(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0141923
(43) 공개일자 2019년12월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/08 (2019.01) *A23L 33/18* (2016.01)
A61P 25/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/08 (2019.01)
A23L 33/18 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0068740
(22) 출원일자 2018년06월15일
심사청구일자 2018년06월15일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
이자경
서울특별시 강서구 등촌로 163 (등촌동, 등촌I-PARK아파트) 119동 901호
김일두
인천광역시 남구 아암대로29번길 16 (용현동, 인천 용현 엑슬루타워) 105동 2004호
이한비
인천광역시 남구 비룡길23번길 7-10 (용현동)
(74) 대리인
이원희

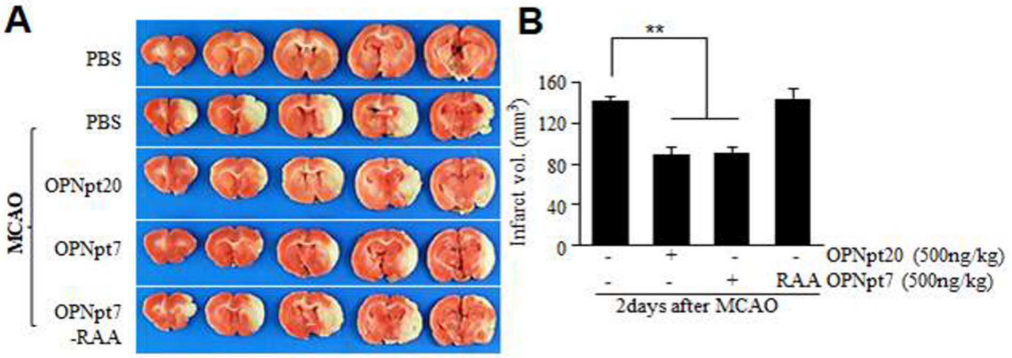
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **오스테오폰틴 단백질 단편을 유효성분으로 함유하는 뇌손상 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 오스테오폰틴 단백질 단편을 유효성분으로 함유하는 뇌손상 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드는 MCAO 랫드 모델에서 뇌허혈 부피를 감소시키고, 운동기능 손상 및 신경학적 결손을 개선시키며, 미세아교세포에서 LPS로 유도한 염증반응을 억제함으로써, 뇌손상 예방, 치료 또는 개선용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 25/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI17C0342
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 보건산업진흥원
연구사업명 질환극복기술개발사업
연구과제명 비강투여를 통한 신경보호 펩타이드의 비침습적 중추신경계 전달 및 뇌졸중 치료 기술 개발(1차년도)
기 여 율 50/100
주관기관 인하대학교
연구기간 2017.04.10 ~ 2017.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2018R1A2B2004264
부처명 과기부
연구관리전문기관 연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업HI17C0342
연구과제명 미세아교세포 세포질 NOD2 리셉터 조절을 통한 Danger signal HMGB1의 뇌졸중 후 염증 유도 기전 연구 (1차년도)
기 여 율 50/100
주관기관 인하대학교
연구기간 2018.09.01 ~ 2019.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 뇌손상 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 뇌손상은 염증에 의한 뇌손상인, 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 염증에 의한 뇌손상은 허혈성 뇌졸중, 노인성 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병, 다발성 경화증, 물리적 뇌손상, 근위축성 축삭경화증 및 루게릭병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 약학 조성물.

청구항 4

서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 뇌손상 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 뇌손상은 염증에 의한 뇌손상으로, 허혈성 뇌졸중, 노인성 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병, 다발성 경화증, 물리적 뇌손상, 근위축성 축삭경화증 및 루게릭병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 오스테오폰틴(osteopontin) 단백질 단편을 유효성분으로 함유하는 뇌손상 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 뇌의 염증반응은 노인성 치매, 파킨슨씨병 등의 퇴행성 뇌질환의 발병 및 진전의 직접 또는 간접적인 위험인자로 알려져 있으며, 또한 그 밖의 뇌졸중이나 타박상에 의한 뇌 손상을 가중시키는 작용을 하는 것으로 알려져 최근 다양한 뇌질환을 조절할 수 있는 대상 경로 중의 하나로 상기 뇌의 염증반응 조절이 강조되고 있다.

[0004] 미세아교세포(microglia)는 교(glia) 세포의 일종으로, 뇌의 염증반응을 매개하는 대표적인 세포이다. 이 세포는 우리 몸 전체의 염증반응을 조절하는 대식세포(macrophage)와 특성이 매우 유사한데, 이들은 감염이나 암세포 등으로부터 뇌를 일차적으로 보호하는 기능이 있다. 상기 미세아교세포는 뇌 전체 교 세포의 10 ~ 20%를 차지하며 독특한 생화학적 및 전기생리학적 특징이 있다. 즉, 자극받지 않은 정상상태에서는 전혀 면역세포로서의

특징을 나타내지 않으나, 일단 감염, 노화, 뇌졸중 및 외상 등과 같은 자극이 주어지면 활성화되어, 여러 신호 전달 체계 및 유전자 발현의 변이를 통해서 다양한 사이토카인(cytokine), 케모카인(chemokine), 프로스타글란딘(prostaglandins) 및 산화질소(nitric oxide, NO) 등의 염증매개물질 분비와 더불어 면역세포로서의 여러 특징을 나타내고, 활발한 대식 작용을 시작하여 병원체와 죽은 세포들을 제거하기도 한다. 상기 염증매개물질들은 신경세포 사멸의 주요 원인으로 작용하는 것으로 알려져 있으므로, 이를 조절하는 것은 뇌손상 시 신경세포 사멸을 억제하는 한 가지 접근 방법이 될 수 있다.

[0005] 오스테오폰틴(osteopontin)은 다양한 종류의 세포에서 발현되는 인산화된 당단백질로, 다양한 인테그린과 결합할 수 있는 아르기닌-글리신-아스파르트산(RGD) 모티프와 세린-루신-알라닌-티로신-글리신-루신-아르기닌(SLAYGLR) 모티프를 통하여 세포분열, 이동 및 부착 등 광범위한 세포 기능에 관여한다(Chen et al. *Stroke*, 42:764-9, 2011). 오스테오폰틴은 지주막하 출혈, 뇌졸중, 다발성 경화증, 파킨슨병 등 여러 종류의 질환에서 신경보호효과 및 항염증효과가 보고되어 있으며, 오스테오폰틴의 상기 두 모티프를 포함하는 20개 아미노산으로 구성된 펩타이드나, RGD 모티프를 포함하는 15개 아미노산으로 구성된 펩타이드들의 신경보호효과가 보고되어 있다. 그러나, 오스테오폰틴의 RGD 모티프를 포함하는 6개 아미노산으로 구성된 펩타이드가 신경보호효과가 없거나 오스테오폰틴의 경쟁적 저해제로 작용한다는 보고도 있어(P. Marc D. Watson et al. *Mol. Cell Neurosci.* 34:147-154, 2007; Jiang Wu et al. *Stroke*, 47(5):1319-1327, 2016), RGD 모티프를 포함하는 모든 오스테오폰틴 유래 펩타이드가 신경보호효과가 있다고 단정할 수는 없다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 오스테오폰틴 단백질의 RGD 모티프를 포함하는 7개 아미노산으로 구성된 펩타이드를 합성한 후(RGD-containing osteopontin heptamer peptide, OPNpt7), OPNpt7이 중대뇌동맥폐색(middle cerebral artery occlusion, MCAO) 랫드 모델에서 뇌허혈 부피를 감소시키고, 운동기능 손상 및 신경학적 결손을 개선시키며, 미세아교세포에서 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)로 유도한 염증반응을 억제시키는 효과가 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 오스테오폰틴 단백질 단편을 유효성분으로 함유하는 뇌손상 예방, 치료 또는 개선용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드(OPNpt7)를 유효성분으로 함유하는 뇌손상 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드(OPNpt7)를 유효성분으로 함유하는 뇌손상 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 OPNpt7은 MCAO 랫드 모델에서 뇌허혈 부피를 감소시키고, 운동기능 손상 및 신경학적 결손을 개선시키며, 미세아교세포에서 LPS로 유도한 염증반응을 억제함으로써, 뇌손상 예방, 치료 또는 개선용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 중대뇌동맥폐색(MCAO) 랫드 모델의 뇌 조직을 염색한 사진(A) 및 뇌허혈 부피를 측정한 결과 그래프(B)이다.

도 2는 중대뇌동맥폐색(MCAO) 랫드 모델에서 로타-로드 테스트(A, rota-rod test) 및 격자발판 도보 테스트(B,

Grid-walk test)로 운동기능을 평가한 결과 그래프 및 변형된 신경학적 결손 지수(mNSS) 측정 결과 그래프(C)이다.

도 3은 미세아교세포주인 BV2 세포에서 리포폴리사카라이드(LPS) 및 약물 처리 후, 세포 배양액에서 산화질소를 측정한 결과 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0017] 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 뇌손상 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0018] 상기 펩타이드는 오스테오폰틴 유래 단백질 단편일 수 있고, 구체적으로 마우스 또는 랫드의 오스테오폰틴 단백질의 RGD 모티프를 포함하는 발린140과 아스파르트산146 사이의 잔기로 구성된 것일 수 있다.

[0019] 상기 오스테오폰틴 단백질은 Mus musculus(NP_001191162.1) 또는 Rattus norvegicus(NP_037013.2) 유래인 것일 수 있다.

[0020] 상기 펩타이드는 당업계의 통상적인 화학적 합성 방법(W. H. Freeman and Co., Proteins; structures and molecular principles, 1983)으로 합성할 수 있으며, 구체적으로는 액상 펩타이드 합성법(solution phase peptide synthesis), 고상 펩타이드 합성법(solid phase peptide synthesis), 단편 응축법 및 F-moc 또는 T-BOC 화학법으로 합성할 수 있고, 더욱 구체적으로는 고상 펩타이드 합성법으로 합성할 수 있다. 또한, 상기 펩타이드는 이를 코딩하는 DNA 서열을 이용하여 통상적인 유전공학적 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0021] 상기 펩타이드는 단백질의 기능에 영향을 미치지 않는 범위 내에서, 아미노산 잔기의 결실, 삽입, 치환 또는 이들의 조합에 의해서 상이한 서열을 가지는 아미노산의 변이체일 수 있다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 또는 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다. 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation) 또는 파네실화(farnesylation) 등으로 수식(modification)될 수 있다. 따라서, 본 발명은 상기 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드와 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 및 이의 변이체 또는 단편을 포함할 수 있다. 상기 실질적으로 동일한 펩타이드는 본 발명의 펩타이드와 80% 이상, 구체적으로 90% 이상, 더욱 구체적으로 95% 이상으로 상동성을 가질 수 있다.

[0022] 상기 뇌손상은 염증에 의한 뇌손상일 수 있고, 구체적으로 허혈성 뇌졸중, 노인성 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병, 다발성 경화증, 물리적 뇌손상, 근위축성 축삭경화증 및 루게릭병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 또한, 상기 뇌손상의 예방 또는 치료는 상기 펩타이드의 미세아교세포의 활성 억제를 통한 염증반응 억제에 의한 것일 수 있다.

[0024] 본 발명자들은 상기 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드가 MCAO 랫드 모델에서 뇌허혈 부피를 감소시키고, 운동기능 손상 및 신경학적 결손을 개선시키며, 미세아교세포에서 LPS로 유도한 염증반응을 억제함을 확인하였다(도 1 내지 3 참조). 따라서, 상기 펩타이드는 뇌손상 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0026] 본 발명에 따른 약학 조성물은 조성물 전체 중량에 대하여 유효성분인 상기 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드를 10 내지 95 중량%로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 상기 유효성분 이외에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 추가로 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 약학 조성물은 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 이의 혼합물을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체는 조성물을 생체 내에 전달하는데 적합한 것이면 모두 사용할 수 있다. 구체적으로, 상기 담체는 Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc.에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 덱스트로스 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 또는 이의 혼합물일 수 있다. 또한, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등과 같은 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다.

[0028] 상기 조성물을 제제화하는 경우, 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희

석제 또는 부형제를 첨가할 수 있다.

[0029] 본 발명의 조성물은 경구용 제제 또는 비경구용 제제로 제형화될 수 있다. 경구용 제제로는 고형 제제 및 액상 제제가 포함될 수 있다. 상기 고형 제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 또는 트로키제일 수 있고, 이러한 고형 제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제를 첨가하여 조제할 수 있다. 상기 부형제는 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 또는 이의 혼합물일 수 있다. 또한, 상기 고형 제제는 윤활제를 포함할 수 있고, 그 예로는 마그네슘 스티레이트, 탈크등이 있다. 한편, 상기 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제일 수 있다. 이때, 상기 액상 제제에는 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등과 같은 부형제가 포함될 수 있다.

[0030] 상기 비경구용 제제는 주사제, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 파우더 및 크림 등을 포함할 수 있다. 상기 주사제는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제 등을 포함할 수 있다. 이때, 비수성용제 또는 현탁용제로서는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름이나, 에틸올레이트와 같이 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0031] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다. 비경구 투여는 복강내, 직장내, 피하, 정맥, 근육내 또는 흉부내 주사 방식을 포함할 수 있다.

[0032] 상기 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 이는 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 환자의 민감도, 투여 시간, 투여 경로, 치료기간, 동시에 사용되는 약물 등에 따라 달라질 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명에 따른 약학 조성물에 포함되는 유효성분의 양은 0.0001 내지 100 ㎎/㎏, 구체적으로 0.001 내지 10 ㎎/㎏일 수 있다. 상기 투여는 하루에 1회 내지 수회일 수 있다.

[0033] 본 발명의 조성물은 단독 또는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있다. 병용 투여시, 투여는 순차적 또는 동시일 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 뇌손상 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0036] 상기 펩타이드는 오스테오폰틴 유래 단백질 단편일 수 있고, 구체적으로 마우스 또는 랫드의 오스테오폰틴 단백질의 RGD 모티프를 포함하는 발린140과 아스파르트산146 사이의 잔기로 구성된 것일 수 있다.

[0037] 상기 오스테오폰틴 단백질은 Mus musculus(NP_001191162.1) 또는 Rattus norvegicus(NP_037013.2) 유래인 것일 수 있다.

[0038] 상기 펩타이드는 상술한 바와 같은 통상적인 화학적 합성 방법 또는 유전공학적 합성 방법 등으로 합성할 수 있다.

[0039] 상기 펩타이드는 상술한 바와 같이 상기 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드와 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 및 이의 변이체 또는 단편을 포함할 수 있다. 상기 실질적으로 동일한 펩타이드는 본 발명의 펩타이드와 80% 이상, 구체적으로 90% 이상, 더욱 구체적으로 95% 이상으로 상동성을 가질 수 있다.

[0040] 상기 뇌손상은 염증에 의한 뇌손상일 수 있고, 구체적으로 허혈성 뇌졸중, 노인성 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병, 다발성 경화증, 물리적 뇌손상, 근위축성 축삭경화증 및 루게릭병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 또한, 상기 뇌손상의 예방 또는 치료는 상기 펩타이드의 미세아교세포의 활성 억제를 통한 염증반응 억제에 의한 것일 수 있다.

[0041] 본 발명자들은 상기 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드가 MCAO 랫드 모델에서 뇌허혈 부피를 감소시키고, 운동기능 손상 및 신경학적 결손을 개선시키며, 미세아교세포에서 LPS로 유도한 염증반응을 억제함을 확인하였다(도 1 내지 3 참조). 따라서, 상기 펩타이드는 뇌손상 예방 또는 개선에 유용하게 사용될 수 있다.

[0043] 본 발명의 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드는 식품에 그대로 첨가하거나, 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있다. 이때, 첨가되는 유효성분의 함량은 목적에 따라 결정될 수 있고, 일반

적으로는 전체 식품 중량의 0.01 내지 90 중량부일 수 있다.

[0044] 건강기능식품의 형태 및 종류는 특별히 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 건강기능식품은 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상 및 환의 형태일 수 있다. 상기 건강기능식품은 추가성분으로서 여러 가지 향미제, 감미제 또는 천연 탄수화물을 포함할 수 있다. 상기 감미제는 천연 또는 합성 감미제일 수 있고, 천연 감미제의 예로는 타우마틴, 스테비아 추출물 등이 있다. 한편, 합성 감미제의 예로는 사카린, 아스파르탐 등이 있다. 또한, 상기 천연 탄수화물은 모노사카라이드, 디사카라이드, 폴리사카라이드, 올리고당 및 당알코올 등일 수 있다.

[0045] 본 발명의 건강기능식품은 상기 서술한 추가성분 외에, 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙스탄 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 등을 더 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합으로 사용될 수 있다.

[0047] 이하 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0048] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해서 한정되는 것은 아니다.

[0050] **실시예 1. OPNpt7의 합성**

[0051] 오스테오폰틴 단백질의 RGD 모티프를 포함하는 발린140과 아스파르트산146 사이의 잔기를 펩트론(대한민국)에 의뢰하여, 서열번호 1로 기재되는 7개의 아미노산을 갖는 OPNpt7을 합성하였다.

[0053] **비교예 1. OPNpt7-RAA의 합성**

[0054] 상기 OPNpt7의 RGD 모티프를 RAA로 치환한 서열번호 2로 기재되는 7개의 아미노산을 갖는 OPNpt7-RAA를 펩트론에 의뢰하여 합성하였다.

[0056] **비교예 2. OPNpt20의 합성**

[0057] 마우스 유래 오스테오폰틴 단백질의 RGD 모티프와 SLAYGLR 모티프를 모두 포함하는 이소루신134와 아르기닌153 사이의 잔기를 펩트론(대한민국)에 의뢰하여, 서열번호 3으로 기재되는 20개의 아미노산을 갖는 OPNpt20을 합성하였다.

[0059] **실시예 2. MCAO 랫드 모델의 제작**

[0060] 체중이 250 - 300 g에 도달한 수컷 SD 랫드(Sprague-Dawley rat, 오리엔트(주), 대한민국)를 30%의 산소 및 70%의 산화질소 가스 혼합물과 5% 아이소플루란(isoflurane)으로 마취하였다. 수술이 진행되는 동안 상기 가스 혼합물 및 0.5% 아이소플루란으로 마취를 유지하였고, 온도가 조절되는 가열받침 및 머리 위에서 열을 가하는 램프를 사용하여 직장의 온도를 37 ± 0.5℃로 유지되도록 하였다.

[0061] 오른쪽 중대뇌동맥(middle cerebral artery, MCA)의 폐색은 외부 경동맥(external carotid artery, ECA)을 통해 내부 경동맥(internal carotid artery, ICA)을 거쳐 MCA까지 나일론 실(4-0)을 삽입하여 유발하였다. MCAO 유발 후 1시간 후에 실을 뽑아 혈액이 다시 순환하도록 하였다.

[0063] **실험예 1. MCAO 랫드 모델에서 OPNpt7의 뇌손상 억제 효과 확인**

[0064] OPNpt7의 뇌손상 억제 효과를 조사하기 위하여, 상기 실시예 2에서 제작한 MCAO 랫드 모델에서 상기 실시예 1, 비교예 1 및 비교예 2에서 합성한 OPNpt7, OPNpt7-RAA 또는 OPNpt20을 각각 투여 후, 뇌허혈 부위의 변화를 분석하였다.

[0065] 구체적으로, 상기 MCAO 랫드에서 MCAO 유발 후 1시간 뒤에 상기 OPNpt7, OPNpt7-RAA 또는 OPNpt20을 각각 인산염 완충액(phosphate buffered saline, PBS)에 녹인 다음 500 ng/kg으로 랫드의 비강 내로 투여하였다. MCAO

유발 후 48시간 뒤에 랫드를 희생시켜 뇌를 적출한 후, 금속성 뇌 모형을 사용하여 적출한 뇌를 2 ㎜ 절편으로 관상으로 잘랐다. 상기 뇌 조직 절편은 즉시 37℃에서 2% TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)에 10분 동안 담가 염색한 후, 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde) 용액에 보관하여 고정하였다. 각 뇌 조직 절편의 뇌허혈 부위를 Scion 이미지 프로그램(Scion corporation, 미국)을 이용하여 측정 및 분석하였다.

[0066] 그 결과, OPNpt7-RAA 투여군은 음성 대조군 대비 뇌허혈 부위의 차이가 없는 반면, OPNpt7 투여군은 음성 대조군 대비 뇌허혈 부위가 유의하게 감소하였으며, 뇌손상 억제 효과가 보고된 OPNpt20 투여군과 비슷한 수준의 효과를 보였다(도 1A 및 1B).

[0068] **실험예 2. MCAO 랫드 모델에서 OPNpt7의 운동기능 손상 및 신경학적 결손 개선 효과 확인**

[0069] OPNpt7이 뇌손상 억제에 따라 운동신경 보호 효과를 나타내는지 조사하기 위하여, 상기 실시예 2에서 제작한 MCAO 랫드 모델에서 상기 실험예 1에 기재된 것과 동일하게 OPNpt7, OPNpt7-RAA 또는 OPNpt20을 투여하고, MCAO/재관류 후 2일 뒤에 랫드의 운동능력 및 신경학적 결손을 하기 실험들로 평가하였다.

[0071] **2-1. 로타-로드 테스트(rota-rod test)를 통한 운동기능 개선 효과 확인**

[0072] MCAO/재관류의 1일 전에 3 rpm으로 돌아가는 로드 위에서 랫드를 180초 동안 학습시킨 후, MCAO/재관류 후 2일 뒤에 랫드가 5, 10 또는 15 rpm으로 돌아가는 로드 위에서 떨어지는데 걸리는 시간을 측정하였다.

[0073] 그 결과, 모든 rpm에서 정상 대조군에 비하여 음성 대조군에서 로드에서 떨어지는데 걸리는 시간이 현저히 감소하였고, OPNpt7-RAA 투여군은 음성 대조군과 차이가 없는 반면, OPNpt7 투여군은 음성 대조군 대비 로드에서 떨어지는데 걸리는 시간이 유의하게 증가하였다. 이는 뇌손상 억제 효과가 보고된 OPNpt20 투여군과 비슷한 수준의 효과였다(도 2A).

[0075] **2-2. 격자발판 도보 테스트(Grid-walk test)를 통한 운동기능 개선 효과 확인**

[0076] 1.5 m 길이의 격자를 지나는 동안 5 cm의 격자 사이로 랫드의 발이 빠지는 횟수를 측정하였다.

[0077] 그 결과, 정상 대조군에 비하여 음성대조군에서 격자 사이로 발이 빠지는 횟수가 현저히 증가하였고, OPNpt7-RAA 투여군은 음성 대조군과 차이가 없는 반면, OPNpt7 투여군은 음성 대조군 대비 격자 사이로 발이 빠지는 횟수가 유의하게 감소하였다. 이는 뇌손상 억제 효과가 보고된 OPNpt20 투여군과 비슷한 수준의 효과였다(도 2B).

[0079] **2-3. 신경학적 결손 개선 효과 확인**

[0080] 신경학적 결손 평가는 변형된 체위 반사, 헤미파레시스 테스트(Bederson JB *et al.*, Stroke 17:472-476, 1986) 및 앞다리 위치잡기 테스트(De Ryck M *et al.*, Stroke 20; 1383-1390, 1989)를 포함한 변형된 신경학적 결손 지수(modified neurological severity score, mNSS) 측정으로 이루어졌다.

[0081] 구체적으로, 신경학적 결손 지수를 16점수 체계(Chen J *et al.*, Stroke 32; 2682-2688)로 측정하였다. 랫드의 꼬리를 잡아 들어 올렸을 때, 정상기능에 0점, 뒷다리 굽힘 이상에 1점, 앞다리 굽힘 이상에 2점 및 몸통을 30초 이상 굽히는 경우에 3점을 부여하고, 이동시 정상적인 움직임에 0점, 바로 걷기 불능인 경우에 1점, 반대쪽으로 회전하는 경우에 2점 및 자발적인 운동성 없이 반대쪽으로 눕는 경우에 3점을 부여하였다. 그리고 4cm의 폭으로 된 평균대에 랫드를 올렸을 때, 균형을 잡으며 정상적인 움직임을 보이면 0점, 평균대를 꽉 움켜쥐고 있으면 1점, 한쪽 다리가 평균대에서 떨어진 채 평균대를 잡고 움켜쥐면 2점, 균형을 잡지 못하지만 평균대 위에서 60초 이상을 버티면 3점, 40 내지 60초를 버티면 4점, 20 내지 40초를 버티면 5점 및 20초 미만을 버티는 경우에 6점을 부여하였다. 랫드의 귀와 눈에 면봉으로 자극 시 반응이 없거나 소리에 반응하지 않으면 각각 1점을 부여하고, 간질이나 근육이상 등이 생겼을 때 각각 1점을 부여하였다. 상기 점수들을 모두 합산하여 신경학적 결손 지수(mNSS)로 계산하였다.

[0082] 그 결과, 정상 대조군에 비하여 음성 대조군에서 신경학적 결손 지수가 현저히 증가하였고, OPNpt7-RAA 투여군은 음성 대조군과 차이가 없는 반면, OPNpt7 투여군은 음성 대조군 대비 신경학적 결손 지수가 유의하게 감소하

였다. 이는 뇌손상 억제 효과가 보고된 OPNpt20 투여군과 비슷한 수준의 효과였다(도 2C).

[0084] 상기 실험예 2-1 내지 2-3을 통하여 MCAO 랫드 모델에서 OPNpt7의 운동기능 및 신경학적 결손 개선 효과를 확인하였으며, 이는 기존에 뇌손상 억제 효과가 보고된 OPNpt20과 비슷한 수준의 효과임을 확인하였다.

[0086] **실험예 3. OPNpt7의 염증반응 억제 효과 확인**

[0087] 상기 실험예 1 및 2에서 확인한 OPNpt7의 뇌허혈에 의한 뇌손상 억제 효과가 염증반응 억제 효과에 기인한 것인지 조사하기 위하여, LPS를 처리한 미세아교세포주(BV2)를 이용하였다.

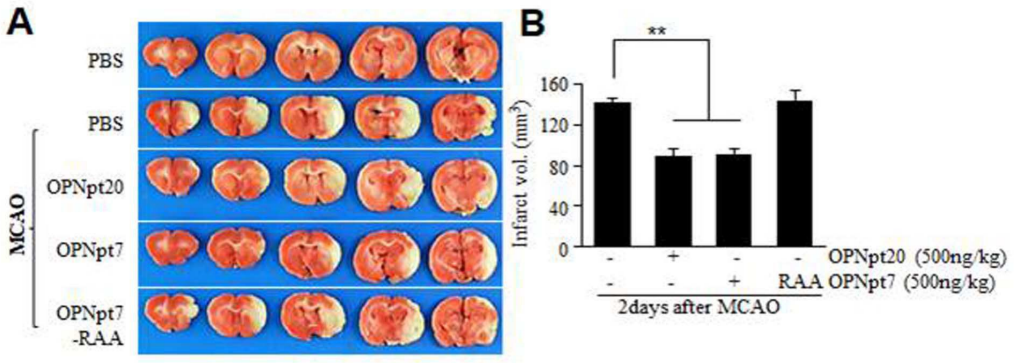
[0088] 구체적으로, BV2 세포를 배양한 후, 100 ng/㎖의 LPS를 처리하고, 상기 실시예 1, 비교예 1 및 비교예 2에서 합성한 OPNpt7(0.001, 0.01, 0.1 또는 1 μM), OPNpt20(1 μM), 또는 OPNpt7-RAA(1 μM)를 각각 처리하였다. 24시간 후에 세포 배양액을 회수하여 Griess 시약과 1:1의 부피비로 혼합한 후, ELISA 리더로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 산화질소 농도를 측정하였다.

[0089] 그 결과, LPS 처리에 의해 증가한 산화질소의 양이 OPNpt7-RAA 처리에 의해서는 감소하지 않은 반면, OPNpt7 0.01 μM 이상 처리군에서 약 70% 수준으로 감소하였으며, 이는 OPNpt20 1 μM을 처리한 경우와 유사한 수준으로 나타났다(도 3). 이는 OPNpt7의 뇌손상 억제 효과가 염증 반응 억제에 기인할 수 있음을 제시한다.

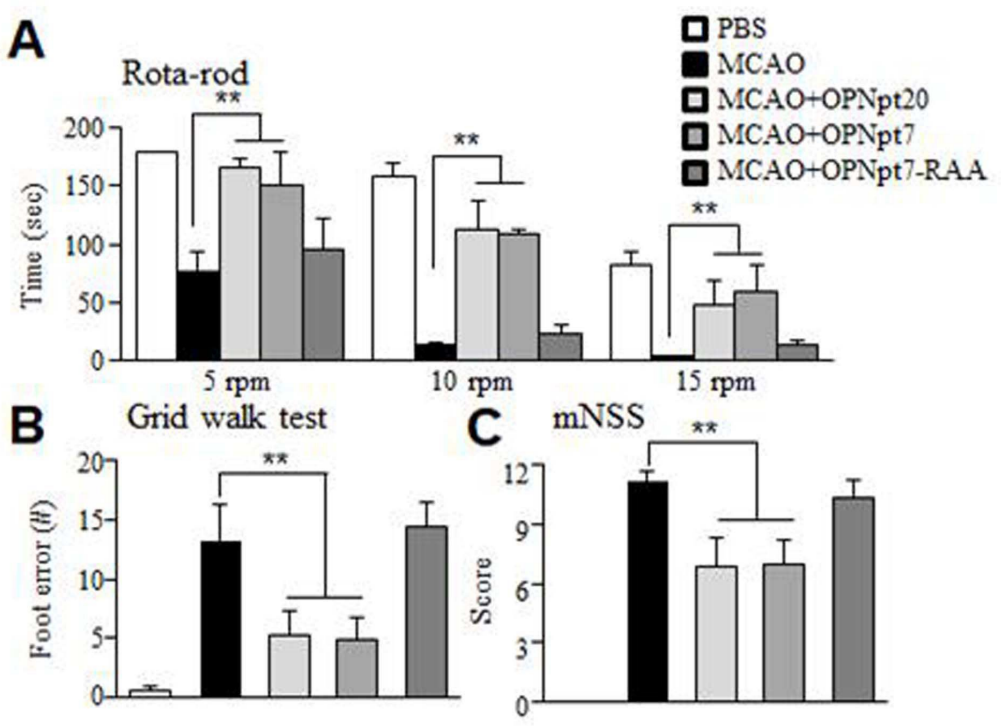
[0091] 결론적으로, 상기 실시예 및 실험예를 통하여, OPNpt7이 MCAO 랫드 모델에서 뇌허혈 부피를 감소시키고, 운동기능 손상 및 신경학적 결손을 개선시키며, 미세아교세포에서 LPS로 유도한 염증반응을 억제함을 확인하였다. 따라서, OPNpt7은 뇌손상 예방, 치료 또는 개선에 유용하게 사용될 수 있다.

도면

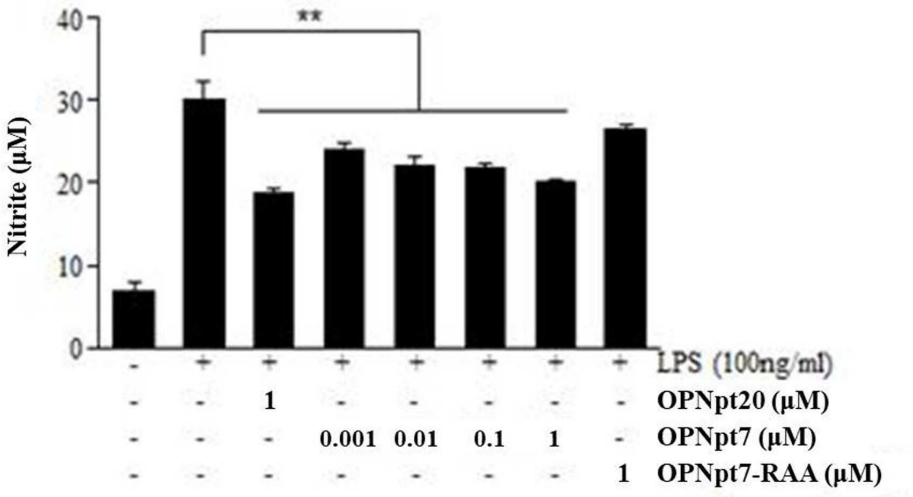
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록

<110> Inha University Research and Business Foundation

<120> Pharmaceutical composition for prevention or treatment of brain injury comprising the osteopontin protein fragment as an active ingredient

<130> 2018P-05-027

<160> 5

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> osteopontin protein fragment (OPNpt7)

<400> 1

Val Pro Asn Gly Arg Gly Asp

1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide for comparative example (OPNpt7-RAA)

<400> 2

Val Pro Asn Gly Arg Ala Ala

1 5

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> osteopontin protein fragment (OPNpt20)

<400> 3

Ile Val Pro Thr Val Asp Val Pro Asn Gly Arg Gly Asp Ser Leu Ala

1 5 10 15

Tyr Gly Leu Arg

20

<210> 4

<211> 294

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Arg Leu Ala Val Ile Cys Phe Cys Leu Phe Gly Ile Ala Ser Ser

1 5 10 15

Leu Pro Val Lys Val Thr Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Leu Tyr

20 25 30

Ser Leu His Pro Asp Pro Ile Ala Thr Trp Leu Val Pro Asp Pro Ser

35 40 45

Gln Lys Gln Asn Leu Leu Ala Pro Gln Asn Ala Val Ser Ser Glu Glu

50 55 60

Lys Asp Asp Phe Lys Gln Glu Thr Leu Pro Ser Asn Ser Asn Glu Ser

65 70 75 80

His Asp His Met Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Gly Asp

85 90 95

His Ala Glu Ser Glu Asp Ser Val Asp Ser Asp Glu Ser Asp Glu Ser

100 105 110

His His Ser Asp Glu Ser Asp Glu Thr Val Thr Ala Ser Thr Gln Ala

115 120 125

Asp Thr Phe Thr Pro Ile Val Pro Thr Val Asp Val Pro Asn Gly Arg

130 135 140

Gly Asp Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg Ser Lys Ser Arg Ser Phe Gln

145 150 155 160

Val Ser Asp Glu Gln Tyr Pro Asp Ala Thr Asp Glu Asp Leu Thr Ser

165 170 175

His Met Lys Ser Gly Glu Ser Lys Glu Ser Leu Asp Val Ile Pro Val

180 185 190

Ala Gln Leu Leu Ser Met Pro Ser Asp Gln Asp Asn Asn Gly Lys Gly

195 200 205

Ser His Glu Ser Ser Gln Leu Asp Glu Pro Ser Leu Glu Thr His Arg

210 215 220

Leu Glu His Ser Lys Glu Ser Gln Glu Ser Ala Asp Gln Ser Asp Val

225 230 235 240

Ile Asp Ser Gln Ala Ser Ser Lys Ala Ser Leu Glu His Gln Ser His

245 250 255

Lys Phe His Ser His Lys Asp Lys Leu Val Leu Asp Pro Lys Ser Lys

260 265 270

Glu Asp Asp Arg Tyr Leu Lys Phe Arg Ile Ser His Glu Leu Glu Ser

275 280 285

Ser Ser Ser Glu Val Asn

290

<210> 5

<211> 317

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 5

Met Arg Leu Ala Val Val Cys Phe Cys Leu Phe Gly Leu Ala Ser Cys
1 5 10 15

Leu Pro Val Lys Val Ala Glu Phe Gly Ser Ser Glu Glu Lys Ala His
20 25 30

Tyr Ser Lys His Ser Asp Ala Val Ala Thr Trp Leu Lys Pro Asp Pro
35 40 45

Ser Gln Lys Gln Asn Leu Leu Ala Pro Gln Asn Ser Val Ser Ser Glu
50 55 60

Glu Thr Asp Asp Phe Lys Gln Glu Thr Leu Pro Ser Asn Ser Asn Glu
65 70 75 80

Ser His Asp His Met Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Gly Asp
85 90 95

His Ala Glu Ser Glu Asp Ser Val Asn Ser Asp Glu Ser Asp Glu Ser
100 105 110

His His Ser Asp Glu Ser Asp Glu Ser Phe Thr Ala Ser Thr Gln Ala

115 120 125

Asp Val Leu Thr Pro Ile Ala Pro Thr Val Asp Val Pro Asp Gly Arg
130 135 140

Gly Asp Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg Ser Lys Ser Arg Ser Phe Pro
145 150 155 160

Val Ser Asp Glu Gln Tyr Pro Asp Ala Thr Asp Glu Asp Leu Thr Ser
165 170 175

Arg Met Lys Ser Gln Glu Ser Asp Glu Ala Ile Lys Val Ile Pro Val
180 185 190

Ala Gln Arg Leu Ser Val Pro Ser Asp Gln Asp Ser Asn Gly Lys Thr
195 200 205

Ser His Glu Ser Ser Gln Leu Asp Glu Pro Ser Val Glu Thr His Ser
210 215 220

Leu Glu Gln Ser Lys Glu Tyr Lys Gln Arg Ala Ser His Glu Ser Thr
225 230 235 240

Glu Gln Ser Asp Ala Ile Asp Ser Ala Glu Lys Pro Asp Ala Ile Asp
245 250 255

Ser Ala Glu Arg Ser Asp Ala Ile Asp Ser Gln Ala Ser Ser Lys Ala
260 265 270

Ser Leu Glu His Gln Ser His Glu Phe His Ser His Glu Asp Lys Leu
275 280 285

Val Leu Asp Pro Lys Ser Lys Glu Asp Asp Arg Tyr Leu Lys Phe Arg
290 295 300

Ile Ser His Glu Leu Glu Ser Ser Ser Ser Glu Val Asn
305 310 315