(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0117923
(43) 공개일자 2011년10월28일

(51) Int. Cl.
A61K 36/31 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0037424
(22) 출원일자 2010년04월22일
심사청구일자 2010년04월22일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
부영민
서울특별시 강동구 고덕1동 현대 I-PARK 105-1703
박시형
서울특별시 서대문구 충정로3가 3-297
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

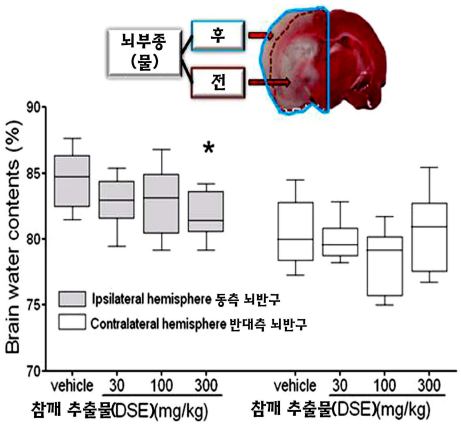
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 참깨 추출물을 유효성분으로 함유하는 뇌부종 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요 약

본 발명은 참깨 추출물을 유효성분으로 함유하는 뇌부종 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 참깨 추출물이 뇌부종 유발 모델에 대하여, 뇌 물 함량을 억제하고, MMP의 활성화로 유발되는 BBB 손상으로 인한 뇌부종이 아닌, 물 채널인 아쿠아포린 4의 과발현에 의한 뇌부종을 아쿠아포린 4의 발현 조절 기능을 통하여 효과적으로 억제함으로써, 뇌부종 치료제 또는 억제제로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김관수

전라남도 목포시 용당동 1199-1 골든하이츠 905호

강철환

경기도 수원시 팔달구 우만동 129-1 현대아파트 1동 403호

김호철

서울특별시 성북구 석관동 10번지 두산아파트 113동 1102호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 109081-3

부처명 농림수산식품기술기획평가원

연구관리전문기관

연구사업명 농림기술개발사업

연구과제명 참깨 고품질 및 1대잡종 다수성 품종개발과 개발품종의 농가보급을 통한 상업화 연구

기여율

주관기관 농림수산식품부

연구기간 2009년 04월 10일 ~ 2012년 04월 09일

특허청구의 범위

청구항 1

참깨 추출물을 유효성분으로 함유하는 뇌부종 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 참깨는 탈지 참깨인 것을 특징으로 하는 뇌부종 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 참깨 추출물은 참깨 건조물을 물, C_1 ~ C_4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것을 특징으로 하는 뇌부종 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 뇌부종 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 뇌부종은 아쿠아포린 4(aquaporin 4)의 과발현에서 기인하는 것을 특징으로 하는 뇌부종 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 뇌부종은 중풍, 뇌경색, 뇌허혈, 뇌종양, 뇌외상 또는 뇌염으로부터 기인하는 것을 특징으로 하는 뇌부종 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

약학적으로 유효한 양의 제 1항의 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌부종 예방 방법.

청구항 8

약학적으로 유효한 양의 제 1항의 조성물을 뇌부종 질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌부종 치료 방법.

청구항 9

참깨 추출물을 유효성분으로 함유하는 뇌부종 예방 또는 개선용 건강기능식품.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 뇌부종 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근에 식품으로서 질병을 예방이나 치료하는 약식동원(藥食同源) 개념을 가지고 기능성 식품에 대한 관심과 이용이 늘어나고 있다. 항산화활성이 매우 높은 리그난 또는 플라보노이드 성분을 다량 함유하고 있는 작물로서 검정쌀(黑米) 및 참깨(胡麻) 등의 기능성이 있는 품종들이 개발되고 있고, 특수용도 작물 또는 기능성 식품으로 이용되고 있다.

[0003] 참깨는 참깨과(Pedaliaceae) 참깨속(Sesamum)의 1년생 초본식물로서 볶은 참깨나 참기름은 우리나라 식단에서 아주 중요한 조미용 양념 및 식용유지로서 사용되고 있다. 약효로는 동맥경화, 고혈압 및 노화 예방 등으로 알려져 왔고, 참깨에는 리그난류 화합물이 다량 함유되어 있어, 항산화 활성을 나타내는 것으로 보고되어 있다. 또한, 쌀, 참깨 등에 함유되어 있는 기능성분(토코페롤, 리그난, 항산화 천연색소 등)은 생체 내에서 산화억제를 통한 노화억제 및 암 예방기능이 있음이 밝혀지고 있다.

[0004] 참깨는 항산화 작용과 더불어 최근에 신경보호 효과 또는 기억력 증진과 같은 뇌기능 증진의 효과가 밝혀지고 있다. 기억력 증진 효과(Kumar et al., 2010), 혈관에서의 항염증 효과(Lee et al., 2009), 참깨 성분인 세사민(sesamin)의 신경보호효과(Khan et al., 2010), 항동맥경화 효과(Visavadiva et al., 2009), 세사민 대사체의 신경세포 분화 효과(Hamada et al., 2009) 등이 보고되었다. 특히, 본 발명자들은 감각 운동 기능 증진 효과, 항산화 기전 및 탈지 참깨의 신경보호 효과를 밝혔다. 상기 신경보호효과는 칼슘증가, 자유기 활성화 및 세포 사멸을 막거나 신경사멸을 저해하는 것을 의미한다(Nils Gunnar Wahlgren and Niaz Ahmed, Cerebrovas Dis 2004;17(supple):153-166).

[0005] 이러한 신경보호의 개념에는 신경학상의 유연성(neurological plasticity)이나 재학습(relearning)으로 인한 신경학적 기능(neurological function)의 회복 또는 뇌부종(extracellular oedema)을 억제하는 것은 포함시키지 않는다. 따라서 현재까지 정립된 신경보호의 기전에서는 뇌부종과 관련된 인자들이 보고된 바 없다. 즉, 신경보호 효과는 뇌부종 억제 효과와는 개념이 다른 경우라고 할 수 있다. 또한, 신경보호제 효과를 가지는 물질의 경우 뇌부종 억제제가 포함되지 않는 것은 이에 대한 또 다른 증거이기도 하다. 이와 같이, 신경보호 효과와 뇌부종 또는 뇌혈관과 관련된 기전에 대한 효과는 뚜렷하게 구별되며, 전세계적으로 신경보호 효과와 뇌부종 연구가 구별되어 진행되고 있는 사실은, 뇌세포 사멸을 억제하는 것과 뇌부종을 억제하는 것은 전혀 다른 방향 또는 다른 분야의 연구라는 것을 알려주고 있다. 그렇기 때문에, 뇌부종 또는 이의 기전에 관한 참깨 추출물의 효과는 아직 명확하게 밝혀지지 않은 상황이다.

[0006] 뇌부종은 중풍, 외상, 종양 및 염증으로 인하여 세포나 조직에 물이 유입되어 뇌조직이 커지는 현상으로서 뇌내 압력을 증가시켜서 뇌손상 부위에 대한 압력이 증가하게 되고 심하면 뇌 탈출(brain herniation)이 발생하여 사망에 이르게 한다. 뇌부종은 혈관의 손상으로 인한 혈액 및 물이 유입되어 초래되고 급격한 부종 형성으로 인하여 이차적인 뇌손상을 유발하는 것으로 알려져 있다. 특이, 이와 관련된 인자는 MMP-2 및 MMP-9이 있다. 상기 MMP2 및 MMP9는 뇌혈관장벽(Blood Brain Barrier, BBB)의 손상을 유발하는 효소로서 뇌 내 세포군들과는 상관없이 혈관 고유의 병리기전을 유도하는 효소들이다. 이들은 현재 rtPA의 부작용을 억제하여 치료 시간을 연장할 목적으로 연구가 진행되고 있는 표적 효소로서 많은 연구들이 진행되고 있다. 뇌부종은 혈관 표적의 연구에서 대체적으로 주목받는 현상으로서, 따라서, 신경세포와는 관련이 적으며, 혈관과 매우 밀접하게 관련되는 병리 기전의 결과물로 인식될 수 있다. 이와 더불어 뇌부종의 연구에서 성상교세포 종족(astrocyte end foot)에 부착된 물 채널(water channel)인 아쿠아포린 4(aquaporin 4)가 뇌신경 관련 기전이 아닌, 새로운 병리기전으로 부각됨에 따라 많은 연구가 진행되고 있다.

[0007] 이전 보고에 의하면 뇌부종으로 유발된 뇌내 압력을 낮추는 것만으로도 50% 정도의 뇌손상을 감소시킬 수 있다고 한다(Gerriets T et al., 2009, Walberer M et al., 2008). 현재까지 뇌부종에 대한 치료법은 삼투압을 이

용한 고삼투압성 용액(hyperosmolar solution), 수술요법인 두개절제술(craniectomy) 및 만니톨(mannitol)과 같은 삼투압 조절제 등이 사용되고 있다(Papadopoulos et al., 2002, Hutchinson et al., 2007). 그러나, 현재 임상에서 뇌부종에 대하여 만니톨 이외에 특별한 치료제가 아직 없고, 혈액 삼투압 조절을 통한 뇌부종 치료술 밖에 없는 현실에서 뇌부종에 효과적인 물질의 발굴이 절실하다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 뇌손상 및 사망률에 밀접한 관련이 있는 뇌부종에 유효한 천연 물질을 개발하기 위하여 연구한 결과, 참깨 추출물이 뇌부종 유발 모델에 대하여 뇌 물 함량을 감소시키고, 물 채널인 아쿠아포린 4(aquaporin 4) 단백질의 발현을 저해하여 뇌부종을 억제하는 활성을 가짐을 확인하였으므로, 상기 참깨 추출물을 뇌부종 치료제 또는 억제제로 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 참깨 추출물을 유효성분으로 함유하는 뇌부종 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 참깨 추출물을 유효성분으로 함유하는 뇌부종 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌부종 예방 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 조성물을 뇌부종 질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌부종 치료 방법을 제공한다.

[0013] 아울러, 본 발명은 참깨 추출물을 유효성분으로 함유하는 뇌부종 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 참깨 추출물은 뇌부종 동물 모델에서 뇌 물 함량을 억제하고 BBB 손상으로 인한 뇌부종이 아닌, 물 채널인 아쿠아포린 4의 과발현에 의한 뇌부종을 아쿠아포린 4의 발현 조절 기능을 통하여 효과적으로 억제하여, 뇌부종에 탁월한 효과가 있으므로 뇌부종의 치료 또는 억제용 약학적 조성물의 유효성분으로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 참깨 추출물의 *in vivo* 뇌부종 유발 모델에서 뇌 물 함량(brain water contents)에 대한 억제 효과를 나타낸 그림이다. 각 결과는 휘스커 박스 플롯(whisker box plots)으로서 나타냈고, 박스는 2575번째 백분위수를 나타내며, 박스를 가로지르는 선은 각 군의 평균을 나타낸다. 각 박스에서 위스커는 가장 낮은 결과값과 가장 높은 결과값을 가리킨다(*; Tukeys test와 ANOVA test 방법으로 운반체 처리된 군과 비교할 경우 $P<0.05$).

도 2는 참깨 추출물의 *in vivo* 뇌부종 유발 모델에서 BBB 손상에 대한 효과를 나타낸 그림이다. 각 결과는 휘스커 박스 플롯(whisker box plots)으로서 나타냈고, 박스는 2575번째 백분위수를 나타내며, 박스를 가로지르는 선은 각 군의 평균을 나타낸다. 각 박스에서 위스커는 가장 낮은 결과값과 가장 높은 결과값을 가리킨다.

도 3은 참깨 추출물의 *in vitro* 자이모그래피(zymography) 분석을 통한 MMP 2 및 9의 억제효과를 나타낸 그림이다.

도 4는 참깨 추출물 300 ㎎/㎏을 투여한 in vivo 뇌부종 유발 모델에서, 유발 후 4시간 및 24시간에 두정엽 피질(parietal cortex)에서의 아쿠아포린 4(aquaporin 4) 발현 억제효과를 면역조직화학적 분석 결과로서 나타낸 그림이다.

도 5는 참깨 추출물 300 ㎎/㎏을 투여한 in vivo 뇌부종 유발 모델에서, 유발 후 4시간 및 24시간에 두정엽 피질(parietal cortex)에서의 아쿠아포린 4(aquaporin 4) 발현 억제효과를 형광염색 결과로서 나타낸 그림이다.

도 6은 아쿠아포린 4와 GFAP(성상교세포 마커)의 공위치(colocalization)를 나타낸 형광염색 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0017] 본 발명은 참깨 추출물을 유효성분으로 함유하는 뇌부종 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 상기 뇌부종은 뇌 외부의 물의 유입을 유도하는 물 채널(water channel)인 아쿠아포린 4(aquaporin 4)의 발현에서 기인하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0019] 상기 뇌부종은 중풍, 뇌경색, 뇌허혈, 뇌종양, 뇌외상 또는 뇌염으로부터 기인하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않고, 뇌부종을 유발하는 임의의 질환에 의해 발생하는 뇌부종은 모두 가능하다.

[0020] 상기 참깨 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[0021] 1) 참깨에 n-헥산(n-hexane)을 가하여 기름성분을 제거하는 단계;

[0022] 2) 단계 1)에서 제조한 탈지 참깨에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0023] 3) 단계 2)의 추출물을 식힌 후 여과하는 단계; 및

[0024] 4) 단계 3)의 여과한 추출물을 감압농축한 후 건조하는 단계.

[0025] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 참깨는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 일반적으로 참깨의 기름 성분은 물에 용해되기 어려우나, 상기 단계 1)에서 제조한 탈지 참깨는 물에 대한 용해도가 높다는 장점이 있다.

[0026] 상기 추출용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 알코올로는 C_1 내지 C_4 저급 알코올을 이용하는 것이 바람직하고, 저급 알코올로는 메탄올 또는 에탄올을 이용하는 것이 바람직하며, 80% 메탄올 수용액인 것이 더욱 바람직하다. 추출방법으로는 진탕추출, Soxhlet 추출 또는 환류추출을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출용매를 건조된 탈지 참깨 분량에 2 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하다. 추출온도는 20 내지 50℃인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 10 내지 48시간인 것이 바람직하며, 24시간이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 아울러, 추출 회수는 3 내지 5회인 것이 바람직하며, 3회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 상기 방법에 있어서, 단계 4)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0028] 본 발명자들은 참깨 추출물의 뇌부종에 대한 효과를 알아보기 위하여, 참깨 메탄올 추출물 투여 모델의 뇌 물 함량(brain water contents)의 변화를 측정함으로써 억제 효과를 확인하고자 하였다. 뇌부종 유발 모델로부터 뇌를 적출하여 완전히 건조시킨 후, 건조 전후의 무게를 비교하여 물의 함량을 측정하는 방법을 이용하였다. 상기 방법은 각 생체 기관의 부종을 측정하는데 주로 사용되는 방법이다. 그 결과, 참깨 추출물을 투여한 군에서 뇌 물 함량이 현저하게 감소되었음을 확인하였다(도 1 참조).

[0029] 본 발명자들은 참깨 추출물이 뇌부종의 기전에 대한 영향을 알아보기 위하여, BBB 손상 및 물 채널인 아쿠아포린 4(aquaporin 4)의 발현을 확인하고자 하였다. 뇌부종의 기전 중 하나인 BBB의 손상은, 에반 블루(evans blue, EB)를 정맥주사하여 BBB 손상에 의해 뇌실질 내로 들어가는 EB의 함량을 측정함으로써 확인하였다. 그

결과, 에반 블루 유출량은 참깨 추출물 투여군과 대조군 사이에 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다(도 2 참조). 또한, 뇌부종 기전 연구로서 뇌부종과 관련된 단백질 수종을 분석하여 참깨 추출물의 항뇌부종의 기전이 확인하고자 하였다. 특히, BBB 손상에 직접적인 손상을 주는 MMP2 및 9의 활성을 측정하는 방법으로서 시험관 내(in vitro) 자이모그래피(zymography)를 실시하였다. 그 결과, MMP2 및 9의 활성은 참깨 추출물 투여군과 대조군 사이에 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다(도 3 참조). 이에, 참깨 추출물은 MMP 2 및 9의 활성에 대한 효과가 없는 것으로 확인됨에 따라, 참깨 추출물 투여에 의한 뇌 물 함량의 감소는 BBB 손상에 의한 효과로부터 비롯된 것이 아님을 알 수 있었다.

[0030] 본 발명자들은 BBB 손상 이외의 뇌부종 기전에 대해 알아보고자, 물 채널인 아쿠아포린 4(aquaporin 4)의 발현 증가로 인해 뇌부종이 유발되는 기전을 바탕으로, 생체 내(in vivo)에서 아쿠아포린 4 단백질에 대한 발현을 면역조직화학 분석을 통하여 확인하였다. 그 결과, 참깨 추출물 투여군은 대조군에 비해 현저하게 아쿠아포린 4의 발현을 억제하는 것으로 나타났고, 이를 통해 참깨 추출물이 아쿠아포린 4의 발현을 저해하는 기전을 통하여 뇌부종을 억제하고 있음을 알 수 있었다(도 4 내지 도 6 참조).

[0031] 따라서, 참깨 추출물은 뇌 세포나 조직에 물의 유입에 의해 커지는 뇌부종에 대하여, 뇌 물 함량을 억제하고 아쿠아포린 4의 발현을 저해하여 아쿠아포린 4의 과발현 기전에 의한 뇌부종을 효과적으로 억제함을 확인하였으므로, 뇌부종 치료 또는 억제용 약학적 조성물의 유효성분으로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0032]

[0033] 본 발명의 조성물은 총 중량에 대하여 상기 참깨 추출물을 0.1 내지 50 중량부인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 참깨 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 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, 동결건조제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0036] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[0037] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 참깨 추출물의 양을 기준으로 0.0001 내지 100 ㎎/㎏이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 ㎎/㎏이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.

[0038] 본 발명의 조성물은 뇌부종의 치료 또는 억제를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 참깨 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌부종 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0040] 상기 약학적으로 유효한 양이란 0.0001 내지 100 ㎎/㎏이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 ㎎/㎏이며, 이에 제한되는 것은 아니다. 투여량은 특정 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여기간, 투여방법, 제거율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0041] 상기 개체는 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 그보다 바람직하게는 쥐, 토끼, 기니아피크, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다.

[0042] 상기 투여 방법은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사, 자궁내 경막 주사, 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0043] 상기 뇌부종은 뇌 외부의 물의 유입을 유도하는 물 채널(water channel)인 아쿠아포린 4(aquaporin 4)의 발현에서 기인하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0044] 상기 뇌부종은 중풍, 뇌경색, 뇌허혈, 뇌종양, 뇌외상 또는 뇌염으로부터 기인하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않고, 뇌부종을 유발하는 임의의 질환에 의해 발생하는 뇌부종은 모두 가능하다.

[0045] 참깨 추출물은 뇌부종에 대하여 뇌 물 함량을 억제하고 아쿠아포린 4의 발현 조절 기능을 통하여 아쿠아포린 4의 과발현 기전에 의한 뇌부종을 효과적으로 억제함을 확인하였으므로, 뇌부종 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0046] 아울러, 본 발명은 참깨 추출물을 유효성분으로 함유하는 뇌부종 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0047] 상기 뇌부종은 뇌 외부의 물의 유입을 유도하는 물 채널(water channel)인 아쿠아포린 4(aquaporin 4)의 발현에서 기인하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0048] 상기 뇌부종은 중풍, 뇌경색, 뇌허혈, 뇌종양, 뇌외상 또는 뇌염으로부터 기인하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않고, 뇌부종을 유발하는 임의의 질환에 의해 발생하는 뇌부종은 모두 가능하다.

[0049] 본 발명의 참깨 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0050] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 참깨 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0051] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 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 ㎖당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

[0052] 상기 외에 본 발명의 참깨 추출물은 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 본 발명의 참깨 추출물은 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 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0053] 참깨 추출물은 뇌부종에 대하여 뇌 물 함량을 억제하고 아쿠아포린 4의 발현 조절 기능을 통하여 아쿠아포린 4의 과발현 기전에 의한 뇌부종을 효과적으로 억제함을 확인하였으므로, 뇌부종 치료 또는 개선용 건강기능식품

에 유용하게 사용될 수 있다.

[0054] 이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의하여 상세히 설명한다.

[0055] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0056] **<실시예 1> 참깨 추출물의 제조**

[0057] **<1-1> 참깨 메탄올 추출물**

[0058] 참깨(*Sesamum indicum L.*) 500 g을 분쇄하여 1 ℓ의 n-헥산(n-hexane)으로 3회 추출하여 기름성분을 제거된 참깨 분말 250 g을 수득하였다. 상기 탈지 참깨 분말을 1 ℓ의 80%(v/v) 메탄올 수용액으로 추출하여 참깨 추출물(DSE) 35 g을 수득하였다.

[0059] **<1-2> 참깨 에탄올 추출물**

[0060] 상기 실시예 <1-1>에서 제조한 참깨 메탄올 추출물 제조방법에 따라 참깨 에탄올 추출물을 제조하였다. 이때, 탈지 참깨 시료에 80% 메탄올 수용액 대신에 80& 에탄올 수용액을 사용하여 참깨 에탄올 추출물 32 g을 수득하였다.

[0061] **<1-3> 참깨 물 추출물**

[0062] 상기 실시예 <1-1>에서 제조한 참깨 메탄올 추출물 제조방법에 따라 참깨 물 추출물을 제조하였다. 이때, 탈지 참깨 시료에 80% 메탄올 수용액 대신에 물을 사용하여 참깨 물 추출물 29 g을 수득하였다.

[0063] **<실시예 2> *in vivo* 중풍 모델에 대한 항뇌부종 효과**

[0064] **<2-1> 중풍 동물 모델의 제조**

[0065] 동물 모델로서 뇌 자체에 대한 물리적인 손상 없이 뇌혈관을 폐쇄하는 중대뇌동맥 폐쇄(Middle cerebral artery occlusion, MCAo) 흰쥐(샘타코, 295~305 g) 모델을 사용하였다. 120분 동안 중대뇌동맥을 폐쇄하였고 24시간 동안 재관류하는 모델을 이용하였다.

[0066] **<2-2> 뇌 물 함량(brain water contents)의 억제 효과**

[0067] 참깨 메탄올 추출물(30, 100 또는 300 ㎎/㎏)의 투여는 중풍 유발 직후 및 재관류시(중대뇌동맥 폐쇄 0분 및 120분) 1차 증류수에 용해하여 경구투여하였다. 상기 중풍 모델에서 중풍 유발 후 24시간에 뇌를 적출하여 손상 반구와 비손상 반구로 나누어 뇌교(Pons), 후구(olfactory bulb)(정수리점(bregma) -2 내지 +10)를 제거하고 건조하기 전의 중량(wet weight)을 저울로 측정하였다. 그 후 105℃에서 24시간 동안 건조시킨 후, 건조 중량(dry wegiht)을 측정하였다. 뇌 물 함량은 건조 전 중량 대비 건조 중량과의 차이에 대한 비율(%)로 계산하였다.

[0068] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 비손상 뇌반구의 뇌 물 함량의 경우 각 군간의 차이가 없었다. 동일한 조건에서 참깨 메탄올 추출물을 투여한 경우 용량 의존적인 손상 뇌반구 (ipsilateral hemisphere)의 뇌 물 함량이 감소한 것을 확인하였고, 특히 참깨 추출물 300 ㎎/㎏ 투여군에서 통계적으로 유의한 결과를 나타냈다(도 1).

[0069] **<2-3> 혈액뇌장벽(blood brain barrier, BBB)에 대한 효과**

[0070] 상기 실시예 <2-1>의 중풍 동물 모델에 실시예 <2-2>에서와 같이, 참깨 메탄올 추출물 300 ㎎/㎏을 투여하고,

중풍 유발한 후 22시간 뒤에, 에반 블루 염료(Evans blue dye)(4%)를 4 ㎖/kg의 용량으로 정맥 주사하였다. 정맥 주사 후 2시간 동안 전신으로 순환되기를 기다린 후, 쥐를 마취시키고 인산염완충용액(phosphate buffered saline, PBS)을 이용하여 푸른 염색용액이 제거되고 투명한 용액이 될 때까지 관류(perfusion)를 실시하였다. 그 후 뇌를 적출하여 좌우반구로 분리하고 각각의 무게를 측정하였다. 105℃에서 24시간 건조시킨 후, 건조 중량 대비 20배의 포름아데히드(formaldehyde)를 첨가하여 호모게나이져로 균질화하였다. 균질화한 후 60℃의 배양기에서 18시간 동안 배양 한 후 14000 rpm으로 30분간 원심분리하였다. 상층액을 610 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 표준용액은 에반 블루를 이용하여 용량별로 측정하였다. 데이터는 건조 조직 1 g 당 에반 블루의 ㎍으로 계산하여 산출하였다.

[0071] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 참깨 메탄올 추출물 투여군은 대조군과 비교하여 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서, 참깨 추출물은 BBB 손상에 대한 보호 효과와는 관련이 없음을 알 수 있었다(도 2).

[0072] **<실시예 3> *In vivo* 중풍 모델에서 항뇌부종 기전 확인**

[0073] **<3-1> 매트릭스 메탈로프로테나제 2 및 9(Matrix metaloproteinase 2 및 9) 활성에 대한 억제효과**

[0074] BBB 손상에 직접적으로 영향을 주는 효소인 MMP 2 및 9에 대한 참깨 추출물의 효과를 확인하기 위하여 시험관내(*in vitro*) 자이모그래피(zymography)를 실시하였다. 0.75 ㎜ 두께의 2 ㎎/㎖ 농도로 젤라틴(gelatin)을 함유한 7.5% SDS-PAGE를 이용하였다. MMP2 및 9를 레인(lane)에 각각 6 및 0.6 ng을 로딩하여 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후, 겔(gel)을 꺼내어 20분간 2.5% 트리톤 X-100(Triton X-100)으로 3회 세척하였다. 그런 다음, 상기 겔을 시료(0, 1, 10, 100 및 1000 ㎍/㎖)가 용해된 배양 완충용액(incubation buffer)(0.01 M $CaCl_2$, 0.2 M NaCl 및 0.05% NaN_3가 함유된 0.05 M TrisHCl[Invitrogen, Carlsbad, CA], pH 7.5)에 넣고 37℃에서 20시간 동안 배양하였다. 배양 후 상기 겔을 0.05% 쿠마시 블릴리언트 블루 G-250/25% 메탄올(Coomassie brilliant blue G-250/25% methanol) 및 10% 아세트산에 2시간 동안 담궈 염색하였고, 4% 메탄올 및 8% 아세트산으로 1시간 동안 탈색하였다. 탈색 후 나타난 밴드는 스캔한 후 그래픽 분석프로그램으로 분석하였다.

[0075] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 참깨 메탄올 추출물 투여군은 대조군과 비교하여 유사한 결과를 나타냈다(도 3).

[0076] **<3-2> 아쿠아포린 4(Aquapoin 4) 발현 억제**

[0077] 상기 실시예 <3-1>에서 확인한 바와 같이, BBB 손상으로 인한 뇌부종에 대해 참깨 추출물의 효과가 미약함을 확인한 후, 최근에, 부종에 있어서 물 채널로서 중요한 부종의 기전으로 인식되고 있는 아쿠아포린 4(Aquaporin 4)에 대해 확인하고자 하였다. 구체적으로, 상기 실시예 <2-1>의 동물 모델을 제작하여 중풍 유발 후 4시간 및 24시간에, 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)를 사용하여 심장 관통(cardiac function)을 통해 관류 고정하였다. 고정 후 40 ㎛ 두께의 슬라이스를 제작하였다. 뇌 슬라이스를 이용하여 1차 항체인 아쿠아포린 4 항체(1:500)와 GFAP(1:500)를 이용하여 배양한 후 2차 항체와 반응시켰다. 반응 후 ABC 키트를 이용하여 배양 및 증폭시킨 후 DAB 반응을 이용하여 발색시켰다. 발색 후 커버글라스를 마운팅(mounting)하였고 현미경으로 관찰하였다.

[0078] 그 결과, 도 4 내지 도 6에 나타낸 바와 같이, 중풍 유발 후 4시간 및 24시간에 관찰한, 참깨 메탄올 추출물의 투여에 따른 아쿠아포린 4의 발현에 있어서, 중풍 유발 후 4시간 뒤에는 억제되었고 24시간 뒤에는 유지되는 효과를 보였다. 4시간 뒤에 관찰한 아쿠아포린 4의 발현은 대조군이 샴(sham)군에 비해 증가된 발현을 보였고, 참깨 메탄올 추출물 투여군의 경우 그 발현이 억제되는 것이 관찰되었다. 24시간 뒤에 관찰한 경우에 대조군의 경우 분산된 양상을 보인 반면 참깨 메탄올 추출물 투여군에서는 혈관의 모양이 그대로 유지되면서 대조군에 비해 덜 분산된 양상을 나타냈다(도 4). 형광염색을 통하여, 아쿠아포린 4의 발현 양상 및 참깨 메탄올 추출물 투여군의 아쿠아포린 4 발현에 대한 효과를 보다 확실하게 확인할 수 있었다(도 5). 발현에 있어서, 성상교세포(astrocyte) 마커인 GFAP와 동시 염색한 결과, 중풍 유발 후 4시간 뒤에는 성상교세포가 혈관 주위에서 정상적인 상태로 존재하는 반면, 24시간 뒤의 발현에서는 성상교세포가 비대한 상태로 혈관 주위에 많은 수가 모여 있는 것이 관찰되었다. 이는 아쿠아포린 4의 발현이 성상교세포와 관련 있으며 성상교세포의 비대함이 이에 대한 반증으로 확인할 수 있었다(도 6).

[0079] **<제조예 1> 약학적 제제의 제조**

[0080] **<1-1> 산제의 제조**

[0081] 실시예 <1-2>의 추출물 2 g

[0082] 유당 1 g

[0083] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0084] **<1-2> 정제의 제조**

[0085] 실시예 <1-2>의 추출물 100 mg

[0086] 옥수수전분 100 mg

[0087] 유 당 100 mg

[0088] 스테아린산 마그네 2 mg

[0089] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0090] **<1-3> 캡슐제의 제조**

[0091] 실시예 <1-3>의 추출물 100 mg

[0092] 옥수수전분 100 mg

[0093] 유 당 100 mg

[0094] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0095] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0096] **<1-4> 환의 제조**

[0097] 실시예 <1-3>의 추출물 1 g

[0098] 유당 1.5 g

[0099] 글리세린 1 g

[0100] 자일리톨 0.5 g

[0101] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0102] **<1-5> 과립의 제조**

[0103] 실시예 <1-3>의 추출물 150 mg

[0104] 대두추출물 50 mg

[0105] 포도당 200 mg

[0106] 전분 600 mg

[0107] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60 ℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충진하였다.

[0108] **<제조예 2> 식품의 제조**

[0109] 본 발명의 참깨 추출물을 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.

[0110] **<2-1> 밀가루 식품의 제조**

[0111] 본 발명의 실시예 <1-2>의 추출물 0.5~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

[0112] **<2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조**

[0113] 본 발명의 실시예 <1-2>의 추출물 0.1~5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0114] **<2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조**

[0115] 본 발명의 실시예 <1-2>의 추출물 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

[0116] **<2-4> 유제품(dairy products)의 제조**

[0117] 본 발명의 실시예 <1-3>의 추출물 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0118] **<2-5> 선식의 제조**

[0119] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0120] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0121] 본 발명의 실시예 <1-3>의 추출물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0122] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 실시예 <1-3>의 추출물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0123] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0124] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0125] 실시예 <1-3>의 추출물(3 중량부),

[0126] 영지(0.5 중량부),

[0127] 지황(0.5 중량부)

[0128] **<제조예 3> 음료의 제조**

[0129] **<3-1> 건강음료의 제조**

[0130] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 실시예 <1-2>의 추출물 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[0131] **<3-2> 야채 주스의 제조**

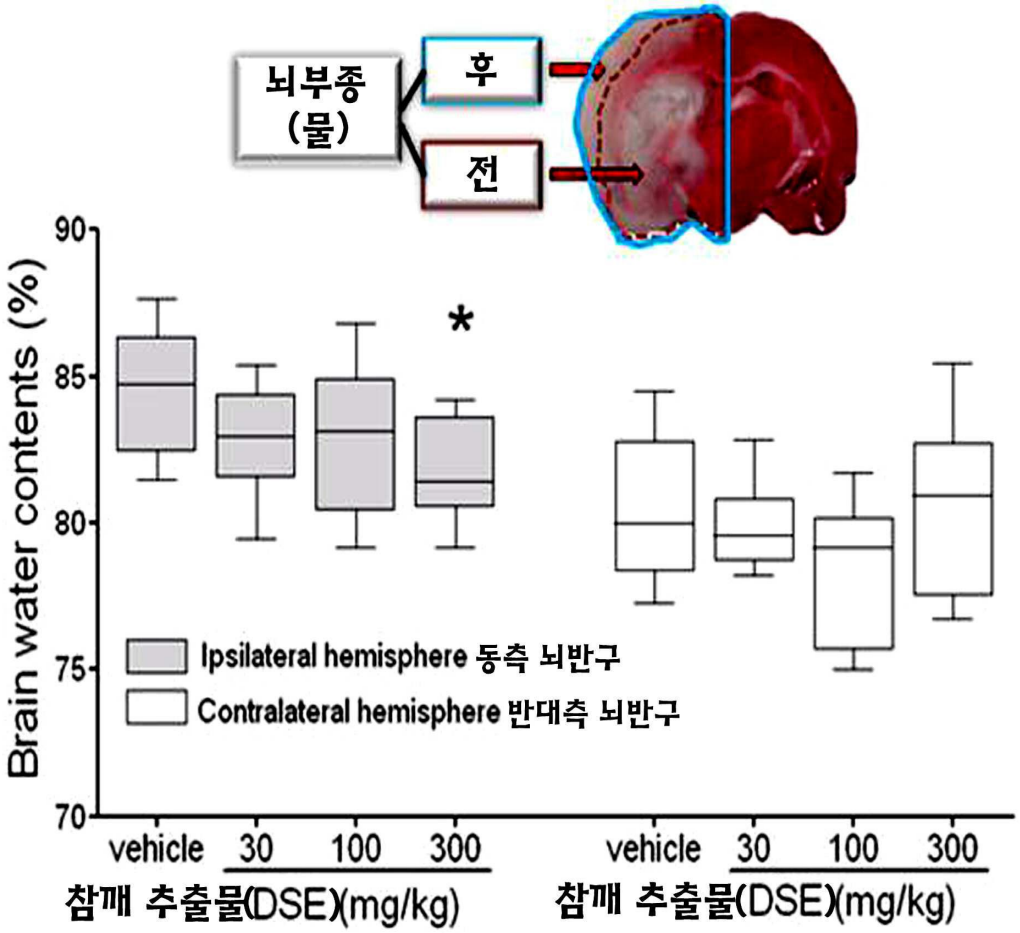
[0132] 본 발명의 실시예 <1-2>의 추출물 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ㎖에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

[0133] **<3-3> 과일 주스의 제조**

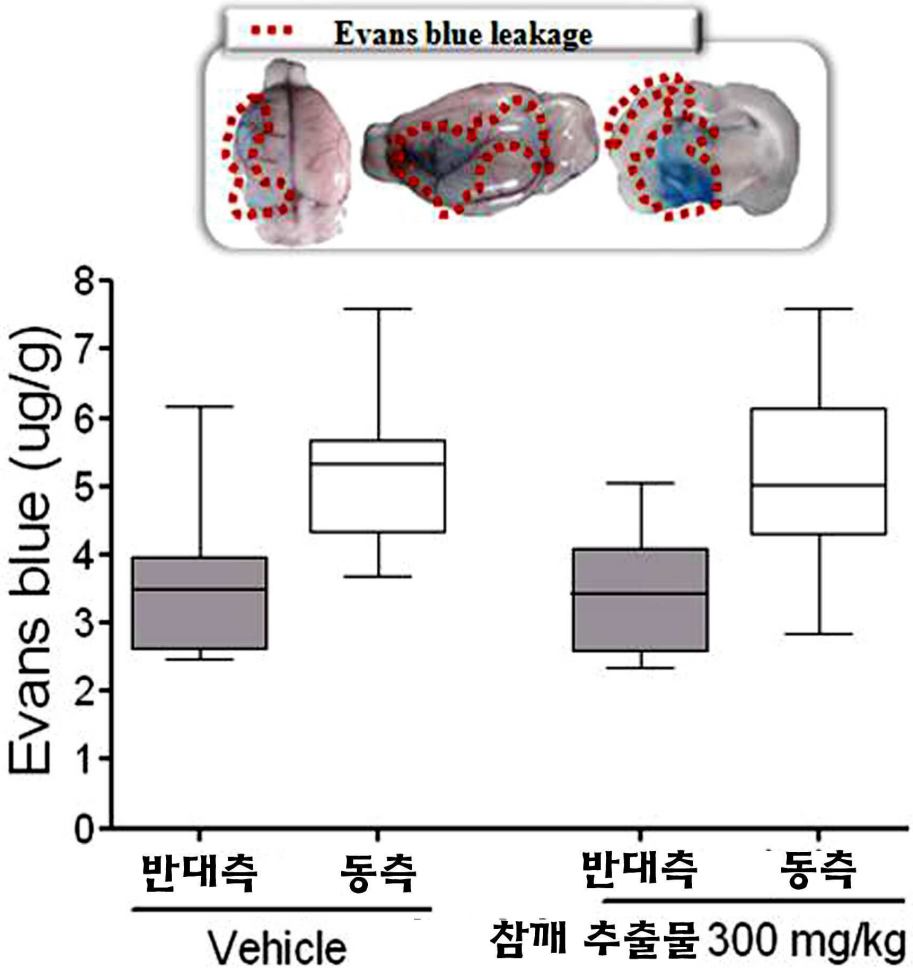
[0134] 본 발명의 실시예 <1-2>의 추출물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ㎖ 에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

도면

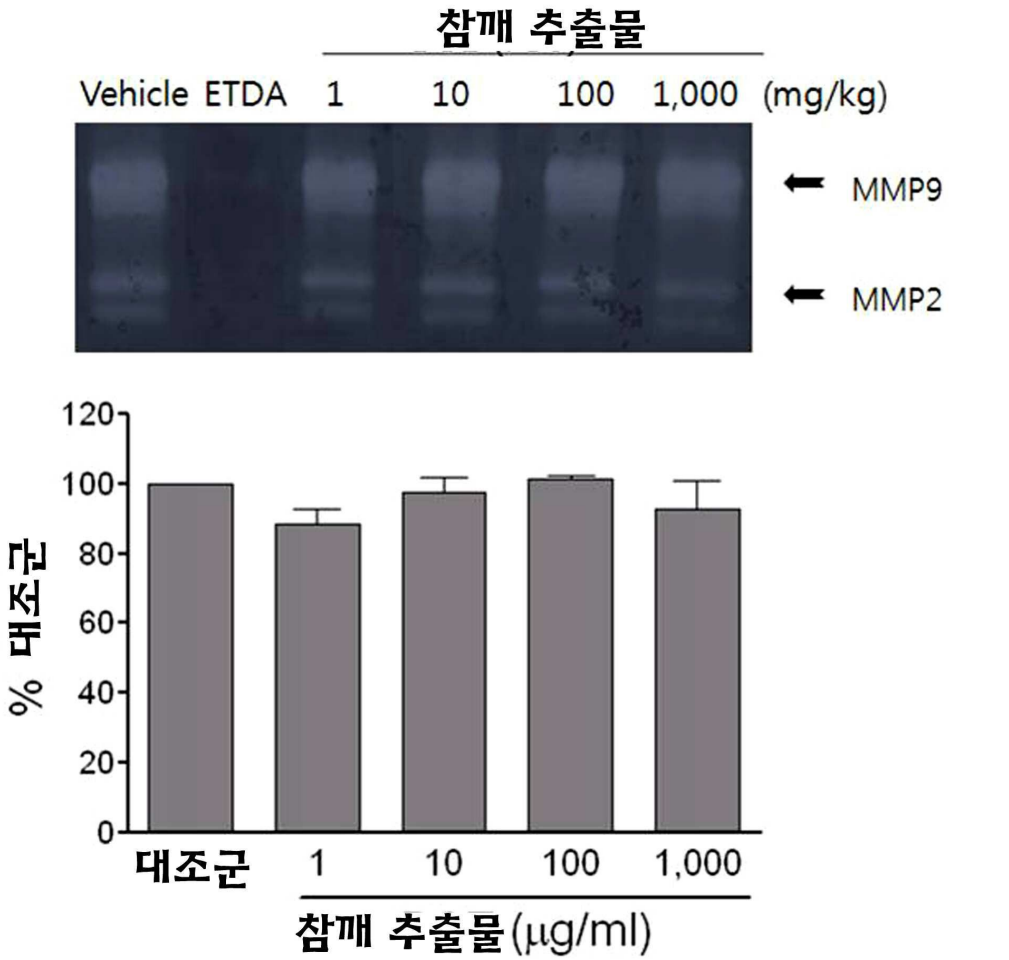
도면1



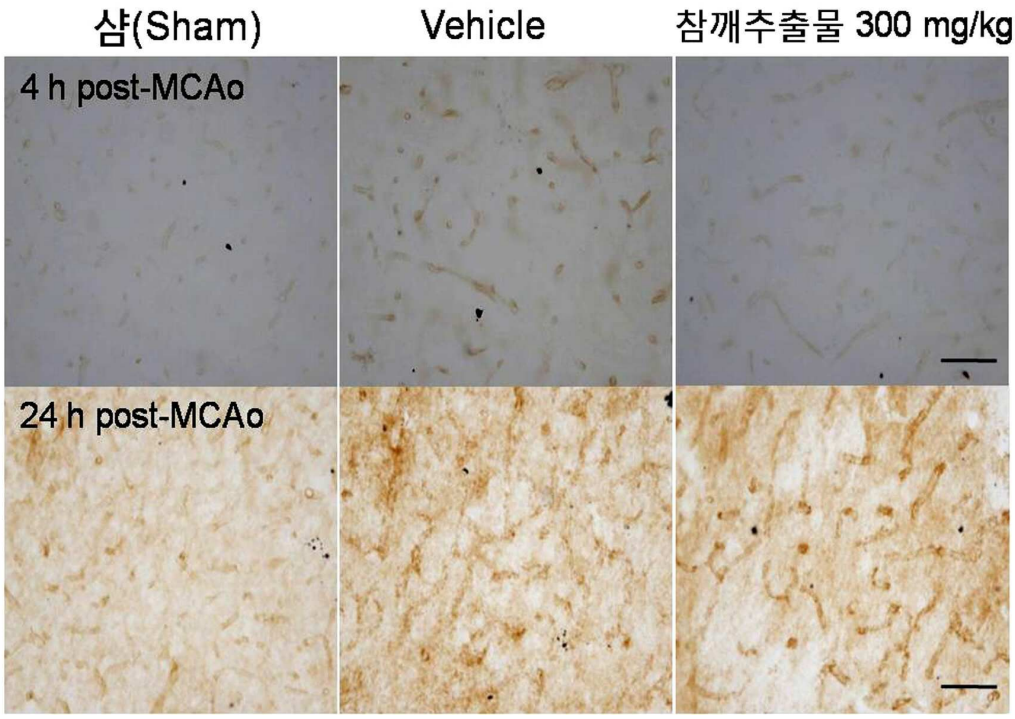
도면2


Evans blue leakage
Evans blue (ug/g)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
반대측
동측
반대측
동측
Vehicle
참깨 추출물 300 mg/kg

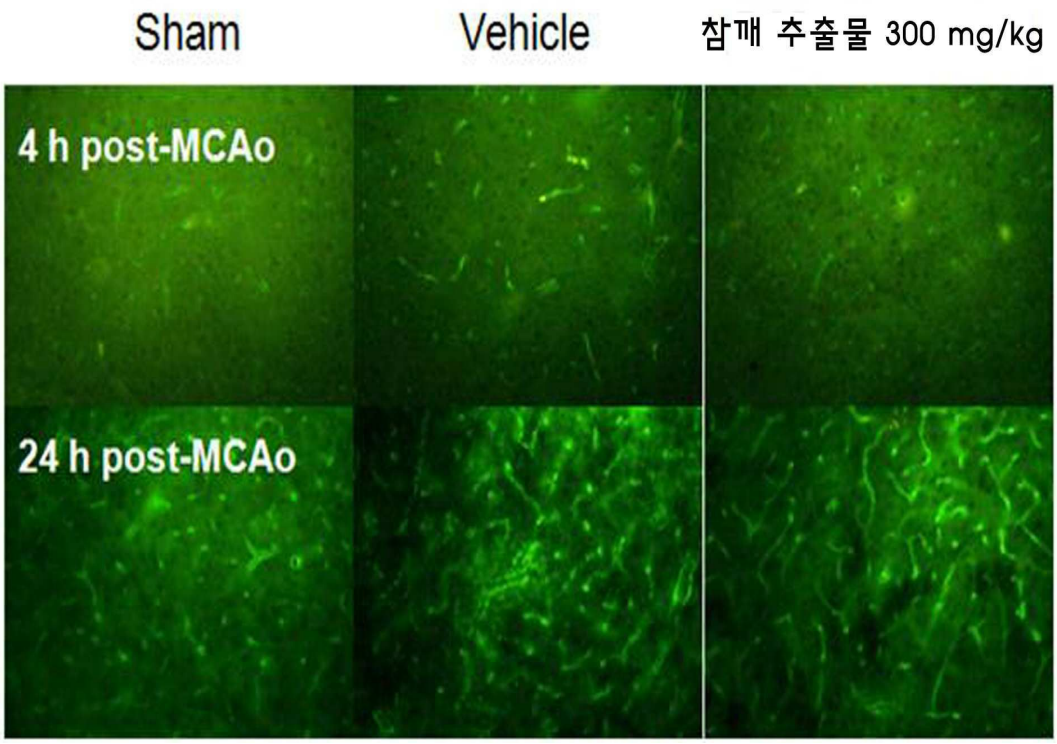
도면3


참깨 추출물
Vehicle ETDA 1 10 100 1,000 (mg/kg)
MMP9
MMP2
% 대조군
120
100
80
60
40
20
0
대조군 1 10 100 1,000
참깨 추출물(μg/ml)

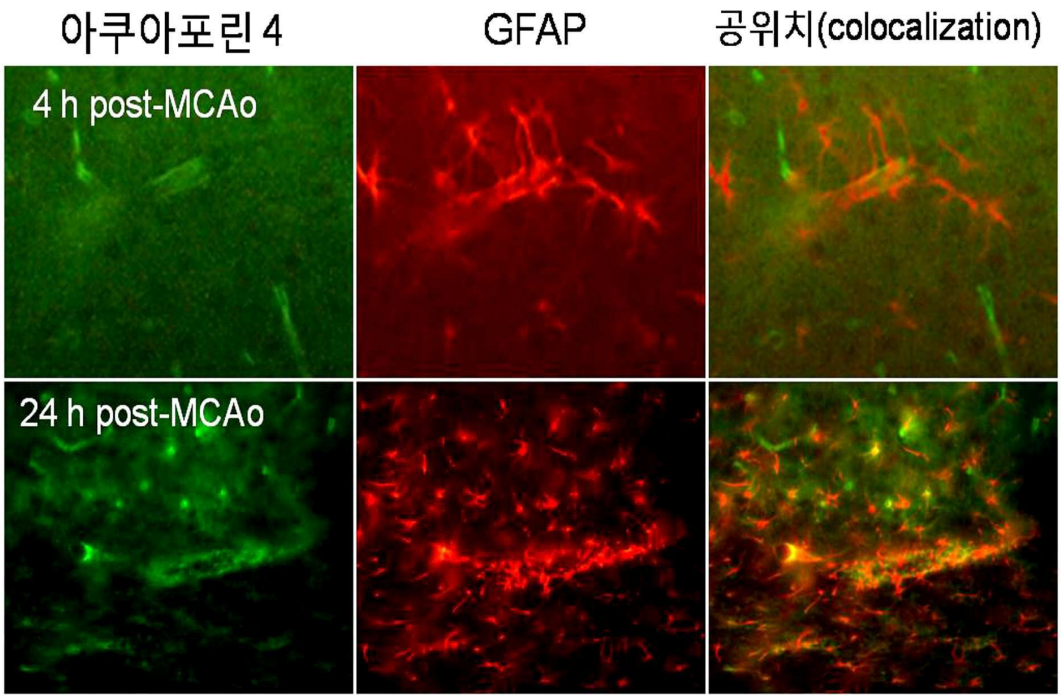
도면4


샴(Sham)
Vehicle
참깨추출물 300 mg/kg
4 h post-MCAo
24 h post-MCAo

도면5


Sham
Vehicle
참깨 추출물 300 mg/kg
4 h post-MCAo
24 h post-MCAo

도면6


아쿠아포린 4
GFAP
공위치(colocalization)
4 h post-MCAo
24 h post-MCAo