



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년01월11일
 (11) 등록번호 10-1937782
 (24) 등록일자 2019년01월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 31/197 (2006.01) A61K 31/13 (2006.01)
 A61K 31/185 (2017.01) A61K 31/27 (2006.01)
 A61K 31/445 (2006.01) A61K 31/55 (2006.01)
 A61K 45/06 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
 A61P 25/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
 A61K 31/197 (2013.01)
 A61K 31/13 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7010681(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2012년03월01일
 심사청구일자 2018년04월18일
- (85) 번역문제출일자 2018년04월16일
- (65) 공개번호 10-2018-0043844
- (43) 공개일자 2018년04월30일
- (62) 원출원 특허 10-2013-7026027
 원출원일자(국제) 2012년03월01일
 심사청구일자 2017년02월01일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2012/053570
- (87) 국제공개번호 WO 2012/117076
 국제공개일자 2012년09월07일
- (30) 우선권주장
 11305217.9 2011년03월01일
 유럽특허청(EPO)(EP)
 (뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
 KR1020110011628 A
 WO2009133128 A1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
 파넥스트
 프랑스공화국, 에프-92130 이씨 레 물리노, 뤼 데
 뻬쁠리에 11
- (72) 발명자
 코엔, 다니엘
 프랑스공화국, 에프-78110 르 베지넷, 아브뉴 데
 꾸르리스 61
 슈마코브, 일리아
 프랑스공화국, 에프-77000 보 르 빼닐, 뤼 드 라
 누 691
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 특허법인오리진

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 박제현

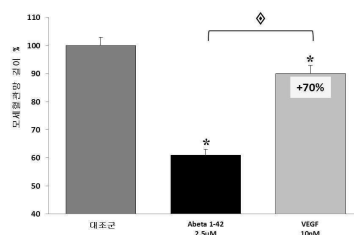
(54) 발명의 명칭 바클로펜 및 아캄프로세이트에 기초한 신경 장애의 치료

(57) 요약

본 발명은 글루타메이트 흥분독성 및 아밀로이드 β 독성과 연관되는 신경 장애를 치료하기 위한 조합 및 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 바클로펜 및 아캄프로세이트 조합에 기초하는, 다발성 경화증, 알츠하이머병, 알츠하이머병 관련 장애, 근위축성 측삭 경화증, 파킨슨병, 헌팅턴병, 신경병성 통증, 알콜성 신경병증, 알콜 중독

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



증 또는 알콜 금단증, 또는 척수 손상의 새로운 조합 치료에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/185 (2013.01)
A61K 31/27 (2013.01)
A61K 31/445 (2013.01)
A61K 31/55 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 9/0053 (2013.01)
A61P 25/00 (2018.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

나비로스킨, 세르게이

프랑스공화국, 에프-92290 샤프네 말라브리, 아브
 뉘 드 술리 푸루돔르 49

비알, 엠마누엘

프랑스공화국, 에프-75012 빠리, 불르바르 디데로,
 78

그디쥬, 미카엘

프랑스공화국, 에프-75011 빠리, 뤼 고드푸로와 까
 배그낙 42

(30) 우선권주장

61/468,658 2011년03월29일 미국(US)
 11305687.3 2011년06월06일
 유럽특허청(EPO)(EP)
 61/493,606 2011년06월06일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

바클로펜 및 아캄프로세이트, 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 대상체의 신경 장애를 치료하기 위한 조성물로,

상기 신경 장애가, 알츠하이머병; 알츠하이머병 형태의 노인성 치매; 루이스 신체 치매; 혈관성 치매; 경도 인지 장애; 노화-관련 기억 손상; 다발성 경화증; 근위축성 측삭 경화증; 헌팅턴병; 척수 손상; 알콜성 신경병증 및 신경병성 통증에서 선택되는 신경병증; 약물 남용;에서 선택되고,

상기 조성물이 하기 화합물의 조합 중 하나 이상을 포함하는 조성물:

바클로펜 및 아캄프로세이트 및 도네페질,

바클로펜 및 아캄프로세이트 및 리바스티그민,

바클로펜 및 아캄프로세이트 및 메만틴, 또는

이들의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 2

제1항에 있어서,

약학적으로 허용가능한 캐리어 또는 부형제를 더 포함하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물 중 화합물은 함께, 개별적으로 또는 연속적으로 제형화되거나 투여되는 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 대상체에게 반복적으로 투여되는 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

아캄프로세이트/바클로펜의 비(W:W)는 0.05 내지 1000인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

바클로펜의 투여량이 100 mg/day 이하인 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

아캄프로세이트의 투여량이 1000 mg/day 이하인 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

아캄프로세이트의 칼슘 염이 사용되는 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신경 질환 및 장애를 치료하기 위한 조합 및 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 바클로펜 및 아캄프로세이트 조합에 기초한, 새로운 신경 장애의 조합 치료에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 알츠하이머병(AD)은 피질 연합 부위와의 관련성에 기인할 수 있는, 실어증(언어능력과 언어능력 이해가 손상된 언어 장애), 통합운동장애(운동 신경계의 부재 또는 감각 신경계의 손상으로 인한 특정 목적의 동작 및 몸짓을 조화시키고 수행하는 것이 불가능함) 및 실인증(객체, 인간, 음향, 형태 또는 향기를 인지할 수 있는 능력)과 함께 기억력 감퇴를 특징으로 하는 원형성 피질 치매이다. 경련성 하반신 마비(하지에 영향을 미치는 쇠약증)와 같은 특이적 증상들이 또한 수반될 수 있다(1-4).

[0003] 알츠하이머병의 발생은 연령에 따라 급격하게 증가한다. AD는 현재 치매의 가장 흔한 원인이다. 이는 임상적으로, 서서히 진행하여 말기 환자가 침대에 속박되고 대소변을 못가리고 관찰 보호에 의존되도록 하는 인지 기능의 전체적인 쇠퇴 증상을 특징으로 한다. 평균적으로 진단 후 9년에 사망에 이른다(5).

[0004] AD 발병율은 연령에 따라 급증한다. 미국 통계청은 2050년까지 80세 이상의 노인수가 3억 7천만명에 달할 것으로 예상하였다. 현재, 85세 이상 인구의 50%가 AD가 발병한 것으로 추정된다. 따라서, 1억명 이상의 전세계인구가 50년 내에 치매로 고통받을 것이다. 지속적인 보호 및 기타 서비스가 요구되는 다수의 환자들이 의료적, 경제적 및 인간적 문제로 심각하게 고통받을 것이다(6).

[0005] 기억력 장애는 상기 질병의 초기 특징이며 에피소드 기억(그날그날 사건에 대한 기억)을 수반한다. 의미 기억(어휘적 및 시각적 의미에 대한 기억)은 상기 질병의 후기에 수반된다. 반대로, 작업 기억(일시적 저장 및 구사력 정보에 사용되는 구조 및 공정에 관련되는 단기 기억) 및 절차기억(숙련 및 절차의 장기 기억인 무의식적 기억)은 후기까지 보존된다. 질병이 진행됨에 따라, 언어 장애, 시각적 지각 및 공간적 결핍증, 실인증 및 실행증의 추가적인 증상이 발현된다.

[0006] 알츠하이머병의 전통적인 특성은 발병 케이스의 약 80%에서 동정이 가능할 정도로 충분히 특징적이다(7). 그럼에도 불구하고, 임상적 이질성이 발생하고, 이는 임상적 관리에 중요할 뿐만 아니라 기능적으로 다른 형태에 대한 특이적인 의학적 치료의 추가적인 관련성을 제공한다(8).

[0007] AD의 병리적 특징은 베타-아밀로이드(beta-amyloid: Abeta)를 포함하는 아밀로이드 플라크, 타우(Tau)를 포함하는 신경섬유매듭증(neurofibrillary tangles: NFT) 및 신경성 및 시냅스성 기능이상 및 손실증을 포함한다(9-11). 지난 십년 동안, AD의 원인에 대한 2가지 주요 가설이 제시되었다: "아밀로이드 캐스케이드 가설"로서, 이는 신경퇴행성 과정이 아밀로이드 전구체 단백질(APP)의 비정상적 과정에 의하여 촉발되는 일련의 이벤트라고 설명한 가설임(12), 및 "신경성 세포골격 퇴행 가설"(13)로서, 이는 세포골격성 변화가 이벤트를 촉발시킨다고 제시한 가설임. AD 진행을 설명하는 가장 널리 수용된 이론은 상기 아밀로이드 캐스케이드 가설이며(14-16), AD 연구자들은 주로 Abeta 단백질과 연관되는 독성에 대한 메커니즘을 측정하는데 중점을 두고 있다. 미세혈관 투과 및 리모델링, 혈관형성 이상 및 혈액 뇌 관문 과열은 아밀로이드 캐스케이드에서 APP 독성에 기여하는 중요한 이벤트로서 확인되었다(17). 반대로, 타우 단백질은 기본적으로 실제적인 관심도 때문에 아밀로이드보다는 약학 산업계로부터 상대적으로 낮은 관심을 받았다. 게다가, 시냅스성 밀도 변화는 2개의 다른 것들보다 인지 손상과 가장 밀접한 관련성을 갖는 병소이다. 연구결과, 아밀로이드 병리는 콜린신 말단부(cholinergic terminal)가 가장 침습당하기 쉬우며, 다음으로 글루타메이트성 말단부, 최종적으로 GABA성 말단부(GABAergic terminal)가 침습되는, 신경전달물질-특이적 양상으로 진행되는 것으로 밝혀졌다(11). 글루타메이트는 포유류

신경계에서 가장 풍부한 흥분성 신경전달물질이다. 병리 조건하에서, 이의 시냅스 간극 내 비정상적인 축적은 글루타메이트 수용체 과활성화를 야기한다(18). 시냅스 간극 내 글루타메이트의 비정상적인 축적은, 병리 과정을 야기하고 최종적으로 신경 세포 사멸을 야기하는 글루타메이트 수용체의 과활성화를 초래한다. 흥분독성이라고 불리는 이러한 과정은 급성 및 만성 신경 장애 동안 신경 조직에서 흔히 관찰된다.

[0008] 다양한 원인의 다발성 장애의 발병, 예컨대 척수 손상, 뇌졸중, 외상성 뇌손상, 청력 손실, 알콜 중독증 및 알콜 금단증, 알콜성 신경병증 또는 신경병성 통증, 뿐만 아니라 신경퇴행성 질환, 예컨대 다발성 경화증, 알츠하이머병, 근위축성 측삭 경화증, 파킨슨병 및 헌팅턴병에 관여한다는 점이 분명해졌다(19-21). 이러한 질환들에 대한 효과적인 치료의 개발은 질환의 발생 뿐만 아니라 치료요법의 부재에 기인하여 주된 공중위생 문제로 남아 있다.

[0009] 두 종류의 약제가 AD의 증상을 개선시키거나 지연시키기 위해 사용되며, 이는 NMDA 글루타메이트 수용체의 일부 아세틸콜린에스테라제 조절제 및 차단제를 제공한다(26-27).

[0010] 상기 수용체의 다양한 부위들을 표적으로 하는 NMDAR 안타고니스트는 흥분독성을 중화시키기 위해 테스트되었다. 비경쟁적 NMDAR 안타고니스트는 이온채널 구멍을 표적으로 하며, 이에 따라 시냅스후 뉴런으로 칼슘이 진입하는 것을 감소시킨다. 이들 중 일부는 승인 상태에 이르렀다. 일례로서, 메만틴은 심각한 알츠하이머병을 완화시키기 위해 현재 승인된 상태이다. 이는 알콜 의존증(제II기), 근위축성 측삭 경화증(제III기), 파킨슨에 수반되는 치매(제II기), 간질, 헌팅턴병(제IV기), 다발성 경화증(제IV기), 파킨슨병(제IV기) 및 외상성 뇌손상(제IV기)과 같은 흥분독성의 성분을 포함하는 다른 지표들에서 임상적으로 테스트된다. 그러나, 상기 분자는 가장 보통의 증후성 효과만을 단지 갖기 때문에, 대부분의 알츠하이머병 환자들에게 제한된 효능을 갖는다. 흥분독성을 제한함에 있어서 다른 접근법은 글루타메이트의 시냅스전 방출을 억제하는 것으로 이루어진다. 근위축성 측삭 경화증에서 현재 승인된 릴루졸은 허혈 및 외상성 뇌손상 모델에서 고무적인 결과를 나타내었다(22-25). 현재, 이는 초기 다발성 경화증, 파킨슨병(이는 플라시보에 비해 어떠한 더 나은 결과도 보이지 않음) 뿐만 아니라 척수 손상에 있어서 제II기 시험에서 테스트된다. 상기 약물은 1995년에는 근위축성 측삭 경화증의 치료에 대해, 1996년에는 헌팅턴병의 치료에 대해 희귀의약품 상태에 이르렀다. 또한, 우울증을 치료하기 위한 메만틴, 펠바메이트, 아캄프로세이트 및 MRZ 2/579와 같은 NMDA 수용체 안타고니스트의 사용에 대해 US2010076075에서 제시되었다.

[0011] W02009133128, W02009133141, W02009133142 및 W02011054759에는 AD의 치료에 사용하기 위한 약물 조합에 대해 개시되어 있다.

[0012] 당해 분야에서 활발한 연구에도 불구하고, 신경 장애, 특히 글루타메이트 및/또는 아밀로이드 베타 독성과 연관되는 신경 장애를 위한 대체 요법 또는 효능이 개선된 요법이 여전히 요구된다. 본 발명은 중추신경계(CNS) 및 말초신경계(PNS)의 상기 신경 질환들에 대한 새로운 치료법을 제공한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 신경 장애를 치료하기 위한 새로운 치료방법 및 조성물을 제공하는 것이다. 특히, 본 발명은 바클로펜 및 아캄프로세이트의 조합에 기초한, 글루타메이트 및/또는 아밀로이드 베타 독성과 연관되는 신경 장애를 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

[0014] 본 발명은 그 중에서도, 바클로펜 및 아캄프로세이트의 조합이 알츠하이머병을 앓는 환자에게 실질적이고 예측하지 못한 이점을 제공한다는 본 발명자들의 예측하지 못한 발견으로부터 유래된다. 또한, 본 발명자들은 놀랍게도 상기 조합에 의해 글루타메이트 독성을 포함하는 신경 장애에서 마주치는 다양한 손상들에 대해 신경 세포의 실질적이고도 예측하지 못한 보호가 제공된다는 점을 발견하였다. 따라서, 이러한 바클로펜 및 아캄프로세이트의 조합은 신경 장애를 앓거나, 신경 장애의 성향이 있거나, 또는 신경 장애를 앓는 것으로 의심되는 환자에 대해 효과적인 치료법을 구성한다.

[0015] 따라서, 본 발명의 목적은 신경 장애, 특히 AD 및 관련 장애, 다발성 경화증(MS), 근위축성 측삭 경화증(ALS), 파킨슨병(PD), 신경병증(예를 들어, 신경병성 통증 또는 알콜성 신경병증), 알콜 중독증 또는 알콜 금단증, 헌팅턴병(HD) 및 척수 손상을 치료하기 위한, 조합 바클로펜 및 아캄프로세이트를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

- [0016] 본 발명의 조성물은 유일한 활성성분으로서 바클로펜 및 아캄프로세이트를 함유할 수 있다. 선택적으로, 조성물은 추가 활성성분(들)을 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 추가 목적은 바클로펜, 아캄프로세이트, 및 솔피속사졸, 메티마졸, 프틸로카인, 디필린, 퀴나크린, 카르베녹솔론, 아미노카프로산, 카베르골린, 디에틸카바마진, 시나칼세트, 신나리진, 에플레레논, 페놀도팜, 레플루노미드, 레보시멘단, 솔로텍시드, 테르비나핀, 조니사미드, 에토미데이트, 펜포르민, 트리메타지딘, 맥실레틴, 이펜프로딜, 목시플록사신, 브로모크립틴 또는 토라세미드 중에서 선택되는 하나 이상의 제3화합물의 조합을 포함하는, 대상체의 신경 장애의 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0017] 본원에서 추가로 후술되는 바와 같이, 본 발명의 조합 치료에서 화합물은 대상체에게 동시적으로, 개별적으로, 연속적으로 및/또는 반복적으로 투여될 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 전술한 둘 이상의 화합물의 조합을 포함하는 임의의 약학 조성물 그 자체에 관한 것이다.
- [0019] 본 발명의 조성물은 통상적으로 하나 또는 수개의 약학적으로 허용가능한 부형제 또는 캐리어를 더 포함한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 화합물은 염, 수화물, 에스테르, 에테르, 산, 아미드, 라세미체 또는 이성질체의 형태일 수 있다. 이는 또한 서방성 제형의 형태일 수 있다. 화합물의 프로드럭 또는 유도체가 또한 사용될 수 있다.
- [0020] 바람직한 구현예에서, 화합물은 그 자체로 사용되거나, 또는 이의 염, 수화물, 에스테르, 에테르 또는 서방성 형태로 사용된다. 본 발명에서 사용하는데 특히 바람직한 염은 아캄프로세이트 칼슘이다.
- [0021] 또다른 바람직한 구현예에서, 프로드럭 또는 유도체가 사용된다.
- [0022] 본 발명의 추가 목적은 약학적으로 허용가능한 부형제 또는 캐리어 중에 바클로펜 및 아캄프로세이트를 혼합하는 단계를 포함하는 약학 조성물의 제조방법이다.
- [0023] 본 발명의 또다른 추가 목적은 포유류 대상체, 바람직하게는 인간 대상체에서 신경 장애를 치료하기 위한 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 유효량의 본 발명의 조합을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0024] 본 발명의 추가 목적은 포유류 대상체, 바람직하게는 인간 대상체에서 알츠하이머 또는 관련 장애를 치료하기 위한 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 유효량의 본 발명의 조합을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0025] 본 발명의 바람직한 목적은 포유류 대상체, 바람직하게는 인간 대상체에서 신경 장애를 치료하기 위한 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 유효량의 바클로펜 및 아캄프로세이트를 상기 대상체에게 동시적, 개별적 또는 연속적으로 투여하는 단계를 포함한다.
- [0026] 본 발명의 더 바람직한 목적은 포유류 대상체, 바람직하게는 인간 대상체에서 알츠하이머 또는 관련 장애를 치료하기 위한 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 유효량의 바클로펜 및 아캄프로세이트를 상기 대상체에게 동시적, 개별적 또는 연속적으로 투여하는 단계를 포함한다.
- [0027] 본 발명은 임의의 포유류 대상체에서, 바람직하게는 임의의 인간 대상체에서 신경 장애를 치료하기 위해 사용될 수 있으며, 임의의 질병 단계에서 사용될 수 있다. 실시예에서 개시되는 바와 같이, 본 발명의 조성물은 상기 대상체의 병리학적 상태를 완화시킬 수 있다.

과제의 해결 수단

- [0028] 본 발명은 신경 장애를 치료하기 위한 새로운 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명은 상기 질환들을 효과적으로 보정할 수 있고 임의의 포유류 대상체에 대해 사용될 수 있는 새로운 약물 조합을 개시한다.
- [0029] 본 발명은 중추인지 말초인지 여부와 무관하게 임의의 신경 장애, 특히 신경 또는 뉴런의 손상, β 아밀로이드, BBB 파괴 또는 글루타메이트 흥분독성이 관여하는 장애를 치료하는데 적합하다. 상기 장애의 특정 예에는 신경 퇴행성 질환, 신경퇴행성 질환, 신경병증, 척수 손상, 및 약물 남용, 예컨대 알콜 중독증이 포함된다.
- [0030] 신경퇴행성 장애는, 뉴런의 사멸 및 기능의 점진적 손상을 포함하여, 알츠하이머 및 관련 장애, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 다발성 경화증(MS), 파킨슨병(PD), 헌팅턴병(HD)과 같은 질환들을 나타낸다.
- [0031] 신경병증은 말초신경계의 신경이 손상된 상태를 나타내며, 여기에는 유전적 요인, 염증성 질환, 또는 약물(빈크리스틴, 옥살리플라틴, 에틸 알콜)을 포함한 화학물질에 의해 유발된 말초신경계의 손상이 포함된다. 신경병증

의 치료에는 또한 신경병성 통증의 치료가 포함된다.

- [0032] 본 발명은 특히 AD 및 관련 장애의 치료에 적합하다. 본 발명에서, "관련 장애"는 AD 형태의 노인성 치매(SDAT), 루이(Lewi) 신체 치매, 혈관성 치매, 경도 인지 장애(MCI) 및 노화관련 기억 손상(AAMI)을 포함한다.
- [0033] 본원에서, "치료"는 상기 질환 또는 장애에 의해 유발되거나 그 원인이 되는 증상들의 치료, 예방, 방지, 지연 또는 감소를 포함한다. 치료라는 용어에는 특히 질환 진행 및 관련 증상의 조절이 포함된다. 치료라는 용어에는 특히 치료된 대상체에서 i) 아밀로이드 베타에 의해 야기되는 독성에 대한 보호, 또는 상기 독성의 감소 또는 지연, 및/또는 ii) 글루타메이트 흥분독성에 대한 보호, 또는 상기 독성의 감소 또는 지연이 포함된다. 또한, 치료라는 용어는 인지 증상의 개선 또는 신경 세포의 보호를 나타낸다.
- [0034] 본 발명에서, 특정 약물 또는 화합물의 표현은 특정적으로 명명된 분자를 포함할 뿐만 아니라, 이의 임의의 약학적으로 허용가능한 염, 수화물, 유도체, 이성질체, 라세미체, 컨주게이트, 프로드럭 또는 유도체를 임의의 화학적 순도로 포함하는 것으로 여겨진다.
- [0035] "조합" 또는 "조합 치료/요법"은 생물학적 효과를 유발하기 위해 적어도 바클로펜 및 아캄프로세이트가 대상체에게 공-투여되는 치료를 나타낸다. 본 발명에 따른 조합 요법에서, 둘 이상의 약물이 함께 또는 개별적으로, 동시에 또는 연속적으로 투여될 수 있다. 또한, 적어도 바클로펜 및 아캄프로세이트는 다른 경로 및 프로토콜을 통해 투여될 수도 있다. 그 결과, 이들이 함께 제형화될 수 있더라도, 조합의 약물은 개별적으로 제형화될 수도 있다.
- [0036] 본원에서 "프로드럭"은 본 발명의 화합물의 임의의 기능적 유도체(또는 전구체)를 나타내며, 이는 생물학적 시스템에 투여될 때 예컨대 자발적 화학반응(들), 효소 촉매 화학반응(들), 및/또는 물질대사 화학반응(들)의 결과로서 상기 화합물을 생산한다. 일반적으로, 프로드럭은 생성되는 약물보다 활성이 더 작거나 비활성이며, 이는 예를 들어 약물의 물리화학적 성질을 개선하기 위해, 특이적 조직에 대해 약물을 표적화시키기 위해, 약물의 약동학적 및 약역학적 성질을 개선하기 위해, 및/또는 원하지 않는 부작용을 감소시키기 위해 이용될 수 있다. 프로드럭 설계에 이용되는 흔한 관능기들 중에는 카복실기, 히드록실기, 아민기, 포스페이트/포스포네이트기 및 카보닐기가 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 이러한 관능기의 개질을 통해 제조되는 전형적인 프로드럭에는 에스테르, 카보네이트, 카바메이트, 아마이드 및 포스페이트가 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 적합한 프로드럭을 선택하기 위한 특정 기술적 가이드는 일반적으로 흔한 기술적 상식이다(29-33). 또한, 프로드럭의 제조는 당업자에게 알려진 통상의 방법에 의해 수행될 수 있다. 다른 프로드럭들을 합성하는데 사용될 수 있는 방법들은 다수의 문헌들에 개시되어 있다(30; 34-40). 예를 들어, 아르바클로펜 플라카르빌은 ChemID plus Advance database(웹사이트: chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/)에 개시되어 있으며, 아르바클로펜 플라카르빌은 바클로펜의 잘 알려진 프로드럭이다(41-42).
- [0037] 화합물의 "유도체"라는 용어에는 상기 화합물에 기능적으로 및/또는 구조적으로 연관되는 임의의 분자, 예컨대 상기 화합물의 산, 아마이드, 에스테르, 에테르, 아세틸화 변이체, 히드록실화 변이체, 또는 알킬화(C1-C6) 변이체가 포함된다. 유도체라는 용어에는 또한 전술한 치환체가 하나 이상 상실된 구조적 연관 화합물이 포함된다. 예를 들어, 호모타우린은 아캄프로세이트의 탈아세틸화된 유도체이다. 화합물의 바람직한 유도체는 공지된 방법들에 의해 측정될 때 상기 화합물에 대해 실질적인 유사도를 갖는 분자이다. 모 분자에 대한 유사 지수에 따라, 유사한 화합물들이 PubChem(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>) 또는 약물 Bank(<http://www.drugbank.ca/>)와 같은 다수의 데이터베이스에서 확인될 수 있다. 더 바람직한 구현예에서, 유도체는 모 약물에 대해 Tanimoto 유사 지수가 0.4 초과, 바람직하게는 0.5 초과, 더욱 바람직하게는 0.6 초과, 더욱더 바람직하게는 0.7 초과이어야 한다. Tanimoto 유사 지수는 2개의 분자 사이에 구조적 유사 정도를 측정하기 위해 널리 사용된다. Tanimoto 유사 지수는 온라인(<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/SMSD/>)에서 이용가능한 Small Molecule Subgraph Detector(43-44)와 같은 소프트웨어에 의해 산출될 수 있다. 바람직한 유도체는 모 화합물에 대해 구조적으로 관련되는 동시에 기능적으로도 관련되어야 하며, 이는 즉 모 약물의 활성 부분을 적어도 보유하여야 하며, 더욱 바람직하게는 A β 또는 글루타메이트 독성에 대한 보호 활성을 가져야 한다.
- [0038] 유도체라는 용어에는 또한 약물의 대사물질이 포함되는데, 예컨대 유기체에 투여된 후에 일반적으로 특이적인 효소계를 통해 상기 약물의 (생화학적) 변형(들) 또는 가공으로부터 생성되고 약물의 생물학적 활성을 나타내거나 보유하는 분자가 포함된다. 대사물질은 모 약물의 치료 작용의 많은 부분에 대해 원인이 되는 것으로서 알려져 왔다. 특정 구현예에서, "대사물질"은 모 약물의 활성 부분을 적어도 보유하는, 바람직하게는 A β 독성 또는 글루타메이트 독성에 대한 보호 활성을 갖는, 개질되거나 가공된 약물을 나타낸다.

- [0039] "염"은 본 발명에 따른 화합물의 약학적으로 허용가능하고 상대적으로 비독성인 무기산 또는 유기산 부가 염을 나타낸다. 약학적 염 형성은 산성, 염기성 또는 썩비터이온성 약물 분자를 반대이온과 결합시켜 약물의 염 형태를 생성하는 것으로 이루어진다. 매우 다양한 화학종들이 중화 반응에 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 약학적으로 허용가능한 염에는, 염을 형성시키기 위한 무기산 또는 유기산을 염기로서 기능하는 주 화합물과 반응시켜 획득된 것들이 포함되며, 예를 들어 아세트산염, 질산염, 타르타르산염, 염산염, 황산염, 인산염, 메탄설폰산염, 캄페실폰산염, 옥살산염, 말레산염, 숙신산염 또는 시트르산염이 포함된다. 또한, 본 발명의 약학적으로 허용가능한 염에는, 주 화합물이 산으로서 기능하고 적절한 염기와 반응하여 예컨대 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 암모늄 또는 콜린 염을 형성하는 것들도 포함된다. 특정 유효성분의 염들 대부분이 생물등가일지라도, 일부는 다른 것들에 비해 가용성 또는 생물학적 이용가능성이 더 높을 수 있다. 염의 선택은 H. Stahl 및 C.G. Wermuth의 안내서에서 교시된 바와 같이 약물 개발 과정에 있어서 이제는 흔한 표준 작업이다(45).
- [0040] 바람직한 구현예에서, 화합물의 표현은 화합물 그 자체 뿐만 아니라 이의 임의의 약학적으로 허용가능한 염, 수화물, 이성질체, 라세미체, 에스테르 또는 에테르를 표현하는 것으로 여겨진다.
- [0041] 더 바람직한 구현예에서, 화합물의 표현은 그 자체로서 특정적으로 표현된 화합물 뿐만 아니라 이의 임의의 약학적으로 허용가능한 염을 표현하는 것으로 여겨진다.
- [0042] 특정 구현예에서, 화합물의 서방성 제형이 사용된다.
- [0043] 전술된 바와 같이, 본 발명은 신경 장애에 수반되는 여러 생물학적 과정들에 대해 예측하지 못한 강한 효과를 나타내는 특정 약물 조합에 관한 것이다. 따라서, 이들 약물 조합은 신경 장애, 예컨대 알츠하이머병 및 관련 장애, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 파킨슨병, 헌팅턴병, 신경병증(예를 들어, 신경병성 통증 또는 알콜성 신경병증), 알콜 중독증 또는 알콜 금단증, 및 척수 손상을 치료하기 위한 새로운 접근법을 나타낸다. 보다 구체적으로, 본 발명은 아캄프로세이트와 조합된 바클로펜을 포함하는 조성물을 개시하며, 이는 신경 장애에 대해 생체내에서 유의적인 효과를 제공한다.
- [0044] 실제로, 본 발명은 실험 파트에서 바클로펜 및 아캄프로세이트를 포함하는 조합 치료가 신경 장애를 앓는 환자의 상태를 실질적으로 개선시킬 수 있다는 점을 보여준다. 특히, 본 발명자들은 바클로펜 및 아캄프로세이트 조합이 베타-아밀로이드 중독된 신경 세포에서 모세혈관벽의 길이 또는 LDH 방출에 대해 예측하지 못한 강한 효과를 나타내고, 이는 AD의 새로운 치료 접근법이 된다는 점을 놀랍게도 발견하였다. 또한, 실시예는 본 발명의 조합 치료에서, 바클로펜이 80 nM 또는 그 미만의 투여량에서 효과적일 수 있다는 점, 및 아캄프로세이트가 1 nM 또는 그 미만의 투여량에서 효과적일 수 있다는 점을 보여준다. 이러한 결과는 매우 낮은 투여량에서도 임의의 가능한 부작용들이 회피된다는 점에서 놀랍고 특히 유리하다.
- [0045] 또한, 이들 조합은 다양한 피해, 예컨대 글루타메이트 독성, 산화적 스트레스로부터 신경 세포를 효과적으로 보호하고, 여러 신경 장애에 수반되는 BBB 투과성화 또는 신경 세포 유도된 세포자멸을 방지한다.
- [0046] 따라서, 본 발명은 바클로펜 및 아캄프로세이트 조성물에 기초한 신경 장애의 새로운 치료법을 제안한다. 특히, 본 발명은 바클로펜 및 아캄프로세이트 조합에 기초하여, 알츠하이머병 및 관련 장애, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 파킨슨병, 헌팅턴병, 신경병증(예를 들어, 신경병성 통증 또는 알콜성 신경병증), 알콜 중독증 또는 알콜 금단증, 및 척수 손상의 새로운 치료법을 제안한다.
- [0047] 이와 관련하여, 특정 구현예에서, 본 발명은 바클로펜 및 아캄프로세이트를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0048] 추가 구현예에서, 본 발명은 AD, AD 관련 장애, MS, PD, ALS, HD, 신경병증(예를 들어, 신경병성 통증 또는 알콜성 신경병증), 알콜 중독증 또는 알콜 금단증, 또는 척수 손상을 치료하기 위한, 바클로펜 및 아캄프로세이트를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0049] 추가 구현예에서, 본 발명은 AD, AD 관련 장애, MS, PD, ALS, HD, 신경병증(예를 들어, 신경병성 통증 또는 알콜성 신경병증), 알콜 중독증 또는 알콜 금단증, 또는 척수 손상의 치료용 약제를 제조하기 위한, 바클로펜 및 아캄프로세이트의 용도에 관한 것이다.
- [0050] 바클로펜 및 아캄프로세이트에 대한 예시적인 CAS 번호가 하기 표 1에 기재된다. 또한, 표 1에는 본 발명의 조성물에서 사용되는 상기 화합물들에 대해 통상적인 염, 라세미체, 프로드럭, 대사물질 또는 유도체가 비제한적인 방식으로 기재된다.

표 1

[0051]

약물	CAS 번호	분류(Class) 또는 Tanimoto 유사 지수
아캄프로세이트 및 관련 화합물들		
아캄프로세이트	77337-76-9; 77337-73-6	NA
호모타우린	3687-18-1	0.73
에틸 디메틸 암모니오 프로판 설포네이트	/	0.77
타우린	107-35-7	0.5
바클로펜 및 관련 화합물들		
바클로펜	1134-47-0; 66514-99-6; 69308-37-8; 70206-22-3; 63701-56-4; 63701-55-3	NA
3-(p-클로로페닐)-4-히드록시부티르산	/	대사물질
아르바클로펜 플라카르빌	847353-30-4	프로드럭

[0052]

바클로펜의 프로드럭의 특징예들은 [Hanafi et al, 2011](41)에 개시되어 있으며, 특히 바클로펜 에스테르 및 바클로펜 에스테르 카바메이트는 CNS 표적화에 대해 관심대상이다. 따라서, 상기 프로드럭은 본 발명의 조성물에 대해 특히 적합하다. 전술한 바와 같이 바클로펜 플라카르빌은 또한 잘 알려진 프로드럭이며, 이는 본 발명의 조성물에서 바클로펜 대신에 사용될 수 있다. 바클로펜의 다른 프로드럭들은 특허출원 W02010102071, US2009197958, W02009096985, W02009061934, W02008086492, US2009216037, W02005066122, US2011021571, W02003077902, W02010120370에서 확인할 수 있다.

[0053]

아캄프로세이트에 대해 유용한 프로드럭, 예컨대 판토산 에스테르 네오펜틸 설포닐 에스테르, 네오펜틸 설포닐 에스테르 프로드럭 또는 아캄프로세이트의 차폐된 카복실레이트 네오펜틸 설포닐 에스테르 프로드럭이 특히 W02009033069, W02009033061, W02009033054 W02009052191, W02009033079, US 2009/0099253, US 2009/0069419, US 2009/0082464, US 2009/0082440 및 US 2009/0076147에 개시되어 있다.

[0054]

바클로펜 및 아캄프로세이트는 단독으로 사용될 수 있으며, 또는 부가 화합물과 추가로 조합될 수도 있다. 이와 관련하여, 특정 구현예에서, 본 발명의 조성물은 숄피속사졸, 메티마졸, 프릴로카인, 디필린, 퀴나크린, 카르베녹솔론, 아미노카프로산, 카베르골린, 디에틸카바마진, 시나칼세트, 신나리진, 에플레레논, 페놀도팜, 레플루노미드, 레보시멘단, 솔로렉시드, 테르비나핀, 조니사미드, 에토미데이트, 펜포르민, 트리메타지딘, 맥실레틴, 이펜프로딜, 목시플록사신, 브로모크립틴 또는 토라세미드 중에서 선택된 하나 이상의 화합물을 더 포함할 수 있다. 상기 화합물들 각각의 예시적인 CAS 번호는 하기 표 2에 기재된다.

표 2

[0055]

약물 명칭	CAS 번호
아미노카프로산	60-32-2
브로모크립틴	25614-03-3
카베르골린	81409-90-7
카르베녹솔론	5697-56-3
시나칼세트	226256-56-0
신나리진	298-57-7
디에틸카바마진	90-89-1
디필린	479-18-5
에플레레논	107724-20-9
에토미데이트	33125-97-2
페놀도팜	67227-57-0
이펜프로딜	23210-56-2 또는 23210-58-4
레플루노미드	75706-12-6
레보시멘단	141505-33-1
메티마졸	60-56-0
맥실레틴	5370-01-4 또는 31828-71-4
목시플록사신	354812-41-2
펜포르민	114-86-3

프릴로카인	721-50-6 또는 14289-31-7 또는 14289-32-8
퀴나크린	83-89-6
술피속사졸	127-69-5
솔로텍시드	57821-29-1
테르비나핀	91161-71-6
토라세미드	56211-40-6 또는 72810-59-4
트리메타지딘	5011-34-7 또는 13171-25-0
조니사미드	68291-97-4

- [0056] 특정 구현예에서, 본 발명은 대상체의 AD 또는 관련 장애를 치료하기 위한, 상기 조합의 용도에 관한 것이다.
- [0057] 특정 구현예에서, 본 발명은 대상체의 MS, PD, ALS, HD, 신경병증(예를 들어, 신경병성 통증 또는 알콜성 신경병증), 알콜 중독증 또는 알콜 금단증, 또는 척수 손상을 치료하기 위한, 상기 조합의 용도에 관한 것이다.
- [0058] 실시예에 개시된 바와 같이, 적어도 바클로펜 및 아캄프로세이트를 이용한 조성물 치료법은 신경 손상을 유발하는 생물학적 과정들에 대해 예측하지 못한 강한 효과를 나타낸다. 또한, 상기 조합은 신경 질환의 증상들을 매우 효과적으로 보정하는 능력을 생체내에서도 보여주었다. 따라서, 상기 조합은 신경 장애, 예컨대 알츠하이머병, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 파킨슨병, 헌팅턴병, 신경병증(예를 들어, 신경병성 통증 또는 알콜성 신경병증), 알콜 중독증 또는 알콜 금단증, 및 척수 손상을 치료하기 위한 새로운 접근법을 나타낸다. 상기 조성물은 신경 세포에서 아밀로이드 β (A β) 펩티드의 독성 또는 글루타메이트 흥분독성을 효과적으로 방지한다. 또한, 생체내에서, 상기 조성물은 여러 인지 증상들의 개선을 가져올 뿐만 아니라, 신경 세포의 보호 가져온다. 따라서, 이들은 상기 장애를 치료하기 위한 새롭고도 강력한 방법을 나타낸다. 또한, 실험 부분은 전술한 조성물이 i) 글루타메이트 흥분독성으로부터 신경 세포를 시험관내에서 시너지 효과에 의해 보호하는데 있어서 효과적이고, ii) 글루타메이트 흥분독성과 관련된 질환들에 대해 생체내 모델에서 임상적인 이점을 부여하는데 있어서 효과적이라는 점을 또한 보여준다.
- [0059] 본 발명의 조성물은 대상체의 알츠하이머병(AD), AD 관련 장애, MS, PD, ALS, HD, 신경병증(예를 들어, 신경병성 통증 또는 알콜성 신경병증), 알콜 중독증 또는 알콜 금단증, 또는 척수 손상의 조합 치료를 위해 2, 3, 4 또는 5개의 별개 약물, 더욱 바람직하게는 2, 3 또는 4개의 별개 약물을 포함할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 약물은 가장 효율적인 효과를 제공하기 위해 조합적, 개별적 또는 연속적인 투여를 위한 조합(들)으로 사용된다.
- [0060] 신경 장애, 예컨대 알츠하이머병(AD), AD 관련 장애, MS, PD, ALS, HD, 신경병증(예를 들어, 신경병성 통증 또는 알콜성 신경병증), 알콜 중독증 또는 알콜 금단증, 또는 척수 손상을 치료하기 위한 본 발명의 바람직한 조성물은 조합적, 개별적 또는 연속적인 투여를 위해, 하기의 약물 조합 중 하나를 포함한다:
- [0061] - 바클로펜 및 아캄프로세이트,
- [0062] - 바클로펜 및 아캄프로세이트 및 디에틸카바마진,
- [0063] - 바클로펜 및 아캄프로세이트 및 시나칼세트,
- [0064] - 바클로펜 및 아캄프로세이트 및 술피속사졸,
- [0065] - 바클로펜 및 아캄프로세이트 및 토라세미드,
- [0066] - 바클로펜 및 아캄프로세이트 및 이펜프로딜,
- [0067] - 바클로펜 및 아캄프로세이트 및 맥실레틴,
- [0068] - 바클로펜 및 아캄프로세이트 및 에플레레논,
- [0069] - 바클로펜 및 아캄프로세이트 및 레보시멘단,
- [0070] - 바클로펜 및 아캄프로세이트 및 테르비나핀, 또는
- [0071] - 바클로펜 및 아캄프로세이트 및 레플루노미드.
- [0072] 실험 부분에서 개시된 바와 같이, 본 발명의 조합 요법은 인간 대상체에서 알츠하이머병 또는 관련 장애를 개선하기 위한 실질적인 치료적 및 생물학적 효과를 제공한다. 이는 A β 독성에 대해 강한 신경보호 효과를 유발하

며, 생체내 생화학적 어세이 및 행동 능력에 있어서 긍정적인 결과를 보여준다. 이러한 결과는 본 발명의 조성물이 i) 생체내에서 A β 집합체에 의해 촉발되는 분자 경로를 효과적으로 보정하고, ii) 뉴런 생존 또는 시냅스 온전성(integrity)과 같이 질환을 앓는 동물에서 관찰되는 신경생리학적 손상을 개선시킨다는 것을 보여준다.

- [0073] 또한, 상기 결과들은 상기 조합 치료에 의해 AD, MS, PD, ALS, HD, 신경병증(예를 들어, 신경병성 통증 또는 알콜성 신경병증), 알콜 중독증 또는 알콜 금단증, 또는 척수 손상과 같이 다양한 신경 질환들에 연루된 경로를 갖는 글루타메이트 흥분독성에 대해 중요한 시너지 신경보호 효과가 나타난다는 것을 보여준다(도 15). 이러한 요법은 상기 질환들에 대해 생체내 또는 시험관내 모델에서 긍정적인 결과를 가져온다.
- [0074] 또한, 생체내 결과들은 본 발명의 조성물에 의해 심각한 신경 질환들에서 손상되는 것으로 알려진 Brain Blood Barrier 온전성이 효과적으로 회복되고, 세포자멸 촉발이 방지, 지연 또는 감소된다는 것을 보여준다.
- [0075] 또한, 상기 2개의 약물에 대해 관찰되는 특히 높은 시너지 상호작용은 단일 약물 처치에서 사용될 때 효과를 나타내지 않는 사용 약물 농도를 가능하게 한다. 또한, 실험 파트에서 보여진 바와 같이, 바클로펜 및 아캄프로세이트 조합은 다른 치료 조합에 비해 알츠하이머병의 치료적 이점을 더욱 증대시킨다. 상기 조성물은 인간 세포에서 그리고 생체내 모델에서 아밀로이드 β 단백질 또는 펩티드의 독성 효과를 효과적으로 방지하고, 상기 장애를 치료하기 위한 새롭고도 강력한 방법을 나타낸다.
- [0076] 따라서, 본 발명의 목적은 또한 신경 장애, 예컨대 알츠하이머병(AD), AD 관련 장애, MS, PD, ALS, HD, 신경병증(예를 들어, 알콜성 신경병증 또는 신경병성 통증), 알콜 중독증 또는 알콜 금단증, 또는 척수 손상을 치료하기 위한 전술한 조성물이다.
- [0077] 전술한 바와 같이, 본 발명의 조합 치료에서 화합물 또는 약물은 함께 또는 개별적으로 제형화될 수 있으며, 함께, 개별적으로 또는 연속적으로 투여될 수 있다.
- [0078] 본 발명의 추가 목적은 신경 장애, 예컨대 알츠하이머병(AD), AD 관련 장애, MS, PD, ALS, HD, 신경병증(예를 들어, 신경병성 통증 또는 알콜성 신경병증), 알콜 중독증 또는 알콜 금단증, 또는 척수 손상의 치료용 의약을 제조하기 위한, 전술한 조성물의 용도이다.
- [0079] 또한, 본 발명은 신경 장애, 예컨대 알츠하이머병(AD), AD 관련 장애, MS, PD, ALS, HD, 신경병증(예를 들어, 신경병성 통증 또는 알콜성 신경병증), 알콜 중독증 또는 알콜 금단증, 또는 척수 손상을 치료하기 위한 방법으로서, 전술한 조성물을 유효량으로 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0080] 본 발명의 추가 목적은 전술한 조성물을 유효량으로 대상체에게 동시적, 개별적 또는 연속적으로 투여하는 단계를 포함하는, 신경 장애, 예컨대 알츠하이머병(AD), AD 관련 장애, MS, PD, ALS, HD, 신경병증(예를 들어, 신경병성 통증 또는 알콜성 신경병증), 알콜 중독증 또는 알콜 금단증, 또는 척수 손상의 치료방법이다.
- [0081] 바람직한 구현예에서, 본 발명은 유효량의 바클로펜 및 아캄프로세이트를 대상체에게 동시적, 개별적 또는 연속적으로 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 신경 장애, 예컨대 알츠하이머병(AD), AD 관련 장애, MS, PD, ALS, HD, 신경병증(예를 들어, 신경병성 통증 또는 알콜성 신경병증), 알콜 중독증 또는 알콜 금단증, 또는 척수 손상의 치료방법에 관한 것이다.
- [0082] 본 발명의 조성물은 통상적으로 하나 또는 수개의 약학적으로 허용가능한 캐리어 또는 부형제를 포함한다. 또한, 본 발명에서 사용하기 위해, 약물 또는 화합물은 약학적으로 허용가능한 부형제 또는 캐리어와 일반적으로 혼합된다.
- [0083] 이와 관련하여, 본 발명의 추가 목적은 상기 화합물을 적합한 부형제 또는 캐리어와 혼합하는 단계를 포함하는 약학 조성물의 제조방법이다.
- [0084] 특정 구현예에서, 상기 방법은 바클로펜 및 아캄프로세이트를 적절함 부형제 또는 캐리어에서 혼합하는 단계를 포함한다.
- [0085] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 전술된 바와 같이 화합물은 그 자체로서 사용되거나, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 프로드럭, 유도체 또는 서방성 제형의 형태로 사용된다.
- [0086] 시험관내 및 생체내에서 매우 효과적일지라도, 대상체 또는 특정 상태에 따라서는, 본 발명의 조합 치료는 대상체에서 치료되는 신경 상태에 유익한 부가적인 약물 또는 치료와 결합되거나 연합되거나 조합되어 추가적으로 사용될 수 있다.

- [0087] 본 발명에 따른 약물(들) 또는 약물(들) 조합(들)과 결합되어 사용되는 다른 치료에는, 알츠하이머병, AD 관련 장애, MS, PD, ALS, HD, 신경병증(예를 들어, 신경병성 통증 또는 알콜성 신경병증), 알콜 중독증 또는 알콜 금단증, 또는 척수 손상의 증상을 완화시키는 하나 이상의 약물(들), 또는 상기 장애의 대기요법(palliative treatment)에 사용될 수 있는 약물(들)이 포함될 수 있다. 예를 들어, 실험 결과들은 상기 조합 치료는 도네페질과 조합될 때 중요한 시너지 신경보호 효과를 나타낸다는 점을 또한 보여준다(도 16). 이에 따라, 본 발명의 조합과 함께 사용될 수 있는 예시적인 요법에는 도네페질(CAS: 120014-06-4), 가바펜틴(CAS: 478296-72-9; 60142-96-3), 리마스티그민(123441-03-2) 또는 메만틴(CAS: 19982-08-2)이 있다.
- [0088] 이와 관련하여, 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 약물(들) 또는 조성물은 은행나무(*Ginkgo Biloba*) 추출물과 추가로 조합될 수 있다. 적합한 추출물에는 은행나무 추출물, 개질된 은행나무 추출물(예를 들어, 유효성분이 강화되거나 또는 오염물이 감소된 것) 또는 은행나무 추출물을 함유하는 임의의 약물이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0089] 본 발명에 따른 치료는 집, 의사 집무실, 임상검사실, 외래병동 또는 병원에서 제공될 수 있으며, 이에 따라 의사는 치료의 효과를 가까이서 관찰할 수 있고 필요한 조정을 할 수 있다.
- [0090] 치료의 기간은 치료대상인 질환의 단계, 환자의 연령 및 상태, 및 환자가 치료에 어떻게 반응하는지에 의존한다. 조합의 각 성분의 투여량, 투여빈도, 투여방식은 독립적으로 조절될 수 있다. 예를 들어, 하나의 약물이 경구 투여될 수 있는 반면, 두번째 약물은 근육내 투여될 수 있다. 조합 치료는 환자의 신체가 아직 예측하지 못한 임의의 부작용들로부터 회복할 기회를 가지도록 휴식기를 포함하는 단속적(on-and-off) 사이클로 주어질 수 있다. 또한, 약물은 한번의 투여에 의해 모든 약물들이 전달되도록 함께 제형화될 수도 있다.
- [0091] 조합의 각 약물의 투여는 다른 성분과 조합되어 환자 상태를 완화시킬 수 있거나 질환 또는 장애를 효과적으로 치료할 수 있는 약물의 농축을 유발하는 임의의 적절한 수단에 의한 것일 수 있다.
- [0092] 조합의 약물이 순수 화학물질로서 투여될 수 있다면, 이를 약학 조성물(본원에서는 약학 제형이라고도 지칭됨)로서 제조하는 것이 바람직할 수 있다. 가능한 조성물에는 경구, 직장, 국부(경피, 구강 및 설하를 포함함), 또는 비경구(피하, 근육내, 정맥내 및 피내를 포함함) 투여에 적합한 것이 포함된다.
- [0093] 더 일반적으로는, 상기 약학 제형은 다수의 투여 단위들을 함유한 "환자 팩(patient pack)"으로 환자에게 처방되거나, 또는 단일 패키지로 별개 처리 기간 동안 사용하기 위한 정량 단위 투여량으로 투여하기 위한 다른 수단, 일반적으로 블리스터 팩으로 처방된다. 약사가 대량 공급물로부터 약학적으로 환자의 공급량을 나누는 전통적인 처방에 대해, 환자 팩은 환자가 환자 팩에 함유되어 있는 패키지 삽입물에 항상 접근할 수 있다는 점(일반적으로 전통적인 처방에서 아쉬운 점임)에서 이점을 가진다. 패키지 삽입물의 포함은 환자가 의사의 지시를 따르도록 개선시켜주는 것으로 보여졌다. 따라서, 본 발명은 전술한 약학 제형과 상기 제형에 적합한 패키징 물질의 조합을 또한 포함한다. 이러한 환자 팩에서, 조합 치료를 위한 제형의 의도된 사용은 치료에 가장 적합한 제형을 사용하도록 도와주는 지시서(instructions), 설비(facilities), 규정(provisions), 적응(adaptations) 및/또는 다른 수단들에 의해 추론될 수 있다. 상기 측정에 의해 본 발명의 조합에 의한 치료에 사용하는데 특이적으로 적합하고 개조된 환자 팩이 만들어진다.
- [0094] 약물은 임의의 적합한 캐리어 물질에 임의의 적합한 양으로 함유될 수 있다. 약물은 조성물 총 중량의 99 중량% 이하의 양으로 포함될 수 있다. 조성물은 경구, 비경구(예컨대, 정맥내, 근육내), 직장, 피부, 코, 질, 흡입제, 피부(패치), 또는 안구 투여 경로에 적합한 투여 형태로 제공될 수 있다. 따라서, 조성물은 예컨대 정제, 캡슐, 알약, 분말, 과립, 현탁액, 에멀전, 용액, 히드로겔을 포함하는 겔, 페이스트, 연고, 크림, 플라스터(plaster), 드렌치(drench), 삼투 전달 도구, 좌제, 관장제, 주사제, 임플란트, 스프레이 또는 에어로졸의 형태일 수 있다.
- [0095] 약학 조성물은 통상의 약학적 실무에 따라 제형화될 수 있다(예컨대, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York 참조).
- [0096] 본 발명에 따른 약학 조성물은 활성 약물을 투여시에 즉시 실질적으로 방출하거나, 임의의 미리 예정된 시기에 방출하거나, 또는 투여하고 임의의 시간 후에 방출하도록 제형화될 수 있다.
- [0097] 제어 방출 제형에는, (i) 연장된 시간에 걸쳐 체내에서 약물의 실질적으로 일정한 농도가 만들어지는 제형; (ii) 연장된 시간에 걸쳐 체내에서 약물의 실질적으로 일정한 농도가 미리 예정된 지연 시간 이후에 만들어지는

제형; (iii) 활성 약물 물질의 혈장 수준의 변동과 연관되는 원하지 않는 부작용의 수반되는 최소화와 함께, 체 내에서 상대적으로 일정하고 효과적인 약물 수준을 유지함으로써, 미리 예정된 시간 동안 약물 작용을 지속시키는 제형; (iv) 예컨대 환부 조직 또는 기관에 근접하거나 환부 조직 또는 기관 내에 제어 방출 조성물의 공간적 위치에 의해, 약물 작용을 편재화시키는 제형; 및 (v) 약물을 특정 유형의 표적 세포에 전달하기 위해 캐리어 또는 화학적 유도체를 사용하여 약물 작용을 표적화시키는 제형이 포함된다.

[0098] 제어 방출 제형의 형태로 약물을 투여하는 것은, 약물이 (i) 좁은 치료 지수(즉, 해로운 부작용 또는 독성 반응을 유발하는 혈장 농도와 치료 효과를 유발하는 혈장 농도 사이의 차이가 작음; 일반적으로, 치료 지수(TI)는 중간치사량(LD50) 대 중간유효량(ED50)의 비로서 정의됨)을 갖는 경우; (ii) 위장관에서 좁은 흡수 창을 갖는 경우; 또는 (iii) 치료적 수준에서 혈장 수준을 유지하기 위해 하루 동안 잦은 투여가 요구되는, 생물학적으로 매우 짧은 반감기를 갖는 경우에, 특히 바람직하다.

[0099] 다수의 임의 전략들이 방출 속도가 문제되는 약물의 물질대사 속도보다 더 큰 제어 방출을 얻기 위해 추구될 수 있다. 제어 방출은 예컨대 다양한 유형들의 제어 방출 조성물 및 코팅을 포함하는 다양한 제형 파라미터들과 성분들을 적절하게 선택함으로써 얻어질 수 있다. 따라서, 약물은 투여시에 제어된 방식으로 약물을 방출시키도록 약학 조성물 내에 적합한 부형제에 의해 제형화된다(단일 또는 다중 단위 정제 또는 캡슐 조성물, 유제, 현탁액, 에멀전, 마이크로캡슐, 마이크로스피어, 나노입자, 패치 및 리포솜).

[0100] 경구용 고체 투여 형태

[0101] 경구용 제형에는 비독성의 약학적으로 허용가능한 부형제와 혼합된 본 발명의 조성물을 함유하는 정제가 포함된다. 이러한 부형제는 예를 들어 불활성 희석제 또는 충전제(예컨대, 수크로스, 미정질 셀룰로스, 감자 전분을 포함하는 전분, 칼슘 카보네이트, 소듐 클로라이드, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실페이트, 또는 소듐 포스페이트); 과립제 및 붕해제(예컨대, 미정질 셀룰로스를 포함하는 셀룰로스 유도체, 감자 전분을 포함하는 전분, 크로스카멜로스 소듐, 알기네이트 또는 알긴산); 결합제(예컨대, 아카시아, 알긴산, 소듐 알기네이트, 젤라틴, 전분, 전-젤라틴화 전분, 미정질 셀룰로스, 카복시메틸셀룰로스 소듐, 메틸셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 에틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 또는 폴리에틸렌 글리콜); 및 윤활제, 활택제, 및 항부착제(예컨대, 스테아르산, 실리카, 또는 탈크)일 수 있다. 다른 약학적으로 허용가능한 부형제들은 착색제, 향미제, 가소제, 습윤제, 완충제 등일 수 있다.

[0102] 정제는 미코팅된 것일 수도 있고, 공지된 기법에 의해 (선택적으로는, 위장관에서 붕해 및 흡수를 지연시킴에 따라 더 긴 시간에 걸쳐 지속되는 작용을 제공하도록) 코팅된 것일 수도 있다. 코팅은 미리 예정된 패턴(예컨대, 제어 방출 제형을 획득하기 위함)으로 활성 약물 물질을 방출하도록 개조될 수 있거나, 또는 위를 통과한 후까지 활성 약물 물질을 방출시키지 않도록 개조될 수도 있다(장용성 코팅). 코팅은 당류 코팅, 필름 코팅(예컨대, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 메틸 히드록시에틸셀룰로스, 히드록시프로필셀룰로스, 카복시메틸셀룰로스, 아크릴레이트 코폴리머, 폴리에틸렌 글리콜 및/또는 폴리비닐피롤리돈에 기초함), 또는 장용성 코팅(예컨대, 메타크릴산 코폴리머, 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트, 히드록시프로필 메틸셀룰로스 프탈레이트, 히드록시프로필 메틸셀룰로스 아세테이트 숙시네이트, 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트, 셀락, 및/또는 에틸셀룰로스에 기초함)일 수 있다. 시간 지연 물질, 예컨대 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트가 이용될 수 있다.

[0103] 고체 정제 조성물에는 원하지 않는 화학적 변화(예컨대, 활성 약물 물질의 방출 이전에 화학적 분해)로부터 조성물을 보호하기 위해 개조된 코팅이 포함될 수 있다. 코팅은 [Encyclopedia of Pharmaceutical Technology]에 기재된 것과 유사한 방식으로 고체 투여 형태에 대해 적용될 수 있다.

[0104] 약물들은 정제 내에 함께 혼합될 수도 있고, 분할되어 있을 수도 있다. 예를 들어, 제1약물은 정제의 내부에 함유되어 있고, 제2약물은 정제의 외부에 함유되어 있어서, 제2약물의 실질적인 부분이 제1약물의 방출에 앞서 방출된다.

[0105] 경구용 제형은 또한 씹을 수 있는 정제로서 제조되거나, 또는 활성성분이 불활성 고체 희석제(예컨대, 감자 전분, 미정질 셀룰로스, 칼슘 카보네이트, 칼슘 포스페이트 또는 카올린)와 혼합된 경질 젤라틴 캡슐로서 제조되거나, 또는 활성성분이 물 또는 오일 매질, 예를 들어 액체 파라핀, 또는 올리브 오일과 혼합된 연질 젤라틴 캡슐로서 제조될 수 있다. 분말 및 과립은 통상의 방식으로 정제 및 캡슐에 대해 전술한 성분들을 사용하여 제조될 수 있다.

[0106] 경구용 제어 방출 조성물은 예컨대 활성 약물 물질의 용해 및/또는 확산을 제어함으로써 활성 약물을 방출하도

록 구축될 수 있다.

- [0107] 용해 또는 확산 제어 방출은 약물의 정제, 캡슐, 펠릿 또는 과립 제형을 적절하게 코팅함으로써 달성되거나, 또는 약물을 적절한 매질 내에 혼입시킴으로써 달성될 수 있다. 제어 방출 코팅은 하나 이상의 전술한 코팅 물질 및/또는, 예컨대 셀락, 비즈왁스, 글리코왁스, 카스토르 왁스, 카르나우바 왁스, 스테아릴 알콜, 글리세릴 모노스테아레이트, 글리세릴 디스테아레이트, 글리세롤 팔미토스테아레이트, 에틸셀룰로스, 아크릴성 수지, d1-폴리락트산, 셀룰로스 아세테이트 부티레이트, 폴리비닐 클로라이드, 폴리비닐 아세테이트, 비닐 피롤리돈, 폴리에틸렌, 폴리메타크릴레이트, 메틸메타크릴레이트, 2-히드록시메타크릴레이트, 메타크릴레이트 히드로겔, 1,3 부틸렌 글리콜, 에틸렌 글리콜 메타크릴레이트, 및/또는 폴리에틸렌 글리콜을 포함할 수 있다. 방출 제어 매질(matrix) 제형에서, 매질 물질에는 예컨대 수화된 메틸셀룰로스, 카르나우바 왁스 및 스테아릴 알콜, 카르보폴 934, 실리콘, 글리세릴 트리스테아레이트, 메틸 아크릴레이트-메틸 메타크릴레이트, 폴리비닐 클로라이드, 폴리에틸렌, 및/또는 할로겐화 플루오로탄소가 또한 포함될 수 있다.
- [0108] 본 발명의 조합의 약물을 하나 이상 포함하는 제어 방출 조성물은 부력 정제 또는 캡슐(즉, 경구 투여시에 특정 시간 동안 위 내용물의 상부에 떠다니는 정제 또는 캡슐)의 형태일 수도 있다. 약물(들)의 부력 정제 제형은 약물(들)과 부형제 및 20-75% w/w의 하이드로콜로이드, 예컨대 히드록시에틸셀룰로스, 히드록시프로필셀룰로스 또는 히드록시프로필메틸셀룰로스의 혼합물을 과립화시킴으로써 제조될 수 있다. 획득된 과립은 이어서 정제로 압착될 수 있다. 위액과 접촉하게 되면, 정제는 그 표면 주위로 실질적으로 물이 침투할 수 없는 겔 장벽을 형성한다. 이러한 겔 장벽은 1 미만의 밀도를 유지하는데 관여하며, 이에 따라 정제가 위액에 떠있는 상태로 남아있게 해준다.
- [0109] 경구 투여용 액체
- [0110] 물을 첨가하여 수성 현탁액을 제조하는데 적합한 분말, 분산성 분말, 또는 과립은 경구 투여를 위한 편리한 투여 형태이다. 현탁액으로서 제형은 분산제 또는 습윤제, 현탁제, 및 하나 이상의 보존제와 혼합된 활성성분을 제공한다. 적합한 현탁제는 예를 들어 소듐 카복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 소듐 알기네이트 등이다.
- [0111] 비경구 조성물
- [0112] 약학 조성물은 투여 형태, 제형의 주사, 수액 또는 이식(정맥내, 근육내, 피하 등)에 의해, 또는 통상적인 비독성의 약학적으로 허용가능한 캐리어 및 아췌반트를 함유하는 적합한 전달 도구 또는 임플란트를 통해, 비경구적으로 투여될 수도 있다. 이러한 조성물의 제형 및 제조는 약학 제형 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 잘 알려져 있다.
- [0113] 비경구용 조성물은 단위 투여량 형태(예컨대, 단일 투여량 앰플)로 제공되거나, 수회 투여량을 함유하는 바이알로 제공될 수 있으며, 적절한 보존제가 첨가될 수 있다(하기 참조). 조성물은 용액, 현탁액, 에멀전, 수액 기기, 또는 이식용 전달 기기의 형태일 수 있으며, 또는 조성물은 건조 분말로서 제공됨에 따라 사용하기 전에 물 또는 다른 적절한 담체에 의해 재구성될 수 있다. 활성 약물(들)과 별도로, 조성물은 비경구적으로 허용가능한 적합한 캐리어 및/또는 부형제를 포함할 수 있다. 활성 약물(들)은 제어 방출을 위해 마이크로스피어, 마이크로캡슐, 나노입자, 리포솜 등에 혼입될 수 있다. 조성물은 현탁제, 가용화제, 안정화제, pH-조정제, 및/또는 분산제를 포함할 수 있다.
- [0114] 본 발명에 따른 약학 조성물은 멸균주사에 적합한 형태일 수 있다. 이러한 조성물을 제조하기 위하여, 적합한 활성 약물(들)은 비경구적으로 허용가능한 액체 담체 내에 용해되거나 현탁된다. 이용될 수 있는 허용가능한 담체 및 용매 중에는 물, 적절한 양의 염산, 수산화나트륨 또는 적절한 완충제의 첨가에 의해 적절한 pH로 조정된 물, 1,3-부탄디올, 링거액, 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 수성 제형은 하나 이상의 보존제(예컨대, 메틸, 에틸 또는 n-프로필 p-히드록시벤조에이트)를 함유할 수 있다. 약물들 중 하나가 물에 약간만 또는 조금만 녹는 경우에, 용해 증강제 또는 가용화제가 첨가될 수 있거나, 또는 용매는 10-60% w/w의 프로필렌 글리콜 등을 포함할 수 있다.
- [0115] 제어 방출 비경구 조성물은 수성 현탁액, 마이크로스피어, 마이크로캡슐, 자성 마이크로스피어, 유제, 유현탁액 또는 에멀전의 형태일 수 있다. 선택적으로, 활성 약물(들)은 생적합성 캐리어, 리포솜, 나노입자, 임플란트 또는 수액 기기에 혼입될 수 있다. 마이크로스피어 및/또는 마이크로캡슐을 제조하는데 사용되는 물질들은 예컨대 생분해성/생식성 폴리머, 예컨대 폴리글락틴, 폴리-(이소부틸 시아노아크릴레이트), 폴리(2-히드록시에틸-L-글루타민)이다. 제어 방출 비경구 제형을 제형화시킬 때 사용될 수 있는 생적합성 캐리어는 탄수화물(예컨대, 텍스트란), 단백질(예컨대, 알부민), 지질단백질 또는 항체이다. 임플란트에 사용하기 위한 물질은 비-생분해성

(예컨대, 폴리디메틸실록산) 또는 생분해성(예컨대, 폴리(카프로락톤), 폴리(글리콜산) 또는 폴리(오르소 에스테르))일 수 있다.

[0116] 대체 경로

[0117] 덜 바람직하고 덜 편리할지라도, 다른 투여 경로 및 이에 따른 다른 제형들이 고려될 수 있다. 이와 관련하여, 직장에 적용하기 위해, 조성물에 대해 적합한 투여 형태는 좌제(에멀전 또는 현탁액 유형), 및 직장 젤라틴 캡슐(용액 또는 현탁액)일 수 있다. 전형적인 좌제 제형에서, 활성 약물(들)은 약학적으로 허용가능한 적합한 좌제 기재, 예컨대 코코아 버터, 에스테르화 지방산, 글리세린화 젤라틴, 및 다양한 수용성 또는 수분산성 염기, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜과 조합된다. 다양한 첨가제, 증강제 또는 계면활성제들이 혼입될 수 있다.

[0118] 약학 조성물은 또한 통상적인 비독성의 약학적으로 허용가능한 캐리어 및 부형제, 예컨대 마이크로스피어 및 리포솜을 함유하는 투여 형태 또는 제형의 경피 흡수를 위해 피부에 대해 국부적으로 투여될 수 있다. 상기 제형에는 크림, 연고, 로션, 도포제, 겔, 히드로겔, 용액, 현탁액, 스틱, 스프레이, 페이스트, 플라스터, 및 다른 종류의 경피 약물 전달 시스템들이 포함된다. 약학적으로 허용가능한 캐리어 또는 부형제에는 에멀전화제, 향산화제, 완충제, 보존제, 습윤제, 침투 촉진제, 킬레이트제, 겔-형성제, 연고 기재, 향수, 및 피부 보호제가 포함될 수 있다.

[0119] 보존제, 습윤제, 침투 촉진제는 파라벤, 예컨대, 메틸 또는 프로필 p-히드록시벤조에이트, 및 벤즈알코늄 클로라이드, 글리세린, 프로필렌 글리콜, 우레아 등일 수 있다.

[0120] 피부에 대해 국부 투여하기 위한 전술한 약학 조성물은 또한 치료하려는 신체의 부위상에 또는 신체의 부위에 가까이 국부 투여하는 것과 연관되어 사용될 수 있다. 조성물은 직접 적용하거나, 또는 특정 약물 전달 도구, 예컨대 드레싱 또는 대안 플라스터, 패드, 스폰지, 스트립, 또는 적절한 가요성 물질의 다른 형태들을 이용하여 적용하기 위해 개조될 수 있다.

[0121] 치료의 투여량 및 기간

[0122] 조합의 약물은 같거나 다른 약학 제형으로 수반되어 투여되거나 연속적으로 투여될 수 있다는 것을 인식될 수 있다. 연속적인 투여의 경우, 제2(또는 부가) 활성성분을 투여함에 있어서 지연되는 것이 활성성분의 조합의 유효한 효과의 이점을 상실하도록 해서는 안 된다. 상기 기재에 따른 조합에 대한 최소 요구조건은, 조합은 활성성분의 조합의 유효한 효과에 기인한 조합된 사용을 위해 의도된 것이어야 한다는 것이다. 조합의 목적하는 사용은 본 발명에 따른 조합을 사용하도록 도와주는 설비(facilities), 규정(provisions), 적응(adaptations) 및 /또는 다른 수단들에 의해 추론될 수 있다.

[0123] 본 발명의 조합에서 약물의 치료적 유효량에는, 예컨대 알츠하이머 질환 증상의 감소, 질환이 임상적으로 나타난 경우 질환 진행의 중단 또는 지연, 또는 질환이 발전할 위험의 예방 또는 감소에 효과적인 양이 포함된다.

[0124] 본 발명의 활성 약물이 분할된 투여량으로 투여될 수 있더라도(예를 들어, 매일 2회 또는 3회), 조합에서 각 약물의 단일 일일 투여량이 바람직하고, 단일 약학 조성물 내 모든 약물들의 단일 일일 투여량(단위 투여 형태)이 가장 바람직하다.

[0125] 투여는 수일 내지 수년 동안 매일 일회 내지 수회일 수 있으며, 이는 심지어 환자의 평생 동안일 수도 있다. 만성 또는 적어도 주기적으로 반복되는 장기 투여는 대부분의 경우에 지시된다.

[0126] "단위 투여 형태(unit dosage form)"는 인간 대상체에 대한 단일 투여량으로서 적합한 물리적으로 별개의 단위(예컨대, 캡슐, 정제, 또는 가득찬 주사기 실린더)를 나타내며, 각각의 단위는 원하는 치료 효과를 나타내기 위해 계산된 미리 예정된 양의 활성 물질 또는 물질들을 필요한 약학적 캐리어와 결부하여 함유한다.

[0127] 바람직한 단위 투여 조성물에서 각 약물의 양은 치료대상인 사람의 일반적인 건강 상태를 고려하여, 투여방법, 환자의 체중 및 연령, 질병의 단계, 잠재적 부작용의 위험을 포함하는 여러 요인들에 의존한다. 부가적으로, 특정 환자에 대한 계통약학(치료법의 약동학적, 약역학적 또는 효능 프로파일에 대한 유전자형의 효과) 정보는 사용되는 투여량에 영향을 미칠 수 있다.

[0128] 더 높은 투여량이 요구될 수 있는, 특히 손상된 부위에 대응하는 경우를 제외하고, 조합의 각 약물의 바람직한 투여량은 통상적으로 장기간 유지 치료 동안 일반적으로 처방된 투여량 또는 3기 임상 시험에서 안전한 것으로 입증된 투여량을 초과하지 않는 범위 내의 투여량이 될 것이다.

[0129] 본 발명의 현저한 이점 중 하나는 각 화합물이 조합 요법에서 낮은 투여량으로 사용될 수 있으면서도, 이 때 조

합은 환자에 대해 실질적인 임상 효과를 나타낸다는 점이다. 실제로, 조합 요법은 화합물이 개별적으로는 효과가 더 낮거나 효과를 나타내지 못하는 투여량에서 효과적일 수 있다. 따라서, 본 발명의 특정 이점은 각 화합물의 준-최적 투여량(sub-optimal dose), 즉 통상적으로 처방되는 치료적 투여량보다 더 낮은 투여량, 바람직하게는 치료적 투여량의 1/2, 더욱 바람직하게는 치료적 투여량의 1/3, 1/4, 1/5, 또는 더욱더 바람직하게는 치료적 투여량의 1/10을 사용할 수 있는 능력에 있다. 특정 구현예에서, 치료적 투여량의 1/20, 1/30, 1/50, 1/100 정도로 낮거나, 이보다 더 낮은 투여량이 사용된다.

- [0130] 상기 준-치료적 투여량에서, 화합물은 어떠한 부작용도 나타내지 않는 반면, 본 발명에 따른 조합(들)은 알츠하이머병의 치료에 있어서 완전한 정도로 효과적이다.
- [0131] 바람직한 투여량은 장기간 유지 치료 동안 통상적으로 처방되는 투여량의 1% 내지 50%의 양에 상응한다.
- [0132] 가장 바람직한 투여량은 장기간 유지 치료 동안 통상적으로 처방되는 투여량의 1% 내지 10%의 양에 상응할 수 있다.
- [0133] 본 발명에서 사용하기 위한 약물의 투여량의 특정 예는 다음과 같다:
- [0134] - 아캄프로세이트, 1 내지 1000 mg/day, 바람직하게는 매일 400 mg 미만, 더 바람직하게는 200 mg/day 미만, 더욱더 바람직하게는 50 mg/day 미만, 여기서 상기 투여량은 특히 경구 투여에 적합함,
- [0135] - 바클로펜, 매일 0.01 내지 150 mg, 바람직하게는 매일 100 mg 미만, 더 바람직하게는 50 mg/day 미만, 더욱더 바람직하게는 25 mg/day 미만, 여기서 상기 투여량은 특히 경구 투여에 적합함,
- [0136] - 아미노카프로산, 경구적으로 매일 약 0.1 g 내지 2.4 g,
- [0137] - 브로모크립틴, 경구적으로 매일 약 0.01 내지 10 mg,
- [0138] - 디에틸카바마진, 경구적으로 매일 약 0.6 내지 600 mg,
- [0139] - 카베르골린, 경구적으로 매일 약 1 내지 10 µg,
- [0140] - 시나칼세트, 경구적으로 매일 약 0.3 내지 36 mg,
- [0141] - 신나리진, 경구적으로 매일 약 0.6 내지 23 mg,
- [0142] - 디필린, 경구적으로 매일 약 9 내지 320 mg,
- [0143] - 에플레레논, 경구적으로 매일 약 0.25 내지 10 mg,
- [0144] - 이펜프로딜, 경구적으로 매일 약 0.4 내지 6 mg,
- [0145] - 레플루노미드, 경구적으로 매일 약 0.1 내지 10 mg,
- [0146] - 레보시멘단, 경구적으로 매일 약 0.04 내지 0.8 mg,
- [0147] - 맥실레틴, 경구적으로 매일 약 6 내지 120 mg,
- [0148] - 목시플록사신, 경구적으로 매일 약 4 내지 40 mg,
- [0149] - 펜포르민, 경구적으로 매일 약 0.25 내지 15 mg,
- [0150] - 퀴나크린, 경구적으로 매일 약 1 내지 30 mg,
- [0151] - 술피속사졸, 경구적으로 매일 약 20 내지 800 mg,
- [0152] - 솔로텍시드, 경구적으로 매일 약 0.05 내지 40 mg,
- [0153] - 테르비나핀, 경구적으로 매일 약 2.5 내지 25 mg,
- [0154] - 토라세미드, 경구적으로 매일 약 0.05 내지 4 mg,
- [0155] - 트리메타지딘, 경구적으로 매일 약 0.4 내지 6 mg,
- [0156] - 조니사미드, 경구적으로 매일 약 0.5 내지 50 mg.
- [0157] 조성물이 활성성분으로서 오직 바클로펜 및 아캄프로세이트만을 포함하는 경우, 이러한 2개의 화합물은 다양한 비율, 예컨대 0.05 내지 1000(W:W), 바람직하게는 0.05 내지 100(W:W), 더 바람직하게는 0.05 내지 50(W:W)에

포함되는 아캄프로세이트/바클로펜 중량비로 사용될 수 있다.

[0158] 실제로 투여되는 약물의 양은 치료하려는 상태 또는 상태들, 투여하려는 정확한 조성물, 개별 환자의 연령, 체중 및 반응, 환자 증상의 중증도, 및 투여의 선택된 경로를 포함한 관련 상황들의 측면에서 의사가 결정할 것이라는 점을 이해할 수 있을 것이다. 따라서, 상기 투여량의 범위는 본원의 개시내용에 대한 일반적인 가이드를 보여주고 뒷받침하기 위한 것이고, 본 발명의 범위를 제한하려는 의도는 아니다.

[0159] 하기의 실시예들은 설명을 위해 주어지는 것이고, 본 발명을 한정하려는 의도는 없다.

도면의 간단한 설명

[0160] **도 1:** 약물 스크리닝에 대해 사용된 내피 세포에서 인간 β 아밀로이드의 독성 실험 모델의 유효성. 10nM으로 1시간의 VEGF 전-처리하는 모세혈관망을 아밀로이드 손상으로부터 유의적으로 보호하였다(아밀로이드 중독에 비해 모세혈관망의 +70%).

도 2: 베타-아밀로이드 중독된 HBMEC 배양에서 모세혈관망의 총 길이에 대한 바클로펜(BCL) 및 아캄프로세이트(ACP) 조합 치료의 효과. 인간 아밀로이드 펩티드($A\beta_{1-42}$ 2.5 μ M)는 담체-처리된 세포에 비해 40% 이상으로 유의적인 중독을 생성한다. 상기 중독은 아캄프로세이트 및 바클로펜의 조합(a)에 의해 유의적으로 방지된 반면, 아캄프로세이트(b) 및 바클로펜(c)은 단독으로 상기 농도에서 중독에 대해 유의적인 효과를 나타내지 않는다. ◆: $p < 0.05$: $A\beta_{1-42}$ 중독과 유의적으로 상이함; *: $p < 0.05$: 담체와 유의적으로 상이함; "ns": 유의적인 효과가 없음(ANOVA + Dunnett Post-Hoc 테스트).

도 3: 베타-아밀로이드 중독된 HBMEC 배양에서 모세혈관망의 총 길이에 대한 바클로펜(BCL) 및 테르비나핀(TBN) 조합 치료의 효과. 인간 아밀로이드 펩티드($A\beta_{1-42}$ 2.5 μ M)는 담체-처리된 세포에 비해 40% 이상으로 유의적인 중독을 생성한다. 상기 중독은 테르비나핀 및 바클로펜의 조합에 의해 방지된다. *: $p < 0.05$: 대조군(중독 없음)과 유의적으로 상이함.

도 4: 약물 스크리닝에 대해 사용된 신경 세포에서 인간 β 아밀로이드의 독성 실험 모델의 유효성. 1시간의 에스트라디올(150 nM) 또는 BDNF(50ng/mL) 전-처리하는 뉴런을 아밀로이드 손상으로부터 유의적으로 보호하였으며(-94%), 이는 신경보호에 대한 양성 대조군으로서 고려된다. *: $p < 0.05$: 대조군(중독 없음)과 유의적으로 상이함; ◆: $p < 0.05$: $A\beta_{1-42}$ 중독과 유의적으로 상이함.

도 5: 래트 일차 피질 세포에 대한 인간 $A\beta_{1-42}$ 독성에서 LDH 방출에 대한 아캄프로세이트(ACP) 및 바클로펜(BCL) 조합 치료의 효과. 인간 아밀로이드 펩티드($A\beta_{1-42}$ 10 μ M)는 담체-처리된 뉴런에 비해 유의적인 중독을 생성한다. 상기 중독은 아캄프로세이트 및 바클로펜의 조합(a)에 의해 유의적으로 방지된 반면, 아캄프로세이트(b) 및 바클로펜(c)은 단독으로 상기 농도에서 중독에 대해 유의적인 효과를 나타내지 않는다. ◆: $p < 0.05$: $A\beta_{1-42}$ 중독과 유의적으로 상이함; *: $p < 0.05$: 담체와 유의적으로 상이함; "ns": 유의적인 효과가 없음(ANOVA + Dunnett Post-Hoc 테스트).

도 6: 래트 일차 피질 세포에 대한 인간 $A\beta_{1-42}$ 독성에서 LDH 방출에 대한 시나칼세트(CNC) 및 솔피속사졸(SFX) 조합 치료의 효과. 인간 아밀로이드 펩티드($A\beta_{1-42}$ 10 μ M)는 담체-처리된 뉴런에 비해 유의적인 중독을 생성한다. 상기 중독은 시나칼세트 및 솔피속사졸의 조합에 의해 방지된다. *: $p < 0.05$: 담체와 유의적으로 상이함.

도 7: 베타-아밀로이드 중독된 피질 뉴런에서 신경돌기 망의 총 길이에 대한 아캄프로세이트(ACP) 및 바클로펜(BCL) 조합 치료의 효과. 인간 아밀로이드 펩티드($A\beta_{1-42}$ 2.5 μ M)는 담체-처리된 세포에 비해 15% 이상으로 유의적인 중독을 생성한다. 상기 중독은 아캄프로세이트 및 바클로펜의 조합에 의해 유의적으로 방지된 반면, 아캄프로세이트 및 바클로펜은 단독으로 상기 농도에서 중독에 대해 유의적인 효과를 나타내지 않는다. ◆: $p < 0.05$: $A\beta_{1-42}$ 중독과 유의적으로 상이함; *: $p < 0.05$: 담체와 유의적으로 상이함(ANOVA + Dunnett Post-Hoc 테스트).

도 8: Y-maze 테스트에 의해 측정되는 거동에 대한 아캄프로세이트 및 바클로펜 조합 치료의 효과. 아밀로이드 펩티드는 선택의 백분율로서 측정되는 인지를 유의적으로 감소시킨다(53.8% vs 73.5%). 이와 같이 해로운 효과는 아캄프로세이트(0.2mg/kg/day) 및 바클로펜(3mg/kg/day)의 조합에 의해 유의적으로 방지된다(48.2%의 보호).

◇: $p < 0.05$, $A\beta_{25-35}$ 중독과 유의적으로 상이함; *: $p < 0.05$, 담체와 유의적으로 상이함(ANOVA + Dunnett Post-Hoc 테스트).

도 9: 수동적 회피(탈출 잠재성)에 의해 측정되는 기억에 대한 아캄프로세이트 및 바클로펜 조합 치료의 효과. 아밀로이드 펩티드는 대조군에 비해 탈출 잠재성에 의해 측정되는 기억 능력을 유의적으로 감소시킨다. 이와 같이 해로운 효과는 아캄프로세이트(0.2mg/kg) 및 바클로펜(3mg/kg)의 조합에 의해 유의적으로 방지된다(완전한 보호). ◇: $p < 0.05$, $A\beta_{25-35}$ 중독과 유의적으로 상이함; *: $p < 0.05$, 담체와 유의적으로 상이함(ANOVA + Dunnett 테스트).

도 10: 수동적 회피(스텝-스루 잠재성)에 의해 측정되는 기억에 대한 아캄프로세이트 및 바클로펜 조합 치료의 효과. 아밀로이드 펩티드는 대조군에 비해 스텝-스루 잠재성에 의해 측정되는 기억 능력을 44% 이상 유의적으로 감소시킨다. 이와 같이 해로운 효과는 아캄프로세이트(0.2mg/kg) 및 바클로펜(3mg/kg)의 조합에 의해 유의적으로 방지된 반면(78.8%의 보호 효과), 아캄프로세이트 및 바클로펜은 단독으로는 중독에 대해 효과가 더 낮게 나타난다. ◇: $p < 0.05$, $A\beta_{25-35}$ 중독과 유의적으로 상이함; *: $p < 0.05$, 담체와 유의적으로 상이함(ANOVA + Dunnett 테스트).

도 11: 해마의 뉴런 밀도에 대해 아캄프로세이트 및 바클로펜 조합 치료의 효과. 아밀로이드 펩티드는 대조군에 비해 해마에서 밀리미터 당 뉴런의 개수에 의해 측정되는 뉴런 밀도를 21% 이상 유의적으로 감소시킨다. 이러한 신경 손상은 아캄프로세이트(0.2mg/kg) 및 바클로펜(3mg/kg)의 조합에 의해 유의적으로 방지된다(손상된 뉴런의 63.2%가 보호됨). ◇: $p < 0.05$, $A\beta_{25-35}$ 중독과 유의적으로 상이함; *: $p < 0.05$, 담체와 유의적으로 상이함(ANOVA + Dunnett Post-Hoc 테스트).

도 12: 혈액 뇌 관문 온전성에 대한 아캄프로세이트 및 바클로펜 조합 치료의 효과. 아밀로이드 펩티드는 대조군에 비해 혈액 뇌 관문(BBB)의 투과성을 51% 이상 유의적으로 증가시키게 한다. 혈액 뇌 관문에 대한 상기 손상은 아캄프로세이트(0.2mg/kg) 및 바클로펜(3mg/kg)의 조합에 의해 유의적으로 방지된다(66.6%의 온전성이 복구됨). ◇: $p < 0.05$, $A\beta_{25-35}$ 중독과 유의적으로 상이함; *: $p < 0.05$, 담체와 유의적으로 상이함(ANOVA + Dunnett Post-Hoc 테스트).

도 13: 시냅토파이신 농도에 의해 반영되는 시냅스 밀도에 대한 아캄프로세이트 및 바클로펜 조합 치료의 효과. 아밀로이드 펩티드는 대조군에 비해 뇌의 시냅토파이신 농도를 34% 이상 유의적으로 감소시켜 시냅스 기능에 영향을 미친다. 시냅스 밀도에 대한 상기 손상은 아캄프로세이트(0.2mg/kg/day) 및 바클로펜(3mg/kg/day)의 조합에 의해 유의적으로 방지된다(76%). ◇: $p < 0.05$, $A\beta_{25-35}$ 중독과 유의적으로 상이함; *: $p < 0.05$, 담체와 유의적으로 상이함(ANOVA + Dunnett Post-Hoc 테스트).

도 14: 해마에서 산화적 스트레스에 대한 아캄프로세이트 및 바클로펜 조합 치료의 보호 효과. 아밀로이드 펩티드는 대조군에 비해 지질 과산화에 의해 측정되는 해마의 산화적 스트레스를 59% 이상 유의적으로 증가시킨다. 이러한 산화적 스트레스는 아캄프로세이트(0.2mg/kg/day) 및 바클로펜(3mg/kg/day)의 조합에 의해 유의적으로 방지된다(65.9%). ◇: $p < 0.05$, $A\beta_{25-35}$ 중독과 유의적으로 상이함; *: $p < 0.05$, 담체와 유의적으로 상이함(ANOVA + Dunnett Post-Hoc 테스트).

도 15: 신경 피질 세포에서 글루타메이트 독성에 대한 바클로펜 및 아캄프로세이트 조합 치료의 효과. 글루타메이트 중독은 바클로펜(400 nM) 및 아캄프로세이트(1.6 nM)의 조합에 의해 유의적으로 방지되는 반면, 상기 농도에서 바클로펜 및 아캄프로세이트는 단독으로 중독에 대해 유의적인 효과를 나타내지 않는다. ◇: $p < 0.001$, 글루타메이트 중독과 유의적으로 상이함(ANOVA + Dunnett Post-Hoc 테스트).

도 16: Y-maze 테스트에 의해 측정되는 거동 및 인지 능력에 대한 도네페질, 아캄프로세이트 및 바클로펜 조합 치료의 효과. 아밀로이드 펩티드는 선택의 백분율로서 측정되는 인지를 유의적으로 감소시킨다(51.5% vs 71.8%). 이와 같이 해로운 효과는 도네페질(0.25mg/kg/day), 아캄프로세이트(32 μ g/kg/day) 및 바클로펜(480 μ g/kg/day)의 조합에 의해 유의적으로 방지되는 반면(98%의 보호), 상기 농도에서 약물들 단독으로는 유의적인 효과를 나타내지 않는다. ◇: $p < 0.01$, $A\beta_{25-35}$ 중독과 유의적으로 상이함; *: $p < 0.01$, 담체와 유의적으로 상이함(ANOVA + Dunnett Post-Hoc 테스트).

도 17: 래트 일차 피질 세포에 대한 인간 $A\beta_{1-42}$ 독성 어세이에서 아캄프로세이트 및 이의 유도체 호모타우린 전

-처리의 보호 효과의 비교. $A\beta_{1-42}$ 는 담체-처리된 뉴런에 비해 유의적인 증독을 생성한다. 증독은 호모타우린 및 아캄프로세이트(99%, 8nM)에 의해 동일하게 유의적으로 방지된다. \diamond : $p < 0.0001$: $A\beta_{1-42}$ 증독과 유의적으로 상이함.

도 18: 임상 스코어에 의해 측정되는 만성 진행성 실험적 자가면역 뇌수막염(EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis)의 발달에 대한 아캄프로세이트 및 바클로펜 조합 치료의 효과. 면역화는 임상 스코어에 의해 측정되는 물리적 특징들을 유의적으로 감소시킨다. 이와 같이 해로운 효과는 아캄프로세이트(2 mg/kg/day) 및 바클로펜(30 mg/kg/day)의 조합에 의해 유의적으로 방지된다(p -값 < 0.01).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0161] 동물들의 취급 및 양육 뿐만 아니라 실험들은 I.A.S.P.의 [Committee for Research and Ethical Issue]의 가이드라인(1983)에 따라 수행된다.
- [0162] **A) $A\beta$ 독성에 관련되는 질환의 치료**
- [0163] 이러한 일련의 실험들에서, 후보 조합들은 인간 $A\beta_{1-42}$ 의 독성 효과를 예방하거나 감소시키는 능력에 대해 테스트되었다. $A\beta_{1-42}$ 는 AD를 앓는 인간 환자에게서 생검을 통해 발견된 응집물을 구성하는 전장(full length) 펩티드이다. AD의 생리학적 특징이 다르게 나타나는 시험관내 모델에서 조합의 활성을 더 기록하기 위해, 효과는 다양한 유형의 세포들에 대해 측정된다. 또한, 생체내 연구는 i) 동물의 인지 능력, 및 ii) AD의 분자적 홀마크(세포자멸 유도, 산화적 스트레스 유도, 염증 경로 유도)에 대한 조합의 효과를 평가함으로써, 이러한 보호 효과를 확인하는 AD에 대한 마우스 모델에서 수행된다.
- [0164] **I. 바클로펜-아캄프로세이트 조합 치료는 시험관내에서 인간 $A\beta_{1-42}$ 의 독성을 방지한다.**
- [0165] I.1. 인간 HBME 세포에서 인간 $A\beta_{1-42}$ 펩티드의 독성에 대한 효과
- [0166] $A\beta_{1-42}$ 독성에 대해 후보 화합물(들)에 의해 제공되는 보호를 연구하기 위해 인간 뇌 미세혈관 내피세포 배양물이 사용되었다.
- [0167] 인간 뇌 미세혈관 내피 세포(HBMEC, ScienCell Ref: 1000, 제10계대에서 동결됨)는 $+37^{\circ}\text{C}$ 의 수조에서 빠르게 해동되었다. 상청액은 즉시 10% 송아지태아 혈청(FCS; GIBCO ref 10270-106)을 함유하는 9 ml의 돌베코 변형 이글 배지(DMEM; Pan Biotech ref: P04-03600)에 놓았다. 세포 현탁액은 $+4^{\circ}\text{C}$ 에서 10분 동안 180 x g에서 원심 분리되었으며, 펠릿은 1.6%의 무혈청 RocketFuel(Cell System, Ref: SF-4Z0-500-R, Batch 54102), 2%의 페니실린 10,000 U/ml 및 스트렙토마이신 10mg/ml(PS; Pan Biotech ref: P06-07100 batch 133080808)를 갖는 CSC 무혈청 배지(CSC serum free, Cell System, Ref: SF-4Z0-500-R, Batch 51407-4)에 현탁되고, 96 웰-플레이트(matrigel layer biocoat angiogenesis system, BD, Ref 354150, Batch A8662)에서 웰 당 20,000개 세포의 밀도로 최종 부피 100 μl 로 파종되었다. 매트릭셀 지지체상에서, 내피 세포들은 모세혈관망 형태형성의 과정을 자발적으로 시작하였다(33).
- [0168] 3개의 분리된 배양이 조건마다 수행되었으며, 6개의 웰이 조건마다 사용되었다.
- [0169] **시험 화합물 및 인간 아밀로이드- β_{1-42} 처리**
- [0170] 요약하면, $A\beta_{1-42}$ 펩티드(Bachem, ref: H1368 batch 1010533)는 20 μM (모액)으로 한정 배양 배지에서 재구성되었으며, 암실에서 3일 동안 $+37^{\circ}\text{C}$ 에서 천천히 진탕되었다. 대조군 배지가 동일한 상태에서 제조되었다.
- [0171] 3일 후에, 인간 아밀로이드 펩티드는 대조군 배지에서 희석된 2.5 μM 으로 HBMEC에 대해 사용되었다(최적 인큐베이션 시간). $A\beta_{1-42}$ 펩티드는 18시간 인큐베이션 동안 매트릭셀상에서 HBMEC를 파종하고 2시간 후에 첨가되었다.
- [0172] 매트릭셀상에서 HBMEC를 파종하고 1시간 후에, 시험 화합물 및 VEGF-165가 배양배지(+ 0.1% DMSO)에 용해되었으며, 이어서 $A\beta_{1-42}$ 를 적용하기 전 1시간 동안 HBMEC와 함께 전-인큐베이션되었다(배양 웰 당 최종 부피 100 μl). 시험 화합물 또는 VEGF 인큐베이션으로부터 1시간 후에(매트릭셀상에 세포 파종으로부터 2시간 후에), 100 μl 의 $A\beta_{1-42}$ 펩티드가 추가 약물 희석을 피하기 위하여 시험 화합물 또는 VEGF의 존재하에(200 μl 총 부피/웰)

대조군 배지에서 희석된 최종 농도 2.5 μM에 첨가되었다.

[0173] **배양 플레이트의 조직화**

[0174] VEGF-A의 혈관형성유발(pro-angiogenic) 이소폼으로 알려진 VEGF-165는 참조 화합물로서 본 연구에서 모든 실험에 사용되었다. VEGF-165는 혈관형성에 관여하는 가장 풍부한 VEGF 이소폼들 중 하나이다. VEGF는 참조 시험 화합물로서 10nM으로 사용되었다(도 1).

[0175] 하기의 조건들이 평가되었다:

[0176] - **음성 대조군:** 배지 단독 + 0.1% DMSO

[0177] - **중독(intoxication):** 18시간 동안 아밀로이드-β₁₋₄₂(2.5 μM)

[0178] - **양성 대조군:** 18시간 인큐베이션 시간 동안 Aβ₁₋₄₂(2.5 μM) 첨가 1시간 전 VEGF-165(10nM)(1개 참조 화합물/배양)

[0179] - **시험 화합물:** 18시간 인큐베이션 시간 동안 Aβ₁₋₄₂(2.5 μM) 첨가 1시간 전 시험 화합물(들).

[0180] **모세혈관망 정량화**

[0181] 웰마다 4x 렌즈로 2개의 사진이 광투과 InCell Analyzer™ 1000(GE Healthcare)을 사용하여 촬영되었다. 모든 이미지들은 동일한 상태에서 촬영되었다. 혈관형성 망의 분석은 Developer 소프트웨어(GE Healthcare)를 이용하여 수행되었다. 모세혈관망의 전체 길이가 평가되었다.

[0182] **데이터 처리**

[0183] 데이터는 아밀로이드 손상을 표현하기 위하여 대조 조건(중독 없음, 아밀로이드 없음 = 100 %)의 백분율로 표현되었다. 모든 값들은 3개 배양의 평균 ± SEM(s.e.mean)으로서 나타내었다(n = 조건 당 6개 웰). 통계 분석은 상이한 조건들에서 수행되었다(ONE-WAY ANOVA, 이어서 가능하다면 Dunnett 테스트, Statview 소프트웨어 버전 5.0).

[0184] **결과**

[0185] 바클로펜-아캄프로세이트 조합은 도 2에서 보여진 바와 같이 HBMEC 모델에서 인간 Aβ₁₋₄₂ 펩티드의 독성에 대해 유의적인 보호 효과를 나타낸다(Aβ₁₋₄₂ 펩티드 손상의 24% 감소가 관찰됨). 이러한 결과는 인간 아밀로이드 펩티드(Aβ₁₋₄₂ 2.5 μM)에 의한 중독이 약물 조합에 의해 유의적으로 방지되는 반면, 상기 농도에서 약물 단독으로는 상기 기재된 실험 조건에서의 중독에 대해 유의적인 효과를 나타내지 못한다는 점을 명백하게 보여준다.

[0186] 역으로, 바클로펜 및 테르비나핀의 조합(이는 비교의 목적을 위해서만 여기에 제시됨)은 Aβ₁₋₄₂에 대해 더 약한 보호(Aβ₁₋₄₂ 펩티드 손상의 15% 감소가 관찰됨)를 제공한다(도 3).

[0187] 따라서, 상기 두 개의 조합이 Aβ₁₋₄₂에 대해 보호를 할 수 있더라도, 바클로펜-아캄프로세이트 조합이 분명하게 부각된다. 실제로, 단독으로는 효과를 나타내지 못하는 농도의 상기 약물들은 조합되어 사용될 때 Aβ₁₋₄₂에 대해 인간 HBME 세포의 유의적인 보호를 할 수 있다. 또한, 바클로펜-아캄프로세이트 조합은 바클로펜-테르비나핀 조합보다 더 효과적이다. 바클로펜 및 아캄프로세이트의 이러한 효과는 예컨대 바클로펜-테르비나핀 조합의 효과에 비해 60% 정도의 현저한 개선을 나타낸다.

[0188] 또한, 바클로펜-아캄프로세이트 조합에서 사용되는 바클로펜의 농도는 바클로펜-테르비나핀 조합에서 사용되는 바클로펜의 농도보다 훨씬 더 낮다(25배 감소).

[0189] I.2 일차 피질 뉴런 세포상에서 인간 Aβ₁₋₄₂ 펩티드의 독성에 대한 효과

[0190] **일차 피질 뉴런의 배양**

[0191] 래트 피질 뉴런이 문헌 [Singer et al.](47)에 기재된 바와 같이 배양되었다. 요약하면, 임신 15일의 임신 암컷 래트가 자궁경부의 전위에 의해 살해되었으며(Rats Wistar), 자궁에서 태아가 제거되었다. 피질이 제거되고, 1%의 소 혈청 알부민(BSA) 및 2%의 페니실린 10,000 U/ml 및 스트렙토마이신 10mg/ml를 함유하는 Leibovitz(L15)의 아이스-콜드 배지에 놓여졌다. 피질이 37°C에서 20분 동안 트립신에 의해 해리되었다(0.05%). 상기 반응은

DNaseI grade II 및 10%의 송아지태아 혈청(FCS)을 함유하는 돌베코 변형 이글 배지(DMEM)의 첨가에 의해 중단되었다. 이어서, 세포들은 10 ml 피펫을 통해 3개의 일련 계대에 의해 기계적으로 해리되었으며, +4°C에서 10분 동안 515 x g에서 원심분리되었다. 상청액은 버려졌으며, 세포의 펠릿은 B27(2%), L-글루타민(0.2mM), 2%의 PS 용액 및 10ng/ml의 BDNF가 보충된 Neurobasal로 구성된 한정 배양배지에 재현탁되었다. 생존 세포는 트리판 블루 배제 시험을 이용하여 Neubauer 세포계산기에서 카운팅되었다. 세포들은 96 웰-플레이트에서 30 000 세포/웰의 밀도로 파종되었으며(웰은 폴리-L-리신(10 µg/ml)으로 사전코팅되었음), 가슴공기(95%)/CO2(5%) 대기에서 +37°C에서 배양되었다. 3개의 독립적인 배양이 조건마다 수행되고, 6개의 웰이 조건마다 사용된다.

[0192] **시험 화합물 및 인간 아밀로이드-β 1-42 처치**

[0193] 요약하면, Aβ₁₋₄₂ 펩티드는 40 µM(모액)으로 한정 배양배지에서 재구성되었으며, 암실에서 3일 동안 +37°C에서 천천히 진탕되었다. 대조군 배지가 동일한 상태에서 제조되었다.

[0194] 3일 후에, 용액은 다음과 같이 일차 피질 뉴런에 대해 사용되었다:

[0195] 뉴런 배양 10일 후에, 시험 화합물은 배양배지(+ 0.1% DMSO)에 용해되었으며, 이어서 Aβ₁₋₄₂를 적용하기 전 1시간 동안 뉴런과 함께 전-인큐베이션되었다(배양 웰 당 최종 부피 100 µl). 시험 화합물(들)의 인큐베이션으로부터 1시간 후에, 100 µl의 Aβ₁₋₄₂ 펩티드가 추가 시험 화합물(들)의 희석을 피하기 위하여 약물(들)의 존재하에 희석된 최종 농도 10 µM에 첨가되었다. 피질 뉴런은 24시간 동안 증독되었다. 3개의 분리된 배양이 조건마다 수행되었으며, 6개의 웰이 조건마다 사용되었다.

[0196] BDNF(50ng/ml) 및 에스트라디올-β(150nM)가 각각 양성 대조군 및 참조 화합물로서 사용되었다. 3개의 분리된 배양이 조건마다 수행되고, 12개의 웰이 조건마다 사용된다.

[0197] **배양 플레이트의 조직화**

[0198] 150nM의 에스트라디올-β가 양성 대조군으로서 사용되었다(도 4).

[0199] 에스트라디올-β는 배양배지에 용해되었으며, 아밀로이드-β₁₋₄₂를 적용하기 전 1시간 동안 전-인큐베이션되었다.

[0200] 하기의 조건들이 평가되었다:

[0201] - 대조 플라크: 12 웰/조건

[0202] * 음성 대조군: 배지 단독 + 0.1% DMSO

[0203] * 증독: 24시간 동안 아밀로이드-β₁₋₄₂(10 µM)

[0204] * 참조 화합물: 에스트라디올(150nM) 1시간.

[0205] - 약물 플레이트: 6 웰/조건

[0206] * 음성 대조군: 배지 단독 + 0.1% DMSO

[0207] * 증독: 24시간 동안 아밀로이드-β₁₋₄₂(10 µM)

[0208] * 시험 화합물(들): 시험 화합물(들) 1시간, 그 후 아밀로이드-β₁₋₄₂(10 µM) 24시간 동안

[0209] **락트산 탈수소효소(LDH) 활성 어세이**

[0210] 증독 24시간 후에, 상청액이 제거되고 Cytotoxicity Detection Kit(LDH, Roche Applied Science, ref: 11644793001, batch: 11800300)로 분석되었다. 세포 독성의 정량화를 위한 상기 비색 분석은 사멸 세포의 사이토졸로부터 상청액으로 방출되는 락트산 탈수소효소(LDH) 활성의 측정에 기초한다.

[0211] **데이터 처리**

[0212] 데이터는 아밀로이드 손상을 표현하기 위하여 대조 조건(증독 없음, 아밀로이드 없음 = 100%)의 백분율로 표현되었다. 모든 값들은 3개 배양의 평균 ± SEM(s.e.mean)으로서 나타내었다(n = 조건 당 6개 웰). 통계 분석은 상이한 조건들에서 수행되었다(ONE-WAY ANOVA, 이어서 가능하다면 Dunnett 테스트, Statview 소프트웨어 버전 5.0).

- [0213] **결과**
- [0214] 바클로펜 및 아캄프로세이트 조합은 도 5에서 보여진 바와 같이 일차 피질 뉴런 세포에서 인간 $A\beta_{1-42}$ 펩티드의 독성에 대해 유의적인 보호 효과를 유도한다(세포 생존의 34% 향상). 이러한 결과는 인간 아밀로이드 펩티드($A\beta_{1-42}$ 10 μM)에 의한 중독이 조합에 의해 유의적으로 방지되는 반면, 상기 농도에서 바클로펜 또는 아캄프로세이트는 단독으로 중독에 대해 유의적인 효과를 나타내지 못한다는 점을 명백하게 보여준다.
- [0215] 역으로, 이 모델에서 활성이더라도, 술피속사졸 및 시나칼세트의 조합은 $A\beta_{1-42}$ 에 대해 더 약한 보호를 제공한다 (19%, 도 6).
- [0216] 따라서, 상기 두 개의 조합이 $A\beta_{1-42}$ 에 대해 보호를 할 수 있지만, 바클로펜-아캄프로세이트 조합이 분명하게 부각된다. 실제로, 단독으로는 효과를 나타내지 못하는 농도에서, 상기 약물들은 조합되어 사용될 때 $A\beta_{1-42}$ 에 대해 일차 피질 뉴런 세포의 유의적인 보호를 가져온다. 또한, 바클로펜-아캄프로세이트 조합은 술피속사졸-시나칼세트 조합보다 훨씬 더 효과적이다. 바클로펜 및 아캄프로세이트의 이러한 효과는 예컨대 술피속사졸 및 시나칼세트 조합의 효과에 비해 60% 정도의 현저한 개선을 나타낸다.
- [0217] 이러한 결과들을 함께 고려할 때, 알츠하이머병의 여러 시험관내 모델들에서 바클로펜-아캄프로세이트 조합의 예측하지 못한 현저한 긍정적인 효과를 확인할 수 있다. 상기 관찰된 효과는 다른 바클로펜-기초 조합 치료(예컨대, 바클로펜-테르비나핀), 또는 다른 활성 조합 치료(술피속사졸-시나칼세트)에 의해 유발되는 효과보다 매우 월등하다.
- [0218] 피질 세포에서의 아캄프로세이트 및 호모타우린 보호 활성이 비교되었다(도 17). 상기 결과는 호모타우린이라고 불리우는 아캄프로세이트의 유도체는 $A\beta_{1-42}$ 에 대해 효과적인 보호를 할 수 있다는 점을 보여주었다. 본원에서, 바클로펜 또는 아캄프로세이트는 그 유도체가 본원에 기재된 어세이에서 효과적이라면, 유도체에 의해 대체될 수 있다.
- [0219] I.3. 신경돌기 성장 및 시냅스 기능성 모델에서 $A\beta_{1-42}$ 의 독성에 대한 효과
- [0220] 래트 피질 뉴런이 문헌 [Singer et al.](35)에 기재된 바와 같이 배양되었다. 요약하면, 임신 15일의 임신 암컷 래트가 자궁경부의 전위에 의해 살해되었으며(Rats Wistar), 자궁에서 태아가 제거되었다. 피질이 제거되고, 1%의 소 혈청 알부민(BSA) 및 2%의 페니실린 10,000 U/ml 및 스트렙토마이신 10mg/ml를 함유하는 Leibovitz(L15)의 아이스-콜드 배지에 놓여졌다. 피질이 37°C에서 20분 동안 트립신에 의해 해리되었다(0.05%). 상기 반응은 DNase1 grade II 및 10%의 송아지태아 혈청(FCS)을 함유하는 둘베코 변형 이글 배지(DMEM)의 첨가에 의해 중단되었다. 이어서, 세포들은 10 ml 피펫을 통해 3개의 일련 계대에 의해 기계적으로 해리되었으며, +4°C에서 10분 동안 515 x g에서 원심분리되었다. 상층액은 버려졌으며, 세포의 펠릿은 B27(2%), L-글루타민(0.2mM), 2%의 PS 용액 및 10ng/ml의 BDNF가 보충된 Neurobasal로 구성된 한정 배양배지에 재현탁되었다. 생존 세포는 트리판 블루 배제 시험을 이용하여 Neubauer 세포계산기에서 카운팅되었다. 세포들은 96 웰-플레이트에서 30 000 세포/웰의 밀도로 파종되었으며(웰은 폴리-L-리신(10 $\mu g/ml$)으로 사전코팅되었음), 가슴공기(95%)/CO2(5%) 대기에서 +37°C에서 배양되었다.
- [0221] 배양 10일 후에, 세포들은 약물과 함께 인큐베이션된다. 1시간 후에, 세포는 BDNF이 없는 한정 배지에서 그러나 약물과 함께 2.5 μM 의 베타-아밀로이드(1-42; Bachem)에 의해 중독된다. 피질 뉴런은 24시간 동안 중독된다. BDNF(10ng/ml)가 양성(신경보호) 대조군으로 사용된다. 3개의 독립 배양이 조건마다 수행되었으며, 조건마다 6개의 웰이 사용되었다.
- [0222] **신경돌기 길이 및 시냅스 정량**
- [0223] 중독된지 24시간 후에, 상층액이 제거되고, 피질 뉴런은 5분 동안 에탄올(95%) 및 아세트산(5%)의 차가운 용액에 의해 고정된다. 0.1%의 사포닌으로 투과성화된 후, 세포는 1% 송아지태아 혈청을 함유하는 PBS로 2시간 동안 블로킹된다. 그 후, 세포는 모노클로날 항체 항 미세소관-연관-단백질 2(MAP-2; Sigma)와 함께 인큐베이션되거나, 또는 시냅스를 정량하기 위하여 항 시냅토파이신(SYN, S5798, Sigma)과 함께 항 PSD95(P246, Sigma) 항체와 함께 인큐베이션된다. 이러한 항체는 뉴런의 세포체 및 신경돌기(MAP2) 또는 전 및 후 시냅스 성분들(각각, SYN 및 PSD95)을 특이적으로 염색한다.
- [0224] 이러한 항체는 Alexa Fluor 488 염소 항-마우스 IgG(Molecular probe)에 의해 나타난다. 뉴런의 핵은 형광 마

커에 의해 표지된다(Hoechst 용액, SIGMA).

[0225] 웰마다 20x 배율로 InCell Analyzer™ 1000(GE Healthcare)을 사용하여 10개의 사진이 촬영된다. 모든 사진들은 동일한 상태에서 촬영된다. 신경돌기 망의 전체 길이를 평가하기 위하여, 신경돌기 망의 분석은 Developer 소프트웨어(GE Healthcare)를 이용하여 수행된다.

[0226] **결과**

[0227] 바클로펜 및 아캄프로세이트의 조합은 도 7에서 보여진 바와 같이 일차 피질 뉴런 세포에서 인간 Aβ₁₋₄₂ 펩티드의 독성에 대해 유의적인 보호 효과를 유도한다(신경돌기 망의 80% 향상). 이러한 결과는 인간 아밀로이드 펩티드(Aβ₁₋₄₂ 2.5 μM)에 의한 중독이 조합에 의해 유의적으로 방지되는 반면, 상기 농도에서 바클로펜 또는 아캄프로세이트 단독으로는 중독에 대해 유의적인 효과를 나타내지 못한다는 점을 명백하게 보여준다.

[0228] 또한, 상기 조합으로 처리된 신경돌기 망의 총 길이는 대조군 세포와 더 이상 유의적으로 상이하지 않다. 따라서, 이러한 조합은 인간 Aβ₁₋₄₂ 펩티드의 독성에 대해 피질 뉴런 세포의 효과적인 보호 뿐만 아니라, 온전한 피질 뉴런 세포와 비슷한 신경돌기 성장을 가능하게 한다.

[0229] **II. 바클로펜-아캄프로세이트 조합 치료는 생체내에서 인간 Aβ₂₅₋₃₅의 독성을 방지한다.**

[0230] **동물**

[0231] 수컷 스위스 마우스가 본 연구에서 사용된다. 동물은 거동 실험 시간을 제외하고는 실험실 음식물과 물에 자유롭게 접근하면서 플라스틱 케이지에서 거주하고, 12시간 명/암 사이클(오전 8:00시에 불음 켜)로 규제된 환경하에 유지된다. 실험은 방음되고 공기-조절된 실험실에서 수행되며, 여기서 마우스는 각 실험으로부터 적어도 30분 전에 익숙해졌다.

[0232] **조합 치료**

[0233] 약물(들)은 매일 위관 영양법에 의해 (경구를 통해) 투여된다. β₂₅₋₃₅ 펩티드 및 스크램블된 β₂₅₋₃₅ 펩티드(대조군)가 멸균 이중류(bidistilled) 물에 용해되었으며, 사용시까지 -20℃에서 저장되었다. 그 후, β-아밀로이드 펩티드는 i.c.v.(뇌심실내: intracerebroventricularly) 투여된다. 요약하면, 각 마우스는 에테르에 의해 가볍게 마취되고, 케이지 스테인리스강 니들이 눈과 귀 사이에 같은 거리에서 두개골 면에 수직으로 각 눈으로부터 동일한 거리에 정중선 포인트의 우측 1 mm에 일방적으로 삽입된다. 펩티드 또는 담체는 약 3초 내에 점진적으로 전달된다. 마우스는 주사한 후 1분 내에 정상적인 거동을 나타낸다. 투여 부위는 예비 실험에서 Indian 잉크를 주사하여 체크된다. 니들의 삽입도, 그리고 담체의 주사도, 생존, 거동 반응 또는 인지 기능에 대해 유의적인 영향을 미치지 않았다.

[0234] **약물(들) 처치**

[0235] -1일째에, 즉 Aβ₂₅₋₃₅ 펩티드 주사하기 24시간 전에, 약물 조합 또는 담체 용액이 매일 2회(오전 8:00시에, 및 오후 6:00시에) 위관 영양법에 의해 경구 투여된다.

[0236] 0일째에(오전 10:00시에), 마우스는 Aβ₂₅₋₃₅ 펩티드 or 스크램블된 Aβ₂₅₋₃₅ 펩티드(대조군)가 최종 부피 3 μl(3 mM)로 i.c.v. 주사된다.

[0237] 0일째와 7일째 사이에, 약물, 약물 조합 또는 담체 용액이 매일 1회 2회(오전 8:00시에, 및 오후 6:00시에) 위관 영양법에 의해 경구 투여된다. 하나의 동물 그룹은 단일 주사로(오전 8:00시에) 위관 영양법에 의해 경구적으로 도네페질(참조 화합물 - 1 mg/kg/day)을 수용한다. 약물은 물에 용해되고, 각각의 위관 영양법 투여 직전에 신선하게 제조된다.

[0238] 7일째에, 모든 동물들은 Y-maze 테스트(공간적 작업 기억의 지표)에서 자발적 선택 능력에 대해 시험된다.

[0239] 7일째 및 8일째에, 동물의 맥락적 장기 기억은 스텝-다운 유형 수동적 회피 과정을 이용하여 평가된다.

[0240] 8일째에, 동물은 희생된다. 동물의 뇌가 해부되어, 추가 분석을 위해 -80℃에서 유지된다.

[0241] **조합은 중독된 동물의 거동 및 인지 능력을 증대시킨다.**

[0242] **자발적 선택 능력-Y Maze 테스트**

- [0243] 7일째에, 모든 동물들은 Y-maze(공간적 작업 기억의 지표)에서 자발적 선택 능력에 대해 시험된다. Y-maze는 회색 폴리비닐클로라이드로 구성된다. 각 암(arm)은 40cm 길이, 13cm 높이, 하부에서 3cm 너비, 상부에서 10cm 너비이고, 동일한 각도에서 수렴된다. 각 마우스는 하나의 암의 끝에 위치되고, 8분의 시간 동안 미로를 통해 자유롭게 이동하도록 놓여진다. 동일한 암으로의 가능한 복귀를 포함하는 암 진입의 계열이 시각적으로 체크된다. 선택은 연속적인 경우에 대해 3개의 모든 암으로의 진입으로서 규정된다. 따라서, 최대 선택의 수는 암 진입의 총 수 - 2이고, 선택의 백분율은 (실제 선택/ 최대 선택) x 100으로 계산된다. 매개변수에는 선택의 백분율(기억 지수) 및 암 진입의 총 수(탐사 진수)가 포함된다. 극적인 거동(선택 백분율 < 25% 또는 > 85% 또는 암 진입 수 < 10)을 보이는 동물들은 버려진다. 통상적으로, 동물들의 0-5%가 확인된다. 이 테스트는 부수적으로 Aβ₂₅₋₃₅ 주사에 의해 마우스에서 유도되는 기억상실 및 충동을 거동 수준에서 분석하는 역할을 한다.
- [0244] *수동적 회피 테스트*
- [0245] 장치는 2-구획(15 x 20 x 15 cm 높이) 박스이고, 이들 중 하나는 흰색 폴리비닐클로라이드 벽으로 조명되고, 다른 하나는 검은색 폴리비닐클로라이드 벽과 그리드 바닥으로 어둡게 되어 있다. 길로틴 문은 각 구획을 분리한다. 상기 장치에서 40cm 위에 위치한 60W 램프는 실험 동안 흰색 구획을 조명한다. 스크램블된 사지충격(3초 동안 0.3mA)은 충격 생성 스크램블러(Lafayette Instruments, Lafayette, USA)를 이용하여 그리드 바닥에 전달될 수 있다. 길로틴 문은 훈련 기간 동안 처음에는 닫혀 있다. 각 마우스는 흰색 구획으로 위치된다. 5초 후에, 문이 올라간다. 마우스가 어두운 구획에 진입하고 그리드 바닥 위에 모든 발을 놓게 되면, 문이 닫히고 사지충격이 3초 동안 전달된다. 스텝-스루 잠재성(step-through latency), 즉 어두운 구획에 진입하는데 소모되는 잠재성, 및 발성의 횟수가 기록된다. 훈련한지 24시간 후에 기억 검사(retention test)가 수행된다. 각 마우스는 흰색 구획으로 다시 놓여진다. 5초 후에 문이 올라가고, 스텝-스루 잠재성 및 탈출 잠재성, 즉 흰색 구획으로 복귀하는데 소모되는 시간이 300초까지 기록된다.
- [0246] β₂₅₋₃₅ 펩티드 icv 주사한지 7일 후에 수행된 거동 능력 및 생화학적 어세이에서 긍정적인 결과들이 관찰된다.
- [0247] 바클로펜 및 아캅프로세이트의 조합은 도 8, 9 및 10에서 보여진 바와 같이 중독된 동물의 거동 및 인지 능력에 대해 유의적인 보호 효과를 유도한다.
- [0248] 도 8에서, 단지 53.8%의 선택만을 보이면서, 중독된 마우스는 대조군에 비해 강하게 손상된 공간적 작업 기억을 나타낸다. 대조군에 비해 선택의 백분율을 48% 이상 개선시키면서, 상기 손상은 바클로펜 및 아캅프로세이트로 처치된 마우스에서 유의적으로 방지된다.
- [0249] 유사하게, 도 9 및 10에서는 중독된 동물들이 각각 탈출 잠재성 및 스텝-스루 잠재성에서 스코어에 따르면 손상된 거동 및 인지 능력을 나타낸다는 것이 확인된다. 두 개의 테스트에서, 바클로펜 및 아캅프로세이트의 조합은 손상을 유의적으로 보정할 수 있게 해준다. 상기 조합으로 처치된 마우스의 탈출 잠재성은 대조군 마우스와 더 이상 유의적으로 상이하지 않으며(도 9), 스텝-스루 잠재성(도 10)은 본 발명의 조합에 의해 유의적으로 증가되고, 약물 단독에 비해 조합의 효과는 증대되었다.
- [0250] 기억 손상은 알츠하이머병의 초기 특징이며, 상기 결과는 거동 및 인지 능력(기억 포함)에 대한 아밀로이드 펩티드의 독성 효과가 본 발명의 조합에 의해 유의적으로 방지된다는 점을 명백하게 보여준다.
- [0251] 또한, 도 16은 바클로펜(480 μg/kg/day), 아캅프로세이트(32 μg/kg/day) 및 도네페질(0.25mg/kg/day)의 극히 낮은 투여량이 조합되어 Y-maze 테스트에서 측정될 때 마우스의 거동 및 인지 능력을 완전하게 보호할 수 있다는 점을 보여준다. 도네페질은 상기 농도에서 공간적 작업 기억에 대해 유의적인 효과를 나타내지 못하는 반면(32% 보호), 바클로펜 및 아캅프로세이트 조합과 결합되어 사용되는 경우에는 중독된 마우스의 인지 능력의 완전한 보호(98%)가 가능해진다. 따라서, 본 발명의 조합은 또한 그 작용을 강화시키기 위하여 다른 치료들과 추가로 조합될 수 있다.
- [0252] **조합은 신경 질환의 신경생리학적 관심을 향상시킨다.**
- [0253] 조합 치료가 Aβ 중독증의 생체내 모델에서 테스트된다. 신경 질환에서 영향을 미치는 여러 매개변수들에 대한 그 효과가 평가된다:
- [0254] - 카스파제(caspase) 3 및 9 발현 수준, 이는 세포자멸의 지표로서 고려됨,
 - [0255] - 지질 과산화, 이는 산화적 스트레스 수준에 대한 마커로서 고려됨,
 - [0256] - GFAP 발현 어세이, 이는 뇌 염증 수준의 마커로서 고려됨,

- [0257] - Brain Blood Barrier 온전성(integrity),
- [0258] - 전반적 시냅스 온전성(시냅토파이신 ELISA),
- [0259] - CA1에서 생존 뉴런의 정량화.
- [0260] *Brain Blood Barrier 온전성*
- [0261] Aβ에 의한 동물 증독에 대한 실험 설계는 상기 III 부분에서와 같다.
- [0262] 혈액 뇌 관문(blood brain barrier: BBB) 온전성에 대한 조합 치료의 잠재적 보호 효과는 올리고머 아밀로이드-β₂₅₋₃₅ 펩티드(Aβ₂₅₋₃₅) 또는 스크램블된 Aβ₂₅₋₃₅ 대조 펩티드(Sc.Aβ)를 i.c.v.(뇌심실내) 주사한 마우스에서 주사한지 7일 후에 분석된다.
- [0263] Aβ₂₅₋₃₅ 주사한지 7일 후가 되는 날, 동물들은 EB(Evans Blue) 방법을 이용하여 BBB 온전성을 결정하기 위해 시험된다. EB 염료는 말초 주사 이후에 혈청 알부민에 결합하는 것으로 알려져 있으며, 이는 혈청 알부민에 대한 트레이서(tracer)로서 사용되어왔다.
- [0264] EB 염료(식염수 중 2%, 4 ml/kg)는 심장관통 관류 3시간 전에 복강내(i.p.) 주사된다. 그 후, 마우스는 200 μl의 전-혼합 케타민 80 mg/kg, 크실라진 10 mg/kg으로 i.p. 마취되고, 흉부가 개봉된다. 마우스는 우심방으로부터의 유체가 무색이 될 때까지 약 15분 동안 250 ml의 식염수로 심장관통 관류된다. 목을 벤 후에, 뇌가 제거되고, 3개의 부위로 해부된다: 대뇌 피질(좌 + 우), 해마 (좌 + 우), 간뇌. 그 후, 각각의 뇌 영역은 EB-알부민 유출의 정량적 측정을 위해 칭량된다.
- [0265] 시료는 포스페이트-완충된 식염수에서 균질화되고, 단백질을 침전시키기 위해 60% 트리클로로아세트산의 첨가 이후에 소용돌이에 의해 혼합된다. 시료는 4℃에서 냉각되고, 이어서 10,000 g, 4℃에서 30분 원심분리된다. 상청액은 분광광도계를 이용하여 EB의 흡광도가 610 nm에서 측정된다.
- [0266] EB는 하기의 2개로서 정량된다:
- [0267] - EB-알부민의 알려진 농도에 의해 획득된 표준 곡선의 사용에 의해, 뇌 조직 μg/mg,
- [0268] - 단백질 μg/mg.
- [0269] *전반적 시냅스 온전성(시냅토파이신 ELISA)*
- [0270] 시냅토파이신이 시냅스 온전성의 마커로서 선택되었으며, 이는 시판되는 ELISA 키트(USCN, Ref. E90425Mu)를 통해 분석된다. 시료는 해마 조직으로부터 준비되고, 제조사 및 참조 문헌에서 지시된 바와 같이 특이적인 추출 완충액에서 균질화된다.
- [0271] 조직들은 과량의 혈액을 완전하게 제거하기 위해 아이스-콜드 PBS(0.02 mol/l, pH 7.0-7.2)에서 세척되고, 질소 동결 및 -80℃ 저장 전에 칭량된다. 조직들은 작은 조각들로 절단되고, 유리 균질화기를 이용해 1ml 아이스-콜드 포스페이트 완충 식염수(PBS) 용액에서 균질화된다. 생성된 현탁액은 초음파 세포 분열기로 초음파처리되거나 2회의 동결-해동 사이클이 처리되어 세포막이 더 파괴된다. 그 후, 균질액은 5분 동안 5,000 g에서 원심분리되고, 상청액이 즉시 분석된다.
- [0272] 모든 시료들은 3회 분석된다.
- [0273] 단백질의 정량화는 추출 성능을 평가하고 정규화를 실시하기 위해 Pierce BCA(bicinchoninic acid) 단백질 어셈블리 키트(Pierce, Ref. #23227)를 이용하여 수행된다.
- [0274] 그 후, 총 단백질 농도는 표준 곡선 희석으로부터 산출되고, ELISA 결과를 정규화하는 역할을 한다.
- [0275] *CA1에서 생존 뉴런의 정량*
- [0276] 8일째에, 각각의 마우스는 케타민 80 mg/kg 및 크실라진 10 mg/kg의 전-혼합물 200 μl로 i.p. 마취되고, 100 ml의 식염수, 이어서 100 ml의 4% 파라포름알데히드로 심장관통 관류된다. 뇌가 제거되고, 4℃에서 4% 파라포름알데히드 용액 중에 24시간 동안 후-고정 상태가 유지된다.
- [0277] 후-고정 이후에, 뇌는 포스페이트 완충 식염수(PBS) 용액에서 세척되고, 이어서 소뇌가 제거되고, 전뇌가 슬라이싱을 위해 비브라툼 플레이트폼(vibratome platform)(Leica VT1000S, Leica, Wetzlar, 독일) 위에 놓여진다.
- [0278] 뇌는 비브라툼(Leica VT1000S, Leica, Wetzlar, 독일)을 이용하여 관상 부분에서 절단된다(20 μm 두께). 연속

절편들이 PBS가 있는 24-웰 플레이트상에 놓여진다. 그 후, 이는 해마 형성체를 포함하는 것이 선택되고, 9개의 절편들이 젤라틴-코팅된 유리-스트립에 놓여진다(크레실 바이올렛을 위해 동물 당 하나의 슬라이드). 모든 슬라이드는 떨어지는 것을 막기 위해 48시간 동안 실온에서 건조된다. 슬라이드는 크레실 바이올렛 염색될 때까지 실온에서 저장된다.

[0279] 절편들은 0.2% 크레실 바이올렛 시약(Sigma-Aldrich)으로 염색된 후, 그레이드 에탄올로 탈수되고, 툴루엔으로 처리되고, Mountex 배지(BDH Laboratory Supplies, Poole, Dorset, UK)에 마운팅된다.

[0280] 마운팅 후에, 슬라이드는 24시간 건조 동안 실온에서 유지된다. CA 1 영역의 조사는 광학현미경(Dialux 22, Leitz)을 이용하여 수행되고, 슬라이드는 NIHImage® v1.63 소프트웨어(NIH)와 함께 CCD 카메라(Sony XC-77CE, Sony, Paris, 프랑스)를 통해 디지털화된다. CA1 측정 및 추상 세포 카운팅은 Image®(NIH)을 이용하여 처리된다. 데이터는 각 군에 대해 밀리미터 당 CA1 추상 세포의 9개 슬라이드의 평균으로서 나타낸다(좌측 및 우측 해마 CA1 카운팅)(49).

[0281] 산화적 스트레스 어세이

[0282] 마우스는 목이 베어지고, 2개의 해마가 신속하게 제거되어 칭량되고 분석할 때까지 액체 질소에서 유지된다. 해동 후에, 해마는 냉각 메탄올(1/10 w/v)에서 균질화되고, 5분 동안 1,000 g에서 원심분리되고, 상청액은 에펜도르프(eppendorf) 튜브에 놓여진다. 각 균질액의 반응 부피가 FeSO₄ 1 mM, H₂SO₄ 0.25 M, 크실레놀 오렌지 1 mM에 첨가되고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션된다. 580nm에서의 흡광도를 판독한 후에(A580 1), 10 μl의 큐멘히드로퍼옥시드 1mM(CHP)이 시료에 첨가되고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션되어, 최대 산화 수준이 측정된다. 흡광도가 580nm에서 측정된다(A580 2). 지질 과산화의 수준은 CHPE = A580 1/A580 2 x [CHP]에 따라 CHP 당량(CHPE)으로서 측정되고, 이는 조직의 중량 당 CHP 당량으로서 나타내고 대조군 데이터의 백분율로서 나타낸다.

[0283] 카스파제 경로 유도 어세이 및 GFAP 발현 어세이

[0284] 마우스는 목이 베어지고, 2개의 해마가 신속하게 제거되고, 과량의 혈액을 완전하게 제거하기 위해 아이스-콜드 PBS(0.02 mol/l, pH 7.0-7.2)에서 세척되고, 칭량되고 분석할 때까지 액체 질소에서 유지된다. 조직들은 작은 조각들로 절단되고, 유리 균질화기를 이용해 1ml 아이스-콜드 PBS에서 균질화된다. 생성된 현탁액은 초음파 세포 분열기로 초음파처리되거나 2회의 동결-해동 사이클이 처리되어 세포막이 더 파괴된다. 그 후, 균질액은 5분 동안 5,000 g에서 원심분리되고, 상청액이 즉시 분석된다.

[0285] 실험은 시판되는 어세이로서 카스파제-3(USCN - E90626Mu), 카스파제-9(USCN - E90627Mu), GFAP(USCN - E90068)를 이용하여 수행된다.

[0286] 단백질의 정량화는 추출 성능을 평가하고 정규화를 실시하기 위해 Pierce BCA(bicinchoninic acid) 단백질 어세이 키트(Pierce, Ref. #23227)를 이용하여 수행된다.

[0287] 바클로펜 및 아캄프로세이트의 조합은 도 11, 12, 13 및 14에서 보여진 바와 같이 중독된 동물의 신경생리학적 기능에 대해 유의적인 보호 효과를 유도한다.

[0288] 비처치된 중독 동물에 비해 60% 이상의 보호를 나타내는 조합은 뉴런(도 11) 및 시냅스 밀도(도 13)의 보호에 대해 효과적이다.

[0289] 유사하게, 도 12는 바클로펜 및 아캄프로세이트의 조합이 비처치된 중독 동물에 비해 BBB 온전성을 보호한다는 점을 나타낸다(76%).

[0290] 마지막으로, 이러한 조합 치료는 비처치된 중독 동물에 비해 처치된 동물의 뇌에서 Aβ에 의해 유도되는 전반적 산화 스트레스를 감소시키는데 있어 효과적이다(도 14).

[0291] 실시예의 A 파트에서 보여진 바와 같이, 알츠하이머병 및 관련 장애들과 같은 신경퇴행성 장애를 포함하는 다수의 신경 장애들에서 손상된 여러 신경 기능들은 바클로펜-아캄프로세이트의 조합에 의해 보호되었으며 증상들이 지연되거나 감소되었다.

[0292] **B) 신경 세포에 대한 글루타메이트 독성의 방지**

[0293] 이번 추가 실험 세트에서, 후보 화합물은 신경 세포상에서 글루타메이트 독성의 효과를 방지하거나 감소시키는 능력에 대해 시험되었다. 글루타메이트 독성은 신경 질환 또는 장애, 예컨대 다발성 경화증, 알츠하이머병, 근위축성 측삭 경화증, 파킨슨병, 헌팅턴병, 신경병증, 알콜 중독증 또는 알콜 금단증, 또는 척수 손상의 발병에

관여한다. 약물은 먼저 개별적으로 테스트되고, 그 후 이들의 조합 작용의 어세이가 수행된다.

[0294] **방법**

[0295] 본 발명의 약물 조합의 효능은 일차 피질 뉴런 세포에 대해 평가된다. 이러한 어세이에서 사용되는 프로토콜은 상기 A.I.2 부분에 기재된 것과 동일하다.

[0296] *글루타메이트 독성 어세이*

[0297] 화합물의 신경보호 효과는 글루타메이트성 뉴런을 특이적으로 나타내는 신경돌기 망(신경미세섬유 면역염색(NF))의 정량화에 의해 평가된다.

[0298] 뉴런 배양 12일 후에, 후보 조합의 약물들이 배양배지(+ 0.1% DMSO)에 용해된다. 이어서, 후보 조합은 글루타메이트 손상되기 전 1시간 동안 뉴런과 함께 전-인큐베이션된다. 함께 인큐베이션되고 1시간 후에, 추가 약물 희석을 피하기 위하여 글루타메이트는 후보 조합의 존재하에 20분 동안 40 μM의 최종 농도로 첨가된다. 인큐베이션의 말기에, 배지는 글루타메이트가 없지만 후보 조합을 갖는 배지로 교환된다. 배양물은 글루타메이트 손상 24시간 후에 고정된다. MK801(Dizocilpinehydrogen maleate, 77086-22-7 - 20 μM)은 양성 대조군으로서 사용된다.

[0299] 사포닌(Sigma)으로 투과성화된 후, 세포는 10% 염소 혈청을 함유하는 PBS로 2시간 동안 블로킹되고, 이어서 세포는 신경미세섬유 항체(NF, Sigma)에 대한 마우스 모노클로날 일차 항체와 함께 인큐베이션된다. 이러한 항체는 Alexa Fluor 488 염소 항-마우스 IgG에 의해 나타난다.

[0300] 세포의 핵은 형광 마커에 의해 표지되고(Hoechst 용액, SIGMA), 신경돌기 망이 정량화된다. 조건마다 6개의 웰이 사용되어, 3개의 다른 배양에서 신경 생존이 평가된다.

[0301] **결과**

[0302] 조합 바클로펜-아캄프로세이트는 피질 신경 세포에서 글루타메이트 독성에 대해 보호 효과를 나타낸다. 도 15에서 예증된 바와 같이, 본 발명의 조합은 전술한 실험 조건하에서 글루타메이트 독성으로부터 뉴런을 강력하게 보호한다. 약물이 단독으로 사용되면 보호 효과가 더 낮게 나타나는 약물 농도를 이용하여 효과적인 보호가 획득된다는 점에 주목된다. 바클로펜 및 아캄프로세이트의 조합은 아캄프로세이트 단독에 비해 200% 이상의 개선을 가져오고, 바클로펜 단독 사용에 비해 47% 이상의 개선을 가져온다.

[0303] **C) 본 발명의 조합을 사용하여 글루타메이트 흥분독성과 연관되는 다른 장애들의 개선**

[0304] 본 발명의 약물 및 약물 조합의 글루타메이트 독성에 대한 전술한 시험관내 보호 효과는 수개의 AD 모델에서 본원에서 예증된 보호 효과와 결합되었으며, 본 발명자들은 MS, ALS 및 신경병성 통증과 같이 글루타메이트 독성이 또한 관여되는 발병에서 다른 질환들의 일부 모델에 있어서 상기 약물 및 조합을 테스트하게 되었다.

[0305] **I) 다발성 경화증의 생체내 모델에서 조합의 보호 효과**

[0306] 미엘린-올리고덴드로사이트 지질단백질-면역화된(MOG-면역화된) 마우스에서 만성 진행 EAE가 진행된 모델이 다발성 경화증 치료에서 본 발명의 조성물의 이로운 효과를 입증하기 위하여 사용된다.

[0307] **동물 및 화학물질**

[0308] C57L/6J 암컷 마우스(8주령)가 Janvier(프랑스)에서 구입되고; 2주의 습관화 이후에, 암컷 마우스(10주령)는 MOG(미엘린 올리고덴드로사이트 지질단백질) 펩티드에 의한 면역화 이후에 만성 마비가 진행된다. 실험적 뇌척수염은 EAE Induction(EK-0110, EK-0115; Hooke laboratories)에 대해 Hooke Kit MOG₃₅₋₅₅/CFA Emulsion PTX(Pertussis toxin)로 유도된다. 대조 키트는 CK-0115(Hooke laboratories)이다.

[0309] **실험 과정**

[0310] 실험적 뇌척수염은 하기 과정에 의해 유도된다:

[0311] 0일제에, 각각 0.1 ml의 피하 주사 2개가 수행되고, 여기는 1개는 마우스의 등 상부에 대해, 다른 1개는 마우스의 등의 더 하부에 대해 수행된다. 각각의 주사는 100 μg의 MOG₃₅₋₅₅ 펩티드(MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK), 200 μg의 불활성화된 결핵균 H37Ra를 함유하고, 완전 프로인트 아췌반트(CFA)(Hooke laboratories)에서 에멀전화된다. 에멀전은 MOG-특이적 자가면역 T 세포를 증식 및 분화시키는데 필요한 항원을 제공한다.

[0312] PBS 중 500ng의 백일해 독소(Pertussis toxin)의 2개의 복강내 주사(Hooke kit)가 MOG 주사로부터 2시간 후(0일째) 및 24시간 후(1일째)에 수행된다. 백일해 독소는 부가적 아췌반트를 제공함으로써 EAE 진행을 증대시킨다.

[0313] 마우스는 면역화로부터 8일 후에 EAE를 진행시키며, 실험 기간 동안 만성적으로 마비된 상태로 놓인다. 면역화 이후에, 마우스는 블라인드 과정에서 임상적 증상이 매일 관찰된다. 동물들은 통상의 무균 설비에서 유지되며, 모든 실험들은 [standing local committee of bioethics]에서 처방되고 승인된 가이드라인에 따라 수행된다.

[0314] **실험군 및 약물 처치**

[0315] 전술한 암컷 마우스 군은 면역화 이전에 중량 균질화된다.

[0316] - 대조군: EAE 마우스의 동일한 조건에서 담체 주사(제-1일째부터 28일째까지, 플라시보가 매일 제공됨).

[0317] - EAE 군: MOG 주사(0일째) + 백일해 독소 주사(0일째 및 1일째) - 제-1일째부터 28일째까지, 플라시보가 매일 경구 제공됨.

[0318] - EAE + 양성 대조군: MOG 주사(0일째) + 백일해 독소 주사(0일째 및 1일째) - 제-1일째부터 28일째까지, 텍사메타존이 매일 경구 제공됨.

[0319] - EAE + 처치군: MOG 주사(0일째) + 백일해 독소 주사(0일째 및 1일째). 치료는 면역화 1일 전에 시작되고 28일째까지 지속된다.

[0320] 임상 스코어는 0-5-8-9-12-14-16-19-21-23-26-28일째에 측정된다.

[0321] 통계 소프트웨어(Statsoft Inc.)가 통계 분석을 위해 계속 사용된다. ANOVA 분석 및 Student's t 테스트는 임상 질환 스코어를 분석하기 위해 이용된다. $P < 0.05$ 는 유의적인 것으로 고려된다.

[0322] 발병의 지체, 임상 스코어 및 사망의 지체는 Cox 모델(R 패키지 "survival") 및 Kaplan-Meier 커브를 갖는 참조 "immu" 군에 대한 각각의 군 사이에서 비교되었다. 산출된 p -값은 단일적(unilateral)이고, 참조 "immu" 군에 비해 더 낮다는 가설을 테스트한다.

[0323] 총 임상 스코어는 하기에 기재된 꼬리 스코어(tail score), 뒷다리 스코어(hind limb score), 앞다리 스코어(fore limb score) 및 방광 스코어(bladder score)로 구성된다:

[0324] 꼬리 스코어:

스코어=0	정상적인 마우스는 움직일 때 그의 꼬리를 세운 상태로 유지한다.
스코어=1	꼬리의 끝이 떨어지려는 경향을 보이면서 들어진 경우.
스코어=2	꼬리가 완전히 들어져 테이블에 질질 끄는 경우.

[0325]

[0326] 뒷다리 스코어:

스코어=0	정상적인 마우스는 힘찬 걸음을 하며, 발을 끌지 않는다.
스코어=1	하기의 테스트 중 하나가 양성인 경우: A - 플립(flip) 테스트: 엄지와 검지 사이로 꼬리를 움켜쥐면서, 마우스의 등을 칠 경우, 마우스가 몸을 바로잡는 시간을 관찰할 것. 건강한 마우스는 즉시 몸을 돌릴 것이다. 지체되는 것은 뒷다리의 약화를 시사한다. B - 마우스를 와이어 케이지의 상단에 올려놓고, 한쪽에서 다른쪽으로 건너갈 때 관찰할 것. 한개 또는 두개의 다리가 막대 사이에서 자주 미끄러진다면, 부분적 마비가 있는 것으로 여겨진다.
스코어=2	앞선 2개의 테스트가 양성인 경우.
스코어=3	한개 또는 두개의 뒷다리가 마비의 징후를 보이지만, 일부 움직임은 보존되는 경우. 예를 들어, 마우스는 놓아주기 전에 짧은 순간 동안 와이어 케이지의 상단 아랫면을 움켜잡고 유지할 수 있다.
스코어=4	두개의 뒷다리가 마비되고, 마우스가 움직일 때 두개의 뒷다리를 끄는 경우.

[0327]

[0328] 앞다리 스코어:

스코어=0	정상적인 마우스는 움켜쥐고 걷는 동안 활발하게 앞발을 사용하며, 머리를 세운 상태로 유지한다.
스코어=1	걷는 것이 가능하지만, 한개 또는 두개의 발의 취약성 때문에 어려워함. 예를 들어, 마우스가 와이어 케이지의 상단 아랫면을 움켜잡는데 어려워하는 경우 앞발이 취약한 것으로 여겨짐. 취약성의 다른 징후는 머리를 떨구는 것이다.
스코어=2	한개의 앞다리가 마비된 경우(움켜쥘 수 없고, 마우스는 마비된 다리 주위로 돈다). 이 경우, 머리는 또한 근긴장의 상당수를 상실함.
스코어=3	마우스는 움직일 수 없고, 음식과 물에 도달할 수 없음.

[0329]

[0330] 방광 스코어:

스코어=0	정상적인 마우스는 방광을 완전히 제어한다.
스코어=1	마우스의 하반신이 소변으로 젖어 있는 경우, 마우스는 실금으로 여겨짐.

[0331]

[0332] 동물 각각에 대한 전체 스코어는 전술한 모든 카테고리를 더하여 결정된다. 살아있는 동물에 대해 최대 스코어는 10이다.

[0333] **결과 - 조합 치료는 MS 모델에서 효과적이다.**

[0334] 전체 임상 스코어의 유의적인 개선이 바클로펜 및 아캄프로세이트 조합에 대해 "EAE + 처치군" 마우스에서 관찰된다.

[0335] 바클로펜(30 mg/kg/day) 및 아캄프로세이트(2 mg/kg/day)의 조합은 만성 진행 EAE의 발달에 대해 유의적인 보호 효과를 가져왔으며, 이에 따라 다발성 경화증 치료에서 조성물의 이로운 효과가 확인되었다(도 18). 증상의 30% 이상의 감소를 보이는 이러한 결과들은 조합이 13일째부터 질환 발달의 유의적인 감소를 가져온다는 점을 명백하게 보여준다. 상기 결과는 바클로펜-아캄프로세이트 조합에 의해 탈수초화(demyelination) 및 이의 결과를 포함하는 신경 보호에 대해 뛰어난 긍정적인 효과가 얻어진다는 점을 보여준다.

[0336] 이러한 결과들을 함께 고려할 때, 상기 조합은 β 아밀로이드, BBB 파괴, 글루타메이트 흥분독성 또는 탈수초화와 같은 신경 질환의 발달에 수반되는 다수의 스트레스에 대해 뉴런을 효과적으로 보호할 수 있다는 점이 확인된다.

[0337] **II. ALS 모델에서 조합의 보호 효과**

[0338] ALS에 대한 본 발명에 따른 조합 치료의 효과는 시험관내 공배양 모델에서 입증되었으며, 생체내 ALS 마우스 모델에서 시험된다. 프로토콜과 결과는 여기에 기재된다.

[0339] **II.1 신경-근육 공-배양의 일차 배양에서 글루타메이트 독성에 대한 보호 효과**

[0340] **신경 및 근육 세포의 일차 공배양**

[0341] 인간 근육은 건강한 환자의 생검 부분에서 이미 기재되어 있는 방법에 따라 준비된다(48). 근육 세포는 분리된 세포들로부터 구축되고(웰 당 10000 세포), 48 웰 플레이트상에 젤라틴-코팅된 0.1%로 놓여지고, MEM 배지 및 M199 배지의 혼합으로 구성된 증식 배지에서 성장된다.

[0342] 위성 세포 융합 이후에 즉시, 후근 신경절(DRG)이 부착된 13일령 래트 Wistar 배아 척수의 전체 횡단 슬라이스가 웰 당 근육 단층 1 절편체(explant)상에 위치된다(중심 부위에). DRG는 신경분포(innervation) 비율을 우수하게 얻기 위해 필요하다. 신경분포된 배양이 혼합 배지에서 유지된다. 통상의 공배양에서 24시간 후에, 신경염이 척수 절편체가 없어지면서 관찰된다. 이는 근관(myotube)과 접촉하게 되고, 8일 후에 첫번째 수축을 유도한다. 그 후 신속하게, 척수 절편체에 근접하여 위치한 신경분포된 근육 섬유는 사실상 계속적으로 수축하고 있다. 신경분포된 섬유는 비-신경분포된 섬유로부터 형태학적으로 그리고 공간적으로 구별되며, 용이하게 구분될 수 있다.

[0343] 하나의 공배양이 수행된다(조건 당 6개의 웰).

[0344] **글루타메이트 손상**

[0345] 27일째에, 공-배양물은 20분 동안 글루타메이트 중독(60 μ M) 1시간 전에 후보 화합물 또는 릴루졸과 함께 인큐

배이션된다. 이어서, 공-배양물은 세척되고, 후보 화합물 또는 킬루졸이 추가 48시간 동안 첨가된다. 이러한 인큐베이션 시간 후에, 고정되지 않은 공배양물은 실온에서 15분 동안 500 nmol/L의 농도로 Alexa 488과 결합된 α-분자로독소와 함께 인큐베이션된다. 이어서, 공배양물은 실온에서 20분 동안 PFA에 의해 고정된다. 0.1%의 사포닌으로 투과성화된 후, 공배양물은 항-신경미세섬유 항체(NF)와 함께 인큐베이션된다.

[0346] 이 항체는 Alexa Fluor 568 염소 항-마우스 IgG(Molecular probe)로 검출된다. 뉴런의 핵은 형광 마커(Hoechst 용액)로 표지된다.

[0347] 종말점은 (1) 전체 신경돌기 길이, (2) 운동 단위의 수, (3) 전체 운동 단위 면적이며, 이들은 운동뉴런 생존 및 기능의 지표이다.

[0348] 각 조건에 대해, 20x 배율로 InCell Analyzer™ 1000(GE Healthcare)을 사용하여 웰마다 2 x 10개의 사진이 촬영된다. 모든 이미지들은 동일한 조건에서 촬영된다.

[0349] **결과**

[0350] 바클로펜 및 아캄프로세이트 조합은 공배양 모델에서 운동뉴런 및 운동 단위를 효과적으로 보호한다.

[0351] II.2 - 조합 치료는 ALS 마우스 모델에서 효과적이다.

[0352] 실험은 수컷 마우스에 대해 수행된다. 형질전환 수컷 마우스 B6SJL-Tg(SOD1)^{2Gur}/J 마우스 및 이의 대조군(각각, SN2726 및 SN2297, 미국의 [Jackson Laboratories, Ben Harbor] 및 프랑스의 [Charles River]에서 판매됨)이 모의(mimic) ALS에 대한 이 실험 세트에서 선택된다.

[0353] 병든 마우스는 내인성 인간 SOD1 프로모터에 의해 유발된 돌연변이 인간 SOD1 유전자(코돈 93에서 글리신이 알라닌으로 단일 아미노산의 치환)에 의해 설계된 SOD1-G93A 이식유전자를 발현한다. 대조 마우스는 대조 인간 SOD1 유전자를 발현한다.

[0354] **동물의 랜덤화**

[0355] 동물의 그룹 지정 및 랜덤화는 체중에 기초하며; 각 군에 대해, 랜덤화는 첫번째 처치 하루 전에 수행된다.

[0356] **약물 투여**

[0357] 마우스는 출생 후 60일째부터 사망시까지 담체 내 희석된 후보 약물 투여가 처치된다. 약물 후보의 희석된 용액은 투여 시작 직전에 실온에서 물에 의해 제조된다.

[0358] * 식용수에서:

[0359] 킬루졸이 5% 시클로텍스트린 중 최종 농도 6mg/ml(각 군의 평균 체중에 조정됨)로 식용수에 첨가된다. 마우스가 약 5 ml/day로 마실 때, 추산되는 투여되는 양은 30mg/kg/day이고, 이는 마우스의 생존을 증가시키는 것으로 나타난 투여량이다.

[0360] - 시클로텍스트린은 저장액(시클로텍스트린 20%)으로부터 실온에서 물에 희석된 최종 농도 5%에서 담체로서 사용된다.

[0361] * 경구 투여(구강을 포함):

[0362] - 약물 조합은 매일 경구 투여된다.

[0363] - 시클로텍스트린은 저장액(시클로텍스트린 20%)으로부터 실온에서 물에 희석된 최종 농도 5%에서 담체로서 사용된다.

[0364] **임상적 관찰**

[0365] 각 마우스의 임상적 관찰이 처치 제1일째(60일령)부터 사망시까지(또는 희생될 때까지) 매일 수행된다. 임상적 관찰은 거동 테스트: 마비의 시작, "스플레이(splay)의 상실", "정위반사(righting reflex)의 상실" 및 일반적인 걸음걸이 관찰을 연구하는 것으로 구성된다:

[0366] - 마비의 시작: 관찰은 각각의 다리에 대한 마비 관찰로 구성된다. 마비의 시작은 마비의 첫번째 징후가 나타난 날에 상응한다.

[0367] - 스플레이 상실 테스트는 마우스가 꼬리를 매달릴 때 뒷다리의 위치(다리가 늘어뜨려짐 또는 다리를 벌림) 및

떨림 또는 흔들림의 표시로 구성된다.

[0368] - 정위반사 상실 테스트는 양측을 공격받는 30초 내에 몸을 바로잡는 마우스의 능력을 평가한다. 마우스가 몸을 바로잡을 수 없는 경우, 정위반사는 상실된다. 정위반사의 상실은 질환의 말기를 결정한다: 몸을 바로잡을 수 없는 마우스는 안락사된다.

[0369] **결과 - 조합 치료는 ALS 생체내 모델에서 효과적이다.**

[0370] 바클로펜 및 아캄프로세이트 조합으로 처리된 병든 동물에게서 질환의 개선이 관찰된다.

[0371] **III) 신경병성 통증에 대한 생체내 모델로서 옥살리플라틴 유도된 신경병증에서 조합이 나타내는 보호 효과**

[0372] 본 발명의 조합 치료는 말초 신경병증의 적절한 모델, 즉 옥살리플라틴-유도된 신경병증의 급성 모델 및 옥살리플라틴-유도된 신경병증의 만성 모델에서 생체내 테스트된다. 동물, 프로토콜 및 결과는 여기에 기재된다.

[0373] **동물 양육**

[0374] 옥살리플라틴 처리 실험을 시작할 때(D₀)에 150-175 g으로 칭량된 Sprague-Dawley 래트(CERJ, 프랑스)가 사용된다. 동물들은 12시간-명/암 사이클을 갖고 온도(19.5°C-24.5°C) 및 상대습도(45%-65%)가 조절된 방에서 접근 제한된 동물 설비에서 거주하고, 연구 내내 표준 펠릿화된 실험실 음식과 물에 자유롭게 접근한다. 동물들은 케이지마다 4마리 또는 5마리가 거주하고, 일주일의 적응 기간이 임의의 테스트 이전에 확인된다.

[0375] **실험 설계**

[0376] 래트의 하기 4개 군이 모든 실험에서 사용된다:

[0377] 대조군:

[0378] 제1군: 옥살리플라틴의 담체(증류수), i.p. / 후보 조합(들)의 담체(증류수), p.o. 매일.

[0379] 제2군: 옥살리플라틴(증류수), i.p. / 후보 조합(들)의 담체(증류수), p.o. 매일.

[0380] 제3군: 옥살리플라틴 3 mg/kg i.p. / 증류수 중 단일 약물, p.o. 매일 x 9.

[0381] 시험 조성물 군:

[0382] 제4군: 옥살리플라틴 3 mg/kg i.p. / 증류수 중 후보 조합(들), p.o. 매일 x 9.

[0383] 제5군: 옥살리플라틴 3 mg/kg i.p. / 증류수 중 가바펜틴(100 mg/kg), p.o. 시험일(즉, D₁ 및 D₈);

[0384] 담체 및 시험 물질은 D-1부터 D7(마지막 시험일 전날)까지 매일 전달되는 반면, 가바펜틴은 시험일에 투여된다(시험 120분 전).

[0385] 모든 처리는 가능한 때에 코드된 임의의 순서로 투여된다. 투여량은 자유 활성 물질의 측면에서 표현된다.

[0386] **신경병증 유도**

[0387] 급성 신경병증은 옥살리플라틴(3 mg/kg)의 단일 복강내 주사에 의해 유도된다.

[0388] 만성 말초 신경병증은 0, 2, 4 및 7일에 옥살리플라틴(3 mg/kg, i.p.)의 반복적인 복강내 주사에 의해 유도된다(CD = 12 mg/kg, i.p.). 인간에게서 만성 신경병증은 또한 누적되고, 래트에서 누적 투여량으로서 ~15 mg/kg에 상응하는 540 mg/m² 이상의 옥살리플라틴의 총 투여량이 제공된 환자에게서 가장 흔하게 나타난다(Cersosimo R.J. 2005).

[0389] 래트에서 옥살리플라틴-유도된 통증 신경병증은 옥살리플라틴-처리된 환자에게서 통증 증상을 재현한다:

[0390] - 열 통각 과민증은 가장 초기의 증상이다. 이는 아세톤 테스트로 측정되거나, 또는 꼬리-침지 테스트로 측정될 수 있다;

[0391] - 기계적 통각 과민증은 더 나중에 나타난다. 이는 Von Frey 테스트로 정량화되거나, 또는 발 압력 테스트로 정량화될 수 있다.

[0392] **동물 투여 및 테스트**

[0393] 모든 약물 조합들은 옥살리플라틴 3 mg/kg의 첫번째 복강내 주사 전날(D-1)부터 투여되고, D7까지 매일 경구적

으로 투여된다. 시험일(즉, D1 및 D7) 동안, 약물 조합들은 시험 이후에 투여된다. 참조-처치된 군(가바펜틴)의 동물은 시험일 동안만 투여된다.

[0394] **아세톤 테스트**

[0395] 냉각 이질통증(allodynia)은 D1(옥살리플라틴 3 mg/kg의 첫번째 주사로부터 약 24시간 후, 옥살리플라틴의 급성 효과) 및 D8(옥살리플라틴의 만성 효과)에 열적 비-통각(non-nociceptive) 자극에 대한 반응을 측정함으로써 아세톤 테스트를 사용하여 평가된다.

[0396] 아세톤 테스트에서, 뒷발 철회의 잠재성은 양쪽 뒷발의 발바닥 표면에 아세톤을 적하 적용시킨 후에 측정되고(반응시간), 반응의 세기가 스코어링된다(콜드 스코어). 아세톤의 냉각 효과에 대한 반응시간은 아세톤 적용 후 20초 내에 측정된다(컷오프: cut-off). 아세톤에 대한 반응은 또한 다음과 같은 4-포인트 등급으로 나뉘어진다: 0(무반응); 1(발을 빠르게 철회, 텅김); 2(발을 지속적으로 철회 또는 뚜렷하게 텅김); 3(훅거나 물면서 발을 반복적으로 텅김).

[0397] 각 실험군에 대해, 결과는 하기와 같이 나타내어진다:

[0398] - 반응시간은 발 반응을 이끌어내는데 필요한 시간(sec로 나타냄)으로서 규정됨(각 래트에 대한 6회 측정의 평균 \pm SEM).

[0399] - 누적 콜드 스코어는 각 래트에 대한 6개의 스코어의 합 \pm SEM으로서 규정됨. 최소 스코어는 0이고(6번의 시험 어느 것에도 반응이 없음), 최대 가능한 스코어는 18임(6번의 시험 각각에 대해 발을 반복적으로 텅기고 훅거나 깨물음).

[0400] **통계학적 분석**

[0401] Student 테스트, 단독, 유형 3이 수행된다. 유의도 수준은 $p < 0.05$ 로 설정되고; 모든 군들은 질환 + 담체 군(옥살리플라틴 처치 군)과 비교된다. 평균 및 표준오차 평균은 도면에 보여진다.

[0402] **결과**

[0403] 옥살리플라틴은 시간 과정 동안 아세톤 적용 후에 발을 철회하는 반응시간의 유의적인 감소를 유도하였다(질환 군 + 담체). 이러한 감소는 담체 군과 비교할 때 제1일(옥살리플라틴-유도된 신경병증의 급성 모델)부터 제8일(만성 모델)까지 점진적이고 유의적이다.

[0404] *** 옥살리플라틴-유도된 신경병증의 급성 모델 및 만성 모델에서 항-이질통증 효과**

[0405] 바클로펜 및 아캄프로세이트 조합은 옥살리플라틴-유도된 신경병증의 두 개 모델에서 시험된다. 이는 옥살리플라틴-담체 처치 군과 비교시에 반응시간의 유의적인 증가 및 누적 콜드 스코어의 유의적인 감소를 유도한다. 결과적으로, 이러한 약물 조합은 만성 및 급성 신경병증으로부터 보호한다.

[0406]

참조문헌

1. Crook R. *et al.* (1998). A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1. *Nat Med.* 4(4): 452-5.
2. Houlden H., Baker M., *et al.* (2000). Variant Alzheimer's disease with spastic paraparesis and cotton wool plaques is caused by PS-1 mutations that lead to exceptionally high amyloid-beta concentrations. *Ann Neurol.* 48(5): 806-8.
3. Kwok J.B., Taddei K., *et al.* (1997). Two novel presenilin-1 mutations in early-onset Alzheimer's disease pedigrees and preliminary evidence for association of presenilin-1 mutations with a novel phenotype. *Neuroreport.* 8(6): 1537-42.
4. Verkkoniemi A., Kalimo H., *et al.* (2001). Variant Alzheimer disease with spastic paraparesis: neuropathological phenotype. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60(5): 483-92.
5. Citron M. (2004). Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 5(9): 677-85.
6. Suh Y.H. and Checler F. (2002). Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev.* 54(3): 469-525.
7. Blacker D., Albert M.S., *et al.* (1994). Reliability and validity of NINCDS-ADRDA criteria for Alzheimer's disease. The National Institute of Mental Health Genetics Initiative. *Arch Neurol.* 51(12): 1198-204.
8. Rossor M.N., Fox N.C., *et al.* (1996). Clinical features of sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurodegeneration.* 5(4): 393-7.
9. Glenner G.G., Wong C.W., *et al.* (1984). The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol.* 2(6): 357-69.
10. Ballatore C., Lee V.M., *et al.* (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci.* 8(9): 663-72.

[0407]

11. Bell K.F. and Claudio Cuello A. (2006). Altered synaptic function in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 545(1): 11-21.
12. Hardy J.A. and Higgins G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 256(5054): 184-5.
13. Braak H. and Braak E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82(4): 239-59.
14. Golde T.E. (2005). The Abeta hypothesis: leading us to rationally-designed therapeutic strategies for the treatment or prevention of Alzheimer disease. *Brain Pathol.* 15(1): 84-7.
15. Hardy J. and Selkoe D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 297(5580): 353-6.
16. Selkoe D.J. (2000). The genetics and molecular pathology of Alzheimer's disease: roles of amyloid and the presenilins. *Neurol Clin.* 18(4): 903-22.
17. Zlokovic B. V., The Blood Brain Barrier In Health And Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron review.* 2008, 57, 178-201.
18. Budd Haeberlein, S.L. and S.A. Lipton, *Excitotoxicity in neurodegenerative disease*, in *Encyclopedia of neuroscience*, L.R. Squire, Editor. 2009, Elsevier. p. 77-86.
19. Hughes, J.R., *Alcohol withdrawal seizures*. *Epilepsy Behav*, 2009. **15**(2): p. 92-7.
20. Kim, A.H., G.A. Kerchner, and C. DW, *Blocking Excitotoxicity*, in *CNS Neuroprotection*, F.W. Marcoux and D.W. Choi, Editors. 2002, Springer: New York. p. 3-36.
21. Hama A, Sagen J., Antinociceptive effect of riluzole in rats with neuropathic spinal cord injury pain. *J Neurotrauma.* 2011 Jan;28(1):127-34.

[0408]

23. Malgouris, C., et al., *Riluzole, a novel antiglutamate, prevents memory loss and hippocampal neuronal damage in ischemic gerbils*. *J Neurosci*, 1989. **9**(11): p. 3720-7.
24. Wahl, F., et al., *Effect of riluzole on focal cerebral ischemia in rats*. *Eur J Pharmacol*, 1993. **230**(2): p. 209-14.
25. Wahl, F., et al., *Riluzole reduces brain lesions and improves neurological function in rats after a traumatic brain injury*. *Brain Res*, 1997. **756**(1-2): p. 247-55.
26. McGleenon B.M., Dynan K.B. and Passmore A.P. (1999). Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Br J Clin Pharmacol*. 48(4): 471-480.
27. Parsons C.G., Danysz W, Quack G. (1999). Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data. *Neuropharmacology*. 38(6):735-67.
28. Magnaghi V, et al. GABA receptor-mediated effects in the peripheral nervous system: a cross-interaction with neuroactive steroids. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2006, 28:89-102.
29. Ettmayer, P., Amidon, G. L., Clement, B. & Testa, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J. Med. Chem.* 47, 2393-2404 (2004).
30. Beaumont, K., Webster, R., Gardner, I. & Dack, K. Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: challenges to the discovery scientist. *Curr. Drug Metab.* 4, 461-485 (2003).
31. Heimbach, T. et al. Enzyme-mediated precipitation of parent drugs from their phosphate prodrugs. *Int. J. Pharm.* 261, 81-92 (2003).
32. Yang, C. Y., Dantzig, A. H. & Pidgeon, C. Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharm. Res.* 16, 1331-1343 (1999).
33. Steffansen, B. et al. Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 3-16 (2004).
34. Stella, V. et al. *Prodrugs: Challenges and Rewards* (AAPS, New York, 2007).

[0409]

35. Wermuth, CG. *The Practice of Medicinal Chemistry*. (Hardbound, 2003). Part VI, Chap 33: Designing prodrugs and bioprecursors.
36. Pezron, I. *et al.* Prodrug strategies in nasal drug delivery. *Expert Opin. Ther. Pat.*, Vol. 12, No. 3, 331-340 (2002).
37. Stella, V. J. Prodrugs as therapeutics. *Expert Opin. Ther. Pat.* 14, 277-280 (2004).
38. Stella, V. J. & Nti-Addae, K. W. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 677-694 (2007).
39. Higuchi, T.; Stella, V. eds. *Prodrugs As Novel Drug Delivery Systems. ACS Symposium Series*. American Chemical Society: Washington, DC (1975). 31.
40. Roche, E. B. *Design of Biopharmaceutical Properties through Prodrugs and Analogs. American Pharmaceutical Association: Washington, DC (1977).*
41. Lal, R., et al., Arbaclofen placarbil, a novel R-baclofen prodrug: improved absorption, distribution, metabolism, and elimination properties compared with R-baclofen. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009. 330(3): p. 911-21.
42. Feng Xu, Ge Peng, Thu Phan, Usha Dilip, Jian Lu Chen, Tania Chernov-Rogan, Xuexiang Zhang, Kent Grindstaff, Thamil Annamalai, Kerry Koller, Mark A. Gallop, David J. Wustrow, *Discovery of a novel potent GABAB receptor agonist*, *Bioorg Med Chem Lett*. 2011 Nov 1;21(21):6582-5.)
43. Andrew R. Leach, Valerie J. Gillet. *An Introduction to Chemoinformatics*. Springer 2007.
44. S. Asad Rahman, M. Bashton, G. L. Holliday, R. Schrader and J. M. Thornton: Small Molecule Subgraph Detector (SMSD) Toolkit, *Journal of Cheminformatics* 2009, 1:12 doi:10.1186/1758-2946-1-12
45. Stahl H., Wermuth C. G. (Eds.) *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*. Wiley-VCH; 2 edition (March 29, 2011).

[0410]

46. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Cheng D, Shrivastava S, Tzur D, Gautam B, Hassanali M. *DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets*. Nucleic Acids Res. 36, Issuesuppl 1. D901-D906 (2008).

47. Singer C. *et al.* Mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J. Neuroscience*, 1999, 19(7):2455-2463.

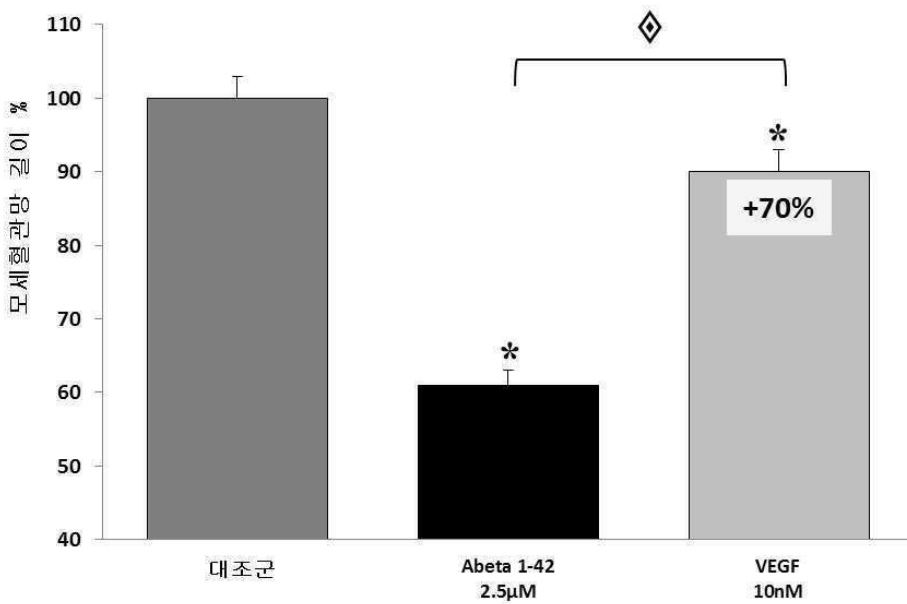
48. Braun S, Croizat B, Lagrange MC, Wartera JM, Poindron P. *Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord-human muscle cocultures*. Volume 136, Issues 1-2, March 1996, Pages 17-23.

49. Meunier J, Ieni J, Maurice T. *The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid ~25-35 peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the G_i receptor*. Br J Pharm 140I. 149, 998-1012, 2006

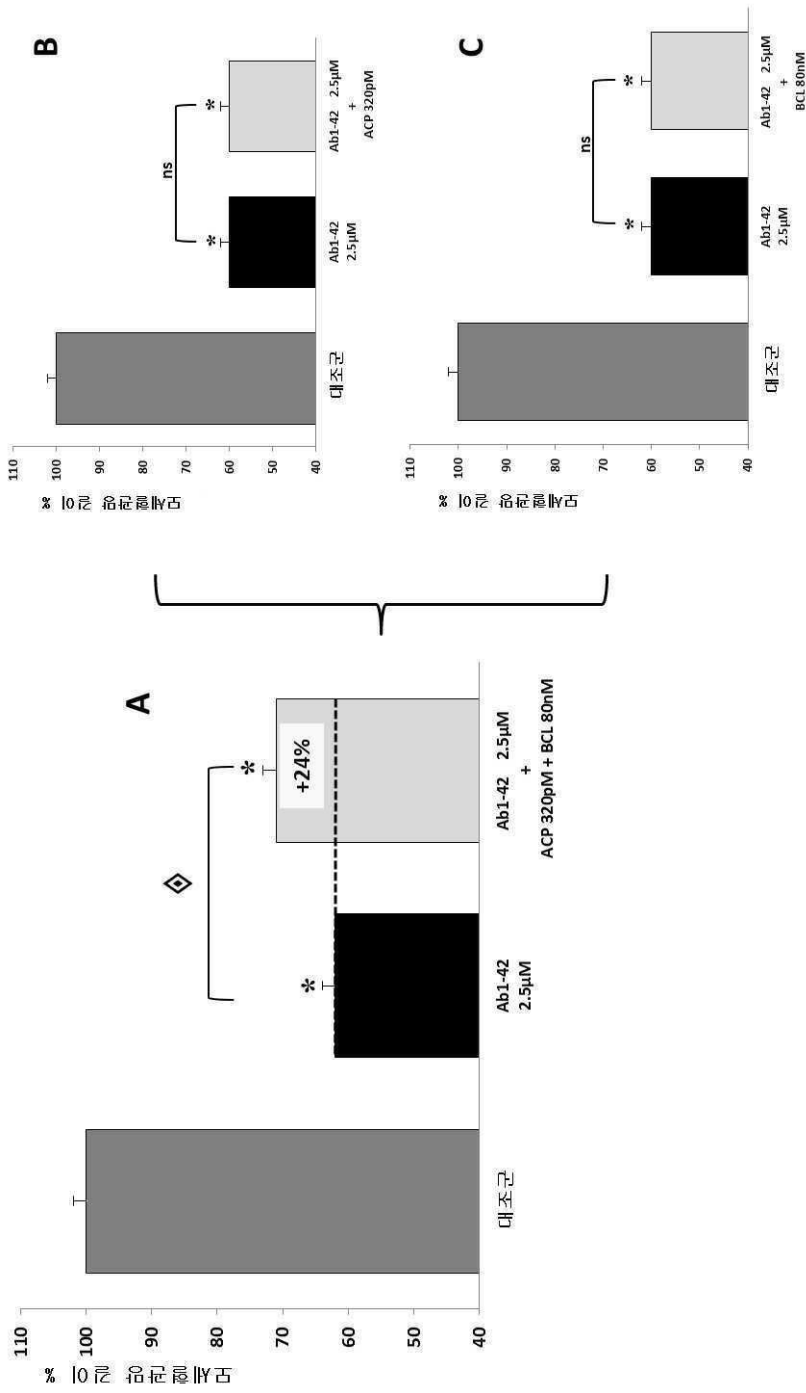
[0411]

도면

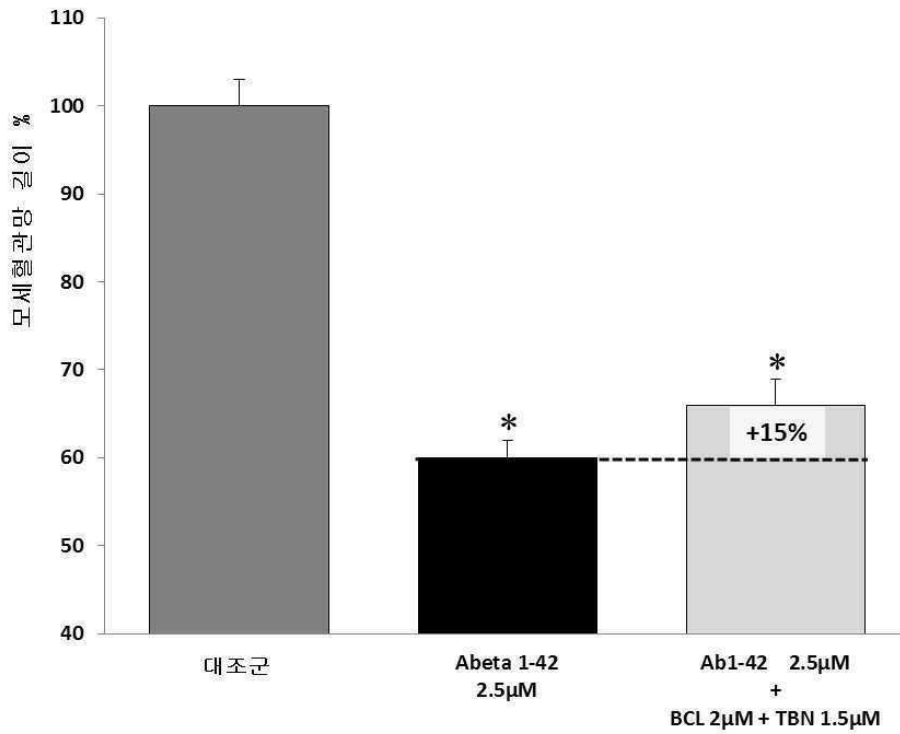
도면1



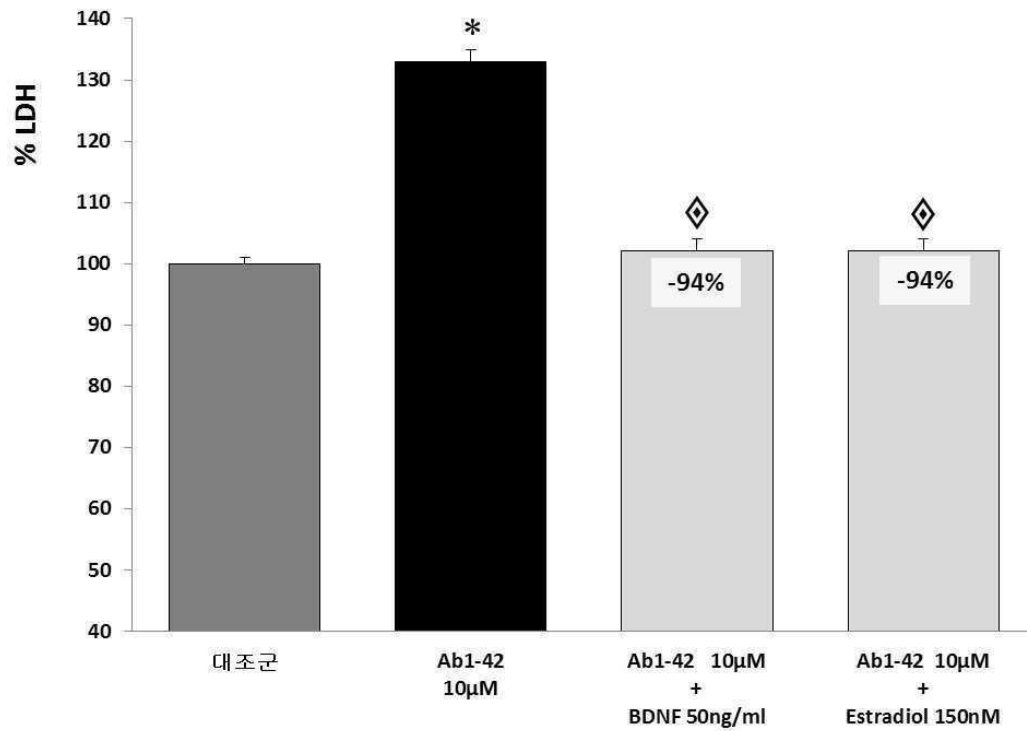
도면2



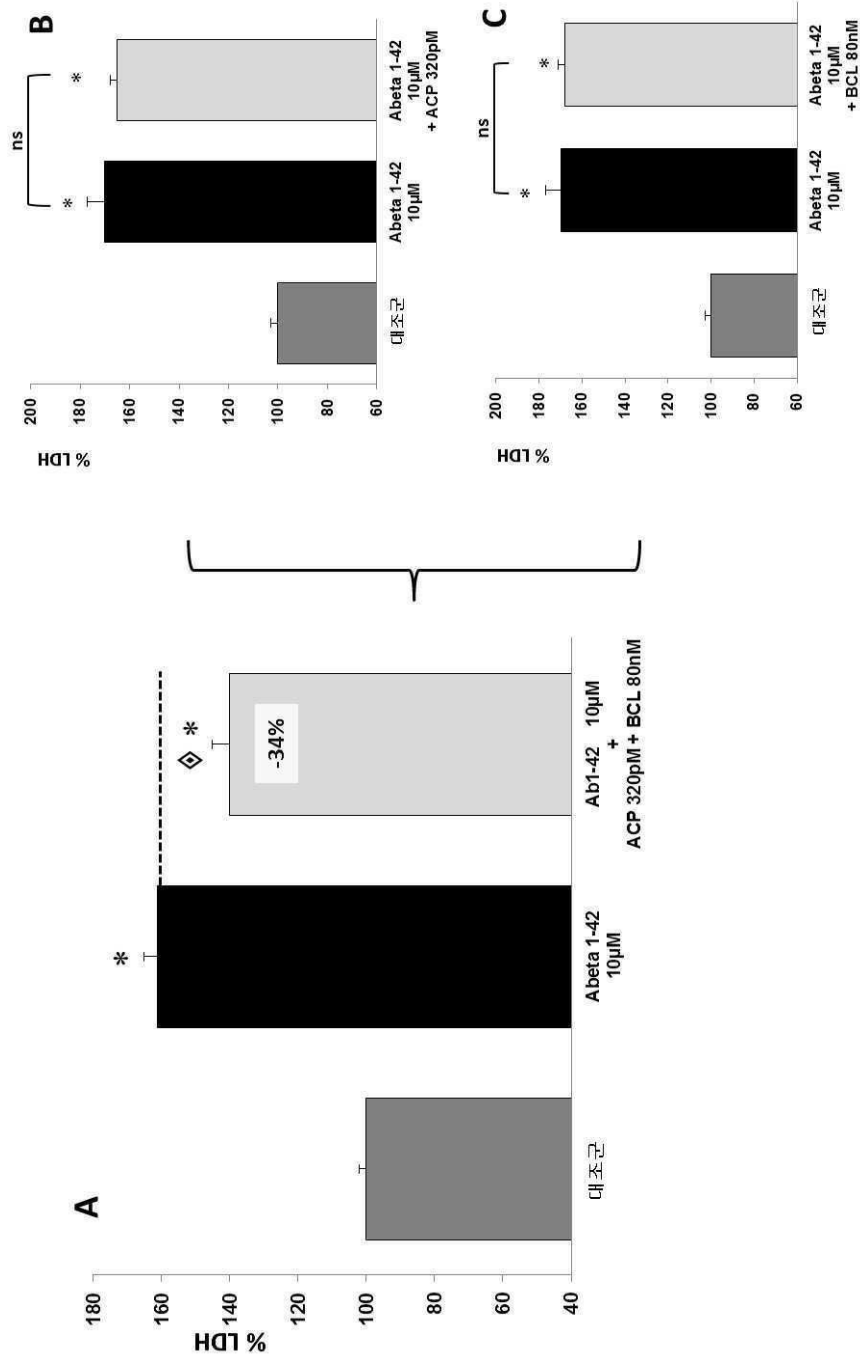
도면3



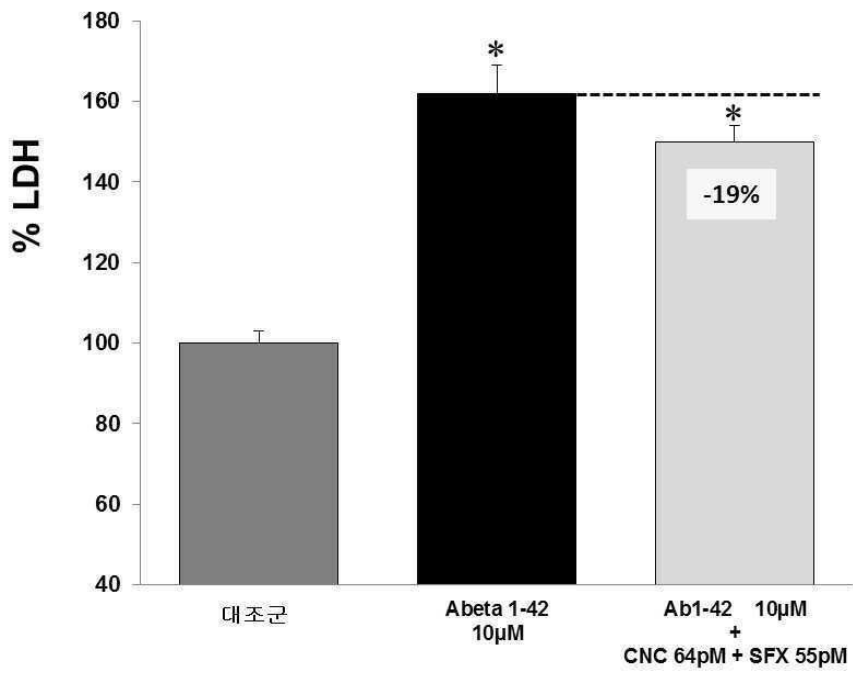
도면4



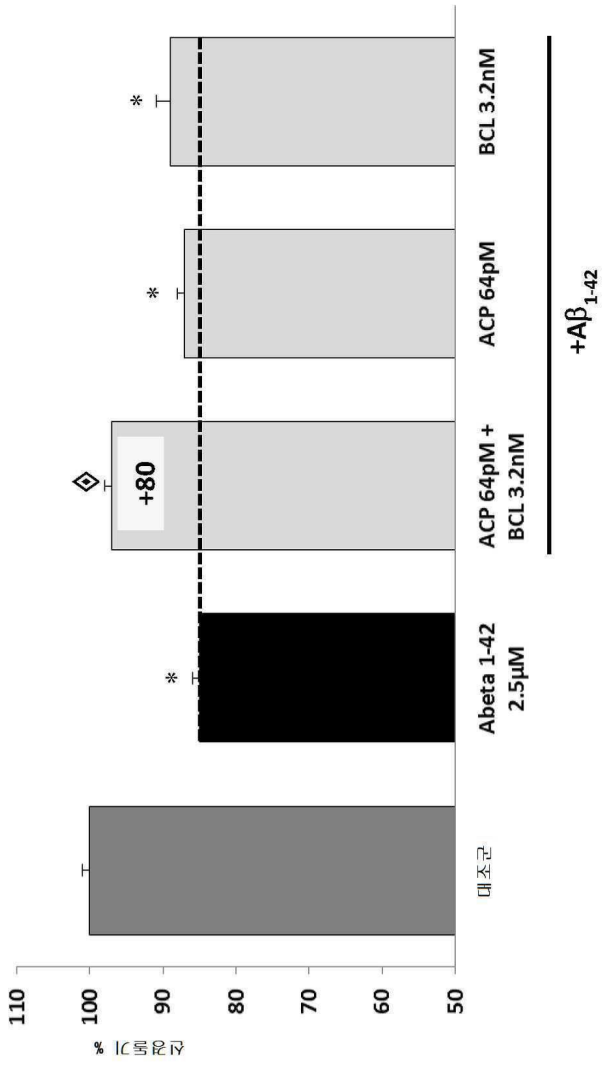
도면5



도면6

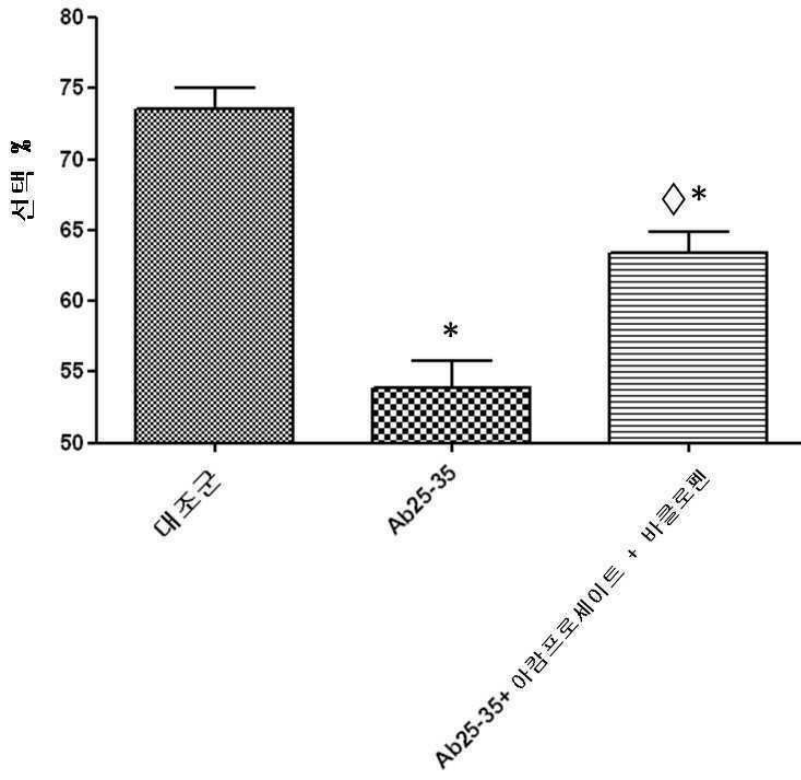


도면7

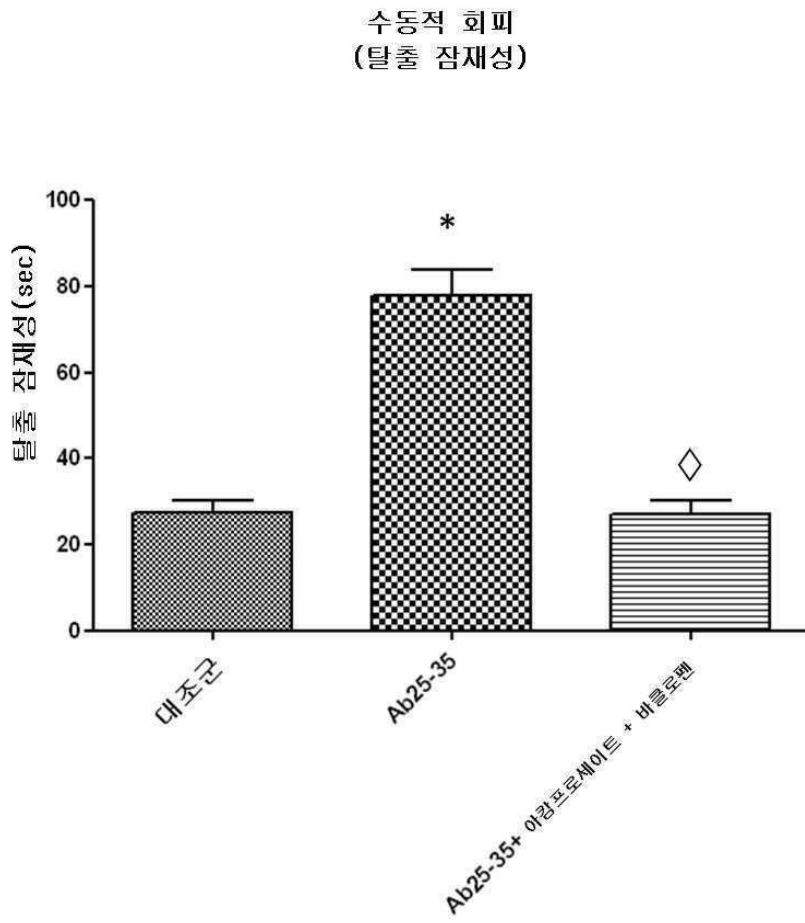


도면8

Y-Maze 테스트

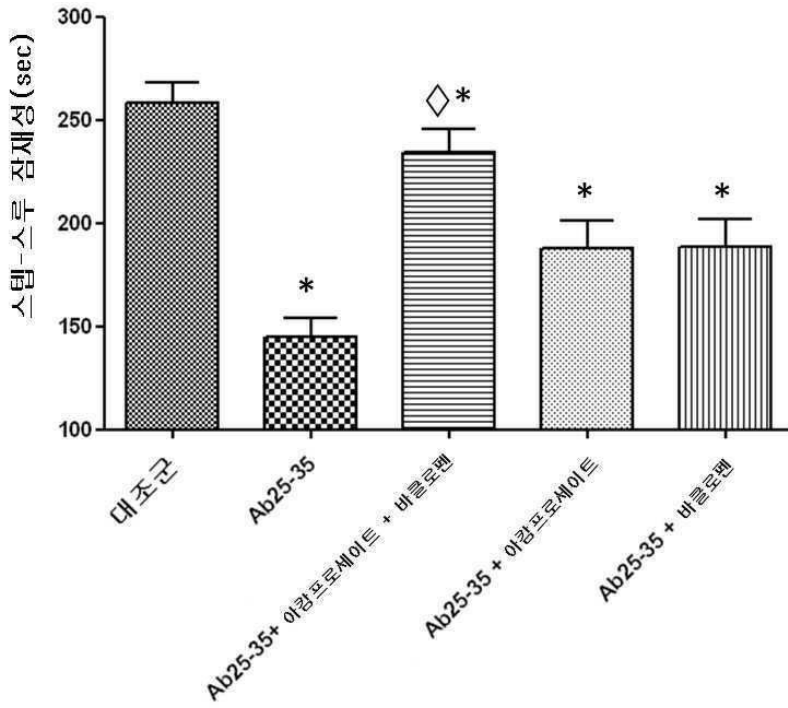


도면9

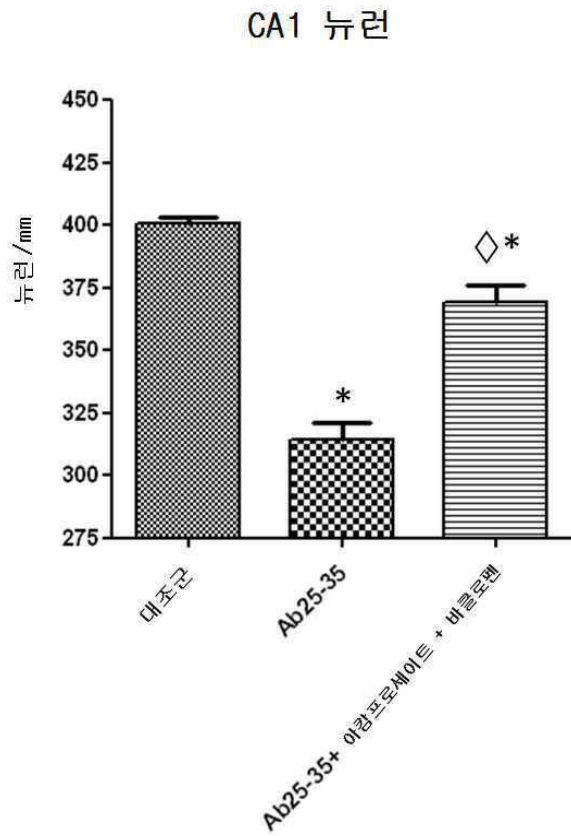


도면10

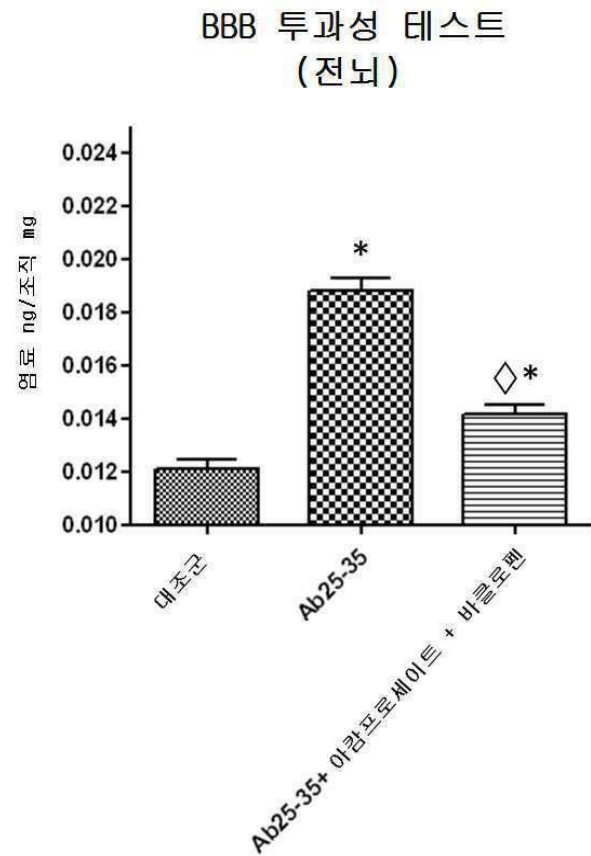
수동적 회피
(스텝-스루 잠재성)



도면11

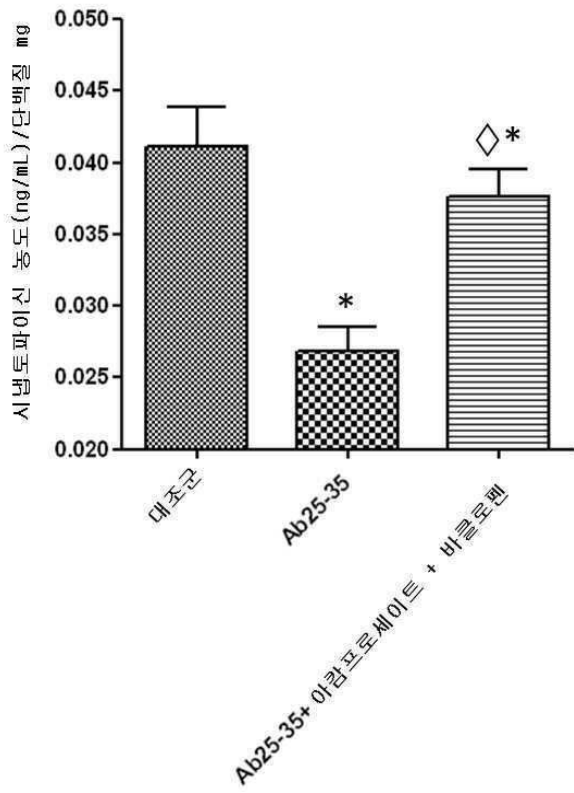


도면12



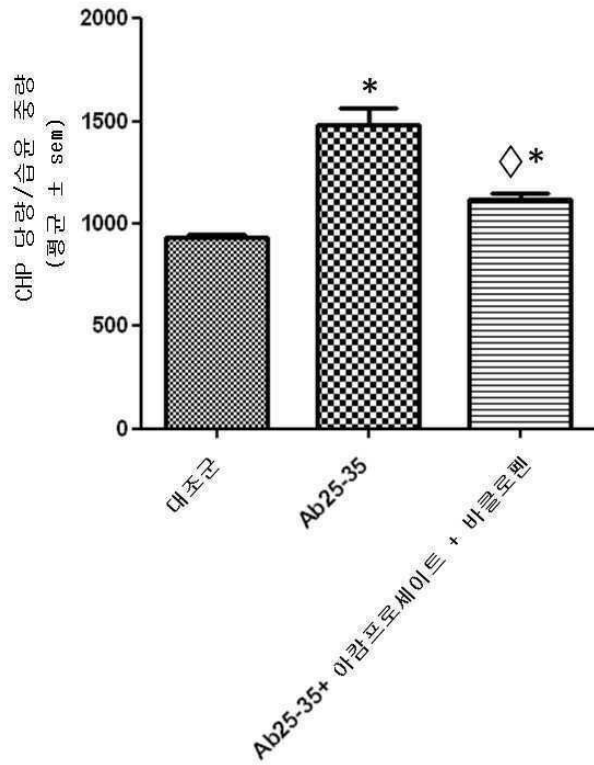
도면13

시냅토파이신 발현

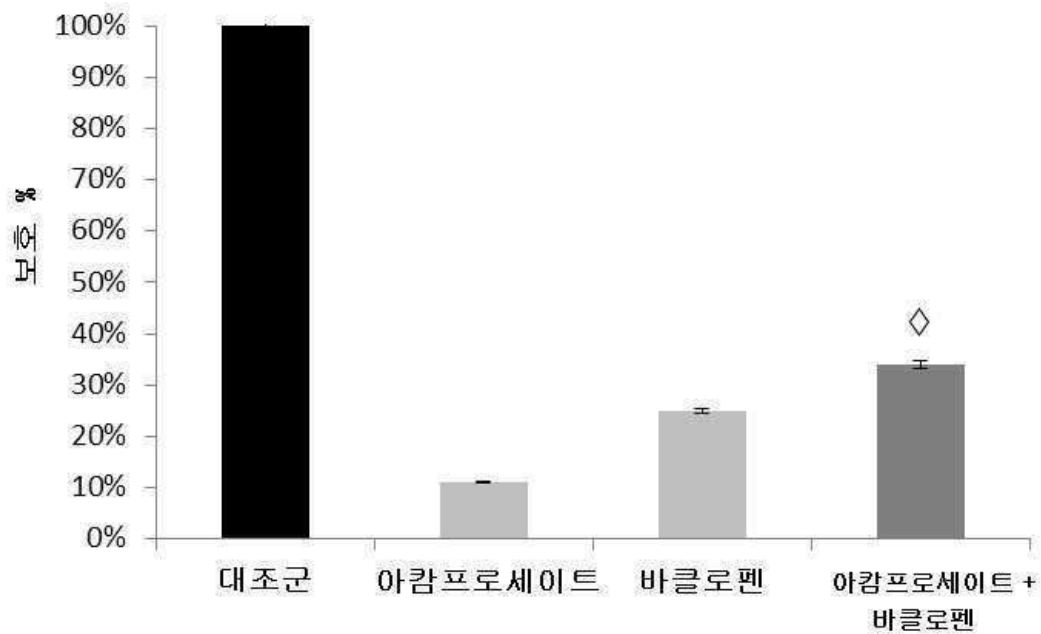


도면14

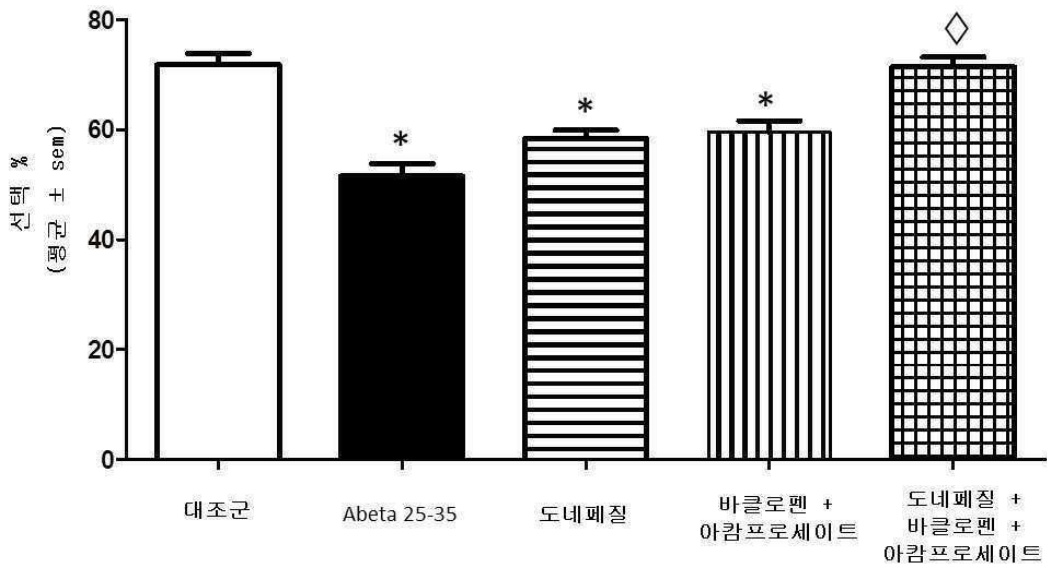
지질 과산화
(FOX 어세이)



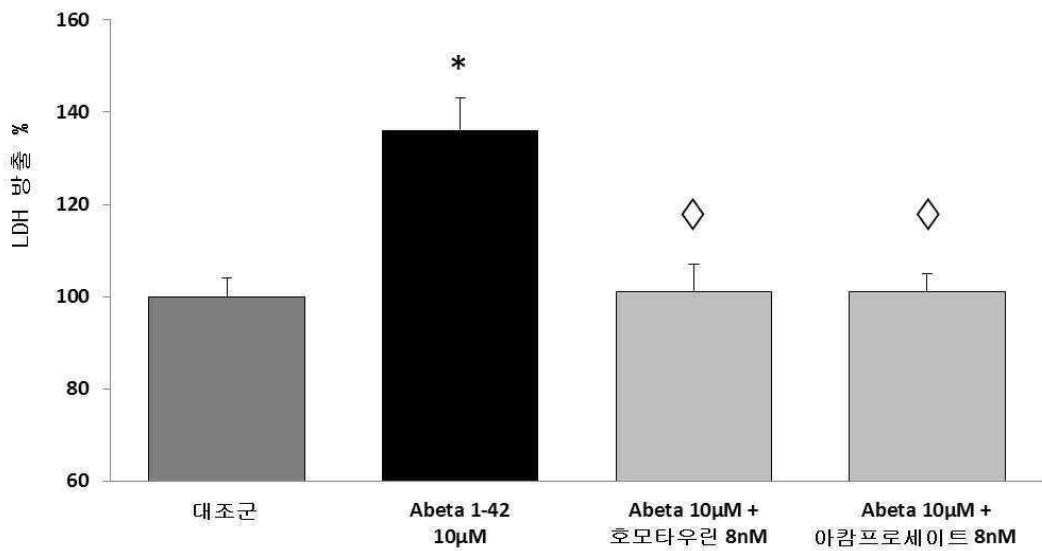
도면15



도면16



도면17



도면18

