(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0103927
(43) 공개일자 2013년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7076 (2006.01) *A61K 31/4045* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0024958
(22) 출원일자 2012년03월12일
심사청구일자 2012년03월12일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
김원기
서울시 강남구 압구정동 미성아파트 2동 905호
(74) 대리인
신동인

전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 **아데노신 유도체 및 멜라토닌의 조합을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 치료 및 예방용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 아데노신 유도체 및 멜라토닌 조합을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 치료용 약학 조성물 또는 건강 기능 식품에 관한 것으로서, 상세하게는 본 발명의 상기 조합은 래트에서의 뇌허혈성 손상에 대하여 탁월한 상승적인 저해활성을 나타내므로 퇴행성 뇌질환 치료에 유용한 약학 조성물 또는 건강 기능 식품을 제공한다.

대 표 도 - 도1

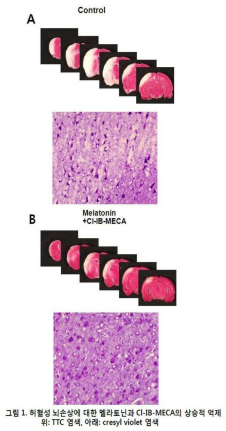


그림 1. 허혈성 뇌손상에 대한 멜라토닌과 Cl-IB-MECA의 상승적 억제
위: TTC 염색, 아래: cresyl violet 염색

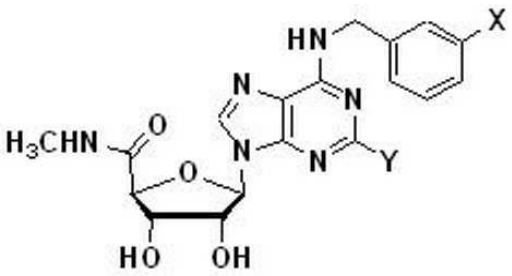
이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345160601
부처명	교육과학기술부
연구사업명	바이오의료기술개발
연구과제명	허혈성 뇌졸중 치료를 위한 새로운 아데노신 A3 수용체 효현제 개발
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2011.06.01 ~ 2012.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 일반식 (I)을 갖는 아데노신 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 멜라토닌과의 조합을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환의 치료 및 예방용 약학조성물:



(I)

상기 식에서,

X 는 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로겐 원자, 히드록시기, 및 C_1 내지 C_3 저급알킬기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기이며,

Y 는 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로겐 원자, 히드록시기, 및 C_1 내지 C_3 저급알킬기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기이다.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 일반식 (I) 화합물의 X는 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로겐 원자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기인 약학조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 일반식 (I) 화합물의 X는 I 치환기인 약학조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 일반식 (I) 화합물의 Y는 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로겐 원자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기인 약학조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 일반식 (I) 화합물의 Y는 염소원자인 약학조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 일반식 (I) 화합물은 2-클로로-N^6-(3-아이오도벤질)-아데노신-5 '-N-메틸유로나미드(chloro-N6-(3-iodo-benzyl)-adenosine-50-N-methyluronamide) 인 약학조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 일반식 (I)을 갖는 아데노신 유도체 및 멜라토닌의 상대적인 조합중량비가 1 : 1 내지 100(w/w)의 비인 약학조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 또는 헌팅턴 질환인 약학조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 뇌졸중인 약학조성물.

청구항 10

제 8항에 있어서,

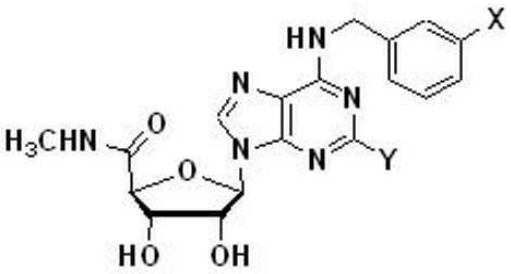
상기 퇴행성 뇌질환은 허혈성 뇌졸중인 약학조성물.

청구항 11

제 1항의 일반식 (I)을 갖는 아데노신 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 멜라토닌과의 조합을 유효성분으로 함유하고 약학적으로 허용가능한 부형제 또는 담체를 함유하는 퇴행성 뇌질환의 치료 및 예방용 약학조성물.

청구항 12

하기 일반식 (I)을 갖는 아데노신 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 멜라토닌과의 조합을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선을 위한 건강기능식품:



(I)

상기 식에서,

X 는 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로겐 원자, 히드록시기, 및 C_1 내지 C_3 저급알킬기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기이며,

Y 는 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로겐 원자, 히드록시기, 및 C_1 내지 C_3 저급알킬기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기이다.

청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 일반식 (I) 화합물의 X는 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로겐 원자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기인 건강기능식품.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 일반식 (I) 화합물의 X는 I 치환기인 건강기능식품.

청구항 15

제 12항에 있어서,

상기 일반식 (I) 화합물의 Y는 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로겐 원자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기인 건강기능식품.

청구항 16

제 15항에 있어서,

상기 일반식 (I) 화합물의 Y는 염소원자인 건강기능식품.

청구항 17

제 12항에 있어서,

상기 일반식 (I) 화합물은 2-클로로-N^6-(3-아이오도벤질)-아데노신-5 '-N-메틸유로나미드(chloro-N6-(3-iodo-benzyl)-adenosine-50-N-methyluronamide) 인 건강기능식품.

청구항 18

제 12항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 또는 헌팅턴 질환인 건강기능식품.

청구항 19

제 18항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 뇌졸중인 건강기능식품.

청구항 20

제 12항에 있어서,

상기 일반식 (I)을 갖는 아데노신 유도체 및 멜라토닌의 상대적인 조합중량비가 1 : 1~100 (w/w)의 비인 건강기능식품.

청구항 21

제 12항에 있어서,

상기 건강기능식품의 형태는 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태인 건강기능식품.

청구항 22

퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선 효과를 갖는 제 1항의 일반식 (I)을 갖는 아데노신 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 멜라토닌과의 조합을 유효성분으로 함유하는 식품.

청구항 23

제 22항에 있어서,

상기 식품형태는 캔디류의 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 또는 건강보조 식품류인 식품.

청구항 24

퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선 효과를 갖는 제 1항의 일반식 (I)을 갖는 아데노신 유도체 또는 이의 약학적으

로 허용가능한 염 및 멜라토닌과의 조합을 유효성분으로 함유하는 식품첨가제.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명의 아데노신 유도체 및 멜라토닌의 조합을 유효성분으로 함유하는 조성물은 래트에서의 뇌허혈성 손상에 대하여 탁월한 상승적인 저해활성을 나타내므로 퇴행성 뇌질환 치료에 유용하다.

배 경 기 술

[0002] [문헌 1] Jin DQ et al, Biochemical and Biophysical Research Communications, 331: 1264-1269, 2005.

[0003] [문헌 2] Lim CS et al, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 29: 1212-1216, 2006.

[0004] [문헌 3] Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA: Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view, Trends Neurosci 1999, 22:391-397.

[0005] [문헌 4] Margaill I, Parmentier S, Callebert J, Allix M, Boulu RG, Plotkine M: Short therapeutic window for MK-801 in transient focal cerebral ischemia in normotensive rats, J Cereb Blood Flow Metab 1996, 16:107-113.

[0006] [문헌 5] Hatfield RH, Gill R, Brazell C: The dose-response relationship and therapeutic window for dizocilpine (MK-801) in a rat focal ischaemia model, Eur J Pharmacol 1992, 216:1-7.

[0007] [문헌 6] Valtysson J, Hillered L, Andine P, Hagberg H, Persson L: Neuropathological endpoints in experimental stroke pharmacotherapy: the importance of both early and late evaluation, Acta Neurochir (Wien) 1994, 129:58-63.

[0008] [문헌 7] Von Lubitz DK, McKenzie RJ, Lin RC, Devlin TM, Skolnick P: MK-801 is neuroprotective but does not improve survival in severe forebrain ischemia, Eur J Pharmacol 1993, 233:95-100

[0009] [문헌 8] Colbourne F, Li H, Buchan AM, Clemens JA: Continuing postischemic neuronal death in CA1: influence of ischemia duration and cytoprotective doses of NBQX and SNX-111 in rats, Stroke 1999, 30:662-668.

[0010] [문헌 9] Price CJ, Warburton EA, Menon DK: Human cellular inflammation in the pathology of acute cerebral ischaemia, J Neurol Neurosurg Psychiatry 2003, 74:1476-1484.

[0011] [문헌 10] Clin Therap. (2008) 30(7):1196

[0012] [문헌 11] JPET. (2010) 332(3):1006

[0013] [문헌 12] Stroke (2004) 35:1197

[0014] [문헌 13] Brain Res. (2009) 1282:173.

[0015] [문헌 14] Chyan YJ, Poeggeler B, Omar RA, Chain DG, Frangione B, Ghiso J, Pappolla MA; Potent neuroprotective properties against the Alzheimer beta-amyloid by an endogenous melatonin-related indole structure, indole-3-propionic acid. J Biol. Chem. 1999 Jul 30;274(31):21937-42. PubMed PMID: 10419516;

[0016] [문헌 15] Pappolla MA, Chyan YJ, Omar RA, Hsiao K, Perry G, Smith MA, Bozner P. Evidence of oxidative stress and in vivo neurotoxicity of beta-amyloid in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a chronic oxidative paradigm for testing antioxidant therapies in vivo. Am. J. Pathol. 1998 Apr;152(4):871-7. PubMed PMID: 9546346; PubMed Central PMCID: PMC1858256;

[0017] [문헌 16] Bonnefont-Rousselot D, Collin F. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. Toxicology. 2010 Nov. 28;278(1):55-67. Epub 2010 Apr 24. Review. PubMed PMID: 20417677.

[0018] [문헌 17] Fishman P, Bar-Yehuda S, Ohana G, Barer F, Ochaion A, Erlanger A, Madi L. An agonist to the

A3 adenosine receptor inhibits colon carcinoma growth in mice via modulation of GSK-3 beta and NF-kappa B. Oncogene. 2004 Apr 1;23(14):2465-71.

[0019] [문헌 18] Madi L, Ochaion A, Rath-Wolfson L, Bar-Yehuda S, Erlanger A, Ohana G, Harish A, Merimski O, Barer F, Fishman P. The A3 adenosine receptor is highly expressed in tumor versus normal cells: potential target for tumor growth inhibition. Clin. Cancer Res. 2004 Jul 1;10(13):4472-9. PubMed PMID: 15240539.

[0020] [문헌 19] Ohana G, Bar-Yehuda S, Arich A, Madi L, Dreznick Z, Rath-Wolfson L, Silberman D, Slosman G, Fishman P. Inhibition of primary colon carcinoma growth and liver metastasis by the A3 adenosine receptor agonist CF101. Br. J. Cancer. 2003 Oct 20;89(8):1552-8.

[0021] [문헌 20] Gessi S, Merighi S, Varani K, Cattabriga E, Benini A, Mirandola P, Leung E, Mac Lennan S, Feo C, Baraldi S, Borea PA.Adenosine receptors in colon carcinoma tissues and colon tumoral cell lines: focus on the A(3) adenosine subtype. J Cell Physiol. 2007 Jun;211(3):826-36.

[0022] [문헌 21] Knight D, Zheng X, Rocchini C, Jacobson M, Bai T, Walker B. Adenosine A3 receptor stimulation inhibits migration of human eosinophils. J. Leukoc Biol. 1997 Oct;62(4):465-8.

[0023] [문헌 22] Ramakers BP, Riksen NP, Rongen GA, van der Hoeven JG, Smits P, Pickkers P. The effect of adenosine receptor agonists on cytokine release by human mononuclear cells depends on the specific Toll-like receptor subtype used for stimulation. Cytokine. 2006 Jul;35(1-2):95-9. Epub 2006 Sep 11

[0024] [문헌 23] Lee JY, Jhun BS, Oh YT, Lee JH, Choe W, Baik HH, Ha J, Yoon KS, Kim SS, Kang I. Activation of adenosine A3 receptor suppresses lipopolysaccharide-induced TNF-alpha production through inhibition of PI 3-kinase/Akt and NF-kappaB activation in murine BV2 microglial cells. Neurosci Lett. 2006 Mar 20;396(1):1-6. Epub 2005 Dec 1.

[0025] [문헌 24] Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD: Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model, Stroke 1986, 17:472-476.

[0026] [문헌 25] Yang Y, Shuaib A, Li Q: Quantification of infarct size on focal cerebral ischemia model of rats using a simple and economical method, J Neurosci Methods 1998, 84:9-16; 29.

[0027] [문헌 26] Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR: A semiautomated method for measuring brain infarct volume, J. Cereb. Blood Flow Metab 1990, 10:290-293.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0028] 본 발명은 아데노신 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다.

[0029] 생활수준이 향상되고 인간의 수명이 증가함에 따라 노화 및 노화에 관련된 각종 질병에 관심이 커지고 있으며 산화적 스트레스가 알츠하이머 증후군, 파킨슨 증후군, 헌팅턴 증후군과 같은 중추신경계의 퇴행성 뇌질환의 중요한 요인으로 밝혀졌다 (Jin DQ et al, Biochemical and Biophysical Research Communications, 331: 1264-1269, 2005; Lim CS et al, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 29: 1212-1216, 2006).

[0030]

[0031] 흥분성 세포독성, 주변-경색 탈분극증, 산화적 스트레스, 세포사멸 및 염증질환은 허혈증 이후의 뇌 손상의 진행과 관련이 있는 것으로 알려져 있으며[1. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA: Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view, Trends Neurosci 1999, 22:391-397,]허혈성 뇌손상 이후 효과적인 치료전략을 위하여, 이러한 개인적 요인들의 매우 다양하고 일시적인 양상(예를 들어, 발병 및 질환 정도)을 이해하고 이들의 병리생태학적 캐스케이드(cascade)를 적절하게 차단하는 것이 결정적이다. 이전에 다수의 연구자들이 NMDA 수용

체- 차단제인 MK-801이 허혈성 뇌손상을 현저하게 감소시킴을 보고하였으나, MK-801의 항-허혈 효과에 대한 데이터는 이의 단기간의 치료 기간 범위(window) 때문에 매우 실망하였다: MK-801의 신경보호적 효과는 래트 및 제르빌(gerbils)에서 겨우 국소적 허혈증의 발병 후 1시간 이내에 투여하여야만 효과를 나타냈으며[Margaill I, Parmentier S, Callebert J, Allix M, Boulu RG, Plotkine M: Short therapeutic window for MK-801 in transient focal cerebral ischemia in normotensive rats, J Cereb Blood Flow Metab 1996, 16:107-113. 3. Hatfield RH, Gill R, Brazell C: The dose-response relationship and therapeutic window for dizocilpine (MK-801) in a rat focal ischaemia model, Eur J Pharmacol 1992, 216:1-7] 게다가, MK-801는 허혈증 이후 신경세포사를 지연하였을 뿐 치료 몇 주 후에서의 신경 회복 또는 최종 세포 생존율을 개선시키지 못했다. [Valtysson J, Hillered L, Andine P, Hagberg H, Persson L: Neuropathological endpoints in experimental stroke pharmacotherapy: the importance of both early and late evaluation, Acta Neurochir (Wien) 1994, 129:58-63. Von Lubitz DK, McKenzie RJ, Lin RC, Devlin TM, Skolnick P: MK-801 is neuroprotective but does not improve survival in severe forebrain ischemia, Eur J Pharmacol 1993, 233:95-100]. 유사하게, AMPA 수용체 길항제들은 MCAO 28일후에 신경 손실을 유의적으로 보호하지 않았다[Colbourne F, Li H, Buchan AM, Clemens JA: Continuing postischemic neuronal death in CA1: influence of ischemia duration and cytoprotective doses of NBQX and SNX-111 in rats, Stroke 1999, 30:662-668.]. 이러한 NMDA 또는 AMPA 수용체 길항제들의 짧은 치료학적 범위 및 단기간 치료효과는 이러한 수용체들이 단지 초기 허혈증 캐스케이드에서 일시적 역할만 수행함을 의미하고 이러한 치료법중 하나에 의하여 영향을 나타내지 않는 몇몇 병태생리학적 과정들은 지연된 뇌허혈 손상에 기여할 것으로 간주된다. 이러한 의미에서 허혈증에서의 집단적인 조직손상을 예방하는 매력적인 치료적 목표로서, 흥분성 세포독성이후에 시작되고 몇일 및 몇주간 지속되는 염증에 주목하고 있다[Price CJ, Warburton EA, Menon DK: Human cellular inflammation in the pathology of acute cerebral ischaemia, J Neurol Neurosurg Psychiatry 2003, 74:1476-1484.]

[0032] 뇌졸중(stroke)은 뇌에 혈액을 공급하는 혈관이 막히거나 터짐으로써 그 부분의 뇌가 손상되어 나타나는 신경학적 증상을 일컫는 뇌혈관질환으로서 사회적 노령화와 함께 뇌졸중의 발병은 매우 빠르게 증가하고 있으며 우리나라의 경우에 단일 질환으로서 사망원인 제 1 위를 차지하고 있다. 현재 우리 나라에서 뇌졸중에 의한 사망률은 70-80/10만 명 정도이며 이는 미국, 캐나다, 호주 등의 선진국에 비해 매우 높은 수준이며 뇌졸중에 의한 사망률이 점차 줄어들고 있는 서구나 일본과는 달리 우리나라에서는 아직 뇌졸중 사망률이 줄어드는 경향을 보이고 있지 않고 있으며, 우리나라의 경우 노인 연령이 급속히 증가하고 있어 뇌졸중의 발생이 증가하는 것으로 추정되어 좌시할 수 없는 중요한 사회문제가 되고 있다.

[0033] 허혈성 혈관질환 환자(심근경색, 뇌졸중, 혈전증)는 세계적으로 2007년에 2,500만명이었으며, 2017년에는 2,800만명으로 꾸준히 증가할 것으로 추산되고 (DataMonitor, 2007) 또한 대부분의 OECD 회원국에서 허혈성 혈관계 질환 (10만명당 226.6명·2004년)으로 인한 사망원이 가장 많았으며 암질환 (165.6명)이 뒤를 이었다. 뇌졸중은 뇌의 혈관 파열로 인한 뇌조직 손상이 특징되는 출혈성 뇌졸중과, 뇌로 공급되는 혈류의 흐름이 차단되어 뇌경색이 유발되는 허혈성 뇌졸중으로 나눠짐. 뇌졸중은 연도에 따라 암과 함께 국내 사망원인 1, 2위를 다투는 매우 발병 빈도가 높은 질환이며(통계청 2002부터 2008년까지의 자료) 뇌졸중으로 인한 국내 사망률은 OECD 국가 중 2위에 달하고 있다. 이들 허혈성 혈관질환의 치료 및 관리를 위하여 2008년 미국심장학회(AHA) 의 보고에 따르면 뇌졸중에 연간 655억불의 막대한 비용이 지출되고 있으며 고혈압에 대한 비용지출 695억불보다 훨씬 큰 비용을 차지하고 있다.

[0034] 또한, 미국에서 고혈압에 의한 사회적 비용은 2008년 현재 연간 690억불로 예측되며 치료제 및 용구 시장은 240억불에 달하고 있는 반면에 뇌졸중의 경우 사회적 비용은 650억 불로 비슷한데 비해 치료제 시장은 13억불에 불과한 실정이다. 이러한 사실은 5-10년 내로 효과가 입증된 뇌졸중 치료약물들이 시판될 경우에 220억불 이상의 잠재 시장 가치를 지님을 의미하여 허혈성 혈관질환이 신약개발의 미개척 황금시장이 됨을 의미하고 선진국들에서도 이러한 허혈성 뇌졸중 치료제 시장의 블루 오션으로서의 가치를 깨달아 연구 개발 노력이 활발히 이루어지고 있으며 후발 생명공학 국가인 우리나라 실정에서도 비교적 경쟁 초기 단계인 이 분야의 치료제 개발이 절실히 요구되고 있다.

[0035] 우리나라의 경우에 뇌졸중은 단일 질환으로써 사망원인 제 1 위를 차지함으로써 미국, 캐나다, 호주 등의 선진국에 비해서 높은 것으로 나타나 있으며 뇌졸중 (중풍)은 운동, 감각기능의 손상 및 기억, 학습, 연산, 추리 등 고차원적 기능의 저해를 야기하여 삶의 질을 파괴하며 환자가 사망에 이를 때까지 본인과 그 가족에게 많은 정신적, 육체적 고통을 야기하고 또한 현대 사회의 노령화 추세로 노인 인구의 급속한 증가가 이루어지고 있는 최근의 경향에 비추어 볼 때 뇌졸중 발생과 발생 후 생존 기간의 증가는 큰 사회적 문제로 대두되고 있다. 따라

서 본 연구과제에서 제시하는 중추신경계에 대한 교세포의 역할을 밝히는 것은 뇌졸중에 대한 증상 경감 및 치료에 기여하게 되어 사회적, 경제적 손실을 최소화하는데 기여할 것임.

[0036] 한편, 국내에서는 주로 혈관질환 치료제 개발과 관련하여 발병기전 규명을 위한 분자생물학적 혹은 세포생물학적인 연구가 활발히 진행되고 있고 일부 허혈성 혈관질환 치료를 위한 치료제 개발이 시도되었지만 매우 산발적으로 되어 왔고 체계적인 연구는 없는 실정이며, 일부 소속 연구진은 국제적으로 경쟁력있는 선두 그룹을 형성하고 있다.

[0037] 앞에서 언급한 바와 같이 뇌졸중의 임상적인 중요성과 큰 시장 등에도 불구하고 뇌졸중에 대한 치료제 개발은 현재까지 걸음마 수준에 불과하며 임상적으로 허용된 뇌졸중의 치료제는 tissue plasminogen activator (t-PA)를 제외하고는 없는 실정으로서 뇌졸중은 단일 질환이라기보다는 다양한 원인에 의해서 발생하며 뇌경색, 뇌출혈, 지주막하 출혈 등 다양한 질환이 포함되어 있으며, 이의 원인 질환이 각기 다르며, 뇌졸중은 동맥경화, 아밀로이드 뇌혈관 병증, 동맥 박리 등의 다양한 뇌혈관 질환에 의해서 유발될 수 있으며 부정맥이나 관상동맥 질환으로 인해서 심인성 색전증이 발생하여 뇌졸중이 발생한다. 이렇게 원인은 다양하나 세포생물학적으로는 혈액공급의 저하와 이로 인한 세포사멸의 유발이란 점에서는 동일한 것으로 여겨지고 있으며 따라서 허혈에 의한 뇌세포의 사멸기전에 대한 이해는 뇌졸중의 예방, 조절 및 치료법 개발의 기반이 되는 핵심기술이다. 국내외적으로 많은 연구진들이 이러한 신경세포의 사멸에 대한 기전을 연구함으로써 뇌질환을 막고자 하는 노력을 기울여 왔다. 뇌졸중의 경우에 현재 뚜렷한 치료제가 개발되어 있지 못하고 임상적으로는 뇌혈관에 생성된 혈전을 용해하기 위하여 사용되고 있는 tPA가 유일한 약물이나 많은 임상의사들이 뇌출혈 등의 부작용을 우려하여 사용을 꺼리고 있다. 지금까지 많은 연구진들이 흥분성신경전달물질인 글루타민산 수용체에 대한 길항제나 항산화제를 허혈성 뇌졸중 치료제로 개발하고자 하였으나 약효가 미미하거나 약물의 독성으로 인하여 모두 실패로 끝났다.

[0038] 뇌졸중은 단일 원인으로 야기되는 질환이 아니므로 다양한 세포사멸의 경로와 각 원인을 이해하고 복합적 처방에 따라 치료하는 것이 반드시 필요하다. 서로 상이한 기전을 가지는 약물의 복합 처방에 의한 뇌졸중 치료 상승작용의 예로는, 아스피린과 dipyridamole을 함께 투여하는 경우에 아스피린 단독 투여에 비하여 뇌졸중 치료의 예후를 좋게 하였으며, (Clin Therap. (2008) 30(7):1196) 또한 17β-Estradiol 과 tPA의 복합 처방은 17β-Estradio이 tPA 투여로 인한 urokinase, MMP2, and MMP9의 발현증가로 생기는 뇌출혈의 부작용을 줄여줌으로써 허혈성 뇌졸중 환자에서 치료 시간대를 늘릴 수 있는 효과를 보여준 바 있다 (JPET. (2010) 332(3):1006). NMDA 수용체 차단물질인 메만틴(Memantine) 과 베타아드레날린 beta 2 수용체 효현제인 Clenbuterol 의 복합투여는 영구적 국소허혈모델에서 허혈성 뇌손상을 억제하는 효과를 상승적으로 보여주었고 (Stroke (2004) 35:1197). 또한 memantine과 칼슘이온 차단물질인 Topiramate의 복합투여는 신생쥐에서 저산소증에 의한 뇌손상을 상승적으로 억제하였으나 (Brain Res. (2009) 1282:173). 그러나 이러한 연구결과들은 증상을 완화시키는 목적이 대부분이며 뇌조작 보호기전에 근거한 상승적 효과를 얻지는 못하였다.

[0039] 환자가 뇌졸중 발생 후 병원 응급실에 도착하기까지 수시간이 지나는 것이 보통이며 뇌졸중의 발생 후 수분에서 수시간 내에 신경세포는 과도함 글루타민산의 유리로 인한 흥분성신경독성에 의하여 일차 손상을 받게 되며 시간이 지나면서 산소 및 질소라디칼의 과도한 생성에 노출되어 이차적 손상을 받게 된다. 수십 시간이 지나면 염증반응으로 인하여 지속적이고 심한 손상을 받게 되고 따라서 흥분성신경독성 차단 물질의 사용은 현실적인 어렵기 때문에 임상적으로 무의미하다.

[0040] 따라서, 이미 초기 치료시기(허혈 후 2-3 시간)가 지난 경우에도 항산화약물의 사용은 의미가 있으며 특히 항염증물약물의 사용은 지속적인 뇌손상을 막음으로써 매우 의미가 크므로 본 발명자는 상기한 바와 같은 항산화 물질 및 항염증물질로 구성된 두가지 약물을 복합 투여함으로써 상승적인 치료효과를 발견하였고 최적의 복합 비율을 결정하였다.

[0041] 항산화물질의 예로는 멜라토닌(melatonin)은 수면호르몬이자 대표적인 항산화물질로 알려져 있으며, 허혈성 뇌손상시 멜라토닌이 신경 조직의 손상을 억제하고, 회복을 위한 매개자로서의 효과가 있음이 알려진 바가 있다. (Chyan YJ, Poeggeler B, Omar RA, Chain DG, Frangione B, Ghiso J, Pappolla MA; Potent neuroprotective properties against the Alzheimer beta-amyloid by an endogenous melatonin-related indole structure, indole-3-propionic acid. J Biol. Chem. 1999 Jul 30;274(31):21937-42. PubMed PMID: 10419516; Pappolla MA, Chyan YJ, Omar RA, Hsiao K, Perry G, Smith MA, Bozner P. Evidence of oxidative stress and in vivo neurotoxicity of beta-amyloid in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a chronic oxidative paradigm for testing antioxidant therapies in vivo. Am J Pathol. 1998 Apr;152(4):871-7. PubMed PMID:

9546346; PubMed Central PMCID: PMC1858256; Bonnefont-Rousselot D, Collin F. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. Toxicology. 2010 Nov. 28;278(1):55-67. Epub 2010 Apr 24. Review. PubMed PMID: 20417677).

[0042] 아데노신 유도체중 하나인 2-클로로-N^6-(3-아이오도벤질)-아데노신-5‘-N-메틸유로나미드(chloro-N6-(3-iodo-benzyl)-adenosine-50-N-methyluronamide, 이하, Cl-IB-MECA라 함)는 항암제로 개발되고 있는 약물로서 (Fishman P, Bar-Yehuda S, Ohana G, Barer F, Ochaion A, Erlanger A, Madi L. An agonist to the A3 adenosine receptor inhibits colon carcinoma growth in mice via modulation of GSK-3 beta and NF-kappa B. Oncogene. 2004 Apr 1;23(14):2465-71; Madi L, Ochaion A, Rath-Wolfson L, Bar-Yehuda S, Erlanger A, Ohana G, Harish A, Merimski O, Barer F, Fishman P. The A3 adenosine receptor is highly expressed in tumor versus normal cells: potential target for tumor growth inhibition. Clin Cancer Res. 2004 Jul 1;10(13):4472-9. PubMed PMID: 15240539; Ohana G, Bar-Yehuda S, Arich A, Madi L, Dreznick Z, Rath-Wolfson L, Silberman D, Slosman G, Fishman P. Inhibition of primary colon carcinoma growth and liver metastasis by the A3 adenosine receptor agonist CF101. Br J Cancer. 2003 Oct 20;89(8):1552-8; Gessi S, Merighi S, Varani K, Cattabriga E, Benini A, Mirandola P, Leung E, Mac Lennan S, Feo C, Baraldi S, Borea PA.Adenosine receptors in colon carcinoma tissues and colon tumoral cell lines: focus on the A(3) adenosine subtype. J Cell Physiol. 2007 Jun;211(3):826-36) 아데노신 A3 수용체에 작용하여 염증세포의 활성을 저하시킬 수 있는 것으로 알려졌다 (Knight D, Zheng X, Rocchini C, Jacobson M, Bai T, Walker B. Adenosine A3 receptor stimulation inhibits migration of human eosinophils.J Leukoc Biol. 1997 Oct;62(4):465-8; Ramakers BP, Riksen NP, Rongen GA, van der Hoeven JG, Smits P, Pickkers P. The effect of adenosine receptor agonists on cytokine release by human mononuclear cells depends on the specific Toll-like receptor subtype used for stimulation. Cytokine. 2006 Jul;35(1-2):95-9. Epub 2006 Sep 11;Lee JY, Jhun BS, Oh YT, Lee JH, Choe W, Baik HH, Ha J, Yoon KS, Kim SS, Kang I. Activation of adenosine A3 receptor suppresses lipopolysaccharide-induced TNF-alpha production through inhibition of PI 3-kinase/Akt and NF-kappaB activation in murine BV2 microglial cells. Neurosci Lett. 2006 Mar 20;396(1):1-6. Epub 2005 Dec 1.)

[0043] 그러나 상기 문헌의 어디에도 멜라토닌과 아데노신 유도체와의 병용투여로 인한 뇌졸중에 대한 상승적 치료효과를 언급하거나 제시한 바는 없다.

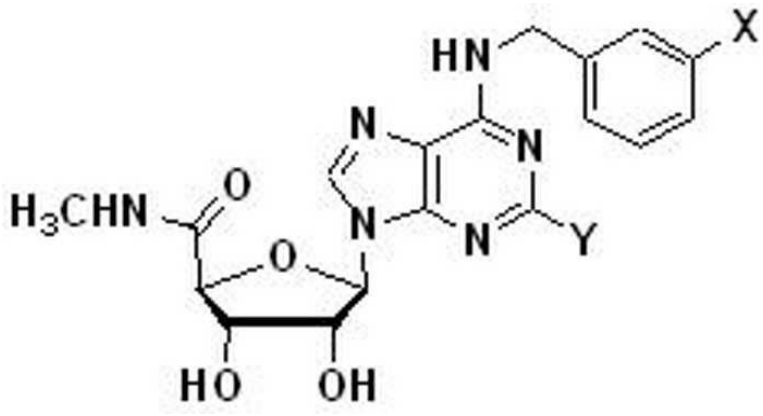
[0044] 이에 따라, 본 발명자들은 본 발명은 뇌졸중 치료 및 개선에 효능이 탁월한 화합물 조합을 찾고자 연구한 결과, 본 연구자는 허혈에 의한 뇌조직의 손상을 항산화작용을 가지는 멜라토닌 약물과 항염증작용을 가지는 아데노신 유도체 물질을 조합하여 사용함으로써 실험동물에서 허혈에 의한 뇌조직 손상을 상승적으로 억제할 수 있음을 실험적으로 확인하여 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0045] 상기 목적을 해결하기 위해 본 발명은 하기 일반식 (I)을 갖는 아데노신 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 멜라토닌과의 조합을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환의 치료 및 예방용 약학조성물을 제공한다.

[0046] 또한, 본 발명은 하기 일반식 (I)을 갖는 아데노신 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 멜라토닌과의 조합을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선을 위한 건강기능식품을 제공한다.

화학식 1

[0047] 

[0048] (I)

[0049] 상기 식에서,

[0050] X 는 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로겐 원자, 히드록시기, 및 C_1 내지 C_3 저급알킬기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기이며,

[0051] Y 는 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로겐 원자, 히드록시기, 및 C_1 내지 C_3 저급알킬기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기이다.

[0052] 상기 일반식 (I)에 속하는 화합물군 중에 바람직하기로는 X는 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로겐 원자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기, 보다 바람직하게는 요오드기이며, Y는 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로겐 원자, 보다 바람직하게는 염소원자인 화합물 군이다.

[0053] 상기 일반식 (I)에 속하는 화합물군 중에 가장 바람직한 화합물로서,

[0054] 2-클로로-N^6-(3-아이오도벤질)-아데노신-5 '-N-메틸유로나미드(chloro-N6-(3-iodo-benzyl)-adenosine-50-N-methyluronamide, 이하, Cl-IB-MECA라 함)을 들 수 있다.

[0055] 본원에서 정의되는 상기 조합은 상기 일반식 (I)을 갖는 아데노신 유도체 및 멜라토닌의 상대적인 조합중량비가 1 : 1~100 (w/w), 바람직하게는 1 : 2~30 (w/w), 보다 바람직하게는 1 : 3~20 (w/w)의 비로 배합되는 것이다.

[0056] 상기 구조식 (I)로 표시되는 본 발명의 화합물들은 당해 기술 분야에서 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용 가능한 염 및 용매화물로 제조될 수 있다.

[0057] 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가 염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

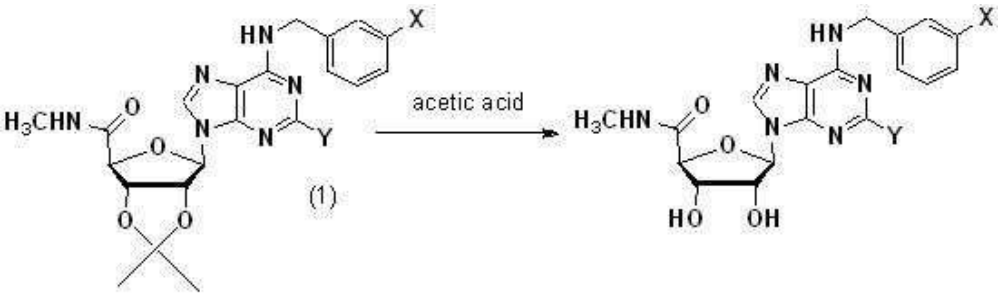
[0058] 이 때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, *p*-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산 (lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 히드로 아이오딕산 등을 사용할 수 있다.

[0059] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이 때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0060] 상기의 일반식 (Ⅰ)의 구조를 갖는 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 일반식 (Ⅰ)의 구조를 갖는 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성기의 염을 포함한다. 예를 들면, 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염이 포함되며, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄설포네이트(메실레이트) 및 *p*-톨루엔설포네이트(토실레이트) 염이 있으며, 당업계에서 알려진 염의 제조방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.

[0061] 본 발명의 다른 목적은 상기 일반식 (Ⅰ) 화합물의 제조방법을 제공하는 것으로, 이는 시중 구입가능하거나 당업계에 공지된 합성방법으로 제조가능하며, 하기의 반응식들에 도시된 방법에 의해 화학적으로 합성될 수 있지만, 이들 예로만 한정되는 것은 아니다.

[0062] [반응식 1]



[0063]

[0064] (3aS, 4R. 6aR)-4-[2-클로로-6-(3-아이오도벤질아미노)퓨린-9-일]-2,2-디메틸테트라히드로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-카르복실산 메틸아미드(1)에 초산 용액 등의 약산성 시약으로 반응시켜 얻어진 반응 혼합물을 감압농축하고 농축물의 pH를 포화 암모니아 및 메탄올 용액 등의 염기로 중성으로 적정화시키고 이 농축물을 실리카겔 컬럼 크로마토그리피로 정제하여 본 발명의 아데노신 유도체를 수득가능하다.

[0065] 상기 퇴행성 뇌질환은 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 또는 헌팅턴 질환, 구체적으로는, 뇌졸중, 혈관성 치매 및 알츠하이머 치매, 보다 바람직하게는 뇌졸중, 보다 더 바람직하게는 허혈성 뇌졸중 질환을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0066] 따라서 본 발명에서는 일반식 (I)을 갖는 아데노신 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 멜라토닌과의 조합을 유효성분으로 함유하고 약학적으로 허용가능한 부형제 또는 담체를 함유하는 퇴행성 뇌질환의 치료 및 예방용 약학조성물을 제공한다.

[0067] 또한 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 일반식 (I)을 갖는 아데노신 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 멜라토닌과의 조합을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환의 치료 및 예방을 위한 약학 조성물 및 건강기능식품을 제공한다.

[0068] 본 발명의 일반식 (I)을 갖는 아데노신 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 멜라토닌과의 조합이 실험동물에서 허혈에 의한 뇌조직 손상을 상승적으로 억제할 수 있음을 실험적으로 확인하여 퇴행성 뇌질환의 치료 및 예방에 유용함을 확인하였다.

[0069] 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 조합을 0.01 내지 99% 중량으로 포함한다.

[0070] 그러나 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 변할 수 있다.

[0071] 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및

희석제를 더 포함할 수 있다.

[0072] 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 이에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 적어도 면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0073] 본 발명의 화합물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 화합물은 1일 0.01 mg/kg 내지 10 g/kg으로, 바람직하게는 1 mg/kg 내지 1 g/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 그러므로 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0074] 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 및 직장, 또는 정맥의 방법을 통하여 투여 할 수 있다.

[0075] 또한 본 발명은 일반식 (I)을 갖는 아데노신 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 멜라토닌과의 조합을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0076] 본 발명의 화합물을 포함하는 건강기능식품은 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 화합물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0077] 따라서 또한, 본 발명은 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선 효과를 갖는 일반식 (I)을 갖는 아데노신 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 멜라토닌과의 조합을 유효성분으로 함유하는 식품 또는 식품첨가제를 제공한다.

[0078] 본 발명의 화합물을 첨가 가능한 식품형태는 캔디류의 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 또는 건강보조 식품류인 식품 등을 포함한다.

[0079] 본 발명의 화합물은 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 화합물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

[0080] 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물의 혼합물을 함유하는 것 외에 액체 성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 화합물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0081] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍

미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

[0082] 본 발명의 일반식 (I)을 갖는 아데노신 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 멜라토닌과의 조합은 래트에서의 뇌허혈성 손상에 대하여 탁월한 저해능을 나타냄을 확인하여 퇴행성 뇌질환의 치료 및 예방에 유용한 약학 조성물 또는 건강 기능 식품을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0083] 도 1은 멜라토닌과 Cl-IB-MECA의 복합처치로 인한 허혈성 뇌조직 손상 억제사진이며 TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)염색을 통한 뇌조직손상의 측정을 통하여 얻은 결과이며;

도 2는 멜라토닌과 Cl-IB-MECA의 허혈성 뇌손상에 대한 보호효과를 나타낸 도이며(용량 반응의 상관관계 표시);

도 3은 허혈성 뇌손상 후 신경행동학적 손상에 대한 멜라토닌 및 Cl-IB-MECA의 억제효과를 나타낸 도이며;

도 4는 허혈성 뇌손상 후 허혈적 뇌조직손상에 멜라토닌 및 Cl-IB-MECA의 상승적 보호효과를 나타낸 도이며;

도 5는 허혈성 뇌손상 후 신경행동학적 손상에 대한 멜라토닌 및 Cl-IB-MECA의 상승적 억제효과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0084] 이하, 본 발명을 하기 참고예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0085] 단, 하기 참고예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 참고예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0086] **실시예 1. 시료의 준비**

[0087] 1-1. 2-클로로-N^6-(3-아이오도벤질)-아데노신-5‘-N-메틸유로나미드(chloro-N6-(3-iodo-benzyl)-adenosine-50-N-methyluronamide의 준비

[0088] 본 실험에서 사용한 2-클로로-N^6-(3-아이오도벤질)-아데노신-5‘-N-메틸유로나미드(chloro-N6-(3-iodo-benzyl)-adenosine-50-N-methyluronamide,(Cl-IB-MECA)은 시그마사(Sigma, C277)에서 구입하여 DMSO-cremophor-saline 혼합용매 (비율 5:10:85)에 녹여 실험에 사용하였다.

[0089] 1-2. 멜라토닌(melatonin)의 준비

[0090] 본 실험에서 사용한 멜라토닌(melatonin)은 시그마사(sigma, M5250)에서 구입하여 DMSO-cremophor-saline 혼합용매 (비율 5:10:85)에 녹여 실험에 사용하였다.

[0091] 1-3. 조합

[0092] 상기 Cl-IB-MECA 및 멜라토닌을 DMSO-cremophor-saline 혼합용매 (비율 5:10:85)에 녹여 다양한 용량비로 조합 (이하 CM이라 함)하여 실험에 사용하였다.

[0093] **참고예 1. 실험동물의 준비**

[0094] SD 래트 (260-270g 수컷)를 회사 (Charles River Laboratories, Seoul, Korea, 한국)에서 공급받아 실험 전 5

일간 환경에 순화시켜 사용하였다.

[0095] **참고예 2. 통계처리**

[0096] Data는 means ± S.D. (생체내 뇌경색 및 신경행동학적 시험)으로 처리하였다.

[0097] **실험예 1. 국소 뇌허혈 실험 모델**

[0098] 상기 실시예에서 수득한 시료의 국소 뇌허혈 실험에서의 효과를 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.(Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD: Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model, Stroke 1986, 17:472-476)

[0099] 1-1.국소 뇌허혈 실험 모델

[0100] 래트를 마스크를 이용하여 N_2O 및 O_2 (70:30v/v) 혼합물중 3.0% 이소플루란(isoflurane)으로 시작하여 2% 이소플루란을 유지시켜 마취하였다. 국소 뇌 허혈은 우측 혈관내 MCAO으로 유도하였다. 요약하면, 3-0 heat-blunted 단섬유성 나일론 봉합사(monofilament nylon suture; Ethicon, Johnson-Johnson, Brussels, Belgium)를 MCA 소공을 폐색시키고자 우측 외부 경동맥 절개 분분 내강에 삽입하고 내측 경동맥으로 17.5 mm로 진입시켰다. 상기 봉합을 동물 회복하도록 1시간 반 후에 제거하였다. 수술-대조군을 MCAO를 제외하고 동일한 수술법으로 수행하였다. 전제 실험 기간동안 체온은 직장용 온도계 및 온열 패드를 이용하여 37° C± 0.3° C으로 조절 및 유지시켰다. 생리학적 수치는 MCAO 15분 전 및 재관류 15분 후에 측정하고 평균 혈압은 혈압기 (MicroMed, Lousville, KY)로 5분간 측정하였다. 혈중 pH, PaO_2, $PaCO_2$ 및 혈당 수치는 분석기(Ciba Corning Diagnostics Corp., Medfield, MA)로 측정하였다. 시료는 허혈 유도 후 3시간째에 래트의 복강 내로 투여하였다 (멜라토닌의 경우는 1, 3, 10 혹은 30 mg/kg; Cl-IB-MECA의 경우는 0.1, 0.3, 1 혹은 3 mg/kg).

[0101] 1-2. 경색 부피의 측정

[0102] 래트를 클로랄 히드레이트로 마취시킨 후에, MCAO 1일 후에 경추탈골시켰다. 뇌 동맥 절편 (2 mm)을 시약으로 (2% 트리페닐테트라졸리움 염산, 시그마-알드리히, St. Louis, MO) 30분간 37°C에서 염색하고 1일간 0.1 M 인산완충액 (PB)중 4% 파라포름알데히드 (pH 7.4)로 고정하고 연속적으로 2일간 30% sucrose 4°C에서 30% 수크로스(sucrose)를 함유한 PB에서 동결보호시켰다. 브레그마의 +4mm(전방) 및-6mm(후방) 사이의 경색 절단부분프로그램(OPTIMAS5.1image analysis program, BioScan Inc. Edmonds, WA)으로 측정하였다. 뇌경색 크기는 경색영역 외부 둘레로 수동으로 측정하였다. 전체 경색 부피는 문헌(Yang Y, Shuaib A, Li Q: Quantification of infarct size on focal cerebral ischemia model of rats using a simple and economical method, J Neurosci Methods 1998, 84:9-16; Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR: A semiautomated method for measuring brain infarct volume, J Cereb Blood Flow Metab 1990, 10:290-293) 에 개시된 바대로 전체 뇌 부피 (total brain volume) 대비 허혈로 인하 뇌부종을 보상하여 계산된 뇌 허혈 부피 (ischemic volume compensated for brain edema)를 표시되는 바와 같은 6개 선택 절편으로부터 계산하였다 (도 1 참조).

[0103] 상기 실험 결과, 대조군과 약물투여군 (멜라토닌과 Cl-IB-MECA의 복합투여)의 뇌절편으로 부터 손상된 부위를 TTC염색으로 분석하면 멜라토닌과 Cl-IB-MECA의 복합투여로 허혈성 뇌세포 손상을 유의적으로 억제한다는 것을 알 수 있었다 (도 1 위 참조). 또한 멜라토닌은 허혈성 뇌조직 손상에 대한 억제작용이 미약한 편이며 저농도에서는 효과가 없고 높은 농도에서는 오히려 허혈로 인한 뇌손상을 증가시키는 독성작용을 나타냈다 (도 2A 참조). 이에 반하여 Cl-IB-MECA는 사용된 용량 범위에서 뇌조직 손상의 보호작용이 용량 의존적으로 증가하였다 (도 2B 참조). 3 mg/kg의 용량에서 Cl-IB-MECA는 약 50%정도 억제하는 것으로 보임 (도 2B 참조).

[0104] **실험예 2. 허혈성 뇌손상 후 신경행동학적 손상에 대한 억제효과**

[0105] 상기 실시예에서 수득한 시료의 허혈성 뇌손상 후 신경행동학적 손상에 대한 억제효과를 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다. (Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD: Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model, Stroke 1986, 17:472-476)

[0106] 신경학적 결손(Neurological deficits)을 실험과정을 모은 관찰자에 의하여 MCA 발생 2.5 시간 및 24시간 후에 세심하게 평가하였다. 신경학적 결손을 4개 단계: 즉, 0, 신경학적 결손 없음(no neurologic deficit); 1, 앞다리 굴절(forelimb flexion); 2, 앞다리 굴절 및 회전없이 측방 누름에 감소된 저항 (forelimb flexion and decreased resistance to lateral push without circling); 3, 2단계와 같으나 회전있음(same behavior as grade 2, with circling)로 구분하여 평가하였다.

[0107] 멜라토닌과 Cl-IB-MECA의 허혈성 뇌손상 후 신경행동학적 손상에 대한 억제효과는 뇌조직손상에 대한 보호효과(도 2)에서 보는 바와 일치하는 결과를 보였다. 도 3은 멜라토닌은 신경행동학적 손상에 대한 억제작용이 미약한 편이며 저농도에서는 효과가 없고 높은 농도에서는 오히려 허혈로 인한 신경행동학적 손상을 증가시키는 독성작용을 나타냈다. 이에 반하여 Cl-IB-MECA는 사용된 용량 범위에서 신경행동학적 손상의 억제작용이 용량 의존적으로 증가하였다 (도 3).

[0108] **실험예 3. 멜라토닌과 Cl-IB-MECA의 복합투여에 의한 상승적 허혈성 뇌손상 억제효과**

[0109] 상기 실시예 1에 기술된 방법으로 멜라토닌의 투여량을 고정하거나 Cl-IB-MECA의 투여량을 고정하고 다른 약물의 용량을 변동시킴으로서 상승작용에 대한 적정 용량을 정하고자 하였다.

[0110] 본 연구결과, 3 mg/kg의 멜라토닌과 0.3 mg/kg의 Cl-IB-MECA에서 가장 뇌조직 보호 효과가 크다는 것을 알 수 있었다 (도 4).

[0111] **실험예 4. 멜라토닌과 Cl-IB-MECA의 복합투여에 의한 상승적 신경행동학적 손상에 대한 억제효과**

[0112] 상기 실시예 1에 기술된 방법으로 멜라토닌의 투여량을 고정하거나 Cl-IB-MECA의 투여량을 고정하고 다른 약물의 용량을 변동시킴으로서 상승작용에 대한 적정 용량을 정하고자 하였다.

[0113] 본 연구결과, 3 mg/kg의 멜라토닌과 0.3 mg/kg의 Cl-IB-MECA에서 허혈 후 뇌기능회복 효과가 가장 크다는 것을 알 수 있었다 (도 5).

[0114] 하기에 본 발명의 화합물을 함유하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0115] **제제예 1. 산제의 제조**

[0116] CM	200 mg
[0117] 유당	100 mg
[0118] 탈크	10 mg

[0119] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

[0120] **제제예 2. 정제의 제조**

[0121] CM	200 mg

[0122] 옥수수전분 100 mg

[0123] 유당 100 mg

[0124] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0125] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0126] **제제예 3. 캅셀제의 제조**

[0127] CM 200 mg

[0128] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0129] 락토오스 14.8 mg

[0130] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0131] 통상의 캅셀제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캅셀제를 제조한다.

[0132] **제제예 4. 주사제의 제조**

[0133] CM 200 mg

[0134] 만니톨 180 mg

[0135] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0136] $Na_2HPO_4,12H_2O$ 26 mg

[0137] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ㎖) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0138] **제제예 5. 액제의 제조**

[0139] CM 200 mg

[0140] 이성화당 10 g

[0141] 만니톨 5 g

[0142] 정제수 적량

[0143] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충진하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0144] **제제예 6. 건강 식품의 제조**

[0145] CM 1000 mg

[0146] 비타민 혼합물 적량

[0147] 비타민 A 아세테이트 70 ㎍

[0148] 비타민 E 1.0 mg

[0149] 비타민 B1 0.13 mg

[0150] 비타민 B2 0.15 mg

[0151] 비타민 B6 0.5 mg

[0152] 비타민 B12 0.2 ㎍

[0153] 비타민 C 10 ㎎

[0154] 비오틴 10 ㎍

[0155] 니코틴산아미드 1.7 ㎎

[0156] 엽산 50 ㎍

[0157] 판토텐산 칼슘 0.5 ㎎

[0158] 무기질 혼합물 적량

[0159] 황산제1철 1.75 ㎎

[0160] 산화아연 0.82 ㎎

[0161] 탄산마그네슘 25.3 ㎎

[0162] 제1인산칼륨 15 ㎎

[0163] 제2인산칼슘 55 ㎎

[0164] 구연산칼륨 90 ㎎

[0165] 탄산칼슘 100 ㎎

[0166] 염화마그네슘 24.8 ㎎

[0167] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0168] **제제예 7. 건강 음료의 제조**

[0169] CM 1000 ㎎

[0170] 구연산 1000 ㎎

[0171] 올리고당 100 g

[0172] 매실농축액 2 g

[0173] 타우린 1 g

[0174] 정제수를 가하여 전체 900 ㎖

[0175] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

[0176] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

도면1

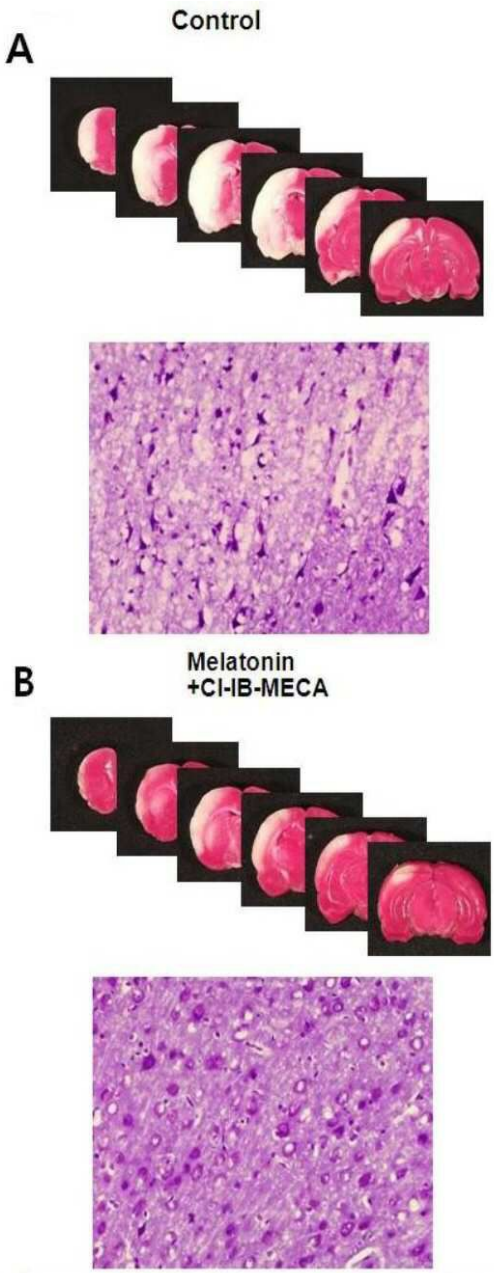


그림 1. 허혈성 뇌손상에 대한 멜라토닌과 CI-IB-MECA의 상승적 억제
위: TTC 염색, 아래: cresyl violet 염색

도면2

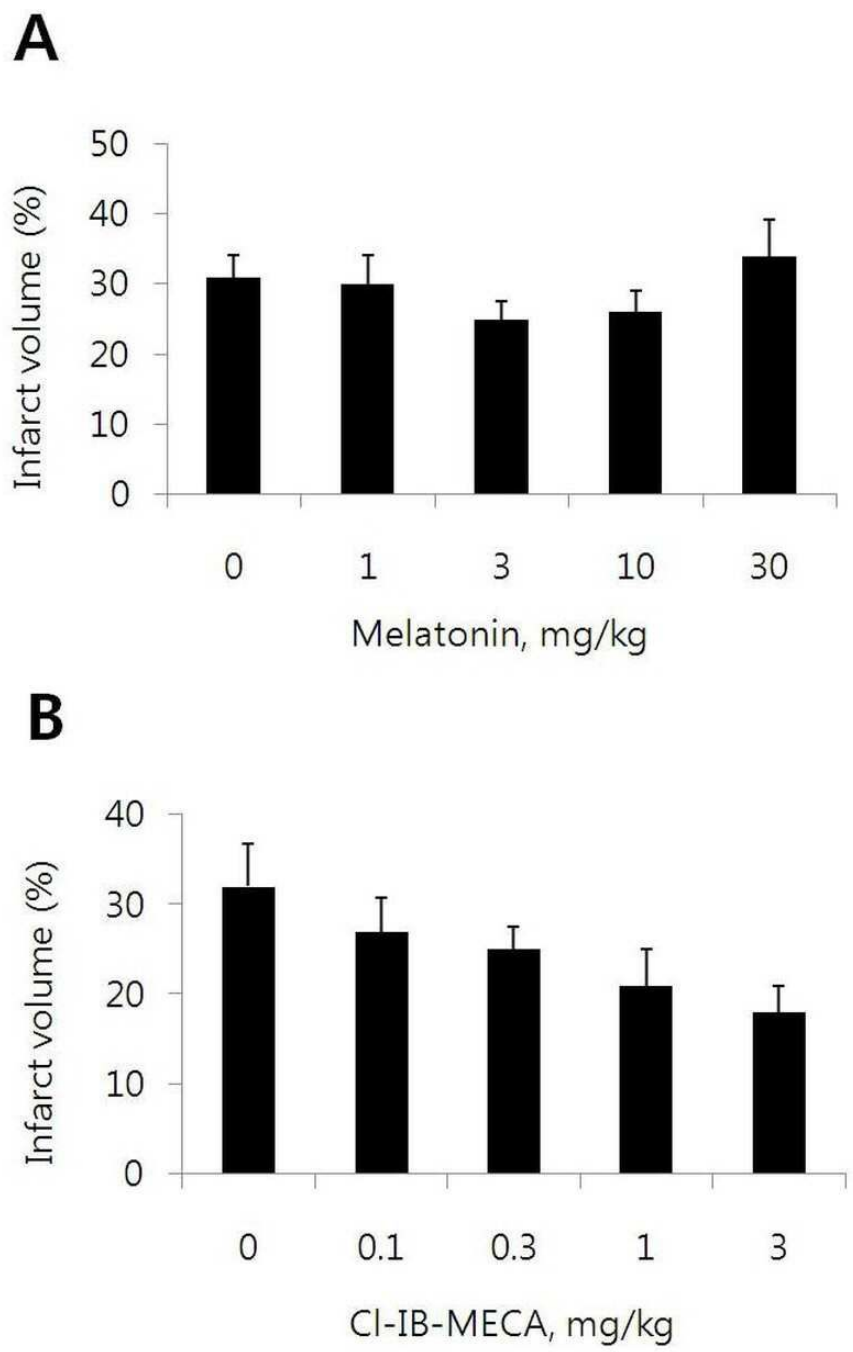


그림 2. 멜라토닌과 Cl-IB-MECA의 허혈성 뇌손상에 대한 보호효과: 용량 반응의 상관관계

도면3

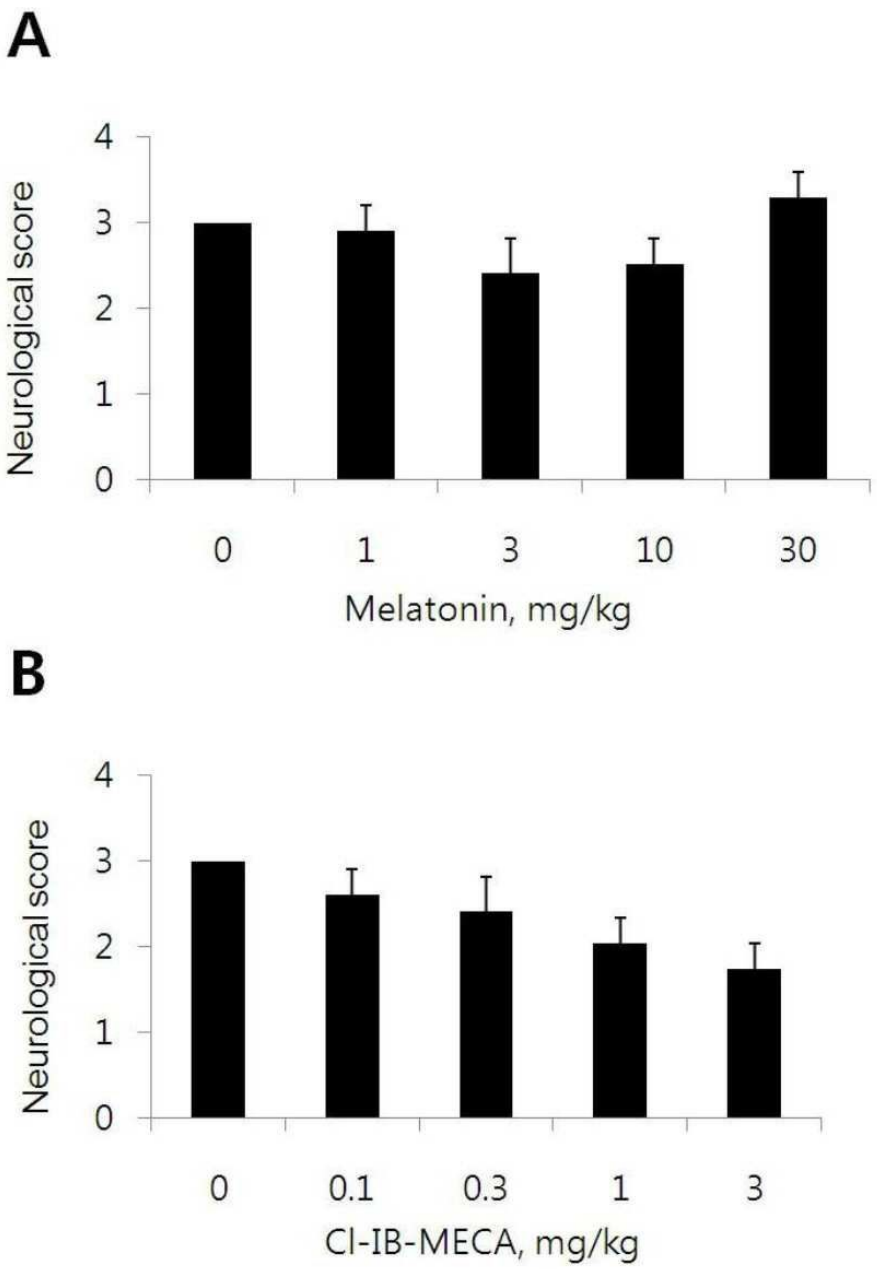


그림 3. 허혈성 뇌손상 후 신경행동학적 손상에 대한 멜라토닌과 Cl-IB-MECA의 억제효과

도면4

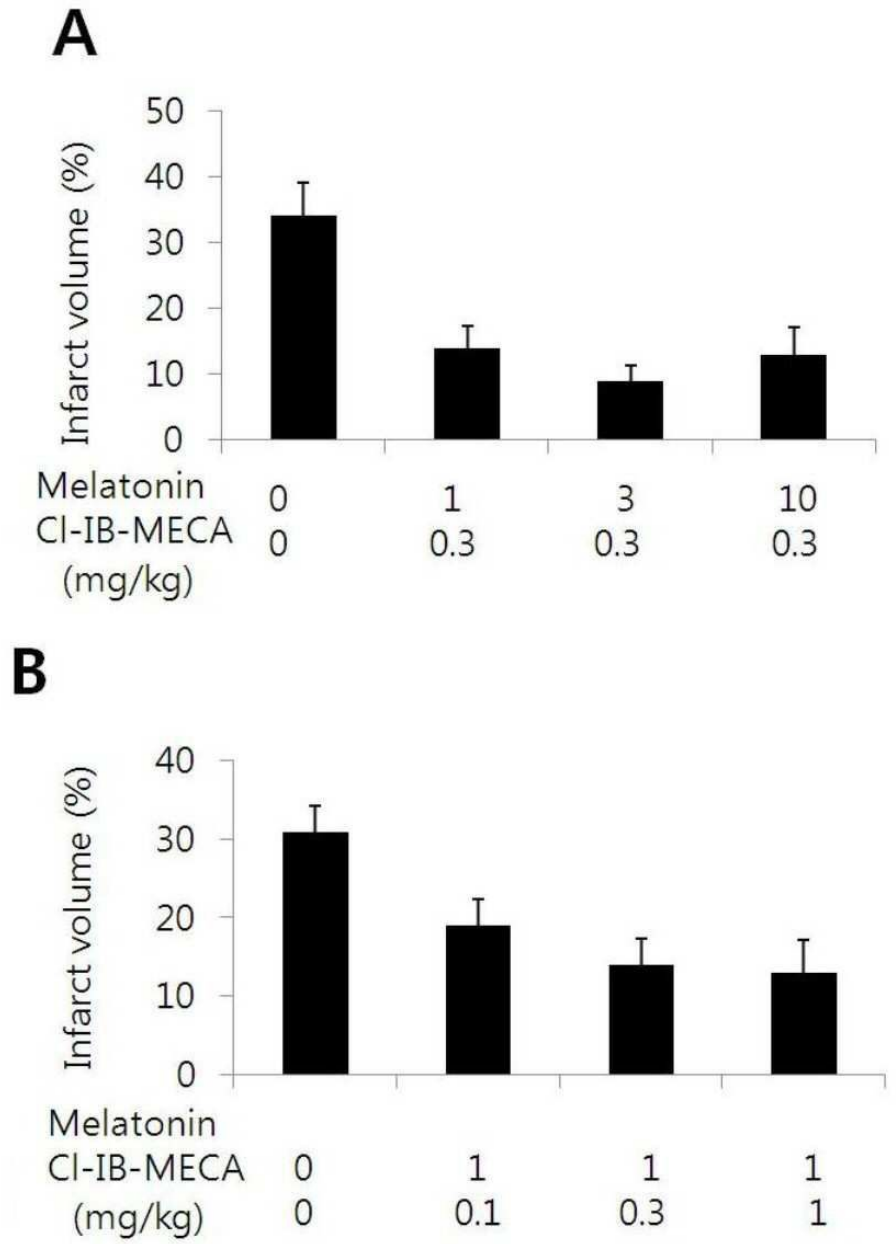


그림 4. 허혈성 뇌손상 후 허혈적 뇌조직손상에 멜라토닌과 Cl-IB-MECA의 상승적 보호효과

도면5

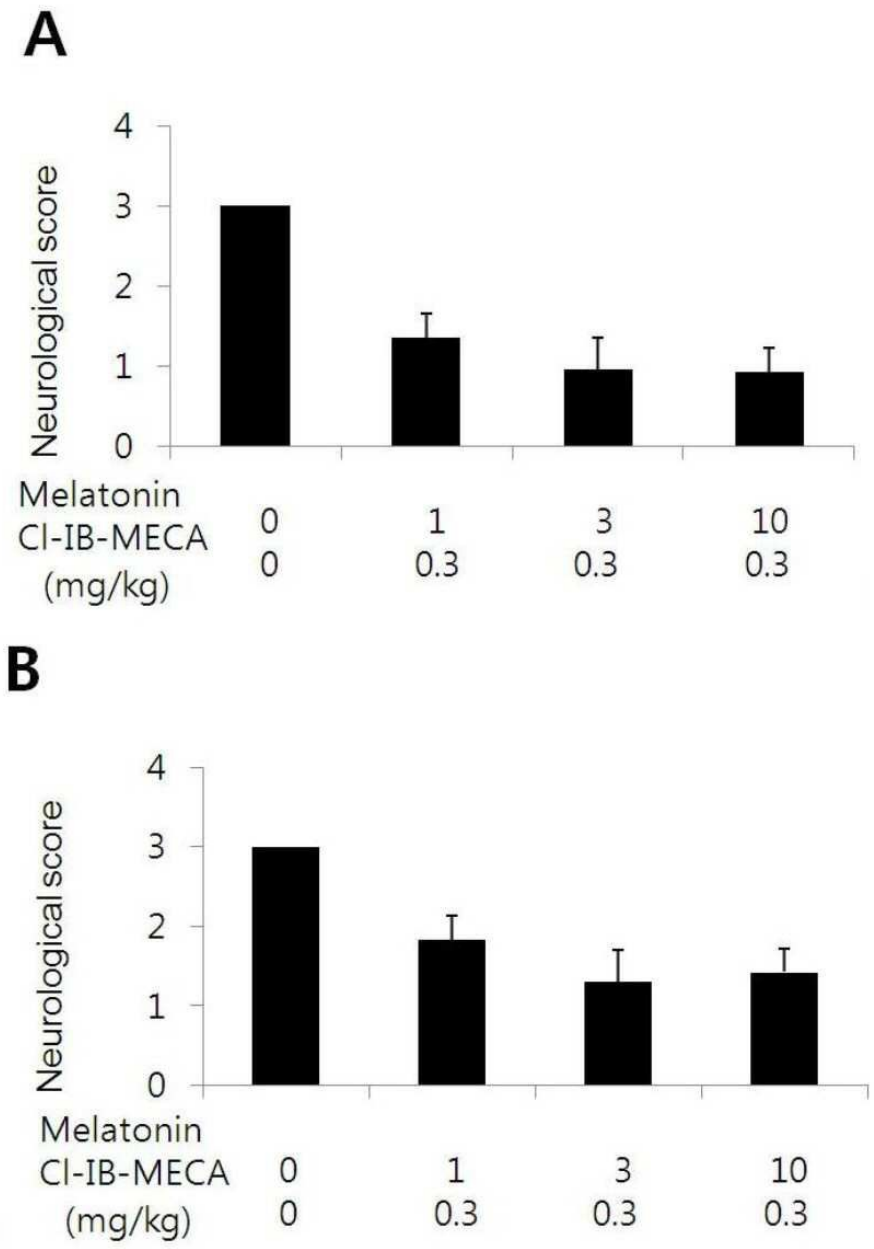


그림 5. 허혈성 뇌손상 후 신경행동학적 손상에 대한 멜라토닌과 CI-IB-MECA의 상승적 억제효과