



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0092961
(43) 공개일자 2015년08월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/82 (2006.01) A61P 7/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0013631

(22) 출원일자 2014년02월06일

심사청구일자 2014년02월06일

(71) 출원인

건양대학교산학협력단

충청남도 논산시 대학로 121 (내동)

(72) 발명자

조현정

대전광역시 중구 계룡로 922 남광하우스토리2차 202동 1203호

노주예

대전광역시 서구 관저북로 80 원앙마을2단지아파트 202동 1501호

류진협

대전광역시 중구 계룡로 922 남광하우스토리2차 202동 1203호

(74) 대리인

김대영

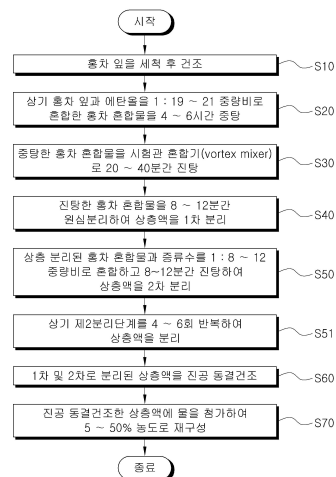
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **항혈전 효과를 갖는 홍차 추출물의 제조방법**

(57) 요약

본 발명에 따른 홍차 추출물의 제조방법은, 홍차 잎을 세척 후 건조하는 건조단계; 상기 홍차 잎과 에탄올을 1 : 19 ~ 21 중량비로 혼합한 홍차 혼합물을 4 ~ 6시간 중탕하는 중탕단계; 중탕한 홍차 혼합물을 시험관 혼합기(vortex mixer)로 20 ~ 40분간 진탕하는 진탕단계; 진탕한 홍차 혼합물을 8 ~ 12분간 원심분리하여 상층액을 1차 분리하는 제1분리단계; 상층 분리된 홍차 혼합물과 증류수를 1 : 8 ~ 12 중량비로 혼합하고 8 ~ 12분간 진탕하여 상층액을 2차 분리하는 제2분리단계; 및 1차 및 2차로 분리된 상층액을 진공 동결건조하는 동결건조단계;를 포함한다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

홍차 잎을 세척 후 건조하는 건조단계;

상기 홍차 잎과 에탄올을 1 : 19 ~ 21 중량비로 혼합한 홍차 혼합물을 4 ~ 6시간 중탕하는 중탕단계;

중탕한 홍차 혼합물을 시험관 혼합기(vortex mixer)로 20 ~ 40분간 진탕하는 진탕단계;

진탕한 홍차 혼합물을 8 ~ 12분간 원심분리하여 상층액을 1차 분리하는 제1분리단계;

상층 분리된 홍차 혼합물과 증류수를 1 : 8 ~ 12 중량비로 혼합하고 8 ~ 12분간 진탕하여 상층액을 2차 분리하는 제2분리단계; 및

1차 및 2차로 분리된 상층액을 진공 동결건조하는 동결건조단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 항혈전 효과를 갖는 홍차 추출물의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제2분리단계를 4 ~ 6회 반복하여 상층액을 분리하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항혈전 효과를 갖는 홍차 추출물의 제조방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

진공 동결건조한 상층액에 물을 첨가하여 1 ~ 50% 농도로 재구성하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항혈전 효과를 갖는 홍차 추출물의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제1분리단계에서 1800×g로 원심분리하는 것을 특징으로 하는 항혈전 효과를 갖는 홍차 추출물의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 동결건조단계에서 상기 진공 동결건조는 -75 ~ -65℃의 온도로 이루어지는 것을 특징으로 하는 항혈전 효과를 갖는 홍차 추출물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 항혈전 효과를 갖는 홍차 추출물의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 홍차로부터 세포독성이 없으면서 항혈전 효능을 나타내는 추출물을 생성할 수 있는 항혈전 효과를 갖는 홍차 추출물의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

최근에 식생활이 서구화됨에 따라 고혈압, 동맥경화, 심혈관 질환들의 순환기계 질병이 증가되고 있다. 최근 선진국의 조사에 의하면 혈관 순환기계 질환이 현대인의 사망 원인의 1위를 차지하고 있으며, 우리 나라의 경우에

도 통계청의 보고에 의하면 2000년 기준으로 암(21.4%), 뇌혈관 질환(16%), 심장병(8.3%)의 순위로 나타나고 있어 심혈관계 질환으로 인한 사망률의 합계가 암에 의한 사망률을 상회하고 있는 실정이다.

[0003] 이러한 순환기계 질병의 원인은 혈관 손상 부위에서의 혈전의 형성인데, 이러한 현상은 ① 혈관 (vascular compartments) 손상, ② 혈소판 응집(platelet aggregation), ③ 혈장 응고 인자 (plasma coagulation factor)에 의한 혈액 응고가 동일한 영역에서 일어나는 병리 현상이다.

[0004] 이와 같은 혈전을 예방하고 치료하기 위하여 현재 많은 약물들이 개발되었으나 혈관 손상 부위에서의 출혈 시간의 연장과 위장 점막에서의 내출혈 또는 전신성 출혈 등의 부작용으로 인하여 장기 치료의 목적에는 적합하지 못하다. 그러므로 좀 더 안전하고 효과적인 항혈소판제의 개발을 위해 많은 연구가 집중되고 있으며, 여러 가지 부작용을 일으키는 의약품과는 달리 반복해서 장기간 섭취하기 때문에 유효 성분이 미량이거나 그 활성이 매우 적은 경우라 하더라도 항상 공급됨으로서 중요한 영향을 줄 수 있는 식품으로부터 그 성분을 찾는 것이 필요하며, 그 중에서 peptide는 구조 및 활성이 다양하고, protease류에 의해 분리되며 유전 공학 기술에 의한 생산 및 개조가 가능하고 높은 안전성을 기대할 수 있다는 장점이 있어 이에 대한 연구가 진행되고 있다

[0005] 한편, 홍차는 폴리페놀 성분과 불소성분이 풍부하게 함유되어 있어 노화를 방지하고 충치를 예방해주는 효능을 가지고 있어 차잎을 발효(醱酵)시켜서 마시는 대표적인 차로 유명하다. 또한, 홍차는 혈액순환을 원활하게 해주어 신진대사를 활발하게 해줄 뿐 아니라 이노를 촉진시켜 젖산과 체내 노폐물의 배설을 촉진시켜 피로회복에 좋다고 알려져 있다. 아울러 홍차에 함유된 폴리페놀 성분이 중금속을 흡착하여 침전 및 분해시켜 주고, 홍차를 꾸준히 섭취하면 뼈 세포를 파괴하는 물질의 활성화를 억제시켜 주어 골다공증을 예방할 수 있으며, 저칼로리에 필수 영양소가 풍부하게 함유되어 있어 다이어트 음료로도 각광받고 있다.

[0006] 이와 같이 홍차의 유효성분을 활용하기 위한 특허로는, 한국공개특허 제10-2012-0089407호(홍차 추출물을 유효 성분으로 포함하는 피부 상태 개선용 조성물), 한국공개특허 제10-2006-0044130호(건강 음료용 액상 홍차 조성물 및 그 제조방법), 한국등록특허 제10-0530875호(홍차버섯 종균을 이용한 유기산의 생산방법), 한국등록특허 제10-0532556호(술잎, 녹차 및 홍차 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 및 변비 치료용 조성물), 한국공개특허 제10-2004-0023151호(홍차 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만, 당뇨병, 고지혈증, 지방간 및 변비 치료용 조성물) 등이 있다.

[0007] 그러나 아직까지 홍차를 이용하여 항혈전에 효능을 나타내는 조성물은 개발되지 않고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 창출된 것으로, 본 발명의 목적은, 홍차로부터 항혈전 효능을 나타내는 추출물을 생성하기 위한 홍차 추출물의 제조방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기와 같은 목적을 위해 본 발명에 따른 홍차 추출물의 제조방법은, 홍차 잎을 세척 후 건조하는 건조단계; 상기 홍차 잎과 에탄올을 1 : 19 ~ 21 중량비로 혼합한 홍차 혼합물을 4 ~ 6시간 중탕하는 중탕단계; 중탕한 홍차 혼합물을 시험관 혼합기(vortex mixer)로 20 ~ 40분간 진탕하는 진탕단계; 진탕한 홍차 혼합물을 8 ~ 12분간 원심분리하여 상층액을 1차 분리하는 제1분리단계; 상층 분리된 홍차 혼합물과 증류수를 1 : 8 ~ 12 중량비로 혼합하고 8 ~ 12분간 진탕하여 상층액을 2차 분리하는 제2분리단계; 및 1차 및 2차로 분리된 상층액을 진공 동결건조하는 동결건조단계;를 포함한다.

[0010] 그리고, 상기 제2분리단계를 4 ~ 6회 반복하여 상층액을 분리하는 단계를 더 포함할 수 있고, 이에 추가하여 진공 동결건조한 상층액에 물을 첨가하여 1 ~ 50% 농도로 재구성하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0011] 또한 상기 제1분리단계에서 1800×g로 원심분리하고, 상기 동결건조단계에서 상기 진공 동결건조는 -75 ~ -65℃의 온도로 이루어지는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 홍차 추출물의 제조방법에 의하면, 홍차로부터 세포독성 없으면서 항혈전 효능을 나타내는 추출물을 생성할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 본 발명에 따른 홍차 추출물의 제조방법을 도시한 순서도,
 도 2는 Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 홍차 추출물의 효과를 나타낸 그래프,
 도 3은 Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 홍차 추출물의 TXA₂ 생성 억제 효과를 나타낸 그래프,
 도 4는 Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 홍차 추출물의 [Ca²⁺]_i 억제 효과를 나타낸 그래프,
 도 5는 혈소판에서 홍차 추출물의 Thromboxane A₂ synthase(TXAS) activity 억제 효과를 나타낸 그래프,
 도 6은 혈소판에서 홍차 추출물의 Cyclooxygenase (COX)-1 activity 억제 효과를 나타낸 그래프,
 도 7은 Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 홍차 추출물의 cAMP 상승 효과를 나타낸 그래프,
 도 8은 혈소판에서 홍차 추출물의 세포 독성을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명에 따른 홍차 추출물의 제조방법의 구성을 자세히 설명한다.
- [0015] 도 1은 본 발명에 따른 홍차 추출물의 제조방법을 도시한 순서도이다.
- [0016] 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 홍차 추출물의 제조방법은 크게 여섯 가지 단계로 이루어지는데, 이는 건조단계(S10), 중탕단계(S20), 진탕단계(S30), 제1분리단계(S40), 제2분리단계(S50) 및 동결건조단계(S60)이다.
- [0017] 상기 건조단계(S10)는 홍차 잎을 세척 후 건조하는 단계이다.
- [0018] 상기 중탕단계(S20)는 상기 홍차 잎과 에탄올을 1 : 19 ~ 21 중량비로 혼합한 홍차 혼합물을 4 ~ 6시간 중탕하는 단계이다. 이때, 사용되는 에탄올은 70% 수용액인 것을 사용한다.
- [0019] 상기 진탕단계(S30)는 중탕한 홍차 혼합물을 시험관 혼합기(vortex mixer)로 20 ~ 40분간 진탕하는 단계이다. 여기서 진탕(shaking)이란 시료로부터 분석성분을 추출하기 위하여 일정한 속도로 흔들리게 하는 것을 의미한다.
- [0020] 상기 제1분리단계(S40)는 진탕한 홍차 혼합물을 1800×g에서 8 ~ 12분간 원심분리하여 상층액을 1차 분리하는 단계이다.
- [0021] 상기 제2분리단계(S50)는 상층 분리된 홍차 혼합물과 증류수를 1 : 8 ~ 12 중량비로 혼합하고 8 ~ 12분간 진탕하여 상층액을 2차 분리하는 단계이다.
- [0022] 상기 홍차 추출물의 제조방법은 상기 제2분리단계(S50)를 4 ~ 6회 반복하여 상층액을 분리하는 단계(S51)를 더 포함할 수 있다. 이때, 6회를 초과하면 회석이 과도하게 되어 효과를 발휘하기 어렵고 오히려 이전에 분리된 상층액을 회석시키기 때문에 바람직하지 않다.
- [0023] 상기 동결건조단계(S60)는 1차 및 2차로 분리된 상층액을 진공 동결건조하는 단계이다. 이때, 상기 동결건조단계(S60)에서 상기 진공 동결건조는 Freeze Dryer(Ilshin Biobase)를 이용하여 -75 ~ -65℃의 온도로 이루어질 수 있다.
- [0024] 이때, 상기 홍차 추출물의 제조방법은 진공 동결건조된 상층액에 물을 첨가하여 원하는 농도로 재구성하는 재구성단계(S70)를 더 포함할 수 있다. 적정 농도는, 이하의 실험예에서 알 수 있듯이 대략 1 ~ 50% 범위인 것이 바람직하다.
- [0025] 이와 같은 과정을 통해 생성되는 홍차 추출물(Black Tea Extract, 이하 "BTE"라 함)의 수득률은 33.8 ± 5.8% 정도이다.

[0026] 다음으로 본 발명에 따른 BTE에 대한 효과를 검증하기 위한 실험방법과 결과를 설명한다.

[0027] **A. Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 BTE의 효과**

[0028] (1) 실험방법

[0029] 1) Washed rat platelet 제조

[0030] 대한바이오링크(대한민국 충북)에서 구입한 SD Rat(8 week-old, male)의 전혈을 분리하여 180×g, 25℃에서 10분 동안 원심분리하고 적혈구를 침전시켜 순수한 PRP(Platelet-Rich Plasma)를 얻었다. 이것을 다시 1800×g, 25℃에서 10분 동안 원심분리하여 PPP(Platelet-Poor Plasma)와 혈소판(PLTs)으로 분리하였다.

[0031] 분리된 혈소판은 Washing buffer(128 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.36 mM NaH₂PO₄, 12 mM NaHCO₃, 5.5 mM Glucose, 1 mM EDTA, pH 6.9)를 이용하여 washing하고 1800×g, 25℃에서 10분 동안 원심분리하는 과정을 2회 반복하였다. Washing buffer에서 분리된 혈소판을 suspending buffer(128 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.36 mM NaH₂PO₄, 12 mM NaHCO₃, 5.5 mM Glucose, 0.49 mM MgCl₂, pH 7.4) 적당량을 PLTs에 조심스럽게 첨가하여 pipette으로 cell suspension을 실시하였다. Cell counting을 하기 위해서 이 중 일부를 취하여 여분의 suspending buffer로 20배 희석한 후, UV/visible spectrophotometer를 이용하여 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 660nm에서 흡광도 값이 1.1일 때 1×10⁸개의 PLTs를 의미하므로, 원하는 cell 수, 5×10⁸ platelets/ml가 되도록 suspending buffer를 첨가하여 조정하였다.

[0032] 2) 혈소판 응집반응 관찰

[0033] 모든 platelets aggregation은 AGGREGOMETER(Chrono-Log Co.)를 이용하여 37℃에서 light transmission의 변화를 측정하였다. In vitro에서 반응계를 250μl로 하여 washed PLTs에 CaCl₂ 2mM를 첨가하여 3분간 preincubation 하고, collagen(10μg/ml)으로 자극하여 혈소판 응집 반응을 측정한 것을 controls로 하였다. 그리고 같은 조건에, 검토하고자 하는 시료(BTE)를 함께 첨가한 후 collagen(10μg/ml)으로 자극하여 혈소판 응집 반응을 측정하여 시료의 영향을 알아보았다.

[0034] (2) 실험결과

[0035] BTE에 의한 혈소판 응집 억제효과를 측정하였다. 도 2에 도시된 바와 같이, Collagen(10μg/ml)으로 응집을 유도하였을 때, 응집률은 82.0 ± 2.0 %로 증가하였으나 BTE를 다양한 농도로 처리하였을 때(10, 100, 500μg/ml), 유의성을 가지고 농도 의존적으로 혈소판 응집이 감소되었으며(각각 67.8 ± 5.2, 30.3 ± 6.3, 4.3 ± 1.2 %) 억제율이 농도 의존적으로 증가하였다. 따라서 BTE가 혈소판 응집 억제 효과를 가짐을 알 수 있다.

[0036] **C. Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 BTE의 TXA₂ 생성 억제 효과**

[0037] (1) 실험방법

[0038] BTE의 TXB₂ 생성 억제능을 측정하기 위하여 "A"에서 기술한 방식으로 8분간 혈소판 응집반응을 시행한 후, ice-cold EDTA(5mM) and indomethacin (0.2mM)를 첨가하여 반응을 정지시켰다. TXA₂의 안정한 상태인 TXB₂의 양을

TXB₂ EIA kit(Cayman Chemical)를 이용하여 측정하였으며 세부적인 방법은 제조사의 설명서를 참조하였다.

(2) 실험결과

TXA₂는 혈소판에서 강력한 혈소판 응집 요소로 작용한다. BTE가 TXB₂(안정한 형태의 TXA₂)의 생성에 관여하는지 알아보려고 TXB₂ 생성을 측정하였다. 도 3에 도시된 바와 같이, Collagen으로 응집을 유도하였을 때, TXB₂의 양이 $76.8 \pm 6.1 \text{ ng}/10^8 \text{ platelets}$ 로 증가하였으나 BTE를 농도별로 처리하였을 때(10, 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 유의성을 가지고 농도 의존적으로 TXB₂ 생성이 억제되었다(57.4 ± 7.3 , 47.8 ± 4.9 , $23.7 \pm 2.6 \text{ ng}/10^8 \text{ platelets}$). 따라서 BTE는 TXA₂를 억제하여 항혈소판 효과를 갖는다.

C. Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 BTE의 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 억제 효과

(1) 실험방법

Concentrated PRP를 만드는 과정 가운데 washing buffer와 혈소판(PLTs)으로 분리되면 상층의 washing buffer를 조심스럽게 덜어낸 후 PLTs에 다시 suspending buffer 10mL를 첨가했다. 여기에 1mM의 Fura 2/AM을 50 μL 를 넣어서 final 농도가 5 μM 이 되도록 첨가했다. 이것을 부드럽게 inversion한 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60분간 incubation하고, incubation이 끝나면 1800 $\times g$, 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분 동안 원심시켜 상층의 suspending buffer 층과 Fura 2/AM이 loading된 PLTs층으로 분리했다. 하층의 PLTs suspending buffer를 첨가하여 2회 세척 후, suspending buffer를 첨가하여 cell suspension하였고 cell counting하여 5×10^8 Fura 2/AM loaded platelets/mL로 조정하였다. 빛을 차단하기 위해 aluminum foil로 wrapping하여 위의 과정을 수행하였다. Fura 2/AM이 loading된 혈소판을 이용하여 fluorescence의 변화를 SPF 25 fluorimeter(Kontron)를 이용하여 측정하였다. Excitation 340nm, emission 510nm로 setting하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 8분간 time drive를 시행하였는데 3분되는 지점에 collagen(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 첨가하여 세포질 내 Ca^{2+} 의 양을 측정하였다. 실제 $[\text{Ca}^{2+}]_c$ 는 relative fluorescence(rf)로 나타내기 때문에 $F_{\max}$ 와 $F_{\min}$ 을 각각 측정한 후 이들 값과 Fura 2/AM의 분해정수($K_d=224\text{nM}$)를 아래의 [수학식 1]에 대입하여 혈소판 내부의 $[\text{Ca}^{2+}]_c$ 계산하였다.

[수학식 1]

$$[\text{Ca}^{2+}]_c = K_d \times (F_o - F_{\min}) / (F_{\max} - F_o)$$

F_o 는 자극 전의 fluorescence이다. 또 $F_{\min}$ 는 최소 fluorescence로서, CaCl_2 를 첨가하지 않은 상태에서 10% triton X-100과 2M tris-300mM EGTA를 첨가하여 측정하였고, $F_{\max}$ 는 최대 fluorescence로서, 충분한 CaCl_2 가 존재하는 상태에서 10% triton X-100을 첨가하여 측정하였다.

(2) 실험결과

칼슘은 강력한 혈소판 응집 촉진 물질로 작용한다. 따라서 BTE가 세포질내 칼슘농도($[\text{Ca}^{2+}]_i$)에 미치는 영향을 측정하였다. 도 4에 도시된 바와 같이, 안정한 상태의 혈소판에서 Collagen으로 응집을 유도하였을 때 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 이 69.9 ± 9.8 에서 $808.6 \pm 34.8\text{nM}$ 로 증가하였으며, BTE를 농도별로 처리하였을 때(10, 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 유의성

을 가지고 농도 의존적으로 $[Ca^{2+}]_i$ 이 억제되었다(각각 545.2 ± 91.1 , 215.3 ± 42.9 , $110.3 \pm 11.0nM$). 따라서 BTE는 $[Ca^{2+}]_i$ 을 억제하여 항혈소판 효과를 나타낸다.

D. 혈소판에서 BTE의 Thromboxane A_2 synthase (TXAS) activity 억제 효과

(1) 실험방법

혈소판에서 TXAS activity를 측정하고자 1%의 protease inhibitor가 함유된 혈소판 부유액을 Sonicator를 이용하여 Platelet lysates를 제조하였다. Platelet lysates($10\mu g$ -protein)은 BTE(10 , $100 \mu g/ml$) 및 TXAS activity를 선택적으로 억제한다고 알려진 ozagrel($11nM$)를 처리하여 $37^\circ C$ 에서 5분간 preincubation 하였다. 반응은 PGH_2 를 기질로 첨가하여 $37^\circ C$ 에서 1분간 유도하였으며, $1M$ citric acid를 이용하여 반응을 정지시키고 $1N$ NaOH를 첨가하여 중화하였다. 생성된 TXB_2 의 양을 TXB_2 EIA kit(Cayman Chemical)를 이용하여 측정하였으며 세부적인 방법은 제조사의 설명서를 참조하였다.

(2) 실험결과

TXA_2 생성이 억제됨에 따라, Prostaglandin이 TXA_2 로 합성되는 과정에서 thromboxane synthase(TXAS) activity를 필요로 하기 때문에 BTE의 TXAS activity의 억제 효과를 측정하였다. 도 5에 도시된 바와 같이, BTE를 농도별로 처리하였을 때(10 , $100\mu g/ml$), Control($112.7 \pm 16.8ng/min/mg$ -protein)과 비교하여 TXAS activity 억제 효과를 보이지 않았다. 이러한 결과는 BTE가 TXAS activity에 영향을 미치지 않고 TXA_2 생성을 억제하거나 또 다른 기전을 이용하여 항혈소판 효과를 가짐을 의미한다. Positive control로는 TXAS activity를 선택적으로 억제하는 Ozagrel(IC_{50} on $11nM$)을 이용하였으며 유의적으로 감소하였다. ($95.5 \pm 5.9ng/min/mg$ -protein)

E. 혈소판에서 BTE의 Cyclooxygenase(COX)-1 activity 억제 효과

(1) 실험방법

1%의 protease inhibitor가 함유된 혈소판 부유액을 Sonicator를 이용하여 Platelets lysate를 제조하였다. Platelet lysates($10\mu g$ -protein)은 BTE(10 , $100 \mu g/ml$) 및 COX-1 activity를 선택적으로 억제한다고 알려진 SC-560($330nM$)과 aspirin($500\mu M$)를 처리하여 $37^\circ C$ 에서 30분간 preincubation하였다. 반응은 arachidonic acid를 기질로 첨가하여 $37^\circ C$ 에서 1분간 유도하였으며, COX-1 activity fluorescent assay(Cayman Chemical)를 이용하여 synergy HT multi-model micro plate reader(BioTek Instruments, Winooski, VT., USA)로 측정하였다. 세부적인 방법은 제조사의 설명서를 참조하였다.

(2) 실험결과

Arachidonic acid($20:4$)가 prostaglandin으로 합성되는 과정에서 COX-1 activity를 필요로 하기 때문에 BTE가 COX-1 activity에 미치는 영향을 측정하였다. 도 6에 도시된 바와 같이, BTE를 농도별로 처리하였을 때(10 , $100 \mu g/ml$), Control($2.6 \pm 0.1nM/min/mg$ -protein)과 비교하여 농도 의존적으로 TXAS activity를 감소시켰다(각각

1.7 ± 0.1, 1.1 ± 0.1 nmol/min/mg-protein). Positive control로는 COX-1 activity를 선택적으로 억제하는 Aspirin(500 μM)과 SC-560(330nM)을 사용하였다. BTE는 COX-1 activity를 억제하여 TXA₂ 생성을 방해하며 특히, BTE의 IC₅₀값의 근사치인 100 μg/ml에서는 약 57.7%의 억제율을 보였으며, Aspirin(IC₅₀ = 500 μM)에서 19.2%의 억제율을 보인 결과와 비교하여 BTE가 약 3배 더 강한 억제효과를 나타냈다. 이는 BTE가 기존약물을 대체할 수 있는 가능성이 높음을 시사한다.

[0059] F. Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 BTE의 cAMP 상승 효과

[0060] (1) 실험방법

[0061] cAMP와 cGMP를 측정하기 위하여 "A"에서 기술한 방식으로 혈소판 응집반응을 유도한 뒤, 8분이 되는 시점에서 80% ice-cold ethanol을 첨가하여 반응을 정지시켰으며, cAMP와 cGMP 값은 각각 cAMP와 cGMP EIA kits(BioVision)을 이용하여 측정하였으며 세부적인 방법은 제조사의 설명서를 참고하였다.

[0062] (2) 실험결과

[0063] Cyclic adenosine monophosphate(cAMP)와 Cyclic guanosine monophosphate(cGMP)는 혈소판 응집 억제하는 second messenger로 작용한다. ATP와 GTP가 각각 cAMP와 cGMP로 전환되어, 각각에 의존적인 Kinase activity가 상승되어 특정 단백질이 phosphorylation되면서 항혈소판 효과를 갖는 것으로 알려져 있다. 따라서 cAMP 또는 cGMP에 있어서 BTE의 효과를 측정하였다. 도 7에 도시된 바와 같이, Collagen으로 유도된 혈소판에서 안정된 상태의 cAMP(36 ± 5.1 pmol/ 10^8 platelets)와 비교하여 감소하였다가 (24.8 ± 6.0 pmol/ 10^8 platelets), BTE를 농도별로 처리하였을 때(10, 100, 500 μg/ml), cAMP가 유의성을 가지고 농도 의존적으로 상승되었다(각각 34.6 ± 3.5 , 37.4 ± 4.2 , 56.5 ± 6.5 pmol/ 10^8 platelets, 도 7A 참조). 그러나, BTE는 cGMP를 상승시키지 않았다(도 7B 참조). 이러한 결과는 BTE가 cGMP가 아닌 cAMP를 상승시켜 항혈소판 효과를 나타냄을 의미한다.

[0064] G. 혈소판에서 BTE의 세포 독성

[0065] (1) 실험방법

[0066] 혈소판에서 BTE의 세포독성을 알아보기 위하여 LDH 방출을 측정하였다. Washed platelets (10^8 platelets/ml)은 혈소판 응집반응과 같은 방법으로 preincubation한 뒤, 상층액을 LDH assay kit (Cayman Chemical)를 이용하여 측정하였다. 세부적인 실험 방법은 제조사의 설명서를 참고하였다.

[0067] (2) 실험결과

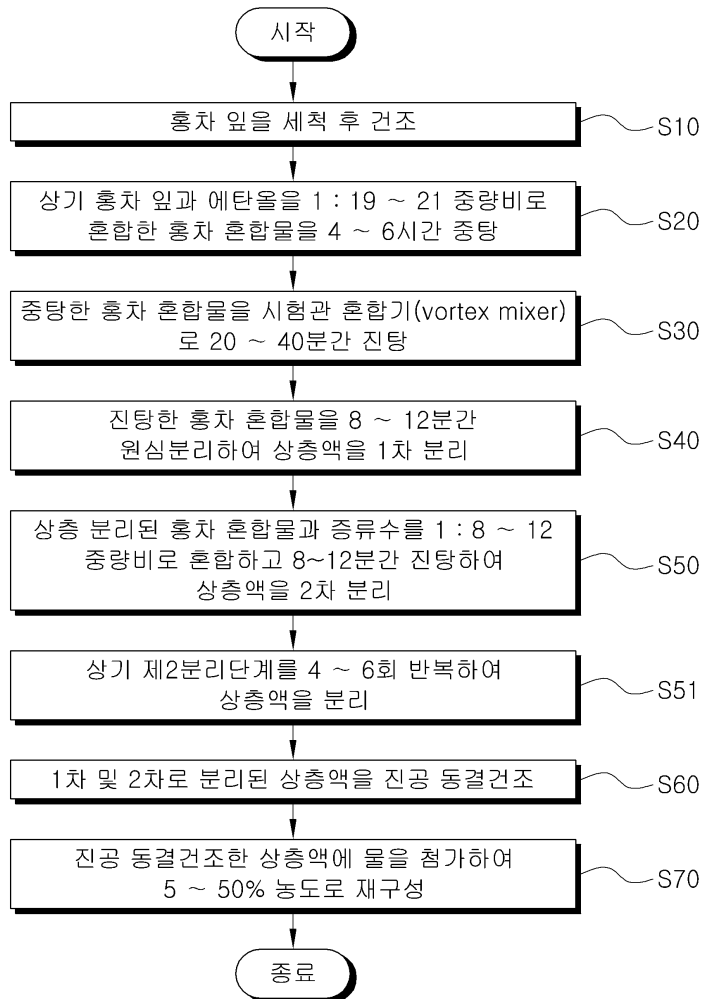
[0068] LDH는 세포 손상에 의한 독성여부를 측정하는 지표로 사용된다. BTE의 혈소판 세포독성 여부를 측정하기 위하여 LDH release를 확인하였다. 도 8에 도시된 바와 같이, BTE를 농도별로 처리하였을 때(10, 100, 500 μg/ml) Control과 비교하여 LDH release에 영향을 미치지 않았다. 이는 BTE의 뛰어난 항혈소판 효과가 본 실험에서 사용된 농도 범위 안에서 세포 독성 없이 이루어졌음을 의미하며, 약물 개발에 있어서 가장 중요한 독성 문제를 해결하여 향후 BTE의 항혈소판 제제로의 개발 가능성을 제시한다.

[0069]

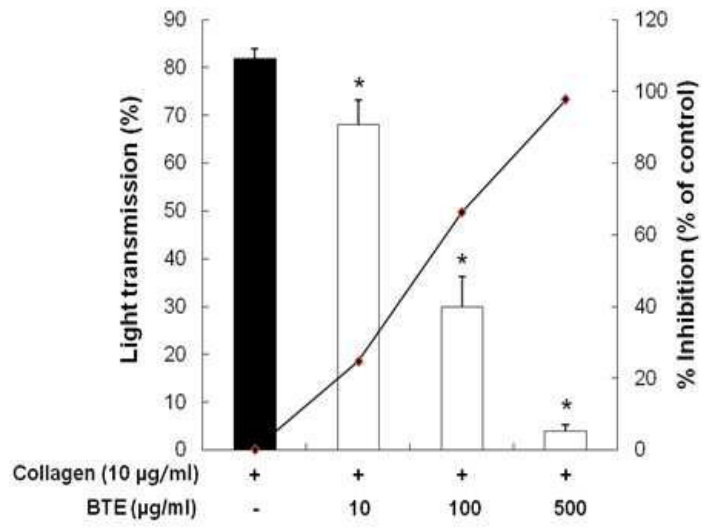
본 발명의 권리는 위에서 설명된 실시예에 한정되지 않고 청구범위에 기재된 바에 의해 정의되며, 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 청구범위에 기재된 권리범위 내에서 다양한 변형과 개작을 할 수 있다는 것은 자명하다.

도면

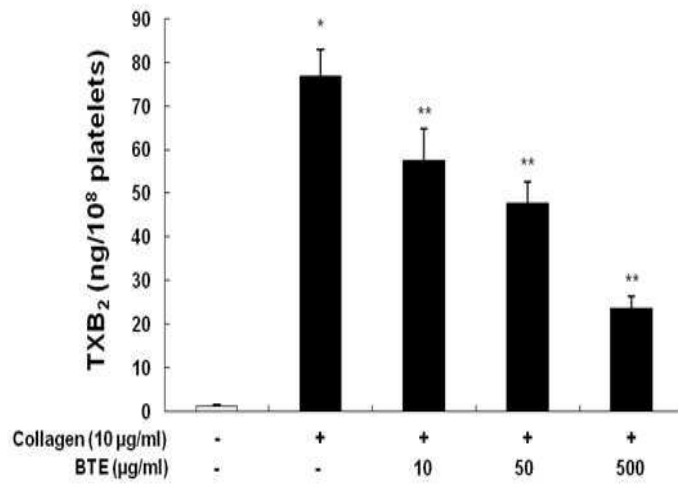
도면1



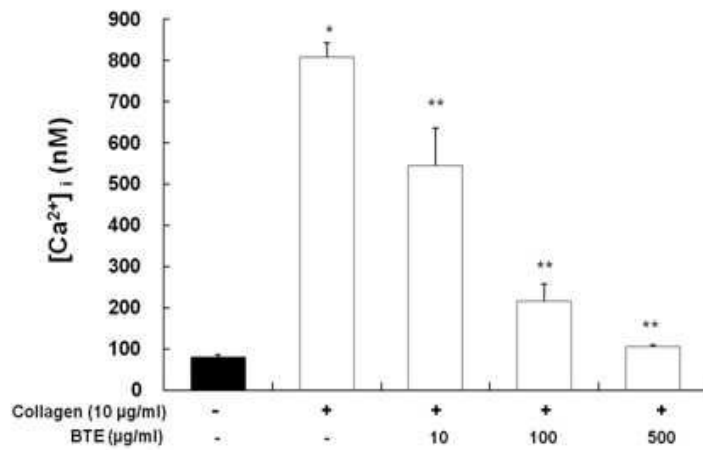
도면2



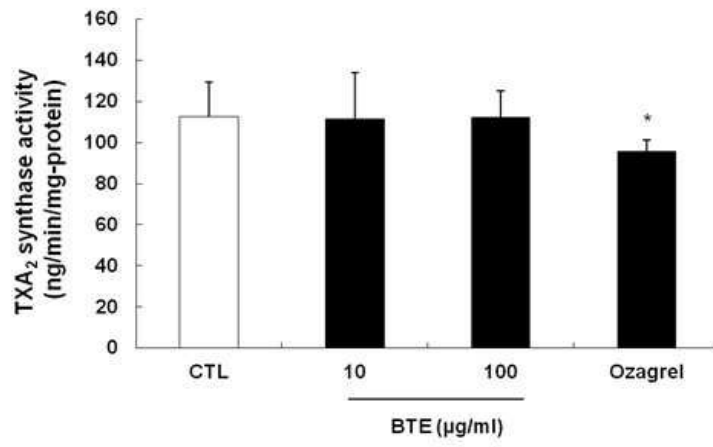
도면3



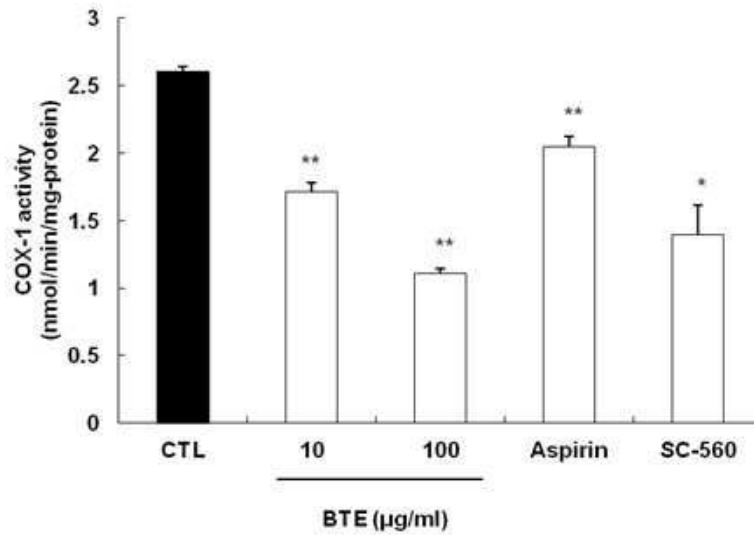
도면4



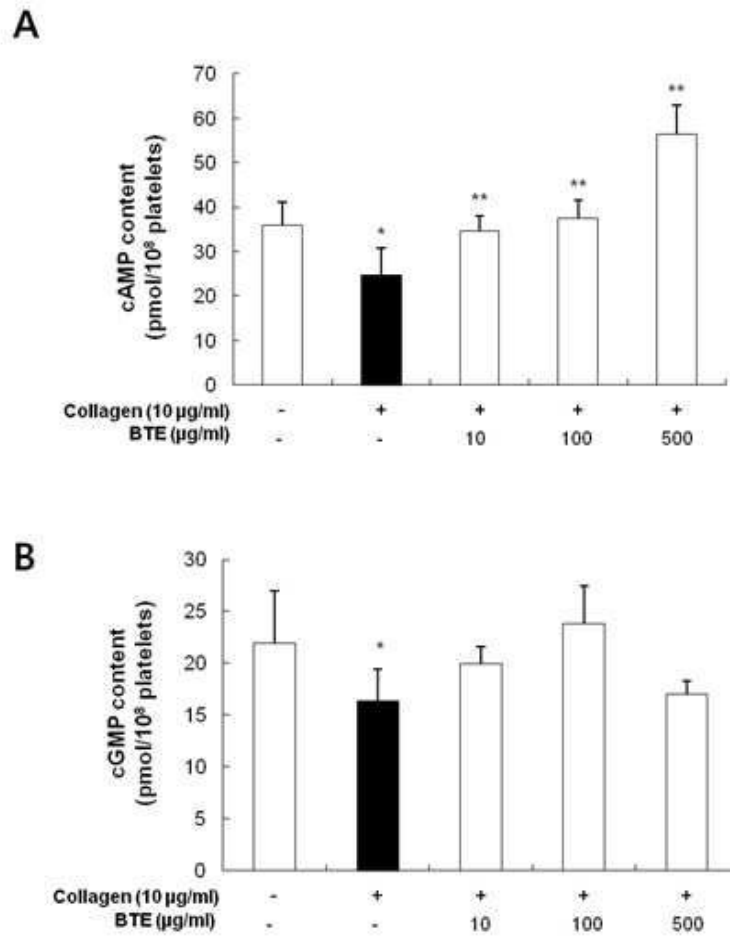
도면5



도면6



도면7



도면8

