



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0044015
(43) 공개일자 2018년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/027 (2013.01)
G01N 33/5088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0137560
(22) 출원일자 2016년10월21일
심사청구일자 2016년10월21일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
김한수
서울특별시 양천구 목동서로2길 22, 112동 310호 (목동, 한신청구아파트)
정수연
서울특별시 마포구 만리재옛길 75, 302호 (공덕동)
박혜상
강원도 춘천시 춘천로 120, 301동 606호 (효자동, 현진에버빌3차아파트)
(74) 대리인
안소영

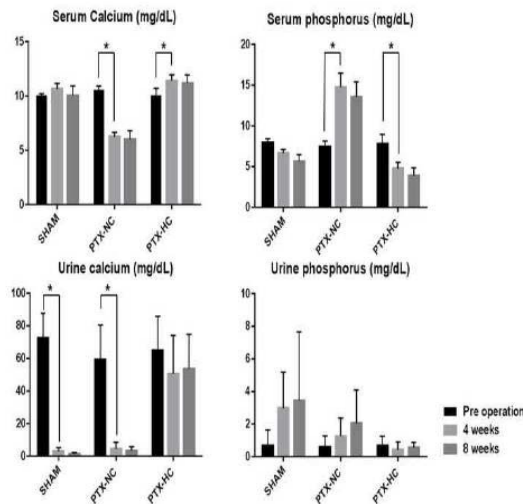
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 부갑상선 기능 저하증 동물모델 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 부갑상선 기능 저하증 동물모델 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 부갑상선 기능 저하증 동물모델은 부갑상선 기능 저하증의 병태생리를 나타낼 수 있으며, 최적의 칼슘함량 식이를 공급함으로써 병태생리를 왜곡하지 않으면서도 동물생존을 유지할 수 있어 경제적이며 효율적이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A01K 2207/10 (2013.01)
A01K 2207/30 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/03 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C1557010015
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 보건의료기술연구개발사업-중개연구(기술도출형)
연구과제명 부갑상선 전절제 동물모델을 이용한 분화 편도줄기세포의 치료효능 평가
기 여 율 50/100
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2015.10.01 ~ 2016.09.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1D1A1A09058485
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-이공학개인지초연구지원사업-기본연구(후속연구지원)
연구과제명 난치성 부갑상선기능저하증 치료를 위한 재생의학적 치료제 개발
기 여 율 50/100
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 인간을 제외한 실험동물의 부갑상선을 적출하는 단계; 및
- (b) 상기 부갑상선을 적출한 실험동물에 칼슘 함량이 조절된 식이를 제공하는 단계를 포함하는 부갑상선 기능 저하증(hypoparathyroidism) 동물모델의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 실험동물은 설치류 동물인 부갑상선 기능 저하증 동물모델의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 부갑상선 적출은 형광식별(fluorescent-identification) 방법을 이용하는 것인 부갑상선 기능 저하증 동물모델의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 형광식별은 아미노레블린산(5-aminolevulinic acid)을 주입하여 수행되는 것인 부갑상선 기능 저하증 동물모델의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 부갑상선 적출 후 부갑상선 호르몬의 혈청 수치를 측정하는 단계를 추가적으로 포함하는 부갑상선 기능 저하증 동물모델의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 식이 칼슘함량은 0.5% (5 g/kg)인 부갑상선 기능 저하증 동물모델의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 식이는 인을 포함하고, 인 함량은 1 내지 2 % (1 내지 2 g/kg)인 부갑상선 기능 저하증 동물모델의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 식이는 AIN-93G인 부갑상선 기능 저하증 동물모델의 제조방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따라 제조된 부갑상선 기능 저하증 동물모델.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 부갑상선 기능 저하증 동물모델은 (a) 부갑상선 호르몬 수치 감소; (b) 혈청 칼슘 수치의 감소 및 인 수치의 증가; (c) 소변 칼슘 수치의 증가 및 인 수치의 감소; (d) 골부피의 증가; (e) 소주(trabecular) 두께의 증가; 및 (f) 골 흡수의 감소로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 특성을 갖는 것인 부갑상선 기능 저하증 동물모델.

청구항 11

(a) 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 부갑상선 기능 저하증 동물모델에 시험물질을 투여하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계의 시험물질을 투여한 동물모델에 부갑상선 호르몬 수치; 칼슘 및 인의 수치; 골부피; 소주(trabecular) 두께; 및 골 흡수도로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 선별인자를 측정하는 단계; 및

(c) 대조군과 대비하여 상기 측정된 인자의 변화를 보이는 물질을 선별하는 단계를 포함하는 부갑상선 기능 저하증 치료물질의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 부갑상선 기능 저하증 동물모델 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 부갑상선 기능 저하증(hypoparathyroidism)은 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone; PTH)의 결핍상태로서 다양한 원인에 의해 유도된다. 부갑상선 기능저하증의 원인으로는 선천적 원인과 자가면역질환, 의인성 손상 등의 후천적 원인으로 나눌 수 있으며, 특히 의인성 손상으로는 갑상선수술 또는 부갑상선수술 시 발생하는 것이 가장 흔한 원인이다(Rubin MR et al., *Osteoporos Int.* 2010; 21(11):1927-34). PTH는 신장(kidney)에 의해 인 배출을 증가시키고, 세뇨관 및 소장(小腸)에 의한 칼슘의 흡수를 자극하며 골 교체율(bone turnover)을 향상시키는 파골세포를 활성화한다. PTH는 또한 신장에서 비타민 D를 활성화 시킨다. PTH 결핍은 칼슘 항상성의 손실 및 저칼슘혈증(hypocalcemia)을 초래하며, 이러한 상태는 이상감각(paresthesia), 약화, 자극 감수성(irritability) 및 근경축(muscle cramping)을 포함하는 신경 생리학적 장애를 일으킨다(Rejnmark L et al., *Osteoporos Int.* 2013;24(5):1529-36).

[0003] 기존 부갑상선 기능 저하증의 치료법은 칼슘 및 비타민 D 유사체를 보충하며, 환자는 매일 경구용 약물(2-8 정제)을 복용해야만 한다. 하지만 이러한 기존의 치료법은 칼슘 수치를 증가시키지만, 이는 약물에 의해 생리적으로 칼슘 수치, 골 대사 및 신장기능이 조절되지 않아 골절 및 신장결석과 같은 합병증의 발생을 증가시킨다(Langdahl BL et al., *Bone.* 1996;18(2):103-8). 이러한 제한은 새로운 치료방법에 대한 요구를 증가시켰고, 임상적으로 재조합 인간 PTH(1-84)를 주입하는 방법이 도입되었으나, 매일 PTH를 투여하는 것은 정상적인 생리적 요구반응과 차이가 있다.

[0004] 인간의 부갑상선 기능 저하증 병리생리를 완벽하게 재현한 동물모델은 새로운 치료방법의 효능검증에 필수적이다. 이상적인 동물모델은 재현성이 있고 비용 효율이 높아야하며, 연구결과를 타당하게 하도록 질병의 인간 생리 및 해부를 정확히 나타내야한다(Lelovas PP et al, *Comp Med.* 2008;58(5):424-30). 하지만 현재 대표적인 부갑상선 기능 저하증 동물모델이 없는 실정이다.

[0005] 동물모델을 제작하는 방법은 수술, 방사선 노출, 유전자 녹아웃(knockout) 및 약물투여를 포함하며, 동물은 질병의 병리생리를 나타내도록 적절하고 통제된 조건에서 적응 및 유지되어야 한다. 부갑상선 기능 저하증 동물모델은 미세절단 및 소작술(cauterization)을 이용하여 외과적으로 부갑상선을 제거하는 방법이 보고되었으나(Katsumata S et al., *BioFactors.* 2004;22(1-4):33-7; Chou FF et al., *Hum Gene Ther.* 2009;20(11):1344-50; Liao HW et al., *PLoS One.* 2015;10(7):e0133278), 랫트의 부갑상선은 매우 작기 때문에 이를 식별하여 정확하게 부갑상선만을 절제하기는 어려우며, 이에 따라 수술 후 PTH 수치가 일치하지 않는 문제점이 있었다(Ferreira JC et al., *PLoS One.* 2013;8(11):e79721). 부갑상선의 불확실한 식별은 부분적인 부갑상선 절제 또는 갑상선을 포함한 과도한 절제를 초래하며, 불완전한 절제는 수술 후 PTH 수치 변화를 초래한다. 갑상선 조직에 지장을 주는 것은 출혈을 일으킬 수 있고 절제된 양이 과한 경우 갑상선 기능 저하증 마저 일으킬 수 있다.

[0006] 따라서 상기 문제점을 해결하기 위하여, 최근 아미노레불린산(5-aminolevulinic acid; 5-ALA) 형광 식별방법을 이용하여 부갑상선만을 외과적으로 절제하는 부갑상선 기능 저하증 동물모델이 보고되었다. 형광검출을 사용함으로써 부갑상선은 남는 조직 없이 정확하게 절제된다. 이러한 수술기법은 수술 후 PTH가 감지할 수 없는 수준으로 빠르게 감소함으로써 부갑상선 기능 저하증 동물모델을 성공적으로 제작한다(Park YS et al. *Biomaterials.* 2015;65:140-52; Park HS et al. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2015;272(10):2969-77).

[0007] 이상적인 부갑상선 기능 저하증 동물모델은 질병의 병리생리를 재현해야 할뿐만 아니라 동물의 상태를 유지해야 하며, 인간 1차 부갑상선 기능 저하증 동물모델은 낮은 PTH 수치뿐만 아니라 칼슘 및 인의 균형 변화를 입증해야 한다. 5-ALA 형광식별방법을 이용한 이전의 동물모델에서 랫트는 낮은 PTH 수치에도 불구하고 저칼슘혈증의 징후 없이 관찰기간 동안 생존하였다(Park HS et al. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2015;272(10):2969-77). 인

간에게 있어 낮은 혈청 칼슘 수치는 추가적인 칼슘을 보충하지 않는 한, 감지할 수 없는 낮은 PTH 수치로 죽음을 초래하기 때문에 이러한 부갑상선 기능 저하증의 동물모델은 인간 부갑상선 기능 저하증과 차이가 있다. 따라서 음식물의 칼슘 공급의 효과를 배제하기 위하여 모든 동물에 칼슘제거 사료(calcium-free diet; CFD)를 공급한 경우, 모든 동물이 심한 저칼슘혈증 증상과 함께 수술 후 2-3일 내 사망하였으나 칼슘을 공급한 경우 혈청 칼슘 수치가 상승하고 동물들이 생존하였다(Park YS et al. Biomaterials. 2015;65:140-52). 이러한 모델은 1차 부갑상선 기능 저하증의 병리생리를 성공적으로 모방하였으나 CFD는 일반 상업적인 사료보다 비싸고 실험동물의 조기 사망 및 비용이 많이 소모되는 문제점이 있다.

[0008] 이러한 배경 하에서, 인간의 부갑상선 기능 저하증의 병리생리를 재현하면서 동물의 조기 사망을 방지하여 생리적 및 비용적으로 효율적인 부갑상선 기능 저하증 동물모델의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Katsumata S et al., BioFactors. 2004;22(1-4):33-7
(비특허문헌 0002) Park YS et al. Biomaterials. 2015;65:140-52

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 부갑상선 기능 저하증을 재현하고 동물의 생존을 유지할 수 있는 부갑상선 기능 저하증 동물모델 및 이의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 부갑상선 기능 저하증 동물모델을 이용한 부갑상선 기능 저하증 치료물질의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 형광식별방법 및 식이의 칼슘 함량을 조절한 부갑상선 기능 저하증 동물모델의 제조방법을 제공한다.

[0013] 구체적으로, 본 발명은 부갑상선 기능 저하증 동물모델의 제조방법으로 (a) 실험동물의 부갑상선을 적출하는 단계; 및 (b) 상기 부갑상선을 적출한 실험동물에 칼슘 함량이 조절된 식이를 제공하는 단계를 포함하는 부갑상선 기능 저하증(hypoparathyroidism) 동물모델의 제조방법을 제공한다.

[0014] 본 발명자들은 재현성이 있고 비용 효율이 높으며, 연구결과를 타당하게 하도록 부갑상선 기능 저하증의 병태생리를 정확히 나타낼 수 있는 부갑상선 기능 저하증 동물모델을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 형광식별방법을 이용하여 부갑상선을 적출한 동물에 칼슘 함량이 조절된 식이를 공급하는 경우, 부갑상선 기능 저하증의 병리생리를 재현하면서 관찰기간 동안 동물모델이 유지되는 최적의 식이 칼슘함량을 확인하였다.

[0015] 본 발명은 상기 (a) 단계 이전에, 실험동물을 마취시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 마취는 당업계에서 통상적으로 수행하는 방법에 따라 행해질 수 있으며, 그 종류에 한정이 있는 것은 아니나, 졸레틸/자일라진(Zoletil/xylazine chloride); 케타민/자일라진(Ketamine/Xylazine); 케타민/메데토미딘(ketamine/medetomidine); 케타민/자일라진/아세프로마이진(ketamine/xylazine/acepromazine); 수디엄 펜티바르비탈(sodium pentobarbital) 단독 투여; 또는 아이소플루란(isoflurane)을 투여하여 마취하는 방법을 이용할 수 있으며, 바람직하게는 졸레틸/자일라진 클로라이드를 투여하여 마취시킬 수 있다.

[0016] 본 발명에 따른 부갑상선 기능 저하증 동물모델의 제조방법은 (a) 실험동물의 부갑상선을 적출하는 단계를 포함한다.

[0017] 본 발명에 있어서 실험동물은 부갑상선 기능 저하증을 유발할 수 있는 모든 동물을 포함하며, 예를 들어 마우스, 햄스터, 랫트 등 설치류, 토끼, 개, 영장류, 돼지 등을 포함할 수 있고, 인간을 제외한다. 바람직하게는 설치류일 수 있으며, 보다 바람직하게는 랫트(rat)일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 6 내지 10주령의 260 내지 350 g 무게의 수컷 Sprague-Dawley 랫트일 수 있다.

- [0018] 상기 (a) 단계의 실험동물의 부갑상선을 절제하여 부갑상선을 적출하는 방법은 당업계에서 통상적으로 사용되는 모든 방법을 동원할 수 있으며, 바람직하게는 부갑상선의 형광식별방법을 이용하여 미세절단 및 조각술로 절제할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 부갑상선의 형광식별은 5-아미노레불린산(5-aminolevulinic acid)을 주입하여 크세논 광원 하에서 붉은 형광을 나타내는 부갑상선을 식별할 수 있다. 부갑상선 적출은 PTH가 검출되지 않는 수치로 감소하여 부갑상선 기능 저하증의 병태생리를 나타내도록 하는데 필수적인 역할을 하며, 형광식별방법을 이용하여 부갑상선을 정확하게 절제할 수 있다.
- [0020] 본 발명은 상기 (a) 단계의 부갑상선 적출 후 부갑상선 호르몬의 혈청 수치를 측정하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다. 이러한 호르몬의 혈청 수치 측정은 당업계에서 통상적으로 수행하는 방법에 따라 행해질 수 있으며, 바람직하게는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)에 의해 측정할 수 있다.
- [0021] 본 발명에 따른 부갑상선 기능 저하증 동물모델의 제조방법은 (b) 부갑상선을 적출한 실험동물에 칼슘 함량이 조절된 식이를 제공하는 단계를 포함한다.
- [0022] 본 발명의 동물모델 제조방법은 칼슘함량이 조절된 식이를 동물모델에 제공하여 관찰기간 동안 동물의 생존을 유지시킬 수 있고, 상기 식이의 칼슘함량은 본 모델이 적용되는 동물에 따라 조절될 수 있으며, 바람직하게는 4 내지 6 g/kg일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 있어, 상기 칼슘함량이 조절된 식이는 5 g/kg 칼슘을 포함하는 AIN-93G일 수 있다. 상기 칼슘함량을 초과하는 경우, 예를 들어 고농도의 칼슘(2 %)을 포함하는 식이를 공급하는 경우 랫트의 혈청 칼슘 수치가 정상 대조군에 비해 증가하여 부갑상선 기능 저하증 생리를 왜곡될 수 있으며, 상기 함량에 미치지 못하는 경우 실험동물이 조기에 사망하는 문제점이 있다.
- [0023] 본 발명의 (b) 부갑상선을 적출한 실험동물에 칼슘 함량이 조절된 식이를 제공하는 단계에 있어서, 상기 식이는 추가로 인 함량이 조절된 식이의 제공일 수 있다. 인 함량이 조절된 식이를 동물모델에 제공하여 관찰기간 동안 동물의 생존을 유지시킬 수 있고, 상기 식이의 인 함량은 본 모델이 적용되는 동물에 따라 조절될 수 있으며, 바람직하게는 1 내지 2 g/kg일 수 있으며, 보다 바람직하게 1.4 내지 1.6 g/kg일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 인 함량이 조절된 식이는 1.56 g/kg 인을 포함하는 AIN-93G일 수 있다. 부갑상선 기능 저하증 치료 효과 평가에 있어 혈중 및 뇨중 인 수치도 중요한 역할을 하기 때문에 인의 함량이 변화할 경우 치료효과 판단에 영향을 미치며 신장 내 칼슘 침착을 유발할 수 있는바, 위 인의 함량 역시 동물 모델에서 중요한 인자로 조절될 필요가 있다.
- [0024] 상기 칼슘과 인의 함량 비율은 2.5 내지 4.0 : 1의 비율, 바람직하게 3.0 내지 3.5 : 1의 비율이 바람직하다.
- [0025] 본 발명에 있어 "AIN-93G"는 분리된 단백질, 당, 오일, 정제된 비타민 및 무기물로 구성된 광범위하게 사용되는 정제사료(purified diet)로서, 곡물을 단순 배합하여 제공되는 비정제사료에 비해 영양소의 배합, 특히 사료 내 무기질의 공급이 일정하여 식이량에 따라 체내 무기물 수치가 민감하게 달라지는 동물실험에 적합하다. 또한, AIN-93G는 기존에 널리 사용되던 AIN-76A 사료를 동물모델에 공급하여 장기사육 시 신석회화증 등이 발생하는 것에 착안하여 칼슘-인 비율을 엄격하게 조절한 무기물 혼합을 사용하며, 칼슘제거사료에 비해 저렴한 장점이 있다.
- [0026] 본 발명은 또한 상기 제조방법에 의해 제조된 부갑상선 기능 저하증 동물모델을 제공한다.
- [0027] 본 발명에 따른 부갑상선 기능 저하증 동물모델은, 재현성 있고 경제적이며 인간 부갑상선 기능 저하증과 유사한 병리생리를 나타낸다.
- [0028] 본 발명의 부갑상선 기능 저하증 동물모델은 (a) 부갑상선 호르몬 수치 감소; (b) 혈청 칼슘 수치의 감소 및 인 수치의 증가; (c) 소변 칼슘 수치의 증가 및 인 수치의 감소; (d) 골부피의 증가; (e) 소주(trabecular) 두께의 증가; 및 (f) 골 흡수의 감소로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 특성을 확인함으로써 부갑상선 기능 저하증이 유발되었음을 확인할 수 있다.
- [0029] 본 발명은 또한 본 발명의 동물모델을 이용한 부갑상선 기능 저하증 치료물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0030] 본 발명의 부갑상선 기능 저하증 치료물질의 스크리닝 방법은 부갑상선 기능 저하증 치료제의 안전성과 유효성 분석에 적용될 수 있으며, 새로운 치료제 개발에 적합하다.
- [0031] 구체적으로, 본 발명은 (a) 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 부갑상선 기능 저하증 동물모델에 시험물질을 투여하는 단계;

- [0032] (b) 상기 (a) 단계의 시험물질을 투여한 동물모델에 부갑상선 호르몬 수치; 칼슘 및 인의 수치; 골부피; 소주(trabecular) 두께; 및 골 흡수도로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 선별인자를 측정하는 단계; 및
- [0033] (c) 대조군과 대비하여 상기 측정된 인자의 변화를 보이는 물질을 선별하는 단계를 포함하는 부갑상선 기능 저하증 치료물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 스크리닝 방법에 사용되는 용어 "시험물질"은 부갑상선 기능 저하증이 개선 또는 치료되는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다.
- [0035] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 (a)의 시험물질로는 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 합성 화합물, 발효 생산물, 세포 추출액, 식물 추출액, 동물 조직 추출액 또는 혈장 등이 있고, 상기 화합물은 신규 화합물 또는 공지된 화합물일 수 있으며 바람직하게는 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다.
- [0036] 본 발명의 (b) 상기 (a) 단계의 시험물질을 투여한 동물모델에 선별인자를 측정하는 단계는 부갑상선 호르몬 수치; 칼슘 및 인 수치; 골부피; 소주(trabecular) 두께; 및 골 흡수도로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 측정을 포함한다.
- [0037] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 선별인자를 측정하는 단계는 혈청 칼슘수치의 변화를 측정하는 것일 수 있다. 상기 측정은 혈청 칼슘수치의 변화를 확인하기 위한 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 전자동 생화학 분석기로 수행될 수 있다.
- [0038] 또한 골 부피 및 소주 두께의 변화는 예를 들어 마이크로컴퓨터 단층촬영(μ CT)을 수행하여 측정될 수 있다.
- [0039] 또한 골 흡수의 변화에 대한 측정은 설치류 동물모델에서 일반적으로 사용되는 통상의 골 흡수의 측정에 의해 측정될 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면 골 흡수 활성의 지표인 CTX-1 수치를 랫트 CTX-1 ELISA kit를 이용하여 측정할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 (c) 대조군과 대비하여 상기 측정된 인자의 변화를 보이는 물질을 선별하는 단계에 있어서 부갑상선 기능 저하증의 치료제 여부는 시험물질을 투여하지 않은 대조군과 대비하여 이루어질 수 있다. 예를 들어, 시험물질을 투여하지 않은 대조군과 비교하여 부갑상선 호르몬의 증가; 혈청 칼슘 수치의 증가 및 인 수치의 감소; 소변 칼슘 수치의 감소 및 인 수치의 증가; 골부피의 감소; 소주(trabecular) 두께의 감소; 또는 골 흡수를 증가시키는 경우, 시험물질은 부갑상선 기능 저하증 치료제로 판단된다. 상기와 같은 방법으로 스크리닝된 치료제는 부갑상선 기능 저하증 치료에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 효과

- [0041] 본 발명에 따른 부갑상선 기능 저하증 동물모델은 부갑상선 기능 저하증의 병태생리를 나타낼 수 있으며, 최적의 칼슘함량 식이를 공급함으로써 병태생리를 왜곡하지 않으면서도 동물생존을 유지할 수 있어 경제적이며 효율적이다.

도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1은 랫트 경골의 관상면을 마이크로컴퓨터를 이용하여 단층 촬영한 것으로, 붉은 색은 관심영역을 나타낸다.
- 도 2는 본 발명의 5-ALA 형광식별방법에 의한 랫트의 부갑상선을 나타내는 도이다.
- 도 3은 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 랫트의 무게변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 랫트의 칼슘 및 인 수치 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 5는 본 발명의 동물모델의 신장 사구체 및 세관 조직을 염색하여 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 6은 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 랫트의 타입 I 콜라겐 C-텔로펩티드 및 오스테오칼신의 수치 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 7은 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 랫트 경골의 마이크로 컴퓨터 단층촬영 이미지를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0043] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시 예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시 예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로

구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0044] <실시예 1> 실험동물 준비

[0045] 8주령의 약 260-350 g 수컷 Sprague-Dawley 랫트(오리엔트 바이오, 성남, 한국) 30마리를 이용하였다. 모든 동물을 실험 전 최소 7일 동안 순응시키고 12시간의 광/암주기 하에서 사료와 물에 자유롭게 접근하도록 하였다. 동물관리는 실험동물자원협회(the Institute of Laboratory Animal Resources) 및 국립보건원(the National Institutes of Health)에 의한 실험동물의 관리 및 사용 지침과 이화여자대학교 의학연구소(Ewha Woman's University Medical Research Institute)의 동물실험 가이드라인을 따랐다.

[0046] <실시예 2> 동물연구 설계

[0047] 수술 절차 및 칼슘 식이 농도에 따라 동물을 다음과 같이 4개의 그룹으로 나누었다.

[0048] 1. 위(偽) 수술(SHAM, 부갑상선 노출 및 절개 봉합, n=5).

[0049] 2. 부갑상선 적출 및 칼슘 미함유 식이(PTX-FC, n = 5).

[0050] 3. 부갑상선 적출 및 보통 칼슘 식이(PTX-NC, n = 10).

[0051] 4. 부갑상선 적출 및 높은 칼슘 식이(PTX-HC, n = 10).

[0052] SHAM 및 PTX-NC 군에 대한 보통식이로서 5 g/kg 칼슘 (0.5%)을 함유한AIN-93G (Research Diets, New Brunswick, NJ, USA)을 사용하였다. AIN-93G 배합에 기초하여, 맞춤 식이로서 칼슘 미함유 및 칼슘첨가 배합을 제조하고 설치류 사료(Cargill Agri Purina, Pyongtaek, Korea)를 포함하여 칼슘 및 인 농도를 표 1에 나타내었다(Park HS et al, *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2015 Oct; 272(10):2969-77). 식이 소비와 무게 변화를 매주 측정하였다.

[0053] [표 1]

	AIN-93G (PTX-NC, SHAM)	칼슘첨가식이 (PTX-HC)	칼슘 미함유 식이 (PTX-FC)	설치류 사료
Ca (g/kg)	5	20	0	11.4
P (g/kg)	1.56	6.24	1.56	6.1
Ca : P 비율	3.20 : 1	3.20:1		1.86 : 1

[0054]

[0055] 부갑상선 기능 저하 생리의 관찰을 위해 모든 군의 랫트에 대하여 혈청 칼슘, 혈청 인, 혈액요소질소(blood urea nitrogen; BUN), 혈청 크레아티닌(creatinine; Cr), 소변 내 칼슘 및 인의 수치를 전자동 생화학 분석기를 이용하여 측정하였다. 또한 혈청 오스테오칼신(osteocalcin) 및 CTX-1(C-telopeptide of type-I collagen) 수치를 각각 랫트 오스테오칼신(Immutopics) 및 랫트 CTX-1 ELISA kit(Cusabio, Wuhan, China)에 의해 측정하였다. 상기 모든 파라미터들을 수술 전, 수술 후 4주 및 8주차에 평가하였다.

[0056] 모든 통계분석은 SPSS (version19) (IBM, Chicago, IL, USA)을 이용하여 수행하였다. 각 결과를 평균 ± 표준편차로 나타내었고, 그룹 간 무게 변화의 통계적 유의성을 결정하기 위해 반복측정 분산분석을 이용하였다. 세 그룹간 결과를 비교하기 위해 크루스칼-윌리스 검정을 사용하고, 세 그룹 중 두 그룹 사이에 통계적 유의성을 결정하기 위하여 Mann-Whitney 검정을 이용하였으며 p value < 0.05는 유의한 것으로 간주하였다. 하기의 각 표에서 *는 세 그룹간 크루스칼-윌리스 검정에서 p -value < 0.05, a는 Mann-Whitney test (p -value < 0.05)에 의한 PTX 및 SHAM군 사이의 통계적으로 유의한 차이, b는 Mann-Whitney test (p -value < 0.05)에 의한 PTX-NC 및 PTX-HC군 사이의 통계적으로 유의한 차이를 의미한다.

[0057] <실시예 3> 부갑상선의 외과적 절제 및 PTH 수치 확인

[0058] 랫트의 부갑상선을 적출하기 위해 5-ALA 형광식별방법을 이용하여 부갑상선을 제거하였다(Park HS et al, *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2015 Oct; 272(10):2969-77). 먼저 5-ALA 파우더(Sigma-Aldrich Korea, Yongin, Korea)를 0.9% 염화나트륨 용액에 현탁시키고, 현탁액(500 mg/kg)을 복강 내 주사로 PTX 및 SHAM군에 투여하였다. 광독성(phototoxicity)을 방지하기 위하여 모든 동물을 2시간 동안 부드러운 빛 하에서 유지하였다. 2시간 후, 졸레틸(Zoletile) (Virbac Korea, Seoul, Korea) 및 자일라진 클로라이드(xylazine chloride) (Bayer

Korea, Seoul, Korea) (1:1 mix, 0.1 mL/100 g)을 복강 내 주사로 동물에 투여하였다. 목 중앙에 수직 피부절개를 수행하고, 기도(trachea) 및 갑상선이 노출될 때까지 근육을 절개하였다. 635 nm에서 형광 방출을 검출하도록 설계된 자외선 필터를 이용하여 크세논 광원 하(380-440 nm)에서 붉은 형광을 나타내는 부갑상선을 검출하였다. SHAM군의 부갑상선은 유지하고, PTX군의 두 부갑상선을 콜드 나이프를 이용하여 제거하였다. 이후 거즈압박 및 양극성 소작(cauterization)으로 지혈하고, 비흡수성 4-0 Ethilon® (Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, USA)로 피부 절개를 봉합하였다. PTX-FC군의 랫트가 저칼슘혈증 증상(억제되지 않는 근육 경련 및 수축)을 보일 때, 5마리 모두를 수술 후 2-4일 내에 안락사 시켰고, 나머지 동물들은 연구가 끝날 때 까지(8주) 생존하였다.

[0059] 부갑상선의 완전한 제거를 확인하기 위해, 수술 후 7일째에 PTH 혈청 수치를 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)(Rat Bioactive Intact PTH ELISA kit, Immutopics, San Clemente, CA, USA)에 의해 측정하였다.

[0060] 그 결과, SHAM군의 수술 후 7일차 혈청 PTH의 수치는 88 ± 46 pg/mL (범위 : 37 - 126 pg/mL)이었다. 하지만, SHAM군과 비교하여 PTX군의 PTH는 검출되지 않는 수치로 상당히 감소하였으며, 또한 체중 증가에 현저한 차이가 있었다. 8주차 SHAM군 랫트의 무게는 599 ± 38 g이었으나 생존한 PTX군 랫트 모두 SHAM군 보다 무게가 덜 나갔고, 8주차 PTX-HC 군은 PTX-NC 군보다 더 나갔다(각각 527 ± 45 및 465 ± 35 g). 이러한 결과는 통계적으로 유의하며(도 3), 랫트의 음식섭취량은 세 군 간의 유의한 차이가 없었다.

[0061] <실시예 4> 칼슘 및 인 수치 확인

[0062] 랫트의 칼슘 및 인 수치를 전자동 생화학 분석기를 이용하여 측정하였다.

[0063] 그 결과, SHAM군(칼슘: 10.02 ± 0.91 mg/dL; 인: 5.66 ± 0.81 mg/dL)과 비교할 때, PTX-NC군에서의 혈청 칼슘 수치는 5.99 ± 0.81 mg/dL로 상당히 떨어졌고, 혈청 인 수치는 13.56 ± 1.84 mg/dL로 상당히 증가하였다(도 4). 이와 반대로, PTX-HC 군은 SHAM군보다 높은 혈청 칼슘 및 낮은 인 수치를 보였다. 4주 및 8주차 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

[0064] 소변 칼슘 수치는 PTX-HC군에서 떨어졌지만, 시간이 경과함에 따라 모든 그룹에서 감소하였다. 소변 인 수치는 PTX-NC 및 SHAM군에서 증가하였고 PTX-HC군에서 감소하였다(도 4 및 표 2). 그룹 간 8주차 결과를 비교하면, PTX NC군에서 SHAM군 보다 높은 소변 칼슘 수치 및 낮은 소변 인 수치를 나타냈다.

[0065] [표 2]

	SHAM	PTX-NC	PTC-HC	P-value
Serum calcium(mg/dL)	10.02 ± 0.89	5.99 ± 0.78^{ab}	11.17 ± 0.68^{ab}	0.000*
Serum phosphorus(mg/dL)	5.66 ± 0.78	13.56 ± 1.76^{ab}	3.89 ± 0.83^b	0.000*
Urine calcium(mg/dL)	1.31 ± 0.82	3.45 ± 2.61^b	53.68 ± 15.37^{ab}	0.000*
Urine phosphorus(mg/dL)	3.44 ± 4.21	2.06 ± 1.86^b	0.558 ± 0.25^b	0.041*

[0066]

[0067] <실시예 5> 신장독성 평가

[0068] 신독성(nephrotoxicity) 발생을 평가하기 위하여 수술 절차 8주 후에 동물을 희생시키고 신장을 수득하였다. 수득한 시료를 파라핀 블록에 넣고, 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다. 관 위축(tubular atrophy), 간질성 섬유증, 간질성염 및 사구체 기형(deformity)을 포함하는 신장 독성의 특징을 평가하였고, 또한 칼슘 침전물의 존재도 평가하였다. 심각도를 0 = 정상 조직; 1 = < 25%; 2 = > 25% , <50%; 3= > 50%, <75%; 4 = >75%로 나누고, 결과를 광학 현미경($\times 100$ 배율) 하에서 평가하였다.

[0069] 그 결과, 식이는 PTX 랫트의 신장 기능장애를 야기하지 않는 것으로 나타났다. 각 식이의 공급 2개월 후, 혈청 BUN(Blood urea nitrogen) 및 크레아티닌 수치는 변화가 없었다(표 3). 조직학적 평가는 신장의 정상적인 관 및 사구 구조를 나타냈으며 관 위축, 간질성 섬유증, 간질성염 또는 관 손상 징후는 없었다. 칼슘 인 침전물은 세관(tubule) 또는 혈관에서 관찰되지 않았다(도 5).

[0070] [표 3]

	SHAM	PTX-NC	PTC-HC	P-value
BUN (mg/dL)	16.73 ± 1.97	15.97 ± 2.19	18.04 ± 3.09	0.080
크레아티닌 (mg/dL)	0.52 ± 0.09	0.61 ± 0.05	0.60 ± 0.07	0.054
조직병리학적 등급	0	0	0	
세뇨관 괴사 (Tubular necrosis)	0	0	0	
관 팽창	0	0	0	
사구체 변화 (Glomerular alteration)	0	0	0	
간질성염 (Interstitial inflammation)	0	0	0	
인산칼슘 침전	0	0	0	

[0071]

[0072] <실시예 6> 골교체 마커

[0073] 골 흡수 활성의 지표인 CTX-1(C-telopeptide of type-I collagen) 수치는 PTX 동물보다 SHAM 동물에서 상당히 높았다. SHAM군의 CTX-1 수치는 관찰기간 동안 증가한 반면 PTX군의 CTX-1 수치는 변화가 없었다(도 6). 혈청 오스테오칼신 수치는 시간이 흐름에 따라 세 군 모두에서 감소하였으나, 군 간의 차이는 없었다(표 4).

[0074] [표 4]

	SHAM	PTX-NC	PTC-HC	P-value
CTX-1 (pg/mL)				
Pre	280.27 ± 4.45	272.25 ± 46.97	262.69 ± 54.00	
8 weeks	487.06 ± 159.97	256.56 ± 68.95 ^a	304.14 ± 115.88 ^a	0.020*
Osteocalcin (ng/mL)				
Pre	40.45 ± 12.35	43.31 ± 6.67	46.20 ± 9.84	
8 weeks	23.46 ± 1.97	21.67 ± 3.97	22.68 ± 4.20	0.552

[0075]

[0076] <실시예 7> 마이크로컴퓨터 단층촬영(μCT)

[0077] 수술 8주 후, 9마리(SHAM, PTX-NC 및 PTX-HC 각 군으로부터 3마리)의 근위 경골에 μCT (NFR Polaris-G90; NanoFocusRay, Jeonju, Korea)를 수행하였다. μCT는 70kVP, 50 μA, 360 views, 500 scan numbers 및 512 × 512 reconstruction matrix로 설정하였다. 3차원 재구성 후, 골 부피율, 소주(trabecular) 두께, 소주 개수, 소주 분리 및 연결성 밀도(Conn.D)를 Skyscan 1076 in vivo μCT scanner software (Skyscan, Aartselaar, Belgium)를 이용하여 관심영역(도 1)에서 획득하였다.

[0078] 그 결과, 골 부피는 SHAM 군보다 PTX군에서 현저히 높았다. 하지만 PTX-NC군이 PTX-HC 군보다 높은 골 부피율을 갖는 경향을 보였으나 PTX군 간 통계적으로 유의한 차이는 없었다(표 5). 섬유 두께, 개수 및 산재(sparseness)는 군 간 유의한 차이를 보이지 않았으며, Conn. D는 세 군 사이에 차이가 없었다. μCT 관상 이미지를 도 7에 나타내었다.

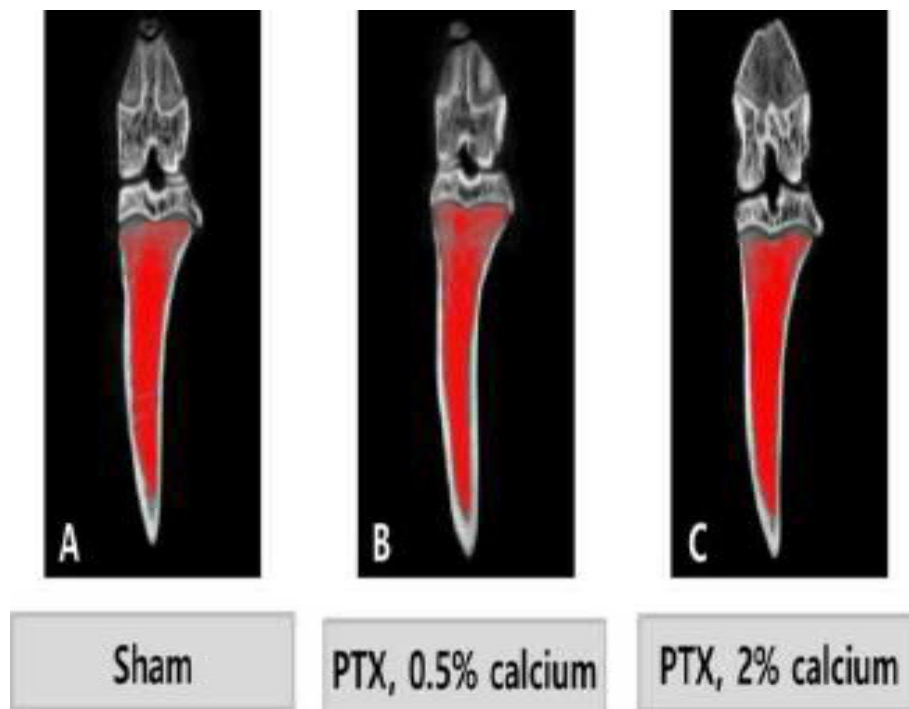
[0079] [표 5]

	SHAM	PTX-NC	PTC-HC	P-value
골부피분율 (%)	17.791 ± 5.741	46.013 ± 22.29 ^a	32.068 ± 6.644	0.048*
소주 두께(mm)	0.840 ± 0.314	1.292 ± 0.577	0.821 ± 0.178	0.430
소주 개수 (mm ⁻¹)	0.232 ± 0.097	0.349 ± 0.044	0.392 ± 0.009	0.430
소주 산재 (mm)	2.314 ± 1.414	1.918 ± 0.647	2.509 ± 0.221	0.240
연결성 밀도(/ mm ³)	0.738 ± 0.405	0.725 ± 0.498	0.862 ± 0.014	0.080

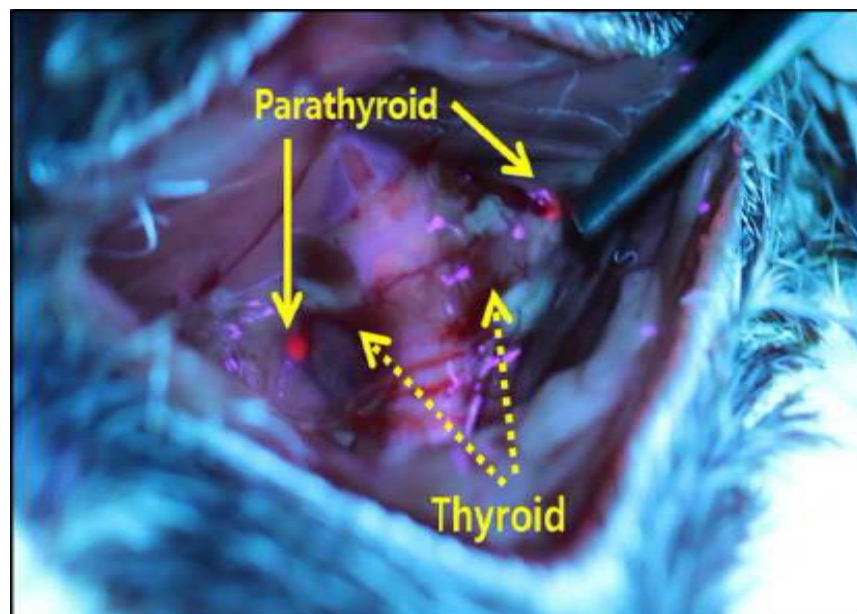
[0080]

도면

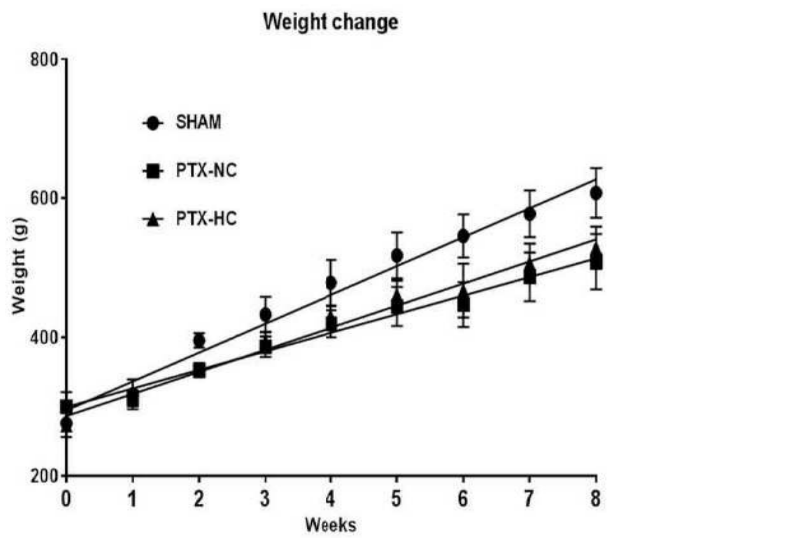
도면1



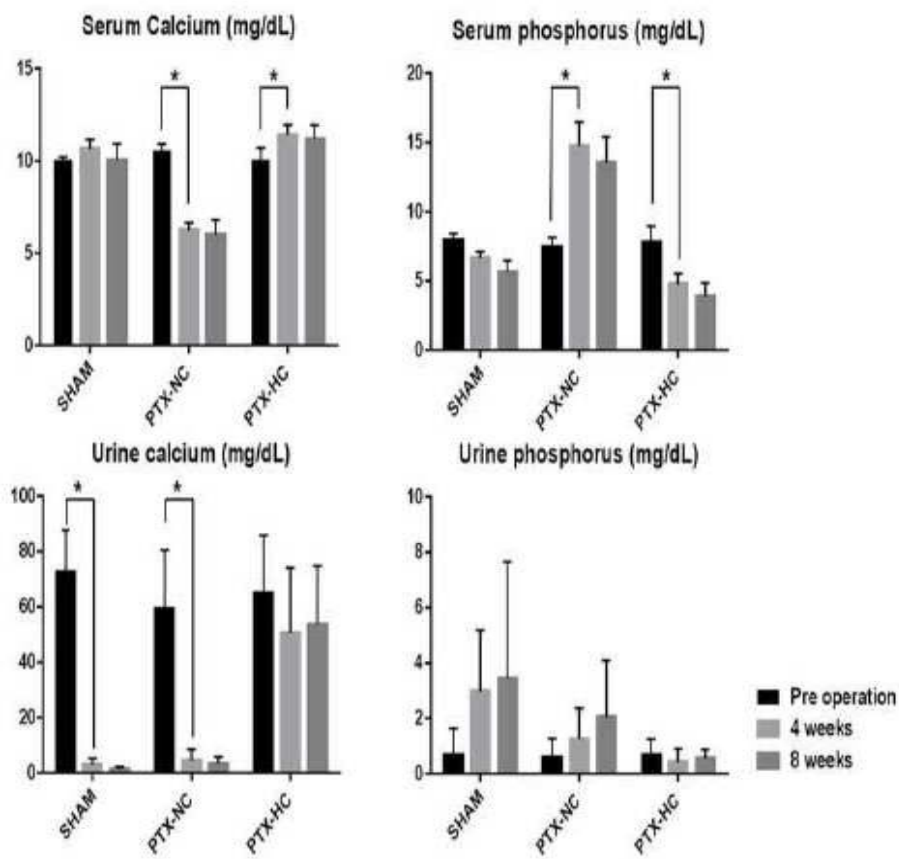
도면2



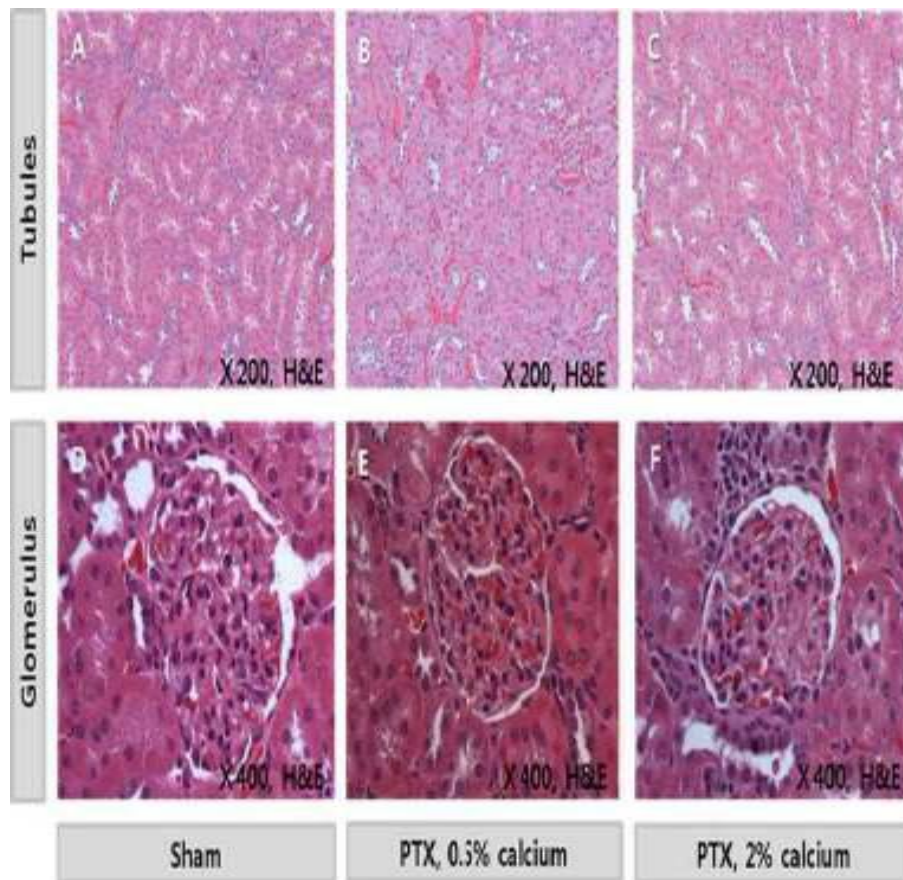
도면3



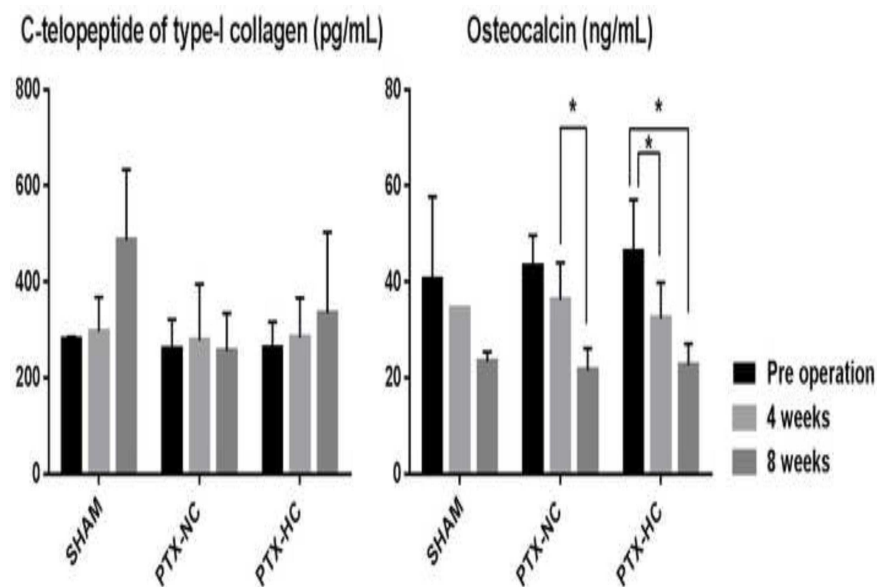
도면4



도면5



도면6



도면7

