



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0066432  
(43) 공개일자 2017년06월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 31/198 (2006.01) A61K 31/12 (2006.01)  
A61K 31/41 (2006.01) A61K 31/4515 (2006.01)  
A61K 31/519 (2006.01) A61K 31/5415 (2006.01)  
A61K 31/551 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
A61K 31/198 (2013.01)  
A61K 31/12 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7010114  
(22) 출원일자(국제) 2015년09월15일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2017년04월13일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/050255  
(87) 국제공개번호 WO 2016/044314  
국제공개일자 2016년03월24일  
(30) 우선권주장  
62/050,635 2014년09월15일 미국(US)
- (71) 출원인  
사운드 파마슈티칼스 인코퍼레이티드  
미국 워싱턴 98103 시애틀 스위트 120 스톤 웨이  
노쓰 4010  
(72) 발명자  
킬, 조나단  
미국 워싱턴 98103, 시애틀, 스위트 120, 스톤 웨이  
노쓰 4010, 사운드 파마슈티칼스 인코퍼레이티드 사내  
(74) 대리인  
김영철, 김 순 영

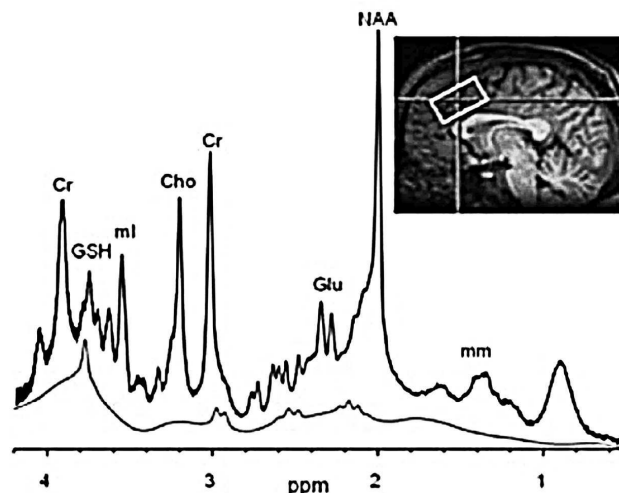
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 정신병적 장애를 치료하기 위한 방법 및 조성물

(57) 요약

본원은 글루타티온 퍼옥시다제 (GPx) 미믹 화합물 및 항정신병제를 포함하는 신규한 약물 조합, 하나 이상의 그러한 조합을 포함하는 약학 조성물, 하나 이상의 그러한 조합을 포함하는 약학 조성물을 제조하는 방법, 및 그러한 조합 또는 약학 조성물을 이용하여 GPx 매개 장애, 정신병적 장애, 또는 항정신병제의 고용량 또는 장기간 투여의 합병증과 관련된 질병을 치료, 예방, 억제 또는 개선하는 방법을 개시한다. 또한, 글루타티온 퍼옥시다제 미믹 화합물의 치료학적 유효량을 공동-투여하는 것을 포함하는 항정신병제의 투여량을 감소시키는 방법이 개시되어 있다.

대표도 - 도2a



(52) CPC특허분류

*A61K 31/41* (2013.01)

*A61K 31/4515* (2013.01)

*A61K 31/519* (2013.01)

*A61K 31/5415* (2013.01)

*A61K 31/551* (2013.01)

*A61K 45/06* (2013.01)

*A61K 2300/00* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

정신병적 장애를 치료하기 위해 투여된 항정신병제의 투여량을 감소시키는 방법으로서, 치료학적 유효량의 글루타티온 퍼옥시다제 조절제 화합물을 공동-투여하는 것을 포함하고, 상기 공동-투여된 글루타티온 퍼옥시다제 조절제 화합물의 존재 하의 항정신병제의 유효 투여량이 상기 글루타티온 퍼옥시다제 조절제 화합물의 부재 하의 항정신병제의 유효 투여량보다 낮은 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 글루타티온 퍼옥시다제 조절제 화합물은 엡셀렌, 2,2'-디셀레노-비스- $\beta$ -시클로텍스트린, 6A,6B-디셀레니닉 산-6A',6B'-셀레늄 가교된  $\beta$ -시클로텍스트린, 글루타티온, 글루타티온 프로드러그, 및 시스테인 프로드러그로 이루어지는 그룹에서 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항정신병제는 클로르프로마진 (토라진), 할로페리돌 (할돌), 페퍼나진, 플루페나진, 리스페리돈 (리스페달), 올란자핀 (자이프렉사), 쿠에티아핀 (쉴로켈), 지프라시돈 (지오돈), 아리피프라졸 (아빌리파이), 팔리페리돈 (인베가), 루라시돈 (라투다) 및 그들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 정신병적 장애는 GPx 매개 장애인 것인 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 정신병적 장애는 산화 스트레스 증가, 조현병, 양극성 장애, 우울증, 조증, 불안 장애, 관련 정신병적 장애, 지연성 운동장애, 관련 증상 또는 그들의 합병증을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 6

정신병적 장애를 치료하는 방법으로서, 치료상 유효량의 글루타티온 퍼옥시다제 조절제 화합물 및 항정신병제를 포함하는 약물 조합을 투여하는 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 글루타티온 퍼옥시다제 조절제 화합물은 엡셀렌, 2,2'-디셀레노-비스- $\beta$ -시클로텍스트린, 6A,6B-디셀레니닉 산-6A',6B'-셀레늄 가교된  $\beta$ -시클로텍스트린, 글루타티온, 글루타티온 프로드러그, 및 시스테인 프로드러그로 이루어진 그룹에서 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 8

제6항에 있어서, 상기 항정신병제는 클로르프로마진 (토라진), 할로페리돌 (할돌), 페퍼나진, 플루페나진, 리스페리돈 (리스페달), 올란자핀 (자이프렉사), 쿠에티아핀 (쉴로켈), 지프라시돈 (지오돈), 아리피프라졸 (아빌리파이), 팔리페리돈 (인베가), 루라시돈 (라투다) 및 그들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 9

제6항에 있어서, 상기 정신병적 장애는 GPx 매개 장애인 것인 방법.

#### 청구항 10

제6항에 있어서, 상기 정신병적 장애는 산화 스트레스 증가, 조현병, 양극성 장애, 우울증, 조증, 불안 장애, 관련 정신병적 장애, 지연성 운동장애, 관련 증상 또는 그들의 합병증을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 11

정신병적 장애를 치료하기 위해 항정신병제를 투여하는 부작용을 줄이는 방법으로서, 치료상 유효량의 글루타티온 퍼옥시다제 조절제 화합물을 공동-투여하는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 상기 글루타티온 퍼옥시다제 조절제 화합물은 엡셀렌, 2,2'-디셀레노-비스-β-시클로텍스트린, 6A,6B-디셀레니닉 산-6A',6B'-셀레늄 가교된 β-시클로텍스트린, 글루타티온, 글루타티온 프로드러그, 및 시스테인 프로드러그로 이루어진 그룹에서 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 13

제11항에 있어서, 상기 항정신병제는 클로르프로마진 (토라진), 할로페리돌 (할돌), 페퍼나진, 플루페나진, 리스페리돈 (리스페달), 올란자핀 (자이프렉사), 쿠에티아핀 (세로켈), 지프라시돈 (지오돈), 아리피프라졸 (아빌리파이), 팔리페리돈 (인베가), 루라시돈 (라투다) 및 그들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 14

제11항에 있어서, 상기 부작용은 지연성 운동장애인 것인 방법.

#### 청구항 15

치료제의 조합을 포함하는 약학 조성물로서, 상기 조합은:

(i) 글루타티온 퍼옥시다제 조절제 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및

(ii) 항정신병제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염

으로 이루어지는 것인 약학 조성물.

#### 청구항 16

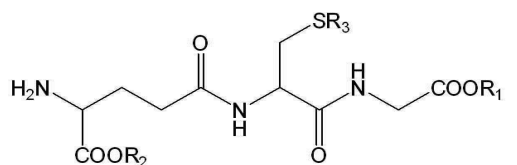
제15항에 있어서, 상기 글루타티온 퍼옥시다제 조절제 화합물은 엡셀렌, 2,2'-디셀레노-비스-β-시클로텍스트린, 6A,6B-디셀레니닉 산-6A',6B'-셀레늄 가교된 β-시클로텍스트린, 글루타티온, 글루타티온 프로드러그, 및 시스테인 프로드러그로 이루어진 그룹에서 선택되는 것인 약학 조성물.

#### 청구항 17

제15항에 있어서, 상기 항정신병제는 클로르프로마진 (토라진), 할로페리돌 (할돌), 페퍼나진, 플루페나진, 리스페리돈 (리스페달), 올란자핀 (자이프렉사), 쿠에티아핀 (세로켈), 지프라시돈 (지오돈), 아리피프라졸 (아빌리파이), 팔리페리돈 (인베가), 루라시돈 (라투다) 및 그들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택되는 것인 약학 조성물.

#### 청구항 18

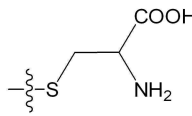
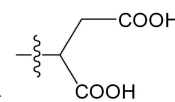
제16항에 있어서, 상기 글루타티온 프로드러그는 하기 화학식의 화합물을 포함하는 것인 약학 조성물:



상기 화학식에 있어서,

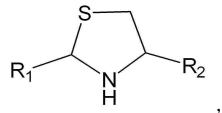
R<sub>1</sub> 은 H, 메틸, 에틸, 또는 이소프로필이고;

R<sub>2</sub> 은 H, 또는 에틸이며;

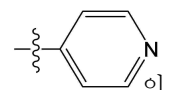
$R_3$  은 H, 아세틸, 페닐아세틸, , 또는  이다.

#### 청구항 19

제16항에 있어서, 상기 시스테인 프로드러그는 N-아세틸 시스테인, N,N'-디아세틸-시스테인, N-아세틸 시스테인 아마이드, N-아세틸 시스테인, S-알릴 시스테인, S-메틸 시스테인, S-에틸 시스테인, S-프로필 시스테인, 및 하기 화학식의 화합물로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 화합물을 포함하는 것인 약학 조성물:



상기 화학식에 있어서,

$R_1$  은 H, 옥소, 메틸, 에틸, n-프로필, n-펜틸, 페닐, , 또는  $-(CHOH)_nCH_2OH$  (상기 n은 1-5이다), 또는 고;

$R_2$  는 H 또는  $-COOH$ 이다.

#### 청구항 20

제16항에 있어서, 상기 시스테인 프로드러그는 2-치환된 티아졸리딘-4-카복시산을 포함하고, 상기 티아졸리딘-4-카복시산의 2-치환기는 알도스 단당인 것인 약학 조성물.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 상기 알도스 단당은 글리세르알데히드, 아라비노오스, 락소오스, 리보스, 자일로스, 갈락토스, 글루코스, 및 만노스로 이루어진 그룹에서 선택되는 것인 약학 조성물.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

##### [0001] <관련 출원에 대한 상호 참조>

[0002] 본 출원은 그 전체가 본원에 참조로서 통합되는 2014년 9월 15일에 출원된 미국 가출원 제62/050,635호를 우선 권으로서 주장한다.

##### [0003] <발명의 분야>

[0004] 본 발명은 GPx 매개 장애를 치료하는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 특히, 상기 조성물은 글루타티온 퍼옥시다제 조절제 및 항정신병제의 조합을 포함한다.

#### 배경 기술

##### [0005] <관련 기술의 설명>

[0006] 수십년동안, 도파민은 조현병 (SZ)의 생리학적 견해와 치료법의 핵심이었고, 이어서 GABA 및 글루타메이트 신경 전달 이론이 뒤따랐다. 최근, SZ 의 병태 생리학은 산화 스트레스와 밀접하게 관련되어 있다(Do 등, 2009; Kano 등, 2013). 중추신경계의 뉴런과 같은 활성 세포에서, 천연 항산화 방어제는 글루타티온에 의한 자유 라디칼의 격리를 포함하며, 이는 글루타티온이 단량체 글루타티온 (GSH)과 같이 그의 환원된 형태로의 전환하고, 글루타티온 퍼옥시다제 (GPx)가 글루타티온 디설피드 (GSSG)와 같이 그의 산화된 형태로 전환되는 것이다. 산화환원 메커니즘의 GPx 및  $GSH \rightarrow GPx \rightarrow GSSG$  방향의 주요 기능은, 하이드로젠 퍼옥사이드 ( $H_2O_2$ ), 퍼옥시니트라이트 ( $ONOO^-$ ), 및 지질 하이드로퍼옥사이드 (LOOH)와 같은 산화 환원 불활성 화합물에 대한 자유 라디칼을 감소시키

는 것이고, 세포막, 단백질 및 다른 구조물을 산화적 손상으로부터 보호하는 것이다.

[0007] GPx 매개 변화를 포함하여, 항산화 시스템의 많은 기질 및 효소가 SZ 에서 조사되었다. 연구 결과는 보상 메커니즘이 여전히 산화 스트레스에 대처할 수 있을 때, 정신병의 초기 발작 동안 GPx의 변화를 보여주었다. 직접적으로 GPx 산화 환원 메커니즘을 표적으로 하는 약은 존재하지 않지만, 전반적으로, GPx 활성화와 SZ 사이에 강한 상관 관계가 존재하는 것으로 나타났다.

[0008] 본 발명은 하기 기술된 바와 같이, 종래 기술의 이러한 단점들을 다룬다.

## 발명의 내용

[0009] <개요>

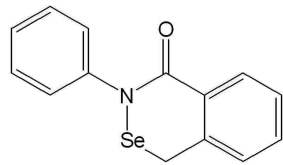
[0010] 다수의 구체예에서, 본 개시 내용은 예를 들어, 글루타티온 퍼옥시다제 (GPx) 조절제와 같은 신규한 유용한 화합물의 조합, 상기 조합의 제조 방법, 상기 조합 중 하나 또는 그 이상을 포함하는 약학 조성물, 상기 조합 중 하나 또는 그 이상을 포함하는 약학 조성물의 제조 방법, 및 상기 조합 또는 약학 조성물을 이용하여 하나 이상의 GPx 매개 장애와 관련된 질병의 치료, 예방, 억제 또는 개선 방법을 제공한다.

[0011] 신규한 조합의 일부 구체예는 최소한 두개의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하고, 제1 화합물은 글루타티온 퍼옥시다제 미믹 화합물이고, 제2 화합물은 항정신병제이다.

[0012] 일부 구체예에서, 상기 글루타티온 퍼옥시다제 조절제 화합물은 글루타티온 퍼옥시다제 미믹 화합물, 글루타티온 (GSH), 글루타티온 프로드러그, 및 시스테인 프로드러그로 이루어진 그룹에서 선택된다.

[0013] 일부 구체예에서, 상기 정신병제 클로르프로마진 (토라진), 할로페리돌 (할돌), 페퍼나진, 플루페나진, 리스페리돈 (리스`페달), 올란자핀 (자이프렉사), 쿠에티아핀 (세로켈), 지프라시돈 (지오돈), 아리피프라졸 (아빌리파이), 팔리페리돈 (인베가), 루라시돈 (라투다) 및 그들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택된다.

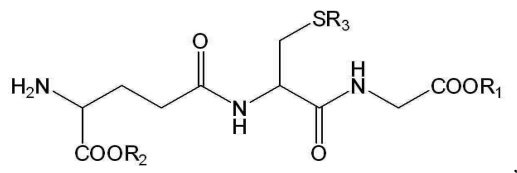
[0014] 일부 구체예에서, 글루티온 퍼옥시다제 미믹 화합물의 대표 화합물은 실험식  $C_{13}H_9NOSe$ , 분자량 274.2 및 하기 화학식을 가지는 엠셀렌, (2-페닐-1,2-벤즈이소셀레나졸-3(2H)-온)을 포함한다:



[0015]

[0016] 일부 구체예에서, 글루티온 퍼옥시다제 미믹은 2,2' -디셀레노-비스-β-시클로텍스트린 및 6A,6B-디셀레니닉 산 -6A' ,6B' -셀레늄 가교된 β-시클로텍스트린을 포함한다.

[0017] 일부 구체예에서, 대표적인 글루타티온 프로드러그는 하기 화학식의 화합물을 포함한다:

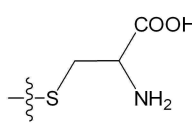
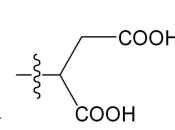


[0018]

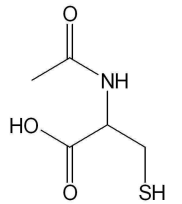
[0019] 상기 화학식에 있어서,

[0020]  $R_1$  은 H, 메틸, 에틸, 또는 이소프로필이고;

[0021]  $R_2$  은 H, 또는 에틸이며;

[0022]  $R_3$  은 H, 아세틸, 페닐아세틸, , 또는  이다.

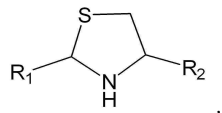
[0023] 일부 구체예에서, 대표적인 시스테인 프로드러그는 하기 화학식을 가지는 N-아세틸 시스테인 (NAC)을 포함한다:



[0024]

[0025]

시스테인 프로드러그의 일부 구체예는 N,N'-디아세틸-시스테인, N-아세틸 시스테인 아마이드, NAC 에스테르 (알킬 에스테르, 글리콜아미드 에스테르 및 아시클록시메틸 에스테르), S-알릴 시스테인, S-메틸 시스테인, S-에틸 시스테인, S-프로필 시스테인, 또는 하기 화학식의 화합물을 포함한다:



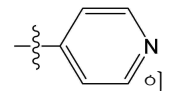
[0026]

[0027]

상기 화학식에 있어서,

[0028]

R<sub>1</sub> 은 H, 옥소, 메틸, 에틸, n-프로필, n-펜틸, 페닐, -(CHOH)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>OH(상기 n은 1-5이다), 또는



고;

[0029]

R<sub>2</sub> 는 H 또는 -COOH이다.

[0030]

시스테인 프로드러그의 일부 구체예는 글리세르알데히드, 아라비노오스, 릭소오스, 리보스, 자일로스, 갈락토스, 글루코스, 및 만노스와 같은 알도스 당을 포함하는 2-치환된 티아졸리딘-4-카복시산을 포함한다.

[0031]

본 발명의 또다른 측면은, 신규한 조합 및 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 특징으로 한다.

[0032]

본 발명의 또다른 측면은 GPx 활성화에 의해 매개되는 질환, 장애 또는 상태로 고통받거나 진단받은 대상을 치료하는 방법을 특징으로 하며, 이 방법은 대상에 신규한 조합을 치료학적 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 상기 질환, 장애 또는 상태는 산화 스트레스 증가, 조현병, 양극성 장애, 우울증, 조증, 불안 장애 또는 관련 정신병적 장애, 지연성 운동장애, 및 관련 증상 또는 그들의 합병증을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 신규한 조합에 포함된 각 화합물의 치료학적 유효량은 각각, 약 0.1 mg/일 내지 약 5000 mg/일일 수 있다.

[0033]

본 발명의 또다른 측면은 글루티온 퍼옥시다제 조절제 화합물을 항정신병제와 함께 공동-투여하여 항정신병제 투여의 부작용을 줄이는 방법을 특징으로 한다. 특히, 엡셀렌을 항정신병제와 공동-투여함으로써 항정신병제 투여의 부작용을 감소시킨다. 더욱 구체적으로, 엡셀렌을 공동-투여하여 클로르프로마진 (토라진), 할로페리돌 (할돌), 페퍼나진, 플루페나진, 리스페리돈 (리스페달), 올란자핀 (자이프렉사), 쿠에티아핀 (세로켈), 지프라시돈 (지오돈), 아리피프라졸 (아빌리파이), 팔리페리돈 (인베가), 루라시돈 (라투다) 또는 그들의 조합 투여의 부작용을 감소시킨다. 일부 구체예에서, 항정신병제 투여의 부작용은 지연성 운동장애, 및 환자에게 고용량 또는 장기간에 걸쳐 항정신병제를 투여하는 다른 합병증을 포함한다.

[0034]

본 발명은 또한 임의의 신규한 조합의 화합물과 약학적으로 허용 가능한 담체를 혼합하는 것을 포함하는 약학 조성물의 제조 방법을 특징으로 한다.

[0035]

추가 구체예 및 그 이점은 이하의 상세한 설명, 방식, 실시예 및 청구 범위에 드러날 것이다.

## 도면의 간단한 설명

[0036]

### <도면의 다양한 부분에 대한 간단한 설명>

다음의 설명 및 첨부된 도면과 관련하여, 본 발명의 이들 및 다른 특징, 측면, 및 장점은 더 잘 이해될 것이다:

다음의 설명 및 첨부된 도면과 관련하여, 본 발명의 이들 및 다른 특징, 측면, 및 장점은 더 잘 이해될 것이다:

도 1A 및 1B는 일 구체예에 따라, (A) 감소된 혈액 GSH 및 (B) NC (검정 막대)와 비교하여, SZ (회색 막대)에서

의 상승된 GSSG를 나타낸다(Ballesteros 등, 2013a).

도 2A 및 2B는 일 구체예에 따라, (A) ACC에서의 MRS GSH 스펙트라 (회색) 및 (B) GSH 측정에서의 정확도를 나타낸다.

도 3A-3C는 일 구체예에 따라, (A) 정상 대조군 (NC) ( $n = 25$ ) ( $* p = 0.015$ )과 비교하여 조현병 (SZ) ( $n = 29$ )에서 감소된 미스매치된 음성도 (MMN) 진폭, (B) NC에서 MMN과 GSH 사이의 유의한 상관 관계 ( $r = -0.46$ ,  $p = 0.03$ )를 나타내고, 및 (C) SZ ( $r = 0.04$ ,  $p = 0.85$ )에서는 그러한 관계가 관찰되지 않음을 나타낸다 (Ballesteros 등 2013a).

도 4는 일 구체예에 따라, 신경 진동자 반응이 GSH와 GSSG 사이의 조절제 및 커뮤니티 기능 측정치인 UPSA-2 (캘리포니아 성능-기반 기술 평가 타입 2)인 다변수 조정 모델을 나타낸다. 회색 실선은 UPSA-2에 대한 GSH 및 GSSG의 직접적이고 중대한 영향을 나타낸다. 회색 점선은 21-40 Hz 진동 반응이 GSH를 기능적 결과 (UPSA-2)에 연결시키는 중요한 중간 바이오마커였음을 의미하는 중대한 간접적인 효과를 나타낸다.

도 5A-5D는 일 구체예에 따라, 엽셀렌의 항산화 작용의 제안된 메커니즘을 나타낸다(Kil 등, 2007; 및 Antony 등, 2011에서 채택됨). (A) 활성 산소 (ROS, 예,  $H_2O_2$ )은 GSH 및 GPx에 의하여 감소된다; 엽셀렌은 GPx 미믹으로 행동하여 이러한 과정을 보조한다. (B) 반응성 질소 종(RNS, 예, 퍼옥시니트라이트  $ONOO^-$ )는 동일한 GSH 시스템에 의하여 감소된다. (C) 지질 하이드로퍼옥사이드 (LOOHs)는 GPx에 의한 산화 환원-비활성 알콜 (LOHs)을 형성하기 위해 2-전자 환원을 거치며, 이러한 지질 퍼옥시데이션 환원에서의 엽셀렌의 효과와 함께, 핵심 막/미엘린 세포보호/회복 메커니즘이 잘 뒷받침된다. (D) 엽셀렌은 다른 핵심 산화 방어인 테오레독신 (Trx) 시스템을 위한 기질이고, 엽셀렌은 Trx 및 토레독신 환원효소 (TrxR)에 의하여 엽셀렌 셀레놀 (Ebs-H)로 환원된다; Ebs-H는 효과적인  $H_2O_2$  환원효소로 작용한다.

도 6A 및 6B는 일 구체예에 따라, 기초 뉴런의 GSH 레벨 증가에 대한 엽셀렌의 효과를 도시한다. (A) 엽셀렌 치료는 스트레스를 받는 상태의 GSH와 유사하게, 기초 뉴런의 GSH 레벨을 증가시켰다. (B) 글루타메이트-유도된 GSH 결핍 및 글루타메이트 신경독성에 대항하는 엽셀렌의 신경보호 효과는 세포질 GSH 레벨 (삼각형), 엽셀렌의 기초 GSH 레벨 (사각형) 증가, 및 엽셀렌 및 글루타메이트(다이아몬드)를 감소시켰다.

도 7A-7C 일 구체예에 따라, PFC에서의 PV 개재뉴런 표시의 청년기 증가를 차단하는 NVHL를 도시한다. (A) 유아기(juvenile) (P21) 및 성인 (P61) 삼 (위약), NVHL, 및 NAC-처리된 NVHL 래트의 PV 염색한 전전부엽의 대표적인 현미경 사진이다. 스케일 막대는  $80 \mu m$ 이다. (B) 막대그래프는 모든 네가지 치료 그룹에서, P21 (왼쪽) 및 P61 (오른쪽)에서의 불변 입체학을 사용하여, PV 세포 수를 도시한다. PV 세포 수는 삼에서 P21 및 P61사이에서는 증가하였으나, NVHL 래트에서는 증가하지 않았다. 유아기(juvenile)의 NAC 치료는 NVHL 래트의 PV 세포 수의 진행을 구조했다. 분산분석  $F_{(5,36)} = 4.7$ ,  $p = 0.002$ . 연령:  $F_{(1,36)} = 10.2$ ,  $p = 0.003$ , 병변:  $F_{(1,36)} = 1.36$ ,  $p = 0.11$ , 병변 x 연령:  $F_{(1,36)} = 6.7$ ,  $p = 0.014$ , 치료:  $F_{(1,36)} = 3.9$ ,  $p = 0.057$ , 치료 x 연령: n.s. (C) 다이어그램은 NAC 치료 및 유아기(juvenile) (P21) 및 성인 (P61) 평가의 시간 경과를 도시한다. 이러한 도면 및 다른 도면에서, 데이터는 평균  $\pm$  SEM,  $*p < 0.05$ 로 표현된다.

도 8A-8D는 일 구체예에 따라 NVHL 래트의 PFC에서 8-옥소-dG에 의한 산화 스트레스를 도시한다. (A) P21의 4개 그룹의 PFC에서 PV (적색)와 8-옥소-dG (녹색)의 이중 표지를 나타내는 대표적인 현미경 사진. 스케일 막대는  $10 \mu m$ 이다. (B) NVHL가 유아기(juvenile) NAC 치료로 예방할 수 있는 P21의 PFC에서 8-옥소-dG 표지를 엄청난 증가시키는 것을 보여주는 데이터의 요약. 상단 그래프는 8-옥소-dG 형광 강도를 나타내고, 하단 그래프는 각 그룹의 표지된 복셀 수를 정량화한다. 8-옥소-dG 강도의 분산분석:  $F_{(3,14)} = 13.7$ ,  $p = 0.00002$ , 병변  $F_{(1,14)} = 18.4$ ,  $p = 0.008$ , 치료  $F_{(1,14)} = 9.6$ ,  $p = 0.008$ , 병변 x 치료  $F_{(1,14)} = 13.0$ ,  $p = 0.003$ . (C) P61의 PFC에서 PV (적색) 및 8-옥소-dG (녹색)의 이중 표지를 나타내는 대표적인 현미경 사진. 스케일 막대는  $10 \mu m$ 이다. (D) NVHL가 유아기(juvenile) NAC 치료로 예방할 수 있는 P61의 PFC에서 8-옥소-dG를 증가시키는 것을 보여주는 데이터 요약. 8-옥소-dG 강도의 분산분석:  $F_{(3,18)} = 7.8$ ,  $p = 0.001$ , 병변  $F_{(1,18)} = 12.5$ ,  $p = 0.002$ , 치료  $F_{(1,18)} = 0.13$ ,  $p = n.s.$ , 병변 x 치료  $F_{(1,18)} = 10.8$ ,  $p = 0.004$ .

도 9A 및 9B는 일 구체예에 따라, 3-NT를 갖는 성인 NVHL 래트의 PFC에서의 산화 스트레스를 나타낸다. (A) 세 그룹에서 3-NT (녹색), WFA (파란색) 및 PV (적색)의 삼중 표지를 보여주는 대표적인 현미경 사진. 스케일 막대는  $100 \mu m$ 이다. (B) NVHL가 유아기(juvenile) NAC 치료로 예방할 수 있는 P61의 PFC에서 1-NT 표지를 뚜렷하게

증가시키는 것을 보여주는 데이터 요약. 그래프는 각 그룹의 3-NT 형광 강도를 도시한다. 3-NT 강도의 일-원 분산분석은 치료의 뚜렷한 효과를 나타냈다 ( $F_{(2,53)} = 85.2, p < 0.0001$ ). 터키-크레이머를 이용한 각 쌍의 비교 또한 삼 대 NVHL 및 NVHL 대 NAC의 뚜렷한 차이를 나타냈다( $p < 0.0001$ ).

도 10A-10C는 일 구체에에 따라 NVHL 병변을 나타낸다. (A) 해마 수준의 삼 (왼쪽), 치료되지 않은 NVHL (중간), 및 NAC-치료된 NVHL (오른쪽) 뇌의 대표적인 슬라이스의 현미경 사진. 화살표는 복부 해마에서의 세포 손실을 나타내고, 별은 확장된 뇌실을 나타낸다. (B) 만화는 복부 해마 전체를 거쳐 다른 전후(rostr-caudal)에서의 치료되지 않은 NVHL 래트 (물)의 병변의 최소 (흑색) 및 최대 범위를 나타낸다. (C) NAC-치료한 NVHL 래트에서 병변의 정도를 보여주는 유사한 만화.

도 11A 및 11B는 일 구체에에 따라, NVHL가 PV에서 산화 스트레스를 증가시킬 수 있지만, CR 및 CB 뉴론은 유발하지 않을 수 있음을 예시하며, 이는 발달 NAC 치료에 의해 예방된다. (A) 삼, NVHL 및 NAC- 치료된 NVHL 래트의 PFC에서 파브알부민 (PV)-, 칼레티닌 (CR)- 및 칼빈딘 (CB)-양성 중간뉴런 (적색)의 8-옥소-dG 표지 (녹색)을 보여주는 현미경 사진. 스케일 막대는 10  $\mu\text{m}$ 이다. (B) 데이터 요약. PV 중간뉴런에서, NAC 치료로 예방된 NVHL 병변에 따라, 8-옥소-dG 표지가 증가했다. (치료:  $F_{(2,65)} = 212.97, p < 0.0001$ ). \*\*\* $p < 0.001$ .

도 12A 및 12B는 일 구체에에 따라, 성인 NVHL 래트의 PFC에서 신경원주위연결망 (PNN)이 감소될 수 있지만, 유아기(juvenile) NAC 치료에 의해 구제될 수 있음을 나타낸다. (A) PNN에 붙인 PV (적색) 및 *Wisteria floribunda agglutinin* (WFA; 녹색)의 이중 표지를 나타내는 대표적인 현미경 사진. 스케일 막대는 10  $\mu\text{m}$ 이다. (B) PV 개재뉴런 (PVI) 카운트 (상단) 및 PV 및 WFA (하단)와 공동-라벨이 붙은 세포의 수를 나타내는 플롯. NVHL 병변에 따라 PVI 카운트가 감소하고, 유아기(juvenile) NAC 치료로 이러한 감소가 예방된다. (총 효과:  $F_{(8,16)} = 3.8, p = 0.01$ , PVI 카운트:  $F_{(2,11)} = 15.3, p < 0.0007$ ). NVHL 래트의 WFA PVI의 수는 대조군에 비해 감소하고, 이러한 감소는 유아기(juvenile) NAC 치료에 의해 예방될 수 있다(PNN 카운트:  $F_{(2,11)} = 28.5, p < 0.0001$ ). \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

도 13A-13E는 일 구체에에 따라, NVHL 래트에서 N-아세틸 시스테인 (NAC) 치료로 구제될 수 있는 전기생리학적 결함을 도시하였다. (A) D2-작용물질 퀴인피롤 (5 마이크로몰농도)의 목욕 적용 전 (검정 추적) 및 후 (green trace) 성인 PFC에서 표면층의 전기 자극에 의해 유발된 흥분성 시냅스후 전위 (EPSP)의 대표적인 추적. (B) PFC의 뉴로바이오틴(Neurobiotin)-충전된 층 V 피라미드형 세포; 양극 자극 전극 및 기록 전극의 상대 위치가 개략적으로 도시되어 있다. (C) 삼, NVHL, 및 NAC- 치료된 NVHL 래트의 조각에서 퀴인피롤에 의한 EPSP 감쇠의 크기를 보여주는 막대 그래프. 삼 래트에서, 퀴인피롤은 시냅스 반응의 크기를 감소시키지만, 반면 NVHL 래트에서는 이러한 감쇠는 없다. 발달 중 NAC 치료는 NVHL 동물에서 이러한 결핍을 역전시킨다 (분산분석:  $F_{(2,39)} = 3.328, p = 0.046$ ). (D) 마취된 삼 (상단), NVHL (중간), 및 NAC-치료된 NVHL (하단) 래트에서 20 Hz 에서 5개의 자극(pulse)의 열을 가진 복측 피개 영역(VTA)의 전기 자극에 대한 반응을 나타내는 PFC 피라미드형 뉴런에서의 *in vivo* 세포내 기록으로부터의 추적. 각 패널은 각 그룹에서 관찰된 반응의 대표적인 타입을 나타내는 5개 추적의 오버레이이며, NVHL VTA 자극 후 향상된 활성을 나타내지만, 상기 활성은 삼 및 NAC-치료된 NVHL 래트에서는 드물다. (E) 3 그룹 모두에서 VTA 자극 후 500 ms 에폭스에서 활동 전위 활성에 대한 그룹 데이터를 나타내는 막대 그래프. 분산분석:  $F_{(2,37)} = 4.5, p < 0.05$ ; NVHL 활성은 삼 (포스트-혹 터키의  $q = 3.9, p < 0.05$ )보다 높았고 NAC-치료된 NVHL 래트 (포스트-혹 터키의  $q = 3.6, p < 0.05$ )보다 높았다. 모든 전기생리학 실험 데이터에서 삼 및 NAC-치료된 삼 래트의 데이터는 차이를 나타내지 않았으므로, 결합되었다.

도 14A 및 14B는 일 구체에에 따라, 부정합 음성도 (MMN) 결핍이 NAC 치료에 의하여 구제될 수 있음을 보여준다. (A) 삼 ( $n = 6$ ; 상단), NVHL ( $n = 3$ ), 및 NAC-치료된 NVHL 래트 ( $n = 3$ ; 하단)에서의 표준 (청색) 및 비정상 (적색) 자극으로부터 청각 유발 전위의 대표적인 추적. 녹색 상자는 음성도가 측정된 시기 (자극 후 35-100 ms)를 강조 표시한다. 모든 추적은 적어도 80 반복의 평균이다. (B) 강조 표시된 영역에서 곡선 아래 면적으로 측정한 MMN을 비교한 그룹 데이터는 그룹 간에 뚜렷한 차이가 있음을 나타낸다. (분산분석:  $F_{(2,11)} = 9.742; p = 0.006$ ). 그림에 표시된 데이터는 각 래트의 3가지 다른 세션의 평균이다. NVHL 및 NVHL+NAC 사이의 포스트-혹 비교는 뚜렷한 차이를 나타냈다. (본페로니 테스트;  $p = 0.005$ ).

도 15A-15D는 일 구체에에 따라, 선행자극 억제(Prepulse inhibition) 결핍이 항산화제 치료로 구제될 수 있음을 나타낸다. (A) 선행자극 억제(Prepulse inhibition) 결핍은 아포모르핀을 투여하였을 때 (0.1 mg/kg, i.p.) NVHL 래트에서 관찰되었다. 이러한 결핍은 유아기(juvenile) NAC 치료로 완전히 역전되었다. (병변:  $F_{(1,42)} =$

3.529  $p = 0.067$ , 치료:  $F_{(1,42)} = 1.644$ ,  $p = 0.207$ , 병변 x 치료:  $F_{(1,42)} = 5.730$ ,  $p = 0.021$ ).  $n = 12-16$ , NVHL에 비교하여 \*  $p < 0.05$ . (B) 래트의 또다른 그룹에서, NAC를 P35에서 시작하여 P50까지 투여하고, 상기 래트들은 P61에서의 PPI를 시험하였다. 막대 그래프는 청소년기(adolescent) NAC 치료를 받은 그룹의 세개의 다른 선행자극 강도에서의 PPI를 나타낸다. 분산분석: 그룹 효과  $F_{(2,28)} = 3.364$ ,  $p < 0.045$ ; 포스트-훅 테스트는 삼(LSD,  $p = 0.069$ )에 비해 NVHL에서 PPI의 차이에 대한 추세와 NVHL 및 NAC-치료된 NVHL (LSD,  $p = 0.016$ )간에 뚜렷한 차이를 나타냈다. (C) 어떤 동물들은 P35로부터 엡셀렌을 받았고, P61에서 PPI를 검사받았다. 치료 상호작용에 의한 뚜렷한 병변 효과 ( $F_{(1,28)} = 7.11$ ;  $p = 0.013$ ) 및 뚜렷한 병변 상태가 있었다( $F_{(1,28)} = 7.09$ ;  $p = 0.013$ ). (D) 또다른 세트의 동물들은 아포시닌을 받고, PPI를 검사받았다. 우리는 치료 상호작용에 의한 뚜렷한 병변을 관찰하였다( $F_{(1,25)} = 4.8$ ;  $p = 0.038$ ).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### <상세한 설명>

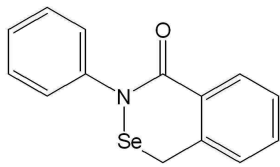
본 발명의 구체예들은 제1 화합물은 글루타티온 퍼옥시다제 조절제를 포함하고, 제2 화합물은 항정신병제인 적어도 두개의 화합물의 신규한 조합에 관한 것이고, GPx 매개 장애, 산화 스트레스 증가, 조현병, 양극성 장애, 우울증, 조증, 불안 장애 또는 관련 정신병적 장애, 지연성 운동장애, 및 관련 증상 또는 그들의 합병증을 포함하지만 이에 제한되지는 않는, 많은 상태의 치료, 개선, 예방 또는 억제를 위한 것이다.

신규한 조합의 대표적인 화합물은 상세한 설명 및 청구 범위를 통하여 기술된다.

일부 구체예에서, 항정신병제는 글루타티온, 글루타티온 프로드러그, 시스테인 프로드러그, 클로르프로마진 (토라진), 할로페리돌 (할돌), 페퍼나진, 플루페나진, 리스페리돈 (리스페달), 올란자핀 (자이프렉사), 쿠에티아핀 (세로켈), 지프라시돈 (지오돈), 아리피프라졸 (아빌리파이), 팔리페리돈 (인베가), 루라시돈 (라투다) 및 그들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택된다.

일부 구체예에서, 글루타티온 퍼옥시다제 조절제는 글루타티온 퍼옥시다제 미믹 화합물, 글루타티온, 글루타티온 프로드러그, 및 시스테인 프로드러그로 이루어진 그룹에서 선택되는 화합물을 포함한다.

일부 구체예에서, 글루타티온 퍼옥시다제 미믹 화합물의 대표적인 화합물은 실험식  $C_{13}H_9NOSe$ , 분자량 274.2 및 하기 화학식을 가지는 엡셀렌, (2-페닐-1,2-벤즈이소셀레나졸-3(2H)-온)을 포함한다:

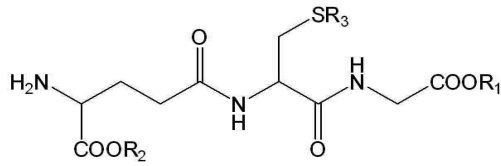


일부 구체예에서, 글루타티온 퍼옥시다제 미믹 화합물 2,2'-디셀레노-비스-β-시클로텍스트린 및 6A,6B-디셀레니닉 산-6A',6B'-셀레늄 가교된 β-시클로텍스트린을 포함한다.

글루타티온 퍼옥시다제와 같은 글루타티온 퍼옥시다제 미믹은, 자유 라디칼이 그의 Se 잔기에 결합함으로써, 활성 산소를 감소시킨다. 글루타티온과 반응함으로써, 글루타티온 퍼옥시다제 미믹은 자유 라디칼 독성을 제한하여, 퍼옥시니트라이트에 대하여 강한 활성을 나타낸다. 글루타티온 퍼옥시다제 미믹인 엡셀렌은, 지질 과산화 동안 미토콘드리아 및 핵 손상으로부터 시토크롬 C 방출을 감소시켜, 산화 스트레스와 관련된 뉴런의 세포자멸을 감소시킨다. 활성 산소의 활성을 감소시키는 약물은 산화 스트레스 증가의 해로운 영향 및 산화 스트레스 증가, 조현병, 양극성 장애, 우울증, 조증, 불안 장애 또는 관련된 정신병적 장애, 지연성 운동장애, 및 관련 증상 또는 그들의 합병증을 포함하지만 이에 국한되지 않는 스트레스로 인해 야기되는 질병을 개선시킬 수 있다.

조현병 환자에서의 산화 스트레스는 글루타티온 (GSH) 결핍과 관련이 있다. 도. 1A 및 1B는 SZ ( $n = 29$ ) 및 정상 대조 환자 ( $n = 25$ )에서의 공복시 혈액 GSH 및 글루타티온 디설피드 (GSSG)를 나타낸 것이다. SZ에서 GSH는 더 낮았고( $p < 0.001$ ) GSSG는 더 높았으며 ( $p = 0.023$ ), 다이어트, 흡연, 약물 치료에 외인성 원인이있고, SZ에서 비정상적인 GSH 산화 환원 상태를 야기하지 않는 것으로 밝혀져, 내재적 산화 환원 이상을 시사한다. 감소된 GSH는 클로자핀 ( $p = 0.005$ ) 또는 다른 항정신병제 ( $p < 0.001$ )의 환자에서도 발견됐다. (Ballesteros 등, 2013a).

[0047] 일부 구체예에서, 대표적인 글루타티온 프로드러그는 하기 화학식의 화합물을 포함한다:



[0048]

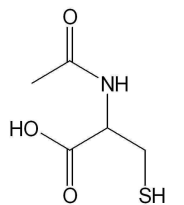
[0049] 상기 화학식에 있어서,

[0050] R<sub>1</sub> 은 H, 메틸, 에틸, 또는 이소프로필이고;

[0051] R<sub>2</sub> 은 H, 또는 에틸이며;

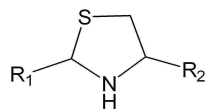
[0052] R<sub>3</sub> 은 H, 아세틸, 페닐아세틸, , 또는  이다.

[0053] 일부 구체예에서, 대표적인 시스테인 프로드러그는 하기 화학식의 N-아세틸 시스테인 (NAC) 을 포함한다:



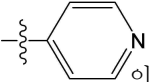
[0054]

[0055] 시스테인 프로드러그의 일부 구체예는 N,N' -디아세틸-시스테인, N-아세틸 시스테인 아마이드, NAC 에스테르 (알킬 에스테르, 글리코아미드 에스테르 및 아씨클록시메틸 에스테르), S-알릴 시스테인, S-메틸 시스테인, S-에틸 시스테인, S-프로필 시스테인, 또는 하기 화학식의 화합물을 포함한다:



[0056]

[0057] 상기 화학식에 있어서,

[0058] R<sub>1</sub> 은 H, 옥소, 메틸, 에틸, n-프로필, n-펜틸, 페닐, -(CHOH)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>OH(상기 n은 1-5이다), 또는  고;

[0059] R<sub>2</sub> 는 H 또는 -COOH이다.

[0060] 시스테인 프로드러그의 일부 구체예는 글리세르알데히드, 아라비노오스, 릭소오스, 리보스, 자일로스, 갈락토스, 글루코스, 및 만노스와 같은 알도스 당을 가지는 2-치환된 티아졸리딘-4-카복시산을 포함한다.

[0061] 본 발명의 또다른 측면은 신규한 조합 및 적어도 하나의 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 특징으로 한다.

[0062] 본 발명은 또한 임의의 신규한 조합의 화합물과 약학적으로 허용 가능한 담체를 혼합하는 것을 포함하는 약학 조성물의 제조 방법을 특징으로 한다.

[0063] 그러나 본 발명의 또다른 측면은 GPx 활성화에 의해 매개되는 질환, 장애 또는 상태로 고통받거나 진단받은 대상을 치료하는 방법을 특징으로 하며, 이 방법은 대상에 신규한 조합을 치료학적 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 상기 질환, 장애 또는 상태는 산화 스트레스 증가, 조현병, 양극성 장애, 우울증, 조증, 불안 장애 또는 관련 정신병적 장애, 지연성 운동장애, 및 관련 증상 또는 그들의 합병증을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0064] 본 발명의 또다른 측면은 글루티온 퍼옥시다제 미믹 화합물을 항정신병제와 함께 공동-투여하여 항정신병제 투여의 부작용을 줄이는 방법을 특징으로 한다. 특히, 엡셀렌을 항정신병제와 공동-투여함으로써 항정신병제 투여의 부작용을 감소시킨다. 더욱 구체적으로, 엡셀렌을 공동-투여하여 클로르프로마진 (토라진), 할로페리돌 (할돌), 페퍼나진, 플루페나진, 리스페리돈 (리스페달), 올란자핀 (자이프텍사), 쿠에티아핀 (세로켈), 지프라시돈 (지오돈), 아리피프라졸 (아빌리파이), 팔리페리돈 (인베가), 루라시돈 (라투다) 또는 그들의 조합 투여의 부작용을 감소시킨다. 일부 구체예에서, 항정신병제 투여의 부작용은 지연성 운동장애, 및 환자에게 고용량 또는 장기간에 걸쳐 항정신병제를 투여하는 다른 합병증을 포함한다.
- [0065] 추가의 구체예에서, 치료를 필요로 하는 대상에서 GPx 매개 상태를 치료하거나 개선시키는 방법은 대상에게 신 규한 조합의 치료학적 유효량을 투여하는 것을 포함하고, 조합 내의 각 화합물의 치료학적 유효량은 약 0.1 mg/일회(dose) 내지 약 5 g/일회(dose)이다. 특히, 상기 조합 내의 각 화합물의 치료학적 유효량은 약 0.5 mg/일회(dose) 내지 약 1000 mg/일회(dose)이다. 더욱 구체적으로, 상기 조합 내의 각 화합물의 치료학적 유효량은 약 1 mg/일회(dose) 내지 약 100 mg/일회(dose)이다. 추가의 구체예에서, 상기 조합의 1일 투여 횟수는 1 내지 3회이다. 추가의 구체예에서, 상기 조합 내의 각 화합물의 치료학적 유효량은 약 0.001 mg/kg/일 내지 약 30 mg/kg/일이다. 더욱 구체적으로, 상기 조합 내의 각 화합물의 치료학적 유효량은 약 0.01 mg/kg/일 내지 약 2 mg/kg/일이다.
- [0066] 추가의 구체예에서, 치료를 필요로 하는 대상에서의 GPx 매개 상태의 진행을 예방 또는 억제하는 방법은 상기 조합의 치료학적 유효량을 대상에 투여하는 것을 포함하고, 상기 조합 내의 각 화합물의 치료학적 유효량은 약 0.1 mg/일회(dose) 내지 약 5 g/일회(dose)이다. 특히, 상기 조합 내의 각 화합물의 치료학적 유효량은 약 1 mg/일회(dose) 내지 약 100 mg/일회(dose)이다. 추가의 구체예에서, 상기 조합의 1일 투여 횟수는 1 내지 3회이다. 추가의 구체예에서, 상기 조합 내의 각 화합물의 치료학적 유효량은 약 0.001 mg/kg/일 내지 약 30 mg/kg/일이다. 더욱 구체적으로, 상기 조합 내의 각 화합물의 치료학적 유효량은 약 0.01 mg/kg/일 내지 약 2 mg/kg/일이다.
- [0067] **정의/용어**
- [0068] 일반적으로, 청구 범위 및 명세서에서 사용된 용어는 당업자에 의해 이해되는 자명한 의미를 갖는 것으로 해석되도록 의도된다. 추가적으로 명확성을 제공하기 위해, 특정한 용어가 하기에 기술된다. 자명한 의미와 제공된 정의가 상충하는 경우, 제공된 정의가 사용되어야 한다. 청구 범위 및 명세서에서 사용된 용어는 달리 명시되지 않는 한, 또는 개시 내용 전반에 걸친 그들의 사용법에 의해 하기와 같이 정의된다.
- [0069] 달리 언급하지 않는 한, 본원에서 사용된 "알킬"은 단독으로 또는 치환기의 일부로 사용되든지간에, 모 알칸의 단일 탄소 원자로부터 하나의 수소 원자를 제거함으로써 유도된 포화, 분지형 또는 직-쇄 1가 탄화수소 라디칼을 의미한다. 전형적인 알킬기는 메틸; 에탄일과 같은 에틸; 프로판-1-일, 프로판-2-일, 시클로프로판-1-일과 같은 프로필; 부탄-1-일, 부탄-2-일, 2-메틸-프로판-1-일, 2- 메틸-프로판-2-일, 시클로부탄-1-일과 같은 부틸 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 바람직한 구현예에서, 상기 알킬기는 C1-6 알킬이고, C1-3이 특히 바람직하다. "알콕시"라디칼은 앞서 기술된 직쇄 또는 분지쇄 알킬기로부터 형성된 산소 에테르이다. 일부 구체예에서, 알킬 또는 알콕시는 옥소, 아미노, 알콕시, 카복시, 헤테로사이클릴, 히드록실 및 할로(F, Cl, Br 또는 I)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 1 내지 5 개의 기로 독립적으로 치환되고, 바람직하게는 1 내지 3개의 기로 치환된다.
- [0070] 본원에 사용된 용어 "아릴"은 탄소 원자로 이루어진 안정한 6-원 모노시클릭 또는 10-원 바이시클릭 또는 14-원 트리시클릭 방향족 링 시스템을 포함하는 방향족 기를 의미한다. 아릴기의 예는 페닐 또는 나프탈레닐을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, "아릴"은 치환된다. 예를 들어, "아릴"은 임의로 치환된 C1-6 알킬, C2-6 알케닐, C2-6 알키닐, 할로, 히드록실, -CN, -C(O)OH, -C(O)O-C1-4알킬, -C(O)NR'R", -SR', -OR', -C(O)R', -N(R')(R), -S(O)2-R', 및 -S(O)2-N(R')(R')로 치환될 수 있고, 상기 R' 및 R' "는 H, C1-6-알킬, 아릴, 헤테로아릴 및/또는 헤테로사이클릴로부터 독립적으로 선택된다.
- [0071] 용어 "헤테로사이클릴" 또는 "헤테로사이클"은 탄소 원자 및 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 6 개의 헤테로원자로 구성되는 3- 내지 8-원 포화되거나 부분적으로 포화된 단일 또는 축합된 고리 시스템이다. 헤테로사이클릴기는 임의의 헤테로원자 또는 탄소 원자에 결합되어 안정한 구조를 생성할 수 있다. 헤테로사이클릴기의 예는 2-이미다졸린, 이미다졸리딘; 모폴린, 옥사졸린, 2-피롤린, 3-피롤린, 피롤리딘, 피리돈, 피리미돈, 피페라진, 피페리딘, 인돌린, 테트라히드로퓨란, 2-피롤린, 3-피롤린, 2-이미다졸린, 2-피라졸린, 인돌리논을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, "헤테로사이클릴" 또는 "헤테로사이클" 독립적으로 치환된다. 예를

들어, "헤테로사이클릴" 또는 "헤테로사이클"은 임의로 치환된 C1-6 알킬, C2-6 알케닐, C2-6 알키닐, 할로, 히드록실,  $-CN$ ,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)O-C1-4$ 알킬,  $-C(O)NR'R''$ ,  $-OR'$ ,  $-SR'$ ,  $-C(O)R'$ ,  $-N(R')(R)$ ,  $-S(O)_2-R'$ , 및  $-S(O)_2-N(R')(R'')$ 로 치환될 수 있고, 상기 R' 및 R''는 H, C1-6-알킬, 아릴, 헤테로아릴 및/또는 헤테로사이클릴로부터 독립적으로 선택된다.

[0072] 단독으로 또는 치환기의 일부로서 사용되는 용어 "옥소"는 탄소 또는 황 원자에 붙은 O-를 의미한다. 예를 들어, 프탈이미드 및 사카린은 옥소 치환기를 갖는 화합물의 예이다.

[0073] 용어 "시스-트랜스 이성질체"는 기준 평면에 대해 원자(또는 그룹)의 위치가 상이한 입체 이성질체 올레핀 또는 시클로알칸(또는 헤테로-아날로그)을 의미한다: 시스-이성질체에서 원자는 같은 편; 트랜스-이성질체에서 그들은 반대편에 있다.

[0074] "치환된"이란 용어는 하나 이상의 수소 원자가 각각 독립적으로 동일하거나 상이한 치환기(들)로 치환된 라디칼을 의미한다.

[0075] 치환기를 언급 할 때, "독립적으로"라는 용어는 이러한 치환기가 둘 이상일 수 있는 경우, 이들 치환기는 서로 동일하거나 상이 할 수 있음을 의미한다.

[0076] 분자 내의 특정 위치에서 임의의 치환기 또는 변수의 정의는 그 분자의 다른 곳에서의 정의와는 독립적인 것으로 의도된다. 본 발명의 화합물 상의 치환기 및 치환 패턴은 당업자에 의해 선택되어, 화학적으로 안정하고 당업계에 공지된 기술뿐만 아니라 본원에 기재된 방법에 의해 용이하게 합성될 수 있는 화합물을 제공 할 수 있음이 이해된다.

[0077] 동일한 조성물 중에 제제화되었는지 여부와 관계 없이, 개시된 약학 조성물 또는 개시된 약물 조합에 대한 치료학적 또는 예방적 목적을 위한 유효량을 결정하는 방법이 당업계에 공지되어 있다. 치료학적 목적을 위하여, 본원에서 사용된 용어 "치료학적 유효량"은 각각의 활성 화합물 또는 약학 제제의 단독 또는 조합의 양을 의미하고, 이는 연구원, 수의사, 의사 또는 다른 임상가가 발견되는 조직계, 동물 또는 인간의 생물학적 또는 의약적 반응을 이끌어내며, 치료되는 질병 또는 장애의 증상의 완화를 포함한다. 예방적 목적을 위하여(즉, 장애의 개시 또는 진행을 억제), 용어 "치료학적 유효량"은 각각의 활성 화합물 또는 약학 제제의 단독 또는 조합의 양을 의미하고, 이는 연구원, 수의사, 의사 또는 다른 임상가가 발견되는 장애의 개시 또는 진행을 대상에서 치료 또는 억제한다. 따라서, 본 발명은 2개 이상의 약물 조합을 제공하며, 상기 약물 조합은 예를 들어, (a) 각 약물은 독립적으로 치료학적으로 또는 예방적으로 유효한 양으로 투여되고; (b) 조합 중 적어도 하나의 약물이 단독으로 투여되는 경우 보조-치료학적이거나 보조-예방적인 양으로 투여되나, 본 발명에 따른 제2 또는 추가의 약물의 조합 투여시는 치료학적 또는 예방적 양으로 투여되며; 또는 (c) 둘 다(또는 그 이상) 약물은 단독으로 투여되는 경우 보조-치료학적이거나 보조-예방적인 양으로 투여되나, 함께 투여되는 경우 치료학적 또는 예방적 양으로 투여된다.

[0078] "약학적으로 허용 가능한 염"이란 용어는 비-독성 약학적으로 허용 가능한 염을 의미한다. (참조 문헌. International J. Pharm., 1986, 33, 201-217; J. Pharm. Sci., 1997 (1월), 66, 1, 1). 그러나, 당업자에게 널리 공지된 다른 염은 본 발명에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 제조에 유용할 수 있다. 대표적인 유기 또는 무기산으로는 염소화수소산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 과염소산, 황산, 질산, 인산, 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 락트산, 숙신산, 말레산, 푸마르산, 말릭산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 만델릭산, 메탄술폰산, 히드록시메탄술폰산, 벤젠술폰산, 옥살산, 과모익산, 2-나프탈렌술폰산, p-톨루엔 술폰산, 시클로헥산술폰산, 살리실산, 사카린산 또는 트리플루오로아세트산을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 대표적인 유기 또는 무기 염은 벤자틴, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 메글루민, 프로카인, 알루미늄, 칼슘, 리튬, 마그네슘, 칼륨, 나트륨 및 아연과 같은 염기성 또는 양이온성 염을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0079] 용어 "조성물"은 특정량의 특정 성분을 함유하는 생성물뿐만 아니라 특정량의 특정 성분의 조합으로부터 직접 또는 간접적으로 생성되는 임의의 생성물을 포함한다.

[0080] 용어 "대상"는 유기체, 치료 대상, 관찰 대상, 임상 시험 또는 실험 대상인 포유류, 인간 또는 비-인간, 남성 또는 여성을 포함하는 동물을 포함한다. 상기 대상은 인간 환자일 수 있다. "인간"이라는 용어는 일반적으로 호모 사피엔스를 의미한다. 본원에서 사용된 용어 "포유류"는 인간, 비-인간 영장류, 마우스, 래트, 기니아 피그, 친칠라 및 원숭이를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 인간 이외의 포유 동물은 예를 들어, 난청, 조현병, 양극성 장애 및/또는 임의의 다른 정신병적 장애의 동물 모델을 나타내는 대상으로 유리하게 사용될 수 있다.

- [0081] 2 개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열과 관련하여 용어 "퍼센트 동일성" 또는 "퍼센트 서열 동일성"은 특정 비율의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기를 갖는 2 개 이상의 서열 또는 서브서열이, 최대 관련성을 위해 비교되고 정렬되었을 때, 아래에 설명된 서열 비교 알고리즘(예를 들어, BLASTP 및 BLASTN 또는 숙련된 기술자가 이용할 수 있는 다른 알고리즘) 중 하나를 사용하여 측정하거나 육안 검사로 측정하여, 동일한 것을 의미한다. 적용에 따라, 퍼센트 "동일성"은 비교되는 서열의 영역, 예를 들어 기능성 도메인을 통해, 또는 대안적으로 비교될 두 서열의 전장에 걸쳐 존재할 수 있다.
- [0082] 서열 비교를 위해, 전형적으로 하나의 서열은 시험 서열이 비교되는 기준 서열로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 사용할 때, 시험 및 기준 서열은 컴퓨터에 입력되고, 필요한 경우 서브서열 좌표가 지정되며, 서열 알고리즘 프로그램 파라미터가 지정된다. 이어서, 서열 비교 알고리즘은 지정된 프로그램 파라미터에 기초하여, 기준 서열에 대한 시험 서열(들)에 대한 퍼센트 서열 동일성을 계산한다.
- [0083] 비교를 위한 서열의 최적 정렬은, 예를 들어, Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)의 로컬 상동성 알고리즘, Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)의 상동성 정렬 알고리즘, Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)의 유사성 방법을 위한 검색, 이러한 알고리즘의 컴퓨터화된 구현 (GAP, BESTFIT, FASTA, Wisconsin Genetics Software Package의 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), 또는 육안 검사 (일반적으로 Ausubel 등, 이하 참조) 에 의해 수행될 수 있다.
- [0084] 퍼센트 서열 동일성 및 서열 유사성을 결정하기에 적합한 알고리즘의 일 예는 BLAST 알고리즘이며, 이는 Altschul 등, J. Mol. Biol. 215 : 403-410 (1990)]에 기재되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 National Center for Biotechnology Information 웹 사이트를 통해 공개적으로 이용 가능하다.
- [0085] 정신병적 장애, 질병, 또는 전조 상태는 산화 스트레스 증가, 조현병, 양극성 장애, 우울증, 조증, 불안 장애 또는 관련 정신병적 장애, 지연성 운동장애, 및 관련 증상 또는 그들의 합병증을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0086] 용어 "통계적으로 유의미한" 은 결과가 랜덤 기회에 의해 야기되지 않는 확률로서 정의된다.
- [0087] 명세서 및 첨부된 청구의 범위에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥이 달리 지시하지 않는 한 복수 대상을 포함한다는 것을 알아야 한다.
- [0088] 명세서 전체에 사용된 약어 또는 머리 글자는 다음을 포함한다:
- [0089] ACC: 전치부 대뇌 피질(Anterior cingulate cortex)
- [0090] AEC: 이상 반응 체크리스트(Adverse event checklist)
- [0091] BPRS: 간단한 정신의학의 평가 척도(Brief psychiatric rating scale )
- [0092] CAT: 카탈라아제(Catalase)
- [0093] CDSS: 조현병을 위한 캘거리 우울증 척도(Calgary depression scale for schizophrenia)
- [0094] C-SSRS: 콜럼비아 자살 심각도 등급 척도(Columbia suicide severity rating scale)
- [0095] EOS: 연구 종료(End of study)
- [0096] GSH: 글루타티온의 환원된 형태(The reduced form of glutathione)
- [0097] GSSG: 글루타티온의 산화된 형태(The oxidized form of glutathione)
- [0098] GPx: 글루타티온 퍼옥시다제(glutathione peroxidases)
- [0099] GR: 글루타티온 환원효소(Glutathione reductase)
- [0100] MCCB: MATRICS 컨센서스 인지 배터리(MATRICES consensus cognitive battery)
- [0101] MMN: 부정합 음성도(Mismatch negativity)
- [0102] MRS: 자기 공명 분광법(Magnetic resonance spectroscopy )
- [0103] NAC: N-acetyl-cysteine(N-아세틸-시스테인)

- [0104] NC: 정상 대조군(Normal controls)
- [0105] NMDAR: N-메틸-D-아스파테이트 수용체 (N-methyl-D-aspartate receptors)
- [0106] POC: 개념 증명(Proof of concept)
- [0107] Redox: 환원/산화Reduction/oxidation
- [0108] RNS: 활성 질소(Reactive nitrogen species)
- [0109] ROS: 활성 산소(Reactive oxygen species)
- [0110] SOD: 수퍼옥시드 디스무타아제(Superoxide dismutase)
- [0111] SPI: 사운드 파마슈티컬스 주식회사(Sound Pharmaceutical Inc )
- [0112] SZ: 조현병 환자(Schizophrenia patients) 또는 조현병(Schizophrenia)
- [0113] UPSA: 캘리포니아 성과-기반 기술 평가(California performance-based skills assessment)
- [0114] h 또는 hr (시간(들))
- [0115] LCMS (질량 분석계가 있는 고압 액체 크로마토그래피(high pressure liquid chromatography with mass spectrometer))
- [0116] Me (메틸)
- [0117] Mg (밀리그램)
- [0118] rt 또는 RT (상온)
- [0119] TLC (박층 크로마토그래피(thin layer chromatography))
- [0120] **참고 문헌**
- [0121] Antony S, Bayse CA. 글루타티온 퍼옥시다제 미믹 앵셀렌의 메카니즘을 모델링. Inorg Chem. 2011;50:12075-12084.
- [0122] Ballesteros A, Jiang P, Summerfelt A, Du X, Chiappelli J, O'Donnell P, Kochunov P, Hong LE. (2013a) 조현병에서 비정상적인 글루타티온 환원 상태에 대한 외인성 기원의 증거는 없다. Schizophre Res. 2013;146:184-189
- [0123] Ballesteros A, Summerfelt A, Du X, Jiang P, Chiappelli J, Tagamets, M, O'Donnell P, Kochunov P, Hong LE. (2013b) 조현병의 산화 스트레스에 대한 전기생리학적 중간 바이오마커. Clin Neurophysiol. 2013 Jun 30. doi:pii: S1388-2457(13)00695-0. 10.1016/j.clinph.2013.05.021. [인쇄 미리보기]
- [0124] Behrens, M.M., Ali, S.S., Dao, D.N., Lucero, J., Shekhtman, G., Quick, K.L., 및 Dugan, L.L. (2007). 케타민-유도된 급속-스파이크 중간뉴런의 손실은 NADPH-산화효소에 의해 매개된다. Science 318, 1645-1647.
- [0125] Berk, M., Copolov, D., Dean, O., Lu, K., Jeavons, S., Schapkaitz, I., Anderson-Hunt, M., Judd, F., Katz, F., Katz, P., 등 (2008). 조현병의 글루타티온 전구체로서N-아세틸 시스테인, --더블-블라인드, 무작위, 플라시보--조절 시험. Biological psychiatry 64, 361-368.
- [0126] Bitanhirwe, B.K., 및 Woo, T.U. (2011). 조현병에서의 산화 스트레스: 통합된 접근법. 신경과학 및 생물행동 리뷰 35, 878-893.
- [0127] Cabungcal, J.H., Nicolas, D., Kraftsik, R., Cuenod, M., Do, K.Q., 및 Hornung, J.P. (2006). 발달 중 글루타티온 결핍은 래트 앞쪽 골관절염 GABA 신경계 뉴런에서 변이를 일으킨다: 조현병과의 관련성. Neurobiology of disease 22, 624-637.
- [0128] Cabungcal, J.H., Steullet, P., Kraftsik, R., Cuenod, M., 및 Do, K.Q. (2013a). 유년기 손상은 산화 스트레스를 통해 파브알부민 중간뉴런을 손상시킨다: N-아세틸시스테인에 의한 역전. Biological psychiatry 73, 574-582.
- [0129] Cabungcal, J.H., Steullet, P., Morishita, H., Kraftsik, R., Cuenod, M., Hensch, T.K., 및 Do, K.Q.

(2013b). 신경원주위연결망은 산화 스트레스에 대항하는 급속-스파이크 중간뉴런을 보호한다. 미국 국립 과학 아카데미 회보(PNAS) 110, 9130-9135.

- [0130] Carlen M, Meletis K, Siegle JH, Cardin JA, Futai K, Vierling-Claassen D, Ruhlmann C, Jones SR, Deisseroth K, Sheng M, Moore CI, Tsai LH. 감마 리듬 유도 및 행동을 위한 파브알부민 중간뉴런 내의 NMDA 수용체의 중요한 역할. *Mol Psychiatry*. 2012; 17:537-548.
- [0131] Carmeli, C., Knyazeva, M.G., Cuenod, M., 및 Do, K.Q. (2012). 글루타티온 전구체 N-아세틸-시스테인 조현병 환자의 EEG 동기화를 조절한다: a 더블-블라인드, 무작위, 플라시보--조절 시험. *PLoS one* 7, e29341.
- [0132] Chambers, R.A., 및 Lipska, B.K. (2011). 광기에 대한 방법: 조현병의 신생아 복부 해마 병변 모델 생성. 조현병 및 관련 장애의 동물 모델, P. O'Donnell, ed. (New York, Humana Press), pp. 1-24.
- [0133] Cho RY, Konecky RO, Carter CS. 조현병에서의 전두엽 피질 감마 동기화 및 인지 조절 장애. 미국 국립 과학 아카데미(Proc Natl Acad Sci U S A.) 2006; 103:19878-19883.
- [0134] Choi YB, Lipton SA. NMDA 수용체의 산화 환원 조절. *Cell Mol Life Sci*. 2000; 57:1535-1541.
- [0135] Daiber A, Zou MH, Bachschmid M, Ullrich V. 인 비트로 및 엑스 비보에서 퍼옥시니트라이트 스캐빈저로서의 엠셀렌. *바이오크 파마콜(Biochem Pharmacol.)* 2000; 59:153-160.
- [0136] das Neves Duarte, J.M., Kulak, A., Gholam-Razaei, M.M., Cuenod, M., Gruetter, R., 및 Do, K.Q. (2012). N-아세틸시스테인은 발달 중에 글루타티온-결핍된 조현병 마우스 모델의 신경화학적 변화를 표준화한다. *Biological psychiatry* 71, 1006-1014.
- [0137] Dietrich-Muszalska A, Olas B. 조현병의 산화 스트레스의 지표로서 이소프로스텐. *World J Biol Psychiatry*. 2009; 10:27-33.
- [0138] Do, K.Q., Cabungcal, J.H., Frank, A., Steullet, P., 및 Cuenod, M. (2009). 산화 환원 조절장애, 신경발달, 및 조현병. *Curr Opin Neurobiol* 19, 220-230.
- [0139] Do, K.Q., Trabesinger, A.H., Kirsten-Kruger, M., Lauer, C.J., Dydak, U., Hell, D., Holsboer, F., Boesiger, P., 및 Cuenod, M. (2000). 조현병: 생체내 뇌척수액 및 전전두엽 피질에서의 글루타티온 결핍. *신경과학 유럽 저널* 12, 3721-3728.
- [0140] Ehrlichman, R.S., Gandal, M.J., Maxwell, C.R., Lazarewicz, M.T., Finkel, L.H., Contreras, D., Turetsky, B.I., 및 Siegel, S.J. (2009). N-메틸-D-아스파르트 산 수용체 길항제-유도된 주파수 진동 조현병에서 전기생리학적 결핍을 재현한다. *신경과학* 158, 705-712.
- [0141] Feleder, C., Tseng, K.Y., Calhoon, G.G., 및 O'Donnell, P. (2010). 신생아 해마 내에서 면역 반응은 성인 래트의 전전두엽 피질 중간뉴런의 도파민 조절을 변화시킨다. *Biological psychiatry* 67, 386-392.
- [0142] Fischer H, Terlinden R, Lohr JP, Romer A. 신규한 생물학적 활성 셀레노유기 화합물 VIII. 엠셀렌의 생체내 변화. *Xenobiotica*. 1988; 18:1347-1359.
- [0143] Gawryluk, J.W., Wang, J.F., Andreazza, A.C., Shao, L., 및 Young, L.T. (2011). 정신 질환 환자의 전전두엽 피질 사후 분석에서 주요 뇌 항산화제인 글루타티온의 레벨 감소. *신경정신약물학 세계 저널 / Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum의 공식 학술지* 14, 123-130.
- [0144] Geyer, M.A., 및 Braff, D.L. (1987). 조현병 및 관련 동물 모델에서 요법 및 감각 운동의 시작. *Schizophrenia bulletin* 13, 643-668.
- [0145] Giovanoli, S., Engler, H., Engler, A., Richetto, J., Voget, M., Willi, R., Winter, C., Riva, M.A., Mortensen, P.B., Schedlowski, M., 및 Meyer, U. (2013). 사춘기의 스트레스는 생쥐에서 태아 면역 활성화의 잠재적인 신경병리학적 결과를 드러낸다. *Science* 339, 1095-1099.
- [0146] Gonzalez-Burgos G, Lewis DA. 조현병에서의 NMDA 수용체 기능 저하, 파브알부민-양성 뉴런, 및 피질 감마 진동. *Schizophr Bull*. 2012; 38:950-957.
- [0147] Gysin, R., Kraftsik, R., Sandell, J., Bovet, P., Chappuis, C., Conus, P., Deppen, P., Preisig, M., Ruiz, V., Steullet, P., 등 (2007). 조현병에서의 글루타티온 장애: 수렴된 유전적 기능적 증거. 미국 국립 과학 아카데미 회보(PNAS) 104, 1055-1060.

학 아카데미 회보(PNAS) 104, 16621-16626.

- [0148] Haddad, J.J. (2002). 산화 환원(의)-센서티브 전사 인자의 조절에 있어서 항산화제 및 산화촉진제 메카니즘. *Cellular signalling* 14, 879-897.
- [0149] Hartig, W., Brauer, K., Bigl, V., 및 Bruckner, G. (1994). 파브알부민-함유 뉴런 주변의 렉틴-표지의 신경 원주위연결망의 콘드로이틴 황산염 프로테오글리칸-면역반응성. *Brain research* 635, 307-311.
- [0150] Hensch, T.K. (2005). 지방 피질 회로에서의 중요한 기간 소성. *네이처 리뷰 뉴로사이언스* 6, 877-888. Javitt, D.C., Doneshka, P., Zylberman, I., Ritter, W., 및 Vaughan, H.G., Jr. (1993). 조현병에서 진행되는 초기 피질의 손상: 사건-관련 잠재적 확인 연구. *Biological psychiatry* 33, 513-519.
- [0151] Herin GA, Du S, Aizenman E. 신경보호제인 엡셀렌은 산화 환원 조절 부위를 통해 NMDA 수용체 기능을 변형시킨다. *J Neurochem.* 2001; 78:1307-1314.
- [0152] Hong LE, Summerfelt A, McMahon R, Adami H, Francis G, Elliott A, Buchanan RW, Thaker GK. 유발된 감마 밴드 동기화 및 조현병에 대한 책임. *Schizophr Res.* 2004; 70:293-302.
- [0153] Imai H, Masayasu H, Dewar D, Graham DI, Macrae IM. 엡셀렌은 국소 뇌경색의 설치류 모델에서의 회색 및 흰색 물질을 보호한다. *Stroke.* 2001; 32:2149-2154.
- [0154] Javitt DC, Doneshka P, Zylberman I, Ritter W, Vaughan HG, Jr. 조현병에서 진행되는 초기 피질의 손상: 사건-관련 잠재적 확인 연구. *Biol Psychiatry.* 1993; 33:513-519.
- [0155] Javitt DC, Grochowski S, Shelley AM, Ritter W. 조현병에서 자극 편차, 확률, 및 자극/편차의 간격의 기능으로서의 손상된 부정합 음성도(MMN)의 생성. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1998; 108:143-153.
- [0156] Javitt DC, Doneshka P, Grochowski S, Ritter W, Jonides J, Smith EE, Koeppe RA, Awh E, Minoshima S, Mintun MA, Just MA, Carpenter PA, Huerta MF, Krubitzer LA, Kaas JH, Keating EG, Pierre A, Chopra S. 손상된 부정합 음성도 생성은 조현병에 있어서, 작업 기억의 광범위한 기능 장애를 반영한다. *Arch Gen Psychiatry.* 1996; 76:637-641.
- [0157] Johnson, A.W., Jaaro-Peled, H., Shahani, N., Sedlak, T.W., Zoubovsky, S., Burruss, D., Emiliani, F., Sawa, A., 및 Gallagher, M. (2013). 신경정신병에 대한 마우스 모델에서 전전두엽 산화 스트레스와 함께 인지 및 동기 부여 결핍. *미국 국립 과학 아카데미 회보(PNAS)* 110, 12462-12467.
- [0158] Jones, D.P., 및 Go, Y.M. (2010). 산화 환원 구획화 및 세포 스트레스. *Diabetes Obes Metab* 12 Suppl 2, 116-125.
- [0159] Kano S, Colantuoni C, Han F, Zhou Z, Yuan Q, Wilson A, Takayanagi Y, Lee Y, Rapoport J, Eaton W, Cascella N, Ji H, Goldman D, Sawa A. 후각 세포에서의 다중 히스톤 메틸화의 게놈-전체의 프로파일링: 조현병에 있어서 산화 스트레스에 대한 세포 감수성에 대한 추가적 의미. *Mol Psychiatry.* 2013;18:740-742.
- [0160] Kasai, H. (1997). 발암 과정에서 세포 산화 스트레스 지표로서의, 산화성 DNA 손상, 8-히드록시-2'-데옥시구아노신의 형태 분석. *Mutat Res* 387, 147-163.
- [0161] Kil, J., Pierce, C., Tran, H., Gu, R., 및 Lynch, E.D. (2007). 엡셀렌 치료는 글루타티온 퍼옥시다제의 모방 및 유도를 통해 소음으로 인한 청력 손실을 줄인다. *Hearing research* 226, 44-51.
- [0162] Kohr G, Eckardt S, Luddens H, Monyer H, Seeburg PH. NMDA 수용체 채널: 약제를 줄임으로써 서브유닛-특정 강화. *Neuron.* 1994; 12:1031-1040.
- [0163] Lavoie, S., Murray, M.M., Deppen, P., Knyazeva, M.G., Berk, M., Boulat, O., Bovet, P., Bush, A.I., Conus, P., Copolov, D., 등 (2008). 글루타티온 전구체, N-아세틸-시스테인은 조현병 환자의 부정합 음성도를 향상시킨다.. *신경정신약물학: 미국 대학의 공식 간행물 of 신경정신약물학* 33, 2187-2199.
- [0164] Lee, H., Dvorak, D., Kao, H.Y., Duffy, A.M., Scharfman, H.E., 및 Fenton, A.A. (2012). 초기 인지 경험은 신경발달 조현병 모델의 성인 결핍을 예방한다. *Neuron* 75, 714-724.
- [0165] Lewis, B.L., 및 O'Donnell, P. (2000). 전전두엽 피질에 대한 복측 피개 영역 구심성 신경은 D<sub>1</sub> 도파민 수용체를 통해 피라미드형 뉴런에서의 막 전위 '업' 상태를 유지한다. *Cerebral cortex* 10, 1168-1175.

- [0166] Lewis, D.A., Curley, A.A., Glausier, J.R., 및 Volk, D.W. (2012). 조현병에서의 피질의 파브알부민 중간뉴런 및 인지 기능 장애. *신경과학 트렌드* 35, 57-67.
- [0167] Light GA, Hsu JL, Hsieh MH, Meyer-Gomes K, Sprock J, Swerdlow NR, Braff DL. 감마 밴드 진동은 조현병 환자에서 신경 네트워크 피질의 일관성 기능 장애를 나타낸다. *Biol Psychiatry*. 2006; 60:1231-1240.
- [0168] Lipska, B.K., Swerdlow, N.R., Geyer, M.A., Jaskiw, G.E., Braff, D.L., 및 Weinberger, D.R. (1995). 래트의 신생아 흥분독성 해마 손상은 스타틀의 선행자극 억제(Prepulse inhibition) 및 이의 아포모르핀에 의한 중단에 있어서, 사후-사춘기의 변화를 일으킨다. *Psychopharmacol* 132, 303-310.
- [0169] Lynch ED, Kil J. 소음-유발성 청력 손실의 예방 및 치료를 위한 글루타티온 퍼옥시다제 미믹인, 엠셀렌의 개발. *Semin Hear*. 2009; 30:47-55.
- [0170] Miller E, Mrowicka M, Saluk-Juszczak J, Ireneusz M. 제2 차 진행성 다발성 경화증에서의 생체내 지질 과산화에 대한 비-침습적인 마커로서의, 이소프로스탄의 레벨. *Neurochem Res*. 2011; 36:1012-1016.
- [0171] Moussawi, K., Pacchioni, A., Moran, M., Olive, M.F., Gass, J.T., Lavin, A., 및 Kalivas, P.W. (2009). N- 아세틸시스테인은 코카인-유발 메타가소성을 역전시킨다. *네이처 신경과학* 12, 182-189.
- [0172] Muller, A., Cadenas, E., Graf, P., 및 Sies, H. (1984). 신규한 생물학적 활성 셀레노-유기 화합물--I. PZ 51 (엠셀렌)의 생체외 글루타티온 퍼옥시다제-유사 활성 및 항산화제 능력. *Biochemical pharmacology* 33, 3235-3239.
- [0173] Muller A, Gabriel H, Sies H, Terlinden R, Fischer H, Romer A. 신규한 생물학적 활성 셀레노 유기 화합물--VII. 관류한 래트의 간에서 엠셀렌의 생체내변화. *바이오크 과마콜(Biochem Pharmacol.)* 1988; 37:1103- 1109.
- [0174] Nakazawa K, Zsiros V, Jiang Z, Nakao K, Kolata S, Zhang S, Belforte JE. 조현병 병태 생리학의 가바성 (GABAergic) 개재뉴런 기원. *Neuropharmacology*. 2012; 62:1574-1583.
- [0175] Nehru B, Kanwar SS. 래트 뇌에서 납-유발성 변화의 N-아세틸시스테인에 의한 조절: 감소된 글루타티온 수치 및 형태. *Toxicol Mech Methods*. 2007;17:289-293.
- [0176] Niwa, M., Kamiya, A., Murai, R., Kubo, K., Gruber, A.J., Tomita, K., Lu, L., Tomisato, S., Jaaro-Peled, H., Seshadri, S., 등 (2010). 자궁 내의 유전자 이동으로 인한 DISC1의 녹다운은 전두엽에서 출생 후의 도파민 성숙을 방해하고, 성인 행동 결핍을 초래한다. *Neuron* 65, 480-489.
- [0177] Noguchi N, Yoshida Y, Kaneda H, Yamamoto Y, Niki E. 지질 과산화에 대한 항산화제로서의 엠셀렌의 작용. *바이오크 과마콜(Biochem Pharmacol.)* 1992; 44:39-44.
- [0178] Nwokocha, C.R., Baker, A., Douglas, D., McCalla, G., Nwokocha, M., 및 Brown, P.D. (2013). 아포시닌은 내피 산화 질소 합성효소의 상승을 통하여 카드뮴-유발 고혈압을 개선시킨다. *Cardiovascular toxicology* 13, 357-363.
- [0179] O'Donnell, P. (2011). 조현병에서의 피질의 탈억제의 청소년기(adolescent) 발병: 동물 모델의 통찰. *조현병* 37, 484-492.
- [0180] O'Donnell, P. (2012a). 조현병의신생아 복부 해마 병변 모델에서 피질의 탈억제: 가능한 치료 방법에 대한 새로운 전망. *Pharmacology & therapeutics* 133, 19-25.
- [0181] O'Donnell, P. (2012b). 조현병의 초기 대상으로서의 피질의 중간뉴런, 면역 인자 및 산화 스트레스. *신경과학 유럽 저널* 35, 1866-1870.
- [0182] O'Donnell, P. (2013). 조현병에서 동물 모델을 어떻게 활용하면 좋을까 : 진화 및 합성, S.M. Silverstein, B. Moghaddam, 및 T. Wykes, eds. (Cambridge, MA: MIT Press), pp. 205-216.
- [0183] O'Donnell, P., Lewis, B.L., Weinberger, D.R., 및 Lipska, B.K. (2002). 신생아 해마 손상은 성인 래트에서 전전두엽 피질 뉴런의 전기생리학적 특성을 변화시킨다. *Cerebral cortex* 12, 975-982.
- [0184] Otte, D.M., Sommersberg, B., Kudin, A., Guerrero, C., Albayram, O., Filiou, M.D., Frisch, P., Yilmaz, O., Drews, E., Turck, C.W., 등 (2011). N-아세틸 시스테인 치료는 G72/G30 트랜스제닉 생쥐에서 미토콘드리아 기능 장애로 유발된 인지 결핍을 구제한다. *신경정신약물학: 신경정신약물학의 미국 대학의 공식 간행물* 36,

2233-2243.

- [0185] Pawlas, N., 및 Malecki, A. (2007). 생체외에서 모조 허혈 과정 중에 아라키돈 산 및 4-히드록시노네날에 노출된 뉴런에서 글루타티온 수치에 대한 엽셀렌의 효과. *Pharmacological reports: PR* 59, 708-714.
- [0186] Paxinos, G., 및 Watson, C. (1998). 정위 좌표에서의 래트의 뇌, 4번째 에디션 edn (San Diego: Academic Press).
- [0187] Radi, R. (2004). 산화 질소, 산화제, 단백질 티로신 질산. *미국 국립 과학 아카데미 회보(PNAS)* 101, 4003-4008.
- [0188] Reiter R, Wendel A. 셀레늄 및 약물 대사--II. 결핍된 생쥐에서의 글루타티온 퍼옥시다제의 독립성과 간 효소 조절의 가역성. *바이오크 화학(Biochem Pharmacol.)* 1984; 33:1923-1928.
- [0189] Satoh T, Ishige K, Sagara Y. 여러 단계의 산화 스트레스에 대한 엽셀렌이 제공하는 생쥐의 신경 세포에 대한 보호 효과. *Neurosci Lett.* 2004; 371:1-5.
- [0190] Schmitz, C., 및 Hof, P.R. (2005). 신경과학의 디자인-기반 입체학. *신경과학* 130, 813-831.
- [0191] Sies H. 엽셀렌: 글루타티온 퍼옥시다제 미믹. *Methods Enzymol.* 1994;234:476-482.
- [0192] Spencer KM, Nestor PG, Perlmutter R, Niznikiewicz MA, Klump MC, Frumin M, Shenton ME, McCarley RW. 신경 동기성은 조현병에서 무질서한 지각 및 인지를 유발한다. *미국 국립 과학 아카데미(Proc Natl Acad Sci U S A.)* 2004; 101:17288-17293.
- [0193] Steullet, P., Cabungcal, J.H., Kulak, A., Kraftsik, R., Chen, Y., Dalton, T.P., Cuenod, M., 및 Do, K.Q. (2010). 산화 환원 조절장애는 복부에는 영향을 미치나, 등쪽 해마: 파브알부민 뉴런의 손상, 감마 진동, 및 관련 행동. *신경과학 저널: 신경과학회의 공식 저널* 30, 2547-2558.
- [0194] Steullet, P., Neijt, H.C., Cuenod, M., 및 Do, K.Q. (2006). 글루타티온 결핍에 의해 유발된 NMDA 수용체의 시냅스 가소성 손상 및 기능 저하: 조현병과의 관련성. *신경과학* 137, 807-819.
- [0195] Tosic, M., Ott, J., Barral, S., Bovet, P., Deppen, P., Gheorghita, F., Matthey, M.L., Parnas, J., Preisig, M., Saraga, M., 등 (2006). 조현병 및 산화 스트레스: 감수성 유전자로서의 글루타메이트 시스템 인 리가아제 변형체. *인간 유전학의 미국 저널(Am J Hum Genet)* 79, 586-592.
- [0196] Tseng, K.Y., Chambers, R.A., 및 Lipska, B.K. (2009). 조현병의 발견적 신경발달 모델로서의 신생아 복부 해마 병변. *뇌 행동 연구(Behavioural brain research)* 204, 295-305.
- [0197] Tseng, K.Y., Lewis, B.L., Hashimoto, T., Sesack, S.R., Kloc, M., Lewis, D.A., 및 O'Donnell, P. (2008). 신생아 복부 해마 병변은 성인 전전두엽 피질 중간뉴런에 기능적 결핍을 일으킨다. *신경과학 저널: 신경과학회의 공식 저널* 28, 12691-12699.
- [0198] Tseng, K.Y., 및 O'Donnell, P. (2007). D2 도파민 수용체는 성인 래트 전전두엽 피질에서의 흥분성 시냅스 전달의 감쇠를 위해 GABA 성분을 모집한다. *Synapse* 61, 843-850.
- [0199] Uhlhaas PJ, Singer W. 조현병에서 이상 신경 진동 및 동기성. *Nat Rev Neurosci.* 2010; 11:100-113.
- [0200] Ullrich V, Weber P, Meisch F, von Appen F. 혈장과 타겟 단백질 사이의 엽셀렌-결합 평형. *바이오크 화학(Biochem Pharmacol.)* 1996; 52:15-19.
- [0201] Umbricht, D., Schmid, L., Koller, R., Vollenweider, F.X., Hell, D., 및 Javitt, D.C. (2000). 건강한 지원자의 청각 및 시각 문맥-의존적 처리에서의 케타민-유도된 결핍: 조현병에서의 인지 결핍 모델에 대한 영향. *일반 정신의학 아카이브(Archives of general psychiatry)* 57, 1139-1147.
- [0202] Wendel A, Fausel M, Safayhi H, Tiegs G, Otter R. 신규한 생물학적 활성 셀레노-유기 화합물--II. 글루타티온 퍼옥시다제와 관련하여 PZ 51의 활동. *바이오크 화학(Biochem Pharmacol.)* 1984; 33:3241-3245.
- [0203] Wijtenburg S A, Gaston FE, Spieker E A, Forenic S A, Kochunov P, Hong LE, Rowland L M. 3T에서 위상 회전 STEAM의 재현성: 글루타티온에 대한 집중. *Magn Reson.Med.* 2013 Oct 22. doi: 0.1002/mrm. 24959. [Epub ahead of print]

[0204] Wirth EK, Conrad M, Winterer J, Wozny C, Carlson BA, Roth S, Schmitz D, Bornkamm GW, Coppola V, Tessarollo L, Schomburg L, Kohrle J, Hatfield DL, Schweizer U. 신경세포 셀레노단백질 발현은 개재뉴런 발달에 필요하며, 발작 및 신경퇴화를 예방한다. FASEB J. 2010; 24:844-852.

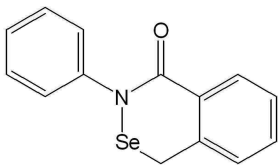
[0205] Yao, J.K., 및 Keshavan, M.S. (2011). 조현병에서의 항산화제, 산화 환원 신호, 및 병태 생리학: 통합적인 견해. 항산화제 & 산화 환원 신호 15, 2011-2035.

[0206] Zhao R, Masayasu H, Holmgren A. 엽셀렌: 인간의 티오레독신 환원효소가 그의 하이드로퍼옥사이드 산화효소 활성 및 초고속 티오레독신 산화제를 강력하게 자극하기 위한 기질. 미국 국립 과학 아카데미(Proc Natl Acad Sci U S A.) 2002; 99:8579-8584.

## [0207] 화합물

[0208] 본 발명의 대표적인 화합물은 명세서 및 청구범위를 통하여 기술된다.

[0209] 글루타티온 퍼옥시다제 (GPx) 미믹의 대표적인 화합물은 실험식  $C_{13}H_9NOSe$ , 분자량 274.2 및 하기 화학식을 가지는 엽셀렌, (2-페닐-1,2-벤즈이소셀레나졸-3(2H)-온)을 포함한다:



[0210]

[0211] 엽셀렌은 제제에서 투여되는 유일한 활성 성분이다. 엽셀렌은 섭씨 25°의 수용액에 약간 용해된다. 엽셀렌은 촉매로서 작용하며 해독 반응 동안 소모되지 않는다(Muller 등, 1988). 엽셀렌 제제의 일 구체예는 HPLC에 의해 확인된 바와 같이 >99% 순수하다. 이러한 제제의 합성은 로디아 파마 솔루션스(Rhodia Pharma Solutions)에서 제공하며 플리스터 팩에 밀봉된 캡슐을 포함한다. 각 캡슐에는 200mg의 엽셀렌 제제 또는 SPI-1000 (위약)이 들어있다.

[0212] 글루타티온 퍼옥시다제 (GPx) 미믹의 다른 대표적인 화합물은 2,2'-디셀레노-비스-β-시클로텍스트린 및 6A,6B-디셀레니닉 산-6A',6B'-셀레늄 가교된 β-시클로텍스트린을 포함한다.

[0213] 조합 내의 제2 화합물의 대표적인 화합물은 글루타티온 (GSH), 표 1에 기재된 글루타티온 프로드러그, 및 표 2에 기재된 시스테인 프로드러그를 포함한다.

## 표 1

글루타티온 프로드러그

[0214]

| 구조 | NO. | 이름                                                                                              |
|----|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | 1   | $N^5-((R)-3\text{-머캅토-1-}((2\text{-메톡시-2-옥소에틸})\text{-아미노})\text{-1-옥소프로판-2-yl})\text{-L-글루타민}$ |
|    | 2   | $N^5-((R)-1-((2\text{-에톡시-2-옥소에틸})\text{-아미노})\text{-3-머캅토-1-옥소프로판-2-yl})\text{-L-글루타민}$        |
|    | 3   | 에틸 $N^5-((R)-1-((2\text{-에톡시-2-옥소에틸})\text{-아미노})\text{-3-머캅토-1-옥소프로판-2-yl})\text{-L-글루탐미네이트}$  |

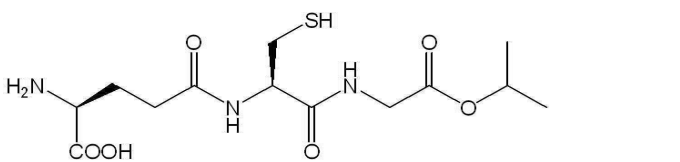
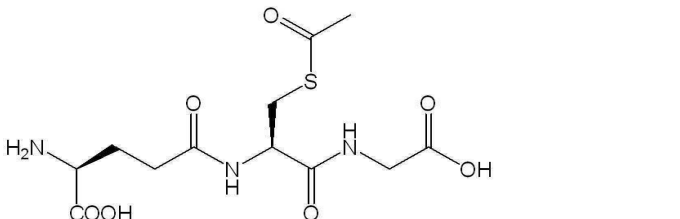
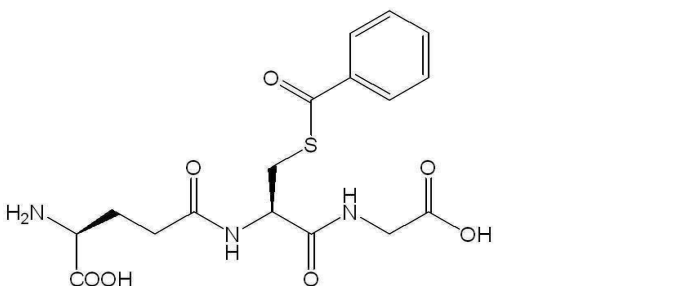
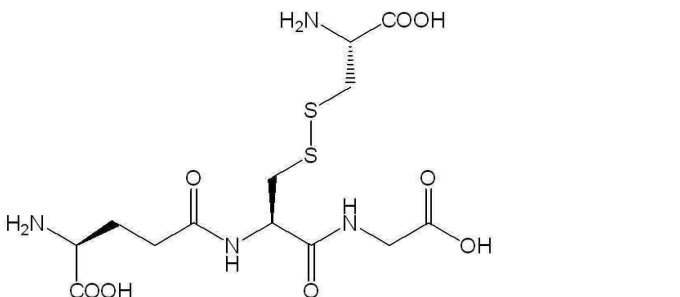
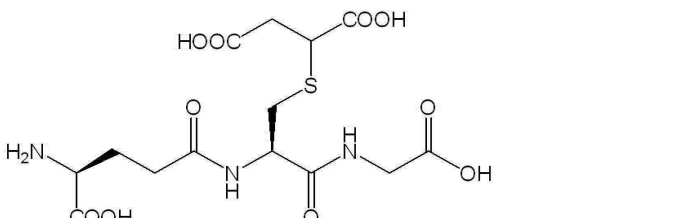
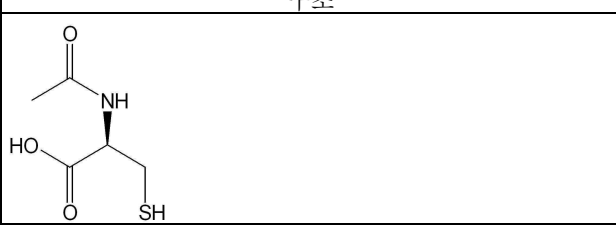
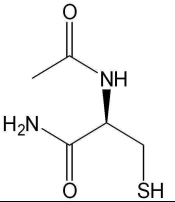
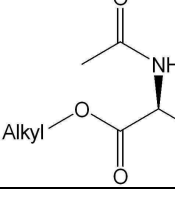
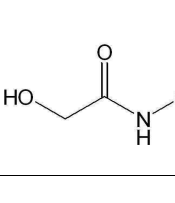
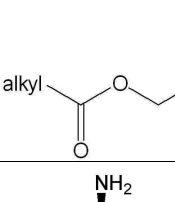
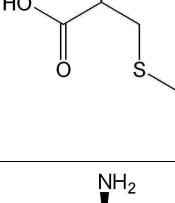
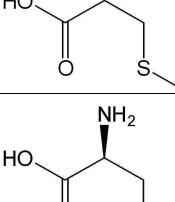
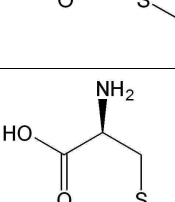
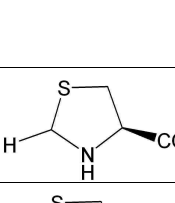
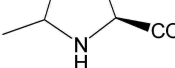
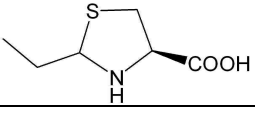
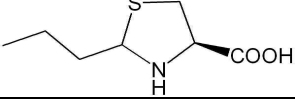
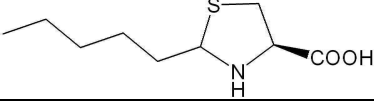
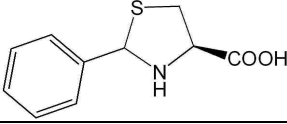
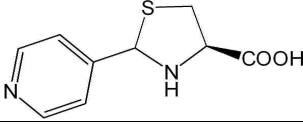
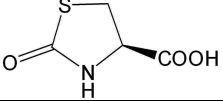
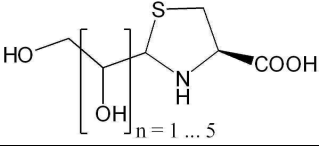
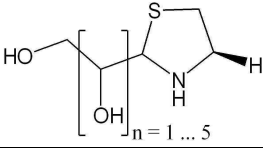
|                                                                                     |   |                                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---|---------------------------------------------------------------------------|
|    | 4 | $N^5-((R)-1-((2-이소프로폭시-2-옥소에틸)아미노)-3-머캅토-1-옥소프로판-2-일)-L-글루타민$             |
|    | 5 | $N^5-((R)-3-(아세틸티오)-1-((카복시메틸)아미노)-1-옥소프로판-2-일)-L-글루타민$                   |
|    | 6 | $N^5-((R)-3-(벤조일티오)-1-((카복시메틸)아미노)-1-옥소프로판-2-일)-L-글루타민$                   |
|   | 7 | $N^5-((R)-3-(((R)-2-아미노-2-카복시에틸)디설파닐)-1-((카복시메틸)아미노)-1-옥소프로판-2-일)-L-글루타민$ |
|  | 8 | $2-(((R)-2-((S)-4-아미노-4-카복시부탄아미도)-3-((카복시메틸)아미노)-3-옥소프로필)티오)숙신 산$         |

표 2

시스테인 프로드러그

| 구조                                                                                  | NO. | 이름                |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------------------|
|  | 1   | $N$ -아세틸 시스테인     |
|  | 2   | $N,N'$ -디아세틸 시스테인 |

|                                                                                     |    |                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|---------------------------------|
|    | 3  | <i>N</i> -아세틸 시스테인 아미드          |
|    | 4  | <i>N</i> -아세틸 시스테인 알킬 에스테르      |
|    | 5  | <i>N</i> -아세틸 시스테인 글리코아미드 에스테르  |
|   | 6  | <i>N</i> -아세틸 시스테인 아시클록시메틸 에스테르 |
|  | 7  | S-알릴 시스테인                       |
|  | 8  | S-메틸 시스테인                       |
|  | 9  | S-에틸 시스테인                       |
|  | 10 | S-프로필 시스테인                      |
|  | 11 | ( <i>R</i> )-티아졸리딘-4-카복시산       |
|  | 12 | ( <i>4R</i> )-2-메틸티아졸리딘-4-카복시산  |

|                                                                                     |    |                                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | 13 | (4 <i>R</i> )-2-에틸티아졸리딘-4-카복시산                                                                |
|    | 14 | (4 <i>R</i> )-2-프로필티아졸리딘-4-카복시산                                                               |
|    | 15 | (4 <i>R</i> )-2-펜틸티아졸리딘-4-카복시산                                                                |
|    | 16 | (4 <i>R</i> )-2-페닐티아졸리딘-4-카복시산                                                                |
|    | 17 | (4 <i>R</i> )-2-(피리딘-4-일)티아졸리딘-4-카복시산                                                         |
|    | 18 | ( <i>R</i> )-2-옥소티아졸리딘-4-카복시산                                                                 |
|   | 19 | n = 3 (립시스, RibCys):<br>2( <i>R,S</i> )-D-리보-(1',2',3',4'-테트라히드록시부틸)-티아졸리딘-4( <i>R</i> )-카복시산 |
|  | 20 | n = 3 (립시스트, RibCyst):<br>2( <i>R,S</i> )-D-리보-(1',2',3',4'-테트라히드록시부틸)-티아졸리딘                  |

[0216] 시스테인 프로드러그의 일부 다른 구체예들은, 글리세르알데히드, 아라비노오스, 릭소오스, 리보스, 자일로스, 갈락토스, 글루코스, 및 만노스와 같은 알도스 당당을 포함하는 2-치환된 티아졸리딘-4-카복시산을 포함한다.

[0217] 본 발명에 따른 화합물이 하나 이상의 키랄 중심을 갖는 경우, 따라서 이들은 거울상 이성질체로서 존재할 수 있다. 화합물이 2 개 이상의 키랄 중심을 갖는 경우, 이들은 부분입체 이성질체로서 추가로 존재할 수 있다. 본 발명에 따른 화합물의 제조 방법이 입체 이성질체의 혼합물을 발생시키는 경우, 이들 이성질체는 조제용 크로마토 그래피와 같은 통상적인 기술에 의해 분리될 수 있다. 화합물은 입체 특이적 합성 또는 분해에 의해 라세미 형태 또는 개별 거울상 이성질체 또는 부분입체 이성질체로서 제조될 수 있다. 화합물은 예를 들어, 광학 활성 염 기와의 염 형성에 의한 입체 이성질체 쌍의 형성, 이어서 분별 결정 및 유리산 재생 같은, 표준 기술에 의해 그들의 성분 거울상 이성질체 또는 부분입체 이성질체로 분리될 수 있다. 화합물은 또한 입체 이성질체 에스테르 또는 아미드의 형성, 이어서 크로마토 그래피 분리 및 키랄 보조제의 제거에 의해 분리될 수 있다. 그 대신에, 화합물은 키랄 HPLC 컬럼을 사용하여 분리될 수 있다. 모든 입체 이성질체, 라세미 혼합물, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체 및 이들의 거울상 이성질체가 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0218] 또한, 화합물에 대한 결정질 형태의 일부는 다 형체로서 존재할 수 있으며, 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다. 또한, 일부 화합물은 물 (즉, 수화물) 또는 통상적인 유기 용매와의 용매화물을 형성할 수 있으며, 이러한 용매화물 또한 본 발명의 범주 내에 포함되는 것으로 의도된다.

#### [0219] 일반적인 투여, 제제, 및 투여량

[0220] 본 화합물은 GPx 조절제이고, 따라서 조현병, 양극성 장애, 정신병적 장애, 및 관련된 다른 장애, 질병, 또는 상태를 포함하지만 이에 제한되지는 않는, GPx 매개 상태의 치료, 예방, 또는 진행의 억제에 유용하다.

[0221] 구체예는 GPx 매개 질병으로 대상을 치료하는 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은 본원에 개시된 화합물을 포함

하는 치료학적 유효량의 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 특히, 상기 구체에는 또한 환자의 조현병, 양극성 장애, 정신병적 장애, 지연성 운동장애, 및 관련 증상 또는 그들의 합병증을 치료하거나 진행을 억제하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 환자에게 치료학적 유효량의 약학 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0222] 구현예는 또한 본원에 개시된 화합물의 프로드러그를 포함한다. 일반적으로, 이러한 프로드러그는 생체내에서 요구되는 화합물로 쉽게 전화될 수 있는 화합물의 기능적 유도체일 것이다. 따라서, 본 발명의 치료 방법에서, "투여하는"이란 용어는 구체적으로 개시된 화합물 또는 구체적으로는 공개되지 않지만 피험자에게 투여된 후에 생체내에서 특정 화합물로 전환되는 화합물로 기재된 다양한 장애를 치료하는 것을 포함한다. 적합한 프로드러그 유도체의 선택 및 제조에 대한 통상적인 절차는 예를 들어, "프로드러그의 디자인", ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985에 기재되어 있다.

[0223] 화합물에 대한 결정질 형태의 일부는 다형체로서 존재할 수 있으며, 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다. 또한, 일부 화합물은 물 (즉, 수화물) 또는 일반적인 유기 용매와의 용매화물을 형성 할 수 있으며, 이러한 용매화물은 일부 구체예에 의해 포함되도록 의도된다.

[0224] 본원에 개시된 바와 같은 화합물의 제조 방법이 입체 이성질체의 혼합물을 발생시키는 경우, 이들 이성질체는 조제용 크로마토그래피와 같은 통상적인 기술에 의해 분리될 수 있다. 화합물은 입체 특이적 합성 또는 분해에 의해 라세미 형태 또는 개별 거울상 이성질체 또는 부분입체 이성질체로서 제조될 수 있다. 화합물은 예를 들어, 광학 활성 염기와의 염 형성에 의한 입체 이성질체 쌍의 형성, 이어서 분별 결정 및 유리산 재생 같은, 표준 기술에 의해 그들의 성분 거울상 이성질체 또는 부분입체 이성질체로 분리될 수 있다. 화합물은 또한 입체 이성질체 에스테르 또는 아마이드의 형성, 이어서 크로마토 그래피 분리 및 키랄 보조제의 제거에 의해 분리될 수 있다. 그 대신에, 화합물은 키랄 HPLC 컬럼을 사용하여 분리될 수 있다. 모든 입체 이성질체, 라세미 혼합물, 부분입체 이성질체, 시스-트랜스 이성질체 및 이들의 거울상 이성질체가 일부 구체예에 의해 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

## [0225] 투여량

[0226] GPx 에 의해 매개되는 장애, 질병, 또는 상태의 치료 기술 분야의 당업자는 하기 제시된 시험 결과 및 다른 정보로부터 유효한 일일 양을 결정할 수 있다. 투여의 정확한 투여량 및 빈도는 당업자에게 널리 알려진 바와 같이, 발명에서 사용되는 특정 화합물, 치료되는 특정 상태, 치료되는 상태의 중증도, 환자의 연령, 체중 및 일반적인 신체 상태뿐만 아니라 환자가 복용하는 다른 약물에 따라 달라질 수 있다. 또한, 상기 유효한 일일 양은 치료된 환자의 반응 및 / 또는 본 발명의 화합물을 처방하는 의사의 평가에 따라 낮추거나 증가시킬 수 있음이 명백하다. 따라서, 본 명세서에서 언급된 유효한 일일 양은 본 발명을 실시하는데 있어서의 가이드라인일 뿐이다.

[0227] 본원에 개시된 임의의 화합물을 사용하여 본원에 기재된 GPx 매개 장애를 치료하는 방법의 경우, 투여량 형태는 약 0.1 mg 내지 약 5000 mg; 특히 약 0.5 mg 내지 약 1000 mg; 및, 더욱 구체적으로, 약 1 mg 내지 약 100 mg 의 화합물을 포함하는 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하고, 선택된 투여 방식에 적합한 임의의 형태로 구성될 수 있다. 그러나, 투여량은 대상의 요구, 치료되는 상태의 중증도 및 사용되는 화합물에 따라 달라질 수 있다. 매일 투여 또는 사후-주기 투여가 사용될 수 있다.

[0228] 본 발명의 약학 조성물은, 약 0.001 mg/kg/일 내지 약 10 mg/kg/일 (특히 약 0.01 mg/kg/일 내지 약 1 mg/kg/일; 및, 더욱 구체적으로, 약 0.1 mg/kg/일 내지 약 0.5 mg/kg/일)의 단위 용량 단위로, 예를 들어, 정제, 캡슐, 분말, 주사제, 좌제, 찻숟가락으로 하나 등을 포함할 것이며, 약 0.001 mg/kg/일 내지 약 30 mg/kg/일 (특히 약 0.01 mg/kg/일 내지 약 2 mg/kg/일, 더욱 구체적으로 약 0.1 mg/kg/일 내지 약 1 mg/kg/일 및 더욱 구체적으로 약 0.5 mg/kg/일 내지 약 1 mg/kg/일)의 여량으로 투여될 수 있다.

[0229] 이들 조성물은 정제, 환제, 캡슐, 제조제 또는 흡입을 위한 건조 파우더, 과립, 마름모꼴 정제, 멸균 비경구 용액 또는 현탁액, 계량된 에어로졸 또는 액체 스프레이, 드롭, 앰플, 경구, 비내, 설하, 안구내, 경피, 비경구, 직장, 질, 건식 파우더 흡입 또는 다른 흡입 또는 통기 수단에 의한 투여를 위한 자동주입 장치 또는 좌제와 같은 단위 투여량 형태를 포함한다. 그 대신에, 조성물은 주 1 회 또는 월 1 회 투여에 적합한 형태로 제공될 수 있으며; 예를 들어, 데카노 에이트 염과 같은 활성 화합물의 불용성 염은 근육 내 주사를 위한 데포 체제를 제공할 수 있다.

[0230] 정제와 같은 고형 약학 조성물을 제조하기 위하여, 주요한 활성 성분은 약학적 담체와 혼합될 수 있고, 예를 들어, 희석제, 결합제, 접착제, 붕괴제, 윤활제, 향균제 및 길단트(gildants)와 같은 통상적인 정제화 성분이 있

다. 적합한 희석제는 전분 (즉, 옥수수, 밀 또는 가수 분해 될 수있는 감자 전분), 락토오스 (과립화, 분무 건조 또는 무수), 수크로스, 수크로스-기반 희석제 (정제 설탕; 수크로스 플러스 약 7 내지 10 중량 퍼센트의 전화당; 수크로스 플러스 약 3 중량 퍼센트 변형된 텍스트린; 수크로스 플러스 전화당, 약 4 중량 퍼센트 전화당, 약 0.1 내지 0.2 중량 퍼센트 옥수수전분 및 마그네슘 스테아레이트), 텍스트로즈, 이노시톨, 만니톨, 소르비톨, 미결정 셀룰로오스 (즉 FMC사에서 구매 가능한 AVICEL™ 미결정 셀룰로오스), 디칼슘 포스페이트, 칼슘 설페이트 디하이드레이트, 칼슘 락테이트 트리하이드레이트 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 적합한 결합제 및 접착제는 아카시아 검, 구아 검, 트라가칸트 검, 수크로스, 젤라틴, 글루코스, 전분, 및 셀룰로오스 (즉, 메틸셀룰로오스, 소듐 카복시메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등), 수용성 또는 분산성 결합제 (즉 알긴산 및 이의 염, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 히드록시에틸셀룰로오스 [즉 Hoechst Celanese로부터 입수 가능한 TYLOSE], 폴리에틸렌 글리콜, 폴리사카라이드 산, 벤토나이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리메타크릴레이트 및 알파전분) 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 붕괴제는 전분 (옥수수, 감자 등), 소듐 전분 글리콜레이트, 알파전분, 점토 (마그네슘 알루미늄 실리케이트), 셀룰로오스 (가교된 소듐 카복시메틸셀룰로오스 및 미결정 셀룰로오스와 같은), 알긴산염, 알파전분 (즉 옥수수 전분 등), 검 (즉 아가, 구아, 로커스트 콩, 카라야, 펙틴, 및 트라가칸트 검), 가교된 폴리비닐피롤리돈 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 적합한 윤활제 및 향균제는 스테아레이트 (마그네슘, 칼슘 및 소듐), 스테아릭 산, 탈크 왁스, 스테아르트, 보론산, 소듐 클로라이드, DL-루신, 카보왁스 4000, 카보왁스 6000, 소듐 올레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 라우릴 설페이트, 마그네슘 라우릴 설페이트 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 적합한 길단트는 탈크, 옥수수전분, 실리카 (즉 Cabot로부터 입수 가능한 CAB-O-SIL™ 실리카, W. R. Grace/Davison로부터 입수 가능한 SYLOID™ 실리카, 및 Degussa로부터 입수 가능한 AEROSIL™ 실리카) 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 경구 투여 형태의 기호성을 개선하기 위해 씹기 쉬운 고체 투여 형태에 감미제 및 향료를 첨가할 수 있다. 추가적으로, 착색제 및 코팅제는 약물의 확인을 용이하게 하거나 미적 목적을 위해 고체 투여 형태에 첨가되거나 적용될 수 있다. 이들 담체는 약학 활성제와 함께 제제화되어, 치료학적 방출 프로파일을 가지는 약학 활성제의 정확하고 적절한 투여량을 제공한다.

[0231] 일반적으로 이러한 담체들은 약학 활성제와 혼합되어 본 발명의 약학 적 활성 형태 또는 그의 약학적으로 허용되는 염의 균질 혼합물을 함유하는 고체 예비형성제 조성물을 형성한다. 일반적으로 예비형성제는 세 가지 통상적인 방법 중 하나에 의해 형성될 것이다: (a) 습식 과립화, (b) 건식 과립화 및 (c) 건식 혼합. 이러한 예비형성제 조성물을 균질한 것으로 언급할 때, 이는 활성 성분이 조성물 전체에 고르게 분산되어 조성물이 정제, 환제 및 캡슐과 같은 유효 투여 형태로 용이하게 세분될 수 있음을 의미한다. 이러한 고체 예비형성제는 본 발명의 활성 성분 약 0.1 mg 내지 약 500 mg을 함유하는 상기 유형의 단위 투여 형태로 세분된다. 신규한 조성물을 함유하는 정제 또는 환제는 또한, 지속 또는 이중-방출 제품을 제공하기 위해 다층 정제 또는 환제로 제제화될 수 있다. 예를 들어, 이중-방출 정제 또는 환제는 내부 투약 및 외부 투약 성분을 포함할 수 있으며, 후자는 전자 투약 성분에 대한 외피의 형태이다. 두 구성 요소는 장층에 의해 분리될 수 있으며, 상기 장 층은 위장에서 붕괴에 저항하고 내부 구성 요소가 그대로 십이지장으로 통과하거나 방출이 지연되는 것을 허용한다. 다양한 물질이 장 층 또는 코팅을 위해 사용될 수 있는데, 이러한 물질은 셀락, 셀룰로오스 아세테이트 (즉, 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트, 셀룰로오스 아세테이트 트리메트리테이트), 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스 프탈레이트, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스 아세테이트 숙시네이트, 메타크릴레이트 및 에틸아크릴레이트 공중합체, 메타크릴레이트 및 메틸메타크릴레이트 공중합체 등과 같은 다수의 중합체 물질을 포함한다. 서방형 정제는 또한 용액 (습식 과립제가 결합제로서 작용함) 또는 용융된 저 융점 고체에 약간 용해되거나 불용성인 물질을 사용하여 필름 코팅 또는 습식 과립화에 의해 제조될 수 있다(습식 과립제가 활성 성분을 함유할 수 있음). 이러한 물질들은 천연 및 합성 폴리머 왁스, 경화유, 지방산 및 알콜 (즉, 밀랍, 카르 나우 바 왁스, 세틸 알콜, 세틸스테아릴 알콜 등), 지방산 금속 비누의 에스테르 및 과립 화, 코팅, 포착에 사용될 수 있거나 활성 성분의 용해도를 제한하여 연장된 또는 서방형 생성물을 달성할 수 있는 기타 허용 가능한 물질을 포함한다.

[0232] 본원에 개시된 신규한 조성물이 경구 또는 주사에 의해 투여하기 위해 배합 될 수있는 액체 형태는 수용액, 적절하게 향미된 시럽, 수성 또는 오일 현탁액 및 참기름, 코코넛 오일 또는 땅콩 오일과 같은 식용 오일뿐만 아니라 엘릭시르제 및 이와 유사한 약학적 수단을 함유한 향미 에멀전을 포함한다. 수성 현탁액을 위한 적합한 현탁제에는, 아카시아, 아가, 알기네이트 (즉 프로피렌 알기네이트, 소듐 알기네이트 등), 구아, 카라야, 로커스트 콩, 펙틴, 트라가칸트, 및 잔탄 검과 같은 합성 또는 천연 검, 소듐 카복시메틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 히드록시프로필 셀룰로오스 및 히드록시프로필 메틸셀룰로오스, 및 그들의 조합과 같은 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 카보머 (즉 카복시폴리메틸렌), 및 폴리에틸렌 글

리콜과 같은 합성 폴리머; 벤토나이트, 헥토라이트, 아타폴자이트 또는 세피올라이트와 같은 점토; 및 다른 약학적으로 허용가능한 현탁제를 포함한다. 적합한 계면 활성제는 소듐 도큐세이트, 소듐 라우릴 설페이트, 폴리소르베이트, 옥톡시놀-9, 노녹시놀-10, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 80, 폴리옥사머 188, 폴리옥사머 235 및 그들의 조합을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 적합한 해고 또는 분산제는 약학적 등급의 레시틴을 포함한다. 적합한 응집제는 단순 중성 전해질 (즉, 소듐 클로라이드, 포타슘, 클로라이드 등), 고도로 대전된 불용성 중합체 및 고분자 전해질 중, 수용성 2가 또는 3가 이온 (즉, 칼슘 염, 명반 또는 황산염, 구연산염 및 인산염 (pH 완충제 및 응집제와 같은 제형에서 공동으로 사용될 수 있음)을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 방부제는 파라벤 (즉, 메틸, 에틸, n-프로필 및 n-부틸), 소르브 산, 티메로살, 4차 암모늄 염, 벤질 알콜, 벤조 산, 클로르헥시딘 글루코네이트, 페닐에탄올 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 액체 약학적 투여 형태에 사용될 수 있는 많은 액체 비히클이 있지만, 특정 투여 형태로 사용되는 액체 비히클은 현탁제 (들)와 상용성이 있어야 한다. 예를 들어, 지방 에스테르 및 오일 액체 비히클과 같은 비극성 액체 비히클은 저 HLB (Hydrophile-Lipophile Balance) 계면활성제, 스테아르알코늄 헥토라이트, 수 불용성 수지, 수 불용성 필름 형성 폴리머 등과 같은 현탁제와 함께 가장 잘 사용된다. 반대로, 물, 알콜, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 극성 액체는 보다 높은 HLB 계면활성제, 점토 실리케이트, 검, 수용성 셀룰로오스, 수용성 폴리머 등과 같은 현탁제와 함께 가장 잘 사용된다. 비경구 투여를 위해, 멸균 현탁액 및 용액이 바람직하다. 비경구 투여에 유용한 액체 형태는 멸균 용액, 에멀전 및 현탁액을 포함한다. 정맥 내 투여가 바람직한 경우 적절한 방부제를 함유하는 등장 제제가 사용된다.

[0233] 또한, 본원에 개시된 화합물은 적합한 비내 비히클의 국소 사용 또는 경피 피부 패치를 통해 비내 투여 형태로 투여될 수 있으며, 그 조성물은 당업자에게 잘 알려져 있다. 경피 전달 시스템의 형태로 투여되기 위해, 치료학적 용량의 투여는 물론, 투여 요법 전체에 걸쳐 간헐적이기보다는, 연속적일 것이다.

[0234] 본원에 개시된 화합물은 또한 작은 단일층 소포, 큰 단일층 소포, 다중층 소포 등과 같은 리포솜 전달 시스템의 형태로 투여될 수 있다. 리포솜은 콜레스테롤, 스테아릴아민, 포스파티딜콜린 등과 같은 다양한 인지질로부터 형성될 수 있다.

[0235] 본원에 개시된 약학 조성물의 1일 투여량은 약 0.1 mg 내지 약 5000 mg의 광범위한 범위로 다양할 수 있고; 바람직하게는, 투여량은 평균 인간에 대해 하루에 약 1 mg 내지 약 100 mg 범위일 것이다. 경구 투여의 경우, 조성물은 바람직하게, 활성 성분 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 150, 200, 250 또는 500 밀리그램의 치료될 피험자에 대한 투여량의 증상 조절을 위한 활성 성분을 함유하는 정제 형태로 제공된다. 유리하게는, 본 발명의 화합물은 단일 일일 투여량으로 투여될 수 있고, 또는 총 1 일 투여량은 1일 2회, 3회 또는 4회로 나누어 투여될 수 있다.

[0236] 본원에 개시된 활성 화합물 또는 이의 약학 조성물의 치료학적 유효 투여량은 목적하는 효과에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 투여될 최적 용량은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있으며, 사용된 특정 화합물, 투여 방식, 제제의 강도 및 질병 상태의 진행에 따라 달라질 수 있다. 또한, 대상 연령, 체중, 식이 및 투여 시간을 포함하여 치료되는 특정 대상과 관련된 인자는 적절한 치료 수준으로 투여량을 조정할 필요성을 초래할 것이다. 상기 투여량은 평균적인 경우의 예시이다. 물론, 더 높거나 낮은 투여량 범위가 유리한 개별적인 경우가 있을 수 있으며, 이는 본 발명의 범위 내에 있다.

[0237] 본원에 개시된 화합물은 GPx 조절제로서 본원에 개시된 화합물의 용도가 이를 필요로 하는 대상에게 필요할 때마다, 전술한 조성물 및 투여 요법 중 어느 것에서 또는 당 업계에 확립된 조성물 및 투여 요법에 따라 투여될 수 있다.

## [0238] 제제

[0239] 본원에 개시된 약학 조성물을 제조하기 위하여, 활성 성분으로서 본원에 개시된 하나 이상의 화합물 또는 이의 염은, 통상적인 약학적 배합 기술에 따라 약학적 담체와 밀접하게 혼합되며, 이 담체는 투여(예를 들어, 경구 또는 비경구)를 위해 필요한 제제의 형태에 따라 매우 다양한 형태를 가질 수 있다. 적합한 약학적으로 허용 가능한 담체는 당업계에 널리 알려져 있다. 이러한 약학적으로 허용 가능한 담체의 일부에 대한 설명은 미국 약학회 및 영국 약학 학회가 발행한 약학 부형제 지침서(The Handbook of Pharmaceutical Excipients)에서 찾을 수 있다.

[0240] 본 발명의 화합물은 투여 목적을 위해 다양한 약학적 형태로 제제화될 수 있다. 약학 조성물 제제화 방법은 많은 공보에 기재되어 있다. 예: 약학적 투여 형태: 정제, 두번째 에디션, 개정 및 확장, 제 1-3권, Lieberman 등

이 편집; 약학적 투여 형태: 비경구 의약품, 제 1-2권, Avis 등이 편집; 및 약학적 투여 형태: 분산 시스템, 제 1-2권, Lieberman 등이 편집; Marcel Dekker, Inc가 출판

[0241] 하기 실시예를 위해 캡슐 형태의 엡셀렌 제제를 준비하여 엡셀렌을 GPx 조절제로서 조사하였고, 여기서 조현병 (SZ) 환자에서 조절되지 않는 효소인 GPx는 신규한 치료학적 SZ 표적이다. 엡셀렌은 해독 반응에서 소모되지 않고 촉매제로 작용하는 유일한 활성 성분이다. 제제는 HPLC 로 측정하였을 때 >99% 순도를 나타낸다. 캡슐은 블리스터 팩으로 밀폐되어 있다. 각 캡슐에는 고유한 구조 안정성으로 인해 독성이 적은 200mg의 엡셀렌이 들어 있다. 그의 셀레늄 (Se) 잔기는 생체내변화 동안 유리되지 않으며, 따라서 셀레늄 대사에 들어가지 않는다. 제조 과정 중에 해방된 셀레늄이 남아 있을 가능성이 있다. 제조 기준은 각 캡슐이 1 마이크로그램 이하의 무기 셀레늄을 포함하는 것이다. 인체에서, 셀레늄 독성, 또는 셀레노시스에 대량의 셀레늄을 만성적으로 섭취한 후에 발생할 수 있다. 성인을 위한 셀레늄의 권장 일일 허용치 (RDA)는 하루에 55 마이크로그램이다. 투여량은 총 셀레늄 노출이 연구 중에 모니터링되는 RDA보다 현저하게 적어지도록 조정된다.

#### [0242] 사용 방법

[0243] 또한, 산화 스트레스, 조현병, 양극성 장애 및 다른 정신병적 장애를 포함하나 이에 제한되지 않는 GPx 매개 장애를 나타내는 동물 모델을 분석/진단하는 것과 관련된 신생아 복부 해마 병변 (NVHL) 래트 및 방법을 사용하는 방법이 본원에 개시된다. 본원에 개시된 이들 방법의 용도는 연구 응용, 치료학적 목적, 의학 진단 및 / 또는 하나 이상의 환자 또는 대상을 계층화하는 것을 포함할 수 있다. 매개 장애의 예방 또는 치료에 유용한 조성물을 식별하는 방법을 개시된다.

[0244] 이들 방법의 일부 구체예는 본원에 개시된 바와 같은 작용의 엡셀렌 메커니즘 및 조현병 환자에서의 바이오마커 참여의 초기 단계 평가를 강조한다. 일 구체예는 GSH의 확증적 뇌 자기 공명 분광학 및 GSH의 다른 말초 혈액 바이오마커를, 예를 들어 임상 시험에서 주요 결과로 사용한다.

#### [0245] 산화 스트레스, 조현병 다른 정신병 치료 방법

[0246] 유아기(juvenile) NVHL 래트의 PFC에서 **산화 스트레스** 번역표지 레벨 증가는 PV 세포 수의 감소, PPI 결핍, 국소 PFC 회로의 변화된 도파민 조절 및 성인 NVHL 쥐의 EEG에서 유발된-관련 전위의 결핍과 함께 관찰되었다. 이러한 모든 결핍은 P5 에서 P50까지 *N-아세틸 시스테인* (NAC) 치료로 예방되었다. PPI 결핍은 또한 NAC 치료가 청소년기(adolescent) (P35)가 시작되고, 두개의 다른 산화 환원 조절제 (**엡셀렌**, **아포시닌**)에 의한 경우 예방되었다. 데이터는 전전두엽 피질의 산화 스트레스가 NVHL에 의해 유도된 변화를 중재하는 핵심 특징이며, 항산화제 치료가 이러한 변화를 막음을 보여준다. PVI에 많이 존재하고 또한 피라미드형 뉴런에서 관찰되는, 증상발현 전 산화 스트레스는, 따라서 산화 환원 경로의 직접적인 조작을 수반하지 않는 신경발달 모델에서의 다양한 조현병-관련 현상의 원인이다.

[0247] 산화 스트레스는 여러 메커니즘을 통해 PFC 기능에 영향을 미칠 수 있다. 높은 수준의 산화 스트레스로 인해, 막 지질 과산화, DNA 돌연변이 유발, 염색질 구조의 변화, 중요한 효소의 비활성화, 또는 키나아제 및 카스파제 캐스케이드의 활성화를 통해 세포 손상 또는 사멸이 일어날 수 있다(비타니히루위 및 우, 2011). 산화 환원 불균형은 전사 인자 DNA-결합 부위에서 산화 환원-민감한 시스테인 잔기에 영향을 미치고(하다드, 2002), 산화에 매우 민감한 미토콘드리아 DNA에 영향을 줌으로써(존스 및 고, 2010) 뇌 발달 장애를 일으킬 수 있다.

[0248] 또한, 많은 시냅스 단백질은 조절 산화 환원 사이트를 포함한다; 예를 들어, NMDA 수용체는 산화 후에 기능 저하가 된다(Steullet 등, 2006). 전기생리학적 및 행동 결핍의 발병 전에 NVHL 를 가진 유아기(juvenile) 래트의 PFC 피라미드형 뉴런 및 PVI에서 산화 스트레스 및 질화 스트레스가 검출되었다. 이는 PVI가 여전히 기능적일 수 있으며, 청소년기(adolescent)(periadolescent) 내 성숙시에 산화 스트레스의 유해한 효과가 PV 및 PNN 표지의 감소로 나타나는 질병 상태로 되게 한다는 것을 나타낸다. 우리의 데이터는 NVHL 모델에서의 산화 환원 변화가 산화성 및 질화 스트레스 모두를 포함하고, GHS (NAC 및 엡셀렌)을 증가시키거나 활성 산소 (ROS) 생성 (아포시닌)을 감소시키는 치료가 성인-발병 행동 결핍을 예방한다는 것을 나타낸다. 따라서, NVHL 모델은 GSH 및 NADPH 산화효소와 같은, 상이한 조절제를 표적으로 하여 역전될 수 있는 산화 환원 경로의 광범위한 변화를 나타낸다.

[0249] 산화 스트레스는 조현병의 또다른 동물 모델에서도 나타난다: 우성 음성 DISC1 (DN-DISC1) 생쥐 (Johnson 등, 2013). DN-DISC1 생쥐는 여러가지 행동 결핍과 관련된 PFC에서 8-옥소-dG 염색을 증가시켰다. 이 데이터는 항산화제 NAC NVHL가 NVHL 래트의 산화 스트레스 및 전기생리학적 및 행동 결핍을 예방하므로, 조현병과 관련된 PFC 내의 산화 스트레스 증가와 전기생리학적 및 행동 결핍의 인과 관계를 나타낸다.

- [0250] PFC 생리학은 성인 NVHL 래트에서 기능 장애였고, 이러한 결핍은 NAC 치료에 의해 예방되었다. 슬라이스에서 피라미드형 뉴런의 시냅스 반응의 도파민 조절, VTA 자극에 대한 생체내 세포내 기록, 및 청각 유발 전위를 포함하여, PFC 기능을 측정하기 위하여 여러 종말점을 사용하였다. 피라미드형 뉴런의 기록은 성인 NVHL 래트에서 생체내 VTA 자극에 의해 유발된, 슬라이스에서 대뇌-피질의 EPSPs의 D2-매개성 감쇠의 손실 및 과장된 활성을 나타내었고, O'Donnell 등, 2002; Tseng 등, 2008에서도 보고되었다. VTA 자극에 의한 피라미드형 세포 시냅스 반응의 슬라이스 D2 감쇠 및 피라미드형 뉴런의 생체내 침묵은 나이브 래트에서 도파민에 의한 FSI의 활성화에 의존한다(Tseng 및 O'Donnell, 2007). NAC-치료된 NVHL 래트에서 이러한 반응의 변화가 없다는 것은 출생 후의 발달 동안의 산화 스트레스가 도파민-조절된 FSI-피라미드형 세포 상호작용에 해로운 영향을 미친다는 것을 나타낸다. 이러한 상호작용은 PFC에서 적절한 흥분-억제 균형 및 정보 처리에 중요하다. 현재, 조현병에서 중간뉴런 또는 피라미드형 뉴런이 기능 장애의 일차 작용점인지 여부에 대한 논쟁이 있다. 우리의 데이터는 세포 유형이 일차적으로 영향을 받는지에 대해 불가론적이며, 피라미드형 뉴런 및 억제된 중간뉴런 사이의 변화된 상호작용의 원인으로 산화 스트레스를 강조한다.
- [0251] 부정합 음성도는 높은 번역 관련성의 척도이다. MMN은 현저한 청각 자극에 대한 돌출성의 속성을 시험하고, 이는 조현병 환자에서 방해를 받는다 (Javitt 등, 1993). MMN은 NMDA 수용체 활동에 의존적이므로 (Ehrlichman 등, 2009), 산화 스트레스가 현저한 대. 일반적인 신호 처리에 관여하는 NMDA-의존 시냅스 피질의 메커니즘을 손상시킬 수 있다.
- [0252] NVHL 래트에서 MMN 결핍이 관찰되었고, 이는 NAC 치료로 예방될 수 있었다. 항산화제 치료의 영향에 대한 기능 평가는 PPI와의 감각운동 집적화의 시험으로 보완되었다. 유아기(juvenile) 및 청소년기(adolescent)-전용 NAC 치료 모두 NVHL 래트에서 성인 PPI 결핍을 예방하였다. NAC 또는 엡셀렌을 사용한 청소년기(adolescent) 치료가 PPI 결핍을 예방하기에 충분하다는 관찰은 조현병 치료의 잠재적 표적으로서의 산화 환원 메커니즘에 중요한 영향을 미친다. 산화 스트레스가 발병한 후에 항산화제 치료가 시작되더라도 결핍이 예방될 수 있다. 청소년기(adolescent)까지 조현병이 걸릴 위험이 매우-높은 대상은 식별할 수 없으므로, 산화 환원 조절은 고 위험군이 확인된 후라도 도움이 될 수 있다.
- [0253] 증상발현전 산화 스트레스는 NVHL 래트에서 비정상적인 성인 PFC 기능을 일으키는 것으로 나타났다. 이러한 발달 조작은 변형된 피질의 흥분-억제 균형의 잘-확립된 모델이다. 모델이 조현병에서 관찰되지 않는 병변을 수반하지만, NVHL 및 다른 발달 모델은 질병과 관련된 전기생리학적 및 행동 현상의 발달 궤적에 대한 특정 가설을 테스트하는데 유용하다(O'Donnell, 2013). NVHL 모델의 주요 강점은 결핍의 청소년기(adolescent) 발병 및 번역 가능한 측정이 평가될 때 조현병에서 관찰되는 현상을 재현하는 능력을 포함한다. (O'Donnell, 2012a). 놀랍게도, NVHL 모델은 PVI 면역표지의 소실과 흥분-억제 균형의 변화를 일으키는 조현병의 동물 모델로 여겨지는 몇 가지 다른 조작으로 수렴한다(O'Donnell, 2011).
- [0254] 그들의 제한에도 불구하고, 개시된 실험에서 사용된 행동 및 생리학적 종말점은 피질의 억제 네트워크의 무결성 및 피라미드형 세포 활성화에 대한 그들의 영향을 평가하는데 널리 사용된다. 병변 및 그 이후에 발생하는 억제 네트워크는, 청소년기(adolescent)까지 확장된 신경 네트워크의 경험-의존적인 정교화에서 중요한 역할을 한다. 이러한 역할은 성인 NVHL 래트에서 인지 손상을 예방하는 청소년기(adolescent) 동안의 인지 훈련(Lee 등, 2012) 및 모성 면역 활성화가 있는 생쥐에서 잠재적인 신경 병리학을 풀어내는 청소년기(adolescent) 스트레스에 반영될 수 있다(Giovanoli 등, 2013). 청소년기(adolescent)는 산화 스트레스를 포함한 병리생리학적 상태가 여전히 발달 중인 PFC에 영향을 줄 수 있는 중요한 발달 단계이나, 치료학적 개입의 기회의 창을 제공한다. 이는 심각한 부작용이 없는 항산화제 또는 산화 환원 조절제가 피질의 PVI 기능 상실로 인한 병리생리학적 변화를 막음으로써 정신 질환의 위험이 있는 대상의 전환을 감소시키는데 효과적일 수 있음을 시사한다.
- [0255] <실시예>
- [0256] 하기는 본 발명을 수행하기 위한 특정 구체예이다. 실시예들은 단지 예시적인 목적으로 제공되며, 본 발명의 범위를 어떤 식으로든 제한하려는 것은 아니다. 사용된 수 (예를 들어, 양, 온도 등)에 대한 정확성을 보장하기 위한 노력이 이루어졌지만, 약간의 실험 오차 및 편차가 허용되어야 한다.
- [0257] 본 발명의 실시는 달리 기술되지 않는 한, 당해 분야의 기술 내에서 단백질 화학, 생화학, 재조합 DNA 기술 및 약리학의 통상적인 방법을 사용할 것이다. 이러한 기술은 문헌에서 충분히 설명되어 있다. 예를 들어, T.E. Creighton, 단백질:구조 및 분자 특성 (W.H. Freeman 및 Company, 1993); A.L. Lehninger, 생화학 (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, 등, 분자 복제: 실험실 설명서 (2번째 에디션, 1989); 효소학의 방법 (S. Colowick 및 N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); 레밍턴의 약학 과학, 18번째 에디션

(Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey 및 Sundberg *고급 유기 화학 3번째 에디션* (Plenum Press) A 및 B편(1992).

[0258] **실시예 1: 뇌 GSH, 말초 GSH 및 지질 과산화 마커**

[0259] 이 실시예는 엽셀렌 단독으로 또는 다른 정신병약과 조합하여 치료된 환자에 대한 생리학적 효과를 설명한다. 전임상 연구에서 엽셀렌의 주요 결과 중 하나는, 이전에 조현병 (SZ) 환자에 대해 감소된 것으로 나타났던 뉴런의 GSH 수치의 상승을 보여주었다(Do 등, 2000; Wood 등 2009). 자기 공명 분광학 (MRS) 은 엽셀렌에 의한 뇌 대상 참여 도중 GSH를 모니터링하도록 개선되었다. 자기 공명 스캐너를 사용하여 효과 크기를 평가하기 위해, 매우 짧은 반향 시간 1H-MRS 시퀀스를 사용하여 조현병 환자 11 명과 정상 대조 환자 11 명에서 GSH 수치를 평가하였다. 2A 및 2B에 도시된 바와 같이 전방 대뇌 피질 (ACC)의 GSH는 정상 대조 환자와 비교하여 SZ 환자에서 감소하였다. (평균 $\pm$ sd = 2.4 $\pm$ 0.3 대. 2.6 $\pm$ 0.4, F=2.0, p=0.17; d=0.65). 이 방법을 사용하여 스펙트라 정량화는 크래머-라오(Cramer-Rao) 하한 (CRLB)이 10 미만인 GSH 및 다른 구성 요소에 대해 우수한 적합성을 산출했다.

[0260] 분광학 복셀에 대한 MRS GSH 시험-재시험 재현성을 5의 참가자에서 1주 간격으로 평가하였다. 재현성은 유목내 상관 ICC=0.967로 우수했다(CV 범위: 1.0-2.3; GSH=1.0; 퍼센트 차이 범위: 1.5-4.2%; GSH=1.5%). GSH를 정량화하는 정확성을 결정하기 위해, GSH (0 mM, 1.0 mM, 2.5 mM, 5 mM 및 10 mM)의 농도가 증가하는 5 개의 팬텀이 제작되었다. GSH와 다른 대사 물질을 분리하는 특이성을 테스트하기 위해 각 팬텀은 myo-이노시톨, 크레아틴, 글루코스, 글루타메이트, 글루타민 및  $\gamma$ -아미노부티르산과 혼합되었다. 선형 회귀를 계산하여 표준 곡선에 대한 적합성을 결정하였으며, 이는 글루타틴은 농도를 검출하는데 우수한 정밀도 및 정확성을 나타내었으며, 여기에서 LC 모델에 의해 정량화된 팬텀 GSH 농도는  $r^2 = 0.994$ 에서 알려진 GSH 농도에 상응한다(Wijtenburg 등, 2013). 거대분자 배경을 다루기 위해, 각 참가자의 스펙트럼 피팅에 사용되는 각 참가자에 대해 무효화된 대사 물질(즉, 거대분자 스펙트럼)이 획득된다. 위약과의 그룹 비교 외에, 엽셀렌에 의한 용량-의존적 및 혈장 수치-의존적 뇌 GSH 변화를 테스트할 수 있다.

[0261] 말초 GSH, GSSG 및 GPx는 엽셀렌이 산화 환원 경로에 관여하는 메커니즘을 모니터링하는 다른 방법을 제공한다. 혈액 대 뇌 조직 GSH / GSSG / GPx의 직접적인 비교는 이루어지지 않았지만, 말초 글루타틴은 투여는 뇌 GSH 수치를 증가시킨다(Nehru 등, 2007). 엽셀렌 효과는 GSH 또는 GSSG 및 GPx 변화를 통해 전송될 수 있다. 엽셀렌이 지질 과산화를 줄임으로써 그 효과를 발휘하는지를 조사하기 위해, 막 인지질의 과산화에 의해 형성된 지질 과산화의 지표인 이소프로스탄을 측정할 수 있다. 일부 백질 질병 (Miller 등, 2011) 및 SZ 환자 (Dietrich-Muszalska 등, 2009)에서 소변의 이소프로스탄이 증가한다. 이소프로스탄을 사용하여 엽셀렌에 의한 지질 과산화 감소에 대한 잠재적인 효과를 평가할 수 있다.

[0262] **실시예 2: 전기생리학 바이오마커 부정합 음성도 및 감마 진동**

[0263] 이 실시예는 산화 환원 조절 부위에 포함된 산화 환원-민감 단백질인 N-메틸-D-아스파라테이트 수용체에 대한 부정합 음성도 (MMN)를 기술한다 (Do 등, 2009, Gonzalez-Burgos 등, 2012, Choi 등, 2012, Kohr, 등, 1994, Nakazawa, 등, 2012). 엽셀렌은 이 산화 환원 조절 부위를 조절하고 뉴런 생존능력을 증가시킨다. (Herin, 등, 2001). 조현병 (SZ)은 부정합 음성도에 의해 색인된 것으로 생각되는, N-메틸-D-아스파라테이트 수용체 기능 장애와 관련이 있다(Javitt, 등, 1993, Javitt, 등, 1998, Javitt, 등, 1996). N-아세틸시스테인의 투여는 SZ에서 부정합 음성도를 향상시켰다(Berk, 등, 2008, Lavoie, 등, 2008). MMN 및 말초 GSH는 도 3에 나타난 바와 같이 대조군에서 뚜렷한 상관 관계가 있었다. 도 3A-3C에 도시된 바와 같이 MMN 및 GSH 모두가 SZ에서 감소되기 때문에, 상관 관계는 조절 불능 관계로 인해 SZ에서 그럴듯하게는 뚜렷하지 않았다. MMN은 엽셀렌 효과가 존재한다면, NMDAR-관련 메커니즘을 통해 매개되는지 여부를 테스트하기 위한 바이오마커 역할을 할 수 있다.

[0264] 감마 진동 신경 진동: 감마 진동 생성을 위한 핵심 세포인 파브알부민 (PV) 중간뉴런은(Carlen, 등, 2012), 산화 스트레스에 민감한 또다른 세포 성분이다 (Do, 등, 2009, Gonzalez-Burgos 등, 2012, Choi 등, 2012, Kohr, 등, 1994, Nakazawa, 등, 2012). 감마 밴드 및 PV-개재뉴런 비정상은 SZ에서 자주 보고된다(Spencer, 등, 2004, Light, 등, 2006, Cho, 등, 2006, Uhlhaas, 등, 2010, Hong, 등, 2004). GPx 돌연변이 생쥐는 PV-양성 중간뉴런에서 특이한 감소를 보였다(Wirth, 2010). GSH가 낮은 동물은 손상된 PV 개재뉴런 기능으로 인해 베타 및 감마 진동 결핍이 현저하게 나타났다(Steullet, 등, 2010). 21-40 및 41-85 Hz 에서 감마 밴드는 정상 대조군과 비교하여 SZ에서 감소하였고(모든 p<0.001), GSH (r=0.40-0.59, p=0.042-0.001)와 상관 관계가 있다. 다변수 중재 모델링은 20-40 Hz에서의 감마 반응이 도 4에 예시된 바와 같이 UPSA-2에 의해 측정된 기능 용량에 대한 GSH 효과에 대한 중요한 중개자임을 보여 주었다(Ballesteros, 등, 2013b). 감마 진동은 엽셀렌이 PV 개재

뉴런 기능을 향상시키고, 이것이 존재한다면, 임상 결과를 향상시키는지 여부를 표시하는 대체 바이오마커로 사용할 수 있다.

[0265] 진단 방법의 일부 구체에는 엽셀렌에 의한 표적 참여를 색인화하는 바이오마커를 확인하는 것을 목표로 하고, 나중의 시험을 위한 바이오마커 선택에 대한 경험적 증거를 제공한다; 또는 중요하지 않은 시험의 경우, 표적 참여가 실패했을 수 있음을 나타낸다.

[0266] **실시예 3: 글루타티온 퍼옥시다제 (GPx) 미믹 - 작용 메커니즘**

[0267] 엽셀렌은 GPx의 작은 분자 미믹이고, 인체에서 유사한 퍼옥시다아제 기능을 갖는 8 개의 아이소자임을 수반한다. 대부분의 GPx 아이소자임은 활성 산소 / 질소 종 (ROS / RNS)을 자유 라디칼의 셀레늄 (Se) 잔기에 결합시킴으로써 감소시킨다. GSH와 반응하여, GPx는 과산화수소( $H_2O_2$ ), 퍼옥시니트라이트 ( $ONOO^-$ ), 두개의 자유 라디칼에 의해 형성되는 RNS 라디칼, 슈퍼 옥사이드 양이온 및 산화 질소 (도 5B, Noguchi, 등, 1992, Daiber, 등, 2000), 및 산화 환원-비활성 알코올로의 지질 하이드로퍼옥사이드 (LOOH) (도. 5C, Sies, 1994)를 감소시켜 자유 라디칼 독성을 제한함으로써 세포 보호 효과가 있다(도 5A, Wendel, 등, 1984, Reiter, 등, 1984, Muller, 등, 1984). 엽셀렌은 또한 도 5D에 나타난 바와 같이 테오레독신(Trx)의 기질이다(Zhao, 등, 2002). 그러나, GPx 효소 자체의 투여는 그 크기가 크고 불안정하기 때문에 실용적이지 못하다.

[0268] 도 5에 도시된 바와 같이, GPx 미믹 엽셀렌은 GSH→GSSG→GSH 의 산화 환원 사이클을 향상시켜, GSH를 재활용한다. 이 촉매 메커니즘은 NAC의 메커니즘과는 다르다. NAC는 항산화제 역할을 하는 설프하이드릴 그룹을 가진 시스테인을 함유한다. 그러나, NAC는 엽셀렌만큼 효율적으로 GSH 수치를 유지하지 않으며, GSH 재활용에 도움이 되는 GPx 활동을 유도하지 않는다. NAC 는 아미노 산: 시스테인을 공급한다. 다른 아미노 산과 마찬가지로, 시스테인은 다양한 기능을 한다. 분명히, NAC 및/또는 엽셀렌이 SZ를 위한 더 나은 선택인지 여부를 지지하거나 반박하는 데 더 많은 작업이 필요하다. 이에 반해, 엽셀렌은 잘-정의된 행동 메커니즘을 가지고 있다.

[0269] 동물 실험은 도 6에 도시된 바와 같이 엽셀렌이 GSH를 증가시키고 신경 독성 메커니즘에 의해 고갈된 GSH를 보충한다는 것을 일관되게 보여준다. 이 향상된 GPx 활성은 또한 산화 스트레스가 증가하는 질병에서 내생적으로 생성된 GSH를 보전할 수 있고(Do, 등, 2009, Kano, 등, 2013), GSH 합성은 감소하며 (Gysin, 등, 2007), 결과적으로 GSH의 가용성이 향상된다. 엽셀렌의 GSH에 대한 효과적인 효과는 엽셀렌으로 치료하면 뉴런, 정상 세포 및 기타 세포 유형에서 용량-의존적으로 GSH 수치를 증가시킨다는 것을 지속적으로 보여주는 여러 사전-임상 연구에서 증명된다.

[0270] 도 6은 또한 엽셀렌에 의한 GSH의 용량-의존적 상승이 뉴런의 기저 상태와 스트레스 상태 모두에서 관찰되었음을 보여준다(Pawlas, 등, 2007). 증가된 글루타메이트 신경 독성 및 GSH를 고갈시킬 수 있다; 엽셀렌 자체는 GSH를 증가시켰고, 글루타메이트와 엽셀렌을 결합시키면 글루타메이트에 의한 GSH 고갈이 중화되었다(Satoh, 등, 2004). 제안된 산화 환원 메카니즘 (도 5)을 지원함으로써, GSH 소모가 감소되고 이용가능한 GSH가 재활용되고 증가된다(Pawlas, 등, 2007). 따라서, GPx 활성 및 GSH 수치가 모두 결핍 상태인 경우, 대부분의 SZ 샘플에서와 마찬가지로, 엽셀렌은 손상된 GPx/GSH 시스템으로 인해 GPx 매개 장애를 치료할 수 있다.

[0271] **실시예 4: 엽셀렌의 약물 대사 및 약물동태학**

[0272] 엽셀렌은 우수한 경구 유용성을 가지고 있다. (Fisher 등, 1988). 뇌 수치는 혈장 수치의 약 20% 이다 (Imai, 등, 2001, Ullrich, 등, 1996). 그 신경보호 효과는 혈장 수치 10  $\mu$ M에서 관찰된다(Zhao, 등, 2002). Ph-1 연구는 위약-대조, 무작위, 단일 오름차순 투여 설계로 32 명의 인간에서 실시되었다. 엽셀렌은 제제에서 200 mg 내지 1600 mg 범위였다. (1) 약물동태학: 엽셀렌과 그 3 가지 대사 산물의 PK 매개 변수가 발표되었다(Lynch, 등, 2009). 간단히 말하면, 평균 엽셀렌  $C_{max}$  는 30.3 ng/mL 내지 83.4 ng/mL의 범위였고; 평균  $AUC_{0-t}$  은 117.4 ng\*hr/mL 내지 880.6 ng\*hr/mL의 범위였으며; 중앙값  $T_{max}$  는 1.5 내지 2.3 시간 범위였고; 평균  $t_{1/2}$  는 6.4-16.7 시간 범위였다. 2-글루쿠로닐 셀레노벤즈아닐리드가 우세한 대사 산물이었다. (2) 안정성: 심각한 유해 사례 (AEs) 또는 AE로 인한 중단이 없었다. 모든 AE는 경증 또는 중등도이며 후유증 없이 해결되었다. 모든 임상 실험실 및 심전도 조건에서 치료- 또는 투여량-관련 추세는 관찰되지 않았다. 요약된 부작용은 Lynch, 등, 2009년에 발표되었다. 엽셀렌 캡슐은 최대 1600 mg의 단일 경구 투여량으로 건강한 남성과 여성에 안전하고 잘 견디는 것으로 나타났다.

[0273] Sprague-Dawley 쥐, Sinclair 사의 소형 돼지 및 Cynomolgus 원숭이에서 7 건의 급성 및 반복 투여 독성 시험 및 3 가지 유전 독성 연구를 수행 하였다. 2000 mg / kg까지의 급성 투여는 이들 종에서 급성 또는 지연된 독성

의 증거와 관련이 없었다. Cynomolgus 원숭이에서 반복 투약 28-일 연구는 NOAEL (no-observable-effect-level)을 2000 mg / kg으로 설정했다; 미니 돼지에서 2000 mg / kg 이상이었고 NOAEL은 래트에 대해서는 확인되지 않았다. 만성 독성 연구에서 26 주와 52 주 동안 엠셀렌을 투여 한 결과, 엠셀렌의 무-독성 영향 수준은 래트의 경우 31.6 mg / kg, 미니 돼지의 경우 178 mg / kg이었다.

#### [0274] 실시예 5: 정신병/조현병의 래트 모델에서의 N-아세틸 시스테인 치료

[0275] 이 실시예는 엠셀렌 치료를 통한 선행자극 억제(Prepulse inhibition)의 역전을 기술한다. 조현병 연구에서 가장 반복된 결과 중 하나는 피질 억제 중간뉴런과 관련된 마커의 감소이다(Lewis 등, 2012). 성인 신생아 복부 해마 병변 (NVHL) 래트는 도파민에 의한 비정상적인 조절을 특징으로 하는 피질의 개재뉴런 성숙에 의한 전기생리학적 이상을 나타낸다(Tseng 등, 2008). 등의 변연전 및 전방 대뇌 피질 (ACC)을 포함하여, PFC 에서 파브알부민 (PV) 양성 중간뉴런이, 편향된 입체 측정 기술을 사용하여 NVHL 래트에서 변경되는지 여부를 평가했다. Between 출생 후의 날 (P) 21 과 P61 사이에, PV 면역 반응성 중간뉴런 (PVI)의 수는 삼-수술된 래트에서는 증가하였으나, 도 7A 및 1B에 도시된 바와 같이 NVHL 래트에서는 증가하지 않았다. 유아기(juvenile) 쥐 (P21)에서는, NVHL과 삼 래트의 PVI 수치에 뚜렷한 차이가 없었으나, 성인 (P61) NVHL 래트는 삼 래트와 비교하여 전전두엽 피질 (PFC)의 PVI가 뚜렷하게 적었다. PVI 감소는 P5 (즉, 해마 병변 2일 전)에서 시작하고, 청소년기(adolescent) (P50; 도 7A-C에 나타남)까지 지속되는 N-아세틸 시스테인 (NAC) 치료로 예방되었고, 이는 신생아 병변에 의해 유도된 유아기(juvenile) 산화 스트레스가 PVI 성숙을 저해한다는 것을 시사한다. Caspase 3 라벨링은 NVHL 래트의 PFC에서 세포자멸 활성화를 나타내지 않았으며 (데이터는 표시되지 않음), 감소된 PVI 면역반응성은 세포 손실보다 감소된 개재뉴런 활동을 반영하는 것으로 나타났다.

[0276] 산화 스트레스를 평가하기 위해, 8-옥소-7, 8-디히드로-20- 데옥시구아닌 (8-옥소-dG) 표지로 DNA 산화를 정량화 하였다. P21에서, NVHL 래트는 삼 래트 와 비교하여 PFC에서 8-옥소-dG 염색의 막대한 증가를 나타내었고, 이는 피라미드형 뉴런 및 중간뉴런 모두에서 NAC 치료로 완전히 예방되었다(도 8A 및 9B에 도시됨). NVHL 래트가 성인기(P61)에 도달했을 때, P21보다 낮지만 (도 8C 및 8D에 나타낸 바와 같이) 여전히 8-옥소-dG의 증가를 보였다. 3-니트로티로신 (3-NT) 수치의 증가가 NVHL 래트의 성인 PFC에서 관찰되었다. 3-NT는 산화성 및 질화 스트레스로 인한 단백질의 질화를 나타내며 (Radi, 2004), NVHL 래트에서의 증가는 발달 중에 NAC 치료로 예방되었다(도 9A 및 9B에 도시). 따라서, 유아기(juvenile) NAC 치료는 성인 NVHL 래트에서 산화 스트레스의 다중 마커를, 병변의 범위에 영향을 주지 않으면서, 대조군 래트에 필적하는 수준으로 감소시켰다(도 10A-10C에 도시). NVHL에 따른 성인 PFC에서 검출되는 산화 스트레스의 수치에 대한 가능한 설명은 발달 중 복부 해마로부터의 글루탐산이 감소된 입력이며, 이는 NMDA 수용체 차단이 PVI에서 산화 스트레스를 유발하기 때문이다 (Behrens 등, 2007). 데이터는 중요한 발달 기간 동안 PFC에 손상을 주는 해마 투입이 PVI의 청소년기(adolescent) 성숙에 해로운 영향을 미치는 유아기(juvenile) 래트에서 PFC 산화 스트레스를 유발한다는 것을 나타냈다.

[0277] NVHL 래트에서 산화 스트레스를 나타내는 중간뉴런의 유형을 결정하기 위해, PV, 칼빈딘 (CB) 및 칼레티닌 (CR)을 갖는 8-옥소-dG 를 공동-표지하였다. 또한 피라미드형 뉴런뿐만 아니라, 증가된 8-옥소-dG 염색은 PVI에서 관찰되었지만, CB 또는 CR 중간뉴런에서는 관찰되지 않았다(도 11A 및 11B에 도시). PVI 의 약 50%가 8-옥소-dG 와 공동-표지되었으며, 산화 스트레스가 이 세포 집단에 널리 퍼져있음을 나타낸다. PVI 성숙의 마커는 비스테리아 플로리번다 응집소 (Wisteria Floribunda agglutinin) (WFA)이며, 성숙한 피질의 PVI를 둘러싸는 신경원 주위연결망 (PNN) 을 인식하는 렉틴이다. NVHL 병변은 WFA 염색을 감소시켰고 (도 12A-12B에 도시), 이는 NVHL 래트의 성인 PFC에서 PVI가 미숙한 표현형을 나타내는 것을 시사한다. 이러한 세포 외 기질의 변화는 유아기(juvenile) NAC 치료로 복원되었다 (도 12A-12B에 도시). PVI는 급속-스파이크 중간뉴런의 대부분을 구성하기 때문에 증가된 산화 스트레스에 고도로 노출될 수 있으며, 이들의 고 에너지 대사는 비-급속 스파이크 뉴런보다 활성 산소를 더 생성할 수 있다. 유아기(juvenile) PVI가 산화 스트레스를 나타내는 동안 기능할 수 있으며, 전 청소년기(periaolescent) PVI 성숙기에 산화 스트레스가 악영향을 미치게 된다.

[0278] 만약 유아기(juvenile) 산화 스트레스가 성인 NVHL 래트에서 관찰된 생리학적 기형의 원인이라면, NAC 치료가 이러한 변화를 구원할 수 있다. 전체-세포 기록은 삼 (n=12), NVHL (n=16), 및 NAC-치료된 NVHL 래트 (n=14)의 내측의 PFC를 포함하는 성인 뇌 슬라이스의 피라미드형 뉴런로부터 수행되었다. 이전에 조현병의 성인 NVHL 래트 및 다른 설치류 모델에서 볼 수 있듯이 (Niwa 등, 2010; Tseng 등, 2008), 층 V 피라미드형 세포에서 흥분성 시냅스후 전위 (EPSPs)의 도파민 D2-의존적 조절은 NVHL 래트에서 손실되었다(도 13A-C에 도시). 이러한 손실은 PFC 중간뉴런의 비정상 성숙으로 인한 것일 수 있으며, 이는 정상 성인 D2 조절이 GABA-A 수용체 성분을 포함하기 때문이며 (Tseng 및 O'Donnell, 2007), 그러나 피라미드형 뉴런에서 산화 스트레스도 역할을 할 수 있다. 변

화된 PVI-의존적 PFC 시냅스 반응이 산화 스트레스 때문인지 여부를 결정하기 위해, 발달 중에 래트를 NAC로 치료한 다음 PFC 생리학의 D2 조절을 시험하였다. NAC 치료는 NVHL 래트에서 시냅스 반응의 D2 조절을 구제하였으며 (도 13A-13C에 도시), 이는 NVHL 래트의 청소년 및 유아기(juvenile) 산화 스트레스가 성인 PFC에서 흥분-억제 균형을 변화시킨다는 것을 나타낸다.

[0279] NVHL 래트에서 PFC 기능의 비정상 도파민 조절 또한 *생체내* 관찰된다. *생체내* 세포내 기록은 성인 래트 (n=9 삼 (위약), n=5 NVHL, 및 n=7 NAC-치료된 NVHL)의 38 피라미드형 뉴런에서 수행되었다. 베이스라인 활성은 PFC 피라미드형 뉴런에 대해 이전에 보고된 것과 일치하고 (Lewis 및 O'Donnell, 2000), 병변 상태 또는 NAC 치료에 크게 영향을 받지 않았다. 기록된 모든 세포는 휴식 막 전위(다운 상태;  $-76.2 \pm 1.1$  mV)와 업 상태( $-67.6 \pm 0.7$  mV)에서 자발적 전이를 보였다. 업 상태는  $0.6 \pm 0.1$  Hz의 주파수에서  $523.6 \pm 24.7$  ms의 지속 시간으로 발생하였다. 대다수의 세포(n=21)는  $2.1 \pm 0.7$  Hz의 속도로 자발적으로 활성화되었다. 이전에 보고된 바와 같이 (O'Donnell 등, 2002), 마취된 성인 NVHL 래트의 *생체내* 세포내 기록은 삼 래트에 비교하여 복측 피개 영역(VTA)의 파열 자극에 반응하여 피라미드형 세포 활성의 비정상 증가를 나타냈다 (도 13D 및 13E에 도시). 이러한 활성의 비정상 증가는 유아기(juvenile) NAC 치료에 의해 예방되었다 (도 13D 및 13E에 도시). 이러한 데이터는 NVHL 래트의 PFC에서 비정상 도파민 기능이 유아기(juvenile) 및 청소년기(adolescent)의 산화 스트레스에 달려 있음을 나타낸다.

[0280] 성인 NVHL 래트에서 비정상 흥분-억제 균형은 산화 스트레스에 의존하는 경우, NAC 치료에 의해 예방되는 변경된 정보 처리를 산출할 수 있다. 부정합 음성도 (MMN)는 삼 (n=6), NVHL (n=3), 및 NAC-치료된 NVHL 래트 (n=3)의 오드볼 패러다임(oddball paradigm)에서 청각 유발 전위를 사용하여 시험하였다. MMN은 조현병 환자 (Javitt 등, 1993) 및 동물 모델 (Ehrlichman 등, 2009)에서 약화됨에 따라 높은 번역 관련성을 갖는다. NVHL, NAC-치료된 NVHL, 및 삼 래트에 뇌파 (EEG) 전극을 이식하였다. MMN은 NVHL 래트에서 NAC 치료로 MMN을 향상시킨 그룹 간에 뚜렷하게 상이하였다(도 14A 및 14B에 도시). 관찰은 환자에서 MMN에 대한 NAC의 효과와 일치하며 (Lavoie 등, 2008), NVHL 모델이 유아기(juvenile) 항산화제 치료에 의해 예방될 수 있는 중요한 질병 마커를 재현함을 나타낸다. MMN은 NMDA 수용체 기능에 의존하기 때문에 (Umbricht 등, 2000) 및 조현병에서 PVI의 NMDA 기능저하가 의심되는 경우, NAC를 사용한 MMN 개선이 복원된 PVI 활동의 결과일 수 있다.

[0281] 유아기(juvenile) 산화 스트레스가 행동 결핍을 초래하는지 여부를 평가하기 위해, 동물 모델 및 조현병 환자에서의 행동 패러다임이 사용되었다. 음향 놀람 반응 (PPI)의 선행자극 억제(Prepulse inhibition)는 환자 (Geyer 및 Braff, 1987) 및 NVHL 래트 (Lipska 등, 1995)에서 감소된 감각운동 게이팅의 척도이다. PPI는 성인 삼 (n=11), NAC-치료된 삼 (n=12), NVHL (n=9), 및 NAC-치료된 NVHL 래트 (n=17)에서 시험되었다. 유아기(juvenile) NAC 치료는 치료되지 않은 NVHL 래트에서 관찰된 감소된 PPI를 예방하였다(도 15A에 도시). PVI 성숙 및 전기생리학적 이상의 손실 뿐만 아니라, 유아기(juvenile) NVHL 래트의 발달적 산화 스트레스는 조현병-관련 성인 행동 결핍을 야기할 수 있다.

[0282] NAC 치료의 유의한 효과는 병변 이전에 시작하여 래트가 젊은 성인이 되면 중지되는 큰 출생 후의 치료를 포함한다. 완전한 번역 가치를 위해서는 사람에서 전조 단계가 확인될 수 있는 시간에 해당하는 나이에 시작될 때 NAC가 효과적인지 여부를 결정한다. 또다른 세트의 래트에서는, NAC는 래트에서 초기 청소년기(adolescent)와 동등한 나이인 P35에서 시작하여 식수로 투여되었다. PPI 결핍에 대해서는 성인 삼 (n=15), 치료되지 않은 NVHL (n=12), 및 NAC-치료된 NVHL 래트 (n=14)에서 시험되었다. 이 그룹의 삼과 비교하여 치료되지 않은 NVHL 래트에서의 결핍에 대한 경향을 나타내면, 치료되지 않은 및 치료된 NVHL 사이에 현저한 차이가 있었다 (도 15B에 도시). 데이터는 산화 스트레스가 시작된 후에도 NAC와 같은 GSH 전구체가 여전히 효과적일 수 있음을 나타낸다.

[0283] NAC의 한가지 중요한 경고는 시스테인-글루타메이트 운송자에 대한 작용으로 글루타메이트 수치가 변경되다는 것이다. (Moussawi 등, 2009). NVHL 래트에서 산화 환원 조절 및 글루타메이트 수치 변화가 NAC 효과를 일으키는 지 여부를 시험하기 위해, 글루타메이트를 변화시키지 않는 두가지 다른 항산화제의 효과가 평가되었다.

#### [0284] 실시예 6: 정신병/조현병의 래트 모델에서의 엽셀렌/아포시닌 치료

[0285] 엽셀렌 GPx 발현을 유도하고(Kil 등, 2007) 신경 독성 메커니즘에 의해 고갈된 GSH를 보충하면서(Pawlas 및 Malecki, 2007), 뉴런의 GSH 수치를 향상시키는 글루타티온 퍼옥시다제 (GPx) 미믹(Muller 등, 1984)이다. PPI는 성인 비히클-치료된 삼 (n=10), 엽셀렌-치료된 삼 (n=7), 비히클-치료된 NVHL (n=8), 및 엽셀렌-치료된 NVHL 래트 (n=9)에서 시험되었고, 청소년기(adolescent)의 엽셀렌 치료는 NVHL 래트에서 PPI 결핍을 역전시켰다 (도 15D에 도시).

- [0286] 다른 그룹의 래트에서, NADPH 산화효소 억제제 **아포시닌**의 효과가 유아기(juvenile) 및 청소년기(adolescent)를 통해 전달되는 동안 평가되었다. PPI는 성인 비히클-치료된 삼 (n=10), 아포시닌-치료된 삼 (n=11), 비히클 치료된 NVHL (n=7), 및 아포시닌-치료된 NVHL (n=5)에서 시험되었다. 도 15C에 도시된 바와 같이 PPI 결핍의 역전이 관찰되었다. 이 데이터는 청소년기(adolescent) 동안의 글루타메이트가 아닌 GSH의 상승이 NVHL 래트에서의 PPI 결핍을 구조한다는 것을 나타낸다.
- [0287] **<실험 절차>**
- [0288] **동물:** 시한-임신한(Timed-pregnant) Sprague-Dawley 래트를 찰스 리버 (Wilmington, MA)에서 임신일 13-15 일에 얻었고, 온도와 습도가 조절된 환경에서 음식과 물을 자유롭게 접할 수 있도록 12:12h 빛/어둠 주기 (7:00 AM에 불켜짐)로 개별적으로 보관했다. 새끼가 P5에 도달했을 때, dams의 절반이 식수에서 NAC를 받았다. P7-9까지 건강한 새끼가 무작위로 분리되어 NVHL 또는 삼 수술을 받을 때까지 새끼들은 그대로 있었다. P21에서 수컷과 암컷 새끼는 면역 세포 화학 작용을 위해 4 % 파라포름알데히드로 경막 외로 관류되거나 2 ~ 3 그룹으로 젖을 떼고 보관되었으며, 병변 상태에 따라 균형을 이뤘다. NAC 치료는 청소년기(adolescent)를 거쳐 P50까지 계속되었다. 성인기(>P60)에 도달한 후, 동물은 면역 세포 화학 작용을 위해 4 % 파라포름알데히드로 관류되거나, 슬라이스 전기생리학을 위해 인공 뇌척수액 (aCSF)으로 관류되었으며, **생체내** 세포내 기록을 위해 이용되거나, PPI 또는 MN에 대해 시험되었다.
- [0289] **신생아 복부 해마 병변 수술:** P7과 P9 사이에서, 새끼 (15-20g)는 앞에서 설명한 바와 같이 (Chambers 및 Lipska, 2011), 복부 해마의 흥분 독성 병변 (NVHL) 또는 삼 절차를 받았다. 새끼를 저체온으로 마취시키고 스테레오택틱 프레임 (David Kopf Instruments, Tujunga, CA)에 부착된 스티로폼 플랫폼에 고정시켰다. NVHL 래트는 복부 해마(브레그마에서 입쪽 3 mm, 중간선에서 측면으로 3.5 mm, 표면에서 5 mm)에 이보텐산 (aCSF에서 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0.3  $\mu\text{l}/\text{side}$ ; Tocris, Minneapolis, MN)을 0.15  $\mu\text{l} / \text{min}$ 으로 양측에 주입받았다. 삼 수술은 정확히 같은 방식으로 이루어졌지만, 가이드 캐놀러는 해마 손상을 피하면서 외과 수술을 제어하기 위해 액체 주입없이 3mm 만 내려졌다. 수술 후, 상처가 클리핑되었고 새끼 활동 수준이 정상으로 돌아왔을 때, 그들은 dams로 돌아가 상처 클립이 제거되고 래트가 P21에서 젖을 떼 때까지 평온하게 남아있었다.
- [0290] 모든 래트에서, 동결 마이크로톰을 사용하여 등 및 복부 해마를 절편화 (40  $\mu\text{m}$ )하여 병변을 확인하였다. 절편을 유리 슬라이드 위에 올려 놓고 Nissl로 염색하였다. 해마는 상호 손상의 증거로 현미경으로 검사되었으며, 전형적으로 세포 손실, 간질, 신경 교세포, 세포 분열 및 심실의 확장이 있었다(Chambers 및 Lipska, 2011).
- [0291] **항산화제 전치료 요법:** NAC (BioAdvantexPharma, Mississauga, Ontario, Canada)를 식수 900 mg/l로 투여하였다. NAC 치료는 P5 또는 P35에서 시작되었으며, 생쥐의 이전 연구 결과에서 dams에 의해 섭취된 NAC는 그의 우유를 통해 새끼에게 전달되는 것으로 나타났다(das Neves Duarte 등, 2012). NAC 치료는 P50에서 끝났다. 2 ~ 3 일마다 신선한 용액을 준비했다. 엠셀렌 (Sound Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA)을 P35부터 시작하여 PPI 검사일(P60)까지 일주일에 i.p. 5일 투여되었다. 스톡 엠셀렌 용액 (20 mg/ml DMSO, 동결 분취량)을 멸균수로 1:5로 희석하고 10 mg/kg의 투여량으로 투여하였다. 대조군 동물은 물에서 1:5로 희석된 DMSO의 등가 농도를 받았다. 아포시닌 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 100 mg/kg의 목표 용량으로 식수에 투여하였다 (Nwokocha 등, 2013). P21에서 이유 전에, dams의 우유를 통한 배달을 보장하기 위해, 식수는 0.5 l의 물 당 2 g의 아포시닌을 포함하였다. 아포시닌 농도는 목표 투여량에 가장 근접하기 위해 이유 후 750mg / l로 낮아졌다. 치료는 치료는 매일 매일 준비된 신선한 용액으로 P5에서 P50으로 지속되었다.
- [0292] **면역조직화학 및 입체적인 정량화:** 이전에 기술된 것처럼(Cabungcal 등, 2006), 총 18 마리 (P21)와 25 마리 (P61)의 수컷 래트를 마취시키고, 관류하고, 뇌를 고정시켰다. 관상면 절편 (40  $\mu\text{m}$ )을 사용하여 전대상피질 (ACC)의 억제 회로를 조사하였다. 이전에 기술된 바와 같이, 뇌 절편을 파브알부민 (PV)에 대해 면역표지하였다 (Steullet 등, 2010). PV-면역반응 세포 (세포체) 수를 스테레오인베스티게이터 7.5 소프트웨어 (MBF Bioscience Inc, Williston, VT, USA)를 이용하여 ACC에서 정량화하였다. 간단히 말하면, 입체과 계수는 낮은 배율 (x2.5 대물 렌즈)에서 시작하여 각 동물의 2-4 연속 섹션에서 관심 영역 (ROI)의 경계를 식별하고 윤곽을 그린다. 파시노스와 왓슨 (파시노스 및 왓슨, 1998)이 제시한 해부학적 세포구축 영역을 따르는 이차 모터 (M2) 피질 영역에서 ACC (브레그마 약 0.70-1.70 mm)가 윤곽이 잡혔다. 선택된 관심 영역 (ROI)은 대뇌 피질 영역 1 (cg1)의 대부분과 대상 피질 영역 2 (cg2)의 일부를 포함했다. ACC의 ROI가 보조 모터 피질과 중첩되지 않도록 ACC 중간 영역과 M2 영역 사이에 작은 중간 여유를 설정했다. 섹션 두께 내의 카운팅 박스 (광학 분석기)와 ACC에 적합한 샘플링 프레임을 사용하여 뉴런을 분석하고 계산했다(Schmitz 및 Hof, 2005). ACC의 ROI 내부의 무작위 위치에서 시작하여 각 샘플링 프레임에 소프트웨어로 카운팅 박스 (40 x 40  $\mu\text{m}$ , 깊이 15  $\mu\text{m}$ )를 배치했다.

카운팅은 고배율 (40 배 대물렌즈)을 사용하여 수행되었다. PV 셀은 카운팅 박스의 깊이 15  $\mu\text{m}$ 에서 초점이 맞지 않을 때까지 상자 표면에 초점이 맞았을 때 계산되었다. 면역 처치 처리로 인한 조직 수축의 영향을 받을 수 있는 인공물로부터 거리를 유지하기 위해 5- $\mu\text{m}$  가드 영역이 사용되었다. P21 및 P61 래트에 대한 ACC의 ROI 양에 25 개의 계수 프레임이 사용되었다.

[0293] 면역형광 염색, 공 초점 현미경 및 이미지 분석: 산화 스트레스는 OH 라디칼과 DNA 구아닌 염기 (Kasai, 1997)의 반응에 의해 형성된 DNA 부가물인, 8-옥소-7, 8-디히드로-20- 테옥시구아닌 (8-옥소-dG)에 대한 항체를 사용하여 시각화하였다. 전자 수송 사슬의 근접성 때문에, 미토콘드리아 DNA는 산화성 손상을 일으키기 쉽다: DNA의 산화된 염기와 8-옥소-dG의 수치는 핵보다 미토콘드리아에서 더 높다. 다양한 유형의 중간뉴런에서 8-옥소-dG 및 3-니트로티로신 (3NT) 표지를 평가하기 위해, 브레그마 0.70-1.70 mm 사이의 관상 절편을 생쥐 단일클론 안티-8-옥소-dG (1:350; AMS Biotechnology, Bioggio-Lugano, Switzerland) 일차 항체 또는 생쥐 단일클론 안티-니트로티로신 (1:1000; Chemicon International, Temecula, USA) 일차 항체와 함께, 토끼 다클론 안티-PV, 안티-칼빈딘-28k (안티-CB), 또는 안티-칼레티닌 (안티-CR) (1:2500; Swant, Bellinzona, Switzerland) 일차 항체로 배양하였다. PV 세포를 둘러싸는 PNN의 시각화를 가능하게 하기 위해, 절편을 비오틴-접합 렉틴 *비스테리아 플로리번다* 응집소 (WFA) (Hartig 등, 1994)을 포함하는 용액에서 배양했다. 절편은 먼저 2 % 정상 말 혈청을 함유하는 PBS + 트리톤 0.3 % + 소듐 아자이드 (1g/l)로 배양하고, 이어서 토끼 다클론 안티-PV (1:2500) 및 비오틴 결합된-WFA (1:2000; Sigma)와 함께 36시간 동안 배양했다. 절편을 세척하고, 적절한 형광 이차 항체 (염소 안티-생쥐 면역글로불린 G (1:300; Alexa Fluor 488; Molecular Probes, Eugene, Oregon), 안티-토끼 면역글로불린 G (1:300; CY3; Chemicon International, Temecula, California), CY2-스트렙타비딘 결합 (1:300; Chemicon))로 배양하고, 100 ng/ml DAPI (4'-6-디아미디노-2-페닐인돌; Vector Laboratories, California, USA)로 대조 염색하였다. 절편은 x10, x20, x40 및 x63 Plan-NEOFLUAR 대물 렌즈가 장착된 Zeiss Confocal Microscope로 시각화하였다. 모든 주변 장치는 LSM 510 소프트웨어 (Carl Zeiss AG, 스위스)로 제어되었다. IMARIS 7.3 소프트웨어 (Bitplane AG, 스위스)에서 분석을 위해 9 개의 이미지 (2.13  $\mu\text{m}$  간격)의 Z 스택을 스캔 (1024 x 1024 픽셀)했다. Z 스택의 모든 이미지를 가우시안 필터 도구로 필터링하여 원치 않는 배경 노이즈를 제거하고 셀 바디 윤곽선을 선명하게 만들었다. 입체학적 절차에 정의된 ROI는 ACC에서 만들어졌다. PV-, CB-, 및 CR-표현 중간뉴런이 분석되는 ACC의 지역 서브 볼륨을 분리하기 위해, ROI는 Z 스택 전체에 걸쳐 마스크 처리했다. 8-옥소-dG를 정량화하기 위해, ROI 내에서 염색 강도 및 표지된 복셀의 수를 측정하였다. PV-, CB- 및 CR-세포에서 8-옥소-dG를 정량하기 위해, 우리는 모든 PV- 면역 표지된 복셀 (각각 CB- 및 CR- 면역 표지된 복셀)의 비율을 계산하기 위해 IMARIS 소프트웨어의 *Coloc* 모듈을 사용하였으며, 상기 복셀들은 또한 8-옥소-dG- 면역 표지되었다. *Coloc* 은 면역 표지된 관심 대상 프로파일 사이에 공동화된 복셀의 수를 제공한다. PNN 으로 둘러싸인 PV 면역반응 뉴런의 수를 정량화하기 위해, 우리는 스팟 모듈을 사용하여 주어진 크기 내에 있는 프로파일-표지된 복셀에 스팟 마킹을 할당했다. PV 및 WFA 면역표지를 위한 채널을 선택하고, 프로파일 크기 기준 (각각 > 9 및 4  $\mu\text{m}$ )을 정의하여 이러한 크기보다 큰 표지된 프로파일을 정량화하였다. WFA에 대해 생성된 스팟과 접촉 및 / 또는 중첩된 PV에 대해 생성된 스팟은 PNN (WFA- 양성 PVI)으로 둘러싸인 PVI로 간주된다.

[0294] 슬라이스 전기생리학: P60에서 시작하여, 수컷 래트를 클로랄 하이드레이트 (400 mg / kg, i.p.)로 마취시킨 후 15 분 동안 목을 베었다. 뇌를 신속하게 두개골에서 제거하여 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> 로 산소 처리하고 다음을 함유한 아이스-콜드 인공 CSF (aCSF)를 만들었다(mM 단위): 125 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 10 글루코스, 3.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 CaCl<sub>2</sub> 및 3 MgCl<sub>2</sub>, pH 7.45 (295-300 mOsm). 아이스-콜드 aCSF에서 비브라툼으로 내측 PFC를 함유하는 관심 슬라이스 (두께 300  $\mu\text{m}$ )을 얻었고, 기록 전에 적어도 45 분 동안 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>로 지속적으로 산소가 공급된 따뜻한 (~ 35 °C) aCSF 용액에서 배양했다. 기록 aCSF (1 CaCl<sub>2</sub> 및 2 MgCl<sub>2</sub>)는 2ml/min의 속도로 펌프로 기록 챔버로 전달되었다.

[0295] 패치 전극 (7-10 M $\Omega$ )은 Flaming-Brown 수평 풀러 (P97; Sutter Instruments)가 장착된 1.5 mm 보로실리케이트 유리 모세관 (세계 정밀 계측기)으로부터 얻어지고, 0.125 % 뉴로바이오틴(Neurobiotin) 및 다음을 함유하는 용액으로 충전하였다 (mM 단위): 115 K-글루코네이트, 10 HEPES, 2 MgCl<sub>2</sub>, 20 KCl, 2 MgATP, 2 Na<sub>2</sub>-ATP, 및 0.3 GTP, pH 7.25-7.30 (280-285 mOsm). 실험 전 매일 퀴인피롤 (5 마이크로몰농도, Tocris)을 산소 첨가 기록 aCSF에 섞었다. 대조군과 약물-함유 aCSF는 모두 실험 기간 동안 지속적으로 산소를 공급받았다.

[0296] 모든 실험은 33-35 °C에서 수행되었고, V 층으로부터의 연전방의 또는 ACC PFC 피라미드형 세포는 40X 물-침지 대물 렌즈(Olympus BX-51WI)를 갖는 적외선 (IR) 미분 간섭 콘트라스트 비디오 현미경을 사용하여 시각적 안내 하에 확인되었다. 이미지는 IR-민감한 CCD 카메라로 감지되어 모니터에 표시된다. 전체-세포 전류-클램프 기록

은 컴퓨터-제어 증폭기(Multiclamp 700A, Molecular Devices)로 수행되고, 디지털화되었으며(Digidata 1322, Molecular Devices), 약시스코 9 (Molecular Devices)로 10 kHz의 샘플링 속도로 획득되었다. 액체 전위를 보정하지 않고 기록 전에 전위를 0으로 조정했다. 각 뉴런의 베이스라인 활성을 10 분 동안 모니터링하여 막 전위 및 입력 저항 (500-ms-지속 시간의 탈분극 및 과분극 자극(pulse)로 얻은 전류-전압 (I/V) 플롯의 기울기로 측정)을 측정하였다.

[0297] 시냅스 반응은 꼬인 테플론 코팅 텅스텐 와이어 (~200  $\mu\text{m}$ 로 분리된 팁) 한 쌍으로 만든 양극성 전극을 가진 표면층의 전기 자극으로 피라미드형 뉴런에서 시험했으며 기록된 뉴런의 정점 수상 돌기의 수직 축에 ~ 500  $\mu\text{m}$  측면에 위치시켰다. 15 초마다 자극 펄스(pulse) (20-400  $\mu\text{A}$ , 0.5 ms)가 전달되었다. 강도는 최대 진폭의 약 절반으로 EPSP를 나타내기 위해 조정되었다. 실험 전반에 걸쳐 입력 저항의 변화를 반복된 과분극 단계를 통해 모니터링하고, 실험 도중에 입력 저항이 20 % 이상 변화면 셀을 폐기했다. 유발된 EPSP의 진폭은 Clampfit 9.0으로 측정하고 퀴인피콜의 적용 7 분 전후에 평균 10 회 스윕했다. 이 주기는 정신 분열증의 설치류 모델에서 PFC 활성의 D2 조절에 대한 이전 연구 (Niwa 등, 2010; Tseng 등, 2008)에 의해 밝혀진 차이점과 일관성을 위해 선택되었다. 각 실험의 끝에서, 조각을 4 % 파라포름알데하이드에 넣고 뉴런의 형태와 위치를 확인하기 위해 표준 조직 화학 기술을 사용하여 DAB 염색을 처리했다.

[0298] 생체내 세포내 기록: 암컷 래트를 코랄 하이드레이트 (400 mg/kg, i.p)로 마취시키고 정위 장치 (Kopf Instruments)에 두었다. 마취는 복강 내 카테터를 통해 연속 코랄 하이드레이트 (24-30 mg/kg/h)로 기록 절차를 통해 유지되었다. 체온은 열 프로브-제어 열 패드 (Fine Science Tools)를 사용하여 섭씨 약 섭씨 37 도로 유지되었다. 동맥 양극성 자극 전극 (0.5 mm 직경, 0.5 mm 극 분리; Rhodes Medical Instruments Inc.)을 자극을 위해 VTA (브레그마에 5.8 mm 꼬리; 정중선에서 측면으로 0.5-0.8 mm; 표면에서 7-8 mm)로 낮추었다. 기록하는 날카로운 미세-전극을 수평 Flaming-Brown 폴러 (Sutter Instruments)상의 보로실리케이트 유리 (1mm O.D.; World Precision Instruments)에서 꺼냈다. 날카로운 전극 (50-110 M) 날카로운 전극 (50-110 M $\Omega$ )을 2M 칼륨 아세테이트 중 2 % 뉴로바이오틴 (Vector Laboratories)으로 채웠다. 미세전극은 유압식 조작기 (Trent Wells, Coulterville, CA)를 사용하여 내측 PFC로 낮추었다. 기록은 전류 클램프에서 만들어졌고, 오프라인 데이터 분석을 위해 Digidata A / D 변환기 (Molecular Devices) 및 Axoscope 9 소프트웨어 (Molecular Devices)를 사용하여 10 kHz로 디지털화 한 Neurodata Amplifier (Cygnus)를 사용하여 신호를 수집하였다.

[0299] 미세전극 뉴런이 찢릴 때까지 내측 PFC를 통해 전진했다. 이 연구에 포함된 뉴런은 잔류 막 전위가 -60 mV보다 더 음수이고 임계 값에서 진폭이 40 mV 이상인 활동 전위를 가진다. 내인성 도파민에 대한 반응을 결정하기 위해, VTA는 20 Hz에서 5 자극(pulse)의 열차로 자극되어 매 10 초마다 전달되었다. VTA 자극에 반응하여 세포 사격을 결정하기 위해 8 ~ 10 개의 스윕이 사용되었다. 활성은 모든 스윕에서 마지막 VTA 자극(pulse)를 따르는 500 ms 에포크에서 측정되었고, 실험 그룹 사이에서 비교되었다. 실험이 끝나면 동물들은 마취 과량으로 사망하고 병변의 상태 및 전극 배치에 대한 조직학적 검증을 위해 뇌를 제거했다.

[0300] 부정합 음성도: NVHL, NAC-치료된 NVHL, 및 삼 암컷 래트에 이소플루레인 마취 하에 만성 EEG 전극을 이식하였다. 전극은 염화은으로 코팅된 직경 2mm의 은 디스크로 만들어졌고, 인간의 정점과 같은 위치인 브레그마의 꼭대기에 붙어 있었고, 그 접촉은 머리 꼭대기의 *Omnetics* 커넥터로 연결되었다. 4-주간의 회복시, 래트를 먼저 스테인리스 스틸 상자 안에 넣은 30 x 50 cm 플렉시글라스 상자인 기록 챔버에 익숙하게 하였다. NNM 세션은 한 주파수 (표준)에서 95 %의 반복과 다른 주파수 (편차)에서 5 %로 400ms 간격으로 분리된 두 개의 서로 다른 주파수(7 또는 9 kHz; 30 ms 지속시간)에서 래트를 약 2,000 개의 톤으로 노출시키는 것으로 구성되었다. 톤은 TDT RZ6 시스템 (Tucker Davis)을 사용하여 인클로저 내부에 장착된 스피커와 함께 전달되었으며, 따라서 편차가 반으로 줄어든 주파수의 절반이 균형을 이루었다. EEG 신호는 1 kHz 샘플링 속도로 32 채널 Omniplex 시스템 (Plexon Instruments)을 사용하여 수집되었다. 분석을 위해, 톤 주변의 300 ms 에포크를 선택하고, 1-30 Hz에서 필터링하고, 자극 이전의 100 ms로 기준선을 보정하고, 표준 및 편차 톤에 대해 개별적으로 평균화하였다. 편파(Devient wave)로부터 표준 파를 뺀 차이 파를 만들고, 자극 후 35 ~ 100 ms 사이의 곡선 아래 면적을 측정하여 MMN을 정량화하였다. 모든 래트는 3 일 동안 3 회의 세션에 노출되었으며, 모든 동물에 대해 세션별로 평균값을 구했다.

[0301] 선행자극 억제(Prepulse inhibition): P60에서 시작하여, 이전에 기술된 바와 같이 수컷 및 암컷 래트 모두 PPI 검사를 받았다(Feleder 등, 2010). NVHL 래트의 PPI 결핍은 아포모르핀 투여를 시도하였을 때 가장 분명하게 나타나기 때문에 (Lipska 등, 1995), 우리는 PPI 테스트 직전에 아포모르핀 (0.1 mg/kg, i.p.)을 주사했다. 래트를 70dB의 배경 백색 잡음을 갖는 완음성 완충 챔버 (San Diego Instruments, San Diego, CA)에 넣었다. 5 분의 적응 기간 후에 PPI 테스트는 15 ~ 25 초마다 의사 랜덤 테스트로 시작되었다. 자극(pulse) (120dB), 선행자

극 (75dB, 80dB 또는 85dB), 자극(pulse) 없음 또는 선행자극 + 자극(pulse)가 전달되었다. 테스트는 23 분 동안 지속되었고 자극(pulse) 또는 선행자극 + 자극(pulse) 시도의 8-10 회 반복이 획득되었지만, 놀 또는 선행자극만의 시도는 각 선행자극 진폭에 대해 5 회 반복되었다. 놀람의 크기는 가속-민감성 변환기를 사용하여 측정하였으며, PPI는 선행자극 +자극(pulse)와 자극(pulse) 사이의 놀람 및 자극(pulse) 단독의 비율로 계산되었으며 백분율 감소로 표시된다. 초기 시도 (모든 자극(pulse) 단독)는 요법을 위해 사용되었으며, 분석에는 포함되지 않았다. 실험실에서 동물이 움직일 때 실험에서 제외되었으며, 깜짝 놀란 진폭이 낮거나 50 % 이상의 시도가 어떤 선행자극 + 자극(pulse) 조합에 대해 제외되었을 때 세션을 분석에서 제외하였다. PPI 세션을 폐기한 경우 일주일 후 래트를 다시 검사하였다.

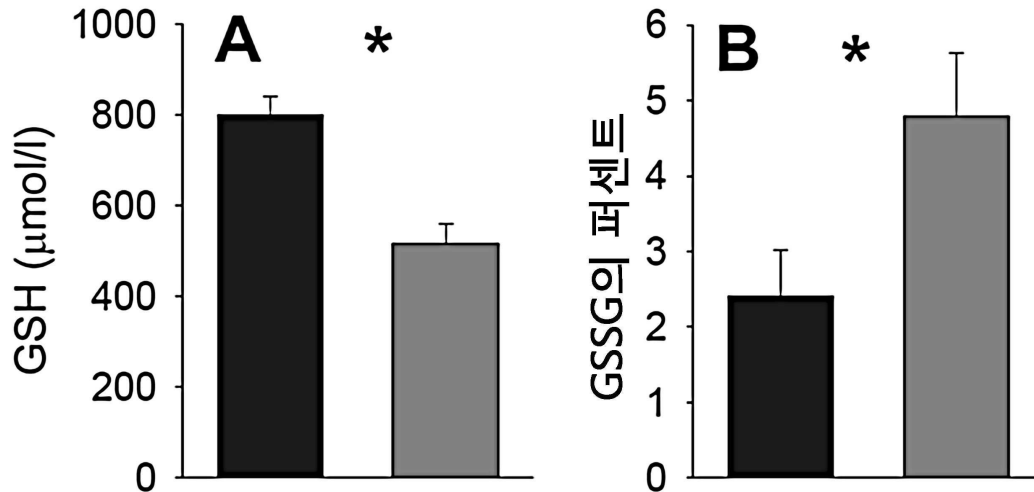
[0302] 통계: ACC에서 조직 부피당 PV-면역 반응성 세포의 평균 수를 일원 분산 분석 후 사후 (post-doc) Dunnett 다중 비교를 사용하여 치료 그룹간에 비교하였다. 다변수 분산분석 (Wilk 's Lambda) 를 사용하여 평균 PV-세포 수, PV-세포 강도, WFA-양성 PV 및 WFA-양성 강도, 전체 8-옥소-dG, 및 WFA 표지를 그룹 간에 비교하였고, 다중 비교를 위해 포스트-혹 Dunnett 시험을 수행하였다. 전기생리학 데이터는 피험자간 변수로서 그룹을 가지는 1-원 분산분석을 사용하여 비교되었다. PPI 데이터는 피험자간 변수로서의 병변 상태 및 치료 및 피험자 내 변수로서의 선행자극 강도를 갖는 반복-측정 2-원 분산분석을 사용하여 비교되었다.

[0303] 본 발명은 바람직한 구체예 및 다양한 대안적인 구체예를 참조하여 도시되고 설명되었지만, 관련 기술 분야의 당업자는 본 발명의 사상 및 범주를 벗어나지 않고 형태 및 세부 사항의 다양한 변경이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

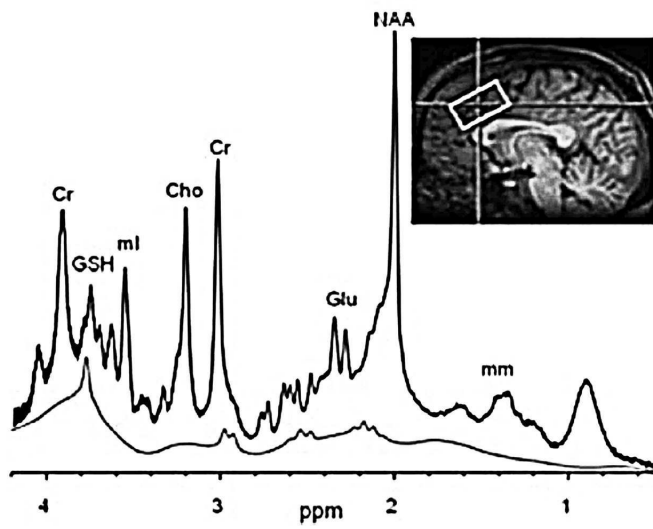
[0304] 본 명세서의 본체 내에 인용된 모든 참고 문헌, 발행된 특허 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

## 도면

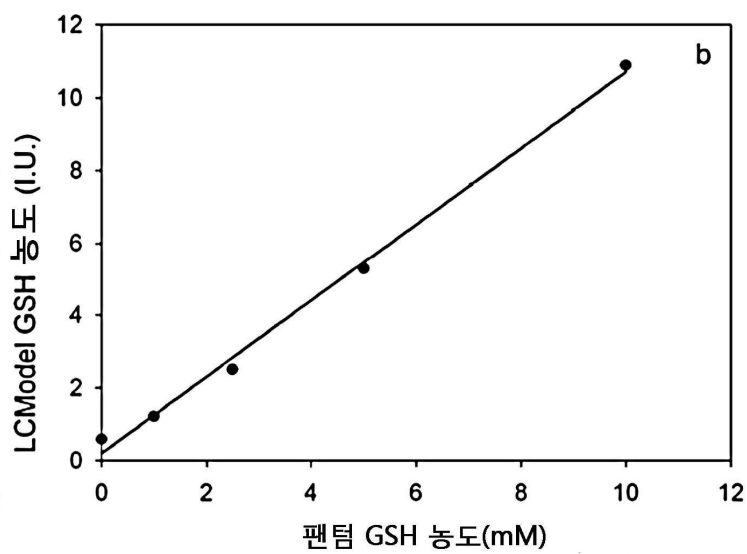
### 도면1



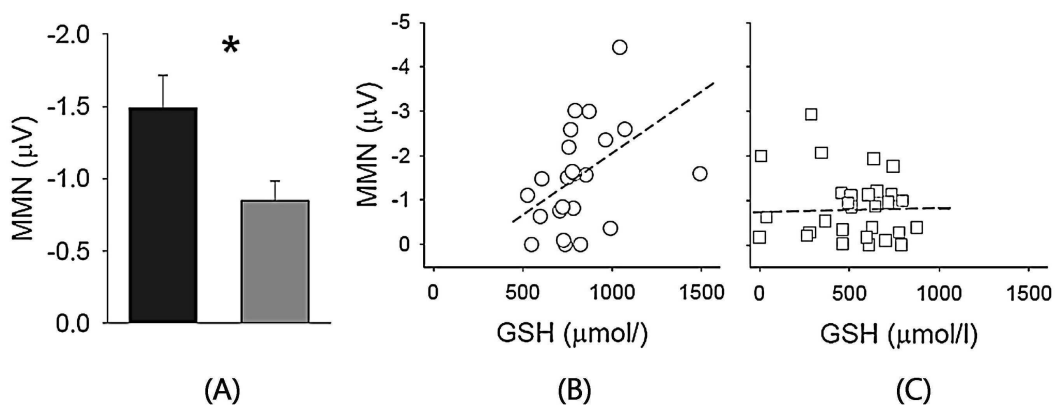
도면2a



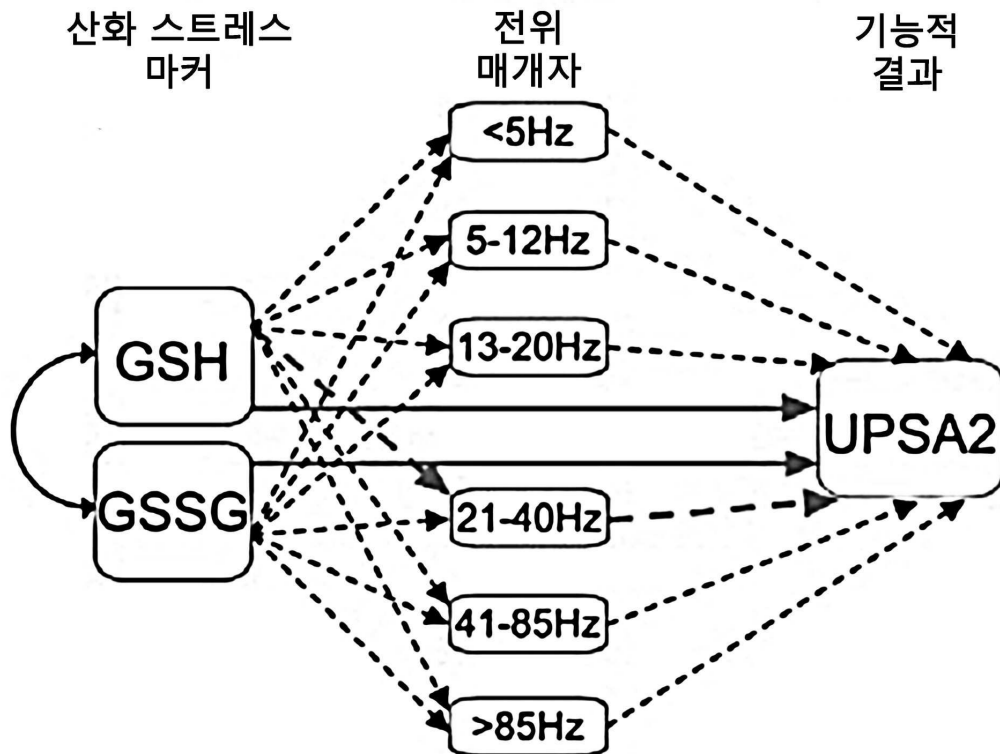
도면2b



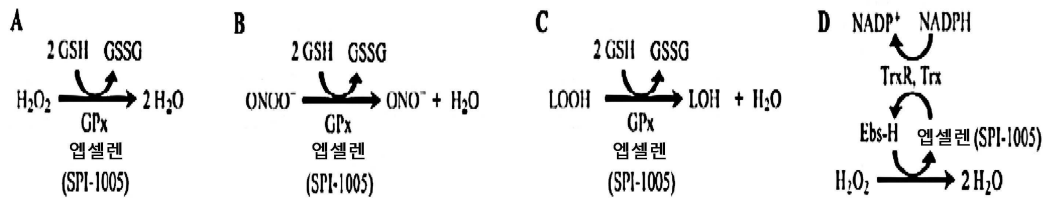
도면3



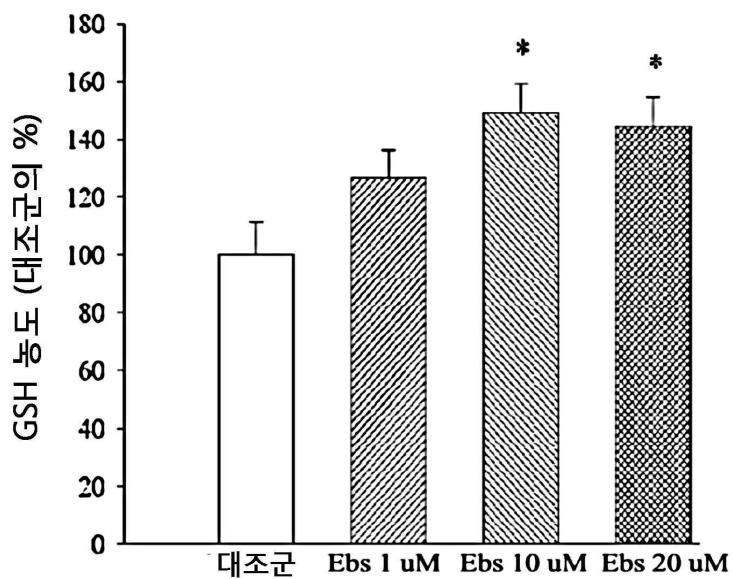
도면4



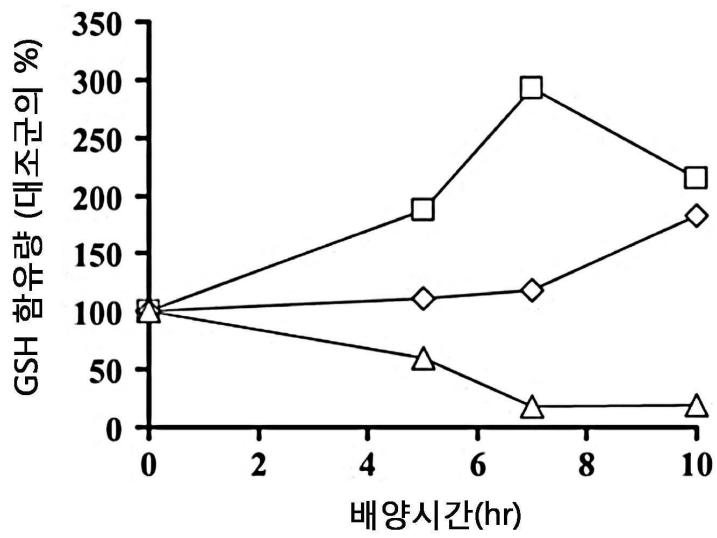
도면5



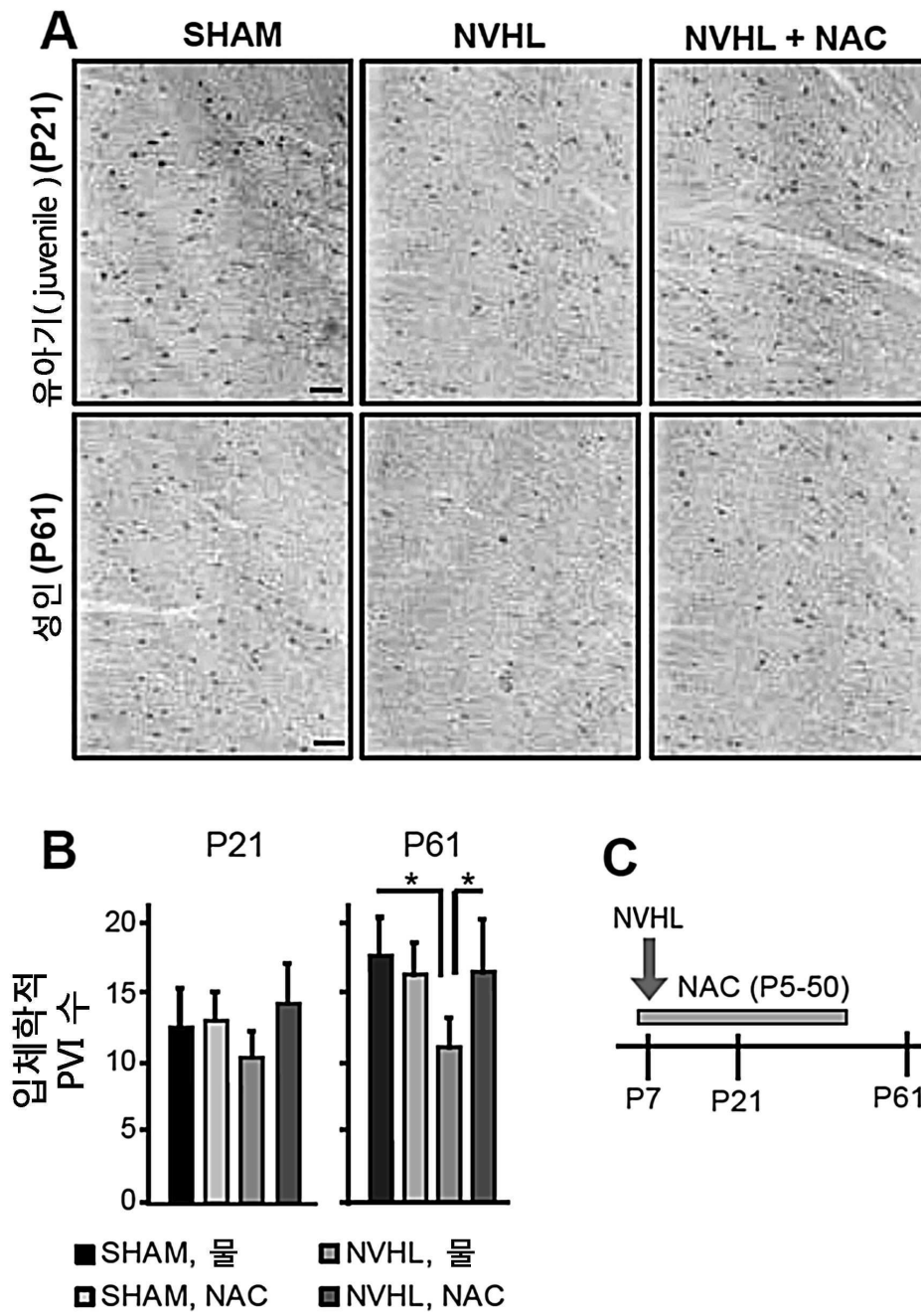
도면6a



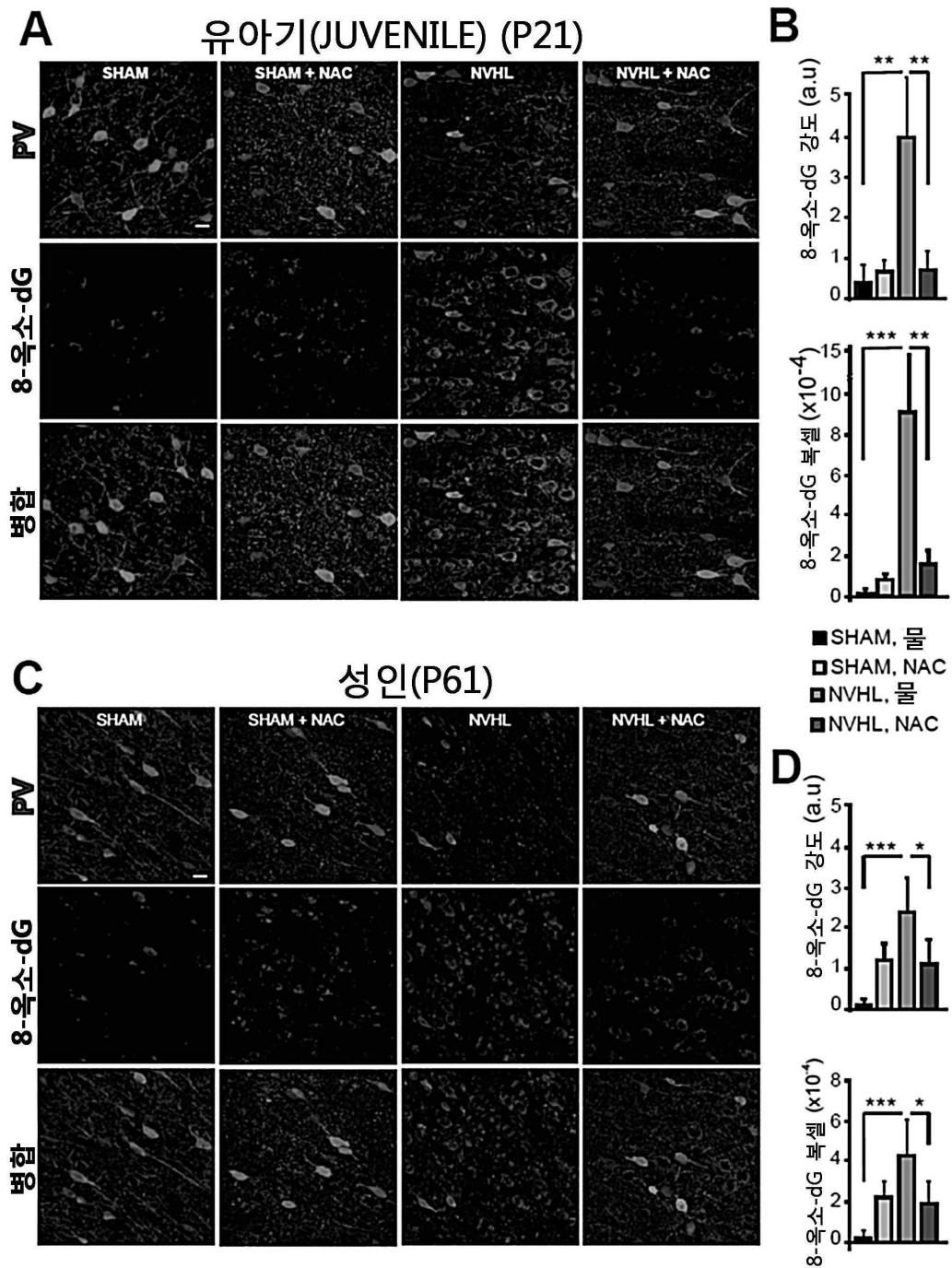
도면6b



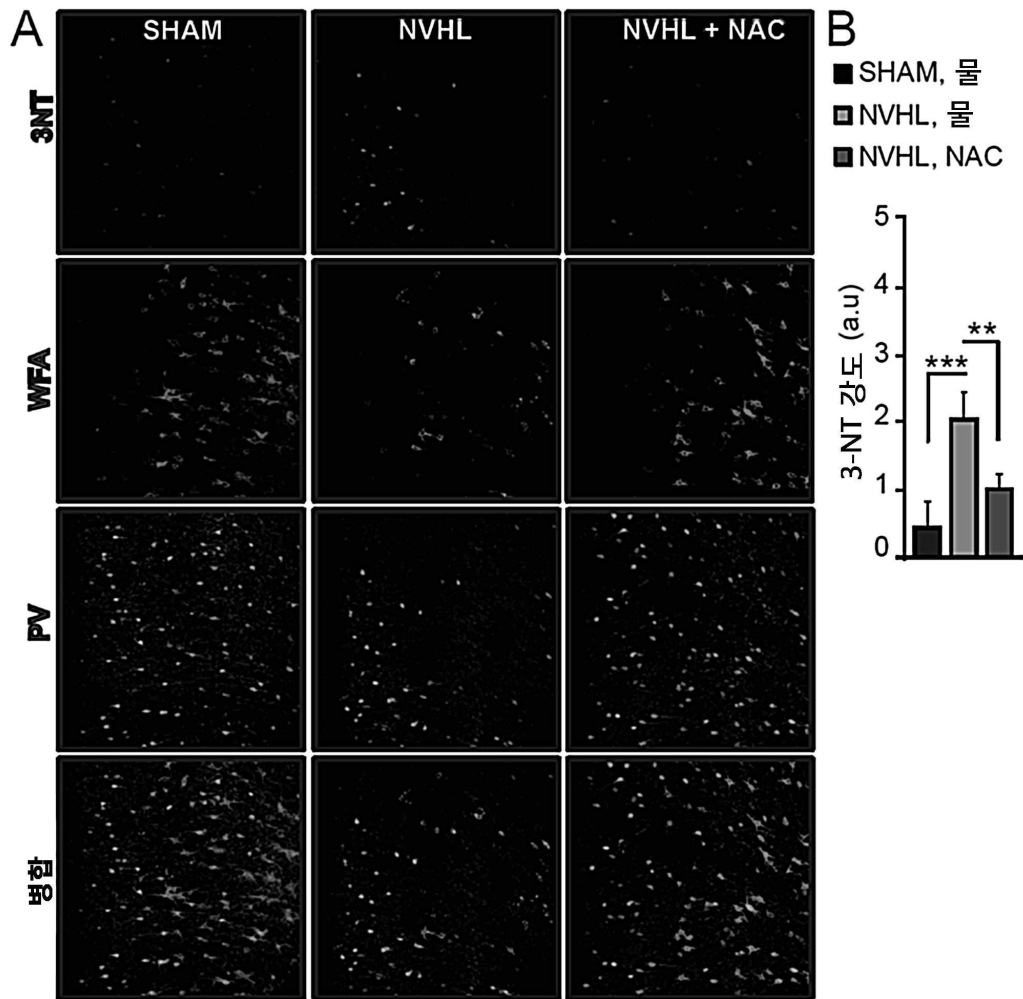
도면7



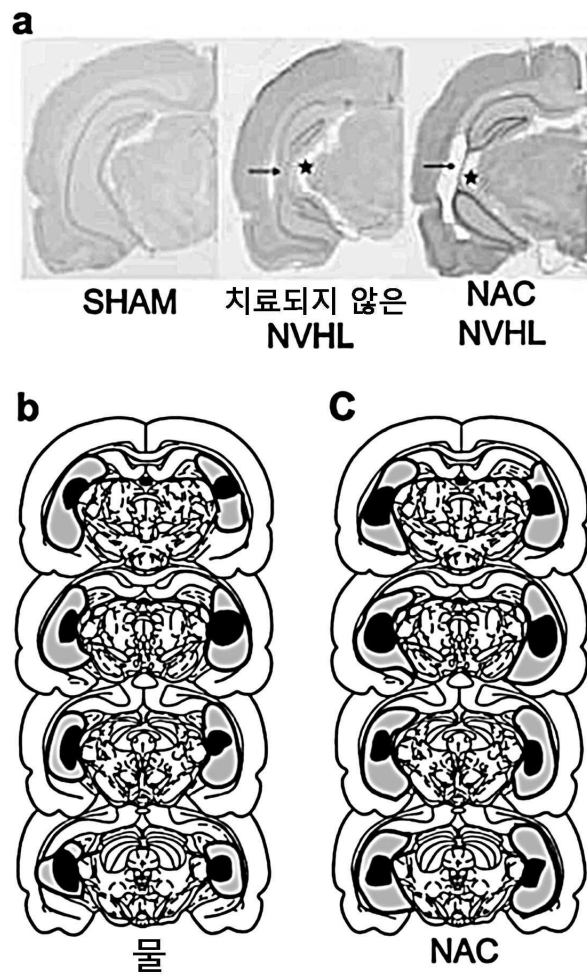
도면8



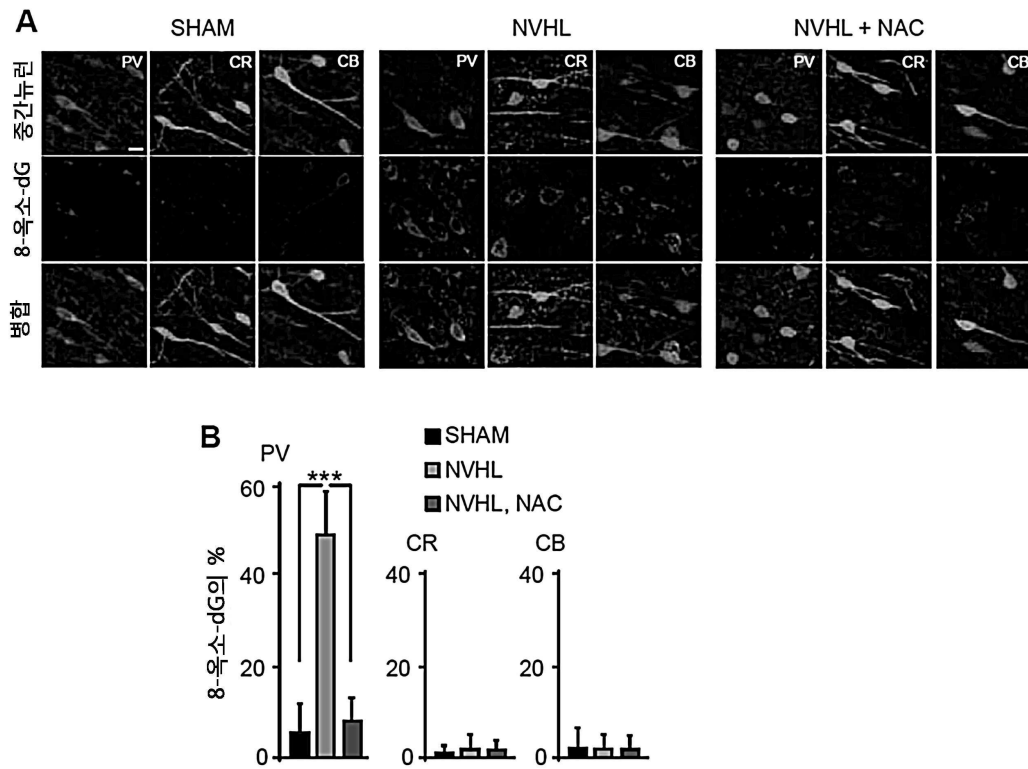
도면9



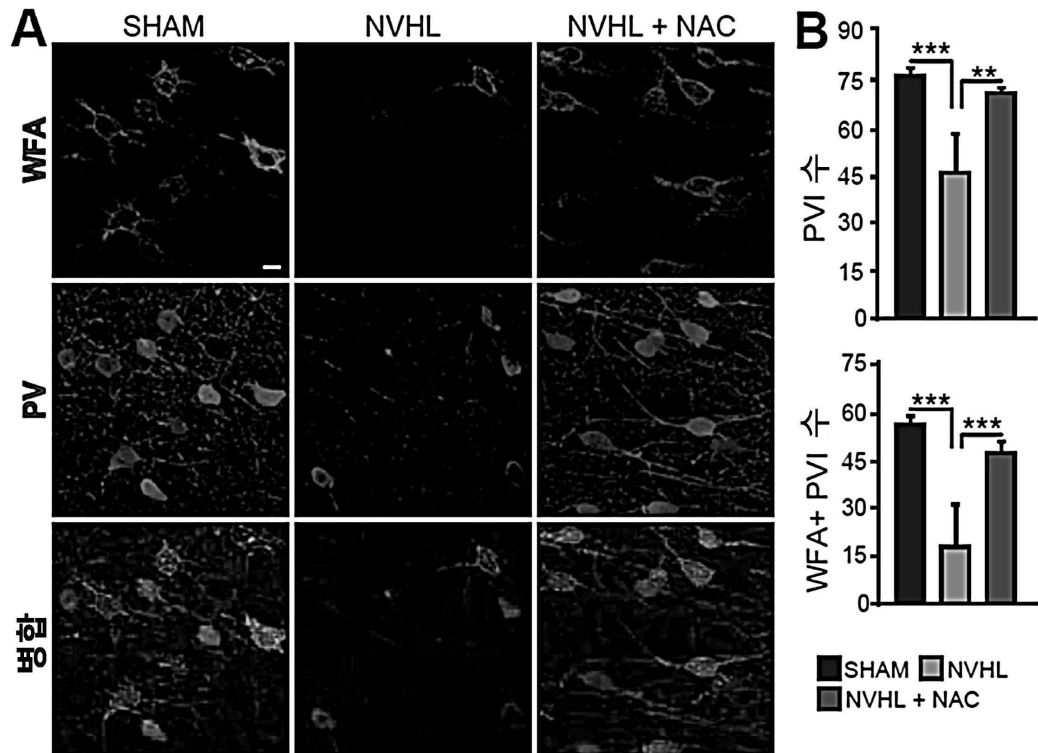
도면10



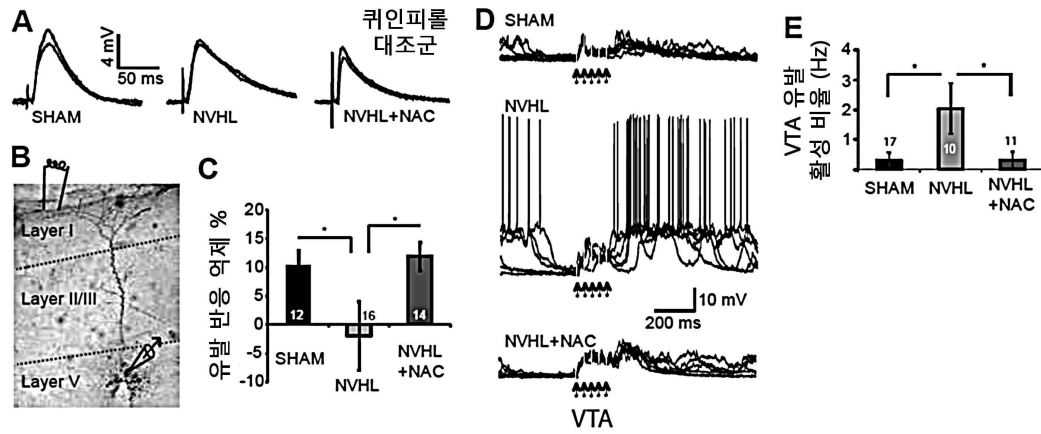
도면11



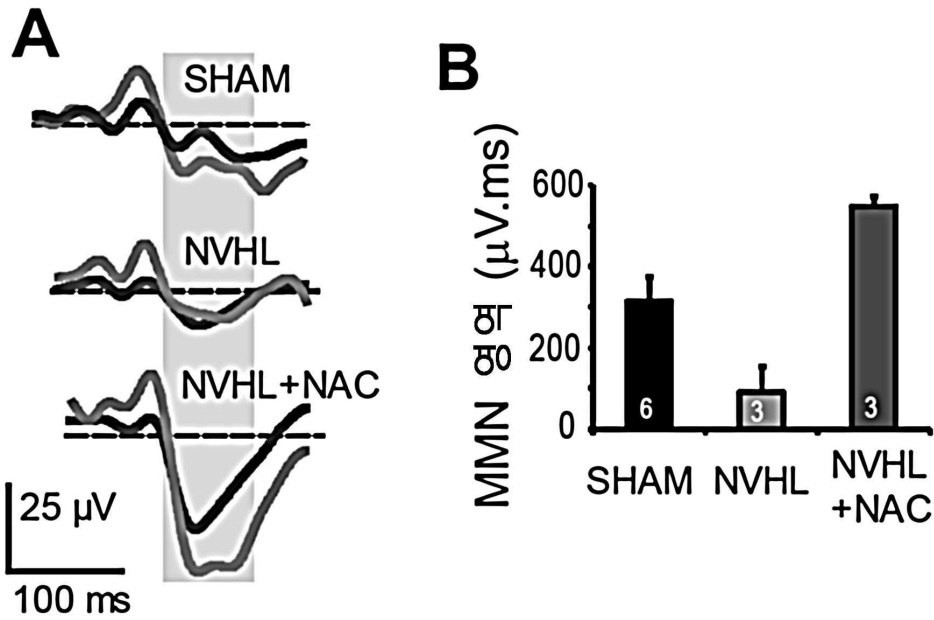
도면12



도면13



도면14



도면15

