(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0081505
(43) 공개일자 2024년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/04 (2006.01) *A61P 15/12* (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01) *A61P 19/10* (2006.01)
A61P 5/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/046 (2013.01)
A61P 15/12 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-0154247
(22) 출원일자 2022년11월17일
심사청구일자 2022년11월17일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
홍현숙
서울특별시 송파구 백제고분로45길 24-5
김도영
경기도 남양주시 경춘로 468-40, 106동 402호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

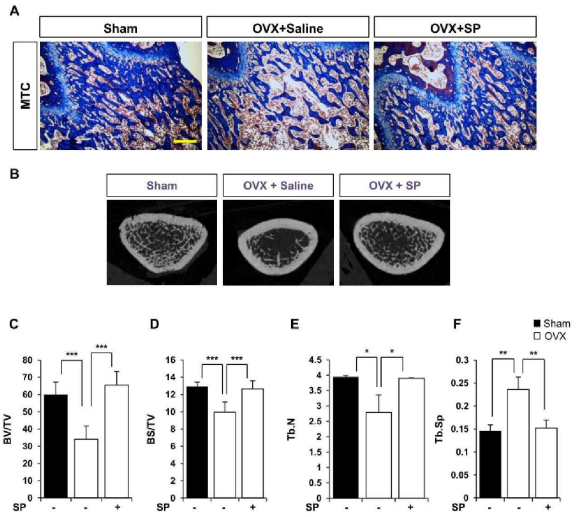
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **SP의 에스트로겐 결핍 질환의 예방 또는 치료 용도**

(57) 요 약

본 발명은 SP의 에스트로겐 결핍 질환의 예방 또는 치료 용도에 관한 것으로, 본 발명에서는 난소절제술에 의한 에스트로겐 결핍에 의해 혈관신생 성장 인자의 부족이 골수에서의 H형 혈관 소실과 연관되고, 이와 같은 혈관신생능 감소에 따른 골 손실이 촉진되는 것을 확인하였으며, 난소절제술 후 초기에 SP를 처리함으로써 산화 스트레스 감소, 혈관신생 인자 증가 및 H형 혈관 손실을 차단함으로써 혈관 골다공증 발달을 억제할 수 있음을 확인하였으므로, 이를 에스트로겐 결핍 질환의 예방 또는 치료 용도로 이용할 수 있고, 특히, 혈관신생능 감소에 따른 골다공증의 발병을 조기에 차단하는 용도로 이용할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
A61P 19/08 (2018.01)
A61P 19/10 (2018.01)
A61P 5/30 (2018.01)
(72) 발명자
이다현
서울특별시 동대문구 회기로23가길 37-1, 203호
손영숙
서울특별시 강남구 언주로 107, 205동 703호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1415179737
과제번호 20018551
부처명 산업통상자원부
과제관리(전문)기관명 한국산업기술평가관리원
연구사업명 산업기술알키미스트프로젝트사업
연구과제명 줄기세포 노화억제 재활성화를 통한 생체 내외 줄기세포 리프로그래밍 기술 발굴 및 노화진단 억제 역전 전략 개발
기 여 율 1/1
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2022.04.01 ~ 2028.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

SP(Substance P), 이의 변이체 또는 이들의 유사체를 유효성분으로 포함하는, 에스트로겐 결핍 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 에스트로겐 결핍 질환은 폐경전 여성, 폐경기 여성 또는 폐경후 여성에서의 에스트로겐 결핍 질환인, 에스트로겐 결핍 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 에스트로겐 결핍 질환은 에스트로겐 결핍에 의한 혈관 손실 질환 또는 골 손실 질환인, 에스트로겐 결핍 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 혈관 손실 질환은 H형 혈관 손실 질환인, 에스트로겐 결핍 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 3항에 있어서, 골 손실 질환은 혈관신생능 감소에 따른 골 손실 질환인, 에스트로겐 결핍 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 염증성 사이토카인을 감소시키는, 에스트로겐 결핍 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 항-염증성(anti-inflammatory) 사이토카인을 증가시키는, 에스트로겐 결핍 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 혈관신생 성장 인자를 증가시키는, 에스트로겐 결핍 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

SP, 이의 변이체 또는 이들의 유사체를 유효성분으로 포함하는, 골 대사 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, 골 대사 질환은 골다공증, 골 소실증, 골연화증, 골 결손, 고관절 감소증 또는 골형성 장애인, 골 대사 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제 9항에 있어서, 에스트로겐 결핍에 의한 골 대사 질환인, 골 대사 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제 9항에 있어서, 에스트로겐 결핍에 의한 골다공증인, 골 대사 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

SP, 이의 변이체 또는 이들의 유사체를 유효성분으로 포함하는, 혈관신생능 감소에 따른 골다공증의 예방 또는 발병 억제용 약학적 조성물.

청구항 14

제 13항의 조성물을 골다공증이 발병되거나 또는 발병될 가능성이 있는 인간을 제외한 개체에 에스트로겐 결핍 초기 단계에 투여하는 단계를 포함하는, 골다공증의 예방 또는 치료 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 SP의 에스트로겐 결핍 질환의 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 과학과 문명의 발달로 점차 인간의 평균 수명이 연장되어 노년층 인구의 증가와 함께 중년 이후의 삶이 길어지고 있고, 실질적으로 현대 여성의 삶의 기간 중 1/3을 폐경에 의한 갱년기를 보내게 되므로 이 시기의 삶의 질을 향상시키기 위한 노력들이 이루어지고 있으며, 이의 일환으로 폐경에 의해 유발되는 여성의 골다공증 치료에 대한 많은 노력들이 이루어지고 있다. 골다공증은 골 기질이 병적으로 희박해져 골밀도가 감소되고 골 강도가 약화되어 골절의 위험성이 증가된 상태를 말한다 (DJ L. Clinical guide for management of osteoporosis. The Korean Journal of Internal Medicine 1999;57(4):801-4). 골격의 강도는 일차적으로 골기질과 골 기질 내부의 무기질의 침착에 의해 형성되고 유지되는데 이는 임상적으로 골밀도에 반영된다. 생리적으로 뼈는 골기질을 새로운 조직으로 대체 (골교체, bone turnover)하기 위한 골개조(bone remodeling)가 꾸준히 지속되는데, 이 과정은 골 흡수(bone resorption)와 골 형성(bone formation)의 균형상태로 진행된다 (Jerome CP. Hormonal therapies and osteoporosis. ILAR J. 2004;45(2):170-8). 따라서, 건강한 골격에서는 골 흡수와 골 형성이 균형적인 골 개조에 따라 골격의 밀도와 강도가 정상상태로 유지되지만 골다공증이 유발된 뼈에서는 골 흡수가 골 형성 보다 많아져 골 개조의 불균형이 발생하고, 골질과 골량이 감소하는 골 교체가 진행됨에 따라 조직학적으로 골이 위축되며 골격의 물리적 강도가 약해져 골절발생률이 증가된다 (Belchetz PE. Hormonal treatment of postmenopausal women. N Engl J Med. 1994 Apr 14;330(15):1062-71). 임상적으로 주로 문제가 되는 것은 원발성 골다공증 중 제 1형인 폐경기 골다공증(postmanopasual osteoporosis)이며, 폐경기의 골다공증은 뼈의 통증, 골절, 기형을 유발하는 노년층의 가장 대표적인 골대사 질환이다 (Lee WS PHBD. Prevalence of Osteoporosis in Korean Women. The Journal of Korean Society of Menopause. 2003;9(4):339-46). 난소 적출로 인해 유발된 에스트로겐(Estrogen) 결핍에 의한 골다공증은 골절이 쉽게 일어날 수 있는 조건이 되며 이 경우의 에스트로겐 투여는 골의 무기질 성분의 증가와 함께 교원섬유의 조성에도 영향을 미쳐서 골절의 예방효과를 지닌다고 보고되어 있다 (Clack A. P., J. A. Schuttinga. Targeted estrogen/proestrogen replacement theraphy for osteoporosis. calculation of health care cost savings. Osteoporos Int., 2, 195-200(1992)). 에스트로겐의 기능은 다양한데, 골모 세포에 직접 작용하여 골 량을 유지시키며 새로운 골 개조 부위의 새로운 활성화를 억제하며, 또한 골모 세포를 자극하며 골내 TGF와 IGF 합성을 증가시켜 파골세포에 작용함으로써 골 흡수를 감소시키며, 인터루킨-1 (Ⅱ-1) (Interleukin-1(Ⅱ-1)) 과 인터루킨-1 (Ⅱ-6)(Interleukin-1(Ⅱ-6))을 억제함으로써 파골세포의 성숙과 출현을 감소시킨다고 보고되어 있다 (Pfelschefter J., C. Chenu, A. Bird. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclast-like cell in vitro. J. Bone Miner Res., 4, 113-118(1989)). 따라서, 최근에는 골대사 질환에 여성호르몬 및 에스트로겐(Estrogen) 유사 호르몬 등을 투여하여 골의 흡수를 차단하는 약물이 많이 사용되고 있다 (Recker RR, Saville PD, Heaney RP. Effect of estrogens and calcium carbonate on bone loss in postmenopausal women. Ann Intern Med. 1977 Dec;87(6):649-55). 하지만, 기존의 호르몬제제는 비싼 비용 및 부작용의 한계점을 가진다 (SH C. Medical treatment of osteoporosis. HANYANG JOURNAL OF MEDICINE. 2002;22(1):15-7). 그러나, 단순한 칼슘보조제 및 비타민 D 보충제와 같은 것은 그 효과가 미비하여, 에스트로겐 부족으로부터 오는 폐경기후 여성의 골다공증 치료의 근본적인 대책이 될 수 없으므로, 에스트로겐 감소와 무관하게 나타나는 골다공증에 대한 예방효과가 있다고 알려진 치료제 즉, 칼슘보조제와 같은 것은 폐경기후 여성의 골다공증 치료에 큰 효과를

나타내기 어렵다.

[0003] 한편, SP(Substance P)는 감각 뉴우런, 대식세포, 호산구, 내피세포와, 상피세포 및 케라토사이트와 같은 각막세포, 및 육아조직(granulation tissue)에서 발현되는 11개의 아미노산으로 이루어진 뉴로펩티드이다. SP가 조혈 조절에 대한 신경-면역 커뮤니케이션에 관여하고 있음이 보고된 바 있다. SP 신경 섬유가 골수 기질에 분포하고 있으며, SP는 골수 기질세포의 표면 수용체 NK-1을 통해 신호를 전달하여 골수 기질세포를 자극함으로써, 골수 기질세포가 공급자로서 조혈 촉진에 유리한 줄기세포 인자 및 인터류킨-1을 생산하도록 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 에스트로겐 결핍 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0005] 또한, 본 발명의 목적은 골 대사 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 또한, 본 발명의 목적은 혈관신생능 감소에 따른 골다공증의 예방 또는 발병 억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 아울러, 본 발명의 목적은 골다공증의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적의 달성을 위해, 본 발명은 SP(Substance P), 이의 변이체 또는 이들의 유사체를 유효성분으로 포함하는 에스트로겐 결핍 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 SP를 유효성분으로 포함하는 골 대사 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 SP를 유효성분으로 포함하는 혈관신생능 감소에 따른 골다공증의 예방 또는 발병 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 아울러, 본 발명은 골다공증의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에서는 난소절제술에 의한 에스트로겐 결핍에 의해 혈관신생 성장 인자의 부족이 골수에서의 H형 혈관 소실과 연관되고, 이와 같은 혈관신생능 감소에 따른 골 손실이 촉진되는 것을 확인하였으며, 난소절제술 후 초기에 SP를 처리함으로써 산화 스트레스 감소, 혈관신생 인자 증가 및 H형 혈관 손실을 차단함으로써 혈관 골다공증 발달을 억제할 수 있음을 확인하였으므로, 이를 에스트로겐 결핍 질환의 예방 또는 치료 용도로 이용할 수 있고, 특히, 혈관신생능 감소에 따른 골다공증의 발병을 조기에 차단하는 용도로 이용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 OVX에 의한 골 손실 및 H형 혈관의 결핍을 확인한 도이다:

A: OVX 후 0, 4 및 8주차의 랫 체중 변화;

B 및 C: 마이크로 CT 분석 결과;

D: 골간단 영역의 미세환경 개략도;

E: MTC 염색 이미지;

F: IHC 염색으로 확인한 CD31 발현;

G: IHC 염색으로 확인한 엔도뮤신 발현;

H: CD31의 웨스턴 블롯 분석; 및

I: 웨스턴 블롯 분석 결과의 정량 분석.

도 2는 OVX에 따른 염증 및 혈관신생 성장 인자들의 수준 변화를 혈청 및 골수에서 확인한 도이다:

A: OVX 후 0, 4 및 8주차 랫 혈청 내 IL-10 수준;

B: OVX 후 0, 4 및 8주차 랫 혈청 내 TNF-α 수준;

C: OVX 후 0, 4 및 8주차 랫 혈청 내 VEGF 수준;

D: OVX 후 0, 4 및 8주차 랫 혈청 내 PDGF-BB 수준;

E: OVX 후 0, 4 및 8주차 랫 BM 내 VEGF 수준; 및

F: OVX 후 0, 4 및 8주차 랫 BM 내 PDGF-BB 수준.

도 3은 OVX 후 4주차 또는 8주차 랫 혈청 내 IL-17 수준을 확인한 도이다.

도 4는 SP(Substance P) 조기 투여에 의한 조기 혈관신생능 보호 효과를 확인한 도이다:

A: OVX 및 SP 처리를 위한 실험 스캐줄;

B: OVX 후 4주차 랫의 체중;

C 및 D: 마이크로 CT를 이용한 OVX 후 4주차의 골밀도 정량화;

E: 대퇴골의 MTC 염색 이미지;

F: 혈청 내 VEGF의 양;

G: 혈청 내 PDGF-BB의 양;

H: BM 내 VEGF의 양;

I: BM 내 PDGF-BB의 양;

J: 혈청 내 TNF-α의 양; 및

K: 혈청 내 IL-10의 양.

도 5는 OVX 후 4주차 랫에서 SP 조기 투여에 의한 OVX-유도 H형 혈관 결핍 차단 효과를 확인한 도이다:

A: OVX 후 4주차 랫 대퇴골의 CD31 및 엔도뮤신에 대한 IHC 염색 이미지; 및

B 및 C: OVX 후 4주차 랫 BMA를 이용한 CD31 발현.

도 6은 OVX 후 8주차 랫에서 SP 조기 투여에 의한 골 손실 차단 효과를 확인한 도이다:

A: OVX 및 SP 처리를 위한 실험 스캐줄;

B: OVX 후 8주차 랫의 체중 변화;

C: OVX 후 8주차 랫의 혈청 내 TNF-α;

D: OVX 후 8주차 랫의 혈청 내 IL-10;

E: OVX 후 8주차 랫의 혈청 내 VEGF;

F: OVX 후 8주차 랫의 혈청 내 PDGF-BB;

G: OVX 후 8주차 랫의 BM 내 VEGF; 및

H: OVX 후 8주차 랫의 BM 내 PDGF-BB.

도 7은 OVX 후 8주차 랫에서 SP 조기 투여에 의한 H형 혈관 보호 효과를 확인한 도이다:

A: OVX 후 8주차 랫 대퇴골 골간단 영역에서 CD31 및 엔도뮤신에 대한 IHC 염색 이미지; 및

B 및 C: OVX 후 8주차 랫의 BMA에서 CD31의 발현.

도 8은 OVX 후 8주차 랫에서 SP 조기 투여에 의한 H형 혈관 보호를 통한 골 손실 진행 억제 효과를 확인한 도이다:

A: OVX 후 8주차 랫 대퇴골 골간단 영역의 MTC 염색 이미지;

B: OVX 후 8주차 랫 대퇴골 마이크로 CT 이미지;

C, D, E 및 F: OVX 후 8주차 랫 대퇴골 해면 골질 파편(trabecular bone fraction)의 마이크로 CT 정량 분석 결과;

BV: trabecular bone volume;

TV: tissue volume;

BS: bone surface;

Tb.N: trabecular number; 및

Tb.SP: trabecular separation.

도 9는 혈관 구조 보호 기전으로서 SP가 산화 스트레스를 감소시키는지 확인한 도이다:

A: OVX 후 3주차 랫의 BMA에서 SOD 활성;

B: OVX 후 4주차 랫의 BMA에서 SOD 활성;

C: OVX 후 3주차 랫의 BMA에서 NO 농도;

D: OVX 후 4주차 랫의 BMA에서 NO 농도;

E; OVX 및 SP 처리를 위한 실험 스캐줄;

F: OVX 후 4주간 SP를 처리한 4주차 랫의 BM에서 NO 농도; 및

G: OVX 후 4주간 SP를 처리한 4주차 랫의 OVX 후 4주차 랫의 BM에서 SOD 활성.

도 10은 OVX 후 4주간 SP 처리한 뒤, 8주차 랫에서 산화 스트레스 발생 (항산화 인자 SOD 및 GPX의 활성)을 확인한 도이다.

도 11은 산화 스트레스 하에 SP의 내피전구세포 보호 효과를 확인한 도이다:

A: 인간 BM-유래 EPCs에 SP 처리 및 산화 스트레스 유발 스캐줄;

B: BM-EPCs의 세포 생존율;

C: NO 농도; 및

D 및 E: p-eNOS 및 t-eNOS의 웨스턴 블롯 분석 결과.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0015] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 통합된다.

[0016] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib(α-아미노이소부티르산), Sar(N-methylglycine) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 발명에서 약어로 언급된 아미노산은 하기와 같이 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다:

[0017] 알라닌: A, 아르기닌: R, 아스파라긴: N, 아스파르트산: D, 시스테인: C, 글루탐산: E, 글루타민: Q, 글리신: G, 히스티딘: H, 이소류신: I, 류신: L, 리신: K, 메티오닌: M, 페닐알라닌: F, 프롤린: P, 세린: S, 트레오닌: T, 트립토판: W, 티로신: Y 및 발린: V.

[0019] 일 측면에서, 본 발명은 SP(Substance P)를 유효성분으로 포함하는, 에스트로겐 결핍 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0020] 일 구현예에서, SP는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있다.

[0021] 일 구현예에서, 에스트로겐 결핍 질환은 폐경전 여성, 폐경기 여성 또는 폐경후 여성에서의 에스트로겐 결핍 질환일 수 있다.

[0022] 일 구현예에서, 에스트로겐 결핍 질환은 에스트로겐 결핍에 의한 혈관 손실 질환 또는 골 손실 질환일 수 있다.

[0023] 일 구현예에서, 혈관 손실 질환은 H형 혈관 손실 질환일 수 있으며, 골수에서 H형 혈관이 손실되거나 H형 혈관 밀도가 감소한 질환일 수 있고, H형 혈관은 CD31 양성 또는 엔도뮤신 양성 혈관일 수 있다.

[0024] 일 구현예에서, 골 손실 질환은 골수에서의 H형 혈관 손실에 의한 혈관신생능 감소에 따른 골 손실 질환일 수 있다.

[0025] 일 구현예에서, 상기 조성물은 에스트로겐 결핍시 골수에서 산화 스트레스를 차단하고 H형 혈관을 보호할 수 있다.

[0026] 일 구현예에서, 상기 조성물은 에스트로겐 결핍시 증가한 염증성 사이토카인을 감소시킬 수 있으며, 상기 염증성 사이토카인은 프로-염증성(pro-inflammatory) 사이토카인인 TNF-α 또는 IL-17일 수 있다.

[0027] 일 구현예에서, 상기 조성물은 에스트로겐 결핍시 감소한 항-염증성(anti-inflammatory) 사이토카인을 증가시킬 수 있으며, 상기 항-염증성 사이토카인은 IL-10일 수 있다.

[0028] 일 구현예에서, 상기 조성물은 에스트로겐 결핍시 감소한 혈관신생 성장 인자를 증가시킬 수 있으며, 상기 혈관신생 성장 인자는 VEGF 또는 PDGF-BB일 수 있다.

[0029] 일 구현예에서, 상기 조성물은 SP 단백질, SP 단백질을 암호화하는 핵산, 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터를 포함할 수 있다.

[0030] 일 측면에서, 본 발명은 SP를 유효성분으로 포함하는, 골 대사 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0031] 일 구현예에서, 골 대사 질환은 골다공증, 골 소실증, 골연화증, 골 결손, 고관절 감소증 또는 골형성 장애일 수 있다.

[0032] 일 구현예에서, 상기 골 대사 질환은 에스트로겐 결핍에 의한 골 대사 질환일 수 있으며, 에스트로겐 결핍에 의한 골다공증인 것이 더욱 바람직하다.

[0033] 일 구현예에서, 상기 골다공증은 혈관신생능 감소에 따른 골다공증일 수 있다.

[0034] 일 측면에서, 본 발명은 SP를 유효성분으로 포함하는, 혈관신생능 감소에 따른 골다공증의 예방 또는 발병 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0035] 본 발명에서 용어, "SP(Substance-P)"는 11개 아미노산(Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH2)(RPKPQQFFGLM)으로 구성된 포유류의 타키키닌의 하나이다. 척수 등 중추신경계뿐만 아니라 장관(腸管) 등의 말초에 널리 분포하여 1차 지각신경에서의 통각의 전달물질로 알려져 있다.

[0036] 본 발명에서 사용되는 용어 “펩타이드”는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 아미노산 중합체로서, 천연 아미노산 뿐 아니라, 비단백질성 아미노산도 구성요소로 포함할 수 있다.

[0037] 본 발명에 있어서, 상기 펩타이드는 상기 아미노산 서열을 갖는 것이 바람직하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 펩타이드는 상기 아미노산의 비율이 50% 이상, 바람직하게는 60% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 100%로 높은 것이 바람직하다.

[0038] 본 발명에서 '특정 서열번호로 이루어진 펩타이드'라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 해당 서열번호의 아미노산 서열 앞뒤의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 잠재성 돌연변이 (silent mutation)

를 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은 돌연변이를 가지는 경우에도 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.

[0039] 본 발명에서, 펩타이드 서열의 변형은 일부 아미노산이 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion) 및 수식(modification) 중 어느 하나의 방법 또는 이러한 방법들의 조합을 통하여 변형된 것일 수 있다. 이러한 변형은 L-형 혹은 D-형 아미노산, 및/또는 비-천연형 아미노산을 이용한 변형; 및/또는 천연형 서열을 개질, 예를 들어 측쇄 작용기의 변형, 분자 내 공유결합, 예컨대, 측쇄 간 고리 형성, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 인산화, 아미노헥산화, 바이오틴화 등과 같이 개질함으로써 변형하는 것을 모두 포함한다. 상기 치환되거나 추가되는 아미노산은 인간 단백질에서 통상적으로 관찰되는 20개의 아미노산뿐만 아니라 비정형 또는 비-자연적 발생 아미노산을 사용할 수 있다. 비정형 아미노산의 상업적 출처에는 Sigma-Aldrich, ChemPep과 Genzyme pharmaceuticals가 포함된다. 이러한 아미노산이 포함된 펩타이드와 정형적인 펩타이드 서열은 상업화된 펩타이드 합성 회사, 예를 들어 미국의 American peptide company나 Bachem, 또는 한국의 Anygen을 통해 합성 및 구매 가능하다.

[0040] 본 발명에 있어서, 상기 펩타이드는 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기, 반감기 또는 펩타이드의 안정성을 증가시키기 위한 특정 목적으로 고안된 추가의 아미노산 서열도 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 펩타이드는 이펙터(effectors), 약물, 프로드럭, 독소, 펩타이드, 전달 분자 등의 커플링 파트너와 연결될 수 있다.

[0041] 본 발명에 있어서, 상기 펩타이드는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 제조될 수 있다. 구체적으로 산을 첨가함으로써 염을 형성할 수 있고, 예를 들어 무기산(예: 염산, 히드로브롬산, 인산, 질산, 황산 등), 유기 카르복실산(예: 아세트산, 트리플루오로아세트산과 같은 할로 아세트산, 프로피온산, 말레산, 숙신산, 말산, 시트르산, 타르타르산, 살리실산), 및 산성 당(글루쿠론산, 갈락투론산, 글루콘산, 아스코르브산), 산성 폴리사카리드(예: 히알우론산, 콘드로이틴 술페이트, 아르기닌산), 콘드로이틴 술페이트와 같은 술폰산 당 에스테르를 포함하는 유기 술폰산(예: 메탄술폰산, p-톨루엔 술폰산) 등을 첨가하여 염을 형성할 수 있다.

[0042] 본 발명에 따른 펩타이드들은 당업계에 공지된 화학적 합성 방법, 표준 합성 방법, 재조합 발현 시스템, 또는 임의의 다른 당해 분야의 방법에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 펩타이드들은, 예를 들어 하기를 포함하는 방법을 포함하는 다수의 방법으로 합성될 수 있다:

[0043] (a) 펩타이드를 고체상 또는 액체상 방법의 수단으로 단계적으로 또는 단편 조립에 의해 합성하고, 최종 펩타이드 생성물을 분리 및 정제하는 방법; 또는

[0044] (b) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물을 숙주세포 내에서 발현시키고, 발현 생성물을 숙주 세포 배양물로부터 회수하는 방법; 또는

[0045] (c) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물의 무세포 시험관 내 발현을 수행하고, 발현 생성물을 회수하는 방법; 또는

[0046] (a), (b) 및 (c)의 임의의 조합으로 펩타이드의 단편을 수득하고, 이어서 단편을 연결시켜 펩타이드를 수득하고, 당해 펩타이드를 회수하는 방법.

[0047] 본 발명에서 사용된, 용어 "변이체"는 기준 물질과 비교하였을 때 최소한 한개의 아미노산 차이(치환, 삽입 또는 결손)를 포함하는 대응하는 아미노산 서열을 말한다. 특정 구체예들에 있어서 "변이체"는 기준 서열과 비교하였을 때 높은 아미노산 서열 상동성(homology) 및/또는 보존적 아미노산 치환, 결손 및/또는 삽입을 가진다.

[0048] 본 발명에 따른 펩타이드 변이체는 특정 아미노산 잔기 위치에서 아미노산 잔기가 보존적으로 치환된 변이체도 포함하는 의미로 해석된다.

[0049] 본 발명에서 "보존적 치환"이란 1개 이상의 아미노산을 해당 멜리틴 단백질 변이체의 생물학적 또는 생화학적 기능의 손실을 야기하지 않는 유사한 생화학적 특성을 갖는 아미노산으로 치환하는 것을 포함하는 변이체의 변형을 의미한다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기를 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체시키는 치환이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 부류는 해당 기술분야에 규정되어 있으며, 잘 알려져 있다. 이들 부류는 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 대전되지 않은 극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 글리신, 아스파라진, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비-극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지된 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포

함한다.

[0050] 본 발명에서 사용된, 용어 "펩타이드 유사체"는 아미노산의 측쇄 또는 알파-아미노산 백본에 대하여 하나 이상의 다른 기능기로 치환된 유사체를 포함할 수 있다. 측쇄 또는 백본 개질화 펩타이드 유사체의 예로는 피롤리딘 고리가 하이드록시기로 치환된 하이드록시프롤린이나, N-메틸 글리신 "펩토이드"를 들 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 펩타이드 유사체의 종류에 대해서는 당업계에 공지되어 있다.

[0051] 본 발명에서 사용되는 용어 "핵산"은 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 다르게 특별하게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs , John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews , 90:543-584(1990)).

[0052] 본 발명에서 사용되는 용어 "벡터"는 숙주 세포에 삽입되어 숙주 세포 게놈과 재조합되고 이에 삽입되거나, 또는 에피좀으로서 자발적으로 복제하는 컴피턴트 뉴클레오티드 서열을 포함하는 임의의 핵산을 의미한다. 이러한 벡터로는 선형 핵산, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, RNA 벡터, 바이러스 벡터 등이 있다.

[0053] 본 발명에서 용어, "발병 억제"는 골다공증의 발생, 발병 또는 발달을 억제하는 것을 의미한다.

[0054] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 질환의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0055] 본 발명에서 사용된 용어 "치료"란 본원발명의 약학적 조성물의 투여로 질환을 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

[0056] 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.

[0057] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 상기 질환을 예방, 발병 억제 또는 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 질환의 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 특히, 상기 유효성분이 전체 조성물 100 중량부에 대하여 0.01 내지 30 중량부를 포함하는 것이 바람직하며, 0.1 내지 20 중량부를 포함하는 것이 보다 바람직하다.

[0058] 본 발명의 약학적 조성물은 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 정상 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로스 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 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 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0059] 일 구현예에서, 상기 약학 조성물은 경구형 제형, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 및 분무제를 포함하는 군으로부

터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있다.

[0060] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로스 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 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 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0061] 본 발명의 조성물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0062] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0063] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용) 하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명에 따른 조성물의 일일 투여량은 0.001 mg/kg 내지 50 mg/kg이며, 바람직하게는 0.0001 ~ 5 mg/㎖이며, 하루 일 회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

[0064] 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다.

[0065] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 골다공증이 발병되거나 또는 발병될 가능성이 있는 인간을 제외한 개체에 에스트로겐 결핍 초기 단계에 투여하는 단계를 포함하는, 골다공증의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

[0066] 일 구현예에서, 에스트로겐 결핍 초기 단계는 랫의 경우 난소절제술 후 3 내지 5주일 수 있다.

[0068] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0070] **실시예 1. 난소절제술 후 골다공증 발생 확인**

[0071] 1-1. 에스트로겐 부족에 의한 골 소실 확인

[0072] 난소절제술(ovariectomy, OVX) 후 혈관 손상 발생 및 골 소실을 시간에 따라 확인하기 위해, 난소절제술을 랫에 유도하고 골밀도 및 골수의 H형 혈관의 변화를 8주 동안 모니터링하였다. 구체적으로, 6주령 암컷 SD(Sprague Dawley) 랫 (160-170 g)을 구입하여 1주 동안 적응시킨 뒤, 케타민(ketamine) (100 mg/kg, Yuhan, Seoul, Korea) 및 럼푼(Rompun) (1.2 mg/kg, Bayer Healthcare, Kyunggi-do, Korea)을 복강내 주사하여 마취하였다. 수술 부위의 털을 제거하고 복부 양쪽에 2cm 피부 절개하였다. 난소 주위의 지방 조직과 난소를 적출하고 난소를 5-0 실크로 결찰하여 제거하였다. 양쪽의 근육 및 피부를 3-0 실크로 봉합하였다. 그 후 랫을 무작위로 (1) sham; (2) OVX + 식염수; 및 (3) OVX + SP의 그룹으로 나누었다. 난소절제술 4주 또는 8주 후, 각 그룹의 랫의 체중을 확인하고, 골밀도 분석 및 MTC 염색을 수행하였다. 골밀도 분석은 *ex vivo* μ-CT(micro-computed

tomography)를 이용하여 수행하였으며, 상기 각 그룹의 랫에서 대퇴골(Femurs)을 채취한 뒤, 13.85 μm의 해상도에서 μ-CT 스캐너 (Skyscan 1173 X-ray microtomography; Bruker, Billerica, MA, USA)를 이용하여 골간단(metaphysis) 영역에서 BMD(bone mineral density), 골 부피 분율(bone volume fraction) 및 해면 골질 공간(trabecular bone space)을 계산하여 골다공증(osteoporosis) 정도를 평가하였다. 또한, 조직학적 분석을 위해, 상기 각 그룹의 랫에서 채취한 대퇴골을 3.7% 포름알데하이드 (Sigma-Aldrich)로 고정하고, 시료들을 탈회 용액 (Sigma-Aldrich)으로 탈회한 뒤, TP1020 조직 처리기 (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)로 처리하여 파라핀 블록을 제조하고 5.0-μm 두께의 절편을 제조하였다. 그 후, MTC(Masson's Trichrome) 염색을 위해, NovaUltra™ Masson trichrome stain kit (IHC World, Woodstock, MD, USA)를 사용하였다.

[0073] 그 결과, 난소절제술에 의해 유도된 에스트로겐 부족은 체중 증가를 야기했으며, 난소절제술 수술 4주 후에 뚜렷하게 구분되는 변화가 관찰되었다 (도 1A). 또한, 마이크로-CT에 의한 골밀도 분석 결과는 난소절제술 8주 후 골밀도가 현저히 줄어든 것으로 나타났다 (도 1B 및 C). 아울러, MTC 염색 결과, 골 구조가 감소함에 따라 지방 조직이 증가했으며, 이는 난소절제술(OVX induction) 후 8주차에 명확하게 나타났다 (도 1D 및 E).

[0075] 1-2. 에스트로겐 부족에 의한 혈관 소실 확인

[0076] 난소절제술 후 혈관 손상을 확인하기 위해, H형 혈관을 조직면역학적 분석을 통해 확인하였다. 구체적으로, 상기 실시예 1-1에서 제조한 랫의 대퇴골 절편을 재수화시키고 0.01 M 시트르산나트륨 (Sigma-Aldrich)과 함께 가열하였다. 그 후, 시료들에 0.5% H_2O_2를 처리하고, 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich)로 투과시켰다. 비특이적 항체 결합을 방지하기 위해, 시료들을 2% 정상 말 혈청과 상온에서 1시간 동안 인큐베이션한 뒤, H형 혈관의 내피 세포 표면 마커인 CD31 또는 엔도뮤신(endomucin)에 대한 1차 항체를 처리하였다. 그 뒤, 시료들을 비오틴화된 이차 항체와 상온에서 1시간 동안 인큐베이션하고, 아비딘-비오틴 복합 용액과 인큐베이션하였다. 기질 용액인 ImmPACT NovaRed 또는 Vector Blue (Vector Laboratories)을 이용하여 조직 내 반응 영역을 시각화하고, 시료를 Fast Red (Vector Laboratories)로 대조 염색하였다. 아울러, 엔도뮤신은 혈관 내피세포 및 조혈 줄기세포에서 발현되므로, 전체 골수 흡인물(Bone marrow aspirates, BMA)에서 엔도뮤신의 수준을 확인하는 것은 H형 혈관 밀도를 추론하는데 적합하지 않으므로, 골수 흡인물에서 CD31 발현만을 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 이를 위해, 대퇴골 생검을 PBS (Welgene, Daegu, Korea)로 3회 세척하고 1,500 rpm (362 g)으로 5분 동안 원심분리하였다. 상층액은 이후의 사이토카인 분석을 위해 분리하고, 세포 펠렛 (bone marrow aspirates, BMA)을 따로 분리하여 파쇄 버퍼 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 및 PMSF (Roche, Basel, Switzerland)를 처리하였다. 파쇄된 시료를 12,000 rpm (13572 g)으로 10분 동안 원심분리하고 상층액을 수집한 뒤 bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 단백질 농도를 정량하였다. 이 후, SDS-PAGE으로 단백질 파쇄물을 분리하고 나이트로셀룰로오스 멤브레인 (GE Healthcare, Amersham, UK) 또는 PD 멤브레인 (Pall Corporation, New York, USA)으로 트랜스퍼하였다. 멤브레인을 BSA (Sigma-Aldrich)를 포함하는 5% 스킴밀크 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)로 블로킹한 뒤, CD31 또는 GAPDH (Abcam, Cambridge, UK)에 대한 일차 항체와 인큐베이션하고, 이 후 항-IgG HRP-컨쥬게이트된 이차 항체와 1시간 동안 상온에서 인큐베이션하였다. 멤브레인을 EZ-western lumi pico (Dogen, Seoul, Korea) 또는 Wester ETA c ultra 2.0 (Cyanagen, Bologna, Italy)로 디벨롭하고, ImageJ software (version 1.52a)를 이용하여 단백질의 발현 수준을 분석 및 정량화하였다.

[0077] 그 결과, 주로 성장판 주변의 골간단(metaphysis) 등 특정 지점에서 H형 혈관이 식별되었다 (도 1D). 또한, 조직면역학적 분석 결과, 성장판 (검은 점선) 주변에서 CD31 양성 또는 엔도뮤신 양성인 혈관의 소실이 난소절제술 후 4주차에 감지되었다 (도 1F 및 G). 또한, 웨스턴 블롯 분석으로 CD31의 단백질 발현 수준을 확인한 결과, 난소절제술 후 4주차부터 현저하게 감소하는 것으로 나타났다 (도 1H 및 I). 이를 통해, 난소절제술에 의해 4주 이후부터 CD31 양성 및 엔도뮤신 양성 H형 혈관의 소실을 야기하고 8주차에 골밀도 감소를 유발하는 것을 확인하였다.

[0079] 1-3. 기전 확인

[0080] 혈관 소실은 혈관신생 성장 인자의 부족 또는 과도한 염증에 의한 혈관 구성 세포들의 불안정 때문에 발생할 것으로 예상되어, 에스트로겐 부족에 의한 염증 및 혈관신생 성장 인자들의 수준 변화를 혈청 및 골수에서 확인하였다. 구체적으로, 혈관신생 성장 인자 VEGF 및 PDGF-BB와 항-염증성 사이토카인인 IL-10 및 프로-염증성(pro-

inflammatory) 사이토카인인 TNF-α의 혈청 내 수준을 ELISA로 분석하고, BM(Bone marrow)에서의 수준은 상기 실시예 1-2에서 대퇴골 생검을 PBS (Welgene, Daegu, Korea)로 3회 세척하고 1,500 rpm (362 g)으로 5분 동안 원심분리한 뒤 수득한 상층액을 이용하여 ELISA로 분석하였다.

[0081] 혈청 분석 결과, IL-10 및 TNF-α의 수준은 난소절제술 이후 4주차에는 거의 나타나지 않았으나, 8주차에는 IL-10가 현저히 감소하고, TNF-α는 현저히 증가되는 것으로 나타났다 (도 2A 및 B). 또한, 골 소실에 중요한 염증 인자인 IL-17 역시 수술 후 8주차에 증가했으나, 4주차에는 증가하지 않은 것으로 나타났다 (도 3). 이러한 데이터는 염증 조건의 전신 발생을 나타내며, 이는 난소절제술 유도 후 8주차부터의 골 소실 시작과 연관될 수 있다. 이와 대조적으로, 대표적인 혈관신생 성장 인자들인 VEGF 및 PDGF-BB의 농도는 4주 이후 명확하게 감소했으며, 이러한 차이는 8주차에 현저히 증가하였다 (도 2C 및 D). 난소절제술 후 8주차가 분명한 골 손실 및 염증으로 특징지어짐을 고려할 때, 혈관신생 성장 인자의 전신에서의 소실이 염증 및 골밀도 감소 이전에 일어난다고 추측되었다. 또한, 골수 환경에서 혈관신생 성장 인자의 수준을 ELISA로 확인한 결과, VEGF 및 PDGF-BB은 난소절제술 후 4주차에 그 수준이 감소되었으며, 이는 혈청에서의 수준과 유사하게 나타났다. 이 데이터는 난소절제술이 혈관신생 성장 인자 부족 환경을 국지적 및 전신적으로 4주 안에 생성하며, 별도로 염증 조건을 난소절제술 후 8주 안에 유발하는 것을 암시하였다. 따라서, 혈청 및 골수에서의 혈관신생 성장 인자의 부족이 골수에서의 H형 혈관 소실과 연관되는 것으로 유추되며, 이러한 초기 단계가 골다공증(osteoporosis) 발달을 촉진하리라 추측되었다.

[0083] **실시예 2. SP(Substance P)에 의한 조기 혈관신생능 보호 효과**

[0084] 2-1. SP의 혈관신생능 소실 차단 확인

[0085] SP의 혈관신생능(angiogenic potential) 보호 효과를 확인하기 위해, SP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 식염수 (JW Pharmaceutical, Seoul, Korea)에 희석하여 5 nmol/kg의 용량으로 난소절제술 레트에게 4주간 주 2회 정맥주사로 투여한 후 (대조군은 식염수 투여), MTC 염색을 통한 조직학적 분석, 혈청 및 골수에서 혈관신생 성장 인자 및 염증 인자들의 ELISA 분석 및 골밀도 분석을 μ-CT로 수행하였다 (도 4A).

[0086] 그 결과, SP의 조기(초기) 처리에 의해 난소절제술 이후 4주차의 체중 증가가 완화되었으며 (도 4B), 동일 시점에서 뚜렷한 골 손실이 나타나지 않았다 (도 4C 및 D). 조직학적 분석 결과에서도 상기 결과와 유사하게 나타났으며 (도 4E), 난소절제술에 의해 4주차에 감소한 혈관신생 성장 인자 VEGF 및 PDGF-BB도 SP의 처리에 의해 그 감소가 완화된 것으로 나타났다 (도 4F 내지 I). 아울러, 난소절제술 4주차에 전신 염증이 유도되지 않는 것으로 나타났다 (도 4J 및 K).

[0088] 2-2. SP의 혈관 소실 차단 확인

[0089] 골수에서 H형 혈관 밀도를 평가하기 위해, CD31 또는 엔도뮤신의 발현을 면역형광염색과 웨스턴 블롯 분석으로 확인한 결과, 난소절제술에 의해 4주차에 감소된 CD31 양성 또는 엔도뮤신 양성 H형 혈관의 밀도 (도 5A)는 SP 처리에 의해 현저히 증가하는 것으로 나타났으며 (도 5B), 난소절제술에 의해 감소된 CD31 발현이 SP에 의해 회복되어, SP-매개된 내피세포 보호를 확인할 수 있었다 (도 5C). 이를 통해, 4주간의 SP 투여가 난소절제술-매개된 혈관 손실을 혈관신생 성장 인자 및 H형 혈관 구조(vasculature)를 강화(enriching)함으로써 완화하는 것을 확인하였다.

[0091] **실시예 3. SP에 의한 골 손실 차단 효과**

[0092] 상기 실시예를 통해 SP의 전신(systemic) 투여가 에스트로겐 부족 상태에서 성장 인자 및 H형 혈관 소실을 차단함으로써 혈관신생능을 유지할 수 있음을 확인하였으므로, SP에 의해 초기 보존되고 강화된 혈관신생능이 골 손실(bone loss)을 억제할 수 있는지 확인하였다. 구체적으로, SP를 상기 실시예에서와 같이 난소절제술된 랫에 4주 동안 주사하고, 추가 주사 등의 처리없이 8주차까지 유지하였다. 이 후 (난소절제술 후 8주차), MTC 염색을 통한 조직학적 분석, 혈청 및 골수에서 혈관신생 성장 인자 및 염증 인자들의 ELISA 분석 및 골밀도 분석을 μ-CT로 수행하였다 (도 6A).

[0093] 그 결과, 난소절제술에 의해 4주차 보다 현저히 증가된 체중 증가가 SP 조기 처리에 의해 완화되는 것으로 나타

났다 (도 6B). 또한, 난소절제술 후 8주차에 증가된 TNF-α와 감소된 IL-10에 의해 전신 염증이 유발된 반면, 난소절제술 직후부터 4 주간 SP를 처리한 군에서는 전신 염증이 유발이 현저히 감소되는 것으로 나타났다 (도 6C 및 D). 또한, 난소절제술 후 8주차에 현저히 감소한 혈관신생 성장 인자 또한 SP의 처리에 의해 회복되는 것으로 나타났다 (도 6E 내지 H).

[0094] 이를 통해, SP의 혈관신생 성장 인자 및 염증 수용성 인자에 대한 8주차에서의 효과가 난소절제술 직후 내지 4주차의 SP 처리에 의한 결과임을 확인하였다.

[0096] **실시예 4. SP에 의한 H형 혈관 보호를 통한 골 손실 진행 억제 효과**

[0097] 골수 내 H형 혈관의 분포를 확인하기 위해, 상기 실시예 3에서와 같이 SP를 상기 실시예에서와 같이 난소절제술된 랫에 4주 동안 주사하고, 추가 주사 등의 처리없이 8주차까지 유지하고, CD31 및 엔도뮤신에 대한 항체를 이용한 조직면역 분석을 수행하였다. 또한, MTC 염색을 통한 조직학적 분석 및 마이크로-CT 분석을 수행하였다.

[0098] 그 결과, 난소절제술에 의해 CD31양성 또는 엔도뮤신 양성 H형 혈관이 4주차 부터 급격히 사라지고 8주차에 현저히 사라지는 반면, SP를 투여한 그룹에서는 H형 혈관이 보호되는 것으로 나타났다 (도 7A). 또한, 골수 흡인물에서의 CD31 발현 분석을 통해, SP가 골수 내 내피세포를 보호하는 것을 확인하였다 (도 7B 및 C). 또한, MTC 염색을 통한 조직학적 분석 결과, SP가 골 손실을 억제하는 것으로 나타났으며 (도 8A), 마이크로-CT 분석 결과, SP 처리한 래트에서 식염수 처리한 래트에 비해 더 높은 골 부피 및 수(number)를 나타냈다 (도 8B 내지 F).

[0099] 이를 통해, SP의 전신투여가 난소절제술에 의해 손상된 혈관신생능을 보존할 수 있고, 혈관 구조의 초기 보호가 골 손실 진행을 차단해 골밀도를 난소절제되지 않은 대조군과 유사하게 유지할 수 있음을 확인하였다.

[0101] **실시예 5. SP의 혈관 구조의 조기 보호를 통한 골밀도 유지 기전 확인**

[0102] 5-1. SP의 혈관 구조 보호 기전 확인

[0103] 상기 실시예를 통해 SP가 난소절제술 레트에서 혈관신생 성장 인자 및 H형 혈관의 부족을 억제하는 것을 확인하였으나, 그 기전이 불분명하므로, 난소절제술 유도 후 골수 환경에서 산화 스트레스의 발달을 확인하였다. 구체적으로, 랫에 난소절제술을 수행한 뒤 3주 및 4주차에 대퇴골 생검을 분리하고 PBS로 플러싱(flushing)하여 골수 흡인물을 제작하고, 총 단백질을 분리한 뒤, SOD activity assay kit (Abcam)를 이용하여 SOD 활성을 Emax Endpoint microplate reader (Molecular Devices)로 확인하였다. 또한, 골수 흡인물에서 NO의 양을 확인하기 위해, Griess reagent system (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 Emax Endpoint microplate reader (Molecular Devices)로 측정하고 NO의 농도를 정량하였다.

[0104] 그 결과, SOD 활성 및 NO 농도는 난소절제술 유도 후 3주차에 일정 정도 줄어드는 경향이 있었으나, 그 차이는 통계적으로 유의미하지 않은 것으로 나타났으나 (도 9A 및 C), H형 혈관 밀도가 감소한 것으로 나타난 난소절제술 후 4주차에는 SOD 활성 및 NO 농도가 통계적으로 유의미하게 감소하는 것으로 나타나 (도 9B 및 D), 산화 스트레스가 발생한 것을 나타냈다. 이러한 변화는 난소절제술 유도 후 SOD 및 GPX의 활성을 확인한 결과에서 4주차에 비해 8주차 (4주간 SP 처리 후 8주차)에 더욱 명확하게 관찰되었다 (도 10). 또한, 난소절제술 유도 후 4주간 SP를 처리한 그룹에서는 SP가 처리되지 않은 난소절제술 그룹에 비해 NO 수준이 증가하고 SOD 활성이 강화되는 것으로 나타났다 (도 9E 내지 G). 즉, SP 처리는 난소절제술 유도 후 4주차 골수에서 NO-강화(enriched)된 환경을 형성하고 항산화 활성을 증진하는 것으로 확인되었다.

[0106] 이러한 데이터는 산화 스트레스에 의해 유도된 세포 위험(cellular risk)이 난소절제술 3주차 이후부터 감지되며, 세포 손상은 난소제거술 후 4주차부터 발생함을 나타내며, 혈관 구조 및 염증에서의 NO의 중요한 역할을 고려할 때, SP에 의해 유도된 H형 혈관의 보호는 에스트로겐 부족 초기에 충분한 NO 생성 및 SOD 활성의 회복을 통해 발생하는 것을 알 수 있었다.

[0108] 5-2. SP의 산화 스트레스 하 내피전구세포 보호 확인

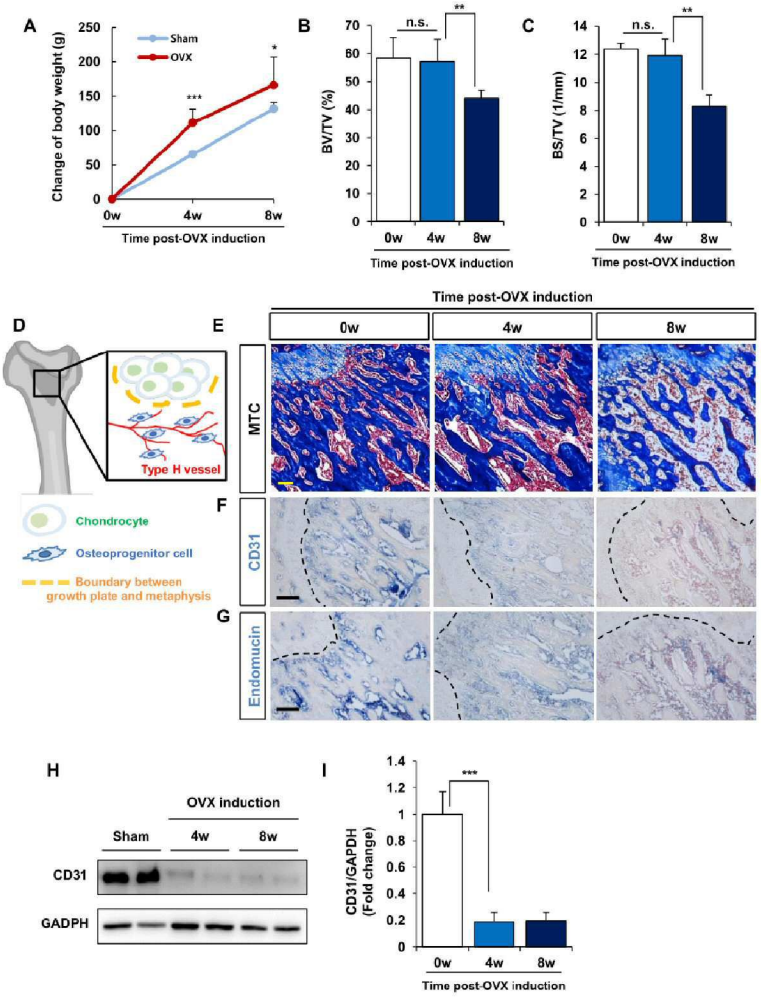
[0109] SP가 혈관신생 기여하는 내피전구세포(endothelial progenitor cell, EPC)를 산화 스트레스 하에 보호할 수 있는지 확인하였다. 구체적으로, 인간 BM-MNCs(BM mononuclear cells) (Stem Cell Technology, Vancouver, Canada)를 인간 피브로넥틴 (Sigma-Aldrich)이 코팅된 배양 디쉬에 분주하고 endothelial growth media-2 (Lonza, Basel, Switzerland)로 배양하였다. 배지는 격일로 교체하였으며, BM-유래 EPCs을 80% 밀도일 때 계대 배양하였다. SP (최종 농도: 100 nM)를 EPC에 30분 간경으로 2회 첨가하여 전처리한 뒤, 300 μM 의 H_2O_2를 8시간 동안 처리하고 (도 11A), EPCs의 세포 생존율을 WST 분석으로 확인하였으며, NO 농도를 확인하였고, eNOS 및 p-eNOS에 대한 항체 (Cell Signaling Technology)를 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[0110] 그 결과, 산화 스트레스에 의해 감소된 EPCs의 세포생존율이 SP 처리에 의해 회복되었으며 (도 11B), eNOS의 인산화 및 NO 생성은 산화 스트레스에 의해 감소되었으나, SP-전처리된 세포들은 처리되지 않은 세포들보다 높은 eNOS인산화 및 NO 농도를 유지하는 것으로 나타났다 (도 11C 내지 E).

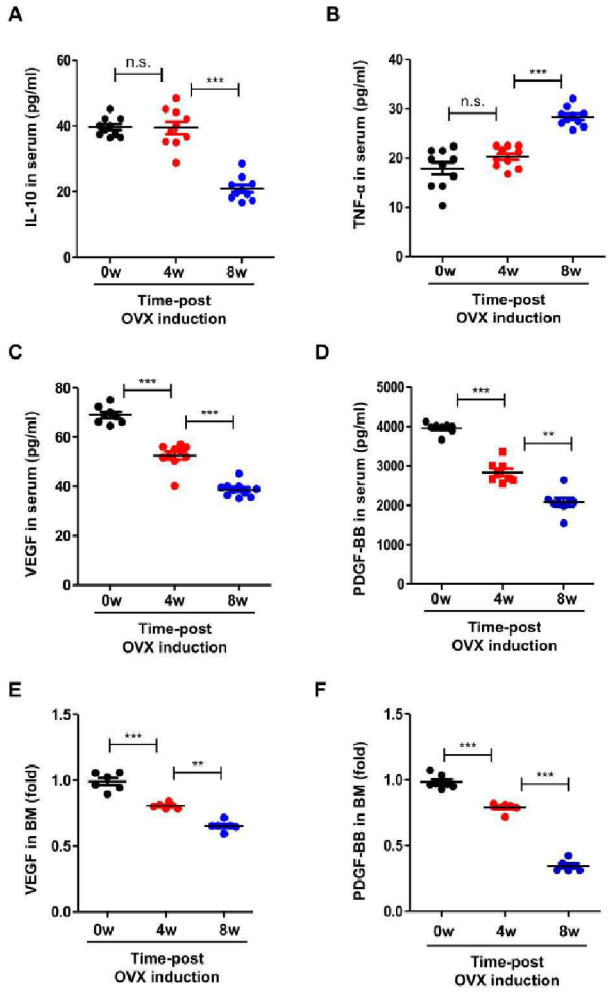
[0111] 이를 통해, SP 전처리가 산화 스트레스 하에서 NO손실을 완화할 수 있으며, 이는 내피전구세포의 강화된 생존율에 기여할 수 있음을 확인하였다.

도면

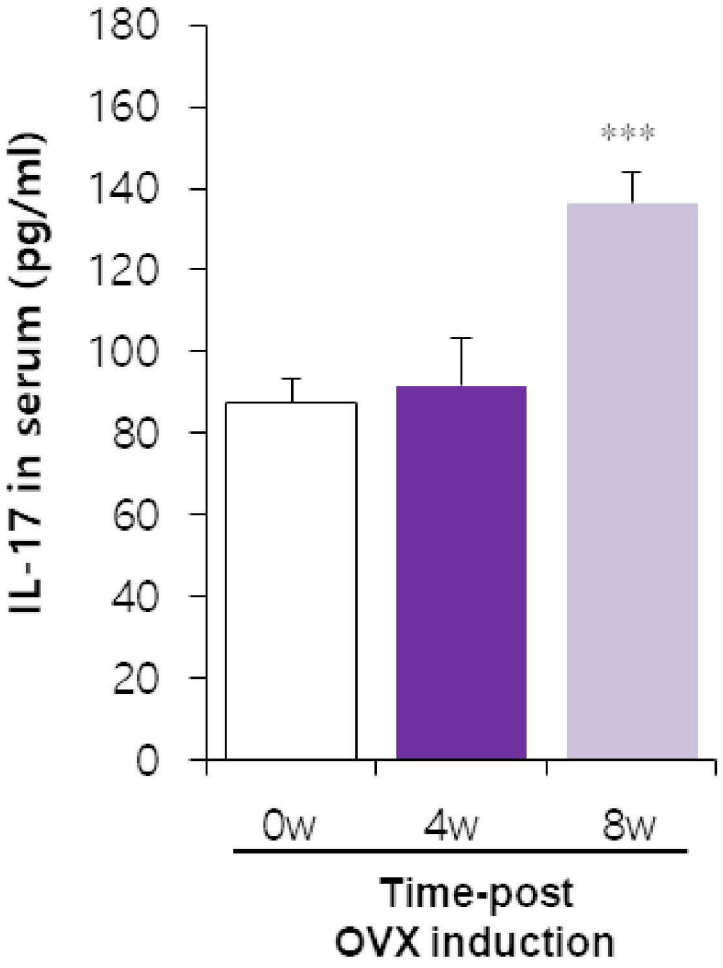
도면1



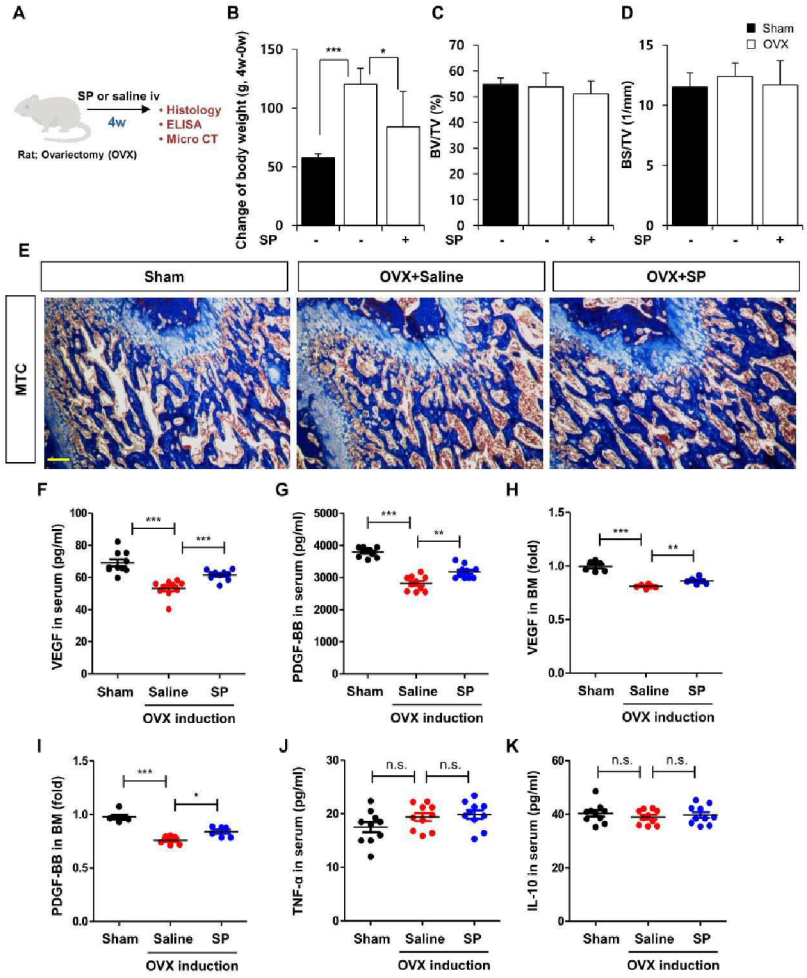
도면2


A
IL-10 in serum (pg/ml)
n.s.
***
0w
4w
8w
Time-post OVX induction
B
TNF-α in serum (pg/ml)
n.s.
***
0w
4w
8w
Time-post OVX induction
C
VEGF in serum (pg/ml)
***
***
0w
4w
8w
Time-post OVX induction
D
PDGF-BB in serum (pg/ml)
***
**
0w
4w
8w
Time-post OVX induction
E
VEGF in BM (fold)
***
**
0w
4w
8w
Time-post OVX induction
F
PDGF-BB in BM (fold)
***
***
0w
4w
8w
Time-post OVX induction

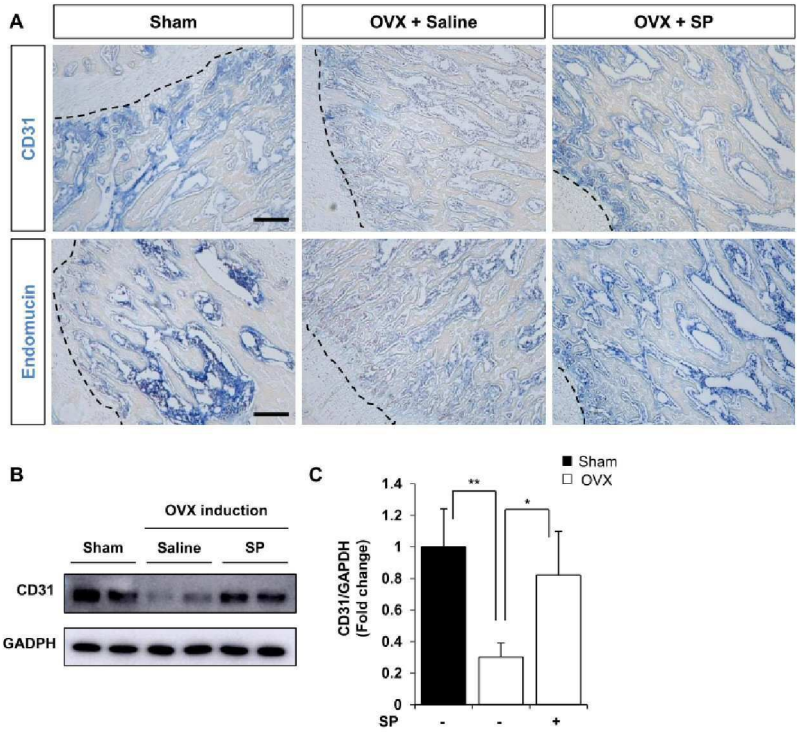
도면3


180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
IL-17 in serum (pg/ml)
***
0w
4w
8w
Time-post
OVX induction

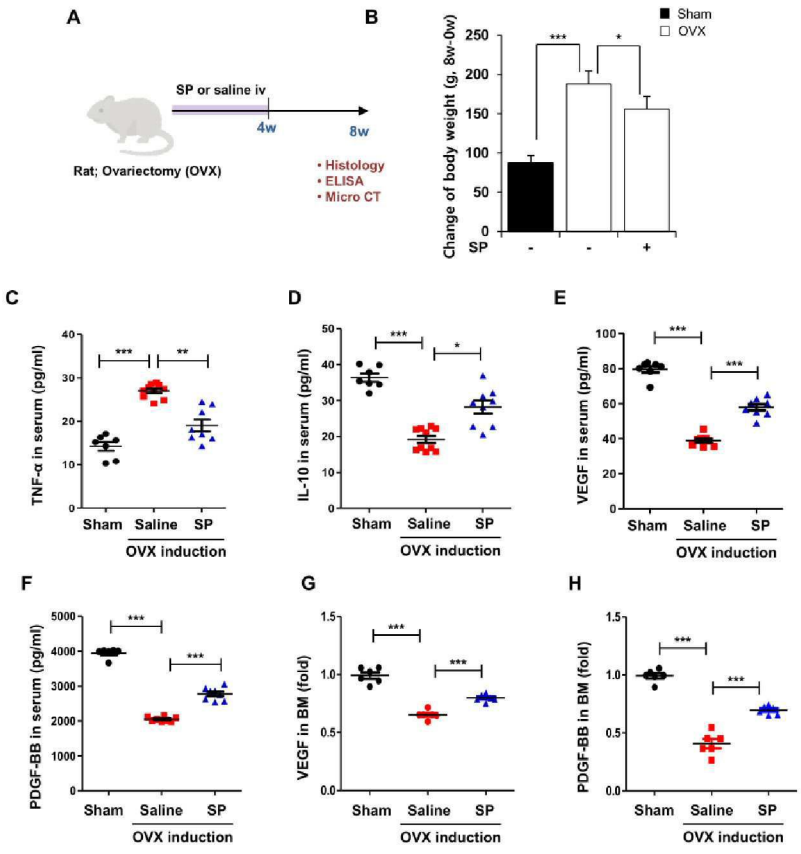
도면4


A
SP or saline iv
4w
• Histology
• ELISA
• Micro CT
Rat; Ovariectomy (OVX)
B
Change of body weight (g, 4w-0w)
C
BV/TV (%)
D
BS/TV (1/mm)
Sham
OVX
SP
E
Sham
OVX+Saline
OVX+SP
MTC
F
VEGF in serum (pg/ml)
G
PDGF-BB in serum (pg/ml)
H
VEGF in BM (fold)
I
PDGF-BB in BM (fold)
J
TNF-α in serum (pg/ml)
K
IL-10 in serum (pg/ml)
Sham
Saline
SP
OVX induction
n.s.

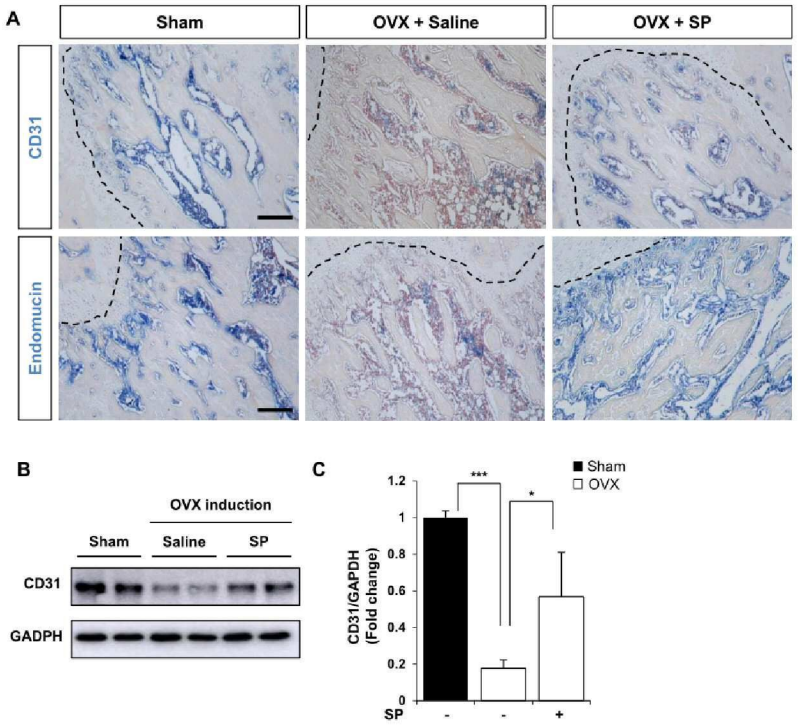
도면5


A
Sham
OVX + Saline
OVX + SP
CD31
Endomucin
B
OVX induction
Sham
Saline
SP
CD31
GADPH
C
Sham
OVX
CD31/GAPDH (Fold change)
SP

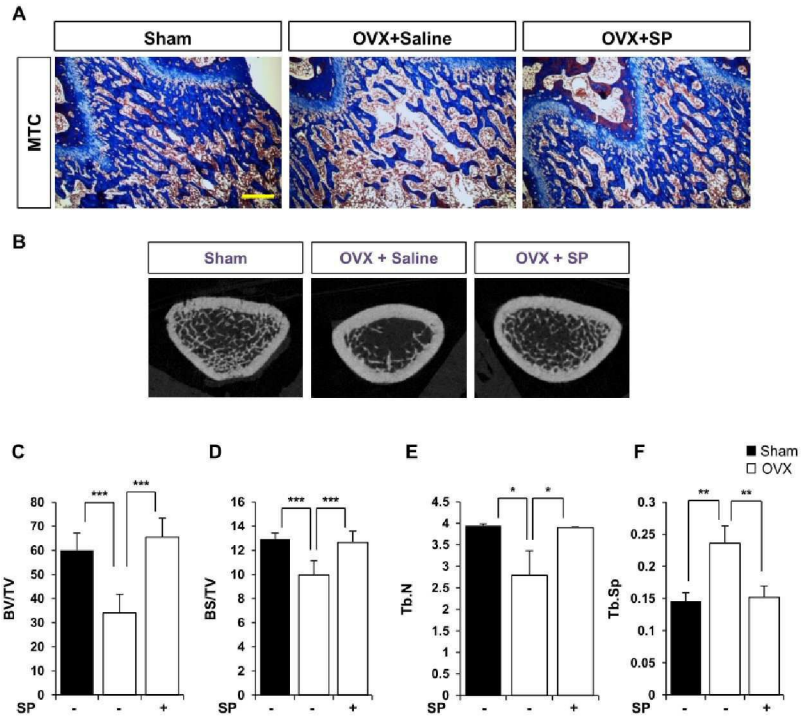
도면6


A
SP or saline iv
4w
8w
Rat; Ovariectomy (OVX)
• Histology
• ELISA
• Micro CT
B
Sham
OVX
Change of body weight (g, 8w-0w)
SP
C
TNF-α in serum (pg/ml)
D
IL-10 in serum (pg/ml)
E
VEGF in serum (pg/ml)
F
PDGF-BB in serum (pg/ml)
G
VEGF in BM (fold)
H
PDGF-BB in BM (fold)
Sham
Saline
SP
OVX induction

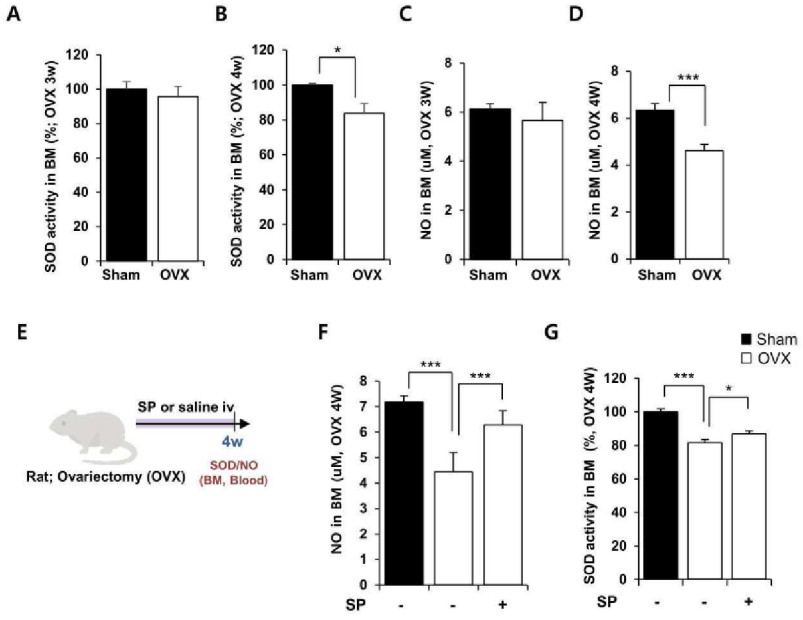
도면7


A
Sham
OVX + Saline
OVX + SP
CD31
Endomucin
B
OVX induction
Sham
Saline
SP
CD31
GADPH
C
Sham
OVX
CD31/GAPDH (Fold change)
SP

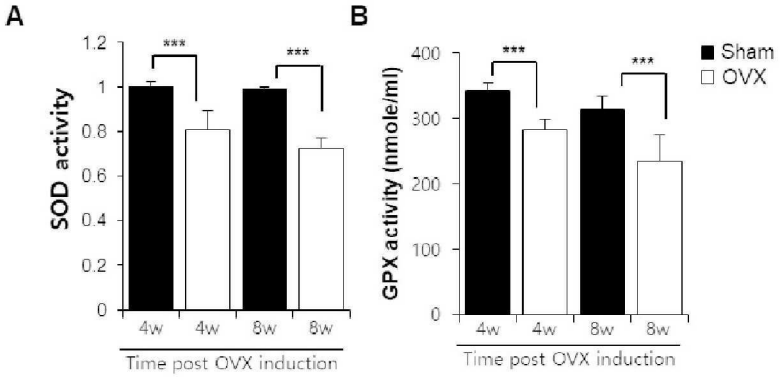
도면8


A
Sham
OVX+Saline
OVX+SP
MTC
B
Sham
OVX + Saline
OVX + SP
C
D
E
F
Sham
OVX
BV/TV
BS/TV
Tb.N
Tb.Sp
SP

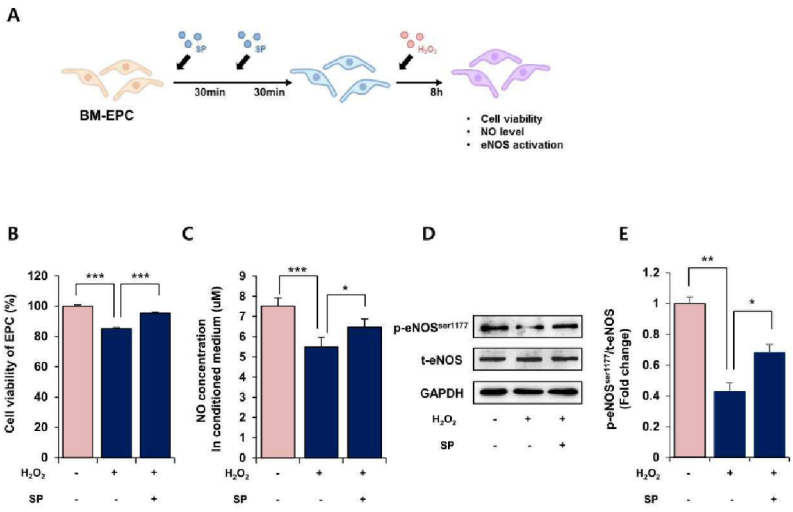
도면9



도면10



도면11



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.