



등록특허 10-2314995



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년10월21일

(11) 등록번호 10-2314995

(24) 등록일자 2021년10월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4245 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61P 25/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 31/4245 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2020-0091203

(22) 출원일자 2020년07월22일

심사청구일자 2020년07월22일

(56) 선행기술조사문헌

European Journal of Medicinal Chemistry, 42,
873-879, 2007.

Pharmaceuticals, 13, 111/1-45, 2020.

(73) 특허권자

한국화학연구원

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

배명애

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

김철희

대전광역시 유성구 어은로 57 132동 204호 (어은
동, 한빛아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 12 항

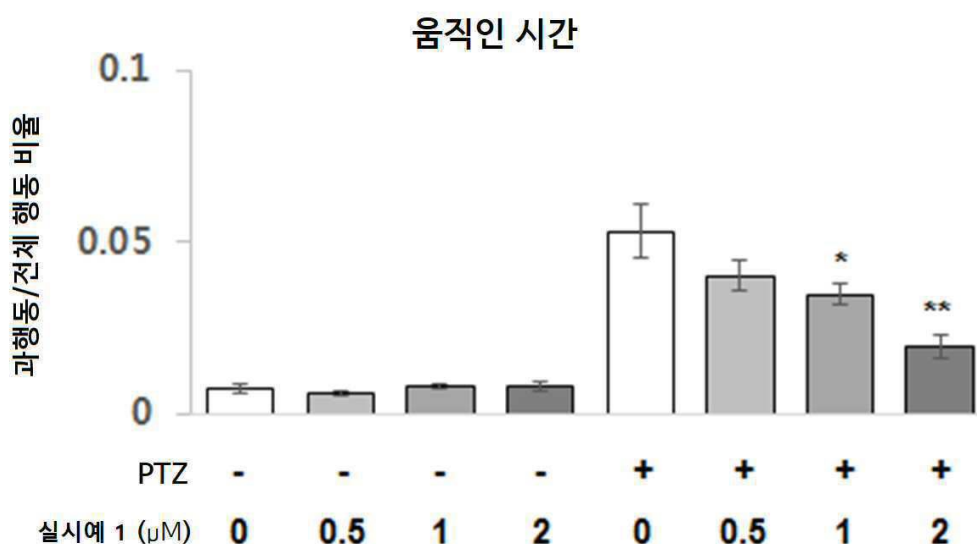
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 4-(2-클로로-4-플루오로벤질)-3-(2-싸이엔일)-1,2,4-옥사다리아졸-5(4H)-온을 유효성분으로 함유하는 뇌전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

4-(2-클로로-4-플루오로벤질)-3-(2-싸이엔일)-1,2,4-옥사다리아졸-5(4H)-온을 유효성분으로 포함하는 뇌전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, PTZ 유도 발작 치어 모델의 과행동 완화 효과, 신경세포 활성화 억제 효과, 인지 능력 회복 효과, 전압의존성 나트륨통로의 불활성화로부터의 회복을 더디게 하는 것에 매우 효과적이므로 본 발명에 따른 약학적 조성물은 뇌전증의 예방 또는 치료를 위해 사용될 수 있다.

대표도 - 도2b



(52) CPC특허분류

A61P 25/08 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

(72) 발명자

간혜민

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

조진화

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

황규석

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

채진실

대전광역시 유성구 가정로 141

안세환

대전광역시 유성구 가정로 141(장동)

장일성

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 TS191-02R

과제번호 10063396

부처명 산업통상자원부

과제관리(전문)기관명 한국화학연구원

연구사업명 산업핵심기술개발사업

연구과제명 (RCMS)제브라피쉬 기반 유효성 · 안전성 · 약물성 평가 서비스

기 여 율 1/1

과제수행기관명 한국화학연구원

연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

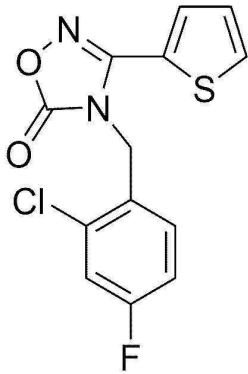
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 뇌전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 과행동을 완화시키는 것을 특징으로 하는, 뇌전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 신경세포의 활성화를 억제시키는 것을 특징으로 하는, 뇌전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 신경세포의 활성화는 펜틸렌테트라졸(pentylentetrazol)에 의해 유발된 것을 특징으로 하는, 뇌전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 뇌의 인산화 ERK1/2 단백질(p-extracellular signal-regulated kinase-1/2, pERK1/2) 양을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 뇌전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 뇌파 신호의 파워(power)를 감소시키는 것을 특징으로 하는, 뇌전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 전압의존성 나트륨전류의 크기를 억제시키는 것을 특징으로 하는, 뇌전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 전압의존성 나트륨통로 불활성화를 촉진시키는 것을 특징으로 하는, 뇌전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 전압의존성 나트륨통로의 불활성화로부터의 회복을 느리게 하는 것을 특징으로 하는, 뇌전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 억제성 신경전달물질(inhibitory neurotransmitter) 분비를 증가시키는 것을 특징으로 하는, 뇌전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

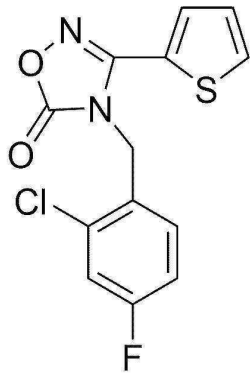
제10항에 있어서,

상기 억제성 신경전달물질은 세린, 페닐알라닌, 타이로신, 도파민, 글루타민, 아세틸콜린, 콜린, 글리신, 베타인, 글루탐산, 노르에피네프린, 세로토닌, 히스타민 및 γ -아미노부티르산으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 뇌전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 뇌전증의 예방 또는 개선용 건강기능식품:

[화학식 1]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 4-(2-클로로-4-플루오로벤질)-3-(2-싸이엔일)-1,2,4-옥사다리아졸-5(4H)-온을 유효성분으로 함유하는 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 발작(Seizure)은 세포의 과흥분으로 인해 자신의 의지와 상관없이 국소적인 또는 전신의 근육에서 반복적인 수축이 일어나는 것이다. 뇌전증(Epilepsy, 간질)은 발작이 반복적으로 일어나는 만성질환이며, 전 세계 1% 인구가 뇌전증 환자이고 발작으로 인해 일상생활의 불편함과 고통을 느끼고 있지만, 환자의 약 30%는 기존 anti-seizure drug(ASD)에 반응하지 않고, 또 다른 환자들은 2가지 이상의 ASD를 복용해야 한다. 이러한 이유 때문에 새로운 ASD 개발이 필요하다고 여겨진다(Zaccara et al., Pharmacological research 104(2016):38-48)

[0005] 제브라피쉬 암컷은 한번에 100~300개의 알을 산란하고, 수정란은 발생이 매우 빨라 수정 후 24시간이 지나면 대부분의 주요 장기와 기관이 형성된다. 또한 인간과 유전적으로 70~80% 일치하여 신약 개발을 위한 스크리닝 단계에 활용하기에 여러 가지 장점을 가진 실험동물이다. ZC4H2 유전자는 X 염색체 연관 지적 장애 (X-linked intellectual disability)에 관련된 후보유전자 중 하나이며 제브라피쉬에 94%의 높은 상동성을 가지는 zc4h2 유전자가 존재한다. zc4h2 유전자의 발현은 수정 후 4시간째부터 발생배 전체적으로 발현이 시작되고 발생이 진행될수록 머리부분과 눈 부분에서 주로 발현된다. 제브라피쉬 zc4h2 KO 치어는 TALEN 유전자 변형 기술을 사용하여 제작되었고, 수정 후 4일째부터 부레가 형성되지 않아 균형을 잡지 못해 옆으로 누워 유명하고, 비정상적인 과한 가슴 지느러미와 턱 움직임 등 seizure-like phenotype들이 나타난다(May, Melanie et al., Human molecular genetics 24.17(2015): 4848-4861).

[0007] 펜틸렌테트라졸(Pentylenetetrazole, PTZ)은 억제성 신경전달물질 GABA의 길항제로써 주로 GABAA 수용체에 경쟁적으로 결합하여 신경세포의 흥분된 상태를 유지시키는 화합물이다. PTZ는 물에 매우 잘 녹아 고농도로 사용할 수 있으며, 가격이 저렴해 여러 동물 모델에서 발작을 유도할 때 사용되는 대표적인 화합물 중 하나이다. PTZ를 고농도 (5mM)로 제브라피쉬 치어에 처리하면 유영거리, 유영 지속시간, 움직임 빈도, 속도 증가 등 발작-유사 행동(seizure-like behavior)을 관찰할 수 있다. 또한 PTZ를 제브라피쉬에 처리하면 발작 환자가 갖는 합병증 중 하나인 인지능력 감소를 color-maze test를 통해 확인할 수 있다. 마우스에서도 PTZ를 이용해 급성 발작을 유도할 수 있다. 마우스에 고용량의 PTZ를 주사하면 수십 초 이내에 부분적으로 또는 몸 전체적으로 경련이 일어나기 시작하며 10분 이내에 긴장간대발작(tonic-clonic seizure, TCS)이 발생하는 등 다양한 발작-유사 행동을 관찰할 수 있다.

[0009] 행동학적인 특성 외에도 뇌전증으로 판단할 수 있는 여러 지표들이 있다. 발작의 대표적인 지표인 인산화 ERK1/2 단백질 (pERK)은 활성화된 신경 세포에서 발견되는 분자이며 발작이 나타날 때 과발현되는 것으로 알려져 있다. 이 단백질은 실험 동물의 행동과 신경세포 간의 연관성에 대한 연구에서 중요하게 사용될 수 있다 (Houser et al., Neuroscience 156.1(2008):222-237). 또한 발작이 발생할 때, 뇌의 전기적 활동인 뇌파 (electroencephalography, EEG) 또한 비정상적으로 불안정하게 나타나며, 뇌전증을 진단하는 주된 방법도 뇌파를 반복적으로 측정하여 판단한다. 신경세포의 전압 의존성 Na⁺ 채널(voltage-gated Na⁺ channel)은 자극이 들

어왔을 때 빠르게 활성화되어 채널이 열리고, 세포 내로 Na⁺ 이온을 쏟아내어 탈분극을 유도한다. 그렇기 때문에 벨프로에이트(valproate), 카르바마제핀(carbamazepine) 등 Na⁺ 채널을 타겟으로 하는 여러 ASD가 존재한다. 신경전달물질은 신경세포의 시냅스에서 분비되어 인접한 신경세포의 수용체에 결합하여 정보를 전달한다. 신경전달물질은 크게 흥분성, 억제성으로 나뉘며 그 중 억제성 신경전달물질인 GABA의 전달을 향상시키는 메커니즘을 갖는 ASD, 예를 들어 페노바르비탈(phenobarbital), 티아가빈(tiagabine) 등이 존재한다.

[0011] 본 발명에서는 신규 뇌전증 치료제를 개발하기 위하여 한국화학물은행 라이브러리 6566종으로부터 유효물질을 선정한 후 최종 선별된 물질에 대해 다양한 방법으로 뇌전증 억제 효능을 검증 하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 일 목적은, 뇌전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

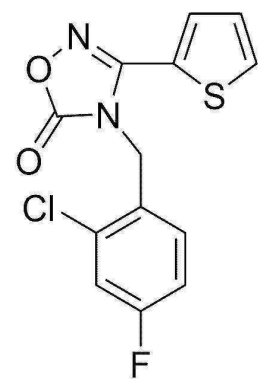
[0014] 본 발명의 다른 일 목적은, 뇌전증의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0017] 본 발명은, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 뇌전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

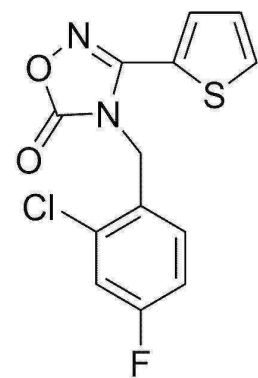
[0018] [화학식 1]



[0019]

[0021] 또한, 본 발명은, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 뇌전증의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0022] [화학식 1]



[0023]

발명의 효과

[0025] 본 발명에 따른 4-(2-클로로-4-플루오로벤질)-3-(2-싸이엔일)-1,2,4-옥사다리아졸-5(4H)-온을 유효성분으로 포함하는 뇌전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 PTZ 유도 발작 치어 모델에서 치어의 턱과 가슴 지느러미의

과행동을 뇌전증 보조 치료제로 사용되는 레티가빈과 유사한 정도로 억제할 수 있을 뿐만 아니라, 발작 모델의 움직임 거리, 시간, 횟수 감소에도 효과가 있음을 확인하였다.

[0026] 또한 발작 모델의 신경 세포 활성화 실험, 인지 능력 실험 등을 통해 PTZ 유도 발작 치어 모델의 뇌전증에 관한 다양한 현상 완화 효과를 확인하였으며, 전기화학적 실험을 통해 전압의존성 나트륨통로 불활성화로부터의 회복을 느리게 함으로써 뇌전증 억제에 효과가 있음을 확인하였으므로, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 뇌전증의 예방 또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1a는 본 발명에 따른 실험예 2에서 수행한 뇌전증 모델 (*zc4h2* KO)에서의 가슴 지느러미 움직임을 완화시켜주는 효능에 대한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 1b는 본 발명에 따른 실험예 2에서 수행한 뇌전증 모델 (*zc4h2* KO)에서의 턱 움직임을 완화시켜주는 효능에 대한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2a는 본 발명에 따른 실험예 3에서 수행한 PTZ 유도 발작 모델에 대한 과행동 억제 실험 결과 중 개체가 움직인 거리를 나타내는 그래프이다.

도 2b는 본 발명에 따른 실험예 3에서 수행한 PTZ 유도 발작 모델에 대한 과행동 억제 실험 결과 중 개체가 움직인 시간을 나타내는 그래프이다.

도 2c는 본 발명에 따른 실험예 3에서 수행한 PTZ 유도 발작 모델에 대한 과행동 억제 실험 결과 중 개체가 움직인 횟수를 나타내는 그래프이다.

도 2d는 본 발명에 따른 실험예 3에서 수행한 PTZ 유도 발작 모델에 대한 과행동 억제 실험 결과 중 개체의 평균 속력을 나타내는 그래프이다.

도 3a는 본 발명에 따른 실험예 4에서 수행한 PTZ 유도 발작 모델에 대한 신경 세포 활성화 억제 실험에서 형광 현미경으로 이미징 및 형광세기를 측정한 결과를 나타내는 사진이다.

도 3b는 본 발명에 따른 실험예 4에서 수행한 PTZ 유도 발작 모델에 대한 신경 세포 활성화 억제 실험에서 전뇌, 시개, 소뇌, 후뇌 부분의 형광 세기 평균값을 나타내는 그래프이다.

도 4는 본 발명에 따른 실험예 5에서 수행한 PTZ 유도 발작 모델에 대한 제브라피쉬 치어의 색상 선호도 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명에 따른 실험예 6에서 수행한 성체 제브라피쉬 PTZ 유도 발작 모델의 뇌파 전위 기록술 (electroencephalography, EEG)에 따른 파워 스펙트럼(power spectrum)에 대한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6a는 본 발명에 따른 실험예 7의 전기화학적 실험에서 탈분극성 전압자극으로 유발되는 전압의존성 나트륨전류의 크기 변화를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6b는 본 발명에 따른 실험예 7의 전기화학적 실험에서 전압의존성 나트륨통로의 막전압-불활성화 관계에 대해 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6c는 본 발명에 따른 실험예 7의 전기화학적 실험에서 전압의존성 나트륨통로의 불활성화 키네틱에 대한 작용을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6d는 본 발명에 따른 실험예 7의 전기화학적 실험에서 전압의존성 나트륨통로의 불활성화로부터 회복 키네틱에 대한 작용을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7a는 본 발명에 따른 실험예 8의 신경전달물질 분석실험에서 뇌의 아세틸콜린, 콜린, 베타인, 세린의 양을 정량 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7b는 본 발명에 따른 실험예 8의 신경전달물질 분석실험에서 뇌의 가바, 글루탐산, 글루타민의 양 및 흥분성/억제성 물질 비율을 정량 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

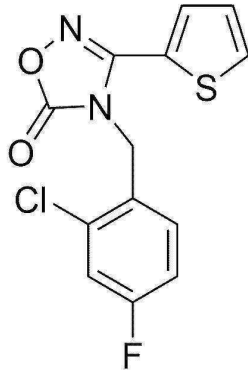
도 7c는 본 발명에 따른 실험예 8의 신경전달물질 분석실험에서 뇌의 페닐알라닌, 타이로신, 도파민, 노르에피네프린의 양을 정량 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0031] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 뇌전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0032] [화학식 1]



[0033]

[0035] 이때 상기 약학적 조성물은 과행동을 완화시킬 수 있다. 본 발명은 뇌전증 제브라피쉬 모델 (zc4h2 KO)에 본 발명에 따른 화합물을 처리할 경우 가슴 지느러미와 턱의 과행동을 완화시켜주는 효과가 있는 것을 확인하였다(도 1a 및 도 1b). 또한, 펜틸렌테트라졸(pentylentetrazol, PTZ)으로 유도한 제브라피쉬 발작 모델에서도 개체의 과행동의 억제됨을 확인하였다(도 2a 내지 도 2d).

[0036] 또한, 상기 약학적 조성물은 신경세포의 활성화를 억제시킬 수 있다. 본 발명은 펜틸렌테트라졸(pentylentetrazol, PTZ)으로 유도한 제브라피쉬 발작 모델에 본 발명에 따른 화합물을 처리할 경우 신경세포의 활성화가 억제되는 것을 확인하였는데, 뇌(전뇌, 시개, 소뇌, 후뇌)의 인산화 ERK1/2 단백질(p-extracellular signal-regulated kinase-1/2, pERK1/2)에 대한 면역조직화학법(immunohistochemistry)를 통해 확인할 수 있었다(도 3a 및 도 3b).

[0037] 또한, 상기 약학적 조성물은 뇌파 신호의 파워(power)를 감소시킬 수 있다. 본 발명은 펜틸렌테트라졸(pentylentetrazol, PTZ)으로 유도한 제브라피쉬 발작 모델에 본 발명에 따른 화합물을 처리할 경우 뇌파의 파워 스펙트럼(power spectrum)이 효과적으로 감소함을 확인하였다(도 5).

[0038] 또한, 상기 약학적 조성물은 전압의존성 나트륨전류의 크기를 억제시킬 수 있고, 전압의존성 나트륨통로 불활성화가 되기 쉽게 할 뿐만 아니라 불활성화로부터의 회복을 느리게 할 수 있다. 본 발명은 본 발명에 따른 화합물을 랫드 해마 신경세포에 적용하여 전압의존성 나트륨전류의 크기 억제, 전압의존성 나트륨통로 불활성화 촉진 및 불활성화로부터의 회복 억제 효과를 확인하였다(도 6a 내지 도 6d).

[0039] 상기 약학적 조성물은 억제성 신경전달물질(inhibitory neurotransmitter) 분비를 증가시키는 효과가 있으며, 이때, 억제성 신경전달물질은 이미 종래에 알려진 억제성 신경전달물질이라면 제한되지 않으나, 예를 들어 세린, 페닐알라닌, 타이로신, 도파민, 글루타민, 아세틸콜린, 콜린, 글리신, 베타인, 글루탐산, 노르에피네프린, 세로토닌, 히스타민 및 γ -아미노부티르산로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상을 들 수 있다. 본 발명에 따른 화합물을 PTZ 유도 발작 제브라피쉬 모델에 처리하여 신경전달물질 분석한 결과 뇌의 세린, 페닐알라닌, 도파민 등의 억제성 신경전달물질의 분비가 유의적으로 증가하는 효과를 확인하였다(도 7a 내지 도 7c).

[0041] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 추가로 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명의 약학적 조성물은 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 이의 혼합물을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체는 조성물을 생체 내에 전달하는데 적합한 것이라면 모두 사용할 수 있다. 구체적으로, 상기 담체는 Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc.에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 텍스트로스 용액, 말토텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 또는 이의 혼합물일 수 있다. 또한, 필요에 따라 향산화제, 완충액, 정균제 등과 같은 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다.

[0044] 상기 조성물을 제제화하는 경우, 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희

석제 또는 부형제를 첨가할 수 있다.

[0046] 본 발명의 조성물은 경구용 제제 또는 비경구용 제제로 제형화될 수 있다. 경구용 제제로는 고형 제제 및 액상 제제가 포함될 수 있다. 상기 고형 제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 또는 트로키제일 수 있고, 이러한 고형 제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제를 첨가하여 조제할 수 있다. 상기 부형제는 전분, 탄산 칼슘, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 또는 이의 혼합물일 수 있다. 또한, 상기 고형 제제는 윤활제를 포함할 수 있고, 그 예로는 마그네슘 스테arate, 탈크등이 있다. 한편, 상기 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제일 수 있다. 이때, 상기 액상 제제에는 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등과 같은 부형제가 포함될 수 있다.

[0048] 상기 비경구용 제제는 주사제, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 파우더 및 크림 등을 포함할 수 있다. 상기 주사제는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제 등을 포함할 수 있다. 이때, 비수성용제 또는 현탁용제로서는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름이나, 에틸올레이트와 같이 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

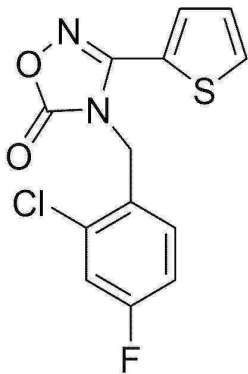
[0050] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다. 비경구 투여는 복강내, 직장내, 피하, 정맥, 근육내 또는 흉부내 주사 방식을 포함할 수 있다.

[0051] 상기 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 이는 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 환자의 민감도, 투여 시간, 투여 경로, 치료기간, 동시에 사용되는 약물 등에 따라 달라질 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명에 따른 약학 조성물에 포함되는 유효성분의 양은 0.0001 내지 100 mg/kg, 구체적으로 0.001 내지 70 mg/kg일 수 있다. 상기 투여는 하루에 1회 또는 수회일 수 있다.

[0053] 본 발명의 조성물은 단독 또는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있다. 병용 투여시, 투여는 순차적 또는 동시 일 수 있다.

[0055] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 뇌전증의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0056] [화학식 1]



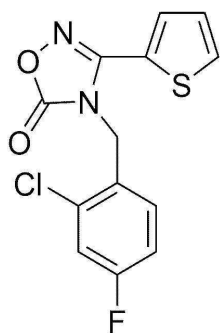
[0057]

[0059] 본 발명에서 용어, "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, '기능성'은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 한편, 건강식품은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품은 건강 보조 목적의 식품을 의미하는데, 경우에 따라, 건강기능식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하다. 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고 휴대성이 뛰어날 수 있다.

[0061] 상기 건강기능식품 제조 시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있으며, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 통상의 식품과 같이 여러 가지 생약 추출물, 식품화학적으로 허용 가능한 식품보조첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0063] 이하, 본 발명의 실시예 및 실험예를 하기에 구체적으로 예시하여 설명한다. 다만, 후술하는 실시예 및 실험예는 본 발명의 일부를 예시하는 것일 뿐, 본 발명에 이에 한정되는 것은 아니다.

[0065] <실시예 1> 4-(2-클로로-4-플루오로벤질)-3-(2-싸이예닐)-1,2,4-옥사디아졸-5(4H)-온의 합성을 통한 뇌전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 준비



[0066]

[0067] 화합물명 : 4-(2-클로로-4-플루오로벤질)-3-(2-싸이예닐)-1,2,4-옥사디아졸-5(4H)-온

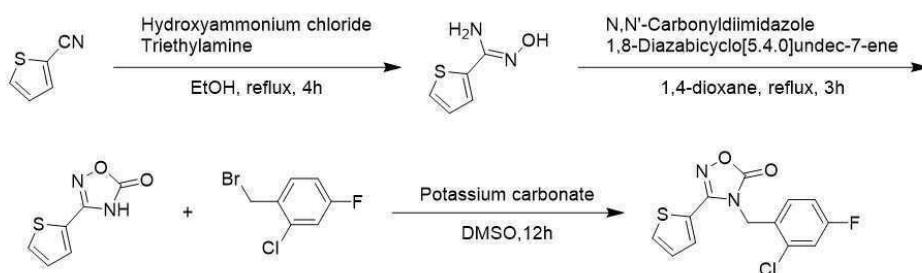
[0068] 4-(2-chloro-4-fluorobenzyl)-3-(2-thienyl)-1,2,4-oxadiazol-5(4H)-one

[0069] CAS No : 902873-60-3

[0070] 분자식 : $C_{13}H_8ClFN_2O_2S$

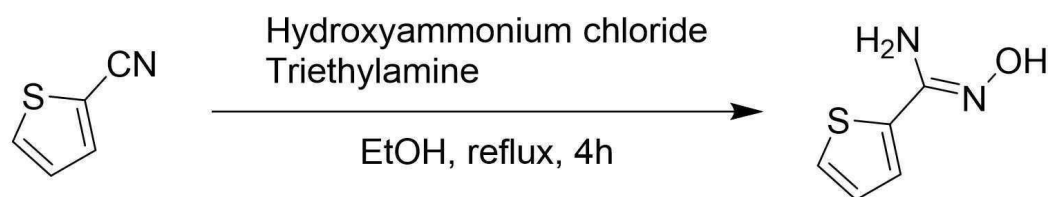
[0071] 분자량 : 310.73

[0073] 전체 반응식



[0074]

[0076] 단계 1: (Z)-N'-하이드록시싸이오펜-2-카복스이미드아마이드 ((Z)-N'-hydroxythiophene-2-carboximidamide)의 제조

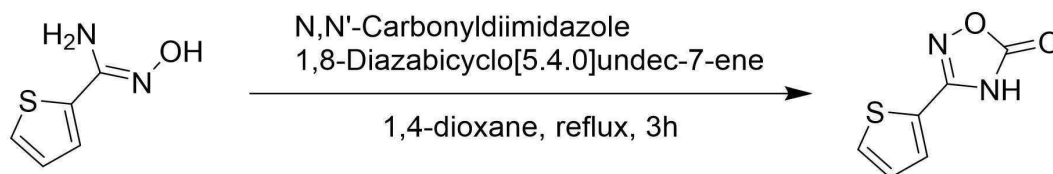


[0077]

[0078] 싸이오펜-2-카보나이트릴 (2.0 g, 18.32 mmol), 하이드록시암모늄 하이드로클로라이드 (1.91 g, 27.48 mmol) 및 다이아이소프로필에틸아민 (5.11 mL, 29.32 mmol)를 반응용기에 넣고 감압하여 진공상태로 만들고 질소 기체 하에서 distilled EtOH (75 mL)를 넣어 4시간 교반하며 reflux하였다. 반응이 종결되면 용매를 감압 하에서 제거하고 추출 (AcOEt / H₂O)을 하였다. 컬럼 크로마토그래피(Column chromatography) (AcOEt ; Hexane = 2 : 8, v/v)를 통해 정제하여 흰색의 고체 (Z)-N'-하이드록시싸이오펜-2-카복스이미드아마이드 (2.379 g, 91.3%)를 얻었다.

[0080] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.61 (s, 1H), 7.47 (dd, J = 3.6 Hz, J = 0.9 Hz, 1H), 7.41 (dd, J = 5.1 Hz, J = 0.9 Hz, 1H), 7.03 (dd, J = 5.1 Hz, J = 3.6 Hz, 1H), 5.92 (brs, 2H).

[0082] 단계 2: 3-(싸이오펜-2-일)-1,2,4-옥사디아졸-5(4H)-온 (3-(thiophen-2-yl)-1,2,4-oxadiazol-5(4H)-one)의 제조



[0083]

[0084]

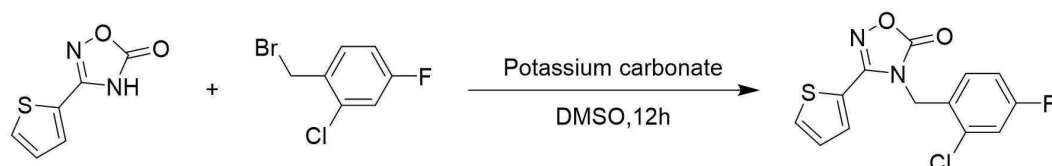
(Z)-N'-하이드록시싸이오펜-2-카복시이미드아마이드 (2.38 g, 16.73 mmol), CDI (N,N'-Carbonyldiimidazole) (3.26 g, 20.08 mmol)와 DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene) (2.75 mL, 18.40 mmol)를 반응용기에 넣고 1,4-다이옥세인 (30 mL)을 넣어 녹인 후 3시간 교반하며 reflux하였다. 반응이 종결되면 3 M HCl 용액으로 pH = 2를 맞춘 후, 추출을 (AcOEt / H₂O)을 3번 하였다. 유기 층을 얻어 용매를 제거하고 AcOEt/Hexane에 녹인 후 DCM으로 재결정 후 흰색의 고체 3-(싸이오펜-2-일)-1,2,4-옥사다리아졸-5(4H)-온 (2.45 g, 87.1%)를 얻었다.

[0086]

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 13.13 (s, 1H), 7.93 (dd, J = 5.0, 1.1 Hz, 1H), 7.72 (dd, J = 3.7, 1.1 Hz, 1H), 7.29 (dd, J = 5.0, 3.8 Hz, 1H).

[0088]

단계 3: 4-(2-클로로-4-플루오로벤질)-3-(싸이오펜-2-일)-1,2,4-옥사다리아졸-5(4H)-온 (4-(2-chloro-4-fluorobenzyl)-3-(thiophen-2-yl)-1,2,4-oxadiazol-5(4H)-one)의 제조



[0089]

[0090]

1-(브로모메틸)-2-클로로-4-플루오로벤젠 (558 mg, 2.50 mmol), 3-(싸이오펜-2-일)-1,2,4-옥사다리아졸-5(4H)-온 (500 mg, 2.97 mmol), 포타슘 카보네이트 (411 mg, 2.97 mmol)를 반응용기에 넣고 아세톤 (10 mL)를 넣어 녹인 후 12시간 교반하며 reflux하였다. 반응이 종결되면 용매를 감압 하에서 제거하고 추출 (AcOEt / H₂O)을 3번 하였다. 컬럼 크로마토그래피(Column chromatography) (AcOEt ; Hexane = 2 : 8, v/v)를 통해 정제하여 흰색의 고체 4-(2-클로로-4-플루오로벤질)-3-(싸이오펜-2-일)-1,2,4-옥사다리아졸-5(4H)-온 (530 mg, 57%)를 얻었다.

[0092]

¹H NMR (400 Mhz, DMSO-*d*₆-4-(2-chloro-4-fluorobenzyl)-3-(thiophen-2-yl)-1,2,4-oxadiazol-5(4H)-one): δ 7.90 (d, J = 4.96 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 11.44 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 3.81 Hz, 1H), 7.29-7.33 (m, 1H), 7.198 (t, J = 8.39 Hz, 1H), 7.12-7.18 (m, 1H), 4.98 (s, 1H).

[0094]

<실험예 1> 스크리닝

[0095]

한국화학물은행에서 보유한 6,566 종의 대표 화합물을 발작 유사 행동을 보이는 제브라피쉬 치어에 반응시켜 발작 유사 행동을 억제하는 화합물을 선별하였다.

[0096]

발작 유사 행동을 보이는 뇌전증 모델인 *zc4h2* knock-out (KO) 제브라피쉬는 인간의 Miles-Carpenter Syndrome의 원인 유전자로 알려진 *ZC4H2* 유전자의 제브라피쉬 상동 유전자인 *zc4h2* 기능이 억제된 모델이다. 이 제브라피쉬는 수정 후 5일째 치어에서 전체적인 움직임을 비롯하여 턱과 가슴 지느러미가 과행동을 보이는 등 인간의 발작과 유사한 행동을 보이는 것이 특징이다 (May et al., 2013. Hum. Mol. Genet.; Frints et al., 2019. Hum. Mutat.).

[0098]

1차 스크리닝

[0099]

1차 스크리닝을 위해 *zc4h2* 이형접합체 성체를 교배하여 얻은 발생배를 수정 후 5일째 치어시기까지 28 °C 배양기에서 발생시켰다. 수정 후 5일째, 개체 중 약 75%의 개체는 *zc4h2* 기능이 억제되지 않은 야생형 치어 (이하 WT)와 약 25%의 *zc4h2* 동형접합체 (이하 *zc4h2* KO) 치어를 선별한 뒤, 오전에는 실험실 환경에 적응시키고 오후 1시에 96-well plate의 각 well에 *zc4h2* KO 치어 2개체씩 각각 분주한 뒤 30분간 환경에 적응시켰다. DMSO에 약 5 mM로 녹여진 대표화합물 6,566 종을 20 μM (1/250)로 희석하여 노출 후 30분, 60분, 120분째 현미경을 통해 움직임을 관찰하고 기록하였다. 음성 대조군은 0.4% DMSO, 양성 대조군으로는 5 μM 농도의 레티가빈 (retigabine)을 사용하였다.

- [0101] <실험예 2> 뇌전증 모델 (*zc4h2* KO)에서의 턱과 가슴 지느러미 과행동 억제 실험
- [0102] 수정 후 5일째 WT 및 *zc4h2* KO 치어 2개체씩을 96-well plate의 각 well에 분주한 뒤 30분간 적응시켰다. 이후 실시예 1 화합물을 5, 10, 20 μ M로 30분간 노출 시킨 뒤 (n=6), 측면이 위를 향하게 한 다음 5% 메틸 셀룰로오스에서 고정시켰다. 고정 후 10초간 녹화하여 턱 움직임 횟수를 기록하여 도 1a에 나타내었다. 또한 실시예 1 화합물을 5, 10, 20 μ M로 30분간 노출 시킨 뒤 (n=6), 배면이 위를 향하게 한 다음 5% methyl cellulose에서 고정시켰다. 고정 후 10초간 녹화하여 가슴 지느러미 움직임 횟수를 기록하여 도 1b에 나타내었다.
- [0104] 도 1a 및 도 1b에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 실시예 1의 화합물은 뇌전증 제브라피쉬 치어 모델에서 가슴 지느러미와 턱의 과행동을 완하시켜주는 능력이 매우 우수하며, 특히, 뇌전증에 대한 보조 치료로 사용되는 항경련제인 레티가빈(retigabine)과 비교할 때 실시예 1의 화합물을 20 μ M로 처리하였을 때는 턱의 움직임 횟수가 레티가빈 거의 동일한 수준으로 나타났다. 이를 통해 본 발명의 실시예 1의 화합물은 농도 의존적으로 우수한 과행동 억제 효능을 나타냄을 알 수 있다.
- [0106] <실험예 3> 펜틸렌테트라졸(Pentylentetrazol, PTZ) 유도 발작 모델에서의 과행동 억제 실험
- [0107] 일반 야생형 제브라피쉬 발생배를 수정 후 5일째 치어시기까지 28 $^{\circ}$ C 배양기에서 발생시켰다. 수정 후 5일째 치어를 실험실 환경에 오전 동안 적응시키고, 오후 1시 96-well plate의 각 well에 1 개체씩 분주한 뒤 30분간 환경에 적응시켰다. 실험군은 총 8개이며, 구체적으로는 PTZ 미처리군에서 DMSO 처리군, 실시예 1 화합물 0.5, 1, 2 μ M 처리군과, 5 mM PTZ 처리군에서 DMSO 처리군, 실시예 1 화합물 0.5, 1, 2 μ M 처리군을 준비하였다 (n=10). 실험 용액을 처리함과 동시에 제브라피쉬 행동학 추적 장비인 DanioVision (Noldus, Netherlands)을 사용하여 30분간 움직임을 추적하였다. 추적한 자료를 EthoVision 소프트웨어 (Noldus, Netherlands)를 통해 각 움직임에 대한 수치를 산출하여 도 2a 내지 도 2d에 나타내었다. 산출한 수치는 Excel (Microsoft, US)을 통해 계산하였다. 각 움직임에 대한 구체적인 설명 및 산출 방법은 아래와 같다.
- [0109] 움직임 산출값
- [0110] 과행동: 치어의 평균 속도가 40 mm/s 이상인 움직임. 발작과 유사한 과행동을 의미함.
- [0111] 전체 행동: 치어의 평균 속도 관계없는 모든 움직임.
- [0112] 과행동/전체 행동 비율: 전체적인 움직임 대비 과행동의 비율값.
- [0114] 과행동에 대한 평가 기준
- [0115] 움직인 거리: 30분 동안 개체가 움직인 거리
- [0116] 움직인 시간: 30분 동안 실제로 개체가 움직인 시간
- [0117] 움직인 횟수: 30분 동안 실제로 개체가 움직인 횟수
- [0118] 평균 속력: 30분 동안 실제로 개체가 움직이는 동안의 평균 속력
- [0120] 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 실시예 1의 화합물은 PTZ가 없는 정상적인 상황에서 움직임에 아무런 영향을 주지 않으면서, PTZ 유도 발작 모델에서는 농도 의존적으로 과행동에 대한 완화 효능을 보여주는 것을 알 수 있으며, 특히 개체가 움직인 거리가 실시예 1을 2 μ M 처리할 때 약 절반 가까이 감소하였고, 움직인 시간 및 움직인 횟수는 실시예 1을 2 μ M 처리할 때 약 70%로 감소한 결과를 보임으로써 과행동 완화에 우수한 효과가 있다는 것을 알 수 있다.
- [0122] <실험예 4> PTZ 유도 발작 모델에서의 신경 세포 활성화 측정 실험
- [0123] 인산화 ERK1/2 단백질 (이하 pERK)은 활성화된 신경 세포에서 발견되는 분자로 개체의 행동과 신경 세포 활성화 간의 연관성에 대한 연구에 중요하다 (Ji et al., 1999. Nat. Neurosci.; Xia et al., 1996. J. Neurosci.).
- [0124] PTZ 유도 발작 모델에서 실시예 1 화합물의 유효성에 대한 검증을 위해 신경 세포의 활성화 측정을 시도했다. 본 실험에서는 pERK 단백질을 대한 면역조직화학법 (immunohistochemistry)을 통해 제브라피쉬 치어에서 신경 세포 활성화 여부를 검증하였다.
- [0126] 수정 후 5일째 치어를 오전 동안 실험실 환경에 적응시킨 뒤, 오후 1시에 12-well plate의 각 well에 치어 10개씩 분주하였다. 실험군은 4개이며, 구체적으로는 PTZ 미처리군에서 DMSO, 실시예 1 화합물 2 μ M 처리군과 5 mM PTZ 처리군에서 DMSO, 실시예 1 화합물 2 μ M 처리군을 준비하였다 (n=10). 각 실험 용액을 제브라피쉬 치어

가 있는 각 well에 30분간 노출한 뒤, 4% paraformaldehyde 용액으로 교체하여 하룻밤 동안 고정시켰다. 고정된 개체를 0.1% tween-20이 포함된 인산완충식염수 (phosphate buffered saline) (이하 PBST)에 15분 간격으로 3회 수세시킨 다음 색소 세포 표백을 위해 1% H₂O₂/3% KOH 용액에 약 1시간 동안 반응시켰다. 색소 세포가 제거된 치어를 PBST에 15분 간격으로 3회 수세시킨 후 150 mM TrisHCl (pH 9.0) 용액으로 교체하여 70 °C에서 20분간 반응시킨 뒤, PBST로 5분간 2회 수세시켰다. 0.05% Trypsin-EDTA 용액으로 교체하여 4 °C에서 45분간 반응시킨 뒤, PBST로 15분간 3회 수세시켰다. Blocking solution (2% normal goat serum, 1% bovine serum albumin, 1% DMSO를 PBST에 첨가)으로 교체한 뒤 상온에서 1시간 동안 반응시키고, 1차 항체인 pERK (Cell Signaling, US)를 1:500으로 blocking solution에 희석하여 4 °C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. PBST로 15분간 3회 수세시킨 뒤, 2차 항체 (Invitrogen, US)를 1:500으로 blocking solution에 희석하여 상온에서 4시간 동안 반응시켰다. PBST로 15분간 3회 수세시킨 뒤, 3% 메틸 셀룰로오스에 고정하여 형광 현미경 (BioTek, US)으로 이미징 및 형광 세기를 측정하여 도 3a에 나타내었다. 또한 치어의 등면 방향으로 획득한 이미지에서 전뇌 (forebrain), 시개 (tectum), 소뇌 (cerebellum), 후뇌 (hindbrain) 부분의 형광 세기를 측정하여 평균값을 비교하였 도 3b에 나타내었다.

[0128] 도 3a의 이미지로 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 실시예 1의 화합물은 PTZ 유도 발작 모델에서 각 뇌부분의 pERK 단백질 양을 감소시킨다는 것을 육안으로도 확인할 수 있었고, 도 3b를 통해 치어의 전뇌, 시개, 소뇌, 후뇌 각각에서의 형광 세기 평균값을 비교했을 때도 모두 실시예 1의 화합물에 의해 유의미한 정도로 형광 세기가 감소하는 결과를 확인할 수 있었다. 이를 통해, 본 발명에 따른 실시예 1 화합물이 PTZ 유도 발작 모델의 신경 세포 활성화를 효과적으로 완화시켜주는 것을 알 수 있다.

[0130] <실험예 5> 제브라피쉬 색상 선호도 테스트

[0131] 동물 실험에서 색상 선호도 테스트는 학습과 기억 (learning and memory) 또는 의사 결정 (decision making)의 평가를 위한 톨로 사용되는 행동학 평가법이다. 제브라피쉬도 색상 판별 능력이 있으며, 치어에서 파란색의 선호도가 가장 높은 것으로 알려져 있다 (Park et al., 2016. Mol. Cells.). 따라서, color maze를 통한 제브라피쉬 치어의 색상 선호도 테스트는 개체가 가지는 인지 능력 등에 대한 평가가 가능하다.

[0133] 수정 후 5일째 치어를 오전동안 실험실 환경에 적응시킨 뒤, 오후 1시에 제브라피쉬 치어용 color maze (흰색, 붉은색, 노란색, 파란색)에 치어 40 개체를 옮겼다. 실험군은 4개이며, 구체적으로는 PTZ 미처리군에서 DMSO, 실시예 1 화합물 2 μM 처리군과 5 mM PTZ 처리군에서 DMSO, 실시예 1 화합물 2 μM 처리군을 준비하였다 (n=40). 각 실험 용액을 제브라피쉬 치어가 있는 color maze에 30분간 노출하면서 영상을 녹화한 후 녹화한 영상을 2분마다 화면을 캡처하여 각 색상에서 머무는 치어의 수를 기록하고, 평균을 내어 치어의 색상 선호도를 산출하여 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0135] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, PTZ 및 DMSO를 처리한 군에서 흰색 선호도 감소, 노란색 선호도 증가, 붉은색 선호도 증가, 파란색 선호도 감소를 보였으나(선호도 순서: 붉은색>파란색>노란색>흰색), 본 발명에 따른 실시예 1의 화합물을 처리한 경우(선호도 순서: 파란색>붉은색>흰색>노란색), 미처리군(선호도 순서: 파란색>붉은색>흰색>노란색)과 비교할 때 흰색, 노란색, 붉은색, 파란색 선호도 모두에서 유사한 경향을 보였다. 특히, 파란색 선호도가 줄어든 PTZ 유도 발작 모델에서 이를 완화시켜 주는 것을 알 수 있다. 이를 통해, 본 발명에 따른 실시예 1 화합물을 처리한 경우 색상 선호도 평가에서 색상 판별 능력을 회복할 수 있으므로 인지 능력 회복에 효과가 있음을 알 수 있다.

[0137] <실험예 6> 성체 제브라피쉬 PTZ 유도 발작 모델에서의 뇌파 전위 기록술 (electroencephalography, EEG) 분석

[0138] 성체 제브라피쉬의 PTZ 유도 발작 모델에서 뇌파 전위기록술 분석을 통해 뇌파 파워 스펙트럼(power spectrum) 감소 여부를 확인하기 위해 아래와 같이 실험하였다.

[0139] 먼저 수컷 성체 제브라피쉬의 무게를 측정하여 400 ~ 750 mg의 개체를 선별하였으며, 실험군은 4개이고 구체적으로는 PTZ 미투여군에서 물, 실시예 1 화합물 1 mM 투여군과 15 mM PTZ 투여군에서 물, 실시예 1 화합물 1 mM 투여군을 준비하였다 (n=4). 본 실험에서는 비침습적으로 전극을 성체 제브라피쉬 머리에 부착한 뒤 MP36 (BIOPAC Systems Inc., US) 시스템을 사용하여 개체의 뇌파 신호를 측정하고 값을 산출하였다 (Cho et al., 2017. Sci. Rep.). 성체 제브라피쉬의 마취를 위해 개체를 실험을 위한 전용틀에 넣고, 유제놀(Eugenol)을 15 ppm 외부 노출, 8 ppm 구강 투여를 통해 개체를 마취시키고 베이스라인으로 10분간 EEG를 측정한 뒤, 각 실험군에 따라서 PTZ 혹은 PTZ와 실시예 1 화합물 혼합 용액 4 mL을 2분 동안 구강 투여하였다. 25분간 EEG를 측정하

여 아래의 계산식을 통해 0~16 Hz 구간의 파워 스펙트럼 증감 데이터를 산출하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[계산식]

$$\frac{Amount\ of\ power\ (treatment) - Amount\ of\ power\ (baseline)}{Amount\ of\ power\ (baseline)} \times 100$$

그 결과, 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, PTZ 처리에 의해 상대적 파워 신호가 약 10 A.U.에서 약 300 A.U.까지 증가하였는데, 본 발명에 따른 실시예 1 화합물을 처리하면 거의 미처리군과 유사한 정도의 약 40 A.U.로 87% 정도로 감소시키는 것을 알 수 있다. 이를 통해, 본 발명에 따른 실시예 1 화합물은 성체 체브라피쉬 PTZ 유도 발작 모델에서 뇌파에 대한 power spectrum이 효과적으로 감소시킬 수 있음을 확인하였다.

<실험예 7> 랫드 해마 신경세포에서 전압의존성 나트륨 통로에 대한 작용 분석

랫드 해마 신경세포에서 전압의존성 나트륨 통로에 대한 작용을 분석하기 위하여, 랫드 (Sprague Dawley계, 생후 12~17일)를 케타민(ketamine) (50 mg/kg, 복강투여)으로 마취한 후 절두하고 신속히 대뇌를 분리, 적출하였다. 적출된 대뇌를 microslicer (vibratome 1000; Warner Instruments, Hamden, CT, USA)을 사용하여 400 μ m 두께의 해마를 포함하는 조직 절편을 제작한 다음 실온 (21~24 $^{\circ}$ C)에서 95% O₂와 5% CO₂로 포화된 인공뇌척수액 (artificial cerebrospinal fluid; ACSF, in mM; 120 NaCl, 2 KCl, 1 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ and 10 glucose)에 최소 1시간 정도 보존하였다. 해마 CA3 영역을 포함하는 조직 절편을 배양 접시에 옮긴 후 표준 세포외액 하에서 (in mM; 150 NaCl, 3 KCl, 1.2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 glucose, 10 HEPES, pH 7.4 with Tris-base) 신경세포의 기계적 분리장치를 이용하여 단일 해마 CA3 영역의 신경세포를 분리하였다. 이들 신경세포는 TE2000 (Nikon, Tokyo, Japan) 하에서 전세포기록법 (whole-cell patch clamp technique)을 이용하여 전기생리학적인 기록을 시행하였는데, 세포외액 및 후보물질을 포함하는 세포외액은 'Y-tube'를 이용하여 신속하게 약물이 교체될 수 있도록 하였다.

모든 전기생리학적인 기록은 미세전류증폭기 (MultiClamp 700B; Molecular Devices; Union City, CA, USA)를 이용하여 전세포기록법 (whole-cell patch clamp recording)을 응용하여 수행하였다. 기록용 전극은 실리카 재질의 유리관 (1.5 mm outer diameter, 0.9 mm inner diameter; G-1.5; Narishige, Tokyo, Japan)을 전용 전극제작기 (P-97; Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA)로 제작하였다. 제작된 전극의 저항은 전극 내액을 충전했을 때 1~2 M Ω 정도로 하였다. 전세포기록시 기록되는 막 전류는 2 kHz로 필터한 후 아날로그-디지털 신호전환기 (Digidata 1440A, Molecular Devices)를 이용하여 10 kHz로 디지털 신호화하였으며, 디지털 신호는 전용 프로그램 (pClamp 10.6, Molecular Devices)을 이용하여 온라인으로 컴퓨터로 저장하였다. 모든 전세포기록에 10 mV의 과분극성 전압자극을 적용하여 직렬저항을 측정하였으며 직렬저항값에 15% 이상 변화가 있을 경우에는 기록을 중단하였다.

전압의존성 나트륨전류를 측정하기 위해서 막전압은 -100 mV에 고정하였다. 세포내액(전극용액)은 주요 양이온으로 Cs⁺을 함유하는 용액 (internal solution; in mM; 140 CsF, 10 CsCl, 2 EGTA, 10 Hepes, pH 7.2 with Tris-base)을 이용하였으며, 세포외액은 표준 세포외액에 전압의존성 칼슘통로 억제제인 Cd²⁺ (100 μ M), 흥분성 글루타민산 수용체 및 억제성 GABA_A 수용체 억제제인 kynurenic acid (3 mM)과 SR95531 (10 μ M)을 첨가하였다. 전압의존성 나트륨전류는 -100 mV에서 -20 mV까지의 탈분극성 전압자극으로 활성화하였다. 상기 실험 결과를 도 6a 내지 도 6d에 나타내었다.

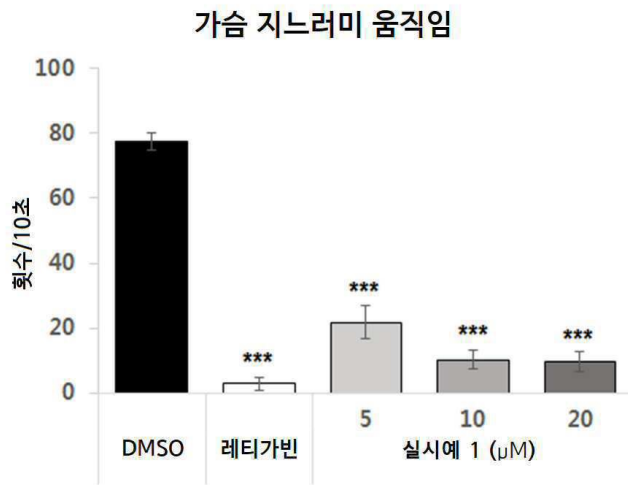
도 6a에 나타난 바와 같이 본 발명에 따른 실시예 1의 화합물은 탈분극성 전압자극으로 유발되는 전압의존성 나트륨전류의 크기를 유의하게 억제함을 알 수 있다.

도 6b는 전압의존성 나트륨통로의 전압-불활성화 관계에 대한 실시예 1 화합물의 작용을 보여준다. 막전압-불활성화 관계는 볼츠만식 ($I/I_{max} = 1/(1 + \exp[(V - V_{50})/k])$)을 이용하여 추세를 확정하고 각 지표를 추산하였다. 여기서 I_{max}는 최대전류 크기, V₅₀은 최대전류 크기의 50% 크기의 전류 크기를 유발하는 전압자극의 크기, V는 각 전압자극의 크기, k는 곡선의 기울기를 의미한다. 도 6b에 나타난 바와 같이 실시예 1 화합물은 V₅₀ 값을 과분극 쪽으로 이동시키는 것을 알 수 있으며, 따라서 전압의존성 나트륨통로가 불활성화되기 쉽게 함을 알 수 있다.

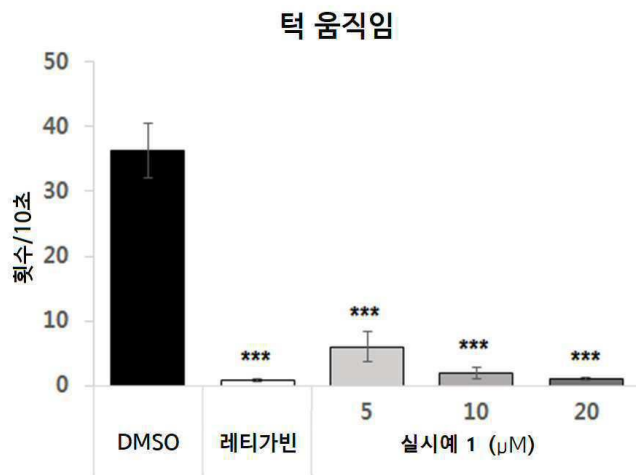
- [0157] 도 6c는 전압의존성 나트륨통로의 불활성화 키네틱에 대한 실시예 1 화합물의 작용을 보여준다. 불활성화 키네틱을 측정하기 위해 두 번의 연속적인 전압자극을 20 ms 간격으로 가하되, 첫 번째 전압자극의 지속기간 (prepulse duration)을 2 ms에서 8000 ms까지 변화시켰다. 여기서 첫 번째 (P_1)와 두 번째(P_2) 전압자극으로 유발되는 나트륨전류의 비율 (P_2/P_1 ratio)을 첫 번째 전압자극의 지속기간과의 관계로 표현했을 때, 전압의존성 나트륨전류의 불활성화 정도의 시간적 관계는 지수함수식 ($I(t) = A_0 + A_{fast} \times [\exp(-t/\tau_{fast})] + A_{slow} \times [\exp(-t/\tau_{slow})]$)으로 표현될 수 있다.
- [0158] 여기서 $I(t)$ 는 첫 번째 전압자극의 각 지속기간에서의 나트륨전류의 크기, τ_{fast} 와 τ_{slow} 는 불활성화되는 시간상수, A_{fast} 와 A_{slow} 는 각 시상수에서의 비율을 의미한다. 도 6c에 나타난 바와 같이 본 발명에 따른 실시예 1 화합물은 전압의존성 나트륨통로의 불활성화 키네틱 성분 중 빠른 불활성화 부분(τ_{fast})을 유의하게 감소시키는 것을 알 수 있으며, 이는 실시예 1 화합물이 전압의존성 나트륨통로의 불활성화를 빠르게 한다는 것을 의미한다.
- [0160] 도 6d는 전압의존성 나트륨통로의 불활성화로부터의 회복 키네틱에 대한 실시예 1 화합물의 작용을 보여준다. 불활성화로부터의 회복 키네틱을 측정하기 위해 두 번의 연속적인 전압자극을 가하되, 첫 번째 전압자극의 지속기간은 500 ms로 고정하고 두 번째 전압자극을 가할 때까지의 회복시간 (recovery duration)을 1 ms에서 5000 ms까지 변화시켰다.
- [0161] 여기서 첫 번째(P_1)와 두 번째(P_2) 전압자극으로 유발되는 나트륨전류의 비율(P_2/P_1 ratio)을 두 번째 전압자극을 가할 때까지의 회복시간과의 관계로 표현했을 때, 전압의존성 나트륨전류의 불활성화로부터의 회복 정도의 시간적 관계는 지수함수식($I(t) = A_0 + A_{fast} \times [1 - \exp(-t/\tau_{fast})] + A_{slow} \times [1 - \exp(-t/\tau_{slow})]$)으로 표현될 수 있다. 여기서 $I(t)$ 는 첫 번째 전압자극의 각 지속기간에서의 나트륨전류의 크기, τ_{fast} 와 τ_{slow} 는 불활성화로부터의 회복 시간상수, A_{fast} 와 A_{slow} 는 각 시상수에서의 비율을 의미한다. 도 6d에 나타난 바와 같이 실시예 1 화합물은 전압의존성 나트륨통로의 불활성화로부터의 회복 키네틱 성분 중 빠른 회복 부분 (τ_{fast})을 유의하게 증가시키는 것을 알 수 있으며, 이는 실시예 1 화합물이 전압의존성 나트륨통로의 불활성화로부터의 회복을 느리게 한다는 것을 의미한다.
- [0163] <실험예 8> 성체 제브라피쉬 PTZ 유도 발작 모델에서의 신경전달물질 분석
- [0164] 신경세포 내에서의 신호전달을 위해 분비되는 신경전달물질은 시냅스에서의 전위를 조절하는 역할을 한다. 따라서, 성체 제브라피쉬 PTZ 유도 발작 모델에서의 신경전달물질을 분석하였다. 성체 제브라피쉬 12 개체를 1L 수조에 옮기고 4개의 실험군을 준비하였다. 구체적으로는 PTZ 미처리군에서 DMSO, 실시예 1 화합물 2 화합물 2 μ M 처리군을 준비하였고, 1 mM PTZ 처리군에서 DMSO, 실시예 1 화합물 2 μ M 처리군을 준비하였다 (n=12). 각 물질들을 24시간 동안 1 L 수조에 넣어 처리하고, 성체 제브라피쉬의 뇌조직을 분리하였다. 뇌조직 무게의 10배에 해당하는 3차 증류수를 가하고, 초음파 기기 (Ultrasonic processor VCX-130; Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT)로 5초간 균질화 후, 동량의 메탄올을 가하여 뇌조직 내의 신경전달물질을 추출하였다. 10분간 원심분리하여 상등액을 수집하고, LC-MS/MS (Waters Xevo-tqs, USA)로 각 신경전달물질을 정량 분석하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0166] 그 결과, 도 7a 내지 도 7c에 나타난 바와 같이, 실시예 1 화합물을 처리하였을 때 DMSO 대조군과 대비하여 뇌에서의 세린 (도 7a), 페닐알라닌, 타이로신, 도파민 (도 7b), 글루타민 (도 7c)의 양이 유의적으로 증가하는 것을 알 수 있다. 특히, 가바A수용체의 길항제인 PTZ 처리군에서는 억제성 신경전달물질의 가바의 양이 유의적으로 크게 증가하였으나, 실시예 1 화합물을 추가적으로 처리하였을 때 DMSO 정상 대조군 수준으로 회복되는 것을 관찰하였다. 그로 인해, PTZ 유도 발작 모델의 뇌에서 흥분성 (가바) / 억제성 (글루탐산) 신경전달물질의 비율이 유의적으로 크게 감소하였지만, 실시예 1 화합물을 추가적으로 처리하였을 때 DMSO 정상 대조군 수준으로 회복되는 것이 관찰되었다. 이를 통해, 실시예 1 화합물이 뇌에서 억제성 신경전달물질인 가바의 신호전달 기전에 효과적으로 관여한다는 것을 알 수 있다.
- [0168] 이상, 본 발명을 바람직한 실시예 및 실험예를 통해 상세히 설명하였으나, 본 발명의 범위는 특정 실시예에 한정되는 것은 아니며, 첨부된 특허청구범위에 의하여 해석되어야 할 것이다. 또한, 이 기술분야에서 통상의 지식을 습득한 자라면, 본 발명의 범위에서 벗어나지 않으면서도 많은 수정과 변형이 가능함을 이해하여야 할 것이다.

도면

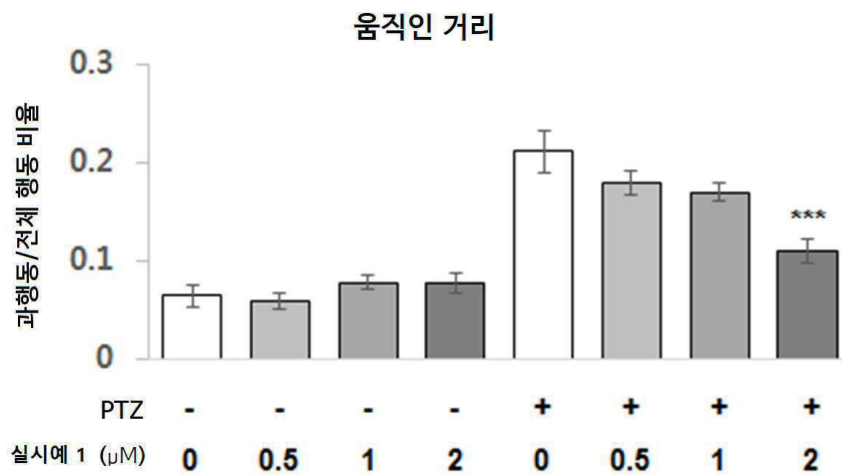
도면1a



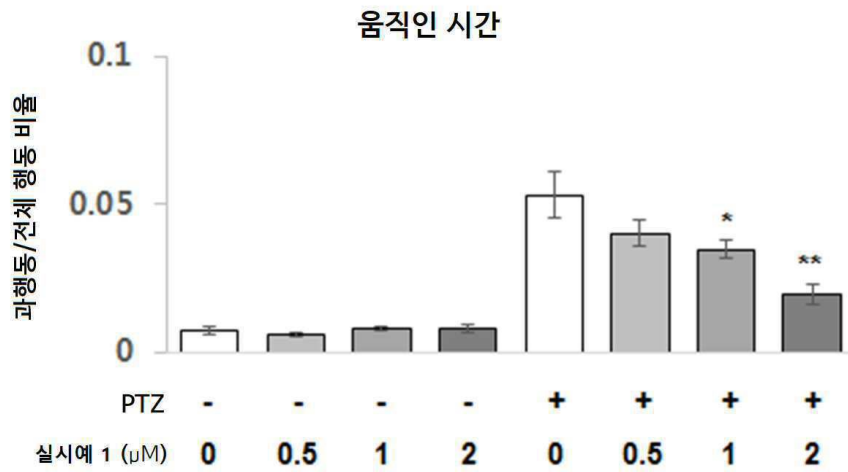
도면1b



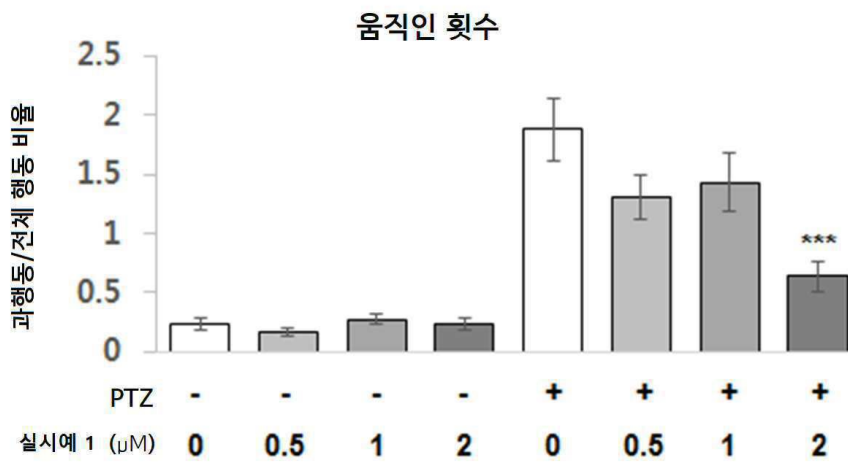
도면2a



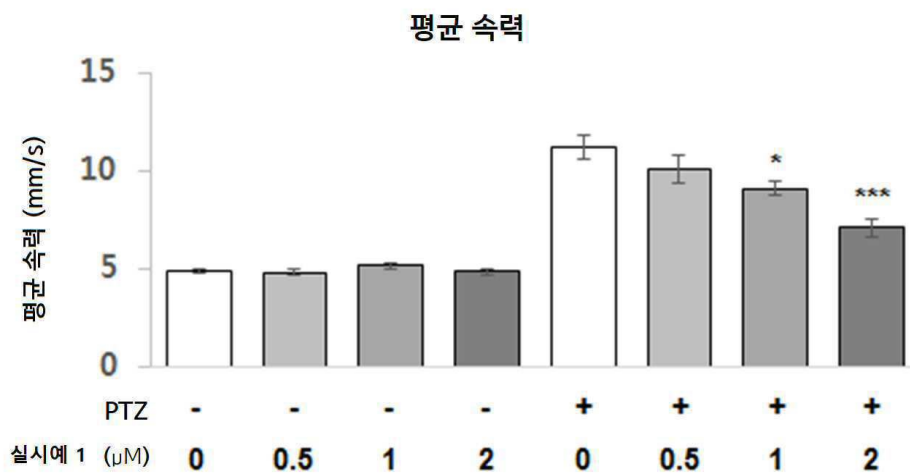
도면2b



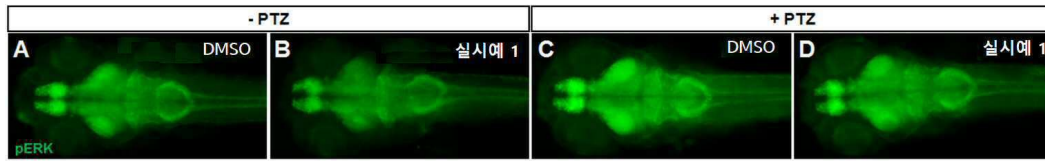
도면2c



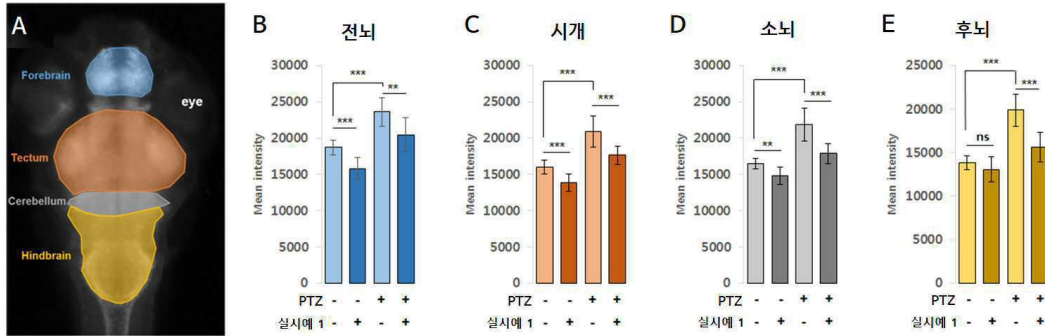
도면2d



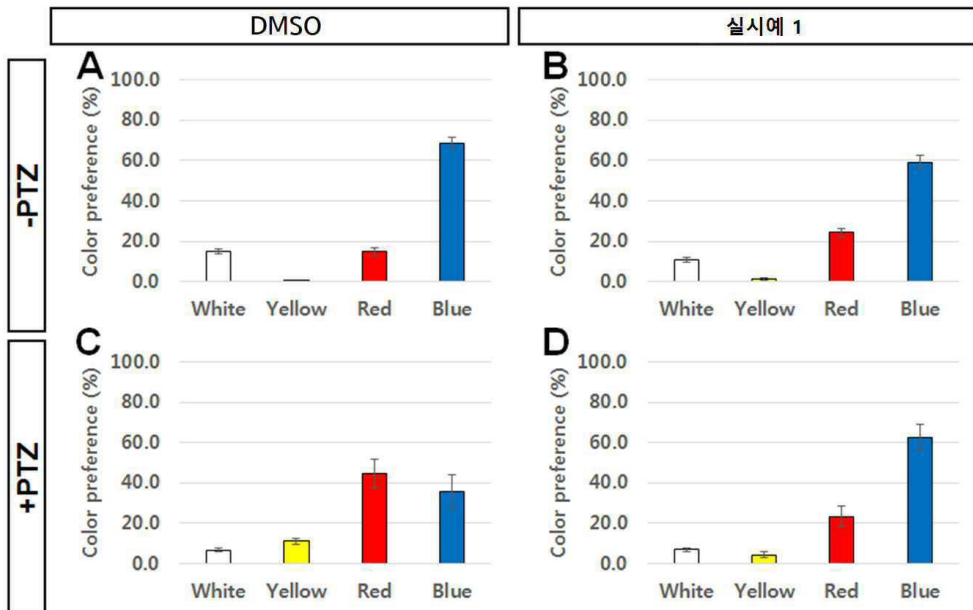
도면3a



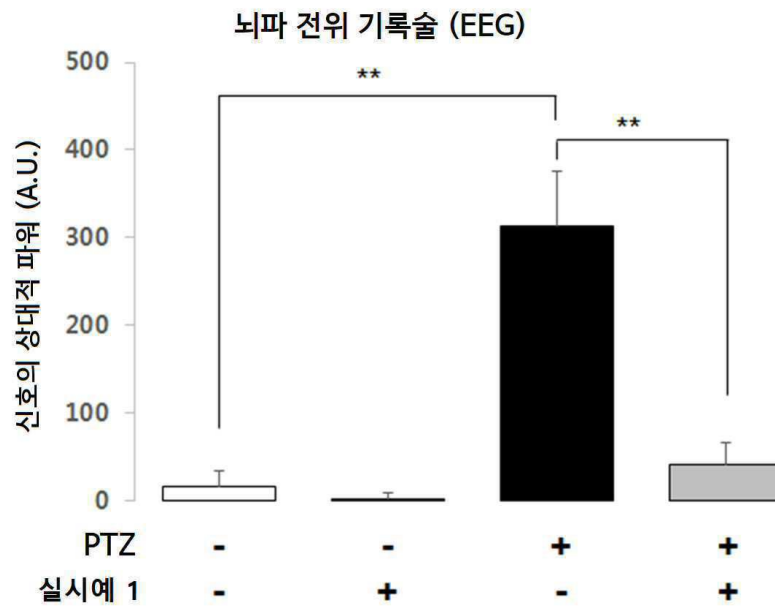
도면3b



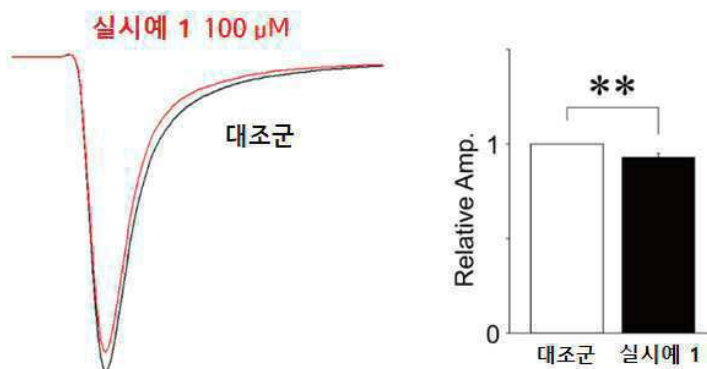
도면4



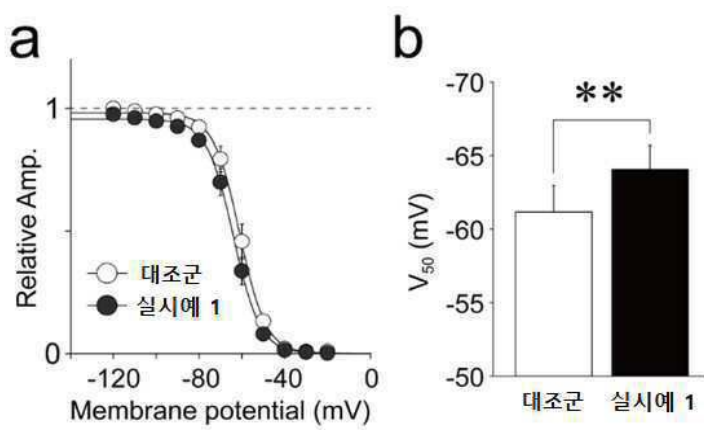
도면5



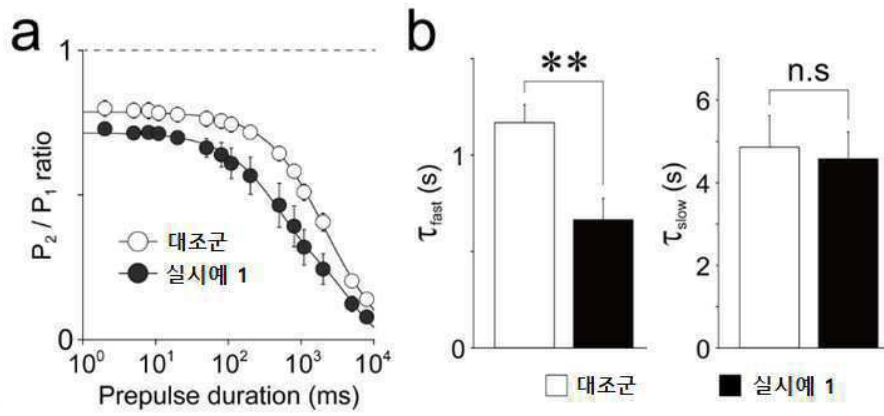
도면6a



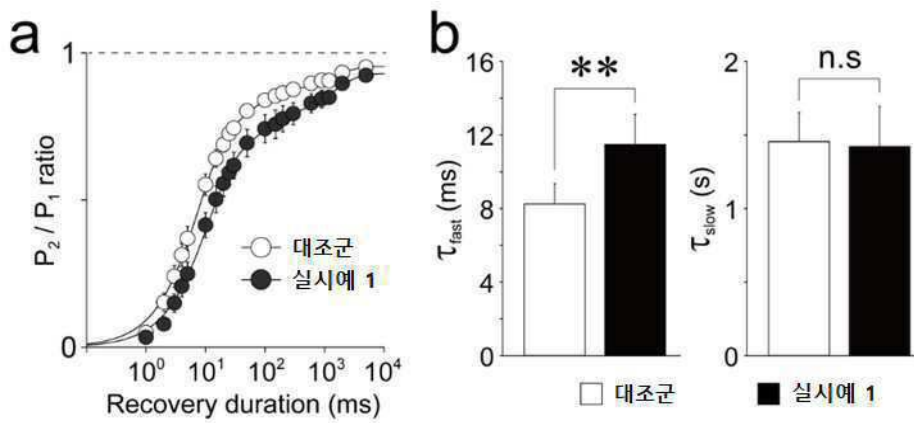
도면6b



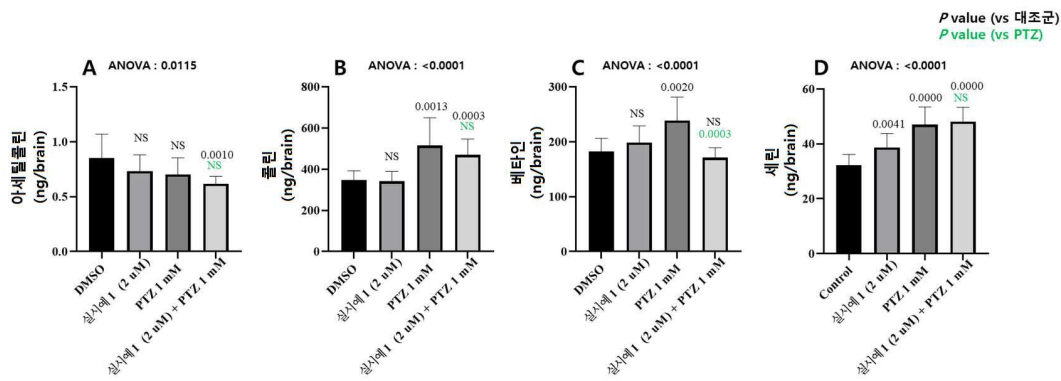
도면6c



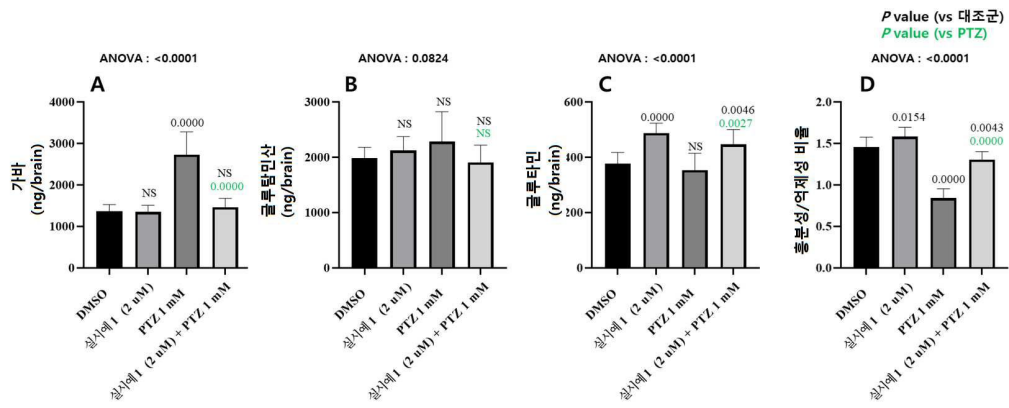
도면6d



도면7a



도면7b



도면7c

