



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0107413  
(43) 공개일자 2015년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/01 (2006.01) A61K 9/08 (2006.01)  
A61P 25/00 (2006.01) C07K 1/24 (2006.01)  
C12P 21/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0030304

(22) 출원일자 2014년03월14일

심사청구일자 2014년03월14일

기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

김동운

대전광역시 서구 둔산북로 160, 7-1003 (둔산동, 한마루아파트)

송희정

대전광역시 서구 둔산남로 127, 104-1503 (둔산동, 목련아파트)

(74) 대리인

특허법인충정

전체 청구항 수 : 총 5 항

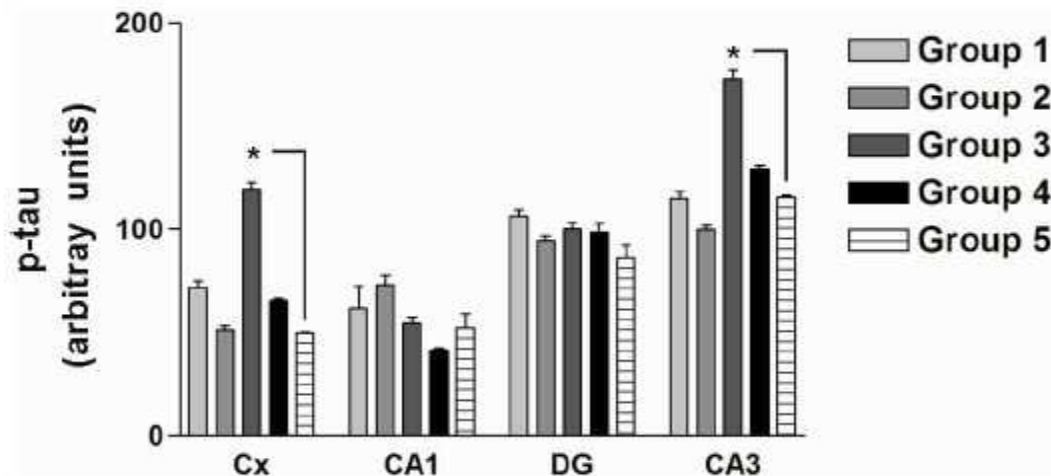
(54) 발명의 명칭 세레브로리신을 유효성분으로 함유하는 만성외상성뇌병증 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 세레브로리신(cerebrolysin)을 유효성분으로 함유하는 만성외상성뇌병증(chronic traumatic encephalopathy) 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 만성외상성뇌병증(CTE) 동물모델에서 신경영양인자의 복합제인 세레브로리신을 투여한 결과 유의하게 뇌손상이 감소되는 효과를 관찰하였다. 따라서 본 발명의 조성물에 유효성분으로서 포함되는 세레브로리신은 만성외상성뇌병증의 예방 및 치료를 목적으로 하는 약제, 치료 보조제, 기타 기능성 제품 등의 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A1A05006966

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 미세아교세포의 활성조절에서 Foxp3신호전달기전규명

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.30

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

세레브로리신(cerebrolysin)을 유효성분으로 함유하는 만성외상성뇌병증(chronic traumatic encephalopathy) 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 세레브로리신은 대뇌피질과 해마내 CA3 영역에서 phospho-tau 단백질의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 세레브로리신은 별아교세포(astrocyte)의 활성화를 억제하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 주사제, 액제, 시럽제, 정제 및 캡슐제로 구성된 군에서 선택된 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

본 발명은 세레브로리신(cerebrolysin)을 유효성분으로 함유하는 만성외상성뇌병증(chronic traumatic encephalopathy) 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002]

만성 외상성뇌병증(Chronic traumatic encephalopathy, CTE)은 반복적 뇌 손상으로 유발되는 신경퇴행성 질환으로 정의되어 있다 (Saulle, M. et al., *Rehabil Res Prac* 2012, 816069). CTE는 1928년 처음 발견되어 미식 축구, 하키, 축구, 복싱 및 프로레슬링 부상과 밀접한 관련이 있는 대중적 주제가 되고 있다. 이러한 영향을 받은 운동선수들의 다수는, 대부분 은퇴하였지만, 이후 수년 동안 우울증(depression), 약물남용(substance abuse), 분노(anger), 기억/운동 장애(memory/motor disturbance) 및 자살(suicide)로 힘겨워하고 있다 (Omalu, B. I. et al., 2010. *Am J Forensic Med Pathol* 31, 130-132). 이러한 운동선수의 부검 결과는 감정적, 인식적 및 육체적 징후와 CTE 사이의 관련성을 암시하고 있다 (McKee, A. C. et al., 2009. *J Neuropathol Exp Neurol* 68, 709-735). 뇌진탕(Concussion) 또는 가벼운 외상성뇌손상(mild traumatic brain injury, rmTBI)은 가장 일반적인 신경계 장애 중 하나이며, 모든 뇌손상의 대략 90%로 알려져 있다 (Fourtassi, M. et al., 2011. *Clin Neurol Neurosurg* 113, 716-720). 그러나 rmTBI는 과소평가되거나 양성(benign)으로 여

겨지고, 일부는 그러한 손상이 잘 인지되지 못하고 있다. CTE에 관한 2009년 보고에 따르면, 51건의 신경병리학 적 진단 중 49건의 CTE가 운동선수에서 발생하는 것으로 밝혀졌다 (McKee, A. C. et al., 2009. *J Neuropathol Exp Neurol* 68, 709-735).

[0003] 반복적인 뇌진탕 또는 머리에 대한 타격(subconcussive blows)은 CTE의 위험에 있는 것으로 인식되고 있다 (Gavett, B. E. et al., 2011. *Clin Sports Med* 30, 179-188). 그러나 어느 정도의 외상이 CTE를 유발하는데 필요한 지에 대한 명확한 의견 일치에 없지만, 반복적인 머리 외상을 경험한 사람들은, 그 메커니즘에 상관없이, CTE로 발전할 위험에 있음은 명확하다. 마우스의 반복적인 머리 외상의 연구에서는, 중증 TBI가 아니라 오히려 rmTBI를 경험한 마우스 동물모델을 제조하여 CTE-유사 변화를 평가하였다 (Kane, M. J. et al., 2012. *J Neurosci Methods* 203, 41-49). 여기서 단일 충격(single impacts)에 노출된 마우스는 매우 약한 손상을 나타낸 것으로 보고되었다. 자발적으로 의식을 회복한 마우스는 케이지 내 동물과 정상적인 행동(grooming) 및 사회적 상호작용(social interaction)을 보이고, 고통, 불편함 또는 실험에 대한 저항의 징후를 보이지 않았다. 두개골절(Skull fractures), 뇌출혈(Intracranial hemorrhage), 호흡정지(respiratory arrest) 또는 발작(seizures)은 드물게 관찰되었다 (Kane, M. J. et al., 2012. *J Neurosci Methods* 203, 41-49). 따라서 본 발명자들은 CTE를 평가하는데 적합할 것으로 보이는 rmTBI 모델을 사용하였다.

[0004] 최근의 연구는 BDNF(brain-derived neurotrophic factor), GDNF(glial cell-derived neurotrophic factor), NGF(nerve growth factor), IGF(insulin-like growth factor), 및 뉴로텐신(neurotensin)과 같은 성장호르몬 및 신경영양인자가 척수(spinal cord) 또는 뇌의 외상성 손상(traumatic injury)에 단독 또는 조합으로 주어질 경우 척수병리학(cord pathology)을 악화시키고 기능적 지표(functional outcome) 및 운동마비(motor paralysis)를 개선시킬 수 있음을 설명하고 있다 (Sharma, H. S. 2007. *Ann N Y Acad Sci* 1122, 95-111).

[0005] 세레브로리신(cerebrolysin)은 다양한 펩티드와 신경영양인자의 혼합물이며 뇌졸중(stroke)과 알츠하이머병에서 임상적으로 입증된 신경보호 역할을 한다 (Ren, J., et al., *Restor Neurol Neuro-Sci* 25, 25-31). 최근, 세레브로리신은 TBI의 초기 단계에 투여 시 뇌 병리학 및 감각-운동 기능(sensory-motor functions)에 대하여 눈에 띄는 신경보호 효과를 나타내는 것으로 보고되었다 (Sharma, H. S. et al., 2010. *Acta Neurochir Suppl* 106, 321-325). 따라서 본 발명은 CTE에 가장 적합한 모델인 rmTBI에서 세레브로리신의 신경보호 역할의 가능성을 평가하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 따라서 본 발명의 목적은 tau 단백질의 인산화 및 별아교세포의 활성을 조절함으로써 신경보호 효과를 나타낼 수 있는 세레브로리신을 유효성분으로 함유하는 만성외상성뇌병증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데 있다.

### 과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세레브로리신을 유효성분으로 함유하는 만성외상성뇌병증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0008] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 세레브로리신은 대뇌피질과 해마내 CA3 영역에서 phospho-tau 단백질의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 한다.

[0009] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 세레브로리신은 별아교세포(astrocyte)의 활성화를 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0010] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 주사제, 액제, 시럽제, 정제 및 캡슐제로 구성된 군에서 선택된 제형을 가질 수 있다.

## 발명의 효과

- [0012] 본 발명에 따르면, 만성외상성뇌병증(CTE) 동물모델에서 신경영양인자의 복합제인 세레브로리신을 투여한 결과 유의하게 뇌손상이 감소되는 효과를 관찰하였다. 따라서 본 발명의 조성물에 유효성분으로서 포함되는 세레브로리신은 만성외상성뇌병증의 예방 및 치료를 목적으로 하는 약제, 치료 보조제, 기타 기능성 제품 등의 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 rmTBI 및 세레브로리신 처리의 시점을 나타낸 도면이다.
- 도 2는 rmTBI의 대뇌피질(cerebral cortex), CA1 영역, 치아이랑(dentate gyrus) 및 CA3 영역에서 p-tau 발현을 나타낸 도면이다.
- 도 3은 rmTBI의 대뇌피질, CA1 영역, 치아이랑 및 CA3 영역에서 p-tau의 상대적인 밀도에 대한 이미지 분석을 나타낸 도면이다.
- 도 4는 rmTBI의 CA3 영역에서 크레일 바이올렛 염색 및 GFAP, iba-1 및 CD45 발현을 나타낸 도면이다.
- 도 5는 rmTBI의 CA3 영역에서 GFAP, iba-1 및 CD45의 상대적인 밀도에 대한 이미지 분석을 나타낸 도면이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명은 세레브로리신(cerebrolysin)을 유효성분으로 함유하는 만성외상성뇌병증(chronic traumatic encephalopathy) 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명에서, 상기 용어 “만성외상성뇌병증(chronic traumatic encephalopathy, CTE)”은 운동선수와 매우 밀접하게 관련되어 있으며 장기간에 걸쳐 반복적인 뇌 충격으로 발생하는 퇴행성뇌질환이라는 점에서 기계적이고 일시적인 충격으로 인해 주로 부종과 출혈 등이 발생하는 일반적인 외상성뇌손상(Traumatic brain injury, TBI)과는 다른 질환으로 분류된다. 따라서 본 발명은 TBI와 구별되는 질환으로서 CTE에 대한 세레브로리신의 신규한 치료적 용도를 제안하고자 한다.
- [0016] 구체적으로, 상기 TBI와 CTE는 다음과 같은 발생기전과 병리학적 소견의 차이점으로 인하여 동일한 뇌손상에 의한 병변으로 분류하지 않는다.
- [0017] 상기 외상성뇌손상(TBI)은 가속, 감속, 충격, 관통 같은 외부의 기계적인 힘에 의하여 뇌손상이 일어나는 것을 말한다 (Maas AI, Stocchetti N, Bullock R (August 2008). "Moderate and severe traumatic brain injury in adults". *Lancet Neurology* 7 (8): 72841). 이러한 결과로 뇌기능에 일시적 또는 영구적으로 장애가 발생하고 해부학적인 손상이 일어나게 된다. 병변은 뇌주변부 또는 뇌실질 안쪽에 일어나게 되고 (Seidenwurm DI (2007). "Introduction to brain imaging". In Brant WE, Helms CA. *Fundamentals of Diagnostic Radiology*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins. pp. 5355), 국소적 또는 미만성으로 일어나고 두 가지 형태 모두 일어나는 경우도 있다 (Smith DH, Meaney DF, Shull WH (2003). "Diffuse axonal injury in head trauma". *Journal of Head Trauma Rehabilitation* 18 (4): 30716). 미만성 병변은 부종, 미만성 축삭손상이 발생하여 백질과 대뇌피질에 영향을 미친다 (Melvin JW, Lighthall JW (2002). Nahum AM, Melvin JW, ed. *Accidental Injury: Biomechanics and Prevention*. Berlin: Springer. pp. 28081. Retrieved 2013-10-22. "brain injury biomechanics"). 국소 손상은 손상받은 병변의 위치에 따라 증상이 달라진다. 흔한 부위로는 전두엽의 아랫부분과 측두엽의 앞부분이다. 이로 인하여 사회적인 행동, 감정조절, 후각과 의사결정 등에 장애를 보이게 된다 (Cummings, J. L. (1993). "Frontal-subcortical circuits and human behavior". *Archives of Neurology* 50 (8): 873880). 뇌출혈도 국소적으로 일어날 수 있는데 뇌실질 또는 주변부위로 혈액이 누출되어 혈종을 형성하게 된다 (Parikh S, Koch M, Narayan RK (2007). "Traumatic brain injury". *International Anesthesiology Clinics* 45 (3): 11935).
- [0018] TBI에서 나타나는 증상은 TBI의 형태와 위치에 따라 달라지고 손상의 정도에 따라 달라진다. 의식장애, 두통, 구토, 구역, 운동장애, 어지럼증, 균형장애, 시각장애, 이명, 수면장애 등의 증상이 나타날 수 있다. 인지 및 감정증상으로 행동 및 감정의 변화, 혼동, 그리고 기억, 집중력, 사고의 장애 등이 나타날 수 있다 ("NINDS Traumatic Brain Injury Information Page". National Institute of Neurological Disorders and Stroke.

September 15, 2008. Retrieved 2008-10-27).

- [0019] 반면, 본 발명의 만성외상성뇌병증(CTE)은 진행형의 퇴행성 변화로, 복수의 다발성 손상 병력이 있는 환자에게서 사후에만 확진할 수 있다. 이 질환은 이전에 ‘권투선수치매(dementia pugilistica)’로 명명되었고 권투선수에서 처음 발견되었으나 미식축구, 아이스하키, 프로레슬링 선수들에게서도 발견되었다. 이 환자들에게서 tau 단백질의 침착이 발견되었고 손상을 받은 후 수 십년이 지나서 기억상실, 혼동, 우울증 등의 치매 증상이 나타난다. 오랜기간 동안 반복되는, 뇌진탕을 일으키지 않는 정도로 경미한 손상(sub-concussion)이나 반복적인 뇌진탕이 CTE를 유발한다 ("Chronic Traumatic Encephalopathy in Blast-Exposed Military Veterans and a Blast Neurotrauma Mouse Model". Proceedings of the National Academy of Sciences).
- [0020] CTE 환자에서 나타나는 병리학적인 소견은, 전두엽 및 측두엽 피질과 내측 측두엽의 위축에 동반되는 뇌중량의 감소가 주된 형태이다. 그리고 뇌위축에 따른 이차적인 변화로 측뇌실과 제3뇌실이 커지게 된다 (Baugh C "et al" (2012). "Chronic Traumatic Encephalopathy: Neurodegeneration following repetitive concussive and subconcussive brain trauma". *Brain Imaging and Behavior* 6 (2): 244254). 또 다른 변화는 흑질의 창백화, 시상과 뇌간 그리고 소뇌의 위축이 동반된다 (Jancin, Bruce (1 June 2011). "Chronic traumatic encephalopathy test sought". *Internal Medicine News*. Retrieved 15 December 2013). 현미경적인 소견으로는 신경세포의 소실, tau 단백질의 침착, 베타아밀로이드 침착, 백질변성 등이다.
- [0021] 본 발명의 조성물에 있어서, 세레브로리신은 대뇌피질과 해마내 CA3 영역에서 phospho-tau 단백질의 발현을 감소시키고, 별아교세포(astrocyte)의 활성화를 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 세레브로리신의 치료 효과에 대한 연구, 조사, 시험 결과는 다음과 같은 문헌내용 및 이론에 기초하여 본 발명이 진행되고 완성되었다.
- [0023] 점점 더 다양한 실험 동물모델들이 TBI에서 이차 손상 과정을 조사하고 후보 치료제 접근에 대한 전임상 데이터를 제공하는데 사용될 수 있다. 대체로, TBI 동물모델은 두 그룹으로 나눌 수 있다: 개방성 두부손상(open head injury, OHI)과 폐쇄성 두부손상(closed head injury, CHI) 모델이다. 유체충격(fluid percussion, FP) 및 제어된 피질충격(controlled cortical impact, CCI)을 포함하는, OHI 모델에서 역학적 힘은 개두술(craniotomy)에 의해 노출되는 경막(dura mater)에 직접적으로 적용된다. CHI 모델에서, 손상은 직접 충격(예컨대, 온전한 두개골에 중량을 떨어뜨리거나 피스톤으로 온전한 두개골을 타격함)에 의해 온전한 두개골(intact skull)에서 유도된다. CHI 모델에 관해서는, 자유-낙하의 만유인력을 이용하는 중량-낙하(weight-drop) 모델은 래트와 마우스 모두에서 개발되어 있고 가장 단순하기 때문에 TBI 연구에 가장 폭넓게 사용된다. 예를 들어 Marmarou 방법에서, 설치류의 머리를 머리 일부분에 가속할 수 있도록 폼 또는 젤의 두꺼운 블록 상에 올려놓아, 미만성축삭손상(diffuse axon injury)을 갖는 적당한 중증 뇌 손상을 유발한다 (Foda, M. A. et al., 1994. *J Neurosurg* 80, 301-313). 그러나 이 모델은 높은 치사율, 두개골 골절 및 호흡정지와 같은 심각한 결과와 관련되어 있다. 이러한 문제점들을 회피하기 위해, 본 발명자들은 머리와 몸체가 완전히 구속되지 않는, 새로운 쥐 CHI 모델(rmTBI)을 사용하였다 (Kane, M. J. et al., 2012. *J Neurosci Methods* 203, 41-49). 이 모델에서, 동물은 바닥에 두꺼운 폼 패드가 있는 빈 케이지 위에 매달린 알루미늄 호일 한 장만으로 지탱된다. 알루미늄 호일은 충격 시 완전하게 찢어져서, 구속이 없는 동물의 머리와 몸체 움직임으로 인해 케이지 내로 떨어지게 된다. 이 연구자들은 가벼운 뇌진탕 손상이 반복적으로 유도될 수 있음을 보고하였고, 이는 이러한 방법이 반복된 충격에 사용될 수 있음을 의미한다. 또한 본 발명자들은 이 모델이 반복된 충격으로 유도되는 CTE에 적합할 수 있을 것으로 판단하였다.
- [0024] 1970년대 초기에, CTE를 가진 복서의 신피질 영역(neocortical areas)에서 신경섬유덩어리(neurofibrillary tangles)가 보고되었다 (Corsellis, J. A. et al., 1973. *Psychol Med* 3, 270-303). 또한 대뇌피질의 덩어리들은 알츠하이머병의 핵심 구성요소이다. 그러나 그들이 상이한 병인학(etiology)을 갖는 많은 만성 신경계 질환에서 발견되기 때문에, 그들이 신경퇴행성 병리학에 대한 더욱 일반적인 반응을 대표할 수 있다 (Blennow, K. et al., 2012. *Neuron* 76, 886-899). 실제로, 반복된 뇌 외상으로 유발되는 CTE에서 그들의 풍부함(abundance)은 그들이 뇌 손상에 대한 반응을 대표할 수 있음을 더욱 뒷받침한다. 덩어리들(tangles)은 신경세포의 세포질에서 발견되고 과인산화된(hyperphosphorylate) tau 단백질의 실과 같은 음집으로 구성된다 (Grundke-Iqbal, I. et al., 1986. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 4913-491). Tau는 미세소관-결합 도메인을 통해 미세소관(microtubules)과 결합하는 정상 축삭돌기 단백질(axonal protein)이다. Tau는 과인산화된 상태에서 빈번하게 발견되고 미세소관 결합을 감소시켜, 미세소관의 분해(disassembly)를 유발하고 면역반응을 제대로 발

취하지 못하는(compromised) 신경세포 및 시냅스 기능을 초래함으로써, tau 응집의 증가시키고 불용성 피브릴(fibrils)과 덩어리(tangles)를 형성시킨다 (Mandelkow, E. M. et al., 2012. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006247). 따라서 인산화된 tau는 CTE의 마커가 될 수 있다. 그러나 면역조직화학으로 마우스 뇌에서 tau 덩어리를 확인하는 것은 매우 어려운 일지만, 본 발명자들은 마우스에서 반복된 가벼운 뇌 충격(rmTBI) 후 구성적으로 인산-tau 발현의 증가를 관찰하였다. 사실, 가벼운 TBI의 많은 방법들이 “스포츠-관련” 뇌 손상의 모델이 된다고 주장하지만, 그러한 방법들은 p-tau 발현의 증가를 유발하지는 않는다. 인간 tau를 발현하는 형질전환 마우스는 흥미롭지만, 뇌 손상이 없는 몇몇 심각한 문제들을 가지고 있기 때문에, 뇌에서 p-tau에 대한 뇌 충격의 영향을 정확히 판단하기는 어렵다 (Ojo, J. O. et al., 2013. *J Neuropathol Exp Neurol* 72, 137-151). 본 발명에서는 rmTBI 후 p-tau 발현의 증가를 확인하였으며, tau 인산화가 반복된 뇌 외상의 결과일 것으로 제시된 동물에서의 실험 연구이기 때문에, 이는 rmTBI 모델이 CTE에 대한 잠재적으로 적절한 모델을 의미한다.

[0025] 세레브로리신(cerebrolysin)은 뇌에 작용하여 산화적 또는 세포의 스트레스를 완화시킬 수 있는 신경영양 인자 및 펩티드의 혼합물이다 (Sharma, H. S. et al., 2010. *Acta Neurochir Suppl* 106, 321-325). 세레브로리신에 의해 매개된 TBI에서 산화 스트레스의 감소는 신경보호를 유도한다는 면에서 약물의 가장 중요한 효과의 하나임은 분명하다 (Guzman, D. C. et al., 2009. *Biomed Pharmacother* 63, 517-521). 본 발명에서는 rmTBI에 이어 세레브로리신의 꼬리정맥 주사 후 p-tau 발현이 대뇌피질과 CA3에서 감소됨을 확인하였으며, 이는 세레브로리신이 rmTBI의 해로운 효과에 대한 신경보호를 부여할 수 있음을 의미한다.

[0026] Gavett 등은 손상이 축삭(axons)의 반복된 외상성 손상을 통해 어떻게 유발되는지에 대한 일반적인 설명을 제시하였다. 축삭에 대한 손상은 막 투과성에 영향을 주어 이온 이동(ionic shifts)을 유발시킴으로써, 칼슘의 대량 유입(large influx)을 초래한다. 이어서 카스파제(caspases)와 칼페인(calpains)의 분비가 tau 인산화, 미스폴딩(misfolding), 쇼트닝(shortening) 뿐만 아니라 신경미세섬유와 미세소관의 분해를 동반하는 세포골격 이상(cytoskeleton failure)을 촉발시킨다 (Gavett, B. E. et al., 2011. *Clin Sports Med* 30, 179-188). 이러한 착안은 CTE에서 가능성 있는 중심 메커니즘으로서 면역흥분세포독성(immunoexcitotoxicity)의 개념으로부터 검토되었다. Blaylock과 Maroon은 초기 뇌 외상으로 시작된 일련의 작용을 설명하였고, 이러한 작용은 별아교세포(astrocytes)와 미세아교세포(microglia)를 “활성화” 시키고 이어서 손상들이 일어난다 (Blaylock, R. L. et al., 2011. *Surg Neurol Int* 2, 107). 따라서 본 발명자들은 세레브로리신 처리가 있거나 없이 TBI 후 별아교세포와 미세아교세포 활성화를 평가하였다. 본 발명에서는 약한 별아교세포 활성화를 관찰하였지만 미세아교세포 활성화 또는 뇌실질(brain parenchyma)로 침투하는 침투는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 이전 연구와 일치하였다 (Kane, M. J. et al., 2012. *J Neurosci Methods* 203, 41-49).

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다.

[0028] 상기 “약제학적으로 허용가능한 담체 (pharmaceutically acceptable carrier)”는 목적 화합물을 하나의 조직, 기관 또는 신체의 부분으로부터 다른 조직, 기관 또는 신체의 부분으로 운반하거나 수송하는데 관여되는 약제학적으로 허용가능한 물질, 조성물, 또는 소포를 말한다. 예를 들면, 담체는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질, 또는 이들의 조합일 수 있다. 담체의 각 구성성분은 제제의 다른 성분과 적합해야 한다는 점에서 “약제학적으로 허용가능”해야 한다. 또한, 담체는 그것이 접촉할 수 있는 조직 또는 기관과 접촉하여 사용하는데 적합해야 하고, 독성, 자극 (irritation), 알러지 반응, 면역원성, 또는 그의 치료적 이득을 과도하게 넘어서는 다른 합병증의 위험을 가져서는 안 된다는 것을 의미한다.

[0029] 본 발명의 약학 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있으며, 주사제, 액제, 시럽제, 정제, 캡슐제 등과 같은 제형으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다.

[0030] 또한 본 발명의 약학 조성물은 치료학적 또는 예방학적 유효량으로 투여될 수 있다. 투여량은 환자의 질환 종류 및 증정도, 연령, 성별, 체중, 약물에 대한 민감도, 현재 치료법의 종류, 투여방법, 표적 세포 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 종래의 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한 단일 또는 다중 투여일 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0031] 또한 상기 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강 내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 약학 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0032] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

### [0033] 실시예 1. 실험동물 및 손상 유도

[0034] 본 발명에서는 23-25 g의 수컷 ICR 마우스(imprinting control region mice; Samtako, Korea)를 사용하였다. 동물들은 낮/밤 사이클이 조절된(12h light/12h dark) 실험실에서 23℃에서 사육하였다. 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 동물-관련 과정들은 충남대학교 the Institutional Animal Care and Use Committee의 가이드라인(CNU-00151)에 따라 수행하였다. rmTBI 동물모델은 이전에 공개된 절차에 따라 수행하였다 (Kane, M. J. et al., *J Neurosci Methods* 203, 41-49). 간략히 설명하면, 쇠구슬(iron ball, 50 g)을 마우스 두개골을 충격하는데 사용하였다. 하부 중량은 1.77 cm<sup>2</sup>이고 양귀 사이의 마우스 정수리 부분으로 접촉면을 제한하였다. 상기 중량(weight)을 PVC(polyvinyl chloride) 가이드 튜브(3.1 cm 직경 × 1 m 길이)를 통해 수직으로 떨어뜨렸다. “H”-형태의 플라스틱 유리 프레임(Plexiglas frame, 15 cm 길이 × 9 cm 폭 × 23 cm 깊이)에 위치된, 알루미늄 호일의 슬릿 조각으로 만든 스테이지에 동물들은 위치시켰다. 이러한 방식에서, 상기 슬릿 호일은 충격에 대한 저항 또는 제한 없이 마우스의 체중(2225 g)만 지탱한다. 스펀지 쿠션(15 cm 길이 × 9 cm 폭 × 13 cm 깊이)은 알루미늄 호일 스테이지 10 cm 아래에 위치시켜 떨어지는 마우스를 받도록 하면서, 그 중량은 동물의 자유롭게 움직이는 몸체 위를 벗어나기 않게 하였다. 충격 즉시, 마우스를 회수하여 뇌와 척수에 이차 손상을 유발하는 충격-유도된 쿠션의 압축으로부터 동물이 반동되는 중량에 의한 재-타격(re-hits)을 방지하였다.

[0035] 마우스는 이소플루레인(isoflurane)으로 마취시키고 바로 PVC 튜브 아래에 놓았다. 그런 다음 마우스를 폼 쿠션 10 cm 위 알루미늄 호일의 슬릿 조각에 가슴이 아래로 가게 매달았다. 각 마우스를 빠르게 위치시켜 브레그마(bregma)와 람다(lambda) 사이의 두피 중앙선에 중량을 먼저 위치시킴으로써 머리를 떨어지는 중량의 경로 방향으로 놓았다. 두피 또는 두개골 보호 헬멧의 설치에서의 절개는 필요하지 않았다. 상기 중량은 낙하거리까지 부착된 줄로 빠르게 위쪽으로 당긴 후 놓았다. 충격 즉시, 마우스를 폼 쿠션에서 자유롭게 하였다. 이러한 방식에서, 충격-유도 가속 및 낙하는 마우스 몸체의 180° 수평 로테이션을 포함하였다. 상기 마우스를 즉시 옮겨 회복을 위한 케이지에 놓았다.

### [0036] 실시예 2. 조직 제조

[0037] rmTBI에 대한 세레프로리신의 효과를 분석하기 위해, 인슐린 주사기를 이용하여 마우스에 10 μl (1 mg/ml, intra-tail vein)의 세레프로리신(cerebrolysin; Ever NeuroPharma, Austria)을 투여하였다. 세레프로리신 주사를 하거나 하지 않고 rmTBI 후 4 또는 8주째에 (도 1 참조), 마우스를 펜토바비탈나트륨(sodium pentobarbital; 50 mg/kg, intraperitoneally)로 마취시키고, 헤파린 처리된 PBS(phosphate-buffered saline)를 심장으로 투여한 다음, PBS에 녹인 4% 파라포름알데히드를 투여하였다. 마우스 뇌를 떼어내고, 동일한 고정 물질에 4시간 동안 담근 후, 30% 수크로오스 용액에서 동결보존하였다. 마우스를 조직 동결배지(OCT 화합물)에 포매한 다음 액체질소로 어느점까지 미리 냉각한 2-메틸 부탄에서 신속하게 동결하였다. 동결된 관상절편(coronal sections; 40 μl 두께)을 Leica cryostat을 이용하여 얻었다. 하나씩 걸러 절편들을 젤라틴-코팅된 슬라이드에 올리거나 항동결 버퍼에 유동(free-floating) 상태로 저장하였다. 젤라틴-코팅된 슬라이드에 올린 절편은 통상적인 조직학적 검사를 위해 크레실 바이올렛(cresyl violet)으로 염색하였다. 저장된 유동 상태의 절편은 면역조직화학 방법을 이용하여 검사하였다.

### [0038] 실시예 3. 면역조직화학 분석

[0039] 병렬로 놓인 유동 상태의 절편을 PBS에 녹인 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 함께 내인성 페록시다아제 블로킹(endogenous

peroxidase blocking)에 사용한 다음, 블로킹 버퍼(PBS에 녹인 1% 우태아혈청[FBS] 및 0.3% Triton X-100, 30 분간)로 처리하고 일차항체: p-tau (1:100, #sc-101817, Santa Cruz), GFAP(glial fibrillary acidic protein, 1:1000, #AM020, Biogenex), Iba-1 (1:500, #019-19741, Wako), CD45 (1:100, #M0701, Dako)로 반응시켰다. 상기 조직 절편의 면역조직화학 염색은 공지의 방법인 ABC(avidinbiotin peroxidase complex, ABC) 방법을 이용하여 수행하였다 (Kim, D. W. et al., 2007. *Neurochem Res* 32, 1460-1468). PBS로 세척한 후, 조직을 비오틴결합(biotinylated) 항-토끼 IgG 및 스트렙토아비딘 페록시다아제 복합체(Vector, USA)에 노출시켰다. 면역염색은 DAB(diaminobenzidine)로 시각화하고 폴리마운트(Polymount; Polysciences, USA)를 이용하여 올려놓았다.

#### [0040] 실시예 4. 이미지 분석

[0041] 면역조직화학 신호를 정량적으로 분석하기 위해, 농도 측정용 NIH 이미지 프로그램(ImageJ)을 사용하였다. 정량 데이터는 t-test를 이용하여 분석하고 \* < 0.05의 P 값을 통계적으로 유의한 것으로 결정하였다.

#### [0042] 실험결과

[0043] 인산-tau (phospho-tau)의 증가는 선수생활 동안 여러 번, 약한 뇌진탕에 노출된 프로 운동선수와 관련되어 있는 전형적인 신경병리학적 특징인, CTE의 초기 징후로 볼 수 있다 (McKee, A. C. et al., 2009. *J Neuropathol Exp Neurol* 68, 709-735). 따라서 본 발명자들은 p-tau 발현의 측두(temporal) 및 세포내 패턴을 확인하였다.

[0044] 도 2는 rmTBI의 대뇌피질(cerebral cortex), CA1 영역, 치아이랑(dentate gyrus) 및 CA3 영역에서 p-tau 발현을 나타낸 도면이다.

[0045] 도 2를 보면, 그룹 1에서 p-tau 인슐린 수용체 발현은 대뇌피질(cortex)의 얇은 층(II-III)에서 가끔씩만 나타났지만 깊은 층(IV-V)에서는 집중적으로 나타났다. 그룹 2에서, p-tau 인슐린 발현 패턴은 더 낮은 수준이긴 하지만, 그룹 1과 유사하게 나타났다. 그러나 p-tau 인슐린 수용체 발현은 그룹 3에서 최고치를 보였고, 그 다음 그룹 4와 5에서 감소하였다. rmTBI 후 해마의 CA1에서, p-tau+ 세포는 그룹 1과 3에서 지향층(stratum oriens, SO), 피라미드층(stratum pyramidale, SP) 및 방사층(stratum radiatum, SR)에 흩어져 있었지만, 그룹 2, 4, 5에서는 거의 없었다. rmTBI 후 해마의 DG에서, p-tau 인슐린 수용체 발현은 해마문(hilus)을 제외하고, 과립세포층(granular cell layer, GCL), 분자층(molecular layer, ML) 및 과립하층(subgranular zone, SGZ)에서는 발견되지 않았다. rmTBI 후 해마의 CA3에서, p-tau 인슐린 수용체 발현은 그룹 1에서 관찰되었지만 그룹 2에서는 감소하였다. 그러나 p-tau 인슐린 수용체 발현은 그룹 3에서 상당히 많았지만 그룹 4와 5에서는 감소하였다 (A-E4). CA3에서 p-tau 인슐린 수용체 발현은 점상으로(punctuate), 핵주위(perinuclear), 세포질(cytoplasmic) 분포를 나타내었다.

[0046] 또한, 도 3은 rmTBI의 대뇌피질, CA1 영역, 치아이랑 및 CA3 영역에서 p-tau의 상대적인 밀도에 대한 이미지 분석을 나타낸 도면이다.

[0047] 도 3에서, 세레브로리신 처리가 있거나 없이 rmTBI 후 p-tau 발현의 정량 분석은 CA3 영역 사이에서 현저한 차이를 나타내었다.

[0048] 또한 p-tau IR이 rmTBI 후 해마의 CA3 영역에서 발견되었기 때문에, 본 발명자들은 그레실 바이올렛 염색을 이용하여 선택적 병변(lesion) 또는 신경퇴화(neurodegeneration)가 CA3 영역에서 발생하는지를 시험하여 신경세포 생존을 분석하였다.

[0049] 도 4는 rmTBI의 CA3 영역에서 크레실 바이올렛 염색 및 GFAP, iba-1 및 CD45 발현을 나타낸 도면이다.

[0050] 도 4를 보면, 두 그룹(그룹 2, 4)에서, 미라미드 세포 변성(pyramidal cell degeneration)이 발견되지 않았다 (도 4의 A). 다음으로, 본 발명자들은 초기 뇌 외상이 별아교세포(astrocyte)와 미세아교세포(microglia) 활성화를 유도한 후 손상을 일으키기 때문에 (Blaylock, R. L. et al., 2011. *Surg Neurol Int* 2, 107), 세페브로리신 처리가 있거나 없이 rmTBI 후 별아교세포와 미세아교세포 활성화를 평가하였다. 그룹 2, 4, 5에서, GFAP+ 별아교세포는 실 같은 돌기 및 작은 세포질(small cytoplasm)을 가졌다. 그룹 1과 3에서, GFAP+ 별아교세포는

비대한 세포질(hypertrophied cytoplasm)과 굵은 돌기(thickened process)를 가진 다소 활성화된 형태였다 (도 4의 B). 그러나 두 그룹에서 iba-1+ 미세아교세포는 작은 세포질과 약간 얇은 돌기를 가졌다. 다수의 iba-1+ 미세아교세포는 모든 그룹에서 비대하거나 응집하지 않았고 고밀도 세포질 및 둥근 형태를 나타내었으며, 이는 미세아교세포 활성화를 의미한다 (도 4의 C). CD45+ 탐식세포(macrophage)/미세아교세포는 두 그룹에서 활성화된 형태로 관찰되지 않았으며 (도 4의 D), 이는 뇌실질(brain parenchyma)에 말초 탐식세포의 침투가 일어나지 않았음을 의미한다. 후자의 결과는 본 발명에 사용된 rmTBI 모델이 혈액-뇌장벽 붕괴(blood-brain barrier disruption) 및 부종(edema)을 나타낸다는 이전 보고(Kane, M. J. et al., 2012. *J Neurosci Methods* 203, 41-49)와 일치한다.

[0051] 도 5는 rmTBI의 CA3 영역에서 GFAP, iba-1 및 CD45의 상대적인 밀도에 대한 이미지 분석을 나타낸 도면이다.

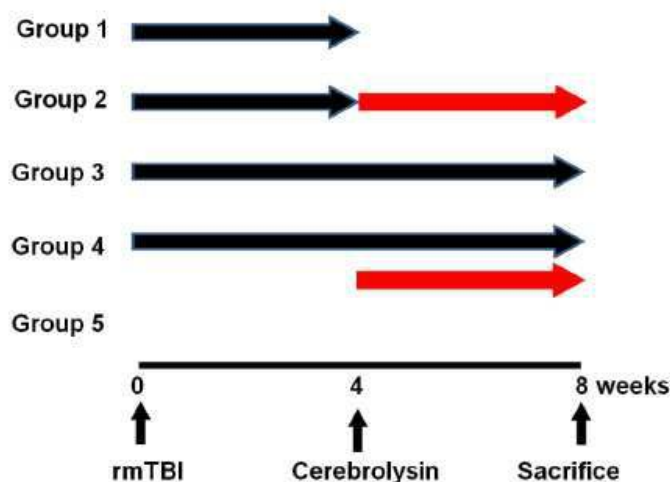
[0052] 도 5를 보면, 세페브로리신 처리가 있거나 없이 rmTBI 후 GFAP 발현의 정량 분석은 CA3 영역 사이의 현저한 차이를 나타내었다 (도 5).

[0053] 이상의 결과를 종합하면, CTE의 가장 대표적 표시인자인 tau 단백질의 인산화를 조직학적으로 조사한 결과, 대뇌피질과 해마내 CA3 영역에서 phospho-tau 단백질의 발현이 증가되었으며 세레브로리신 투여시 p-tau 발현이 감소되었다. 또한 CTE의 병인으로 알려진 별아교세포와 미세아교세포의 활성을 각각의 표시인인 GFAP, iba-1을 이용하여 면역조직화학염색을 시행한 결과, 별아교세포의 활성화는 rmTBI에 의하여 증가하였으며 세레브로리신에 의해 회복되었으나 미세아교세포의 활성화는 관찰되지 않았다. 또한 rmTBI 모델에서 체내 탐식세포(macrophage)의 뇌내유입유무를 관찰하고자 CD45 염색을 시행하였으나 유의한 차이를 관찰하지 못하였다. 따라서 세레브로리신이 rmTBI에 의한 tau 단백질의 인산화 및 별아교세포의 활성을 조절하는 것으로 사료된다. 따라서 세레브로리신이 CTE 환자에 대한 치료 약물의 후보가 될 수 있음을 시사한다.

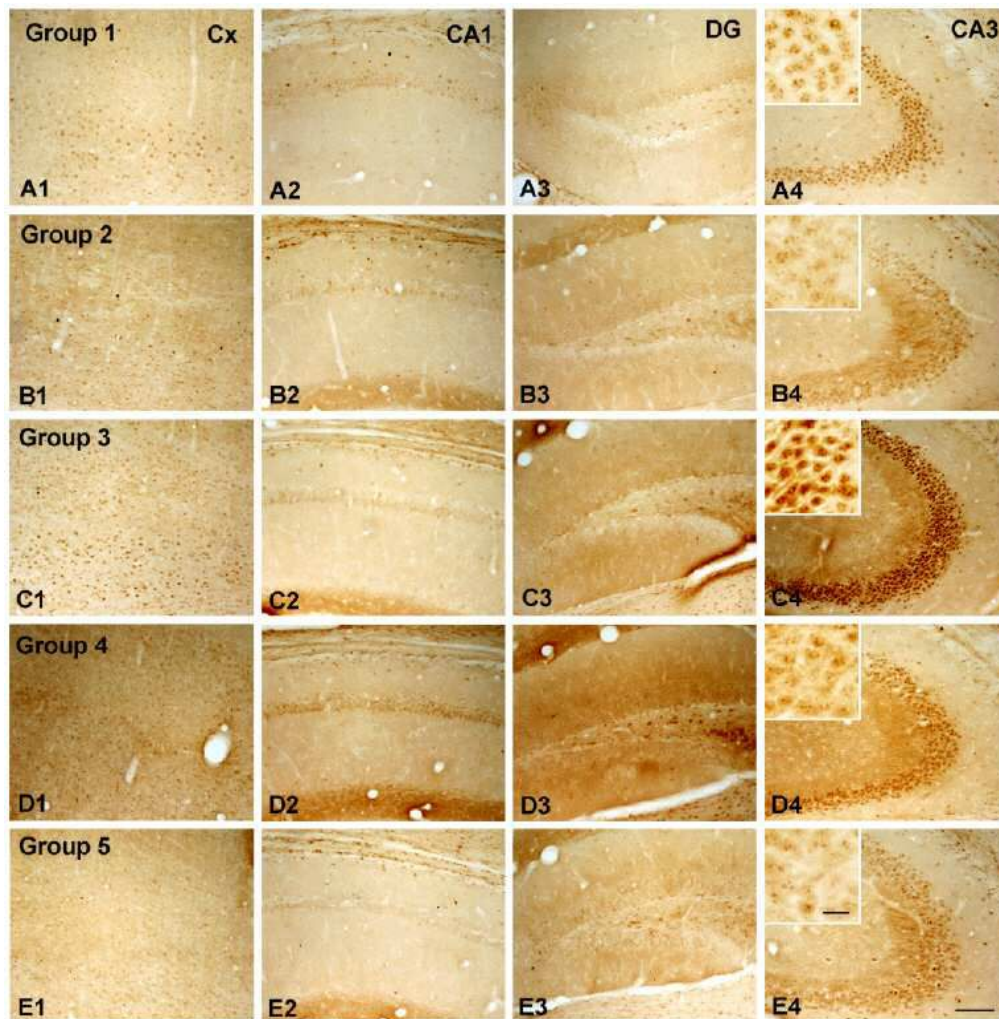
[0054] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

## 도면

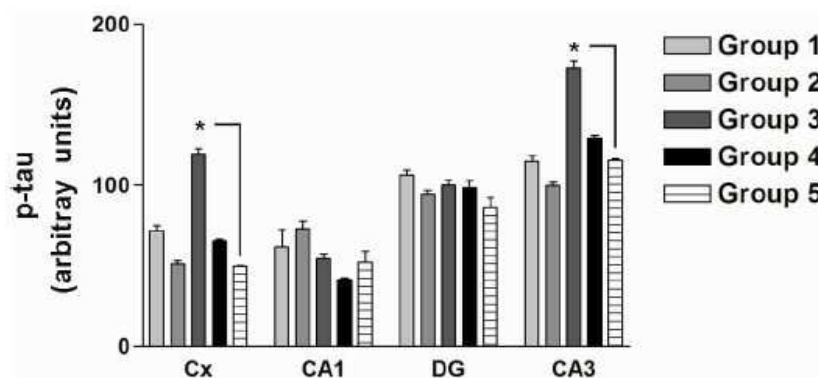
### 도면1



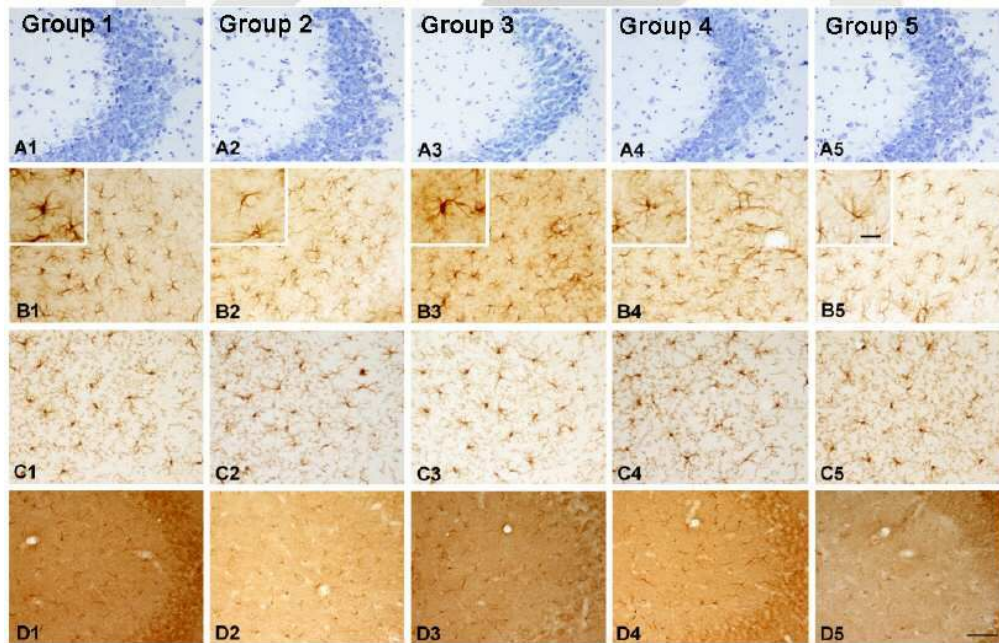
도면2



도면3



도면4



도면5

