(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년03월23일
(11) 등록번호 10-1719321
(24) 등록일자 2017년03월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/429 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 31/4188 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/429 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0039530
(22) 출원일자 2016년03월31일
심사청구일자 2016년10월31일
(56) 선행기술조사문헌
WO2007039462 A1

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
(72) 발명자
김철희
대전광역시 유성구 어은로 57, 132동 204호(어은동, 한빛아파트)
정승현
대전광역시 유성구 문화원로6번길 31, 402호 (장대동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인필앤온지

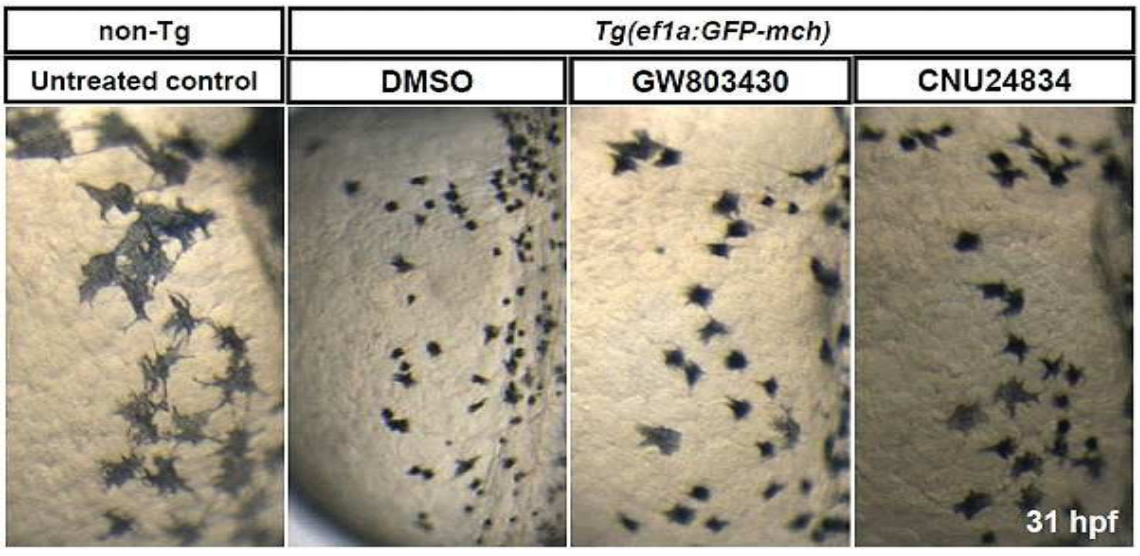
전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 이형준

(54) 발명의 명칭 **3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산을 포함하는 항비만 또는 항우울증 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산 의 MCH 신호 전달 조절 기능에 관한 것으로, 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하여 MCH 신호 전달 조절과 관련된 다양한 질환, 예를 들어 비만, 당뇨병, 우울증, 불안증 등을 치료 또는 예방하는데 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A61K 31/4188 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2200/332 (2013.01)

(72) 발명자
황규석
충청남도 예산군 예산읍 신례원로212번길 20-3 (신례원리)
배명애
대전광역시 유성구 죽동로 251, 307동 2102호(죽동, 푸르지오아파트)
김낙정
대전광역시 유성구 가정로 43, 101동 601호(신성동, 삼성한울아파트)
이규양
대전광역시 유성구 어은로 57, 132동 605호 (어은동, 한빛아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015-B-0011-010105
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 [LINC]산학공동기술개발사업
연구과제명 뇌전증(간질) 질환모델동물 제작 및 치료제 효능 평가 활용 기술 개발
기 여 율 10/100
주관기관 충남대학교산학협력단
연구기간 2015.06.01 ~ 2015.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015M3A9A8029261
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신약타겟발굴·검증사업
연구과제명 뇌전증(간질) 신규타겟 및 KO 모델동물을 활용한 치료제 개발 기반구축
기 여 율 70/100
주관기관 충남대학교산학협력단
연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 KK1503-B00
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국화학연구원
연구사업명 기관고유사업
연구과제명 대사증후군 치료제 후보물질 개발
기 여 율 20/100
주관기관 한국화학연구원
연구기간 2015.01.01 ~ 2015.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 우울증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산 또는 이의

약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 우울증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 3

3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산 또는 이의

약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 우울증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 4

다음 단계를 포함하는 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산의 제조방법:

메틸-3,4-디아미노벤조에이트와 1,1-티오카보닐 디-2(1H)-피리돈을 반응시켜 메틸 2-머캅토-1H-벤조[d]이미다졸-5-카복실에이트를 제조하는 단계;

메틸 2-머캅토-1H-벤조[d]이미다졸-5-카복실에이트와 2-브로모-4'-클로로아세토페논을 반응시켜 메틸 2-((2-(4-클로로페닐)-2-옥소에틸)싸이오)-1H-벤조[*d*]이미다졸-5-카복실에이트 브롬산을 제조하는 단계;

메틸 2-((2-(4-클로로페닐)-2-옥소에틸)싸이오)-1H-벤조[*d*]이미다졸-5-카복실에이트 브롬산에 산을 첨가하여 메틸 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-*b*]싸이아졸-6-카복실에이트를 제조하는 단계; 및

메틸 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-*b*]싸이아졸-6-카복실에이트에 NaOH 수용액을 첨가하여 가수분해하는 단계.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 멜라닌 응집 호르몬(melanin-concentrating hormone, MCH) 신호 전달 조절제 및 이를 이용한 MCH 신호 전달 관련 질환의 치료 및 예방 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 멜라닌 응집 호르몬(melanin-concentrating hormone, MCH)은 연어의 뇌하수체로부터 최초로 단리된 환상 펩타이드이다. MCH는 처음에 경골어류에서 색 변화를 조절하는 인자로 알려졌는데, 어류에서는 17개의 아미노산으로 구성되어 있고, 포유류에서는 19개의 아미노산으로 구성되어 있으며 이들 서열은 설치류, 토끼 및 인간 등에서 매우 유사함이 보고되었다. 또한, 이러한 MCH는 G-단백질 결합 수용체(Gprotein coupled receptor, GPCR)를 통하여 세포 내로 신호전달을 하게 되는데, 현재까지 MCH-1(SLC-1, GPR24)과 MCH-2(SLT, GPRv17)의 두가지 종류의 수용체가 보고되었다. 1999년에 알려진 MCH-1의 경우 353개의 아미노산으로 구성되어 있으며 전형적인 GPCR의 특징들을 가진다고 보고되었는데, 소마토스타틴(somatostatin) 수용체와 35% 정도의 유사성을 가지며 해당 유전자가 염색체 22q13.3 위치에 존재한다고 알려져 있다.

[0004] 포유동물의 섭식 거동에 있어서 MCH의 역할은 수년간 연구된 주제였으며, MCH 조절에 의한 포유동물의 섭식 거동 조절의 약리 기전은 이미 익히 공지되어 있다. MCH는 중추신경계의 외측 시상하부(lateral hypothalamus) 및

불확정구역(zonaincerta)에서 우세하게 발현된다. MCH의 중추 투여는 음식 섭취를 자극하고 에너지 균형을 조절하는 것으로 알려져 있다. MCH는 절식 동안 외측 시상하부에서 발현이 증가한다. 녹아웃(knockout) 실험에 의하면, MCH가 발현하지 않는 마우스는 깡마르고 소식을 하며 높은 대사 속도를 유지함을 확인할 수 있었다. 반면, MCH를 과발현하는 형질전환 마우스는 비만이고 인슐린 내성으로 확인되었다. MCH 수용체(receptor)를 코딩하는 유전자를 갖지 않는, 유전공학적으로 변형된 동물은 적당히 과식하지만 비만해지는 것에 대해 저항성을 나타내고 높아진 대사속도를 갖는다.

[0005] MCH(MCH-1 또는 MCH-2)는 MCH 수용체에 결합함으로써 섭식 거동에 대한 효과를 발휘하여 세포 내 칼슘을 운용하는 동시에 환상 AMP 수준을 감소시키는 것으로 추정되고 있다. 또한, 다수의 연구들이 MCH 신호전달 조절제의 단기 투여 후 설치류의 음식 섭취가 통계학적으로 유의하게 감소됨을 보고하고 있다.

[0006] 뿐만 아니라, MCH가 우울증이나 불안, 초조와 관련되어 있음이 보고되어 있다(Borowsky et al., 2002, Nat. Med. 8:825-830). 특히, MCH 신호전달 조절제는 인간에서의 우울증 및 불안의 모델이 되는 설치류에서의 우울 및 불안을 억제함이 확인되었다(Hervieu, 2003, Expert Opin. Ther. Targets.7:495-511; Georgescu et al., 2005, J. Neurosci. 25:2933-2940; Chaki et al.,2005, J. Pharmcol. Exp. Ther. 313:831-839. 상기 논문들에 있어서 설치류 모델은 강제 수영 시험, 발성 및 사회적 상호작용의 다양한 모델을 포함한다. 또한, 최근의 연구에서는 MCH가 인지(cognition)에도 영향을 미친다는 것이 발표되었다.

[0007] 이상과 같은 일련의 연구결과에 의하면 MCH 신호전달 조절제가 식욕 억제제로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 우울증 또는 불안증 제거에도 효과가 있어 항우울증 치료제로도 사용될 수 있음을 확인할 수 있다. 국제공개특허 제07/039462호 등 다수의 문헌에서는 MCH 신호전달 조절제를 이용하여 과식증, 불안증, 우울증 및 관련 장애의 치료에 활용하고자 함이 기재되어 있다.

[0009] 한편, 제브라피쉬(zebrafish)는 척추동물로서 인간의 유전자와 매우 유사하고, 크기가 작아 실험실 수준에서 사육이 용이하며, 많은 배를 얻을 수 있고 발생이 빨라 단기간에 모든 장기의 발생을 관찰할 수 있고, 더욱이 이들 배의 신경계 골격이 확립되는 발생 초기에는 투명하게 보이므로 가시적인 관찰이 용이할 뿐만 아니라, 비교적 간단한 신경계를 가지고 있으며 초기 발생에 관한 많은 유전자들이 동정되어 있다는 장점을 가지고 있어, 최근 환경독성 및 질환 모델로 사용이 증가하고 있는 추세이다. 이러한 추세에 따라, 본 발명자들은 제브라피쉬 모델이 약물 스크리닝에 유용함을 토대로 하여, MCH 조절 약물을 스크리닝하는데 사용하기 위한 제브라피쉬 모델을 개발하였고, 2015년 11월 23일자로 한국 특허출원 제10-2015-0164102호를 출원하였다. 인용된 한국 특허출원 제10-2015-0164102호는 본 발명의 명세서에서 참조문헌으로 편입한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 MCH 조절 약물, 보다 구체적으로 MCH 신호전달 억제제로 작용함으로써 대사질환(예를 들어, 비만 또는 당뇨병 등) 및 신경질환(예를 들어, 우울증, 불안증 또는 초조 등)과 같은 MCH 관련 질환을 예방 또는 치료하는데 유용한 화합물을 제공하는데 있다.

[0012] 이에, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 i. 비만 또는 당뇨병을 포함하는 대사질환, 또는 ii. 우울증, 불안증 또는 초조를 포함하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

[0013] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 i. 비만 또는 당뇨병을 포함하는 대사질환, 또는 ii. 우울증, 불안증 또는 초조를 포함하는 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는데 있다.

[0014] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0016] 상술한 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 MCH 신호 전달 조절을 위한 조성물을 제공한다. 또한, 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산 또는 이의 염을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계

를 포함하는 MCH 신호 전달을 조절하는 방법 및/또는 MCH 신호 전달과 관련된 질환, 장애 또는 증상을 치료, 예방 또는 개선하는 방법을 제공한다. 또한, 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산 또는 이의 염의 MCH 신호 전달 조절 용도 및/또는 MCH 신호 전달과 관련된 질환, 장애 또는 증상의 치료, 예방 또는 개선 용도를 제공한다.

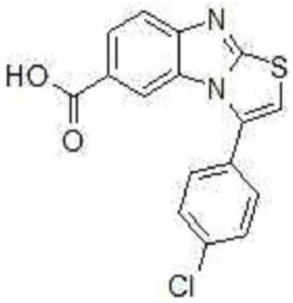
[0018] 본 발명은 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산 또는 이의 염의 MCH 신호 전달 조절 작용 및 이러한 작용에 따른 질환의 개선, 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.

[0020] 본 발명자들은 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산 또는 이의 염을 MCH가 과발현된 제브라피쉬 모델에 투여한 결과, MCH의 과발현에 의해 응집된 멜라노좀을 분산시키는 MCH 신호 전달을 조절하는 효과가 있으며, 운동성 향상 및 뇌신경세포 활성화 효과가 있으므로, MCH 신호 전달 관련 질환, 예를 들어 우울증 치료에 효과적임을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0022] 본 발명은 활성성분으로 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산 또는 이의 염을 이용한다.

[0023] '3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산'은 하기 화학식 1의 화합물이며 'CNU24834'로 지칭할 수도 있다.

[0024] [화학식 1]

[0025] 

[0026] 본 발명에 있어서, '활성성분'이란 치료적으로 활성이 있는 화합물, 이의 임의의 프로드럭, 이들의 염, 수화물 및 용매화물을 의미한다. 따라서, 본 발명에서 다른 한정이 없는 이상, 활성성분으로 '3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산'를 지칭하는 경우, '3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산', 이의 임의의 프로드럭, 이들의 염, 수화물, 용매화물 및 입체이성질체를 함께 지칭하는 것으로 해석한다.

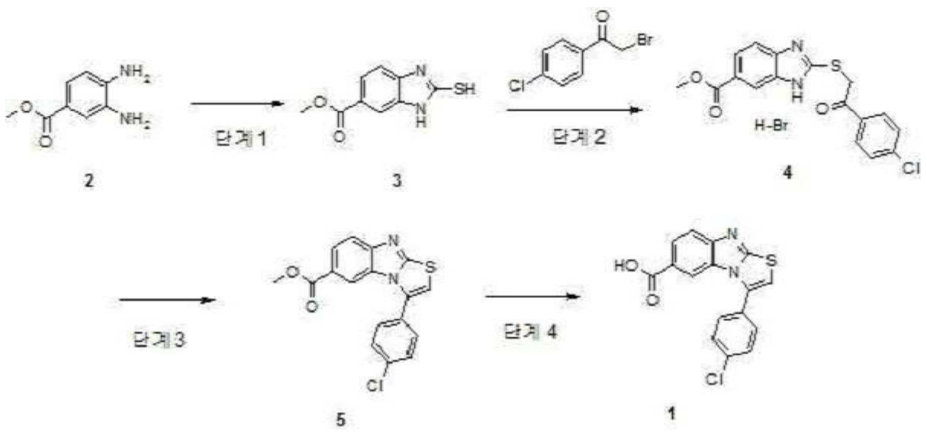
[0027] 또한, 본 발명에 있어서, 유효성분으로서, 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산에 대체하여 또는 이와 함께 이의 유도체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 조성물에는 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산과 동등한 활성을 가지는 유도체를 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명에 있어서, '염'은 활성성분이 적용되는 용도에 따라 해당 용도에서 허용가능한 염일 수 있다. 예를 들어, 약학적으로 허용가능한 염, 식품학적으로 허용가능한 염, 또는 화장학적으로 허용가능한 염 등이 포함될 수 있다. 상기 '허용가능한'이란 조성물을 이루는 다른 성분들 및/또는 이를 투여하는 대상과 화학적, 물리적 및/또는 독성학적으로 상용성이 있어야 함을 의미한다.

[0029] 본 발명에 있어서, '약학적으로 허용가능한 염'이란 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염을 예시할 수 있다. 상기 유리산으로는 유기산 또는 무기산을 사용할 수 있는데, 유기산으로는 예를 들어 구연산, 초산, 말레산, 퓨마르산, 글루코산, 메탄설폰산, 아세트산, 글리콜산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산, 아스파르트산 등을 사용할 수 있고, 무기산으로는 예를 들어, 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 메탄설폰산, 염산 등을 사용할 수 있다. 본 발명에 사용되는 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들어, 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산(CNU24834) 화합물을 아세톤, 메탄올, 에탄올, 아세토니트릴 등과 같은 수혼화성 유기용매에 녹이고 과량의 유기산을 가하거나, 무기산의 산 수용액을 가한 후 침전시키거나 결정화시킨 후, 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 다음 건조시키거나 석출된 염을 흡인 여과시킴으로써 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 있어서, '(건강)식품학적으로 허용가능한 염' 및/또는 '화장품학적으로 허용가능한 염'도 통상의 기술자가 '약학적으로 허용가능한 염'에 준하여 제조 및 적용할 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, '3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산'은 당 업계에 유통되는 화합물을 구입하여 사용할 수 있고, 통상의 기술자에게 공지된 다양한 방법으로 제조하여 사용할 수도 있다. 바람직하게, 다음의 반응식 1의 방법으로 제조할 수 있다.

[0032] [반응식 1]



[0033]

[0034] 즉, 메틸-3,4-디아미노벤조에이트와 1,1-티오카보닐 디-2(1H)-피리돈을 반응시켜 메틸 2-머캅토-1H-벤조[d]이미다졸-5-카복실에이트를 제조하는 단계;

[0035] 메틸 2-머캅토-1H-벤조[d]이미다졸-5-카복실에이트와 2-브로모-4'-클로로아세토페논을 반응시켜 메틸 2-((2-(4-클로로페닐)-2-옥소에틸)싸이오)-1H-벤조[d]이미다졸-5-카복실에이트 브롬산을 제조하는 단계;

[0036] 메틸 2-((2-(4-클로로페닐)-2-옥소에틸)싸이오)-1H-벤조[d]이미다졸-5-카복실에이트 브롬산에 산을 첨가하여 메틸 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실에이트를 제조하는 단계; 및

[0037] 메틸 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실에이트에 NaOH 수용액을 첨가하여 가수분해하는 단계를 포함하여, 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산을 제조할 수 있다.

[0038] 이하, 각 단계에 대해 구체적으로 설명한다.

[0039] 상기 반응식 1의 단계 1에서는, 메틸-3,4-디아미노벤조에이트(상기 반응식 1에서의 화합물 2)를 출발물질로 하여 1,1-티오카보닐 디-2(1H)-피리돈을 사용하여 상온에서 반응시킨다. 여기서 반응 용매로는 테트라하이드로퓨란, 디클로로메탄, N,N-디메틸포름알데히드 등을 단독 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 상기 출발물질은 당업계에서 유통되는 것을 구입하여 사용할 수도 있고, 통상의 기술자에게 공지된 다양한 방법으로 제조하여 사용할 수도 있다.

[0040] 상기 반응식 1의 단계 2에서는, 단계 1에서 얻은 메틸 2-머캅토-1H-벤조[d]이미다졸-5-카복실에이트(상기 반응식 1에서의 화합물 3)을 2-브로모-4'-클로로아세토페논과 반응시킨다. 이때 반응용매로는 예를 들어, 에탄올, 메탄올, 테트라하이드로퓨란 등을 사용할 수 있고, 반응시간은 1시간 내지 16시간이고 반응온도는 상온에서 용매의 비등점까지이나, 이에 제한되지 않는다.

[0041] 상기 반응식 1의 단계 3에서는, 단계 2에서 얻은 메틸 2-((2-(4-클로로페닐)-2-옥소에틸)싸이오)-1H-벤조[d]이미다졸-5-카복실에이트 브롬산(상기 반응식 1에서의 화합물 4)에 산을 첨가하여 고리화반응을 시킨다. 이때, 상기 산으로는 예를 들어, p-톨루엔 설폰산, 인산, 염산, 황산, 폴리포스포릭 엑시드(PPA) 등을 0.3 내지 3당량 사용할 수 있고, 반응용매로는 예를 들어, 톨루엔, 벤젠, 에탄올, 메탄올 등을 사용할 수 있고 반응시간은 1시간 내지 16시간이고 반응온도는 상온에서 용매의 비등점까지이나, 이에 제한되지 않는다.

[0042] 상기 반응식 1의 단계 4에서는, 단계 3에서 얻은 메틸 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실에이트(상기 반응식 1에서의 화합물 5)에 NaOH 수용액을 첨가하여 가수분해 반응을 통해 최종 목적화합물 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산을 제조할 수 있다. 여기서 반응용매는 예를 들어, 메탄올, 에탄올 등의 알코올류와 테트라하이드로퓨란 등을 사용하고, 반응온도는 상온에서에서 용매의 비등점까지이나, 이에 제한되지 않는다.

[0044] 본 발명에 있어서, 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산은 MCH 신호 전달 조절제로서 사용하며, 구체적으로 MCH 신호 전달 조절과 관련된 질환 또는 장애의 예방, 개선 또는 치료 용도로 사용될

수 있다.

[0045] MCH 신호 전달 조절과 관련된 질환 또는 장애에는 당업계 공지된 약리 기전에 따라 다양한 질환이 포함될 수 있으며, 예를 들어 비만 또는 당뇨병을 포함하는 대사질환; 및 우울증, 불안증 또는 초조를 포함하는 신경질환이 포함될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0046] 본 발명에 있어서, '비만'은 고콜레스테롤증, 동맥경화, 고지혈증, 식욕 및 음식 섭취조절, 이상지질혈증, 과중성지방혈증, 중상경화성 등과 같은 비만관련질환들을 통칭하는 것으로서 체내에 과다하게 많은 양의 체지방이 쌓여 있는 상태를 의미한다. 또한, 비만은 죽상경화증, 고혈압, 당뇨병, 뇌졸증, 폐색전증, 수면 무호흡증 및 암과 같은 생명 위협의 가능성이 있는 많은 질병에 대해 공지된 위험요소이다. 또한, 비만은 호흡기 질병, 골관절염, 골다공증, 쓸개 담낭 질병 및 이상지질혈증과 같은 수많은 임상적 질환을 합병증화한다.

[0047] 본 발명에 있어서, '당뇨병'은 췌장에서 분비되는 인슐린이 부족하거나 기능이 제대로 작용하지 못하여 포도당이 세포 내에서 이용되지 않고 혈액 속에 포도당 농도가 높아져서 발생하는 만성대사성 질환으로서, 제1형 당뇨병 및 제2형 당뇨병을 포함할 수 있다.

[0048] 본 발명에 있어서, '우울증'은 정신 질환의 일종으로서 주로 슬픔, 무미, 감정의 상실, 무쾌감증(쾌감의 결여), 비탄, 동요 또는 지체, 죄의식과 무가치하다는 생각을 특징으로 하며 심각한 경우에는 자살, 환각 및 망상 등의 증상을 동반한다.

[0049] 본 발명에 있어서, '불안증 또는 초조'는 정신 질환의 일종으로서 실제적인 위험에 기인하지 않고 공격(공황 장애)이나 지속적인 상태(일반화된 불안 장애)로서 나타나는 심리적이고 육체적인 불안 징후들의 다양한 조합과 관련이 있다.

[0050] 보다 구체적으로, MCH 신호 전달 조절에 의해 비만이 치료될 수 있음은 참조문헌 Segal-Lieberman et al., 2003, PNAS 100(17):10085-10090 등에 상세히 기재되어 있으며, 이들 문헌은 본 발명에 참조로서 편입한다.

[0051] MCH 신호 전달 조절에 의해 우울증이 치료될 수 있음은 참조문헌 Lagos et al., 2010, Behav. Brain Res. 218(2):259-66에 상세히 기재되어 있으며, 이들 문헌은 본 발명에 참조로서 편입한다.

[0052] MCH 신호 전달 조절에 의해 불안증 또는 초조가 치료될 수 있음은 참조문헌 Borowsky et al., 2002, Nat. Med. 8:825-830 에 상세히 기재되어 있으며, 이들 문헌은 본 발명에 참조로서 편입한다.

[0053] 본 발명에 있어서, '치료' 및 '개선'은 대상물의 투여로 질환, 장애 및 이로 인해 나타나는 증상을 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 또한, 상기 '치료'는 광범위하게 '예방'의 의미를 포함하는바, '예방'은 대상물의 투여로 질병, 장애 및 이로 인해 나타나는 증상이 억제되거나 발병이 지연되는 모든 행위를 의미한다. 상기 '치료' 및 '개선'은 예를 들어, 질환, 장애 및 이로 인해 나타나는 증상 진행의 방해, 완화, 개선, 정지, 억제, 지연, 역전 등이 포함되는 의미이다.

[0054] 본 발명에 따른 MCH 신호 전달 조절을 위한 조성물에는 예를 들어, 약학적 조성물, 건강기능식품 조성물, 식품 조성물, 화장품 조성물 등이 포함될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0055] 예를 들어, 본 발명은 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산 및 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물로 사용될 수 있다.

[0056] 본 발명에 따른 조성물에는 조성물의 총 중량 대비 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산 및 이의 염이 0.001 중량% 이상 50 중량% 이하로 포함될 수 있으며, 0.001 중량% 미만으로 포함되면 질병 치료에 유효한 효과 발휘가 어렵고, 50 중량% 초과하여 포함되면 간독성 등 안전성에 문제가 있을 수 있다.

[0057] 본 발명에 따른 조성물은 경구 또는 비경구로 투여, 예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 투여될 수 있다. 상기 조성물은 경구 투여용 제형, 예를 들면, 정제, 트로키제(troches), 로진지(lozenge), 수용성 또는 유성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀젼, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭실제(elixirs)로 제제화될 수 있다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제화하기 위해 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕해제; 스테아린산 마그네슘, 스테아린산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유가 함유될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 캡슐제의 경우는 상기에서 언급한 물질 이외에도 지방유와 같은 액체 담체를 함유할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명의 조성물은 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 예를 들어, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사, 흉부 내 주사 주입방식에 의한다. 비경구

투여용 제형으로 제제화하기 위해서는 상기 조성물을 예를 들어, 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액으로 제조하고 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제제화될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0058] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 이를 필요로 하는 대상에게 투여할 수 있는바, 상기 '이를 필요로 하는 대상'이라 함은 질병, 장애 또는 증상이 발생하였거나 발생할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 조성물을 개체에게 투여함으로써, 상기 질환, 장애 또는 증상을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.

[0059] 본 발명에 따른 약학적 조성물에는 통상적으로 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물에 첨가할 수 있는 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체는 약제학 분야에서 통상적으로 사용되는 예를 들어, 부형제, 붕해제, 결합제, 활택제, 유화제, 현탁화제, 안정화제 등의 첨가제를 포함하고, 이에 제한되지 않는다.

[0060] 본 발명에 따른 약학적 조성물에는 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산 및 이의 약학적으로 허용가능한 염이 치료유효량으로 포함될 수 있다.

[0061] 본 발명에 있어서, 상기 '치료유효량'이란 상술한 다양한 병적 상태 또는 그의 증상 및 후유증을 치료, 개선하거나 예방할 수 있는 활성성분의 양을 가리킨다. 약학 조성물은 적당한 경우 치료 또는 개선 둘다를 위해 사용될 수 있다. 투여량, 빈도 및 지속성은 치료할 상태의 성질 및 위중함, 치료할 대상의 연령 및 일반적인 건강상태 및 활성 성분에 대한 숙주의 내성과 같은 인자에 따라 다를 것이다. 약학 조성물 또는 약제는 1일 1회 투여량으로, 1일 다수회 투여량으로 또는 심지어 주간 투여량으로 제공될 수 있다. 처방은 약 2 내지 3일에서부터 수주 이상까지 지속될 수 있다. 통상적으로, 조성물은 인간 환자에게 1일 1회 또는 2회 투여되고, 투여량은 환자의 연령, 체중 및 건강 상태, 및 투여 유형에 따라 적당히 변할 수 있다.

[0062] 또한, 본 발명은 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산 및 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 건강기능식품 조성물 또는 식품 조성물로 사용될 수 있다.

[0063] 본 발명에 있어서, '건강기능식품'은 건강 기능성 식품, 영양 보조제, 영양제, 파머푸드(pharmafood), 건강 식품, 뉴트라슈티칼(nutraceutical), 디자이너 푸드, 식품 첨가제 등의 모든 형태에 해당하고, 이에 제한되지 않는다.

[0064] 본 발명에 있어서, 본 발명의 화합물 또는 이의 염을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 사용 목적(예방 또는 개선적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0065] 상기 건강기능식품 조성물 또는 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0066] 또한, 상기 조성물은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, '식품첨가물'로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안정청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 '식품첨가물공전' 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀롤로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류들을 들 수 있다. 이때, 조성물을 제조하는 과정에서 음료를 포함한 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 화합물 및 이의 염은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있다.

[0067] 또한, (건강기능)식품의 종류에는 특별한 제한은 없으며, 예를 들면 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 (건강기능)식품을 모두 포함한다.

발명의 효과

[0069] 본 발명에 따르면, MCH 신호 전달 조절에 효과적이면서 안전한 성분을 제공할 수 있고, 이로써 MCH 신호 전달 조절과 관련된 다양한 질환 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0071] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 발명의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

도 1의 상단 MCH 과발현 되도록 형질전환된 제브라피쉬 배아(Tg)와 야생형 제브라피쉬 배아(Non Tg)의 멜라노좀 발현양상을 시간의 변화에 따라 관찰한 사진이다. 하단은 형질전환(좌)과 야생형(우) 제브라피쉬 배아의 형광단백질 발현 양상을 관찰한 사진이다.

도 2는 GFP형광댄백질과 MCH 과발현 형질전환 제브라피쉬 제작을 위해 미세주입한 플라스미드 벡터의 지도이다.

도 3은 MCH의 과발현에 의한 제브라피쉬 멜라노좀 변화양상에 대한 설명(상단)과 실제 멜라노좀 변화양상을 관찰한 사진(하단)이다. MCH의 과발현에 의해 B 및 D와 같이 제브라피쉬 멜라노좀이 변화한다.

도 4는 야생형(Non-Tg) 및 MCH 과발현되도록 형질전환된 제브라피쉬에 DMSO, GW803430, CNU24834을 투여한 뒤의 멜라노좀 변화를 관찰한 사진이다.

도 5는 야생형(Non-Tg) 및 MCH 과발현되도록 형질전환된 제브라피쉬에 DMSO, GW803430, CNU24834을 투여한 뒤의 멜라노좀 변화를 정량적으로 분석한 그래프이다.

도 6은 야생형 제브라피쉬에 DMSO, GW803430, CNU24834을 투여한 뒤의 제브라피쉬의 신경 활성 마커인 c-fos 발현 패턴을 관찰한 사진이다.

도 7은 야생형 제브라피쉬에 DMSO, GW803430, CNU24834을 투여한 뒤의 제브라피쉬 행동학적 변화를 정량적으로 분석한 그래프이다.

도 8은 CNU24834의 배독성(embryo toxicity) 및 최기성(teratogenicity)을 확인하기 위해 CNU24834 20μM을 야생형 제브라피쉬에 투여한 다음 배발생 과정을 관찰한 사진이다.

도 9는 CNU24834의 심장 기능에 미치는 효과를 확인하기 위해 CNU24834, GW803430을 20uM, 10uM, 5uM, 2.5uM, 1.25uM씩 야생형 제브라피쉬에 투여한 다음 20초(20sec) 당 심장박동수를 확인한 것이다.

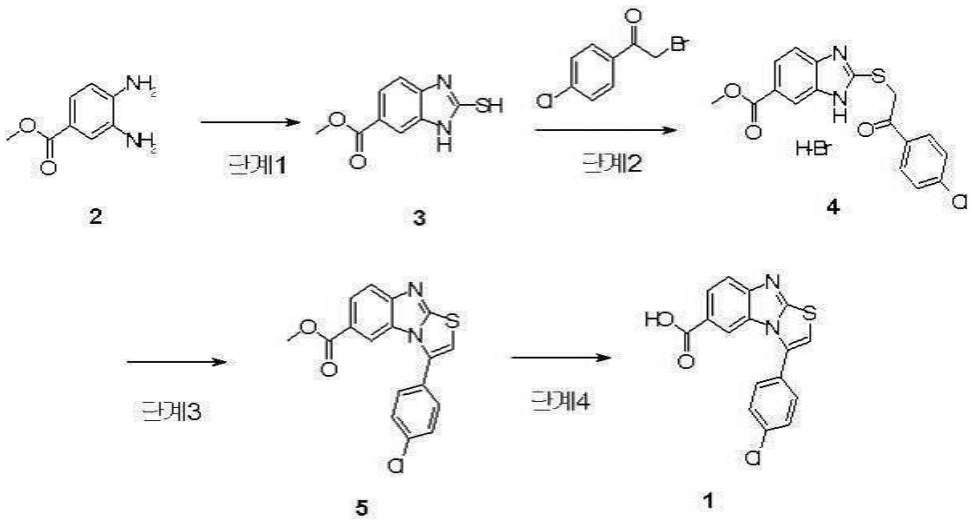
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0072] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0074] **1. 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산의 제조**

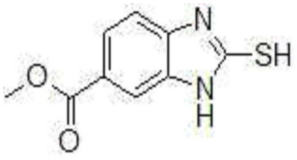
[0075] 하기 반응식 1에 따라 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산의 제조하였다.

[0076] [반응식 1]



[0077]

[0078] **<제조예 1> 메틸 2-머캅토-1H-벤조[d]이미다졸-5-카복실에이트 (3)의 제조**



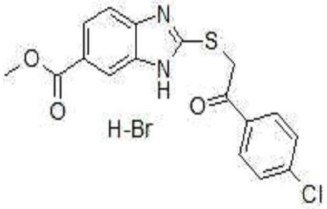
[0079]

[0080] 메틸 3, 4-디아미노벤조에이트 2 g (12 mmol)을 20ml 테트라하이드로퓨란에 용해시킨 후, 1, 1' -싸이오카보닐디-2-(1H)-피리돈 3.07 g (13.20 mmol)을 첨가하고 질소기류 하에서 상온에서 3시간 동안 교반하였다. TLC로 반응의 종결을 확인한 후, 에틸아세테이트 (100ml) 로 추출하고 물과 소금물로 세척하였다. 유기층을 무수황산나트륨으로 건조시키고 여과한 후 감압하에서 농축하여 얻어진 잔유물을 컬럼 크로마토그래피 (노말 헥산 : 에틸아세테이트 = 1:1, v/v)로 정제하여 고체상태의 표제화합물 1.66g (67% 수율)을 얻었다.

[0081] Rf = 0.54 (노말 헥산 : 에틸 아세테이트 = 1:1, v/v)

[0082] ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 12.85 (brs, 2H), 7.78 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.23 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H) ; MS(m/e, M^+): 208.24

[0084] **<제조예 2> 메틸 2-((2-(4-클로로페닐)-2-옥소에틸)싸이오)-1H-벤조[*d*]이미다졸-5-카복실에이트 브롬산 (4)의 제조**

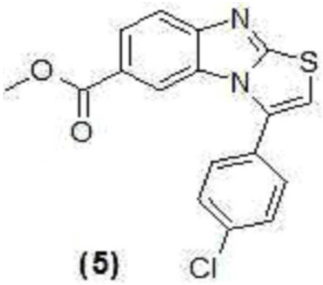


[0085]

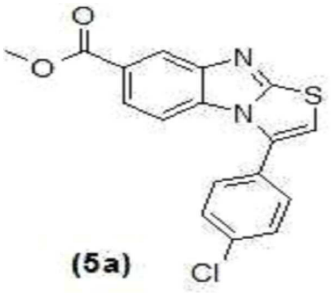
[0086] 메틸 2-머캅토-1H-벤조[d]이미다졸-5-카복실에이트(3) 1.66 g (7.98 mmol)을 메탄올 30 ml에 용해시키고 2-브로모-4'-클로로아세토페논 2.24 g (8.729 mmol)을 첨가한 후 6시간동안 환류상태로 교반하였다. 반응종결 후 감압농축하고 얻어진 잔유물에 에틸아세테이트 50ml을 가하여 묽히고 10분정도 교반한 후, 여과하고 에틸아세테이트로 세척하여 고체를 회수하였다. 얻은 고체를 진공하에서 건조하여 백색고체 상태의 표제 화합물을 3.08 g (87% 수율)을 얻었다.

[0087] ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 8.09 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 8.01 (s, 1H), 7.81 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.67 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.54 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 5.13 (s, 2H), 3.85 (s, 3H) ; MS(m/e, M^+): 441.73

[0089] **<제조예 3> 메틸 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-*b*]싸이아졸-6-카복실에이트 (5)와 구조이성질체 메틸 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-*b*]싸이아졸-7-카복실에이트 (5a) 의 제조**



[0090]



(5a)

[0091]

[0092] 메틸 2-((2-(4-클로로페닐)-2-옥소에틸)싸이오)-1H-벤조[*d*]이미다졸-5-카복실에이트 브롬산(4) 121 mg (0.33 mmol)을 톨루엔 5ml에 용해시키고 p-톨루엔설폰산 일수화물 125 mg (0.66 mmol)을 첨가한 후 8 시간 동안 환류 상태로 교반하였다. TLC로 반응의 종결을 확인한 후, 에틸아세테이트 (50ml)로 추출하고 물과 소금물로 세척하였다. 유기층을 무수황산나트륨으로 건조시키고 여과한 후 감압하에서 농축하여 얻어진 잔유물을 컬럼 크로마토그래피 (5% 에틸아세테이트 / 디클로로메탄, v/v)로 정제하여 흰색고체 상태의 표제화합물 51 mg (45% 수율)을 얻었고, 구조이성질체인 메틸 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-*b*]싸이아졸-7-카복실에이트 (5a)화합물도 흰색고체 상태로 44 mg (39% 수율)로 얻었다.

[0093] Rf = 0.24 (2% 메탄올 / 디클로로메탄, v/v)

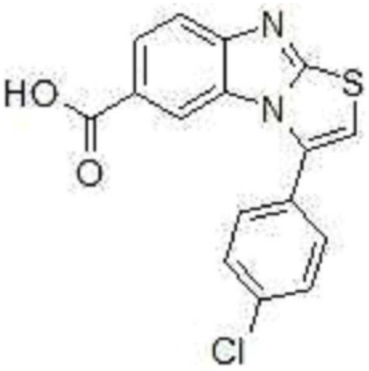
[0094] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.07 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.58-7.68 (m, 4H), 6.70 (s, 1H), 3.90 (s, 3H) ; MS(m/e, M^+): 342.81

[0095] * 구조이성질체: 메틸 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-*b*]싸이아졸-7-카복실에이트(5a)

[0096] Rf = 0.21 (2% 메탄올 / 디클로로메탄, v/v)

[0097] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.52 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 9.8 H, 1H), 7.56-7.65 (m, 4H), 7.24 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 6.70 (s, 1H), 3.97 (s, 3H)

[0099] **<제조예 4> 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-*b*]싸이아졸-6-카복실산 (1 ; CNU24834) 의 제조**



[0100]

[0101] 메틸 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-*b*]싸이아졸-6-카복실에이트(5) 50mg (0.145 mmol)을 2ml의 메탄올과 2ml의 테트라하이드로퓨란의 혼합용매에 용해시키고 2N-NaOH 수용액 0.36ml (0.72 mmol)을 첨가한 후, 50 ℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응종결 후 물 30ml에 용해시키고 1N 염산을 적가하여 pH = 3~4정도로 산성화 시킨다. 침전된 고체를 여과하면서 물과 에틸아세테이트로 세척하여 회수하고 진공오븐에서 건조하여 흰색 고체 상태의 최종 목적화합물을 45 mg (94% 수율) 로 얻었다.

[0102] ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 8.26 (s, 1H), 7.76-7.84 (m, 5H), 7.35 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H) ; MS(m/e, M^+): 328.78

[0104] **2. 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산의 MCH 신호 전달 억제 효과**

[0106] **<실시예 1> MCH 형질전환된 제브라피쉬의 제작**

[0107] NCBI BLAST Database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)를 통한 mch 유전자 검색을 통해 염기서열을 분석하였다. 그리고 주형으로 사용할 cDNA 합성을 위하여 제브라피쉬 성체 뇌 조직을 분리하여 1XPBS로 두 번 수세 후 TRIzol (MRC, 미국) 1㎖을 넣고 으깬 후 상온에서 5분간 둔 다음 클로로폼 200 ㎕를 처리한 후 15초동안 강하게 흔들어 준 뒤 상온에서 2~3분 반응하였다. 그 후 4에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리 한 뒤 상층액을 분리하여 이소프로판올 500 ㎕를 넣고 다시 4에서 10분간 원심분리 한 뒤 상층액은 버리고 pellet을 70% 에탄올로 수세하였다. 4에서 5분간 원심분리 후 얻어진 mRNA pellet에 RNase free water를 10 ㎕ 넣어서 녹였으며, 이러한 total RNA 4 ㎕에 0.2 ㎍ oligo-dT 2.5 ㎕와 10 mM dNTP 1 ㎕를 넣은 후 65에서 5분간, 4에서 1분간 반응시킨 뒤, 5x First-strand buffer (250 mM Tris-Cl (pH8.3), 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$)를 넣고 RNase inhibitor (40 U/㎕) (iNtRON, 한국) 1㎕, 0.1 DTT 2 ㎕를 첨가하여 전체 반응액 부피를 20 ㎕로 하여 42에서 1분간 반응시켰다. 그 뒤, Superscript II RT (200 U/㎕) (Invitrogen, 미국) 1 ㎕를 넣고 42에서 50분, 70에서 15분간 반응을 시킨 뒤 80 ㎕의 Nuclease free water를 첨가하였다.

[0108] mch 유전자를 분리하기 위해 데이터베이스로부터 확보한 mch 유전자의 염기서열을 이용하여 ORF(Open Reading Frame)를 포함하는 정방향 프라이머(5'-CAAGACAGGAAACAGCAGCCAAACC-3'; 서열번호 1) 및 역방향 프라이머(5'-CCATGTCTTCCCAGAAGTCCTACAC-3'; 서열번호 2)를 제작하였다. 제브라피쉬 성체 뇌 조직의 cDNA를 주형으로 사용하여 상기 프라이머(5 pmol)들을 각각 2.5㎕씩 넣고, 10X PCR 버퍼 2.5㎕, 5X Qual-up 버퍼 5㎕, 10mM dNTP 0.5㎕, 주형 cDNA 1㎕, Ampli-Taq Gold 폴리머라제 (ThermoFisher, 미국) 0.25㎕ 및 증류수 10.75㎕를 혼합하여 총량을 25㎕로 하여 95 30초, 52 30초, 72, 60초, 25회 사이클 조건으로 PCR을 수행하여 약 490bp 크기의 단편을 확보하였다. 이 단편을 pGEM T-easy 벡터에 삽입하였고, 다시 490bp의 mch 단편이 삽입된 pGEM T-easy 벡터로부터 mch 유전자를 EcoRI 제한효소로 절단하여 겔 추출 키트(QIAGEN, 미국)를 이용하여 분리하고, 발현벡터인 pCS2+ 벡터 내 EcoRI 제한효소 위치에 삽입하였다.

[0109] mch 과발현 벡터 제작을 위한 제브라피쉬 ef1a 프로모터는 Genome Database (http://ensembl.org/Danio_rerio)를 통해 염기서열정보를 획득하였고, ef1a 프로모터 조절부위는 염기서열의 정방향 프라이머(5'-GAGCTCGGGTCGATCAGGAAGC-3'; 서열번호 3) 및 역방향 프라이머(5'-GGATCCCAAGATTGAGAGATCACT-3'; 서열번호 4)를 제작하여 PCR를 수행하였다. 제브라피쉬 성체의 genomic DNA를 주형으로 하여 상기 프라이머(5 pmol)들을 각각 2.5㎕씩 넣고, 10X PCR 버퍼 2.5㎕, 5X Qual-up 버퍼 5㎕, 10mM dNTP 0.5㎕, 주형 cDNA 1㎕, Ampli-Taq Gold 폴리머라제 (ThermoFisher, 미국) 0.25㎕ 및 증류수 10.75㎕를 혼합하여 총량을 25㎕로 하여 95 30초, 57 30초, 72, 30초, 30회 사이클 조건으로 PCR을 수행하여 147bp 크기의 단편을 확보하였다. 확보된 ef1a 프로모터 단편은 pGEM T-easy 벡터에 삽입하였다.

[0110] pCS2+ mch 플라스미드 벡터를 주형으로 하여 MCH 아미노산에 N-말단의 신호펩티드와 C-말단의 분비 MCH 펩티드만을 분리하기 위해 염기서열의 정방향 프라이머(5'-CCATGGAAACAGCTGTTTTAAAGTA-3'; 서열번호 5) 및 역방향 프라이머(5'-AGATCTGCCATCATCAGAAGGGAC-3; 서열번호 6)을 제작하여 정반대 PCR(inverse PCR)을 수행하였고, 4,240bp의 DNA를 증폭하여 정제한 뒤, pGEM T-easy 벡터에 삽입하였다. 4,240bp의 DNA에 GFP 형광단백질을 결합한 플라스미드 벡터를 제작하기 위해 pGEM T-easy 벡터에 삽입된 pCS2+ mchΔNEI와 pCS2+GFP 벡터를 NcoI, BglII 제한효소로 절단한 뒤 정제하여 두 벡터가 연결된 pCS2+GFP-mch 플라스미드 벡터를 제작하였다.

[0111] pCS2+GFP-mch 플라스미드 벡터의 프로모터인 sCMV 프로모터를 SalI, BamHI 제한효소로 제거하고, pGEM T-easy 벡터에 있는 147bp의 ef1a 프로모터를 같은 제한효소로 절단하여 정제한 뒤 pCS2+ef1a:GFP-mch 플라스미드 벡터를 제작하였다(도 2).

[0112] 플라스미드 DNA 정제 키트(iNtRON, 한국)를 이용하여 정제한 pCS2+ef1a:GFP-mch 플라스미드 벡터를 0.2M 염화칼륨을 포함하고 있는 0.2% 페놀 레드와 1 : 1로 섞어 DNA 농도를 100ng/㎕로 설정하여 제브라피쉬 1 세포기 수정란을 100mm-직경 페트리 디쉬의 1.2% 한천 트러프(agar trough)에 정렬한 후, 미세주사기(microinjector, World Precision Instruments, 미국)를 이용하여 미세주입하였다.

[0113] 미세주입을 통해 확보된 형질전환 제브라피쉬 배아를 형광현미경으로 확인한 후, 형광이 발생하는 개체만을 선별하여 지속적인 사육을 통해 성체로 성장시켰다. 성체로 성장한 형질전환 제브라피쉬는 형질전환 개체와 야생형 개체의 교배를 통해 배아를 획득하고 22시간 동안 배양한 후 형광현미경(Leica DC 300FX, 독일)을 통해 형광의 발생여부를 확인하였다. 형광의 발생여부는 형광현미경을 통하여 도 1의 하단과 같은 형태로 구별할 수 있었다. 형광발생이 되는 배아만을 선별하여 실험에 활용하였다.

[0115] **<실시예 2> 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-*b*]싸이아졸-6-카복실산 (CNU24834) 의 처리에 따른 멜라**

노좀 변화

[0116] 소형 열대어인 제브라피쉬는 적정 생육온도인 28.5℃의 수온을 유지한 어항에서 사육하며, 먹이는 시판되고 있는 브라인슈림프(brine shrimp)를 부화시켜 사용하였다. 제브라피쉬의 산란과 수정은 빛에 의해 유도되므로 낮 14시간 및 밤 10시간의 명암을 유지시켰다. 전날 오후에 암수 한쌍씩 전용 교배 케이지에 함께 넣어준 후 수집된 수정란을 링거액(116mM 염화나트륨, 2.9mM 염화칼륨, 1.8mM 염화칼슘 및 5mM HEPES(pH 7.2))으로 씻어 페트리디쉬에 옮기고 28.5℃의 배양기에 넣어 발생을 유도시켰다. 발생의 과정은 해부현미경을 통해 시간별, 형태학적 변화들을 관찰하였다. 형질전환된 제브라피쉬는 과발현된 MCH에 의해 시간의 경과에 따라 멜라닌 색소가 응집되어 발생중에 멜라노좀의 분산이 이루어지지 않고 응집되는 형태를 보여주었다(도 1 및 도 3).

[0117] 이러한 형질전환된 제브라피쉬를 이용하여 MCH 신호 전달 조절제로서 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산 (CNU24834)의 효과를 확인하기 위해 멜라노좀(melanosome)의 분산 정도 및 멜라노좀의 면적을 측정하여 평가하였다(도 4 및 도 5).

[0118] 양성대조군으로 MCH 수용체에 대한 길항제인 6-(4-chlorophenyl)-3-[3-methoxy-4-(2-pyrrolidin-1-ylethoxy)phenyl]-3H-thieno[3,2-d]pyrimidin-4-one (GW803430)을 사용하였다.

[0119] MCH 형질전환 제브라피쉬 발생배를 22시간까지 배양기에서 발생시킨 후, 형광 현미경을 통해 GFP가 발현하는 발생배를 선별하고, 발생배의 난막 (chorion)을 핀셋으로 제거하였다. 난막이 제거된 발생배 2~3개체를 24-웰 플레이트의 각 웰에 분주한 뒤, 20uM의 농도로 각각 DMSO, GW803430, CNU24834를 노출시키고, 약9~10시간 동안 반응시켰다. 그 후에 각각의 제브라피쉬에서 멜라노좀 30개를 무작위로 선별하여 분석 프로그램(ImageJ, 미국립보건원)을 통해 그 면적을 측정하고 평균값을 대조군(GW803430를 처리하지 않은 군)과 비교하여 분석하였다.

[0120] 그 결과, DMSO 처리군의 경우 멜라노좀이 응집되어 있으며, GW803430 처리군의 경우에는 멜라노좀의 분산이 이루어지는 경향을 보여주었고, CNU24834 처리군의 경우에도 멜라노좀의 분산이 이루어짐을 알 수 있었다(도 4). 또한, 분석 프로그램을 통하여 정량화한 결과, CNU24834 처리군에서 멜라노좀의 면적이 상당히 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(도 5). 이러한 결과들을 통해, CNU24834가 MCH 과발현된 형질전환 제브라피쉬에서 응집된 멜라노좀을 분산시키는 효과가 있음을 알 수 있었으며, CNU24834에 MCH 조절능이 있음을 알 수 있었다.

[0122] **<실시예 3> 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-*b*]싸이아졸-6-카복실산 (CNU24834) 의 처리에 따른 운동성 변화**

[0123] 상기 형질전환된 제브라피쉬를 이용하여 선별한 MCH 신호 전달 조절제로서, 특히 우울증에 대한 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산 (CNU24834)의 치료 효과를 확인하기 위해 제브라피쉬의 신경 활성 마커인 c-fos의 발현양상과 운동성 변화를 측정하여 평가하였다.

[0124] 양성대조군으로 MCH 수용체에 대한 길항제인 6-(4-chlorophenyl)-3-[3-methoxy-4-(2-pyrrolidin-1-ylethoxy)phenyl]-3H-thieno[3,2-d]pyrimidin-4-one (GW803430)을 사용하였다. GW803430는 항우울증, 항불안제로 공지된 약물이다.

[0125] 수정 후 5일째 야생형 제브라피쉬 2~3개체에 20uM의 농도로 각각 DMSO, GW803430, CNU24834를 노출시키고, 약1시간 동안 반응시켰다. 그 후에 신경 활성 마커인 c-fos의 발현 양상을 측정하여 평가하였다(도 6).

[0126] c-fos의 발현 양상을 확인하기 위해 전조직표본현장혼성화(whole-mount in situ hybridization)기법을 이용하였는바, c-fos 탐침의 제작을 위해 제브라피쉬 뇌 조직의 cDNA를 주형으로 정방향 프라이머 (5'-GGGATCCGACAGGATGATGTTTACCAGCCTT-3'; 서열번호 7) 및 역방향 프라이머 (5'-CCTCCTCACTCTTTGAGATTCCACCTCGAGG-3'; 서열번호 8)를 이용한 PCR을 수행하여 1,064bp c-fos 유전자 단편을 획득한 뒤, pGEM T-easy 벡터에 삽입하였다. pGEM T-easy 벡터에 삽입된 c-fos 유전자는 SpeI 제한효소로 절단하여 선형화 시킨 뒤, 정제하고, T7 RNA Polymerase (ThermoFisher, 미국)와 Digoxigenin-labelled UTP (Roche, 독일)을 이용하여 c-fos RNA 탐침을 합성하였다.

[0127] 상기의 과정으로 DMSO, GW803430, CNU24834에 노출된 제브라피쉬 야생형 개체를 4% 파라포름알데히드/PBS에 넣어 4℃에서 12시간 이상 고정시켰다. 고정된 개체들은 PBST (1X PBS, 0.1% Tween-20)으로 5분간 3회 수세하고, 100% 메탄올로 3회 갈아준 뒤 메탄올에 든 상태로 -20 ℃에서 장기간 보관하였다. 메탄올에 보관된 개체들을 75%, 50%, 25% 메탄올/PBST에서 각각 5분씩 점차적으로 교체한 뒤 PBST로 5분간 5회 수세하였다. 그 뒤 PBST에 Proteinase K (Roche, 독일) (10 ㎕/㎖)를 첨가하여 개체에 30분간 반응시킨 뒤, 4% 파라포름알데히드/PBS 용액으로 교체하여 30분이상 반응시켰다. 그 뒤, PBST로 5분간 5회 수세하였고 HYB* (50% 포름알데히드, 5X

saline sodium citrate, 0.1% Tween-20) 300 ㎕로 교체하여 70℃에서 5분간 반응시켰다. HYB+ (5 mg/㎖ torula RNA, 50 ㎕/㎖ heparin, 1M citric acid, pH 6.0) 300 ㎕로 교체하여 70℃에서 1시간 반응시킨 뒤, c-fos 탐침 50 ng/㎕를 첨가하여 70℃에서 12시간 이상 반응하였다. c-fos 탐침이 든 용액을 제거하고 70℃에서 75%, 50%, 25% HYB*/2X SSCT (2X SSC, 0.1% Tween-20) 용액으로 20분마다 교체해 준 뒤, 2X SSCT 용액으로 20분, 0.2X SSCT로 30분 간격으로 5회 교체해 주었다. 그 뒤, 상온에서 75%, 50%, 25% 0.2X SSCT/PBST로 5분마다 교체해 준 뒤, PBST로 5분간 5회 수세하였다. 5% sheep serum/PBST 300 ㎕로 교체하여 상온에서 1시간 반응시킨 뒤, 5% sheep serum/PBST에 1/4,000로 희석시킨 anti-DIG-Alkaline Phosphatase Fab (Roche, 독일)를 넣어 상온에서 4시간 또는 4℃에서 12시간 반응시켰다. 그 후, PBST로 상온에서 30분간 4시간 수세한 뒤 staining buffer (0.1M Tris-Cl pH 9.5, 0.1M NaCl, 50mM $MgCl_2$, 0.1% Tween-20)로 5분에 3회 교체해 주었고, 발색기질인 NBT/BCIP (Roche, 독일)의 stock을 staining buffer에 각각 4.5 ㎕/㎖ (stock; 50 mg/㎖ NBT/70% 디메틸포름아마이드)과 3.5 ㎕/㎖ (stock; 50 mg/㎖ BCIP/ 디메틸포름아마이드)를 사용하여 빛을 차단한 상온에서 반응시킨 뒤 현미경으로 관찰하면서 염색 여부를 확인하였다. 염색이 끝난 개체들은 stop solution (1X PBS pH 5.5, 1 mM EDTA, 0.1% Tween-20)으로 5분간 3회 교체하였고, PBST로 5분간 3회 수세하였다. 그 다음 100% 메탄올로 10분간 3회 교체한 뒤, -20℃에서 보관하였다. 사진 작업은 25%, 50%, 75% 글리세롤/PBST로 점차 교체해준 뒤 현미경상에서 수행하였다.

[0128] 그 결과, DMSO에 노출된 경우에 비해, GW803430 및 특히 CNU24834에 노출된 경우 상당히 많은 양의 c-fos가 발현된 것을 알 수 있었다.

[0129] 한편, 수정 후 5일째 야생형 제브라피쉬 한 개체를 96-웰 플레이트의 각 웰에 분주한 뒤, 20uM의 농도로 각각 DMSO, GW803430, CNU24834를 노출시키고, DanioVision(Noldus, 네덜란드) 장치와 EthoVision XT(Noldus, 네덜란드) 프로그램을 사용하여 시간 경과에 따른 각각의 행동학적인 변화(이동거리, 운동지속시간)를 비교하여 분석하였다(도 6).

[0130] 그 결과, DMSO 처리군의 경우 운동성에 변화가 없었고, GW803430 처리군의 경우에는 운동성이 증가하는 경향을 보여주었고, CNU24834 처리군의 경우에도 운동성 향상이 눈에 띄게 일어남을 알 수 있었다(도 6).

[0132] **3. 3-(4-클로로페닐)벤조[4, 5]이미다조[2, 1-b]싸이아졸-6-카복실산의 안정성**

[0133] **<실시예 1> 배독성(embryo toxicity) 및 최기성(teratogenicity) 확인**

[0134] 제브라피쉬 야생형의 수정란을 씻어 페트리디쉬에 옮기고 각각 CNU24834 20uM 첨가한 배양기 및 무첨가 배양기에 넣어 28.5℃에서 발생을 유도시켰다. 발생의 과정은 해부현미경을 통해 시간별, 형태학적 변화들을 관찰하였다.

[0135] 그 결과, 정상적인 배발생 과정을 보였으며, 어떠한 기형적 변화도 나타나지 않았으며, 무첨가 배양기에서 배양과정을 거치는 제브라피쉬와 동일한 형태를 나타냈다. (도 7)

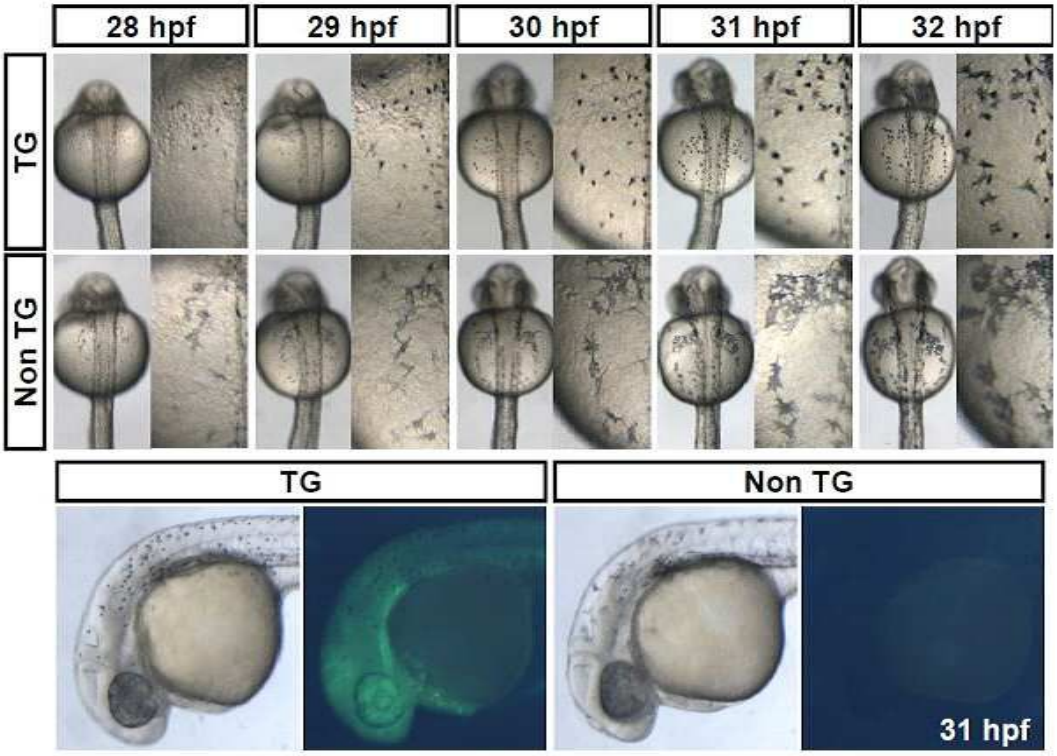
[0137] **<실시예 2> 심장 기능성 확인**

[0138] 야생형 제브라피쉬 2~3개체에 20uM의 농도로 각각 DMSO, GW803430, CNU24834를 노출시키고, 약 1시간 동안 반응시켰다. 그 후에 각각의 제브라피쉬의 분당 심상박동수를 체크하였다.

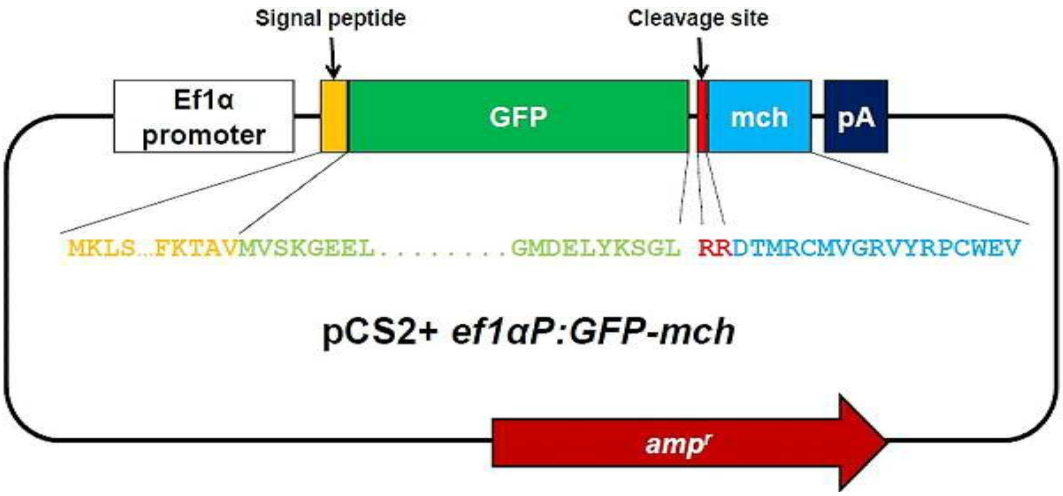
[0139] 그 결과, GW803430, CNU24834 처리 군의 경우 DMSO 처리 군과 유사한 정도의 분당 심장박동수를 나타냈다. (도 8) 이를 통해, CNU24834는 심장 기능성에 어떠한 영향도 미치지 않음을 알 수 있었다.

도면

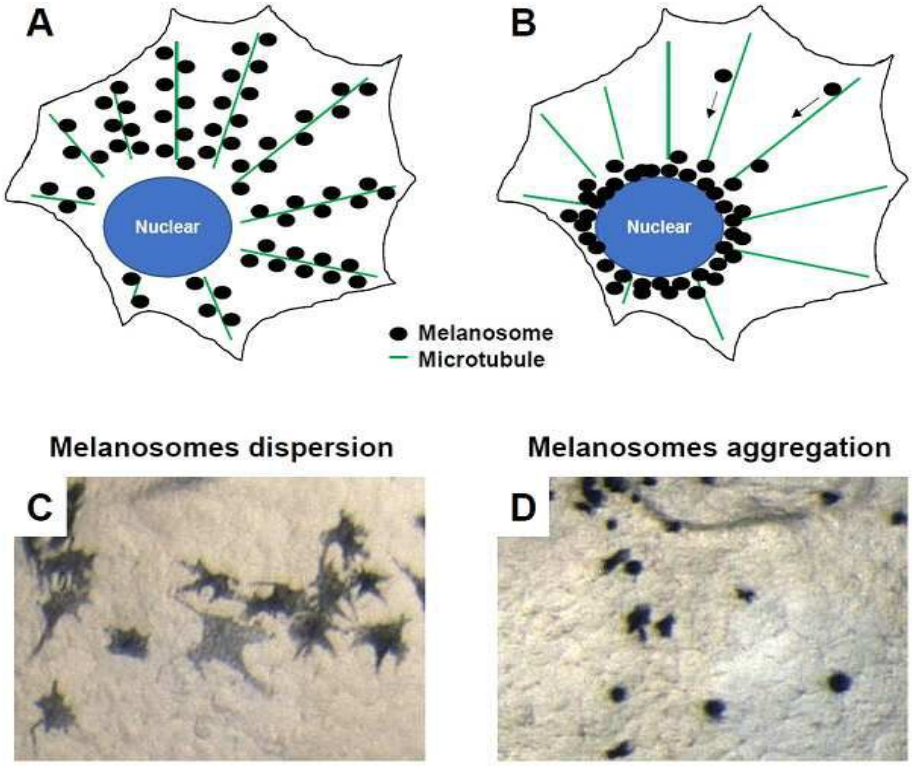
도면1


28 hpf
29 hpf
30 hpf
31 hpf
32 hpf
TG
Non TG
TG
Non TG
31 hpf

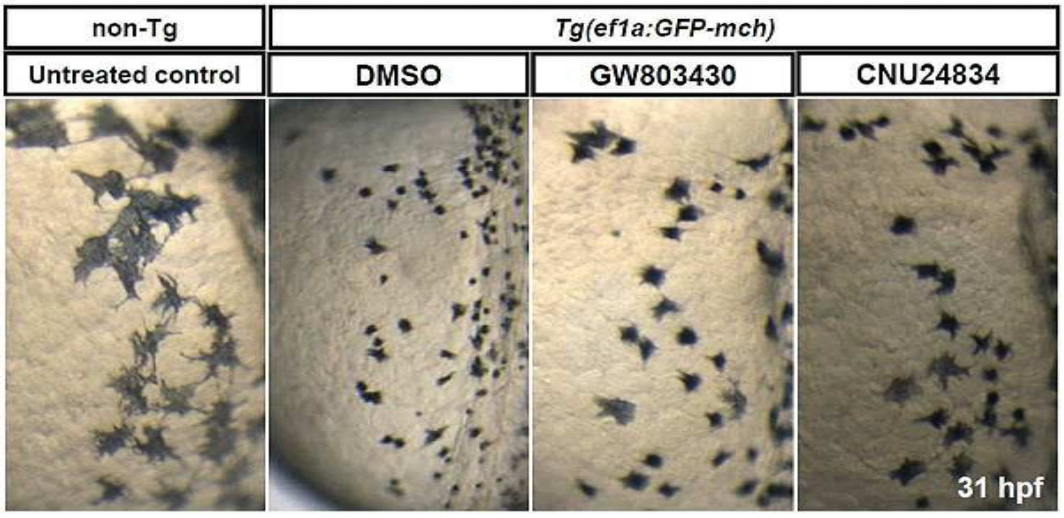
도면2


Signal peptide
Cleavage site
Ef1α promoter
GFP
mch
pA
MKLS...FKTAVMVSKGEEL.....GMDELYKSGL RRDTMRCMVGRVYRPCWEV
pCS2+ ef1αP:GFP-mch
ampr

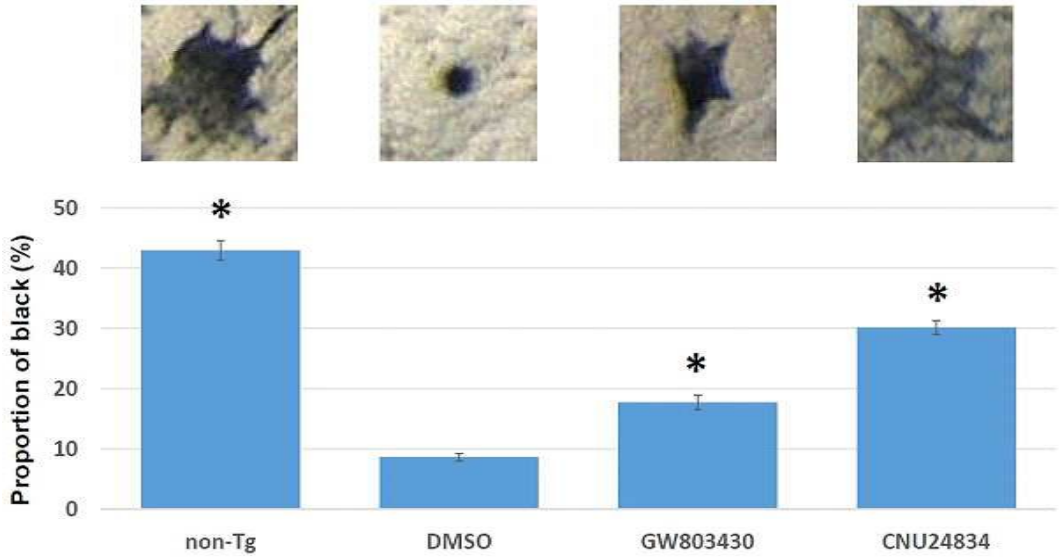
도면3


A
B
Nuclear
Nuclear
Melanosome
Microtubule
Melanosomes dispersion
Melanosomes aggregation
C
D

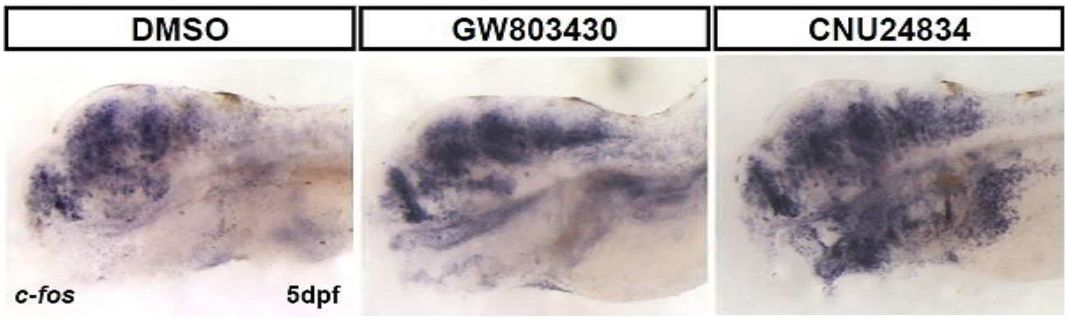
도면4


non-Tg
Tg(ef1a:GFP-mch)
Untreated control
DMSO
GW803430
CNU24834
31 hpf

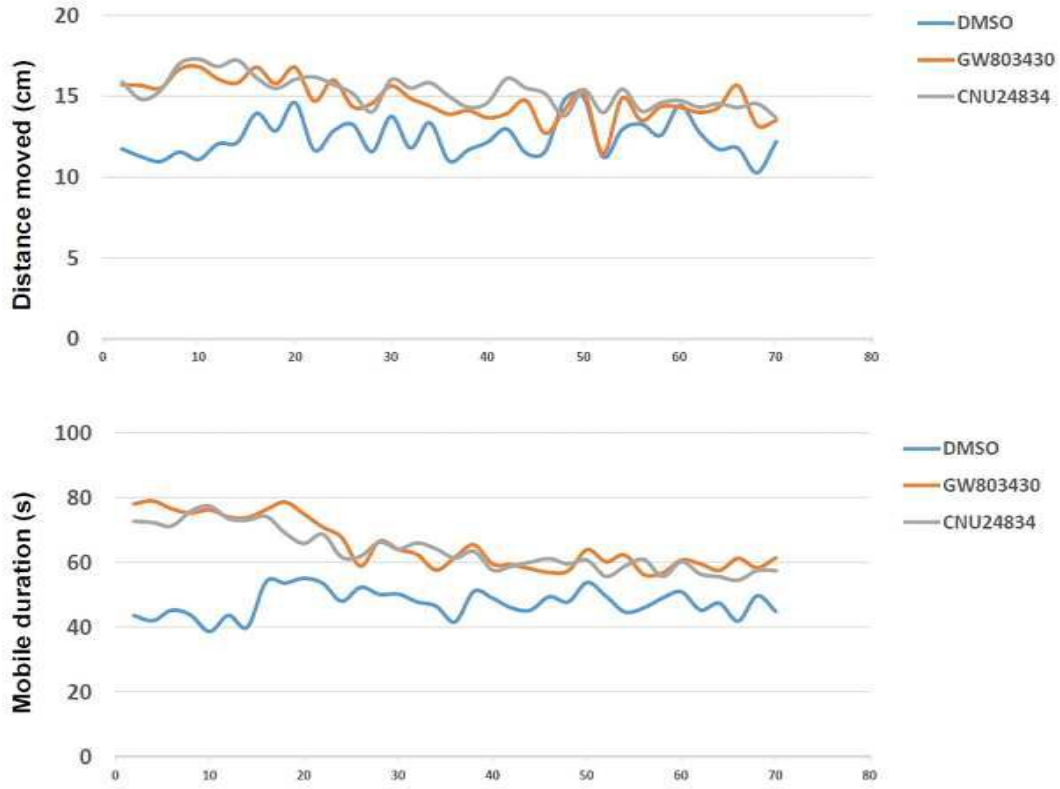
도면5


50
40
30
20
10
0
Proportion of black (%)
*
*
*
non-Tg
DMSO
GW803430
CNU24834

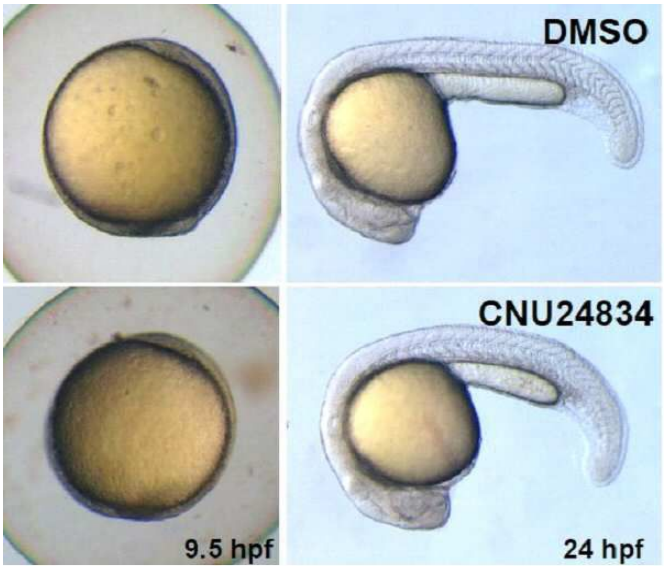
도면6


DMSO
GW803430
CNU24834
c-fos
5dpf

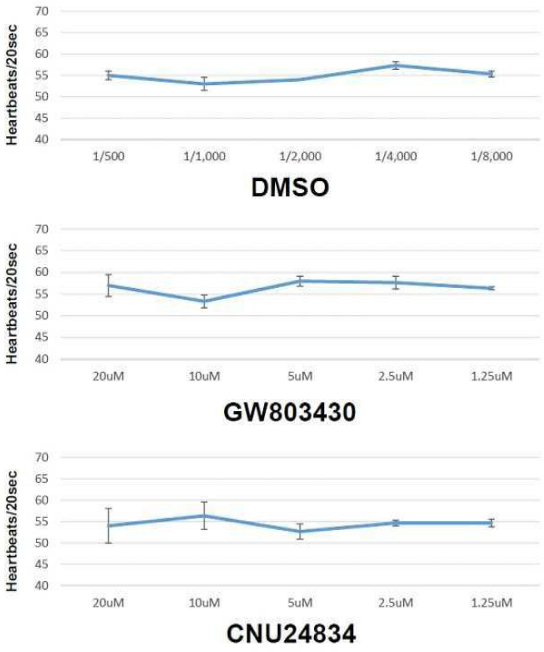
도면7


Distance moved (cm)
20
15
10
5
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
DMSO
GW803430
CNU24834
Mobile duration (s)
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
DMSO
GW803430
CNU24834

도면8


DMSO
CNU24834
9.5 hpf
24 hpf

도면9



서 열 목 록

<110> Chungnam National University

<120> Composition for treating obesity or depressive disorder comprsing 3-(4-chlorophenyl)benzo[4,5]imidazo[2,1-b]thiazole-6-carboxylic acid

<130> P15-356

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 1

caagacagga aacagcagcc aaacc 25