



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0142488
(43) 공개일자 2016년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/36 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)

A61K 31/216 (2006.01) A61K 31/505 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/36 (2013.01)

A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2015-0078281

(22) 출원일자 2015년06월03일

심사청구일자 2015년06월03일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

명창선

대전광역시 유성구 대학로 59 상그릴라플러스빌
1212호

김영호

대전광역시 유성구 봉명로 48, 801동 302호(신한
인스빌)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 공간

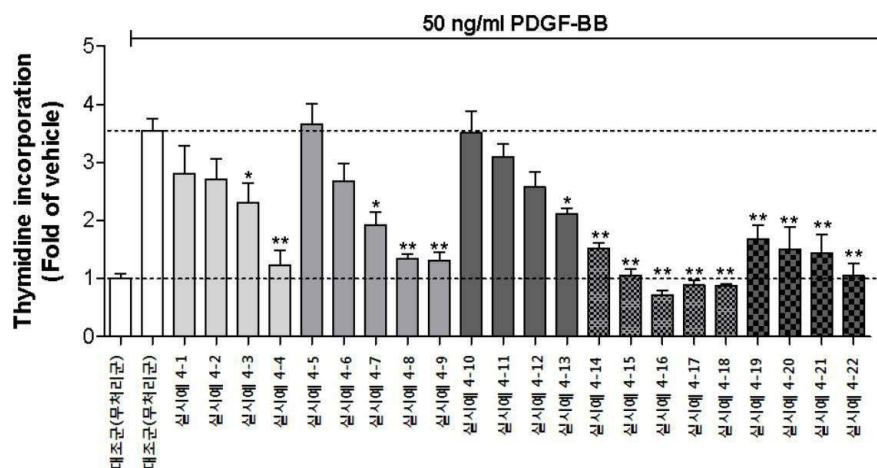
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 세사민, 및 페노피브레이트 또는 로수바스타틴을 포함하는 혈관재협착증의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 (a) 세사민(sesamin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및 (b) 페노피브레이트(fenofibrate) 및 로수바스타틴(rosuvastatin) 중 1종 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈관재협착증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이며, 상기 조성물은 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 효과가 우수하여 혈관재협착증의 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 31/216 (2013.01)

A61K 31/505 (2013.01)

A23V 2200/326 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

장태수

경기도 수원시 영통구 도청로 65, 5411동 3303호(
이의동, 자연앤힐스테이트)

한주희

대전광역시 유성구 장대로 90-1, 302호(장대동, 진
원빌라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093815

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소 지원사업

연구과제명 심혈관계 질환 치료제 개발 기반 연구

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 약학대학

연구기간 2009.09.01 ~ 2018.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 세사민(sesamin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및
- (b) 페노피브레이트(fenofibrate) 및 로수바스타틴(rosuvastatin) 중 1종 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈관재협착증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

- (a) 상기 세사민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및 (b) 페노피브레이트 및 로수바스타틴 중 1종 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 1:0.5~4의 중량비로 혼합된 것을 특징으로 하는 혈관재협착증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 것을 특징으로 하는 혈관재협착증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

- (a) 세사민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및
- (b) 페노피브레이트 및 로수바스타틴 중 1종 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈관재협착증의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 5

제4항에 있어서,

- (a) 상기 세사민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및 (b) 페노피브레이트 및 로수바스타틴 중 1종 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 1:0.5~4의 중량비로 혼합된 것을 특징으로 하는 혈관재협착증의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 조성물은 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 것을 특징으로 하는 혈관재협착증의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세사민과, 페노피브레이트 및 로수바스타틴 중 1종 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 혈관재협착증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 혈관재협착증(angioplasty restenosis)은 혈관조영술에 의한 진단으로, 혈관성형술 후 추적 조영술 상의 혈관내경 협착이 50% 이상인 경우를 말한다. 최근에는 스텐트를 이용하는 기술이 증가하면서 혈관재협착증의 발생율이 감소하기는 하였으나, 여전히 혈관성형술(풍선확장술 및 스텐트 삽입)을 시술받은 환자의 30% 정도는 혈관재협

착증이 발생하고 있다.

- [0003] 정상적인 경우의 내피세포는 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 물질을 분비하여 세포 증식이 일어나지 않지만, 스텐트 시술 등을 통하여 내피세포가 손상되는 경우에는 활성화된 혈소판에서 분비되는 혈소판 유래 성장인자(PDGF, platelet-derived growth factor)와 혈장 중에 포함되어 있는 다양한 사이토카인이 분비되어, 혈관 평활근 세포의 증식, 이동, 단백질 합성능력 등의 급격한 변화를 유도한다(Ross, R., 1999; Sachinidis, A. et al., 1990). 그 결과 동맥내강이 좁아져서 혈관재협착증에 이르게 되는 것으로 알려져 있으며, 선행문헌에는 혈관 평활근 세포의 증식이 혈관성형술의 효율을 제한하는 주요한 임상상의 문제로 제기되어 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 약물이나 물질을 방출하는 스텐트를 개발하여 임상에 사용하였음을 보고하였다(Ross, R., 1990; Ross, 1995; Schwartz, S. M., 1997). 그러나 이러한 목적으로 사용되고 있는 약물들은 혈관 평활근 세포를 사멸시키는 기전을 통해 내막의 과형성을 방지하지만, 약물이 지닌 독성에 의해 평활근 세포뿐만 아니라 내피세포의 사멸까지 유도하므로 임상 사용에 있어 한계를 드러내고 있다. 따라서 혈관 평활근 세포의 성장은 선택적으로 억제하면서 독성이 나타나지 않는 약물의 개발이 시급한 실정이다.
- [0004] 한편, 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하기 위해서는 세포 주기(cell cycle)의 조절도 중요한 요인으로 작용할 수 있으며, 일반적으로 동물 세포의 증식은 복합적이면서도 순차적인 G_0/G_1 , S, G_2/M 의 세포 주기 통제를 받는다(Sherr, C. J., 1996). 정상적인 조건의 경우, 혈관에 있는 대부분의 혈관 평활근 세포는 G_0 상태이지만 기구(balloon)에 의해 손상(injury)되거나 PDGF 자극 등이 있는 경우에는 세포 주기의 변화가 유도된다(Xiong, Y. et al., 1993).
- [0005] 또한, 세포 주기를 조절하는데 있어 CDK(cyclin-dependent kinases)는 중요한 인자이다. CDK의 활성은 사이클린 조절 서브유닛(cyclin regulatory subunits)에 의해 조절되고, 효소활성을 가진 CDK 서브유닛으로 구성된 복합체를 형성하며, 대부분의 세포에서는 G_1 구간에서 S구간으로 진입 시에 사이클린 D/CDK4(cyclin D/CDK4)나 사이클린 E/CDK2(cyclin E/CDK2)와 같은 사이클린/CDK 복합체(cyclin/CDK complexes)의 결합 및 활성이 요구된다. 이러한 복합체의 활성화는 Rb(retinoblastoma) 단백질의 인산화반응을 촉진하고 PCNA(proliferating cell nuclear antigen)의 발현을 향상시킴으로써 세포의 증식에 영향을 미친다.
- [0006] 반면, 사이클린/CDK 복합체의 키나아제(kinase) 활성은 CKI(cyclin-dependent kinase inhibitors)에 의해 억제된다. 상기 CKI 중에서 INK4 패밀리(INK4 family, p16INK4a 및 p15INK4b)는 CDK4와 CDK6만을 저해하지만, Cip 패밀리(Cip family, p21^{CIP1} 및 p27^{KIP1})는 모든 CDK를 억제하여, 세포 증식의 억제에 영향을 미치므로 세포 주기를 조절하는 경우에 고려할 만한 인자이다(Hunter, T. et al., 1994; Coqueret, O., 2003).
- [0007] 한편, 혈관재협착증의 치료를 위해 택솔(Herdeg, C. et al., 1999), 헤파린, EPA, 에스트로젠 등을 연구 개발 중에 있으나, 이 역시 뚜렷한 실효를 거두지 못하는 실정이다. 한국등록특허 제478671호에는 클로트리마졸을 유효성분으로 포함하는 혈관 재협착 예방 및 치료용 약학 조성물이 개시되어 있으며, 한국등록특허 제516026호에는 3'-디옥시아데노신(3'-deoxyadenosine)을 유효성분으로 하는 혈관 재협착 예방 및 치료용 조성물이 개시되어 있다. 또한, 한국등록특허 제817932호에는 베르바민을 유효성분으로 포함하는 스텐트 시술 후에 발생하는 혈관 재협착의 예방제에 관한 조성물이 개시되어 있지만, 이러한 혈관재협착 억제제는 혈관재협착을 방지하는 것 이외의, 상처재생억제, 혈관손상, 간독성, 신장손상, 혈소판응집억제에 의한 출혈량 증가 등의 다양한 부작용을 나타내기 때문에, 안전성이 입증된 다양한 천연물로부터 유래된 혈관재협착을 억제할 수 있는 물질을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있으나, 별다른 연구 성과가 보고되지 않는 실정이다. 따라서 안전하면서도 효과적으로 혈관재협착을 억제할 수 있는 물질을 개발하여야 할 필요성이 끊임없이 대두되고 있다.
- [0008] 세사민(sesamin)은 참깨 종자유(sesame seed oil) 내에 가장 많이 함유된 리그난(lignan)의 일종으로 민족두리풀(*Asiasarum heterotropoides*), 흰털오갈피 및 가시오가피(*Acanthopanax senticosus*) 등의 여러 약용식물에서도 발견된다(Ryu, J. et al., 2004). 또한, 세사민은 항콜레스테롤(Rogi, T. et al., 2011), 항고혈압(Lee, C. C. et al., 2004), 항산화(Nakano, D. et al., 2008), 항균성(Bankole, M. A. et al., 2007), 간의 보호 작용(Periasamy, S. et al., 2014) 및 항암 활성(Hibasami, H. et al., 2000; Ju, Y. et al., 2001; Miyahara, Y. et al., 2000) 효과 등의 다양한 약리학적 활성을 나타내는 것으로도 알려져 있다.
- [0009] 페노피브레이트(fenofibrate)는 일반적으로 물에 잘 녹지 않으며 메탄올과 에탄올에는 부분적으로 녹으며 아세톤, 에테르, 벤젠에는 잘 녹는 성질을 가지고 있다. 또한, 피브레이트 계열의 의약품으로 콜레스테롤을 낮추기 위한 용도로 주로 사용되며, 성인의 내인성 고지질혈증(hyperlipidemias), 과콜레스테롤혈증(hypercholesterolemias), 고중성지방혈증(hypertriglyceridemias)의 치료에 이용된다. 페노피브레이트와 관련

하여, 한국등록특허 제1286743호에는 패혈증에 대한 치료 효과가 있음을 나타내었으며, PPAR α 의 활성을 촉진시켜서 중성지방은 감소시키고 고밀도지단백 콜레스테롤은 증가시키는 효과가 있음을 나타낸 문헌도 있다(Costet, P. et al., 1998).

[0010] 로수바스타틴(rosuvastatin)은 고콜레스테롤혈증(hypercholesterolemia), 고지질단백질혈증(hyperlipidproteinemia) 및 죽상동맥경화증(atherosclerosis)의 치료에 사용된다. 또한, 로수바스타틴의 경우 20%의 높은 생체이용률을 보이며, 반감기는 약 19시간으로 길다. 90% 정도가 대변으로 배설되며, 다른 스타틴 제제와 달리 cytochrome P(CYP) 450 3A4와 상호작용을 나타내지 않으므로 근육병증(myopathy)의 위험이 높지 않다. 또한, Shionogi사에 의하여 헤미칼슘염으로 판매(CRESTOR)되고 있고, 로수바스타틴 헤미칼슘염은 현존하는 스타틴 제제 중 가장 우수한 LDL 콜레스테롤 수치 감소 효과를 가지고 있으며, 약물학적으로 수용성이고 간에 대한 선택성이 뛰어나 우수한 약리효과 및 안정성을 가지고 있다.

[0011] 이에 본 발명자들은 세사민을 페노피브레이트 및 로수바스타틴 중 1종 이상의 화합물과 병용하는 것에 의해 혈관재협착증의 발생을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성할 수 있었다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제478671호, 클로트리마졸을 포함하는 혈관 재협착 예방 및 치료용약학 조성물 및 스텐트, 2005년 03월 15일, 등록.
- (특허문헌 0002) 한국등록특허 제516026호, 코디세핀을 유효성분으로 하는 혈관재협착 방지용 조성물, 2005년 09월 13일, 등록.
- (특허문헌 0003) 한국등록특허 제817932호, 베르바민을 유효성분으로 포함하는 혈관 재협착 예방제, 2008년 04월 01일, 등록.
- (특허문헌 0004) 한국등록특허 제1210553호, 신규한 당지질 유도체 화합물 및 이를 함유하는 혈관평활근세포 이상 증식 억제용 조성물, 2012년 12월 04일, 등록.

비특허문헌

- [0013] (비특허문헌 0001) Bankole, M. A. et al., Synergistic antimicrobial activities of phytoestrogens in crude extracts of two sesame species against some common pathogenic microorganisms. African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines, 4(4), 427-433, 2007.
- (비특허문헌 0002) Coqueret, O., New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment?, Trends in Cell Biology, 13(2), 65-70, 2003.
- (비특허문헌 0003) Costet, P. et al., Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis, J. Biol. Chem., 273(45), 29577-29585, 1998.
- (비특허문헌 0004) Heldin, C. H. et al., Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors, Biochim. Biophys. Acta., 1378, 79-113, 1998.
- (비특허문헌 0005) Herdeg, C. et al., Paclitaxel: a chemotherapeutic agent for prevention of restenosis? Experimental studies in vitro and in vivo, Z. Kardiol., 89(5), 390-397, 1999.
- (비특허문헌 0006) Hibasami, H. et al., Induction of apoptosis by Acanthopanax senticosus HARMS and its component, sesamin in human stomach cancer KATO III cells, Oncology Reports, 7(6), 1213-1216, 2000.
- (비특허문헌 0007) Hunter, T. et al., Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age, Cell, 79(4), 573-582, 1994.
- (비특허문헌 0008) Ju, Y. et al., Cytotoxic coumarins and lignans from extracts of the northern

prickly ash (*Zanthoxylum americanum*), *Phytother Res.*, 15(5), 441-443, 2001.

(비특허문헌 0009) Lee, C. C. et al., Sesamin induces nitric oxide and decreases endothelin-1 production in HUVECs: possible implications for its antihypertensive effect, *Journal of Hypertension*, 22(12), 2329-2338, 2004.

(비특허문헌 0010) Lefkovits, J. et al., Pharmacological approaches for the prevention of restenosis after percutaneous coronary intervention, *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 40(2), 141-158, 1997.

(비특허문헌 0011) Miyahara, Y. et al., Sesamin and episesamin induce apoptosis in human lymphoid leukemia Molt 4B cells, *International Journal of Molecular Medicine*, 6(1), 43-46, 2000.

(비특허문헌 0012) Nakano, D. et al., Dietary sesamin suppresses aortic NADPH oxidase in DOCA salt hypertensive rats, *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 35(3), 324-326, 2008.

(비특허문헌 0013) Periasamy, S. et al., Sesame oil attenuates nutritional fibrosing steatohepatitis by modulating matrix metalloproteinases-2, 9 and PPAR- γ , *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(3), 337-344, 2014.

(비특허문헌 0014) Rogi, T. et al., The mechanism underlying the synergetic hypocholesterolemic effect of sesamin and alpha-tocopherol in rats fed a high-cholesterol diet, *Journal of Pharmacological Sciences*, 115(3), 408-416, 2011.

(비특허문헌 0015) Ross, R., Mechanisms of atherosclerosis - a review, *Adv. Nephrol. Necker. Hosp.*, 19, 79-86, 1990.

(비특허문헌 0016) Ross, R., Cell biology of atherosclerosis, *Annual Review of Physiology*, 57, 791-804, 1995.

(비특허문헌 0017) Ross, R., Atherosclerosis - an inflammatory disease, *N. Engl. J. Med.*, 340, 115-126, 1999.

(비특허문헌 0018) Ryu, J. et al., A benzenoid from the stem of *Acanthopanax senticosus*, *Arch. Pharm. Res.*, 27(9), 912-914, 2004.

(비특허문헌 0019) Sachinidis, A. et al., Different effects of platelet-derived growth factor isoforms on rat vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 265, 10238-10243, 1990.

(비특허문헌 0020) Schwartz, S. M., Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis, *J. Clin. Invest.*, 100, 87-89, 1997.

(비특허문헌 0021) Sherr, C. J., Cancer cell cycles, *Science*, 274, 1672-1677, 1996.

(비특허문헌 0022) Xiong, Y. et al., p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases, *Nature*, 366(6456), 701-704, 1993.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 세사민과, 페노피브레이트 및 로수바스타틴 중 1종 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 혈관재협착증의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다. 보다 더 자세하게는 상기 조성물이 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 효과가 우수한 것을 특징으로 하는 혈관재협착증의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명은, 유효성분으로서, (a) 세사민(sesamin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및 (b) 페노피브레이트(fenofibrate) 및 로수바스타틴(rosuvastatin) 중 1종 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포

합하는 혈관재협착증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

- [0016] 상기 (a) 세사민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 (b) 페노피브레이트 및 로수바스타틴 중 1종 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 1:0.5~4의 중량비로 혼합된 것을 특징으로 한다.
- [0017] 상기 조성물은 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [0018] 또 다른 일면에 있어서, 본 발명은, (a) 세사민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및 (b) 페노피브레이트 및 로수바스타틴 중 1종 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈관재협착증의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.
- [0019] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0020] 본 발명은 (a) 세사민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및 (b) 페노피브레이트 및 로수바스타틴 중 1종 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 혈관재협착증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0021] 상기 조성물에 있어서, 유효성분인 (a)와 (b)는, 1:0.5~4의 중량비로 혼합될 수 있고, 보다 바람직하게는 1:0.5~2의 중량비로 혼합될 수 있으며, 가장 바람직하게는 1:1~2의 중량비로 혼합될 수 있다.
- [0022] 또한, 유효성분 (b)로서, 페노피브레이트 및 로수바스타틴을 동시에 포함하는 경우라면, 이들 페노피브레이트 및 로수바스타틴은 1:0.5~2의 중량비로 혼합되는 것이 바람직하다.
- [0023] 상기 세사민은 흰털오갈피나무(*Acanthopanax divaricatus* var. *albeofructus*)를 물, C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매 흰털오갈피나무 추출물을 크로마토그래피로 분획하여 얻을 수 있고, 상기 C1 내지 C4의 저급 알코올로는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 등을 이용할 수 있다. 보다 바람직하게는, 흰털오갈피나무의 건조된 줄기를 물, C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 흰털오갈피나무 추출물을 얻어, n-헥산 및 에틸아세테이트를 이용하여 순차적으로 분획하며, 상기 각 분획물을 크로마토그래피로 분리하여 세사민을 얻을 수 있다.
- [0024] 상기 크로마토그래피는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), RP 컬럼 크로마토그래피(reverse-phase column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC), 이온교환수지 크로마토그래피(ion exchange resin chromatography), 중압 액체 크로마토그래피(medium pressure liquid chromatography), 실리카겔 진공 액체 크로마토그래피(silica gel vacuum liquid chromatography) 및 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) 중에서 선택될 수 있다.
- [0025] 또한, 세사민은 당해 기술 분야에서 통상적인 방법에 따라 합성될 수 있으며, 약학적으로 허용 가능한 염 형태로 제조될 수 있다. 세사민의 약학적으로 허용가능한 염으로는, 바람직하게는 염산, 브롬산, 황산 및 인산 등의 무기산에 의해 형성된 부가염이나, 초산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 구연산, 젖산, 주석산, 글리콜산, 숙신산 등의 유기산에 의해 형성된 부가염을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 유효성분 (b)에 있어서, 페노피브레이트는 약학적으로 허용가능한 염으로서 금속, 유기아민, 4급 암모늄, 염기성 아미노산, 또는 암모니아와 염을 형성한 형태로 이용할 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 금속의 예로는 리튬, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 스트론튬, 아연, 철 등을 들 수 있고, 유기아민의 예로는 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 에틸아민, 디에틸아민, 에틸렌디아민, 에탄올아민, 1-아미노-2-프로판올, 3-아미노-1-프로판올 등을 들 수 있으며, 4급 암모늄의 예로는 테트라메틸암모늄, 콜린 등을 들 수 있고, 염기성 아미노산의 예로는 아르기닌, 리신 등을 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0027] 또한, 본 발명의 유효성분 (b)에 있어서, 로수바스타틴은 약제학적으로 허용가능한 염 형태로 이용될 수 있으며, 바람직하게는, 로수바스타틴 칼슘염, 로수바스타틴 염산염, 로수바스타틴 푸마르산염, 로수바스타틴 숙신산염, 로수바스타틴 말레인산염 등을 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 또한, 본 발명은 (a) 세사민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및 (b) 페노피브레이트 및 로수바스타틴 중 1종 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 혈관재협착증의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 또한, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트,

셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명의 혈관재협착증의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0030] 본 발명의 혈관재협착증의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0031] 또한, 본 발명은 (a) 세사민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및 (b) 페노피브레이트 및 로수바스타틴 중 1종 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물에, 추가적으로 식품학적으로 허용가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 혈관재협착증의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다. 상기 조성물은 본 발명의 건강기능식품에 0.001~100 중량%로 하여 첨가될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제 등이 있다.

발명의 효과

[0032] 본 발명은 (a) 세사민과, (b) 페노피브레이트 및 로수바스타틴 중 1종 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 혈관재협착증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이며, 상기 조성물은 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 효과가 우수하여 혈관재협착증의 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 본 발명의 실시예 4-2 내지 4-4, 4-7 내지 4-9 및 4-11 내지 4-22에 대한 세포생존율을 확인하는 WST-1 어세이 결과이다.

도 2는 본 발명의 세사민이 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 효과가 있음을 나타내는 WST-1 어세이의 분석 결과이다.

도 3은 본 발명의 세사민이 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 효과가 있음을 나타내는 혈관 평활근 세포 수의 측정 결과이다.

도 4는 본 발명의 실시예 4-1 내지 4-22가 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 효과가 있음을 나타내는 DNA 합성 어세이의 분석 결과이다.

도 5는 본 발명의 세사민이 혈관 평활근 세포의 세포 주기 조절 활성을 갖는 PCNA(도 5A), p27^{KIP1}(도 5B) 및 p21^{CIP1}(도 5C)의 단백질 발현을 확인하는 공초점 레이저 현미경 측정 결과이다.

도 6은 본 발명의 세사민이 혈관 평활근 세포의 세포 주기 조절 활성을 갖는 PCNA(도 6A), p27^{KIP1}, p21^{CIP1} 및

p53(도 6B)의 단백질 발현을 확인하는 웨스턴 블롯 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.
- [0035] <실시예 1. 세사민의 분리>
- [0036] 본 발명에서 사용된 흰털오갈피나무는 충남 천안시 수신면의 오가피 농장에서 직접 채취하였다. 상기 흰털오갈피나무의 건조된 줄기 6.0kg에 메탄올(30ℓ×3회)을 넣고 환류추출하여 300g의 메탄올 추출물을 얻었다. 상기 메탄올 추출물을 1.6ℓ의 물에 현탁하고, n-헥산(1.6ℓ×3회) 및 에틸아세테이트(1.6ℓ×3회)를 순차적으로 가해 n-헥산 분획물(120g) 및 에틸아세테이트 분획물(40g)과 마지막으로 물층 잔사를 포함하는 분획물(130g)을 얻었으며, 에틸아세테이트 분획물에서 본 발명의 세사민을 분리하였다.
- [0037] 상기 에틸아세테이트 분획물을 클로로포름:아세톤:메탄올(1:0:0 → 1:1:0.2[v:v:v])의 농도구배 용출 조건으로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Φ 5×30cm, 70-230 mesh MERCK ASTM)로 분획하여 7개의 소분획물 A1-A7을 얻었다. 상기 소분획물 중 A2를 n-헥산:에틸아세테이트:메탄올(20:1:0.1 → 2:1:0.1[v:v:v])의 농도구배 용출 조건으로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Φ 2×40cm, 230-400 mesh MERCK ASTM)로 분획하여 6개의 소분획물 A2.1-A2.6을 얻었다.
- [0038] 상기 소분획물 중 A2.3을 메탄올:물(1:2[v:v])의 조건으로 RP-컬럼 크로마토그래피(Φ 1.5×50cm, Cosmosil 75C18-PREP, Nacalai tesque, Japan)를 이용하여 (+)-세사민 10mg을 분리하였다.
- [0039] 또한, 상기 세사민은 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해하였으며, 이때 세포배양에서의 DMSO 최종 농도가 0.1%[v/v]를 넘지 않도록 사용하였다.
- [0040] <실시예 2. 세사민의 물리화학적 구조 확인>
- [0041] (+)-Sesamin;
- [0042] white amorphous powder;
- [0043] mp: 122-123℃;
- [0044] EI-MS, m/z 354 $[M]^+$, $C_{20}H_{18}O_6$;
- [0045] 1H -NMR (pyridine- d_5 , 400 MHz): δ 7.13 (2H, s, H-2', 2"), 6.97 (2H, d, J = 8.3 Hz, H-6', 6"), 6.95 (2H, d, J = 8.3 Hz, H-5', 5"), 6.01 (4H, s, H-OCH₂O), 4.95 (2H, s, H-2, 6), 4.28 (2H, m, H-4, 8), 3.98 (2H, m, H-4, 8), 3.09 (2H, m, H-1, 5);
- [0046] ^{13}C -NMR (pyridine- d_5 , 100 MHz): δ 148.6 (C-4', 4"), 147.6 (C-3', 3"), 136.5 (C-1', 1"), 119.9 (C-6', 6"), 108.6 (C-5', 5"), 107.3 (C-2', 2"), 101 (C-OCH₂O), 86.1 (C-2, 6), 71.9 (C-4, 8), 54.8 (C-1, 5).
- [0047] <실시예 3. 랫드 대동맥의 혈관 평활근 세포의 분리 및 배양>
- [0048] 랫드 대동맥의 혈관 평활근 세포(Rat aortic VSMCs)를 추출하기 위해, 마취된 랫드로부터 적출된 대동맥을 2mm 두께로 잘라 엘라스타아제(elastase, 0.5mg/ml, Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)와 콜라게네이즈(type II collagenase, 1mg/ml, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 1시간 동안 처리하여 내피세포(endothelial cells)를 제거하였고, 이를 세포 배양 배지로 세척하였다. 내피세포가 제거된 대동맥 조직들은 0.1% 젤라틴으로 코팅된 배양접시에서 10일간 세포 배양 배지로 배양하였다. 상기 내피세포를 제거한 후 남은 세포는 베타 평활근 액틴(β -smooth muscle actin)의 면역염색법(immunocytochemical staining)을 이용하여 95% 이상이 랫드 대동맥의 평활근 세포임을 확인하였다.
- [0049] 이 후, 4~8번째 계대(passages) 배양된 랫드 대동맥의 혈관 평활근 세포를 10%[v/v] FBS(fetal bovine serum), 100U/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신이 포함된 DMEM(Dulbeco's Modified Eagle Medium) 배지를 이용하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

[0050] <실시예 4. 세사민의 혈관 평활근 세포의 세포생존율>

[0051] 본 발명의 상기 실시예 1의 세사민과, 페노피브레이트(Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA) 및 로수바스타틴(Masung & Co., LTD, Korea)의 세포생존율을 측정하기 위해, WST-1 어세이(2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-[2,4-disulfophenyl]-2H-tetrazolium, monosodium salt assay)를 실시하였다.

[0052] 본 발명의 실시예 3에서 추출한 랫드 대동맥의 혈관 평활근 세포를 96-웰 플레이트(96-well plate)에 4×10^4 세포/㎖가 되도록 분주하고 10%[v/v] FBS, 100U/㎖ 페니실린 및 100 μ g/㎖ 스트렙토마이신이 포함된 DMEM 배지를 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 이후, 혈청이 없는 DMEM 배지로 교체하여 24시간 동안 배양하고, 하기 표 1의 실시예 4-2 내지 4-4, 4-7 내지 4-9 및 4-11 내지 4-22의 화합물을 각각 처리하여 반응하였다. 반응 46시간째에 WST-1 용액(premix WST-1, Takara, Japan) 10 μ l를 더한 뒤, 2시간 동안 동일 조건의 배양기에서 배양하고, 마이크로플레이트 리더(microplate reader, Tecan Group Ltd., Switzerland)로 450nm에서 흡광도를 측정하여, 이를 도 1에 나타내었다.

표 1

[0053]

조건	처리 농도			
	디기토닌(μ g/㎖)	세사민(μ M)	페노피브레이트(μ M)	로수바스타틴(μ M)
대조군(무처리군)	-	-	-	-
디기토닌	100	-	-	-
실시예 4-1	-	1.25	-	-
실시예 4-2	-	2.5	-	-
실시예 4-3	-	5	-	-
실시예 4-4	-	10	-	-
실시예 4-5	-	-	1.25	-
실시예 4-6	-	-	2.5	-
실시예 4-7	-	-	5	-
실시예 4-8	-	-	10	-
실시예 4-9	-	-	20	-
실시예 4-10	-	-	-	1.25
실시예 4-11	-	-	-	2.5
실시예 4-12	-	-	-	5
실시예 4-13	-	-	-	10
실시예 4-14	-	1.25	1.25	-
실시예 4-15	-	2.5	2.5	-
실시예 4-16	-	5	5	-
실시예 4-17	-	10	10	-
실시예 4-18	-	10	20	-
실시예 4-19	-	1.25	-	1.25
실시예 4-20	-	2.5	-	2.5
실시예 4-21	-	5	-	5
실시예 4-22	-	10	-	10

[0054] 도 1을 참고하면, 본 발명의 실시예 4-9 및 4-18을 제외한 세사민, 페노피브레이트 및 로수바스타틴의 단독 화합물을 처리하는 경우뿐만 아니라, 세사민을 페노피브레이트 및 로수바스타틴 중 1종 이상의 화합물과 병용하여 처리 경우에도 대조군(무처리군)과 유사한 세포생존율을 나타내어, 혈관 평활근 세포에 대한 세포독성이 나타나지 않음을 확인할 수 있다.

[0055] <실시예 5. 세사민의 혈관 평활근 세포의 증식 억제 확인>

[0056] 혈관 평활근 세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해, WST-1 어세이(2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-[2,4-disulfophenyl]-2H-tetrazolium, monosodium salt assay), 세포 수 측정 및 DNA 합성 어세이(DNA synthesis assay)를 실시하였다.

[0057] 실시예 5-1. 혈관 평활근 세포의 증식 억제 확인 - WST-1 어세이

[0058] WST-1 어세이를 위해, 실시예 3에서 추출한 랫드 대동맥의 혈관 평활근 세포를 96-웰 플레이트(96-well plate)

에 4×10^4 세포/ml가 되도록 분주하고 10%[v/v] FBS, 100U/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신이 포함된 DMEM 배지를 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 이후, 혈청이 없는 DMEM 배지로 교체하고 24시간 동안 배양한 뒤, 다시 혈청이 없는 DMEM 배지로 교체하여 본 발명의 세사민(0, 1, 5 및 10 μ M)을 더하고 24시간 동안 반응하였다. 반응 후, PDGF-BB를 50ng/ml로 처리하여 24시간 동안 세포 증식을 자극하였으며, 반응 22시간째에 WST-1 용액 10 μ l를 더한 뒤 2시간 후인 24시간째에 마이크로플레이트 리더로 450nm에서 흡광도를 측정하여 도 2에 나타내었다.

[0059] 도 2의 결과를 참고하면, 본 발명의 세사민이 혈관 평활근 세포의 증식을 자극하는 PDGF-BB의 처리 시에 농도 의존적으로 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 효과를 나타냄을 확인할 수 있다.

[0060] **실시예 5-2. 혈관 평활근 세포의 증식 억제 확인 - 세포 수 측정**

[0061] 혈관 평활근 세포의 수를 측정하기 위해, 실시예 3에서 추출한 랫드 대동맥의 혈관 평활근 세포를 12-웰 플레이트에 1×10^5 세포/ml가 되도록 분주한 뒤, 이후 과정은 상기 실시예 5-1의 WST-1 어세이 방법과 동일하게 실시되, PDGF-BB 처리 후 WST-1 용액을 더하는 대신, 증식이 자극된 세포를 트립신-EDTA에 현탁하여 헤모사이토미터(hemocytometer)와 현미경을 이용해 세포 수를 측정하고 이를 도 3에 나타내었다.

[0062] 도 3을 참고하면, 본 발명의 세사민이 세포 증식을 자극하는 PDGF-BB만을 단독으로 처리하는 군에 비해, 농도 의존적으로 혈관 평활근 세포 수의 증식을 억제하는 것을 확인할 수 있다.

[0063] **실시예 5-3. 혈관 평활근 세포의 증식 억제 확인 - DNA 합성 어세이**

[0064] DNA 합성 어세이를 실시하기 위해, 상기 실시예 5-1의 WST-1 어세이 방법과 동일하게 실시되, 세사민 대신 상기 표 1을 참고하여 실시예 4-1 내지 4-22의 화합물 및 대조군(무처리군)을 사용하였다(이때, 디기토닌은 제외하였음). 또한, PDGF-BB 처리 후 WST-1 용액을 더하는 대신, 배양 20시간째에 [³H]-티미딘(thymidine)을 2 μ Ci/ml로 첨가하였다. 4시간 뒤인 배양 24시간째에, 10%[v/v] TCA(trichloroacetic acid)가 포함된 PBS(phosphate buffer saline)와 에탄올/에테르(ethanol/ether, 1/1[v/v])로 세척하였다. 이후, 0.5M의 NaOH를 500 μ l씩 각 웰에 분주하고, 3ml의 신틸레이션 콕테일(scintillation cocktail, Ultimagold, Packard Bioscience, Waltham, MA)과 혼합하여 액체 신틸레이션 카운터(LSC, liquid scintillation counter, LS3801, Beckman, Germany)로 방사능(radioactivity)을 측정하여 도 4에 나타내었다.

[0065] 도 4를 참고하면, 혈관 평활근 세포의 증식을 자극하는 PDGF-BB의 처리 시에, 본 발명의 실시예 4-1 내지 4-13의 세사민, 페노피브레이트 및 로수바스타틴을 단독으로 처리하는 경우에는, 농도 의존적으로 혈관 평활근 세포의 증식을 억제한다. 또한, 실시예 4-14 내지 4-22의 세사민을 페노피브레이트 및 로수바스타틴 중 1종 이상의 화합물과 병용 처리하는 경우에도, PDGF-BB를 처리하지 않은 대조군(무처리군)과 유사한 결과를 나타내어, 혈관 평활근 세포에 대해 PDGF-BB에 의해 유도되는 증식을 억제하는 효과가 우수함을 확인할 수 있다.

[0066] **<실시예 6. 세사민의 혈관 평활근 세포의 세포 주기 조절 확인>**

[0067] 혈관 평활근 세포의 세포 주기 조절 활성을 갖는 인자의 단백질 발현을 확인하고자, 공초점 레이저 현미경(confocal laser microscope) 및 웨스턴 블롯 방법을 사용하였다.

[0068] **실시예 6-1. 혈관 평활근 세포의 세포 주기 조절 확인 - 공초점 레이저 현미경**

[0069] 공초점 레이저 현미경(confocal laser microscope)을 이용한 단백질 발현의 확인을 위해, 실시예 3에서 추출한 혈관 평활근 세포를 24-웰 플레이트의 유리 커버 슬립(glass cover slip)에 접종하였으며, 10%[v/v] FBS, 100U/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신이 포함된 DMEM 배지를 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 이후, 혈청이 없는 DMEM 배지로 교체한 후 PDGF-BB를 50ng/ml로 처리하여 24시간 동안 배양한 뒤, 세포를 차가운 상태의 PBS로 2번 세척하였으며 PBS에 용해한 4%[v/v] 포름알데히드로 15분 동안 고정하였다. 고정 후, PBS에 용해된 100mM 글리신(glycine)을 10분 동안 처리하고, 세포를 다시 PBS로 2번 세척하여 0.1%[v/v] 트리톤(triton) X-100으로 3분간 삼투(permeabilize)한 뒤 PBS에 용해한 5%[v/v] 고트(goat) 혈청으로 1시간 동안 블로킹(blocking)하였다. 각 anti-PCNA 항체 용액(3%[w/v] BSA가 함유되어 있는 PBS 용액에 1/100[v/v]으로 희석한 항체) 또는 anti-p27^{KIP1} 항체 용액(3%[w/v] BSA가 함유되어 있는 PBS 용액에 1/200[v/v]으로 희석한 항체) 및 anti-p21^{CIP1} 항체 용액(3%[w/v] BSA가 함유되어 있는 PBS 용액에 1/100[v/v]으로 희석한 항체)으로 1시간 30분 동안 반응하고 PBS로 세척한 뒤, 2차 항체(3%[w/v] BSA가 함유되어 있는 PBS

용액에 1/200[v/v]으로 희석한 FITC-IgG)를 넣고 1시간 30분 동안 반응하였다. 반응이 끝난 세포를 PBS로 세척하고 DAPI(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA)가 포함된 봉입제(mounting medium)로 고정하여 공초점 레이저 현미경(LSM5 live configuration Variotwo VRGB; Zeiss, Jena, Germany)으로 분석한 결과를 도 5A 내지 5C에 나타내었다.

[0070] 도 5를 참고하면, 본 발명의 세사민이, 증식하고 있는 S기의 세포핵에서 볼 수 있는 PCNA(도 5A)의 단백질 발현은 감소하는 효과를 나타내며, CDK 억제제의 일종인 p27^{KIP1}(도 5B) 및 p21^{CIP1}(도 5C)의 단백질 발현은 증가하는 효과를 나타내어, 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 조성물로서의 효과가 우수함을 확인할 수 있다.

[0071] **실시예 6-2. 혈관 평활근 세포의 세포 주기 조절 확인 - 웨스턴 블롯**

[0072] 웨스턴 블롯을 이용한 단백질 발현의 측정은 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, 7.5-12.5[w/v] acrylamide gels) 방법을 사용하였다. 혈관 평활근 세포의 증식을 유도하는 PDGF-BB 50ng/ml를 처리하여 24시간 동안 배양하고, 상기 배양된 세포를 차가운 PBS로 2번 세척하였다. 이후, SDS 환원 용액(reducing buffer)인 Laemmli sample buffer(62.5mM Tris-HCl pH 6.8, 20%[v/v] glycerol, 2%[w/v] SDS, 5%[v/v] β-Mercaptoethanol)를 더하고 98℃-100℃에서 10분간 끓여주었다. 상기 용해물을 SDS-PAGE에 로딩(loading)하여 전기영동을 실시한 후, PVDF(polyvinylidene fluoride) 멤브레인(membrane, Atto Corp., Tokyo, Japan)에 200mA의 전류로 2시간 동안 전이시켰다. 상기 단백질이 전이된 멤브레인을 5%[w/v] BSA(bovine serum albumin)가 포함된 TBS-T(tris-buffered saline and tween 20)로 블로킹한 뒤, 상기 실시예 6-1의 1차 항체(1/500 내지 1/1000[v/v]로 희석)를 첨가하여 4℃에서 오버나이트(overnight)동안 반응하고 2차 항체(1/2000[v/v]로 희석)를 더하였다. 단백질은 ECL 키트(Atto Corp., Tokyo, Japan)를 사용하여 확인하였으며, 단백질 밴드(band)의 세기는 Quantity One software(Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 도 6A 및 6B에 나타내었다.

[0073] 도 6을 참고하면, 혈관 평활근 세포의 증식을 자극하는 PDGF-BB의 처리 시, 본 발명의 세사민이 세포 주기를 조절하는 PCNA(도 6A)의 단백질 발현은 감소시키고, p27^{KIP1}, p21^{CIP1} 및 p53(도 6B)의 단백질 발현은 증가시켜, 실시예 6-1과 동일한 결과를 나타내므로, 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 조성물로서의 효과가 우수함을 확인할 수 있다.

[0074] **<실시예 7. 독성실험>**

[0075] **실시예 7-1. 급성독성**

[0076] 상기 실시예 4-14와 같이 세사민 및 페노피브레이트를 1:1의 몰비(중량비 1:1.02)로 혼합한 조성물을 단기간에 과량을 섭취하였을 때 급성적(24시간 이내)으로 동물 체내에 미치는 독성을 조사하고, 치사율을 결정하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 일반적인 마우스인 ICR 마우스를 20마리를 준비하였고, 각 군별로 10마리씩 배정하였다. 대조군에는 30% PEG-400만을 투여하고, 실험군은 본 발명의 조성물을 1.0g/kg의 농도로 각각 경구 투여하였다. 투여 24시간 후에 각각의 치사율을 조사한 결과, 대조군과 상기 조성물을 투여한 실험군에서는 모두 생존하였다.

[0077] **실시예 7-2. 실험군 및 대조군의 장기 및 조직 독성 실험**

[0078] 장기 독성 실험은 C57BL/6J 생쥐를 대상으로 동물의 각 장기(조직)에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 세사민 및 페노피브레이트를 1:1의 몰비(중량비 1:1.02)로 혼합한 조성물을 1.0g/kg의 농도로 투여한 실험군과 용매만을 투여한 대조군의 동물들로부터 8주 후 혈액을 채취하여 GPT(glutamate-pyruvate transferase) 및 BUN(blood urea nitrogen)의 혈액 내 농도를 Select E(vital scientific NV, Netherland) 기기를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 간독성과 관계있는 것으로 알려진 GPT와 신장독성과 관계있는 것으로 알려진 BUN의 경우, 대조군과 비교하여 실험군은 별다른 차이를 보이지 않았다. 또한, 각 동물로부터 간과 신장을 절취하여 통상적인 조직절편 제작과정을 거쳐 광학현미경으로 조직학적 관찰을 시행하였으나 특이한 이상은 관찰되지 않았다.

[0079] **<제제예 1. 약학적 제제>**

[0080] **제제예 1-1. 정제의 제조**

[0081] 본 발명의 세사민 및 페노피브레이트를 1:1의 몰비(중량비 1:1.02)로 혼합한 조성물 200g을 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨

가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0082] 제제예 1-2. 주사제의 제조

[0083] 본 발명의 세사민 및 페노피브레이트를 1:1의 몰비(중량비 1:1.02)로 혼합한 조성물 1g, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100ml를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[0084] <제제예 2. 식품 제조>

[0085] 제제예 2-1. 조리용 양념의 제조

[0086] 본 발명의 세사민 및 페노피브레이트를 1:1의 몰비(중량비 1:1.02)로 혼합한 조성물을 조리용 양념에 1 중량%로 첨가하여 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

[0087] 제제예 2-2. 밀가루 식품의 제조

[0088] 본 발명의 세사민 및 페노피브레이트를 1:1의 몰비(중량비 1:1.02)로 혼합한 조성물을 밀가루에 0.1 중량%로 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0089] 제제예 2-3. 스프 및 육즙(gravies)의 제조

[0090] 본 발명의 세사민 및 페노피브레이트를 1:1의 몰비(중량비 1:1.02)로 혼합한 조성물을 스프 및 육즙에 0.1 중량%로 첨가하여 건강 증진용 스프 및 육즙을 제조하였다.

[0091] 제제예 2-4. 유제품(dairy products)의 제조

[0092] 본 발명의 세사민 및 페노피브레이트를 1:1의 몰비(중량비 1:1.02)로 혼합한 조성물을 우유에 0.1 중량%로 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0093] 제제예 2-5. 야채주스 제조

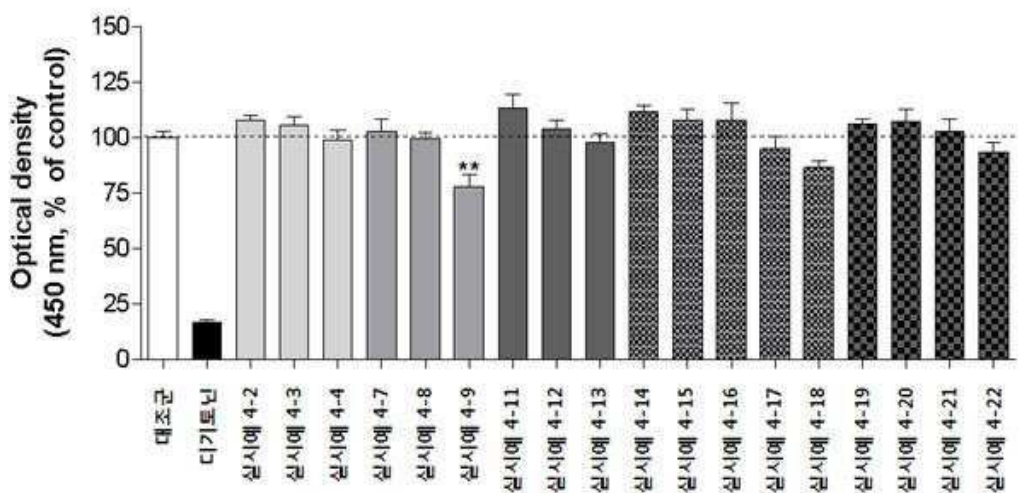
[0094] 본 발명의 세사민 및 페노피브레이트를 1:1의 몰비(중량비 1:1.02)로 혼합한 조성물 0.5g을 토마토주스 또는 당근주스 1,000ml에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

[0095] 제제예 2-6. 과일주스 제조

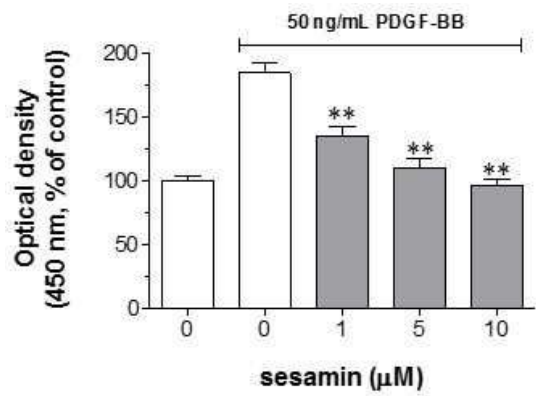
[0096] 본 발명의 세사민 및 페노피브레이트를 1:1의 몰비(중량비 1:1.02)로 혼합한 조성물 0.1g을 사과주스 또는 포도주스 1,000ml에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

도면

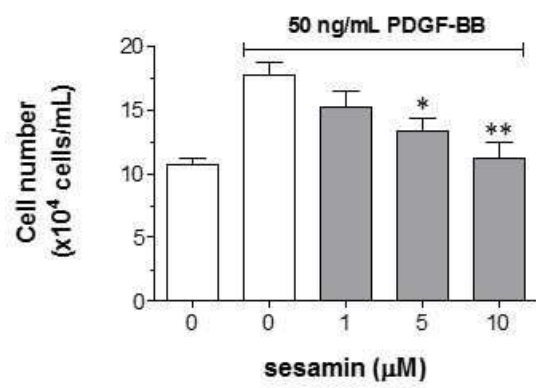
도면1



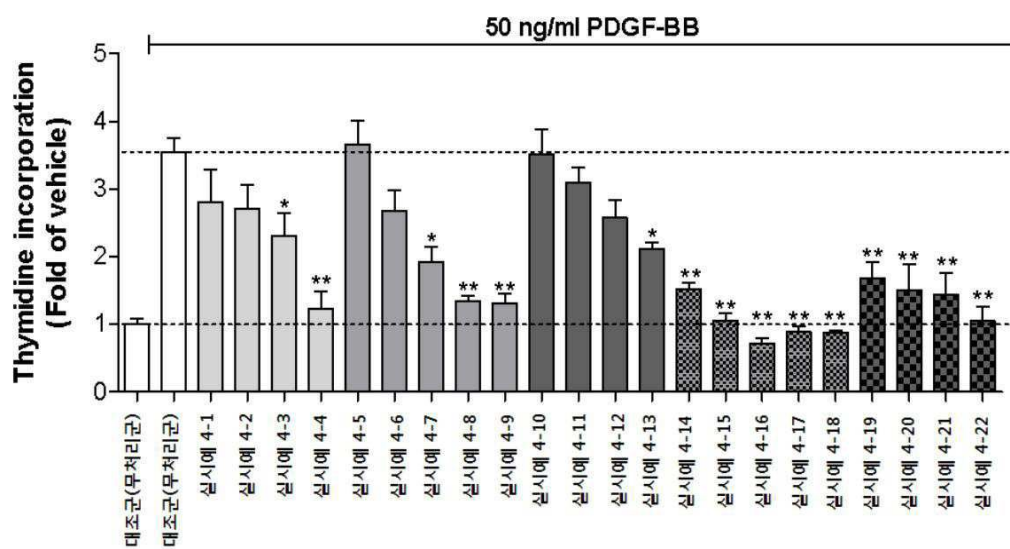
도면2



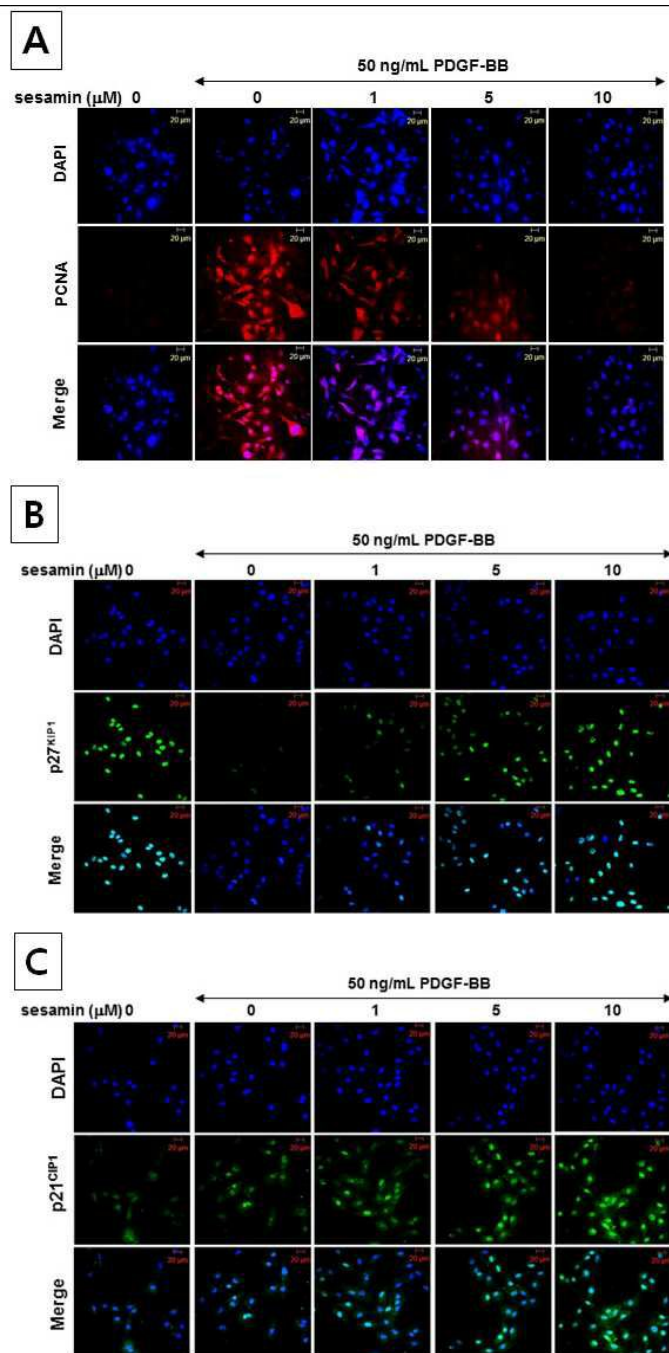
도면3



도면4



도면5



도면6

