(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2011 년 2 월 24 일 (24.02.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/021832 A2

(51) 국제특허분류:
A61K 38/10 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) *A61P 25/16* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2010/005419

(22) 국제출원일: 2010 년 8 월 17 일 (17.08.2010)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2009-0075880 2009 년 8 월 17 일 (17.08.2009) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE)** [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내, 446-701 Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자; 겸
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **손영숙 (SON, Young Sook)** [KR/KR]; 서울 강남구 개포 4 동 현대 2 차 APT 205-703, 135-808 Seoul (KR). **강미화 (JIANG, Mei Hua)** [CN/KR]; 경기도 용인시 기흥구 서천동 경희대학교 국제캠퍼스내, 446-701 Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: **안소영 (AHN, So-Young)**; 서울 서초구 서초동 1676-1 신승빌딩 10 층 안소영국제특허법률사무소, 137-881 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, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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.

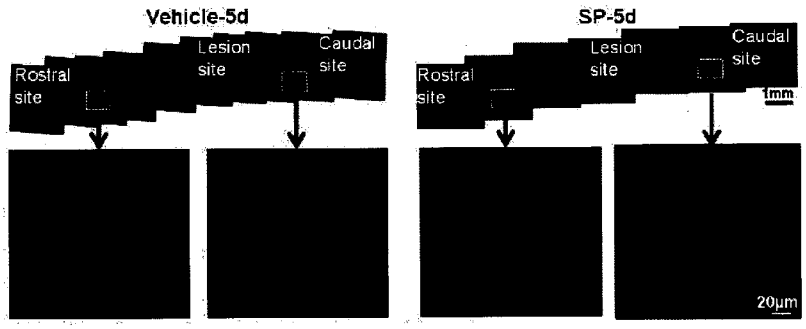
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING A SPINAL CORD INJURY

(54) **발명의 명칭** : 척수 손상 예방 또는 치료용 조성물

【도 1】



(57) **Abstract**: The present invention relates to a novel use of substance P. The substance P of the present invention exhibits the effects of decreasing microglia activity, decreasing proinflammatory cytokines, inhibiting apoptosis, etc. The substance P of the present invention effectively treats degenerative central nervous system diseases or disorders such as a spinal cord injury caused by a traumatic injury (flexion injury, vertical compression injury, hyperextension injury, flexion-rotation injury) and by a non-traumatic injury (vascular dysfunction, arthritis, or degenerative arthritis), Parkinson's disease, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, Huntington's disease, depressive disorder, epilepsy, etc.

(57) **요약서**: 본 발명은 서브스턴스-P(Substance P, 서브스턴스 P)의 신규용도에 관한 것이 다. 본 발명에 의한 서브스턴스-P 는 소교세포 활성 감소 작용, 염증유발 싸이토카 인 감소, 세포자멸사 억제 등의 효과를 나타내며, 외상성 손상(굴곡손상, 수직압박손 상, 과신전손상, 굴곡회전손상)과 비외상성 손상(혈관기능장애, 관절염이나 퇴행성관 절질환)으로 인한 척수손상, 파킨슨병, 알츠하이머병, 루게릭병, 헌팅톤병, 우울증, 간질병 등의 중추신경계 퇴행성 질환 등을 효과적으로 치료할 수 있다.

WO 2011/021832 A2

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

【명세서】

【발명의 명칭】

척수 손상 예방 또는 치료용 조성물

【기술분야】

<1> 본 발명은 서브스턴스 P를 포함하는 척수손상 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

<2>

【배경기술】

<3> 경제의 발전이 가속화 되면서 척수손상 환자가 급증하고 있고 이로 인하여 사회 의료 비용이 증가됨으로써 막대한 경제손실을 초래하고 있다. 그 원인은 척수손상 발생 환자층이 대부분이 활동이 많은 젊은 층인 바, 그들의 일생 동안의 생산력을 고려해볼 때 개인적 국가적 차원에서의 손실은 상상하기 어려운 정도의 액수에 달하기 때문이다. 또한 중추신경 퇴화로 인한 운동 및 감각 기능의 영구적 손실은 한 개인의 삶의 질을 저하할 뿐 만 아니라 환자를 부양하는 보호자들에게 정신적 및 경제적 영향을 미쳐 사회, 문화적으로 심한 부작용을 일으키고 있으므로 치료방법과 약물개발이 절실하게 요구되고 있다.

<4> 척수손상은 갑작스런 마비를 유도하여 여러 부위의 기능손상을 유발하여 다양한 합병증을 유발할 수 있는 위험요소를 가진다. 이러한 신경장애는 직접 압박을 받은 신경절에 국한되지 않고 해당 신경절 이하의 신경에 걸쳐 광범위하게 발생한다. 또한 외상 후 손상된 생리기능들은 그 상태로 멈춰 있지 않으며 더욱 악화되기가 쉬워진다(el Masry WS, Short DJ., 1997).

<5> 1997년에 발표된 연구에서 척수손상이 일어나면 흥분독성 신경전달 물질, 자유라디칼, 염증촉진 매개물질 등이 발생되어 세포사멸이 유발됨이 밝혀졌고 최근에 이르러 신경교성반흔이 형성되어 신경재생에 부적합한 환경이 만들어지는 것이 밝혀진 이후(Liu XU et al., 1997, Fitch MT, Silver J., 2008) 수많은 연구자들은 신경장애를 최소화하고 신경기능의 회복을 촉진시킬 수 있는 치료방법의 개발에 중점을 두고 있다. 그러나 임상시험을 통하여 척수 손상의 치료에 효과가 인정된 것은 오로지 급성기 즉 손상 후 24시간 이내에 신경조직의 손상을 줄여주기 위하여 시도되는 메틸프레디솔론 치료에 불과하며(Bracken et al., 1990), 그 치료효과가 매우 미미하고 효용성에 대해서는 아직도 논란이 많은 상태이다(Schwab et al., 1996). 이에 전세계 과학자들은 많은 종류의 신경보호치료제에 대한 연구가 활발하게 진행되어 조직 및

세포이식, 신경영양인자 투입, 유전자 요법을 이용한 신경영양인자 생산, 그리고 미세수술기법, 복합제제의 투여 등 연구가 진행되어 왔으나 뚜렷한 효과를 보지 못하는 상황이다. 즉 현재로서는 척수신경 손상에 효과적인 치료제 및 예방책은 전무한 상황이다. 따라서 척수손상 회복 약물개발이 더욱 시급하다.

<6> 척수손상은 주로 외상으로 인한 척추의 변위에 의하여 척수가 압박되면서 발생한다. 기계적인 일차적인 손상과 함께 손상 즉시 세포괴사(necrosis)가 일어나고 서행적으로 일어나는 세포자멸사(apoptosis)에 의해 회백질의 신경세포와 백질의 희돌기교세포의 세포사멸을 유발하게 되고 축색돌기(axon)의 미엘린제거(demyelination)를 일으켜 궁극적으로 영구적인 기능장애를 발생하게 된다. 그 병태생리학적 분석을 보면 척수 손상 이후 손상 부위에 초기 다량으로 유리되는 글루타메이트(glutamate)에 의한 흥분세포독성, 활성산소(ROS)에 의한 산화적 스트레스, ATP 고갈(depletion), 무산소 상태(anaerobic condition)등에 의한 허혈손상, 그리고 TNF-α, IL-1β등과 같은 염증성 매개자(proinflammatory cytokines)이나 iNOS등과 같은 염증성 매개자(inflammatory mediators)에 의한 염증반응 등이 세포사멸의 주요 원인으로 알려져 있다(Lu et al., 2000, Kapoor et al., 2003). 그 중에서도 염증반응은 병변 초기뿐만 아니라 장시기에 걸쳐 지속되며 특히 서행적으로 일어나는 세포사멸이나 axon 퇴화에서의 소교세포에 의한 염증반응은 척수 손상뿐만 아니라 대부분의 신경질환에서 공통적으로 나타나는 병리학적 특징으로, 이의 조절은 신경계 질환의 확장을 막는데 중요하다고 알려져 있다(Beattie, 2004).

<7> 전 세계적으로 가장 많은 사람들이 앓고 있는 질환으로 노인성 치매(dementia)는 중추신경 질환 중의 하나로 그 원인이 다양해서 50% 정도는 알츠하이머형 치매, 20~30%는 혈관성 치매, 알코올성 치매, 파킨슨병에 의한 치매 등이 있다. 또한 대표적인 퇴행성 뇌질환인 파킨슨병은 알츠하이머병, 혹은 루게릭병이 동반되기도 하여 퇴행성 뇌질환의 공통적인 병리기작이 암시되어있다. 공통적으로 발생하는 신경계질환들의 병리학적 기전을 살펴보면 노인성 치매, 파킨슨병, 광우병, 헌팅튼병, 루게릭병 등 대부분의 퇴행성 신경질환들의 비정상적 축적과 그에 따른 단백질 응집, 및 침착이 확인되고 있고 이들 침착물은 신경세포에 산화적스트레스를 유도하고 미토콘드리아 기능을 저하함으로 세포사멸을 유도하고, 또한 이로 인해 생성된 신경세포의 파괴 산물은 면역-염증 촉진 인자로 작용하여 보체경로의 활성화 및 소교세포가 활성화되고 서로 양성 되먹임을 함으로써 염증반응이 가속화되어 퇴행성 변화를 촉진한다(McGeer et al., 1995, Kohutnicka et al., 1998, Alexianu et al., 2001).

<8> 한편, 각종 중추신경질환에서 신경세포의 세포자멸사가 관여함이 알려져 있다.

예를 들면 뇌졸중에서는 허혈손상의 진행성 과정으로 명암선 반영부분에 있는 세포들은 세포자멸사로 수 주 동안 죽게 된다(Lo et al., 2003). 또한 중추신경계 퇴행성질환인 파킨슨병은 뇌 흑질에 있는 도파민신경세포가 산화적 스트레스, 미토콘드리아 기능장애(dysfunction) 및 죽음 수용체(death receptor)등의 원인으로 세포자멸사가 일어나고(Tansey et al., 2007), 알츠하이머는 아밀로이드 베타 단백질에 의해 세포자멸사로 이어지며(Tesco et al., 2003), 따라서 운동세포만 선택적으로 사멸하는 루게릭병, 치명적인 유전장애로 세포사멸을 유발하는 헌팅톤병 및 각종 정신과 질환에서 세포자멸사가 주요한 원인임이 밝혀졌다(Mattson et al., 2008). 이로부터 추리할 때 세포자멸사를 막을 수 있는 약물의 개발은 척수 손상, 뇌졸중뿐만 아니라 이와 유사한 기작을 갖는 중추신경계 퇴행성 질환인 파킨슨병, 알츠하이머병, 루게릭병, 헌팅톤병 그리고 우울증, 간질병 등 질환에 있어서 꼭 필요한 것이며 그 시장성 또한 막대하다.

<9> 한편, 척수손상에 대한 회복의 가장 중요한 척도는 그 행동학적 변화 관측의 결과가 될 수 있는데, 이는 척수 손상 후에 나타난 운동기능의 상실과 회복을 측정하는 BBB이동평가척도를 기준으로 할 수 있다(Basso et al., 1995).

<10> 서브스턴스 P (이하, 'SP'라고도 언급함)는 11개의 아미노산으로 구성된 펩타이드로 여러기관(피부, 타액선, 폐, 이자, 신장, 방광, 전립선)(Kohlmann et al., 1997, Rupniak and Kramer., 1999)과 신경조직에 널리 분포하며(Kramer et al., 1998), 특히 후근 신경절에서 생성하여 척수 후각에 많이 분포하고 있고 말초신경계에서 C섬유의 중추와 말초돌기에서 모두 발견된다(Radhakrishnan and Henry., 1995, Henry., 1993, Vaught 1988). 서브스턴스 P는 생리학적 기능으로 통증과 연관되어 유해자극이 발생하면 1차 구심성 말단(primary afferent terminals)에서 서브스턴스 P를 분비하여 뉴로키닌 1 수용체(neurokinin 1 receptor)에 작용하여 2차 메신저(2^{nd} messenger)를 활성화 시켜 칼슘이온을 유입시킨다. 칼슘이온 유입의 증가는 산화질소의 생성을 촉진하고 따라서 생성된 산화질소는 되먹임으로 서브스턴스 P의 유리를 증가시켜 서브스턴스 P의 신호전달 경로를 통하여 과잉감작을 형성함이 알려졌다(Radhakrishnan and Henry., 1995, Chatani et al., 1995). 통증과 관련된 이러한 기작은 연구자들로 하여금 중추신경계손상 및 퇴행성질환에서 서브스턴스 P의 약물 치료제 개발 가능성을 대폭 제한하였다.

<11> 이외 서브스턴스 P는 말초신경계통에서 여러 염증반응의 유도와 연관되어 있음이 보고되어 있고 혈관확장과 내피세포의 투과성을 증가하여 상처치유에 관련되어 있는 것으로 알려졌다(Matthay MA and Ware L, 2004). 따라서 본 발명자들은 각막손상

모델에서 손상후 서브스턴스 P의 투여는 상처 치유에 촉진효과를 보임을 확인한 바 있다.

<12> 이후 본 발명자들은 예의 연구를 거듭한 끝에 서브스턴스 P가 척수 손상후 발생하는 중추신경세포의 사멸에 관여하고 운동기능 회복에 크게 기여함을 밝혀내어 본 발명에 이르게 되었다.

<13>

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

<14> 본 발명자들은 서브스턴스-P를 유효성분으로 함유하는 척수손상 치료용 조성물, 세포자멸사 억제용 조성물, 소교세포 활성 감소 활성 조성물, 항염증 활성 조성물 등을 제공하고자 한다.

<15>

【기술적 해결방법】

<16> 본 발명은 서브스턴스-P를 유효성분으로 포함하는 척수손상 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

<17> 본 발명은 또한 서브스턴스-P를 유효성분으로 포함하는 외상성 척수 손상 또는 비외상성 척수손상 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

<18> 상기 외상성 손상에는 굴곡손상, 수직압박손상, 과신전손상, 굴곡회전손상 등이 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 외상성 척수손상은 교통사고, 추락, 스포츠손상, 폭행 등으로 인한 것일 수 있다. 상기 비외상성 손상에는 혈관기능장애, 관절염, 퇴행성관절질환, 척추아탈구, 척수염, 횡단성 척후염, 척수공동증, 또는 척수 결핵 등이 있으나 이에 제한되지 않는다.

<19> 본 발명은 또한 서브스턴스-P를 유효성분으로 포함하는 세포자멸사 억제용 조성물을 제공한다.

<20> 본 발명은 또한 세포자멸사에 기인한 척수손상 치료용 조성물, 또는 세포자멸사에 기인한 중추신경계 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

<21> 본 발명은 나아가, 서브스턴스-P를 유효성분으로 포함하는 중추신경계 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

<22> 본 발명에 있어서 중추신경계 퇴행성 질환에는 뇌졸중, 파킨슨병, 알츠하이머병, 루게릭병, 헌팅톤병, 우울증 또는 간질병 등을 들 수 있다.

<23> 본 발명은 또한 서브스턴스-P를 유효성분으로 포함하는 소교세포 활성 감소용 조성물을 제공한다.

<24> 서브스턴스-P를 유효 성분으로 포함하는 본 발명에 의한 조성물은, 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

<25> 서브스턴스-P를 유효 성분으로 포함하는 본 발명에 의한 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약학적 조성물로 제제화할 수 있다.

<26> 서브스턴스-P를 유효 성분으로 포함하는 조성물의 약제학적 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 연고제, 크림제, 겔제, 점적제, 에어로졸, 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다.

<27> 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕괴제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토나이트, 잔탄 검 등을 포함한다.

<28> 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1성분 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 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

<29> 본 발명은 서브스턴스-P를 유효성분으로 포함하는 조성물의 척수손상의 예방 또는 치료용도를 제공한다.

<30> 본 발명은 또한 서브스턴스-P를 유효성분으로 포함하는 조성물의 외상성 척수

손상 또는 비외상성 척수손상의 예방 또는 치료용도를 제공한다. 상기 외상성 손상에는 굴곡손상, 수직압박손상, 과신전손상, 굴곡회전손상 등을, 상기 비외상성 손상에는 혈관기능장애, 관절염, 퇴행성관절질환, 척추아탈구, 척수염, 횡단성 척수염, 척수공동증, 또는 척수 결핵 등을 들 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 외상성 척수손상은 교통사고, 추락, 스포츠손상, 폭행 등으로 인한 것일 수 있다.

<31> 본 발명은 또한 서브스턴스-P를 유효성분으로 포함하는 조성물의 세포자멸사 억제용도를 제공하며, 세포자멸사에 기인한 척수손상 치료용도, 또는 세포자멸사에 기인한 중추신경계 퇴행성 질환 치료용도를 제공한다.

<32> 본 발명은 나아가, 서브스턴스-P를 유효성분으로 포함하는 조성물의 중추신경계 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용도를 제공한다. 본 발명에 있어서 중추신경계 퇴행성 질환에는 뇌졸중, 파킨슨병, 알츠하이머병, 루게릭병, 헌팅톤병, 우울증 또는 간질병 등을 들 수 있다.

<33> 본 발명은 또한 서브스턴스-P를 유효성분으로 포함하는 조성물 소교세포 활성 감소용도를 제공한다.

<34> 본 발명은 포유동물에게 치료학적으로 유효한 양의 서브스턴스-P를 투여하는 것을 포함하는 척수손상, 바람직하게는 외상성 척수 손상 또는 비외상성 척수손상의 예방 또는 치료방법을 제공하며, 본 발명에 있어서 상기 외상성 손상에는 굴곡손상, 수직압박손상, 과신전손상, 굴곡회전손상 등을, 상기 비외상성 손상에는 혈관기능장애, 관절염, 퇴행성관절질환, 척추아탈구, 척수염, 횡단성 척후염, 척수공동증, 또는 척수 결핵 등을 들 수 있다.

<35> 본 발명에 있어서, 외상성 척수손상은 교통사고, 추락, 스포츠손상, 폭행 등으로 인한 것일 수 있다.

<36> 본 발명은 또한 포유동물에게 치료학적으로 유효한 양의 서브스턴스-P를 유효성분으로 포함하는 세포자멸사에 기인한 척수손상의 예방 또는 치료방법, 또는 세포자멸사에 기인한 중추신경계 퇴행성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

<37> 본 발명은 또한 포유동물에게 치료학적으로 유효한 양의 서브스턴스-P를 투여하는 것을 포함하는 중추신경계 퇴행성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

<38> 본 발명에 있어서 중추신경계 퇴행성 질환에는 뇌졸중, 파킨슨병, 알츠하이머병, 루게릭병, 헌팅톤병, 우울증 또는 간질병 등을 들 수 있다.

<39> 여기에서 사용된 "치료학적으로 유효한 양"은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상의에 의해 생각되는 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 활성 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는

장애의 증상 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 중추신경계 퇴행성 질환, 그 중에서도 뇌졸중, 파킨슨병, 알츠하이머병, 루게릭병, 헌팅톤병, 우울증 또는 간질병 등의 치료 방법에 있어서, 성인의 경우, 서브스턴스-P를 1일 1회 투여시, 0.001 ~ 0.5mg/일, 바람직하게는 0.0001 ~ 0.005mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 좋다고 생각된다.

<40> 본 발명에 의한 조성물은 경구, 설하, 직장, 피부, 피하, 근육, 복강, 정맥, 동맥, 뇌척수강내, 골수내 등으로 투여가능하며, 바람직하게는 정맥내로 투여될 수 있다.

<41>

【유리한 효과】

<42> 본 발명에 의한 서브스턴스-P는 척수손상 치료 효과, 소교세포 활성 감소, 염증유발 사이토카인 감소, 세포자멸사 억제, 운동기능 회복/및 향상 등의 효과를 나타낸다. 이는 신경계에서 통증이나 염증반응에 관여되어 있다는 기존 연구결과와는 달리 새로운 서브스턴스 P의 기능을 시사하고, 특히 척수손상, 치매, 뇌졸증 등 중추신경계 질환에 있어서 새로운 치료제로의 발굴에 중요한 후보물질로 예상된다.

<43>

【도면의 간단한 설명】

<44> 도 1은 척수 손상 부위에서 서브스턴스 P에 의한 소교세포/대식세포의 활성 감소를 확인한 도이다.

<45> 도 2는 척수 손상 부위에서 서브스턴스 P에 의한 염증 관련 사이토카인의 발현 프로파일을 나타낸 도이다.

<46> 도 3은 척수 손상 부위에서 서브스턴스 P에 의한 인터루킨-10(IL-10)의 발현 프로파일을 나타낸 그래프이다.

<47> 도 4는 척수 손상 부위에서 서브스턴스 P에 의한 사이토카인 변화에 관한 항체 어레이 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

<48> 도 5는 척수 손상 모델에서 서브스턴스 P 투여시 말초혈액에서 사이토카인에 대한 효과를 확인한 도이다 (도 5A: TNF-α, 도5B: IL-10).

<49> 도 6은 척수 손상 후 서브스턴스 P에 의한 신경세포와 희소돌기아세포에서의 IL-10 발현 증가를 확인한 도이다.

<50> 도 7은 척수 손상 부위에서 소교세포/대식세포의 표현형을 비교한 도이다.

<51> 도 8은 척수 손상 부위 및 척수 손상 부위 부근의 소교세포/대식세포의 표현형을 비교한 도이다.

<52> 도 9는 척수 손상 모델에서 서브스턴스 P 투여에 의한 ED1+ 세포 및 CD206+/ED1+ 세포의 프로파일을 나타낸 그래프이다.

<53> 도 10은 척수 손상 부위에서 서브스턴스 P에 의한 세포 자멸사 감소를 TUNEL 염색을 통해 확인한 도이다.

<54> 도 11은 척수 손상 부위에서 서브스턴스 P에 의한 세포 자멸사 감소를 웨스턴 블롯을 통해 확인한 도이다.

<55> 도 12는 척수 손상 모델에서 서브스턴스 P에 의한 CSPG의 감소를 확인한 도이다.

<56> 도 13은 척수 손상 모델에서 서브스턴스 P에 의한 CD206+/ED1+ 이중 양성 세포들의 분포 증가를 확인한 도이다.

<57> 도 14는 척수 손상 모델에서 서브스턴스 P에 의한 GFAP-양성 세포들의 분포 증가를 확인한 도이다.

<58> 도 15는 척수 손상 모델에서 서브스턴스 P에 의한 신경섬유미세단백질의 보존을 확인한 도이다.

<59> 도 16은 척수 손상에 의한 행동학적 변화 관측 결과를 나타낸 도이다.

<60> 도 17은 척수 손상 모델에서 서브스턴스 P의 신경세포의 미엘린 수초(myelin sheath) 보호 효과를 확인한 도이다.

<61> 도 18은 척수 손상 모델에서 서브스턴스 P의 신경세포의 미엘린 수초(myelin sheath) 보호 효과를 나타내는 그래프이다.

<62>

【발명의 실시를 위한 형태】

<63> 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

<64>

<65> [실시예]

<66> 실시예 1. 서브스턴스 P의 소교세포/대식세포 활성 감소 효과 확인

<67> (1) 척수손상 모델 확립 및 서브스턴스 P의 투여

<68> 본 실험에서는 수컷 흰쥐 (Sprague-Dawley 240-250g, 7주령, 10마리)를 케타민(80mg/kg, 유한양행)과 럼푼(7.4mg/kg, 바이엘코리아 주식회사)을 복강내 주사로 전신 마취하였다. 척추 T9-10 부분에서 절제술을 실시하여 척수막을 완전하게 (intact) 보존한 상태에서 척수를 노출시켰다. 그 후 Spinal cord dropping device(NYU)에 올려놓고 클램프(clamp)를 이용하여 T8과 T11 부위 척추돌기를 각각 고정한 뒤 척수상방 수직25㎜ 높이 지점에서 막대(rod)(직경 2㎜, 무게 10g)를 떨어뜨려 척수손상을 준 후 손상 부위 근육과 피부를 순차적으로 봉합하였다. 척수손상을 주지 않고 T9 척추 절제술을 시행한 위-수술 동물(sham-operated animal)을 위-수술 대조군(도면 내에서는 'sham'이라 표시; 이하 동일함)으로서 사용하였다.

<69> 실험군은 각각 척수손상 이후 즉시, 24시간, 48시간에 농도 5nmol/kg 의 생리식염수에 용해된 서브스턴스 P(도면 내에서는 'SP'라 표시; 이하 동일함)를, 대조군은 동일한 시간대에 서브스턴스 P를 함유하지 않은 동일한 부피의 생리식염수(도면 내에서는 'vehicle'이라 표시, 이하 동일함)를 꼬리 정맥에 주사하였다. 수술은 28℃ 전기 온열패드(heating pad) 위에서 실행하였고 마취에서 깨어난 후 케이지에 옮겼다.

<70>

<71> (2) 조직 준비

<72> 척수손상 5일 후 케타민(80mg/kg)과 럼푼(7.4mg/kg)을 흰쥐 복강내 주사하여 마취시킨 후 수술대 위에 고정시키고 개복하였다. 심장 우심방을 열고 좌심실에 생리식염수 및 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde, Sigma)를 각각 200ml을 관류시킨 후 상처부위를 포함한 척수를 적출하여 4% 파라포름알데히드에 넣어 4℃에서 6시간 고정하였다. 그 후 생리식염수로 세척한 다음 30% 수크로스(sucrose, Sigma) 용액 중 4℃에서 하룻밤 동안(overnight) 방치하였다. 고정된 조직은 상처부위를 중심으로 1.5cm의 길이로 자른 후 OCT 화합물(optimal cutting temperature compound, Sakura)에 포매하여 동결 고정하였다. 고정한 조직을 Cryostat(Leica)로 10㎛(종단절편(Longitudinal section)) 혹은 20㎛(횡단절편(cross section))의 두께로 절편하여 조직 슬라이드에 부착시켜 -80℃에서 보관하였다.

<73>

<74> (3) 면역조직형광염색

<75> 면역조직형광염색을 위하여 선택한 절편을 생리식염수로 3번 세척한 후 상온에서 1시간 동안 10% 홀스 혈청(Jackson ImmunoResearch)으로 블로킹 하였다. 활성화된 소교세포(microglia)/대식세포(macrophage)에 대한 표식자로 마우스 단일클론 항-ED1 항체(1:200, Milipore)를 일차항체로 처리한 후 4℃에서 하룻밤 동안 방치하였다. 다음날 생리식염수로 충분히 세척한 후 상온에서 1시간 동안 Alexa Fluor 488(1:400, Invtrogen) 또는 cyanine 3(1:500, Jackson ImmunoResearch)가 접합된 이차항체를 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 생리식염수로 2번 세척한 후 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)를 포함한 Vectashield 마운팅 매질(DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 표본을 마운팅하였다. Leica CTR 4000 형광현미경) 또는 Zeiss LSM 510 META 공초점현미경으로 관찰하고 그 결과를 도 1에 나타내었다.

<76> 도 1은 실험군과 대조군에서 척수손상 부위를 포함한 부분을 중심으로 양끝으로 ED1항원을 발현하는 활성화된 소교세포/대식세포의 분포를 보여준다. 서브스턴스 P가 투여된 실험군에서 머리쪽(rostal)과 꼬리쪽(caudal) 모두에서 ED1항원을 발현하고 있는 활성화된 소교세포/대식세포 수가 대조군에 비하여 현저히 줄어든 것을 관찰할 수 있었다. 한편, 도면에 나타내지는 않았지만, 위-수술 대조군에서는 활성화된 소교세포/대식세포가 관찰되지 않았다. 따라서, 서브스턴스 P가 소교세포/대식세포의 활성을 감소시킴을 확인할 수 있었으며, 이는 서브스턴스 P가 척수의 손상 이후 기능 회복에 중대한 역할을 함을 의미한다.

<77>

<78> **실시예 2. 서브스턴스 P의 척수손상 후의 염증 감소 효과 확인**

<79> (1) 척수로부터 전체 RNA의 추출 및 사이토카인(cytokine)에 대한 RT-PCR 분석

<80> 실시예 1.(1)에서와 동일한 방법으로 척수손상 수술 및 수술후 즉시, 1일째, 2일째에 서브스턴스 P(5nmol/kg in saline) 또는 생리식염수(서브스턴스 P를 함유하지 않은 동일한 부피)를 꼬리정맥으로 투여하고 수술 이후 실험군(6마리/군)과 대조군 쥐(6마리/군)를 각각 1시간, 6시간, 1일, 3일, 5일에 전신 마취하고 희생시켰다. 피부를 절개하여 척수를 노출한 후 T9-10 사이의 손상부위를 중심으로 하여 1cm 길이의 척수를 신속히 절단하여 즉시 액체질소에 넣어 동결시켰다. 트라이졸 시약(invitrogen)을 이용하여 전체 RNA를 추출하고, 역전사과정을 거쳐 cDNA를 합성하였다. 그 후 흰쥐 TNF-α IL-1β iNOS 프라이머(primer)를 사용하여 획득한 cDNA로 PCR(chromagen)을 실시하고 그 결과를 도 2에 나타내었다. 프라이머 서열순서와 PCR 조건은 다음과 같다.

	프라이머 서열	PCR 파라이터 (온도, 시간)	사이클 수	산물 크기 (bp)
TNF-α	5′-CCCAGACCCTCACACTCAGAT-3′ (sense) 5′-TTGTCCCTTGAAGAGAACCTG-3′ (antisense)	94℃-30s 55℃-30s 72℃-30s	30	215
IL-1β	5′-GCAGCTACCTATGTCTTGCCCGTG-3′ (sense) 5′-GTCGTTGCTTGTCTCTCCTTGTA-3′ (antisense)	94℃-30s 50℃-30s 72℃-30s	30	290
IL-6	5′-AAGTTTCTCTCCGCAAGATACTTCCAGCCA-3′ (sense) 5′-AGGCAAATTTCCTGGTTATATCCAGTTT-3′ (antisense)	94℃-30s 55℃-30s 72℃-30s	30	327
iNOS	5′-CTCCATGACTCTCAGCACAGAG-3′ (sense) 5′-GCACCGAAGATATCCTCATGAT-3′ (antisense)	94℃-30s 55℃-30s 72℃-30s	30	435
IL-10	5′-GAGTGTTCAAAGGGAAATTATAT-3′ (sense) 5′-CTGGTTTCTCTTCCCAAGAC-3′ (antisense)	94℃-30s 55℃-30s 72℃-30s	30	201
TGF-β	5′-GAGAGCCCTGGATACCAACTACTG-3′ (sense) 5′-CTCCACCTTGGGCTTGCGACCCAC-3′ (antisense)	94℃-30s 60℃-30s 72℃-30s	30	278
β-actin	5′-CTTCTGCATCCTGTCAGCGATGC-3′ (sense) 5′-AGAAGAGCTATGAGCTGCCTGACG-3′ (antisense)	94℃-30s 58℃-30s 72℃-30s	25	241

<81>

<82>

<83> 도 2에 나타난 바와 같이, 척추손상 1시간 후에 서브스턴스 P가 투여된 실험군에서 대조군에 비해 TNF-α, IL-1β, IL-6, iNOS mRNA의 발현이 다소 감소된 것을 확인할 수 있다. 다른 시간대에서 이러한 염증성 사이토카인의 발현은 서브스턴스 P 투여군과 대조군간에 차이가 없었으나, iNOS의 발현은 척추손상 후 1일째에서 확연히 감소된 것을 관찰할 수 있다. 또한 도 3에 나타난 바와 같이 척추손상 6시간 후에 서브스턴스 P 투여에서 항염증성 사이토카인인 IL-10 mRNA의 발현이 대조군에 비해 17배 이상 증가하며, 척수손상 후 3일째까지 IL-10 mRNA의 발현이 증가되어 있음을 확인할 수 있다. 이는 서브스턴스 P가 척추손상 후 염증반응에 관여하는 염증성 사이토카인의 발현을 억제하고 항염증성 사이토카인의 발현을 유도함을 시사한다.

<84>

<85> (2) 랫트 사이토카인 항체 어레이 분석

<86> 서브스턴스 P의 사이토카인의 발현에 대한 영향을 조사하기 위하여 랫트 사이토카인 항체 어레이 분석을 수행하였다.

<87> 실시예 1.(1)에서와 동일한 방법으로 척수 손상시킨 후 즉시, 1일째, 2일째에 서브스턴스 P 또는 생리식염수(서브스턴스 P를 함유하지 않은 동일한 볼륨) 각각 꼬리정맥으로 투여하고 수술 이후 실험군(4마리/군)과 대조군 쥐(4마리/군)를 각각 1일, 5일에 전신 마취하고 희생시켰다. 동물로부터 얻은 척수 조직(1cm)을 용해완충액(10% 글리세롤, 20mM 트리스[pH 8.0], 137mM NaCl, 1% 노니데트(Nonidet) P-40, 0.5mM EDTA, 10mM $Na_2P_2O_7$, 10mM NaF, 1㎍/ml 아프로티닌(aprotinin), 10㎍/ml 류펩틴(leupeptin), 1mM 바나데이트(vanadate) 및 1mM PMSF으로 균질화하였다. 상청액의 단백질 양은 BCA 분석(Pierce)을 사용하여 결정하였다. 이어서, Ray Biotech Norcross GA 프로토콜 지시에 따라 사이토카인 분석을 수행하였다. 막을 블로킹 완충액으로 블로킹한 다음, 단백질 시료 150㎍을 첨가하고 상온에서 2시간 동안 배양하였다. 막을 세척하고, 바이오틴이 접합된 일차항체 1ml을 첨가해 4℃에서 하룻밤 동안(overnight) 방치하였다. 막을 세척한 다음, 호스라디시페록시다제(horseradish peroxidase)가 접합된 스트렙토아비딘(streptoavidin) 2ml과 상온에서 30분 동안 배양하였다. 증강 화학발광형(enhanced chemiluminescence-type) 용액을 이용하여 막을 현상하고, 필름에 노출하여 방사선사진촬영을 수행하였다. 어레이의 밀도 정량은 미국 NIH Image and Image J 소프트웨어를 이용하여 수행하였다(Hong et al., 2009). 그 결과를 도 4에 나타내었다.

<88> 도 4에 나타난 바와 같이, 척수손상 후 1일째에서 IL-4 및 IL-10의 양은 서브스턴스 P 투여에 의해 각각 2배, 10배 이상 증가하였다. 또한 IL-10의 양은 척수손상 후 5일째에 대조군보다 더 높았다. 염증성 사이토카인인 IL-6의 양은 척추손상 후 1일째에서 유의적으로 증가하였고, 이는 IL-10 발현 증가를 뒷받침하며, T세포에서 IL-27 및 IL-6이 IL-10 생산을 유도한다는 이전의 보고(Stumhofer et al., 2007)와도 일치한다. 척수손상 후 5일째에서 IFN-γ 및 IL-1α 발현은 서브스턴스 P 투여군에서 대조군에 비해 다소 감소되는 것으로 나타났다.

<89>

<90> (3) 말초혈액 중 사이토카인의 변화 여부 확인-ELISA 분석

<91> 서브스턴스 P의 말초혈액에서 사이토카인에 대한 효과를 조사하기 위하여, 실시예 1.(1)에서와 동일한 방법으로 척수손상 수술 및 수술후 즉시, 1일째, 2일째에 서브스턴스 P(5nmol/kg in saline) 또는 생리식염수(서브스턴스 P를 함유하지 않은

동일한 볼륨)를 꼬리정맥으로 투여하고 수술 이후 실험군(4마리/군)과 대조군 쥐(4마리/군)를 각각 1시간, 6시간, 1일, 3일, 5일에서 혈청을 수집하고, TNF-α 및 IL-10의 수준을 ELISA kit(R&D Systems)를 이용하여 측정하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

<92> 도 5A 및 5B에 나타난 바와 같이, 말초혈액의 TNF-α 및 IL-10 수준에 있어 서브스턴스 P 투여군과 대조군간에 유의적인 차이가 없음을 확인할 수 있다.

<93>

<94> **실시예 3. 척수 손상 후 서브스턴스 P에 의한 신경세포와 희소돌기아세포(oligodendrocyte)에서 IL-10발현 증가 확인**

<95> 척수 손상후 서브스턴스 P를 투여 시 IL-10의 발현을 증가하는 세포를 확인하기 위하여 면역조식 염색을 수행하였다.

<96> 실시예 1.(1)에서와 동일한 방법으로 척수 손상시킨 후 즉시, 1일째, 2일째에 서브스턴스 P 또는 생리식염수(서브스턴스 P를 함유하지 않은 동일한 볼륨) 각각 꼬리정맥으로 투여하고 수술 이후 실험군(4마리/군)과 대조군 쥐(4마리/군)를 1일에 전신 마취하고 희생시켰다. 실시예 1.(2)와 (3)의 제시한 방법대로 조직절편을 만들고 면역조직형광염색을 위하여 선택한 절편을 생리식염수로 3번 세척한 후 상온에서 1시간 동안 10% 홀스 혹은 레빗(rabbit) 혈청(Jackson ImmunoResearch)으로 블로킹 하였다. 신경세포-특이적 항체 NeuN (1:100, Millipore), 소교세포(microglia)/대식세포(macrophage)에 대한 표식자로 마우스 단일클론 항-CD11b 항체(1:200, Milipore) 및 IL-10 (1:100 MBL, Nagoya, Japan) 를 일차항체로 처리한 후 4℃에서 하룻밤 동안 방치하였다. 다음날 생리식염수로 충분히 세척한 후 상온에서 1시간 동안 Alexa Fluor 488(1:400, Invtrogen) 또는 cyanine 3(1:500, Jackson ImmunoResearch)가 접합된 이차항체를 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 생리식염수로 2번 세척한 후 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)를 포함한 Vectashield 마운팅 매질(DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 표본을 마운팅하였다. Leica CTR 4000 형광현미경) 또는 Zeiss LSM 510 META 공초점현미경으로 관찰하고 그 결과를 도 6 에 나타내었다.

<97> 도 6에서와 같이 정상 쥐에서 IL-10은 거의 발현되지 않고, 척수 손상 1일 이후에 서브스턴스 P 투여한 쥐에서 신경세포에 특이적으로 IL-10이 발현되고, 특히, 손상부위 근처에서는 신경세포가 아닌 다른 세포에서도 IL-10을 발현하고 있는 것을 관찰하였다. 확인결과 손상부위 근처에서 IL-10을 발현하는 세포는 신경세포 뿐만 아니라 부분적으로 소교아세포 혹은 대식세포(macrophage)임을 확인하였다. 이는 서브스턴스 P 투여 후 처음으로 IL-10을 발현하는 세포를 밝힌 것이며, 또한 항염증반응의

증거가 되는 IL-10의 증가를 보여 도 2 내지 4의 결과를 재확인한 것이다.

<98>

<99> **실시예 4. 서브스턴스 P의 M2 표현형 대식세포 유도 효과 확인-MACS 분석**

<100> 소교세포와 대식세포는 염증성 대식세포 표현형(M1)과 선택적으로 활성화된 대식세포 표현형(M2)를 가진다. M1 대식세포는 TNF-α 및 iNOS를 발현하고 단백질가수분해 활성이 있으며, M2 대식세포는 면역조절, 조직 복구, 조직 재구성(remodeling) 성질을 가진다. 척수 손상 모델에서 서브스턴스 P 투여 후, M1(ED1 양성, CD206 음성) 및 M2(ED1 양성, CD206 양성) 표현형 대식세포의 정량을 위해, MACS(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) 분석을 시행하였다.

<101> 실시예 1.(1)에서와 동일한 방법으로 척수 손상시킨 후 즉시, 1일째, 2일째에 서브스턴스 P 또는 생리식염수(서브스턴스 P를 함유하지 않은 동일한 볼륨) 각각 꼬리정맥으로 투여하고 수술 이후 5일째에 실험군(4마리/군)과 대조군 쥐(4마리/군)를 각각 전신 마취하고 희생시켰다. 손상부위를 포함한 3cm 길이의 척수를 절단하여 즉시 1% 페니실린-스트렙토마이신(Gibco)을 첨가한 얼음-냉각 Ca-Mg-부재 HBSS(Hank's balanced salt solution) 완충액에 넣었다. 해부 현미경 하에서 dura를 제거하고 손상부위를 중심으로 1cm 길이로 절단하였다. Yoo 및 Wrathall (Yoo and Walthall, 2007)의 방법을 수정하여 본 실험에 적용하였다. 간략하게 언급하면, 각 절편을 각각 분쇄하고, HBSS 용액 내 50 U/ml DNase I(Sigma)와 0.25% 트립신(Sigma) 용액에서 37℃에서 10분 동안 분리하였다. 혈청을 첨가하여 트립신을 불활성화시킨 후에 200g에서 10분 동안 원심분리하였다. 세포 펠렛을 HBSS로 세척하고, 70μm pore 크기의 필터(BD Biosciences, Mississauga, Ontario)를 통과시킨 후에 0.5% BSA를 함유한 MACS 완충액(Miltenyi Biotec)으로 세척하였다. 시료를 동일 완충액 0.5ml로 재현탁하고, 얼음에서 마우스 항-ED1(1:100; Millipore) 단일클론 항체로 15분간 처리한 후, PBS 세척 및 원심분리를 시행하였다. 완충액 50㎕로 현탁시킨 세포 현탁액을 얼음위에서 랫트 안티-마우스 MicroBeads(Miltenyi Biotech) 20㎕와 10분 동안 처리한 후, PBS로 세척하였다. 자기 표지된(magnetically labeled) 세포를 칼럼을 세정하여 수집하고 계수하였다. 이어서, ED1 양성 세포 중에서 CD206 양성 세포를 선별하기 위해, 총 유출액을 완충액으로 2회 세척하고 새로운 MACS 칼럼에 다시 통과시켜 ED1이 결합된 항-마우스 MicroBeads가 완전히 제거된 것을 확인하였다. MACS 칼럼에 결합된 세포는 없었다. 유출된 세포에 대하여 래빗 항-CD206 다클론 항체(1:100; Millipore)와 2차 MACS를 수행하였다. 나머지 절차는 항-래빗 MicroBeads를 사용한 것을 제외하고는 앞서 기재한 것과 같이 수행하였다. Leica CTR 4000 형광현미경으로 세포를 관찰하고

계수하였다. 그 결과를 도 7 내지 9에 나타내었다.

<102> 위-수술 대조군의 조직 절편은 M2 표현형을 발현하는 CD206이 매우 적었다(도 7). 척추 손상군에서 활성화된 소교세포/대식세포들은 ED1(활성화된 소교세포/대식세포-특이적인 표지자) 뿐만 아니라, CD206(M2 대식세포-특이적인 표지자) 및 CD11b(소교세포/대식세포 표지자)을 함께 발현하는 것을 확인할 수 있다(도 7 및 8). 한편, MACS 분석 후에 척수손상 후 5일째에서, 서브스턴스 P 투여군에서 활성화된 소교세포/대식세포들의 58.7%가 CD-206 양성이었으며, 이는 대조군의 약 6.5배에 해당되었다(도 9). 따라서, 이러한 결과들은 서브스턴스 P가 손상된 미세환경(microenvironment)에서 소교세포/대식세포들의 M2 표현형으로의 전환을 유도함을 시사한다.

<103>

<104> **실시예 5. 서브스턴스 P에 의한 세포자멸사 감소 효과 확인**- TUNEL 염색 및 Western blot 분석

<105> (1) 세포자멸사 정도를 정량화 하기 위하여 실시예 1.(1)에서와 동일한 방법으로 척수손상시킨 후 즉시, 1일째, 2일째에 서브스턴스 P 또는 생리식염수(서브스턴스 P를 함유하지 않은 동일한 부피) 각각 꼬리정맥으로 투여한 실험군(4마리/군) 및 대조군(4마리/군)로부터 5일째에 얻은 척수 조직을 종단(longitudinally section)으로 절편하였다. 척수의 배측표면 (ventral surface) 으로부터 1200 ㎛ 떨어진 위치에서 조직 절편을 선택하여 신경세포-특이적 항체 NeuN (1:100, Millipore), 희소돌기아세포-특이적 항체 APC (1:100, Abcam) (를 일차항체로 처리한 후 4℃에서 하룻밤 동안 방치하였다.

<106> 다음날 생리식염수로 충분히 세척한 후 상온에서 1시간 동안 cyanine 3(1:500, Jackson ImmunoResearch)가 접합된 이차항체를 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 생리식염수로 2번 세척한 후, 그 다음 In situ cell death detection kit (Fluoresecein, Roche)로 염색을 시행하였다. DAPI를 포함한 Vectashield(Vector)로 슬라이드를 덮은 후 형광현미경(Leica CTR 4000)로 관찰하였다. TUNEL 양성염색과 DAPI 양성염색 결과 및 확연히 세포자멸사에 처한 세포의 종류를 확인, 비교하기 위해 두 염색이 서로 겹치는 세포가 NeuN 또는 CD11b 양성염색과 일치한 세포만을 도 10 에 나타내었다.

<107> 도 10에 나타난 바와 같이, 서브스턴스 P가 손상 이후 1일에 주로 일어나는 신경세포의 사멸을 감소시키고 또한 손상 5일에 희소돌기아세포의 사멸을 현저히 감소시켰다.

<108>

:109> (2) 실시예 1.(1)에서와 동일한 방법으로 척수 손상시킨 후 즉시, 1일째, 2일째에 서브스턴스 P 또는 생리식염수(서브스턴스 P를 함유하지 않은 동일한 볼륨) 각각 꼬리정맥으로 투여하고 수술 이후 실험군(4마리/군)과 대조군 쥐(4마리/군)를 각각 1일, 5일에 전신 마취하고 희생시켰다. 동물로부터 얻은 척수 조직(1cm)을 용해완충액(10% 글리세롤, 20mM 트리스[pH 8.0], 137mM NaCl, 1% 노니데트(Nonidet) P-40, 0.5mM EDTA, 10mM $Na_2P_2O_7$, 10mM NaF, 1㎍/ml 아프로티닌(aprotinin), 10㎍/ml 류펩틴(leupeptin), 1mM 바나데이트(vanadate) 및 1mM PMSF으로 균질화하였다. 상청액의 단백질 양은 BCA 분석(Pierce)을 사용하여 결정하였다. 전체 단백질(50 ㎍)을 SDS-PAGE를 통해 분해 한 후 니트로셀룰로오즈(Millipore, Billerica, MA) 막에 트랜스퍼하였다. 트랜스퍼된 막에 β-Tubulin (1:10,000; Sigma), Arginase 1 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), iNOS (1:10,000; BD Transduction Laboratory, Lexington, KY), CD86 (1:1000; BD Transduction Laboratory), 그리고 cleaved caspase-3 (1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA)등의 일차 단일세포 유래 항체를 처리하였다. 이 때 β-Tubulin은 내부 비교군으로 사용되었으며 각각의 결과는 네 번의 독립적인 실험을 수행하여 확정하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.

<110> 도 11 에서와 같이, caspase-3의 활성화를 의미하는 19, 17kD의 분자량을 가지는 caspase-3가 손상이후 5일까지 증가하는 것을 확인하였고 서브스턴스 P의 투여로 현저히 감소되는 것을 확인한 것이다. 이로써 서브스턴스 P의 투여에 의해 세포자멸사가 억제되었음을 알 수 있다.

<111>

<112> **실시예 6. 서브스턴스 P에 의한 척수손상 후 조직손상 개선 효과 확인**

<113> 신경 친화성 인자(neurotrophic factor)들에 대한 영향을 보기 위하여, 마우스 단일클론 항-콘드로이친 설페이트 프로테오글리칸 항체(CSPG, 1:200, Milipore), 항-신경미세섬유단백질 200kDa 항체(NF200, 1:500, Millipore), 래빗 다클론 항-CD206 항체(1:100, Abcam), 항-신경아교섬유산성단백질 항체(GFAP, 1:200, Abcam)를 일차항체로 사용한 것을 제외하고, 실시예 1. (1)-(3)과 동일한 방법으로 척수 손상시킨 후 서브스턴스 P를 투여하고 척수조직을 준비하여 면역조직형광염색을 시행하였다. 그 결과를 도 12 내지 16에 나타내었다.

<114> 도 12에 나타난 바와 같이, 척수손상 2주 후에, 손상부위 주변에서 CSPG-양성 시그널은 서브스턴스 P 투여에 의해 확연히 감소되었으며, CSPG-양성 시그널은 성상세포와 겹쳐지는 것을 확인하였다. 참고로, CSPG는 축색돌기의 성장을 저해하는 작

용이 알려져 있으며, 대부분의 세포들, 특히 성상세포(astrocytes)는 손상 부위에서 CSPG를 분비한다.

<115> 도 13에 나타난 바와 같이 척수손상 2주 후, 서브스턴스 P 투여군에서 CD206 및 ED1 이중-양성 세포들이 손상 부위에 모여 있음을 확인할 수 있다. 반면, 대조군은 손상 부위에서 CD206 및 ED1 이중-양성 세포가 더 적음을 알 수 있다. 즉, 후기-단계의 세포사멸 및 세포괴사 세포들에 결합하여 죽은 세포들의 제거를 용이하게 하고, 조직복구를 위한 축색돌기의 재생을 촉진하는 CD206이 서브스턴스 P 투여군에 더 많이 존재함을 확인할 수 있었다. 또한, 서브스턴스 P 투여군의 CD206-양성 척수손상 부위에서 GFAP-양성 세포들이 배제되어 있으며(도 14), 수많은 신경미세섬유단백질이 뻗쳐(outreach)있음이 관찰되었다(도 15). 신경미세섬유단백질은 CD206-양성 세포 필드에 노출됐을 때 서브스턴스 P 투여군에서 대조군에 비해 더 잘 보존되어 있었다.

<116>

<117> **실시예 7. 서브스턴스 P에 의한 척수손상 후 척수신경기능 회복효과 확인**

<118> (1) 행동학적 변화 관측

<119> 행동학적 변화의 검사는 바닥이 부드럽고 매끄럽지 않은 큰 대야(너비90cm x 길이130cm x 높이30cm)에 실험동물을 넣어 자유스럽게 걸을 때 뒷다리의 엉덩관절, 무릎관절, 발목관절 운동의 움직이는 상태와 몸의 균형 유지 상태를 관찰하여 Basso-Bresnahan-Beattie(BBB) 이동평가척도 (locomotor rating scale)에 근거하여 점수로 환산하였고 (Basso et al., 1995), 4명의 연구자가 맹검술(blind technique)을 시행하였다. 실시예 1. (1)에서와 동일한 방법으로 척수를 손상시키고 서브스턴스 P 또는 생리식염수를 각각 손상후 즉시, 1일째, 2일째에 꼬리정맥으로 투여한 후 시험군(10마리/군) 및 대조군 (9마리/군)에 대해, 손상 후, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주를 기간별로 척수 손상에 의한 행동학적 변화를 관측하여 평가를 시행하였고, 4명 검사자의 관측치(BBB 점수)의 평균값을 취하여 그 결과를 통계학 분석하여 도16에 나타내었다. 통계는 two-way ANOVA with *post hoc* Tukey test방법으로 시행하였다.

<120> 도 16에 나타낸 바와 같이 서브스턴스 P 투여군인 실험군에서는 투여 약 1주 경과시부터 대조군에 비하여 척수 신경 기능 회복이 진행되며, 14일부터 서브스턴스 P 투여군이 대조군에 비하여 유의적으로 향상된 운동기능을 나타내고, 투여 약 5주 이후에는 대조군에 비하여 유의하게 운동기능이 회복 향상된 것을 확인할 수 있었다 (6주에서 BBB 점수 실험군: 11.5ㅁ0.5; 대조군: 9.3ㅁ0.8, $P<0.05$). 따라서, 놀랍게도 서브스턴스 P투여로 인한 척수 신경 손상 치료를 통해 운동기능 향상에 따른 기능

적인 보호효과까지 얻을 수 있음이 확인되었다.

<121>

<122> (2) 면역조직형광염색

<123> 신경세포의 미엘린 수초(myelin sheath)가 보호되는지 여부를 조사하기 위해, 재성장되는 축색돌기의 표지자인 마우스 단일클론 항-미엘린염기단백질 항체(MBP, 1:50, Santa Cruz Biotechnology)를 일차항체로 사용한 것을 제외하고, 실시예 1. (1)-(3)과 동일한 방법으로 척수 손상시킨 후 서브스턴스 P를 투여하고 척수조직을 준비하여 면역조직형광염색을 시행하였다. 그 결과를 도 17 및 18에 나타내었다.

<124> 도 17에 나타난 바와 같이 서브스턴스 P 투여군인 실험군에서 MBP 양성인 수초가 더 잘 유지되어 있음을 확인할 수 있다. 도 18에 나타난 바와 같이 서브스턴스 P 투여에 의해 중심으로부터 머리쪽과 꼬리쪽 2㎜ 위치에서 조직 손실이 50% 이상 억제되었다.

<125>

<126> 참고문헌:

<127> Alexianu ME, Kozovska M, Appel SH. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. Neurology., 57, 1282(2001)

<128> Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC., A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats, *J Neurotrauma.*, 12, 1(1995)

<129> Beattie MS., Inflammation and apoptosis: linked therapeutic targets in spinal cord injury, *Trends Mol Med.*, 10, 580(2004)

<130> Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, et al., A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study, *N. Engl. J. Med.*, 322, 1405(1990)

<131> Chatani K, Kawakami M, Weinstein JN, et al., Characterization of thermal hyperalgesia, c-fos expression, and alterations in neuropeptides after mechanical irritation of the dorsal root ganglion, *SPine.*, 20, 277(1995)

<132> el Masry WS, Short DJ., Current concepts: Spinal injuries and rehabilitation, *Curr Opin Neurol.*, 10, 484(1997)

<133> Fitch MT, Silver J., CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure, *Exp Neurol.*, 209, 294 (2008)

:134> Henry JL., Substance P and inflammatory pain: potential of substance P antagonists as analgesics, *Agents Actions Suppl.*, 41, 75(1993)

:135> Kapoor R, Davies M, Blaker PA, et al., Blockers of sodium and calcium entry protect axons from nitric oxide-mediated degeneration, *Ann Neurol.*, 53, 174(2003)

:136> Kohlmann O Jr, Cesaretti ML, Ginoza M, et al., Role of substance P in blood pressure regulation in salt-dependent experimental hypertension, *Hypertension.*, 29, 506(1997)

:137> Kohutnicka M, Lewandowska E, Kurkowska-Jastrzebskal, et al., Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP). *Immunopharmacology.*, 39, 167(1998)

<138> Kramer MS, Cutler N, Feighner J, et al., Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors, *Science.*, 281, 1640(1998)

<139> Liu XZ, Xu XM, Hu R, et al., Neuronal and glial apoptosis after traumatic Spinal cord injury, *J Neurosci.*, 17, 5395(1997)

<140> Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA., Mechanisms, challenges and opportunities in stroke, *Nat Rev Neurosci.*, 4, 399(2003)

<141> Lu J, Ashwell KW, Waite P., Advances in secondary Spinal cord injury: role of apoptosis, *Spine.*, 25,1859(2000)

<142> Matthay MA, Ware LB., Can nicotine treat sepsis, *Nat Med.*,10, 1161(2004)

<143> Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A., Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders, *Neuron.*, 10, 748(2008)

<144> McGeer PL, McGeer EG. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev.*, 21, 195(1995)

<145> Radhakrishnan V, Henry JL., Electrophysiology of neuropeptides in the sensory Spinal cord, *Prog Brain Res.*, 104, 175(1995)

<146> Rupniak NM, Kramer MS., Discovery of the anti-depressant and anti-emetic efficacy of substance P receptor (NK1) antagonists. *Trends Pharmacological Sci.*, 20, 485(1999)

147> Schwab ME, Bartholdi D., Degeneration and regeneration of axons in the lesion Spinal cord, *Physiol.Rev.*, 76, 319(1996)

148> Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC., Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention, *Exp Neurol.*, 208, 1(2007)

149> Tesco G, Koh YH, Tanzi RE., Caspase activation increases beta-amyloid generation independently of caspase cleavage of the beta-amyloid precursor protein (APP), *J Biol Chem.*, 278, 46074(2003)

150> Vaught JL., Substance P antagonists and analgesia: a review of the hypothesis, *Life Sci.*, 43, 1419(1988)

【청구의 범위】

【청구항 1】

서브스턴스-P를 유효성분으로 포함하는 중추신경계 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 중추신경계 퇴행성 질환은 뇌졸중, 파킨슨병, 알츠하이머병, 루게릭병, 헌팅톤병, 우울증 또는 간질병인 조성물.

【청구항 3】

서브스턴스-P를 유효성분으로 포함하는 척수손상의 예방 또는 치료용 조성물.

【청구항 4】

제3항에 있어서, 상기 척수손상이 외상성 손상 또는 비외상성 손상인 조성물.

【청구항 5】

제4항에 있어서, 상기 외상성 손상은 굴곡손상, 수직압박손상, 과신전손상, 또는 굴곡회전손상인 조성물.

【청구항 6】

제4항에 있어서, 상기 비외상성 손상이 혈관기능장애, 관절염, 퇴행성관절질환, 척추아탈구, 척수염, 척수공동증, 또는 척수결핵에 의한 것인 조성물.

【청구항 7】

포유동물에게 치료학적으로 유효한 양의 서브스턴스-P를 투여하는 것을 포함하는 중추신경계 퇴행성 질환의 예방 또는 치료방법.

【청구항 8】

제7항에 있어서, 상기 중추신경계 퇴행성 질환은 뇌졸중, 파킨슨병, 알츠하이머병, 루게릭병, 헌팅톤병, 우울증 또는 간질병인 방법.

【청구항 9】

포유동물에게 치료학적으로 유효한 양의 서브스턴스-P를 투여하는 것을 포함하는 척수손상의 예방 또는 치료 방법.

【청구항 10】

제9항에 있어서, 상기 척수손상이 외상성 손상 또는 비외상성 손상인 방법.

【청구항 11】

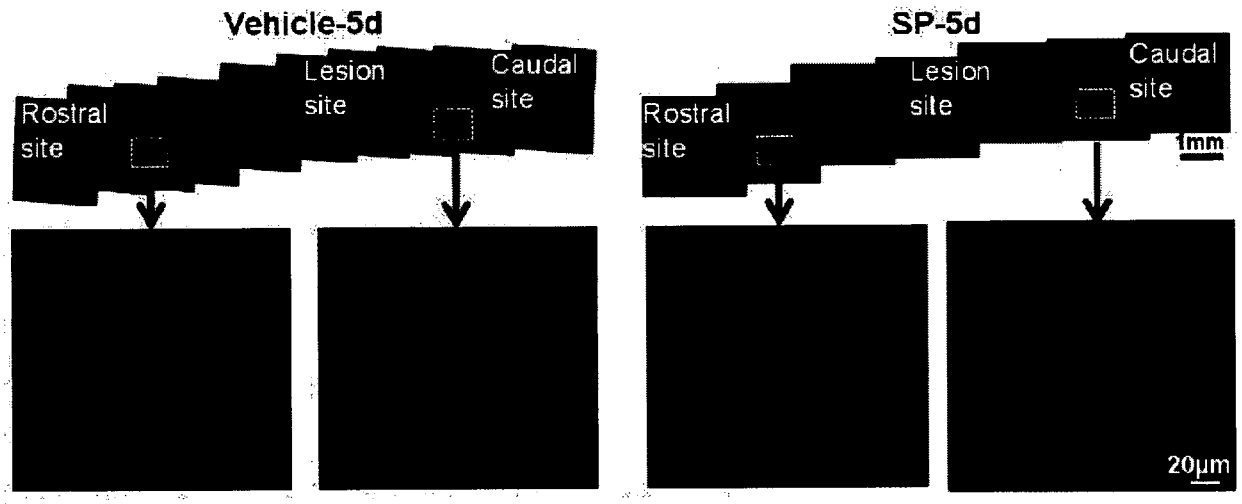
제10항에 있어서, 상기 외상성 손상은 굴곡손상, 수직압박손상, 과신전손상, 또는 굴곡회전손상인 방법.

【청구항 12】

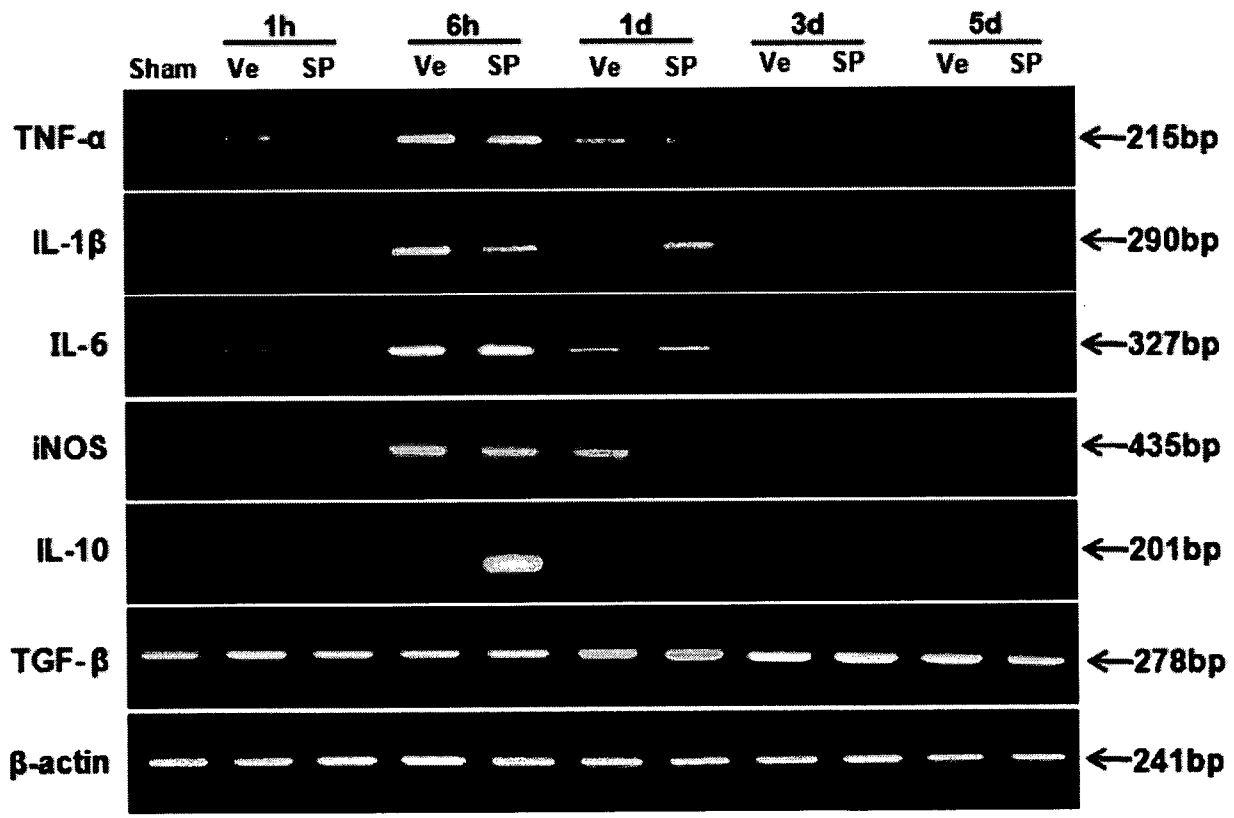
제10항에 있어서, 상기 비외상성 손상이 혈관기능장애, 관절염, 퇴행성관절질환, 척추아탈구, 척수염, 척수공동증, 또는 척수결핵에 의한 것인 방법.

【도면】

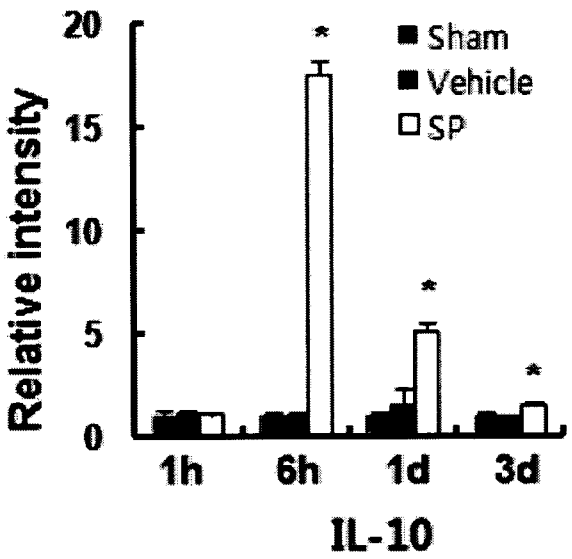
【도 1】


Vehicle-5d
Rostral site
Lesion site
Caudal site
SP-5d
Rostral site
Lesion site
Caudal site
1mm
20μm

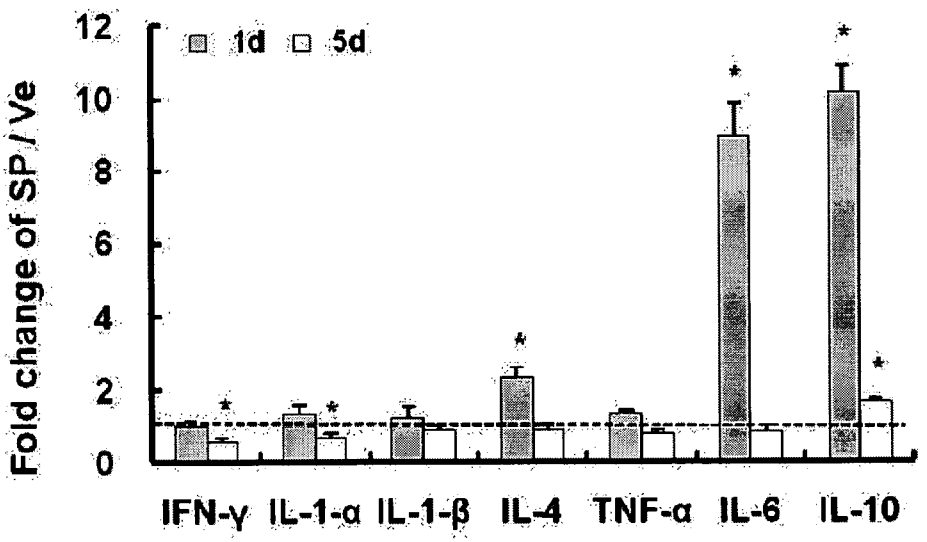
【도 2】


Sham
1h
6h
1d
3d
5d
Ve
SP
TNF-α
IL-1β
IL-6
iNOS
IL-10
TGF-β
β-actin
←215bp
←290bp
←327bp
←435bp
←201bp
←278bp
←241bp

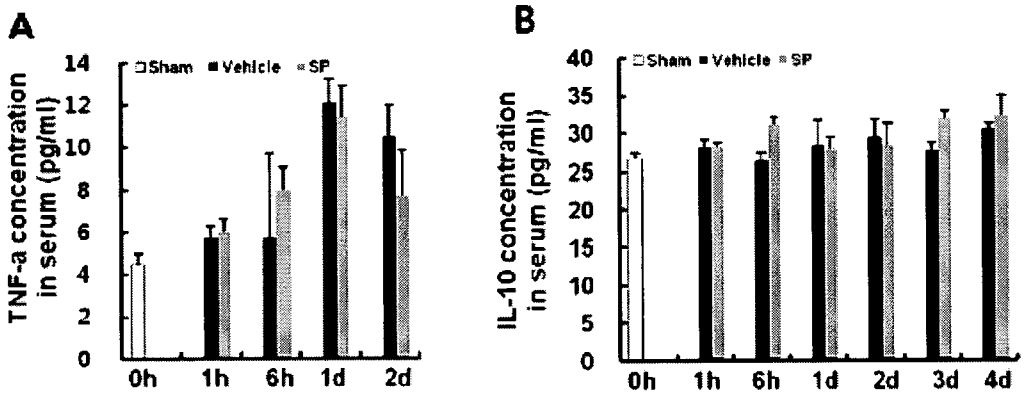
【도 3】


Relative Intensity
20
15
10
5
0
Sham
Vehicle
SP
*
1h
6h
1d
3d
IL-10

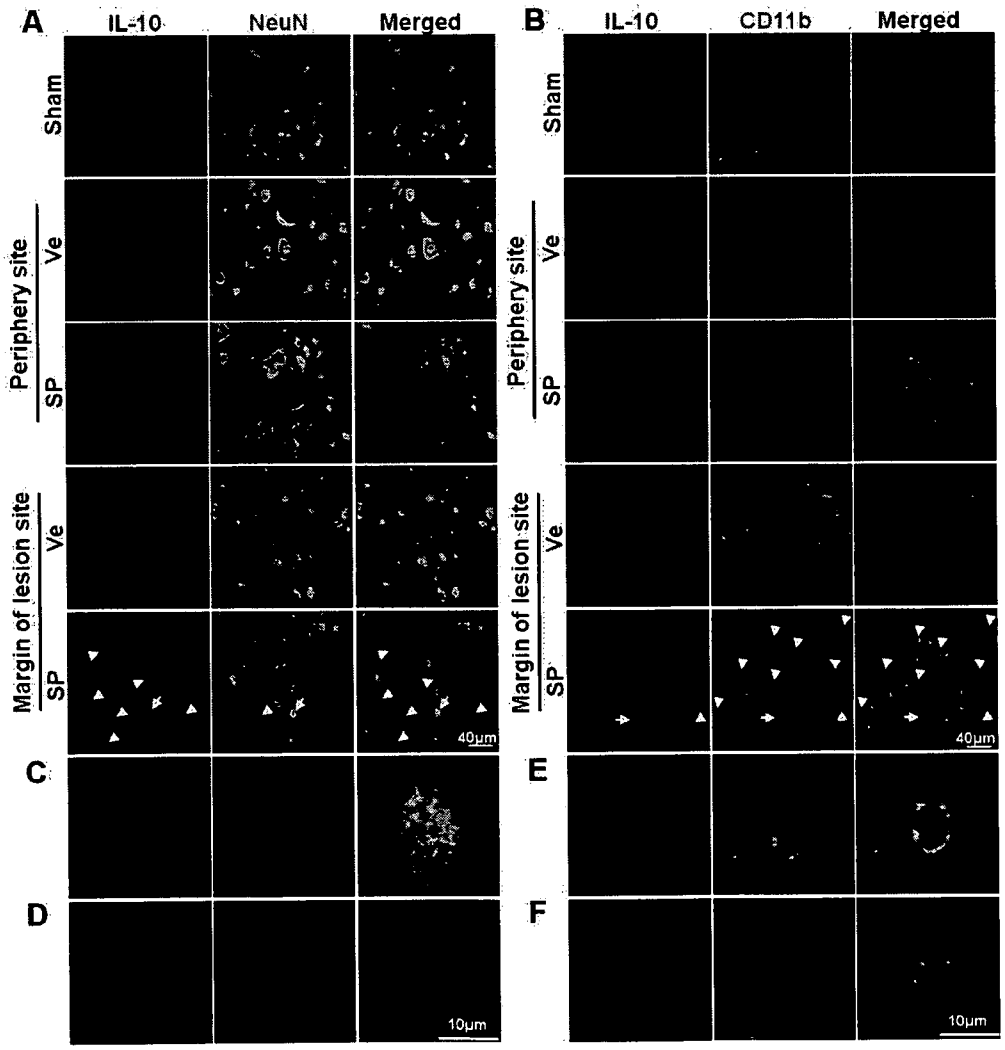
【도 4】


Fold change of SP / Ve
12
10
8
6
4
2
0
1d
5d
IFN-γ
IL-1-α
IL-1-β
IL-4
TNF-α
IL-6
IL-10

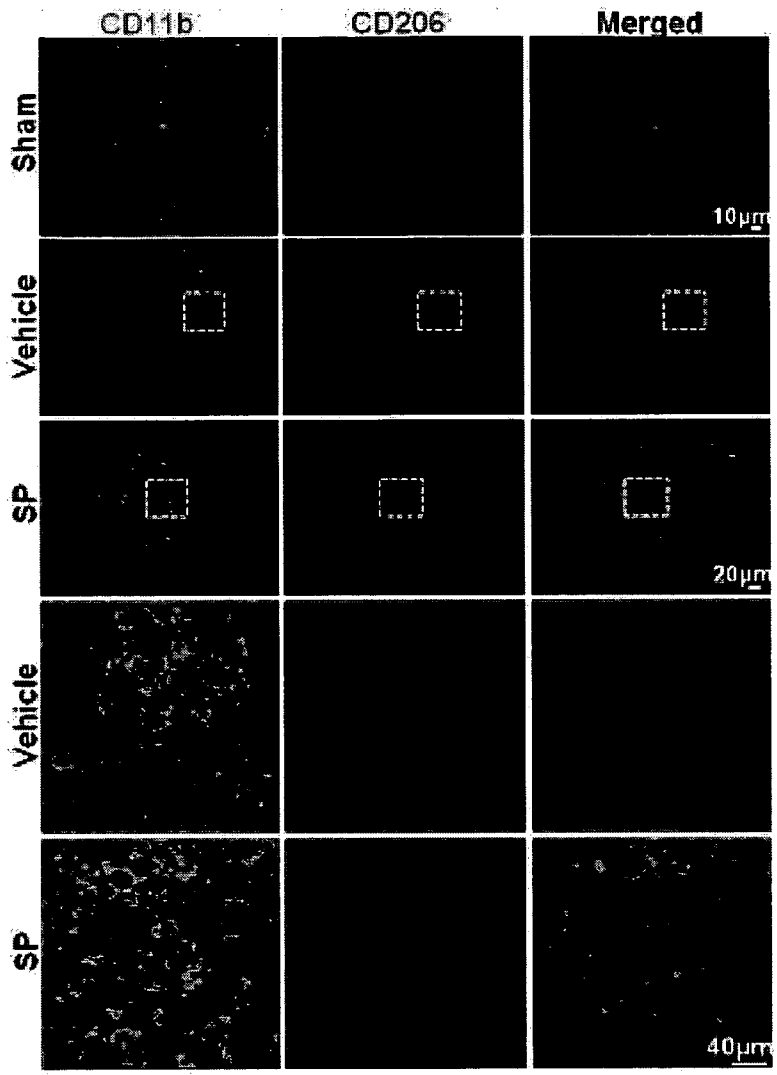
【도 5】


A
TNF-a concentration in serum (pg/ml)
Sham Vehicle SP
0h 1h 6h 1d 2d
B
IL-10 concentration in serum (pg/ml)
Sham Vehicle SP
0h 1h 6h 1d 2d 3d 4d

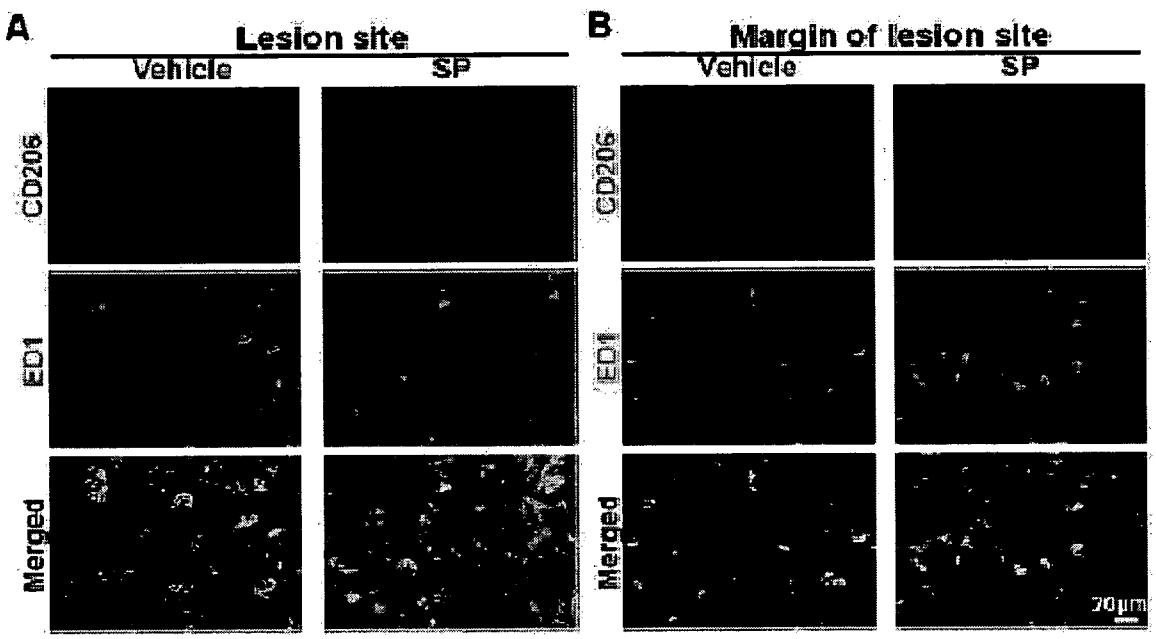
【도 6】


A
IL-10
NeuN
Merged
B
IL-10
CD11b
Merged
Sham
Periphery site
Ve
SP
Margin of lesion site
Ve
SP
40μm
C
D
E
F
10μm

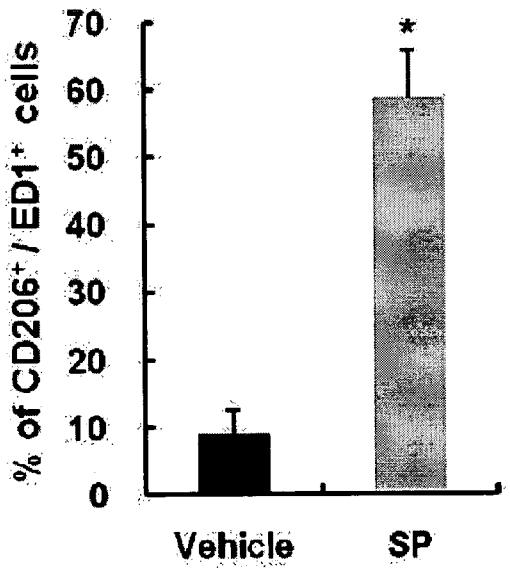
【도 7】


CD11b
CD206
Merged
Sham
Vehicle
SP
Vehicle
SP
10μm
20μm
40μm

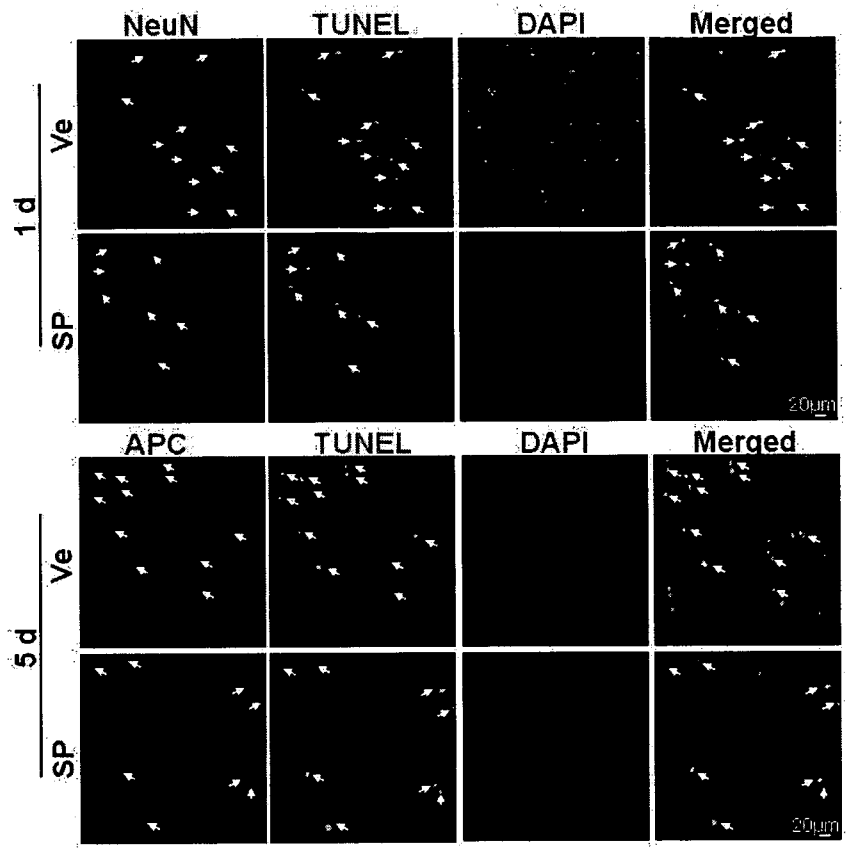
【도 8】


A
Lesion site
Vehicle
SP
CD206
ED1
Merged
B
Margin of lesion site
Vehicle
SP
CD206
ED1
Merged
20μm

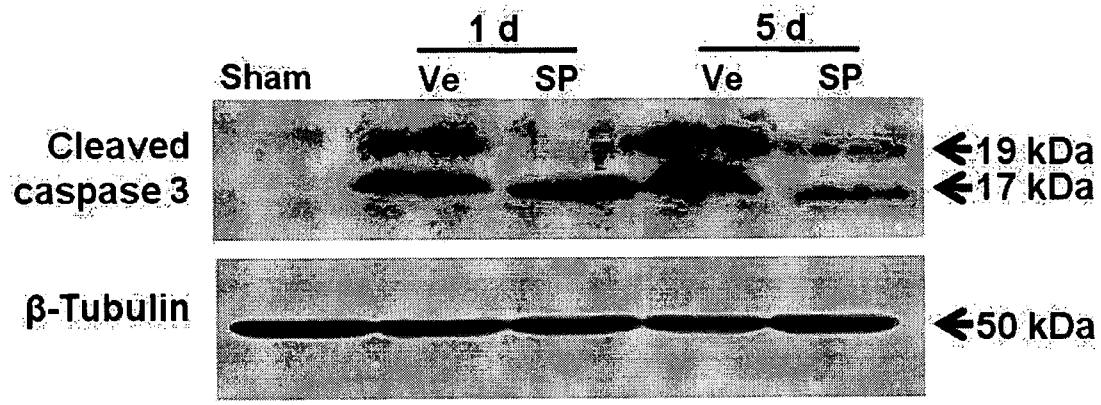
【도 9】


% of CD206+ / ED1+ cells
70
60
50
40
30
20
10
0
*
Vehicle
SP

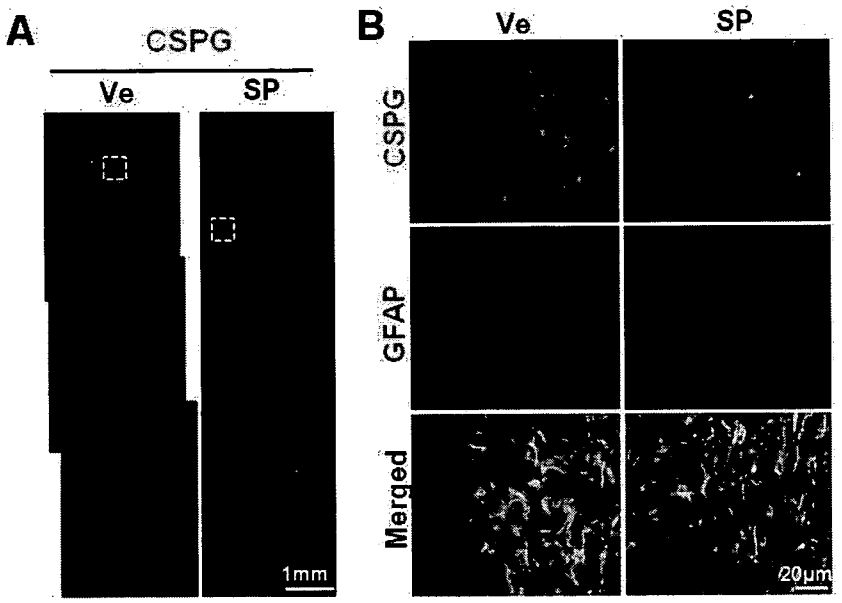
【도 10】


NeuN
TUNEL
DAPI
Merged
1 d
Ve
SP
20μm
APC
TUNEL
DAPI
Merged
5 d
Ve
SP
20μm

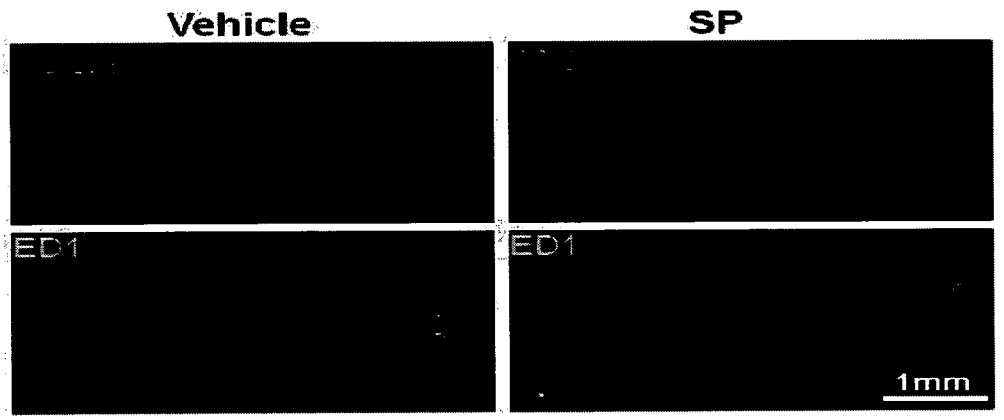
【도 11】


1 d
5 d
Sham
Ve
SP
Ve
SP
Cleaved caspase 3
19 kDa
17 kDa
β-Tubulin
50 kDa

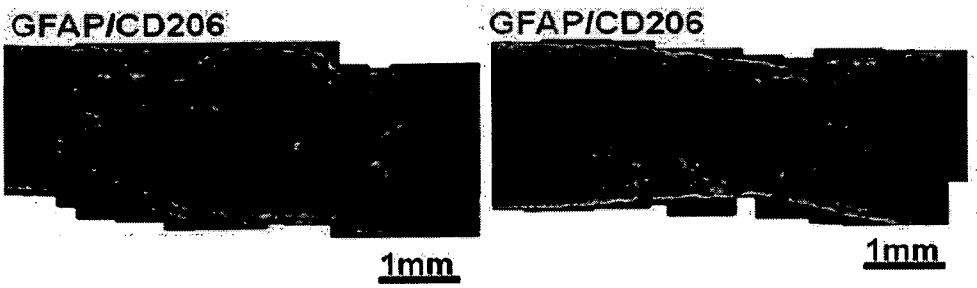
【도 12】


A
CSPG
Ve
SP
1mm
B
Ve
SP
CSPG
GFAP
Merged
20μm

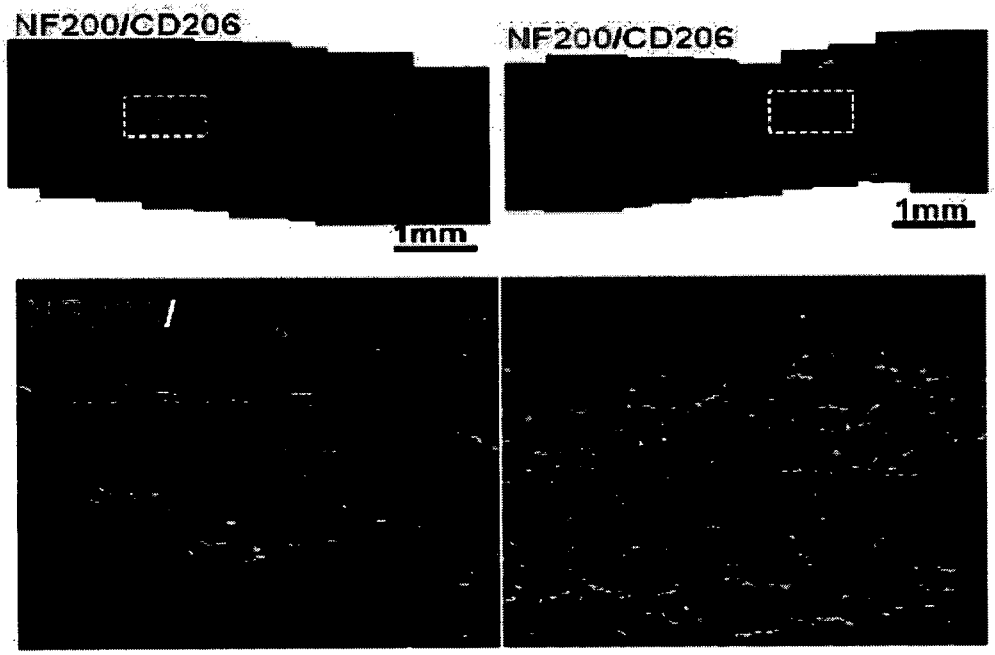
【도 13】


Vehicle
SP
ED1
ED1
1mm

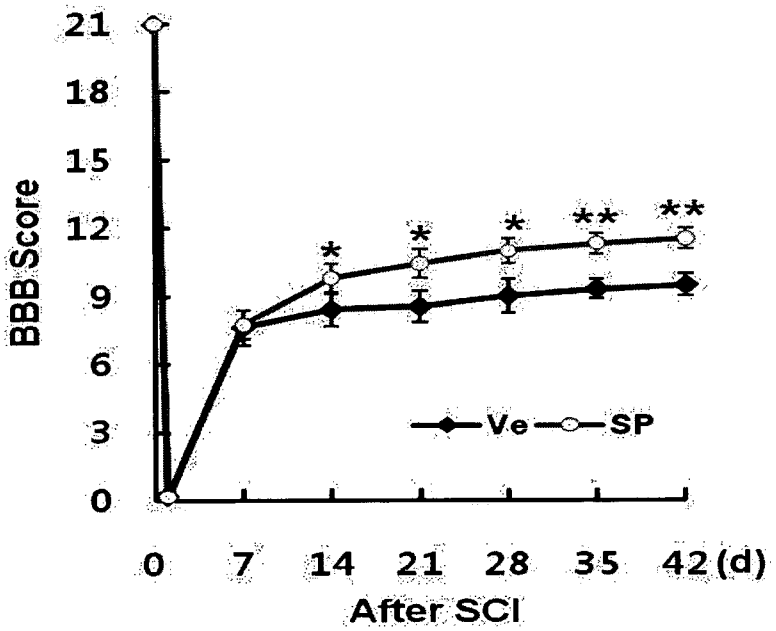
【도 14】


GFAP/CD206
1mm
GFAP/CD206
1mm

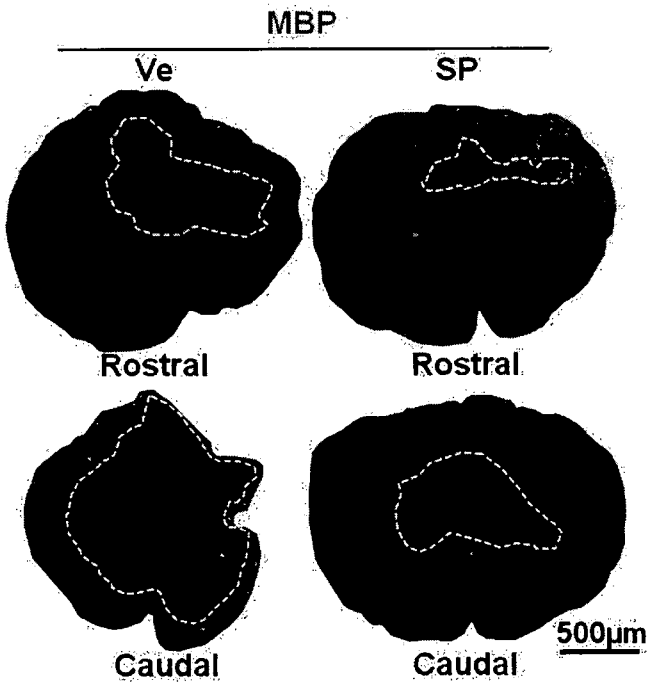
【도 15】


NF200/CD206
1mm
NF200/CD206
1mm

【도 16】


21
18
15
12
9
6
3
0
BBB Score
*
*
*
**
**
Ve
SP
0
7
14
21
28
35
42 (d)
After SCI

【도 17】


MBP
Ve
SP
Rostral
Rostral
Caudal
Caudal
500μm

【도 18】

