

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013년 4월 4일 (04.04.2013)



(10) 국제공개번호
WO 2013/048116 A2

- (51) 국제특허분류:
A61K 38/17 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/505 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/007763
- (22) 국제출원일: 2012년 9월 26일 (26.09.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0097723 2011년 9월 27일 (27.09.2011) KR
- (72) 발명자: 겸
- (71) 출원인: 김후정 (KIM, Hoojung) [KR/KR]; 150-796 서울시 영등포구 여의도동 한양아파트 G동 902호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 리엔목특허법인 (Y.P. LEE, MOCK & PARTNERS); 135-971 서울시 강남구 언주로 30길 13, 12F (도곡동, 대림아크로텔), Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ,

CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

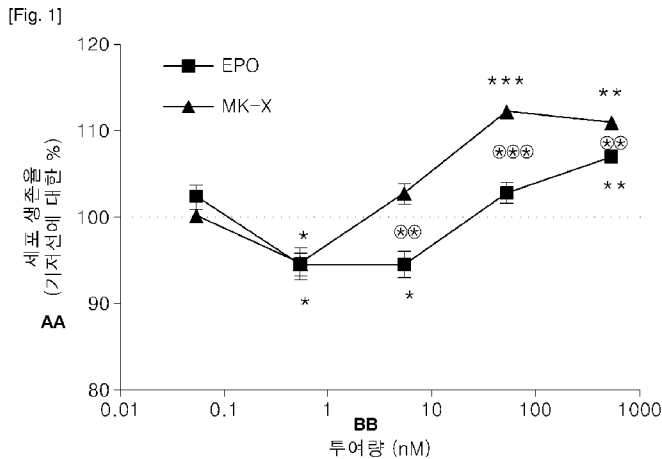
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: ERYTHROPOIETIN-DERIVED PEPTIDE AND USE THEREFOR

(54) 발명의 명칭 : 에리스로포이에틴-유래 펩타이드 및 그 용도



* : 자체 치료군의 0.1nM과의 비교 CC
 ◎ : 에리스로포이에틴군과 MKX군과의 비교 DD
 ** , ◎◎ : p<0.005
 *** , ◎◎◎ : p<0.001

AA ... Cell survival rate (percentage relative to baseline)
 BB ... Dose (nM)
 CC ... Comparison with 0.1 nM in the self-treatment group
 DD ... Erythropoietin group and MKX group comparison

(57) Abstract: Provided are: a peptide effective in preventing cell damage having an amino acid sequence in the first sequence in the sequence listing; and a pharmaceutical composition for preventing cell damage comprising the peptide as an active ingredient. The peptide according to the present invention not only has far better physiological activity in its protective action on various cells than does existing natural human erythropoietin but also has a markedly more simple structure than does natural human erythropoietin, and thus the peptide easily passes across the tissue-blood barrier and is economic in that production costs are reduced which makes the peptide advantageous. Consequently, a pharmaceutical composition comprising the peptide according to the present invention as an active ingredient is efficacious in the prevention or treatment of, *inter alia*, neurodegenerative diseases and acute and chronic kidney function impairment, such as stroke, mechanical damage or ischemic damage of the nervous system, myocardial infarction, diabetes, cardiac insufficiency, peripheral vascular disorders, diabetic retinopathy, diabetic nephropathy, diabetic neuropathy, glaucoma, dementia, Parkinson's disease and Lou Gehrig's disease.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2013/048116 A2

본 발명은 서열목록 제 1서열의 아미노산 서열을 갖는 세포손상방지에 효과적인 펩타이드, 및 상기 펩타이드를 유효 성분으로 포함하는 세포손상방지용 약학 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 펩타이드는 종래의 천연 인간 에리트로포이에틴에 비해 각종 세포의 보호 활성에 있어서 현저히 우수한 생리활성을 가질 뿐만 아니라, 천연 인간 에리트로포이에틴에 비해 현저히 간단한 구조를 가지므로 조직-혈관방어막(tissue-blood barrier)의 통과가 용이하고, 생산비용이 적게 들어 경제적이 장점이 있다. 따라서, 본 발명에 따른 펩타이드를 활성성분으로 포함하는 약제학적 조성물은 뇌졸중, 신경계의 기계적 손상 또는 허혈성 손상, 심근경색, 당뇨병, 심부전, 말초혈관장애, 당뇨병성 망막증, 당뇨병성 신장증, 당뇨병성 신경증, 녹내장, 치매, 파킨슨병, 루게릭병 등 신경퇴행성 질환, 급성 및 만성 신기능 장애 등의 예방 또는 치료에 효과적이다.

명세서

발명의 명칭: 에리스로포이에틴-유래 펩타이드 및 그 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 에리스로포이에틴-유래 펩타이드 및 그 펩타이드를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인체는 살아가는 동안 내부 또는 외부의 끊임없는 자극과 유해 요소에 노출되고 개체는 그 유해 요소에 대응하여 여러 기전에 의해 자신의 몸을 보호하게 된다. 이러한 유해 요소는 기계 화학적 위험요소, 저산소증, 감염 등 다양한 요소가 있으며, 이러한 다양한 유해 요소로부터 신체를 보호하기 위하여 개체는 물론 작게는 세포 단위에서 유해 요소를 방어하는 여러 기전들이 발견되고 있다. 이러한 기전에 의해 분비되는 다양한 세포 인자(cell factor)들은, 초기 외부 유해요소 뿐 아니라 방어 기전을 다하고 수명을 마치는 세포들이 생산하는 이차적 내부 유해 물질에 의한, 화학적, 면역학적 손상까지 방어하게 되어, 세포사멸 또는 세포자멸사(necrosis or apoptosis) 방지, 초기 손상부위의 확산 방지, 새로운 세포의 출현, 새로운 건강한 조직으로의 재생까지 유도하는 역할을 하기도 한다.
- [3] 에리스로포이에틴(EPO)은 이미 잘 알려진 165개의 아미노산으로 구성된 34kDa의 혈액조성 사이토카인(hematopoietic cytokine)으로서, 신체 내의 저산소증(hypoxia)에 반응하여 신장에서 생성되어 골수 내의 적혈구 전구세포(precursor of red blood cell)를 자극하여 적혈구의 증가를 유발시킨다. 따라서, 재조합 인간 에리스로포이에틴(rhEPO)은 만성신부전에 의한 빈혈, 수술에 따른 빈혈, 암 또는 항암치료에 따른 빈혈 등, 빈혈을 치료하는 약제로 사용될 수 있다(비특허문헌 1). 최근 EPO는 빈혈 치료 이외에 신경계의 기계적 손상 또는 허혈성 손상에서 괄목할 만한 세포, 조직 보호 능력을 보여주었고(비특허문헌 2), 급성심근경색 동물 모델에서도 50% 정도의 조직손상을 줄여주는 효과를 보여주었으며, 이는 항세포자멸사(antiapoptosis) 억제에 의한 것으로 여겨진다(비특허문헌 3,4).
- [4] 이러한 EPO의 빈혈치료효과 및 세포조직보호능력의 이면에 EPO의 투여시 발생할 수 있는 적혈구의 증가에 따른 혈행장애 및 혈소판 활성도의 증가 등이 나타나는 것으로 밝혀졌으며(비특허문헌 5,6), 이러한 부작용들로 인해 EPO의 조직보호 능력이 상쇄될 수 있는 문제점이 대두되고 있다. 따라서, 적혈구 증가나 혈소판의 활성도를 자극하지 않으면서 조직보호능력은 유지하는 무-시알산 에리스로포이에틴(asialoEPO), 카바밀화 에리스로포이에틴(carbamylated EPO) 등 에리스로포이에틴의 변형(derivatives) 또는 에리스로포이에틴의 일부 구조를 이용한 펩타이드(peptide)에 관한 연구가

진행 중이다(비특허문헌 7~9).

- [5] 앞서 설명한 바와 같이 에리스로포이에틴은 적혈구 증가에 의한 빈혈치료, 신경계의 세포, 조직 보호 능력, 심근 조직손상 보호 능력 등 매우 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 이와 같이, EPO는 활성이 매우 높은 단백질이기는 하지만 생산비용이 매우 높으며, EPO를 말초혈관내로 투여할 경우 일부 표적장기에 존재하는 조직-혈관 방어막(tissue-blood barrier) 등에 의해 표적장기로 수송이 되지 않아 약물전달에 어려움이 있는 것으로 알려져 있다(비특허문헌 10-12). 따라서, 생산 비용이 적게 들면서 생체 조직으로의 수송이 원활하면서 효과적인 인간 EPO 대체물질이 요구되고 있다.
- [6] [선행기술문헌]
- [7] 비특허문헌
- [8] 1. Jelkmann, W. Biology of erythropoietin (1994) Clin. Invest. 72, S3-S10
- [9] 2. Brines, M. L. et al. Erythropoietin crosses the blood brain barrier to protect against experimental brain injury (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 10526-10531.
- [10] 3. Moon C. et al. Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats) (2003) Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 September 30; 100(20): 11612-11617.
- [11] 4. Siren et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 4044-4049.
- [12] 5. Wiessner, C. et al. Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin (2001) J. Cereb. Blood Flow Metab. 21, 857-864. pmid:11435798
- [13] 6. Wolf, R. F., Erythropoietin administration increases production and reactivity of platelets in dogs (1997) Thromb. Haemostasis 78, 1505-1509. pmid:9423803
- [14] 7. Imai, N. et al., Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin. Suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin in vitro) (1990) Eur. J. Biochem. 194, 457-462.
- [15] 8. Leist M et al., Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. Science (New York, NY 2004;305:239-42.
- [16] 9. Brines M, et al., Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105:10925-30.
- [17] 10. Marti et al., Detection of erythropoietin in human liquor:intrinsic erythropoietin production in the brain, 1997, Kidney Int. 51:416-8
- [18] 11. Juul et al., Erythropoietin in the cerebrospinal fluid of neonates who sustained CNS injury, 1999, Pediatr, Res. 46:543-547
- [19] 12. Buemi et al. Intravenous recombinant erythropoietin dose not lead to increase in cerebrospinal fluid rethropoietin concentration, 2000, Nephrol. Dial. Transplant. 15:422-433.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [20] 이에 본 발명자들은 천연 인간 EPO와 동일한 효과를 가지면서도 천연 EPO에 비해 생산비용이 적게 들 뿐만 아니라 신체 내 존재하는 조직-혈관방어막(tissue-blood barrier)의 통과가 용이한 펩타이드를 제조하고자 다양한 종류의 인간 EPO 유래 펩타이드를 제조 및 스크리닝 하였다. 그 결과, 수많은 펩타이드 후보 물질 중에서도 천연 EPO 보다 생리활성이 현저히 우수할 뿐만 아니라 조직-혈관방어막의 투과가 용이하고 생산비용이 적게 들어 경제적인 펩타이드를 선별하게 되어 본 발명을 완성하게 되었다.
- [21] 따라서, 본 발명의 목적은 EPO 보다 우수한 생리 활성을 가지면서도 조직-혈관방어막의 투과가 용이하고 경제적으로 생산될 수 있는 펩타이드를 제공하는 것이다.
- [22] 본 발명의 다른 목적은 상기 펩타이드를 포함하는 세포손상 방지용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [23] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 갖는 세포손상방지에 효과적인 펩타이드를 제공한다.
- [24] 본 발명의 다른 일 측면은 세포손상방지에 효과적인 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 세포손상방지용 약학 조성물을 제공한다.
- [25] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [26] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 전체가 참고로 통합된다.
- [27] 본 발명자들은 다양한 종류의 인간 EPO 유래 펩타이드를 제조 및 스크리닝함으로써, 천연 인간 EPO에 비해 현저히 우수한 생리활성을 갖는 펩타이드를 규명하였으며, 그 펩타이드는 천연 인간 EPO에 비해 현저히 간단한 구조를 가지므로 조직-혈관방어막(tissue-blood barrier)의 통과가 용이하고, 생산비용이 적게 들어 경제적이다.
- [28] 따라서, 본 발명은 일 측면에 있어서, 하기 일반식 I로 표시되는 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 갖는 세포손상방지에 효과적인 펩타이드를 제공한다.
- [29] [일반식 I]
- [30] Ile Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Leu Met

- [31] 본 발명에 따른 펩타이드를 표현한 상기 일반식 I는 본 발명의 펩타이드 구조를 편의적으로 표현하기 위해 기재된 것이며, 이의 변형도 본 발명에 속한다는 것은 당업자에게 자명하게 인식되어야 한다. 예를 들어, 상기 일반식 I에서 EPO 유래 서열의 변형체들도 본 발명의 범위에 속한다는 것은 당업자에게 자명하다.
- [32] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단은 아세틸기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐기, 포르밀기, 팔미토일기, 미리스틸기, 스테아릴기, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 및 아미노산으로 구성된 군으로부터 선택되는 보호기가 추가적으로 결합될 수 있다.
- [33] 본 발명의 또 다른 일 구현예에 따르면, 본 발명의 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단은 히드록시기(-OH) 또는 아미노기(-NH₂)로 변형되어 있으며, 보다 바람직하게는 히드록시기로 변형되어 있다.
- [34] 상기 설명한 아미노산의 변형은 본 발명의 펩타이드의 안정성을 크게 개선시키는 작용을 할 수 있다. 본 명세서에서 용어 "안정성"은 *in vivo* 안정성 및 저장 안정성(예: 상온 저장 안정성)을 의미한다. 상기 보호기는 생체 내의 단백질 절단효소의 공격으로부터 본 발명의 펩타이드를 보호하는 작용을 할 수 있다.
- [35] 본 명세서에서 용어 "펩타이드"는 아미노산이 펩타이드 결합에 의해 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다. 본 발명의 펩타이드는 당해 기술분야에 공지되어 있는 합성 방법, 예를 들어 고상 합성 기술(solid-phase synthesis technique)에 따라 제조될 수 있다(Merrifield, *J. Amer. Chem. soc.* 85:2149-54(1963); Stewart et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd, ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)).
- [36] 상기 펩타이드는 인간 EPO로부터 유래된 것으로, 그 자체로서 천연 인간 EPO에 비해 현저히 우수한 신경세포 보호효과, 심근세포 보호효과, 망막세포 보호효과, 및 췌장 베타세포 보호효과를 갖는 것으로 밝혀졌다(실험예 1-4).
- [37] 따라서, 본 발명은 다른 일 측면에 있어서, 상기 본 발명에 따른 펩타이드를 포함하는 세포, 조직, 또는 기관 손상의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [38] 또한, 본 발명의 일 구현 예에 따르면 약제학적으로 유효한 양의 상기 본 발명에 따른 펩타이드 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 세포, 조직, 또는 기관 손상의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [39] 본 명세서에서 "손상"이란 신경학적 또는 정신학적 증상, 눈 질병, 심혈관 질병, 심압 질병, 호흡질병, 신장, 요도 및 생식기 질병, 뼈 질병, 피부 질병, 위장 질병 및 내분비 및 대사 장애에서 본 발명에 따른 펩타이드가 예방 또는 치료학적 효과를 갖도록 하는, 임의의 인간 질병을 지칭한다. 특히, 그러한 상태 및 질병으로는 흥분 조직, 예컨대 중추 신경계, 말초 신경계, 심장 세포 또는 망막조직의 흥분 조직(excitable tissue), 예컨대 뇌/척수, 심장, 또는 망막/눈에 악영향을 주는 저산소증 상태가 포함된다.
- [40] 산소를 신경 조직으로 이용하도록 할 수 있는 가능성의 감소는 스트레스, 손상,

및 최종적으로는 신경 세포사를 초래하고, 본 발명에 따른 펩타이드로 치료될 수 있다. 일반적으로, 저산소증 및/또는 허혈로 지칭되는 이들 상태는 뇌졸중, 혈관 막힘, 출생전 또는 후 산소 결핍, 질식, 기도폐색, 천식, 익사 직전, 일산화탄소 중독, 연기흡입, 수술 및 방사선 치료를 포함하는 외상, 질식, 간질, 저혈당(증), 만성 폐순환 장애 질병, 폐기종, 성인 호흡 곤란 증후군, 저혈압 쇼크, 폐혈성 쇼크, 초과민방응 쇼크, 인슐린 쇼크, 낮적혈구 발작, 부정맥, 질소 마취, 및 심장-폐 이식 과정으로 야기된 신경학적 결핍이 포함되나, 이로써 제한되지 않는다. 그러므로, 본 발명에 따른 펩타이드는 다양한 상태 및 환경에서 저산소 상태에서부터 야기되는 흥분 조직(*excitable tissue*)의 결핍을 치료하거나 예방하기 위해 사용될 수도 있다. 그러한 질병 또는 상태의 예로는 허혈증(심장동맥질환, 심근 경색증, 협심증, 선천성 심장질환으로서 관막성 심근병증, 프린즈메탈 협심증, 심장파열, 맥관염, 부정맥, 심근염, 둔기외상, 관통외상, 코카인과 같은 독소), 고혈압, 감압병, 섬유근육 과다형성증, 동맥류, 천식, 만성기관지염, 폐기종, 항공폐쇄, 폐색전증, 폐혈전증, 특발성 폐섬유증, 낭성 섬유증, 폐렴, 사코이도증, 1형 및 2형 당뇨병, 골감소증, 골수염, 무혈관 괴사, 외상, 파제트병, 탈모증, 백반증, 당뇨병성 궤양, 화상, 말초혈관질환, 홍반성 루푸스, 쇼그렌 증후군, 류마티스 관절염, 사구체 신염, 맥관염, 시각신경염, 망막박리, 측두동맥염, 망막허혈, 황반변성, 망막박리, 색소성 망막염, 동백경화, 망막병증, 고혈압성 망막병증, 망막동맥폐쇄, 망막정맥폐쇄, 당뇨병성 망막병증, 질식, 허혈, 자간증, 허혈성 뇌졸중, 출혈성 뇌졸중, 뇌외상, 척수외상, 간질, 경련, 만성 발작장애, 만성 피로 증후군, 급성 및 만성 저삼투압 및 고삼투압 증후군, AIDS, 치매, 감전사, 질식, 다발성 경화증, 알츠하이머병, 뇌성마비, 뇌기능 노화, 기억 손실, ALS, 발작 장애, 아급성 경화 범뇌염, 뇌염, 수막염, 경막하 혈종, 니코틴 중독, 약물남용 및 금단, 강박정신장애, 기분장애, 불안장애, 우울증, 자폐증, 주의력 결핍, 과활동장애, 인식 기능장애, 척추관 협착증, 횡단 처긋염, 길리안 바레, 외상, 신경근 압박, 종양성 압박, 열사병, 결절 경화증, 윌슨 질병, 대뇌 및 진행성 핵상 마비, 구암 질병, 로이체 치매, 헌팅톤 질병, 근육긴장 퇴행위축, 프레드리히 조화운동불능 및 기타 조화운동불능, 뚜렛 증후군, 크로이츠펠트 야콥 질병(CJD), 이명, 메니에르 증후군, 청각 손실, 외상성 손상, 당뇨병성 신질환, 헤노cm-스코늘레인 자색반증, 중증근무력증, 피부근육염, 다발근육염, 근육병증, 열사병, 랩도마일로시스, 미토콘드리아 질병, 괴사근막염, 약물에 의한 2차성 발기부전, 바이러스성/세균성/기생충성 간염, 간경화, 지방간, 간에서의 침윤/대사질환, 허혈성 대장질환, 염증성 대장 질환, 괴사상 위장염, 기관이식에서의 공여자 및 수여자의 치료, 불임증(혈관성, 자가면역, 자궁이상, 착상장애), 내분비선 기능항진, 또는 내분비선 기능저하 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [41] 상기 본 발명에 따른 약학 조성물은, 활성성분인 본 발명에 따른 펩타이드가 심근세포 보호효과, 신경세포 보호효과, 망막세포 보호효과, 및 체장 베타 세포

보호효과 등을 가지므로, 세포손상 방지에 의해 세포, 조직, 및 기관 손상의 예방 또는 치료에 효과가 있다. 또한, 이러한 효과로 인해 뇌졸중, 신경계의 기계적 손상 또는 허혈성 손상, 심근경색, 망막손상, 및 당뇨병을 포함하여, 세포, 조직, 또는 기관의 손상을 야기할 수 있는 상기 열거된 다양한 질병의 예방 또는 치료에 사용될 수 있으며, 바람직하게는 뇌졸중 장애, 다발성 경화증, 발작, 저혈압, 심장 마비, 허혈증, 심근 경색, 염증, 인지 기능의 나이와 연관된 손실, 방사선 손상, 대뇌 마비, 신경퇴화성 질병, 알츠하이머 병, 피킨슨 병, 라이(Leigh) 병, AIDS성 치매, 기억 손상, 근위축성 측삭 경화증, 알콜중독, 기분 장애, 불안 장애, 주위력 결핍 장애, 자폐증, 크로이츠펠트야콥병, 뇌 또는 척수 외상 또는 허혈증, 심장-뇌 바이패스, 만성 심장 부전, 노화에 의한 시력 감퇴, 당뇨병, 당뇨병성 신경 장애, 당뇨병성 신장 장애, 녹내장, 망막성 허혈증 또는 막막 외상과 관련된 기능적 손상에 대한 보호 또는 복구하기 위해 사용될 수 있다.

[42] 본 명세서에서 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 상기 펩타이드의 생체 내 효과를 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

[43] 상기 약제학적 조성물은 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 약제학적 제형으로 제제화될 수 있다. 상기 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구, 바람직하게는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여하는 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 국소 투여, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 따라서, 상기 약제학적 조성물은 경구투여제제, 주사제, 좌제, 경피투여제제, 및 경비투여제제를 포함하지만, 이에 한정되지 않는 임의의 제형으로 제제화되어 투여될 수도 있다.

[44] 상기 각각의 제형으로 제제화 시, 각각의 제형의 제조에 필요한 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 첨가제를 부가하여 제조할 수 있다. 대표적으로 주사제로 제제화할 경우에는, 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상의 주사제 제조방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 본 발명에 따른 주사제는 일 구현예에 따르면, 통상 증류수에 약물을 녹여 주사제로 할 수 있다. 본 발명에 따른 주사제는 환자에게 투여 시 그대로 이용될 수 있도록 멸균 매질에 분산된 형태일 수도 있으며, 투여 시 주사용 증류수를 가해 적절한 농도로 분산시킨 다음 투여하는 형태일 수도 있다.

[45] 경구 투여용 제형으로 제제화 시 상기 담체로서 희석제, 활택제, 결합제, 붕해제, 감미제, 안정제, 및 방부제 중에서 1 종 이상을 선택하여 사용할 수 있으며, 첨가제로는 향료, 비타민류, 및 항산화제 중에서 1 종 이상을 선택하여 사용할 수 있다. 상기 담체 및 첨가제는 약제학적으로 허용 가능한 것은 모두 가능하며, 구체적으로 희석제로는 유당, 옥수수 전분, 대두유, 미정질 셀룰로오스, 또는 만니톨, 활택제로는 스테아린산 마그네슘 또는 탈크, 결합제로는 폴리비닐피롤리돈 또는 히드록시프로필셀룰로오스가 바람직하다. 또한, 붕해제로는 카르복시메틸셀룰로오스 칼슘, 전분글리콜산나트륨, 폴라크릴린칼륨, 또는 크로스포비돈, 감미제로는 백당, 과당, 솔비톨, 또는

아스파탐, 안정제로는 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 베타-사이클로덱스트린, 백납, 또는 잔탄검, 방부제로는 파라옥시안식향산메틸, 파라옥시안식향산프로필, 또는 솔빈산칼륨이 바람직하다.

- [46] 상기 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여시간, 투여경로, 배설속도, 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 결정될 수 있으며, 성인 표준 남성을 기준으로 본 발명의 펩타이드를 0.001 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{일}$ 의 범위로 투여할 수 있다.

발명의 효과

- [47] 앞서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 펩타이드는 종래의 천연 인간 EPO에 비해 각종 세포의 보호 활성화에 있어서 현저히 우수한 생리활성을 가질 뿐만 아니라, 천연 인간 EPO에 비해 현저히 간단한 구조를 가지므로 조직-혈관방어막(tissue-blood barrier)의 통과가 용이하고, 생산비용이 적게 들어 경제적인 장점이 있다. 따라서, 본 발명에 따른 펩타이드를 활성성분으로 포함하는 약학 조성물은 뇌졸중, 신경계의 기계적 손상 또는 허혈성 손상, 심근경색, 망막손상, 당뇨병 등 세포손상과 관련된 다양한 질병의 예방 또는 치료에 효과적이다.

도면의 간단한 설명

- [48] 도 1은 심근세포에 EPO 및 MKX-2를 다양한 농도별로 처리한 다음 72 시간 동안 배양 후 MTT 어세이 방식으로 세포생존율을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [49] EPO 그래프에서 아래쪽에 * 마크가 없는 것은 기준점 0.1 nM 과 비교했을 때 통계적 의의가 없었기 때문이고, 1000nM에서의 3 지점에서의 * 마크 중 상부 **는 MKX 1000nM은 MKX 0.1nM에 비교해서 통계적 의의가 있었다는 것이고, 중간 ⊗⊗ 는 MKX 1000nM과 EPO 1000nM사이에 세포보호 효과에 차이가 있다는 것이며, 아래쪽 **는 EPO 1000nM은 EPO 0.1nM에 비교해서 통계적 의의가 있다는 것을 의미한다.
- [50] 도 2는 뇌신경세포에 EPO 및 MKX-2를 다양한 농도별로 처리한 다음 72 시간 동안 배양 후 MTT 어세이 방식으로 세포생존율을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [51] 도 3은 망막신경세포에 EPO 및 MKX-2를 다양한 농도별로 처리한 다음 72 시간 동안 배양 후 MTT 어세이 방식으로 세포생존율을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [52] 도 4a는 베타세포 HIT-T15에 MKX-2를 각각 농도별로 전처리한 다음 H_2O_2 를 2 시간 처리 후 MTT 어세이 방식으로 세포생존율을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [53] 도 4b는 베타세포 HIT-T15에 MKX-2를 각각 농도별로 전처리한 다음 H_2O_2 를 4 시간 처리 후 MTT 어세이 방식으로 세포생존율을 비교한 결과를 나타낸

그래프이다.

- [54] 도 5a는 베타세포 INS-1에 MKX-2를 각각 농도별로 전처리한 다음 H₂O₂를 2시간 처리 후 MTT 어세이 방식으로 세포생존율을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [55] 도 5b는 베타세포 INS-1에 MKX-2를 각각 농도별로 전처리한 다음 H₂O₂를 4시간 처리 후 MTT 어세이 방식으로 세포생존율을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [56] 도 6은 뇌경색을 유발시킨 Sprague-Dawley 백서 모델에게 시험약물을 투여한 후 뇌를 분리하고 두정면을 따른 절편을 TTC 염색 후 촬영한 사진이다.
- [57] 도 7은 뇌경색을 유발시킨 Sprague-Dawley 백서 모델에게 시험약물을 투여한 후 뇌를 분리하고 두정면을 따른 절편을 TTC 염색 후 뇌경색 면적을 측정한 결과를 도시한 그래프이다.
- [58] 도 8은 Wistar 쥐로부터 얻어짐 배양된 심근세포에 대해 TUNEL 어세이 결과 DAPI로 염색된 세포와 TUNEL positive를 보이는 세포의 수를 개수하고 그 비율을 계산한 결과를 도시한 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [59] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 더욱 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 어떤 의미로든 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [60]
- [61] <실시예>
- [62] 1.Ile Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Leu Met의 합성
- [63] 종래 공지된 고상 합성 기술(solid-phase synthesis technique)에 따라 서열목록 1의 Ile Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Leu Met 펩티드를 합성하였다.
- [64] 상기 합성된 펩타이드를 MKX-2라 명명하였다.

[65]

<실험예>

실험방법 및 재료

1. 심근세포 실험방법 및 재료

A. 심근세포의 분리 및 배양

- [70] 생후 8주령의 Wistar 쥐를 준비한 후, 성체 쥐를 케타민과 펜토바비탈을 주입하여 사망케 한 후, 심장을 빠르게 분리하였다. 대동맥을 이용하여 역방향으로 심장 방향으로 34~37도로 미리 덩혀둔 Ca free Krebs-Henseleit buffer 용액(KHB)로 5분간 관류시켰다. 이후 KHB 용액을 0.15% class II collagenase(Cooper Biomedical, Malvern, PA) 함유 Hank's balanced salt

solution(HBSS:GIBCO, Grand Island, NY)으로 바꾸어 30~40분 정도 관류시켰다. 이후 세포배양액(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)으로 2회 반복하여 씻어냈다. 심실(ventricle)과 심방(atria)을 분리하고 심실조직을 잘게 분쇄한 후, 34~37도로 미리 덩혀둔 클래스 II 콜라게나제 함유 배양배지(DMEM)로 채워진 진탕기(shaker)에서 5분 정도 잘 저어주었다. 녹지 않은 결체조직은 필터를 통해 걸러내고 콜라게나제 함유 용액은 배양배지(DMEM) 용액으로 2회 반복하여 씻어냈다. 10g의 속도로 부드럽게 원심분리를 2분간 시행한 후, 상층액은 분리하여 제거한 후, 세포 성분은 1% 우태아혈청(FBS; Sigma Chemical, St. Louis, MO)함유 배양배지(DMEM)용액으로 3회 씻어주었다. 이후, 얻어진 세포는 배양배지(DMEM), 10% FBS, 10mM

HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), GIBCO Laboratories, Grand Island, NY), 2mM L-글루타민, 페니실린-스트렙토마이신(100 IU/mL, GIBCO)에서 60분간 안정시켰다.

[71] 그런 다음, 세포들을 20×10^3 세포/cm²의 밀도로 6-웰 플레이트에 분주하고 3일간 브로모데옥시유리딘(BrdU, 10uM, Sigma-Aldrich)을 배양액에 추가하여 섬유아세포와 전구세포들의 증식을 막았다(Lokuta et al, 1994; Miragoli et al., 2006). 세포들을 다음 실험을 위해 95% O₂, 5% CO₂, 37도 배양기에서 배양하였다.

[72] **B. MTT 어세이**

[73] 96웰 플레이트에 세포를 2×10^4 cells/well, 200ul씩 시딩(seeding)하였다. 이 때, cell confluence를 약 70~80%로 맞췄다. 24시간 후 세포 안정화가 이루어지면 26 또는 28 게이지(gauge)의 니들(needle)을 이용하여 웰내 기존의 배지를 제거하였다. 혈청과 영양물질이 없는 FBS 200ul를 각각의 웰에 투여하고 EPO 치료군과 MKX-2 치료군을 나누는 후, EPO 및 MKX-2 치료군은 다시 0, 0.1, 1, 10, 100, 100 nM의 용량에 따른 실험군으로 나누고 각 용량 별로 저산소배양(hypoxic condition) 조건에서 72 시간 동안 약물치료 후 MTT 어세이 방식으로 세포생존율을 비교하였다. EPO는 에포론주사액(동아제약, 한국)을 사용하였다. 각 농도에 따른 모든 실험군은 각각 7 웰 씩 시행하였다.

[74] 기정해진 처리시간이 지나면 PBS(phosphate buffered saline)에 녹인 후 0.22um 멤브레인 필터로 멸균 여과된 MTT (3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드, Sigma, M2128)을 1 mg/ml의 농도로 웰당 100 ul씩 넣어주었다. 이 때, MTT 시약은 호일에 싸서 빛을 차단시켜 사용하였다. MTT 시약을 넣은 웰 플레이트를 배양기에 2 시간 동안 반응시켰다. 배양이 끝난 후 배지를 제거하였다. 배지 제거 시 세포들이 같이 떨어져 나오지 않도록 주의하였다.

[75] DMSO를 각 웰에 200 ul씩 넣어주었다. 호일에 싸서 약 10분간 진탕기로 가볍게 흔들면서 포르마잔 결정이 잘 녹을 수 있도록 섞어주었다. 멀티피펫(160ul)으로 두 세 번 정도 피펫팅을 해주어 포르마잔을 깨주었다. ELISA 리더(reader)로 570 nm에서 O.D.값을 측정하여 정량적으로 분석하였다.

[76]

[77] 2. 신경세포 실험방법 및 재료

[78] A. 신경세포 분리 및 배양

[79] (1) 플레이트 코팅

[80] 폴리-L-라이신(sigma P4707)을 세포를 배양할 플레이트에 넣고 배양기 안에서 1시간 동안 보관하였다. 폴리-L-라이신을 피펫을 이용하여 석션 후 멸균 증류수로 3 번 씻어냈다. 코팅된 플레이트는 클린 벤치 안에서 2시간 이상 완전히 말린 후 랩에 싸서 냉장보관하였다.

[81] (2) 배지 만들기

[82] 1) 태아세척배지 또는 HBSS (마리당 200 ml)

[83] HBSS(GIBCO, 14170-112, 180ml) 및 10% 페니실린/스트렙토마이신(GIBCO, 15140-122) 20ml 를 혼합하여 준비하였다.

[84] 2) 트립신 용액

[85] 0.125% 트립신 - EDTA (3ml), HBSS (12ml), 0.1mg/ml DNase1 (sigma, deoxyribonuclease1, D5025) 1.5mg을 혼합한 후 실린지를 통해 여과를 실시하였다.

[86] 3) 기본 배지 (basal media, 총 1L)

[87] DMEM(hg, GIBCO, 12100-046) 1봉, 1% P/S 10 ml(penicillin/streptomycin, GIBCO, 15140-122), 3.7g NaHCO₃(sodium bicarbonate, sigma, S5761)을 증류수 0.8L와 혼합 후, 실린지를 통해 여과를 실시하였다.

[88] 4) 배양 배지 (총 1L)

[89] 기본 배지(basal media) 900 mL, 10% FBS 100mL, 인슐린(sigma, I9278-5ml, 10mg/ml) 500ul, p-아미노벤조산(PABA : N-아세틸 트랜스퍼라제 억제제, A9878) 70mM 100ul를 혼합한 후, 실린지를 통해 여과를 실시하였다.

[90] 5) 세척 배지 (마리당 20ml)

[91] DMEM(hg, GIBCO, 12100-046), 1% P/S 20ml, 0.1mg/ml DNase1 2mg를 혼합 후, 실린지를 통해 여과를 실시하였다.

[92] (3) 신경세포 분리 및 배양

[93] 임신 16일된 랫트의 경추를 탈골시켜 실험동물을 희생시킨 후, 실험동물의 복부를 U자 형으로 절개하여 태아(fetus)가 있는 자궁 들어내었다. 이후 자궁에서 태아를 꺼내어 태아세척배지에 넣고 세척을 3회 실시하였다. 태아의 머리 부분만 잘라 태아 세척 배지에 넣고 다시 세척을 3회 실시 후, 두개골을 정래하고 뇌를 분리하였다. 칼을 이용하여 뇌의 피질 부분을 절개하여 얻은 후 조직을 잘게 잘라 미리 준비해둔 태아세척배지에 모았다. 400g, 4분간 원심분리한 후, 상층액을 제거하고 얻어진 펠렛에 0.025% 트립신과 DNase1 10ml 넣고 펠렛을 췌다. 이때 배양기에서 15분간 보관하였다.

[94] 이후 다시 배양배지 15ml를 첨가한 후, 400g, 4분간 원심분리 하고 상층액을 제거한 후 얻어진 펠렛을 세척 배지(DNase1첨가)로 6 ml씩 2번 세척 후, 400g,

4분간 다시 원심분리 하였다. 원심분리 후, 상층액을 다시 제거한 후 얻어진 펠렛에 배양 배지 10 ml를 넣고 10 ul를 트립판블루와 혼합한 후, hemocytometer로 세포 계수(cell counting)를 실시하였다. 준비된 24 웰 플레이트에 웰 당 500 ul씩 세포를 접종(seeding)하고 48 시간 동안 배양하였다. 이 후, 안정화를 위해 배양액을 제거 후, 새로운 배양배지와 5uM Ara-c(cytosine arabinoside, sigma, C1768)를 각각 넣은 후 14 시간 동안 배양하고 24 시간 후, 다시 배양액을 제거한 후, 새로운 배양배지를 넣고 준비된 실험을 위해 95% O₂, 5% CO₂, 37도 배양기에서 배양하였다.

[95] **B. MTT 어세이**

[96] 96웰 플레이트에 세포를 2*10⁴cells/well, 200 ul씩 접종하였다. 이 때, 세포 컨플루언스를 약 70~80%로 맞췄다. 24 시간 후 세포 안정화가 이루어지면 26 또는 28 게이지의 니들을 이용하여 웰 내 기존의 배지를 제거하였다. 혈청과 영양물질이 없는 FBS 200ul를 투여하고 EPO 치료군과 MKX-2 치료군을 나눈 후, EPO 치료군은 다시 혈청 제거(serum starvation) 후 EPO 비치료군, 1 IU/ml, 10 IU/ml 치료군의 3개군으로 나누고 각각을 다시 신경독성물질인 0.1% 2-머캅토에탄올을 18 시간 동안 처치한 군과 비치치군으로 나누어 비교하였다. 마찬가지로 MKX-2 치료군도 혈청 제거 후 MKX-2 비치료군, 1.2ng/ml, 12ng/ml치료군의 3개군으로 나누고 각각을 다시 신경독성물질인 0.1% 2-머캅토에탄올을 18시간 동안 처치한 군과 비치치군으로 나누어 비교하였다. 또한, 음의 대조군을 위해 정상 배양액 조건에서 배양된 군을 설정하여 이들간의 비교를 시행하였다. 각 실험조건에서 모두 6 웰씩 실험을 하였고 통계분석에는 평균 및 표준편차를 이용하였다. EPO와 MKX-2 치료군은 각 72 시간 동안 약물치료 환경에서 배양하였다. EPO는 에포론주사액(동아제약, 한국)을 사용하였다. 기정해진 처리시간이 지나면 PBS (phosphate buffered saline)에 녹인 후 0.22 um 멤브레인 필터로 멸균 여과된 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, M2128)를 1 mg/ml의 농도로 웰당 100 ul씩 넣어줬다. 이 때, MTT 시약은 호일에 싸서 빛을 차단시켜 사용하였다. MTT 시약을 넣은 웰 플레이트를 배양기에서 2시간 동안 반응시켰다. 배양이 끝난 후 배지를 제거하였다. 배지 제거 시 세포들이 같이 떨어져 나오지 않도록 주의했다. 그런 다음, DMSO를 각 well에 200 ul씩 넣어주었다. 호일에 싸서 약 10분간 진탕기로 가볍게 흔들면서 포르마잔 결정이 잘 녹을 수 있도록 섞어줬다. 멀티피펫(160ul)으로 두세 번 정도 피펫팅을 해주어 포르마잔을 깨줬다. ELISA reader로 570nm에서 O.D.값을 측정하여 정량적으로 분석하였다.

[97]

[98] **3. 망막신경세포 실험방법 및 재료**

[99] **A. 망막신경세포 분리와 배양**

[100] (1) 플레이트 코팅

- [101] 폴리-D-라이신(sigma P7280)을 넣고 세포를 배양할 플레이트에 넣고 배양기 안에서 2시간 동안 보관하였다. 폴리-D-라이신을 피펫을 이용하여 석션 후 멸균 증류수로 3회 씻어냈다. 코팅된 플레이트는 클린 벤치 안에서 2시간 이상 완전히 말린 후 랩에 싸서 냉장보관하였다,
- [102] (2) 배지 만들기
- [103] 1) 용액 1
- [104] 다음과 같은 조성의 배지(5.4 mM KCl, 116 mM NaCl, 0.096 mM NaH₂PO₄·2H₂O, 19.5 mM D-글루코오스, 0.15 mM MgSO₄, 23.8 mM NaHCO₃, 3g/L 소혈청알부민, 10 mg/L 페놀-레드)와 10% 페니실린/스트렙토마이신 (GIBCO, 15140-122) 20ml를 혼합하여 준비하였다.
- [105] 2) 트립신 용액
- [106] 0.125% 트립신-EDTA (3ml), 용액 1 (12 ml), 0.1 mg/ml DNase1 (sigma, deoxyribonuclease1, D₅O₂₅) 1.5mg을 혼합한 후 실린지를 통해 여과를 실시하였다.
- [107] 3) 용액 1에서의 정지 용액(stop solution)
- [108] 용액 1에 DNase(10000U/7.5 ml 소 판크레아제 타입 II), 대두 트립신 억제제(타입 1-S, 5mg/7.5 ml), 0.19 mM MgSO₄를 넣어 만들었다.
- [109] 4) 최소 필수 배지 (총 1L)
- [110] 기본 배지(basal media) 900 mL, 10% FBS 100mL, 91mg/L 겐타마이신 설페이트, 2.3 mg/L 암포테리신 B, 5 mM 글루코오스를 혼합 후, 실린지를 통해 여과를 실시하였다.
- [111] (3) 망막신경세포 분리 및 배양
- [112] 생후 3일된 랫트의 안구를 적출하여 망막을 꺼내 용액 1에 넣었다. 망막조직을 트립신에서 37도에서 10분간 처리한 후, 180g에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리후 상층액은 버리고 모은 조직을 정지용액(stop solution)에 넣었다. 뭉친 조직을 피펫으로 풀어준 후 다시 180 g에서 5 분간 원심분리하였다. 분리된 세포를 1X10⁶ 세포/mL로 10% FBS-MEM와 혼합하였다. 준비된 96 웰 플레이트에 웰 당 100 ul씩 세포를 접종하고 24시간 동안 배양하였다.
- [113] 이후, 안정화를 위해 배양액을 제거한 후, 새로운 배양배지와 5uM Ara-c(cytosine arabinoside, sigma, C1768)를 각각 넣은 후 48시간 동안 배양하고 48시간 후, 다시 배양액을 제거 후, 새로운 배양배지를 넣고 준비된 실험을 위해 95% O₂, 5% CO₂, 37도 배양기에서 배양하였다. 다시 48시간 후 배양액을 제거 후, 새로운 배양배지를 넣고 준비된 실험을 위해 95% O₂, 5% CO₂, 37도 배양기에서 배양하였다.
- [114] **B. MTT 어세이**
- [115] 96 웰 플레이트에 세포를 2x10⁴cells/웰, 200 ul씩 접종하였다. 이 때, 세포 컨플루언스를 약 70~80%로 맞췄다. 24 시간 후 세포 안정화가 이루어지면 26 또는 28 게이지의 니들을 이용하여 웰내 기존의 배지를 제거하였다. 혈청과 영양물질이 없는 FBS 200ul를 투여하고 EPO 치료군과 MKX-2 치료군으로 나눈

후, EPO 및 MKX-2 치료군은 0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 nM의 용량에 따른 실험군으로 나누고 각각 72 시간 동안 약물치료 환경에서 배양되었고 생존하고 있는 망막신경세포는 형광물질이 함유된 MTT 어세이를 이용하여 이를 형광분석기를 이용하여 정량적으로 분석하였다. EPO는 에포론주사액(동아제약, 한국)을 사용하였다. 각 농도에 따른 세포군은 양군 각각 7웰에 대해 수행하였다. 기 정해진 처리시간이 지나면 PBS(phosphate buffered saline)에 녹인 후 0.22um 멤브레인 필터로 멸균 여과된 MTT (3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드, Sigma, M2128)을 1 mg/ml의 농도로 웰당 100 ul씩 넣어줬다. 이 때, MTT 시약은 호일에 싸서 빛을 차단시켜 사용하였다. MTT 시약을 넣은 웰 플레이트를 배양기에 2시간 동안 반응시켰다.

[116] 배양이 끝난 후 배지를 제거하였다. 배지 제거 시 세포들이 같이 떨어져 나오지 않도록 주의하였다. 그런 다음, DMSO를 각 웰에 200 ul씩 넣어줬다. 그런 다음, 호일에 싸서 약 10분간 진탕기로 가볍게 흔들면서 포르마잔 결정이 잘 녹을 수 있도록 섞어주었다. 멀티-피펫(160ul)으로 두 세 번 정도 피펫팅을 해주어 포르마잔을 깨줬다.

[117] 그런 다음, ELISA 리더로 570 nm에서 O.D.값을 측정하여 정량적으로 분석하였다.

[118]

[119] **4. 췌장 베타세포 실험방법 및 재료**

[120] **A. 췌장 소도세포 배양**

[121] 햄스터 유래의 인슐린 분비 세포주인 HIT-T15 세포(75~77 passage)와 랫트 유래의 인슐린 분비 세포주인 INS-1 세포(18~20 passage)를 사용하였다. HIT-T15 세포의 배양에 사용된 배지는 RPMI-1640에 10% FBS 및 100 units/ml의 페니실린, 100 g/ml의 스트렙토마이신을 첨가하여 사용하였다. INS-1 세포의 배양에 사용된 배지는 RPMI-1640에 10% FBS 및 1 mM 피루베이트, 10 mM HEPES, 50 mM 2-머캅토에탄올, 100 units/ml 페니실린, 100 g/ml의 스트렙토마이신을 혼합하여 사용하였다. 두 베타세포주는 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다. 세포밀도(confluence)가 약 70~80%에 이르면 PBS(phosphate buffered saline)로 세척하고 0.05% 트립신-EDTA를 처리하여 계대배양하였다.

[122] **B. MTT 어세이**

[123] 베타세포주를 24-well 플레이트에 1×10^5 cells/well로 분주하고, 24시간 배양하여 세포밀도가 약 70~80% 되도록 맞췄다. 24 시간 후, 기존 배지를 제거하고 0.5% FBS가 포함된 RPMI-1640배지로 교체 후, 6시간 배양하며 증식과 분화 정지상태로 만들었다. MKX-2는 DMSO에 녹여, 0, 0.12, 1.2, 12, 60, 120 ng/ml의 농도로 H₂O₂처리 1시간 전에 전처리하였다. 대조군에는 DMSO 0.001%로 처리하여 비교하였다. MKX-2처리 1시간 후, H₂O₂를 2시간 또는 4시간

처리하여 반응시켰다. 각 well에 PBS 완충액에 녹인 MTT (5 mg/ml) 용액을 첨가하여 2~3시간 반응 후, well 바닥에 형성된 포르마잔이 흡여지지 않게 상등액을 제거하고 DMSO 250 ul 첨가하여 녹이고, ELISA reader (Molecular Devices Exax, Sunnyvale, CA)를 사용하여 540 nm (ref. 650 nm)에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 값을 정량적으로 분석하여 상대적인 세포성장 억제율을 구하였다.

[124]

[125] **5. 뇌경색 동물실험 방법 및 재료**[126] **A. 실험동물 및 뇌경색 실험모델**

[127] 본 실험에서는 Spague-Dawley (SD) 백서를 실험에 사용하였고 실험동물들은 무게가 280 g 내지 330 g이며 모두 Koatech Inc.(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 사용된 백서의 수는 모두 39 마리로 13 마리는 대조군으로 사용하였고, 나머지 26 마리는 MKX-2 치료군 13 마리, 그리고 에리스로포이에틴(EPO) 치료군 13 마리로 사용하였다.

[128] 뇌경색을 유발하기 위해, 좌측 중뇌동맥을 일시적으로 폐색한 후 재관류시키는 방법을 사용하였으며 고이즈미 방법을 변형하여 만든 동맥 내 세사 폐쇄 방법 (intraluminal filament technique)을 이용하였다. SD 백서를 70% nitrous oxide 및 30% oxygen의 혼합 기체와 함께 isoflurane (3% for induction and 2% for surgical procedure)으로 마취하였다. 수술 시 목의 중앙에서 약간 좌측으로 치우쳐 절개를 하였고 주변의 미주신경이 손상되지 않도록 좌측 총경동맥을 조심스럽게 박리하였다.

[129] 좌측 총경동맥을 black silk (3.0로) 견인하고 동측 외경동맥과 내경동맥을 박리하고 좌측 외경동맥을 먼저 결찰한 후 내경동맥을 견인하였다. Silicon resin (Xantopren; Bayer Dental, Osaka, Japan)으로 미리 코팅한 20 mm 길이의 4-0 nylon thread (Ethilon; Ethicon Norderstedt, Germany)를 외경동맥에 낸 구멍을 통해 밀어 넣어 좌측 중뇌동맥의 기시부를 폐색하였다. 삽입 후 외경동맥과 남은 nylon thread를 함께 결찰하여 출혈이나 nylon thread가 밀려나오는 것을 방지하였다. 수술 과정은 출혈 없이 15분 내에 이루어졌다. 두 시간이 경과한 후 좌측 총경동맥을 통한 완전한 재관류가 이루어지도록 nylon thread를 제거하였다.

[130] 중뇌동맥을 폐색/재관류시킨 직후 기 정해진 동물실험군에 따라 각각의 실험동물에 0.9% 생리식염수 또는 MKX-2 3.6 µg/kg 또는 에리스로포이에틴 3000iu/kg(에포론, 동아제약(주))을 좌측 외경정맥을 통하여 재관류 직후에 바로 투여하였다. 좌측중뇌동맥 폐색/재관류 시술과 약물투여가 끝난 후, 24 시간이 지나 백서를 희생하였다. 수술 전후로 백서들이 사료와 물에 자유롭게 접근할 수 있도록 하였다.

[131]

[132] **B. 뇌경색의 부피 측정**

[133] 뇌경색 부위를 결정하기 위해 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 염색을

이용하였다.

[134] 우선, 백서들에게 zoletile과 rompun을 근육 내로 주입하여 안락사 시켰으며 뇌는 두개골로부터 조심스럽게 분리하여 1분 동안 냉각된 0.9% 식염수에 담가두었다. 그 다음에 rodent brain matrix (RBM-4000C, ASI Instruments, Warrin, MI, USA)를 이용하여 frontal pole로부터 1 mm 되는 곳에서부터 2 mm 간격으로 두정면을 따라 절편하였다.

[135] 절편들은 2% 2,3,5-TTC (Sigma, St.Louis, MO, USA)를 포함하는 phosphate-buffer(PB)에 실온으로 1 시간 동안 보관하였다가 그 후에 10% phosphate-buffered formalin으로 고정하였다. 각각의 실험군의 고정된 두정면 절편을 촬영한 사진을 도 6에 나타내었다.

[136] 도 6은 뇌경색을 유발시킨 Sprague-Dawley 백서 모델에게 시험약물을 투여한 후 뇌를 분리하고 두정면을 따른 절편을 TTC 염색 후 촬영한 사진이다.

[137] 뇌경색 면적은 image analyzer with LeicaQwin program (Leica Microsystem Image Solution Ltd., Cambridge, England)로 측정하였고 부피(mm³)는 절편의 경색 부피(=절편의 경색 면적 X 두께)들의 합으로 계산하여 각 실험군의 평균과 표준편차를 구했다.

[138] **6. 심근세포 세포자멸사 실험**

[139] **A. 심근세포의 분리 및 배양**

[140] 생후 8주령의 Wistar 쥐를 준비한 후, 성체 쥐를 케타민과 펜토바비탈을 주입하여 사망케 한 후, 심장을 빠르게 분리하였다. 대동맥을 이용하여 역방향으로 심장 방향으로 34~37°C로 미리 덥혀둔 Ca free Krebs-Henseleit buffer 용액 (KHB)으로 5분간 관류시켰다. 이후 KHB 용액을 0.15% class II collagenase(Cooper Biomedical, Malvern, PA) 함유 Hank's balanced salt solution(HBSS:GIBCO, Grand Island, NY)으로 바꾸어 30~40분 정도 관류시켰다. 이후 세포배양액(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)으로 2회 반복하여 씻어냈다. 심실(ventricle)과 심방(atria)를 분리하고 심실조직만을 분리하여 잘게 분쇄한 후, 34~37°C로 미리 덥혀둔 class II collagenase 함유 culture medium(DMEM)으로 채워진 shaker에서 5분 정도 잘 저어줬다. 녹지 않은 결체조직은 필터를 통해 걸러내고 collagenase 함유 용액은 culture medium(DMEM) 용액으로 2회 반복하여 씻어냈다. 10g의 속도로 부드럽게 원심분리를 2분간 시행 후, 상층액은 분리하여 제거한 후, 세포 성분은 1% fetal bovine serum(FBS; Sigma Chemical, St. Louis, MO)이 함유된 배양배지(DMEM) 용액으로 3회 씻어주었다. 이후, 얻어진 세포는 배양배지(DMEM), 10% FBS, 10mM HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), GIBCO Laboratories, Grand Island, NY), 2mM L-glutamine, penicillin-streptomycin(100 IU/mL, GIBCO) 에서 60분간 안정시켰다. 세포들은 20X10³ 세포/cm²의 밀도로 6-well plaste에 분주하고 3일간 Bromodeoxyuridine(BrdU, 10uM, Sigma-Aldrich)을 배양액에 추가하여 섬유아세포(fibroblast)와 전구세포(progenitor)들의 증식을

막았다(Lokuta et al, 1994; Miragoli et al., 2006).

[141] 세포들은 다음 실험을 위해 95% O₂, 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양하였다.

[142] **B. TUNEL 어세이**

[143] MKX-2 처치를 위해 배양세포를 대조군과 실험군으로 나누었으며, 처치를 하기 전에 두 군 모두 FBS가 포함되어 있지 않은 배양액으로 바꾸어 주었다. 처치시간은 대조군, 실험군 모두 0, 12, 24시간으로 나누었으며, MKX-2의 농도는 0.1와 0.01 ng/ μ l로 나누어 처치하였다. 대조군과 실험군 모두 세포자연사 (apoptosis)를 유도하기 위하여 MKX-2를 처치하기 30분 전 0.03% H₂O₂를 투여했다.

[144] 6-well plate 안에 커버글라스(cover glass)를 넣고 그 위에서 배양된 세포를 PBS(phosphate buffered solution)으로 세척한 다음 100% 에탄올로 실온에서 5초 고정시킨 후, PBS로 다시 한번 세척해주었다. 새로 만든 permeabilization solution(0.1% Triton X-100 + 0.1% sodium citrate)을 넣어 37°C 배양기에서 10분간 처리하였다. 이후 PBS로 5분간 2번 세척하고, In situ cell death detection kit(Roche, Germany)에 들어 있는 라벨(label) 용액과 효소 용액의 혼합액을 각 커버글라스마다 30 μ l 떨어뜨려 준 뒤, 파라필름(parafilm)으로 살짝 덮었다. 37°C 배양기에서 1 시간 반응시키고, PBS로 5 분간 2 번 씻어준 뒤, DAPI (Sigma)를 10분간 실온에서 처리했다. PBS로 세척 후 형광현미경을 이용하여 관찰하면서 임의로 선택된 10 곳을 선정한 뒤, DAPI로 염색된 세포와 TUNEL positive를 보이는 세포의 수를 개수하고 그 비율을 계산하였다.

[145] **결과**

[146] **1. 심근세포에서 펩타이드 MKX-2의 세포 보호효과**

[147] 상기 심근세포의 분리 및 배양에 따라 얻어진 심근세포를 96 웰 플레이트에 각 웰당 세포를 2x10⁴세포/웰, 200 μ l씩 접종하고 24 시간 후 세포 안정화가 이루어지면 26 or 28 게이지의 니들을 이용하여 웰내 기존의 배지를 제거했다.

[148] 혈청과 영양물질이 없는 FBS 200 μ l를 투여하고 EPO 치료군과 MKX-2 치료군을 나눈 후, EPO 및 MKX-2 치료군은 0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 nM의 용량에 따른 실험군으로 나누고 각각 72 시간 동안 약물치료 후 MTT 어세이 방식으로 세포생존율을 비교하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[149] 도 1은 심근세포에 EPO 및 MKX-2를 다양한 농도별로 처리한 다음 72 시간 동안 배양 후 MTT 어세이 방식으로 세포생존율을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.

[150] 72시간 후 0 nM을 기준으로 세포 생존율을 100%로 기준을 정하였을 때, 0.1nM 치료시에는 초기와 큰 차이를 보이지 않았으나, 1nM 농도에서는 양 치료군이 모두 감소하는 경향을 보였으며 두 군간의 차이는 없었다. 이후 10 nM 농도에서는 MKX-2군이 EPO 치료군에 비해 세포생존율에서 우위를 보였으며(102.67+3.22% vs. 94.52+4.36%, p=0.002), 100nM(112.28+2.17% Vs. 102.64+2.69%, p<0.001), 1000nM(115.05+0.90% Vs. 106.97+1.99%, p=0.001)

치료군에서도 비교 우위를 보였다.

[151] **2. 신경세포에서 펩타이드 MKX-2의 세포 보호효과**

[152] 상기 신경세포의 분리 및 배양에 따라 얻어진 신경세포를 96 웰 플레이트에 각 웰당 세포를 2×10^4 세포/웰, 200ul씩 접종하고 24 시간 후 세포 안정화가 이루어지면 26 또는 28 게이지의 니들을 이용하여 웰내 기존의 배지를 제거했다.

[153] 혈청과 영양물질이 없는 FBS 200 ul를 투여하고 EPO 치료군과 MKX-2 치료군을 나누는 후, EPO 치료군은 다시 혈청 제거 후 EPO 비치료군, 1 IU/ml, 10 IU/ml 치료군으로 나누고 각각을 다시 신경독성물질인 0.1% 2-머캅토에탄올을 18시간 처치한 군과 비치료군으로 나누어 비교하였다. 마찬가지로 MKX-2 치료군도 혈청 제거 후 MKX-2 비치료군, 1.2ng/ml, 12ng/ml 치료군으로 나누고 각각을 다시 신경독성물질인 0.1% 2-머캅토에탄올을 18시간 처치한 군과 비치료군으로 나누어 비교하였다. 또한 음의 대조군을 위해 정상 배양액과 조건에서 배양된 군을 설정하여 이들간의 비교를 시행하였다. 각각 72 시간 동안 약물치료 환경에서 배양되었고 생존하고 있는 신경세포는 형광물질이 함유된 칼세인-AM 어세이를 이용하여 이를 형광분석기를 이용하여 정량적으로 분석하였다. EPO 1 IU/ml은 10 ng/ml이며 EPO 10 ng/ml과 MKX-2 1.2ng/ml은 공히 0.54 nM로 같은 농도로 맞추어 시행하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[154] 도 2는 심근세포에 EPO 및 MKX-2를 각각 농도별로 처리한 다음 72 시간 동안 배양 후 MTT 어세이 방식으로 세포생존율을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.

[155] 72 시간 후 정상 배양한 군의 세포생존율을 100%로 정하였을 때, EPO를 처리한 군에서 EPO를 처리하지 않은 군에 비해 약 2배의 높은 유의미한 세포 생존율의 증가를 보였으며 증가한 EPO 농도에 따라 세포생존율도 증가하는 양상을 보였다(비치료군: EPO(1 IU/ml): EPO(10 IU/ml)= 18.60%: 41.64%: 48.57%). MKX-2 처치군 역시 유사한 결과를 보였으며(비치료군: MKX-2(1.2 ng/ml): MKX-2(12 ng/ml)= 18.60% : 46.05% : 52.85%) 양 군간의 차이에 통계적 의의는 없었다.

[156] 2-머캅토에탄올에 노출된 신경세포는 노출되지 않은 후각신경세포에 비해 약 50%의 높은 세포사망율을 보였다.

[157] 2-머캅토에탄올에 노출 후, EPO를 1U/ml 를 처리한 경우 비치료군에 비하여 세포생존율에는 의미있는 증가가 없었으며(5.89% : 6.98%, $p=0.19$) 10U/ml를 처리한 경우 통계적으로 유의한 수준의 신경세포 보호효과를 보였다(5.89% : 11.70%, $p=0.02$).

[158] MKX-2 를 1.2ng/ml 처리한 군에서는 비치료군에 비해 세포생존율에 의미있는 증가를 보였으며(5.89% : 25.72%, $p=0.005$) 12ng/ml 치료군에서도 역시 신경세포 보호효과를 보였으며(5.89% : 24.12%, $p=0.007$) EPO 치료군과의 비교에서 각각의 농도에서 모두 EPO에 비해 우월한 세포생존율을 보였다($p<0.001$, $P=0.002$).

[159] **3. 망막신경세포에서 펩타이드 MKX-2의 세포 보호효과**

- [160] 상기 망막신경세포의 분리 및 배양에 따라 얻어진 망막신경세포를 96웰 플레이트에 각 웰당 세포를 2×10^4 cells/well, 200 μ l씩 접종하고 24시간 후 세포 안정화가 이루어지면 26 or 28 게이지의 니들을 이용하여 웰 내 기존의 배지를 제거했다.
- [161] 혈청과 영양물질이 없는 FBS 200 μ l를 투여하고 EPO 치료군과 MKX-2 치료군을 나누는 후, EPO 및 MKX-2 치료군은 0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 nM의 용량에 따른 실험군으로 나누고 각각 72 시간 동안 약물치료 환경에서 배양되었고 생존하고 있는 망막신경세포는 MTT 어세이를 이용하여 이를 형광분석기를 이용하여 정량적으로 분석하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [162] 도 3은 망막신경세포에 EPO 및 MKX-2를 각각 농도별로 처리한 다음 72 시간 동안 배양 후 MTT 어세이 방식으로 세포생존율을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [163] 72 시간 후 0 nM을 기준으로 세포 생존율을 100%로 기준을 정하였을 때, 0.1nM, 1nM 치료시에는 양군 모두 0 nM 기준보다는 세포 생존율은 증가하였으나 양군 모두 통계적 의의는 없었다. 이후 10nM 농도에서는 양군 모두 세포 생존율은 0 nM과 비교하여 의미있게 증가하였으나 MKX-2 치료군과 EPO 치료군간의 통계적 의의는 없었다(128.03% vs. 118.62%, $p=0.065$). 100 nM 치료군에서는 양군 모두 세포 보호능력을 보였으나 MKX-2 치료군이 EPO 치료군에 비해 세포생존율에서 우위를 보였으며(144.41% Vs. 127.6%, $p=0.002$), 1000 nM 그룹에서도 MKX-2 치료군에서 비교 우위를 보였다(149.80% Vs. 124.77%, $p=0.001$).
- [164] **4. 췌장 베타세포에서 펩타이드 MKX-2의 세포 보호효과**
- [165] 위의 기술한 내용대로 췌도의 베타세포주인 HIT-T15 와 INS-1 세포를 배양하여 24-well plate에 각각 well당 1×10^5 cells/well을 분주하고 안정화시킨 후, 실험 당일 기존의 배지를 조심스럽게 제거한 후 남아있는 소량의 배지까지 세척해 낸다. 이후 0.5% FBS를 포함한 RPMI-1640 배지로 6시간 배양하여 증식과 분화를 정지시킨다. MKX-2 치료군과 MKX-2를 녹일 때 사용된 DMSO만을 동일용량 집어넣은 대조군을 나누는 후, MKX-2 치료군은 0, 0.12, 1.2, 12, 60, 120 ng/ml의 용량으로 처리하고, 스트레스를 주기 위하여 H_2O_2 (100 M)를 2 시간 또는 4 시간 동안 처리 후, MTT 어세이 방식으로 세포 생존율을 비교하였다. 그 결과를 도 4 및 도 5에 도시하였다.
- [166] 도 4는 베타세포 HIT-T15에 MKX-2를 각각 농도별로 전처리한 다음 H_2O_2 를 2 시간(도 4a) 또는 4 시간(도 4b) 처리 후 MTT 어세이 방식으로 세포생존율을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [167] 도 5는 베타세포 INS-1에 MKX-2를 각각 농도별로 전처리한 다음 H_2O_2 를 2 시간(도 5a) 또는 4 시간(도 5b) 처리 후 MTT 어세이 방식으로 세포생존율을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [168] H_2O_2 처리 2 시간 또는 4 시간 후 0 ng/ml을 기준으로 세포 생존율을 100%로

기준을 정하였을 때, 0.12와 1.2 ng/ml 치료 시에는 두 베타세포 모두 초기 MKX-2를 처리하지 않은 경우와 비교하여 통계적 차이를 보이지 않았으나, MKX-2를 처리하지 않은 경우와 비교했을 때 HIT-T15 세포에서는 12, 60 과 120 ng/ml 농도에서 통계적으로 유의하게 세포생존율이 증가하였으며(H_2O_2 2시간 처치 시: 78.5%+0.92(12 ng/ml), 92.3%+5.24(60 ng/ml), 104.1%+2.87(120 ng/ml) Vs. 71%+1.44(미처치); H_2O_2 4시간 처치 시: 59.57%+2.09(12 ng/ml), 67.19%+1.05(60 ng/ml), 84.73%+4.82(120 ng/ml), Vs. 52.46%+1.20(미처치)), INS-1세포는 60과 120 ng/ml에서 통계적으로 유의하게 세포생존율이 증가하였다(H_2O_2 2시간 처치 시: 86.4%+4.79(60 ng/ml), 95.0%+4.53(120 ng/ml), Vs. 77.6%+1.02(미처치); H_2O_2 4시간 처치 시: 64.39%+1.65(60 ng/ml), 83.60%+5.76(120 ng/ml), Vs. 58.26%+2.56(미처치)).

[169] **5. 뇌경색 동물실험에서 MKX-2의 조직 보호효과**

[170] 상기 뇌경색 동물모델을 이용한 실험방법에 따라 각 실험군을 음성대조군, MKX-2 치료군, 에리스로포이에틴 치료군(양성대조군)을 각각 비교하였다.

[171] 음성대조군은 좌측 중뇌동맥(middle cerebral artery)의 폐색 후, 2 시간이 경과된 후, 폐색을 유도한 Nylon thread를 제거하여 완전한 재관류가 일어나도록 유도한 후, 즉시 0.9% 생리식염수를 투여하였다. MKX-2 치료군은 동일한 과정을 시행 후, 0.9% 생리식염수 대신 MKX-2 3.6 μ g/kg를 투여하였으며, 에리스로포이에틴 치료군은 에리스로포이에틴 3000 IU/kg(에포론, 동아제약(주))를 투여하였다.

[172] 각 군은 공히 24시간이 지난 후, 위에 기술한 방법으로 실험동물들을 희생시킨 후, 뇌를 적출하여 상기 기술한 방법으로 뇌경색의 양을 측정하였다. 그 결과로도 7에 그래프로서 나타내었다.

[173] 도 7은 뇌경색을 유발시킨 Sprague-Dawley 백서 모델에게 시험약물을 투여한 후 뇌를 분리하고 두정면을 따른 절편을 TTC 염색 후 뇌경색 면적을 측정된 결과를 도시한 그래프이다.

[174] 24 시간 후 0.9% 생리식염수를 투여한 음성대조군의 뇌경색양은 $318.70 + 29.64 \text{ mm}^3$ 이었고, 에리스로포이에틴 치료군의 뇌경색양은 $246.27+37.52 \text{ mm}^3$, MKX-2치료군의 뇌경색양은 $159.24+27.78 \text{ mm}^3$ 로 음성대조군에 비해 에리스로포이에틴 치료군은 뇌경색의 양이 의미 있게 줄어든 것을 확인할 수 있었으며($318.70+29.64 \text{ mm}^3$ Vs. $246.27+37.52 \text{ mm}^3$, $p=0.05$)음성대조군에 비하여 MKX-2 치료군 역시 뇌경색의 양이 의미있게 줄어든 것을 확인할 수 있었다($318.70+29.64 \text{ mm}^3$ Vs. $159.24+27.78 \text{ mm}^3$, $p<0.001$). 에리스로포이에틴 치료군과 MKX-2 치료군과의 비교에서는 에리스로포이에틴 치료군보다 MKX-2 치료군이 뇌경색의 양이 의미있게 더 감소하며 비교우위를 보이는 것을 확인할 수 있었다($246.27+37.52 \text{ mm}^3$ Vs. $159.24+27.78 \text{ mm}^3$, $p=0.05$).

[175] **6. 심근세포 세포자멸사실험에서 MKX-2의 세포 보호효과**

[176] 상기 심근세포 자멸사실험을 이용한 실험방법에 따라 각 실험군을 대조군, MKX-2 0 시간 치료군, 12시간 치료군, 24시간 치료군으로 나누고, MKX-2

치료군은 각각 0.01 ng/uL, 0.1 ng/uL의 두가지 치료군으로 나누어 실험을 진행하였다. 대조군은 기준시점, 12 시간 후, 및 24 시간 후에 DAPI로 염색된 세포와 TUNEL positive를 보이는 세포의 수를 개수하고 그 비율을 계산하였다. 동일한 방법으로 MKX-2 치료군은 0.01 ng/uL, 0.1 ng/uL 농도로 처리하여 0 시간, 12 시간, 24 시간 치료 후 DAPI로 염색된 세포와 TUNEL positive를 보이는 세포의 수를 개수하고 그 비율을 계산하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[177] 도 8은 Wistar 쥐로부터 얻어짐 배양된 심근세포에 대해 TUNEL 어세이 결과 DAPI로 염색된 세포와 TUNEL positive를 보이는 세포의 수를 개수하고 그 비율을 계산한 결과를 도시한 그래프이다.

[178] 0 시간, 12 시간, 24 시간 후 대조군의 TUNEL positive 세포수/DAPI염색세포수는 각각 $3.74 \pm 0.67\%$, $65.52 \pm 5.09\%$, $68.13 \pm 2.27\%$ 였고, 0 시간과 비교하여 12시간($3.74 \pm 0.67\%$ Vs. $65.52 \pm 5.09\%$, $p < 0.001$)과 24시간($3.74 \pm 0.67\%$ Vs. $68.13 \pm 2.27\%$, $p < 0.001$)에서 통계적으로 유의하게 증가하였다. MKX-2 0.01 ng/uL 치료군의 0 시간, 12 시간, 24 시간 후 TUNEL positive 세포수/DAPI염색세포수는 $10.12 \pm 2.03\%$, $35.82 \pm 3.95\%$, $44.16 \pm 3.34\%$ 로 0 시간과 비교하여 12 시간($10.12 \pm 2.03\%$ Vs. $35.82 \pm 3.95\%$, $p < 0.05$)과 24 시간($10.12 \pm 2.03\%$ Vs. $44.16 \pm 3.34\%$, $p < 0.05$)에서 통계적으로 유의하게 증가하였고, MKX-2 0.1 ng/uL 치료군의 0 시간, 12 시간, 24 시간 후 TUNEL positive 세포수/DAPI염색세포수는 $5.38 \pm 2.36\%$, $44.35 \pm 3.91\%$, $47.97 \pm 2.85\%$ 였으며 0 시간과 비교하여 12 시간($5.38 \pm 2.36\%$ Vs. $44.35 \pm 3.91\%$, $p < 0.05$)과 24 시간($5.38 \pm 2.36\%$ Vs. $47.97 \pm 2.85\%$, $p < 0.05$)에서 통계적으로 역시 비슷한 결과를 보여주었다.

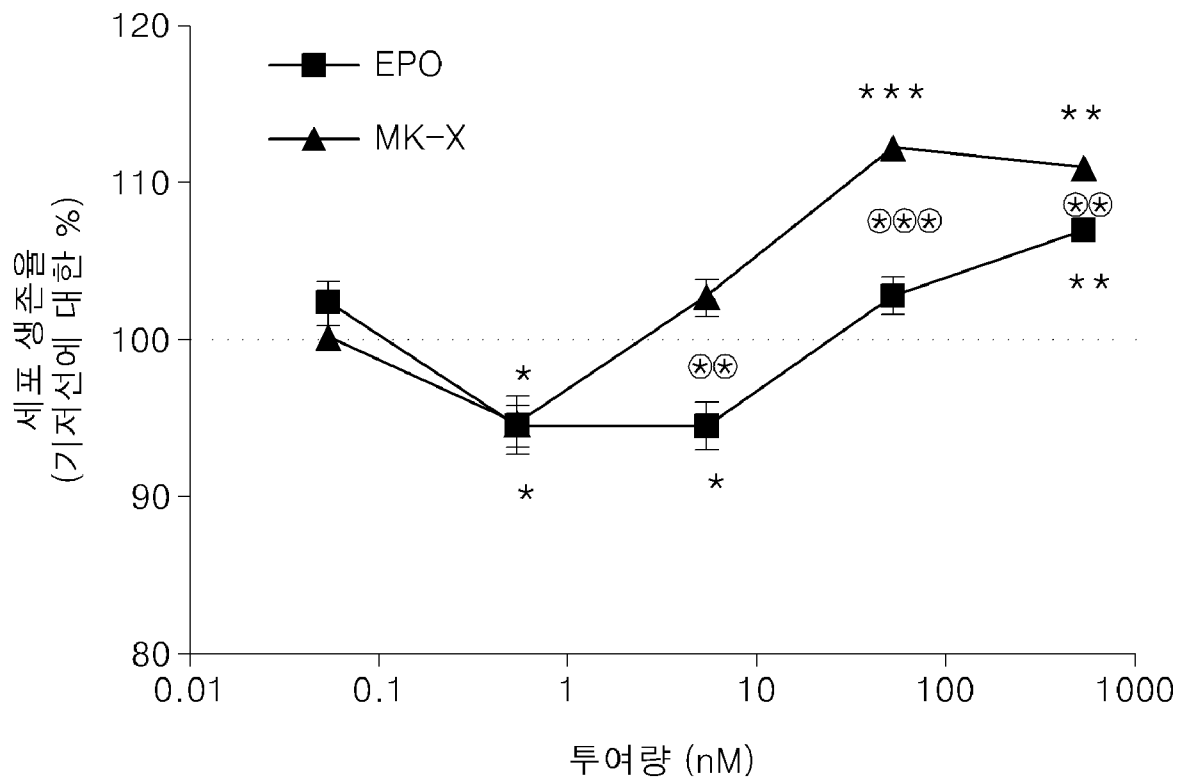
[179] 기준시점에서의 대조군, MKX-2 0.01 ng/uL 치료군, MKX-2 0.1 ng/uL 치료군간의 TUNEL positive 세포수/DAPI염색세포수의 차이는 통계적으로 의미가 없었으나 12 시간 치료 시점에서 대조군과 비교하여 MKX-2 0.01 ng/uL 치료군($65.52 \pm 5.09\%$ Vs. $35.82 \pm 3.95\%$, $p < 0.05$), MKX-2 0.1 ng/uL 치료군($65.52 \pm 5.09\%$ Vs. $44.35 \pm 3.91\%$, $p < 0.05$)은 통계적으로 의미있는 차이를 보였고, 24 시간 치료 시점에서도 대조군과 비교하여 MKX-2 0.01 ng/uL 치료군($68.13 \pm 2.27\%$ Vs. $44.16 \pm 3.34\%$, $p < 0.05$), MKX-2 0.1 ng/uL 치료군($68.13 \pm 2.27\%$ Vs. $47.97 \pm 2.85\%$, $p < 0.05$)은 통계적으로 의미있는 차이를 보였다. 12 시간 치료시점과 24 시간 치료시점에서의 MKX-2 0.01 ng/uL 치료군, MKX-2 0.1 ng/uL 치료군 간에는 양군간에 통계적으로 의미있는 차이가 없었다.

[180] 위의 결과는 MKX-2의 세포보호기능이 항세포자멸사(antiapoptosis)의 기전에 의해 이루어짐을 시사한다.

청구범위

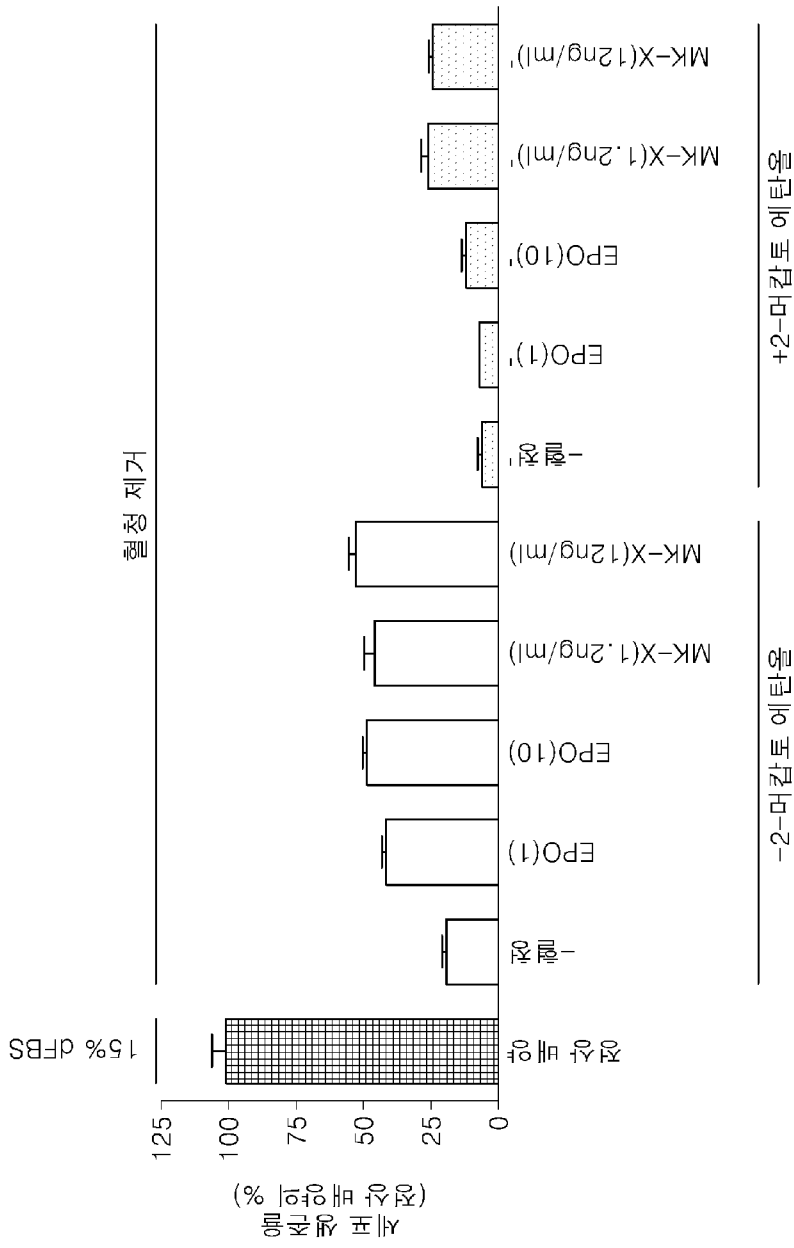
- [청구항 1] 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 갖는 세포, 조직, 또는 기관 손상의 예방 또는 치료에 효과적인 펩타이드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 에리스로포이에틴(EPO)에서 유래된 것을 특징으로 하는 펩타이드.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 따른 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 세포, 조직, 또는 기관 손상의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 세포, 조직, 또는 기관이 척수, 뇌, 심장, 망막, 피부, 근육, 폐, 간, 신장, 소장, 부신, 혈관, 방광, 요도, 위, 장관, 신경, 고환, 난소, 또는 자궁의 세포, 조직, 또는 기관인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 손상이 뇌졸중, 신경계의 기계적 손상 또는 허혈성 손상, 심근경색, 다발성 경화증, 발작, 저혈압, 심장 마비, 허혈증, 심근 경색, 염증, 인지 기능의 나이와 연관된 손실, 방사선 손상, 대뇌 마비, 신경퇴화성 질병, 알츠하이머병, 파킨슨병, 라이(Leigh)병, AIDS성 치매, 기억 손상, 근위축성 측삭 경화증, 알콜중독, 기분 장애, 불안 장애, 주위력 결핍 장애, 자폐증, 크로이츠펠트야콥병, 뇌 또는 척수 외상 또는 허혈증, 심장-뇌 마이페이스, 만성 심장 부전, 노화에 의한 시력 감퇴, 당뇨병성 신경 장애, 당뇨병성 신장 장애, 녹내장, 망막성 허혈증 또는 망막 외상에 기인한 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

[Fig. 1]

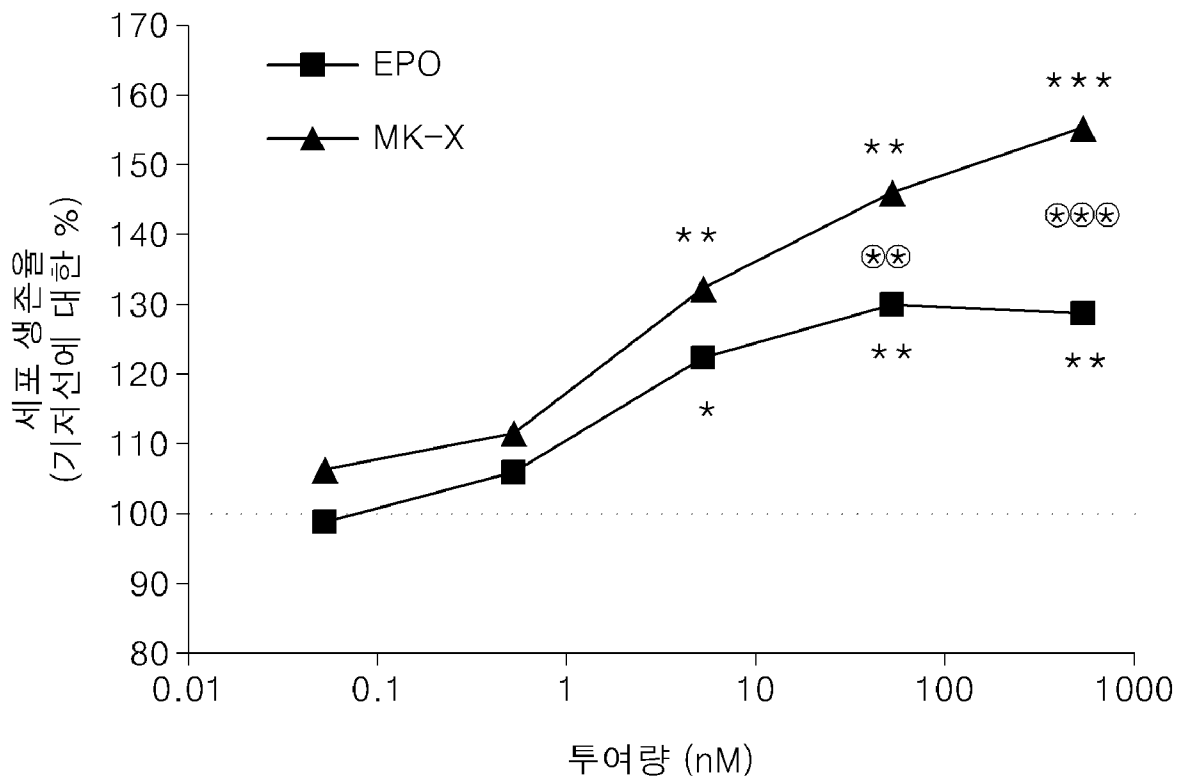


* : 자체 치료군의 0.1nM과의 비교
 ⊗ : 에리스로포이에틴군과 MKX군과의 비교
 ** , ⊗⊗ : p<0.005
 *** , ⊗⊗⊗ : p<0.001

[Fig. 2]



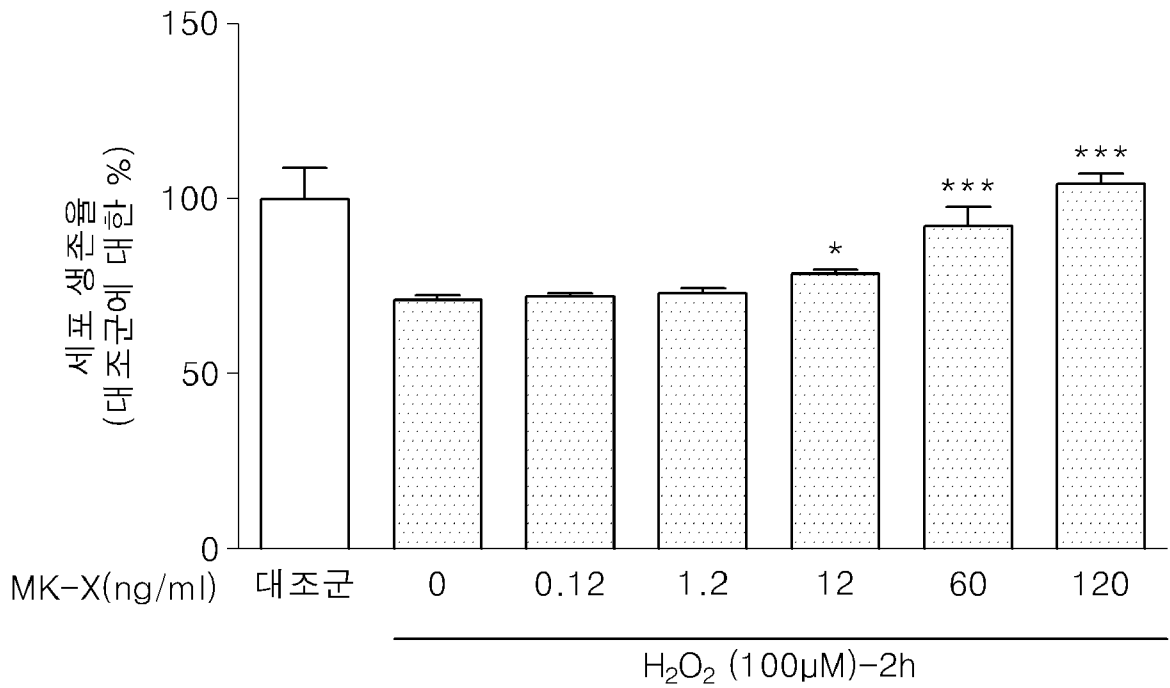
[Fig. 3]



* : 자체 치료군의 0.1nM과의 비교
 ⊗ : 에리스로포이에틴군과 MKX군과의 비교
 ** , ⊗⊗ : p<0.005
 *** , ⊗⊗⊗ : p<0.001

[Fig. 4a]

HIT-T15 세포, H₂O₂ 2시간 처치군

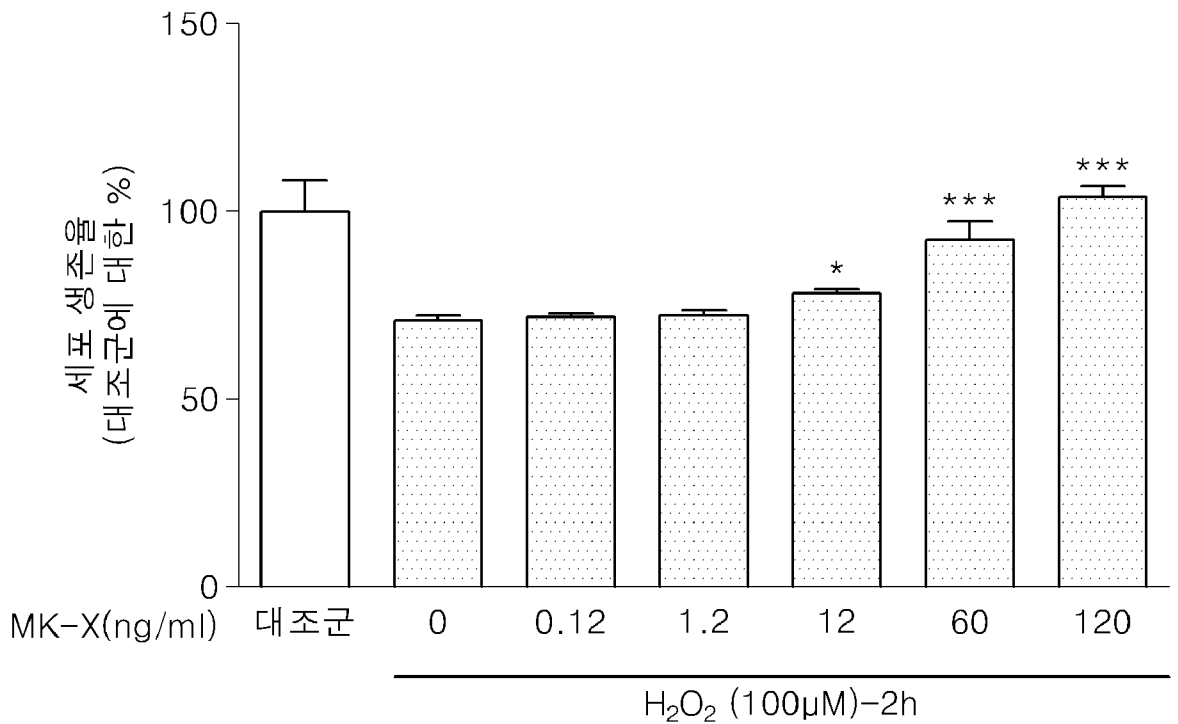


* P < 0.05 vs H₂O₂ 단독

*** P < 0.001 vs H₂O₂ 단독

[Fig. 4b]

HIT-T15 세포, H₂O₂ 4시간 처치군

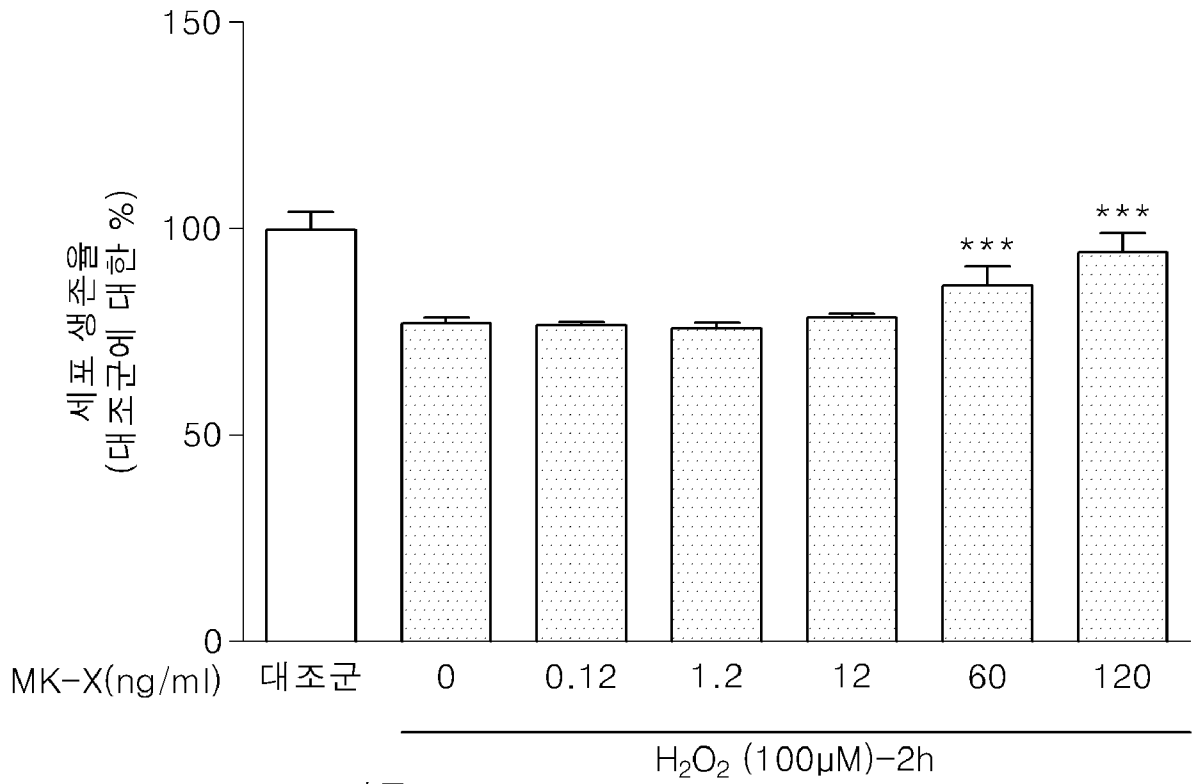


* P < 0.05 vs H₂O₂ 단독

*** P < 0.001 vs H₂O₂ 단독

[Fig. 5a]

INS-1 세포, H₂O₂ 2시간 처치군

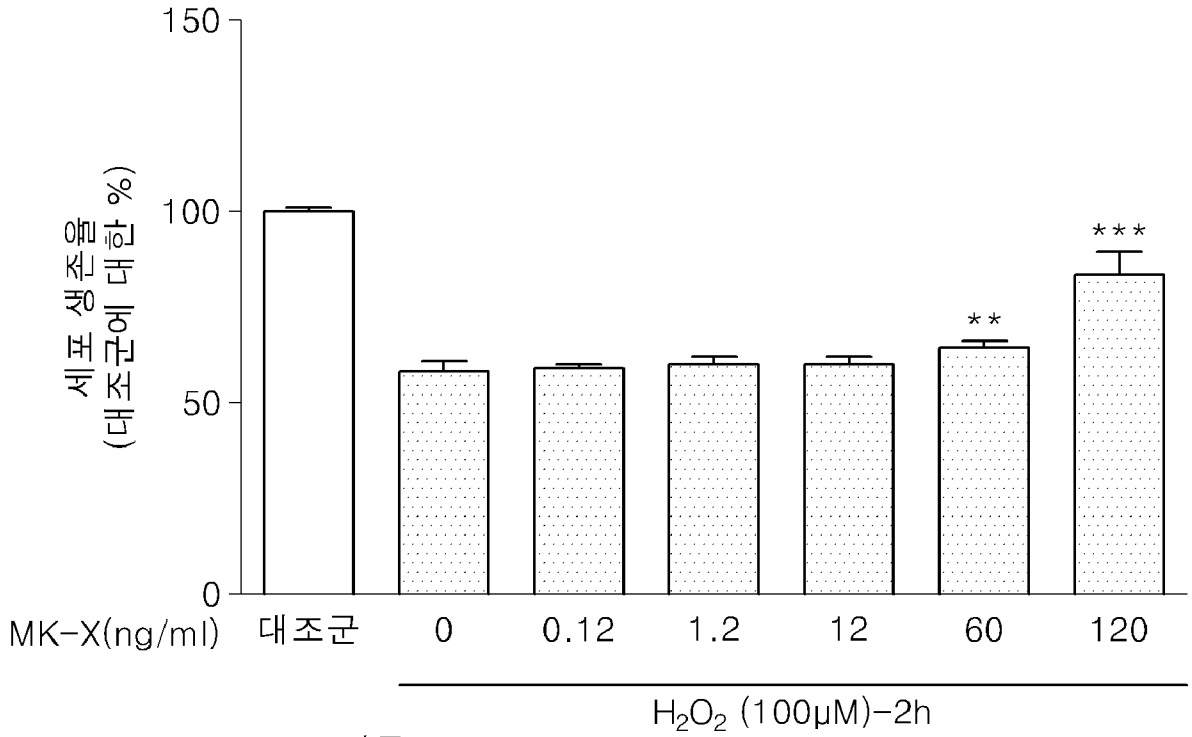


** P < 0.01 vs H₂O₂ 단독

*** P < 0.001 vs H₂O₂ 단독

[Fig. 5b]

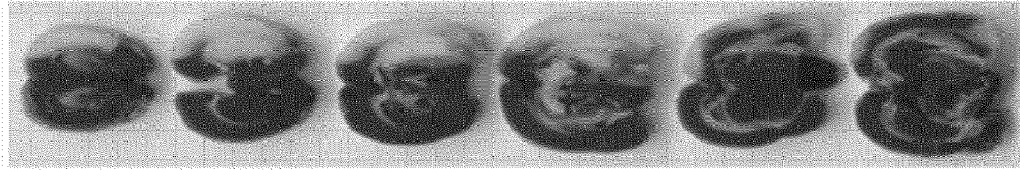
INS-1 세포, H₂O₂ 4시간 처치군



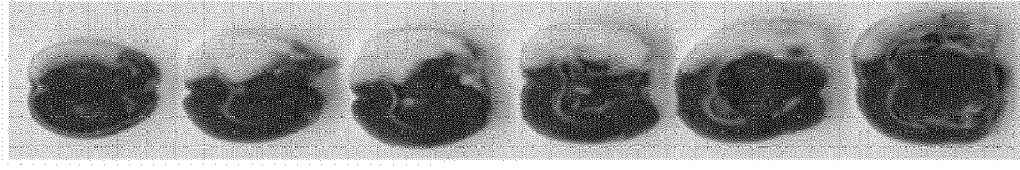
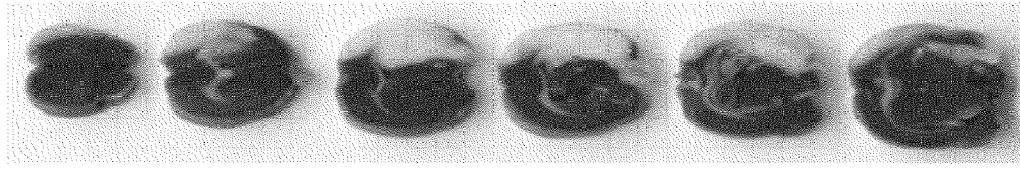
** P < 0.01 vs H₂O₂ 단독

*** P < 0.001 vs H₂O₂ 단독

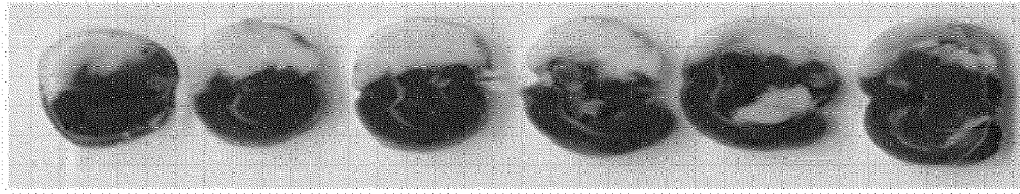
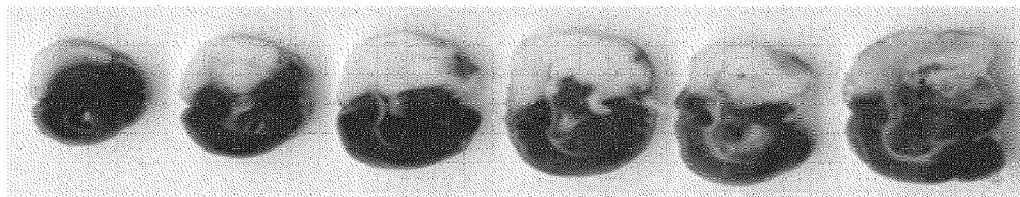
[Fig. 6]



MKK 3.6 ng/kg

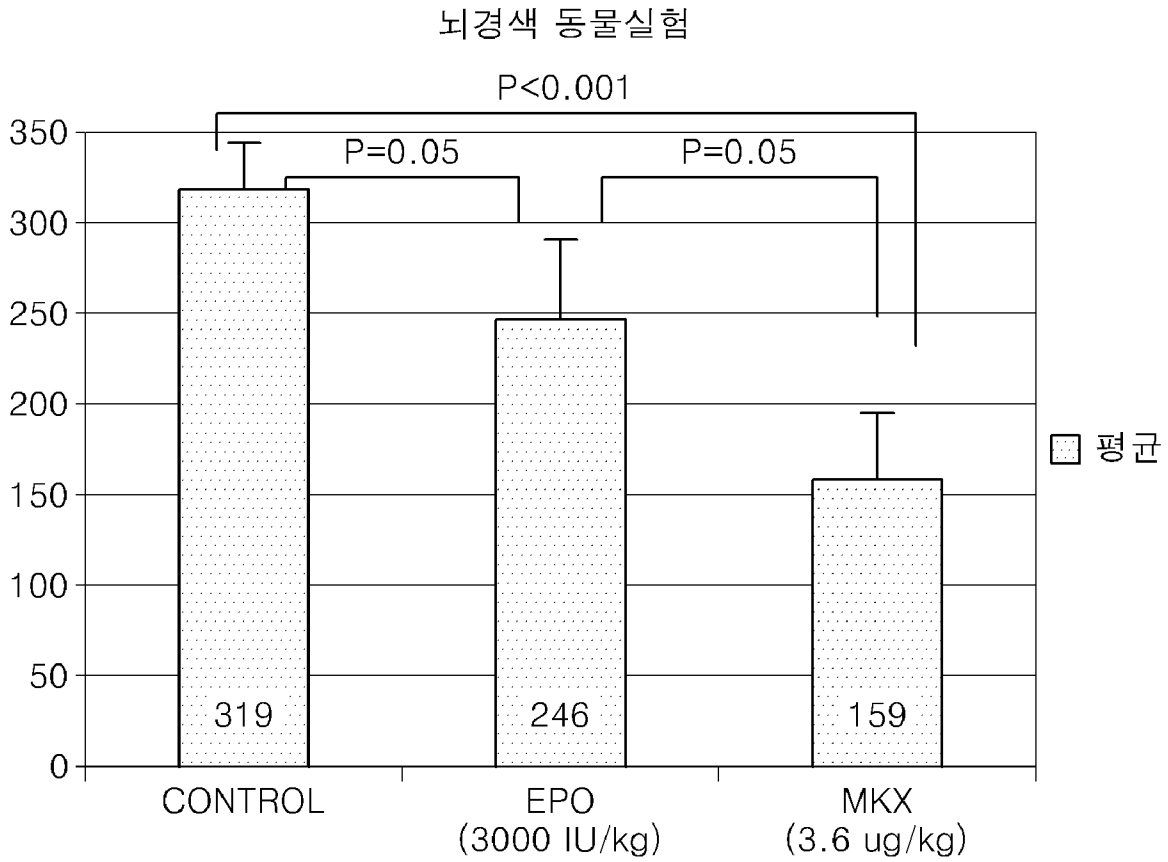


EPO 3000 IU/kg

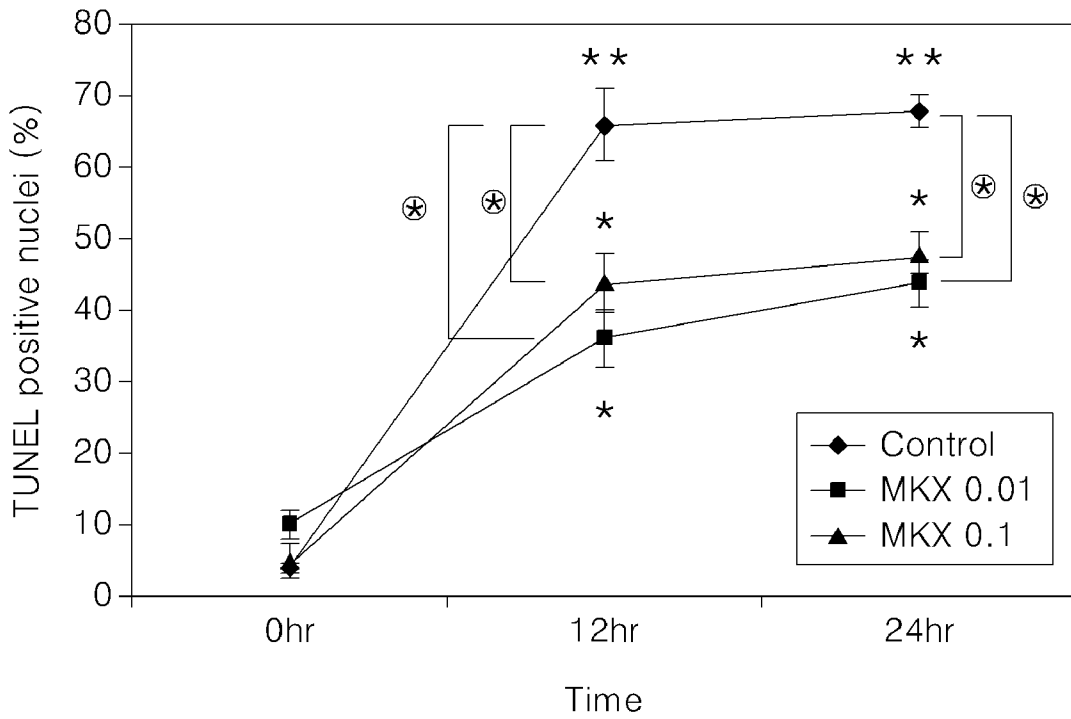


CONTROL

[Fig. 7]



[Fig. 8]



* p<0.05, ** p<0.001
⊗ p<0.05, ⊗⊗ p<0.001