



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0018343
(43) 공개일자 2018년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/427 (2006.01) A61K 31/404 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/427 (2013.01)
A61K 31/404 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0098417
(22) 출원일자 2017년08월03일
심사청구일자 2017년08월03일
(30) 우선권주장
1020160101093 2016년08월09일 대한민국(KR)

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
김양희
서울특별시 광진구 아차산로 262. A동 3006호 (자양동, 더샵스타시티)
박황서
서울특별시 광진구 아차산로69길 19, 901동 502호 (광장동, 현대아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
한윤호

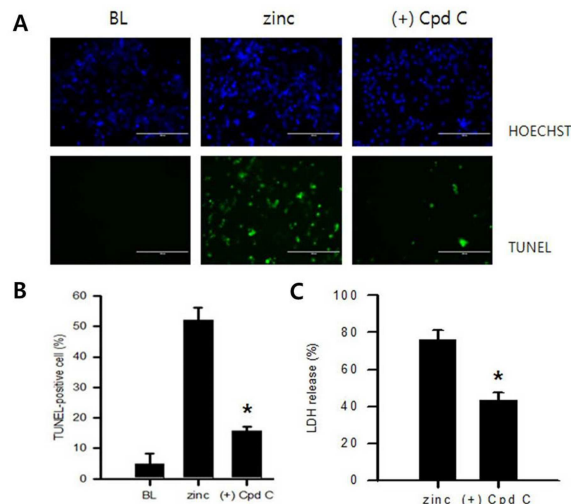
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 AMPK 억제기능에 기반한 뇌졸중 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 뇌졸중의 주요 원인인 아연신경독성의 AMPK 활성을 억제하는 새로운 화합물을 처리하여 뇌졸중 치료하는 새로운 뇌졸중 치료용 조성물을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

고재영

서울특별시 강남구 광평로51길 22, 101동 1206호
(수서동, 한아름아파트)

엄재원

경기도 구리시 장자대로37번길 55, 107동 1702호
(교문동, 덕현아파트)

김태윤

서울특별시 광진구 광나루로30나길 22, 302호 (구
의동, 현대하이츠빌라)

서보라

서울특별시 송파구 토성로17길 8, 303호 (풍납동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C0527

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발사업

연구과제명 선도물질 작용기전 규명 및 세포수준의 최적화 후보물질 개발

기 여 율 1/1

주관기관 세종대학교 산학협력단

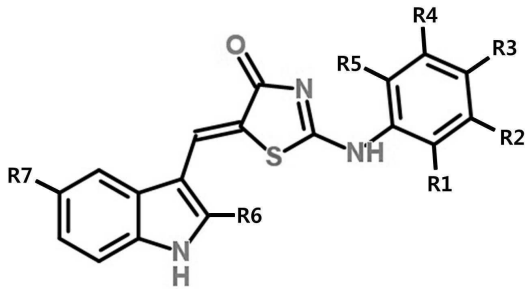
연구기간 2015.09.07 ~ 2018.09.06

명세서

청구범위

청구항 1

하기 구조식을 갖는 화합물을 유효성분으로 함유하는, 뇌졸중 치료용 약학적 조성물:



(상기 식에서 R₁ 내지 R₅는 각각 독립적으로 수소, 히드록시기, 할로젠, 탄소수 1 내지 7의 치환되거나 치환되지 않은 알킬기, 탄소수 1 내지 7의 치환되거나 치환되지 않은 알콕시기, 아민기, 카르복실기이거나 R₂ 및 R₃는 함께 -O-(CH₂)_n-O- 고리 또는 치환 또는 비치환된 벤젠고리를 형성하며(n은 1 내지 3의 정수), R₆는 수소 또는 메틸기이고, R₇은 수소 또는 할로젠이다)

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 치환된 알킬기는 트리플루오로메틸기인, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 할로젠은 요오드, 브롬 또는 염소인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 화합물은 (5Z)-5-(1H-Indol-3-ylmethylene)-2-[[2-(trifluoromethyl) phenyl]amino]-1,3-thiazol-4(5H)-one, (5Z)-5-(1H-Indol-3-ylmethylene)-2-[[3-(trifluoromethyl)phenyl]amino]-1,3-thiazol-4(5H)-one, (5Z)-2-[[3-(Bromophenyl)amino]-5-(1H-indol-3-ylmethylene)-1,3-thiazol-4(5H)-one, (5Z)-5-(1H-Indol-3-ylmethylene)-2-[[4-methylphenyl]amino]-1,3-thiazol-4(5H)-one, (5Z)-5-(1H-Indol-3-ylmethylene)-2-[[3-methylphenyl]amino]-1,3-thiazol-4(5H)-one, (5Z)-2-Anilino-5-(1H-indol-3-ylmethylene)-1,3-thiazol-4(5H)-one, no]-1,3-thiazol-4(5H)-one, (5E)-5-[(2-Methyl-1H-indol-3-yl)methylene]-2-[[4-methylphenyl]amino]-1,3-thiazol-4(5H)-one, 3-[[[(5Z)-5-(1H-Indol-3-ylmethylene)-4-oxo-4,5-dihydro-1,3-thiazol-2-yl]amino}benzoic acid, 2-[[[(5E)-5-(1H-Indol-3-ylmethylene)-4-oxo-4,5-dihydro-1,3-thiazol-2-yl]amino}benzoic acid, (5Z)-2-[[2-(Chlorophenyl)amino]-5-[(2-methyl-1H-indol-3-yl)methylene]-1,3-thiazol-4(5H)-one, 또는 2-Hydroxy-5-[[[(5Z)-5-(1H-indol-3-ylmethylene)-4-oxo-4,5-dihydro-1,3-thiazol-2-yl]amino}benzoic acid인, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 뇌졸중은 출혈성(hemorrhagic) 뇌졸중, 허혈성(ischemic) 뇌졸중 또는 금속 독성(metal toxicity) 뇌졸중

인, 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 금속은 납(lead), 수은(mercury), 망간(manganese), 비소(arsenic), 탈륨(thallium), 철(iron), 아연(zinc), 카드뮴(cadmium), 비스무스(bismuth) 또는 주석(tin)인, 약학적 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 허혈성 뇌졸중은 흥분성 신경세포사 또는 산화성 신경세포사에 의해 유발되는 것인, 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 뇌졸중 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 더 상세하게는 AMPK 억제기능에 기반한 새로운 뇌졸중 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뇌졸중(腦卒中, stroke)은 뇌혈류 이상으로 인해 갑작스레 유발된 국소적인 신경학적 증상을 통칭하는 말이다. 뇌는 몸 전체에서 무게로는 체중의 2%만 차지하지만, 뇌로 가는 혈류량은 심박출량의 15%, 산소 소모량은 몸 전체 산소 소모량의 20%나 된다. 게다가 뇌는 에너지원으로 포도당만을 사용하므로 에너지 공급이 잠시만 중단되어도 쉽게 괴사가 일어난다. 따라서 뇌혈류의 이상은 뇌손상과 밀접한 관련이 있다. 뇌졸중에 의한 뇌손상은 흥분독성(excitotoxicity), 산화성손상(oxidative stress), 아포토시스(apoptosis) 및 아연독성(zinc neurotoxicity) 등의 다양한 독성기전을 포함하고 있어 뇌손상을 막기 위해서는 다양한 신경독성에 모두 효과적인 약물의 발굴이 필요하다.

[0003] 현재, 뇌졸중 치료를 위한 많은 연구가 진행되었으나 아직까지 뚜렷한 치료제 개발이 되고 있지 않다. 뇌허혈-재관류 손상은 여러 가지 복잡한 신경세포사 기전에 입각한 약물 개발 및 효과 평가를 위해 시험관내 모델이나 동물 모델과 같은 객관적인 평가 시스템이 필요하나 약물치료에 다른 생체 징후의 변화나 부작용을 평가할 수 있는 방법이 전 임상 연구에서는 매우 제한적이어서 임상 시험 시 부작용으로 인한 실패를 초래할 가능성이 높다. 특히 NMDA 길항제(antagonist)를 중심으로 많은 임상연구들이 진행되었으나 모두 실패하였다. 이와 관련하여 대한민국 공개특허 제1283416호는 AMPK 저해제 화합물 C 또는 FAS 저해제 C75를 허혈성 마우스에 투여하여 경색부의 크기를 유의하게 감소시켜 뇌졸중 또는 허혈성 상해 후 기능이 보존 되게 하는 신경보호 방법에 대해 개시하고 있다.

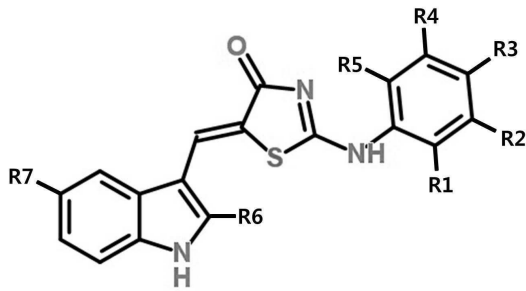
발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 그러나, 상기 선행기술의 경우 허혈 모델 동물에 대하여만 뇌신경보호 효과를 입증한 것으로서 허혈이 아닌 다른 기전에 의한 뇌졸중에 대한 치료효과까지 보증하는 것은 아니다. 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 다양한 기전에 의한 뇌졸중에 효과적인 AMPK 억제기능에 기반한 새로운 뇌졸중 치료제를 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명은 일 관점에 따르면, 하기 구조식을 갖는 화합물을 유효성분으로 함유하는, 뇌졸중 치료용 약학적 조성물이 제공된다:



[0006]

[0007]

(상기 식에서 R_1 내지 R_5 는 각각 독립적으로 수소, 히드록시기, 할로젠, 탄소수 1 내지 7의 치환되거나 치환되지 않은 알킬기, 탄소수 1 내지 7의 치환되거나 치환되지 않은 알콕시기, 아민기, 카르복실기이거나 R_2 및 R_3 는 함께 $-O-(CH_2)_n-O-$ 고리 또는 치환 또는 비치환된 벤젠고리를 형성하며(n 은 1 내지 3의 정수), R_6 는 수소 또는 메틸기이고, R_7 은 수소 또는 할로젠이다)

발명의 효과

[0008]

상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 뇌졸중의 주요 원인인 아연신경독성의 AMPK 활성을 억제하는 새로운 화합물을 처리하여 뇌졸중 치료효과를 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0009]

도 1은 배양된 대뇌피질 신경세포에 아연처리 후 신경독성이 증가되었음을 TUNEL 염색으로 확인한 사진(A)과 AMPK 억제제인 Compound C(+Cpd C) 처리 후 세포독성 정도를 TUNEL 염색과 LDH assay를 통해 정량화한 그래프이다(B 및 C).

도 2는 배양된 대뇌피질 신경세포에 아연처리 후 AMPK 활성이 증가됨을 확인한 Western blot 사진(A)과 enzyme activity assay(B) 그래프이다.

도 3은 배양된 대뇌피질 신경세포에 아연처리 후 아포토시스 촉진 유전자인 Bim의 발현증가와 caspase-3 활성을 관찰한 Western blot 사진(A)과 AMPK 억제제인 Compound C(+Cpd C) 처리 후 Bim 발현증가와 caspase-3 활성이 모두 감소된 것을 확인한 Western blot 사진(B)이다.

도 4는 AMPK activity assay kit(CycLex, Japan)와 recombinant AMPK($\alpha 2/\beta 1/\gamma 1$; CycLex, Japan)를 구입하여 효소활성을 측정하고 compound C 효과와 비교하여 비슷하거나 좀 더 강한 억제효과를 나타내는 40개의 후보 화합물을 선별한 그래프이다.

도 5는 배양된 대뇌피질 신경세포에 다양한 신경독성을 유발한 뒤, 선별된 7개의 화합물을 처리하고 세포 독성 정도를 LDH assay를 통해 정량화하여 다양한 신경 독성 억제 여부를 관찰한 그래프이다.

도 6은 뇌졸중 동물모델에 최종 선별된 약물 #28을 투여하여 뇌손상 억제효과를 관찰한 그래프와 실험동물의 뇌손상 정도를 대조군과 비교한 그림이다.

도 7은 최종 선별된 약물 #28를 랫트에 투여하고 비장(A), 간(B) 및 신장(C)을 적출하여 급성 독성 테스트 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 기존에 선별된 약물 #28과 유사한 구조를 갖는 화합물을 검색하여 선별된 25개의 유사화합물을 아연독성이 유발된 생쥐의 대뇌피질 신경세포에 처리하여 신경보호 효과를 관찰한 그래프이다.

도 9는 아연독성에 대해 유의하게 약물효과를 나타낸 12개의 약물을 선정하여 NMDA에 의해 신경독성이 유발된 생쥐의 대뇌피질 신경세포에 처리하여 신경보호 효과를 관찰한 그래프이다.

도 10은 H_2O_2 에 의해 신경독성이 유발된 생쥐의 대뇌피질 신경세포에 선별된 12개의 약물을 처리하여 신경보호 효과를 관찰한 그래프이다.

도 11은 신경세포에 본 발명의 #28 약물 및 클리오퀴놀을 농도별로 처리하고 자유 아연 농도를 pZn meter로 분

석한 그래프이다.

도 12는 test tube 상에서 아연, 클리오퀴놀 및 #28 약물을 처리하고 형광 염색물질인 Newport green DCF(Kd(Zn)=1 uM)을 사용하여 자유 아연 농도 변화를 분석한 그래프이다.

도 13은 test tube 상에서 아연, 클리오퀴놀 및 #28 약물을 처리하고 형광 염색물질인 FluoZin-3(Kd(Zn)=15 nM)을 사용하여 자유 아연 농도 변화를 분석한 그래프이다.

도 14는 신경세포에 아연, 클리오퀴놀, 피리치온 및 #28 약물을 처리하고 아연신경독성 억제효과를 분석한 그래프이고(A) DTDP 및 #28 약물을 처리하고 아연신경독성 억제효과를 분석한 그래프이다(B).

도 15는 신경세포에 4C01, 4C07 및 #28 약물을 처리 후 FluoZin-3 염색물질을 처리하여 공초점 레이저 현미경으로 관찰한 사진이고(A) 형광크기를 정량적으로 분석한 그래프이다(B).

도 16은 신경세포에 과산화수소(H_2O_2), 아연 킬레이터인 TPEN 또는 CaEDTA, 칼슘 킬레이터 ZnEDTA를 처리하고 신경독소 감소여부를 분석한 그래프이다.

도 17은 신경세포에 과산화수소(H_2O_2), TPEN, #28, 4C01, 4C07 약물을 처리하고 FluoZin-3 염색한 후 상기 약물의 독성 억제 효과를 현미경으로 관찰한 사진이다.

도 18은 신경세포에 이오노마이신 및 #28 약물을 농도별로 처리하여 이온투과담체의 독성 억제여부를 분석한 그래프이다.

도 19는 test tube 상에서 Ca^{2+} , #28 약물 및 EDTA를 처리하고 형광물질인 Fura-2 dye 처리하여 칼슘에 대한 킬레이트화 효과를 분석한 그래프이다.

도 20은 신경세포에 TPEN, 아연, #28 약물 및 클리오퀴놀을 처리하여 caspase-3의 활성을 분석한 그래프이고 (A) 신경독성(LDH 분비)을 분석한 그래프이다(B).

도 21은 신경세포 배양액을 일반 배양액, 아연 첨가 배양액, 아연 제거 배양액으로 분류하고 클리오퀴놀 및 #28 약물의 처리하고 형광물질인 ZinPyr-1을 처리하여 신경세포 내 아연 농도의 변화를 분석한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010]

용어의 정의:

[0011]

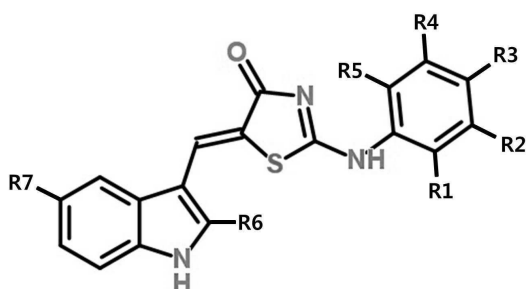
본 문서에서 사용되는 "AMPK(AMP-activated protein kinase)"는 촉매 α 서브유닛($\alpha 1$ 또는 $\alpha 2$), 및 2개의 조절 서브유닛(β 및 γ)으로 구성된 이형삼량체 단백질(heterologous trimer protein)이다. AMPK는 세포 에너지 수준이 낮을 때 인산화되고 활성화되며 다시 세포 대사 작용을 조절하여 유전자 발현을 장기간에 걸쳐 조절하여 ATP의 수준을 회복한다. AMP/ATP 비의 증가, 세포 pH 및 산화 환원 상태의 변화 및 크레아틴/포스포크레아틴 비의 증가가 AMPK를 활성화시키는 것으로 공지되어 있다.

[0012]

발명의 상세한 설명:

[0013]

본 발명은 일 관점에 따르면, 하기 구조식을 갖는 화합물을 유효성분으로 함유하는, 뇌졸중 치료용 약학적 조성물이 제공된다:



[0014]

[0015]

(상기 식에서 R_1 내지 R_5 는 각각 독립적으로 수소, 히드록시기, 할로젠, 탄소수 1 내지 7의 치환되거나 치환되지 않은 알킬기, 탄소수 1 내지 7의 치환되거나 치환되지 않은 알콕시기, 아민기, 카르복실기이거나 R_2 및 R_3 는 함

계 $-O-(CH_2)_n-O-$ 고리 또는 치환 또는 비치환된 벤젠고리를 형성하며(n 은 1 내지 3의 정수), R_6 는 수소 또는 메틸기이고, R_7 은 수소 또는 할로젠이다)

- [0016] 상기 뇌졸중 치료용 약학적 조성물에 있어서, 상기 치환된 알킬기는 트리플루오로메틸기일 수 있고 상기 할로젠은 요오드, 브롬 또는 염소일 수 있다.
- [0017] 상기 뇌졸중 치료용 약학적 조성물에 있어서, 상기 화합물은 (5Z)-5-(1H-Indol-3-ylmethylene)-2-[[2-(trifluoromethyl)phenyl]amino]-1,3-thiazol-4(5H)-one, (5Z)-5-(1H-Indol-3-ylmethylene)-2-[[3-(trifluoromethyl)phenyl]amino]-1,3-thiazol-4(5H)-one, (5Z)-2-[(3-Bromophenyl)amino]-5-(1H-indol-3-ylmethylene)-1,3-thiazol-4(5H)-one, (5Z)-5-(1H-Indol-3-ylmethylene)-2-[(4-methylphenyl)amino]-1,3-thiazol-4(5H)-one, (5Z)-5-(1H-Indol-3-ylmethylene)-2-[(3-methylphenyl)amino]-1,3-thiazol-4(5H)-one, (5Z)-2-Anilino-5-(1H-indol-3-ylmethylene)-1,3-thiazol-4(5H)-one, no]-1,3-thiazol-4(5H)-one, (5E)-5-[(2-Methyl-1H-indol-3-yl)methylene]-2-[(4-methylphenyl)amino]-1,3-thiazol-4(5H)-one, 3-[[[(5Z)-5-(1H-Indol-3-ylmethylene)-4-oxo-4,5-dihydro-1,3-thiazol-2-yl]amino]benzoic acid, 2-[[[(5E)-5-(1H-Indol-3-ylmethylene)-4-oxo-4,5-dihydro-1,3-thiazol-2-yl]amino]benzoic acid, (5Z)-2-[(2-Chlorophenyl)amino]-5-[(2-methyl-1H-indol-3-yl)methylene]-1,3-thiazol-4(5H)-one, 또는 2-Hydroxy-5-[[[(5Z)-5-(1H-indol-3-ylmethylene)-4-oxo-4,5-dihydro-1,3-thiazol-2-yl]amino]benzoic acid일 수 있다.
- [0018] 상기 뇌졸중 치료용 약학적 조성물에 있어서, 상기 뇌졸중은 출혈성(hemorrhagic) 뇌졸중, 허혈성(ischemic) 뇌졸중 또는 금속 독성(metal toxicity) 뇌졸중일 수 있고 상기 금속은 납(lead), 수은(mercury), 망간(manganese), 비소(arsenic), 탈륨(thallium), 철(iron), 아연(zinc), 카드뮴(cadmium), 비스무트(bismuth) 또는 주석(tin)일 수 있으며 상기 허혈성 뇌졸중은 흥분성 신경세포사 또는 산화성 신경세포사에 의해 유발되는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 화합물의 유효량은 환자의 환부의 종류, 적용부위, 처리회수, 처리시간, 제형, 환자의 상태, 보조제의 종류 등에 따라 변할 수 있다. 사용량은 특별히 한정되지 않지만, $0.01 \mu\text{g/kg/day}$ 내지 10 mg/kg/day 일 수 있다. 상기 1일량은 1일에 1회, 또는 적당한 간격을 두고 하루에 2~3회에 나눠 투여해도 되고, 수일(數日) 간격으로 간헐(間歇)투여해도 된다.
- [0020] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 화합물은, 조성물 총 중량에 대하여 0.1~100 중량%로 함유될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 약학적 조성물의 제조에는 고체 또는 액체의 제제용 첨가물을 사용할 수 있다. 제제용 첨가물은 유기 또는 무기 중 어느 것이어도 된다.
- [0021] 부형제로서는 예를 들면 유당, 자당, 백당, 포도당, 옥수수 전분(cornstarch), 전분, 탈크, 소르비트, 결정 셀룰로오스, 텍스트린, 카올린, 탄산칼슘 및 이산화규소 등을 들 수 있다. 결합제로서는 예를 들면 폴리비닐알코올, 폴리비닐에테르, 에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 아라비아고무, 트래거캔스(tragacanth), 젤라틴, 셀락(shellac), 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 구연산칼슘, 텍스트린 및 펙틴(pectin) 등을 들 수 있다. 활택제로서는 예를 들면 스테아린산마그네슘, 탈크, 폴리에틸렌글리콜, 실리카, 경화식물유 등을 들 수 있다. 착색제로서는 통상 의약품에 첨가하는 것이 허가되어 있는 것이라면 모두 사용할 수 있다. 이들의 정제, 과립제에는 당의(糖衣), 젤라틴코팅, 기타 필요에 따라 적절히 코팅할 수 있다. 또한, 필요에 따라 방부제, 항산화제 등을 첨가할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 약학적 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며(예: 문헌[Remington's Pharmaceutical Science, 최신판;Mack Publishing Company, Easton PA], 제제의 형태는 특별히 한정되는 것은 아니다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌[Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042(Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기술되어 있다.
- [0023] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 화합물은 경구 또는 비경구로 투여되는 것이 가능하며, 바람직하게는 비경구 투여로 정맥내 주입, 피하 주입, 뇌실내 주입(intracerebroventricular injection), 뇌척수액내 주입(intracerebrospinal fluid injection), 근육내 주입 및 복강 주입 등으로 투여할 수 있다.
- [0024] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록

하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0025] 일반적 방법

[0026] 대뇌피질 신경세포(Cerebral Cortex Neurons) 배양

[0027] 본 발명에서 사용한 마우스 대뇌피질 신경세포는 마우스 배아의 뇌로부터 추출 배양하여 5% 우태아혈청(FBS)과 5% 마혈청(HS)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco, Grand Island, NY, US)을 이용하여 95% 습도, 5% CO₂ 및 37℃ 온도 조건에서 배양하였다. 상기 세포의 활성화와 분화를 위해 24-well 조직 배양 플레이트에서 2×10^4 세포의 밀도로 증식하였고 아연 및 화합물을 처리하기 전에는 FBS와 HS가 없는 MEM 배지에서 배양하였다.

[0028] 실시예 1: AMPK 억제제에 의한 세포독성 감소확인

[0029] 본 발명의 일 실시예에 따라 아연독성(Zinc toxicity)은 뇌졸중의 대표적인 원인기전 중 하나로서, 상기 배양된 대뇌피질 신경세포에서 유발된 아연독성이 AMPK 억제제 처리에 따른 독성 감소여부를 확인하였다.

[0030] 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 배양된 대뇌피질 신경세포에 300 μM의 아연(ZnCl₂)을 10분간 처리한 후 제거하고 10시간 후에 세포독성(cytotoxicity)을 TUNEL 염색 또는 LDH(Lactate Dehydrogenase) 분석을 통해 관찰하였고 상기 세포에 AMPK 억제제인 Compound C(+Cpd C, Tocris)를 20 μM로 처리한 후 신경독성 감소를 관찰하였다.

[0031] 그 결과, 대뇌피질 신경세포에 아연 처리 후 신경독성이 증가되었음을 TUNEL 염색으로 확인하였고(도 1A) 세포 독성 정도를 TUNEL 염색과 LDH 분석을 통해 정량화하고 AMPK 억제제인 Compound C(+Cpd C) 처리에 의해 아연신경독성이 현저히 감소했음을 확인하였다(도 1B 및 1C).

[0032] 실시예 2: 아연처리 후 AMPK 활성 관찰

[0033] 본 발명의 일 실시예에 따라 아연독성과 AMPK 효소 활성간의 상관관계를 파악하고자 대뇌피질 신경세포에 아연 처리 후 AMPK 활성을 웨스턴 블랏과 효소활성 분석을 통해 관찰하였다.

[0034] 2-1: 웨스턴 블랏(Western blot)

[0035] 배양된 대뇌피질 신경세포에 300 μM의 아연(ZnCl₂)을 10분간 처리한 후 제거하고 0.5, 1, 2, 4, 6시간 후에 상기 세포 샘플을 단백질 레더와 함께 폴리아크릴아마이드 겔에 로딩하고 단백질 크기에 따라 분리하였다. 그 후, 항체를 처리하고 세척한 뒤 판독하였다.

[0036] 그 결과, 아연처리 후 30분 후부터 AMPK alpha-1과 alpha-2의 트레오닌 잔기(threonine residue)에 인산화됨이 관찰되었는데 이는 AMPK 활성(phosphorylated AMPK)을 의미한다. 그러나 다른 세린 잔기(serine residue)의 인산화는 관찰되지 않았다(도 2A).

[0037] 2-2: 효소활성 분석(enzyme activity assay)

[0038] 대뇌피질 신경세포에 상기와 같은 조건으로 아연을 처리한 후 0.5, 1, 2, 4 및 6시간 경과에 따라 각각 단백질 추출물을 얻어 AMPK activity assay kit(CycLex, Japan)를 이용하여 효소활성을 측정하였다.

[0039] 그 결과, 아연 처리에 따른 AMPK 효소의 활성은 시간 의존적(Time-dependent)으로 증가하는 것을 관찰하였다(도 2B).

[0040] 실시예 3: AMPK 활성억제를 통한 아연독성 억제

[0041] 본 발명의 일 실시예에 따라 대뇌피질 신경세포에 아연을 처리하여 AMPK 효소 활성이 증가하는 것이 세포사멸(apoptosis)과 관련이 있는지 관찰하였다.

[0042] 구체적으로, 대뇌피질 신경세포에 300 μM의 아연(ZnCl₂)을 2, 3, 4, 5 및 6시간 동안 처리하여 아연독성을 유발하였다. 상기 각 샘플의 단백질을 분리하여 웨스턴 블랏을 실시하였고 AMPK 억제제인 Compound C(+Cpd C)를 20 μM로 처리하여 아연독성과 아포토시스와의 관계를 확인하였다.

[0043] 그 결과, 아연 처리 후 3시간 이후부터 BH3-only Bcl family 중에 하나인 아포토시스 촉진 단백질(pro-apoptotic protein)인 Bim의 발현 증가가 관찰되었고caspase-3 활성도 관찰할 수 있었다(도 3A). 그러나 아연

독성에 의한 Bim의 증가와 caspase-3 활성 증가가 AMPK 억제제인 compound C 처리에 의해 모두 감소된 것을 확인하였다(도 3B). 그러므로 AMPK 효소는 아연독성 기전에서 아포토시스(apoptosis)와 관련되어 있으며 AMPK 효소의 활성억제는 아연독성에 의한 아포토시스를 억제하는 것을 의미한다.

[0044] 실시예 4: AMPK 활성억제 화합물 스크리닝 및 억제효과 확인

[0045] 4-1: 구조기반 가상 스크리닝(Structure-based virtual screening)

[0046] 본 발명의 일 실시예에 따라 AMPK 활성억제제로 작용할 가능성이 있는 화합물을 대상으로 1차 스크리닝을 실시하였다.

[0047] 구체적으로, 상기 선행연구를 통해 AMPK 활성이 아연독성 기전에 관련되어 있음을 확인하였고, 다른 연구논문에서도 흥분독성 기전에서 AMPK 활성 및 Bim 발현 증가가 보고되었다. AMPK 효소는 α , β 및 γ 3개의 서브유닛이 복합구조를 이루어 작용하는 효소로, 이중 α 서브유닛이 키나아제 효소활성을 가지고 있다. 기존의 연구 결과에서 AMPK $\alpha 2$ 가 $\alpha 1$ 과 달리 넵-아웃 마우스(knock-out mice)에서 허혈(ischemia)에 의한 신경독성을 현저히 억제한다고 보고하였다. 따라서 본 발명은 $\alpha 2$ 를 타겟으로 하여 AMPK 효소활성을 억제할 가능성이 있는 후보 케미컬(chemicals)을 구조기반 가상 스크리닝(Structure-based virtual screening)을 통해 선별하였고 결론적으로 208개의 후보 화합물이 선별되었다.

[0048] 4-2: AMPK 효소활성 분석(AMPK enzyme activity assay)

[0049] 상기 실시예 4-1에서 선별된 화합물 208개를 화합물 라이브러리 제조회사(Interbioscreen, Russia)로부터 입수하여 이들의 AMPK 효소활성 억제효과 관찰을 통해 2차 스크리닝을 실시하였다.

[0050] 구체적으로, AMPK 효소활성은 AMPK activity assay kit(CycLex, Japan)와 recombinant AMPK($\alpha 2/\beta 1/\gamma 1$; CycLex, Japan)를 이용하여 측정하였다. 상기 선별된 208개의 화합물과 기존에 잘 알려진 AMPK 억제제 compound C의 AMPK 효소활성 억제 효과를 측정한 결과, 40개의 약물이 10 μ M에서 compound C와 비슷하거나 더 좋은 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 상기 40개의 약물을 하기 표 1에 표시하였다.

표 1

Compound ID	Mean (% remaining activity)	SEM	Compound ID	Mean (% remaining activity)	SEM
#1	-1.2626	1.768	#22	-0.5291	0.000
#2	-1.7934	0.072	#23	1.0582	0.000
#3	-0.9684	0.036	#24	5.0505	5.051
#4	5.5556	0.265	#25	-0.1793	0.538
#5	4.2328	0.529	#26	-1.2554	0.036
#6	2.3810	0.794	#27	5.8201	0.000
#7	3.4392	0.265	#28	3.9683	1.852
#8	-0.2152	0.215	#29	0.0000	0.000
#9	0.5739	0.359	#30	1.0000	0.667
#10	-0.3945	0.179	#31	0.3641	0.850
#11	5.2910	0.529	#32	0.1257	0.126
#12	-1.3245	0.662	#33	2.9801	2.980
#13	-0.9684	0.681	#34	0.3143	0.566
#14	-0.1435	0.000	#35	0.1214	0.121
#15	5.0265	0.265	#36	0.2514	0.126
#16	6.3492	0.529	#37	7.3333	1.000
#17	2.9101	0.265	#38	5.6667	4.667
#18	2.9053	0.681	#39	1.667	3.333
#19	4.3400	1.614	#40	3.6667	0.000
#20	-1.7575	0.036	Compound C	5.3000	0.760
#21	0.8967	0.251			

[0052] 4-3: 아연독성 억제효과 관찰

[0053] 상기 실시예 4-2에서 선별된 화합물 40 개의 아연 신경독성 억제효과 관찰을 통해 3차 스크리닝을 실시하였다.

[0054] 구체적으로, 배양된 마우스의 대뇌피질 신경세포에 300 μ M의 아연을 10분간 처리하고 제거한 후 12시간이 경과한 시점에서 상기 선별한 40개의 약물들을 각각 아연과 함께 처리하여 신경보호효과를 관찰하였다. 상기 세포의 사멸 정도는 LDH 분석을 통해 정량화하였는데 각각의 효과를 평균하여 수치로 나타내었고 선별된 각각의 약물들에 대해 별도의 실험을 4회 수행하였다(도 4).

[0055] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 일부 화합물은 아연독성에 의한 세포사멸을 억제하였는데, 하기 표 2에 나타난 바와 같이 이 중 7개의 화합물(#6, #11, #14, #17, #28, #35 및 #37)이 아연독성을 유의하게 억제하는 것으로 확인되었다.

표 2

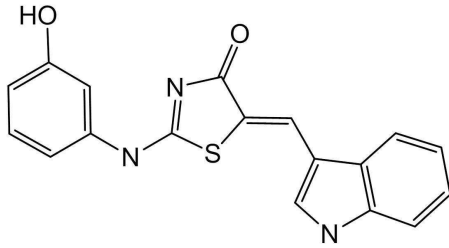
Compound ID	유의성	Compound ID	유의성
#1	0.5487	#22	0.0200
#2	0.8483	#23	0.8757
#3	0.5597	#24	0.8699
#4	0.0283	#25	0.4870
#5	0.9326	#26	0.6624
#6	0.0278	#27	0.3030
#7	0.0003	#28	0.0008
#8	0.0001	#29	0.1137
#9	0.8649	#30	0.2142
#10	0.1253	#31	0.1777
#11	0.0311	#32	0.7276
#12	0.0000	#33	0.2386
#13	0.4384	#34	0.1043
#14	0.0220	#35	0.0016
#15	0.2378	#36	0.0381
#16	0.2488	#37	0.0290
#17	0.0048	#38	0.3225
#18	0.3961	#39	0.0027
#19	0.7590	#40	0.0390
#20	0.8889	Compound C	0.0003
#21	0.6141		

[0057] 4-4: 다양한 신경독성에 대한 억제효과 관찰

[0058] 상기 실시예 4-3에서 선별한 7개 화합물의 신경독성 억제효과 관찰을 통해 4차 스크리닝을 실시하였다.

[0059] 구체적으로, 배양된 마우스의 대뇌피질 신경세포에 50 μ M NMDA, 50 μ M FeCl₂, 100 μ M H₂O₂, 2 μ M TPEN(N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine, Sigma), 500 nM 스토로스포르린(staurosporine, Abchem) 및 10 μ M 에토포사이드(etoposide, Sigma)를 각각 처리 하여 세포독성을 유발한 후 상기 선별된 7개 화합물을 20 μ M의 농도로 처리하여 세포사멸 억제 효과를 관찰하였고 세포사멸 정도는 LDH assay를 통해 정량화하였다. 상기 사용한 신경독성 모델은 뇌졸중의 원인기전으로 생각되는 흥분독성, 산화성 손상 및 세포사멸(apoptosis) 등이 포함되어 있는데 그 중 흥분독성 모델로는 NMDA를 처리하였고, 산화성손상 모델로는 철(iron) 독성과 H₂O₂ 독성 모델을 사용하였으며, 세포사멸 모델로는 TPEN, 스토로스포르린(staurosporine) 및 에토포사이드(etoposide) 독성모델을 이용하였다. 상기 TPEN은 아연 킬레이터(zinc chelator)로 신경세포에서 전형적인 세포사멸을 유발하는 것으로 잘 알려져 있고, 스토로스포르린은 효소활성 억제제(kinase inhibitor)로 역시 대표적인 세포사멸 유발물질 중 하나이며 에토포사이드는 DNA 손상으로 인한 세포사멸을 유발한다고 알려진 약물이다.

[0060] 그 결과, 상기 선별된 7개의 약물을 함께 처리하여 신경독성 감소에 따른 신경보호 효과를 관찰하였는데 특히, 화합물 #35 및 화합물 #28이 모든 독성에 억제효과를 나타냄을 알 수 있었다(도 5). 라이브러리 구입처로부터 상기 화합물 #28은 하기와 같은 구조를 갖는 (Z)-5-((1H-indol-3-yl)methylene)-2-((3-hydroxyphenyl)amino)thiazol-4(5H)-one임을 확인하였다:



실시예 5: 뇌졸중 동물모델에서 뇌손상 억제효과 관찰

상기 실시예 4-4에서 최종 선별된 화합물인 #28이 실제 동물 모델에서도 효과적인지 확인하기 위해 상기 화합물을 뇌손상을 유발한 뇌졸중 모델 동물에 처리한 후, 뇌손상 억제효과가 나타나는지 여부를 조사하였다.

구체적으로, 8-9 주령이 된 수컷 Sprague-Dawley(SD) 랫트(rat)를 이용하여 영구 중뇌동맥(MCA) 폐쇄모델을 제작하였다. 영구 중뇌동맥 폐쇄(MCAO) 전 30분 및 폐쇄 후 10분경과 시점에서 레이저 도플러 혈류측정기(Laser-Doppler flowmetry)를 이용하여 대뇌 혈류(CBF)를 측정하였고 하기 표 3에 표시하였다. 그 후, 상기 최종 선별된 AMPK 억제제 후보 화합물인 #28(3 μ l 내 75 ng) 또는 비히클(10% DMSO)을 MCAO 후 15분에 3.8 mm 깊이로 0.8 mm 후면 및 브레그마의 측면 1.2 mm의 뇌실내 주입(intracerebroventricular injection)하였다. 이 후, 상기 랫트의 운동 결핍(motor deficit) 정도를 평가 하였는데 평가의 기준(Longa *et al.*, 1989)은 결핍을 나타내지 않는 것은 정상(Normal), 수직으로 정지할 때 앞발 연장의 실패는 경증(mild), 반대쪽으로 회전하는 것은 보통(moderate) 및 회전 손실(loss of circling) 또는 반사작용의 손실은 심각한 결핍(severe deficit)으로 분류하였다. 또한, 상기 랫트 모델에 허혈(ischemia)을 유도 후 24시간 경과한 시점에서 뇌를 수득하였고 2% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride(TTC)로 염색하여 뇌경색(cerebral infarction) 정도를 측정하였다.

그 결과, 본 발명을 통해 발굴된 최종 후보 화합물인 화합물 #28이 뇌졸중 동물모델 중 하나인 영구 중뇌동맥 폐쇄(permanent middle cerebral artery occlusion)에 따른 뇌손상을 현저하게 억제시킴을 최종 확인하였다(도 6).

표 3

	Veh	AMPK 억제제
CBF(% of baseline)	37.8±13.5	33.1±9.0
Weight reduction(g)	48.3±4.7	43.8±6.1

실시예 6: 급성 독성 테스트(Acute toxicity test)

상기 최종 선별된 화합물인 #28을 랫트에 주입하고 급성 독성 결과를 관찰하였다.

구체적으로, 8-9 주령된 수컷 Sprague-Dawley(SD) 랫트에 상기 최종 선별된 AMPK 억제제 후보 화합물인 화합물 #28을 랫트 1 마리 당 75 μ g/kg 또는 비히클(10% DMSO)을 정맥내 주입(intravenous injection)하였고 이를 4회 반복하였다.

그 결과, 24시간 경과 후에도 죽는 랫트는 발견되지 않았고 랫트를 희생시켜 간, 비장 및 신장 장기들을 적출하여 무게를 측정하였고, 상기 랫트의 혈액을 채취하여 WBC, RBC, BUN, AST, ALT, CREA 및 GLU 등의 지표 결과를 확인하였으나 대조군과 비교하여 대부분의 지표가 정상으로 나타났으며 눈에 띄는 독성을 관찰되지 않았다(도 7). 상기 지표에 대한 결과를 하기 표 4에 표시하였다.

표 4

	정상 범위	Veh(n=4)	AMPK 억제제(n=4)
WBCB($\times 10^3$ cell/ μ L)	6.6 - 12.6	11.0 $\pm$ 2.5	11.6 $\pm$ 1.9
RBC($\times 10^3$ cell/ μ L)	6.8 - 9.8	6.7 $\pm$ 0.4	7.4 $\pm$ 0.5
BUN(mg/dL)	5 - 21	16.1 $\pm$ 2.2	17.6 $\pm$ 1.8
AST(U/L)	45.7 - 80.8	121.7 $\pm$ 34.6	142.3 $\pm$ 50.7
ALT(U/L)	17.5 - 30.2	47.4 $\pm$ 10.1	54.5 $\pm$ 8.2
CREA(mg/dL)	0.2 - 0.8	0.5 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0

GLU(mg/dL)	50 - 135	174.8 ± 39.5	174.6 ± 18.0
------------	----------	--------------	--------------

[0072] **실시예 7: 유사화합물 검색 및 아연독성 억제효과 관찰**

[0073] 본 발명의 일 실시예에 따라 상기 최종 선별된 #28의 구조 유사성을 기반으로 하여 이와 유사한 구조를 가지는 25개 유사 화합물을 화합물 라이브러리 제조회사(InterBioScreen, Russia; Akos, Germany)로부터 구입하였다. 이 후 상기 배양된 생쥐의 대뇌피질 신경세포에 아연독성을 유발하기 위하여 $ZnCl_2$ (400 μM)을 10분간 처리하였고 12.5시간 경과 한 뒤, 상기 선별된 25개의 화합물 및 기존에 선별된 약물인 #28을 처리(20 μM)하여 세포 생존능 분석(cell viability assay, Cell Counting Kit-8, Dojindo)을 통해 세포사(cell death) 억제 여부를 관찰하였다. 그 결과, 상기 처리한 25개의 새로운 화합물 중에서 3개의 약물(4A02, 4B02 및 4D01)을 제외한 나머지 22개 약물이 모두 신경보호 효과를 나타내었다(도 8). 상기 선별된 25개 화합물의 명칭과 구조를 하기 표 5에 표시하였다.

표 5

[0074]

코드명	구조식	IUPAC 명칭
4-A01		(5Z)-5-(1H-Indol-3-ylmethylene)-2-{{2-(trifluoromethyl)phenyl}amino}-1,3-thiazol-4(5H)-one
4-A02		(5Z)-5-(1H-Indol-3-ylmethylene)-2-{{3-(trifluoromethyl)phenyl}amino}-1,3-thiazol-4(5H)-one
4-A03		(5Z)-2-[(3-Bromophenyl)amino]-5-(1H-indol-3-ylmethylene)-1,3-thiazol-4(5H)-one
4-A04		(5Z)-5-(1H-Indol-3-ylmethylene)-2-[(4-methylphenyl)amino]-1,3-thiazol-4(5H)-one
4-A05		(5Z)-5-(1H-Indol-3-ylmethylene)-2-[(3-methylphenyl)amino]-1,3-thiazol-4(5H)-one
4-A06		(5Z)-2-Anilino-5-(1H-indol-3-ylmethylene)-1,3-thiazol-4(5H)-one
4-A07		(5Z)-2-[(2,4-Dimethylphenyl)amino]-5-(1H-indol-3-ylmethylene)-1,3-thiazol-4(5H)-one
4-A08		(5Z)-2-[(2-Chlorophenyl)amino]-5-(1H-indol-3-ylmethylene)-1,3-thiazol-4(5H)-one
4-B01		(5Z)-2-[(3,4-Dimethylphenyl)amino]-5-(1H-indol-3-ylmethylene)-1,3-thiazol-4(5H)-one
4-B02		(5Z)-2-[(4-Hydroxyphenyl)amino]-5-(1H-indol-3-ylmethylene)-1,3-thiazol-4(5H)-one
4-B03		(5Z)-5-(1H-Indol-3-ylmethylene)-2-[(2-methylphenyl)amino]-1,3-thiazol-4(5H)-one
4-B04		(5Z)-2-[(2,3-Dimethylphenyl)amino]-5-(1H-indol-3-ylmethylene)-1,3-thiazol-4(5H)-one
4-B05		(5E)-5-(1H-Indol-3-ylmethylene)-2-(1-naphthylamino)-1,3-thiazol-4(5H)-one
4-B06		(5Z)-2-[(3-Chlorophenyl)amino]-5-(1H-indol-3-ylmethylene)-1,3-thiazol-4(5H)-one

[0075] **실시예 8: 신경독성 억제효과 관찰**

[0076] 본 발명의 일 실시예에 따라 아연독성에 대한 상기 25개 유사화합물의 신경보호 효과를 반복적으로 관찰한 결과, 12개의 약물이 지속적으로 유의성 있는 약물효과를 나타내어 다양한 신경독성 억제효과 관찰을 위해 상기 12개의 약물을 선별하여 처리하였다.

[0077] 구체적으로, 신경독성 억제효과를 관찰하기 위한 신경독성 모델은 뇌졸중의 원인기전으로 분류되는 흥분독성(excitotoxicity), 산화성손상 등이 포함되어 있는데 상기 흥분독성 모델로는 NMDA(N-methyl-D-aspartate)를 사용하였고, 산화성손상 모델로는 과산화수소(H_2O_2) 독성 모델을 사용하였다. 먼저, 상기 배양된 생쥐의 대뇌피질 신경세포에 NMDA(50 μ M) 또는 H_2O_2 (100 μ M)를 각각 1.5시간, 4.5시간 처리하여 신경독성을 유발하였고 상기 신경세포에 상기 선별된 12개의 약물(10 μ M) 및 기준에 선별된 약물인 #28을 처리(20 μ M)하였다. 이후 상기 신경세포를 프로피디움 요오드화물(propidium iodide, PI)에 염색 후 염색된 세포수를 정량화하여 세포사 정도를 측정하였다. 상기 염색 후 죽은 세포는 세포막의 선별적 투과성이 없기 때문에 PI에 염색되는 반면, 건강한 세포는 염색되지 않는다.

[0078] 그 결과, 1개의 약물(4B04, 4B07, 4B08)을 제외한 9개의 약물이 NMDA에 의한 신경독성을 유의성 있게 억제함으로써 신경보호 효과를 나타내는 것을 확인하였고(도 9) 2개의 약물(4B03, 4B04)을 제외한 10개의 약물이 H_2O_2 에 의한 신경독성을 유의성 있게 억제하는 것을 관찰하였다(도 10). 이러한 결과는 먼저 선정된 약물인 #28과 비교하여 동일하거나 더 높은 신경보호 효과를 확인한 것이다.

[0079] **실시예 9: 자유아연(free zinc) 농도 측정**

[0080] **9-1: pZn meter**

[0081] 자유 아연 농도를 측정하기 위하여 Test tube 상에서 아연 형광 물질인 ZnAF(2.5 μ M) 와 함께 본 발명의 #28 약물을 농도별(2.5 ~ 20 μ M)로 처리하였고 대조군은 매우 강력한 아연 킬레이터(zinc chelator)로 알려진 클리오퀴놀(clioquinol, 1 ~ 5 μ M)을 사용하였으며 pZn meter(NeuroBioTex Inc)를 이용하여 자유아연 농도를 측정하였다.

[0082] 그 결과, 본 발명의 #28 약물에 의해 자유아연 농도가 농도의존적으로 감소하는 것을 관찰하였다(도 11).

[0083] **9-2: 형광 염색물질**

[0084] 또한, Test tube 상에서 클리오퀴놀(20 μ M) 또는 #28(20 μ M) 약물과 함께 아연 형광 염색물질인 Newport green DCF(0.5 μ M, Kd(Zn)=1 μ M) 또는 FluoZin-3(0.5 μ M, Kd(Zn)=15 nM)을 사용하여 자유 아연 농도 변화를 측정하였다.

[0085] 그 결과, 대조군인 클리오퀴놀 및 #28 약물 모두 아연이온에 결합하여 자유 아연이온이 감소하는 것을 관찰하였다(도 12 및 13). 특히 #28 약물의 경우 높은 농도의 아연에 대해서 자유 아연 농도를 낮춰주는 효과가 현저하게 관찰되었으나 (도 12), 낮은 농도의 아연에 대해서는 뚜렷한 효과가 보이지 않았다(도 13). 이러한 결과는 #28 약물의 아연 친화도가 클리오퀴놀에 비해 현저히 낮음을 의미한다.

[0086] **9-3: 아연 신경독성 억제 효과**

[0087] 본 발명의 #28 약물 아연 신경독성 억제 효과가 아연 통로인 채널에 작용하는 것이 아니라 직접적인 아연 킬레이트화(zinc chelation)에 의한 결과인지 확인하기 위해 상기 배양된 생쥐의 대뇌피질 신경세포에 세포 내 아연을 유입시키는 아연 이온투과담체(zinc ionophore)로 잘 알려진 클리오퀴놀, 피리치온(pyrrithione) 및 세포내 아연 분비를 유발하는 약물인 DTPD(2,2'-Dithiodipyridine)을 처리한 후 세포 밖에서 유입된 아연 증가 외에 세포 내에서 유발된 아연 신경독성 감소를 관찰하였다.

[0088] 그 결과, 이온투과담체에 의한 아연 신경독성이 #28 약물에 의해 현저히 감소하는 것으로 나타났다 (도 14). 즉, #28 약물 효과는 아연 통로에 작용하여 나타나는 것이 아니라 직접적인 아연 킬레이트화에 의한 결과라 예상할 수 있다.

[0089] **9-4: 현미경 관찰**

[0090] 신경세포 내 실제 자유 아연 농도가 증가하는지 관찰하기 위하여 상기 배양된 생쥐의 대뇌피질 신경세포에

FluoZin-3 염색물질을 미리 처리하고 고농도의 아연에 노출시킨 후 4C01(20 μ M), 4C07(20 μ M) 및 #28(20, 50 μ M) 약물을 처리해서 공초점 레이저 현미경을 사용하여 이미지를 관찰하였고 형광광도계(fluorometer)를 사용하여 형광크기를 정량적으로 측정하였다.

[0091] 그 결과, 아연 노출 16분 후부터 신경세포 내 자유 아연이 뚜렷이 증가하며 #28 약물에 의해 신경세포 내 자유 아연 증가가 현저히 감소됨을 관찰하였고(도 15A) 형광크기를 정량적으로 분석한 결과 #28 약물 이외에 유사화합물 4C01과 4C07도 유사한 수준으로 세포 내 자유 아연 증가를 억제할 수 있음을 확인하였다(도 16B).

[0092] **9-5: H_2O_2 독성 및 아연 킬레이트화**

[0093] 과산화수소에 의한 신경독성 기전에서 세포 내 자유 아연이 증가하고 이때 아연 킬레이터를 처리하면 과산화수소 독성이 감소한다고 보고된 바 있고 종래 실험에서 #28 약물이 과산화수소에 의한 신경독성을 억제했다. 따라서 이때 #28 약물 효과가 아연 감소와 관련 있는지 관찰하기 위해 신경세포에 과산화수소(H_2O_2), 아연 킬레이터인 TPEN 또는 CaEDTA 및 칼슘 킬레이터인 ZnEDTA를 처리한 후 신경 독성(LDH 분비)을 확인하였다. 또한, FluoZin-3 염색을 통해 과산화수소 처리 후에 신경세포 내 자유 아연의 증가여부를 관찰하였고 TPEN 처리군은 대조군으로 사용하였다. #28 외에도 유사 화합물 4C01, 4C07의 아연 킬레이션 여부를 공초점 현미경으로 관찰하였다.

[0094] 그 결과, 대표적인 아연 킬레이터 중 하나인 TPEN 처리에 의해 과산화수소에 의한 신경 독성이 감소하였고 다른 아연 킬레이터인 CaEDTA의 처리에 의해서도 독성이 유의성 있게 감소하여 H_2O_2 독성이 아연과 관련되어 있음을 나타내었다. 그러나 이미 아연이 결합된 EDTA(ZnEDTA)에 의해서는 독성이 억제되지 않았는데 이는 EDTA가 추가적으로 아연을 킬레이트화(chelation) 하지 못했기 때문에 H_2O_2 신경독성은 아연 킬레이트화에 의해 감소되는 것으로 나타났다(도 16).

[0095] 또한, #28, 4C01, 4C07 약물 처리에 의해 H_2O_2 독성 과정에서 나타나는 신경세포 내 아연 증가가 감소됨을 관찰하였으므로 상기 약물의 독성 억제 효과가 아연 감소에 의한 결과로 사료된다(도 17).

[0096] **9-6: NMDA 독성 및 Ca^{2+} 킬레이트화**

[0097] 종래 실험에서 신경세포의 NMDA 채널을 개방하여 세포 내로 칼슘이온이 유입되도록 하는 약물인 NMDA에 의한 흥분독성도 #28 약물에 의해 억제되었는데 상기 결과가 #28 약물 외에 Ca^{2+} 이온의 킬레이트화에 의한 결과인지 관찰하기 위해 칼슘 이온투과담체(calcium ionophore)인 직접적으로 세포 내 칼슘농도를 증가시키는 이오노마이신(ionomycin)을 처리 후 #28 약물(10 ~ 60 μ M)의 보호효과를 관찰하였다. 또한, 칼슘에 결합해서 형광을 나타내는 Fura-2 dye를 이용해서 Test tube 상에서 #28 약물이 칼슘에 결합해서 킬레이트화 효과를 나타내는지 관찰하였다.

[0098] 그 결과, #28 약물의 처리는 이온투과담체의 독성을 억제할 수 있음을 관찰하였으나 40 μ M이상의 농도를 처리해야 보호효과가 나타남을 확인하였다(도 18). 또한 EDTA는 낮은 칼슘농도에서 킬레이트화 효과가 잘 나타나는 반면, #28 약물은 높은 농도의 칼슘에 대해 킬레이트화 효과가 관찰되었다(도 19). 따라서 #28 약물에 의한 NMDA 신경독성 억제 효과는 칼슘이온을 직접적으로 킬레이트화한 결과로 나타나는 현상이며 아연 이온보다 칼슘 이온에 대한 친화도가 더 낮음을 알 수 있었다.

[0099] **9-6: TPEN 독성 및 아연 이온투과담체**

[0100] 일반적으로 세포 내로 쉽게 유입되는 아연 킬레이터인 TPEN을 처리하면 전형적인 아포토시스(apoptosis) 형태의 세포사가 나타나는데(EDTA는 세포 내로 유입되지 않음) 여기에 아연을 첨가해주면 세포 내 자유 아연이온이 유지되어 신경세포사가 감소되고 아포토시스 과정에서 caspase-3 단백질 분해효소 활성화도 감소된다. 본 발명의 #28 약물과 클리오퀴놀이 킬레이터의 역할 뿐만 아니라 이온투과담체 역할을 하여, 세포 내로 아연과 결합된 상태로 유입되고 이후 세포질 내 자유 아연 농도가 너무 낮기 때문에 약물로부터 아연이 떨어져 나와 세포질 내 자유아연 농도가 증가 유지되어 TPEN에 의한 신경독성이 감소될 것을 예상하고 아연, #28 약물 및 클리오퀴놀을 처리하여 caspase-3의 활성 및 신경독성(LDH 분비)를 관찰하였다.

[0101] 그 결과, 아연, #28 약물 및 클리오퀴놀의 처리에 의해 TPEN에 의해 유도된 caspase-3 활성이 유의성 있게 감소하였고 TPEN에 의한 신경독성도 감소하는 것으로 나타났다(도 20).

[0102] **9-7: 아연 이온투과담체**

[0103] ZinPyr-1은 형광염색물질로 FluoZin-3보다 Kd 값이 작아서 더 낮은 농도의 아연 변화를 측정하는데 사용되는데 본 발명의 #28 약물이 이온투과담체의 역할을 할 수 있는지 ZinPyr-1을 사용하여 관찰하였다. 구체적으로 상기 배양된 생쥐의 대뇌피질 신경세포에 ZinPyr-1을 처리한 후 일반적으로 사용하는 신경세포 배양액에 #28 약물 (0.05 μ M)과 클리오퀴놀(0.5 μ M)을 처리하고 무처리군을 대조군으로 하여 신경세포 내 아연이온 농도의 변화를 측정하였다.

[0104] 그 결과, 일반적인 배양액 조건에서는 클리오퀴놀에 의한 아연 증가가 관찰되었으나 #28 약물에 의한 증가는 뚜렷하게 관찰되지 않았다. 그래서 세포배양액에 추가적으로 0.5 μ M 농도의 아연을 추가한 후 세포 내 아연농도 변화를 관찰한 결과 클리오퀴놀 및 #28 약물의 처리에 의해 유의한 아연 증가가 관찰되었다(도 21). 따라서 본 발명의 #28 약물도 이온투과담체 역할을 할 수 있다고 사료되며 클리오퀴놀과 비교할 때 낮은 수준으로 아연을 증가시키는 것으로 사료된다.

[0105] 실제 클리오퀴놀은 아연 친화도(affinity)가 높아서 높은 농도의 아연은 킬레이트화 할 수 있으나 약물 자체의 이온투과담체 기능 때문에 세포질 아연농도를 쉽게 증가시켜서 독성이 유발되는 것으로 잘 알려져 있다. 그래서 클리오퀴놀은 뇌졸중 치료제로 적합하지 않으나 본 발명의 #28 약물은 세포질 아연농도를 크게 증가시키지 않는 수준에서 이온투과담체 역할을 수행하며, 독성이 유발될 수준으로 세포질 내 자유 아연이 증가하게 되면 킬레이트화를 통해 적절한 수준으로 아연 항상성을 조절하는 것으로 사료된다.

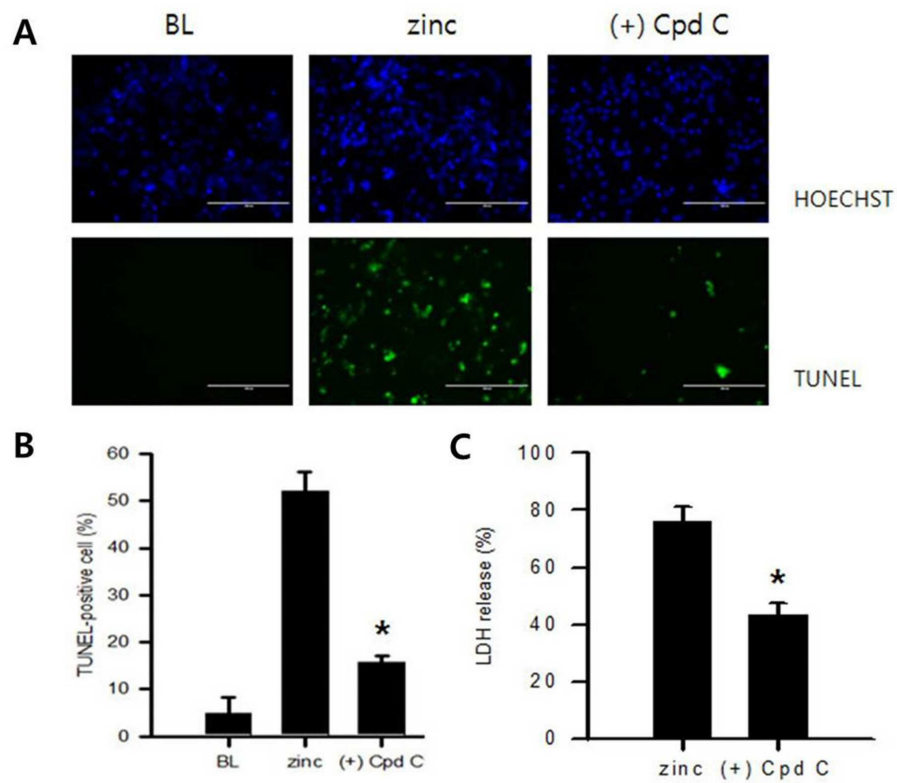
[0106] 상기 결과들을 종합해보면, AMPK 효소가 뇌졸중의 원인기전 중 하나로 생각되는 아연독성에 중요한 역할을 하고 있음을 발견하여 AMPK 효소 활성을 억제기능을 가지고 있는 새로운 화합물 후보군에서 여러 차례 스크리닝을 실시하여 탁월한 아연독성에 효과를 보인 화합물 #28을 최종 선별하고 뇌졸중 동물모델에 처리한 결과 현저하게 뇌손상을 억제됨을 확인하였고 상기 #28 약물의 구조를 기반으로 유사화합물을 선별하여 다양한 신경독성 유발 후 처리한 결과 뛰어난 신경보호 효과를 나타내었으므로 이들 화합물들은 새로운 뇌졸중 치료제로 활용 가능하다.

[0107] 본 발명은 상술한 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

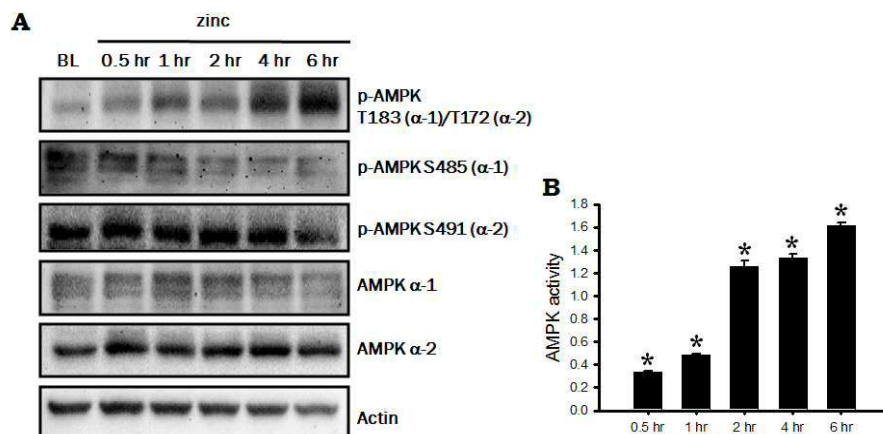
[0108]

도면

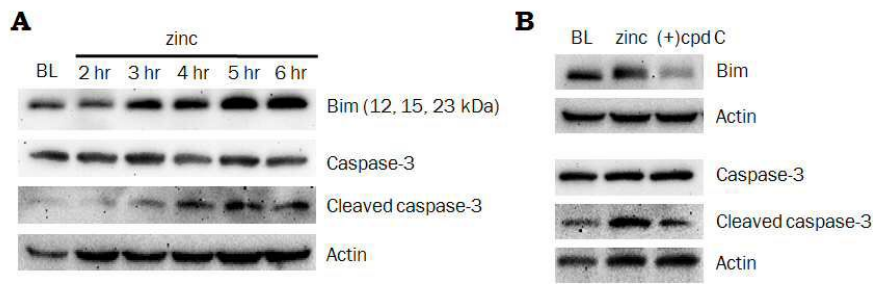
도면1



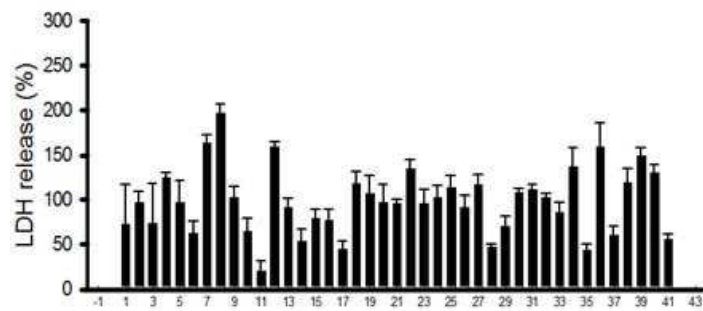
도면2



도면3

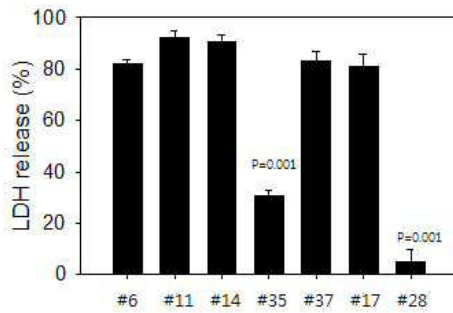


도면4

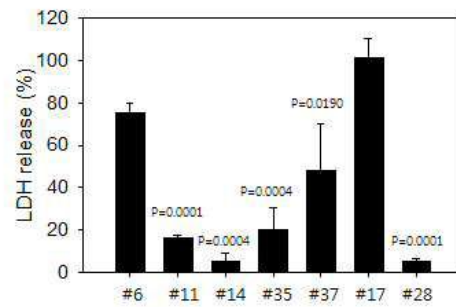


도면5

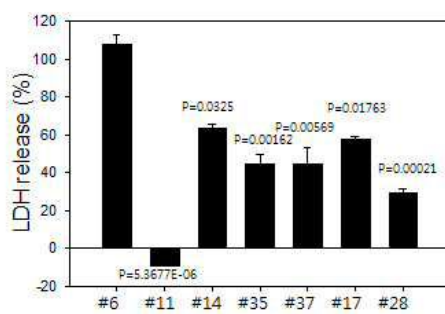
NMDA toxicity



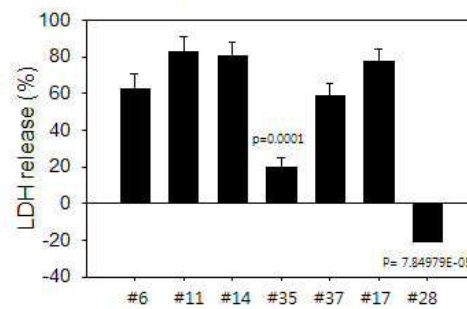
Iron toxicity



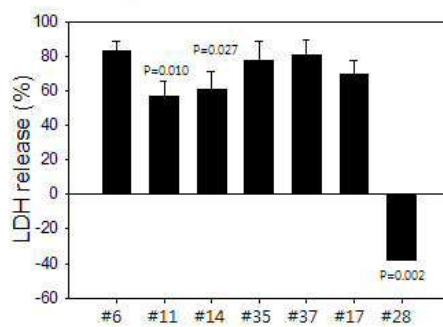
H2O2 toxicity



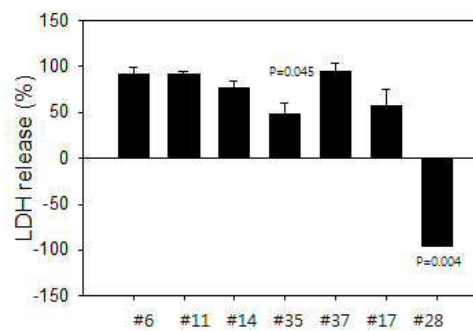
TPEN toxicity



Staurosporine toxicity



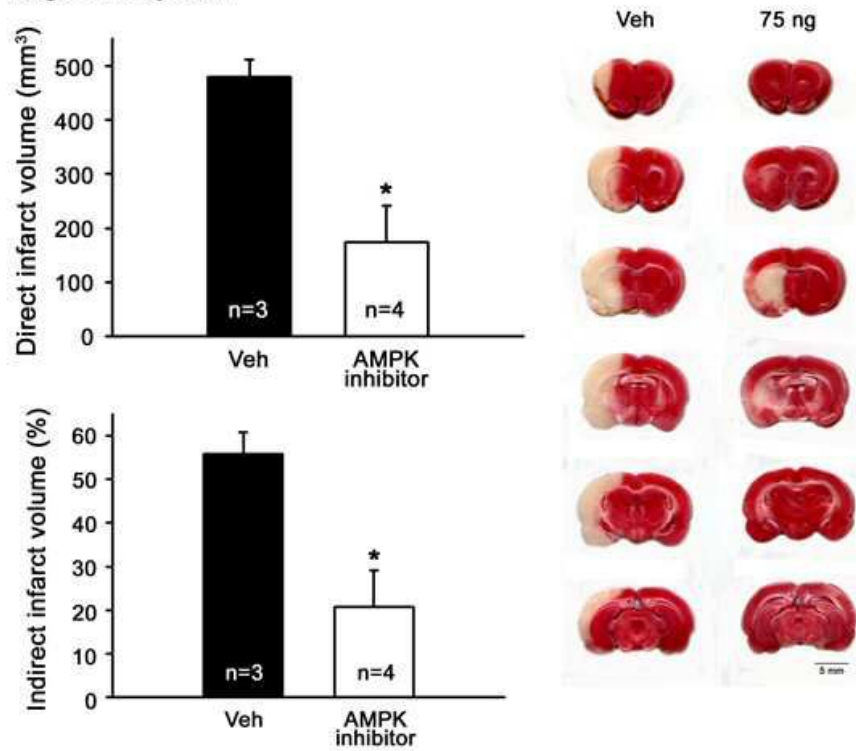
Etoposide toxicity



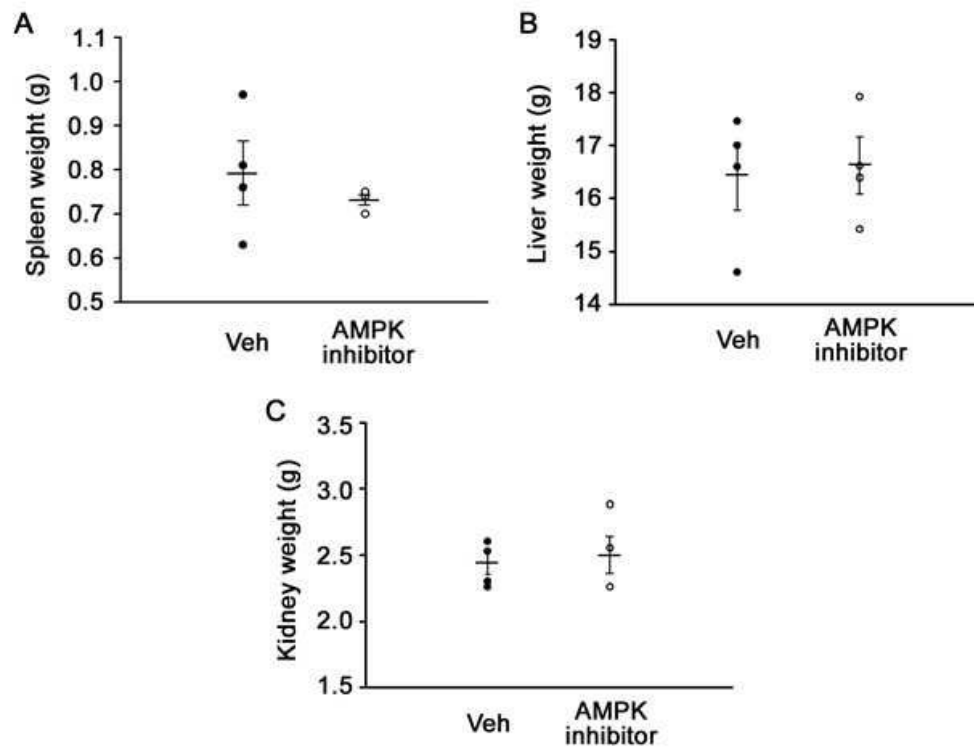
도면6

Effect of AMPK inhibitor II on focal cerebral ischemia

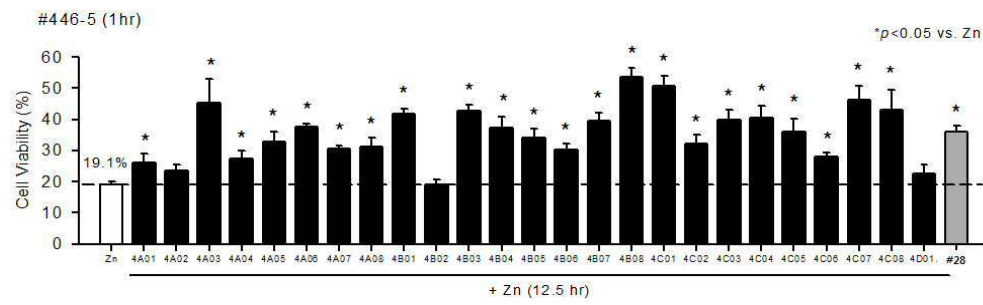
75ng/3ul icv injection



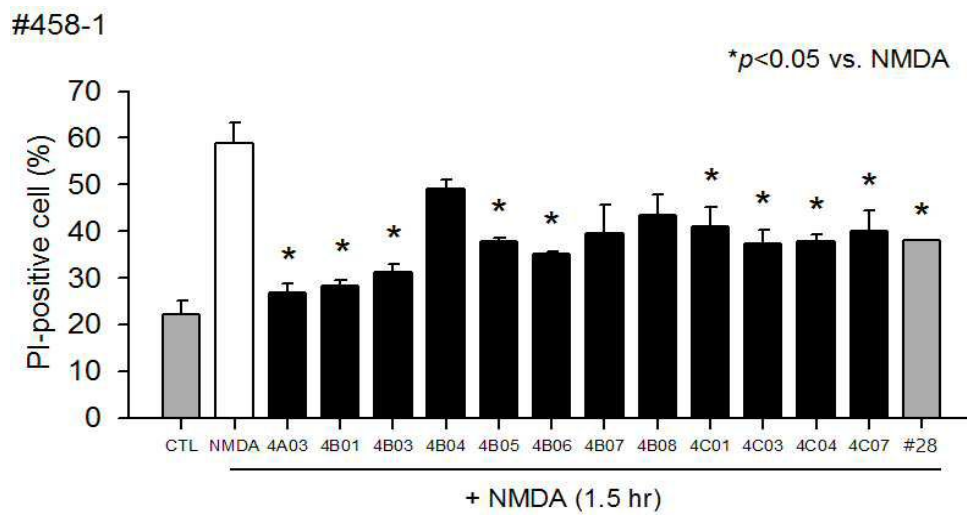
도면7



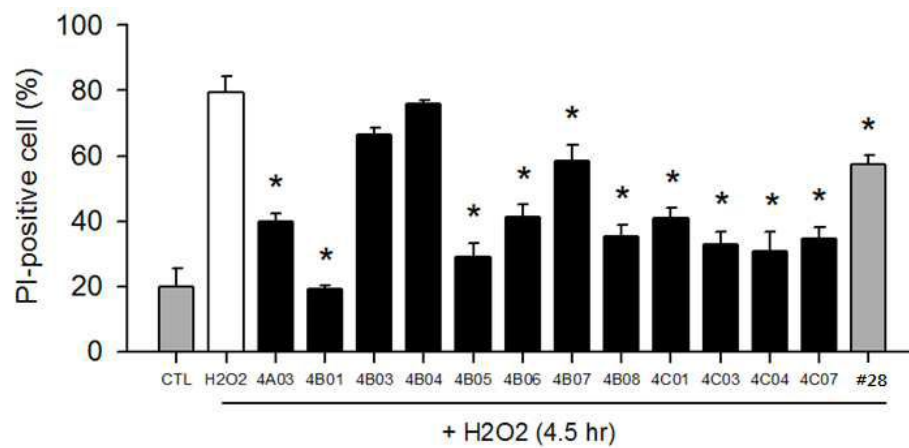
도면8



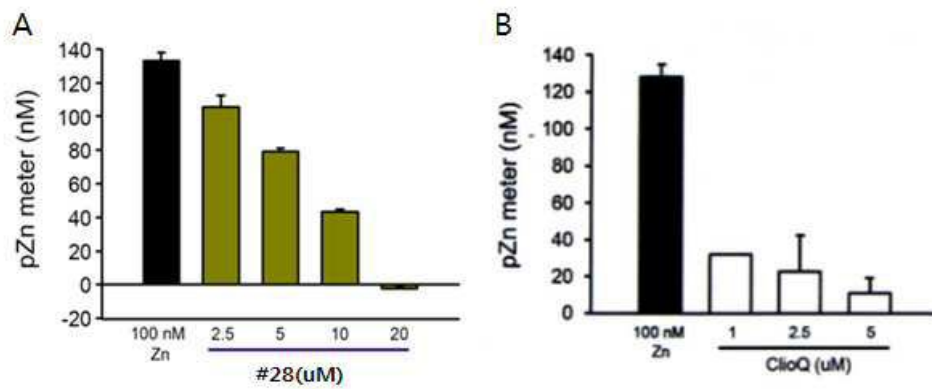
도면9



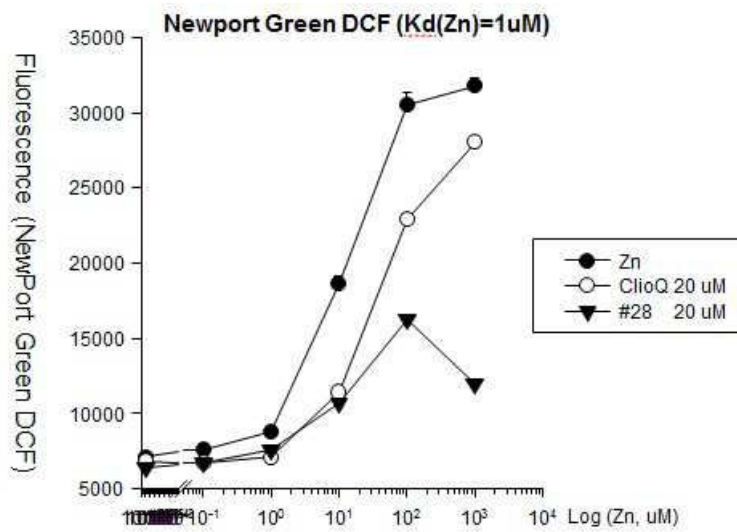
도면10



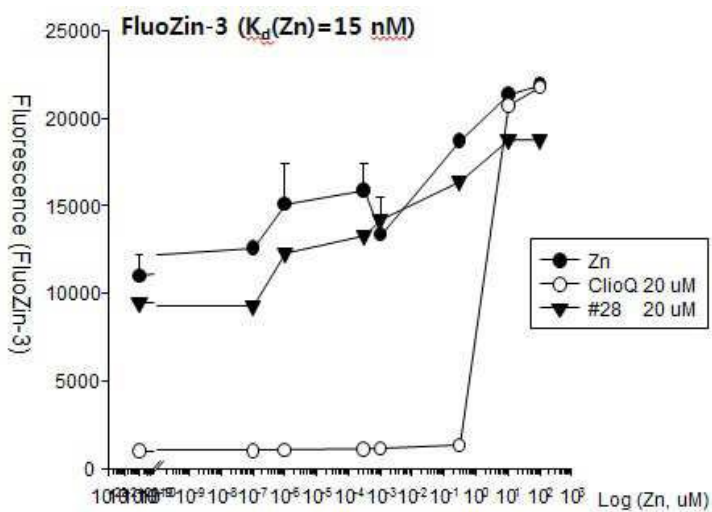
도면11



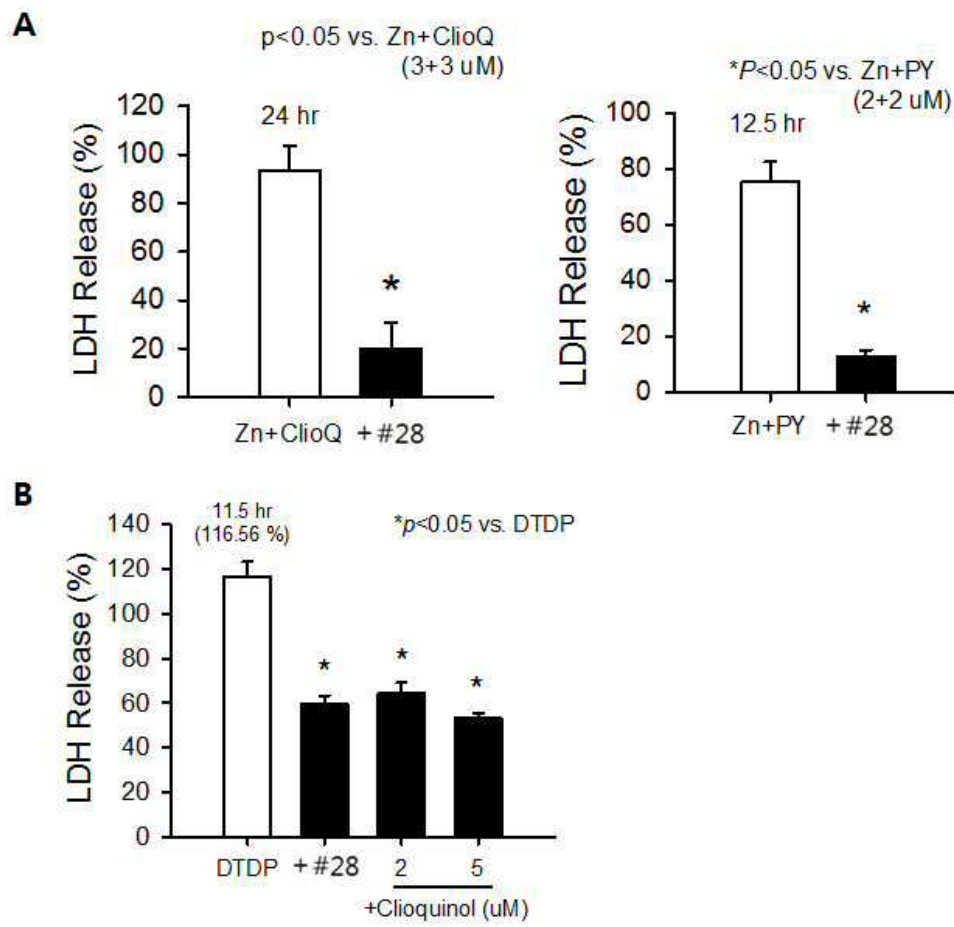
도면12



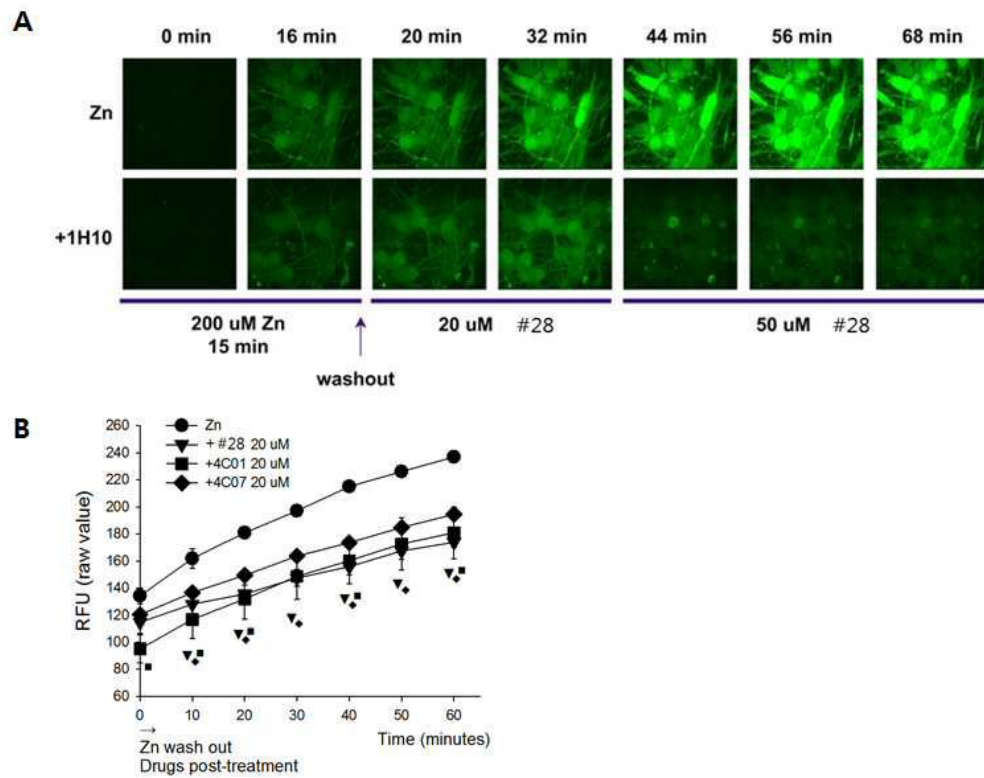
도면13



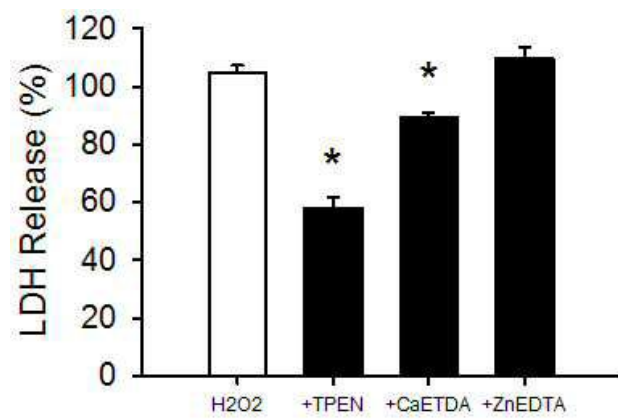
도면14



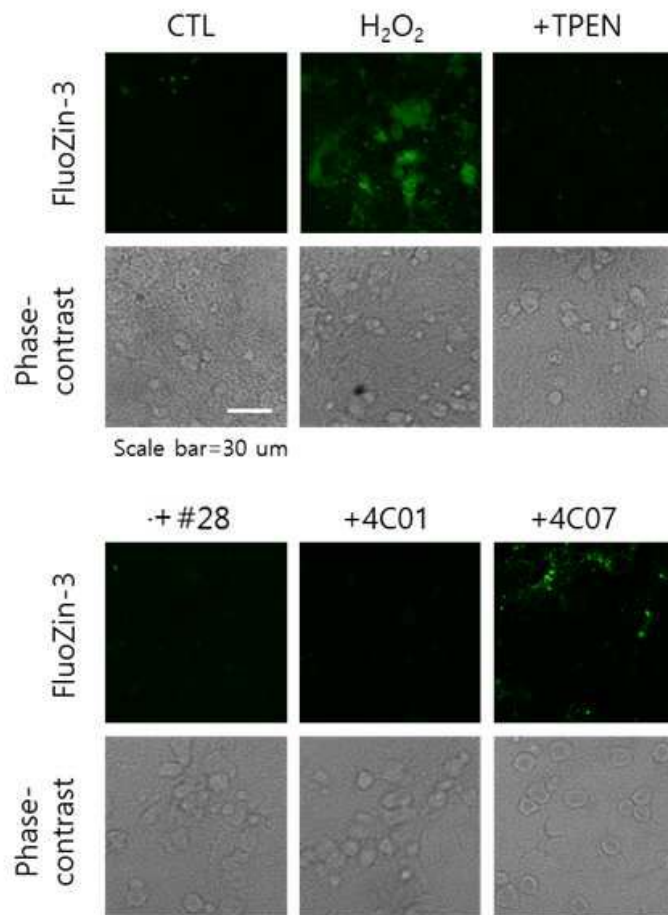
도면15



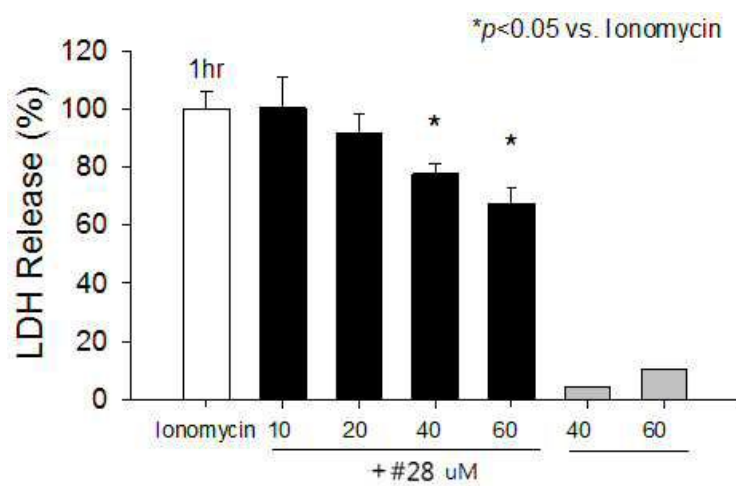
도면16



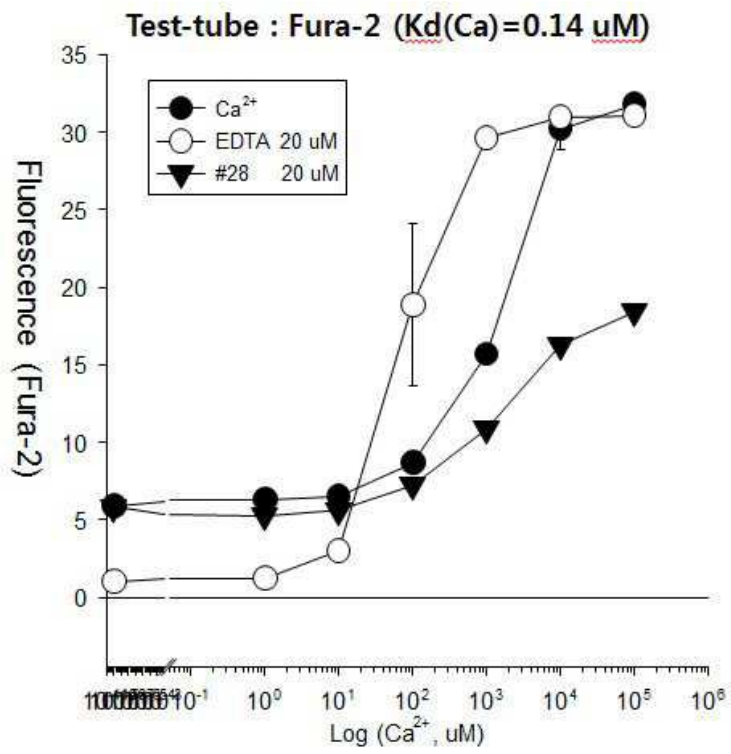
도면17



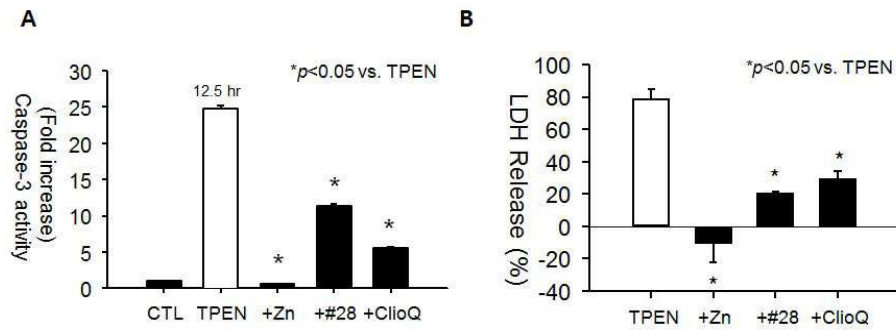
도면18



도면19



도면20



도면21

