이클로로메탄, 부탄올 또는 이들의 혼합용매인 것이며, 상기 다이클로로메탄 분획물을 크로마토그래피로 분리, 정제하는 단계에서 이동상으로 다이클로로메탄, 메탄올, 헥산, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합용매를 이용하는 것이 바람직하다.
- [0034] 단계 a)에서는 아위를 C1-C4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 추출물을 제조하는 단계를 수행한다.
- [0035] 추출용매는 아위 건조량의 2 ~ 20 배로 하는 것이 바람직하다. 추출방법은 통상적으로 행하는 모든 추출방법이 가능하며, 바람직하게는, 40 ~ 120 에서 2 ~ 24시간 동안 끓여 열추출하거나, C1 ~ C6 알콜 또는 물과 C1 ~ C6 알콜의 혼합용매를 추출용매로 사용할 경우, 상온에서 1일 ~ 5일 동안 방치하여 추출할 수 있다. 상기의 방법으로 얻어진 추출물은 여과지 등을 이용한 여과, 정제, 농축 등의 단계를 더 거쳐 아위추출물로서 사용될 수 있다.
- [0036] 다음으로, 단계 b)에서는 상기 a)단계의 추출물을 여과하여 감압농축하는 단계를 수행한다. 바람직하게는 추출물을 메탄올을 사용하여 수일동안 냉침시킨 후 여과하고 여액을 감압 농축하는 단계를 수행한다.
- [0037] 상기 단계 c)에서는 단계b)에서 얻은 아위추출물, 바람직하게는 아위의 메탄올추출물에 물을 가하여 현탁시키고, 헥산, 다이클로로메탄 및 부탄올로 순차 분획하여 추출물을 수득한다. 이때, 통상의 분별 추출 방법을 이용할 수 있다.
- [0038] 다음으로, 단계 d)에서는 상기 단계 c)에서 얻은 다이클로로메탄 가용추출물을 크로마토그래피로 분리 및 정제하는 단계를 수행한다.
- [0039] 다음 e)단계에서는 상기 d) 단계에서 얻어진 2번째 분획에 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 다시 수행하여 화학식 1의 카모로놀 화합물을 얻는 단계를 수행한다.
- [0040] 상기 단계 크로마토그래피는 이동상으로 다이클로로메탄, 메탄올, 헥산, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합용매를 사용할 수 있으며, 통상의 방법으로 수행할 수 있다. 이때, 혼합용매를 사용할 시 바람직하게는, 다이클로로메탄 및 메탄올의 혼합용매, 헥산 및 에틸아세테이트의 혼합용매를 사용할 수 있다. 크로마토그래피는 단일 화합물이 정제될 때까지 1회 ~ 수회에 걸쳐 수행할 수 있으며, 필요에 따라 농축, 재결정을 실시할 수 있다.
- [0041] 보다 상세하게, 다이클로로메탄 분획물을 다이클로로메탄에 용해한 후, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 이용 분리정제과정을 수행하였다. 이동상으로는 다이클로로메탄/메탄올 (100:0 → 50:0 → 10:1) 혼합용매를 사용하여 4개의 분획을 얻었으며, 그 중 2번째 분획 을 다시 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 재수행하여 분리 및 정제 하였으며, 이때 사용한 용매는 농도를 비극성에서 극성으로 순차적으로 올려주는 농도구배 용출방식 (gradient elution)으로 헥산/에틸아세테이트를 이용 용출분리하여 최종 카모로놀을 수득 할 수 있다. 수득한 카모로놀은 물리적 스펙트럼 성질 ($^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$)을 직접 비교함으로써 검증하였다.

[0042] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스,

폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 운환제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0043] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0044] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 예컨대 0.001-100 mg/kg이다.

[0045] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 통상적인 제제로 제형화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 통상적인 제형이라 함은 예를 들면 경구(정제, 캡슐제, 분말제), 구강 내, 혀 밑, 직장 내, 질 내, 비강 내, 국소 또는 비경구(정맥 내, 해면체 내, 근육 내, 피하 및 관 내를 포함) 투여 제형을 일컫는다. 예를 들면, 본 발명에 따른 화합물은 전분 또는 락토오스를 함유하는 정제 형태로, 또는 단독 또는 부형제를 함유하는 캡슐 형태로, 또는 맛을 내거나 색을 띄게 하는 화학 약품을 함유하는 엘릭시르 또는 현탁제 형태로 경구, 구강 내 또는 혀 밑 투여될 수 있다. 액체 제제는 현탁제(예를 들면, 메틸셀룰로오즈, 위템솔(witepsol)과 같은 반합성 글리세라이드 또는 행인유(apricot kernel oil)와 PEG-6 에스테르의 혼합물 또는 PEG-8과 카프릴릭/카프릭 글리세라이드의 혼합물과 같은 글리세라이드 혼합물)와 같은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제와 함께 제조된다. 또한, 비경구적으로 예를 들면, 정맥 내, 해면체 내, 근육 내, 피하 및 관내를 통하여 주사되는 경우 무균의 수용액 형태로서 사용하는 것이 가장 바람직하며, 이때 상기 용액은 혈액과의 등장성을 갖기 위하여 다른 물질들(예를 들면 염(salt) 또는 만니톨, 글루코오스와 같은 단당류)를 함유할 수도 있다.

[0046] 본 발명의 카모로놀은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염을 사용될 수 있다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산, 아세트산, 안식향산, 구연산, 젯산, 말레인산, 글루콘산, 메탄설폰산, 4-톨루엔설폰산, 주석산, 푸마르산과 같은 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 핵산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 화학식 1의 화합물을 유기용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤, 메틸렌클로라이드, 아세토니트릴 등에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조하여 제조되거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조하거나 유기용매 하에서 결정화시켜서 제조할 수 있다.

[0048] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속 염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다. 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 카모로놀 화합물 및 이의 약

학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 입체이성질체 등을 모두 포함한다.

[0049] 또한, 본 발명의 화합물은 하나 이상의 비대칭 탄소 원자를 함유할 수 있으며, 라세미체 및 광학적 활성 형태로 존재할 수 있다. 이러한 화합물 및 거울상 이성질체 모두는 본 발명의 범주내에 포함되는 것이다.

[0050] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

[0051] **카모로놀 화합물의 제조**

[0052] 본 발명에 따른 카모로놀 (kamolono1)은 구매 가능한 아위추출물로부터 용매추출 및 분리정제함으로써 제조할 수 있다. 아위추출물은 아르주나 천연추출물사 (Arjuna Natural Extracts, Ltd., Kerala, India)로부터 구매하였고, 김영균교수로부터 인증을 받아 화학연구원의 식물표본실에 보관하였다. 추출은 아위추출물에 20리터의 메탄올을 사용하여 7일간 냉침시킨 후 여과하고 여액을 감압 농축하였다. 460g의 추출물을 물에 현탁한 후, 헥산 (56 g), 다이클로로메탄 (290 g), 부탄올 (50 g)을 이용, 순차적으로 용매 추출하였다. 이후, 상기 다이클로로메탄 분획물 (5g)을 다이클로로메탄 100 mL에 용해한 후, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 이용 분리정제 과정을 수행하였다. 이동상으로는 다이클로로메탄/메탄올 (100:0 → 50:0 → 10:1) 혼합용매를 사용하여 4개의 분획을 얻었으며, 그 중 2번째 분획 (570 mg)을 다시 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 재수행하여 분리 및 정제 하였으며, 이때 사용한 용매는 농도를 비극성에서 극성으로 순차적으로 올려주는 농도구배 용출방식 (gradient elution)으로 헥산/에틸아세테이트를 이용 용출분리하여 최종 120 mg의 카모로놀을 수득 할 수 있다. 수득한 카모로놀은 물리적 스펙트럼 성질 (1H-NMR 및 13C-NMR)을 도2 및 도3에 나타난 것과 같이 얻어 동일한 것을 확인하였다.

실시예 2

[0053] **로키나아제 아형-2 억제 확인 실험**

[0054] 본 발명에 따른 상기 화학식1으로 표시되는 카모로놀의 로키나아제 아형-2에 대한 억제 활성을 MDS사 (MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA)에서 제공하는 시차성형광분석법 (IMAP-TR-FRET Screening Express Kit)을 기반으로 실험하였다.

[0055] 완충용액은 인산화 반응용액 (MDS사에서 제공하는 0.01% Tween20이 포함된 reaction buffer를 5배 희석 후, 5 mM DTT 첨가)과, 형광검출용액 (MDS사에서 제공하는 binding solution A, B, 용액을 각기 7:3로 혼합하고 IMAP binding reagent 1/600, turbium donor 1/400 첨가)의 두 종류를 준비하고, 20 μM의 기질 (S6 ribosomal protein-derived substrate; MDS)과 100 μg/ml의 효소 로키나아제 아형-2 (#14-451; Upstate) 및 10 mM ATP (Sigma-aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 준비하였다. 100 μg/ml 로키나아제 아형-2와 20 μM 기질 그리고 10 mM ATP를 각각 0.4 μg/ml (최종 반응농도: 0.1 μg/ml), 4 μM (최종 반응농도: 1 μM)과 12 μM (최종 반응농도: 3 μM)이 되도록 희석하였다. 모든 희석과 준비과정에서 사용되는 완충용액은 인산화 반응용액이며, 형광검출용액은 마지막에 시차성 형광반응을 유도할 때 사용하였다.

[0056] 준비된 시료의 분주는 흰색 미소판 (Multiwell 384 well plates, #3572, Corning Life Sciences, Lowell, MA, USA)에 16 채널 파이펫 (multi 16-channel, Finnpiptette, Thermo Scientific, Essex, UK)을 이용하여 각 웰 (well)당 전체 인산화 반응부피가 20 μl가 되게 반응물을 분주하였다. 이때, 음성 대조군 (negative control)으로는 5% DMSO 5 μl, 기질액 5 μl, 인산화반응용액 5 μl를 사용하였으며, 양성 대조군 (positive control)으로는 5% DMSO 5 μl, 기질액 5 μl, 로키나아제 아형-2 용액 5 μl를 사용하였다. 실험 군으로는 실시예에서 제조한 화합물 5 μl, 기질액 5 μl, 로키나아제 아형-2 용액 5 μl를 사용하였다. 인산화 반응 전에 약 10분간 화합물과 효소간의 전처리를 실시한 후, ATP 5 μl를 첨가하여 인산화 반응을 유도하였다. 각 시험물질, 효소, 기질 및 ATP는 반응 시 전체부피의 25 %,씩을 차지하게 되므로, 첨가 직전에는 각기 4배의 고농도로 준비하

었다. 이후, 3분간 약하게 흔들어 주고 상온에서 45분간 인산화 반응을 유도한 후, 시차성 형광반응을 유도하기 위하여 미리 준비해 놓은 형광검출용액 60 μl 첨가하여 시차성 형광반응을 유도하였다. 형광검출용액 내에는 3 개의 메탈이온으로 구성되어 있는 nanoparticle 과 linker 그리고 형광물질인 Tb (Turbium)이 표지 되어 있는 sensitizer (Tb-donor)이 혼합되어 있어서 nanoparticle과 linker 그리고 Tb donor의 연쇄적인 결합반응을 통해 시차성 형광반응이 유도된다. 상온에서 그대로 3시간 방치시킨 후 시차성 형광반응 (Time-resolved fluorescence resonance energy transfer, TR-FRET) 값을 다기능 형광측정기 (multilabel counter, Envision, PerkinElmer, Turku, Finland)를 이용하여 측정하였으며 (방출파장: 495 nm, 520 nm, 여기파장: 340 nm), 하기 수학적식에 따라 시차성 형광 반응 및 억제율을 계산하고, 그 결과를 *in vitro* 에서 로키나아제 아형-2 를 50% 저해한 시험물질의 농도인 IC₅₀값으로 표시하였다.

[0057] [수학적식 1]

$$\text{시차성 형광반응율} = \left(\frac{520 \text{ nm 방출파장}}{495 \text{ nm 방출파장}} \right) \times 10000$$

[0058]

[0059] [수학적식 2]

$$\text{시차성형광억제율} = \left(\frac{\text{시험물질의 시차성형광반응율} - \text{음성대조군의 시차성형광반응율}}{\text{양성대조군의 시차성형광반응율} - \text{음성대조군의 시차성형광반응율}} \right) \times 100$$

[0060]

[0061] 첨부된 도4에서 볼 수 있듯이, 다양한 농도의 카모로놀 (0.01 μM - 30 μM)에 대한 약효평가 결과 농도 의존적으로 로키나아제 아형-2의 활성을 억제하였으며, IC₅₀값이 2.27 μM 로 분석되었다.

실시예 3

[0062] 카모로놀의 로키나아제 아형-2 저해에 따른 억제양식분석

[0063] 카모로놀의 로키나아제 아형-2 저해에 따른 억제양식을 분석하기 위하여 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 로키나아제 아형-2 (최종 반응농도: 0.1 $\mu\text{g/ml}$), 4 μM 기질(최종 반응농도: 1 μM)과 다양한 농도의 ATP (최종 반응농도: 0.625 ~ 10 μM) 그리고 Kamolonl (최종반응 농도: 0.3, 6 μM)을 상기 방법 (실험예 1)에 따라 인산화 반응을 유도하였고, 반응속도를 측정하기 위하여 0, 30, 60, 120분에서의 시차성 형광반응율을 측정하였다. 시차성 형광 반응율과 인산화된 기질양 간의 회귀 직선을 이용하여 분당 생성되는 인산화된 기질의 양, 즉 초기반응속도를 산출하였으며, 초기반응속도 (분당 인산화된 기질의 양; nM/min)와 적용된 ATP의 양 (μM)을 기준으로 이중역수분포 (double reciprocal plots)에 적용하여 카모로놀의 로키나아제 아형-2 저해에 따른 억제양식을 분석하였다.

[0064] 카모로놀의 로키나아제 아형-2 저해에 따른 억제양식은 도5에서 보는 바와 같이, ATP에 경쟁적 저해제 (ATP-competitive inhibitor)로 분석되었으며, 이는 카모로놀이 ATP 결합부위에 결합하여 로키나아제 아형-2의 활성을 억제하는 양식으로 분석되었다.

실시예 4

[0065] MYPT/MLC 인산화 억제 확인 실험

[0066] 본 발명에 따른 상기 화학식으로 표시되는 카모로놀의 직접적인 로키나아제 아형-2의 저해효과를 검증하기 위하여, 로키나아제 아형-2의 직접적인 기질로 알려진 미오신 포스파타아제 (MYPT; myosin phosphatase)

및 미오신 L 사슬 (MLC; myosin light chain)의 인산화 억제에 대한 약효 평가를 엔지오텐신 II (angiotensin II)로 활성화시킨 흰쥐 유래의 심장 세포주 (H9c2)를 이용하여 웨스턴 블롯 (Western blotting)을 실시하였다.

[0067]

심장세포 (H9c2)에 1 시간 동안 카모로놀을 전처리 하고, 15분 동안 엔지오텐신 II로 세포내 신호전달을 활성화 시켰다. 배지를 제거하고 국내 인트론사에서 제공하는 세포용해 완충액 (PRO-PREP protein extraction solution)를 처리하여 세포의 총 단백질 추출액(total protein extract)을 얻어냈다. 이를 사용하여 8% 혹은 12% 글라이신(Glycine) SDS-PAGE를 수행하였으며, nitrocellulose 막(membrane)에 단백질을 전이 (transfer)시킨 후, 항인산-MYPT항체 와 항인산-MLC 항체(Cell signalling)를 사용하여 MYPT및 MLC의 인산화 정도 및 인산화 억제율을 확인하였다 이때, 동량의 단백질이 분석된 것을 보이기 위해 항-MYPT항체 와 항MLC항체를 사용하여 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0068]

실험결과로는 도6에서 보는 바와 같이, 엔지오텐신 II에 의하여 유도된 MYPT 및 MLC의 인산화를 카모로놀 (> 3 μM)의 직접적인 로키나아제의 저해를 통해 농도의존적으로 억제하고 있음을 보여 주고 있다. 확인실험으로는 로키나아제 아형-2의 참고물질로 알려진 Y27632 (0.3 μM)로 검증을 하였다.

실시예 5

[0069]

세포비대 (Cellular hypertrophy) 억제 확인 실험

[0070]

심부전의 직접적인 병리학적 소인인 심장세포비대의 주된 인자 중의 하나로 로키나아제 아형-2의 과잉 활성이 인지되고 있다. 따라서 카모로놀의 세포비대 억제능을 통해 로키나아제 아형-2 저해능을 검증하기 위한 실험을 하기와 같이 실시하였다.

[0071]

심장세포 (H9c2)에 1 시간 동안 상기 화학식으로 표시되는 시험물질을 전처리 하고, 심장세포 비대의 유발인자인 엔지오텐신 II (100 nM)를 4일간 지속적으로 투여하였다. PBS (phosphate buffered saline)로 세척 후 1% glutaraldehyde (Sigma, St. Louis, MD, USA)로 30분간 세포를 고정시켰다. 고정시킨 세포를 0.1% Crystal viole (Sigma)로 10분간 염색을 한 후, 디지털 카메라가 장착되어있는 현미경 (Nikon, Tokyo, Japan)으로 세포 이미지를 수집하였고, Image-Pro PLUS software (MediaCybernetics, Silver Spring, MD, USA)를 이용하여 세포의 수 및 크기를 분석하였다. 이때, 실험결과는 심장세포비대의 유발인자인 엔지오텐신 II를 4일간 지속적으로 투여함으로써 약 44%정도의 심장세포비대를 유발됨을 확인하였고, 엔지오텐신 II에 의해 유발된 심장세포상태를 기준으로 하여 심장비대 억제되는 정도를 퍼센트 (%)로 나타냈으며, 각각의 농도별 심장비대 억제효과를 그래프로써 도7에 나타내었다.

[0072]

도 7에서 보는 바와 같이, 카모로놀이 엔지오텐신 II에 의하여 유발되는 심장비대를 농도 의존적으로 억제시킴을 확인 할 수 있었고 특히, 3 μM 이상부터는 통계학적으로 유의성 있는 억제능을 확인하였다. 이는 기존의 로키나아제 아형-2 억제제로 알려진 reference 화합물인 Y27632 (0.3 μM)로 확인실험을 검증하였다.

실시예 6

[0073]

액틴 스트레스 섬유질 형성 (Actin stress fiber formation) 억제 확인 실험

[0074]

액틴 스트레스 섬유질 형성은 미오신 L 사슬 인산화 반응 이후 발생하는 심장세포 및 혈관수축의 직접적인 세포의 형태학적 현상으로 카모로놀의 액틴 스트레스 섬유질형성 억제능을 통해 로키나아제 아형-2 저해능을 검증하기 위한 실험을 하기와 같이 실시하였다.

[0075]

챔버 슬라이드 (chamber slide; 16 well)에서 배양된 심장세포 (H9c2)에 1 시간 동안 상기 화학식으로 표시되는 시험물질을 전처리 하고, 2 시간 동안 엔지오텐신 II로 세포내 신호전달을 활성화 시켜, F-액틴 스트레스 섬유질 형성을 유도하였다. PBS (phosphate buffered saline)로 세척후 4% paraformaldehyde (Sigma, St. Louis, MD, USA)로 30분간 세포를 고정시켰다. 고정시킨 세포를 0.5% triton X-100 용액에 5분간 재고정시킨 후, 1% BSA (bovine serum albumin)가 함유된 저지용액 (blocking solution)으로 30분간 상온에서 처리 하였다. Alexa fluor 586 phalloidin 및 Hoechst 염색시약을 사용하여 F-액틴 스트레스 섬유질 및 핵을

염색하고, 디지털 카메라가 장착되어있는 현미경 (Nikon, Tokyo, Japan)으로 세포 이미지 (200배)를 수집하였다.

[0076] 실험결과로는 도 8에서 보는 바와 같이, 엔지오텐신 II (300 nM)에 의하여 강하게 발생하는 F-액틴 스트레스 섬유질형성이 카모로놀의 2시간 전처리를 통하여 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였고, 3 μ M 이상부터는 통계학적으로 유의성 있는 억제능을 확인하였다. 특히 전형적인 로키나아제 아형-2 저해제의 양상처럼, 굵은 peripheral actin 보다는 세포내 central actin의 억제가 보다 더 강하게 진행되었음을 확인하였다.

[0077] 하기에 본 발명의 카모로놀을 유효성분으로 포함하는 조성물을 위한 제제예를 예시한다.

[0078] [제제예 1]

[0079] **약학적 제제의 제조**

[0080] 1-1: 산제의 제조

[0081] 본 발명에 따른 카모로놀 화합물 2 g

[0082] 유당 1 g

[0083] 상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0084] 1-2: 정제의 제조

[0085] 본 발명에 따른 카모로놀 화합물 100 mg

[0086] 옥수수전분 100 mg

[0087] 유 당 100 mg

[0088] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0089] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0090] 1-3: 캡슐제의 제조

[0091] 본 발명에 따른 카모로놀 화합물 100 mg

[0092] 옥수수전분 100 mg

[0093] 유 당 100 mg

[0094] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0095] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0096] 1-4: 주사액제의 제조

[0097] 본 발명에 따른 카모로놀 화합물 10 μ g/ml

[0098] 묽은 염산 BP pH 3.5로 될 때까지

[0099] 주사용 염화나트륨 BP 최대 1 ml

[0100] 적당한 용적의 주사용 염화나트륨 BP 중에 본 발명에 따른 카모로놀 화합물을 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묽은 염산 BP를 사용하여 pH 3.5로 조절하고, 주사용 염화나트륨 BP를 사용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 5 ml 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하

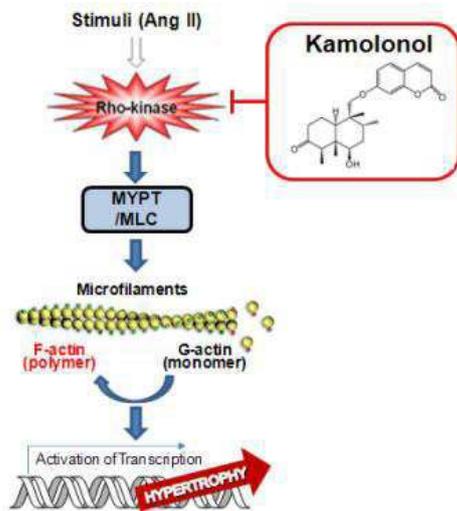
에 봉입시키고, 120 °C에서 15 분 이상 오토클레이브시켜 살균하여 주사액을 제조하였다.

[0101]

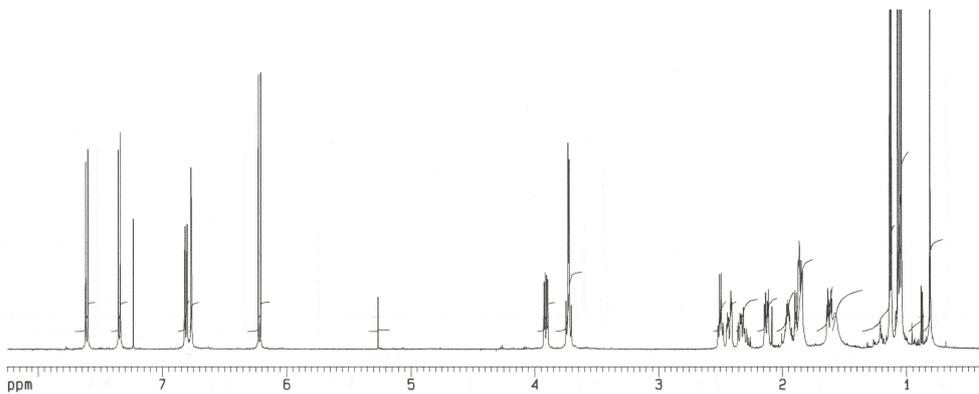
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

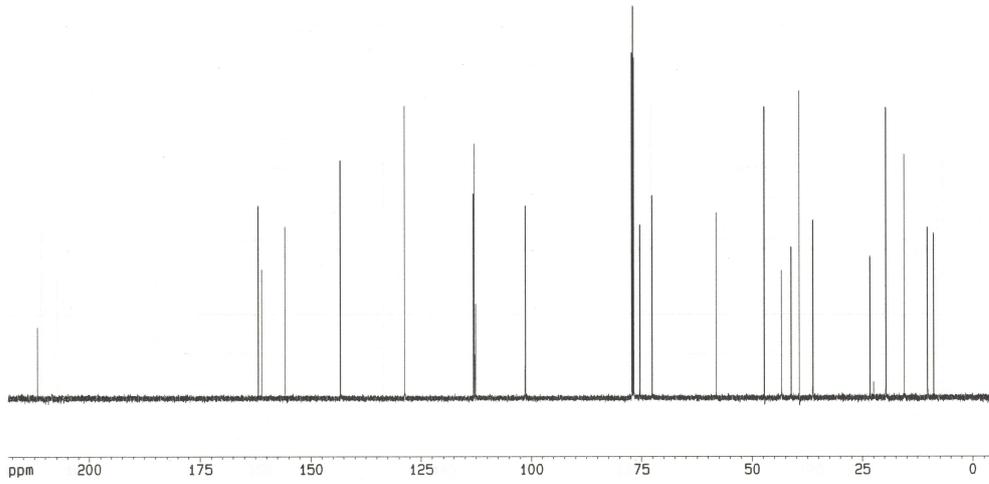
도면1



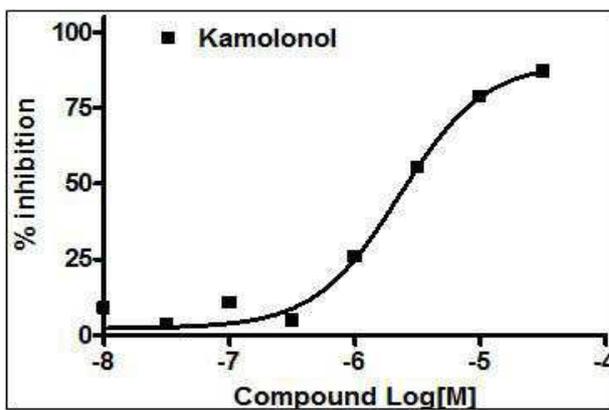
도면2



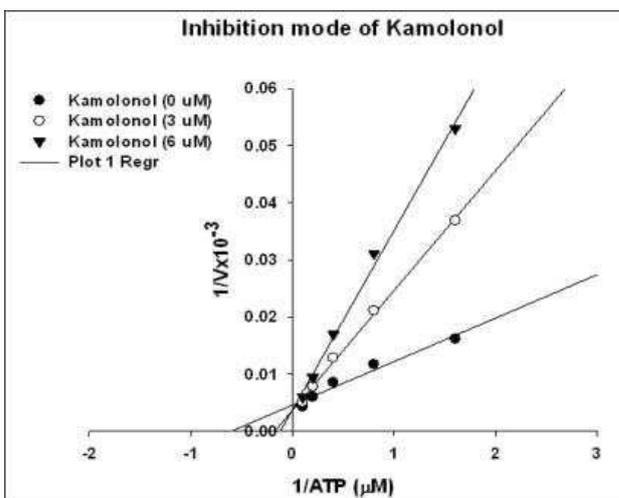
도면3



도면4

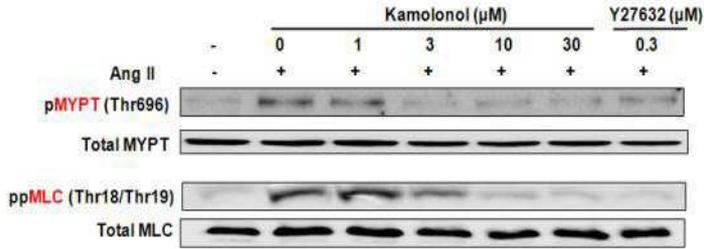


도면5

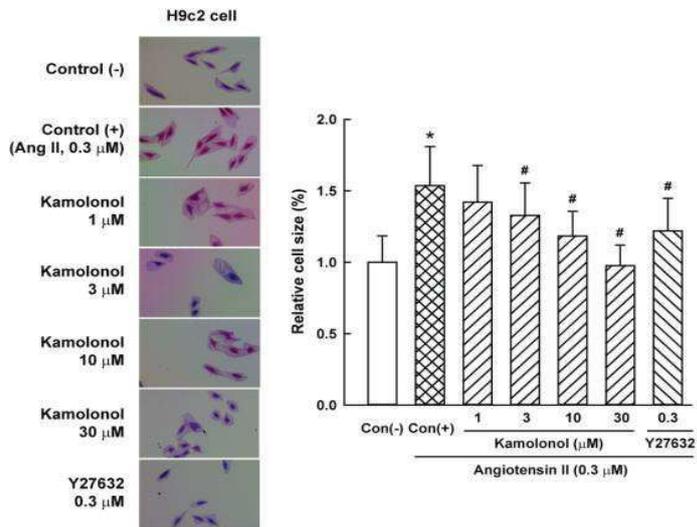


도면6

● Inhibition of Ang II-induced MLC/MYPT phosphorylation



도면7



도면8

