(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년01월25일
(11) 등록번호 10-1811462
(24) 등록일자 2017년12월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7028 (2006.01) *A61K 31/704* (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01) *A61K 36/24* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7018043
(22) 출원일자(국제) 2011년01월10일
심사청구일자 2016년01월11일
(85) 번역문제출일자 2012년07월11일
(65) 공개번호 10-2013-0004252
(43) 공개일자 2013년01월09일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/020672
(87) 국제공개번호 WO 2011/085307
국제공개일자 2011년07월14일
(30) 우선권주장
61/293,812 2010년01월11일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20060234955 A1*
US20060135443 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
피닉스 바이오테크놀러지 인코포레이티드.
미국 78217 텍사스 산 안토니오 스위트 801 테소로 디알. 8626
(72) 발명자
애딩턴, 오티스, 씨.
미국 78232 텍사스 산 안토니오 무스탕 써클 320
뉴먼, 로버트, 에이.
미국 04684 메인 서리 웨일 락 레인 112
(74) 대리인
김해중, 홍순우

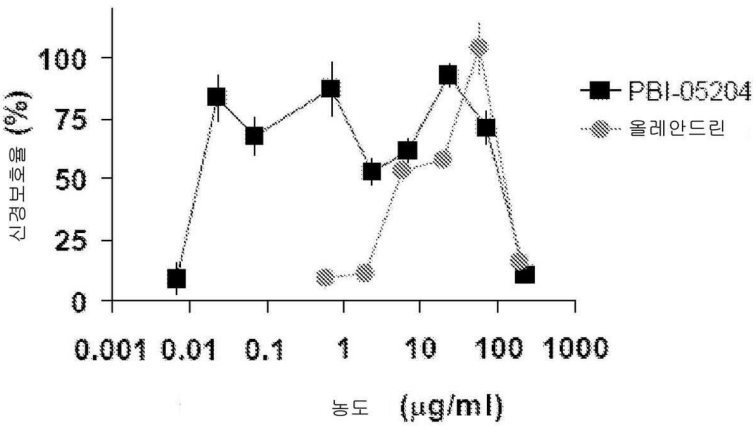
전체 청구항 수 : 총 26 항 심사관 : 신창훈

(54) 발명의 명칭 **협죽도 추출물을 포함하는 신경질환 치료용 조성물**

(57) 요 약

강심성 배당체의 투여에 의해 신경학적 질병을 치료하는 방법이 제공된다. 알츠하이머병, 헌팅턴병 또는 뇌졸증이 치료학적 유효량의 강심성 배당체를 피검체에 투여함으로써 치료된다. 강심성 배당체는 제형 (dosage form) 중에 존재할 수 있다.

대 표 도 - 도7b



명 세 서

청구범위

청구항 1

유효량의 협죽도(*Nerium oleander*)의 초임계 유체(supercritical fluid; SCF) CO_2 추출물을 포함하는 피검체에서 신경학적 질병(neurological condition)을 치료하기 위한 약제 조성물로서,

SCF 추출물이 상기 신경학적 질병을 치료하기 위한 유효량의 강심성 배당체를 포함하며,

강심성 배당체가 협죽도 식물 매스(oleander plant mass)로부터 초임계 유체 추출에 의해 제조된 추출물에 포함된 올레안드린이며, 추출물이 추출 동안 강심성 배당체와 함께 얻어진, 올레아시드 A, 올레안드리게닌, 네리탈로사이드, 또는 오도르사이드를 포함하는 하나 이상의 다른 치료학적 유효 제제를 추가로 포함하며, 강심성 배당체에는 네리폴린(neriifolin)이 제외되며, 조성물의 투여가 피검체에 0.005 내지 10 ng/ml 범위의 강심성 배당체의 혈장 농도를 제공하는 약제 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 신경학적 질병이 강심성 배당체를 포함하는 조성물로 변형된 Na,K-ATPase 활성과 관련된 병인을 갖는 신경학적 질환 또는 질병인 약제 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 신경학적 질병이 강심성 배당체를 포함하는 조성물로 변형된 HIF-1α 활성과 관련된 병인을 갖는 신경학적 질환 또는 질병인 약제 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 강심성 배당체의 투여 후에, 강심성 배당체가 뇌혈막(blood brain barrier)을 통과하고, 8시간 이상의 기간 동안 뇌조직에 유지되는 약제 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 신경학적 질병이 허혈성 뇌졸중 또는 뇌졸중-매개된 허혈성 뇌손상인 약제 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항에 있어서, 조성물이 0.1 내지 50 mg의 강심성 배당체를 포함하는 약제 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

제1항에 있어서, 조성물이 하나 이상의 다른 치료학적 유효 제제를 추가로 포함하는 약제 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 신경학적 질병은 헌팅턴병, 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성 측상 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 소 해면상뇌증(bovine spongiform encephalopathy), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 당뇨병성 신경병증(diabetic neuropathy), 자폐증(autism) 및 아동 신경 세로이드 리포푸시노시스(juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis)로 구성된 군으로부터 선택되는 약제 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 강심성 배당체가 약제 제형 또는 조성물에 존재하는 약제 조성물.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

제1항에 있어서, 강심성 배당체가 피검체로 투여 후 뇌혈막을 통과하는 약제 조성물.

청구항 17

제1항에 있어서, 추출물이 개질제의 존재 하에 초임계 유체 추출에 의해 제조된 약제 조성물.

청구항 18

제1항에 있어서, 강심성 배당체가 뇌조직에 있어서 4 L/hr 이하의 제거율을 갖는 약제 조성물.

청구항 19

신경학적 질병을 갖는 피검체 군집(population)에서 통계학적으로 유의미한 수(statistically significant number)의 피검체의 임상 상태를 개선시키기 위한 약제 조성물로서,

강심성 배당체 또는 강심성 배당체-함유 조성물이 피검체 군집에 투여되고,피검체의 임상 상태를 측정하기 위해, 상기 신경학적 질병을 치료하기 위한 유효량의 강심성 배당체를 포함하는 유효량의 협죽도의 초임계 유체(SCF) CO_2 추출물을 포함하며,

강심성 배당체가 협죽도 식물 매스로부터 초임계 유체 추출에 의해 제조된 추출물에 포함된 올레안드린이며, 추출물이 추출 동안 강심성 배당체와 함께 얻어진, 올레아시드 A, 올레안드리게닌, 네리탈로사이드, 또는 오도르사이드를 포함하는 하나 이상의 다른 치료학적 유효 제제를 추가로 포함하며, 강심성 배당체에는 네리폴린이 제외되며, 조성물을 투여하는 것이 피검체에 0.005 내지 10 ng/ml 범위의 강심성 배당체의 혈장 농도를 제공하는 약제 조성물.

청구항 20

알츠하이머병, 헌팅턴병, 뇌졸중 또는 기타 신경학적 질병으로부터 선택된 신경학적 질병으로부터 고통받을 위험이 있는 피검체 군집에서 하나 이상의 피검체에 리커링 베이시스(recurring basis)에 대한 유효량의 강심성 배당체를 투여하여 군집에서 신경학적 질병의 발병율을 저하시키기 위한, 신경학적 질병을 치료하기 위한 유효량의 강심성 배당체를 포함하는 유효량의 협죽도의 초임계 유체(SCF) CO_2 추출물을 포함하는 약제 조성물로서,

강심성 배당체가 협죽도 식물 매스로부터 초임계 유체 추출에 의해 제조된 추출물에 포함된 올레안드린이며, 추출물이 추출 동안 강심성 배당체와 함께 얻어진, 올레아시드 A, 올레안드리게닌, 네리탈로사이드, 또는 오도르사이드를 포함하는 하나 이상의 다른 치료학적 유효 제제를 추가로 포함하며, 강심성 배당체에는 네리폴린이 제외되며, 조성물을 투여하는 것이 피검체에 0.005 내지 10 ng/ml 범위의 강심성 배당체의 혈장 농도를 제공하는 약제 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 리커링 베이시스(recurring basis)가 매일, 격일, 매 2일, 매 3일, 매 4일, 매 5일, 매 6일, 매주, 격주, 매 2주, 매 3주, 매달, 매 2달, 월 2회, 반달에 한번, 격달, 2달에 1회, 분기별로, 2분기마다, 3개월마다, 계절마다, 년 2회 또는 년 1회인 약제 조성물.

청구항 22

제20항에 있어서, 1주 이상, 1달 이상, 1분기 이상 또는 1년 이상 동안 투여되는 약제 조성물.

청구항 23

제20항에 있어서, 유효량이 1일 1회 이상 투여되는 약제 조성물.

청구항 24

제20항에 있어서, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 뇌졸중 또는 다른 신경학적 질병으로부터 선택된 신경학적 질병으로부터 고통받을 위험이 있는 피검체의 군집을 확인하는 것을 추가로 포함하는 약제 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 위험성이 있는 피검체 군집이 피검체의 노령화, 신경학적 질병의 가족력, 신경학적 질병 발병에 대한 유전적 소인, 피검체에서 ApoE4 유전자의 존재 및 발현, 여성, 심혈관 질환, 당뇨병, 다운 증후군, 뇌손상, 낮은 수준의 교육 수준, 흡연, 과도한 알코올 섭취 또는 약물 남용에 의해 특징되는 약제 조성물.

청구항 26

피검체가 뇌졸중을 일으킨 후 허용되는 지연된 기간 내에, 초기 투약 요법에 따라 초기 용량의 강심성 배당체를 투여하되, 지연된 기간이 10 시간 이하이고, 강심성 배당체로의 치료에 대한 피검체의 임상 반응 또는 치료 반응의 적당성을 측정하고, 요구되는 임상 종점에 도달할 때까지 강심성 배당체로의 처치를 계속하거나, 피검체에서 요구되는 임상 반응 또는 치료 반응이 달성될 때까지 용량을 증가시키거나 감소시키는 것을 포함하여 피검체의 뇌졸중 치료의 시간 지연 방법에서 사용하기 위한, 신경학적 질병을 치료하기 위한 유효량의 강심성 배당체를 포함하는 유효량의 협죽도의 초임계 유체(SCF) CO_2 추출물을 포함하는 약제 조성물로서,

강심성 배당체가 협죽도 식물 매스로부터 초임계 유체 추출에 의해 제조된 추출물에 포함된 올레안드린이며, 추출물이 추출 동안 강심성 배당체와 함께 얻어진, 올레아시드 A, 올레안드리게닌, 네리탈로사이드, 또는 오도르사이드를 포함하는 하나 이상의 다른 치료학적 유효 제제를 추가로 포함하며, 강심성 배당체에는 네리폴린이 제외되며, 조성물을 투여하는 것이 피검체에 0.005 내지 10 ng/ml 범위의 강심성 배당체의 혈장 농도를 제공하는 약제 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 지연 기간이 10시간 이하, 8시간 이하, 6시간 이하, 4시간 이하, 3시간 이하, 2시간 이하, 1시간 이하, 45분 이하, 30분 이하, 20분 이하, 또는 10분 이하인 약제 조성물.

청구항 28

제26항에 있어서, 피검체의 임상 반응 또는 치료 반응의 적당성을 결정하는 것이 신체의 한쪽의 안면, 팔 또는 다리의 약함, 신체의 한쪽의 안면, 팔 또는 다리의 무감각, 언어의 이해 불능, 분명하게 말하지 못하는 것, 쓰지 못하는 것, 현기증 또는 걸음걸이 불균형, 복시 및 비정상적인 심한 두통의 평가에 의해 이루어지는 약제 조성물.

청구항 29

제1항에 있어서, 조성물이 0.01 내지 100 ㎎의 올레안드린을 포함하는 약제 조성물.

청구항 30

제19항에 있어서, 조성물이 0.01 내지 100 ㎎의 올레안드린을 포함하는 약제 조성물.

청구항 31

제20항에 있어서, 조성물이 0.01 내지 100 ㎎의 올레안드린을 포함하는 약제 조성물.

청구항 32

제26항에 있어서, 조성물이 0.01 내지 100 ㎎의 올레안드린을 포함하는 약제 조성물.

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 강심 배당체 화합물 또는 이를 함유하는 제조물로 신경학적 질병을 치료하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 강심 배당체를 이를 필요로 하는 피검체에 투여함으로써 신경학적 질병 또는 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 신경학적 질병 및 장애는 뇌 작용에 영향을 끼친다. 이들 질환 및 장애에 대한 치료적 또는 완화적 요법을 개발하기 위해 많은 노력이 기울어져 왔다: 그러나, 다양한 여러 질환 및 질병에 대해 유효한 것으로 입증된 수많은 약물요법적 방법이 존재하지만, 포괄적이거나 보편적인 요법은 개발되지 않았다.

[0003] 헌팅턴 병 (HD)은 신경계에 영향을 끼치는 뇌의 유전적 질환이다. 이는 부모로부터 아이로 전해지는 결함 유전자에 의해 초래된다. HD 유전자는 적당한 뇌 발달에 중대한 것으로 드러난 "헌팅턴"으로서 공지된 특정 단백질의 제조에 관여한다. HD의 표준 사인은 감정, 인식 및 운동 장애를 포함한다. 헌팅턴은 움찔거리는 불수의적 움직임 (무도병)을 특징으로 하나, 기억력의 점진적인 황폐화, 생각 속도, 판단력 및 문제 인식력 및 계획력 손실을 포함하는, 가끔 비정상적인 움직임이 없는 경직성, 사지 이용에서의 변화 (운동신경장애), 신체적 기능의 조종 손실 및 치매를 초래한다. 헌팅턴 병에 대한 치유는 공지되어 있지 않다. HD와 관련된 증상의 조종 예컨대, 감정 및 운동 문제를 돕는 많은 약물이 존재하나, 질환 과정을 중단시키거나 역행시키는 처치는 존재하지 않는다. 헌팅턴 병은 일반적인 막 기형을 갖는 질환으로서 인지되어 왔다. 현저하게 증가된 수준 및 활성 (10배 증가)의 Na,K-ATPase가 정상적인 사람과 비교하여 헌팅턴 병 환자의 적혈구 및 기저핵의 막에서 관찰되었다 (Butterfield DA, Oeswein JQ, Prunty ME, Hisle KC, Markesbery WR. Increased sodium, potassium adenosine triphosphatase activity in erythrocyte membranes in Huntington's disease. Ann Neurology, 4:60-62, 1978) fibroblast membranes obtained form the skin of Huntington's disease patients (Schroeder F, Goetz IE, Roberts E, Membrane anomalies in Huntington's disease fibroblasts.J.Neurochem. 43:526-539, 1984).

[0004] 알츠하이머병은 치매의 형태이다 - 뇌의 지적 기능 (기억, 정위, 계산 등)을 손상시키나, 일반적으로 이의 운동 기능은 유지시키는 신경퇴행성 질환. 알츠하이머병에서, 마음은 점차적으로 피폐해지며, 기억력 손실, 혼란, 방향감각 손실, 손상된 판단력 및 정상적인 일상 생활을 수행하는 능력에 영향을 끼칠 수 있는 다른 여러 문제점을 초래한다. 정신 변화의 유형, 중증도, 연속성 및 진행성은 매우 다양하다. 알츠하이머병에 대한 공지된 치료법은 없으며, 이의 진행을 감속시키는 공지된 방법이 존재하지 않는다. 질환의 초기 또는 중간 단계의 일부 사람에 있어서, 태크린과 같은 약물은 일부 인식 증상을 완화시킬 수 있다. 아리셉트 (도네페질) 및 엑셀론 (리바스티그민)은 가역적인 아세틸콜린스테아라아제 억제제이며, 이는 알츠하이머 유형의 치매를 경감시키기 위한 완만한 치료를 나타낸다. 이들 약물 (콜린에스테라아제 억제제로서 불림)은 뉴로트랜스미터 아세틸콜린의 뇌 수준을 증가시킴으로써 작용하여, 뇌 세포간의 소통 복구를 돕는다. 일부 약물은 행동 증상 예컨대, 불면, 동요, 혼란, 불안 및 우울의 통제를 도울 수 있다. 이러한 처치는 환자를 더욱 편안하게 하기 위한 목적이다. 알츠하이머병을 치료할 수 있는 약물은 공지되어 있지 않지만, 콜린에스테라아제 억제제는 일상 생활의 능력을 향상시키거나 행동적 문제를 감소시킬 수 있다. 현재 테스트되고 있는 알츠하이머병 치료를 위한 약물로는 에스트로겐, 비스테로이드 항염증제, 비타민 E, 셀레길린 (카르벡스 (Carbex), 엘데프릴 (Elderpryl)) 및 식물성 생성물 징코 빌로바 (gingko biloba)를 포함한다.

[0005] 정상적인 조건하에서, 신경은 막 경계된 항상성의 에너지 의존적 Na-K-ATPase 펌프에 의해 조절되는 시험 막 포텐셜 및 기능을 유지한다. 허혈은 이온 항상성 변화를 촉발시켜 잠재적으로는 비가역적인 조직 손상을 초래한다. 절충된 Na,K-ATPase 활성은 뇌 허혈 및 외상성 뇌손상의 일부 모델에서 신경병리학적 및 아폽토틱 과정에서 역할을 수행하는 것으로 암시되었다. 뇌졸증 (stroke)-매개된 허혈성 뇌손상에서 Na,K-ATPase의 역할은 여러 다양한 분자 메카니즘과 관련있는 것으로 보고되었다. Na,K-ATPase 촉매 활성의 억제는 예를 들어, 허혈-재관류 동안 ATP 소모의 저하를 유도할 수 있다. 또한, 사이토솔릭 Ca^{2+}의 제거는 신경 세포 치사를 초래할 수 있다. 따라서, 예컨대, 강심성 배당체에 의한 Na,K-ATPase의 억제는 세포내 Ca^{2+} 수준의 증가를 유도하고, Na-Ca 익스체인저 (exchanger)를 통한 세포내 Ca^{2+} 분출의 저하를 유도할 수 있다. 이러한 맥락에서, 해마 CA1 뉴런에

서 비교적 낮은 수준의 세포내 Ca^{2+}이 일과성 허혈 후 3일에 관찰되었으며, 칼슘 수준의 증가는 광범위한 범위의 허혈후 치료 시간에 걸쳐 지연된 신경 치사에 대한 보호를 제공하는 것으로 여겨진다.

[0006] 강심성 배당체의 작용의 약물학적 메카니즘중 하나로는 이들의 이온 교환 펌프 즉, Na,K-ATPase로 결합하여 이러한 특정 효소의 활성을 억제할 수 있는 능력을 포함한다. 플라즈마 멤브레인을 통과하여 Na^+와 K^+의 활성적인 수송을 촉매하는 트랜스멤브레인 단백질인 Na,K-ATPase는 강심성 배당체에 대한 잘 확립된 약물학적 수용체이다. 이러한 효소는 ATP를 가수분해하고, 유리 에너지를 사용하여 전기화학적 구배에 반하여 K^+는 세포내로 Na^+는 세포 밖으로 수송한다 (Hauptman, P.J., Garg, R., and Kelly, R.A. Cardiac glycosides in the next millennium. Prog. Cardiovasc. Dis. 41:247-254, 1999).

[0007] Na,K-ATPase는 2개의 헤테로다이머 서브유닛 즉, 촉매적 α-서브유닛 및 글리코실화된 β-서브유닛으로 이루어져 있다. 또한, γ 서브유닛이 존재하나, 이는 자세히 연구되지 않았다. α-서브유닛은 ATP, Na^+, K^+ 및 강심성 배당체에 대해 결합 부위를 갖는다. β-서브유닛은 촉매적 α-서브유닛을 안정화시키는 기능을 하며, 또한 조절 역할을 수행할 수 있다. 4개의 상이한 α 이소폼 (α1, α2, α3, α4) 및 3개의 상이한 β 이소폼 (β1, β2 및 β3)이 포유동물 세포에서 확인되었다. 이러한 서브유닛 유형의 상대적 발현은 정상 상태 및 질환 상태에서 현저하게 변화된다. 또한, 다양한 α 이소폼에 대한 강심성 배당체의 겉보기 친화도 (apparent affinity)는 매우 상이하다. α1 이소폼에 대한 강심성 배당체의 결합은 α2 및 α3 이소폼에 대해 발생하는 것보다 낮으며, α2 및 α3 이소폼은 이러한 유형의 약물에 의한 억제에 대해 250배 또는 그 초과로 더욱 민감하다 (Blanco, G. and Mercer, R.W.Isozymes of the Na, K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. Am.J.Physiol. 275 (Renal Physiol. 44): F633-F650, 1998). 사카이 (Sakai) 등은 (FEBS Letters 563:151-154, 2004) α3 서브유닛 이소폼의 발현이 정상적인 직장결장 세포와 비교하여 인간 직장결장 암 세포에서 증가되었음을 보고하였다.

[0008] 강심성 배당체는 지용성과 대조적으로 다양한 범위의 상대적인 수용성이 존재한다. 대부분의 강심성 배당체가 Na, K-ATPase 활성에 결합하고 이의 활성을 억제할 수 있는 반면, 지용성 (친지성 또는 소수성) 보다는 비교적 더욱 수용성 (친수성)을 띠는 강심성 배당체는 뇌혈류 배리어로서 공지된 뇌에 대한 액체 배리어를 통과하는 단지 제한된 능력을 갖는다. 뇌혈류 벽 (BBB)은 중추신경계 (CNS)에서 맥락총에 의해 유지되는 혈류와 뇌척수액 (CSF)의 분리체이다. 내피 세포는 미시적 물질 (예를 들어, 박테리아) 및 큰 또는 친수성 분자의 CSF로의 확산을 제한하는 반면, 작은 소수성 분자 (O_2, 호르몬, 지용성 강심성 배당체 등)의 확산은 허용한다.

[0009] 협죽도(*Nerium oleander*)는 아열대 아시아, 미국 남서부 및 지중해에 널리 분포되어 있는 관상용 식물이다. 이의 의약적 및 독성적 특성은 오래전부터 인정되어왔다. 이는, 예를 들면, 치질, 궤양, 나병 및 독뱀에 물린 데의 치료, 및 유산 유도에 사용되어 왔다. 협죽도 추출물의 단독 성분은 아니나 중요 성분은 강심성 배당체이다.

[0010] 네리움 (*Nerium*) 종의 식물로부터의 글리코시드의 추출은 협죽도로부터의 약물학적/치료학적 활성 성분을 제공하였다. 이들 중에는 올레안드린, 네리폴린 (nerifolin) 및 기타 강심성 배당체 화합물이 존재한다. 상표명 안비르젤 (ANVIRZEL™)로 판매되는 협죽도의 고온수 추출에 의해 수득된 올레안드린 추출물은 농축된 형태 또는 분말 형태의 협죽도의 고온수 추출물을 함유한다. 고온수 협죽도 (oleander) 추출물 (즉, 안비르젤 (Anvirzel)™)의 페이스 I 시험이 완료되었다 (Mekhail et al., Am.Soc.Clin.Oncol., vol. 20, p. 82b, 2001). 약 57ug 올레안드린/1일 제공될 협죽도 추출물은 1.2ml/m^2/d 이하의 용량으로 투여되기에 안전할 수 있는 것으로 추정되었다. 독성 제한 용량은 발견되지 않았다.

[0011] 후안찬수 (Huachansu)는 두꺼비 피부로부터 수득된 추출물이며, 이는 부파디에놀라이드 예컨대, 부팔린, 강심성 배당체를 포함한다. 후안찬수는 중국에서 암 치료를 위해 승인된 약물이다. 이는 간암, 위암, 폐암, 피부암 및 식도암을 포함하는 다양한 암을 치료하는데 사용되었다.

발명의 내용

[0012] 발명의 요약

[0013] 본 발명은 신경학적 질병을 치료하기에 유효한 양의 강심성 배당체를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 피검

체에 투여하는 것을 포함하여 신경학적 질병을 치료하는 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명의 또 다른 양태는 강심성 배당체를 포함하는 조성물로 이를 필요로 하는 피검체에서 변형된 Na,K-ATPase 활성과 관련된 병인을 갖는 신경학적 질병 또는 질병을 치료하기 위한 방법으로서;

[0015] 변형된 Na,K-ATPase α3 이소폼 대 α1 이소폼 서브유닛 비와 관련되거나 변형된 Na,K-ATPase 활성과 관련된 병인을 갖는 신경학적 질병 또는 질병을 갖는 피검체를 확인하고;

[0016] 강심성 배당체를 포함하는 조성물의 피검체로의 투여를 지시하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일부 구체 예는 1) 피검체가 강심성 배당체를 포함하는 조성물의 치료학적 관련 용량을 처방받고 투여되는 구체 예; 2) 피검체에 처방된 투약 요법에 따라 강심성 배당체를 포함하는 조성물을 투여하는 구체 예; 3) 피검체에 강심성 배당체를 포함하는 추출물을 포함하는 조성물을 투여하는 구체 예; 4) 추출물이 추출 동안 강심성 배당체와 함께 수득된 하나 이상의 다른 치료학적 유효제를 포함하는 구체 예; 5) 추출물이 추출 동안 강심성 배당체와 함께 수득된 하나 이상의 다른 치료학적 유효제를 추가로 포함하는 구체 예; 6) 조성물이 하나 이상의 다른 비-강심성 배당체 치료학적 유효제 즉, 강심성 배당체가 아닌 제제를 추가로 포함하는 구체 예; 및/또는 7) 피검체에 고온수 식물 또는 동물 공급원 추출물 함유 강심성 배당체 2mg 내지 22.5mg/1일, 또는 강심성 배당체의 식물 또는 동물 공급원 농축 추출물 (예를 들어, 초임계 CO_2 추출물 또는 유기 용매 추출물) 0.6 내지 4.8mg, 또는 10 내지 500ug의 강심성 배당체의 순수한 단일 화학 형태를 투여하는 구체 예를 포함한다.

[0018] 본 발명은 또한, 필요로 하는 피검체에 신경학적 질병을 치료하는 방법으로서,

[0019] 피검체의 신경학적 질병이 알츠하이머병, 헌팅턴병, 뇌졸증 또는 다른 신경학적 질병인지의 여부를 측정하고;

[0020] 강심성 배당체의 투여를 지시하고;

[0021] 기간 동안 처방된 초기 투약 요법에 따라 피검체에 초기 용량의 강심성 배당체를 투여하고;

[0022] 주기적으로 강심성 배당체로의 치료에 대한 피검체의 임상적 반응 및/또는 치료적 반응의 적절성(adequacy)을 측정하고;

[0023] 피검체의 임상 반응 및/또는 치료적 반응이 적절한 경우, 요망되는 임상적 종점에 도달할 때까지 필요에 따라 강심성 배당체로의 치료를 계속하거나;

[0024] 피검체의 임상 반응 및/또는 치료적 반응이 초기 용량 및 초기 투약 요법에 부적절한 경우, 피검체에서 요망되는 임상 반응 및/또는 치료적 반응이 달성될 때까지 용량을 단계적으로 증가시키거나 감소시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0025] 본 발명은 또한, 신경학적 질병의 발병 위험성이 있는 피검체 군집에서 신경학적 질병의 발생을 예방하거나 발병율을 저하시키는 방법으로서,

[0026] 신경학적 질병 예컨대, 알츠하이머병, 헝틴턴병, 뇌졸증 또는 기타 신경학적 질병으로부터 고통받을 위험이 있는 피검체 군집에서 하나 이상의 피검체에 연장된 기간 동안 리커링 베이시스 (recurring basis)에 대한 유효량의 강심성 배당체를 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0027] 본 발명은 또한, a) 방법이 하나 이상의 피검체에 강심성 배당체의 투여를 지시하는 것을 포함하는 구체 예; b) 방법이 기간 동안 처방된 투약 요법에 따라 피검체에 유효량의 강심성 배당체를 투여하는 것을 추가로 포함하는 구체 예; c) 방법이 강심성 배당체로의 처리에 대한 하나 이상의 피검체의 임상 반응 및/또는 치료적 반응의 적절성을 주기적으로 측정하는 것을 추가로 포함하는 구체 예; d) 피검체 임상 반응 및/또는 치료적 반응이 적절한 경우, 방법이 요구되는 임상 종점에 도달할 때까지 필요에 따라 강심성 배당체로의 처치를 계속하는 것을 추가로 포함하는 구체 예; e) 피검체의 임상 반응 및/또는 치료적 반응이 초기 용량 및 초기 투약 요법에서 부적절한 경우, 방법이 피검체에서 요구되는 임상 반응 및/또는 치료적 반응이 달성될 때까지 용량을 점차적으로 증가시키거나 감소시키는 것을 추가로 포함하는 구체 예; f) 강심성 배당체가 다수의 피검체 군집에 투여되는 구체 예; g) 리커링 베이시스가 매일, 매 2일, 매 3일, 매 4일, 매 5일, 매 6일, 매주, 매 2주, 매 3주, 매달, 매 2달, 월 2회, 반달에 한번, 2달에 1회, 분기별로, 2분기 마다, 3분기마다, 계절마다, 년 1회 및/또는 매년마다인 구체 예; h) 연장된 기간은 1주 이상, 1달 이상, 1분기 이상 및/또는 1년 이상인 구체 예; i) 유효량이 1일 1회 이상 투여되는 구체 예; j) 방법이 신경학적 질병 예컨대, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 뇌졸증 또는 기타 신경학적 질병에 걸릴 위험성이 있는 피검체 군집을 확인하는 것을 추가로 포함하는 구체 예; 및/또는 k) 위험성이 있는 피검체 군집이 피검체의 노령화, 신경학적 질병의 가족력, 신경학적 질병 발병에 대한 유전적 소인, 피검

체에서 ApoE4 유전자의 존재 및 발현, 여성 (여성이 알츠하이머병에 남성보다 2배 걸렸음), 심혈관 질환 (예를 들어, 고혈압 및 고콜레스테롤 수준), 당뇨병 (특히, 타입 2 또는 이러한 질환의 성인 발병 형태), 다운 증후군, 뇌 손상, 낮은 수준의 교육 수준, 흡연, 과도한 알코올 섭취 및/또는 약물 남용을 특징으로 하는 구체 예를 포함한다.

[0028] 본 발명은 또한, 피검체의 뇌졸증 치료의 시간 지연된 방법으로서,

[0029] 피검체가 뇌졸증을 일으킨 후 허용되는 지연된 기간 내에, 초기 투약 요법에 따른 초기 용량의 강심성 배당체를 투여하고;

[0030] 강심성 배당체로의 치료에 대한 피검체의 임상 반응 및/또는 치료적 반응의 적절성을 측정하고;

[0031] 피검체의 임상 반응 및/또는 치료적 반응이 적절한 경우, 요구되는 임상 종점에 도달할 때까지 필요에 따라 강심성 배당체로의 처치를 계속하고;

[0032] 초기 용량 및 초기 투약 요법에서 피검체의 임상 반응 및/또는 치료적 반응이 부적절한 경우, 피검체에서 요구되는 임상 반응 및/또는 치료적 반응이 달성될 때까지 용량을 점차적으로 증가시키거나 감소시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0033] 본 발명의 일부 구체 예는 1) 지연 기간이 10시간 이하, 8시간 이하, 6시간 이하, 4시간 이하, 3시간 이하, 2시간 이하, 1시간 이하, 45분 이하, 30분 이하, 20분 이하 또는 10분 이하인 구체 예; 2) 피검체의 임상 반응/또는 치료적 반응의 적절성을 평가하는 것이 신체 한 쪽의 안면, 팔 또는 다리의 약함, 신체 한 쪽의 안면, 팔 및/또는 다리의 무감각, 언어의 이해 불능, 분명하게 말하지 못하는 것, 쓰지 못하는 것, 현기증 및/또는 걸음걸이 불균형, 복시 및 비정상적인 두통의 평가에 의해 이루어지는 구체 예; 또는 3) 이들의 조합의 구체 예를 포함한다.

[0034] 본 발명은 또한 피검체에서 신경학적 질병의 치료를 위한 의약 제조에서 강심성 배당체의 이용을 제공한다. 일부 구체 예에서, 이러한 의약의 제조가 강심성 배당체를 제공하고; 투여량의 강심성 배당체를 약제학적 제형에 포함시키고; 약제학적 제형을 패키징하는 것을 포함한다. 일부 구체 예에서, 제조는 PCT 국제 출원 PCT/US06/29061에 기술된 바와 같이 수행하였다. 제조는 또한 하나 이상의 추가 단계 예컨대; 패키징된 제형을 판매체 (소매인, 도매인 및/또는 배포체)에 전달하는 단계; 신경학적 질병을 갖는 피검체에 패키징된 제형을 판매하거나 제공하는 단계; 제형의 사용, 투약 요법, 투여, 용량 및 독성 프로필에 대한 설명서를 제공하는 라벨 및 패키징 삽입물을 의약과 포함시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구체 예에서, 신경학적 질병의 치료는 피검체가 신경학적 질병 또는 질병을 갖는지를 측정하고; 투약 요법에 따라 피검체에 강심성 배당체의 투여를 지시하고; 강심성 배당체를 함유하는 하나 이상의 약제학적 제형을 피검체에 투여하는 것을 포함하며, 여기서 하나 이상의 약제학적 제형은 투약 요법에 따라 투여된다.

[0035] 본 발명은 또한, 강심성 배당체 또는 강심성 배당체 함유 조성물 즉, 신경학적 질병의 치료를 위한 약제 제형 또는 투약 형태를 제공한다. 일부 구체 예에서, 강심성 배당체 함유 조성물은 본원 또는 본원에 그 전체가 참조로서 통합된 U.S. 특허 7,402,325, PCT 국제 출원 PCT/US06/29061, U.S. 출원 12/019435에 기술되어 있다.

[0036] 일부 구체 예에서, 신경학적 질병을 갖는 피검체, 즉 이를 필요로 하는 피검체는 이러한 피검체의 군집의 일부이다. 본 발명은 신경학적 질병을 갖는 피검체 군집에서 통계학적으로 유의한 수의 피검체의 임상 상태를 개선시키는 방법으로서, 강심성 배당체 또는 강심성 배당체 함유 조성물을 피검체 군집에 투여하고; 피검체의 임상 상태를 측정하는 것을 포함한다. 일부 구체 예에서, 통계학적으로 유의한 수는 군집의 5% 이상이다.

[0037] 일부 구체 예에서, 신경학적 질병은 알츠하이머병, 헌팅턴병, 뇌졸증 또는 기타 본원에 기술된 신경학적 질병이다. 의약은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 함유하는 약제학적 제형에 강심성 배당체를 포함시킴으로써 제조될 수 있다.

[0038] 강심성 배당체로의 피검체의 치료는 필요에 따라 계속된다. 투여량 또는 투약 요법은 환자가 요망되는 임상 종점 예컨대, 질환과 관련된 특정 신경학적 증상의 감소 또는 완화에 도달할 때까지 필요에 따라 조절될 수 있다. 임상 반응 및/또는 치료적 반응의 적합성의 측정은 치료될 신경학적 질병에 친숙한 임상학자에 의해 수행될 수 있다.

[0039] 일부 구체 예에서, 신경학적 질병은 신경학적 질병, 신경학적 질병 및 뇌졸증으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구체 예에서, 신경학적 질병은 신경퇴해성 질환이다. 일부 구체 예에서, 신경퇴행성 질환은 헌팅턴병, 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성 측상 경화증, 소 해면상뇌증, 다발성 경화증, 당뇨병성 신경병증, 자폐증 및

아동 신경 세로이드 리포푸시노시스 (neuronal ceroid lipofuscinosis)로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구체 예에서, 뇌졸증은 허혈성 뇌졸증 또는 뇌졸증 매개된 허혈성 손상이다.

[0040] 일부 구체 예에서, 1) 강심성 배당체는 올레안드린, 오우아바인 (ouabain), 부팔린 (bufalin), 디지톡신 (digitoxin), 시노부파탈린 (cinobufatalin), 시노부파긴 (cinobufagin) 및 레시부포게닌 (resibufogenin)으로 구성된 군으로부터 선택되며; 2) 강심성 배당체는 식물 또는 동물 공급원의 추출을 통해 유래되거나, 화학적 변형 (예를 들어, 유도)를 통해 합성되거나 제조되든지 순수한 형태로 존재하며; 3) 강심성 배당체가 추출물중에 존재하며; 4) 강심성 배당체는 약제 제형 또는 조성물중에 존재하며; 5) 강심성 배당체는 협죽도 식물 매스로부터 수득되며; 6) 협죽도 식물 매스는 네리움 종 (Nerium species) 예컨대, 협죽도, 또는 테베티아 종 (Thevetia species) 예컨대, 테베티아 네리폴리아 (Thevetia neriifolia) (옐로우 협죽도로서 공지되어 있음)을 포함하며; 7) 강심성 배당체는 피검체로 투여 후 뇌혈막 (BBB)을 통과하며; 8) 강심성 배당체 추출물은 임의적으로 개질제의 존재하에 초임계 유체 (SCF) 추출에 의해 제조되며; 9) 강심성 배당체가 올레안드린이며; 10) 강심성 배당체는 뇌조직에 있어서 4L/hr 이하의 제거율을 가지며; 및/또는 11) 본원에 기술된 임의의 루트에 의해 투여 후, 강심성 배당체는 8시간 이상 동안 뇌조직에 유지된다. 일부 구체 예에서, 강심성 배당체에는 네리폴린이 제외된다.

[0041] 일부 구체 예에서; 1) SCF 추출물은 강심성 배당체 이외의 하나 이상의 다른 약물학적 활성제를 추가로 포함하며, 이러한 다른 약물학적 활성제는 추출물을 제조하는데 이용된 추출 공정 동안 강심성 배당체와 함께 수득되며; 2) SCF 추출물은 하나 이상의 다른 비-강심성 배당체 약물학적 활성제를 추가로 포함하며; 3) 이러한 다른 약물학적 활성제는 추출물이 피검체에 투여되는 경우 강심성 배당체의 치료 효력에 기여할 수 있으며; 4) 다른 약물학적 활성제는 강심성 배당체의 치료 효력에 추가적으로 또는 상승적으로 기여하는 작용을 하며; 및/또는 5) 추출물은 두꺼비 피부 또는 이로부터의 분비물로부터 수득될 수 있다.

[0042] 일부 구체 예에서, 신경학적 질병은 아동 자폐증과 관련된 것과 같은 증가된 효소 활성 (*Clin. Biochem.* 2009; 42(10-11), 949-957), 당뇨병성 신경병 (Neuroscience 2009), 바텐병 (Exp. Cell Res. 2008, 314(15):2895-2905), 노화 관련 치매 및 알츠하이머병 (J.Alzheimers Dis. 2008, 14(1):85-93; Neurobiol. Aging 2007, 28(7):987-994)에서 관찰된 것과 같은 감소된 효소 활성, 또는 파킨슨병 (Human Gen. 2009, 126(3):431-447)과 관련된 것과 같은 Na,K-ATPase 서브유닛에서의 특정 변이를 통해 Na,K-ATPase에서의 특정 변화와 관련된 병인을 갖는다.

[0043] 본 발명의 방법의 개별 단계는 별도의 설비 또는 동일한 설비내에서 수행될 수 있다.

[0044] 일부 구체 예에서, 뉴론은 실험관내, 생체외 또는 생체내 존재하는 것이다. 일부 구체 예에서, 뉴론은 CA-1 뉴론이다.

[0045] 본 발명은 신경학적 질병을 치료하는 방법; 변형된 Na,K-ATPase 활성과 관련된 병인을 갖는 신경학절 질환 또는 질병을 치료가 필요한 피검체에서 치료하는 방법; 신경학적 질병의 치료를 위한 의약의 제조에서 강심성 배당체의 용도; 및/또는 실질적으로 본원에 제시되고 기술된 바와 같은 신경학적 질병의 치료를 위한 강심성 배당체 또는 강심성 배당체 함유 조성물을 제공한다.

[0046] 본 발명은 본원에 기재된 본 발명의 양태, 구체 예 및 하위-구체 예의 모든 조합을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0047] 하기 도면은 본 기술의 일부를 형성하며, 청구된 발명의 예시적 구체 예를 기술한다. 당업자는 이들 도면 및 본원의 기술의 견지에서 과도한 실험 없이 본 발명을 실시할 수 있을 것이다.

도 1A-1C는 신경보호 뇌-슬라이스-기초 "뇌졸증" 분석에서 올레안드린 대 네리폴린의 비교 평가의 결과를 나타내며 (실시예 8), 여기서 건강한 피질 뉴론의 수는 이들 제제의 존재 또는 부재하에 5-6분의 산소 및 글루코스 결핍 (OGD) 후 측정된다. 3개의 독립적인 실험의 결과가 존재한다.

도 1D는 신경보호 뇌-슬라이스-기초 "뇌졸증" 분석에서 올레안드린 대 대조군인 네리폴린의 비교 평가로부터 수득된 농도-반응 데이타이며 (실시예 11), 여기서 건강한 피질 뉴론의 수는 이들 제조의 존재 또는 부재하에 5-6분의 산소 및 글루코스 결핍 (OGD) 후 측정된다.

도 1E는 본원에 기술된 바와 같은 신경보호 뇌-슬라이스-기초 "뇌졸증" 분석에서 올레안드린-함유 SCF 추출물에 대한 농도-반응 분석의 결과이며 (실시예 11), 비-산소 또는 글루코스 결핍 (no oxygen or glucose

deprivation)이 대조군으로서 이용된다.

도 2A-2C는 신경보호 뇌-슬라이스-기초 "비-뇌졸증" 분석에서 올레안드린 대 네리폴린의 비교 평가의 결과를 나타내며 (실시예 8), 여기서 건강한 피질 뉴론의 수는 이들 제제의 존재 또는 부재하에 OGD 없이 측정된다.

도 3A-3C는 신경보호 뇌-슬라이스-기초 "알츠하이머" 분석에서 올레안드린 대 올레안드린 추출물의 비교 평가의 결과를 나타내며 (실시예 9), 여기서 건강한 피질 뉴론의 수는 다양한 양의 이들 제제의 존재 또는 부재하에 APP/Aβ-유도된 변성 후 측정된다.

도 4A-4D는 신경보호 피질-줄무늬체간 공배양 뉴론-기초 "헌팅턴병" 분석에서 올레안드리의 비교 평가의 이중 실험의 결과를 나타내며 (실시예 10), 변이 형태의 헌틴턴 (htt) 단백질로 트랜스펙션된 피질 뉴론 및 줄무늬체간 뉴론의 보호율은 다양한 양의 올레안드린의 부재 또는 존재하에 대조군과 비교하여 측정된다.

도 4E는 헌틴턴병의 트랜스펙션으로 인한 뉴론 손상 및 치사를 구조하는 올레안드린 상대 능력에 있어서 올레안드린에 대한 농도-반응 곡선을 나타낸다 (실험관내 분석으로부터의 결과; 실시예 10).

도 5는 본원에 기술된 바와 같은 지연된 신경보호 뇌-슬라이스-기초 "뇌졸증" 분석 결과를 나타내며 (실시예 13), 여기서 "뇌졸증" 뇌조직은 OGD 후 약 2, 약 4 또는 약 6시간의 종결후 강심성 배당체-함유 용액 (올레안드린-함유 SCF 추출물)을 처리한다.

도 6은 CD1 마우스에서 올레안드린-함유 SCF 추출물 (삼각형, 확인 코드: PBI-05204) 및 올레안드린 (원형)의 복강내 투여 후 24시간에 걸쳐 올레안드린에 대한 플라즈마 및 뇌조직에서 농도-시간 관계의 플롯이다. 5마리 마우스에서 뇌 (ng/g) 및 플라즈마 (ng/ml)에서 평균 ± SD 올레안드린 농도가 도시된다. PBI-05204 (0.8mg/kg 올레안드린을 함유하는 38mg/kg, 50㎕) 및 올레안드린 (3mg/kg, 100㎕)를 DMSO:PEG400 비히클에 50:50v/v (PBI-05204, 28.6mg/ml) 또는 25:75 v/v (올레안드린, 1mg/ml)에 용해시켰다. 대조군은 단독으로 DMSO:PEG400 비히클에 수용시켰다. 0.5, 1, 2, 4, 8 및 24시간에, 플라즈마 및 뇌조직을 LC/MS/MS 분석을 위해 채집하였다. PBI-05204 및 올레안드린 투여 후 신속하고 지속된 CNS 투과가 관찰되었다.

도 7A 및 7B는 본원에 기술된 바와 같이 수행된 신경보호 뇌-슬라이스 기초 분석의 결과를 나타낸다. 도 7A는 올레안드린에 대한 관계를 보여주는 농도-반응 곡선이다 (회색 원형). 각 진행에 있어서 내부 파지티브 (비-OGD) 및 네거티브 (OGD) 대조군 사이의 차로 표준화된 6개 진행 세트를 100%로 맞추었다; 평균 ±SEM이 도시되어 있다. 네리폴린 (백색 사각형)에 대한 농도 관계는 비교를 위해 왕 등 (Proc.Natl.Acad. Sci. USA (2006), 103(27), 10461-10466)으로부터 취해진 것으로서 재프린팅하였다. 도 7B는 PBI-05204 (검정 사각형)에 대한 관계를 나타내는 농도 반응 곡선이다. 각 진행에 대해 내부 파지티브 (비-OGD) 및 네거티브 (OGD) 대조군 사이의 차로 표준화된 13개 진행 세트를 100%로 맞추었다; 평균 ±SEM이 도시되어 있다. 올레안드린에 있어서 도 7A로부터의 데이타는 도 7B에 재구성되었으며, 이는 PBI-05204 추출물에서 올레안드린에 대해 3% 조성인 것으로 추정된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 본 발명은 유효량의 강심성 배당체를 이를 필요로 하는 피검체에 투여함으로써 신경학적 질병을 치료하는 방법을 제공한다. 강심성 배당체는 피검체에 최상으로 맞춰진 투약 요법에 따라 투여되며, 투여량 및 투약 요법의 적합성은 치료되는 신경학적 질병에 대한 통상적인 임상 실행 및 임상 치료 종점에 따라 임상적으로 결정된다.

[0049] 일부 구체 예에서, 치료되는 신경퇴행성 장애 또는 신경학적 질병은 세포 또는 조직내에서 Na,K-ATPase의 조절장애 또는 Na,K-ATPase 결합 활성과 관련된 병인을 갖는다. 일부 구체 예에서, 치료되는 신경퇴행성 질환 또는 신경학적 질병은 세포 또는 조직내에서 HIF-1α의 조절장애 또는 HIF-1α 결합 활성과 관련된 증상을 갖는다. 이러한 조절장애는 예를 들어, 효소 활성 정도에서의 현저한 변화로서 발생할 수 있다. 이는 효소 작용, 효소 함량 또는 손상된 조직 내에서의 균일한 분포의 변화로부터 초래될 수 있다.

[0050] 본 발명에 따른 피검체는 치료적 반응을 나타낼 것이다. "치료적 반응"은 질환 또는 질병으로부터 고통받는 피검체가 강심성 배당체로의 처리 결과로서 하기 임상학적 이점중 하나 이상을 느끼게될 것을 의미한다: 질환 또는 질병의 완화, 질환 또는 질병과 관련된 증상의 발생의 감소, 질환 또는 질병의 부분적 완화, 또는 진행되기까지의 증가된 시간. 즉, 치료적 반응은 전체적인 또는 부분적인 치료적 반응일 수 있다.

[0051] 치료적 반응은 신경퇴행성 질환을 겪는 환자의 삶의 질을 향상시키는 것으로서 기술될 수 있다. 삶의 질의 향상은 예를 들어, 질환과 관련된 증상 (예를 들어, 떨림, 비수의적 근육 움직임, 신경-근육 조정의 손실 또는 부

분적 손실, 기억력 등)의 발생, 빈도 또는 중증도의 감소를 통해 이루어질 수 있다.

[0052] "위험 피검체 군집에서 신경학적 질병의 발병 예방"은 신경학적 질병이 신경학적 질병으로부터 고통받을 위험에 있는 인구학적으로 소정의 피검체 군집에서 소정 기간 동안 발생하지 않음을 의미한다. 소정 기간 동안의 예방은 이러한 군집의 피검체에 본 발명에 따른 강심성 배당체를 투여하는 결과로서 발생한다. 예로서, 강심성 배당체-함유 조성물이 뇌졸증으로부터 고통받을 위험이 있는 피검체 군집의 피검체에 소정의 기간 동안 투여되는 경우, 뇌졸증은 소정의 기간 동안 이들 피검체에서 발생하지 않을 것이다. 특히, 강심성 배당체-함유 조성물은 알츠하이머병으로부터 고통받을 위험에 있는 피검체의 군집에 1년에 걸쳐 만성적으로 투여되며, 이들 군집의 피검체는 1년 동안 알츠하이머와 관련된 증상을 나타내지 않는다.

[0053] "발병 위험이 있는 피검체의 군집에서 신경학적 질병의 발병율의 감소"는 "발병 예방"에 대한 의미와 관련이 있으며, 단 "발병률 감소"는 인구학적으로 소정의 피검체 군집에서 신경학적 질병의 발생을 허용하나, 단 본 발명의 방법에 따라 강심성 배당체-함유 조성물을 투여하지 않은 발병 위험이 있는 인구학적으로 유사한 소정의 피검체 군집과 비교하여, 발병율 또는 중증도 수준이 저하됨을 의미한다.

[0054] 본원에 사용된 바와 같은 "진행되기 까지의 시간"은 질환이 진단된 후 (또는 치료된 후) 질환이 악화되기 까지의 기간이다. 이는 질환의 수준이 질환의 추가의 진행없이 유지되는 기간, 및 질환이 다시 진행되기 시작하는 경우의 종말점 기간이다. 질환의 진행은 치료 시작시에 또는 전에 신경학적 질병을 갖는 피검체를 "스테이징(staging)"함으로써 결정된다. 예를 들어, 피검체의 신경학적 건강도는 치료 전 또는 치료 시작시에 결정된다. 그 후, 피검체는 강심성 배당체로 처리되고, 신경학적 건강도가 주기적으로 모니터링된다. 일정 시간 후에, 신경학적 질병의 증상이 악화될 수 있으며, 질환의 진행 및 "진행되기 까지의 시간"의 종료를 마킹한다. 질환이 진행되지 않거나 질환의 수준 또는 중증도가 악화되지 않는 동안의 기간이 "진행되기 까지의 시간"이다.

[0055] 투약 요법은 투약 스케줄에 따라 투여되는 하나 이상의 강심성 배당체의 치료학적 관련 투여량 (또는 유효량)을 포함한다. 따라서, 치료학적 관련 용량은 강심성 배당체로의 처치에 대한 질환 또는 질병의 치료적 반응이 관찰되고, 과도한 부작용 없이 강심성 배당체에 피검체에 투여될 수 있는 치료적 용량이다. 치료학적 관련 용량은 피검체에 비치사적이며, 물론 환자에 일부 부작용은 초래할 수도 있다. 강심성 배당체가 투여되는 피검체에 대한 임상 이점 수준이 강심성 배당체의 투여로 인한 피검체가 경험하게 되는 부작용의 수준을 초과하는 용량이다. 치료학적 관련 용량은 다양한 확립된 약물학적, 약력학적 및 약동학적 원리에 따라 피검체 마다 상이할 것이다. 그러나, 치료학적 관련 용량 (상대적인, 예를 들어, 올레안드린에 있어서)은 전형적으로, 25, 100, 250, 500 또는 1000 마이크로그램의 강심성 배당체/일을 초과하지 않거나, 이는 25-500 또는 25-1000 마이크로그램의 강심성 배당체/일의 범위일 수 있다. 피검체에서 목표로하는 치료학적 결과를 제공하는데 요구되는 약물의 실제적 양은 약학의 기본 원리에 따라 피검체 마다 상이할 수 있다.

[0056] 치료학적 관련 용량은 신경학적 또는 신경퇴행성 질환 또는 질병의 치료에 통상적으로 사용되는 임의의 투약 요법에 따라 투여될 수 있다. 치료학적 관련 용량은 1회, 2회, 3회 또는 그 초과의 매일 투약 스케줄로 투여될 수 있다. 이는 매 2일마다, 매 3일마다, 매 4일마다, 매 5일 마다, 매 반주마다, 주마다, 2주마다, 매 3주마다, 매 4주마다, 달마다, 2달마다, 반달마다, 매 3달마다, 매 4달 마다, 반년마다, 년마다, 또는 적합한 투약 스케줄에 도달하기 위해 상기중 임의의 조합에 따라 투여될 수 있다. 예를 들어, 치료학적 관련 용량은 1주 이상 동안 1일 1회 투여될 수 있다.

[0057] 하기 예는 신경학적 질병, 신경학적 장애 및 뇌졸증과 같은 신경학적 질병에서 강심성 배당체의 효력에 대한 증거를 포함한다. 실시예 3은 강심성 배당체 또는 강심성 배당체와 하나 이상의 다른 치료제와의 조합물로의 알츠하이머병의 치료 방법에 관한 것이다. 실시예 4는 강심성 배당체 또는 강심성 배당체와 하나 이상의 다른 치료제와의 조합물로의 헌팅턴병의 치료 방법에 관한 것이다. 실시예 5는 강심성 배당체 또는 강심성 배당체와 하나 이상의 다른 치료제와의 조합물로의 뇌졸증-매개된 허혈성 뇌손상의 치료 방법에 관한 것이다.

[0058] 일반적으로, 하기와 같은 신경학적 질병을 갖는 피검체가 치료된다. 신경학적 질병을 나타내는 피검체는 신경학적 질병이 알츠하이머병, 헌팅턴병, 뇌졸증 또는 다른 신경학적 질병인지의 여부를 측정하도록 평가된다. 강심성 배당체의 투여가 지시된다. 초기 투여량의 강심성 배당체는 기간 동안 처방된 투여 요법에 따라 피검체에 투여된다. 피검체의 임상 반응 및 치료적 반응 수준이 주기적으로 측정된다. 치료적 반응 수준이 1회 투여로 너무 낮은 경우, 투여량은 피검체의 목적하는 수준의 치료적 반응이 달성될 때까지 소정의 투여 증량 스케줄에 따라 증량될 수 있다. 강심성 배당체로의 피검체의 처리는 필요에 따라 계속된다. 투여량 또는 투여 요법은 환자가 질병 자체의 중지, 증상과 관련된 질환의 저하, 및/또는 질환 진행의 저하와 같은 요구되는 임상 종점에 도달할 때까지 필요에 따라 조절될 수 있다.

[0059] 실시예 8은 뇌졸증-매개된 허혈성 신경 손상의 치료에 대한 강심성 배당체의 효력을 평가하는데 사용된 실험관내 분석의 상세한 설명이다. 이러한 분석은 24시간 까지 건강한 피질 뉴론의 50% 이상의 손실을 유도하는데 사용된 산소 및 글루코오스 결핍 (OGD)에 대한 뇌 슬라이스-기초 분석법이다. 강심성 배당체 네리폴린 (3μM)이 파지티브 대조군으로서 사용된다. 올레안드린을 OGD 처리된 뇌 슬라이스 (뇌졸증 모델, 도 1A-1c) 및 비-OGD 처리된 뇌 슬라이스 (비-뇌졸증 모델, 도 2A-2C)에서 시험하였다. 데이타는, 뇌 슬라이스 (뉴론)이 0.1 내지 3 μM 농도의 올레안드린 용액에 노출되는 경우, 올레안드린이 실질적인 신경보호를 제공함을 나타낸다. 올레안드린의 전신 투여 후 인간 뇌에서 직접적인 측정치는 관찰되지 않은 반면, 협죽도 추출물의 페이스 I 연구에서 수득된 데이타 및 뇌혈벽을 특이적으로 통과하는 올레안드린의 능력이 시험되는 설치류 시험에서 이전에 수득된 결과로부터, 인간 뇌에서 올레안드린의 이러한 농도에 도달하기 위한 용량 수준은 아마도 약 1-10ng, 약 3-6ng, 또는 약 4ng일 것으로 추정될 수 있다.

[0060] SCF 추출물중의 올레안드린 이외의 하나 이상의 약물학적 활성 성분의 존재의 증거는 순수한 올레안드린을 함유하는 용액 대 SCF 추출물을 함유하는 용액에 대한 농도-반응 곡선을 비교함으로써 수득되었다. 도 1D는 실시예 11에 기술된 바와 같은 신경보호성 뇌-슬라이스-기초 "뇌졸증" 분석에서 순수한 올레안드린을 함유하는 수용액에 대한 농도-반응 분석의 결과이다. 수용액중의 올레안드린의 농도는 0.0069 내지 230㎍/ml로 다양할 수 있다. 도 1E는 본원에 기술된 바와 같이 신경보호성 뇌-슬라이스-기초 "뇌졸증" 분석에서 올레안드린-함유 SCF 네리움 종 추출물에 대한 농도-반응 분석의 결과이다 (실시예 11). 데이타는 추출물이 순수한 올레안드린 보다 더욱 효과적임을 입증하며, 이는 추출물이 신경 보호를 제공하는 하나 이상의 약물학적 활성제를 함유함을 의미한다.

[0061] 실시예 11은 뇌졸증-매개된 허혈성 신경 손상의 치료를 위해 추출물 또는 이들의 조성물의 효력을 평가하기 위해 이용된 실험관내 분석의 상세 설명이다. 분석은 24시간 까지의 건강한 피질 뉴론의 50% 이상의 손실을 유도하는데 이용된 산소 및 글루코오스 결핍 (OGD)에 대한 뇌 슬라이스-기초 분석이다. 네리움 종 예를 들어, 협죽도의 어미 비분별된 (parent unfractionated) SCF 추출물이 파지티브 대조군으로서 이용된다.

[0062] 따라서, 본 발명은 산소 고갈된 및/또는 글루코오스 고갈된 뉴론을 유효량의 올레안드린 또는 올레안드린-함유 추출물에 노출시킴으로써 산소 고갈 또는 산소-글루코오스 고갈에 의해 초래된 활성 손실에 대해 뉴론을 보호하여, 뉴론의 활성 손실을 최소화하고, 활성 손실율을 저하시키고, 활성 손실을 중단시키고, 활성 손실의 개시를 감소시키고/거나 산소 고갈된 및/또는 글루코오스-고갈된 상태를 노출시킴으로써 초래된 뉴론의 기능을 보호하는 방법을 제공한다.

[0063] 실시예 9는 알츠하이머병의 치료를 위해 강심성 배당체의 효력을 평가하는데 사용된 실험관내 분석의 상세한 설명을 제공한다. 이러한 분석은 피질 피라미드 뉴론의 APP/Aβ-유도된 (APP: 아밀로이드 전구체 단백질) 퇴행에 대한 뇌 슬라이스-기초 분석이다. 세크레타아제 효소에 의한 절단 시, APP는 Aβ로 환원되며, 이는 베타-아밀로이드 플라크 형성에서 원인 요인인 것으로 여겨진다. Aβ 단백질은 베타-아밀로이드 플라크 형성과 관련되며, 알츠하이머병에서 병인 요인 (etiologic factor)이 아니더라도 검증물 (hallmark)인 것으로 여겨진다. 바이오리스틱 트랜스펙션이 바이탈 마커 예컨대, YFP (마커 옐로우 플루오센트 프로테인 (yellow fluorescent protein))를 유입시키고, 질환 유전자 구조체를 뇌 슬라이스에서 동일한 뉴론 군집에 유입시키기 위해 이용된다. YFP는 APP 이소폼과 공동-트랜스펙션되어 뇌 슬라이스 준비 및 트랜스펙션 후 3 내지 4일 과정에 걸쳐 피질 피라미드 뉴론의 진행성 퇴행을 유도한다. 데이타 (도 3A-3C)는 올레안드린 및 올레안드린-함유 SCF 추출물이 APP-트랜스펙션된 뇌 슬라이스에 대한 농도-의존적 신경보호를 제공하여, BACE 억제제 약물 즉, 베타 세크레타아제 억제제 약물에 의해 제공된 것과 거의 동일한 수준으로 보호함을 나타낸다. 베타 세크레타아제 효소는 APP 전구체 단백질을 독성의 Aβ-단백질로 절단한다. 올레안드린-함유 SCF 추출물은 올레안드린 단독 보다 더 큰 신경 보호를 제공하는 것으로 보인다. 알츠하이머병을 나타내는 실험관내 분석법에서 뉴론의 현저한 보호를 나타내는 문헌내의 화합물 또는 치료학적 요법이 거의 존재하지 않는다는 점에 있어서 도 3A-3C의 데이타는 유의성이 있다. 데이타는 알츠하이머병 치료에 있어서 강심성 배당체 예컨대, 올레안드린이 단일 제제로서 유효하거나, 단일 치료법으로서 사용되는 추출물중에 존재하거나 다른 생성물 예컨대, BASE 억제제와의 조합되는 경우에도 유효함을 나타낸다.

[0064] 따라서, 본 발명은 알츠하이머병에 의해 초래된 활성 손실에 대한 뉴론 보호 방법으로서, 알츠하이머병의 특징을 나타내는 뉴론을 유효량의 올레안드린 또는 올레안드린-함유 추출물에 노출시켜 활성 손실을 최소화시키고, 활성 손실율을 저하시키고, 활성 손실을 중단시키고, 활성 손실의 개시를 저속시키고/거나 알츠하이머병에 의해 초래된 뉴론의 임계적 작용화시키는 방법을 제공한다.

[0065] 실시예 10은 헝틴턴병의 치료를 위한 강심성 배당체의 효력을 평가하는데 사용된 분석의 상세한 설명이다. 변이체 htt 단백질은 피질 뉴론, 선조 뉴론 (striatal neuron) 및 신경교의 고밀도의 혼합된 공동 배양물로의 일렉트로포레이션을 통해 유입된다. 선조 및 피질 뉴론은 상이한 색 형광 단백질로 트랜스펙션되어 공동 배양물에서 다양한 유형의 뉴론의 별도의 동정을 촉진한다. 색 형광 단백질은 형광성이며, 적합한 파장의 광원으로의 활성화시 색을 '방사'한다. 데이타 (도 4A-4D)는 올레안드린 및 올레안드린-함유 SCF 추출물이 더 많은 수의 생존 뉴론을 제공한다는 점에 있어서 KW6002 (아데노신 2a 수용체 안타고니스트) 보다 더욱 효과적임을 나타낸다. 따라서, 본 발명은 헌팅턴병에 의해 초래된 활성의 손실에 대한 뉴론을 보호하는 방법으로서, 헝팅턴병의 특징을 나타내는 뉴론을 유효량의 올레안드린 또는 올레안드린-함유 추출물에 노출시켜, 활성의 손실을 최소화시키고, 활성의 손실률을 저하시키고, 활성의 손실을 중단시키고, 활성 손실의 개시를 저속시키고/거나 헝팅턴병에 의해 초래된 뉴론의 정상 기능화시키는 방법을 제공한다.

[0066] 실시예 13은 뇌졸증 후 지연된 기간의 완료 후 피검체에서 뇌졸증의 치료에서 강심성 배당체의 효력을 평가하기 위한 모델로서 사용된 예시적인 뇌-슬라이스 분석을 설명하다. 산소 글루코오스 고갈로의 뇌-슬라이스 분석을 본원에 기술된 바와 같이 수행하였다; 그러나, 강심성 배당체로 예방학적으로 뇌 슬라이스를 처리하기 보다는, 0, 1, 2, 4 및 6시간의 지연 기간 후 강심성 배당체로 처리하였다. 도 5에 요약된 데이타는, 강심성 배당체 예컨대, 올레안드린 또는 올레안드린 함유 SCF 추출물이 뇌졸증 후 1시간 이하, 2시간 이하, 3시간 이하, 4시간 이하, 5시간 약 6시간 이하의 지연 기간 동안 현저한 신경보호에 유효함을 입증한다.

[0067] 따라서, 본 발명은 피검체가 뇌졸증을 일으킨 후 피검체에 투여량의 강심성 배당체를 투여함으로써 피검체의 뇌졸증을 치료하는 시간-지연 방법을 제공한다. 피검체가 뇌졸증을 일으킨 후 허용가능한 지연 기간 내에서, 초기 용량의 강심성 배당체를 초기 투약 요법에 따라 투여한다. 그 후, 강심성 배당체로의 처치에 대한 피검체의 임상 반응 및/또는 치료적 반응의 적합성을 측정한다. 피검체의 임상 반응 및/또는 치료적 반응이 적합한 경우, 요망되는 임상 종점이 달성될 때까지 강심성 배당체로의 처치를 계속한다. 대안적으로, 피검체의 임상 반응 및/또는 치료적 반응이 초기 투여량 및 초기 투약 요법에서 부적절한 경우, 피검체에서 요망되는 임상 반응 및/또는 치료적 반응이 달성될 때까지 투여량을 증량시키거나 감량시킨다. 용량 증량 또는 감량이 투약 요법에서의 변화 예컨대, 투약 빈도에서의 변화와 함께 또는 투여량 투여의 전반적인 기간에 걸쳐 수행될 수 있다.

[0068] 본원의 뇌 슬라이스 분석 일부는, 뇌 조직이 OGD 전에 강심성 배당체로 처리되는 조건하에 수행된다. 이러한 조건하에서, 데이타는 예방적으로 사용된 강심성 배당체의 유용성이 뇌졸증에 의해 초래된 손상에 대한 신경보호를 제공함을 입증한다.

[0069] 임상학자가 강심성 배당체와 하나 이상의 다른 치료제와의 조합물로 신경학적 질병을 갖는 피검체를 치료하고자 하며, 피검체가 갖고 있는 특정 신경학적 상태가 상기 하나 이상의 다른 치료제로의 처리에 적어도 부분적으로 치료적 반응을 나타내는 것으로 공지된 경우, 본 방법은 치료학적 관련 용량의 강심성 배당체 및 치료학적 관련 용량의 상기 하나 이상의 다른 치료제를 이를 필요로 하는 피검체에 투여하는 것을 포함하며, 여기서, 강심성 배당체는 제 1 투약 요법에 따라 투여되며, 하나 이상의 다른 치료제는 제 2 투약 요법에 따라 투여된다. 일부 구체 예에서, 제 1 및 제 2 투약 요법은 동일하다. 일부 구체 예에서, 제 1 및 제 2 투약 요법은 상이하다.

[0070] 치료할 신경학적 질병이 알츠하이머병인 경우, 하나 이상의 다른 치료제가 BACE 억제제 또는 아세틸콜리에스테라아제 억제제로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 구체 예에서, 하나 이상의 다른 치료제는 나멘다™ (Namenda™; 메만틴 HCl), 아리셉트™ (Aricept™; 도네페질), 라자딘™ (Razadyne™; 갈란타민), 엑셀론™ (Exelon™; 리바스티그민) 및 코그넥스™ (Cognex™; 타크린)으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0071] 치료될 신경학적 질병이 헝틴턴병인 경우, 하나 이상의 다른 치료제는 천연 생성물, 항경련제, NMDA (n-메틸 d-아스파르테이트) 수용체 안타고니스트 및 나트륨 채널 차단제로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 예시적인 제제로는 비타민 E, 바클로펜 (Baclofen) (CoQ10의 유도체), 라모트리진 (Lamotgrigine) (항경련제), 라마세미드 (저친화도 NMDA 안타고니스트인 마취제), 및 릴루졸 (riluzole) (Na 채널 차단제)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 이들 제제의 각각의 효율은 이들 자체로는 낮은 것으로 간주된다 (Mestre T. et al, Chochrane Database Systematic Reviews July 8, 2009; 8(3): CD006455); 그러나, 하나 이상의 이러한 다른 제제를 수용한 피검체에 올레안드린 또는 올레안드린 함유 추출물을 함유하는 제형의 투여는 신경학적 질병을 갖는 피검체에 올레안드린 부재의 이들 제제의 투여와 비교하여 증가된 임상적 영향을 끼칠 것으로 예상된다.

[0072] 처리될 신경학적 질병이 뇌졸증 매개된 허혈성 뇌 손상 (허혈성 뇌졸증)인 경우, 본 발명의 올레안드린 또는 올

레안드린 추출물-기초 방법 이외에 문헌에 기재된 치료학적 처치 (Gutierrez M. et al. "Cerebral protection, brain repair, plasticity and cell therapy in ischemic stroke" Cerrebrovasc. Dis. 2009; 27 Suppl 1:177-186) 예를 들어, 정맥내 혈전용해가 이용될 수 있다. 일부 구체 예에서, 하나 이상의 다른 치료제가 약물 예컨대, 알테플라제 (Alteplase) (혈전용해제)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0073] 하나 이상의 다른 치료제는 임상의에 의해 치료학적으로 유효한 것으로서 인정된 투여량 및 투약 요법에 따라 또는 부차적으로 치료학적으로 유효한 것으로서 임상의에 의해 인정된 투여량으로 투여될 수 있다. 강심성 배당체 및 하나 이상의 다른 치료제의 투여에 의해 제공된 임상적 이점 및/또는 치료 효과는 부가적이거나 상승적일 수 있으며, 이러한 이점 또는 효과의 수준은 조합물의 투여와 개별적인 강심성 배당체 및 하나 이상의 다른 치료제의 투여와 비교함으로써 측정된다. 하나 이상의 다른 치료제는 단체 [the Food and Drug Administration, World Health Organization, European Medicines Agency (E.M.E.A.), Therapeutic Goods Administration (TGA, Australia), Pan American Health Organization (PAHO), Medicines and Medical Devices Safety Authority (Medsafe, new Zealand)] 또는 다양한 세계의 보건부에 의해 제안되거나 기술된 바와 같은 투여량 및 투약 요법에 따라 투여될 수 있다.

[0074] 강심성 배당체는 Na,K-ATPase 결합 활성 및/또는 HIF-1α (저산소증 유도 인자 알파) 결합 활성을 갖는 것으로 공지된 임의의 강심성 배당체일 수 있다. 강심성 배당체는 뇌혈벽를 통과하여 투여후 연장된 기간 동안 뇌 조직에 유지될 수 있다. 이와 관련하여, 강심성 배당체는 조직 결합 및 그 후의 낮은 제거율로 인해 강심성 배당체의 투여 후 8시간 이상 동안 뇌에 유지된다.

[0075] 강심성 배당체는 하나 이상의 다른 화합물과의 혼합물로서 또는 순수한 형태로 존재할 수 있다. 강심성 배당체는 추출물로서 존재할 수 있다. 추출물은 초임계 유체 (SCF) 이산화탄소 (CO_2) 추출 또는 이러한 추출물의 화학적으로 변형된 형태 (예를 들어, 에탄올을 포함하는 추출물 또는 SCF CO_2 및 에탄올을 이용하여 제조된 추출물; 실시예 1)에 의해 제조될 수 있다. 추출물은 유기 용매 예를 들어, 에탄올, 메탄올, 프로판올 또는 기타 이러한 용매로 식물 물질을 추출함으로써 수득될 수 있다. 추출물은 식물 또는 동물 물질로부터 수득될 수 있다. 동물 물질은 두꺼비 (예를 들어, 부포 부포 (Bufo bufo))의 삼출물일 수 있다. 식물 물질은 네리움 종 예컨대, 협죽도 또는 테베티아 종 예컨대, 테베티아 네리폴리아 또는 테베티아 푸루비아나 (다르게는, 옐로우 올렌더로 공지되어 있음)로부터 수득되는 식물 물질일 수 있다. 추출 공정은 본원에 참조로서 통합된 현재 계류중인 U.S. 가출원 시리즈 No. 60/653,210 (2005년 2월 15일, Addington) 또는 U.S. 가출원 시리즈 No. 11/340,016 (2006년 1월 26일, Addington), U.S. 출원 No. 11/191,650 (2006년 7월 28일) (현재 U.S. 특허 7,402,325; 2008년 7월 22일) (Addington) 또는 PCT 국제특허 출원 PCT/US06/29061 (2006년 7월 26일)에 기술된 공정 또는 본원에 기술된 공정에 따라 제조된 협죽도 잎의 건조 분말로 수행될 수 있다.

[0076] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "올레안드린"은 다르게 언급되지 않는 한 모든 공지된 형태의 올레안드린을 의미한다. 올레안드린은 라세미체, 광학적으로 순수한 또는 광학적으로 부화된 (enriched) 형태로 존재할 수 있다. 협죽도 식물 물질은 예를 들어, 시중의 식물 공급체 예컨대, 알드리지 너서리 (Aldridge Nursery, Atascosa, Texas)로부터 수득될 수 있다.

[0077] 본 작업은 올레안드린이 BBB를 통과하며 뇌조직에서 장기간 동안 존재할 수 있는 우수한 능력을 가짐을 입증하였다. 즉, 뇌에서의 올레안드린의 잔여 시간이 실험 동물의 플라즈마로부터 이러한 분자의 제거하는데 예상되는 것보다 더 길다. 이와 같이, 올레안드린의 뇌에서의 비교적 긴 잔여시간은 수용성 강심성 배당체 예컨대, 디곡신과 비교하여 이러한 지용성 강심성 배당체의 분명한 이점으로서 제공된다.

[0078] 추출물은 강심성 배당체-함유 식물 물질의 변형된 (예를 들어, 에탄올) 또는 비변형된 초임계 유체 추출법에 의해 수득될 수 있다. 초임계 유체 추출물은 추출물이 피검체에 투여되는 경우 강심성 배당체의 치료 효력에 기여하는 하나 이상의 다른 강심성 배당체 약물학적 활성제 및/또는 하나 이상의 다른 비-강심성 배당체 약물학적 활성제를 포함할 수 있다. 이는 강심성 배당체의 치료 효력에 부가적으로 또는 상승적으로 기여할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "비-강심성 배당체 약물학적 활성제 " (또는 성분)은 강심성 배당체가 아닌 화합물을 의미한다.

[0079] 추출물은 다양한 상이한 공정에 의해 제조될 수 있다. 추출물은 물중의 식물 추출물의 제조 공정을 기술한 닥터 유세인 지아 오젤 (Dr. Huseyin Ziya Ozel; U.S. 특허 출원 5,135,745)에 의해 개발된 공정에 따라 제조될 수 있다. 수성 추출물은 산성 호모폴리갈락투로난 또는 아라비노갈락투로난을 포함하는 것으로 보고되었다. U.S. 특허 5,869,060 (Selvaraj et al.)은 네리움 종의 고온수 추출물 및 이의 생성 방법 예를 들어, 실시예 2

를 발견하였다. 생성된 추출물은 동결시켜 분말로 만들 수 있다. U.S. 특허 6,565,897 (U.S. Pregrant Publication No. 20020114852 and PCT International Publication No. WO 2000/016793 to Selvaraj et al.)에는 실질적으로 멸균 추출물의 제조를 위한 고온수 추출 공정이 기술되어 있다. 에르데모글루(Erdemoglu) 등의 문헌(*J.Ethnopharmacol.*(2003) Nov.89(1),123-129)은 협죽도를 포함하는 식물의 항침해수용 및 항염증 활성에 기초하는 이들의 수성 및 에탄올 추출물의 비교 결과를 기술하고 있다. 협죽도의 유기 용매 추출물은 또한 아돔(Adome) 등의 문헌(*Afr.Health* Sci.(2003) Aug.3(2),77-86;ethanolic extract),엘-사즐리(el-Shazly) 등의 문헌(*J.Egypt Soc.Parasitol.*(1996),Aug.26(2),461-473;ethanolic extract), 베굼(Begum) 등의 문헌(*Phytochemistry*(1999)Feb.50(3),435-438; methanolic extract), 지아(Zia) 등의 문헌(*J.Ethnopharmacol.*(1995)Nov.49(1),33-39; methanolic extract) 및 블라젠코(Vlasenko) 등의 문헌(Farmatsia.(1972)Sept.Oct.21(5),46-47;alcoholic extract)에도 기술되어 있다. 문헌(U.S.Pregnant Patent Application Publication No. 20040247660 to Singh et al.)에는 암 치료에 사용하기 위한 올레안드린의 단백질 안정화된 리포좀 제형의 제조 방법이 기술되어 있다. 다른 문헌(U.S.Pregnant Patent Application Publication No. 20050026849 to Singh et al.)에는 시클로덱스트린을 함유하는 올레안드린의 수용성 제형이 기술되어 있다. 또 다른 문헌(U.S.Pregnant Patent Application Publication No. 20040082521 to Singh et al.)에는 고온수 추출물로부터의 올레안드린의 단백질 안정화된 나노입자 제형의 제조가 기술되어 있다.

[0080] SCF 추출은 초임계 유체에서 개질제 예컨대, 에탄올의 존재하에 수행되어 식물 물질로부터 요망되는 화합물(들)의 추출을 증가시킬 수 있다. 개질제는 일반적으로 초임계 유체의 휘발성과 추출되는 화합물의 휘발성 사이의 휘발성을 가지며, 이들은 초임계 유체와 혼화성이어야 한다. 일부 구체 예에서, 개질제는 주위 환경하에서 액체이다. 예를 들어, 비제한적으로 개질제는 에탄올, 메탄올, 프로판올, 아세톤, 에틸 아세테이트, 메틸렌 클로라이드 등으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0081] 추출물은 약물학적 활성 화합물 예컨대, 올레안드린 또는 다른 강심성 배당체, 올레아시드 및 다른 식물 물질의 혼합물이다. 초임계 유체 공정으로부터의 올레안드린 추출물은 중량 기준으로 0.9 내지 2.5%의 올레안드린을 함유한다. 다양한 양의 올레안드린을 포함하는 초임계유체 추출물을 수득한다. 하나의 양태에서 초임계유체 추출물은 약 2중량%의 올레안드린을 포함한다.

[0082] SCF 추출물은 다양한 성분의 혼합물을 포함할 수 있다. 이들 성분중 일부로는 올레안드린, 올레아시드 A, 올레안드리게닌, 네리탈로사이드, 오도르사이드 (Wang X, Plomley JB, Newman RA and Cisneros A. LC/MS/MS analyses of an oleander extract for cancer treatment, Analytical Chem. 72:3547-3552, 2000) 및 다른 비확인된 성분을 포함한다. SCF 추출물의 SCF 추출가능한 비확인된 성분은 SCF 추출물중의 올레안드린의 효능에 기여하는 하나 이상의 다른 강심성 배당체 약물학적 활성 성분 및/또는 하나 이상의 다른 비-강심성 배당체 약물학적 활성 성분을 포함할 수 있다. 즉, 하나 이상의 다른 SCF 추출가능한 성분은 올레안드린과 부가적으로 또는 상승적으로 작용하여 관찰된 효능을 제공한다.

[0083] 올레안드린 또는 올레안드린과 하나 이상의 다른 약물학적 활성 성분 (강심성 배당체 및/또는 비-강심성 배당체)를 포함하는 추출물은 신경보호를 제공할 수 있는 것으로 측정되었다. 따라서, 본 발명의 SCF 추출물은 올레안드린 및 하나 이상의 다른 생물학적 활성 성분을 포함하며 (또는 이들을 주성분으로 하며), 이들 자체는 신경보호를 제공하는 강심성 배당체 또는 비-강심성 배당체일 수 있다.

[0084] SCF 추출물중의 올레안드린 이외의 하나 이상의 생물학적 활성 성분의 존재에 대한 추가의 증거는 순수한 올레안드린을 함유하는 수용액 대 SCF 추출물을 함유하는 수용액의 농도-반응 곡선을 비교함으로써 얻어졌다. 도 1D는 실시예 11에 기술된 바와 같이 신경보호 뇌-슬라이스-기초 "뇌졸증" 분석에서 순수한 올레안드린을 함유하는 수용액에 대한 농도-반응 분석의 결과를 나타낸다. 수용액중의 올레안드린의 농도는 0.0069 내지 230㎍/ml로 다양하였다.

[0085] 도 1E는 본원에 기술된 바와 같은 신경보호 뇌-슬라이드-기초 "뇌졸증"에서 올레안드린-함유 SCF 추출물에 대한 농도-반응 분석 결과를 나타낸다. 데이타는 추출물이 순수한 올레안드린 보다 더욱 효과적이며, 이는 추출물이 신경보호를 제공하는 하나 이상의 약물학적 활성제를 함유함을 의미한다.

[0086] 추출물은 또한, 본원에 포함된 분석에서 효능에 의해 측정되는 바와 같이 이들의 상대 능력이 상이하다. 그렇지만, 강심성 배당체가 추출물 중에 충분히 많은 양 또는 농도로 존재하여 치료학적 관련 용량을 제조할 수 있는 경우, 추출물은 본 발명의 일부로서 간주된다.

[0087] 강심성 배당체는 적합한 약제학적으로 허용되는 제형으로 제형화될 수 있다. 비경구, 귀, 안구, 비, 흡입성,

구강, 설하, 장, 국소, 입, 경구 및 주사가능한 제형이 특히 유용하다. 특정 제형으로는 고체 또는 액체 제형을 포함한다. 예시적인 적합한 제형은 정제, 캡슐, 필, 캐플릿, 트로키, 사세, 용액, 현탁액, 분산액, 물약, 백, 병, 주사액, 정맥내, 근내 또는 복강내 투여가능한 액체 및 약제 분야의 당업자에게 공지된 다른 이러한 제형을 포함한다.

[0088] 본 발명의 용량에 혼입된 강심성 배당체의 양은 하나 이상의 제형으로 존재할 것이며, 공지된 약학 원리에 따라 선택될 수 있다. 치료 화합물의 유효량 또는 치료학적 관련 양이 특히 고려된다. 용어 "유효량"은 예를 들어, 약제에 있어서, 약제학적 유효량이 고려되는 것으로 이해된다. 약제학적 유효량은 요구되거나 목적하는 치료적 반응에 충분한 양의 활성 성분이거나, 다른 말로, 환자에게 투여시 뚜렷한 생물학적 반응을 유도하기에 충분한 양이다. 뚜렷한 생물학적 반응은 활성 물질의 단일 또는 다중 용량의 투여 결과 발생할 수 있다. 투여량은 하나 이상의 제형을 포함할 수 있다. 임의의 환자에 있어서 특정 투여 수준은 치료할 징후, 징후의 중증도, 환자 건강 상태, 연령, 성별, 체중, 식이, 약리 반응, 사용된 특정 투약 형태 및 기타 다른 요인을 포함하는 다양한 요인에 의존적일 것이다.

[0089] 경구 투여에 요망되는 용량은 적어도 하나 내지 많게는 10개의 제형 (dosage form)으로 투여할 수 있지만, 5개 이하의 제형이 적당하다. 예시적인 제형은 제형당 0.6mg의 SCF 추출물을 함유할 수 있는데, 투여량당 총 0.6 내지 60mg (1 내지 10개 용량 수준)에 이른다.

[0090] 강심성 배당체는 12 내지 1200ug 또는 그 이상 또는 이하의 초기 용량의 올레안드린을 피검체에 제공하기에 충분한 양으로 제형중에 존재할 수 있다. 제형은 0.01 내지 100mg의 올레안드린, 올레안드린 추출물 또는 올레안드린을 함유하는 협죽도의 추출물을 포함할 수 있다.

[0091] 포유동물 치료에 사용하기 위해서, 강심성 배당체가 제형 (dosage form)중에 포함될 수 있다. 제형의 일부 구체 예는 장용 제피되지 않으며, 0.5 내지 1시간 이내에 이의 강심성 배당체 충전물을 방출한다. 제형의 일부 구체 예는 장용 제피되며, 이의 강심성 배당체 충전물을 위 하류 예컨대, 십이지장, 회장, 소장 및/또는 대장(결장)에 방출한다. 장용 제피된 제형은 경구 투여 후 1 내지 10시간 내에 강심성 배당체를 전신 순환계에 배출할 것이다.

[0092] 예비 동물 투여 데이타에 기초하여, 협죽도 추출물의 투여된 용량의 50 내지 75%는 경구적으로 생체이용가능할 것이며, 따라서 제형당 0.25 내지 0.4mg, 0.1 내지 50mg, 0.1 내지 40mg, 0.2 내지 40mg, 0.2 내지 30mg, 0.2 내지 20mg, 0.2 내지 10mg, 0.2 내지 5mg, 0.2 내지 2.5mg, 0.2 내지 2mg, 0.2 내지 1.5mg, 0.2 내지 1mg, 0.2 내지 0.8mg, 0.2 내지 0.7, 또는 0.25 내지 0.5mg의 올레안드린을 제공한다. 성인의 평균 혈액량이 5리터라면, 고려되는 올레안드린 플라즈마 농도는 0.05 내지 2ng/ml, 0.005 내지 10ng/ml, 0.005 내지 8ng/ml, 0.01 내지 7ng/ml, 0.02 내지 7ng/ml, 0.03 내지 6ng/ml, 0.04 내지 5ng/ml 또는 0.05 내지 2.5ng/mL일 것이다. SCF 추출물중에 존재하는 올레안드린의 권장 1일 용량 일반적으로 1일 2회 약 0.25 내지 약 50mg 또는 1일 2회 또는 매 12시간마다 약 0.9 내지 5mg이다. 투여량은 약 0.5 내지 약 100mg/일, 약 1 내지 약 80mg/일, 약 1.5 내지 약 60mg/일, 약 1.8 내지 약 60mg/일, 약 1.8 내지 약 40mg/일일 수 있다. 최대 관용되는 용량은 약 100mg/일, 약 80mg/일, 약 60mg/일, 약 40mg/일, 약 38.4mg/일 또는 약 30mg/일의 올레안드린을 함유하는 협죽도 추출물이며, 최소 유효량은 약 0.5mg/일, 약 1mg/일, 약 1.5mg/일, 약 1.8mg/일, 약 2mg/일 또는 약 5mg/일일 수 있다.

[0093] 본 명세서의 화합물은 본 발명의 제형에서 하나 이상의 작용을 가질 수 있을 것이다. 예를 들면, 화합물은 계면활성제 및 수혼화성 용매 둘 모두로서의 또는 계면활성제 및 수불혼화성 용매 둘 모두로서의 역할을 해야 할 것이다.

[0094] 액체 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 액체 담체를 포함할 수 있다. 액체 담체는 수성, 비수성, 극성,비극성 및/또는 유기 담체일 수 있다. 액체 담체는 비한정적인 예로서 수혼화성 용매, 수불혼화성 용매, 물, 완충액 및 이들의 혼합물을 포함한다.

[0095] 본 명세서에서, 호환적으로 사용되는 "수용성 용매" 또는 "수혼화성 용매"란 용어는 물과 이상 혼합물을 형성하지 않으며 액체 상의 분리없이 5% 이상의 용매를 함유하는 수성 용매 혼합물을 제공하도록 물에 충분히 가용성인 유기 액체를 말한다. 용매는 사람 또는 동물에 적합하다. 수용성 용매의 비한정적 예에는 PEG(폴리)에틸렌 글리콜)), PEG 400(분자량이 약 400인 폴리(에틸렌 글리콜)), 에탄올, 아세톤, 알칸올, 알콜, 에테르, 프로필렌 글리콜, 글리세린, 트리아세틴, 폴리(프로필렌 글리콜), PVP(폴리(비닐 피롤리돈)), 디메틸설폭시드, N,N-디메틸포름아미드, 포름아미드, N,N-디메틸아세트아미드, 피리딘, 프로판올, N-메틸아세트아미드, 부탄올, 솔루퍼

(2-피롤리돈), 파마솔브 (N-메틸-2-피롤리돈)이 포함된다.

[0096] 본 명세서에서, 호환적으로 사용되는 "수불용성 용매" 또는 "수불혼화성 용매"란 용어는 물과 이상 혼합물을 형성하물 중의 용매 농도가 5%를 초과할 때 상을 분리하는 유기 액체를 말한다. 용매는 사람 또는 동물에게 투여하기에 적합하다. 수불용성 용매의 비한정적 예에는 중쇄/장쇄 트리글리세라이드, 오일, 피마자유, 옥수수유, 비타민 E, 비타민 E 유도체, 올레산, 지방산, 소프티산 645(디글리세릴 카프릴레이트/카프레이트/스테아레이트/하이드록시 스테아레이트 아디페이트), 미글리올, 캅테스(캅텍스 350:글리세릴 트리카프릴레이트/카프레이트/라우레이트 트리글리세라이드;캅텍스 355:글리세릴 트리카프레이트/카프레이트 트리글리세라이드;캅텍스 355EP/NF:글리세릴 트리카프레이트/카프레이트 중쇄 트리글리세라이드)가 포함된다.

[0097] 적합한 용매는 문헌("International Conference on Humonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use(ICH) guidance for industry *Q3C Impurities: Residual Solvents*" (1997)에 열거되어 있으며 여기에는 어느 정도의 잔류 용매의 양이 약제에 안전한 것으로 고려되는지에 대해 권고하고 있다. 바람직한 용매는 클래스 2 또는 클래스 3 용매로 열거되어 있다. 클래스 3 용매에는, 예를 들면, 아세트산, 아세톤, 아니솔, 1-부탄, 2-부탄올, 부틸 아세테이트, 3급 부틸메틸 에테르, 쿠멘, 에탄올, 에틸 에테르, 에틸 아세테이트, 에틸 포르메이트, 포름산, 헵탄, 이소부틸 아세테이트, 이소프로필 아세테이트, 이소프로필 아세테이트, 메틸 아세테이트, 메틸-1-부탄올, 메틸에틸 케톤, 메틸이소부틸 케톤, 2-메틸-1-프로판올, 펜탄, 1-펜탄올, 1-프로판올, 2-프로판올 또는 프로필 아세테이트가 포함된다.

[0098] 본 발명에서 수불혼화성 용매로서 사용할 수 있는 다른 물질의 예에는 다음이 포함된다: 캅텍스 100: 프로필렌 글리콜 디카프레이트; 캅텍스 200: 프로필렌 글리콜 디카프레이트/디카프레이트; 캅텍스 200 P: 프로필렌 글리콜 디카프레이트/디카프레이트; *프로필렌 글리콜 디카프릴로카프레이트*; 캅텍스 300:글리세릴 트리카프릴레이트/카프레이트; 캅텍스 300 EP/NF: 글리세릴 트리카프릴레이트/카프레이트 중쇄 트리글리세라이드; 캅텍스 350: 글리세릴 트리카프릴레이트/카프레이트/라우레이트; 캅텍스 355: 글리세릴 트리카프레이트/카프레이트; 캅텍스 355 EP/NF: 글리세릴 트리카프릴레이트/카프레이트 중쇄 트리글리세라이드; 캅텍스 500: 트리아세틴; 캅텍스 500P: 트리아세틴(약제 등급); 캅텍스 800: 프로필렌 글리콜 Di(2-에티텍사노에이트); 캅텍스 810 D: 글리세릴 트리카프릴레이트/카프레이트/리놀리에이트; 캅텍스 1000: 글리세릴 트리카프레이트; 캅텍스 CA: 중쇄 트리글리세라이드; 캅텍스 MCT-170: 중쇄 트리글리세라이드; 캡물 GMO: 글리세릴 모노올레에이트; 캡물 GMO-50 EP/NF: 글리세릴 모노올레에이트; 캡물 MCM: 중쇄 모노- 및 디글리세라이드; 캡물 MCM C8; 글리세릴 모노카프릴레이트; 캡물 MCM C10: 글리세릴 모노카프레이트; 캡물 PG-8: 글리세릴 모노카프릴레이트; 캡물 PG-12: 프로필렌 글리콜 모노라우레이트; 카프롤 10G100: 데카글리세롤 데카올레에이트; 카프롤 3GO: 트리글리세롤 모노올레에이트; 카프롤 ET: 혼합된 지방산의 폴리글리세롤 에스테르; 카프롤 MPGO: 헥사글리세롤 디올레에이트; 카프롤 PGE 860: 데카글리세롤 모노-, 디올레에이트.

[0099] 본 명세서에서, "계면활성제"는 극성 또는 하전된 친수성 잔기뿐만 아니라 비극성 소수성 (친지성) 잔기를 포함하는 화합물을 말한다. 즉, 계면활성제는 양쪽 친매성이다. 계면활성제란 용어는 하나의 화합물 또는 화합물의 혼합물을 의미할 수 있다. 계면활성제는 가용화제, 유화제 또는 분산제일 수 있다. 계면활성제는 친수성 또는 소수성일 수 있다.

[0100] 친수성 계면활성제는 약제 조성물에 사용되기에 적합한 친수성 계면활성제일 수 있다. 이러한 계면활성제는 음이온, 양이온, 양쪽성 또는 비이온성일 수 있으며, 비이온성 친수성 계면활성제가 현재 바람직하다. 상기 기술된 바와 같이, 이러한 비이온성 친수성 계면활성제는 약 10을 초과하는 HLB 값을 가질 것이다. 친수성 계면활성제의 혼합물은 본 발명의 범위내에 있다.

[0101] 유사하게는, 소수성 계면활성제는 약제 조성물에 사용하기에 적합한 소수성 계면활성제일 수 있다. 통상, 적합한 소수성 계면활성제는 HLB 값이 약 10 미만이다. 소수성 계면활성제의 혼합물 또한 본 발명의 범위에 속한다.

[0102] 추가의 적합한 가용화제의 예에는 다음이 포함된다: 알콜 및 폴리올, 예를 들면, 에탄올, 이소프로판올, 부탄올, 벤질 알콜, 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 부탄디올 및 이의 이성체, 글리세롤, 펜타에리트리톨, 소르비톨, 만니톨, 트랜스큐톨, 디메틸 이소소르비드, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리비닐알콜, 하이드록시프로필 메틸셀룰로즈 및 다른 셀룰로즈 유도체, 사이클로덱스트린 및 사이클로덱스트린 유도체; 평균 분자량이 약 200 내지 약 6000인 폴리에틸렌 글리콜의 에테르, 예를 들면, 테트라하이드로푸르푸릴 알콜 PEG 에테르(글리코푸롤-Tetraglycol이라는 상표명으로 BASF가 판매) 또는 메톡시 PEG(Union Carbide); 아미드, 예를 들면, 2-피롤리돈, 2-피페리돈, 카프로락탐, N-알킬피롤리돈, N-하이드록시알킬피롤리돈, N-알킬피페리돈, N-알킬카프로락탐, 디메틸아세트아미드 및 폴리비닐피롤리돈; 에스테르, 예를 들면, 에틸 프로피오네이트, 트리부틸

시트레이트, 아세틸 트리에틸시트레이트, 아세틸 트리부틸 시트레이트, 트리에틸 시트레이트, 에틸 올레에이트, 에틸 카프릴레이트, 에틸 부티레이트, 트리아세틴, 프로필렌 글리콜 모노아세테이트, 프로필렌 글리콜 디아세테이트, 카프로락톤 및 이의 이성체, 발레로락톤 및 이의 이성체, 부티로락톤 및 이의 이성체; 및 당업계에 공지된 다른 가용화제, 예를 들면, 디메틸 아세트아미드, 디메틸 이소소르비드(Arlasolve DMI(ICI)), N-메틸 피롤리돈(Pharmasolve(ISP)), 모노옥타노인, 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르(Gattefosse가 Transcutol이라는 상표명으로 시판) 및 물. 가용화제의 혼합물도 본 발명의 범위에 속한다.

[0103] 위에 명시한 것을 제외하고는 표준 상업 공급원으로부터 구입 가능하다.

[0104] 맑은 액체 조성물은 도구의 도움없는 육안에 시각적으로 맑은데, 조성물의 총 중량을 기준으로 하여 현탁된 고체의 5중량 % 미만, 3중량 % 미만 또는 1중량 % 미만을 함유할 것이다.

[0105] 필수적인 것은 아니지만, 본 발명의 조성물 또는 키트는 킬레이트제, 방부제, 흡착제, 산성화제, 알칼리성화제, 발포방지제, 완충제, 착색제, 전해질, 염, 안정제, 감미제, 장성 조절제(tonicity modifier), 희석제, 다른 약제학적 부형제 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0106] 본 명세서에서, "항산화제"라는 용어는 산화 방지제로서 산화 공정에 의한 제조물의 열화를 방지하는데 사용된다. 이러한 화합물의 비한정적 예에는 아스코르브산, 아스코르브산 팔미테이트, 비타민 E, 비타민 E 유도체, 부틸화된 하이드록시아니솔, 부틸화된 하이드록시톨루엔, 하이포아인산, 모노티오글리세롤, 프로필 갈레이트, 나트륨 아스코르베이트, 아황산수소나트륨, 나트륨 포름알데히드 설폭실레이트, 금속아황산수소 나트륨(sodium metalbisulfite) 및 당업계에 공지된 다른 물질이 포함된다.

[0107] 본 명세서에서, 킬레이트제란 용어는 용액 내에서 금속을 킬레이트화시키는 화합물을 말한다. 킬레이트제의 예에는 EDTA(테트라나트륨에틸렌디아민테트라아세테이트), DPTA(펜타나트륨 디에틸렌트리아민펜타아세테이트), HEDTA(N-(하이드록시에틸)-에틸렌디아민트리아세트산의 삼나트륨 염), NTA(삼나트륨 니트릴로트리아세테이트), 이나트륨 에탄올디글리신(Na_2EDG), 나트륨 디에탄올글리신(DEGNa), 시트르산 및 당업계에 공지된 다른 화합물이 포함된다.

[0108] 본 명세서에서, "흡착제"란 용어는 물리적 또는 화학적(화학흡착) 수단에 의해 다른 분자를 표면에 붙들어 둘 수 있는 화학제를 의미한다. 이러한 화합물의 비한정적 예에는 분말화된 또는 활성화된 목탄 및 당업계에 공지된 다른 물질이 포함된다.

[0109] 본 명세서에서, "알칼리화제"란 알칼리성 매질을 제공하는 화합물을 의미한다. 이러한 화합물의 비한정적 예에는 암모니아 용액, 탄산 암모늄, 디에탄올아민, 모노에탄올아민, 수산화칼륨, 붕산 나트륨, 탄산 나트륨, 탄산수소나트륨, 수산화 나트륨, 트리에탄올아민, 및 트롤아민, 및 당업계에 공지된 다른 화합물이 포함된다.

[0110] 본 명세서에서, "산성화제"란 산성 매질을 제공하는데 사용되는 화합물을 의미한다. 이러한 화합물의 비한정적 예에는 아세트산, 아미노산, 시트르산, 푸마르산 및 다른 알파 하이드록시산, 염산, 아스코르브산 및, 질산 및 당업계에 공지된 다른 화합물이 포함된다.

[0111] 본 명세서에서, "발포방지제"는 충전 조성물의 표면에 형성되는 발포의 양을 줄이거나 방지하는 화합물을 의미한다. 적합한 발포방지제의 비한정적 예에는 디메티콘, SIMETHICONE, 옥토시놀 및 당업계에 공지된 다른 물질이 포함된다.

[0112] 본 명세서에서, "완충제"는 상 또는 알칼리로 희석시 또는 이들을 첨가시 pH 변화를 견디게 하는 화합물을 의미한다. 이러한 화합물의 비한정적 예에는 메타인산 나트륨, 인산 칼륨, 일염기 아세트산 나트륨 및 시트산 나트륨 무수물 및 탈수물 및 당업계에 공지된 다른 물질이 포함된다.

[0113] 본 명세서에서, "희석제" 또는 "충전제"란 정제 및 캡슐 제조시 목적하는 부피, 흐름 특성 및 압축 특성을 나타내게 하는 충전제로서 사용되는 불활성 물질을 의미한다. 이러한 화합물의 비한정적 예에는 이염기성 인산 나트륨, 카올린, 락토오즈, 슈크로즈, 만니톨, 미세결정성 셀룰로즈, 분말 세룰로즈, 침강 탄산 칼슘, 소르비톨 및 전분 및 당업계에 공지된 다른 물질이 포함된다.

[0114] 본 명세서에서, "방부제"란 미생물의 성장을 방지하는데 사용되는 화합물을 의미한다. 이러한 화합물의 비한정적 예에는 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 벤조산, 벤질 알콜, 세틸피리디늄 클로라이드, 크로로부탄올, 페놀, 페닐에틸 알콜, 페닐머큐릭 니트레이트, 페닐머큐릭 아세테이트, 티메로살, 메타크레솔, 미리스틸감마 피콜리늄 클로라이드, 벤조산 칼륨, 소르브산 칼륨, 벤조산 나트륨, 프로피온산 나트륨, 소르브산, 티

물, 및 에틸, 프로필, 또는 부틸 파라벤 및 당업계에 공지된 다른 물질이 포함된다.

[0115] 본 명세서에서, "착색제"는 약제학적 제제에 색을 부여하는데 사용되는 화합물을 의미한다. 이러한 화합물의 비한정적 예에는 FD&C Red No.3, FD&C Red No.20, FD&C Yellow No.6, FD&C Blue No.2, FD&C Green No.5, FD&C Orange No.5, FD&C Red No.8, 카라멜 및 산화철(흑, 적, 황), 및 다른 FD&C 염료 및 천연 착색제, 예를 들면, 포도 피부 추출물, 비트 레드 파우더, 베타 카로틴, 아나토, 카르민, 투르메릭, 파프리카, 이들의 조합 및 당업계에 공지된 다른 물질이 포함된다.

[0116] 본 명세서에서, "안정제"란 화학제의 치료 활성을 감소시킬 수 있는 물리적, 화학적 또는 생화학적 공정에 대해 활성제를 안정시키는데 사용되는 화합물을 의미한다. 적합한 안정제의 비한정적 예에는 알부민, 시알산, 크레아티닌, 글리신 및 다른 아미노산, 니아신아미드, 나트륨 아세틸트립토포네이트, 산화 아연, 슈크로즈, 글루코스, 락토오즈, 소르비톨, 만니톨, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜, 카프릴산 나트륨 및 나트륨 사카린 및 당업계에 공지된 다른 물질이 포함된다.

[0117] 본 명세서에서, "장성 조절제"는 액체 제형의 장성을 조정하는데 사용되는 화합물을 의미한다. 적합한 장성 조절제의 예에는 글리세린, 락토오즈, 만니톨, 덱스트로즈, 염화 나트륨, 황산 나트륨, 소르비톨, 트레할로즈 및 당업계에 공지된 다른 물질이 포함된다.

[0118] 본 발명의 조성물은 또한 불휘발성유, 땅콩유, 참기름, 면실유, 옥수수 오일 및 올리브유, 올레산, 스테아르산 및 이소스테아르산과 같은 지방산, 에틸 올레에이트, 이소프로필 미리스테이트, 지방산 글리세라이드 및 아세틸화된 지방산 글리세라이드와 같은 지방산 에스테르를 포함할 수 있다. 조성물은 또한 에탄올, 이소프로판올, 헥사데실 알콜, 글리세롤 및 프로필렌 글리콜과 같은 알콜, 2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-메탄올과 같은 글리세롤 케탈, 폴리(에틸렌 글리콜)450과 같은 에테르, 광유 및 바셀린과 같은 석유 탄화수소, 물, 약제학적으로 적합한 계면활성제, 현탁제 또는 유화제, 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0119] 약제 제형 분야에서 사용되는 화합물은 일반적으로 다양한 기능 또는 목적에 맞는다는 것을 이해해야 한다. 이와 같이, 본 명세서에서 거명한 화합물이 본 명세서에서 하나 이상의 용어를 정의하는데 사용되거나 단 한 번 언급되는 경우, 이의 목적 또는 기능이 그 이름 또는 기능에만 한정되는 것이 아니다.

[0120] 제형의 성분 하나 이상이 유리 형태 또는 약제학적으로 허용되는 염 형태로 존재할 수 있다. 본 명세서에서, "약제학적으로 또는 분석적으로 허용되는 염"은 이온적으로 결합된 쌍을 형성시키기 위해서 필요에 따라 산과 반응시켜 변형시킨 화합물을 말한다. 약제학적으로 허용되는 염의 예에는 예를 들면 비독성 무기 또는 유기산으로부터 형성된 종래의 비독성 염이 포함된다. 적합한 비독성 염에는 염산, 브롬화수소산, 황산, 설폰산, 설팜산, 인산, 질산 및 당업계에 공지된 다른 산으로부터 유도된 것이 포함된다. 염은 아미노산, 아세트산, 프로피온산, 수신산, 글리콜산, 스테아르산, 락트산, 말산, 타타르산, 시트르산, 아스코르브산, 파모산, 말레산, 하이드록시말레산, 페닐아세트산, 글루탐산, 벤조산, 살리실산, 설파닐산, 2-아세톡시벤조산, 푸마르산, 토루엔설폰산, 메탄설폰산, 에탄 디설폰산, 옥살산, 이세티온산 및 당업계에 공지된 다른 산과 같은 유기산으로부터 제조한다. 다른 적합한 염의 목록은 문헌(Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th. ed., Mack Publishing Company, Easton,PA, 1985,p.1418)에 있다.

[0121] "약제학적으로 허용되는"이라는 표현은 건전한 의약적 판단의 범위 내에서 사람 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하고 과도한 독성, 앨러지 반응 또는 다른 문제 또는 복합 증상 없이 합리적인 이익/위험 비를 갖는 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 말한다.

[0122] 제형은 약제 산업에서 공지된 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있다. 액제 제형은 컨테이너내에 하나 이상의 액체 담체 및 올레안드린 또는 올레안드린-함유 추출물을 제공함으로써 제조될 수 있다. 하나 이상의 다른 부형제가 액체 제형에 포함될 수 있다. 고체 제형은 하나 이상의 고체 담체 및 올레안드린 또는 올레안드린-함유 추출물을 제공함으로써 제조될 수 있다. 하나 이상의 다른 부형제가 고체 제형에 포함될 수 있다.

[0123] 제형은 통상적인 패키징 장치 및 재료를 사용하여 패키징될 수 있다. 이는 팩, 병, 유리병, 백, 주사기, 엔벨로프, 파켓, 블리스터 팩, 박스, 앰플 또는 기타 이러한 컨테이너내에 포함될 수 있다.

[0124] 본 발명은 신경학적 질병을 갖는 피검체 군집에서 통계학적으로 현저한 수의 피검체의 임상 상태를 개선시키는 방법으로서, 강심성 배당체 또는 강심성 배당체-함유 조성물을 피검체 군집에 투여하고, 피검체의 임상 상태를 측정하는 것을 포함한다. 일부 구체 예에서, 통계적으로 현저한 수는 군집의 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상 또는 90% 이상이다. 일부 구체 예에서, 조성물은 올레안드린 또는 올레안드린을 포함하는 추출물을 포함한다. 추출물은 임의적으로 올레안드린과 협조하는

하나 이상의 다른 약물학적 활성 화합물을 포함하여 피검체의 임상 상태를 개선시킨다.

[0125] 본원에 사용된 바와 같은 "유도체"는 a) 제 1 화학 물질과 구조적으로 관련되고 이로부터 이론적으로 유도가능한 화학 물질; b) 유사한 제 1 화합물로부터 형성된 화합물 또는 제 1 화합물의 하나의 원자가 또 다른 원자 또는 원자의 군으로 치환되는 경우 또 다른 제 1 화합물로부터 발생할 것으로 이미징될 수 있는 화합물; c) 어미 화합물로부터 유래되거나 수득되며, 어미 화합물의 필수 요소를 함유하는 화합물; 또는 d) 하나 이상의 단계에서 유사한 구조의 제 1 화합물로부터 생성될 수 있는 화학적 화합물.

[0126] 상기 설명 및 아래 실시예로 볼 때, 당업계의 기술자는 과도한 실험없이 청구된 본 발명을 실시할 수 있을 것이다. 전술한 내용은 본 발명의 양태 제조를 위한 특정 공정을 상세히 설명한 다음 실시예를 참조하면 더욱 잘 이해할 수 있을 것이다. 이들 실시예에서 모든 참조는 예시 목적이다. 하기 실시예는 배타적인 것이 아니며 본 발명에서 고려되는 많은 양태 중 몇몇 만을 예시한 것이다.

[0127] 올레안드린은 시그마 케미칼 코. (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO)로부터 구입할 수 있다.

[0128] **실시예1**

[0129] 분말화된 협죽도 잎의 초임계유체 추출물

[0130] 방법 A. 이산화탄소 사용

[0131] 협죽도 잎 분말을 수확하고, 세척한 후 건조시켜 준비한 다음, 협죽 잎 재료를 분쇄 및 탈수 장치, 예를 들면, 미국 특허 제5,236,132호, 제5,598,979호, 제6,517,015호 및 제6,715,705호에 기술된 장치를 통과시킨다. 출발 물질의 중량은 3.94kg이다.

[0132] 출발 물질은 추출기 장치 내에서 300bar(30 MPa, 4351psi)의 압력 및 50℃(122°F)의 온도에서 순수한 이산화탄소와 합친다. 총 197kg의 이산화탄소를 사용하여 50:1의 용매 대 원료비를 제공한다. 이어서 이산화탄소와 원료의 혼합물을 분리 장치를 통과시키고, 혼합물의 압력과 온도를 변화시키고 이산화탄소로부터 추출물을 분리한다.

[0133] 추출물(65g)을 향이 좋은 갈색의 끈끈한 점성 물질로서 수득한다. 색은 클로로필 및 복합 다당류에 기인한 것으로 보인다. 추출물 수율을 측정하기 위해서, 튜브 및 분리기를 아세톤으로 세정하고 아세톤을 증발시켜 추출물 9g을 수득한다. 총 추출물 양은 74g이다. 출발 물질의 중량을 기준으로, 추출물의 수율은 1.88%이다. 추출물 중의 올레안드린의 함량은 고압 액체 크로마토그래피 및 질량 분석(mass spectrometry)을 사용하여 계산한 결과 560.1 mg 또는 0.76% 수율이다.

[0134] 방법 B. 이산화탄소와 에탄올의 혼합물 사용

[0135] 협죽도 잎 분말을 수확하고, 세척한 후 건조시켜 준비한 다음, 협죽도 잎 재료를 분쇄 및 탈수 장치, 예를 들면, 미국 특허 제5,236,132호, 제5,598,979호, 제6,517,015호 및 제6,715,705호에 기술된 장치를 통과시킨다. 출발 물질의 중량은 3.85kg이다.

[0136] 출발 물질을 280bar(28 MPa, 4061 psi)의 압력 및 50℃(122°F)의 온도에서 순수한 이산화탄소와 개질제로서의 5% 에탄올과 추출 장치 내에서 합친다. 총 160kg의 이산화탄소 및 8kg의 에탄올을 사용하여 43.6:1의 용매 대 원료의 비를 제공한다. 이어서, 이산화탄소, 에탄올 및 원료의 혼합물을 분리 장치를 통과시키고, 혼합물의 압력과 온도를 변화시켜 이산화탄소로부터 추출물을 분리한다.

[0137] 에탄올을 제거하여 약간의 클로로필을 함유하는 것이 분명한 암녹색의 끈끈한 점성 물질로서 추출물(207g)을 수득한다. 출발 물질의 중량을 기준으로, 추출물의 수율은 5.38%이다. 추출물 내의 올레안드린의 함량은 고압 액체 크로마토그래피 및 질량 분석(mass spectrometry)을 사용하여 계산한 결과, 1.89g이거나 수율이 2.1%이다.

[0138] **실시예 2**

[0139] 협죽도 잎 분말의 고온수 추출물

[0140] 협죽도 잎으로부터 올레안드린 및 다른 활성 성분을 추출하기 위해서는 보통 고온수를 사용해 왔다. 고온수 추출 공정의 예는 미국 특허 제 5,135,745호 및 제 5,869,060호에서 찾을 수 있다.

[0141] 고온수 추출은 협죽도 잎 분말 5g을 사용하여 수행한다. 10 용적(협죽도 출발 물질의 중량 기준)의 끓는 물을 협죽도 잎 분말에 첨가하고 혼합물을 6 시간 동안 계속 교반한다. 이어서 혼합물을 여과하고 잎 잔류물을 수집하고 동일한 조건에서 다시 추출한다. 여과물을 합치고 동결건조시킨다. 추출물의 외관은 갈색이다. 건조된 추

출 물질의 중량은 약 1.44g이다. 34.21mg의 추출 물질을 물에 용해시키고 고압 액체 크로마토그래피 및 질량 분석을 사용하여 올레안드린 함량을 분석한다. 올레안드린의 양은 3.68mg으로 측정되었다. 올레안드린 수율은, 추출물의 양을 기준으로, 0.26%로 계산되었다. 아래 표는 실시예 1의 두 초임계 이산화탄소 추출과 고온수 추출에 대한 올레안드린 수율 간의 비교를 보여준다.

[0142]

표 1

[0143] 수율 비교

추출 매질	총 추출물 중량을 기준으로 한 올레안드린 수율
초임계 이산화탄소: 실시예 1, 방법A	0.76%
B초임계 이산화탄소: 실시예 1, 방법A	2.1%
고온수 추출: 실시예2	0.26%

[0144] **실시예 3**

[0145] 알츠하이머병을 포함하나 이에 제한되지 않는 신경학적 질병의 치료

[0146] 방법 A. 강심성 배당체 치료

[0147] 알츠하이머병을 나타내는 피검체에 강심성 배당체를 처방하고, 치료학적 관련 용량을 처방된 투약 요법에 따라 소정 기간 동안 피검체에 투여하였다. 피검체의 치료적 반응의 수준을 주기적으로 측정하였다. 치료적 반응의 수준이 1회 투여에서 매우 낮은 경우, 투여량은 피검체에서 목적하는 수준의 치료적 반응이 달성될 때까지 소정의 증량 스케줄에 따라 증량한다. 강심성 배당체로의 피검체 처리는 필요에 따라 계속하며, 투여량 또는 투여 요법은 환자가 목적하는 임상 종점에 도달할 때까지 필요에 따라 조절될 수 있다.

[0148] 방법 B. 조합물 치료: 강심성 배당체와 다른 제제

[0149] 상기 방법 A에 따르고, 단 알츠하이머병 또는 이의 증상 치료를 위한 하나 이상의 다른 치료제를 피검체에 처방하고 투여하였다. 하나 이상의 다른 치료제는 강심성 배당체 투여 전, 후 또는 함께 투여될 수 있다. 하나 이상의 다른 치료제의 증량 (또는 감량)이 또한, 수행될 수 있다. 적합한 하나 이상의 치료제는 나멘다™ (Namenda™; 메만틴 HCl), 아리셉트™ (Aricept™; 도네페질), 라자딘™ (Razadyne™; 갈란타민), 엑셀론™ (Exelon™; 리바스티그민) 및 코그넥스™ (Cognex™; 타크린)으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0150] **실시예 4**

[0151] 헌팅턴병을 포함하나 이에 제한되지 않는 신경학적 질병의 치료

[0152] 방법 A. 강심성 배당체 치료

[0153] 헌팅턴병을 나타내는 피검체에 강심성 배당체를 처방하고, 치료학적 관련 용량을 처방된 투약 요법에 따라 소정 기간 동안 피검체에 투여하였다. 피검체의 치료적 반응의 수준을 주기적으로 측정하였다. 치료적 반응의 수준이 1회 투여에서 매우 낮은 경우, 투여량은 피검체에서 목적하는 수준의 치료적 반응이 달성될 때까지 소정의 증량 스케줄에 따라 증량한다. 강심성 배당체로의 피검체 처리는 필요에 따라 계속하며, 투여량 또는 투여 요법은 환자가 목적하는 임상 종점에 도달할 때까지 필요에 따라 조절될 수 있다. 투여된 용량은 실시예 3의 용량과 유사하거나 본원에 달리 기술된 것과 유사하다.

[0154] 방법 B. 조합물 치료: 강심성 배당체와 다른 제제

[0155] 상기 방법 A에 따르고, 단 헌팅턴병 또는 이의 증상 치료를 위한 하나 이상의 다른 치료제를 피검체에 처방하고 투여하였다. 하나 이상의 다른 치료제는 강심성 배당체 투여 전, 후 또는 함께 투여될 수 있다. 하나 이상의 다른 치료제의 증량 (또는 감량)이 또한, 수행될 수 있다. 적합한 하나 이상의 치료제는 비타민 E, 바클로펜 (Baclofen) (CoQ10의 유도체), 라모트리진 (Lamotgrigine) (항경련제), 라마세미드 (저친화도 NMDA 안타고니스트인 마취제), 및 릴루졸 (riluzole) (Na 채널 차단제)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0156] **실시예 5**

[0157] 허혈성 뇌졸증을 포함하나 이에 제한되지 않는 신경학적 질병의 치료

[0158] 방법 A. 강심성 배당체 치료

[0159] 허혈성 뇌졸증을 나타내는 피검체에 강심성 배당체를 처방하고, 치료학적 관련 용량을 처방된 투약 요법에 따라 소정 기간 동안 피검체에 투여하였다. 피검체의 치료적 반응의 수준을 주기적으로 측정하였다. 치료적 반응의 수준이 1회 투여에서 매우 낮은 경우, 투여량은 피검체에서 목적하는 수준의 치료적 반응이 달성될 때까지 소정의 증량 스케줄에 따라 증량한다. 강심성 배당체로의 피검체 처리는 필요에 따라 계속하며, 투여량 또는 투여 요법은 환자가 목적하는 임상 종점에 도달할 때까지 필요에 따라 조절될 수 있다. 투여된 용량은 실시예 3의 용량과 유사하거나 본원에 달리 기술된 것과 유사하다.

[0160] 방법 B. 조합물 치료: 강심성 배당체와 다른 제제

[0161] 상기 방법 A에 따르고, 단 허혈성 뇌졸증 또는 이의 증상 치료를 위한 하나 이상의 다른 치료제를 피검체에 처방하고 투여하였다. 하나 이상의 다른 치료제는 강심성 배당체 투여 전, 후 또는 함께 투여될 수 있다. 하나 이상의 다른 치료제의 증량 (또는 감량)이 또한, 수행될 수 있다.

[0162] **실시예 6**

[0163] 올레안드린을 함유하는 용액의 HPLC 분석

[0164] 샘플(올레안드린 표준, 초임계유체 추출물 및 고온수 추출물)을 다음 조건을 사용하여 HPLC(Waters) 상에서 분석한다: Symmetry C18 Column(5.0㎛, 150x4.6 mm I.D.;Waters); MeOH:물=54:46(v/v)의 이동상 및 1.0ml/분의 유량. 검출 파장은 217nm에 설정하였다. 샘플은 화합물 또는 추출물을 고정량의 HPLC 용매 내에 용해시켜 올레안드린의 근접한 표적 농도에 달하게 함으로써 제조하였다.

[0165] **실시예 7**

[0166] 정상 신경 조직에서 α3 및 α1 발현의 측정

[0167] 본원에 참조로 통합된 PCT 국제 출원 PCT/US08/82641 (filed November 6, 2008 in the name of Phoenix Biotechnology, Inc.)에 기재된 공정에 따른다.

[0168] **실시예 8**

[0169] 뇌졸증 및 비-뇌졸증에 대한 실험관내 분석에서 강심성 배당체의 평가

[0170] 방법 A. 뇌졸증: 피질 뇌 슬라이스의 제조 및 OGD

[0171] 신피질 뇌 슬라이스를 PND 7 스프라그-돌레이 래트 폽 (Sprague-Dawley rat pup)으로부터 제조하였다. 대뇌피질을 절개하고, 400-마이크론-두께 슬라이스로 절단하고, 1uM MK-801과 냉 인공 뇌척수액을 함유하는 컨테이너에 옮긴 후 플레이팅시키고; MK-801은 후속 공정에는 포함시키지 않았다. 일시적 산소-글루코오스 결핍 (OGD)를 이용하여 허혈성 손상을 모방하고, 각 뇌의 한 반구로부터의 슬라이스를 글루코오스 비함유 N_2-버블링된 인공 뇌척수액에 낮은 O_2 (0.5%) 환경에서 7.5분 동안 노출시켰다. 그 후, OGD 슬라이스를 니트로셀룰로오스 또는 밀리셀 (Millicell) (Millipore) 투과성 멤브레인상의 반대쪽 반구로부터의 대조군 슬라이스와 나란히 플레이팅시키고, 상기 대조군 슬라이스는 비 OGD를 제외하고는 동일하게 제조된 것이다. 플레이트 후 30분에, 뇌 슬라이스 쌍을 트렌스퓩션시키고, 24웰 플레이트에 이동시키고, 가습 챔버내의 5% CO_2 하에 37℃에서 인큐베이션하였다. 각 실험에서, 5-6분의 산소-글루코오스 결핍 (OGD) 처리를 이용하여 24시간 까지 건강한 피질 뉴론의 50% 초과의 손실을 유도하였다 (도 1A의 처음 두개의 바 비교). 지정된 농도 (3 μM)의 네리폴린을 내부 파지티브 대조군으로서 이용하였다. 올레안드린에 있어서, 0.3 내지 3 μM의 모든 세 농도가 처음 두 실험에서 신경 보호를 제공하는 것으로 보이며 (도 1A 및 1B), 따라서, 시험한 올레안드린 농도를 세번째 수행시 저하시켰으며 (도 1C), 이는 신경보호에 대한 경계 농도가 0.1 내지 0.1 내지 0.3 μM에 있음을 시사한다.

[0172] 방법 B. 비-뇌졸증: 뇌 슬라이스 분석

[0173] 올레안드린 및 PBI-05204를 "비-뇌졸증" 뇌 슬라이스에서 시험하였다; 즉, 슬라이싱하고 YFP를 트랜스퓩션시켰으나, OGD를 통한 추가적인 트라우마는 발생시키지 않았다. 상기 개략된 실험 공정 참조. 본 발명자들은 네리폴린을 포함하는 많은 신경보호 화합물이 이러한 뇌 슬라이스에서 완만한 수준의 신경보호를 제공할 수 있으며, 아마도 슬라이스 및 배양 자체의 공정에 의해 초래된 트라우마에 대한 보호에 의해 발생한 것으로 추정된다.

도 2A-2C에서 확인할 수 있는 바와 같이, 올레안드린은 네리폴린과 유사한 수준으로 이러한 "비-OGD" 뇌 슬라이스에 신경보호를 제공할 수 있는 것으로 보이며, 이는 강심성 배당체가 산소 또는 글루코오스 결핍의 부재하에서도 신경보호를 매개함을 암시한다.

[0174] **실시예 9**

[0175] 알츠하이머병에 있어서 실험관내 APP 분석에서 강심성 배당체의 평가

[0176] 피질 추상체 뉴론의 APP/Abeta-유도된 퇴행에 대한 래트 뇌 슬라이스 모델에서, 바이탈 마커 예컨대, YFP 뿐만 아니라 질환 유전자 구조체를 뇌 슬라이스의 동일한 뉴론 군집에 유입시키기 위해 바이오리스틱 트랜스펙션을 이용하였다. 이렇게 하여, APP/Aβ 뇌 슬라이스 모델을 YFP와 APP 이소폼으로 공동-트랜스펙션시켜, 뇌 슬라이스 제조 및 트랜스펙션 후 3-4일에 걸쳐 피질 추상체 뉴론의 진행적인 퇴행을 유도하였다. 도 3A-3C에서의 세 작업에서 확인할 수 있는 바와 같이, 올레안드린과 PBI-05204 모두는 APP-트랜스펙션된 뇌 슬라이스에 대한 용량-의존적인 신경 보호를 제공할 수 있는 것으로 보이며, BACE 억제제 약물에 의해 제공될 수 있는 수준에 근접한 수준으로 복구시켰다.

[0177] **실시예 10**

[0178] 헝틴턴병에 대한 실험관내 피질선조체 공생-배양 분석에서 강심성 배당체의 평가

[0179] 본 분석에서, 본래의 뇌 슬라이스를 이용하는 대신에, 변이체 htt를 96-웰 플레이트에 정렬된 피질 뉴론, 선조체 뉴론 및 신경교의 고밀도의 혼합된 공생-배양물로 일렉트로포레이션에 의해 유입시켰다. 본 분석의 목적은 생체내에서의 질환 관련 신경 군집과 대규모의 완전 자동화된 스크리닝 컴패인과의 상호연결성의 주요 양상을 반복하는 복잡한 일차 배양 시스템의 생물학적/임상적 관련성을 조합시키기 위한 것이다. 본 분석에 있어서, 실험관내에서의 1-2주 과정에 걸쳐, 트랜스펙션된 변이체 htt 작제물은 선조 및 피질 뉴론의 진행성 퇴화를 유도하며, 이는 후속적으로 셀로믹스 어레이스캔 VTI 플랫폼 (Cellomics Arrayscan VTI platform)상의 자동화된 이미지 습득 및 물체 검출 알고리즘을 이용하여 정량화된다. 각각의 데이타 포인트는 각 웰에서 16개 이미지로 6개 웰로부터 유도되며, 자동으로 캡처링되고 처리되고, 대규모 스크리닝 캠페인이 큐어 헌팅턴 디지즈 이니시에이티브 (Cure Huntington's Disease Initiative)와 관련되어 수행되는 동안 발생되는 프로토콜을 이용하여 셀로믹스 어레이스캔상에서 분석되었다. 총 수행시, 일부 25,000 이미지가 수집되었으며, 각각의 사이클은 주당 4 사이클씩 분석되었다.

[0180] 피질-선조 공생배양 분석 플랫폼

[0181] 순수한 신경아교세포 배양물을 제조한 후 신경세포 플레이팅하여 유착성 신경아교세포 베드를 갖는 96-웰 플레이트를 설치하였다. 피질 및 선조 조직을 별도로 분리하고, 적합한 DNA 작제물로 "뉴클레오펙션"시키고, 이는 상이한 형광 단백질 예컨대, YFP, CFP 및 mCherry의 발현에 의해 후에 구별가능해 진다. 이러한 별도로 트랜스펙션된 피질 및 선조 뉴론을 완전히 혼합한 후, 이전에 플레이팅된 신경아교세포 모노레이어를 함유하는 96-웰 플레이트에 플레이팅시켰다.

[0182] 올레안드린과 PBI-05204 (협죽도의 초임계 CO_2 추출물)를 이러한 선조-피질 공생배양 플랫폼에서 시험하고, 사전에 이들 화합물은 본 분석 시스템에서 평가되었던 >400 레이트-스테이지 (late-stage) 약물 분자중 지금까지 관찰된 가장 강한 히트를 나타낸다. 비교를 위해, KW6002 (아데노신 2a 수용체 안타고니스트) 즉, 본 발명자들이 이러한 공생-배양 분석에서 파지티브 대조군으로서 포함시킨 화합물에 대한 용량-반응 곡선이 포함된다 (도 4E 참조). 올레안드린에 대한 효율 (efficacy)은 KW6002과 동일한 반면, 이의 효능 (potency)은 100배는 더 큰 것으로 나타났다.

[0183] **실시예 11**

[0184] 뇌졸증 및 비-뇌졸증에 대한 실험관내 분석에서 본 발명의 강심성 배당체 및 추출물의 평가

[0185] 방법 A. 뇌졸증: 피질 뇌 슬라이스의 제조 및 OGD

[0186] 신경피질 뇌 슬라이스를 PND 7 스프라그-돌리 래트 펍으로부터 준비하였다. 뇌 피질을 절단하고, 400㎛-두께 슬라이스로 절단하고, 플레이팅 전에 1uM MK-801과 냉 인공 뇌척수액을 함유하는 컨테이너로 옮겼다; MK-801은 임의의 후속 과정에 포함시키지 않았다. 일시적 산소-글루코오스 결핍 (OGD)를 사용하여 허혈성 손상을 모방하기 위해, 각 뇌의 하나의 반구로부터의 슬라이스를 낮은 O_2 (0.5%) 환경에서 7.5분 동안 글루코오스 비함유 N_2-버블링된 인공 뇌척수액에 노출시켰다. 그 후, OGD 슬라이스를 니트로셀룰로오스 또는 밀리셀 (밀리포어) 투과

막상의 반대쪽 반구로부터의 대조군 슬라이스와 나란히 플레이팅시켰으며, 이러한 대조군 슬라이스는 OGD 처리를 하지 않을 것을 제외하고는 상기와 동일하게 제조한 것이다. 플레이팅하고 30분 후, 뇌 슬라이스 쌍을 트랜스펙션시키고, 24-웰 플레이트에 운반하고, 습화된 챔버에서 5% CO_2하에 37℃에서 인큐베이션하였다. 각 실험에서, 5-6분의 산소-글루코오스 결핍 (OGD)를 이용하여 24시간까지 건강한 피질 뉴론의 >50% 손실을 유도하였다. 지정된 농도 (3μM)의 네리폴린 (강심성 배당체)를 내부 파지티브 대조군으로서 사용하였다. 올레안드린 (강심성 배당체)에 있어서, 처음 두 실험에서 3 내지 3μM의 모든 세 농도가 신경보호를 제공하는 것으로 보이며, 따라서, 올레안드린의 시험 농도를 세 번째 수행시 낮췄으며, 이는 신경보호에 대한 경계 농도값이 0.1 내지 0.3μM임을 시사한다. 예를 들어, 네리움 종의 비분별화된 추출물 또는 이의 분별물이 올레안드린에 대해 기술된 것과 같이 이용될 수 있다.

[0187] 방법 B. 비뇌졸증: 뇌 슬라이스 분석

[0188] 올레안드린 및 PBI-05204 즉, 협죽도의 비분별화된 SCF 추출물을 "비뇌졸증" 뇌 슬라이스에 대해 시험하였으며; 즉, 이를 슬라이싱하고, YFP로 트랜스펙션시켰으나, OGD를 통한 추가적인 트라우마 처리는 하지 않았다. 상기 개략된 실험 과정을 참조하라. 본 발명자들은 네리폴린을 포함하는 많은 신경보호 화합물이 이러한 뇌 슬라이스에 대한 완만한 수준의 신경보호를 제공할 수 있음을 관찰하였으며, 이는 아마도 슬라이싱 및 배양 과정에 의해 초래된 트라우마에 대한 보호에 의해서인 것으로 보인다. 이러한 데이타는 이러한 "비-OGD" 뇌 슬라이스에 대해 신경보호를 제공할 수 있는 것으로 보인 올레안드린 및 추출물이 네리폴린과 유사한 수준으로 이러한 "비-OGD" 뇌 슬라이스에 신경보호를 제공할 수 있는 것으로 보이며, 이는 강심성 배당체가 산소 또는 글루코오스 고갈의 부재시에서도 신경보호를 매개함을 의미한다.

[0189] **실시예 12**

[0190] SCF 추출물의 HPLC 분석

[0191] 이러한 분석의 목적은 강심성 배당체를 함유하는 추출물을 확인하는 것이다. 각 추출물로부터의 샘플을 하기와 같이 분석하였다. 추출물 (1-3mg)을 1-5ml의 수성 메탄올 (물중의 80% 메탄올)에 용해시켰다. 희석된 샘플 (10-25㎕)를 이동상으로서 물중의 80% 메탄올, 0.7mL/분의 유속 및 하기 파장에서의 DAD-UV 유출을 이용하여 어질런트 조르박스 (Agilent Zorbax) SB-C18 칼럼으로 분석하였다: 203, 210, 217, 230, 254, 280, 310 및 300nm. 파지티브 확인은 비교 샘플에 대한 보유 시간 및 스펙트럼을 비교할 경우 크로마토그램상의 피크 형성을 통해 확인하였다.

[0192] **실시예 13**

[0193] 신경보호 판단을 위한 시간-지연 뇌-슬라이스 분석

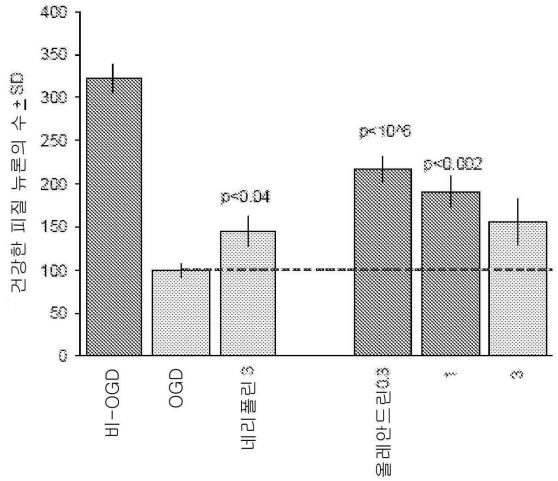
[0194] 본 분석은 실시예 11에 따라 수행하였으며, 단 하기와 같이 변형시켰다. OGD와 제시된 신경보호제의 유입 사이에 특정화된 시간 간격을 부여하였다. OGD의 타이밍에 대하여 처치가 지연되는 경우 뇌 슬라이스에 대한 신견보호를 제공할 수 있는 PBI-05204의 능력을 측정하였다. 데이타는, 협죽도 추출물은 2시간 지연에 대해 견디었으며, 이는 OGD 처리 직후 PBI-05204의 적용으로 수득된 것과 유사한 신경 보호 수준을 나타낸다. 신경보호 이점은 PBI-05204의 투여의 4 내지 6시간 지연으로 변형시켰으며, 신경 보호의 수준은 여전히 유의학적으로 그리고, 생리학적으로 상응하였다.

[0195] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "약"은 특정화된 값의 ±10%, ±5%, ±2.5% 또는 ±1%이다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "실질적으로"는 "큰 범위로" 또는 적어도 대부분의" 또는 "50% 초과의"를 의미한다.

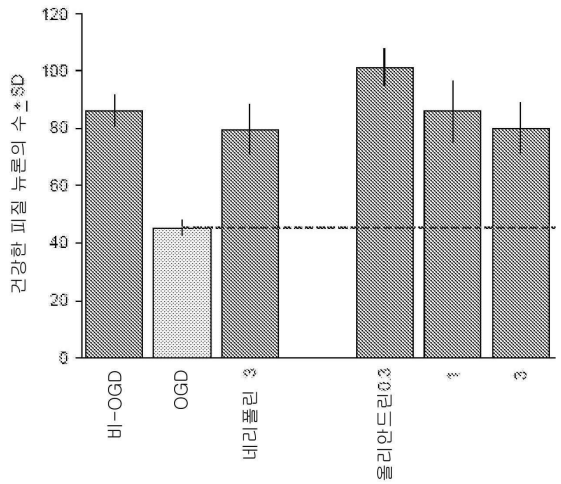
[0196] 상기는 본 발명의 특정 양태의 상세한 설명이다. 본 발명의 특정 양태를 예시 목적으로 기재하였지만 다양한 변경이 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않는 범위에서 이루어질 수 있음을 이해해야 한다. 따라서, 본 발명은 첨부되는 청구의 범위를 제외하고는 달리 제한되지 않는다. 본 명세서에 기술하고 청구한 양태는 모두 본 명세서에 비추어 보아 과도한 실험없이 이루어지고 실시될 수 있다.

도면

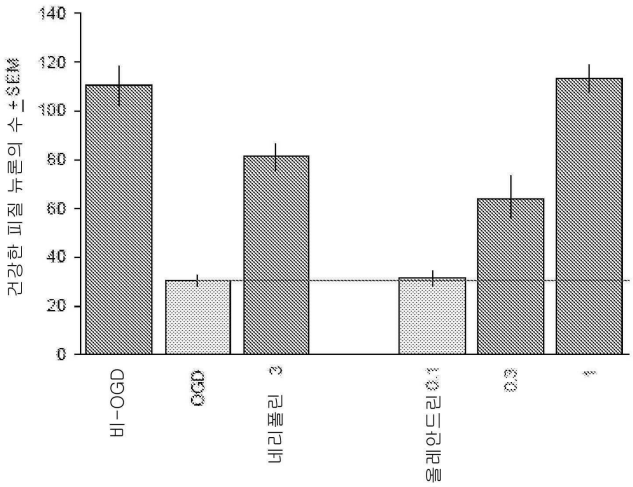
도면1a



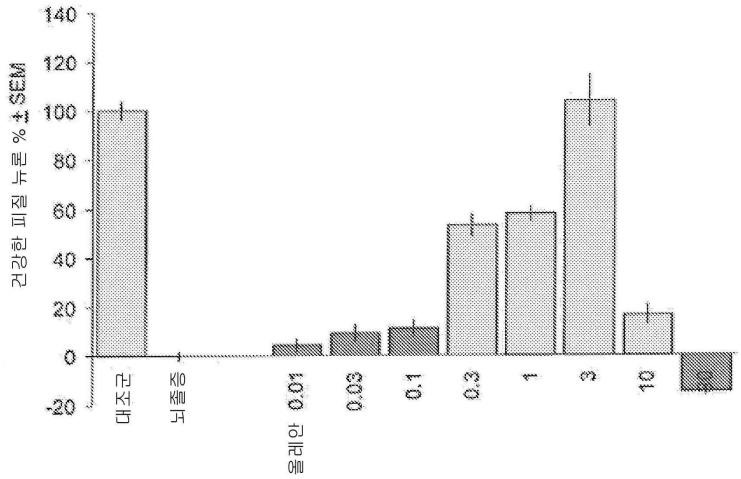
도면1b



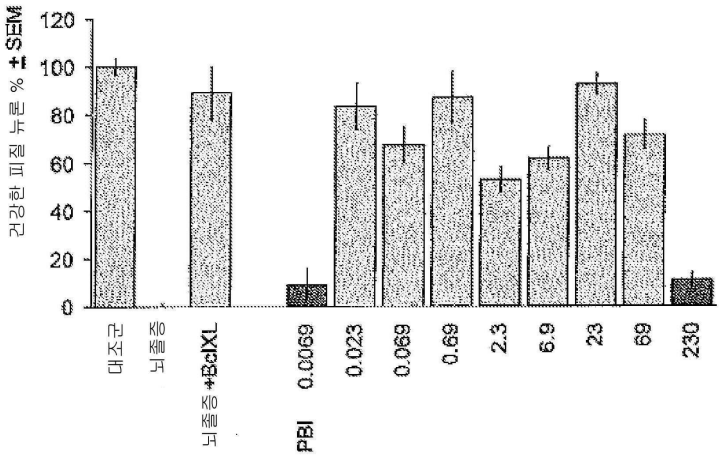
도면1c



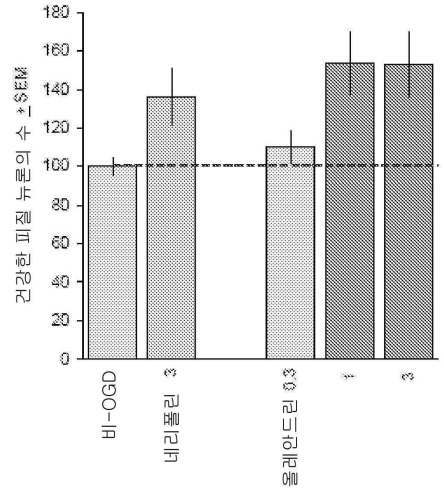
도면1d



도면1e

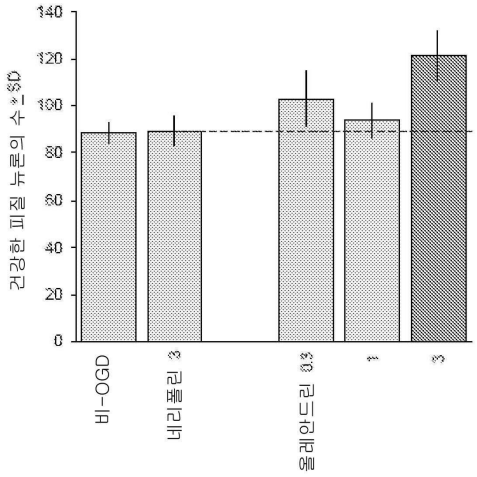


도면2a



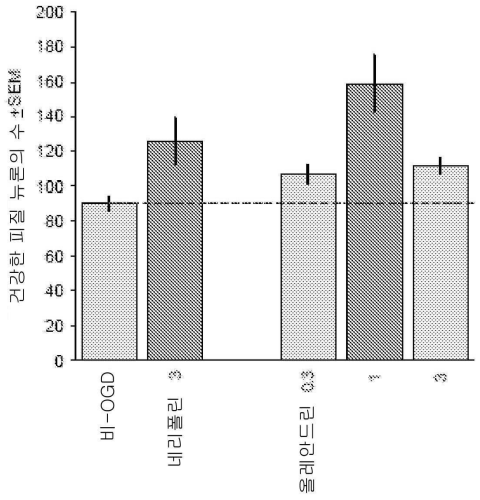
비-뇌졸증 : 올레안드린, 수행 1

도면2b



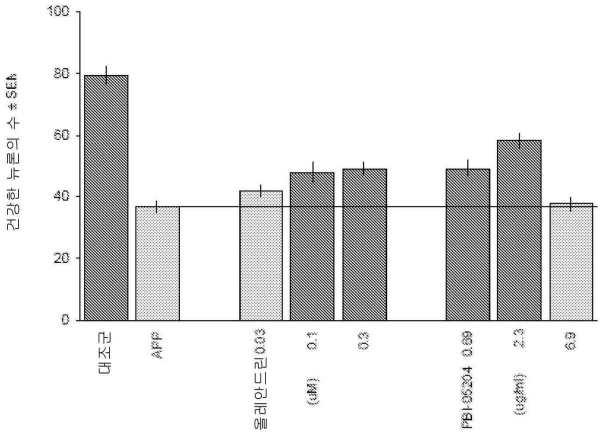
비-뇌졸증 : 올레안드린, 수행 2

도면2c

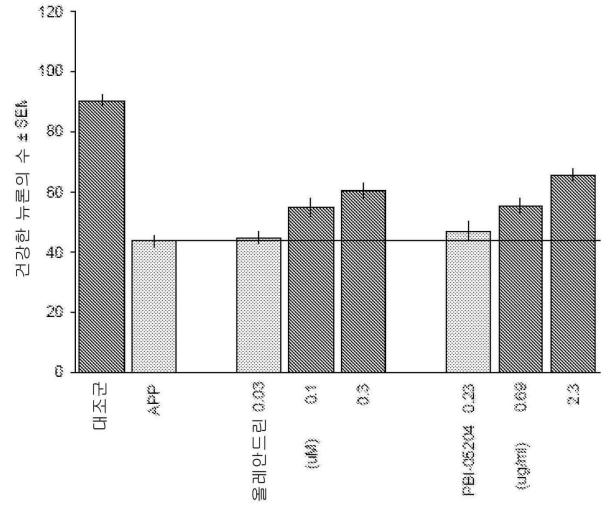


비-뇌졸증 : 올레안드린, 수행 3

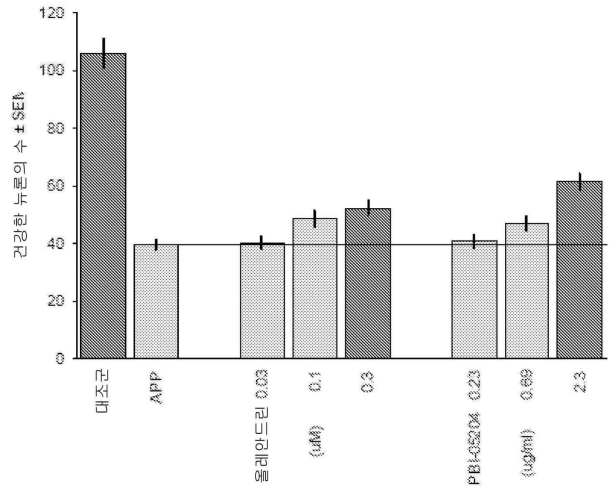
도면3a



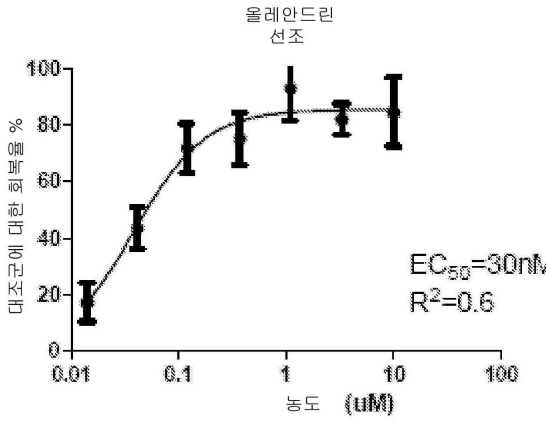
도면3b



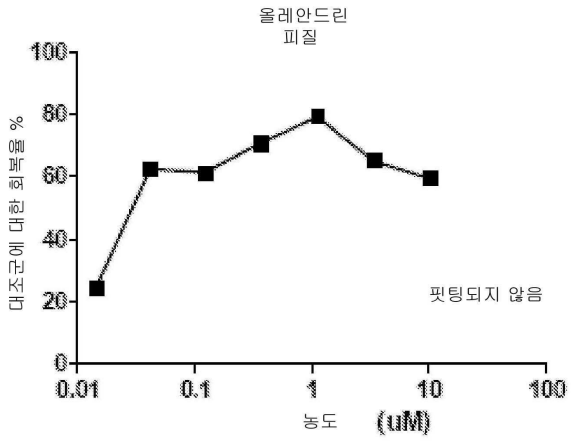
도면3c



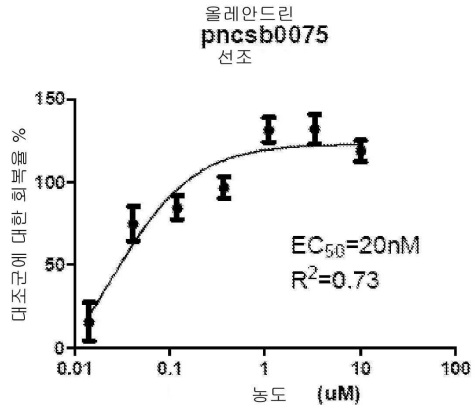
도면4a



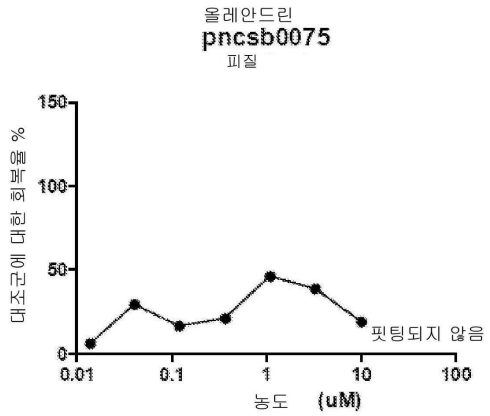
도면4b



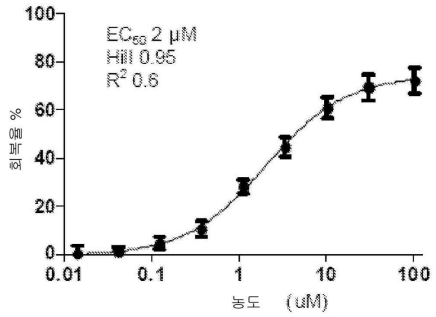
도면4c



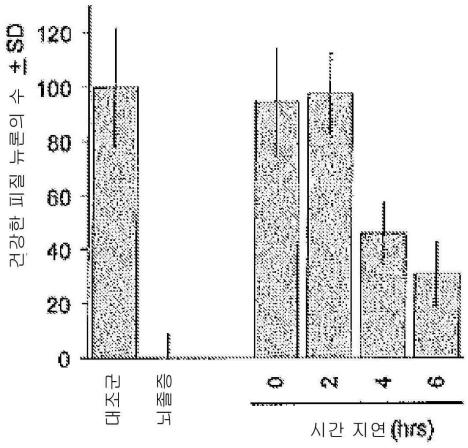
도면4d



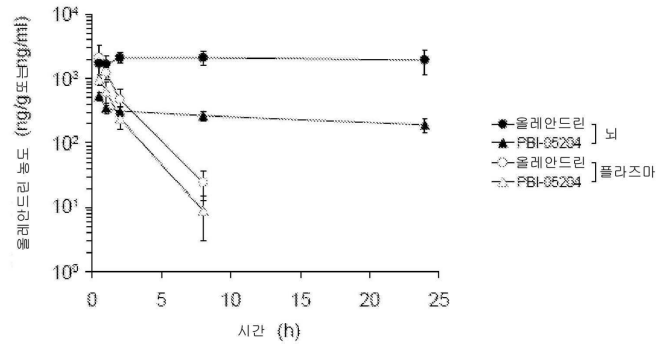
도면4e



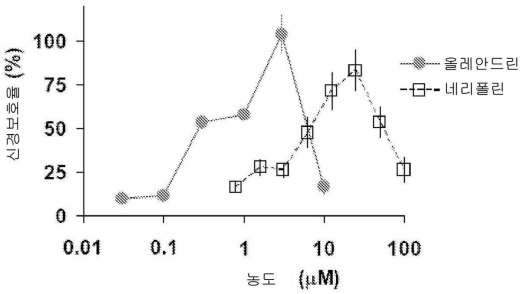
도면5



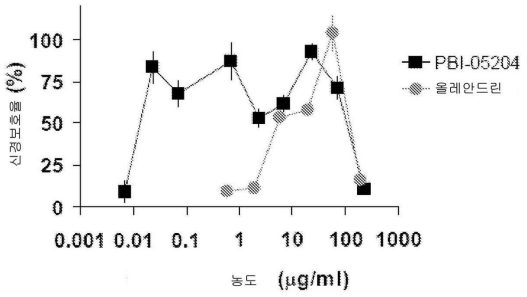
도면6



도면7a



도면7b



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 발명(고안)의 설명

【보정세부항목】 발명의 명칭

【변경전】

강심 배당체로 신경계 질환을 치료하는 방법 {METHOD OF TREATING NEUROLOGICAL CONDITIONS WITH CARDIAC GLYCOSIDES}

【변경후】

협죽도 추출물을 포함하는 신경질환 치료용 조성물 {COMPOSITION TREATING NEUROLOGICAL CONDITIONS COMPRISING NERIUM OLEANDER}