



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0017428

(43) 공개일자 2015년02월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/704 (2006.01) A61K 31/70 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0091220

(22) 출원일자 2013년07월31일

심사청구일자 2013년07월31일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

윤태영

서울 중랑구 공릉로18길 59, 101동 804호 (목동, 브라운스톤태릉아파트)

이지윤

서울 중랑구 공릉로18길 59, 103동 1204호 (목동, 브라운스톤태릉아파트)

최혜영

서울 중랑구 숙선동 91, 407동 703호 (목동, 신내4단지신내아파트)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 10 항

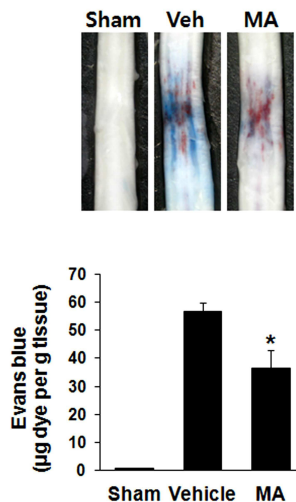
(54) 발명의 명칭 미스라마이신 A를 유효성분으로 함유하는 중추신경계 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 미스라마이신 A(mithramycin A)를 유효성분으로 함유하는 중추신경계 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 상기 미스라마이신 A가 척수손상 후 MMP(Matrix metalloproteinase)-9의 발현 및 활성을 저해하고, 내피세포 간 폐쇄연접의 분해를 억제하여 뇌혈관장벽을 보호하고 뇌혈관장벽 파괴를 억제하며, TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2, 및 iNOS와 같은 염증성 인자의 발현을 억제하여 염증세포의 침윤현상을 완화하고, Gro- α , MIP-2 α , MCP-1, 및 MIP-1 α 와 같은 화학유인물질의 발현을 억제시켜 척수손상에 의한 운동기능을 회복시키는 효과를 나타내므로, 상기 미스라마이신 A를 중추신경계 질환 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도3a

a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0019349

부처명 한국연구재단

연구관리전문기관 한국과학기술연구원

연구사업명 첨단융합기술개발사업(미래유망융합기술파이오니어사업)

연구과제명 다공성 고분자/신경소자 이식에 따른 손상된 척수신경 재생평가 기술연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.03.01 ~ 2016.02.29

특허청구의 범위

청구항 1

미스라마이신 A(mithramycin A)를 유효성분으로 함유하는 뇌혈관장벽 장애 및 중추신경계 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 미스라마이신 A는 MMP(matrix metalloproteinase)-9의 발현 및 활성을 억제하고, 폐쇄 연결 단백질(tight junction protein, TJP) 분해를 억제하는 것을 특징으로 하는 뇌혈관장벽 장애 및 중추신경계 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 미스라마이신 A는 염증세포의 침윤현상을 완화하고, 염증성 인자 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 뇌혈관장벽 장애 및 중추신경계 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 미스라마이신 A는 혈액세포 화학유인물질(chemoattractant)의 발현을 억제하고, 척수손상에 의한 운동기능 저하를 회복시키는 것을 특징으로 하는 뇌혈관장벽 장애 및 중추신경계 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 뇌혈관장벽 장애는 중추신경계 질환으로 인한 것을 특징으로 하는 뇌혈관장벽 장애 및 중추신경계 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 중추신경계 질환은 척수손상, 뇌졸중, 뇌경색, 뇌허혈, 알츠하이머병, 및 다발성 경화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 뇌혈관장벽 장애 및 중추신경계 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

미스라마이신 A를 유효성분으로 함유하는 뇌혈관장벽 장애 및 중추신경계 질환 예방 및 개선용 건강식품.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 뇌혈관장벽 장애는 중추신경계 질환으로 인한 것을 특징으로 하는 뇌혈관장벽 장애 및 중추신경계 질환 예방 및 개선용 건강식품.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 중추신경계 질환은 척수손상, 뇌졸중, 뇌경색, 뇌허혈, 알츠하이머병, 및 다발성 경화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 뇌혈관장벽 장애 및 중추신경계 질환 예방 및 개선용 건강식품.

청구항 10

제 7항에 있어서, 상기 미스라마이신 A는 MMP(matrix metalloproteinase)-9의 발현 및 활성을 억제하고, 폐쇄연접 단백질(tight junction protein, TJP) 분해를 억제하는 것을 특징으로 하는 뇌혈관장벽 장애 및 중추신경계 질환 예방 및 개선용 건강식품.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 미스라마이신 A(mithramycin A)를 유효성분으로 함유하는 중추신경계 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

중추신경계(central nervous system, CNS) 조직에는 여러 가지 이유로 병변이 생길 수 있다. CNS 병변의 주된 원인 중 하나인 뇌졸중은 뇌의 일정 부위의 순환이 갑자기 멈추어, 그 부위에 상응하는 신경의 기능이 손실되는 결과를 초래하는 것이 특징이다. 뇌혈관 사고 또는 뇌졸중 증후군으로 불리기도 하는 뇌졸중은, 혈전성, 색전성, 출혈성 뇌졸중을 포함하는 이질적인 병원을 모두 포함하는 포괄적인 용어이다. 최근의 연구에서는 모든 유형의 뇌졸중을 통틀어 연간 500,000건을 초과하는 신규 뇌졸중 발생율을 보고한 바 있다. 뇌졸중은 사망 및 장애를 초래한다.

[0003]

뇌경색(cerebral infarction)은 혈관의 동맥경화증으로 인한 뇌동맥의 혈전이나 색전과 심장질환 등에 의한 심인성 색전이 주된 원인이다. 뇌혈관이 막혀서 발생하게 되는 뇌경색증은 다시 뇌혈전증과 뇌 색전증으로 구분하게 된다. 뇌혈전증은 고혈압, 당뇨병, 고지혈증 등에 의하여 동맥경화증이 초래되어 동맥의 벽이 두꺼워 지거나 딱딱해지게 된다. 이로 인해 혈관이 좁아지고 혈관의 안벽이 상처받기 쉬워 매끄럽지 못해서 피가 엉겨 붙으면서 막히게 되어 혈액의 공급이 현저히 감소하거나 중단되어 뇌세포로 가는 산소 및 영양공급이 부족하여 뇌기능의 장애가 초래된다. 뇌 색전증은 심장판막증 또는 심방세동 등의 질환에 의하여 심장 내의 피의 흐름에 이상이 생겨 혈액의 일부가 심장 내에 부분적으로 정체해 있게 되고 따라서 응고되어 피 찌꺼기가 생기게 되며, 이것이 떨어져 나가 뇌혈관을 막게 되어 뇌경색이 발생하게 된다.

[0004]

알츠하이머병(AD; Alzheimer's disease)은 신경세포(neuron) 상실과, 아밀로이드 전구체 단백질로부터 유래된 39-43 아미노산 펩티드인 아밀로이드 β 단백질(amyloid- β ; A β)을 주요 구성성분으로 하는 세포외 노인성 반(senile plaque)을 특징으로 한다. 시험관 내 및 생체 내 연구 결과 A β 또는 A β 펩티드 단편은 독성 효과를 갖는 것으로 보고되어 A β 가 AD의 발병에 중요한 역할을 함을 시사한다. 배양시, A β 가 신경세포 사멸을 직접적으로 유도하며 신경세포를 흥분 독성 및 산화성 손상에 취약하게 한다. 특히, A β 노출에 의한 NMDA 수용체를 통한 Ca^{2+} 유입은 A β -유도된 신경 독성에서 결정적인 역할을 한다. 활성산소(Reactive Oxygen species; ROS)의 형성 또한 퇴행성 뇌질환의 발병에 관여하는 것으로 믿어진다. 몇몇 증거가 신경세포 항상성을 방해하는 광범위한 분자적 형상을 통해 신경퇴화를 촉발하거나 용이하게 함으로써, A β -매개 된 신경병에서 활성 인자로서 산화성 스트레스의 관여를 뒷받침한다. 그러나 NMDA 수용체 길항제와 신경세포 채널의 직접적 차단제의 임상적 유의성은 아직까지 논란의 여지가 있다.

[0005]

신경조직에는 특정한 물질들이 혈관으로부터 들어가는 것을 막는 일종의 장벽이 존재한다. 이러한 기능적인 장벽을 뇌혈관장벽(blood-brain barrier: BBB, 또는 뇌혈관관문)이라고 한다. 뇌혈관장벽은 신경의 미세 환경의 항상성을 유지하는 뇌모세혈관이 매우 분화되어 있는 형태이다. 뇌혈관장벽은 신경조직에 있는 모세혈관이 다

른 조직에 비해 낮은 혈관 투과성을 유지함으로써 쓸모없는 물질들의 이동을 최소한으로 유지할 수 있도록 형성된 구조이다. 뇌혈관장벽을 이루는 주된 구조는 모세혈관 내피세포(capillary endothelial cell)에 있는 폐쇄연접(tight junction) 또는 폐쇄띠(zonula occluden)으로 구성되어 있다. 내피세포의 세포질에는 다른 여러 부위의 모세혈관에서 볼 수 있는 창(fenestra)이 없으며, 포음소포(pinocytotic vesicle)도 아주 드물게 존재한다. 신경조직에 필요한 작은 분자량의 물질은 세포막에 있는 운반물질(carrier)과 결합되어 내피를 통해 뇌실질로 들어간다. 뇌혈관장벽은 이온이나 단백질, 기타 물질이 중추신경계 환경으로 불특정 유입되는 것을 차단하므로, 이러한 장벽으로서의 역할은 혈액으로부터 공급되는 해로운 성분들로부터 신경원을 보호하며 필수적인 물질들은 투과되도록 한다. 뇌경색 및 외상과 같은 뇌 손상의 대부분은 뇌혈관장벽의 붕괴와 연관되며 이는 신경원의 이차적인 손상을 초래한다. 따라서, 뇌혈관장벽의 발생 기전과 조절에 대한 연구는 중추신경계 질환을 이해하고 치료하는데 매우 중요하다. 또한, 많은 종류의 약물과 대사물질이 뇌혈관장벽을 투과하지 못하므로, 뇌혈관장벽의 적절한 조절은, 치매를 포함한 여러 가지 뇌질환을 치료함에 있어서 약물을 적적적소에 투여할 수 있는 아주 중요한 부분이 된다고 할 수 있다.

[0006]

건강한 상태 하에서, 뇌혈관장벽은 약물 또는 내인성 화합물이 뇌로 들어가는 제어할 뿐만 아니라, 세포성 침윤이 말초 기관에 비해 낮다. 정상적 내피 세포 층은 혈소판 및 백혈구의 접착, 및 임의의 응고 시스템의 활성화를 방지하는 내혈소판 표면을 제공한다. 고분화된 뇌 미세혈관 내피 세포는 면역 감시로부터 뇌를 단리하는 치밀한 장벽을 형성하고, 단지 수개의 단핵 세포(예컨대, 활성화된 T-세포)만이 CNS로 이동하도록 한다. 구조적 적합성 복합체 항원의 낮은 발현, 건강한 CNS 중의 항원-제시 세포의 적은 수, 및 CNS가 매우 발달된 임파성 맥관구조에 의해 적절히 배수되지 않는다는 사실은 뇌를 "면역 격리된" 부위가 되게 한다.

[0007]

뇌혈관장벽의 기능장애는 뇌 장애와 관련이 있다. 예를 들어, 뇌 혈관인성 부종은 뇌 조직으로의 혈관으로부터 물 및 혈장 단백질의 질병(염증)-유도 누출의 결과이다. 이는 발작, 뇌 감염, 두부 외상, 뇌 종양 및 다발성 경화증과 같은 장애들에 있어 불능 및 죽음의 주요 원인이다. 또한, 다발성 경화증은 활성화된 자동반응 T 세포가 활성화된 뇌혈관장벽을 통과한다. CNS 내에서, 이 T 세포는 수초에 대해 표적화된 염증 반응을 유도하고 뇌혈관장벽의 파멸을 유발하여, 파멸된 뇌혈관장벽으로 자동항체 및 보체 인자가 유입되어 탈수초화 공정을 초래한다. 또한, 세포외 유체 내에서의 신경전달물질과 미세한 이온들의 균형을 확실히 하지 못하면, 손상된 뉴런 신호전달을 초래하고, 이에 손상된 인식 기능화, 신경정신 장애 또는 간질성 발작이 초래된다. 또한, 혈류로의 뇌혈관장벽 전반에 걸친 손상된 독성 단백질 제거는 최근 알츠하이머병과 같은 신경퇴행 장애 및 크루즈펠트-제이아콥병 및 BSE와 같은 프라이온 질병의 병인이다. 따라서, 기능장애 뇌혈관장벽의 치료는 뇌 장애의 치료를 위한 새로운 해결책으로 제시되고 있다.

[0008]

미스라마이신 A(mithramycin A)은 스트렙토마이세스(*streptomyces*) 균주로부터 분리된 아우레오산-타입 폴리케티드(aureolic acid-type polyketide)로 전사인자인 Sp1을 억제함으로써 종양세포의 성장을 저해하는 백혈병을 포함한 항암 항생제로 사용되고 있다. 한편, 미스라마이신 A는 생체 외(*in vitro*) 및 생체 내(*in vivo*) 신경퇴화 모델에서 신경 보호에 대한 연구가 보고되고 있으나, 미스라마이신 A와 뇌혈관장벽과의 연관성은 보고된 바 없다.

[0009]

이에 따라, 본 발명자들은 뇌혈관장벽에 미치는 미스라마이신 A의 역할에 대해 연구하기 위해 노력한 결과, 항암제로 알려진 미스라마이신 A가 척수손상 후 MMP(Matrix metalloproteinase)-9의 발현 및 활성을 저해하고, 내피세포 간 폐쇄연접의 분해를 억제하여 뇌혈관장벽을 보호하고, 뇌혈관장벽의 파괴를 억제하며, TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2, 및 iNOS와 같은 염증성 인자의 발현을 억제하여 염증세포의 침윤현상을 완화하고, Gro- α , MIP-2 α , MCP-1, 및 MIP-1 α 와 같은 화학유인물질의 발현을 억제시켜 척수손상에 의한 운동기능을 회복시키므로, 상기 미스라마이신 A를 뇌혈관장벽 장애, 또는 뇌졸중 또는 척수손상을 포함하는 중추신경계 질환 예방 및 치료에 이용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010]

본 발명의 목적은 미스라마이신 A(mithramycin A)를 유효성분으로 함유하는 뇌혈관장벽 장애 및 중추신경계 질환

환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 미스라마이신 A(mithramycin A)를 유효성분으로 함유하는 뇌혈관장벽 장애 및 중추신경계 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 미스라마이신 A를 유효성분으로 함유하는 뇌혈관장벽 장애 및 중추신경계 질환 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명은 미스라마이신 A(mithramycin A)를 유효성분으로 함유하는 중추신경계 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 상기 미스라마이신 A가 척수손상 후 MMP(Matrix metalloproteinase)-9의 발현 및 활성을 저해하고, 내피세포 간 폐쇄연접의 분해를 억제하여 뇌혈관장벽을 보호하고 뇌혈관장벽 파괴를 억제하며, TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2, 및 iNOS와 같은 염증성 인자의 발현을 억제하여 염증세포의 침윤현상을 완화하고, Gro- α , MIP-2 α , MCP-1, 및 MIP-1 α 와 같은 화학유인물질의 발현을 억제시켜 척수손상 후 운동기능을 회복시키는 효과를 나타내므로, 상기 미스라마이신 A를 뇌혈관장벽 장애, 또는 뇌졸중 또는 척수손상을 포함하는 중추신경계 질환 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1a는 척수손상 후 미스라마이신 A(mithramycin A)가 MMP(matrix metalloproteinase)의 발현에 미치는 영향을 나타낸 도이다:
- S 또는 Sham: 척수손상이 없는 군;
- Veh: 척수손상 후 생리식염수를 투여한 군; 및
- MA: 척수손상 후 미스라마이신 A를 투여한 군.
- 도 1b는 척수손상 후 미스라마이신 A가 MMP의 활성화에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 2는 척수손상 후 미스라마이신 A가 폐쇄연접 단백질(tight junction protein, TJP) 분해에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 3a는 척수손상 후 미스라마이신 A가 뇌혈관장벽(blood brain barrier, BBB) 투과성에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 3b는 척수손상 후 미스라마이신 A가 뇌출혈(hemorrhage)에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 4a는 척수손상 후 미스라마이신 A가 염증세포의 침윤에 미치는 영향을 시각화한 도이다.
- 도 4b는 척수손상 후 미스라마이신 A가 대식세포(macrophage)의 침윤에 미치는 영향을 나타내는 도이다.
- 도 5a는 척수손상 후 미스라마이신 A가 염증성 인자의 발현에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 5b는 척수손상 후 미스라마이신 A가 염증성 인자 단백질의 발현에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 6은 척수손상 후 미스라마이신 A가 혈액세포 화학유인물질(chemoattractant)의 발현에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 7a는 동물행동테스트(BBB 테스트)를 통해 척수손상 후 미스라마이신 A가 운동기능 회복에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 7b는 경사면 테스트(inclined plane test)를 통해 척수손상 후 미스라마이신 A가 운동기능 회복에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 7c는 그리드 워크 테스트(grid walk test)를 통해 척수손상 후 미스라마이신 A가 운동기능 회복에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 7d는 발자국 분석(foot print analysis)을 통해 척수손상 후 미스라마이신 A가 운동기능 회복에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 미스라마이신 A(mithramycin A)를 유효성분으로 함유하는 뇌혈관장벽 장애 및 중추신경계 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

상기 미스라마이신 A는 MMP(matrix metalloproteinase)-9의 발현 및 활성을 억제하는 것이나 이에 한정되지 않는다.

상기 미스라마이신 A는 폐쇄연접 단백질(tight junction protein, TJP) 분해를 억제하는 것이나 이에 한정되지 않는다.

상기 미스라마이신 A는 뇌혈관장벽(blood brain barrier, BBB) 파괴를 억제하는 것이나 이에 한정되지 않는다.

상기 미스라마이신 A는 염증세포의 침윤현상을 완화하는 것이나 이에 한정되지 않는다.

상기 미스라마이신 A는 염증성 인자의 발현을 억제하는 것이나 이에 한정되지 않는다.

상기 미스라마이신 A는 혈액세포 화학유인물질(chemoattractant)의 발현을 억제하는 것이나 이에 한정되지 않는다.

상기 미스라마이신 A는 척수손상에 의한 운동기능 저하를 회복시키는 것이나 이에 한정되지 않는다.

상기 뇌혈관장벽 장애는 중추신경계 질환으로 인한 것이나 이에 한정되지 않는다.

상기 중추신경계 질환은 척수손상, 뇌졸중, 뇌경색, 뇌허혈, 알츠하이머병, 및 다발성 경화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 질환인 것이나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 척수손상 후 미스라마이신 A가 미치는 영향을 확인하기 위하여, 척수손상 래트(rat)를 제작하고 미스라마이신 A를 투여하였다.

또한, 척수손상 후 미스라마이신 A가 MMP 발현 및 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 척수손상 래트에 미스라마이신 A를 투여하고 RT-PCR 및 지아모그래피(Zymograohy)를 수행한 결과, 척수손상 후 미스라마이신 A를 투여한 래트에서 MMP-9의 발현 및 활성이 감소되는 것을 확인함으로써, 상기 미스라마이신 A가 척수손상 후 MMP-9의 발현 및 활성을 억제함을 확인하였다(도 1 참조).

또한, 척수손상 후 미스라마이신 A가 폐쇄연접 단백질의 분해에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 척수손상 래트에 미스라마이신 A를 투여하고 웨스턴 블롯팅(western blotting)을 수행한 결과, 척수손상 후 미스라마이신 A를 투여한 래트에서 폐쇄연접 단백질인 ZO-1 및 막단백질인 오클루딘(occludin)의 발현 감소현상이 완화되는 것을 확인함으로써, 상기 미스라마이신 A가 척수손상 후 폐쇄연접 단백질의 분해를 억제함을 확인하였다(도 2 참조).

또한, 척수손상 후 미스라마이신 A가 뇌혈관장벽 파괴에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 척수손상 래트에 미스라마이신 A를 투여하고 에반스 블루를 이용한 뇌혈관 장벽 투과성 측정 및 Drabkin's reagent를 이용한 뇌출혈 테스트를 수행한 결과, 척수손상 후 미스라마이신 A를 투여한 래트에서 에반스 블루의 양이 감소하고, 뇌출혈 현상이 완화되는 것을 확인함으로써, 상기 미스라마이신 A가 척수손상 후 뇌혈관장벽 파괴를 억제함을 확인하였다(도 3 참조).

또한, 척수손상 후 미스라마이신 A가 염증세포의 침윤에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 척수손상 래트에 미스라마이신 A를 투여하고 면역염색조직화염색법 및 웨스턴 블롯팅을 수행한 결과, 척수손상 후 미스라마이신 A를 투여한 래트에서 호중구(neutrophil) 마커인 MPO 및 대식세포(macrophage) 마커인 ED1의 발현이 현저히 감소하는 것을 확인함으로써, 상기 미스라마이신 A가 척수손상 후 염증세포의 침윤현상을 완화함을 확인하였다(도 4

참조).

- [0031] 또한, 척수손상 후 미스라마이신 A가 염증성 인자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 척수손상 래트에 미스라마이신 A를 투여하고 RT-PCR 및 웨스턴 블롯팅을 수행한 결과, 척수손상 후 미스라마이신 A를 투여한 래트에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 및 iNOS의 발현이 감소하는 것을 확인함으로써, 상기 미스라마이신 A가 척수손상 후 염증성 인자의 발현을 억제함을 확인하였다(도 5 참조).
- [0032] 또한, 척수손상 후 미스라마이신 A가 혈액세포 화학유인물질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 척수손상 래트에 미스라마이신 A를 투여하고 RT-PCR을 수행한 결과, 척수손상 후 미스라마이신 A를 투여한 래트에서 Gro- α , MIP-2 α , MCP-1, MIP-1 α 의 발현이 감소하는 것을 확인함으로써, 상기 미스라마이신 A가 척수손상 후 혈액세포 화학유인물질의 발현을 억제함을 확인하였다(도 6 참조).
- [0033] 또한, 척수손상 후 미스라마이신 A가 운동기능 회복에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 척수손상 래트에 미스라마이신 A를 투여하고 동물행동테스트(BBB 테스트), 경사면 테스트(inclined plane test), 그리드 워크 테스트(grid walk test), 및 발자국 분석(foot print analysis)을 수행한 결과, 미스라마이신 A를 투여한 군은 BBB 점수, 경사면 테스트, 그리드 워크 테스트, 및 발자국 분석에서 모두 생리식염수를 투여한 군에 비해 운동기능이 현저히 향상되는 것을 확인하였다(도 7 참조).
- [0034] 따라서, 본 발명의 미스라마이신 A는 척수손상 후 뇌혈관장벽 파괴에 관여하는 MMP-9의 발현 및 활성을 저해하고, 내피세포 간 폐쇄연접의 분해를 억제하여 뇌혈관장벽을 보호하며, TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2, 및 iNOS와 같은 염증성 인자의 발현을 억제하여 염증세포의 침윤현상을 완화하고, Gro- α , MIP-2 α , MCP-1, 및 MIP-1 α 와 같은 화학유인물질의 발현을 억제시켜 척수손상에 의한 운동기능을 회복하는 효과를 나타내므로 중추신경계 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.
- [0035] 상기 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0036] 상기 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직강내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] 상기 본 발명의 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 혼합생약제에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 상기 조성물은 1일 0.0001 내지 1 g/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 200 mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [0039] 또한, 본 발명은 미스라마이신 A를 유효성분으로 함유하는 뇌혈관장벽 장애 및 중추신경계 질환 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.
- [0040] 상기 뇌혈관장벽 장애는 중추신경계 질환으로 인한 것이나 이에 한정되지 않는다.
- [0041] 상기 중추신경계 질환은 척수손상, 뇌졸중, 뇌경색, 뇌허혈, 알츠하이머병, 및 다발성 경화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 질환인 것이나 이에 한정되지 않는다.
- [0042] 본 발명의 미스라마이신 A는 척수손상 후 뇌혈관장벽 파괴에 관여하는 MMP-9의 발현 및 활성을 저해하고, 내피 세포 간 폐쇄연접의 분해를 억제하여 뇌혈관장벽을 보호하며, TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2, 및 iNOS와 같은 염증성 인자의 발현을 억제하여 염증세포의 침윤현상을 완화하고, Gro- α , MIP-2 α , MCP-1, 및 MIP-1 α 와 같은 화학유인물질의 발현을 억제시켜 척수손상에 의한 운동기능을 회복하는 효과를 나타내므로 뇌혈관장벽 장애 및 중추신경계 질환 예방 및 개선용 건강식품으로 유용하게 사용할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 건강식품은 상기 미스라마이신 A를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0044] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 비스킷, 떡, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0045] 본 발명에 따른 미스라마이신 A는 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 미스라마이신 A의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량으로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 미스라마이신 A를 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0047] 상기 외에 본 발명의 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 미스라마이신 A는 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하지 않지만 본 발명의 미스라마이신 A 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0048] 이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0049] 단, 하기의 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예 및 제조예에 의하여 한정되는 것은 아니다.
- [0050] <실시예 1> 척수손상 동물모델의 제조

[0051]

<1-1> 척수손상 동물모델의 제조

[0052]

성체 수컷 스프라귀 다우레이 래트(Sprague Dawley rat)(샘타코, 한국)에 클로랄하이드레이트 (500 mg/kg)를 복강 주입하여 마취한 후, 흉추 8번 내지 10번 부분을 노출시켰다. 10 g 무게의 추를 일정 높이에서 떨어뜨려 인간 척수손상과 유사한 외상을 주고, 외상 강도를 컴퓨터에서 수치화할 수 있게 고안된 NYU 임팩터(impactor)(Routes, 사이텍 코리아)를 사용한 척수 외상 동물 모델을 수행하였다. 컴퓨터에 나타나는 손상 강도에 대한 데이터를 통하여 정해진 오차 범위 내에 일정한 손상이 가해진 것을 확인한 후 상처부위를 봉합하였다. 상처부위를 포비딘 액으로 소독한 후 2마리씩 케이지(cage)에 넣어 사육하였고, 하루 3회 인위적으로 방광을 마사지하여 배뇨를 도왔다.

[0053]

<1-2> 미스라마이신 A(mithramycin A)의 투여

[0054]

척수손상을 준 직후, 미스라마이신 A(mithramycin A)(Sigma, USA)를 생리식염수에 녹여 150 μ g/kg로 복강주사하였다. 대조군으로는 미스라마이신 A를 포함하지 않는 생리식염수를 복강주사 하였다. 상기 투여는 하루에 한 번씩 5 일 동안 투여하였다.

[0055]

<1-3> 척수조직절편의 준비

[0056]

척수손상을 준 래트에서 심장(right atrium)을 통해 관류(perfusion)를 시행하여 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정하고, 척수 신경을 절단한 후 OCT 화합물(compound)에 포매(embedding)하고 이후 저온 유지 장치(Cryostat)를 사용하여 절단하였다. RNA 및 단백질 분리를 위한 척수조직은 PBS로 관류(perfusion)하여 손상부위를 중심으로 1 cm 절단하여 액체질소에 동결시켜 사용할 때까지 -80℃에 보관하였다.

[0057]

<실시에 2> 척수손상 후 미스라마이신 A의 매트릭스 메탈로프로테이나제(matrix metalloproteinase, MMP) 발현 및 활성화 억제 효과 확인

[0058]

<2-1> 척수손상 후 미스라마이신 A의 MMP 발현 억제 확인

[0059]

척수손상 후 미스라마이신 A에 의한 뇌혈관장벽(blood brain barrier, BBB) 파괴 및 염증반응에 관여한다고 보고된 MMP의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, RT-PCR를 수행하였다.

[0060]

구체적으로, 상기 실시예 <1-3>에 기재된 방법으로 획득한 척수조직절편을 TRIZOL Reagent(Invitrogen)를 이용하여 매뉴얼에 따라 시행하여 RNA를 분리하고, 1 μ g의 전체 RNA를 이용하여 20 μ l의 전체 혼합물을 만들어 MMLV 역전사 효소(reverse transcriptase)(Invitrogen)를 이용하여 RT-PCR를 수행하였다. 주형(Template)과 하기 [표1]에 기재한 각각의 프라이머(primer)를 이용하여 MMP-2 및 MMP-9 유전자를 증폭한 후 아가로스 젤(agarose gel)에 전기 영동하여 결과를 얻었다.

표 1

[0061]

MMP-2	sense	5'-ACCATCGCCCATCATCAAGT-3' (서열번호 1)
	antisense	5'-CGAGCAAAAGCATCATCCAC-3' (서열번호 2)
MMP-9	sense	5'- AAAGGTCGCTCGGATGGTTA-3' (서열번호 3)
	antisense	5'-AGGATTGTCTACTGGAGTCGA-3' (서열번호 4)
GAPDH	sense	5'-AGGTCATCCAGAGCTGAACG-3' (서열번호 5)
	antisense	5'-CACCTGTTGCTGTAGCCGTAT-3' (서열번호 6)

[0062]

그 결과, 도 1a에 나타난 바와 같이, 척수손상 후 MMP-2 및 MMP-9 발현이 증가하는 반면, 척수손상 후 미스라마이신 A를 투여한 래트의 경우 MMP-9 유전자 발현이 현저하게 낮아지는 것을 확인하였다(도 1a).

[0063]

<2-2> 척수손상 후 미스라마이신 A의 MMP 활성화 억제 확인

[0064]

척수손상 후 미스라마이신 A에 의한 MMP의 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 지아모그래피(Zymography)를

수행하였다.

[0065] 구체적으로, 용해 완충용액(Lysis Buffer)(1% Nonidet P-40, 50 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)을 이용하여 상기 실시예 <1-3>에 기재된 방법으로 획득한 척수조직에서 세포 내 단백질을 얻고, 얻은 단백질을 30 μ g을 Novex 10% 젤라틴 지아모그램 젤(gelatine zymogram gel)(EC61752;Invitrogen)에 로딩(loading)한 후 4°C에서 100 V 조건하에 전기영동을 시행하였다. 그 후 젤을 재결합 완충용액(renaturing buffer)(2.5% Triton X-100)에 넣고 상온에서 30 분간 인큐베이션(incubation)한 후 현상 완충용액(developing buffer)(50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.2 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% Brij35)에 넣어 37°C에서 24 시간 동안 두었다. 그 후 0.5% 쿠마시 블루(Coomassie blue)로 24시간 염색 후 40% 메탄올(methanol), 10% 아세트산(acetic acid)을 함유한 탈색 완충용액(destaining buffer)에 두었다. 이 때 지아모그램 젤에서 선명하게 나오는 밴드가 젤라티네이스 활성(gelatinase activity)을 나타내는 것으로 판단하였다.

[0066] 그 결과, 도 1b에 나타난 바와 같이, 척수손상 후 8 시간에 강한 젤라티네이스의 활성이 나타나며, 1 일째에도 활성이 유지되는 것을 확인하였다. 반면, 척수손상 후 미스라마이신 A를 투여한 래트의 경우, MMP-9의 활성이 감소하며, 특히, 1일째에 MMP-9의 활성이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다(도 1b).

[0067] <실시예 3> 척수손상 후 미스라마이신 A의 폐쇄연접 단백질(tight junction protein, TJP) 분해 억제 효과 확인

[0068] 혈관을 구성하는 내피세포(endothelial cell) 간 폐쇄연접 단백질의 감소가 뇌혈관장벽 파괴의 주된 원인 중 하나로 알려져 있으므로, 척수손상 후 미스라마이신 A가 폐쇄연접 단백질에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 웨스턴 블롯팅(western blotting)을 수행하였다.

[0069] 구체적으로, 용해 완충용액(Lysis Buffer)(1% Nonidet P-40, 50 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)을 이용하여 상기 실시예<1-3>에 기재된 방법으로 획득한 척수조직에서 세포 내 단백질을 얻고, 이를 SDS-PAGE를 실행하였다. 이 후 니트로셀룰로오스 막(Nitrocellulose membrane)에 이동(transfer)시킨 후, 각각의 항체 데이터 시트(antibody data sheet)에 나오는 프로토콜(protocol)에 따라 웨스턴 블롯(Western blot) 시행하였다.

[0070] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 척수손상 후 생리식염수를 투여한 래트는 4 시간째에 폐쇄연접 단백질인 ZO-1이 현저히 감소하지만 미스라마이신 A를 투여한 래트에서는 ZO-1의 감소현상이 완화되는 것을 확인하였다. 또한, 척수손상 후 생리식염수를 투여한 래트는 3 일째에 막단백질인 오클루딘(Occludin)이 감소하지만, 미스라마이신 A를 투여한 래트에서는 오클루딘의 감소현상이 완화되는 것을 확인하였다(도 2).

[0071] <실시예 4> 척수손상 후 미스라마이신 A의 뇌혈관장벽 파괴 억제 효과 확인

[0072] <4-1> 미스라마이신 A의 뇌혈관장벽 투과성 증가 억제 효과 확인

[0073] 척수손상 후 미스라마이신 A가 뇌혈관장벽 투과성 증가에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 에반스 블루를 이용한 뇌혈관장벽 파괴를 측정하였다.

[0074] 구체적으로, 뇌혈관장벽 파괴 정도를 측정하기 위하여 에반스 블루(Evans blue)를 이용하여 뇌혈관장벽 투과성을 확인하였다. 생리식염수에 녹인 2% 에반스 블루를 래트에 0.5 ml씩 복강주사 하고 3 시간 후에 PBS로 관류(perfusion)하였다. 손상부위를 중심으로 4 mm 척수조직을 적출하여 50% 트리클로로초산 용액(trichloroacetic acid solution)을 넣어 조직을 분쇄하여 10,000 $\times$ g에서 10 분간 원심분리 후 상층액을 얻어 620 nm의 들뜸 파장(excitation wavelength), 680 nm의 방출 파장(emission wavelength)에서 형광을 측정하였다.

[0075] 그 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이, 척수손상을 받기 전에 비해 척수손상 후 50배 이상 증가된 에반스 블루의 양이 척수손상 후 미스라마이신 A를 투여한 군에서 60% 가량 감소됨을 확인함으로써, 상기 미스라마이신 A가 척수손상 후 뇌혈관장벽 투과성 증가를 억제함을 확인하였다(도 3a).

[0076] <4-2> 척수손상 후 미스라마이신 A의 뇌출혈 억제 효과 확인

[0077] 척수손상 후 미스라마이신 A가 뇌출혈(hemorrhage)에 미치는 영향을 확인하기 위하여, Drabkin's reagent를 이용한 뇌출혈 테스트(hemorrhage test)를 수행하였다.

[0078] 구체적으로, 래트를 관류고정 하여 손상부위를 중심으로 5 mm 길이의 척수를 분리하여 증류수를 넣고 조직을 간 후, 초음파분쇄기(ultrasonicator)를 이용하여 분쇄하고 13,000 rpm에서 30 분간 원심분리시켜 상층액을 얻었다. 상기 분리한 상층액에 Drabkin's reagent(Sigma Diagnostics, USA)를 넣고 15분간 상온에 둔 후, 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 유입된 혈액의 양을 수치화하였다.

[0079] 그 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이, 척수손상 후 생리식염수를 투여한 래트의 경우 뇌출혈 현상이 현저하게 증가하는 반면, 미스라마이신 A를 투여한 래트의 경우 뇌출혈 현상이 완화되는 것을 확인함으로써, 상기 미스라마이신 A가 척수손상 후 뇌혈관장벽 파괴를 억제함을 확인하였다(도 3b).

[0080] <실시예 5> 척수손상 후 미스라마이신 A의 염증세포 침윤 완화 효과 확인

[0081] 척수손상 후 미스라마이신 A에 의한 염증세포 침윤 완화 효과를 확인하기 위하여, 면역염색조직화염색법 및 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

[0082] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3>에 기재된 방법으로 획득한 10 μ m 조직 절편을 이용하여 미엘로퍼옥시다아제(myeloperoxidase, MPO)(Dako, Carpinteria, CA, USA) 및 ED1(Serotec, Raleigh, NC, USA)을 1차 항체로 사용하여 1차 항체의 매뉴얼(manual)에서 제시하는 조건에서 반응시킨 후, 2차 항체를 사용하여 발색하였다. 형광면역염색의 경우 Jackson의 2차 항체를 사용하였다(도 4a). 또한, 상기 <실시예 3>과 같이 ED1 항체를 이용해 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 4b).

[0083] 그 결과, 도 4a 및 도 4b에 나타난 바와 같이, 척수손상 후 생리식염수를 투여한 래트에서 호중구(neutrophil) 마커인 MPO 및 대식세포(macrophage) 마커인 ED1의 발현이 증가하는 반면 미스라마이신 A를 투여한 래트에서는 MPO 및 ED1의 발현이 현저하게 감소하는 것을 확인함으로써, 상기 미스라마이신 A가 척수손상 후 염증세포의 침윤현상을 완화함을 확인하였다(도 4a 및 도 4b).

[0084] <실시예 6> 척수손상 후 미스라마이신 A의 염증성 인자 발현 억제 효과 확인

[0085] 척수손상 후 미스라마이신 A가 염증성 인자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, RT-PCR 및 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

[0086] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3>에 기재된 방법으로 획득한 척수조직으로부터 분리한 RNA를 이용해 상기 실시예 <2-1>과 같이 RT-PCR을 수행하였다. 프라이머로 하기 [표 2]에 기재된 TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2, 및 iNOS를 사용하였다(도 5a).

표 2

TNF- α	sense	5'-CCCAGACCCTCAGCTCAGAT-3' (서열번호 7)
	antisense	5'-TTGTCCCTGAAGAGAACCTG-3' (서열번호 8)
IL-1 β	sense	5'-GCAGCTACCTATGTCTTGCCCGTG-3' (서열번호 9)
	antisense	5'-GTCGTGCTTGCTCTCCTTGTA-3' (서열번호 10)
IL-6	sense	5'-AAGTTCTCTCCGCAAGATACTCCAGCCA-3' (서열번호 11)
	antisense	5'-AGGCAAATTCCTGGTTATATCCAGTT-3' (서열번호 12)
COX-2	sense	5'-CCATGTCAAAACCGTGGTGAATG-3' (서열번호 13)
	antisense	5'-ATGGGAGTTGGGCAGTCATCAG-3' (서열번호 14)
iNOS	sense	5'-CTCCATGACTCTCAGCACAGAG-3' (서열번호 15)
	antisense	5'-GCACCGAAGATATCCTCATGAT-3' (서열번호 16)

[0088] 또한, 상기 실시예 <1-3>에 기재된 방법으로 획득한 척수조직으로부터 세포 내 단백질을 얻고, 상기 <실시예 3>과 같이 COX-2(Cayman Chemicals Ann Arbor, MI) 및 iNOS(Transduction Laboratory, Lexington, KY) 항체를 이용해 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 5b).

[0089] 그 결과, 도 5a에 나타난 바와 같이, 척수손상 후 생리식염수를 투여한 래트에서 염증성 인자인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2, 및 iNOS의 발현이 증가하는 반면, 미스라마이신 A를 투여한 래트에서 상기 염증성 인자의 발현이 감소하는 것을 확인하였다(도 5a).

[0090] 또한, 도 5b에 나타난 바와 같이, 척수손상 후 미스라마이신 A를 투여한 래트가 생리식염수를 투여한 래트와 비교해서 COX-2 및 iNOS 단백질의 발현이 감소되는 것을 확인함으로써, 상기 미스라마이신 A가 척수손상 후 염증성 인자의 발현을 억제함을 확인하였다(도 5b).

[0091] <실시예 7> 척수손상 후 미스라마이신 A의 혈액세포 화학유인물질(chemoattractants) 발현 억제 효과 확인

[0092] 척수손상 후 미스라마이신 A가 화학유인물질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, RT-PCR을 수행하였다.

[0093] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3>에 기재된 방법으로 획득한 척수조직으로부터 분리한 RNA를 이용해 상기 실시예 <2-1>과 같이 RT-PCR을 수행하였다. 프라이머로 하기 [표 3]에 기재된 Gro- α , MIP-2 α , MCP-1, MIP-1 α , 및 MIP-1 β 를 사용하였다.

표 3

Gro- α	sense	5'-CCGAAGTCATAGCCACACTCAA-3' (서열번호 17)
	antisense	5'-GCAGTCGTCTCTTTCTCCGTAC-3' (서열번호 18)
MIP-2 α	sense	5'-AGACAGAAGTCATAGCCACTCTCAAG-3' (서열번호 19)
	antisense	5'-CCTCCTTTCCAGGTCAGTTAGC-3' (서열번호 20)
MCP-1	sense	5'-TCAGCCAGATGCAGTTAACG-3' (서열번호 21)
	antisense	5'-GATCCTCTGTAGCTCTCCAGC-3' (서열번호 22)
MIP-1 α	sense	5'-ACTGCCTGCTGCTTCTCCTACA-3' (서열번호 23)
	antisense	5'-AGGAAAATGACACCTGGCTGG-3' (서열번호 24)
MIP-1 β	sense	5'-TCCCACCTTCTGCTGTTCTCT-3' (서열번호 25)
	antisense	5'-GAATACCACAGCTGGCTTGA-3' (서열번호 26)

[0095] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 척수손상 후 생리식염수를 투여한 래트에서 상기 혈액세포 화학유인물질의 발현이 현저하게 증가하는 반면, 미스라마이신 A를 투여한 래트에서 MIP-1 β 를 제외한 화학유인물질의 발현이 억제되는 것을 확인하였다(도 6).

[0096] <실시예 8> 척수손상 후 미스라마이신 A의 운동기능 회복 효과 확인

[0097] <8-1> 동물행동테스트(BBB 테스트)를 통한 척수손상 후 미스라마이신 A의 운동기능 회복 확인

[0098] 척수손상 후 미스라마이신 A의 운동기능 회복 효과를 확인하기 위하여, 동물행동테스트(BBB 테스트)를 수행하였다.

[0099] 구체적으로, BBB 테스트는 운동기능을 조절하는 다양한 신경 다발의 회복정도를 복합적으로 평가할 수 있는 실험 방법으로서 0 부터 21까지 점수를 나누어 뒷다리를 전혀 사용하지 못하는 경우 0점, 정상 래트의 경우 21점을 주어 점수가 높아질수록 운동기능이 향상되었음을 나타낸다. 척수손상을 주기 3일 전부터 하루에 한번, 한 마리당 4분씩 가로 90 x 세로 90 x 높이 7의 플라스틱 오픈 필드 상자에 래트를 올려놓고 상자 안에서 자유롭게 돌아다니도록 하여 실험 환경에 대한 사전 적응 훈련을 실시하였다. 척수손상을 준 후 1일부터 일주일에 2회씩 5명의 훈련된 실험자들이 각 래트의 뒷다리 움직임을 관찰하여 BBB 점수를 매기고, 이들 5명의 BBB 점수의 평균 값을 해당 쥐의 최종 BBB 점수로 결정하였다. 동물실험에 대한 개인의 편견을 배제하기 위하여 테스트에 임하는 실험자들은 각 래트에 대한 정보를 알지 못하게 하였고, 각 쥐에 대해 4분씩 관찰하여 점수를 내었다.

[0100] 그 결과, 도 7a에 나타난 바와 같이, 척수손상을 받은 직후 모든 래트는 뒷다리의 움직임이 전혀 없이 앞다리에 의존하여 하반신을 끄는 현상을 나타내는 것을 확인하였다. 척수손상 후 1주일 이 지난 후부터 미스라마이신 A를 투여한 래트의 BBB 점수가 척수손상 후 생리식염수만 투여한 대조군에 비하여 높게 나타나기 시작하였고, 척수손상을 준지 35일 지난 후에 BBB 점수를 확인한 결과 대조군 래트의 BBB 점수는 9.0 ± 0.4 로서 몸무게를 지탱하지 못한 채 엉덩이, 무릎, 발목 등의 관절을 크게 움직이는 정도의 회복을 나타내었다. 한편, 미스라마이신 A를 투여한 래트의 BBB 점수는 10.6 ± 0.3 으로 발바닥으로 몸무게를 지탱하여 걸으며 걷는 동안에 대략 50% 빈도로 앞다리와 뒷다리가 리듬 있게 교차하게 되는 회복수준을 보여 대조군과 비교할 때 현저한 운동기능 회복 효과를 나타내었음을 확인하였다(도 7a).

- [0101] <8-2> 경사면 테스트(Inclined plane test)를 통한 척수손상 후 미스라마이신 A의 운동기능 회복 확인
- [0102] 척수손상 후 미스라마이신 A의 운동기능 회복 효과를 확인하기 위하여, 경사면 테스트를 수행하였다.
- [0103] 구체적으로, 균형 잡는 능력을 평가할 수 있는 경사면 테스트를 일주일에 한 번씩 4주 동안 시행하였다. 평가의 기준으로는 경사진 판 위에 래트를 경사면과 수직이 되도록 올려놓은 후, 5초 동안 떨어지지 않고 버티는지를 확인하였다. 각도를 5도씩 올리면서 최대한 균형을 잡고 견딜 수 있는 각도를 점수로 나타내었으며, 이 테스트는 각 래트가 어느 그룹에 속하는지 알지 못하는 2명의 실험자에 의하여 수행되었다.
- [0104] 그 결과, 도 7b에 나타난 바와 같이, 정상 래트의 경우 평균 80도 각도에서도 떨어지지 않고 몸을 지탱하고, 척수 손상 후 1 주일에도 대부분의 래트가 40도 정도의 점수를 나타내었다. 한편, 2주가 지나면서부터 척수 손상 후 미스라마이신 A를 투여한 래트는 생리식염수만을 투여한 래트에 비하여 경사면에서 몸을 지탱하는 능력이 더 높게 나타나고, 4주째에서는 생리식염수를 투여한 대조군이 53.2 ± 1.25 점에 머무른 것에 비하여 미스라마이신 A를 투여한 래트는 61.1 ± 1.23 점을 보여 통계적으로 유의한 차이를 나타내는 것을 확인하였다(도 7b).
- [0105] <8-3> 그리드 워크 테스트(Grid walk test)를 통한 척수손상 후 미스라마이신 A의 운동기능 회복 확인
- [0106] 척수손상 후 미스라마이신 A의 운동기능 회복 효과를 확인하기 위하여, 그리드 워크 테스트를 수행하였다.
- [0107] 구체적으로, 앞다리와 뒷다리가 리듬 있게 교차하는 능력과 정확하게 뒷발을 디딜 수 있는지를 평가하였다. 평가의 기준으로 1 m 길이의 금속 격자 판에 래트를 통과하게 하여 발이 격자 아래로 떨어지는 빈도를 퍼센트(%)로 나타내었다. 테스트 시작하기 5일 전부터 1 m의 금속 격자에 각 래트당 하루 3회씩 지나가게 함으로서 실험 환경에 적응하게 하였고, 척수 손상 후 5주째에 테스트를 수행하였다. 이때, 금속 격자 판에 래트를 통과시키는데, 중간에 멈추는 것은 무효로 하고 자발적으로 쉬지 않고 끝까지 지나가는 경우만 인정하여 래트 한 마리당 3회 격자를 통과하게 하였다. 쥐의 움직임은 비디오 카메라로 녹화하여 각 래트가 어느 그룹에 속하는지 알지 못하는 2명의 실험자가 실험 결과를 분석하였다. 또한, 실험 결과는 래트가 걸은 총 걸음 수에서 격자 아래로 뒷발이 빠진 걸음 수가 차지하는 비율을 퍼센트(%)로 나타내어 미스라마이신 A 투여 그룹과 대조군인 생리식염수 투여 그룹의 평균값을 비교하였다.
- [0108] 그 결과, 도 7c에 나타난 바와 같이, 생리식염수만 투여한 대조군 그룹의 래트는 평균 약 61%의 에러율을 나타내었고, 미스라마이신 A 투여 그룹은 평균 약 30%의 에러율을 보여 50% 가량의 에러율 감소 효과를 나타내므로, 미스라마이신 A를 투여한 래트가 더 정확하게 뒷발을 디디고, 리듬감 있게 걷는 능력이 높다는 것을 확인하였다(도 7c).
- [0109] <8-4> 발자국 분석(Foot print analysis)을 통한 척수손상 후 미스라마이신 A의 운동기능 회복 확인
- [0110] 척수손상 후 미스라마이신 A의 운동기능 회복 효과를 확인하기 위하여, 발자국 분석을 수행하였다.
- [0111] 구체적으로, 척수 손상 후 래트의 뒷다리 운동기능 회복 정도를 평가하는 또 하나의 기준으로서 5주째에 발자국 분석을 수행하였다. 래트의 앞다리에는 빨간색 잉크를 묻히고, 뒷다리에는 파란색 잉크를 묻혔으며, 하얀 종이 바닥에 깔린 내부가 어두운 좁은 통로(길이 1 m, 너비 7 cm)로 지나가게 하면서 발자국을 내게 하였다. 만일 래트가 5초 이내 통로를 통과하지 못하거나 중간에 멈추면 그 때의 결과는 분석에서 제외하였으며, 한 동물당 8번의 테스트를 시행하였다. 앞발과의 조화, 간격, 뒷발의 회전 정도 및 뒷발 사이의 보폭, 양발 사이의 간격, 발가락의 끌림 등이 뒷다리의 기능을 측정하는 지표로서 사용되었다. 테스트 시작하기 5일 전부터 하루에 3번씩 통로를 지나가게 함으로써, 실험 환경에 적응하게 하였다.
- [0112] 그 결과, 도 7d에 나타난 바와 같이, 일반적으로 척수신경 외상 이후, 래트는 뒷다리가 마비되어 뒷발을 바닥에 대며 제대로 걸음을 걷지 못하고, 발을 질질 끌고 다녔다. 손상 이후 5주째에 발자국 분석을 해 보았을 때 생리식염수만 투여한 래트는 서 있는 상태에서 발바닥을 땅에 딛고 몸을 지탱할 수는 있으나 걸을 때에는 다리가 몸을 지탱하지 못하여 발등으로 걷기 때문에 개별적인 발자국이 찍히지 않고 지속적으로 긴 끌림 현상이 나타나는 것을 확인하였다. 한편, 미스라마이신 A를 투여한 래트는 이 회복 정도가 훨씬 향상되어 약간의 발가락 끌림 현상은 있으나, 주로 발바닥으로 걸음을 걸을 수 있을 정도로 회복되어 뒷발의 발자국이 종이에 찍히게 되며 발가락의 끌림으로 인해 뒷발 발자국 뒤로 짧게 끌리는 현상이 나타나는 것을 확인하였다. 따라서, 상기 <실시

예 8>의 결과들을 통해, 척수손상 후 미스라마이신 A에 의해 운동기능이 회복되는 것을 확인하였다.

[0113] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 예시한다.

[0114] <제조예 1> 미스라마이신 A를 유효성분으로 함유하는 약학적 제제의 제조

[0115] <1-1> 산제의 제조

[0116] 본 발명의 미스라마이신 A 2g

[0117] 유당 1g

[0118] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0119] <1-2> 정제의 제조

[0120] 본 발명의 미스라마이신 A 100

[0121] 옥수수전분 100

[0122] 유 당 100

[0123] 스테아린산 마그네슘 2

[0124] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0125] <1-3> 캡슐제의 제조

[0126] 본 발명의 미스라마이신 A 100

[0127] 옥수수전분 100

[0128] 유 당 100

[0129] 스테아린산 마그네슘 2

[0130] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0131] <1-4> 환의 제조

[0132] 본 발명의 미스라마이신 A 1 g

[0133] 유당 1.5 g

[0134] 글리세린 1 g

[0135] 자일리톨 0.5 g

[0136] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0137] <1-5> 과립의 제조

[0138] 본 발명의 미스라마이신 A 150

[0139] 대두 추출물 50

[0140] 포도당 200

[0141] 전분 600

[0142] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 을 첨가하여 섭씨 60에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.

[0143] <제조예 2> 미스라마이신 A를 유효성분으로 함유하는 건강식품의 제조

[0144] 본 발명의 미스라마이신 A를 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.

[0145] <2-1> 밀가루 식품의 제조

[0146] 본 발명의 미스라마이신 A의 0.5 내지 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

[0147] <2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조

[0148] 본 발명의 미스라마이신 A의 0.1 내지 5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0149] <2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조

[0150] 본 발명의 미스라마이신 A의 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

[0151] <2-4> 유제품(dairy products)의 제조

[0152] 본 발명의 미스라마이신 A의 5 내지 10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0153] <2-5> 전식의 제조

[0154] 현미, 보리, 찰쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0155] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0156] 본 발명의 미스라마이신 A를 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0157] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 미스라마이신 A를 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0158] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0159] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0160] 본 발명의 미스라마이신 A(3 중량부),

[0161] 영지(0.5 중량부),

[0162] 지황(0.5 중량부)

[0163] <제조예 3> 미스라마이신 A를 유효성분으로 함유하는 건강음료의 제조

[0164] <3-1> 건강음료의 제조

[0165] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 미스라마이신 A 5 g 을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[0166]

<3-2> 야채 주스의 제조

[0167]

본 발명의 미스라마이신 A 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

[0168]

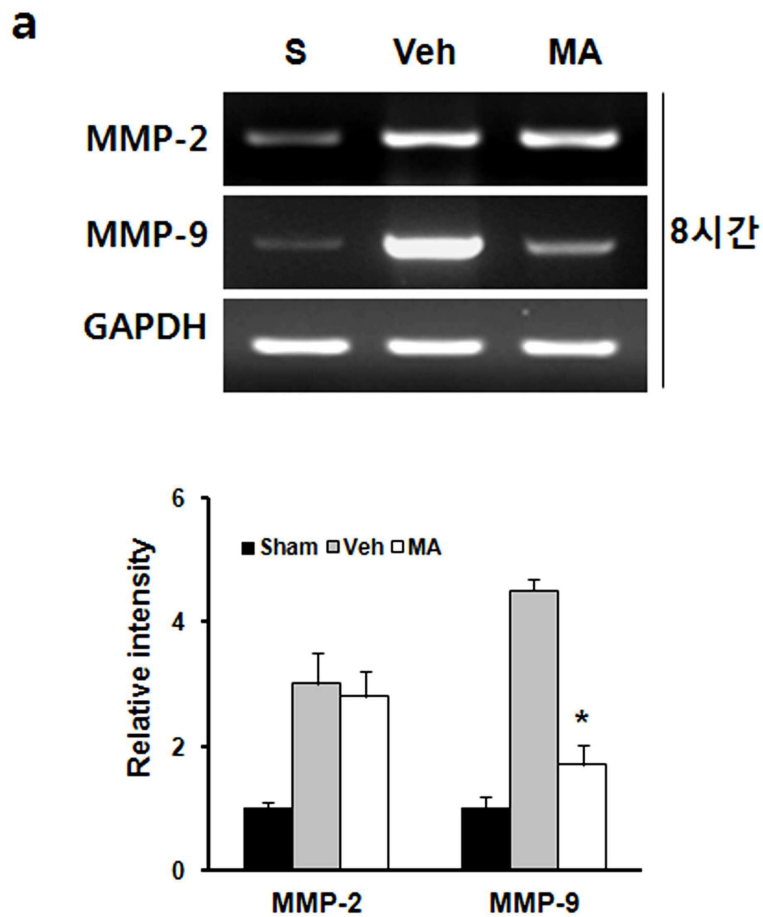
<3-3> 과일 주스의 제조

[0169]

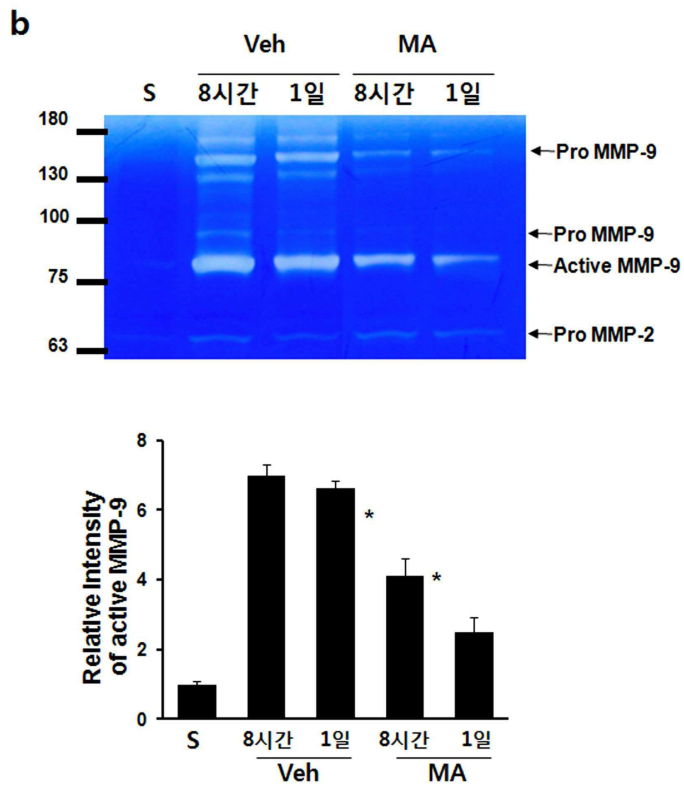
본 발명의 미스라마이신 A 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

도면

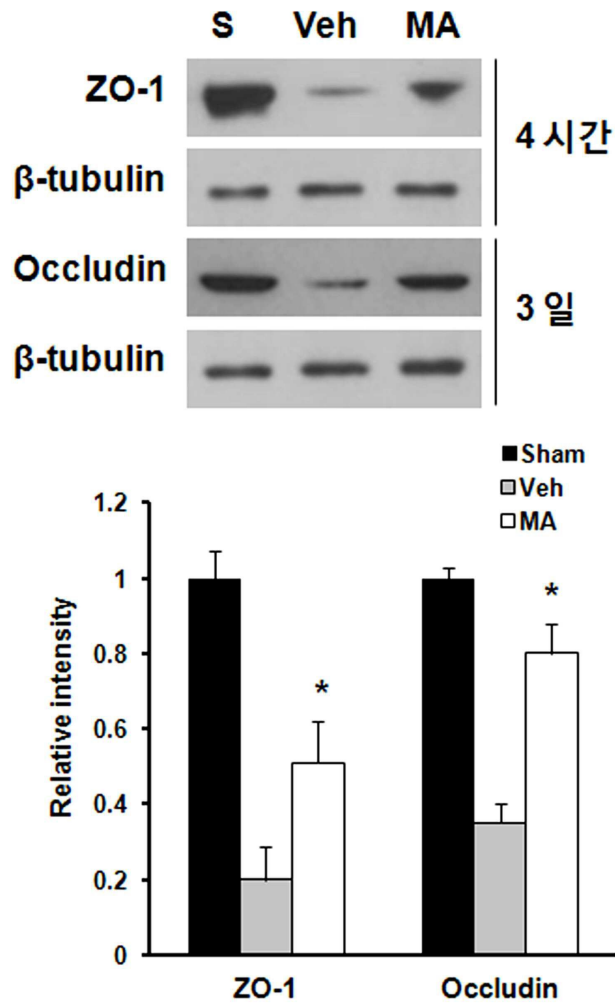
도면1a



도면1b

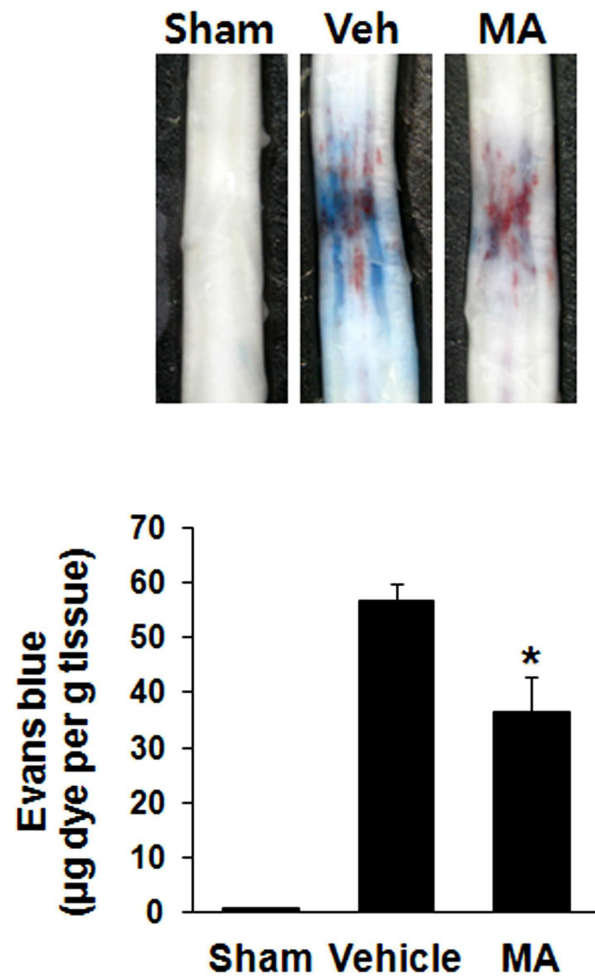


도면2



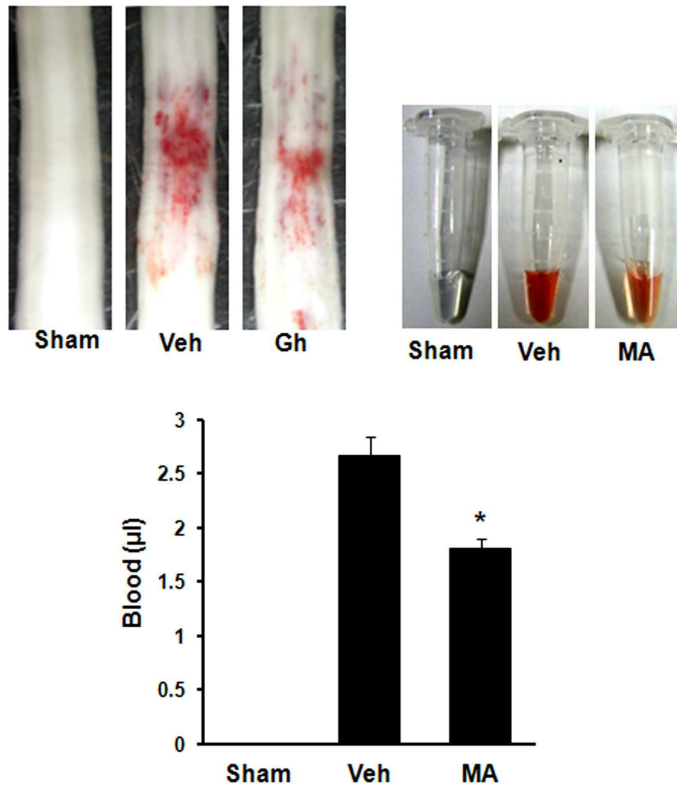
도면3a

a

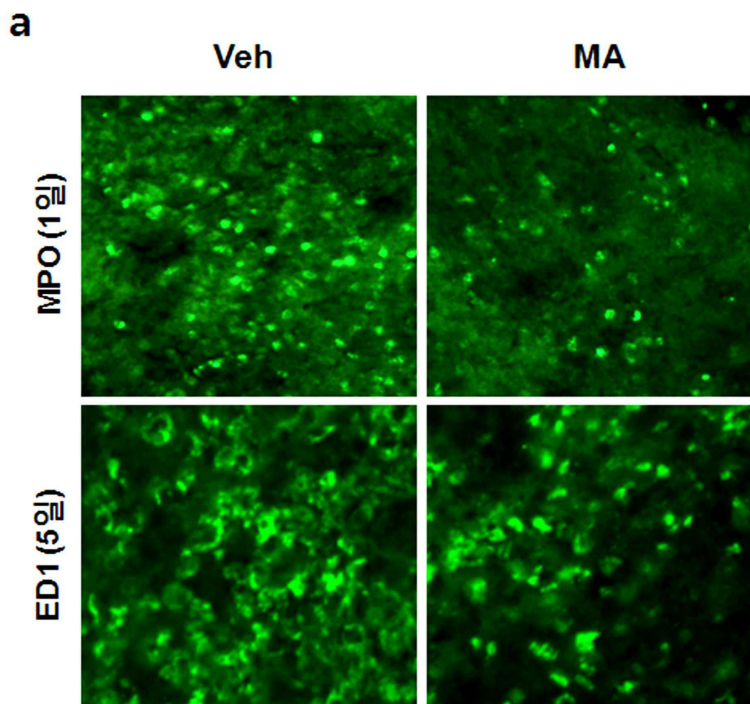


도면3b

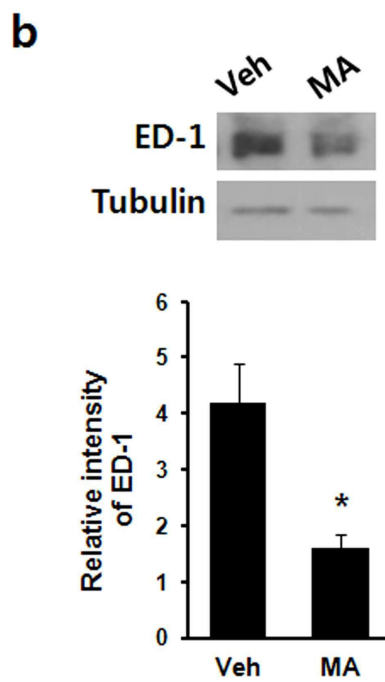
b



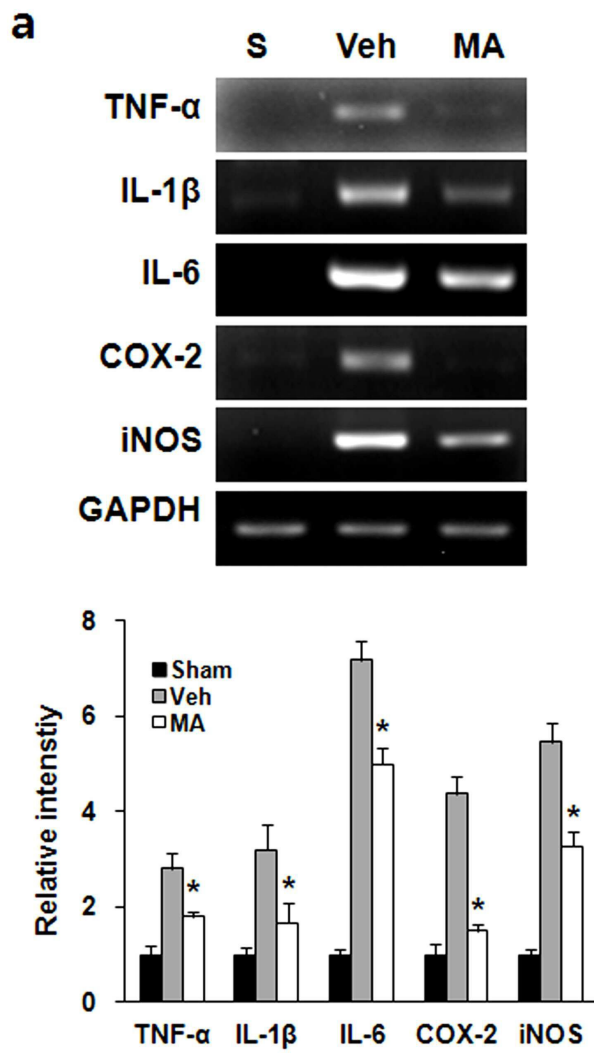
도면4a



도면4b

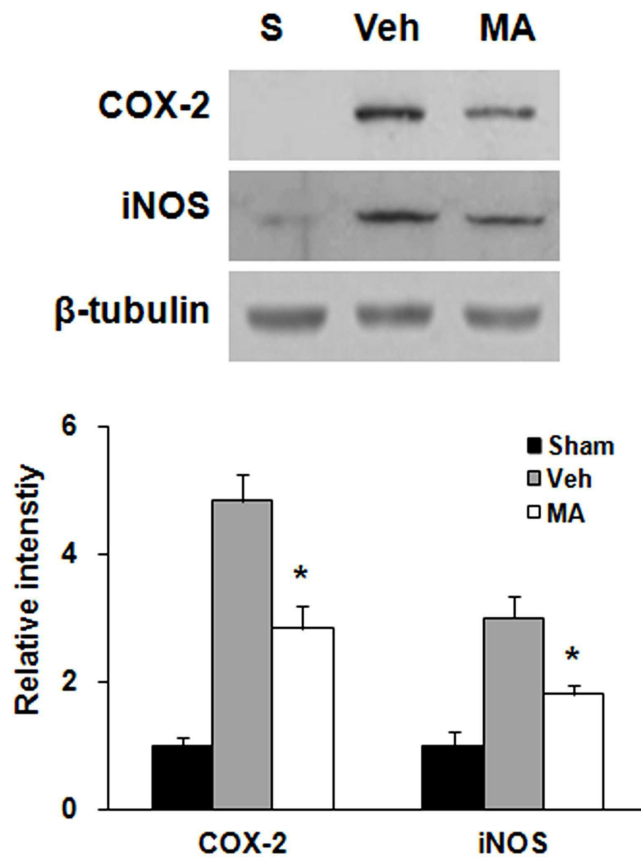


도면5a

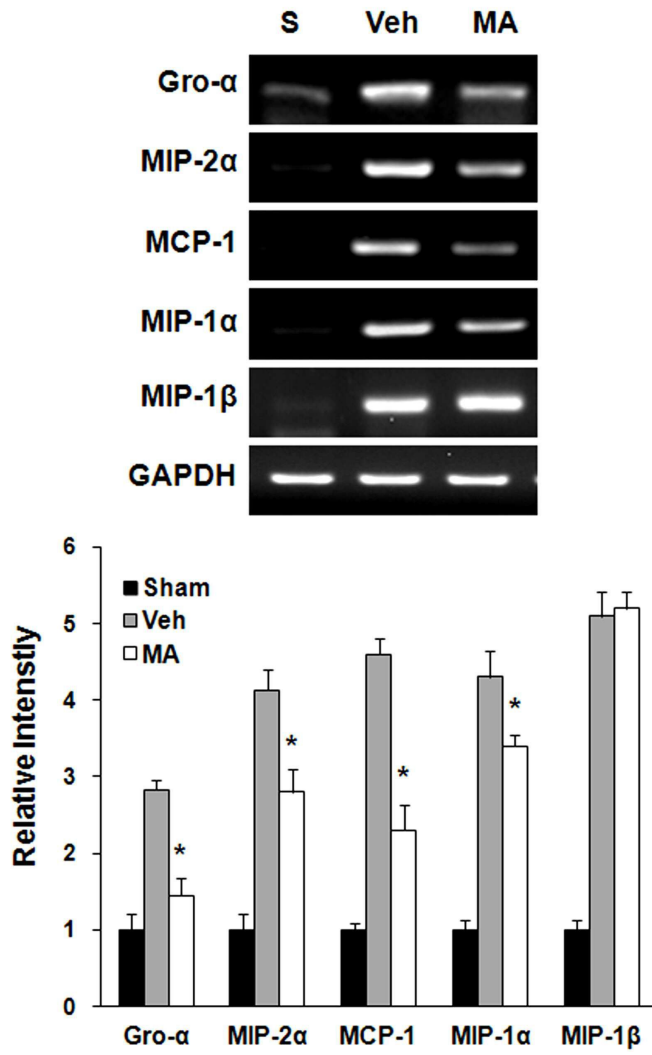


도면5b

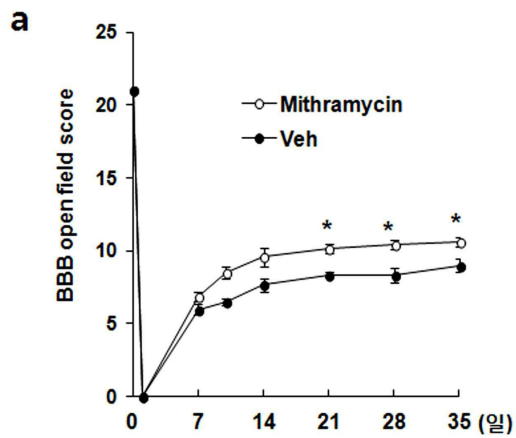
b



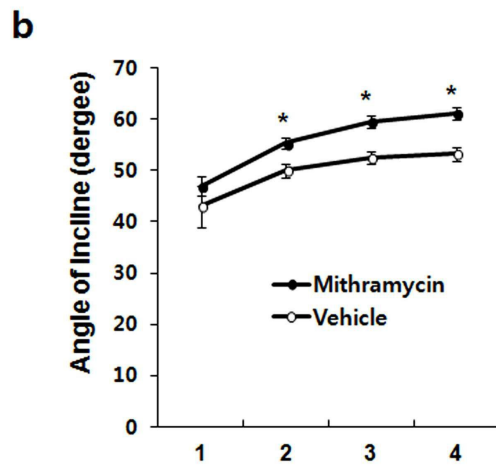
도면6



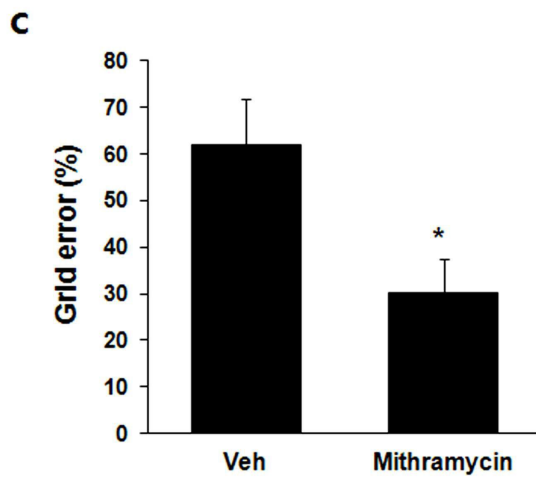
도면7a



도면7b



도면7c



도면7d



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Pharmaceutical composition comprising mithramycin A as an active ingredient for prevention or treatment of central nervous system diseases
- <130> 13P-06-41
- <160> 26
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> MMP 2 forward primer
- <400> 1
- accatcgccc atcatcaagt
- <210>
- 2
- <211> 20

20

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	MMP 2 reverse primer	
<400>	2	
	cgagcaaaag catcatccac	20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	MMP 9 forward primer	
<400>	3	
	aaaggtcgct cggatggtta	20
<210>	4	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	MMP 9 reverse primer	
<400>		
>	4	
	aggattgtct actggagtcg a	21
<210>	5	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH forward primer	
<400>	5	
	aggatcatccc agagctgaac g	21
<210>	6	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH reverse primer	
<400>	6	
	caccctgttg ctgtagccgt at	22
<210>	7	

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF alpha forward primer

<400> 7

cccagaccct cacactcaga t

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF alpha reverse primer

<400> 8

ttgtcccttg aagagaacct g

21

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL 1beta forward primer

<400> 9

gcagctacct atgtcttgcc cgtg

24

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL 1beta reverse primer

<400> 10

gtcgttgctt gtctctcctt gta

23

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL 6 forward primer

<400> 11

aagtttctct cgcgaagata cttccagcca	30
<210> 12	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IL 6 reverse primer	
<400> 12	
aggcaaattt cctggttata tccagtt	27
<210> 13	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> COX 2 forward primer	
<400> 13	
ccatgtcaaa accgtggtga atg	23
<210> 14	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> COX 2 reverse primer	
<400> 14	
atgggagttg ggcagtcac ag	22
<210> 15	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> iNOS forward primer	
<400> 15	
ctccatgact ctcagcacag ag	22
<210> 16	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> iNOS reverse primer
 <400> 16
 gcaccgaaga taccctcatg at 22
 <210> 17
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Gro alpha forward primer
 <400> 17

 ccgaagtcac agccacactc aa 22
 <210> 18
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Gro alpha reverse primer
 <400> 18
 gcagtcgtct cttctccgt tac 23
 <210> 19
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MIP 2alpha forward primer
 <400> 19
 agacagaagt catagccact ctcaag 26
 <210> 20
 <211>
 > 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MIP 2alpha reverse primer
 <400> 20
 cctcctttcc aggtcagtta gc 22
 <210> 21
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MCP 1 forward primer
 <400> 21
 tcagccagat gcagttaacg 20
 <210> 22
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MCP 1 reverse primer
 <400> 22

 gatcctcttg tagctctcca gc 22
 <210> 23
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MIP 1alpha forward primer
 <400> 23
 actgctgct gcttctccta ca 22
 <210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MIP 1alpha reverse primer
 <400> 24
 aggaaaatga cacctggctg g 21
 <210> 25
 <211>
 > 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MIP 1beta forward primer
 <400> 25
 tcccacttcc tgctgtttct ct 22

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MIP 1beta reverse primer

<400> 26

gaataccaca gctggcttgg a

21