



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년03월26일
(11) 등록번호 10-1841951
(24) 등록일자 2018년03월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/655 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/655 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0105614
(22) 출원일자 2017년08월21일
심사청구일자 2017년08월21일
(30) 우선권주장
1020160182639 2016년12월29일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
Brain Research., 1994., Vol.666., pp 182-188*
JP2015520144 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
충남대학교 산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이원형
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 402동 1403호(전민동, 엑스포아파트)
김동운
대전광역시 서구 둔산북로 160, 7동 1003호(둔산동, 한마루아파트)
(74) 대리인
김순용
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 7 항

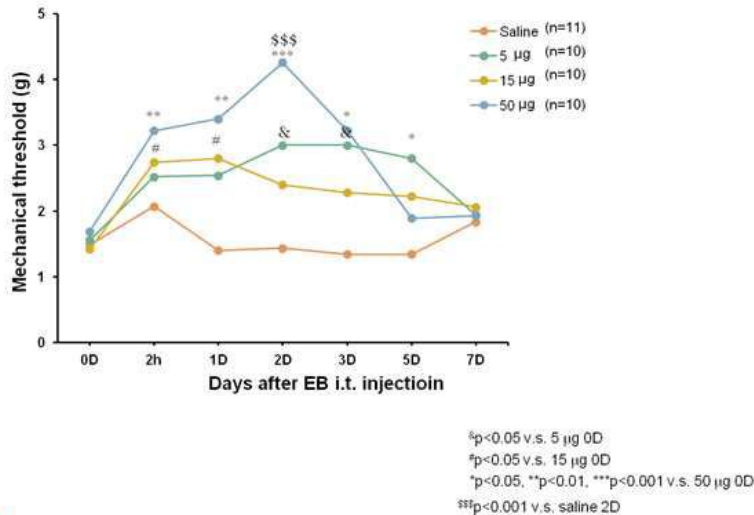
심사관 : 송호선

(54) 발명의 명칭 **에반스 블루를 포함하는 만성통증 질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 에반스 블루를 포함하는 만성통증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 식품 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 에반스 블루를 투여하는 경우, 만성통증, 예컨대 신경병증성 통증을 효과적으로 감소시킬 수 있다. 특히, 에반스 블루는 구심성신경의 말단에서 ATP를 분비하는데 중요한 역할을 하는 배근 신경절의 VNUT 단백질을 주요한 표적으로 하여 부작용 없이 지속적으로 약물을 사용하여 통증을 경감시킬 수 있는바, 만성통증 질환에 의하여 유발되는 각종 통증에 대한 진통제로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류
 A23V 2002/00 (2013.01)
 A23V 2200/30 (2013.01)

윤옥화
 대전광역시 중구 문화로 282(대사동)

(72) 발명자
홍진표
 대전광역시 중구 대흥로10번길 58, 401호(대사동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 2014R1A1A2056019
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 2014년도 하반기 일반연구자지원사업(기본연구)
 연구과제명 신경병증성통증에서 3-MA의 진통효능 및 autophagy작용기전 규명
 기여율 1/3
 주관기관 충남대학교
 연구기간 2014.11.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 2017R1A2B4005905
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 2017년도 중견연구(개인연구)
 연구과제명 신경병증성통증에 대한 Evans blue의 진통효과, 작용기전 및 응용연구
 기여율 1/3
 주관기관 충남대학교
 연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 2016M3C7A1905074
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 2016년도 뇌과학원천기술개발사업
 연구과제명 뇌손상/재생 연관 교세포기반 뇌기능 조절기술 개발
 기여율 1/3
 주관기관 충남대학교
 연구기간 2016.06.01 ~ 2021.02.28

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

에반스 블루(Evans Blue)를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 신경병증성 통증은 말초 신경 손상 또는 중추 신경 손상에 의해서 유도되는 것을 특징으로 하는, 신경병증성 통증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 신경병증성 통증은 말초신경계 이상 또는 손상, 척수신경 손상을 포함한 다발성경화증, 척수부상, 통각과민, 감각과민, 신경병증, 당뇨병성 신경장애, 신경염, 신경통, 작열통, 이질통, 포진후신경통, 요추 신경근압박, 암과 관련된 통증, 알코올 중독, 비정형 안면통증, 포진성 신경통, 증풍후통증, HIV 연관 신경병증, 골관절염 및 환상사지통증으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 것인, 신경병증성 통증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 에반스 블루는 통증의 역치를 증가시키는 것인, 신경병증성 통증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 에반스 블루는 척수내 후각에 분포하는 흥분성 신경세포의 과흥분을 억제하는 것을 특징으로 하는, 신경병증성 통증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 흥분성 신경세포의 과흥분 억제는 배근 신경절의 vesicular nucleotide transporter(VNUT), 척수내 후각에 존재하는 흥분성 신경세포 및 미세아교세포로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 부위의 기능 억제를 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는, 신경병증성 통증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

에반스 블루(Evans Blue)를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 에반스 블루를 포함하는 만성통증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 식품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 통증은 부상이나 수술 후의 수백만의 사람들 및 관절염, 암 및 당뇨병과 같은 질환을 겪는 사람들에게 영향을 미친다. 통각수용(Nociception)(유해 자극 또는 위해 자극의 검출)은 중대한 생물학적 목적을 제공한다. 즉, 이는 살아있는 유기체가 환경의 위협에 대비하도록 하며, 통증 감각, 반사적인 금단 및 복잡한 거동적 및 감정적 반응을 유도하여, 유기체를 추가적인 손상으로부터 보호한다. 유해 자극은 전문화된 고 역치 일차감각 뉴런(통각 수용기)에 의해 검출되며, 이는 척수로 신호를 전달한 다음 통증이라고 불리는 감각의 의식적인 인지를 초래하는 더 높은 수준의 프로세싱을 목적으로 뇌에 이를 전송한다. 통증 자극의 기능적 중요성은 통각 수용에 결합이 있는 개개인에 의해 예시되며, 통증에 선천적으로 무감각한 환자는 이십대를 지나서까지 생존하지 못한다.

[0004] 통증은 발생부위, 원인, 성질 및 발생기전 등을 고려하여 구분할 수 있다. 예를 들면, 통각 수용성 통증은 병태생리학 기전에 의한 분류로서 조직 손상에 따라 발생하고, 유해한 자극에 비례하여 통증이 증가하는 경향을 보인다. 일반적으로 자기-제어 방식이며 유해한 화학적, 열적 및 기계적 자극에 의해 유발된 진행중인 조직 손상을 경고함으로써 방어적인 생물학적 기능을 갖는다. 통각 수용성 통증의 예로는 수술 후 통증, 외상과 연계된 통증, 및 관절염과 연계된 통증 등을 들 수 있다. 이와 달리, 신경병증성 통증은 유해자극 정도와 관계없이 부적절한 이상 반응의 통증으로 자발통, 과통증, 이질통을 특징으로 한다.

[0005] 통증은 그 지속기간에 따라서는 급성과 만성 통증으로 나눌 수 있다. 대표적인 만성 통증 질환으로는 신경병증성 통증, 복합부위 통증 증후군, 대상포진 후 신경통, 척추 수술 후 통증 증후군 등이 있다. 만성통증은 단순히 급성통증의 연장선이 아니며, 통증의 정도는 원래의 손상 정도와 비례하지 않고 자극이 없이도 자발적으로 일어날 수 있다. 통증의 기간과 강도가 환자의 기능이나 생활에 유해한 효과를 일으키거나 또는 정상적인 조직 치유기간, 보통 3개월을 넘어서서 지속되는 경우는 만성 통증으로 정의하며 증상이 아닌 하나의 질병으로 간주한다. 만성 통증은 무자비하고 자기-제어적이지 않으며 초기 부상 후 수년 및 수십 년 까지도 지속될 수 있다. 만성 통증은 성질에 있어서 주로 신경병성이며 말초 또는 중추신경계 손상을 포함할 수 있다.

[0006] 다양한 통증의 종류 중, 외견상으로는 상처나 동통의 원인이 없는데도 발생하는 통증이 바로 신경성 동통, 신경병증성 통증(neuropathic pain)이다. 신경병증성 통증은 암, 자가면역 질환 또는 대상포진 감염에 의한 신경 압박(nerve compression), 신경 외상(nerve trauma)과 같은 신경세포의 손상이나 신경계의 이상으로 생기는 통증을 총칭하며, 이는 정상적인 상태에서는 통증을 유발하지 않는 자극에도 통증반응을 보이는 이질통(allodynia)과 통증자극에 대해 더욱 민감한 반응을 보이는 통각과민(hyperalgesia), 또한, 자이 없는 상태에서도 화끈거리거나 타는듯한 감각(spontaneous burning sensation)을 느끼는 등의 임상적 특성을 보이는 만성 통증이다 (James, 2006, Neuron). 이와 같은 신경병증성 통증은 이로운을 주는 급성 통증과는 달리 통증을 전달하는 신경계의 변형으로 인해 질병 이상의 통증을 가져오게 된다.

[0007] 전통적으로 이러한 신경병증성 통증은 신경세포의 변성에 의해 야기되는 감각뉴런(sensory neuron)의 과흥분성(hyperexcitability)에 기인한다고 생각되어져 왔으며, 이러한 감각뉴런의 과흥분성의 원인으로는, 1) 신경세포 손상에 의한 세포주변 환경의 항상성(extraneuronal homeostasis)의 변화, 2) 신경세포 손상에 따른 감각뉴런 세포막 이온통로 발현 및 이온통로 조절 단백질 활성의 변화, 3) 중추 시냅스 재조정(synaptic reorganization)에 의한 새로운 통증전달 회로의 형성, 4) 억제성 인터뉴런의 사멸에 의한 감각신경세포의 과흥분과 같은 몇 가지 원인들이 가설로 제기되었다 (James, 2006, Neuron; Zhuo, 2007, Mol. Pain).

[0008] 전체 인구의 3% 정도가 살면서 신경병증성 통증을 느끼는 것으로 보고되고 있으며, 가장 일반적인 신경병증성 통증으로는 통각과민, 감각과민, 신경병증, 당뇨병성 신경병증, 신경염, 신경통, 작열통, 이질통, 포진후신경통, 요추 신경근압박 등이 있고, 그 외에는 암과 관련된 통증, 척수부상, 중풍후 통증, HIV 연관 신경병증 및 환상사지통증이 있다. 미국의 경우 신경병증성 통증과 관련된 불구로 인한 비용이 매년 400억불에 이른다는 조사 결과도 보고된 바 있어, 이와 같은 신경병증성 통증을 치료하기 위한 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

[0009] 현재 신경병증성 통증에는 신경흥분성이나 감각축삭전도성을 감소시키는 물질을 투여하는데, 항간질약, 국소리도카인, 진통제, 비스테로이드 소염 진통제, 오피오이드 등 다양한 약물을 사용하고 있다. 그러나 여전히 신경병

증성 통증을 효과적으로 치료할 수 있는 물질에 대한 연구가 많이 이루어지지 않았으며, 약에 따른 효능과 부작용 차이로 인하여 신경병증성 통증을 치료하기 위한 약물의 선택이 어려워, 새로운 신경병증성 통증 치료제 개발에 대한 필요성이 있다.

[0010] 한편, 에반스 블루(Evans Blue, EB)는 인체에 무해하고 알부민과 결합해 장시간 혈중에 체류하는 청색고질성 아조색소이다. 용혈에 의한 영향도 적기 때문에 측정하는 것이 용이하여 순환혈액량(circulating blood volume)을 측정하는데 사용된다. 에반스 블루의 만성통증 질환 또는 신경병증성 통증에 대한 역할에 대해서는 아직까지 밝혀진 바 없으며, 이에 대한 연구도 전무한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명자들은 새로운 만성통증 질환 치료제에 관하여 연구하던 중, 에반스 블루가 만성통증 질환에 있어서 진통효과를 나타냄을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0013] 또한, 에반스 블루가 배근신경절 세포의 VNUT(vesicular nucleotide transporter), 척수내 후각(dorsal horn)에 존재하는 신경세포와 미세아교세포를 모두 표적하여, 결과적으로 척수 내 후각에서 신경세포의 과흥분을 억제하여 통증을 감소시킴을 밝혀내었다.

[0014] 따라서 본 발명은 에반스 블루를 유효성분으로 포함하는 만성통증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0015] 또한, 본 발명은 에반스 블루를 유효성분으로 포함하는 만성통증 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 에반스 블루를 유효성분으로 포함하는 만성통증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 에반스 블루를 유효성분으로 포함하는 만성통증 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 에반스 블루를 투여하는 경우, 만성통증을 효과적으로 감소시킬 수 있다. 특히, 에반스 블루는 구심성신경의 말단에서 ATP를 분비하는데 중요한 역할을 하는 배근 신경절의 VNUT 단백질을 주요한 표적으로 하며 부작용 없이 지속적으로 약물을 사용하여 통증을 경감시킬 수 있는바, 만성통증 질환에 의하여 유발되는 각종 통증에 대한 진통제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 랫트의 척수신경결찰(spinal nerve ligation, SNL) 수술 과정 및 이의 모식도이다.
 도 2는 에반스 블루 투여에 따른 진통 효과 확인을 위한 실험 과정을 나타낸 도이다.
 도 3은 척수신경결찰 모델에서 에반스 블루 투여에 따른 진통 효과를 확인한 도이다.
 도 4는 에반스 블루가 배근 신경절(dorsal root ganglia)(도 4의 A~C)과 척수내 후각(dorsal horn)(도 4의 D~F)의 VNUT를 표적함을 확인한 결과를 나타낸 도이다. 도 4의 G는 척수내 후각 얽층 I, II에 분포하는 억제성 신경세포에서 발현되는 칼레티닌(Calretinin)의 신호를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 5는 에반스 블루가 척수내 후각 신경세포(도 5의 A~C), 척수내 후각에 분포하는 흥분성 신경세포(도 5의 D~F)를 표적함을 확인한 결과를 나타낸 도이다. 도 5의 G~I는 억제성 신경세포에서 발현되는 칼레티닌의 신호를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 6은 에반스블루가 척수내 후각에 존재하는 미세아교세포를 표적함을 확인한 결과를 나타낸 도이다(도 6의 A~C). 도 6의 D~F는 에반스블루가 별아교세포를 표적하는지 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0024] 본 발명은 에반스 블루를 유효성분으로 포함하는 만성통증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 에반스 블루는 만성통증을 효과적으로 감소시킬 수 있으므로, 만성 통증 질환에 의하여 유발되는 각종 통증에 대한 진통제로 유용하게 사용될 수 있다. 여기에서, 상기 에반스 블루는 에반스 블루를 유효성분으로 포함하는 조성물로서 투여될 수 있다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 '만성통증 질환'은 몸의 한 곳 또는 여러 곳에 영향을 주고 3개월 이상 지속되는 다소 심한 고통을 의미하며, 시간이 지남에 따라 그 강도가 달라질 수 있는 통증 증후군을 포함한다. 상기 만성통증 질환은 신경병증성 통증, 복합부위 통증 증후군, 대상포진 후 신경통 또는 척추 수술 후 통증 증후군, 골관절염 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 '신경병증성 통증'은 말초 신경 손상 또는 중추 신경 손상에 의해서 유도되는 것이 바람직하며, 말초신경계 이상 또는 손상, 척수신경 손상을 포함한 다발성경화증, 척수부상, 통각과민, 감각과민, 신경병증, 당뇨병 신경장애(diabetes neuropathy), 신경염, 신경통, 작열통, 이질통, 포진후신경통, 요추 신경 근압박, 압과 관련된 통증, 알코올 중독, 비정형 안면통증(atypical facial pain), 포진성 신경통(post herpetic neuralgia), 중풍후통증, HIV 연관 신경병증, 골관절염 및 환상사지통증을 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 신경병증성 통증은 만성통증의 기전을 설명하는 모델이다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 에반스 블루는 통증의 역치를 증가시키는 것을 특징으로 한다.
- [0029] 본 발명에서는 신경병증성 통증 동물 모델에서 에반스 블루를 척수강 내로 주입하고 본 프레이 필라멘트 테스트(von frey filament test)를 수행하여 에반스 블루를 처리시 전반적으로 통증 역치가 증가, 즉 통증이 감소함을 확인하였다.
- [0030] 또한 에반스 블루가 배근신경절 세포의 vesicular nucleotide transporter(VNUT), 척수내 후각(dorsal horn)에 존재하는 신경세포와 미세아교세포를 모두 표적하여, 결과적으로 척수내 후각에서 신경세포의 과흥분을 억제함을 확인하였다.
- [0031] 따라서, 본 발명에 있어서, 에반스 블루는 척수내 후각에 분포하는 흥분성 신경세포의 과흥분을 억제하는 것을 특징으로 하며, 상기 흥분성 신경세포의 과흥분 억제는 배근신경절의 vesicular nucleotide transporter(VNUT), 척수내 후각에 존재하는 흥분성 신경세포 및 미세아교세포로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 부위의 기능 억제를 통해 이루어지는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함되며 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일, 식염수, PBS(phosphate buffered saline) 또는 배지 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 상기 용어 '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.
- [0034] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).
- [0035] 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화 할 수 있다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기재되어 있다.
- [0036] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 예를 들어, 척수 내, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 경막 내, 심장 내, 경피, 피하, 복강 내, 비강 내, 장관, 국소, 설하 또는 직장 내 투여될 수 있으며, 바람직하게는 경구 또는 피하 투여될 수 있고, 만성통증 또는 신경병증성 통증 치료를 위한 추가적인 성

분을 포함하여 함께, 동시에, 순차적으로 사용할 수 있다.

- [0037] 상기 '척수 내 투여'란 본 발명의 약학적 조성물을 척수 내에 투여하여 만성통증 질환, 예컨대 신경병증성 통증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 함유된 활성성분이 척수 내로 전달되도록 하는 것을 말한다.
- [0038] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 "약제학적으로 유효한 양"은 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도; 환자의 연령, 체중, 건강, 성별; 환자의 약물에 대한 민감도; 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율; 치료 기간; 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효량을 달리할 수 있으나, 바람직하게는 150~5000 μ g/60kg/day, 더욱 바람직하게는 500~1500 μ g /60kg/day의 유효량으로 하루에 수회 반복 투여될 수 있다. 상기 조성물의 투여량은 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.
- [0039] 본 발명의 만성통증 질환, 예컨대 신경병증성 통증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 포유동물, 예를 들어 인간 및 인간을 제외한 포유동물에 투여할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 또한, 본 발명은 에반스 블루를 유효성분으로 포함하는 만성통증 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 조성한다.
- [0041] 본 발명에 따른 에반스 블루는 만성통증 질환, 예컨대 신경병증성 통증의 예방 또는 개선을 목적으로 식품 또는 음료 등에 첨가할 수 있다. 상기 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있으며, 특수영양식품 (예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 건강보조식품, 조미식품 (예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류 (예, 스낵류), 캔디류, 초코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품 (예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 음료 (예, 과일 음료, 채소류 음료, 발효음료류 등) 및 천연조미료를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품 첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.
- [0042] 상기 '기능성 식품'이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적인 수법을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미하며, 구체적으로는 건강 기능성 식품일 수 있다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0043] 식품 또는 음료 중의 에반스 블루의 양은 전체 식품 중량의 0.001중량% 내지 90중량%로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.1중량% 내지 50중량%로 포함할 수 있고, 음료의 경우, 100ml를 기준으로 0.001g 내지 2g, 바람직하게는 0.01g 내지 0.1g의 비율로 포함할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있으므로 상기 범위에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토오스, 수크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0045] 상기 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 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.
- [0046] 또한, 본 발명은 에반스 블루를 개체에 투여하여 만성통증 질환, 예컨대 신경병증성 통증을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0047] 상기 에반스 블루를 투여하는 경로는 국소 (협측(buccal), 설하, 피부 및 안내의 투여를 포함), 비경구(피하, 피내 근육내, 혈관내 및 관절내의 투여를 포함) 또는 경피성 투여를 포함한 여러 경로를 포함한다.
- [0048] 상기 개체는 개과 동물, 고양이과 동물, 멧돼지과 동물, 소과 동물, 사슴과 동물, 기린과 동물, 페커리과 동물, 낙타과 동물, 하마과 동물, 말과 동물, 맥과 동물, 코뿔소과 동물, 족제비과, 토끼과, 설치류 및 영장류를 포함

하나, 이에 한정되지 않는다.

[0050] 상술한 본 발명의 내용은 상호 모순되지 않는 한, 서로 동일하게 적용되며, 당해 기술분야의 통상의 기술자가 적절한 변경을 가해 실시하는 것 또한 본 발명의 범주에 포함된다. 이하 본 발명을 실험예 및 실시예를 통해 상세하게 설명하나 본 발명의 범위가 하기 실험 예 및 실시 예로만 한정되는 것은 아니다.

[0052] **실시예 1. 신경병증성 통증 동물 모델에서 에반스 블루의 진통 효과 확인**

[0053] **1-1. 동물 모델의 준비**

[0054] 5주령 SD 수컷 흰쥐 (Sprague-dawley rat, 150-180g)를 구입해서, 밤과 낮이 12시간씩 일정하게 유지되고, 온도가 22 ± 2℃사이로 유지되는 환경에서 사육하였다. 또한, 물과 사료는 흰쥐가 자유롭게 섭취할 수 있도록 했고, 케이지 당 3마리 이하로 사육하였다. 실험 전 7일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 6주령이 되었을 때, 먼저 von Frey filament 8g 이상의 자극에 반응하는 흰쥐만을 선택하여, 척수신경결찰(spinal nerve ligation, SNL) 수술을 수행하여, 신경병증성 통증(neuropathic pain; NPP)을 유발하였다.

[0055] 보다 구체적으로, 아이소플로란(isofluorane)으로 호흡마취를 통해 전신마취를 한 후, L4 및 L5 척수신경을 분별하기 위하여 왼쪽 요추(L6) 횡돌기를 조심스럽게 제거한 다음, L5 척수신경을 실크봉합사(3-0)로 단단히 결찰(ligation)하고, 상처를 봉합하여 SNL 신경병증성 통증 실험동물 모델을 만들었다.

[0056] 이와 같은 랫트의 SNL 수술 과정 및 모식도를 도 1에 나타내었다.

[0058] **1-2. 생체 내(in vivo)에서 행동실험을 통한 에반스 블루의 진통 효과 확인**

[0059] 신경병증성 통증 동물 모델을 이용하여 기계적 통각과민(mechanical hyperalgesia)을 측정함으로써, 본 발명의 에반스 블루의 진통 효과를 확인하였다. 본 프레이 필라멘트 테스트(von frey filament test, 기계적 이질통 평가)는 동물통증모델 제작 후 기계적 이질통의 정도를 측정하기 위한 방법으로 Chaplan 등에 의해 기술되었다(Chaplan et. al, 1994). 랫트를 그물눈의 크기가 2×2 mm 인 철망 실험대 위에 설치된 아크릴 상자에 넣고 15분 이상 적응시킨 뒤, 랫트의 움직임 등이 조용해지면 0.4, 0.6, 1, 2, 4, 6, 8, 15g 굵기의 본 프레이 필라멘트(Stoelting, 미국)를 사용하여 통증 역치(g) 값을 평가하였다. 필라멘트를 좌측 환부 발바닥에 수직으로 접촉시키고 5~6초간 유지시켜 랫트가 신속한 회피반응을 보이거나 또는 털을 때면서 즉시 움찔하거나 발바닥을 핥으면 양성반응을 보인 것으로 간주하였다. 중앙부의 본 프레이 필라멘트부터 자극하여 양성반응을 보이면 약한 필라멘트로 자극하고, 양성반응이 없으면 강한 필라멘트로 자극하며 진행하였다. 그 결과, 통증모델 수술 후 7일째에 본 프레이 필라멘트 테스트에 대한 통증역치의 감소가 최대치로 나타났다.

[0060] 통증모델 수술 후 본 프레이 필라멘트 테스트에 대한 통증역치의 감소가 최대치로 나타난 7일째부터 해밀턴주사기로 에반스 블루(Evans Blue, EB)를 척수강 내로(intrathecal injection; i.t.) 투여하고, 마우스의 뒷 발바닥(hind paw)에 본 프레이 필라멘트로 자극하여 최소통증역치를 측정하였다. 2시간 후, 1일, 2일, 3일, 5일 및 7일째에 통증 역치의 변화를 측정하였다. 이때, 대조군에는 생리식염수(saline)를 10μl로 투여하고, 에반스 블루는 다양한 농도(5, 15, 50μg/10μl)로 투여하였다. 이와 같은 실험과정을 도 2에 나타내었으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0061] 도 3에 나타난 바와 같이, 생리식염수만을 처리한 대조군에서는 모든 시간대에서 진통 효과가 거의 없는 반면, 에반스 블루를 처리한 실험군에서는 전반적으로 통증에 대한 진통 효과가 유의적으로 증가함을 확인하였다. 구체적으로, 5μg 투여군은 2, 3일째에 에반스 블루 처리 전보다(OD) 통증을 느끼는 힘의 크기가 유의적으로 증가함을 확인하였다(p<0.05). 15μg 투여군은 2시간 후, 1일째에 에반스 블루 처리 전보다(OD) 통증을 느끼는 힘의 크기가 유의적으로 증가함을 확인하였다(p<0.05). 50μg 처리군은 2시간 후, 1일째(p<0.01), 2일째(p<0.001), 3일째, 5일째(p<0.05)에 에반스 블루 처리 전보다(OD) 통증을 느끼는 힘의 크기가 유의적으로 증가함을 확인하였고, 2일째에는 생리식염수 대조군에 비하여 유의적으로 증가함을 확인하였다(p<0.001). 진통 효과는 3일째에 정점에 이르고 이후에는 점차 감소하였다. 이를 통해 에반스 블루의 통증 완화 효과를 확인하였다.

[0063] **실시예 2. 에반스 블루의 작용기전 확인**

[0064] 상기 실시예 1에서 에반스 블루가 신경병증성 통증을 완화시키는 것을 확인하였으므로, 에반스 블루의 진통 작용기전에 대한 확인을 수행하였다. 기존 연구에 의하면 에반스 블루의 표적은 세 가지로 존재한다. 첫째는 배근 신경절(dorsal root ganglia, DRG) 구심성(afferent) 신경세포의 세포체와 신경말단에 존재하는 vesicular nucleotide transporter (VNUT)이고, 둘째는 척수내 후각(dorsal horn)에 존재하는 흥분성 신경세포이고, 마지막은 척수 내 후각에 분포하는 미세아교세포(microglia)이다. 이 세 가지 가능성을 확인해보고자 다음과 같은

실험을 진행하였다.

[0066] 2.1 에반스 블루의 배근 신경절 (dorsal root ganglia) 및 척수내 후각(dorsal horn)의 VNUT 표적화 여부 검증

[0067] 에반스 블루가 생체 내에서 배근 신경절 및 척수 내 후각의 VNUT을 표적화하는지 여부를 *in vivo*에서 검증하기 위해, VNUT의 면역염색을 실시하고, 에반스 블루를 생체 내에 투여하여 표적화 여부를 확인하였다.

[0068] 구체적으로, 척수 내 후각 및 배근 신경절에서 VNUT의 발현을 알아보기 위하여, VNUT 항체(녹색)로 면역염색을 실시하였다. 통증모델 수술 후 7일째에 에반스 블루를 주입하고, 에반스블루 주입 후 2일째에, 흰쥐(rat)에 나트륨 펜토바비탈(100mg/Kg)을 복강주사하여 마취시킨 후, 인산완충용액(PBS, PH7.4)를 심장관류하여 혈액을 완전히 제거한 다음 4% 파라포름알데하이드로 관류하여 고정시켰다. 그리고, 척수부위(L4-L6)를 조심스럽게 꺼내서 동일한 고정액에 하루밤 동안 후고정시키고 30% 수크로스(sucrose) 용액에 담겼다. 이후, 척수를 30µm로 동결절편하여 얻은 조직을 nomal serum blocking을 거친 다음 VNUT(1:500; ABN83; milipore) 항체로 하룻밤 동안 4℃에서 배양하였다. 다음날, PBS로 세척한 후 cy2가 결합된 2차 항체(1:400)로 2시간 동안 배양한 다음 DAPI로 핵을 염색하였다. 조직을 슬라이드글래스에 부착하고, 공초점현미경(Leica, TCS SP8)에서 사진을 얻었다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0069] 도 4에 나타난 바와 같이, 배근 신경절에서 VNUT가 발현하는 세포체(cell body), 액손 및 액손말단에서 에반스 블루의 신호가 겹치는 것을 확인하였다(도 4의 A-C). 또한, vGluT2(흥분성 vesicle의 마커)는 척수내 후각 엽층 I, II에서 에반스블루가 표적한 신경세포의 세포체 주위로 염색되었다(도 4의 D-F). 한편, 엽층 I, II에 분포하는 억제성 신경세포에서 발현되는 칼레티닌은 에반스블루와 신호가 겹치지 않았다(도 4의 G). 이를 통해 에반스 블루는 배근 신경절(dorsal root ganglia)과 척수 내 후각(dorsal horn)의 VNUT를 표적함을 확인하였다.

[0071] 2.2 에반스블루의 척수내 후각에 분포하는 흥분성 신경세포 표적화 여부 검증

[0072] 에반스블루가 척수내 후각 신경세포를 표적화하는지 알아보기 위해서, 에반스블루를 주입한 척수조직을 신경세포를 확인하는 마커인 NeuN으로 염색하였다. 다음으로 에반스블루가 표적한 신경세포가 흥분성 신경세포(excitatory neuron)인지 확인하기 위하여 vGluT2 마커로 면역염색을 수행하였다. 또한, 척수 엽층(I) 내지(III)에 위치한 억제성 신경세포도 통증 신호전달 및 통각 활성화에 관여하는 중요한 신경세포이기 때문에, 에반스블루가 억제성 신경세포(inhibitory neuron)도 표적하는지 알아보기 위하여, 칼레티닌의 마커로 면역염색을 수행하였다. 실시예 2.1과 동일한 조직을 사용하여 조직을 슬라이드글래스에 부착하여 수행하였고, 공초점현미경(Leica, TCS SP8)에서 사진을 얻었다. 구체적으로 이를 확인한 결과를 도 5에 나타내었다.

[0073] 도 5에 나타난 바와 같이, 신경세포 마커인 NeuN은 에반스블루와 대부분의 신호가 겹치는 것을 확인하였다(도 5의 A-C). 흥분성 신경세포의 마커인 vGluT2는 척수후각 엽층 I, II에서 에반스블루가 표적한 신경세포의 세포체 주위로 염색된 것을 확인하였다. 에반스 블루가 표적하는 신경세포와 대부분 일치한 것으로 보아, 에반스 블루는 척수 내 후각에 위치한 흥분성 신경세포를 표적함을 확인하였다(도 5의 D-F). 한편, 엽층 I, II에 분포하는 억제성 신경세포에서 발현되는 칼레티닌은 에반스 블루가 표적하는 신경세포와 신호가 겹치지 않는 것으로 보아, 에반스블루가 억제성 신경세포는 표적하지 않음을 확인하였다(도 5의 G-I).

[0075] 2.3 에반스블루의 척수내 후각에 존재하는 미세아교세포 표적화 여부 검증

[0076] 에반스블루가 미세아교세포의 수용체(예를 들면, P2X 수용체)에 결합해서, 후심성 신경세포의 말단에서 분비되는 ATP의 결합을 방해함으로써 미세아교세포의 활성화를 저해하는지 여부를 확인해보기 위하여 미세아교세포 마커인 Iba-1 항체로 면역염색을 수행하였다. 또한, 에반스블루가 다른 아교세포인 별아교세포도 표적하는지 알아보기 위하여 별아교세포 마커인 GFAP으로 면역염색을 수행하였다. 실험에는 실시예 2.1과 동일한 조직을 사용하여 조직을 슬라이드글래스에 부착하고, 공초점현미경(Leica, TCS SP8)에서 사진을 얻었다. 구체적인 결과를 도 6에 나타내었다.

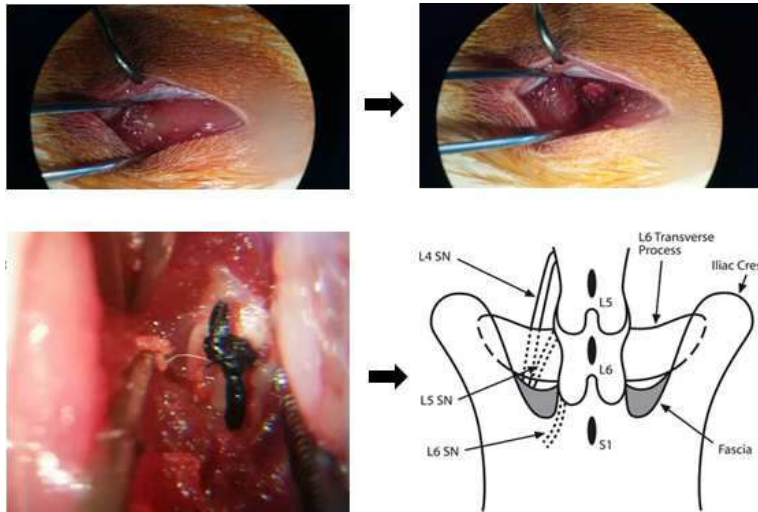
[0077] 도 6에 나타난 바와 같이, 미세아교세포의 마커인 Iba-1의 신호(녹색)가 엽층 (I) 내지 (III) 영역에서 에반스 블루의 신호와 일부분 겹치는 것을 확인하였다. 이를 통해 에반스블루가 미세아교세포의 수용체에 결합해서 미세아교세포의 활성을 낮추어 통증을 경감시킬 가능성이 있음을 확인하였다(도 6의 A-C). 그러나, 별아교세포의 마커인 GFAP의 신호(녹색)는 에반스블루와 전혀 겹치지 않음을 확인하였다(도 6의 D-F). 이를 통해 에반스 블루가 별아교세포는 표적하지 않음을 확인하였다.

[0078] 상기 결과를 통해 에반스블루가 구심성신경의 말단에서 ATP를 분비하는데 중요한 역할을 하는 배근 신경절의 VNUT단백질을 주요한 표적으로 하기 때문에 부작용 없이 지속적으로 약물을 사용하여 통증을 경감시킬 수 있음

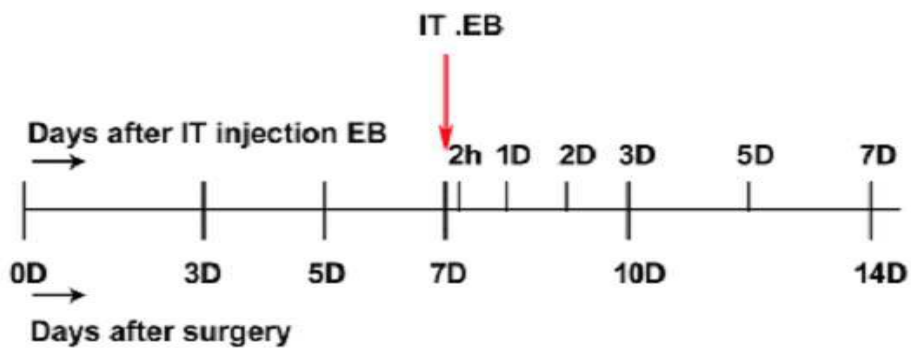
을 확인하였다.

도면

도면1



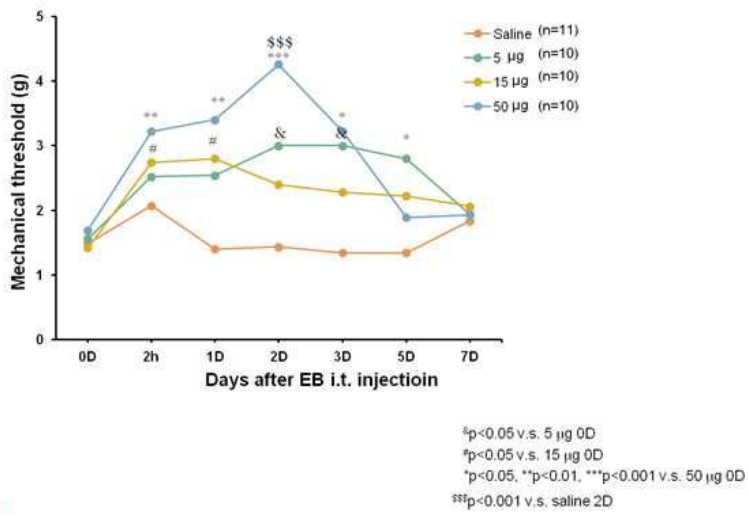
도면2



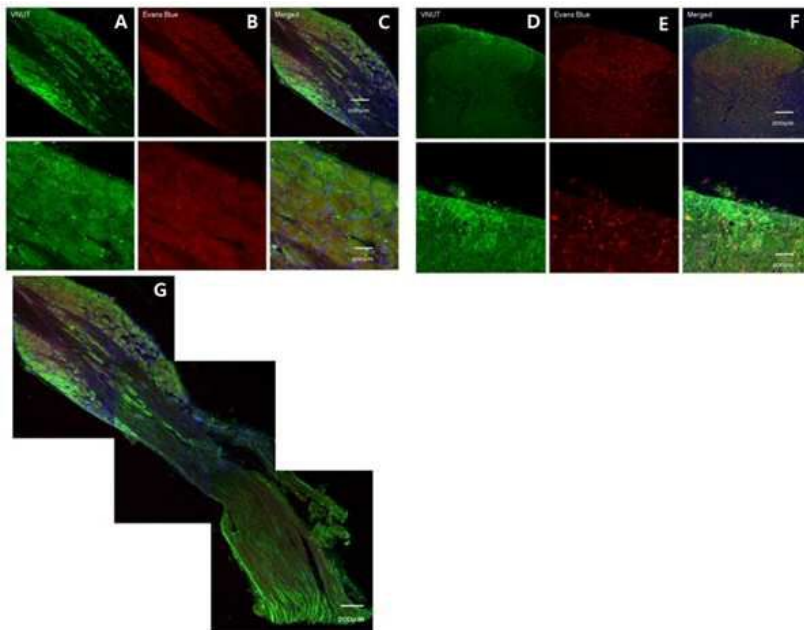
양: saline, 5, 15, 50 μg / Rat

Saline (n=11), 5 μg (n=10), 15 μg (n=10), 50 μg (n=10)

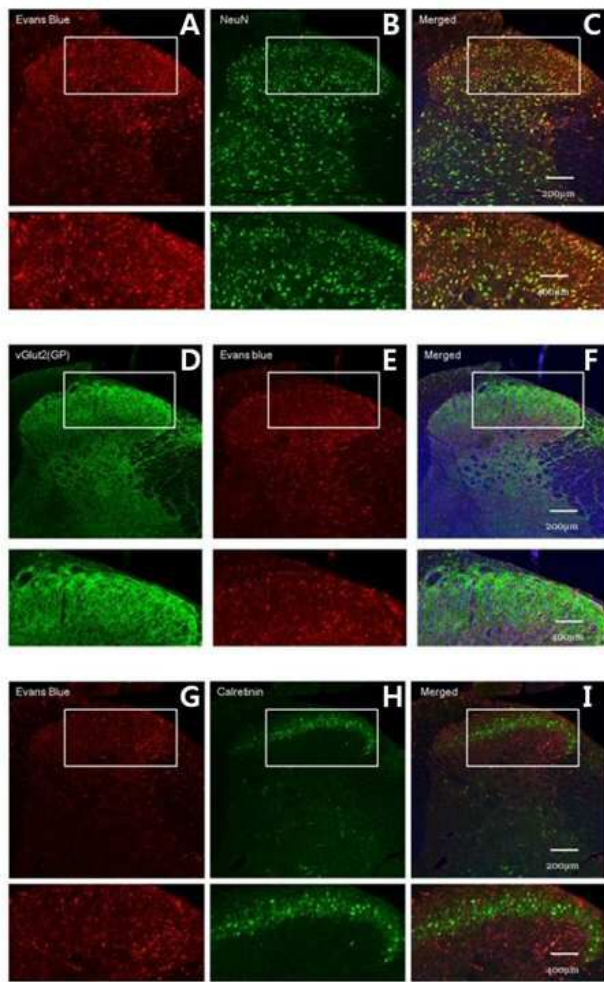
도면3



도면4



도면5



도면6

