



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0098347
(43) 공개일자 2013년09월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/353 (2006.01) A61K 31/352 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01) A61P 25/32 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7007021
(22) 출원일자(국제) 2011년08월23일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2013년03월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/048749
(87) 국제공개번호 WO 2012/027326
국제공개일자 2012년03월01일
(30) 우선권주장
61/376,528 2010년08월24일 미국(US)

(71) 출원인
더 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아
미국 캘리포니아 94607-5200 오클랜드 12층 프랭클린 스트리트 1111
(72) 발명자
리양, 정
미국, 캘리포니아 90095, 로스 앤젤레스, 23-120 씨에이치에스 찰스 영 드라이브, 디파트먼트 몰레글러 & 메디컬 파마콜로지, 씨/오 데이빗 게펜 스쿨 오브 메디슨 옛 유씨엘에이
울젠, 리차드 더블유.
미국, 캘리포니아 90095, 로스 앤젤레스, 23-120 씨에이치에스 찰스 영 드라이브, 디파트먼트 몰레글러 & 메디컬 파마콜로지, 씨/오 데이빗 게펜 스쿨 오브 메디슨 옛 유씨엘에이
스피겔맨, 이고르
미국, 캘리포니아 90095-1668, 로스 앤젤레스, 63-078 씨에이치에스, 10833 르 콘테 애비뉴, 디비전 오브 오랄 바이올로지 & 메디슨, 씨/오 유씨엘에이 스쿨 오브 덴티스트리
(74) 대리인
허용록

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 디히드로미리세틴의 투여를 포함하는, 알코올 중독, 알코올 사용 장애 및 알코올 남용을 치료하는 방법들

(57) 요약

디히드로미리세틴의 투여를 포함하는 알코올 중독, 알코올 사용 장애 및 알코올 남용의 치료방법이 본원에 개시된다. 본원에 개시된 바와 같이, 디히드로미리세틴은 에탄올의 효과와 관련 있는 $\alpha 4\beta \delta$ 하위 단위를 함유하는 $GABA_A$ R의 활성을 강화하고, $GABA_A$ R에 대한 에탄올의 작용을 저해하고, $GABA_A$ R의 벤조다이아제핀 부위에 작용하며, 에탄올 노출에 의해 유발되는 $GABA_A$ R 감소성의 일부 또는 전부를 억제하고, 감소시키고 및/또는 역전시킨다.

특허청구의 범위

청구항 1

에탄올에 노출될, 노출되는 및/또는 노출되었던 GABA_A 수용체에 디히드로미리스틴을 투여하는 단계를 포함하는, 에탄올 노출로 유발된 GABA_AR 가소성과 관련된 알코올 중독 및 알코올 사용 장애의 치료, 억제, 감소 및/또는 역전 방법.

청구항 2

GABA_A 수용체에 디히드로미리스틴을 투여하는 단계를 포함하는, GABA_A 수용체의 활성을 강화하는 방법.

청구항 3

에탄올 노출 전, 노출 중 및/또는 노출 후에 GABA_A 수용체에 디히드로미리스틴을 투여하는 단계를 포함하는, GABA_A 수용체에 대한 에탄올의 활성을 저해하는 방법.

청구항 4

제1항에 따라 대상자의 GABA_A 수용체의 GABA_AR 가소성을 치료, 억제, 감소 및/또는 역전시키는 단계;

제2항에 따라 대상자의 GABA_A 수용체의 활성을 강화하는 단계; 및/또는

제3항에 따라 대상자의 GABA_A 수용체에 대한 에탄올의 활성을 저해하는 단계를 포함하는, 대상자의 에탄올 중독, 알코올 금단 증후군의 증상, 알코올 사용 장애 및/또는 알코올 남용의 치료, 억제 및/또는 감소 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

알코올 금단 증후군의 증상은 에탄올에 대한 내성, 증가된 기저 불안 및 과잉 민감성으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

치료는 에탄올 노출에 의해 유발되는 대상자의 각성도 감소를 줄이거나 억제하는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

디히드로미리스틴은 유효한 양으로 투여되는, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

디히드로미리스틴은 에탄올 노출 전, 노출 중 및/또는 노출 후에 투여되는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항에 있어서,

디히드로미리스틴은 에탄올을 함유하거나 함유하지 않을 수 있는, 음료와 같은 식품의 형태로 투여되는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

디히드로미리세틴은 에탄올과 공동 투여되는, 방법.

청구항 11

본원에 개시된 바와 같은 발명.

명세서

기술분야

[0001] 관련된 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 발명은, 2010 년 8 월 24에 출원된, 미국 특허 출원 일련 번호 제61/376,528호의 이익을 주장하며, 이는 본원에서 그 전부가 참조로서 포함된다.

[0003] 정부 지원에 대한 진술

[0004] 본 발명은, 미국 국립 보건원 지원 과제 번호 AA007680, AA016100 및 A0017991 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대해 일정한 권리가 있다.

[0005] 본 발명은, 일반적으로 감마-아미노부티르산(γ -aminobutyric acid)(A) 수용체의 에탄올에 의해 유발된 가소성을 조절하기 위해, 디히드로미리세틴(dihydromyricetin)을 이용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 에탄올 중독, 알코올 사용 장애 및 알코올 남용을 치료하기 위하여, 디히드로미리세틴을 이용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0006] 알코올 의존도는 미국에서 유병율과 사망률에 대한 예방 가능한 원인들에 대한 목록에서 3위를 차지한다. 미국에서 매년 사고와 살인 사건을 제외하고, 알코올 유발 사망 건수는 20,000 건 이상이다. 2008년 미국에서는 음주 운전으로 11,773명이 죽었는데, 이는 전체 교통관련 사망의 거의 1/3 정도를 차지한다. 질병통제예방센터에 따르면 알코올 관련성 사고에 대한 연간 비용은 총 510억 달러를 넘는다.

[0007] 알코올(에탄올, EtOH)의 감마-아미노부티르산(A) 수용체(GABA_AR)와의 상호 작용은 알코올 금단 증후군(AWS)에 있어 중요한 역할을 한다. 참조: Becker HC(1998) Alcohol Health Res World 22(1):25-33; Boehm SL, 2nd, 등 (2004) Biochem Pharmacol 68(8):1581-1602; Koob GF (2004) Biochem Pharmacol 68:1515-1525; Anacker AM 및 Ryabinin AE (2010) Int J Environ Res Public Health 7(2):473-493; 및 Dopico AM 및 Lovinger DM (2009) Pharmacol Rev 61(1):98-114.

[0008] 시냅스상에 있는 GABA_AR들은 에탄올에 대해 낮은 민감도를 가지는 $\alpha\beta\gamma$ 의 하위단위(subunits)로 이루어 지지만; $\alpha4\beta\delta$ 하위 단위를 포함하는 GABA_AR들은 낮은 에탄올 농도에 매우 민감하다. 참조: Liang J, 등(2008) Alcohol Clin Exp Res 32(1):19-26; Santhakumar V, 등, (2007) Alcohol 41(3):211-221; 및 Jia F 등, (2005) J Neurophysiol 94(6):4491-4501. GABA_AR들은 에탄올, 일반 마취제들, 벤조다이아제핀과 신경 스테로이드들에 의해 알로스테릭(allosteric) 조절을 받는 것으로 알려져 있다. 참조: Olsen RW 및 Homanics GE (2000) GABA in the Nervous System: The View at Fifty Years (Martin DL 및 Olsen RW eds) pp 81-96, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; 및 Wallner M, 등(2003) PNAS USA 100(25):15218-15223. AWS의 근본적인 메커니즘은 에탄올의 과도한 남용에 의해 유발되는 GABA_AR의 가소성이며, 이것은 일반적으로, 감소된 GABA_AR의 활성화와 관련이 되어 있고, 다르게 변형된 하위 단위(subunit)의 발현이라는 것을 여러 연구들에서 나타내고 있다. 참조: Olsen RW 등(2005) Neurochem Res 30:1579-1588; Liang J 등(2006) J Neurosci 26:1749-1758; 및 Liang J 등(2007) J Neurosci 27:12367-12377. 체외 및 생체 내 에탄올 중독 후 시냅스의 $\alpha4\beta\delta$ 하위 단위들을 포함하는 GABA_AR들은 곧 바로 내재화한다. 참조: Shen Y, 등, (2010) Mol Pharmacol 79(3):432-442; 및 Liang J, 등, (2007). 시냅스의 $\alpha4\beta\delta$ 하위 단위를 포함하는 GABA_AR은 에탄올 중독 및 다른 진정-취면-마취 약물에 의해 유발되는 정위반사(LORR)의 행동 손실과 뚜렷한 선형적인 관계를 보인다. 참조: Liang J, 등 (2009) J Neurophysiol 102:224-233. 바꿔 말하면, 시냅스의 $\alpha4\beta\delta$ 를 포함하는 GABA_AR의 특성 변화는 알코올 유발성 행동 변화의 기저를 이룬다. 따라서, GABA_AR은 알코올 의존성 치료에서 신경약물학적인 표적으로서의 가

능성이 지적되어 왔다. 참조: Olsen RW 및 Sieghart W (2009) Neuropharmacology 56:141-148. 불행하게도, 만성 에탄올 노출로 초래되는 GABA_AR의 감소성을 억제 및/또는 역전시키는 방법이나 조성물은 알려진 바가 없다.

[0009] 벤조다이아제핀(예컨대, 다이아제팜)은 AWS 증후군을 감소시키기 위한 고전적인 약물이다. 하지만, 벤조다이아제핀은 알코올 민감성 및 비민감성 $\alpha 4\beta \delta$ 하위단위를 포함하는 GABA_AR에서 비활성이다. 또한, 벤조다이아제핀은 에탄올에 대한 교체 내성을 초래한다. 게다가, 주요 부작용으로서, 벤조다이아제핀의 빈번한 사용은 의존성으로 이어질 수 있다. 사실, 벤조다이아제핀 및 알코올의 조합은 알코올 의존성 그 자체와 비교 시 극복하기 더 힘든 보다 심각한 물질 중독 문제를 일으킨다.

[0010] 벤조다이아제핀 외에도, 오직 세가지 약물들, 즉, 날트렉손, 아캄프로세이트 및 디설피람이 알코올 의존성을 치료를 위해 현재 미국 식품의약국에서 승인되었다. 날트렉손은 오피오이드 수용체를 차단하고 사고와 반응시간에도 손상을 줄 수 있으며, 불안과 기타 불행감을 초래할 수 있다. 아캄프로세이트는 두통, 설사, 속이 부글거림, 및 메스꺼움 등의 부작용을 일으키며 두 가지 대규모 미국 임상 시험은 그 효능을 확인하는 데 실패하였다. 디설피람은 알코올 대사를 차단하도록 되어 있어 알코올 흡수에 대한 거부 반응 및 홍조, 심박동수 촉진, 숨가쁨, 메스꺼움, 구토, 도통, 시각 장애, 정신 혼란, 및 순환허탈을 포함하는 부작용을 일으킨다.

[0011] 따라서, 에탄올에 노출 시 초래되는 일부 또는 모든 GABA_AR의 감소성을 치료, 억제, 감소 및/또는 역전시키는 조성물들 및 방법에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 디히드로미리세틴의 투여를 포함하는, 알코올 중독, 알코올 사용 장애 및 알코올 남용을 치료하는 방법들을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 일부 실시예에서, 본 발명은 에탄올에 노출 시 초래되는 GABA_AR의 감소성을 치료, 억제, 감소 및/또는 역전시키는 방법들을 제공하는 데, 이러한 방법은 에탄올에 노출될, 노출되는, 및/또는 노출되었던 GABA_A 수용체에 대하여 디히드로미리세틴을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 본 발명은, GABA_A 수용체의 활성을 강화시킬 방법들을 제공하는데, 이러한 방법은 GABA_A 수용체에 대하여 디히드로미리세틴을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 본 발명은, GABA_A 수용체에 대한 에탄올의 활성을 저해시키는 방법들을 제공하는데, 이러한 방법은 에탄올에 노출되기 전, 노출 중, 및/또는 노출 후에, 중추 신경계 GABA_A 수용체에서 작용하는 뇌 조직에 대하여 디히드로미리세틴을 투여하는 단계를 포함한다.

[0014] 일부 실시예에서, 본 발명은 대상자에서 에탄올 중독, 알코올 금단 증후군 중 적어도 하나, 알코올 사용 장애 및/또는 알코올 남용을 치료, 억제 및/또는 감소시킬 방법들을 제공하는 데, 이러한 방법은 본원에서 개시된 바와 같이 GABA_A 수용체에서 GABA_AR의 감소성을 치료, 억제, 감소 및/또는 역전시키는 것, GABA_A 수용체의 활성을 강화하는 것 및/또는 GABA_A 수용체에 대한 에탄올의 활성을 저해시키는 것을 포함한다. 일부 실시예에서, 대상자는 포유류, 바람직하게는 사람이다. 일부 실시예에서, 알코올 금단 증후군의 증상은, 에탄올에 대한 내성, 증가된 기저 불안, 및 과잉 민감성으로 이루어진 군에서 선택되었다. 일부 실시예에서, 치료는 에탄올에 노출 시 대상자에게서 일어나는 각성도 감소를 줄이거나 억제한다. 일부 실시예에서, 알코올 남용이란 에탄올에 노출 시 유발되는 높은 알코올 소비를 말한다.

[0015] 본원에서 개시된 실시예에서, 에탄올에 노출되기 전, 노출 중 및/또는 노출 후에 디히드로미리세틴이 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, 에탄올에 노출되기 30분 전부터 바로 직전까지의 기간에 디히드로미리세틴이 투여된다. 일부 실시예에서, 에탄올에 노출된 후 직후부터 약 30분 후까지의 기간에 디히드로미리세틴이 투여된다. 일부 실시예에서, 디히드로미리세틴은 음료 같은 식품 형태로 투여될 수 있으며, 이때 에탄올을 포함하거나 포함하지 않을 수도 있다. 일부 실시예에서, 디히드로미리세틴은 약학 제형 형태로 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, 디히드로미리세틴은 에탄올과 공동 투여될 수 있다. 본원에서 개시된 실시예들에서, 디히드로미리세틴은 효과적인 양으로 투여될 수 있다. 일부 실시예들에서, 디히드로미리세틴은 치료적으로 효과적인 양으로 투여될 수 있다. 일부 실시예들에서, 디히드로미리세틴은 한 단위 용량 형태로 투여될 수 있다. 일부 실시예들에서, 사람을 위한

한 단위 용량의 디히드로미리세틴의 양은 약 50 내지 70 mg 이다.

[0016] 전술한 일반적인 설명과 후술할 상세한 설명은 모두 단지 예시적이고 설명적인 것이며, 청구된 바와 같은 본 발명을 보다 더 설명하기 위하고자 함이다. 첨부된 도면은 본 발명의 더 나은 이해를 제공하기 위해 포함되었으며, 명세서 내에 통합되어 있고, 명세서의 일부를 구성하며, 또한, 본 발명의 몇 가지 실시예를 예시하고 있으며 상세한 설명과 함께 본 발명의 원리를 설명하고 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 본 발명은 도면들을 참조함으로써 더욱 이해된다.

도 1a 내지 1f는, DHM이 급성EtOH 중독을 차단하고, EtOH 금단 증상을 예방하는 것을 보여주는 그래프이다. DHM(1 mg/kg, 복강, n = 5-7 마리 쥐/집단)로 사전(도 1a), 사후(도 1b) 및 조합(도 1c)해서 치료하여 EtOH(3 g/kg, 복강)을 감소시키면, LORR 지속 시간을 유도한다. 담체 주입 쥐는 식염수(20 ml/kg, 복강)를 공급받았다. 그 결과, DHM만으로는 LORR(도 1c)을 유발하지 않았지만, 단지 EtOH 이후 30 분에 주입했음에도(점선), DHM은 현저히 LORR 지속 시간을 감소시켰다. 도 1d는 별도의 실험 결과를 보여주는 그래프이다. 도 1d에 도시된 바와 같이, EtOH(3 g/kg) 와 DHM(1 mg/kg, 복강)을 동시에 복강내 주입 시, EtOH(3 g/kg, 복강)-유발 LORR(n = 7/집단)에 대한, 금단(24 시간)-유발성 내성은 사라져 버렸다. DHM + EtOH의 공동투여는 단일 투여량의 EtOH 중독(도 1b에서와 같은 동물)으로부터 PTZ-유발 발작 지속시간(도 1e) 및 발생(도 1f)의 금단(48 시간)-유발성 증가를 막았다. *, $p < 0.01$ 대 담체만 처리, 일원배치분산분석.

도 2a 및 2b는, DHM이 단일 투여량의 EtOH 노출/금단-유발 GABA_AR의 가소성을 차단하는 것을 나타낸 그래프이다. 쥐는 4 그룹으로 나누고, 담체, EtOH(5 g/kg, E), DHM(1 mg/Kg, E+D) 또는 DHM(D)이 혼합된 EtOH를 위관으로 투여했다. 48 시간 금단 후, 해마 절편에서 DGC에 대해 패치-클램프 기록이 이루어졌다. I_{tonic} 변화는 도 2a에 보여지며, mIPSC 변화는 도 2b(% 대조군)에 보여진다. n= 4 -7 마리 쥐/집단. * $P < 0.05$ 대 0; †, $P < 0.05$ 대 담체만 처리, 이원배치분산분석방법.

도 3은 DHM이 GABA_AR-매개 전류를 증가시키고 순수한 쥐(naive rats)의 DGC에 있어 급성 EtOH에 의해 그 강화를 저해시키는 것을 보여주는 그래프이다. 도 3의 a는 I_{tonic} 크기와 mIPSC 전하 이동(mIPSC 면적)에 대한 DHM의 효과를 보여주는 연속 전류의 자취(trace)이다. 총 전하 이동은 DHM(1.0 μ M)에 의해 약간 증가한다 I_{tonic} (도 3a-1)와 mIPSC(도 3a-2)의 DHM 농도 의존성 강화. n = 6 뉴런/집단. *, $p < 0.05$ 대 사전-약물, 일원배치분산분석. 도 3의 b는, EtOH(60 mM) 투여 후, 이어서 EtOH와 DHM(0.3 및 1 μ M)를 공동 투여하는 동안 DGC로부터의 샘플 자취를 기록한 것이다. 도 3b-1은 I_{tonic} 의 크기는 EtOH에 의해 현저히 향상되는 것을 보여 주며; 이러한 향상은 DHM 공동 투여에 의해 농도 의존적으로 줄어든다. n= 6 뉴런/집단. 도 3b-2는 mIPSC 총 전하 이동이 EtOH-DHM에 의해 비슷하게 영향을 받지만, EtOH와 DHM 모두에 대한 mIPSC의 낮은 민감도로 인해, 그 효과는 현저하지 않음을 보여 준다. n= 5-7 뉴런/집단. 도 3의 c는 DHM(0.3 μ M) 투여 이후, DHM 와 EtOH(10 및 60 mM)를 공동 투여 시, DGC에서의 샘플 자취를 기록한 것이다. 도 3의 c-1은 DHM에 의한 I_{tonic} 강화에 EtOH는 영향을 주지 못함을 보인다. 도 3의 c-2는 mIPSC 총 전하 이동이 DHM-EtOH에 의해 비슷하게 영향을 받지만 그 효과는 현저하지 않음을 보여준다. n= 5-7 뉴런/집단. *, $p < 0.01$, 사후-DHM 대 사전-약물, 일원배치분산분석.

도 4a 및 4b는 DIV14 초대 배양 해마 뉴런에서 DHM + EtOH의 공동 투여가 EtOH 중독-유발 기능성 GABA_AR의 가소성을 억제하는 것을 보여 준다. 도 4a는 I_{tonic} 크기에 대한 개요이며, 4b는 담체 처리된, EtOH 처리된, EtOH + DHM 처리된 그리고 DHM 처리된 뉴런으로부터의 급성 EtOH(60 mM)에 대한 응답으로, mIPSC 전하 이동(% 사전-약물)의 변화를 보여 준다. n= 8-9 뉴런/집단. *, $p < 0.05$, 대 사전-EtOH; †, $p < 0.05$, 약물-처리 대 담체-처리, 이원배치분산분석방법.

도 5a 내지 5d는 대조군 및 EtOH 노출/금단 군 뉴런에서 DHM이 GABA_AR의 기능을 강화시킴을 보여준다. DHM은 DIV14 뉴런에서 농도 의존적으로 GABA_AR 매개의 I_{tonic} 과(도 5a) 및 mIPSC을(도 5b)를 증가시켰다. 이러한 반응은 대조군과 비교하여(속이 빈 원) EtOH 노출 후에(속이 찬 원) 약간 감소하였다. EtOH의 노출/금단 후(n=5-9 뉴런/군) I_{tonic} 의 크기가 약간의 오른쪽으로의 이동이 있었으나 mIPSC의 총 전하 이동은 변화가 없었다. 도 5c는 발생한 GABA_AR 매개 전류에 대한 샘플 자취를 보여준다. 도 5d는 GABA의 농도 반응 곡선에 대한 DHM의 효과를 보

여준다. 진폭은 DHM이 없는 상태에서 $300\ \mu\text{M}$ 의 GABA로 활성화된 피크전류로 정규화하였다. 각 데이터의 점은 5에서 9개 뉴런의 평균 진폭이다. DHM은 GABA와 공동 투입된다.

도 6a 내지 6c는 DHM이 EtOH 중독을 상쇄시키는 것과 DHM의 효과가 플루마제닐에 의해 저해되는 것을 보여주는 그래프이다. 도 6a는 EtOH(E, $3\ \text{g/kg}$, 복강 투입)가 정위반사소실(LORR)을 유발하는 반면 EtOH(E+D1)과 DHM(1mg/kg , 복강)의 병행투여는 LORR의 지속을 상당히 감소시키는 것을 보여준다. DHM(D1)은 식염수 투여와 마찬가지로 LORR을 유발하지 않는다($n=8-20$ 쥐/군). 도 6b는 EtOH 투입 30분 전 DHM 투여 시 EtOH에 의해 유발된 LORR을 상쇄시키는 것을 보여준다. 반면 EtOH에 의해 유발된 LORR(검은 선으로 표시) 30분 후의 DHM 투여는 남은 LORR을 감소시킨다($n = 5-10$ 쥐/군). 도 6c는 EtOH와 DHM($3\ \text{mg/kg}$, E+D3)의 동시 투여가 EtOH 유발-LORR을 현저히 감소시킴을 보여준다. EtOH, DHM(E+D3+F10) 및 플루마제닐($10\ \text{mg/kg}$, F10)의 병행투입은 DHM의 효과를 역전시킨다. DHM의 양을 $10\ \text{mg/kg}$ (E+D10+F10)으로 증가시키면 플루마제닐은 DHM의 효과를 일부만 역전한다. 플루마제닐의 양을 $30\ \text{mg/kg}$ (E+D3+F30)으로 증가시키면 DHM에 대한 보다 강한 저해효과가 관찰되었다. 플루마제닐과 EtOH(E+F10)의 공동투여는 LORR 지속시간을 변화시키지 않았다($n = 5-6$ 쥐/군, $\dagger$, $p < 0.05$ 대 식염수군, *, $p < 0.05$ 대 EtOH 군).

도 7은 과량의 DHM과 플루마제닐의 쥐의 LORR에 대한 효과를 보여준다. 100 또는 $300\ \text{mg/kg}$ 의 DHM (복강 투입은 매우 짧은 LORR 지속시간을 유발한다. 30 그리고 $200\ \text{mg/kg}$ 플루마제닐의 복강 투입은 LORR을 유발하지 않는다.

도 8은 EtOH에 의해 유발된 LORR 동안의 혈장 [EtOH] 분석 결과를 보여준다. X축은 EtOH($3\ \text{g/kg}$)의 복강 투입 후 혹은 DHM(1 및 $10\ \text{mg/kg}$) 과 EtOH(E+D) 동시 적용 후의 혈액 샘플 채취 시간을 나타낸다($n = 3-4$ 쥐/군, *, $p < 0.05$ 대 EtOH 군, 이원배치분산분석).

도 9는 DHM이 EtOH에 의해 유발된 GABA_{A} R 강화를 저해하며 이러한 효과는 플루마제닐에 의해 차단되는 것을 보여준다. 도 9의 A는 쥐 해마의 DGC에서 전세포 전압 클램프($-70\ \text{mV}$)기록(왼쪽)과 평균 mIPSC(오른쪽) 중첩하여 보여준다. 회색의 점선은 피크로톡신(PTX, GABA_{A} R 저해제, $100\ \mu\text{M}$)에 의해 모든 GABA_{A} R-전류가 완전하게 차단된 후의 평균 전류를 나타내며 이는 GABA_{A} R-매개 I_{tonic} 의 크기를 계산하기 위한 기준이 된다. EtOH($60\ \text{mM}$, E)의 욕조 적용(bath application)은 I_{tonic} 과 mIPSC를 증가시킨다. DHM(0.3 및 $1.0\ \mu\text{M}$)은 이러한 EtOH의 효과를 저해한다. 도 9의 B에서는 EtOH와 DHM에 대응하는 I_{tonic} 면적을 요약하였다. 도 9의 C는 EtOH와 DHM에 대응하는 mIPSC 면적을 보여준다. 도 9의 D는 DGC로부터 기록된 샘플 자취(왼쪽)이며 평균 mIPSC(오른쪽)을 중첩된다. 급성 EtOH에 의해 유발된 GABA_{A} R 강화에 대한 DHM($3\ \mu\text{M}$) 저해효과가 $10\ \mu\text{M}$ 플루마제닐에 의해 역전되었다. 도 9의 E는 EtOH, DHM 및 플루마제닐에 대응하는 I_{tonic} 면적의 개요이다. 도 9의 F는 EtOH, DHM 및 플루마제닐에 대응하는 mIPSC 면적의 개요이다. $n = 4-6$ /군. *, $p < 0.05$ 대 약물 0; $\dagger$, $p < 0.05$ 대 EtOH, 이원배치분산분석.

도 10은 DHM이 GABA_{A} R의 벤조다이아제핀 자리의 양성 조절자임을 보여준다. 도 10의 A는 쥐의 해마 DGC 전세포 전압-클램프($-70\ \text{mV}$) 기록을 평균 mIPSC(오른쪽)와 중첩하여 보여준다. 도 10의 B에서는 0.1 내지 $0.3\ \mu\text{M}$ 의 DHM에 의한 I_{tonic} 강화를 요약하였다($n = 4-5$. *, $p < 0.05$ 대 투여 0, 일원배치분산분석). 도 10의 C는 0.1 내지 $0.3\ \mu\text{M}$ 의 DHM에 의해 강화된 mIPSC 면적을 요약한 것이다($n = 4-5$. *, $p < 0.05$ 대 투여 0, 일원배치분산분석). 도 10의 D는 DIV(체의 배양일) 14로 배양된 해마 뉴런 전세포 전압-클램프($-70\ \text{mV}$)기록을 보여준다. DHM($1\ \mu\text{M}$, D1)에 의해 증가된 GABA_{A} R-매개 I_{tonic} 과 mIPSC는 플루마제닐에 의해 역전된다(F, 10 및 $100\ \mu\text{M}$). 모든 GABA_{A} R-전류는 바이쿠클린(GABA_{A} R 저해제, Bic, $10\ \mu\text{M}$, 회색점선)에 의해 차단된다. DHM ($1\ \mu\text{M}$, D1)의 I_{tonic} (도 10의 E)과 mIPSC(도 10의 F)의 증가에 대한 요약(% 사전-약물(0))이며, 플루마제닐은 이를 농도의존적으로 억제한다($n = 7$, * $p < 0.05$ 대 투약 0, 일원배치분산분석). 도 10의 G는 DHM이 쥐의 대뇌 피질막 균질 현탁액에서 [^3H] 플루니트라제팜(flu)의 결합을 억제함을 보여준다. DHM 최종 농도의 증가는($0.03-100\ \mu\text{M}$) 대뇌 피질 결합 부위에서 [^3H] 플루니트라제팜의(최종 농도 $1\ \text{nM}$) 교체를 야기한다. 결과들은 GraphPad Prism 4.0으로 그래프화하였으며 2개의 실험의 각 점에서 3회 반복된 결과의 평균을 보여준다($n=2$).

도 11a 내지 11d는 쥐의 DIV14 일차 배양된 해마 뉴런에서 DHM이 농도 의존적인 방식으로 GABA_{A} R-매개 억제를 강화하는 것을 보여준다. DHM은 농도 의존적인 방식으로 GABA_{A} R-매개 억제를 강화한다. DIV14로 배양된 뉴런을

-70 mV에서 전세포 전압-클램프를 하였다. Itonic(도 11a)과 mIPSC(도 11b)에 대한 DHM의 투여량-반응 곡선($n=9-10$ 뉴런/군). 도 11c는 배양된 해마 뉴런으로부터의 샘플 추적을 보여주는데, DHM($1 \mu M$)은 10 및 $300 \mu M$ GABA의 중심 흡취에 의해 발생하는 GABA_AR-전류를 증가시킴을 보여준다. 도 11d는 GABA의 중심 흡취에 의해 유발되는 GABA_AR-전류의 농도-반응 곡선이 DHM에 의해 왼쪽으로 이동됨을 보여준다(0.3 및 $1 \mu M$, $n = 5-9$ 뉴런/군, *, $p < 0.05$ 대 DHM 0, 일원배치분산분석)

도 12a 내지 12e는 쥐의 해마에서 DHM이 EtOH 금단 증상을 예방하고 EtOH 노출/금단으로 유발된 GABA_AR $\alpha 4$ 하위단위에서 나타나는 변화를 저해하는 것을 보여준다. 4군의 쥐는 일회 량의 담체, EtOH($3 g/kg$, E), EtOH에 DHM 추가($1 mg/kg$, E+D), 또는 DHM 단독으로 주사한다(복강) (도 12D). 48시간의 금단 후: 도 12의 불안감은 고가식 십자 미로 실험(elevated plus maze, EPM)으로 측정하였다. E-군은 열린 팔(arm)에서 보내는 시간이 짧았으며 막힌 팔(arm)에서 보내는 시간이 길었다. E+D-군과 담체군은 양쪽 팔에서 보내는 시간이 비슷했다: 도 12b는 LORR로 측정된 내성을 보여준다. E-군은 급성 EtOH에 의해 유발된 LORR의 지속시간이 확연하게 짧아졌으며, E+D-군은 담체군과 비교하여 LORR에 있어서의 차이를 보이지 않았다: 도 12c는 E-군이 PTZ-유발 발작 지속이 증가함을 보여준다. E+D-군은 담체군과 비슷한 정도의 PTZ-유발 발작을 나타내었다. D-군은 3가지의 분석 모두에서 담체군과 비교할 때 차이가 없었다($n = 5-13$ 쥐/군). 도 12d는 담체, EtOH, E+D, 혹은 DHM를 위관 투여한 후 48시간 금단한 쥐의 해마 조직 GABA_AR $\alpha 4$ 하위 단위의 웨스턴 블롯을 보여준다. β -액틴은 로딩 컨트롤(loding control)로서 보여진다. 도 12e는 도 12d 실험에서의 전체 $\alpha 4$ 하위 단위 단백질의 정량을 보여준다. EtOH-금단은 $\alpha 4$ GABA_AR 하위단위의 증가를 유발하는 반면 E+D 처리에서는 이러한 증가가 예방되었다. DHM은 $\alpha 4$ GABA_AR 하위단위의 변화를 생성하지 않는다($n = 3$ 쥐/군 *, $p < 0.05$ 대 담체 처리, 일원배치분산분석). □ = 담체, ■ = EtOH, ■ = EtOH + DHM, ■ = DHM.

도 13은 쥐의 해마 DGC에서 DHM이 EtOH 노출/금단으로 유발된 GABA_AR 기능의 가소성을 억제하는 것을 보여준다. 쥐를 4군으로 나누고 담체, EtOH($5 g/kg$, E), DHM과 결합된 EtOH($1 mg/kg$, E+D), 또는 DHM (도 13의 D)을 위관 투여하였다. 48시간의 금단 후, 해마 절편의 DGC에 대한 패치-클램프 기록을 수행하였다. 도 13의 A는 급성 EtOH($60 mM$)가 담체를 처리한 쥐에서 Itonic과 mIPSC를 증가시킴을 보여준다. 도 13의 B는 EtOH 노출/금단 군에 있어서, EtOH는 Itonic을 증가시키지 않는 반면, mIPSC 면적은 상당히 증가시킴을 보여준다. 도 13의 C는 E+D 군에서, EtOH는 Itonic과 mIPSC를 담체군과 비슷한 정도로 증가시키는 것을 보여준다. 도 13의 D는 DHM군의 Itonic과 mIPSC의 EtOH에 대한 반응이 담체군과 유사한 것을 보여준다. 도 13의 E 및 F는 졸피뎀(Zolpidem, ZP, 벤조다이아제핀 작용제, $0.3 \mu M$)이 담체군에서와 같이 DHM군에서 Itonic과 mIPSC를 강화시키는 반면 EtOH군에서는 GABA_AR-전류에 영향을 주지 않는 것을 보여준다. 도 13의 G는 4개의 군에서 Itonic에 대한 EtOH의 효과에 대한 요약을 보여준다. 도 13의 H는 4개의 군에서 mIPSC에 대한 EtOH 효과의 요약을 보여준다. 도 13의 I는 졸피뎀의 Itonic에 대한 효과의 요약을 보여주며, 도 13의 J는 4개의 군의 mIPSC 면적에 대한 요약을 보여준다($n = 4-7$ 쥐/군, *, $p < 0.05$ 대 투약 0; †, $p < 0.05$ 대 담체군, 이원배치분산분석).

도 14a 내지 14d는 EtOH로 사전 노출되어 배양된 해마 뉴런에서 GABA_AR-매개 억제를 DHM이 강화함을 보여준다: DHM과 EtOH 공동투여는 체외에서 EtOH-로 유발된 GABA_AR의 가소성을 예방한다. 배양된 해마 뉴런에서(DIV13-14)에서 EtOH 노출($60 mM$, 30 분) 24시간 후, DHM은 도 11a 및 11b와 비교하여 여전히 내성 없이 GABA_AR-m매개 Itonic(도 14a) 및 mIPSC 면적(도 14b)을 농도 의존적으로 증가시킨다($n = 8-9$ 뉴런/군, *, $p < 0.05$ 대 투약 0, 일원배치분산분석). 도 14c는 EtOH와 DHM의 동시투여가 EtOH로 유발된 GABA_AR 가소성을 예방함을 보여준다. 배양된 해마 뉴런(DIV13-14)에서 담체, EtOH, E+D 및 DHM의 4종류로 처리 24시간 후 관찰한 세포 표면 발현(sur) 대 전체 GABA_AR $\alpha 4$ 하위 단위 발현(tot)의 대표적인 웨스턴 블롯이 보여진다. β -액틴은 로딩 컨트롤로서 보여지며, 세포 표면에서는 관찰되지 않는다. 도 14d는 표면의 GABA_AR $\alpha 4$ 단백질의 정량을 보여준다(% 담체). 표면의 신호는 상대적인 β -액틴의 신호로 정규화하였다(담체=100%). EtOH는 GABA_AR $\alpha 4$ 단백질의 표면 발현을 1.5 배 증가시켰으며, 반면에 E+D군은 이러한 증가를 예방하였다($n = 5$ /군, *, $p < 0.05$ 대 담체, 일원배치분산분석).

도 15a 및 15b는 DHM을 추가함으로써 2병 선택 패러다임(two-bottle choice paradigm)에서의 EtOH 소비 증가를

완전히 예방함을 보여준다. 도 15a는 20% EtOH의 EtOH/물에 간헐적 접근하도록 노출된 군에서 EtOH의 소모가 빠르게 증가함을 보여준다. DHM(0.05 mg/ml)을 EtOH (E+D/water)과 공동 투여한 경우 이러한 증가는 상쇄되었다. 부호는 평균 EtOH 섭취(g/kg/24 hr) $\pm$ 표준오차이다. 4주 후, E/물 군을 2개의 하위 군으로 나누었다: 한 군은 지속적으로 EtOH에 간헐적으로 접근하도록 한 반면, 다른 한 군은 E+D에 간헐적으로 접근하도록 하였다. E/물 군은 높은 수준의 EtOH 소비를 유지한 반면에, E+D/물 군은 3차례의 DHM 복용 시 EtOH 소비에 상당한 감소를 보였으며, DHM의 네 번째 복용은 EtOH 소비에 있어 유사하였다. 물/물과 D/물 군 간의 용액 소비에 있어서 유의적인 차이는 없음을 주목하라($n = 6-8$ 쥐/군. *, $p < 0.05$, E+D/물 군 대 E/물 군; †, $p < 0.05$, E+D/물 5주 대 E/물 군 5, 6 및 7주; 이원배치분산분석 후 뉴먼-쿨스 사후 검정). 도 15b는 5주째 측정된 혈장 [EtOH]를 나타낸다($n = 2-5$ 쥐/군. *, $p < 0.05$, 대, EtOH군, t-검정).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명은 알코올(에탄올, EtOH) 중독, 알코올 노출로부터의 금단, 및 알코올 남용을 치료, 억제 및/또는 감소시키기 위한 방법들 및 조성물들에 관한 것으로, 디히드로미리세틴(DHM)의 투여를 포함한다.
- [0019] DHM은 헛개나무(*Hovenia dulcis*)로부터 수득될 수 있다. 헛개나무 추출물과 정제된 DHM을 함유하는 한방 치료는 알코올 및 기타 화학품에 의해 유발된 간 손상을 개선하고, 숙취 증상을 개선하며, 알코올 중독을 완화하기 위해 사용되어 왔다. 참조: Kawai K, 등(1977) *Experientia* 33(11):1454; Hase K, 등(1997) *Biol Pharm Bull* 20:381-385; Yoshikawa, 등(1997) *Yakugaku Sasshi* 117(2):108-118; Ji Y, 등(2001) *Zhong Yao Cai* 24:126-128; Ji Y, 등(2002) *Zhong Yao Cai* 25:190-191; Chen SH, 등(2006) *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 31:1094-1096; Liu XL, 등(2006) *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 31:1097-1100; Fang HL, 등(2007) *Am J Chin Med* 35:693-703; Hussain RA, 등(1990) *J Ethnopharmacol* 28(1):103-115; Yoshikawa K, 등(1993) *Phytochemistry* 34:1431-1433; Yoshikawa M, 등(1996) *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 44:1454-1464; Wang Y, 등(1994) *China Trad Herbal Drugs* 25:306-307; 및 Kim K, 등(2000) *Korean J Med Crop Sci* 8:225-233.
- [0020] 그러나, 본 발명 이전에는, 알코올에 노출로 인한 GABA_AR의 가소성을 DHM 및/또는 헛개나무 추출물이 조절할 수 있을 지 알려진 바 없었다. 사실, 본 발명 이전에는, GABA_AR에 대한 DHM 및/또는 헛개나무 추출물의 영향을 조사했던 연구가 없었다. 또한, 종래 기술의 연구는, 만성 알코올 노출 상황을 포함할 필요가 없었고, 그래서, 종래 기술의 연구는, 알코올에 노출로 인한 GABA_AR의 가소성의 일부 또는 전부를 치료, 억제 및/또는 역전시킬 DHM 및/또는 헛개나무 추출물을 투여하도록 본질적으로 교시하거나 시사했다고 할 수 있다.
- [0021] 디히드로미리세틴 뿐만 아니라, 미리세틴(myricetin), 퀘시틴(quercetin), 호베니틴(hovenitin), 라리시트린(laricitrin), 아피제닌(apigenin) 등과 같은 다양한 플라보노이드들이, 헛개나무 및 첩과 같은 다른 식물, 그리고 다양한 조건들을 위한 한방 요법에 사용되는 그 추출물들에서 발견된다. 알코올 노출에 관련하여, 플라보노이드의 유익한 효과의 대부분은 그들의 항산화 특성의 결과다. 따라서, DHM 또는 임의의 화합물 또는 헛개나무의 추출물이 만성 알코올 노출에 의해 초래된 GABA_AR의 가소성에 어떤 영향을 미칠지, 또는 DHM 및 헛개나무 추출물의 유익한 효과는 단순히 항산화 활성의 결과인지는 알려진 바가 없다. 또한, DHM의 일부의 양이 혈액 뇌관문을 통과 할 수 있다고 우리, 발명자는 믿고 있지만, 많은 플라보노이드들이나 항산화 물질들이 하지 못하는 것처럼, 그런 양들이 GABA_AR에 어떤 영향을 줄지는 알려진 바가 없다. 따라서, 본원에서 설명 된 바와 같이 우리는 다양한 실험을 실시하였다. 본원에서 제공된 바와 같이 실험들이 다음을 보여준다.
- [0022] 1) DHM은 강력하게(1 mg/kg) EtOH의 중독을 상쇄한다. 따라서, 본 발명은, 대상자에서 EtOH의 중독을 치료, 억제 및 감소시키는 방법을 제공하는데, 이러한 방법은 EtOH 중독에 대한 치료, 억제 및 감소할 필요가 있는 대상자들에게 DHM을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시예들에서, EtOH에 노출 전, 노출 중, 및/또는 노출 후에, DHM이 투여된다. 일부 실시예들에서, DHM은 EtOH와 함께 투입된다. 예를 들어, 음료 같은 식품 형태로 만든, EtOH를 포함하는 조성물에 DHM을 첨가한 후, 이 조성물이 대상자에 투여된다. 일부 실시예들에서, EtOH의 중독은 급성 EtOH의 중독이다.
- [0023] 2) DHM은 a) EtOH에 대한 내성, b) 기저 불안 증가, c) PTZ 유발 발작에 대한 과민증(과잉 민감성)을 포함한, EtOH에 노출/금단에 의해 유발되는 행동 변화들을 호전시킨다. 따라서, 본 발명은, EtOH 노출을 차단함으로써 유발되는 증상을 치료하기 위한 방법들을 제공하는데, 이러한 방법은 치료가 필요로 한 대상자에 DHM을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시예들에서, EtOH 노출을 중단하기 전, 중단 중, 및/또는 중단 후에 DHM이 투여된다. 일부 실시예들에서, 증상은 EtOH에 대한 내성, 기저 불안 증가 및 과잉 민감성으로 이루어진 군에서 선택된다.

- [0024] 3) DHM은 대상자의 EtOH 소비의 확대를 막는다. 따라서, 본 발명은, 대상자가 자발적으로 EtOH을 더 많이 소비를 하는 것을 억제, 감소 또는 차단 하기 위한 방법을 제공하며, 이러한 방법은 대상자에 DHM을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시예들에서, EtOH을 소비하기 전, 소비 중, 및/또는 소비 후에 DHM이 투여된다. 일부 실시예들에서, EtOH 소비와 함께 DHM이 투여된다. 예를 들어, 음료 같은 식품형태로, EtOH를 포함하는 조성물에 DHM이 부가된 다음, 그 조성물이 대상자에게 투여된다.
- [0025] 4) DHM은 중독, 진정 또는 마취를 유발하지는 않는다. 따라서, 본 발명은 대상자에서 EtOH 노출에 의한 각성 감소를 치료, 감소 또는 차단하기 위한 방법을 제공하는 데, 이러한 방법은 대상자에게 DHM을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, DHM은 EtOH 노출 전, 노출 중 및/또는 노출 후에 투여된다. 일부 실시예에서, DHM은 EtOH와 함께 투여된다. 예를 들어, 음료 같은 식품 형태로 만든, EtOH를 포함하는 조성물에 DHM을 첨가한 후, 이 조성물이 대상자에 투여된다.
- [0026] 본원에서 개시된 실험들은 또한 다음과 같은 것들을 보여준다: a)DHM의 상쇄(counteracting) 효과는 체내와 체외에서 플루마제닐(flumazenil)에 의해 저해되었고, GABA_AR의 벤조디아제핀(benzodiazepine) 자리에 대한 [³H] 플루니트라제팜(flunitrazepam)의 결합을, DHM은 경쟁적으로 억제한다; b) DHM은 급성 EtOH 유도에 의한 GABA_AR의 강화를 저해한다;c) DHM은 급성 EtOH에 대해, I_{tonic} 조절의 상실과 증가된 mIPSC 의 민감도를 포함한 GABA_AR의 반응에 있어서, EtOH 유도에 의한 변동을 저해한다;d) DHM은 EtOH에 대한 내성을 유발하는 EtOH 노출/금단 후에서 초차 GABA_AR을 강화시키는 데에 효력을 유지하며, 해마 절편과 배양된 뉴런에서 GABA_AR을 강화시킨다; 그리고 e) DHM은 쥐 해마에서 EtOH 노출/금단 유도에 의한, GABA_AR의 α4 하위 단위의 양의 증가를 차단한다. 다시 말해서, DHM은 EtOH 노출과 관련한 GABA_AR의 활성을 강화하며, 각각의 GABA_AR에 대한 EtOH 작용을 저해하고, GABA_AR의 벤조디아제핀 자리에 결합한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, “강화한다”라는 의미는 GABA_AR의 활성 및/또는 효능의 증가를 일으킴을 뜻한다.
- [0027] 놀랍게도, 본원에서 실험들은 또한 DHM이 EtOH 노출에 의해 초래되는 GABA_AR의 가소성을, 억제, 감소, 심지어는 역전시키는 것을 보여 준다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 수용체의 “가소성”은, 수용체의 하위 단위 구성의 변화를 의미한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 본 발명과 관련하여, “GABA_AR의 가소성”은 GABA_AR의 하위 단위 구성의 변화를 말한다. EtOH에 노출은, α4βδ 하위 단위들을 가진 GABA_AR가 내재화 되도록(internalized) 한다. α4 하위 단위가 포스트시냅스막에 복귀하면, δ 하위 단위의 위치는 변경되어, δ 하위 단위는 α4 하위 단위와 더 이상 관련되지 못하고, 그래서, EtOH에 노출 전과 비교 시, 포스트시냅스막에서 α4 하위 단위의 증가 같은, GABA_AR의 가소성을 가져 온다. 본원에서 개시된 바와 같이, DHM은 EtOH에 노출로 인한 GABA_AR의 가소성을 억제, 감소, 반전 및/또는 방지한다. 본 발명 시까지는, EtOH에 노출로 인한 GABA_AR의 가소성을 억제, 감소, 반전 및/또는 방지할 화합물이나 조성물들은 알려진 바가 없어, 이러한 결과들은 놀라운 것이다. DHM과 유사한 다이진(daidzin)과 퀴세틴 같은 다른 플라보노이드들은 DHM과 동일하거나 비슷한 활성, 즉, GABA_AR 강화, EtOH 작용 저해, GABA_AR의 벤조디아제핀 자리에 결합 같은 것을 보이지 못하기 때문에, 본원에서의 본 실험의 결과들이 더욱 놀라운 것이다.
- [0028] 따라서, 본 발명은, EtOH에 노출에 의해 초래되는 GABA_AR의 가소성을 치료, 억제, 감소, 역전 및/또는 예방하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 GABA_AR에 작용하는 뇌 조직에 DHM을 투여하는 단계를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, Liang J, 등,(2007) J Neurosci. 27(45):12367-77; Zucca S 및 Valenzuela CF(2010) J Neurosci. 30(19):6776-81; 및 Shen 등, (2011) Mol Pharmacol. 79(3):432-42에서 설명되는 바와 같이, “EtOH 노출로 인한 GABA_AR의 가소성”은 GABA_AR의 가소성을 칭한다. 본 발명의 일부 실시예들에서, 투여되는 DHM의 양은 효과적인 양이다. 본원에서 사용된 바와 같이, DHM의 “효과적인 양”은 대조군에 비해 바람직한 효과를 보이는 양으로서, 에탄올에 노출로 인한 GABA_AR의 가소성을 치료, 억제, 감소, 및/또는 역전하며, 또는, GABA_A 수용체의 활성을 강화하고, 또는, GABA_A 수용체에 대한 에탄올의 활성을 저해하는 양이다. 예를 들어, (만성적인 간헐적 노출 및 단일 용량 노출을 포함하는) EtOH에 노출에 의해, GABA_AR의 일부 또는 전부의 가소성을 역전시킬 정도의 효과적인 양은, 관련된 순수한 GABA_AR과 실질적으로 같거나 유사한 조성 및/또는 활성을 가진 GABA_AR

의 양을 증가시킬 것을 의미한다.

[0029] DHM의 “치료적으로 효과적인 양”은 대상자에게 투여 시 EtOH에 노출로 인한 GABA_AR의 가소성을 치료, 억제, 감소, 및/또는 역전시키며, 또는 GABA_AR의 활성을 강화하거나 또는 GABA_AR에서 에탄올의 활성을 저해함으로써, 투여 받은 대상자의 상태가 치료 전 대상자의 상태나 대조 대상자에 비해 관찰 가능할 정도로 향상될 정도의 충분한 양이다. 또한, 본원에서 사용되는 바와 같이, DHM의 “치료적으로 효과적인 양”은 대상자에게 투여 시, 대조군과 비교하여 대상자에서 주어진 임상 조건, 예를 들어, 에탄올 중독, 알코올 금단 증후군 중 적어도 하나, 알코올 사용 장애 및/또는 알코올 남용을 치료할 정도의 양이다. 통상적으로, DHM의 치료적으로 효과적인 양은 약 0.002 내지 약 200 mg/kg의 양으로, 바람직하게는 약 0.1 내지 약 100 mg/kg의 양으로, 예를 들어 1 mg/체중 kg의 양으로 매일 경구 또는 정맥 투여될 수 있다.

[0030] 보통, 하루 1회 내지 4회의 분할투여 형태로 또는 서방출성 제형의 형태로 0.01 내지 10 mg/kg의 투여량이 원하는 약리효과를 얻는 데 효과적일 것이다. 그러나 임의의 특정 대상자에 대한 구체적인 투여 정도는 사용된 특정 화합물의 활성도, 연령, 체중, 일반적인 건강상태, 성별, 식습관, 투여 시간, 투여 경로, 및 배출 속도, 약물 조합 및 특정 질병 및/또는 건강의 심각도를 포함하는 다양한 요인에 따라 달라질 것임을 이해해야 할 것이다. 투여 횟수는 치료되는 특정 질병 및/또는 치료 상태에 따라 달라질 수 있다. 또한, 치료에 효과적인 양은 특정 치료 과정에 걸쳐 증가 또는 감소할 수 있을 것이라고 이해되어야 한다. 투여량의 변화는 결과적으로 기술분야에서 알려진 임상기법에서의 표준 진단 방법에 의해 분명해질 수 있다. 일부 예에서, 만성투여가 요구될 수도 있다. DHM의 효과적인 양 및 치료적으로 효과적인 양은 기술분야에서 알려진 통상적인 방법에 의한 일반적인 기술 중 하나에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

[0031] 일부 실시예에서, DHM의 효과적인 양은 음료와 같은 식품 형태로 투입될 수 있다. 일부 실시예에서, 음료는 발효된 곡물(예를 들어, 위스키, 버몬, 라이(rye), 보드카, 진 및 맥주), 발효된 과일(예를 들어, 와인, 브랜드, 셰리, 및 꼬냑), 사탕수수 및/또는 사탕무(예를 들어, 럼주), 및/또는 발효된 용설란(데킬라)로 제조될 수 있는 알코올을 포함한다. 일부 실시예에서, DHM의 효과적인 양은 검 조성물의 형태로 투여될 수 있다.

[0032] 본 발명의 약학적 제형은 DHM의 분할 투여량 또는 단일 투여량을 포함하며, 원하는 투여 형태에 적합한 단일 투여 형태 및/또는 패키지 형태로 제조될 수 있다. 본 발명의 약학적 제형은 경구, 직장, 비강, 국소(구강 및 설하를 포함), 표피, 점막, 질내, 및 비경구(피하, 근육 내, 정맥 내, 및 피내를 포함)를 포함한 적절한 경로에 의해 치료를 위해 투입될 수 있다. 바람직한 경로는 투여를 받는 자의 상태 및 연령, 치료될 상태의 성질에 따라 변할 것임을 이해해야 한다. 예를 들어, 일부 실시예에서, DHM의 치료적으로 유효한 양은 경피패치 또는 발포정(예를 들어, 유효량의 DHM, 탄산염(예컨대, 중탄산나트륨), 및 산성물질(예컨대, 구연산)을 포함하며 물과 같은 액체에 용해 시 발포성을 초래하는 정제)의 형태로 대상자에게 투여될 수 있다.

[0033] 일부 실시예에서, 인간 대상자에 대한 DHM의 단위 투여량은 약 50 내지 70 mg이다. 따라서, 일부 실시예에서, 본 발명에 따른 식품, 경피패치, 검 및/또는 발포정은 단위 당 약 50 내지 70 mg을 포함한다.

[0034] 실험

[0035] 동물 및 재료

[0036] 모든 동물 실험은 실험동물윤리위원회의 허가를 받았다. 250 내지 300g 사이의 암수 흰 쥐(Sprague-Dawley, SD)를 12시간의 낮/밤 주기로 동물사육장에서 음식과 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하여 사육하였다.

[0037] 디히드로미리세틴(DHM, (2R,3R)-3,5,7-트리히드록시-2-(3,4,5-트리히드록시페닐)-2,3-디히드록로멘-4-원)은 ZR Chemical(상하이, 중국, HPLC에 의해 98% 정제된 CAS No. 27200-12-0)로부터 구입했다. 플루마제닐과 피크로톡신, 바이쿠쿨린(bicuculine)은 Sigma로부터 구입했다.

[0038] 통계분석

[0039] 데이터는 나타낸 바와 같이 뉴런 배양의 적어도 3개의 개별적인 제제 및/또는 쥐로부터 얻어졌다. 시그마 플롯(윈도우 버전 10.1)과 시그마 스탯(윈도우 버전 3.5)이 데이터의 표시와 통계 분석에 사용되었다. 데이터는 평균값 ± 표준오차로 표기하였다. 던넛트 검증 또는 뉴먼-쿨스 검증에 기초한 사후비교 분석을 가지고 일원 혹은 이원배치분산분석(RM), 및 치료군과 담체군 사이의 유의적인 차이를 결정하기 위해 t-검정이 사용되었다.

[0040] DHM은 급성 EtOH 중독을 막고 EtOH 금단 증상을 예방한다.

[0041] 쥐에서 수행된 대사 연구에서 DHM(1kg 당 1mg의 양으로 경구 투여) 투여에 의해 유도된 대사 변화(음식이나 물

의 섭취, 소변이나 대변 양의 변화)는 없는 것으로 확인되었다(데이터 생략).

- [0042] DHM의 EtOH에 의해 유도된 쥐에서의 LORR에 대한 효과는 기술 분야에서 알려진 표준 LORR 분석을 이용하여 검사하였다. 참조 Kakihana R, 등(1966) Science 154(756):1574-1575). 간단히 말하면, 약물 투여 후에 쥐는 V-형태의 지지대에 반듯이 누운 자세로 놓여진다. LORR 시작시간은 약물 투여(복강)가 끝나는 시점부터 취해졌다. LORR의 지속은 실험동물이 30초 내에 3번 이상 뒤집는 것이 가능해지는 시점에 끝난다. LORR 분석은 맹검법으로 수행된다. LORR 지속 시간은 평균(분) $\pm$ 표준오차로 표기된다.
- [0043] EtOH(3 mg/kg, 복강)은 대조군(EtOH 투여 30분 전에 식염수(20 ml/kg, 복강)로 전처리)에서 72 ± 2 분 간의 LORR을 유발하였다. DHM 전처리군(1 mg/kg, EtOH 투여 30분 전, 복강)은 EtOH에 의해 유도된 LORR을 8 ± 4 LORR로 감소시켰다(대조군의 $10.6 \pm 5.9\%$, 도 1a, $p < 0.05$). EtOH(3 mg/kg, 복강) 투여로부터 30분 후의 DHM(1 mg/kg, EtOH, 복강) 치료는 LORR이 79 ± 2 에서 49 ± 2 로 감소하도록 하였다(도 1b). 특히, DHM 투여가 시작되면서(도 1b의 붉은 점선), LORR 지속 시간은 51 ± 2 에서 21 ± 2 분으로 감소하였다(대조군의 $41.2 \pm 3.8\%$, $p < 0.05$). EtOH(3 mg/kg, 복강)와 DHM(1 mg/kg, EtOH, 복강)의 공동 투여는 EtOH에 의해 유도된 LORR 지속 시간을 0.7 ± 0.4 감소시켰다(대조군의 $1.2 \pm 0.6\%$, 도 1c, $p < 0.05$). DHM 단독으로는 LORR을 유발하지 않았다(도 1c). 이러한 결과는 DHM이 EtOH의 투여 전, 투여 중 및/또는 투여 후에 급성 EtOH 중독을 저해함을 시사한다.
- [0044] 다음으로는 단일 투여량의 EtOH 중독과 금단에 대한 DHM의 효과를 검사하였다. 쥐들에게는 식염수(20 ml/kg, 담체), EtOH(3 g/kg), EtOH + DHM(EtOH 투여 30분 후, 1 mg/kg), 또는 DHM(1 mg/kg)만을 복강 투여하였다. 48시간의 금단 시간 후, EtOH로 유발된 LORR 분석(EtOH, 3 g/kg, 복강)을 수행하였다. 1회 투여 후 EtOH중독 및 금단에 의한 LORR 지속 시간은 감소되었는데, 즉, 9 ± 3 대 58 ± 5 분(담체). 이는 EtOH 금단이 EtOH 내성을 유발함을 시사한다. EtOH과 함께 DHM을 사후 처리는 EtOH 금단으로부터 LORR 지속시간의 감소를 현저히 억제하거나, 감소시키고/감소시키거나, 예방하였다(도 1d, $p < 0.05$). LORR 지속 시간(분): 각각 EtOH + DHM 61 ± 4 및 DHM 61 ± 4 . 이는 DHM은 EtOH 금단으로 유발된 EtOH 내성을 억제하거나, 감소 및/또는 예방하는 것으로 여겨진다.
- [0045] 쥐에서 펜틸레테트라졸(Ptz) 유도 발작도 또한 측정하였다. 담체(식염수, 20 ml/kg, 복강), EtOH(3 g/kg, 복강), DHM + EtOH(1 mg/kg, 3 g/kg 복강), 또는 DHM(1 mg/kg, 복강) 처리 24 시간 후, 쥐는 Ptz 유도 발작 검사를 받았다. 본 연구에 사용된 Ptz의 투여량은(식염수에 42 mg/kg) 순수한 쥐의 75%에서 발작이 유발되는 양으로 정하였다. 간단히 말하면, Ptz를 복강 주입한 후, 강직성-간대성 발작이 시작되고 지속되는 시간을 앞서 설명한 바와 같이 측정하였다. 동물 행동 실험을 수행하는 연구자는 치료 그룹에 대해 알지 못하도록 하였다. 모든 결정에 대하여 동물들은 한 번씩만 사용되었다.
- [0046] EtOH 금단은 Ptz-발작의 지속시간을 1.7 ± 0.8 (담체)에서 8.1 ± 1.2 분으로 현저히 증가시켰다(도 1e, $p < 0.05$). 이는 EtOH 금단은 발작에 대한 감수성을 증가시킨다는 것을 시사한다. DHM 과 EtOH의 공동투여는, Ptz-발작 지속시간의 증가를 현저히 없애거나, 감소 및/또는 억제하였다(0.9 ± 0.2 분 감소). DHM의 사전치료만으로는 발작의 지속에 있어 유의적이거나 관찰 가능한 어떠한 변화도 유도되지 않았다. DHM은 또한 발작 정도의 증가를 현저히 없애거나 감소 및/또는 억제하였다(도 1f). EtOH 금단은 담체(85%)에 비해 발작 정도를 100%로 증가시켰으며, DHM은 이러한 증가를(85%) 억제하거나 감소, 및/또는 예방하였다. 상기의 결과로 DHM이 EtOH 금단으로 유발된 발작 감수성이나 과잉민감성의 증가를 개선할 수 있음을 시사한다.
- [0047] 이러한 발견은 DHM이 급성 EtOH 중독, EtOH 노출/금단으로 유발된 EtOH 내성, 및 EtOH 금단으로 유발된 과잉민감성을 효과적으로 억제, 감소, 및/또는 예방할 수 있음을 시사한다.
- [0048] DHM은 단일 투여량의 EtOH 중독으로 유발된 GABA_AR 감소성을 예방한다.
- [0049] DHM이 EtOH중독으로 인한 급성 EtOH에 대한 GABA_AR의 민감성의 변화를 예방하는지를 판단하기 위해, EtOH 금단으로 유도된 GABA_AR의 기능적인 변화에 대한 DHM의 효과를 48시간의 금단 후 얻은 쥐의 해마 절편의 치아이랑과 랩세포(DGC)로부터 전세포 전압 패치 클램프 기록법으로 측정하였다.
- [0050] 등쪽 해마의 횡절편은(400 μ m) 바이브라톱(VT 100, Technical Products International, St. Louis, MO)과 이미 알려진 표준적인 기술을 이용하여 획득했다. 절편은 인공뇌척수액(ACSF)으로 계속 뿌려졌다. 참조 Liang, J., 등(2007) J Neurosci 27:12367-12377
- [0051] 전세포 패치 클램프 기록은 인공뇌척수액(ACSF, 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 26 mM

NaHCO₃, 및 10 mM D-glucose)으로 살포 도중에 34 ± 0.5° C 에서 -70 mV의 홀드 전위로 DG층에 위치한 세포들로부터 얻었다. 인공뇌척수액은 계속적으로 95% O₂-5% CO₂로 차 있음으로써 절편의 적절한 산화와 pH 7.4를 보증한다. 패치의 전극은 7.5 내지 9 MΩ의 저항을 가지는 얇은 벽의 붕규산 유리 피펫으로 당겨지며 피펫 용액으로 채워져 있다(즉, 137 mM CsCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES 및 3 mM ATP, pH는 CsOH를 이용하여 7.30로 조절됨). 신호는 Axopatch 700B 증폭기(Molecular Devices, Sunnyvale, 캘리포니아)의 전압-클램프 모드에서 기록되었다. 전세포의 접근 저항은 전기적 보상의 약 70% 이전에는 25 MΩ 미만이다. 전압 클램프가 기록되는 동안, 접근 저항은 5 mV 의 계단 명령에 응답하여 용량성 과도 크기를 측정함으로써 모니터링하며, 데이터는 20% 초과와 변화와 마주치는 경우에는 버려졌다. mIPSC 기록을 수행하기 전 피펫 용액과 세포 내 환경 사이에 충분한 평형이 이루어지도록 하기 위해 적어도 10분이 주어졌다. 세포 내 신호는 3 kHz의 저역 통과 필터링되며 데이터는 Digidata 1440A 및 CLAMPEX 10(Molecular Devices) 소프트웨어를 이용하여 20 kHz의 샘플링 주파수에서 얻어졌다.

[0052] 약리학적으로 분리된 GABA_AR 매개의 mIPSC는 앞서 설명된 방법으로 기록되었다(Liang(2007) 및 Shen(2011)). GABA 농도 반응 곡선에서, 발생한 GABA_AR의 전류는 GABA, DHM, 또는 디아제팜을 Valvlink 8.02 급속 교환 관류 시스템(AutoMate Scientific, 미국)을 이용하여 제거 가능한 피펫 끝부분을 통해 뉴런에 급성 적용하는 동안 기록되었다. 데이터는 Clampfit(버전 9.0, Molecular Devices) 및 MiniAnalysis Program(버전 6.0.7, Synaptosoft, Decatur, GA)을 이용하여 분석하였다.

[0053] MiniAnalysis Program(Synaptosoft, Decatur, GA)을 이용하여 mIPSC를 분석하였다. I_{tonic}은 주어진 기록 시간에서의 평균 기저 전류값이다. I_{tonic}의 진폭은 피크로톡신(100 μM)이나 바이쿠쿨린(10 μM) 전과 후에 측정된 홀드 전류의 차이로 계산한다. 참조: Wei, W., 등(2004) J Neurosci 24, 8379-8382; Liang(2007); 및 Shen(2011). 간단히 말하면, 기록은 2 kHz에서 저역통과 필터링된 오프라인이다(Clampfit 소프트웨어). mIPSC는 8 pA의 진폭과 20 pA*ms의 전하 이동의 역치 기준으로 (Mini Analysis Program, 버전 6.0.7) 검출되었다. mIPSC의 주파수는 주어진 100초의 기간 동안 자동적으로 관찰된 모든 이벤트들로부터 결정되었다. 동역학적 분석을 위해, 시각적으로 추적 곡선을 관찰하는 동안 안정적인 기저선, 급격히 증가하는 구간(10 에서 90%로 상승 시간) 및 지수함수형 감소를 가지는 오직 하나의 이벤트 mIPSC만이 선택되었다. 이중 혹은 다중 피크의 mIPSC는 제외되었다. 각각의 실험 조건 하에서 적어도 100개의 개별적인 mIPSC 이벤트들이 기록된다. mIPSC 동역학은 각 세포에서의 상승시간의 반과 정렬된 평균의 선택된 단일 이벤트들의 분석으로부터 얻어졌다. 감쇠 시간 상수는 평균을 낸 mIPSC의 감소 단계에 이중지수를 맞춤으로써 얻어졌다. I_{tonic} 크기는 주어진 기록 기간 동안의 평균 기저 전류로부터 얻어졌다. I_{tonic}의 진폭은 피크로톡신(50 μM)이나 바이쿠쿨린(10 μM) 주입 전과 후에 측정된 홀드 전류의 차이로 산출하였다. 참조: Liang J 등(2007); Shen(2011); Hamann(2002); 및 Mangan PS, 등.(2005) Mol Pharmacol 67(3):775-788. 이러한 기록과 mIPSC 분석을 수행하는 연구자는 쥐가 받은 치료(담체, EtOH, E+D, 또는 D)에 대해 알지 못했다.

[0054] EtOH-치료 쥐의 뉴런으로부터 얻은 기록은 급성 EtOH(60 mM) 투여로 인해 I_{tonic} 강화의 감소를 보여주었으며(도 13의 A, B, G)(I_{tonic} 14.0 ± 2.1에서 14.3 ± 2.8 pA 대 담체: 28.2 ± 4.5에서 62.1 ± 3.0 pA; 도. 2a, p <0.05), 그리고 EtOH에 대한 mIPSC의 민감성의 증가를 보여주었다(58.5 ± 20.0%만큼 증가 대 담체 대조군 16.9 ± 4.1%)(도 13의 H, 도 2b, p <0.05). 반면, EtOH + DHM-치료 쥐의 뉴런으로부터의 기록은 담체와 구별되기 어려운 급성 EtOH에 대한 반응성을 나타내었다(도 13의 C)(I_{tonic}이 27.9 ± 3.0 에서 61.3 ± 2.3 pA로 증가, mIPSC는 18.0 ± 5.9%만큼 증가, 도 13의 G, 도 13의 H, 도 2a, 도 2b).

[0055] 쥐 해마로부터의 평행 웨스턴 블롯을 검사하여 EtOH가 GABA_AR α4 하위단위의 총 단백질에서의 변화를 유발하였는지 여부를 판단하였다. 쥐의 해마 조직을 1% 트리톤 X-100, 0.1% 황산도데실나트륨(SDS), 50 mM Na₃PO₄, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 10 mM 피로인산 나트륨, 1 mM 나트륨 오르도바나드사산염, 1 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드(PMSF) 및 완전한 프로테아제 억제제 혼합물(Roche)을 포함하는 RIPA완충액에 용해시켰다. 용해물은 15분간 원심 분리한 후(14,000 x g, 4° C), 웨스턴 블롯 분석을 위해 상층액을 채취하였다. 웨스턴 블롯은 토끼의 항GABA_AR α4(aa 379-421)과 생쥐 항β-액틴(Sigma)을 사용하여 수행하였으며 이후 HRP 결합된 2차 항체를 사용하여 수행하였다. 밴드는 ECL 검출 키트(Amersham)를 사용해 검출하였고 ImageQuant 5.2(Molecular Dynamics)을 이용하여 농도 계측 방법으로 분석하였다. 밴드는 62.5 mM 트리스-염산, 100 mM β-메르캅토에탄올

및 2% SDS(pH 6.7)를 함유하는 완충액을 이용하여 잘라낸 후 여러 차례 재검사하였다. 단백질 농도는 제조사 설명에 따라 BCA 단백질 검출 키트(Pierce)로 결정하였다.

[0056] 담체, EtOH, E+D 또는DHM을 위판 투여하고 48 시간의 금단 후, 쥐의 해마 조직으로부터 GABA_AR α4 소단위체를 웨스턴 블롯한 결과를 도 12d에 나타내었다. EtOH 노출/금단에 의해 α4 GABA_AR 하위 단위의 증가가 유도되었으며, 반면 E+D 치료는 이러한 증가를 막았다. DHM 단독으로는 α4 GABA_AR 하위 단위의 변화를 만들어내지 않았다(도 12d). 도 12e는 도 12d의 실험으로부터 얻은 전체 α4 하위 단위 단백질의 정량을 보여준다. 이러한 결과는 DHM를 EtOH와 함께 치료함으로써 전체 또는 일부의 EtOH 금단으로 유발된 GABA_AR 감소성을 억제, 감소, 및/또는 예방할 수 있음을 보여준다. 따라서, 본 발명은 DHM의 대상자에서 EtOH 노출/금단으로 인한 GABA_AR 감소성을 치료, 억제, 감소 및/또는 예방할 수 있는 방법을 제공하는 데, 여기서 이러한 방법은 대상자에게 DHM을 투여하는 단계를 포함한다.

[0057] DHM은 GABA_AR 매개 전류를 증가시키고, 순수한 쥐의 DGC에서 급성 EtOH에 의한 강화작용을 저해한다.

[0058] 알코올 작용의 주요 대상으로 대표되는 GABA_AR과의 상호작용으로 인한 DHM의 항알코올 효과 여부를 확인하기 위해, 순수한 쥐의 해마 절편의 DGC에서 GABA_AR의 기능에 대한 급성적인 DHM의 효과에 대해 상기에 설명한 바와 같이 조사하였다. 급성적인 DHM(0.3 μM) 투여는 GABA_AR 매개의 I_{tonic}을 17.5 ± 4.9에서 29.0 ± 6.7 pA로 향상시켰으며, mIPSC의 감쇠 시간을 지연시키고, DGC(571 ± 61 에서 615 ± 22로의 면적 증가)에서 mIPSC 전체 전하 이동(면적)을 농도 의존적으로 향상시켰다(도 3의 a, 도 3의 a-1, 도 3의 a-2).

[0059] EtOH와 DHM 모두 별도로 투여 시 GABA_AR 매개 전류를 강화시켰다. 그러나, EtOH에 의해 유도된 I_{tonic} 강화는 EtOH 존재 하에서 DHM에 의해 의존적으로 감소하였다(1 μM DHM에 의해 43.8 ± 1.8에서 32.0 ± 2.0 pA로 감소, 도 3의 b, 도 3의 b-1, p < 0.05). 하지만, EtOH가 DHM의 존재 하에 투여된 경우 그 이상의 I_{tonic}의 강화는 없었다(60 mM EtOH에 의해 41.1 ± 2.2에서 44.4 ± 3.6 pA로, 도 3의 c, 도 3의 c-1).

[0060] 이 데이터는 DHM이 EtOH 중독에 의해 유도된 GABA_AR 감소성을 EtOH에 의해 유도된 GABA_AR 강화작용을 간접함으로써 저해시킴을 나타낸다. 따라서, 본 발명은 EtOH와 DHM을 공동 투여함으로써 EtOH에 의한 GABA_AR 감소성을 저해하는 방법을 제공한다. 또한 본 발명은 DHM을 EtOH 노출에 앞서 투여함으로써 EtOH에 의해 유도된 GABA_AR 감소성을 저해하는 방법을 제공한다. 일부 실시예에서, 본 발명은 DHM의 투여 단계를 포함하는, GABA_AR 매개 전류의 강화 방법을 제공한다.

[0061] DHM+EtOH의 공동 투여는 일차 배양된 해마의 뉴런에서EtOH 중독으로 인해 유도된 GABA_AR 감소성을 예방한다.

[0062] DHM이 체외 배양된 뉴런에서 EtOH에 의해 유도된 GABA_AR 감소성을 억제 및/또는 예방하는지를 확인하기 위해 다음과 같은 실험이 수행되었다.

[0063] 배아일로 18일이 된 쥐로부터의 해마 뉴런을 파파인 분리법(Worthington Biochemical, Lakewood, NJ)으로 제조하였으며, 신경기저배양액과 B27 보조제(Invitrogen)에서 배양하였다. 배양은 37° C, 5% CO₂의 가습이 되는 인큐베이터에서 앞서 설명된 바와 같이 유지하였다. 참조: Shen, Y., 등.(2011) Mol Pharmacol 79:432-442.

[0064] 배아일로 18일이 된 SD 쥐의 해마 뉴런을 파파인 분리법(Worthington Biochemical, Lakewood, NJ)으로 제조하였으며, 신경기저배양액과 B27 보조제(Invitrogen)에서 앞서 보고한 바와 같이 배양하였다. 참조: Stowell JN 및 Craig AM(1999) Neuron 22(3):525-536. 간단히 말하면, 이소플루란으로 마취한 후 안락사한 어미 쥐로부터 단독으로 태아가 제거된다. 해부된 해마는 Ca²⁺과 Mg²⁺가 제거된 HEPES-완충된 Hank 완충 염 용액에(pH 7.45) 둔다. 조직은 파파인 분해방법과 이후 파스퇴르 피펫 및 파파인 억제제 처리를 통해 분쇄법으로 분해된다. 세포는 펠릿화한 후 2% B27 세럼이 없는 보조제, 100 U/ml 페니실린, 100 μg/ml 스트렙토마이신, 0.5 mM 글루타민(모두 Invitrogen으로부터 얻음), 및10 μM 글루타메이트(Sigma)를 함유하는 신경기저배양액에서 다시 현탁시켰다.

[0065] 그 후, 분리된 뉴런은 폴리-D-리신(Sigma, 50 μg/ml)으로 코팅된, 24웰 배양접시(패치 클램프 기록용)의 12mm의 둥근 커버슬립에 0.3 x 10⁵ cells/cm² 밀도로, 및/또는 6 웰 배양접시에(웨스턴 블롯이나 비오틴 분석용)

0.5×10^5 cells/cm² 의 밀도로 깔았다. 배양은 37° C, 5% CO₂ 와 습도가 유지되는 인큐베이터에서 유지되었다. 그 후, 배양액의 1/3 내지 절반까지를 매주 2회씩 2%의 B27 보조제와 0.5 mM 글루타민을 함유하는 신경기저세포 배양액으로 교체하였다.

[0066] DIV 13-14뉴런(체외에서 13-14일간 배양됨) 이후, 배양된 뉴런의 배양액 중 절반을 120 mM EtOH(최종 EtOH 농도는 60 mM 임), 0.2 μ M DHM에 120 mM EtOH 추가, 또는 0.2 μ M DHM 단독(DHM 대조군, 즉, EtOH 제외군)을 함유하는 신경기저세포배양액으로 30분 동안 교체한 다음, 새로운 신경기저세포배양액 반과 원래의 배양액의 절반이 각각 섞인 배양액으로 모두 교체한다. 대조 뉴런은 EtOH가 처리된 뉴런과 동일한 과정으로 대응되는 담체를 처리하였다. 60 mM EtOH 농도는 앞선 실험을 고려하여 선정하였다. Liang J 등(2007) 참조. 구체적으로, 배양된 뉴런을 처리하기 위해 사용될 60 mM EtOH의 농도는 5 g/kg으로 위관투여로 중독 시킨 후 성인 쥐에서 측정된 혈중 농도와 맞도록 선택되었으며, 이는 2 에서 3시간 가량 유지되는 약 60 mM 혈장 농도의 EtOH를 초래하였으며 확인한 GABA_AR의 감소성과 내성을 유발하였다.

[0067] DIV 14뉴런(체외에서 14일간 배양)은 담체, EtOH, EtOH + DHM 또는 DHM 단독으로 처리하였으며, 이후 24시간의 금단시간을 두었다. 그 후, 전기생리학적 기록을 시작하기 직전에 커버슬립에서 자라던 세포는 관류 시험용기(perfusion chamber, Warner Instruments)로 옮기고 도립현미경(TE200, Nikon)으로 시각화하였다. 전세포 패치 클램프 기록이 배양된 뉴런으로부터 상온(22 내지 25° C)에서 -70 mV의 홀드 전위로 전압-클램프 모드 하에서 얻어졌다. 세포는 세포외액(137 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM 글루코스 및 10 mM HEPES(310-320 Osm, NaOH를 이용하여 pH가 7.40으로 조절됨))으로 관류시켰다. 유리 피펫은 절편 기록에 사용된 것과 동일한 내부 용액으로 채워졌으며 그 내부 용액의 내부 저항은 4-7 M Ω 였다. GABA_AR-매개 mIPSC는 상기에 기술된 것과 동일한 약리학적 방법으로 기록되었다. GABA의 농도반응 곡선에서, 발생된 GABA_AR-매개 전류는 GABA 및/또는 DHM을, 제거가 가능하며 뉴런의 체세포에 가까운 위치한 틈을 통해 Valvelink 8.02 급속 교환 관류 시스템(AutoMate Scientific, 미국)을 이용하여 배양된 뉴런에 급격히 투여하여 기록하였다. 전기적 신호는 Multiclamp 200 B 증폭기(Molecular Devices, 미국)를 이용하여 증폭되었다. 전세포 배치를 수행한 후, 약물 투여 전 최소 10분 이상이 흐르도록 하여 맴브레인 패치가 안정화되고 기록 전극과 세포질 사이의 이온 교환이 일어나도록 하였다. 데이터는 pClamp 소프트웨어(버전 10.0, Molecular Devices, USA)를 사용하여 얻어졌으며, 20 kHz로 디지털화되었고(Digidata 1440A, Molecular Devices), Clampfit 소프트웨어(버전 10.0, Molecular Devices) 및 Mini Analysis Program(버전 6.0.7, Synaptosoft, Decatur, GA)으로 종래에 알려진 방법을 이용하여 분석하였다. 참조: Hamann M, 등.(2002) Neuron 33(4):625-633; Stell BM 및 Mody I(2002) J Neurosci 22(10): RC223; 및 Liang(2007).

[0068] EtOH의 노출/금단 뉴런은 I_{tonic} 크기의 급격한 감소(담체-뉴런에서 13.8 $\pm$ 1.4 pA로부터 EtOH -뉴런에서 5.6 $\pm$ 1.0 pA로 감소) 및 급성 EtOH에 대한 반응의 급격한 감소(담체-뉴런에서 EtOH에 의한 강화 109.6 $\pm$ 15.7%로부터 EtOH -뉴런에서 14.3 $\pm$ 18.9%로 감소, 도 4a, p <0.05)를 나타냈고; 반면에, 앞서 보고한 바와 같이, 급성 EtOH 에서 EtOH 노출/금단 뉴런은 급성 EtOH에 대한 mIPSC 반응성 증가(EtOH의 강화가 담체 뉴런에서 3.0 $\pm$ 10.0%로부터 EtOH-뉴런에서는 33.7 $\pm$ 14.9%로 증가하였음, 도 4b, p <0.05)를 유발하였다. Shen(2010) 참조. EtOH와 DHM의 동시투여는 GABA_AR(평균 I_{tonic} 크기는 11.2 $\pm$ 0.6 pA였으며, EtOH에 의해 25.2 $\pm$ 1.2 pA로 증가하였고, EtOH에 의한 mIPSC 강화는 8.3 $\pm$ 9.4%였음)의 효과들을 저해하였고; DHM 단독으로 노출/금단된 경우 GABA_AR의 기능은 변하지 않았다(도 4a 및 4b).

[0069] 본원에서 기술한 바와 같이 배양된 뉴런의 웨스턴 블롯이 이루어졌으며 조사되었다. 배양된 뉴런의 GABA_AR에 대한 비오틀화(biotinylation) 분석이 앞서 기술된 바와 같이 수행되었다. 참조: Chung WO, 등(2000) Infect Immun 68(12):6758-6762. 간단히 말하면, 배양접시의 뉴런을 얼음 위에 두고 아주 찬 PBS를 이용해 두 차례 세척하였다. 그 후 뉴런을 1 mg/ml 설포-NHS-LC-비오틀(ProteoChem)을 함유하는 PBS로 얼음 상에서 30분간 배양하였다. 트리스 완충 식염수(TBS)으로 비오틀 반응을 중단한 후, 뉴런을 150 μ l의 변형된 RIPA 완충액(20 mM 트리스-염산(pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂ EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% 디옥시콜산나트륨, 2.5 mM 피로인산나트륨, 1 mM b-글리세로인산염, 1 mM Na₃VO₄, 및 1 μ g/ml 류펩틴)에서 용해시켰다. 균질현탁액을 15분간 원심 분리하였다(14,000 x g, 4° C). 상층액의 일부 분획(10%)은 β -액틴을 측정하기 위해 제거하였다. 남은 상층액은 60 μ l의 50% 뉴트라비딘 아가로스(Pierce Chemical 사)에서 4° C에서 4시간 동안 배양한 후 용해 완충액으로 4차례 씻어냈다. 아가로스가 결합된 단백질은 20 μ l의 SDS 샘플 완충액과 혼합하여 끓였다. 웨스턴 블롯

을 앞서 기술한 바와 같이 동일하게 수행하였다.

[0070] 웨스턴 블롯과 비오틴화로부터 얻은 데이터는 배양된 뉴런에서 DHM이 EtOH노출/금단으로 유발된 세포 표면의 GABA_AR α4하위단위의 변화를 제거하거나 회복시킨다는 것을 보여줬다(도 14c). 이러한 발견은 EtOH와 더불어 DHM을 공동투여함으로써 EtOH에 의해 유도된 GABA_AR의 가소성을 체외에서 억제, 감소, 및/또는 예방할 수 있음을 증명하였으며, 이에 따라 본원에서 개시된 바와 같이 쥐에서 생체 내 조사결과들을 확인하였다.

[0071] DHM은 대조군 뉴런과 EtOH 노출/금단 뉴런 모두에서 GABA_AR의 기능을 강화시킨다.

[0072] 배양된 해마 뉴런에 대한 DHM의 효과도 역시 측정하였다. GABA_AR-매개 I_{tonic}(도 5A, 속이 빈 원, EC₅₀ = 약 0.2 μM)과 mIPSC(도 5b, 속이 빈 원, EC₅₀ = 약 0.3 μM)에 대한 DHM의 농도-반응 곡선을 배양된 뉴런에서 구하였다. EtOH의 노출이 GABA_AR의 DHM에 대한 반응성을 변화시키는지 확인하기 위해, EtOH 노출/금단 뉴런에서의 DHM 농도-반응 곡선을 또한 구하였다. EtOH 노출은 I_{tonic}(도 5a, 속이 채워진 원, EC₅₀ = 약 0.3 μM)이나 mIPSC(도 5b, 속이 채워진 원, EC₅₀ = 약 0.5 μM)와의 DHM의 농도-반응 관계에 어떠한 영향도 미치지 않았다. 이러한 결과는 DHM이 EtOH 노출/금단 조건에서조차도 DHM이 시냅스 및 시냅스의 GABA_AR을 강화시킴을 보이며, 이는 EtOH에 대한 교차내성을 생성하지 않음을 나타낸다.

[0073] GABA_AR에 대한 DHM의 직접적인 영향을 확인하기 위해, GABA(1 내지 300 μM)를 배양된 해마 뉴런에 처리하고 농도반응 곡선을 얻었다. DHM(0.3 및 1 μM)과 GABA의 공동 투여는 동일한 GABA농도에서 GABA의 활성 전류의 진폭을 증가시켰으며 GABA 농도-반응 곡선을 왼쪽으로 이동시켰다(도 5c 및 5d). 이러한 결과는 DHM이 직접적으로 GABA_AR을 강화시킴을 보여준다.

[0074] DHM은 EtOH 중독을 상쇄시키며 DHM의 효과는 플루마제닐에 의해 저해된다.

[0075] 추가적인 LORR 분석이 하기와 같이 진행되었다. 4개의 그룹으로 쥐를 나눈 후 식염수, EtOH(3 g/kg, E), EtOH와 DHM(1 mg/kg, E+D1), 또는 DHM(D1)을 복강 투여하였다. EtOH은 69 ± 18 LORR을 유발하였다. E+D1은 LORR을 2.7 ± 1.4으로 감소시켰다(도 6a). 식염수와 같이 DHM은 LORR을 유발하지 않았다. 이러한 결과들은 DHM이 급성 EtOH 중독을 상쇄시킴을 시사한다.

[0076] 추가로 전처리와 후처리 실험이 또한 진행되었다. EtOH 투여 30분 전(D1 + E) 처리 시, DHM은 LORR을 8.2 ± 4.1로 감소시켰다(도 6b). LORR을 유발하는 EtOH 투여 30분 후는 식염수를 투여한 쥐에서는 LORR이 42 ± 9.1로 올라갔으나 DHM의 투여는 잔류 LORR을 19 ± 1.0(E + 식염수의 42%, 도. 6b)로 감소시켰다. 이러한 결과는 DHM이 EtOH 중독을 상쇄시킨다는 것을 시사한다. 따라서, EtOH 노출 30분 전이나 30분 후에도 DHM은 소량 혹은 과량의 EtOH 중독을 효과적으로 개선한다.

[0077] DHM의 항-EtOH 효과의 대상을 확인하기 위해, GABAAR 조절에 있어서 선택된 벤조다이아제핀의 저해제인 플루마제닐을 시험하였다. 참조: Hunkeler, W., 등.(1981) Nature 290:514-516. EtOH는 69 ± 11.3 LORR을 유발하였고; DHM(3 mg/kg)과 EtOH의 공동투여는 LORR을 2.7 ± 1.7(도 6c)로 감소시켰다. 플루마제닐(10 mg/kg)은 DHM의 LORR(56.1 ± 4.6) 감소를 역전시켰다. DHM 투여량을 10 mg/kg까지 증가시켰을 때 플루마제닐의 효과는 감소하였으며(29.3 ± 4.8), 반면에 플루마제닐의 투여량을 30 mg/kg로 증가시키자 DHM 효과에 대한 저해 작용이 증가하였다(58.2 ± 3.9). 플루마제닐과 EtOH의 동시투여는 EtOH 군(71.1 ± 4.8, Fig. 6c)과 비교 시 LORR의 변화가 없었다. 이상의 결과는 GABA_AR이 생체 내에서 EtOH에 의해 유발된 LORR 행동효과에 중요한 역할을 함을 시사한다. 플루마제닐은 EtOH에 의해 유도된 LORR에 대한 DHM의 효과를 경쟁적으로 저해한다. 또한, 이상의 결과들은 DHM과 EtOH의 상호작용이 EtOH 중독에 대한 DHM의 치료효과의 근간이 될 수 있는 GABA_AR 벤조다이아제핀 자리에서의 DHM의 역할에 관여함을 시사한다.

[0078] 과량의 DHM(EtOH 중독에 대한 저해효과를 나타내는 것의 100배 많은 양)에 대해 조사하였다. DHM(100 및 300 mg/kg)은 각각 0.9 ± 0.8 및 4.0 ± 2.8 LORR만을 유발한다(도 7). 이는 DHM이 단지 전형적인 벤조다이아제핀이 아님을 시사한다. 과량의 플루마제닐은(200 mg/kg) LORR을 유발하지 않았다(도 7).

[0079] LORR 분석 과정에서, EtOH와 EtOH + DHM 군으로부터 정맥혈 샘플이 5 내지 180 분 사이의 다양한 시점에서 혈장 EtOH 농도(혈장 [EtOH])를 측정하기 위해 취해졌다. 혈액 샘플은 혈장 [EtOH] 분석을 위해 EtOH 또는 E+D의 복강 투여 혹은 2병 선택절차로(EtOH와 EtOH + DHM 군) 자발적인 알코올 섭취 한 쥐에서 상이한 시점에서(0, 5,

30, 60, 90, 180 분) 쥐의 꼬리 혈관에서 수집했다. Liang(2007) 참조. 쥐는 제한된 관에 넣었으며 꼬리는 약 40° C로 따뜻하게 하였다. 쥐의 꼬리 혈관의 혈류의 끝 부분에 날카로운 칼로 구멍을 내었다. 대략 0.2 ml의 정맥혈이 리튬 헤파린(Ram Scientific Inc. Yonkers, NY)을 함유하는 모세혈관 채혈관에 떨어뜨렸다. 혈액샘플은 약 2500rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 취한 후 분석까지 -80° C 에서 보관하였다. 각 혈액 샘플의 EtOH 농도는 알코올 산화효소 반응 절차(GM7 Micro-Stat; Analox Instruments, Lunenburg, MA)를 이용하여 표준EtOH와 함께 이중으로 측정되었다.

[0080] EtOH은 5분 내에 LORR의 개시를 유발하였다. 혈장 [EtOH]는 5분간 급격히 증가하며 이후 약 60분까지 서서히 증가하고 그 후 [EtOH]는 점차적으로 감소하였다. E+D1 과 E+D10(DHM 1, 10 mg/kg) 군에서 혈장[EtOH]의 증가 시간은 초기 단계에서 느려졌다(도 8). 그러나 30에서 60분 사이 혈장[EtOH]는 EtOH- 와 E+D1-군 사이에서 통계학적으로 현저한 차이를 보이지 않았지만(30 분: EtOH 대 E+D1 = 334.9 ± 37.8 대 287.7 ± 21.5 mg/dl, 및 60 min: EtOH 대 E+D1 = 353.7 ± 35.4 대 326.27 ± 17.8 mg/dl), 반면에 그 기간 동안에 E+D10은 [EtOH]를 현저히 감소시켰다(30 분 250.6 ± 12.2 및 60 분 306.0 ± 7.6 mg/dl, 도 8). 30에서 60분 동안, EtOH 군은 잠든 반면 E+D1- 과 E+D10-군은 깨어있었다. 이러한 결과들은 DHM이 EtOH 약물동력학에 영향을 줄을 시사하지만 이러한 효과는 EtOH에 의해 유도된 LORR의 DHB 차단을 설명하기에는 충분하지 않다.

[0081] DHM은 EtOH로 유도된 GABA_AR 강화를 저해하며 이러한 효과는 플루마제닐에 의해 차단된다.

[0082] 앞서 수행된 바와 같이, 해마 절편의 치아이랑과립세포(DGC)에서 전세포 패치 클램프 기록이 체외에서 수행되었다. EtOH(60 mM) 욕조 적용은 I_{tonic} 을 22.0 ± 0.7 에서 46.9 ± 1.4 pA 로 증가시켰으며 mIPSC 를 0.53 ± 0.02 에서 0.64 ± 0.02 nC 로 증가시켰다(도 9의 A 내지 9의 B). EtOH의 효과는 DHM(0.3 및 1.0 μ M)에 의해 농도 의존적으로 저해되었다.

[0083] 플루마제닐의 DHM의 항-EtOH 작용에 대한 효과는 본원에서 앞서 제공된 바와 같이 시험하였다. DHM(3 μ M)은 EtOH로 강화된 I_{tonic} 을 44.8 ± 2.3 에서 21.0 ± 0.9 pA로 감소시키고 mIPSC를 0.78 ± 0.01 에서 0.70 ± 0.02 nC로 감소시키는 반면, 플루마제닐은(10 μ M)은 DHM 작용을 역전시켰다(I_{tonic} 을 37.3 ± 1.6 pA로, mIPSC을 0.78 ± 0.01 nC로 역전시킴, 도 9의 D 내지 9의 F). 이러한 데이터는 DHM이 EtOH에 의해 유도된 시냅스와 및 시냅스 GABA_AR의 강화작용을 저해하며 이러한 효과는 플루마제닐에 의해 차단됨을 시사한다. 이러한 데이터는 GABA_AR 벤조다이아제핀 자리에서 DHM과 EtOH의 상호작용이 EtOH 중독에 대한 DHM의 치료 효과의 기저가 되는 세포 내 기작임을 의미하는 행동학적 실험 관찰(도 6c)과 일치한다.

[0084] DHM은 GABA_AR의 벤조다이아제핀 자리의 양성 조절자이다.

[0085] DHM(0.1 내지 30 μ M)의 해마 절편에서 DGC의 GABA_AR-매개 I_{tonic} 과 mIPSC에 대한 효과. DHM(1 μ M)은 농도 의존적으로(0.1 내지 30 μ M) I_{tonic} 을 증가시키며(22.5 ± 2.5 에서 44.0 ± 4.1 pA로) mIPSC 면적도 증가시킨다(0.59 ± 0.01 에서 0.72 ± 0.03 nC로, 도 10의 A 내지 C). 이러한 결과는 DHM이 중추신경계 뉴런에서 GABA_AR 기능을 강화시킴을 나타낸다.

[0086] GABA_AR에서 DHM 작용 위치에 대한 추가 연구를 위해, DIV13-14(DIV: 체외 배양일)의 배양된 해마 뉴런에서 DHM의 GABA_AR의 기능 강화에 대한 플루마제닐의 효과를 분석하였다. DHM(1 μ M)은 I_{tonic} (대조군의 $194.9 \pm 13.6\%$)과 mIPSC 면적을 증강하였다(대조군의 $181.8 \pm 9.2\%$, 도 10의 D 내지 F). 플루마제닐은 농도의존적인 방식으로 DHM의 GABA_AR의 전류 강화를 억제하였다(10 μ M 플루마제닐에 의해 I_{tonic} : $143.0 \pm 3.2\%$ 로 감소, 및 mIPSC: $125.7 \pm 3.9\%$ 로 감소, 도 10의 D 내지 F). 이러한 관찰은 DHM이 GABA_AR의 기능을 강화하기 위해 벤조다이아제핀과 동일한 GABA_AR의 위치에 작용함을 시사한다.

[0087] 벤조다이아제핀 자리에 대한 DHM(0.03-100 μ M)의 작용을 순수한 어른 쥐의 대뇌 피질막 균질 현탁액에서 [³H] 플루미트라제팜 결합 분석을 이용하여 조사하였다. 방사성 리간드 결합 분석을 위한 쥐의 대뇌 피질막 준비를 위한 표준 과정을 앞서 기술된 바와 같이 진행하였으며 원심분리 및 세척에서의 속도와 횟수, 완충액의 구성에 있어서는 변형이 있었다. 참조: Li GD 등(2010) J Biol Chem 285:8615-8620. 순수한 쥐의 대뇌 피질을 해부한 후 0.32 M 자당이 함유된 10 mM HEPES 완충액(pH 7.4)로 균질화하여 4° C 에서 650 x g으로 원심 분리하였다. 다음의 상층액을 150,000 x g으로 원심 분리하여 원하는 막을 함유한 펠릿을 모았다. 펠릿은 세척 후 두 차례

더 원심분리하는 데, 첫 회에는 아주 찬물을 사용하고 두 번째에는 50 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 2 mM 벤자미딘 HCl, 0.5 mM DTT, 0.1 mM 벤제토늄 HCl, 0.01% 바시트라신, 0.2 PMSF(pH 7.4)을 포함하는 막 완충액을 사용하며, 최종 펠릿을 냉동하였다. 결합 분석 당일, 펠릿은 50 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 200 mM KCl(pH 7.4)을 포함하는 분석 완충액으로 균질화시킨 후 원심 분리하고 최종 단백질 농도가 1 mg/ml이 되도록 새로운 분석 완충액으로 재현탁시켰다. [³H] 플루니트라제팜(85.2 Ci/mmol, PerkinElmer, 보스턴, MA), 뇌균질액, 및 DHM은 최종 분석 부피가 0.5 ml이 되도록 조합한 후 얼음에서 배양하고 Brandel 셀 수확기 M-24R(Brandel Co, Gaithersburg MD)을 이용하여 걸러냈다. 샘플은 Beckman LS-3801 액체섬광계수기를 사용하여 카운팅하였다. 특이적 결합은 전체 결합(결합안된 리간드가 하나도 없음)에서 최종 농도가 10 μ M인 플루마제닐의 존재 하에서의 결합을 뺀 것으로 정의하였다. 데이터는 GraphPad Prism 4.0 소프트웨어(San Diego, CA)로 분석하여 IC₅₀(한자리 경쟁 방정식)과 Hill 기울기(S자형 투여량-반응 방정식)을 결정하였다. 실험은 3회 실시하였다.

[0088] DHM에 의한 [³H] 플루니트라제팜의 결합의 현저한 억제에 관찰되었는데, 3 μ M에서 농도 의존적인 방식으로 시작되며 IC₅₀은 4.36 μ M이고 Hill 기울기는 -0.73이었다(도 10의 G). 이러한 데이터는 DHM이 직접적으로 [³H] 플루니트라제팜과 GABA_AR의 결합을 명백하게 경쟁적으로 억제함을 시사하며, 이는 DHM이 GABA_AR의 벤조다이아제핀 자리에 작용함을 보여준다.

[0089] 배양된 해마 뉴런에서 GABA_AR 매개 전류흐름에 대한 DHM의 효과 또한 조사하였다. DHM은 농도 의존적으로 I_{tonic}을 강화하며(0.3 μ M DHM에 의해 9.5 $\pm$ 1.5에서 21.0 $\pm$ 2.3 pA로, EC₅₀은 약 0.20 μ M임) mIPSC를 증가시켰다(1 μ M DHM에 의해 대조군의 128.2 $\pm$ 8.3%, EC₅₀은 대략 0.20 μ M; 1 μ M보다 큰 DHM에 대한 반응성은 서서히 감소함, 도 11a 및 11b).

[0090] DIV14의 배양된 뉴런의 중심에 뿌려지는 10 및 300 μ M GABA에 의해 유발되는 GABA_AR 전류에 대한 DHM의 효과를 조사하였다. DHM(0.3 및 1 μ M)과 GABA의 공동 투여 시 GABA 전류의 진폭 증가하였으며 GABA 농도 반응 곡선의 왼쪽으로의 이동이 초래되었다(도 11c 및 11d). 이러한 결과는 DHM이 GABA_AR에 직접적으로 작용하고 시냅스 및 시냅스의 GABA_AR을 강력하게 강화함을 시사한다.

[0091] DHM은 에탄올 금단 증후군을 예방하고 쥐 해마의 EtOH 노출/금단에 의해 유도되는 GABA_AR 감소성을 예방한다.

[0092] 쥐에서 EtOH 금단 증후군에 대한 DHM의 효과를 조사하였다. 쥐를 4개의 군으로 나누고, 담체, EtOH(5g/kg, E), DHM과 EtOH(1mg/kg, E+D), 또는 DHM 각각을 위관 투여하였다. 주입 48시간 후, EtOH 금단의 징후를 측정하기 위해 쥐를 3개의 군으로 세분화하였다.

[0093] EtOH 금단과 관련된 불안 및 보행운동/운동실조를 EtOH 금단시킨 쥐에서 고가식 십자 미로 시험으로 측정하였다(EPM, 도 12a). 소비된 시간을 분 단위로 측정하였다. 십자 미로를 만들고, 이전에 기술된 바와 같이 측정치의 점수를 매겼다. 참조: Liang 등(2004) J Pharmacol Exp Ther 310:1234-1245. 간단히 말하면, 미로는 바닥에서 1m 위로 높은 것으로, 수직으로 정렬된 네 개의 길이 51cm, 너비 11.5cm의 팔(arm)이 있다. 폐쇄된 팔은 30cm 높이의 불투명한 벽이 있어서, 팔의 길이를 연장하였다. 시험 시, 각 동물을 개방된 팔을 향하게 미로의 중심에 위치시켜, 5분 동안 탐색하게 하였다. 시험기간 동안, 동물의 행동(예컨대, 팔 출입횟수 및 각 팔 출입 당 소비된 시간)을 캠프코더로 기록하였다.

[0094] 담체군에 속하는 대상자는 개방된 팔에서 2.71 $\pm$ 0.71을 소비하였고, 폐쇄된 팔에서 1.80 $\pm$ 0.67을 소비하였다. EtOH군에 속하는 대상자는 담체군보다 개방된 팔에서 현저히 보다 짧은 시간(0.88 $\pm$ 0.32)을, 폐쇄된 팔에서는 보다 긴 시간(3.64 $\pm$ 0.27)을 보냈으며; 반면에, EtOH + DHM(E+D)군에 속하는 대상자는 비슷한 시간을 소비했다(개방된 팔: 2.68 $\pm$ 0.77, 폐쇄된 팔: 1.88 $\pm$ 0.79). DHM은 쥐가 어느 한 팔에서 보낸 시간에 영향을 미치지 않았다(개방된 팔: 2.92 $\pm$ 0.70, 폐쇄된 팔: 1.52 $\pm$ 0.56). 이러한 데이터는 (1) EtOH 노출/금단은 불안을 유발하고, (2) EtOH과 조합된 DHM은 EtOH에 의해 유도된 불안을 억제하고, 감소시키고/또는 예방하며, (3) DHM은 불안 수준에 영향을 미치지 않음을 시사한다.

[0095] EtOH에 대한 내성을 급성 EtOH로 유도된 LORR(단위: 분, 도 12b)로 측정하였다. EtOH군 대상자에서의 10.8 $\pm$ 3.8 LORR과 비교할 때, 담체군 대상자에서는 EtOH은 63.6 $\pm$ 7.0 LORR을 유도하였다. EtOH은 EtOH + DHM군 대상자에서 61.0 $\pm$ 3.8 LORR을 유도하였고, DHM군 대상자에서는 65.6 $\pm$ 8.4 LORR을 유도하였다. 이러한 결과들은 EtOH에 대한 단독 노출은 EtOH에 대한 내성을 생겨나게 하고, DHM은 이러한 EtOH 노출/금단으로 유도된 EtOH에

대한 내성을 억제하고, 감소시키고/또는 예방함을 시사한다.

- [0096] 본원에 기술된 바와 같이, 과잉 민감성을 PTZ로 유도된 발작 지속시간으로 분석하였다(도 12c). PTZ는 담체군 대상자에서 0.9 ± 0.2 분의 발작을, EtOH군 대상자에서 6.5 ± 1.1 분의 발작을 유도하였다. 발작 지속시간은 EtOH + DHM군에서 최소화되었다(1.7 ± 0.8 분). DHM군에서 PTZ로 유도된 발작은 담체군과 비슷하였다(0.6 ± 0.4 분). 이러한 결과는 EtOH 노출/금단이 발작 민감성(과잉 민감성)을 증가시키고, DHM은 이러한 EtOH의 효과를 개선함을 시사한다.
- [0097] 위의 4가지 처리 후 48시간 경과 시 해마의 GABA_AR $\alpha 4$ 하위 단위의 총 단백질 함량을 분석하였다. 웨스턴 블롯은 담체군의 총 단백질 함량과 비교할 때, EtOH 노출은 총 $\alpha 4$ 단백질 수준을 $184.0 \pm 26.0\%$ 까지 증가시켰다. EtOH + DHM군에서는 총 $\alpha 4$ 단백질 수준이 증가하지 않았다(대조군의 $93.0 \pm 21.0\%$). DHM 노출은 $\alpha 4$ 하위 단위 수준에 아무런 효과를 나타내지 않았다(대조군의 $88.3 \pm 10.3\%$, 도 12d 및 12e). 이러한 데이터는 DHM이 생체 내에서 EtOH 노출/금단으로 유도된 GABA_AR 감소성을 억제하고, 감소시키고/또는 예방함을 나타낸다.
- [0098] DHM이 중추 신경 계통 뉴런에서 EtOH로 유도된 GABA_AR 감소성을 예방하는지를 분석하였다. 4개 군의 쥐에 담체(담체군), EtOH(EtOH군), DHM과 조합된 EtOH(1mg/kg, E+D, EtOH + DHM군) 또는 DHM(DHM군)을 위관 투여하였다. 48시간 금단 후, 전 세포 GABA_AR 매개 전류를 해마 절편의 DGC에 대해 기록하였다. 담체군에서는 EtOH(60mM) 옥조 적용은 I_{tonic} 을 28.8 ± 3.1 에서 62.1 ± 3.3 pA로 높였다(도 13의 A 및 G). EtOH은 mIPSC 면적을 0.67 ± 0.08 에서 0.78 ± 0.10 nC로 높였다(도 13의 A 및 H). EtOH군에서, EtOH은 I_{tonic} 을 증가시키지 않았지만(13.0 ± 0.95 내지 13.8 ± 1.28 pA), mIPSC 면적을 0.95 ± 0.01 에서 1.4 ± 0.02 nC로 크게 높였다(도 13의 B, Gg, H). EtOH + DHM군에서는 EtOH이 I_{tonic} 을 30.0 ± 2.8 에서 60.0 ± 2.2 pA로 증가시켰지만, mIPSC 조절은 바뀌지 않았다(0.70 ± 0.03 내지 0.78 ± 0.02 nC, 도 13의 C, G, H). DHM군에서는 EtOH에 대한 I_{tonic} 및 mIPSC 반응이 담체군과 비슷하였다(도 13의 D, G, H). 이러한 결과는 DHM과 조합된 EtOH의 위내 투여가 EtOH에 대한 이후의 내성과 EtOH로 유도된 GABA_AR 감소성을 억제하고, 감소시키고/또는 예방함을 시사한다.
- [0099] 위의 4가지 처리 후, 벤조디아제핀의 저해제인 졸피뎀의 쥐의 DGC에 대한 효과. 졸피뎀은 담체군에서와 마찬가지로 DHM군에서 GABA_AR 전류의 상승을 유도하였지만, EtOH군의 GABA_AR 전류에는 영향을 미치지 않아, EtOH이 졸피뎀에 대해 교차내성을 발생시킴을 시사하였다(도 13의 F, I, J). 이러한 결과는 EtOH과 DHM의 공동 투여가 EtOH로 유도된 GABA_AR 감소성을 억제하고, 감소시키고 및/또는 예방하고, DHM이 EtOH이나 졸피뎀에 대하여 교차내성을 발생시키지 않음을 나타낸다.
- [0100] EtOH에 사전 노출시킨 배양된 뉴런에 대한 DHM의 영향을 조사하였다. DHM 옥조 적용은 I_{tonic} 및 mIPSC를 농도 의존적으로 높였다($0.03 \sim 30 \mu\text{M}$, 도 14a 및 도 14b). I_{tonic} (약 $0.20 \mu\text{M}$) 및 mEPSC(약 $0.15 \mu\text{M}$)을 향상시키기 위한 EC_{50} 은 담체군과 그것과 유사하였다(도 11a 및 도 11b). 데이터는 EtOH에 대한 내성을 초래하는 EtOH 노출/금단 후에도 DHM은 여전히 시냅스 및 시냅스의 GABA_AR를 강화하는 데 유효함을 시사한다.
- [0101] 배양된 뉴런에서 $\alpha 4$ 하위 단위의 표면 발현을 세포 표면 비오틴화 및 이후의 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 측정하였다. EtOH을 처리한 뉴런은 증가된 $\alpha 4$ 하위 단위 표면 발현(대조군의 $249.7 \pm 28.1\%$)을 나타냈지만, 이러한 증가는 EtOH + DHM으로 처리한 뉴런에서 차단되었다(대조군의 $123.0 \pm 8.4\%$, 도 14c 및 도 14d). DHM은 $\alpha 4$ 표면 발현을 바꾸지 않았다(대조군의 $125.0 \pm 27.3\%$, 도 14c 및 도 14d). 이러한 생체 외 데이터는 EtOH과 DHM의 공동 투여가 EtOH 노출(EtOH에 대한 단일 노출 및 만성적인 EtOH 간헐 노출 포함)에 의해 정상적으로 나타나는 GABA_AR 감소성을 억제하고, 감소하고 및/또는 예방함을 나타낸다.
- [0102] DHM은 만성 자발적 알코올 섭취 쥐 모델에서 EtOH 소비를 줄였다.
- [0103] 알코올 소비에 대한 DHM의 영향을 조사하였다. 모든 액체를 명암주기가 뒤바뀐 사육실에서 물을 켜고 15분 후에 삽입한, 스테인레스 스틸 주둥이가 달린 100ml 메스실린더에 제공하였다. 액체를 제공하고 30분 및 24시간 후에 병의 무게를 측정하였다. 건강을 모니터링하고 체중 1킬로그램 당 EtOH 섭취그램을 계산하고자 각 쥐의 체중을 매일 측정하였다. 쥐를 4개의 군으로 나누고, 각각 물/물, 20%(w/v) EtOH/물, E+D/물 또는 DHM/물로 이루어진 두 병 선택에 간헐적으로 접근할 수 있게 하였다.
- [0104] 2주 동안 물/물, 20%(w/v) EtOH/물, EtOH + DHM(0.05mg/ml , E+D)/물, 또는 DHM/물의 두 병 선택에 자유롭게 접

근하도록 쥐들을 훈련시켰다. 1주차에는 감미료(2pk/L)를 각 병에 첨가하였다. 2주차에는 감미료(1pk/L)를 각 병에 첨가하였다. 훈련 뒤, 주당 3회, 24시간 세션(월요일, 수요일, 금요일) 동안, 쥐들이 물/물, EtOH/물, E+D/물, 또는 DHM/물(모든 경우에 감미료 미첨가)의 두 병 선택에 접근하도록 하였다. 쥐들은 EtOH 접근 기간 사이에 물 두 병에 제한 없이 접근할 수 있었다. EtOH 병의 배치는 일측 선호도(side preference)를 제어하기 위하여 EtOH 음주 세션마다 교체하였다. 7주 동안 20% EtOH 간헐 접근식 두 병 선택 패러다임으로 쥐를 유지시켰다(21개 EtOH 접근 세션). EtOH군의 절반은 5주차 시작 시(13번째 세션) EtOH 병에 DHM을 추가하였다. EtOH군의 나머지는 EtOH 접근 세션을 계속하였다. EtOH 소비는 체중 1킬로그램 당 소비된 EtOH의 그래프로 나타내었다. 물 두 병에 대한 쥐들의 접근은 대조군으로서 측정하였다. 실험 말기에 대조군과 EtOH 음주 쥐들 사이에 유의미한 체중의 차이는 없었다.

[0105] 2주부터 시작하여, EtOH/물 군에서 EtOH 소비가 3.1 ± 1.3 에서 7.5 ± 0.5 g/kg/day로 증가하였다. EtOH과 DHM의 공동 투여(E+D/물 군)는 EtOH 섭취의 이러한 증가를 상쇄시켰다(2.6 ± 0.4 g/kg/day, 도 15a). 4주 후, EtOH/물 군을 2개의 군으로 세분하였다. 한 군은 EtOH/물을 계속하였지만, 다른 군은 E+D/물을 제공하였다. EtOH/물 하위 군은 높은 수준의 EtOH 섭취를 유지하였지만, E+D/물 하위 군에서는 EtOH 섭취가 E+D/물로 시작한 군과 비슷하게 5주차 말에는 1.8 ± 1.0 g/kg/day 그리고 6주차 말에는 1.2 ± 0.2 g/kg/day로 매우 줄어들었다(도 15a). 4개 군 사이의 총 액체 소비에는 유의미한 차이가 없었다. 이러한 결과는 DHM을 알코올과 함께 복용한다면, DHM이 과잉 알코올 소비(남용)을 억제하고, 감소시키고 및/또는 예방함을 시사한다. EtOH 노출에 의해 높은 자발적 EtOH 소비가 이미 확립되는 경우, DHM은 알코올 소비를 줄인다(알코올 남용을 치료한다).

[0106] 4주차 말, E+D/물 노출된 쥐 군의 혈장 [EtOH]은 E/물에 노출된 군보다 유의미하게 낮았다. 혈장 [EtOH]은 소비된 EtOH의 측정량과 상당히 관련이 있었다. 4주차 말의 알코올 날짜에 시작된 자발적 20% 알코올의 30분, 45분 및 100분 후, 각 동물의 혈장 [EtOH](mg/dl)을 측정하였다. 두 군의 혈장 [EtOH]은 현저하게 차이가 있다($p < 0.05$, 도 15b). 이러한 데이터는 DHM이 높은 자발적 EtOH 소비(EtOH 남용)를 억제하고, 감소시키고 및/또는 예방함을 시사한다.

[0107] 수컷 쥐의 경우와 비슷하게, 암컷 쥐에서 DHM의 병용 치료(1mg/kg, 복강, $n = 6$ 마리/군)에 의해 EtOH(3g/kg, 복강)로 유도된 LORR 지속기간이 감소하였음을 보여주는 추가적인 실험을 수행하였다. 이와 비슷하게, 암컷 쥐에서, DHM + EtOH의 공동 투여는 EtOH 중독/금단에 의해 유도된, PTZ로 유도된 발작 지속시간 및 발작 발생의 증가를 억제하고, 감소시키고 및/또는 예방한다.

[0108] 본원의 실험은 배양되었거나 절편 내의 해마 뉴런에서, DHM은 GABA_AR 매개성 mIPSC와 지속성 전류(tonic current)를 농도 의존적으로 강화하였음을 보여준다. 배양된 뉴런으로, DHM은 GABA농도-반응 관계의 왼쪽 이동을 초래하였다. 이러한 결과는 DHM이 시냅스 및 시냅스의 GABA_AR 모두를 강화함을 시사한다. 그러나 DHM 노출/금단은 세포 수준에서 오래 지속되는 GABA_AR 가소성을 유도하지 않았다. DHM은 LORR과 같은 취한 증상을 유도하지 않고, 또한 발작 민감성 증가와 같은 알코올 금단 증후군(AWS)을 초래하지 않으며, EtOH 중독을 개선하기에 적당한 용량 범위에서 EtOH에 대한 교차내성을 유도하지도 않는다. 따라서 DHM은 급성 및 만성 알코올 소비를 치료하는 데 이용될 수 있다.

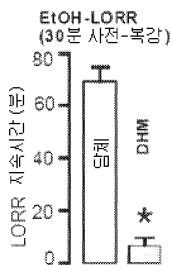
[0109] EtOH 노출로부터 금단 상태의 쥐에서, 생체 내 행동 실험은 인간 AWS에서 관찰된 증상과 비슷한 방식으로 발작 역치, 불안 및 진정제/마취제에 대한 내성을 감소시킴을 보여준다. 본원에 개시된 바와 같이, 해마 절편을 이용한 연구는 EtOH과 DHM의 공동 투여로부터 48시간 금단 시, 급성 EtOH에 대하여 유의미한 I_{tonic} 민감성이 있음을 보여준다. 또한, EtOH과 DHM의 공동 투여는 EtOH 처리에 의한 기준치 I_{tonic} 규모의 감소를 차단한다. DHM의 비슷한 효과들이 배양된 해마 뉴런에서 발견되었다. 쥐의 해마로부터 얻은 이러한 결과들은 $\alpha 4$ 를 함유하는 GABA_AR에서 EtOH로 유도된 변화가 DHM에 의해 차단됨을 보여준다. 이러한 결과는 DHM이 GABA_AR 기능에 대한 EtOH의 효과를 저해시킬 뿐만 아니라, $\alpha 4$ 를 함유하는 GABA_AR의 시냅스외로부터 시냅스로의 이동을 차단한다. 따라서 DHM은 EtOH 노출로부터 발생한 GABA_AR 가소성과 관련된 알코올 사용 장애를 치료하는 데 이용될 수 있다.

[0110] 본원의 순수한 GABA_AR과 EtOH에 노출되었던 GABA_AR의 경우, DHM이 시냅스 및 시냅스의 GABA_AR를 계속하여 효과적으로 강화함을 보여준다. 더구나, DHM은 뇌 절편의 고유한 해마 뉴런의 시냅스 GABA_AR의 급성 EtOH 상승작용을 차단한다. 이러한 결과는 DHM이 GABA_AR의 조절전자임을 보여주며, 따라서 DHM이 벤조다이아제핀과 같은 다른 약물치료에 내성을 나타내는 대상자에서 알코올 중독 및 AWS에 대한 효과적인 치료제일 수 있음을 나타낸다.

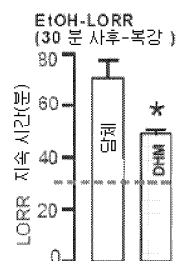
- [0111] 다이진, 퀴세틴, 제니스테인, 미리세틴 및 푸에라린을 이용한 비교 실험은 EtOH 노출로 말미암은 GABA_AR와 관련된 알코올 중독, 알코올 사용 장애 및 알코올 남용에 대한 DHM의 효과가 독특할 수 있음을 보여준다. 특히, 쥐 해마 절편 뉴런의 패치 클램프 기록은 A) DHM은 시냅스와 GABA_AR 매개성 지속성 전류(I_{tonic}) 및 시냅스 후 전류(mIPSC)를 강화하지만, 다이진은 I_{tonic}에 아무런 영향을 나타내지 않고 mIPSC를 유의미하게 강화하였음을 보여준다. 퀴세틴은 I_{tonic} 또는 mIPSC 어느 것에도 아무런 효과를 나타내지 않았다. 따라서 DHM은 시냅스와 GABA_AR를 선택적으로 조절하는 데 이용될 수 있다. 쥐 해마 절편 뉴런의 패치 클램프 기록은 60mM EtOH 존재 시, DHM은 GABA_AR 매개성 I_{tonic} 및 mIPSC의 EtOH 상승작용을 농도 의존적으로 차단하지만, 다이진과 퀴세틴은 그렇지 않음을 보여준다. [3H]플루니트라제팜 결합 분석법은 DHM, 다이제인 및 다이진은 GABA_AR와 결합하지만 [3H]플루니트라제팜으로 상당히 교체되는 반면, 제니스테인, 미리세틴, 푸에라린 및 퀴세틴은 GABA_AR에 결합하지 않음을 보여준다. 이러한 결과는 DHM이 중추 신경 계통 뉴런에서 GABA_AR의 알코올 상승작용을 독특하게 저해함을 나타낸다.
- [0112] 본 발명의 개시를 이해하거나 완벽하게 하는 데 필요한 범위까지, 본원에 언급된 모든 출판물, 특허 및 특허 출원은 마치 각각이 개별적으로 통합되었던 것과 같은 정도로 본원에 참조로 명확히 통합된다.
- [0113] 본원에 개시된 실시예 및 실험은 본 발명을 제한하고자 함이 아니라, 설명하고자 의도된 것이다. 본 발명의 상세한 본보기들을 위한 실시예로써, 본 발명이 속한 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 개시된 범위 내에서 예시만을 위한 것이며, 본 발명이 범위 내에서 다양한 기타 대안, 각색 및 변경이 이루어질 수 있음을 주의하여야 한다. 따라서 본 발명은 본원에 설명된 바와 같은 특정 실시예에 한정되지 않고, 다음과 같은 청구항에 의해서만 한정된다.

도면

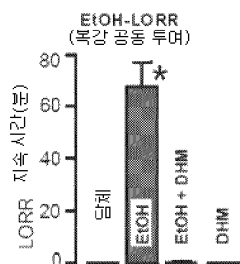
도면1a



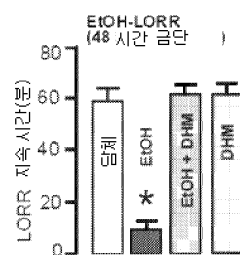
도면1b



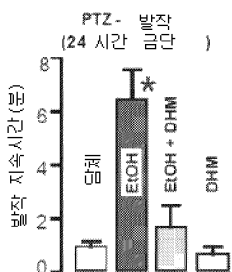
도면1c



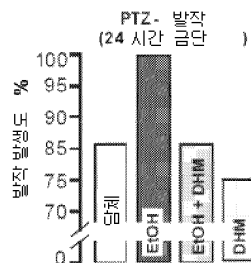
도면1d



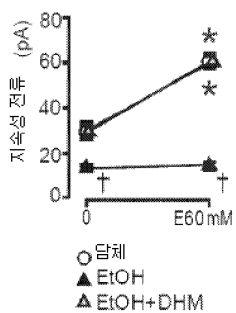
도면1e



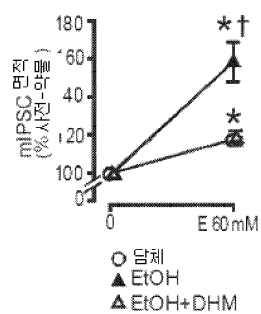
도면1f



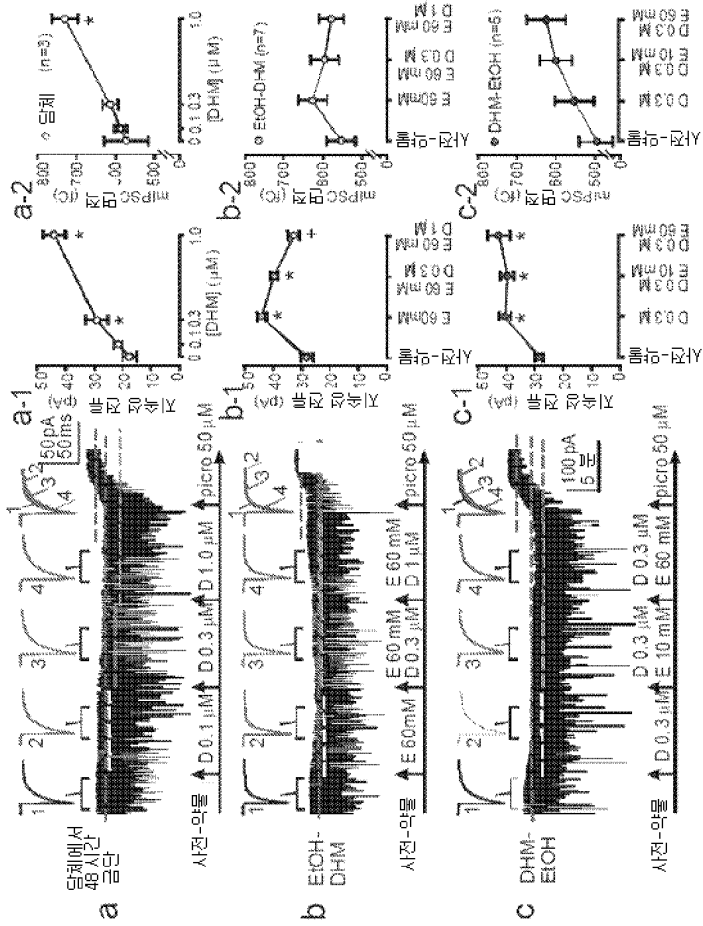
도면2a



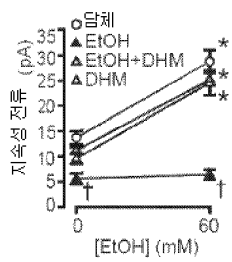
도면2b



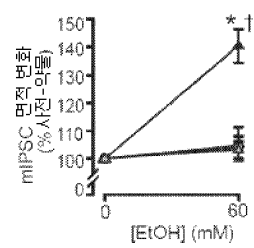
도면3



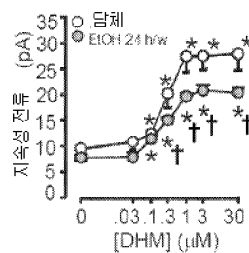
도면4a



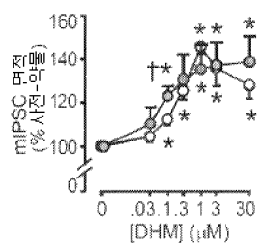
도면4b



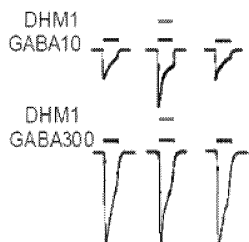
도면5a



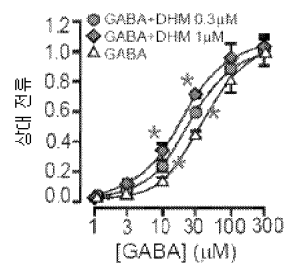
도면5b



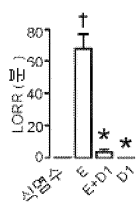
도면5c



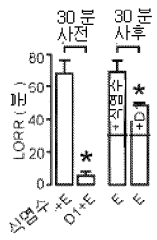
도면5d



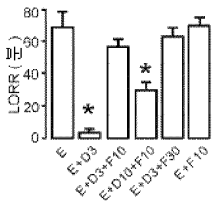
도면6a



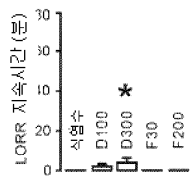
도면6b



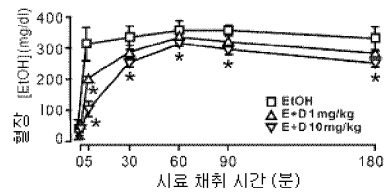
도면6c



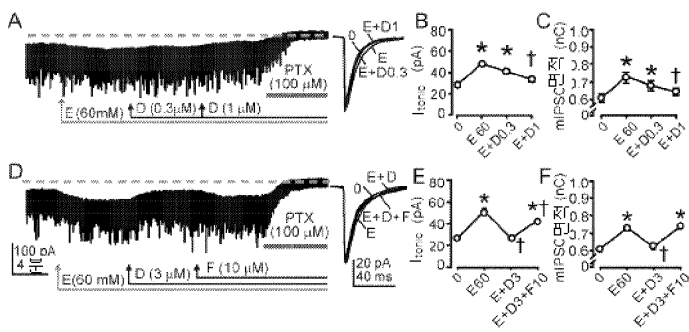
도면7



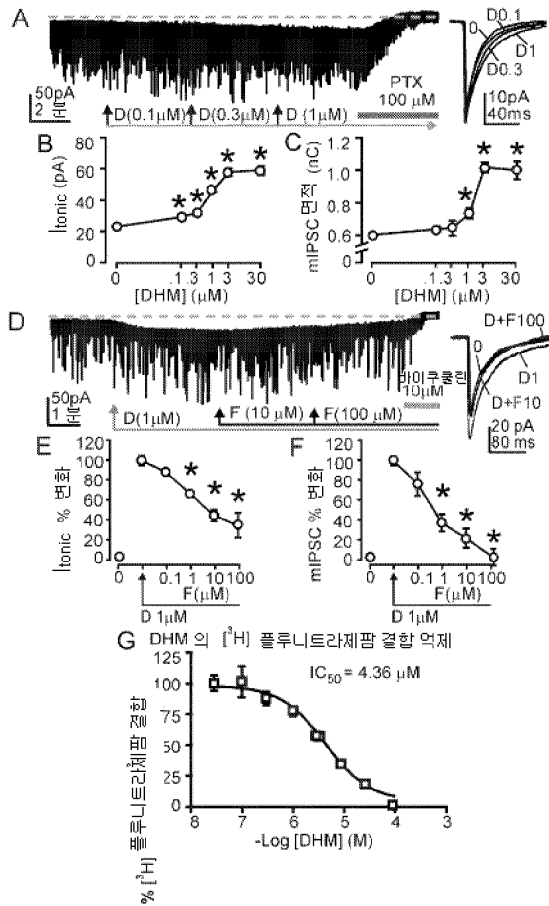
도면8



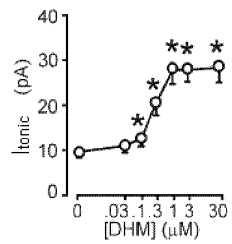
도면9



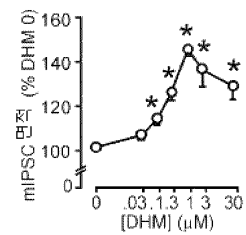
도면10



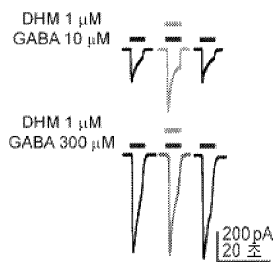
도면11a



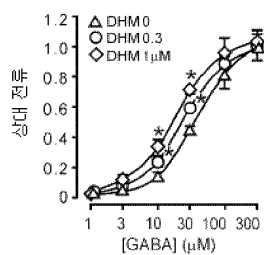
도면11b



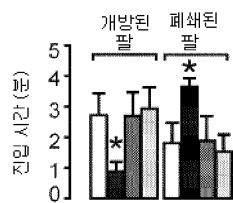
도면11c



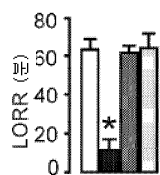
도면11d



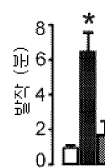
도면12a



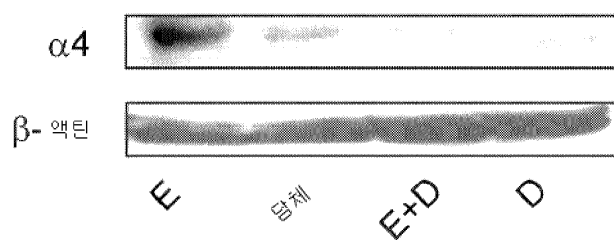
도면12b



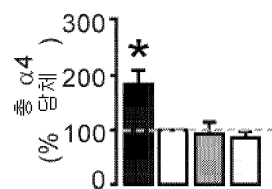
도면12c



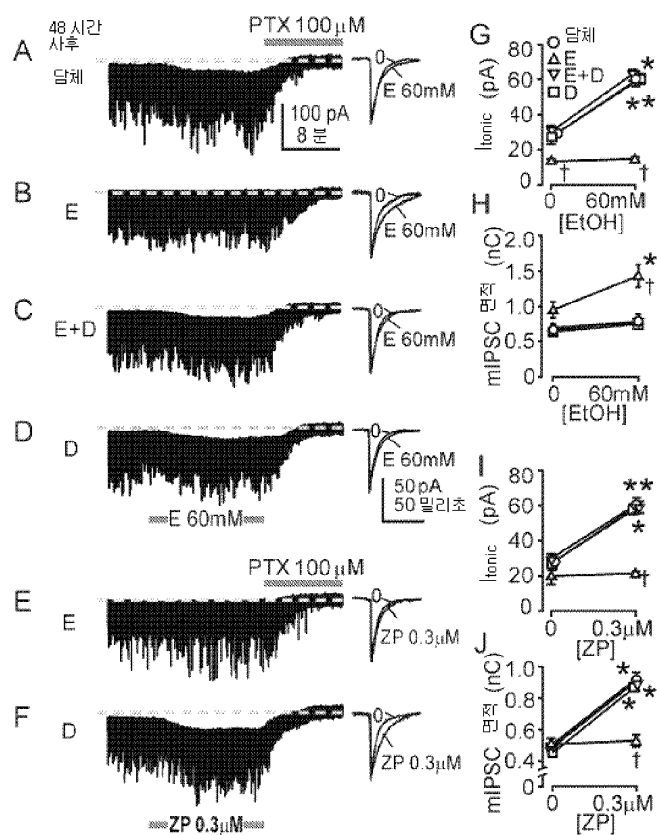
도면12d



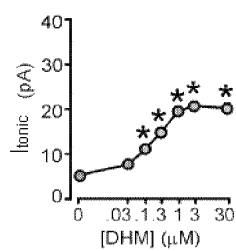
도면12e



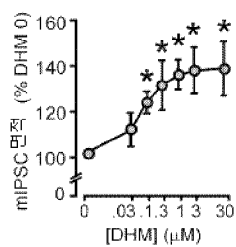
도면13



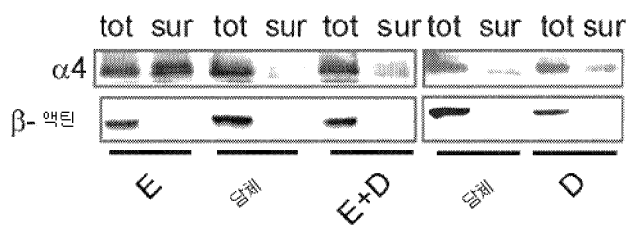
도면14a



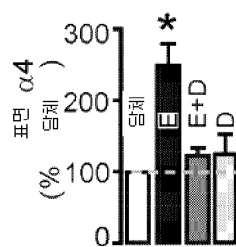
도면14b



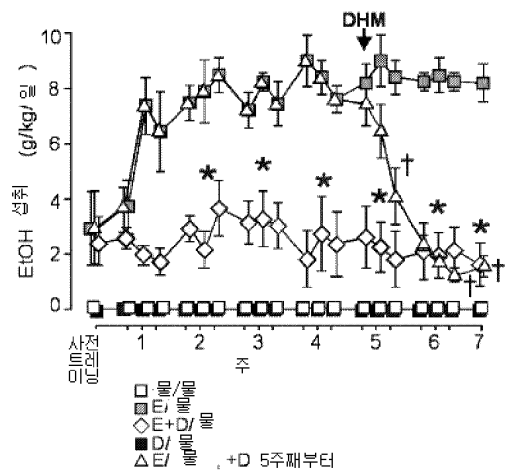
도면14c



도면14d



도면15a



도면15b

