(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0044930
(43) 공개일자 2013년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/165 (2006.01) *A61K 31/341* (2006.01)
A61K 31/34 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0109293
(22) 출원일자 2011년10월25일
심사청구일자 2011년10월25일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
서석효
경기도 고양시 일산동구 식사동 위시티자이 아파트 406동 804호
정재철
충청남도 천안시 서북구 쌍용동 주공9단지아파트 410동 704호
오세관
서울시 양천구 목동 이화여자대학교 의학전문대학원 의학과 분자의과학교실
(74) 대리인
손민

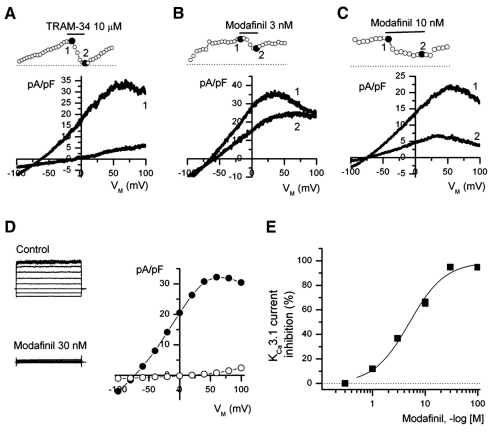
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **모다피닐 또는 이의 유도체를 포함하는 KCa3.1 채널 매개 질환 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 모다피닐 또는 이의 유도체의 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환 치료제로서의 새로운 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 세포 내 cAMP를 증가시켜 $K_{Ca}3.1$ 채널 인산화를 통해 $K_{Ca}3.1$ 채널 전류를 억제하는 모다피닐 또는 이의 유도체 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환 치료 또는 예방용 약학적 조성물, 상기 조성물을 이용하여 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환을 치료하는 방법 및 모다피닐 또는 이의 유도체 화합물, 및 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 포함하는 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



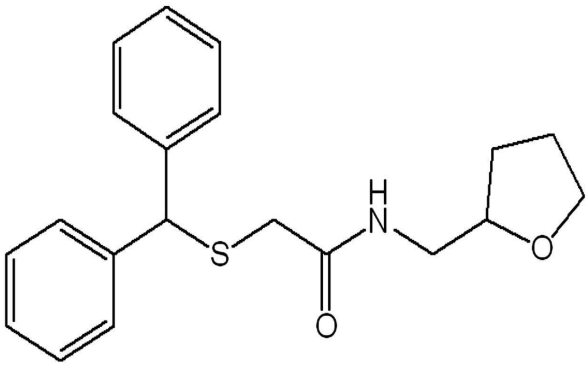
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2010-220-E00001
부처명 교육과학기술부
연구사업명 글로벌연구네트워크지원사업
연구과제명 Impact of Ceramide on Ca2+homeostasis in neuronal and endothelial cells 신경세포 및 혈관내피세포 Ca2+homeostasis에 미치는 세라마이드의 영향
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2010.09.01 ~ 2013.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 A100955
부처명 보건복지가족부
연구사업명 질병중심중개연구
연구과제명 The underlying mechanisms of vascular endothelial and smooth muscle dysfunctions in preeclampsia patients 자간전증에서 혈관내피세포와 혈관평활근세포 기능부전 발생 기전 연구
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2010.07.01 ~ 2012.05.31

특허청구의 범위

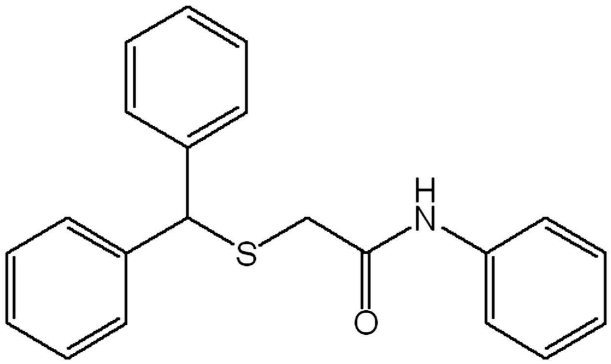
청구항 1

모다피닐 또는 하기 화학식 2 내지 5의 모다피닐 유도체 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

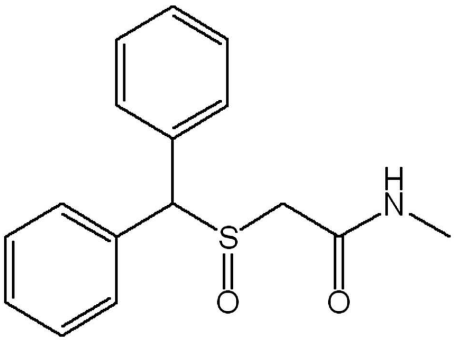
[화학식 2]



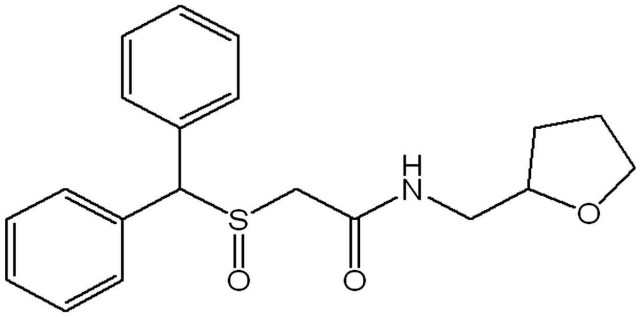
[화학식 3]



[화학식 4]



[화학식 5]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환은 겸상적혈구 빈혈증(sickle cell anemia); 급성 면역반응 또는 자가 면역질환을 포함하는 면역질환; 재협착 또는 죽상동맥경화증을 포함하는 혈관질환; 트라우마 뇌손상, 뇌허혈, 또는 퇴행성 신경질환을 포함하는 뇌질환; 전립선암, 또는 췌장암을 포함하는 암질환; 및 분비성 설사로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 세포 내 cAMP 농도를 증가시켜 $K_{Ca}3.1$ 채널을 억제하는 것을 특징으로 하는 것인 조성물.

청구항 5

제1항의 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 동물의 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환을 예방 또는 치료하는 방법.

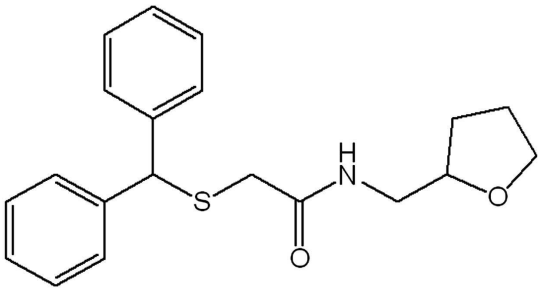
청구항 6

제5항에 있어서, 상기 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환은 겸상적혈구 빈혈증(sickle cell anemia); 급성 면역반응 또는 자가 면역질환을 포함하는 면역질환; 재협착 또는 죽상동맥경화증을 포함하는 혈관질환; 트라우마 뇌손상, 뇌허혈, 또는 퇴행성 신경질환을 포함하는 뇌질환; 전립선암, 또는 췌장암을 포함하는 암질환; 및 분비성 설사로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 방법.

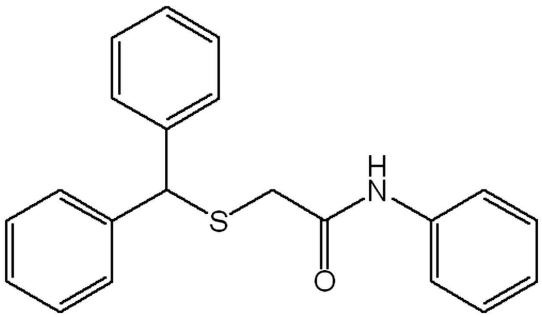
청구항 7

제1항의 모다피닐 또는 하기 화학식 2 내지 5의 모다피닐 유도체 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

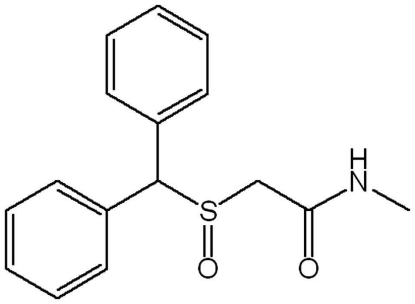
[화학식 2]



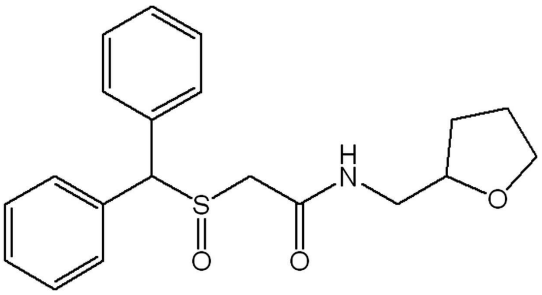
[화학식 3]



[화학식 4]



[화학식 5]



청구항 8

제7항에 있어서, 상기 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환은 겸상적혈구 빈혈증(sickle cell anemia), 급성 면역반응 또는 자가 면역질환을 포함하는 면역질환; 재협착 또는 죽상동맥경화증을 포함하는 혈관질환; 트라우마 뇌손상, 뇌허혈, 또는 퇴행성 신경질환을 포함하는 뇌질환; 전립선암, 또는 췌장암을 포함하는 암질환; 및 분비성 설사로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 건강기능식품 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 모다피닐 또는 이의 유도체의 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환 치료제로서의 새로운 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 세포 내 cAMP를 증가시켜 $K_{Ca}3.1$ 채널 인산화를 통해 $K_{Ca}3.1$ 채널 전류를 억제하는 모다피닐 또는 이의 유도체 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환 치료 또는 예방용 약학적 조성물, 상기 조성물을 이용하여 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환을 치료하는 방법 및 모다피닐 또는 이의 유도체 화합물, 및 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 포함하는 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] $K_{Ca}3.1$ 채널은 신경세포, 적혈구, 섬유아세포, 증식하는 혈관평활근 세포, 혈관내피세포, 그리고 면역세포(T 세포와 B 세포) 등에 분포하고 있으며 이들 세포의 기능을 조절하는데 기여한다[Kaushal V. *et al.*, 2007, *J. Neurosci.*, 27(1):234-244; Anand U. *et al.*, 2006, *Neurosci. Lett.*, 399(1-2):51-56; Wulff H. *et al.*, 2004, *J. Immunol.*, 173(2):776-786; Wulff H. *et al.*, 2007, *Curr. Med. Chem.*, 14(13):1437-1457]. 그러므로 $K_{Ca}3.1$ 채널은 이러한 세포들에 의하여 발생하는 질병들을 치료하는 타깃으로 여겨지고 있다.

[0003] 구체적으로 심혈관계에서 $K_{Ca}3.1$ 채널은 주로 혈관내피세포에 분포하므로, $K_{Ca}3.1$ 채널 기능 이상은 혈관내피세포 기능 이상을 야기하여 혈압을 증가시키는 것으로 알려져 있다[Si H. *et al.*, 2006, *Circ. Res.*, 99(5):537-544; Kohler R. *et al.*, 2010, *Pflugers Arch.*, 459(6):969-976]. 한편 $K_{Ca}3.1$ 채널은 면역세포 (T세포 및 B 세포), 섬유아세포, 암세포, 혈관평활근 세포 등의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다[Ghanshani S. *et al.*, 2000, *J. Biol. Chem.*, 275(47):37137-37149; Wulff H. *et al.*, 2004, *J. Immunol.*, 173(2):776-786; Pena T. L. & Rane S. G., 1999, *J. Membr. Biol.*, 172(3):249-257; Chou C. C. *et al.*, 2008, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 8(2):179-187; Neylon C. B. *et al.*, 2004, *Pflugers Arch.*, 448(6):613-620]. 그러므로 $K_{Ca}3.1$ 채널을 억제하는 약물을 투여하거나 $K_{Ca}3.1$ 채널을 파괴하면 암세포의 증식이 억제되고 죽상경화증, 신 섬유화(renal fibrosis), 혈관성형술 후 재협착 (post-angioplasty restenosis)의 진행이 억제되었다[Chou C. C. *et al.*, 2008, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 8(2):179-187; Grgic I. *et al.*, 2009, *Pflugers Arch.*, 458(2):291-302; Kohler R. *et al.*, 2003, *Circulation*, 108(9):1119-1125; Toyama K. *et al.*, 2008, *J. Clin. Invest.*, 118(9):3025-3037]. 그리고 $K_{Ca}3.1$ 채널을 억제하는 약물들은 실험적으로 자가면역성 뇌염(autoimmune encephalomyelitis)과 심혈관질환들의 증세를 완화시켰다 [Chou C. C. *et al.*, 2008]. 따라서, $K_{Ca}3.1$ 채널을 억제하는 물질은 다양한 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환을 치료할 수 있을 것으로 기대되고 있으나, 효과적으로 $K_{Ca}3.1$ 채널을 억제하는 물질에 대한 보고가 미미한 상황이다.

[0004] 한편, 모다피닐은 기면증[Ballon J. S. *et al.*, 2006, *J. Clin. Psychiatry*, 67(4): 554-566]과 같은 수면장애 치료에 사용되고 있고, 코카인 의존성, 주의력부족 행동과다장애, 우울증, 계절정동장애, 양극성 우울증, 니코틴 중독, 및 정신분열병과 같은 다른 정신과 질환에서의 사용을 위한 임상실험이 진행 중이다[Dackis C. A. *et al.*, 2005, *Neuropsychopharmacology*, 30(1): 205-211; Donovan J. L. *et al.*, 2003, *Ther. Drug Monit.*, 25(2): 197-202; Minzenberg M. J. *et al.*, 2008, *Neuropsychopharmacology*, 33(7): 1477-1502; Swanson J. M. *et al.*, 2006, *J. Clin. Psychiatry*, 67(1): 137-147]. 또한 몇몇 전임상증거는 신경변성질환, 파킨슨 병과 암관련 피로의 치료에의 사용 가능성을 보여준다[Campos M. P. *et al.*, 2011, *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 57(2): 211-219; Portela M. A. *et al.*, 2011, *Curr. Opin. Support Palliat. Care*, 5(2): 164-168; Wirz S. *et al.*, 2010, *Schmerz*, 24(6): 587-595; Zeng B. Y. *et al.*, 2004, *Neurosci. Lett.*, 354(1): 6-9]. 치료를 위한 다른 약물들이 아직 승인되지 않았으므로, 이러한 정신과 질환의 치료를 위한 모다피닐의 사용은 주목할 만하다.

[0005] 이와 같이 모다피닐은 기면증 치료를 위한 정신자극제로 사용되어왔기 때문에 모다피닐의 작용 기전에 대한 대부분의 연구는 모다피닐이 뇌에서 히스타민, 노르에피네프린, 세로토닌, 도파민 및 오렉신 계통을 자극하는 것을 보이는 모노아민화(monoaminergic) 효과에 집중되어있었다. 모다피닐은 도파민과 노르에피네프린 전달체를 점유하고 조절한다[Madras B. K. *et al.*, 2006, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 319(2): 561-569; Zolkowska D.

et al., 2009, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 329(2): 738-746]. 또한 모다피닐은 사람 간 시토크롬 P450 활성을 억제[Robertson P. *et al.*, 2000, *Drug Metab. Dispos.*, 28(6): 664-671]하는 것으로 알려져 있으며 신경보호 기능을 갖는다[Anronelli T. *et al.*, 1998, *Neuroreport*, 9(18): 4209-4213; van Vliet S. A. *et al.*, 2008, *Brain Res.*, 1189: 219-228; van Vliet S. A. *et al.*, 2006, *Behav. Pharmacol.*, 17(5-6): 453-462]. 또한 모다피닐은 GABA-활성화된 전류를 억제하는 것을 보였다[Huang Q. *et al.*, 2008, *Brain Res.*, 1208: 74-78]. 그러나, 이것의 주된 작용 메커니즘은 규정하기 힘들고 자극성 효과와 신경보호 효과를 설명하기 위해 모다피닐에 대한 세포 내 작용 부위에 대한 연구가 필요한 실정이다. 그러나 모다피닐의 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환 치료 용도에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 작용기전을 밝히기 위해 예의 연구 노력한 결과, 모다피닐이 세포 내 cAMP 수준을 증가시켜 $K_{Ca}3.1$ 채널 단백질을 인산화하여 $K_{Ca}3.1$ 전류를 억제함을 확인하였다. 더불어 이의 신규한 유도체를 다수 합성하여 세포 내 cAMP 수준과 $K_{Ca}3.1$ 전류 억제효과를 관찰하고 이 중 몇 가지 유도체들에서 세포 내 cAMP 농도 증가와 $K_{Ca}3.1$ 전류 억제효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 모다피닐 또는 모다피닐 유도체 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

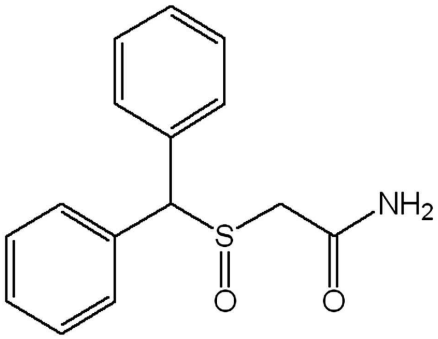
[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 모다피닐 또는 모다피닐 유도체 화합물, 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 모다피닐 또는 모다피닐 유도체 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 모다피닐은 하기의 화학식 1의 구조식을 갖는 화합물로, 현재 기면증 치료제로 사용되고 있고 다른 정신과 질환의 치료에 이용하기 위한 임상실험이 진행중이다. 이와 같이 본 발명의 모다피닐은 이미 상용화되고 있는 제품으로 인체에 무해함이 입증된 화합물로서, 인간을 포함한 동물의 치료용 또는 약제학적 조성물로 사용할 수 있음은 자명하다.

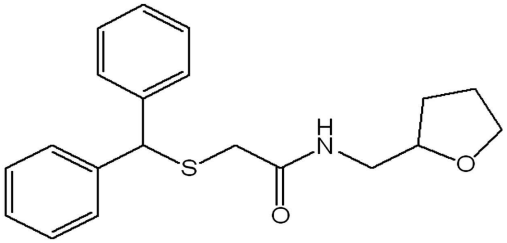
[0012] [화학식 1]

[0013] 

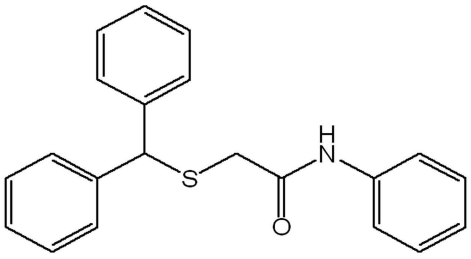
[0014] 상기 모다피닐은 2-(벤즈히드릴술피닐)아세트아미드로도 불린다. 모다피닐은 공지의 제조방법에 의해 당업자가 용이하게 화학적으로 합성하거나 상업적으로 상용화된 것을 구입하여 사용할 수 있다.

[0015] 이와 더불어 모다피닐과 같은 cAMP 증가 효과를 갖는 하기 화학식 2 내지 5의 구조식을 갖는 모다피닐 유도체 화합물을 포함하는 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

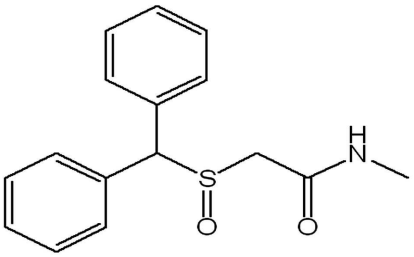
[0016] [화학식 2] (M006)

[0017] 

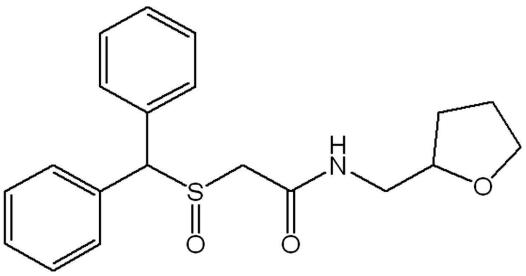
[0018] [화학식 3] (M008)

[0019] 

[0020] [화학식 4] (M015)

[0021] 

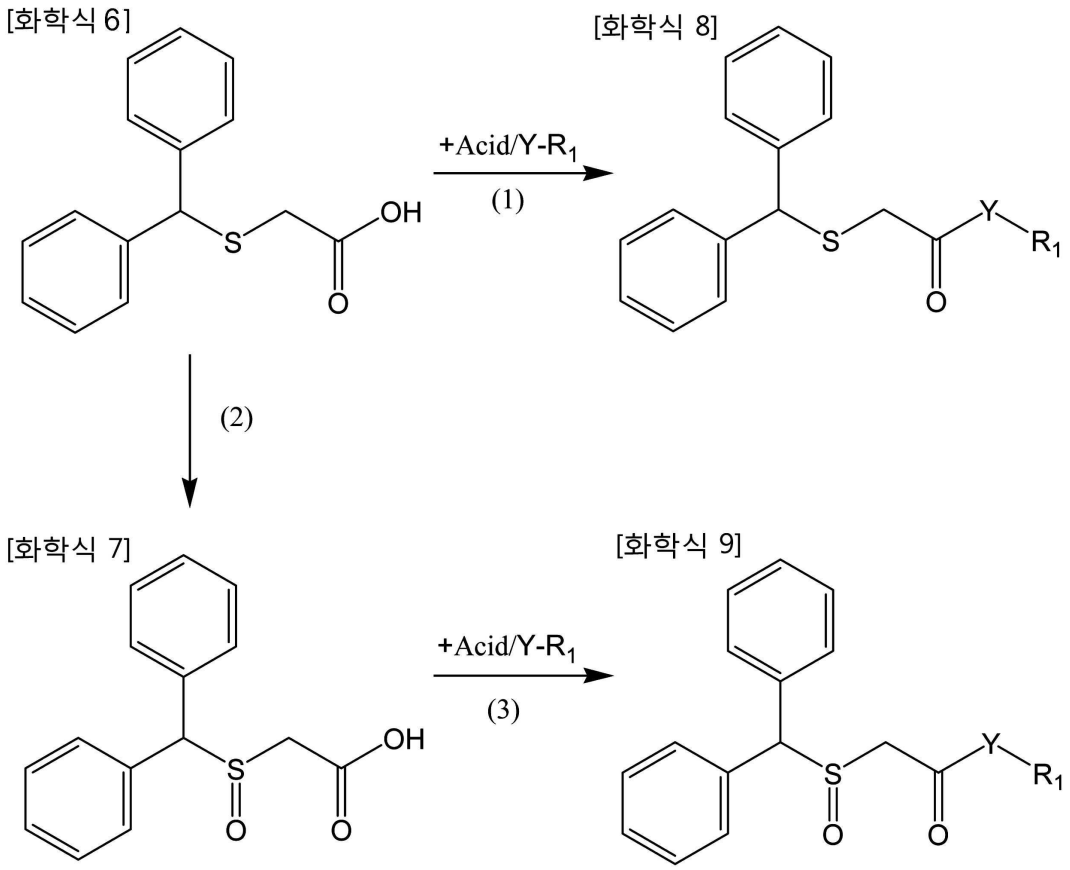
[0022] [화학식 5] (M020)

[0023] 

[0024] 상기 화학식 2는 2-(벤즈히드릴티오)-N-((테트라히드로퓨란-2-일)메틸)아세트아미드로 불리며, 화학식 3은 2-(벤즈히드릴티오)-N-페닐아세트아미드로, 화학식 4는 2-(벤즈히드릴술피닐)-N-메틸아세트아미드로, 화학식 5는 2-(벤즈히드릴술피닐)-N-((테트라히드로퓨란-2-일)메틸)아세트아미드로 불린다.

[0025] 이와 같은 화학식 2 내지 5의 모다피닐 유도체는 하기 반응식 1의 제조방법에 의해 당업자가 용이하게 화학적으로 합성하거나, 당업계의 공지의 제조방법 또는 상업적으로 상용화된 것을 구입하여 사용할 수 있다.

[0026] [반응식 1]



[0027]

[0028] 상기 모다피닐은 기면증 치료제로 잘 알려져 있으나, 세포 내 cAMP를 증가시켜 $K_{Ca}3.1$ 채널 인산화를 통해 $K_{Ca}3.1$ 채널 전류를 억제함으로 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환을 치료할 수 있음에 대해 보고된 바 없다. 바람직하게 본 발명의 모다피닐 또는 화학식 2 내지 5의 구조식을 갖는 모다피닐 유도체들은 세포 내 cAMP 수준을 증가시켜 $K_{Ca}3.1$ 채널 인산화를 통해 $K_{Ca}3.1$ 채널 전류를 억제함으로써, $K_{Ca}3.1$ 채널 활성과 관련된 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환을 치료할 수 있다.

[0029] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 화학식 1의 모다피닐 또는 화학식 2 내지 5의 모다피닐 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 용어 "약학적으로 허용가능한 염"은 상기 화합물의 원하는 생물학적 및/또는 생리학적 활성을 보유하고 있고, 원하지 않는 독물학적 효과는 최소한으로 나타내는 모든 염을 의미한다. 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알콜(예, 글리콜 모노메틸 에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다. 이때, 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 히드로브롬산, 인산, 질산, 황산, 주석산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 메탄 술폰산, p-톨루엔 술폰산, 아세트산, 트리프루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 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, 히드로아이오딕산 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.

[0030] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을

제조하는 것이 제약상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0031] 상기 화학식 1의 모다피닐 또는 화학식 2 내지 5의 모다피닐 유도체의 약학적으로 허용가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 모다피닐 또는 화학식 2 내지 5의 모다피닐 유도체의 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 거의 포함한다. 예를 들어 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄술포네이트(메실레이트) 및 *p*-톨루엔술포네이트(토실레이트) 염 등이 있으며 당업계에서 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다.

[0032] 본 발명의 조성물은 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환의 예방 또는 치료에 제한없이 사용될 수 있다. 본 발명에서, 용어 "$K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환"은 적혈구, 면역세포, 증식하는 혈관 평활근세포, 내피세포, 암세포 일부, 분비하는 상피세포 등에 분포하는 $K_{Ca}3.1$ 채널의 활성에 의해 조절되는 질환을 의미한다. 일반적으로 $K_{Ca}3.1$ 채널은 상기와 같은 여러 세포에 분포하고 있어고 비교적 안전한 타겟으로 판단되므로, $K_{Ca}3.1$ 채널을 조절하는 약물들은 다양한 병증의 예방 또는 치료제로 사용될 수 있다.

[0033] 따라서, 본 발명에 의해 치료가능한 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환은 그 예로 겸상적혈구 빈혈증(sickle cell anemia); 급성 면역반응 및 자가 면역질환 등의 면역질환 ; 재협착 및 죽상동맥경화증 등의 혈관질환; 트라우마 뇌손상, 뇌허혈, 및 퇴행성 신경질환 등의 뇌질환; 전립선암, 췌장암 등의 암질환; 또는 분비성 설사 등이 포함되나 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0034] 이미 $K_{Ca}3.1$ 채널 억제제와 관련된 많은 연구가 진행되었다. $K_{Ca}3.1$ 채널 억제제가 겸상적혈구 빈혈증에서 적혈구 탈수를 예방할 수 있음이 개시되었고[Brugnara, C. *et al.*, 2001, *Drug News Perspect.*, 14:208; De Franceschi, L. *et al.*, 1994, *J. Clin. Invest.*, 93:1670; Brugnara, C. *et al.*, 1996, *J. Clin. Invest.*, 97:1227], $K_{Ca}3.1$ 차단제 ICA-17043은 히드록시유레아와 병용하여 임상 연구 중이다[Swerdlow, P. *et al.*, 2006, *Blood*, 108:Abstract 685]. 따라서 본 발명의 $K_{Ca}3.1$ 채널 억제제가 겸상적혈구 빈혈증의 예방 또는 치료에 사용될 수 있음은 자명하다. $K_{Ca}3.1$ 채널 억제제의 모든 T 세포의 칼슘 이온 신호 억제효과[Ghanshani, S. *et al.*, 2000, *J. Biol. Chem.*, 275:37137; Jensen, B. S. *et al.*, 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:10917], 중추 기억 T 세포 억제효과[Chandy, K.G. *et al.*, 2004, *Trends Pharmacol. Sci.*, 25:280; Wulff, H. *et al.*, 2003, *J. Clin. Invest.*, 111:1703; Vennekamp, J. *et al.*, 2004, *Mol. Pharmacol.*, 65:1364], 급성 면역반응 억제효과[Wulff, H. *et al.*, 2004, *J. Immunol.*, 173:776; Wulff, H. *et al.*, 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:8151], 및 자가 면역성 질환 치료용으로 사용된 예[Khanna, R. *et al.*, 2001, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 280:C796; Chung, I. *et al.*, 2002, *J. Neuroimmunol.*, 122:40]가 개시되었다. 따라서 본 발명의 $K_{Ca}3.1$ 채널 억제제가 면역질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있음은 자명하다. 또한, $K_{Ca}3.1$ 채널 억제제의 혈관 평활근세포 및 섬유아세포 증식 억제효과가 있음이 개시되었고[Kohler, R. *et al.*, 2003, *Circulation*, 108:1119; Pena, T.L. *et al.*, 2000, *J. Biol. Chem.*, 275:13677; Neylon, C.B., 2002 *Vasc. Pharmacol.*, 38:35; Tharp, D. L. *et al.*, 2006, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 291:H2493] , 허혈 후 심장에서 혈관재형성 등에 KCa3.1 채널이 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다[Saito, T. *et al.*, 2002, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 29:324]. 따라서 본 발명의 $K_{Ca}3.1$ 채널 억제제가 혈관질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있음은 자명하다. 덧붙여 $K_{Ca}3.1$ 채널 억제제가 충격에 의한 급성 경막하혈종 후 발생하는 뇌부종 및 두 개내 압력을 낮출 수 있음[Mauler, F. *et al.*, 2004, *Eur. J. Neurosci.*, 20:1761]과 미세아교세포에서 발생하는 산화 파열을 감소시켜 신경세포사멸을 감소시킬 수 있음이 개시되었다[Khanna, R. *et al.*, 2001, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 280:C796; Kaushal, V. *et al.*, 2007, *J. Neurosci.*, 27:234]. 따라서, 본 발명의 $K_{Ca}3.1$ 채널 억제제가 뇌질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있음은 자명하다. $K_{Ca}3.1$ 채널 억제제는 또한 전립선암 세포주[Parihar, A.S. *et al.*, 2003, *Eur. J. Pharmacol.*, 471:157], 췌장암 세포주[Jager, H. *et al.*, 2004, S. *Mol. Pharma*, 65:630]의 증식을 억제할 수 있음이 개시되었고, 혈관신생을 억제하므로[Grgic, I. *et al.*, 2005, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 25:704] 종양 혈관신생을 억제하는 약물로도 사용될 수 있다.

따라서, 본 발명의 $K_{Ca}3.1$ 채널 억제제가 암질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있음은 자명하다. 마지막으로 $K_{Ca}3.1$ 채널 억제제는 콜레라 독소에 의한 장상피세포의 분비를 억제하여 분비성 설사를 억제할 수 있음이 개시되었다[Rufo, P.A. *et al.*, 1997, *J. Clin. Invest.*, 100:3111; Lencer, W. I. *et al.*, 1996, *US 5,889,038*]. 따라서 본 발명의 $K_{Ca}3.1$ 채널 억제제 또한 분비성 설사의 예방 또는 치료에 사용될 수 있음은 자명하다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 모다피닐 또는 화학식 2 내지 5의 모다피닐 유도체가 세포 내 cAMP를 증가시켜, $K_{Ca}3.1$ 채널을 인산화하고, $K_{Ca}3.1$ 전류를 억제함을 확인하였다(도 1 내지 5). 따라서, 본 발명의 모다피닐 또는 화학식 2 내지 5의 모다피닐 유도체는 $K_{Ca}3.1$ 채널을 억제하여 면역질환, 혈관질환, 뇌질환, 암 또는 분비성 설사 등을 치료할 가능성이 있음을 확인하였다.

[0036] 따라서, 본 발명의 조성물은 세포 내 cAMP 농도를 증가시켜 $K_{Ca}3.1$ 채널을 억제하는 것을 특징으로 하여 상기 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환을 치료할 수 있다.

[0037] 현재 본 발명과 동일한 기전 즉, $K_{Ca}3.1$ 채널을 직접 억제하는 약물로는 TRAM-34와 같은 약물이 있다. $K_{Ca}3.1$ 채널을 직접 억제하는 경우 혈관내피세포의 기능이 억제되어 혈관의 수축성이 증가하고 혈압이 증가한다. 그러나 본 발명의 모다피닐은 혈관평활근에는 cAMP 증가를 통해 이완시키므로 $K_{Ca}3.1$ 채널 억제제에 비해 혈압 증가 없이 위와 같은 치료효과를 얻을 수 있다는 장점이 있다.

[0038] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 죽상경화증, 암, 신 섬유화(renal fiborsis), postangiplasty restenosis 등의 질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0039] 본 발명의 실시예에 의하면 한편, 모다피닐 적용시 $K_{Ca}3.1$ 전류를 억제하는 효과가 있고(도 1), 이러한 모다피닐의 $K_{Ca}3.1$ 전류 억제효과는 단백질 활성효소 A(protein kinase A; PKA) 억제제인 H89와 단백질 분해효소 억제제(protein kinase inhibitor; PKI)에 의해 억제되었고, PKA 활성제인 포스콜린(forskolin)은 모다피닐처럼 $K_{Ca}3.1$ 전류가 억제하였고 이러한 포스콜린의 효과는 PKA 억제제에 의해 억제됨을 보였다(도 2). 이러한 결과는 모다피닐이 PKA를 활성화시킬 가능성을 보여준다. 그리고 모다피닐은 세포 내 cAMP 농도를 증가시켰고(도 3), $K_{Ca}3.1$ 채널 단백질을 인산화 시켰다(도 4). 한편 $K_{Ca}3.1$ 채널의 활동도 (단일 채널 전도도와 전류 크기)는 모다피닐에 영향을 받지 않아 이러한 모다피닐의 $K_{Ca}3.1$ 전류 억제효과는 $K_{Ca}3.1$ 채널을 직접 억제한 결과가 아님을 확인할 수 있었다(도 5). 그러므로 본 발명자들은 모다피닐이 세포 내 cAMP 농도를 증가시킴으로 PKA를 활성화하고 $K_{Ca}3.1$ 채널을 인산화하여 $K_{Ca}3.1$ 채널을 억제시킬 수 있다는 모다피닐의 작용기전을 유추할 수 있었다. 이와 함께 상기 화학식 2 내지 5의 구조를 갖는 화합물들에 있어서도 모다피닐과 유사한 세포 내 cAMP 증가 및 $K_{Ca}3.1$ 전류 억제에 효과가 있음을 확인하였다(도 6 및 7)

[0040] 상기 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 용어 "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 윤활제 등 당업계에 공지된 것이라면 제한없이 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 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, 메틸셀룰로즈, 미정질셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 전형적으로 막을 통과한 이동을 용이하게 하는 사용가능한 계면활성제로는 스테로이드에서 유도된 것이나, N-[1-(2,3-디올레오일)프로필-N,N,N-트리메틸암모늄클로라이드](DOTMA) 등의 양이온성 지질, 또는 콜레스테롤 헤미숙시네이트 등이 있다.

[0041] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0042] 본 발명에서, 용어 "개체"란 위와 같은 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 약학적 조성물을 개체에게 투여함으로써 상기 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 기존의 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환 치료제와 병행하여 투여될 수 있다.

[0043] 본 발명의 용어 "투여"란, 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물 이외에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 또는 락토즈, 젤라틴 등을 섞어 조제한다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 그러나 경구 투여시, 펩타이드는 소화가 되기 쉽기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 하는 것이 바람직하다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로골, 트윈61. 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 펩타이드의 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스, 덱스트란 등의 카보하이드레이트, 아스코르빅산, 글루타치온 등의 항산화제, 킬레이팅 물질, 저분자 단백질 또는 다른 안정화제들을 사용할 수 있다.

[0044] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내 주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제(예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.

[0045] 한편, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 상기 용어 "약학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 체중, 건강상태, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로, 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 활성물질을 약 0.01 mg/kg/일 내지 1000 mg/kg/일의 용량으로 투여할 수 있다. 경구 투여하는 경우, 50 내지 500 mg/kg의 범위가 적합할 수 있으며, 1일 1회 이상 투여할 수 있다.

[0046] 또 다른 하나의 양태로서 본 발명은 상기 화학식 1의 모다피닐 또는 화학식 2 내지 5의 모다피닐 유도체, 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 포함하는 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 모다피닐 또는 이의 유도체를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상의 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0047] 본 발명의 용어 “건강기능식품”은 건강보조의 목적으로 특정성분을 원료로 하거나 식품 원료에 들어있는 특정성분을 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조, 가공한 식품을 말하며, 상기 성분에 의해 생체방어, 생체리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발휘할 수 있도록 설계되고 가공된

식품을 말하는 것으로서, 상기 건강식품용 조성물은 질병의 예방 및 질병의 회복 등과 관련된 기능을 수행할 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 건강식품의 종류에는 제한이 없다. 아울러 본 발명의 모다피닐 또는 이의 유도체를 활성성분으로 포함하는 조성물은 당업자의 선택에 따라 건강기능식품에 함유될 수 있는 적절한 기타 보조 성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림 류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 화합물을 추출물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다.

발명의 효과

[0049] 본 발명의 모다피닐은 세포 내 cAMP 농도를 증가시키고, $K_{Ca}3.1$ 채널을 인산화시켜 그 활성을 억제시키고 수 있다. 또한 새롭게 합성된 모다피닐의 유도체에서도 같은 효과를 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명의 모다피닐 및 이의 신규한 유도체들은 죽상경화증, 암, 신 섬유화, postangiplasty restenosis 등의 질환의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 $K_{Ca}3.1$ 전류에 대한 모다피닐의 효과를 나타낸다. 세포에 유리미세피펫를 통해 1 μM Ca^{2+}을 주입한 다음 $K_{Ca}3.1$ 채널 활성제 1-EBIO(100 μM)에 노출시켜 $K_{Ca}3.1$ 전류를 활성화시켰다. (A-C) 반복적인 램프 자극 동안 기록된 전류 중 50 mV에서의 전류 데이터를 수집(상부)하고, 상부에 표시된 지점에서 얻어진 전류-전압 곡선을 하부 자취에 나타내었다. (D) $K_{Ca}3.1$ 전류를 전압 계단을 적용하여 기록하고(좌측), 전압 계단의 중앙부위에서 활성화된 전류의 전류-전압 곡선을 우측 자취에 나타내었다. (E) 모다피닐의 농도와 반응의 관계를 나타낸다. 각 처리에서 $K_{Ca}3.1$ 전류 억제 정도는 50 mV에서 초기 $K_{Ca}3.1$ 전류 밀도에 대한 백분율로 표현하였다(n=7).

도 2는 모다피닐에 의한 $K_{Ca}3.1$ 전류 억제에서 PKA의 역할을 나타낸다. $K_{Ca}3.1$ 전류는 Ca^{2+}(1 μM) 주입과 1-EBIO(100 μM) 적용에 의해 활성화된다. 반복적인 램프 자극 동안 50 mV에서 데이터를 수집하고(좌측 상부), 상부에 표시된 지점에서 얻어진 전류-전압 곡선을 우측 하부에 나타내었다. (A 및 B) 모다피닐에 의한 $K_{Ca}3.1$ 전류 억제 효과에 미치는 PKA 억제제인 H89(A)와 PKI_{14-22}(B)의 효과를 관찰하였다. H89로 선처리하거나 PKI_{14-22}를 미세피펫으로 세포내에 주입한 세포에서는 모다피닐에 의한 $K_{Ca}3.1$ 전류 억제 효과가 관찰되지 않았다. (C 및 D) PKA 활성제인 포스콜린이 $K_{Ca}3.1$ 전류에 미치는 효과(C)와 이에 대한 PKA 억제제인 PKI_{14-22}의 효과(D)를 나타내었다. $K_{Ca}3.1$ 전류는 포스콜린에 의해 억제되었으며 PKI_{14-22}의 세포내 주입에 의하여 포스콜린의 억제효과는 나타나지 않았다. 이러한 실험결과는 모다피닐은 포스콜린처럼 PKA를 활성화시켜 $K_{Ca}3.1$ 전류를 억제함을 나타낸다.

도 3은 세포 내 cAMP 함량에 대한 모다피닐의 효과를 나타낸다. 모다피닐은 NIH-3T3 세포에서 cAMP 수준에 영향을 준다. 즉 세포내 cAMP 농도를 농도 의존적으로 증가시켰다. 일로프로스트와 포스콜린도 cAMP 농도를 증가시켰는데, 모다피닐 1 μM은 일로프로스트 1 μM, 포스콜린 10 μM 보다 유사하거나 더 크게 증사시켰다. 각각의 포인트는 3회 개별 실험의 평균±표준오차이다. $*p<0.05$: $**p<0.01$.

도 4는 모다피닐-유도 $K_{Ca}3.1$ 채널의 인산화를 나타낸다. 모다피닐은 NIH-3T3 세포에서 $K_{Ca}3.1$ 채널 인산화를 유도한다. (A) 모다피닐 또는 포스콜린에 노출되지 않은 세포에서 $K_{Ca}3.1$ 채널의 존재를 확인하기 위해 항-$K_{Ca}3.1$ 항체로 면역블롯하였다(좌측 패널). 화살표는 $K_{Ca}3.1$ 채널의 존재를 나타낸다. PKA 억제제 H89 존재하에 (또는 부재하에) 30분간 세포를 선처리하고, 이후 불완전 배지에서 5분간 모다피닐 또는 포스콜린에 노출시켰다(우측 패널). 용해질은 표시된 바와 같이 면역블롯 분석하였다. (B) $K_{Ca}3.1$ 채널의 모다피닐 및 포스콜린-유도 인산화를 나타낸다(n=3). 모다피닐은 $K_{Ca}3.1$ 채널을 인산화시켰으며 PKA 억제제인 H89에 의해 모다피닐의 효과는 억제

되었다. *p<0.05: **p<0.01.

도 5는 NIH-3T3 세포에서 $K_{Ca}3.1$ 채널 활성에 대한 모다피닐의 효과를 나타낸다. (A) 세포막 조각(membrane patch)에서, 단일 채널 전류는 1 μM Ca^{2+} 및 1-EBIO에 의해 활성화되고, 활성화된 전류는 특이적 $K_{Ca}3.1$ 채널 차단제 TRAM-34에 의해 소멸되었다. 이는 활성화된 단일 채널 전류가 $K_{Ca}3.1$ 채널 전류임을 나타낸다. (A 및 B) 정류전위(Holding potential)에 따른 단일 채널 전류와 모다피닐의 효과를 나타낸다. 각 정류전위에서 단일채널 전류는 모다피닐에 의하여 변화하지 않았다. (C) 대조 조건 하에서 (●) 및 30 nM 모다피닐 적용 후 (○) 단일 채널의 전류-전압 관계를 도시하였다. 모다피닐을 처리하여도 단일채널전류는 변하지 않았다. 이 실험결과는 모다피닐은 $K_{Ca}3.1$ 채널에 직접 작용하여 $K_{Ca}3.1$ 채널의 활성을 조절하지 않음을 나타낸다.

도 6은 세포 내 cAMP 함량에 대한 모다피닐 유도체(화학식 2 내지 5, 각각 MO06, MO08, MO15, MO20)의 효과를 나타낸다. 모다피닐 유도체(MO06, MO08, MO15, MO20)들은 NIH-3T3 세포에서 cAMP 수준에 영향을 준다. 즉 세포 내 cAMP 농도를 농도 의존적으로 증가시켰다. 각각의 포인트는 3회 개별 실험의 평균±표준오차이다. **p< 0.01: ***p<0.001.

도 7은 $K_{Ca}3.1$ 전류에 대한 모다피닐 유도체(MO06, MO08, MO15, MO20)의 효과를 나타낸다. 이러한 유도체들의 효과는 모다피닐의 것과 매우 유사하여 $K_{Ca}3.1$ 채널 전류를 억제하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0052] **실시예 1: 세포의 분리 및 배양**

[0053] NIH-3T3 섬유아세포(CRL-2795; American Type Culture Collection, VA, USA)를 10% 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS), 100 unit/ml 페니실린, 및 100 μg/ml 스트렙토마이신을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Hyclone, Logan, UT, USA) 배지에서 단층으로 배양했다. 모든 세포는 5% 이산화탄소 습식 조건에서 37℃로 유지하였다. 배지는 매주 2회 갈아주었고 배양은 매주 1:5의 비율로 계대배양 하였다. 배지를 제거하고 신선한 배지로 바꾸어 주면서 명시된 기간 동안 세포를 유지하였다.

[0054] **실시예 2: 전기생리학 분석**

[0055] **<2-1> 전기생리학 분석 방법**

[0056] Nilius 등에 의해 보고된 방법에 따라 전기생리학적 분석을 수행했다[Nilius *et al.*, 1993, *Pflugers Arch.*, 424(3-4): 285-293]. 조각 집게법(pach-clamp technique)을 전세포에 사용하였고, 실온에서 조각 윤곽(patch configurations)을 잘라냈다. 전세포 전류는 파열된 조각을 사용하여 측정하였다. 전류는 적절한 증폭기(EPC-10, HEKA, Lambrecht, Germany)를 사용하여 관찰하였다. 전세포 실험에서, 10초 간격(650 msec 지속시간)으로 -100 mV에서 +100 mV까지의 전압 램프(voltage ramp) 또는 정류전위(holding potential) -60 mV로부터 -100 mV에서 +100 mV까지 범위의 전위로 5초 간격으로 20 mV씩 증가(1 sec 지속시간)하는 전압 계단을 적용하였다. 전류는 1 내지 4 kHz의 표본추출률로 기록하였다. 8 내지 10 MΩ의 말단 저항을 갖는 유리전극을 사용하여 내외전도 전압 고정을 수행하였다. 데이터를 1 KHz에서 필터링하고 표준 소프트웨어(Axoscope 9.0, Axon Instruments, Foster City, CA, USA)를 사용한 분석을 위하여 컴퓨터에 저장하였다. 몇몇 실험에 대해, 채널 활성은 채널 수와 개방 가능성의 곱(NP_0)으로 표현되었다;

[0057] 이때, NP_0=Σ[(개방 시간×열린 채널 수)/기록한 전체 시간].

[0058] 표준 외용액은 pH 7.4의 NaOH 용액 내에 다음의 물질을 포함한다; 150 mM NaCl, 6 mM KCl, 1.5 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 10 mM 글루코스. 삼투압계(Fiske, Norwood, MA, USA)에 의하여 결정된 바와 같이 이 용액의 삼투압농도는 320±5 mOsm 이었다. 내외전도 모드에서 수조 용액은 pH 7.2의 KOH 용액 내에 다음을

포함하고; 150 mM KCl, 0.5 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 피펫 용액은 pH 7.4의 NaOH 용액 내에 다음의 물질을 포함한다; 150 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 10 mM 글루코스, 5 mM EGTA. 피펫 또는 수조용액 중 자유 Ca^{2+} 농도는 5 mM EGTA 존재하에 적당량의 Ca^{2+}(CaBuf 소프트 웨어를 사용하여 계산된; G. Droogmans, Leuven, ftp://ftp.cc.kuleuven.ac.be/pub/droogmans/cabuf.zip)를 가하여 1 μM로 조절하였다.

[0059] $K_{Ca}3.1$ 전류는 외용액에 1-에틸-2-벤즈이미다졸리논(1-ethyl-2-benzimidazolinone; 1-EBIO, 100 μM)를 가하고 전세포 고정된 NIH-3T3 섬유아세포에 조각 피펫을 통해 1 μM Ca^{2+}를 주입하여 활성화하였다.

[0060] **<2-2> 모다피닐에 의한 $K_{Ca}3.1$ 전류의 억제**

[0061] 세포를 조각 피펫을 통하여 1 μM Ca^{2+}와 함께 적재하고 1-EBIO에 노출시켰을 때, 도 1에 나타낸 바와 같이 외향 전류가 서서히 발생하였다. 램프 또는 단계 펄스에 의한 전류-전압 곡선은 50 mV에 대해 음전위에서 선형이었고, 50 mV에 대해 양전위에서는 가로축을 향해 굽어졌다. 이러한 전류는 특이적 $K_{Ca}3.1$ 채널 차단제 TRAM-34에 의해 억제되었다(도 1A). 이러한 결과는 활성화된 전류가 $K_{Ca}3.1$ 전류임을 의미한다.

[0062] 이어서 본 발명자들은 $K_{Ca}3.1$ 전류에 대한 모다피닐의 효과를 확인하였다(도 1B 내지 1D). 그 결과 모다피닐은 농도-의존적 방식으로 $K_{Ca}3.1$ 전류를 억제하였다. 이러한 전류 억제를 각각의 모다피닐 농도에 대하여 힐 방정식(Hill's equation)으로 조정할 때, 전류 억제에 대한 모다피닐의 절반-최대 억제(IC_{50})를 위해 요구되는 농도는 6.8±0.7 nM 이었고, 최대 억제를 위한 모다피닐의 농도는 100.0±5.7 nM 이었다. 이와 같은 결과는 모다피닐이 $K_{Ca}3.1$ 전류를 억제하는데 매우 민감함을 나타낸다.

[0063] **<2-3> PKA 억제제의 모다피닐의 $K_{Ca}3.1$ 전류 억제 효과 저해**

[0064] $K_{Ca}3.1$ 채널은 채널 단백질의 PKA-유도 인산화에 의해 억제된다고 보고되어 있다[Neylon C. B. *et al.*, 2004, *Pflugers Arch.*, 448(6): 613-620]. 이는 모다피닐이 PKA를 활성화함으로 $K_{Ca}3.1$ 전류를 억제할 수 있음을 의미한다. 따라서, 본 발명자들은 PKA 억제제 H89 및 PKI_{14-22}에 의한 PKA 억제가 $K_{Ca}3.1$ 전류에 대한 모다피닐의 억제 효과를 차단할 수 있는지를 시험하고 이를 도 2A 및 2B에 나타내었다.

[0065] $K_{Ca}3.1$ 전류는 H89(10 μM)로 선처리한 세포에서 활성화되었고, 이후 외용액을 가함으로 세포에 모다피닐을 적용시켰다. 정류상태에 도달한, 활성화된 $K_{Ca}3.1$ 전류는 H89로 선처리된 세포에서는 모다피닐에 의해 억제되지 않았다(도 2A). 또한, 피펫 용액에 가함으로 세포에 PKI_{14-22}(10 μM)를 적용했을 때에도 $K_{Ca}3.1$ 전류는 모다피닐에 의해 영향을 받지 않았다(도 2B).

[0066] 이에 덧붙여, 본 발명자들은 PKA 활성제 포스콜린이 $K_{Ca}3.1$ 전류를 억제하는지를 시험하였다. 활성화된 $K_{Ca}3.1$ 전류가 정류상태에 도달했을 때, 외용액에 포스콜린(10 μM)을 가하였다. 이때, $K_{Ca}3.1$ 전류는 적용과 더불어 감소되었다(도 2C). 반면, 피펫 용액에 더함으로 세포에 PKI_{14-22}(10 μM)를 적용했을 때, $K_{Ca}3.1$ 전류는 포스콜린에 의해 영향받지 않았다(도 2D). 이러한 결과는 $K_{Ca}3.1$ 전류의 모다피닐-유도 억제가 PKA-매개 과정을 통해 이루어짐을 의미한다.

[0067] **실시예 3: 세포 내 cAMP 측정**

[0068] NIH-3T3 섬유아세포를 불완전 배지에서 모다피닐과 3분간 인큐베이션하였다. 용해질로부터의 cAMP(adenosine 3',5'-cyclic monophosphate)의 농도는 각각의 시료에서 Parameter cAMP 분석 키트(R&D systems)를 사용하여 제조사의 지시대로 측정하였다.

[0069] PKA는 cAMP에 의해 활성화되고, $K_{Ca}3.1$ 단백질과 같은 세포 내 단백질을 인산화한다. 따라서 본 발명자들은 모다

피닐에 의한 cAMP 농도 증가를 관찰하였다.

[0070] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, NIH-3T3 세포를 모다피닐에 3분간 노출시켰을 때, 세포 내 cAMP 농도가 모다피닐 농도-의존적 방식으로 증가하는 것을 확인하였다.

[0071] **실시예 4: 웨스턴 블롯 분석**

[0072] 모다피닐 처리 후, 세포를 빙냉의 인산완충염용액(phosphate buffered saline; PBS)으로 한번 세척하고 단백질 분해효소 억제제 칵테일을 포함한 단백질 추출 완충액에서 용해하였다. 상등액에서 단백질 농도를 브래드포드(Bradford) 단백질 분석에 의해 결정하였다. 웨스턴 블롯 분석을 위해 단백질 30 μg을 SDS-PAGE에 가한 후, 단백질을 니트로셀룰로스 막에 옮겼다. 막을 5% BSA를 포함한 TBST(10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 1%(v/v) Tween-20, pH 7.6)로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 블롯은 래빗 항-P-PKA 기질 항체와 3시간 동안 인큐베이션한 후 홍당무과산화효소-결합(horseradish peroxidase-conjugated) 2차 항체 1시간 동안 인큐베이션하였다. 밴드를 화학발광에 의해 시각화하였다. 데이터 수집과 처리는 발광영상 분석기(luminescent image analyzer LAS-3000)와 IMAGE GAUSE 소프트웨어(Fuji film, Japan)를 사용하여 수행하였다.

[0073] 상기 실시예 3에 언급된 바와 같이 PKA는 cAMP에 의해 활성화되고, $K_{Ca}3.1$ 단백질과 같은 세포 내 단백질을 인산화한다. 따라서 본 실시예에서 모다피닐에 의한 $K_{Ca}3.1$의 인산화를 관찰하였다. 결론적으로 도 4에 나타낸 바와 같이 모다피닐은 농도-의존적 방식으로 $K_{Ca}3.1$ 인산화를 증가시키며, 이러한 인산화는 PKA 억제제인 H89에 의해 억제되었다.

[0074] 우선 $K_{Ca}3.1$ 채널의 존재를 웨스턴 블롯팅으로 확인하였다(도 4A 좌측 패널). $K_{Ca}3.1$ 채널의 인산화는 휴면상태에서 나타났으며, 이러한 채널 인산화는 모다피닐 또는 포스콜린을 5분간 처리함으로 증가되었다(도 5A 우측 패널). 휴면상태 및 포스콜린에 의한 채널 인산화는 H89에 의해 완전히 제거되었다. 따라서, 이러한 결과는 모다피닐이 cAMP를 증가시켜 PKA를 활성화하여, $K_{Ca}3.1$ 채널과 같은 목적 단백질을 인산화시킴으로 $K_{Ca}3.1$ 채널을 억제함을 의미한다.

[0075] 위와 같은 실험결과로 미루어 모다피닐은 세포내 cAMP를 증가시켜, PKA를 활성화시키고, PKA는 $K_{Ca}3.1$ 채널을 인산화시켜 $K_{Ca}3.1$ 전류를 억제하는 것으로 사료된다. 아울러, 모다피닐은 매우 낮은 농도인 나노몰 단위에서 $K_{Ca}3.1$ 채널 단백질을 인산화하여 이온 통로를 억제할 수 있음을 시사한다.

[0076] **실시예 5: 모다피닐과 $K_{Ca}3.1$ 채널 활성의 독립성 확인**

[0077] $K_{Ca}3.1$ 채널은 세포 내 Ca^{2+}에 의해 활성화되므로, 모다피닐은 Ca^{2+} 민감도를 감소시킴으로 $K_{Ca}3.1$ 전류를 억제할 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 모다피닐이 Ca^{2+} 민감도를 변화시킴으로 $K_{Ca}3.1$ 전류를 조절하는지를 시험하였다. 모다피닐(30 nM)은 $K_{Ca}3.1$ 전류에 대한 Ca^{2+}의 EC_{50}에 영향을 주지 않았다.

[0078] 모다피닐에 의한 $K_{Ca}3.1$ 전류 억제가 $K_{Ca}3.1$ 채널과 모다피닐 간의 직접적인 상호작용의 결과가 아님을 보이기 위해, 본 발명자들은 모다피닐이 $K_{Ca}3.1$ 채널 활성에 영향을 미치는 지를 시험하였다. 내외전도 조각에서, $K_{Ca}3.1$ 채널은 수조 용액의 Ca^{2+} 농도를 1 μM에 고정하고 1-EBIO를 적용함으로 활성화되었다. 그리고 정류전위(holding potential)를 -70에서 +50 mV로 변화시켰다(도 5). 단일 채널 전류는 TRAM-34에 의하여 억제되었다. 이는 활성화된 전류가 $K_{Ca}3.1$ 채널을 관통함을 의미한다(도 5A). 이에 본 발명자들은 수조 용액에 모다피닐(30 또는 100 nM)을 적용하였다. 모다피닐은 $K_{Ca}3.1$ 채널의 단일 채널 활성을 변화시키지 않았다. 개방 가능성 또한 모다피닐에 의해 변하지 않았다(도 5A 및 5B). 50에서 -70 mV사이의 데이터에 대한 선형 피트로부터 대조군과 모다피닐 존재군에서 각각 38.1 pS와 39.4 pS의 기울기 전도도를 얻었다(도 5C). 대조조건에서 기록된 단일 채널 전도도는 모다피닐(30 μM) 존재군의 것과 매우 근사한 것을 보였다. 이는 단일 채널의 전도도는 모다피닐에 의해 변화하지 않았음을 나타낸다.

[0079] **실시예 6: 모다피닐 유도체들의 효과**

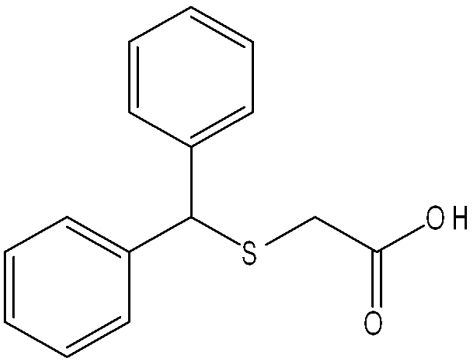
[0080] 상기 실시예 2와 3과 같은 방법으로 모다피닐 유도체들의 배양된 섬유아세포 NIH-3T3 세포 내 cAMP 농도와 $K_{Ca}3.1$ 전류에 대한 효과를 관찰하였다.

[0081] 합성된 모다피닐 유도체 중 화학식 2의 MO06, 화학식 3의 MO08, 화학식 4의 MO15 및 화학식 5의 MO20의 4가지 유도체가 모다피닐과 상기 실시예들에서 관찰된 모다피닐에 의한 효과와 비슷한 효과를 보이는 것을 확인하였다. 이들 모다피닐 유도체 MO06, MO08, MO15 및 MO20에 의한 세포 내 cAMP 농도 증가를 도 6에, 근육 수축 및 $K_{Ca}3.1$ 전류 억제 효과를 도 7에 나타내었다. 대조군과 비교하여 모다피닐 유도체로 처리하였을 때 세포 내 cAMP의 농도는 1 μM에 대해 약 2배, 100 μM에 대해 5배 또는 그 이상 증가되었다(도 6). 또한 $K_{Ca}3.1$ 전류 억제 효과 또한 모다피닐로 처리하였을 때와 비슷한 수준으로 나타남을 확인하였다(도 7). 이와 같은 결과는 본 발명의 유도체들이 모다피닐과 유사하게 세포 내 cAMP를 증가시킬 뿐만 아니라, $K_{Ca}3.1$ 채널을 억제하여 $K_{Ca}3.1$ 채널 매개 질환의 치료효과가 있음을 시사한다.

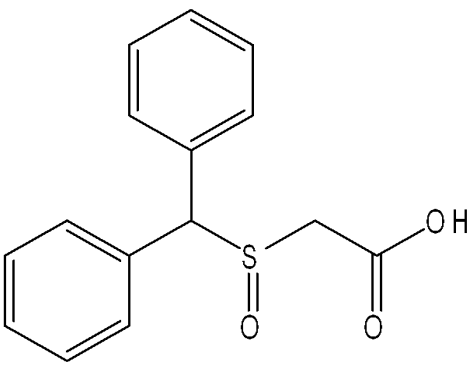
[0082] **실시예 7: 모다피닐 유도체의 일반적인 합성예**

[0083] 하기 화학식 6 또는 7로 표현되는 카르복실산 화합물(0.77 mmol)을 디메틸포름아미드(dimethylformamide; DMF, 40 ml)에 용해시킨 후 HOBt[208 mg, 1.54 mmol, (1-히드록시 벤조트리아졸; 1-hydroxybenzotriazole)]와 EDC[295 mg, 1.54 mmol, (에틸(디메틸아미노프로필)카보디이미드; ethyl(dimethylaminopropyl)carbodiimide)]를 각각 첨가하여 상온에서 30분간 교반한다. 반응액에 아민 화합물(0.77 mmol)을 넣은 후 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, 에틸아세테이트(ethylacetate; 100 ml)와 포화식염수(brine; 100 ml)로 세척한 후 유기층을 분리, 건조하고 감압하에 용매를 제거한 후 잔사를 관 크로마토그래피법으로 분리정제하여 목적화합물 모다피닐 유도체를 얻는다.

[0084] [화학식 6]

[0085] 

[0086] [화학식 7]

[0087] 

[0088] **제조예 1: 2-(벤즈히드릴티오)-N-((테트라히드로퓨란-2-일)메틸)아세트아미드 (MO06)**

[0089] 상기 실시예 7에서 화학식 6의 화합물을 출발물질로 하고 아민 화합물은 테트라히드로 퍼퓨릴아민을 사용하여, 상기 실시예 7과 동일한 방법으로 반응을 수행하여 목적화합물을 제조하였고 그 특성은 하기와 같다.

[0090] White solid. mp 117.8℃; R_f=0.3 (ethyl acetate/n-hexane = 1:1, v/v); IR_{max} ($CHCl_3$, KBr) 3304, 3060, 3027, 2926, 2870, 1651, 1531, 1494, 1450, 1384, 1304, 1078, 1030, 922, 750, 702, 629, 587, 507 cm^{-1}; ^1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ=7.43-7.20 (m, 10H), 6.99 (s, 1H), 5.20 (s, 1H), 3.99-3.75 (m, 3H), 3.58-3.52 (m, 1H), 3.19-3.09 (m, 3H), 2.02-1.87 (m, 4H); ^{13}C-NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ=168.5, 140.3, 128.8, 128.4, 127.6, 68.2, 54.8, 43.5, 36.1, 29.8, 25.9; LC-MS (ESI+) m/z 364 - [M+Na].

[0091] **제조예 2: 2-(벤즈히드릴티오)-N-페닐아세트아미드 (M008)**

[0092] 상기 실시예 7에서 화학식 6의 화합물을 출발물질로 하고 아민 화합물은 아닐린을 사용하여, 상기 실시예 7과 동일한 방법으로 반응을 수행하여 목적화합물을 제조하였고 그 특성은 하기와 같다.

[0093] White solid. mp 98.9℃; R_f=0.43 (ethyl acetate/n-hexane = 1:2, v/v); IR_{max} ($CHCl_3$, KBr) 3301, 3060, 3019, 2913, 1659, 1601, 1540, 1495, 1442, 1319, 1242, 1074, 1029, 747, 690, 625, 584, 498 cm^{-1}; ^1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ=8.45 (s, 1H), 7.49-7.08 (m, 15H), 5.19 (s, 1H), 3.23 (s, 2H); ^{13}C-NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ=166.7, 140.3, 137.7, 129.2, 129.0, 128.5, 127.9, 124.8, 119.9, 54.3, 37.2; LC-MS (ESI+) m/z 356-[M+Na].

[0094] **제조예 3: 2-(벤즈히드릴술피닐)-N-메틸아세트아미드 (M015)**

[0095] 상기 실시예 7에서 화학식 7의 화합물을 출발물질로 하고 아민 화합물은 메탄아민을 사용하여, 상기 실시예 7과 동일한 방법으로 반응을 수행하여 목적화합물을 제조하였고 그 특성은 하기와 같다.

[0096] White liquid. R_f=0.08 (ethyl acetate/n-hexane = 2:1, v/v); IR_{max} ($CHCl_3$, KBr) 2961, 2926, 1736, 1494, 1451, 1282, 1117, 1053, 1031, 967, 753, 702 cm^{-1}; ^1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ=7.50-7.34 (m, 10H), 7.09 (s, 1H), 5.21 (s, 1H), 3.43 (d, *J*=13.90 Hz, 1H), 3.15 (d, *J*=13.90 Hz, 1H), 2.79 (d, *J*=4.74 Hz, 3H); ^{13}C-NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ=164.9, 135.0, 129.7, 129.6, 129.0, 128.8, 72.3, 52.7, 26.6; LC-MS (ESI+) m/z 310-[M+Na].

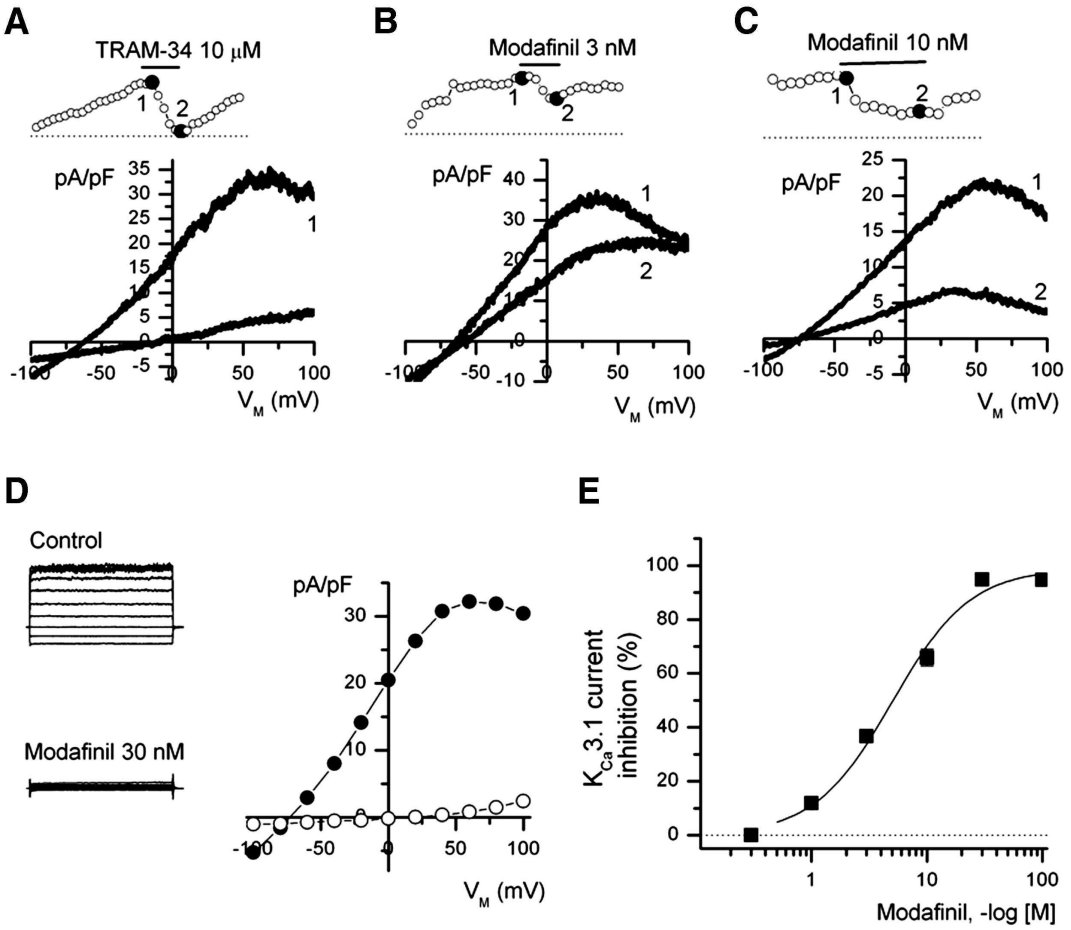
[0097] **제조예 4: 2-(벤즈히드릴술피닐)-N-((테트라히드로퓨란-2-일)메틸)아세트아미드 (M020)**

[0098] 상기 실시예 7에서 화학식 7의 화합물을 출발물질로 하고 아민 화합물은 테트라히드로 퍼퓨릴아민을 사용하여, 상기 실시예 7과 동일한 방법으로 반응을 수행하여 목적화합물을 제조하였고 그 특성은 하기와 같다.

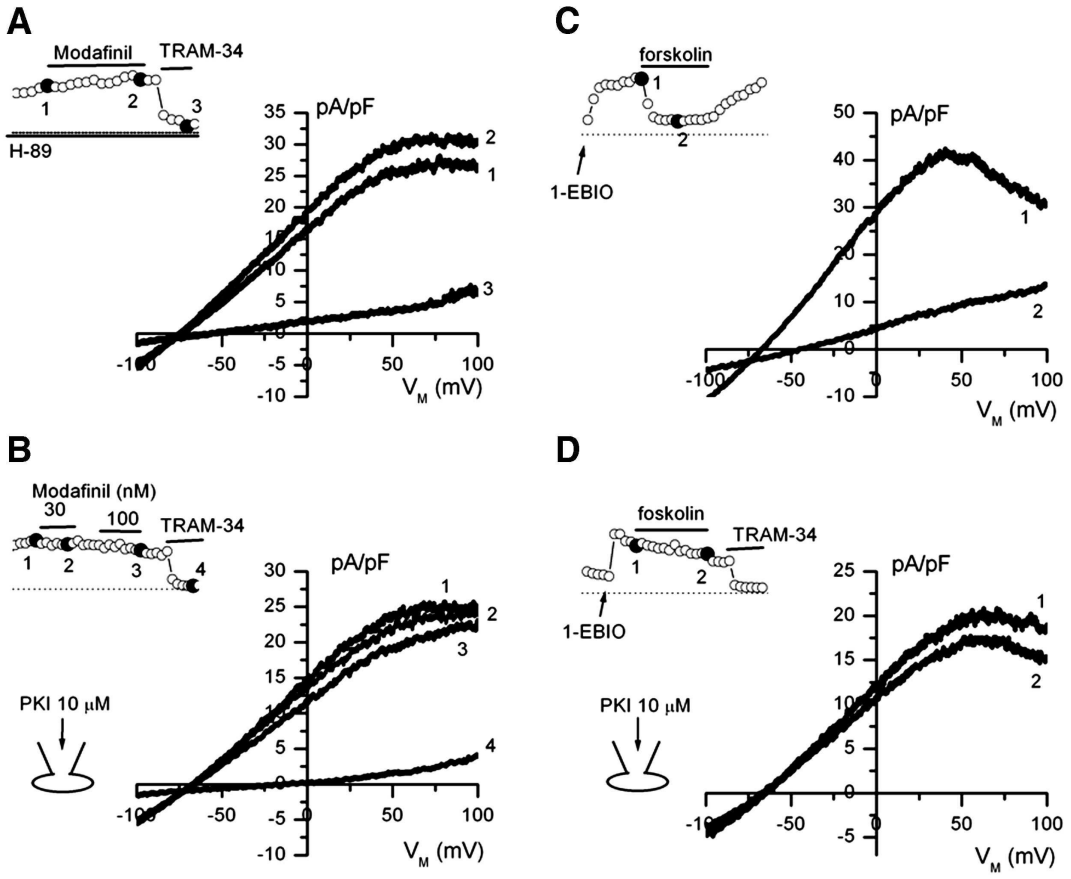
[0099] White liquid. R_f=0.1 (ethyl acetate/n-hexane = 2:1, v/v); IR_{max} ($CHCl_3$, KBr) 3287, 3064, 2926, 2871, 2243, 1738, 1667, 1556, 1495, 1451, 1383, 1304, 1257, 1136, 1080, 1031, 911, 732, 703, 646, 595, 498 cm^{-1}; ^1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ=7.53-7.27 (m, 11H), 5.28 (s, 1H), 4.03-3.99 (m, 1H), 3.88-3.82 (m, 1H), 3.76 (t, *J*=6.79 Hz, 1H), 3.49-3.42 (m, 2H), 3.19-3.10 (m, 2H), 2.04-1.86 (m, 4H); ^{13}C-NMR (63 MHz, $CDCl_3$) 164.5, 135.2, 129.4, 128.9, 128.7, 71.3, 68.2, 52.9, 52.6, 43.6, 28.8, 25.9; LC-MS (ESI+) m/z 380-[M+Na].

도면

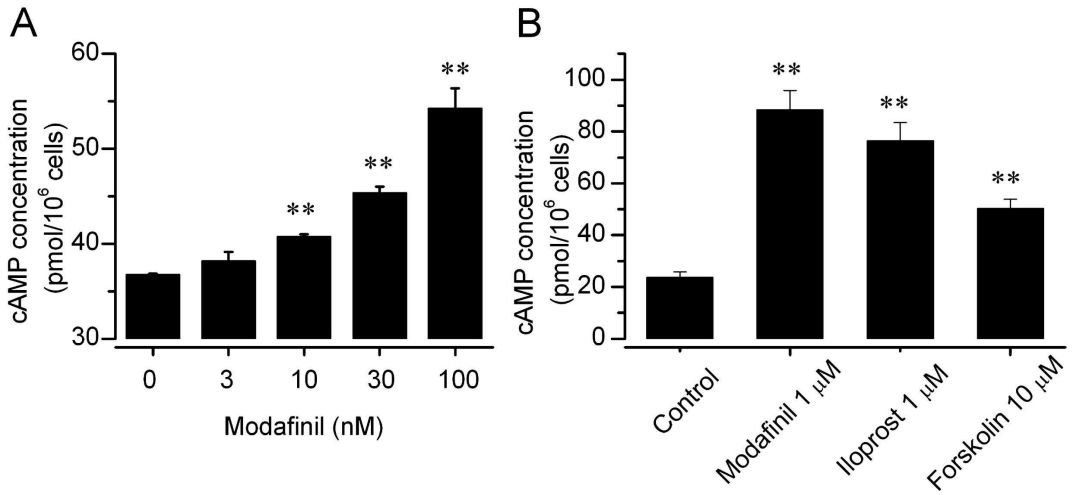
도면1


A
TRAM-34 10 μM
pA/pF
V_M (mV)
B
Modafinil 3 nM
pA/pF
V_M (mV)
C
Modafinil 10 nM
pA/pF
V_M (mV)
D
Control
Modafinil 30 nM
pA/pF
V_M (mV)
E
K_Ca3.1 current inhibition (%)
Modafinil, -log [M]

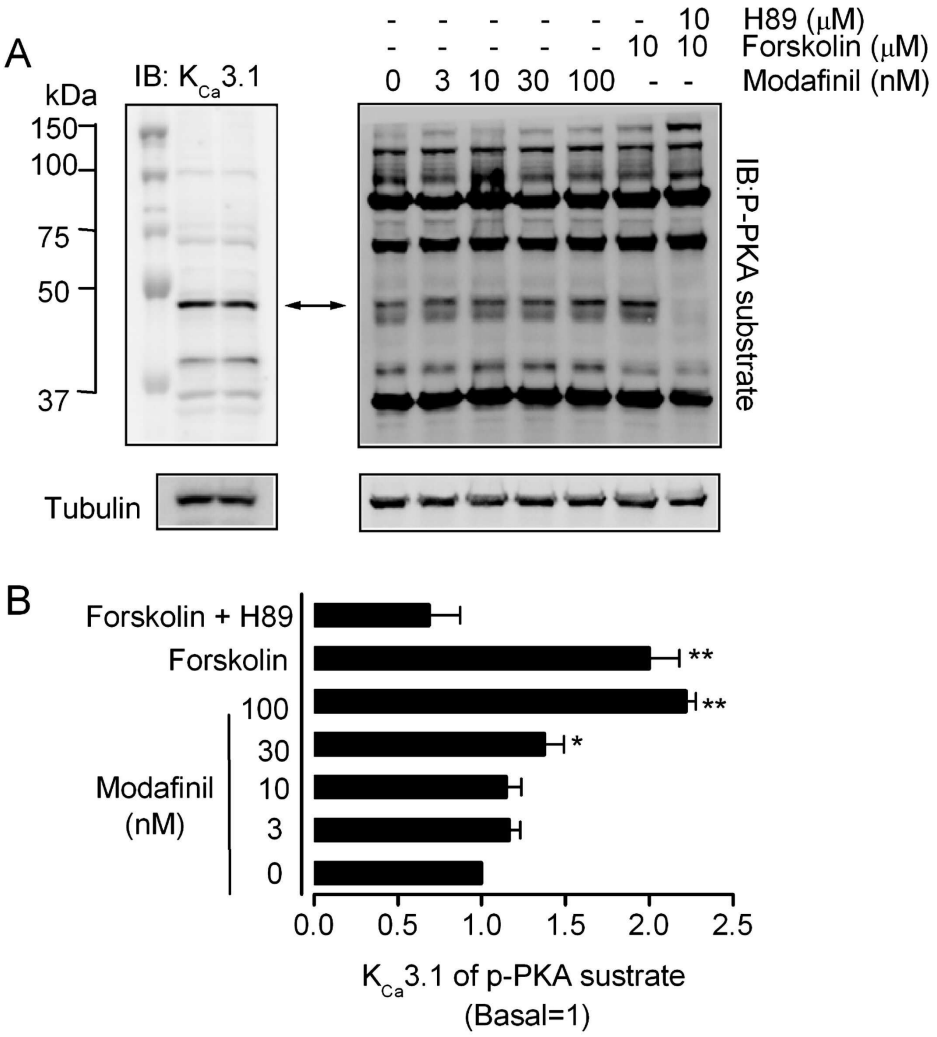
도면2


A
Modafinil
TRAM-34
H-89
pA/pF
V_M (mV)
B
Modafinil (nM)
30
100
TRAM-34
PKI 10 μM
pA/pF
V_M (mV)
C
forskolin
1-EBIO
pA/pF
V_M (mV)
D
foskolin
TRAM-34
1-EBIO
PKI 10 μM
pA/pF
V_M (mV)

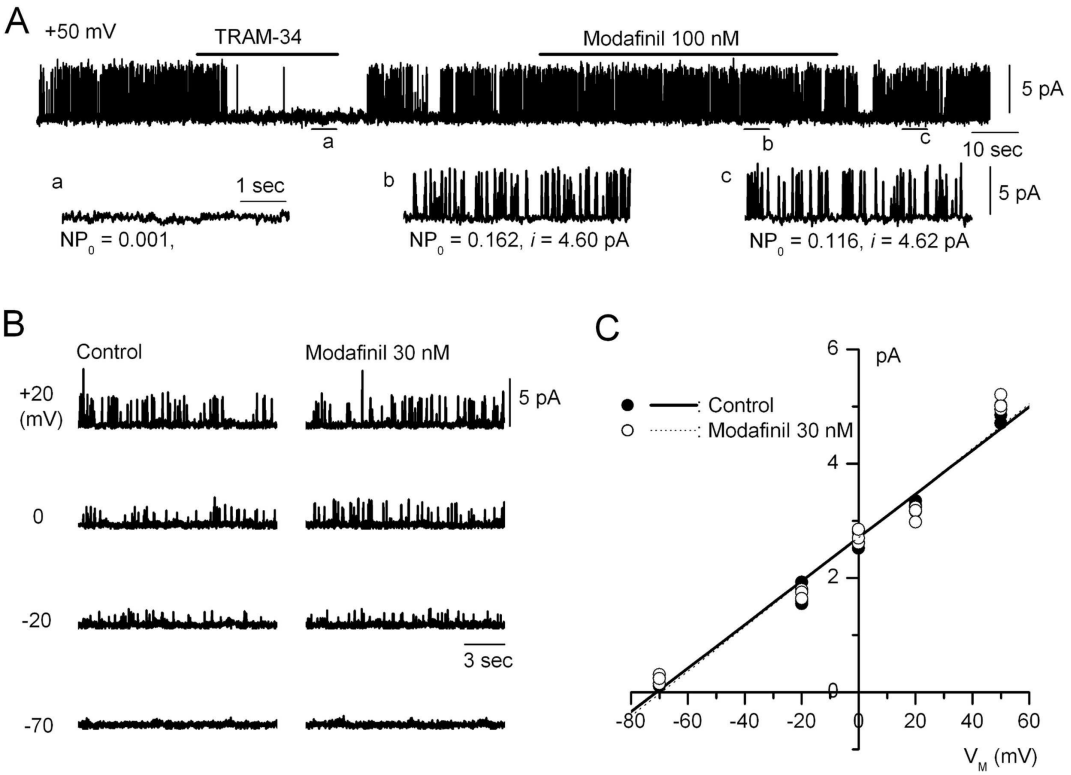
도면3


A
cAMP concentration (pmol/10^6 cells)
Modafinil (nM)
0
3
10
30
100
B
cAMP concentration (pmol/10^6 cells)
Control
Modafinil 1 μM
Iloprost 1 μM
Forskolin 10 μM

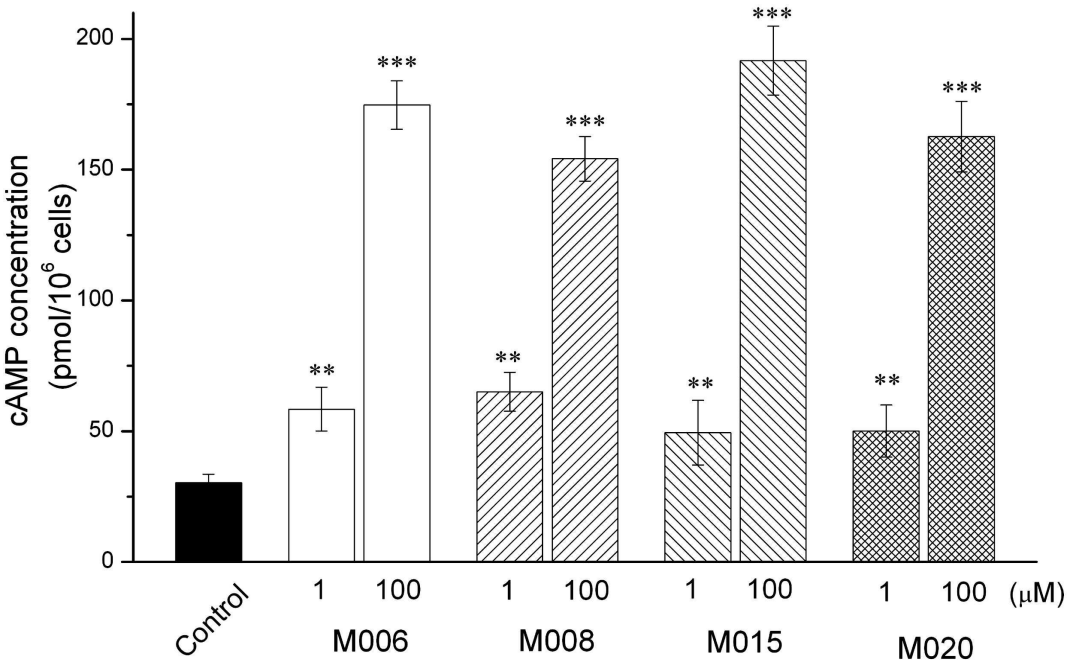
도면4


A
IB: K_{Ca}3.1
kDa
150
100
75
50
37
Tubulin
- - - - - - 10 H89 (μM)
- - - - - 10 10 Forskolin (μM)
0 3 10 30 100 - - Modafinil (nM)
IB:P-PKA substrate
B
Forskolin + H89
Forskolin
100
30
10
3
0
Modafinil (nM)
**
**
*
0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5
K_{Ca}3.1 of p-PKA sustrate
(Basal=1)

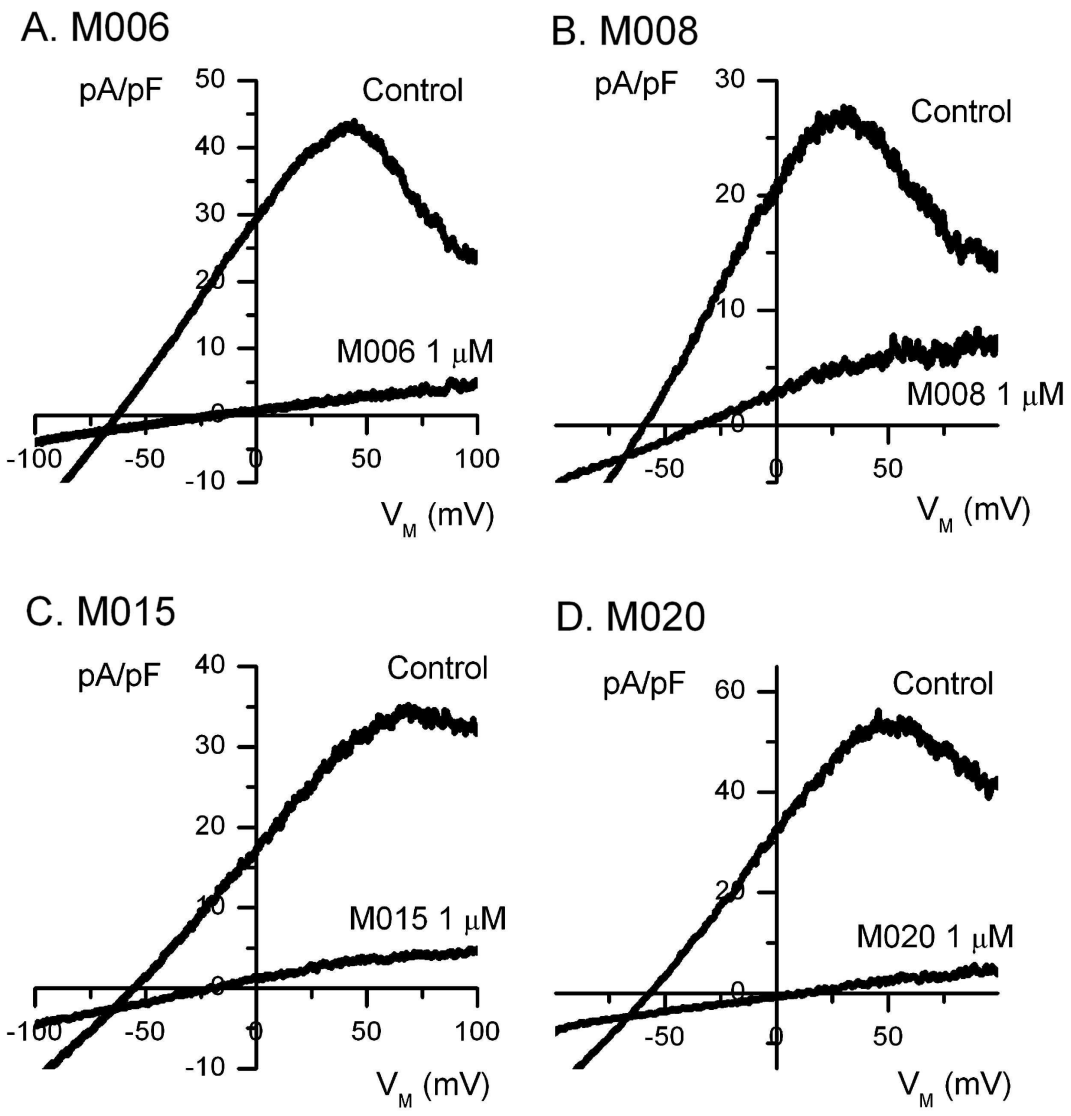
도면5


A
+50 mV
TRAM-34
Modafinil 100 nM
5 pA
10 sec
a
b
c
1 sec
NP0 = 0.001,
NP0 = 0.162, i = 4.60 pA
NP0 = 0.116, i = 4.62 pA
B
Control
Modafinil 30 nM
+20 (mV)
0
-20
-70
3 sec
C
pA
: Control
: Modafinil 30 nM
VM (mV)

도면6


cAMP concentration (pmol/10^6 cells)
Control
M006
M008
M015
M020
(μM)

도면7


A. M006
pA/pF
Control
M006 1 μM
V_M (mV)
B. M008
pA/pF
Control
M008 1 μM
V_M (mV)
C. M015
pA/pF
Control
M015 1 μM
V_M (mV)
D. M020
pA/pF
Control
M020 1 μM
V_M (mV)