



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0098746
(43) 공개일자 2022년07월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/472 (2006.01) A61P 25/24 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/472 (2013.01)
A61P 25/24 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-7017725
(22) 출원일자(국제) 2020년11월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년05월25일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/059481
(87) 국제공개번호 WO 2021/092439
국제공개일자 2021년05월14일
(30) 우선권주장
62/932,724 2019년11월08일 미국(US)

(71) 출원인
제논 파마슈티칼스 인크.
캐나다 브이5지 4더블유8 브리티시 컬럼비아 버나비 길모어 웨이 3650
(72) 발명자
하든 신시아 루이스
미국, 뉴욕 10024, 뉴욕, 아파트먼트 3알, 138 더블유. 87 스트리트
비치 그레고리 엔.
캐나다, 브리티시 콜롬비아 브이7더블유 2 에이치8, 웨스트 밴쿠버, 6994 하이크로프트 로드
(74) 대리인
특허법인한얼

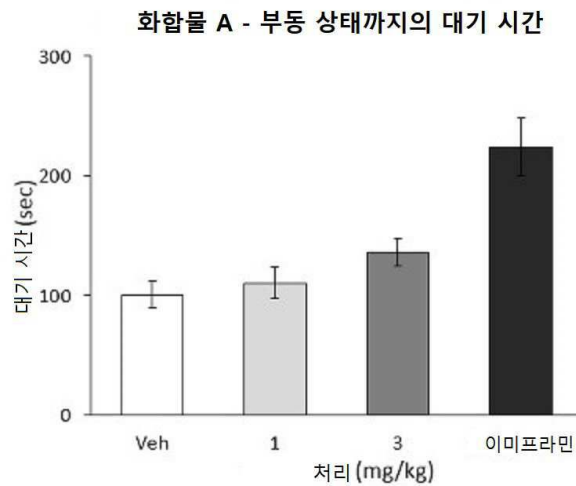
전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 발명의 명칭 **우울 장애 치료 방법**

(57) 요약

특정 실시양태에서, 본 개시내용은 치료학적 유효량의 N-[4-(6-플루오로-3,4-디하이드로-1H-이소퀴놀린-2-일)-2,6-디메틸페닐]-3,3-디메틸부탄아미드(화합물 A)를 이를 필요로 하는 인간에게 경구 투여하는 것을 포함하여, 인간에서 우울 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 개시내용은 추가로 화합물 A의 다양한 개선된 치료 및 투여 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

N-[4-(6-플루오로-3,4-디하이드로-1H-이소퀴놀린-2-일)-2,6-디메틸페닐]-3,3-디메틸부탄아미드인 화합물 A의 치료학적 유효량을 인간에게 투여하는 것을 포함하여, 우울 장애(depressive disorder)의 치료를 필요로 하는 인간에서 우울 장애를 치료하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 인간에서 Kv7 칼륨 채널의 개방을 향상시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 3

N-[4-(6-플루오로-3,4-디하이드로-1H-이소퀴놀린-2-일)-2,6-디메틸페닐]-3,3-디메틸부탄아미드인 화합물 A의 유효량을 우울 장애를 갖는 인간에게 투여하는 것을 포함하여, 상기 인간에서 Kv7 칼륨 채널의 개방을 향상시키는 방법.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, Kv7 칼륨 채널이 Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4, 또는 Kv7.5 중 하나 이상인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, Kv7.1보다 Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4, 또는 Kv7.5 중 하나 이상의 개방을 향상시키는데 선택적인 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, Kv7.2/Kv7.3 (KCNQ2/3) 칼륨 채널의 개방을 포함하는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중의 어느 한 항에 있어서, 우울 장애가 주요 우울 장애(major depressive disorder)(MDD), 파괴적 기분 조절 곤란 장애(disruptive mood dysregulation disorder), 지속성 우울 장애(persistent depressive disorder), 양극성 스펙트럼 장애(bipolar spectrum disorder), 산후 우울증(postpartum depression), 월경전 불쾌 장애(premenstrual dysphoric disorder)(PMDD), 계절성 정동 장애(seasonal affective disorder)(SAD), 비전형 우울증(atypical depression), 치료-저항성 우울증(treatment-resistant depression)(TRD), 초조 또는 불안 관련 우울증(depression associated with agitation or anxiety), 우울한 기분을 동반한 적응 장애(adjustment disorder with depressed mood), 지속 우울 반응(prolonged depressive reaction), 또는 이들의 조합인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중의 어느 한 항에 있어서, 우울 장애가 주요 우울 장애(major depressive disorder)(MDD)인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중의 어느 한 항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 경구 투여되는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중의 어느 한 항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 2 내지 200mg의 용량으로 투여되는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 2 내지 100mg의 용량으로 투여되는 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 5 내지 50mg의 용량으로 투여되는 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 10, 20, 또는 25mg의 용량으로 투여되는 방법.

청구항 14

제10항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 20mg의 용량으로 투여되는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제9항 중의 어느 한 항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 적어도 20mg의 용량으로 투여되는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 적어도 50mg의 용량으로 투여되는 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 적어도 100mg의 용량으로 투여되는 방법.

청구항 18

제1항 내지 제9항 중의 어느 한 항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 1일당 5-1000mg의 용량으로 투여되는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 1일당 5-500mg의 용량으로 투여되는 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 1일당 5-250mg의 용량으로 투여되는 방법.

청구항 21

제18항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 1일당 20-150mg의 용량으로 투여되는 방법.

청구항 22

제18항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 1일당 100mg의 용량으로 투여되는 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중의 어느 한 항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 0.05-2.0mg/kg의 용량으로 투여되는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 0.1-1.0mg/kg의 용량으로 투여되는 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 0.2-0.5mg/kg의 용량으로 투여되는 방법.

청구항 26

우울 장애의 치료를 필요로 하는 인간에서 우울 장애를 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의, N-[4-(6-플루오로-3,4-디하이드로-1H-이소퀴놀린-2-일)-2,6-디메틸페닐]-3,3-디메틸부탄아미드인 화합물 A의 용도.

청구항 27

제26항에 있어서, 우울 장애를 치료하는 것이 인간에서 Kv7 칼륨 채널의 개방을 향상시키는 것을 포함하는 용도.

청구항 28

우울 장애를 갖는 인간에서 Kv7 칼륨 채널의 개방을 향상시키기 위한 약제의 제조에 있어서의, N-[4-(6-플루오로-3,4-디하이드로-1H-이소퀴놀린-2-일)-2,6-디메틸페닐]-3,3-디메틸부탄아미드인 화합물 A의 용도.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, Kv7 칼륨 채널이 Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4, 또는 Kv7.5 중 하나 이상인 용도.

청구항 30

제29항에 있어서, Kv7 칼륨 채널의 개방을 향상시키는 것이 Kv7.1보다 Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4, 또는 Kv7.5 중 하나 이상의 개방을 향상시키는데 선택적인 용도.

청구항 31

제27항에 있어서, Kv7 칼륨 채널의 개방을 향상시키는 것이 Kv7.2/Kv7.3 (KCNQ2/3) 칼륨 채널의 개방을 포함하는 용도.

청구항 32

제26항 내지 제31항 중의 어느 한 항에 있어서, 우울 장애가 주요 우울 장애(major depressive disorder)(MDD), 파괴적 기분 조절 곤란 장애(disruptive mood dysregulation disorder), 지속성 우울 장애(persistent depressive disorder), 양극성 스펙트럼 장애(bipolar spectrum disorder), 산후 우울증(postpartum depression), 월경전 불쾌 장애(premenstrual dysphoric disorder)(PMDD), 계절성 정동 장애(seasonal affective disorder)(SAD), 비전형 우울증(atypical depression), 치료-저항성 우울증(treatment-resistant depression)(TRD), 초조 또는 불안 관련 우울증(depression associated with agitation or anxiety), 우울한 기분을 동반한 적응 장애(adjustment disorder with depressed mood), 지속 우울 반응(prolonged depressive reaction), 또는 이들의 조합인 용도.

청구항 33

제26항 내지 제32항 중의 어느 한 항에 있어서, 우울 장애가 주요 우울 장애(major depressive disorder)(MDD)인 용도.

청구항 34

제26항 내지 제33항 중의 어느 한 항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 경구 투여되는 용도.

청구항 35

제26항 내지 제34항 중의 어느 한 항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 2 내지 200mg의 용량으로 투여되는 용도.

청구항 36

제35항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 2 내지 100mg의 용량으로 투여되는 용도.

청구항 37

제35항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 5 내지 50mg의 용량으로 투여되는 용도.

청구항 38

제35항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 10, 20, 또는 25mg의 용량으로 투여되는 용도.

청구항 39

제35항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 20mg의 용량으로 투여되는 용도.

청구항 40

제26항 내지 제34항 중의 어느 한 항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 적어도 20mg의 용량으로 투여되는 용도.

청구항 41

제40항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 적어도 50mg의 용량으로 투여되는 용도.

청구항 42

제40항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 적어도 100mg의 용량으로 투여되는 용도.

청구항 43

제26항 내지 제34항 중의 어느 한 항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 1일당 5-1000mg의 용량으로 투여되는 용도.

청구항 44

제43항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 1일당 5-500mg의 용량으로 투여되는 용도.

청구항 45

제43항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 1일당 5-250mg의 용량으로 투여되는 용도.

청구항 46

제43항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 1일당 20-150mg의 용량으로 투여되는 용도.

청구항 47

제43항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 1일당 100mg의 용량으로 투여되는 용도.

청구항 48

제26항 내지 제47항 중의 어느 한 항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 0.05-2.0mg/kg의 용량으로 투여되는 용도.

청구항 49

제48항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 0.1-1.0mg/kg의 용량으로 투여되는 용도.

청구항 50

제48항에 있어서, 화합물 A가 인간에게 0.2-0.5mg/kg의 용량으로 투여되는 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 우울 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 우울 장애는 미국에서 2천만 명 이상의 성인에게 영향을 미친다. 우울 장애는 기능을 방해할 만큼 충분히 심각하거나 지속되는 슬픔 및 종종 활동에 대한 관심이나 즐거움 감소를 특징으로 한다. DSM-5(*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition*)는 주요 우울 장애(흔히 주우울증이라고 함) 또는 지속성 우울 장애(기분저하증)와 같이 특정 증상에 따라 일부 우울 장애를 분류하고, 월경전 불쾌 장애, 다른 의학적 상태로 인한 우울 장애, 또는 물질/약물-유발된 우울 장애와 같이 병인에 따라 기타 우울 장애를 분류한다. 또 다른 유형의 우울 장애는 양극성 장애(조울증)를 포함한다. 우울 장애의 정확한 원인(들)은 알려져 있지 않으나, 유전적 및 환경적 요인이 기여하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 우울 장애의 1차 치료는 전형적으로 지원, 정신 요법 및 항우울제 중 하나 이상을 포함한다. 선택적 세로토닌

재흡수 억제제(SSRI), 세로토닌 조절제(5-HT₂ 차단제), 세로토닌-노르에피네프린 재흡수 억제제(SNRI), 노르에피네프린-도파민 재흡수 억제제, 비정형 항우울제, 삼환계 항우울제, 모노아민 산화효소 억제제(MAOI), 멜라토닌성 항우울제, 및 케타민-유사 약물과 같은 몇 가지 약물류 및 약물이 우울 장애를 치료하는데 사용될 수 있으며, SSRI가 종종 초기 선택 약물이다. 그러나 많은 사람들에게, 일부 항우울제는 부분적으로만 효과적이고 치료 작용의 느린 개시 및 바람직하지 않은 부작용을 포함한 추가 제한사항과 관련되기 때문에, 우울 장애에 대한 올바른 항우울 치료제를 찾는 것은 시행착오 접근 방식을 취할 수 있다. 대부분의 승인된 항우울제는 동일한 세로토닌성 및 노르아드레날린성 경로를 공유하여 기전의 다양성을 제한하고 개선된 환자 결과 또는 개인화된 치료 접근법에 대한 기회를 거의 남기지 않는다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 영향을 받는 성인의 수, 장애 부류의 수 및 복잡성, 및 종종 1차 항우울제의 비효율성과 기전적 균일성으로 인해, 우울증을 포함한 우울 장애의 신규하고 효과적인 치료에 대한 요구가 당업계에 남아 있다. 본 개시내용은 우울 장애를 치료하기 위한 조성물 및 방법 및 용도를 제공함으로써 이러한 요구를 다루며 다른 관련 이점을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 개시내용은 소분자 N-[4-(6-플루오로-3,4-디하이드로-1H-이소퀴놀린-2-일)-2,6-디메틸페닐]-3,3-디메틸부탄아미드(본원에서 "화합물 A"로 지칭됨)에 대한 특정 방법 및 용도를 기술한다.

[0006] 하나의 실시양태에서, 본 개시내용은 치료학적 유효량의 화합물 A를 인간에게 투여하는 것을 포함하여, 이를 필요로 하는 인간에서 우울 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다. 특정 경우에, 화합물 A의 투여에 의해 치료되는 우울 장애는 주요 우울 장애(major depressive disorder)(MDD), 파괴적 기분 조절 곤란 장애(disruptive mood dysregulation disorder), 지속성 우울 장애(persistent depressive disorder), 양극성 스펙트럼 장애(bipolar spectrum disorder), 산후 우울증(postpartum depression), 월경전 불쾌 장애(premenstrual dysphoric disorder)(PMDD), 계절성 정동 장애(seasonal affective disorder)(SAD), 비정형 우울증(atypical depression), 치료-저항성 우울증(treatment-resistant depression)(TRD), 초조 또는 불안 관련 우울증(depression associated with agitation or anxiety), 우울한 기분을 동반한 적응 장애(adjustment disorder with depressed mood), 지속 우울 반응(prolonged depressive reaction), 또는 이들의 조합이다. 특정 실시양태에서, 화합물 A의 투여에 의해 치료되는 우울 장애는 주요 우울 장애(major depressive disorder)(MDD)이다.

[0007] 추가의 실시양태에서, 치료학적 유효량의 화합물 A를 투여하는 것을 포함하는 우울 장애의 치료 방법은 인간에서 Kv7 칼륨 채널의 개방을 향상시키는 것을 추가로 포함한다.

[0008] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 인간에게 유효량의 화합물 A를 투여하는 것을 포함하여, 인간에서 Kv7 칼륨 채널을 개방하거나 개방을 향상시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 인간은 본원에 기술된 것과 같은 우울 장애를 갖는다.

[0009] 일부 측면에서, Kv7 칼륨 채널은 Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 또는 Kv7.5 중 하나 이상이다. 특정 경우에서, Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4, 또는 Kv7.5 칼륨 채널 중 하나 이상의 개방 또는 향상된 개방은 Kv7.1보다 선택적이다. 또 다른 경우에서, 상기 방법은 Kv7.2/Kv7.3(KCNQ2/3) 칼륨 채널을 개방하거나 개방을 향상시키는 것을 포함한다.

[0010] 하나의 실시양태에서, 본 개시내용은 우울 장애의 치료를 필요로 하는 인간에서 우울 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 화합물 A는 인간에게 경구 투여된다. 특정 경우에, 인간에 대한 경구 투여는 투여당 화합물 A 2 내지 200mg의 용량을 포함한다. 또 다른 경우에, 인간에 대한 경구 투여는 1일당 5-1000mg의 용량을 포함한다.

[0011] 화합물 A는 발작 장애의 치료를 위해 현재 개발 중인 소분자이며, 칼륨 채널 조절제로서의 이의 용도는 미국 특허 제8,293,911호 및 제8,993,593호 뿐만 아니라 미국 출원 제16/409,684호 및 제16/410,851호에 개시되어 있으며, 이의 개시내용은 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0012] 본 개시내용의 이들 및 다른 측면은 하기 상세한 설명을 참조하여 명백해질 것이다. 이를 위해, 특정 배경 정보 및 절차를 보다 상세하게 설명하고 각각 전문이 본원에 참고로 포함되는 다양한 참조문헌이 본원에 제시되어

있다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 비히클(vehicle), 1mg/kg 화합물 A, 3mg/kg 화합물 A, 및 이미프라민 투여(x축)에 대한 부동 상태 (immobility)까지의 평균 대기 시간(초, y축)의 그래픽 표현을 포함하는 마우스 강제 수영 검사의 결과를 보여 준다.
- 도 2는 비히클, 1mg/kg 화합물 A, 3mg/kg 화합물 A, 및 이미프라민 투여(x축)에 대한 평균 부동 시간(2-6분)(초, y축)의 그래픽 표현을 포함하는 마우스 강제 수영 검사의 결과를 보여준다.
- 도 3은 비히클, 1mg/kg 화합물 A, 3mg/kg 화합물 A, 및 이미프라민 투여(x축)에 대한 평균 부동 시간(0-6분)(초, y축)의 그래픽 표현을 포함하는 마우스 강제 수영 검사의 결과를 보여준다.
- 도 4는 1mg/kg 및 3mg/kg 투여(x축)에 대한 혈장 및 뇌에서의 화합물 A 농도(μM , y축)의 그래픽 표현을 포함한다.

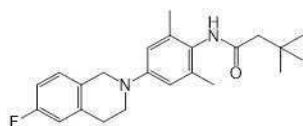
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 개시내용은, 경구 투여를 포함하여 이를 필요로 하는 인간 환자에게 화합물 A를 투여함으로써, 특히 우울 장애의 치료를 위한, 화합물 A에 대한 신규하고 개선된 방법 및 용도에 관한 것이다.
- [0015] 하기 개시내용에서, 다양한 실시양태의 완전한 이해를 제공하기 위해 특정의 구체적인 세부사항이 제시된다. 그러나, 당업계의 숙련가는 본원에 기술된 방법 및 용도가 이러한 세부사항 없이 실시될 수 있음을 이해할 것이다. 또 다른 경우에, 잘 알려진 구조는 실시양태의 설명을 불필요하게 모호하게 하는 것을 피하기 위해 상세하게 도시되거나 기술되지 않았다. 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 명세서 및 뒤따르는 청구범위 전반에 걸쳐, 단어 "포함하다(comprise)" 및 이의 변형, 예를 들어 "포함하다(comprises)" 및 "포함하는(comprising)"은 개방적이고 포괄적인 의미로, 즉 "포함하지만 이에 제한되지 않는(including, but not limited to)"으로 해석되어야 한다. 또한, 본원에 제공된 제목은 단지 편의를 위한 것이며 청구된 발명의 범위 또는 의미를 해석하지 않는다.
- [0016] 본 명세서 전반에 걸쳐 "하나의 실시양태(one embodiment)" 또는 "한 실시양태(an embodiment)"에 대한 참조는 실시양태와 관련하여 기술된 특정 특징, 구조 또는 특성이 적어도 하나의 실시양태에 포함된다는 것을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전반에 걸쳐 다양한 위치에서 문구 "하나의 실시양태에서(in one embodiment)" 또는 "한 실시양태에서(in an embodiment)"의 출현은 반드시 모두 동일한 실시양태를 지칭하는 것은 아니다. 또한, 특정 특징, 구조, 또는 특성은 하나 이상의 실시양태에서 임의의 적절한 방식으로 조합될 수 있다. 또한, 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수형 "a", "an" 및 "the"는 내용이 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다. "또는"이라는 용어는 내용이 명백하게 달리 지시하지 않는 한 "및/또는"을 포함하는 의미로 일반적으로 사용된다는 것을 또한 주지해야 한다.

[0017] 4.1. 정의

[0018] 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 달리 명시되지 않는 한, 다음 용어 및 약어는 표시된 의미를 갖는다:

[0019] "화합물 A"는 다음 화학식:



[0020] [0021] 을 갖고 N-[4-(6-플루오로-3,4-디하이드로-1H-인솔리놀린-2-일)-2,6-디메틸페닐]-3,3-디메틸부탄아미드의 화학 명을 갖는 화합물을 지칭한다. 화합물 A의 제조 및 Kv7.2/Kv7.3(KCNQ2/3) 개방제로서의 이의 용도는 미국 특허 제8,293,911호 및 제8,993,593호 뿐만 아니라 미국 출원 제16/409,684호 및 제16/410,851호에 개시되어 있다. 화합물 A는 뉴런 흥분성을 조절하는데 중요한 전압-개폐 칼륨 채널 Kv7.2 및 Kv7.3(Kv7.2/Kv7.3)의 개방을 강화하고 향상시킨다는 점에서 대부분의 알려진 AED와 다르다. 화합물 A는 본원에 기술된 방법 및 용도에 사용된다.

- [0022] 본원에 사용된 "치료학적 유효량"은 인간 대상체에서 명시된 질병, 장애 또는 상태를 치료하기에 충분하거나 질병, 장애 또는 상태, 또는 질병, 장애 또는 상태의 기저에 있는 하나 이상의 기전에 대해 원하는 명시된 효과를 갖는 화합물 A의 양을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 화합물 A가 우울 장애의 치료를 위해 투여되는 경우, 치료학적 유효량은 인간에게 투여시 인간에서 우울 장애를 치료 또는 개선하거나 우울 장애를 갖는 인간에서 검출 가능한 치료 효과를 나타내는 화합물 A의 양을 지칭한다. 효과는, 예를 들면, 우울증 에피소드 수의 감소 또는 우울증 에피소드의 중증도 감소에 의해 검출될 수 있다.
- [0023] 본원에 사용된 "치료"는 인간 대상체에서 질병, 장애 또는 상태, 또는 기저에 있는 하나 이상의 기전의 진행을 늦추거나 중지시키는 것을 포함하여, 표시된 질병, 장애 또는 상태, 또는 상기 질병, 장애 또는 상태의 기저에 있는 하나 이상의 기전을 개선하는 화합물 A의 투여와 관련된 치료적 적용을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 화합물 A가 우울 장애의 치료를 위해 투여되는 경우, 치료는 우울 장애의 진행을 늦추거나 중지시키기 위한 치료적 적용 및/또는 우울 장애의 역전을 지칭한다. 우울 장애의 역전은 역전의 방법으로 우울 장애의 진행이 중지될 뿐만 아니라 세포 행동이 우울 장애가 없을 때 관찰되는 정상 상태로 어느 정도 이동된다는 점에서 우울 장애를 늦추거나 중지시키는 치료적 적용과는 다르다. 일부 실시양태에서, 화합물 A의 투여를 포함하는 우울 장애의 치료는 우울 장애가 없을 때 관찰되는 정상 수준으로의 하나 이상의 Kv7 칼륨 채널(예를 들어, 임의로 Kv7.1보다 Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4, 및/또는 Kv7.5, 특히 Kv7.2 및/또는 Kv7.3)의 세포 활성의 변화를 동반한다.
- [0024] "섭식 상태(fed condition) 하에서"는 화합물 A의 유효량(예를 들어, 치료학적 유효 용량 범위 내)의 경구 투여 전 약 4시간 내지 화합물 A의 투여 후 약 4시간 사이의 기간 동안 음식을 섭취한 상태를 지칭한다. 음식은 위에서 빠르게 용해 및 흡수되지 않는 충분한 부피와 지방 함량을 가진 고체, 액체 또는 고체 및 액체 음식의 혼합물일 수 있다. 일부 경우에, 음식은 아침, 점심, 저녁 식사 또는, 대안적으로, 이유식(예를 들어, 분유 또는 모유)과 같은 식사이다. 화합물 A의 치료학적 유효량은, 예를 들면, 식사 전 약 30분에서 식사 후 약 2시간 사이에 대상체에게 경구 투여될 수 있으며, 가장 유리하게는 화합물 A의 투여 단위는 식사 동안 또는 식사 후 15분 내에 경구 투여된다.
- [0025] "공복 상태하에서"는 치료학적 유효량의 화합물 A의 경구 투여 전 적어도 4시간 내지 화합물 A의 투여 후 약 4시간 사이의 기간 동안 음식을 섭취하지 않은 상태를 지칭한다.
- [0026] 4.2. 실시양태
- [0027] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 치료학적 유효량의 화합물 A를 인간에게 (예를 들어, 경구로) 투여하는 것을 포함하여, 이를 필요로 하는 인간에서 우울 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다. 특정 경우에, 화합물 A의 투여를 포함하여 치료되는 우울 장애는 주요 우울 장애(major depressive disorder)(MDD), 파괴적 기분 조절 곤란 장애(disruptive mood dysregulation disorder), 지속성 우울 장애(persistent depressive disorder), 양극성 스펙트럼 장애(bipolar spectrum disorder), 산후 우울증(postpartum depression), 월경전 불쾌 장애(premenstrual dysphoric disorder)(PMDD), 계절성 정동 장애(seasonal affective disorder)(SAD), 비전형 우울증(atypical depression), 치료-저항성 우울증(treatment-resistant depression)(TRD), 초조 또는 불안 관련 우울증(depression associated with agitation or anxiety), 또는 이들의 조합이다. 특정 실시양태에서, 투여되는 화합물 A의 양은 우울 장애의 중증도, 우울 장애의 빈도, 또는 둘 다를 감소시키기에 충분하다. 특정 실시양태에서, 화합물 A의 투여를 포함하여 치료되는 우울 장애는 주요 우울 장애(major depressive disorder)(MDD)이다.
- [0028] 일부 실시양태에서, 치료학적 유효량의 화합물 A를 투여함으로써 우울 장애를 치료하는 방법은 인간에서 Kv7 칼륨 채널의 개방을 향상시키는 것을 포함한다.
- [0029] 추가 실시양태에서, 본 개시내용은 치료학적 유효량의 화합물 A를 이를 필요로 하는 인간에게 투여하는 것을 포함하여, 강박 장애(obsessive-compulsive disorder)(OCD), 공황 장애(panic disorder), 사회 불안 장애(social anxiety disorder), 사회 공포증(social phobia), 광장 공포증(agoraphobia), 공황 장애를 동반한 광장 공포증(agoraphobia with panic disorder), 건강염려증(hypochondriasis), 외상 후 스트레스 장애(post-traumatic stress disorder)(PTSD), 치료-저항성 양극성 장애(treatment-resistant bipolar disorder), 범불안 장애(generalized anxiety disorder), 주의력 결핍/과잉 행동 장애(attention-deficit/hyperactivity disorder)(ADHD), 양극성 I 장애(bipolar I disorder), 양극성 II 장애(bipolar II disorder), 조증 장애(manic disorder), 순환성 장애(cyclothymic disorder) 및 달리 명시되지 않은 양극성 장애(bipolar disorder not otherwise specified), 감정부전장애(dysthymic disorder), 달리 명시되지 않은 우울 장애(depressive disorder not otherwise specified), 경미한 우울증(minor depression), 재발성 단기 우울 장애(recurrent

brief depressive disorder), 우울형 정신병(depressive-type psychosis), 충동-조절 장애(impulse-control disorders), 조현병(schizophrenia), 정신분열형 장애(schizophreniform disorder), 분열 정동 장애(schizoaffective disorder), 파킨슨 병(Parkinson's disease), 치매(dementia), 알츠하이머 병(Alzheimer's disease), 헌팅턴 병(Huntington's disease), 투렛 증후군(Tourette's syndrome), 공격성(aggression) 및 약물 사용 및/또는 남용, 또는 이들의 조합을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0030] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 유효량의 화합물 A를 투여함으로써 이를 필요로 하는 인간에서 Kv7 칼륨 채널, 예를 들어 Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4, 및/또는 Kv7.5 칼륨 채널, 특히 Kv7.2/Kv7.3 (KCNQ2/3) 칼륨 채널을 개방하거나 개방을 향상시키는 것을 포함하는 방법 또는 용도를 제공한다. 이러한 일부 실시양태에서, 인간은 본원에 기술된 것과 같은 우울 장애를 갖는다.

[0031] 특정 경우에, 본원에 기술된 방법 또는 용도는 Kv7 칼륨 채널, 예를 들어 Kv7.1 보다는 Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4, 또는 Kv7.5 중 하나 이상을 선택적으로 개방하거나 개방을 향상시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법 또는 용도는 Kv7.1보다 Kv7.2에 대해 선택적이다. 또 다른 실시양태에서, 방법 또는 용도는 Kv7.1보다 Kv7.3에 대해 선택적이다. 또 다른 실시양태에서, 방법 또는 용도는 Kv7.1보다 Kv7.4에 대해 선택적이다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 방법 또는 용도는 Kv7.1보다 Kv7.5에 대해 선택적이다. 특정 실시양태에서, 방법 또는 용도는 Kv7.1보다 Kv7.2 및 Kv7.3에 대해 선택적이다. 특정 실시양태에서, 방법 또는 용도는 다른 Kv7 칼륨 채널보다 Kv7.2 및 Kv7.3에 대해 선택적이다. 특정 실시양태에서, 방법 또는 용도는 Kv7.4 및 Kv7.5보다 Kv7.2 및 Kv7.3에 대해 선택적이다.

[0032] 하나의 실시양태에서, 우울 장애의 치료를 필요로 하는 인간에서 우울 장애를 치료하는데 있어서의 방법 또는 용도와 같은 본원에 기술된 방법 및 용도는 약 0.05mg/kg 내지 약 2.0mg/kg과 같은 치료학적 유효량의 화합물 A를 (예를 들어, 경구로) 투여함으로써 달성된다. 보다 구체적인 대표적인 양은 0.05mg/kg, 0.10mg/kg, 0.20mg/kg, 0.30mg/kg, 0.40mg/kg, 0.5mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.7mg/kg, 0.80mg/kg, 0.90mg/kg, 1.0mg/kg, 1.1mg/kg, 1.2mg/kg, 1.3 mg/kg, 1.4mg/kg, 1.5mg/kg, 1.6mg/kg, 1.7mg/kg, 1.8mg/kg, 1.9mg/kg 및 2.0mg/kg, 또는 앞서 언급한 양 중 2개를 중점으로 사용하여 생성된 임의의 범위의 양을 포함한다. 일부 측면에서, 방법 또는 용도는 0.1-1.0mg/kg의 화합물 A를 (예를 들어, 경구로) 투여하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 방법은 0.2-0.5mg/kg의 화합물 A를 (예를 들어, 경구로) 투여하는 것을 포함한다.

[0033] 일부 실시양태에서, 우울 장애의 치료를 필요로 하는 인간에서 우울 장애를 치료하는데 있어서의 방법 또는 용도와 같은 본원에 기술된 방법 및 용도는 2 내지 200mg의 화합물 A와 같은 치료학적 유효량의 화합물 A를 단일 또는 분할 용량으로 (예를 들어, 경구로) 투여함으로써 달성된다. 예를 들면, 방법은 단일 또는 분할 용량으로, 약 2mg, 약 3mg, 약 4mg, 약 5mg, 약 6mg, 약 7mg, 약 8mg, 약 9mg, 약 10mg, 약 11mg, 약 12mg, 약 13mg, 약 14mg, 약 15mg, 약 16mg, 약 17mg, 약 18mg, 약 19mg, 약 20mg, 약 21mg, 약 22mg, 약 23mg, 약 24mg, 약 25mg, 약 26mg, 약 27mg, 약 29mg, 약 30mg, 약 31mg, 약 32mg, 약 33mg, 약 34mg, 약 35mg, 약 36mg, 약 37mg, 약 38mg, 약 39mg, 약 40mg, 약 41mg, 약 42mg, 약 43mg, 약 44mg, 약 45mg, 약 46mg, 약 47mg, 약 48mg, 약 49mg, 약 50mg, 약 51mg, 약 52mg, 약 53mg, 약 54mg, 약 55mg, 약 56mg, 약 57mg, 약 58mg, 약 59mg, 약 60mg, 약 61mg, 약 62mg, 약 63mg, 약 64mg, 약 65mg, 약 66mg, 약 67mg, 약 68mg, 약 69mg, 약 70mg, 약 71mg, 약 72mg, 약 73mg, 약 74mg, 약 75mg, 약 76mg, 약 77mg, 약 78mg, 약 79mg, 약 80mg, 약 81mg, 약 82mg, 약 83mg, 약 84mg, 약 85mg, 약 86mg, 약 87mg, 약 88mg, 약 89mg, 약 90mg, 약 91mg, 약 92mg, 약 93mg, 약 94mg, 약 95mg, 약 96mg, 약 97mg, 약 98mg, 약 99mg, 약 100mg, 약 101mg, 약 102mg, 약 103mg, 약 104mg, 약 105mg, 약 106mg, 약 107mg, 약 108mg, 약 109mg, 약 110mg, 약 111mg, 약 112mg, 약 113mg, 약 114mg, 약 115mg, 약 116mg, 약 117mg, 약 118mg, 약 119mg, 약 120mg, 약 121mg, 약 122mg, 약 123mg, 약 124mg, 약 125mg, 약 126mg, 약 127mg, 약 129mg, 약 130mg, 약 131mg, 약 132mg, 약 133mg, 약 134mg, 약 135mg, 약 136mg, 약 137mg, 약 138mg, 약 139mg, 약 140mg, 약 141mg, 약 142mg, 약 143mg, 약 144mg, 약 145mg, 약 146mg, 약 147mg, 약 148mg, 약 149mg, 약 150mg, 약 151mg, 약 152mg, 약 153mg, 약 154mg, 약 155mg, 약 156mg, 약 157mg, 약 158mg, 약 159mg, 약 160mg, 약 161mg, 약 162mg, 약 163mg, 약 164mg, 약 165mg, 약 166mg, 약 167mg, 약 168mg, 약 169mg, 약 170mg, 약 171mg, 약 172mg, 약 173mg, 약 174mg, 약 175mg, 약 176mg, 약 177mg, 약 178mg, 약 179mg, 약 180mg, 약 181mg, 약 182mg, 약 183mg, 약 184mg, 약 185mg, 약 186mg, 약 187mg, 약 188mg, 약 189mg, 약 190mg, 약 191mg, 약 192mg, 약 193mg, 약 194mg, 약 195mg, 약 196mg, 약 197mg, 약 198mg, 약 199mg, 또는 약 200mg을 (예를 들어, 경구로) 투여하거나 앞서 언급한 양 중 2개를 중점으로 사용하여 생성된 임의의 범위의 양을 (예를 들어, 경구로) 투여하는 것을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 방법 또는 용도는 단일 또는 분할 용량으로 5 내지 50mg의 화합물

A의 경구 투여를 포함한다. 일부 측면에서, 방법 또는 용도는 단일 또는 분할 용량의 10, 20, 또는 25mg의 화합물 A의 경구 투여를 포함한다. 일부 측면에서, 방법 또는 용도는 단일 또는 분할 용량의 20mg의 화합물 A의 경구 투여를 포함한다.

[0034] 일부 측면에서, 우울 장애의 치료를 필요로 하는 인간에서 우울 장애를 치료하는데 있어서의 방법 또는 용도와 같은 본원에 기술된 방법 및 용도는 적어도 20mg의 화합물 A, 예를 들어 적어도 25, 30, 35, 50, 75, 또는 100mg의 화합물 A를 (예를 들어, 경구로) 투여함으로써 달성된다. 일부 실시양태에서, 우울 장애의 치료를 필요로 하는 인간에서 우울 장애를 치료하는데 있어서의 방법 또는 용도와 같은 본원에 기술된 방법 및 용도는 1일당 적어도 50mg의 화합물 A, 예를 들어 1일당 적어도 60, 75, 85, 100, 125, 150, 175, 또는 200mg의 화합물 A를 (예를 들어, 경구로) 투여함으로써 달성된다.

[0035] 일부 실시양태에서, 우울 장애의 치료를 필요로 하는 인간에서 우울 장애를 치료하는데 있어서의 방법 또는 용도와 같은 본원에 기술된 방법 및 용도는 1일당 치료학적 유효량의 화합물 A, 예를 들어 1일당 5 내지 1000mg의 화합물 A, 예를 들어 1일당 5 내지 500mg 또는 5 내지 250mg의 화합물 A를 (예를 들어, 경구로) 투여함으로써 달성된다. 예를 들면, 방법 또는 용도는 1일당 약 5mg, 약 10mg, 약 15mg, 약 20mg, 약 25mg, 약 30mg, 약 35mg, 약 40mg, 약 45mg, 약 50mg, 약 55mg, 약 60mg, 약 65mg, 약 70mg, 약 75mg, 약 80mg, 약 85mg, 약 90mg, 약 95mg, 약 100mg, 약 105mg, 약 110mg, 약 115mg, 약 120mg, 약 125mg, 약 130mg, 약 135mg, 약 140mg, 약 145mg, 약 150mg, 약 155mg, 약 160mg, 약 165mg, 약 170mg, 약 175mg, 약 180mg, 약 185mg, 약 190mg, 약 195mg, 약 200mg, 약 205mg, 약 210mg, 약 215mg, 약 220mg, 약 225mg, 약 230mg, 약 235mg, 약 240mg, 약 245mg, 약 250mg, 약 255mg, 약 260mg, 약 265mg, 약 270mg, 약 275mg, 약 280mg, 약 285mg, 약 290mg, 약 295mg, 약 300mg, 약 305mg, 약 310mg, 약 315mg, 약 320mg, 약 325mg, 약 330mg, 약 335mg, 약 340mg, 약 345mg, 약 350mg, 약 355mg, 약 360mg, 약 365mg, 약 370mg, 약 375mg, 약 380mg, 약 385mg, 약 390mg, 약 395mg, 약 400mg, 약 405mg, 약 410mg, 약 415mg, 약 420mg, 약 425mg, 약 430mg, 약 435mg, 약 440mg, 약 445mg, 약 450mg, 약 455mg, 약 460mg, 약 465mg, 약 470mg, 약 475mg, 약 480mg, 약 485mg, 약 490mg, 약 495mg, 약 500mg, 또는 약 1000mg의 화합물 A를 (예를 들어, 경구로) 투여하거나, 1일당 앞서 언급한 양 중 2개를 중점으로 사용하여 생성된 범위의 양을 (예를 들어, 경구로) 투여하는 것을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 방법 또는 용도는 1일당 10 내지 200mg의 화합물 A, 예를 들어 1일당 20 내지 150mg을 포함하여 1일당 10, 15, 20, 25, 30, 35, 또는 40mg 내지 75, 100, 125, 150, 175, 또는 200mg의 화합물 A를 경구 투여하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 경구 투여는 1일당 50, 75, 100, 또는 125mg의 화합물 A, 예를 들어 1일당 100mg을 포함한다.

[0036] 특정 경우에, 화합물 A의 상기 1일 용량은 1일 2회, 3회, 4회 또는 5회 용량과 같이 1일 다중 용량으로 (예를 들어, 경구로) 투여된다. 예를 들면, 100mg의 1일 용량은 하루에 걸쳐 20mg 5번, 25mg 4번, 33.3mg 3번 또는 50mg 2번의 용량으로 투여될 수 있다.

[0037] 일부 실시양태에서, 화합물 A의 상기 1일 용량은 단일 용량으로 (예를 들어, 경구로) 투여된다. 예를 들면, 단일 용량으로 1일당 10-25mg, 10-30mg, 및 10-40mg, 예를 들어 단일 용량으로 1일당 10-25mg을 포함하여 1일당 약 5, 10, 15, 20, 25, 또는 30mg 내지 약 50, 65, 75, 100, 125, 또는 150mg의 화합물 A가 단일 용량으로 경구 투여될 수 있다. 이와 관련하여, 선행 단락에서 논의된 화합물 A의 임의의 용량은 단위 투여 형태에 포함될 수 있다.

[0038] 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 방법 및 용도는, 본원에 개시된 1일 투여량을 사용할 때, 6 내지 9일 이내에, 예를 들어 약 1주에 화합물 A에 대한 정상 상태(steady state)를 달성한다.

[0039] 추가의 실시양태에서, 치료학적 유효량의 화합물 A를 (예를 들어, 경구로) 투여함으로써 우울 장애를 치료하는 상기 논의된 방법 또는 용도는 섭식 상태하에서 인간에게 화합물 A를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 섭식 상태하에(즉, 음식과 함께 또는 음식 섭취에 시간적으로 근접한 상태에서) 인간에게 화합물 A의 경구 투여는 공복 상태하에(즉, 음식 없이 또는 음식 섭취에 시간적으로 근접하지 않은 상태에서) 인간에게 화합물 A의 경구 투여와 비교하여 화합물 A의 생체이용률 및 노출을 상당히 향상시킨다. 일부 실시양태에서, 섭식 상태하에서 인간에게 화합물 A의 경구 투여는 동일한 양의 화합물 A가 공복 상태하에서 인간에게 경구 투여되는 경우와 비교하여 화합물 A에 대한 하나 이상의 약동학적 매개변수(예를 들어, C_{max} , AUC_{inf} , T_{max} , $t_{1/2LZ}$ 등)를 증가시킨다.

[0040] 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 방법 및 용도는 화합물 A 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적으로 허용되는 경구 조성물의 형태로 화합물 A를 투여한다. 이러한 조성물에 포함

된 화합물 A의 양은 본원에 기술된 양 중 하나 이상에 상응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 단위 용량이다.

[0041] 화합물 A를 포함하는 약제학적으로 허용되는 경구 조성물의 예는 고체 제형(예를 들어, 정제, 캡슐, 로젠지, 당 의정, 과립, 분말, 웨이퍼, 다중미립자 및 필름), 액체 제형(예를 들어, 수용액, 엘릭시르, 팅크제, 슬러리, 현탁액 및 분산액) 및 에어로졸 제형(예를 들어, 미스트 및 스프레이)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 화합물 A의 약제학적으로 허용되는 경구 조성물은 소아(pediatric) 현탁액 또는 과립을 포함한다. 화합물 A의 모든 상기 언급된 양이 이러한 제형, 예를 들어 5, 10, 15, 10, 25, 30, 또는 35mg의 화합물 A를 포함하는 캡슐에 포함될 수 있다.

[0042] 또 다른 실시양태에서, 경구 투여시 우울 장애의 치료를 위한 화합물 A의 경구 투여용 키트가 제공된다. 이러한 키트는 화합물 A의 복수의 경구 투여 단위 형태를 화합물 A의 경구 투여를 위한 지침서와 함께 포함한다.

[0043] 본 개시내용의 추가 실시양태 및 실시예가 본원에 기술되어 있다. 이들 실시양태 및 실시예는 예시적이며 청구된 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0044] 5. 실시예

[0045] 행동 절망(behavioral despair)의 설치류 모델에서 화합물 A의 효과를 결정하기 위한 연구가 수행되었다(즉, 마우스 강제 수영 검사). 추가 분석은 강제 수영 검사에서 화합물 A의 총 뇌-대-혈장 비율을 결정하였다. 허용된 우울증 모델에서 화합물 A의, 있다면, 효과를 결정하기 위해 추가 연구를 수행한다.

[0046] 5.1. 실시예 1. 마우스 강제 수영 검사

[0047] 목적: 마우스 강제 수영 검사를 사용하여 화합물 A의 잠재적 효능을 평가하기 위한 연구가 수행되었다. 강제 수영 검사는 행동 절망의 모델이며, 다양한 종류의 항우울제의 검출에 민감하다(Can et al., The Mouse Forced Swim Test. J. Vis. Exp. 2012 (59), e3638, DOI:10.3791/3638).

[0048] 연구 설계: 사십(40) 마리의 수컷 CD-1 마우스는 시험 시작 전에 시험 시설에 1주 동안 순응시켰다(표 1에 요약된 이벤트). 동물은 설치류 먹이와 물(SOP ROD.03.01, SOP ROD.04.01, SOP ROD.18)에 제한 없이 접근할 수 있게 하여 케이지당 5마리씩 수용되었고 12h/12h 명/암 주기로 유지되었으며 모든 실험 활동은 동물의 명 주기(light cycle) 동안 일어난다. 모든 동물 사용 절차는 캐나다 동물 관리 위원회(CCAC)의 원칙에 따라 수행되었다.

[0049] 표 1. 연구 이벤트의 요약

연구 일자	주요 이벤트	절차
-3	동물 도착	동물 시설에 순응시킴
0	강제 수영 검사	일반적인 건강 관찰 및 체중 강제 수영 검사 혈액 및 뇌 수집(N = 화합물 A가 투여된 20 마리 동물)

[0050]

[0051] 화합물 A의 제형: 화합물 A(99.4% 순도)를 칭량하고(순도에 대한 보정 없음) 의도한 최종 농도의 20배로 DMSO에 용해시켰다. 화합물 A의 20x DMSO 스톡 용액(stock solution)을 물 중의 0.5% 메틸 셀룰로스로 20배 희석하여 원하는 최종 농도를 달성하였다. 화합물 A가 미세 현탁액으로서 침전될 때, 교반 또는 와류 혼합으로 균질한 현탁액을 생성하였다. 상기 제형을 실온에서 유지하고 각 용량 투여 전에 연속적으로 교반하거나 와류 혼합하였다. 시험 물품은 표 2에 요약되어 있다.

[0052] 표 2. 시험 물질

시험 물질	BEW	용량	경로	Ppt ¹	투여 용적	비히클
화합물 A	1	1 및 3 mg/kg	IP	30 min	10 mL/kg	5% DMSO, 역삼투압수 중의 0.5% 메틸 셀룰로스 ² ; 점도: 400 cP
이미프라민 ³	1.13	30 mg/kg	IP	30 min	10 mL/kg	염수

[0053]

[0054]

¹ 전처리 시간. ² Sigma-Aldrich 카탈로그 #M0430 (USP 시험 사양 충족). ³ 이미프라민은 초조와 불안 증상을 또한 감소시킬 수 있는 알려진 삼환계 항우울제이다.

[0055]

강제 수영 검사: 사십(40) 마리의 수컷 CD-1 마우스는 적절한 용량의 비히클, 시험 물질 또는 양성 대조물을 제공받았다(표 3에 요약된 처리). 사전-결정된 전처리 시간(Can et al., 2012) 후에, 동물을 물(20-25°C)로 채워진 키가 큰 유리 실린더에 부드럽게 넣었다. 격렬한 활동 기간 후에, 마우스는 특징적이고 쉽게 식별할 수 있는 부동 자세를 취하였다. 수영 검사는 부동 상태의 지속시간을 측정하는 것을 포함하였다. 6분의 검사 세션에 걸쳐, 1차 부동 상태까지의 대기 시간(초 단위)을 기록하였다. 검사의 마지막 4분 동안의 부동 상태의 지속 시간(초 단위)을 또한 측정하였다. 0-2분 동안의 활동 또는 비활동은 기록하지 않았다.

[0056]

표 3. 처리 그룹의 요약

그룹	처리	경로	Ptt	투여 용적	그룹 크기
A	비히클	IP	30 min	10 mL/kg	N = 10
B	화합물 A (1 mg/kg)	IP	30 min	10 mL/kg	N = 10
C	화합물 A (3 mg/kg)	IP	30 min	10 mL/kg	N = 10
D	이미프라민 (30 mg/kg)	IP	30 min	10 mL/kg	N = 10

[0057]

[0058]

결과: 강제 수영 검사의 결과는 표 4 및 도 1-3에 나타내어져 있다.

[0059] 표 4. 강제 수영 검사의 결과

그룹	동물 ID	처리	부동 상태까지의 대기 시간 (sec)	부동 시간 (sec)		
				0 - 2 min	2 - 6 min	0 - 6 min
A	A1	비히클	80	39	222	261
	A2		106	13	226	239
	A3		200	0	188	188
	A4		79	38	209	247
	A5		91	22	119	141
	A6		90	20	148	168
	A7		99	20	190	210
	A8		91	5	199	204
	A9		79	15	121	136
	A10		93	24	192	216
평균			100.8	19.6	181.4	201.0
표준 편차			11.4	3.9	12.3	13.6
B	B1	화합물 A (1 mg/kg)	77	32	142	174
	B2		84	28	170	198
	B3		206	0	33	33
	B4		100	16	109	125
	B5		70	20	149	169
	B6		109	4	192	196
	B7		144	0	134	134

[0060]

그룹	동물 ID	처리	부동 상태까지의 대기 시간 (sec)	부동 시간 (sec)		
				0 - 2 min	2 - 6 min	0 - 6 min
	B8		105	7	189	196
	B9		130	0	141	141
	B10		80	20	150	170
평균			110.5	12.7	140.9	153.6
표준 편차			13.0	3.8	14.4	15.8
C	C1	화합물 A (3 mg/kg)	135	0	166	166
	C2		165	0	144	144
	C3		155	0	122	122
	C4		86	23	184	207
	C5		150	0	82	82
	C6		127	0	146	146
	C7		192	0	101	101
	C8		162	0	90	90
	C9		83	21	163	184
	C10		105	15	166	181
평균			136.0	5.9	136.4	142.3
표준 편차			11.3	3.1	11.3	13.5
D	D1	이미프라민 (30 mg/kg)	224	0	32	32
	D2		213	0	45	45
	D3		180	0	63	63
	D4		169	0	133	133
	D5		215	0	84	84
	D6		350	0	10	10
	D7		163	0	126	126
	D8		244	0	42	42
	D9		360	0	0	0
	D10		126	0	102	102
평균			224.4	0.0	63.7	63.7
표준 편차			24.3	0.0	14.7	14.7

[0061]

[0062]

통계 분석: 표 4의 결과는 표 5-14에 나타난 바와 같이 T-, 일변량 및 Dunnett's 검정을 사용하여 유의성에 대해 검사하였다.

[0063]

표 5. 부동 상태까지의 대기 시간 결과에 대한 T-검정

	비히클	1 mg/kg	3 mg/kg	이미프라민
	80	77	135	224
	106	84	165	213
	200	206	155	180
	79	100	86	169
	91	70	150	215
	90	109	127	350
	99	144	192	163
	91	105	162	244
	79	130	83	360
	93	80	105	126
T-검정 (단측)		0.290	0.021	0.000
T-검정 (양측)		0.581	0.042	0.000

[0064]

[0065] 표 6. 부동 상태까지의 대기 시간 결과에 대한 유의성의 일변량 검정(Guadalupe)

효과	시그마-제한된 매개변수화 효과적인 가설 분해; 추정치 표준 오차 50.44372				
	SS	자유도	MS	F	P
인터셉트	817102.2	1	817102.2	321.1161	0.000000
처리	95120.3	3	31706.8	12.4606	0.000010
오차	91604.5	36	2544.6		

[0066] 표 7. 부동 상태까지의 대기 시간 결과에 대한 Dunnett's 검정(Guadalupe)

세포 번호	사후 검정에 대한 확률 (양측) 오차: MSE 사이 = 2544.6, df = 36.000	
	처리	{1} 100.80
1	비히클	
2	1 mg	0.949581
3	3 mg	0.290085
4	이미프라민 30 mg	0.000018

[0068] 표 8. 2-6분 결과에 대한 T-검정

	비히클	1 mg/kg	3 mg/kg	이미프라민
	222	142	166	32
	226	170	144	45
	188	33	122	63
	209	109	184	133
	119	149	82	84
	148	192	146	10
	190	134	101	126
	199	189	90	42
	121	141	163	0
	192	150	166	102
T-검정 (단측)		0.023	0.007	0.000
T-검정 (양측)		0.046	0.015	0.000

[0070] 표 9. 2-6분 결과에 대한 유의성의 일변량 검정(Guadalupe)

효과	시그마-제한된 매개변수화 효과적인 가설 분해; 추정치 표준 오차 41.83426				
	SS	자유도	MS	F	P
인터셉트	682254.4	1	682254.5	389.8361	0.000000
처리	71959.8	3	23986.6	13.7058	0.000004
오차	63003.8	36	1750.1		

[0072] 표 10. 2-6분 결과에 대한 Dunnett's 검정(Guadalupe)

세포 번호	사후 검정에 대한 확률 (양측) 오차: MSE 사이 = 1750.1, df = 36.000	
	처리	{1} 181.40
1	비히클	
2	1 mg	0.093513
3	3 mg	0.055570
4	이미프라민 30 mg	0.000008

[0075] 표 11. 0-6분 결과에 대한 T-검정

	비히클	1 mg/kg	3 mg/kg	이미프라민
	261	174	166	32
	239	198	144	45
	188	33	122	63
	247	125	207	133
	141	169	82	84
	168	196	146	10
	210	134	101	126
	204	196	90	42
	136	141	184	0
	216	170	181	102
T-검정 (단측)		0.018	0.003	0.000
T-검정 (양측)		0.035	0.007	0.000

[0076]

[0077] 표 12. 0-6분 결과에 대한 유의성의 일변량 검정(Guadalupe)

효과	시그마-제한된 매개변수화 효과적인 가설 분해; 추정치 표준 오차 45.57429				
	SS	자유도	MS	F	P
인터셉트	785680.9	1	785680.9	378.2738	0.000000
처리	97328.5	3	32442.8	15.6199	0.000001
오차	74772.6	36	2077.0		

[0078]

[0079] 표 13. 0-6분 결과에 대한 Dunnett's 검정(Guadalupe)

세포 번호	사후 검정에 대한 확률 (양측) 오차: MSE 사이 = 2077.0, df = 36.000	
	처리	{1} 201.00
1	비히클	
2	1 mg	0.066283
3	3 mg	0.018039
4	이미프라민 30 mg	0.000008

[0080]

[0081] 표 5-13은 화합물 A가 마우스 강제 수영 검사 모델에서 통계적으로 유의한 효과를 나타냄을 보여준다. 예를 들면, 3mg/kg 용량은 부동 상태까지의 대기 시간, 2-6분 및 0-6분 결과에 대해 각각 0.042, 0.015 및 0.007(예를 들어, <0.05)의 양측 T-검정 점수를 제공하였다.

[0082] 혈액 및 뇌 수집: 강제 수영 검사 직후, 시험 물품이 투여된 모든 동물을 이소플루란 흡입제로 마취시키고, 말초 혈액 수집(~1ml)을 칼륨 EDTA 혈액 수집 튜브에 심장 천자를 통해 수행하였다(SOP ROD.14.02). 4°C에서 5분 동안 3000rpm으로 원심분리하여 전혈에서 혈장을 단리하였다. 일단 단리되면, 혈장을 냉동 바이알에 넣고 생물학적 분석을 위해 선적될 때까지 -80°C에서 동결하였다. 혈액 수집 후, 동물의 목을 베고 표준 작업 절차에 따라 전체 뇌를 수집하였다(SOP ROD.59). 뇌를 칭량하고, 급속 냉동하고, 선적할 때까지 -80°C에서 보관하였다. 화합물 A의 혈액 및 뇌 농도는 도 4에 나타내어져 있다. 1 및 3mg/kg 용량 모두에 대해 2.2의 총 뇌-대-혈장 비율(B/P 비율)은 생체내에서 우수한 CNS 침투를 시사한다.

[0083] 5.2. 실시예 2. 꼬리 매달기 검사

[0084] 꼬리 매달기 검사(Tail Suspension Test; TST)는 마우스에서 항우울제-유사 활성을 평가하는데 가장 널리 사용되는 모델 중 하나가 되었다. 이 검사는 꼬리로 매달려 있는 피할 수 없는 단기적인 스트레스를 받는 동물이 부동 자세를 갖게 된다는 사실에 근거한다. 프로토콜은 문헌[Cryan, J.F. et al., Neurosci. Biobehav. Rev. 2005, 29:571-625]에 기술되어 있다.

[0085] 설명: 장치는 각각 3개 케이지의 2가지 매달기 유닛으로 구성되어 있으며 6마리의 마우스를 동시에 검사할 수 있다. 각 마우스는 스트레인 게이지에 연결된 후크에 접촉 테이프를 사용하여 꼬리로 매달려 있다. 스트레인

케이지는 마우스의 모든 움직임을 포착하여 신호를 디지털화하는 중앙 유닛으로 전송한다. 신호는 LED를 사용하여 시각적으로 표시되므로 각 유닛의 양호한 기능을 온라인으로 확인할 수 있다. 중앙 유닛에는 레벨 필터링 장치(1에서 9까지)가 포함되어 있어 원하는 감도로 설정할 수 있어 동물 또는 이의 내부 장기의 다른 미세-움직임과 신체 전체의 움직임을 최대한 구별할 수 있다.

[0086] 매개변수: "부동 상태의 지속시간"이 측정된 주요 매개변수이다. 이것은 동물의 움직임이 레벨 필터링 장치에 의해 결정된 임계값을 초과하지 않는 누적 시간으로부터 계산된다. 검사 동안 동물이 소비하는 "에너지"는 임의의 단위로 개별 움직임의 누적 진폭에 의해 측정된다. "움직임의 힘"은 검사 동안 동물이 소비한 총 에너지를 동물이 활동하는 총 시간으로 나눈 값으로부터 계산된다(임의 단위). 세 가지 매개변수 모두에 대해, 컴퓨터는 데이터 수집, 실험 일정 생성(무작위화) 및 결과 그룹화를 제공한다(평균, 중앙값 및 SEM은 각 처리 그룹에 대해 자동으로 계산됨).

[0087] 절차: 검사 당일, 마우스를 하우징 콜로니 룸에서 검사 실험실로 이동시키고(케이지는 운송 동안 필터로 덮여 있음), 검사 실험실에서 필터 덮개를 즉시 제거하며, 검사 전에 적어도 1시간 동안 마우스를 방해받지 않게 둔다. 이후 마우스를 약물로 처리한 다음 1시간(PO) 또는 30분(IP)의 처리 후, 마우스를 무작위화 방식에 따라 TST 장치에 (예를 들어, 접착 테이프) 꼬리를 매달았다. 세 가지 매개변수 모두에 대한 측정값을 수득하기 위해 검사를 6분 동안 지속한다. 실험은 08:00에서 12:30 사이에 수행된다. 전형적으로, 처리 그룹당 12마리의 마우스가 사용된다.

[0088] 약물 처리: 화합물 A 및 이미프라민을 상기 실시예 1의 표 2에 기술된 농도로 제형화 및 투여하고 TST 30분 전에 투여하였다. 각 실험에 대해, 적어도 하나의 대조 그룹이 포함되고, 취급하며, 엄격하게 동일한 실험 조건 하에서 병렬로 검사된다.

[0089] 통계: 각 실험에 대해, 매개변수 "부동 시간(immobility time)"에 대한 통계적 유의도를 일원 분산 분석(ANOVA)을 사용하여 평가한 다음, 적절한 경우, Dunnett's 검정을 사용하여 사후 분석을 수행한다. 매개변수 "에너지" 및 "움직임의 힘" 정규성 검정이 실패하면, Kruskal-Wallis 순위 일원 분산 분석을 사용하여 그룹간 비교를 수행한 다음, 적절한 경우, Dunnett's 검정을 사용하여 사후 분석을 수행한다. 세 가지 매개변수 모두에 대해, $p < 0.05$ 의 값은 통계적으로 유의한 것으로 간주된다.

[0090] 5.3. 실시예 3. 수크로스 선호도 및 두개내 자기-자극

[0091] 수크로스 섭취 및 두개내 자기-자극(ICSS)은 설치류에서 만성 경미한 스트레스(CMS) 유발 행동 결손에 대한 쾌락 척도(Hedonic Measure)이다. 프로토콜은 문헌[Nielsen, C.K. et al., Behav. Brain Res. 2000, 107:21-33]에 기술되어 있다. CMS 모델을 사용하여 화합물 A의 잠재적 효능을 평가하기 위한 연구가 수행된다.

[0092] 대상체: 연구 시작시 각각 체중이 250-300g 및 220-240g인 수컷 Wistar 래트 및 수컷 Pieball ViroL Glaxo(PVG) 두건 모양 래트가 사용된다. 래트를 폴리카보네이트 케이지에 개별적으로 또는 쌍으로 수용하고 12시간 명:암 주기(06:00에 라이트)로 유지한다. 검사에 요구하는 경우를 제외하고, 동물은 음식과 물에 자유롭게 접근할 수 있다. 온도($22 \pm 1^\circ\text{C}$), 상대 습도($55 \pm 5\%$) 및 공기 교환(시간당 16회)은 자동으로 제어된다. 체중은 모든 실험 동안 매주 측정된다.

[0093] 약물 처리: 화합물 A 및 이미프라민은 스트레스 섭생 및/또는 두개내 자기-자극 동안 매일 기준으로 상기 실시예 1의 표 2에 기술된 농도로 제형화 및 투여된다. 각 실험에 대해, 적어도 하나의 대조 그룹이 포함되고, 취급되며, 엄격하게 동일한 실험 조건하에서 병렬로 검사된다.

[0094] 스트레스 섭생: 두 가지 상이한 스트레스 섭생(CMS-1 및 CMS-2)이 사용된다. CMS-1의 각 주는 두 기간(8시간 및 19시간)의 음식 부족; 세 기간(6, 7, 19시간)의 물 부족; 두 기간(7시간 및 16시간)의 케이지 기울기(45°); 2회의 17시간 기간의 짝을 이룬 수용; 1회 17시간 기간의 더러워진 케이지(툽밥 배당 100g에 물 200ml); 1회 6시간 기간의 저장도 스트로보스코프 조명(150회 플래시:분); 및 48시간의 명:암 반전으로 구성된다. CMS-2의 각 주는 1회 17시간 동안 음식과 물이 부족하고 즉시 2시간 동안 음식에 대한 접근 제한; 1회 17시간 동안 물이 부족하고 즉시 빈 병에 1시간 노출됨; 1회 17시간 동안 더러워진 케이지에 짝을 이루어 수용(툽밥 배당 100g에 물 200ml); 작은 케이지(25x10x10cm)에 1시간 동안 8번 감금; 한 기간의 야간 조명; 및 주말 동안 64시간의 역전된 명:암 주기로 구성된다.

[0095] 5.3.1 쾌락 척도

[0096] 수크로스 섭취: 래트(일부 실험의 경우 Wistar 래트 및 다른 실험의 경우 PVG 두건 모양 래트)를 매주 2회(화요

일 및 금요일) 획득하여 1% 수크로스 용액을 소비시켰다. 획득은 20시간의 음식과 물 부족 후 홈 케이지에서 수크로스 용액이 제공되는 8-10 1시간 기준 검사로 구성된다. 수크로스 섭취는 검사 전후에 병을 청량함으로써 측정된다. 안정적인 기준선 수준에 따라, 실험 전반에 걸쳐 매주 간격(수요일)으로 유사한 조건하에서 CMS 프로토콜 동안 수크로스 소비를 측정한다. 수크로스 검사 이전의 음식과 물 부족은 스트레스 요인이며, 그후에 CMS 섭생에 포함된 후속 스트레스 요인이 부과되며, 이전 스트레스 요인 이력은 임의의 후속 분석에서 고려되지 않는다.

[0097] 두개내 자기-자극: 래트(일부 실험의 경우 Wistar 래트 및 다른 실험의 경우 PVG 두건 모양 래트)를 쌍으로 수용하고 수술 전에 2주 동안 순응시킨다. 이들을 마취하고 이간선(interaural line) 아래 2.7mm에 절치 막대(incisor bar)가 설정된 정위 프레임에 장착한다. 스테인리스-강 쌍극 전극을 전극 팁을 0.5mm로 분리하여 복부 피개 영역(VTA)에 편측으로 이식한다. 사용된 좌표는 이간선 전방 3.2mm, 정중선에서 측면 0.6mm, 두개골 표면에서 복측으로 8.2mm이다. 5개의 스테인리스-강 나사와 치과용 시멘트를 사용하여 전극 조립체를 두개골에 고정한다. 수술 후 2주에 각 래트를 음향-감쇠된 상자에 배치된 시험 챔버에서, 두개내 전기 자극을 보상하기 위해 노즈-포크(nose-poke)를 하도록 훈련시킨다. 바닥 위 1cm 측벽에 위치한 구멍(직경 2.5cm)에 코를 포킹하면 수렴 광선을 차단하여 정전류 자극기를 통해 전달되는 뇌 자극을 개시한다. 각 노즈-포크는 지속 시간이 각각 0.1ms인 단상 방형파 펄스의 0.5초 트레인을 생성한다. 극도의 자극 밀도를 피하기 위해 고정-간격 1초의 강화 일정으로 자극을 전달한다. 전기 자극 및 데이터 기록은 컴퓨터와 인터페이스를 통해 제어된다. 운동 장애를 유도하지 않고 가능한 가장 높은 반응률을 유지하기 위해 래트를 초기에 70Hz의 고정된 자극 주파수 및 개별적으로 선택된 전류 강도(70-300mA)에서 훈련시킨다. 이들을 대략 3주 동안 매일 40분 세션으로 훈련시킨다. 이어서, 전류 강도를 일정하게 유지하면서 주파수를 단계적으로 변화시켜 비율-주파수 곡선을 확립한다. 2분 간격으로 주파수가 감소한 다음 1.1-1.9 log Hz(10-85 Hz) 범위에서 0.05-0.2 log 단위 단계로 증가한다. 각 세션은 각 시험 시작시 1개의 프라임링 자극으로 각 주파수에 대해 15개의 개별 2분 시험을 포함한다. 감소하는 일련의 주파수는 위밍업 단계로 사용되며; 즉, 오름차순 단계로부터 수득된 데이터만 후속 계산에 사용된다. 증가하는 일련의 주파수는 각각 최대 및 최소 반응률의 적어도 두 개의 인접 지점을 갖는 상승 곡선을 생성하도록 개별적으로 선택된다. 이 연구는 보상에 대한 CMS 효과를 평가하기 위해 비율-주파수 버전의 곡선-이동법(curve-shift method)을 사용한다. 비율-주파수 함수의 속성, 특히 작동적 운동:수행 능력에 대한 ICSS 보상 효과를 분리하는 것과 관련하여 광범위하게 검증되고 조사되었다. ICSS 행동은 최대 반응률의 50%를 지원할 주파수인 유효 주파수(EF₅₀)를 결정함으로써 평가된다. "파선(broken-line)" 원리에 기반하여, EF₅₀을 추정하는 수학적 모델이 설명된다. 이 방법은 신뢰할 수 있고 안정적인 EF₅₀ 추정치를 제공한다. 각 시험일 상승 비율-주파수 곡선은 부가된 주파수(F)의 log₁₀의 함수로서 관찰된 반응률(노즈포크(NP):2분 시험)을 모델링함으로써 각 래트에 대해 생성된다. 함수는 3개의 선형 세그먼트로 구성된다: 최소 반응을 통한 수평 하부 점근선(NP_{min}), 최대 반응을 통한 수평 상부 점근선(NP_{max}) 및 점근선 사이의 선형 이동(a + b*F). 마지막 NP_{min}과 첫 번째 NP_{max} 사이의 데이터(M)만 포함된다. 이것은 다음 방정식으로 설명할 수 있다:

[0098]
$$1. M = \{(F, NP(F) | \max\{F | NP(F) = NP_{min}\}$$

[0099]
$$\leq F \leq \min\{F | NP(F) = NP_{max}\}\}$$
을 고려한다

[0100] 2. $f(F) = \min(\max(a + b*F, NP_{min}), NP_{max})$ 를 최소 제곱 절차에 의해 M의 데이터에 맞춘다. 모호한 경우, b가 가장 작은 함수가 사용된다.

[0101] 최대 반응률의 50%를 지원할 주파수로 정의되는 유효 주파수(EF₅₀)가 결정된다. 시뮬레이션 주파수 축을 따른 측면 곡선-이동, 즉 EF₅₀의 변화는 자극의 보상 효과의 변화를 반영할 것이다. 비율-주파수 시험은 매주 두 번(화요일과 금요일) 수행된다. 최대 반응이 증가 또는 감소 경향을 보이지 않을 때 및 EF₅₀이 10-12% 미만으로 변할 때 안정적인 반응이 달성된다. 동물은 이후 2개의 매칭된 그룹에 할당된다.

[0102] 5.3.2 실험의 설계

[0103] CMS-1 섭생(상기 참조)에 노출된 Wistar 래트에서 수크로스 섭취에 대한 영향: Wistar 래트를 실험이 시작되기 4주 전에 실험실로 옮긴다. 스트레스 프로토콜에서 요구하는 경우를 제외하고 동물을 개별적으로 수용한다. 기준선 수크로스 섭취량에 따라 동물을 두 개의 매칭된 그룹에 할당한다. 한 그룹의 래트는 6주의 기간 동안 CMS-1에 적용되는 반면 다른 그룹은 표준 실험실 조건하에 유지된다.

- [0104] CMS-1 섭생(상기 참조)에 노출된 PVG 두건 모양 래트에서 수크로스 섭취에 대한 영향: PVG 두건 모양 래트를 실험이 시작되기 3주 전에 실험실로 옮긴다. 스트레스 프로토콜에서 요구하는 경우를 제외하고 동물을 개별적으로 수용한다. 기준선 수크로스 섭취량에 따라 동물을 두 개의 매칭된 그룹에 할당한다. 한 그룹의 래트는 9주의 기간 동안 CMS-1에 적용되는 반면 다른 그룹은 표준 실험실 조건하에 유지된다.
- [0105] CMS-2 섭생(상기 참조)에 노출된 Wistar 래트에서 ICSS에 대한 영향: Wistar 래트를 한 그룹에 할당하고, 개별적으로 수용하고 10주간 CMS-2에 적용하고 다른 그룹(대조 그룹)은 짝을 지어 표준 실험실 조건하에 수용한다. 이들의 EF₅₀을 매주 2회 결정하고 각각의 개별 래트에 대해 2회의 마지막 기준선 검사의 평균과의 비교를 수행한다.
- [0106] ICSS 행동(상기 참조)에 대한 래트 긴장 및 스트레스 섭생의 영향: Wistar 래트를 세 개의 매칭된 그룹에 할당한다. 대조 그룹 및 CMS-1 및 CMS-2를 각각 9주간 적용한 2개의 그룹. PVG 래트를 두 개의 매칭된 그룹에 할당한다; 한 그룹은 9주간 CMS-2에 적용되고 다른 그룹(대조 그룹)은 표준 실험실 조건하에 유지된다. 대조 그룹은 짝을 지어 수용된다. 스트레스 프로토콜에서 요구하는 경우를 제외하고 스트레스 그룹의 래트는 단독으로 수용된다. 이들의 EF₅₀을 매주 2회 결정하고 각각의 개별 래트에 대해 2회의 마지막 기준선 검사의 평균과의 비교를 수행한다.
- [0107] 조직학: ICSS 검사의 완료 후, 동물을 죽이고 뇌를 제거하여 80°C에서 보관한다. 크레일 바이올렛으로 염색하기 전에 저온 유지 장치에서 12mm의 절편을 절단한다. 전극 팁 배치는 Paxinos 및 Watson 뇌 입체 해부도의 전두 평면에서 결정된다.
- [0108] 통계 분석: 수크로스 섭취 및 ICSS 데이터 모두에 대해 대조 그룹과 스트레스 그룹 검사 간의 정규성 또는 분산 동질성 비교 외에도, 데이터를 또한 비모수 통계에 의해 평가할 수 있다. 순위에 대한 이원 분산 분석(ANOVA)을 수행하며, 여기서 일자 및 처리(스트레스)를 요인으로 하고 동물을 처리에 네스트하며 이것은 매개변수 집합이 하나의 관찰에만 해당함을 의미한다. 따라서 모든 관찰은 독립적이다. ICSS 실험에서, 스트레스 그룹의 하위 분류가 있을 수 있다. 스트레스를 받은 동물의 총 평균 반응이 대조 그룹의 최대 평균 반응을 초과하는 경우, 이것은 하위그룹에 속하는 것으로 분류된다. 스트레스(하위 및 주 그룹)와 대조 그룹 간의 비교에 앞서 스트레스 하위그룹과 주 그룹의 반응을 순위에 대한 이원 ANOVA로 비교하며, 여기서 일자 및 그룹을 요인으로 하고 동물을 그룹에 네스트한다. 매일 처리에 대한 유의한 주 효과($p < 0.05$)에 이어 비쌍성 t-검정이 뒤따른다. 명확성을 위해, 수크로스 섭취 데이터와 ICSS 데이터는 모두 평균 \pm SEM으로 표시될 수 있으며, 여전히 비모수 분석을 수행한다. 정규성 및 분산 동질성 검정을 통과한 체중 데이터는 일원 또는 이원 ANOVA로 분석한다. 다중 비교는 Tukey's 검정에 의해 수행되고/되거나 Kruskal-Wallis 순위 ANOVA가 사용된다.
- [0109] 5.4. 실시예 4. 신미-유도된 절식증(Novelty-Induced Hypophagia)
- [0110] '절식증(hyponeophagia)'이라고 하는 신미에 의해 생성되는 섭식의 역제는 만성적이지만 급성 또는 아만성이 아닌 항우울제 치료의 효과에 민감한 불안-관련 조치를 제공한다. 프로토콜은 문헌[Dulawa, S.C. and Hen, R., Neurosci. Biobehav. Rev. 2005, 29:771-83]에 기술되어 있다.
- [0111] 대상체 선택: 수컷 Balb/cJ 마우스를 12 L:12 D 일정(06:00에 라이트)으로 유지하고 동일한 유형의 마우스와 함께 5마리 그룹으로 수용한다. 음식과 물은 자유롭게 섭취하도록 제공된다. 행동 검사는 07:00에서 17:00 사이의 명 단계에서 일어났다.
- [0112] 장치 및 절차: 화합물 A 및 이미프라민을 상기 실시예 1의 표 2에 기술된 농도로 제형화하고 투여하며, 검사 전 적어도 30분에 적용한다. 화합물 A 혈장 수준은 액체 크로마토그래피와 형광 검출에 의해 결정된다.
- [0113] 만성 검사: 수컷 Balb/cJ 마우스에게 투여한다(예를 들어, 1일당 화합물 A 1 및 3mg/kg). 별도 그룹의 마우스가 아만성 실험 대 만성 실험에 사용된다. 처리 23일째에 마우스를 단독으로 수용한다. 마우스는 연속 3일(25-27일) 동안 가당 연유를 마시도록 훈련된다. 마우스에게 매일 30분 동안 희석된 가당 연유(1:3; 우유:물)를 제공한다. 우유는 파라필름이 부착된 빨대가 있는 10ml 혈청학적 피펫으로 제공된다. 피펫을 고무 마개로 닫아 와이어 케이지 뚜껑을 통해 배치한다. 홈 케이지 검사는 28일째에 일어나며, 이때 마우스를 케이지에서 잠시 제거하여 우유가 들어 있는 피펫을 배치하고, 마우스를 케이지로 돌려보낼 때 검사를 시작한다. 마실 때까지 대기 시간 및 소비된 용적을 30분 동안 5분마다 기록한다. 홈 케이지 시험은 어두운 조명(대략 50lux)하에서 일어난다. 새로운 케이지 시험은 29일째에 일어나며, 이때 마우스를 동일한 치수의 깨끗한 새 케이지에 넣되, 대팻밥 없이 우유가 들어 있는 피펫을 배치한다. 새로운 케이지 검사는 밝은 조명(대략 1200lux)하에서

일어나며, 혐오감을 높이기 위해 케이지 아래에 흰색 종이를 배치한다. 30분의 홈 케이지 검사 동안 마시지 않은 마우스는 훈련 중에 우유 마시는 법을 배우지 않았을 가능성이 있으므로 실험에서 제외된다. 아만성 검사는 별도의 수컷 Balb/cJ 마우스 그룹을 사용하여 수행한다(예를 들어, 1일당 화합물 A 1mg/kg 및 3mg/kg). 마우스를 단독으로 수용한 다음 처리 1일째부터 시작하여 우유를 마시도록 훈련시킨다. 래트를 1-3일에 가당 연유를 마시도록 훈련시킨다. 그 후 이들을 아만성 처리의 4일(홈) 및 5일(신규) 후 신미-유도된 절식증 검사에서 시험한다.

[0114] 5.5. 실시예 5. 학습성 무기력 모델

[0115] 학습성 무기력(learned helplessness) 패러다임은 동물이 예측할 수 없고 통제할 수 없는 스트레스, 예를 들어 전기 충격에 노출된 후 혐오적이지만 탈출할 수 없는 상황에 대한 대처 손상을 발달시키는 우울증 모델이다. 프로토콜은 문헌[Chourbaji, S. et al., Brain Res. Protoc. 2005, 16:70-8]에 기술되어 있다.

[0116] 재료: 충격 절차는 스테인리스 강 격자 바닥(각 격자의 직경: 0.5cm, 간격: 0.6cm)이 장착된 투명한 플렉시 유리 충격 챔버(18x18x30 cm³)에서 적용된다. 양방향 회피 검사를 2개 구획 각각의 바닥에 적외선 빔이 장착된 2개 구획 셔틀 박스에서 수행하여 자발적 왕복 뿐만 아니라 각각 광선(조건) 또는 혐오적 발충격(무조건) 자극에 대한 행동 반응을 모니터링한다. 셔틀 박스는 작은 게이트(폭 6cm, 높이 7cm)로 분리된 동일한 크기의 구획(18x18x30 cm³)으로 구성된다. 셔틀 박스의 두 구획 모두는 전류가 인가되는 격자 바닥(각 격자의 직경: 0.5cm, 간격: 0.6cm)과 각 구획의 상단에 신호등을 포함한다. 충격 절차 및 셔틀 박스 시험 모두에 대한 프로토콜 차트가 각각 설계된다.

[0117] 핫플레이트: 교란 요인으로서 변경된 통증 감도를 배제하기 위해, 모든 마우스를 핫플레이트에서 시험한다.

[0118] 약리학적 처리: 모델을 시험 전 적어도 30분에 적용된, 상기 실시예 1의 표 2에 기술된 농도로 제형화 및 투여된 화합물 A 및 이미프라민으로 약리학적으로 검증하였다. 셔틀 박스에서 무력한 행동을 되돌리기 위한 화합물 A의 용량이 이용된다.

[0119] 동물: 10주령 수컷 C57BL/6N 마우스를 구입하여 실험 전 2주 동안 12시간 암-명 주기 및 평균 실온 22°C의 일정 조건에서 음식과 물은 자유롭게 섭취하도록 하여 폴리카보네이트 케이지(유형 II)에서의 단독 수용에 순응시킨다.

[0120] 탈출할 수 없는 충격(Inescapable Shock) 절차:

[0121] 1. 마우스를 활동(어두운) 단계 동안 탈출할 수 없는 충격에 노출시킨다. 동물을 홈 케이지에서 실험실로 이동시킨 다음 충격 챔버에 배치한다.

[0122] 2. 충격 절차는 연속 2일 동안 360회의 스크램블 발 충격(0.150mA)을 포함한다. 발 충격은 다양한 지속시간(1-3초)과 간격-에피소드(1-15초)로 예측이 불가능하며, 총 세션 지속시간은 대략 52분에 이른다. 충격 노출 동안, 조명은 끈다.

[0123] 3. 대조 동물은 발 충격을 받지 않고 동일한 취급 및 맥락 관련 절차를 거친다. 70% 에탄올로 철저히 세척하여, 전기충격을 받지 않는 대조 동물이 충격을 받은 마우스의 냄새에 괴로워하지 않고 충격 챔버에 노출되도록 주의한다. 비누로 매일 세척하면 잠재적인 경계 물질(alarm substance)의 고착이 방지된다.

[0124] 학습성 무기력의 평가: 두 번째 충격 절차 후 24시간에, 셔틀 박스 성능을 시험함으로써 동물의 어두운 단계에서 학습성 무기력을 평가한다. 각 시행은 5초의 빛 자극으로 시작하여 최대 10초 지속시간(강도: 0.150mA)의 후속 발 충격을 통지한다. 시행간 간격은 30초이다. 하기 행동 반응이 정의된다: "회피"는 다른 구획으로 즉시 변경함으로써 빛 자극에 대한 적절한 반응으로 정의되고, "탈출"은 전기 충격에 대한 반응으로 다른 구획으로 왕복하는 것으로 정의되고, "실패"는 탈출 시도가 없을 때로서 정의된다. 또한, 매개변수 탈출 대기 시간은 발 충격의 개시 후 다른 구획으로 왕복하는데 필요한 시간으로서 기록된다. 일반 활동의 결정을 위해, 첫 번째 발 충격 전의 셔틀(초기 활동) 뿐만 아니라 시행간 활동(시행간 간격 활동 또는 ITI)을 기록한다. 무기력에 대한 총 시험 시간은 약 20-24분 동안 지속되며, 정확한 시간은 동물이 패러다임을 학습하고 적절하게 반응하는 능력에 따라 좌우된다. 각 시행 전에, 장치를 70% 에탄올로 철저히 세척한다. 스트레스의 통제 불가능성에 의존하는 "진정한" 학습성 무기력 효과의 평가를 강조하기 위해, 추가 동물 코호트를 예방 집중을 위해 검사한다. 이 동물들은 셔틀 박스에서의 학습성 무기력 검사와 동일한 사전-세션에 노출되며, 여기서 이들은 제어 가능한 충격 조건을 경험한다. 또한, 사전-노출 동안 초기 활동을 모니터링한다.

[0125] 통증 감도: 전기 충격의 효과에 영향을 미칠 수 있는 변경된 통증 감도에 의한 잠재적인 허상(artifact)을 배제하기 위해, 52°C의 온도에서 학습성 무기력 절차 전에 핫플레이트에서 마우스의 하위그룹을 시험한다. 첫 번째 반응(뒷발 점프 또는 핥기)까지의 대기 시간을 모니터링한다.

[0126] 무기력 정의: 행동 매개변수를 평가한 후, 충격을 받은 동물을 서틀 박스 시험에서의 이들의 수행능력에 따라 "무기력" 또는 "저항"으로 분류한다. 실패 및 탈출 대기 시간을 무기력에 대한 지표로 간주하며, k-평균(k = 2) 클러스터링 알고리즘(clustering algorithm)을 기술된 프로토콜에 적용된 마우스의 데이터 풀에 적용한다. 실패 횟수와 탈출 대기 시간은 가장 일반적으로 보고되는 무기력 지표이기 때문에 개별 동물의 수행 점수로 사용된다. 이러한 행동 지표는 편향을 야기할 수 있는 각 변수 범위의 차이를 방지하기 위해 정규화(즉, Z 점수로 변환)된 다음 의도하지 않게 클러스터링 프로세스를 구현하는데 사용된다. 이 분류는 이러한 프로토콜에 따라 무기력/비무기력 마우스의 식별을 위한 분류 방정식을 제공하는 2단계 판별식 표준 분석(discriminant-canonical analysis)에 의해 더욱 개량된다.

[0127] 약리학적 검증: 추가 C57BL/6N 마우스를 프로토콜에서 훈련하고 검사한다. 임의의 약리학적 처리에 앞서, 이들 마우스를 실패 횟수와 탈출까지의 대기 시간을 고려하여 이전에 수득된 분류 방정식(예를 들어, 상기 무기력 정의)을 사용하여 "무기력" 또는 "비무기력"으로 분류한다. 대략 10일 동안의 무기력 지속기간은 5-6일의 단기 화합물 A 처리 간격을 지시하였다. 따라서, 동물은 5일 동안 화합물 A 요법을 수행한다. 6일째에, 동물을 프로토콜에서 재검사한다. 분류 방정식이 다시 각 대상을 분류하는데 사용되지만, 지금은 재시험 세션의 값이 계산에 사용된다. 화합물 A 처리 후 이러한 범주적 분류(즉, "무기력"에서 "비-무기력" 그룹으로 이동하는 마우스)의 변화가 무기력의 제공된 작동적 정의의 민감도 지표로 간주된다. 분석은 화합물 A 효과의 범주형 지표가 아니라 연속 지표를 갖도록 약리학적 처리 전/후에 비-무기력 그룹의 중심까지의 스쿼어드 마할라노비스 거리(squared Mahalanobis distance)에 있어서의 변화의 평가에 의해 보완된다.

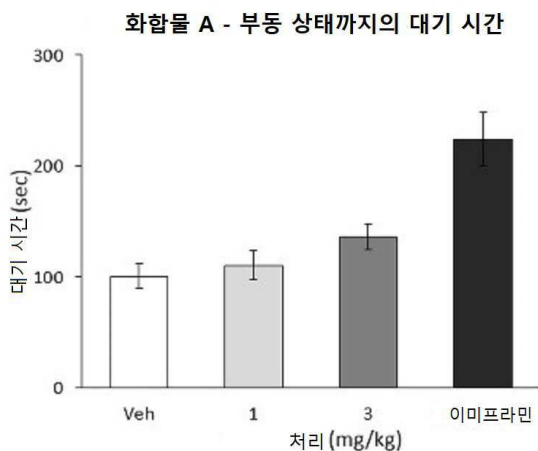
[0128] * * * * *

[0129] 본 명세서에서 언급된 모든 미국 특허, 미국 특허 출원 공보, 미국 특허 출원, 외국 특허, 외국 특허 출원 및 비특허 공보는 전문이 본원에 참고로 포함된다.

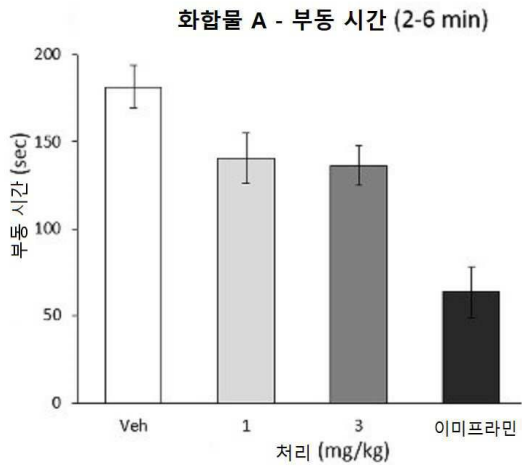
[0130] 전문한 조성물, 방법 및 용도가 이해를 용이하게 하기 위해 다소 상세하게 설명되었지만, 특정 변경 및 수정이 첨부된 청구범위의 범위 내에서 실시될 수 있음이 명백할 것이다. 따라서, 기술된 실시양태는 제한적이지 않고 예시적인 것으로 간주되어야 하며, 청구된 발명은 본원에 제공된 세부사항으로 제한되지 않고 첨부된 청구범위의 범위 및 등가물 내에서 수정될 수 있다.

도면

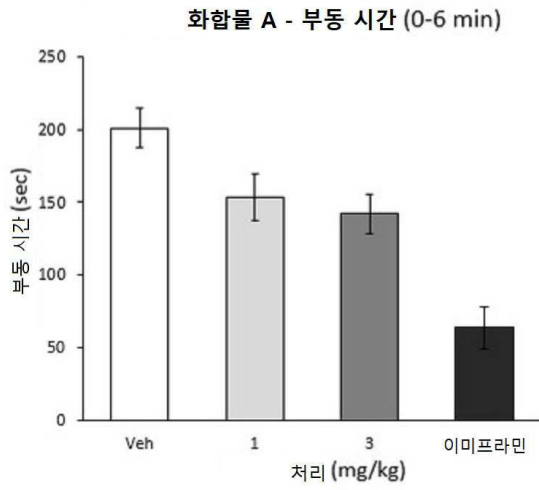
도면1



도면2



도면3



도면4

