



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년05월02일
(11) 등록번호 10-1727000
(24) 등록일자 2017년04월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) A61K 31/05 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7003123
(22) 출원일자(국제) 2010년06월29일
심사청구일자 2015년06월25일
(85) 번역문제출일자 2012년02월03일
(65) 공개번호 10-2012-0088648
(43) 공개일자 2012년08월08일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2010/051066
(87) 국제공개번호 WO 2011/001169
국제공개일자 2011년01월06일
(30) 우선권주장
0911580.9 2009년07월03일 영국(GB)
(56) 선행기술조사문헌
W02009007697 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
지더블유 파마 리미티드
영국 윌트셔 에스피4 0제이큐 솔즈베리 포턴 다운
사이언스 파크
오쓰까 세이아꾸 가부시키키가이샤
일본 도쿄도 지요다꾸 간다-쓰까사마치 2-9
(72) 발명자
웨일, 벤
영국, 레딩 알지6, 6에이피, 피오 박스 226, 화이
트나이트, 유니버시티 오브 레딩, 스쿨 오브 파머
시
스티븐, 게리
영국, 레딩 알지6, 6에이피, 피오 박스 226, 화이
트나이트, 유니버시티 오브 레딩, 스쿨 오브 파머
시
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 강덕희

(54) 발명의 명칭 간질을 치료하기 위한 식물-칸나비노이드의 단독 또는 배합의 용도

(57) 요약

본 발은 간질의 치료에 있어서, 하나 또는 그 이상의 칸나비노이드(cannabinoids)의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 전신발작 또는 부분발작을 치료하기 위한 칸나비노이드의 단독 또는 배합에 용도에 관한 것이다. 하나의 실시예에서, 본 발명은 순수 또는 분리된 화합물, 또는 자연적으로 존재하는 THC의 유의적인 양이 제거된 식물추출물에서의 칸나비노이드 THCV의 용도에 관한 것이다. 또 다른 실시예에서, 식물칸나비노이드는 CBD이다.

(72) 발명자

윌리엄스, 클레이

영국, 레딩 알지6, 6에이피, 파오 박스 226, 화이트나이트, 유니버시티 오브 레딩, 스쿨 오브 파머시

가이, 제프리

지더블유 파마슈티컬스 리미티드, 포턴 다운 사이언스 파크, 솔즈베리 에스피4 0제이큐, 영국

라이트, 스티븐

지더블유 파마슈티컬스 리미티드, 포턴 다운 사이언스 파크, 솔즈베리 에스피4 0제이큐, 영국

키쿠치, 텃슈로

일본, 오사카 6410045, 오사카시, 도쇼마오히 큐오쿠, 1-7-1, 오쓰카 파마슈티컬 컴패니 리미티드 내

명세서

청구범위

청구항 1

칸나비디올(CBD)은 일일 투여량 400 mg 내지 800 mg을 제공할 수 있는 양으로 존재하는 유효성분으로서 CBD를 포함하는 부분발작의 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 부분발작은 강직성-간대 발작(tonic-clonic seizure)으로 발전하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 CBD는 테트라하이드로칸나비바린(THCV)과 배합하여 사용되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 THCV는 최소한 일일 투여량 1.5 mg을 제공할 수 있는 양으로 존재하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 THCV는 최소한 일일 투여량 15 mg을 제공할 수 있는 양으로 존재하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8

제 1항의 약학적 조성물, 또는 제 5항의 THCV와 배합에 있어서, CBD 단독 또는 THCV와 배합된 CBD는 대마초 식물 추출물로서 존재하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 대마초 식물 추출물은 대마초 식물 추출물에 존재하는 칸나비노이드(cannabinoids)의 비율로서 5% 중량 미만의 테트라하이드로칸나비놀(THC)을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 대마초 식물 추출물은 대마초 식물 추출물에 존재하는 칸나비노이드(cannabinoids)의 비율로서 1% 중량 미만의 테트라하이드로칸나비놀(THC)을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 11

제 1항의 약학적 조성물 단독, 또는 제 5항의 THC와 배합에 있어서, CBD 단독 또는 THC와 배합된 CBD는 순수하게 또는 분리된 칸나비노이드로 존재하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 12

칸나비디올(CBD)을 포함하는 부분발작의 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 13

칸나비디올(CBD)을 포함하는 부분발작의 치료를 위한 약제의 제조를 위한 약학적 조성물.

청구항 14

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 간질을 치료하기 위한 식물-칸나비노이드의 단독 또는 배합의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 전신발작을 치료하기 위한 트라하이드로칸나비바린(THCV) 및/또는 전신발작 및/또는 부분발작(측두엽 발작에 대조하여)을 치료하기 위한 칸나비디올(CBD)의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 간질은 세계적으로 대략 5천만 명에서 발생하는 다양한 질환에 존재하는 만성적인 신경 장애를 말한다(Sander, 2003).

[0003] 신체 내부 ‘엔도칸나비노이드’ 시스템의 이해가 발달함으로써, 몇몇 대마초에서 유래된 약품은 중추 신경계에 과잉 민감성 장애를 치료할 수 있는 가능성이 있음을 제안하고 있다(Mackie, 2006, Wingerchuk, 2004, Alger, 2006).

[0004] 대마초는 경련발현전구제(Brust et al., 1992) 및 경련억제의 효과가 있음이 밝혀졌다. 따라서, 칸나비노이드가 새로이 밝혀진 치료용 경련억제제인지 아니면, 반대로 대마초를 기호성으로 및 의료용으로 사용하는 사용자에게 잠재적 위험요소인지를 결정할 필요가 있다.

[0005] 1975년 Consroe et al.는 표준 치료법(페노바비탈 및 피니토인)으로 발작을 통제할 수 없는 젊은 남자 케이스를 보고하였다. 상기 남자는 사회에서 마리화나를 하였을 때, 발작을 나타내지 않았다. 그러나, 오직 대마초만을 하였을 때 발작이 나타났다. 따라서, ‘마리화나(marihuana)는 인간 간질에 있어서, 경련억제효과를 가지는 것’을 확인하였다.

[0006] Ng (1990)는 첫 번째 발작을 일으킨 후, 병원에서 간질환자라고 판명한 308명의 대상으로 연구를 진행하였다. 그들은 발작증상을 나타내지 않는 294명의 대조군 환자와 비교하여, 대마초의 사용이 발작 증세를 감소시키는 가능성이 있음을 확인하였다. 그러나 상기 연구는 의료기관보고서(Institute of Medicine report)(1999)에서 ‘상기 연구는 병원 입원 전 건강상태의 측정 및 건강상태의 차이가 그들의 약물 사용에 영향을 미칠 수 있음을 포함하고 있지 않으므로 상기 주장과 반대로 “약하다.” 라고 비평하였다.

[0007] W002/064109에는 칸나비노이드 칸나비디올(CBD)의 간질 효과에 대하여 언급하고 있다.

- [0008] WO 2006/054057에서는 다양한 질환에서의 간질을 치료하기 위한 THC의 잠재적 용도에 대하여 언급하고 있다.
- [0009] WO2009/007697은 THC 및 CBD를 포함하는 제형을 개시하고 있다.
- [0010] 세 번의 대조군 실험으로 칸나비디올의 항-간질 가능성을 조사하였다. 각각, 칸나비디올을 일반적인 대발작(grand mal) 또는 병소 발작(focal seizures)으로 고통받는 환자에게 경구제로서 투여하였다.
- [0011] Cunha et al (1980)은 일반적인 약제에 잘 반응하지 않는 16명의 대발작 환자에 대한 연구를 보고하였다. 상기 환자들은 그들의 일반적인 약제 및 칸나비디올 200-300 mg 또는 플레세보(placebo)를 제공받았다. CBD를 제공받은 환자 중에서, 3명은 완벽하게, 2명은 부분적으로, 2명은 약간의 개선증상은 나타낸 반면은 1명은 여전히 아무런 변화를 나타내지 않았다. 오직 부작용은 간단한 진정효과였다. 플레세보를 제공받은 환자 중에서, 1명은 증상이 개선되었고, 7명은 아무런 변화를 나타내지 않았다.
- [0012] Ames (1986)는 매일 칸나비디올 200-300 mg과 항간질 약제를 제공받은 12명의 간질 환자의 다소 미흡한 연구를 보고하였다. 상기 연구에서 발작 빈도에 있어서 유의적인 개선효과는 보이지 않았다.
- [0013] Trembly et al (1990)은 10개월 동안 매일 칸나비디올 900-1200mg을 투여한 단일 환자의 공개 실험을 보고하였다. 상기 실험은 환자에게서 발작빈도가 현저하게 감소되는 것을 확인하였다.
- [0014] 상기 실험 이후로 약 20년 동안 더 이상의 발전이 없었으므로 이는 상당한 의미를 가진다. 대마초를 기초로 한 약제에 대하여 일반적인 편견을 포함하는 몇몇 요인들이 감소하였다. 실험에 사용된 투여수준은 최적은 아니었지만, 연구자들은 칸나비노이드는 종형 용량 반응곡선(bell shaped dose response curves)을 만드는 것을 확인하였다.
- [0015] 또한, 일반적인 치료에 반응하지 않는 5명의 시설보호아동(institutionalized children)에 테트라하이드로칸나비놀(tetrahydrocannabinol)(THC)을 투여한 보고(Davis & Ramsey)에 있어서, CBD가 효과적이라는 것이 공개되어 있다. 한 명은 발작이 완전히 치유되었고, 한 명은 발작이 거의 완전히 치유되었으며, 다른 3명은 이전보다 악화하지 않았다.
- [0016] 그러나 환자들에게서 다양한 발작 감수성 때문에 부분적으로 간질 증후군으로 인식되는 타입은 40가지가 존재하고(McCormick and Contreras, 2001, Lutz, 2004) 이러한 다양한 타입에 대한 효과적인 약을 찾기 위해 노력하고 있다.
- [0017] 신경활성은 적절한 뇌 기능을 위한 필요조건이다. 그러나 신경활성의 흥분-억제 평형상태의 교란은 간질 발작을 유도할 수 있다. 이러한, 간질 발작은 2개의 기본적인 카테고리 나눌 수 있다: 부분 및 전신 발작. 부분 발작은 특이적인 뇌 영역에서 유래되고 국부적으로 유지된다-대부분 측두엽(해마 포함), 반면에 전신 발작은 부분 발작의 이차성 전신발작처럼(secondary generalisation) 완전히 전뇌에서 나타난다(McCormick and Contreras, 2001, Lutz, 2004). 1969년 국제간질기구(International League Against Epilepsy)에서 공포한 간질 발작의 분류체계가 공표되기 전까지는 부분 및 전신 발작을 분류하는 개념은 공통적으로 확립되지 못하였다(Merlis, 1970, Gastaut, 1970, Dreifuss et al., 1981).
- [0018] 국제간질기구(International League Against Epilepsy)는 의식상태의 존재 및 장애에 따라 부분 발작을 단순 또는 복합으로 나누어, 부분 발작을 보다 세분화하였다(Dreifuss et al., 1981).
- [0019] 상기 기구는 다양한 임상적 발작 타입에 따라서, 하기 기술된 몇몇 예로 전신발작을 또한 분류하였다:
- [0020] 결식발작(Absence-seizures)은 흔히 지속적인 활동의 갑작스러운 중단이 발생한다. 게다가, 말하는 것이 오직 짧은 시간 동안 느려지거나, 방해를 받는다(Dreifuss et al., 1981).
- [0021] “대발작(grand mal)”로 알려진 강직성-간대 발작(Tonic-clonic seizures)은 대부분 자주 전신 발작에 직면한다(Dreifuss et al., 1981). 상기 전신 발작 타입은 2가지 단계를 가진다: 강직근육(tonic muscle)이 수축한 다음 경련활동의 간대단계(clonic stage)로 바뀐다. 상기 환자는 발작이 일어나는 동안 및 발작 후 가변적인 시간 동안 의식이 없는 상태를 유지한다.
- [0022] “적하 발작(drop attacks)”이라고 알려진 무동 발작(Atonic seizure)은 신체의 특정근육, 근육군 또는 모든 근육 중 어느 하나에서 근긴장도(muscle tone)의 갑작스런 저하를 일으킨다(Dreifuss et al., 1981).
- [0023] 간질 발작의 발병은 간질 발작으로 고통받는 환자에게 생명의 위협이 될 수 있고 또한 오랫동안 건강의

영향을 미친다(Lutz, 2004). 상기 영향은 많은 형태로 나타날 수 있다:

[0024] · 정신 건강 문제(예를 들면 아동기의 정상적인 글루타메이트성 시냅스(glutamatergic synapse) 발달의 저지);

[0025] · 지각 장애(cognitive deficits)(예를 들면 학습 및 기억을 저장하는 해마의 신경회로(neuronal circuit)의 저감 능력);

[0026] · 형태학적 변화(morphological changes)(예를 들면 흥분세포독성(excitotoxicity)의 결과 내측 측두엽 간질(mesial temporal lobe epilepsy)을 나타내는 환자의 해마에 있어서 CA1 및 CA3 영역의 신경세포의 선택적인 손실)(Swann, 2004, Avoli et al., 2005).

[0027] · 발작이 일어나지 않는 긴 시간을 가짐에도 불구하고, 간질의 고통을 받는 환자들은 대발작으로 인한 중대한 부상(예를 들면, 머리부상)의 두려움, 일상적인 일의 수행 불능 또는 운전의 불능의 잠재적인 삶으로 인해 생활방식에 큰 영향을 미치는 것은 주목할 만한 사실이다(Fisher et al., 2000).

[0028] · 간질에 걸린 사람의 발작에서 나타나는 신체증상 및 신경활성을 모방한, 3가지의 확립된 그리고 널리 사용되고 있는 생체내(*in vivo*) 모델은 하기와 같다:

[0029] · 펜틸렌테트라졸(pentylentetrazole)-유도된 전신 발작 모델(Obay et al., 2007, Rauca et al., 2004);

[0030] · 피로카루핀(pilocarpine)-유도된 측두엽(즉, 해마) 발작 모델(Pereira et al., 2007); 및

[0031] · 페니실린(penicillin)-유도된 부분 발작 모델(Bostanci and Bagirici, 2006).

[0032] · 상기 모델들은 인간의 치료법의 탐구를 위하여 필수적인 다양한 발작 및 간질모델을 제공한다.

[0033] · 본 발명의 목적은 간질과 관련된 발작의 특이적인 유형의 치료에 사용하기 위한 식물-칸나비노이드 또는 식물-칸나비노이드의 조합을 확인하는 것이다.

[0034]

[0035] · 본 발명은 환자들을 행동 메커니즘의 차이에 있어서 보다 효과적인 칸나비노이드(대마초의 다른 케모타입(chemotype) 또는 품종에 존재할 수 있음)의 조합을 확인하고 효과적인 투여량의 범위를 결정하는 것이다.

[0036] 발명의 요약(BRIEF SUMMARY OF THE DISCLOSURE)

[0037] · 본 발명의 첫 번째 측면에 따라, 본 발명은 전신 발작 및/또는 부분 발작의 치료에 사용하기 위한 테트라하이드로칸나비바린(THCV) 및 칸나비디올(CBD)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 식물칸나비노이드를 제공한다.

[0038] · 바람직하게 상기 약제는 간대 및/또는 강직 발작을 치료하기 위한 것이다.

[0039] · THCV의 일일 투여량은 적어도 1.5 mg인 것이 바람직하고, 5 mg에서 10 mg 내지 15 mg까지 또는 그 이상인 것이 보다 바람직하다.

[0040] · 바람직하게 THCV는 적어도 치료적으로 효과적인 칸나비노이드, 바람직하게 CBD와 함께 배합하여 사용될 수 있다.

[0041] · 상기 CBD는 적어도 일일 투여량 400 mg, 보다 바람직하게는 적어도 600 mg, 가장 바람직하게는 800 mg 또는 그 이상, 그러나 1200 mg 보다 적게 제공할 수 있는 양으로 존재하는 것이 바람직하다.

[0042] · 상기 칸나비노이드는 식물 추출물 형태 또는 순수 또는 분리된 칸나비노이드로 존재할 수 있다. 상기 식물 추출물을 사용될 경우, 전체 칸나비노이드 비율에 대해 바람직하게는 5% 미만, 보다 바람직하게는 4% 내지 3%, 2% 내지 1%의 THC를 포함할 수 있다. THC는 크로마토그래피와 같은 기술을 이용하여 추출물로부터 선별적으로 정제될 수 있다.

[0043] · 본 발명은 간질의 특이적 형태를 치료하기 위한 약제를 제조함에 있어서 식물-칸나비노이드를 이용하는 것을 포함한다.

[0044] · 본 발명의 두 번째 측면에 따라, 본 발명은 THCV 및 또는 CBD를 포함하는 전신발작 및/또는 부분발작의

치료에 사용하기 위한 조성물을 제공한다.

- [0045] 상기 조성물은 하나 또는 그 이상의 식물 칸나비노이드 및 하나 또는 그 이상의 첨가물을 포함하는 식물 추출물의 형태를 가지는 것이 바람직하다.
- [0046] 본 발명의 세 번째 측면에 따라, 본 발명은 전신발작 및/또는 부분발작의 치료에 사용하기 위하여 약제의 제조에 이용하기 위한 THCV 및/또는 CBD를 제공한다.
- [0047] 본 발명의 네 번째 측면에 따라, 본 발명은 유효한 양의 THCV 및/또는 CBD를 포함하는 약제를 환자에 투여하는 단계를 포함하는 전신발작 및/또는 부분발작을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0048] 다른 동물 모델과 다른 복용량에서 관찰된 서로 다른 결과를 고려해 볼 때, 배합 사용은 명백히 서로 다른 작용기전에 근거를 두고 있다.

도면의 간단한 설명

- [0049] 본 발명의 실시예에서 하기의 첨부된 도면은 참조로 하여 보다 구체적으로 기술된다,
- 도 1은 최초 및 최후 발작 심각도에서의 잠복기를 나타낸다. 비히클(vehicle), 또는 저용량, 중간용량 또는 고용량의 THCV BDS 및 70mg/kg PTZ에서 첫 번째 근간대성 경련(myoclonic jerk)(FMJ) 및 3.5의 평균 잠복기는 \pm S. E. M.으로 나타낸다. $n = 8 - 10$;
- 도 2는 발작 지속시간 및 사망 시까지 시간을 나타낸다. 비히클(vehicle), 또는 저용량, 중간용량 또는 고용량의 THCV BDS 및 70mg/kg PTZ에서 생존한 동물의 발작 지속시간 및 사망한 동물의 첫 번째 발작에서 사망까지의 시간은 \pm S. E. M.으로 나타낸다. 실험군에서 죽은 동물의 비율은 $n = 3 - 10$ 에 의존한다. \bar{f} = 비히클 그룹은 사망한 동물이 없었고, 따라서, 값을 나타내지 않았다;
- 도 3은 평균 심각도 점수를 나타낸다. 비히클(vehicle), 또는 70mg/kg PTZ 투여된 저용량, 중간용량 또는 고용량의 THCV BDS를 처리한 동물군의 평균 심각도를 기록하였다. 모든 그룹의 $n = 10$; \bar{f}
- 도 4는 치사율(mortality rates)을 나타낸다. 치사율은 비히클(vehicle), 또는 저용량, 중간용량 또는 고용량의 THCV BDS 및 70mg/kg PTZ를 처리한 동물의 백분율로 나타낸다. 모든 그룹의 $n = 10$. \bar{f} = 비히클 그룹은 사망한 동물이 없었고, 따라서, 값을 나타내지 않았다;
- 도 5는 최초 및 최후 발작 심각도에서의 잠복기를 나타낸다. 비히클(vehicle), 또는 저용량, 중간용량 또는 고용량의 THCV BDS 및 80mg/kg PTZ에서 첫 번째 근간대성 경련(myoclonic jerk) (FMJ) 및 3.5의 평균 잠복기는 \pm S. E. M.으로 나타낸다. $n = 7 - 10$;
- 도 6은 발작 지속시간 및 사망 시까지 시간을 나타낸다. 비히클(vehicle), 또는 저용량, 중간용량 또는 고용량의 THCV BDS 및 80mg/kg PTZ에서 생존한 동물의 발작 지속시간 및 사망한 동물의 첫 번째 발작에서 사망까지의 시간은 \pm S. E. M.으로 나타낸다. 실험군에서 죽은 동물의 비율은 $n = 3 - 7$ 에 의존한다;
- 도 7은 평균 심각도 점수를 나타낸다. 비히클(vehicle), 또는 80mg/kg PTZ 투여된 저용량, 중간용량 또는 고용량의 THCV BDS를 처리한 동물군의 평균 심각도를 기록하였다. 모든 그룹의 $n = 10$;
- 도 8은 치사율을 나타낸다. 치사율은 비히클, 또는 저용량, 중간용량 또는 고용량의 THCV BDS 및 80mg/kg PTZ를 처리한 동물의 백분율로 나타낸다. 모든 그룹의 $n = 10$;
- 도 9의 A-D는 순수 THCV 처리시 PTZ-유도 발작 발생 및 지속시간을 나타낸다. A, B 및 C는 80 mg/kg PTZ 주입부터 첫 번째 발작 신호까지의 평균 잠복기(s)(A), 비히클 및 THCV-투여군에서 근간대 경련의 발생(B) 및 전체 강직성-간대 발작(C)까지의 평균잠복기(s)를 나타낸다. (D)는 발작 후 생존한 동물의 발작의 평균지속시간을 나타낸다. 모든 값은 \pm S.E.M.으로 나타내며, *은 비히클 그룹의 유의적인 차이를 나타낸다($P < 0.05$; Mann-Whitney U test);
- 도 10 A-B는 PTZ-유도 발작에서 CBD의 효과를 나타낸다 A: 비히클 및 CBD가 투여된(1, 10, 100mg/kg CBD) 동물(모든 그룹에서 $n=15$)에서 80mg/kg PTZ IP 주입 후 나타내는 % 치사율. B: 80mg/kg PTZ의 IP 주입 결과로서 강직성-간대 발작을 나타내는 비히클 및 CBD가 투여된(1, 10, 100mg/kg CBD) 동물의 %. *은 유적적인 결과를 나타낸다($p < 0.01$);

도 11은 치사율 백분율에서 THC의 부족한 효과를 나타낸다. 유의성은 대조군 및 $P < 0.05$ 에서 유의성과 비교하여 이항검정(binomial test)을 이용하여 평가하였다. 모든 용량에서 대조군과 비교하여 유의적인 차이를 찾지 못하였다;

도 12는 평균 최고 발작 심각도에 있어서 THC의 부족한 효과를 나타낸다. 유의성은 사후 터키 검정과 함께 일방향 ANOVA로 평가하였다; 모든 용량 vs 대조군 $P > 0.5$;

도 13 A-D는 THC 처리시, 특이적인 발작 단계에 도달한 각각의 그룹에서 동물의 비율을 나타낸다. 대조군과의 유의적인 차이는 이항검정을 통해 평가하였다. $P < 0.05$.

도 14는 치사율 백분율에 있어서 CBD의 효과를 나타낸다. 유의성은 이항검정으로 평가하였다; *은 치사율의 유의적인 증가를 나타낸다($P < 0.05$). 상기 효과는 오직 10 mg/kg에서 나타내고 100 mg/kg에서 상실하므로, 양면적 효과(biphasic effect)를 시사한다;

도 15는 평균 최고 발작 심각도를 나타낸다. 유의성은 사후 터키 검정과 함께 일방향 ANOVA로 평가하였다; 모든 용량 대 대조군에서 $P > 0.5$.

도 16 A-D는 특이적 발작 단계에 도달한 각각의 그룹에서 동물의 백분율을 나타낸다. 대조군 vs 유의적인 차이는 이항검정을 이용하여 평가하였다. $P < 0.05$ (*); $P < 0.001$ (***);

도 17은 강직성-간대성 발생빈도에서 CBD의 효과를 나타낸다. 유의성은 사후 터키 검정과 함께 일방향 ANOVA로 평가하였다. $P < 0.05$ (*); $P < 0.01$ (**);

도 18은 발작기간의 전체 지속시간과 비교하여 강직성-간대 단계가 일어나는 시간의 지속시간 백분율을 나타낸다. 유의성은 사후 터키 검정과 함께 일방향 ANOVA로 평가하였다. $P < 0.05$ (*);

도 19 A-B는 자세조절 없이 강직성-간대 발작에 있어서 CBD의 효과를 나타낸다. A: 자세조절 없이 강직성-간대 발작을 나타내는 동물의 %. B: 2시간의 기록 기간 동안(또는 사망 시까지) 자세조절 없이 강직성-간대 발작을 나타내는 동물의 발생빈도. A: 이항검정; B: 터키 검정에 의한 일방향 ANOVA. **, *** 및 #은 $p < 0.01$ 을 나타내고, 0.001 및 0.1은 독립적이다; 및

도 20은 페니실린(penicillin)-유도된 발작 심각도 및 치사율에서 CBD의 효과를 나타낸다. A: 발작의 평균 심각도(회색 라인)는 25 및 75 백분위(percentile)(검정 수평라인) 및 최고 및 최저값(각각, 위쪽 바, 아래쪽 바)을 또한 나타낸다. B:는 처음에서 끝까지 발작이 일어나지 않은 동물의 백분율. C: 치사율. A: 터키 검정에 의한 일방향

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] PTZ 모델-실시에 1-3

[0051] PTZ 모델을 위한 일반적인 방법론

[0052] 동물

[0053] 수컷 Wister 네트(P24-29; 75-1 10g)는 칸나비노이드의 효과를 평가하기 위하여 사용되었다: 전신발작 PTZ 모델에서 THC (BDS 및 pure) 및 CBD. 동물은 실험 시작 전에 실험환경, 우리, 주입 프로토콜 및 처리에 적응시켰다. 동물은 50% 습도에서 12시간 암주기: 광주기(광 0900) 사이클로 21°C의 온도에서 사육하였다.

[0054] 실험 단계

[0055] 5개의 뚜껑이 있는 6L 페스팩스 탱크를 벤치사이에 칸막이가 있는 하나의 벤치 위에 놓아두었다. 폐쇄 회로 텔레비전(CCTV) 카메라를 랫트의 행동을 관찰하기 위하여 칸막이 쪽으로 고정시켰다. Sony Topica CCD 카메라(Bluecherry, 미국)는 Brooktree 디지털 캡처 카드(Bluecherry, 미국)를 통한 저-잡음 PC에 BNC 케이블을 통해 연결되었다. Zoneminder(<http://www.zoneminder.com>) 소프트웨어는 랫트의 모니터, 시작 및 종료의 기록 및 비디오 파일의 관리를 위하여 사용되었다. 인-하우스 Linux script은 관찰자(Noldus Technologies)의 오프라인 분석을 위한 비디오 파일을 적합한 형태로 인코드하기 위하여 사용되었다.

[0056] 투여량

[0057] PTZ (50-100mg/kg 몸무게)의 투여량의 범위는 발작의 유도를 위한 최적 투여량으로 결정하여 사용하였다(하기 참조). 그 결과, 복막내(IP: 0.9% 염분을 함유하는 모액(stock solution) 50mg/ml) 주입된 70 및 80mg/kg의 투여량을 칸나비노이드의 검진을 위하여 사용되었다.

[0058] 실험 프로토콜

[0059] 실험시작일, 동물에 칸나비노이드(저, 중 또는 고 투여량) 또는 음성대조군의 효과를 가지는 칸나비노이드 용매와 동일한 부피(1 :1 :18 에탄올:크레모포(Cremophor): 0.9%w/v NaCl 용액)를 IP 주입하였다. 70 또는 80mg/kg PTZ를 IP 주입한 후, 동물들은 30분 동안 관찰하였다. 칸나비노이드-투여된 개체와 병행하여 음성 용매 대조를 수행하였다. PTZ의 투여를 수행한 후, 발작의 심각도 및 몇몇 발작 행동 타입에서 잠복기를 확인하기 위하여 동물들을 관찰 및 녹화하였다(하기 생체내 분석 참조). 동물들은 발작의 최종 신호를 나타낸 후, 30분 동안 촬영한 다음 동물 우리로 복귀시켰다.

[0060] 생체내(in vivo) 분석

[0061] 동물들을 실험 진행 동안 관찰하였으나, 모든 분석은 행동관찰분석 소프트웨어(Observer behavioural analysis software)(Noldus, 네델란드)를 이용하여 기록된 비디오 파일을 이용하여 오프라인에서 수행하였다. 발작 심각도 점수 체계는 개체가 겪는 발작 수준을 결정하기 위하여 사용하였다(Pohl & Mares, 1987). 발작의 모든 신호는 모든 동물을 위해 열거하였다.

표 1

[0062] Pohl & Mares, 1987을 개작한, 발작 심각도 점수 등급

발작 점수	행동 표현	장위 반사 (Right reflex)
0	행동변화 없음	유지
0.5	비정상적인 행동(코를 훌쩍거림, 지나치게 씻음, 방위 결정)	유지
1	근간대성 경련	유지
2	간대 발작	유지
3	완전히 발병된 양쪽 앞다리의 간헐성 경련	유지
3.5	강직 발작 및 신체 꼬임을 동반하는 앞다리의 간헐성 경련	유지
4	억제된 긴장기와 강직성-간대 발작	상실
5	완전히 발병된 강직성-간대 발작	상실
6	사망	

[0063]

[0064] PTZ 주입부터 발작 발생의 특이적 표시까지 잠복기

[0065] PTZ 주입부터 첫 번째 근간대성 경련(myoclonic jerk) (FMJ; 점수 1) 및, 동물이 “강직 발작 및 신체 꼬임을 동반하는 앞다리 간헐성경련” (점수 3.5)에 도달까지 잠복기(초)를 기록하였다. FMJ는 발작 활성화의 시작의 지표이며, 동물의 >90%는 점수 3.5가 발생하기 때문에 보다 심각한 발작의 발생을 의미하는 좋은 마커이다. 데아터는 모든 실험 그룹에서 mean ± S. E. M.로 나타내었다.

[0066] 최고 발작 심각도:

- [0067] 하기 척도 점수(scoring scale)를 기초로 하여 각각의 실험그룹의 중간값(median value)으로 한다.
- [0068] **% 사망률:**
- [0069] PTZ-유도된 발작의 결과로 실험 그룹에서 동물의 사망률을 말한다. THCV (BDS) 연구에서 강직성-간대 발작(점수 4 및 5)이 발생한 대다수의 동물은 결국 사망하며, 점수 6(사망)의 동물은 또한 강직성-간대 발작을 자동적으로 겪는 것을 의미한다.
- [0070] **발작지속시간:**
- [0071] 발작의 첫 징후로부터(전형적으로 FMJ) 살아남은 동물과 그렇지 못한 동물을 분리하여 발작의 최종 징후 또는 실험동물이 죽은 경우 사망시간까지의 시간(초 단위). 각 실험군에서 mean±S.E.M 으로 나타내었다.
- [0072] **통계:**
- [0073] 발작 잠복기와 발작 지속기와의 차이는 사후 터키 검증(post-hoc Tucky's test)과 함께 변수의 일방향 분석(AVONA)를 이용하여 평가하였다. $P \leq 0.05$ 는 유의성이 있는 것으로 간주 된다.
- [0074] **<실시예 1> THCV(BDS)**
- [0075] THCV는 THCV가 지배적인 칸나비노이드인 화학변종(chemovar)의 모든 추출물을 포함하였다(즉 이것은 추출물 내에 총 칸나비노이드 내용물의 80중량%가 존재하는 주요 칸나비노이드). THC는 두 번째로 많이 존재하는 칸나비노이드였고, 유의적인 양으로 존재하였다(즉 총 칸나비노이드 내용물의 10중량%이상 포함하였고 약 16%로 존재하였다.). 그리고 몇몇 중요하지 않은 칸나비노이드가 확인되었고, 각각은 HPLC 분석을 통해 측정되어 총 칸나비노이드 내용물의 2중량%이하로 포함되어 있었다. 이 추출물에서 THC에 대한 THCV의 비는 약 5:1이다.
- [0076] 실제로는 THCV 내용물은 추출물의 67.5중량%였고 THC 내용물은 추출물의 13.6중량 %였고 그 외 확인된 칸나비노이드는 모두 합쳐서 추출물의 3중량%였고, 나머지 칸나비노이드가 아닌 것은 추출물의 16중량%였다.
- [0077] **PTZ 예비연구**
- [0078] 칸나비노이드 효과를 연구하기 전에 최적 투여량을 결정하기 위해서 랫트에서 PTZ 농도(50-100mg/k; 문헌에 기재된 용량 범위) 범위로 유도된 발작을 조사하였다. PTZ 투여량은 :
- [0079] • 50mg/kg and 60mg/kg 은 발작이 거의 없는 것과 같은 활발한 움직임을 유도하였고(n=4);
- [0080] • 70mg/kg은 일반적으로 강대성 발작을 유도하였고(점수 3.5; 13 개체 중 8);
- [0081] • 80mg/kg은 규칙적으로 강직성-간대성 발작을 유도하였다(점수 4; 10 개체 중 8).
- [0082] 었다.
- [0083] 부가적으로, PTZ의 반복투여는 시간이 흐름에 따라 감수성이 증가한다는 것을 확인하였고; 그러므로 PTZ를 이미 투여받은 동물에게는 실험을 더 이상 수행하지 않았다.
- [0084] PTZ-유도 발작에 대한 THCV BDS의 효과는 첫 번째로 70mg/kg의 PTZ 복용량에 대하여 평가되었다. 하기에 기재되었듯이, 이것은 일반적으로 심각한 발작 점수를 경험하지 않는 비이클 대조군(vehicle control group)을 만들어 냈다. 그러므로 THCV BDS는 또한 80mg/kg의 PTZ 복용량에 대하여 평가되었다. 80mg/kg PTZ가 투여된 비이클 대조군 동물에서의 증가된 발작 심각도는 잠재적인 항경련 활성을 시험하는데 더 적절하다는 것을 알 수 있었다.
- [0085] **중등도의 심각한(70mg/kg) PTZ 유도 발작에 대한 THCV BDS의 효과**

- [0086] THCV BDS의 세 가지 용량이 랫트에서 중등도의 심각한 발작을 유도하는 것으로 알려진 PTZ의 농도(70mg/kg; 상기 참고)에 대하여 평가하였다. 사용된 THCV BDS의 저용량, 중간용량, 고용량은 0.37, 3.70 및 37.04mg/kg 이고, 실제적으로 산출된 THCV 용량은 각각 0.25, 2.5 및 25mg/kg이다. 상기 세 가지 용량은 PTZ-유도 발작에 대한 순수한 THCV 검사를 위해 이용되는 THCV 내용물과 일치한다.
- [0087] THCV BDS는 첫 번째 근간대성 경련에 대한 잠복기 또는 발작 심각도 단계에서 3.5의 심각도 점수를 얻는 잠복기에 대해서는 어떠한 유의적인 효과를 가지지 않았다(도 1). 대조군에 비해 중간용량 및 고용량의 THCV BDS로 처리된 동물에서 변수들에 대한 값이 둘 다에서 높았지만, 유의성이 있지는 못하는($P>0.05$) 것으로 나타났다. 비슷하게 발작의 지속시간에 대한 유의적인 효과도 보이지 않았다(도 2).
- [0088] 70mg/kg의 PTZ를 투여받은 동물에서 발작 심각도(도 3) 및 치사율(도 4)에 대한 THCV BDS의 효과는 단순한 양상으로 확인되지 않았다. 비이클-단독으로 투여된 어떤 동물도 3.5의 평균 심각도 점수를 넘지 않았고 사망한 동물도 없었다($n=10$).
- [0089] 이와 대조적으로, 70mg/kg PTZ는 저용량의 THCV BDS가 주사된 동물의 50%에서 심각한 강직-강대성 발작 및 폐사를 유도하였고 이것은 4.75의 평균 심각도 점수를 나타낸다. 심각도의 이러한 증가는 유의적이지 않다. 그러나 중간용량 및 고용량의 THCV BDS가 주사된 동물은 저용량이 투여된 동물보다 더 낮은 평균 심각도 점수 및 낮은 치사율을 나타냈다(도 3 및 4). 중간 및 고용량의 치사율은 대조군 보다 높았지만 유의성이 있지는 않았다($P>0.05$; 도4). 그러나 평균 심각도 점수는 중간용량 및 고용량이 같았다(도 3). 결과의 이러한 양상은 대조군 동물에서 심각한 발작을 유도하는 PTZ의 용량에 대한 THCV BDS가 확인되는 추가의 실험 세트가 필요하다는 것을 나타낸다.
- [0090] **심각한 PTZ-유도 발작에 대한 THCV BDS의 효과**
- [0091] 80mg/kg PTZ에 의해 유도된 발작에 대한 상기와 똑같은 세 가지 용량의 THCV BDS의 효과를 평가하였다. 대조군($P=0.009$)에서 80mg/kg이 70mg/kg에 비해서 유의적으로 더 심각한 발작을 일으킨다는 것은 언급할 가치도 없고, 평균 심각도 점수는 각각 6 및 3.5이다. THCV BDS는 FMJ의 잠복기 또는 평균 심각도 점수 3.5의 잠복기에 대한 유의적인 효과를 가지지 않았다(도 5). 비슷하게 발작 지속시간에 있어서도 효과가 보이지 않았다(도 6).
- [0092] 80mg/kg PTZ가 투여된 동물에서 저용량 THCV BDS는 발작 심각도(도 7) 및 치사율(도 8)을 모두 감소시켰다. THCV BDS가 투여된 동물은 대조군에 비해서 더 낮은 평균 심각도 점수(6과 비교하여 3.5)를 가졌다. 그러나 이 차이는 유의적이지 않았다($P>0.5$). 또한 저용량 THCV BDS군의 치사율은 비히클 대조군의 반이었다(30% vs 60%).
- [0093] **생체 내(In vivo) 요약 및 결론**
- [0094] PTZ 모델에서 THCV BDS의 스크리닝은 중등도 또는 그 이상의 PTZ-유도 발작에서 어떠한 유의적인 항경련 효과 또는 경련 유발 효과를 보이지 않았다. 그러나 심각한 발작(80mg/kg PTZ)의 유도전에 THCV BDS를 투여받은 동물에서 비이클 대조군과 비교하여 더 낮은 심각도와 치사율을 가지는 경향이 보였다.
- [0095] 이러한 효과는 THCV BDS의 THCV가 아닌(non-THCV) 내용물에 존재하는 높은 수준의 다른 칸나비노이드 구성물(예를 들면 THC)에 의해 고용량의 THCV BDS에서 가려질 수 있다. 고용량의 THCV BDS는 THCV의 잠재적인 양(positive)의 효과들을 막는 THC와 같은 증가된 용량의 비-THCV(non-THCV) 내용물을 포함할 것이다.
- [0096] **<실시예 2> THCV(순수)**
- [0097] **PTZ-유도 발작에 대한 순수 THCV의 효과**
- [0098] 저용량(0.025mg/kg), 중간용량(0.25mg/kg) 및 고용량(2.5mg/kg)의 순수 THCV가 PTZ-유도 발작에 미치는 효과가 평가되었다. 이 시점에서 실시예 1(THCV BDS)과 비교하여 순수 THCV의 용량을 THCV BDS와 다르게 하는 것은 의미가 없다. 하기의 표 2참조.
- [0099]

표 2

[0100] PTZ 모델에서 이용된 순수 THCv 복용량과 THCv BDS의 비교

	"저"용량(mg/kg)	"중간"용량(mg/kg)	"고"용량(mg/kg)
THCVBDS	0.25	2.5	25
순수 THCv	0.025	0.25	2.5

[0101] 투여된 수치는 효과적인 THCv 내용물의 용량이다(그러므로 실제 THCv BDS의 용량은 약 1.5배 크다).

[0102] 80mg/kg PTZ는 모든 4가지 실험군(각 군마다 n=16)의 동물에서 다양한 심각도의 발작을 성공적으로 유도하였다. PTZ 유도 발작은 비이클만 투여받은 동물의 44%에서 폐사를 일으켰다. 저용량, 중간용량 및 고용량 THCv를 투여받은 군은 모두 각각 41%, 33% 및 38%의 낮아진 치사율을 보였다; 그러나 이 수치는 비이클군에 비해서 유의적인 차이를 보이지 않았다($P>0.05$, 이항시험(binomial test)).

[0103] 도 9A-D에는 살아남은 동물에서의 발작 지속시간뿐만 아니라 첫 발작 징후의 잠복기, 발작 점수 단계에 사용된 [3] 및 [5]의 점수에 대한 잠복기의 평균값이 기재되어 있다.

[0104] 비이클 대조군에 비해 발작과 비슷한 행동의 첫 징후가 나타나는 잠복기가 증가된 것에서 알 수 있듯이 THCv를 투여받은 동물은 발작이 더 늦게 시작되었다는 것을 알 수 있다.

[0105] 가장 고용량의 THCv에서 징후의 지연이 유의적이었다($p=0.02$). 이와 비슷한 양상이 [3] 및 [5]의 점수에 대한 잠복기에서 나타나서 모든 THCv 복용량에서 증가된 잠복기를 나타냈고 가장 고용량의 THCv에서 유의적인 수준에 도달하였다([3]에서는 $p=0.017$, [5]에서는 $p=0.013$).

[0106] 또한, 실험기간 동안 살아남은 동물에서 PTZ-유도 발작의 지속시간이 비이클 대조군에 비해 중간용량의 THCv가 투여된 후에 더 짧아졌다(도 9D; $p=0.03$).

[0107] 하기 표3은 각 실험군에서의 평균 발작 심각도의 값을 표시한다.

표 3

[0108] 발작 심각도 및 발생율

	비이클(Vehicle)	0.025mg/kg THCv	0.25mg/kg THCv	2.5mg/kg THCv
평균 심각도 (median severity)	4.25	3.5	3.5	3.5
발작 발생하지 않는 % (% no seizure)	12.5	5.9	33.3*	18.8

[0109] 평균 최대 심각도 및 어떠한 발작의 징후도 경험하지 않은 동물의 %를 각 실험군에 대해 나타내었다(각 값에서 n=16). *는 비이클군과의 유의적인 차이를 나타낸다(이항 유의성 시험, $P<0.05$).

[0110] 비이클 대조군 동물은 4.25의 평균 발작 심각도를 가진 반면에, THCv를 투여받은 모든 그룹은 3.5의 평균 발작 심각도 점수를 가졌다. 이러한 감소는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

[0111] 12.5%의 비이클 대조군 동물은 발작의 징후를 보이지 않았고, 이것은 동물이 PTZ 투여 후에 발작이 발생하지 않았다는 것을 의미한다. 상당히 많은 숫자의 동물(33.3%)이 0.25mg/kg(표3; $p=0.031$)의 THCv를 투여받은 군에서 발작의 징후가 나타나지 않았다. 이러한 데이터는 0.25mg/kg의 중간용량 THCv가 발작의 발생으로부터 보호했다는 것을 의미한다.

[0112] 생체 내(In vivo) 요약 및 결론

- [0113] 잠복기 값에 대한 고용량의 THC의 효과는 THC가 징후와 발작의 발생을 모두 지연시킬 수 있다는 것을 의미하고, 반면에 중간 용량(0.25mg/kg) THC에서의 발작의 발생에 대한 중간 용량의 유의적인 효과는 PTZ-유도 발작에 있어서 유의적인 항경련 작용을 의미한다.
- [0114] <실시예 3> CBD(순수)
- [0115] THC외에 CBD 또한 PTZ 모델에서 확인되었다. 결과는 이 모델에서 비이클 대조군 동물에 비해 CBD(100mg/kg의 수준)가 대부분의 심각한 발작의 치사율과 발생율을 유의적으로 감소시키는 것으로 보아 항경련제라는 것을 강하게 시사한다.
- [0116] PTZ-유도 발작에 대한 순수 CBD의 효과
- [0117] 순수 CBD를 1, 10 및 100mg/kg의 용량으로 표준 비이클(1:1:18 에탄올:크레모포(Cremophor):0.9%w/v 염화나트륨)에서 복강 내(IP) 주사하였고 이와 함께 비이클만을 똑같은 용량으로 투여하였다(각 군에서 n=15). 60분 후에 PTZ(80mg/kg, IP)를 투여하였다.
- [0118] 비이클만을 투여받은 동물의 46.7%가 PTZ 투여 30분 내에 폐사하였다(도 10). 이와 대조적으로 100mg/kg의 CBD를 투여받은 동물의 6.7%(15개체 중에 1)만이 폐사하였고, 이러한 뚜렷한 감소는 유의적인 것으로 나타났다($P<0.001$).
- [0119] 부가적으로 100mg/kg의 CBD를 투여받은 동물의 6.7%만이 가장 심각한 발작(점수 5) 경험하였고 이와 비교하여 비이클 대조군 동물에서는 53.3%였고 이러한 감소는 또한 유의적이었다($P<0.001$; 도 10 생체 내).
- [0120] 순수 THC와 대조적으로, 발작 발생의 잠복기의 유의적인 증가는 관찰되지 않았다. 그러나 뚜렷하고 상당한 감소는 PTZ-유도 발작에 대한 현저한 항경련 효과를 나타낸다.
- [0121] 가장 심각한 발작의 치사율과 발생율에 대한 고용량(100mg/kg) CBD에서의 PTZ 모델의 CBD 확인과 분석은 CBD가 PTZ-유도 발작의 심각도를 완화시킬 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0122] 필로카핀(Pilocarpine model)- 실시예 4 및 5
- [0123] <실시예 4> - Pure THC
- [0124] 필로카핀-유도 발작에 대한 순수 THC의 효과
- [0125] 순수 THC를 0.025, 0.25 및 2.5mg/kg의 용량으로 표준 비이클(1:1:18 에탄올:크레모포(Cremophor):0.9%w/v 염화나트륨)에서 복강 내(IP) 주사하였고 이와 함께 비이클만을 똑같은 용량으로 투여하였다(각 군에서 $n \geq 14$). 15분 후에 메틸스코폴라민(methylscopolamine)(1mg/kg; 필로카핀의 무스카린성 효과를 감소시키기 위해)를 투여하였고 다음에 45분 후에 필로카핀(380mg/kg, IP)를 투여하였다.
- [0126] 결과
- [0127] 모든 용량의 THC에서 발작 징후의 잠복기에 대한 유의적인 효과가 보이지 않았다(모든 용량 대 대조군에서 $P>0.5$; 사후 터키 검정과 함께 일방향 ANOVA). 대조군과의 관계에서 모든 THC 용량에서 유의적인 치사율의 변화가 보이지 않았다(도 11).
- [0128] 또한 THC는 각 동물군이 도달한 발작의 평균 최대 심각도에 대한 효과를 가지지 않았다(도 12).
- [0129] 각 군에서 특정 발작 상태(일측성 앞다리 간헐성 경련, 양측성 앞다리 간헐성경련, 뒷발로 지탱하고(rearing) 넘어지는(falling) 증상이 나타나는 양측성 앞다리 간헐성 경련 및 강직성-간대성 발작)에 도달한 동물의 퍼센트 또한 평가되었다(도 13A-D).
- [0130] THC는 모든 용량에서 일측성 앞다리 간헐성 경련, 양측성 앞다리 간헐성경련 또는 강직성-간대성 발작을 보이는 동물의 퍼센트의 유의적인 변화를 일으키지 않았다. 흥미롭게도, 0.25mg/kg THC는 뒷발로 지탱하고(rearing) 넘어지는(falling) 증상이 나타나는 양측성 앞다리 간헐성 경련을 보이는 동물의 퍼센트를 유의적인

변화를 일으켰고 이러한 효과는 다른 용량에서는 보이지 않았다.

[0131] <실시예 5> 순수 CBD

[0132] 필로카핀-유도 발작에 대한 순수 CBD의 효과

[0133] 순수 CBD를 1, 10 및 100mg/kg의 용량으로 표준 비이클(1:1:18 ethanol:Cremophor:0.9%w/v/ 염화나트륨)에서 복강 내(IP) 주사하였고 이와 함께 비이클만을 똑같은 용량으로 투여하였다(각 군에서 $n \geq 14$). 15분 후에 메틸스코폴라민(methylscopolamine)(1mg/kg; 필로카핀의 무스카린성 효과를 감소시키기 위해)를 투여하였고 다음에 45분 후에 필로카핀(380mg/kg, IP)를 투여하였다.

[0134] 결과

[0135] 모든 용량의 CBD에서 발작 징후의 잠복기에 대한 유의적인 효과가 보이지 않았다(모든 용량 대 대조군에서 $P > 0.5$; 사후 터키 검정과 함께 일방향 ANOVA). 대조군과의 관계에서 10mg/kg의 CBD에서 유의적인 치사율의 증가가 보였다(도 14).

[0136] 도 15는 CBD가 각 동물군이 도달한 발작의 평균 최대 심각도에 대한 효과를 가지지 않았다는 것을 보여준다.

[0137] 도 16A-D는 특정 발작 상태(일측성 앞다리 간헐성 경련, 양측성 앞다리 간헐성경련, 뒷발로 지탱하고(rearing) 넘어지는(falling) 증상이 나타나는 양측성 앞다리 간헐성 경련 및 강직성-강대성 발작)에 도달한 동물의 퍼센트를 보여준다.

[0138] CBD는 $>1\text{mg/kg}$ 의 용량에서 일측성 앞다리 간헐성 경련을 보이는 동물의 퍼센트의 유의적인 감소를 유발하였으나 흥미롭게도 양측성 간헐성 경련을 보이는 동물의 퍼센트의 유의적인 변화는 보이지 않았고 뒷발로 지탱하고(rearing) 넘어지는(falling) 증상이 나타나는 양측성 앞다리 간헐성 경련을 보이는 동물의 퍼센트는 $>1\text{mg/kg}$ 의 모든 CBD 용량에서 유의적으로 감소하였다. 강직-강대성 발작을 보이는 동물의 퍼센트는 1mg/kg 및 100mg/kg의 CBD 용량에서는 유의적으로 감소하였으나 10mg/kg에서는 그렇지 않았다(도 14 참조).

[0139] 강직-강대성 발생의 평균 빈도를 검사하여 강직-강대성 발작에 대한 CBD의 효과를 도 17에 나타내었다. CBD는 시험된 모든 용량에서 평균 강직-강대성 빈도의 유의적인 감소를 유발하였다. 모든 다른 발작 점수의 평균 빈도에 대한 CBD의 효과가 똑같은 방법으로 평가되었지만 대조군과의 관계에서 유의적인 차이를 보이지 않았다(모두 $P > 0.5$).

[0140] 발작의 총 지속시간에 대한 강직-강대성 상태에 있는 시간의 퍼센트가 검사되었다(도 18). CBD는 1mg/kg 및 100mg/kg의 용량에서 시간의 퍼센트를 유의적으로 감소시켰지만 10mg/kg에서는 그렇지 않았다.

[0141] 실시예 6

[0142] 페니실린 모델-실시예 6

[0143] <실시예 6> 순수 CBD

[0144] 페니실린 유도 발작에 대한 순수 CBD의 효과

[0145] CBD(1, 10 및 100mg/kg) 또는 CBD 비이클(1:1:18 에탄올:크레모포:0.9%w/v 염화나트륨)를 성숙한 수컷 위스타랫(Wistar rats)($\geq 250\text{g}$)에 복강 내 투여하였다. 투여하기 일주일 전에 동물에게 마취 상태에서 외측 우심실에 카놀라(cannula)를 외과적으로 이식하였다. CBD 투여 한 시간 후에, 150IU 페니실린을 $1.5\mu\text{l}$ 식염수와 함께 외측 우심실에 1분 동안 주입하였고 발작행동을 2시간 동안 녹화하였다.

[0146] 비이클 대조군에서 얻어진 데이터를 이용하여 페니실린 단독에 대한 동물의 반응을 자세하게 검사한 후에, 페니실린 유도 부분 발작에 대한 확정된 발작 점수 단계를 얻었다. 그러므로 이것과 똑같은 모델에서 여러 가지로 존재하고 발표된 점수 시스템에서 얻어진 다음의 점수 시스템은 이러한 발작에 대한 약물의 효과를 분석하는데 이용될 것이다.

[0147] 페니실린-유도 부분 발작에 대한 발작 점수 단계

0	잠복기
1	거친 달리기/도약
2	근강대성기
3	일측성 앞다리 간헐성 경련
4	양측성 앞다리 간헐성 경련
5	자세 통제 유지된 강대-강직성 발작
6	자세 통제 못하는 강대-강직성 발작

[0148]

[0149] 비이클 처치된 12 개체 중 7개체에서 가장 심각한 발작(자세 통제 못하는 강직-강대성 발작; 도 19A)가 발생하였고 반면에 100mg/kg CBD의 투여는 이러한 발작의 발생을 유의적으로 막았다($p=0.001$). 1 및 10mg/kg CBD로 처치된 동물에서 이러한 발작의 발생이 약간의 유의적인 감소를 보였다(도 16A, 둘 모두에서 $p=0.76$). 가장 심각한 발작을 경험한 동물에서의 빈도는 또한 유의적으로 영향을 받았고(ANOVA, $p=0.009$; 도 19B), 비이클군과의 비교에서 100mg/kg CBD에서 유의적인 감소가 나타났고($p=0.006$), 10mg/kg에서는 약간의 유의적인 효과가 있었다($p=0.071$).

[0150]

발작 심각도와 치사율에 대한 CBD 처치의 효과는 도 20A-C에 나타나 있다. 100mg/kg의 CBD는 비이클 처치된 동물에 비해서 페니실린-유도 발작의 평균 심각도를 유의적으로 감소시켰다(ANOVA $p=0.024$; 비이클과 100mg/kg CBD와의 차이 $p=0.012$; 도 20A). 흥미롭게도 모든 용량의 CBD(1, 10 및 100mg/kg)은 발작을 일으키지 않은 동물의 비율을 유의적으로 증가시켰다(모든 용량에서 $p<0.001$; 도 20B). 마지막으로, 100mg/kg 은 비이클에 비해 치사율에 대한 약간의 유의적인 효과를 가지고 있었다($p=0.057$)

[0151] 전체 결론

[0152] 이 연구에서 THCV(순수) 및 CBD(순수) 둘 모두는 전신 발작, 특히 강대성/강직성 발작에 있어서 항간질약으로 가능성이 있다는 것을 보여주었다. 유의적 양의 THC를 함유하고 있는 다른 칸나비노이드를 포함하는 THCV 풍부한 추출물에서 얻어진 데이터는 THC가 THCV의 효과를 반대로 할 수 있고 최소로 포함하거나 거의 안 포함하고 있는 THC 뿐만 아니라, THCV를 주요 또는 지배적인 칸나비노이드로 포함하고 있는 칸나비노이드 추출물은 간질의 치료에 바람직하다는 것을 시사한다.

[0153]

또한, 순수 CBD에서의 결과는 최소로 포함하거나 거의 안 포함하고 있는 THC 뿐만 아니라 THCV 및 CBD를 유의적인 양으로 포함하는 추출물은 최적의 조합을 제공할 수 있다는 것을 시사한다. 이에 이것은 THC가 선택적으로, 상당히 제거된(약간의 퍼센트 이하의 수준으로) THCV 지배적 추출물을 제조하는 것이 바람직하다는 것을 증명한다. 이것은 확실히 정제되고 THCV 및 CBD를 유의적인 수준으로 포함하지만 THC는 적은 수준으로 포함하는 추출물을 만들어 내기 위해서 CBD가 주요 및 지배적인 칸나비노이드(THC 보다 적은 수준)인 CBD 풍부한 추출물(평균적으로 적은 수준의 THC를 포함)과 혼합될 수 있다. 이러한 추출물은 다른 칸나비노이드 및 추출의 결과로 생긴, 예를 들면 엔도칸나비노이드 시스템에서 "수행단(entourage)" 효과를 지지하는 W004/016277에 기재되어 있는 이산화탄소와 같은 비-칸나비노이드 구성성분을 포함할 수 있다.

[0154]

용량에 있어서 랫트/인간 전환 요소(X6)는 600mg(및 임의적으로 400mg 및 800mg 사이)의 CBD 일일 복용량과 THCV에서는 최소한 1.5mg(중간용량), 바람직하게는 최소한 15mg(고용량)을 제시한다.

[0155]

피토칸나비노이드(phytocannabinoid) 추출물이 이용될 때는 낮은 또는 무시해도 될 정도의 낮은 수준의 THC 및 약학적으로 유효한 수준의 THCV 및/또는 CBD가 포함된 추출물이 바람직하다.

[0156]

상기 실시예에 기재된 데이터는 CBD가 시험된 모든 세 모델에서 약간의 항경련 특성을 보이지만 이것이 전신성 또는 부분 발작의 치료에 가장 좋다는 것이 명백하게 나타나 있다. 이와 대조적으로 THCV는 PTZ-모델에서만 효

과적이었다. 이러한 발견은 2개의 칸나비노이드가 서로 다른 작용기전을 가지고 이들의 배합은 더 일반적 치료를 제공할 수 있다는 것을 시사한다. 이러한 관점에서 THCV는 전신발작, 더욱 상세하게는 강직-강대성 발작에 선택적으로 나타나고 CBD는 전신 및 부분 발작에 가장 효과적으로 나타난다.

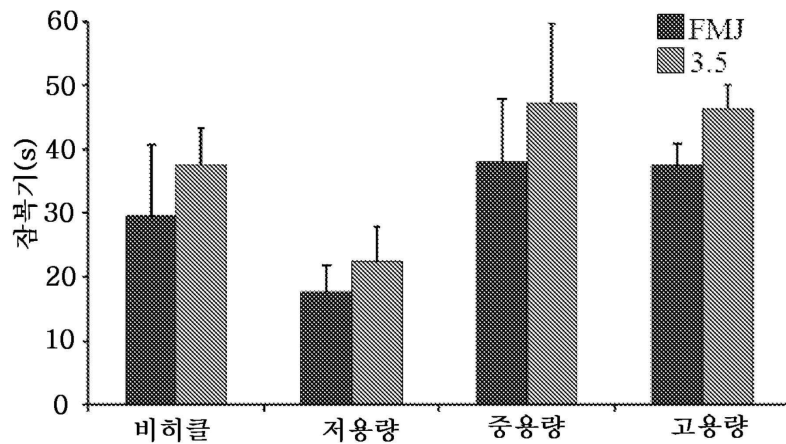
[0157] **참조**

- [0158] ALGER, B. E. (2006) Not too excited? Thank your endocannabinoids. *Neuron*, 51 , 393-5.
- [0159] AMES FR. (1986) Anticonvulsant effect of cannabidiol. *South African Medical Journal* 69:14.
- [0160] AVOLI, M., LOUVEL, J., PUMAIN, R. & KOHLING, R. (2005) Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain. *Prog Neurobiol*.
- [0161] BOSTANCI, M. O. & BAGIRICI, F. (2006) The effects of octanol on penicillin induced epileptiform activity in rats: an in vivo study. *Epilepsy Res*, 71 , 188-94.
- [0162] BRUST, J. C, NG, S. K., HAUSER, A. W. & SUSSER, M. (1992) Marijuana use and the risk of new onset seizures. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 103, 176-81.
- [0163] CONSROE, P.F., WOOD, G.C. & BUCHSBAUM, H. (1975) Anticonvulsant Nature of Marihuana Smoking. *J.American Medical Association* 234 306-307
- [0164] CUNHA, J. M., CARLINI, E. A., PEREIRA, A. E., RAMOS, O. L, PIMENTEL, C, GAGLIARDI, R., SANVITO, W. L, LANDER, N. & MECHOUAM, R. (1980) Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. *Pharmacology*, 21 , 175-85.
- [0166] DAVIS, J P., & RAMSEY, H. H. (1949) Antiepileptic Action of Marijuana-active Substances. *Federation Proceedings* 8 284-285
- [0167] DREIFUSS, F. E., BANCAUD, J., HENRIKSEN, O., RUBIO-DONNADIEU, F.PENRY, J. K. & SEINO, M. (1981) Proposal for revised clinical and electroencephalograph^ classification of epileptic seizures. *Epilepsia*, 22, 489-501.
- [0168] FERDINAND, R. F., VAN DER ENDE, J., BONGERS, I., SELTEN, J. P.,
- [0169] HUIZINK, A. & VERHULST, F. C. (2005) Cannabis-psychosis pathway independent of other types of psychopathology. *Schizophr Res*, 79, 289-95.
- [0170] FISHER, R. S., VICKREY, B. G., GIBSON, P., HERMANN, B., PENOVICH, P., SCHERER, A. & WALKER, S. (2000) The impact of epilepsy from the patient's perspective I. Descriptions and subjective perceptions. *Epilepsy Res*, 41 , 39-51.
- [0171] GASTAUT, H. (1970) Clinical and Electroencephalographical Classification of Epileptic Seizures. *Epilepsia*, 11 , 102-112.
- [0172] INSTITUTE OF MEDICINE (1999) Marijuana and medicine: Assessing the science base. National Academy Press
- [0173] LUTZ, B. (2004) On-demand activation of the endocannabinoid system in the control of neuronal excitability and epileptiform seizures. *Biochem Pharmacol*, 68, 1691 - 8.
- [0174] MACKI E, K. (2006) Cannabinoid receptors as therapeutic targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 46, 101 -22.
- [0175] MCCORMICK, D. A. & CONTRERAS, D. (2001) On the cellular and network bases of epileptic seizures. *Annu Rev Physiol*, 63, 815-46.
- [0176] MERLIS, J. K. (1970) Proposal for an International Classification of the Epilepsies. *Epilepsia*, 11 , 114-119.

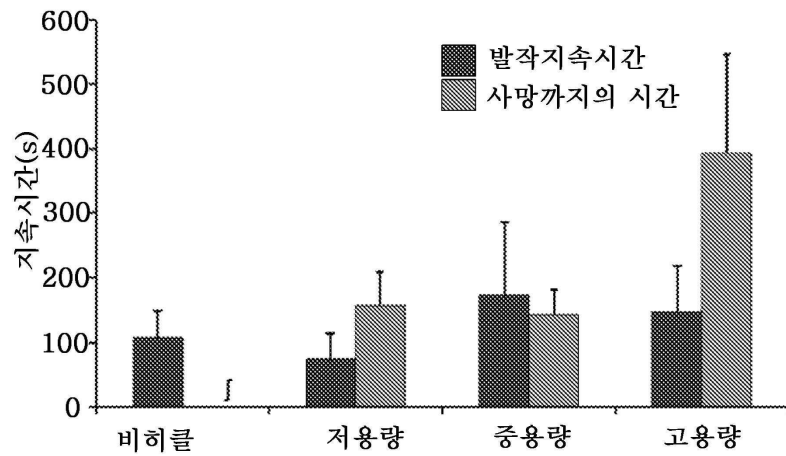
- [0177] NG et al. (1990) Illicit drug use and the risk of new-onset seizures, American Journal of Epidemiology 132: 47-57.
- [0178] ODAY, B. D., TASDEMIR, E., TUMER, C, BILGIN, H. M. & SERMET, A. (2007) Antiepileptic effects of ghrelin on pentylenetetrazole-induced seizures in rats. Peptides, 28, 1214-9.
- [0179] PEREIRA, M. B., FREITAS, R. L., ASSIS, M. A., SILVA, R. F., FONTELES, M. M., FREITAS, R. M. & TAKAHASHI, R. N. (2007) Study pharmacologic of the GABAergic and glutamatergic drugs on seizures and status epilepticus induced by pilocarpine in adult Wistar rats. Neurosci Lett, 419, 253-7.
- [0180] RAUCA, C, WISWEDEL, I., ZERBE, R., KEILHOFF, G. & KRUG, M. (2004) The role of superoxide dismutase and alpha-tocopherol in the development of seizures and kindling induced by pentylenetetrazol - influence of the radical scavenger alpha-phenyl-N-tert-butyl nitrone. Brain Res, 1009, 203-12.
- [0181] SANDER, J. W. (2003) The epidemiology of epilepsy revisited. Curr Opin Neurol, 16, 165-70.
- [0182] SWANN, J. W. (2004) The effects of seizures on the connectivity and circuitry of the developing brain. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 10, 96-100.
- [0183] TREMBLY B. SHERMAN M. (1990) Double-blind clinical study of cannabidiol as a secondary anticonvulsant. Marijuana '90 International Conference on Cannabis and Cannabinoids. Kolympari, Crete, July 8-11, 1990.
- [0184] WINGERCHUK, D. (2004) Cannabis for medical purposes: cultivating science, weeding out the fiction. Lancet, 364, 315-6

도면

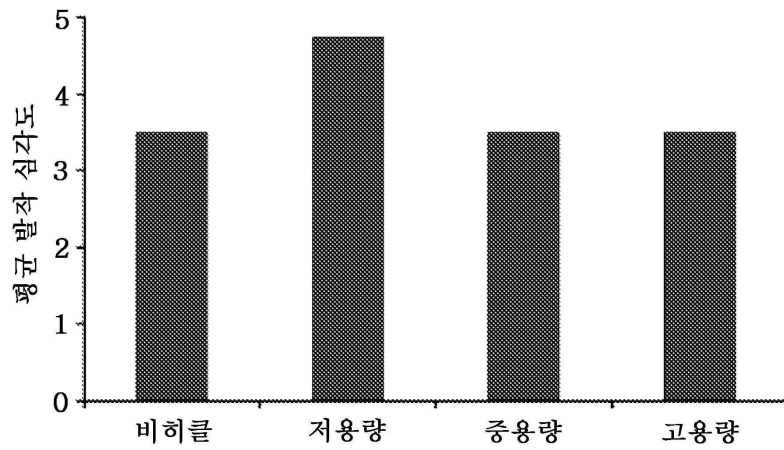
도면1



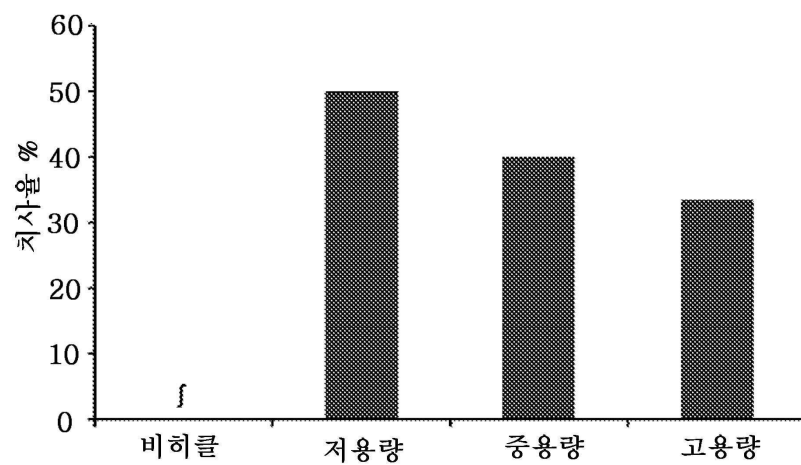
도면2



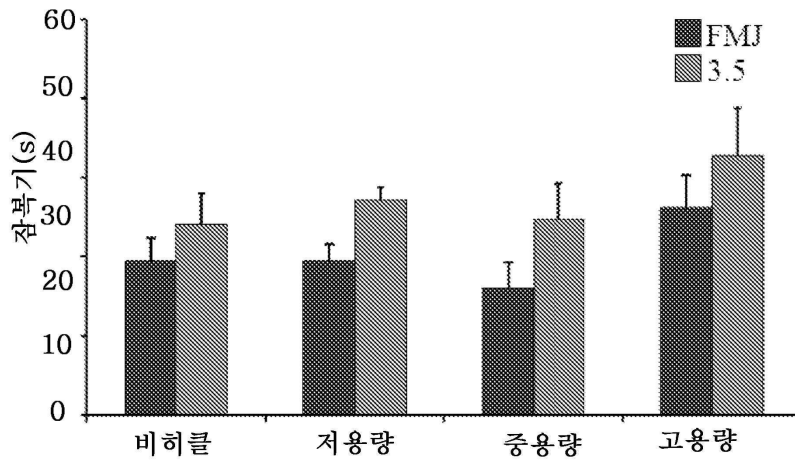
도면3



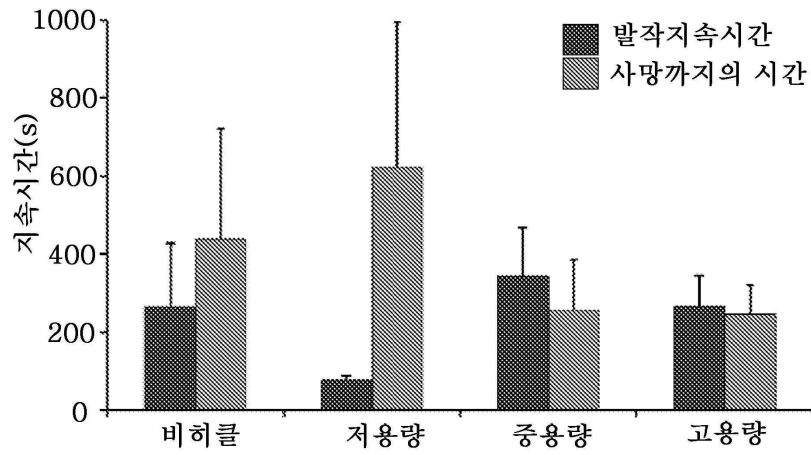
도면4



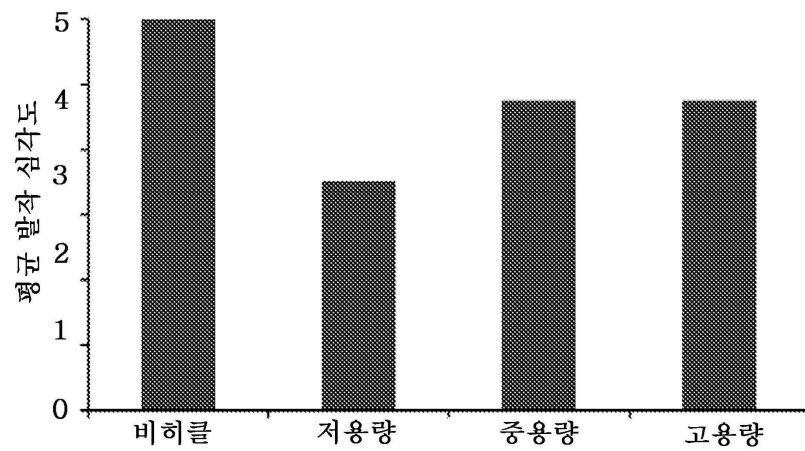
도면5



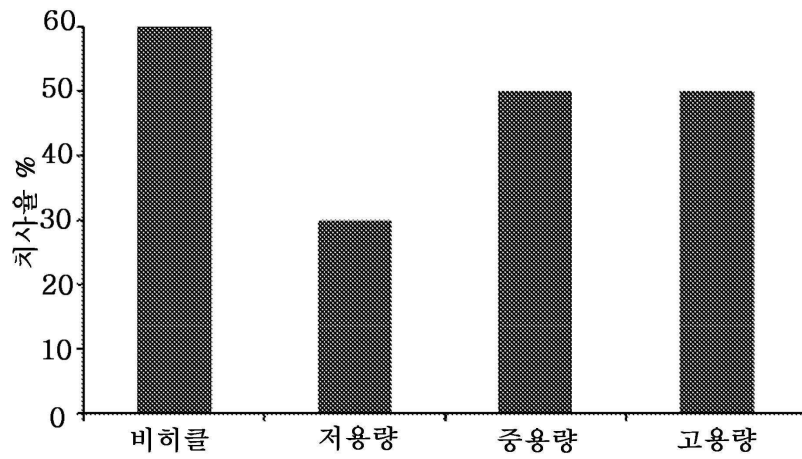
도면6



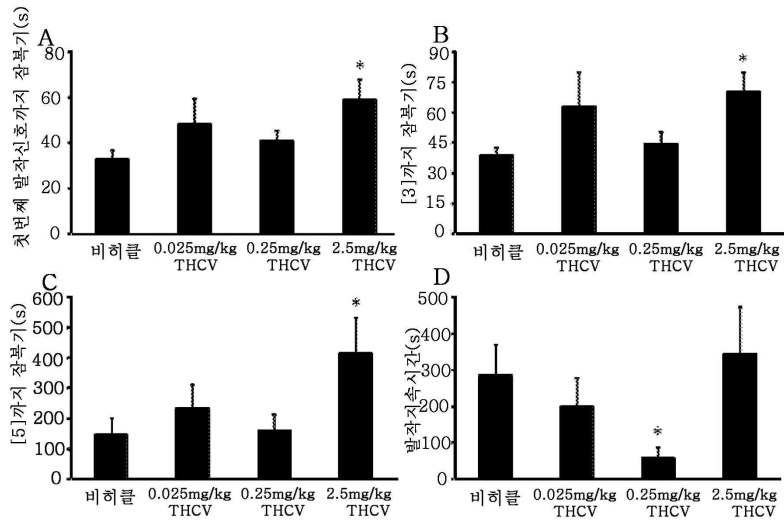
도면7



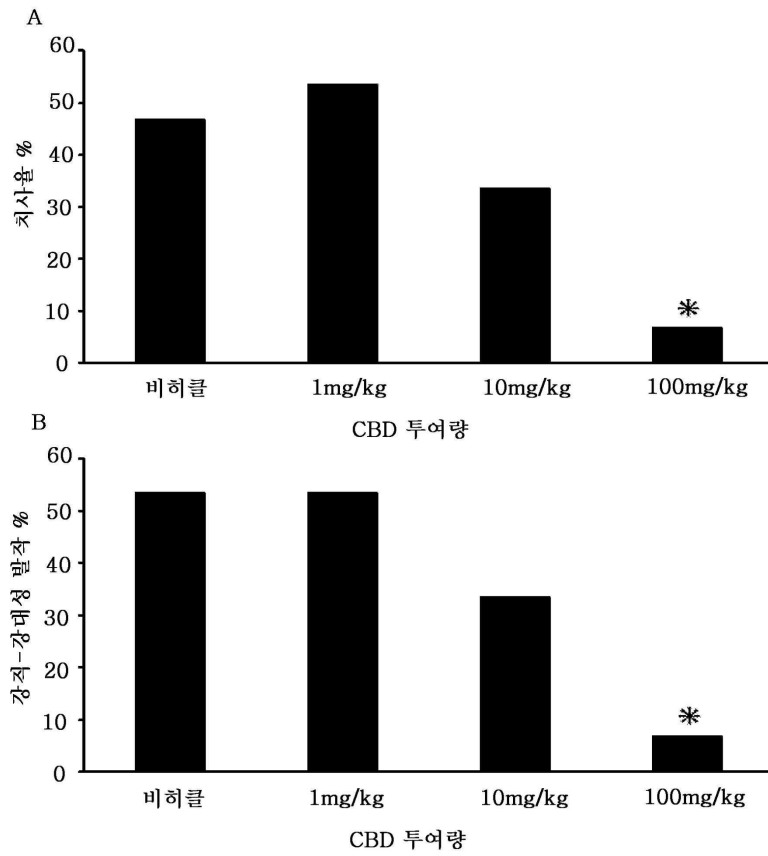
도면8



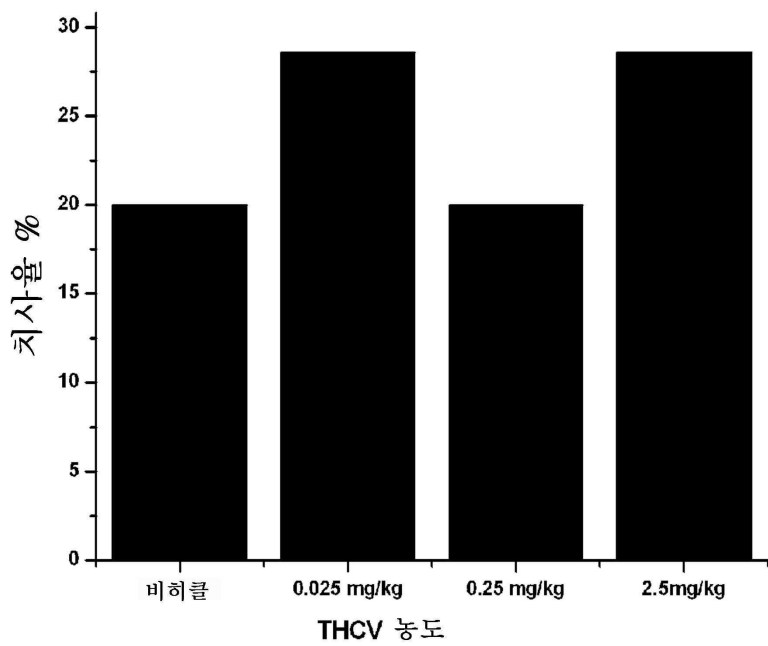
도면9



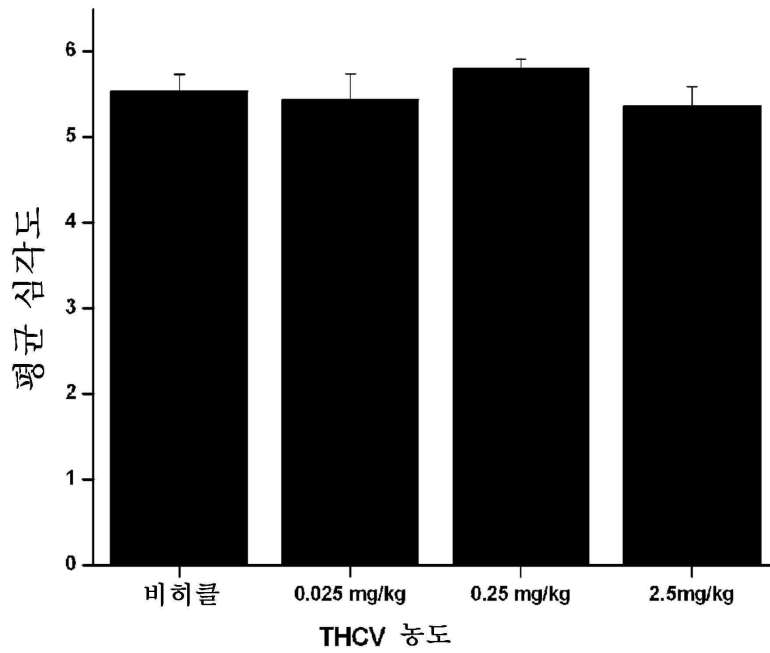
도면10



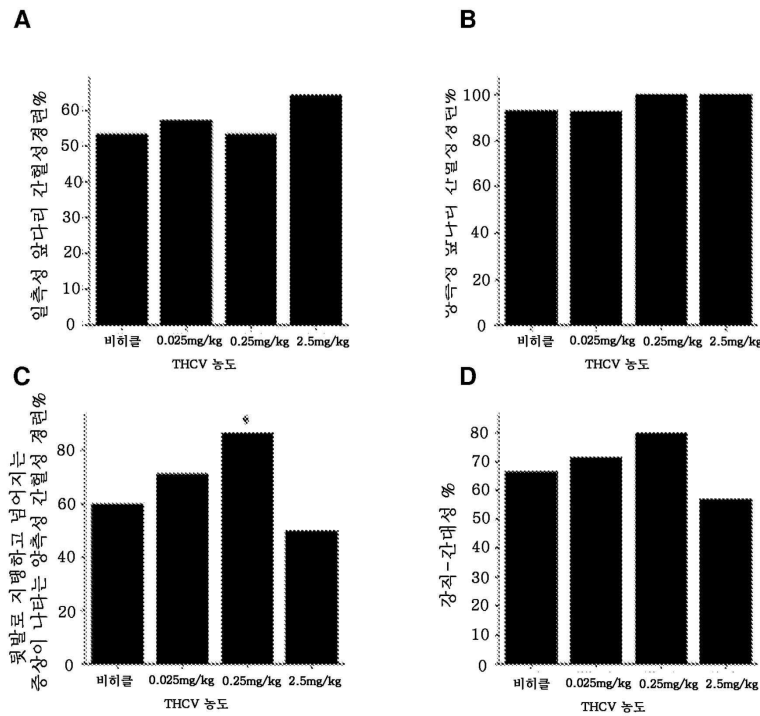
도면11



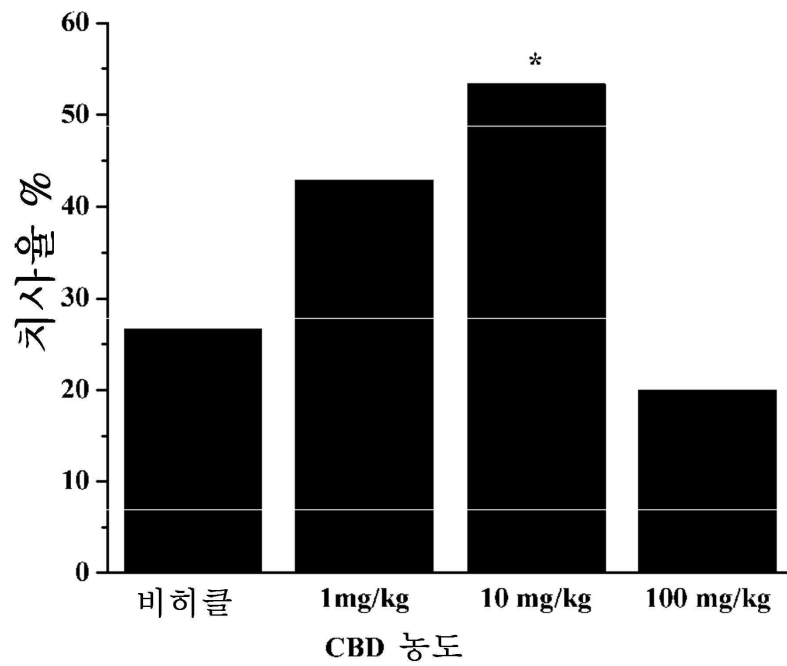
도면12



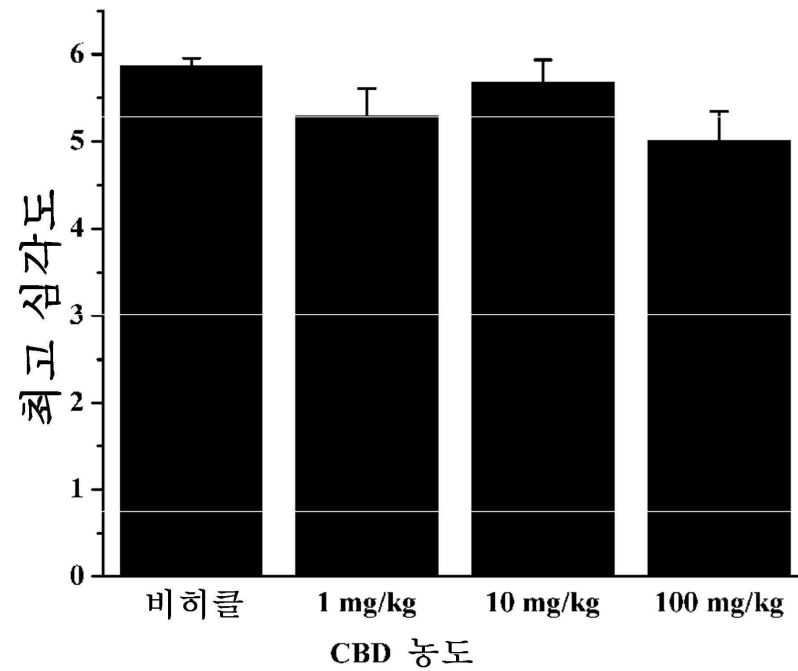
도면13



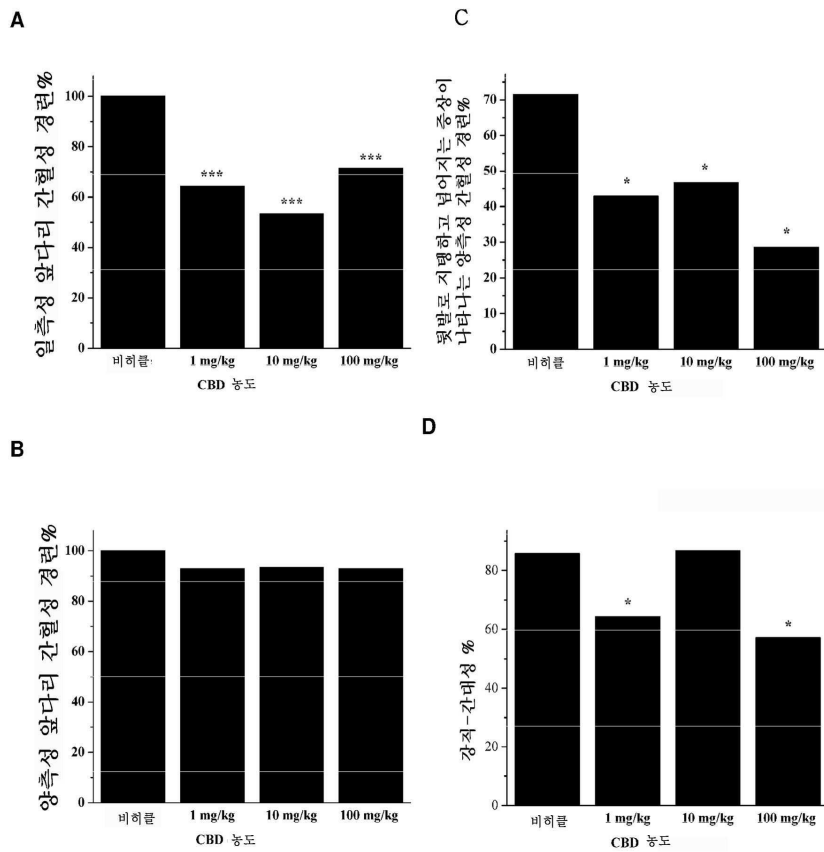
도면14



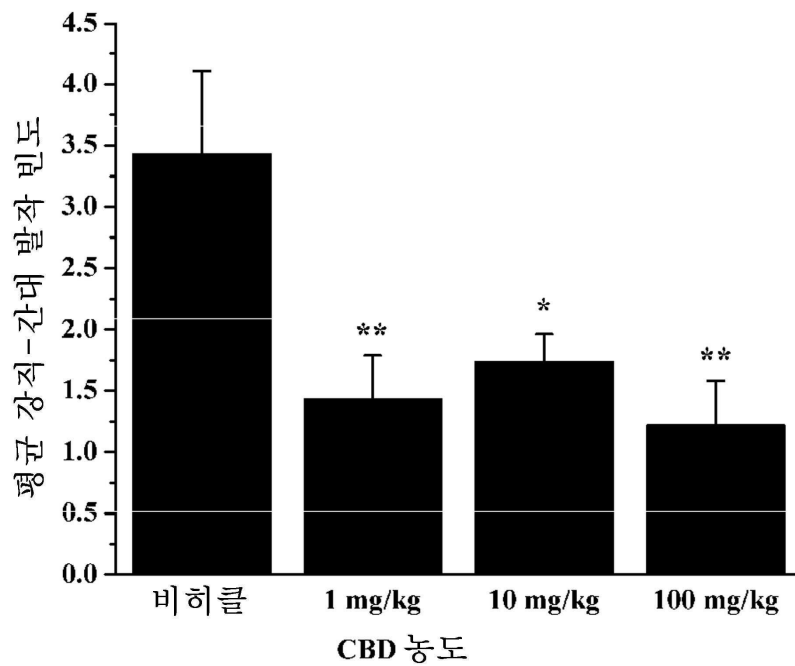
도면15



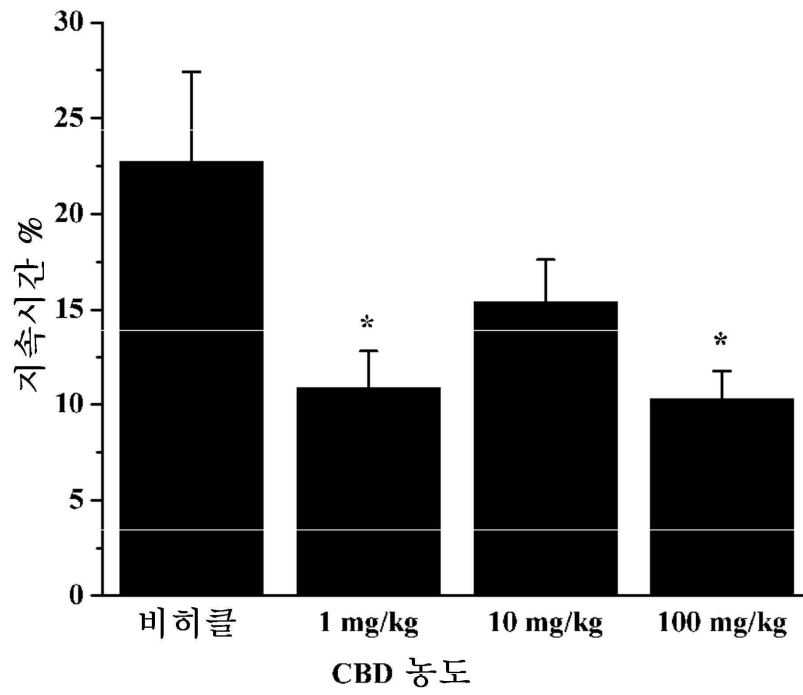
도면16



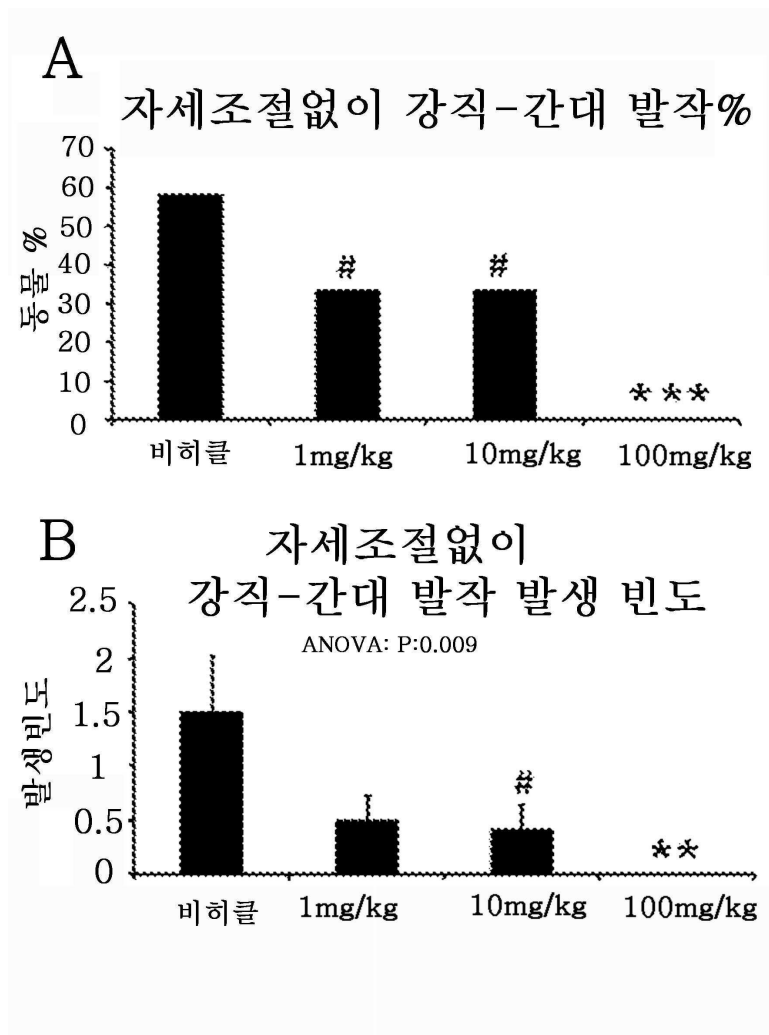
도면17



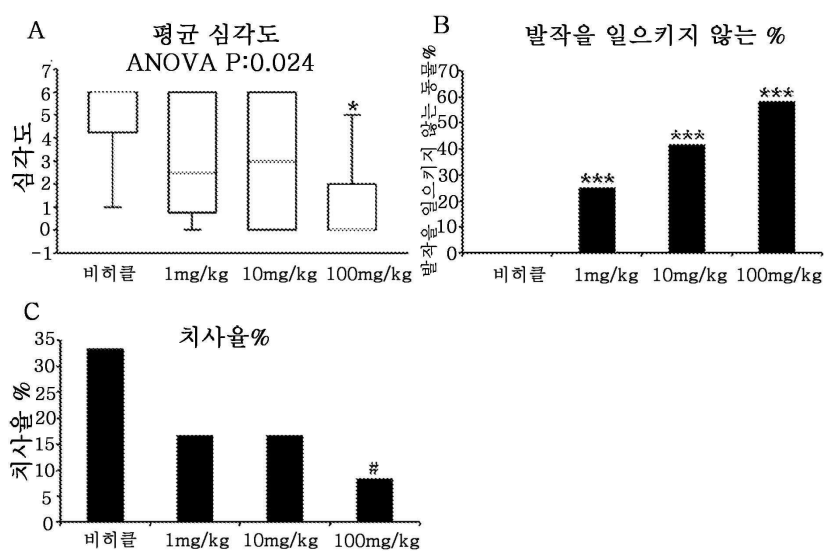
도면18



도면19



도면20



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 10

【변경전】

중량부

【변경후】

중량

【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 9

【변경전】

중량부

【변경후】

중량