(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0050905
(43) 공개일자 2022년04월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/551 (2006.01) *A61P 25/14* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/551 (2013.01)
A61P 25/14 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-7006569
(22) 출원일자(국제) 2020년07월24일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년02월25일
(86) 국제출원번호 PCT/ES2020/070482
(87) 국제공개번호 WO 2021/019116
국제공개일자 2021년02월04일
(30) 우선권주장
P201930713 2019년07월31일 스페인(ES)

(71) 출원인
유니버시다데 데 산티아고 데 콤포스텔라
스페인 E-15782 산티아고 데 콤포스텔라 캠퍼스 비다 에디피시오 엠프렌디아
(72) 발명자
무뇨스 파티뇨, 아나 엠.
스페인 15782 산티아고 데 콤포스텔라 캠퍼스 비다 에디피시오 엠프렌디아
라반데이라 가르시아, 호세 루이스
스페인 15782 산티아고 데 콤포스텔라 캠퍼스 비다 에디피시오 엠프렌디아
로페스 로페스, 안드레아
스페인 15782 산티아고 데 콤포스텔라 캠퍼스 비다 에디피시오 엠프렌디아
(74) 대리인
양영준, 이상영

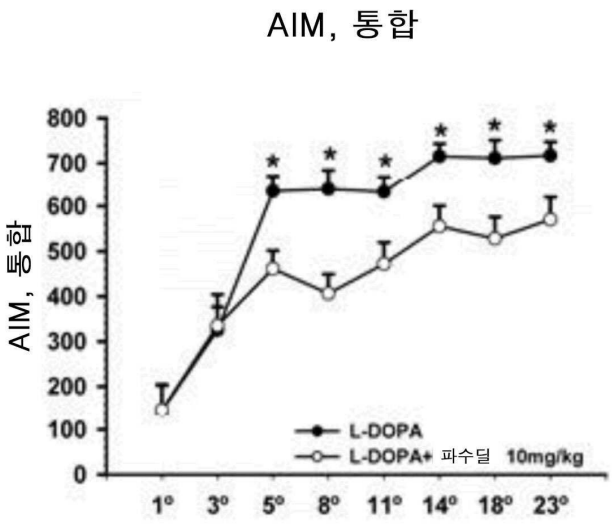
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **L-DOPA-유도된 운동이상증의 예방적 및/또는 치료적 처치에 사용하기 위한 약제학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 약제의 분야, 더욱 구체적으로 L-DOPA-유도된 운동이상증의 치료 또는 예방을 위한 rho 키나제 저해제의 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2a



명 세 서

청구범위

청구항 1

L-DOPA에 의해 유도되는 운동이상증의 예방적 또는 치료적 처치에 사용하기 위한, ROCK 경로를 저해할 수 있는 화합물을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 ROCK 경로를 저해할 수 있는 화합물이 파수딜(fasudil) 및 이의 유도체, 리파수딜(Ripasudil), E-27632, E-32885, AMA-0076, AR-12286, AR-13324(로프레사(Rhopressa)), KD-025(S1x2119), LX7101, PG-324(로클라탄(Roclatan)), SAR407899로부터 선택되는 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 ROCK 경로를 저해할 수 있는 화합물이 파수딜, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 유사체인 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 경구 또는 주사 투여에 적합한 투여형으로 투여되는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 화합물이 파수딜 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이며, 이의 투여형이 L-DOPA에 의해 유도되는 운동이상증의 예방에 사용하기 위한 경구 또는 주사 투여에 적합한 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 하기를 포함하는 L-DOPA에 의해 유도되는 운동이상증의 예방적 처치에 사용하기 위한 조성물: (i) L-DOPA로의 치료의 시작 이전의 치료적 유효량의 상기 약제학적 조성물의 투여, 및 (ii) L-DOPA의 각각의 투여와 동시에 또는 이와 순차적으로 치료적 유효량의 상기 약제학적 조성물의 투여.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 화합물이 파수딜 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이며, 이의 투여형이 경구 또는 주사 투여에 적합한 약제학적 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, L-DOPA의 각각의 투여와 동시에 또는 이와 순차적으로 치료적 유효량의 상기 약제학적 조성물의 투여를 포함하는 L-DOPA에 의해 유도되는 운동이상증의 치료적 처치에 사용하기 위한 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 화합물이 파수딜 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이며, 이의 투여형이 경구 또는 주사 투여에 적합한 약제학적 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 화합물이 파수딜 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이며, 이의 투여형이 L-DOPA에 의해 유도되는 운동이상증의 치료에 사용하기 위한 경구 또는 주사 투여에 적합한 약제학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 약제 분야, 특히 L-DOPA에 의해 유도되는 운동이상증을 치료하거나 예방하기 위한 Rho 키나제 저해제의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 파킨슨병(PD)은 우리 인구에서 가장 흔한 신경변성 질병 중 하나이다. 이는 다른 뉴런계도 연관되지만, 흑질의 도파민성 뉴런의 변성으로 인해 발생하는 운동 증상을 주로 특징으로 한다. 이 질병에 대한 현재까지 가장 효과적인, 일반적인 치료는 도파민 전구체 분자인 L-DOPA를 투여하는 것으로 이루어진다. 이 약물은 초년에는 효과적인 것으로 입증되지만, 더 장기적으로는 특히 운동이상증을 포함하는 합병증 및 부작용을 야기한다.

[0003] L-DOPA에 의해 유도되는 운동이상증은 무도병 유형의 비정상적인 빠른 불수의적 운동과 아테토시스(athetosis)로 이루어지며, 이는 보통 팔다리 및 때때로 얼굴 및 목 부위에 영향을 미친다. 시간적 발현 패턴에 따라 몇몇의 형태의 운동이상증이 설명된 바 있다: 피크-용량 운동이상증(가장 높은 도파민 혈장 수준과 동시에 일어남), 이상성(diphasic) 운동이상증 및 지속성 근긴장이상(off-period dystonia). 이들 합병증은 L-DOPA의 치료 효과를 크게 감소시켜 환자의 일상 활동을 제한하기 때문에, 정상적인 생활을 하지 못하게 할 수 있다. 5년의 치료 후에, 약 50%의 환자가 운동이상증을 갖지만, 10년째에는 그러한 비율이 90%로 증가한다고 기술된 바 있다(문헌 [Olanow CW, Stocchi F. Levodopa: A new look at an old friend. Mov Disord (2018) 33(6):859-866. doi: 10.1002/mds.27216]).

[0004] 글루타메이트계가 중요한 역할을 한다는 것이 알려져 있지만, 운동이상증의 발생에 관여하는 원인은 충분히 알려져 있지 않다. 사실상, 운동이상증을 방지하기 위해 현재 사용되는 약물은 NMDA 글루타메이트 수용체 길항제인 아만타딘(amantadine)이다. 그러나, 이 화합물은 신장 및 심장 기능부전의 사례 및 정신과적 문제에서 금기되며, 하기와 같은 합병증 및 수많은 부작용의 발생을 초래한다: 혼돈, 집중 곤란, 불면증, 식욕 부진, 구역 및 정신과적 문제(혼돈, 환각, 섬망 증후군, 정신병). 지난 10년간, 질병의 진행 단계에서 L-DOPA가 세로토닌 말단에서 도파민으로 전환되고, 제어되지 않은 방식으로 방출되기 때문에, 세로토닌계와 같은 다른 계도 또한 관여하는 것이 입증된 바 있다. 그러나, 예를 들어, 세로토닌 5-HT1a 수용체 효능제(부스피론(buspirone), 사리토잔(saritozan), 탄도스피론(tandospirone))와 같이 이 수준으로 작용하는 화합물은 항운동이상 효과가 예비 시험에서 관찰되었지만, 특정 경우에 항파킨슨 반응에 영향을 미칠 수 있기 때문에, 문제를 보일 수 있다. 또는, 예를 들어, 5-HT1a/b 효능제(엘토프라진((eltoprazine) 및 안피르톨린(anpirtoline))는 상기 화합물들보다 더욱 바람직한 약리학적 프로파일을 갖지만, 또한 L-DOPA의 치료 효과를 부분적으로 감소시킬 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 따라서, 더 적은 부작용을 갖고 더욱 효과적인, 운동이상증을 방지하기 위한 다른 예방적 및/또는 치료적 처치를 조사하고 개발하는 것이 필요하다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 문서에 제시된 결과는 RhoA/Rho 키나제(ROCK) 경로의 저해가 파킨슨병 환자에게 투여되는 L-DOPA를 이용한 만성 치료에 의해 야기될 수 있는 운동이상증을 치료하고/거나 예방할 수 있게 하는 것을 보여준다.

[0007] 따라서, 본 발명은 L-DOPA에 의해 유도되는 운동이상증의 예방적 또는 치료적 처치에 사용하기 위한 ROCK를 저해할 수 있는 화합물을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0008] 본 발명은 추가로 ROCK 저해제의 약제학적 조성물, 상이한 투여 경로를 위한 이의 투여형 및 운동이상증을 예방하는데 유용한 특정 용량 및 운동이상증을 치료하는데 유용한 특정 용량에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 흑질(a 내지 c) 및 선조체(d 내지 f)에서 RhoA/ROCK 경로에 대한 L-DOPA에 의해 유도되는 운동이상증의 영향을 보여준다. 두 용량의 L-DOPA(6 mg/kg; LD-6 및 12 mg/kg)로 처리된 운동이상증 동물에서, 흑질에서는 RhoA 및 ROCK에 대한 단백질 발현(a, b)과 ROCK에 대한 활성(c)에서 유의미한 증가가 관찰되었지만, 선조체에서는 차이가 고 용량(d, e)에서만 유의미하였다. 그러나, 리얼-타임(real time) PCR 분석 후에, 선조체에서 두 용

량에서 모두 유의미한 차이가 관찰되었다. 결과를 염수로 처리된 6-OHDA에 의해 병변이 야기된 동물에 대한 값에 대하여 정규화시켰다. 데이터는 평균 값 ± SEM으로서 제시됨, t-스튜던트(Student) *p<0.05.

도 2는 L-DOPA(23일 및 32일) 및 상이한 용량의 파수딜(fasudil)(10 mg/kg; a, c, e 및 g, 및 30 내지 40 mg; b, d, f, h)로의 만성 처리 후에 관찰되는 비정상적인 불수의적 운동(AIM)을 보여준다. 파수딜로 동시-처리된 동물의 군(백색 원)에서, 이들 운동의 통계적으로 유의미한 감소가 전체 점수(a, b) 및 개별 구성요소: 팔다리(c, d), 몸통(e, f), 구설(g, h)의 분석 둘 모두에서 관찰되었다. 데이터는 평균 값 ± SEM(평균의 표준 오차)으로서 제시됨, t-스튜던트, *p<0.05.

도 3은 기준선 조건에서 좌측 팔다리의 20% 미만의 이용이 관찰되는 편측 도파민성 병변을 갖는 동물에서의 실린더 시험, 및 대조군 동물(L-DOPA만; 흑색 막대)에서, 그리고 파수딜 10 mg/kg(a), 30 및 40 mg/kg(b)으로 동시-처리된 동물(회색 막대)에서 60분과 90분에 L-DOPA의 주사 이후의 운동 비대칭의 회복을 보여준다. 회전 거동은 또한, 파수딜 처리 후에 영향을 받지 않았으며, 이는 운동이상증의 감소가 운동 활동의 감소에 기인하지 않음을 나타낸다(c 내지 e). 데이터는 평균값 ± SEM으로서 제시됨, t-스튜던트, *p<0.05.

도 4는 안정한 정도의 운동이상증을 갖는 동물에서의 ROCK 저해의 영향을 보여준다(L-DOPA로의 만성 처리, 3주). 이 경우에, 저 용량(10 mg/kg, a)의 파수딜은 운동이상성 운동에 어떠한 영향도 미치지 않았다(a). 그러나, 고 용량의 화합물(30 및 40 mg/kg)은 심지어 고용량의 L-DOPA(24 mg/kg)에도 불구하고 L-DOPA의 유의미한 감소를 야기한다(b). 데이터는 평균값 ± SEM으로서 제시됨, t-스튜던트 *p<0.05.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용되는 바와 같이, 용어 "ROCK 경로"는 GTPase RhoA 단백질 및 이의 관련 키나제(Rho-키나제로도 알려져 있음)가 참여하는 경로를 나타낸다. Rho A는 ROCK의 특정 영역에 결합하여, 이를 활성화시킨다. ROCK는 미오신의 경쇄를 포함하는 다양한 표적 단백질을 인산화시켜, 세포골격의 액틴의 재조직하고, 아포토시스 사건을 조절한다(문헌[Amin E, Dubey BN, Zhang SC, Gremer L, Dvorsky R, Moll JM, Taha MS, Nagel-Steger L, Piekorz RP, Somlyo AV, Ahmadian MR (2013) Rho-kinase: regulation, (dys)function, and inhibition. Biol Chem 394:1399-410. doi: 10.1515/hsz-2013-0181]). 이 경로는 신경변성 질병, 예컨대 파킨슨병을 포함하는 특정 질병에서 염증 반응에 관련된다. ROCK는 또한 자가포식의 과정에서 작용하며, 이 경로의 저해는 축삭돌기 안정화를 생성하여, 신경보호 효과를 야기한다. 상이한 유전자에 의해 인코딩되는 2가지 아이소폼이 설명된 바 있다: ROCK I 및 ROCK II. ROCK II는 뇌에서 우선적으로 발현된다(검토를 위하여 문헌[Labandeira-Garcia et al., 2014] 참조).

[0011] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용되는 바와 같이, 용어 "ROCK 경로를 저해할 수 있는 화합물"은 저해제를 투여하지 않은 이들의 대응하는 대조군에 비하여 효소의 활성 및 이의 발현 수준을 통계적으로 유의미한 방식으로 감소시킬 수 있는 화합물을 나타낸다. 당업자는 다양한 방법, 예를 들어, 예컨대 미오신의 인산화를 검출하는 효소-면역검정 기법(ROCK 활성 검정 키트; 셀 바이오랩스, 인코포레이티드(Cell Biolabs, Inc.), 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재)에 의한 상기 ROCK 효소의 활성, 리얼-타임 PCR에 의한 mRNA의 발현 수준 또는 웨스턴 블롯에 의한 단백질 발현 수준의 측정에 의해 상기 저해를 시험할 수 있다. 이들 기법은 본 명세서에 그의 전체가 포함되는 하기의 간행물에 상세히 설명된다: 문헌[Rodriguez-Perez AI, Dominguez-Meijide A, Lanciego JL, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. Inhibition of Rho kinase mediates the neuroprotective effects of estrogen in the MPTP model of Parkinson's disease. Neurobiol Dis. 2013 58:209-19. doi: 10.1016/j.nbd.2013.06.004].

[0012] 본 발명에 따르면, ROCK 경로를 저해할 수 있는 화합물은 ROCK 경로를 직접적으로 또는 간접적으로 조절할 수 있다.

[0013] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용되는 바와 같이, 용어 "L-DOPA에 의해 유도되는 운동이상증"은 파킨슨 병을 갖고, L-DOPA로 치료 중인 포유동물(예를 들어, 인간)이 경험하는 비정상적인 불수의적 운동으로서 이해될 것이다.

[0014] 본 명세서에서, 저자는 6-OHDA에 의해 병변이 야기된 랫트 모델에서 L-DOPA의 만성 투여에 의해 분자 수준으로 생성되는 영향을 조사하였으며, 이는 대조군에 비하여 증가된 Rho A 및 ROCK의 수준을 보여주며(도 1 참조), 이는 이 경로의 활성화를 뒷받침한다. 이들 조건에서, 기능적 수준에서 랫트는 L-DOPA로의 만성 처리에 의해 야기되는 운동이상증을 앓고 있다. 이들 실험에 기초하여, ROCK 경로의 활성화와 운동이상증 간의 관계가 처음으로 입증된다. 본 발명자들은 ROCK 경로의 조절이 운동이상증에 영향을 미치므로, ROCK 경로를 저해함으로써, L-

DOPA로 처리된 동물 모델에서 이미 확립된 운동이상증을 감소시키거나(실시예 4 참조) 또는 L-DOPA로의 처리가 시작된 동물 모델에서 운동이상증의 발생을 감소시킬 수 있다는 것(실시예 2 참조)을 입증하였다.

[0015] 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 L-DOPA에 의해 유도되는 운동이상증의 예방적 또는 치료적 처치에 사용하기 위한 ROCK 경로를 저해할 수 있는 화합물을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0016] 특정 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 복강내, 경구 또는 주사 투여에 적합한 투여형으로 투여된다. 특정 실시형태에서, 주사 투여는 근육내, 피하, 정맥내 및 피내 투여를 포함한다.

[0017] 특정 실시형태에서, ROCK 저해제는 파수딜 및 이의 유도체, 리파수딜(Rifasudil), E-27632, E-32885, AMA-0076, AR-12286, AR-13324(로프레사(Rhopressa)), KD-025(Slx2119), LX7101, PG-324(로클라탄(Roclatan)), SAR407899로부터 선택된다.

[0018] 바람직한 실시형태에서, 본 발명을 위한 관심 ROCK 경로 저해제는 파수딜이다. 따라서, 특정 실시형태에서, 본 발명은 상기 기술된 약제학적 조성물에 관한 것이며, 상기 화합물은 파수딜, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 유도체이다. 또 다른 특정 실시형태에서, 파수딜 유도체는 하이드록시 파수딜 및 디메틸 파수딜로부터 선택된다.

[0019] 본 발명은 또한, L-DOPA로 처리하기 이전의 파킨슨 동물 모델로의 파수딜의 투여를 기술하며, 또한 L-DOPA로의 처리 동안에, 파수딜도 또한 투여하면, 운동이상증에 대한 예방 효과가 달성되어, 처리 내내 이들의 발생이 감소된다. 실시예 2에서, L-DOPA의 급성 투여의 경우에, 그리고 운동이상증이 더욱 확연한 경우에, 그럼에도 불구하고 파수딜로의 처리가 효과적이어서, 파수딜로의 처리가 없는 경우에 비하여 운동이상증의 발생을 감소시키는 것도 또한 입증된다(실시예 2 및 도 2 참조).

[0020] 따라서, 특정 실시형태에서, 본 발명은 하기를 포함하는 L-DOPA에 의해 유도되는 운동이상증의 예방적 처치에 사용하기 위한 본 발명의 약제학적 조성물에 관한 것이다: (i) L-DOPA로의 치료의 시작 이전의 치료적 유효량의 상기 약제학적 조성물의 투여, 및 (ii) L-DOPA의 각각의 투여와 동시에 또는 이와 순차적으로 치료적 유효량의 상기 약제학적 조성물의 투여.

[0021] 특정 실시형태에서, 본 발명은 L-DOPA에 의해 유도되는 운동이상증의 예방 방법에 관한 것이며, 환자는 파킨슨병이 있으며, 당해 방법은 L-DOPA로의 치료의 시작 이전에 치료적 유효량의 파수딜을 투여하는 것, 및 L-DOPA의 각각의 투여와 동시에 또는 이와 순차적으로 치료적 유효량의 파수딜을 투여하는 것을 포함한다.

[0022] 특정 실시형태에서, 본 발명은 L-DOPA에 의해 유도되는 운동이상증의 예방적 처치에 사용하기 위한 본 발명의 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0023] 이 경우에, 또한, 이 용량에서 파수딜이 파킨슨병 환자에 대하여 신경보호를 제공하고, 도파민성 변성을 둔화시키기 때문에, 추가의 이점이 존재한다(문헌[Villar-Cheda B, Dominguez-Meijide A, Joglar B, Rodriguez-Perez AI, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. (2012) Involvement of microglial RhoA/Rho-kinase pathway activation in the dopaminergic neuron death. Role of angiotensin via angiotensin type 1 receptors. Neurobiol Dis 47: 268-79 doi: 10.1016/j.nbd.2012.04.010]). 또한, 운동이상증을 예방하기 위한 본 발명의 조성물의 투여는 파수딜의 신경보호 효과도 또한 촉진시키는 상기 기술된 바와 같은 바람직한 약량학을 갖는다(문헌[Borrajo A, Rodriguez-Perez AI, Villar-Cheda B, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. (2014) Inhibition of the microglial response is essential for the neuroprotective effects of Rho-kinase inhibitors on MPTP-induced dopaminergic cell death. Neuropharmacology 85: 1-8 doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.05.021]; 문헌[Villar-Cheda B, Dominguez-Meijide A, Joglar B, Rodriguez-Perez AI, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. (2012) Involvement of microglial RhoA/Rho-kinase pathway activation in the dopaminergic neuron death. Role of angiotensin via angiotensin type 1 receptors. Neurobiol Dis 47: 268-79 doi: 10.1016/j.nbd.2012.04.010]; 문헌[Labandeira-Garcia JL, Rodriguez-Perez AI, Villar-Cheda B, Borrajo A, Dominguez-Meijide A, Guerra MJ. (2015) Rho Kinase and Dopaminergic Degeneration: A Promising Therapeutic Target for Parkinson's Disease. Neuroscientist 21: 616-29 doi: 10.1177/1073858414554954]).

[0024] 본 발명은 또한, L-DOPA에 의해 유도되는 운동이상증의 치료적 처치를 위한 본 발명의 조성물의 유용성을 기술한다. 실시예 4에서, 심지어 운동이상증이 이미 확립된 경우에도, ROCK 저해제를 갖는 조성물이 이들을 감소시킬 수 있다는 것이 입증된다. 파수딜의 용량을 증가시킴으로써(40 mg/kg), 이미 운동이상증이 있는 동물(3주 내지 4주 동안 L-DOPA로 주기적으로 처리)에서 운동이상증이 거의 50%로 감소된다. 심지어 L-DOPA의 급성 투여

후에도, 본 발명의 조성물의 투여를 동반하는 경우에는 운동이상증이 더욱 감소된다.

[0025] 따라서, 특정 실시형태에서, 본 발명은 L-DOPA의 각각의 투여와 동시에 또는 이와 순차적으로 치료적 유효량의 상기 약제학적 조성물의 투여를 포함하는 L-DOPA에 의해 유도되는 운동이상증의 치료적 처치에 사용하기 위한 본 발명의 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0026] 특정 실시형태에서, 본 발명은 L-DOPA에 의해 유도되는 운동이상증의 치료 방법에 관한 것이며, 환자는 파킨슨병이 있으며, 당해 방법은 L-DOPA의 각각의 투여와 동시에 또는 이와 순차적으로 치료적 유효량의 파수딜을 투여하는 것을 포함한다.

[0027] 특정 실시형태에서, 본 발명은 L-DOPA에 의해 유도되는 운동이상증의 치료적 처치에 사용하기 위한 본 발명의 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0028] 본 발명에서 바람직한 투여 경로 중 하나는 주사를 통한 것이며, 따라서, 본 발명의 특정 실시형태에서, 본 발명은 상기 기술된 바와 같은 약제학적 조성물에 관한 것이며, 이의 투여형은 L-DOPA에 의해 유도되는 운동이상증의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 주사 투여에 적합하다.

[0029] 본 발명에서 바람직한 또 다른 투여 경로는 경구 경로이며, 따라서, 본 발명의 특정 실시형태에서, 본 발명은 상기 기술된 바와 같은 약제학적 조성물에 관한 것이며, 이의 투여형은 L-DOPA에 의해 유도되는 운동이상증의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 경구 투여에 적합하다.

[0030] 하기의 실시예는 본 발명을 예시하기 위해 제공되며, 이의 제한을 나타내지 않는다.

[0031] **방법 및 실험 설계**

[0032] 하기의 실시예에서, 스프라그-다우리(Sprague-Dawley) 스트레인의 랫트를 사용하였으며, 내측전뇌다발에서 정위 기법에 따라 신경독소 6-하이드록시도파민(6-OHDA)을 주사하였다. 이 기법은 파킨슨병(PD) 및 이의 가능한 치료 경로를 연구하기 위한 가장 널리 사용되는 실험실 모델 중 하나이다(문헌[Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. Eur J Pharmacol. (1968) 5(1): 107-10]; 문헌[Cenci MA, Crossman AR. Animal models of l-dopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. Mov Disord (2018) 33(6):889-899. doi: 10.1002/mds.27337]).

[0033] 운동이상증의 동물 모델을 확립하기 위하여, 동물을 3주 내지 4주 동안 L-DOPA 6 mg/kg(치료적 용량) 및 벤세라자이드(10 mg/kg)로 만성적으로 처리하였으며, 이 기간 동안 비정상적인 불수의적 운동(AIM)을 특수 시험을 사용하여 평가하였다(문헌[Cenci MA, Lundblad M. Ratings of L-DOPA-induced dyskinesia in the unilateral 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease in rats and mice. Curr Protoc Neurosci. (2007) Chapter 9:Unit 9.25. doi: 10.1002/0471142301]).

[0034] **실시예 1. 운동이상증 모델의 연구**

[0035] 운동이상증의 수준이 안정할 때까지(3주 내지 4주) PD의 동물 모델의 군에 상이한 용량의 L-DOPA(6 mg/kg 및 12 mg/kg)를 매일 주사하였다. 해부 시에, 선조체 및 흑질을 절개하고, RhoA 및 ROCK의 발현 수준을 웨스턴 블롯 및 리얼-타임 PCR에 의해 분석하였다.

[0036] 운동이상증 동물에서, RhoA 단백질 및 ROCK 단백질의 수준의 유의미한 증가가 존재하였음이 관찰되었다. 또한, 보다 고 용량의 L-DOPA로 처리되고, 더욱 조기에 더욱 중증의 운동이상증을 보였던 동물에서, 상기 단백질의 수준의 증가가 더 컸음이 관찰되었다(도 1 참조).

[0037] 이 실험은 ROCK 경로가 운동이상증 동물에서 활성화되는 것을 보여준다.

[0038] **실시예 2. L-DOPA로의 만성 처리 동안 파수딜로의 처리**

[0039] 상기 기술된 바와 같은 L-DOPA로 처리되는 랫트의 군을 본 연구에서 대조군으로서 사용하였다. L-DOPA에 더하여, ROCK 경로의 저해제인 파수딜을, L-DOPA로 처리를 시작하기 5일 전에 시작하여, 그리고 L-DOPA의 각각의 투여 30분 전에, (이것이 용량을 적합하게 조절한 후에 경구 경로에 의해 투여될 수 있었지만) 복강내 경로에 의해 10 mg/kg/일의 용량으로 하나의 군에 투여하였다. L-DOPA에 더하여, 또 다른 군에는 이전의 군과 동일한 빈도로, 30 및 40 mg/kg/일의 용량으로 파수딜을 복강내로 투여하였다. 모든 경우에, 처리를 3주 동안 만성적으로 수행하였으며, 비정상적인 불수의적 운동을 이 기간 동안 평가하였다.

[0040] 저 용량의 파수딜(10 mg/kg) 및 L-DOPA로 처리되는 동물에서, L-DOPA로만 처리되는 동물의 군에 비하여 운동이

상증의 발생의 통계적으로 유의미한 감소가 관찰되었다: 팔다리에서 운동이상증의 대략 25% 감소, 30% 구설 감소 및 35% 몸통 감소. 5일째부터 시작하여 운동이상증의 감소가 관찰되었다.

[0041] 파수딜의 용량이 증가한 경우(30 mg/kg), 분석된 모든 운동이상 구성요소에서 운동이상증의 더 큰 감소가 관찰되었다(70% 구설, 60% 몸통 및 60% 팔다리). 파수딜 용량을 40 mg/kg로 증가시키면, 운동이상증의 감소가 70%에 도달하였다.

[0042] 처리의 마지막에, L-DOPA의 용량을 24 mg/kg으로 증가시켜, 파수딜이 중증 운동이상증의 조건에서도 효과적인지 여부를 입증하였으며, 대략 50%의 유의미하게 큰 감소가 관찰되었다(도 2 참조).

[0043] 이 연구는 ROCK 경로의 저해제, 예컨대 파수딜이 심지어 이들이 급성 용량의 L-DOPA에 의해 야기되는 경우에도 운동이상증의 발생을 감소시키는데 유용하다는 것을 입증한다.

[0044] **실시예 3. ROCK 경로의 저해와 L-DOPA의 치료적 효과 간의 상호작용의 연구**

[0045] 파수딜이 L-DOPA의 치료적 효과를 간섭할 수 있는지를 조사하기 위하여, 6-OHDA에 의한 편측 병변 후에 동물에 영향을 미치는 운동 비대칭성의 분석에 기초한 실린더 시험을 수행하였다(문헌[Schallert T, Kozlowski DA, Humm JL, Cocke RR. (1997) 73:229-38]). 이 실험에서, 연구된 모든 용량(10, 30 및 40 mg/kg)에서 파수딜로 처리된 동물은 L-DOPA의 주사 1시간 후에 병변에 의해 야기되는 운동 비대칭성을 회복하였으며, L-DOPA만을 주사한 동물에 비하여 차이가 관찰되지 않았으며, 이는 이 화합물이 L-DOPA의 치료적 효과를 변경시키지 않는 것을 나타낸다(도 3a 및 도 3b 참조). 또한, 회전 거동을 평가한 실험에서, 상이한 용량의 파수딜로 처리된 동물에서 L-DOPA에 의해 유도되는 회전에서 차이가 관찰되지 않았으며, 이는 운동이상증의 감소가 운동 활동의 감소에 기인하지 않는 것을 나타낸다(도 3c 내지 도 3e 참조).

[0046] 본 실험은 심지어 고용량의 파수딜의 투여에 의한 ROCK 경로의 저해가 L-DOPA의 치료 효과를 간섭하지 않는 것을 보여준다.

[0047] **실시예 4. 치료적 효과의 연구**

[0048] 6-OHDA에 의한 편측 병변을 갖는 동물의 군을 3주 동안 매일 L-DOPA로 처리한 다음, 이들을 L-DOPA 및 파수딜로 처리하여, 운동이상증이 이미 확립되면, ROCK 경로의 저해가, 운동이상증을 감소시키는지 여부를 조사하였다.

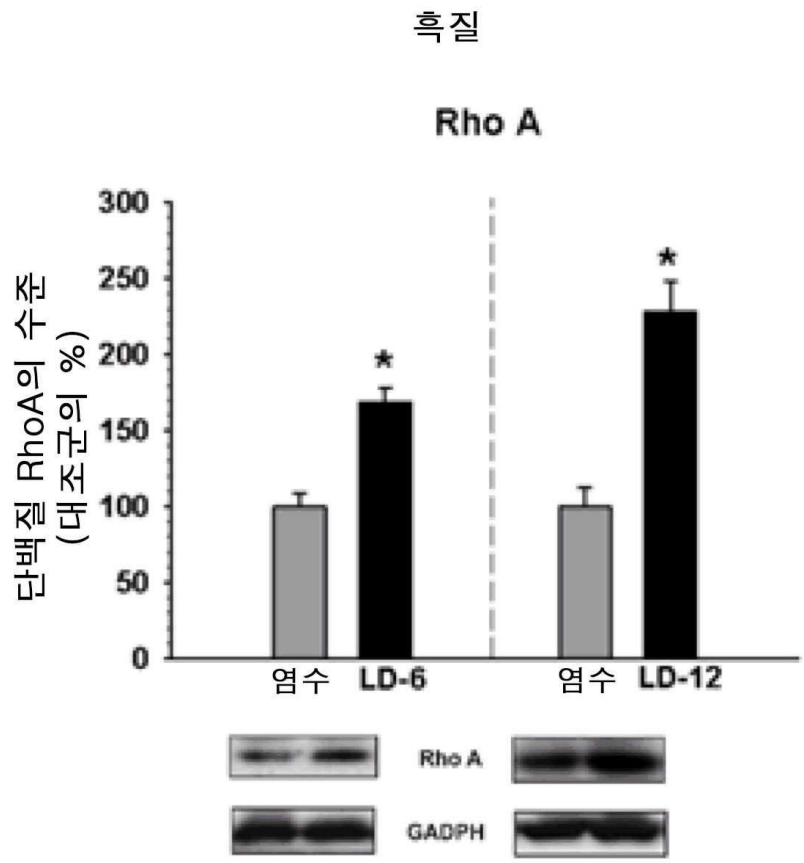
[0049] 10 mg/kg/일의 파수딜 용량을 사용하는 경우, 동물에서 개선이 관찰되지 않았다(최대 7일의 처리).

[0050] 그러나, 40 mg/kg/일의 파수딜 용량을 사용하는 경우, 처리 3일째에 시작하여 약 45%의 운동이상증의 감소가 존재하였다.

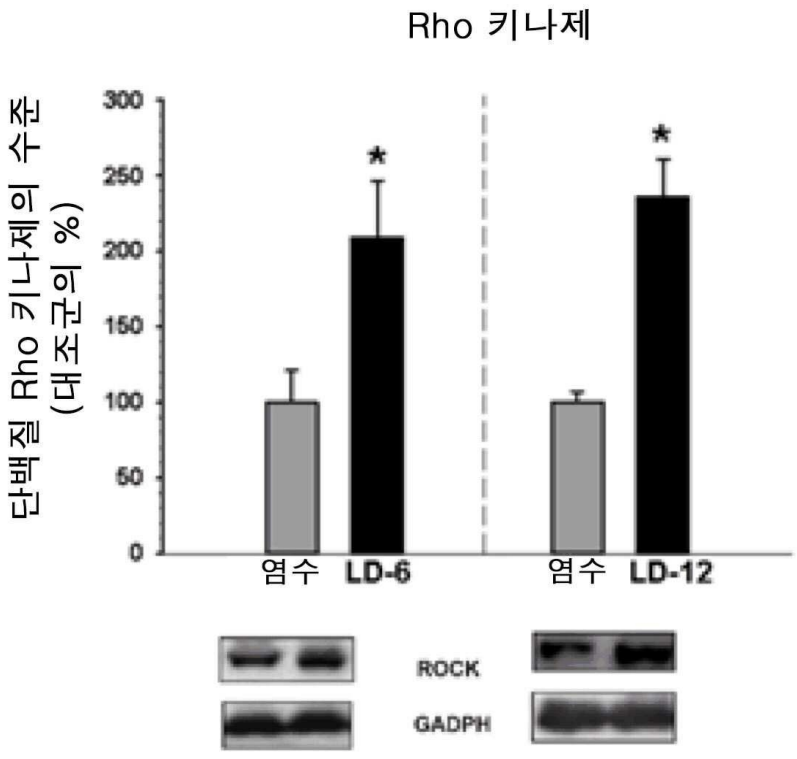
[0051] L-DOPA의 용량을 24 mg/kg로 증가시켜, 중증 운동이상증의 조건을 야기하면, 감소가 대략 50%로 훨씬 더 컸으며, 이는 처리가 끝날 때까지 유지되었다(도 4 참조).

도면

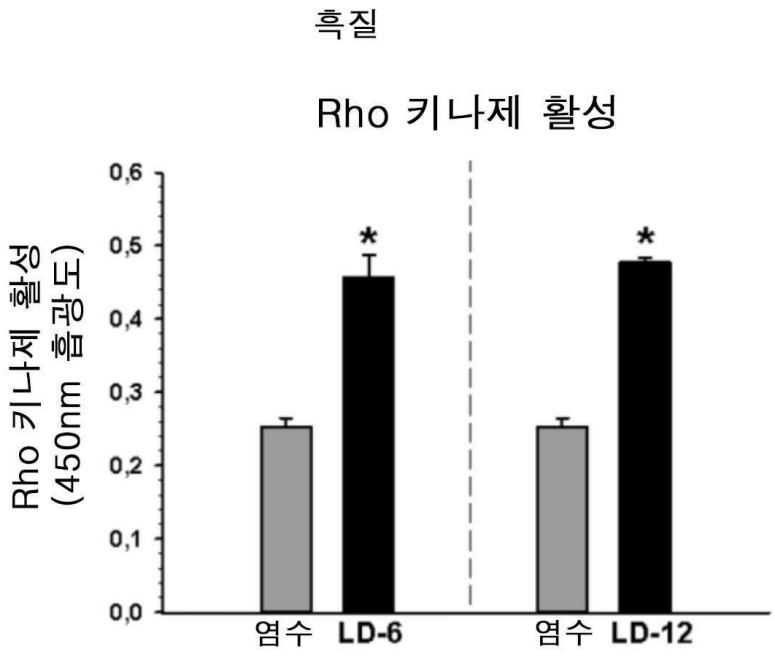
도면1a


흑질
Rho A
단백질 RhoA의 수준
(대조군의 %)
300
250
200
150
100
50
0
*
*
염수
LD-6
염수
LD-12
Rho A
GADPH

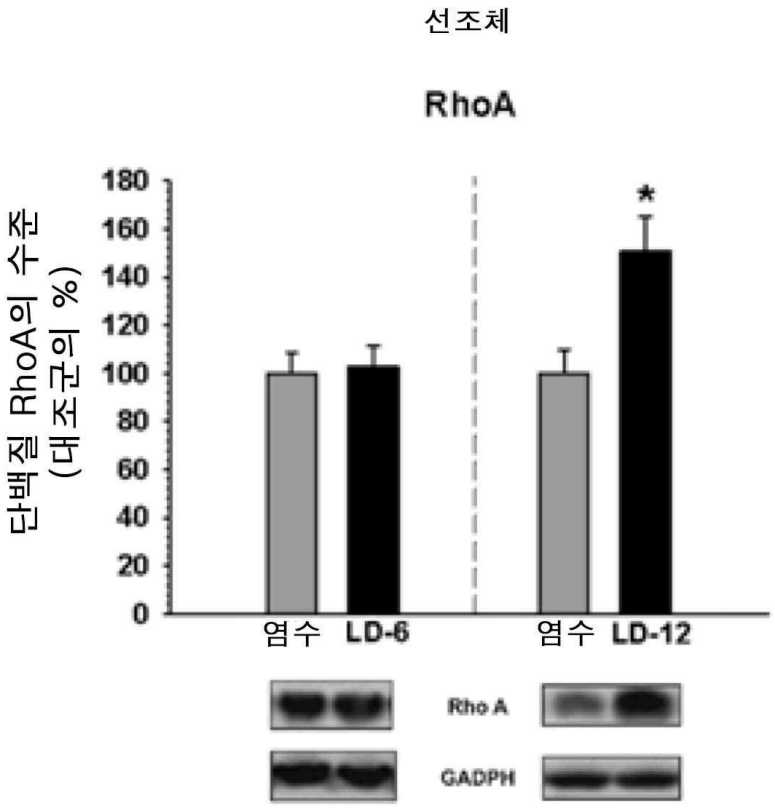
도면1b


Rho 키나제
단백질 Rho 키나제의 수준
(대조군의 %)
300
250
200
150
100
50
0
*
*
염수
LD-6
염수
LD-12
ROCK
GADPH

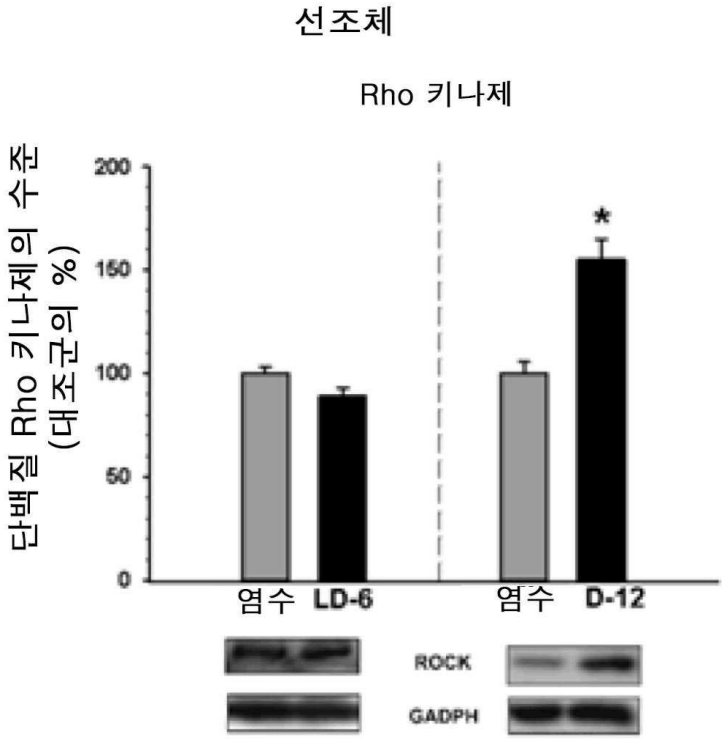
도면1c


흑질
Rho 키나제 활성
Rho 키나제 활성
(450nm 흡광도)
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
*
*
염수
LD-6
염수
LD-12

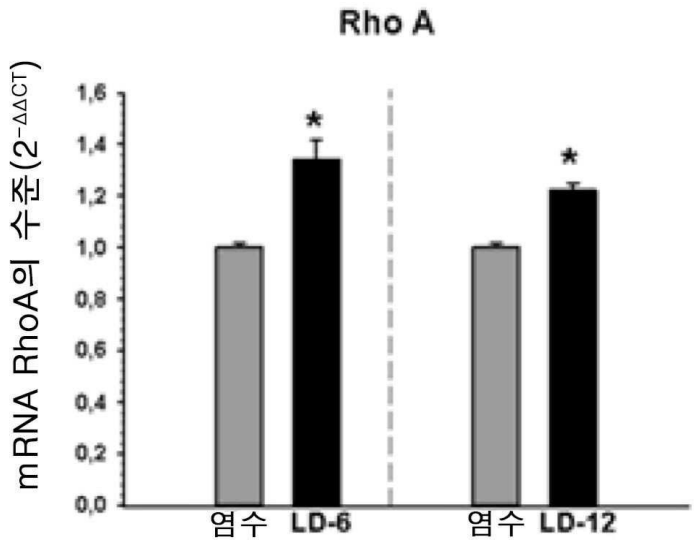
도면1d


선조체
RhoA
단백질 RhoA의 수준
(대조군의 %)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
*
염수
LD-6
염수
LD-12
Rho A
GADPH

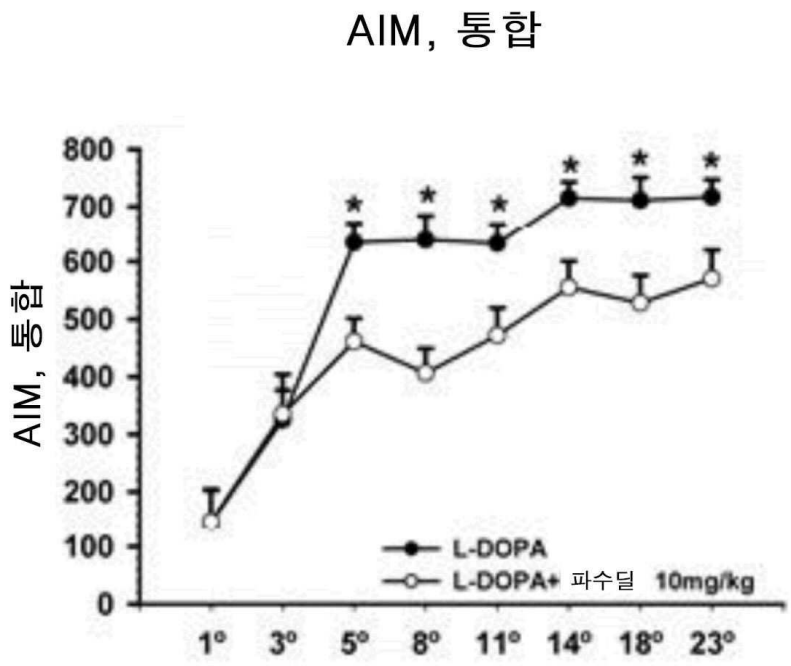
도면1e


선조체
Rho 키나제
단백질 Rho 키나제의 수준
(대조군의 %)
200
150
100
50
0
*
염수
LD-6
염수
D-12
ROCK
GADPH

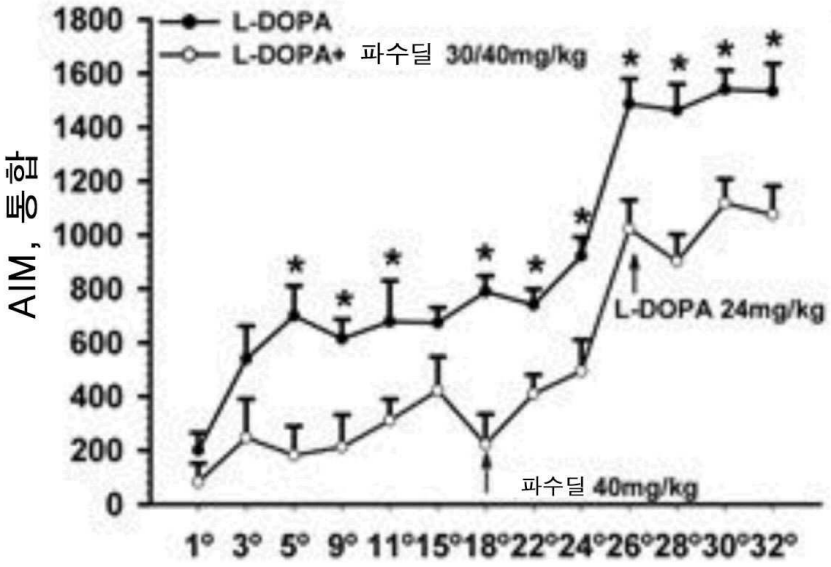
도면1f


Rho A
mRNA RhoA의 수준(2-ΔΔCT)
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
*
*
염수
LD-6
염수
LD-12

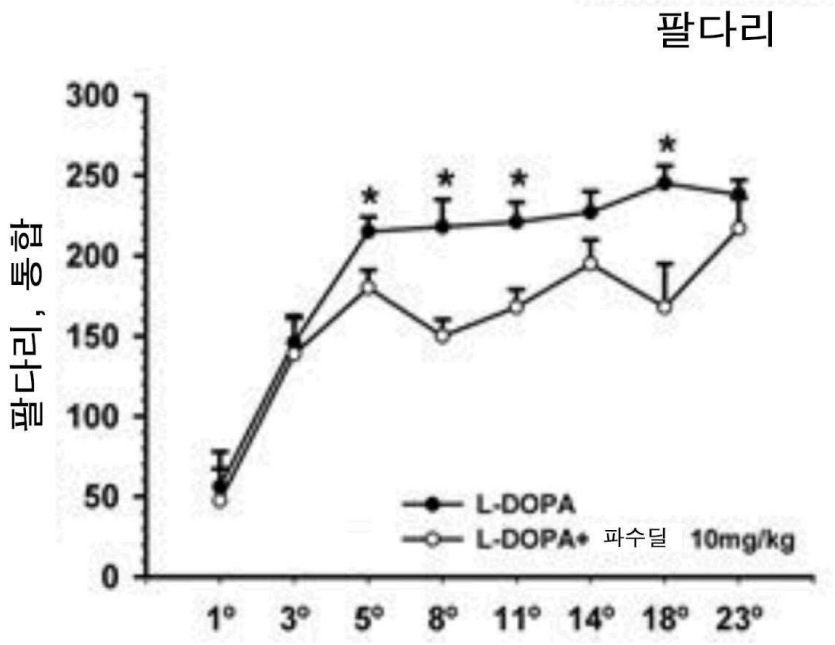
도면2a


AIM, 통합
AIM, 통합
800
700
600
500
400
300
200
100
0
L-DOPA
L-DOPA+ 파수딜 10mg/kg
1°
3°
5°
8°
11°
14°
18°
23°

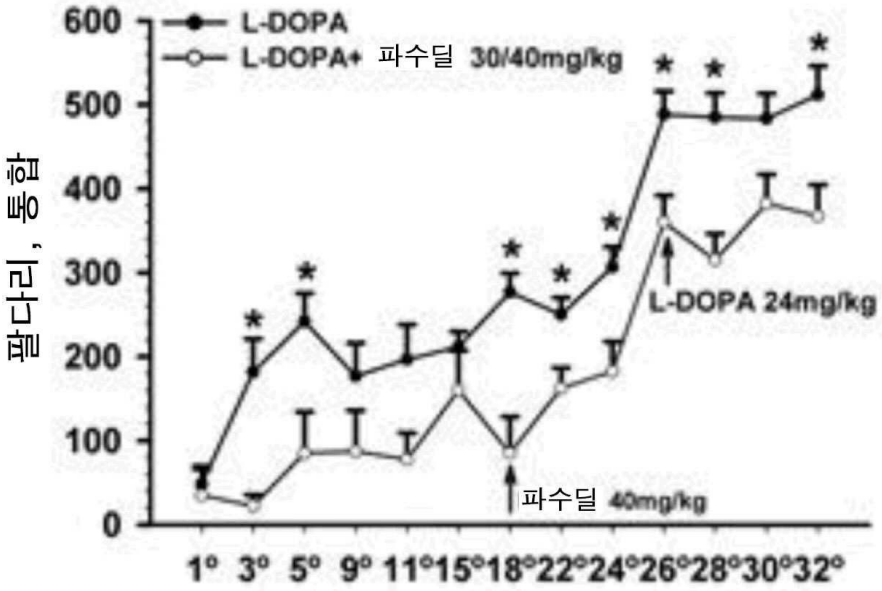
도면2b


AIM, 통합
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
L-DOPA
L-DOPA+ 파수딜 30/40mg/kg
L-DOPA 24mg/kg
파수딜 40mg/kg
1° 3° 5° 9° 11° 15° 18° 22° 24° 26° 28° 30° 32°

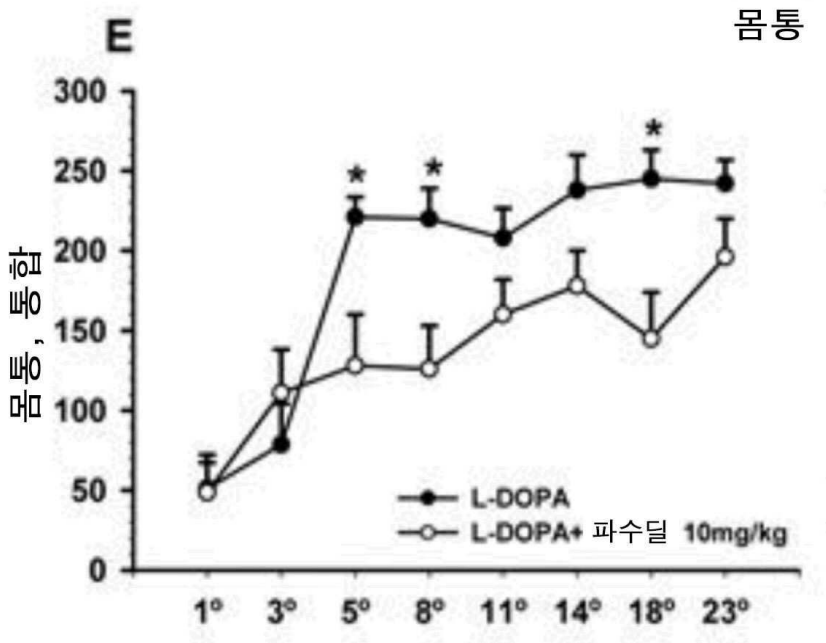
도면2c


팔다리
팔다리, 통합
300
250
200
150
100
50
0
L-DOPA
L-DOPA+ 파수딜 10mg/kg
1°
3°
5°
8°
11°
14°
18°
23°

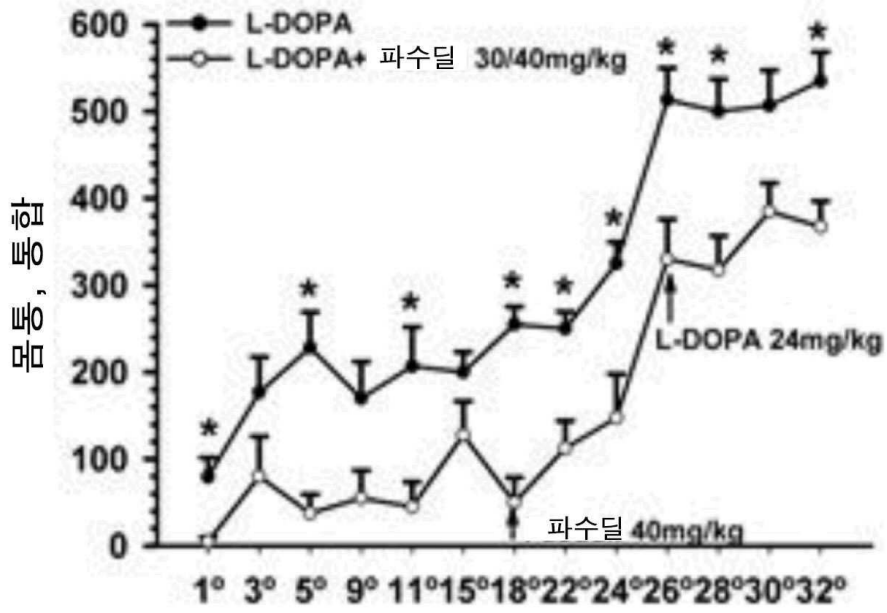
도면2d


팔다리, 통합
600
500
400
300
200
100
0
L-DOPA
L-DOPA+ 파수딜 30/40mg/kg
L-DOPA 24mg/kg
파수딜 40mg/kg
1° 3° 5° 9° 11° 15° 18° 22° 24° 26° 28° 30° 32°

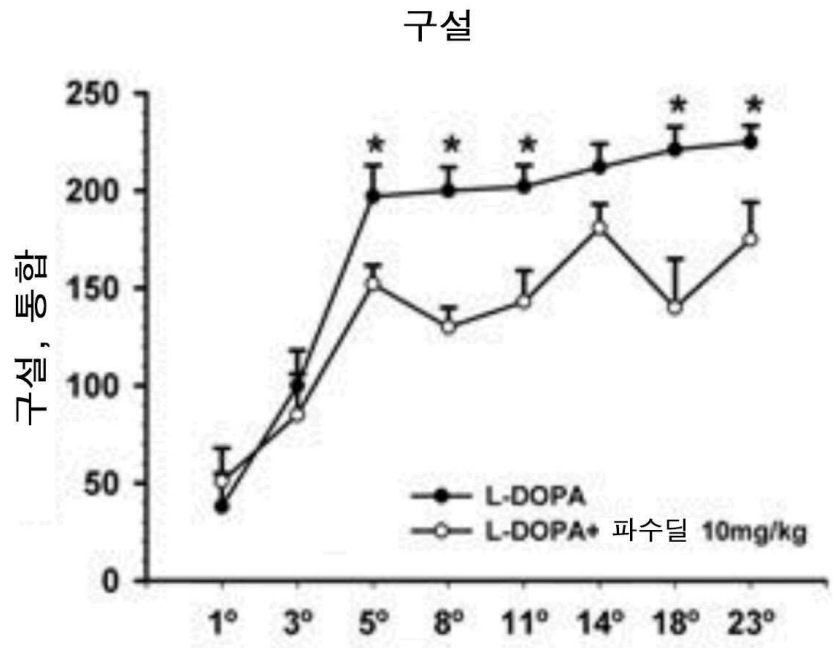
도면2e


E
몸통
몸통, 통합
300
250
200
150
100
50
0
L-DOPA
L-DOPA+ 파수딜 10mg/kg
1°
3°
5°
8°
11°
14°
18°
23°

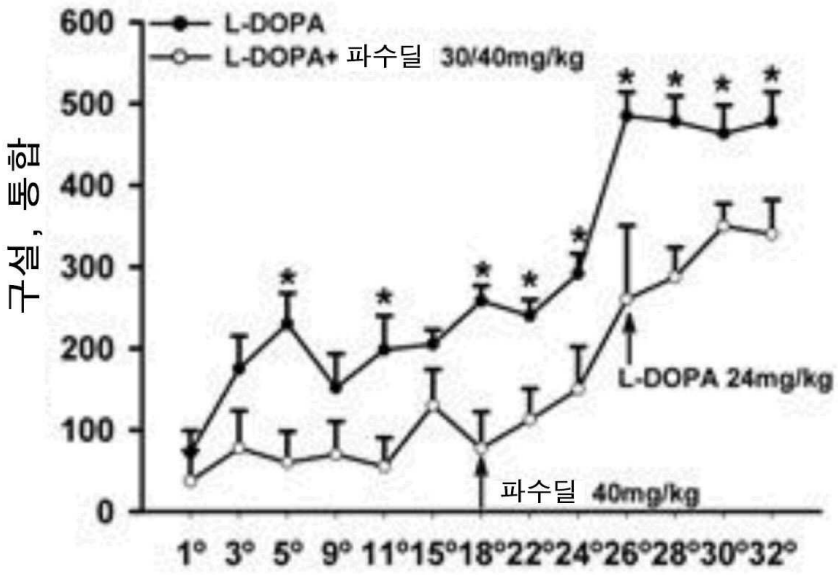
도면2f


몸통, 통합
600
500
400
300
200
100
0
L-DOPA
L-DOPA+ 파수딜 30/40mg/kg
L-DOPA 24mg/kg
파수딜 40mg/kg
1° 3° 5° 9° 11° 15° 18° 22° 24° 26° 28° 30° 32°

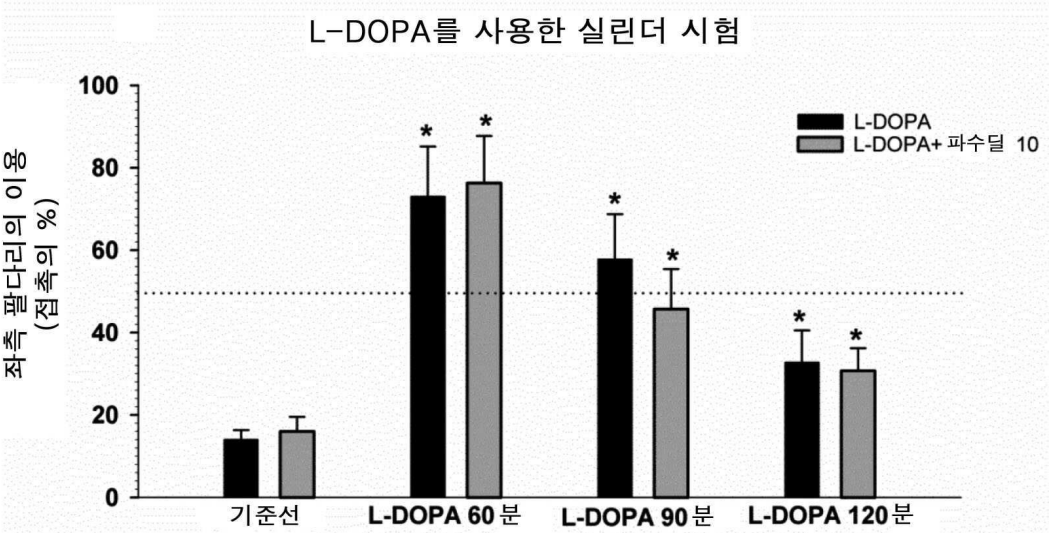
도면2g


구설
구설, 통합
250
200
150
100
50
0
L-DOPA
L-DOPA+ 파수딜 10mg/kg
1°
3°
5°
8°
11°
14°
18°
23°

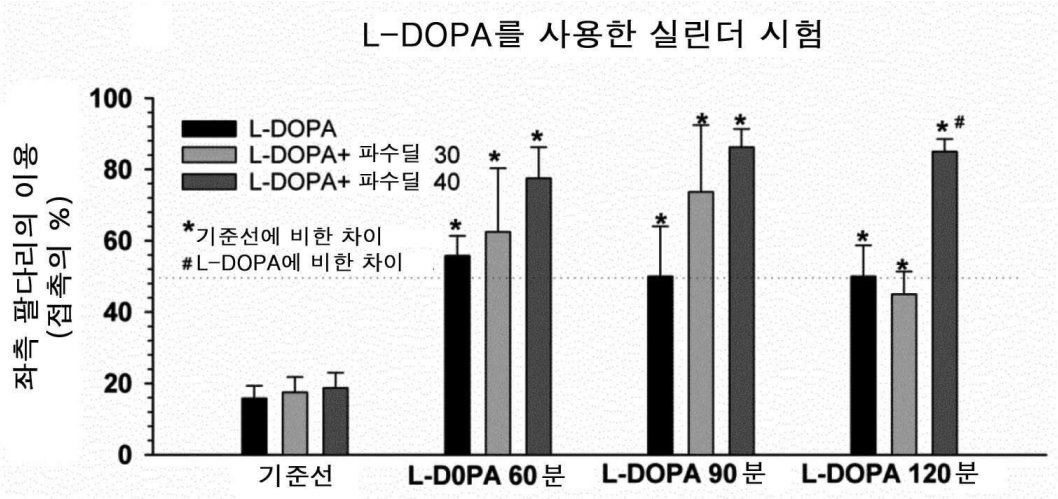
도면2h


구설, 통합
600
500
400
300
200
100
0
L-DOPA
L-DOPA+ 파수딜 30/40mg/kg
L-DOPA 24mg/kg
파수딜 40mg/kg
1° 3° 5° 9° 11°15°18°22°24°26°28°30°32°

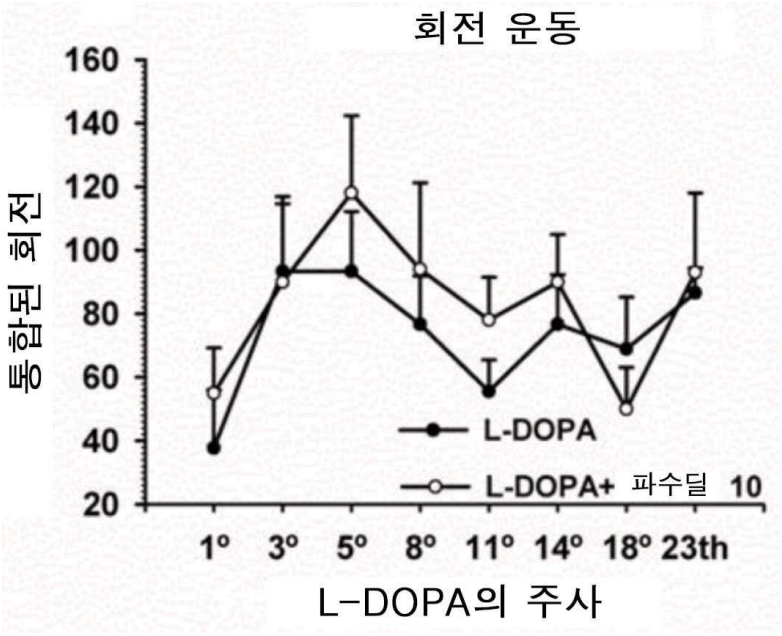
도면3a


L-DOPA를 사용한 실린더 시험
좌측 팔다리의 이용
(접촉의 %)
100
80
60
40
20
0
L-DOPA
L-DOPA+ 파수딜 10
*
기준선
L-DOPA 60 분
L-DOPA 90 분
L-DOPA 120 분

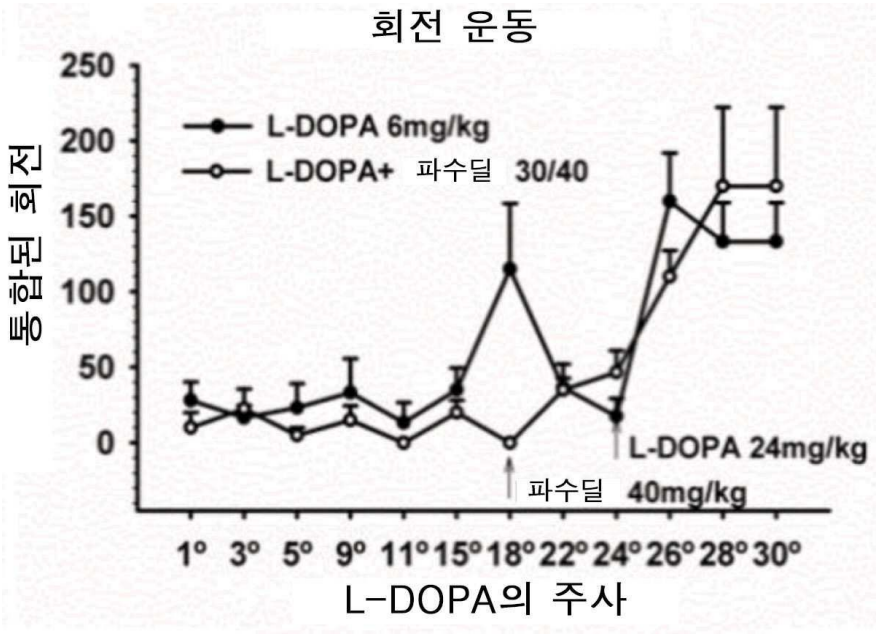
도면3b


L-DOPA를 사용한 실린더 시험
좌측 팔다리의 이용
(접촉의 %)
100
80
60
40
20
0
L-DOPA
L-DOPA+ 파수딜 30
L-DOPA+ 파수딜 40
*기준선에 비한 차이
#L-DOPA에 비한 차이
*
#
기준선
L-D0PA 60 분
L-DOPA 90 분
L-DOPA 120 분

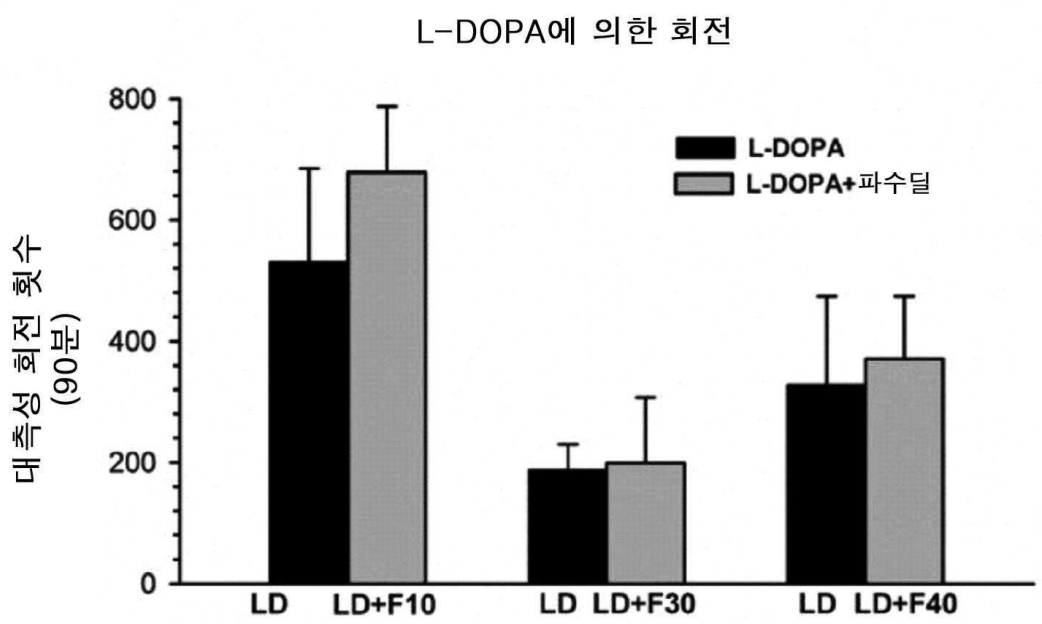
도면3c


회전 운동
통합된 회전
160
140
120
100
80
60
40
20
L-DOPA
L-DOPA+ 파수딜 10
1° 3° 5° 8° 11° 14° 18° 23th
L-DOPA의 주사

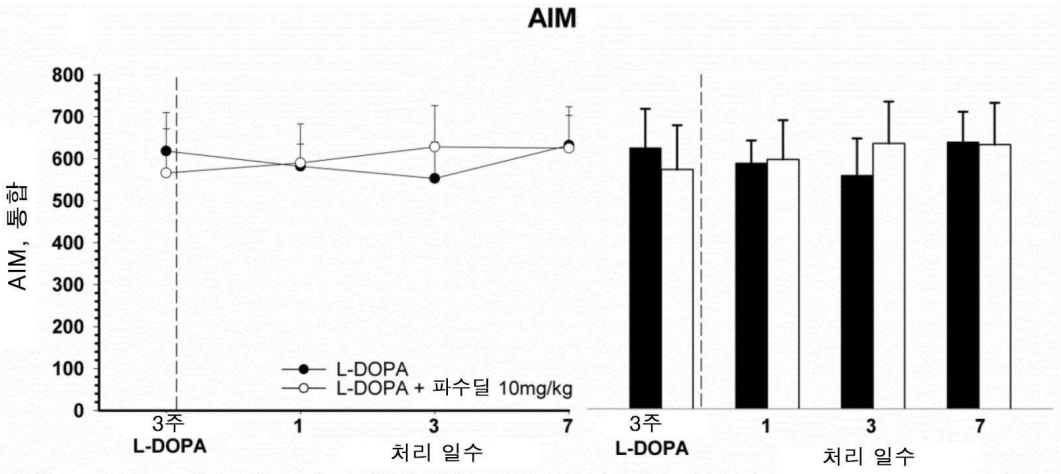
도면3d


회전 운동
통합된 회전
250
200
150
100
50
0
L-DOPA 6mg/kg
L-DOPA+ 파수딜 30/40
L-DOPA 24mg/kg
파수딜 40mg/kg
1° 3° 5° 9° 11° 15° 18° 22° 24° 26° 28° 30°
L-DOPA의 주사

도면3e



도면4a



도면4b

