



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년03월26일
(11) 등록번호 10-1129303
(24) 등록일자 2012년03월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/138 (2006.01) A61K 31/135 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0106982

(22) 출원일자 2011년10월19일

심사청구일자 2011년10월19일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020080051246 A*

KR1020010050798 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

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

(72) 발명자

윤태영

서울시 중랑구 묵동 태릉 브라운스톤@ 102-1404

오태환

서울시 중랑구 묵동 태릉 브라운스톤@ 103-701

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 9 항

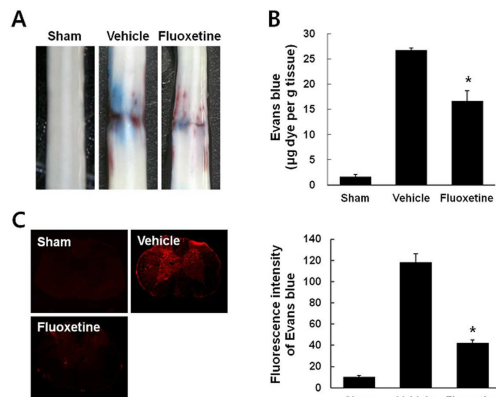
심사관 : 박제현

(54) 발명의 명칭 플루옥세틴을 유효성분으로 함유하는 중추신경계 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 플루옥세틴(fluoxetine)을 유효성분으로 함유하는 중추신경계 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 플루옥세틴이 척수손상 후 뇌혈관장벽(blood brain barrier, BBB) 파괴 및 염증반응에 관여한다고 보고된 MMP(matrix metalloproteinase)-2, MMP-9 및 MMP-12의 발현을 억제하고 특히, MMP-2 및 MMP-9의 활성화를 현저히 감소시키며, 대표적인 폐쇄연접 단백질인 ZO-1의 분해를 억제하여 내피세포 간 폐쇄연접을 유지시킴으로서 뇌혈관장벽을 보호하고, 뇌혈관장벽 투과성 증가를 억제하며, CXCL-1, CXCL-2, CCL-2, CCL-3, CCL-4와 같은 혈액세포 화학유인물질 발현을 억제시켜 척수 내로의 혈액의 유입을 감소시키고 척수손상에 의한 운동기능을 회복시킬 수 있다는 것을 확인함으로써, 플루옥세틴을 중추신경계 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

백형환

서울특별시 중랑구 양원역로6가길 19, 해모로@
101-101 (망우동)

이지윤

서울시 노원구 월계동 미릉@ 22-912

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110001692

부처명 한국연구재단

연구사업명 첨단융합기술개발사업(미래유망 융합기술 파이오니어사업)

연구과제명 다공성 고분자/신경소자 이식에 따른 손상된 척수신경 재생평가 기술연구

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2010.07.01 ~ 2016.02.29

특허청구의 범위

청구항 1

플루옥세틴(fluoxetine)을 유효성분으로 함유하는 뇌혈관장벽 장애의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 플루옥세틴은 뇌혈관장벽(blood brain barrier, BBB) 파괴를 억제하는 것을 특징으로 하는 뇌혈관장벽 장애의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 플루옥세틴은 MMP(matrix metalloproteinase)-2, MMP-9 및 MMP-12의 발현 또는 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 뇌혈관장벽 장애의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 플루옥세틴은 폐쇄연접 단백질(tight junction protein, TJP) 분해를 억제하는 것을 특징으로 하는 중추신경계 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 플루옥세틴은 뇌혈관장벽 투과성 증가를 억제하는 것을 특징으로 하는 뇌혈관장벽 장애의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 플루옥세틴은 척수 내 혈액세포 유입을 억제하는 것을 특징으로 하는 뇌혈관장벽 장애의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 플루옥세틴은 혈액세포 화학유인물질(chemoattractant)의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 뇌혈관장벽 장애의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 플루옥세틴은 척수손상에 의한 운동기능 저하를 회복시키는 것을 특징으로 하는 뇌혈관장벽 장애의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

플루옥세틴을 유효성분으로 하는 뇌혈관장벽 장애의 예방 및 개선용 건강식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 플루옥세틴을 유효성분으로 함유하는 중추신경계 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 중추신경계(central nervous system, CNS) 조직에는 여러 가지 이유로 병변이 생길 수 있다. 이러한 CNS 병변의 주된 원인 중 하나가 뇌졸중이다. 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. 모든 유형의 뇌졸중을 조합했을 때, 뇌졸중은 사망에 이르는 원인으로서 세 번째에 이르고, 장애에 이르는 원인으로서 첫 번째에 이른다. 최근의 경향을 살펴보면 이러한 숫자는 2050년까지 해마다 백만씩 증가할 것으로 예상된다. 뇌졸중에 드는 직접적 비용(간호 및 치료) 및 간접적 비용(생산력 손실)은 모두 합쳐서 미국 사회에서 연간 433억 달러에 이르는 것으로 추산된다. 일반적으로 뇌졸중은 출혈성 뇌졸중 또는 허혈성 뇌졸중으로 분류된다. 급성 허혈성 뇌졸중은 혈전증 및 색전증에 의해 유발되는 것을 가리키고, 모든 뇌졸중 유형의 80%를 차지한다.

[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-beta; $A\beta$)을 주요 구성성분으로 하는 세포외 노인성 반(senile plaque)을 특징으로 한다. 시험관 내 및 생체 내 연구 결과 $A\beta$ 또는 $A\beta$ 펩티드 단편은 독성 효과를 갖는 것으로 보고되어 $A\beta$ 가 AD의 발병에 중요한 역할을 함을 시사한다(Butterfield *et al.*, *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, 32:1050-1060 ; Butterfield *et al.*, *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, 43:658-677). 배양시, $A\beta$ 는 신경세포 사멸을 직접적으로 유도하며 신경세포를 흥분 독성 및 산화성 손상에 취약하게 한다. NMDA(N-methyl-D-aspartate receptor)수용체는 $A\beta$ 결합의 선택적 기질이나 $A\beta$ -유발되는 글루타메이트 흥분 독성의 매개자로 작용한다. NMDA수용체는 특히 Ca^{2+} 에 고도로 투과성인 리간드-게이트/볼티지-감수

성 양이온 채널이다. $[Ca^{2+}]_i$ 의 광범위한 상승은 직접적으로 세포 기능부전, 과잉흥분 또는 사멸에 이르게 한다. 따라서 $A\beta$ 의 신경 독성 효과가 비-경쟁적 NMDA수용체 길항제인(5R.10S)-(+)-5-메틸-10,11-디하이드로-5H-디벤조[a,d]사이클로헵텐-5,10-이민 말레이트(MK-801)[5R.10S)-(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo(a,b)cyclohepten-5,10-imine maleate]에 의해 감소된다는 보고에 의해 증명되는 바와 같이, $A\beta$ 노출에 의한 NMDA수용체를 통한 Ca^{2+} 유입은 $A\beta$ -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, $A\beta$ -매개 된 신경 병에서 활성 인자로서 산화성 스트레스의 관여를 뒷받침한다. 그러나 NMDA수용체 길항제와 신경세포 채널의 직접적 차단제의 임상적 유의성은, 그들이 확인할만한 효능을 결여하고 있거나 심각한 부작용을 가지므로, 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 다른 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 적재적소에 투여할 수 있는 아주 중요한 부분이 된다고 할 수 있다. 뇌혈관장벽은 염증성질환(inflammatory disease), 종양(tumor) 등 여러 질환에서 손상되며, 외상(injury) 후에도 2 내지 3 주일 정도 기능을 못하는 경우가 있다. 이러한 성질을 이용하여 혈액 내로 추적물질(tracer substance)을 준 후 이 물질이 뇌의 어느 부분으로 투과해 들어가는지를 관찰하면 병변이 있는 장소를 추측할 수 있다. 그러나, 지금까지 이러한 뇌혈관장벽의 조절에 관여하는 연구가 거의 되어있지 않은 상황이다.

[0006]

뇌혈관장벽의 발생은 크게 두 단계, 뇌혈관 신생과 뇌혈관장벽의 분화로 분류할 수 있다. 첫 단계에서는 투과 가능한 혈관에서 유도된 뇌혈관 내피세포가 무혈관성 신경외배엽으로 침투하여 신경내 혈관을 형성한다. 두 번째 단계에서는 후기 배아 상태와 초기 출생 후 기간동안 뇌모세혈관이 성상교세포와 함께 분화하고, 점차적으로 성숙하며 비투과성을 가진 뇌혈관장벽으로서 개조된다. 이러한 뇌혈관장벽 발생의 두 단계는 여러 조직이나 기관의 혈관 발생 과정에서 중요한 역할을 하는 산소 분압에 의하여 조절될 수 있다(Risau, W., Nature, 386, 671-674, 1997; Maltepe, E. & Simon, M.C., J. Mol.Med., 76, 391-401, 1998; Lee, Y.M. et al., Dev. Dyn., 220, 175-186, 2001). 본 발명 이전, 생체내에서의 발생 과정 중인 래트의 대뇌피질에서 저산소 영역이 점진적으로 사라진다는 사실이 보고되었다(Lee, Y.M. et al., Dev. Dyn., 220, 175-186, 2001). 특히, 성상교세포가 재산소화(reoxygenation) 환경에서 뇌혈관 신생을 억제하며 내피세포가 뇌혈관장벽으로서의 성질을 갖추어 나가는 데에 중요한 역할을 한다고 보고되었다(Song, H.S. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun, 290, 325-331, 2002).

[0007]

뉴런은 적절하게 기능하기 위해 치밀하게 제어되는 세포외 환경을 필요로 한다. 이 본질적이고 잘 확립된 마이크로환경은 아스트로사이트 (또는 astroglia)라고 불리는 뇌 세포를 간호함으로써 국소적으로 유지된다. 혈액과 뇌의 세포외 구획 간의 상당하고 가변적인 상이성의 문제에 대응하기 위해, 중추신경계(CNS)는 또한 수많은 혈관-CNS 장벽, 즉 뇌혈관장벽(blood brain barrier, BBB), 뇌혈관척수액(CSF) 장벽, 혈관-CSF 장벽, 뇌실막 및 교세포경계, 또한 혈액-망막 장벽, 혈액-신경 장벽, 혈관-척수 장벽에 의해 일반 혈액 순환으로부터 차폐된다. 뇌혈관장벽은 다른 혈관-CNS 장벽들에 비해, 1000배 더 큰 표면적을 덮고 있고 때문에, 가장 중요한 혈관-

CNS 장벽으로 간주된다. 뇌혈관장벽은 CNS에서의 모세혈관을 덮는 독특한 치밀 내피 세포층을 그 특징으로 한다. 또한, 아스트로사이트는 모세혈관 상에 있는 '신경아교족(glialfoot)'을 보호함으로써 상기 내피 세포에서 뇌혈관장벽 성질을 주로 유도한다.

[0008] 특히, 뇌혈관장벽 이온(Na^+ , F , Ca^{2+}), 물, 영양소, 대사물, 신경전달물질(글루탐산, 트립토판), 혈장 단백질(알부민, 피브리노겐, 면역글로불린), 면역계로부터의 세포 및 뇌의 유입 및 유출성 생체이물(약물)의 수송을 제어한다. 뇌의 모세혈관 상피 세포는 말초 모세혈관에 비해 특수한 성질들을 가진다. 그것은 좁은 밀착성 결합을 가지고, 창이 없으며, 낮은 포음(pinocytotic) 활성 및 연속적 기저막을 가진다. 좁은 밀착성 결합은 1500 내지 2000 $\text{Ohm}\cdot\text{cm}^2$ 의 높은 전기저항을 초래한다. 게다가, 내피 세포는 음으로 하전된 화합물을 거부하는 음성 표면 전하를 가진다. 그것은 영양소 및 기타 화합물을 뇌에서 활성적으로 유출 및 유입 수송하는 화합물 및 선택적 운송 시스템을 파괴하는 많은 미토콘드리아 및 효소를 가진다. 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 임파선 맥관구조에 의해 적절히 배수되지 않는다는 사실은 뇌를 "면역 격리된" 부위가 되게 한다.

[0009] 뇌혈관장벽의 해부학적 기초의 본 이해는, 그것이 말초(예컨대 코티솔, 아드레날린) 및 국소(예컨대 사이토킨, 케모킨) 호르몬에 의해 영향을 받는 동적 제어 기관으로서 기능한다는 것이다. 아스트로사이트에 부가하여, 혈관주위세포, 뉴런 및, 면역계의 세포와 같은 수개의 다른 세포는 그것의 성질에 영향을 준다. 그 다음, 상피세포는 응고, 베스토너스의 조절, 항원-제시 및, 예컨대 성장 인자에 의한 기저막의 조절과 같은 다른 공정들에 관여한다. 특히, 뇌 및 대뇌 염증, 뇌 종양의 신생혈관 형성과 같은 병리학적 상태 하에서는, 활성화된 상피세포가 중요한 역할을 한다.

[0010] 일반적으로, 뇌혈관장벽은 뇌의 항상성을 보호하는 작용을 하는 기관으로 간주될 수 있다. 당연히, 뇌혈관장벽의 기능장애는 매우 대부분의 뇌 장애들에 있어 중심적인 역할을 한다. 일부 예들은 다음과 같다:

[0011] i. 뇌 혈관인성 부종은 뇌 조직으로의 혈관으로부터의 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. 부종은 뇌가 스칼라의 경질 환경 내에서 팽창하도록 유발한다. 그에 따른 두개강내 압력의 상승은 이어서 뇌의 헤르니화를 초래할 수 있고, 그 후 호흡과 같은 본질적인 뇌의 기능이 불량해지고, 비치료된 경우, 심각한 장애, 코마 및 심지어는 죽음을 초래한다.

[0012] ii. 다발성 경화증에서, 활성화된 자동반응 T 세포는 활성화된 뇌혈관장벽을 통과한다. CNS 내에서, 이 T 세포는 수초에 대해 표적화된 염증 반응을 유도하고, 이는 또한 뇌혈관장벽의 파멸을 유발한다. 자동항체 및 보체 인자가 이제 파멸된 뇌혈관장벽에 걸쳐 있고, 이는 탈수초화 공정을 초래한다. 이제, 수초 단편은 또한 파멸된 뇌혈관장벽을 통해 말초로 다시 누출되고, 여기에서 그것은 더 많은 자동반응 T 세포를 활성화시키고, 이는 더 많은 자동항체의 생산을 증진시킨다.

[0013] iii. 세포의 유체 내에서의 신경전달물질과 미세한 이온들의 균형을 확실히 하지 못하면, 손상된 뉴런 신호전달을 초래하고, 이에 손상된 인식 기능화, 신경정신 장애 또는 간질성 발작이 초래된다.

[0014] iv. 혈류로의 뇌혈관장벽 전반에 걸친 손상된 독성 단백질 제거는 최근 알츠하이머병과 같은 신경퇴행 장애 및 크루즈펠트-제이아콥병 및 BSE와 같은 프라이온 질병의 병인으로 이어졌다. 병리학적 그러한 단백질의 병리학적 축적은 신경 세포의 죽음, 및 그에 이은 손상된 인식 기능화를 초래한다. 따라서, 이에 따른 기능장애 뇌혈관장벽의 치료는 뇌 장애의 치료를 위한 새로운 해결책을 제시한다.

[0015] 플루옥세틴(fluxetine)이 마우스에서의 최대 전격경련 시험에서 카르바마제핀, 페니토인 및 아멜톨리드(ameltolide)의 항경련 효과를 증가시킨다는 것이 보고되었다(Leander, J.D. Fluoxetine, a selective serotonin-uptake inhibitor enhances the anticonvulsant effects of phenytoin, carbamazepine, and ameltolide(LY201116). Epilepsia 33:573-576, 1992). 또한, 플루옥세틴이 동시에 투여된 항간질성제의 효과를 증가시킬 수 있기 때문에 간질 문제를 갖는 우울증 환자의 치료에도 유용할 수 있다고 보고되었다. 그러나,

플루옥세틴과 뇌혈관장벽과의 연관성은 보고된 바 없다.

[0016] 이에 따라, 본 발명자들은 뇌혈관장벽에 미치는 플루옥세틴의 역할에 대해 연구하기 위해 예의 노력한 결과, 플루옥세틴이 척수손상 후 뇌혈관장벽 파괴 및 염증반응에 관여한다고 보고된 MMP(matrix metalloproteinase)-2, MMP-9 및 MMP-12의 발현을 억제하였고 특히, MMP-2 및 MMP-9의 활성화를 현저히 감소시켰으며, 대표적인 폐쇄연접 단백질인 ZO-1의 분해를 억제하여 내피세포 간 폐쇄연접을 유지시킴으로서 뇌혈관장벽을 보호하고, 뇌혈관장벽 투과성 증가를 억제하며, CXCL-1, CXCL-2, CCL-2, CCL-3, CCL-4와 같은 혈액세포 화학유인물질 발현을 억제시켜 뇌혈관장벽 파괴로 인한 척수 내로의 혈액의 유입을 감소시키고 척수손상에 의한 운동기능을 회복시킬 수 있으므로, 뇌졸중 또는 척수손상 등의 중추신경계 질환의 예방 및 치료에 이용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 본 발명의 목적은 플루옥세틴이 뇌졸중 또는 척수손상 등 중추신경계 질환에서 MMP(matrix metalloproteinase)의 활성을 저해하고, 뇌혈관장벽 파괴를 억제함으로써, 플루옥세틴을 유효성분으로 함유하는 뇌졸중 또는 척수손상 등의 여러 중추신경계 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 뇌혈관장벽(blood brain barrier, BBB) 파괴를 억제하는 플루옥세틴(fluoxetine)을 유효성분으로 함유하는 중추신경계 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0019] 또한, 본 발명은 플루옥세틴을 유효성분으로 하는 뇌혈관장벽 장애의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0020] 또한, 본 발명은 뇌혈관장벽 파괴를 억제하는 플루옥세틴을 유효성분으로 함유하는 중추신경계 질환의 예방 및 개선용 건강식품을 제공하는 것이다.

[0021] 또한, 본 발명은 플루옥세틴을 유효성분으로 하는 뇌혈관장벽 장애의 예방 및 개선용 건강식품을 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에서는 플루옥세틴(fluoxetine)이 척수손상 후 뇌혈관장벽(blood brain barrier, BBB) 파괴 및 염증반응에 관여한다고 보고된 MMP(matrix metalloproteinase)-2, MMP-9 및 MMP-12의 발현을 억제하고, 특히, MMP-2 및 MMP-9의 활성화를 현저히 감소시키며, 내피세포 간 폐쇄연접을 유지시킴으로서 뇌혈관장벽을 보호하고, 뇌혈관장벽 투과성 증가를 억제하며, CXCL-1, CXCL-2, CCL-2, CCL-3, CCL-4와 같은 혈액세포 화학유인물질 발현을 억제시켜 뇌혈관장벽 파괴로 인한 척수 내로의 혈액의 유입을 감소시키고 척수손상에 의한 운동기능을 회복시킬 수 있음을 확인함으로써, 중추신경계 질환의 예방 및 치료를 위한 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 척수손상 후 플루옥세틴(fluoxetine)이 MMP(matrix metalloproteinase) 발현에 미치는 영향을 나타낸 그림이다.

S: 척수손상이 없는 군; 및

Vehicle: 척수손상 후 생리식염수를 투여한 군.

도 2는 척수손상 후 플루옥세틴(fluoxetine)이 MMP(matrix metalloproteinase)-2 및 MMP-9 활성화에 미치는 영향을 나타낸 그림이다.

Flu: 플루옥세틴;

SCI: 척수손상 있음;

S 또는 Sham: 척수손상이 없는 군; 및

Veh 또는 Vehicle: 척수손상 후 생리식염수를 투여한 군.

도 3은 척수손상 후 플루옥세틴(fluoxetine)이 폐쇄연접 단백질(tight junction protein, TJP) 분해에 미치는 영향을 나타낸 그림이다.

S 또는 Sham: 척수손상이 없는 군; 및

Vehicle: 척수손상 후 생리식염수를 투여한 군.

도 4는 척수손상 후 플루옥세틴(fluoxetine)이 뇌혈관장벽(blood brain barrier, BBB) 투과성에 미치는 영향을 나타낸 그림이다.

Sham: 척수손상이 없는 군; 및

Vehicle: 척수손상 후 생리식염수를 투여한 군.

도 5는 척수손상 후 플루옥세틴(fluoxetine)이 척수 내 혈액세포 유입에 미치는 영향을 나타낸 그림이다.

Sham: 척수손상이 없는 군; 및

Vehicle: 척수손상 후 생리식염수를 투여한 군.

도 6은 척수손상 후 플루옥세틴(fluoxetine)이 혈액세포 화학유인물질(chemoattractant)의 발현에 미치는 영향을 나타낸 그림이다.

Flu: 플루옥세틴;

S: 척수손상이 없는 군; 및

Veh 또는 Vehicle: 척수손상 후 생리식염수를 투여한 군.

도 7은 척수손상 후 플루옥세틴(fluoxetine)이 운동기능 회복에 미치는 영향을 나타낸 그림이다.

Vehicle: 척수손상 후 생리식염수를 투여한 군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 플루옥세틴(fluoxetine)을 유효성분으로 함유하는 중추신경계 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 플루옥세틴을 유효성분으로 하는 뇌혈관장벽 장애의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

상기 플루옥세틴은 $C_{17}H_{18}F_3NO$ 의 화학식으로 나타내는 것이나 이에 한정되는 것은 아니다.

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

상기 플루옥세틴은 구체적으로 뇌혈관장벽(blood brain barrier, BBB) 파괴를 억제하고, MMP(matrix metalloproteinase)-2, MMP-9 및 MMP-12의 발현 또는 활성을 억제하며 폐쇄연접 단백질(tight junction protein, TJP)의 분해 및 뇌혈관장벽의 투과성 증가를 억제한다. 또한, 혈액세포 화학유인물질

(chemoattractant)의 발현을 억제시켜 척수 내로의 혈액의 유입을 감소시키고 척수손상에 의한 운동기능 저하를 회복시키는 것이나 이에 한정되지 않는다.

[0030] 본 발명자들은 척수손상 후 플루옥세틴의 뇌혈관장벽 파괴 및 염증반응에 관여한다고 보고된 MMP-2, MMP-9 및 MMP-12의 발현 억제 효과를 알아보기 위하여, RT-PCR을 실시하여 상기 유전자의 발현 양상을 알아본 결과, MMP-2, MMP-9 및 MMP-12 모두 척수손상 후 발현이 증가하였고, 특히 MMP-9은 4시간에서 1일 사이에 발현이 가장 증가하였으며, MMP-12는 1일 이전에는 발현되지 않다가 3일 이후부터 급격히 발현이 증가하였음을 확인하였다(도 1의 A 참조). 반면, 척수손상 후 생리식염수를 투여한 마우스와 비교하여 플루옥세틴을 투여하였을 때에는 MMP-2, MMP-9 및 MMP-12 모두 유전자 발현이 현저하게 낮아졌음을 확인하였다(도 1의 B 내지 F 참조).

[0031] 또한, 본 발명자들은 척수손상 후 플루옥세틴의 MMP-2, MMP-9 활성화 억제 효과를 알아보기 위하여, pro-form의 단백질이 잘려 활성화되어야 주변의 기질을 분해시키는 MMP의 성질을 이용하여, MMP-2, MMP-9의 기질이 함유된 젤라틴 지아모그램 젤(gelatin zymogram gel)을 활용하여 활성화 정도를 측정하였다. 그 결과, 척수손상 8시간에 강한 젤라티네이스(gelatinase)의 활성이 나타났고, 1일 이후부터 5일까지 활성이 감소되었다. 또한 정점(peak time)인 1일째에 척수손상 후 생리식염수를 투여한 마우스와 플루옥세틴을 투여한 마우스를 비교하였을 때, 척수손상 후 플루옥세틴을 투여한 마우스의 척수조직에서 MMP-2와 MMP-9의 활성이 현저히 감소됨을 확인하였다(도 2의 A 내지 C 참조).

[0032] 또한, 본 발명자들은 혈관을 구성하는 내피세포(endothelial cell) 간 폐쇄연접 단백질(tight junction protein, TJP)의 감소는 뇌혈관장벽 파괴의 주된 원인 중 하나로 알려져 있으므로, 척수손상 후 플루옥세틴의 폐쇄연접 단백질(tight junction protein)의 분해 억제 효과를 알아보기 위하여, 웨스턴 블롯(Western blot)을 이용하여 대표적인 폐쇄연접 단백질인 ZO-1의 발현 양상을 조사하였다. 그 결과, 척수손상 8시간, 1일째에 척수손상을 받지 않은 조직에 비해 ZO-1의 양이 현저히 감소됨을 확인하였고(도 3의 A 참조), 척수손상 후 생리식염수를 투여한 마우스 비교하여 플루옥세틴을 투여한 마우스에서는 ZO-1의 감소현상이 거의 일어나지 않았다는 것을 확인하였다(도 3의 B 및 C 참조). 상기와 같은 결과는 플루옥세틴이 척수손상 후 ZO-1의 분해를 억제하여 내피세포 간 폐쇄연접을 유지시킴으로서 뇌혈관장벽을 보호한다는 것을 의미한다.

[0033] 또한, 본 발명자들은 척수손상 후 플루옥세틴의 뇌혈관장벽 투과성 증가 억제 효과를 알아보기 위하여, 척수손상 후 뇌혈관장벽의 투과성이 높아지게 되면 평소에는 척수조직 내로 들어오지 못하는 혈액이 뇌혈관장벽을 통과하여 척수조직 내에서 검출되게 되는데 이렇게 척수내로 들어온 혈액 양을 측정함으로써 뇌혈관장벽 투과성 정도를 정량화할 수 있으므로, 이를 위하여 혈액의 알부민과 친화력이 높은 청색교질성 아조색소인 에반스 블루(Evans blue)를 투여하여 3시간 후 척수를 적출하고 척수조직 내에 검출된 에반스 블루의 양을 비교하였다. 그 결과, 척수손상 후 손상 받기 전에 비해 25배 가량 증가된 에반스 블루의 양이 척수손상 후 플루옥세틴 투여한 그룹에서 40%가량 감소됨을 확인하였다(도 4의 A 내지 C 참조). 상기와 같은 결과는 척수손상 후 플루옥세틴이 뇌혈관장벽 투과성 증가를 억제하는 효과를 가진다는 것을 시사한다.

[0034] 또한, 척수손상 후 뇌혈관장벽의 파괴로 인하여 호중구(neutrophil), 대식세포(macrophage), T 세포 등의 다양한 혈액세포가 유입되는데, 손상 후 8시간에서 1일째에는 유입된 세포의 대부분이 호중구이고, 3일 이후부터는 호중구의 유입은 감소되고 대식세포의 유입이 증가된다고 알려져 있다. 따라서, 본 발명자들은 척수손상 후 플루옥세틴의 척수 내 혈액세포 유입 억제 효과를 알아보기 위하여, 1일 및 5일째에 각각 유입된 호중구와 대식세포의 양을 유체 세포 측정법(Flow cytometry)을 이용하여 측정하였다. CD45와 Gr-1이 모두 높은 수치를 보이는 세포를 호중구로, CD45와 CD11b가 모두 높은 수치를 나타내는 세포를 대식세포로 간주하였다. 그 결과 척수손상 1일째와 5일째에 플루옥세틴을 투여한 마우스의 척수조직에서 척수손상 후 생리식염수를 투여한 마우스와 비교하여 호중구와 대식세포의 양이 현저히 감소되었음을 확인하였다(도 5의 A 내지 N 참조).

[0035] 또한, 본 발명자들은 척수손상 후 플루옥세틴에 의한 혈액세포 감소효과가 혈액세포 이동을 유도하는 화학유인물질(chemoattractant)의 발현을 조절함으로써 나타나는지 여부를 알아보기 위하여, 호중구와 단핵구(monocyte)의 화학유인물질로 알려진 CXCL-1, CXCL-2, CCL-2, CCL-3, CCL-4의 유전자 발현을 RT-PCR을 통하여 조사하였다. 그 결과, 척수손상 후 상기와 같은 화학유인물질의 발현이 현저히 증가하며, 특히 CCL-3와 CCL-4가 척수손상 후 1 내지 5일에 플루옥세틴에 의해 발현이 억제된다는 결과를 얻었다(도 6의 A 및 B 참조). 이를 통하여 플루옥세틴이 혈액세포 화학유인물질 발현을 억제시켜 척수내로의 혈액의 유입을 감소시켰음을 확인하였다.

[0036] 아울러, 본 발명자들은 척수손상 후 플루옥세틴의 운동기능 회복 효과를 알아보기 위하여, 운동기능을 조절하는

다양한 신경 다발의 회복정도를 복합적으로 평가할 수 있는 실험 방법인 BBB 테스트를 실시하였다. 그 결과, 척수손상을 받은 직후 모든 마우스는 뒷다리의 움직임이 전혀 없이 앞다리에 의존하여 하반신을 끄는 현상을 나타내는 것을 확인하였다. 척수손상 후 1주일이 지난 후부터 플루옥세틴을 투여한 마우스의 BBB 점수가 생리식염수만 투여한 대조군에 비하여 높게 나타나기 시작하였고, 척수 외상을 준지 28일 지난 후에 BBB 점수를 확인한 결과 대조군 마우스의 BBB 점수는 7.5 ± 0.29 로서 몸무게를 지탱하지 못한 태 엉덩이, 무릎, 발목등의 관절을 크게 움직이는 정도의 회복을 나타내었다. 한편, 플루옥세틴을 투여한 마우스의 BBB 점수는 10.2 ± 0.92 로 발바닥으로 몸무게를 지탱하여 걸으며 걷는 동안에 대략 50% 빈도로 앞다리와 뒷다리가 리듬 있게 교차하게 되는 회복 수준을 보여 대조군과 비교할 때 현저한 운동기능 회복 효과를 나타낸 것을 확인하였다(도 7 참조).

[0037] 그러므로 본 발명의 플루옥세틴은 척수손상 후 뇌혈관장벽 파괴 및 염증반응에 관여한다고 보고된 MMP-2, MMP-9 및 MMP-12의 발현을 억제하였고 특히, MMP-2 및 MMP-9의 활성화를 현저히 감소시켰으며, 내피세포 간 폐쇄연접을 유지시킴으로서 뇌혈관장벽을 보호하고, 뇌혈관장벽 투과성 증가를 억제하며, 혈액세포 화학유인물질 발현을 억제시켜 뇌혈관장벽 파괴로 인한 척수 내로의 혈액의 유입을 감소시키고 척수손상에 의한 운동기능을 회복시킬 수 있으므로 중추신경계 질환의 예방 및 치료를 위한 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0038] 상기 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0039] 상기 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 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, 붕해제, 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, 글리세로스테라틴 등이 사용될 수 있다.

[0041] 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.

[0042] 또한, 본 발명은 플루옥세틴을 유효성분으로 함유하는 중추신경계 질환의 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

[0043] 또한, 본 발명은 플루옥세틴을 유효성분으로 하는 뇌혈관장벽 장애의 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

[0044] 상기 플루옥세틴은 $C_{17}H_{18}F_3NO$ 의 화학식으로 나타내는 것이나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 상기 중추신경계 질환은 척수손상, 뇌졸중, 뇌경색, 뇌허혈, 알츠하이머병 및 다발성 경화증으로 구성된 군으로

부터 선택되는 어느 하나의 질환인 것이나 이에 한정되지 않는다.

- [0046] 상기 플루옥세틴은 구체적으로 뇌혈관장벽(blood brain barrier, BBB) 파괴를 억제하고, MMP-2, MMP-9 및 MMP-12의 발현 또는 활성을 억제하며 폐쇄연접 단백질(tight junction protein, TJP)의 분해 및 뇌혈관장벽의 투과성 증가를 억제한다. 또한, 혈액세포 화학유인물질(chemoattractant)의 발현을 억제시켜 척수 내로의 혈액의 유입을 감소시키고 척수손상에 의한 운동기능 저하를 회복시키는 것이나 이에 한정되지 않는다.
- [0047] 본 발명의 플루옥세틴은 척수손상 후 뇌혈관장벽 파괴 및 염증반응에 관여한다고 보고된 MMP-2, MMP-9 및 MMP-12의 발현을 억제하였고 특히, MMP-2 및 MMP-9의 활성화를 현저히 감소시켰으며, 내피세포 간 폐쇄연접을 유지시킴으로서 뇌혈관장벽을 보호하고, 뇌혈관장벽 투과성 증가를 억제하며, 혈액세포 화학유인물질 발현을 억제시켜 뇌혈관장벽 파괴로 인한 척수 내로의 혈액의 유입을 감소시키고 척수손상에 의한 운동기능을 회복시킬 수 있으므로 중추신경계 질환 또는 뇌혈관장벽 장애의 예방 및 개선용 건강식품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 건강식품은 상기 플루옥세틴을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0049] 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.
- [0050] 본 발명에 따른 플루옥세틴은 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 플루옥세틴의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15중량%로 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.
- [0051] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 플루옥세틴을 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.
- [0052] 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 플루옥세틴은 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 중요하진 않지만 본 발명의 플루옥세틴 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0053] 이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0054] 단, 하기의 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예 및 제조예에 의하여 한정되는 것은 아니다.
- [0055] <실시예 1> 척수손상 후 플루옥세틴(fluoxetine)에 의한 MMP(matrix metalloproteinase) 발현 억제 효과 확인
- [0056] <1-1> 척수손상 동물모델의 제조

[0057] 성체 수컷 C57BL/6 마우스(20-30g)에 클로랄하이드레이트 (500mg/kg)를 복강 주입하여 마취한 후, 흉추 8번 내지 10번 부분을 노출시켰다. PSI(Precision Systems and Instrumentation) 충격기(impactor)를 이용하여 흉추 9번에 40 kd의 강도로 추를 낙하시켜 타박상(contusion injury)을 주었다. 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.

[0058] <1-2> 플루옥세틴의 투여

[0059] 척수손상을 준 직후, 플루옥세틴(fluoxetine)(Sigma, St. Louis, MO)을 생리식염수에 녹여 200mg/kg로 복강주사 하였다. 대조군으로는 플루옥세틴을 포함하지 않는 생리식염수를 복강주사 하였다. 상기 투여는 하루에 한 번씩 2주 동안 투여하였다.

[0060] <1-3> 척수조직절편의 준비

[0061] 척수손상을 준 마우스에서 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 0.8 cm 절단하여 액체질소에 동결시켜 사용할 때 까지 -80℃에 보관하였다.

[0062] <1-4> RNA 분리 및 RT-PCR 방법을 통한 MMP 발현 수준의 확인

[0063] RNA 분리는 TRIZOL Reagent(Invitrogen)를 이용하여 매뉴얼에 따라 시행하였고, 1 µg의 전체 RNA를 이용하여 20 µl의 전체 혼합물을 만들어 MMLV 역전사 효소(reverse transcriptase)(Invitrogen)를 이용하여 RT-PCR를 수행하였다. 주형(Template)과 각각의 프라이머(primer)를 이용하여 MMP-2, MMP-9 및 MMP-12 유전자를 증폭한 후 아가로스 젤(agarose gel)에 전기 영동하여 결과를 얻었다. RT-PCR에 사용된 프라이머는 하기와 같다.

표 1

[0064]

MMP-2	sense	5'-ACC ATC GCC CAT CAT CAA GT-3' (서열번호: 1)
	antisense	5'-CGA GCA AAA GCA TCA TCC AC-3' (서열번호: 2)
MMP-9	sense	5'- AAA GGT CGC TCG GAT GGT TA-3' (서열번호: 3)
	antisense	5'-AGG ATT GTC TAC TGG AGT CGA-3' (서열번호: 4)
MMP-12	sense	5'-GAA ACC CCC ATC CTT GAC AA-3' (서열번호: 5)
	antisense	5'-TTC CAC CAG AAG AAC CAG TCT TTA A-3' (서열번호: 6)
GAPDH	sense	5'-AGG TCA TCC CAG AGC TGA ACG-3' (서열번호: 7)
	antisense	5'-CAC CCT GTT GCT GTA GCC GTA T-3' (서열번호: 8)

[0065] 그 결과, 도 1의 A에서 보는 바와 같이 척수손상 후 MMP-2, MMP-9 및 MMP-12 모두 발현이 증가하였고, 특히 MMP-9은 4시간에서 1일 사이에 발현이 가장 증가하였고, MMP-12는 1일 이전에는 발현되지 않다가 3일 이후부터 급격히 발현이 증가하였음을 확인하였다(도 1의 A). 반면, 도 1의 B 내지 F에서 보는 바와 같이 척수손상 후 생리식염수를 투여한 마우스와 비교하여 플루옥세틴을 투여하였을 때는 MMP-2, MMP-9 및 MMP-12 모두 유전자 발현이 현저하게 낮아졌음을 확인하였다(도 1의 B 내지 F).

[0066] <실시예 2> 척수손상 후 플루옥세틴의 MMP-2 및 MMP-9의 활성화 억제 효과 확인

[0067] <2-1> 지아모그래피(Zymography) 방법에 의한 MMP-2 및 MMP-9의 활성화 억제 효과 확인

[0068] 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 척수조직에서 세포 내 단백질을 얻고, 얻은 단백질 30ug을 Novex 10% 젤라틴 지아모그람 젤(gelatin zymogram gel)(EC61752;Invitrogen)에 로딩(loading)한 후 4℃에서 100V 조건하에 전기영동을 시행하였다. 그 후 젤을 재결합 완충용액(renaturing buffer)(2.5% Triton X-100)에 넣고 상온에서 30분간 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 24시간 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 지아모그람 젤에서 선명하게 나오는 밴드가 젤라티네이스 활성(gelatinase activity)을 나타내는 것으로 판단하였다.

[0069] 그 결과, 도 2의 A 내지 C에서 보는 바와 같이 척수손상 후 8시간에 강한 젤라티네이스의 활성이 나타났고, 1일 이후부터 5일까지 활성이 감소되었다. 또한, 정점(peak time)인 1일째에 척수손상 후 생리식염수를 투여한 마우스와 플루옥세틴을 투여한 마우스를 비교하였을 때, 플루옥세틴 투여 마우스의 척수조직에서 MMP-2와 MMP-9의 활성이 현저히 감소하였음을 확인하였다(도 2의 A 내지 C).

[0070] <실시예 3> 척수손상 후 플루옥세틴의 폐쇄연접 단백질(tight junction protein, TJP)의 분해 억제 효과 확인

[0071] <3-1> 웨스턴 블롯(Western Blot) 분석을 통한 ZO-1의 발현 양상 확인

[0072] 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 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.

[0073] 그 결과, 도 3의 A에서 보는 바와 같이 척수손상 8시간, 1일째에 손상 받지 않은 조직에 비해 ZO-1의 양이 현저히 감소됨을 확인하였고(도 3의 A), 도 3의 B에서 보는 바와 같이 척수손상 후 생리식염수를 투여한 마우스와 비교하여 플루옥세틴을 투여한 마우스에서는 이러한 ZO-1의 감소현상이 거의 일어나지 않았음을 확인하였다(도 3의 B).

[0074] <3-2> 면역염색조직화학염색법

[0075] 10 μm조직 절편을 이용하여 각각의 1차 항체의 매뉴얼(manual)에서 제시하는 조건에서 반응시킨 후, 2차 항체를 사용하여 발색하였다. 형광면역염색의 경우 Jackson의 2차 항체를 사용하고, DAB 발색의 경우 Vectastatin kit(Vector)를 사용하여 발색하였다.

[0076] 그 결과, 도 3의 B에서 보는 바와 같이 척수손상 후 생리식염수를 투여한 마우스와 비교하여 플루옥세틴을 투여한 마우스에서 ZO-1의 감소현상이 거의 일어나지 않았음을 확인하였다(도 3의 B).

[0077] <실시예 4> 척수손상 후 플루옥세틴의 뇌혈관장벽 투과성 증가를 억제하는 효과 확인

[0078] <4-1> 에반스 블루(Evans blue)를 이용한 뇌혈관장벽 파괴 측정

[0079] 뇌혈관장벽 파괴정도를 측정하기 위하여 에반스 블루(Evans blue)를 이용하여 뇌혈관장벽 투과성을 확인하였다. 생리식염수에 녹인 2% 에반스 블루를 마우스에 0.5ml씩 복강주사 하고 3시간 후에 PBS로 관류(perfusion)하였다. 손상부위를 중심으로 4mm 척수조직을 적출하여 50% 트리클로로초산 용액(trichloroacetic acid solution)을 넣어 조직을 분쇄하여 10,000xg에서 10분간 원심분리 후 상층액을 얻어 620 nm의 들뜸 파장(excitation wavelength), 680 nm의 방출 파장(emission wavelength)에서 형광을 측정하였다.

[0080] 그 결과, 도 4의 A 내지 C에서 보는 바와 같이 척수손상을 받기 전에 비해 척수손상 후 25배 가량 증가된 에반스 블루의 양이 척수손상 후 플루옥세틴을 투여한 군에서 40% 가량 감소됨을 확인하였다(도 4의 A 내지 C).

[0081] <실시예 5> 척수손상 후 플루옥세틴의 척수 내 혈액세포 유입 억제 효과 확인

[0082] <5-1> 유체 세포 측정법(Flow cytometry)을 통한 플루옥세틴의 척수 내 혈액세포 유입에 미치는 영향 확인

[0083] 척수손상 1일, 5일 째에 척수조직을 적출하여 PBS에 넣고 다운스 균질기(dounce homogenizer)를 이용하여 조직을 으갠 후, 1,100rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 펠릿(Pellet)을 FBS가 포함된 완충용액과 섞어 풀어준 후 3,000rpm에서 7분간 원심분리하여 펠릿을 다시 얻어 이를 FBS가 포함된 완충용액에 섞고, 여러 튜브에 분주한 후 형광물질이 붙어있는 항체를 넣어 4℃에서 반응시켰다. FBS 포함된 완충용액으로 세척한 후 Becton Dickinson LSR Benchtop Flow Cytometer(BD Biosciences)를 이용하여 척수손상 1일 및 5일째에 각각 유입된 호중구(neutrophil)와 대식세포(macrophage)의 양을 측정하였다. CD45와 Gr-1이 모두 높은 수치를 보이는 세포를 호중구로, CD45와 CD11b가 모두 높은 수치를 나타내는 세포를 대식세포로 간주하였다.

[0084] 그 결과, 도 5의 A 내지 N에서 보는 바와 같이, 척수손상 1일 및 5일째에 플루옥세틴을 투여한 마우스의 척수조직에서 척수손상 후 생리식염수를 투여한 마우스와 비교하여 호중구와 대식세포의 양이 현저히 감소되었음을 확인하였다(도 5의 A 내지 N).

[0085] <실시예 6> 척수손상 후 플루옥세틴의 혈액세포 화학유인물질(chemoattractant)의 발현 억제 효과 확인

[0086] 상기 실시예 <1-4>의 방법에 따라 혈액세포 화학유인물질인 CXCL-1, CXCL-2, CCL-2, CCL-3, CCL-4의 발현 양상 확인한 결과, 도 6의 A 내지 B 에서 보는 바와 같이 척수손상 후 상기 혈액세포 화학유인물질(chemokine)의 발현이 현저히 증가하며, 특히 CCL-3와 CCL-4가 척수손상 후 1 내지 5일에 플루옥세틴에 의해 발현이 억제함을 확인하였다(도 6의 A 내지 B). 상기 실시예 <1-4>의 방법에 사용된 프라이머는 하기와 같다.

표 2

[0087]

CXCL-1	sense	5'-CCG AAG TCA TAG CCA CAC TCA A-3' (서열번호: 9)
	antisense	5'-GCA GTC TGT CTT CTT TCT CCG TTA C-3' (서열번호: 10)
CXCL-2	sense	5'-ATC CAG AGC TTG ACG GTG AC-3' (서열번호: 11)
	antisense	5'-AGG TAC GAT CCA GGC TTC CT-3' (서열번호: 12)
CCL2	sense	5'-TCA GCC AGA TGC AGT TAA CG-3' (서열번호: 13)
	antisense	5'-GAT CCT CTT GTA GCT CTC CAG C-3' (서열번호: 14)
CCL3	sense	5'-ACT GCC TGC TGC TTC TCC TAC A-3' (서열번호: 15)
	antisense	5'-AGG AAA ATG ACA CCT GGC TGG-3' (서열번호: 16)
CCL4	sense	5'-TCC CAC TTC CTG CTG TTT CTC T-3' (서열번호: 17)
	antisense	5'-GAA TAC CAC AGC TGG CTT GGA-3' (서열번호: 18)

[0088] <실시예 7> 척수손상 후 플루옥세틴의 운동기능 회복 효과 확인

[0089] <7-1> 동물행동테스트(BBB 테스트)

[0090] 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 마우스의 경우 21점을 주어 점수가 높아질수록 운동기능이 향상되었음을 나타낸다. 척수손상을 주기 3일 전부터 하루에 한번, 한 마리당 4분씩 가로 90cm x 세로 90cm x 높이 7cm의 플라스틱 오픈 필드 상자에 마우스를 올려놓고 상자 안에서 자유롭게 돌아다니도록 하여 실험 환경에 대한 사전 적응 훈련을 실시하였다. 척수손상을 준 후 1일부터 일주일에 2회씩 5명의 훈련된 실험자들이 각 마우스의 뒷다리 움직임을 관찰하여 BBB 점수를 매기고, 이들 5명의 BBB 점수의 평균값을 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.

[0091] 그 결과, 도 7에서 보는 바와 같이 척수손상을 받은 직후 모든 마우스는 뒷다리의 움직임이 전혀 없이 앞다리에 의존하여 하반신을 끄는 현상을 나타내는 것을 확인하였다. 척수손상 후 1주일의 지난 후부터 플루옥세틴을 투여한 마우스의 BBB 점수가 척수손상 후 생리식염수만 투여한 대조군에 비하여 높게 나타나기 시작하였고, 척수손상을 준지 28일 지난 후에 BBB 점수를 확인한 결과 대조군 마우스의 BBB 점수는 7.5 ± 0.29 로서 몸무게를 지탱하지 못한 태 엉덩이, 무릎, 발목등의 관절을 크게 움직이는 정도의 회복을 나타내었다. 한편, 플루옥세틴을 투여한 마우스의 BBB 점수는 10.2 ± 0.92 로 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 7).

[0092] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 예시한다.

[0093] <제조예 1> 플루옥세틴을 유효성분으로 함유하는 약학적 제제의 제조

[0094] <1-1> 산제의 제조

[0095] 본 발명의 플루옥세틴 2g

[0096] 유당 1g

[0097] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0098] <1-2> 정제의 제조

[0099] 본 발명의 플루옥세틴 100mg

[0100] 옥수수전분 100mg

[0101] 유 당 100mg

[0102] 스테아린산 마그네슘 2mg

[0103] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0104] <1-3> 캡슐제의 제조

[0105] 본 발명의 플루옥세틴 100mg

[0106] 옥수수전분 100mg

[0107] 유 당 100mg

[0108] 스테아린산 마그네슘 2mg

[0109] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0110] <1-4> 환의 제조

[0111] 본 발명의 플루옥세틴 1 g

[0112] 유당 1.5 g

[0113] 글리세린 1 g

[0114] 자일리톨 0.5 g

[0115] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0116] <1-5> 과립의 제조

[0117] 본 발명의 플루옥세틴 150 mg

[0118] 대두 추출물 50 mg

[0119] 포도당 200 mg

- [0120] 진분 600 mg
- [0121] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.
- [0122] <제조예 2> 플루옥세틴을 유효성분으로 함유하는 건강식품의 제조
- [0123] 본 발명의 플루옥세틴을 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.
- [0124] <2-1> 밀가루 식품의 제조
- [0125] 본 발명의 플루옥세틴의 0.5~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.
- [0126] <2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조
- [0127] 본 발명의 플루옥세틴의 0.1~5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.
- [0128] <2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조
- [0129] 본 발명의 플루옥세틴의 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.
- [0130] <2-4> 유제품(dairy products)의 제조
- [0131] 본 발명의 플루옥세틴의 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.
- [0132] <2-5> 전식의 제조
- [0133] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.
- [0134] 감정콩, 감정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.
- [0135] 본 발명의 플루옥세틴을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.
- [0136] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 플루옥세틴을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.
- [0137] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),
- [0138] 종실류(들깨 7 중량부, 감정콩 8 중량부, 감정깨 7 중량부),
- [0139] 본 발명의 플루옥세틴(3 중량부),
- [0140] 영지(0.5 중량부),
- [0141] 지황(0.5 중량부)
- [0142] <제조예 3> 플루옥세틴을 유효성분으로 함유하는 건강음료의 제조
- [0143] <3-1> 건강음료의 제조
- [0144] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 플루옥세틴 5 g을

균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[0145] <3-2> 야채 주스의 제조

[0146] 본 발명의 플루옥세틴 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

[0147] <3-3> 과일 주스의 제조

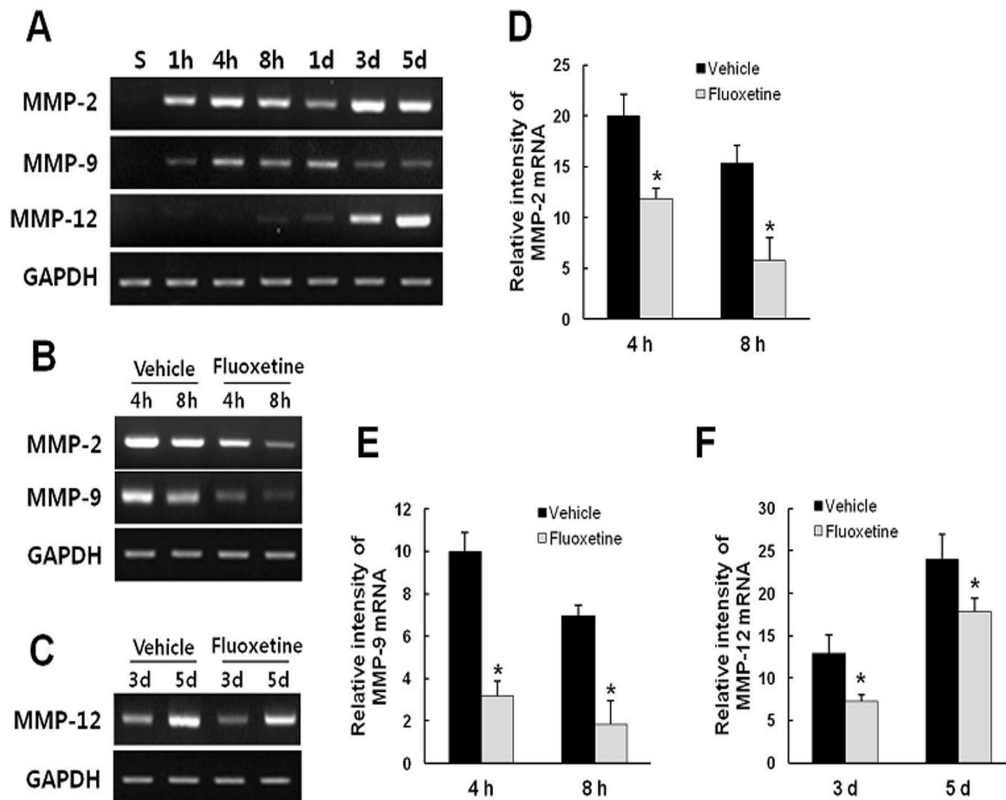
[0148] 본 발명의 플루옥세틴 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

산업상 이용가능성

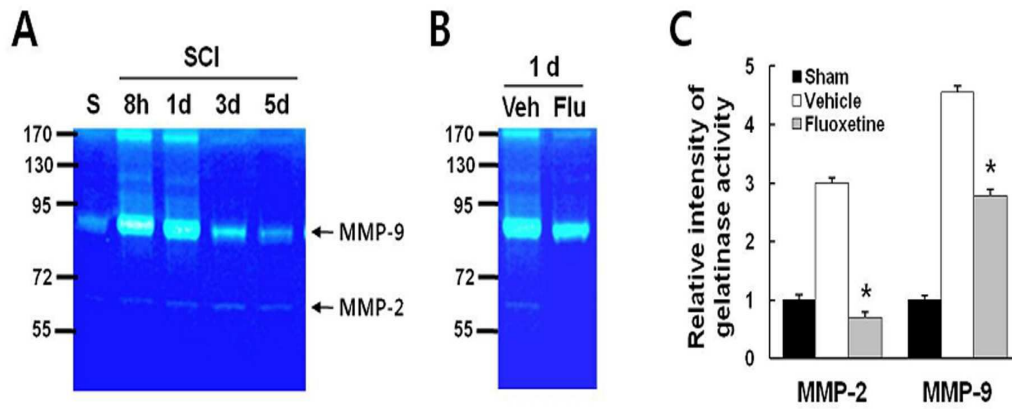
[0149] 상기에서 보는 바와 같이, 본 발명의 플루옥세틴(fluoxetine)은 뇌혈관장벽(blood brain barrier, BBB) 파괴를 억제하므로, 중추신경계 질환의 예방 및 치료를 위한 약제 또는 건강식품의 개발과 이를 이용한 예방 또는 치료 방법 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

도면

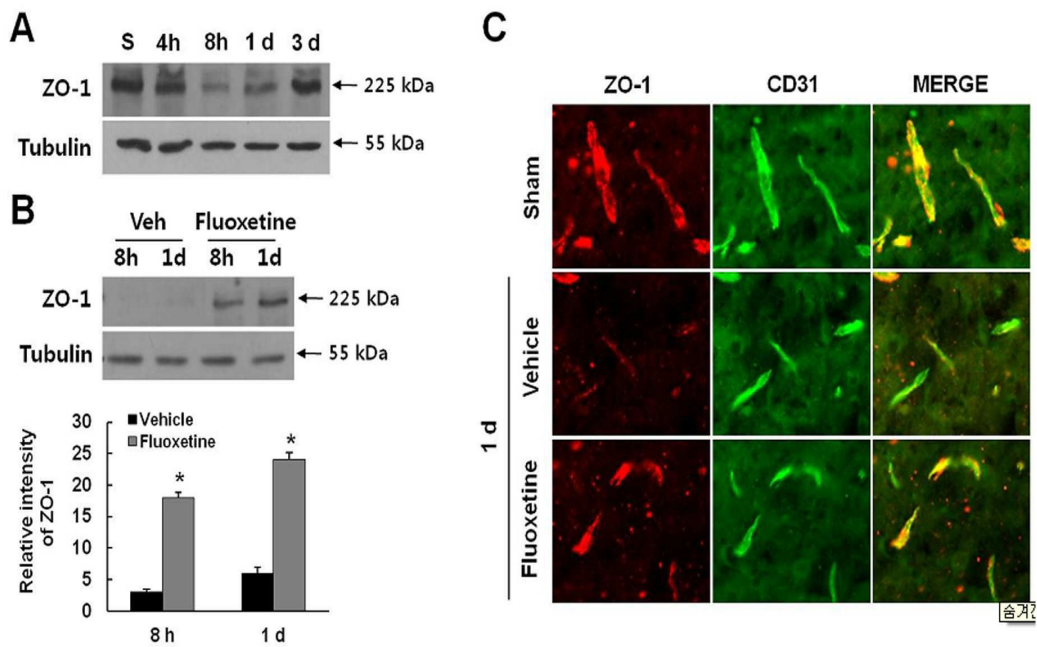
도면1



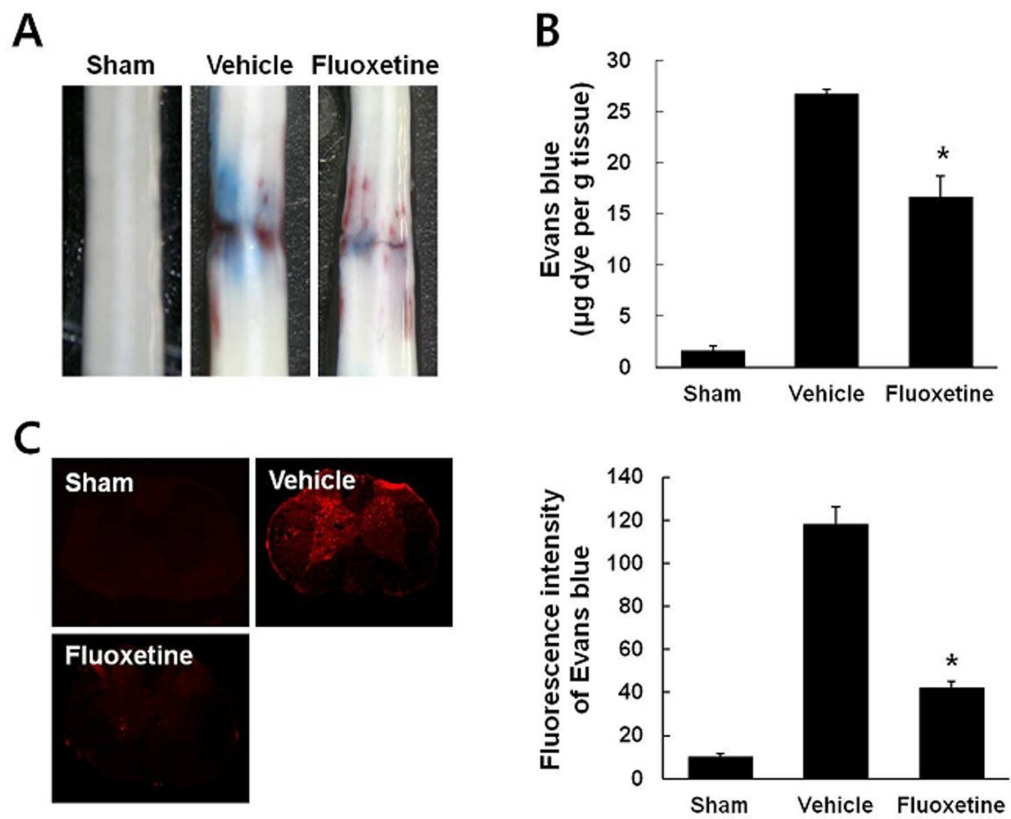
도면2



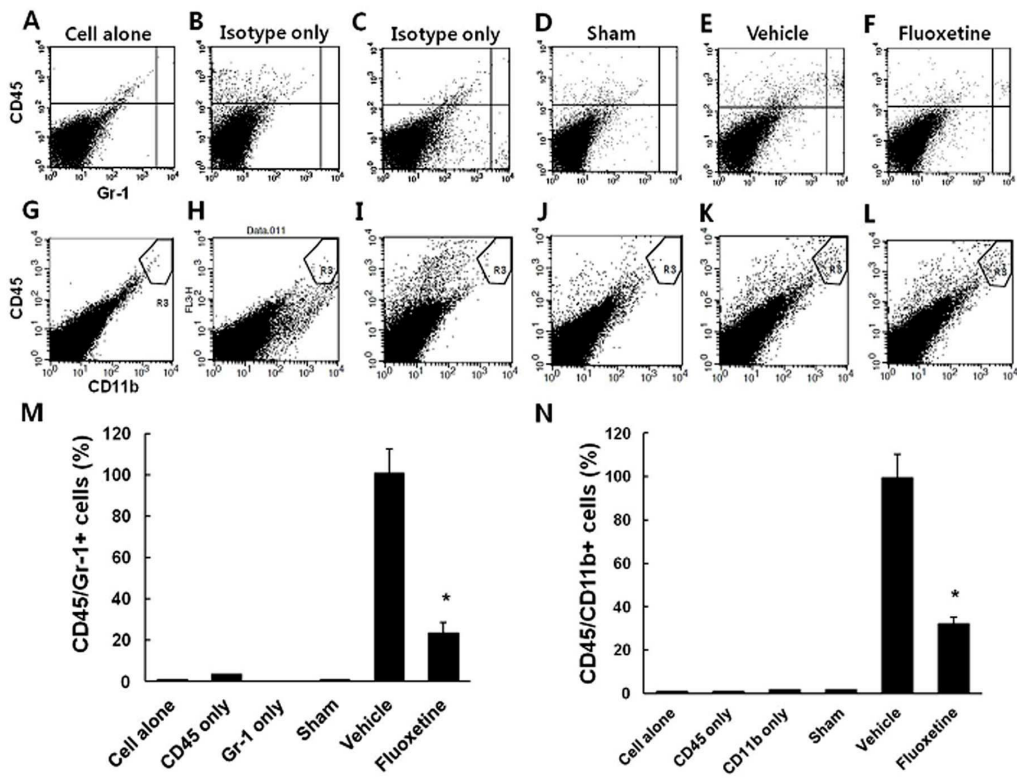
도면3



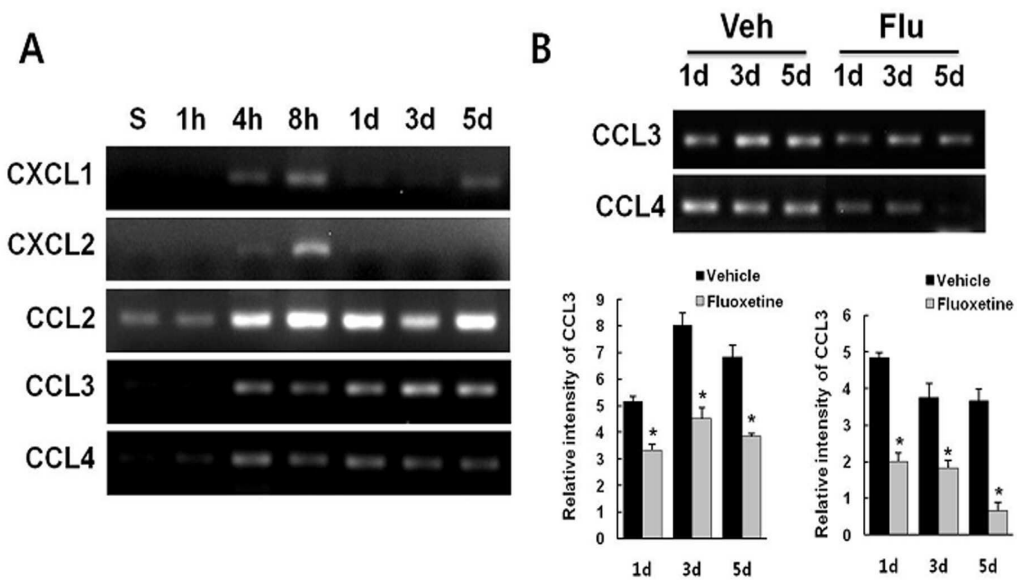
도면4



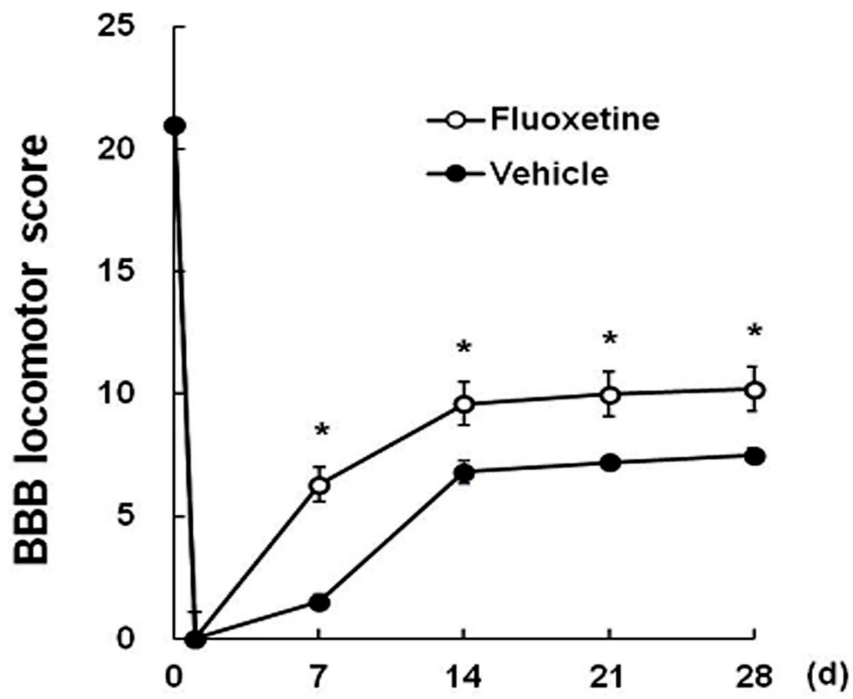
도면5



도면6



도면7



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)