(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0054452
(43) 공개일자 2010년05월25일

(51) Int. Cl.
A61K 31/343 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0113389
(22) 출원일자 2008년11월14일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교
(주)네추럴에프앤피
충북 청원군 오창면 송대리 319-11
(72) 발명자
원무호
강원 춘천시 신북읍 용산리 147-2
유기연
경기도 김포시 하성면 마조2리 173번지
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

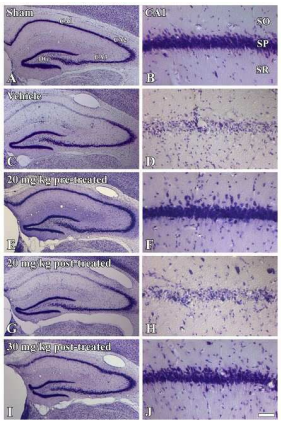
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 에스시탈로프람을 포함하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 약학조성물

(57) 요 약

본 발명은 에스시탈로프람을 유효성분으로 포함하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 약학조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 조성물은 해마 CA1 영역의 신경세포의 손상을 효과적으로 방지함과 동시에 뇌허혈에 의한 신경세포사를 억제하여 허혈성 뇌질환의 예방 또는 개선제로써 유용하다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

황인구

서울시 관악구 봉천11동 180-164

리화

강원도 춘천시 옥천동 1번지 한림대학교 의과대학 해부신경생물학교실

서홍원

경기도 용인시 기흥구 보정동 1162 동아솔레시티아파트 115동 1201호

김도훈

강원도 춘천시 석사동 684-827 에버빌 2차 아파트 212동 1402호

문원국

서울특별시 강남구 청담동 122-15 대우멤버스카운티 11차 201호

김동우

서울특별시 송파구 문정동 삼성레미안 116동 602호

특허청구의 범위

청구항 1

에스시탈로프람을 포함하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 약학조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 허혈성 뇌질환은 혈전증, 색전증, 일과성 허혈발작, 뇌경색, 뇌출혈, 지주막하 출혈, 백질 이상증 및 소경색으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 약학 조성물.

청구항 3

에스시탈로프람을 투여하여 허혈성 뇌질환을 예방 또는 개선하는 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 에스시탈로프람 투여는 허혈성 뇌질환 발병 이전 또는 발병 이후인 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 에스시탈로프람을 유효성분으로 포함하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 통계청이 발표한 2005년 총인구 중 65세 이상 노령인구의 비율은 9.1%를 차지하고 있고, 14세 이하 유년인구의 비중은 점차 줄어들고 있으며, 65세 이상 인구의 비중은 지난 2000년에 7.2%를 기록하여 우리 사회는 이미 고령화 사회로 진입한 것으로 평가된다. 또한, 2003년 기준으로 우리나라 국민의 평균수명은 77.5세로 노령인구가 급격하게 증가되고 있는 추세이다. 한편, 통계청이 발표한 우리나라 1인당 GNI는 2004년 14,162달러였으며, 매년 10% 이상 증가하고 있어 삶의 질은 점차 나아지고 있다고 할 수 있다. 이러한 사회적 조건의 변화에 의해 과거 주요한 사망원인인 전염성 질병에 의한 사망자 수는 급격하게 줄어들고 있는 반면 암, 뇌혈관 질환, 당뇨병 등의 퇴행성 질환에 의한 사망자 수는 꾸준히 증가하고 있다.

[0003] 우리나라 사망 원인 중 2위를 차지하는 질환인 뇌혈관 질환이란 흔히 뇌졸중이라고도 하며, 뇌에 있는 혈관이 막히거나 터져서 발생하는 병으로, 크게 뇌경색과 뇌출혈의 두 가지 유형으로 나눌 수 있다.

[0004] 상기 뇌경색은 허혈성 뇌혈관 질환이라고도 하며, 뇌혈관이 막혀서 뇌에 혈액과 산소 공급이 되지 못하여 뇌세포가 죽게 되어 발생하는 질환을 의미한다. 상기 뇌출혈은 출혈성 뇌혈관 질환이라고도 하며, 뇌혈관이 터져 피가 흐르고 고여서 뇌 손상이 오는 경우를 의미한다. 상기 뇌경색이나 뇌출혈로 인해 뇌의 기능을 잃게 되면 외견상 반신마비, 언어 장애 및 의식 장애 등의 신체증상이 나타나기도 하며, 심한 경우에는 사망할 수도 있다.

[0005] 이 중 허혈성 뇌혈관 질환은 뇌의 혈류가 감소되어 뇌세포에 산소와 포도당의 공급이 이루어지지 않아 해마 CA1 영역에 지연성 신경세포사(delayed neuronal death)가 유발되어 발생되는 질환을 의미한다(Kirino, *Brain Res.*, 239, pp57-69(1982); Petito et al., *Neurology*, 37, pp1281-1286(1987); Pulsinelli et al., *Ann. Neurol.*, 11, pp491-498(1982)). 또한, 상기 허혈성 뇌질환은 뇌졸중이나 심장마비와 같은 병리학적 상황에서

뇌에 혈액이 공급되지 않음으로써 유발되는 것으로 알려져 있다(Nedergaard, *Acta. Neurol. Scand.*, 77, pp81-101(1988); White et al., *Neurology*, 43, pp1656-1665(1993)).

[0006] 허혈성 뇌질환은 혈전증(thrombosis), 색전증(em bolism), 일과성 허혈 발작(transient ischemic attack) 및 소경색(lacune) 등으로 세분할 수 있다.

[0007] 뇌허혈성 질환에 관한 치료약으로는 티크로피딘(ticlopidine), 시로스타졸(cilostazole) 및 프로스타시크린(prostacycline)과 같은 혈소판 응집 억제제나 항트롬빈제제가 있다. 이러한 약제는 종종 두통, 심계항진 및 간에 부담을 주는 등 부작용을 나타내는 단점이 있어 그 사용에 제한이 따른다.

[0008] 국내의 경우, 뇌허혈에 의한 뇌신경세포 손상의 예방 및 치료에 대한 약효가 입증되지 않았음에도 불구하고, 노화 관련 건강식품인 DHEA 및 멜라토닌(Melatonine)을 남용하기도 한다.

[0009] 일시적인 뇌허혈 및 재관류(reperfusion)에 의해 발생되는 해마 CA1영역에서의 지연성 신경세포사의 원인은 세포 내로 칼슘의 과다유입(Hara et al., *Brain Res. Bull.*, 29, pp659-665(1992); Nedergaard, *Acta Neurol. Scand.*, 77, pp81-101(1988))이나 프리 라디칼(free radical) 관련 신경세포 손상 및 글루타메이트-수용체 매개 신경세포 손상이라고 알려져 있다(Won et al., *Neurosci. Lett.*, 301, pp139-142(2001)). 즉, 뇌허혈이 발생하면 신경세포의 탈분극이 일어나고, 시냅스의 글루타메이트가 유리되어 세포 외 글루타메이트의 농도가 증가한다. 또한, ATP(Adenosine Triphosphate)의 감소로 인해 발생하는 능동수송의 역전은 세포 외 글루타메이트의 축적을 가속시킨다. 세포 외 글루타메이트의 축적은 NMDA(N-methyl-D-aspartic Acid), AMPA(α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4 -isoxazole-propionic acid) 및 메타보트로픽 글루타메이트 수용체(metabotropic glutamate receptor)의 연속적인 활성을 유도하여, 칼슘의 세포 내 과다 유입을 초래한다(Olney et al., *Science*, 244, pp1360-1362(1989)). 칼슘의 세포 내 유입은 특히 칼슘 의존성 프로테아제, 리파제 및 모듈레이터의 활동을 촉발시키고, 결국 프리 라디칼을 포함하는 세포 독성분자가 생성되어 DNA 및 세포막 등의 세포 구조물을 파괴하여 신경세포사가 유발되는 것으로 알려져 있다.

[0010] 뇌졸중 치료에는 급성기 치료와 재발 방지를 위한 예방 치료가 있으며, 뇌졸중이 발생한 3시간 이내에 병원에 가서 급성 뇌졸중 치료를 받아야 치료 효과를 볼 수 있으며, 이보다 늦어지면 치료 효과를 보기 힘든 것으로 알려져 있다. 즉, 일단 뇌혈관 질환에 이환되면 비가역적인 신경세포 손상으로 인해, 운동능력 저하, 성적능력 저하, 기억력 감퇴 등을 유발하는 것으로 알려져 있다.

[0011] 뿐만 아니라, 최근 뇌신경 세포의 재생이 가능하다는 것이 보고되기는 하였으나, 이러한 뇌신경 세포의 재생은 그 조직학적 특성을 고려하건대 용이하지는 아니할 것으로 예상된다.

[0012] 이와 같은 허혈성 뇌질환 등 뇌질환의 특성을 고려할 때, 치료보다는 예방이 강조되고 있는 경향이며, 뇌신경세포를 보호할 수 있는 물질을 지속적으로 섭취하여 뇌혈관 질환을 예방하는 것의 필요성이 새롭게 인식되고 있다.

[0013] 또한, 부작용이 없으면서도 효과적으로 뇌허혈에 의한 신경세포 손상을 방지할 수 있는 약제의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0014] 본 발명은 허혈성 뇌질환을 효과적으로 예방 또는 개선하고, 뇌허혈에 의한 뇌 손상을 억제하는 에스시탈로프람을 유효성분으로 포함하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 조성물 및 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 허혈성 뇌질환의 예방 또는 개선용 약학조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 에스시탈로프람을 유효성분으로 포함하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 조성물을 유효성분으로 포함하고 신경세포 보호 효능을 갖는 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 약학 조성물을 제공한다.

[0017] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0018] 본 발명의 발명자들은 뇌질환 예방 및 개선용 조성물을 연구하던 중 항우울제로 사용되고 있는 에스시탈로프람이 뇌허혈에 민감하다고 알려져 있는 뇌 해마조직 CA1 영역의 신경세포의 손상 예방효과 및 개선 효과가 뛰어난 것을 확인하였으며, 이를 토대로 본 발명을 완성하게 되었다.

[0019] 본 발명은 에스시탈로프람을 유효성분으로 포함하는 허혈성 뇌혈관 질환의 예방 또는 개선용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0020] 에스시탈로프람(escitalopram)은 시탈로프람(citalopram)으로부터 유도된 라세믹 이륜 거울이성질체(S-enaniomer of the racemic bicyclic phthalane derivative citalopram)로써, 선택적 세로토닌 재흡수 저해(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI) 기능을 가지고 있으며, 주요 우울증 (major depressive disorder, MDD) 및 불안장애 (anxiety disorder)의 단기 치료제로 효과가 있음이 알려져 있다 (Atar et al., J Clin Psychopharmacol., 26, pp172-177(2006)).

[0021] 일반적으로 거울이성질체인 시탈로프람에 대해서는 다양한 신경계통질환에서의 연구가 되고 있지만 에스시탈로프람은 아직까지 다양하게 연구되지 않았으며, 특히 뇌허혈에 의한 신경세포 사멸에 어떠한 영향을 미치는지에 관한 연구가 진행된 바 없다. 본 발명에서의 에스시탈로프람은 뇌허혈에서 해마 내 CA1영역의 신경세포 보호효과 및 신경사멸 개선효과가 있는 것으로 확인되었다.

[0022] 본 발명에서 허혈성 뇌질환이란 뇌의 혈관이 어떠한 이유로 막혀 뇌에 필요한 혈액이 공급되지 않아 발생하는 질환을 총칭하는 용어를 의미하며, 뇌허혈 질환이라고도 한다.

[0023] 상기 허혈성 뇌질환이란 뇌의 혈류가 감소되어 산소와 포도당의 공급이 정상적으로 이루어지지 않아, 뇌세포 중 뇌허혈에 민감하다고 알려져 있는 해마조직 CA1 영역의 신경세포에 지연성 신경세포사가 유발되어 발생되는 질환을 말하며, 허혈성 뇌혈관 질환의 예로는 뇌경색, 뇌출혈, 지주막하 출혈, 백질 이상증 등이 포함될 수 있다.

[0024] 본 발명의 에스시탈로프람은 일정기간 투여 후 저빌을 마취시켜 온목동맥을 결찰하여 뇌허혈을 유발시킨 후, 생존하여 있는 신경세포의 염색 및 사멸한 신경세포의 염색을 통하하여 효능을 측정하는 실험에서 뇌허혈에 의한 신경세포 보호 효과가 있는 것으로 확인되었고, 뇌허혈을 유발한 다음 에스시탈로프람을 투여한 후 생존하여 있는 신경세포의 염색 및 사멸한 신경세포의 염색을 통하여 신경세포 사멸 억제 효능을 가지고 있는 것으로 확인되었다.

효 과

[0025] 상술한 바와 같이, 본 발명의 에스시탈로프람은 뇌허혈에 의해 유발되는 신경세포의 손상을 효과적으로 예방하고, 뇌허혈에 의한 신경세포사를 억제할 수 있어서 허혈성 뇌혈관 질환의 예방, 치료 또는 개선을 위한 약학조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명은 에스시탈로프람을 포함하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 약학조성물을 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 허혈성 뇌질환이 혈전증, 색전증, 일과성 허혈발작 및 소경색으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 약학 조성물을 제공한다.

[0028] 또한, 본 발명은 에스시탈로프람을 투여하여 허혈성 뇌질환을 예방 또는 개선하는 방법을 제공한다.

[0029] 또한, 본 발명은 상기 에스시탈로프람 투여가 허혈성 뇌질환 발병 이전 또는 발병 이후인 것을 특징으로 하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선 방법을 제공한다.

[0030] 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 약학 조성물은 에스시탈로프람만을 단독으로 포함할 수도 있으나, 제형 및 사용방법에 따라 약리학적으로 허용가능한 담체나 부형제를 더욱 포함할 수 있다.

[0031] 상기 약리학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제는 제형에 따라 통상의 물질을 사용할 수 있으며, 대표적인 것으로는 물, 덱스트린 또는 생리식염수가 있다.

[0032] 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 약학 조성물은 약제 또는 식품으로 사용할 수 있으며, 약제로 사용하는 경우 투여방법은 경구 또는 비경구 모두 가능하다. 상기 조성물의 제형은 사용방법에 따라 달라질 수 있으나, 경고제(PLASTERS), 과립제(GRANULES), 로션제(LOTIONS), 산제(POWDERS), 시럽제(SYRUPS), 액제(LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 연고제(OINTMENTS), 유동엑스제(FLUIDEXTRACTS), 유제(EMULSIONS), 현탁제

(SUSPESIONS), 침제(INFUSIONS), 정제(TABLETS), 주사제(INJECTIONS), 캅셀제(CAPSULES) 및 환제(PILLS)등으로 제조할 수 있다.

[0033] 또한 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 약학 조성물은 뇌허혈성 질환으로 인한 신경세포를 보호할 목적으로 사용할 수 있다. 상기 조성물의 투여량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성율 및 병용되는 약물을 고려하여 결정하는 것이 좋으며, 1일 에스시탈로프람을 기준으로 하였을 때 5mg/kg(체중) 내지 500mg/kg(체중)으로 투여할 수 있다.

[0034] 이하, 본 발명의 바람직한 실시예를 기재한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0035] **실시예 1: 에스시탈로프람의 뇌허혈시 신경세포 보호효능 측정**

[0036] 체중 65g ~ 75g인 수컷 몽골리안 저빌(Mongolian gerbil, Harlan, USA)을 마취시켜 온목동맥(common carotid artery)을 노출 후 결찰하여 뇌허혈을 유발시킨 다음 몽골리안 저빌의 해마조직을 염색하여 관찰하는 방법을 통하여 에스시탈로프람의 신경세포 보호효과를 확인하였다.

[0037] 1-1. 실험동물의 사육

[0038] 체중 65 ~ 75g의 수컷 몽골리안 저빌(Mongolian gerbil, Meriones unguiculatus, Halan, USA) 40 마리를 오전 7시부터 오후 7시까지 빛을 가하는 일정한 명암주기, 21℃ 내지 25℃의 온도 및 45% 내지 65%의 상대습도의 조건에서 사육하였다. 실험동물 사료는 일반적인 펠렛건조 사료(대한실험동물, 대한민국)를 사용하였고, 사료와 물은 상시로 섭취할 수 있게 하였다.

[0039] 1-2. 에스시탈로프람의 뇌허혈시 신경세포 보호 효능 검정

[0040] 상기 실험동물에 실시예 1의 에스시탈로프람 140 mg을 증류수 50ml에 녹인 것을 일주일 전부터 매일 식도용 바늘을 이용하여 실험동물 체중 1kg 당 20mg이 되도록 경구투여하였다. 일주일간 상기 추출물들을 투입한 후 질소와 산소가 7 : 3으로 혼합된 가스에 3% 이소플루란(isoflurane, Baxtor, USA)을 혼합한 가스를 이용하여 실험동물을 전신마취하였다. 상기의 질소와 산소 혼합가스에 2.5% 이소플루란을 혼합한 가스를 이용하여 실험동물의 마취상태를 유지하면서 실험동물에 대한 수술을 수행하였다.

[0041] 또한, 신경세포 사멸 억제 효과를 확인하기 위하여 에스시탈로프람을 140mg을 증류수 50ml에 녹인 것을 뇌허혈 수술 뒤 30분 및 24시간 뒤에 체중 1kg 당 20mg 및 30mg이 되도록 경구 투여하였다.

[0042] 실험동물에 대한 수술은 목 부위의 털을 깎고 소독한 다음 절개를 하여 양쪽 온목동맥을 노출시키고, 동맥류 클립(aneurysm clip, Staelting, USA)을 이용하여 5분 동안 결찰하여 뇌허혈을 일으킨 후, 클립을 제거하여 재관류시키는 방법으로 수행하였다. 이때, 각 실험군은 검안경(ophthalmoscope)을 이용하여 망막중심동맥(central artery of retina)의 혈액 순환 유무를 관찰하여 완전한 온목동맥의 폐쇄가 있었는지 여부를 확인하였다.

[0043] 뇌허혈을 유발시키는 동안 직장 내 체온계를 삽입하여 체온을 측정하였으며, 실험동물의 온도에 따라 자동으로 조절되는 온열 패드를 사용하여 체온을 정상 체온인 36.7℃ 내지 37.3℃로 일정하게 유지시켰다.

[0044] 실험군은 뇌허혈 유발 4일 후에 티오펜탈 소듐(thiopental sodium, 유한양행, 한국)을 체중 1kg 당 각각 30mg의 용량으로 복강 내 주사하여 마취시킨 다음, 1,000㎖ 당 헤파린 1,000IU를 함유한 4℃의 생리식염수를 좌심실로 주입하여 관류 세척하였다. 관류 세척이 완료된 상기 동물에 대해 4℃의 4% 파라포름알데하이드(in 0.1 M phosphate buffer; PB, pH 7.4)를 이용하여 관류고정을 수행하였다.

[0045] 뼈절단기를 이용하여 관류 고정이 끝난 실험동물의 머리뼈 공간을 열어 뇌를 적출하였다. 적출된 실험동물의 뇌를 4℃의 4% 파라포름알데하이드(in 0.1M 인산 완충액; pH 7.4)를 이용하여 6시간 동안 후고정하였다. 후고정이 끝난 뇌는 30% 수크로스 용액(in 0.1M 인산완충액)에 넣어 바닥에 가라앉을 때까지 침강시킨 후 슬라이드 마이크로톰(sliding microtome, Reichert-Jung, Germany)으로 상기 뇌의 조직을 30㎛ 두께로 잘라 조직절편을 만들었다. 상기의 조직절편을 보존액(storing solution)이 들어있는 6웰 플레이트에 넣어 염색을 수행할 때까지 4℃

에서 보관하였다.

[0046] 각 조직절편 중에서 해마 부위가 잘 나와 있는 조직을 선택하여 0.01M PBS로 10분씩 3회 세척한 후, 젤라틴 코팅된 슬라이드에 도말하여 37℃에서 충분히 건조시켰다. 크레실 바이올렛(Cresyl violet) 염색을 수행하기 위하여 조직을 증류수에 잠시 담근 후, 2% 크레실 바이올렛 아세테이트(Sigma, 미국) 용액으로 1분 동안 염색하였다. 이어 상기 조직을 흐르는 물에 충분히 세척하여 슬라이드에 묻어 있는 과량의 염료를 제거하고, 증류수에 잠시 담근 후 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 및 100% 에탄올을 거쳐 탈수하였다. 조직에서 니슬 소체(Nissle body)를 확인한 후, 자일렌(Junsei, 일본)에 담가 투명화하고 캐나다 발삼(Canada Balsam, 일본 간토 소재)으로 봉입하였다.

[0047] 허혈-재관류를 실시하지 않은 정상군(가수술군)은 온목 동맥을 결찰하지 않은 것을 제외하고는 동일한 방법으로 수술, 조직처리, 크레실 바이올렛 염색을 수행하였다.

[0048] 또한, 허혈-재관류를 실시한 대조군(용매투여군)은 에스시탈로프람 대신 증류수를 투여한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 수술, 조직처리 및 크레실 바이올렛 염색을 수행하였다.

[0049] 정상군, 대조군 및 실험군의 각 조직들을 디지털 카메라(Axiocam, Cal Zeiss, Germany)가 부착되어 있는 악시오 M1 현미경(AxioM1 microscope, Carl Zeiss, Germany)으로 전체 해마 영역을 25배로, CA1 영역을 200배로 각각 확대하여 각 조직절편들을 사진 촬영하였다. 전체 해마영역을 촬영한 사진을 도 1의 A, C, E, G 및 I에, 해마의 CA1 영역을 촬영한 사진을 도 1의 B, D, F, H 및 J에 나타내었다. 또한 이미지 분석기 옵티마스 6.5(Optimas 6.5, CyberMetrics, 미국)를 사용하여 염색된 부분의 신경세포를 계수한 상대 세포수의 비율(%)을 도 2에 나타내었다. 각군에 대한 유의성의 검증은 일원분산 분석(one-way ANOVA test)으로 수행하였다.

[0050] 또한 허혈로 인한 손상에 대한 에스시탈로프람의 신경세포 보호효능을 확인하기 위하여 상기와 같이 제조된 조직 절편을 사멸 중이거나 사멸한 신경세포를 표지하는 플루오로-제이드 B(Fluoro-Jade B) 0.0001% 용액으로 염색하여 그 결과를 도 3의 B, D, F, H 및 J에 나타내었다.

[0051] 1-3. NeuN, GFAP 및 Iba-1에 대한 면역조직학적 분석

[0052] 허혈-재관류 후 해마의 CA1 영역에서 에스시탈로프람의 신경세포 보호효능 및 아교세포(microglia) 활성을 확인하기 신경세포에 특이적으로 반응하는 항체인 NeuN(neuron specific nuclear protein), 별아교세포(astrocyte)에 특이적으로 반응하는 항체인 GFAP(glial fibrillay acidic protein) 및 미세아표세포에 특이적으로 반응하는 항체인 아이소렉틴(isolectin)-B4를 이용하여 2-2에서와 같이 제작된 조직 절편들에 대한 면역조직화학적 분석을 실시하였다.

[0053] 해마복합체가 잘 나타난 조직절편을 선택하여 실험에 사용하였으며, 상기 선택된 조직절편은 조직에 존재하는 내인성 페록시다아제(peroxidase)를 제거하기 위하여 0.3% H_2O_2(in PBS)와 30분 동안 반응시켰다. 비특이적인 면역반응을 방지하기 위하여, 상기 반응된 조직절편을 3%의 정상 염소 혈청(normal goat serum)으로 30분간 반응시켰다.

[0054] 신경세포의 변화를 확인하기 위하여 상기 3%의 정상 염소 혈청과 반응을 한 조직절편은 1:1000으로 희석한 1차 항체인 마우스 항-NeuN (Chemicon International, USA)와 반응시키고, 별아교세포의 변화를 확인하기 위하여, 상기의 조직을 1:1000으로 희석한 1차 항체인 래빗 항-GFAP(Chemicon International, USA)와 반응시켰으며, 미세돌기아교세포의 변화를 확인하기 위하여, 상기 조직절편을 1:1000으로 희석한 1차 항체인 래빗 항-Iba-1(Wako, USA)과 4℃에서 48시간 반응시켰다.

[0055] 반응이 끝난 조직절편은 각각 1:200으로 희석한 2차 항체인 항-래빗 IgG(Vector) 또는 항-마우스 IgG(Vector)로 2시간 반응시킨 후, 1:200으로 희석한 3차 항체인 ABC용액(Vector)으로 2시간 반응시켰으며, DAB(3,3'-diaminobezidine)를 기질로 발색하였다.

[0056] 각 단계 사이에는 0.01M PBS를 사용하여 10분씩 3회 세척하였다.

[0057] 상기 3차 반응이 끝난 조직절편은 젤라틴 코팅된 슬라이드 글라스에 도말한 후 실온에서 12시간 동안 건조하였으며, 상기 건조한 조직절편은 통상적인 탈수·투명화 과정을 거쳐 봉입하였다. 상기 NeuN과 반응을 완료한 조직 절편의 면역염색사진은 도 3의 A, C, E, G, I에 그리고 GFAP, Iba-1과 반응을 완료한 조직절편의 면역염색사진은 도 4에 각각 나타내었다.

[0058] **실험 결과**

[0059] **크레실 바이올렛(cresyl violet, CV)**

[0060] 정상군에서는 크레실 바이올렛에 염색된 신경세포들이 해마 전 영역에서 골고루 관찰되었다(도 1의 A 및 B). 반면 용매 투여 후 허혈을 유발한 대조군에서는 해마의 CA2 및 CA3 영역에서 정상군과 유사한 정도의 크레실 바이올렛에 염색된 신경세포들이 관찰되었으나, CA1 영역에서는 크레실 바이올렛에 염색된 신경세포들이 거의 관찰되지 않았다(도 1의 C 및 D). 또한 대조군의 CA1 영역에서는 정상군에 비하여 12.2%의 크레실 바이올렛 염색성을 보이는 피라밋 신경세포(pyramidal neuron)들이 관찰되었다(도 2). 즉, 허혈 후 해마 CA1 영역에서는 지연성 신경세포사로 인하여 대부분의 피라밋 신경세포들이 사멸하게 되는 것을 확인하였다. 각 실험군의 해마 CA1 영역에서의 피라밋 신경세포의 생존율을 도 2에 나타내었다. 한편, 에스시탈로프람을 수술 전 반복적으로 투여한 군에서는 크레실 바이올렛에 염색된 피라밋 신경세포를 해마 전 영역에서 관찰할 수 있었으며(도 1의 E), 특히 CA1 영역에서도 정상군에 비교하여 약 73% 가량의 크레실 바이올렛에 염색된 피라밋 신경세포를 확인할 수 있어 에스시탈로프람의 신경세포 보호효과를 확인할 수 있었다(도 1의 F 및 도 2). 또한 신경세포 사멸 억제 효능을 확인하기 위하여 뇌허혈 유발 수술 후 에스시탈로프람을 투여한 경우에서는 20mg/kg으로 투여한 군에서는 CA1 영역에서 크레실 바이올렛에 염색된 피라밋 신경세포가 거의 관찰되지 않는 것을 확인할 수 있었지만(도 1의 G 및 H), 에스시탈로프람을 30mg/kg의 용량으로 투여한 군에서는 약 64.5% 가량의 크레실 바이올렛에 염색된 피라밋 신경세포를 확인할 수 있어서 뇌허혈 유발 후에 신경세포 사멸을 억제하는 효과를 확인할 수 있었다(도 1의 I, J 및 도 2).

[0061] **NeuN 면역조직화학 염색**

[0062] 에스시탈로프람 처리에 따른 신경세포 보호 혹은 신경손상 개선 효과를 확인하기 위하여 신경세포의 표지자인 NeuN(Neuronal Nuclei)을 이용하여 면역조직화학 염색을 수행한 결과, 정상군의 해마 CA1 영역에서는 NeuN에 면역반응성을 보이는 신경세포가 다수 관찰되었다(도 3의 A). 반면 용매 단독으로 투여한 대조군의 CA1 영역에서는 NeuN에 면역반응성을 나타내는 신경세포의 수가 급격하게 감소하는 것이 관찰되었다 (도 3의 C). 하지만, 에스시탈로프람을 20mg/kg의 용량으로 수술전 반복적으로 처리한 군에서는 정상군에 비하여 다소 NeuN 면역 반응성이 떨어지지만 다수의 피라밋세포에서 NeuN 면역반응성을 확인할 수 있어서, 신경세포의 표지자인 NeuN이 원활히 발현하고 있음을 확인할 수 있었다(도3의 E). 손상 이후의 개선효과를 확인하기 위하여 수술 후 에스시탈로프람을 처리한 실험에서는 20mg/kg의 용량으로 처리한 군에서는 NeuN 면역반응성을 보이는 피라밋세포가 거의 관찰되지 않아 용매 단독으로 투여한 군과 유사한 결과를 확인할 수 있어 신경손상 개선효과를 거의 확인할 수 없었지만(도 3의 G), 30mg/kg으로 투여한 군에서는 에스시탈로프람을 수술 전 투여한 군에 투여한 군에 비교하여 NeuN 면역 반응성이 떨어지기는 하지만 20mg/kg으로 투여한 군과 비교하였을 때 NeuN에 면역반응성을 보이는 피라밋세포가 월등히 많이 NeuN에 면역반응성을 보이고 있는 것을 확인할 수 있었다(도3의 I). 이를 통하여, 에스시탈로프람은 수술 전 투여에 의한 보호효과가 월등하며 손상이후에는 투여 용량에 따라 손상 개선 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0063] **플루오로-제이드 B 염색 (Fluoro-Jade B, "F-J B")**

[0064] 에스시탈로프람의 신경세포 보호 및 신경손상 개선 효과를 확인하기 위하여 손상 혹은 손상과정 중에 있는 신경세포의 표지자인 플루오로-제이드 B를 이용하여 염색한 결과, 정상군에서는 플루오로-제이드 B에 염색되는 신경세포가 발견되지 않는 것을 확인할 수 있었지만(도 3의 B), 용매 단독으로 투여 후 허혈을 유발한군에서는 CA1 영역의 피라밋 세포층에서 플루오로-제이드 B에 염색되는 다수의 신경세포를 확인할 수 있었다(도 3의 D). 하지만 에스시탈로프람을 20mg/kg의 용량으로 수술 전 처리한 군에서는 매우 적은 숫자의 신경세포에서만 플루오로-제이드 B 염색성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(도 3의 F). 수술 유발 후 처리한 실험에서는 20mg/kg으로 투여한 군에서는 용매 단독으로 투여한 군과 유사하게 거의 모든 피라밋세포에서 플루오로-제이드 B에 염색성을 나타내는 것을 확인할 수 있었지만(도 3의 H), 30mg/kg의 용량으로 수술 후 투여한 군에서는 20mg/kg으로 수술 전 투여한 군에 비하여 다소 많은 플루오로-제이드 B 염색 피라밋세포가 관찰되었지만 20mg/kg의 용량으로 수술 후 처리한 군에 비교하여 플루오로-제이드 B 염색성을 보이는 신경세포가 감소하여 있는 것을 확인할 수 있었다(도 3의 J). 따라서, 에스시탈로프람의 반복적인 투여가 뇌허혈에 의한 신경세포의 손상을 보호할 수 있으며,

신경손상 후에도 적절한 투여 용량의 처리는 어느 정도 개선의 효과를 나타낸다는 결론을 얻을 수 있었다.

[0065] **GFAP 및 아이소렉틴-B4 면역조직화학 염색**

[0066] 에스시탈로프람 투여에 따른 신경세포 보호 혹은 신경손상 개선 효과와 아교세포 활성화와의 상관관계를 확인하기 위하여 별아교세포(astrocyte)의 표지자인 GFAP와 활성화된 미세아교세포(reactive microglia)의 표지자인 아이소렉틴-B4(이하 "IB4") 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 수행한 결과 정상군에서 GFAP(Glial fibrillary acidic protein) 면역반응성은 휴면상태의 형태로 관찰되었으며(도 4의 A), 용매 투여 후 뇌허혈을 유발한 군에서는 GFAP 면역반응성을 보이는 별아교세포가 활성화되어있는 상태로 관찰되었다 (도 4의 C). 에스시탈로프람을 투여한 군에서는 용매를 투여한 대조군에 비교하여 별아교세포에서 GFAP 면역반응성이 떨어지는 것을 확인할 수 있었으며, 신경세포 보호 및 개선 정도에 따라 별아교세포의 활성화가 억제됨을 확인할 수 있었다(도 4의 E, G 및 F).

[0067] IB4를 이용하여 미세아교세포를 확인할 결과, 정상군에서는 IB4에 반응하는 아교세포(microglia)가 관찰되지 않았지만(도 4의 B), 용매 투여 후 허혈을 유발한 대조군에서는 다수의 IB4에 면역반응성을 보이는 미세아교세포가 활성화되어 있는 형태로 관찰되었다(도 4의 D). 하지만, 에스시탈로프람을 처리한 군에서는 신경세포 보호효과 및 신경손상 개선효과가 좋은 20mg/kg을 수술 전 투여한 군과 30mg/kg을 수술 후 투여한 군에서 미세아교세포의 활성화가 현저하게 억제되어 있는 것을 확인할 수 있었으며 (도 4의 F 및 J), 20mg/kg을 수술 후 투여한 군에서도 미세아교세포의 활성화가 다소 억제되어 있기는 하지만 IB4 면역반응을 보이는 미세아교세포를 상당수 확인할 수 있었다 (도 4의 H).

[0068] 이상의 결과는 에스시탈로프람이 뇌허혈 유발에 따른 지연성 신경세포사로 인한 신경세포 손상을 보호 또는 개선할 수 있음을 입증한다.

도면의 간단한 설명

[0069] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 에스시탈로프람의 허혈성 뇌질환 보호 효과를 알아보기 위하여, 뇌허혈 유발 후 4일이 경과된 실험동물의 해마조직을 크레실 바이올렛(cresyl violet)으로 염색하여 사진이다.

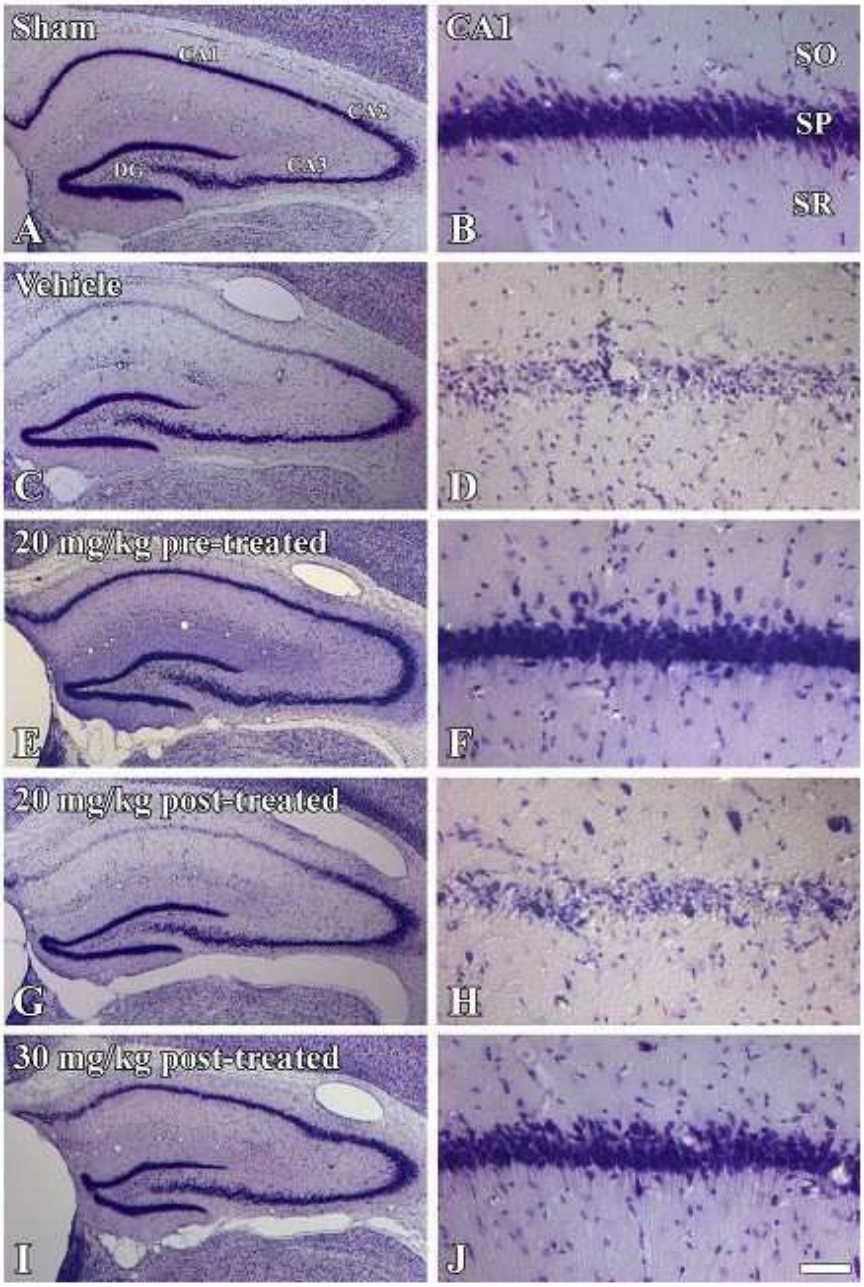
[0070] 도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 에스시탈로프람의 허혈성 뇌질환 보호 및 개선효과를 알아보기 위하여, 신경세포의 생존율을 뇌허혈 유발 4일 후에 생존해 있는 세포수를 정상군에 대한 상대적 수치로 나타낸 그래프이다.

[0071] 도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 에스시탈로프람의 허혈성 뇌질환 보호 효과를 알아보기 위하여, 정상 실험동물 및 뇌허혈 유발 후 4일이 경과된 실험동물의 해마조직을 신경세포의 표지자인 NeuN을 이용하여 면역조직화학(immunohistochemistry) 염색 및 사멸과정의 신경세포의 표지자인 플루오로-제이드 B를 이용하여 염색을 수행한 사진이다.

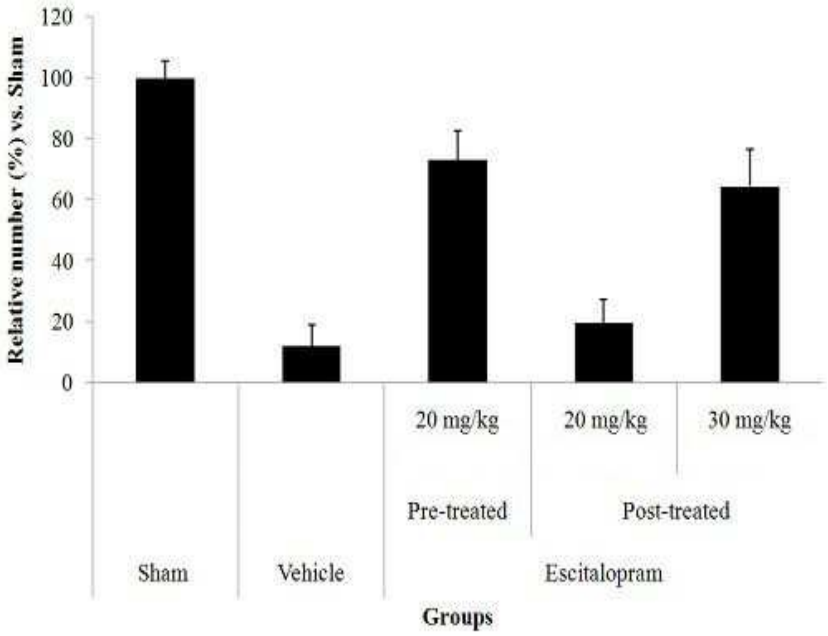
[0072] 도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 에스시탈로프람의 허혈성 뇌질환 보호 효과를 알아보기 위하여, 뇌허혈 유발 후 4일이 경과된 실험동물의 해마조직을 별아교세포의 표지자인 GFAP 및 활성화된 미세돌기아교세포의 표지자인 아이소렉틴-B4를 이용하여 면역조직화학 방법으로 관찰한 사진이다.

도면

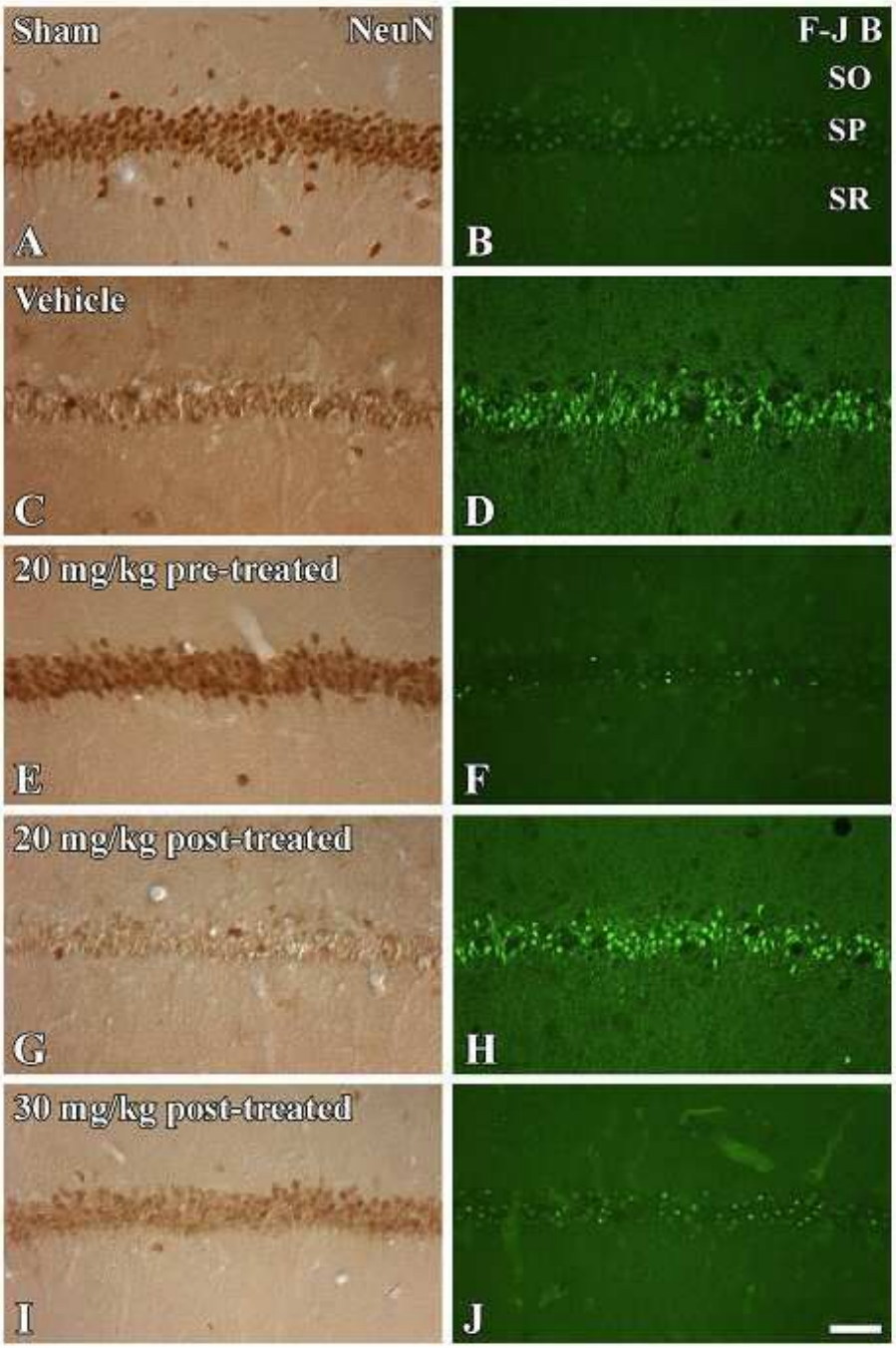
도면1


Sham
CA1
CA2
DG
CA3
A
CA1
SO
SP
SR
B
Vehicle
C
D
20 mg/kg pre-treated
E
F
20 mg/kg post-treated
G
H
30 mg/kg post-treated
I
J

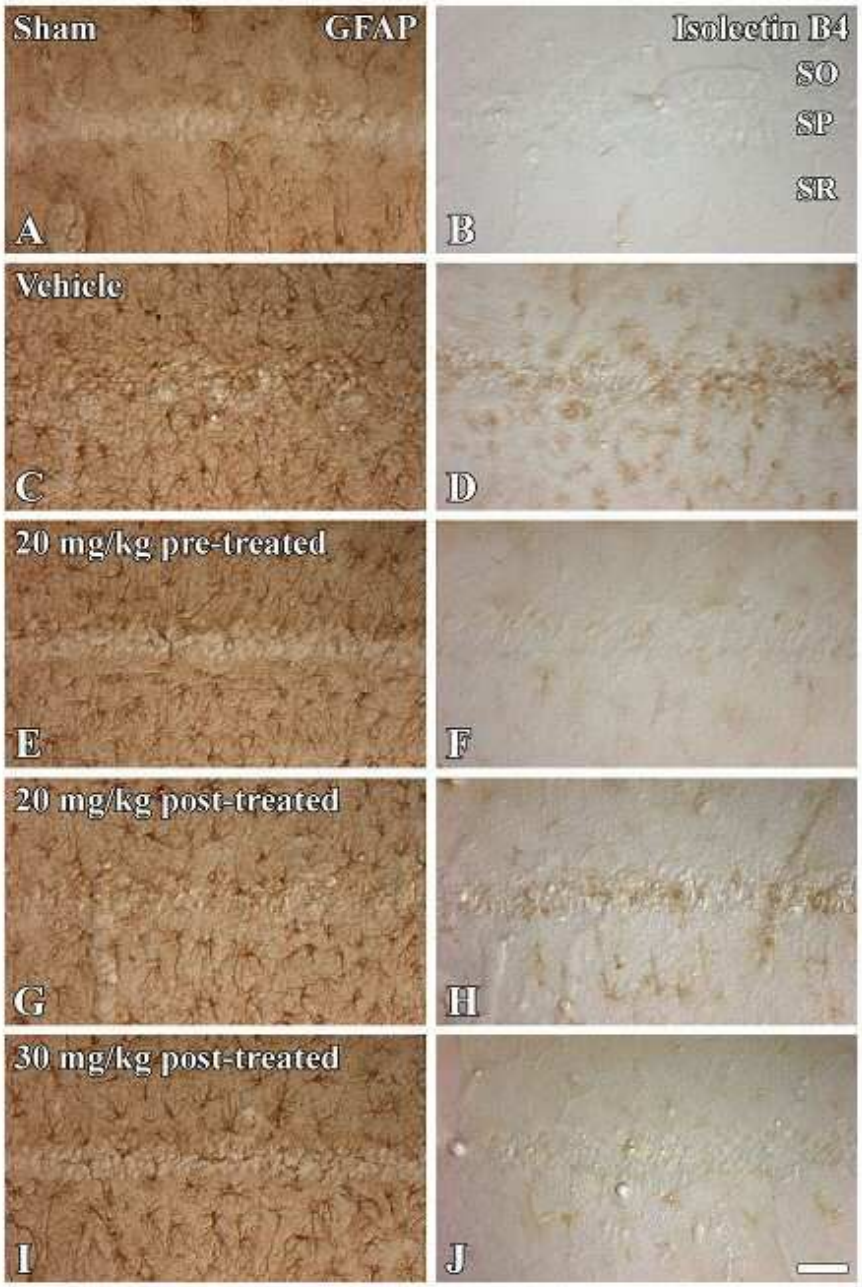
도면2


Relative number (%) vs. Sham
120
100
80
60
40
20
0
20 mg/kg
20 mg/kg
30 mg/kg
Pre-treated
Post-treated
Sham
Vehicle
Escitalopram
Groups

도면3


Sham
NeuN
A
F-J B
SO
SP
SR
B
Vehicle
C
D
20 mg/kg pre-treated
E
F
20 mg/kg post-treated
G
H
30 mg/kg post-treated
I
J

도면4


Sham
GFAP
A
Isolectin B4
SO
SP
SR
B
Vehicle
C
D
20 mg/kg pre-treated
E
F
20 mg/kg post-treated
G
H
30 mg/kg post-treated
I
J