



등록특허 10-2259460



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월03일

(11) 등록번호 10-2259460

(24) 등록일자 2021년05월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/131 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61P 7/02 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/131 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0001977
(22) 출원일자 2020년01월07일
심사청구일자 2020년01월07일
(56) 선행기술조사문헌
Scientific Edition, 298-301쪽(1959.) 1부.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
기술이전 희망 : 기술양도

(73) 특허권자
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
강창근
경상남도 진주시 초북로 55, 402동 2402호(초전동, 초전 해모로 루비채 4단지)
노일래
경상남도 진주시 새평거로 30, 106동 2902호(평거동, 엠코타운더프라하)
양혜련
경상남도 진주시 호탄길34번길 15, 스카이빌 203호(호탄동)
(74) 대리인
김계환, 위병갑

전체 청구항 수 : 총 7 항

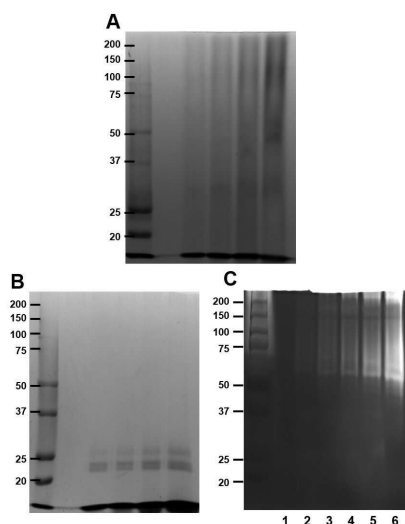
심사관 : 이형준

(54) 발명의 명칭 피신을 유효성분으로 포함하는 혈전증 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명에 따른 피신 (Ficin)은 피브린 플레이트법 (fibrin plate), 피브린 자이모그래피 (섬유소 자이모그래피; fibrin zymography), 섬유소원분해 (fibrinogenolytic), 혈전 용해 (blood clot lysis), PT (프로트롬빈 시간)&aPTT (활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간) 실험을 통해 동맥경화증 예방 및 치료 효과를 확인하였다. 또한, 쥐에서 κ -카라기난 (κ -carrageenan)을 이용한 혈전 유도 실험에서 피신의 혈전용해 효과를 확인하였다. 따라서 본 발명의 피신은 동맥경화의 예방 및 치료에 탁월한 효과를 기대할 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 7/02 (2018.01)

A61P 9/10 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/326 (2013.01)

A23V 2200/3262 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

피신(Ficin)을 유효성분으로 포함하는, 피브린 또는 혈전이 생성되어 발생하는 혈전증 치료용 혈전용해제.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 피신은 섬유소(피브린; fibrin)를 용해하는 효과를 가지는 것인, 피브린 또는 혈전이 생성되어 발생하는 혈전증 치료용 혈전용해제.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 피신은 피브리노겐의 α -사슬 및 β -사슬을 분해시켜 피브리노겐을 감소시키는 것인, 피브린 또는 혈전이 생성되어 발생하는 혈전증 치료용 혈전용해제.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 피신은 0.0125 내지 0.8 U/ml인 것인, 피브린 또는 혈전이 생성되어 발생하는 혈전증 치료용 혈전용해제.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 피신은 1 또는 10 U/kg인 것인, 피브린 또는 혈전이 생성되어 발생하는 혈전증 치료용 혈전용해제.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 혈전용해제를 유효성분으로 포함하는, 피브린 또는 혈전이 생성되어 발생하는 혈전증 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 혈전용해제를 유효성분으로 포함하는, 피브린 또는 혈전이 생성되어 발생하는 혈전증 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 피신(Ficin)을 유효성분으로 포함하는 혈전증 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 동맥 혈관은 내막 (tunica intima), 중간막 (tunica media), 외막 (tunica extema)의 세 종류의 층으로 구성되어 있다. 이중에서 혈액과 접촉하는 부위가 내막이며, 혈관내피세포 (vascular endothelial cell) 층과 콜라겐 (collagen)과 프로테오글리칸 (proteoglycan) 등의 결합조직 (extracellular connective tissue matrix)으로 되어있는 아주 얇은 층이다. 중간막은 혈관평활근세포 (vascular smooth muscle cell)로 구성되어있다. 외막은 콜라겐 (collagen), 탄성섬유 (elastin fiber)등의 결합조직과 드문드문 존재하는 섬유모세포로 구성되어 있다.

[0003] 한편, 동맥경화증은 죽상경화 (atherosclerosis), 중막경화 (medial classification), 세동맥경화 (arteriosclerosis) 등 3가지 질환으로 세분되며, 일반적으로 동맥경화증은 죽상동맥경화증을 지칭하여 불려진다. 죽상동맥경화증은 동맥의 내막쪽 혈관벽이 손상되면 죽과 같이 걸쭉한 상태의 지방과 세포 덩어리, 즉 죽종 (atheroma) 이 생겨 혈액의 흐름을 방해하며, 죽종이 파열되면 혈관내에 혈전 (thrombus)이 생겨 혈관을 막히게 하여 말초 혈액 순환 장애를 일으키며, 동맥 혈관 내벽에 콜레스테롤, 인지질, 중성지방등과 같은 지질 성분과 섬유소 및 석화 단백질 등이 침착되고 혈관벽이 비정상적으로 두꺼워지면 섬유화가 진행되어 혈관의 탄력이 감소되고 동맥 내경이 좁아지는 혈관 질환이다 (Lusis. Atherosclerosis. Nature 2000;407:233-241).

[0004] 동맥경화가 진행되어도 초기에는 별다른 증상을 보이지 않다가 혈관 내경의 70% 이상이 막히게 되면 증상이 나타나기 시작한다. 대동맥 혈관이 좁아지면 동맥벽의 탄성이 약해져서 동맥이 늘어나서 주머니 모양의 병변이 생기는 동맥류 (aneurysm)가 올수 있으며, 동맥류가 터지면 많은 출혈이 생겨 갑작스런 사망의 원인이 될 수 있다. 심장의 수축과 이완을 조절하는 심장근육에 혈액을 공급하는 관상동맥이 좁아지게 되면 심근에 산소 공급이 원활하지 않게 되어 일시적인 허혈상태가 발생되어 대증적으로 심장마비 (heart attack)라고 불리는 심근경색증 (myocardial infarction)이나 가슴에 통증이 생기는 협심증 (angina pectoris) 원인이 되며, 뇌혈관이 좁아지게 되면 혈압이 상승할 때 약한 부위가 터져서 뇌출혈 (cerebral concussion)과 뇌졸중 (stroke)이 생길 수 있으며, 동맥이 완전히 막히게 되면 신체 각 부위의 괴사가 생겨 감각이상, 마비등과 같은 인체 전반적으로 치명적인 문제가 생길 수 있는 질환이다.

[0005] 동맥경화증의 원인은 노화 현상으로 혈관이 약해져서 생기기도 하지만, 유전적 요인, 지질대사이상, 고지혈증, 지방식 식생활, 스트레스, 비만, 흡연, 과체중 및 운동부족 등 여러 가지 원인이 복합적으로 작용하여 발생하는 것으로 알려져 있으며 성인병의 주종을 이루고 있는 고혈압이나 당뇨병이 오래 지속되면 동맥경화증이 발생할 수 있다고 알려져 있다.

[0006] 동맥경화증 초기에 관찰되는 반응으로서 혈중 콜레스테롤 농도가 높아지면 콜레스테롤 운반체인 저밀도지질단백질 (low density lipoprotein; LDL)이 내피세포를 통해 intima로 유입되고 산화되어 내피세포를 자극하게 되면, 혈액에 있던 단핵구 (monocyte)가 내막 (intima)으로 이동하고 내피세포에서 분비하는 macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)와 monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) 자극에 의해 대식세포 (macrophage)로 분화되고 활성화되면서 다량의 활성산소 (reactive oxygene specoes; ROS)와 TNF- α (tumor

necrosis factor- α) 등의 염증성 사이토카인을 분비하여 혈관 염증 반응을 유도한다 (Libby et al, Nature, 420, 2002;6917:868-874). 대식세포에 의한 혈관 염증 반응은 동맥경화를 유발하는 주요 원인으로 생각되고 있다 (Ross. Atherosclerosis-An inflammatory disease. New Engl J Med 1999;340:115-126). 혈관 내막(intima)으로 유입된 LDL은 산화되어 oxidized LDL (oxLDL) 형태로 되고 대식세포의 SR-A, CD36, CD68 등과 같은 청소수용체 (scavenger receptor)와 결합하여 대식세포 안으로 유입된다. 이로 인해 대식세포는 많은 양의 지방구를 축적하게 되면서 거품형태의 세포 (foam cell)로 변하게 된다 (Lusis. Atherosclerosis. Nature 2000;407:233-241).

[0007] 거품형태의 세포가 죽으면서 축적되었던 지방 성분이 내막으로 배출되고, 대식세포가 분비하는 TNF α , INF γ 등의 사이토카인 (cytokine)과 세포성장인자 (growth factor) 자극에 의해 중간층에 있던 혈관평활근세포 (vascular smooth muscle cell; VSMC)는 내막 쪽으로 이동하여 세포 증식이 촉진되고 collagenase등과 같은 단백분해효소와 세포외기질 (extracellular matrix)을 분비한다. 세포외기질은 분해되면서 지질 덩어리, 평활근세포 등과 함께 섬유관 (fibrous plaque)을 형성하고, 여기에 혈소판과 여러 종류의 혈액세포가 뭉쳐서 혈전 (thrombus)을 만들고, 혈관벽이 두꺼워져서, 결국에는 혈관이 좁아지게 된다. 결론적으로, 동맥경화의 시작 단계는 고지혈증에 따른 LDL 농도가 높은 것이 주요 위험인자이지만, 대식세포에 의한 광범위한 염증반응과 혈관 평활근세포의 비정상적 세포증식 등의 복잡한 과정이 병변 진행에 중요하게 관여하고 있다.

[0008] 혈전 (thrombus)은 심장과 혈관계 내강면에 형성되는 혈액성분으로 구성된 부착물로 동맥혈전과 정맥혈전으로 나누는데, 그 구성성분의 비율은 모든 혈액의 경우가 동일하지 않으며 피브린망 내에 주로 혈소판이나 다른 혈구가 선택적으로 존재한다. 혈액 (혈소판, 응고인자, 섬유용해계), 혈류, 혈관의 단일 또는 복수 요인의 이상으로 혈전이 생긴다. 동맥혈전의 형성은 혈소판과 콜라겐 등의 내피하조직의 반응 (점착, 방출, 응집)으로 시작하여 혈액응고인자의 활성화에 의해 생긴 피브린이 다른 혈구를 둘러싸 완성된다. 동맥혈전의 부착부 (두부)는 혈소판이 중심의 백색혈전이지만 이보다 하류에서는 혈류장애에 따라 확대되는 피브린망에 적혈구가 끼여 들어가서 적색혈전 (미부)을 형성한다. 정맥에서의 혈전 형성에는 혈류 정체의 관여가 크기 때문에 정맥혈전은 주로 대량의 피브린 (fibrin)과 적혈구로 구성되는 적색혈전이다. 혈전은 피브린 분해효소인 플라스민 (plasmin)에 의해 용해된다.

[0009] 한편, 시스테인 프로테아제 (시스테인 프로테이스; cysteine protease)는 티올프로테아제 (thiol protease)라고도 부른다. 시스테인의 SH기가 활성중심이 되는 단백질 가수분해효소 (protease)의 총칭으로 단백질과의 반응으로 S-아실 중간체를 형성하여 이것에 물에 친핵 공격하여 펩티드결합을 가수분해하는 반응을 촉매한다. S-아실 중간체 형성에 있어서 효소의 활성중심 근방의 히스티딘이 일반 염기촉매로 작용한다. 최적 pH는 미산성이고 SH 시약으로 활성화하여 SH저해물로 실활된다. 식물에는 피신 (ficin), 파파인 (papain), 부로메라인 (bromelain)이 있고, 동물에서는 카테프신 (cathepsin) B, H, L, 칼슘의존성 프로테아제 (protease)가 있다.

[0010] 이 중에서 피신 (ficin)은 식물성 천연 프로테아제의 일종으로, 1938년 A. Walti가 최초로 결정상으로 분리하였다. 무화과 Ficus carica L. (뽕나무과) 등의 식물의 유액 중에 존재하는 세포 내 효소이며, 파파인과 작용이 비슷하기 때문에 파파인, 브로멜린 등과 함께 일괄해서 파파이나아제 (papainase)라고 불리는 경우도 있다. 단백질, 어느 종류의 합성 펩티드와 그 유도체 및 아미노산아미드 (벤조일-L-아르기닌아미드, 벤족시-L-메티오닌아미드 등), 아미노산에스테르 (벤조일-L-아르기닌에틸 등)의 가수 분해를 하는 외에, 펩티드 전이 반응도 한다.

[0011] 본 발명은 천연유래 시스테인 프로테아제 (cysteine protease) 중 하나인 피신 (Ficin)을 이용하여 혈전을 유도하여 진행된 실험과 동물실험을 통해서 증상 완화 효과가 탁월한 것을 확인하였다. 따라서 피신은 동맥경화증 예방 및 치료제 제품화를 통해 의약품으로 사용할 수 있기에 이는 피신을 유효성분으로 포함하는 동맥경화증 예방 및 치료용 조성물로 활용될 수 있을 것이다.

[0012] 삭제

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 동맥경화증을 비롯한 혈관 질환의 예방 및 치료를 위하여 현재 사용하고 있는 약물로는 아스피린과 헤파린 등이 있으나 이들은 혈전에 관한 특이성이 없고 장기간 사용 시에는 체내에서 출혈을 일으키는 등의 부작용이 있다.

이에 본 발명은 이러한 문제점을 해결하기 위하여 천연유래 시스테인 프로테아제 (cysteine protease) 중 하나인 피신 (Ficin)을 이용하여 혈전을 유도하여 진행된 실험과 동물실험을 통해서 증상 완화 효과가 탁월한 것을 입증하였다. 따라서 피신 (Ficin)은 동맥경화증 예방 및 치료제 제품화를 통해 의약품으로 발전할 가능성을 확인하였다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 피신 (Ficin)을 유효성분으로 포함하는, 동맥경화증의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 “피신”은 피브린 분해 효과를 가지는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 “피신”은 피브리노겐의 α -사슬, β -사슬 및 γ -사슬을 분해시키는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 “피신”은 혈전을 용해시키는 효과를 가지는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 “피신”은 κ -카라기난 (κ -carrageenan)으로 유발된 쥐 꼬리 혈전증 동물 모델에서 항혈전 효과를 가지는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 “피신”은 0.0125 내지 0.8 U/ml인 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 삭제
- [0022] 삭제
- [0023] 삭제
- [0024] 또한, 본 발명은 피신 (Ficin)을 유효성분으로 포함하는, 동맥경화증의 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0025] 또한, 본 발명은 피신 (Ficin)을 유효성분으로 포함하는, 항혈전용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 “혈전”은 κ -카라기난 (κ -carrageenan)에 의하여 유발된 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 “조성물”은 헤파린 (heparin) 보다 항혈전 효과가 높은 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 삭제
- [0029] 삭제
- [0030] 삭제
- [0031] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 “피신”은 피브린 분해 효과를 가지는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 “피신”은 피브리노겐의 α -사슬, β -사슬 및 γ -사슬을 분해시키는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 또한, 본 발명은 피신 (Ficin)을 유효성분으로 포함하는, 혈전 생성 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0034] 본 발명은 천연유래 cysteine protease 중 하나인 피신 (Ficin)을 유효성분으로 포함하는 동맥경화증 예방 및 치료제 개발을 위한 조성물과 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 피신이 혈전이 유도된 상황에서 혈전을 제거하는 능력과 혈전생성을 억제시키는 효능이 뛰어나 동맥경화증의 예방 및 치료제로서의 효과가 우수함을 확인하였다. 또한 동물실험을 통하여 혈전 생성이 현저하게 감소되는 효과를 확인하여 동맥경화 예방 및 치료제 개발을 위한 의약외품의 조성물로 사용시에 우수한 효과를 기대할 수 있을 것으로 보인다. 피신 (Ficin)은 천연유래 cysteine protease로서, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명을 장기적으로 사용하여도 안전한 이점을 가질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 본 발명의 피신의 SDS-PAGE 프로파일 및 섬유소 분해 활성을 나타낸 도이다.
 도 2는 본 발명의 피신의 섬유소 분해 활성을 나타낸 도이다.
 도 3은 피브리노겐에 대한 피신의 용량 의존적 효과를 나타낸 도이다.
 도 4는 혈액 응고 형성에 대한 피신의 효과를 나타낸 도이다.
 도 5는 개의 피 (canine blood)를 사용한 응고 시간에 대한 피신의 효과를 나타낸 도이다.
 도 6은 쥐의 꼬리정맥에 κ -카라기난 (κ -carrageenan)을 투여하여 정맥혈전을 유도하여 피신의 동맥경화 예방 및 치료효과를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0037] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어 (terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0038] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

[0040] 본 발명의 용어, "피신 (ficin)"이란 식물성 천연 프로테아제 (protease)의 일종으로, 무화과 Ficus carica L. (뽕나무과) 등의 식물의 유액 중에 존재하는 세포 내 효소를 의미한다.

[0041] 본 발명의 용어, "동맥경화증 (arteriosclerosis)"이란, 동맥 내벽이 두꺼워지고 혈관의 탄력성이 감소되고, 혈류에 대하여 저항성이 증가되며, 혈전과 색전이 유발되는 혈관 질환으로서, 뇌졸중, 심근경색증, 협심증, 관상동맥경화증, 죽상동맥경화증 등을 포함한다. 본 발명의 목적상 상기 동맥경화증은 본 발명의 조성물의 투여로 인하여 예방, 경감, 개선 또는 치료될 수 있는 목적 질환으로 사용되지만, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0042] 본 발명의 용어, "예방"이란, 조성물의 투여에 의해 동맥경화증을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 예방은 본 발명의 조성물을 사용하여 동맥경화증의 발병을 억제시키거나 지연시키는 행위를 의미하는 것으로 이해될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0043] 본 발명의 용어, "치료"란, 조성물의 투여에 의해 동맥경화증에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 치료는 본 발명의 조성물을 사용하여 동맥경화증의 증세를 호전시키거나

나 병리증상을 경감시키는 행위를 의미하는 것으로 이해될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

- [0044] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0046] 일 측면에서, 본 발명은 피신 (Ficin)을 유효성분으로 포함하는, 동맥경화증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0047] 또는, 본 발명은 피신 (Ficin)을 유효성분으로 포함하는, 항혈전용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0048] 본 발명의 약학적 조성물에는 유효성분 이외에 보조제 (adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있으나, 예를 들어 프로인트 (Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 면역성을 증가시킬 수 있다.
- [0049] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0050] 본 발명의 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0051] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔 (witepsol), 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0052] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0053] 상기 약학적 조성물은 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화될 수 있다.
- [0054] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질, 연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제 (예: 락토스, 텍스트로즈, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제 (예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리돈과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 봉해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0055] 또한, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제제이며, 주사용 제제의 용매로서 물, 링거액, 등장성 생리식염수 또는 현탁액을 들 수 있다. 상기 주사용 제제의 멸균 고정 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 사용할 수 있으며 모노-, 디-글리세라이드를 포함하여 어떠한 무자극성 고정오일도 이러한 목적으로 사용될 수 있다.
- [0056] 또한, 상기 주사용 제제는 올레산과 같은 지방산을 사용할 수 있다.
- [0058] 일 측면에서, 본 발명은 피신 (Ficin)을 유효성분으로 포함하는, 동맥경화증 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

- [0059] 또는, 본 발명은 피신 (Ficin)을 유효성분으로 포함하는, 혈전 생성 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0060] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 유효성분인 피신 (Ficin)을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0061] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 본 발명의 건강기능식품 조성물은 상기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 건강기능식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.
- [0062] 또한, 상기 건강기능식품 조성물은 유효성분인 추출물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 건강기능식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 건강기능식품 조성물은, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공될 수 있다. 본 발명에서 '건강기능식품 조성물'이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 목적으로 섭취하는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 '식품 첨가물 공전'에 수록된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다. 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분을 부형제, 결합제, 봉해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다. 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다. 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분과 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기준에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다. 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분의 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기준에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.
- [0065] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 상기 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0067] 준비예 1. 실험에 사용된 화학물질 및 시약
- [0068] 피신 (Ficin), 피브리노겐 (fibrinogen; 소 혈장으로부터의 I-S 형 피브리노겐) 및 트롬빈 (thrombin; 소 혈장 트롬빈)은 Sigma Chemical Co.에서 구입했다. 사용된 다른 모든 시약은 가장 순수한 등급이다.
- [0070] 실시예 1. 폴리아크릴아마이드 겔 전기 영동법 (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis; SDS-PAGE)

[0071] 1.1 실험 방법

[0072] 12% 분리 겔 및 4% 적층 겔을 사용하여 Laemmli 방법에 따라 전기 영동을 수행 하였다. 피신을 비 환원 샘플 완충액 (4% SDS, 125mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% 글리세롤 (glycerol), 0.01% 브로모페놀 블루 (bromophenol blue))에서 제조 한 다음, 추후 사용할 때까지 -20℃에서 저장하였다. 피신을 트리스-글리신 (Tris-glycine) 실험 완충액을 사용하여 일정한 전압에서 100V에서 90분 동안 전기 영동시켰다. 분자량 마커인 10-250 kDa (Precision Plus Protein™ Standards, Bio-rad, USA)를 분자량 추정을 위해 피신과 평행하게 진행시켰다. 전기 영동 후, 분리된 단백질 밴드를 40% 메탄올 (methanol), 10% 아세트산 (acetic acid) 중 0.125 % 쿠마시 블루 (Coomassie blue)로 염색 하였다.

[0074] 1.2 실험 결과

[0075] 도 1은 비 환원 (1A) 및 환원 (1B) 조건 하에서 수득된 SDS-PAGE 겔 전기 영동도를 나타내었다. 피신은 비 환원 조건에서 유사한 단백질 밴드가 나타났다. 피신의 섬유소 분해 (;용해) 활성을 비교하기 위해 다양한 농도를 피브린 자이모그래피 (fibrin zymography)에 넣었다 (1C). 이때 피브린 겔의 투명 구역 (Clear zones)은 단백질 가수 분해 활성 영역을 나타낸 것이다. 섬유소 분해 (;용해) 활성 (fibrinolytic activity)은 피신이 섬유소 (fibrin) 분해 (;용해)에 매우 강력하고 분자량이 50kDa 이상임을 나타냈다. 이때 레인 1은 0, 레인 2는 0.0125, 레인 3은 0.025, 레인 4는 0.05, 레인 5는 0.1, 레인 6은 0.2 (U/ml)를 나타낸다. 또한, 제시된 데이터는 3개의 독립적인 실험의 평균±SD이다.

[0077] 실시예 2. 피브린 플레이트 (Fibrin plate)

[0078] 2.1 실험 방법

[0079] 섬유소 분해 (;용해) 활성 (Fibrinolytic activity)은 약간의 변형으로 Astrup 및 Mullertz의 방법에 따라 평가되었다. 간략하게, 5%의 0.6% w/v 섬유소원 (fibrinogen) (Calbiochem, Darmstadt, Germany)을 1% 아가로스 및 100 μl의 트롬빈 (100NIH U/ml, Sigma Aldrich, USA)과 50-mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.8)에 혼합하여 플라스미노젠 (plasminogen) 비 함유 플레이트를 제조 하였다. 플레이트를 실온에서 30분 동안 정치시켜 피브린 응괴를 형성시켰다. 10 μL의 피신 (0, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1U) 또는 양성 대조군 플라스민 (plasmin 1mg/ml)을 건조된 여과지 디스크 (diameter 5mm) 상에 떨어 뜨리고, 이를 37℃에서 24시간 동안 인큐베이션하기 위해 피브린층 상에 놓았다. 투명한 구역은 섬유소 분해 (;용해) (fibrin degradation)를 나타내고, 섬유소 분해 (;용해)의 효능은 그 직경에 비례한다. 투명 고리의 직경을 이미지 J로 측정 한 후, 섬유소 분해 (;용해) 면적 (mm²)을 계산 하였다. 가수 분해 된 투명 구역의 평균 직경을 측정하고 각 샘플에 의해 야기된 분해 (;용해) 부피를 계산 하였다.

[0081] 2.2 실험 결과

[0082] 도 2에서의 피브린 플레이트 결과는 피신의 섬유소 분해 (;용해) 활성을 나타냈다. 피신은 투명 구역 (clear zone)을 형성했다. 피신은 용량 의존적이고 섬유소 분해 (;용해) 활성에서 투명 구역 (clear zone)의 형성을 유발하였고, 플라스민 (positive control)과 비교하여 높았다. 24시간의 인큐베이션 후 피신의 섬유소 분해 (;용해) 활성이 나타 났으며, 24시간 후에 투명한 중공의 형성이 서서히 반응하였다. 도 2A는 섬유소 분해 (;용해) 활성을 피브린 플레이트상에서 분석 한 것이고, 도 2B는 섬유소 분해 (;용해) 활성을 투명 구역의 치수에 의해 측정된 것이다. 이때, 도 2A의 A는 0, B는 0.0125, C는 0.025, D는 0.05, E는 0.01 (U)이고, F는 플라스민 1mg/ml이다. 제시된 데이터는 3개의 독립적인 실험의 평균±SD이다.

[0084] 실시예 3. 섬유소 (피브린; fibrin) 자이모그래피 (zymography)를 이용한 섬유소 분해 (;용해) 활성 검사

[0085] 섬유소는 자이모그래피 (zymography) 분석에서 섬유소 분해 (;용해) 활성의 평가를 위한 기질로서 사용되었다. 본 실험을 위해, 20mM 인산 나트륨 (sodium phosphate) 완충액 (pH 7.4)에 용해된 피브리노젠 (0.6mg/mL) 및 트롬빈 (0.01 unit/mL)을 12% 폴리아크릴아미드 (polyacrylamide)와 공중합시켜 각각의 자이모그래피 겔을 제조 하였다. 분석될 다양한 독 (20 μg)을 비 환원 샘플 완충액에서 제조한 다음, 4℃에서 100V에서 겔상에서 작동시켰다. 전기영동 후, 2.5% Triton X-100에서 겔을 30분 동안 2회 세척하여 SDS를 제거 하였다. 이어서, 겔을 20mM 트리스 (pH 7.4), 0.5mM 염화칼슘 (calcium chloride), 200mM 염화나트륨 (sodium chloride)과 37℃에서 16시간 동안 배양하고 겔을 0.125% 쿠마시 블루 (Coomassie blue)로 염색 하였다. 겔의 명확한 영역은 섬유소 분해 (;용해) 활성 영역을 나타낸다. 섬유소 분해 (;용해) 활성에 대한 금속 이온 및 프로테아제 (protease) 억제제의 효과를 알기 위해, 금속 이온 및 프로테아제 억제제를 인큐베이션 완충액 (20mM Tris (pH 7.4), 200mM

염화 나트륨)에 첨가하고 겔을 평소와 같이 염색 하였다. 모든 금속 이온 및 억제제는 PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) (1mM)를 제외하고 2mM의 최종 농도를 제공한다.

[0087] 실시예 4. 섬유소 생분해 활성 검사 (Fibrinogenolytic activity)

[0088] 4.1 실험 방법

[0089] 피신의 섬유소 분해 (;용해) 활성은 Matsubara 등의 방법에 따라 조사되었다. 간략하게, 15 μ L의 소 섬유소원 (bovine fibrinogen, 20mg/mL)을 지시된 시간 및 용량 동안 37°C에서 10 μ L 피신 및 5 μ L의 반응 완충액 (pH 7.4, 200mM 염화나트륨, 0.5mM 염화칼슘, 20mM 트리스)과 함께 인큐베이션 하였다. 분해된 생성물은 7.5% SDS-PAGE에서 전기 영동하고 쿠마시 블루로 염색 하여 분석되었다.

[0091] 4.2 실험 결과

[0092] 상기 4.1의 방법에 따라 다양한 농도의 피신의 섬유소 분해 (;용해) 활성을 SDS-PAGE로 분석 하였다. 피브리노젠은 3개의 폴리펩티드 사슬 α , β 및 γ 로 구성된다. 피신은 피브리노젠의 α -사슬과 β -사슬을 용량 의존적으로 분해했다 (도 3 참조). 피브리노젠의 α 및 β 사슬은 0.0125U에서 즉시 소화되었다. 피신과의 인큐베이션 후 0.05U에서 이의 완전히 분해된 γ -사슬이 관찰되었다. 제시된 데이터는 3개의 독립적 인 실험의 평균 $\pm$ SD이다.

[0094] 실시예 5. 혈전 용해 분석 (Blood clot lysis assay)

[0095] 5.1 실험 방법

[0096] 사람의 혈액을 채취 후 혈전을 유도한 후 피신을 처리하여 혈전을 제거하는 효과를 확인하였다. 건강한 지원자로부터 채취 된 정맥혈을 상이한 사전 중량 측정된 평균 미세 원심 분리 튜브 (500 μ L/튜브)로 옮기고 37°C에서 45분 동안 배양 하였다. 혈전 형성 후, 혈청을 완전히 제거하고 혈전이 담긴 각 튜브의 무게를 다시 측정하여 혈전 중량을 측정 하였다 (혈전 중량 = 혈전 함유 관의 무게-관 단독의 무게). 혈전을 함유하는 각각의 미세 원심 분리 튜브를 적절히 표지하고 다양한 농도의 피신을 튜브 (0 내지 0.1U)에 첨가 하였다. PBS 및 스트렙토키나아제 (Streptokinase)를 혈전을 함유하는 각각의 튜브에 첨가하였고 이는 음성 대조군 (PBS) 및 양성 대조군 (Streptokinase)으로서 작용 하였다. 이어서, 모든 튜브를 37°C에서 24시간 동안 인큐베이션하고 혈전 용해를 관찰 하였다. 인큐베이션 후 수득된 유체를 제거하고 혈전 중단 후 중량의 차이를 관찰하기 위해 튜브를 다시 칭량 하였다. 혈전 용해 전, 후에 얻은 중량의 차이를 혈전 용해 백분율로 표시 하였다.

[0098] 5.2 실험 결과

[0099] 피신의 혈전 용해 효과는 인간 혈전 용해 분석에 의해 조사되었다. 혈전에 대한 피신의 효과를 평가하기 위해, 본 발명자들은 인간 혈전 용해 분석법을 조사 하였다. 피신은 용량 의존적 방식으로 혈전 용해 활성을 나타냈다. 피신은 스트렙토키나제 (양성 대조군; Streptokinase) 혈전 용해 활성보다 높은 것으로 나타났다. 도 4에 도시된 바와 같이, 피신은 혈전의 중량을 현저하게 감소 시켰으며, 특히 피신 0.1U는 혈전의 98.6%를 용해 시켰다. 즉, 피신은 저농도에서도 높은 혈전 제거능이 있음을 확인하였다.

[0101] 실시예 6. 피신의 항혈전 효과 (Anti-coagulation effect of ficin)

[0102] 6.1 실험 방법

[0103] 파신의 항혈전 효과를 알아보기 위해 혈액 혈전 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간 (aPTT) 및 프로트롬빈 시간 (PT) 수준에 대한 피신의 작용을 조사 하였다. 혈전 분석을 위해, 개 혈액 샘플을 실온 (RT; room temperature)에서 10분 동안 상이한 농도의 피신이 혼합 된 3.2% 시트르산 나트륨 (1:9, v/v)으로 몽골 개로부터 수집 하였다. 배양 후, PT 및 aPTT 조합 시험 키트 (Vetscan@VSprio PT/aPTTcombination test cartridge, Abaxis Inc., California, NO, USA)를 사용하여 혼합물을 측정 하였다.

[0105] 6.2 실험 결과

[0106] 항혈전제 파라미터에 대한 피신의 효과를 조사하기 위해, 개혈을 사용하여 aPTT 및 PT 수준을 측정 하였다. 도 5에서 나타난 것과 같이 피신으로 처리 한 것은 피신으로 처리하지 않은 것과 비교하여 PT 및 aPTT 값이 개선 된 것으로 나타났다. 피신은 각각 35초 및 200초의 PT, aPTT 초과로 강하게 연장되었다. 이와 같은 결과는 피신이 조절 고유 및 외부 응집제 경로를 통해 항혈전제로서 작용하는 성분을 가지고 있음을 나타냈다. 제시된 데이터는 3개의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD이다.

[0108] 실시예 7. κ -카라기난 (κ -carrageenan)으로 유발된 쥐 꼬리 혈전증 동물모델

[0109] 7.1 실험 방법

[0110] κ -카라기난 (κ -carrageenan)을 식염수 (1mg/kg)에 용해시키고 등쪽 꼬리정맥에 주사하여 정맥 혈전을 유도한 후 동맥경화 예방 및 치료 효과를 확인하였다. 혈전 생성은 다음과 같이 평가되었다 : 쥐 꼬리 끝으로부터 12cm의 부위를 결찰하고, 1mg/kg의 κ -카라기난 (κ -carrageenan)을 정맥 내 주사 하였다. 20분 후, 결찰을 제거 하였다. 실험군을 1시간 동안 피신 전처리 한 후 κ -카라기난 (κ -carrageenan)을 주사 하였다. 양성 대조군은 κ -카라기난 (κ -carrageenan)을 1mg/kg의 용량으로 정맥 내 투여한 후 쥐 꼬리를 10분 동안 결찰하였고, heparin-Na을 100U (ml/kg)의 용량으로 복강 내 투여 하였다. κ -카라기난 (κ -carrageenan) 주사 후 12시간에 꼬리 끝에서의 경색 빈도 및 경색 영역의 길이를 기록 하였다.

[0112] 7.2 실험 결과

[0113] κ -카라기난 (κ -carrageenan)으로 유발된 쥐 꼬리 혈전증 동물모델을 사용하여 연구에서 피신의 혈전 용해 활성을 조사한 결과, 쥐의 꼬리는 κ -카라기난 (κ -carrageenan) 처리 후 적갈색을 나타내며 혈전 형성을 나타내었다. 도 6A는 κ -카라기난 (κ -carrageenan) 주사 후 12시간 까지의 대표적인 사진이며 도 6B는 κ -카라기난 (κ -carrageenan) 주사 후 12시간 후 쥐 꼬리 혈전에서 피신 및 헤파린의 혈전 억제 효과를 나타낸 것이다. 이때, 음성 대조군 (κ -carrageenan 단독 주사)에서의 평균 혈전 길이는 12cm였다. 이 그룹에서 꼬리 끝의 혈전증은 와인에서 적갈색으로 나타 났으며 κ -카라기난 (κ -carrageenan) 주사 48 시간 후에 심각한 괴사로 변했다. 그러나 피신은 이러한 증상을 효과적으로 약화시켰고, 실제 피신 처리 군의 경우, 평균 혈전증 길이는 8cm였다. 또한, 피신 처리 군에서의 혈전 길이는 용량 의존적 방식으로 감소되었다. 또한, 헤파린을 양성 대조군으로 사용 하였다. 헤파린 처리 군에서 평균 혈전증 길이는 10cm였다. 따라서, 피신은 κ -카라기난 (κ -carrageenan)으로 유발된 쥐 꼬리 혈전증 동물모델에서 강력한 항혈전 효과를 나타내었으며, 이 효과는 헤파린에 비해 더 컸다. 데이터는 3개의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD (n=4)로 표현되었다.

[0114] 즉, 피신은 고농도에서 혈전 형성을 유의하게 억제하는 효과를 확인하였고, 이를 통해 피신을 동맥경화증 예방 및 치료용 조성물로 사용가능성을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0116] 실시예 8. 통계 분석 (Statistical analysis)

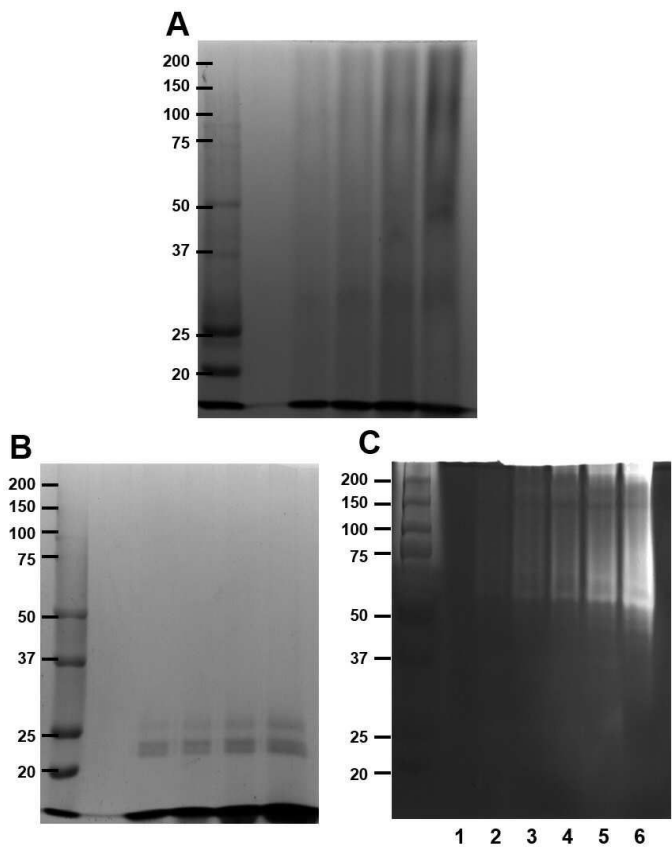
[0117] 실험 결과는 평균 $\pm$ 표준 편차 (SD; standard deviation)로 표시하였다. 일원분산분석 (ANOVA)을 사용하여 두 평균값 간의 차이의 유의성을 평가하였고, *P<0.05 및 **P<0.01는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0119] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시 예들을 중심으로 살펴보았다.

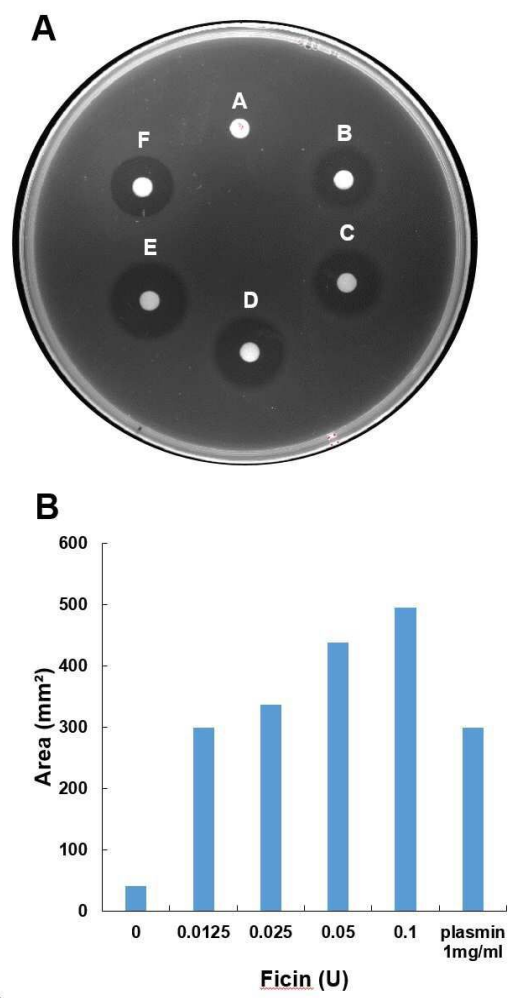
[0120] 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구 범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

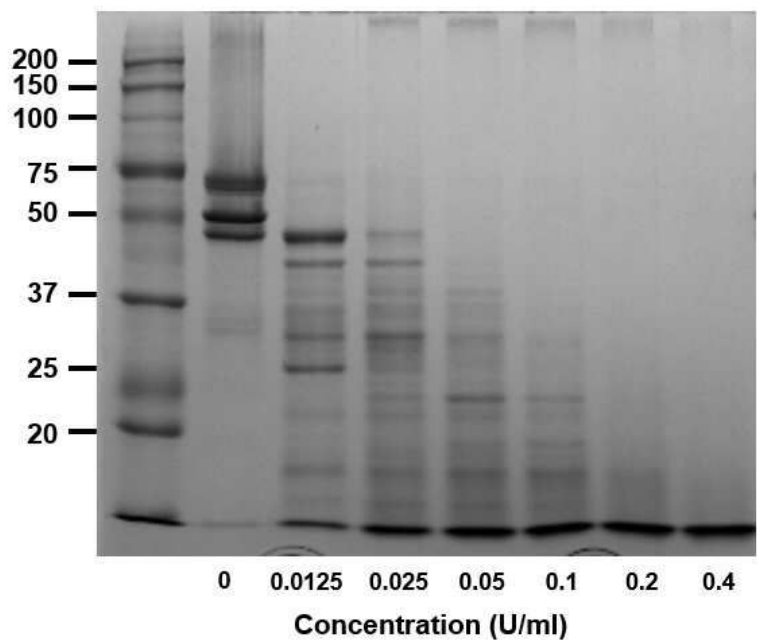
도면1



도면2

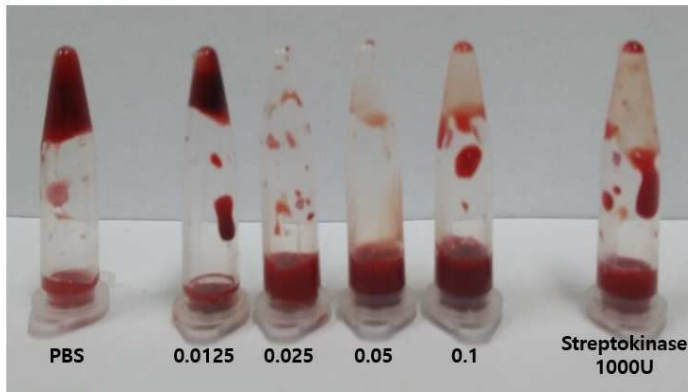


도면3

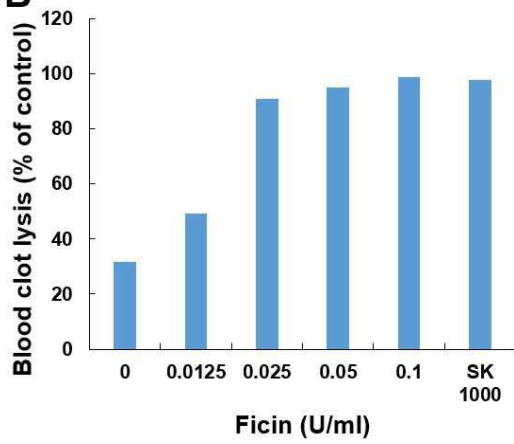


도면4

A



B



도면5

Ficin	PT (sec)	aPTT (sec)
con	17.5	93.9
0.8 U/ml	35<	200<
* Normal range	14-19	75-105

도면6

