(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년04월27일
(11) 등록번호 10-1031163
(24) 등록일자 2011년04월18일

(51) Int. Cl.
A61K 31/47 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2005-7015646
(22) 출원일자(국제출원일자) 2004년02월24일
심사청구일자 2008년09월08일
(85) 번역문제출일자 2005년08월24일
(65) 공개번호 10-2005-0098960
(43) 공개일자 2005년10월12일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2004/002146
(87) 국제공개번호 WO 2004/075897
국제공개일자 2004년09월10일
(30) 우선권주장
60/449,435 2003년02월25일 미국(US)
60/449,589 2003년02월26일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US4277479 A
US6187790 A
US20020147215 A1
JP1994014444 A
전체 청구항 수 : 총 4 항

(73) 특허권자
오츠카 세이야쿠 가부시키가이샤
일본 도쿄도 지요다쿠 간다츠카사마치 2-9
(72) 발명자
홍, 기환
부산시 연제구 거제 1동 현대 홈타운 210-1102
(74) 대리인
주성민, 위혜숙

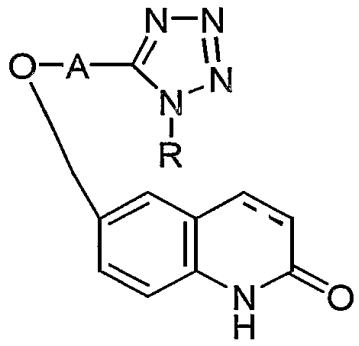
심사관 : 성선영

(54) 신경원성 장애를 치료하기 위한 제약 조성물

(57) 요 약

활성 성분으로서 다음 화학식 I의 테트라졸릴알콕시-디히드로카보스티릴 화합물 또는 이의 염을 포함하는, 신규한 PTEN 억제제 또는 전도도가 큰 신규한 Ca^{2+}-활성화 K^{+} 채널 (Maxi-K 채널) 개방제는 PTEN의 억제로 인해 정상 세포, 뇌 세포, 심장 세포 및 피부의 생존을 증진시키고, 추가로 그람 음성 패혈증, 세포 유주 및 세포 침입을 억제시키기 위한 약제로서 유용하며; 신경원성 장애를 치료하기 위한 약제, 예를 들면, 항경련제; 신경보호제; 국소 뇌부종 및 신경학적 운동 장해, 인지력 장애, 외상성 뇌 손상, 파킨슨병, 간질, 편두통 및 알츠하이머병을 치료하기 위한 약제 등으로서 또한 유용하다:

화학식 I

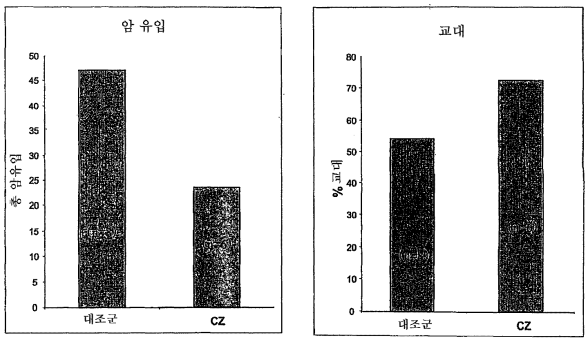


상기식에서,

R은 시클로알킬이고, A는 저급 알킬렌이며, 카보스티릴 핵의 3-위치와 4-위치 사이의 결합은 단일 결합 또는 이중 결합을 의미한다.

대 표 도

Y-미로


암 유입
총 암유입
60
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
대조군
CZ
교대
% 교대
80
70
60
50
40
30
20
10
0
대조군
CZ

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

6-[4-(1-시클로헥실-1H-테트라졸-5-일)부톡시]-3,4-디히드로카보스티릴 또는 이의 염을 포함하는, 알츠하이머병을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

6-[4-(1-시클로헥실-1H-테트라졸-5-일)부톡시]-3,4-디히드로카보스티릴 또는 이의 염을 포함하는,

경련, 국소 뇌부종, 신경학적 운동 장해, 인지력 장애, 외상성 뇌 손상, 파킨슨병, 간질, 편두통, 통증, 절박 요실금, 장 운동과다, 자궁 수축성, 불안증 및 우울증으로부터 선택된 신경원성 장애를 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 24

삭제

청구항 25

제14항에 있어서, 알츠하이머병이 Maxi-K 채널의 개방에 의해 치료되는 제약 조성물.

청구항 26

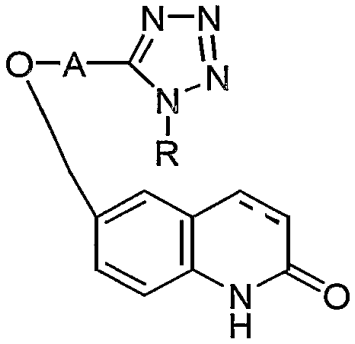
제23항에 있어서, 신경원성 장애가 Maxi-K 채널의 개방에 의해 치료되는 제약 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 PTEN 억제제 또는 신규한 Maxi-K 채널 개방제에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 활성 성분으로서 다음 화학식 I의 테트라졸릴알콕시-디히드로카보스티릴 화합물 또는 이의 염을 포함하는, PTEN 억제제 또는 신규한 Maxi-K 채널 개방제에 관한 것이다:

화학식 I



[0002]

[0003] 상기식에서,

[0004] R은 시클로알킬기이고, A는 저급 알킬렌기이며, 카보스티릴 핵의 3-위치와 4-위치 사이의 결합은 단일 결합 또는 이중 결합을 의미한다.

배 경 기 술

[0005] PTEN (염색체 10 상에 결실된 포스파타제 및 텐신 상동체)는 1997년에 종양 억제인자 유전자로서 분리하였고, 그 이후로 지금까지 여러 가지 관점에서 이의 생리학적 기능에 관한 분석이 이루어져 왔다. PTEN 유전자 생성물이 새로운 포스파타제 활성을 나타낸다는 사실, 즉 지질 제2 메신저인 포스파티딜이노시톨 3,4,5-트리스포스페이트 (PIP3) 기질을 이의 D3 위치에서 탈인산화시킬 수 있다는 사실이 1998년에 당해 분야에 보고되었다 [참조: Beitner-Johnson D, Millhorn DE, J. Biol. Chem., 273: pp. 13375-13378, 1998].

[0006] PTEN의 기능 측면에서 보면, PTEN을 억제시키는 것이 정상 세포, 뇌 세포, 심장 세포 및 피부의 생존을 증진시키는데 유효하고, 그람 음성 패혈증, 세포 유주 및 세포 침입을 억제하는데 있어 추가로 유효할 것으로 예상된다.

[0007] 그 밖에도, 칼륨 채널의 개방으로 인해 세포내 칼륨 이온이 세포 밖으로 유동하게 되어, 음성 세포내 전위가 발생된다는 사실과, 이러한 칼륨 채널이 전압-의존적이고 세포내 칼슘 농도와 세포내 ATP에 의해 제어된다는 사실이 공지되어 있다. Maxi-K 채널은 전도도 (conductance)가 큰 특정 부류의 칼슘 민감성 칼륨 채널이고 Maxi-K 채널의 활성은 세포내 칼슘 농도와 막 전위 등에 의해 제어된다. Maxi-K 채널은 신경원, 심장 세포, 평활근 세포 등의 생체 내에 널리 분포되어 있고, Maxi-K 채널을 개방시키면 세포의 과분극 (hyperpolarization)이 유도된다. Maxi-K 채널의 개방은 신경원성 장애, 예를 들면, (1) 항경련제, (2) 신경보호용 약제; 국소 뇌부종 및 신경학적 운동 장해, 인지력 장애, 외상성 뇌 손상, 파킨슨병 (Parkinson's disease), 간질, 편두통 및 알츠하이머병 (Alzheimer's disease) 치료용 약제, (3) 통증 제어용 약제, (4) 절박 요실금 (urge urinary incontinence), 장 운동과다 (intestinal hypermotility), 자궁 수축성, 불안증 및 우울증을 치료하기 위한 약제로서 유용한 것으로 공지되기도 한다.

[0008] 발명의 개시

[0009] PTEN에 대해 연구하는 동안, 본 발명자들은 상기 언급된 바와 같은 화학식 I의 테트라졸릴알콕시-디히드로카보스티릴 화합물 또는 이의 염, 특히 혈소판 응집 억제 활성과 혈관확장 활성을 지니는 것으로 공지되어 있는 6-[4-(1-시클로헥실-1H-테트라졸-5-일)부톡시]-3,4-디히드로-카보스티릴 또는 이의 염이 PTEN 억제 활성을 나타내므로, PTEN 억제제로서 유용하다는 사실을 밝혀내고, 본 발명을 완성하였다.

[0010] 추가로, Maxi-K 채널의 기능적 분석에 관해 연구하는 동안, 본 발명자들은 상기 언급된 바와 같은 화학식 I의 테트라졸릴알콕시-디히드로카보스티릴 화합물 또는 이의 염, 특히 혈소판 응집 억제 활성과 혈관확장 활성을 지니는 것으로 공지되어 있는 6-[4-(1-시클로헥실-1H-테트라졸-5-일)부톡시]-3,4-디히드로카보스티릴 또는 이의 염이 Maxi-K 채널의 개방 활성을 나타내므로, Maxi-K 채널 개방제로서 유용하다는 사실을 밝혀내고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

[0015] 본 발명은 활성 성분으로서 화학식 I의 테트라졸릴알콕시-카보스티릴 화합물 또는 이의 염을 포함하는, 신규한 PTEN 억제제 또는 신규한 Maxi-K 채널 개방제를 제공한다. 본 발명은 추가로, 화학식 I의 테트라졸릴알콕시-카보스티릴 화합물 또는 이의 염을, 치료가 필요한 환자에게 투여하는 것을 포함하여, PTEN을 억제하는 방법 및 Maxi-K 채널을 개방시키는 방법을 제공하고, PTEN을 억제할 뿐만 아니라 Maxi-K 채널을 개방시키기 위한, 화학식 I의 테트라졸릴알콕시-카보스티릴 화합물 또는 이의 염의 용도를 추가로 제공한다.

[0016] 화학식 I의 화합물 또는 이의 염은 탁월한 PTEN 억제 효과를 지니므로, 활성 성분으로서 화학식 I의 화합물 또는 이의 염을 포함하는 본 발명의 PTEN 억제제는 PTEN의 억제로 인한 어떠한 부작용도 없이, 정상 세포, 뇌 세포, 심장 세포 및 피부의 생존을 증진시키고, 추가로 그람 음성 패혈증, 세포 유주 및 세포 침입을 억제하기 위한 약제로서 유용하다.

[0017] 더욱이, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염은 전도도가 큰 칼슘-활성화 K^+ 채널 (Maxi-K 채널)의 탁월한 개방 효과를 지니므로, 활성 성분으로서 화학식 I의 화합물 또는 이의 염을 포함하는 본 발명의 Maxi-K 채널 개방제는 신경원성 장애를 치료하기 위한 약제, 예를 들면, 항경련제; 신경보호제; 국소 뇌부종 및 신경학적 운동 장해, 인지력 장애, 외상성 뇌 손상, 파킨슨병, 간질, 편두통 및 알츠하이머병을 치료하기 위한 약제; 통증, 절박 요실금, 장 운동과다, 자궁 수축성, 불안증 및 우울증을 치료하기 위한 약제로서 유용하다.

[0018] 화학식 I의 테트라졸릴알콕시-디히드로카보스티릴 화합물 및 이의 제조 방법은 JP-63-20235에 기재되어 있다.

[0019] 화학식 I에서, "시클로알킬기"에는 C_{3-8} 시클로알킬기, 예를 들면, 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵틸, 시클로옥틸 등이 포함되지만, 바람직한 것은 시클로헥실이다. "저급 알킬렌기"에는 C_{1-6} 알킬렌기, 예를 들면, 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌, 부틸렌 등이 포함되지만, 바람직한 것은 부틸렌이다.

[0020] 특히 바람직한 화합물은 6-[4-(1-시클로헥실-1H-테트라졸-5-일)부톡시]-3,4-디히드로-카보스티릴인데, 이는 혈관확장제로서 실로스타졸이란 상표명으로 시판되고 있다.

[0021] 본 발명의 화학식 I의 화합물은 벌크로 사용되거나, 또는 바람직하게는 통상적인 제약 담체 또는 희석제를 수반한 제약 제제 (pharmaceutical preparation)의 형태로 사용될 수 있다. 투여 형태는 특정한 형태로 제한되지 않지만, 이는 통상적인 모든 투여 형태, 예를 들면, 경구 투여용 제제, 예를 들면, 정제, 캅셀제, 과립제, 경구 투여용으로 적합한 각종 액상 제제, 또는 비경구 투여용 제제, 예를 들면, 주사제, 좌제 등일 수 있다. 투여량은 특정한 범위로 제한되지 않지만, 이는 성인 (체중 50 kg)의 경우 통상적으로 1일 100 내지 400 mg의 범위인데, 이를 한번에 투여하거나 1회 내지 수 회분으로 나누어 투여한다. 활성 화합물은 투여 단위당 50 내지 100 mg의 양으로 해당 제제 내에 함유되는 것이 바람직하다.

[0022] 주사용 제제는 통상적으로, 액상 제제, 유제 또는 현탁제의 형태로 제조되는데, 이는 멸균시킨 것이고 추가로 바람직하게는, 혈액과 등장성이 되도록 만든 것이다. 액상물, 유제 또는 현탁제 형태의 제제는 통상적인 제약 희석제, 예를 들면, 물, 에틸 알코올, 프로필렌 글리콜, 에톡시화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 솔비탄 지방산 에스테르를 사용함으로써 통상 제조한다. 등장성으로 만드는데 충분한 양의 등장성제, 예를 들면, 염화나트륨, 글루코스, 글리세린을 상기 제제에 혼입시킬 수 있고, 통상적인 가용화제, 완충제, 마취제, 및 임의의 착색제, 방부제, 방향 물질, 향미제, 감미제 및 기타 약제를 상기 제제에 추가로 혼입시킬 수 있다.

[0023] 경구 투여용 정제, 캅셀제, 액상물 등의 제제는 통상적인 방법에 의해 제조할 수 있다. 정제는 통상적인 제약 담체, 예를 들면, 젤라틴, 전분, 락토스, 마그네슘 스테아레이트, 탈크, 아라비아검 등과 혼합함으로써 제조할 수 있다. 캅셀제는 불활성 제약 충진제 또는 희석제와 혼합하고 이를 경질 젤라틴 캡슐 또는 연질 캡슐 내에 충진시킴으로써 제조할 수 있다. 경구용 액상 제제, 예를 들면, 시럽제 또는 엘릭서제는 활성 화합물을 감미제 (예: 슈크로스), 방부제 (예: 메틸파라벤, 프로필파라벤), 착색제, 향미제 등과 혼합함으로써 제조한다. 비경구 투여용 제제는 통상적인 방법, 예를 들면, 본 발명의 화학식 I의 화합물을 멸균된 수성 담체, 바람직하게는 물 또는 식염수에 용해시킴으로써 제조할 수도 있다. 비경구 투여용으로 적합한 바람직한 액상 제제는 약 50 내지 100 mg의 활성 화합물 (I)을 물 및 유기 용매, 및 추가로 분자량이 300 내지 5000인 폴리에틸렌 글리콜에 용해시킴으로써 제조되는데, 이에는 바람직하게는, 윤활제, 예를 들면, 나트륨 카복시-메틸셀룰로스, 메틸-셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈 및 폴리비닐 알코올이 혼입된다. 상기 액상 제제에는 바람직하게는, 소독제 (예: 벤질 알코올, 페놀, 티메로살), 살진균제가 추가로 혼입될 수 있고, 등장성제 (예: 슈크로스, 염화나트륨), 국부 마취제, 안정화제, 완충제 등이 임의로 추가 혼입될 수 있다. 안정성을 유지하기 위한 측면에서는, 비경구 투여

용 제제를 특정 캡슐에 충진시킨 다음, 통상적인 동결 건조 기술에 의해 수성 매질을 제거할 수 있으며, 사용된 경우 수성 매질에 용해시킴으로써 액상 제제로 재생시킨다.

실 시 예

[0024] 본 발명은 TNF-α에 의해 자극되는 PTEN 인산화 증가에 대한 해당 화합물의 억제 효과, 또는 Maxi-K^+ 채널 개방에 대한 해당 화합물의 효과를 나타내는 다음 실험 및 제제 실시예에 의해 예시되지만, 이로써 본 발명의 범위가 제한되지 않아야 한다.

[0025] 제제 실시예 1

[0026] 주사용 제제의 제조:

[0027] 성분	양
[0028] 6-[4-(1-시클로헥실-1H-테트라졸-5-	
[0029] 일)부톡시]-3,4-디히드로카보스티릴	5 g
[0030] 폴리에틸렌글리콜 (분자량: 4000)	0.3 g
[0031] 염화나트륨	0.9 g
[0032] 폴리옥시에틸렌 솔비탄 모노올레에이트	0.4 g
[0033] 나트륨 메타비설피트	0.1 g
[0034] 메틸파라벤	0.18 g
[0035] 프로필파라벤	0.02 g
[0036] 주사용 증류수	10.0 ml

[0037] 상기 파라벤들, 나트륨 메타비설피트 및 염화나트륨을 80℃ 하에 교반시키면서 상기 증류수의 절반 양에 용해시킨다. 이러한 혼합물을 40℃로 냉각시키고, 이에 활성 화합물을 용해시킨 다음, 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리옥시에틸렌 솔비탄 모노올레에이트를 추가로 용해시킨다. 나머지 주사용 증류수를 상기 혼합물에 가하고, 필터 종이로 여과시킴으로써 멸균시켜 목적하는 주사용 제제를 수득한다.

[0038] 제제 실시예 2

[0039] 정제의 제조:

[0040] 성분	양
[0041] 6-[4-(1-시클로헥실-1H-테트라졸-5-	
[0042] 일)부톡시]-3,4-디히드로카보스티릴	100 g
[0043] 락토스 [일본 약전(Japanese Pharmacopeia)]	40 g
[0044] 옥수수 전분 [일본 약전]	40 g
[0045] 결정성 셀룰로스 [일본 약전]	20 g
[0046] 히드록시프로필 셀룰로스 [일본 약전]	4 g
[0047] 마그네슘 스테아레이트 [일본 약전]	2 g

[0048] 상기 본 발명의 화합물, 락토스, 옥수수 전분 및 결정성 셀룰로스를 잘 혼합하고, 이 혼합물을 히드록시프로필 셀룰로스의 5% 수용액과 함께 과립화한 다음, 이와 같이 과립화된 혼합물을 200 메쉬 스크린으로 시빙하여 과립을 조심스럽게 건조시킨 후, 이 과립을 통상적인 방법에 의해 정제화하여 정제를 수득한다 (1000개 정제).

[0049] 약리학적 실험

[0050] 본 발명의 대표적인 화합물 실로스타졸에 의한, TNF-α-자극된 PTEN 인산화 수준 증가의 억제 효과를 시험하였다.

[0051] 추가로, 본 발명의 대표적인 화합물 실로스타졸과, 몇 가지 시판용 Maxi-K 채널 개방제 또는 차단제의 Maxi-K 채널 개방에 대한 효과를 시험하였다.

[0052] 실험 1

[0053] TNF-α-자극된 PTEN 인산화 수준 증가의 억제에 대한 실로스타졸의 효과:

[0054] 물질:

[0055] 세포 배양물: SK-N-SH (KCLB 30011, 사람 뇌 신경아세포종) 세포를 10% 열-불활성화 태아 소 혈청이 보충된 1.0 mM 나트륨 피루베이트 및 2 mM L-글루타민을 수반한 이글스 최소 필수 배지 [Eagle's minimum essential medium (MEM)]에서 배양하였다. 세포를 37℃하 5% CO_2에서 합류되도록 성장시키고, 이를 20회 이하의 계대에서 실험에 사용하였다.

[0056] TNF-α 용액의 제조: TNF-α (Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY)를 인산염 완충 식염수에 10 ㎍/ml 저장 용액으로서 용해시켰다.

[0057] 방법:

[0058] 웨스턴 블롯 분석 (Western blot analysis): 상기 합류성 세포를 TNF-α로 자극하기 3시간 전에, 이에 1% FBS + 실로스타졸을 수반한 MEM 배지를 접종한 다음, 1시간 동안 TNF-α에 노출시켰다.

[0059] 상기 세포를, 50 mM 트리스 (Tris)-Cl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.02% 나트륨 아지드, 100 ㎍/ml 페닐메틸설포닐 플루오리드, 1 ㎍/ml 아프로티닌 및 1% 트리톤 (Triton) X-100을 함유하는 용해용 완충액에 용해시켰다. 12,000 rpm으로 원심분리시킨 후, 총 50 ㎍의 단백질을 8 또는 10% SDS-PAGE 겔 내로 부하하고, 니트로셀룰로스 막 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 내로 옮겼다. 이어서, 이와 같이 차단된 막을 지시된 항체와 함께 항온 배양하고, 다음 키트 [Supersignal West Dura Extended Duration Substrate Kit (Pierce, Rockford, IL)]에 의해 권장되는 바와 같은 화학발광성 시약을 사용하여 면역반응성 밴드를 가시화하였다. GS-710 보정 영상화 밀도계 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 사용하여 상기 밴드의 신호를 정량화하였다. 그 결과를 상대 밀도로서 표시하였다. PTEN, 포스포-PTEN에 대항한 폴리클로널 항체 (Ser 380/Thr382/383)는 공급원 [Cell Signaling Technology (Beverly, MA)]으로부터의 것이다.

[0060] 통계적 분석: 상기 결과는 평균치 ±SEM으로서 표시된다. 그룹들 간의 통계적 차이는 스튜던츠 t-시험에 의해 결정하였다. $p<0.05$가 유의적인 것으로 고려되었다.

[0061] 결과:

[0062] 웨스턴 블롯 분석과 밀도측정 분석 결과가 도 1에 제시되어 있다.

[0063] 도 1로부터 알 수 있는 바와 같이, 실로스타졸은 농도 (1, 10 및 100 μM) 의존적 방식으로, TNF-α (50 ng/ml)-자극된 PTEN 인산화 수준 증가를 억제하였다.

[0064] 상기 실험 결과로부터, 실로스타졸이 PTEN 인산화를 억제하는데 있어 강력한 활성을 나타낸다는 사실은 명백하다.

[0065] 실험 2

[0066] 물질:

[0067] 세포 배양물: SK-N-SH (KCLB 30011, 사람 뇌 신경아세포종) 세포를 10% 열-불활성화 태아 소 혈청이 보충된 1.0 mM 나트륨 피루베이트 및 2 mM L-글루타민을 수반한 이글스 최소 필수 배지 (MEM)에서 배양하였다. 세포를 37℃하 5% CO_2에서 합류되도록 성장시키고, 이를 20회 이하의 계대에서 실험에 사용하였다.

[0068] 시험용 약물:

[0069] (1) 실로스타졸 (본 발명의 화합물, 6-[4-(1-시클로헥실-1H-테트라졸-5-일)부톡시]-3,4-디히드로-카보스티릴의 상표명).

[0070] (2) 글리벤클라미드 ("GBC"로 약칭됨, 일반명: 글리부리드, 화학명: 5-클로로-N-[2-[4-[[[(시클로헥실아미노)카보닐]아미노]설포닐]페닐]에틸]-2-메톡시-벤자미드; 이는 ATP-민감성 K^+ 채널 차단제인 항당뇨병제로서 시판되

고 있다).

[0071] (3) 이베리오톡신 ("Ibtx"로서 약칭되는데, 이는 Maxi-K^+ 채널 차단제로서 공지되어 있다).

[0072] 방법:

[0073] 완전-세포 K^+ 전류의 기록: 본 실험은 1 ml/min의 유속으로 지속적으로 관류된 도립 현미경 (inverted microscope: Nikon model TE300, Tokyo, Japan) 단 상에 고정시킨 작은 욕 (5 ml)에서 수행하였다. 패치 클램프 기술의 완전-세포 입체 배치를 이용하여, 악소패치 (Axopatch)-200B 패치 클램프 증폭기 (Axon Instruments, Foster City, CA)로 K^+ 전류를 실온 (20 내지 22℃)에서 기록하였다. 0.5 내지 5 kHz 하에 반앨리어스 (anti-alias) 여과 후 1 내지 10 kHz 하에 전류를 샘플링하였다. 데이터 획득과 명령 전위는 pClamp 6.0.3 소프트웨어 (Axon Instruments, Foster City, CA)에 의해 제어되었다. 전압 클램프 질을 보장하기 위해, 전극 저항을 3 MΩ 이하로 유지시켰다. 표준 욕 용액 중의 전극을 이용하여 접합 전위를 제로(0)에 맞추었다. 흡인시킴으로써 기가옴 실 (Gigaohm seal) 형성을 달성하고, 완전 세포 입체 배치를 정립한 후, -80 mV로부터 대칭 10 mV 전압 클램프 단계에 의해 유도된 용량성 과도 전류 (capacitive transients)를 세포 전도도 산정을 위해 50 kHz 하에 기록하였다. 완전-세포 기록을 위한 정상적인 욕 용액은 다음과 같다: NaCl 130 mM, KCl 5 mM, $MgCl_2$ 1.2 mM, $CaCl_2$ 1.8 mM, HEPES 10 mM, 글루코스 5.2 mM, 및 NaOH를 이용하여 pH를 7.4로 조정하였다. 피펫에 KCl 140 mM, $MgCl_2$ 0.5 mM, $CaCl_2$ 0.1 mM, 에틸렌비스 (옥소니트릴로) 테트라-아세트산 (EGTA) 0.09 mM, HEPES 10 mM, 글루코스 10 mM을 채워 놓고, KOH를 이용하여 pH를 7.4로 조정하였다.

[0074] 탈분극에 의해 유도시킨 전류가 안정화될 때까지 대략 5분 동안 완전 세포 기록치를 정립시키고 대조군 기록치를 수집한 후, 실로스타졸을 상기 욕에 부하하였다. 이러한 실험에서는, 글리벤클라미드 또는 이베리오톡신을 사용하여, 글리벤클라미드 또는 이베리오톡신을 투여한지 대략 20분 후에 실로스타졸을 상기 욕에 부하하였다.

[0075] 결과:

[0076] 시험 결과가 도 2에 도시되어 있는데, 도 2A는 실로스타졸의 효과를 도시한 것이고, 도 2B는 실로스타졸 및(또는) 글리벤클라미드 ("GBC", Maxi-K^+ 채널의 개방을 암시함)의 효과를 도시한 것이며, 도 2C는 실로스타졸 및(또는) 이베리오톡신 ("Ibtx", Maxi-K^+ 채널 차단제)의 효과를 도시한 것이다.

[0077] 도 2로부터 알 수 있는 바와 같이, 전류는 실로스타졸에 의해 상당히 증가되었지만, 한편으론 이베리오톡신 (100 nM)을 욕에 부가함으로써 가역적으로 차단되었으나, 글리벤클라미드 (10 μM)에 의해서는 그렇치 못하였다. Maxi-K 채널-매개된 전류 상의 증가는 심지어 글리벤클라미드가 동시에 존재하는 경우에도 실로스타졸에 의해 제공되었지만, 글리벤클라미드 단독으로는 Maxi-K 채널-매개된 전류를 증가시킬 수 없었다. 실로스타졸을 Maxi-K 채널 차단제인 이베리오톡신과 함께 해당 세포에 부가한 경우에는, 전류 증가가 이베리오톡신 단독의 경우 보다 오히려 못하다.

[0078] 실험 3

[0079] 1. 화합물 제제

[0080] 비히클 대조군; 0.5% 카복시메틸셀룰로스. 1일 2회 (n=10)

[0081] 실로스타졸; 100 mg/kg. 1일 2회 (n=10)

[0082] 소량의 분말 (실로스타졸)을 마노 모르타르 (agate mortar)에 의해 연마시킨다. 0.5% 카복시메틸셀룰로스 (CMC) 2 또는 3 방울을 가하고, 잘 연마시킨다. 4 내지 5 ml의 0.5% CMC를 가하고, 현탁된 실로스타졸을 광 보호된 유리병에 담아 둔다.

[0083] 화합물 제제를 1000 mg/50 ml의 농도로 매주 시험하고, 4℃ 하에 빛으로부터 보호하여 저장한다.

[0084] 화합물 투여:

[0085] 투여하기 전에, 시험용 화합물의 보존 병을 초음파 처리기로 초음파 처리시킨 다음 잘 혼합한다.

[0086] 화합물은 할당된 그룹에 따라서 1일 2회 경구 섭식시킴으로써 투여한다.

[0087] 비히클 대조군 (0.5% 카복시메틸셀룰로스: CMC; 1 kg/5 ml)은 1일 2회 섭식시킴으로써 투여한다. 시험용 화합

물 (실로스타졸; 100 mg/kg/5 ml)는 1일 2회 섭식시킴으로써 투여한다.

[0088] 2. 관찰, 검사 및 측정 방법

[0089] a. 해당 동물 (돌연변이체 사람 $APP_{K670N,M671I}$/주 Tg2576을 발현하는 8주생의 반접합 형질전환성 마우스)을 이중 형질전환성 APP/PS1 마우스의 2개 그룹 (대조군 및 실로스타졸, 총 = 20마리 마우스)으로 무작위 배분하였다. 다음 표에 제시된 바와 같이, 6주 동안 각 마우스에게 1일 2회 섭식 투여하였다:

표 1

[0090]

계획 설계			
처리	초기 생존시기	마우스 수	말기 생존시기
대조군(비히클)	8주	10	14주
시험용 화합물	8주	10	14주
	총 마우스 = 20		

[0091] b. 본 연구의 초기와 말기에 마우스를 대상으로 하여 유전자형을 결정하였다.

[0092] c. 마우스의 생존 시기를 마감하기에 앞서, 마우스를 대상으로 하여 Y-미로 행위 파라다임을 수행하였다.

[0093] d. 생후 14주때 마우스를 희생시켰다.

[0094] e. 희생시킬 때, 실로스타졸 혈액 농도 측정을 위해 1 ml의 혈액을 수집하고, APP/PS1 마우스를 식염수로 관류시켰다. 뇌를 반측 절개하여, 한쪽 반구는 고정시키고 다른 반구는 냉동시켰다.

[0095] f. 상기와 같이 냉동시킨 반구를 균질화시키고, ELISA를 통하여 총 아밀로이드-베타 농도를 알아보기 위해 분석하였다.

[0096] 마우스의 뇌 중의 총 A-베타 40 수준과 총 A-베타 42 수준을 대조군 그룹과 실로스타졸 처리된 그룹에서 탐지하였다. 그 결과가 도 3에 도시되어 있다.

[0097] 3. 과정

[0098] 다음 과정은 "Y-미로에서의 자발적 교대" 시험을 수행하기 위해 취한 단계의 개요를 설명한 것이다. 마우스는 선천적으로 자신의 주변 환경을 탐사하려는 경향이 있다. 성공적인 탐사는 마우스가 최근에 들른 적이 있는 장소를 회피할 수 있는 능력에 좌우되는데, 이러한 장소는 음식물이 고갈되었거나 부재할 수도 있기 때문이다 ("자발적 교대"). Y-미로는 보상 전달을 포함하지 않은, 동물 행동학에 기초한 시험이다. "작동 기억" 기능이 저하된 마우스는 방금 들렀던 장소에 관한 정보를 자신의 작동 기억에 유지할 수 없기 때문에, 이들 마우스는 자발적 교대 능력 저하를 나타낸다.

[0099] 공표된 결과는, 특정의 형질전환성 마우스 균주, 예를 들면, APP/PS1 마우스에서는 자발적 교대 능력이 저하되었고 탐사 능력은 증가된 것으로 나타났다.

[0100] 실로스타졸은 항-혈소판 작용과 혈관확장 작용을 지니는데, 이는 ASO에 대한 조치이며 2차 뇌 경색을 예방시켜 준다.

[0101] 이러한 실로스타졸 작용은 아밀로이드-베타 단백질의 침착을 감소시켜 줄 수 있고 알츠하이머성 치매 행위를 개선시켜 줄 수 있다.

[0102] i. 시험하고자 하는 마우스를 시험용 방에 놓아 둔다. 많은 마우스 (3개 우리 초과)가 시험 구역 내로 동시에 들어가는 것을 피해야 하는데, 이는 이것이 마우스의 행위에 영향을 미칠 수 있기 때문이다. (단, 동물을 송수신기 (transponder) 또는 명백히 가시적인 문신에 의해 표지하지 못하는 경우에만 동시에 놓아 두는데, 이는 선택 사항이다). 마우스 꼬리에 비독성 색 표지자를 다음 순서로 표지시킨다:

[0103] 1: 적색

[0104] 2: 녹색

[0105] 3: 청색

[0106] 4: 흑색

[0107] ii. 실험을 비디오로 기록할 수 있다. 이로써 영구적인 기록물이 생기고, 의문이 생길 경우에는 연구원이 해당 실험을 재조사할 수 있게 된다.

[0108] iii. 시험하고자 하는 첫 번째 마우스의 꼬리 끝을 잡아 마우스 우리로부터 끄집어 내고, 이를 칭량한다. Y-미로 데이터 스프레드시트에 그 몸무게를 기록한다. 마우스를 다시 우리 안에 넣어 둔다. (또 다른 한편으론, 실험을 시작하기 전에, 예를 들면, 실험 전날에 마우스를 칭량할 수도 있다).

[0109] iv. 마우스가 시험용 방에 익숙해질 수 있도록 시험을 시작하기 전 1시간 동안은 방해하지 않고 내버려 둔다. 우리들이 하나의 특정 암 (arm)에 인접하여 위치하지 않도록 특별한 주의를 기울여야 하는데, 이는 예를 들어, 마우스가 단일 암 내로 들어가는데 후각 (냄새)이 영향을 미칠 수 있기 때문이다. 따라서, 우리를 해당 장치로부터 일정 간격 떨어져 위치시키거나, 또는 우리들이 시험용 방 주변에 균등하게 분포되도록 한다. (예를 들어, 3개의 우리를 각 암에 근접하게 하여 동시에 도입할 수 있다). 기술자가 시험용 방에 참석할 수 있지만, 마우스를 방해하지는 말아야 한다.

[0110] v. 시험을 시작하기 전에, Y-미로 내부를 이소프로판올로 닦는다.

[0111] vi. 마우스 꼬리를 잡고 조심스럽게 다루며, 마우스 머리가 먼저 미로 내로 돌진하지 못하도록 주의하면서 마우스를 암 상에 얹혀 둔다. 모두 탐사에 이용될 수 있는 3개의 암 (암 A, 암 B 및 암 C)이 있는 Y 미로의 중앙에 마우스를 개별적으로 8분 동안 놓아 둔다.

[0112] vii. Y-미로 데이터 시트의 출력 정보 상에 모든 유입을 기록한다. 해당 동물이 암 A에 완전히 들어간 경우에는 "암 유입됨" 구획에 "A"를 기입한다. 이와 동일한 줄에, 마우스가 암을 탐사하고 끝나는 지점으로 갈 경우에는 "관찰부"에 "종결"을 기입하고, 마우스가 똑바로 설때 마다 (앞다리를 자유롭게 하면서 뒷다리에 걸터 앉는다) "R"로 기입하거나 또는 마우스가 상체를 구부릴 경우에는 (앞발을 벽에 접촉시키면서 "벽을 기어올라 탐사"한다) "L"로 기입하고, 마우스의 몸이 굳어진 경우에는 (5초 이상 동안 움직이지 않은 채로 있다) "F"로 기입한다. 마우스가 암 A 내에서 왔다 갔다할 경우에는, 동일한 줄의 관찰부에 "bf"를 더 기입한다. 기타 모든 관찰 결과를 전문에 기입한다. 관찰 결과를 기입하기에 충분한 시간이 없는 경우에는, 이를 건너 뛴다. 마우스가 다시 중앙으로 돌아 오면, 새로운 라인을 시작한다. 마우스가 암 A로 다시 돌아온 경우에는 새로운 라인에 "A"를 기입하고, 암 B로 다시 돌아온 경우에는 "B"를 기입하며 암 C로 다시 돌아온 경우에는 "C"를 기입한다.

[0113] viii. 8분 후, 마우스 꼬리를 잡고 꺼내어 자신의 우리 속에 놓아 둔다. Y-미로 스프레드시트에 볼리 (boli) 수를 기록하고, 마우스가 오줌을 쌌는지의 여부를 기록한다. Y-미로 내부를 이소프로판올로 닦는다. 코너는 브러쉬를 사용하고, 양 벽과 마루를 깨끗이 한다. Y-미로를 깨끗하게 하고, 이전 마우스에 의해 미로 내에 야기될 수 있는 어떠한 냄새, 깔짚 또는 음식물도 전혀 없게 해야 한다. 알코올로 소독한 후에 Y-미로를 건조시켜야 한다. 이러한 미로 내에 클리닝 재료 (예: 티슈)가 남아 있지 않도록 해야 한다.

[0114] ix. 시험하고자 하는 마우스 모두를 대상으로 하여 상기 단계들을 반복한다.

[0115] x. 본 시험 후, 데이터를 하드 카피에서 엑셀 스프레드시트로 옮긴다.

[0116] Y-미로 행위 파라다임으로부터 획득된 결과가 도 4에 요약되어 있다.

[0117] xi. 데이터 분석: 교대는 재유입이 없는, 3개 암 모두에 대한 방문으로서 규정된다 (ABC, ACB, BAC, BCA, CAB 또는 CBA). 각 "암 유입"을 별개로 분석하고, 이것이 교대를 완료하였는지 여부를 결정한다. ABCABC 순서는 4번의 교대를 나타내는데, 첫 번째는 C로 종결되고, 그 다음은 A, 그 다음은 B, 그 다음은 C로 종결된다. ABCBAC 순서는 3번의 교대 만을 나타내는데, 첫 번째는 C에서 종결되고, 두 번째는 A로 종결되고, 세 번째는 C로 종결된다. % 교대는 (관찰된 교대 수)/(가능한 교대 수)이다. n개 암을 방문한 경우에, 가능한 가장 높은 교대 수는 n-2이다. 동물이 무작위로 움직인 경우에는, 22% 교대가 예상될 것이다 (3*2*1/3*3*3). 포괄적인 활성은 상이한 암을 방문하는 총 횟수에 반영된다. 따라서, "활성"은 (총 암 유입 횟수)/(관찰 시간 (분))이다.

[0118] 따라서, 본 발명의 화학식 I의 테트라졸릴알콕시-디히드로카보스티릴 화합물 또는 이의 염은 Maxi-K 채널을 개방시키는데 유효하고, 신경원성 장애, 특히 알츠하이머병을 치료하는데 유용하다.

산업상 이용 가능성

[0119] 본 발명은 탁월한 PTEN 억제 효과를 지니고, PTEN의 억제로 인한 어떠한 부작용도 없이, 정상 세포, 뇌 세포,

심장 세포 및 피부의 생존을 증진시키고, 추가로 그람 음성 패혈증, 세포 유주 및 세포 침입을 억제하기 위한 약제로서 유용한, 활성 성분으로서 화학식 I의 테트라졸릴알콕시-디히드로카보스티릴 화합물 또는 이의 염을 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 전도도가 큰 Ca^{2+}-활성화 K^+ 채널 (Maxi-K 채널)의 개방제로서 유용하므로, 신경원성 장애를 치료하기 위한 약제, 예를 들면, 항경련제; 신경보호제; 국소 뇌부종 및 신경학적 운동 장해, 인지력 장애, 외상성 뇌 손상, 파킨슨병, 간질, 편두통 및 알츠하이머병을 치료하기 위한 약제 등으로서 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 실로스타졸 (cilostazol) (6-[4-(1-시클로헥실-1H-테트라졸-5-일)부톡시]-3,4-디히드로-카보스티릴의 상표명)에 의한, TNF-α (50 ng/ml)-자극된 PTEN 인산화 수준 증가의 억제를 도시한 것이다.

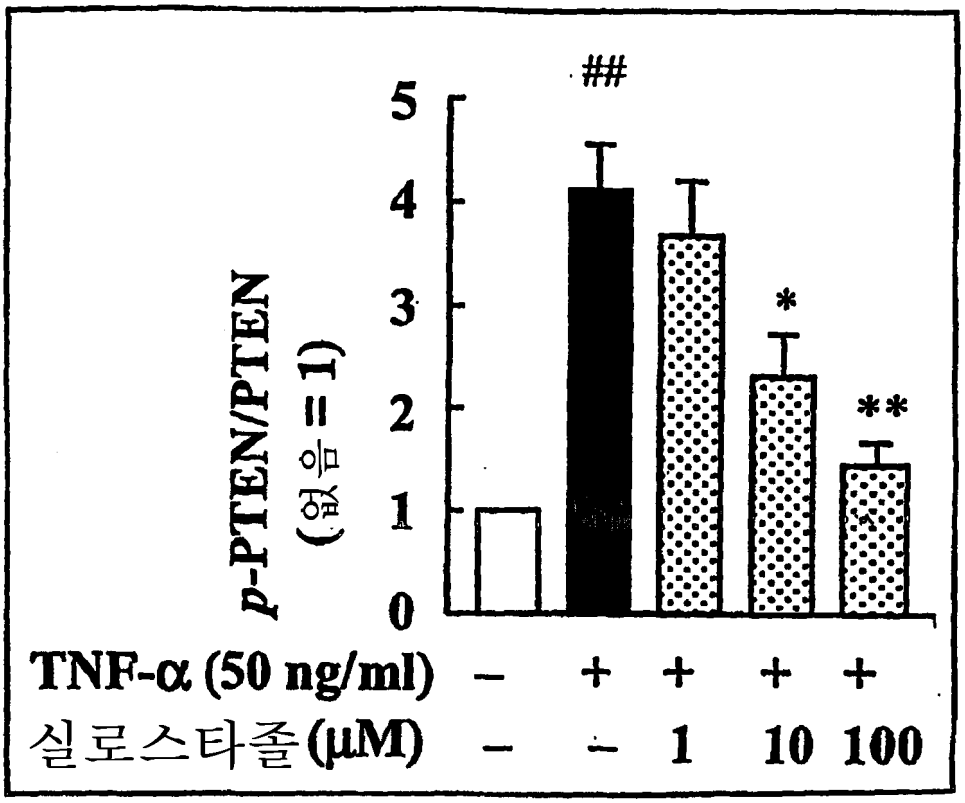
[0012] 도 2는 SK-N-SH 세포 중의 칼슘-활성화 K^+ 전류의 개방에 대한 약물의 효과를 도시한 것인데, 도 2A는 실로스타졸 (6-[4-(1-시클로헥실-1H-테트라졸-5-일)부톡시]-3,4-디히드로-카보스티릴의 상표명)의 효과를 도시한 것이고, 도 2B는 실로스타졸 및(또는) 글리벤클라미드 (glibenclamide) (ATP-민감성 K^+ 채널 개방의 부재를 암시하는, 시판용 항당뇨병제로서 "GBC"로 약칭됨)의 효과를 도시한 것이며, 도 2C는 실로스타졸 및(또는) 이베리오톡신 (iberiotoxin) (Maxi-K^+ 채널의 개방을 암시하는, Maxi-K^+ 채널 차단제로서 공지되어 있고 "Ibtx"로 약칭됨)의 효과를 도시한 것이다.

[0013] 도 3은 ELISA에 의해 탐지된, 실로스타졸 처리된 그룹과 대조군 마우스의 뇌 중의 총 아밀로이드-베타 농도 (A-베타 40 및 A-베타 42 수준)를 도시한 것이다.

[0014] 도 4는 알츠하이머병에 대한 본 발명의 화합물의 효과를 시험하기 위해 Y-미로 행위 파라다임으로부터 수득된 실험상 결과를 요약하여 도시한 것이다.

도면

도면1

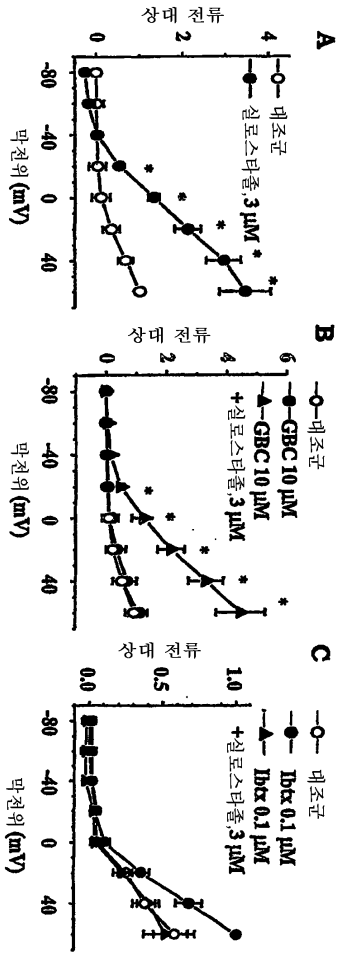


##$P < 0.01$ 대 TNF-α 및 실로스타졸 부재

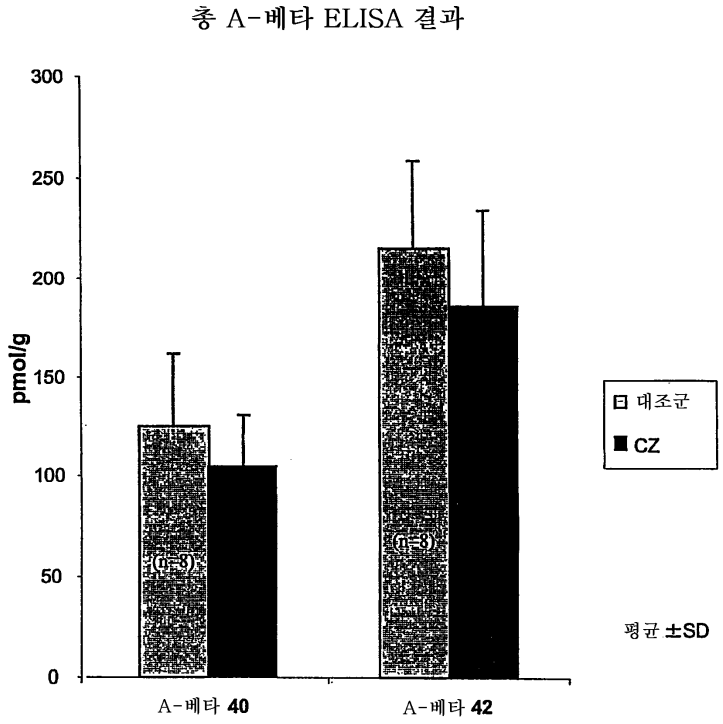
*$P < 0.05$; **$P < 0.01$ 대 TNF-α 단독

†$P < 0.05$ 대 실로스타졸 (10 μM) 단독

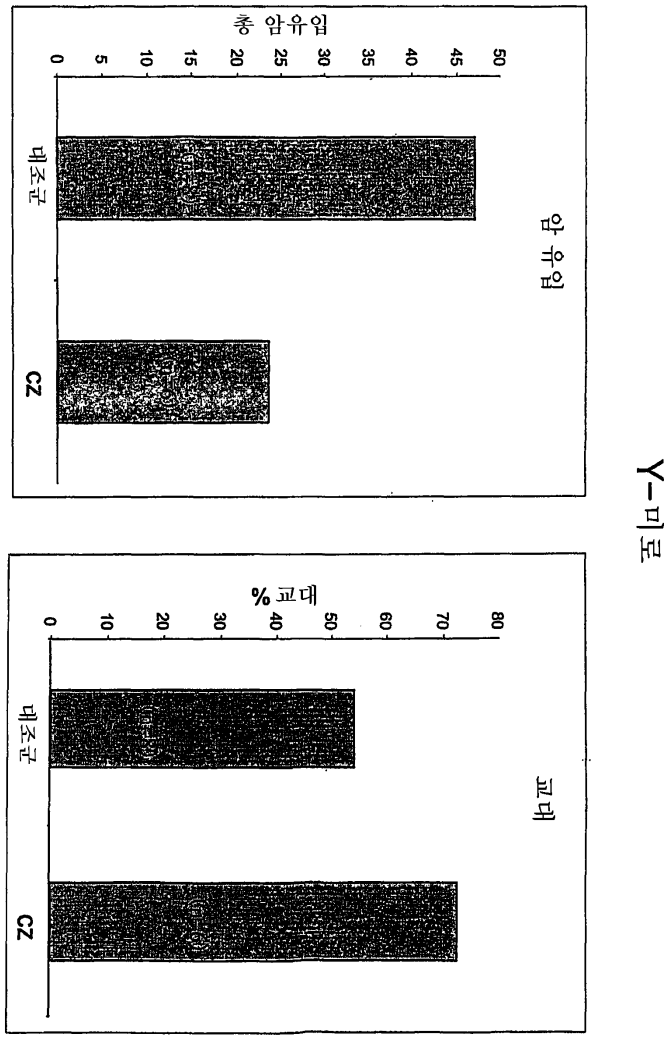
도면2


A
상대 전류
대조군
실로스타졸,3 μM
막전위 (mV)
B
상대 전류
대조군
GBC 10 μM
GBC 10 μM
+실로스타졸,3 μM
막전위 (mV)
C
상대 전류
대조군
Ibtx 0.1 μM
Ibtx 0.1 μM
+실로스타졸,3 μM
막전위 (mV)

도면3


총 A-베타 ELISA 결과
300
250
200
150
100
50
0
pmol/g
(n=3)
(n=3)
A-베타 40
A-베타 42
대조군
CZ
평균 ±SD

도면4


총 암유입
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
대조군
CZ
암 유입
% 교대
0
10
20
30
40
50
60
70
80
대조군
CZ
교대

Y-미로