

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0059093 (43) 공개일자 2014년05월15일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 38/19 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0125730 (22) 출원일자 2012년11월07일 심사청구일자 없음	(71) 출원인 연세대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신촌동) (72) 발명자 조성래 서울 서대문구 연세로 50-1, 연세의료원 재활병원 (신촌동) (74) 대리인 양부현	

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **조혈성장인자를 포함하는 뇌질환의 예방 또는 치료용 조성물**

### (57) 요약

본 발명은 유효성분으로써 G-CSF 및 EPO가 0.01 - 0.25 ( $\mu\text{g}:\text{unit}$ )의 비율로 포함된 뇌질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 조성물은 종전에 예측할 수 없었던 월등히 우수한 신경 재생 및 혈관 재생 효과를 가져 효율적인 뇌질환 치료용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 급성 허혈성 뇌졸중에서 보다 뛰어난 신경 및 혈관 재생 효과를 보임으로써, 폐색된 혈관의 혈류를 일시적으로 개선하는 종전의 급성 뇌혈관 질환의 치료방법을 대체하는 근본적인 치료방법으로 응용될 수 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2010-0020408

부처명 교육과학기술부

연구사업명 원천기술개발사업, 바이오·의료기술개발사업, 줄기세포연구사업(줄기세포선도연구팀육성사업)

연구과제명 생체내 신경재생 유도를 통한 허혈성 뇌손상 치료기술의 전 임상 기반구축

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2010.06.01 ~ 2013.05.31

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

에리스로포에틴(EPO) 및 과립구 집락 자극인자(Granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)를 유효성분으로 포함하며, 에리스로포에틴의 함량(unit/kg)에 대한 과립구 집락 자극인자의 함량( $\mu\text{g/kg}$ )의 함량비( $\mu\text{g:unit}$ )가 0.01 - 0.25 인 뇌질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 에리스로포에틴의 함량(unit/kg)에 대한 과립구 집락 자극인자의 함량( $\mu\text{g/kg}$ )의 함량비( $\mu\text{g:unit}$ )는 0.05 - 0.1 인 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 뇌질환은 뇌혈관 질환, 외상성 뇌손상 및 신경퇴행성 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 뇌혈관 질환은 허혈성 또는 출혈성 뇌졸중, 저산소성-허혈성 뇌손상, 저산소성 뇌손상 및 뇌성마비로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 뇌혈관 질환은 허혈성 뇌졸중 또는 저산소성-허혈성 뇌손상인 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 6

제 3 항에 있어서, 상기 신경 퇴행성 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 크루츠펔트-제이야콥병, 픽병, 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 파킨스-ALS-치매 복합증, 다발성 경화증 및 간질로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 HIF-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ )의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 뇌질환은 급성 허혈성 뇌졸중 또는 급성 저산소성-허혈성 뇌손상인 것을 특징으로 하는 조성물.

## 명세서

## 기술 분야

[0001] 본 발명은 에리스로포에틴(EPO) 및 과립구 집락 자극인자(Granulocyte colony- stimulating factor, G-CSF)를 일정 비율로 포함하는 뇌질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0002] 에리스로포에틴(EPO)과 과립구 집락 자극인자(Granulocyte colony- stimulating factor, G-CSF)는 적혈구 전구체 세포의 증식, 분화, 산소 농도에 따른 골수 내에서의 생존을 조절한다. 또한, EPO는 여러가지 신경학적 질병에서 유망한 후보물질이다. 특히 허혈성 모델에서 EPO는 신경보호적인 작용 뿐만 아니라 신경재생과 혈관생성을 촉진하며 혈액 뇌 장벽의 채구축에 관여한다고 보고 되었다(Siren AL et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98(7):4044-9, Leist M et al. Science 2004;305(5681):239-42, Villa P et al. J Cereb Blood Flow Metab 2007;27(3):552-63, Belayev L et al. Stroke 2005;36(5):1071-6, Villa P et al. J Exp Med 2003;198(6):971-5, Wang L et al. Stroke 2004;35(7):1732-7, Wang Y et al. Br J Pharmacol 2007;151(8):1377-84, Yu YP et al. Neurosci Lett 2005;387(1):5-10, Chang YS et al. Pediatr Res 2005;58(1):106-11, Ehrenreich H et al. Metab Brain Dis 2004;19(3-4):195-206, Gonzalez FF et al. Dev Neurosci 2007;29(4-5):321-30, Kumral A et al. Behav Brain Res 2004;153(1):77-86, Spandou E et al. Brain Res 2005;1045(1-2):22-30). G-CSF는 조혈세포의 분화, 증식, 생존에 관여하는 요인 중 하나로 알려져 있다. 또한 G-CSF는 뇌졸중 동물모델에서 여러 가지 긍정적인 효과를 보여준다. 특히 뇌졸중 후 심지어 지연된 시기에 치료를 시작하였을 때도 기능적 회복이 증가되는 것이 보고된 바 있다(Toth ZE et al. Blood 2008;111(12):5544-52, Beck H et al. J Cereb Blood Flow Metab 2003;23(6):709-17, Six I et al. Eur J Pharmacol 2003;458(3):327-8, Schneider A et al. BMC Biol 2006;4:36). 최근 논문에서 G-CSF는 저산소 유도인자(Hypoxia-inducible factor 1 alpha, HIF-1 $\alpha$ )를 세포질에서 핵 안으로 전좌시켜 EPO나 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)의 발현을 유도한다고 보고되었다(Signore AP et al. J Neurochem 2006;96(2):428- 43). 따라서 EPO와 G-CSF의 각각 뇌신경계 질환에서 기능회복을 위한 치료 조성물로서의 가능성을 인정받고 있다. 그러나 이들 두 성분의 각각의 약리활성이 연구되고 있음에도 불구하고 이들이 병합투여에 의한 효과는 연구된 바가 없다. 보다 구체적으로, 이들이 뇌신경계 질환에 대해 함께 사용되었을 때 각 성분이 가지는 효과가 단순히 산술적으로 합산된 효과가 도출될지, 하강효과(negative effect)가 도출될지, 혹은 상승효과(synergic effect)가 도출될지는 복잡한 생물학적 기작으로 인해 예측하기가 매우 어렵우며, 아울러 상승효과를 발휘하는 경우 이러한 효과를 최대화하기 위한 구체적인 함량비 등에 대한 연구는 이제까지 없었다.

[0003] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0004] 본 발명자들은 허혈성 또는 출혈성 뇌졸중, 저산소성-허혈성 뇌손상, 저산소성 뇌손상, 뇌성마비와 같은 뇌혈관 질환, 외상성 뇌손상 및 신경퇴행성 질환을 비롯한 다양한 뇌질환에 대한 효율적인 치료제 조성물을 발굴하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, G-CSF 및 EPO를 0.01 - 0.25 ( $\mu$ g:unit)의 비율로 조합할 경우 뇌신경 및 뇌혈관의 재생이 매우 효율적으로 달성된다는 사실을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0005] 따라서 본 발명의 목적은 조혈성장인자를 포함하는 뇌질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0006] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

### 과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 에리스로포에틴(EPO) 및 과립구 집락 자극인자(Granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)를 유효성분으로 포함하며, 에리스로포에틴의 함량(unit/kg)에 대한 과립구 집락 자극인자의 함량( $\mu\text{g/kg}$ )의 함량비( $\mu\text{g:unit}$ )가 0.01 - 0.25 인 뇌질환의 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0008] 본 발명자들은 뇌혈관 질환, 외상성 뇌손상 및 신경퇴행성 질환을 비롯한 다양한 뇌질환에 대한 효율적인 치료제 조성물을 발굴하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, G-CSF 및 EPO를 0.01 - 0.25 ( $\mu\text{g:unit}$ )의 비율로 조합할 경우 내재성(endogenous) 뇌신경 및 뇌혈관의 재생이 매우 효율적으로 달성된다는 사실을 발견하였다.
- [0009] EPO는 신경조직을 보호하고 재생하는 기능을 하며, G-CSF는 조혈세포의 분화, 증식 및 생존에 관여하므로, 각 성분이 단독으로 사용된 경우에도 뇌질환에 대해 긍정적인 효과를 발휘한다. 그러나, 본 발명에 따르면, EPO 및 G-CSF가 병용투여된 경우 종전에 예측할 수 없었던 월등히 우수한 신경 재생 및 혈관 재생 효과가 발휘됨으로써 뇌손상 개체에서 비약적인 행동 개선 및 인지기능 향상을 야기한다는 사실을 관찰하였다.
- [0010] 본 명세서에서 용어 “뇌질환”은 뇌혈관 또는 뇌신경의 손상에 의해 뇌조직의 기능이 가역적 또는 비가역적으로 저하 또는 소실되는 병적상태(pathologic condition)를 의미한다. 바람직하게는, 본 발명의 조성물로 치료되는 뇌질환은 뇌혈관 질환, 외상성 뇌손상 및 신경퇴행성 질환으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0011] 본 발명의 보다 바람직한 구현 예에 따르면, 본 발명의 조성물로 치료되는 뇌혈관 질환은 허혈성 또는 출혈성 뇌졸중, 저산소성-허혈성 뇌손상, 저산소성 뇌손상 및 뇌성마비로 구성된 군으로부터 선택된다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 조성물로 치료되는 뇌혈관 질환은 허혈성 뇌졸중 또는 저산소성-허혈성 뇌손상이다.
- [0012] 본 발명의 보다 바람직한 구현 예에 따르면, 본 발명의 조성물로 치료되는 신경 퇴행성 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 크루즈펠트-제이아콕병, 픽병, 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 파킨스-ALS-치매 복합증, 다발성 경화증 및 간질로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0013] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 에리스로포에틴의 함량(unit/kg)에 대한 과립구 집락 자극인자의 함량( $\mu\text{g/kg}$ )의 함량비( $\mu\text{g:unit}$ )는 0.05 - 0.1이다.
- [0014] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0015] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 예컨대 0.001-100 mg/kg이다.
- [0017] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 세포질(cytosol)과 핵(nucleus) 안에서 HIF-1 $\alpha$

(hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ )의 발현을 증가시킨다.

- [0019] 본 발명에 따르면, 본 발명의 화합물은 저산소 상태에서 유도되어 혈관의 신생을 촉발하는 저산소 유도인자 HIF-1 $\alpha$ 의 발현을 효율적으로 촉진하여 뇌조직에 대한 혈류량 및 산소 공급을 개선시킨다. 본 명세서에서 용어 “발현의 증가”는 대상 물질의 생체 내 발현량 또는 생물학적 활성을 대조군에 비하여 유의한 수준으로 증가시키는 것을 의미한다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 치료되는 뇌질환은 급성 허혈성 뇌졸중(acute ischemic stroke) 또는 급성 저산소성-허혈성 뇌손상(acute hypoxic-ischemic brain injury)이다.
- [0021] 본 명세서에서 용어 “급성 허혈성 뇌졸중” 또는 “급성 저산소성-허혈성 뇌손상”은 뇌조직에 혈액을 공급하는 뇌혈관의 협소·폐색 등의 허혈 또는 저산소증 유발 요인이 발생한 후 1주일 이내 경과한 상태의 뇌혈관 질환을 의미한다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 허혈성 또는 저산소성-허혈성 뇌 손상 후 1-5일의 뇌조직에서 신경재생을 크게 증가시키며, HIF-1 $\alpha$ 의 발현을 비약적으로 증가시킨다. 뇌졸중은 다른 신경질환과 마찬가지로 조직의 손상 요인이 발생한 후 최대한 시간이 경과하기 전 치료를 개시하여야 효과를 거둘 수 있으나, 이는 단순히 조직의 비가역적 손상 부위가 시간에 따라 증가하기 때문에 신속히 치료된 경우에 치료가 완료된 후의 보존된 부위의 비율이 높기 때문이다. 그러나 본 발명자들은 허혈성 및 저산소성-허혈성 손상이 가해진 후 1-5일 이내의 시점에 본 발명의 조성물을 투여한 경우 혈관세포 마커인 PECAM,  $\alpha$ -SMA 및 신경세포 마커인 PSA-NCAM,  $\beta$  III tubulin 등이 크게 증가하고 HIF-1 $\alpha$ 의 발현 역시 비약적으로 증가한다는 사실을 발견하였다. 이는 비가역적 손상이 덜 진행되었다는 사실과 무관하게 신경 및 혈관의 재생 자체도 손상 후 5일 이내에 가장 활발하게 일어남을 보여주는 것이다. 따라서, 종래에는 급성 허혈성 뇌졸중에 있어 주로 정맥 및 동맥내 혈전 용해제를 이용하여 일시적으로 혈류를 개선하는 임시방편적이고 피상적인 치료에 집중하였으나, 본 발명의 조성물은 급성 허혈성 뇌졸중 또는 저산소성-허혈성 뇌손상에 대한 새롭고 근본적인 치료 조성물로서 유용하게 이용될 수 있다.

### 발명의 효과

- [0022] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0023] (a) 본 발명은 유효성분으로써 G-CSF 및 EPO가 0.01 - 0.25 ( $\mu$ g:unit)의 비율로 포함된 뇌질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0024] (b) 본 발명의 조성물은 종전에 예측할 수 없었던 월등히 우수한 신경 재생 및 혈관 재생 효과를 가져 효율적인 뇌질환 치료용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.
- [0025] (c) 본 발명의 조성물은 급성 허혈성 뇌졸중 및 저산소성-허혈성 뇌손상에서 보다 뛰어난 신경 및 혈관 재생 효과를 보임으로써, 폐색된 혈관의 혈류를 일시적으로 개선하는 종전의 급성 허혈 질환의 치료방법을 대체 보완하는 근본적인 치료방법으로 응용될 수 있다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

### [0027] 실시예

- [0028] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.