



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년04월24일
(11) 등록번호 10-1729561
(24) 등록일자 2017년04월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/197 (2006.01) A61K 31/38 (2006.01)
A61K 31/4406 (2006.01) A61K 31/445 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/197 (2013.01)
A61K 31/38 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-0143193
(22) 출원일자 2015년10월14일
심사청구일자 2015년10월14일
- (56) 선행기술조사문헌
Nature. 2010. Vol. 468, pp. 176-177*
Brain Research. 2002. Vol. 946, pp. 162-170*
Nature. 2010. Vol. 468, No. 7321, pp. 305-309*
J Physiol. 2009. Vol. 587, pp. 4645-4660*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
- (72) 발명자
박진봉
대전광역시 서구 둔산남로 127, 204동 901호(둔산동, 목련아파트)
수디퍼
대전광역시 중구 문화로 266 (문화동)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 공간

전체 청구항 수 : 총 3 항

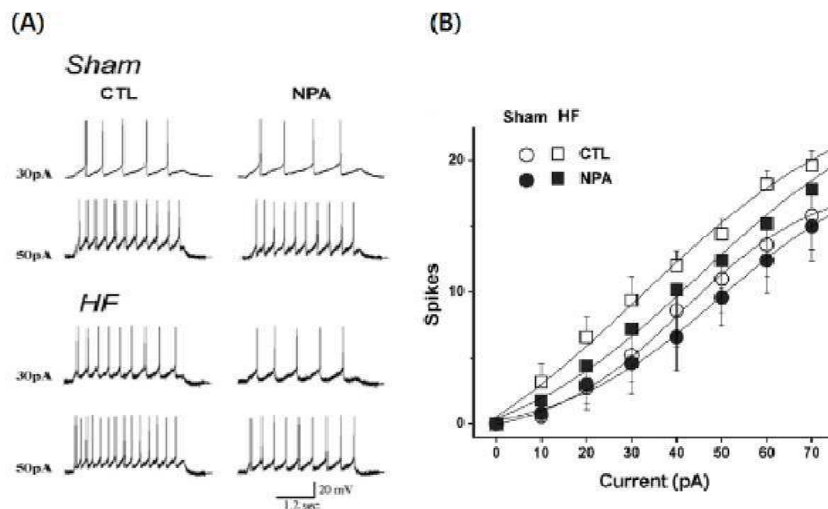
심사관 : 감윤희

(54) 발명의 명칭 가바 수송체-3 억제제를 포함하는 심부전 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 심부전 환자들에게서 나타나는 교감신경계 과활성 억제를 통한 심부전 치료용 조성물에 관한 것으로, 교감신경계 과활성 억제를 위해 가바 수송체-3 억제제를 이용할 수 있다. 가바 수송체-3 억제제는 가바의 긴장성 전류의 감소에 의해 나타나는 교감신경계 과활성을 억제함으로써 교감신경계 과활성이 수반되는 심부전을 치료할 수 있고, 심부전에 의한 돌연사, 부정맥 및 뇌졸중 등과 같은 부작용을 예방 및 치료할 수 있다. 이를 통해 심부전에 의한 사망률의 감소를 기대할 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 31/4406 (2013.01)

A61K 31/445 (2013.01)

(72) 발명자

김현우

대전광역시 중구 서문로 96, 211동 2203호(문화동,
센트럴파크2단지아파트)

김동운

대전광역시 서구 둔산북로 160, 7동 1003호(
둔산동, 한마루아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2008-0061214

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국과학재단

연구사업명 중견연구자 지원사업 -핵심연구

연구과제명 허혈성 심부전시 교감신경과활성에 대한 GABA 신경계의 역할

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교산학협력단

연구기간 2008.09.01 ~ 2011.08.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

가바 수송체-3(GABA transporter-3) 억제제인 니페코트산(nipecotic acid) 및 SNAP-5114(1-[2-[tris(4-methoxyphenyl)methoxy]ethyl]-3-piperidinecarboxylic acid)에서 선택된 1종 이상을 포함하는 심부전 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

심부전은 교감신경계 과활성을 수반하는 것을 특징으로 하는 심부전 치료용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

교감신경계 과활성은 심부전의 예후를 나쁘게 하여 심부전에 의한 돌연사, 부정맥 및 뇌졸중을 포함하는 심부전에 의한 부작용을 포함하는 것을 특징으로 하는 심부전 치료용 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 가바 수송체-3 억제제를 포함하는 심부전 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 국민의 평균 수명이 늘어남에 따라 노인 인구가 급격히 증가하고 고혈압이나 당뇨병과 같은 심혈관계 위험인자의 유병률이 증가함에 따라 심부전의 유병률 역시 크게 증가하고 있다(한성우 et al., 2005). 지난 10년간 의학의 비약적 발전과 신 치료 기술의 개발이 있었으나, 심부전 질환은 여전히 높은 병원 내 사망률(in-hospital mortality)을 보이고 있으며, 의료비 부담 또한 점차 가중되고 있다. 한 예로 2004년 이후 미국에서 100만 명이상이 심부전을 주 진단으로 입원하였고, 특히 노인 인구의 병원 입원 및 사망의 주요 원인이 되고 있다. 이처럼 심부전이 공중 보건에서 상당히 중요한 부분을 차지하고, 예방 가능한 측면이 많음에도 불구하고, 심부전 환자의 삶의 질은 크게 나아지지 않았다.

[0003] 심부전(heart failure)이란 심장의 구조적 또는 기능적 이상으로 인해 심장이 혈액을 받아들이는 충만 기능(이완 기능)이나 짜내는 펌프 기능(수축 기능)이 감소하여, 결과적으로 심장이 신체 조직에 필요한 혈액을 제대로 공급하지 못하는 상태를 통칭한다(임성란, 2013). 심부전이 발생되면 원인에 관계없이 심근기능의 저하, 좌심실의 재형성, 혈액학적 변화, 신경호르몬계의 활성화, 사이토카인의 발현, 혈관내피세포의 기능 이상 등이 발생하여(조명찬, 2008) 여러 종류의 부정맥, 심박세동, 뇌졸중, 급성 폐수종, 신장 기능 손상 및 돌연사와 같은 합병증을 일으킬 수 있다. 심부전은 적극적인 치료를 하더라도 1년 사망률이 10%가 넘는 질환으로 심부전의 병태생리와 진행과정을 연구하여 치료방법을 개발하는 노력과 심부전 시 좌심실의 구조와 기능의 변화를 야기시키고 진행시키는 원인들을 규명하는 연구가 매우 중요하다.

[0004] 심부전 환자에서는 교감신경계 과활성과 체액보존을 위한 호르몬 활성화 증가가 특징적으로 관찰되며, 교감신경 과활성은 돌연사 등 심부전의 예후를 나쁘게 하는 요인으로 알려져 있다. 그러나, 교감신경 과활성과 관련된 세

포 수준의 신경전달 기전 및 조절 기작에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

- [0005] 시상하부(hypothalamus)의 뇌실옆핵(paraventricular nucleus, PVN)은 자율신경 및 내분비기능 조절의 최고의 중추이고, 연수복외측부(rostral ventrolateral medulla, RLVM)는 긴장성 및 반사성 교감신경 활성의 조절을 위한 중요한 센터이다. 특히나 뇌실옆핵 연수복외측부(PVN-RLVM)는 심혈관 시스템의 자율신경계를 조절하는데 중요한 역할을 하고 있다.
- [0006] 심부전 시 교감신경 과활성을 반영하는 시상하부 뇌실옆핵 전교감신경세포의 활성 증가는 발화 빈도의 증가를 통해 확인할 수 있다. 심부전 시 뇌실옆핵 신경세포의 발화 빈도가 증가하는 시냅스 기작은 현재까지 알려진 결과에 따르면 가바(γ -aminobutyric acid, GABA)에 의한 억제성 신경 전달의 감소(Li Y. F. et al., 2003)에 의한 교감신경 활성 증가가 유력한 기전으로 생각되어지고 있다.
- [0007] 가바(γ -aminobutyric acid, GABA)는 중추신경계 신경회로의 활성을 억제하는 신경전달물질로, 가바 수용체($GABA_A$ receptor)에 의해 유도된 이온통로(ion channel)에 작용하여 염소 이온(Cl^-)의 세포 내 유입을 증가시켜 세포막의 과분극(hyperpolarization)을 일으켜 신경을 억제 시키는데, 이러한 $GABA_A$ 수용체의 전도는 일과성(transient)으로 억제성 시냅스 후 전류(inhibitory postsynaptic current, IPSCs)를 강화시켜 억제 시냅스(inhibitory synapse) 정보를 전달한다. 최근 $GABA_A$ 수용체에 의한 시냅스 전류(synaptic currents) 이외에 긴장성 전류(tonic inhibitory currents, I_{tonic})의 기능에 대해서도 밝혀지고 있다. 이러한 긴장성 전류는 낮은 농도의 가바가 시냅스가 아닌 시냅스 밖(extrasynapse)의 가바 수용체에 작용하여 나타는 것으로 알려져 있다. 시냅스 밖 가바 수용체는 시냅스 내 가바 수용체에 비해 더욱 가바에 친화성이 크며, 탈감작(desensitization)도 적게 발생한다. 따라서 이러한 특징에 의해서 긴장성 전류가 발생된다. 시냅스 밖의 낮은 농도의 가바는 시냅스에서 유출되며 이에 의해 발생하는 긴장성 전류는 소뇌, 시상, 및 해마 등에서 관찰된다(천상우 et al., 2009).
- [0008] 시냅스 밖의 가바는 가바 수송체(GABA transporter, GAT)에 의해서 성상세포(astrocyte)나 축삭(axon) 말단으로 흡수(uptake)된다. 가바 수송체에는 GAT-1, GAT-2, GAT-3 및 BGT1(betaine-GABA transporter) 4종류가 존재한다. 이러한 수송체는 세포 밖의 가바를 흡수하여 가바의 양을 조절함으로써 신경 증상들을 나타내도록 한다(Zhou Y. et al., 2013). 예를 들면, 신경세포(GAT-1)나 성상세포(GAT-3) 안쪽으로 가바를 흡수하는 가바 수송체의 활성이 억제되면 가바의 억제 작용이 증가된다. 따라서 가바 신호 감소가 나타내는 다양한 신경 증상 및 질환에서 가바 수송체 억제 물질이 가바 신호의 증가를 통해 신경 증상을 호전시킬 수 있다. 현재 다양한 가바 수송체 억제 약물이 발작(seizures)(Pirttimaki T. et al., 2013) 및 정신분열(schizophrenia)(Yu Z. et al., 2013)의 치료에 이용되고 있다.
- [0009] 한편, 한국공개특허 제2014-0033377호에서는 나트륨 채널을 차단하는 헤테로시클릭 화합물을 이용해 심부전을 치료할 수 있다고 개시하고 있다. 또한, 한국공개특허 제2014-0140029호에서는 가바 수송체 억제제 중 하나인 니페코트산 유도체를 포함하는 만성 신장병 도는 폐고혈압증 치료제 조성물에 대해 개시하고 있다.
- [0010] 이에 본 발명자는, 심부전 모델에서 가바의 흡수로 인해 가바의 긴장성 전류가 감소한 것을 관찰하였고, 이를 바탕으로 가바의 흡수와 관련된 가바 수송체-3를 차단함으로써 긴장성 전류가 증가하고 교감신경계 과활성이 억제되는 것을 밝힘으로써 본 발명을 완성할 수 있었다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2014-0033377호, 나트륨 채널 조절제로서의 융합된 헤테로시클릭 화합물, 2014. 03. 18. 공개.
- (특허문헌 0002) 한국공개특허 제2014-0140029호, 니페코트산 유도체 및 그 의약 용도, 2014. 12. 08. 공개.

비특허문헌

- [0012] (비특허문헌 0001) 임성관, 심부전(Heart Failure) 레지스트리(Registry) 국외 연구현황 및 KorAHF 소개, 주간 건강과 질병, 5(40), 806-810, 2013.

- (비특허문헌 0002) 조명찬, 심부전의 동물모델과 심부전 치료의 새로운 분자전략, 대한내과학회지, 74(1), 4-15, 2008.
- (비특허문헌 0003) 천상우 et al., 흰 쥐 해마에서 Midazolam 및 Propofol에 의한 GABA성 전류(GABAergic Currents)에 대한 비교, Korean J. Anesthesiol, 56(6), 675-680, 2009.
- (비특허문헌 0004) 한성우 et al., 한국인 심부전 환자의 임상특성 및 예후인자에 관한 다기관 연구, Korean Circulation J., 35, 357-361, 2005.
- (비특허문헌 0005) Li Y. F. et al., Paraventricular nucleus of the hypothalamus and elevated sympathetic activity in heart failure: the altered inhibitory mechanisms, Acta. Physiol. Scand., 177, 17-26, 2003.
- (비특허문헌 0006) Pirttimaki T. et al., Astrocytic GABA transporter GAT-1 dysfunction in experimental absence seizures, J. Physiol., 591, 823-833, 2013.
- (비특허문헌 0007) Yu Z. et al., GABA transporter-1 deficiency confers schizophrenia-like behavioral phenotypes, PLoS One, 8, e69883, 2013.
- (비특허문헌 0008) Zhou Y. et al., GABA and Glutamate Transporters in Brain, Front Endocrinol (Lausanne), 4(165), doi:10.3389/fendo.2013.00165. eCollection 2013, 2013.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명의 목적은 심부전 환자들에게서 나타나는 교감신경계 과활성을 억제할 수 있는 가바 수송체-3 억제제를 포함하는 심부전 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명은 가바 수송체-3 억제제를 포함하는 심부전 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0015] 상기 심부전은 교감신경계 과활성을 수반하는 것으로 교감신경계 과활성을 억제함으로써 심부전을 치료할 수 있다.
- [0016] 이하 본 발명을 상세하고 설명한다.
- [0017] 본 발명은 가바 수송체-3 억제제를 포함하는 심부전의 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0018] 상기 심부전은 교감신경계 과활성을 수반하는 것으로, 교감신경계 과활성이 원인이 되어 심부전의 예후를 나쁘게 하여 심부전에 의한 돌연사, 부정맥 및 뇌졸중과 같은 심부전에 의한 부작용을 일으킬 수 있다.
- [0019] 상기 가바 수송체-3 억제제는 가바의 흡수를 억제함으로써 교감신경계의 과활성을 억제하는 것으로, 베타-알라닌(β -alanine), 구바신 히드로클로라이드(guvacine hydrochloride), NNC 05-2090 히드로클로라이드(1-[3-(9H-carbazol-9-yl)propyl]-4-(2-methoxyphenyl)-4-piperidinol hydrochloride), 리루졸 히드로클로라이드(riluzole hydrochloride), 티아가빈(tiagabine), 니페코트산(nipecotic acid) 및 SNAP-5114(1-[2-[tris(4-methoxyphenyl)methoxy]ethyl]-3-piperidinecarboxylic acid)로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있고, 바람직하게는 니페코트산 및 SNAP-5114에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0020] 한편, 본 발명의 가바 수송체-3 억제제는 당해 기술 분야에서 통상적인 방법에 따라 합성 할 수 있으며, 약학적으로 허용 가능한 염으로 제조될 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명에 따른 가바 수송체-3 억제제를 유효성분으로 포함하는 심부전의 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 가바 수송체-3 억제제를 포함하는 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학 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. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 약학 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토즈, 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 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0022] 상기 약학 조성물의 투여량은 치료 받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0023] 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명은 심부전 환자들에게서 나타나는 교감신경계 과활성 현상을 억제하는 것을 이용하여 교감신경계 과활성으로 인한 심부전 치료용 조성물에 관한 것으로, 가바의 긴장성 전류의 감소에 의해 나타나는 교감신경계 과활성을 억제할 수 있는 가바 수용체-3 억제제를 이용하여 교감신경계 과활성에 의해 나타나는 심부전을 치료하고, 심부전에 의한 돌연사, 부정맥 및 뇌졸중과 같은 심부전에 의한 부작용을 예방 또는 치료함으로써 심부전에 의한 사망률 감소를 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 정상 모델(Sham)과 심부전 모델(HF)의 심부전 유도 결과를 보여주고 있다. 초음파 심장 검사를 통해 정상 모델과 심부전 모델의 이동 모드(1A) 및 박출량(ejection fraction)(1B)을 비교하였다.

도 2는 정상 모델과 심부전 모델의 시상하부의 뇌실열핵에서 나타나는 긴장성 전류를 확인한 것으로, 가바 수용체 억제제인 비쿠쿨린(BIC)을 처리함으로써 나타나는 유지 전류(I_{holding})의 변화 보여주고 있다. 2A는 비쿠쿨린(BIC)에 의한 유지전류의 이동을 보여주고 있고, 2B는 유지 전류를 수치화하여 그래프로 보여주고 있다.

도 3은 가바 수용체의 비선택적 억제제인 니페코트산(NPA)의 처리에 의한 긴장성 전류의 변화를 확인하였다. 3A는 니페코트산의 처리 농도에 따른 유지 전류의 변화를 나타내었고, 3B는 유지 전류의 변화($I_{\text{holding shift}}$)를 수치화하여 그래프로 나타내었다.

도 4는 가바 수용체-3 억제제인 SNAP-5114의 처리에 의한 긴장성 전류를 확인하였다. 4A는 SNAP-5114의 처리에 의한 유지 전류의 변화를 나타내었고, 4B는 유지 전류의 변화($I_{\text{holding shift}}$)를 수치화하여 그래프로 나타내었다.

도 5는 전류 증폭의 탈분극 전류에 따른 유발된 스파이크의 수를 플롯팅한 결과를 보여주고 있다. 탈분극 전류는 긴장성 전류를 의미하며, 유발된 스파이크의 수는 발화 빈도, 즉 전교감신경세포의 활성을 의미한다. 5A는 주입한 탈분극 전류에 의해 발화(firing)가 유발되는 것을 보여주고 있으며, 5B는 입력-출력 함수를 플롯팅한 결과를 나타내고 있다. X축은 긴장성 전류를 표기하였고 Y축은 스파이크 수(발화 빈도)를 표기하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0027] <실시예 1. 쥐의 심부전 유도>

[0028] 무체가 140g 내지 180g가 되는 수컷의 SD 쥐(Sprague-Dawley rat)를 실험에 이용하기 전 1주일 동안 낮 12시간, 밤 12시간으로 하여 사육하였다. 이때, 물과 식사는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

[0029] 심부전 모델은 SD 쥐를 마취시킨 후 개흉술로 가슴의 왼쪽을 절개하여 심장이 노출되도록 한 뒤 심방의 끝에 있는 좌전하행동맥을 7-0 비단 봉합사(silk suture)로 묶어 심부전이 유도되도록 하였다. 이때 대조군으로 사용할 정상 모델은 쥐를 비단 봉합사로 동맥을 묶는 과정을 제외하고 나머지 과정은 동일하게 진행하였다.

[0030] 심근경색의 유도 여부는 심장 초음파 및 혈류역학(hemodynamic)적인 것을 통해 확인하였고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0031] 도 1에서 보여주듯이, 심장 초음파를 통해 얻은 이미지(도 1A)를 확인한 결과 심부전 모델(HF)의 경우 정상 모델(Sham)과 비교하였을 때, 좌심실 내부 치수가 증가된 것을 통해 심장의 수축 기능이 상실되었음을 알 수 있었다. 또한 박출률(ejection fraction)을 확인한 결과(도 1B)의 경우에도 정상 모델의 박출률이 50% 이상인 반면에 심부전 모델의 경우는 50%가 되지 않는 것을 알 수 있었다. 이를 통해 심부전 모델에서 심부전이 유도된 것을 알 수 있었다.

[0032] <실시예 2. 뇌의 절편 제작>

[0033] 심부전 모델 및 정상 모델로부터 뇌의 절편을 제작하였다.

[0034] 쥐를 마취시키고 목을 자른 후 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌는 95% 산소, 5% 이산화탄소로 이루어진 공간에서 인공 뇌척수액(126mM NaCl, 2.5mM KCl, 1mM MgSO₄, 26mM NaHCO₃, 1.25mM NaH₂PO₄, 20mM glucose, 0.4mM ascorbic acid, 1mM CaCl₂, 2mM pyruvic acid, pH 7.3-7.4)상에서 시상하부의 뇌실액이 포함되어 있는 부위를 절편으로 잘랐다.

[0035] <실시예 3. 전기 생리학적 기록>

[0036] 시상하부의 뇌실액이 포함되어 있는 절편을 가지고, 패치고정(patch-clamp) 방법을 이용하여 전기 생리학적 기록을 수행하였다. 이때, Axopatch 200B(Axon Instruments, Foster City, CA)를 이용하여 35℃에서 3uM의 가바가 포함된 인공 뇌척수액 상에서 측정하였다.

[0037] 실시예 3-1. 전압고정(voltage-clamp) 실험

[0038] 패치 피펫에 높은 농도의 Cl⁻이 포함된 용액(140mM KCl, 10mM HEPES, 5mM Mg²⁺ ATP, 0.9mM MgCl₂, 10mM EGTA)으로 채우고 전류는 1kHz로 여과하고 10kHz로 기록하였다. 유지 전류(holding current, I_{holding})는 유지 전압을 -70mV로 하여 기록하였다. 이때 글루타메이트(glutamate) AMPA(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)/카인네이트(kainate) 수용체 길항제인 DNQX(5,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione) 10uM과 NMDA(N-methyl-D-aspartate receptor) 수용체 길항제인 AP5(D,L-2-amino-5-phosphonopentanoic acid) 100uM을 처리한 상태에서 Mini Analysis로 분석하였다.

[0039] 긴장성 전류(I_{tonic})는 가바 수용체 억제제인 비쿠쿨린(bicuculline, BIC) 20uM을 처리하기 전과 후의 유지 전류(holding current, I_{holding})의 차이를 의미한다.

[0040] 실시예 3-2. 전류고정(current-clamp) 실험

[0041] 패치 피펫에 생리학적 농도의 Cl⁻보다 높은 농도의 용액(130mM K-gluconate, 10mM KCl, 10mM HEPES, 5mM Mg²⁺ ATP, 0.9mM MgCl₂, 10mM EGTA)으로 채웠다. 입력 저항(input resistance)를 측정하기 위해 10pA의 과분극(hyperpolarizing) 과정을 거쳐 생체막의 전위 변화를 표시하였다. 입력-출력의 상관관계는 변화하는 진폭의 탈분극(depolarizing) 펄스(pulse)에 대한 반응을 유발된 스파이크(spike)의 수 대 주입 전류로 나타낼 수 있으며, 볼츠만 함수(Boltzmann function)로 피팅(fitting)하였다.

[0042] 실시예 3-3. 세포부착 전압고정(cell-attached voltage-clamp) 실험

[0043] 세포부착 전압고정(cell-attached voltage-clamp)은 신경에 활동 전류가 발생하는 것(발화, firing discharg

e)을 분석하기 위해 이용하였다. 패치 피펫에 낮은 농도의 Cl^- 를 함유하는 용액(135mM K-gluconate, 10mM KCl, 10mM HEPES, 5mM Mg^{2+} ATP, 0.9mM MgCl_2 , 10mM EGTA)으로 채웠다. 발화율(firing rate)은 시약을 처리하기 전과 후에 3분 동안 10초 씩 발화된 수를 Mini Analysis를 이용해 계산하였다.

[0044] <실시예 4. 긴장성 전류 변화 분석>

[0045] 뇌에서는 세포 밖(extracellular) 가바의 농도가 낮으면 세포 밖에 존재하는 가바 수용체의 활성화를 통해 긴장성 전류가 나타난다. 이를 바탕으로 심부전이 유도된 쥐에서 긴장성 전류를 확인하였다.

[0046] 이를 위해 실시예 3-1의 전압고정 실험 방법을 이용하였다. 정상 모델과 심부전 모델로부터 얻은 뇌의 절편에 가바 수용체 억제제인 비쿠쿨린 20uM을 처리한 후, 비쿠쿨린에 의해 유도된 유지 전류의 외부 이동을 측정하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0047] 도 2를 살펴보면, 가바 수용체 억제제인 비쿠쿨린(BIC)를 처리한 경우에는 도 2A 및 2B에서 보여주듯이, 정상 모델과 비교하였을 때, 심부전 모델의 뇌 조직에서 유지 전류의 외부 이동이 감소 된 것을 알 수 있었다. 이를 통해 심부전 상태에서는 긴장성 전류가 감소함을 알 수 있었다.

[0048] <실시예 5. 가바 수송체 활성 차단을 통한 긴장성 전류 변화 확인>

[0049] 신경세포에서 긴장성 전류는 가바 수송체의 가바 통관에 의해 조절된다. 즉, 가바 수송체의 활성 증가로 인해 세포 밖의 가바가 정상세포나 축삭 말단으로 흡수되어 긴장성 전류가 감소하게 된다. 이를 이용해, 심부전 모델에서 가바 수송체 차단 시 가바의 긴장성 전류가 변하는지를 확인하였다.

[0050] 가바 수송체의 비선택적인 억제제인 니페코트산(nipecotic acid, NPA)을 100uM 및 300uM로 처리하고 실시예 3-1의 전압고정 실험 방법을 이용하여 긴장성 전류의 변화를 확인하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0051] 도 3에서 보여주듯이, 니페코트산의 처리 농도 의존적으로 유지 전류의 내향성 이동이 증가되는 것을 알 수 있었다. 또한 심부전 모델의 경우에는 정상 모델과 비교하였을 때, 유지 전류의 내향성 이동이 더 크게 나타나는 것을 알 수 있었다. 이를 통해, 심부전 상태에서 가바 수송체에 의한 가바의 흡수(uptake)가 증가한다는 것을 예측할 수 있다.

[0052] <실시예 6. 정상세포의 가바 흡수와 긴장성 전류와의 관계 확인>

[0053] 가바의 긴장성 전류는 정상세포의 가바 수송체-3의 활성에 의해 조절된다는 것을 통해 가바 수송체-3이 심부전 상태의 신경세포에서 긴장성 전류의 감소에 중요한 역할을 할 것으로 생각되었다.

[0054] 이를 확인하기 위해 실시예 3-1의 전압고정 실험을 수행하였고, 가바 수송체-1 억제제인 NO-711(5uM)을 처리한 상태에서 가바 수송체-3 억제제인 SNAP-5114(100uM)를 처리하여 가바 수송체-3에 의한 영향을 분석하여 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0055] 도 4를 참고하면, 가바 수송체-1 억제제인 NO-711을 처리한 경우에는 정상 모델과 심부전 모델의 유지 전류의 변화에 있어서 차이가 거의 없는 반면에, 가바 수송체-3 억제제인 SNAP-5114를 처리한 경우에는 심부전 모델에서 유지 전류의 내향성 이동이 크게 나타나는 것을 알 수 있었다. 이를 통해 심부전 상태의 신경세포에서 긴장성 전류의 감소가 가바 수송체-3에 의한 가바의 흡수 증가에 의해 일어남을 알 수 있었다.

[0056] <실시예 7. 심부전 모델에서 긴장성 전류와 전교감신경세포의 활성>

[0057] 심부전의 신경세포에서 반복적인 발화 빈도(전교감신경세포의 활성)에 대한 긴장성 전류가 미치는 영향을 확인하기 위해 정상 모델과 심부전 모델의 입력-출력 함수(input-output function)를 비교하였다. 이때, 실시예 3-2의 전류고정 실험 방법을 이용하였다.

[0058] 전류 증폭의 탈분극 전류 단계를 적용하고, 유발된 스파이크의 수를 플롯팅하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0059] 도 5에서 보여주듯이 주입한 전류의 크기에 의존적으로 발화(firing)가 유발되는 것을 알 수 있었다. 또한 가바 수송체 억제제인 니페코트산(NPA)에 의한 입력-출력 함수를 비교한 결과, 니페코트산의 처리에 의한 발화의 유발 빈도가 감소하는 것을 알 수 있었다. 또한 심부전 모델의 경우에는 정상 모델과 비교하였을 때, 니페코트산에 의한 발화 억제 효과가 더 크게 나타나는 것을 알 수 있었다.

[0060] 이를 통해 심부전 모델에서 긴장성 전류가 전교감신경의 활성화에 영향을 주며, 가바 수송체 억제제가 교감신경의

과활성을 억제하여 심부전에 의한 돌연사 방지 및 심부전의 예후를 나쁘게 하는 요인을 제거함으로써 심부전 치료가 가능할 것이라 사료된다.

[0061] <실시예 8. 독성실험>

[0062] 실시예 8-1. 급성독성

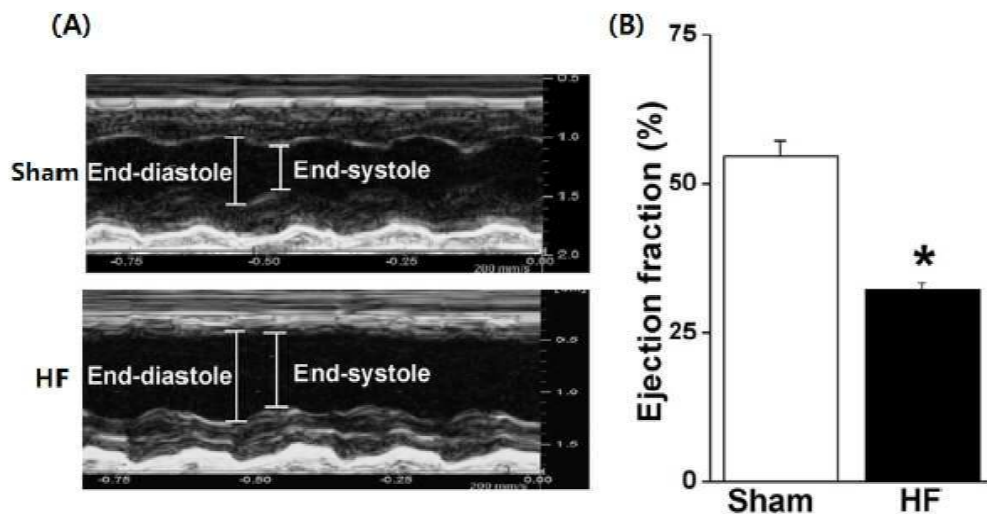
[0063] 본 발명의 가바 수송체-3 억제제를 단기간에 과량을 섭취하였을 시 급성적(24시간 이내)으로 동물체내에 미치는 독성을 조사하고, 치사율을 결정하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 일반적인 마우스인 ICR 마우스 계통 20마리를 대조군은 10마리, 실험군은 10마리씩 배정하였다. 대조군에는 아무것도 투여하지 않았으며, 실험군은 본 발명의 가바 수송체 억제제인 니페코트산을 2.0g/kg(일반적인 동물실험에서 사용되는 양의 50배 정도)의 농도로 경구 투여하였다. 투여 24시간 후에 각각의 치사율을 조사한 결과, 대조군과 2.0g/kg 농도의 본 발명의 가바 수송체-3 억제제를 투여한 실험군은 모두 생존하였다.

[0064] 실시예 8-2. 실험군 및 대조군의 장기 및 조직 독성 실험

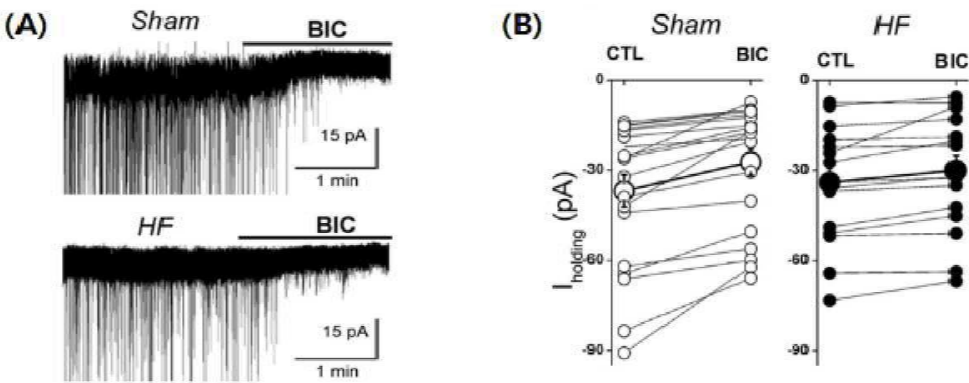
[0065] C57BL/6J 생쥐를 대상으로 동물의 각 장기(조직)에 미치는 영향을 조사하기 위하여 본 발명의 가바 수송체 억제제인 니페코트산을 투여한 실험군과 용매만을 투여한 대조군의 동물들로부터 8주 후 혈액을 채취하여 GPT(glutamate-pyruvate transferase) 및 BUN(Blood Urea Nitrogen)의 혈액 내 농도를 Select E(Vital Scientific NV, Netherland) 기기를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 간독성과 관계있는 것으로 알려진 GPT와 신장독성과 관계있는 것으로 알려진 BUN의 경우, 대조군과 비교하여 실험군은 별다른 차이를 보이지 않았다. 또한, 각 동물로부터 간과 신장을 절취하여 통상적인 조직절편 제작과정을 거쳐 광학현미경으로 조직학적 관찰을 시행하였으며 특이한 이상이 관찰되지 않았다.

도면

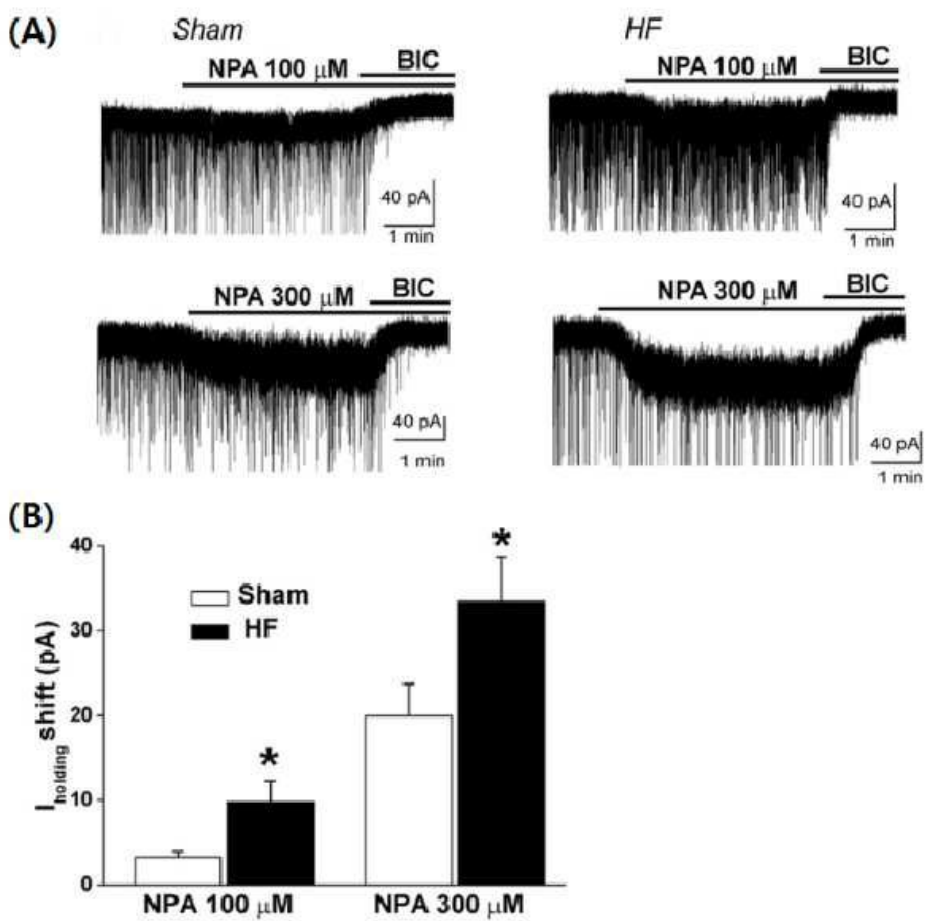
도면1



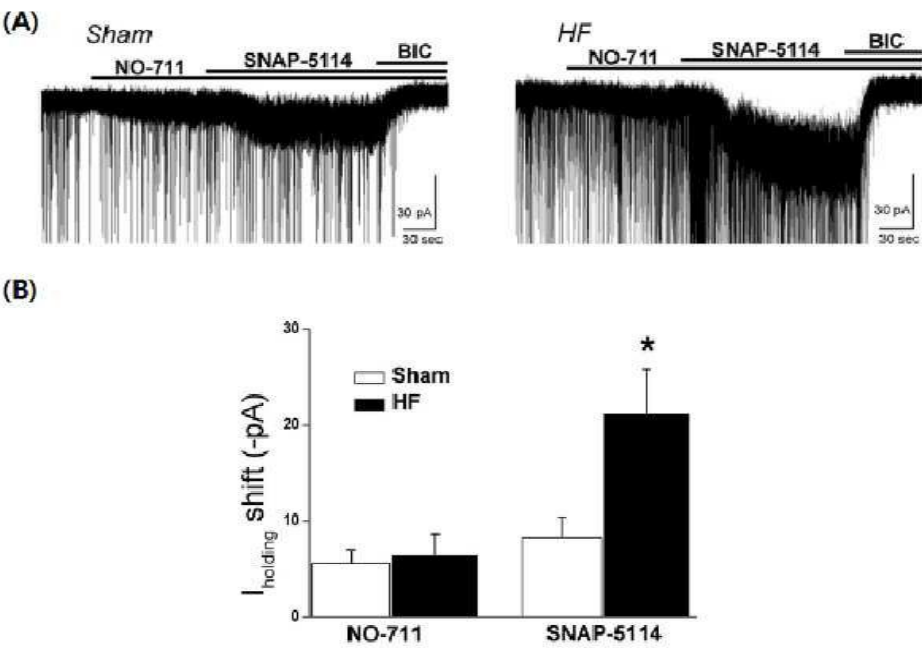
도면2



도면3



도면4



도면5

