



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년01월06일
(11) 등록번호 10-1692849
(24) 등록일자 2016년12월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/05 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/05 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0107879
(22) 출원일자 2015년07월30일
심사청구일자 2015년07월30일
(56) 선행기술조사문헌
W02012107905 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
박은미
서울특별시 양천구 목동동로 350 531동 404호 (목동, 목동5단지아파트)
신진아
경기도 고양시 일산동구 무궁화로 43-50 1221호 (장항동, 우인아크리움빌1차)
정재임
서울특별시 서대문구 성산로17길 7 405호 (연희동, 연희궁빌라)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 6 항

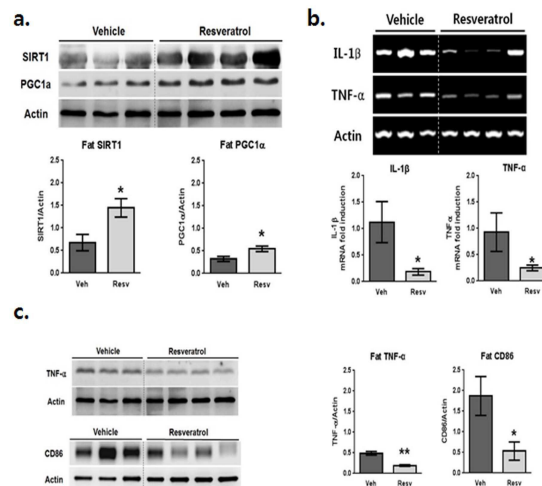
심사관 : 강덕희

(54) 발명의 명칭 레스베라트롤 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 갱년기 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 레스베라트롤(resveratrol) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 갱년기 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 자연 폐경 모델 마우스에 레스베라트롤을 경구 투여한 결과, 뇌내 노화 현상이 완화되고, 내장지방 및 뇌에서 염증성 사이토카인 발현이 감소하며, 혈액-뇌 장벽의 주요세포인 뇌혈관내피세포 치밀이음부 단백질 클라우딘-5(claudin-5) 및 오클루딘(occludin) 발현이 증가함으로써, 내장지방 염증이 완화되고, 허혈성 뇌중풍에 의한 뇌 경색 정도가 감소함을 확인함으로써, 본 발명의 레스베라트롤은 갱년기 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2250/2132 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A5A2A32671867

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업-선도연구센터육성사업-기초의과학분야(MRC)

연구과제명 조직손상방어연구센터-효율적인 내인성 보호 모듈 발굴

기 여 율 50/100

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2019.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0015923

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업-중견연구자지원사업-핵심연구(개인)

연구과제명 마우스 모델을 이용한 폐경 후 혈액뇌장벽 손상기전 연구

기 여 율 50/100

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2014.04.30

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

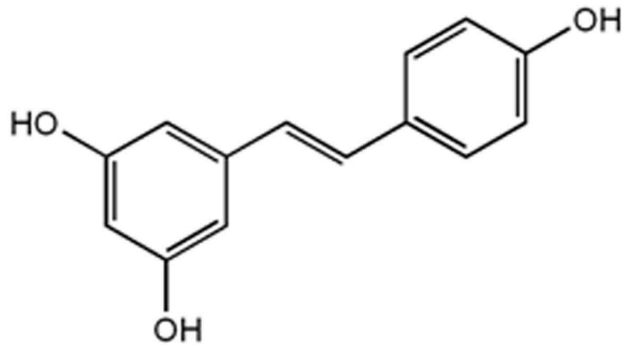
청구항 1

레스베라트롤(resveratrol) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 내장지방 염증 또는 허혈성 뇌중풍 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 레스베라트롤은 하기 화학식 1로 기재되는 것을 특징으로 하는 내장지방 염증 또는 허혈성 뇌중풍 예방 및 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 내장지방 염증 또는 허혈성 뇌중풍은 여성을 대상으로 하는 것을 특징으로 하는 내장지방 염증 또는 허혈성 뇌중풍 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

삭제

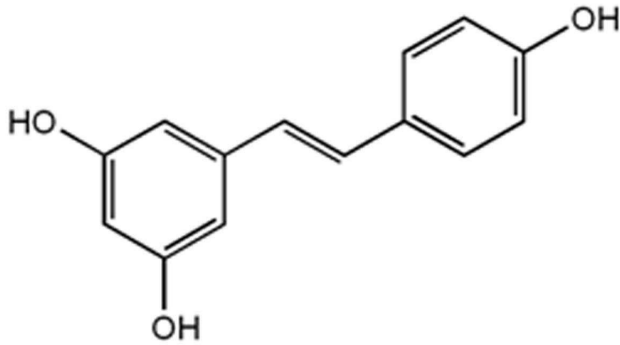
청구항 5

레스베라트롤(resveratrol) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 내장지방 염증 또는 허혈성 뇌중풍 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 레스베라트롤은 하기 화학식 1로 기재되는 것을 특징으로 하는 내장지방 염증 또는 허혈성 뇌중풍 예방 및 개선용 건강기능식품:

[화학식 1]



청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 내장지방 염증 또는 허혈성 뇌중풍은 여성의 갱년기 질환인 것을 특징으로 하는 내장지방 염증 또는 허혈성 뇌중풍 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 8

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 레스베라트롤(resveratrol) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 갱년기 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 최근 문명의 발달과 과학의 진보로 인간의 수명이 점차 연장되고, 동시에 다양한 환경에서의 스트레스, 공해 및 노화현상 등으로 인하여 면역력이 저하되고 자연치유력이 점차 떨어져 노화가 진행되게 된다. 특히, 여성의 경우 40대 이후 서서히 시작되는 갱년기 증상으로 인해 신체적, 정신적 고통을 겪고 있다. 여성의 갱년기란 내분비 증후군의 일종으로, 난소 기능의 전반적이고 점진적인 노화로 인한 여성호르몬, 즉 에스트로겐의 감소로 인해 생리적 기능 및 성기능이 감소 내지 소실되는 과도기를 의미한다. 이러한 갱년기의 증상으로는 안면홍조, 빈맥, 발한 또는 두통과 같은 혈관성 변화에 의한 증상이 있고, 근육통, 관절통 및 요통과 같은 근골격계 변화에 의한 증상이 있다. 또한, 빈뇨 또는 요실금과 같은 비노생식기 변화에 의한 증상이 있고, 기억력 감퇴, 우울증, 집중력 감퇴 및 현기증과 같은 뇌신경계 변화에 의한 증상이 있으며, 이 외에도 시력감퇴 및 피부와 모발이 변화되는 증상들이 발생되며, 호르몬 변화로 인한 골다공증이나 심혈관계 질환 등 여성의 건강에 치명적인 질환이 발생하기도 한다. 체지방 분포에도 변화가 생기는데, 피하지방은 줄어들고 내장지방은 증가한다. 내장지방의 축적으로 지방조직의 상대적인 저산소증이 발생하고 염증세포의 유입이 증가하여 내장지방내 염증반응이 증가하게 된다. 내장지방 염증 증가는 노화과정에서 발생하는 혈중내 사이토카인 증가에 기여하며, 내장지방 증가는 대사성 질환 및 노인성 뇌질환 발생의 위험인자로 작용한다. 따라서 노화에 따른 내장지방 증가 및 염증 발생을 억제하는 것이 노인성 뇌질환 발생 예방의 한 방법이 될 것이다.

[0005] 에스트로겐은 폐경기 증상의 완화, 여드름 치료, 월경곤란증 및 기능부전성 자궁 출혈의 치료, 골다공증의 치료, 다모증의 치료, 전립선암의 치료, 일과성 열감의 치료, 심혈관 질환의 예방 및 뇌 보호 효과를 가지며, 치료학적으로 광범위하게 연구되고 있다. 현재 갱년기 증상의 개선을 위해 에스트로겐을 대체하여 비스테로이드계 제제 등의 약물이 개발된 바 있으나, 이들 약물의 경우 대부분이 두통, 자궁 출혈 및 뇌졸중 등의 부작용이 있는 것으로 알려져 있다.

[0007] 레스베라트롤(resveratrol)은 식물이 곰팡이나 해충 같은 스트레스를 받을 때 생산하는 파이토알렉신(phytoalexin)으로서 폴리페놀의 일종으로, 포도, 땅콩, 오디, 라스베리, 크랜베리 등의 베리류 등을 포함한 많은 식물에서 발견된다. 레스베라트롤은 항암 및 강력한 항산화 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 이외에도 항바이러스, 신경보호작용, 항염증작용, 항노화 및 수명연장 효과 등이 있고, 이로 인해 레스베라트롤은 항염,

항암, 항바이러스제제, 당뇨병 및 심장 질병 치료제 등의 여러 가능성이 제시되고 있다. 레스베라트롤은 에스트로겐과 유사한 화학구조를 가지고 있어 피토에스트로겐(phytoestrogen)으로 분류되며, 다양한 레스베라트롤의 작용은 에스트로겐 수용체 활성화를 통해 나타나는 것으로 알려져 있다. 그러나, 아직까지 레스베라트롤의 갱년기 여성에서 발생하는 갱년기 질환에 대한 효과는 아직 연구되지 않은 실정이다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 갱년기 여성 질환을 완화시킬 수 있는 약학적 조성물을 개발하기 위해 노력하던 중, 레스베라트롤이 자연 폐경 모델 마우스에서 내장지방 염증 반응을 감소시키고, 허혈성 뇌중풍에 의한 뇌손상을 완화시켜, 레스베라트롤이 갱년기 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물로 유용하게 이용될 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 레스베라트롤(resveratrol) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 갱년기 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 레스베라트롤(resveratrol) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 갱년기 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 레스베라트롤 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 갱년기 질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명은 노령의 자연 폐경 모델 마우스에 레스베라트롤을 경구 투여한 결과, 뇌내 노화 현상이 완화되고, 내장지방 및 뇌에서 염증성 사이토카인 발현이 감소하며, 혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier)의 일차적 구성 세포인 뇌혈관내피세포의 치밀이음부 단백질 클라우딘-5(claudin-5) 및 오클루딘(occludin) 발현 감소를 억제함으로써, 내장지방 염증이 완화되고, 허혈성 뇌중풍에 의한 뇌 경색 정도가 감소함을 확인함으로써, 본 발명의 레스베라트롤은 갱년기 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 2.5, 18 및 20개월 암컷 마우스에서 혈액 내 에스트로겐 수치를 나타낸 도이다.

도 2는 20개월 암컷 자연 폐경 모델 마우스에서 레스베라트롤(resveratrol) 투여에 의한 뇌내 항염증작용을 나타내는 SIRT/PGC1- α 단백질과 염증성 사이토카인 변화를 나타낸 도이다.

도 3은 20개월 암컷 자연 폐경 모델 마우스에서 레스베라트롤 투여에 의한 뇌내 혈관내피세포의 치밀이음부 단백질 변화를 나타낸 도이다.

도 4는 20개월 암컷 자연 폐경 모델 마우스에서 레스베라트롤 투여에 의한 내장지방 염증 반응의 감소를 나타낸 도이다.

도 4a는 대조군과 레스베라트롤 투여군에서 SIRT/PGC1- α 의 mRNA 발현 변화를 나타낸 도이다.

도 4b는 대조군과 레스베라트롤 투여군에서 염증성 사이토카인의 발현 변화를 나타낸 도이다.

도 4c는 대조군과 레스베라트롤 투여군에서 TNF- α 및 CD86의 발현 변화를 나타낸 도이다.

도 5는 20개월 암컷 자연 폐경 모델 마우스에서 레스베라트롤 투여에 의한 내장지방내 염증성 대식세포 유입 및 지방세포 크기 변화를 나타낸 도이다.

도 6는 20개월 암컷 자연 폐경 모델 마우스에서 레스베라트롤 투여에 의한 허혈성 뇌중풍의 뇌경색 변화를 나타낸 도이다.

도 6a는 대조군과 레스베라트롤 투여군 마우스의 체중변화를 나타낸 도이다.

도 6b는 대조군과 레스베라트롤 투여군 마우스의 공복시 혈당 변화를 나타낸 도이다.

도 6c는 대조군과 레스베라트롤 투여군의 뇌경색 정도를 나타낸 도이다.

도 6d는 대조군과 레스베라트롤 투여군의 중뇌동맥 결찰시와 재관류시의 뇌혈류변화를 나타낸 도이다.

도 7은 20개월 암컷 자연 폐경 모델 마우스에서 레스베라트롤 투여에 의한 허혈성 뇌중풍의 신경행동학적 변화를 나타낸 도이다.

도 7a는 신경학적 점수를 나타낸 도이다.

도 7b는 wire suspension test 결과를 나타낸 도이다.

도 7c는 grip strength test 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 20개월 암컷 자연 폐경 모델 마우스에서 레스베라트롤 투여에 의한 허혈성 뇌중풍후 뇌 단백질 변화를 나타낸 도이다.

도 8a는 대조군과 레스베라트롤 투여군에서 TNF- α , 클라우딘-5 및 오클루딘 단백질의 발현을 나타낸 도이다.

도 8b는 도 8a의 결과를 정량적으로 나타낸 도이다.

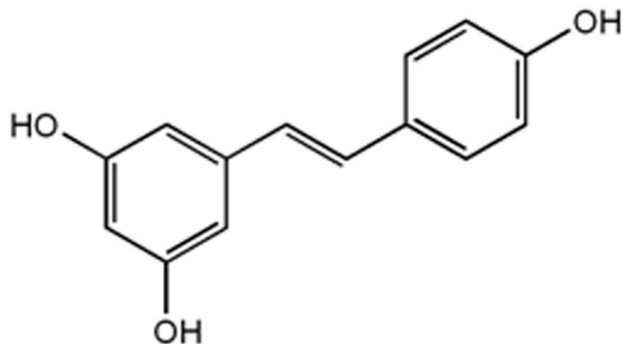
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0021] 본 발명은, 레스베라트롤(resveratrol) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 갱년기 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0022] 상기 레스베라트롤은 하기 화학식 1로 기재되는 것을 특징으로 한다;

화학식 1



[0023]

[0025] 상기 레스베라트롤은 식물에서 분리된 것, 합성된 것 또는 시판되는 것등을 모두 포함한다.

[0026] 상기 레스베라트롤은 여성의 갱년기 질환을 치료하는 것을 특징으로 한다. 상기 갱년기 질환은 폐경 또는 급격한 여성호르몬 감소로 인한 질환으로, 그 증상으로는 우울증, 빈맥, 불안, 안면홍조, 가슴 두근거림, 요실금, 배뇨곤란, 오줌 소태, 재발성 비뇨기계 염증 및 발한 등이 있으며, 여성 호르몬의 급감으로 인한 증상이라면 모두 갱년기 질환에 해당하고 상기 증상에 국한되지 않으나, 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면 여성호르몬 감소로 인한 내장지방 염증 및 허혈성 뇌중풍인 것이 가장 바람직하다.

[0027] 상기 내장지방 염증 및 허혈성 뇌중풍은 염증성 사이토카인 증가가 완화되고, 뇌혈관내피세포 치밀이음부 단백질 발현 감소가 완화됨으로써 예방 및 치료 효과를 가질 수 있다.

[0029] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 20개월령 암컷 마우스에서 혈액 내 에스트로겐이 감소함을 확인하고 이를 자연 폐경 모델 마우스로 이용하였으며(도 1 참조), 상기 자연 폐경 모델 마우스에 레스베라트롤을 경구투여한 결과, 뇌내 노화 현상인 염증성 사이토카인 증가가 완화되고, 뇌혈관내피세포 치밀이음부 단백질 클라우딘-5(claudin-5) 및 오클루딘(occludin)의 발현 감소가 완화되었으며(도 2 내지 도 4 참조), 내장지방에서 염증성 사이토카인 발현이 감소되고, 내장지방 세포 크기가 감소함을 확인하였다(도 4 및 도 5 참조). 또한, 상기 자연 폐경 모델 마우스에 레스베라트롤을 경구 투여로 전처리한 결과, 허혈성 뇌중풍 유도 후, 뇌 경색 정

도가 감소하고, 신경행동학적 손상이 완화되며, 염증성 사이토카인 발현이 감소하고, 치밀이음부 단백질 클라우딘-5 및 오클루딘의 발현 감소를 억제함을 확인함으로써(도 6 내지 도 8 참조), 본 발명의 레스베라트롤은 갱년기 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

[0031] 본 발명은 상기 레스베라트롤뿐만 아니라, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 라세미체, 또는 입체이성질체를 모두 포함한다.

[0032] 본 발명의 레스베라트롤은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설포산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[0033] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 레스베라트롤을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시켜서 건조하거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0034] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0036] 본 발명의 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 레스베라트롤 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 0.1 내지 99.9 중량%를 유효성분으로 함유하고, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.

[0037] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다.

[0038] 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 피부외용 또는 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사 방식을 선택하는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 피부외용으로 사용한다.

[0040] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용

량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0041] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 상기 레스베라트롤 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 양을 기준으로 0.01 내지 2000 mg이고, 바람직하게는 30 내지 500 mg/kg이고, 더욱 바람직하게는 50 내지 300 mg/kg이며, 하루 1 내지 6회 투여될 수 있다.

[0042] 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0044] 또한, 본 발명은, 레스베라트롤(resveratrol) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 갱년기 질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0046] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 20개월령 암컷 마우스에서 혈액 내 에스트로겐이 감소함을 확인하고 이를 자연 폐경 모델 마우스로 이용하였으며(도 1 참조), 상기 자연 폐경 모델 마우스에 레스베라트롤을 경구투여한 결과, 뇌내 노화 현상인 염증성 사이토카인 증가가 완화되고, 치밀이음부 단백질 클라우딘-5(claudin-5) 및 오클루딘(occludin)의 발현 감소가 완화되었으며(도 2 내지 도 4 참조), 내장지방에서 염증성 사이토카인 발현이 감소되고, 내장지방 세포 크기가 감소함을 확인하였다(도 4 및 도 5 참조). 또한, 상기 자연 폐경 모델 마우스에 레스베라트롤을 경구 투여로 전치치한 결과, 허혈성 뇌중풍을 유도한 후 뇌 경색 정도가 감소하고, 신경행동학적 손상이 완화되며, 염증성 사이토카인 발현이 감소하고, 치밀이음부 단백질 클라우딘-5 및 오클루딘의 발현 감소를 억제함을 확인함으로써(도 6 내지 도 8 참조), 본 발명의 레스베라트롤은 갱년기 질환 예방 및 개선용 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

[0048] 본 발명의 건강기능식품은 레스베라트롤 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0049] 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 레스베라트롤 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0050] 본 발명의 건강기능음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 g당 일반적으로 약 0.01 내지 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 내지 0.03 g 이다.

[0051] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 2 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0053] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0054] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0056] <실시예 1> 실험 동물 모델의 준비

[0057] <1-1> 자연 폐경 마우스 모델 확인

[0058] 노화가 진행된 암컷 마우스의 에스트로겐 변화를 측정하여, 자연 폐경 마우스 모델로 이용할 수 있는지 실험하였다.

[0059] 구체적으로, C57BL/6 암컷 마우스 2.5, 18 및 20 개월령을 사용하였으며, 실험동물은 전 실험기간 동안 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하고, 낮밤주기는 12시간(light/dark cycle)으로 조절되는 실험실 환경에서 유지하였다. 마우스의 자연적 폐경 모델을 확인하기 위하여, EIA 키트를 사용하여 혈액 내 에스트로겐을 측정하였다. 본 연구의 모든 실험결과는 평균±표준오차로 표기하였으며, 두 그룹간의 비교는 unpaired Student's t-tests를 사용하여 분석하였고, 두 그룹 이상의 비교는 평균값의 집단 간 비교는 사후 피서의 최소유의차검정(Fisher's least significant difference tests)을 이용하여 ANOVA 단방향 분석으로 수행하였다.

[0060] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 20개월 암컷 마우스에서 혈액 내 에스트로겐이 감소함으로써, 상기 모델이 자연 폐경 모델로 사용될 수 있음을 확인하였다(도 1).

[0062] <1-2> 허혈성 뇌중풍 동물 모델 제작

[0063] 허혈성 뇌중풍 모델에서 레스베라트롤의 효과를 확인하기 위해 상기 실시예 <1-1>에서 확인된 자연 폐경 마우스 모델을 이용하여 허혈성 뇌중풍 모델 마우스를 제작하였다.

[0064] 구체적으로, 20개월의 C57BL/6 암컷 마우스에 산소와 질소 혼합기체(70%/30%)와 1.2% 아이소플루레인(isoflurane)으로 동물을 흡입 마취시켰다. 마우스 오른쪽 두정부(parietal area)의 피부를 절개하고, 정수리점(bregma)에서 뒤로 2mm, 오른쪽으로 5mm 부위 두정골(parietal bone)에 컴퓨터와 연결된 레이저 도플러 뇌혈류 측정기(laser-Doppler flowmeter)의 광섬유 측정소자(fiber optic probe)를 부착시켜 뇌혈류 측정하였다. 그런 다음, 마우스의 앞쪽 경부(anterior neck)의 피부를 절개 후, 오른쪽 외경동맥(ECA, external carotid artery)를 분리하여 폐쇄시키고 오른쪽 내경동맥(ICA, internal carotid artery)에 동맥 절개(arteriotomy)한 부위에 실리콘으로 끝부분이 코팅된 6-0 나일론 봉합사를 삽입하여, 컴퓨터상 정상 뇌혈류의 85% 이상 감소되는 지점인 중뇌동맥(middle cerebral artery)의 시작 부위(origin)까지 진행시킨 후 30분간 유지하였다. 이후 나일론 봉합사를 천천히 꺼내면서 다시 재관류 시키고, 재관류가 80% 이상임을 확인한 후, 절개 부위를 재 봉합하여 마취에서 회복시켰다.

[0066] <실험예 1> 레스베라트롤 투여에 의한 뇌내 노화 변화 감소

[0067] 자연 폐경 모델 마우스에서 레스베라트롤 투여에 의한 뇌내 노화 변화를 염증성 사이토카인 및 치밀이음부 단백질 발현을 측정하여 확인하였다.

[0068] 구체적으로, 20개월령의 C57BL/6 암컷 마우스를 무작위로 대조군(vehicle)과 레스베라트롤 투여군으로 나누었다. 레스베라트롤이 함유되지 않은 0.2% 에탄올을 투여하는 대조군(vehicle, 0.2% ethanol) 및 레스베라트롤 0.1 mg/kg 투여하는 투여군으로 나누어 10일 동안 경구투여 하였다. 그리고나서, 뇌에서 단백질을 추출하여 12% SDS(sodium dodecyl sulfate)-폴리 아크릴아미드 겔에 전기영동한 후 니트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane)으로 옮겨주었다. 분리된 단백질이 옮겨진 막은 항체와의 비특이적인 결합을 막기 위해 TBST 완충액(10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.5% Tween-20)에 10%로 녹인 탈지유(skim milk)로 블라킹(blocking)하고, TNF- α (1:250, Santa Cruz Biotechnology), 클라우딘-5(claudin-5; 1:1000, Invitrogen Corporation), 오클루딘(occludin; 1:1000, Invitrogen Corporation), SIRT1(1:2000, Millipore Corporate), PGC1- α (1:500, Santa Cruz Biotechnology)를 인지하는 1차 항체를 3% BSA (Bovine Serum Albumin) 용액을 이용하여 반응시켰다. 1차 항체를 인지하는 Horseradish peroxidase가 표지된 2차 항체는 TBST 완충액에 5%로 녹인 탈지유에 1:1000의 비율로 희석하여 반응시킨 후 루미놀 시약(luminol reagent)을 사용하여 관찰하였으며, 액틴(actin)으로 발현 정도를 보정하였다.

[0069] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 레스베라트롤 투여군에서 대조군에 비해 노화 현상인 뇌내 염증성 사이토카인 증가가 완화되고, 치밀이음부 단백질인 클라우딘-5 및 오클루딘의 발현 감소가 완화되었으며, 이는 레스베라트롤에 의해 활성화되는 뇌내 SIRT1/PGC1- α 발현 증가와 관련이 있음을 확인하였다(도 2 및 도 3).

[0071] <실험예 2> 레스베라트롤 투여에 의한 내장지방 염증 반응 감소

[0072] <2-1> 레스베라트롤 투여에 의한 내장지방의 단백질 및 mRNA 발현 확인

[0073] 자연 폐경 모델 마우스에서 레스베라트롤 투여에 의한 내장지방 내 염증반응 변화를 염증성 사이토카인 및 발현

단백질을 측정하여 확인하였다.

[0074] 구체적으로, <실험예 1>과 동일한 방법으로 내장지방 내 TNF- α , CD86, SIRT1 및 PGC1- α 의 단백질 발현을 확인하였으며, CD86(1:500, BD Bioscience)를 인지하는 1차 항체를 사용하였다. 또한, 내장지방 조직에서 RNA를 추출하고, cDNA를 합성하여 하기 표 1의 프라이머로 인터루킨-1 β (IL-1 β)와 TNF- α 에 대한 real-time PCR을 수행하였다.

표 1

[0075]

서열 번호	서열
인터루킨-1 β (IL-1 β)-F (서열번호 1)	5'-AATGATCTGTCTTTGAGGCTGAC-3'
인터루킨-1 β (IL-1 β)-R (서열번호 2)	5'-CGAGATGCTGCTGTGAGATTGAAG-3'
TNF- α -F (서열번호 3)	5'-GAACTGGCAGAAGAGGCACTC-3'
TNF- α -R (서열번호 4)	5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACTG-3'

[0077] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 레스베라트롤이 투여된 자연 폐경 모델 마우스에서 대조군에 비해 내장지방 내 인터루킨-1 β 및 TNF- α 의 mRNA 및 TNF- α 단백질 발현이 발현이 감소함을 확인하였다(도 4).

[0079] <2-2> 레스베라트롤 투여에 의한 내장지방 세포 크기 측정

[0080] 자연 폐경 모델 마우스에서 레스베라트롤 투여에 의한 내장지방내 염증세포 감소 및 지방세포 크기 변화를 확인하였다.

[0081] 구체적으로, 마우스 내장지방 조직을 30 μ m 두께로 자른 후, 헤마토실린(hematoxylin)과 에오신(eosin)을 이용하여 염색하였다. 헤마토실린은 세포의 핵 및 기타 산성구조 등의 산선과 만나 청색으로 염색하고, 에오신은 염기성과 만나 세포질 성분 및 아교질을 붉은색으로 염색한다. 염색 후, 무작위로 1024 $\times$ 1024 픽셀 크기에서 각 지방세포의 세포막 사이 간격을 Axiovision LE 프로그램을 이용하여 측정하였다. 또한, 같은 두께의 지방조직을 CD68 항체(1:1000, BD Bioscience)와 반응시켜, FITC 2차 항체로 염색하여 1024 $\times$ 1024 픽셀 크기 내에서 CD68이 염색된 대식세포 수를 정량화하였다.

[0082] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 레스베라트롤이 투여된 자연 폐경 모델 마우스의 내장지방의 세포 크기가 감소하고, 대식세포 유입이 감소함을 확인하였다(도 5).

[0084] <실시예 3> 레스베라트롤 투여에 의한 허혈성 뇌중풍 손상 감소

[0085] <3-1> 레스베라트롤 투여에 의한 허혈성 뇌중풍의 뇌 손상 확인

[0086] 실시예 <1-2>에서 제작된 허혈성 뇌중풍 모델 마우스의 레스베라트롤 투여에 의한 뇌 손상 정도 변화를 뇌경색 크기를 측정 및 분석함으로써 확인하였다.

[0087] 구체적으로, 레스베라트롤 투여는 허혈 유도 7일 전부터 상기 <실험예 1>과 동일하게 수행한 뒤, 마우스를 희생시켜 조심스럽게 뇌를 적출한 후에 뇌를 cryostat을 이용하여 뇌를 600 μ m 간격으로 30 μ m 두께의 관상절편(coronal slices)으로 자른 후, 상기 관상절편을 유리 슬라이드에 4% 포름알데하이드로 고정 후 크레실 바이올렛(cresyl violet)으로 염색하고 커버슬라이드로 덮어 카메라로 각 절편을 촬영하였다. 이미지 J(Image J) 프로그램을 사용하여 뇌경색 부피(크레실 바이올렛으로 염색되지 않은 부위)를 측정하고, 뇌부종을 교정하여 측정값을 산출하였다.

[0088] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 레스베라트롤을 투여한 군에서 뇌경색 정도가 감소하였다(도 6). 대조군과 레스베라트롤 투여군간 뇌혈류변화, 뇌경색 전후 체중 및 공복시 혈당은 유의한 차이가 없었다.

[0090] <3-2> 레스베라트롤 투여에 의한 허혈성 뇌중풍의 신경행동학적 변화 측정

[0091] 상기 실험예 <3-2>에서 레스베라트롤에 의해 허혈성 뇌중풍에서 뇌경색 정도가 감소됨을 확인하였다. 이에, 이와 같은 결과가 신경학적인 행동변화로 도출되는지 확인하였다.

[0092] 구체적으로, 신경학적 행동변화 시험법은 이미 확립된 방법을 사용하였으며, 평가는 신경학적 점수(5점), wire suspension test(5점), grip strength test의 3가지 항목으로 분류하여 실시하였다. Grip strength test는 마우스 앞발로 grid를 잡게 한 후 꼬리를 당겨 앞발이 떨어질 때의 힘을 측정하고 최대값을 기록하였다. 다섯 번 측정하여 평균값을 얻었으며 허혈성 뇌중풍 전의 값을 기본으로 퍼센트 변화로 측정값을 산출하였다. 신경

학적 점수와 wire suspension test는 Mann-Whitney U-test를 사용하여 분석하였으며, 유의성 있는 p값은 < 0.05로 표기하였다.

[0093] 그 결과 도 7에 나타난 바와 같이, 허혈성 뇌중풍 전 실시한 모든 행동 실험에서 두 치료군간 차이가 없었으며, 뇌중풍 후 3일에 측정한 행동실험에서는 wire suspension test에서 레스베라트롤 투여군이 유의하게 차이를 보여주었다(도 7). 즉, 뇌경색 감소가 신경학적 호전과 관련이 있음을 보여주었다.

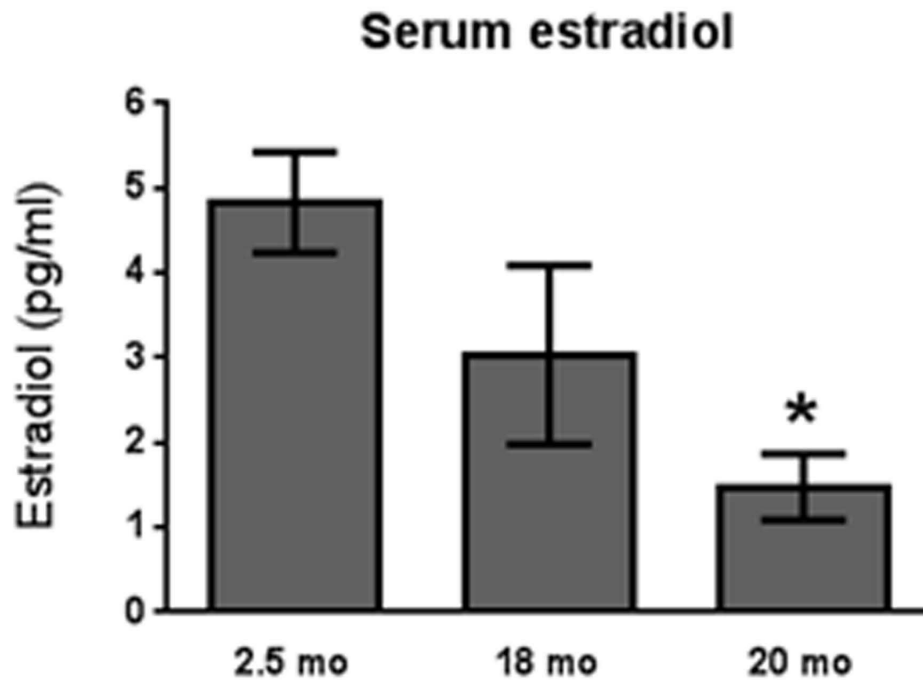
[0095] <3-3> 레스베라트롤 투여에 의한 허혈성 뇌중풍의 단백질 발현 확인

[0096] 상기 실시예 <1-2>의 허혈성 뇌중풍 모델 마우스에서 레스베라트롤 투여에 의한 허혈성 뇌중풍의 염증성 사이토카인 및 발현 단백질을 측정하여 확인하였으며, <실험예 1>과 동일한 방법으로 뇌내 TNF- α , 클라우딘-5 및 오클루딘 단백질 발현을 확인하였다.

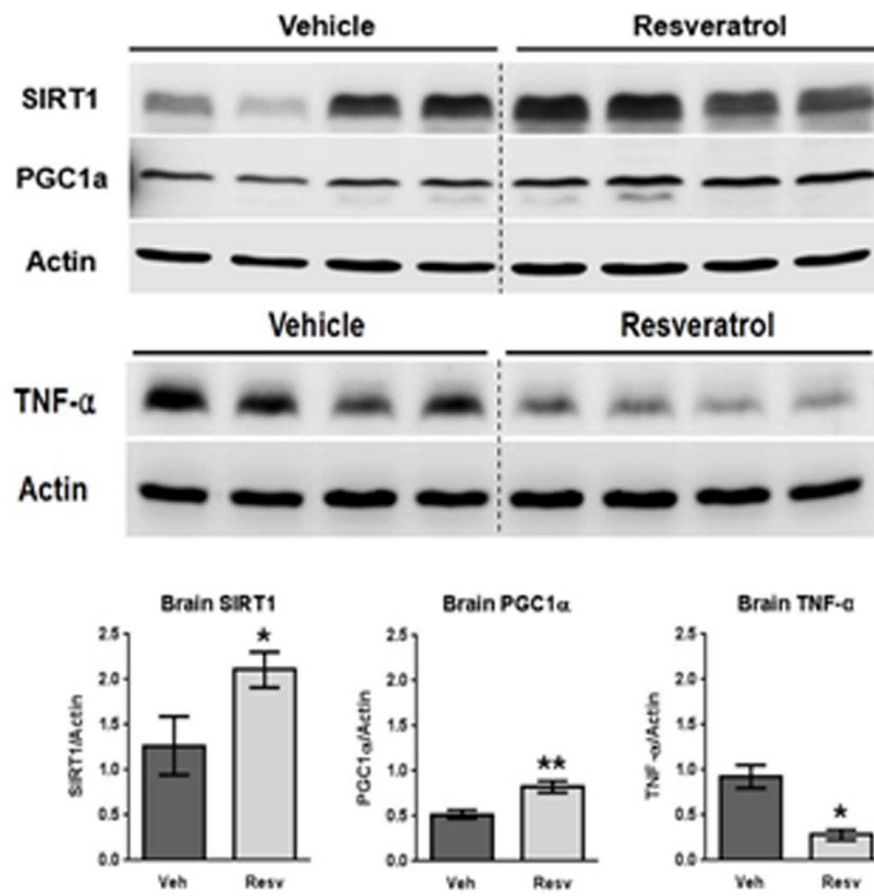
[0097] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 TNF- α 발현이 감소하고, 치밀이음부 단백질은 클라우딘-5, 오클루딘의 발현 감소를 억제하였다(도 8).

도면

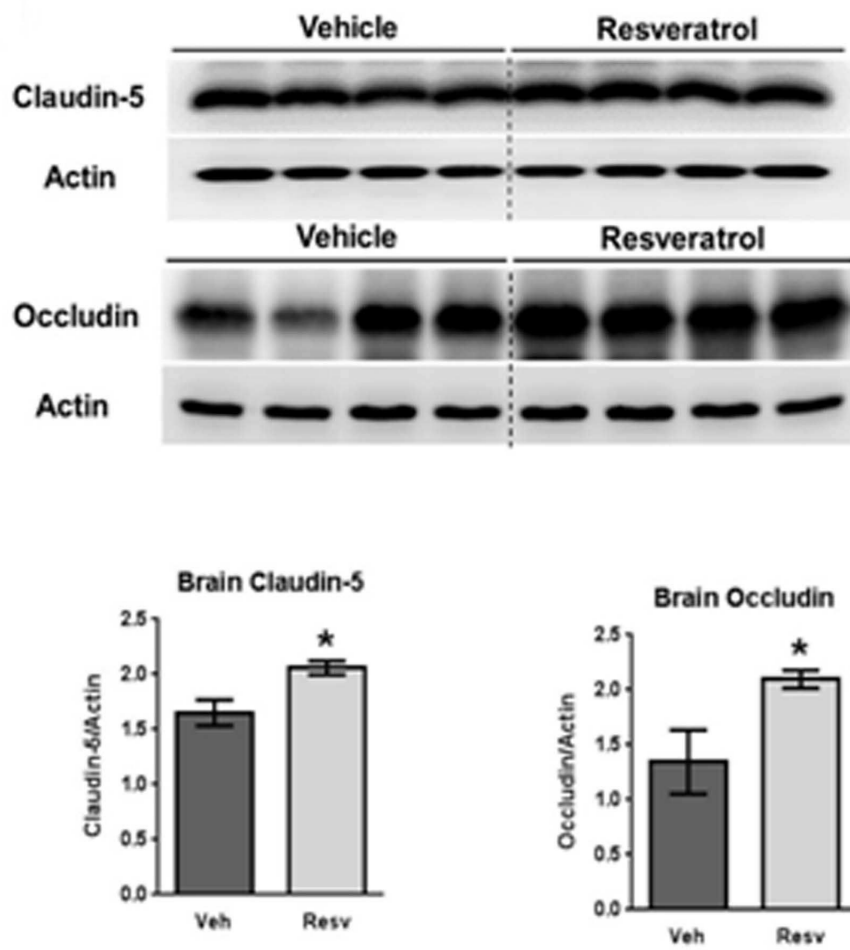
도면1



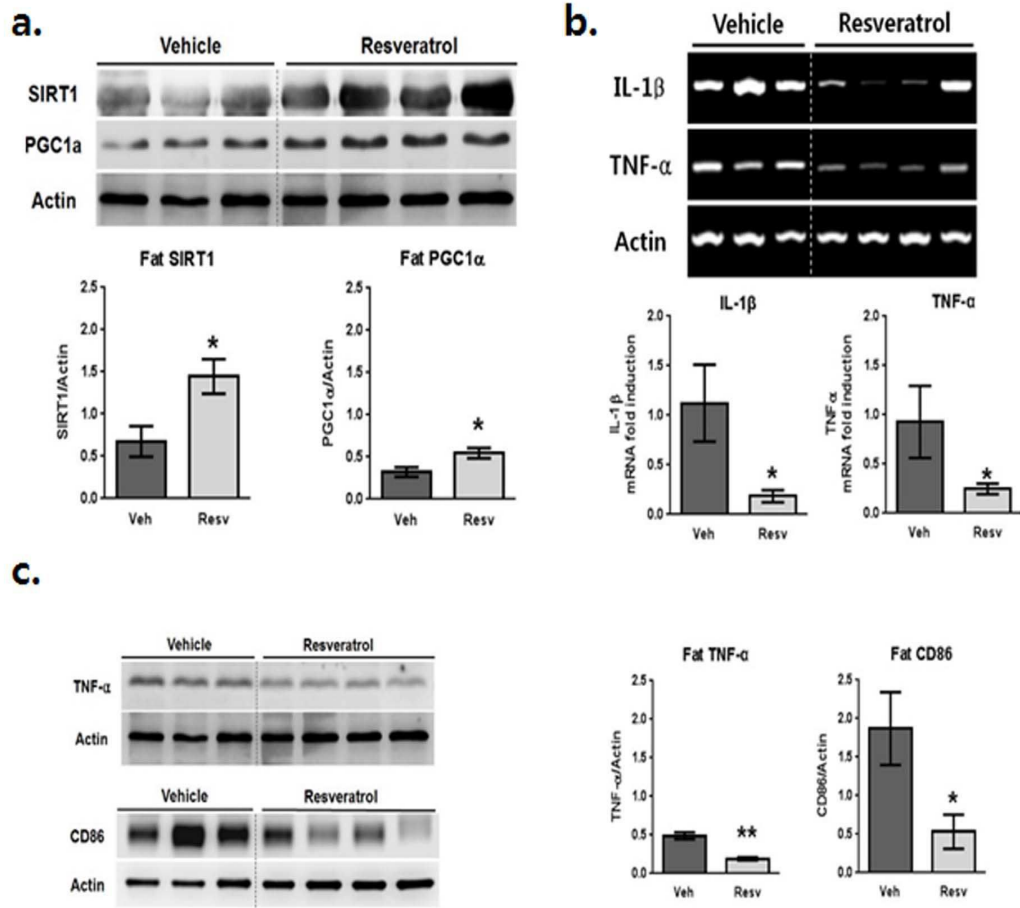
도면2



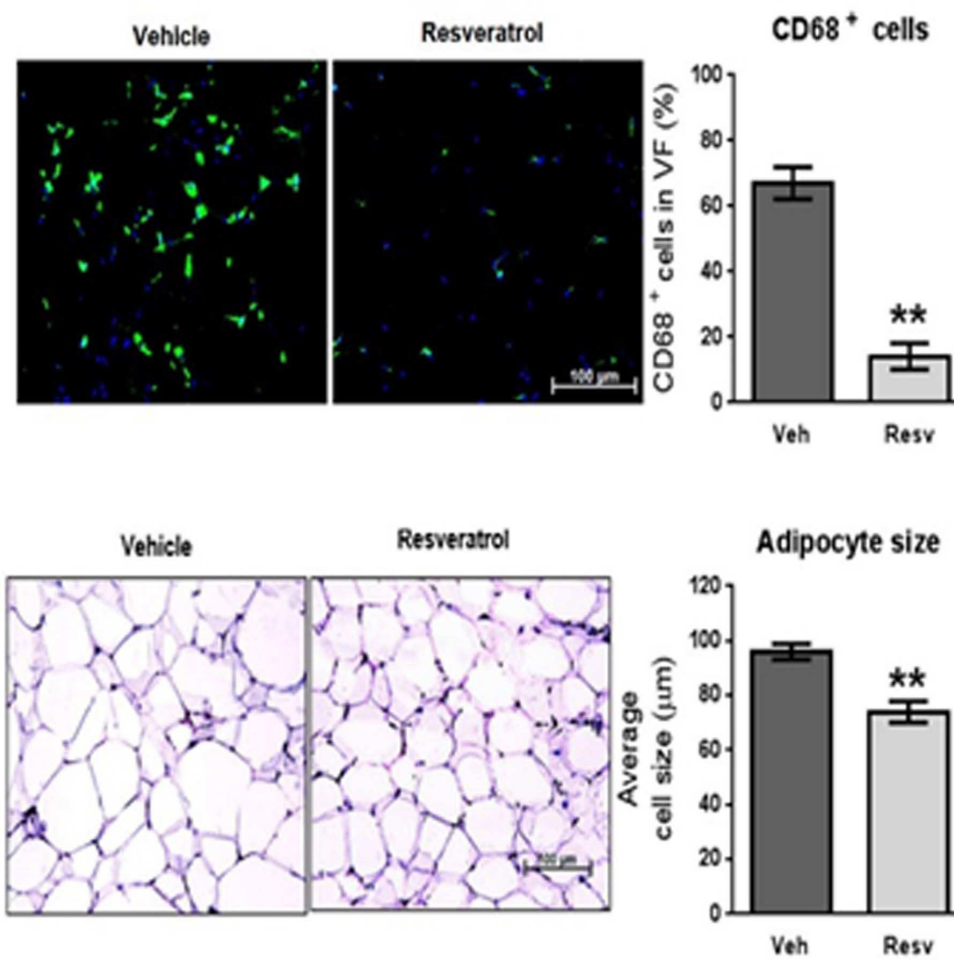
도면3



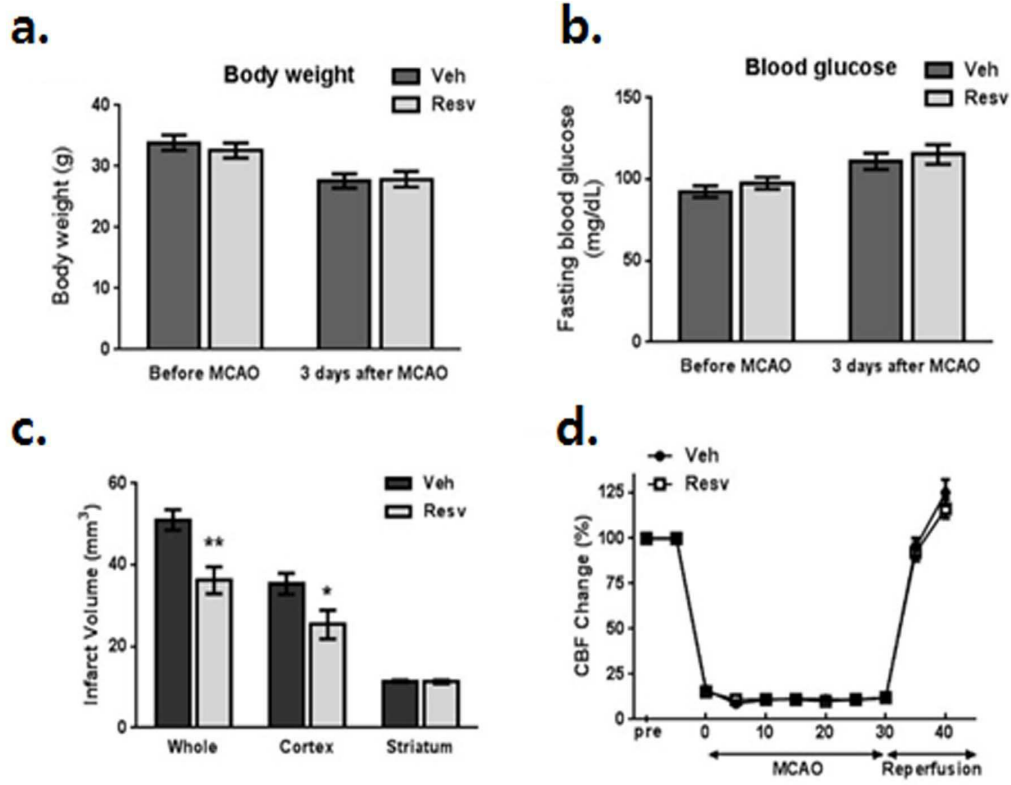
도면4



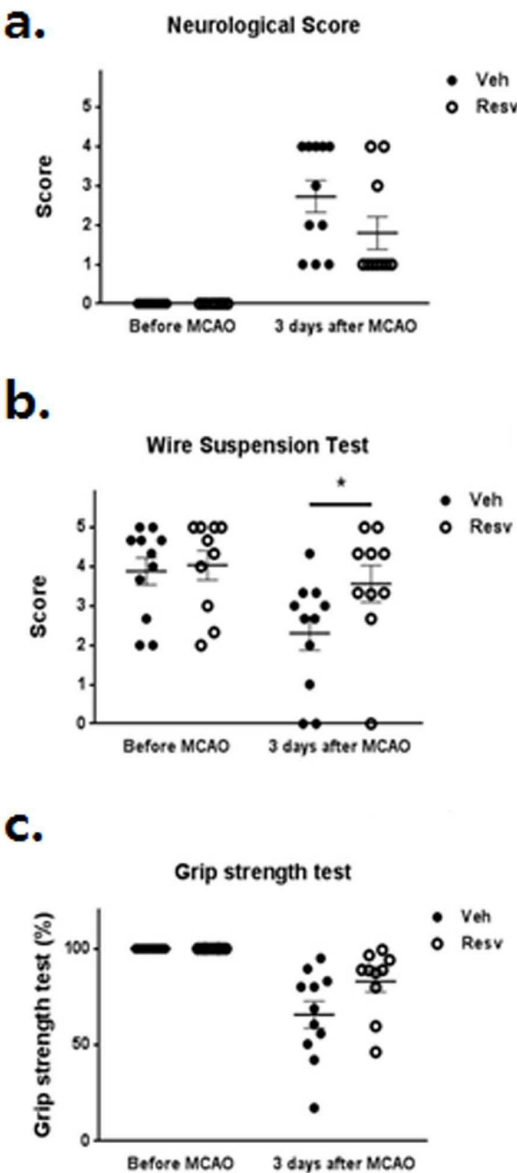
도면5



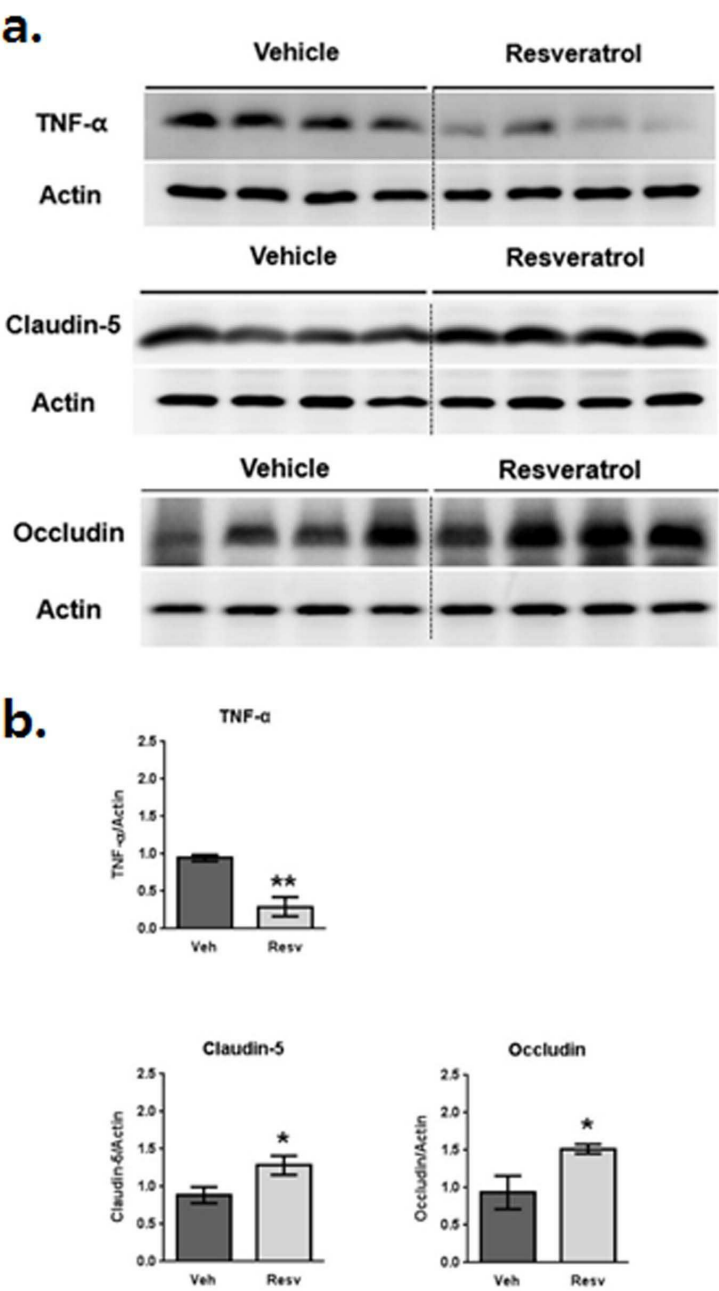
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Pharmaceutical composition for preventing or treating menopausal diseases comprising Resveratrol or pharmaceutically acceptable salts thereof
- <130> 15p-05-044
- <160> 4
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-1beta-F
 <400> 1
 aatgatctgt tctttgaggc tgac 24
 <210> 2
 <211> 25

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-1beta-R
 <400> 2
 cgagatgctg ctgtgagatt tgaag 25
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TNF-alpha-F
 <400> 3
 gaactggcag aagaggcact c 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TNF-alpha-R
 <400> 4
 aggtctctggg ccatagaact g 21