



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0050324
(43) 공개일자 2013년05월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61B 8/06 (2006.01) A61P 7/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0035213(분할)

(22) 출원일자 2013년04월01일

심사청구일자 2013년04월01일

(62) 원출원 특허 10-2010-0091500

원출원일자 2010년09월17일

심사청구일자 2010년09월17일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신촌동)

(72) 발명자

허지희

서울특별시 양천구 신정동 목동신시가자아파트 1331-1503

김영대

서울특별시 광진구 광장동 극동아파트 7동 1001호

권일

경기도 화성시 정남면 덕절리 303-1번지

(74) 대리인

양부현

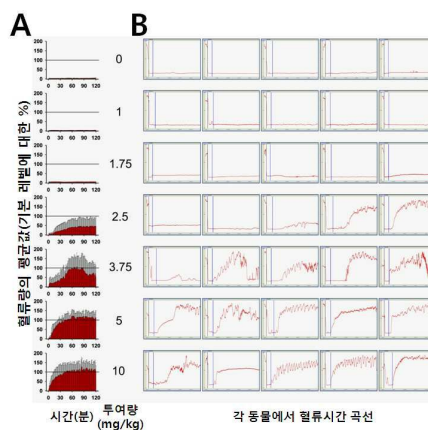
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 도플러를 이용한 혈관 내 혈전의 실시간 측정방법

(57) 요약

본 발명은 다음의 단계를 포함하는 혈전용해제의 스크리닝 방법을 제공한다: (a) 동물 혈관에 혈전을 유발시키는 단계; (b) 상기 동물에 시험물질을 투여하는 단계; 및 (c) 상기 혈관 내 혈류량(blood flow)을 측정하는 단계, 상기 시험물질이 혈류량을 정상 혈류량(baseline blood flow)의 50% 이상으로 회복시키면 혈전용해능을 가지는 혈전용해제인 것으로 판단된다. 본 발명의 방법은 혈전이 형성된 혈관에 시험물질, 바람직하게는 디스인 테그린을 처리하여 실시간으로 혈류량을 측정함으로써 혈관 내 혈전을 정량적으로 검출할 수 있으며, 생체 내에서 혈전용해능을 시간별로 정량적으로 분석할 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 실시간으로 혈전의 회복 정도를 혈류량을 통해 측정하기 때문에, 혈전용해제를 저-비용으로 매우 용이하고 정확하게 스크리닝할 수 있다. 또한, 본 발명의 혈관 폐색이 유발된 동물은 혈전용해제 후보물질을 인 비보에서 테스트하여 동정할 수 있고, 동정된 혈전용해제의 인 비보 부작용을 최소화할 수 있다. 따라서, 본 발명은 혈전-관련 질환(예컨대, 뇌혈관질환, 심혈관질환 또는 동맥경화성 혈관질환)의 진단, 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	A08136
부처명	보건복지부
연구사업명	선도형연구중심병원
연구과제명	표적지향형 광기능성 자성나노입자와 혈전영상을 이용한 환자 맞춤형 혈전용해제 개발
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2009.12.01 ~ 2010.11.30

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 혈전용해제의 스크리닝 방법:

- (a) 인간을 제외한 동물 혈관에 혈전을 유발시키는 단계;
- (b) 상기 동물에 시험물질을 투여하는 단계; 및
- (c) 상기 혈관 내 혈류량(blood flow)을 실시간(real-time)으로 측정하는 단계, 상기 시험물질이 혈류량을 정상 혈류량(baseline blood flow)의 70% 이상으로 회복시키면 혈전용해능을 가지는 혈전용해제인 것으로 판단된다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 동물은 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 영양, 개 또는 고양이를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 혈전은 산화적 스트레스, 풍선 카테터를 이용한 내피세포 손상, 약물의 주입, 전기적 혈관 손상, 동정맥루형성술(Arteriovenous shunt model), 광화학적 색전모델(photothrombosis model) 또는 카테터를 이용한 외부로부터의 혈전 주입에 의해 유발되는 것을 특징을 하는 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 혈전은 산화적 스트레스에 의해 유발되는 것을 특징을 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 혈류량의 측정은 초음파를 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 단계 (c) 이후에 조직학적 염색을 통해 혈전의 용해 정도를 확인하는 단계 (d)를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 혈전용해제에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 혈관질환은 뇌혈관질환(cerebrovascular disease), 심혈관질환(cardiovascular disease) 또는 동맥경화성 혈관질환(arteriovascular disease)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 뇌혈관질환(cerebrovascular disease)은 허혈성 뇌혈관질환, 급성 뇌경색, 뇌졸중, 허혈성 뇌졸중, 출혈성 뇌졸중, 정맥류, 경증인지장애(mild cognitive impairment, MCI) 또는 일과성 허혈발작

(transient ischemic attacks, TIA)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 7 항에 있어서, 상기 심혈관질환 또는 동맥경화성 혈관질환은 대사증후군, 증후군 X, 아테롬성 동맥경화증, 죽상혈전증, 관상동맥질환, 안정 및 불안정 협심증, 뇌졸중, 대동맥 협착증 및 대동맥류를 포함하는 대동맥 질환, 말초혈관질환 또는 급성 허혈성 심혈관질환(acute ischemic arteriovascular event)인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 실시간 혈전용해능 측정방법 및 이를 이용한 혈전용해제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 대부분의 뇌졸중은 주 또는 더 작은 뇌내 동맥의 혈전색전성폐색(thromboembolic occlusion)에 의해 야기된다(Wardlaw, Murray *et al.*, 2009). 허혈성 뇌졸중의 경우, 빠른 혈전용해만이 불가피한 완전한 경색의 발병을 억제하기 위한 유일하게 확립된 치료방법이다(1995; 및 Choi, Bateman *et al.*, 2006). 재조합 조직 플라스미누겐 활성화인자(recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA)의 정맥내 투여에 의한 치료법은 허혈성 뇌졸중의 발병(onset) 후 3시간 내에 행할 수 있는 현재 유일하게 승인된 허혈성 뇌졸중에 대한 치료법이다(Caplan, Mohr *et al.*, 1997; 및 Lopez-Yunez, Bruno *et al.*, 2001). 하지만, 절반 이상의 환자들이 혈전용해 치료 후 성공적인 재관통(recanalization)을 이루는데 실패한다(Rha and Saver, 2007; 및 Lee *et al.*, Stroke, 2007; 38: 192-193). 비록 폐색된 동맥이 혈전용해 치료법에 의해 성공적으로 재관통된다 할 지라도, 이러한 회복(benefits)은 재관류 손상(Hallenbeck and Dutka, 1990), 뇌출혈(Adams *et al.*, 2005) 및 재폐색(Heo, Lee *et al.*, 2003)의 위험에 의해 다시 약화된다. 또한, rt-PA는 신경독성을 가지는 것으로 보고되었다(Chen and Strickl, 1997; Wang, Tsirka *et al.*, 1998; Nicole, Docagne *et al.*, 2001; Yepes, Sandkvist *et al.*, 2002; 및 Matys and Strickl, 2003).

[0003] 재관통 전략은 그 효능이 증명되었지만, 적용가능성의 한계 및 잠재적인 부작용을 유발하기 때문에, rt-PA보다 더 효능이 좋은 신규한 혈전용해 제제(agents)를 개발하기 위한 많은 시도(efforts)가 있었다. 이러한 시도들은 t-PA의 변이체들, 동물 소스로부터 유래한 플라스미노겐 활성화인자들 및 마이크로플라스민을 포함한다. 상술한 약물들(drugs)은 다음과 같은 목적을 지닌다: (a) 피브린 특이성의 증대; (b) 혈장 내 반감기의 연장; (c) 플라스미노겐 활성화인자 억제제-1에 의한 억제능 감소; 및 (d) 신경독성의 회피. 여러 가지 약물들은 임상 실험을 완료하였으며, 몇몇 약물들은 현재 효능을 연구하고 있는 상태이다. 이러한 약물들은 혈전 내 피브린을 타겟으로 하며, 예를 들어 rt-PA, Urokinase 등의 혈전용해제가 이에 해당된다. 하지만, 혈전은 혈소판-피브리노겐 상호작용에 의해 형성된다. 또한, 트롬빈, 백혈구 및 적혈구세포도 혈전의 구성성분들이다. 피브린을 타겟으로 하는 혈전용해 제제들에 대한 혈전의 저항성은 뇌졸중 환자들에서 보여지는 낮은 재개통율(recanalization rates)의 주된 이유들 중 하나이고, 이러한 현상은 혈소판-풍부 혈전에 의한 폐색에서 보다 더 일반적으로 일어날 수 있다. 이러한 측면에서, 혈소판을 타겟으로 하는 치료법이 개선된 혈전용해 효능을 위해 피브린을 타겟팅하는 치료법에 대한 선택적인 또는 추가적인 방법일 수 있다.

[0004] 인테그린 패밀리의 멤버인 혈소판 당단백질(Platelet glycoprotein, GP) IIb/IIIa는 고밀도로 혈소판 막 표면에 존재한다(Shattil and Ginsberg, 1997). GPIIb/IIIa 수용체는 피브리노겐에 특이적으로 결합함으로써 혈소판 응집 경로의 최종 단계를 매개한다(Phillips, Charo *et al.*, 1988). 따라서, 혈소판 GPIIb/IIIa 수용체를 타겟팅하는 것이 혈소판에 작용하는 약물 개발을 위한 대들보(mainstay)였다. 많은 혈소판 GPIIb/IIIa 길항제들이 개발되어 왔는데, 이들은 GP IIb/IIIa에 대한 인간-마우스 키메라 항체의 Fab 단편(abciximab), RGD 펩타이드의 비-펩타이드 유사체들(티로피반 및 라미피반) 및 KGD 모티프를 포함하는 원형 헵타펩타이드 디스인테그린(eptifibatide)을 포함한다(Seitz, Meisel *et al.*, 2004; Abou-Chebl, Bajzer *et al.*, 2005; 및 Eckert, Koch *et al.*, 2005). 상술한 GPIIb/IIIa 길항제들은 불안정성 협심증, 급성 심근경색, 그리고 경피적 관상동맥 성형술(percutaneous transfemoral coronary angioplasty, PTCA) 및 스텐트시술을 받은 환자들에게

효과적이었다. 뇌졸중의 경우, 압식시맙(abciximab)은 증상이 발병한 지 5시간 내지 6시간이 지나고 처리된 환자들에서 그 효능을 나타내지 못했다(Adams, Effron *et al.*, 2008). 하지만, GPIIb/IIIa 길항제들은 재폐색된 뇌졸중 환자들에서 혈전을 용해시키고 선택된 환자들에 효과적이다(Heo, Lee *et al.*, 2003; Seitz, Hamzavi *et al.*, 2003; Seitz, Meisel *et al.*, 2004; Eckert, Koch *et al.*, 2005; 및 Chen, Mo *et al.*, 2007). 또한, GPIIb/IIIa 억제제들은 동물 뇌졸중에서 미세혈관 개방을 유지하는데 유익하며 신경보호 효능을 가진다(Choudhri, Hoh *et al.*, 1998; 및 Abumiya, Fitridge *et al.*, 2000).

[0005] 한국 뱀독으로부터 정제되고 클로닝된 신규한 디스인테그린인 삭사틸린(Saxatilin)은 트리펩타이드 서열인 ArgGlyAsp(RGD)를 가지는데, 이 서열은 혈소판 GPIIb/IIIa 수용체에 대한 디스인테그린의 인지 부위(recognition site)이다(Hong, Koh *et al.*, 2002; 및 Hong, Sohn *et al.*, 2002). 삭사틸린은 혈소판 응집(Hong, Koh *et al.*, 2002) 및 혈소판 활성화(Jang, Jeon *et al.*, 2007) 상에 강력한 억제효능을 가진다. 혈전 용해 상에 GPIIb/IIIa 수용체 억제제들의 알려진 효능을 고려할 때, 삭사틸린이 혈전용해 작용을 가질 가능성이 있다. 본 연구에서, 본 발명자들은 $FeCl_3$ -유도된 동맥 혈전증 마우스 모델을 이용하여 혈전 용해 상에 제IV형 삭사틸린의 효능을 조사하였다(Kurz, Main *et al.*, 1990; 및 Konstantinides, Schafer *et al.*, 2001).

[0006] 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.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 혈관 내 혈전을 정량적으로 측정할 수 있는 신규한 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 디스인테그린, 보다 바람직하게는 뱀독으로부터 유래한 삭사틸린이 혈관 내에 생성된 혈전을 효과적으로 용해하는 활성을 가지며, 이를 이용하여 $FeCl_3$ -유도된 경동맥 동물 모델에서 혈관 내 혈전을 실시간(real-time)으로 정량할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 혈전용해제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 혈전용해제 스크리닝용 동물모델을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 혈전용해제의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0012] (a) 동물 혈관에 혈전을 유발시키는 단계;

[0013] (b) 상기 동물에 시험물질을 처리하는 단계; 및

[0014] (c) 상기 혈관 내 혈류량(blood flow)을 실시간(real-time)으로 측정하는 단계, 상기 시험물질이 혈류량을 정상 혈류량(baseline blood flow)의 50% 이상으로 회복시키면 혈전용해능을 가지는 혈전용해제인 것으로 판단된다.

[0015] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 혈관 내 혈전에 의해 혈관 폐색(occlusion)이 유발된 동물을 포함하는 혈전용해제 스크리닝용 동물 모델을 제공한다.

[0016] 본 발명자들은 혈관 내 혈전을 정량적으로 측정할 수 있는 신규한 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 디스인테그린, 바람직하게는 뱀독으로부터 유래한 삭사틸린이 혈관 내에 생성된 혈전을 효과적으

로 용해하는 활성을 가지며, 이를 이용하여 FeCl_3 -유도된 경동맥 동물 모델에서 혈관 내 혈전을 실시간으로 정량할 수 있음을 확인하였다.

[0017] 본 발명은 혈전이 형성된 혈관에 디스인테그린을 처리하여 실시간(real-time)으로 혈관 내 혈전을 정량적으로 검출할 수 있는 방법으로, 생체 내에서 혈전용해능을 시간 별로 정량적으로 분석할 수 있다는 장점을 가진다.

[0018] 혈전용해능을 측정하는 종래기술은 실시간 측정이 어렵고 정량적 및/또는 정성적 분석이 어렵다. 예를 들어, 피브린 플레이트 어세이(Astrup A and Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys* 40: 346-351(1952))는 가장 일반적으로 이용되는 혈전용해능 측정 방법으로, 플레이트 내 피브린이 가수분해되어 생기는 투명환의 면적을 관찰함으로써 혈전용해능을 측정한다. 상기 어세이 방법은 투명환의 형성으로 혈전용해능을 판단할 수 있으나 투명환의 형성 시간 동안 그 결과를 예측하기 어려울 뿐 아니라 정량적 및 정성적 분석이 불가능하다는 단점이 있다.

[0019] 다른 방법으로, 미국공개 특허번호 제US2009/0305301 A1호는 혈전분해를 나타내는 D-다이머(D-dimer)를 검출하는 방법을 개시하고 있다. 피브린은 응집효소인 트롬빈의 활성 하에서 피브리노겐의 전환에 의해 생성되어 피브린 분해과정(fibrinolysis)을 거친다. 응집반응의 활성화 동안, 발생한 트롬빈은 피브린의 침전물(deposits) 형성을 유도하여 혈전 및 수용성 피브린을 생성시킨다. 트롬빈에 의해 공격당한 피브리노겐은 두 개의 피브리노펩타이드 A(fibrinopeptide A) 및 두 개의 피브리노펩타이드 B(fibrinopeptide B)로 분해되어 피브린 모노머를 형성한다. 형성된 피브린 모노머들은 자발적으로 A와 B 폴리머화 위치 간의 자발적인 상호작용을 통해 폴리머 형태를 형성하여 혈전을 구성하는 불용성 피브린을 생산한다. 또한, 다른 피브린 모노머들은 피브리노겐또는 피브리노겐 분해산물과 반응하여 수용성 피브린을 형성한다. 이후, 피브린의 분해(fibrinolysis)는 D-다이머 단편을 포함하는 분해산물을 초래한다. 상기 D-다이머는 피브린 모노머의 또 다른 분해산물인 E 단편과 결합할 수 있으며, 이러한 형태도 D-다이머에 포함된다. D-다이머의 레벨은 피브린 덩어리(clots)가 인 *비보*에서 분해되는 동안 증가되기 때문에, D-다이머의 농도는 혈전의 분해 정도를 반영한다. 즉, D-다이머 레벨의 측정은 혈전용해 정도를 측정할 수 있는 우수한 방법이다. 하지만, D-다이머 검출 방법은 시료로부터 얻어진 혈액 또는 혈장에서 D-다이머 레벨을 측정하기 때문에, 실시간으로 혈관 내 혈전을 정량적으로 검출할 수 없다.

[0020] 또 다른 방법으로, 국제공개 특허번호 제WO 94/22494호는 이미징제로서 방사선 동위원소로 표지된 고리화합물을 유효성분으로 포함하는 혈관 혈전을 진단하는 조성물을 개시하고 있다. 동위원소로 표지된 고리화합물에서 유래한 방사선을 통해 혈전 위치를 검출함으로써 혈전을 검출할 수 있지만, 안전성 문제로 인해 생체 내 적용이 용이하지 않다. 이외에도, 혈관 내 혈전무게 측정법, 혈전용해 후 유리된 분쇄물의 탁도(turbidity) 측정법 등을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 본 명세서의 용어 "혈전용해제"는 혈전용해능을 가지는 물질을 의미하며, 혈관 내 혈전을 용해하는 기능을 가지는 물질 뿐 아니라, 혈전형성을 억제하는 물질(예컨대, rt-PA, Urokinase 등을 포함하는 혈전용해제)을 포함할 수 있다. 상기 혈전용해제는 본 발명의 폐색된 혈관 내 혈류량(blood flow)의 회복에 영향을 미치는 지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질로써, 화합물질, 단백질, 효소, 효소활성제, 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 천연물 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 보다 상세하게는, 본 발명의 방법은 혈전이 형성된 동물에 혈전용해능을 가지는 물질, 바람직하게는 디스인테그린을 처리한다. 디스인테그린은 독사 패밀리에 속하는 다양한 뱀의 뱀독으로부터 동정된 펩타이드로, 인테그린 단백질의 베타1 및 베타3 패밀리와 상호작용한다. 디스인테그린은 45 내지 84 아미노산의 길이를 가지는 시스테인-풍부 펩타이드로, 혈소판 응집 및 인테그린-의존성 세포 부착에 대한 강력한 억제인자이다. 디스인테그린은 혈소판 표면에 존재하는 인테그린 IIb-IIIb 수용체에 특이적으로 결합하는 Arg-Gly-Asp(RGD) 또는 Lys-Gly-Asp(KGD) 서열 모티프를 포함하고, 이를 통해 활성화된 혈소판의 수용체-당단백질 복합체에 피브리노겐의 결합을 차단한다. 디스인테그린은 수용체 길항제로 기능하여 ADP, 트롬빈, 혈소판-활성화 인자(PAF) 및 콜라겐에 의해 유도된 응집을 억제하기 때문에, 항-응고제(anti-coagulant)로서 이용된다. 또한, 디스인테그린은 혈소판 인테그린인 IIb3와 상호작용하여 혈소판 응집을 방해하는 기능을 가진다.

[0023] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 디스인테그린은 혈전용해능을 가지며, Arg-Gly-Asp(RGD) 아미노산 서열을 포함한다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 디스인테그린은 삭사틸린(saxatilin), 로도스토민(rhodostomin), 알보라브린(albolabrin), 아플라긴(aplagin), 바실리신(basilicin), 바트로소스타틴(batroxostatin), 비티스타틴(bitistatin), 바부린(barbourin), 세레베린(cereberin), 세라스틴(cerastin), 크로타트록신(crotatroxin), 두리신(durissin), 에키스타틴(echistatin), 엘레간틴(elegantin), 에리스티코핀

(eristicophin), 플라보리딘(flavoridin), 플라보스타틴(flavostatin), 할리신(halysin), 자라라신(jararacin), 자라스타틴(jarastatin), 자라린(jararin), 라체신(lachesin), 루토신(lutosin), 몰로신(molossin), 살모신(salmosin), 테르게미닌(tergeminin), 트리그라민(trigramin), 트리메스타틴(trimestatatin), 트리무크린(trimucrin), 트리무타제(trimutase), 우슈리스타틴(ussuristatin) 및 비리딘(viridin)으로 구성된 군으로부터 선택된 디스인테그린 또는 이의 변이체이고, 가장 바람직하게는 삭사틸린 또는 이의 변이체이다.

[0024] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 r-삭사틸린의 처리 농도는 3-20 mg/kg이고, 보다 더 바람직하게는 4-15 mg/kg이며, 가장 바람직하게는 5-10 mg/kg이다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 r-삭사틸린은 투여농도-의존적으로 완전 폐색된 혈관의 재관통에 효과를 나타냈다. 도 3 내지 도 5에서 볼 수 있듯이, 2.5 mg/kg의 r-삭사틸린 처리는 완전 폐색된 혈관의 재관통에 약 30%의 혈류량 회복 효과를 나타내고, 3.75 mg/kg의 처리는 약 60%의 혈류량 회복 효과(투여 후 60분 췌)를 나타냈다. 더 나아가, 5 mg/kg 및 10 mg/kg의 r-삭사틸린 처리는 완전 폐색된 혈관의 재관통에 거의 기본 레벨(94.5020.47%)까지의 회복 효과(투여 후 14-19분 췌)를 나타냈다.

[0025] 본 명세서의 용어 "폐색(occlusion)"은 항상 혈전에 의해 발생하는 혈관의 갑작스런 차단을 의미한다. 본 발명의 폐색은 혈액 덩어리(clots)에 의해 형성되는 것이 아니라, 혈관의 차단된 형태를 모두 포함한다. 폐색은 주로 정맥에서 발생하여 심부정맥 혈전증을 야기할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명에서 언급된 폐색의 정도는 측정된 혈류량에 기초하여 판단된다. 즉, 폐색의 정도는 부분적 폐색(partial occlusion) 또는 완전 폐색(complete occlusion)으로 분류되며, 부분적 폐색은 정상 혈류량(baseline blood flow)의 50-60% 수준으로 감소된 경우를 의미하며, 완전 폐색은 90-100% 수준으로 감소된 경우를 의미한다(참고: 도 2).

[0026] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법이 적용될 수 있는 동물은 특별하게 제한되지 않으며, 바람직하게는 포유동물이고, 보다 바람직하게는 인간, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 영양, 개 또는 고양이를 포함하며, 보다 더 바람직하게는 인간 또는 마우스를 포함한다.

[0027] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 동물 혈관은 동맥, 정맥, 모세혈관을 포함하고, 보다 바람직하게는 대동맥, 경동맥, 쇄골하 동맥, 복강동맥, 장관막동맥(mesenteric arteries), 신동맥, 장골동맥, 소동맥, 모세혈관, 소정맥을 포함하며, 가장 바람직하게는 대동맥 또는 경동맥을 포함한다.

[0028] 이후, 본 발명의 방법은 상기 혈관 내 혈류량(blood flow)을 정량적으로 측정한다. 혈관 내 혈류량을 측정하는 방법은 당업계에 공지된 방법에 따라 실시될 수 있으며, 예를 들어 초음파 회색법(Lee KH, Park JY, Choi SJ, Kim JK, Hwang SD, Joh JH, Clinical utility of access blood flow measurement by ultrasound dilution in hemodialysis patients. *Korean J Nephrol*, 24: 265-273(2005)), 도플러 초음파법(Strauch B, O'Connell R, Geoly K, Forecasting thrombosis of vascular access with doppler flow imaging. *Am J Kidney Dis*, 19: 554-557, (1992)), 글루코오스 펌프 테스트(glucose pump test, GPT; Magnasco A, Alloatti S, Martinoli C, Solari P, Glucose pump test: a new method for blood flow measurements. *Nephrol Dial Transplant*, 17: 2244-2248(2002)), 근적외선(700-1000 nm)을 이용하는 방법(Buunk G, van der Hoeven JG, Meinders AE, A comparison of near-infrared spectroscopy and jugular bulb oximetry in comatose patients resuscitated from a cardiac arrest. *Anesthesia*, 53: 13-19(1998)), 열전도혈류측정법(Ogata N, Fournier JY, Imhof HG, et al., Thermal diffusion blood flow monitoring during aneurysm surgery. *Acta Neurochir(Wien)*, 138: 726-731(1996)) 등을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 혈류량의 측정은 초음파를 이용한 도플러 초음파법에 의해 측정된다.

[0029] 또한, 혈류량의 측정방법은 측정 시점에 따라 실시간(real-time)으로 혈류량을 측정하는 방식, 지정된 시간(pre-determined time interval)에 혈관에서 혈류량을 측정하는 방식, 최종 시점(end-point)에 혈류량을 측정하는 방식 등에 의해 실시될 수 있지만, 이에 한정하는 것은 아니다.

[0030] 본 발명에 따르면, 본 발명의 방법은 상기 혈관 내 실시간 혈류량을 일정 시간 동안 측정한 평균값을 분석하여 혈류량의 변화를 측정한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 혈전 유발된 동물 혈관 내의 혈류량을 1-120분, 보다 바람직하게는 1-60분, 보다 더 바람직하게는 1-30분, 및 가장 바람직하게는 1분 동안 실시간으로 측정한 후, 이의 평균값을 분석함으로써 보다 더 정확하고 빠르게 혈류량의 변화를 측정할 수 있다. 상술한 방법은 시험물질의 투여 후 혈류량의 변화 뿐 아니라, 그 시간동안 변화하는 혈류량의 변화 패턴(예를 들어, 혈관의 재관류, 재폐색의 빈도, 정도 또는 시점, 등)을 분석하는 데 적용될 수 있다.

- [0031] 본 명세서의 용어 "실시간(real-time)"은 연속적으로 혈류량을 측정하는 것을 의미하며, 이는 혈관 내 혈전 정도를 시간에 따라 지속적으로 정량적 및/또는 정성적 분석을 가능하게 한다. 따라서, 상술한 종래기술과 비교하여 본 발명의 방법은 실시간으로 혈관 내 혈전을 정량적/정성적으로 검출할 수 있다는 장점이 있다.
- [0032] 본 발명의 방법에 따르면, 우선 본 발명에서 이용되는 동물 혈관에 혈전을 유발시킨다. 혈전유발 방법은 당업계에 공지된 방법에 따라 실시할 수 있으며, 예를 들어 산화적 스트레스를 이용한 혈전 유발, 풍선 카테터를 이용한 내피세포 손상, 약물의 주입, 전기손상법(electrical injury; Steffen W, Fishbein MC, Luo H, Lee DY, Nita H, Cumberland DC, et al. High intensity, low frequency catheterdelivered ultrasound dissolution of occlusive coronary artery thrombi: An in vitro and in vivo study. J Am Coll Cardiol, 24: 1571-9(1994)), 동맥루형성술(Arteriovenous shunt model), 광화학적 색전모델(photothrombosis model) 또는 카테터를 이용한 외부로부터의 혈전 주입 등을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는 산화적 스트레스를 이용한 혈전 유발이다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 산화적 스트레스 유발 물질로 $FeCl_3$ 를 이용한다.
- [0033] 이어, 혈전이 유발된 동물(바람직하게는 동물 혈관, 보다 바람직하게는, 완전 폐색된 혈관)에 시험물질을 처리한다. 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시험물질"은 본 발명의 폐색된 혈관 내 혈류량(blood flow)의 회복에 영향을 미치는 지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화합물, 단백질, 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 천연물 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 시험물질은 경구 또는 비경구, 바람직하게는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 동맥내 주입, 근육 주입, 피하 주입, 복강 주입, 국소 투여, 경피 투여 등으로 투여할 수 있으며, 가장 바람직하게는 정맥내 주입이다.
- [0034] 최종적으로, 본 발명의 방법은 완전 폐색된 동물 혈관 내 혈류량을 실시간으로 측정한다. 처리된 시험물질에 의해 혈관 내 혈류량이 정상 혈류량의 50% 이상으로 회복되면 혈전용해능을 가지는 혈전용해제로 간주한다.
- [0035] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 시험물질에 의해 회복된 혈류량의 레벨은 정상 혈류량의 70-95%, 보다 바람직하게는 80-96%, 보다 더 바람직하게는 90-97%, 가장 바람직하게는 95-100%이다.
- [0036] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 상기 단계 (c) 이후에 조직학적 염색을 통해 혈전의 용해 정도를 확인하는 단계(c-1)를 추가적으로 포함한다.
- [0037] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법에 따라 스크리닝된 혈전용해제에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 혈관질환은 뇌혈관질환(cerebrovascular disease), 심혈관질환(cardiovascular disease) 또는 동맥경화성 혈관질환(arteriovascular disease)이다.
- [0038] 본 명세서의 용어 "뇌혈관질환(cerebrovascular disease, CVD)"은 산소-풍부 혈액을 안면 및 뇌에 공급하는 혈관에서 일어나는 동맥경화성 혈관질환으로, 일반적으로 CAD(coronary artery disease) 및/또는 PAD(peripheral artery disease)와 함께 발생하는 동반질환(comorbid disease) 뿐 아니라, 허혈성 질환 또는 혈류량의 부족을 야기하는 질환도 포함한다. 예를 들어, CVD는 허혈성 뇌혈관질환, 급성 뇌경색, 뇌졸중, 허혈성 뇌졸중, 출혈성 뇌졸중, 정맥류, 경증인지장애(mild cognitive impairment, MCI) 또는 일과성 허혈발작(transient ischemic attacks, TIA)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 본 명세서의 용어 "심혈관질환(cardiovascular disease) 또는 동맥경화성 혈관질환(arteriovascular disease)"은 심장, 심장 판막, 혈액 및 몸의 혈관구조(vasculature)에 영향을 미치는 수많은 상태를 분류하는데 이용되는 일반적인 용어로, 심장 또는 혈관에 영향을 미치는 질병들을 포함한다. 바람직하게는, 대사증후군, 증후군 X, 아테롬성 동맥경화증, 죽상혈전증, 관상동맥질환, 안정 및 불안정 협심증, 뇌졸중, 대동맥 협착증 또는 대동맥류 같은 대동맥 질환, 말초혈관질환 또는 급성 허혈성 동맥경화성 이벤트를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 일반적으로, 본 명세서의 용어 "동맥경화성 혈관질환(arteriovascular disease)"는 비-허혈성 질환보다는 허혈성 질환 또는 허혈유발성(proischemic) 질환을 의미한다.
- [0040] 본 명세서의 용어 "동맥경화성 이벤트(arteriovascular event)"는 "심혈관 이벤트(cardiovascular event)"와 상호교환하여 사용될 수 있는 용어로, 급성 심장사(sudden cardiac death, SCD), 비-심장성 급성 동맥경화성 이벤트 또는 급성 관상동맥증후군을 포함한다. 상기 비-심장성 급성 동맥경화성 이벤트는 다리(특히, 하지)의 혈액응고, 동맥류(aneurysms), 뇌졸중 또는 동맥경화성 혈류 및 산소화를 방해하는 다른 동맥경화성 허혈성 이벤트를 포함한다. 상기 급성 관상동맥증후군은 죽상반 파열(plaque rupture), 심근경색 또는 불안정성 협심증을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 명세서의 용어 "아테롬성 동맥경화증(atherosclerosis)" 및

"죽상혈전증(atherothrombosis)"은 광범위한 혈관 병리상태에 대한 복잡한 염증 반응과 연관된 전신성 염증 질환 상태를 의미한다.

[0041] 본 명세서의 용어 "관상동맥질환(coronary artery disease, CAD)"은 심근에 혈액을 공급하는 동맥(관상동맥)이 죽상경화(atherosclerotic), 칼슘 침전에 의한 경화 및/또는 좁아져서 발생하는 동맥경화성 혈관질환을 의미한다. CAD는 심근으로의 혈류량 감소를 초래하며 이에 따라 심근이 충분한 양의 산소를 공급받지 못하고 궁극적으로 괴사(necrosis)를 야기한다. CAD는 급성 관상동맥증후군, 심근경색(심장마비), 협심증(안정 및 불안정) 또는 심장으로 혈액을 공급하는 혈관에서 발생하는 아테롬성 동맥경화증 및 죽상혈전증을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 본 명세서의 용어 "말초혈관질환(peripheral artery disease, PAD)"은 심장 및 뇌 이외의 곳에서 발생하는 아테롬성 동맥경화증 및 죽상혈전증 같은 질환으로 일반적으로 CAD와 함께 발생하는 동반질환(comorbid disease)을 포함한다.

발명의 효과

[0043] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0044] (a) 본 발명은 혈전용해제의 스크리닝 방법 및 동물모델에 관한 것이다.

[0045] (b) 본 발명의 방법은 혈전이 형성된 혈관에 시험물질, 바람직하게는 디스인테그린을 처리하여 실시간으로 혈류량을 측정함으로써 혈관 내 혈전을 정량적으로 검출할 수 있으며, 생체 내에서 혈전용해능을 시간별로 정량적으로 분석할 수 있다.

[0046] (c) 또한, 본 발명의 방법은 실시간으로 혈전의 회복 정도를 혈류량을 통해 측정하기 때문에, 혈전용해제를 저비용으로 매우 용이하고 정확하게 스크리닝할 수 있다.

[0047] (d) 본 발명의 혈관 폐색이 유발된 동물은 혈전용해제 후보물질을 인 vivo에서 테스트하여 동정할 수 있고, 동정된 혈전용해제의 인 vivo 부작용을 최소화할 수 있다.

[0048] (e) 따라서, 본 발명은 혈전-관련 질환(예컨대, 뇌혈관질환, 심혈관질환 또는 동맥경화성 혈관질환)의 진단, 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1a는 FeCl_3 -처리에 따른 폐색 패턴을 보여주는 결과로, 기본 혈류량이 FeCl_3 -처리 후 혈류량이 감소하다가 혈관이 완전히 폐색되어 유지되었다.

도 1b는 실제 혈관에 생성된 혈전을 검출하기 위한 H&E 염색 결과로, 상당한 크기의 혈전이 생성되었다. 다섯 마리의 마우스로부터 적절한 혈관의 혈전 크기를 측정한 결과, 균일한 크기의 혈전이 생성되어 혈전용해제에 의한 용해효과를 확인하였다.

도 2는 정상 혈관 및 폐색된 정도가 상이한 혈관에서 측정된 혈류량, 그리고 이의 혈관에 형성된 혈전을 검출한 결과이다.

도 3은 본 발명의 재조합 삭사틸린(r-삭사틸린)의 투여량에 따른 혈류량의 변화를 측정한 그래프이다. 본 발명의 r-삭사틸린의 투여량이 증가함에 따라 혈류량(혈류시간 곡선 아래의 면적)이 거의 기본 레벨(baseline)로 회복되었다(5 mg/kg과 10 mg/kg의 r-삭사틸린 투여군).

도 4는 본 발명의 r-삭사틸린의 투여방법에 따른 혈전용해 효능을 비교한 결과이다. 패널 A의 파란색 화살표는 재폐색이 일어나는 시점을 나타낸다. 패널 A의 B는 볼루스 주입(bolus injection)을 의미하며, I는 연속적인 정맥 내(intravenous) 주입을 나타낸다.

도 5는 본 발명의 r-삭사틸린의 투여량에 따른 혈전용해 효능을 측정한 결과이다. FeCl_3 -유도된 동물에 지시된 농도의 r-삭사틸린을 투여하여 2시간 동안 혈류량을 연속적으로 모니터링하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0051] 실시예
- [0052] 실험방법
- [0053] 실험 동물 및 FeCl_3 -유도된 대동맥 혈전증
- [0054] 수컷 ICR(Institute of Cancer Research) 마우스(8-주령)(주 오리엔트 바이오)를 이용하였다. 실험실 동물의 관리 및 이용은 이에 대한 NIH의 지침에 합당한 제도적으로 승인된 프로토콜에 따라 실시하였다. 수술 과정을 살펴보면, 동물은 70% N_2O 및 30% O_2 로 구성된 혼합물(대한특수가스, 한국)에 포함된 5% 이소플루란(일성신약, 한국)의 흡입을 통해 마취시켰다. 마취는 2% 이소플루란으로 유지시켰다. 수술 과정 동안, 동물의 체온은 직장용 프로브로 지속적으로 모니터링하였으며, 항온피복 조절 유니트(Homeothermic blanket control unit) 및 히팅 패드(Harvard Apparatus, Holliston, MA)를 이용하여 $37.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 로 유지하였다. r-삭사틸린의 인 vivo 혈전용해 활성을 테스트하기 위해 FeCl_3 -유도된(Sigma-Aldrich, USA) 경동맥 혈전 모델을 이용하였다. 경부 정중절개(midline cervical incision)를 실시하여 좌측 총경동맥을 수술 현미경(SEILER, USA)하에서 조심스럽게 해부하였다. 초음파 도플러 유속프로브(ultrasonic Doppler ow probe; Transonic MA0.7PSB)를 총경동맥(CCA)의 중앙부위에 위치시켰다. 경동맥 혈류량은 음속 TS420 혈류량 미터(Transonic Instruments, Ithaca, NY) 및 iWorx IX-304T 데이터 획득 시스템(iWorx Systems, Inc., Dover, NH)을 이용하여 측정하였다. 대조군으로서 CCA의 기본 혈류량을 5분 동안 측정하였다. 대조군 기본 혈류량의 결정 후, 프로브를 제거하였다. 노출된 CCA 중앙지점의 바깥쪽 표면(adventitial surface)에 50% FeCl_3 로 포화된 여과지($700 \times 500 \mu\text{m}$)(ADVANTEC, Japan)를 5분 동안 접촉시킴으로써 화학적 스트레스에 의한 산화적 혈관 손상이 유도되었다. 여과지를 제거한 후, CCA를 정상 염으로 세척하고 이의 혈류량을 측정하였다. 혈류량의 감소를 통해 혈전 형성 및 동맥 폐색을 결정하였으며, 완전 폐색(complete occlusion)은 혈류가 10분 동안 부재한 경우로 정의되었다.
- [0055] 혈전성 폐색의 결정 및 크기 측정
- [0056] 혈전 형성 및 크기에서 모델의 일치성(consistency)을 평가하였다. 완전 폐색 10분 후, 손상된 CCA 절편들을 절개하여 4% 파라포름알데하이드(MERCK-schuchardt, Germany)에 담가 고정시키고 조직학적 분석을 위해 파라핀에 임베드시켰다. 파라핀 블록을 $3 \mu\text{m}$ -두께로 수직방향으로 연속적으로 절단하였다. 절단된 슬라이스들을 유리 슬라이드에 마운팅하여 헤마톡실린(Dako, Denmark) 및 에오신(Sigma-Aldrich, USA)으로 염색하였다. 각 동물에서 혈전의 크기(수직 길이 및 영역)는 가장 큰 혈전 크기를 보이는 슬라이스에서 Scion 이미지 분석 소프트웨어(Scion Co., Frederick, MA, USA)를 이용함으로써 결정하였다.
- [0057] 재조합 삭사틸린에 의한 정맥 내 혈전용해
- [0058] CCA 폐색 10분 후, PE-10 튜빙(Becton Dickinson and Company, USA) 과 연결된 주입펌프(KD Scientific Inc., USA)을 이용하여 좌측 대퇴부 정맥을 통해 r-삭사틸린을 정맥내 투여하였다. 경동맥 혈류량을 주입 개시시간부터 2시간 동안 연속적으로 모니터링하였다.
- [0059] r-삭사틸린의 용량-반응(dose response)
- [0060] r-삭사틸린의 용량-반응을 조사하기 위해, 동물을 임의적으로 7개의 군(각 군은 5마리의 마우스를 포함)으로 나누었다: 정상 염(대조군), 1, 1.75, 2.5, 3.75, 5.0 및 10.0 mg/kg의 r-삭사틸린이 투여된 군. 투여량(dose)의 10% 정도는 볼루스(bolus)로 정맥 내 투여하고 나머지는 60분 동안 끊임없이 주입되었다.

- [0061] **r-삭사틸린의 투여방법**
- [0062] 혈전용해에 있어서 r-삭사틸린의 효과는 투여방법에 따라 평가되었다. 본 실험을 위해, 각 동물에서 5 mg/kg의 r-삭사틸린의 총 투여량을 이용하였고 동물을 임의적으로 4개의 군(각 군은 5마리의 마우스를 포함)으로 나누었다: (a) 총 투여량(5 mg/kg)의 볼루스 주입; (b) 폐색 후 10분 후에 r-삭사틸린 투여량의 반(2.5 mg/kg)을 주입하고 첫 번째 볼루스 주입 후 60분 후에 r-삭사틸린 투여량의 반을 주입하는 이중 볼루스 주입; (c) 폐색 후 10분 후에 r-삭사틸린 투여량의 반(2.5 mg/kg)을 주입하고 나머지 투여량을 60분 동안 연속적으로 주입하는 이중 볼루스 주입; 및 (d) 폐색 후 10분 후에 r-삭사틸린 투여량의 10%(0.5 mg/kg)를 주입하고 나머지(4.5 mg/kg)를 60분 동안 끊임없이 주입하는 이중 볼루스 주입.
- [0063] **재관통의 확인**
- [0064] 혈류량을 측정함으로써 재관통의 확인(presence) 및 정도를 측정하였다. 기본 혈류량에 대한 데이터 및 CCA 폐색 후 2시간 동안 지속적으로 모니터링된 혈류량에 대한 데이터가 iWorx Labscribe2 데이터 획득 소프트웨어(version 2.045000)를 이용하여 얻어졌다. 혈류량 모니터링 후 2시간 후에 모든 마우스에서 CCA를 얻어 4% 파라포름알데하이드 용액으로 고정하고 조직학적 조사를 위해 파라핀에 임베드시켰다. 파라핀 블록을 3 μ m-두께로 가로방향으로 연속적으로 절단하고 유리 슬라이드에 마운팅하여 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다.
- [0065] **r-삭사틸린의 용량-반응(dose response)**
- [0066] 혈류시간(flow-time) 곡선 아래의 면적에 의해 경동맥 혈류량을 분석하였다. 동물들 간의 생리학적 조건의 변이에 따라 야기되는 오차(differences)를 피하기 위해, 모든 측정된 수치들은 각 동물의 최소 혈류에 의해 표준화시켰다. 혈전용해 효과를 아래와 같이 계산하고 정상 혈류량의 평균값에 대한 백분율로 표시하였다: (r-삭사틸린 처리 시간에 따른 혈류량의 평균값/정상 혈류량의 평균값) 100(%). 용량-반응 연구에서 각 군의 평균값이 계산되고 이는 표준 혈전용해활성 곡선에서 확인하였다(평균값 \pm 표준편차).
- [0067] **혈전용해 효과의 시간-패턴(Time-pattern)**
- [0068] 각 동물에서 매 1분 동안 혈류량의 평균을 계산하였고, r-삭사틸린의 투여량 및 투여방법에 대해 각각 대표적인 패턴을 시간-의존적으로 보여줬다. 각 군에서 모든 동물의 평균값을 계산하였으며 일시적인 변화를 연속적인 막대 그래프로 보여줬다(평균값 \pm 표준편차).
- [0069] **재관통 시간**
- [0070] 효과적인 재관통(effective recanalization)을 위한 r-삭사틸린의 투여 시간이 조사되었다. 효과적인 재관통은 적어도 정상 레벨의 50%까지 혈류량이 회복되는 것으로 정의되었는데, 이때 회복은 30분 보다 더 오랫동안 유지되었다.
- [0071] **실험 결과**
- [0072] **동물 모델의 일치성**
- [0073] FeCl₃를 5분 동안 처리한 후, CCA의 혈류량은 조사된 모든 동물들(5마리)에서 거의 제로까지 빠르고 지속적으로 감소하였다(도 1a). CCA의 혈전성 폐색을 동물들에 대한 조직학적 분석으로 확인하였다(도 1b). 혈전의 크기는 동물들 간에 유사하였다(길이, 1.139 ± 0.091 mm; 면적, 0.799 ± 0.139 mm²). r-삭사틸린 처리군의 조직학적 분석을 통해 혈전이 완벽하게 회복된 경동맥 혈류량을 가진 마우스의 경동맥 루멘에서 관찰되지 않았고 회복된 경동맥 혈류량을 보이지 않거나 부분적으로 회복된 경동맥 혈류량을 가진 마우스의 경동맥 루멘에서 남아 있음을 확인하였다(도 2).

[0074] r-삭사틸린의 투여량-의존적 혈전용해 효과

[0075] r-삭사틸린의 투여량-의존적 효과는 혈류시간(flow-time) 곡선 아래의 면적에 대한 데이터를 이용하여 평가하였다(도 3). 정상 염 처리군($2.47 \pm 1.07\%$)과 비교하여 r-삭사틸린 처리는 1 mg/kg ($2.36 \pm 0.78\%$) 또는 1.75 mg/kg ($4.97 \pm 3.94\%$)의 투여량에서 눈에 띄는 변화를 야기하지 않았다. 혈류량의 회복은 2.5 mg/kg ($32.50 \pm 33.70\%$)의 투여량에서 관찰되었으며, 투여량-의존적으로 증가하였다. 혈류는 5 mg/kg 의 r-삭사틸린의 투여로 거의 기본 레벨($94.50 \pm 20.47\%$)까지 회복되었다. 5 mg/kg 과 10 mg/kg 의 r-삭사틸린 투여군 간에 뚜렷한 차이가 없었다.

[0076] 투여방법에 따른 r-삭사틸린의 효과

[0077] 최적화된 r-삭사틸린의 정맥 내 투여방법은 용량-반응 연구에서 충분한 효과를 나타낸 5 mg/kg 의 총 투여량을 이용하여 결정하였다. 정상 혈류량과 비교하여 투여군들에서의 혈류량의 평균백분율은 다음과 같다: (a) 총 투여량(5 mg/kg)의 볼루스 주입군, $77.01 \pm 46.11\%$; (b) 투여량의 반을 각각 이용한 이중 볼루스 주입군, $85.23 \pm 29.95\%$; (c) 투여량의 반을 주입하고 나머지 투여량을 연속적으로 주입하는 이중 볼루스 주입군, $80.72 \pm 30.13\%$; 및 (d) 총 투여량의 10%를 주입하고 나머지 투여량을 연속적으로 주입하는 이중 볼루스 주입군, $94.50 \pm 20.47\%$.

[0078] 혈전용해 효과의 감소는 투여방법에 따라 다른 시점(time points)에서 관찰되었다. 갑작스런 재폐색은 다음과 같은 시점에 관찰되었다: (a) 이중 볼루스 주입된 마우스에서 첫 번째 주입 후 약 50분 쯤; (b) 총 투여량의 볼루스 주입 후 약 100분 쯤; 및 (c) 투여량의 절반이 볼루스 주입되고 나머지가 연속적으로 주입된 후 약 110분 쯤(도 4). 총 투여량의 10%를 주입하고 나머지 투여량을 연속적으로 주입하는 마우스에서는 어떠한 재폐색도 관찰되지 않았다.

[0079] r-삭사틸린에 의한 재관통 시간

[0080] 정상 염이 처리된 마우스 및 1 mg/kg 또는 1.75 mg/kg 의 r-삭사틸린이 처리된 마우스에서는 효과적인 재관통이 관찰되지 않았다. 2.5 mg/kg 의 r-삭사틸린이 처리된 다섯 마리의 마우스 중 두 마리, 및 3.75 mg/kg 의 r-삭사틸린이 처리된 다섯 마리의 마우스 중 세 마리에서만 효과적인 재관통이 일어났다. 효과적인 재관통은 정상 레벨의 50%까지 혈류량을 회복하는 것으로 정의되었으며, 이러한 회복은 30분 보다 더 오랫동안 유지되었다(도 5). 5 mg/kg 또는 10 mg/kg 의 r-삭사틸린이 처리된 모든 마우스에서 효과적인 재관통이 관찰되었다(도 5). 효과적인 재관통 시간은 처리량에 따라 다음과 같다: (a) 2.5 mg/kg 의 r-삭사틸린이 처리된 마우스, 32.92 ± 23.52 분; (b) 3.75 mg/kg 의 r-삭사틸린이 처리된 마우스, 21.75 ± 21.62 분; (c) 5 mg/kg 의 r-삭사틸린이 처리된 마우스, 13.92 ± 6.02 분; 및 (d) 10 mg/kg 의 r-삭사틸린이 처리된 마우스, 19.46 ± 19.75 분. 또한, 효과적인 재관통은 r-삭사틸린의 투여방법에 따라 평가하였다. 총 투여량의 볼루스 주입으로 처리된 두 마리의 마우스를 제외한 5 mg/kg 의 r-삭사틸린이 처리된 모든 마우스는 효과적인 재관통을 나타냈다. 효과적인 재관통 시간은 다음과 같다: (a) 총 투여량의 볼루스 주입군, 2.86 ± 0.22 분; (b) 이중 볼루스 주입군, 13.44 ± 26.31 분; (c) 투여량의 반을 주입하고 나머지 투여량을 연속적으로 주입하는 이중 볼루스 주입군, 19.48 ± 25.94 분; 및 (d) 총 투여량의 10%를 주입하고 나머지 투여량을 연속적으로 주입하는 이중 볼루스 주입군, 13.92 ± 6.02 분. 효과적인 재관통 시간은 총 투여량의 10%를 주입하고 나머지 투여량을 연속적으로 주입하는 이중 볼루스 주입군 보다 총 투여량의 볼루스 주입군에서 더 짧았다($p = 0.004$).

[0081] r-삭사틸린 처리 후 사망률 및 출혈

[0082] 총 51마리의 동물들을 r-삭사틸린의 혈전용해 효과에 대한 조사에 이용하였다. 이들 중, 5 mg/kg 의 r-삭사틸린의 볼루스 주입 후 약 90분 쯤에 경부절개 위치에서의 출혈로 인해 한 마리의 동물이 사망하였으며, 다른 한 마리의 동물은 출혈로 인해 고통받았다.

[0083] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한

구체적인 기술은 단지 구체적인 일 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명 의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0084] **참고문헌**

- [0085] (1995). "Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group." N Engl J Med 333(24): 1581-1587.
- [0086] Abou-Chebl, A., C. T. Bajzer, et al. (2005). "Multimodal therapy for the treatment of severe ischemic stroke combining GPIIb/IIIa antagonists and angioplasty after failure of thrombolysis." Stroke 36(10): 2286-2288.
- [0087] Abumiya, T., R. Fitridge, et al. (2000). "Integrin alpha(IIb)beta(3) inhibitor preserves microvascular patency in experimental acute focal cerebral ischemia." Stroke 31(6): 1402-1409; discussion 1409-1410.
- [0088] Adams, H., R. Adams, et al. (2005). "Guidelines for the early management of patients with ischemic stroke: 2005 guidelines update a scientific statement from the Stroke Council of the American Heart Association/American Stroke Association." Stroke 36(4): 916-923.
- [0089] Adams, H. P., Jr., M. B. Effron, et al. (2008). "Emergency administration of abciximab for treatment of patients with acute ischemic stroke: results of an international phase III trial: Abciximab in Emergency Treatment of Stroke Trial (AbESTT-II)." Stroke 39(1): 87-99.
- [0090] Alexandrov, A. V. and J. C. Grotta (2002). "Arterial reocclusion in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator." Neurology 59(6): 862-867.
- [0091] Caplan, L. R., J. P. Mohr, et al. (1997). "Should thrombolytic therapy be the first-line treatment for acute ischemic stroke? Thrombolysis--not a panacea for ischemic stroke." N Engl J Med 337(18): 1309-1310; discussion 1313.
- [0092] Chen, H., W. Mo, et al. (2007). "Characterization of a novel bifunctional mutant of staphylokinase with platelet-targeted thrombolysis and antiplatelet aggregation activities." BMC Mol Biol 8: 88.
- [0093] Chen, Z. L. and S. Strickland (1997). "Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin." Cell 91(7): 917-925.
- [0094] Choi, J. H., B. T. Bateman, et al. (2006). "Endovascular recanalization therapy in acute ischemic stroke." Stroke 37(2): 419-424.
- [0095] Choudhri, T. F., B. L. Hoh, et al. (1998). "Reduced microvascular thrombosis and improved outcome in acute murine stroke by inhibiting GP IIb/IIIa receptor-mediated platelet aggregation." J Clin Invest 102(7): 1301-1310.
- [0096] Ciccone, A., I. Abraha, et al. (2007). "Glycoprotein IIb-IIIa Inhibitors for Acute Ischemic Stroke." Stroke.
- [0097] Eckert, B., C. Koch, et al. (2005). "Aggressive therapy with intravenous abciximab and intra-arterial rtPA and additional PTA/stenting improves clinical outcome in acute vertebrobasilar occlusion: combined local fibrinolysis and intravenous abciximab in acute vertebrobasilar stroke treatment (FAST): results of a multicenter study." Stroke 36(6): 1160-1165.
- [0098] Hallenbeck, J. M. and A. J. Dutka (1990). "Background review and current concepts of reperfusion injury." Arch Neurol 47(11): 1245-1254.
- [0099] Heo, J. H., K. Y. Lee, et al. (2003). "Immediate reocclusion following a successful thrombolysis in acute stroke: a pilot study." Neurology 60(10): 1684-1687.
- [0100] Hong, S. Y., Y. S. Koh, et al. (2002). "Snake venom disintegrin, saxatilin, inhibits platelet

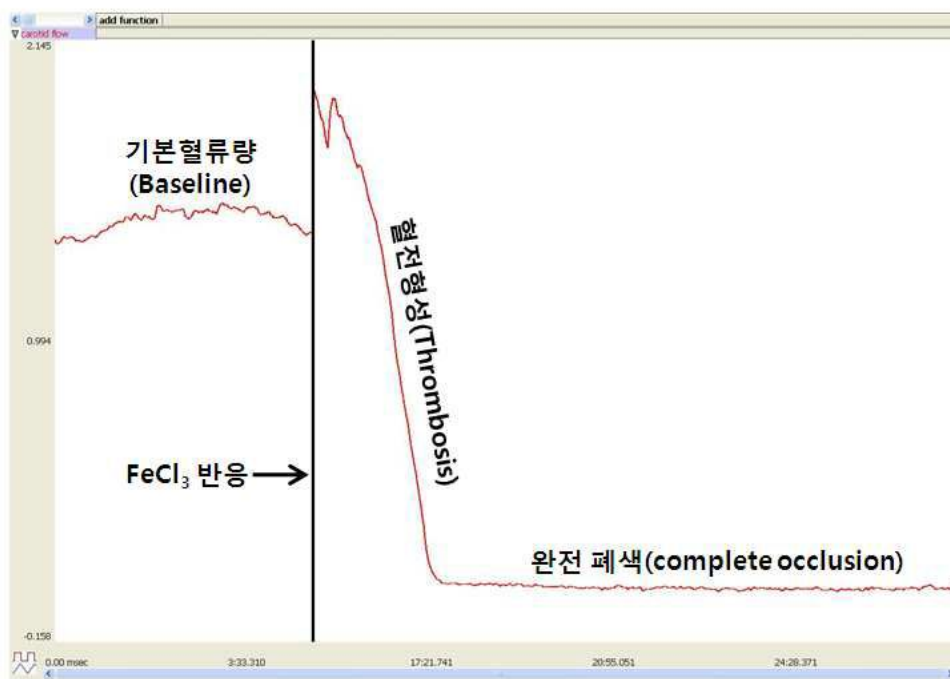
aggregation, human umbilical vein endothelial cell proliferation, and smooth muscle cell migration." *Thromb Res* 105(1): 79-86.

- [0101] Hong, S. Y., Y. D. Sohn, et al. (2002). "Structural and functional significance of disulfide bonds in saxatilin, a 7.7 kDa disintegrin." *Biochem Biophys Res Commun* 293(1): 530-536.
- [0102] Hussain, M. S., R. Lin, et al. (2010). "Symptomatic delayed reocclusion after initial successful revascularization in acute ischemic stroke." *J Stroke Cerebrovasc Dis* 19(1): 36-39.
- [0103] Jang, Y. J., O. H. Jeon, et al. (2007). "Saxatilin, a snake venom disintegrin, regulates platelet activation associated with human vascular endothelial cell migration and invasion." *J Vasc Res* 44(2): 129-137.
- [0104] Konstantinides, S., K. Schafer, et al. (2001). "Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice." *Circulation* 103(4): 576-583.
- [0105] Kurz, K. D., B. W. Main, et al. (1990). "Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride." *Thromb Res* 60(4): 269-280.
- [0106] Lopez-Yunez, A. M., A. Bruno, et al. (2001). "Protocol violations in community-based rTPA stroke treatment are associated with symptomatic intracerebral hemorrhage." *Stroke* 32(1): 12-16.
- [0107] Matys, T. and S. Strickland (2003). "Tissue plasminogen activator and NMDA receptor cleavage." *Nat Med* 9(4): 371-372; author reply 372-373.
- [0108] Nicole, O., F. Docagne, et al. (2001). "The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling." *Nat Med* 7(1): 59-64.
- [0109] Phillips, D. R., I. F. Charo, et al. (1988). "The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex." *Blood* 71(4): 831-843.
- [0110] Qureshi, A. I., A. M. Siddiqui, et al. (2004). "Reocclusion of recanalized arteries during intra-arterial thrombolysis for acute ischemic stroke." *AJNR Am J Neuroradiol* 25(2): 322-328.
- [0111] Rha, J. H. and J. L. Saver (2007). "The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis." *Stroke* 38(3): 967-973.
- [0112] Seitz, R. J., M. Hamzavi, et al. (2003). "Thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator and tirofiban in stroke: preliminary observations." *Stroke* 34(8): 1932-1935.
- [0113] Seitz, R. J., S. Meisel, et al. (2004). "The effect of combined thrombolysis with rtPA and tirofiban on ischemic brain lesions." *Neurology* 62(11): 2110-2112.
- [0114] Shattil, S. J. and M. H. Ginsberg (1997). "Integrin signaling in vascular biology." *J Clin Invest* 100(11 Suppl): S91-95.
- [0115] Sohn, Y. D., S. Y. Hong, et al. (2008). "Acute and repeated dose toxicity studies of recombinant saxatilin, a disintegrin from the Korean snake (*Gloydus saxatilis*)." *Toxicon* 51(3): 406-417.
- [0116] Wang, Y. F., S. E. Tsirka, et al. (1998). "Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice." *Nat Med* 4(2): 228-231.
- [0117] Wardlaw, J. M., V. Murray, et al. (2009). "Thrombolysis for acute ischaemic stroke." *Cochrane Database Syst Rev*(4): CD000213.
- [0118] Yepes, M., M. Sandkvist, et al. (2002). "Regulation of seizure spreading by neuroserpin and tissue-type plasminogen activator is plasminogen-independent." *J Clin Invest* 109(12): 1571-1578.

도면

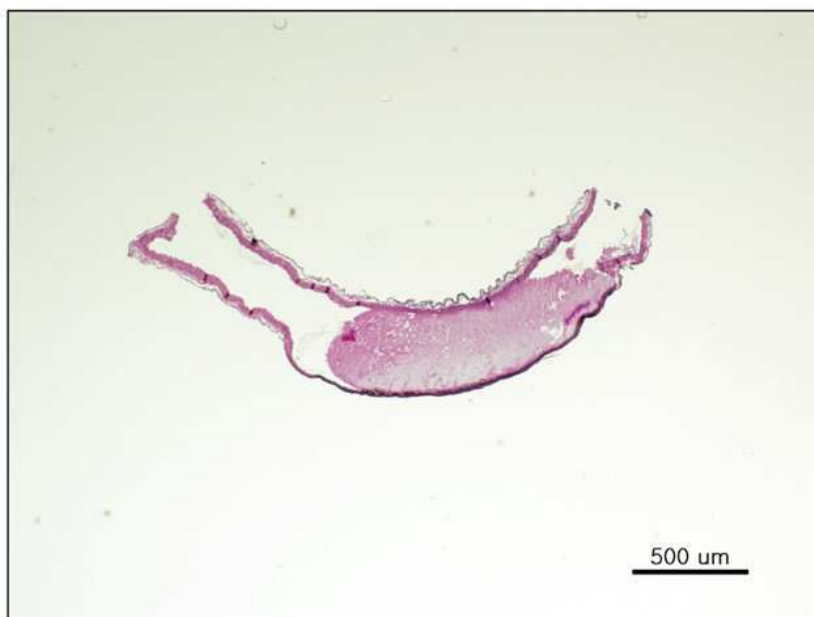
도면1a

A

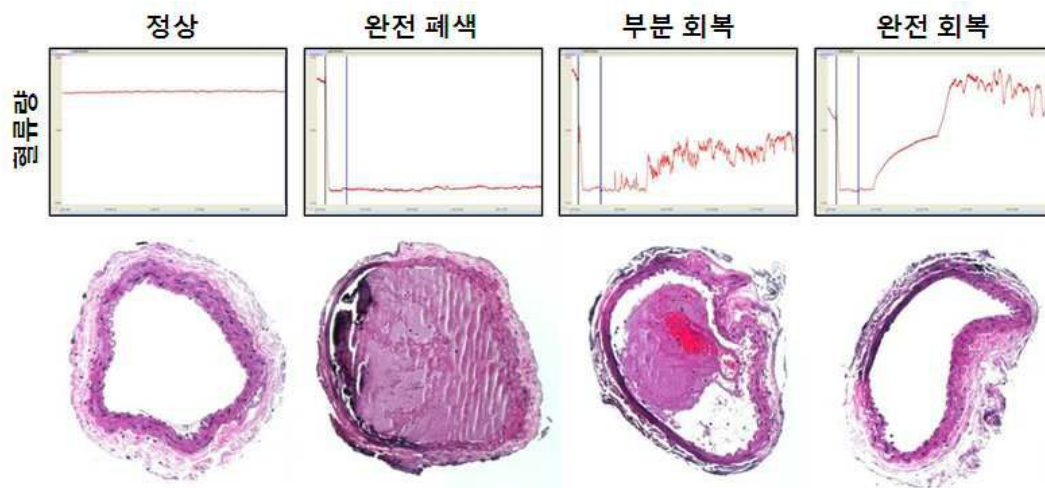


도면1b

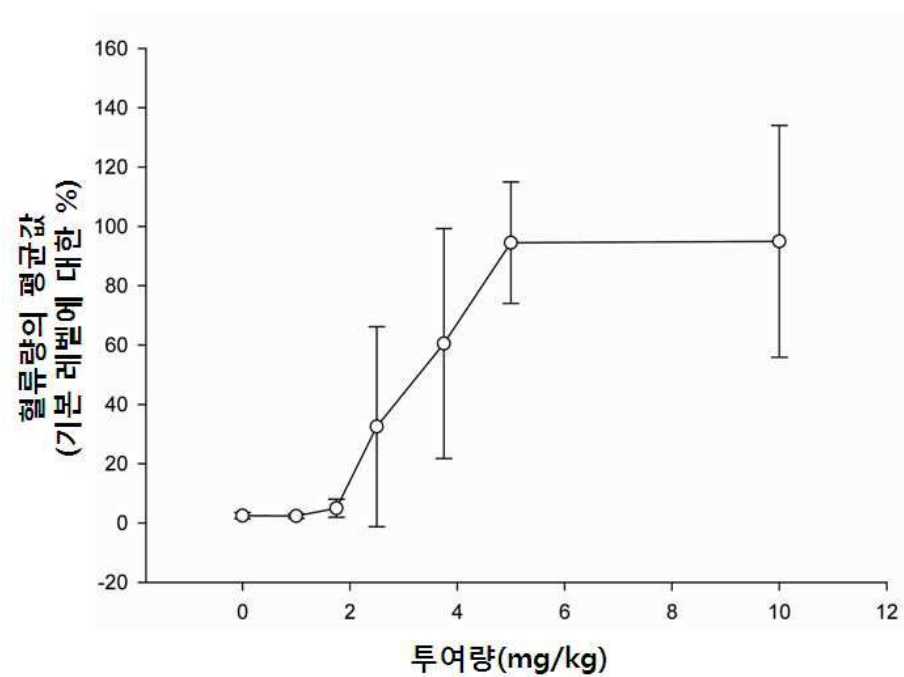
B



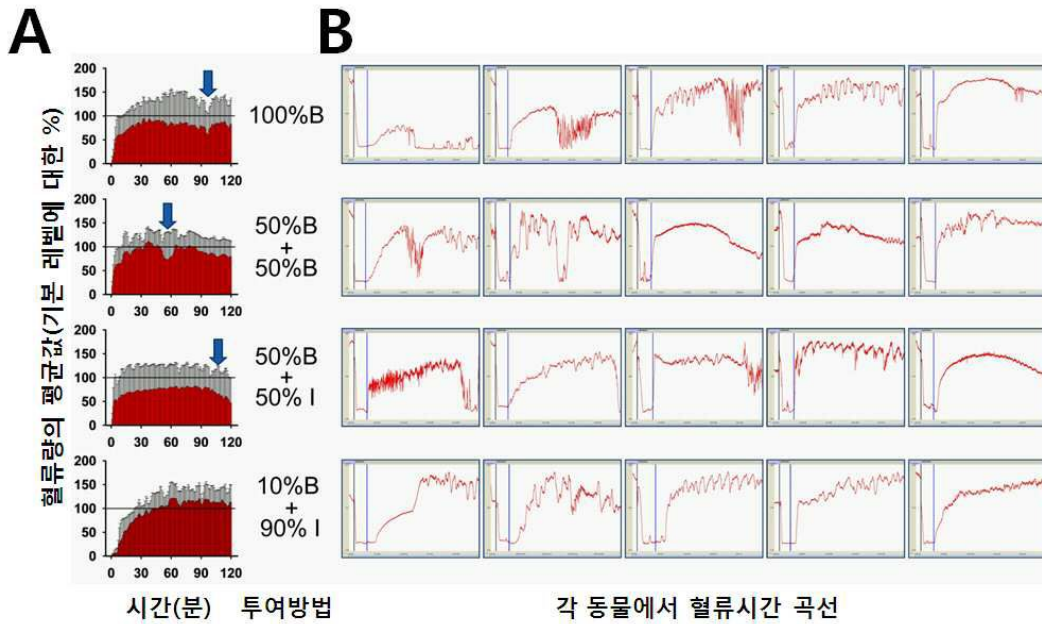
도면2



도면3



도면4



도면5

