



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년06월13일
(11) 등록번호 10-1988882
(24) 등록일자 2019년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/704 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/704 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0183746
(22) 출원일자 2017년12월29일
심사청구일자 2017년12월29일
(56) 선행기술조사문헌
Progress in Mordern Biomedicine, 13(11),
2062-2064, 2013.*
Phytotherapy Research, 28, 1893-1896, 2014.
KR1020110047170A
KR1019990015090A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
경북대학교 산학협력단
대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교)
(72) 발명자
송규용
대전광역시 서구 둔산중로 20, A동 1201호(탄방동)
조은경
대전광역시 중구 계백로1716번길 87, 301동 2302호(문화동, 센트럴파크3단지아파트)
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
특허법인 공간

전체 청구항 수 : 총 5 항

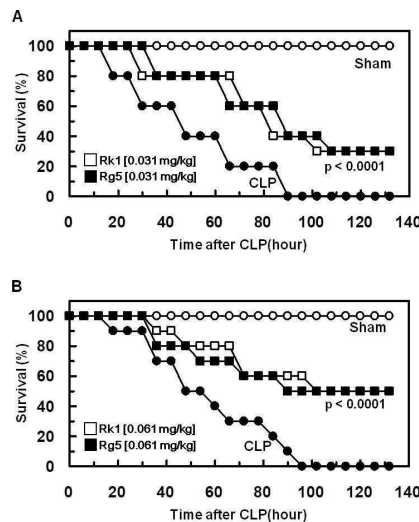
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5를 포함하는 패혈증의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 패혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 상기 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5는 HMGB1의 발현을 감소시키는 효과 및 패혈증에 의한 사망률을 감소시키는 효과가 우수하여, 패혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

(72) 발명자

허강민

대전광역시 유성구 상대남로 26, 903동 502호(상대동, 도안신도시9블록 트리폴시티아파트)

배중섭

대구광역시 수성구 범어로 61, 101동 911호(범어동, 범어폴비체)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A5A2015385

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터사업

연구과제명 감염제어 컨버전스 연구센터

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2017.06.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

진세노사이드 Rk1을 유효성분으로 포함하는 패혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 진세노사이드는 HMGB1(high mobility group box 1)의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 패혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가하여 약제학적 투여형으로 제형화되는 것을 특징으로 하는 패혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

진세노사이드 Rk1을 유효성분으로 포함하는 패혈증의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 건강기능식품의 제형은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 패혈증의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5를 포함하는 패혈증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 패혈증(sepsis)은 미생물에 감염되어 전신에 심각한 염증 반응이 나타나는 상태를 말한다. 체온이 38도 이상으로 올라가는 발열 증상, 36도 이하로 내려가는 저체온증, 분당 24회 이상으로 증가한 호흡수(빈호흡), 분당 90회 이상의 심박수(빈맥), 혈액 검사상 백혈구 수의 증가 또는 현저한 감소 중 두 가지 이상의 증상을 보이는 경우를 전신성 염증 반응 증후군(systemic inflammatory response syndrome)이라고 부르며, 이러한 전신성 염증 반응 증후군이 미생물의 감염에 의한 것일 때 패혈증이라고 한다. 미생물의 감염 경로를 잘 알 수 없는 경우도 있으나 맹장염, 중이염, 피부화농증, 욕창, 폐질환, 담낭염, 신우염, 골수염 등이 패혈증의 원인으로 알려져 있다.

[0003] 현재까지 패혈증의 치료를 위한 근본적인 치료제는 확인되지 않은 상태이며, 주로 항생제나 항진균제 주사로 치료한다. 치료 약제와 기간은 미생물의 종류에 따라 결정하거나 환자의 상태에 따라 혈액투석 또는 수혈을 하기도 한다. 항생제와 항진균제가 잘 들으면 패혈증은 완치되기도 하지만, 약제에 내성이 있는 미생물에 감염되거나 면역력이 약한 환자이거나 또는 너무 늦게 치료를 시작하는 등의 경우에는 치료가 어려워 환자가 사망하기도 한다.

[0004] 패혈증의 치사율은 50~70% 정도로 매우 높은 편이며, 전세계적으로도 사망의 원인 중에서 높은 비중을 차지하는 것으로 알려져 있다. FDA가 승인한 유일한 패혈증 치료제인 드로트레코긴 알파(drotrecogin alfa, Xigris[®])가 효능이 없는 것으로 판명되어, 2011년 시장에서 퇴출된 이후로 현재까지 승인받은 중증 패혈증 치료제는 없는

상태이다(Ranieri, V. M. et al., N Engl J Med., 366(22), 2055-2064, 2012). 따라서 패혈증 치료제의 개발은 임상적으로 상당한 의의를 가지며 국내외적으로 패혈증 치료제를 개발하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

- [0005] HMGB1(high mobility group box 1)은 히스톤과 마찬가지로 가장 중요한 크로마틴 단백질(chromatin proteins) 중 하나이며 패혈증과 같은 혈관 손상이 있을 때 혈관내피에서 발현되고, 단핵구(monocyte), 대식세포(macrophage), 인간 제대정맥혈관내피세포(Human umbilical vein endothelial cell)에서 분비된다.
- [0006] HMGB1의 수용체로는 RAGE(receptor for advanced glycation end products), TLR2(Toll like receptor 2) 및 TLR4(Toll like receptor 4)가 알려져 있다. 상기 수용체와 HMGB1의 작용에 의해 내피세포상의 점착 분자(VCAM-1, ICAM-1, E-selectin)가 유도되고, 이는 백혈구의 소집(recruitment)을 통하여 염증을 촉진한다(Bae, J. S. et al., 118(14), 3952-3959, 2011).
- [0007] 패혈증 환자의 혈청에서 HMGB1이 검출되고, 나쁜 예후를 가진 환자에서 HMGB1의 혈청 수준이 매우 증가된다는 것이 알려져 있으며, 중증 패혈증 환자의 혈장에서 HMGB1의 농도가 증가하면 사망할 가능성이 높다는 것이 알려져 있어, 패혈증의 예방 또는 치료를 위한 타겟 인자로서 HMGB1이 주로 사용되고 있다(Lee, W. et al., Toxicol Appl Pharmacol., 262(1), 91-98, 2012; Yang, E. J. et al., J Cell Physiol., 228(5), 975-982, 2013; Wang, H. et al., Science, 285(5425), 248-251, 1999).
- [0008] 진세노사이드(ginsenoside)란 인삼(ginseng)과 배당체(glycoside)의 합성어로, 다른 식물에서 발견되는 사포닌과는 다르게 특이한 화학구조와 약리효능을 가진 것으로 알려져 있다.
- [0009] 진세노사이드는 트리테르페노이드(triterpenoid) 계열의 담마란(dammarane) 골격에 글루코즈(glucose), 아라비노즈(arabinose), 자일로즈(xylose), 람노즈(rhamnose) 등이 결합되어 있는 중성배당체이며, 현재 약 30종 이상의 화학 구조가 밝혀졌고, 화학 구조의 특성에 따라 프로토파낙사디올(protopanaxadiol, PPD)계(19종), 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol, PPT)계(10종) 및 올레안(oleanane)계(1종)로 구분된다.
- [0010] 진세노사이드에 의한 약리 활성은 상기 다량으로 존재하는 진세노사이드로부터 기인되는 특이 진세노사이드에 의해 나타나며, 면역력강화, 항염증, 항알러지, 항암, 혈압강하, 항콜레스테롤, 항혈전, 항노화, 항산화, 두뇌 활동 촉진, 피부미용 효과 등이 주요 효능으로 알려져 있다(Kim, Y. S. et al., Arch Pharm Res., 23(5), 518-524, 2000; Tachikawa, E. et al., Biochem Pharmacol., 66(11), 2213-2221, 2003; Tsai, S. C. et al., Chin J Physiol., 46(1), 1-7, 2003; Shibata, S., J Korean Med Sci., 16(suppl), S28-37, 2001).
- [0011] 한편, 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5의 패혈증 치료용 조성물과 관련된 선행문헌으로써, 한국등록특허 제10-1293278호 및 제10-1352635호에는 진세노사이드 Rk1 또는 Rg3 유사체의 신규 혈관누출 차단제 용도가 개시되었고, 한국공개특허 제10-2006-0095599호에는 감염 방어능력 및 패혈증 치료능력을 지닌 인삼추출 다당체가 개시되었으며, 선행논문 [Xing, W. et al., Biosci Rep., 37(4), 2017]에는 진세노사이드 Rg3이 패혈증 유도성 손상 및 미토콘드리아 기능 장애의 치료 효과에 대해 개시된 바 있다.
- [0012] 그러나, 본 발명의 경우 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5를 패혈증이 유도된 동물 모델에 0.031~0.061mg/kg의 적은 농도로 처리하여 30~60%의 생존율을 나타내었음을 확인한 반면에, 상기 한국등록특허 제10-1293278호 및 제10-1352635호의 경우 본 발명의 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5와 기본 골격은 유사하나 그 구조가 상이한 화합물을 이용하여 망막혈관내피세포 또는 당뇨병성 망막증의 혈관 투과성 및 혈관 누출 억제 효과를 확인하였으며, 상기 선행논문의 경우 진세노사이드 Rg3를 패혈증이 유도된 동물 모델에 10~20mg/kg 농도(본 발명에 비해 100배 이상 높은 농도에 해당)로 처리하여 본 발명과 동등한 정도의 생존율을 나타내었음을 확인한 바, 본 발명과 같이 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5가 패혈증에 우수하게 선택적인 치료 효과가 있음을 확인한 이전 보고는 아직 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0013] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1293278호, 신규 혈관누출 차단제, 2013년 07월 30일, 등록.
- (특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1352635호, 신규 혈관누출 차단제, 2014년 01월 10일, 등록.
- (특허문헌 0003) 한국공개특허 제10-2006-0095599호, 감염 방어능력 및 패혈증 치료능력을 지닌 인삼추출 다당체, 2006년 09월 01일, 공개.

비특허문헌

- [0014] (비특허문헌 0001) Bae, J. S. et al., Activated protein C inhibits high mobility group box 1 signaling in endothelial cells, 118(14), 3952-3959, 2011.
- (비특허문헌 0002) Kim, Y. S. et al., Differential expression of protein kinase C subtypes during ginsenoside Rh2-induced apoptosis in SK-N-BE(2) and C6Bu-1 cells, Arch Pharm Res., 23(5), 518-524, 2000.
- (비특허문헌 0003) Lee, W. et al., Barrier protective effects of withaferin A in HMGB1-induced inflammatory responses in both cellular and animal models, Toxicol Appl Pharmacol., 262(1), 91-98, 2012.
- (비특허문헌 0004) Ranieri, V. M. et al., Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock, N Engl J Med., 366(22), 2055-2064, 2012.
- (비특허문헌 0005) Shibata, S., Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds, J Korean Med Sci., 16(suppl), S28-37, 2001.
- (비특허문헌 0006) Tachikawa, E. et al., In vitro inhibition of adrenal catecholamine secretion by steroidal metabolites of ginseng saponins, Biochem Pharmacol., 66(11), 2213-2221, 2003.
- (비특허문헌 0007) Tsai, S. C. et al., Stimulation of the secretion of luteinizing hormone by ginsenoside-Rb1 in male rats, Chin J Physiol., 46(1), 1-7, 2003.
- (비특허문헌 0008) Wang, H. et al., HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice, Science, 285(5425), 248-251, 1999.
- (비특허문헌 0009) Xing, W. et al., Ginsenoside Rg3 attenuates sepsis-induced injury and mitochondrial dysfunction in liver via AMPK-mediated autophagy flux, Biosci Rep., 37(4), 2017.
- (비특허문헌 0010) Yang, E. J. et al., Barrier protective effects of rosmarinic acid on HMGB1-induced inflammatory responses in vitro and in vivo, J Cell Physiol., 228(5), 975-982, 2013.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0015] 본 발명의 목적은 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5를 포함하는 패혈증의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명은 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 패혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 상기 진세노사이드는 HMGB1(high mobility group box 1)의 발현을 억제하는 효과가 우수하다.
- [0017] 본 발명에 따른 약학 조성물은 일반적으로 사용되는 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. “약학적으로 허용 가능”이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.
- [0018] 또한, 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. 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로즈, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아라비아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 파라옥시벤조산메틸, 파라옥시벤조산프로

필, 탈크, 스테아르산마그네슘 및 광물유를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 안정화제, 결합제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 진세노사이드에 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 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0019] 본 발명에 개시된 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 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. 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여시간, 투여경로, 약물의 흡수, 분포 및 배설률, 사용되는 다른 약물의 종류 및 처방자의 판단 등에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.001mg/kg/일 내지 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.01mg/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.

[0020] 또 다른 일면에 있어서, 본 발명은 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5에서 선택되는 1종 이상 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 패혈증의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다. 상기 건강기능식품은 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 또는 가공한 식품을 지칭하는 것으로, 예를 들어 건강보조 식품, 기능성 식품, 영양제, 보조제 등을 모두 포함한다.

[0021] 상기 진세노사이드는 전체 식품 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.001중량% 내지 50중량%, 더 바람직하게는 0.001중량% 내지 30중량%, 가장 바람직하게는 0.001중량% 내지 10중량%로 하여 첨가될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 진세노사이드를 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제 등이 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명은 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 패혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 상기 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5는 HMGB1의 발현을 감소시키는 효과 및 패혈증에 의한 사망률을 감소시키는 효과가 우수하여, 패혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 혈관내피세포에서의 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5 처리에 따른 세포생존율을 확인한 결과이다.

도 2는 패혈증이 유도된 세포(도 2A) 또는 동물(도 2B) 모델에서의 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5 처리에 따른 HMGB1 발현 수준을 ELISA로 확인한 결과이다.

도 3은 HMGB1이 처리된 혈관내피세포에서 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5 처리에 따른 HMGB1 수용체(TLR2, TLR4 및 RAGE)의 단백질 발현 수준을 ELISA로 확인한 결과이다.

도 4는 HMGB1이 처리된 혈관내피세포에서 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5 처리에 따른 점착 분자 VCAM-1(도 4A), ICAM-1(도 4B) 및 E-selectin(도 4C)의 단백질 발현 수준을 ELISA로 확인한 결과이다.

도 5는 패혈증 동물 모델에서 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5의 농도별 처리에 따른 생존율을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정

되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0025] <실시예 1. 진세노사이드 Rk1 및 Rg5의 제조>

[0026] 실시예 1-1. 흑삼 추출물의 제조

[0027] 흑삼 2kg을 정확히 측량하여 분쇄하고 5ℓ의 70%(v/v) 메탄올 수용액에서 하루 동안 침출시킨 다음, 3시간 동안 초음파 진탕한 후 여과하였다. 흑삼 분말에 8ℓ의 70%(v/v) 메탄올 수용액을 넣고 침출 및 초음파 진탕 과정을 2회 더 반복한 다음 처음 여과한 여액과 합하여 감압 농축함으로써 완전히 건조된 메탄올 추출물 474g 얻었다.

[0028] 상기 메탄올 추출물을 초음파 진탕하여 2.5ℓ의 물에 완전히 녹인 후, 2ℓ의 디에틸에테르를 넣고 실온에서 2일 동안 교반하였다. 교반 후 용액을 분액깔때기로 옮겨 층 분리를 한 다음, 디에틸에테르 층을 제거하고 남은 물 층에 5ℓ의 수포화 부탄올을 넣고 교반기에서 2일 동안 교반하였다. 교반 후 용액을 분액깔때기로 옮겨 하루 이상 층 분리를 한 후 부탄올 층만 모아 감압 농축하고, 완전히 건조된 부탄올 추출물 87.6g 얻었다.

[0029] 실시예 1-2. 흑삼 추출물로부터 진세노사이드 Rk1 및 Rg5의 분리 및 정제

[0030] 상기 실시예 1-1에서 얻은 흑삼의 부탄올 분획물 87.6g의 조사포닌 추출물을 메탄올에 녹인 후, 실리카겔 500g과 혼합 반죽한다. 이를 감압 농축하여 고운 파우더로 만든 뒤 250~400 메시(mesh) 실리카겔을 클로로포름에 반죽하여 12×50cm 오픈 컬럼에 부어 높이 25cm까지 채우고, 이 위에 씨샌드(sea sand : 실리카겔과 반죽한 물질들이 용매와 섞이지 않고 충전되어 있는 상태로 분리할 때 사용)를 2cm 올려준 후, 앞서 만들어 놓은 파우더를 올려주었다. 클로로포름:메탄올:물=10:2:0.2(1500ml:300ml:30ml)의 비율로 혼합한 용액을 분액깔때기에서 혼합한 후 하층을 받아 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 위한 전개 용매로 사용하였다. 이와 같이 1차 분리 하여 5개의 분획을 만든 뒤 진세노사이드 Rk1과 Rg5가 포함된 3번 분획을 얻었다. 상기 진세노사이드 Rk1과 Rg5가 포함된 3번 분획을 가지고 C18 역상 컬럼크로마토그래피를 수행하였다. 40%(v/v) 메탄올 수용액으로 반죽한 C18 역상 충전제를 3.5×60cm 플래쉬 컬럼에 높이 30cm까지 채워준 후 여기에 진세노사이드 Rk1, Rg5가 포함된 분획을 25%(v/v) 메탄올 수용액에 녹여 로딩한 후 전개 용매는 메탄올:물을 1:1(v:v)에서 2:1(v:v), 3:1(v:v), 4:1(v:v), 5:1(v:v) 조건으로 변화시켜 가며 분리 정제하였다. 이를 통해 최종적으로 225mg의 순수한 진세노사이드 Rk1과 255mg의 순수한 진세노사이드 Rg5를 얻을 수 있었고 이의 물리화학적 성질은 하기와 같다.

[0031] 1. ginsenoside Rk1

[0032] white powder;

[0033] mp: 178-181°C, $[\alpha]_D^{20}$: =11.0(c 0.2, MeOH), $C_{42}H_{70}O_{12}$, MS(m/z) 789 (M+Na)⁺;

[0034] ¹H-NMR(400MHz, C₅D₅N, ppm) δ 0.62(d, J = 11.47 Hz 1H), 0.72(s, 3H), 0.91(s, 3H), 1.02(s, 3H), 1.31(s, 3H), 1.49(s, 3H), 1.61(s, 3H), 1.95(s, 3H), 2.77(s, 1H), 3.23(dd, J = 4.37, 11.7Hz, 1H), 3.89(s, 3H), 4.83(d, J = 7.53Hz, 1H), 4.86(br s, 1H), 5.13(br s, 1H), 5.23(br t, J = 6.68Hz, 1H), 5.33(d, J = 7.71, 11.7Hz, 1H);

[0035] ¹³C-NMR(100MHz, C₅D₅N, ppm) δ 15.80, 16.45, 16.58, 16.98, 17.74, 18.45, 25.74, 26.75, 27.08, 28.11, 30.77, 32.60, 32.67, 33.89, 35.36, 39.30, 39.72, 37.03, 40.21, 48.23, 50.86, 51.21, 52.49, 56.43, 62.76, 62.87, 71.65, 71.72, 72.47, 77.08, 77.96, 78.06, 78.19, 78.34, 83.45, 88.95, 105.09, 106.01, 108.15, 125.33, 131.21, 155.55.

[0036] 2. ginsenoside Rg5

[0037] white powder;

[0038] mp: 188-192.5°C, $[\alpha]_D^{20}$: =+4.7(c 1.2, MeOH), $C_{42}H_{70}O_{13}$, MS(m/z) 789 (M+Na)⁺;

[0039] ¹H-NMR(400MHz, C₅D₅N, ppm) δ 0.81(s, 3H), 0.95(s, 3H), 1.01(s, 3H), 1.09(s, 3H), 1.27(s, 3H), 1.58(s, 3H), 1.62(s, 3H), 1.81(s, 3H), 2.77(dd, J = 6.9, 7.0Hz, 1H), 3.26(dd, J = 4.0, 11.63Hz, 1H), 3.90(br s, 1H), 4.1(dd-like, 1H), 4.21(dd-like, 1H), 4.90(d, J = 7.4Hz, 1H), 5.21(t, J = 6.9Hz, 1H), 5.33(t, J

= 7.6Hz, 1H), 5.49(t, J = 7.0Hz, 1H);

¹³C-NMR(100MHz, C₅D₅N, ppm) δ 13.07, 15.72, 16.35, 16.49, 16.92, 17.66, 18.33, 25.60, 26.64, 27.35, 28.00, 28.73, 32.10, 32.54, 35.24, 39.60, 36.91, 39.17, 40.14, 50.33, 50.66, 50.80, 50.91, 56.29, 62.58, 62.73, 71.50, 71.53, 72.49, 77.00, 77.82, 77.98, 78.13, 78.21, 83.31, 88.18, 105.00, 105.91, 123.21, 123.54, 131.16, 140.06.

<실시예 2. 혈관내피세포에서 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5의 처리에 따른 세포생존율 확인>

HUVEC(Human umbilical vein endothelial cells, Cambrex Bioscience, Charles City, IA)은 EBM-2 기본 배지 (growth supplement 포함)를 사용하여 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 3~5번 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

이후, 상기 계대 배양한 세포를 96-웰 플레이트에 웰당 5×10^3 개로 분주하여 24시간 동안 배양한 다음, 새로운 배지로 세척한 후 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5를 0, 20, 40 및 80 μM 농도로 처리하여 48시간 동안 반응하였다. 48시간 후 100 μl의 1mg/ml MTT 용액을 세포에 더하여 4시간 동안 반응한 다음, DMSO 150 μl를 더하여 세포 내에 생성된 포마잔염을 용해시켰다. 용해된 포마잔의 양을 Microplate reader(Tecan Austria GmbH, Austria)로 540 nm에서 측정하여 도 1에 나타내었다.

도 1을 참고하면, 혈관내피세포(HUVEC)에 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5를 처리하는 경우, 농도에 상관없이 대조군 (무처리군)과 동등한 세포생존율을 나타내어 세포 독성을 나타내지 않는 것임을 확인할 수 있었다.

<실시예 3. 패혈증 모델에서 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5가 HMGB1 발현에 미치는 영향 확인>

실시예 3-1. 패혈증이 유도된 세포의 제조

상기 실시예 2에서 계대 배양한 HUVEC에 100ng/ml의 LPS(lipopolysaccharide, serotype: 0111:B4; L5293)를 처리하여 16시간 동안 배양한 다음, 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5를 농도별(0, 10, 20 및 40 μM)로 6시간 동안 반응하여 세포배양액을 얻었다. 상기 세포배양액은 단백질 분리 시약(1mM PMSF, 1mM Na₃VO₄, 1mM NaF, 1μg/ml 아프로티닌(aprotinin), 1μg/ml 펩스타틴(pepstatin), 1μg/ml 류펩틴(leupeptin) 및 10% RIPA 용해 버퍼(Upstate Biotechnology, USA)를 함유)을 이용하여 4℃에서 1시간 동안 볼텍싱(vortexing)함으로써 분해시켰고, 이를 원심분리(15000rpm, 4℃, 20분)하여 상층액만을 회수하였다.

실시예 3-2. 패혈증이 유도된 동물 모델의 제조

패혈증이 유도된 동물 모델을 제조하기 위해 CLP 수술법(cecal ligation and puncture operation)을 이용하여 마우스에 패혈증을 유도하였다. 실험에 사용된 마우스는 경북대학교 동물 관리 위원회의 승인(IRB No. KNU 2016-54)하에 진행하였다.

수컷 C57BL/6 마우스(6~7주령, 체중27g, Orient Bio Co., Sungnam, Republic of Korea)를 20~25℃ 온도, 40~45%의 습도 및 12시간 간격의 낮/밤이 유지되는 조건에서 12일 동안 순응시켰다. 이후, 산소 기체와 2% 이소플루란(Forane; JW pharmaceutical, South Korea)을 혼합한 기체를 설치류 호흡 마취 기계(RC2; Vetequip, Pleasanton, CA)로 마우스를 마취시키고, 페이스 마스크로 마취 상태를 유지하여 수술 도중 자연스럽게 호흡할 수 있도록 하였다.

다음으로, 2cm의 정중앙 절개(midline incision)를 실시하여 맹장과 인접해 있는 장을 노출시킨 후, 맹장 끝으로부터 5mm 부위를 3.0-비단봉합사(silk suture)로 단단히 묶고, 22-게이지 바늘로 1개의 구멍을 만들었다. 이후, 맹장을 부드럽게 짜내어 상기 구멍 부위로부터 소량의 배설물을 압출시키고 다시 복막강(peritoneal cavity)으로 위치시킨 다음 개복부위를 4.0-비단봉합사로 봉합하였다. 이때, 대조군(sham, sham-operated mice)의 경우 맹장을 노출시켰으나 이를 묶고 구멍 내는 단계를 수행하지 않고 복강으로 위치시켰다. 각 마우스들은 CLP 수술 24시간 후부터 패혈증 증상에 노출되었는데, 전율(shivering)이 있거나 털이 곤두서거나(bristled hair) 또는 무기력증(weakness) 등의 현상이 나타났다.

CLP 수술 후 12시간 후에 본 발명의 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5(0.031 또는 0.061mg/kg)를 정맥투여하였으며, CLP 수행 24시간 후 마우스 혈액을 채취한 후 2000×g에서 5분간 원심분리하여 혈청 샘플을 얻었다.

실시예 3-3. 패혈증 모델에서 HMGB1 발현 수준 확인

패혈증 모델에서 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5가 HMGB1 발현에 미치는 영향 확인하기 위해, 상기 실시예 3-1 세포

배양액의 상층액 및 실시예 3-2의 혈청 샘플을 이용하여 HMGB1의 발현 수준을 ELISA(competitive enzyme-linked immunosorbent assays)로 확인하였다.

[0055] 먼저, 96웰 플레이트(96-well plastic flat microtiter plates, Corning, NY, USA)에 0.02% 소듐 아자이드(sodium azide)가 포함된 20mM 카보네이트/바이카보네이트 버퍼(carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6)에 녹인 HMGB1 단백질(Abnova)을 코팅하여 4℃에서 18시간 이상(overnight) 반응하였다. 이후, PBS-T(PBS-0.05%[w/w] Tween 20)로 플레이트를 3번 세척한 다음, 다시 PBS-T를 넣고 4℃에서 18시간 이상 보관하였다.

[0056] 한편, HMGB1 단백질(Abnova, 단백질 정량용, PBS-T에 희석), 상기 실시예 3-1의 세포배양액의 상층액 및 상기 실시예 3-2의 혈청 샘플은 각각 96웰 플레이트에서 항-HMGB1 항체(Abnova, PBS-T에 1:1000 희석)와 37℃에서 90분 동안 전처리하였다.

[0057] 상기 항체가 전처리된 HMGB1 단백질, 세포배양액의 상층액 및 혈청 샘플을 HMGB1이 코팅된 플레이트로 옮겨 실온에서 30분 동안 반응하였다. 이후, 각 플레이트를 PBS-T로 3번 세척한 다음, 실온에서 90분 동안 2차 항체(peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibodies, R&D Systems, PBS-T에 1:2000 희석)와 반응하였다.

[0058] 다음으로 플레이트들을 PBS-T로 3번 세척한 후, 실온의 암실에서 60분 동안 200 μ l의 기질용액(100 μ g/ml o-phenylenediamine & 0.003% H₂O₂)을 처리하였다. 60분후, 50 μ l의 8N, H₂SO₄로 모든 반응을 중단시킨 후, 490nm에서 흡광도를 확인하여 도 2에 나타내었다.

[0059] 도 2를 참고하면, 패혈증이 유도된 세포(도 2A) 및 동물(도 2B) 모델에 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5를 처리하는 경우 농도 의존적으로 HMGB1 발현을 억제하는 효과가 우수하여, 패혈증의 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0060] 실시예 3-4. HMGB1이 처리된 혈관내피세포에서 세포 표면 마커 수용체의 발현 수준 확인

[0061] HMGB1의 수용체인 RAGE(receptor for advanced glycation end products), TLR2(Toll like receptor 2) 및 TLR4(Toll like receptor 4)의 단백질의 발현 수준을 ELISA로 확인하였다.

[0062] 상기 실시예 2에서 계대 배양한 HUVEC을 96웰 플레이트에 배양하여 90%의 confluence를 이루면 HMGB1(1 μ g/ml)을 넣고 16시간 동안 반응한 다음, 본 발명의 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5를 농도별(0, 10, 20 및 40 μ M)로 처리하여 6시간 동안 반응하였다. 이후, 세포배양액을 제거하고 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 후, 각 세포를 50 μ l의 1%(w/v) 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 15분 동안 실온(25℃)에서 고정하였다. 15분 후 파라포름알데히드를 제거하고 세포를 세척한 후, TLR2 항체 A-9, TLR4 항체 H-80 및 RAGE 항체인 A-9(Santa Cruz, CA)를 각각 100 μ l씩 더하였다. 1시간 후, 각 세포를 3번씩 세척한 다음 100 μ l의 1:2000 퍼옥시다아제-결합 항-마우스 IgG 항체(1:2000 peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibody, Sigma, Saint Louis, MO)와 1시간 동안 반응하였다. 이후, 3번 세척한 다음 o-PPD 기질(o-phenylenediamine substrate, Sigma, St. Louis, MO)과 반응하여 이에 대한 발색반응의 흡광도를 490nm에서 측정하여, 이를 도 3에 나타내었다.

[0063] 도 3을 참고하면, HMGB1이 처리된 혈관내피세포에 본 발명의 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5를 처리하는 경우 HMGB1의 수용체인 TLR2, TLR4 및 RAGE의 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다.

[0064] 실시예 3-5. HMGB1이 처리된 혈관내피세포에서 세포 점착 분자의 발현 수준 확인

[0065] HMGB1과 수용체와의 작용에 의해 유도되는 점착 분자인 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1) 및 E-selectin의 단백질의 발현 수준을 ELISA로 확인하였다.

[0066] 단백질 발현 수준을 확인하기 위해, 상기 실시예 3-4와 동일한 과정으로 진행하되 TLR2, TLR4 및 RAGE 항체(TLR2 항체 A-9, TLR4 항체 H-80 및 RAGE 항체인 A-9) 대신 VCAM-1, ICAM-1 및 E-selection에 대한 마우스 항인간 모노클로날 항체(mouse anti human monoclonal antibody, Temecula, CA, USA, 1:50 희석)를 사용하였다. 점착 분자 VCAM-1, ICAM-1 및 E-selectin의 단백질의 발현 수준을 확인한 결과는 도 4에 나타내었다.

[0067] 도 4를 참고하면, HMGB1이 처리된 혈관내피세포에 본 발명의 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5를 처리하는 경우 HMGB1과 수용체와의 작용에 의해 유도되는 점착 분자인 VCAM-1, ICAM-1 및 E-selection의 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다.

[0068] 이에, 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5가 패혈증에 의해 발현이 증가된 HMGB1 및 HMGB1의 수용체의 발현을 억제하는 효과가 우수하며, HMGB1과 수용체와의 작용을 억제하는 효과가 우수하여 패혈증 치료용 조성물로 유용하게 사용

할 수 있음을 알 수 있었다.

[0069] <실시예 4. 패혈증이 유도된 동물 모델에서 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5의 처리에 따른 생존율 변화 확인>

[0070] 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5가 패혈증이 유도된 동물 모델에 미치는 영향을 확인하기 위해, 먼저 상기 실시예 3-2의 방법으로 CLP 수술을 실시하여 패혈증이 유도된 동물 모델을 얻었다. CLP 수술 후 12시간 및 50시간째에 본 발명의 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5(0.031 또는 0.061mg/kg)를 꼬리정맥으로 2회씩 투여한 다음, CLP 수술을 수행한 후부터 140시간까지 6시간 간격으로 생존율을 확인(Kaplan-Meier survival analysis)하여 도 5에 나타내었다.

[0071] 도 5를 참고하면, CLP 수술 후 본 발명의 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5를 0.031 또는 0.061mg/kg의 농도로 투여한 마우스의 경우 무처리군(CLP 수술만 시행)에 비해 생존율이 30~60%까지 증가되는 것을 확인할 수 있어, 패혈증 치료 효과가 우수한 것임을 알 수 있었다.

[0072] <제제예 1. 산제의 제조>

[0073] 본 발명의 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5 2g, 유당 1g을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0074] <제제예 2. 정제의 제조>

[0075] 본 발명의 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5 100mg, 옥수수전분 100mg, 유당 100mg 및 스테아린산 마그네슘 2mg을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0076] <제제예 3. 캡슐제의 제조>

[0077] 본 발명의 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5 100mg, 옥수수전분 100mg, 유당 100mg 및 스테아린산 마그네슘 2mg을 혼합한 후 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0078] <제제예 4. 환제의 제조>

[0079] 본 발명의 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5 90mg, 참쌀전분 5mg 및 정제수 5mg 및 흡습성을 저해하는 첨가제로서 텍스트린, 말토덱스트린, 옥수수전분, 미결정셀룰로오스(MCC)를 소량 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 100mg의 환제를 만들었다.

[0080] <제제예 5. 주사액제의 제조>

[0081] 본 발명의 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5 1g, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100ml를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[0082] <제제예 6. 건강기능식품의 제조>

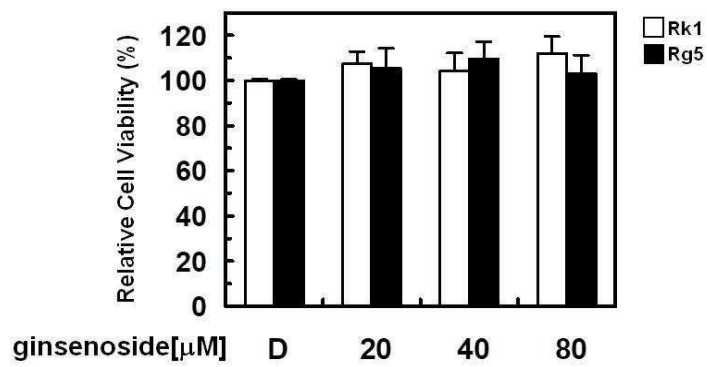
[0083] 본 발명의 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5 20g, 비타민 혼합물 적량, 비타민 A 아세테이트 70 μ g, 비타민 E 1.0mg, 비타민 B1 0.13mg, 비타민 B2 0.15mg, 비타민 B6 0.5mg, 비타민 B12 0.2 μ g, 비타민 C 10mg, 비오틴 10 μ g, 니코틴산아미드 1.7mg, 엽산 50 μ g, 판토텐산 칼슘 0.5mg, 무기질 혼합물 적량, 황산제1철 1.75mg, 산화아연 0.82mg, 탄산 마그네슘 25.3mg, 제1인산칼륨 15mg, 제2인산칼슘 55mg, 구연산칼륨 90mg, 탄산칼슘 100mg, 염화마그네슘 24.8mg을 섞어 과립으로 제조하였으나, 용도에 따라 다양한 제형으로 변형시켜 제조할 수 있다. 또한, 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하여 제조할 수 있다.

[0084] <제제예 7. 건강기능성 음료의 제조>

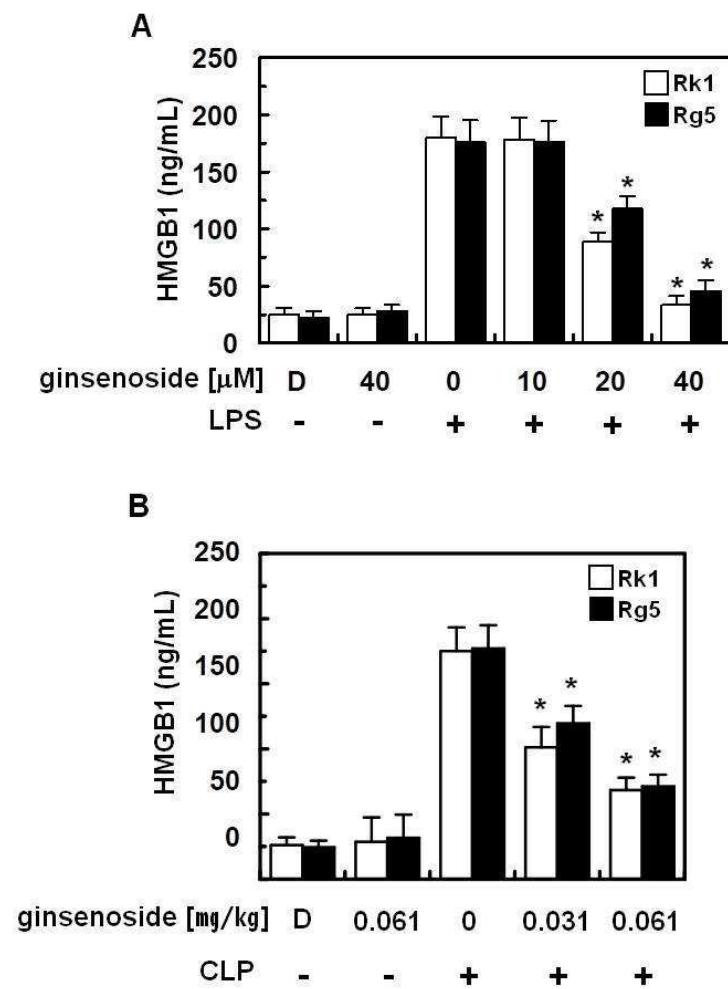
[0085] 본 발명의 진세노사이드 Rk1 또는 Rg5 1g, 구연산 0.1g, 프락토올리고당 100g, 정제수 900g을 섞어 통상의 음료 제조방법에 따라 교반, 가열, 여과, 살균, 냉장하여 음료를 제조하였다.

도면

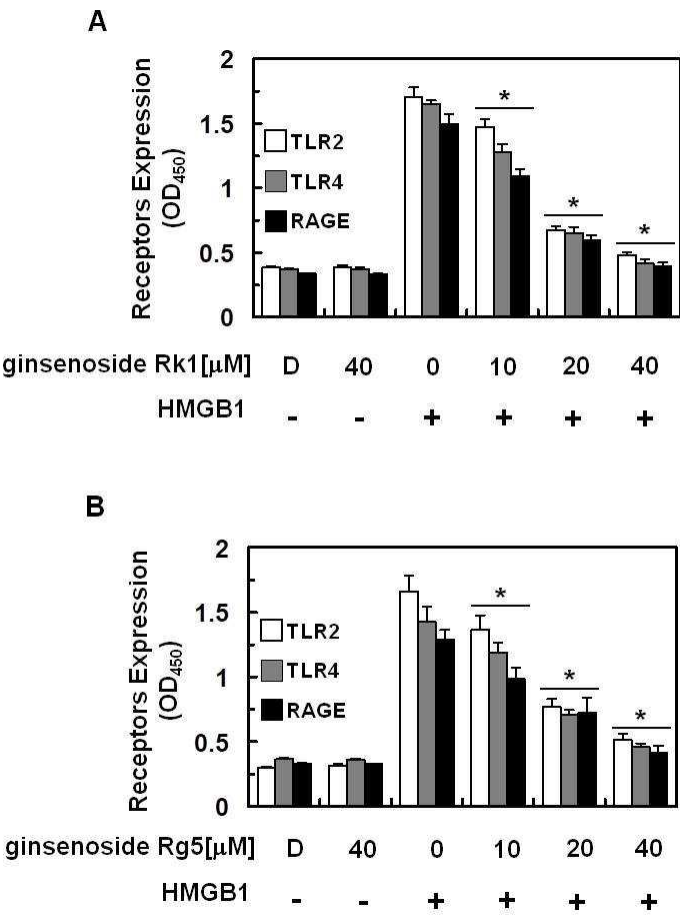
도면1



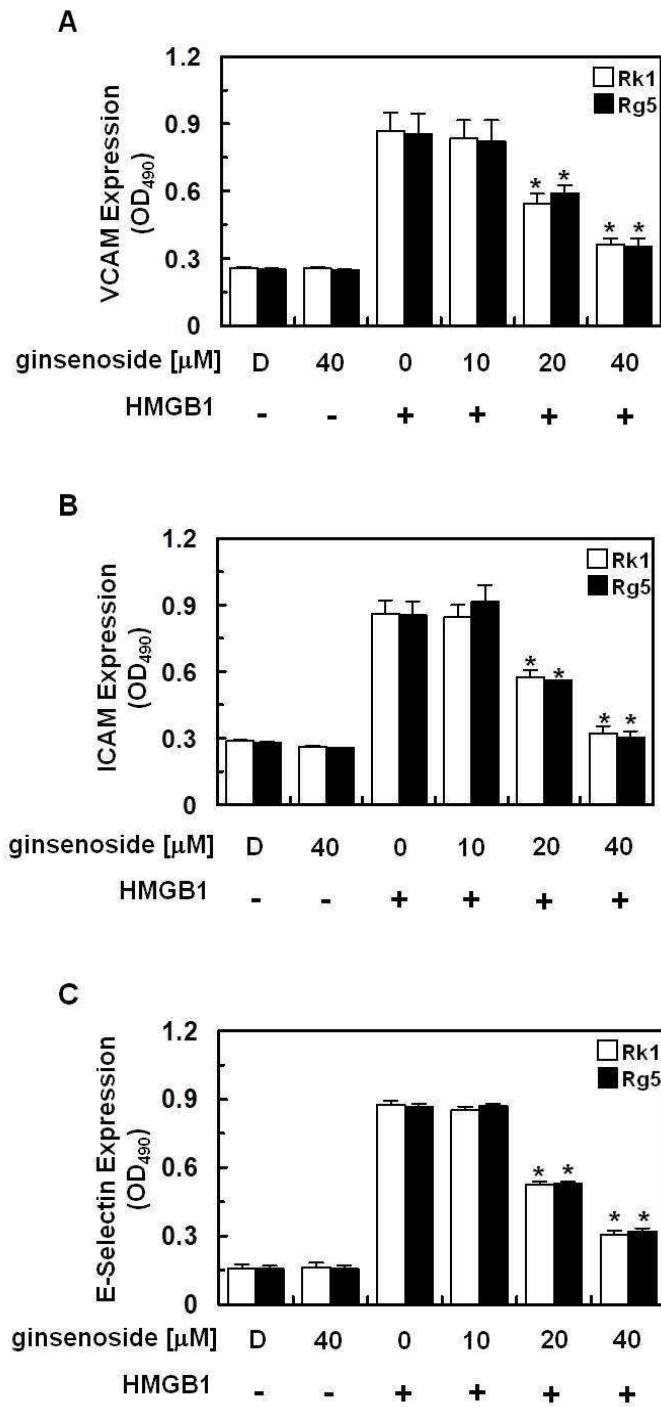
도면2



도면3



도면4



도면5

