



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년09월26일
(11) 등록번호 10-1779132
(24) 등록일자 2017년09월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/62 (2006.01) A61F 2/82 (2006.01)
A61M 25/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/62 (2013.01)
A61F 2/82 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0183937
(22) 출원일자 2015년12월22일
심사청구일자 2015년12월22일
(65) 공개번호 10-2017-0074540
(43) 공개일자 2017년06월30일
(56) 선행기술조사문헌
비특허문헌1: 목포대학교 대학원
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
목포대학교 산학협력단
전라남도 무안군 청계면 영산로 1666
(72) 발명자
김동욱
전라남도 목포시 삼학로 303-3, 1동 1501호 (용해동, 동아아파트)
문영준
전라남도 목포시 삼학로 363, 105동 306호 (용해동, 신안인스빌아파트)
(74) 대리인
리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 10 항

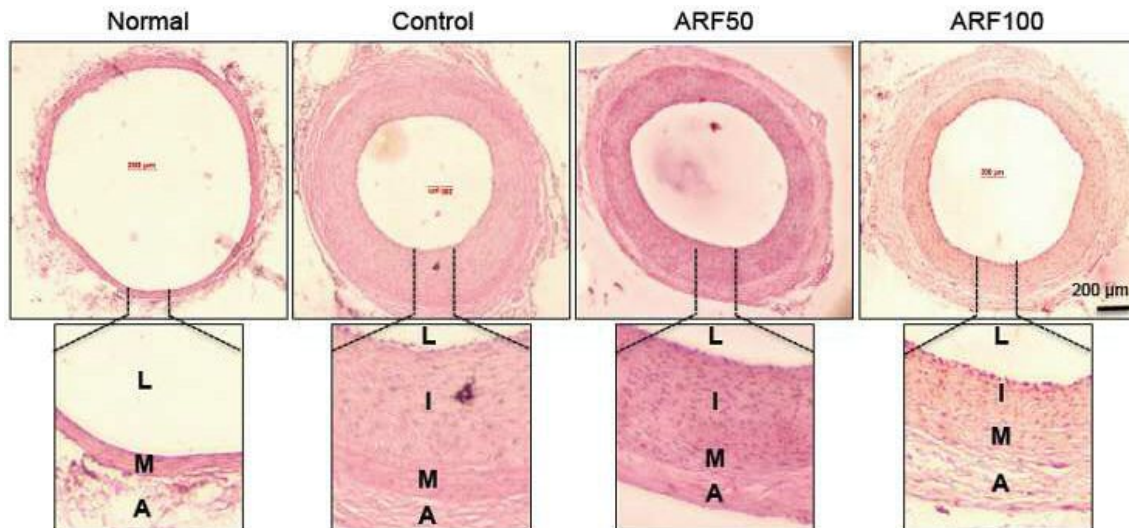
심사관 : 강승진

(54) 발명의 명칭 연자 추출물을 포함하는 혈관 재협착 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

일 양상은 연자(*Nelumbo nucifera* seed) 추출물 또는 그의 분획물을 포함하는 혈관 재협착 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 다른 양상은 상기 조성물을 포함하는 국소투여용 약물 전달 장치를 제공한다. 상기 약학적 조성물 및 약물 전달 장치는 혈관 재협착의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61M 25/10 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020140040359 A

KR1020040072146 A

비특허문헌2: JOURNAL OF FOOD BIOCHEMISTRY

Keshav Raj Paudel and Nisha Panth.
Phytochemical Profile and Biological Activity
of Nelumbo nucifera. Evidence-Based
Complementary and Alternative Medicine,
2015.12.07., pp. 1-16*

김선모 외 5인. Human Aortic Smooth Muscle Cell
에서 화염의 항동맥경화 활성 연구. 대한본초학회
지, 2009.12., 제24권, 제4호, pp.77-86

Xiao-chun LI와 6인. Neferine inhibits
angiotensin II-stimulated proliferation in
vascular smooth muscle cells through heme
oxygenase-1. Acta Pharmacologica Sinica.
2010., Vol. 31, pp. 679-686

Rajendra Karki와 1인. Preventive effect of
different Parts of Nelumbo nucifera on Intimal
thickening of carotid artery injured by ballon
cathether in rats. 한국자원식물학회 2007년 학술
심포지엄, 2007.05., pp. 95

Rajendra Karki와 2인. Effect of Nelumbo
nucifera on proliferation, migration and
expression of MMP-2 and MMP-9 of rSMC, A431
and MDA-MB-231. Korean J. Plant Res. 2008,
Vol. 21, No. 1, pp. 96-102

Rajendra Karki와 2인. Nelumbo nucifera leaf
extract inhibits neointimal hyperplasia
through modulation of smooth muscle cell
proliferation and migration. Nutrition. 2013,
Vol.29, pp.268-275

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

연자(*Nelumbo nucifera* seed) 추출물의 클로로포름 분획물을 포함하는, 혈관 재협착 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 추출물은 연자 전체 또는 배(embryo)를 포함한 연자의 일부로부터 추출된 것인 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 추출물은 C₁ 내지 C₂의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것인 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 추출물은 에탄올 추출물 또는 메탄올 추출물인 것인 약학적 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 추출물의 분획물은 네페린(neferine) 및 리엔시닌(liensinine) 중 하나 이상을 포함하는 것인 약학적 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 네페린을 1 내지 25 μ M, 5 내지 25 μ M, 5 내지 23 μ M, 또는 5 내지 20 μ M로 포함하는 것인 약학적 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 혈관은 경동맥, 신동맥, 관상동맥, 또는 말초동맥인 것인 약학적 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 혈관 재협착은 혈관성형술, 혈관이식, 혈관절단, 동맥경화, 혈관 내 지방축적, 고혈압, 및 혈관염증 중 하나 이상에 의해 유발된 것인 약학적 조성물.

청구항 10

청구항 1 내지 4 및 6 내지 9 중 어느 한 항의 약학적 조성물을 포함하는, 국소투여용 약물 전달 장치.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 장치는 풍선 카테터 또는 스텐트인 것인 장치.

발명의 설명

기술 분야

연자 추출물을 포함하는 혈관 재협착 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 혈관 재협착(restenosis)은 혈관이 좁아져 폐색을 없애기 위해 시술을 받았으나 다시 좁아지는 현상을 의미한다. 혈관 재협착은 시술과정 중 혈관내피세포의 손상으로 인해 분비된 성장인자 및 사이토카인이 혈관 평활근 세포의 증식 및 이동을 유도하여 발생하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 혈관 재협착은 심혈관 확장 시술의 장애 요인으로 작용하고 있다.
- [0003] 연자(*Nelumbo nucifera* seed)는 수련과(Nymphaeaceae)에 속하는 연꽃의 종자로 한의학에서 약제의 성분으로 이용되어 왔다. 그러나, 이제까지 연자 유래 성분이 혈관 평활근 세포의 증식 및 이동을 억제한다는 것에 대해서는 알려진 바가 없었다.

선행기술문헌

비특허문헌

(비특허문헌 0001) 박성규 등, "연잎, 연꽃 및 연꽃 수술 추출물의 Tyrosinase 활성억제 및 Melanin 생성억제에 의한 미백 효과", 대한본초학회지, 22(4): 87-94 (2007년).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 일 양상은 혈관 재협착 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0005] 다른 양상은 상기 조성물을 포함하는 국소투여용 약물 전달 장치를 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0006] 일 양상은 연자(*Nelumbo nucifera* seed) 추출물 또는 그의 분획물을 포함하는, 혈관 재협착 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0007] 상기 추출물은 연자 전체 또는 배(embryo)를 포함한 연자의 일부로부터 추출된 것일 수 있다. 연자의 배는 연자 심(嚢子心) 또는 연심(嚢心)으로도 명명되며, 연의 종자에 들어있는 배아를 의미한다. 상기 배는 연자의 유엽 및/또는 유근 전체 또는 그의 일부일 수 있다.
- [0008] 상기 추출물은 C₁ 내지 C₂의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출된 것일 수 있다. 상기 추출물은 에탄올 추출물 또는 메탄올 추출물일 수 있다. 상기 추출물은 추출 후 여과시킨 것일 수 있다. 또한, 상기 추출물은 여과 후 감압농축 및/또는 건조 과정을 거쳐 수득된 것일 수 있다. 상기 추출은 진탕 추출 또는 환류 추출일 수 있다. 상기 추출물은 20℃ 내지 90℃, 20℃ 내지 75℃, 20℃ 내지 60℃, 20℃ 내지 50℃, 또는 20℃ 내지 45℃에서 추출된 것일 수 있다. 상기 추출물은 1 내지 5회, 2 내지 5회, 4회, 또는 3회 반복 추출된 것일 수 있다.
- [0009] 상기 분획물은 상기 추출물을 유기용매로 추가로 추출하여 수득된 것일 수 있다. 상기 분획물은 상기 추출물의 n-헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 또는 물 분획물일 수 있다. 상기 분획물은 상기 추출물을 n-헥산, 클로로포름, 및 물로 순차적으로 분획하여 얻은 n-헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 또는 물 분획물일 수 있다. 상기 분획물은 예를 들면, 클로로포름 분획물일 수 있다.
- [0010] 상기 추출물 또는 분획물은 비스벤조이소퀴놀린(bisbenzoisoquinoline) 알칼로이드를 포함할 수 있다. 상기 알칼로이드는 네페린(neferine) 및/또는 리엔시닌(liensinine)일 수 있다. 네페린은 4-[[[(1R)-6,7-디메톡시-2-메틸-3,4-디히드로-1H-이소퀴놀린-1-일]메틸]-2-[[[(1R)-6-메톡시-1-[(4-메톡시페닐)메틸]-2-메틸-3,4-디히드로-1H-이소퀴놀린-7-일]옥시]페닐]로 명명된다. 리엔시닌은 4-[[[(1R)-6,7-디메톡시-2-메틸-3,4-디히드로-1H-이소퀴놀린-1-일]메틸]-2-[[[(1R)-1-(4-히드록시벤질)-6-메톡시-2-메틸-3,4-디히드로-1H-이소퀴놀린-7-일]옥시]페닐]로 명명된다.
- [0011] 상기 추출물 또는 분획물 중 네페린 함량은 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 또는 30% 이상일 수 있다. 상기 추출물 또는 분획물 중 리엔시닌의 함량은 5% 이상, 7% 이상, 또는 8% 이상일 수 있다. 상기 조성물은 상기 추출물 또는 분획물을 5 내지 200 μg/ml, 5 내지 150 μg/ml, 7 내지 120 μg/ml, 7 내지 100 μg/ml, 또

는 10 내지 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 포함하는 것일 수 있다. 상기 조성물은 네페린을 1 내지 25 μM , 5 내지 25 μM , 5 내지 23 μM , 또는 5 내지 20 μM 로 포함하는 것일 수 있다. 상기 네페린은 연자로부터 분리된 것, 미생물을 이용하여 생산된 것, 및/또는 화학적으로 합성된 것일 수 있다.

[0012] 상기 혈관은 경동맥, 신동맥, 관상동맥, 또는 말초동맥일 수 있다. 상기 혈관 재협착은 혈관성형술, 혈관이식, 혈관절단, 동맥경화, 혈관 내 지방축적, 고혈압, 및 혈관염증 중 하나 이상에 의해 유발된 것일 수 있다.

[0013] 상기 조성물은 약제학적으로 허용가능한 희석제 또는 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 담체는 부형제, 붕해제, 결합제, 활택제, 또는 그 조합을 포함할 수 있다. 상기 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있다. 상기 첨가제는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드성 실리콘 디옥사이드, 락토스, 만니톨, 아라비아고무, 호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 스테아린산, 스테아린산염, 텍스트로스, 소르비톨, 탈크, 또는 이들의 혼합물일 수 있다.

[0014] 상기 조성물은 경구 또는 비경구 투여 제형을 갖는 것일 수 있다. 경구 투여 제형은 과립제, 산제, 액제, 정제, 캡셀제, 또는 건조시럽제일 수 있다. 비경구 투여 제형은, 복강 내 주사, 직장 내 주사, 피하 주사, 정맥 주사, 근육 내 주사, 또는 흉부 내 주사에 적합한 제형일 수 있다.

[0015] 다른 양상은 상기 혈관 재협착 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 포함하는, 국소투여용 약물전달 장치를 제공한다.

[0016] 상기 장치는 풍선 카테터(balloon catheter) 또는 스텐트일 수 있다. 상기 풍선 카테터는 풍선이 달린 가는 관 형태의 의료용 기구로, 협착 부위에 삽입되어 그 부위를 확장시킬 수 있다. 상기 스텐트는 좁아지거나 막힌 내강 또는 혈관 내에 삽입되어 내강 또는 혈관을 확장시키는 의료용 기구를 의미한다. 상기 풍선 카테터 또는 스텐트는 통상의 기술자가 목적에 따라 적절히 변형하여 사용할 수 있다. 상기 장치는 예를 들면, 서방성 약물방출형 스텐트일 수 있다.

[0017] 상기 장치는 상기 약학적 조성물로 코팅된 것일 수 있다. 상기 약학적 조성물에 대해서는 전술된 바와 같다. 상기 약학적 조성물은 고분자 물질과 혼합된 후 상기 장치에 코팅될 수 있다. 상기 고분자 물질은 예를 들면, 폴리우레탄, 폴리에틸렌 테레프탈레이트, PLA-폴리글리콜산 공중합체, 폴리카프로락톤, 폴리-(하이드록시부티레이트/하이드록시발레레이트)공중합체, 폴리비닐피롤리돈, 실리콘, 아크릴, 에폭사이드, 폴리에스테르, 플루오로고분자, 폴리아마이드, 폴리올레핀, 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 상기 장치는 항혈전제로 추가로 코팅된 것일 수 있다.

발명의 효과

[0018] 일 양상에 따른 약학적 조성물 및 국소투여용 약물 전달 장치는 혈관 재협착의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1a는 연자심의 분획물 수득 과정을 나타낸다.

도 1b는 연자심의 클로로포름 분획물에 대한 HPLC 분석 결과를 나타낸다.

도 2a는 연자심 분획물의 DPPH 소거 활성에 대한 용량-반응(dose-response) 곡선을 나타낸다.

도 2b는 네페린 및 레인시닌의 DPPH 소거 활성에 대한 용량-반응 곡선을 나타낸다.

도 2c는 연자심 분획물의 혈청 지질 과산화 억제 활성을 나타낸다.

도 2d는 레인시닌, 네페린 및 갈산의 TBARS 분석 결과를 나타낸다.

도 3a는 연자심의 각 분획물이 세포 증식에 미치는 영향을 나타낸다.

도 3b 및 도 3c는 각각 연자심의 클로로포름 분획물 및 네페린의 농도에 따른 세포 증식을 나타낸다.

도 3d 및 3e는 각각 연자심의 클로로포름 분획물 및 네페린의 농도에 따른 세포 생존율을 나타낸다.

도 3f 내지 3h는 각각 연자심의 각 분획물, 농도별 클로로포름 분획물, 및 농도별 네페린에 의한 상처 봉합 억

제 효과를 나타낸다.

도 3i 내지 3k는 각각 연자심의 각 분획물, 농도별 클로로포름 분획물, 및 농도별 네페린에 의한 혈관 평활근 세포의 이동 억제 효과를 나타낸다.

도 4a 내지 4d는 연자심의 분획물 및 네페린이 ERK1/2, JNK 및 P38의 인산화 및 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향을 나타낸다.

도 5a 내지 5c는 세포 주기 조절인자의 발현에 미치는 네페린의 영향을 나타낸다.

도 6a 내지 6e는 연자심의 분획물 및 네페린이 MMP의 발현 및 스트레스 섬유 형성에 미치는 영향을 나타낸다.

도 7a 내지 도 7f는 풍선 손상된 경동맥의 조직학적 분석 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 실시예 1: 연자심(lotus seed embryo)의 분획물 분석

[0022] 1.1. 연자심의 분획물 수득

[0023] 국내 지역 시장으로부터 얻은 *N.nucifera* 종자의 배(embryo) 5.8 kg를 고온의 메탄올로 4회 추출하였다. 그 후, 추출물을 감압하에 증발시켜 점성이 있는 짙은 녹색의 잔여물을 얻었다. 이 잔여물을 물에 재용해하고 헥산으로 분리(partition)하였다. 수성층을 다시 클로로포름으로 분리하여 클로로포름 분획물 및 수 분획물을 수득하였다. 클로로포름 분획물 중 알칼로이드의 존재를 드라젠도르프 시약(dragendorff's reagent)으로 확인하였다. 연자심의 분획물 수득 과정을 도 1a에 나타내었다.

[0024] 1.2. 분획물에 대한 HPLC 분석

[0025] Waters Breeze System을 이용하여 수득된 분획물에 대한 HPLC 분석을 수행하였다. 이 시스템은 1525 binary pump, 2487 dual absorbance 검출기, 717 plus autosampler, inline 탈기기(degasser) 및 breeze 소프트웨어(version3.2)로 이루어져 있다. 배의 조 추출물, 여러 분획물 (헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 및 수 분획물), 및 네페린(neferine) 또는 리엔시닌(liensinine)을 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m 입자의, C18 역상 컬럼에서 메탄올과 0.1% 트리에틸아민 (7:3)을 이동상으로 하여 1 ml/분의 유속으로 분리시켰다. 시료와 표준 용액의 주입 부피는 20 μ l이고 검출 파장은 280 nm였다. 실온에서 분석을 수행하였다.

[0026] 도 1b는 연자심의 클로로포름 분획물에 대한 HPLC 분석 결과를 나타낸다. 도 1b에 나타난 바와 같이, 클로로포름 분획물인 ARF는 3개의 구별되는 피크를 나타내고 표준 시료에 의해 확인되는 리엔시닌과 네페린의 보유 시간(retention time)은 각각 4.6분 및 10.14분이었다. 6.25-50 μ g/ml의 네페린 및 리엔시닌 표준 시료에 대한 선형 교정곡선 및 회귀식을 얻었다. 클로로포름 분획물 중 네페린 및 리엔시닌의 함량은 각각 20.14 % 및 8.4 %이었다.

[0027] 실시예 2: 연자심 분획물의 항산화 효과 분석

[0028] 2.1. 2,2-디페닐-1- 피크릴히드라질(DPPH) 소거 활성 및 킬레이트 활성 분석

[0029] Karki, R., Sahi, N., Jeon, E.R., Park, Y.S., Kim, D.W., 2011. Chungtaejeon, a Korean fermented tea, scavenges oxidation and inhibits cytokines induced proliferation and migration of human aortic smooth muscle cells. Plant Foods Hum Nutr. 66, 27-33에 기재된 방법에 따라, 연자심 분획물의 DPPH 소거 활성 및 킬레이트 활성을 결정하였다.

[0030] SPSS (SPSS, Chicago, IL, USA)를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 모든 데이터를 평균 $\pm$ S.D.로 표시하였다. 일원 분산분석을 사용하여 각 군을 비교하고 Duncan's 다중 비교 사후검증법(post hoc test of multiple comparison)을 수행하였다. p-값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 고려하였다. 하기 실시예에서도

동일한 방법으로 통계 분석을 수행하였다.

[0031] 도 2a는 연자심 분획물의 DPPH 소거 활성에 대한 용량-반응(dose-response) 곡선을 나타낸다. 조 추출물 (MeOH), 헥산, ARF (CHCl_3), 및 수성 (H_2O) 분획물의 억제 농도 (IC_{50}) 값은 각각 55.07, 87.55, 27.61 및 44.45 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 도 2b는 네페린 및 레인시닌의 DPPH 소거 활성에 대한 용량-반응 곡선을 나타낸다. 도 2b에 나타난 바와 같이, 네페린 및 레인시닌은 강한 DPPH 소거 활성을 나타내었다. 네페린, 레인시닌 및 양성 대조군인 아스코르브산의 IC_{50} 값은 각각 2.1, 4.7 및 1.5 μM 이었다.

[0032] 2.2. 혈청 지질 과산화(serum lipid peroxidation) 억제 활성 및 TBARS 분석

[0033] Karki, R., Park, C.H., Kim, D.W., 2013. Extract of buckwheat sprouts scavenges oxidation and inhibits pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated macrophages (RAW264.7). J Integr Med. 11, 246-252에 기재된 방법에 따라 혈청 지질 과산화 억제 활성을 분석하였다. 형성된 TBARS의 농도를 MDA의 연속 희석을 통해 얻어진 표준 곡선과의 비교에 의해 계산하였다.

[0034] 도 2c는 연자심 분획물의 혈청 지질 과산화 억제 활성을 나타낸다. 혈청 지질 과산화의 측정치인 말론디알데히드(MDA)의 농도는 정상군 및 대조군에서 각각 1.4 및 18.3 μM 이었다. 도 2c에 나타난 바와 같이, 연자심 분획물의 농도가 증가함에 따라 황산구리에 의해 유도된 혈청 지질 과산화가 유의하게 억제되었다. 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 연자심 클로로포름 분획물은 TBARS 형성을 50% 이상 억제하였고 분획물들 중 가장 강한 활성을 나타내었다.

[0035] 도 2d는 레인시닌, 네페린 및 갈산의 TBARS 분석 결과를 나타낸다. 도 2d에 나타난 바와 같이, 네페린, 리엔시닌 및 양성 대조군인 갈산의 양이 증가함에 따라 MDA 수준이 감소되었다. 20 μM 의 네페린, 리엔시닌 및 갈산은 각각 MDA 수준을 각각 62.8, 54.5 및 77.2 % 감소시켰다.

[0036] 실시예 3: 연자심 분획물 및 네페린의 혈관 평활근 세포에 대한 영향 분석

[0037] 혈관 평활근 세포가 PDGF-BB와 같은 여러 성장인자에 반응하여 과다증식될 경우 이 세포는 중간층(media)으로부터 내층(intima)으로 이동하여 신생내막 과다형성(neo-intima hyperplasia)을 초래하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 연자심의 분획물과 그로부터 유래된 네페린이 혈관 평활근 세포의 증식 및 이동을 억제하는지 확인하고자 하였다.

[0038] Bio-Whittaker (San Diego, CA)에서 구입한 혈관 평활근 세포를 10% 우태아혈청(FBS), 100-unit/ml의 페니실린 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 스트렙토마이신이 보충된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 37°C 및 5% CO_2 를 함유한 습기에서 배양하였다. 세포를 0.1% FBS가 보충된 DMEM에서 24시간 동안 인큐베이션하여 G0 기에서 동기화하였다.

[0039] 3.1. 혈관 평활근 세포의 증식에 대한 영향

[0040] 각 분획물, 네페린, ERK 억제제 (U0126), JNK 억제제 (SP600125), P38 억제제 (SB202190), 또는 NF- κB 억제제 (PDTC)에 의해 1시간 동안 전처리된 혈관 평활근 세포를 추가로 24시간 동안 20 ng/ml의 PDGF-BB에 의해 자극하였다. 그 후, 0.1 mg/ml의 MTT를 4시간 동안 첨가하였다. 이로 인해 형성된 보라색 결정을 100 μl 의 DMSO에 용해시키고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군의 증식률을 100으로 잡고 증식에 대한 여러 분획 또는 억제제의 억제 효과를 대조군에 대한 %로 나타내었다.

[0041] 도 3a는 연자심의 각 분획물이 세포 증식에 미치는 영향을 나타낸다. 도 3a에 나타난 바와 같이, 연자심의 클로로포름 분획물 ARF는 메탄올 분획물, 헥산 분획물, 및 수성 분획물에 비하여 PDGF-BB 유도성 혈관 평활근 세포 증식에 대하여 강한 억제 효과를 나타내었다. 또한, 연자심 클로로포름 분획물 AFR 및 네페린이 세포 증식에 미치는 효과를 분석하였다. 도 3b 및 도 3c는 각각 연자심의 클로로포름 분획물 및 네페린의 농도에 따른 세포 증식을 나타낸다. 도 3b에 나타난 바와 같이, 10, 50, 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 연자심 클로로포름 분획물은 세포 증식을 각각 6, 21.42, 및 32.95% 억제하였다. 도 3c에 나타난 바와 같이, 10 및 20 μM 의 네페린은 세포 증식을 각각 21.94 및 38.4% 억제하였다.

- [0042] 3.2. 세포 독성 시험
- [0043] 자극받지 않은 세포에 연자심의 클로로포름 분획물 또는 네페린을 농도별로 24시간 동안 처리하여 3.1.에서 나타난 세포 증식 억제 효과가 세포에 대한 독성 또는 손상으로 인한 것이 아니라는 것을 확인하고자 하였다.
- [0044] 도 3d 및 3e는 각각 연자심의 클로로포름 분획물 및 네페린의 농도에 따른 세포 생존율을 나타낸다. 도 3d 및 3e에 나타난 바와 같이, 각각 100 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 연자심 클로로포름 분획물 및 20 μM 의 네페린은 기저 수준의 세포 생존에 대한 유의한 영향을 미치지 않았다. 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 연자심 클로로포름 분획물 또는 20 μM 의 네페린은 세포 독성을 나타내었으므로, 이후 분석에 포함되지 않았다.
- [0045] 3.3. 상처 봉합(wound closure) 억제 효과
- [0046] Scratch wound motility 분석을 통해 연자심으로부터 얻은 각 분획물이 상처 봉합과 관련된 혈관 평활근 세포의 이동에 미치는 영향을 평가하였다.
- [0047] 70 내지 80% confluent 혈관 평활근 세포 플레이트를 멸균 플라스틱 피펫 팁으로 각 웰의 직경을 넘어 스크랩하여 상처를 생성하였다. 세포를 무혈청 DMEM으로 2회 씻어내어 세포 부스러기를 제거하였다. 그 후, 세포를 각 분획물 또는 네페린으로 1시간 처리한 후 PDGF-BB로 처리하였다. 상처난 영역의 이미지를 손상 후 즉시 (시점 0) 및 6, 12 및 24 시간차에 캡처하였다. 카메라가 구비된 Nikon Eclipse TE200 현미경으로 이미지를 수집하였다. 세포 배양 플레이트의 바닥에 부착된 격자(grid)를 각 시간 간격에서의 동일 위치의 캡처 이미지에 대한 참조 점으로 사용하였다. Axio Vert Rel. 4.2 이미지 분석 프로그램을 사용하여 상처난 영역을 결정하였다. 상처 봉합을 혈관 평활근 세포에 의해 회복된 초기 상처 영역의 퍼센트로 정량하였다.
- [0048] % 상처 봉합 = $(\text{영역}_{t_0} - \text{영역}_{t_i}) / \text{영역}_{t_0} \times 100\%$
- [0049] 식 중 영역_{t_0} 은 초기 영역이고 영역_{t_i} 는 손상 후 6, 12, 또는 24시간차의 영역이다.
- [0050] 도 3f 내지 3h는 각각 연자심의 각 분획물, 농도별 클로로포름 분획물, 및 농도별 네페린에 의한 상처 봉합 억제 효과를 나타낸다. 도 3f에 나타난 바와 같이, 연자심의 클로로포름 분획물은 타 분획물에 비해 가장 강한 상처 봉합 억제 효과를 나타내었다. 도 3g에 나타난 바와 같이, 10, 50, 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 연자심 클로로포름 분획물은 24시간 후 상처 봉합을 각각 대조군 대비 약 14%, 37%, 및 69% 억제하였다. 도 3h에 나타난 바와 같이, 10 및 20 μM 의 네페린은 24시간 후 상처 봉합을 각각 대조군 대비 약 29% 및 63% 억제하였다.
- [0051] 3.4. 혈관 평활근 세포의 이동에 대한 영향
- [0052] 변형 transwell apparatus를 이용한 보이덴 챔버(Boyden chamber) 분석을 통해 하여 PDGF-BB에 반응하는 혈관 평활근 세포의 이동을 평가하였다.
- [0053] 0.1%의 콜라겐 타입 I 용액으로 코팅된 transwell 챔버를 600 ml의 DMEM을 함유한 더 낮은 챔버 중에서 20 ng/ml의 PDGF-BB에 의해 침지시켰다. 세포를 6시간 동안 이동시켰다. 헤마톡실린 및 에오신에 의한 염색 후 이동된 세포를 5개의 무작위 가시범위 (200X) 중에서 계수하고 고배율 시야(HPF) 당 세포 수로 계산하였다.
- [0054] 도 3i 내지 3k는 각각 연자심의 각 분획물, 농도별 클로로포름 분획물, 및 농도별 네페린에 의한 혈관 평활근 세포의 이동 억제 효과를 나타낸다. 20 ng/ml의 PDGF-BB에 의한 자극은 혈관 평활근 세포의 이동을 7.3배 증가시켰다. 도 3i에 나타난 바와 같이, 연자심의 클로로포름 분획물은 타 분획물에 비해 세포의 이동을 가장 많이 억제하였다. 도 3j에 나타난 바와 같이, 10, 50, 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 연자심 클로로포름 분획물은 PDGF-BB 자극된 혈관 평활근 세포의 이동을 각각 13.3, 42.7, 및 70.3% 억제하였다. 도 3k에 나타난 바와 같이, 10 및 20 μM 의 네페린은 PDGF-BB 자극된 혈관 평활근 세포의 이동을 각각 40.3 및 67.6% 억제하였다.
- [0055] 실시예 4: 연자심 분획물 및 네페린이 MAPK 및 NF- κ B 활성화에 미치는 영향
- [0056] MAPK 및 NF- κ B 활성화는 PDGF-BB를 포함한 여러 성장인자에 반응하여 혈관 평활근 세포의 증식을 유도하고, 최종적으로는 죽상동맥경화증 및 재협착증이 진행되는 동안 신생내막 과다증식(neointimal hyperplasia)을 유발한

다.

[0057] 혈청 고갈 혈관 평활근 세포를 각 분획물, 네페린, 또는 각 억제제로 1시간 동안 전처리한 후 15분 동안 PDGF-BB로 자극시켰다. 세포를 용해시킨 후 p-ERK1/2, ERK1/2, p-JNK, JNK, p-P38, P38 및 GAPDH에 대한 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. Picotect™ Western blot 화학발광 기질을 이용하여 해당 단백질을 검출하였다. NF-κB p65 이동(translocation)의 경우, 세포를 30분 동안 20 ng/ml의 PDGF-BB로 자극시키고, NE-PER 키트 (Thermo Scientific, IL, USA)를 이용하여 세포질 분획 및 핵의 분획을 수득하였다. 수득된 분획을 NF-κB p65 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[0058] 도 4a 내지 4d는 연자심의 분획물 및 네페린이 ERK1/2, JNK 및 P38의 인산화 및 NF-κB의 활성화에 미치는 영향을 나타낸다. 도 4a에 나타난 바와 같이, 100 μg/ml의 연자심 클로로포름 분획물 ARF는 타 분획물에 비해 PDGF-BB에 의해 유도되는 ERK1/2, JNK 및 P38의 인산화를 가장 강하게 억제하였다. 도 4b에 나타난 바와 같이, 연자심 클로로포름 분획물의 농도가 증가함에 따라 ERK1/2, JNK 및 P38의 인산화가 더욱 억제되었다. 도 4c에 나타난 바와 같이, 네페린의 농도가 증가함에 따라 ERK1/2 및 JNK의 인산화가 더욱 억제되었다. 도 4d에 나타난 바와 같이, 네페린에 의한 ERK1/2 및 JNK의 인산화 억제 정도는 ERK 억제제인 U0126 및 JNK 억제제인 SP100625에 상당하는 것으로 확인되었다.

[0059] 또한, NF-κB 활성화를 나타내는 NF-κB p65 서브유닛의 이동에 대한 연자심의 분획물 및 네페린의 영향을 평가하였다. PDGF-BB에 의해 유도되는 핵 내 NF-κB p65 서브유닛의 이동을 통해 NF-κB의 활성화를 확인할 수 있다. 도 4b 및 도 4c에 나타난 바와 같이, 연자심의 클로로포름 분획물 ARF 또는 네페린의 농도가 증가함에 따라 PDGF-BB에 의해 유도되는 핵 내 NF-κB p65 서브유닛의 이동이 더욱 억제되었다.

[0060] 실시예 5: 네페린이 혈관 평활근 세포의 증식에 미치는 영향

[0061] 세포의 증식은 여러 세포 주기 단백질에 의해 정밀하게 조절된다. 특히 사이클린 D1은 CDK4의 활성화를 통해 G1기에서 S기로의 세포 주기 진행을 유도하며, 그의 발현은 혈관 평활근 세포의 증식과 상관관계를 갖는다.

[0062] 혈청 고갈 혈관 평활근 세포를 네페린 또는 각 억제제로 1시간 동안 전처리 후 PDGF-BB로 추가의 24시간 동안 자극시켰다. 총 RNA를 TRI 시약 (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA)을 이용하여 추출하였다. 1 μg의 총 RNA를 제조사에 지시사항에 따라 Superscript®II First-Strand kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 역전사시켰다. Cycle 기반 PCR을 이용하여 사이클린 D1, 사이클린 E, CDK4, CDK2 및 GAPDH를 반정량화하였다. cDNA 주형을 하기 표 1에 기재된, 사이클린 D1, 사이클린 E, CDK4, 및 CDK2에 대한 가닥-특이 프라이머에 의해 증폭하였다. GAPDH를 내부 로딩 대조군으로 사용하였다. PCR 반응 조건은 하기와 같았다: 95℃에서 5분간 cDNA 변성 및 30 주기의 증폭(1 주기: 94℃, 1분; 58℃, 1분; 및 72℃, 2분) 후 72℃에서 7분간 최종 신장. 세포 증식 분석 방법은 실시예 3.1.에 기재된 바와 같다.

표 1

[0063]

대상	GenBank ID	센스 프라이머 (5'→ 3')	안티센스 프라이머 (5'→ 3')
Cyclin E	NM_001100821	ACATTCTACTTGGCACAGG (서열번호 1)	TGTCTCTGTCCTACTGCT (서열번호 2)
Cyclin D1	NM_171992	CATCCGCAACATGCACAGACCTT (서열번호 3)	TTTCTCTTCGCGGATGCCACTACT (서열번호 4)
CDK2	NM_199501	AATTCTCTGCACCAGGACCTCAAGA (서열번호 5)	TAACTCCTGGCCAAACCACCTCAT (서열번호 6)
CDK4	NM_053593	TCAGCACAGTTCGTGAGGT (서열번호 7)	CAGGTATGTCCGTAGGTCC (서열번호 8)
GAPDH	NM_017008	TATGACAACTCCCTCAAGAT (서열번호 9)	AGATCCACAACGGATACATT (서열번호 10)

[0064] 도 5a 내지 5c는 세포 주기 조절인자의 발현에 미치는 네페린의 영향을 나타낸다. 도 5a에 나타난 바와 같이, 네페린의 농도가 증가함에 따라 전사 수준에서 사이클린 D1 및 CDK4가 억제되었고, G1 후기에서 S기로의 진입을 조절하는 사이클린 E 및 CDK2의 mRNA 발현도 상당히 억제되었다. 도 5b에 나타난 바와 같이, ERK의 억제제인 U0126, NF-κB의 억제제인 PDTC, 및 네페린은 사이클린 D1, CDK4, 사이클린 E, 및 CDK2의 mRNA 발현을 억제하

였으나, JNK 억제제 및 P38 억제제는 이들의 발현을 억제하지 않았다. 또한, 도 5c에 나타난 바와 같이, PDGF-BB 유도 혈관 평활근 세포의 증식은 ERK 및 NF- κ B 활성화에 의해 매개되었다.

[0065] 이를 통해, 네페린이 NF- κ B 및 ERK1/2의 활성화를 타겟팅함으로써 세포 주기 조절인자의 전사를 억제하여 혈관 평활근 세포의 증식을 약화시킨다는 것을 확인하였다.

[0066] 실시예 6: 네페린이 혈관 평활근 세포의 이동에 미치는 영향

[0067] 혈관성형술 후 MMP-2 및 MMP-9의 발현이 증가하고 세포 외 기질 성분을 분해하여 혈관 평활근 세포의 이동을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 따라서, TNF- α 에 의해 자극된 혈관 평활근 세포에서 MMP-2 및 MMP-9의 발현에 미치는 연자심의 클로로포름 분획물 및 네페린의 효과를 확인하였다.

[0068] 혈관 평활근 세포를 각 분획물, 네페린, 또는 각 억제제로 1시간 동안 전처리 후 TNF- α 로 추가의 24시간 동안 자극시켰다. 그 후, 조정 배지를 수집하고 단백질 추출 용액 (Pro-PrepTM, Intron Biotech) 중에서 세포를 용해시켰다. 조정 배지 및 세포 용해물을 0.1% 젤라틴이 함유된 10% SDS-PAGE에 가하였다. 자이모그램(zymogram)을 사진 찍고 푸른 배경 중의 백색 영역으로 단백질을 분해를 검출하였다.

[0069] 도 6a 내지 6e는 연자심의 분획물 및 네페린이 MMP의 발현 및 스트레스 섬유 형성에 미치는 영향을 나타낸다. 도 6a에 나타난 바와 같이, TNF- α 에 의해 24시간 동안 자극된 혈관 평활근 세포에서 MMP-9의 단백질 분해 활성 및 단백질 발현이 증가하고 MMP-2가 지속적으로 분비되었다. 100 μ g/ml의 연자심 클로로포름 분획물 ARF는 MMP-9의 효소 작용 및 단백질 발현을 가장 강하게 억제하였다. 도 6b에 나타난 바와 같이, 연자심 클로로포름 분획물의 농도가 증가함에 따라 MMP-9의 효소 활성이 더욱 억제되었다. 도 6c에 나타난 바와 같이, 네페린의 농도가 증가함에 따라 TNF- α 유도된 MMP-9의 발현이 억제되었다.

[0070] 본 발명자의 이전 연구를 통해, 세포의 이동은, MMP에 의한 세포 외 기질의 분해 외에, 스트레스 섬유 형성을 통해 유도되는 세포 골격의 리모델링을 수반한다는 것이 밝혀졌다.

[0071] 네페린 또는 블레비스타틴(blebbistatin)에 의해 1시간 전처리된 혈관 평활근 세포를 유리 커버슬립 위에 올리고 콜라겐 타입 I으로 코팅한 뒤 37°C에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 ice cold PBS로 세척하고, 20분간 냉각된 5% 포르말린으로 고정시키고, 10분간 냉각된 0.2% Triton X-100으로 투과성을 증가시켰다. 5% BSA에 의해 블로킹한 후 세포를 플루오레신-5-이소티오시아네이트(FITC)-결합 팔로이딘(phalloidin) (Sigma, 1:200)으로 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 형광 현미경 하에 커버슬립을 장착시키고 면역형광 영상을 분석하였다. 도 6d에 나타난 바와 같이, 네페린은 혈관 평활근 세포 및 랫트의 평활근 세포 (A7r5)에서 콜라겐에 의해 유도된 스트레스 섬유의 형성을 억제하지 못했다.

[0072] MMP-9의 발현과 MAPK 및 NF- κ B 활성화의 관련성을 확인하기 위하여, MAPK 및 NF- κ B 신호전달을 차단하고 MMP-9의 효소 활성 및 발현을 조사하였다. 도 6e에 나타난 바와 같이, ERK1/2 억제제는 MMP-9의 발현을 약하게 억제하며, JNK, P38, 및 NF- κ B 억제제는 MMP-9의 발현을 상당히 억제하였다. 이를 통해, JNK, P38, 및 NF- κ B 활성화가 혈관 평활근 세포의 이동에 요구된다는 것을 확인하였다. 또한, pan-MMP 억제제인 GM6001 및 네페린은 MMP-9의 발현을 완전히 억제하였다.

[0073] 실시예 7: 풍선 손상에 의해 유도된 내막 비후에 대한 연자심 분획물의 영향

[0074] 동물실험은 목포대학교의 동물실험 윤리위원회에 의해 승인된 관련 가이드라인 및 규정을 준수하여 수행되었다. 50 mg/kg의 페노파르비탈을 복강내 주사하여 200 내지 240g의 수컷 스프라그-다워리(Sprague-Dawley) 랫트를 마취시켰다. Karki R 등이 기술한 방법에 따라 경동맥의 풍선 카테터 노출(denudation)을 수행하였다 (Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(3-4):634-640). 요약하면, 풍선 카테터 (2 F, Edwards Life sciencesTM, USA)를 우측 장골 동맥(iliac artery)에 삽관하고 풍선을 총경동맥을 통해 후방으로 잡아당기면서 염수 0.02 ml로 부풀게 하고 회전시켜 혈관 내피를 노출시켰다. 알칼로이드 고함유 분획인 ARF50 및 ARF100을 위 내시경을 사용하여 경구로 투여하고 이를 35일간 계속하였다. 대조군은 증류수를 투여하였다.

[0075] 혈관 손상 후 35일차에, 랫트를 마취시키고 염수를 이용하여 경심관류로(transcardially) 관류시켰다. 그 후, 4% 파라포름알데하이드에 의해 혈관을 관류-고정(perfusion-fix)시키고 경동맥을 절제하였다. 고정 후 하룻밤이 지난 뒤, 혈관을 절단된 바와 같이 처리하였다. 도 7a 내지 도 7f는 풍선 손상된 경동맥의 조직학적 분석 결과

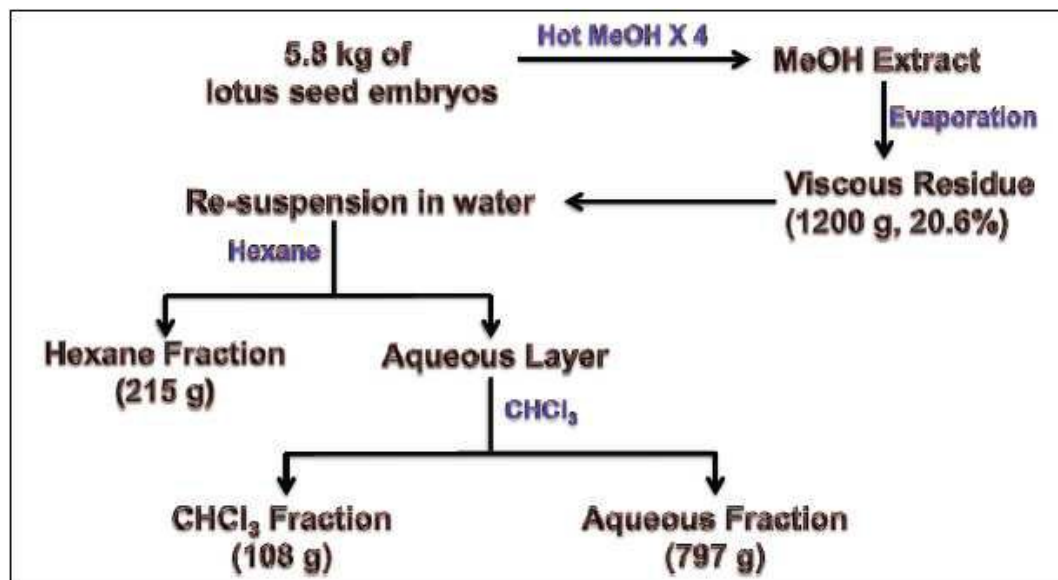
를 나타낸다. ARF50 및 ARF100은 각각 랫트에 50 mg/kg 및 100 mg/kg으로 클로로포름 분획물을 투여한 것을 나타낸다.

[0076] 도 7a는 풍선 손상 후 35일차에 수집된 랫트의 동맥 단면을 헤마톡실린 및 에오신 염색한 후 광학 현미경으로 관찰한 결과이다. 하였다. 도 7a에 나타난 바와 같이, 손상되지 않은 랫트의 경우 경동맥에서 내막의 병변이 관찰되지 않고, 내막층은 내탄성판(internal elastic lamina) 상의 내피세포층으로만 이루어져 있었다.

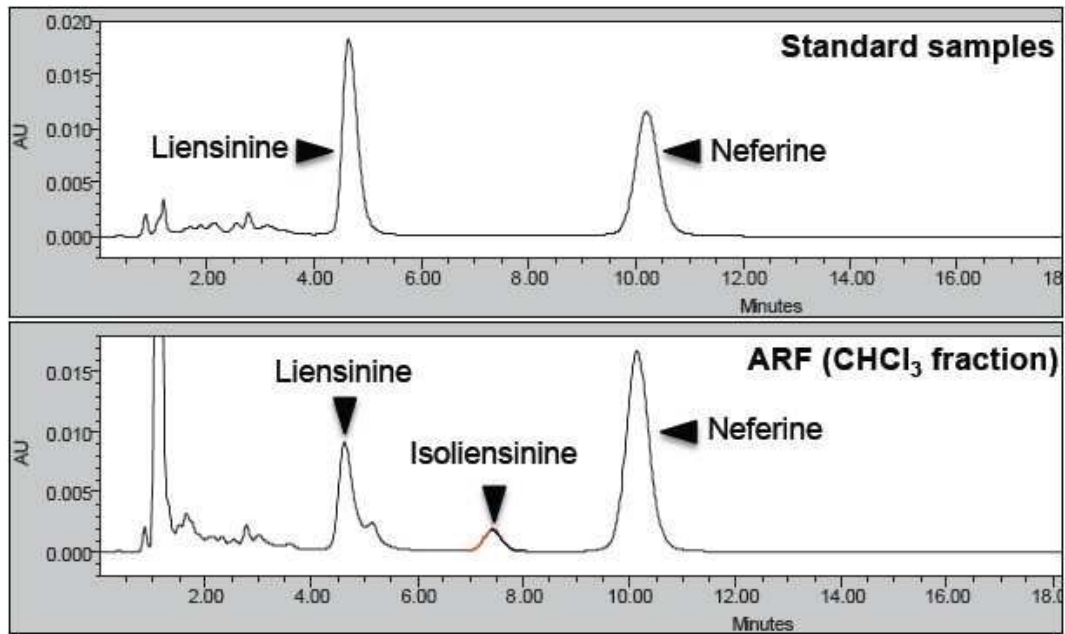
[0077] 도 7b 내지 도 7f는 컴퓨터 보조 형태측정 분석(computer-assisted morphometric analysis)에 의해 내막 과다형성을 정량한 결과이다. 혈관의 횡단면 영역을 Axio Vert Rel.4.2 image 분석 프로그램을 이용하여 내강(luminal), 중간층(medial) 및 내막(intimal) 영역을 측정하였다. 그 후, I/M 비율 [(내막 영역) / (중간층 영역)] 및 협착률 [(내막 영역) x100 / (내막 영역 + 내강 영역)]을 계산하였다. 도 7b 및 도 7d에 나타난 바와 같이, 대조군 랫트의 경우 풍선 손상은 내피의 손실 및 내막 과다형성의 발달을 유발하여, 평균 내막 영역 및 평균 내강 영역은 각각 0.042 mm^2 및 0.029 mm^2 이었다. ARF100 실험군의 경우, 평균 내막 영역이 0.028 mm^2 로 대조군에 비해 상당히 감소하였고 내강 영역이 0.05 mm^2 로 대조군에 비해 더 넓은 것으로 관찰되었다. 또한, 내강 영역, 내막 영역 및 중간층 영역에서의 I/M 비율 및 협착율을 계산하였다. 도 7e 및 7f에 나타난 바와 같이, ARF100에서 I/M 비율 및 협착율이 대조군에 비해 낮았다. 이를 통해, 연자심의 클로로포름 분획물이 혈관 내막을 과다형성으로부터 보호한다는 것을 확인하였다.

도면

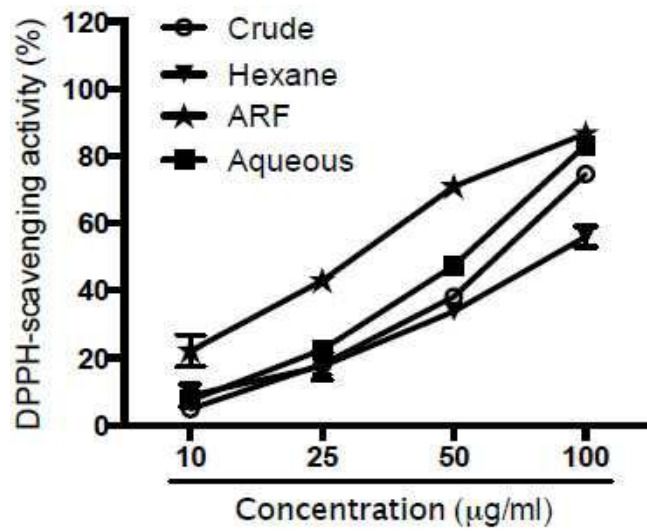
도면1a



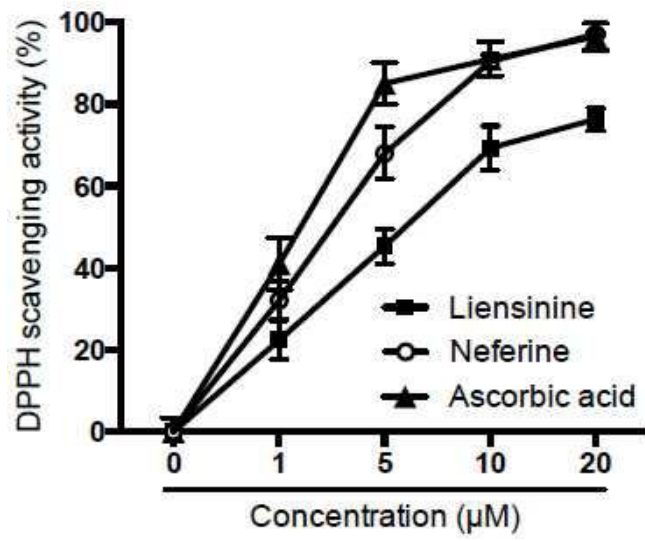
도면1b



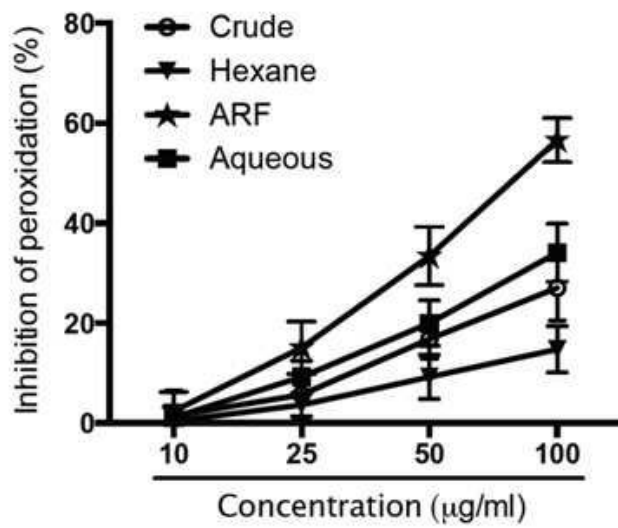
도면2a



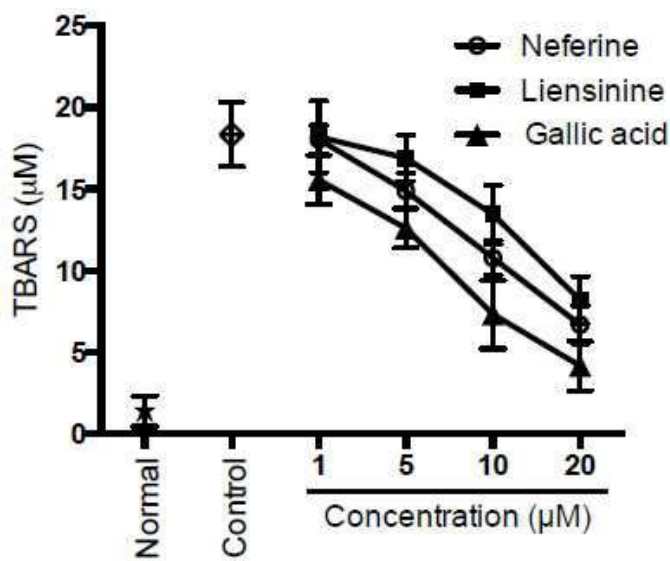
도면2b



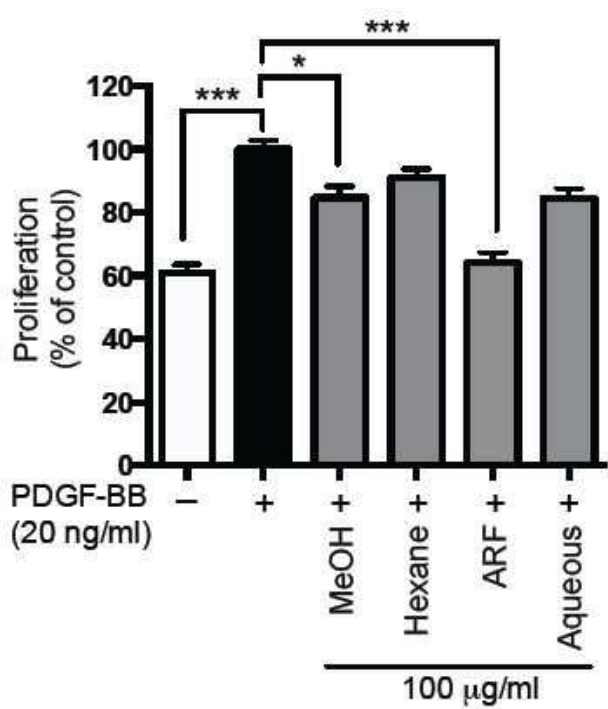
도면2c



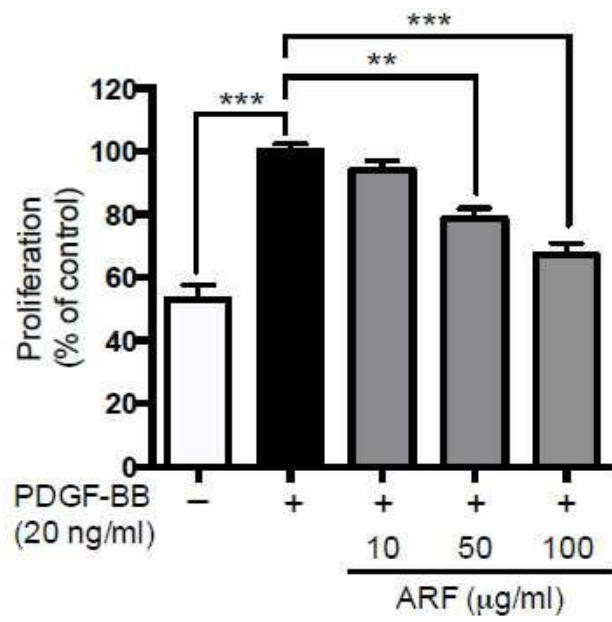
도면2d



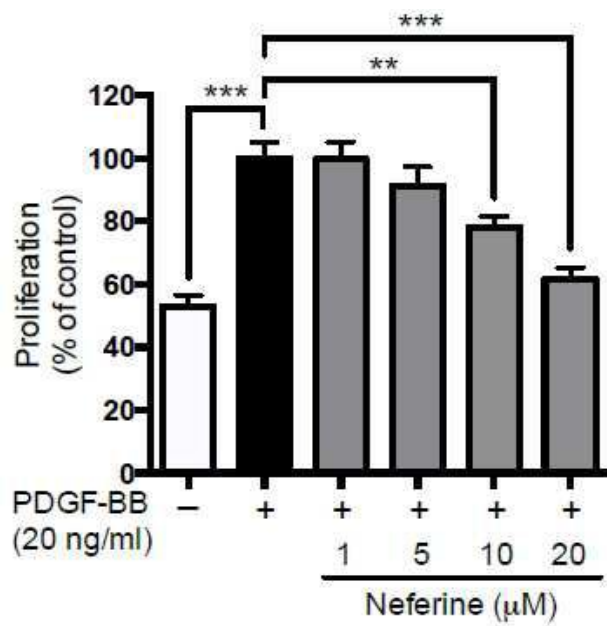
도면3a



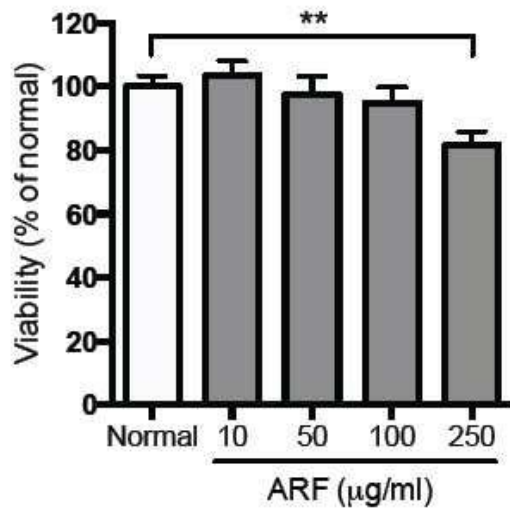
도면3b



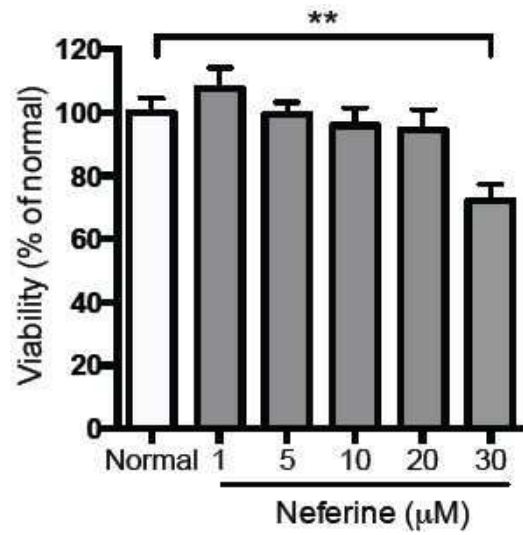
도면3c



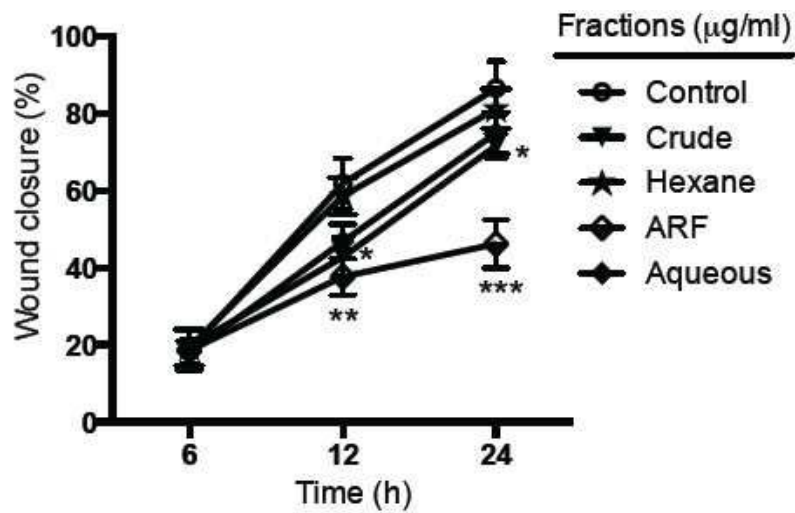
도면3d



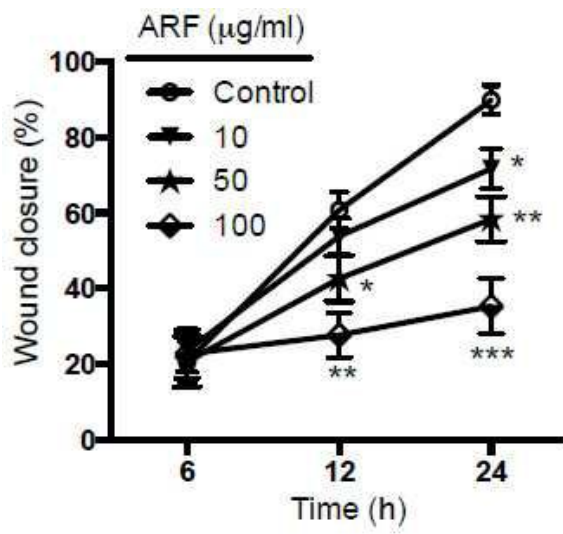
도면3e



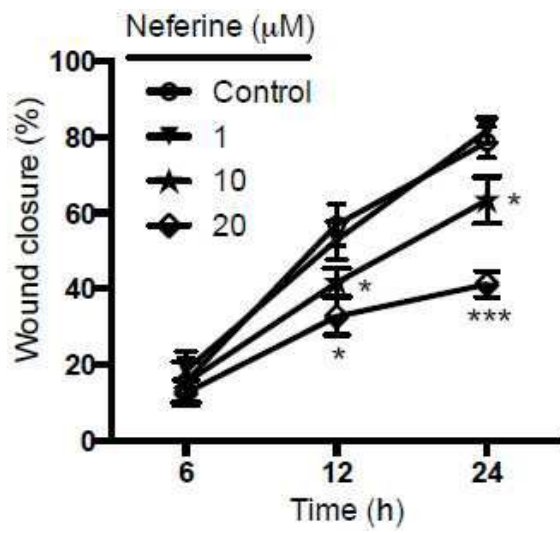
도면3f



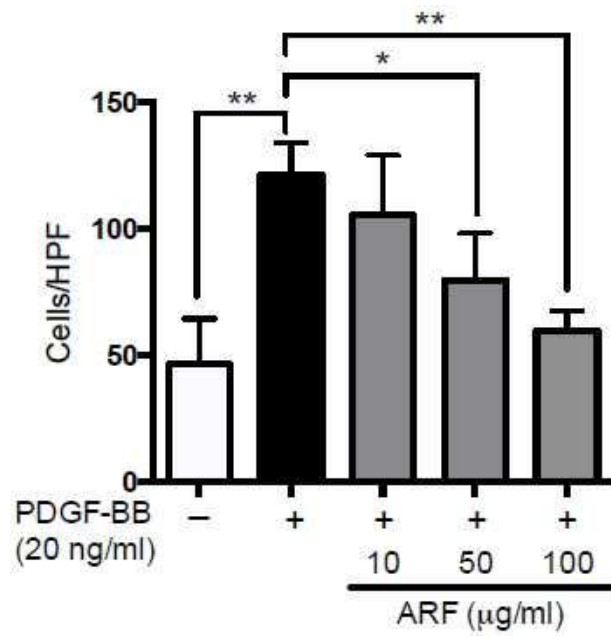
도면3g



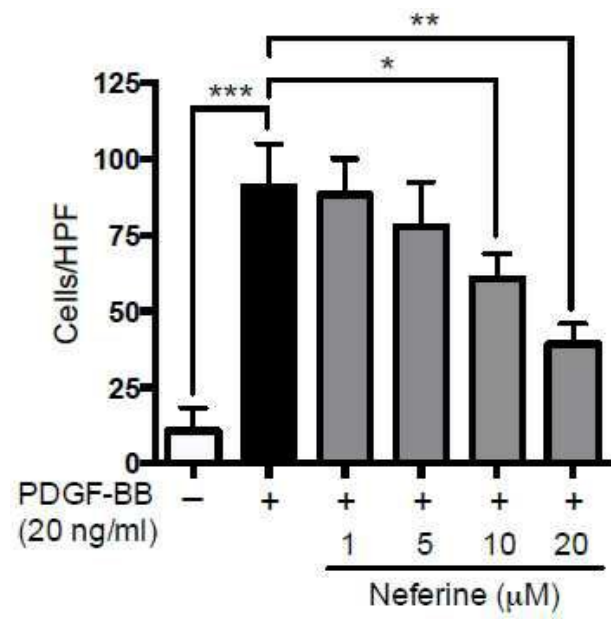
도면3h



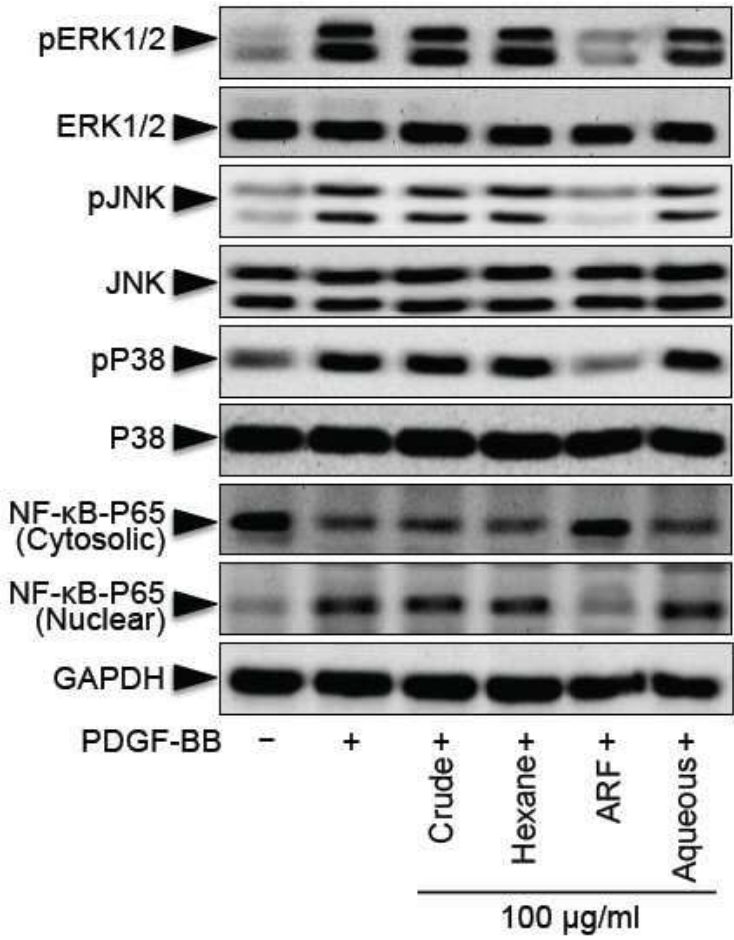
도면3j



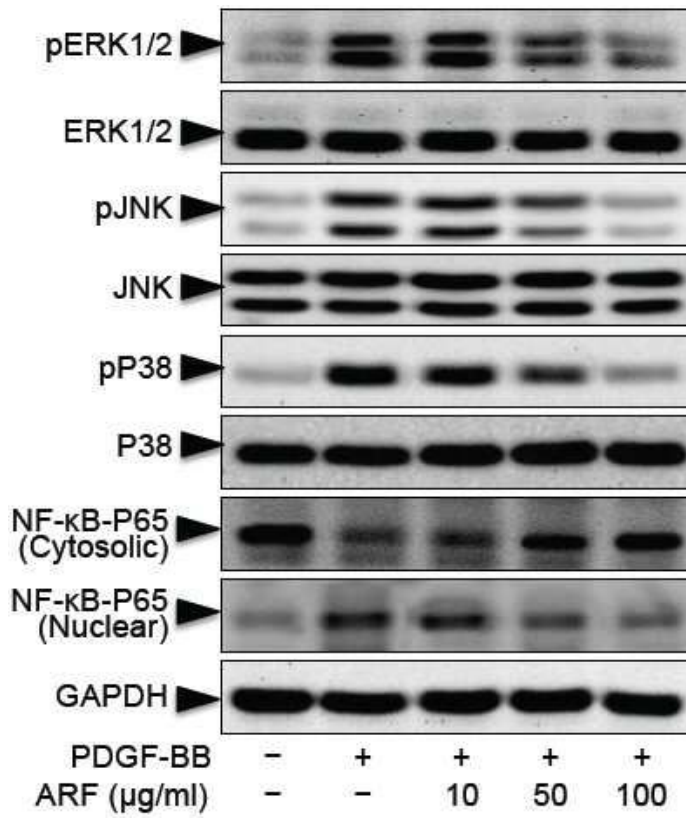
도면3k



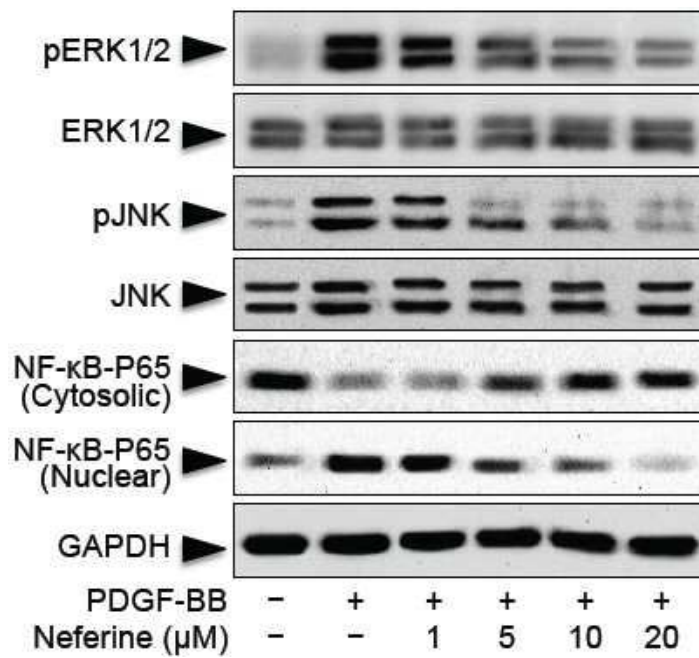
도면4a



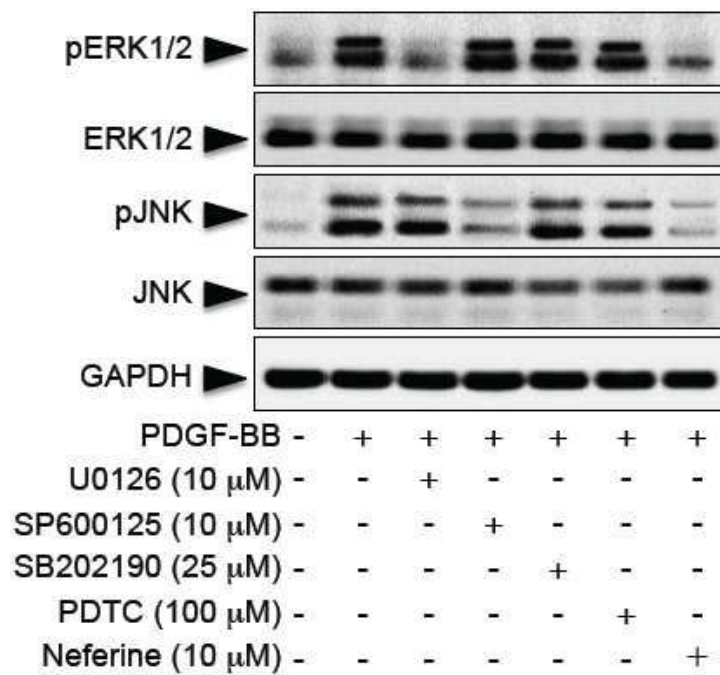
도면4b



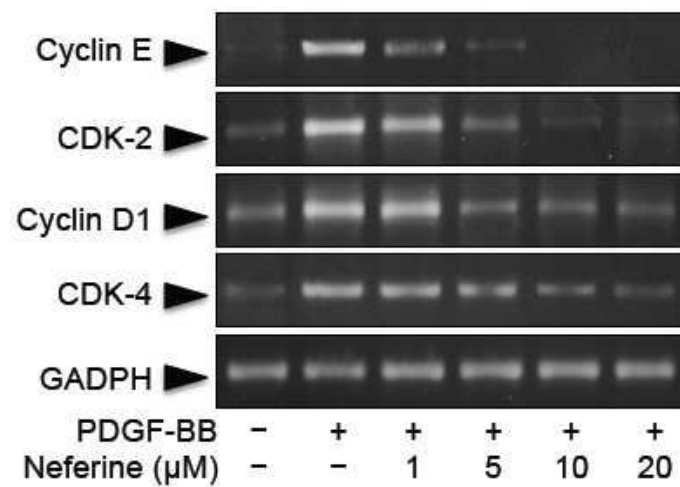
도면4c



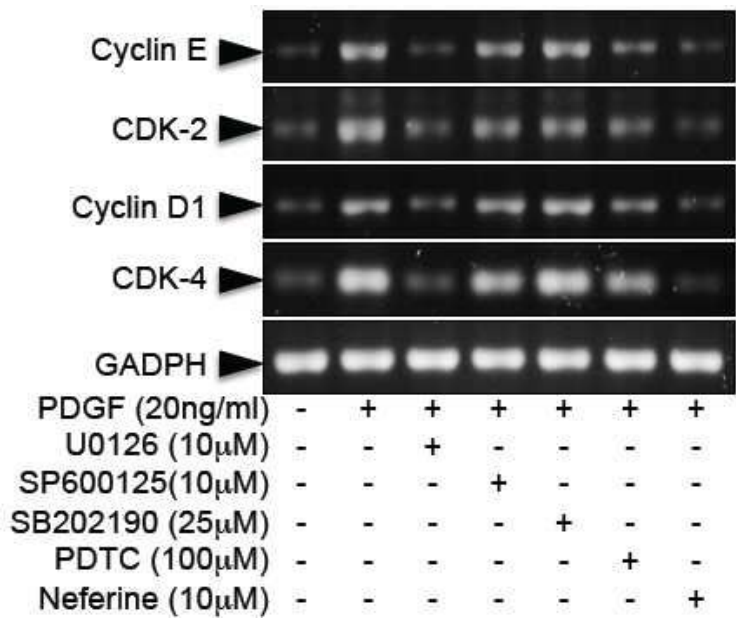
도면4d



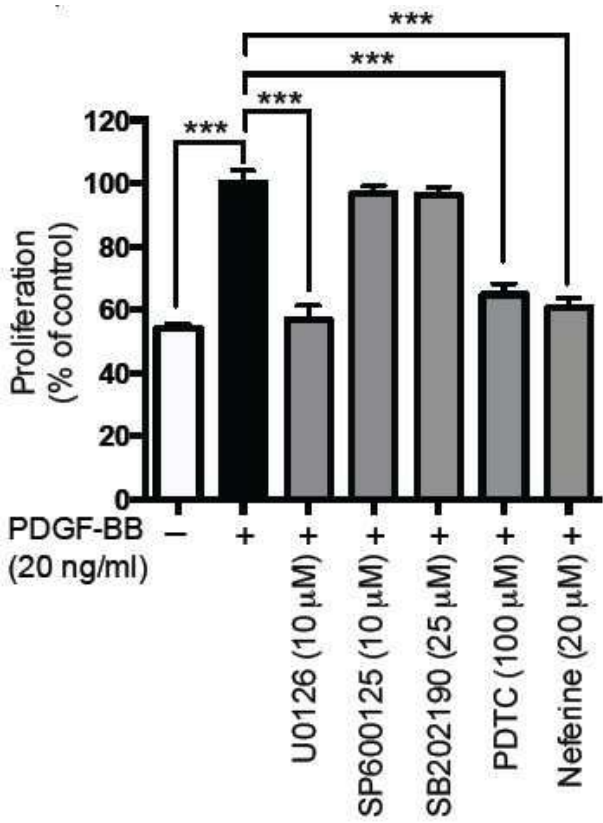
도면5a



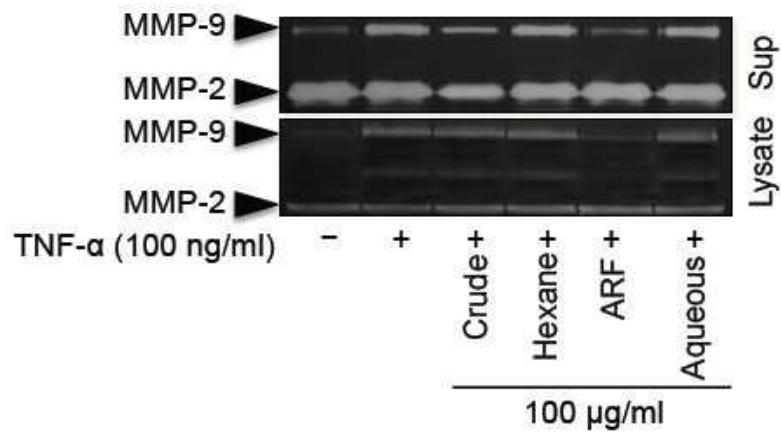
도면5b



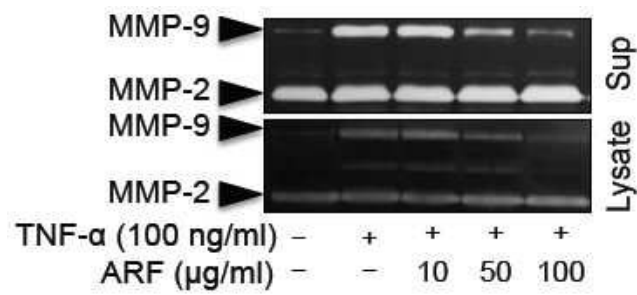
도면5c



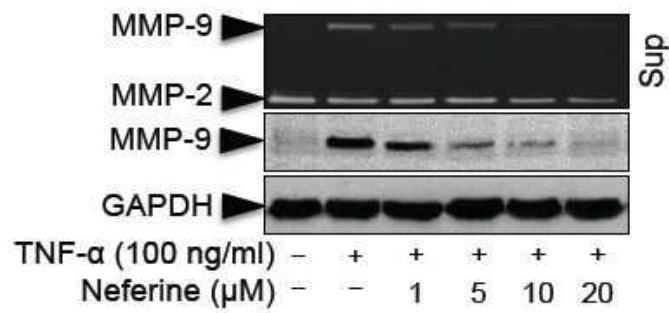
도면6a



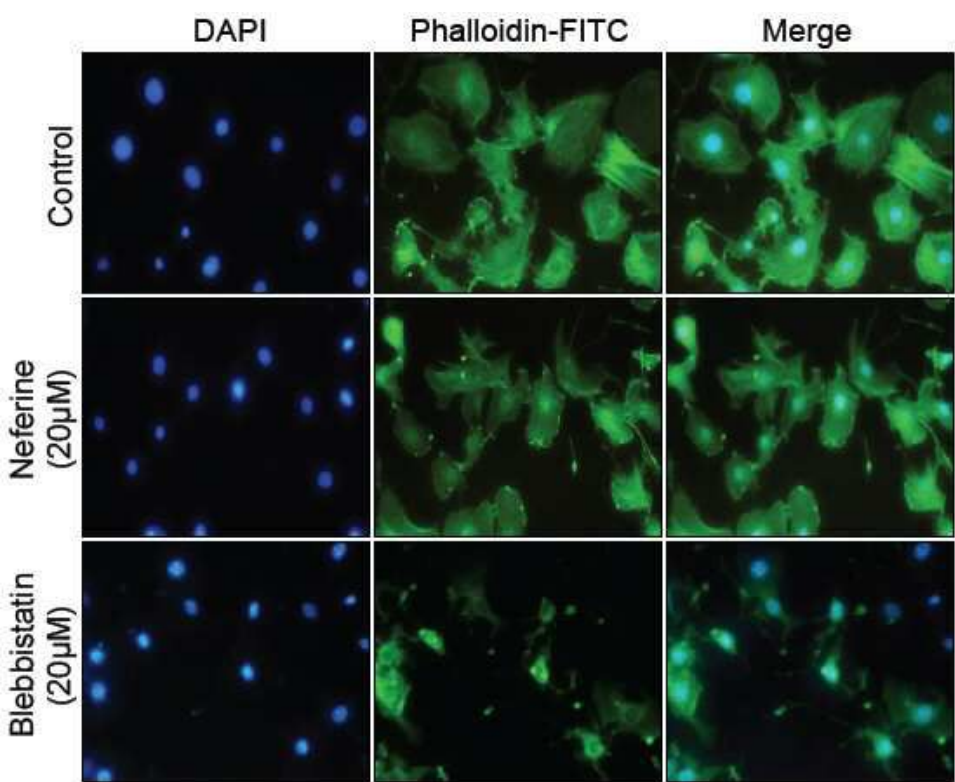
도면6b



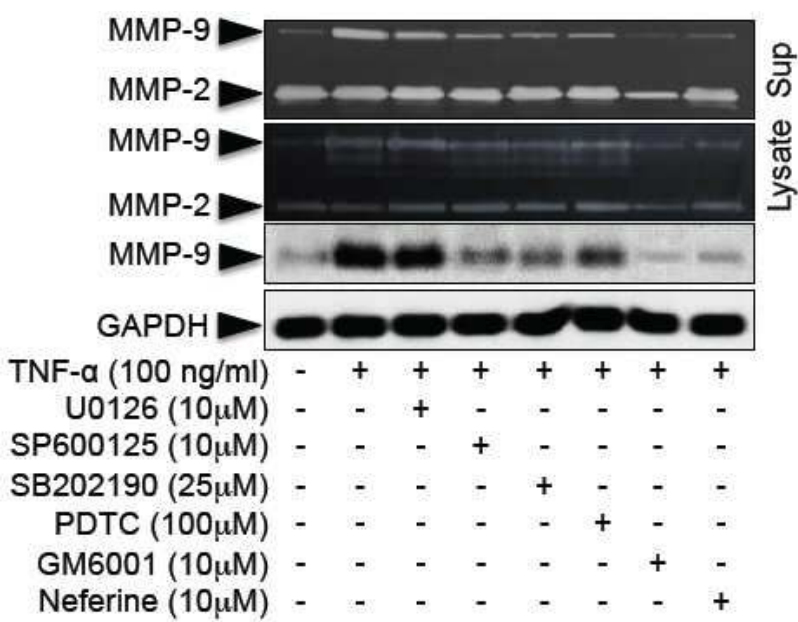
도면6c



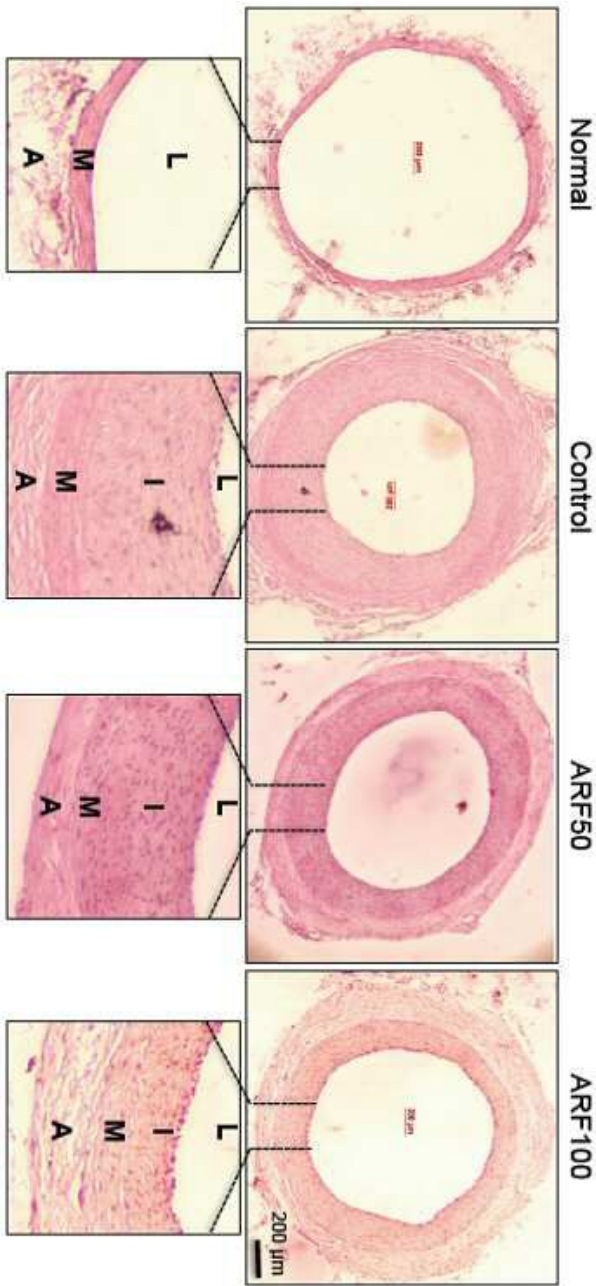
도면6d



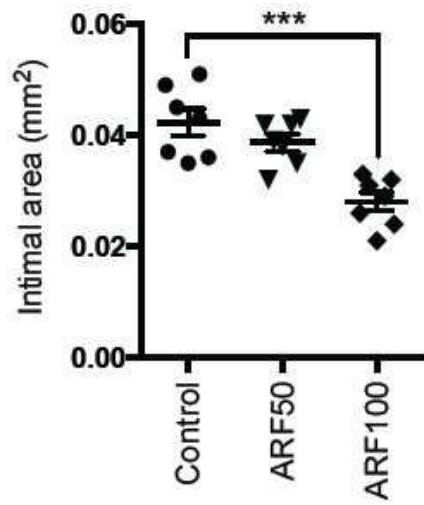
도면6e



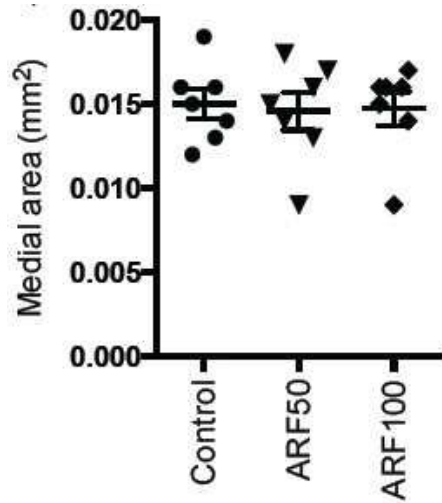
도면7a



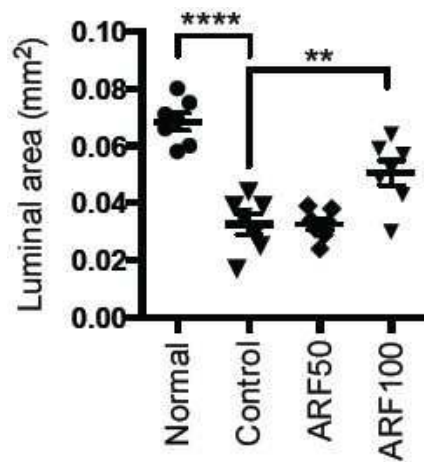
도면7b



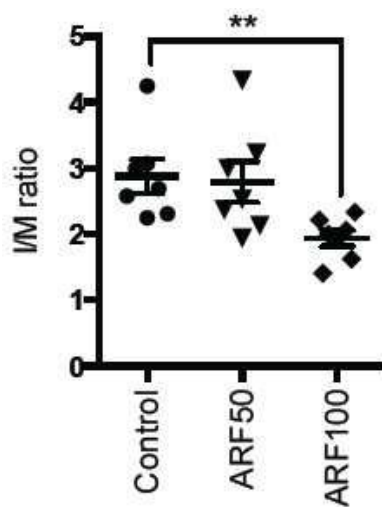
도면7c



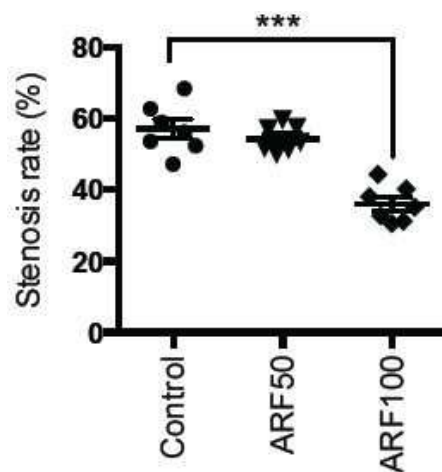
도면7d



도면7e



도면7f



서열 목록

- <110> Mokpo National University Industry-Academic Cooperation Foundation
- <120> Pharmaceutical composition for preventing or treating restenosis comprising extracts of Nelumbo nucifera seed
- <130> PN110925
- <160> 10
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Cyclin E_F
- <400> 1

acattctact tggcacagg	19
<210> 2	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Cyclin E_R	
<400> 2	
tgtctcctgc tcaactgt	18
<210> 3	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Cyclin D1_F	
<400> 3	
catccgcaaa catgcacaga cctt	24
<210> 4	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Cyclin D1_R	
<400> 4	
tttctcttcg cggatgccac tact	24
<210> 5	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CDK2_F	
<400> 5	
aattcctgca ccaggacctc aaga	24
<210> 6	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	CDK2_R	
<400>	6	
taactcctgg ccaaccacc tcat		24
<210>	7	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CDK4_F	
<400>	7	
tcagcacagt tcgtgaggt		19
<210>	8	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CDK4_R	
<400>	8	
caggtatgtc cgtaggtcc		19
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH_F	
<400>	9	
tatgacaact ccctcaagat		20
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH_R	
<400>	10	
agatccacaa cggatacatt		20

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 6

【변경전】

상기 추출물 또는 분획물

【변경후】

상기 추출물의 분획물