



- (51) 국제특허분류:
A61K 38/16 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/003260
- (22) 국제출원일: 2012 년 4 월 26 일 (26.04.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0039219 2011 년 4 월 26 일 (26.04.2011) KR
10-2012-0043799 2012 년 4 월 26 일 (26.04.2012) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 아주
대학교 산 학 협 력 단 (AJOU UNIVERSITY IN-
DUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDA-
TION) [KR/KR]; 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5,
443-749 Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 홍지만 (HONG, Ji
Man) [KR/KR]; 경기도 용인시 수지구 상현동 쌍용 1
차아파트 703-1602, 448-521 Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 이룸 (ERUUM PATENT LAW
FIRM); 서울특별시 강남구 대치동 1005-8 보성빌딩 5
층, 135-851 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, 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.

(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).

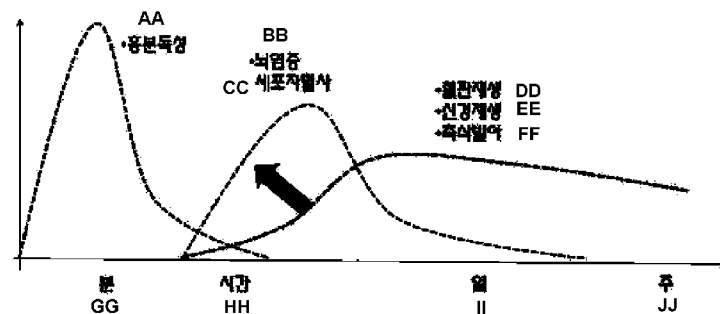
공개:

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

(54) Title: COMPOSITION FOR AIDING SURGICAL PROCEDURES FOR TREATING ISCHEMIC VASCULAR DISEASES

(54) 발명의 명칭: 허혈성 혈관 질환 치료시술 보조용 조성물

[Fig. 1]



AA ... Excitotoxicity
BB ... Encephalitis
CC ... Apoptosis
DD ... Reperfusion
EE ... Neuranogenesis

FF ... Axonal sprouts
GG ... Minutes
HH ... Hours
II ... Days
JJ ... Weeks

(57) Abstract: The present invention relates to a composition comprising erythropoietin (EPO) as an active ingredient for aiding surgical procedures for treating ischemic vascular diseases. The present invention also relates to a method for treating ischemic vascular diseases using said composition. The composition for aiding surgical procedures according to the present invention may improve the success rate of a variety of surgical procedures including multiple cutting operations performed on an adult patient suffering from a variety of ischemic vascular diseases including moyamoya disease, and can be widely used in the treatment of a variety of ischemic vascular diseases.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



본 발명은 에리스로포이에틴(Erythropoietin, EPO)을 유효성분으로 포함하는 허혈성 혈관 질환 치료시술 보조용 조성물 및 상기 조성물을 이용하여 허혈성 혈관 질환을 치료하는 방법 등에 관한 것이다. 본 발명의 치료시술 보조용 조성물은 모야모야 질환을 비롯한 다양한 허혈성 혈관 질환이 발병된 성인 환자에게 다발천공 수술을 포함하는 다양한 치료시술 시 성공율을 향상시킬 수 있으며, 다양한 허혈성 혈관 질환의 치료에 널리 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: 허혈성 혈관 질환 치료시술 보조용 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 허혈성 혈관 질환 치료시술 보조용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 에리스로포이에틴(Erythropoietin, EPO)을 유효성분으로 함유하는 허혈성 뇌혈관 질환, 허혈성 심혈관 질환, 또는 허혈성 말초혈관 질환 치료시술 보조용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 허혈(Ischemia)이란 신체기관, 조직 또는 부위로의 혈류 공급 감소 상태를 말하며, 궁극적으로 비가역적인 손상인 세포 및 조직의 괴사(necrosis)로 이어지게 된다. 특히, 뇌나 심장은 혈류 부족에 가장 민감한 신체 기관으로서, 예를 들어, 뇌졸중 또는 두부 손상 등으로 조직에 허혈이 발생하면 허혈폭포반응(ischemic cascade)이라고 불리는 과정들이 촉발되어 뇌 조직이 영구적으로 손상된다.
- [3] 뇌졸중(腦卒中)은 뇌에 혈액을 공급하고 있는 혈관이 막히거나 터짐으로써, 뇌의 국소적인 부분이 손상되어 나타나는 질환으로, 흔히 '중풍'으로 알려져 있다. 증상으로는 반신마비, 감각장애, 언어장애, 발음장애, 시력 및 시야장애, 복시, 두통, 어지럼증, 의식장애, 식물인간 상태 및 치매 등이 있다. 뇌졸중은 뇌의 혈관이 완전히 막히거나 심하게 좁아져 조직 내 혈류가 공급되지 못하여 발생하는 허혈성 뇌졸중(80~85%)과 출혈에 의해 뇌세포의 기능이 손상되는 증상인 출혈성 뇌졸중(15~20%)으로 나뉜다. 뇌졸중은 우리나라 사망률의 2위, 전 세계적 사망률의 3위를 차지하고 있으며 뇌졸중에서 살아남은 환자도 약 50%이상에서 여러 가지 장애가 남아 환자 뿐 아니라 환자를 돌봐야 하는 사람들에게 사회적 부담을 주고 있다.
- [4] 전체 뇌졸중의 대부분을 차지하고 있는 허혈성 뇌졸중은 급성기(7일 이내) 혹은 아급성기(4주 이내) 임상 경과에 따라 향후 환자의 예후가 결정되는 경우가 많다. 이러한 허혈성 뇌졸중에서 급성기 치료의 생리적 표적인 뇌-허혈반음영(ischemic penumbra)의 뇌조직이 다시 기능을 하도록 혈류를 재공급시키기 위해서 재개통치료가 수행된다. 하지만, 현재까지 재개통 치료법은 정맥제 투여방법으로는 증상발현 4.5시간이내까지 또는 동맥 내 방법으로는 6시간 이내에 재개통이 되어야 환자의 예후를 호전시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 하지만, 우리나라를 포함하여 세계적으로도 뇌졸중 환자가 시간 내에 발견되어 적절한 응급실에서 재개통 치료를 받을 수 있는 비율은 극히 낮은 수준이다. 따라서 대부분의 급성 허혈성 뇌졸중 환자들이 적절한 치료를 받지 못하고 있는 실정이기 때문에 급성기 환자에서 안전하고 효과적인 새로운 치료법은 너무도 절실하다.

- [5] 한편, 같은 조직 내 허혈성 질환인 허혈성 심혈관 질환 또는 허혈성 말초혈관 질환의 경우는 뇌에서보다는 상대적으로 긴 치료창(time window)을 가지고 있지만 여전히 많은 환자에서 치료시간을 놓쳐 적절한 치료를 받지 못하고 있는 것이 현실이다. 하지만 심, 뇌, 말초 조직에 허혈성 질환이 발생하여 치료시간 내에 재관류 치료를 성공적으로 받는다고 할지라도 경우에 따라 역설적으로 조직손상이 더 발생하는 경우가 있는데 이를 재관류손상(reperfusion injury)라고 한다. 이러한 재관류 손상은 천천히 혈관이 막히는 경우가 아니고 갑자기 혈관이 막히는 경우, 조직의 허혈이 더 큰 경우, 혈관이 막혀있는 시간이 더 길었던 경우 더 쉽게 발생하는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 손상이 나타나면 역설적으로 더 많은 조직 손상을 초래하므로, 재관류 수술이나 시술을 통해 오히려 더 나쁜 예후를 야기하는 경우들이 종종 있었다.
- [6] 뇌경색을 비롯한 심근경색, 말초동맥폐색질환 등의 허혈성 질환은 혈류의 공급감소가 근본적인 원인이고, 궁극적으로는 조직을 구성하는 세포의 비가역적인 손상을 유발하는 결과를 나타낸다.
- [7] 지금까지 허혈성 폭포반응(ischemic cascade)의 초기, 즉 조직의 파괴기(destructive phase)에 나타나는 흥분독성(excitotoxicity), 염증(inflammation), 산화손상(oxidative stress) 등을 치료의 표적으로 뇌보호 약물을 개발하여 전임상연구와 임상연구를 진행하였지만 아직까지 인체에서 뚜렷한 효능을 보여주지 못했다.
- [8] 급성기 뇌졸중이 아닌, 만성적 폐쇄성 허혈성 뇌혈관 질환의 경우(모야모야 포함), 두 개강의 외측의 정상혈관과 두 개강내의 비정상 혈관측의 연결을 시도하는 문합술(anastomosis)을 통해 두 개강 내 혈류를 개선하는 치료가 개발되었다. 이러한 혈관문합술은 시술방법에 따라 두 개강 내-외의 혈관을 직접적으로 연결하는 직접 혈관문합술과 두 개강 내-외의 혈관을 직접적으로 연결하지는 않는 간접 혈관문합술로 나뉜다. 이러한 혈관 문합술은 두 개강 외의 혈관을 박리한 다음 두개골을 제거하고 직접인 경우 비정상적의 두 개강 내의 혈관을 찾아 연결시켜주는 수술이고 간접인 경우에도 위의 과정은 동일하지만 두 개강 내-외의 혈관을 직접 연결만 시켜주지 않는 수술이다. 따라서 전신마취가 필요하고, 수술시간이 길고, 시술자의 숙련된 기술이 필요할 수 밖에 없었다. 특히 직접문합술인 경우 수술자에 매우 의존적이어서 신뢰할만한 의료기관에서도 수술 후 뇌경색이 약 21%에 이르고 사망률이 9%에 달하는 경우도 있었다. 간접 혈관문합술인 경우에도 직접 문합술에 비해 상대적으로 시술이 간단하다는 장점이 있었지만 수술 후에 신생혈관생성(neovascularization)이 전제되어야 하므로 대뇌의 신생혈관생성 환경 및 조건이 성인보다 뛰어나다고 알려진 소아환자에만 적용할 수 있을 뿐, 성인환자에게는 적용할 수 없다는 단점이 있었다. 또한, 직접 혈관문합술에 비해 상대적으로 간단한 수술이지만, 여전히 수술 부작용이 나타나서 수술 후 환자 약 15%에서 뇌경색 등의 문제가 있을 수 있었다. 따라서 급성기 뇌졸중의 치료에는

시도하기조차 어려웠다. 이에 비해 다발천공술은 거의 합병증이 발생하지 않는 안전한 방법으로 국소마취 하에서 가능하고, 수술시간이 짧고, 수술자에 비-의존적이며, 시술 시 환자의 상태변화를 임상의가 관찰하여 처치할 수 있다는 장점이 있다.

- [9] 한편, 고영삼 등은 다수의 성인 모야모야 환자에게 다발천공(multiple Burr Hole)수술을 수행한 결과, 뇌막동맥으로부터 신생혈관생성이 유발되고, 모야모야 혈관이 소실됨을 확인하였다(J Korean Neurosurg Soc 35:17-22, 2004). 하지만 이 경우에 급성기에 시행한 시술이 아니었고 모든 환자에서 신생혈관생성이 유발된 것도 아니어서 본 시술이 활발하게 세계적으로 응용되지는 않고 있는 실정이다. 대한민국 특허등록 제10-0774827호에는 허혈증에 걸린 뇌조직에 에리스로포이에틴을 말초적으로 투여하면 현저한 뇌 보호효과를 가짐으로써 영구적으로 손상된 뇌조직의 부위가 감소됨이 개시되어 있으나, 상기 특허문헌에는 뇌보호효과(neuroprotection)만 언급이 되어 있다. 또한, 미국특허공개 제2010/0247452호에는 에리스로포이에틴이 내피전구세포 분화 및 유착 능력을 향상시켜 혈관형성 또는 혈관신생자극이 방출되는 조직 또는 기관에서 신생혈관형성을 유도할 수 있음이 개시되어 있지만, 상기 특허문헌에는 생체의 물리적 장벽에 대한 개념은 전혀 언급되거나 제시된 바 없다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명자는 허혈성 뇌혈관 질환, 허혈성 심혈관 질환, 허혈성 말초혈관 등과 같은 허혈성 혈관 질환 치료시술을 수행함에 있어, 물리적 장벽을 최소한으로 파괴하는 시술(또는 수술)을 위한 치료시술 보조용 신생혈관생성 유도제로서 에리스로포이에틴을 사용할 경우, 시술에 의한 신생혈관생성작용을 도모하고 허혈-재관류 손상을 감소시켜 허혈질환을 효과적으로 치료할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [12] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 에리스로포이에틴(Erythropoietin, EPO)을 유효성분으로 포함하는 허혈성 혈관 질환 치료시술 보조용 조성물을 제공하는 것이다. 또한, 본 발명은 에리스로포이에틴(Erythropoietin, EPO)을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 허혈성 뇌혈관 질환, 허혈성 심혈관 질환, 허혈성 말초혈관 질환 등을 치료시술하는 방법을 제공한다.
- [13] 그러나 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[14]

과제 해결 수단

- [15] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 에리스로포이에틴(Erythropoietin, EPO)을 유효성분으로 포함하는, 허혈성 혈관 질환 치료시술 보조용 조성물을 제공한다. 상기 허혈성 혈관 질환은 허혈성 뇌혈관 질환, 허혈성 심장 질환, 및 허혈성 말초혈관 질환 등을 포함한다.
- [16] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 허혈성 혈관 질환 치료시술은 혈관중재술, 천공술, 직접 혈관문합술, 및 간접 혈관문합술 등을 포함한다.
- [17] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 조성물은 허혈성 혈관 질환 치료시술을 받기 이전에 투여되는 것을 특징으로 한다.
- [18] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 조성물은 허혈성 심혈관 질환 또는 허혈성 말초혈관 질환 치료 시술 후 허혈-재관류 손상을 감소시키는 것을 특징으로 한다.
- [19] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 조성물은 허혈성 뇌혈관 질환에서 두 개강 내-외 혈관을 연결시키는 치료 수술 후 신생혈관생성을 위해 투여되는 것을 특징으로 한다.
- [20] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 조성물은 급성기 혈관폐색의 상황에서 환자에게 투여되는 것을 특징으로 한다.
- [21] 또한 본 발명은 허혈성 혈관 질환 치료시술이 필요한 환자에게 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 허혈성 혈관 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 조성물은 허혈성 혈관 질환 치료시술을 받기 이전 또는 받은 이후에 투여할 수 있으며, 바람직하게는 허혈성 혈관 질환 치료시술을 받기 이전에 환자에게 투여할 수 있다. 상기 본 발명의 허혈성 혈관 질환은 허혈성 뇌혈관 질환, 허혈성 심혈관 질환, 및 허혈성 말초혈관 질환 등을 포함한다.
- [22] 본 발명의 일 구현예에서 상기 방법은 상기 조성물을 급성기 혈관폐색의 상황에서 환자에게 투여하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [23] 모야모야 질환을 비롯한 허혈성 뇌혈관 질환, 허혈성 심혈관 질환 또는 허혈성 말초혈관 질환이 발병된 성인 환자에게 다발천공 수술을 포함하는 다양한 치료시술을 제공할 때 본 발명의 에리스로포이에틴 함유 조성물을 사용하면 신생혈관생성기전을 신속히 극대화하여 혈관의 재생기전을 이용한 치료를 안전하고, 간단하며, 그리고 효율적으로 할 수 있게 함으로써 시술의 성공율을 현저히 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [24] 도 1은 본 발명의 혈관생성을 이용한 뇌졸중 치료의 전략을 설명하는 도면이다.
- [25] 도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 신생혈관생성과 뇌의 기능적 회복을 나타내는 모식도이다.
- [26] 도 3은 환자 1 내지 4의 시간의 경과에 따른 NIH 뇌졸중 지수의 평균값의 변화를 나타내는 그래프이다.

- [27] 도 4는 환자 1 내지 4의 시간의 경과에 따른 수정바텔지수의 평균값의 변화를 나타내는 그래프이다.
- [28] 도 5는 환자 1 내지 4의 시간의 경과에 따른 수정란킨지수의 평균값의 변화를 나타내는 그래프이다.
- [29] 도 6은 환자 5 내지 10의 시간의 경과에 따른 NIH 뇌졸중 지수의 평균값, 수정바텔지수의 평균값, 수정란킨지수의 평균값의 변화를 나타내는 그래프이다.
- [30] 도 7은 환자 1을 대상으로 하여 본 발명의 일실시에에 따른 급성 허혈성 뇌질환 치료를 위한 혈관생성 보조용 조성물을 투여 및 다발천공 수술을 시행할 때, 시술하기 전과 후에 촬영한 뇌의 혈관영상을 나타내는 사진이다.
- [31] 도 8은 환자 2를 대상으로 하여 본 발명의 일실시에에 따른 급성 허혈성 뇌질환 치료를 위한 혈관생성 보조용 조성물을 투여 및 다발천공 수술을 시행할 때, 시술하기 전과 후에 촬영한 뇌의 혈관영상을 나타내는 사진이다.
- [32] 도 9는 환자 3을 대상으로 하여 본 발명의 일실시에에 따른 급성 허혈성 뇌질환 치료를 위한 혈관생성 보조용 조성물을 투여 및 다발천공 수술을 시행할 때, 시술하기 전과 후에 촬영한 뇌의 혈관영상을 나타내는 사진이다.
- [33] 도 10은 환자 4를 대상으로 하여 본 발명의 일실시에에 따른 급성 허혈성 뇌질환 치료를 위한 혈관생성 보조용 조성물을 투여 및 다발천공 수술을 시행할 때, 시술하기 전과 후에 촬영한 뇌의 혈관영상을 나타내는 사진이다.
- [34] 도 11은 환자 5를 대상으로 하여 본 발명의 일실시에에 따른 급성 허혈성 뇌질환 치료를 위한 혈관생성 보조용 조성물을 투여 및 다발천공 수술을 시행할 때, 시술하기 전과 후에 촬영한 뇌의 혈관영상을 나타내는 사진이다.
- [35] 도 12는 환자 6을 대상으로 하여 본 발명의 일실시에에 따른 급성 허혈성 뇌질환 치료를 위한 혈관생성 보조용 조성물을 투여 및 다발천공 수술을 시행할 때, 시술하기 전과 후에 촬영한 뇌의 혈관영상을 나타내는 사진이다.
- [36] 도 13은 환자 7을 대상으로 하여 본 발명의 일실시에에 따른 급성 허혈성 뇌질환 치료를 위한 혈관생성 보조용 조성물을 투여 및 다발천공 수술을 시행할 때, 시술하기 전과 후에 촬영한 뇌의 혈관영상을 나타내는 사진이다.
- [37] 도 14는 환자 8을 대상으로 하여 본 발명의 일실시에에 따른 급성 허혈성 뇌질환 치료를 위한 혈관생성 보조용 조성물을 투여 및 다발천공 수술을 시행할 때, 시술하기 전과 후에 촬영한 뇌의 혈관영상을 나타내는 사진이다.
- [38] 도 15는 환자 9를 대상으로 하여 본 발명의 일실시에에 따른 급성 허혈성 뇌질환 치료를 위한 혈관생성 보조용 조성물을 투여 및 다발천공 수술을 시행할 때, 시술하기 전과 후에 촬영한 뇌의 혈관영상을 나타내는 사진이다.
- [39] 도 16은 환자 10을 대상으로 하여 본 발명의 일실시에에 따른 급성 허혈성 뇌질환 치료를 위한 혈관생성 보조용 조성물을 투여 및 다발천공 수술을 시행할 때, 시술하기 전과 후에 촬영한 뇌의 혈관영상을 나타내는 사진이다.
- [40] 도 17은 환자 1 내지 10을 대상으로 하여 본 발명의 일실시에에서 천공수술을

하는 모식도와 양측 수술을 시행한 환자에서 1주일 후의 모습을 보여주는 그림 및 사진이다.

- [41] 도 18은 환자 1을 대상으로 하여 본 발명의 일실시에 따른 급성 허혈성 뇌질환 치료를 위한 혈관생성 보조용 조성물을 투여 및 다발천공 수술을 시행할 때 두 개의 다양한 해부학적 장벽 제거 방법에 따른 뇌혈관의 신생혈관생성 여부를 나타내는 사진이다.
- [42] 도 19는 환자 1 및 환자 4를 대상으로 하여 본 발명의 일실시에 따른 급성 허혈성 뇌질환 치료를 위한 혈관생성 보조용 조성물을 투여 및 다발천공 수술을 시행할 때 동맥경화성 뇌혈관 폐색의 경우에도 유효한 신생혈관생성 방법임을 보여주는 뇌혈관 사진이다.
- [43] 도 20은 환자 6 및 환자 8을 대상으로 하여 본 발명의 일실시에 따른 급성 허혈성 뇌질환 치료를 위한 혈관생성 보조용 조성물을 투여 및 다발천공 수술을 시행할 때, 고령의 나이와 동맥경화성 뇌혈관 폐색의 경우에도 유효한 신생혈관생성 방법임을 보여주는 뇌혈관 사진이다.
- [44] 도 21은 환자 10을 대상으로 하여 본 발명의 일실시에 따른 급성 허혈성 뇌질환 치료를 위한 혈관생성 보조용 조성물을 투여 및 다발천공 수술을 시행할 때, 치료 전-후의 뇌혈류 공급에서 현저한 증가를 보여주는 관류영상 사진이다.
- [45] 도 22은 쥐를 대상으로 하여 최소수술을 위한 모델을 만들 때 사용했던 모식도 사진이다.
- [46] 도 23은 쥐를 대상으로 제작된 모델에서 인체에서와 같이 EPO와 천공수술의 여부에 따른 신생혈관생성을 관찰하기 위한 약물투여 및 수술을 수행하였을 경우, 각 3그룹(Group 1은 약물만 투여, Group 2는 천공수술만 시행, Group 3은 약물투여와 천공수술을 시행)에서 신생혈관생성 정도를 보여주는 사진이다.
- [47] 도 24는 쥐를 대상으로 제작된 모델에서 EPO, 천공수술 및 rh-VEGF-A165를 병합하여 치료한 경우, 신생혈관 발달정도를 나타내는 사진이다.
- [48] 도 25은 본 발명의 일실시에 따른 신생혈관생성과 심장의 기능적 회복을 나타내는 모식도이다.
- [49] 도 26은 본 발명의 일실시에 따른 신생혈관생성과 말초조직의 기능적 회복을 나타내는 모식도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [50] 본 발명자는 허혈성 뇌혈관 질환, 허혈성 심혈관 질환, 허혈성 말초혈관 질환 등 허혈성 혈관 질환 치료기술을 수행함에 있어, 환자의 합병증을 최대한으로 줄이기 위해 환자에게는 최소로 물리적 장벽을 파괴하는 기술(또는 수술)을 위한 치료기술 보조용 신생혈관생성 유도제로서 에리스로포이에틴을 사용할 경우, 허혈성 뇌혈관질환, 허혈성 심혈관질환, 허혈성 말초혈관질환 등의 허혈성 혈관질환에서 신생혈관생성기전을 신속히 극대화하여, 지속적으로 조직 파괴가 일어나는 혈관질환의 급성 시기에 혈관의 재생기전을 이용한 치료를 안전하고,

간단하며, 효율적으로 할 수 있고, 허혈성 질환의 경우 에리스로포이에틴을 시술 전 미리투여 하여 시술에 의한 신생혈관생성작용을 도모하고 허혈-재관류 손상을 감소시켜 허혈질환을 효과적으로 치료할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

- [51] 이에 본 발명은 에리스로포이에틴(Erythropoietin, EPO)을 유효성분으로 포함하는 허혈성 혈관 질환 치료시술 보조용 조성물 및 상기 조성물을 이용하여 허혈성 혈관 질환을 치료하는 방법 등을 제공한다.
- [52] 구체적으로, 현재까지 EPO의 신정보호 작용이 동물에서 보고된 바는 있으나, 어떠한 물질이나 방법으로도 인체와 실험동물에서 급성기 대뇌허혈 시기에 간단한 시술을 통해 두 개 안-밖의 해부학적 장벽을 제거하여 건강한 뇌 바깥으로부터 확산개념을 통해 신생혈관재생을 유도하여 뇌 안의 급성 허혈조직에서 사용하게 한다는 개념이나 이로부터 유추된 결과는 없었다. 따라서 본 발명은 생체에 매우 안전한 EPO 및 성장인자 단백질을 이용하여 급성 뇌경색 환자 및 동물의 허혈조직에서 신생혈관조성을 안전하고 효과적으로 증강시키는 방법을 제공하고 그 유효성을 증명함으로써 본 조성물의 새로운 기능을 생체에서 규명하였다.
- [53] 본 발명에서 용어, "에리스로포이에틴(Erythropoietin, EPO)"은 성인 신장의 간질조직에서나 태아의 간에서 생성되는 당단백질로서, EPO과 그의 수용체는 골수에서 적혈구 전구세포(erythroid progenitor cell)의 자멸사를 막아서 혈색소를 증가시키므로, 주로 만성신부전 환자의 빈혈치료에 사용되어 왔다. 아울러, 조직의 저산소나 허혈은 뇌에서 EPO의 발현에 직접적으로 작용하는 중요한 요소이고, 허혈 재관류 실험모델에서 뇌보호작용이 있으며, 항세포자멸사(apoptosis)에 효과가 있다고 보고되었다. 또한, EPO는 내피세포의 생성시에 VEGF(vascular endothelial growth factor)를 보조하고, 미세혈관생성과 동맥형성 등에 직-간접적으로 관여한다.
- [54] 본 발명에서 용어, "허혈성 혈관 질환"은 혈관에 직접 또는 간접적으로 관련되어 발병하는 질환으로서, 혈관에 발생하는 장애로 인하여 혈류량이 감소하게 되는 질환 또는 상기 감소된 혈류로 인하여 발병하게 되는 질환을 의미한다. 상기 허혈성 혈관 관련 질환은 특별히 이에 제한되지 않으나, 허혈성 뇌혈관 질환, 허혈성 심장 질환 및 허혈성 말초혈관 질환 등을 모두 포함한다.
- [55] 본 발명에서 용어, "허혈성 뇌혈관 질환"은 뇌의 혈관에 혈액이 정상적으로 공급되지 않아 발생하는 질환을 의미한다. 상기 허혈성 뇌혈관 질환은 특별히 이에 제한되지 않으나, 허혈성 뇌졸중, 모야모야 질환, 뇌혈전증 및 뇌색전증 등을 포함한다.
- [56] 본 발명에서 용어, "허혈성 뇌졸중"은 "뇌경색"이라고도 하고, 뇌에 공급되는 혈액량의 감소로 인한 뇌조직의 괴사가 회복불가능한 상태를 의미한다.
- [57] 본 발명에서 용어, "모야모야(Moyamoya) 질환"은 특별한 이유없이 두 개강 내 내경동맥의 끝부분이나 전대뇌동맥과 중대뇌동맥 시작부분에 협착이나 폐색이

보이고, 그 부근에 모야모야 혈관이라는 비정상적인 혈관의 생성이 관찰되는 증상을 나타내는 질환을 의미한다.

- [58] 본 발명에서 용어, “뇌혈전증”은 뇌혈관의 어느 부분이 동맥경화에 의한 동맥내강협착이나 혈전 때문에 혈류의 통과장애가 생겨 발생하는 질환을 의미한다.
- [59] 본 발명에서 용어, “뇌색전증”은 심장에서 생긴 혈전으로 인하여 뇌혈관이 막힘으로써 발생하는 질환을 의미한다.
- [60] 본 발명에서 용어, “허혈성 심혈관 질환”은 심장관련 혈관에 혈액이 정상적으로 공급되지 않아 발생하는 질환을 의미한다. 상기 심혈관 질환은 특별히 이에 제한되지 않으나, 심근경색 및 협심증 등을 포함한다.
- [61] 본 발명에서 용어, “심근경색”은 심장의 관상동맥이 혈전 또는 연축 등에 의해 급성으로 폐색되어 심장 근육의 조직이나 세포가 괴사하는 질환을 의미한다.
- [62] 본 발명에서 용어, “협심증”은 심장의 전체 또는 일부분에 혈류 공급이 감소하면서 산소 및 영양 공급이 급격하게 줄어들어 심장근육이 이차적으로 허혈 상태를 유지하는 질환을 의미한다.
- [63] 본 발명에서 용어, “허혈성 말초혈관 질환”은 주로 사지동맥 및 정맥 등에 혈류가 정상적으로 공급되지 않아 발생하는 혈관질환을 의미한다. 상기 말초혈관 질환은 특별히 이에 제한되지 않으나, 말초혈관 협착증, 말초혈관 폐색증 등을 포함한다.
- [64] 본 발명에서 용어, “말초혈관 협착증”은 사지 동맥 또는 정맥이 노화 등에 의해 좁아지는 질환을 의미한다.
- [65] 본 발명에서 용어, “말초혈관 폐색증”은 사지 동맥 또는 정맥이 노화 등에 의해 막히는 질환을 의미한다.
- [66] 본 발명에서 용어, “동맥류”는 동맥벽이 국소적으로 혹 모양으로 확장되는 질환을 의미한다.
- [67] 본 발명에서 용어, “허혈성 혈관 질환 치료시술”은 상기 허혈성 혈관 관련 질환을 외과적인 방법으로 치료하기 위한 시술방법을 의미한다. 상기 허혈성 혈관 관련 질환 치료시술은 특별히 이에 제한되지 않으나, 혈관중재술, 직접 혈관문합술 및 간접 혈관문합술 등을 포함한다.
- [68] 본 발명에서 용어, “혈관중재술”은 혈관에 발생하는 질병을 수술이 아니라 혈관을 따라 들어가 치료하는 시술방법을 의미한다. 상기 혈관중재술은 특별히 이에 제한되지 않으나, 풍선도자 확장술 및 스텐트 삽입술 등을 포함한다.
- [69] 본 발명에서 용어, “풍선도자 확장술”은 사타구니 또는 팔의 혈관을 통해 실처럼 가늘고 부드러운 철선과 끝에 작은 풍선이 달린 풍선도자를 삽입하고, 상기 풍선도자를 혈관이 막혀있는 부위까지 진입시킨다음, 상기 풍선도자를 부풀려서 혈관을 확장시키는 시술을 의미한다.
- [70] 본 발명에서 용어, “스텐트 삽입술”은 상기 풍선도자 확장술을 수행할 때, 외측에 미세철망 형태의 구조물인 스텐트가 구비된 풍선도자를 이용하여, 상기

풍선도자의 확장에 의하여 스텐트를 확장시키고, 상기 확장된 스텐트를 이용하여 확장된 혈관을 유지하게 하는 기술을 의미한다.

- [71] 본 발명에서 용어, “간접 혈관문합술”은 두피동맥, 뇌막 또는 근육을 단순히 외표면과 접촉하게 하여 뇌로 혈류를 공급하는 신생혈관이 생성되게 유도하는 기술방법을 의미한다. 상기 간접 혈관문합술은 특별히 이에 제한되지 않으나, 다발천공 수술을 포함한다.
- [72] 본 발명에서 용어, “허혈-재관류(ischemia-reperfusion) 손상”은, 급작스런 허혈상태가 발생한 허혈 조직으로의 혈류 회복과 산소화로 인하여 발생하는 조직 손상으로서, 특히 미세혈관 장애를 포함한다. 미세혈관의 모든 분절(세동맥, 모세혈관, 세정맥)에 있는 내피세포의 기능이 허혈-재관류(ischemia-reperfusion)에 노출시 장애가 발생하게 되는데, 세동맥에서는 혈관확장 능력이 떨어지고, 모세혈관에서는 체액 여과 및 백혈구에 의한 혈관의 막힘(leukocyte plugging)이 증가되며, 세정맥에서는 백혈구-내피세포 접착(leukocyte-endothelial cell adhesion)과 단백질 혈관 외 누출이 증가한다. 활성 산소(reactive oxygen species)와 NO의 생산의 불균형이 이들 반응을 촉진시킨다.
- [73] 본 발명에서 용어, "다발천공 수술(multiple Burr-hole Surgery)"은 경질막이 닿으면 자동으로 멈추는 드릴을 이용하여 두개골에만 다수의 구멍을 내는 수술을 의미하고, 수술이 거의 기술에 가까운 정도로 간단하기 때문에 외과의의 수술 숙련도 등의 기술적인 문제가 없는 방법이고 국소마취 하에서도 간단히 시행할 수 있다는 장점이 있다.
- [74] 본 발명의 허혈성 혈관 질환 치료기술 보조용 조성물은 허혈성 혈관 질환의 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [75]
- [76] 종래의 허혈성 혈관 질환의 치료에 있어서, 혈관중재술 또는 간접 혈관문합술 등의 다양한 치료용 기술방법을 사용하여 왔으나, 특히 환자가 급성기 환자이거나 위험도가 높다면 기술이 제한받을 수 있어 단점이 있었다. EPO 등을 처리하여 혈관신생을 유도하는 방법을 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있으나, 상기 EPO가 VEGF를 보조하고, 혈관생성에 관여한다는 결과만을 얻었을 뿐, 실질적으로 허혈성 질환을 치료하기 위하여 EPO를 임상적으로 적용하여 신생혈관생성에 성공한 임상적 사례는 아직까지 보고되지 않았다.
- [77] 해부학적으로, EPO 또는 어떠한 신생혈관유도물질이라도 단독으로 사용한다면 상기 혈관신생을 유도하는 방법은 물리적 장벽(physical barrier)에 의하여 그의 효과를 충분히 나타내지 못하게 된다. 해부학적으로 두 개강 내-외의 혈관인 내경동맥의 분지와 외경동맥의 분지들은 머리뼈와 뇌막이라는 물리적 장벽(physical barrier)에 의해 서로 연결이 될 수 없다. 따라서 두 개강 내의 혈관에 병이 발생하였을 때 두피를 공급하는 외경동맥의 가지들은 이러한

물리적 장벽이 파괴되지 않는 한 두 개강 내에 혈류공급을 할 수 없게 된다. 따라서 장벽의 물리적 파괴가 수반되지 않는다면 정상적인 외경동맥의 혈류를 두 개강 내로 이용하는 것은 불가능하다. 또한, 생리학적으로, EPO 또는 어떠한 신생혈관유도물질 단독으로만 이용하는 경우에는 혈류량 측면에서 효과적이지 않은 미세혈관만이 생성될 뿐(angiogenesis) 실제 허혈성 질환의 치료를 위하여 필요한 혈류를 충분히 공급할 수 있는 혈관생성(vasculogenesis)은 달성하지 못하게 된다. 이러한 물리적 장벽(physical barrier)의 개념은 말초혈관 폐색질환인 경우에도 해당이 된다. 즉, 막힌 혈관이 근위부인 경우 EPO 또는 혈관생성유도제에 의해 생성되어야 할 혈관의 길이가 너무 과다할 수 있게 된다. 따라서 EPO를 단독으로 투여할 경우에는 신생되어야 할 혈관의 길이가 과다하여 치료에 필요한 만큼의 충분한 혈관신생이 되지 못하게 된다. 따라서 이러한 길이에 대한 물리적 장벽을 파괴하는 기술이나 수술이 신생혈관유도제와 동반되어야만 원하는 부위의 신생혈관생성이 유도될 수 있다.

- [78] 이에 더하여, 상대적으로 재관류 치료의 치료창(time window)이 길다고 할 수 있는 심장허혈, 말초동맥폐색질환 등의 허혈성 심혈관 질환 또는 허혈성 말초혈관 질환의 경우, 허혈 조직으로의 혈류 회복을 위한 수술 후 허혈-재관류 손상으로 인한 부작용으로 예후가 좋지 않은 문제들이 있었다.
- [79] 이에 본 발명자는 상기 치료용 기술방법 전에 안전한 EPO를 전처리하여 혈관신생이나 조직허혈을 조건화하는 다양한 신호를 유도하여, 상기 각 방법의 단점을 극복한 새로운 방법을 개발하였다.
- [80] 즉, 지금까지의 허혈성 질환의 초기(destructive phase)에 나타나는 흥분독성, 염증 등을 치료표적으로 삼는 뇌허혈 보호방법과는 달리, 본 발명자는 허혈성 질환의 후기(regenerative phase)에 나타나기 시작하는 혈관신생기작을 본 발명을 통해 더욱 강하고 신속하게 유도하는데 성공하여 근본적이고 효과적인 급성기 허혈성 질환 치료를 달성하게 되었다(도 1 참조).
- [81] 실제로, 허혈성 뇌혈관 질환의 일종인 모야모야 질환 또는 폐색 동맥질환의 치료 시에 EPO를 투여하여 환자에게 신생혈관생성신호를 먼저 일으키고 두 개강 내-외의 방벽인 두개골과 뇌막만을 파괴하는 다발천공 수술을 병행한 결과, 신생혈관이 뇌조직 전체로 충분히 생성되어 각 방법을 독립적으로 수행할 경우보다도 현저한 치료효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.
- [82] 또한, 심장허혈, 말초동맥폐색질환 등의 허혈성 심혈관 질환 또는 허혈성 말초혈관 질환의 경우, 허혈 조직으로의 혈류 회복을 위한 수술 또는 기술 전 EPO를 전처리 하여 혈관신생유도 신호를 조건화하면 수술 후 허혈-재관류 손상으로 인한 부작용이 현저히 감소한다(도 25 및 도 26 참조).
- [83] 본 발명의 일 구현예에 의하면, 본 발명의 조성물은 EPO 이외의 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다.
- [84] 상기 담체는 특별히 이에 제한되지 않으나, 멸균용액, 정제, 코팅정 및 캡슐과

같은 공지된 제형들에 사용되는 표준의 제약학적 담체 중 어느 것이든 포함된다. 전형적으로 이러한 담체는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 마그네슘 스테아레이트, 폴리비닐피롤리돈, 텍스트린, 밀크, 특정 종류의 클레이, 스테아린산, 탈크, 식물성 기름(예를 들면 식용유, 면실유, 코코넛유, 아몬드유, 낙화생유), 중성지방산 글리세라이드 등의 유상 에스테르, 광물유, 바세린, 동물유지, 셀룰로오스 유도체(예를 들면 결정셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스), 등의 부형제, 또는 기타 다른 공지된 부형제를 포함한다. 이러한 담체에는 또한 산화방지제, 습윤제, 점도안정제, 풍미제, 색소 첨가제 및 다른 성분들이 포함될 수 있다.

- [85] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 본 발명의 조성물은 에리스로포이에틴을 유효성분으로 포함하고, 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 다양한 제형으로 제제화 될 수 있다.
- [86] 상기 제형은 특별히 이에 제한되지 않으나, 연질캡슐제, 경질캡슐제, 정제, 시럽제 등의 경구제, 주사제 또는 외용제를 들 수 있다. 상세하게는, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다.
- [87] 또한 본 발명은 허혈성 혈관 질환 치료시술을 받기 이전 또는 받은 이후의 환자에게 본 발명의 EPO 함유 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 허혈성 혈관 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 바람직하게는 급성기 허혈성 혈관 질환 치료시술을 받기 이전에 환자에게 EPO 함유 본 발명의 조성물을 투여할 수 있다. 상기 본 발명의 허혈성 혈관 질환은 허혈성 뇌혈관 질환, 허혈성 심혈관 질환, 및 허혈성 말초혈관 질환 등을 포함한다.
- [88] 상기 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 경구 투여, 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강내 투여, 경막내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 조성물은 상기 시술 이전에 매일 투여 또는 간헐적으로 투여해도 좋고, 1일당 투여 횟수는 1회 또는 2~3회로 나누어 투여하는 것이 가능하며, 바람직하게는 상기 시술 10일 이전에 3일간 40,000 IU의 용량으로 상기 보조용 조성물을 투여하고, 7일이 경과한 후에, 국소마취상태에서 상기 시술을 수행함이 바람직하지만, 상기 조성물의 투여방법 및 투여량은 상기와 같이 제한되지 않고, 질환의 종류나 투여 형태, 그리고 치료 효과 등을 고려하여 당업자에게 통상적으로 알려진 다양한 방법에 따라 적절히 투여할 수 있을 것이다.

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

[90] 실시예 1: 급성 뇌경색 환자에서 병합요법에 의한 신생혈관생성

[91]

[92] 급성 뇌경색 환자에서(증상발생 1주일 이내) 병합요법[multiple burr-hole operation (다발천공 수술) + EPO infusion]의 신생혈관생성 및 치료 효과를 확인하기 위하여, 급성뇌경색의 원인이 대형동맥 죽상경화기전이거나 성인형 모야모야 환자를 대상으로 상기 병합요법을 시행하고, 치료 이전과 이후의 임상양상 및 신생혈관생성의 변화를 측정하였다.

[93]

[94] 실시예 1-1: 모야모야 환자의 치료를 위한 다발천공 수술의 시술

[95]

[96] 6개월 이상 임상소견이 관찰된 18세 이상의 확산강조영상에서 급성 뇌경색으로 확인된 성인 환자에서, 급성뇌경색의 원인이 대형동맥 죽상경화기전(n=5)이거나 성인형 모야모야 환자(n=5) 총 10인(환자 1 내지 환자 10)에게 각각 에리스로포이에틴(EPO)를 하루 40,000 IU의 용량으로 3일간 투여하고, 4일 내지 7일에 국소 마취상태에서 대뇌반구 당 2개 내지 3개의 다발천공수술을 시술하였다. 시술이 종료된 후 6개월 동안 환자의 임상상태를 검사하여 지수화하고 대뇌혈관의 신생여부를 치료 전-후로 변화를 비교하였다.

[97] 환자 1은 우측 편마비, 전신피로증을 나타내는 모야모야 증후군 환자(편측성 + 모야모야혈관없음), 환자 2는 우측 편마비, 전신피로증 나타내는 모야모야 증후군 환자(편측성 + 모야모야혈관있음), 환자 3은 의식저하를 나타내는 모야모야병 환자(양측성 + 모야모야혈관있음), 환자 4는 우측 편마비를 나타내는 모야모야 증후군 환자(양측성 + 모야모야혈관없음), 환자 5는 우측 편마비를 나타내는 모야모야병 환자(양측성 + 모야모야혈관있음), 환자 6은 우측 편마비를 나타내는 모야모야 증후군 환자 (편측성 + 모야모야혈관없음), 환자 7은 좌측 편마비를 나타내는 모야모야병 환자 (양측성 + 모야모야혈관있음), 환자 8은 우측 편마비를 나타내는 모야모야 증후군 환자 (양측성 + 모야모야혈관없음) 이었다, 환자 9는 우측 편마비를 나타내는 모야모야병 환자 (양측성 + 모야모야혈관 있음), 환자 10은 일시적 좌측 편마비를 나타내는 모야모야 증후군 환자 (편측성 + 모야모야 혈관 없음).

[98]

[99] 실시예 1-2: 환자의 신경학적 상태 및 기능적 상태의 분석

[100]

[101] 상기 다발 천공수술을 시술한 환자 1 내지 환자 4를 대상으로 하여, NIH 뇌졸중 지수, 수정바텔지수(modified Bathel Index) 및 수정란킨지수(modified Rankin score)를 각각 측정하고, 이들의 평균값을 시간의 변화에 따라 분석하였다(도 3

내지 도 5 참조).

[102] 상기 다발 천공 수술을 시술한 환자 5 내지 환자 10 을 대상으로 하여, NIH 뇌졸중 지수, 수정바텔지수(modified Bathel Index) 및 수정란킨지수(modified Rankin score)를 각각 측정하고, 이들의 평균값을 시간의 변화에 따라 분석하였다 (도 6 참조).

[103] NIH 뇌졸중 지수는 신경학적 증세가 나타나는 것에 대하여 1점씩 부과하는 방식으로 0점 내지 34점이 있고, 점수가 0점이 될수록 예후가 우수한 것이다. 수정바텔지수는 0점 내지 100점의 범위 내이고, 일상생활기능 상태에 따라 점수가 높을수록 예후가 우수한 것이다. 수정란킨지수의 경우 0점 내지 6점의 범위 내이고, 6점의 경우 사망이고 1점의 경우 증세를 자각하지만 모든 일상생활이 가능한 정도를 나타낸다.

[104] 도 3은 환자 1 내지 4의 시간의 경과에 따른 NIH 뇌졸중 지수의 평균값의 변화를 나타내는 그래프이고, 도 4는 환자 1 내지 4의 시간의 경과에 따른 수정바텔지수의 평균값의 변화를 나타내는 그래프이며, 도 5는 환자 1 내지 4의 시간의 경과에 따른 수정란킨지수의 평균값의 변화를 나타내는 그래프이다.

[105] 도 3 내지 도 5에 나타난 바와 같이, 모든 환자의 기능 상태는 전체적으로 입원당시보다 7일째 나빠진 후 이후 회복됨을 알 수 있었다.

[106] 또한 도 6은 환자 5 내지 10의 시간의 경과에 따른 NIH 뇌졸중 지수의 평균값, 수정바텔지수의 평균값, 수정란킨지수의 평균값의 변화를 나타내는 그래프이다. 환자들은 환자 1 내지 4보다 뇌졸중의 강도가 덜한 환자들 이었다. 환자들은 뇌졸중의 강도가 경한 경우에도 심한 경우(환자 1 내지 4)와 마찬가지로 기능의 회복을 모두에서 보였다.

[107] 또한 모든 환자에서(환자 1 내지 10) 수술 후 합병증은 전혀 관찰되지 않았으며 환자 전체에서 6개월 이후 기능회복을 보였다.

[108]

[109] 상기 결과로부터, 본 발명의 조성물을 동맥경화성 및 모야모야병에 의한 급성 뇌경색 치료를 위한 다발천공 수술 보조용 조성물로 사용하면서, 다발천공 수술을 시술할 경우에는 그 치료 성공율이 향상됨을 명백히 알 수 있고 위 병합치료는 매우 안전하였다.

[110]

[111] 실시예 1-3: 환자의 뇌 혈관영상 촬영 및 분석

[112]

[113] 상기 환자 1 내지 환자 10을 대상으로 하여 다발 천공수술의 시술이전 및 시술 후 6개월이 경과한 시점에서 각각 뇌혈관 영상을 촬영하고, 이를 비교 분석하였다. 도 7 내지 도 16 은 각각 환자 1 내지 환자 10을 대상으로 하여 본 발명의 맥경화성 및 모야모야병에 의한 급성 뇌경색 치료를 위한 다발천공 수술 보조용 조성물로 사용하면서 다발천공 수술을 시술할 경우에 시술하기 전과 후에 촬영한 뇌의 혈관영상을 나타내는 사진이다.

- [114] 환자 1은 구멍을 총 3개를 천공하였는데 맨 앞은 두개골만, 그 뒤는 경질막까지 또 그 뒤는 연질막까지 천공을 하였다. 신생혈관은 두개골만 천공한 경우는 혈관이 자라지 않았고 경질막 이상으로 구멍을 낸 경우만 신생혈관이 생성됨을 확인하였으므로, 모야모야 질환이 치유되었음을 알 수 있었다. 따라서 시술 시 해부학적으로 두 개 내-외의 비교적 단단한 장벽인 경질막의 충분한 파괴가 있어야만 신생혈관이 생성된다는 것을 알려주는 증례가 된다. 그 이후의 모든 환자는 경질막까지만 천공을 하였다. 환자 1, 4, 6, 8, 10인 경우는 모야모야혈관이 없는 환자에서 신생혈관생성을 증명하였는데 이는 모야모야 병 뿐 아니라 동맥경화성 폐쇄성 동맥질환에 의한 뇌졸중에서도 신생혈관생성 유도술을 이용할 수 있다는 것을 보여주는 증례가 된다.
- [115] 환자 6과 8은 나이가 70세 이상인 고령이고 관류장애가 심하지 않은 대뇌 동맥경화성 폐쇄성 동맥질환 환자였는데 환자들 모두 6개월 후 두 개외에서 두 개 안으로 혈관의 통로가 생성되었다.
- [116] 환자 6과 8, 그리고 환자 10에서는 신경학적 악화가 없는 환자였지만, 대뇌 안쪽으로 새로운 신생혈관이 생성되었다.
- [117]
- [118] 상기 결과로부터, 본 발명의 방법은 20세 이상의 급성 허혈성 뇌졸중을 동반한 성인[총 인원수 10명 중 여자 6명, 나이의 평균은 50.5 ± 17.4 (범위는 22-75세)]에서 병합치료를 시행한 모든 환자에서 치료로 인한 부작용이 전혀 발견되지 않았다. 급성기 뇌경색 환자에서 혈관재개통의 방법 이외에는 특별한 약물치료가 없는 현 상황에서 본 방법은 환자의 임상상태가 불안정한 급성기에도 시행할 수 있는 매우 안전한 방법이 될 수 있음을 알 수 있다. 또한 효과적인 면에서도 시술한 15반구에서 모두 건강한 두 개 외로부터 혈관통로를 생성하여 신생혈관재생을 100% 성공시킬 수 있는 방법임을 보여준다. 이에 더하여, 대상적인 면에서 환자 10명 중 5명은 모야모야병 환자였지만 나머지 5명은 동맥경화성 폐쇄성 동맥질환 환자였기 때문에 본 방법은 동맥경화에 의해 대뇌혈관폐색이 있는 환자에서도 역시 효과가 있는 방법임을 알 수 있다. 또한, 임상적인 측면에서, 본 병합요법은 뛰어난 효과성 및 안전성의 측면과 더불어, 참여한 모든 환자에서 다양한 방법을 통해 측정된 수치에서 기능적인 회복을 보여주었다.
- [119]
- [120] 실시예 2: 동물 모델에서 신생혈관생성
- [121]
- [122] 실시예 2-1: 적합한 동물 모델 제작
- [123]
- [124] 인체에서 나타난 본 발명의 조성물의 효과에 대하여 동물에서도 이를 증명하고자, 다양한 동물 모델을 제작하였다. 동물은 최대한 인체에서 시행한 방법과 동일하도록 시행하기 위하여 적절한 강도의 동물 모델을 제작하려고

하였다. 290 내지 340그램의 수컷 Sprague-Dawley 쥐를 3.5% isoflurane으로 흡입 마취한뒤 우측 총경동맥(common carotid artery, CCA), 외경동맥(external carotid artery, ECA), 내경동맥(internal carotid artery, ICA)을 노출 시켰다. 직장 온도는 수술적 시술 동안 heating pad에 연결된 electronic temperature controller를 통해 37°C로 유지하였다. 같은 방법으로 쥐 경부의 좌측 혈관을 노출시켰다. 그룹 1은 편측 내경동맥을 묶고 반대편 총경동맥을 묶는 방법을 시행하였다. 그룹 2는 그룹 1의 방법을 사용한 쥐에서 전기응고기를 이용하여 편측 척추동맥을 차단하였다. 그룹 3은 그룹 2의 방법을 사용한 쥐에서 전기응고기를 사용하여 반대편 척추동맥도 차단하였다. 그룹 4는 혈관 내경 내 나일론 실을 이용하여 영구적 편측 중대뇌동맥 폐색을 시행하였다.

- [125] 너무 심한 대뇌동맥 폐색은 거의 모든 쥐들을 사망시켜 (그룹 1 내지 3에서는 쥐의 사망률 86%) 장기적인 신생 혈관생성 모델로 사용할 수가 없었고 그룹 4의 모델에서도 사망률이 64%에 이르러 이보다 뇌경색의 정도가 약한 모델을 채택하는 것이 좋겠다고 여겨 향후 90분 폐색-재관류 중대뇌동맥 모델을 사용하기로 하였다.

[126]

[127] 실시예 2-2: 동물 모델에서 병합요법(EPO와 천공수술)의 효과

[128]

- [129] 290 내지 340그램의 수컷 Sprague-Dawley 쥐를 3.5% isoflurane으로 흡입 마취한뒤 우측 총경동맥(common carotid artery, CCA), 외경동맥(external carotid artery, ECA), 내경동맥(internal carotid artery, ICA)을 노출 시켰다. 3 Cm 의 4-0 monofilament nylon 실을 ECA를 통해서 ICA로 진입하고 중대뇌동맥(middle cerebral artery, MCA)을 막을 때까지 밀어 넣어 허혈성뇌손상을 유발하였다. MCA occlusion (MCAo) 후 90분 이후 다시 흡입 마취를 한 뒤 실을 제거하여 재관류를 시행하였다. 직장 온도는 수술적 시술 동안 heating pad에 연결된 electronic temperature controller를 통해 37°C로 유지했다. 실험의 목적을 달성하기 위하여 3 그룹으로 나누어 결과를 비교하였다. 그룹 1 (control: t-MCAO + no burrhole)은 위 방법대로 동물모델을 만들어 자연경과를 관찰하였고, 그룹 2 (t-MCAO + burrhole)는 뇌경색 동물모델을 만들고 이후 3일 째에 최소수술을 시행하였다. 그룹 3 (t-MCAO + EPO + burrhole)도 뇌경색 동물모델을 만들고 뇌혈관신생을 위한 전조건화(preconditioning)를 위해 EPO를 5000U/kg/일의 용량으로 3일 동안 복강 내로 투입한 후 3일째에 최소수술을 시행하였다. 최소수술은 흡입마취법을 이용하여 동물을 마취시킨 후 도 17과 같이 드릴을 이용하여 측두뼈에 직경 4mm의 구멍을 만들었다. 수술이 끝난 후 나일론 5-0실을 이용하여 수술부위를 봉합하였다.

- [130] 전체 3개월 내지 4개월을 관찰하여 그 결과를 표 1 및 도 하였다. 표 1에 나타난 바와 같이, 사망률은 그룹 1은 7/11이 사망(63.6%), 그룹 2는 6/19이 사망 (31.6%), 그룹 3는 1/18(5.3%)이 사망하여 통계적으로 유의하게 사망률의 차이가

있었다($p=0.003$). 또한, 3개월 뇌경색 부피는 그룹1 은 $348 \pm 42\text{mm}^3$, 그룹 2는 $298 \pm 58\text{mm}^3$, 그룹 3은 $280 \pm 67\text{mm}^3$ 이었다. 2주 후에 기능상태를 나타내는 수정 신경학적 강도 수치(Modified Neurological Severity Score, mNSS), mNSS, 최소 0점 최대 28점: 높은 점수가 기능이 나쁜 것임)를 관찰한 결과, 그룹 1에서 19.0 ± 1.9 , 그룹 2에서 11.1 ± 3.9 , 그룹 3에서 10.8 ± 3.8 를 나타내어 통계적인 유의한 차이를 나타내었다 ($P < 0.001$). 최종 목표였던 3개월 신생혈관재생 면에서 보면 다음과 같다. 그룹 1에서는 0/4 (0%), 그룹 2에서는 3/7 (42.9%). 그룹 3에서는 6/8 (75.0%)를 나타내어 통계적인 유의한 차이를 나타내었다 ($P=0.047$).

[131] 표 1

[Table 1]

	사망율	뇌경색 부피	mNSS	신생혈관재생
그룹 1(t-MCAO + no burrhole)	63.6%	$348 \pm 42\text{mm}^3$	19.0 ± 1.9	0%
그룹 2(t-MCAO + burrhole)	31.6%	$298 \pm 58\text{mm}^3$	11.1 ± 3.9	42.9%
그룹 3(t-MCAO + EPO + burrhole)	5.3%	$280 \pm 67\text{mm}^3$	10.8 ± 3.8	75.0%

[132] 또한, 도 23에 나타난 바와 같이 외경동맥에서 메칠렌블루 염색약을 주사하여 두피로 부터의 뇌 안쪽으로의 혈관연결을 보기위한 사진에서, 그룹 1에서는 쥐의 우측 반구에서 메칠렌 블루에 염색된 지역이 없었지만, 그룹 2에서는 약하게 염색되고 그룹 3에서는 강하게 염색이 되어 있는 것을 확인하였다.

[133]

[134] 상기 결과로부터, 이미 괴사된 조직에는 혈관이 새로이 생성되지 않는 것을 관찰하였기 때문에 추후 본 실험의 뇌경색 강도보다 약한 뇌경색 모델을 만드는 것이 바람직할 것이며, 아울러 수술여부에 따른 예후 차이가 너무 분명히 있었기 때문에 천공수술을 조금 더 작게 하는 것이 약물의 효과를 대비시킬 수 있으며, 궁극적으로 신생혈관재생을 보다 효과적으로 보여줄 수 있을 것이라 생각하였다. 이에 하기 실험을 추가적으로 수행하였다.

[135]

[136] **실시예 2-3: 동물 모델에서 병합요법(EPO, 천공수술, VEGF 병합)의 효과**

[137]

[138] 상기 실시예의 결과를 바탕으로 본 실험은 뇌경색의 강도를 줄이기 위해 재관류 시간을 줄였으며, 최소수술의 크기를 2mm로 줄였고 신생혈관 재생의 전-후 조건화(pre & post-conditioning)를 위해 EPO에 더하여 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)를 추가하여 사용하였다. 290 내지 340그램의 수컷

Sprague-Dawley 쥐를 사용하여 동물 모델을 제작하였으며, 신생혈관재생 여부를 확인하기 위하여 2마리만을 사용하여 모델을 제작하였다. 기존의 방법과 동일하게 대뇌동맥 60분 폐색-재관류 방법을 이용하여 뇌경색을 만들고 이후 5000U/KG/일의 용량으로 3일 동안 복강내로 투입하였다. 또한 rh-VEGF-A165 50ng/kg/min의 용량으로 투입펌프를 이용하여 복강 내로 주었다. 투여 시기는 수술 후 3일, 6일, 9일 쯤에 투입하였다.

- [139] 전체 3개월을 관찰한 결과, 사망률은 없었고(0/2, 0%), 뇌경색 부피는 $292 \pm 15 \text{ mm}^3$ 이었으며, 쥐의 행동을 보는 점수인 1주일 쯤 Modified Neurological Severity Score(mNSS, 최소 0점 최대 28점: 높은 점수가 기능이 나쁜 것임)점수는 10.7 ± 3.2 점 이었다. 또한, 도 24 에 나타난 바와 같이 외경동맥에서 메칠렌블루 염색약을 주사하여 두피로 부터의 뇌 안쪽으로의 혈관연결을 보기위한 사진에서, 두 마리 모두 대뇌지역의 염색이 많이 되어 있는 것을 확인할 수 있어 신생혈관 생성은 매우 잘 되었다는 것을 알 수 있었다.

[140]

- [141] 상기 인체 및 동물실험 결과로부터, 허혈성 뇌혈관 질환 치료 등을 위한 본 발명의 조성물은 환자의 뇌에서 혈관생성을 촉진하는 환경을 조성함으로써, 급성기 혈관폐색의 상황에서(증상 발병 7일 이내) 다발천공 수술과 같은 쉽고 안전한 허혈성 혈관 관련 질환 치료시술과 병합하여 치료할 경우 신생혈관생성을 통해 조직 허혈 증상이 있는 생체의 예후를 호전시킴을 알 수 있었다. 또한 인체 및 동물실험 결과, 신생혈관생성 반응은 상기 조성물에 포함된 에리스로포이에틴(EPO)이 혈관발달을 위한 해부학적 장벽을 제거하는 수술 전 투여로 신생혈관생성이 증강될 수 있음을 알 수 있었다. 이러한 신생혈관 생성은 수술 후 rhVEGF-A165 단백질의 병합에 의해 더욱 증강됨을 동물실험으로 명백히 알 수 있었다.

- [142] 따라서 급성 뇌경색의 치료와 관련하여, 본 발명의 방법은 지금까지 대뇌혈관 폐색에 의해 대뇌까지 도달하지 못해 인체에서 유효성을 나타내지 못했던 다양한 물질들이 도달할 수 있는 통로를 재생함으로써 향후 다양한 약물의 전달 방법으로도 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

[143]

- [144] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

[145]

산업상 이용가능성

- [146] 본 발명의 조성물은 허혈성 뇌혈관 질환, 허혈성 심혈관 질환, 및 허혈성

말초혈관 질환을 포함하는 허혈성 혈관 질환을 효과적으로 치료하는 데 있어서 널리 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

[147]

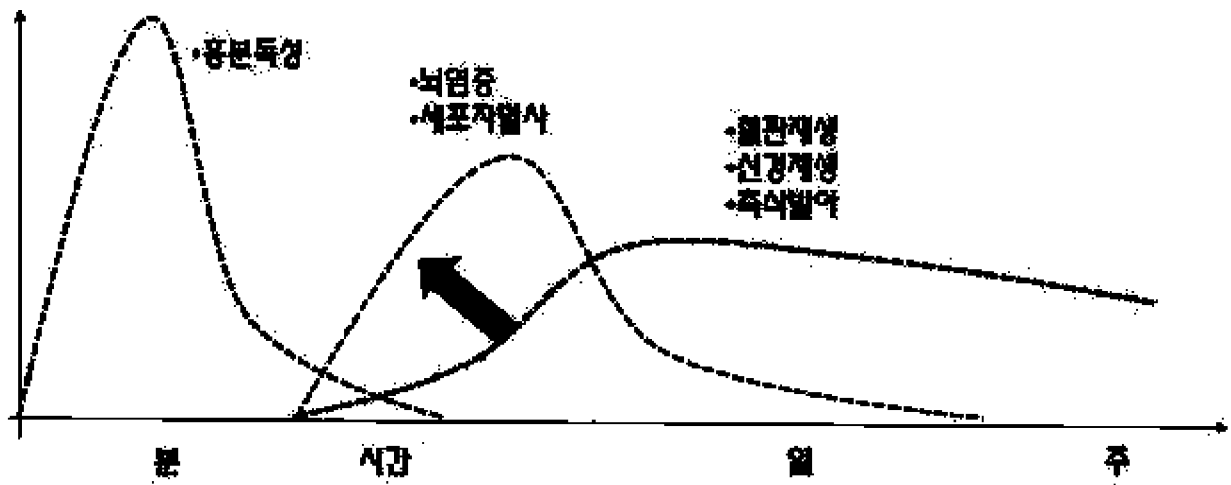
[148]

청구범위

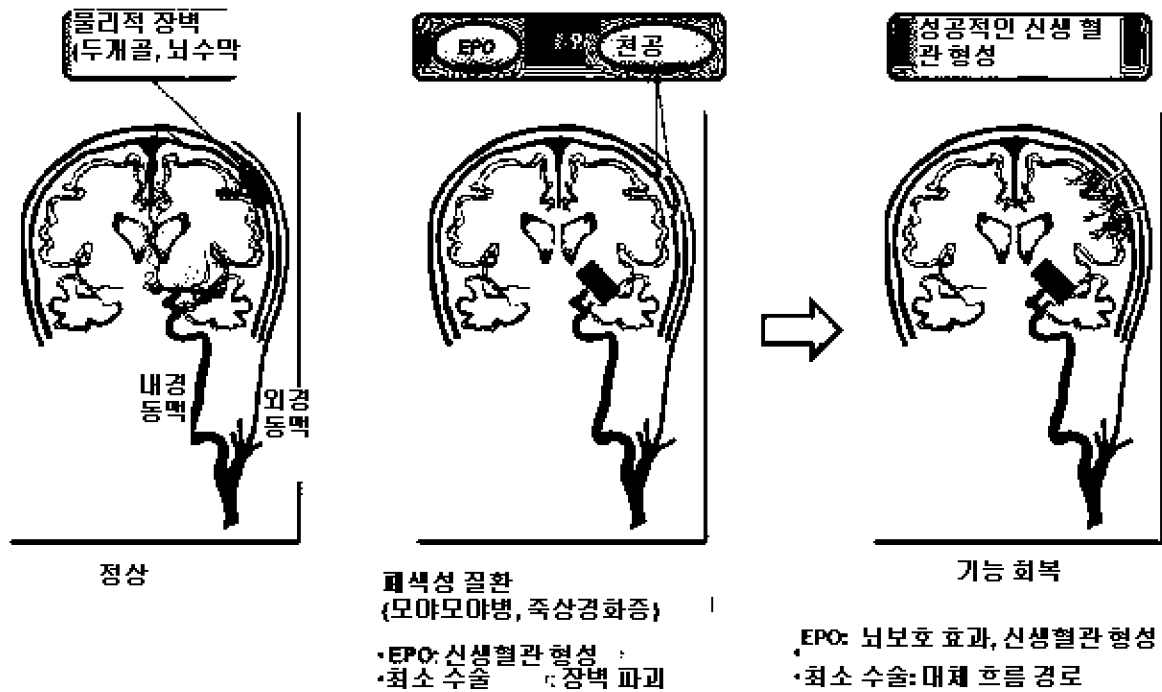
- [청구항 1] 에리스로포이에틴(Erythropoietin, EPO)을 유효성분으로 포함하는, 허혈성 혈관 질환 치료시술 보조용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 허혈성 혈관 질환은 허혈성 뇌혈관 질환, 허혈성 심혈관 질환 또는 허혈성 말초혈관 질환인 것인 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 허혈성 뇌혈관 질환은 허혈성 뇌졸중, 모야모야 질환, 뇌혈전증 또는 뇌색전증인 조성물.
- [청구항 4] 제2항에 있어서,
상기 허혈성 심혈관 질환은 심근경색 또는 협심증인 조성물.
- [청구항 5] 제2항에 있어서,
상기 허혈성 말초혈관 질환은 말초혈관 협착증 또는 말초혈관 폐색증인 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 허혈성 혈관 질환 치료시술은 혈관중재술, 직접 혈관문합술 또는 간접 혈관문합술인 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 혈관중재술은 풍선도자 확장술 또는 스텐트 삽입술인 조성물.
- [청구항 8] 제6항에 있어서,
상기 간접 혈관문합술은 다발천공 수술인 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 다발천공 수술은 뇌경질막 또는 뇌연질막까지 천공하는 것인 조성물.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 허혈성 혈관 질환 치료시술을 받기 이전에 환자에게 투여되는 것인 조성물.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 급성기 혈관폐색의 상황에서 환자에게 투여되는 것인 조성물.
- [청구항 12] 제2항에 있어서, 상기 조성물은 허혈성 심혈관 질환 또는 허혈성 말초혈관 질환 치료시술 후 허혈-재관류 손상을 감소시키는 것인 조성물.
- [청구항 13] 제2항에 있어서, 상기 조성물은 허혈성 뇌혈관 질환에서 두 개강 내-외 혈관을 연결시키는 치료 수술 후 신생혈관생성을 위해 투여되는 것인 조성물.
- [청구항 14] 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 것인 조성물.

- [청구항 15] 허혈성 혈관 질환 치료기술이 필요한 환자에게 제 1항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 허혈성 혈관 질환을 치료하는 방법.
- [청구항 16] 제 15항에 있어서,
상기 방법은 상기 조성물을 상기 치료기술을 받기 이전에
환자에게 투여하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 17] 제 15항에 있어서,
상기 방법은 상기 조성물을 급성기 혈관폐색의 상황에서 환자에게
투여하는 것을 특징으로 하는 방법.

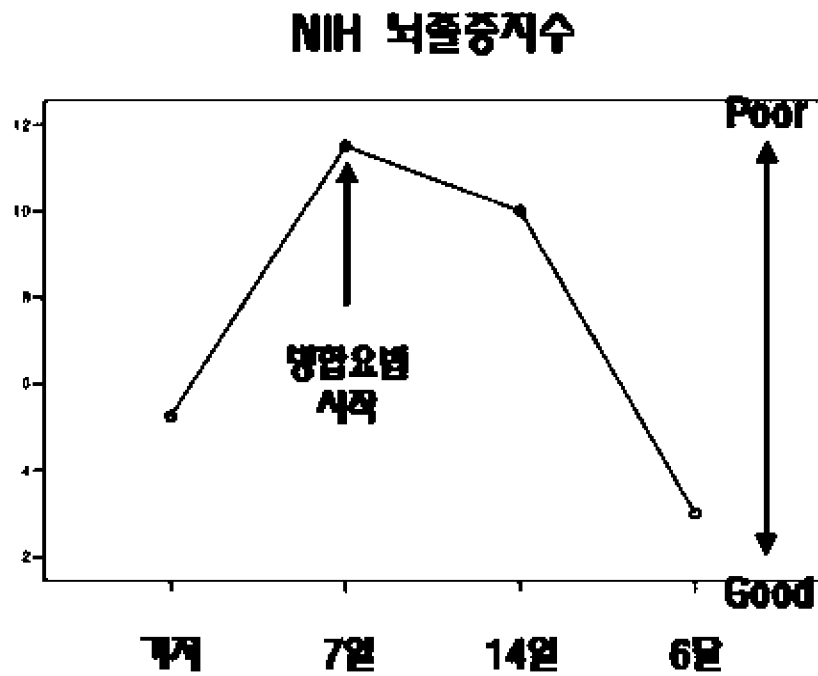
[Fig. 1]



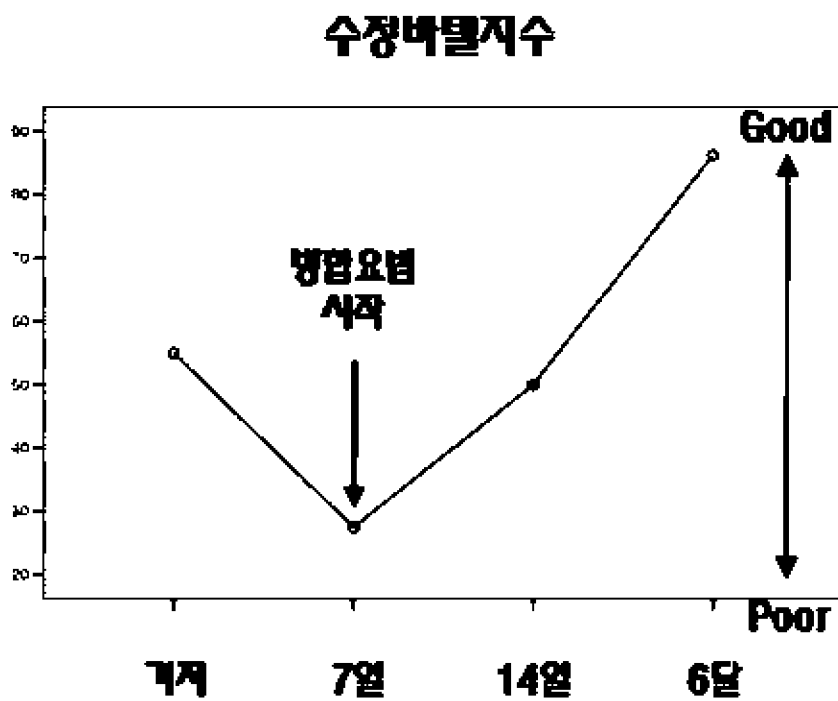
[Fig. 2]



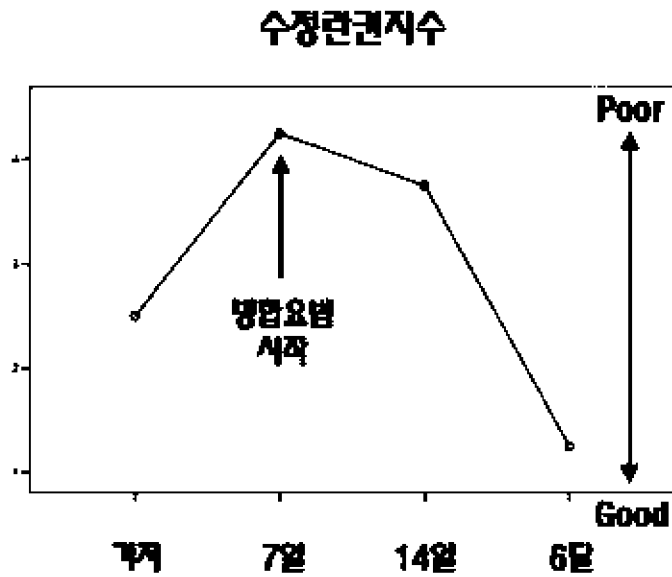
[Fig. 3]



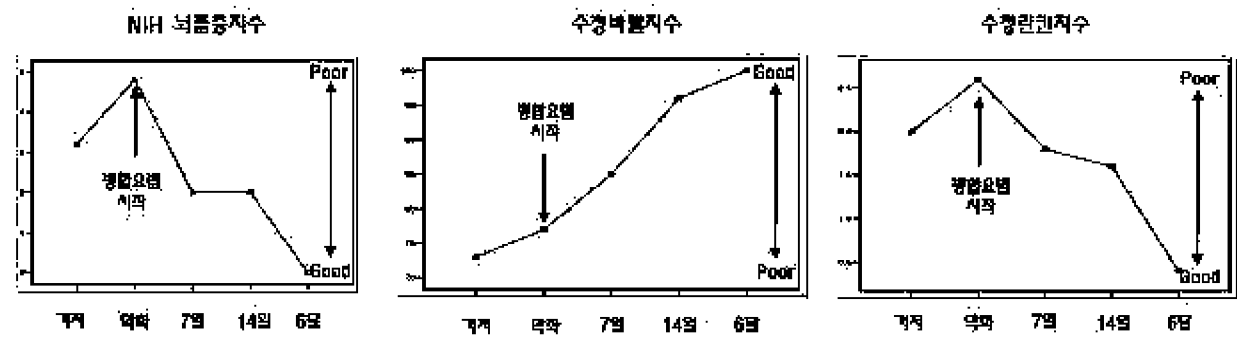
[Fig. 4]



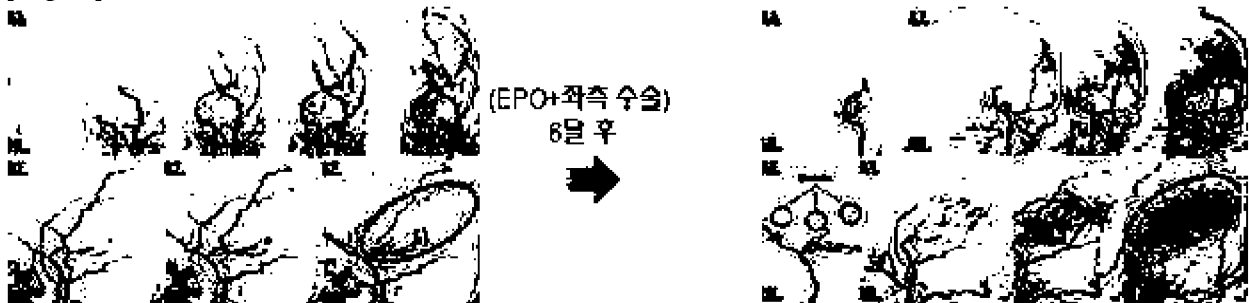
[Fig. 5]



[Fig. 6]



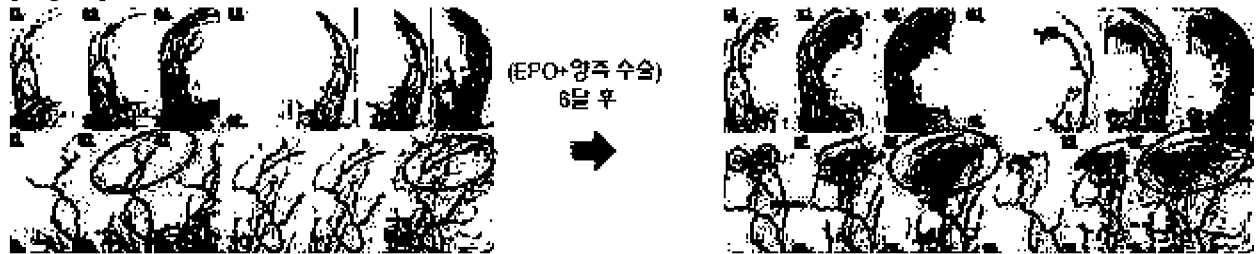
[Fig. 7]



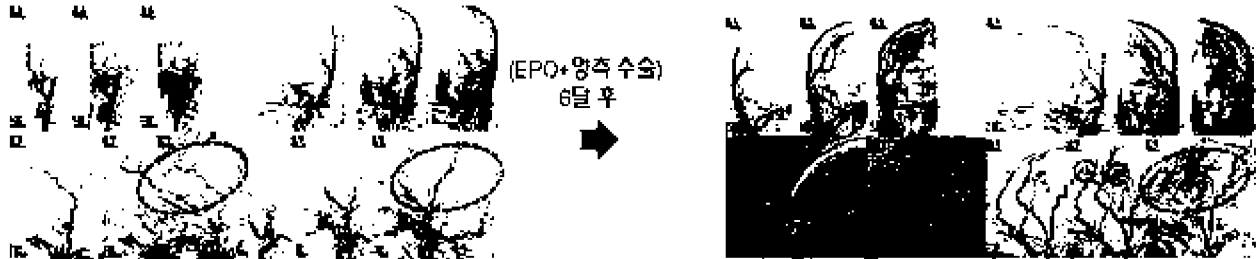
[Fig. 8]



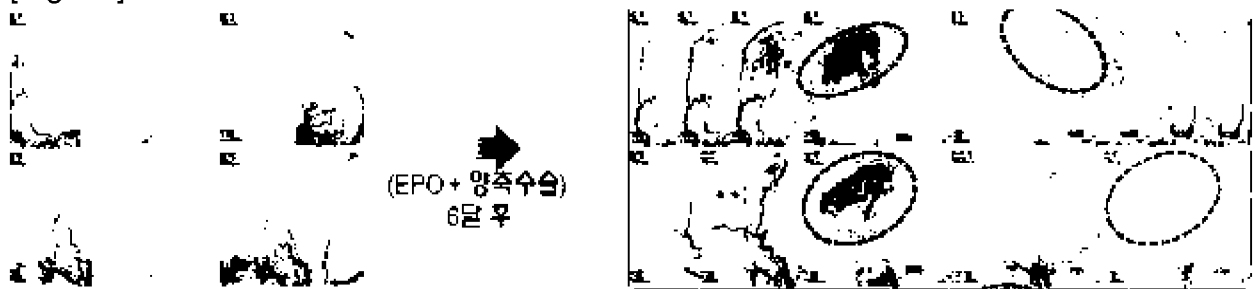
[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]



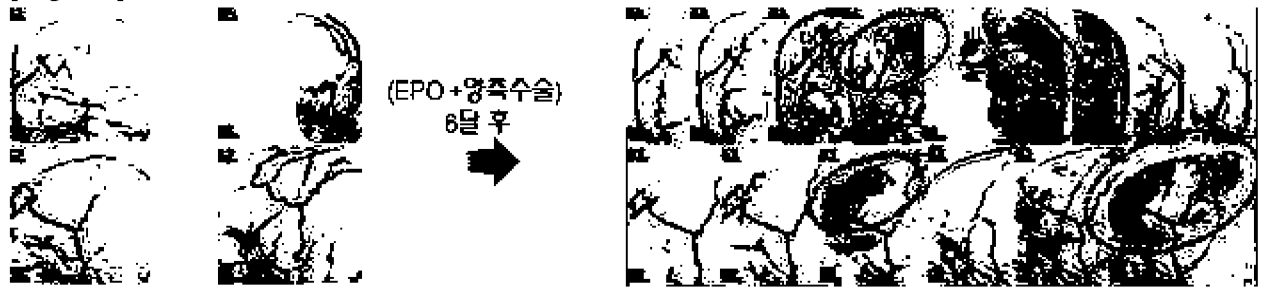
[Fig. 12]



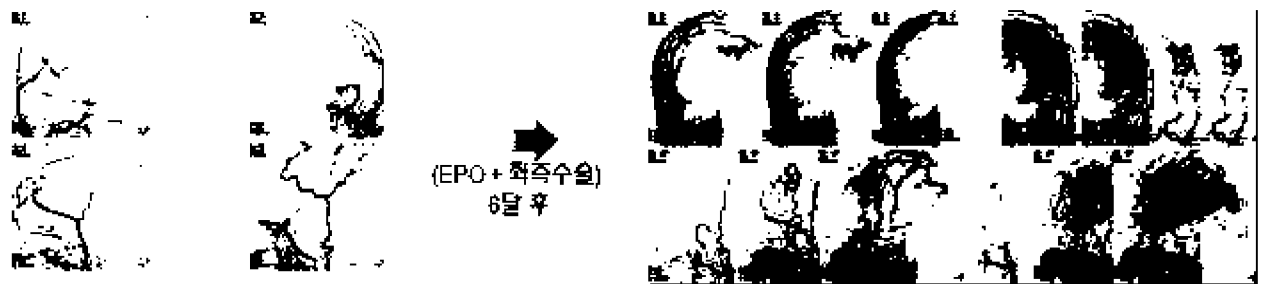
[Fig. 13]



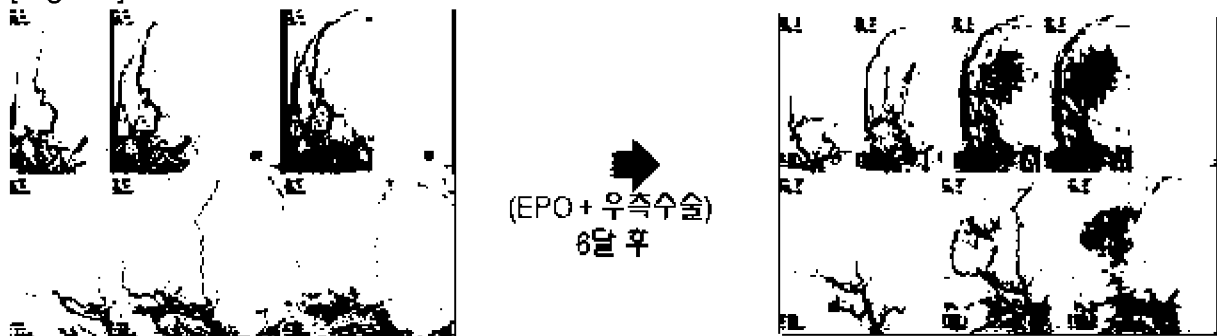
[Fig. 14]



[Fig. 15]



[Fig. 16]



[Fig. 17]

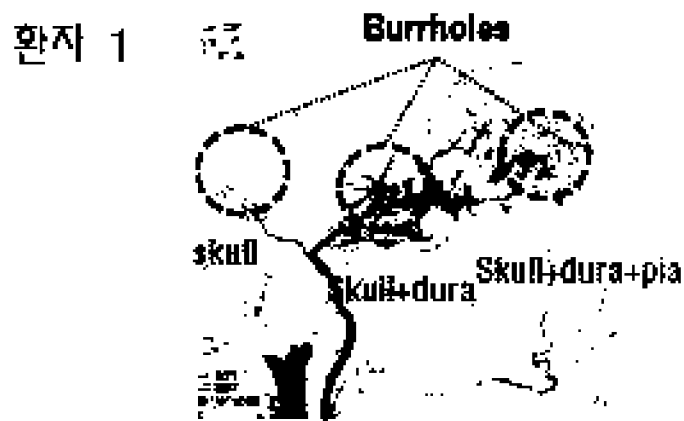
천공수술



수술 1주일 후의 모습



[Fig. 18]



(physical barrier 제거:
신생혈관생성에 필수적 요인)

[Fig. 19]



(병합요법이 동맥경화성 신생혈관생성에도
유효한 방법일 수 있음을 알려주는 중례)

[Fig. 20]

환자 6 F/75



다발성 동맥 폐색 질환에서도 두개 외에서 두개 안으로 혈관 통로 생성 가능 (증례 6과 8)

환자 8 F/72

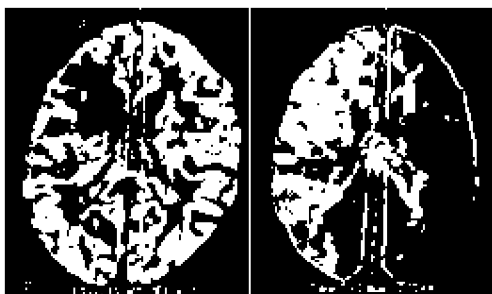


나이가 많고 관류부족이 심하지 않은 환자에서도 효과적인 두개 외부에서 내부로 혈관생성을 이룰 수 있는 방법의 예시 (증례 6과 8)

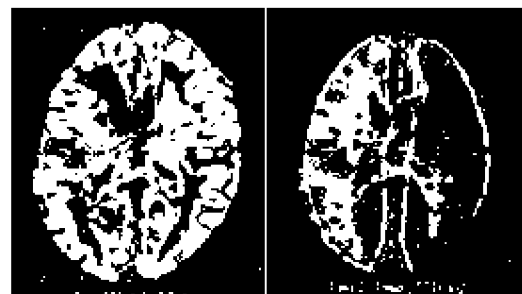
[Fig. 21]

환자 10 F/64

치료전



치료후



[Fig. 22]



[Fig. 23]



[Fig. 24]

