(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년06월30일
(11) 등록번호 10-1532211
(24) 등록일자 2015년06월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/423 (2006.01) *A61K 31/404* (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0052583
(22) 출원일자 2014년04월30일
심사청구일자 2014년04월30일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020080048550 A
KR1020120078756 A

(73) 특허권자
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
김양희
서울특별시 광진구 아차산로 262, A동 3006호
박황서
서울특별시 광진구 아차산로69길 19, 901동 502호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
한윤호, 양기혁, 이인행, 김남식

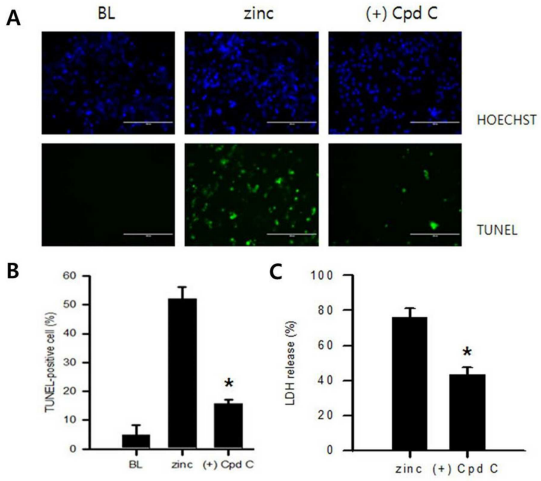
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 **AMPK 억제기능에 기반한 뇌졸중 치료용 약학적 조성물 및 방법**

(57) 요 약

본 발명은 뇌졸중의 주요 원인인 아연신경독성의 AMPK 활성을 억제하는 새로운 화합물을 처리하여 뇌졸중 치료하는 새로운 뇌졸중 치료용 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

고재영

서울특별시 강남구 광평로51길 22 한아름아파트 101-1206

엄재원

경기도 구리시 장자대로37번길 55 덕현아파트 107동 1702호

김태윤

서울특별시 광진구 광나루로30나길 22, 302호

서보라

서울특별시 송파구 토성로17길 8, 303호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2009-0081490
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 뇌과학원천기술개발사업
연구과제명 NAD 중심의 신경세포사 기전에 근거한 뇌질환 제어기술 개발
기 여 율 70/100
주관기관 세종대학교 산학협력단
연구기간 2009.05.01 ~ 2014.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

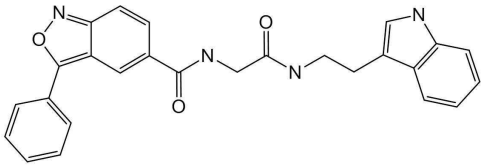
과제고유번호 NRF-2011-0016050
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 카텝신 효소 및 자식작용 중심의 퇴행성신경계질환 연구
기 여 율 30/100
주관기관 세종대학교 산학협력단
연구기간 2011.05.01 ~ 2014.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 구조식을 갖는 화합물을 유효성분으로 함유하는 뇌졸중 치료용 약학적 조성물:



.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 뇌졸중은 출혈성(hemorrhagic) 뇌졸중, 허혈성(ischemic) 뇌졸중 또는 금속 독성(metal toxicity) 뇌졸중인 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 금속은 납(lead), 수은(mercury), 망간(manganese), 비소(arsenic), 탈륨(thallium), 철(iron), 아연(zinc), 카드뮴(cadmium), 비스무스(bismuth) 또는 주석(tin)인 약학적 조성물.

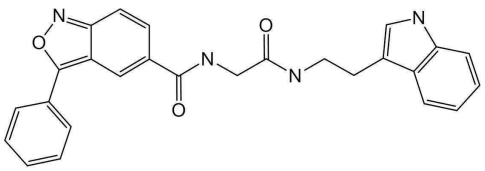
청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 허혈성 뇌졸중은 흥분성 신경세포사 또는 산화성 신경세포사에 의해 유발되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

하기 구조식을 갖는 화합물을 뇌졸중에 걸린 인간을 제외한 포유동물 개체에 투여하는 단계를 포함하는 인간을 제외한 포유동물의 뇌졸중 치료방법:



.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 투여는 경구 투여 또는 정맥내 주입, 피하주입, 근육내 주입, 뇌실내 주입(intracerebroventricular injection), 뇌척수액내 주입(intracerebrospinal fluid injection), 근육내 주입 및 경피흡수로 구성되는 군으로부터 선택되는 비경구 투여인, 인간을 제외한 포유동물의 뇌졸중 치료방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 뇌졸중 치료용 약학적 조성물 및 방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 AMPK 억제기능에 기반한 새로운 뇌졸중 치료용 약학적 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 뇌졸중(腦卒中, stroke)은 뇌혈류 이상으로 인해 갑작스레 유발된 국소적인 신경학적 증상을 통칭하는 말이다. 뇌는 몸 전체에서 무게로는 체중의 2%만 차지하지만, 뇌로 가는 혈류량은 심박출량의 15%, 산소 소모량은 몸 전체 산소 소모량의 20%나 된다. 게다가 뇌는 에너지원으로 포도당만을 사용하므로 에너지 공급이 잠시만 중단되어도 쉽게 괴사가 일어난다. 따라서 뇌혈류의 이상은 뇌손상과 밀접한 관련이 있다. 뇌졸중에 의한 뇌손상은 흥분독성(excitotoxicity), 산화성손상(oxidative stress), 아폽토시스(apoptosis) 및 아연독성(zinc neurotoxicity) 등의 다양한 독성기전을 포함하고 있어 뇌손상을 막기 위해서는 다양한 신경독성에 모두 효과적인 약물의 발굴이 필요하다.

[0003] 현재, 뇌졸중 치료를 위한 많은 연구가 진행되었으나 아직까지 뚜렷한 치료제 개발이 되고 있지 않다. 뇌허혈-재관류 손상은 여러 가지 복잡한 신경세포사 기전에 입각한 약물 개발 및 효과 평가를 위해 시험관내 모델이나 동물 모델과 같은 객관적인 평가 시스템이 필요하나 약물치료에 다른 생체 징후의 변화나 부작용을 평가할 수 있는 방법이 전임상 연구에서는 매우 제한적이어서 임상 시험 시 부작용으로 인한 실패를 초래할 가능성이 높다. 특히 NMDA 길항제(antagonist)를 중심으로 많은 임상연구들이 진행되었으나 모두 실패하였다.

[0004] 대한민국 공개특허 제1283416호는 AMPK 저해제 화합물 C 또는 FAS 저해제 C75를 허혈성 마우스에 투여하여 경색부의 크기를 유의하게 감소시켜 뇌졸중 또는 허혈성 상해 후 기능이 보존 되게 하는 신경보호 방법에 대해 개시하고 있다.

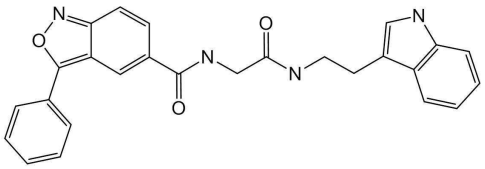
발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 그러나, 상기 선행기술의 경우 허혈 모델 동물에 대하여만 뇌신경보호 효과를 입증한 것으로서 허혈이 아닌 다른 기전에 의한 뇌졸중에 대한 치료효과까지 보증하는 것은 아니다. 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 다양한 기전에 의한 뇌졸중에 효과적인 AMPK 억제기능에 기반한 새로운 뇌졸중 치료제를 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

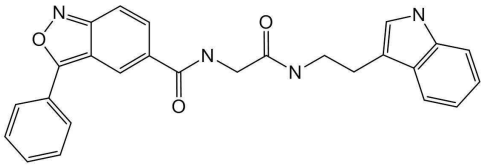
과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 일관점에 따르면, 하기 구조식을 갖는 화합물을 유효성분으로 함유하는 뇌졸중 치료용 약학적 조성물이 제공된다:



[0007] .

[0008] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 하기 구조식을 갖는 화합물을 뇌졸중에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌졸중의 치료방법이 제공된다:



[0009] .

발명의 효과

[0010] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 뇌졸중의 주요 원인인 아연신경독성의 AMPK 활성을 억제하는 새로운 화합물을 처리하여 뇌졸중 치료효과를 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범

위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 배양된 대뇌피질 신경세포에 아연처리 후 신경독성이 증가되었음을 TUNEL 염색으로 확인한 사진(A)과 AMPK 억제제인 Compound C (+Cpd C) 처리 후 세포독성 정도를 TUNEL 염색과 LDH assay를 통해 정량화한 그래프이다(B 및 C).

도 2는 배양된 대뇌피질 신경세포에 아연처리 후 AMPK 활성이 증가됨을 확인한 Western blot 사진(A)과 enzyme activity assay(B) 그래프이다.

도 3은 배양된 대뇌피질 신경세포에 아연처리 후 아폽토시스 촉진 유전자인 Bim의 발현증가와 caspase-3 활성을 관찰한 Western blot 사진(A)과 AMPK 억제제인 Compound C (+Cpd C) 처리 후 Bim 발현증가와 caspase-3 활성이 모두 감소된 것을 확인한 Western blot 사진(B)이다.

도 4는 AMPK activity assay kit(CycLex, Japan)와 recombinant AMPK (α2/β1/γ1; CycLex, Japan)를 구입하여 효소활성을 측정하고 compound C 효과와 비교하여 비슷하거나 좀 더 강한 억제효과를 나타내는 40개의 후보 화합물을 선별한 그래프이다.

도 5는 배양된 대뇌피질 신경세포에 다양한 신경독성을 유발한 뒤, 선별된 7개의 화합물을 처리하고 아폽토시스 정도를 LDH assay를 통해 정량화하여 아폽토시스 억제 여부를 관찰한 그래프이다.

도 6은 뇌졸중 동물모델에 최종 선별된 약물 #35를 투여하여 뇌손상 억제효과를 관찰한 그래프와 실험동물의 뇌손상 정도를 대조군과 비교한 그림이다.

도 7은 최종 선별된 약물 #35를 랫트에 투여하고 비장(A), 간(B) 및 신장(C)을 적출하여 급성 독성 테스트 결과를 나타낸 그래프이다.

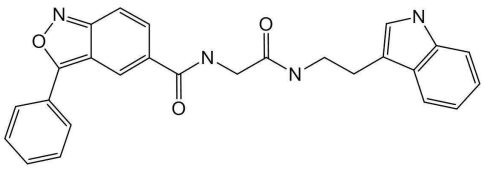
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] **용어의 정의:**

[0013] 본 문서에서 사용되는 "AMPK(AMP-activated protein kinase)"는 촉매 α 서브유닛(α1 또는 α2), 및 2개의 조절 서브유닛(β 및 γ)으로 구성된 헤테로삼량체 단백질이다. AMPK는 세포 에너지 수준이 낮을 때 인산화되고 활성화되며 다시 세포 대사 작용을 조절하여 유전자 발현을 장기간에 걸쳐 조절하여 ATP의 수준을 회복한다. AMP/ATP 비의 증가, 세포 pH 및 산화 환원 상태의 변화 및 크레아틴/포스포크레아틴 비의 증가가 AMPK를 활성화시키는 것으로 공지되어 있다.

[0014] **발명의 상세한 설명:**

[0015] 본 발명의 일 관점에 따르면, 하기 구조식을 갖는 화합물을 유효성분으로 함유하는 뇌졸중 치료용 약학적 조성물이 제공된다:

[0016] 

[0017] 상기 화합물 IUPAC 명칭은 N-[2-[2-(1H-indol-3-yl)ethylamino]-2-oxoethyl]-3-phenyl-2,1-benzoxazole-5-carboxamide으로서, 상기 화합물은 AMPK(AMP-activated protein kinase) 효소 활성을 억제하여 신경보호 효과를 제공하며, 상기 AMPK 효소는 α2 서브유닛이 키나아제 효소활성 가지고 있다.

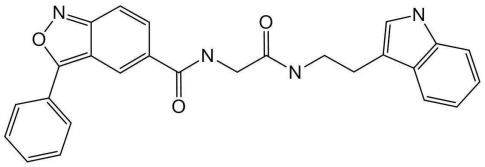
[0018] 상기 뇌졸중은 출혈성(hemorrhagic) 뇌졸중, 허혈성(ischemic) 뇌졸중 및 금속 독성(metal toxicity) 뇌졸중일 수 있다.

[0019] 상기 금속은 납(lead), 수은(mercury), 망간(manganese), 비소(arsenic), 탈륨(thallium), 철(iron), 아연(zinc), 카드뮴(cadmium), 비스무스(bismuth) 또는 주석(tin)일 수 있다.

[0020] 상기 허혈성 뇌졸중은 흥분성 신경세포사 또는 산화성 신경세포사에 의해 유발되는 뇌졸중일 수 있다. 지금까지

가장 널리 알려진 뇌허혈에 의한 신경세포사 기전으로는 2가지가 있다. 하나는 뇌허혈에 의해서 세포바깥에 과도한 글루타메이트(glutamate)가 축적되게 되며, 이러한 글루타메이트가 세포 내로 유입되어 결국 과도한 세포내 칼슘의 축적으로 신경세포사가 유발된다는 흥분성 신경세포사 기전(Kang TC, *et al., J.Neurocytol.*,30:945-955,2001)이고, 다른 하나는 허혈-재관류시에 갑작스러운 산소 공급으로 인한 생체 내 라디칼의 증가로 인해 DNA 및 세포질에 손상을 입어 유발된다는 산화성 신경세포사이다(Won MH, *et al., BrainRes.,* 836: 70-78, 1999; Sub AY., Chen YM., *J. Biomed. Sci.,* 5: 401-414, 1998; Flowers F, Zimmerman JJ. *New Horiz.* 6: 169-180, 1998).

[0021] 본 발명의 다른 관점에 따르면, 하기 구조식을 갖는 화합물을 뇌졸중에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌졸중의 치료방법이 제공된다:

[0022] 

.

[0023] 상기 투여는 경구 투여 또는 정맥내 주입, 피하주입, 뇌실내 주입(intracerebroventricular injection), 뇌척수액내 주입(intracerebrospinal fluid injection), 근육내 주입 및 경피흡수로 구성되는 군으로부터 선택되는 비경구 투여일 수 있다.

[0024] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 화합물의 유효량은 환자의 환부의 종류,적용부위, 처리회수, 처리시간, 제형, 환자의 상태, 보조제의 종류 등에 따라 변할수 있다. 사용량은 특별히 한정되지 않지만, 0.01μg/kg/day 내지 10 mg/kg/day일일 수 있다. 상기 1일량은 1일에 1회, 또는 적당한 간격을 두고 하루에 2~3회에 나눠 투여해도 되고, 수일(數日) 간격으로 간헐(間歇)투여해도 된다.

[0025] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 화합물은, 조성물 총 중량에 대하여 0.1-100 중량%로 함유될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 약학적 조성물의 제조에는 고체 또는 액체의 제제용 첨가물을 사용할 수 있다. 제제용 첨가물은 유기 또는 무기 중 어느 것이어도 된다.

[0026] 부형제로서는 예를 들면 유당, 자당, 백당, 포도당, 옥수수 전분(cornstarch), 전분, 탈크, 소르비트, 결정 셀룰로오스, 덱스트린, 카올린, 탄산칼슘 및 이산화규소 등을 들 수 있다. 결합제로서는 예를 들면 폴리비닐알코올, 폴리비닐에테르, 에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 아라비아고무, 트래거캔스(tragacanth),젤라틴, 셀락(shellac), 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 구연산칼슘, 덱스트린 및 펙틴(pectin) 등을 들 수 있다. 활택제로서는 예를 들면 스테아린산마그네슘, 탈크, 폴리에틸렌글리콜, 실리카, 경화식물유 등을 들 수있다. 착색제로서는 통상 의약품에 첨가하는 것이 허가되어 있는 것이라면 모두 사용할 수 있다. 이들의 정제, 과립제에는 당의(糖衣), 젤라틴코팅, 기타 필요에 따라 적절히 코팅할 수 있다. 또한, 필요에 따라 방부제, 항산화제 등을 첨가할 수있다.

[0027] 본 발명의 약학적 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며(예: 문헌[Remington's Pharmaceutical Science, 최신판;Mack Publishing Company, Easton PA), 제제의 형태는 특별히 한정되는 것은 아니다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌[Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042(Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기술되어 있다.

[0028] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 화합물은 경구 또는 비경구로 투여되는 것이 가능하며, 바람직하게는 비경구 투여로 정맥내 주입, 피하 주입, 뇌실내 주입(intracerebroventricular injection), 뇌척수액내 주입(intracerebrospinal fluid injection), 근육내 주입 및 복강 주입 등으로 투여할 수 있다.

[0029] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0030] **일반적 방법**

[0031] **대뇌피질 신경세포(Cerebral Cortex Neurons) 배양**

[0032] 본 발명에서 사용한 마우스 대뇌피질 신경세포는 마우스 배아의 뇌로부터 추출 배양하여 5% 우태아혈청(FBS)과 5% 마혈청(HS)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's mediuM(DMEM, Gibco, Grand Island, NY, US)을 이용하여 95% 습도, 5% CO_2 및 37℃ 온도 조건에서 배양하였다. 상기 세포의 활성화와 분화를 위해 24-well 조직 배양 플레이트에서 2 x10^4 세포의 밀도로 증식하였고 아연 및 화합물을 처리하기 전에는 FBS와 HS가 없는 DMEM 배지에서 배양하였다.

[0033] **실시예 1: AMPK 억제제에 의한 세포독성 감소확인**

[0034] 아연독성(Zinc toxicity)은 뇌졸중의 대표적인 원인기전 중 하나로서, 상기 배양된 대뇌피질 신경세포에서 유발된 아연독성이 AMPK 억제제 처리에 따른 독성 감소여부를 확인하였다.

[0035] 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 배양된 대뇌피질 신경세포에 300 uM의 아연($ZnCl_2$)을 10분간 처리한 후 제거하고 10시간 후에 세포독성(Cytotoxicity)을 TUNEL 염색 또는 LDH(Lactate Dehydrogenase) 분석을 통해 관찰하였다. 또한 상기 세포에 AMPK 억제제인 Compound C(=Cpd C, Tocris)를 20 uM로 처리한 후 신경독성 감소를 관찰하였다.

[0036] 그 결과, 대뇌피질 신경세포에 아연 처리 후 신경독성이 증가되었음을 TUNEL 염색으로 확인하였고(도 1A) 세포독성 정도를 TUNEL 염색과 LDH 분석을 통해 정량화하고 AMPK 억제제인 Compound C(=Cpd C) 처리에 의해 아연신경독성이 현저히 감소했음을 확인하였다(도 1B 및 1C).

[0037] **실시예 2: 아연처리 후 AMPK 활성 관찰**

[0038] 아연독성과 AMPK 효소 활성간의 상관관계를 파악하고자 대뇌피질 신경세포에 아연 처리 후 AMPK 활성을 웨스턴 블랏과 효소활성 분석을 통해 관찰하였다.

[0039] **2-1: 웨스턴 블랏(Western blot)**

[0040] 배양된 대뇌피질 신경세포에 300 uM의 아연($ZnCl_2$)을 10분간 처리한 후 제거하고 0.5, 1, 2, 4, 6시간 후에 상기 세포 샘플을 단백질 레더와 함께 폴리아크릴아마이드 겔에 로딩하고 단백질 크기에 따라 분리하였다. 그 후, 항체를 처리하고 세척한 뒤 판독하였다.

[0041] 그 결과, 아연처리 후 30분 후부터 AMPK alpha-1과 alpha-2의 트레오닌 잔기(threonine residue)에 인산화됨이 관찰되었는데 이는 AMPK 활성(phosphorylated AMPK)을 의미한다. 그러나 다른 세린 잔기(serine residue)의 인산화는 관찰되지 않았다(도 2A).

[0042] **2-2: 효소활성 분석(enzyme activity assay)**

[0043] 대뇌피질 신경세포에 상기와 같은 조건으로 아연을 처리한 후 0.5, 1, 2, 4 및 6시간 경과에 따라 각각 단백질 추출물을 얻어 AMPK activity assay kit(CycLex, Japan)를 이용하여 효소활성을 측정하였다.

[0044] 그 결과, 아연 처리에 따른 AMPK 효소의 활성은 시간 의존적(Time-dependent) 으로 증가하는 것을 관찰하였다(도 2B).

[0045] **실시예 3: AMPK 활성억제를 통한 아연독성 억제**

[0046] 대뇌피질 신경세포에 아연을 처리하여 AMPK 효소 활성이 증가하는 것이 세포사멸(apoptosis)과 관련이 있는지 관찰하였다.

[0047] 구체적으로, 대뇌피질 신경세포에 300 uM의 아연($ZnCl_2$)을 2, 3, 4, 5 및 6시간 동안 처리하여 아연독성을 유발하였다. 상기 각 샘플의 단백질을 분리하여 웨스턴 블랏을 실시하였고 AMPK 억제제인 Compound C(=Cpd C)를 20 uM로 처리하여 아연독성과 아폽토시스와의 관계를 확인하였다.

[0048] 그 결과, 아연 처리 후 3시간 이후부터 BH3-only Bcl family 중에 하나인 아폽토시스 촉진 단백질(pro-apoptotic protein)인 Bim의 발현 증가가 관찰되었고caspase-3 활성도 관찰할 수 있었다(도 3A). 그러나 아연독성에 의한 Bim의 증가와 caspase-3 활성 증가가 AMPK 억제제인 compound C 처리에 의해 모두 감소된 것을 확인하였다(도 3B). 그러므로 AMPK 효소는 아연독성 기전에서 아폽토시스(apoptosis)와 관련되어 있으며 AMPK 효소의 활성억제는 아연독성에 의한 아폽토시스를 억제하는 것을 의미한다.

[0049] **실시예 4: AMPK 활성억제 화합물 스크리닝 및 억제효과 확인**

[0050] **4-1: 구조기반 가상 스크리닝(Structure-based virtual screening)**

[0051] AMPK 활성억제제로 작용할 가능성이 있는 화합물을 대상으로 1차 스크리닝을 실시하였다.

[0052] 구체적으로, 상기 선행연구를 통해 AMPK 활성이 아연독성 기전에 관련되어 있음을 확인하였고, 다른 연구논문에서도 흥분독성 기전에서 AMPK 활성 및 Bim 발현 증가가 보고되었다. AMPK 효소는 α, β 및 γ 3개의 서브유닛이 복합구조를 이루어 작용하는 효소로, 이중 alpha 서브유닛이 키나아제 효소활성을 가지고 있다. 기존의 연구결과에서 AMPK alpha2가 alpha1과 달리 넉-아웃 마우스(knock-out mice)에서 허혈(ischemia)에 의한 신경독성을 현저히 억제한다고 보고하였다. 따라서 본 발명은 alpha2를 타겟으로 하여 AMPK 효소활성을 억제할 가능성이 있는 후보 케미컬(chemicals)을 구조기반 가상 스크리닝(Structure-based virtual screening)을 통해 선별하였고 결론적으로 208개의 후보 화합물이 선별되었다.

[0053] **4-2: AMPK 효소활성 분석(AMPK enzyme activity assay)**

[0054] 상기 실시예 4-1에서 선별된 화합물 208개를 화합물 라이브러리 제조회사(Interbioscreen, Russia)로부터 입수하여 이들의 AMPK 효소활성 억제효과 관찰을 통해 2차 스크리닝을 실시하였다.

[0055] 구체적으로, AMPK 효소활성은 AMPK activity assay kit(CycLex, Japan)와 recombinant AMPK(α2/β1/γ1; CycLex, Japan)를 이용하여 측정하였다. 상기 선별된 208개의 화합물과 기존에 잘 알려진 AMPK 억제제 compound C의 AMPK 효소활성 억제 효과를 측정한 결과, 40개의 약물이 10 μM에서 compound C와 비슷하거나 더 좋은 억제효과를 나타내는 것을 확인하였다(표 1). 상기 40개의 약물을 하기 표 1에 표시하였다.

표 1

[0056]

Compound ID	Mean (% remaining activity)	SEM		Compound ID	Mean (% remaining activity)	SEM
#1	-1.2626	1.768		#22	-0.5291	0.000
#2	-1.7934	0.072		#23	1.0582	0.000
#3	-0.9684	0.036		#24	5.0505	5.051
#4	5.5556	0.265		#25	-0.1793	0.538
#5	4.2328	0.529		#26	-1.2554	0.036
#6	2.3810	0.794		#27	5.8201	0.000
#7	3.4392	0.265		#28	3.9683	1.852
#8	-0.2152	0.215		#29	0.0000	0.000
#9	0.5739	0.359		#30	1.0000	0.667
#10	-0.3945	0.179		#31	0.3641	0.850
#11	5.2910	0.529		#32	0.1257	0.126
#12	-1.3245	0.662		#33	2.9801	2.980
#13	-0.9684	0.681		#34	0.3143	0.566
#14	-0.1435	0.000		#35	0.1214	0.121
#15	5.0265	0.265		#36	0.2514	0.126
#16	6.3492	0.529		#37	7.3333	1.000
#17	2.9101	0.265		#38	5.6667	4.667
#18	2.9053	0.681		#39	1.667	3.333
#19	4.3400	1.614		#40	3.6667	0.000
#20	-1.7575	0.036		Compound C	5.3000	0.760
#21	0.8967	0.251				

[0057] **4-3: 아연독성 억제효과 관찰**

[0058] 상기 실시예 4-2에서 선별된 화합물 40 개의 아연 신경독성 억제효과 관찰을 통해 3차 스크리닝을 실시하였다.

[0059] 구체적으로, 배양된 마우스의 대뇌피질 신경세포에 400 uM의 아연을 10분간 처리하고 제거한 후 12시간이 경과한 시점에서 상기 선별한 40개의 약물들을 각각 아연과 함께 처리하여 신경보호효과를 관찰하였다. 상기 세포의 사멸 정도는 LDH 분석을 통해 정량화하였는데 각각의 효과를 평균하여 수치로 나타내었고 선별된 각각의 약물들에 대해 별도의 실험을 4회 수행하였다(도 4).

[0060] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 일부 화합물은 아연독성에 의한 세포사멸을 억제하였는데, 표 2에 나타난

바와 같이 이 중 7개의 화합물(#6, #11, #14, #17, #28, #35 및 #37)이 아연독성을 유의하게 억제하는 것으로 확인되었다.

표 2

[0061]

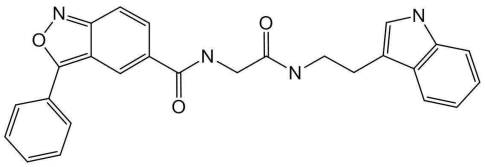
Compound ID	유의성		Compound ID	유의성
#1	0.5487		#22	0.0200
#2	0.8483		#23	0.8757
#3	0.5597		#24	0.8699
#4	0.0283		#25	0.4870
#5	0.9326		#26	0.6624
#6	0.0278		#27	0.3030
#7	0.0003		#28	0.0008
#8	0.0001		#29	0.1137
#9	0.8649		#30	0.2142
#10	0.1253		#31	0.1777
#11	0.0311		#32	0.7276
#12	0.0000		#33	0.2386
#13	0.4384		#34	0.1043
#14	0.0220		#35	0.0016
#15	0.2378		#36	0.0381
#16	0.2488		#37	0.0290
#17	0.0048		#38	0.3225
#18	0.3961		#39	0.0027
#19	0.7590		#40	0.0390
#20	0.8889		Compound C	0.0003
#21	0.6141			

[0062] **4-4: 다양한 신경독성에 대한 억제효과 관찰**

[0063] 상기 실시예 4-3에서 선별한 7개 화합물의 신경독성 억제효과 관찰을 통해 4차 스크리닝을 실시하였다.

[0064] 구체적으로, 배양된 마우스의 대뇌피질 신경세포에 50 μM NMDA, 50 μM $FeCl_2$, 100 uM H_2O_2, 2 μM TPEN(N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine, Sigma), 500 nM 스토로스포린(staurosporine, Abchem) 및 10 μM 에토포사이드(etoposide, Sigma)를 각각 처리 하여 세포독성을 유발한 후 상기 선별된 7개 화합물을 20 μM의 농도로 처리하여 세포사멸 억제 효과를 관찰하였고 세포사멸 정도는 LDH assay를 통해 정량화하였다. 상기 사용한 신경독성 모델은 뇌졸중의 원인기전으로 생각되는 흥분독성, 산화성 손상 및 세포사멸(apoptosis) 등이 포함되어 있는데 그 중 흥분독성 모델로는 NMDA를 처리하였고, 산화성손상 모델로는 철(iron) 독성과 H_2O_2 독성 모델을 사용하였으며, 세포사멸 모델로는 TPEN, 스토로스포린(staurosporine) 및 에토포사이드(etoposide) 독성모델을 이용하였다. 상기 TPEN은 아연 킬레이터(zinc chelator)로 신경세포에서 전형적인 세포사멸을 유발하는 것으로 잘 알려져 있고, 스토로스포린은 효소활성 억제제(kinase inhibitor)로 역시 대표적인 세포사멸 유발물질 중 하나이며 에토포사이드는 DNA 손상으로 인한 세포사멸을 유발한다고 알려진 약물이다.

[0065] 그 결과, 상기 선별된 7개의 약물을 함께 처리하여 신경독성 감소에 따른 신경보호 효과를 관찰하였는데 특히, 화합물 #35 및 화합물 #28이 모든 독성에 억제효과를 나타냄을 알 수 있었다(도 5). 화합물 #35의 경우, 세포사멸 모델 중에 스토로스포린 독성만 억제하지 못하였으나 이는 스토로스포린이 유발하는 독성기전과 관련된 것으로, 다른 2개의 세포사멸 모델에 효과가 있는 것으로 확인되었으므로 최종 화합물로 선별하였다. 라이브러리 구입처로부터 상기 화합물 #35는 하기와 같은 구조를 갖는 N-[2-[2-(1H-indol-3-yl)ethylamino]-2-oxoethyl]-3-phenyl-2,1-benzoxazole-5-carboxamide임을 확인하였다:

[0066] 

.

[0067] **실시예 5: 뇌졸중 동물모델에서 뇌손상 억제효과 관찰**

[0068] 상기 실시예 4-4에서 최종 선별된 화합물인 #35가 실제 동물 모델에서도 효과적인지 확인하기 위해 상기 화합물을 뇌손상을 유발한 뇌졸중 모델 동물에 처리한 후, 뇌손상 억제효과가 나타나는지 여부를 조사하였다.

[0069] 구체적으로, 8-9 주령이 된 수컷 Sprague-Dawley(SD) 랫트(rat)를 이용하여 영구 중뇌동맥(MCA) 폐쇄모델을 제작하였다. 영구 중뇌동맥 폐쇄(MCAO) 전 30분 및 폐쇄 후 10분경과 시점에서 레이저 도플러 혈류측정기(Laser-Doppler flowmetry)를 이용하여 대뇌 혈류(CBF)를 측정하였고 하기 표 3에 표시하였다. 그 후, 상기 최종 선별된 AMPK 억제제 후보 화합물인 #35(4 ㎕ 내 100 ng) 또는 비히클(10% DMSO)을 MCAO 전 15분에 3.8 mm 깊이로 0.8 mm 후면 및 브레그마의 측면 1.2 mm의 뇌실내 주입(intracerebroventricular injection)하였다. 이 후, 상기 랫트의 운동 결핍(motor deficit) 정도를 평가 하였는데 평가의 기준(Longa *et al.*, 1989)은 결핍을 나타내지 않는 것은 정상(Normal), 수직으로 정지할 때 앞발 연장의 실패는 경증(mild), 반대쪽으로 회전하는 것은 보통(moderate) 및 회전 손실(loss of circling) 또는 정확한 반사작용은 심각한 결핍(severe deficit)으로 분류하였다. 또한, 상기 랫트 모델에 허혈(ischemia)을 유도 후 24시간 경과한 시점에서 뇌를 수득하였고 2% 2,3,5-triphenyl tetrazoliuM chloride(TTC)로 염색하여 뇌경색(cerebral infarction) 정도를 측정하였다.

[0070] 그 결과, 본 발명을 통해 발굴된 최종 후보 화합물인 화합물 #35이 뇌졸중 동물모델 중 하나인 영구 중뇌동맥 폐쇄(permanent middle cerebral artery occulusion)에 따른 뇌손상을 현저하게 억제시킴을 최종 확인하였다(도 6).

표 3

[0071]

	Veh	AMPK 억제제
CBF(% of baseline)	36.9+2.5	38.4+2.4
Weight reduction(g)	48.8+2.9	40.0+3.5

[0072] **실시예 6: 급성 독성 테스트(Acute toxicity test)**

[0073] 상기 최종 선별된 화합물인 #35을 랫트에 주입하고 급성 독성 결과를 관찰하였다.

[0074] 구체적으로, 8-9 주령된 수컷 Sprague-Dawley(SD) 랫트에 상기 최종 선별된 AMPK 억제제 후보 화합물인 화합물 #35을 랫트 1 마리 당 100 μg/kg 또는 비히클(10% DMSO)을 정맥내 주입(intravenous injection)하였고 이를 4회 반복하였다.

[0075] 그 결과, 24시간 경과 후에도 죽는 랫트는 발견되지 않았고 랫트를 희생시켜 간, 비장 및 신장 장기들을 적출하여 무게를 측정하였고, 상기 랫트의 혈액을 채취하여 WBC, RBC, BUN, AST, ALT, CREA 및 GLU 등의 지표 결과를 확인하였으나 대조군과 비교하여 대부분의 지표가 정상으로 나타났으며 눈에 띄는 독성을 관찰되지 않았다(도 7). 상기 지표에 대한 결과를 하기 표 4에 표시하였다.

표 4

[0076]

	정상 범위	**Veh(n=4)**	**AMPK 억제제(n=4)**
WBCB($x10^3$ cell/uL)	6.6 - 12.6	10.5 ㅁ 3.5	9.9 ㅁ 2.5
RBC($x10^3$ cell/uL)	6.8 - 9.8	6.7 ㅁ 0.5	6.4 ㅁ 0.3
BUN(mg/dL)	5 - 21	16.9 ㅁ 2.0	15.2 ㅁ 1.8
AST(U/L)	45.7 - 80.8	64.2 ㅁ 5.0	91.2 ㅁ 15.3
ALT(U/L)	17.5 - 30.2	38.9 ㅁ 0.4	40.2 ㅁ 5.0
CREA(mg/dL)	0.2 - 0.8	0.4 ㅁ 0.1	0.4 ㅁ 0.0
GLU(mg/dL)	50 - 135	175.5 ㅁ 26.5	162.1 ㅁ 13.2

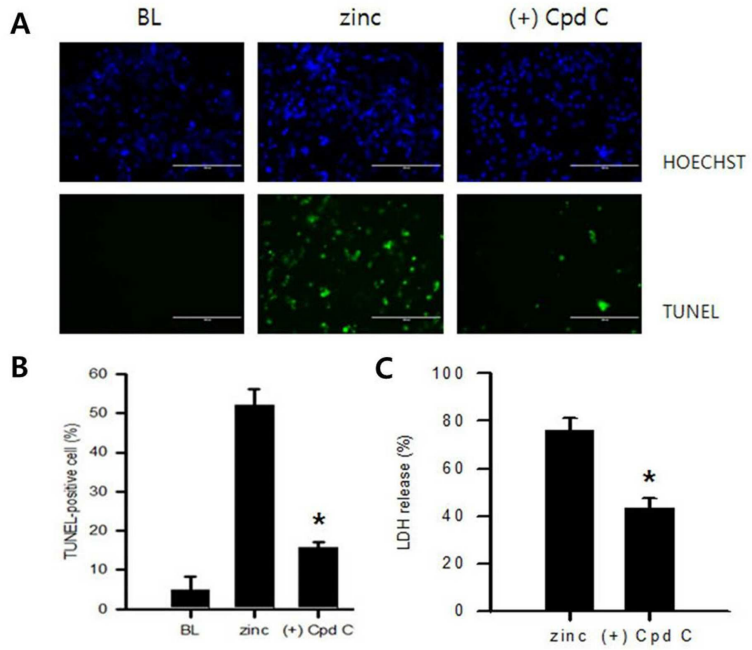
[0077] 상기 결과들을 종합해보면, AMPK 효소가 뇌졸중의 원인기전 중 하나로 생각되는 아연독성에 중요한 역할을 하고 있음을 발견하여 AMPK 효소 활성을 억제기능을 가지고 있는 새로운 화합물 후보군에서 여러 차례 스크리닝을 실시하여 탁월한 아연독성에 효과를 보인 화합물 #35을 최종 선별하고 뇌졸중 동물모델에 처리한 결과 현저하게 뇌손상을 억제됨을 확인하였으므로 AMPK 억제기능에 기반한 새로운 뇌졸중 치료제로 활용 가능하다.

[0078] 본 발명은 상술한 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식

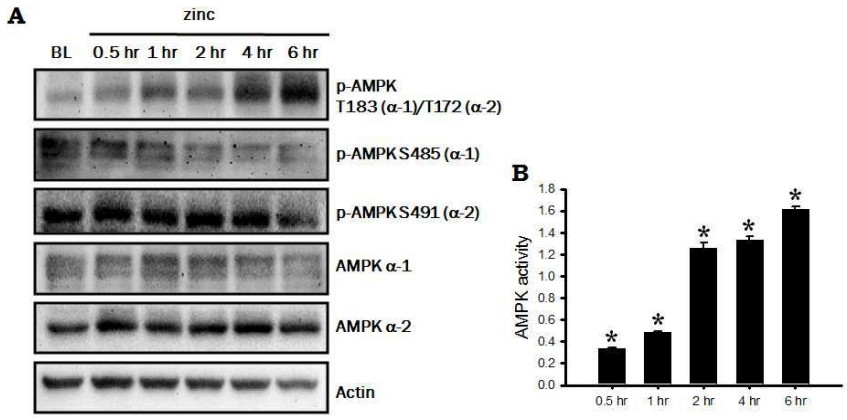
을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

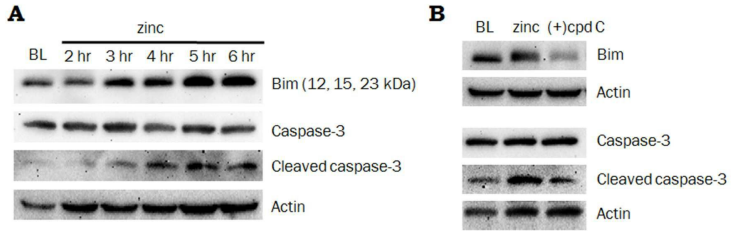
도면1



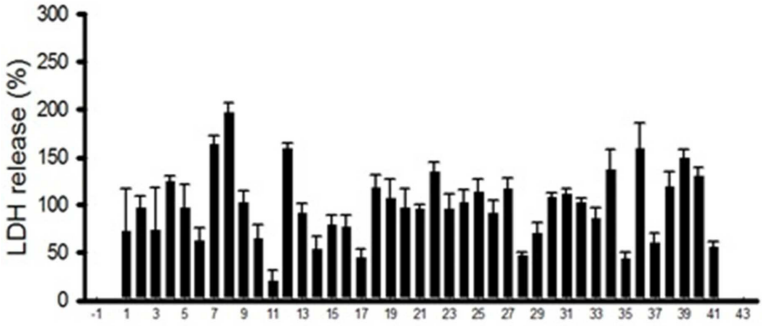
도면2



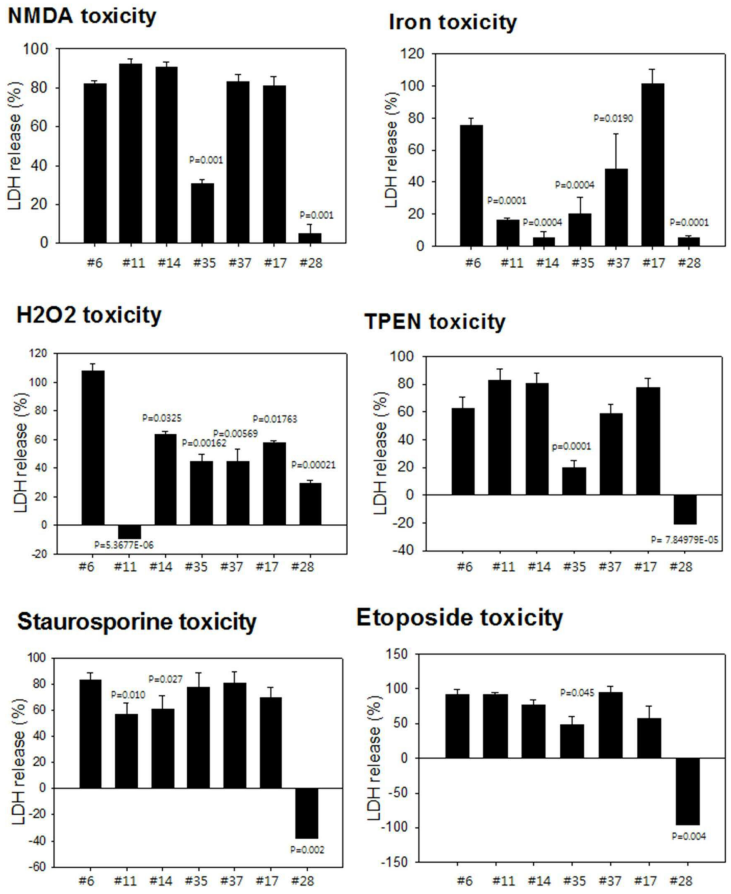
도면3


A
zinc
BL
2 hr
3 hr
4 hr
5 hr
6 hr
Bim (12, 15, 23 kDa)
Caspase-3
Cleaved caspase-3
Actin
B
BL
zinc
(+)cpd C
Bim
Actin
Caspase-3
Cleaved caspase-3
Actin

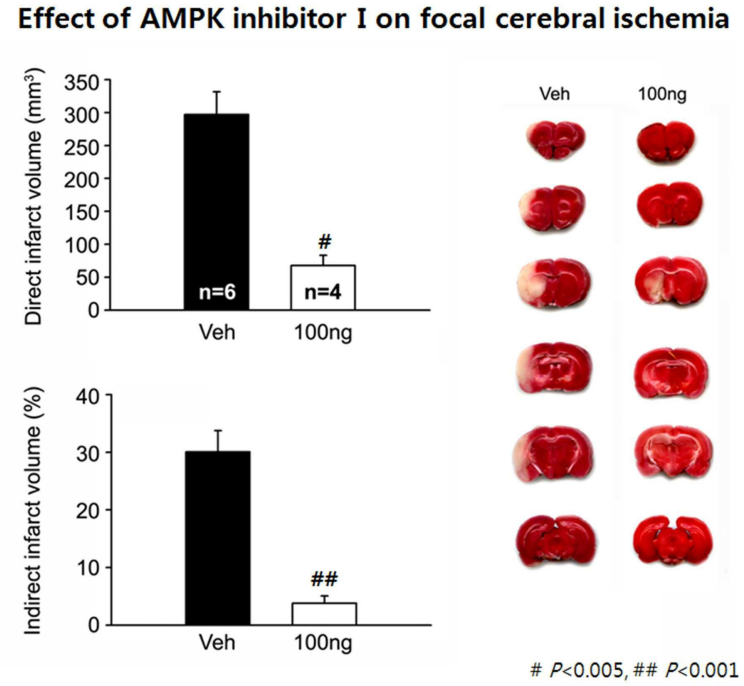
도면4


LDH release (%)
300
250
200
150
100
50
0
-1 1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43

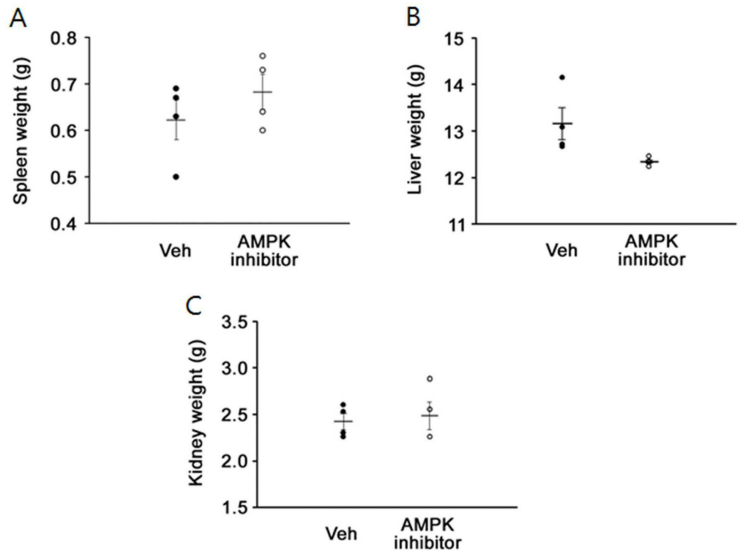
도면5


NMDA toxicity
LDH release (%)
P=0.001
P=0.001
#6 #11 #14 #35 #37 #17 #28
Iron toxicity
LDH release (%)
P=0.0001
P=0.0004
P=0.0004
P=0.0190
P=0.0001
#6 #11 #14 #35 #37 #17 #28
H2O2 toxicity
LDH release (%)
P=0.0325
P=0.00162
P=0.00569
P=0.01763
P=0.00021
P=5.3677E-06
#6 #11 #14 #35 #37 #17 #28
TPEN toxicity
LDH release (%)
p=0.0001
P= 7.84979E-05
#6 #11 #14 #35 #37 #17 #28
Staurosporine toxicity
LDH release (%)
P=0.010
P=0.027
P=0.002
#6 #11 #14 #35 #37 #17 #28
Etoposide toxicity
LDH release (%)
P=0.045
P=0.004
#6 #11 #14 #35 #37 #17 #28

도면6


Effect of AMPK inhibitor I on focal cerebral ischemia
Direct infarct volume (mm³)
350
300
250
200
150
100
50
0
n=6
n=4
#
Veh
100ng
Indirect infarct volume (%)
40
30
20
10
0
##
Veh
100ng
Veh
100ng
# P<0.005, ## P<0.001

도면7


A
Spleen weight (g)
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
Veh
AMPK inhibitor
B
Liver weight (g)
15
14
13
12
11
Veh
AMPK inhibitor
C
Kidney weight (g)
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
Veh
AMPK inhibitor