



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년08월07일  
(11) 등록번호 10-1427381  
(24) 등록일자 2014년07월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A23L 1/30 (2006.01) A23L 2/38 (2006.01)  
A61K 31/19 (2006.01) A61P 7/02 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2013-0026277  
(22) 출원일자 2013년03월12일  
심사청구일자 2013년03월12일  
(56) 선행기술조사문헌  
Lin, W.-Y. et al. Planta Medica (2003) Vol.69  
pp.757-764

(73) 특허권자  
조선대학교산학협력단  
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)  
(72) 발명자  
정현숙  
광주광역시 북구 설죽로 595 롯데아파트 107동  
404호  
김성심  
광주광역시 광산구 풍영로 63 영천마을주공9단지  
아파트 914동 1403호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
최규환

전체 청구항 수 : 총 5 항

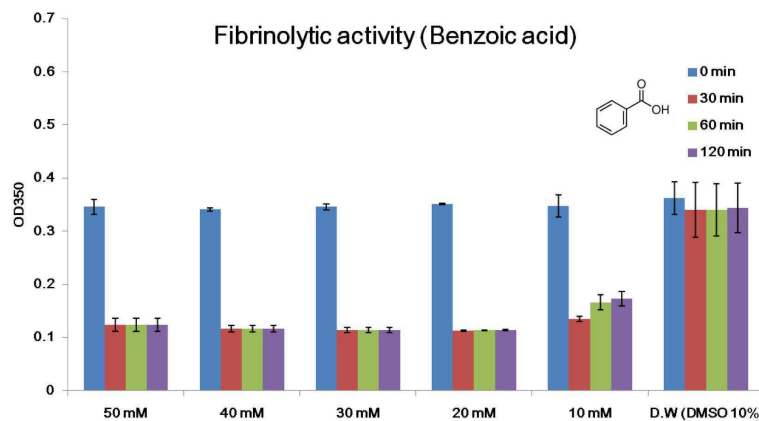
심사관 : 윤재욱

(54) 발명의 명칭 항혈전 활성을 갖는 프로토키테큐산 유도체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 항혈전 활성을 갖는 프로토키테큐산 유도체 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 항혈전 약학 조성물은 통상의 음료, 건강 보조 식품, 또는 의약품에 적용할 수 있어 동맥경화증, 뇌출혈, 뇌졸중 또는 뇌경색과 같은 혈전형성을 수반하는 질환의 예방 및 치료에 큰 효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

**박재영**

광주광역시 남구 수박등로18번길 10-6, 201호(월산동, 광남빌라)

**이범기**

전라남도 광양시 공영로 39 호반리젠시빌아파트 102동 1105호

**최학준**

광주광역시 동구 동계로15번길 1-23 (동명동)

**김웅**

광주광역시 동구 지산로57번길 6, 207호(지산동)

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

2,4,6-트리히드록시벤조산 일수화물(2,4,6-trihydroxybenzoic acid monohydrate), 3,5-디히드록시벤조산(3,5-dihydroxybenzoic acid), 트리메스산(trimesic acid), D-(-)-퀸산(D-(-)-quinic acid), 시클로헥산-1,1-디카르복실산(cyclohexane-1,1-dicarboxylic acid), (±)-시스-시클로펜탄-1,2-디카르복실산((±)-cis-cyclopentane-1,2-dicarboxylic acid), 시스,시스,시스,시스-1,2,3,4-시클로펜탄테트라카르복실산(cis,cis,cis,cis-1,2,3,4-cyclopentanetetracarboxylic acid), 시클로부탄-1,1-디카르복실산(cyclobutane-1,1-dicarboxylic acid), 시스-시클로부탄-1,2-디카르복실산(cis-cyclobutane-1,2-dicarboxylic acid) 및 트랜스-시클로부탄-1,2-디카르복실산(trans-cyclobutane-1,2-dicarboxylic acid)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 프로토카테큐산 유도체를 유효성분으로 함유하는 항혈전 식품 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 식품 조성물은 혈전 및 혈소판 응집으로 인한 고혈압, 심장병, 뇌졸중 또는 심근경색의 개선용으로 사용되는 것을 특징으로 하는 항혈전 식품 조성물.

### 청구항 3

2,4,6-트리히드록시벤조산 일수화물(2,4,6-trihydroxybenzoic acid monohydrate), 3,5-디히드록시벤조산(3,5-dihydroxybenzoic acid), 트리메스산(trimesic acid), D-(-)-퀸산(D-(-)-quinic acid), 시클로헥산-1,1-디카르복실산(cyclohexane-1,1-dicarboxylic acid), (±)-시스-시클로펜탄-1,2-디카르복실산((±)-cis-cyclopentane-1,2-dicarboxylic acid), 시스,시스,시스,시스-1,2,3,4-시클로펜탄테트라카르복실산(cis,cis,cis,cis-1,2,3,4-cyclopentanetetracarboxylic acid), 시클로부탄-1,1-디카르복실산(cyclobutane-1,1-dicarboxylic acid), 시스-시클로부탄-1,2-디카르복실산(cis-cyclobutane-1,2-dicarboxylic acid) 및 트랜스-시클로부탄-1,2-디카르복실산(trans-cyclobutane-1,2-dicarboxylic acid)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 프로토카테큐산 유도체를 유효성분으로 함유하는 항혈전 약학 조성물.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 약학 조성물은 혈전 및 혈소판 응집으로 인한 고혈압, 심장병, 뇌졸중 및 심근경색이 포함된 군에서 어느 하나 이상의 혈전증으로 인한 질병의 예방 및 치료용으로 사용되는 것을 특징으로 하는 항혈전 약학 조성물.

### 청구항 5

제3항 또는 제4항의 조성물로 제조된 경질 및 연질 캡슐제, 정제, 당의정, 필름코팅정, 나정, 장용정, 산제, 현탁제, 시럽제 및 주사제로 구성된 군으로부터 선택된 항혈전 약학 제제.

## 명세서

## 기술분야

[0001]

본 발명은 항혈전 활성을 갖는 프로토카테큐산 유도체 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 벤조산(benzoic acid), 2,4,6-트리히드록시벤조산 일수화물(2,4,6-trihydroxybenzoic acid monohydrate), 3,5-디히드록시벤조산(3,5-dihydroxybenzoic acid), 트리메스산(trimesic acid), D-(-)-퀸산(D-(-)-quinic acid), 시클로헥산-1,1-디카르복실산(cyclohexane-1,1-dicarboxylic acid), (±)-시스-시클로펜탄-1,2-디카르복실산((±)-cis-cyclopentane-1,2-dicarboxylic acid), 시스,시스,시스,시스-1,2,3,4-시클로펜탄테트라카르복실산(cis,cis,cis,cis-1,2,3,4-cyclopentanetetracarboxylic acid), 시클로부탄-1,1-디카르복실산(cyclobutane-1,1-dicarboxylic acid), 시스-시클로부탄-1,2-디카르복실산(cis-cyclobutane-1,2-dicarboxylic acid) 및 트랜스-시클로부탄-1,2-디카르복실산(trans-cyclobutane-1,2-dicarboxylic acid)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 프로토카테큐산 유도체를 유효성분으로 함유하는 항혈전 약학 조성물 및 항혈전 식품 조성물에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0002] 최근 선진국뿐만 아니라 우리 나라에서도 동맥경화증, 뇌출혈, 고혈압, 심장병, 뇌졸중, 뇌경색 등 순환기 질환이 사망원인 1, 2위를 차지하게 되었다. 이러한 성인병은 현대사회로 발전하면서 식생활 양식의 변화 및 내, 외부적인 환경 스트레스로 인해 중, 장년층에서 빈번하게 발생하고 있다. 다양한 원인에 의해 혈관이 막혀 상기 질병들이 발생할 수 있는데, 심장 혈관이 막힐 경우 심근 경색증이 일어날 수 있고, 뇌의 혈관이 막혔을 때 뇌경색이 발병된다. 뇌경색의 경우 질병이 계속 진행되어 뇌졸중 증세가 나타나 목숨을 잃게 될 수 있다. 미국의 경우 뇌졸중이 성인의 사망 원인 중 3번째로 높은 순위를 차지하고 있으며 운동성이 무력하게 되는 가장 큰 요인으로 알려져 있다. 이들 질환의 주요 발병 원인으로는 혈전(thrombus)으로 알려져 있는데, 혈전이란 과잉 혈소판 응집에 의해 매개 되는 병리현상으로 인식되고 있다.
- [0003] 혈전은 혈액 인자의 응집물로서, 주로 혈소판 및 피브린의 응집물로 이루어지며, 통상적으로 혈관의 과도한 출혈을 막기 위하여 형성된다. 혈소판이 내피하층의 표면과 접촉시 혈전을 생성시켜 혈관계를 차단하는 반응이 개시되는데 이러한 과정을 지혈이라고 하고, 상기 과정은 상처 부위에서 과도한 출혈을 막는데 매우 중요하다. 동맥 혈전은 국소 폐색에 의한 심각한 질환을 야기하는 반면, 정맥 혈전은 주로 원거리 폐색, 또는 색전을 야기한다.
- [0004] 혈관을 막는 기전은 혈액응고 기전과 혈전형성 기전이 존재한다. 혈액응고 기전은 용해성 피브리노겐이 난용성 피브린으로 변화되어 혈액이 응고되는 것으로, 주 개시자로는 외인성 인자인 조직인자(TF; tissue factor)와 외인성 인자인 VIIa 인자(factor VIIa)가 있다. 각 단계에서 여러 가지 응고 인자를 활성화시켜 섬유소 응고(fibrin clot; cross-linked fibrin molecule)가 형성되고, 이때 트롬빈이 생성되는데 이 물질이 강한 혈소판 활성화물질로 활성화 인자 방출을 자극하게 된다. 혈전형성 기전은 손상된 혈관 내피 노출시 혈소판이 콜라겐에 부착되고, 서로 활성화에 의해 점성의 젤라틴 덩어리를 형성하는 것이므로, 정상적인 혈관 내피 세포에 생기는 것이 아니라 손상된 혈관으로부터의 출혈을 막기 위한 자발적인 과정이다.
- [0005] 현재까지 혈전증의 치료에 전형적으로 사용되어온 의약품은 유로키나아제(urokinase), 스트렙토키나아제(streptokinase) 및 tPA(tissue-type plasminogen activator) 등이 있다. 그러나, 이들은 고가이며, 반감기가 짧고 전신출혈의 부작용이 있으며, 유로키나아제를 제외하고는 경구투여가 불가능하다는 단점 등의 문제점을 지니고 있다. 따라서, 이러한 혈전증 치료제의 제한성 때문에 현재 혈전증을 치료하기 위한 새로운 방법들이 모색되고 있다.
- [0006] 따라서, 본 발명에서는 예로부터 건위, 보혈작용이 있고 중풍, 동맥경화, 고혈압, 당뇨병 등을 예방하는 효능이 있는 것으로 알려져 왔으며 선식이나 차로도 이용되고 있는 솔잎의 착즙액으로부터 항혈전 물질인 프로토키테큐산을 분리정제 하였으며, 화학적·구조적 변화와 치환을 통해 PCA보다 항혈전 효과가 현저히 증가된 프로토키테큐산 유도체를 스크리닝하였다.
- [0007] 한편, 한국등록특허 제0784339호에는 혼합 생약제 추출물을 유효성분으로 함유하는 항혈전제가 개시하고 있으며, 한국공개특허 제2003-0048487호에는 숙취해소 효과가 있는 솔잎의 다단발효추출물이 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이, 항혈전 활성을 갖는 프로토키테큐산 유도체 및 이의 용도에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 솔잎의 착즙액으로부터 항혈전 물질인 프로토키테큐산을 분리정제 하였으며, 화학적·구조적 변화와 치환을 통해 프로토키테큐산보다 항혈전 효과가 현저한 프로토키테큐산 유도체 12종을 스크리닝함으로써, 본 발명을 완성하였다.

### 과제의 해결 수단

- [0009] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 벤조산(benzoic acid), 2,4,6-트리히드록시벤조산 일수화물(2,4,6-trihydroxybenzoic acid monohydrate), 3,5-디히드록시벤조산(3,5-dihydroxybenzoic acid), 트리메스산(trimesic acid), D-(-)-퀸산(D-(-)-quinic acid), 시클로헥산-1,1-디카르복실산(cyclohexane-1,1-dicarboxylic acid), (±)-시스-시클로펜탄-1,2-디카르복실산((±)-cis-cyclopentane-1,2-dicarboxylic acid), 시스,시스,시스,시스-1,2,3,4-시클로펜탄테트라카르복실산(cis,cis,cis,cis-1,2,3,4-cyclopentanetetracarboxylic acid), 시클로부탄-1,1-디카르복실산(cyclobutane-1,1-dicarboxylic acid), 시스

-시클로부탄-1,2-디카르복실산(cis-cyclobutane-1,2-dicarboxylic acid) 및 트랜스-시클로부탄-1,2-디카르복실산(trans-cyclobutane-1,2-dicarboxylic acid)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 프로토키테큐산 유도체를 유효성분으로 함유하는 항혈전 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 프로토키테큐산 유도체를 유효성분으로 함유하는 항혈전 식품 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

[0011] 따라서, 본 발명에 따른 항혈전 약학 조성물은 통상의 음료, 건강 보조 식품, 또는 의약품에 적용할 수 있어 동맥경화증, 뇌출혈, 뇌졸중 또는 뇌경색과 같은 혈전형성을 수반하는 질환의 예방 및 치료에 큰 효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대된다.

### 도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 대조구로 이용한 프로토키테큐산(PCA)의 섬유소용해 활성을 분석한 결과이다.

도 2는 프로토키테큐산 유도체인 벤조산(benzoic acid)의 섬유소용해 활성(fibrinolytic activity)을 분석한 결과이다.

도 3은 프로토키테큐산 유도체인 2,4,6-트리히드록시벤조산 일수화물(2,4,6-trihydroxybenzoic acid monohydrate)의 섬유소용해 활성을 분석한 결과이다.

도 4는 프로토키테큐산 유도체인 3,5-디히드록시벤조산(3,5-dihydroxybenzoic acid)의 섬유소용해 활성을 분석한 결과이다.

도 5는 프로토키테큐산 유도체인 트리메산(trimesic acid)의 섬유소용해 활성을 분석한 결과이다.

도 6은 프로토키테큐산 유도체인 D(-)-퀸산(D(-)-quinic acid)의 섬유소용해 활성을 분석한 결과이다.

도 7은 프로토키테큐산 유도체인 시클로헥산-1,1-디카르복실산(cyclohexane-1,1-dicarboxylic acid)의 섬유소용해 활성을 분석한 결과이다.

도 8은 프로토키테큐산 유도체인 (±)-시스-시클로펜탄-1,2-디카르복실산((±)-cis-cyclopentane-1,2-dicarboxylic acid)의 섬유소용해 활성을 분석한 결과이다.

도 9는 프로토키테큐산 유도체인 시스,시스,시스,시스-1,2,3,4-시클로펜탄테트라카르복실산(cis,cis,cis,cis-1,2,3,4-cyclopentanetetracarboxylic acid)의 섬유소용해 활성을 분석한 결과이다.

도 10은 프로토키테큐산 유도체인 시클로부탄-1,1-디카르복실산(cyclobutane-1,1-dicarboxylic acid)의 섬유소용해 활성을 분석한 결과이다.

도 11은 프로토키테큐산 유도체인 시스-시클로부탄-1,2-디카르복실산(cis-cyclobutane-1,2-dicarboxylic acid)의 섬유소용해 활성을 분석한 결과이다.

도 12는 프로토키테큐산 유도체인 트랜스-시클로부탄-1,2-디카르복실산(trans-cyclobutane-1,2-dicarboxylic acid)의 섬유소용해 활성을 분석한 결과이다.

도 13은 피브리노겐(fibrinogen)에 플라스민과 각종 화학물질을 처리한 후에 SDS-PAGE를 수행한 결과이다. 레인 M: 분자량 마커, 레인 1, 2: 피브리노겐, 레인 3, 4: 피브리노겐 + 플라스민, 레인 5, 6: 피브리노겐 + PCA, 레인 7, 8: 피브리노겐 + SA(shikimic acid). 피브리노겐에서는 플라스민과 화학물질(chemical)들과의 별다른 차이가 없다.

도 14는 피브린에 플라스민과 각종 화학물질을 처리한 후에 SDS-PAGE를 수행한 결과이다. 레인 M: 분자량 마커, 레인 1, 2: 피브린, 레인 3, 4: 피브린 + 플라스민, 레인 5, 6: 피브린 + PCA, 레인 7, 8: 피브린 + SA(shikimic acid). 레인 3 및 4에서 보듯이, 대조구인 레인 1 및 2와는 다른 밴드 패턴이 나타남을 확인할 수 있다. 하지만 화학물질들은 다른 대조구 레인인 1, 2와 차이를 나타내지 않지만, 혈전 분해능 효과가 있는 것으로 보아 피브린들이 서로 결합하고 있는 수소 결합을 공격하여 혈전을 제거한다고 볼 수 있다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 벤조산(benzoic acid), 2,4,6-트리히드록시벤조산 일수화물

(2,4,6-trihydroxybenzoic acid monohydrate), 3,5-디히드록시벤조산(3,5-dihydroxybenzoic acid), 트리메산(trimesic acid), D-(-)-퀸산(D-(-)-quinic acid), 시클로헥산-1,1-디카르복실산(cyclohexane-1,1-dicarboxylic acid), (±)-시스-시클로펜탄-1,2-디카르복실산((±)-cis-cyclopentane-1,2-dicarboxylic acid), 시스,시스,시스,시스-1,2,3,4-시클로펜탄테트라카르복실산(cis,cis,cis,cis-1,2,3,4-cyclopentanetetracarboxylic acid), 시클로부탄-1,1-디카르복실산(cyclobutane-1,1-dicarboxylic acid), 시스-시클로부탄-1,2-디카르복실산(cis-cyclobutane-1,2-dicarboxylic acid) 및 트랜스-시클로부탄-1,2-디카르복실산(trans-cyclobutane-1,2-dicarboxylic acid)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 프로토크아테큐산 유도체를 유효성분으로 함유하는 항혈전 약학 조성물을 제공한다.

- [0014] 본 발명의 일 구현 예에 따른 항혈전 약학 조성물에서, 상기 약학 조성물은 혈전 및 혈소판 응집으로 인한 고혈압, 심장병, 뇌졸중 및 심근경색이 포함된 군에서 어느 하나 이상의 혈전증으로 인한 질병의 예방 및 치료용으로 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0015] 본 발명의 명세서 내 용어, "혈전"은 주로 혈소판과 세포성분을 둘러싼 섬유소로 구성된 혈액성분의 응집을 말하며, 혈액의 기타 형성된 혈액 요소와 뒤섞인 것으로 주로 혈소판 및 피브린의 응집물로 이루어진다.
- [0016] 본 발명의 프로토크아테큐산 유도체를 유효성분으로 포함하는 항혈전 조성물이 예방 또는 치료 효과를 가지는 질병은 다양하고, 예를 들어 고혈압, 심장병, 뇌졸중, 심근경색 등이 있으나 이에 제한되지 않으며 혈전 및 혈소판의 응집으로 생기는 질병은 모두 이에 포함될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 조성물은 본 발명의 프로토크아테큐산 유도체와 함께 항혈전의 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로오스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 향산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 약학 조성물은 경구 투여용 제형, 예를 들면 정제, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 수용성 또는 유성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭실제(elixirs)로 제제화된다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제하기 위해 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕괴제; 스테아린산 마그네슘, 스테아린산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유가 함유된다. 캡슐제형의 경우는 상기에서 언급한 물질 이외에도 지방유와 같은 액체 담체를 함유한다.
- [0021] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내주사 주입방식에 의한다.
- [0022] 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.
- [0023] 본 발명의 조성물은 항혈전의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 조성물로 제조된 경질 및 연질 캡셀제, 정제, 당의정, 필름코팅정, 나정, 장용정, 산제, 현탁제, 시럽제 및 주사제로 구성된 군으로부터 선택된 항혈전 약학 제제를 제공한다.
- [0025] 본 발명의 조성물은 항혈전의 개선 또는 치료를 목적으로 식품에 첨가될 수 있다. 또한, 식품이란 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다.

- [0026] 본 발명의 프로토포카테큐산 유도체를 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 프로토포카테큐산 유도체를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에는 본 발명의 프로토포카테큐산 유도체는 원료에 대하여 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0027] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0028] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 시클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml당 일반적으로 약 0.01~0.04g, 바람직하게는 약 0.02~0.03g 이다.
- [0029] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0030] 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0031] 본 발명의 조성물은 혈전 형성을 수반하는 질환의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0032] 이하, 본 발명의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] **실험방법**
- [0034] 항혈전 효과 분석은 피브리노겐(Sigma-Aldrich)에 증류수를 넣어 1mg/ml로 만든 후 37℃에서 배양하였다. 완전히 녹은 피브리노겐 용액에 트롬빈(Sigma-Aldrich)을 1U/ml에 넣은 후 96-웰 플레이트에 90 $\mu$ l씩 분주하고 상온에서 피브린을 굳혔다. 각 화합물을 50 mM로 만들어 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM로 희석한 다음 굳은 피브린에 10  $\mu$ l씩 점적한 후 UV 분광광도계(Biotek)를 이용하여 파장(wavelength) 350nm에서 2시간 동안 관찰하였다.
- [0035] SDS-PAGE는 Harlow와 Lane (1988)의 실험방법에 기초한 변형된 방법을 이용한 Sambrook과 Russell이 저자인 Molecular cloning 3판에 나온 실험 방법을 사용하였다. 12% 폴리아크릴아미드 겔(polyacrylamide gel)을 사용하였으며, 분자량 마커(ProSieve) 10  $\mu$ l, 화합물을 처리한 피브린에 5X 로딩 버퍼를 섞은 용액을 20 $\mu$ l씩을 분주하였다. 이후 겔은 러닝 버퍼(running buffer)로 채워진 전기영동 탱크(electrophoresis tank)에서 100mV로 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 겔은 염색 키트(Bio-shop)를 이용하여 염색한 후 탈색을 거쳐 바이오-이미징 시스템(Bio-imaging system)을 사용하여 사진을 촬영하였다.
- [0036] **실시예 1. 프로토포카테큐산 유도체의 항혈전 효과 분석**
- [0037] 본 발명에서는 술알의 착즙액으로부터 항혈전 물질인 프로토포카테큐산(3,4-dihydroxybenzoic acid, PCA)를 분리 정제 하였으며, 화학적·구조적 변화와 치환을 통해 PCA보다 항혈전 효과가 더욱 뛰어난 물질을 찾아 항혈전 치료제로 적용하고자 하였다.
- [0038] PCA는 벤젠 고리(benzene ring)에 수소 대신에 카르복실기(-C(=O)OH) 1개와 히드록실기(-OH) 2개를 지닌 구조로써 식물의 대사과정 중 중간산물에 해당하는데, PCA가 어떤 원리로서 항혈전 물질로 작용하는지 알아보하고자 하

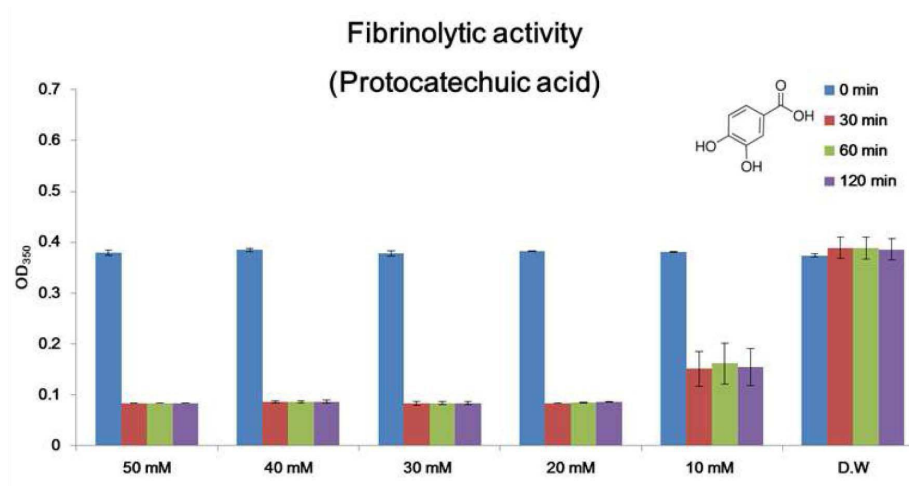
며, 생리 생화학적으로 항혈전제로 더 좋은 물질을 찾기 위하여 히드록실기의 변형을 통한 벤조산 유도체 화합물의 항혈전 기작을 알아보기 위한 실험을 수행하였다.

- [0039] PCA의 3번 및 4번에 위치한 히드록실기를 제거한 벤조산(benzoic acid)의 경우 그 자체로 항혈전 효과를 지니며, PCA보다 히드록실기가 하나 더 많은 2,4,6-트리히드록시벤조산(2,4,6-trihydroxybenzoic acid)의 경우에도 항혈전 효과에 변화가 없는 것으로 보아 히드록실기의 존재와 개수는 항혈전 효과와 무관함을 알 수 있다(도 2 및 도 3).
- [0040] 한편, 카르복실기(carboxy acid group)를 제거하고 3개의 히드록실기만 남아있는 1,3,5-트리히드록시벤젠 디히드레이트(1,3,5-trihydroxybenzene dihydrate)는 항혈전 효과가 없었으며, 이러한 결과는 히드록실기가 항혈전 효과에 영향을 미치지 않지만 PCA의 구조에서 히드록실기의 위치만 변경된 2,4-디히드록시벤조산(2,4-dihydroxybenzoic acid), 2,6-디히드록시벤조산(2,6-dihydroxybenzoic acid) 및 3,5-디히드록시벤조산(3,5-dihydroxybenzoic acid) 등은 히드록실기의 위치에 상관없이 항혈전 효과를 나타냈으므로, 항혈전 효능은 카르복실기에 의존적으로 활성을 나타냄을 확인할 수 있다(도 4).
- [0041] 카르복실기의 항혈전 효과에 대한 화학구조적 측면에서 기전을 알아보기 위하여 PCA의 카르복실기가 아미드기( $C(=O)NH_2$ )로 변형된 살리실아미드(salicylamide), 그리고 카르복실기의 수소 원자가 에틸기로 치환된 프로토키테큐산 에틸에스터(protocatechuic acid ethylester)의 항혈전 효능을 비교한 결과 살리실아미드 및 프로토키테큐산 에틸에스터는 항혈전 효과를 가지지 않는 것으로 보아 카르복실기( $C(=O)OH$ )의 수소가 항혈전 효능을 나타내는데 필수적으로 작용하는 것을 알 수 있다.
- [0042] PCA 보다 카르복실기가 하나 더 많은 프탈산(phthalic acid) 및 테레프탈산(terephthalic acid)의 효과가 PCA보다 높게 나타났으며, 카르복실기가 3개인 트리메스산(trimesic acid)도 PCA보다 효과가 더욱 뛰어남을 확인함으로써 카르복실기의 개수가 증가함에 따라 항혈전 효과가 증가됨을 알 수 있다(도 5).
- [0043] 그러나 흥미롭게도 카르복실기를 4개 가진 1,2,4,5-벤젠테트라카르복실산(1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid)은 항혈전 효과가 눈에 띄게 줄어들며, 급기야 카르복실기를 6개 가진 멜리트산(mellitic acid)은 항혈전 효과가 나타나지 않았다. 그러므로 카르복실기의 개수가 3개까지는 항혈전 효과가 증가하나 그 이후부터는 항혈전 효과가 급격하게 감소하는 것으로 미루어 카르복실기가 3개까지는 분자간 수소결합(inter-molecular hydrogen bonding)에 의해 항혈전 효과를 보이지만 4개 이상부터는 분자내 수소결합(intra-molecular hydrogen bonding)에 의해 자체 분자간 수소결합이 더 강해져서 안정하므로 더 이상 분자간 수소결합을 하지 않게 되므로 항혈전 효과가 급격하게 사라지는 것으로 분석되었다.
- [0044] 벤젠 고리(Benzene ring)가 항혈전 효과에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 벤젠 고리에 탄소를 질소로 치환한 피리미딘(pyrimidine) 및 피라진(pyrazine)을 실험한 결과 항혈전 효과가 나타나지 않았으나, 피라진(pyrazine)에 카르복실기(carboxy acid group)가 붙은 피라진 카르복실산(pyrazine carboxylic acid)의 경우 항혈전 효과를 나타내는 것으로 보아 벤젠 고리는 항혈전 효과에 영향을 미치지 않으며, 카르복실기의 영향으로 혈전을 녹이는 것임을 알 수 있다.
- [0045] 평면 불포화 육각형의 벤젠 고리가 아닌 의자형 포화 육각형의 시클로헥산(cyclohexane)에 카르복실기가 하나 붙은 D-(-)-퀸산(D-(-)-quinic acid)과 시클로헥산에 카르복실기가 2개 붙은 시클로헥산-1,1-디카르복실산(cyclohexane-1,1-dicarboxylic acid)에서 항혈전 효과가 나타나는 것으로 보아 벤젠 고리는 항혈전 효과에 영향을 미치지 않음을 또한 확인할 수 있었다(도 6 및 도 7).
- [0046] 굽은 형태의 포화 오각형인 펜탄(pentane)에 카르복실기가 하나 붙은 1-시클로펜텐카르복실산(1-cyclopentenecarboxylic acid), 카르복실기가 2개 붙은 (±)-시스-시클로펜탄-1,2-디카르복실산((±)-cis-cyclopentane-1,2-dicarboxylic acid), 카르복실기가 4개 붙은 시스,시스,시스,시스-1,2,3,4-시클로펜탄테트라카르복실산(cis,cis,cis,cis-1,2,3,4-cyclopentanetetracarboxylic acid)은 항혈전 효과가 카르복실기의 수에 따라 증가하였다(도 8 및 도 9).
- [0047] 나비형(V자형) 포화 사각형인 부탄에서도 카르복실기가 2개 붙은 시클로부탄-1,1-디카르복실산(cyclobutane-1,1-dicarboxylic acid), 시스-시클로부탄-1,2-디카르복실산(cis-cyclobutane-1,2-dicarboxylic acid), 트랜스-시클로부탄-1,2-디카르복실산(trans-cyclobutane-1,2-dicarboxylic acid)은 항혈전 효과가 뛰어났다(도 10, 도 11 및 도 12).
- [0048] 위의 실험 결과들로부터 혈액 내 섬유질(피브린)간 수소결합을 통해 응고되어있는 혈전을 분자간 수소결합으로

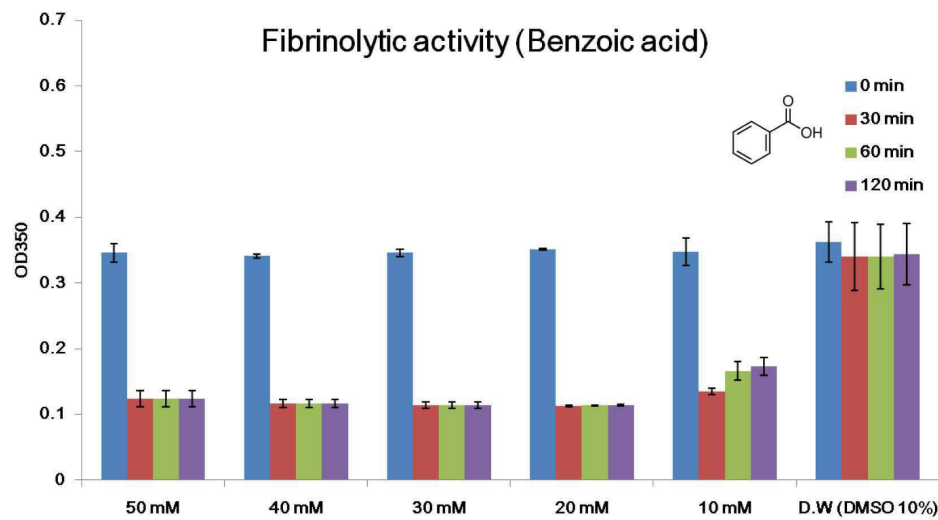
용해할 때 이 섬유질 자체들간 수소결합을 깰 수 있는 화학구조에 따라 항혈전능이 어떻게 나타나는지 알 수 있다. 체내에서 생성되는 단백질인 플라스민(plasmin)의 경우 피브린의 L-아르기닌과 L-리신을 가수분해하여 피브린 자체를 제거하는 양상과 비교하였을 때, 항혈전능을 가진 PCA, 아스피린, 쉬킴산(shikimic acid)과 같은 화합물들은 플라스민과 같이 혈전의 구성요소들을 분해하는 양상이 아니고, 아무것도 처리하지 않은 대조구와 같은 형태를 나타내는 것으로 보아 피브린들간의 수소결합을 파괴함으로써 혈전을 제거하는 양상을 보여주었다.

## 도면

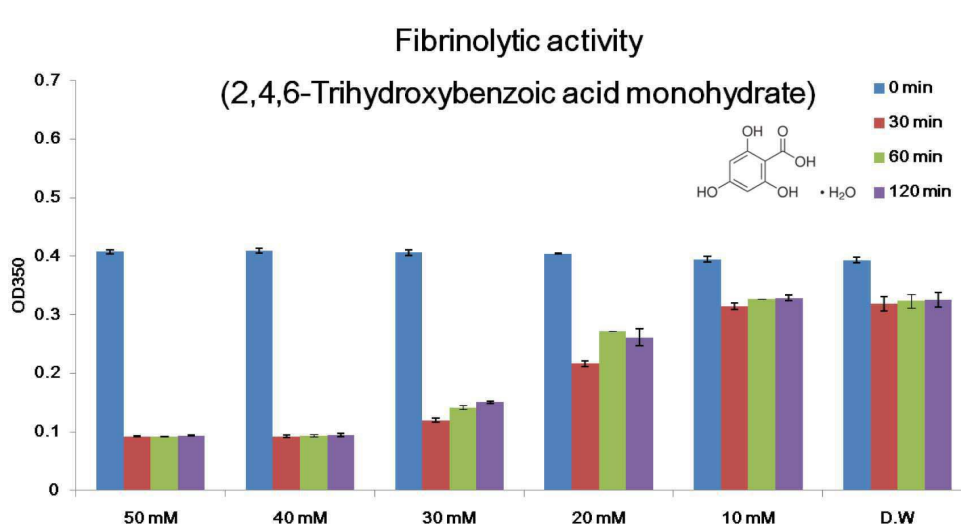
### 도면1



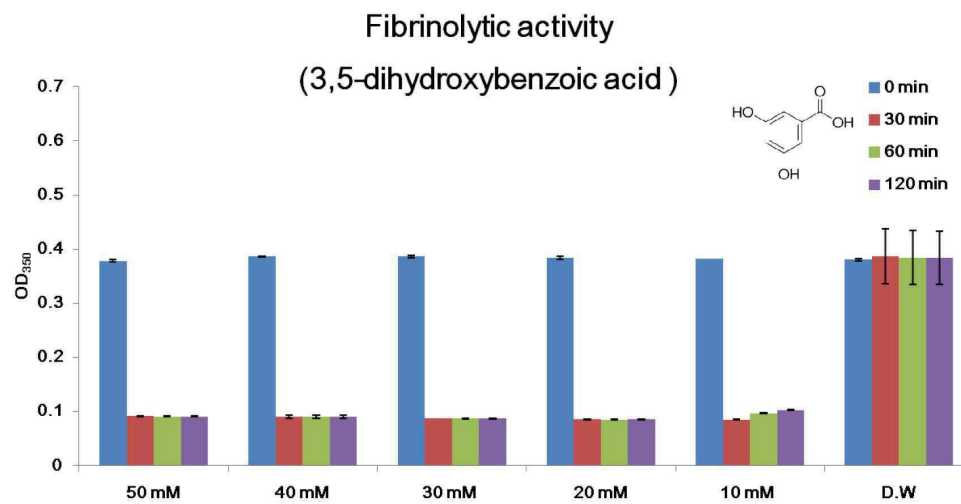
### 도면2



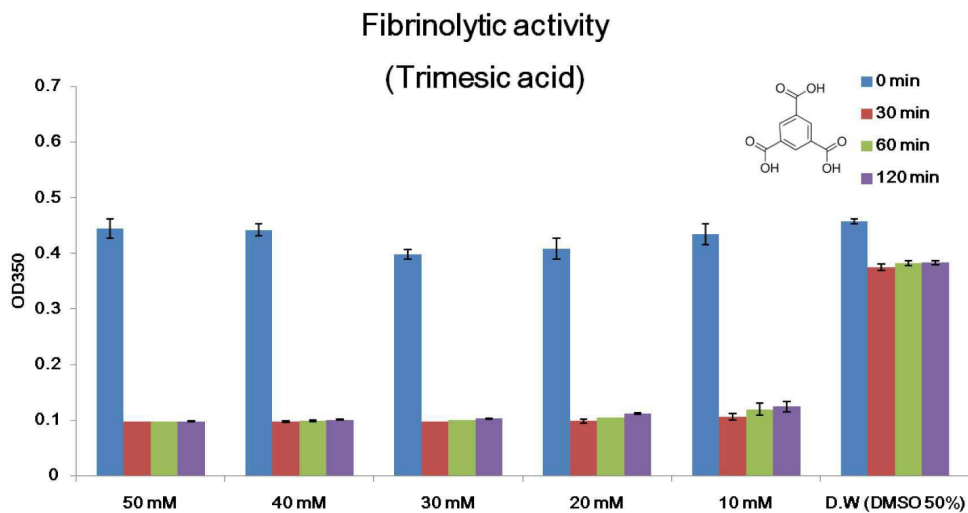
도면3



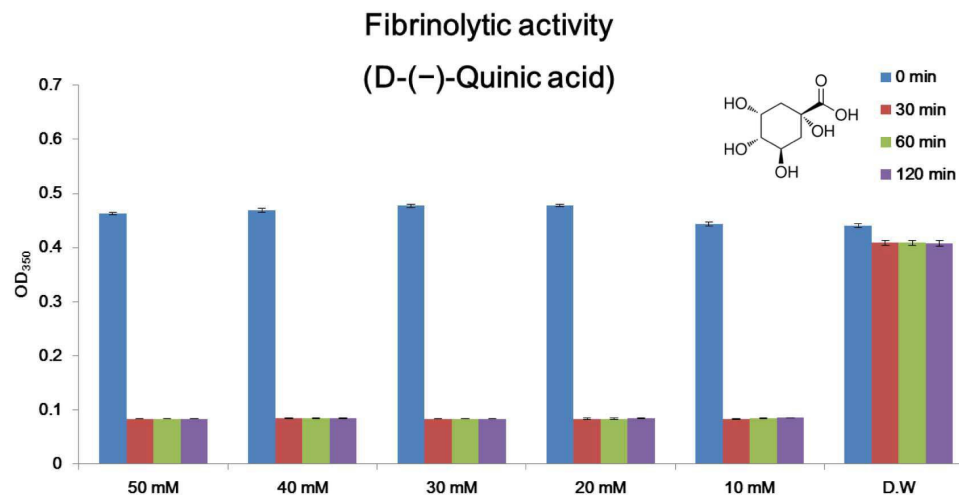
도면4



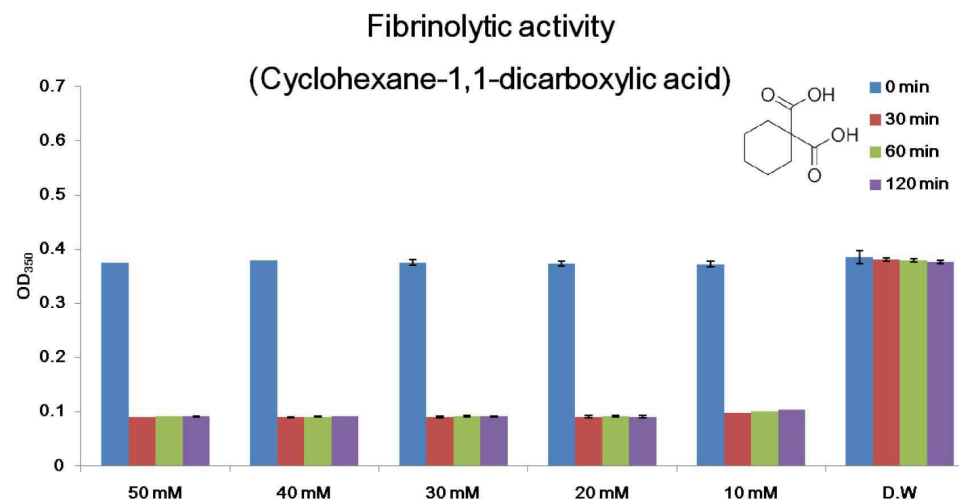
도면5



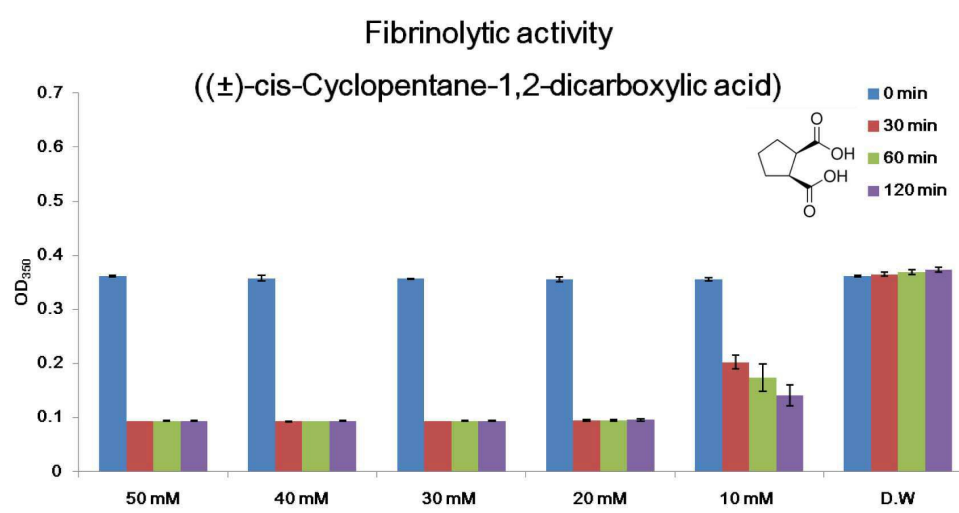
도면6



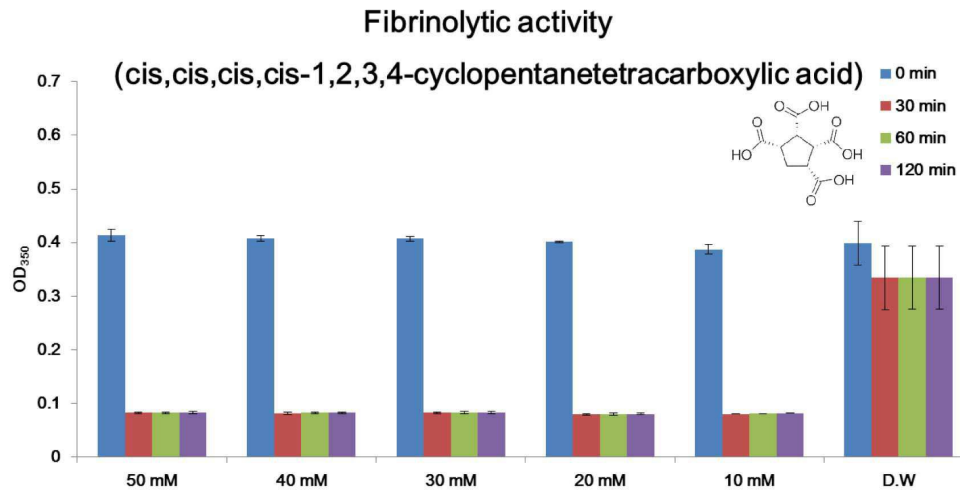
도면7



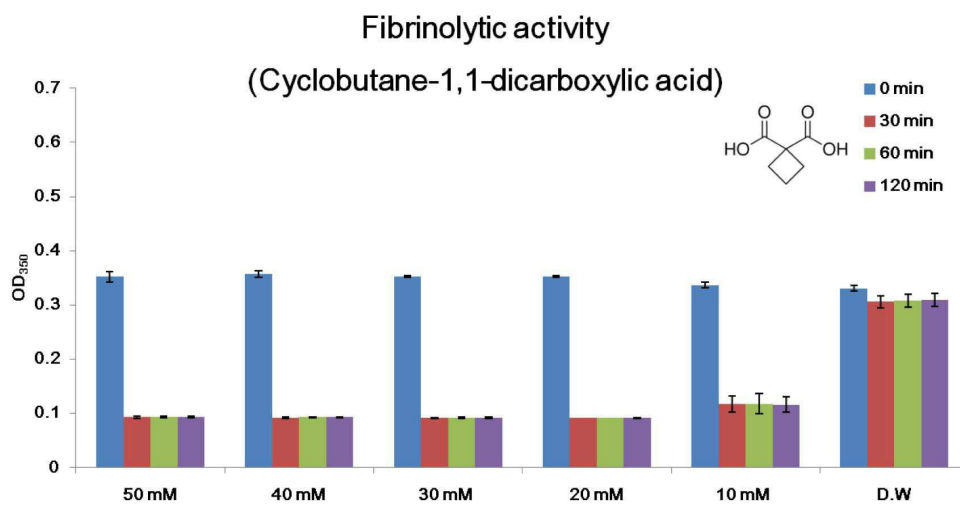
도면8



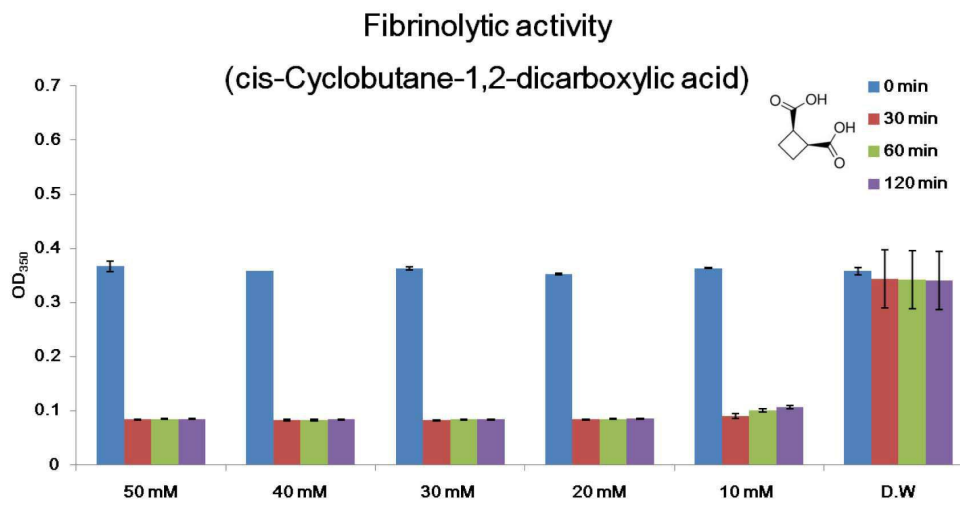
도면9



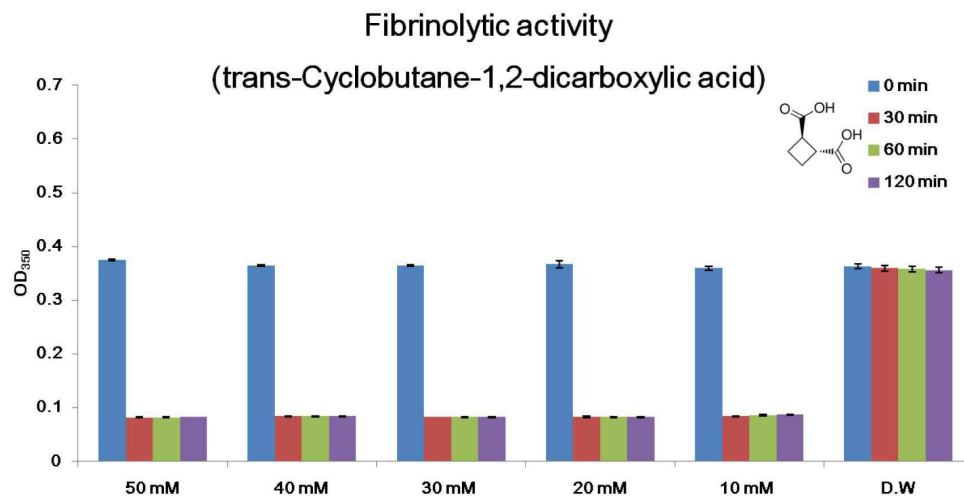
도면10



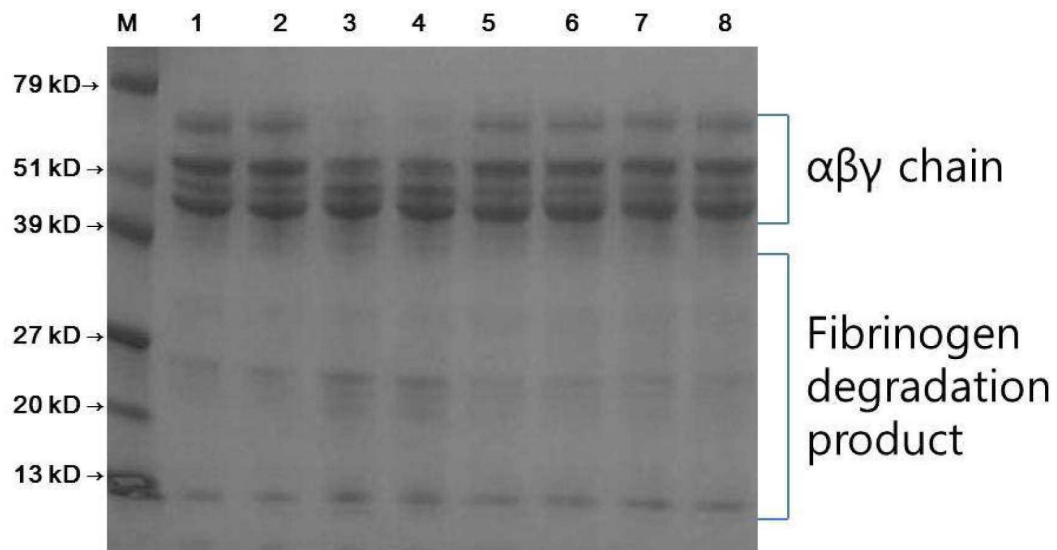
도면11



도면12



도면13



도면14

