



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0093992
(43) 공개일자 2011년08월19일

(51) Int. Cl.

A61K 36/81 (2006.01) *A61P 7/02* (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7010048

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년11월02일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2011년05월02일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2009/002593

(87) 국제공개번호 WO 2010/049707

국제공개일자 2010년05월06일

(30) 우선권주장

0819959.8 2008년10월31일 영국(GB)

(71) 출원인

프로벡시스 내추럴 프로덕츠 리미티드

영국 원저 에스엘4 1와이비 1 빅토리아 스트리트
템즈 코트 프로벡시스 피엘씨

(72) 발명자

오케네디 나이암

영국 원저 에스엘4 1와이비 1 빅토리아 스트리트
템즈 코트 프로벡시스 피엘씨 프로벡시스 내추럴
프로덕츠 리미티드

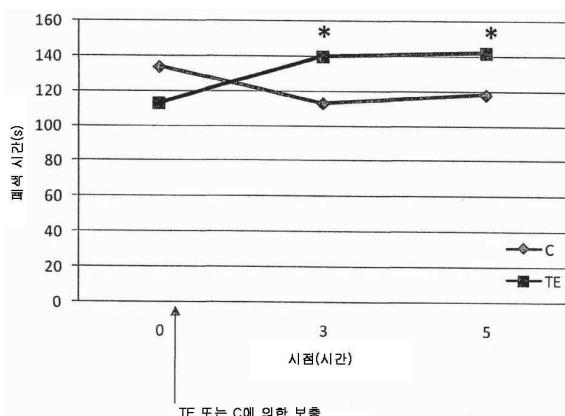
(74) 대리인

석혜선, 김용인

전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 농산물 추출물**(57) 요 약**

본 발명은 가지과의 농산물 추출물 제조 방법으로서 농산물을 추출물의 혈소판 응집 억제 활성을 최적화하게 처리된다. 이 방법은 균일한 농산물의 출발 믹스(start mix)를 제조하는 단계; 수용성 부분(soluble fraction)을 농산물 고체들로부터 분리하는 단계; 수용성 부분의 여과하는 단계; 및 여과액에 있는 활성 물질들을 농축하는 단계를 포함한다. 본 발명은 이런 방법에 의해 제조된 농산물 추출물들 및 글리코실화 폐놀산 또는 폐놀산 에스터 또는 이의 유도체; 글리코실화 플라보노이드 및 뉴클레오시드를 포함하는 농산물 추출물을 제공한다. 본 발명의 추출물은 부적절한 혈소판 응집을 특징으로 하는 질환의 치료 또는 예방을 위한 의약으로서 유용하다. 특히 의약은 부적절한 혈소판 응집을 특징으로 하는 질환의 치료 또는 예방은 혈소판 응집을 감소시켜 심장 건강을 유지하고; 순환을 이롭게 하고; 혈류를 정상화 또는 이롭게 하는데 유용할 수 있다.

대 표 도 - 도7

특허청구의 범위

청구항 1

가지과의 농산물 추출물 제조 방법으로서 농산물을 다음 단계를 포함하여 추출물의 혈소판 응집 억제 활성을 최적화하게 처리되는 방법:

- (a) 균일한 농산물의 출발 믹스(start mix)를 제조하는 단계;
- (b) 수용성 부분(soluble fraction)을 농산물 고체들로부터 분리하는 단계;
- (c) 수용성 부분을 여과하는 단계; 및
- (d) 여과액에 있는 활성 물질들을 농축하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

출발 믹스의 유지 온도는 35°C를 초과하지 않는 가지과의 농산물 추출물 제조 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

출발 믹스의 pH는 5.5를 초과하지 않는 가지과의 농산물 추출물 제조 방법.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

420nm의 가용성 부분의 흡수율로서 정의된 출발 믹스의 갈색화 지수는 4% 고체에서 0.4AU를 초과하지 않는 가지과의 농산물 추출물 제조 방법.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

단계(b)는 가용성 부분을 입자 크기 $> 500\mu$ 를 가진 불용성 고체들로부터 분리하는 가지과의 농산물 추출물 제조 방법.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

단계(b)는 가용성 부분의 온도를 60°C 이상으로 올리는 절차를 포함하지 않는 가지과의 농산물 추출물 제조 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

단계(c)는 고체들의 손실 없이 0.2μ 필터를 통과할 용액을 형성하는 가지과의 농산물 추출물 제조 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서,

단계(d)는 가용성 부분의 온도를 60°C 이상으로 올리는 절차를 포함하지 않는 가지과의 농산물 추출물 제조 방법.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,

수용성 추출물로부터 유리 당들을 제거하기 위한 단계(c) 후 추가 단계를 포함하는 가지과의 농산물 추출물 제조 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

당들은 추출물 성분들의 수지-매개 분리에 의해 제거되는 가지과의 농산물 추출물 제조 방법.

청구항 11

필수적으로 실시예 2 또는 3에 개시된 대로 농산물의 추출물을 제조하는 방법.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 정의된 방법에 따라 제조된 농산물 추출물.

청구항 13

(a) 글리코실화 폐놀산 또는 폐놀 에스터 또는 이의 유도체;

(b) 글리코실화 플라보노이드; 및

(c) 뉴클로오시드를 포함하는 농산물 추출물.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

글리코실화 폐놀산 또는 폐놀 에스터는 글리코실화 신남산 또는 이의 유도체인 농산물 추출물.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

글리코실화 신남산 또는 이의 유도체는 카페오일-4-0-퀴닌산, 카페오일-4-0-글루코시드, 쿠마로일-4-0-글리코시드(gluc / gal) 또는 쿠마로일-4-글리코시드(다이사카라이드)를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 농산물 추출물.

청구항 16

제 13 항에 있어서,

글리코실화 폐놀산 또는 폐놀 에스터는 카페인산 글루코시드; p-쿠마르산 헥소스 / 다이하이드로카엠프페롤 헥소스; 폐롤산 글리코시드; 및 p-쿠마르산 유도체로부터 선택되는 농산물 추출물.

청구항 17

제 13 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서,

글리코시드화 플라보노이드는 쿠에르세틴-3-0-글루코시드 또는 루틴인 농산물 추출물.

청구항 18

제 13 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서,

뉴클레오시드는 AMP, 우리딘, 아데노신, 구아노신 또는 GMP를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 농산물 추출물.

청구항 19

제 13 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서,

추출물은 표 1에서 확인된 16개 화합물의 각각을 포함하는 농산물 추출물.

청구항 20

제 13 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서,
추출물은 표 2에서 확인된 32개 화합물의 각각을 포함하는 농산물 추출물.

청구항 21

필수적으로 실시예 2 또는 3에서 정의된 농산물 추출물.

청구항 22

제 12 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항에 있어서,
부적절한 혈소판 응집을 특징으로 하는 질환의 치료 또는 예방을 위한 의약으로 사용하기 위한 농산물 추출물.

청구항 23

제 22 항에 있어서,

부적절한 혈소판 응집을 특징으로 하는 질환의 치료 또는 예방은 혈소판 응집을 감소시켜 심장 건강을 유지하고; 순환을 이롭게 하고; 혈류를 정상화 또는 이롭게 하는 것으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 목적을 위한 농산물 추출물.

명세서**기술 분야**

[0001]

본 발명은 혈소판 응집을 막고 항혈전제로서 유용한 농산물 추출물 및 이런 추출물의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

과일과 야채의 섭취는 중요한 예방 수단이며 이로 인해 심혈관 질환들이 감소할 수 있다는 것은 주지되어 있다. 따라서 심장 질환의 예방에 중요한 역할을 하는 과일과 야채로부터 유도된 화합물들을 확인하려는 시도에 상당한 노력이 소비되었다.

[0003]

혈소판 응집을 억제하는 물질들에 특별한 관심이 있어왔다. 혈소판들이 순환계 내에서 응집할 때, 혈관들을 막는데 충분하게 큰 혈전들이 형성된다. 그러나, 완전한 응집이 일어나기 전에, 혈소판들은 활성 상태로 순환할 수 있다. 이 상태일 때, 혈소판 점착성은 매우 증가하여, 서로, 다른 혈액 세포들에 또는 지질 풍부 칼로마이크론(chylomicron)과 같은 혈액의 성분들에 점착할 수 있다. 이것이 미소응집체들을 형성하게 하여 혈액의 유동성을 낮추어, 국소적으로는 혈류에 영향을 주고 전신으로는 순환에 영향을 준다. 혈소판 응집성을 감소시키면 혈액을 유동성이고 낮은 응고 상태로 유지하는 것을 돋는다. 이것이 순환계 내에 형성된 미세-응집체들을 형성을 막고, 혈소판들이 혈관벽들 또는 지방 플라크(fatty plaque)에 점착하는 것을 막음으로써 혈류를 정상화하는 것을 돋는다.

[0004]

이런 관점에서 혈소판 응집을 억제할 수 있는 물질들은 관상동맥 질환, 예를 들어, 심근경색 및 뇌졸중을 예방하고, 심근경색, 뇌졸중 또는 불안정협심증(unstable angina)을 앓고 있는 환자들에서 혈전색전증(thromboembolic disorders)을 추가로 예방하는데 유용하다는 것을 인식할 것이다. 또한, 이런 물질들은 혈관성형술(angioplasty) 및 우회 수술(bypass procedures) 이후 재협착(restenosis)을 예방하는 하는데 유용할 수 있다. 또한, 이런 물질들은 혈전용해 치료와 함께 심근경색과 같은 혈전색전증으로부터 발생한 관상동맥 질환의 치료에 유용할 수 있다.

[0005]

혈소판 생산과 작용의 다른 단계에서 작용하는 여러 공지된 항-혈소판-응집제가 있다. 아스피린(아세틸살리실산)이 가장 널리 사용되고 연구된다. 다이피리다몰과 티클로피딘도 사용되고 있다. 아스피린의 항혈소판 활성은 혈소판 사이클로-옥시지나아제의 비가역적 억제 때문이며, 따라서 혈소판 응집을 일으키는 화합물인 트롬복세인 A2의 합성을 막는다. 인도부펜은 혈소판 사이클로-옥시지나아제의 비가역적 억제제이다. 일부 화합물들은 트롬복세인 A2 합성효소, 예를 들어, 피르마그렐(pirmagrel)의 직접 억제제들이거나 트롬복세인 수용체들, 예를 들어, 술로트로반(sulotroban)에서 길항제들로서 작용한다.

- [0006] 국제특허출원 WO 99/55350은 여러 농산물로부터의 수용성 추출물들이 혈소판 응집을 억제하는 능력을 나타낸다는 것을 개시한다. 항-혈소판-응집 활성이 수용성인 것으로 발견된 것은 놀라웠는데, 이는 그 당시 당업계에 공지된 활성 추출물들은 지용성 화합물들(예를 들어, 리코펜(lycopene))이었기 때문이다. 이런 수용성 추출물들은 혈소판 응집을 막거나 감소시키는데 현저한 효과를 갖는 것으로 발견되었고 건강에 유익한 영양 보충제로서 유럽 식품 표준국에서 승인되어 판매되었다.
- [0007] WO 99/55350 농산물 추출물의 활성 성분은 질량 분광법(MS)과 핵자기 공명(NMR) 분광법에 의해 분석하였고 혈소판 응집 억제 활성을 가진 뉴클레오시드의 혼합물을 포함하는 것을 발견하였다.
- [0008] 본 발명은 수용성 농산물 추출물 내 뉴클레오시드는 항-혈소판 응집을 막는 이런 추출물 내에 있는 유일한 화합물이 아닐 수 있다는 것은 발명자들의 이해를 기초로 한다. 따라서 본 발명자들은 혈소판 응집을 억제하기 위한 이런 추출물들의 효능을 향상시키고 이런 용도를 위한 농산물 처리의 새로운 방법을 개발하려는 노력으로 WO 99/55350에 개시된 수용성 추출물들 내에 활성 물질들을 추가로 분별증류하고 특징을 나타내기 위한 상당한 노력을 하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 가지과의 농산물들은 혈소판 응집에 대한 최적의 유익한 효과를 갖는 수용성 추출물들을 형성하는 방식으로 가공될 수 있다는 것을 발견하였다. 이런 새로운 지식은 본 발명자들이 혈소판 응집을 억제하는 효능을 가진 새로운 농산물 추출물 및 이의 제조 방법을 개발하게 하였다.

과제의 해결 수단

- [0010] 따라서, 본 발명의 첫 번째 태양에 따라, 가지과의 농산물 추출물을 제조하는 방법이 제공되며, 농산물은 다음 단계를 포함하여 추출물의 혈소판 응집 억제 활성을 최적화하게 처리된다:
- (a) 균일한 농산물의 출발 믹스(start mix)를 제조하는 단계;
- (b) 수용성 부분(soluble fraction)을 농산물 고체들로부터 분리하는 단계;
- (c) 수용성 부분을 여과하는 단계; 및
- (d) 여과액에 있는 활성 물질들을 농축하는 단계.

[0015] 본 발명자들은 WO 99/55350(실시예 1 참조)에 개시된 농산물 추출물에 있는 활성 화합물들을 분석하도록 하였다. 본 발명자들은 식물들에서 자연적으로 발견되는 여러 화합물이 혈소판 응집을 억제하는데 효과적이었다는 것을 놀랍게도 발견하였다. 이것은 발명자들이 WO 99/55350에 개시된 방법들이 추출물들을 형성할 방법들을 개발하는데 적합할 수 있다는 것을 인식하게 하였고, 이 추출물들에서 이런 활성 물질들의 내용물이 포함되거나 (즉, 활성 화합물의 최소량은 과일의 처리 동안 사라진다) 활성 물질들은 농산물 추출물의 산물에 실질적으로 풍부하다. 많은 실험과 실수 후, 본 발명자들은 본 발명의 첫 번째 태양의 방법에 따른 단계들은 혈소판 응집을 감소시키는데 효과적이고 농산물에서 발견된 여러 활성인 수용성 화합물을 포함하는 농산물 추출물들을 형성한다는 것을 확립하였다.

(a) 출발 믹스의 제조

- [0017] 손상되지 않은 농산물, 바람직하게는 토마토의 과육을 농산물의 껍질과 함께 또는 껍질 없이 균질화하여 페이스트를 형성한다.

- [0018] 선택적으로, 구입할 수 있는 토마토 페이스트를 출발 믹스의 제조를 위한 출발 재료로 사용할 수 있다. 추출물들의 제조를 위한 출발 재료가 토마토 페이스트인 경우, "핫-브레이크" 공정("hot-break" process)보다 "콜드-브레이크" 공정("cold-break" process)에 의해 생산된 것이 바람직하다. "콜드-브레이크" 및 "핫-브레이크"라는 용어는 토마토 처리 분야에서 주지되었고 구입할 수 있는 토마토 페이스트들은 통상적으로 핫-브레이크 또는 콜드 브레이크 페이스트로 판매된다. 콜드 브레이크 페이스트는 토마토의 균질화 이후 열 처리 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있으며, 열처리 단계에서 토마토들은 불과 약 60°C의 온도로 가열되며, 균질화된 토마토들이 약 95°C의 온도에서 열 처리 받는 핫-브레이크 페이스트와 반대이며, 예를 들어, Anthon et al., J. Agile. Food Chem. 2002, 50, 6153-6159를 참조.

- [0019] (보존 가공하지 않은 농산물 또는 구입한 페이스트로부터의) 이런 페이스트의 질음은 "출발 믹스"를 형성하기 위해 물 또는 수용액(바람직하게는 탈염수)으로 희석하여 조절해야 한다. 본 발명자들은 최적 활성을 출발 믹스가 희석되어 33% 미만의 고체 및 더욱 바람직하게는 20% 미만의 고체를 포함하는 최종 농산물 추출물에서 얻는다는 것을 발견하였다. 본 발명의 한 바람직한 실시예에서, 출발 믹스는 약 10 내지 15% 고체(예를 들어, 13% 고체)를 포함한다.
- [0020] 본 발명자들은 출발 믹스가 유지한 온도는 추출물의 활성에 현저한 효과를 가질 수 있다는 것을 발견하였다. 따라서 출발 믹스가 유지한 온도는 35°C를 초과하지 않고 더욱 바람직하게는 30°C를 초과하지 않는 것이 바람직하다.
- [0021] 본 발명자들은 출발 믹스의 pH는 본 발명의 방법에 따라 제조된 추출물의 활성에 대해 영향을 준다는 것을 발견하였다. 혼합물의 pH는 산성이어야 하며 바람직하게는 pH 5.5 미만이어야 하고 한 바람직한 실시예에서 pH는 4.2 이상으로 올라가지 않아야 한다. 필요한 경우, pH 조절은 시트르산의 첨가에 의해 이루어질 수 있다.
- [0022] 또한 본 발명자들은 출발 믹스의 갈색화 지수(browning index)는 최종 추출물의 활성을 최적하도록 제어되어야 한다는 것을 발견하였다. 따라서, 420nm에서 가용성 부분의 흡수율로 정의된 출발 믹스의 갈색화 지수는 4% 고체에서 0.4AU를 초과하지 않는 것이 바람직하다. 갈색화 지수는 멜라노이딘(당과 아미노산을 기초로 한 가변 조성물의 폴리머 접합물)의 형성에 의해 유발된 눈에 보이는 갈색화의 지수이고 실온에서 10분 동안 3500rpm에서 출발 믹스의 50mL 샘플을 원심분리하고, 상청액 부분을 제거하고, 굴절계로 측정한 대로 4% 고체로 희석하고 분광 광도계에서 420nm에서 이 용액의 흡수율을 측정함으로써 측정될 수 있다.
- [0023] 본 발명자들은 본 발명의 방법에 따른 농작물 추출물들은 온도, pH 및 갈색화 지수 중 적어도 하나는 상기한 대로 출발 믹스에서 제어되는 경우 항-응집 활성을 향상시킨다는 것을 발견하였다. 이런 제어 단계의 적어도 두 개(예를 들어, 온도 및 pH; 또는 온도 및 갈색화 지수)는 제어되는 것이 바람직하고 온도, pH 및 갈색화 지수가 상기한 대로 제어되는 것이 더욱 바람직하다.
- [0024] 출발 믹스는 30°C를 초과하지 않는 온도, 4.2 미만의 pH 및 0.4AU를 초과하지 않는 갈색화 지수에서 유지되는 것이 가장 바람직하다.
- [0025] (b) 농산물 고체로부터 수용성 부분을 분리하는 단계.
- [0026] 수-불용성 고체들은 여러 표준 기술을 사용하여 수용성 부분으로부터 제거될 수 있다.
- [0027] 본 방법에서 본 단계는 출발 믹스로부터 대형(즉, >500μ 입자 크기) 수-불용성 고체들을 제거하는 것이 바람직하다.
- [0028] 이런 고체들은 다음을 사용하여 제거될 수 있다:
- [0029] (a) 디캔터(예를 들어, 웨스트팔리아 GEA 디캔터(Westfalia GEA decanter))
- [0030] (b) 원심분리 단계(예를 들어, 회전식 디스크 원심분리기) 또는
- [0031] (c) 크기-조절가능한 노즐들을 포함하는 분리기(예를 들어, 공백과 0.45 크기의 노즐의 혼합물을 사용하는 웨스트팔리아 MSB-15 분리기).
- [0032] 선택적으로 고체들은 침전될 수 있고 수용성 부분은 단순히 손으로 기울여 제거될 수 있다.
- [0033] 어떤 방법이 사용되든, 본 발명자들은 수용성 부분에서 최적의 생체활성의 보유를 위해서, 작동 온도는 60°C를 초과하지 않아야 한다. 또한 장비를 통과한 유속은 60°C의 온도에 대한 노출이 60초보다 긴 동안 일어나지 않게 하는 것이 바람직하다.
- [0034] 결과로 얻은 수용성 부분은 분리 단계 이후 이상적으로 냉각돼야 한다. 수용성 부분이 저장될 때, 분리 후, 즉시 <8°C로 냉각되는 것이 바람직하다.
- [0035] 본 발명의 방법의 단계(c)의 바람직한 실시예들에서, 디캔터는 40-45°C의 작동 온도로 사용될 수 있다.
- [0036] 선택적으로 분리 단계는 모든 잔존하는 불용성 재료가 입자크기 <500μ를 갖지며 스판-다운(spin-down) 고체(즉, 실온에서 10분 동안 3500rpm에서 원심분리에 의해 눈에 보이게 침전이 형성되는 재료)가 1 부피%의 부분을 포함하는 정화된 수용성 부분을 생산하기 위해 제 2 정화 단계(예를 들어, 알파 라바알 정화기)가 이어질 수 있다.

- [0037] 본 발명자들은 최종 생성물은 정화된 부분(그러나 생산된)은 10% 미만의 전체 고체 및 더욱 바람직하게는 약 8% 미만의 고체를 포함하는 경우 최대 활성 성분 농도를 보유한다는 것을 발견하였다.
- [0038] (c) 수용성 부분의 여과
- [0039] 매우 고운 미립자 물질(<500 μ)(예를 들어, 단백질 및 일부 펩틴과 같은 대형 폴리머 재료)을 제거하기 위해서, 수용성 부분은 여과돼야 하고 여과액은 보유해야 한다.
- [0040] 여과는 단일 단계 또는 일련의 여과 단계에서 완성될 수 있고, 토마토 껍질의 더 큰 입자들 및/또는 토마토 과육의 다른 수-불용성 조각들을 제거하기 위해 비교적 거친 여과 단계로 시작한다. 추가 여과 단계들은 실질적으로 깨끗한 용액, 예를 들어, 고체의 손실 없이 0.2 μ 필터를 통과할 용액을 제공할 수 있다.
- [0041] 한 바람직한 실시예에서, 본 발명의 방법의 단계(c)는 세라믹 막 필터(예를 들어, 세라믹 막 필터(예를 들어, Pall Membralox P19-30 다중-요소 유닛)이 장착된 Tetra Alcross 교차-여과 MF 유닛)을 가진 여과 장치를 사용하는 미세여과 단계를 포함한다. 나선으로 감긴 막들은 세라믹 막들에 대한 대안으로 사용될 수 있다.
- [0042] 초여과는 미세여과에 대한 대안으로 사용될 수 있다. 같은 종류의 구멍 크기가 허용가능한데, 예를 들어, 1.4 μ, 0.1 μ이나 본 발명자들은 생체활성 성분들을 가진 여과액의 최대 농축(즉, 생체활성 성분의 최소 손실 및 비-생체활성 성분의 최대 포함)은 0.1 μ의 입자 크기가 사용될 때 발생한다는 것을 발견하였다.
- [0043] 최적의 생체활성을 얻기 위해서, 여과 단계 동안 35°C를 초과하지 않아야 하고 여과액은 여과막을 나온 후 즉시 <8°C로 냉각해야 한다. 최종 여과액의 갈색화 지수는 0.4AU를 초과해서는 안 된다.
- [0044] 본 발명자들은 생체활성 성분의 최대 회수 및 (여과되지 않은 재료에 대한)생체활성 성분들에서 여과액의 농축은 출발 여과되지 않은 재료가 <10% 고체를 포함하고 최종 여과액이 대략 7% 고체를 포함하고 갈색화 지수 <0.4AU를 가질 때 일어난다는 것을 발견하였다.
- [0045] 단계(a) 내지 (c)에 따른 고체의 제거는 껍질과 열매, 큰 분자량 단백질 및 펩틴 및 리코펜과 같은 카르테노이드 / 펩틴과 단백질의 존재에 의해 수용액 내 방울들에서 안정화되는 다른 지질의 단편을 제거하는 효과를 가진다. 따라서, 본 발명의 방법은 수용성 추출물들이고 실질적으로 리코펜이 없는 토마토 추출물을 제조하는 방식을 제공한다.
- [0046] 개시된 방법들은, 특히 온도 >35°C(바람직하게는 >30°C)에 대한 노출의 길이의 세밀한 제어는 제조된 리코펜-제거 수용성 추출물들이 <0.4AU의 갈색화 지수 값에 의해 입증된 대로, 눈에 보이는 갈색화의 생산(Maillard reaction)을 일으키는 분해 화학반응이 일어나지 않게 한다. 이것이 아미노산 - 생체활성 성분들의 일부를 결합할 수 있는 당착물과 멜라노이딘 폴리머의 형성은 최소로 유지돼야 한다는 것을 확보한다. 따라서 개시된 방법들은 생체활성 성분 내용물에 대해 최적화되는 추출물들을 형성한다.
- [0047] 본 발명의 방법의 한 바람직한 실시예에서, 토마토 추출물은 리코펜이 실질적으로 없는 수용성 추출물이고 고체들의 손실 없이 0.2 μ 필터를 통과할 수 있고 갈색화 지수 <0.4AU를 가질 수 있다.
- [0048] (d) 여과액에서 활성 물질들의 농축
- [0049] 수성 여과액은 혈소판 응집을 억제하는 능력이 있는 화합물들을 포함하는 생체활성 농축액을 제공하는 추가 농축 / 여과 단계를 거친다.
- [0050] 많은 실험을 거친 후, 발명자들은 농축 단계는 최종 추출물의 최대 생체활성이 보유되었거나 생체활성의 농축이 최종 농축 생성물에서 얻어지는 경우 세심한 제어를 필요로 한다는 것을 입증하였다. 이에 대한 이유는 열-의존성 및 pH-의존성 분해 반응의 과정은 고체 농도가 증가함에 따라 가속된다는 것을 발견하였다. 따라서 본 발명자들은 온도 제어 및 온도에 대한 노출의 길이가 희석 추출물보다 농축 추출물에 더욱 중요하다는 것을 인식하였다.
- [0051] 추출물의 온도가 상승하지 않게 되어 추출물 내의 활성 물질들의 분해가 희석 부분의 경우 약 60°C 이상으로 상승하지 않게 되고 더 농축된 샘플의 경우 40°C 이하로 상승하지 않게 되는 경우 수용성 재료를 농축 / 풍부하게 하는데 여러 방법이 사용될 수 있다.
- [0052] 증발 기술을 사용하는 농축
- [0053] 감압하에서 용액의 증발은 온도가 60°C를 초과하지 않는 조건하에서 사용될 수 있다.

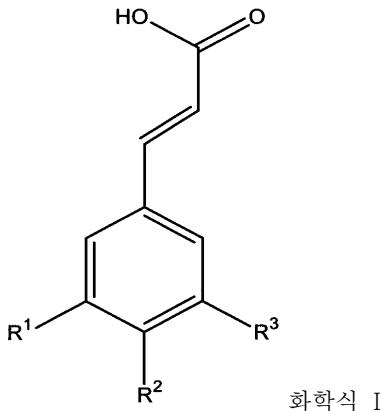
- [0054] 바람직하게는, 다중-효과 증발기가 사용되어, 온도는 액체가 증발기를 통과함에 따라 낮아질 수 있어서, 더 농축된 재료는 온도 $>40^{\circ}\text{C}$ 에 노출되지 않는 반면, 더 희석된 재료는 60°C 까지의 온도를 견딜 수 있다.
- [0055] 증발을 사용하여, 수용성 추출물은 70% 고체, 예를 들어, 20% 고체 또는 50% 고체 또는 65% 고체까지 농축될 수 있다. 가장 바람직한 한 실시예에서, 최종 추출물은 단계(d)에 따른 농축 후 60–62% 고체를 포함한다.
- [0056] 온도의 효과는 갈색화 지수를 측정함으로써 정량화할 수 있다. 온도는 충분히 낮아서 최종 농축 생성물이 0.8AU를 초과하지 않아야 한다.
- [0057] 단계 (a), (b), (c) 이후 및 단계(d)에 따른 증발기를 사용하여 형성된 최종 농축액은 $<0.8\text{AU}$ 의 갈색화 지수, 4.0–4.3의 pH 및 1.15–1.20의 밀도를 갖는 것이 바람직하다.
- [0058] 막 처리를 사용하는 농축
- [0059] 선택적으로 막 내에 모든 다른 성분들 보유하면서 물이 막을 통과하게 하는 막 처리가 사용될 수 있다. 구체적인 기술들의 예는 역삼투 또는 나노여파이다. 둘 다는 수용성 추출물을 필요한 등급으로 농축하면서 저온($<40^{\circ}\text{C}$)에서 작동하는데 사용될 수 있다.
- [0060] 건조 기술
- [0061] 건조 기술은 수용성 추출물로부터 물을 제거하는데 사용될 수 있다. 적절한 건조 기술은 담체 재료(예를 들어, 감자 전분, 타피오카 전분, 말토덱스트란)와 함께 또는 없이 분사 건조; 담체 재료와 함께 또는 없이 진공 드럼 건조; 또는 담체 재료와 함께 또는 없이 롤러 건조를 포함한다.
- [0062] 저당 농산물 추출물의 제조
- [0063] 상기한 방법들은 수용성 추출물에 원래 존재하는 모든 원소들을 포함하는 농축액의 생산을 위해 설계되었다.
- [0064] 본 발명의 한 바람직한 실시예에서, 본 발명의 첫 번째 태양의 방법은 생체활성 성분들에서 풍부한(예를 들어, 25 – 35배) 농축액을 형성하는데 적합할 수 있다.
- [0065] 수용성 추출물 내에 생체활성 성분들의 농축은 이의 건조 물질 함량의 최대 부분을 형성하는 가용성 당을 제거함으로써 이루어질 수 있다.
- [0066] 저당 농산물 추출물은 상기 단계 (a), (b) 및 (c) 이후 및 최종 온도 단계((d) 상기) 이전에 방법들에 추가 단계를 사용하여 제조될 수 있다.
- [0067] 가용성 당의 제거는
- [0068] (1) 예를 들어, 90%의 최종 온도로 용액에 에탄올을 첨가하여 유리 글루코오스, 프록토오스 및 수크로오스의 침전을 형성할 침전;
- [0069] (2) 소화, 효소(예를 들어, 글루코오스 옥시다아제)에 의한 유리당의 부분 제거;
- [0070] (3) 미생물(박테리아 또는 효모) 처리; 또는
- [0071] (4) 추출물 성분들의 수지-매개 분리에 의해 수용성 추출물로부터 유리당의 제거에 의해 이루어질 수 있다.
- [0072] 유리당은 추출물 성분들((4) 상기)의 수지-매개 분리에 의해 수용성 추출물로부터 제거되는 것이 바람직하다. 본 발명자들은 식품 등급 수지(Amberlite FPX66)이 유리당, 유기산 및 염을 제외한 모든 추출물 성분을 흡수하는데 사용되는 방법을 개발하였다. 유리당, 유기산 및 염은 수지에 의해 흡수되지 않고 통과한 후 버려질 것이다. 아미노산, 생체활성 성분들 및 갈색화 반응의 생성물(마이야르 분해 생성물)을 포함하는 수지상에 흡수된 추출물 성분들은 에탄올 / 물 혼합물, 예를 들어, 50% 에탄올 또는 80% 에탄올에 의한 용리에 의해 수지로부터 회수된다. 에탄올은 감압하에서 증발(예를 들어, 폭발-방지 통상적인 증발기 또는 센트리텀 원심분리 농축기(Centritherm centrifugal concentrator) 또는 역삼투에 의해 결과로 얻은 용액으로부터 제거될 수 있다.
- [0073] 당의 제거 후 생성물의 농도는 상기 단계(d)에서 논의된 절차들을 사용하여 조절될 수 있다.
- [0074] 결과로 얻은 저당 추출물은 $<1\%$ 당 및 출발 믹스에 포함된 $>95\%$ 의 생체활성 성분들을 포함하는 농축 수용액이 바람직하다.
- [0075] 농산물 추출물

- [0076] 본 발명의 첫 번째 태양의 방법에 따라 제조된 추출물들은 혈소판 응집을 막는데 놀라운 효과를 가진 새로운 농산물 추출물들을 나타낸다.
- [0077] 따라서 본 발명의 두 번째 태양에 따라 본 발명의 첫 번째 태양의 방법에 따라 제조된 혈소판 응집을 억제할 수 있는 농산물 추출물이 제공된다.
- [0078] 본 발명의 두 번째 태양에 따른 추출물들은 부적절한 혈소판 응집을 특징으로 하는 질병 상태의 치료 및 특히 질병 상태의 성장을 예방하는데 사용될 수 있다. 본 발명자들은 본 발명의 추출물들은 특히
- [0079] (a) 당뇨병, 염증성장자병, 고지혈증과 같은 질환과 주로 관련이 있는 과응고 상태(hypercoagulable state) 또는 전혈전 상태(prothrombotic state)의 발생을 예방하거나 감소시키고
- [0080] (b) 죽상경화증(atherosclerosis)의 성장을 예방하거나 감소시키고
- [0081] (c) 관상동맥질환(예를 들어, 심근경색 및 뇌졸중)의 성장을 예방하고, 심근경색, 뇌졸중 또는 불안정협심증(unstable angina)을 앓고 있는 환자들에서 혈전색전증(thrombo-embolic disorders)을 추가로 예방하고
- [0082] (d) 혈관성형술(angioplasty) 및 우회 수술(bypass procedures) 이후 재협착(restenosis)의 성장을 예방하고
- [0083] (e) 혈전용해 치료와 함께 심근경색과 같은 혈전색전증으로부터 발생한 관상동맥질환을 치료하고
- [0084] (f) 심부정맥 혈전증(deep vein thrombosis)의 위험을 예방하거나 감소시키고
- [0085] (g) 좋은 순환계 건강을 유지하는 순환에 유익하고
- [0086] (h) 심혈관계에서 건강한 혈류를 유지하는데 유용하다는 것을 입증하였다.
- [0087] 본 발명의 추출물들은 혈소판 응집을 감소시켜 심혈관 및 심장 건강을 유지하고, 순환을 이롭게 하고 및/또는 혈류를 정상화 또는 이롭게 하기 위한 (예를 들어, 상기 (g) 및 (h)에 약술) 일반적인 건강 이익을 가질 것이다.
- [0088] 또한 추출물들의 이런 사용은 매우 유리해서, 본 발명은 환자의 혈류를 정상화 또는 이롭게 하기 위한 의약으로 사용하기 위해 본 발명의 방법에 따라 제조된 농산물 추출물을 추가로 제공한다. 본 발명은 또한 글리코실화 폐놀산 또는 폐놀 에스터 또는 이의 유도체; 글리코실화 플라보노이드; 및 환자의 혈류를 정상화 또는 이익을 주기 위한 의약으로 사용하기 위한 뉴클로오시드를 포함하는 농산물 추출물을 제공한다.
- [0089] 본 발명의 추출물들을 포함하는 조성물들은 약학적 제품으로 유용할 것이나 유익한 기능성 식품 또는 "건강기능식품"을 나타낼 것이다. 따라서 조성물들의 바람직한 용도는 의약 및 기능성 식품 또는 음료이다(아래 약술).
- [0090] 본 발명의 바람직한 농산물 추출물들은 익은 (즉, 적색) 토마토로부터의 수성 추출물들이고 수용성이다.
- [0091] 본 명세서에 사용된 대로 "수용성"이란 용어는 토마토 추출물들이 실온, 예를 들어, 25°C에서 가용성이라는 것을 의미한다. 추출물들은 훨씬 낮은 온도, 예를 들어, 4°C의 온도에서 수용성인 것으로 발견되었다.
- [0092] 추출물들은 리코펜이 없거나 무시해도 좋은 농도의 리코펜을 포함한다. 예를 들어, 추출물들은 0.5중량%(건중량) 미만의 리코펜, 예를 들어, 0.1중량%(건중량) 미만 또는 0.05중량% 미만 또는 0.01중량% 미만 또는 0.005중량% 미만 또는 0.001중량% 미만 또는 0.0005중량% 미만 또는 0.0001중량% 미만의 리코펜을 포함한다.
- [0093] 추출물들은 수용성 미립자 재료가 실질적으로 없다. 따라서, 예를 들어, 추출물들은 0.5중량%(건중량) 미만의 수-불용성 미립자 재료, 예를 들어, 0.1중량%(건중량) 미만 또는 0.05중량% 미만 또는 0.01중량% 미만 또는 0.005중량% 미만 또는 0.001중량% 미만 또는 0.0005중량% 미만 또는 0.0001중량% 미만의 수-불용성 미립자 재료를 포함한다. 한 실시예에서, 추출물들은 수-불용성 미립자 재료를 포함하지 않는다.
- [0094] 본 명세서에서 사용된 "활성 부분"이란 용어는 토마토 추출물로부터 분리된 부분을 의미하고, 이 부분은 혈소판 응집을 감소시킬 수 있는 능력을 가진다.
- [0095] 본 발명자들의 연구(실시예 1 참조)는 농산물 추출물들은 제조될 수 있고 여기에 여러 생체활성 물질이 부적절한 혈소판 응집을 특징으로 하는 의학적 질환을 예방하거나 치료하는데 사용될 추출물에 풍부하거나 유지된다는 것을 입증하였다. 본 발명의 첫 번째 태양의 방법은 이런 생체활성을 유지하기 위해 개발되었다. 본 발명자들은 본 발명에 따라 제조된 추출물들은 다음을 포함하는 여러 생체활성 분자들을 포함한다:

[0096] (A) 본 발명의 추출물에 생체활성 페놀 화합물

[0097] 본 발명자들은 페놀 및 이의 유도체를 기초로 한 여러 분자들은 농산물 내에 포함되고 혈소판 응집을 막는 효능을 가진다는 것을 입증하였다(실시예 1 참조).

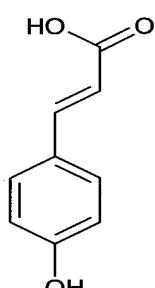
[0098] 특히 신남산 및 이의 유도체는 혈소판 응집을 억제하는데 특히 효과적인 것으로 발견하였다. 따라서 본 발명의 첫 번째 태양의 방법들은 추출물이 화학식 I에 의해 정의된 신남산 또는 이의 유도체를 포함한다:



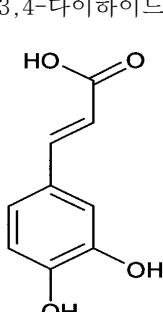
[0099] 화학식 I에서, R1 및 R2 및 R3는 H, OH 및 OMe로부터 독립적으로 선택될 수 있다.

[0100] 이 화합물은 자체가 신남산(화학식 I의 R1 및 R2 및 R3는 H이다)일 수 있거나 다음을 포함하는 여러 유도체들 중 임의의 하나일 수 있다:

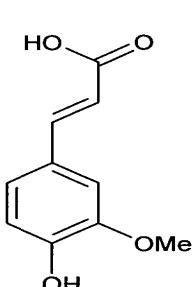
[0101] 4-하이드록시신남산(p-쿠마르산)



[0102] 3,4-다이하이드록시신남산(카페인산)

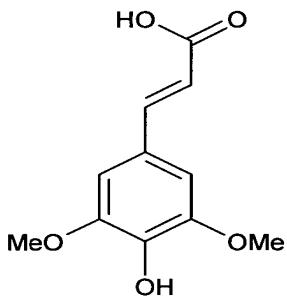


[0103] 4-하이드록시-3-메톡시신남산(페룰산)



[0104]

[0108] 4-하이드록시-3,5-다이메톡시신남산(시나피산)



[0109]

[0110] 본 발명자들은 또한 혈소판 응집을 억제하는데 효과적인 농산물 추출물들에서 식물 폐놀 유도체, 벤조산 및 이의 유도체의 다른 종류를 확인하였다. 따라서, 본 발명의 첫 번째 태양의 방법들은 추출물이 화학식 II에 의해 정의된 벤조산 또는 이의 유도체를 포함하도록 조절될 수 있다:



[0111]

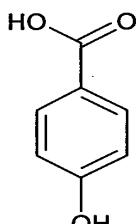
[0112] 화학식 II에서, R1 및 R2 및 R3는 이전에 정의한 것이다.

[0113]

[0113] 따라서 본 발명의 두 번째 태양에 따른 바람직한 추출물들은 자체로 벤조산(R1 및 R2 및 R3의 각각은 H이다)을 포함하거나 예를 들어 여러 유도체 중 임의의 하나이다:

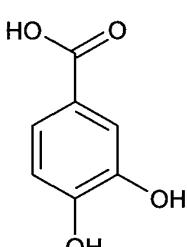
[0114]

4-하이드록시벤조산(p-하이드록시벤조산)



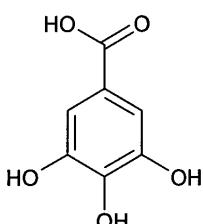
[0115]

[0116] 3,4-다이하이드록시벤조산(프로테카테쿠산(Protocatechuic acid))



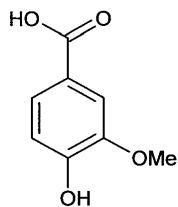
[0117]

[0118] 3,4,5-트라이하이드록시벤조산(갈산)

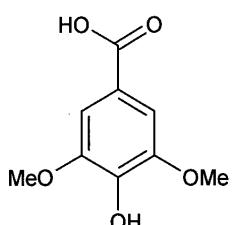


[0119]

[0120] 4-하이드록시-3-메톡시벤조산(바닐산(vanillic acid))



[0121] 4-하이드록시-3,5-다이메톡시벤조산(시린지산(syringic acid))



[0124] 본 발명자들이 농산물 추출물들로 연구하는 동안 이들은 카복실산기에 있는 에스터 결합을 통해 다른 분자들과 컨쥬케이트되어 카복실 에스터를 형성하거나 페놀 하이드록실 치환기에서 에터 결합을 통해 글리코시드를 형성하는 페놀 생체활성물질들은 혈소판 응집을 감소시키는데 특히 효과적이고 따라서 다양한 심혈관 질환의 성장을 치료하거나 예방하는데 유용하다는 것을 놀랍게도 발견하였다. 따라서, 본 발명의 첫 번째 태양의 방법은 추출물이 다른 분자들과 컨쥬케이트된 페놀 생체활성물질을 포함하도록 설계되었다.

[0125] 생체활성물질들은 당과 컨쥬케이트되어 글리코시드를 형성하는 것이 바람직하다. 본 발명자들은 여러 다른 생체 활성 글리코시드가 추출물들 내에 포함되어 있다는 것을 발견하였다. 따라서, "글리코시드"라는 용어에 의해, 생체활성물질에 컨쥬케이트된 적어도 하나의 헥소스 또는 펜토스 당 잔기를 의미하고; 바람직하게는 1-5 및 더욱 바람직하게는 1-3 모노사카라이드 단위가 생체활성 화합물에 있는 OH기에 반응에 의해 첨가된다. 글루코시드, 갈락토오스 또는 아라비노스 및 이런 당들의 다이-/트라이-사카라이드가 페놀산 유도체 글리코시드를 형성하기 위해 생체활성 화합물에 가장 바람직하게 첨가된다.

[0126] 선택적으로 생체활성 화합물들은 식물들에서 발견된 여러 화합물들(예를 들어, 타르타르산, 퀴닌산)과 컨쥬케이트되어 에스터를 형성한다. 이런 화합물들은 타르타르산과 같은 열린 사슬 화합물들 또는 퀴닌산과 같은 이형고리 화합물들일 수 있고 식물들에서 탄수화물 결로로부터 유도될 수 있다. 타르타르산 또는 퀴닌산은 화합물에 가장 바람직하게 첨가되어 페놀 에스터 유도체들을 형성한다.

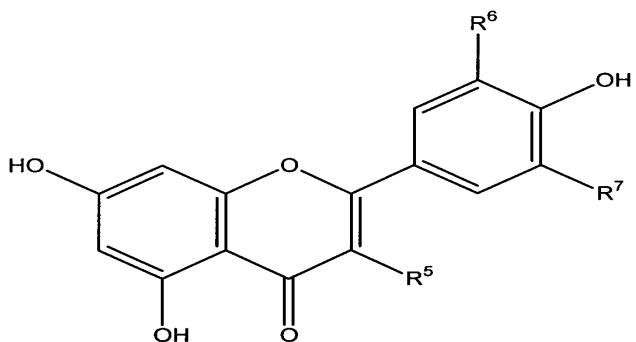
[0127] 본 발명의 방법은 추출물을 풍부하게 하여 추출물이 카페인산 3-0-글리코시드, 카페인산 4-0-글리코시드, 페롤산 4-0-글리코시드, p-쿠마르산 4-0-글리코시드를 포함하는 그룹으로부터 선택된 글리코시드 또는 카페오일퀴닌산(예를 들어, 3-0-카페오일퀴닌산, 4-0-카페오일퀴닌산 또는 5-0-카페오일퀴닌산), 페롤오일퀴닌산, p-쿠마로일퀴닌산, 카페오일타르타르산, 페롤오일타르타르산, p-쿠마로알타르타르산, 퀴닌산 유도체들의 다이머를 포함하는 그룹으로부터 선택된 에스터화 유도체를 포함하는 것이 바람직하다.

[0128] 따라서 본 발명의 두 번째 태양에 따른 추출물은 상기한 화합물들로부터 선택된 신남산의 적어도 하나의 글리코시드 또는 이의 유도체를 포함할 수 있고 상기한 화합물들로부터 선택된 벤조산의 적어도 하나의 글리코시드 또는 이의 유도체를 포함할 수 있다.

(B) 본 발명의 추출물에서 생체활성 플라보노이드 화합물들

[0129] 본 발명자들은 혈소판 응집의 최적 억제는 플라보노이드 또는 이의 유도체를 포함하는 추출물들에서 이루어진다는 것을 입증하였다.

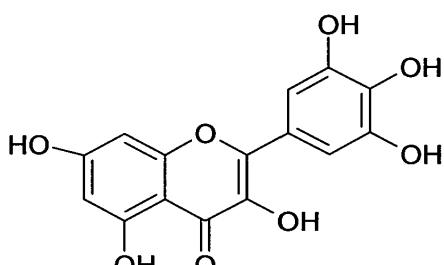
[0131] 추출물은 화학식(III)의 플라보이드를 포함하는 것이 바람직하다:



[0132]

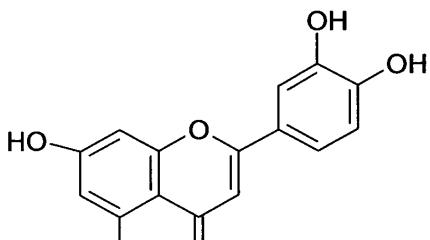
[0133] 여기서 R5, R6 및 R7은 독립적으로 H, OH이다.

[0134] 바람직하게는 추출물은 다음 플라보노이드들 중 하나를 포함한다:



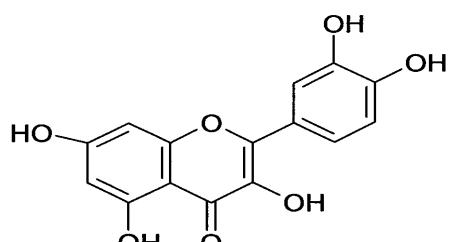
[0135]

메리세틴



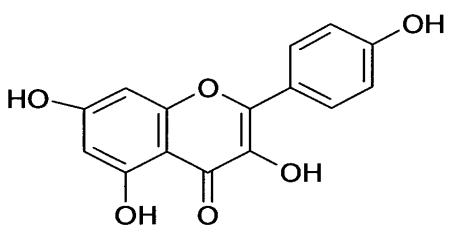
[0136]

루테올린



[0137]

쿠에르세틴



[0138]

카эм프페롤

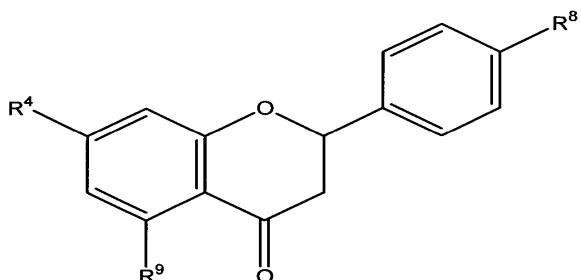
[0139] 추출물이 쿠에르세틴 또는 카эм프페롤 또는 이의 유도체를 포함하는 것이 가장 바람직하다.

[0140]

본 발명자들은 다른 분자들과 컨쥬게이트되는 생체활성 플라보노이드들은 혈소판 응집을 감소시키는데 특히 효과적이라는 것을 입증하였다. 따라서, 본 발명의 가장 바람직한 실시예에서, 추출물은 위에서 정의한 대로 (즉, 당, 타르타르산, 퀴닌산 등에) 컨쥬게이트된 플라보노이드 화합물들을 포함한다.

[0141]

나린제닌 및 이의 유도체는 본 발명자들이 발견한 본 발명의 두 번째 태양에 따른 추출물들에서 발견된 플라보노이드의 다른 형태는 혈소판 응집을 억제하는 활성을 가진다는 것을 나타낸다. 따라서 추출물은 화학식 IV의 분자들을 포함할 수 있다.

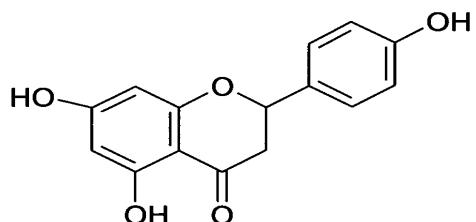


[0142]

R4, R8 및 R9는 이미 정의한 것이다.

[0143]

추출물 내에 포함된 화학식 IV에 의해 정의된 바람직한 화합물은 나린제닌이다.



[0145]

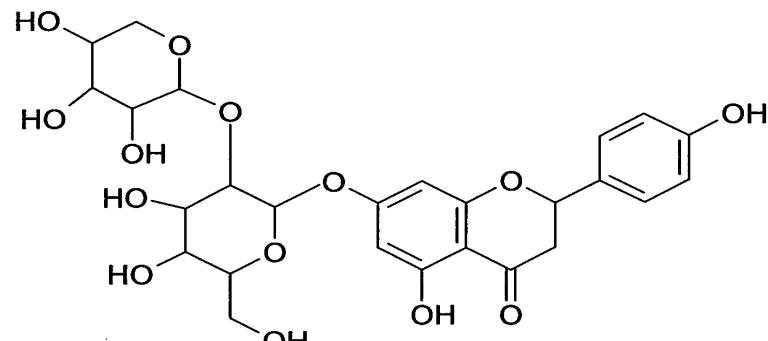
나린제닌

[0146]

본 발명자들은 다른 분자들과 컨쥬게이트되는 화학식(IV)의 화합물들은 혈소판 응집을 감소시키는데 특히 효과적인 것을 입증하였다. 따라서, 본 발명의 가장 바람직한 실시예에서, 추출물은 위에서 정의한 대로 (즉, 당, 타르타르산, 퀴닌산 등에) 컨쥬게이트된 플라보노이드 화합물들을 포함한다.

[0147]

본 발명의 추출물들에서 발견된 가장 바람직한 글리코실화된 플라보노이드 화합물은 나린진이다.



[0148]

나린진

[0149]

본 발명자들은 바람직한 추출물들은 서로 컨쥬게이트되는 상기한 폐놀 및 플라보노이드 생체활성 화합물들을 포함할 수 있다는 것을 발견하였다. 예를 들어, 카페인산 4-0-루티노시드는 항-혈소판 응집 특성들을 가진 분자이며 글리코시드 결합은 카페인산과 (쿠에르세틴을 포함하는) 루틴에 있는 당 잔기 사이에 이루어진다.

[0150]

(c) 뉴클레오시드/뉴클레오티드

[0151]

WO 99/55350에서 고려한 대로, 항-혈소판 활성을 가진 농산물 추출물들은 뉴클레오시드를 더 포함할 수 있다. 추출물은 아데노신 5'-모노포스페이트, 시티딘, 우리딘, 아데노신, 이노신, 구아노신 및 구아노신 5'-모노포스페이트로부터 선택된 적어도 하나의 뉴클레오시드를 포함할 수 있다.

[0152]

본 발명자들은 토마토 추출물들의 다른 부분에서 여러 생체활성 화합물들을 확인하였다는 것을 알게 될 것이다. 이들은 농산물 추출물들을 제조하기 위한 방법을 적합하게 할 수 있어서 이들이 확인한 활성 화합물들은 이런 농산물 추출물들에 유지 및/또는 풍부하였다.

[0153]

본 발명의 세 번째 태양에 따라 다음을 포함하는 농산물 추출물이 제공된다:

(a) 글리코시드화 폐놀산 또는 폐놀 에스터 또는 이의 유도체;

(b) 글리코시드화 플라보노이드; 및

(c) 뉴클레오시드.

- [0157] (a) 글리코시드화 페놀산은 글리코시드화 신남산 또는 이의 유도체가 바람직하다. 추출물은 카페오일-4-O-퀴닌산, 카페오일-4-O-글루코시드, 쿠마로일-4-O-글리코시드(gluc / gal) 또는 쿠마로일-4-글리코시드(다이사카라이드) 중 적어도 하나를 포함하는 것이 가장 바람직하다. 추출물은 이런 글리코시드들의 하나, 둘, 셋 또는 각각을 포함할 수 있다. 본 발명의 한 바람직한 실시예에서, 본 발명의 세 번째 태양에 따른 농산물 추출물은 상기한 대로 글리코시드화 신남산 또는 이의 유도체 및 벤조산 또는 이의 유도체를 포함한다.
- [0158] 추출물이 카페인산 글루코시드; 및/또는 p-쿠마르산 혼소스 / 다이하이드로카엠프페롤 혼소스; 및/또는 페룰산 글리코시드; 및/또는 p-쿠마르산 유도체를 포함하는 것이 가장 바람직하다.
- [0159] (b) 글리코시드화 플라보노이드는 나린진, 퀴에르세틴-3-O-글루코시드 또는 루틴이 바람직하다. 추출물은 이런 글리코시드들의 하나, 둘 또는 각각을 포함할 수 있다. 생체활성물질은 루틴이 가장 바람직하다.
- [0160] (c) 뉴클레오시드는 AMP, 우리딘, 아데노신, 구아노신 또는 GMP 중 임의의 하나일 수 있다. 추출물은 이런 뉴클레오시드들의 하나, 둘, 셋, 넷 또는 각각을 포함할 수 있다. 뉴클레오시드는 구아노신 및/또는 아데노신 3'-모노 포스페이트가 바람직하다.
- [0161] 본 발명의 세 번째 태양에 따른 농산물 추출물은 토마티딘과 같은 스테로이드성 글리코시드를 선택적으로 포함할 수 있다.
- [0162] 농산물 추출물들은 지방 또는 카르티노이드를 포함하지 않는 것이 바람직하다.
- [0163] 본 발명의 방법에 따라 농산물 특히 토마토로부터 제조될 수 있는 두 바람직한 추출물들은 특정 농도(mg/g)로 다음 생체활성 화합물들을 포함하는 것을 발견하였다:
- [0164] (1) 실시예 2에 개시된 방법에 따라 제조된 바람직한 추출물은 다음을 포함한다:
- [0165] (a) 다음 글리코시드화 페놀산 또는 페놀 에스터:
- [0166] 카페인산 글루코시드(0.01 ~ 1mg/g);
- [0167] p-쿠마르산 혼소스 / 다이하이드로카엠프페롤 혼소스 혼합물(0.05 ~ 2.5mg/g)
- [0168] 페룰산 글리코시드(0.025 ~ 5mg/g); 및
- [0169] p-쿠마르산 유도체(0.01 ~ 1mg/g).
- [0170] (b) 글리코시드화 플라보노이드: 루틴(0.01 ~ 1mg/g).
- [0171] (c) 다음 뉴클레오시드 / 뉴클레오티드:
- [0172] 구아노신(0.1 ~ 5mg/ml); 및
- [0173] 아데노신 3'-모노포스페이트(0.5 ~ 25mg/ml)
- [0174] (2) 실시예 3에 개시된 방법에 따라 제조된 바람직한 저당 추출물은 다음을 포함한다:
- [0175] (a) 다음 글리코시드화 페놀산 또는 페놀 에스터:
- [0176] 카페인산 글루코시드(1 ~ 25mg/g);
- [0177] p-쿠마르산 혼소스 / 다이하이드로카엠프페롤 혼소스 혼합물(5 ~ 100mg/g)
- [0178] 페룰산 글리코시드(25 ~ 300mg/g); 및
- [0179] p-쿠마르산 유도체(1 ~ 25mg/g).
- [0180] (b) 글리코시드화 플라보노이드: 루틴(1 ~ 25mg/g).
- [0181] (c) 다음 뉴클레오시드 / 뉴클레오티드:
- [0182] 구아노신(1 ~ 50mg/g); 및
- [0183] 아데노신 3'-모노포스페이트(1 ~ 50mg/g).
- [0184] 본 발명의 두 번째 또는 세 번째 태양을 구현하는 두 구체적인 토마토 추출물은 표 1에서 확인된다. 표 1은 분리되어 평가되었고(실시예 1 참조) 최대 항-헬소판 활성을 가진 것으로 발견된 16개 화합물(3열 및 ID No는 2열

에 제공된다)을 확인한다. 따라서 본 발명의 두 번째 또는 세 번째 태양에 따른 추출물들은 16개 생체활성 화합물의 각각을 포함하는 것이 바람직하다. 본 발명의 첫 번째 태양의 방법은 농산물 추출물에 있는 이런 화합물들의 활성을 최적화하도록 설계되는 것이 바람직하는 것을 알 것이다.

[0185] 표 1은 또한 실시예 2 및 3에서 명시한 방법에 따라 제조된 추출물들에서 발견된 각각의 생체활성 화합물의 범위(mg/g 습량)를 확인한다. 평균 농도(mg/g)가 도시된다. 본 발명의 두 번째 또는 세 번째 태양에 따른 가장 바람직한 추출물들은 이런 구체적인 범위로 생체활성 화합물들을 포함한다.

표 1

화합물 형태로 분류한 토마토 추출물에 있는 항 혈소판 화합물들

생체활성물 질의 형태	화합물 ID	생체활성 화합물	실시예 2의 방법에 따라 제조된 바람직한 추출물			실시예 3의 방법에 따라 제조된 바람직한 저당 추출물		
			하위 범위 mg/g	상위 범위 mg/g	평균 mg/g	하위 범위 mg/g	상위 범위 mg/g	평균 mg/g
뉴클레오티드	2	아데노신	0.382	2.440	2.033	1.800	2.927	2.439
	4	구아노신	0.400	1.759	1.466	6.970	19.354	16.128
	5	아데노신 3'-모노포스페이트	1.132	11.491	9.576	6.421	16.087	13.406
	6	아데노신 5'-모노포스페이트						
페놀 글리코시드	8	p-쿠마르산 헥소스 / 퀴닌산 유도체	0.050	0.456	0.380	9.418	11.867	9.889
	9	카페인산 글리코시드	0.069	0.477	0.398	3.736	13.402	11.168
	10	페룰산 헥소스	0.028	0.048	0.040	0.706	1.340	1.117
	11	p-쿠마르산 헥소스 / 다이하이드로카엠프페롤 헥소스 혼합물	0.277	0.997	0.831	26.121	40.288	33.573
	12	p-쿠마르산 / 카페인산 칸쥬게이트, 글리코실화	0.170	1.419	1.182	90.872	131.722	109.768
	13	페룰산 글리코시드	0.155	1.199	0.999	85.333	199.679	166.399
	14	클로로젠판	0.131	0.953	0.794	18.274	43.366	36.138
페놀 에스터 유도체	15	p-쿠마르산 유도체	0.105	0.332	0.277	8.620	16.584	13.820
플라보노이드 글리코시드	23	쿠에르세틴-3-0-글리코시드	0.050	0.324	0.270	8.463	13.257	11.048
	25	쿠에르세틴-3-0-트라이사카라이드	0.157	0.610	0.508	14.679	24.799	20.666
	26	나린진	0.739	2.103	1.753	38.016	61.709	51.424
	27	루틴	0.583	2.804	2.337	50.688	106.147	88.456

[0187] 토마토 추출물에 포함된 생체활성 화합물들의 상세한 분석에 따라 본 발명자들은 추가 16개 화합물을 항-응집 활성을 가졌다는 결론을 내렸다. 따라서 본 발명의 두 번째 또는 세 번째 태양에 따른 가장 바람직한 추출물은 표 2에 나타낸 32개 생체활성 화합물을 포함한다는 것을 인식하였다.

표 2

32개 생체활성 화합물을 포함하는 가장 바람직한 추출물

그룹	화합물 ID	생체활성 화합물	실시예 2의 방법에 따라 제조된 바람직한 추출물			실시예 3의 방법에 따라 제조된 바람직한 저당 추출물		
			하위 범위 mg/g	상위 범위 mg/g	평균 mg/g	하위 범위 mg/g	상위 범위 mg/g	평균 mg/g
뉴클레오티드	1	시티딘	0.487	2.051	1.709	21.971	36.911	30.759
	2	아데노신	0.382	2.440	2.033	1.800	2.927	2.439
	3	우리딘	0.414	2.089	1.741	21.917	31.340	26.117
	4	구아노신	0.400	1.759	1.466	6.970	19.354	16.128

뉴클레오티드	5	아데노신 3'-모노포스페이트	1.132	11.491	9.576	6.421	16.087	13.406
	6	아데노신 5'-모노포스페이트						
페놀산 글리코시드	7	혼합 페놀산 글리코시드	0.352	0.956	0.796	20.982	145.537	121.281
	8	p--쿠마르산 헥소스 / 퀴닌산 유도체	0.050	0.456	0.380	9.418	11.867	9.889
	9	카페인산 글리코시드	0.069	0.477	0.398	3.736	13.402	11.168
	10	페롤산 헥소스	0.028	0.048	0.040	0.706	1.340	1.117
	11	p-쿠마르산 헥소스 / 다이하이드로카엠프페롤 헥소스 혼합물	0.277	0.997	0.831	26.121	40.288	33.573
	12	p-쿠마르산 / 카페인산 컨쥬게이트, 글리코실화	0.170	1.419	1.182	90.872	131.722	109.768
	13	페롤산 글리코시드	0.155	1.199	0.999	85.333	199.679	166.399
	14	클로로젠판	0.131	0.953	0.794	18.274	43.366	36.138
페놀 에스터 유도체	15	p-쿠마르산 유도체	0.105	0.332	0.277	8.620	16.584	13.820
	16	카페오일-퀴닌산 다이머 #1	0.066	0.701	0.584	13.850	85.176	70.980
	17	카페오일-퀴닌산 다이머 #2	0.142	0.701	0.584	12.672	22.731	18.943
페놀산	18	카페인산	0.058	0.873	0.727	5.842	9.042	7.535
	19	p-쿠마르산	0.046	0.488	0.407	11.403	27.568	22.974
	20	벤조산	0.006	0.077	0.064	0.959	1.554	1.295
	21	페롤산	0.016	0.140	0.117	0.584	1.113	0.927
	22	신남산	0.028	0.084	0.070	1.966	6.896	5.747
플라보노이드 글리코시드	23	쿠에르세틴-3-0-글리코시드	0.050	0.324	0.270	8.463	13.257	11.048
	24	카엠페롤 글리코시드	0.008	0.049	0.041	1.269	5.277	4.398
	25	쿠에르세틴-3-0-트라이사카라이드	0.157	0.610	0.508	14.679	24.799	20.666
	26	나린진	0.739	2.103	1.753	38.016	61.709	51.424
	27	루틴	0.583	2.804	2.337	50.688	106.147	88.456
플라보노이드 에스터 유도체	28	플라보노이드 컨쥬게이트	0.004	0.032	0.027	0.846	1.733	1.444
	29	소량 플라보노이드 + 글리코시드	1.253	3.900	3.250	90.660	319.469	266.224
플라보노이드	30	쿠에르세틴	0.014	0.130	0.108	3.787	20.578	17.149
	31	카엠페롤	0.039	0.180	0.150	3.49	8.230	6.858
	32	나린제닌	소량	1.540	소량	25.600	소량	소량

[0189] 본 발명의 세 번째 태양에 따른 바람직한 추출물을 실시예 1(1.1.3)에서 언급한 대로 부분 1, 부분 2 및 부분 3의 재조합을 포함하여 재조합 추출물을 형성한다. 본 발명자들은 이런 재조합 추출물은 상기한 생체활성물질에 풍부하고 혈소판 응집을 억제하는데 놀랍게 향상된 효과를 가진다는 것을 발견하였다.

농산물 추출물을 포함하는 약학적 제제 및 건강기능식품 제제

[0190] 본 발명의 농산물 추출물들은 경구 투여를 위해 제제화될 수 있다. 이와 같이, 농산물 추출물들은 예를 들어 용액, 혼탁액, 시럽, 정제, 캡슐, 약용박하드롭스 및 스낵바, 삽입물 및 패치로 제제화될 수 있다. 이런 제제는 당업계에 주지된 방법들에 따라 제조될 수 있다.

[0192] 예를 들어, 추출물은 시럽 또는 건강음료로서 경구로 투여하기 위한 다른 용액으로 형성될 수 있다. 당, 비타민, 향료, 착색제, 방부제 및 점증제로부터 선택된 하나 이상의 부형제가 이런 시럽 또는 용액에 포함될 수 있다. 염화나트륨 또는 당과 같은 긴장조절제는 특정 삼투압의 용액, 예를 들어 등장액을 제공하기 위해 첨가될 수 있다. 완충제와 같은 하나 이상의 pH-조절제가 pH를 특정 값으로 조절하고 바람직하게는 그 값으로 유지하기 위해 사용될 수 있다. 완충제의 예들은 시트르산 나트륨/시트르산 완충제 및 인산염 완충제를 포함한다.

[0193] 선택적으로, 추출물은 (예를 들어, 분사 건조 또는 동결 건조에 의해) 건조될 수 있고 건조된 생성물은 정제, 약용박하드롭스, 캡슐, 분말, 과립 또는 젤로서 고체 또는 반고체 제형으로 제제화되었다.

- [0194] 추출물들을 포함하는 조성물들은 어떠한 추가 성분 없이 제조될 수 있다. 선택적으로, 조성물들은 수크로오스, 락토오스, 글루코오스, 프룩토오스, 만노스와 같은 당 또는 자일리톨, 소르비톨 또는 만니톨과 같은 당 알콜; 또는 셀룰로오스 유도체와 같은 고체 지지체 상에 흡착시켜 제조될 수 있다. 다른 특히 유용한 흡수제들은 밀가루와 옥수수 가루와 같은 곡류 가루와 같은 전분 계 흡착제를 포함한다.
- [0195] 정제 형성을 위해서, 추출물은, 예를 들어, 수크로오스와 락토오스와 같은 당 및 자일리톨, 소르비톨 및 만니톨과 같은 당 알콜; 또는 분말 셀룰로오스 또는 미세결정 셀룰로오스 또는 카복시메틸 셀룰로오스와 같은 변형 셀룰로오스 또는 셀룰로오스 유도체와 같은 희석제와 통상적으로 혼합될 수 있다. 정제들은 과립제, 접합제, 윤활제 및 분해제로부터 선택된 하나 이상의 부형제를 통상적으로 포함할 수 있다. 분해제들의 예는 전분과 전분 유도체, 및 가교 카복시메틸셀룰로오스, 가교폴리바이닐파롤리돈 및 글리콜산 전분과 같은 가교 폴리머 분해제와 같은 다른 팽창성 폴리머를 포함한다. 윤활제들의 예는 스테아르산 마그네슘과 스테아르산과 같은 스테아르산염을 포함한다. 접합제와 과립제의 예들은 폴리바이닐파롤리돈을 포함한다. 희석제가 자연적으로 매우 달콤하지 않은 경우, 글리시지산 암모늄(ammonium glycyrrhizinate) 또는 아스파탐과 같은 스위트너 또는 사카린산 나트륨과 같은 인공 스위트너가 첨가될 수 있다.
- [0196] 추출물들은 캡슐에 포함하기 위해 분말, 과립 또는 반고체로 제제화될 수 있다. 분말 형태로 사용될 때, 추출물들은 정제에 관해 상기한 부형제들의 임의의 하나 이상과 함께 제제화될 수 있거나 희석되지 않은 형태로 제공될 수 있다. 반고체의 형태로 제공하기 위해서, 건조된 추출물들은 점성 액체 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 반고체 운반체 또는 글리콜, 예를 들어, 프로필렌 글리콜 또는 글리세롤과 같은 액체 담체 또는 올리브 오일, 해바라기 오일, 잇꽃 오일, 달맞이 꽃 종자 오일, 대두 오일, 대구간 오일, 청어 오일 등과 같은 식물 또는 생선 오일에 용해 또는 혼탁될 수 있다. 이런 추출물들은 경질 젤라틴 또는 연질 젤라틴 형태의 캡슐 속에 채워질 수 있거나 또는 경질 또는 연질 젤라틴 등가물로 제조될 수 있고, 연질 젤라틴 또는 젤라틴-등가 캡슐은 점성 액체 또는 반고체 충전제에 대해 바람직하다.
- [0197] 본 발명에 따른 추출물들은 농산물 바, 너트 바 및 곡류 바와 같은 스낵 식품 바 속에 포함시키기 위해 분말 형태로 제공될 수 있다. 스낵 식품 바의 형태로 제공하기 위해서, 추출물들은 태양-건조 토마토, 건포도 및 씨 없는 건포도, 땅콩 또는 귀리와 밀과 같은 곡류와 같은 건조된 농산물로부터 선택된 임의의 하나 이상의 성분들과 미리 혼합될 수 있다.
- [0198] 본 발명에 따른 추출물들은 용액으로 재구성하기 위해 분말 형태로 제공될 수 있다. 이와 같이 추출물들은 당, 시트르산염과 인산염 완충제와 같은 완충제 및 중탄산나트륨 또는 중탄산암모늄과 같은 중탄산염과 같은 탄산염으로 형성된 벌포제(effervescent agent) 및 시트르산 또는 시트르산염과 같은 고체 산과 같은 가용성 부형제를 포함할 수 있다.
- [0199] 한 바람직한 실시예에서, 본 발명에 따른 추출물은, 예를 들어, 경질 젤라틴 캡슐과 같은 캡슐 속에 포함시키기 위한 바람직한 고체(예를 들어, 분말) 부형제와 함께 선택적으로 분말 형태로 제공된다.
- [0200] 본 발명의 고체 또는 반고체 제형은 조성물의 약 1000mg까지, 예를 들어, 약 800mg까지 포함할 수 있다.
- [0201] 추출물은 식품 보충제 또는 식품 첨가제로 제공될 수 있거나 기능성 식품 또는 건강기능식품과 같은 식품 속에 포함될 수 있다.
- [0202] 본 발명의 추출물은 혈소판 응집을 억제하는 활성을 가진 화합물들의 설정된 농도를 포함하는 단위 제형의 형태로 제공될 수 있다. 이런 단위 제형은 생물학적 활성의 원하는 수준을 얻도록 선택될 수 있다. 예를 들어, 단위 제형은 본 발명에 따른 조성물의 1000mg(건량)까지, 더욱 통상적으로 800mg까지, 예를 들어, 50mg 내지 800mg, 예를 들어, 100mg 내지 500mg의 양을 포함할 수 있다. 단위 제형에 포함될 수 있는 조성물의 구체적인 양은 50mg, 100mg, 150mg, 200mg, 250mg, 300mg, 350mg, 400mg, 450mg, 550mg, 600mg, 650mg, 700mg, 750mg 및 800mg으로부터 선택될 수 있다.
- [0203] 본 발명의 추출물들은 투여 지시사항과 함께 용기, 팩 또는 디스펜서에 포함될 수 있다.
- [0204] 본 발명에 따른 추출물을 포함하는 바람직한 제품들은 실시예 5에 정의된다.
- [0205] **복용량**
- [0206] 고려하는 질병 및 질환의 치료를 위해서, 하루당 환자에게 투여된 본 발명에 따른 추출물의 양은 치료중인 특정 질환 또는 질병 및 이의 심각성에 의존할 것이고 궁극적으로 의사의 판단에 의할 것이다. 그러나 투여된 양은

통상적으로 당해 질환을 치료하는데 효과적인 비-독성 양일 것이다.

[0207] 당을 포함하는 조성물의 경우, 본 발명의 방법에 따라 제조된 농산물 추출물의 권장 일일 복용량은 0.5g 내지 20g이고 더욱 바람직하게는 2g 내지 7g이다. 일일 복용량은 3g일 수 있다. 저당 조성물(상기 참조)의 경우, 권장 일일 복용량은 10mg 내지 500mg일 수 있고 약 85mg 내지 약 150mg이 더욱 바람직하다.

[0208] 심혈관 질환을 앓고 있는 사람 환자에 대한 통상적인 일일 복용량 범위는 kg 체중당 농산물 당을 포함하는 추출물의 약 70mg 내지 285mg, 바람직하게는 약 25mg 내지 100mg일 수 있고 kg 체중당 저당 추출물의 약 1mg 및 2.25mg 내지 100mg일 수 있다.

[0209] 추출물은 일일 1 내지 4회, 바람직하게는 일일 2회와 같이 하루당 1회 또는 수회 복용 단위로 투여될 수 있다. 추출물은 1회 일일 복용량으로 제공되는 것이 가장 바람직하다.

[0210] 추출물들은 토마토 주스 또는 이의 농축액의 형태로 투여될 수 있거나 오렌지 주스와 같은 다른 과일 주스와 혼합해서 투여될 수 있다.

치료 효과의 증거

[0212] 유익한 치료 효과를 제공하는 본 발명의 추출물들을 포함하는 조성물들의 능력은 여러 다른 변수들을 참조하여 평가할 수 있다. 아래 실시예는 혈소판 응집 또는 1차 지혈(primary haemostasis)의 평가를 위한 적절한 프로토콜의 상세 내용을 제공하며, 혈소판 응집 또는 1차 지혈의 각각은 치료 효과를 평가하기 위해 조사될 수 있다. 실시예들에 개시된 PFA-100® 혈소판 기능 분석기는 1차 지혈의 평가를 위한 비교적 새로운 장치이나 잘 입증되었다(예를 들어, "The platelet-function analyzer (PFA-100®) for evaluating primary hemostasis" by M. Franchini Hematology, Volume 10, Issue 3 June 2005 , pages 177 - 181 참조).

[0213] 이런 목적을 위해 평가될 수 있는 다른 변수들은 혈액 유동성과 혈류를 포함하며, 혈액 유동성 또는 혈류의 증가는 일반적으로 치료적으로 유효한 효과를 나타내는 증거일 것이다.

혈액 유동성 측정 방법

[0215] 혈액 유동성의 직접 측정은 모세혈관을 모방한 Arkray로부터 구입할 수 있는 MC-FAN HR300과 같은 마이크로 채널 어레이 혈류 분석기(MC-FAN)를 사용하여 이루어질 수 있다.

[0216] MC-FAN의 사용을 위한 적절한 프로토콜은 "Determinants of the daily rhythm of blood fluidity", by Tatsushi Kimura, Tsutomu Inamizu, Kiyokazu Sekikawa, Masayuki Kakehashi and Kiyoshi Onari(*Journal of Orcadian Rhythms* 2009, 7:7)에 제공된다.

[0217] 단결정 실리콘 칩의 표면상에 광가공(photo-fabrication)에 의해 폭 $7\mu\text{m}$, 길이 $30\mu\text{m}$, 깊이 $4.5\mu\text{m}$ 를 가진 미세 홈들을 간단하게 형성한다. 적절한 칩 치수는 약 $15 \times 15\text{mm}$ 일 수 있다. 미세 홈은 모세혈관을 나타내는 누출-방지 마이크로채널로 형성된다. 채널로의 이런 변환은, 예를 들어, 광학적으로 평평한 유리판과 같은 덮개로 채널을 단단히 덮음으로써 이루어질 수 있다. 적절한 홈들은 광학적으로 연마된 유리판의 납땜에 의해 기밀한 마이크로채널로 변형될 수 있다.

[0218] 마이크로채널의 치수는 한 흐름 경로를 통과하는 유체의 부피가 매우 적게 되는 것이다. 따라서, 유속의 측정을 용이하게 하도록 흐름 채널을 반복하는 것이 바람직할 수 있다. 위에서 인용한 참조문헌은 동일한 크기의 8736 흐름 경로가 형성된 장치의 생산을 기술한다. 실리콘 기판을 마이크로채널 흐름 시스템, MC-FAN(Hitachi Haramachi Electronics Co., Ltd, Ibaragi, Japan) 위에 장착하여, 이미지 디스플레이 장치에 연결된 혈미경 아래에서 마이크로채널을 통과하는 혈액 세포 원소들의 흐름을 직접 관찰할 수 있게 한다. 흐름은 연속적으로 볼 수 있으면서 혈액의 소정 부피에 대한 통과시간은 자동으로 측정된다.

[0219] 혈액 통과의 적절한 값은 다음과 같이 20cm H₂O의 압력에서 12초의 식염수 통과 시간 동안 실제 전혈 통과 시간의 함수로서 표현될 수 있다:

$$\text{혈액통과시간(수정된 값; 초)} = \frac{\text{전혈통과시간(실제 값)}}{\text{식염수통과시간}} \times 12$$

혈류 측정 방법

[0222] 도플러 초음파 유류측정술은 생체 내에서 손상되지 않은 혈관을 통과하는 혈류의 측정을 위한 널리 사용되는 방법이다. 도플러 초음파를 사용하는 적절한 방법은 당업자에게 주지되어 있고, "Measurement of blood flow by ultrasound: accuracy and sources of error." By R. W. Gill (Ultrasound Med Biol. 1985 Jul-Aug;11(4):625-41)에 기술된 방법을 포함한다.

발명의 효과

[0223] 본 발명의 내용 중에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0224] 본 발명은 다음 실시예들 및 첨부된 도면을 참조하여 설명될 것이나 이에 제한되지 않는다.

도 1은 실시예 1에서 논의한 대로 (a) 화합물 1; (b) 화합물 5; (c) 화합물 9; (d) 화합물 18; (e) 화합물 23; 및 (f) 화합물 30에 대해 생성한 응집의 억제율 % vs 억제제 용액 농도의 복용량-반응 곡선의 예를 나타낸다. (a)와 (b)는 ADP-매개응집의 억제율 %의 복용량-반응 곡선을 나타낸다. (c)와 (d)는 콜라겐-매개 응집의 억제율 %의 복용량-반응 곡선을 나타낸다. (e)와 (f)는 아라키돈산-매개 응집의 억제율 %의 복용량-반응 곡선을 나타낸다.

도 2는 실시예 2에서 논의한 대로 농산물 추출물을 제조하기 위한 본 발명의 첫 번째 태양에 따른 바람직한 방법을 명시한다.

도 3은 실시예 2에 상술한 방법을 사용하여 생산된 시럽의 HPLC 크로마토그램이다. 생체활성 화합물들은 크로마토그램 상에서 번호를 매긴다.

도 4는 실시예 3에 논의한 대로 저당 농산물 추출물을 제조하기 위한 본 발명의 첫 번째 태양에 따른 바람직한 방법을 명시한다.

도 5는 실시예 3에서 상술한 방법을 사용하여 생산된 시럽의 HPLC 크로마토그램이다. 생체활성 화합물들은 크로마토그램 상에서 번호를 매긴다.

도 6은 실시예 4에 기술한 대로, 토마토 추출물(TE) 또는 대조군(C)의 소비 3시간 후, 다른 혈소판 효현제에 반응하여 기준선 응집으로부터 % 변화를 나타낸다. 사용된 혈소판 효현제들은 아데노신 다이포스페이트(ADP) 7.5 $\mu\text{mol/L}$ 및 3 $\mu\text{mol/L}$ 및 콜라겐 5mg/L 및 3mg/L이었다. TE와 C 보충제 사이의 현저한 차이는 그래프 상에 나타난다($P<0.001$). N = 모든 측정에 대해 9.

도 7은 실시예 6에 기술된 대로 기준선(0), $t=3$ 시간(3) TE 또는 C로 보충 후 및 TE 또는 C로 보충 후 $t=5$ 시간(5)에서 기록한 평균 종료시간을 도시한다. n = 각 그룹에 대해 3이다. C와 TE 사이의 현저한 차이는 *에 의해 그래프 상에 나타난다($P = 0.011$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예 1

[0226] 본 발명은 WO 99/55350에 개시된 농산물 추출물에서 확인된 항 혈소판 활성의 관점에서 수행된 추가 연구를 기초로 한다.

[0227] 본 발명자들은 철저한 실험들을 수행하였고 이들은 혈소판 응집에 대한 억제 효과와 관련이 있는 이런 추출물들 내 화합물들을 확인하기 위해 토마토 추출물들을 추가로 분별증류하였다. 본 발명자들은 혈소판 응집에 효과가 없거나 미미한 효과를 가진 농산물 추출물을 가진 여러 화합물(모두 화학적으로 확인되지 않고; 모든 데이터가 제공되지 않음)을 확인하였다. 그러나, 본 발명자들은 현저한 활성을 가진 32개 화합물은 본 발명의 세 번째 태양에 의해 정의된 화학물질들의 종류에 해당한다는 것을 놀랍게 발견하였다. 이런 발견이 본 발명자들이 이런 화합물들의 활성이 농산물 추출물들에 유지/풍부할 수 있도록 본 발명의 첫 번째 태양의 방법을 개발하게 하였다.

1.1. 방법

[0229] 1.1.1 WO 99/55350에 정의된 대로 토마토 추출물의 제조.

[0230] 토마토 추출물은 출발 재료로서 갈색화 지수(420nm에서 농도 12.5g 가용성 고체 / L의 용액의 흡수율) <0.350

AU을 가진 28 - 30 ° Brix(즉, 28 - 30 % 고체, w/w)의 구입가능한 콜드-브레이크 토마토 페이스트를 사용하여 제조하였다. 페이스트를 초순수(ultrapure water)로 희석(1:5)하고 대형 미립 물체를 원심분리하고 실온에서 Westfalia MSB-14 분리기(원심 디스크 정화기)를 사용하여 정화하여 제거하였다. 더 작은 미립 물체를 45°C를 초과하지 않는 온도에서 미세여과에 의해 제거하여 불용성 스판-다운 고체를 포함하지 않고 가용성 고체의 손실 없이 0.2 μ 필터를 통과할 수 있는 깨끗한 담황색 용액을 형성한다. 이 용액을 증발하여 65 ° Brix의 시럽으로 농축하였고, 세밀하게 제어된 조건과 50°C를 초과하지 않는 온도를 사용하여 비-효소 갈색화 반응의 진행을 제한하였다. 단시간살균처리(flash pasteurisation) 단계(3초 동안 T = 105°C)를 증발 절차의 초기에 포함시켰다. 최종 생성물은 갈색화 지수 <0.600AU와 미생물 전체 평판 계수(plate count) < 1000을 특징으로 하였다.

[0231] 1.1.2 관심 활성 화합물들을 가진 토마토 추출물의 농축 및 불활성 재료들의 제거

생체활성 성분들에 더욱 농축된 출발 재료를 형성하기 위해서, 당을 다음과 같이 상기한 생성물로부터 제거하였다.

[0233] FPX66 수지를 포함하는 130L 수지 컬럼(롬앤하스)을 준비하고 4°C의 초순수에서 평형화시켰다. 1.1.1에 기술된 재료를 초순수로 대략 8 Brix로 희석하였고 대략 260L/분의 유속으로 수지 컬럼을 통과시켜, 4°C의 온도를 유지하였다. 컬럼 삼투액을 버렸다. 일단 모든 필요한 재료가 컬럼을 통과한 후, 대략 130L의 물을 통과시키고 버렸다. 그런 후에, 수지에 의해 보유된 화합물들을 컬럼을 통해 130L의 뜨거운 물(75°C)을 통과시키고 130L의 80% 에탄올을 통과시켜 용출하였다. 모든 용출된 재료를 보유하고 결합하여 관심 화합물들을 포함하는 대략 25% 에탄올 용액의 대략 400L를 얻었다.

[0234] 관심 화합물들을 포함하는 희석 용액을 약 30°C의 온도에서 Trisep ACM5 막을 사용하여 역삼투로 농축하였다. 에탄올 / 물 용매를 이 막에 통과시켰고, 용해된 모든 화합물들은 막 내에 잔존하였다. 일단 희석 용액을 10배로 농축하였는데, 즉, 부피를 40 - 50L 감소시켰고, 정용여과(diafiltration)를 개시하였고, 그동안 삼투액 제거 속도와 동일한 속도로 초순수를 보유액에 첨가하였다. 이런 방식으로, 용액의 에탄올 농도를 25%로부터 < 5%로 점차 감소시켰다.

[0235] ~15 - 20% 고체인 에탄올 용액을 무수 분사-건조기를 사용하여 분사-건조하여 < 6% 수분 함량을 가진 고운, 금색 분말을 형성하였다. 이것이 최종의 농축된 토마토 추출물이었고, 관심 항 혈소판 성분들을 분리하는데 사용되었다.

[0236] 1.1.3 토마토 추출물에서 개별 생체활성 화합물들의 분리와 특징묘사

[0237] 50mg/mL의 원료 용액을 초-순수 HPLC-등급 수에 용해시켜 1.1.2에 개시된 건 분말로 제조하였다. Luna C18(2) 5 μ 세미-분취 컬럼, 100 x 4.6mm을 사용하여 세미-분취 HPLC(semi-preparative HPLC)를 수행하였고, 단번에 컬럼 위에 100 μL을 첨가하였다. 부분 수집기를 사용하여, 토마토 추출물에 포함된 UV-흡수 성분들을 3개의 큰 부분으로 나눴다. 부분 1은 대부분 뉴클레오시드와 뉴클레오티드를 포함하였다. 부분 2는 대부분 폐놀산 글리코시드 / 에스터 및 폐놀산을 포함하였다. 부분 3은 대부분 플라보노이드 글리코시드와 플라보노이드를 포함하였다. 3개의 큰 부분을 동결건조하여 건조하고 물에 재용해하여 50mg/mL의 용액을 만들었다. 차례로 각 부분에 동일한 컬럼이나 각 부분의 극성과 용출 특성에 적합한 다른 구배를 사용하여 추가의 세미-분취 HPLC를 실시하였다. 각 큰 부분으로부터, 10개까지 개별 또는 혼합 부분을 부분 수집기를 사용하여 수집하였다.

[0238] 개별 부분들을 동결건조하고 1mL 순수에 재용해하였다. 각 부분을 Luna C18(2) 3 μ 분석 컬럼, 100 x 4.6mm를 사용하고, 아세토나이트릴 / 폼산 구배를 사용하여 분석 HPLC-MS로 검사하였다. 각 분리된 부분의 특징은 다이 오드-어레이 탐지기를 통해 부분의 UV 스펙트럼의 수집 및 양극 이온 모드로 전기분무 MS에 의해 발생한 부분의 특징적인 이온들의 검사에 의해 측정하였다.

[0239] 필요한 경우, 최종 정제(예를 들어, 소량의 오염물질 제거)를 추가 HPLC로 수행하였다. 최종적으로 정제된 화합물을 동결건조하고 냉동보관하였다. 원료 용액을 50mg/mL로 제조하고 HPLC 완충제 속에 희석하여 6배 농도 레벨을 만들었고, HPLC 방법을 조정하는데 사용하였고, 반응 인자들은 각 개별 화합물에 대해 계산될 수 있다. 이런 조정 곡선과 반응 인자는 토마토 추출물에 있는 화합물을 정량하는데 사용하였다. 분리된 생체활성 화합물들의 구조적 형태 / 정체는 표 3에 도시된다.

[0240] 1.1.4 혈소판 응집을 억제하는 활성 측정 방법

[0241] 아래 기술된 실험 프로토콜은 1.1.3에 기술된 대로 분리된 화합물들의 IC₅₀ 값을 측정하도록 연구하였다. 생체 외 혈소판 응집의 억제를 평가하는 미정제 생체분석법을 일부 미정제 추출물들에 수행하여(데이터 도시되지 않

음) 기능성 활성을 위한 HPLC에 의해 확인된 고운 부분/화합물을 선택하는 것을 도왔다. 이런 방법은 농산물 추출물들에 있는 어느 화합물(수천 개일 수 있음)이나 평가할 필요를 피하기 위해 필수라고 생각되었다.

[0242] IC50 값은 대조군 샘플과 비교해서, 1mL 혈소판-풍부 혈장에서 표준화된 조건하에서 유발된 50% 혈소판 응집을 억제하는데 필요한 mg인 화합물의 양을 나타낸다.

[0243] 32개 대부분 활성 화합물의 활성을 표 4에 제공된다.

정맥절개술 및 혈액 샘플

[0245] 생체 외 연구를 위한 혈액을 약을 복용하지 않는 건강한 지원자들이고, 남녀이고, 18-60세이고, 정상 혈소판 기능을 가진 사람으로부터 채취하였다. 피험자들은 혈액 샘플을 제공하기 전 최소 10일 동안 혈소판 기능에 영향을 주는 것으로 알려진 약 또는 보충제를 복용하지 않았다고 밝혔다. 혈액은 플라스틱 진공채혈관(plastic citrated blood collection tubes)(Sarstedt Monovettes, 최종 농도 시트르산 나트륨, 13 mmol/L) 속에 실리콘 바늘을 통해 주전정맥(antecubital vein)에 1회 정맥친자 후 채취하였다. 모든 혈액은 혈액 샘플링 시부터 37°C로 유지하였다.

혈소판-풍부 혈장의 제조

[0247] 혈소판-풍부 혈장(PRBC)을 200 x g에서 15분 동안 시트르산첨가혈액(citrated blood)의 원심분리에 의해 얻었고 사용 전에 320 ± 20 x 10⁹ /L의 표준 혈소판 수로 혈소판-부족 혈장으로 조절하였다. PRBC는 2시간 내 혈소판 측정을 위해 사용하였다.

혈소판 효현제

[0249] 다음 효현제들은 혈소판 기능 측정을 위해 사용하였다. 아데노신 다이포스페이트(ADP), 최종 농도 10 μmol/L; 콜라겐, 최종 농도 5mg/L; 아라키돈산, 최종 농도 500U/L(전부 Helena Biosciences, Sunderland, UK); 트롬빈 수용체-활성화 웨타이드(TRAP), 최종 농도 25nmol/L(Sigma-Aldrich, Poole, UK). 효현제들은 사용 직전에 원료 용액으로부터 제조하여, 따뜻한 생리식염수(0.9% NaCl)로 희석하였다

혈소판 억제 용액의 제조

[0251] 개별 혈소판 억제제들을 생리식염수, 초순수 메탄올 또는 초순수 DMSO(Sigma-Aldrich, Poole, UK)에서 500g/L 내지 100g/L의 농도로 제조하고 필요할 때까지 냉동보관하였다. 원료 용액을 사용 직전에 생리식염수로 희석하였다.

혈소판 억제제와 PRBC의 배양

[0253] 450 μL PRBC를 로우 리텐션 에펜토르프(low retention epindorff)에서 10분 동안 37°C로 50 μL 희석 억제제 용액으로 배양하였다. 억제제 용액을 희석하여 PRBC 샘플에서 메탄올 또는 DMSO의 최종 농도가 2%를 절대 초과하지 않게 하였다. 적절한 메탄올 또는 DMSO 함량에 적합한 50 μL 생리식염수를 포함하는 적절한 대조군 샘플들을 동시에 배양하였다. 각각의 억제제 화합물의 경우, 5개 배양 농축액을 사용하였다; 0.005mg/mL, 1.00mg/mL, 5.00mg/mL 및 10mg/mL의 최종 농도를 표준으로 사용하였다.

혈소판 응집 및 응집 억제율의 측정

[0255] 혈소판 억제제에 의한 배양 후, PRBC 샘플들을 유리 셀에 옮겼고 ADP, 콜라겐, TRAP 또는 아라키돈산에 의해 유발된 응집의 양은 혈소판 응집측정기(PACKS 4, Helena Biosciences, Sunderland, UK) 상에서 10분 동안 관찰하였다. 대조 샘플을 각 샘플 세트와 함께 작동시켰다. 발생한 응집 곡선들로부터, 곡선 아래 면적은 각 PRBC 샘플에 대해 계산하였고 각 억제제 농도에서 얻은 응집의 억제는 대조 샘플의 곡선 아래 면적을 PRBC 샘플에 대한 곡선 아래 면적과 비교함으로써 계산하였다. 응집의 억제율은 대조군과 비교하여 % 억제율로 표현하였고 억제제 화합물당 얻은 6개 데이터 점으로부터, 복용량-반응 곡선을 만들었다. 이 곡선을 사용하여 1.2 결과와 도 1에 도시된 대로, 억제제 화합물에 대한 IC50 값을 예측하는데 사용하였다.

[0256] 얻은 각 혈액 샘플에 대해, 2개의 다른 억제 화합물에 대한 6-점 복용량-반응 곡선이 만들어질 수 있다. 이런 실험들을 반복하여 각 억제 화합물의 경우, 다른 피험자들로부터의 혈액을 사용하여 적어도 3개(대부분 7 - 10)의 다른 IC50 값을 다른 날에 얻었다(이것은 관심 효현제 각각에 적용된다). 다른 IC50의 평균을 구하였고 이런 값은 1.2 결과, 표 4에 인용된다.

1.2 결과

[0258] 대부분 항 혈소판 활성(아래 참조)을 가진 것으로 발견된 32개 화합물의 물리화학적 특성들은 표 3에 요약된다.

표 3

농산물 추출물들에서 확인한 생체활성 화합물들의 물리화학적 특성

그룹	화합물 ID	생체활성 화합물	RT(s)	λ_{max}	질량/특징 이온 (POS 모드)
뉴클레오시드	1	시티딘	1.24	275	487,244
	2	아데노신	3.17	260	268,136
	3	우리딘	2.59	270	267,113
	4	구아노신	3.9	260(278sh)	284,152
뉴클레오티드	5	아데노신 3'-모노포스페이트	1.6	260	348,136
	6	아데노신 5'-모노포스페이트	1.78	260	348,136
페놀 글리코시드	7	흔합 페놀산 글리코시드	8.0-9.0		흔합물
	8	p--쿠마르산 헥소스 / 퀴닌산 유도체	9.02	300	469,147,119
	9	카페인산 글리코시드	9.39	290	319,163
	10	페롤산 헥소스	9.67	295,315	265,177
	11	p-쿠마르산 헥소스 / 다이하이드로카엠프페롤 헥소스 혼합물	10.62	265	467,449,287,450,163
	12	p-쿠마르산 / 카페인산 컨쥬케이트, 글리코실화	11	285	367,344,163,147
	13	페롤산 글리코시드	11	285,315sh	379,196,177
	14	클로로젠판	12.77	325,300sh	163,377
	15	p-쿠마르산 유도체	11.55	275	396,196,163
	16	카페오일-퀴닌산 다이머#1	14.96	310	
	17	카페오일-퀴닌산 다이머#2	26.63		573,814,163
	18	카페인산	13.39	325,295sh	163
	19	p-쿠마르산	18.19	235,310	165,147,119
	20	벤조산	22.36		
	21	페롤산	22.61		177
플라보노이드 글리코시드	22	신남산	30.27	273	621,599.5,131.1
	23	쿠에르세틴-3-0-글리코시드	23.57	275	400,303
	24	카엠페롤 글리코시드	24.7		592,535
	25	쿠에르세틴-3-0-트라이사카라이드	25.44		765,453,303
	26	나린진	25.88	285,330	621,563
플라보노이드 에스터 유도체	27	루틴	27.2	260,350	633,303
	28	플라보노이드 컨쥬케이트	24.33		258
	29	소량 플라보노이드 + 글리코시드	27.5 - 30.0		흔합물
플라보노이드	30	쿠에르세틴	36.5	255,370	629,303,273
	31	카엠프페롤	44.58	260,370	287
	32	나린제닌	35.1		

[0260] 표 4는 토마토 추출물에서 확인한 32개 화합물에 대한 (혈소판 응집을 억제하는) IC50 데이터를 제공한다. 활성은 방법 1.1.4에 개시된 대로 평가하였다. 도 1은 (a) 뉴클레오시드(시티딘); (b) 뉴클레오티드(아데노신 3'-모노포스페이트); (c) 페놀산 글리코시드(카페인산 글루코시드); (d) 페놀산(카페인산); (e) 플라보노이드 글리코시드(쿠에르세틴-3-0-글리코시드); 및 (f) 플라보노이드(쿠에르세틴)에 대해 만든 ADP-매개 응집의 억제율 % vs 억제제 용액 농도의 복용량-반응 곡선의 예를 제공한다.

표 4

[0261]

농산물 추출물들에서 확인한 화합물들의 항 혈소판 활성

그룹	화합물 ID	생체활성 화합물	IC50 ADP	IC50 콜라겐	IC50 TRAP	IC50 AA
뉴클레오시드	1	시티딘	2.42	10.66	39.03	39.03
	2	아데노신	0.4	0.82	>50	-
	3	우리딘	6.51	15.99	>50	-
	4	구아노신	0.25	0.53	26.07	0.91
뉴클레오티드	5	아데노신 3'-모노포스페이트	0.12	0.28	24.51	2.41
	6	아데노신 5'-모노포스페이트	0.12	0.28	24.51	2.41
페놀 글리코시드	7	혼합 페놀산 글리코시드	N/A	N/A	N/A	N/A
	8	p--쿠마르산 헥소스 / 퀴닌산 유도체	10.25	9.88	1.61	0.19
	9	카페인산 글리코시드	10.16	8.22	0.8	0.23
	10	페룰산 헥소스	12.61	14.16	0.52	0.46
	11	p-쿠마르산 헥소스 / 다이하이드로카엠프페롤 헥소스 혼합물	11.1	14	0.56	0.31
	12	p-쿠마르산 / 카페인산 컨쥬케이트, 글리코실화	12.61	13.18	0.25	0.2
	13	페룰산 글리코시드	13.11	14.56	0.37	0.41
	14	클로로젠산	10.08	10.11	1.1	0.77
	15	p-쿠마르산 유도체	14.65	15.18	0.35	0.26
	16	카페오일-퀴닌산 디아이머#1	31.55	35	11.12	0.3
페놀 에스터 유도체	17	카페오일-퀴닌산 디아이머#2	32.96	3307	12.16	0.2
	18	카페인산	18.98	11.37	8.03	7.33
	19	p-쿠마르산	13.22	14.62	12.82	10.18
페놀산	20	벤조산	25.11	17.74	18.19	15.45
	21	페룰산	18.67	13.9	14.65	9.94
	22	신남산	22.14	24.6	12.92	0.22
	23	쿠에르세틴-3-0-글리코시드	25.18	28.43	12.06	0.19
	24	카엠페롤 글리코시드	>50	>50	N/A	N/A
플라보노이드 글리코시드	25	쿠에르세틴-3-0-트라이아사카라이드	>50	>50	18.61	0.46
	26	나린진	28.1	29.55	9.13	0.31
	27	루틴	35.21	32.18	8.96	0.41
	28	플라보노이드 컨쥬케이트	27.68	27.22	13.67	0.23
	29	소량 플라보노이드 + 글리코시드	N/A	N/A	N/A	N/A
플라보노이드 에스터 유도체	30	쿠에르세틴	>50	>50	19.66	3.66
	31	카엠페롤	>50	>50	26.18	5.18
	32	나린제닌	>50	>50	33.21	10.41

1.3 결론

[0263] 본 발명자들은 토마토 추출물들 내에서 발견한 여러 화합물을 검사하였고 표 2 및 3에서 확인된 32개 화합물은 혈소판 응집을 억제하는 효과를 가졌다는 것을 입증하였다. 또한, 본 발명자들은 분리되어 항-응집 능력을 가진 것으로 나타난 32개 화합물 중에서, 16개 화합물이 전체 생체활성에 매우 중요하였다는 것을 결론내렸다. 이런 16개 화합물은 표 1에 도시된다.

[0264] 특히 본 발명자들은 생체활성 화합물들이 (a) 페놀 화합물(및 이의 에스터 및 글리코시드 유도체); (b) 플라보노이드(및 이의 에스터 및 글리코시드 유도체) 및 (c) 뉴클레오티드/뉴클레오시드로 분류될 수 있다는 것을 놀랍게 발견하였다. 이것이 발명자들이 혈소판 응집에 억제 효과를 가진 두 새로운 종류의 화합물(페놀류 및 플라보노이드가 존재한다는 것을 깨닫게 하였다.

- [0265] 이런 화합물들 중에서, 최대 항-응집의 비-페놀 화합물은 AMP이었다. 당과 인산염 잔기에 의한 뉴클레오시드의 변형은 항-응집 작용을 실질적으로 증가시키는 효과를 가졌다. 이것은 초기 연구는 항 혈소판 성분들로서 시티딘과 아데노신을 확인하였으나 뉴클레오시드는 아니었기 때문에 놀라웠다.
- [0266] 확인된 페놀 산-유도 화합물들 중에서, 최대 항-응집성은 p-쿠마르산과 카페인산의 글리코실화 형태였다. 이런 글리코실화 화합물들은 비-글리코실화 유리산들에 비해, 검사된 모든 효현제들에 반응하여 현저하게 높은 항-응집력을 보여주었다. 이런 구조-기능 관계가 보고된 것은 이것이 처음이다. 따라서 글리코실화 페놀 화합물들은 본 발명에 따른 추출물을 포함할 수 있고 본 발명의 첫 번째 태양의 방법에 따라 제조된 추출물들에 포함/풍부한 가장 바람직한 생체활성 분자들을 나타낸다.
- [0267] 유사한 발견은 플라보노이드 유도체들에 대해 이루어졌다. 글리코시드 또는 쿠에르세틴과 나린제닌의 다른 컨쥬게이트된 유도체는 플라보노이드 아글리콘(aglycone)보다 현저하게 더 항-응집성이었다. 이것은 TRAP와 아라키돈산 효현제와 반응하여 특히 주목할만하나 ADP와 콜라겐 효현제에 적용되었다. (매우 제한된) 양의 구조-기능 연구들이 유리 플라보노이드 아글리콘에 대한 문헌에 보고된 반면, 저자들은 아글리콘과 컨쥬게이트된 분자들을 비교하는 어떠한 연구들로 알지 못한다. 따라서 글리코실화 플라보노이드 화합물들은 본 발명에 따른 추출물을 포함할 수 있고 본 발명의 첫 번째 태양의 방법에 따라 제조된 추출물들에 포함/풍부한 가장 바람직한 생체활성 분자들을 나타낸다.
- [0268] AMP 대 아데노신의 비율이 증가할 때, 추출물의 전체 생체활성은 감소한다는 것을 아는 것은 놀라웠다. 동일한 것이 페놀산 글리코시드 / 에스터 대 유리 페놀산의 비율이 감소할 때 및 플라보노이드 글리코시드 대 유리 플라보노이드의 비율이 감소할 때 일어나는 것을 발견하였다.
- [0269] 본 발명의 세 번째 태양에 따른 농산물 추출물을 생산하는 간단한 방식은 1.1.3에 개시되어 있다는 것은 언급할 가치가 있다. WO 99/55350에 개시된 방법들에 따라 제조된 추출물은 항-혈소판 활성을 가진 것으로 확인된 세 부분을 분리하기 위해 분별증류하였다. 부분 1은 대부분 뉴클레오시드와 뉴클레오티드를 포함하였다. 부분 2는 대부분 페놀산 글리코시드 / 에스터 및 페놀산을 포함하였다. 부분 3은 대부분 플라보노이드 글리코시드와 플라보노이드를 포함하였다. 이런 세 부분은 재조합(부분 1 + 2 + 3)되어 놀라운 효과를 가진 본 발명의 세 번째 태양에 따른 추출물을 제공할 수 있다.
- [0270] 실시예 2**
- [0271] 토마토 추출물들 내 활성 화합물들에 대해 얻은 지식으로 본 발명자들은 농산물들을 가공하여 화합물들의 활성이 유지 및/또는 활성 화합물들의 농도가 풍부한 추출물들을 생산하는 방법을 개발하였다.
- [0272] 많은 실험 후에, 본 발명자들은 본 발명의 첫 번째 태양에 따른 방법은 실시예 1에서 확인된 많은 수의 활성 화합물들에 풍부한 추출물들을 생산하는데 최적이라는 것을 입증하였다.
- [0273] 이런 방법을 입증함으로써, 본 발명자들은 의약 또는 식품(드링크 또는 식품 재료)의 제조에 사용될 수 있는 시럽을 생산하기 위해 본 발명의 방법의 산업용 규모로 사용될 수 있는 방법을 개발하였다.
- [0274] 이런 시럽을 제조하는 방법은 도 2에 도시되며 본 발명의 첫 번째 태양의 바람직한 실시예를 나타낸다.
- [0275] 도 2의 방법에 따라 제조된 시럽은 본 발명의 두 번째 또는 세 번째 태양에 따른 가장 바람직한 추출물을 나타내며 표 2(위 참조)와 표 5에 정의한 특징들을 가진다.

표 5

본 발명의 두 번째 또는 세 번째 태양에 따른 가장 바람직한 추출물의 조성물

내역 변수	내역
건조 물질([°] Brix)	60 내지 63
밀도(g/cm ³)	1.15 내지 1.22
pH(4° Brix에서)	3.90 내지 4.15
갈색화 지수(4° Brix에서)	<0.70
전체 탄수화물(g/100g)	58 내지 70
펩틴(g/100g)	33 내지 40
환원당(g/100g)	22 내지 30
단백질(g/100g)	4 내지 6

유리 아미노산(g/100g)	2 내지 3.5
생체활성 화합물들(g/100g)	3.0 내지 4.0
전체 생균수(viable count)(CFU/mL)	<1,000
살모넬라(CFU/25mL)	없음
리스테리아균(CFU/25mL)	없음
황색포도상구균(CFU/mL)	없음
장내세균(CFU/mL)	<10
효모 및 곰팡이(CFU/mL)	<1,000

- [0277] 시럽은 70%까지의 건조 물질 단당(글루코오스, 프룩토오스 및 수크로오스)을 포함할 수 있고 50%까지의 물을 포함할 수 있다.
- [0278] 이런 방법을 사용하여 생산한 가장 바람직한 시럽들은 32개까지의 생체활성 성분들을 포함하며, 도 3에 도시된 HPLC 크로마토그램에서 번호를 매기며 표 1-4에서 확인되고 실시예 1에서 논의한 번호를 매긴 화합물들과 일치한다.
- [0279] 이들의 생체활성 프로파일을 최적화하는데 중요한 시럽들의 일부 추가 특징들은 표 6(아래)에 제공된다. 화합물 번호들은 도 3에 도시된 크로마토그램과 표 1-4에서 확인한 화합물들을 의미한다.

표 6

화합물 ID	내역
화합물 2-6	>2.00mg/g
화합물 8	>0.05mg/g
화합물 9	>0.07mg/g
화합물 10	>0.03mg/g
화합물 11	>0.30mg/g
화합물 12	>0.20mg/g
화합물 13	>0.16mg/g
화합물 14	>0.13mg/g
화합물 15	>0.10mg/g
화합물 23	>0.05mg/g
화합물 25	>0.16mg/g
화합물 26	>0.74mg/g
화합물 27	>0.60mg/g
화합물 18, 19 & 21	<1.50mg/g
화합물 5: 화합물 2 비율	>3.0
글루타민	>8.00mg/g
푸르푸랄 유도체	<0.15mg/g

- [0281] 본 발명자들은 표 6에 약술한 특징들은 본 발명에 따른 추출물들의 항-헬소판 활성을 최적화할 때 중요하다는 것을 인식하였다. 본 발명의 두 번째 또는 세 번째 태양에 따른 가장 바람직한 추출물들은 이런 특성을 가진다. 또한 이런 특징들은 본 발명의 첫 번째 태양의 방법들의 가장 바람직한 실시예들에서 품질 대조 수단으로 사용될 수 있다. 따라서 이런 특징들은 추출물들이 산업용 규모로 생산될 때 특히 유용한 제어 포인트이다.

실시예 3

- [0283] 본 발명자들은 분말 형태의 저당 농산물 추출물의 생산을 위한 본 발명의 방법들의 산업적 규모에 사용될 수 있는 방법을 개발하였다. 분말은 의약 또는 식품(드링크 또는 식품 재료)의 제조에 사용될 수 있다.

[0284] 이런 분말을 생산하는 방법은 도 4에 도시되고 본 발명의 첫 번째 태양의 바람직한 실시예를 나타낸다.

[0285] 도 4의 방법에 따라 제조된 추출물들은 두 번째 또는 세 번째 태양에 따른 바람직한 추출물들을 나타낸다.

[0286] 도 4의 방법에 따라 제조된 추출물들은 두 번째 또는 세 번째 태양에 따른 바람직한 추출물들을 나타내고 표 2(위 참조) 및 표 7에 정의된 특성을 가진다.

표 7

[0287] 본 발명의 두 번째 또는 세 번째 태양에 따른 가장 바람직한 저당 토마토 추출물의 조성물

내역 변수	내역
건조 물질(° Brix)	94 내지 96
부피 밀도(g/cm ³)	0.25 내지 0.30
pH(4° Brix에서 물 속)	3.5 내지 3.8
갈색화 지수(at 4° Brix)	<3.00
전체 탄수화물(g/100g)	<0.1
페틴(g/100g)	-
환원당(g/100g)	<0.1
단백질(g/100g)	<0.01
유리 아미노산(g/100g)	30 내지 37
생체활성 화합물들(g/100g)	50 내지 60
전체 생균수(viable count)(CFU/mL)	<1,000
살모넬라(CFU/25mL)	없음
리스테리아균(CFU/25mL)	없음
황색포도상구균(CFU/mL)	없음
장내세균(CFU/mL)	<10
효모 및 곰팡이(CFU/mL)	<1,000

[0288] 분말은 1% 미만의 건조 물질 단당(글루코오스, 프룩토오스 및 수크로오스)를 포함할 수 있고 <6% 물을 포함할 수 있다. 농축 분말 추출물은 통상적으로 60%까지의 생체활성 화합물들을 포함한다.

[0289] 이런 방법을 사용하는 추출물들은 33개까지의 다른 생체활성 화합물들을 포함하며, 도 5에 도시된 HPLC 크로마토그램에서 번호를 매기며 표 1-4에서 확인되고 실시에 1에서 논의한 번호를 매긴 화합물들과 일치한다.

[0290] 이들의 생체활성 프로파일을 최적화하는데 중요한 시립들의 일부 추가 특징들은 표 8에 제공된다. 화합물 번호들은 도 5와 표 1-4에 도시된 크로마토그램을 의미한다.

표 8

화합물 ID	내역
화합물 2-6	>15.20mg/g
화합물 8	>9.40mg/g
화합물 9	>3.70mg/g
화합물 10	>0.70mg/g
화합물 11	>26.10mg/g
화합물 12	>90.80mg/g
화합물 13	>85.30mg/g
화합물 14	>18.30mg/g
화합물 15	>8.60mg/g
화합물 23	>8.50mg/g
화합물 25	>14.70mg/g
화합물 26	>38.00mg/g
화합물 27	>50.70mg/g
화합물 18, 19 & 21	<38.00mg/g
화합물 5; 화합물 2 비율	>3.0
글루타민	>52.00mg/g
푸르푸랄 유도체	<0.50mg/g

[0292] 본 발명자들은 표 8에 약술한 특징들은 본 발명에 따른 추출물들의 항-혈소판 활성을 최적화할 때 중요하다는 것을 인식하였다. 본 발명의 두 번째 또는 세 번째 태양에 따른 가장 바람직한 추출물들은 이런 특성들을 가진

다. 또한 이런 특징들은 본 발명의 첫 번째 태양의 방법들의 가장 바람직한 실시예들에서 품질 대조 수단으로 사용될 수 있다. 따라서 이런 특징들은 추출물들이 산업용 규모로 생산될 때 특히 유용한 제어 포인트이다.

[0293] 실시예 4

[0294] 다음 실시예에서, 실시예 2에 개시된 방법들에 따라 제조된 조성물의 항-혈소판 효과가 검사되는 실험이 개시된다. 실시예 3에 개시된 방법들에 따라 제조된 조성물들은 동일한 프로토콜을 따라 검사될 수 있다는 것을 알 것이다.

[0295] 4.1 연구 프로토콜

[0296] 4.1.1 연구 목적 및 짧은 개요

[0297] 이 연구는 건강한 피험자들에서 대조군 보충제와 비교해서, (실시예 2에 개시된 방법들에 따라 제조된) 3g의 토마토 추출물 시럽을 포함하는 치료 드링크를 소비하는 생체 외 항 혈소판 효과를 정량화하였다.

[0298] 4.1.2 연구 설계

[0299] 싱글-블라인드 연구 설계가 수반되었다. 금식한 피험자들에게 캐뉼라를 삽입하고 기준 샘플을 07:00 내지 08:00에 채취했다. 기준 샘플을 수집한 직후, 피험자들은 치료(TE) 보충제 또는 대조군 보충제를 소비했다. 추가 혈액 샘플들을 $t = 3\text{hours}$ 의 시간에 캐뉼라로부터 빼냈다. 탈수를 피하기 위해 샘플링 시점들 사이에 피험자들에게 소량(25mL)의 물을 제공하였다.

[0300] 4.1.3 피험자들

[0301] 남성 및 여성인 9명의 건강한 성인을 연구에 모집하였다. 피험자들은 40 ~ 65세이었고, 심각한 질병 또는 지혈장애의 병력이 없었다. 연구에 포함하기 위한 적합성은 식이요법과 라이프스타일 설문지와 의학적 심사에 의해 평가하였고, 그동안 전혈 개체수를 얻었다. 낮은 혈액 개체수를 가진 사람들은 연구에 포함되지 않았다. 식품 보충제(예를 들어, 생선 오일, 달맞이꽃종자오일)을 습관적으로 소비하는 임의의 피험자는 연구에 참가하기 전 한 달의 최소 기간 동안 이런 보충제들을 중단하였다. 피험자들은 참가 전 10일 동안 혈소판 기능에 영향을 주는 것으로 알려진 약물들을 복용하는 것을 자제하도록 지시받았다. 모든 피험자들로부터 문서화한 동의서를 받았고, 연구는 그램피언 리서치 에티 커미티(Grampian Research Ethics Committee)에 의해 승인받았다.

[0302] 4.1.4 정맥절개

[0303] 연구에 모집한 피험자들은 실리콘 21 게이지 버터플라이 니들을 사용하여 캐뉼라를 삽입하여 여러 혈액 샘플을 채취하는 동안 정맥에 최소 파열을 일으킨다. 지혈 시스템의 작동을 최소화하기 위해, 최대 3개 정맥천자를 명시하였다. 캐뉼라는 전체 연구 기간 동안 제 위치에 존재하고 ~30mL의 정맥혈 샘플은 각 샘플링 시점에서 채취하였고, 각각의 경우 처음 2mL을 버렸다. 혈액 샘플을 채취한 후, 캐뉼라에 식염수를 흐르게 하여 봉쇄를 막았다. 혈소판 기능과 응고 시간의 측정을 위해서, 혈액을 플라스틱 주사기에 수집하였고 시트르산첨가 혈액수집 튜브에 옮겼다(최종 농도 시트르산나트륨, 13mmol/L). C-반응성 단백질(CRP)의 측정을 위해서, 단일 기준 혈액 샘플(5mL)을 EDTA 항응고제(최종 농도, 1.6g/L)에 첨가하였다. 각 시점에서 피브리노펩타이드 A의 측정을 위해서, 4.5mL 혈액을 EDTA, 트라실 및 클로로메틸케톤을 포함하는 0.5mL의 혼합 항응고제에 수집하였다. 혈액 샘플들을 실험실로 옮기기 위한 휴대용 배양기에 37°C로 배양하였다. 6μg/L보다 높은 피브리노펩타이드 A 농도로 정의된 활성의 증거를 나타내는 임의의 혈액 샘플들을 버렸다. 6mg/L보다 높은 기준 C-반응성 단백질 농도에 의해 증명된 대로, 증가한 염증 반응의 증거를 나타내는 임의의 지원자들을 영향을 받은 기간 동안 연구로부터 배제하였고 예정된 치료를 나중에 실시하였다.

[0304] 4.1.5 생체 외 혈소판 응집 연구

[0305] 혈소판-풍부 혈장에서 ADP와 콜라겐-유도 혈소판 응집의 정도의 측정을 각 시점에서 실시하였다. 다른 물리적 상태를 모방하기 위해 다른 효현제 농도를 사용하였다. 처선 혈소판 자극의 조건하에서 데이터를 수집하기 위해서, 표준화된 하위 농도(ADP의 경우 $3\text{ }\mu\text{mol/L}$, 콜라겐의 경우 3mg/L)를 부최적으로 정의하고, 표준화된 상위 농도(ADP의 경우 $7.5\text{ }\mu\text{mol/L}$, 콜라겐의 경우 5mg/L)를 최적으로 정의하였다. 이런 효현제 농도들은 모든 측정을 위해 사용하였다. 치료 또는 제어 간섭 후 관찰된 혈소판 응집에 대한 효과들은 기준 값들과 비교해서 추출물 / 플라시보의 소비 후 응집 곡선 아래 면적의 백분율 변화로 표현한다.

[0306] 4.1.6 보충제 측정

[0307] 고 혈장 CRP의 탐지는 세미-정량적 라텍스 응집 분석법(Dade Behring, UK)을 사용하여 실시하였고, 혈장 >6mg/L에서 레벨을 탐지하였다. 이런 역치를 급성 염증 시스템 활성화의 증거로 생각하고, 이와 같이 감염(예를 들어, 바이러스 감염 또는 감기의 개시) 또는 손상(예를 들어, 건염(tendonitis))과 관련이 있을 수 있다. 이런 급성 활성화의 신호를 나타내는 샘플은 혈소판 기능 연구를 위해 사용되지 않아야 한다.

[0308] FPA의 측정은 혈장에 대해 ELISA(Zymutest FPA assay, HyphenBioMed, France)에 의해 수행되었고 혈장으로부터 피브리노겐은 벤토나이트 흡착 처리에 의해 제거되었다. $6\mu\text{g}/\text{L}$ 보다 큰 레벨로 혈장에 FPA의 존재하면 혈액 샘플링 동안 지혈 시스템 활성화의 증거로 생각할 수 있다. 이런 샘플들은 혈소판 기능 측정을 위해 사용되지 않아야 하는데 이는 얻은 결과들이 신뢰할 수 없기 때문이다. 따라서 순환 CRP 레벨(circulating CRP level)과 혈액 샘플 FPA 레벨은 혈소판 측정을 위한 샘플들의 안정성을 나타내는데 사용되었다.

4.2 결과

[0310] 이 연구 동안 채취한 혈액 샘플들은 역치 $6\text{mg}/\text{L}$ 보다 높은 순환 CRP를 나타내지 않았고, 급성 단계 활성화는 연구 샘플링 날 동안 어떤 피험자에도 존재하지 않았다는 것을 나타낸다. 유사하게는, 이 연구를 위해 채취한 혈액 샘플들에서, 어떤 샘플도 역치 $6\mu\text{g}/\text{L}$ 보다 높은 FPA 레벨을 나타내지 않았다. 따라서 채취한 모든 샘플들은 혈소판 기능 연구에 적합한 것으로 판단하였다. 이런 선별 데이터는 포함되지 않는다.

[0311] 도 6에 제공된 데이터는 기준($t = 0$)과 치료 보충제의 소비 후 3시간($t = 3$)에서 수행된 혈소판 응집 측정값을 나타낸다. 결과들은 기준 값들과 비교하여 혈소판 응집의 억제율 %로 표현된다.

4.3 결론

[0313] 도 6은 본 발명에 따른 토마토 추출물들은 소비 3시간 후 ADP 매개 응집의 경우 18% 내지 28% 및 콜라겐 매개 응집의 경우 3% 내지 12%의 기준 혈소판 응집으로부터 감소를 나타낸다는 것을 증명한다. 대조군 보충제의 소비는 3시간 후 ADP-매개 응집의 경우 2% 내지 4% 및 콜라겐 매개 응집의 경우 대략 2%의 기준 응집으로부터의 변화를 일으켰다. 기준과 3시간 지점 사이의 차이는 대조군 보충제의 경우 현저하지 않았으나, 토마토 추출물 보충제의 경우 $P < 0.001$ 에서 현저하였다. 대조군과 토마토 추출물 보충제들 사이의 차이는 $P < 0.001$ 레벨에서 현저하였다.

[0314] 이런 결과들은 본 발명에 따른 토마토 추출물들은 부적절한 혈소판 응집을 특징으로 하는 질환을 치료하는데 유용하다는 것을 분명하게 입증한다.

[0315] 또한 본 발명자들은 본 발명에 따른 방법들은 공지된 토마토 추출물들(예를 들어, WO 99/55350에 개시된 것들)과 비교할 때 개량된 특성들을 가진 새로운 토마토 추출물들을 생산한다는 것을 확립하였다. 본 발명자들은 공지된 가공 방법에 의해 생산된 토마토 추출물과 글리코시드와 에스터의 보유를 목표로 하는 본 발명에 따른 방법들을 사용하여 생산된 토마토 추출물을 섭취한 후 측정한 생체 외 항 혈소판 활성을 비교하였다. 본 발명자들은 본 발명에 따른 3g의 토마토 추출물의 1회 복용은 기준과 비교해서 $3\mu\text{mol}/\text{L}$ ADP-유도 혈소판 응집의 28%의 억제를 일으켰으나, 공지된 추출물은 비록 9g의 추출물을 소비하여 이루어졌으나 ~25%의 ADP-유도 혈소판 응집의 억제를 일으켰다. 따라서 본 발명의 방법들은 대략 3배 추출물의 생체활성을 증가시키는 것으로 보인다. 본 발명의 첫 번째의 방법들은 더욱 효과적인 추출물을 형성하며 유리하게는 필수 일일 복용량을 감소시킬 수 있다.

실시예 5

[0317] 본 발명자들은 본 발명에 따른 추출물들을 포함하는 바람직한 제제들을 나타내는 여러 생성물을 제조하였다.

토마토 추출물들을 포함하는 요거트 드링크

[0319] 실시예 2 및 3에 개시된 대로 제조된 토마토 추출물들은 모두 요거트 드링크 속에 포함하는데 적합하다. 이런 드링크의 한 예는 다음과 같이 제조될 수 있다.

[0320] 살아있는 프로바이오틱 배양균(probiotic cultures) 없이 제조한 마시는 요거트는 저온살균되고 4~8°C로 냉각되어야 한다. 냉각된 요거트는 50:1의 비율로 실시예 2에서 제조한 토마토 추출물과 혼합되어야 하거나 1000:1(w/w)의 비율로 실시예 3에서 제조한 토마토 추출물과 혼합되어야 한다. 산도는 확인하고 시트르산으로 조절해야 하며 향신료도 조절되어야 한다. 프로바이오틱 배양액이 최종 제품에 필요한 경우, 조절 후에 첨가되어야 하고, 최종 혼합물은 1회용 150g 병에 포장되어야 한다.

[0321] 각각 1회용 150g 병은 실시예 2에 따라 제조된 3g 토마토 추출물 또는 실시예 3에 따라 제조된 150mg 토마토 추

출물을 포함해야 한다. 이것은 1회 일일 복용량을 나타낸다. 최종 제품들은 권장 보존기간(통상적으로 14 내지 21일) 동안 4°C에서 저장하였다.

[0322] 토마토 추출물을 포함하는 지방 스프레드

실시예 3에서 개시된 대로 제조되거나 추가로 가공되어 캡슐(encapsulate)을 형성하는 토마토 추출물은 지방 스프레드 속에 포함하는데 적합하다. 이런 제제의 예는 분쇄된 저당 토마토 추출물을 선-제제화되고 저온살균되고 냉각된 지방 스프레드 속에 200:1(w/w) 비율로 후-저온살균 첨가하여 생산할 수 있다. 혼합물은 균일한 분산을 얻기 위해 높은 전단력으로 균일화해야하고 여러 번 사용하는 용기 속에 포장되어야 한다.

표지 본문은 지방 스프레드의 정상적인 일일 섭취량은 대략 30g이어야 한다는 정보를 포함해야 한다. 일일당 30g 지방 스프레드의 소비는 대략 150mg 토마토 추출물의 일일 섭취량을 초래하게 될 것이고, 1회 일일 복용량을 구성한다. 스프레드는 보존기간(통상적으로 90일)의 기간 동안 4°C로 저장해야 한다.

[0325] 토마토 추출물들을 포함하는 농산물 주스-기초 드링크

실시예 2와 3에 개시된 대로 제조된 토마토 추출물들은 모두 농산물-주스 기초 드링크에 포함되기에 적합하다. 이런 드링크의 한 예는 다음과 같이 제조될 수 있다.

오렌지 주스 농축액을 1:5.4의 비율로 물로 희석한다. 재구성된 주스에, 0.1% 포도 향료, 0.05% 파인애플 향료 및 실시예 2에서 생산된 1.2% 토마토 추출물을 첨가하였다. 산도와 당도를 검사하고, 5%까지의 시트르산(산도 조절제)과 2%까지의 수크라로스를 필요한 대로 첨가한다. 121°C에서 90초 동안 저온살균한다.

저온살균된 혼합물을 1L 판지 또는 1회용 판지 또는 병에 포장한다. 개시한 대로 250mL의 최종 드링크는 1회 일일 복용량과 동일한 대략 3g 토마토 추출물을 포함해야 한다. 표지 세부사항은 이런 정보 및 하루 당 250mL 부분을 마시라는 권고를 포함해야 한다.

다른 농산물 주스 농축액도 사용하기에 동일하게 적절하며; 선택적으로 신선한 농산물 주스, 농산물 및 야채 주스의 혼합물 또는 가변적인 양의 과육을 포함하는 혼합물을 제조할 수 있다.

[0330] 캡슐

실시예 3에 개시된 대로 제조한 분쇄된 저당 토마토 추출물의 50% w/w 용액을 제조한다. 온도를 60°C로 올린다. 동일한 부피의 에터: 고-용융 지방, 예를 들어, 트라이글리세라이드의 용융되고 유화된 혼합물; 분산된 폴리사카라이드의 용액, 예를 들어, 페틴, 한천의 용액; 또는 다른 적절한 폴리머들을 혼합한다. 올바른 혼합을 얻기 위해 조심스럽게 균일화한다. 온도-제어 분사-건조와 같은 기술을 사용하고, 입자 크기를 제어하여 최종 입자 크기가 < 200 μ 이도록 캡슐을 형성한다. 착색제, 방부제 또는 자유-유동제와 같은 첨가제들을 적절한 대로 분사 건조 이전에 분산액에 첨가할 수 있다.

결과로 얻은 캡슐은 w/w 기초로 12% 내지 20% 토마토 추출물을 포함해야 한다. 캡슐은 어둔 곳에, 밀봉된 호일 포장 재료에 <4°C에서 저장해야 한다. 캡슐의 복용량은 식품들에 포함될 때 하루 당 400mg - 700mg이어야 한다.

[0333] 향 주머니에 담긴 즉시 용해 제제(Sacheted ready-to-dissolve formulations)

실시예 3에 개시된 대로 토마토 추출물은 미리 혼합되고, 즉시 용해되는 1회용 향 주머니 제제에 포함하기에 적합하다. 이런 제제의 한 예는 150mg 분쇄된 저당 토마토 추출물; 285g 말토덱스트린; 6.5g 딸기 크림 향신료; 0.8g 수크라로스; 3.8g 시트르산; 2.5g 천연 비트 적색; 및 0.25g 카라멜을 혼합하여 제조할 수 있다. 결과로 얻은 ~300d 건조 분말 믹스는 맛을 보기 위해 50mL 내지 300mL 물에 용해하는데 적합한 1회용 호일-보강 향 주머니에 제공될 수 있다. 각 300g 혼합물은 1회 하루 복용량의 토마토 추출물을 포함한다.

분쇄되고 향 주머니에 담긴 제제는 실온에 저장해야 하며 하루 당 물에 하나의 주머니를 소비하라는 지시가 제공되어야 한다.

[0336] 정제

실시예 2에 개시된 대로 제조한 토마토 추출물은 다음과 같이 예를 들어, 타정(tabletting)과 같은 직접 압축에 의해 의약 보충제 또는 식품 보충제를 위한 정제를 제조하는데 사용될 수 있다.

실시예 2에 개시된 토마토 추출물은 타정 이전에 1 - 3 μ의 입자 크기 범위로 제분 / 분쇄되어야 한다. 미리-분쇄된 분말 추출물은 압축 공정 동안 윤활을 제공하기 위해 미세결정 셀룰로오스 또는 말토덱스트린 M700과 같은 부형제와 건조-혼합되어야 한다. 40% 추출물 대 60% 부형제의 비율이 적절하나, 10:90 내지 60:40의 비율도 사

용될 수 있다. 분쇄된 착색제들은 필요에 따라 첨가될 수 있다.

[0339] 1.5 - 2.0 tonnes / square inch의 압력으로 설정된 통상적인 타정 장치를 사용하여, 5kg 강도의 212g 정제들을 생산할 수 있다. 이런 정제들은 정제당 85mg 토마토 추출물을 포함할 것이다. 박층화된 알루미늄 호일 기포팩에 저장하는 것이 권장된다. 이런 포장에서, 정제들은 45°C까지의 온도하에서 저장하는데 안정할 것이다. 권장된 복용 레벨을 얻기 위해 하루당 두 정제를 함께 한 번에 또는 두 번 복용해야 한다.

실시예 6

[0341] 실시예 2에 개시된 방법들에 따라 제된 조성물의 직접 항 혈소판 효과들을 실시예 4에 기술하였다. 이런 항 혈소판 효과들은 혈액 유동성 또는 혈류에 중대한 영향을 미친다는 것을 설명하기 위해서, 추가 작업을 착수하였고, 여기서 전반적인 1차 지혈에 대한 이런 조성물의 효과들을 측정하였다. 지혈, 즉, 응고 과정에 의해 출혈의 멈춤은 두 부분으로 일어난다. 1차 지혈은 전혈이 유동하는 상태하에서 혈소판 미세- 및 거대-응집체들을 형성하고 콜라겐-풍부 표면(보통 혈관벽) 상에 최초 혈소판 덩어리를 형성하는 능력을 의미한다. 2차 지혈은 트롬빈에 의해 유발된 이런 1차 덩어리에 피브린 네트워크의 형성을 의미하고, 혈전용해를 통해 용해하는데 상당한 시간이 걸리는 더욱 영구적인 덩어리를 형성한다. 1차 지혈의 측정은 혈액 유동성과 혈류에 영향을 주는 토마토 추출물 조성물의 효과를 검사할 때 응집 데이터 단독보다 생리학적으로 더 관련이 있을 수 있는 데이터를 제공한다.

[0342] 다음 실시예에서, 실험이 개시되며 여기서 혈소판 기능 분석기, PFA-100®를 사용하여, 실시예 2에 개시된 방법들에 따라 제조된 조성물의 전반적인 1차 지혈에 대한 효과를 검사하였다. 혈소판 기능 분석 장치는 혈액의 소량 샘플에서 1차 지혈의 측정을 위한 유용한 도구가 되었다. 이 검사 시스템은 1차 지혈의 생체 외 혈소판 의존 상태를 모방하면서 유동학적 인자들의 역할의 범위를 정하는 마이크로프로세서 제어 장비이다. 기본적으로, 시스템은 콜라겐-ADP(COL-ADP) 또는 콜라겐-에피네프린(COL-EPI) 코팅 막들에 대한 혈소판 상호작용을 관찰한다. 시트르산첨가 혈액의 샘플들을 막에 절단하여 형성된 150 마이크로미터 구멍을 통해 제어된 흐름 조건(절단 속도: 4,000 - 5,000/s)하에서 흡입된다. 과정 동안, 커지는 혈소판 마개가 구멍을 통과하는 혈류를 점차 막는다. 혈액 샘플에서 혈소판 지혈 용량은 초로 표현한 혈소판 마개가 구멍을 막는데 필요한 시간(폐색 시간(closure time))으로 나타내어진다.

6.1 연구 프로토콜

6.1.1 연구 목적 및 짧은 개요

[0345] 이 연구는 건강한 피험자들에서 1차 지혈에 대해, 대조군 보충제와 비교해서, (실시예 2에 개시된 방법들에 따라 제조된) 3g의 토마토 추출물 시럽을 소비하는 생체 외 항 혈소판 효과를 검사하였다.

6.1.2 연구 설계

[0347] 정상적인 지혈 변수(혈구수)를 가지며, 심각한 질병 또는 지혈 장애의 병력이 없고 혈소판 기능에 영향을 주는 것으로 알려진 식품 보충제 또는 약물을 복용하지 않는 45 - 75세의 건강한 성인 6명을 모집하였다. 문서화한 공지된 동의서를 받았고 연구는 그램피언 리서치 에티커미티(Grampian Research Ethics Committee)에 의해 승인받았다. 기준 혈액 샘플들(시트르산 텍스트로스 베퍼로 항 응고함)을 07:00 내지 08:30 사이에 금식한 피험자들로부터 채취하였다. 기준 샘플의 수집 직후, 피험자들은 치료(TE) 보충제 또는 대조군 보충제를 소비했다. 보충 후 추가 혈액 샘플들을 t = 3hours 및 t = 5hours의 시간에 채취하였다.

6.1.5 생체 외 혈소판 응집 연구

[0349] 전혈 샘플들의 경우 PFA-100의 폐색 시간의 측정은 각 시점에서 실시하였다. 측정은 콜라겐-에피네프린 막들을 사용하여 실시하였다. 간략하게, 적절한 막들을 포함하는 카트리지들을 실온으로 만들고, 900 μ l의 항 응고된 전혈을 각 카트리지의 저장소에 삽입하였다. 그런 후에 카트리지들을 PFA-100의 처리 장치 속에 즉시 삽입하였다. 막 구멍이 폐색되거나(폐색 시간) 덩어리가 형성되지 않는 경우에 최대 300s의 동안 혈액을 높은 전단 속도로 카트리지 막을 통해 저장소로부터 자동으로 흡입하였다. 폐색 시간을 기록하고 인쇄하였다. 모든 측정들은 혈액 샘플링 후 최소 30분 동안 실시하였다.

6.2 결과

[0351] 각 치료에 대한 평균 폐색 시간은 도 7에 그래프로 제공된다. 이 도면에서 기록된 평균 폐색 시간은 기준(치료제(TE) 또는 대조군(C)에 의한 보충에 대한 0 시간) 및 TE 또는 C로 보충한 후 3시간 및 5시간에 대해

나타낸다. 각 그룹에 대한 $n = 3$ 이고 데이터는 ANOVA로 분석하였다. C와 TE 사이의 현저한 차이는 *에 의해 그 래프 상에 나타난다($P = 0.011$).

[0352] 6.3 결론

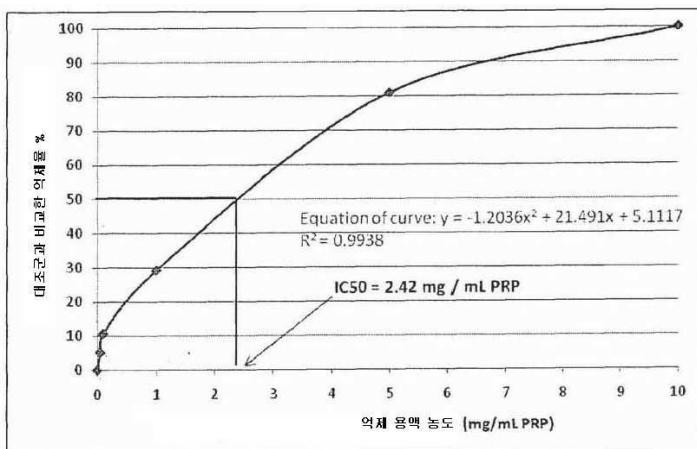
결과들은 본 발명에 따른 조성물들을 나타내는 토마토 추출물들은 소비 3시간 및 5시간 후 기준 값으로부터 24%의 PFA-100 폐색 시간에 평균 증가를 일으킨다는 것을 입증한다. 대조군 보충제의 소비는 3시간 후 16% 및 5시간 후 12%의 기준 폐색 시간으로부터의 평균 감소를 일으킨다. 기준과 3시간 및 5시간 시점 사이의 차이들은 대조군 보충제의 경우 현저하지 않았고 토마토 추출물 보충제의 경우 $P = 0.011$ 에서 현저하였다. 대조군과 토마토 추출물 보충제들 사이의 차이들은 현저하였다($P = 0.011$)

[0354] 이 결과들은 본 발명에 따른 토마토 추출물 보충제 조성물들은 각 카트리지 구멍에 혈소판 덩어리가 형성되는데 걸리는 시간을 증가시켜서, 혈소판 지혈 능력이 감소한다는 것을 나타낸다. 덩어리가 형성되는데 더 긴 시간은 더 높은 혈액 유동성을 의미한다.

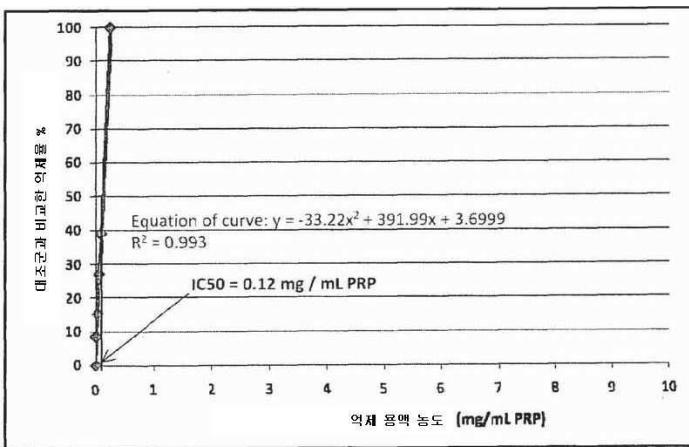
[0355] 이런 결과들은 본 발명에 따른 조성물(예를 들어, 토마토 추출물들)은 혈액 유동성을 감소시키는데 유용하다는 것을 분명하게 입증한다. 이것은 혈류를 정상화하는데 있어서 이들의 사용을 지지한다.

도면

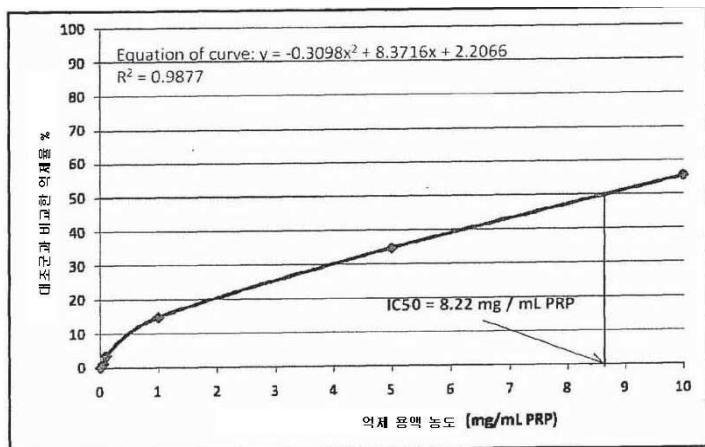
도면1a



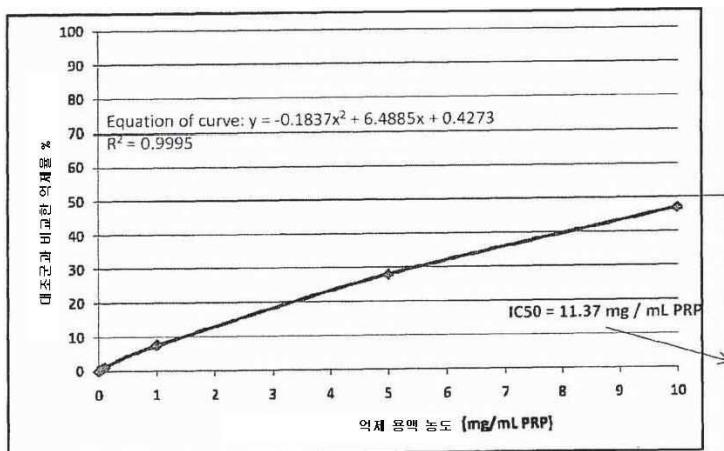
도면1b



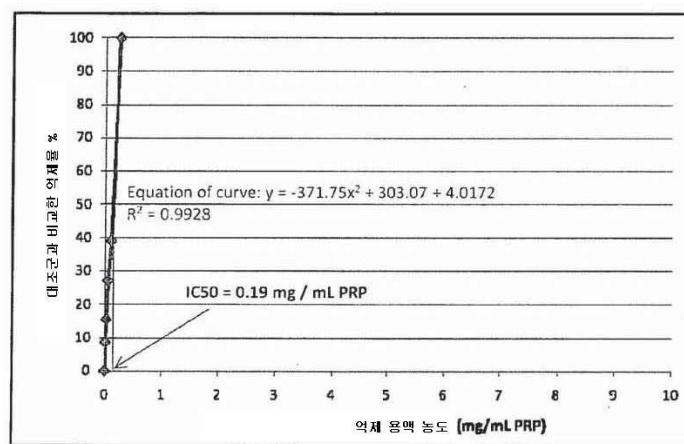
도면1c



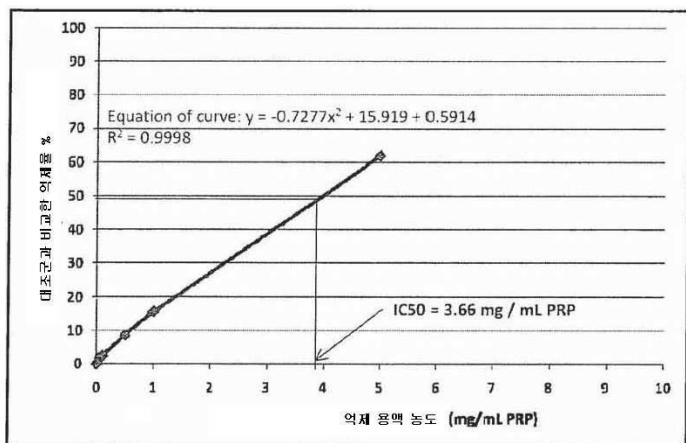
도면1d



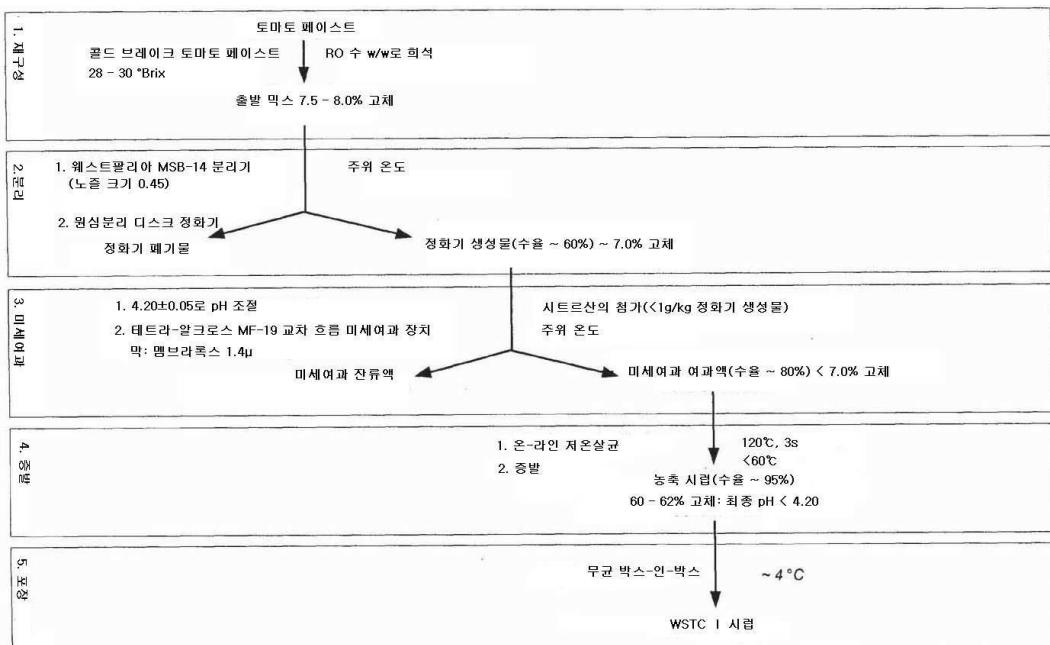
도면1e



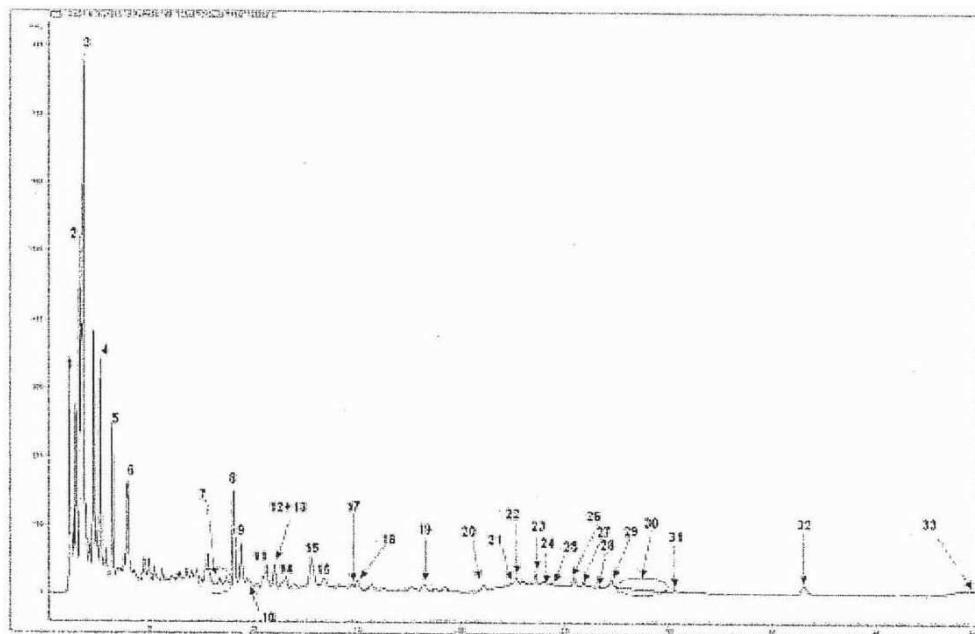
도면1f



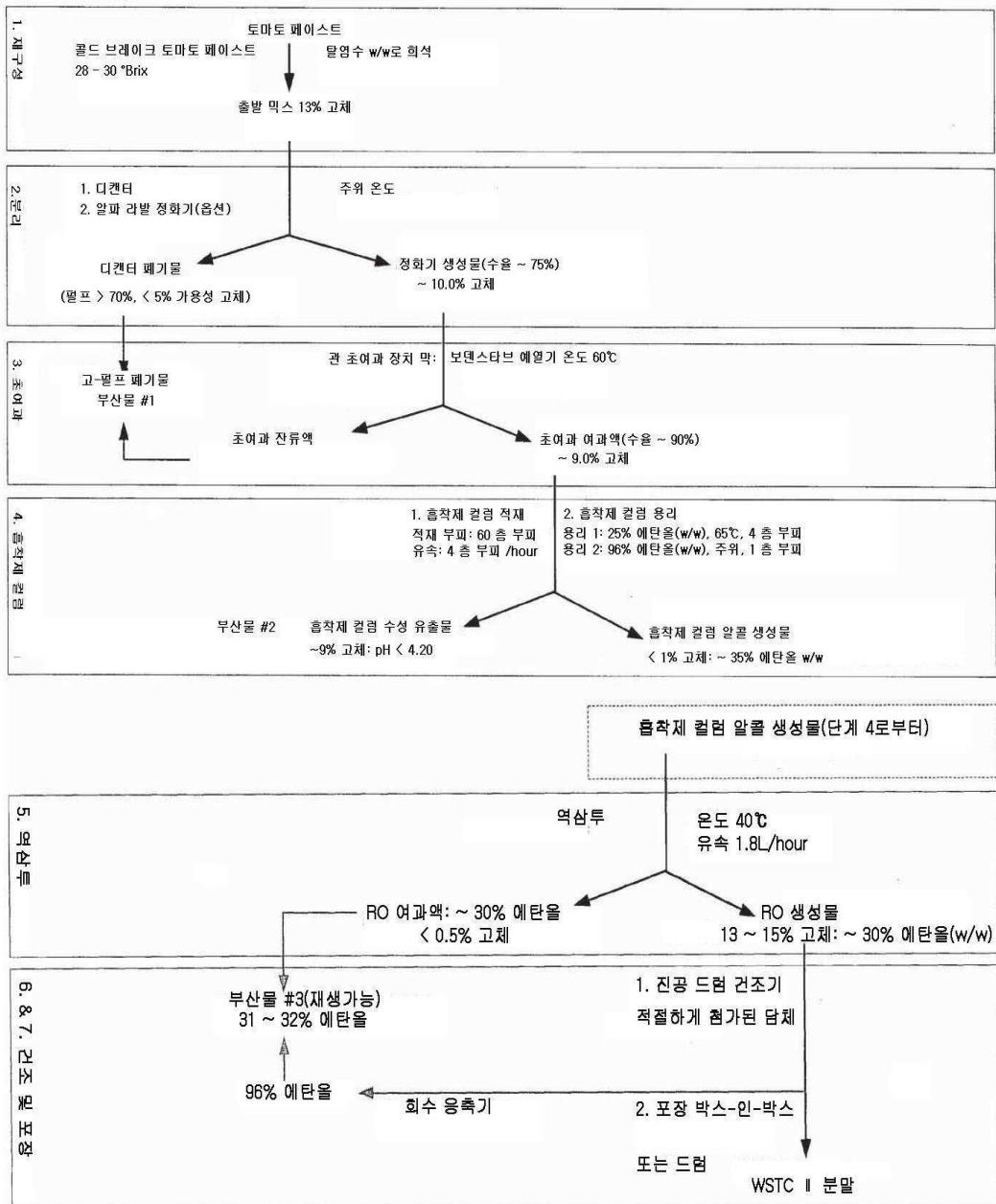
도면2



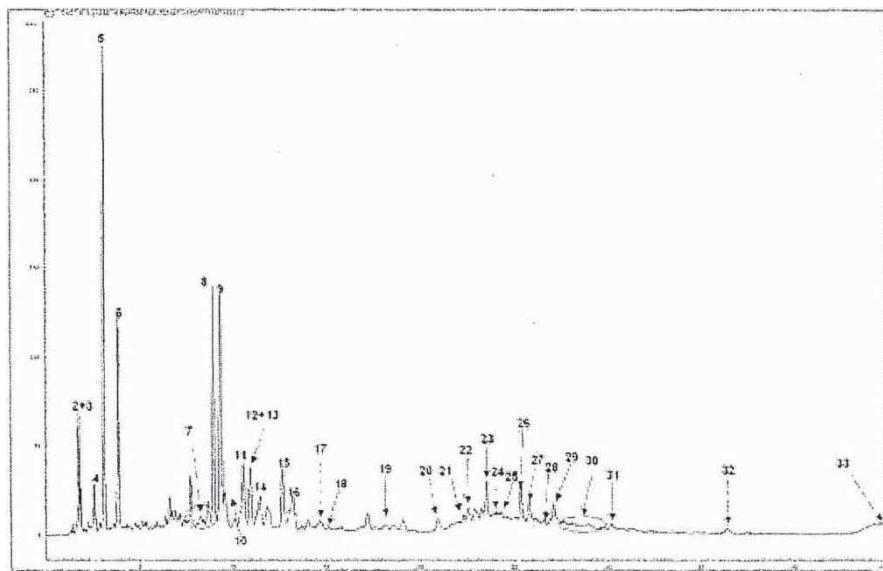
도면3



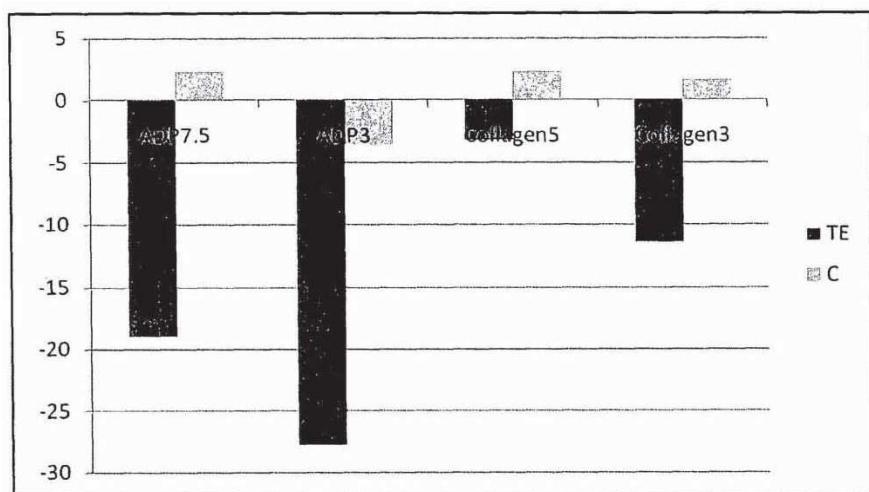
도면4



도면5



도면6



도면7

