



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0020612
(43) 공개일자 2018년02월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/64 (2015.01) A23L 1/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/64 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0105238
(22) 출원일자 2016년08월19일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
임영희
서울특별시 서대문구 통일로25길 30, 108동 208호(홍제동, 한양아파트)
이지윤
서울특별시 종로구 종로66길 28, 907호(송인동, 종로중흥S클래스)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 다해

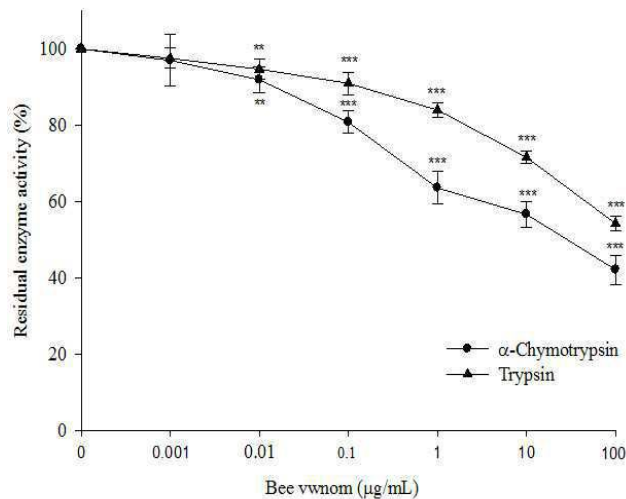
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 혈액응고인자의 활성 저해 및 세린 프로테아제 활성 저해 활성을 갖는 봉독을 포함하는 혈행 개선 조성물

(57) 요약

봉독을 유효성분을 함유하는 혈행개선용 조성물이 제공된다. 본 발명에 따른 조성물은 봉독이 가지는 세린 단백질 분해효소 저해 활성에 따라 활성 부분 트롬보플라스틴 및 프로트롬빈 시간을 증가시켜 혈행을 개선시킨다. 더 나아가, 혈행개선에도 불구하고 출혈지연반응이 없으므로, 별도의 부작용이 없다는 장점이 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2250/204 (2013.01)

(72) 발명자

박지은

서울특별시 광진구 아차산로 437, 102호(구의동,
퓨전빌)

한은혜

경기도 수원시 장안구 송정로76번길 45, 1206호(정
자동, 기산아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 114070032SB010

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 농생명산업기술개발

연구과제명 봉독을 이용한 탈모방지 및 양모촉진 효능 및 기전 연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교산학협력단

연구기간 2014.09.25 ~ 2017.09.24

명세서

청구범위

청구항 1

봉독을 유효성분을 함유하는 혈행개선용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 혈행개선 조성물은 혈액응고인자의 활성 저해 및 세린 프로테아제 활성 저해 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 혈행개선 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 봉독은 정제된 후 동결건조된 것을 특징으로 하는 혈행개선 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 봉독의 농도 증가에 따라 혈장응고 시간이 지연되는 것을 특징으로 하는 혈행개선 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 봉독의 농도 증가에 따라 활성 부분 트롬보플라스틴 및 프로트롬빈 시간이 증가하나, 트롬빈 시간은 상기 활성 부분 트롬보플라스틴 및 프로트롬빈 시간보다 적게 증가하는 것을 특징으로 하는 혈행개선 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 봉독은 세린 단백질 분해효소 저해 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 혈행개선 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 혈행개선 조성물은, 출혈지연반응이 없는 것을 특징으로 하는 혈행개선 조성물.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 따른 혈행개선 조성물용 봉독.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 봉독은 정제 후 동결건조된 것을 특징으로 하는 혈행개선 조성물용 봉독.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 혈액응고인자의 활성 저해 및 세린 프로테아제 활성 저해 활성을 갖는 봉독(bee venom, BV)을 포함하는 혈행을 개선시키는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 세린 단백질 분해효소 저해 활성에 따라 활성 부

본 트롬보플라스틴 및 프로트롬빈 시간을 증가시켜 혈행을 개선시키며, 혈행개선에도 불구하고 출혈지연반응이 없으므로, 별도의 부작용이 없다는 장점이 있는, 혈액응고인자의 활성 저해 및 세린 프로테아제 활성 저해 활성을 갖는 봉독(bee venom, BV)을 포함하는 혈행을 개선시키는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생체 내에서 혈액은 응고와 용해작용이 항상 평형을 이루고 있어 정상적인 상태에서는 출혈이나 혈전 등에 의해 흐름이 방해 받지 않는다. 하지만 다양한 원인에 의해 혈액의 흐름이 지연되거나 혈관벽이 손상을 받게 되면 이러한 평형상태가 깨지고 혈액 중의 혈소판이 점착, 활성화, 응집됨으로써, 혈액 응고계를 활성화하여 급속하게 혈전을 형성하게 된다. 혈전증은 응고된 혈액에 의해 혈관내 혈액의 흐름이 저지되는 것을 말하며 동맥, 정맥, 모세혈관 또는 심장 등 순환기계 어느 곳에서도 발생할 수 있어 생명에 지장을 주는 중대한 결과를 초래할 수 있다. 최근 국내에서 식습관의 서구화로 심혈관계질환의 발병이 급격히 증가하고 있다. 건강보험심사평가원의 자료에 의하면 2014년 협심증이나 심근경색으로 진단된 환자의 수가 약 68만명으로 그 수가 지속적으로 증가하고 있다. 약물요법으로는 현재 아스피린, 디피리다몰, 티클로피딘 등의 혈소판응집 억제제와 스트렙토키나아제(streptokinase, SK), 유로키나아제(urokinase, UK), 아미노카프로익산(aminocaproic acid) 등의 혈전용해제 및 헤파린, 와파린, 디쿠마롤 등의 항응고제가 보편적으로 사용되고 있다. 그 중 헤파린이 가장 많이 사용되고 있으나 사용에 여러 가지 단점을 가지고 있다. 헤파린은 돼지내장이나 소의 허파에서 추출하는데 그 수율이 현저히 낮고, 포유류에서의 프리온(prion) 관련 사고의 발생과 항 트롬빈 치료가 추가로 요구되는 등 많은 단점을 지니고 있다. 또한 생체 내에 혈전용해제를 지속적으로 투여하게 되면, 면역반응 유발에 의해 치료제의 효과가 감소하거나 출혈지연과 같은 부작용을 유발한다.

[0003] 따라서, 이러한 출혈지연과 같은 부작용없이 혈행을 개선시키는 조성물의 개발이 필요한 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 따라서 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 출혈지연과 같은 부작용없이 혈행을 개선시키는 조성물과 그 유효성분을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 봉독을 유효성분을 함유하는 혈행개선 조성물을 제공한다.

[0006] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 혈행개선 조성물은 혈액응고인자의 활성 저해 및 세린 프로테아제 활성 저해 활성을 가지며, 상기 봉독은 정제된 후 동결건조된 것이다.

[0007] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 봉독의 농도 증가에 따라 혈장응고 시간이 지연되며, 보다 구체적으로는 상기 봉독의 농도 증가에 따라 활성 부분 트롬보플라스틴 및 프로트롬빈 시간이 증가하나, 트롬빈 시간은 상기 활성 부분 트롬보플라스틴 및 프로트롬빈 시간보다 적게 증가한다.

[0008] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 봉독은 세린 단백질 분해효소 저해 활성을 가지며, 상기 혈행개선 조성물은, 출혈지연반응이 없다.

[0009] 본 발명은 또한 혈행개선용 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있는 봉독을 제공한다.

[0010] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 봉독은 정제 후 동결건조된 것이다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 봉독이 가지는 세린 단백질 분해효소 저해 활성에 따라 활성 부분 트롬보플라스틴 및 프로트롬빈 시간을 증가시켜 혈행을 개선시킨다. 더 나아가, 혈행개선에도 불구하고 출혈지연반응이 없으므로, 별도의 부작용이 없다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 다양한 농도(5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$)의 봉독의 LDH 유출을 나타낸 그래프이다.

도 2는 다양한 농도(0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$)의 봉독에 트롬빈 용액을 첨가한 후의 트롬빈 활성

변화를 나타낸 그래프이다.

도 3은 다양한 농도(0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$)의 봉독에 트립신 또는 카이모트립신을 첨가한 후의 각각의 활성 변화를 나타낸 그래프이다.

도 4는 출혈지연 반응에 대한 비교실험 결과 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 구현에 및 실시예를 상세히 설명한다.
- [0014] 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 구현에 및 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0015] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0016] 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용 오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "~(하는) 단계" 또는 "~의 단계"는 "~를 위한 단계"를 의미하지 않는다.
- [0017] 본 발명은 상술한 과제를 해결하기 위하여 봉독을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0018] 봉독은 꿀벌이 분비하는 약 40가지의 성분으로 구성된 물질로 천연 봉독에는 멜리틴(melittin), 아파민(apamin), MCD 펩타이드(MCD peptide), 아돌라핀(adolapin), 인지질 분해효소(phospholipase A2), 단백질 분해 효소 저해제(protease-inhibitors) 등 주요 유효성분이 함유되어 있다(Son DJ. et al., Pharmacology & Therapeutics 2007, 115, 246-270). 그 중 멜리틴 함량이 40-50%를 차지하고 있으며 인지질 분해효소는 10-12%를 차지하고 있으며 항염증 작용 및 항암효과를 보이는 것으로 알려져 있다. 아민류로는 히스타민(histamine), 도파민(dopamine) 및 노르에피네프린(norepinephrine) 성분이 1% 이하로 함유되어 있다.
- [0019] 봉독은 알레르기를 유발하는 것으로 알려져 있으나 전통적으로 진통 및 소염 효과를 보여 치료용으로 사용되어 오고 있다. 최근에는 류마티스 관절염(Seo BK et al., 대한침구학회 2005, 22, 19-32), 파킨슨병의 개선(Doo AR. et al., Brain Research 2012, 1429, 106-115.; Alvarez-Fische D., PLoS One. 2013, 8, e61700) 및 항치매와 같은 퇴행성 뇌질환의 치료뿐만 아니라 피부미백(한국공개특허 10-2012-0003178) 및 피부재생효과(한국공개특허 10-2011-0139486)에 효과가 있음이 알려져 있으나, 봉독의 혈행개선 효과에 관련된 내용은 어디에도 개시되어 있지 않다.
- [0020] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 정제 봉독을 제조하고, 봉독이 혈액 응고 시간에 미치는 영향을 측정하여, 혈액 응고에 대한 효과를 확인하였다.
- [0021] 구체적으로, 혈액응고시간은 PT (prothrombin time), aPTT (activated partial thromboplastin time) 및 TT (thrombin time)를 측정하였고, 봉독이 상기 PT, aPTT 및 TT를 얼마나 연장시키는지 확인하였다. 또한 혈행개선 효과가 출혈시 혈액응고 지연시간에 영향을 주는 부작용이 있는지를 확인 하였으며 혈소판등에 미치는 세포독성에 대해서도 확인하였다.
- [0022] 상기 PT는 조직이 손상되었을 때 일어나는 외인성 혈액 응고계로서 혈액 응고 인자 VII의 활성을 시작으로 하여 혈전 (fibrin clot)을 형성할 때까지의 시간을 말한다. aPTT는 혈관이 손상되었을 때 일어나는 내인성 혈액 응고계로서 트롬보플라스틴(thromboplastin)이 혈액 응고 인자 Xa, Va, Ca^{2+} 과 더불어 혈전을 형성시킬 때까지의 시간을 말한다. TT는 TCT (thrombin clotting time)라고도 하고 플라스마(plasma)에 과량의 트롬빈(thrombin)을 첨가한 후 혈액응고 시간을 측정하는 것으로 TT는 공통혈액응고 경로를 시험하는 일반적인 방법이다.
- [0023] 봉독의 혈행개선 효과를 확인하기 앞서 혈소판에 대한 독성시험을 실시하였다.
- [0024] 그 결과, LDH 유출이 없는 결과를 통해 사용농도 범위내에서 봉독은 세포 독성이 없는 것을 확인하였다(실험예

2, 도 1).

- [0025] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 혈액응고인자들에 대한 혈액응고 시간의 연장 효과에 대해 확인하였다.
- [0026] 그 결과, aPTT 및 PT는 봉독의 농도 의존적으로 시간이 지연되었고(실험예 3, 표 1), aTTP 및 PT에 대한 항응고 활성 또한 농도 의존적으로 증가하였음을 확인하였다(실험예 3, 표 2).
- [0027] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 봉독의 혈액응고인자 결핍 혈액에 대한 혈장응고 억제 작용을 확인하였다.
- [0028] 그 결과, 각 혈액응고인자가 결핍된 혈장 모두에서 봉독 투여 시 혈장 응고시간이 크게 증가하였고, 이를 통하여, 봉독의 혈액응고 억제 활성은 특정 혈장응고인자에 대한 특이적인 저해보다는 혈액응고인자 전반에 걸쳐 효과를 보이는 것임을 확인하였다(실험예 4, 표 3).
- [0029] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 봉독이 단백질 분해효소 활성을 억제하는 효과를 확인하였다. 구체적으로, 봉독이 혈장응고의 공통적인 특성인 세린 단백질 분해효소인 응고인자(coagulant factor)에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 혈액응고인자와 같은 종류의 세린 단백질 분해효소(Serine protease)인 트립신(trypsin)과 카이모트립신(a-chymotrypsin)에 대한 활성 억제 효과를 측정하였다.
- [0030] 그 결과, 봉독은 트립신에 대한 억제 효과를 나타내었고(실험예 5-1 및 도 2), 봉독이 농도 의존적으로 트립신과 카이모트립신의 작용을 억제하는 것을 통하여 봉독이 같은 종류의 세린단백질 분해 효소인 혈액응고인자들의 작용을 억제할 수 있음을 확인하였다(실험예 5-2 및 도 3).
- [0031] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 봉독의 항응고 효과가 혈액응고 지연시간에 영향을 주는지 알아보기 위해 출혈지연시간을 측정하였다.
- [0032] 그 결과, 봉독은 출혈지연에 대한 부작용은 없음을 확인할 수 있었다. (실험예 6, 도 4).
- [0033] 따라서, 본 발명자들은 봉독이 혈액응고를 억제하는 효과가 있음을 입증하여 본 발명을 완성하였다.
- [0034] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0035] 본 발명의 하나의 양태는, 봉독을 포함하는 혈행개선을 위한 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0036] 본 발명에서 봉독은, 벌이 가지고 있는 독액으로, 벌 복부 끝 독낭(毒囊)에 저장되어 봉침과 연결되어 자극 시에 분비되는 동물성 천연생리 활성물질들을 의미한다. 예를 들어, 꿀벌의 산란관에서 나오는 독액일 수 있고, 벌의 독선에서 분비되는 물질에 해당하는 한 특별히 한정되지 않는다.
- [0037] 또한, 상기 봉독은 생(生)봉독, 건조봉독, 봉독 추출물 및 정제봉독을 포함하고, 벌의 독선에서 분비되는 물질이 포함되어 있는 한 제한되지 않고 본 발명의 봉독에 해당한다. 본 발명에서 봉독은 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 봉독은 천연 또는 잡종 꿀벌로부터 추출 및/또는 정제하여 사용할 수 있다.
- [0038] 생봉독은 건조 또는 정제과정을 거치지 않은 것으로서, 비중이 1.1 내지 1.3, 산도(pH)가 5.2 내지 5.5 범위이고, 75%는 단백질 또는 펩타이드로 이루어질 수 있다.
- [0039] 봉독 추출물은 생봉독에서 펩티드 등을 포함하는 유효성분을 분리, 추출하여 얻을 수 있다. 상기 봉독 추출물은 당업계에서 공지된 다양한 추출 방법을 이용할 수 있으며, 바람직하게는 물, 탄소수 1~4의 무수 또는 함수 저급 알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등), 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸렌글리콜을 추출 용매로 하여 얻을 수 있다. 예를 들어, 봉독을 물로 현탁하고, 에틸아세테이트를 용매로 수회 추출하고, 분리된 수층을 다시 부탄올로 추출하며, 각층을 감압 농축하여 분획을 얻는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0040] 정제봉독은 상술한 추출 용매에 의한 추출물 이외에 통상적인 정제 과정을 거쳐 얻거나, 여과막을 이용한 분리, 다양한 크로마토그래피에 의한 분리, 또는 통상의 다른 정제방법에 의해 정제된 봉독을 포함할 수 있다. 예를 들어, 정제봉독은 봉독을 정제수(또는 증류수)로 용해한 후 이를 여과한 다음, 여과된 봉독을 동결건조 처리하여 수득할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명의 일 구현예로, 봉독은 본 발명의 조성물에 0.001 내지 0.01 중량%로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 봉독이 본 발명의 조성물에 0.001 중량% 미만인 경우 낮은 농도로 인하여 효과가 거의 없을 수 있고, 0.01 중량% 초과인 경우 봉독 성분에 의한 부작용이 발생할 수 있다.

- [0042] 본 발명에 따른 혈행개선 조성물은 봉독 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 유효성분으로 함유하는 것이다. 또한 본 발명의 혈행개선 조성물은 이미 사용되고 있는 약제와 함께 제제화하거나 병용하여 사용될 수 있으며 공지의 의약학용 담체(예, 분산제, 유화제, 안정제, 부형제, 용제, 결합제 등)와 조합하여 사용될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 약학 조성물은 제제 형태에 따른 적당한 투여경로로 투여될 수 있다. 투여방법은 특히 한정할 필요는 없고, 내용, 외용 및 주사에 의해 투여할 수 있고, 이 경우, 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 주사제는, 예를 들어 정맥내, 근육내, 피하, 피내 등에 투여할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은, 그 제제형태, 투여방법, 사용 목적 및 이것에 적용되는 환자의 연령, 체중, 증상에 따라서 적절히 설정되고, 일정하지 않지만 일반적으로는 제제중에 함유되는 유효성분의 양은 성인 1일당 예컨대 10 μ g~200 mg/kg일 수 있다. 그러나, 당업자는 특정 시약의 약물동력학적인 특성 및 그의 투여 모드 및 경로; 수여자의 나이, 건강, 체중; 증상의 성질 및 정도, 동시 치료의 종류, 치료의 빈도 및 목적하는 효과 등의 공지의 요인에 따라서 투여량을 조절할 수 있다.
- [0045] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 봉독을 혈액 시료에 처리하는 단계를 포함하는, 혈액 응고인자 및 트롬빈으로 이루어진 군에서 선택되는 세린 단백질 분해효소의 활성을 억제하는 방법에 관한 것이다.
- [0046] 바람직하게, 상기 혈액 응고인자는 인자 VII, 인자 IX, 인자 X, 인자 XI 또는 인자 XII 일 수 있다.
- [0047] 본 발명에서 봉독은 응고 시스템(coagulation system)에서 트롬빈은 물론, 트롬빈 형성에 관여하는 세린 단백질 분해 효소인자의 활성을 억제함으로써 항응고 효과를 보이는 것이 확인되었으므로, 혈액 시료에 봉독을 처리하여 혈액 응고인자 또는 트롬빈을 억제하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 혈액 응고인자 또는 트롬빈의 활성을 연구하는데 사용할 수 있고, 혈액 응고인자 또는 트롬빈과 관련된 질환의 치료제를 개발하는 데 있어서, 혈액 시료에 봉독과 후보 물질을 함께 처리하거나, 봉독 처리군을 비교 실험군으로 함으로써, 후보 물질이 혈액 응고인자 또는 트롬빈의 활성을 조절할 수 있는지 검증하는데 봉독을 사용할 수 있다.
- [0048] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0049] 실험예 1. 봉독의 제조공정 및 정제
- [0050] 비정제 봉독(국전약품) 50g과 정제수 2.5kg을 반응용기에 투입하고 30~35℃에서 2시간 교반하였다. 여과지를 이용하여 여과한 후 정제수 100g으로 세척하였다. 이 용액을 0.45 μ m 멤브레인 여과장치를 이용하여 여과하였다. 정제수 100g으로 세척한 후 90~120 시간 동결건조하여 정제 봉독 41g을 얻었다.
- [0051] 실험예 2: 세포독성시험
- [0052] 봉독의 혈소판에 대한 세포독성을 평가하기 위해 혈소판의 LDH 유리 정도를 지표로 이용하였다. 혈소판에 봉독을 농도별로 가한 후 LDH 유리 정도를 물질을 처리하지 않은 대조군을 100%로 산정하여 비교한 결과, 5 μ g/ml (105.0 $\pm$ 7.3%), 10 μ g/ml (107.9 $\pm$ 9.6 %), 20 μ g/ml (118.3 $\pm$ 11.2 %)에서 모두 대조군(100 %)과 비교하였을 때, 유의적인 LDH 유출이 없었다(도 1). 이때 대조군과 비교하였을 때 $p < 0.05$ 정도로 차이를 보이는 경우를 유의성 있는 LDH 유출로 보고자 하였으며, 하기 도 1에 의하면 5 μ g/ml (105.0 $\pm$ 7.3%), 10 μ g/ml (107.9 $\pm$ 9.6 %), 20 μ g/ml (118.3 $\pm$ 11.2 %)에서 모두 이 정도의 차이가 없어 유의한 LDH 유출은 없었던 것으로 확인된 것이다. 이렇게 유의한 LDH 유출이 없는 결과를 통해 상기 농도에서 봉독은 세포 독성이 없는 것을 확인할 수 있었다.
- [0053] 실험예 3. 혈액 응고에 대한 봉독 (Bee Venom, BV)의 효과 확인
- [0054] 혈액 응고 시간의 측정은 PT (prothrombin time), aPTT (activated partial thromboplastin time) 및 TT (thrombin time)를 측정하여 결정하였으며, 봉독이 PT 및 aPTT, TT를 얼마나 연장시키는가를 측정하였다.
- [0055] 혈장은 건강한 지원자(3명, 남자)의 전혈로부터 조제하였으며, 3.2% sodium citrate tube에 채혈 후 즉시 1,500 g로 15분 동안 원심 분리하여 혈장을 분리하고 2시간 이내에 실험하였다.
- [0056] 3-1. 활성 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT) 변화 확인
- [0057] 플라스틱 큐벳 내에 정상의 구연산-항응고 처리된 인간 혈소판-부족 혈청[citrate-anticoagulated human PPP(Platelet-Poor Plasma)](Haematologic Technologies Inc. factor deficient plasma) 90 μ l와 봉독 (최종

농도: 0, 0.5, 1, 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$) 10 μl , aPTT 시약 (AMP DIAGNOSTICS) 100 μl 를 첨가하고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분간 정치하였다. 여기에 0.25M 염화칼슘 (CaCl_2) 수용액 100 μl 를 가하여 혼합한 후, 혈액응고자동분석기(DCA-2, Dutch Diagnostics)를 사용하여 혈액응고 시간을 측정하였다. 혈액응고 시간은 초로 나타내었다. 그 결과를 표 1에 나타내었다.

[0058] 3-2. 프로트롬빈 시간(PT) 변화 확인

[0059] 플라스틱 큐벳 내에 정상의 citrate-anticoagulated human PPP(Platelet-Poor Plasma) 90 μl 와 봉독 (최종 농도: 0, 0.5, 1, 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$) 10 μl 를 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 정치한 후, PT 시약 (AMP DIAGNOSTICS) 200 μl 를 혼합하여 혈액응고 시간을 혈액응고자동분석기를 사용하여 측정하였다. 혈액응고 시간은 초로 나타내었다. 그 결과를 표 1에 나타내었다.

[0060] 3-3. 트롬빈 시간 (TT) 변화 확인

[0061] 플라스틱 큐벳 내에 정상의 citrate-anticoagulated human PPP(Platelet-Poor Plasma) 90 μl 와 봉독 (최종 농도: 0, 0.5, 1, 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$) 10 μl 를 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분간 정치한 후, 100 μl 의 트롬빈 시약 (Haematologic Technologies Inc.)을 혼합하고 혈액응고 시간을 혈액응고자동분석기로 측정하였다. 그 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

샘플	농도	aPTT (s)	PT (s)	PT (INR) ¹⁾	TT (s)
대조군	PBS	33.2 $\pm$ 1.2	13.5 $\pm$ 0.5	1.19	10.2 $\pm$ 0.8
봉독	0.5 ($\mu\text{g/ml}$)	38.0 $\pm$ 3.6	12.9 $\pm$ 0.3	1.13	10.4 $\pm$ 0.8
	1.0 ($\mu\text{g/ml}$)	42.8 $\pm$ 4.8*	13.4 $\pm$ 0.4	1.18	10.7 $\pm$ 1.2
	5 ($\mu\text{g/ml}$)	55.8 $\pm$ 4.9**	15.1 $\pm$ 0.9*	1.36	11.0 $\pm$ 1.0
	10 ($\mu\text{g/ml}$)	65.9 $\pm$ 6.4**	17.3 $\pm$ 0.6**	1.59	10.9 $\pm$ 1.9
	20 ($\mu\text{g/ml}$)	86.9 $\pm$ 12.3**	22.9 $\pm$ 1.7**	2.21	11.1 $\pm$ 0.8
헤파린 (Heparin)		1.5 $\mu\text{g/ml}$ >300	15 $\mu\text{g/ml}$ 13.6 $\pm$ 0.5	1.21	1.5 $\mu\text{g/ml}$ >300

¹⁾ INR = (patient PT/Mean normal PT)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (대조군에 대해서)

[0062]

[0063] aPTT시험의 경우, 대조군에서는 33.2초에 혈장응고가 완료된 반면, 봉독투여 시료군의 경우 0.5, 1.0, 5.0, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ 처리시 각각 38.0, 42.8, 55.8, 65.9, 86.9초에 혈장응고가 완료되는 결과를 보여 농도 의존적으로 응고시간이 증가하였다. PT시험 결과를 보면 대조군의 경우는 13.5초에 혈장응고가 완료된 반면 봉독 투여군의 경우는 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 각각 15.1, 17.3, 22.9초에 응고가 완료되었다. 이러한 결과를 통하여, 봉독은 농도 의존적으로 혈장응고 시간을 지연시키는 효과가 있음을 입증하였다. 상기 표 1의 결과를 가지고 항응고활성을 계산한 결과를 표 2에 나타내었다.

[0064] [항응고활성 계산식]

[0065] 항응고활성(%) = (시료응고시간 - 대조군응고시간)/시료응고시간 $\times$ 100

표 2

[0066]

봉독 농도 ($\mu\text{g/ml}$)	aPTT (%)	PT (%)
5	40.5	10.6
10	49.6	22.0
20	61.8	41.0

[0067] 상기 표 1에 표시된 바와 같이 PT, aPTT 모두 봉독 농도가 5 $\mu\text{g/ml}$ 일 때부터 농도에 따라 응고시간이 연장되었고, 표 2에 나타낸 것처럼 항응고활성 또한 농도에 따라 증가하였다. TT는 봉독 농도가 증가하더라도 거의 연장되지 않으므로 봉독은 공통 혈액응고과정에 미치는 영향은 적으나, 농도에 증가할수록 항응고 활성이 증가하는

것을 확인하였다.

[0068] 실험예 4. 혈액응고인자 결핍 혈액에 대한 혈장응고 억제 작용

[0069] 특정 혈액 응고인자가 결핍된 혈장에서 응고시간이 증가하지 않는다면 결핍된 응고 인자에 봉독이 특이적으로 작용하는 것이라고 할 수 있으므로, 봉독에 의한 혈장응고 기전을 설명하기 위해 특정 혈장응고 인자가 봉독의 타깃이 되는지를 알기 위해 아래와 같이 실험을 수행하였다.

[0070] 건강한 지원자의 전혈에서 조제한 혈장 대신 혈액 응고인자가 결핍된 혈장을 이용하여 aPTT와 PT를 측정하였고, 방법은 위와 동일하다. 혈액 응고인자 결핍 혈장은 Haematologic Technologies Inc.에서 구입하였다. 혈액 응고 기작에서 내인계와 외인계에 공통으로 작용하는 혈액 응고인자 V(factor V)와 혈액 응고인자 X(factor X)결핍 혈장은 PT와 aPTT 모두 측정하였고, 외인계 인자인 혈액 응고인자 VII(factor VII) 결핍혈장은 PT, 내인계 인자인 factor VIII, IX, XI, XII 결핍 혈장은 aPTT를 측정하였다. 그 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

	봉독 (μg/ml)	PT(s)	aPTT(s)
혈액 응고인자 V 결핍 혈장 (Factor V deficient plasma)	0	42.7	156.5
	1	43.9	186.1
	20	65.9	>420
혈액 응고인자 VII 결핍 혈장 (Factor VII deficient plasma)	0	99.2	
	0.5	98.2	
	1	95.9	
	10	134.8	
	20	160.0	
혈액 응고인자 VIII 결핍 혈장 (Factor VIII deficient plasma)	0		74.1
	1		90.0
	20		265.3
혈액 응고인자 IX 결핍 혈장 (Factor IX deficient plasma)	0		84.8
	0.5		89.8
	1		121.3
혈액 응고인자 X 결핍 혈장 (Factor X deficient plasma)	0	148.6	85.4
	1	135.3	142.2
	20	>420	>420
혈액 응고인자 결핍 혈장 (Factor deficient plasma)	0		108.0
	0.5		141.6
	1		163.3
혈액 응고인자 결핍 혈장 (Factor deficient plasma)	0		136.2
	1		185.3
	20		>420

[0071]

[0072] 각각의 응고인자들이 결핍된 혈장을 이용해 실험을 수행한 결과 응고인자가 결핍된 혈장 모두에서 봉독 투여 시 혈장 응고시간이 크게 증가하는 결과를 얻었다. 이를 통하여, 봉독의 혈액응고 억제 활성은 특정 혈장응고인자에 대한 특이적인 저해보다는 응고인자 전반에 걸쳐 효과를 보이는 것임을 확인하였다.

[0073] 실험예 5. 봉독의 단백질 분해 효소 활성 억제 작용 확인

[0074] 실험예 3 및 4의 결과에서, 봉독이 혈장응고의 공통적인 특성인 세린 단백질 분해효소인 응고인자의 작용을 저해하여 항응고 효과를 보이는 것이라면, 혈액응고인자(VII, IX, X, XI, XII, 트롬빈, 플라스미노겐(plasminogen))와 같은 종류의 세린 단백질 분해효소인 트립신과 카이모트립신의 작용 또한 억제 시킬 것이므로 봉독에 의한 트립신과 카이모트립신의 활성 저해 효과를 측정하였다.

[0075] 5-1. 트롬빈 활성 억제시험

[0076] 96 well plate에 7.5 mM EDTA, 150 mM NaCl을 포함한 50 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.4) 로 희석한 봉독 110 μl (최종 농도: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μg/ml)에 Anti-thrombin III (Haematologic Technologies Inc) 30 μl (최종 농도: 200 nM)를 첨가하여 37℃ 2분간 정치한 후, 트롬빈 용액(thrombin solution)(Haematologic Technologies Inc. human alpha thrombin) 30 μl (최종 농도: 10 U/ml)를 첨가하고 37℃에서 1분간 정치하였다. Substrate S-2238 (Chromogenix) 30 μl (final concentration: 1.5 mM)을 첨가하여 405 nm에서 120초 동안 분광광도계를 이용해 흡광도를 측정하였다. Anti-thrombin III (AT3) 대신 buffer(50 mM Tris-HCl

(pH 7.4) buffer containing 150mM NaCl and 7.5mM EDTA)를 넣고 같은 방법으로 측정된 값과 비교하여 AT3에 의존적으로 혈액 응고를 저해하는지 알아보았다. 양성대조물질로 헤파린을 사용하였다. 실험 결과를 도 2 에 나타내었다.

[0077] 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, 봉독은 1 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 트롬빈에 대한 저해 작용을 보이며, AT3가 있는 경우와 없는 경우 트롬빈 활성저하 정도가 거의 유사하게 나타났으므로 AT3가 없는 상태에서도 항응고 작용을 보임을 확인하였다.

[0078] 5-2. 세린 단백질 분해효소 저해 활성

[0079] 96 well plate에 20 mM CaCl_2 , 0.05% Triton X-100을 포함한 100 mM Tris-HCl Buffer (pH 8.0)로 희석한 봉독 160 μl (최종 농도: 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$)에 트립신 또는 카이모트립신 (sigma) 400 ng (최종 농도: 2 $\mu\text{g/ml}$)을 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 정치하였다. BApNA 또는 SucAAPP-pNA (sigma) 20 μl (최종 농도: 0.4 mM)을 첨가하여 405 nm에서 120초 동안 분광광도계(spectrophotometer)를 이용해 흡광도를 측정하였다. 실험결과를 도 3 에 나타내었다.

[0080] 도 3에서 알 수 있듯이, 봉독이 농도 의존적으로 트립신과 카이모트립신의 작용을 억제하는 것으로 보아, 봉독이 같은 종류의 세린단백질 분해 효소인 혈액응고인자들의 작용을 억제할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 봉독은 응고시스템(coagulation system) 중에서 트롬빈 형성에 관여하는 세린 단백질 분해 효소인자의 활성을 억제함으로써 항응고 효과를 보이는 것임을 입증하였다.

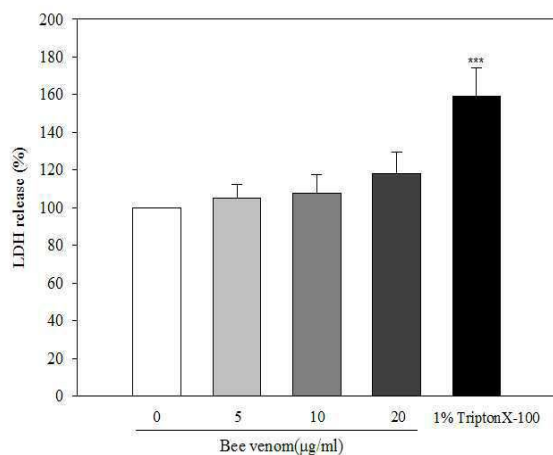
[0081] 실험예 6: 출혈지연시간 측정

[0082] 봉독의 혈액응고인자 활성저해 효과가 혈액응고 지연시간에 영향을 주는지 알아보기 위해 tail bleeding time을 평가하였다. 30-35 g의 수컷 ICR mouse에 대해 봉독 0.0625, 0.125, 0.25 mg/kg 투여군과 용매대조군 및 aspirin(500 μM)의 양성대조군으로 설정하였고, 시료를 꼬리정맥에 투여하였다. 2 시간 후 에테르로 마취하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 로 체온을 유지시키고 꼬리를 끝에서 3 mm 자른 후 식염수가 들어있는 투명한 15 ml tube에 꼬리 끝을 넣고 관찰하였다. 혈액이 퍼지는 것을 확인하고 혈액이 더 이상 퍼지지 않고 출혈이 멈춘 시간을 측정하였다.

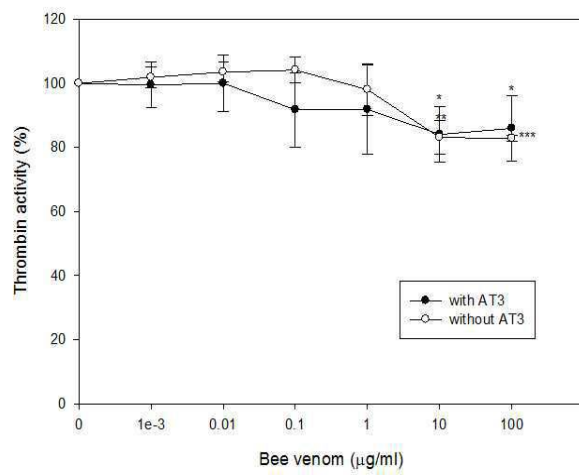
[0083] 대조군(133.0 ± 33.6 초)과 봉독 임상용량의 해당하는 0.0625 mg/kg(144.0 ± 49.6 초), 0.125 mg/kg(145.7 ± 17.2 초), 0.25 mg/kg(143.0 ± 22.3 초)을 비교한 결과 출혈지연반응이 나타나지 않았으므로 출혈지연에 대한 부작용은 없음을 확인할 수 있었다. 반면에 양성 대조군인 aspirin (500 μM)은 244.3 ± 32.9 초로 유의하게 증가하여 부작용이 있음을 확인하였다(도 4).

도면

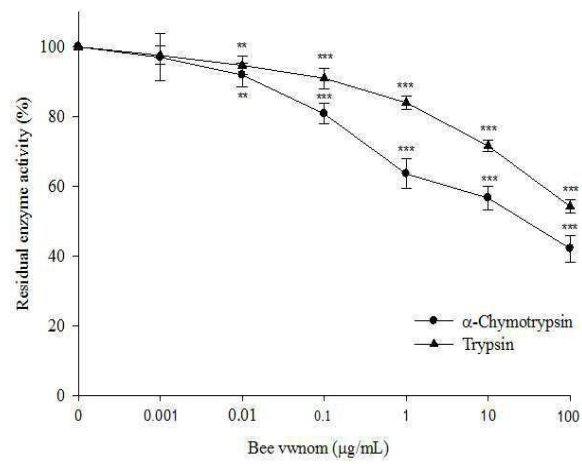
도면1



도면2



도면3



도면4

