	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2008-0074182 (43) 공개일자 2008년08월12일
(51) Int. Cl. <i>A61K 31/194</i> (2006.01) <i>A61K 31/198</i> (2006.01) <i>A61P 19/02</i> (2006.01) <i>A61P 19/10</i> (2006.01)		(71) 출원인 엔트레스 에이비 스웨덴 에스-111 57 스톡홀름 14 티알 스베아바겐 17
(21) 출원번호 10-2008-7014596		(72) 발명자 피에르지노브스키 스테판 지. 스웨덴 에스이-211 14 말뫼 뱀펠가탄 21
(22) 출원일자 2008년06월16일 심사청구일자 없음 번역문제출일자 2008년06월16일		(74) 대리인 박장원
(86) 국제출원번호 PCT/SE2006/050479 국제출원일자 2006년11월15일		
(87) 국제공개번호 WO 2007/058612 국제공개일자 2007년05월24일		
(30) 우선권주장 60/597,172 2005년11월15일 미국(US)		

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 연골 손상에 사용하기 위한 약제

(57) 요약

의료적 관절 상태, 예를 들면 관절증, 류마티스성 관절염 및 연골 손상을 치료하기 위한 물질의 용도. 상기 용도는 알파-케토글루타르산, 글루타민 또는 글루탐산은 물론, 상기 물질의 염, 아미드, 디- 또는 트리펩티드를 사용하는 것을 포함한다.

특허청구의 범위

청구항 1

제중 감량 및/또는 영양 부족; 영양실조; 위절제술, 부분 위절제술 또는 위 띠감기와 관련된 상태에서의 연골 손상의 치료 또는 예방을 위한 약학 제제의 제조용으로서의, 알파-케토글루타르산 또는 알파-케토글루타르산의 약학적으로 수용 가능한 염의 용도.

청구항 2

제1항에 있어서, 알파-케토글루타르산 또는 알파-케토글루타르산의 약학적으로 수용 가능한 염은 1종 이상의 아미노산과의 약학적으로 수용 가능한 물리적 혼합물 형태인 것인 용도.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 아미노산은 글루타민, 글루탐산, 아르기닌, 오르니틴, 류신, 이소류신, 리신, 프롤린 및 이들의 조합 중에서 선택되는 것인 용도.

청구항 4

제1항 내지 제3항에 있어서, 알파-케토글루타르산의 약학적으로 수용 가능한 염은 알칼리 금속염 또는 알칼리토 금속염, 또는 이들의 조합인 것인 용도.

청구항 5

제1항 내지 제4항에 있어서, 알파-케토글루타르산의 약학적으로 수용 가능한 염은 소듐 알파-케토글루타레이트 인 것인 용도.

청구항 6

제중 감량 및/또는 영양 부족; 영양실조; 위절제술, 부분 위절제술 또는 위 띠감기와 관련된 상태에서의 연골 손상의 치료 또는 예방을 위한 약학 제제의 제조용으로서의, 아미노산, 디펩티드 또는 트리펩티드와 알파-케토글루타르산의 아미드의 용도.

청구항 7

제6항에 있어서, 알파-케토글루타르산과의 아미드를 생성하는 아미노산은 글루타민, 글루탐산, 아르기닌, 오르니틴, 리신, 프롤린, 이소류신 및 류신 중에서 선택되는 것인 용도.

청구항 8

제6항에 있어서, 알파-케토글루타르산과 아미드를 형성하는 디펩티드는 글루타민과 글루탐산, 아르기닌, 오르니틴, 리신, 프롤린, 이소류신 및 류신 중의 어떤 것의 디펩티드인 것인 용도.

청구항 9

제1항 내지 제8항에 있어서, 환자에게 공급되는 투여량은 물질을 하루에 1 내지 1000 mg/kg 체중의 범위인 것인 용도.

청구항 10

제1항 내지 제8항에 있어서, 환자에게 공급되는 투여량은 물질을 하루에 10 내지 400 mg/kg 체중의 범위인 것인 용도.

청구항 11

제1항 내지 제8항에 있어서, 환자에게 공급되는 투여량은 물질을 하루에 10 내지 100 mg/kg 체중의 범위인 것인 용도.

명세서

기술분야

- <1> 본 발명은 의약 조성물과, 연골 손상 및 이와 관련된 통증의 치료, 완화 및 예방, 또는 아트로스(artrose)과 류마티스성 관절염 및 이들과 관련된 통증의 예방을 위한 상기 조성물의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 산업화 세계에서는 성인 3명 중의 1명이 현재 만성적인 관절 증상 또는 관절염으로 고통을 받고 있다. 가장 일반적인 증상인 지속적인 관절 통증은 둔부 통증, 무릎 통증, 손의 통증 또는 손목 통증으로서 뿐 아니라, 신체의 기타 부위의 관절 통증으로 나타날 수 있다. 상기 증상들은 고통을 유발하며, 일을 중단하거나 또는 일하는 시간을 줄여야하는 경제적 손실을 가져온다. 또한, 의료에 있어서 많은 비용이 지출된다. 관절 증상 및 관절염을 완화 또는 치유하기 위한 비용 효율이 높은 해법에 대한 요구가 명백하게 존재한다.

발명의 상세한 설명

- <3> 발명의 요약

- <4> 본 발명의 구체에는 알파-케토글루타르산(ketoglutaric acid), 글루타민, 글루탐산 및 이들 산의 약학적으로 수용 가능한 염, 아미노산 또는 글루타민과 다른 1종의 아미노산과의 디-또는 트리펩티드, 글루타민과 다른 아미노산들과의 트리펩티드, 글루탐산과 다른 아미노산들과의 트리펩티드와, 알파-케토글루타르산과의 아미드, 및 상기 디펩티드 및 트리펩티드의 약학적으로 수용 가능한 염, 알파-케토글루타르산 또는 약학적으로 수용 가능한 염과 1종 이상의 아미노산의 약학적으로 수용 가능한 물리적 혼합물로 구성된 군에서 선택되는 한 가지 이상의 구성원을 포함하는 물질의, 염증성 또는 비염증성 연골 손상 및 이와 관련된 통증 상태의 치료 또는 예방을 위한 약학 제제의 제조용으로서의 용도를 포함한다.

- <5> 추가의 구체에는 아트로스 및 류마티스성 관절염과 이들과 관련된 통증의 치료 또는 예방을 위한 상술한 용도를 포함한다.

- <6> 추가의 구체에는 체중 감량(weight loss) 및/또는 악화된 영양 섭취(impaired nutrition), 또는 위절제술(gastrectomy), 부분 위절제술 또는 위 락기(gastric banding)와 관련된 상태에서의 연골 손상의 치료 또는 예방을 위한 상술한 용도를 포함한다.

- <7> 추가의 구체에는 영양실조와 관련된 상태에서의 연골 손상의 치료 또는 예방을 위한 상술한 용도를 포함한다.

- <8> 추가의 구체에는 상술한 상태에서의 연골 손상과 관련된 통증을 완화하기 위한 상술한 용도를 포함한다.

- <9> 추가의 구체에는 위절제술과 관련된 골다공증의 치료 또는 예방을 위한 상술한 용도를 포함한다.

- <10> 상세한 설명

- <11> 따라서, 본 발명의 한 가지 관점에 따라, 알파-케토글루타르산, 글루타민, 글루탐산 및 이들 산의 약학적으로 수용 가능한 염, 아미노산, 또는 글루타민과 다른 1종의 아미노산과의 디-또는 트리펩티드, 글루타민과 다른 아미노산들과의 트리펩티드, 글루탐산과 다른 아미노산들과의 트리펩티드와 알파-케토글루타르산과의 아미드, 및 상기 디펩티드 및 트리펩티드의 약학적으로 수용 가능한 염, 알파-케토글루타르산 또는 약학적으로 수용 가능한 염과 1종 이상의 아미노산의 약학적으로 수용 가능한 물리적 혼합물로 구성된 군에서 선택되는 한 가지 이상의 구성원의, 아트로스, 류마티스성 관절염 및 연골 파괴와, 전술한 장애와 관련된 통증 상태의 치료 또는 예방을 위한 약학 제제의 제조용으로서의 새로운 용도를 제공한다.

- <12> 본 발명의 바람직한 구체에 따르면, 알파-케토글루타르산 또는 이의 알칼리 금속염 또는 알칼리토금속염, 또는 이들의 조합이 사용된다. 바람직하게는 소듐 알파-케토글루타레이트가 사용된다.

- <13> 본 발명의 다른 한 가지 관점에 따르면, 인간을 비롯한 포유류의 아트로스로 구성된 군에서 선택되는 한 가지 이상의 구성원의 증가된 통증 상태의 치료 또는 예방을 위한 방법이 제공되는데, 이 방법은 알파-케토글루타르산, 글루타민, 글루탐산 및 이들 산의 약학적으로 수용 가능한 염, 아미노산 또는 글루타민과 다른 1종의 아미노산과의 디- 또는 트리펩티드, 디펩티드, 글루타민과 다른 아미노산들과의 트리펩티드, 글루탐산과 다른 아미노산들의 디펩티드, 글루탐산과 다른 아미노산들과의 트리펩티드와 알파-케토글루타르산과의 아미드, 및 상기 디펩티드 및 트리펩티드의 약학적으로 수용 가능한 염, 알파-케토글루타르산 또는 약학적으로 수용 가능한 염과 1종 이상의 아미노산의 약학적으로 수용 가능한 물리적 혼합물로 구성된 군에서 선택되는 한 가지 이상의 구성

원의 유효한 통증량을 그러한 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

- <14> 이 관점의 바람직한 구체예에 따르면, 알파-케토글루타르산 또는 이의 알칼리금속염 또는 알칼리토금속염, 또는 이들의 조합이 투여된다. 가장 바람직하게는 소듐 알파-케토글루타레이트가 투여된다.
- <15> 본 발명에 따라 사용되는 활성 주성분(principle) 또는 주성분들의 약학 제제는 생쥐(mouse), 쥐(rat), 기니피그 또는 토기와 같은 설치류, 칠면조, 암탉 또는 병아리(chicken) 및 불고기용 영계(broilers)와 같은 조류, 및 자유롭게 돌아다니는 동물, 소, 말, 돼지 또는 새끼 돼지 및 기타의 농장 동물, 개, 고양이 및 기타의 애완동물, 및 특히 인간과 같은 포유류 및 조류를 비롯한 척추 동물에 투여될 수 있다.
- <16> 투여는 치료되는 척추 동물의 종, 상기 방법을 필요로 하는 척추 동물의 상태 및 치료에 대한 구체적인 징후(specific indication)에 의존하여 다양한 방법으로 이루어질 수 있다.
- <17> 한 가지 구체예에 있어서, 투여는 식품, 또는 보조식품(feed supplement) 및/또는 고형 식품 및/또는 음료 형태의 구성 성분과 같은 식이 보충제로서 이루어진다. 추가의 구체예는 이하에 추가로 기술되는 음료와 같은, 현탁액 또는 용액일 수 있다. 또한, 씹을 수 있거나 용해성인 캡슐 또는 정제, 예를 들면, 비등성 정제 형태는 물론, 분말 및 마이크로펠릿과 같은 펠릿, 및 알갱이(grains)와 같은, 본 발명 분야의 숙련자에게 알려져 있는 기타의 건조 형태일 수 있다.
- <18> 투여는 앞에서 밝힌 식품 또는 보조식품의 비경구, 직장 또는 경구 형태일 수 있다. 비경구 운송 수단(vehicles)은 염화나트륨 용액, 링거(Ringer's) 텍스트로스, 텍스트로스와 염화나트륨, 유산화(lactated) 링거 또는 고정유(fixed oil)를 포함한다.
- <19> 식품 및 보조식품을 유화(emulsified)할 수도 있다. 그 다음, 활성 치료 성분 또는 성분들을 약학적으로 수용 가능하고 활성 성분과 양립성이 있는 부형제와 혼합할 수 있다. 적합한 부형제는 예를 들면, 물, 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 또는 이들의 조합이다. 또한, 필요한 경우, 조성물은 활성 성분의 효능을 향상시키는 습윤제 또는 유화제, pH 완충제와 같은 보조 물질을 소량 함유할 수 있다.
- <20> 고형 식품, 액체(liquids), 또는 동결 건조 또는 기타의 건조 제형과 같은 다양한 형태의 비경구(parental) 식품 또는 보조식품이 공급될 수 있다. 이것은 희석제인 다양한 완충제(예를 들면, 트리스-HCl, 아세테이트, 포스페이트), pH 및 이온 세기, 알부민 또는 표면 흡수를 방지하기 위한 젤라틴과 같은 첨가제, 세제(예를 들면, Tween 20, Tween 80, 플루로닉(Pluronic) F68, 담즙산 염), 가용화제(예를 들면, 글리세롤, 폴리에틸렌글리세롤), 산화방지제 (예를 들면, 아스코르브산, 소듐 메타설파이트(metabisulfite)), 방부제(예를 들면, 티머로살(Thimerosal), 벤질 알콜, 파라벤류), 벌크화(bulking) 물질 또는 탄력성(tonicity) 개조제(예를 들면, 락토오스, 마니톨), 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리머의 조성물에 대한 공유 부착, 금속 이온과의 착화, 또는 폴리락트산, 폴리글리콜산, 하이드로겔 등과 같은 폴리머 화합물의 미립자 제제에의 또는 이에 대한, 또는 리포솜, 마이크로에멀전, 미셀(micelles), 단일막(unilamellar) 또는 다중막(multilamellar) 소낭(vesicles), 적혈구 허깨비 또는 스페로플라스트(spheroplasts)에 대한 물질의 혼입을 포함할 수 있다.
- <21> 한 가지 구체예에 있어서, 상기 식품 또는 보조식품은 본 발명에 따른 방법 중의 어떤 경우에 있어서 음료, 또는 이의 건조 조성물 형태로 투여된다.
- <22> 상기 음료는 미네랄, 비타민, 탄수화물, 지방 및 단백질과 같은 영양학적으로 수용 가능한 수용성 담체와 함께 그 활성 성분 또는 활성 성분들을 포함한다. 음료가 건조 형태로 제공되는 경우, 이들 성분은 모두 건조 형태로 공급된다. 소비를 위하여 제공된 음료는 추가로 물을 포함한다. 최종적인 음료 용액은 예를 들면 이전 단락의 일반적으로 제안에 따른 완충 용액과 같이, 조절된 탄력성과 산성(acidity)을 가질 수도 있다.
- <23> pH는 세균 및 균류의 성장을 방지하기 위하여 약 2-5, 특히 약 2-4 범위인 것이 바람직하다. pH 약 6-8인 멸균 음료가 사용될 수도 있다.
- <24> 상기 음료는 단독으로 또는 1종 이상의 치료학적으로 유효한 조성물과 조합으로 공급될 수 있다.
- <25> 추가의 구체예에 따르면, 경구 및 직장 사용을 위한 약제로서의 약학 제제는, 본 발명에 개시된 방법 및 용도에 유용한 약학적으로 수용 가능한 담체, 및/또는 희석제, 방부제, 가용화제, 유화제, 보조제 및/또는 담체와 같은 첨가제와 혼합된 활성 성분 또는 활성 성분들을 포함하는 정제, 마름모꼴 정제, 캡슐, 분말, 수성 또는 유성 현탁액, 시럽, 엘릭시르, 수용액 등의 형태일 수 있다.
- <26> 추가로, 본원에서 사용된 "약학적으로 수용 가능한 담체"는 본 발명 분야의 숙련자에게 잘 알려져 있는 것으로

서, 0.01- 0.05M 포스페이트 완충제 또는 0.8% 식염수를 포함할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 추가로, 이러한 약학적으로 수용 가능한 담체는 수계 또는 비수계 용액, 현탁액 및 에멀전일 수 있다. 비수계 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 및 에틸 올리에이트와 같은 주사 가능한 유기 에스테르이다. 수계 담체는 식염수 및 완충 매질을 비롯하여, 물, 알콜 용액/수용액, 에멀전 또는 현탁액이다. 비경구 운송 수단은 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스와 염화나트륨, 유산화 링거 또는 고정유를 포함한다. 방부제 및 기타 첨가제 역시 존재할 수 있는데, 예를 들면 항균제 (antimicrobials), 산화방지제, 킬레이트화제, 불활성 기체 등과 같은 것이다.

<27> 알파-케토글루타르산과 부분적으로 아마이드를 형성하거나 또는 글루타민 또는 글루탐산과 디펩티드를 형성하거나 또는 글루타민 및/또는 글루탐산과 트리펩티드를 형성하는 아미노산은 천연에 존재하는 펩티드의 성분으로서의 아미노산 중의 어떤 것이다. 이것은 알파-케토글루타르산 또는 이의 염과 1종 이상의 아미노산의 약학적으로 수용 가능한 물리적 혼합물에도 동일하게 적용된다. 바람직하게는 아미노산 또는 아미노산들은 아르기닌, 오르니틴, 류신, 이소류신 및 리신으로 구성된 군에서 선택되는 것(들)이다.

<28> 상기 아미노산들은 바람직하게는 L-배열 상태로 사용된다.

<29> 아미노산, 또는 디- 또는 트리펩티드와 알파-케토글루타르산의 아마이드의 예는 글루타민, 글루탐산, 아르기닌, 오르니틴, 리신, 프롤린, 이소류신 및 류신으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산과 알파-케토글루타르산의 아마이드, 및 글루타민과 글루탐산, 아르기닌, 오르니틴, 리신, 프롤린, 이소류신 및 류신 중의 어떤 것의 티펩티드 및 글루탐산과 아르기닌, 오르니틴, 리신, 프롤린, 이소류신 및 류신 중의 어떤 것과의 디펩티드와 알파-케토글루타르산의 아마이드를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

<30> 글루타민 및 글루탐산과 기타의 아미노산들의 디펩티드 및 펩티드의 예는 디- 또는 트리펩티드와 알파-케토글루타르산의 아마이드에 관하여 앞에서 언급한 것들을 포함한다.

<31> 케토글루타르산 또는 이의 염과 1종 이상의 아미노산의 물리적 혼합물의 예는 알파-케토글루타르산 및 이들의 소듐, 포타슘, 칼슘 및 마그네슘 염으로 구성된 군에서 선택되는 한 가지 이상의 구성원과, 글루타민, 글루탐산, 아르기닌, 오르니틴, 류신, 이소류신, 리신 및 프롤린 중의 어떤 것 및 상기 아미노산들의 조합 중의 어떤 것과의 물리적 혼합물을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

<32> 상기 물리적 혼합물에 있어서 알파-케토글루타르산 또는 이의 염 대 아미노산 또는 아미노산들의 몰비는 일반적으로 1:0.01 내지 1:2, 바람직하게는 1:0.1 내지 1:1.5 및 가장 바람직하게는 1:0.2 내지 1:1.0의 범위 내일 것이다.

<33> 투여량은 사용되는 활성 성분 또는 성분들, 치료되는 상태, 치료를 받는 환자의 연령, 성별, 체중 등에 의존하여 변할 것이지만, 일반적으로 하루에 1 내지 1000 mg/kg 체중, 또는 하루에 10 내지 400mg/kg 체중, 바람직하게는 하루에 10 내지 100 mg/kg 체중 범위 내일 것이다.

실시예

<38> 본 발명은 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되지 않는 실시예를 통하여 추가로 설명될 것이다.

<39> **배경:** 위장의 외과적 제거(위절제술, Gx)은 동물 및 인간에게 있어서 골다공증을 유발한다. 위절제술은 주로 섬유주 골(trabecular bone)의 구조에 영향을 미친다. Gx가 골단 연골(epiphyseal plate)에도 악영향을 미치는지 여부는 확실하지 않다. 식이 α-케토 글루타레이트 (AKG)는 뼈 및 연골 프로-콜라겐(pro-collagen) 내에 가장 풍부한 아미노산인 하이드록시프롤린의 전구체이다. 연구의 목적은 위절제술에 의존하는 뼈/연골 손실에 대한 AKG의 영향을 강조하기 위한 것이었다.

<40> **방법:** 40 마리의 암컷 스프라그-다울리(Sprague-Dawley) 쥐를 사용하였다. 20 마리의 쥐의 위를 절제하고, Gx+AKG와 Gx+위약의 2군으로 나누었다. 다른 20 마리의 쥐를 허위(sham) 수술하고, Sham+AKG와 Sham+위약의 2군으로 나누었다. 8주 후에, 동물을 희생시키고, 머리뿔개골, 대퇴(femora) 및 경골(tibiae)을 수집하였다. 오른쪽 대퇴 및 경골의 골질량 밀도[bone mass density (BMD)]를 산측하고, 왼쪽 뼈로부터 히스토모포메트리(histomorphometry)를 산측하였다. 또한, 머리뿔개골의 투과조명 측정을 수행하였다.

<41> **결과:** 식이 α-케토글루타레이트는 위절제 쥐의 머리뿔개골 손실에 대한 강한 보호 효과를 나타내었다. AKG는 위 절제 쥐의 골단 연골 세포, 섬유주 골 부피 및 섬유주의 형상(shape of the trabeculas)에 대하여 강한 파괴 방지 효과를 나타내었다.

- <42> 결론: AKG는 쥐의 위장 절제술 후에 진행되는 뼈 및 연골의 파괴를 최소화한다.
- <43> 위장의 외과적 제거는 인간, 쥐 및 기타의 실험 동물에게 있어서 골 감소증 및 관절염을 유발한다. 위절제술은 인간에게 있어서 골 감소증과 관련이 있다. 위장 기능 장애는 성인에게 있어서 골다공증의 진행에 기여할 수도 있다. 따라서, 골 질환에 관한 대부분의 연구는 위장 절제술 후의 환자를 다룬다.
- <44> 위절제술은 주로 섬유주 골 및 때로는 머리덮개뼈 파괴를 유발하는 피질 뼈(cortical bone)에 영향을 미친다. 위절제술 이후의 피질 및 섬유주 골 질량의 감소는 남성 및 여성 양쪽 모두에서 보고되고 있다. 경골 및 대퇴골 내의 섬유주 골 부피는 위절제술 16주 이후에 60%까지 감소한다. 위절제술 환자에게 있어서 골 손실은 둔부, 척추골 및 다른 부위의 골절 위험성을 증가시키는데, 이는 현재 심각한 문제이다.
- <45> 위절제 환자의 골 손실은 식이 결핍(예를 들면 칼슘)이나, 위산 또는 비타민 D 결핍의 결과가 아닌 것으로 여겨진다. 위절제술에 의하여 유발된 골 감소증의 메커니즘은 아직 알려져 있지 않다. 그러나, 골다공증의 1차적인 원인은 파골 세포에 의한 대량 파괴 이후에 골(bone) 콜라겐의 불충분한 재합성인 것으로 여겨진다. 골 프로-콜라겐의 주요 성분은 프롤린이다 - 아미노산은 위장관 내에서 AKG로부터 글루타메이트 및 프롤린을 거쳐 합성하고, 이어서 뼈 프로-콜라겐 내에서 AKG, 비타민 C 및 Fe²⁺ 존재하에서 하이드록시프롤린으로 전환된다.
- <46> AKG가 난소 절제 쥐 및 칠면조의 신경이 제거된 뼈의 골(bone) 손실을 방지하는 데에 효과적이라는 것이 최근에 밝혀졌다. 전술한 모든 것을 고려하여, 본 연구의 목적은 식이 AKG가 위 절제 쥐의 뼈 및 연골 손실을 방지할 수 있는가를 조사하는 것이었다.
- <47> 동물 및 외과 수술 절차
- <48> 10주령의 40 마리의 암컷 스프라그 다울리 쥐(220-230 g)를 Macrodon[®] 우리(각 우리당 2 마리)에 넣고, 표준 쥐 먹이 펠릿(Lactamin, Vadstena, Sweden)과 운송 수단 또는 임의로 물에 용해시킨 AKG를 공급하였다(표 1). 연구는 8주 동안 지속되었다. 쥐의 체중을 매주 측정하였다.
- <49> 쥐는 매일 25 내지 50 ml를 마셨다. 원칙적으로, 쥐는 체중의 10 내지 20%를 마셨다.
- <50> AKG군의 쥐는 매일 약 25 ml의 AKG를 마셨다. 음료 25 ml에는 0.36 g의 AKG가 존재하는데, 이것은 쥐의 체중 1kg당 하루 1 내지 1.4 g의 AKG를 공급하는 것이다. 위약(대조)군의 쥐는 하루에 약 50 ml의 위약을 마셨다.
- <51> 외과 수술
- <52> 20 마리의 쥐를 위장 절제 수술하고, Gx+AKG와 Gx+위약의 2군으로 나누었다(각 군에 쥐 10 마리씩). 위장의 샘 부분[즉, 산 생산 부분, 기저(fundus) 및 유문 공동(pyloric antrum)]을 절제한 다음, 비 샘 부분(non-glandular part)(전위)을 십이지장과 연결시켰다. 20 마리의 쥐를 허위(sham) 수술하고, Sham+AKG와 Sham+위약의 2군으로 나누었다(각 군에 쥐 10 마리씩). 허위 수술은 정중선 복부 절개(midline abdominal incision), 위장의 처치 및 절개의 봉합을 포함하였다. Ketalar[®] (50 mg/kg; 미국 뉴저지 모리스 필레인스의 파크-테이비스) 및 Stresnil[®] (40 mg/kg; 오스트리아 비인의 얀센 실라그 파마)를 피하 주사하여 마취시켰다. Temgesic[®] (0.18 mg/kg; 미국 뉴저지 케널워쓰의 쉐링-플러우)를 주사하여 진통시켰다.
- <53> Sham+위약군 및 Gx+위약군은 운송 수단으로 처치하고, Sham+AKG 및 Gx+AKG는 AKG로 처치하였다.
- <54> Gx 쥐에게 (수술 후 1주에 시작하여) 근육 내 경로로 비타민 B₁₂의 흡수에 필수적인 내인자(intrinsic factor)의 손상을 보상하기 위한 0.4 mg/kg의 비타민 B₁₂ (Betolvex[®] 1 mg/ml, 덴마크 코펜하겐의 듀팩스)과, 위산의 손실에 기인하여 예상되는 철분 흡수 부족에 대한 보상으로서 20 mg Fe³⁺/kg의 수산화철(III) 폴리말토스 착화합물 (Ferrum[®] 50 mg Fe³⁺ mg/ml, 스위스 세인트 갈렌의 비포르 (인터내셔널) 인코포레이티드)을 매 2주마다 한 번씩 주사하였다. 이러한 보충은 외과 수술 절차를 거치지 않은 쥐의 체중 발달에는 영향이 없었다.
- <55> 실험 중에 8 마리가 죽었다. 최종적으로 남은 동물은 Sham+위약군에서 7 마리, Sham+AKG군에서 10 마리, Gx+위약군에서 8 마리, Gx+AKG군에서 7 마리이었다. 상술한 것과 같은 마취 조건에서 복부 대동맥으로부터의 실험로 쥐를 모두 희생시켰다.
- <56> 연구는 스웨덴 룬드의 지역 동물 복지 위원회에 의하여 승인되었다.

<57> 조직 수집 및 분석

<58> 각 쥐로부터 머리뿔개골을 박리시키고, 골막을 조심스럽게 제거하여 부드러운 티슈로 닦았다. 각 머리뿔개골을 식염수에 적신 거즈로 감싸서 건조를 방지하고, 실험 이전에 +4℃의 밀폐된 용기에 보관하였다. 각 두개관(calvarium)을 일정한 세기로 빛을 방출하는 광원(시판되는 형광 튜브)의 정상부에 놓인 유리 플레이트에 놓았다. 얻어지는 투과조명 영상을 작동 현미경(배율 x 16)에 연결된 카메라를 이용하여 촬영하였다. 영상을 ImageJ v. 1.33a로 수행되는 히스토모포메트리 컴퓨터 분석법으로 분석하였다. (공간의 영역으로 관찰되는) 뼈 손실 퍼센트를 산출하였다.

<59> 대퇴 및 경골 양쪽 모두를 수집하고, 추가 분석시까지 70% 에탄올 내에 보관하였다.

<60> 오른쪽 대퇴 및 경골을 PIXIMUS® 분석법으로 분석하였는데, 이로부터 BMD를 g/cm^2 단위로, BMC를 g/cm^3 단위로 얻었다.

<61> 에탄올로 고정한 왼쪽 대퇴 및 경골의 칼슘을 7% 질소산(nitrogen acid)으로 48시간 동안 제거하였다. 원위(distal) 대퇴골 및 근위(proximal) 경골 시편(8 mm 부분의 뼈 몸통끝(metaphysis)을 가지는 골단(epiphysis)으로 이루어짐)을 추가의 조직학 절차(histological processes)에 사용하였다. 시편을 파라핀에 담갔다. 대퇴골 및 경골 시편(6 μm 두께)의 종단면(longitudinal section)을 자동 마이크로톰 Microm HM 360으로 절단하였다. 1 마리로부터의 뼈 1개당 20개의 슬라이스(각각 5 μm 후에 20 μm 의 간격으로)를 절단하였다. 슬라이스를 표준 조건에서 헤마토크실린/에오신(hematoxylin/eosin)으로 염색하였다. 염색된 각각의 슬라이스로부터 현미경 영상을 얻었다. 섬유주 골을 산출하는 데에 사용된 사진은 Nikon Eclipse E800 - 광현미경, 배율 x 40 및 Nikon D70 - 디지털 사진 카메라를 사용하여 촬영하였다. 대퇴골 및 경골의 단면 현미경 영상을 히스토모포메트리 컴퓨터 분석법으로 분석하였다. ImageJ v. 1.33a를 이용하여 섬유주(Trabeculas)를 분석하였다. 골단 연골을 평가하는 데에 이용된 사진을 Nomarski 대조 기술로 만들고, 아르곤 레이저 파장 514 nm의 LSM 5 파스칼 레이저 주사 헤드 Zeiss, 배율 x 100이 장착된 AXIOVERT 200 M으로 수집하였다. Analysis v. 3.0을 이용하여 골단 연골을 분석하였다.

<62> 아르곤 레이저 파장 514 nm의 LSM 5 파스칼 레이저 주사 헤드 Zeiss, 배율 x 100이 장착된 AXIOVERT 200 M의 형광 모드를 이용하여 관절 연골 영상을 포착하였다. Zeiss LSM Image Examiner v. 3.1.0.99로 관절 연골의 사진을 평가하였다. 섬유주 하부 골단 연골과 관련하여 고려된 변수: 해면 뼈의 특성을 얻기 위하여 측정된 섬유주 골 부피(BV/TV %) 및 섬유주 프랙탈 디멘전(박스 카운팅법). 골단 연골과 관련된 변수는 휴면 영역(Resting zone), 증식 영역(Proliferative zone) 및 비대성(Hypertrophic) 연골 영역으로 이루어진 관심 영역(Region Of Interest, ROI) 내의 연골 세포 수. LSM 5 파스칼 레이저 주사 헤드 검출기 12 비트 그레이 수준의 측정 스케일로서, 임의 선택 ROI(모든 슬라이스에 대하여 동일한 면적 - 관절 연골을 따라 각각 직경 83 μm 의 6개의 원)에서의 에오신 염색 콜라겐 형광 강도 측정으로 관절 연골의 상대적인 콜라겐 함량을 계산하였다. 모든 슬라이스에 대하여 정확하게 동일한 표준 조건에서 측정하였다.

<63> 통계

<64> 데이터를 변수의 일방 분석법(ANOVA)인 Student's t-테스트와 비교하고, $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

<65> 결과

<66> 실험 종료 시에 외과적으로 처치된 동물의 체질량은 허위 수술된 경우에 비하여 8 % 적었다. 군들 사이에 통계적으로 유의한 차이는 없었다(도 1).

<67> 머리뿔개골의 투과조명

<68> 머리뿔개골의 투과조명은 Sham+위약 및 Sham+AKG에 비하여 Gx+위약 및 Gx+AKG 쥐에서 뼈 공간의 퍼센트가 유의하게 증가한 것을 보여주었다(도 2). Gx+AKG 쥐 역시 Gx+위약 군($*p = 0.031$)에 비하여 공간의 퍼센트가 유의하게 낮은 것으로 나타난다(도 3). Sham+위약과 Sham+AKG 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

<69> 대퇴골 및 경골 내의 골 미네랄 밀도(BMD) 및 골 미네랄 함량(BMC)

<70> BMD 및 BMC는 Sham+위약 및 Sham+AKG 쥐(데이터 미제시)에 비하여 Gx+위약 및 Gx+AKG 쥐에서 더 낮았다. 그러나, Gx+AKG에서의 BMD는 Gx+위약 군($p = 0.19$)보다 더 큰 경향이 있었다.

- <71> 히스토모포메트리
- <72> 관절 연골 분석
- <73> Gx+AKG 군에서의 연골 콜라겐의 양은 대조(허위 수술)군에서의 양과 유사하였고, Gx+위약 군에 비해서는 유의하게 높았다(표 2).
- <74> 골단 연골 분석
- <75> 골단 성장판 세포의 정량적인 계산은 Gx+위약에 비하여 (대퇴골 및 경골 양쪽 모두에서) 군 Gx+AKG 에서 세포 수가 증가한 것을 보여주었다. 또한, Gx+AKG 군의 연골 세포 수가 2개의 Sham 군보다 유의하게 많았다 (표 3, 4).
- <76> 섬유주 골 부피
- <77> 위약 및 Sham+AKG 쥐에 비하여 Gx+위약 및 Gx+AKG 쥐에서 섬유주 골 부피가 감소하였다. 그러나, Gx + AKG에서의 섬유주의 면적 감소가 Gx + 위약 군에서의 감소에 비하여 더 적었다 (표 5, 6).
- <78> 골 섬유주의 프랙탈 디멘전
- <79> Gx+AKG에서의 프랙탈 디멘전은 대조군들과 유사하였고, Gx+위약보다는 높았다 (표 7, 8).
- <80> 토의
- <81> 실험의 목적은 위절제술에 의하여 유발된 골 손실에 대한 식이 α -케토글루타레이트의 영향을 평가하는 것이었다. 얻어진 데이터는 가정을 확인시켰다. 실제로 식이 AKG는 위 절제 쥐에서 뼈 및 연골 손실을 방지하였다. 우리의 결과는 난소 절제 쥐 및 폐경기 이후 여성에게 있어서의 골다공증의 진행을 AKG가 방지한다는 것을 보여주는 최근의 실험과 일치한다.
- <82> 위절제술은 Gx+위약 쥐에서 연골 콜라겐 및 연골 세포 손실을 유발하였으나, Gx+AKG 쥐에서는 그렇지 않았다. Gx+위약 군보다 22% 더 많은 연골 세포가 Gx+AKG에서 확인되었다. 이것은 위 절제 쥐에서 연골 세포의 손실을 방지함에 있어서 AKG가 효과적이라는 것을 나타낸다. 분석은 뼈 및 연골 콜라겐에 대한 AKG의 보호 효과를 나타내었다. Gx+AKG 군에서의 콜라겐의 양은 실험 대조군들의 범위 내이었고, Gx+위약 쥐보다 약 18% 더 높았다.
- <83> 위 절제 쥐의 머리덜개골에 대한 AKG의 보호 효과가 관찰되었다. Gx+AKG 쥐의 머리덜개골은 Gx+위약 쥐로부터의 그것에 비하여 20% 적은 손상을 보여주었다. BMD 및 BMC 값은 Gx+위약 및 Gx+AKG 쥐에서 위절제술이 골 감소증을 유발한다는 것을 보여주었는데, 이는 다른 실험과 일치하는 것이다. 그러나, 우리는 더 민감한 히스토모포메트리법을 이용하여, AKG가 GX 쥐의 골 감소증 방지에 유효할 가능성이 있음을 보여주었다.
- <84> 또한, 조사된 섬유주 골 부피는 Gx+위약 동물에 비하여 Gx+AKG 쥐에서 38% 덜 감소한다는 것을 보여주었다. 또한, Gx+AKG 군의 섬유주의 프랙탈 디멘전은 허위 수술 군들과 거의 동일한 수준인 것을 보여주었다. 따라서, 실제로 α -케토글루타레이트는 골 섬유주 구조의 리모델링에 강하게 영향을 미친다.
- <85> 위절제술은 골격에 강한 파괴적인 영향을 나타내며, 골 감소증 및 관절증(arthropathy)을 유발한다. AKG는 이들 손상을 완전히 중단시킬 수는 없으나, 골 및 연골에서의 파괴적인 위절제술-관련 변화를 명백하게 제한하며, 골격계의 리모델링을 향상시킬 것이다. 이러한 관찰 결과의 암시는 예를 들면 비만 환자의 체중 감량을 위하여 부분 위절제술이 추천되는 인간에게 있어서 임상적인 고려를 위하여 중요할 수 있다. 이들 모든 환자는 골다공증 및 관절증이 진행된다. 따라서, 이들 환자를 위한 식이 AKG는 이러한 파괴적인 뼈의 변화를 중지시키거나 또는 제한할 수 있다는 것을 생각할 수 있다.

<86> 표 1. AKG 및 위약 음료 조성물

<87>

성분	AKG (g/dm ³)	위약 (g/dm ³)
AKG (α -케토 글루타레이트)	14.6	0
HCl 염산	0	3.32
C ₆ H ₁₂ O ₆ 글루코오스	30.0	30.0
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ 스쿠로오스	15.0	15.0
NaOH 수산화나트륨	3.6	3.6
KOH 수산화칼륨	0.75	0.75

Ca(OH) ₂ 수산화칼슘	0.46	0.46
Mg(OH) ₂ 수산화마그네슘	0.18	0.18
pH	4.6	4.6

각 용액에서 동일한 수준의 pH를 얻기 위하여 위약 음료를 0,1 M HCl로 pH 4,6 (AKG 음료의 pH 수준)까지 적정하였다.

표 2. 관절 연골 콜라겐의 상대적인 함량에 대한 AKG 및 위절제술의 영향

처치	형광	SD
Gx+AKG	2363 ^a	623
Gx+위약	1928 ^b	647
Sham+AKG	2475 ^a	457
Sham+위약	2171 ^a	374

칼럼 내의 결과와 함께 주어진 서로 다른 문자는 p<0.05인 경우에 유의한 차이를 기술한다.

Gx+AKG에서 n=7, Gx+위약에서 n=8, Sham+AKG에서 n=10, Sham+위약에서 n=7

표 3. 대퇴 골단 연골 연골 세포 수에 대한 AKG 및 위절제술의 영향

처치	세포수 / mm ²	SD
Gx +AKG	2220 ^a	490
Gx+위약	1760 ^b	360
Sham+AKG	1890 ^b	330
Sham+위약	1850 ^b	220

칼럼 내의 결과와 함께 주어진 서로 다른 문자는 p<0.05인 경우에 유의한 차이를 기술한다.

Gx+AKG에서 n=7, Gx+위약에서 n=8, Sham+AKG에서 n=10, Sham+위약에서 n=7

표 4. 경골 골단 연골 연골 세포의 수에 대한 AKG 및 위절제술의 영향

처치	세포수 / mm ²	SD
Gx +AKG	2470 ^a	470
Gx+위약	1950 ^b	330
Sham+AKG	1840 ^b	410
Sham+위약	2110 ^b	340

칼럼 내의 결과와 함께 주어진 서로 다른 문자는 p<0.05인 경우에 유의한 차이를 기술한다.

Gx+AKG에서 n=7, Gx+위약에서 n=8, Sham+AKG에서 n=10, Sham+위약에서 n=7

표 5. 대퇴 섬유주 골 부피에 대한 α-케토글루타레이트 및 위절제술의 영향

처치	섬유주의 면적 (%)	SD
Gx +AKG	18.8 ^a	3.7
Gx+위약	11.2 ^b	2.1
Sham+AKG	25.5 ^c	7.8

Sham+위약	24.5 ^c	5.9
---------	-------------------	-----

<103> 칼럼 내의 결과와 함께 주어진 서로 다른 문자는 $p < 0.05$ 인 경우에 유의한 차이를 기술한다.

<104> Gx+AKG에서 $n=7$, Gx+위약에서 $n=8$, Sham+AKG에서 $n=10$, Sham+위약에서 $n=7$

<105> 표 6. 경골 섬유주 골 부피에 대한 α -케토글루타레이트 및 위절제술의 영향

<106>

처치	섬유주의 면적 (%)	SD
Gx +AKG	16.7 ^a	3.4
Gx+위약	10.5 ^b	2.5
Sham+AKG	24.9 ^c	5.3
Sham+위약	21.1 ^c	5.7

<107> 칼럼 내의 결과와 함께 주어진 서로 다른 문자는 $p < 0.05$ 인 경우에 유의한 차이를 기술한다.

<108> Gx+AKG에서 $n=7$, Gx+위약에서 $n=8$, Sham+AKG에서 $n=10$, Sham+위약에서 $n=7$

<109> 표 7. 대퇴 섬유주의 프랙탈 디멘전에 대한 α -케토글루타레이트 및 위절제술의 영향

<110>

처치	프랙탈 디멘전 [D]	SD
Gx +AKG	1.22 ^b	0.02
Gx+위약	1.19 ^a	0.03
Sham+AKG	1.24 ^b	0.04
Sham+위약	1.25 ^b	0.03

<111> 칼럼 내의 결과와 함께 주어진 서로 다른 문자는 $p < 0.05$ 인 경우에 유의한 차이를 기술한다.

<112> Gx+AKG에서 $n=7$, Gx+위약에서 $n=8$, Sham+AKG에서 $n=10$, Sham+위약에서 $n=7$

<113> 표 8. 경골 섬유주의 프랙탈 디멘전에 대한 α -케토글루타레이트 및 위절제술의 영향

<114>

처치	프랙탈 디멘전 [D]	SD
Gx +AKG	1.22 ^b	0.02
Gx+위약	1.17 ^a	0.02
Sham+AKG	1.22 ^b	0.03
Sham+위약	1.21 ^b	0.04

<115> 칼럼 내의 결과와 함께 주어진 서로 다른 문자는 $p < 0.05$ 인 경우에 유의한 차이를 기술한다.

<116> Gx+AKG에서 $n=7$, Gx+위약에서 $n=8$, Sham+AKG에서 $n=10$, Sham+위약에서 $n=7$

<117> 도면에 대한 범례:

<118> 도 1. 쥐의 체중에 대한 식이 α -케토글루타레이트 및 위절제술의 영향. 대조군: SHAM+PLAC, GX+PLAC 실험군: SHAM+AKG, GX+AKG (SHAM - 허위 수술 쥐, GX - 위 절제 쥐).

<119> 도 2. 시험 동물의 머리덮개골의 선택된 사진. 대조군: SHAM+PLAC, GX+PLAC 실험군: SHAM+AKG, GX+AKG (SHAM - 허위 수술 쥐, GX - 위 절제 쥐).

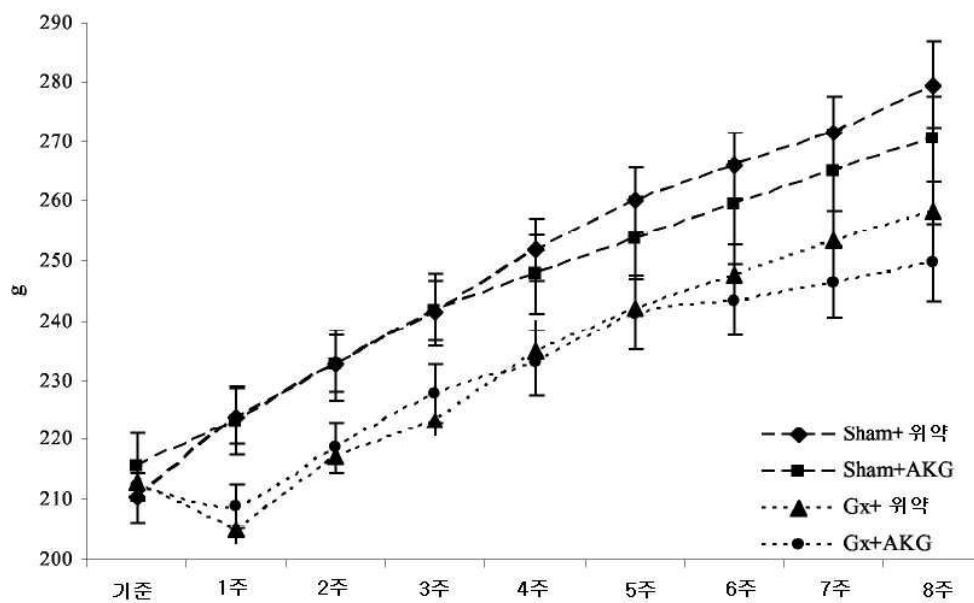
<120> 도 3. 머리덮개골의 투과 조명에 대한 α -케토글루타레이트 및 위절제술의 영향. 대조군: SHAM+PLAC, GX+PLAC 실험군: SHAM+AKG, GX+AKG (SHAM - 허위 수술 쥐, GX - 위 절제 쥐). * $p = 0.0288$

도면의 간단한 설명

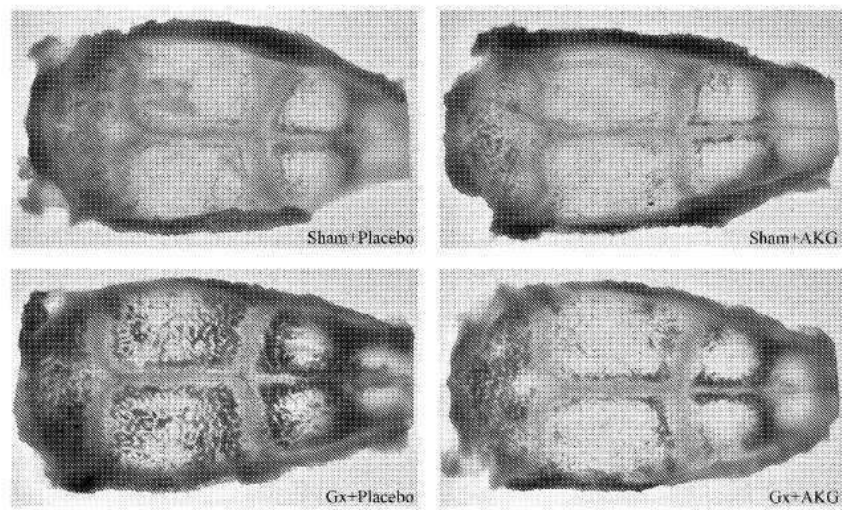
- <34> 본 발명은 바람직한 구체예, 예시적인 연구 및 이에 수반되는 이하에 설명된 도면의 도움으로 이하의 상세한 설명에서 추가로 설명될 것이다.
- <35> 도 1은 쥐의 체중을 기준으로 한, 식이 알파-케토글루타레이트 및 위절제술의 영향을 설명한 다이어그램이다.
- <36> 도 2는 실험 쥐의 두개골[머리덮개골(calvaria)]의 상급(superior) 부분의 4개의 투과조명(transillumination) 사진을 보여준다.
- <37> 도 3은 실험 주의 머리덮개골의 투과조명 사진에서 발견된 공간(lacunae) 영역을 보여준다.

도면

도면1



도면2



도면3

