(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0138356
(43) 공개일자 2019년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/185 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/185 (2013.01)
A61P 25/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2018-0064694
(22) 출원일자 2018년06월05일
심사청구일자 2018년06월05일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
서홍원
강원도 춘천시 영서로2141번길 25(퇴계동, 중앙하이츠 2차 202동 303호
임순성
강원도 춘천시 후석로 325, 105동 302호(후평동, 춘천더샵 아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이정훈, 진현정

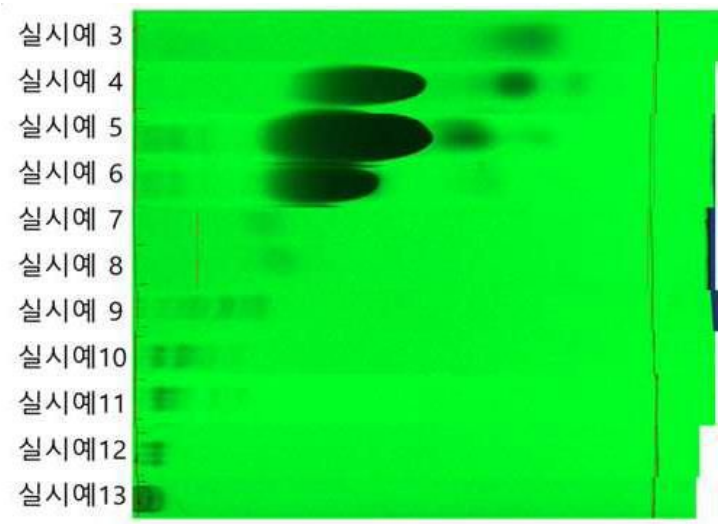
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **로로통 추출물을 유효성분으로 함유하는 통증 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 로로통 추출물 및/또는 이의 소분획물을 유효성분으로 함유하는 통증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 통증 예방 효과가 우수하면서도 독성과 부작용이 없는 천연물 유래의 조성물이므로, 통증 치료에 보다 안전하게 적용될 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
(72) 발명자
김현용
강원도 춘천시 향교앞길 13-10 , 201호
이희정
강원도 춘천시 동산면 논골길 25-7
이수경
강원도 춘천시 우석로85번길 1
최상호
대전광역시 유성구 과학로 125 한국생명공학연구원
김수용
대전광역시 유성구 과학로 125 한국생명공학연구원
박정광
대전광역시 유성구 과학로 125 한국생명공학연구원
이동근
대전광역시 유성구 과학로 125 한국생명공학연구원

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016K1A1A8A01939063
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업
연구과제명 해외생물소재로부터 신경병증(neuropathy)치료 천연물신약 소재 개발
기 여 율 1/1
주관기관 한림대학교 산학협력단
연구기간 2016.10.01 ~ 2018.09.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

로로통 추출물을 유효성분으로 함유하는 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 추출물은 물, C_1 내지 C_4의 직쇄 또는 분지형 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 1종 이상의 용매를 이용하여 추출된 것인, 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 로로통 추출물의 소분획물을 유효성분으로 함유하는, 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 소분획물은 로로통 추출물로부터 극성 용매, 비극성 용매 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 전개 용매로 하는 크로마토그래피(Chromatography)에 의하여 분리된 것인, 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 전개 용매는 100% n-헥산으로부터 100% 에틸아세테이트까지 구배를 갖는 n-헥산, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합 용액 또는 100% 에틸아세테이트부터 100% 메탄올까지 구배를 갖는 에틸아세테이트, 메탄올 및 이들의 혼합 용액인 것인, 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 전개 용매는 n-헥산:에틸아세테이트가 10~30:70~90의 구배를 갖는 것인, 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제 3 항에 있어서,

상기 소분획물을 헥산:에틸아세테이트= 5:3을 전개 용매로 하여 박막크로마토그래피 분리 시, 주요 성분의 Rf 값이 0.1 내지 0.3인 분획을 유효성분으로 함유하는, 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제 3 항에 있어서,

상기 소분획물을 헥산:에틸아세테이트= 5:3을 전개 용매로 하여 박막크로마토그래피 분리 시, 주요 성분의 Rf 값이 0.1 내지 0.2인 분획을 유효성분으로 함유하는, 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제 3 항에 있어서,

상기 소분획물을 헥산:에틸아세테이트= 5:3을 전개 용매로 하여 박막크로마토그래피 분리 시, 주요 성분의 Rf 값이 1.5인 분획을 유효성분으로 함유하는, 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

상기 통증은 통각수용 통증(nociceptive pain), 신경병증성 통증(neuropathic pain), 복합 통증(mixed pain) 및 암성 통증(cancer pain)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 만성 통증인, 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 신경병증성 통증은 항암제에 의한 신경병증성통증(CIPN)인, 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 약학적 제제.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

상기 약학적 제제는 정제, 환제, 산제, 캡슐제, 시럽 또는 에멀젼 형태인, 약학적 제제.

청구항 14

제 12 항에 있어서,

상기 약학적 제제는 약제학적으로 허용 가능한 담체, 보강제 및 부형제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 추가로 포함하는, 약학적 제제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 로로통 추출물 및/또는 이의 소분획물을 유효성분으로 함유하는 통증 예방 또는 치료용 조성물에 관

한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 인간이 느끼는 통증은 크게 급성통증(Acute pain)과 만성통증(chronic pain)으로 구분할 수 있으며, 국제통증연구학회에 따르면 통증은 "실제적 또는 잠재적 조직 손상을 동반한 불쾌한 감각적이고 정서적 경험"이라 정의하고 있다.

[0004] 급성통증은 질병이나 외상에 의한 조직 손상으로 인해 발생하는 침해성 자극에 의해 발생하는 통증으로, 출산통증, 수술 후 통증, 조직손상 후 통증 등이 있으며, 일반적으로 3 내지 6개월 이내 소실되며, 여러 약물(마약성 진통제, 비스테로이드성 소염진통제)에 의해 효과적으로 치료가 된다. 그러나, 만성통증은 여러 불분명한 원인에 의해 신경손상과 이에 따른 신경계의 변화에 의해 유발되며, 원인이 된 질환이나 손상의 치유기간보다 길게 지속이 된다. 또한 통증 부위의 경계가 불분명하며, 지속적으로 무디고 깊은 통증을 보이며, 6개월 이상 지속되며, 마약성 진통제나 비스테로이드성 소염진통제의 효과가 제한적이다. 예를 들어, 편두통, 류마티스성통증, 당뇨병성통증, 및 암성 통증이 있으며, 이러한 통증은 환자의 삶의 질을 급격히 떨어뜨리고, 우울증 등을 수반할 수 있다.

[0005] 한편, 통증을 치료하는 기존의 진통제는 크게 두 종류로 나눌 수 있다. 하나는 몰핀과 같은 마약성 진통제(narcotic analgesics)로서 코데인(codeine)과 디히드로코데인(dihydrocodeine)이 많이 사용되고 있고, 다른 하나는 비스테로이드성 항염제(NSAIDS: non-steroidal anti-inflammatory drugs)로서 아스피린(aspirin), 이브프로펜(ibuprofen), 및 인도메타친(indomethacin) 등이 대표적이다.

[0006] 최근 개발된 새로운 통증 억제제로는 해외의 경우, 통증 치료제 전문 개발사 자벨린 파마슈티컬스(Javelin Pharmaceuticals) 비강내 모르핀 분무제 「릴로민」(Rylomine)이 후기 2상 임상에서 중등도에서 중증 수술 후 통증의 치료에 정맥주사 모르핀과 대등한 진통효과를 나타내는 뿌리는 마약성 진통제를 개발하였으며, 중국에서는 상하이 싱롱 바오테크 제약회사에서 위와 이오테크 제약회사에서 위와장(腸), 유방, 폐, 신장과 관련된 암으로 인한 통증에 효능이 있는 신약 '아킬레스'를 개발한 바 있다. 또한, 바다 달팽이 독에서 추출한 새로운 진통제 '프라이얼트(Prialt)'를 아일랜드 제약회사인 이랜(Elan)이 개발한 진통제로 영국에서 첫 시판되기도 하였다.

[0007] 국내에서는 캡사이신 길항물질을 개발하여 2004년 2월에 독일의 다국적 제약업체인 슈바르쯔 파마社가 이의 가치를 인정, 공동연구 및 라이선스 계약을 체결하였으나, 현재까지, 로로통 추출물 또는 상기 추출물의 소분획물을 이용하여 통증제로 개발하거나 시도된 사례는 없다.

[0008] 만성 악성 종양성 통증은 물론 사회가 고령화됨에 따라 퇴행성 관절염, 요통 관련 질환 환자는 매년 증가 추세에 있으나, 모르핀과 같은 기존의 아편제제는 일반인에게 마약작용으로 인하여 사용에 제한이 있고, 통증자체가 질병으로 여겨지며 이에 대한 관심이 어느 때보다 높고 확산되고 있어 통증완화제의 수요는 향후 훨씬 더 늘 것으로 예상된다. 아울러, 기존의 진통제에 반응하지 않는 통증에 대한 진통제 개발이 크게 요구되는 시점이다.

[0009] 그러나, 기존의 마약성 및 비마약성 진통제들에 반응하지 않는 통증환자가 많이 보고될 뿐만 아니라, 진통효과가 상대적으로 큰 것으로 알려진 기존의 아편유사제제 등이 마약성 및 심각한 부작용들로 인해 일반 환자가 편하게 사용할 수 없는 실정이다.

[0010] 현재까지 진통제로는 아세트아미노펜, 아스피린 등이 주로 사용되어 왔으나, 이들은 성인에게 1일 약 1 내지 4g의 고용량으로 투여되어야 하고 이로 인해 위장장애, 알레르기, 간독성 등의 부작용이 문제되어 왔다. 따라서, 부작용과 독성이 없으며, 진통 효과가 우수한 천연 유래의 통증 예방 또는 치료용 조성물의 개발이 요구된다.

[0011] 이에 본 발명자들은 로로통 추출물 및/또는 이의 소분획물이 통증 예방 또는 치료 효과가 있음을 발견함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 전술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 로로통 추출물 및/또는 이의 소분획물을 유효성분으로 함유하는 통증 예방 또는 치료용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 로로통 추출물 유효성분으로 함유하는 통증 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0016] 아울러, 본 발명의 통증 예방 또는 치료용 조성물은 상기 로로통 추출물의 소분획물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 통증 예방 또는 치료용 조성물은, 일반적인 만성 통증에 적용될 수 있다. 구체적으로 통각수용 통증, 신경병증성 통증, 복합 통증, 암성 통증일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 수술 후 통증, 외상 후 통증, 분만 통증, 관절염 통증, 당뇨병성 신경병증성 통증, 대상포진 후 신경통, 삼차신경통, 척추 수술 후 통증, 척추관협착증, 손목터널증후군, 암에 의한 모든 2차적 통증 등일 수 있으며, 상기 신경병증성 통증은 항암제에 의한 신경병증성통증(CIPN)일 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 로로통 추출물 및/또는 이의 소분획물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 통증 치료 효과가 우수하면서도 독성과 부작용이 없는 천연물 유래의 조성물이므로, 통증 치료에 보다 안전하게 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 로로통 소분획물의 박층크로마토그래피(TLC)를 이용한 성분 분석 시험 결과이다.

도 2 내지 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 로로통 추출물의 진통 효능을 나타내는 라이딩(writhing) 억제 시험 결과이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 로로통 추출물의 추출물의 진통 효능을 나타내는 포르말린 통증 시험(Formalin test) 결과이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 로로통 추출물의 진통 효능을 나타내는 글루타민 산의 통증 시험(Glutamate test) 결과이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 로로통 추출물의 진통 효능을 나타내는 물질 P의 통증 시험(Substance P test) 결과이다.

도 9 내지 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 로로통 추출물의 진통 효능을 나타내는 다양한 사이토카인의 통증 시험(cytokine test) 결과이다.

도 12 내지 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 로로통 추출물의 항암제에 의한 신경병증성통증(CIPN)에 대한 진통 효능을 나타내는 꼬리 움직임 시험(tail-flick test) 결과이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 로로통 추출물의 진통 효능을 나타내는 기계적 자극에 대한 이질통 시험(Von-frey test) 결과이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 로로통 소분획물의 진통 효능을 나타내는 라이딩(writhing) 억제 시험 결과이다.

도 16 내지 도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 로로통 소분획물의 항암제에 의한 신경병증성통증(CIPN)에 대한 진통 효능을 나타내는 꼬리 움직임 시험(tail-flick test) 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 본 발명에 대하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다.

[0023] '로로통'(路路通)(또는 '노로통'이라 함)은 루매과의 식물인 풍향수((楓香樹, Liquidambar taiwaniana Hance (조록나무과 Hamamelidaceae))의 잘 익은 열매로, 로로통 열매의 또 다른 별명은 풍과(楓果), 풍실(楓實), 풍구자(楓球子), 구공자(九孔子) 등이 있다.

[0024] 로로통은 취과로서 여러 개의 작은 삭과가 모여서 된 것이다. 구형이고, 지름은 2~3 ㎝로서 기부에는 총과경(總果梗)이 있으며, 표면은 회갈색 혹은 갈색이며, 뾰족한 가시와 부리모양의 작고 둔한 가시가 많다. 가시 길이는 0.5~1 ㎜로 흔히 끊어져 있으며, 작은 삭과의 머리부분은 열려 있어 봉와상의 작은 구멍을 형성하여, 흡사 밤송이와 비슷한 생김새를 갖는다. 몸체는 가볍고 질은 단단하며 쉽게 깨어지지 않고, 약간의 냄새가 있고 맛이 덤덤하다.

[0025] 로로통이 갖는 효능으로는 거풍통락하고 이수제습하는 효능이 있어, 손발경련, 위통, 수종, 무월경, 악창, 옴, 습진을 치료하는데 사용하였다. 또한, 거풍습(祛風濕) 작용이 있기 때문에 관절통 치료에 사용되기도 하였다.

[0026] 본 발명에서는 풍향수의 열매인 로로통 추출물 및/또는 이의 소분획물이 통증 예방 또는 치료에 우수한 효과가 있음을 확인하고, 본 연구를 완성하였다.

[0027] 본 발명에서 사용된 로로통은 그 형태에 특별한 제한이 없으며, 본 발명의 조성물은 로로통으로부터 얻어진 추출물 및/또는 이의 소분획물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 한다.

[0028] 본 발명에서 용어, "추출물" 은 천연물로부터 분리된 활성 성분을 의미하며, 여기서는 상기 로로통으로부터 분리된 물질을 의미한다.

[0029] 상기 로로통 추출물은 물 및 C_1 내지 C_4의 직쇄 또는 분지형 알코올 또는 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매를 이용하여 통상의 로로통 추출 방법으로 얻어진 것일 수 있다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 로로통 추출물은 효과적인 통증 예방 또는 치료 효과를 달성하기 위하여, 로로통을 30 내지 80 %(v/v) 에탄올로 추출하여 얻어진 에탄올 추출물일 수 있다.

[0031] 상기 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 바람직하게는 가온추출법, 가압추출법, 환류추출법, 온침추출법, 용매추출법, 초음파분쇄 추출법 등에 의할 수 있고, 바람직하게는 용매추출법, 가온추출법에 의할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명에서 용어, "소분획물" 은 추출물의 활성 성분을 분획한 것으로, 여기서는 로로통 추출물을 크로마토그래피에 의하여 여러 개로 분리시킨 일부분을 의미한다.

[0033] 상기 크로마토그래피는 크기, 이온, 전하(극성), 소수성 또는 친화성에 따른 분획물의 분리를 수행할 수 있는 것이면 어느 것이나 가능하나, 바람직하게는 극성에 따른 분리를 수행하는 실리카 겔 크로마토그래피이다. 실리카 겔 크로마토그래피를 사용하는 경우, 이용되는 용매는 겔 크로마토그래피에 통상적으로 사용되는 다양한 용매를 포함하며, 바람직하게는 극성 용매와 비극성 용매의 혼합용매일 수 있다. 예를 들면, 클로로포름(CHCl3)과 메탄올의 혼합 용액, n-헥산과 에틸아세테이트의 혼합 용액 및 에틸아세테이트와 메탄올의 혼합용액으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 1종의 것일 수 있다. 바람직하게는 n-헥산과 에틸 아세테이트 또는 에틸아세테이트와 메탄올의 혼합용액일 수 있다.

[0034] 아울러, 상기한 바와 같이 추출된 추출물 또는 상기 추출물의 소분획물은 이후 감압 여과 과정을 수행하거나 추가로 농축 및/또는 동결 건조를 수행하여 농축하거나 용매를 제거할 수 있다. 따라서, 본 발명에서의 추출물은 통상적 방법으로 건조된 건조물과 통상적 방법으로 농축된 농축물을 포함하는 의미로 사용된다.

[0035] 이하, 본 발명의 로로통으로부터 얻어진 추출물 및/또는 이의 소분획물을 유효성분으로 함유하는 통증 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 제조 방법을 구체적으로 하기의 다양한 실시예를 통하여 상세히 설명한다.

[0037] **실시예 1. 로로통 물 추출물 제조**

[0038] 로로통 열매 1000 g을 크기 0.5 ㎝이하로 잘게 분쇄한 후, 이를 10 배수의 물을 가하고, 60 ℃에서 5 시간 동안 추출하였다. 추출된 추출액을 여과지를 이용하여 여과한 후, 박을 제거하고 얻어진 추출액 9400 ml를 얻었다.

이를 농축하여 110 g의 고형분 로로통 물 추출물을 수득하였다.

[0040] **실시예 2. 로로통 에탄올 추출물 제조**

[0041] 상기 실시예 1에서 로로통 열매에 10 배수의 물을 첨가하는 대신 주정에탄올을 가하는 것을 제외하고는, 실시예 1의 방법과 동일하게 하여 120 g의 고형분 로로통 에탄올 추출물을 수득하였다.

[0043] **실시예 3 내지 13. 로로통 소분획물 제조**

[0044] 상기 실시예 1 에서 수득한 로로통 추출물을 크로마토그래피를 통해 여러 개로 분리시켜 실시예 3 내지 13의 로로통 소분획물을 제조하였다.

[0045] 구체적으로, 극성에 따른 분리를 수행하는 실리카 겔 크로마토그래피를 사용하였고, 전개 용매로는 n-헥산과 에틸아세테이트의 혼합용액을 사용하여 100% n-헥산으로부터 100% 에틸아세테이트까지 구배를 부여한 후, 메탄올의 비율을 증가시켜 용출함으로써 11개의 로로통 소분획물을 수득하였다.

[0046] 전개 용매에 대한 구체적인 농도 구배는 하기의 표 1과 같다.

표 1

[0047]

구분	전개 용매 (노르말-헥산: 에틸아세테이트: 메탄올)
실시예 3	100 : 0 : 0 ~ 95 : 5 : 0
실시예 4	95 : 5 : 0 ~ 80 : 20 : 0
실시예 5	80 : 20 : 0 ~ 75 : 25 : 0
실시예 6	75 : 25 : 0 ~ 70 : 30 : 0
실시예 7	70 : 30 : 0 ~ 60 : 40 : 0
실시예 8	60 : 40 : 0 ~ 50 : 50 : 0
실시예 9	50 : 50 : 0 ~ 30 : 70 : 0
실시예 10	30 : 70 : 0 ~ 20 : 80 : 0
실시예 11	20 : 80 : 0 ~ 10 : 90 : 0
실시예 12	10 : 90 : 0 ~ 0 : 100 : 0
실시예 13	0 : 100 : 0 ~ 0 : 90 : 10

[0049] **실험예 1. 박층크로마토그래피(TLC)를 이용한 성분 분석 시험**

[0050] 상기 실시예 3 내지 13에서 수득한 로로통 소분획물의 주요 성분 물질의 분포를 Rf 값으로 확인하기 위하여, TLC(Thin layer chromatography, silicagel 60(Merk Co. USA)F254 precoated사용) 분석을 실시하였다.

[0051] 상기 분획물을 10 mg/ml 농도로 메탄올에 용해한 후, 10 ul 점적하여 전개 용매(헥산: 에틸아세테이트= 5:3)에 전개하였다. 이 후, UV (254 nm)로 관찰하고, 그 결과를 도 1 및 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0052]

구분	주요성분 Rf	함량%
실시예 3	0.7	1.1
실시예 4	0.5	15.2
실시예 5	0.5+0.4	25.3
실시예 6	0.4	12.1
실시예 7	0.3	5.2
실시예 8	0.3	4.1
실시예 9	0.2	7.1
실시예 10	0.2~0.3	2.2
실시예 11	0.15	5.6
실시예 12	0.1	5.1

실시예 13	~0.1	17.5

[0053] * Rf (Retention factor)= 시료의 이동거리 / 전개 용매의 이동거리

[0055] **실험예 2. 진통 효능 평가: 라이딩(writhing) 억제 시험**

[0056] 상기 실시예 1 및 2에서 수득한 로로통 추출물의 진통 효능을 평가하기 위하여, 상기 추출물을 마우스에 투여한 후, 라이딩(writhing) 억제 시험을 농도별로 실시하고, 그 결과를 도 2 내지 5에 도시하였다.

[0057] 도 2 및 도 4은 실시예 1에서 수득한 로로통 물 추출물을 및 실시예 2에서 수득한 로로통 에탄올 추출물을 각 농도별로 마우스에 경구 투여한 30분 후, 1% Acetic acid를 복강 투여하여 writhing test를 진행하였다. 이때 대조군으로서 상기 추출물이 투여되지 않은 생쥐를 사용하여 동일하게 시험하였다.

[0058] 그 결과, 저농도부터 고농도까지 유의성 있는 진통 효능을 보였으며, 특히 로로통 물 추출물의 경우, 저농도에서도 높은 수준의 진통 효능이 유지되는 것을 확인할 수 있다.

[0059] 아울러, 도 3 및 도 5는 실시예 1에서 수득한 로로통 물 추출물 및 실시예 2에서 수득한 로로통 에탄올 추출물을 기존의 의약품 제제인 Methysergide, Naloxone, Phentolamine 및 Yohimbine에 더하여 효능을 평가하기 위하여, 상기 성분들을 로로통 추출물과 별도 및 혼합 투여하여 writhing test를 진행하였다.

[0060] 그 결과, 도 3 및 도 5에서 보는 바와 같이, 로로통 추출물을 Methysergide, Naloxone, Phentolamine 및 Yohimbine에 혼합 투여하였을 때 내지는 단독 투여하였을 때 유의적인 진통 효능을 확인할 수 있다.

[0062] **실험예 3. 진통 효능 평가: 포르말린 통증 시험(Formalin test)**

[0063] 상기 실시예 1 에서 수득한 로로통 물 추출물의 진통 효능을 평가하기 위하여, 상기 추출물을 마우스에 투여한 후, 포르말린 통증 시험(Formalin test)을 실시하고, 그 결과를 하기 도 6에 도시하였다.

[0064] 구체적으로, 상기 로로통 추출물을 마우스에 경구 투여한 30분 후, 5% Formalin을 마우스의 왼쪽 발바닥에 투여하여 실험을 진행하였고, 이때 대조군으로서 상기 추출물이 투여되지 않은 생쥐를 사용하여 동일하게 시험하였다.

[0065] 그 결과, 도 6에서 보는 바와 같이, 2nd phase에서 로로통 추출물의 유의적인 진통 효능을 확인할 수 있다.

[0067] **실험예 4. 진통 효능 평가: 글루타민 산의 통증 시험(Glutamate test)**

[0068] 상기 실시예 1 에서 수득한 로로통 추출물의 진통 효능을 평가하기 위하여, Glutamate test를 실시하고, 그 결과를 도 7에 도시하였다.

[0069] 구체적으로, 상기 로로통 추출물을 4주령 ICR 생쥐(체중 약 25 g)에게 여러가지 농도로 경구투여하고, 이 후 30분이 경과한 때에, 각각의 생쥐의 척수강(intrathecal)에 글루타민 산 20 ㎍ 을 투여한 후, 30분 동안 생쥐가 꼬리 및 하반신 쪽을 핥거나 흔드는 등의 통증 반응을 보이는 시간을 측정하였다. 이때 대조군으로서 상기 추출물이 투여되지 않은 생쥐를 사용하여 동일하게 시험하였다.

[0071] **실험예 5. 진통 효능 평가: 물질 P의 통증 시험(Substance P test)**

[0072] 상기 실시예 1 에서 수득한 로로통 추출물의 진통 효능을 평가하기 위하여, Substance P tset를 실시하고, 그 결과를 도 8에 도시하였다.

[0073] 상기 실험예 3에서 글루타민 산 20 ㎍ 대신 물질 P(Substance P) 0.7 ㎍ 을 투여하는 것을 제외하고는, 상기 실험예 3과 동일하게 시험하였다.

[0075] **실험예 6. 진통 효능 평가: 다양한 사이토카인의 통증 시험(cytokine test)**

[0076] 상기 실시예 1 에서 수득한 로로통 추출물의 진통 효능을 평가하기 위하여, 사이토카인의 통증 시험을실시하고, 그 결과를 도 9 내지 도 11에 도시하였다.

[0077] 상기 실험예 3에서 글루타민 산 20 ㎍ 대신 사이토카인 IL-1â 또는 IFN-ɣ 또는 TNF-α 100 ㎍을 투여하는 것을 제외하고는, 상기 실험예 3과 동일하게 시험하였다.

[0079] **실험예 7. 항암제에 의한 신경병증성통증(CIPN)에 대한 진통 효능 평가: 꼬리 움직임 시험(tail-flick test)**

[0080] 상기 실시예 1 에서 수득한 로로통 추출물의 항암제에 의한 신경병증성통증(CIPN)에 대한 진통 효능을 평가하기 위하여, 꼬리 움직임 시험(tail-flick test)을 실시하고, 그 결과를 도 12 내지 도 13에 도시하였다.

[0081] 구체적으로, 상기 로로통 추출물을 4주령 ICR 생쥐(체중 약 25g)에게 여러가지 농도로 경구투여 하였다. 이어서, 각각의 생쥐의 꼬리에 빛(radient heat)을 쪼인 후 작열성 동통 수용기(thermal nociceptor)자극에 따른 통증으로 꼬리 움직임 반응을 보이는 시간을 측정하여 진통 기간(초)을 결정하였다. 이 검사법은 척수동통 회로에 대한 약물의 진통 효과를 확인해준다. 이 때 대조군으로서 상기 추출물이 투여되지 않은 생쥐를 사용하여 동일하게 시험하였다.

[0083] **실험예 8. 항암제에 의한 신경병증성통증(CIPN)에 대한 진통 효능 평가: 이질통 시험(Von-frey test)**

[0084] 상기 실시예 1에서 수득한 로로통 추출물의 진통 효능을 평가하기 위하여, 상기 추출물을 마우스에 투여한 후, 좌골신경 손상 후 기계적 자극에 대한 이질통 시험(Von-frey test)을 실시하고, 그 결과를 하기 도 14에 도시하였다.

[0085] 상기 측정방법은 마우스를 철망 실험대 위에 설치된 아크릴 상자에 넣고 60분 이상 적응시킨 후, Von Frey Filament를 사용하여 연속적인 반응을 Up-Down method로 평가하였다. 구체적으로, Filament를 마우스의 좌측 환부 발바닥에 수직으로 접촉시키고 5~6초간 유지시켜 마우스가 신속한 회피반응을 보이거나 hairs를 떼면서 즉시 움찔하거나 발바닥을 핥으면 양성반응을 보인 것으로 간주하였다. Von Frey Filament부터 자극하여 양성반응을 보이면 약한 Filament로 자극하고, 양성반응이 없으면 강한 Filament로 자극하여 분석하였다. 이때 대조군으로서 상기 추출물이 투여되지 않은 생쥐를 사용하여 동일하게 시험하였다.

[0086] 그 결과, 도 14에서 보는 바와 같이, 상기 로로통 추출물을 투여하고 60분이 되는 시점까지 유의적인 진통 효능을 확인할 수 있다.

[0088] **실험예 9. 진통 효능 평가: 라이딩(writhing) 억제 시험**

[0089] 상기 실시예 3 내지 13에서 수득한 로로통 소분획물의 진통 효능을 평가하기 위하여, 상기 소분획물을 마우스에 투여한 후, 라이딩(writhing) 억제 시험을 실시하고, 그 결과를 도 15에 도시하였다.

[0090] 그 결과, 소분획물마다 다른 진통 효능을 갖는 것으로 나타났으며, 이 중 실시예 11에서 수득한 소분획물의 진통 효능이 가장 우수한 것을 볼 수 있다.

[0092] **실험예 10. 항암제에 의한 신경병증성통증(CIPN)에 대한 진통 효능 평가: 이질통 시험(Von-frey test)**

[0093] 상기 실시예 6, 10, 11에서 수득한 로로통 소분획물의 진통 효능을 평가하기 위하여, 상기 각 소분획물을 농도별로 마우스에 투여한 후, 좌골신경 손상 후 기계적 자극에 대한 이질통 시험(Von-frey test)을 실시하고, 그 결과를 하기 도 16 내지 18 에 도시하였다.

[0094] 도 16을 참조하면, 실시예 6에서 수득한 로로통 소분획물의 경우, 투여 후 90분이 되는 시점에서 고농도의 소분획물이 보다 진통 효능을 보이나, 농도 및 시간에 따른 유의적인 큰 차이는 없었다.

[0095] 도 17을 참조하면, 실시예 10에서 수득한 로로통 소분획물의 경우, 40 mg/kg의 농도로 투여한 후 120분이 되는 시점에서, 우수한 진통 효능을 확인할 수 있다.

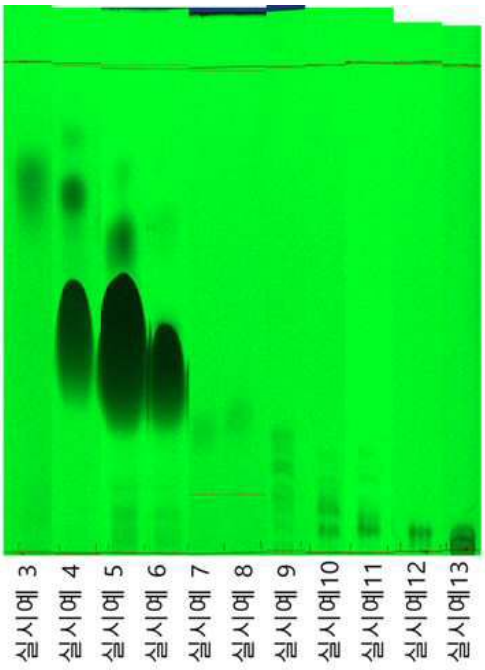
[0096] 아울러, 도 18을 참조하면, 실시예 11에서 수득한 로로통 소분획물의 경우, 20 mg/kg의 저농도부터 80 mg/kg의

고농도까지 유의적인 진통 효능을 확인할 수 있다.

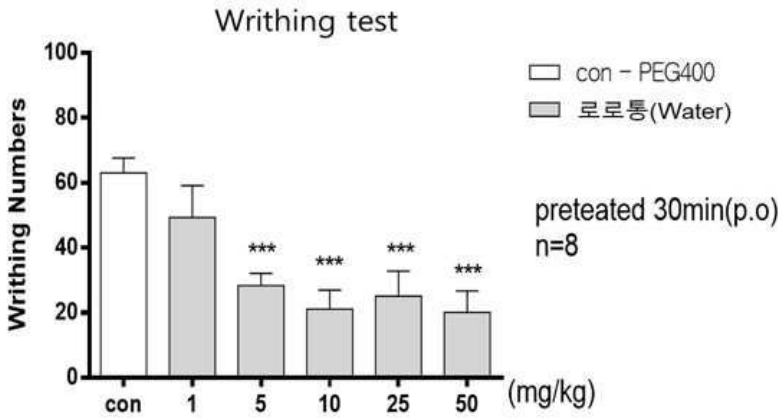
[0098] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

도면

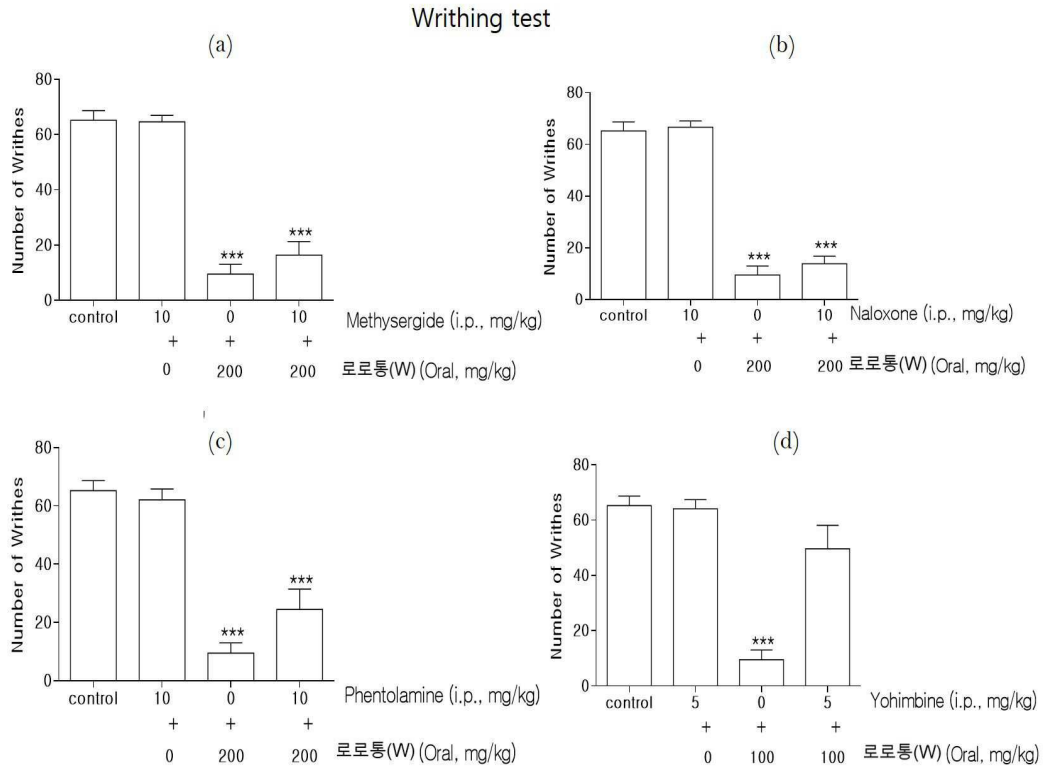
도면1



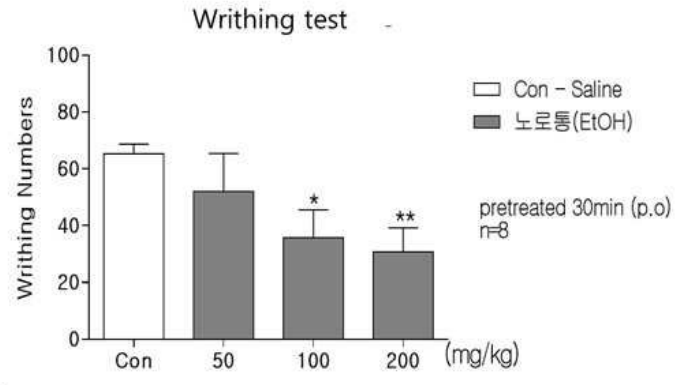
도면2



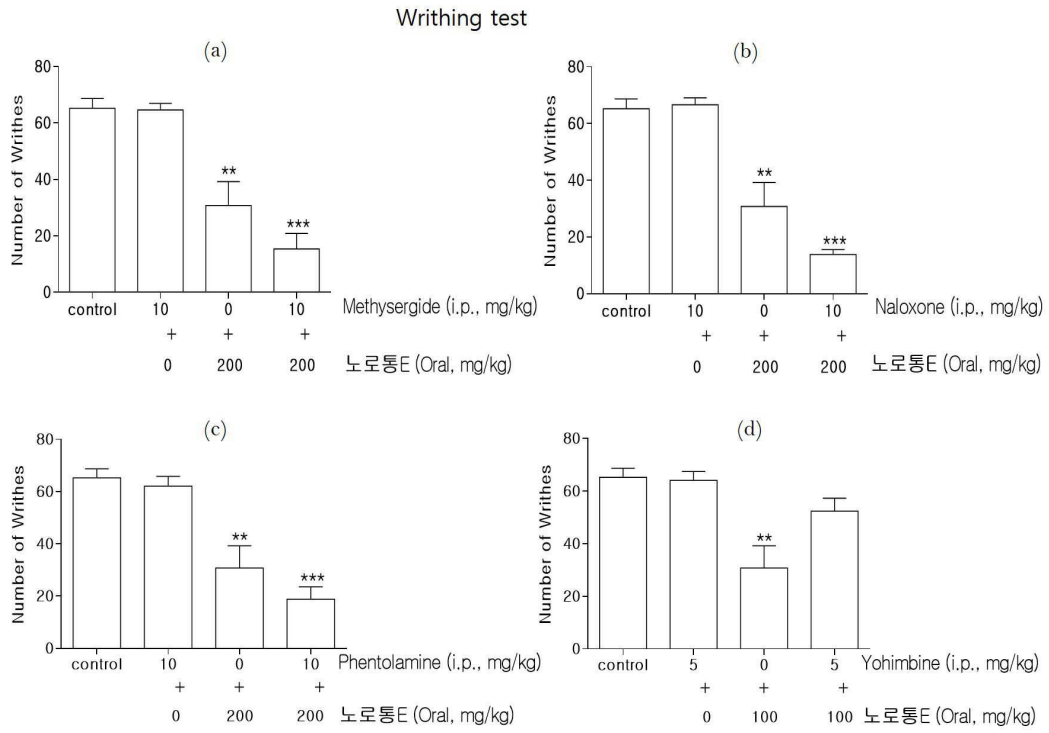
도면3


Writhing test
(a)
(b)
(c)
(d)
Number of Writhes
control
Methysergide (i.p., mg/kg)
Naloxone (i.p., mg/kg)
Phentolamine (i.p., mg/kg)
Yohimbine (i.p., mg/kg)
로로통(W) (Oral, mg/kg)

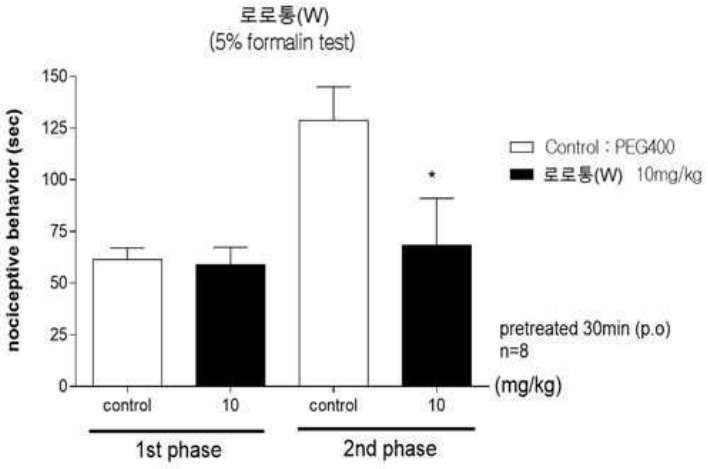
도면4


Writhing test
Writhing Numbers
Con - Saline
노로통(EtOH)
pretreated 30min (p.o)
n=8
Con
50
100
200
(mg/kg)

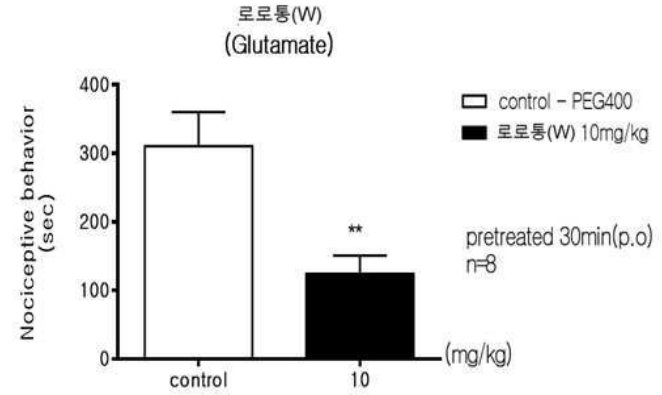
도면5


Writhing test
(a)
(b)
(c)
(d)
Number of Writhes
control
Methysergide (i.p., mg/kg)
Naloxone (i.p., mg/kg)
Phentolamine (i.p., mg/kg)
Yohimbine (i.p., mg/kg)
노로통E (Oral, mg/kg)

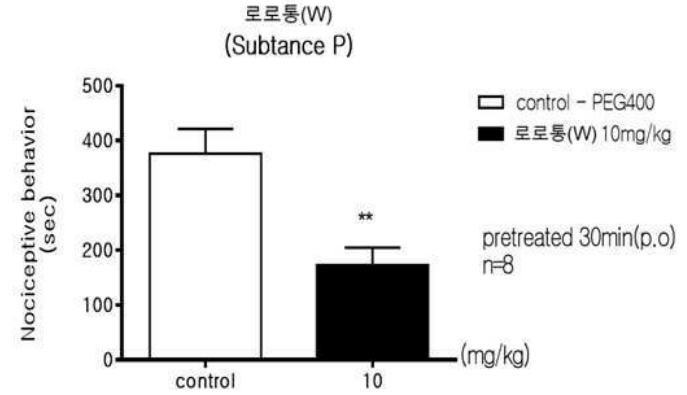
도면6


로로통(W)
(5% formalin test)
nociceptive behavior (sec)
Control : PEG400
로로통(W) 10mg/kg
pretreated 30min (p.o)
n=8
(mg/kg)
control
10
1st phase
2nd phase

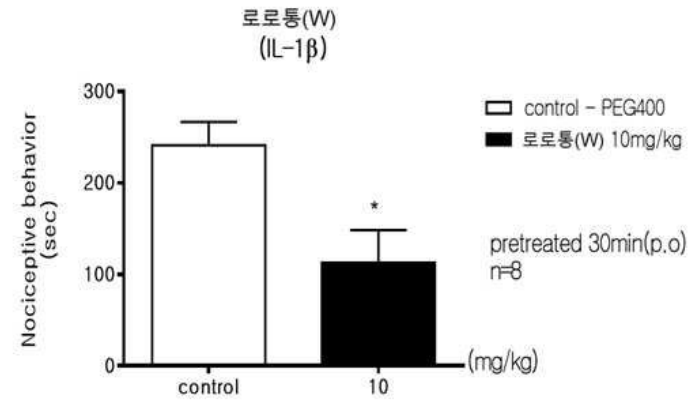
도면7


로로통(W)
(Glutamate)
Nociceptive behavior (sec)
400
300
200
100
0
control
10
(mg/kg)
**
control - PEG400
로로통(W) 10mg/kg
pretreated 30min(p.o)
n=8

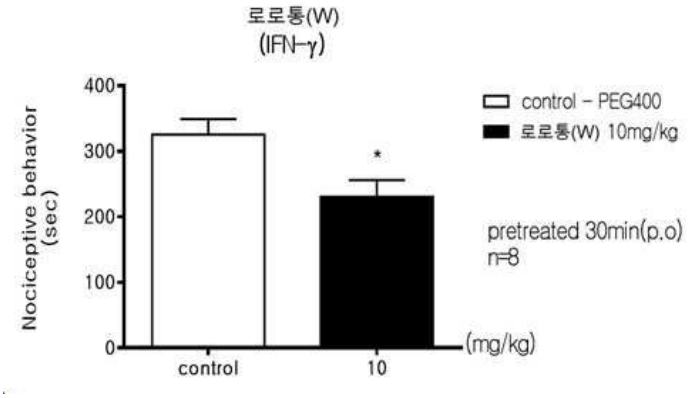
도면8


로로통(W)
(Subtance P)
Nociceptive behavior (sec)
500
400
300
200
100
0
control
10
(mg/kg)
**
control - PEG400
로로통(W) 10mg/kg
pretreated 30min(p.o)
n=8

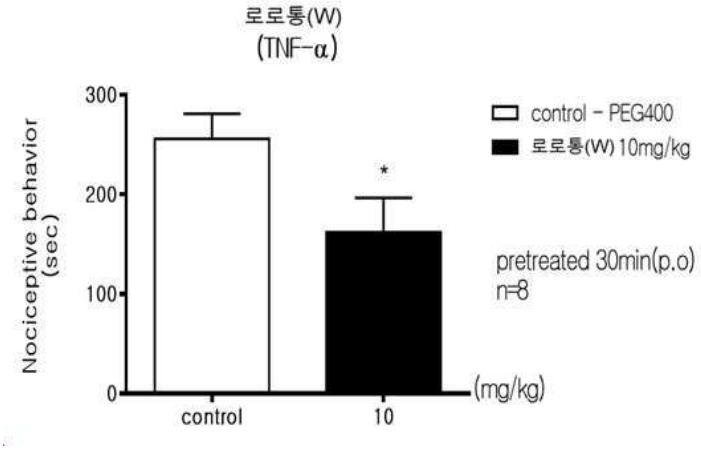
도면9


로로통(W)
(IL-1β)
Nociceptive behavior (sec)
300
200
100
0
control
10
(mg/kg)
*
control - PEG400
로로통(W) 10mg/kg
pretreated 30min(p.o)
n=8

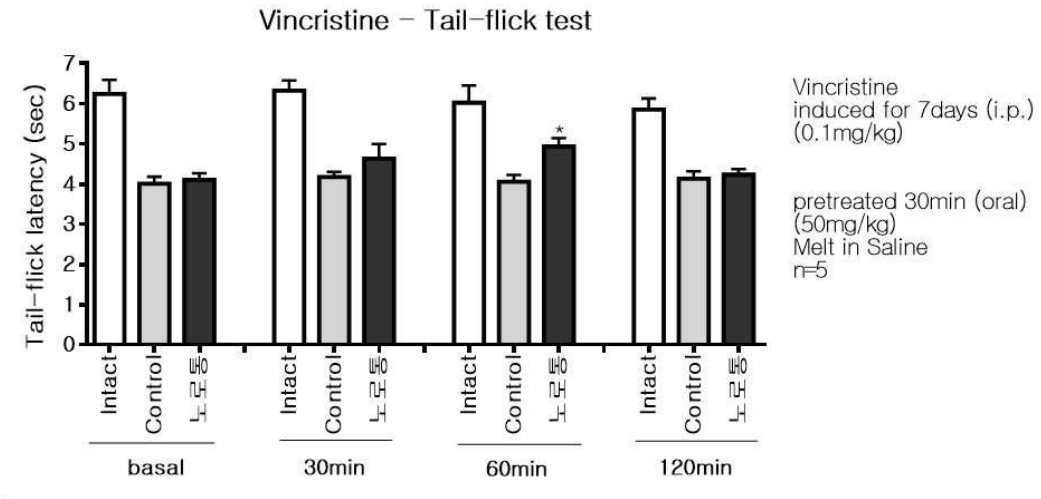
도면10



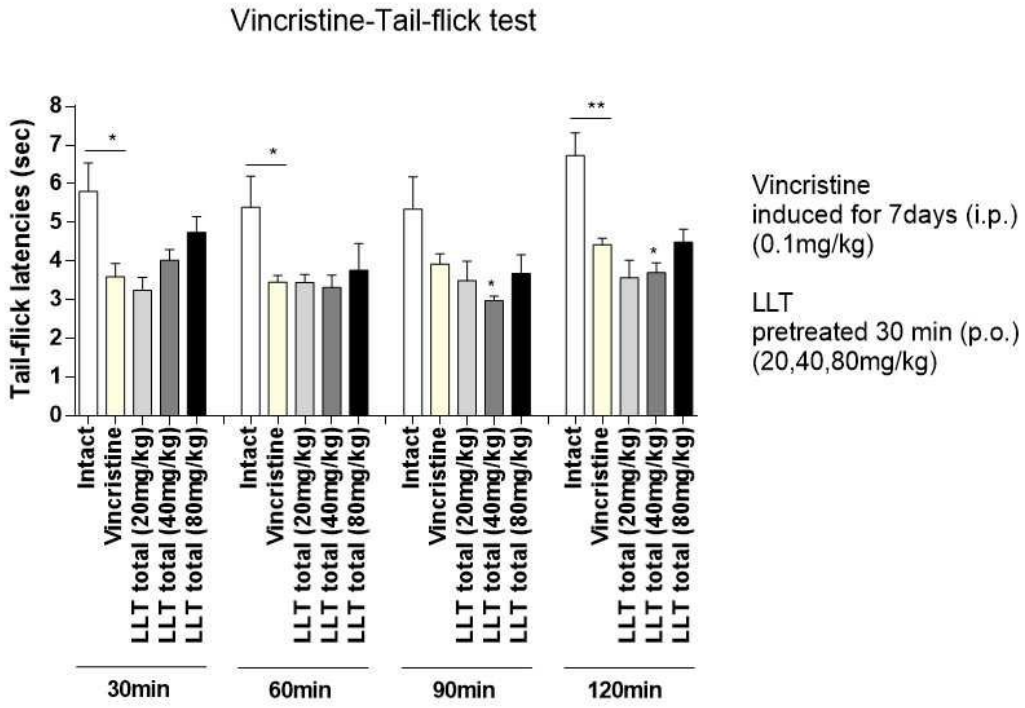
도면11



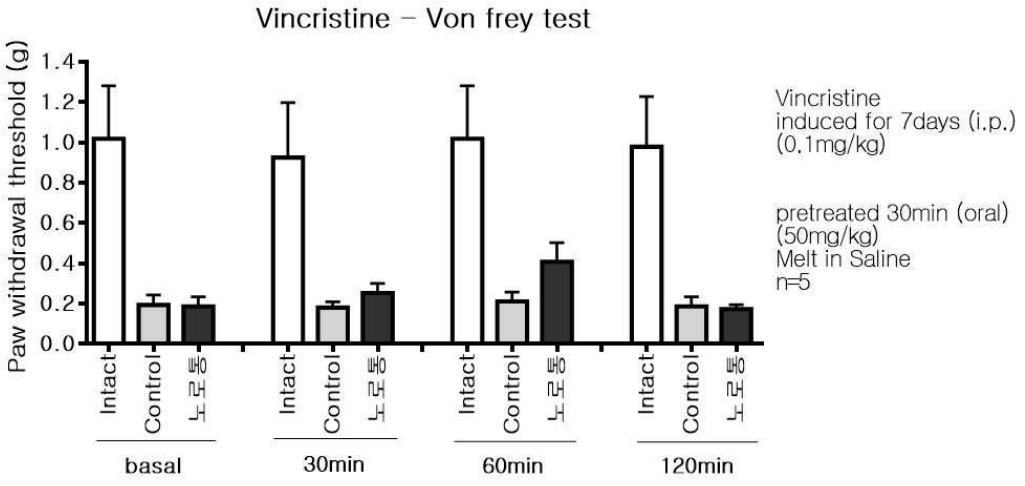
도면12



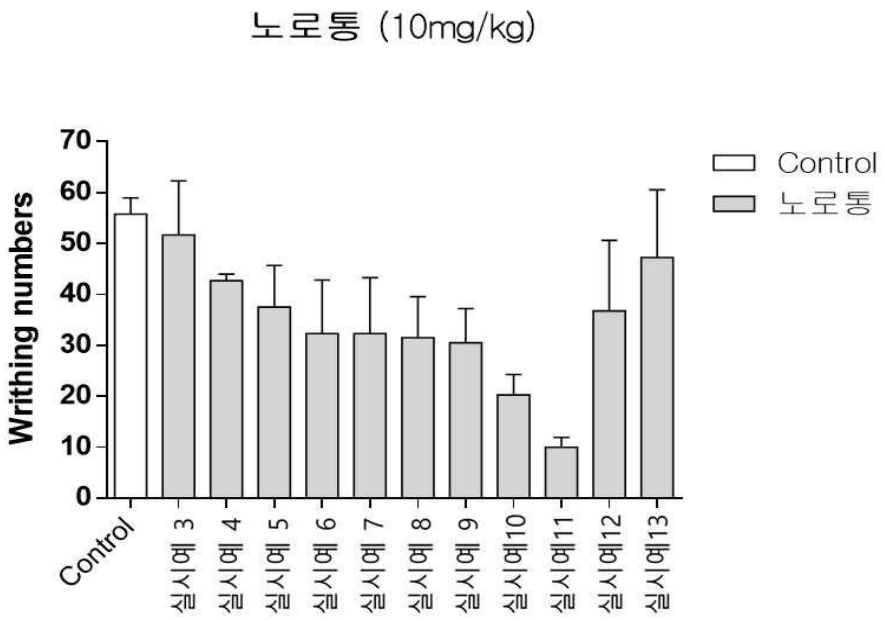
도면13


Vincristine-Tail-flick test
Tail-flick latencies (sec)
Intact
Vincristine
LLT total (20mg/kg)
LLT total (40mg/kg)
LLT total (80mg/kg)
30min
60min
90min
120min
Vincristine
induced for 7days (i.p.)
(0.1mg/kg)
LLT
pretreated 30 min (p.o.)
(20,40,80mg/kg)

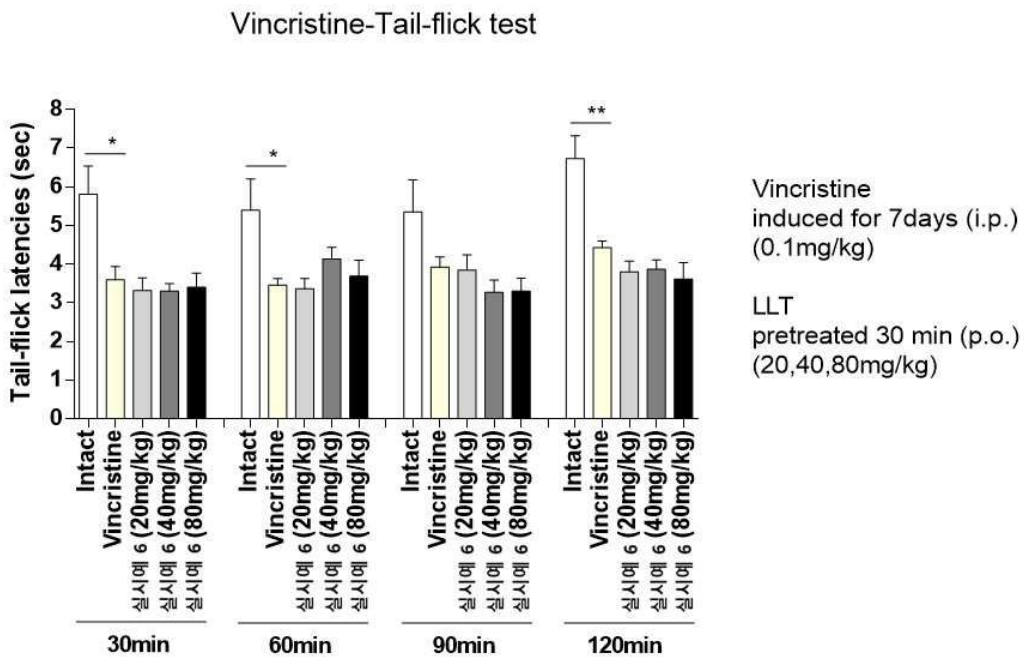
도면14


Vincristine – Von frey test
Paw withdrawal threshold (g)
Intact
Control
노로통
basal
30min
60min
120min
Vincristine
induced for 7days (i.p.)
(0.1mg/kg)
pretreated 30min (oral)
(50mg/kg)
Melt in Saline
n=5

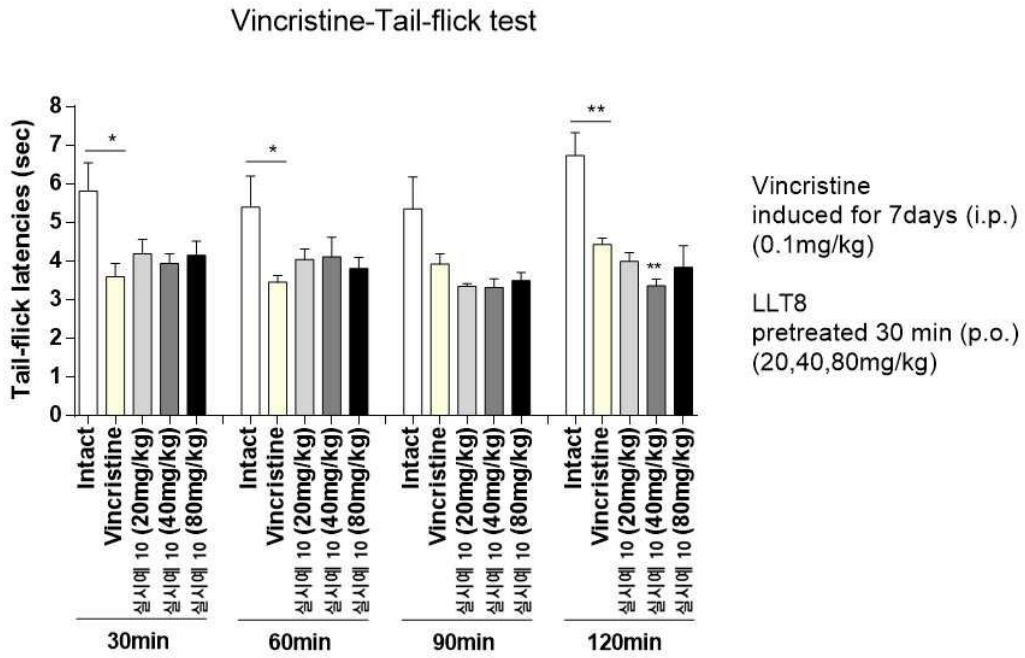
도면15


노로통 (10mg/kg)
Writing numbers
70
60
50
40
30
20
10
0
Control
노로통
Control
실시예 3
실시예 4
실시예 5
실시예 6
실시예 7
실시예 8
실시예 9
실시예10
실시예11
실시예12
실시예13

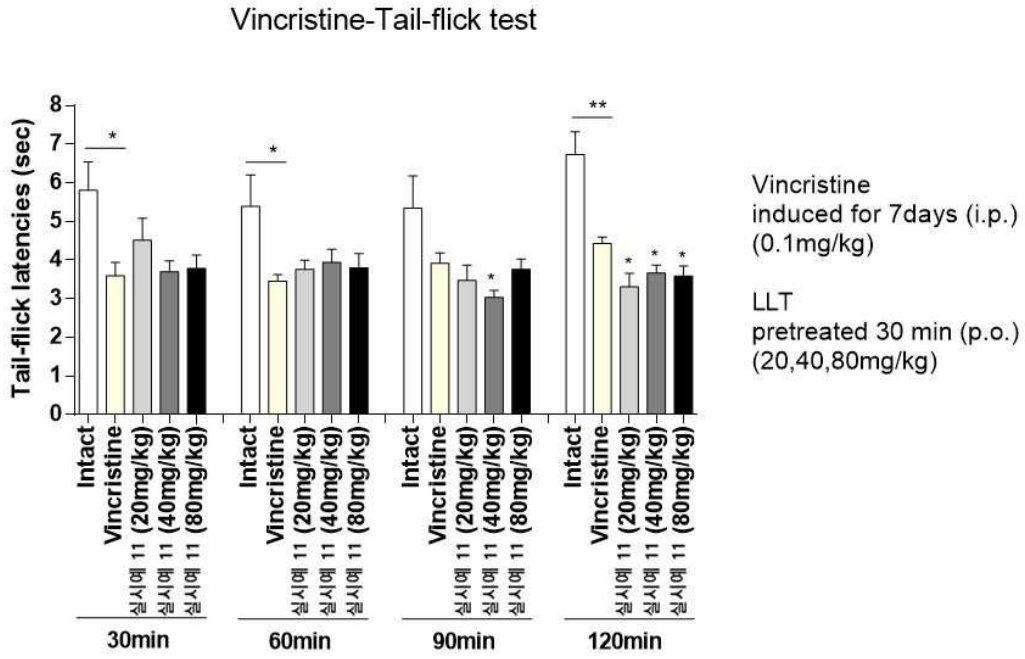
도면16


Vincristine-Tail-flick test
Tail-flick latencies (sec)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
*
*
**
Intact
Vincristine
실시예 6 (20mg/kg)
실시예 6 (40mg/kg)
실시예 6 (80mg/kg)
30min
60min
90min
120min
Vincristine
induced for 7days (i.p.)
(0.1mg/kg)
LLT
pretreated 30 min (p.o.)
(20,40,80mg/kg)

도면17


Vincristine-Tail-flick test
Tail-flick latencies (sec)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
*
*
**
**
Intact
Vincristine
실시예 10 (20mg/kg)
실시예 10 (40mg/kg)
실시예 10 (80mg/kg)
30min
60min
90min
120min
Vincristine
induced for 7days (i.p.)
(0.1mg/kg)
LLT8
pretreated 30 min (p.o.)
(20,40,80mg/kg)

도면18


Vincristine-Tail-flick test
Tail-flick latencies (sec)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
*
*
**
*
*
*
Intact
Vincristine
실시예 11 (20mg/kg)
실시예 11 (40mg/kg)
실시예 11 (80mg/kg)
30min
60min
90min
120min
Vincristine
induced for 7days (i.p.)
(0.1mg/kg)
LLT
pretreated 30 min (p.o.)
(20,40,80mg/kg)