

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 7월 10일 (10.07.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/106967 A1

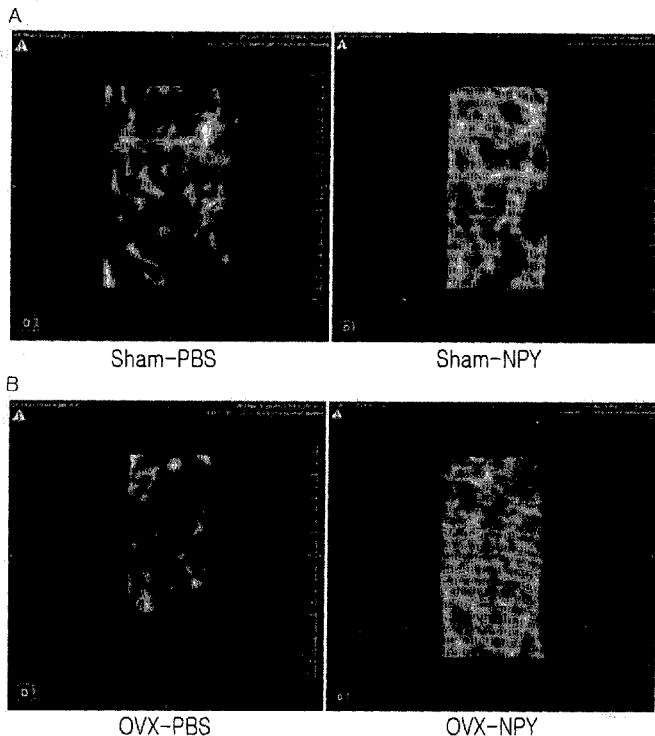
- (51) 국제특허분류:
A61K 38/17 (2006.01) A61P 19/10 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/001102
- (22) 국제출원일: 2013년 2월 13일 (13.02.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0001681 2013년 1월 7일 (07.01.2013) KR
- (71) 출원인: 경북대학교 산학협력단 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 702-010 대구시 북구 산격동 1370, Daegu (KR).

- (72) 발명자: 배재성 (BAE, Jae Sung); 701-796 대구시 동구 신천동 신천두산위브아파트 102/404, Daegu (KR). 진희경 (JIN, Hee Kyung); 705-787 대구시 남구 봉덕2동 레미안 웰리스트아파트 105/1703, Daegu (KR). 박민희 (PARK, Min Hee); 712-120 경상북도 경산시 계양동 계양아파트 104/304, Gyeongsangbuk-do (KR). 이종길 (LEE, Jong Kil); 705-752 대구시 남구 봉덕3동 대덕맨션 103/1405, Daegu (KR).
- (74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 152-766 서울시 구로구 구로동 197-22 번지 에이스테크노타워 5차 601호, 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.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING OSTEOPOROSIS WHICH COMPRISES NEUROPEPTIDE Y AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 뉴로펩티드 Y를 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating osteoporosis which comprises neuropeptide Y as an active ingredient. The neuropeptide Y according to the present invention reduces the expression of a cell adhesion factor in osteoblasts in which a Y1 receptor is present, and consequently an effect of releasing a haematopoietic stem cell from bone marrow into the blood is excellent. When a haematopoietic stem cell is released into the blood, the number of osteoclasts which induce an osteoporotic lesion by differentiation from the haematopoietic stem cell decreases, and thus progression of a bone erosion caused by osteoclasts can be prevented. Accordingly, the neuropeptide Y which is an active ingredient of the composition of the present invention is useful as a therapeutic agent for osteoporosis.

(57) 요약서: 본 발명은 뉴로펩티드 Y를 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 뉴로펩티드 Y는 Y1 수용체가 존재하는 골아세포의 세포부착인자의 발현을 감소시키고, 이에 따라 골수로부터 조혈줄기세포를 혈중으로 방출시키는 효과가 우수하다. 조혈줄기세포가 혈중으로 방출되면 조혈줄기세포로부터 분화되어 골다공증성 병변을 유도하는 파골세포의 수적인 감소가 일어난다. 따라서 본 발명의 조성물의 유효성분인 뉴로펩티드 Y는 골다공증의 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.



(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:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 뉴로펩티드 Y를 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 뉴로펩티드 Y를 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 골다공증은 폐경에 따른 급격한 호르몬의 변화에 의한 파골세포(osteoclast)의 활성화에 따른 골흡수 증가로 나타나는 폐경 후 골다공증과, 노화가 되면서 조골세포(osteoblast)의 기능이 감소하여 골형성이 감소하는 노인성 골다공증으로 분류할 수 있다. 이러한 골다공증으로 인한 골절은 심각한 활동 제한에 이르게 되고, 고관절 골절의 경우 약 15-35%의 높은 사망률과 관련되어 있기 때문에, 골다공증성 골절이 발생하기 이전에 골다공증의 진단과 치료가 중요하다(골다공증 진단 및 치료 지침 2007, 2008).
- [4] 국내의 골다공증 유병률은 2008년 기준 최근 5년간 약 3배 증가되었고, 골다공증 골절에 의한 연간 사회경제적 손실이 약 1조 500억원에 달할 정도로 심각한 수준에 이르고 있다고 보고된다(골다공증 진단 및 치료 지침 2007, 2008). 또한, 최신의 2009년도 국민건강통계에 따르면, 50세 이상 및 65세 이상 한국인 전체의 골다공증 유병률은 23.1%와 42.0%로 만성질환 중에서도 유병률이 매우 높게 나타나 국민건강에 커다란 문제로 떠오르고 있다(2009년 국민건강통계-국민건강영양조사).
- [5] 기존에 알려진 골다공증 치료제로는 비스포스포네이트(bisphosphonate)계열의 약물이 있는데, 비스포스포네이트는 골의 무기질 성분에 침착되며, 비스포스포네이트가 침착된 골을 파골세포가 탐식할 경우 가수분해되지 않는 ATP 유사체(analogue)를 형성하여 세포에 독성을 나타내거나 파골세포 내에서 다양한 방식으로 파골세포의 활성 감소 및 아폽토시스(apoptosis)를 초래해 골 흡수를 줄이고 이를 통해 골밀도를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 약물들은 비교적 안전한 것으로 알려져 있으나, 최근 장기간 사용시 정상적인 골 흡수 및 골 형성에 의한 골의 재형성(remodeling)이나 골절 이후 골 재생(healing)과정에 영향을 주어 골의 탄성이 떨어져 오히려 골 강도에 좋지 않은 영향을 줄 수 있다는 우려들이 제기되고 있으며, 실제로 이로 인해 많은 환자에서 피로 골절을 일으킨다는 보고가 있다.
- [6] 따라서 골다공증 발병과 관련된 새로운 골대사 기전의 발견 및 골다공증 예방 또는 치료제 개발의 필요성이 절실하게 요구되고 있는 실정이다.
- [7]

- [8] 전통적으로 뼈의 재생(remodeling, regeneration)은 내분비계와, 사이토카인, 성장인자와 같은 국소작용인자에 의해서 주로 조절되는 것으로 생각되어왔다. 그러나, 이러한 관점은 신경학적 인자가 골세포의 활성을 변화시킬 수 있다는 증거가 속속 밝혀지면서 점차 변하고 있으며, 최근 많은 연구에서 골조직 내에서 신경섬유 및 신경학적 인자가 발견되고 있어 이를 뒷받침하고 있다.
- [9] 교감신경계 전달물질인 뉴로펩티드 Y(neuropeptide Y, NPY)는 포유류의 뇌에 가장 풍부하게 존재하는 36개의 아미노산으로 이루어진 신경전달물질로서, 시상하부의 Y2 수용체로부터 분비되고 식욕조절, 기억, 및 발작과 같은 다양한 생리 및 병리 조건에 관여하는 것으로 알려져 있다(Balasubramaniam, 1997; Vezzani et al., 1999; Wettstein et al., 1995). 이와 관련하여서 우리 몸이 스트레스 환경에 처하면 뇌와 교감신경계로부터 뉴로펩티드 Y의 분비가 증가하고, 그 결과 섭식 작용이 증가하여 비만이 발생한다는 보고는 있었으나, 아직까지 뉴로펩티드 Y가 조혈줄기세포, 분화세포, 및 면역관련세포 등의 골수유래 줄기세포의 기능조절, 방출 및 회귀에 미치는 영향에 대한 연구보고는 알려진 바 없으며, 특히 뉴로펩티드 Y와 골다공증의 관련성에 대한 연구는 전무한 상태이다.
- [10] 본 발명의 발명자들은 뉴로펩티드 Y가 골수로부터 조혈줄기세포의 혈중으로의 방출을 유도하여 골다공증의 예방 또는 치료에 사용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명은 뉴로펩티드 Y를 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

[13]

과제 해결 수단

- [14] 본 발명은 뉴로펩티드 Y를 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[15]

발명의 효과

- [16] 본 발명에 따른 뉴로펩티드 Y는 Y1 수용체가 존재하는 골아세포의 세포부착인자의 발현을 감소시키고, 이에 따라 골수로부터 조혈줄기세포를 혈중으로 방출시키는 효과가 우수하다. 조혈줄기세포가 혈중으로 방출되면 조혈줄기세포로부터 분화되어 골다공증성 병변을 유도하는 파골세포의 수적인 감소가 일어나므로, 파골세포에 의한 골침식 진행을 억제할 수 있다. 따라서 본 발명의 조성물의 유효성분인 뉴로펩티드 Y는 골다공증의 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

[17]

도면의 간단한 설명

[18] 도 1은 뉴로펩티드 Y 킥아웃(NPY KO) 마우스 및 WT(wild type) 마우스에서의 골수조혈줄기세포 접착인자의 발현량을 나타낸 도이다.

[19] 도 2는 NPY KO 마우스 및 WT 마우스에서의 혈중 골수조혈전구세포의 수를 나타낸 도이다.

[20] 도 3은 본 발명의 뉴로펩티드 Y가 골수조혈줄기세포 접착인자의 발현량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 수행한 본 발명의 실험의 개요를 나타낸 도이다.

[21] 도 4는 본 발명의 뉴로펩티드 Y의 골수조혈줄기세포 접착인자의 발현량에 미치는 영향을 농도별로 알아본 결과를 나타낸 도이다.

[22] 도 5는 본 발명의 뉴로펩티드 Y의 투여시 골수조혈줄기세포 접착인자의 발현량 변화를 나타낸 도이다.

[23] 도 6은 본 발명의 뉴로펩티드 Y의 투여시 시간에 따른 혈중 골수조혈전구세포의 수를 나타낸 도이다.

[24] 도 7은 본 발명의 뉴로펩티드 Y의 투여시 골수조혈줄기세포의 혈중으로의 방출 정도를 골수조혈줄기세포의 표지인자를 이용하여 나타낸 도이다.

[25] 도 8은 본 발명의 뉴로펩티드 Y의 투여시 골수조혈줄기세포의 혈중으로 방출 정도를 경쟁적 이식(competitive transplantation) 실험결과로 나타낸 도이다.

[26] 도 9는 뉴로펩티드 Y 수용체 작용제(Y1 agonist)의 투여시의 골수조혈줄기세포 접착인자의 발현량 변화를 나타낸 도이다.

[27] 도 10은 뉴로펩티드 Y 수용체 작용제의 투여시의 혈중 골수조혈전구세포의 수를 나타낸 도이다.

[28] 도 11은 뉴로펩티드 Y 수용체 길항제(Y1 antagonist)의 투여시의 골수조혈줄기세포 접착인자의 발현량 변화를 나타낸 도이다.

[29] 도 12는 뉴로펩티드 Y 수용체 길항제의 투여시의 혈중 골수조혈전구세포의 수를 나타낸 도이다.

[30] 도 13은 본 발명의 뉴로펩티드 Y가 골다공증 예방 및 치료에 미치는 영향을 알아보기 위하여 수행한 실험의 개요를 나타낸 도이다.

[31] 도 14은 골다공증 모델에 뉴로펩티드 Y 투여시의 전체적인 골밀도 변화를 마이크로 씨티(micro CT)로 촬영한 후 사진으로 나타낸 도이다.

[32] 도 15는 골다공증 모델에 뉴로펩티드 Y 투여시의 골밀도 변화 및 골조직 두께 변화를 마이크로 씨티(micro CT)로 촬영한 후 그래프로 정량화하여 나타낸 도이다.

[33] 도 16은 골다공증 모델에 뉴로펩티드 Y 투여시의 골밀도 변화를 마이크로 씨티로 촬영한 후 3D로 재구성한 사진을 나타낸 도이다(A: Sham, B: OVX).

[34]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [35] 본 발명은 뉴로펩티드 Y를 유효성분으로 포함하는 골다공증 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [36]
- [37] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [38] 줄기세포 서식지(Stem cell niche)란, 줄기세포들이 발견되며, 줄기세포들이 상호작용하여 줄기세포의 운명을 조절하는 미세환경을 말한다. 상기 서식지(niche)라는 단어는 인비보(in vivo) 및 인비트로(in vitro)의 줄기세포의 미세환경을 의미할 수 있다. 배아의 발달과정에서는, 다양한 서식지 요소들이 배아줄기세포에 작용하여 유전자의 발현에 영향을 미치고, 세포의 증식 또는 분화를 유도하여 태아를 발달시킨다. 그러나 성체 내에서는 성체줄기세포를 휴지 상태로 유지하다가 조직의 손상이나 세포에 상처가 생기면 주변 각 조직의 미세환경이 줄기세포가 존재하는 서식지로 활발하게 신호를 보내어 서식지 내에 존재하는 줄기세포의 자가재생(self renewal) 또는 새로운 조직의 형성을 위한 분화를 촉진한다.
- [39] 줄기세포 서식지 내에서 줄기세포 특성을 조절하는 데는 줄기세포와 주변의 분화 세포 또는 부착 분자간의 상호작용, 세포외기질 성분, 성장인자, 사이토카인, pH등의 생리화학적 환경, 칼슘이온 농도 등의 이온강도(ionic strength), 및 ATP등의 대사산물뿐만 아니라, 줄기세포 사이의 세포-세포 상호작용이 중요하며, 줄기세포 및 줄기세포 서식지 간에는 발달단계 및 성체시기 모두에서 줄기세포의 유지를 위한 가역적 신호를 주고받는 것으로 알려져 있다.
- [40] 인간의 생체 내에는 뇌의 해마, 가쪽 뇌실(lateral ventricle)의 신경줄기세포 서식지(neural stem cell niche), 골수 내의 골수줄기세포 서식지(bone marrow stem cell niche) 등이 존재하는 것으로 알려져 있다. 그 중에서도 골수줄기세포 서식지는 골수줄기세포를 비롯하여 골수 내 존재하는 다양한 세포들 간의 상호작용을 통해 세포들의 기능 및 운명을 조절하는 분자적 미세환경으로 정의되며, 현재까지 크게 “endosteal niche”와 “perivascular niche”의 두 가지의 골수줄기세포 서식지가 알려져 있다.
- [41] 먼저 “endosteal niche”는 골수 내 기저세포들이 존재하는 미세환경으로 주로 기저세포나 골아세포(osteoblast), 파골세포(osteoclast) 등이 존재하는데, 이들 세포들은 접착인자(CXCL12, Ang-1, VCAM1, stem cell factor, IL-7 등)에 의해 다른 세포들, 특히 조혈전구세포 또는 조혈줄기세포(hematopoietic progenitor cells, HPCs, or hematopoietic stem cell, HSC)와 인접해 있으며, 외부로부터의 신경전달신호에 반응하여 골아세포에 부착되어 있던 조혈줄기세포가 혈중으로 방출되거나, 골수로 회귀하여 골수의 항상성 유지에 영향을 주는 골수줄기세포 서식지이다.
- [42] 또한, “perivascular niche”는 대식세포(macrophage), 골수중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC) 및 CAR 세포(CXCL12 abundant reticular cell)에

의해 구성된 미세환경으로, endosteal niche와 유사하게 세포간 접촉인자들에 의해 조혈줄기세포와 인접해 있으며, 스트레스나 신경전달물질 등 외부로부터의 신경전달신호에 반응하여 대식세포, 중간엽줄기세포가 잡고 있는 조혈줄기세포를 혈중으로 방출하는데 관여하는 골수줄기세포 서식지이다.

- [43] 상기와 같이, 골수서식지에서는 골수 내 줄기세포가 혈류로 방출(mobilization)되거나 방출된 골수 내 줄기세포가 회귀(homing)하는 현상이 일어난다. 골수 내 줄기세포의 혈중으로의 방출(mobilization)은 우리 몸이 스트레스를 받거나 손상을 입었을 때 골수 내에서 나타나는 중요한 현상으로 줄기세포, 면역관련세포 및 파골세포들이 골수로부터 혈관으로 이동하는 현상을 말하는데, 혈관으로 동원된 세포들은 혈류를 타고 손상이 발생한 병변부위로 이동하여 이를 치유하는데 도움을 준다. 한편, 이러한 병변부에서 치유작용을 마친 골수 내 줄기세포들은 다시 혈류를 타고 골수 내로 돌아오게 되는데 이러한 현상을 회귀(homing)라고 한다.

[44]

- [45] 본 발명의 유효성분인 뉴로펩티드 Y는 통상적인 방법으로 생체 내에서 추출하여 얻거나, 또는 시판되는 것을 구입하여 사용할 수 있다.

- [46] 본 발명의 유효성분인 뉴로펩티드 Y는 생체 내 투여될 경우, 골수 내 골수조혈줄기세포의 유지와 관련된 접착인자의 발현을 감소시키는 효과가 있어, 골수 내에 유지된 골수조혈줄기세포, 또는 골수조혈전구세포의 혈중으로의 방출을 유도하는 효과가 우수하다.

[47]

- [48] 골수조혈줄기세포는 골수 내에서 림프구성세포와 골수성세포로 분화될 수 있다. 골수조혈줄기세포로부터 분화되는 골수성세포 중 하나인 파골세포는 골수 내 골아세포와의 균형을 통해 골 형성 및 침식 작용을 유지하고 있다. 이러한 균형이 깨어지면 파골세포의 수적 증가 및 골 침식 작용의 속도가 빠르게 진행되어 골다공증이 발생하게 된다.

- [49] 골수 내 파골세포의 수를 감소시키기 위해 파골세포의 전구세포(osteoclast precursors)의 혈중 방출을 유도하는 물질인 S1P (sphingosine-1-phosphate)를 투여하거나, S1P 수용체의 작용제(FTY720)를 투여하게 되면 골 형성이 증가하는 것으로 알려져 있으며(nature, 2009; Masaru Ishii *et al.*), 마찬가지로 파골세포의 원시세포인 골수조혈줄기세포의 혈중으로 방출을 유도하게 되면 파골세포로의 분화가 감소되어 골수 내 파골세포의 수가 감소된다.

- [50] 상기와 같이 조혈줄기세포의 혈중 방출로 인한 파골세포의 수적 감소는 파골세포에 의한 골 침식 작용을 감소시킴으로써 골다공증 병변의 진행을 억제하게 된다. 따라서, 본 발명의 뉴로펩티드 Y는 조혈줄기세포의 혈중으로의 방출을 유도하여 골수내 파골세포로의 분화를 감소시킴으로써 골다공증의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[51]

- [52] 본 발명의 조성물은 뉴로펩티드 Y와 함께 골다공증의 예방 또는 치료효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 포함할 수 있다.
- [53] 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로오스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [54] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 상기 뉴로펩티드 Y의 일일 투여량은 약 0.01~1 mg/kg, 바람직하게는 약 0.05~0.1) mg/kg이며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 바람직하다.
- [55] 본 발명의 조성물은 골다공증의 예방, 치료 또는 골밀도의 증가를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[56]

발명의 실시를 위한 형태

- [57] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[58]

[59] 실시예 1. 실험 재료 및 실험 방법

[60] 1-1. 마우스의 준비 및 약물처리 프로토콜

- [61] 실험에 사용된 모든 마우스는 6주령 내지 8주령의 마우스로, 뉴로펩티드 Y(NPY, neuropeptide Y)를 유전적으로 녹아웃(knock out)시킨 NPY KO 마우스 및 NPY WT(wild type) 마우스, Ly5.1 (BoyJ)마우스 및 Ly5.2 (C57BL/6)마우스이며 Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

- [62] 뉴로펩티드 Y, Y1 작용제(agonist), Y1 길항제(antagonist)는 Bache으로부터 구입하여 사용하였다. 인 비트로(in vitro) 실험을 위하여는 NPY 1, 5 nM을 각

배지에 희석하여 주입하였다. 또한, 인 비보(in vivo) 실험을 위하여는 한 그룹 당 3마리, 총 15마리의 마우스를 100 mg/kg 케타민(ketamine) 및 10 mg/kg 자일라진(xylazine) 혼합액으로 마취시키고, 각각 뉴로펩티드 Y, Y1 작용제, Y1 길항제 50 μ g/kg, PBS (Gibco) 100 μ l를 마우스의 꼬리 정맥 주사를 통해 주입하였다.

- [63] 또한, 골다공증 모델을 만들기 위해 한 그룹당 3마리, 총 6마리의 12 주령 암컷 마우스를 난소적출 수술을 실시하였고, 일주일 후에 50 μ g/kg의 뉴로펩티드 Y와 PBS(Gibco) 100 μ l를 12시간 간격으로 하루에 2회씩 3주간 복강 투여하였다. 대조군으로는 골다공증의 Sham 모델로 한 그룹당 3마리, 총 6마리의 암컷마우스의 피하절개술만 실시를 하였고, 100 μ l의 PBS또는 50 μ g/kg의 뉴로펩티드 Y를 복강 투여하였다.

[64]

[65] **1-2. 골수 중간엽 줄기세포의 배양 및 골아세포로의 분화 유도**

- [66] 4주 내지 6주된 C57BL/6 마우스를 마취 후 희생시킨 다음, 경골(tibias)과 대퇴골(femurs)을 절개하였다. 경골 및 대퇴골로부터 골수를 수거하고 단일세포 현탁액을 40 μ m cell strainer (Becton-Dickinson LA β ware, Franklin Lakes, NJ)를 사용하여 얻었다. 대략 10^7 개의 세포를, 항생제가 첨가된 중간엽 줄기세포 Stimulatory Supplements (Stem Cell Technologies, Inc) 및 MesenCult™ MSC Basal 배지를 함유하는 75-cm²플라스크에 분주하였다. 상기 세포들을 1주 동안 배양하고, 골아세포(osteoblast)로의 분화를 위해 StemXVivo Osteogenic supplement (20X)와 페니실린-스트렙토마이신(Penicillin-streptomycin, 100X)이 첨가된 StemXVivo Osteogenic/Adipogenic Base Media (R&D systems)로 3주간 배양하였고, 배양액은 매 2일 내지 3일 간격으로 교체하였다.

[67]

[68] **1-3. 실시간 정량 PCR(Real-time quantitative PCR)**

- [69] 골아세포(osteoblast)에 존재하는 조혈줄기세포 접착인자(Sdf-1a, Kitl, Angpt1, IL7, Vcam1, Spp1)의 발현량을 측정하기 위하여 실시간 정량 PCR법을 사용하였다.

- [70] 총 RNA를 RNeasy Plus 미니 키트 (Qiagen, Korea, Ltd)를 사용하여 세포 용출액 및 골수 세포로부터 추출하고, Clontech (Mountain View, CA)사의 키트를 사용하여 5 μ g 총 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 또한, Corbett research RG-6000 real-time PCR 기기를 사용하여, 95 °C, 10분; 95 °C, 10초; 58 °C, 15초; 72 °C, 20초;를 1 사이클로 하여 40 사이클을 반복하는 실시간 정량 PCR을 수행하였다.

- [71] 상기 실시간 정량 PCR에 사용한 프라이머는 표 1과 같다.

- [72] 표 1

[Table 1]

SDF-1 α	F	5'-TTCCTATCAGAGCCCATAGAG-3'
	R	5'-CCAGACCATCCTGGATAATG-3'
Kit ligand (stem cell factor; SCF)	F	5'-CCAAAAGCAAAGCCAATTACAAG-3'
	R	5'-AGACTCGGGCCTACAATGGA-3'
Angiopoietin-1 (Angpt1)	F	5'-ACGGGGGTCAATTCTAAG-3'
	R	5'-GCCATTCCTGACTCCACA-3'
Vascular cell adhesion molecule-1 (Vcam1)	F	5'-AAAAGCGGAGACAGGAGACA-3'
	R	5'-AGCACGAGAAGCTCAGGAGA-3'
IL7	F	5'-ATTGAACCTGCAGACCAAGC-3'
	R	5'-GCAACAGAACAAGGATCAGG-3'
Spp1 (osteopontin)	F	5'-TGTGGAGTTTTAGAGATATTAGATAG TGGG-3'
	R	5'-AACA CACTCTTAACACCACTAAATCACC-3'
GAPDH	F	5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'
	R	5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'

[73]

[74] **1-4. Colony-forming cell(CFC) assays**

[75] 마우스의 혈중 골수 조혈전구세포의 수를 측정하기 위하여 CFC 분석을 수행하였다.

[76] 먼저 마우스를 마취한 후, 심장 채혈로 500 μ l 내지 700 μ l의 혈액을 헤파린 튜브에 모은 다음, 염화암모늄 용액(Stem Cell Technologies, Inc. 1:10)에 넣고 15분간 얼음에 넣어두어 적혈구를 제거하였다. 2분 내지 3분 간격으로 적혈구가 잘 제거되도록 흔들어 준 뒤 7분간 1000 rpm에서 원심 분리시켰다. 상층액을 제거하고 2% 소태아혈청(FBS, Gibco)이 공급된 IMDM(Gibco)으로 세척하였다. 세척한 세포 (3×10^5 per mouse)를 메틸셀룰로오스-기반 배양액(methylcellulose-based media, Methocult, Stem cell)이 포함된 35 mm 접시 3개에 각각 분주 (1×10^5 per dish)하여 상기 세포를 2주 동안 배양한 뒤 플라스크에 생긴 콜로니의 개수를 세었다.

[77]

[78] **1-5. Flow Cytometry Analysis (FACs)**

[79] 마우스의 골수 내에 존재하는 골수조혈줄기세포의 수에는 어떠한 변화가 있는지 알아보기 위해, 정상 마우스에 각각 NPY 및 PBS를 주입한 후 60분 뒤에

골수를 채취하여 골수조혈줄기세포의 표지인자인 Lineage, Sca-1, c-kit, CD48, CD150 다섯 가지의 항체를 사용하여 FACs로 분석하였다.

- [80] 골수조혈줄기세포 분석을 위해, 4주 내지 6주된 C57BL/6 마우스의 경골(Tibias)과 대퇴골(femurs)로부터 수거한 골수를 염화암모늄 용액(Stem Cell Technologies, Inc. 1:4)으로 적혈구를 제거한 후, 10% 소태아혈청(FBS, Gibco)과 1% 아지드 나트륨(sodium azide, Sigma-Aldrich)이 포함된 PBS(Gibco)용액으로 세척한 뒤 10분간 300 xg에서 원심 분리시켰다. 골수에 포함된 조혈세포들은 biotinylated lineage 항체(Miltenyi Biotec)를 이용하여 MACs 비드(Miltenyi Biotec)로 제거하였고, 남은 세포들은 Sca-1-PECY7, c-kit-APC, CD150-PE, CD48-FITC(BD science) 항체를 이용하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후 LSRII (BD science) 유세포 분석기(flow cytometry)로 분석하였다.

[81]

[82] **1-6. Competitive transplantation assay**

- [83] 마우스의 골수 내에 존재하는 골수조혈줄기세포 및 골수조혈전구세포의 혈중으로 동원을 확인할 수 있는 실험 방법으로 Competitive transplantation 실험을 실시하였다.

- [84] 전신을 10 Gy 조사 (2 x 5 Gy)에 노출시킨 수용체(recipient) 마우스에 Ly5.2 (C57BL/6) 공여체(donor) 마우스의 골수세포 (2 x 10⁵) 및 Ly5.1 (BoyJ) 마우스의 골수세포 (2 x 10⁵)를 혼합하여 꼬리 정맥을 통해 주입하였다. 골수세포 이식 후 8주째에, 수용체 마우스의 혈액을 채취하여 CD45.1-PE (BD science), CD45.2-FITC (BD science)항체를 이용하여 LSRII (BD science) 유세포 분석기로 분석하였다. Repopulating units (RU)은 하기 수학적 1의 계산법을 이용하여 나타내었다.

- [85] [수학적 1]

- [86] $\text{Repopulating unit(RU)} = (20 \times \text{CD45.2\%}) / (100 - \text{CD45.2\%})$

[87]

[88] **1-7. 마이크로 씨티(micro CT)**

- [89] 마우스로부터 대퇴골을 분리하여 80% 에탄올에 냉장 보관한 뒤, micro CT촬영을 위해 micro CT scanner(Inveon preclinical CT, Siemens Healthcare, Hoffman Estates, IL)로 조직 두께 40 μm , 600 msec의 노출시간, 70 keV의 광자에너지, 400 μA 의 전류를 흘려 측정하였다. 골밀도(bone volume/total volume) 및 골조직 두께(trabecular thickness) 측정을 위해서 그룹당 동일한 부위의 2.5 x 0.5 x 0.5 mm³의 부피부분을 Siemens Inveon Software를 이용하여 측정하였다.

[90]

[91] **실시예 2. 뉴로펩티드 Y 발현 유전자의 녹아웃이 조혈줄기세포 접착인자의 발현 및 혈중 조혈줄기세포의 수에 미치는 영향**

- [92] 뉴로펩티드 Y를 발현하는 유전자를 녹아웃(knock out)시킨 마우스(이하 NPY KO 마우스)의 골아세포에 존재하는 조혈줄기세포 접착인자(Sdf-1a, Kitl, Angpt1,

IL7, Vcam1, Spp1)의 발현 및 혈중의 골수조혈전구세포의 수에 미치는 영향을 알아보기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[93]

[94] **2-1. 조혈줄기세포 접착인자의 발현량 확인**

[95] 먼저, Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA)로부터 NPY KO 마우스 및 WT(wild type) 마우스를 구입하여 각 마우스의 골수를 채취하였다. 채취한 골수에서 상기 실시예 1-3에 기재된 방법으로 총 RNA의 추출 cDNA를 합성하여 골수 내 골수조혈줄기세포의 유지에 관여하는 주요 접착인자들인 Sdf-1a, Kitl, Angpt1, IL7, Vcam1, Spp1의 발현량을 실시간 정량 PCR로 분석하였다.

[96] 결과는 도 1에 나타내었다.

[97] 도 1에 나타낸 바와 같이, 상기 6개의 인자들의 발현량이 모두 WT 마우스의 골수에서보다 NPY KO 마우스의 골수에서 더 증가한 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$, $n=3$ per group).

[98]

[99] **2-2. 혈중 골수조혈전구세포의 수 측정**

[100] NPY KO 마우스와 WT 마우스의 혈액에 존재하는 골수조혈전구세포의 수를 측정하기 위해 실시예 1-4에 기재된 방법으로 실험을 수행하였다. 마우스의 심장에서 혈액을 채취하고 CFC 분석법에 따라 세포의 집락을 계수하여 혈액 내에 존재하는 골수조혈전구세포의 수를 조사하였다.

[101] 결과는 도 2에 나타내었다.

[102] 도 2에 나타낸 바와 같이, WT 마우스에 비해 NPY KO 마우스의 혈액 내 골수조혈전구세포의 수가 상당히 감소한 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$, $n=3$ per group).

[103]

[104] 상기 결과로부터, NPY KO 마우스의 골수 내에 존재하는 골수조혈줄기세포 접착인자의 발현량이 증가하여 골수조혈줄기세포가 혈류로 방출되기 어렵기 때문에 혈액에서 골수조혈전구세포의 수가 감소된다는 것을 알 수 있다.

[105]

[106] **실시예 3. 본 발명의 뉴로펩티드 Y가 조혈줄기세포 접착인자의 발현에 미치는 영향**

[107] 뉴로펩티드 Y가 골수 내에서 골수조혈줄기세포의 유지에 관여하는 접착인자의 발현량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시예 1-2 및 실시예 1-3의 방법에 따라 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[108] 먼저 4주 내지 6주된 C57BL/6 마우스로부터 골수를 채취하여 골수 중간엽줄기세포(BM-MSC)를 수거한 뒤, 골세포 분화 유도 배지로 3주간 배양하여 골아세포(osteoblast)로 분화시켰다. 21 일째에 뉴로펩티드 Y를 0, 1, 5 nM로 3일간 처리 한 뒤, 골세포를 수거하여 실시간 정량 PCR로 6가지 접착인자의 발현량을 조사하였다.

[109] 실험과정에 관한 모식도는 도 3에 나타내었고, 상기 접착인자의 발현량 측정 결과는 도 4에 나타내었다.

[110] 도 4에 나타낸 바와 같이, 뉴로펩티드 Y를 처리하지 않은 골아세포(control)와 비교시 1, 5 nM의 뉴로펩티드 Y를 처리한 골세포의 Sdf-1a, Kitl, Angpt1의 발현량이 농도의존적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$, $n=3$ per group).

[111]

[112] 상기 결과로부터, 뉴로펩티드 Y가 골아세포에 존재하는 골수조혈줄기세포 접착인자의 발현량을 감소시킴으로써 골수에서 혈액으로의 골수조혈줄기세포의 방출을 유도할 가능성이 있음을 알 수 있다.

[113]

[114] **실시예 4. 본 발명의 뉴로펩티드 Y의 골수 내 골수조혈줄기세포의 혈중내 방출 조절에 미치는 영향**

[115] **4-1. 골수조혈줄기세포 접착인자의 발현량 확인**

[116] 본 발명의 뉴로펩티드 Y가 생체 내에서 골수조혈줄기세포 접착인자의 발현량에 미치는 영향을 알아보기 위해, 뉴로펩티드 Y 50 $\mu\text{g/kg}$ 을 마우스 꼬리 정맥을 통해 주사하고 60분 후에 마우스의 경골(tibia)과 대퇴골(femur)로부터 골수를 채취하여 실시간 정량 PCR법으로 접착인자의 발현량을 조사하였다.

[117] 결과는 도 5에 나타내었다.

[118] 도 5에 나타낸 바와 같이, Sdf-1a, Kitl, Angpt1, Vcam1의 주요 접착인자들의 발현량이 감소되었다 ($p < 0.05$, $n=3$ per group).

[119]

[120] **4-2. 혈중 골수조혈전구세포의 수 측정(CFC 분석)**

[121] 본 발명의 뉴로펩티드 Y의 투여에 의한 접착인자의 발현량 감소로 인해 혈액으로 골수조혈전구세포의 방출이 유도되었는지 알아보기 위해, NPY 50 $\mu\text{g/kg}$ 을 마우스 꼬리 정맥을 통해 주사하고 15분, 60분, 12시간 간격으로 마우스의 심장에서 혈액을 채취하여 CFC(Colony-forming cell) 분석을 실시하였다.

[122] 결과는 도 6에 나타내었다.

[123] 도 6에 나타낸 바와 같이, 뉴로펩티드 Y 주입 60분 뒤에 혈중으로 방출된 골수조혈전구세포의 콜로니 수가 가장 많았고, 뉴로펩티드 Y 주입 12시간 뒤에 확인한 콜로니 수가 PBS를 주입한 마우스의 혈중 골수조혈전구세포의 콜로니 수와 비슷한 것으로 보아 주입 12시간 후에는 뉴로펩티드 Y에 의한 골수조혈전구세포의 방출이 정상으로 회복되는 것으로 보인다 ($p < 0.05$, $n=3$ per group).

[124]

[125] **4-3. 혈중 골수조혈줄기세포의 수 측정(FACs 분석)**

[126] 본 발명의 뉴로펩티드 Y의 투여가 골수 내에 존재하는 골수조혈줄기세포의 수에 미치는 영향을 알아보기 위해, 실시예 1-5의 방법에 따른 하기의 실험을

수행하였다.

- [127] 먼저 정상 마우스를 각군당 3마리씩 두군으로 나누어 각각 50 $\mu\text{g/kg}$ 의 뉴로펩티드 Y와 PBS(Gibco) 100 μl 를 투여하고 60분 후에 골수를 채취하였다. 채취한 골수로부터 골수조혈줄기세포의 표지인자인 Lineage, Sca-1, c-kit, CD48, CD150 다섯 가지의 항체를 사용하여 FACs로 분석하였다.
- [128] 결과는 도 7에 나타내었다.
- [129] 도 7에 나타낸 바와 같이, Lin-, Sca-1+, c-kit+, CD48-, CD150+로 표지되는 골수조혈줄기세포가 PBS를 투여하였을 때 보다 뉴로펩티드 Y를 투여하였을 때 골수 내에서 감소되었다 ($p < 0.05$, $n=3$ per group).

[130]

[131] **4-4. 혈중 골수조혈줄기세포 및 골수조혈전구세포의 방출 확인(Competitive transplantation assay)**

- [132] 본 발명의 뉴로펩티드 Y의 투여에 의한 골수조혈줄기세포 및 골수조혈전구세포의 혈중으로 방출을 확인하기 위하여, 실시예 1-6의 방법에 따라 Competitive transplantation 실험을 수행하였다.
- [133] 전신을 10 Gy 조사 (2 x 5 Gy)에 노출시킨 수용체(recipient) 마우스에 Ly5.2 (C57BL/6) 공여체(donor) 마우스의 골수세포 (2 x 10⁵) 및 Ly5.1 (BoyJ) 마우스의 골수세포 (2 x 10⁵)를 혼합하여 꼬리 정맥을 통해 주입하였다. 골수세포 이식 후 8주째에, 수용체 마우스의 혈액을 채취하여 CD45.1-PE (BD science), CD45.2-FITC (BD science)항체를 이용하여 LSRII (BD science) 유세포 분석기로 분석하였다. Repopulating units (RU)은 하기 수학적 식 1의 계산법을 이용하여 나타내었다.
- [134] [수학적 식 1]
- [135]
$$\text{Repopulating unit(RU)} = (20 \times \text{CD45.2\%}) / (100 - \text{CD45.2\%})$$
- [136]
- [137] 뉴로펩티드 Y를 주입한 마우스의 골수 (CD45.2+)와 Ly5.1 마우스의 골수 (CD45.1+; CD45.2+세포와 구별하기 위함)를 함께 혼합하여, 전신을 10 Gy(2x5 Gy)의 방사선에 조사시킨 정상마우스(recipient)에 주입하였다. 이로부터 8주 후에 골수를 주입시킨 마우스의 혈액을 채취하여 CD45.1+, CD45.2+ 세포의 비율(%)을 FACs 분석법으로 분석하였다.
- [138] 결과는 도 8에 나타내었다.
- [139] 도 8에 나타낸 바와 같이, 뉴로펩티드 Y를 주입한 정상마우스의 골수인 CD45.2+ 세포의 비율(%)은 대조군인 PBS를 주입한 마우스 골수의 CD45.2+ 세포보다 감소되었다.
- [140] RU(Repopulating unit)값 또한 PBS를 주입한 마우스의 골수를 주입시킨 마우스의 혈액에서보다 감소되었다($p < 0.05$, $n=3$ per group).
- [141]
- [142] 상기 결과로부터, 본 발명의 뉴로펩티드 Y를 주입한 마우스의 골수에서는

CD45.2+인 골수조혈줄기세포가 혈중으로 방출되어, 조혈줄기세포의 수가 PBS를 주입한 마우스의 골수에 존재하는 CD45.2+인 골수조혈줄기세포보다 적게 존재하게 되므로, 골수를 이식한 수용체 마우스의 골수 내에 CD45.2+의 공여자유래 골수조혈줄기세포(donor-derived BM-HSC)가 적게 존재함을 알 수 있다.

[143]

[144] 실시에 5. 본 발명의 뉴로펩티드 Y 수용체의 활성이 골수 내 골수조혈줄기세포 접착인자 발현 및 골수조혈전구세포의 방출에 미치는 영향

[145]

[146] 뉴로펩티드 Y 수용체인 Y1 수용체는 골수 내에서 뼈 형성에 관여하는 골아세포에 존재하므로, 뉴로펩티드 Y에 의한 골수조혈줄기세포 접착인자의 발현량과 골아세포의 Y1 수용체를 통하여 이루어지는 것인지를 알아보기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[147]

[148] **5-1. 뉴로펩티드 Y 수용체 활성화가 골수조혈줄기세포 접착인자의 발현 및 혈중 골수조혈전구세포의 방출에 미치는 영향**

[149] 먼저 실험군으로는 뉴로펩티드 Y와 유사한 작용을 하여 Y1 수용체와 반응하는 Y1 작용제(agonist) 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 꼬리정맥 주사를 통해 주입한 마우스를 사용하였다. 대조군으로는 뉴로펩티드 Y 및 PBS를 동량 주입한 마우스를 사용하였다. 60분 후에 각각의 마우스의 골수를 채취하여 실험에 1-3의 실시간 정량 PCR방법으로 골수조혈줄기세포 접착인자들의 발현량을 조사하였다.

[150] 결과는 도 9에 나타내었다.

[151] 도 9에 나타낸 바와 같이, 뉴로펩티드 Y 수용체의 활성화는 뉴로펩티드 Y를 투여했을 때보다 대체로 골수조혈줄기세포의 접착인자인 Sdf-1a, Angpt1, Vcam1, Spp1 의 발현량을 더욱 감소시키는 것을 알 수 있었다 ($p < 0.05$, $n=3$ per group).

[152]

[153] 또한, 뉴로펩티드 Y 수용체의 활성화가 혈중으로의 골수전구세포 방출에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시예 1-4의 CFC 분석법으로 골수전구세포의 집락수를 계수하였다.

[154] 결과는 도 10에 나타내었다.

[155] 도 10에 나타낸 바와 같이, 뉴로펩티드 Y수용체의 활성화는 뉴로펩티드 Y를 투여했을 때보다 골수조혈전구세포의 혈중 방출을 증가시킴을 알 수 있었다 ($p < 0.05$, $n=3$ per group).

[156]

[157] **5-2. 뉴로펩티드 Y 수용체 억제제가 골수조혈줄기세포 접착인자의 발현 및 혈중 골수조혈전구세포의 방출에 미치는 영향**

[158]

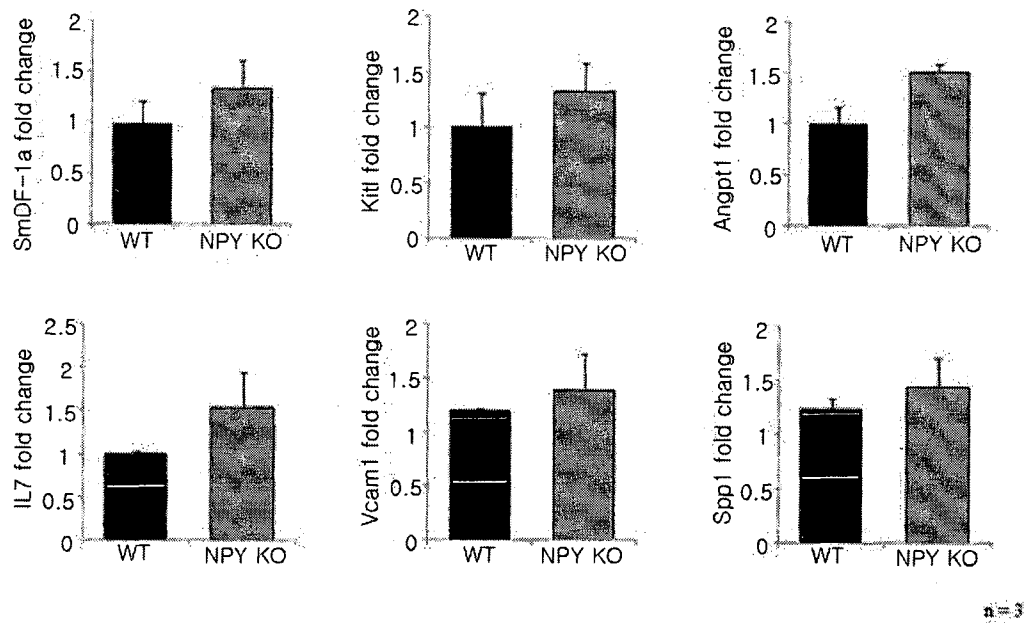
- [159] 실험군으로 뉴로펩티드 Y가 Y1 수용체와 반응하는 것을 방해하는 Y1 길항제(antagonist) 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 꼬리정맥 주사를 통해 주입한 마우스를 사용한 것을 제외하고는 상기 5-1과 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.
- [160] 결과는 도 11에 나타내었다.
- [161] 도 11에 나타낸 바와 같이, 뉴로펩티드 Y 수용체의 억제제는 골수조혈줄기세포의 접착인자인 Sdf-1a, Kitl, Angpt1, Vcam1의 발현량을 감소시키지 않는 반면, 뉴로펩티드 Y의 투여는 골수조혈줄기세포 접착인자의 발현을 대체로 감소시키는 것을 확인하였다 ($p < 0.05$, $n=3$ per group).
- [162]
- [163] 또한, 뉴로펩티드 Y 수용체의 억제가 혈중으로의 골수조혈전구세포 방출에 미치는 영향을 알아보기 위하여 상기 5-1과 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.
- [164] 결과는 도 12에 나타내었다.
- [165] 도 12에 나타낸 바와 같이, 뉴로펩티드 Y 수용체의 억제는 뉴로펩티드 Y를 투여했을 때보다 골수조혈전구세포의 혈중 방출을 감소시킴을 알 수 있었다 ($p < 0.05$, $n=3$ per group).
- [166]
- [167] 상기 결과로부터, 골수조혈전구세포의 혈중 동원이 Y1 작용제에 의해서는 증가되고, Y1 길항제에 의해서는 증가하지 않는 것으로 보아 뉴로펩티드 Y에 의한 골수조혈줄기세포 및 골수조혈전구세포의 혈중 방출은 골아세포에 존재하는 Y1 수용체와 반응하여 골수조혈줄기세포 접착인자의 발현량을 감소시킴으로써 일어나는 것임을 알 수 있다.
- [168]
- [169] 실시예 6. 본 발명의 뉴로펩티드 Y가 골다공증 예방 및 치료에 미치는 영향
- [170] 본 발명의 뉴로펩티드 Y의 투여에 의한 조혈줄기세포의 혈중으로 방출이 골다공증 예방 및 치료에 효과가 있는지 알아보기 위하여 실시예 1-1 및 1-7의 방법에 따라 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [171] 실험과정에 대한 모식도는 도 13에 나타내었다.
- [172] 먼저 골다공증 모델을 만들기 위해 12주된 C57BL/6 암컷 마우스를 각군당 3마리씩 난소적출 수술을 실시하였고, 일주일 후에 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 뉴로펩티드 Y와 PBS(Gibco) 100 μl 를 12시간 간격으로 하루에 2회씩 3주간 복강 투여하였다. 대조군으로는 정상 마우스에 피하절개술만 실시하여 PBS 100 μl 또는 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 뉴로펩티드 Y를 복강 투여한 마우스를 사용하였다. 22일째에 마우스의 대퇴골을 분리하여 80% 에탄올에 냉장 보관한 뒤 마이크로 시티(micro CT)를 이용하여 골밀도 및 골조직 두께를 측정하였다.
- [173] 대조군과 골다공증 모델의 골의 마이크로 시티(micro CT) 관찰 결과는 도 14에, 이들의 골밀도 및 골조직 두께 변화 결과에 대한 그래프는 도 15에 나타내었으며, 대조군과 골다공증 모델의 동일한 골조직의 마이크로 시티 관찰 결과를 3D로 재구성한 사진은 도 16에 나타내었다.

- [174] 도 14에 나타낸 바와 같이, 마이크로 씨티(micro CT) 로 촬영한 사진에서 골다공증 마우스에 뉴로펩티드 Y를 주입한 경우, 마우스의 전체적인 골밀도가 PBS를 주입한 골다공증 마우스에서보다 더 높게 관찰되었으며, 대조군 모델에서도 이와 마찬가지로 뉴로펩티드 Y를 주입한 마우스에서, PBS를 주입한 마우스에서보다 골밀도가 더 높게 관찰되었다.
- [175] 또한, 도 15에 나타낸 바와 같이, 골다공증 마우스에 뉴로펩티드 Y를 주입한 마우스의 골밀도 퍼센트(BV/TV, %) 및 골조직 두께(Trabecular Thickness, mm)가 PBS를 주입한 마우스 보다 증가한 것을 확인하였고, 대조군 모델에서도 유사한 경향을 확인하였다 (n=3 per group).
- [176] 한편, 도 16에 나타낸 바와 같이, 뉴로펩티드 Y를 투여하자 골다공증 마우스의 감소된 골밀도가 PBS 투여군에 비하여 확연히 증가하는 것을 확인하였고, 대조군 그룹에서도 뉴로펩티드 Y를 주입 하였을 때의 골밀도가 PBS 투여군에 비하여 증가 됨을 알 수 있었다.
- [177]
- [178] 상기 결과로부터, 골다공증 모델에서 장기적인 뉴로펩티드 Y의 투여에 의한 골수조혈줄기세포의 혈중 방출은 골수 내에서 조혈줄기세포로부터 파골세포로의 분화 및 파골세포의 수적인 감소를 유도함으로써 골다공증 마우스의 골밀도 및 골조직 두께 감소를 억제시키는 것임을 알 수 있다.
- [179]
- [180]

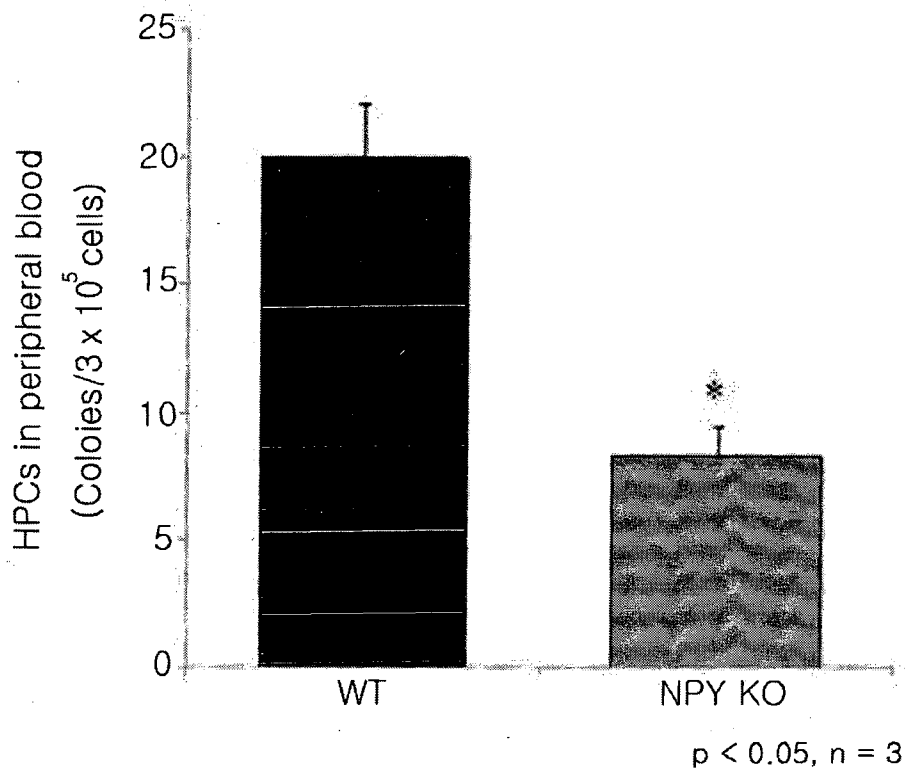
청구범위

- [청구항 1] 뉴로펩티드 Y를 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 뉴로펩티드 Y는 골아세포에 존재하는 Y1 수용체에 작용하여 골아세포상의 골수조혈줄기세포 접착인자 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 뉴로펩티드 Y는 골수 내로부터 혈중으로 골수조혈줄기세포의 방출을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[Fig. 1]



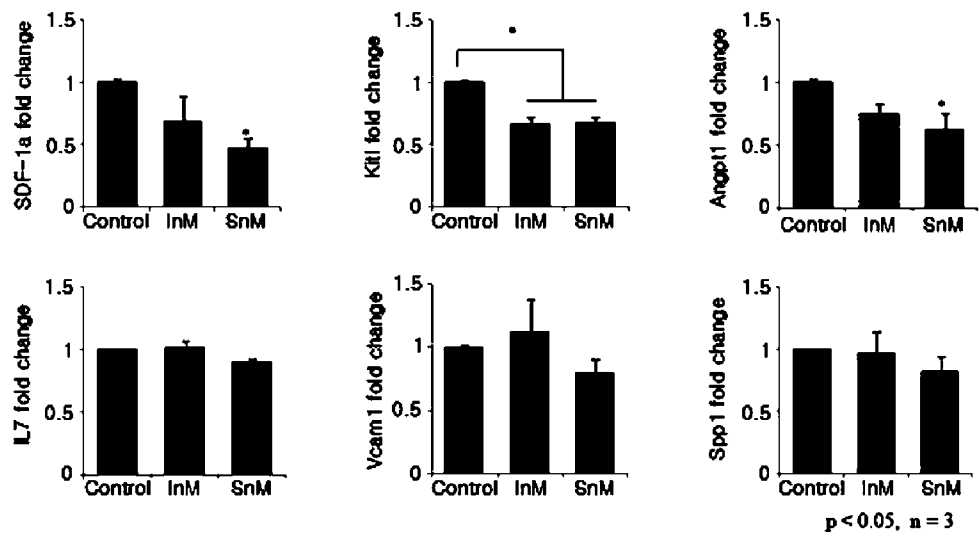
[Fig. 2]



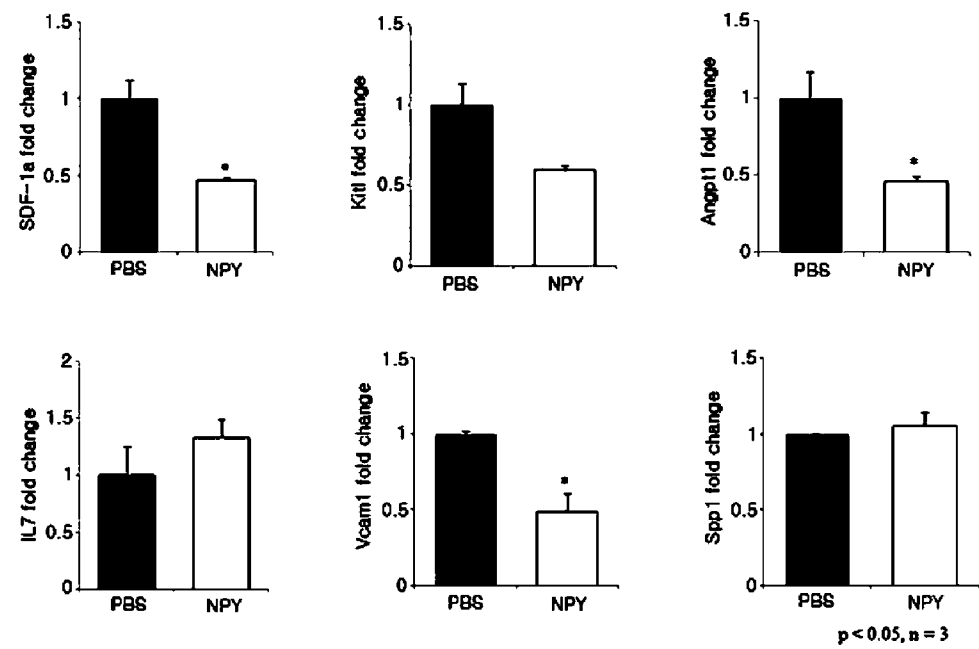
[Fig. 3]



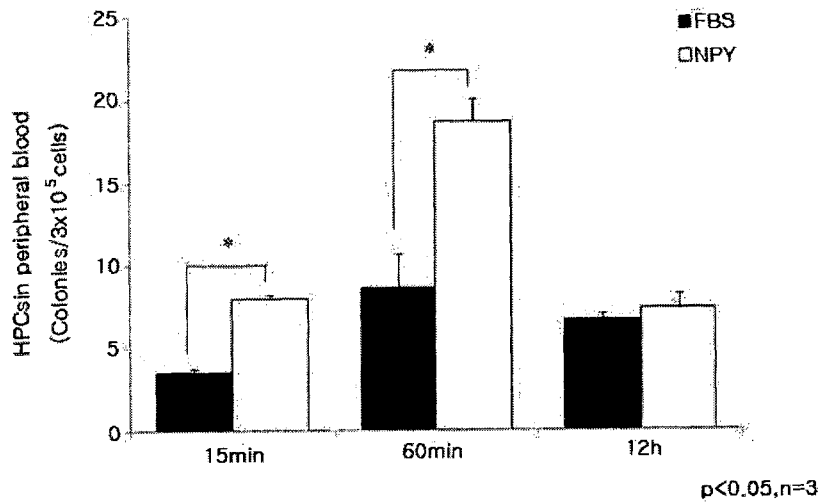
[Fig. 4]



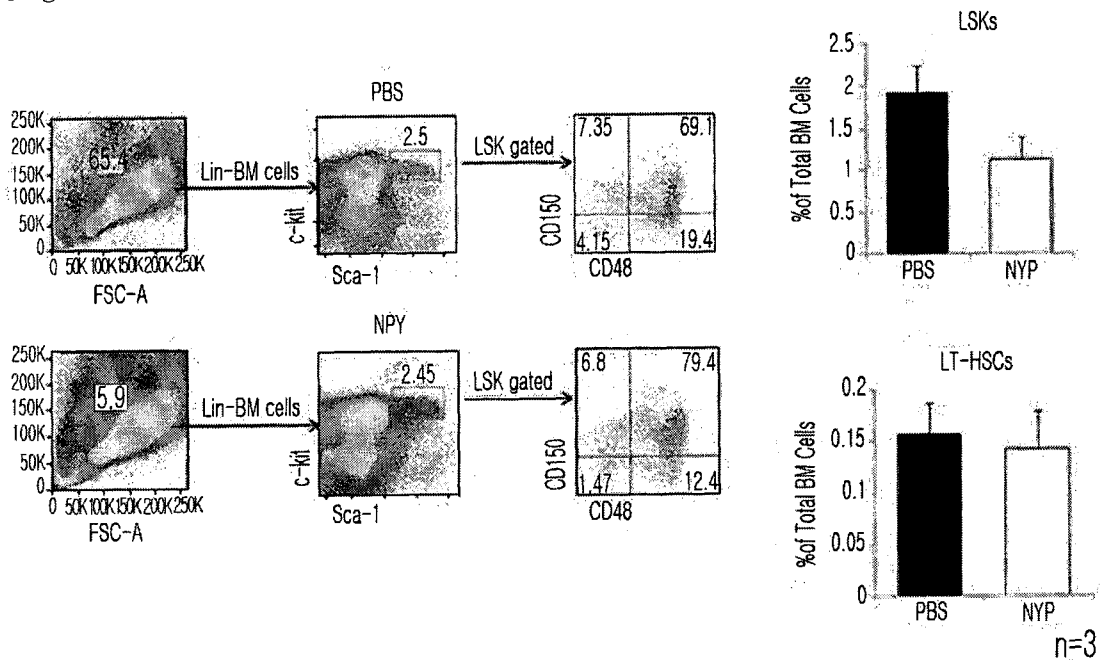
[Fig. 5]



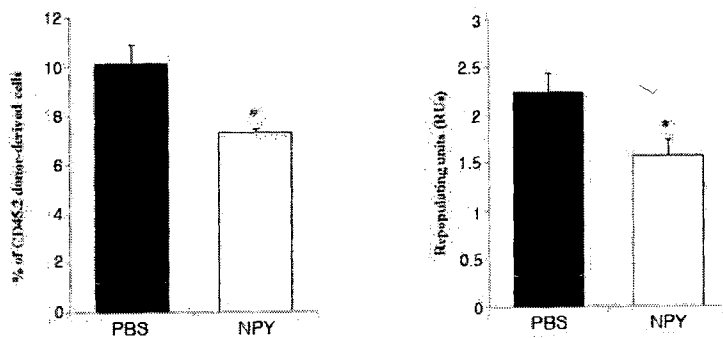
[Fig. 6]



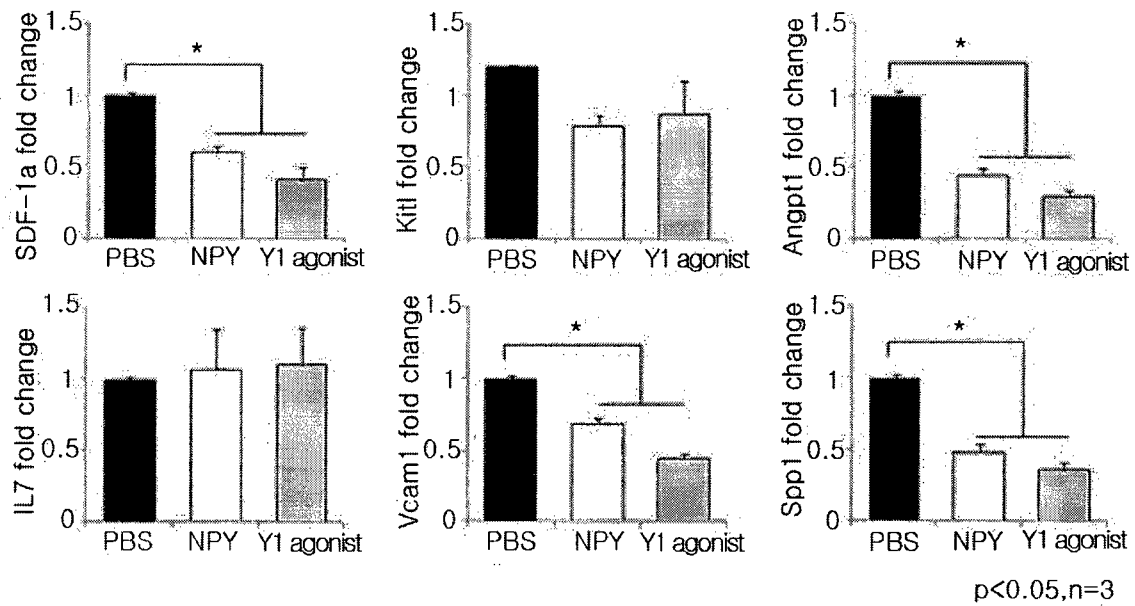
[Fig. 7]



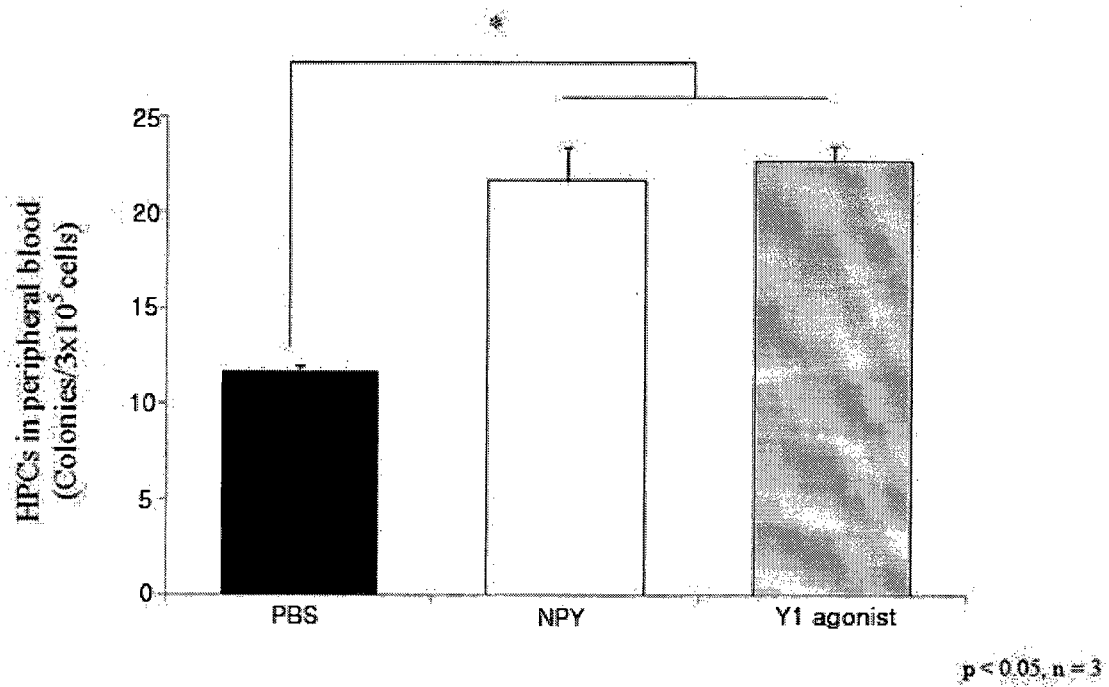
[Fig. 8]



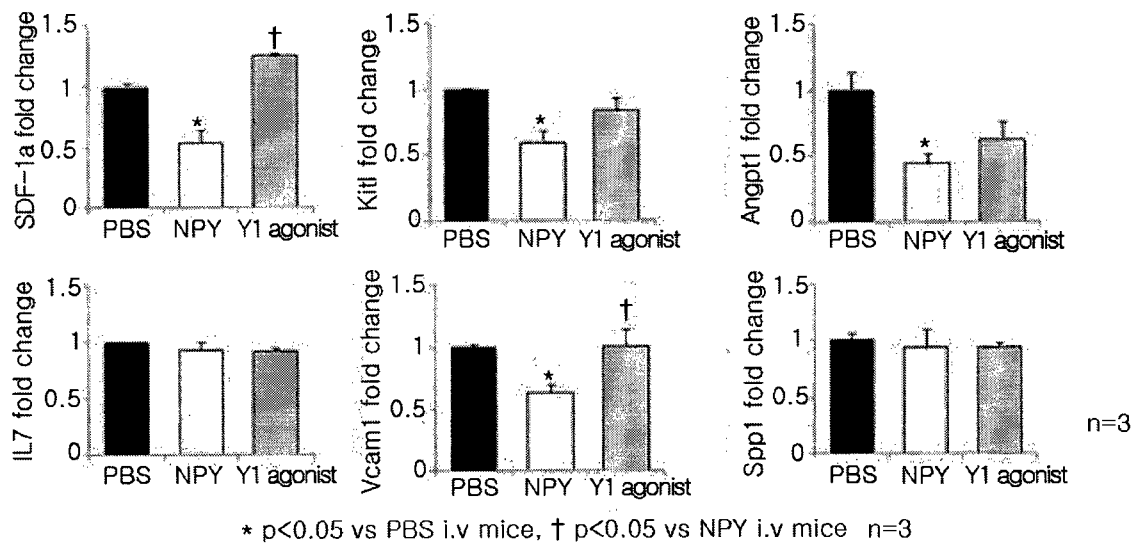
[Fig. 9]



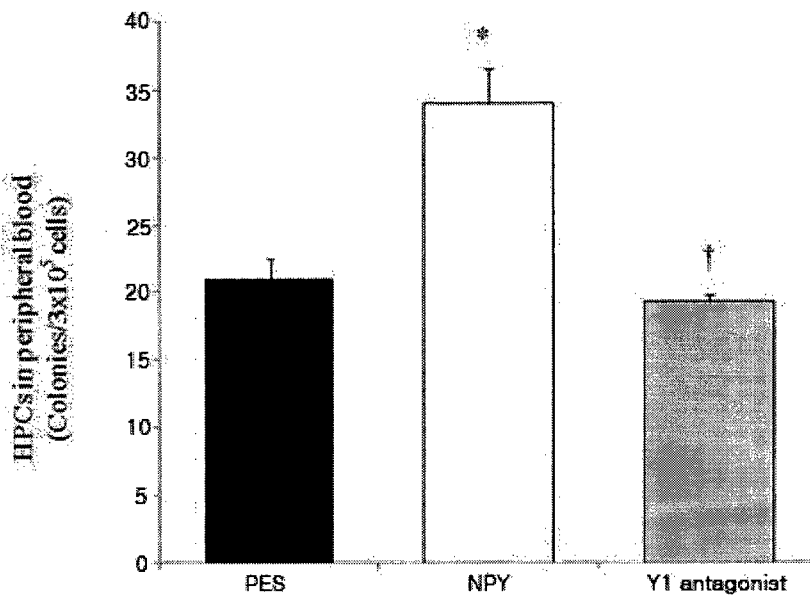
[Fig. 10]



[Fig. 11]

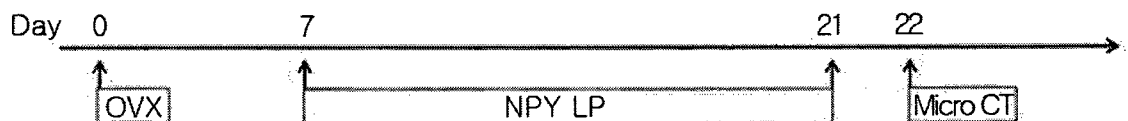


[Fig. 12]

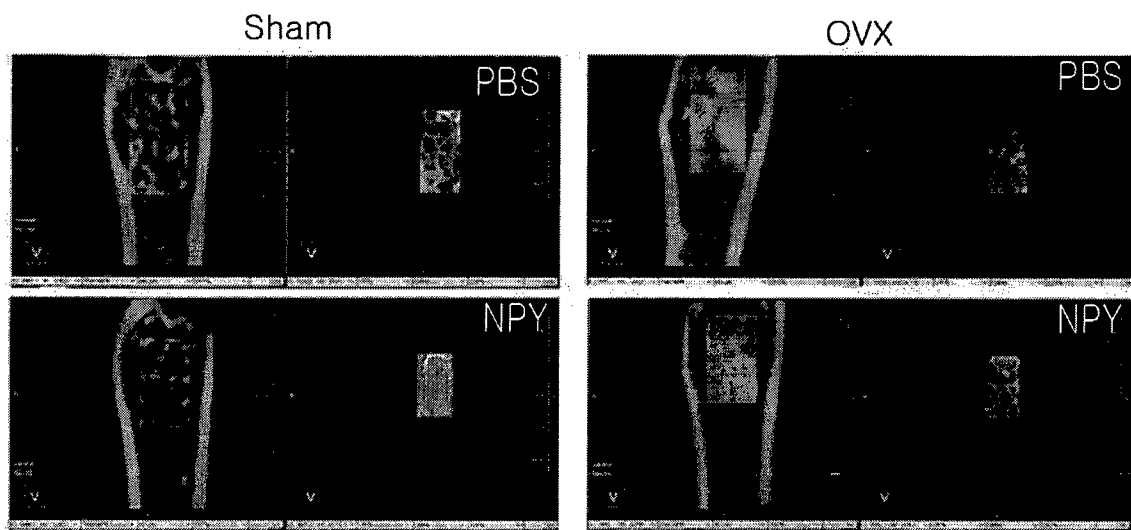


* p<0.05 vs PBS i.v mice, † p<0.05 vs NPY i.v mice n=3

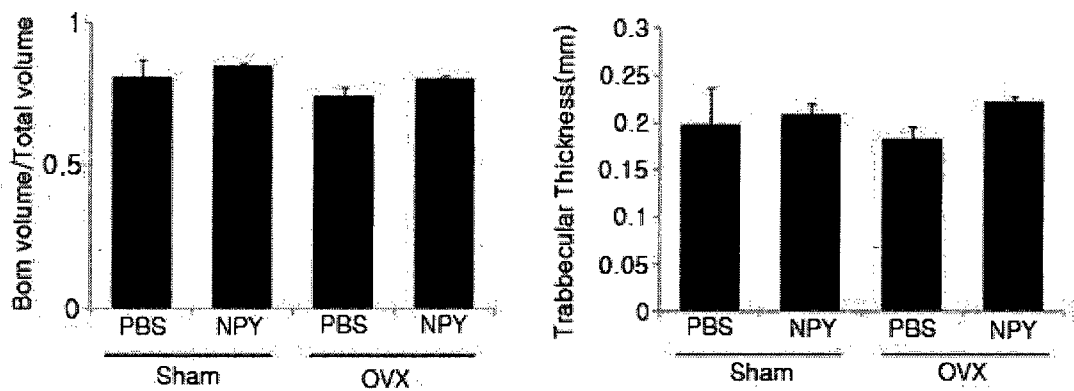
[Fig. 13]



[Fig. 14]

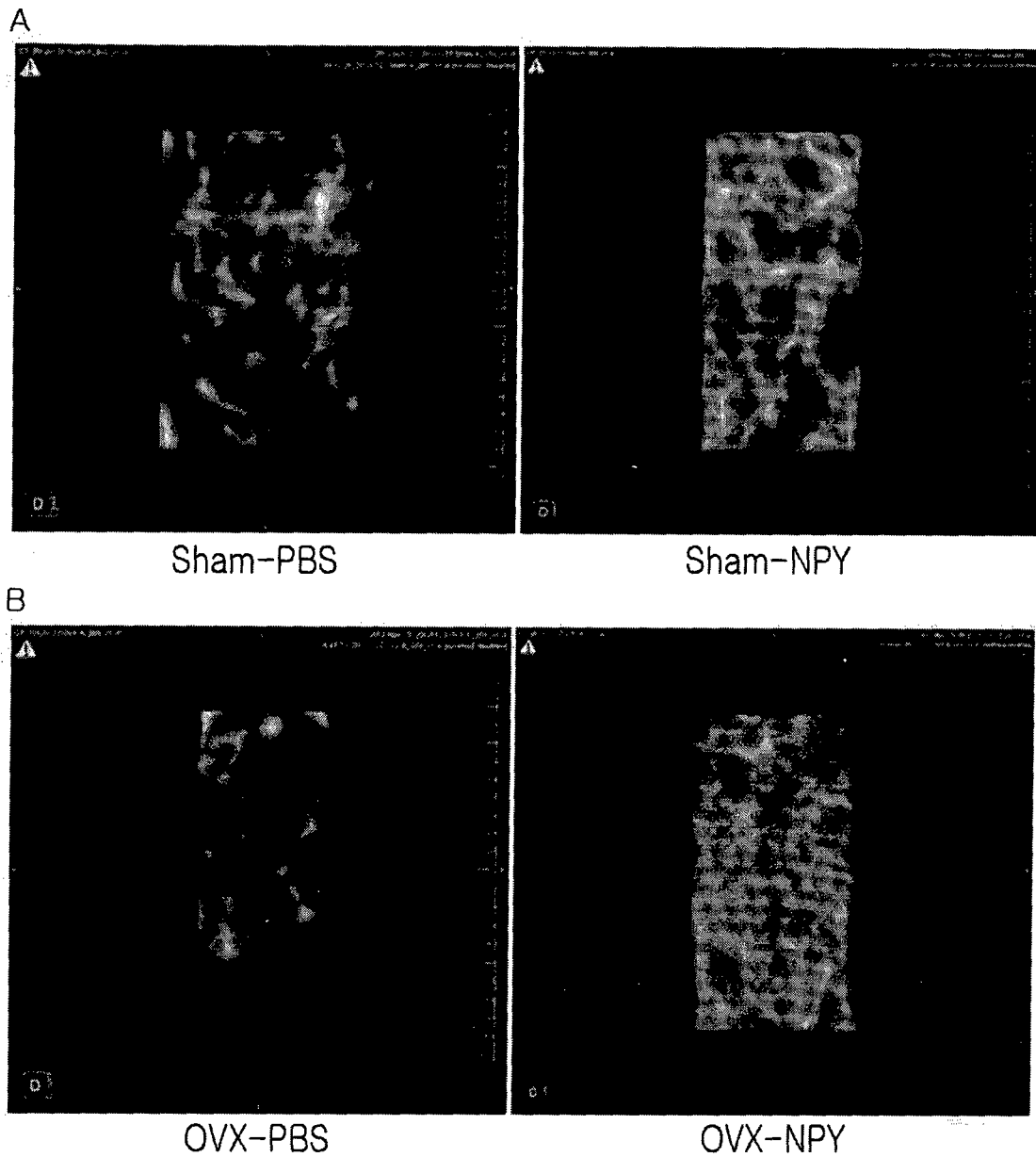


[Fig. 15]



n=3

[Fig. 16]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/001102**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 38/17(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61P 19/10(2006.01)i, A61P 19/00(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/17, A61K 38/16, A61P 19/10, A61P 19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: neuropeptide Y, osteoporosis, osteoblast, hematopoietic stem cell(hematopoietic stem cell), Y1 recipient

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006-0247156 A1 (VANDERBY, Ray et al.) 02 November 2006 See abstract, claims 1-3, 7, 8, 15-17, paragraphs [0216], [0222].	1-3
A	US 2004-0053864 A1 (KARSENTY, Gerard et al.) 18 March 2004 See abstract and claims 1-8, 20-24, 27.	1-3
A	WO 2005-026342 A1 (GARVAN INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH et al.) 24 March 2005 See abstract and claims 1-7, 128-134, 147.	1-3
A	LEE et al, "NPY regulation of bone remodelling" Neuropeptides. vol. 43, no. 6, pp. 457-463 (11 September 2009) See abstract and figure 1.	1-3
A	MATIC et al, "Bone-specific overexpression of NPY modulates osteogenesis" Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions, vol. 12, no. 4, pp. 209-218 (December 2012) See abstract and figures 1, 5, 6.	1-3



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 JUNE 2013 (19.06.2013)

Date of mailing of the international search report

20 JUNE 2013 (20.06.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/001102

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2006-0247156 A1	02.11.2006	US 2006-0030942 A1 US 7776815 B2 US 7928059 B2	09.02.2006 17.08.2010 19.04.2011
US 2004-0053864 A1	18.03.2004	AU 2001-290001 A US 2004-0127440 A1 WO 01-53477 A1	31.07.2001 01.07.2004 26.07.2001
WO 2005-026342 A1	24.03.2005	AU 2003-260187 A1 US 2007-0037158 A1 WO 2005-026342 A9	06.04.2005 15.02.2007 04.08.2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/17(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61P 19/10(2006.01)i, A61P 19/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 38/17, A61K 38/16, A61P 19/10, A61P 19/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 뉴로펩티드 Y, 골다공증, 골아세포, 골수조혈줄기세포(hematopoietic stem cell), Y1 수용체

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2006-0247156 A1 (VANDERBY 외) 2006.11.02. 요약, 청구항 1-3, 7, 8, 15-17, 문단 [0216], [0222] 참조.	1-3
A	US 2004-0053864 A1 (KARSENTY 외) 2004.03.18. 요약 및 청구항 1-8, 20-24, 27 참조.	1-3
A	WO 2005-026342 A1 (GARVAN INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH 외) 2005.03.24. 요약 및 청구항 1-7, 128-134, 147 참조.	1-3
A	LEE 외, `NPY regulation of bone remodelling` Neuropeptides. Vol.43, No.6, pp.457-463 (2009.09.11.) 요약 및 도면 1 참조.	1-3
A	MATIC 외, `Bone-specific overexpression of NPY modulates osteogenesis` Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions, Vol.12, No.4, pp.209-218 (2012.12.) 요약 및 도면 1, 5, 6 참조.	1-3

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2013년 06월 19일 (19.06.2013)

국제조사보고서 발송일

2013년 06월 20일 (20.06.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 82-42-472-7140

심사관

김승범

전화번호 82-42-481-3371



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2006-0247156 A1	2006.11.02	US 2006-0030942 A1 US 7776815 B2 US 7928059 B2	2006.02.09 2010.08.17 2011.04.19
US 2004-0053864 A1	2004.03.18	AU 2001-290001 A US 2004-0127440 A1 WO 01-53477 A1	2001.07.31 2004.07.01 2001.07.26
WO 2005-026342 A1	2005.03.24	AU 2003-260187 A1 US 2007-0037158 A1 WO 2005-026342 A9	2005.04.06 2007.02.15 2005.08.04