



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0076254
(43) 공개일자 2009년07월13일

(51) Int. Cl.

A61K 38/25 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0002098

(22) 출원일자 2008년01월08일

심사청구일자 2008년01월08일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

박승준

서울시 강남구 대치4동 920-32 동양아파트 402호

윤태영

서울시 중랑구 묵동 태릉 브라운스톤 태릉 아파트 102-1404

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

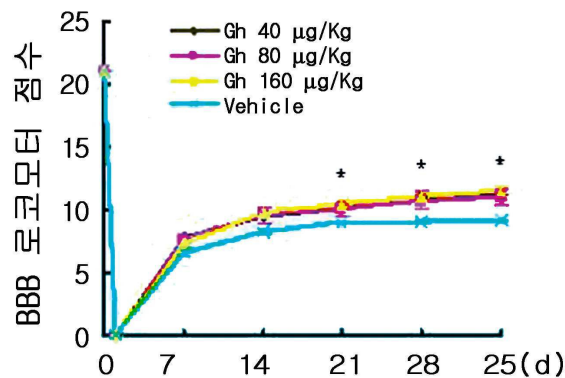
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 그렐린을 함유하는 척수 손상 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 그렐린을 유효성분으로 함유하는 척수 손상 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 척수 신경 외상 후 운동기능 향상 효과, 척수 신경세포사멸 억제효과, 척수 회소돌기아교세포사멸 억제효과, 상처 공간 감소 효과, 축삭 퇴화 억제 효과 및 탈수초화 감소 효과를 나타내는 그렐린을 함유하는 척수 손상 치료용 약학적 조성물을 중추신경계 질환에 걸린 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 상기 환자의 중추신경계 질환의 치료방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 그렐린을 유효성분으로 포함하는 조성물은 척수 손상, 신경세포 및 회소돌기아교세포의 사멸, 축삭 퇴화 및 탈수초현상을 나타내는 중추신경계 질환에 대한 치료제로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

오태환

서울시 중랑구 목동 태릉 브라운스톤 태릉아파트
103-701

이지윤

서울시 노원구 월계동 미릉 아파트 22-912

정현주

서울시 동대문구 제기1동 한신아파트 107동 205호

특허청구의 범위

청구항 1

그렐린을 유효성분으로 함유하는 척수 손상 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 척수 신경 외상 후 운동기능 향상 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 척수 손상 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 척수 신경 외상 후 척수 신경세포사멸 억제효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 척수 손상 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 척수 신경 외상 후 척수 희소돌기아교세포사멸 억제효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 척수 손상 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 척수 신경 외상 후 상처 공간 감소 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 척수 손상 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 척수 신경 외상 후 축삭 퇴화 억제 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 척수 손상 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 척수 신경 외상 후 탈수조화 감소 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 척수 손상 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

그렐린을 유효성분으로 함유하는 중추신경계 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 중추신경계 질환은 외상성 뇌손상(traumatic brain injury), 허혈(ischemia) 및 다발성 경화증(multiple sclerosis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제 1항 또는 제 8항에 있어서, 에스트로젠 또는 미노사이클린을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 척수 손상 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제 1항의 조성물을 척수 손상 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 상기 환자의 척수 손상 치료방법.

청구항 12

제 8항의 조성물을 중추신경계 질환에 걸린 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 상기 환자의 중추신경계 질환의 치료방법.

청구항 13

제 11항 또는 제 12항에 있어서, 에스트로젠 또는 미노사이클린과 복합 투여되는 것을 특징으로 하는 치료방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 그렐린을 유효성분으로 함유하는 척수 손상 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 척수 신경 외상 후 운동기능 향상 효과, 척수 신경세포사멸 억제효과, 척수 회소돌기아교세포사멸 억제효과, 상처 공간 감소 효과, 축삭 퇴화 억제 효과 및 탈수초화 감소 효과를 나타내는 그렐린을 함유하는 척수 손상 치료용 약학적 조성물을 중추신경계 질환에 걸린 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 상기 환자의 중추신경계 질환의 치료방법을 제공하는 것이다.

배경 기술

- <2> 외상 등으로 인해 척수신경이 손상을 받게 되면 인체기능의 마비를 초래한다. 척수 신경 조직은 뇌와 비교할 때 단순한 구조를 가지고 있으나 신경 재생에 매우 어려운 문제를 가지고 있다. 척수 손상 후 일어나는 병리학적 현상은 시간에 따라 일차적 손상과 이차적 손상 크게 두 가지 단계로 나누어진다. 일차적 손상은 손상 직후 수 분 내에 일어나는 현상으로서 주로 상처 부위의 세포가 괴사(necrosis)하는데, 이 시기에는 워낙 빠르게 세포가 파괴되기 때문에 약물학적인 치료로 다루기가 거의 불가능하다. 일차적 손상에 이어 나타나는 이차적 손상은 수 시간에서 수일에 걸쳐 천천히 진행되는데, 상처부위의 세포만 퇴화되는 것이 아니라 주변의 신경세포와 회소돌기아교세포에서 아포토시스에 의하여 서서히 세포사멸이 일어난다. 상기 세포사멸은 상처부위를 중심으로 하여 지속적으로 진행되어 결국 척수 내부의 손상부위가 점차 넓어지게 된다. 더불어 신경 신호의 이동통로인 축삭과 축삭의 기능을 돕는 미엘린 수초의 퇴화가 일어나, 결국에는 구멍과 같은 빈 공간이 형성되어 더 이상의 신경 신호 전달이 이루어질 수 없게 되어 영구적인 기능 소실을 초래한다.
- <3> 지난 십여 년 동안 이러한 척수신경 외상 후 일어나는 병리작용에 대한 원인 규명과 재생에 관한 연구를 통하여 척수 손상으로 인한 영구적 기능 마비를 억제하거나 완화시키려는 연구가 진행되어왔다. 척수 손상의 초기 기전은 워낙 빠르게 일어나 약물학적인 치료로 다루기 어렵기 때문에, 이차적인 기전을 다루는 약물학적 전략이 치료제 개발에 중요한 부분이다. 이와 관련하여 현재까지 스테로이드, 항산화제, 글루타메이트 수용체 억제제, 이온 채널 억제제, 갱글리오시드(ganglioside), 축삭돌기 재생 억제제에 대한 항체, 항염증제, 신경영양인자 등 다양한 가능성 있는 약물학적인 치료들이 시도되어 왔다. 그러나 오직 메틸프레드니솔론만이 척수 손상 후에 유일한 치료제로서 현재 사용되고 있다. 하지만 메틸프레드니솔론은 불분명한 치료 효과와 과량의 투여량으로 인한 부작용 등 많은 문제점을 안고 있다. 따라서 새로운 치료제 개발이 매우 절실한 실정이다.
- <4> 그렐린은 1999년 말의 위장에서 분리된 28개의 아미노산으로 이루어진 펩티드 호르몬으로 성장 호르몬 분비 유도물질 수용체(growth hormone secretagogue receptor, GHS-R)에 작용하며 뇌하수체로부터의 성장호르몬 분비를 항진시키는 내인성의 뇌-소화관 호르몬이다. 그렐린은 주로 위에서 합성 분비되나 다른 조직에서도 적은 양이지만 합성 분비 된다. GHS-R은 뇌하수체 및 시상하부뿐만 아니라 다른 뇌조직에서도 발현됨이 알려져 있는데, 이는 그렐린이 성장 호르몬 분비 외에 다른 작용을 하리라는 것을 시사한다. 최근 그렐린이 성장호르몬 합성 분비 촉진 외에도 음식 섭취의 촉진 및 에너지 대사의 조절, 위산의 분비 및 위 운동 조절, 인슐린 분비의 조절, 수면에 대한 영향, 심혈관계에 대한 작용 등에도 관여한다는 것이 확인되었다. 그러나 그렐린의 척수 손상 치료제로서의 용도는 아직까지 확인된 바가 없다.
- <5> 이에 본 발명자들은 인간 척수손상과 매우 유사한 형태를 재현한 래트 척수 손상 모델을 이용하여 척수 손상 후 그렐린을 투여하였을 때, 외상으로 인해 기능을 잃고 마비된 뒷다리의 운동 능력 회복 여부를 다양한 동물 행동 실험을 통하여 확인하였고, 특히 이차 손상의 주된 현상인 신경세포와 회소돌기아교세포의 사멸에 대한 그렐린의 억제효과를 확인하였다. 또한 실제 운동기능 소실과 밀접한 관계가 있다고 알려진 축삭의 퇴화와 탈수초화 현상에 대한 그렐린의 효과를 검증함으로써 그렐린의 척수 신경 외상에서의 치료 효과를 증명하였고, 그렐린의 척수 손상에 대한 임상 치료제로서의 가능성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<6> 본 발명의 목적은 척수 외상 후 이차적 손실에 의한 신경의 퇴화를 억제하기 위한 치료제를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<7> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 그렐린을 유효성분으로 함유하는 척수 손상 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

<8> 또한, 본 발명은 그렐린을 유효성분으로 함유하는 중추신경계 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

<9> 또한, 본 발명은 상기 척수 손상 치료용 약학적 조성물을 척수 손상 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 상기 환자의 척수 손상 치료방법을 제공한다.

<10> 또한, 본 발명은 상기 중추신경계 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 중추신경계 질환에 걸린 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 상기 환자의 중추신경계 질환의 치료방법을 제공한다.

<11> 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

<12> 본 발명은 그렐린을 유효성분으로 함유하는 척수 손상 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

<13> 본 발명의 구체적인 실시예에서 척수 외상 동물모델에 상기 그렐린을 투여한 군은 비비비 오픈필드 스코어(BBB Open field score; 도 1 참조), 경사면 테스트(Inclined plane test; 도 2 참조), 그리드 워크 테스트(Grid walk test; 도 3 참조) 및 발자국분석(Foot print analysis; 도 4 참조)에서 모두 대조군(생리식염수 투여군)에 비해 운동기능이 향상되는 것을 확인하였다.

<14> 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서 그렐린 투여시 척수 외상 후 이차적 손실로 인해 생성된 조직의 소실에 의한 빈 상처공간의 크기가 감소되는지 확인한 결과, 대조군에 비해 그렐린 투여군의 척수 조직 내 상처공간의 크기가 현저히 줄어 있음을 확인할 수 있었으며(도 5a 참조), 정량적인 측정 결과 대조군에 비하여 그렐린 투여군은 각 농도에서 45, 58 및 49%의 감소 효과를 나타내었다(도 5b 참조). 상기 빈 상처공간은 신경다발의 연결을 완전히 차단하여 영구적인 기능 소실을 초래한다고 알려져 있다.

<15> 상기 신경다발은 축삭이라고 불리고, 뇌의 신호를 신체 각 부위에 전달하는 통로의 역할을 하고 있는데, 외상 등으로 인하여 척수가 손상되면 축삭은 지속적으로 퇴화되는 현상이 나타나 기능 소실을 유도하게 된다. 이에 본 발명의 구체적인 실시예에서 척수 외상 동물모델에 그렐린 투여시 뉴로필라멘트의 수를 몸의 지지와 균형유지를 주로 조절하는 축삭이 모여 있는 배면(ventral)과 걸을 때 다리 근육을 움직이게 조절하고 리듬 있게 다리를 교차하는 데 관여하는 축삭이 주로 분포되어 있는 측면(lateral)에서 세어 수치화 한 결과 상처 부위로부터 머리 또는 꼬리쪽으로 축삭의 퇴화 정도가 현저히 감소됨을 확인하였다(도 6 참조). 또한, 척수 외상 후 척수 내 운동신경 주변에서 운동 조절 역할을 수행하는 세로토닌을 분비하는 축삭 말단이 분포되어 있는 양상에 그렐린이 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군에 비하여 운동신경 주변에 많이 분포함으로써 운동 기능 조절하는 축삭이 더 많이 보호되고 있음을 확인하였다(도 7 참조). 이는 그렐린이 척수 외상 후 축삭의 퇴화를 억제하는 효과를 보여주는 결과이다.

<16> 척수 내에 지나가고 있는 축삭은 지질 성분으로 되어 있는 미엘린 수초라는 막에 의해 싸여 있는데, 미엘린 수초는 축삭 내의 신호전달을 돕고 축삭을 보호하는 역할을 하며 미엘린이 손상을 입으면 축삭의 퇴화를 유도하는 물질을 노출시켜 축삭 퇴화를 더욱 증가시킨다. 또한 미엘린 수초의 감소를 탈수초현상이라고 하는데 이는 운동기능 소실과 밀접하게 연관되어 있다고 알려져 있다. 이에 본 발명의 구체적인 실시예에서 척수 외상 동물모델에 그렐린 투여시 상기 탈수초현상에 억제효과를 나타내는지 확인한 결과, 대조군 조직에 비해 조직의 척수 백질이 더욱 진하게 염색이 되어 그렐린이 척수 외상 후 탈수초현상을 억제하고 있음을 확인하였다(도 8 참조).

<17> 척수 외상 후 세포 사멸은 손상부위에서 시작되어 지속적으로 일어나게 되는데 뉴런과 희소돌기아교세포의 사멸이 기능 마비를 일으키는 중요한 요인으로 알려져 있다. 래트의 경우 척수 외상 후 1일에서는 뉴런의 아포토시스가 현저히 증가하고, 5-7일 사이에는 희소돌기아교세포의 사멸이 주되게 일어난다(Liu XZ *et al.*, *J Neurosci* 17:5395-406, 1997). 그렐린의 신경세포 사멸 억제 효과를 확인한 결과, 뉴런과 희소돌기아교세포의 사멸이 현저하게 감소하였음을 확인하였다(도 9 및 도 10 참조).

<18> 척수 내에서 그렐린은 존재하지 않으나 그렐린 수용체는 발현하였고(도 11 참조), 또한 상기 그렐린 수용체는 뉴런과 희소돌기아교세포에서 발현하였다(도 12 참조).

- <19> 상기와 같이 그렐린은 척수 신경 외상 후 운동기능 향상 효과, 척수 신경세포사멸 억제효과, 척수 회소돌기아교 세포사멸 억제효과, 상처 공간 감소 효과, 축삭 퇴화 억제 효과 및 탈수초화 감소 효과를 나타내어 척수 손상 치료용 약학적 조성물에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 에스트로젠 또는 미노사이클린을 추가로 포함할 수 있다. 에스트로젠과 미노사이클린은 래트 척수 손상 후 뒷다리 운동 기능 회복 및 신경세포사멸 억제 효과를 나타내는 것으로 보고된바 있다(Yune TY *et al.*, *J Neurotrauma* 21(3):293-306, 2004; Lee SM *et al.*, *J Neurotrauma* 20(10):1017-27, 2003). 특히 상기 두 약물은 현재 임상에서도 사용되는 약물로서 매우 안전하고 부작용이 전혀 없는 약물로 알려져 있다. 척수 손상 후 상기 약물들의 효과는 여러 가지 세포 내 신호전달 과정을 통하여 나타나므로(예를 들어 에스트로젠은 척수 손상 후 Akt나 ERK를 매개로 하는 신호전달을 활성화시켜 세포사를 억제하고, 미노사이클린은 p38MAPK를 매개로 하는 신호전달을 억제시켜 세포사를 억제한다.), 각각의 서로 다른 작용 메커니즘을 가지는 약물을 함께 투여할 때에 다양한 신호전달 체계를 조절하여 시너지 효과를 기대할 수 있을 것이다. 이러한 관점에서 볼 때에 그렐린과의 복합적인 치료는 척수 손상 환자에게 더욱 효과적인 치료전략이라 할 수 있을 것이다.
- <20> 본 발명의 척수 손상 치료용 약학적 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 그렐린을 0.1 내지 50 중량%로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 그렐린을 함유하는 조성물은 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적 조성물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 다 약학적 활성 화합물과 결합 뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- <21> 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡셀제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 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, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- <22> 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- <23> 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 액제, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- <24> 그렐린은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- <25> 또한, 본 발명은 그렐린을 유효성분으로 함유하는 중추신경계 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- <26> 상기 중추신경계 질환은 외상성 뇌손상(traumatic brain injury), 허혈(ischemia), 다발성경화증(multiple sclerosis) 및 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또한, 상기 조성물은 에스트로젠 또는 미노사이클린을 추가로 포함할 수 있다.
- <27> 또한, 본 발명은 상기 척수 손상 치료용 약학적 조성물을 척수 손상 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 상기 환자의 척수 손상 치료방법을 제공한다.
- <28> 또한, 본 발명은 상기 중추신경계 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 중추신경계 질환에 걸린 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 상기 환자의 중추신경계 질환의 치료방법을 제공한다.

<29> 상기 조성물들의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 그렐린은 1일 0.0001 내지 1000 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 1000 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 아울러, 상기 조성물들은 에스트로젠 또는 미노사이클린과 복합 투여될 수 있다.

<30> 상기 투여방법은 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 비경구투여 방법이라면 어느 것이나 사용 가능하고, 전신 투여 또는 국소 투여가 가능하나, 전신 투여가 더 바람직하며, 정맥내 투여가 가장 바람직하다.

효 과

<31> 본 발명의 그렐린을 유효성분으로 포함하는 조성물은 척수 손상, 신경세포 및 회소돌기아교세포의 사멸, 축삭 퇴화 및 탈수초현상을 나타내는 중추신경계 질환에 대한 치료제로 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<32> 이하 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명을 한정하는 것은 아니다.

<실시예 1> 척수 외상 동물모델 및 그렐린의 투여

<1-1> 척수 외상 동물 모델

<35> 10 g 무게의 추를 일정 높이에서 떨어뜨려 인간 척수손상과 유사한 외상을 주고, 외상 강도를 컴퓨터에서 수치화 할 수 있게 고안된 NYU impactor(Routes, 사이텍, USA)를 사용한 척수 외상 동물 모델을 수행하였다. 성체 수컷 래트(230-250 g; 샘타코, 한국)를 클로랄하이드레이트(500 mg/kg; Fluka, 일본)를 복강 주입하여 마취한 후에 척수 T8-T10 부분을 노출시켰다. 구체적으로 래트의 등 중앙을 자른 후, 척추를 기준으로 양 옆에 있는 근육들은 제거하였다. 노출시킨 척추에서 흉추 8-9번을 찾아 내부의 척수를 손상시키지 않았고 척추만 위로 절반을 제거함으로써 척수를 노출시켰다. 상기 과정동안 래트는 37℃가 유지되는 패드 위에서 체온을 유지하였다. NYU impactor의 클램프에 상기 래트를 고정시킨 다음, 25 mm 높이에서 10 g의 추를 자유낙하 시켜 척수 T9 부위에 손상을 주었다. 컴퓨터에 나타나는 손상 강도에 대한 데이터를 통하여 정해진 오차 범위 내에 일정한 손상이 가해진 것을 확인한 후 상처부위를 봉합하였다. 상처부위를 포비딘 액으로 소독한 후 2마리씩 우리(cage)에 넣어 사육하였고, 하루 3회 인위적으로 방광을 마사지 하여 배뇨를 도왔다.

<1-2> 그렐린의 투여

<37> 실시예 1-1의 방법으로 척수 외상을 준 래트에게 1 ml 생리식염수에 녹인 그렐린(Peptides international, USA)을 각각 40 µg/kg(체중), 80 µg/kg 및 160 µg/kg으로 복강 주사 하였다. 대조군으로는 그렐린을 포함하지 않는 생리식염수 1 ml를 복강 주사 하였다. 상기 투여는 척수 손상 직후, 손상 후 6시간 및 24시간 후에 동일한 양을 주사하여 총 3회 투여하였다.

<실시예 2> 행동 테스트

<39> 척수 손상 모델에 그렐린 투여 후 운동기능 회복 효과를 네 가지 행동 테스트를 이용하여 확인하였다.

<2-1> 비비비 오픈필드 스코어(BBB Open field score)

<41> BBB 테스트는 운동기능을 조절하는 다양한 신경 다발의 회복정도를 복합적으로 평가할 수 있는 실험 방법으로서, 0부터 21까지 점수를 나누어 뒷다리를 전혀 사용하지 못하는 경우 0점, 정상 래트의 경우 21점을 주어 점수가 높아질수록 운동기능이 향상되었음을 나타내었다.

<42> 척수 외상을 가하기 3일 전부터 하루에 한번, 한 마리당 4분씩 가로 90 cm × 세로 90 cm × 높이 7 cm의 플라스틱 오픈 필드 상자에 래트를 올려놓고 상자 안에서 자유롭게 돌아다니도록 하여 실험 환경에 대한 사전 적응 훈련을 실시하였다. 척수 외상을 준 후 1일부터 일주일에 2회씩 5명의 훈련된 실험자들이 각 래트의 뒷다리 움직임을 관찰하여 BBB 점수를 매겼고, 이들 5명의 BBB 점수의 평균값을 해당 쥐의 최종 BBB점수로 결정하였다. 동물실험에 대한 개인의 편견을 배제하기 위하여 테스트에 임하는 실험자들은 각 래트에 대한 정보를 알지 못하게 하였고, 각 쥐에 대해 4분씩 관찰하여 점수를 내었다.

<43> 그 결과, 척수 외상을 받은 직후 모든 래트는 뒷다리의 움직임이 전혀 없이 앞다리에 의존하여 하반신을 끄는

현상을 나타내는 것을 확인하였다. 척수 외상 후 1주일이 지난 후부터 그렐린을 투여한 래트의 BBB 점수가 생리식염수만 투여한 대조군에 비하여 높게 나타나기 시작하였고, 척수 외상을 준지 35일 지난 후에 BBB 점수를 확인한 결과 대조군 래트의 BBB 점수는 9.22 ± 0.09 로서 가만히 서 있을 때에만 몸무게를 지탱할 뿐, 걸을 때에는 계속 발 등으로 딛는 정도의 회복을 나타내었다. 한편, 그렐린을 투여한 래트의 BBB 점수는 사용한 모든 농도 ($40 \mu\text{g/kg}$, $80 \mu\text{g/kg}$, $160 \mu\text{g/kg}$)에서 각각 11.42 ± 0.24 , 12.10 ± 0.10 , 11.58 ± 0.30 으로 발바닥으로 몸무게를 지탱하여 걸으며 걷는 동안에 대략 50% 빈도로 앞다리와 뒷다리가 리듬 있게 교차하게 되는 회복수준을 보여 대조군과 비교할 때 현저한 운동기능 회복 효과를 나타내었다(도 1).

<44> <2-2> 경사면 테스트(Inclined plane test)

<45> 균형 잡는 능력을 평가할 수 있는 경사면 테스트를 일주일에 한 번씩 4주 동안 시행하였다. 평가의 기준으로는 경사진 판 위에 쥐를 경사면과 수직이 되도록 올려놓은 후 5초 동안 떨어지지 않고 버티는지를 테스트 한 후 각 도를 5도씩 올리면서 최대한 균형을 잡고 견딜 수 있는 각도를 점수로 나타내었으며, 이 테스트는 각 래트가 어느 그룹에 속하는지 알지 못하는 2명의 실험자에 의하여 수행되었다.

<46> 그 결과, 정상 래트의 경우 평균 80도 각도에서도 떨어지지 않고 몸을 지탱할 수 있는 반면, 척수 외상 후 1주일에는 대부분의 래트가 40도 정도의 점수를 나타내었다. 2주가 지나면서부터 그렐린을 투여한 래트는 생리식염수만 투여한 래트에 비하여 경사면에서 몸을 지지하는 능력이 더 높게 나타났으며 4주째에서는 대조군이 55.6 ± 0.8 점에 머무른 것에 비하여 그렐린을 투여한 래트는 세 가지 농도 모두 62점 이상을 보여 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다(도 2).

<47> <2-3> 그리드 워크 테스트(Grid walk test)

<48> 앞다리와 뒷다리가 리듬 있게 교차하는 능력과 정확하게 뒷발을 디딜 수 있는지를 평가하였다. 평가의 기준으로 1 m 길이의 금속 격자 판에 쥐를 통과하게 하여 발이 격자 아래로 떨어지는 빈도를 퍼센트(%)로 나타내었다. 테스트 시작하기 5일 전부터 1 m의 금속 격자에 각 래트당 하루 3회씩 지나가게 함으로서 실험 환경에 적응하게 하였고, 척수 외상 후 5주째에 테스트를 실시하였다. 이때, 금속 격자 판에 래트를 통과시키는데, 중간에 멈추는 것은 무효로 하고 자발적으로 쉬지 않고 끝까지 지나가는 경우만 인정하여 래트 한 마리당 3회 격자를 통과하게 하였다. 쥐의 움직임은 비디오카메라로 녹화하여 각 래트가 어느 그룹에 속하는지 알지 못하는 2명의 실험자가 실험 결과를 분석하였다. 또한, 실험 결과는 래트가 걸은 총 걸음 수에서 격자 아래로 뒷발이 빠진 걸음 수가 차지하는 비율을 퍼센트(%)로 나타내어 그렐린 투여 그룹과 대조군인 생리식염수 투여 그룹의 평균값을 비교하였다.

<49> 그 결과, 도 3에서 보는 바와 같이 생리식염수만 투여한 대조군 래트는 평균 75%의 에러율을 나타내었고, 그렐린 투여군은 세 가지 농도 모두에서 평균 60%의 에러율을 보임으로서 15% 가량의 에러율 감소 효과를 나타내 그렐린 투여한 래트가 더 정확하게 뒷발을 디디고, 리듬감 있게 걷는 능력이 높다는 결과를 얻었다.

<50> <2-4> 발자국분석(Foot print analysis)

<51> 척수 외상 후 래트의 뒷다리 운동 기능 회복정도를 평가하는 또 하나의 기준으로서 5주째에 발자국 분석을 실시하였다. 래트의 앞다리에는 빨간색 잉크를 묻히고, 뒷다리에는 파란색 잉크를 묻혔으며, 하얀 종이가 바닥에 깔린 내부가 어두운 좁은 통로(길이 1 m, 너비 7 cm)로 지나가게 하면서 발자국을 내게 하였다. 만일 래트가 5초 이내 통로를 통과하지 못하거나 중간에 멈추면 그 때의 결과는 분석에서 제외하였으며, 한 동물 당 8번의 테스트를 시행하였다. 앞발과의 조화, 간격, 뒷발의 회전정도 및 뒷발사이의 보폭, 양발 사이의 간격, 발가락의 끌림 등이 뒷다리의 기능을 측정하는 지표로서 사용되었다. 테스트 시작하기 5일 전부터 하루에 3번 씩 통로를 지나가게 함으로써 실험 환경에 적응하게 하였다.

<52> 그 결과, 도 4a에서 나타낸 바와 같이 일반적으로 척수신경 외상 이후, 래트는 뒷다리가 마비되어 뒷발을 바닥에 대며 제대로 걸음을 걷지 못하고, 발을 질질 끌고 다녔다. 손상 이후 5주째에 발자국 분석을 해 보았을 때 생리식염수만 투여한 래트는 서 있는 상태에서 발바닥을 땅에 딛고 몸을 지탱할 수는 있으나 걸을 때에는 다리가 몸을 지탱하지 못하여 발등으로 걷기 때문에 개별적인 발자국이 찍히지 않고 지속적으로 긴 끌림 현상이 나타남을 볼 수 있다. 한편, 그렐린을 투여한 래트는 이 회복 정도가 훨씬 향상되어 약간의 발가락 끌림 현상은 있으나 주로 발바닥으로 걸음을 걸을 수 있을 정도로 회복되어 뒷발의 발자국이 종이에 찍히게 되었으며 발가락의 끌림으로 인해 뒷발 발자국 뒤로 짧게 끌리는 현상이 나타났다. 이러한 뒷발 끌림 정도를 수치화 한 결과 그렐린을 투여한 그룹의 래트에서 끌림현상이 현저히 낮게 나타났다(도 4b).

<53> <실시에 3> 상처공간의 회복 효과

<54> 척수 외상 후 이차적 손실로 인해 생성된 조직의 소실에 의한 빈 공간의 형성은 신경다발의 연결을 완전히 차단하여 영구적인 기능 소실을 초래한다고 알려져 있다. 이에 본 발명자들은 그렐린의 투여로 인해 상기 빈 상처공간의 크기가 감소되는지 알아보기 위하여 외상 후 5주째에 척수 조직 2 cm를 20 μ m 두께의 횡단면 절편으로 잘라서 크레슬 바이올렛 염색을 한 후 상처공간의 크기를 측정하였다. 40배율의 대물렌즈를 이용하여 상기 염색된 사진을 찍었고, 메타모프 이미지 소프트웨어(Universal Imaging Crop., USA)를 이용하여 구멍의 크기를 측정하였다.

<55> 그 결과, 현미경 상에서 관찰한 그렐린 투여한 래트의 척수 조직 내 상처공간의 크기가 생리식염수만 투여한 래트에 비하여 현저히 줄어 있음을 확인할 수 있었으며(도 5a), 정량적인 측정 결과 대조군에 비하여 그렐린은 각 농도에서 45, 58, 49%의 감소 효과를 나타내었다(도 5b).

<56> <실시에 4> 축삭 퇴화 억제 효과

<57> <4-1> 뉴로필라멘트

<58> 그렐린의 척수 외상 후 축삭 퇴화 억제 효과를 확인하기 위하여 척수의 단면을 20 μ m 두께로 잘라 축삭의 주된 구성 물질 중 하나인 뉴로필라멘트를 항-뉴로필라멘트 항체(시그마알드리치코리아, 한국)를 이용하여 면역조직화학 염색법으로 염색하였다. 구체적으로, 척수 조직을 PBS에 5분간 담근 후 0.3% 과산화수소수(Fluka, 일본) 용액에 넣어 조직내 퍼옥시데이제(oxidase)를 비활성화 시킨 후 염소혈청을 처리하여 1 시간 동안 차단 과정을 거쳤다. 이 후 PBS에 항-뉴로필라멘트 항체를 1/1000으로 희석하여 조직에 처리한 후 4℃에서 12시간 이상 두었다. PBS로 조직을 씻어준 후 Vectastain ABC 키트(Vector, USA)를 이용하여 2차 항체를 넣어준 후 DAB(Pierce, USA)과 0.02% 과산화수소수를 1:1로 섞어 넣어줌으로서 발색 시켰다.

<59> 그 결과, 생리식염수만을 투여한 대조군 래트에 비하여 그렐린을 투여한 래트의 척수 조직 내에 축삭이 많이 남아 있음을 확인하였다. 염색 후 배면(ventral)과 측면(lateral)의 뉴로필라멘트의 수를 세어 수치화 한 결과 상처 부위로부터 머리 또는 꼬리쪽으로 축삭의 퇴화 정도가 그렐린으로 인하여 현저히 감소됨을 확인하였다(도 6).

<60> <4-2> 그렐린

<61> 또한 운동 조절 역할을 수행하는 세로토닌을 분비하는 축삭 말단이 척수 외상 후 척수 내 운동신경 주변에 분포되어 있는 양상에 그렐린이 미치는 영향을 항-그렐린 항체(Chemicon international, USA)를 이용한 면역조직화학 염색법을 이용하여 관찰하였다.

<62> 그 결과, 그렐린을 투여한 래트의 척수 조직에 세로토닌을 분비하는 축삭이 대조군에 비하여 운동신경 주변에 많이 분포함으로서 운동 기능 조절하는 축삭이 더 많이 보호되고 있음을 확인하였다(도 7).

<63> <실시에 5> 탈수초현상 감소

<64> 그렐린이 척수 외상 후 일어나는 탈수초현상에 억제효과를 나타내는지 확인하기 위하여 미엘린 수초의 주성분인 인지질을 염색하는 룩솔 페스트 블루(luxol fast blue) 염색을 시행하였다. 구체적으로, 척수 조직을 PBS에 5분간 담근 후 95% 에탄올(대정화금, 한국)에 5분 동안 담갔다. 그 후 95% 에탄올에 녹아있는 0.1% 룩솔 페스트 블루 용액(Sigma, USA)에 조직을 담가 56℃에서 14시간동안 방치한 다음 0.5% 리튬 카보네이트(lithium carbonate; sigma, USA) 용액과 70% 에탄올, 증류수에 순서대로 각각 30초씩 담그는 과정을 5-6회 반복하여 색을 조절한 뒤 95%, 100% 에탄올에 5분씩 담가 탈수한 후 자일렌(Xylene, 대정화금, 한국)에 담근 뒤 커버그라스를 덮었다. 척수 바깥 부분의 백질에 축삭이 존재하기 때문에 정상 조직을 염색한 경우에는 척수 백질이 진한 파란색으로 나타나지만, 외상 후 탈 수초현상으로 인하여 미엘린 수초가 소실되게 되면 등성등성 염색이 되며 흐린 파란색을 띤다.

<65> 그 결과 도 8에서 보는 바와 같이 생리식염수만을 투여한 대조군 조직에 비하여 그렐린을 투여한 조직의 백질이 더욱 진하게 염색이 되어 그렐린이 척수 외상 후 탈수초현상을 억제하고 있었다.

<66> <실시에 6> 신경세포사멸 억제

<67> 래트의 경우 척수 외상 후 1일에서는 뉴런의 아포토시스가 현저히 증가하고, 5-7일 사이에는 회소돌기아교세포의 사멸이 주되게 일어난다. 이에 본 발명자들은 그렐린의 신경세포 사멸 억제 효과를 확인하기 위하여 ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit(Interger, USA)를 이용하여 터넬(TUNEL) 염색을 시행하

였는데, 이 방법은 아포토시스 과정에서 특징적으로 나타나는 염색체가 잘리는 현상이 나타나는데, 이렇게 잘린 염색체 말단에 항체를 붙여 발색시켜 아포토시스로 죽어가는 세포만을 염색할 수 있는 방법이다.

<68> 구체적으로, 척수 조직을 에탄올과 아세트산이 2 : 1 비율로 섞인 용액에 5분 동안 담근 후 PBS로 씻어주었다. 그리고 평형 완충용액(equilibration buffer)에 10초간 둔 후, TdT 효소를 반응효소(reaction buffer)에 1 : 7 비율로 섞어 37℃에서 1시간 반응시켰다. 그 후 키트에서 제공하는 정지 완충용액(stop buffer)으로 반응을 종결한 후 항-Dig-HRP 항체를 붙인 후 DAB로 발색하였다.

<69> 그 결과, 1일과 7일의 척수 조직에서 터널 염색을 시행한 결과 그렐린 투여로 인하여 뉴런과 회소돌기아교세포의 사멸이 현저하게 감소되었음을 확인하였다(도 9). 도 10은 터널 염색 된 세포를 세어 수치화하여 나타낸 결과이다.

<70> <실시예 7> 그렐린 수용체 mRNA 및 단백질의 쥐의 척수내 뉴런과 회소돌기아교세포에서 발현

<71> <7-1> RT-PCR

<72> 래트의 위, 척수 및 뇌하수체로부터 RNeasy mini kit(QIAGEN, USA)를 이용하여 전체 RNA를 추출한 뒤, 전체 RNA 1 µg과 oligo-d(T) 1 µl(Invitrogen, USA, 0.5 µg/µl)에 증류수를 50 µl까지 채운 후, AccuPower RT-premix(Bioneer, 한국)에 넣어 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction) 반응시켰다. 70℃에서 5분, 4℃에서 5분, 42℃에서 60분, 94℃에서 5분, 4℃에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성함으로써 수득하였다. 상기 cDNA를 주형으로 하여, 표 1의 프라이머쌍을 이용하여 그렐린은 60℃, 38 cycles, GHS-R은 61℃, 35 cycles, 액틴은 60℃, 22 cycles의 조건으로 PCR을 수행하였다.

표 1

유전자명	Genebank no.	서열번호	프라이머쌍	염기서열
그렐린	NM_021669	1	정방향	5'-TTG AGC CCA GAG CAC CAG AAA-3'
		2	역방향	5'-AGT TGC AGA GGA GGC AGA AGC T-3'
GHS-R	NM_032075	3	정방향	5'-TTC GCC ATC TGC TTC CCT CTG-3'
		4	역방향	5'-CCA CCA CAG CAA GCA TCT TCA-3'
액틴	NM_031144	5	정방향	5'-ATG GGT CAG AAG GAC TCC TCA G-3'
		6	역방향	5'-AGT GGT ACG ACC AGA GGC ATA C-3'

<74> 그 결과, 척수 조직에서 RT-PCR을 시행한 결과 척수 내에 그렐린은 존재하지 않으나 그렐린 수용체가 발현한다는 것을 확인하였다(도 11).

<75> <7-2> 면역조직화학 염색

<76> 래트의 척수의 단면을 20 µm 두께로 잘라 축삭의 주된 구성 물질 중 하나인 그렐린 수용체를 항-그렐린 수용체 항체(Phoenix Pharmaceuticals, Inc., USA)를 이용하여 실시예 4와 유사한 방법으로 면역조직화학 염색법으로 염색하였다.

<77> 그 결과, 그렐린 수용체가 뉴런과 회소돌기아교세포에서 발현하고 있음을 확인하였다(도 12).

도면의 간단한 설명

<78> 도 1은 비비비 오픈필드 스코어(BBB Open field score) 결과를 나타낸 도이다(*: 0.05% 오차범위).

<79> 도 2는 경사면 테스트(Inclined plane test) 결과를 나타낸 도이다(*: 0.05% 오차범위).

<80> 도 3은 그리드 워크 테스트(Grid walk test) 결과를 나타낸 도이다(*: 0.05% 오차범위).

<81> 도 4는 발자국분석(Foot print analysis) 결과를 나타낸 도이다(*: 0.05% 오차범위, **: 0.01% 오차범위):

<82> a: 현미경 결과; 및,

<83> b: 정량화 결과.

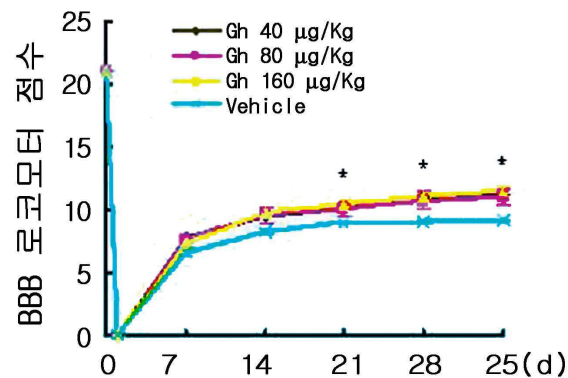
<84> 도 5는 척수 조직 내 상처공간의 크기의 측정 결과를 나타낸 도이다:

<85> a: 현미경 결과; 및,

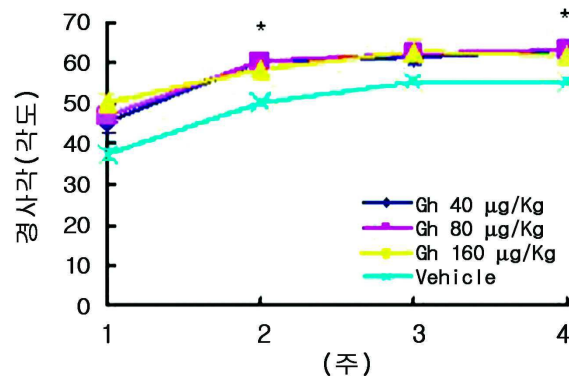
- <86> b: 정량화 결과.
- <87> 도 6은 축삭 퇴화 억제 효과를 뉴로필라멘트에 대해 나타낸 도이다.
- <88> 도 7은 축삭 퇴화 억제 효과를 그렐린에 대해 나타낸 도이다.
- <89> 도 8은 그렐린의 탈수초화현상 억제 효과를 나타낸 도이다.
- <90> 도 9는 신경세포사멸 억제 효과를 나타낸 도이다:
- <91> a: 척수 회백질; 및,
- <92> b: 척수 백질.
- <93> 도 10은 도 9의 결과의 수치화 결과를 나타낸 도이다:
- <94> a: 척수 회백질; 및,
- <95> b: 척수 백질.
- <96> 도 11은 RT-PCR을 통한 척수내 그렐린 수용체 존재 여부의 확인 결과를 나타낸 도이다.
- <97> 도 12는 면역조직화학 염색에 의한 그렐린 수용체 존재 여부의 확인 결과를 나타낸 도이다:
- <98> a: 척수 회백질; 및,
- <99> b: 척수 백질.

도면

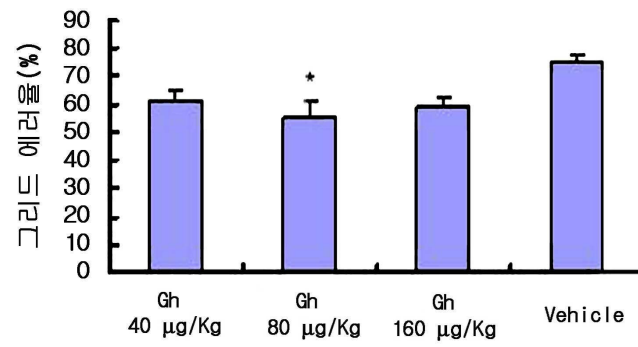
도면1



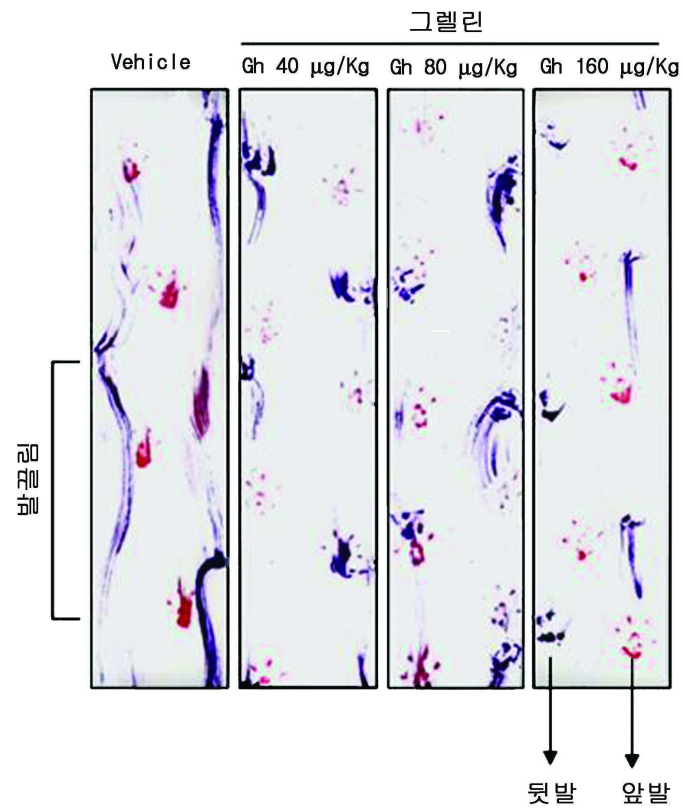
도면2



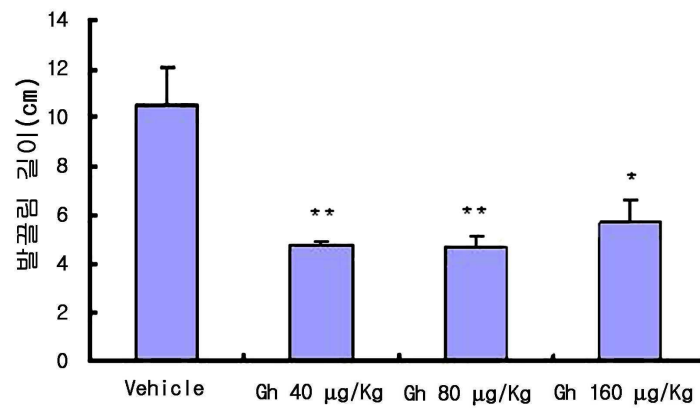
도면3



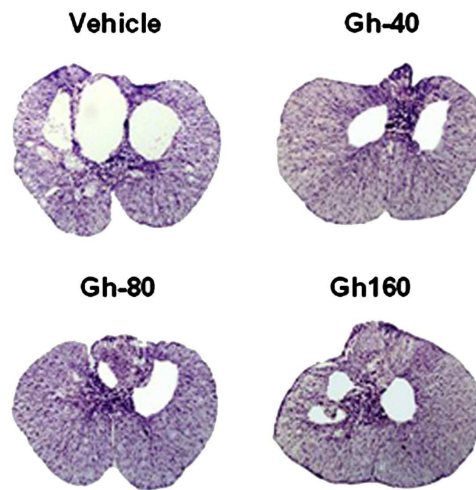
도면4a



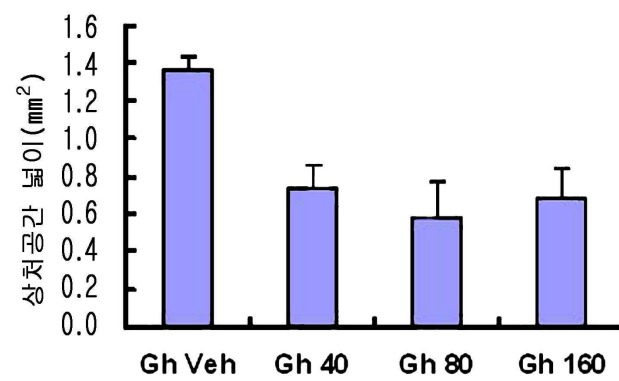
도면4b



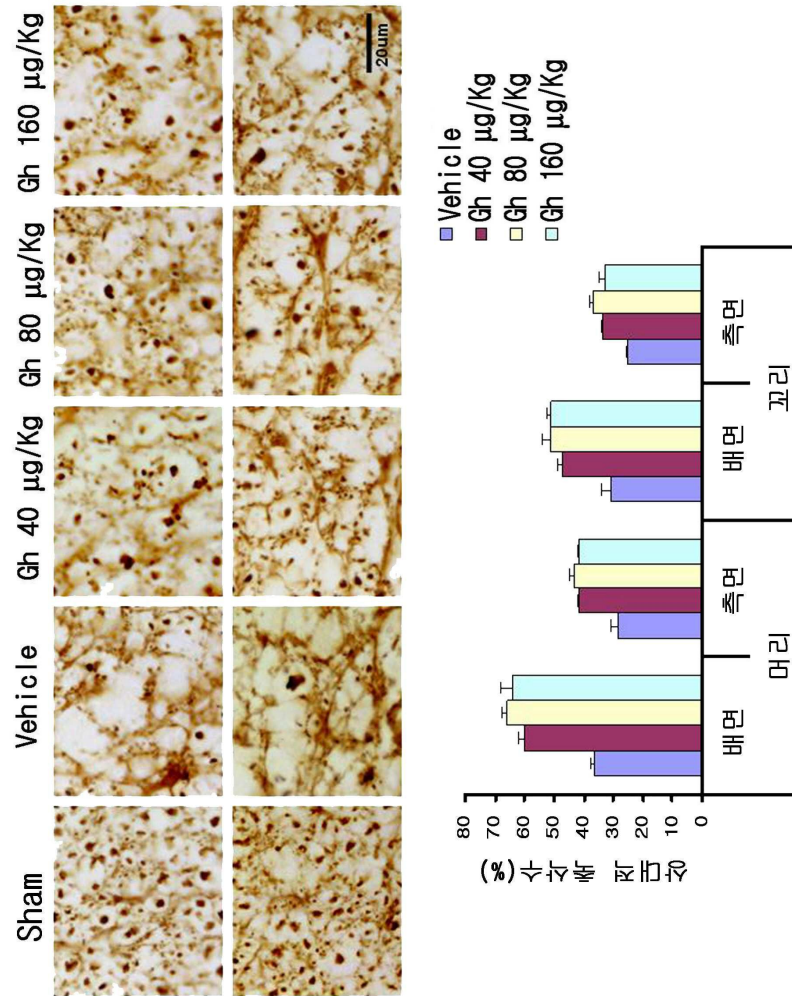
도면5a



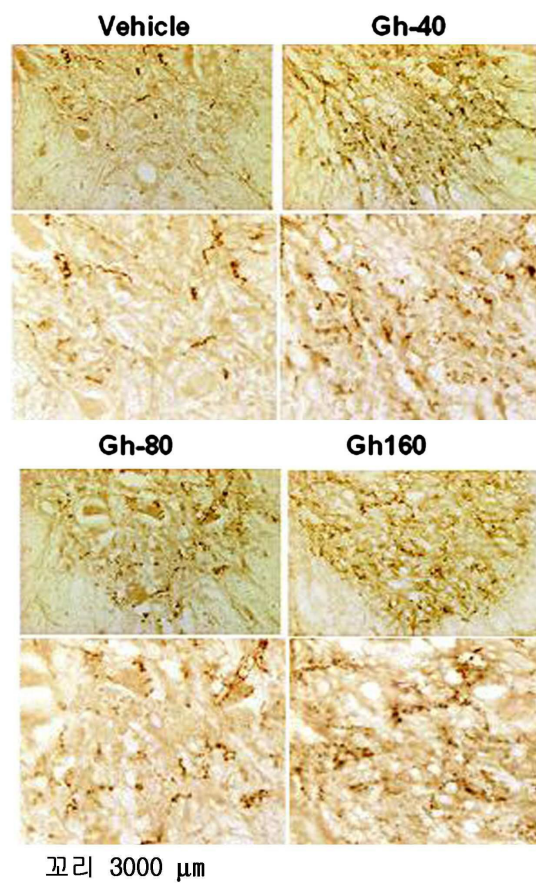
도면5b



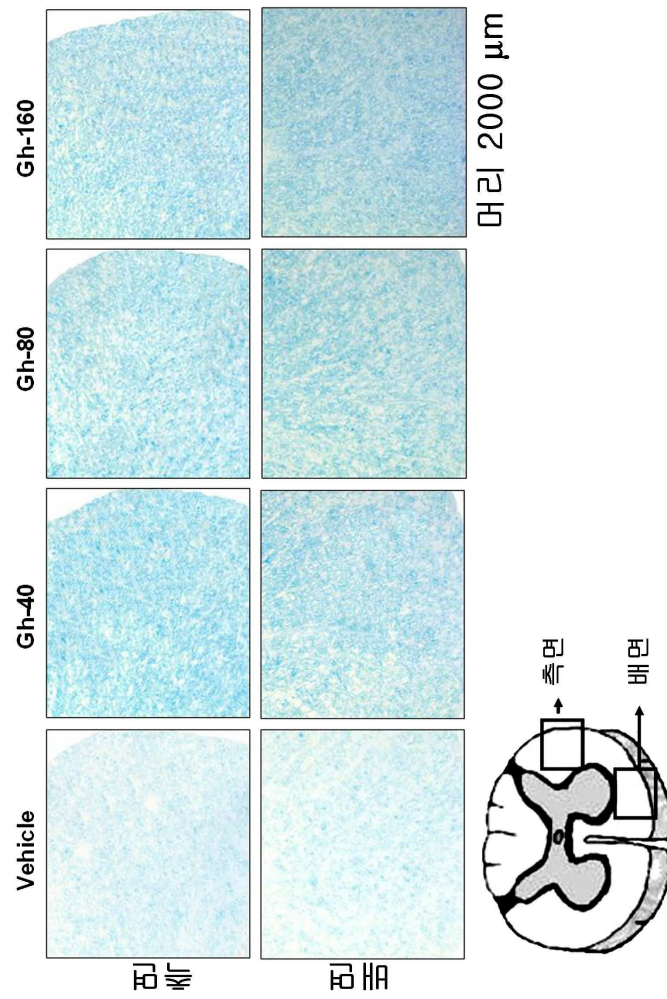
도면6



도면7

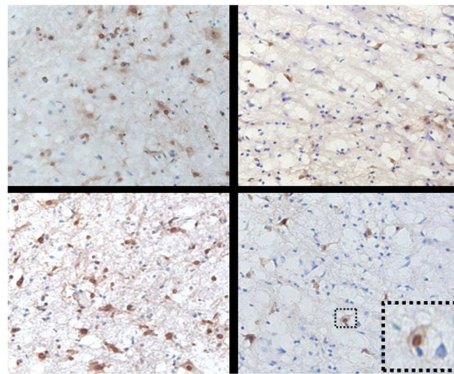


도면8

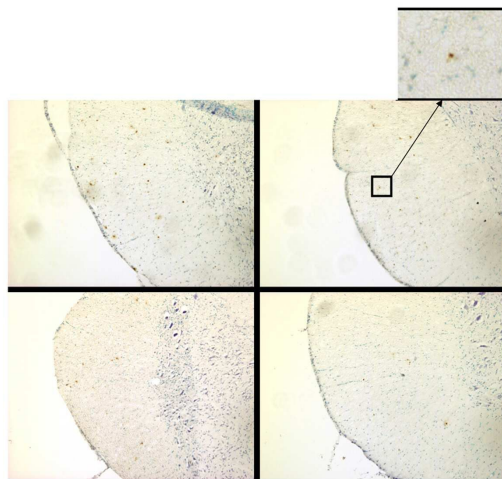


도면9

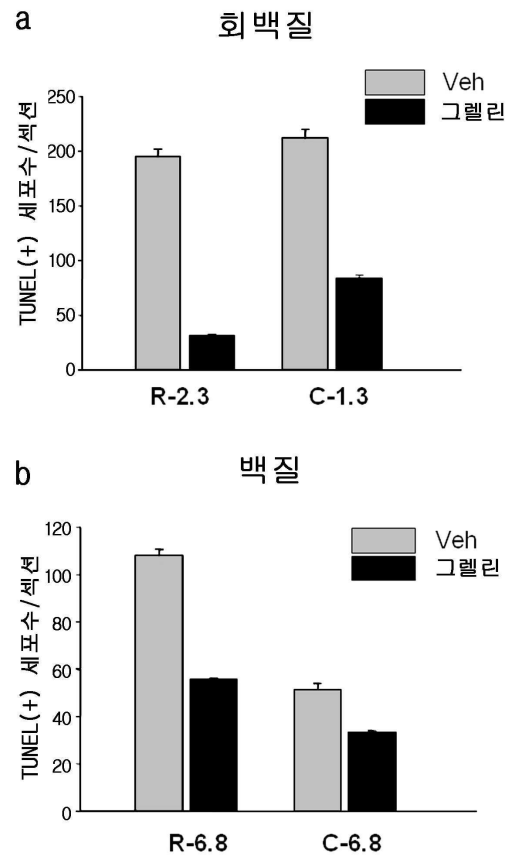
a



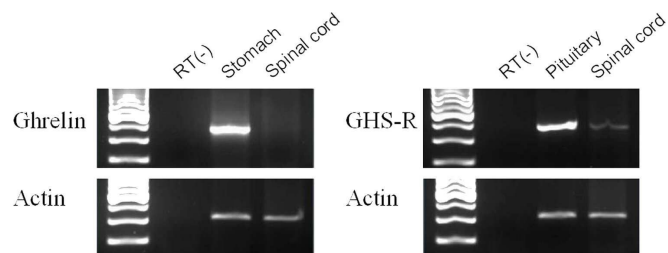
b



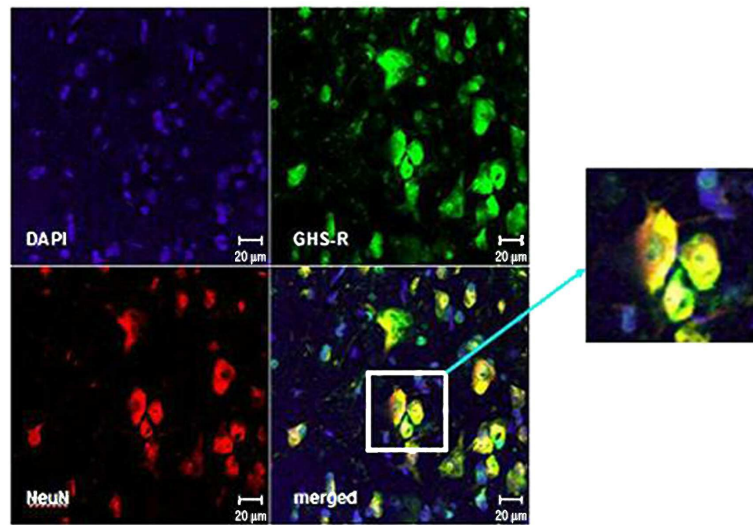
도면10



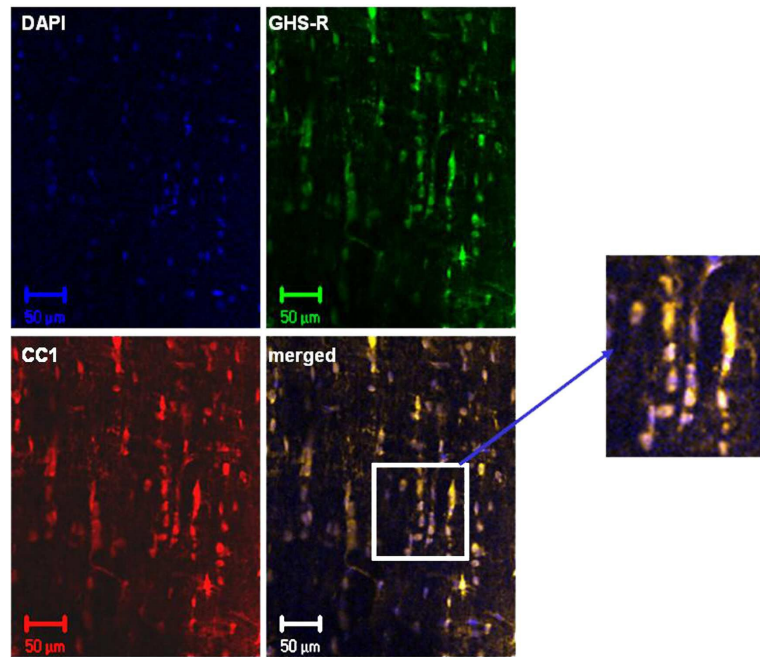
도면11



도면12a



도면12b



서열 목록

- <110> Kyung Hee University
- <120> Pharmaceutical composition comprising the ghrelin for treating injury of spinal cord
- <130> 7p-12-30
- <160> 6

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Ghrelin forward primer

<400> 1

ttgagcccag agcaccagaa a

21

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Ghrelin reverse primer

<400> 2

agttgcagag gaggcagaag ct

22

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GHS-R forward primer

<400> 3

ttcgcatct gcttcctct g

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GHS-R reverse primer

<400> 4

ccaccacagc aagcatcttc a

21

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> actin forward primer

<400> 5

atgggtcaga aggactcctc ag

22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> actin reverse primer

<400> 6

agtggtagca ccagaggcat ac

22