



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년11월27일
(11) 등록번호 10-1802089
(24) 등록일자 2017년11월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/704 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 36/258 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/704 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0123284
(22) 출원일자 2016년09월26일
심사청구일자 2016년09월26일
(56) 선행기술조사문헌
Rev. Bras Psiquiatr. 35, 21-28, 2013*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
정성현
서울특별시 서초구 방배로2길 24-5, 13동 901호 (방배동, 임광아파트)
윤태영
서울특별시 중랑구 공릉로18길 59, 101동 804호 (목동, 브라운스톤태릉아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 2 항

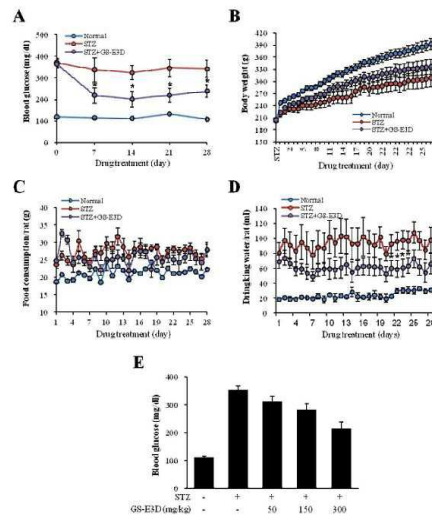
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 당뇨병성 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 당뇨병성 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 건강기능식품에 관한 것으로, 당뇨병성 신경병증성 통증을 효과적으로 예방, 치료 또는 개선할 수 있는 당뇨병성 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 건강기능식품에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)
A61K 36/258 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2250/2124 (2013.01)
A23V 2250/50 (2013.01)
A61K 2236/19 (2013.01)

(72) 발명자

이지윤

서울특별시 중랑구 공릉로18길 59, 103동 1204호
 (목동, 브라운스톤태릉아파트)

최혜영

서울특별시 중랑구 공릉로18길 59, 102동 1404호
 (목동, 브라운스톤태릉아파트)

박찬술

경기도 부천시 상오정로 31-5, 101호 (오정동, 신
 한카사피아아파트)

(56) 선행기술조사문헌

International Journal of Clinical Nutrition,
 1(1), 11-17, 2013.*
 Lab Anim Res, 30(4), 151-160, 2014.*
 KR1020160052243A
 CN104983759A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	315049-5
부처명	농림축산식품부
연구관리전문기관	경희대학교 산학협력단
연구사업명	수출전략기술개발사업
연구과제명	Global 전임상을 통한 고려인삼의 효능 규명 및 현지 시판 가능한 제품개발
기 여 율	1/1
주관기관	경희대학교
연구기간	2015.08.14 ~ 2020.08.13

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

GS-E3D를 유효성분으로 포함하고,

상기 GS-E3D는 백삼 또는 홍삼의 탄소수 1 내지 4의 알코올 수용액 추출물을 효소처리 한 것인 당뇨병성 신경병 증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

GS-E3D를 유효성분으로 포함하고,

상기 GS-E3D는 백삼 또는 홍삼의 탄소수 1 내지 4의 알코올 수용액 추출물을 효소처리 한 것인 당뇨병성 신경병 증성 통증 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 5

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 당뇨병성 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 당뇨병(diabetes mellitus)은 고혈당을 특징으로 하는 일련의 복합적이며 만성적인 대사성 질환으로, 고혈당 자체에 의한 임상적 증상 외에 장기적인 합병증의 발병이 매우 심각하다.
- [0003] 그 중 당뇨병성 신경병증(diabetic neuropathy)은 심각하고 위험한 당뇨병의 합병증 중 하나로, 크게 다발성 말초신경병증과 국소성 말초신경병증으로 분류된다. 다발성 말초신경병증으로는 고혈당성 신경병증, 원위부 대칭성 다발신경병증, 자율신경병증, 급성 감각신경병증, 급성 통증성 감각신경병증, 만성 운동성 감각신경병증 등이 포함된다. 국소성 말초신경병증은 뇌 신경병증, 몸통 및 사지 신경병증, 흉요추 신경병증, 요천골 신경총근병증 등으로 분류된다(Andrew J.M. et al., Diabetescare 28:956-962 (2005); J Gareth Llewelyn et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry 74:15-19 (2003)). 당뇨병성 신경병증은 심한 통증 및 운동성 상실 등을 대표적인 증상으로 가진다.
- [0004] 현재 당뇨병성 신경병증에 대해 시판 허가를 받은 약물로는 Pfizer 의 Lyrica ®와 Eli Lilly 의 Cymbalta®가 유일하다. 이 두 약물은 당뇨병성 신경병증에서 나타나는 통증을 완화시키는 일종의 진통제일 뿐, 질병의 진행을 지연시키거나 증상을 근본적으로 개선하지 못하는 한계가 있다.
- [0005] 당뇨병성 신경병증 환자의 신경의 손상을 막고 예방하기 위해서는 신경병증의 병인에 대한 치료가 필요하지만, 그 신경병증의 발병기전이 매우 복잡하며 여러 영향 인자를 포함하고 있어 현재로서는 이러한 약물치료 외에 통증 완화, 운동기능 향상, 정신적 스트레스 감소를 위한 대증적인 요법이 이용되고 있다. 근본적인 치료제가 없는 현재로서는 식이조절을 통한 당뇨병의 조절이 당뇨병성 신경병증의 발생률을 최소화할 수 있는 유일한 방법

이다.

- [0006] 따라서, 부작용이 비교적 적은 천연 물질을 이용하여 당뇨병성 신경병증성 통증을 개선, 예방 또는 치료하기 위한 효과적인 치료제의 개발이 절실한 실정이다.
- [0007] 본 발명자들은 안전하면서도 효과적으로 당뇨병성 신경병증의 통증을 예방 또는 치료할 수 있는 치료제를 개발하기 위하여 연구를 진행하던 중, GS-E3D가 당뇨병성 신경병증의 통증의 개선, 예방 또는 치료에 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 당뇨병성 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.
- [0009] 본 발명은 또한 GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 당뇨병성 신경병증성 통증 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 당뇨병성 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0011] 이하, 본 명세서에 대하여 더욱 상세하게 설명한다.
- [0012] 본 명세서에서 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0013] 본 명세서에서 상기 "예방"이란 상기 약학적 조성물의 투여로 당뇨병성 신경병증성 통증을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 상기 "치료"란 상기 약학적 조성물의 투여로 당뇨병성 신경병증성 통증의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0014] 본 명세서에서 당뇨병성 신경병증성 통증(diabetic neuropathic pain)이란 당뇨병성 신경병증으로 인한 신경손상 및 비정상적인 신경기능으로 인해 발생하는 만성적인 병적 통증을 의미한다.
- [0015] 본 발명의 약학적 조성물은 GS-E3D를 유효성분으로 포함하며, 상기 GS-E3D는 진세노사이드 Rd를 진세노사이드 Rd 함량 기준 규격인 10 mg/g 이상 포함한다. 상기 GS-E3D는 백삼으로부터 추출되거나, 효소 처리된 홍삼으로부터 추출될 수 있으나, 이를 한정하지 않는다.
- [0016] 상기 진세노사이드 Rd(Ginsenoside Rd)는 프로토파낙사디올(Protopanaxadiol/PPD) 진세노사이드의 일종으로, 화학식은 2-O-베타-D-글루코피라노실-(3베타,12베타)-20-(베타-D-글루코피라노실옥시)-12-히드록시담마라-24-엔-3-일-베타-D-글루코피라노시드이다.
- [0017] 진세노사이드 Rd는 부신피질호르몬 분비 촉진 작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 간기능 개선효과(대한민국 공개특허공보 10-1994-0011007), 신경퇴행성 질환의 예방 효과(대한민국 공개특허공보 10-2007-0033977호) 및 지질개선 효과(대한민국 공개특허공보 제10-2016-0052243호) 등이 공개되어 있으나, 당뇨병성 신경병증성 통증 관련 작용효과에 대해서는 밝혀진 바 없었다.
- [0018] 본 명세서에서 백삼(white ginseng)이란 4 내지 6년근 인삼의 껍질을 벗겨내고, 그대로 햇볕에 건조시켜 제조한 14% 이하의 수분함량을 갖는 원형 그대로의 인삼제품을 의미하며, 전체적으로 미황백색의 색을 나타내고, 형태를 기준으로 하여 직삼, 곡삼 및 반곡삼으로 분류한다(한국인삼사 편집위원회. 2002. 한국인삼사(하권) 동일문화사: 16-167). 상기 백삼은 쉽게 변질되지 않고, 별도의 가공과정이 필요하지 않으므로, 쉽게 변질되기 때문에 과도한 유통비용이 소요되는 수삼이나, 증자 및 건조단계를 반복하여 상당한 가공비용이 소요되는 홍삼에 비하여, 가격 면에서 저렴하다는 장점이 있다.
- [0019] 본 명세서에서 “추출물”은 천연물로부터 그 안의 성분을 뽑아냄으로써 얻어진 물질을 의미하는 것으로, 뽑아내는 방법이나 성분의 종류와 무관하게 모든 형태를 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 백삼 추출물은 당업계에서 공지된 통상의 방법에 따라, 즉 통상적인 온도와 압력의 조건하에서, 통상적

인 용매를 사용하여 제조될 수 있다.

- [0021] 추출용매로는 물, 유기용매 또는 이의 혼합용매가 이용될 수 있으며, 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 헥산, 아세트산에틸, 디클로로메탄, 에테르, 클로로포름 및 아세톤으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것이 바람직하다. 상기 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 및 n-부탄올로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것이 바람직하며, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올은 무수 또는 함수 알코올을 모두 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 추출 용매는 탄소수 1 내지 4의 알코올 수용액일 수 있고, 상기 알코올 수용액은 바람직하게는 70% 에탄올일 수 있다.
- [0023] 추출방법은 당 분야에 알려진 추출방법, 예컨대 냉침, 열수 추출, 초음파 추출, 환류냉각 추출, 초임계 추출, 압착 추출 등의 방법으로 수행될 수 있으나, 이에 국한되지 않는다.
- [0024] 본 발명의 일 실시예에 있어서, GS-E3D는 백삼을 에탄올 추출 방법으로 추출하여 수득한 백삼 추출물을 농축한 후, 상기 농축된 추출물을 식품의 생산에 통상적으로 사용되어 안정성이 입증된 분해효소(lyase)로 처리하고, 반응이 끝난 후 가열하여 동결 건조시킴으로써 얻을 수 있다.
- [0025] 본 발명의 GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 스트렙토조토신-유도성 당뇨병 쥐 모델에서의 통증과 관련된 물리적 이질통(mechanical allodynia) 및 열에 대한 통각과민(thermal hyperalgesia) 실험에서 물리적 이질통 및 통각과민의 현저한 감소를 나타내어 통증을 효과적으로 완화시키는 효과가 있음을 확인하였다(도 2).
- [0026] 또한, 본 발명의 GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 스트렙토조토신-유도성 당뇨병 쥐 모델에서 염증반응의 억제에도 치료 효과가 있음을 확인하였다(도 3).
- [0027] 따라서, 본 발명의 GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 당뇨병성 신경병증성 통증의 예방 또는 치료에 우수한 효과를 나타낼 수 있다.
- [0028] 본 발명의 약학적 조성물은 약효를 증가시키지는 않으나 약학적 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 성분을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 예컨대, 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화 전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 있으나, 이를 한정하지 않는다. 추가로, 상기 약학적 조성물은 단독 사용하거나 기존에 사용된 당뇨병성 신경병증성 통증에 대한 예방 또는 치료 활성을 가지는 물질을 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하고 경구 또는 비경구용의 인체 또는 수의용으로 제형화될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물을 제제화하는 경우 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다.
- [0030] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 화합물을 포함하는 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose) 및 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘, 스티레이트, 탈크 같은 윤활제를 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물 및 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0031] 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜 및 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다.

- [0033] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 개체에 투여하여 당뇨병성 신경병증성 통증을 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어, "개체"는 당뇨병성 신경병증으로 인해 유발된 통증을 가지고 있으며, 본 발명의 상기 약학적 조성물을 투여하여 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간을 포함한 말, 양, 돼지, 염소, 개 등의 포유동물을 의미하나, 바람직하게는 인간을 의미한다.
- [0034] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 개체에 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미한다. 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물이 표적 세포로 이동할 수 있도록 하는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용된 용어, 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 체중, 성별, 연령, 건강상태, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 단일 또는 다중 투여될 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 투여량은 약제학적으로 유효한 양이어야 한다. “약학적으로 유효한 양”은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 예방 또는 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 제제화 방법, 환자의 상태 및 체중, 환자의 성별, 연령, 질환의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간, 배설 속도, 반응 감응성 등과 같은 요인들에 따라 당업자에 의해 다양하게 선택될 수 있다. 유효량은 당업자에게 인식되어 있듯이 처리의 경로, 부형제의 사용 및 다른 약제와 함께 사용할 수 있는 가능성에 따라 변할 수 있다.
- [0037] 본 발명에 따른 GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 투여량 또는 복용량은 환자의 나이, 신체적 조건, 몸무게 등에 의해 다양화될 수 있지만, 일반적으로 1 ~ 20 mg/kg(몸무게)/1일 범위 내에서 투여하는 것이 바람직하다. 그리고, 1일 유효투입량 범위 내에서 하루에 한번 또는 하루에 여러 번 나누어 투입할 수 있다.
- [0038] 본 발명은 또한 GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 당뇨병성 신경병증성 통증 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0039] 본 발명에서의 GS-E3D에 대한 설명은 전술한 바와 같다.
- [0040] 본 발명의 GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 조성물은 식품에 포함되어 섭취시 당뇨병성 신경병증의 통증 완화 효과를 나타내므로, 당뇨병성 신경병증의 통증을 효과적으로 개선, 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0041] 상기 당뇨병성 신경병증성 통증을 예방 또는 개선용 건강기능식품은 본 발명의 백삼 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0042] 본 명세서에서 상기 “기능 식품”이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, 본 명세서의 상기 “기능”이란 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적인 작용으로 보건 용도에 유용한 효과를 의미할 수 있다.
- [0043] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 백삼 추출물을 포함하는 조성물에 첨가할 수 있는 식품의 예로는 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함할 수 있다. 상기 외에 본 발명의 백삼 추출물을 포함하는 조성물은 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 건강기능식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [0044] 본 발명에 따른 GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 당뇨병성 신경병증성 통증을 효과적으로 완화시켜 당뇨병성 신경병증성 통증을 개선, 예방 또는 치료에 현저한 효과를 보인다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 정상대조군(Normal), STZ-유도성 당뇨병 쥐 모델(STZ) 및 GS-E3D 처리된 STZ-유도성 당뇨병 쥐 모델(STZ+GS-E3D)에서 (A) 혈당, (B) 체중, (C) 사료 섭취, (D) 음수 섭취, 및 (E) 용량별 GS-E3D 처리에 따른 혈당에 있어서의 GS-E3D의 효과를 나타낸 것이다(* $p < 0.05$ vs STZ).

도 2는 정상대조군(Normal) 및 STZ-유도성 당뇨병 쥐 모델(STZ)에서의 STZ-유도성 물리적 이질통 및 열에 대한 통각과민에 대한 GS-E3D의 효과를 통증단위 역치(Paw withdrawal threshold, PWT) 값으로 나타낸 것이다(# $p < 0.05$ vs Normal, * $p < 0.05$ vs STZ).

도 3은 (A) 정상대조군(Normal), (B) STZ-유도성 당뇨병 쥐 모델(STZ) 및 (C) GS-E3D 처리된 STZ-유도성 당뇨병 쥐 모델(STZ+GS-E3D)에서 L4-L5 척수에서의 미세교신경세포 활성화에 대한 GS-E3D의 효과를 x40, x200, x400의 배율로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하, 본 명세서를 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 명세서에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 명세서의 범위가 아래에서 기술하는 실시예들에 한정되는 것으로 해석되지 않는다. 본 명세서의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 명세서를 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0048] 실시예

[0049] 실시예 1: GS-E3D의 제조

[0050] 건조된 백삼 뿌리 500 g을 70% 에탄올로 3번 추출하였다. 얻어진 추출물을 40℃에서 진공 증발기를 이용하여 6 brix로 농축하였다. 상기 농축물을 진탕 배양기에서 5일간 50℃, 150 rpm에서 10% 펙틴 가수분해효소(pectin lyase)와 함께 배양하였다. 반응이 종료된 후, 효소처리된 추출물을 10분간 95℃에서 가열한 후 동결건조시켜 건조된 GS-E3D를 얻었다.

[0051] 상기 수득된 GS-E3D의 진세노사이드를 확인하기 위하여, 발효전 홍삼추출물 GS-C46과 효소처리홍삼추출물인 상기 GS-E3D의 진세노사이드 함량을 HPLC를 이용하여 분석하였으며, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[0052] [표 1] GS-E3D의 진세노사이드 함량

GS-E3D(분말)의 ginsenoside 함량												
Ginsenoside (mg/g)	Rg1	Re	Rf	Rb1	Rc	Rb2	Rb3	Rd	SRg3	RRg3	Rk1	Rg5
발효전 (GS-C46)	3.80 ±0.30	13.90 ±1.00	3.30 ±0.10	47.33 ±7.30	53.93 ±8.80	35.03 ±5.38	6.03 ±1.59	7.53 ±0.35	0.90 ±0.20	0.67 ±0.06	0.93 ±0.06	1.10 ±1.15
발효후 (GS-E3D)	2.90 ±0.70	6.55 ±1.60	3.37 ±0.29	15.37 ±3.88	16.33 ±6.90	12.43 ±2.81	1.53 ±0.25	33.70 ±2.30	2.33 ±0.88	2.60 ±0.20	1.80 ±0.30	2.40 ±0.79

[0053] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, GS-C46에 비하여 효소처리홍삼추출물인 GS-E3D는 프로토파낙사디올(PPD) 계열 진세노사이드인 Rb1, Rc, Rb2 및 Rb3가 현저하게 줄어들어 Rd로 전환됨으로써 진세노사이드 Rd의 함량이 7.53 ± 0.35 mg/g에서 33.70 ± 2.30 mg/g으로 효소처리 전보다 3배 가량 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이것은 당이 4개 붙어있는 진세노사이드 Rb1, Rc, Rb2 및 Rb3가 효소처리에 의해 1개의 당이 떨어져 당이 3개인 진세노사이드 Rd로 전환되었기 때문이다.

[0055] 또한, 대량생산 시스템으로 3회 반복하여 GS-E3D를 제조한 후 진세노사이드의 함량을 분석한 결과에서도 진세노사이드 Rd의 함량은 30.20 ± 71.40 mg/g으로 분석되어 소량으로 제조되었을 때와 비슷한 결과를 보여 하기 표 2와 같이 대량생산 시스템에 공정표준화가 완성됨을 확인하였다.

[0056] [표 2]

GS-E3D(분말)의 ginsenoside 함량												
Ginsenoside (mg/g)	Rg1	Re	Rf	Rb1	Rc	Rb2	Rb3	Rd	SRg3	RRg3	Rk1	Rg5
발효전 (GS-C46)	5.92	13.49	3.98	33.02	25.24	13.66	1.86	7.16	0.70	0.78	1.05	1.10
발효후 (GS-E3D)	4.39	9.46	3.51	22.68	10.50	13.22	1.87	20.81	0.95	1.05	0.63	1.13

[0057]

[0058] **실시예 2: 스트렙토조토신-유도성 당뇨병 쥐 모델의 제작**

[0059] 실험 동물로서 체중이 200g 정도인 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐를 사육실에서 7일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 백서를 정상대조군, STZ-saline군 및 STZ+0.3 g/kg GS-E3D의 세 군으로 나누었다. 각 군별 식이 및 물은 자유로이 섭취케 하였다. 사육실 온도는 24 ~ 26℃, 습도는 60% 정도로 유지하고 12시간 사이클(06:00 ~ 18:00)로 점등과 소등을 하였다.

[0060] 백서에서의 당뇨병 유도는 구연산 완충액(pH 4.5)에 녹인 스트렙토조토신(streptozotocin)을 60 mg/kg의 용량으로 복강내 주사하여 실시하였다. 스트렙토조토신을 이용한 당뇨병 유도 2 ~ 4주후, 당뇨병 쥐 모델은 고혈당, 체중 감소 및 이질통과 통각과민과 같은 발의 신경병증성 통증을 나타내었다. 백서 희생까지 2~8주간 사육하였다.

[0062] **실시예 3: 스트렙토조토신-유도성 당뇨병 쥐 모델에서 GS-E3D의 혈당 및 체중에의 효과 확인**

[0063] 각 군별 공복 시 혈당, 체중, 사료섭취 및 음수투여 결과를 도 1에 나타내었다.

[0064] 도 1에 나타난 바와 같이, STZ+0.3 g/kg GS-E3D 군에서 높은 혈당은 감소하였고(도 1의 A), 체중의 감소가 감소되었음을 확인하였다(도 1의 B).

[0065] 상기 결과로부터, 본 발명에 따른 백삼 추출물로부터 유래된 GS-E3D가 당뇨병에 의한 고혈당 및 체중감소를 억제하는데 효과가 있음을 확인하였다.

[0067] **실시예 4: 스트렙토조토신-유도성 당뇨병 쥐 모델에서 GS-E3D의 당뇨병성 신경병증성 통증 완화 효과 확인**

[0068] 상기 실시예 1에서 제조된 백삼 추출물로부터 유래된 GS-E3D의 신경병증성 통증의 완화 효과를 확인하기 위하여, 스트렙토조토신-유도성 당뇨병 쥐 모델에서 GS-E3D의 투여에 따른 통증 평가를 수행하였다.

[0069] 스트렙토조토신-유도성 당뇨병 쥐 모델에 GS-E3D를 300 mg/kg의 용량으로 하루 2번씩 경구투여 하였다. 약 5주간의 투여 후, 물리적 이질통(mechanical allodynia)과 열에 대한 통각과민(thermal hyperalgesia)을 통해 통증 평가를 실시했다.

[0070] **(1) 물리적 이질통(mechanical allodynia)의 측정**

[0071] 본 발명자들은 기계적 자극에 대한 통증 변화를 측정하여 본 발명에 따른 GS-E3D에 대한 통증 행동의 감소나 완화 효과를 측정하고자 하였다.

[0072] 실험동물은 철망(3 mm × 3 mm) 위의 투명한 플라스틱 박스(10 cm × 10 cm) 아래에 두었다. 적응은 감각 테스트 시작 전 적어도 20분 동안 시켰다. 본프레이 필라멘트(von-Frey filaments)는 양쪽 발바닥에 적용하였다.

[0073] 촉각(기계적) 민감도는 로그로 증가되는 땀땀한 나일론 본프레이 단일 필라멘트 시리즈(3.61, 3.84, 4.08, 4.31, 4.56, 4.74, 4.93 and 5.18mN, Stoelting, WoodDale, IL, USA; equivalent in grams to 0.4, 0.6, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 and 15.0)를 사용하였다. 증가된 기계적 자극에 대한 발의 회피반응은 힘을 충분히 가함으로써 평가하였다. 본프레이 필라멘트는 완전히 구부러질 정도로 각 발에 3-4초 동안 적용되었다. 50% 문턱값은 up-down 방법(Chaplan et al. 1994)을 사용하여 확인하였다. 0.4 ~ 15 g의 8개 본프레이 필라멘트 가운데 중간인 2.0 g(4.31 mN)의 필라멘트를 처음으로 사용하였으며, 여러 부위에서 가장 민감한 부위를 확인하는 것으로 시작했다. 만약 발의 회피반응이 나타나지 않는다면 그 다음 굵기의 필라멘트로 반복하였다. 만약 반응이 있다면 더 약한 필라멘트로 그 민감한 부위에 적용한다. 자극은 2초 간격으로 행하였다.

[0074] 도 2는 정상대조군(Normal) 및 STZ-유도성 당뇨병 쥐 모델(STZ)에서의 STZ-유도성 물리적 이질통 및 열에 대한 통각과민에 대한 GS-E3D의 효과를 통증단위 역치(Paw withdrawal threshold, PWT) 값으로 나타낸 것이다(#p < 0.05 vs Normal, *p < 0.05 vs STZ).

[0075] 구체적으로 도 2의 A는 스트렙토조토신-유도성 당뇨병 쥐 모델을 제조한 후 본 발명에 따른 GS-E3D를 포함하는 조성물을 투여하지 않은 상태에서 무게가 있고 탄성이 있는 필라멘트(filament)로 동물 모델의 발바닥에 자극을 주었을 때, Normal 상태에 비하여, 2.7 ± 0.3 g의 적은 자극에서도 발을 들어올렸다. 이는 당뇨병성 신경병증성 통증이 현저하게 유발되었음을 의미할 수 있다.

[0076] 본 발명의 당뇨병성 동물모델에서 통증이 유발됨을 확인한 후, 본 발명에 따른 GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 조성물의 진통 효과를 확인하였다. 그 결과, 도 2의 B에 나타난 바와 같이, GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 조성물의 처치가 반복될수록 기계적 자극에 대한 통증 반응을 감소시킴으로써 진통효과가 나타나는 것을 확인할

수 있다.

[0078] (2) 열 통각과민(thermal hyperalgesia)의 측정

[0079] 본 발명자들은 온도 자극에 대한 통증 변화를 측정하여, 본 발명에 따른 GS-E3D에 대한 통증 행동의 감소나 완화 여부를 측정하고자 하였다.

[0080] 열 민감성은 Hargreaves et al.(1988)의 방법대로 발바닥 검사 장치를 사용하여 평가하였다. 유리판 위에 당뇨병성 신경병증성 통증 동물모델을 아크릴 박스 내에서 적어도 20분 정도 적응시켰다. 유리판 아래에는 위치 이동 가능한 레이저 빔이 나오는 장치로 실험동물의 발바닥 표면에 맞출 수 있게 되어있다. 그 빔의 열 강도는 약 15초의 평균 발 회피 잠복기를 얻어서 조절되었고 제한 시간은 조직 손상을 막기 위해 20초로 맞췄다. 3번의 열 자극은 5 ~ 10분 간격으로 양쪽 발에 주었다. 세 번 시도한 각 발의 발 회피 잠복기의 평균은 발 회피의 정도를 나타냈다.

[0081] 도 2는 정상대조군(Normal) 및 STZ-유도성 당뇨병 쥐 모델(STZ)에서의 STZ-유도성 물리적 이질통 및 열에 대한 통각과민에 대한 GS-E3D의 효과를 통증단위 역치(Paw withdrawal threshold, PWT) 값으로 나타낸 것이다(# $p < 0.05$ vs Normal, * $p < 0.05$ vs STZ).

[0082] 구체적으로, 도 2의 C는 스트렙토조토신-유도성 당뇨병 쥐 모델을 제조한 후 본 발명에 따른 GS-E3D를 포함하는 조성물을 투여하지 않은 상태에서 스트렙토조토신-유도성 당뇨병성 통증 동물 모델의 발바닥에 열빔으로 자극을 주었을 때, Normal 상태에 비하여, 6.2 ± 0.2 초 버티다가 발을 들어 올림을 확인하였다. 이는 당뇨병성 신경병증성 통증이 현저하게 유발되었음을 의미할 수 있다.

[0083] 본 발명의 당뇨병성 동물모델에서 통증이 유발됨을 확인한 후, 본 발명에 따른 GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 조성물의 진통 효과를 확인하였다. 그 결과, 도 2의 D에 나타난 바와 같이, GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 조성물의 처치가 반복될수록 열적 자극에 대한 통증 반응을 감소시킴으로써 진통효과가 나타나는 것을 확인할 수 있다.

[0084] 실시예 4에 따른 도 2에 나타난 바와 같이, 당뇨병성 신경병증성 통증 모델에서 본 발명에 따른 GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 조성물을 처치하는 경우, 물리적 이질통 평가 결과 실험군이 대조군에 비해 기계적 자극에 대한 통증 반응이 현저히 감소되었으며, 열통각과민 평가 결과 실험군이 대조군에 비해 열 자극을 견디는 시간이 유의하게 증가하는 것을 확인하였다.

[0085] 상기 결과로부터, 본 발명에 따른 백삼 추출물로부터 유래된 GS-E3D가 신경병증성 통증을 완화시키는데 효과가 있음을 확인하였다.

[0087] 실시예 5: 스트렙토조토신-유도성 당뇨병 쥐 모델에서 GS-E3D의 미세교신경세포 활성 억제 효과

[0088] 본 발명에 따른 중추 신경병증성 동물모델에서 GS-E3D에 의한 척수 후각부위의 L4-L5에서의 미세신경교세포의 활성 억제효과를 확인하기 위해서 스트렙토조토신-유도성 당뇨병 쥐 모델에 GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 조성물을 하루에 2번씩 28일 동안 경구 투여하고, 마지막 28일째 경구 투여 1시간 후, 조직을 얻어 면역조직화학 염색법을 실시하였다.

[0089] 미세신경교세포의 마커인 OX-42로 항원-항체반응을 시켜 실험군과 대조군의 활성화된 미세신경교세포의 수를 비교하였다.

[0090] 본 발명에 따른 GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 조성물의 투여 마지막 날 약물 투여 한 시간 후, 클로랄하이드레이트(chloral hydrate) (500 mg/kg)을 복강 내에 주사하여 마취하고, 0.9% 생리식염수 용액을 좌심실을 통해 대동맥에 관류하여 혈관 내의 혈액을 씻어낸 후 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)를 함유하는 0.1몰의 인산 완충액으로 경심적으로 관류 고정하였다. 그 후 요추신경 4번~ 5번 척수신경을 적출하였고 이 조직을 고정액에 2시간 후고정(postfixation)한 후, 4℃의 30% 슈크로즈(sucrose) 용액에 2 ~ 3일간 담궈 조직이 가라앉을 때까지 보관하였다. 적출한 조직은 냉동박절기를 이용하여 척수를 10 mm로 자른 후, 젤라틴으로 코팅된 슬라이드에 붙여 사용 전까지 냉동 보관하였다.

[0091] 10 mm 두께로 자른 척수 절편을 미세신경교세포 마커인 OX-42에 대한 항체를 사용하여 ABC(Avidin-biotinperoxidasecomplex) 방법으로 면역조직-화학염색을 시행하였다(Hsu 등, 1981). 조직의 투과성을 높이기 위하여 0.3% Triton X-100을 포함한 0.05몰 인산완충액(PBS-Tx) 내에서 모든 반응을 진행시켰다. 조직절편을 10% 정상 염소 혈청(normal goat serum, NGS), 1% 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)이 포함된 PBS-

Tx용액에서 1시간 반 동안 반응 시켜 비특이적 항원-항체 반응을 방지하고, 4℃에서 회석한 OX-42 (Millipore, USA)의 1차 항체에 24시간 반응시켰다(회석도는 실험진행 중 결정). 이 조직 절편들을 0.05M PBS-Tx로 10분씩 3회 세척하고, 1:200으로 회석한 2차 항체용액(biotinylated goat anti-mouse IgG)에 담가 2시간 실온에서 반응시켰다. 다시 PBS-Tx로 10분씩 3회 세척한 뒤 ABC 용액에 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 인산완충액으로 10분씩 3회 씻고, 0.01% 과산화수소와 0.05% DAB를 포함한 인산완충액에 5 ~ 10분간(계속 관찰하면서 적절하게 시간을 조절함) 실온에서 발색반응을 일으켰다. 다시 인산완충액으로 10분씩 3회 세척한 후 3차 증류수에 5분씩 3회 세척하고, 상승 농도순의 에틸알코올(ethyl alcohol)과 자이렌(xylene) 으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 덩 개유리를 씌워 영구표본으로 만들었다.

[0092] 척수 후각의 신경교세포의 발현정도는 면역염색 세포의 활성화된(activated) 혹은 비활성화된(resting) 상태로 나누어 개수를 세어 비교, 분석하였다.

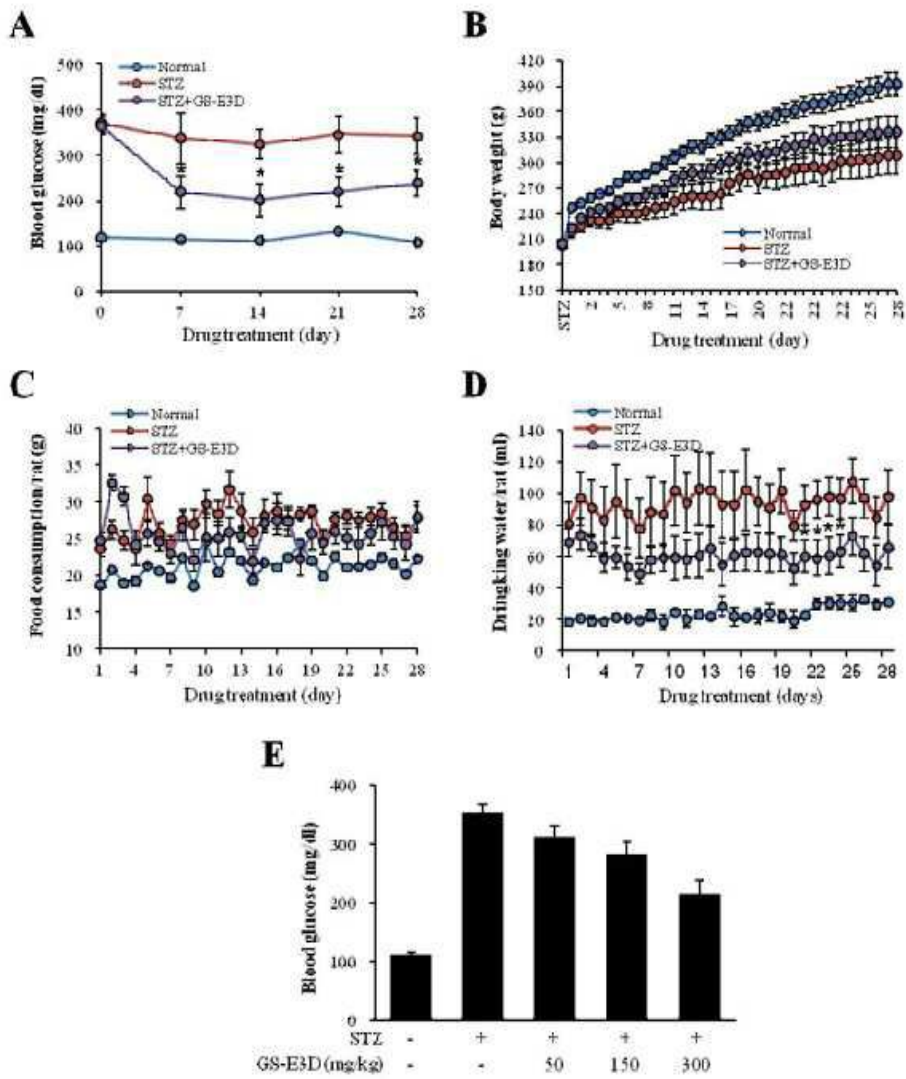
[0093] OX-42의 발현정도는 현미경을 통하여 획득한 척수의 디지털 영상을 분석소프트웨어(Scion image, Scion Corp.USA)를 이용하여 대조군과 비교, 분석하였다.

[0094] 도 3은 (A) 정상대조군(Normal), (B) STZ-유도성 당뇨병 쥐 모델(STZ) 및 (C) GS-E3D 처리된 STZ-유도성 당뇨병 쥐 모델(STZ+GS-E3D)에서 L4-L5 척수에서의 미세교신경세포 활성화에 대한 GS-E3D의 효과를 나타낸 것이다.

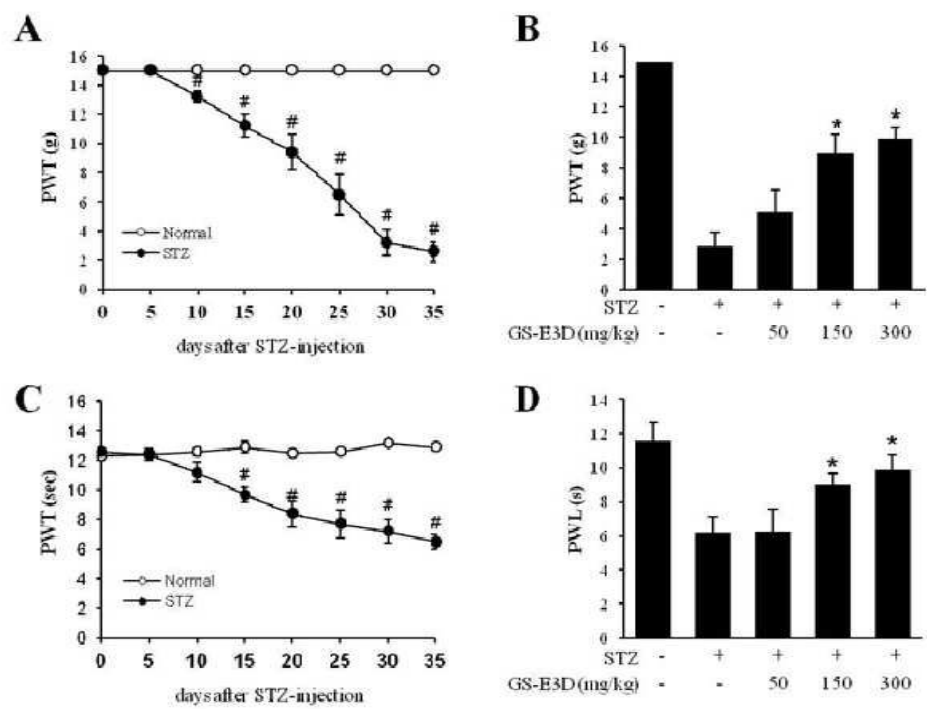
[0095] 도 3B 및 C를 보면 활성화된 미세교신경세포(microglia)의 수는 STZ-유도성 당뇨병 쥐 모델에 비하여, GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 조성물을 투여한 군보다 활성화된 미세교신경세포의 수가 더욱 현저하게 감소함을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 척수 후각에서 활성화된 미세교신경세포가 통증을 증가시키고, 이를 GS-E3D를 유효성분으로 포함하는 조성물이 미세교신경세포의 활성화를 막아 통증을 억제시키는 것을 의미한다.

도면

도면1



도면2



도면3

