



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0054854
(43) 공개일자 2021년05월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4184 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61P 25/36 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/4184 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2019-0141035
(22) 출원일자 2019년11월06일
심사청구일자 2019년11월06일
- (71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)
- (72) 발명자
서영호
대구광역시 수성구 청수로 261, 1410동 1301호 (황금동, 캐슬골드파크 4단지)
- 박병덕
대구광역시 수성구 수성로69길 41, 301동 1906호 (수성동1가, 수성롯데캐슬더퍼스트3단지)
- (74) 대리인
특허법인태백

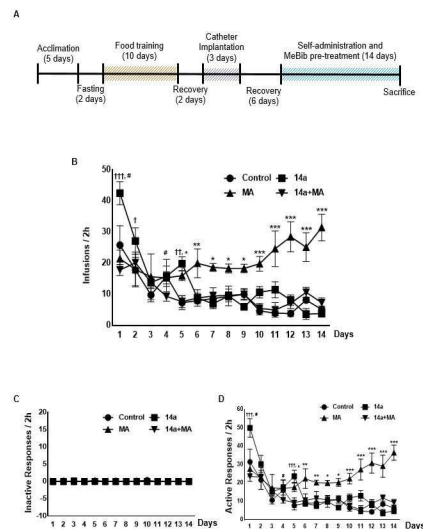
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 마약 중독 예방 또는 치료용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 마약 중독을 예방하거나 치료하기 위한 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 화합물 14a는 약물 노출에 의해 유도되는 GluN2B 발현을 억제하는 효과를 나타내었으며, GluN2B 발현 억제를 통하여 마약 중독을 유도하는 BDNF/ERK/CREB 신호과정을 억제하는 효과를 나타내어 메스암페타민과 같은 약물 중독이 억제되는 효과를 확인함에 따라, 상기 화합물 14a를 유효성분으로 함유하는 조성물은 마약 중독 예방 또는 치료용 약학조성물 및 건강식품으로 제공될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 25/36 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2200/334 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	116102-03
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림수산식품기술기획평가원
연구사업명	가축질병대응개발사업
연구과제명	항바이러스 제제 합성 및 라이브러리 구축
기 여 율	30/100
과제수행기관명	(주)동방
연구기간	2018.09.05 ~ 2019.09.04

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2016R1A6A1A03011325
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중점연구소지원(이공계분야)
연구과제명	약물의존장애 핵심 진단기술 개발 및 치료전략 연구
기 여 율	40/100
과제수행기관명	계명대학교 산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2016R1A1A1A05921696
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(구)신진연구지원사업(후속연구지원)
연구과제명	골 흡수형 파골세포 전환의 선택적 제어를 통한 골다공증의 치료기전연구
기 여 율	30/100
과제수행기관명	계명대학교 산학협력단
연구기간	2019.08.01 ~ 2019.11.30

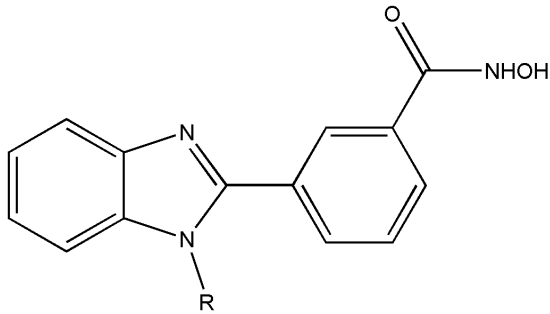
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 마약 중독 예방 또는 치료용 약학조성물.

[화학식 1]



상기 화학식 1에 있어서, R은 수소 또는 (C1~C4)알킬 임.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 마약 투여에 의해 유도되는 GluN2B 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는 마약 중독 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 GluN2B 발현 억제를 통하여 마약 중독을 유도하는 BDNF/ERK/CREB 신호과정을 억제하는 것을 특징으로 하는 마약 중독 예방 또는 치료용 약학조성물.

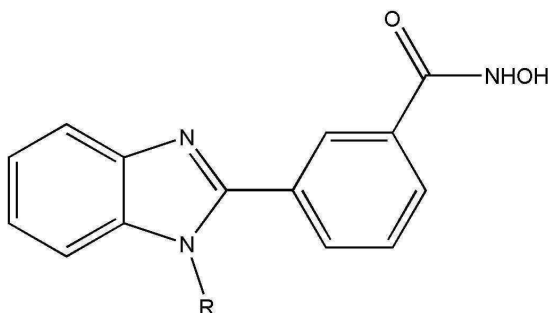
청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 마약은 메스암페타민, 모르핀, 코케인, 아편, 대마, 필로폰 및 엑스터시로 이루어지는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 마약 중독 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 마약 중독 예방 또는 개선용 건강식품.

[화학식 1]



상기 화학식 1에 있어서, R은 수소 또는 (C1~C4)알킬 임.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 마약은 메스암페타민, 모르핀, 코케인, 아편, 대마, 필로폰 및 엑스터시로 이루어지는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 마약 중독 예방 또는 개선용 건강식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 마약 중독을 예방하거나 치료하기 위한 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 "마약(narcotics)"은 아편 및 이의 유도체와 유사한 효과를 갖는 화합물을 의미하고, 사전적으로는 모르핀, 코데인, 노스카핀, 파파베린, 테바인, 헤로인 등의 습관성 또는 중독성 약물을 포함하는, 양귀비 식물로부터 유래된 자연 배합물인 아편성 약물 또는 아편 유사 약물로 정의된다(Stedman's Medical Dictionary, 26th edition, Williams & Wilkins Publ., 1995). 특정 화합물이 마약으로 분류되기 위해서는 "감정 및 행동의 중대한 변화"를 유발할 수 있어야 하고, "혼수의 무통"의 상태를 유발할 수 있어야 하며, 의존성, 내성 및/또는 중독과 같은 심각한 위험을 나타낼 수 있음을 입증하여야 한다.

[0003] 대부분의 마약 중독자들은 처음에는 진통을 목적으로 마약성 물질을 투여하게 되지만, 점차적으로 마약성 물질에 중독되면서 좀 더 강력한 마약을 찾게 된다. 이들 마약 중독자들의 공통적인 병리학적 증세로는 피로, 정서적 불안정, 반-혼수 상태, 구토 등을 예로 들 수 있고, 상기 증세가 심화되면 반사회적, 반윤리적인 행동을 취하게 되어, 결과적으로는 사회적인 문제를 발생시킨다. 이에, 마약 중독자를 치료하기 위한 노력이 범국가적인 차원에서 수행되고 있으나, 대다수의 마약 중독자들이 완전히 치료되지 않고 있는 실정이다. 이는 마약류의 중독기전이 복잡하고, 환경, 유전, 인종, 투약 형태, 약물 종류 등의 다양한 요인이 관여하기 때문이다.

[0004] 마약 중독을 치료하기 위해서, 금단 증상의 완화 및 재투약의 억제가 필수적인데, 금단 증상은 특별한 치료약이 없고 대증요법을 실시하는 형편이다. 또한, 재투약을 완화시키는 치료의 측면에서는 중독의 생리적인 기능의 이해가 중요하다. 중독이라는 상태가 나타나는 원인에 대해서는 여러 가지 이론이 있지만, 가장 일반적으로 받아들여지는 것은 섭취 욕구(craving)의 증가이다. 이는 마약 중독의 주요한 현상이고, 단약을 하고 수년이 지난 뒤에도 쉽게 재투약을 하는 원인이기 때문에 치료의 주목표가 되고 있다.

[0005] 메스암페타민(Methamphetamine)은 중추신경계 흥분활성을 지닌 교감신경 유사아민으로서 암페타민계 약물에 해당한다. 메스암페타민은 중추신경계의 노르에피네프린성 신경세포로부터 노르에피네프린을 유리시켜 중추신경계에 효과를 나타내고 고용량에서는 대뇌변연계에서 도파민의 분비를 증가시키는 작용을 하여 수면 발작의 치료나 외인성 비만증에 있어서 단기 보조치료 및 소아의 과운동성 집중력 결핍 장애의 치료에 사용되고 있는 약물이다.

[0006] 이러한 메스암페타민을 과량 투여하거나 반복해서 사용하면 중독을 일으키는데 중독 증상으로 초초, 불안감, 불면, 공격성향, 환각, 공황상태, 발한, 고혈압 또는 저혈압 등의 증상들이 나타나다가 부정맥, 경련, 혼수 등을 유발시켜 심할 경우 사망에도 이를 수 있음이 보고되고 있다. 또한 장기간 복용시 내성 및 금단현상이 나타날 수 있다.

[0007] 이러한 약물 중독의 치료를 위해 일반적으로 사용되는 약물로서, 정신적 증상들의 완화를 위해 haloperidol과 같은 정신질환치료제나 발작이나 경련을 치료하기 위한 diazepam, phenytoin과 같은 경련 억제약물 등이 증상을 완화시키기 위해 사용되고 있으나, 이러한 약물들은 그 자체에 의해서도 탐닉성이 유발될 수 있어 그 사용이 엄격히 제한되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2010-0066802호 (2010.06.18. 공개)

발명의 내용

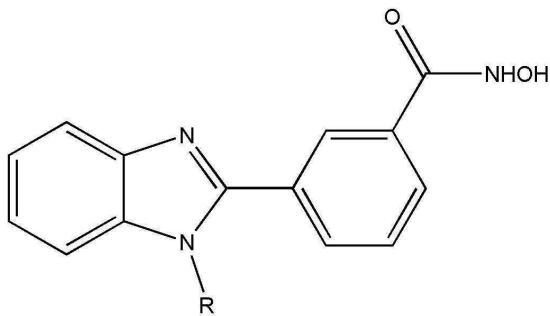
해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 마약 중독을 예방하고 치료에 유용하게 사용될 수 있는 화합물을 확인하고, 상기 화합물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 제공하여 마약 중독 예방 또는 치료용 약학조성물 및 건강식품으로 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 마약 중독 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0011] [화학식 1]



[0012] 상기 화학식 1에 있어서, R은 수소 또는 (C1~C4)알킬 임.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 마약 중독 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따르면, 화합물 14a는 약물 노출에 의해 유도되는 GluN2B 발현을 억제하는 효과를 나타내었으며, GluN2B 발현 억제를 통하여 마약 중독을 유도하는 BDNF/ERK/CREB 신호과정을 억제하여 메스암페타민과 같은 마약성 약물의 중독이 억제되는 효과가 나타나는 것이 확인됨에 따라, 상기 14a 화합물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 마약 중독 예방 또는 치료용 약학조성물 및 건강식품으로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 14a 화합물이 지속적인 MA 자가 투여를 억제하는 효과를 확인한 결과로, 도 1A는 실험 과정을 나타낸 모식도이며, 도 1B는 14일의 실험기간 동안 주입 레버 누름 평균 수를 나타낸 결과이며(± SEM), 도 1C는 비활성 레버 누름의 평균 수를 나타낸 그래프이며(± SEM), 도 1D는 활성 레버 누름의 평균 수를 나타낸 그래프이며(± SEM), 활성 레버 누름은 FR1 10초 타임아웃 및 메스암페타민이 주입된 5초의 수가 포함되고, 결과값은 각 그룹의 평균 ± SEM 값으로 나타내었다 (n = 6 per group). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 control vs MA; † p < 0.05, †† p < 0.01, ††† p < 0.001 control vs 14a; # p < 0.05 control vs 14a+MA.

도 2는 화합물 14a의 NMDA 수용체 서브유닛인 GluN2B 발현 억제 효과를 확인한 결과로, 도 2A 및 도 2B는 각 그룹의 해마 조직을 웨스턴 블롯 분석한 결과로, 막을 GluA2 또는 GluN2B 항체와 인큐베이션하고 β-액틴을 이용하여 동량의 샘플이 로딩되었는지 확인하였으며, 결과값은 독립적인 3번의 반복실험을 나타내고 평균 ± SEM로 정량하였다. Turkey's multiple comparison test ***p < 0.001 compared to control.

도 3은 화합물 14a가 MA 자가 투여에 의한 ERK, CREB 및 BDNF의 발현을 억제하는 효과를 확인한 결과로, 도 3A 내지 도 3C는 각 그룹의 해마 조직을 웨스턴 블롯 분석한 결과로, 막을 p-ERK, ERK, p-CREB 및 BDNF 항체와 인큐베이션하고, β-액틴으로 동량의 샘플이 로딩된 것을 확인하였으며, 결과값은 독립적인 3번의 반복실험을 나타내고 평균 ± SEM로 정량하였다. Turkey's multiple comparison test *** p < 0.001 compared to control.

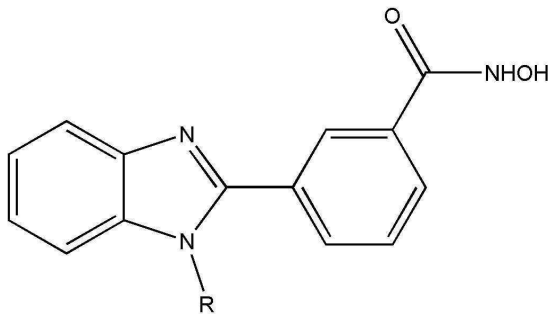
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0018] 본 발명자들은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 14a의 다양한 생리활성을 연구하던 중 화합물 14a가 마약 중독에 대한 탁월한 억제 활성 및 예방 효과를 나타내는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0020] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 마약 중독 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.

[0021] [화학식 1]



[0022] 상기 화학식 1에 있어서, R은 수소 또는 (C1-C4)알킬일 수 있다.

[0024] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 마약 투여에 의해 유도되는 GluN2B 발현을 억제시키는 것일 수 있다.

[0025] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 GluN2B 발현 억제를 통하여 마약 중독을 유도하는 BDNF/ERK/CREB 신호과정을 억제하는 것일 수 있다.

[0026] 상기 마약은 메스암페타민, 모르핀, 코케인, 아편, 대마, 필로폰 및 엑스터시로 이루어지는 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0027] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 마약 중독 예방 또는 치료용 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 젤, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.

[0028] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 마약 중독 예방 또는 치료용 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0029] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

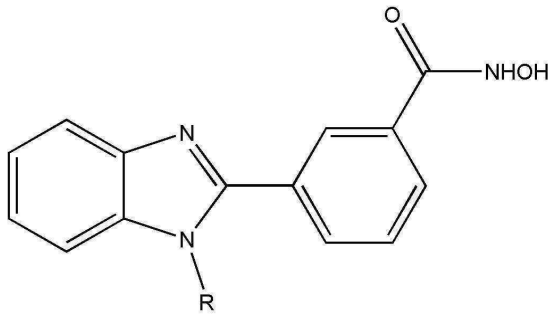
[0031] 상기 돌단풍 추출물의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로

및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 마약 중독 예방 또는 개선용 건강식품을 제공할 수 있다.

[0034] [화학식 1]



[0035] 상기 화학식 1에 있어서, R은 수소 또는 (C1~C4)알킬일 수 있다.

[0037] 상기 마약은 메스암페타민, 모르핀, 코케인, 아편, 대마, 필로폰 및 엑스터시로 이루어지는 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0038] 상기 건강식품은 화학식 1로 표시되는 화합물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적절하게 결정될 수 있다.

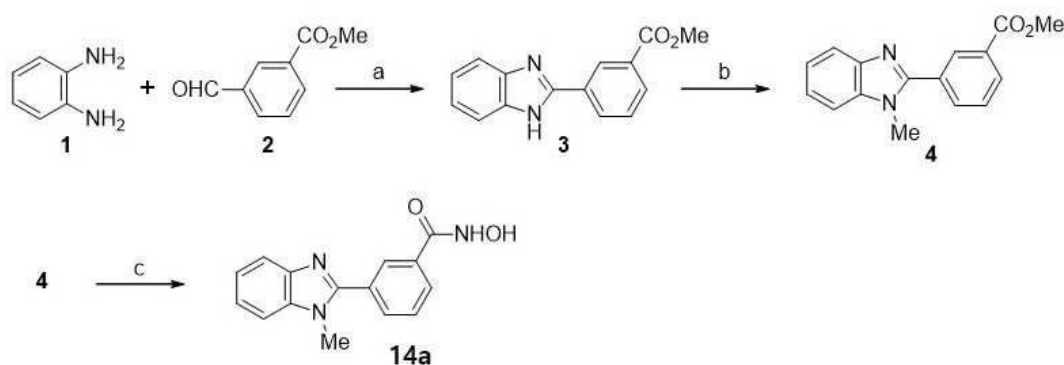
[0039] 상기 건강식품에 함유된 화합물의 유효용량은 상기 치료제의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0040] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제등을 들 수 있다.

[0042] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0044] <합성예> 화합물 14a 합성

[0045] [반응식 1]



[0046]

[0047] 시약 및 반응 조건: (a) 10% H₂O in DMF, 80℃, 48h, 86%; (b) NaH, methyl iodide, DMF, rt, 10h, 91%; (c) NH₂OH, KOH, MeOH, 0℃, 2h, 49%;

[0049] 상기 반응식 1과 같은 과정으로 화합물 14a를 합성하였다.

[0050] 간략하게, o-페닐렌디아민 (o-phenylenediamine; 1)과 알데하이드 (2)를 수용성 DMF에 용해시켜 화합물 3을 86% 수율로 얻었다. 화합물 3과 메틸 아이오다이드의 친핵성 치환으로 화합물 4를 91% 수율로 얻었다. 마지막으로 메탄올에 화합물 4를 NH₂OH 및 KOH와 함께 처리하여 목적 화합물인 14a를 49% 수율로 얻었다.

[0052] 1. 메틸 3-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)벤조에이트 [Methyl 3-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)benzoate] (3)

[0053] o-페닐렌디아민 (2.00 g, 18.50 mmol)과 메틸 3-포밀벤조에이트 (3.03 g, 18.50 mmol)를 용해시킨 DMF (180 mL)과 물(20 mL)을 혼합하고 오픈 플라스크하에서 80℃로 48시간 동안 교반하였다. 그 후 혼합물을 감압하여 농축하고 컬럼으로 정제하여 화합물 3을 86% 수율로 얻었다. R_f = 0.25 (3:7 ethyl acetate: hexanes). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.66 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 8.37-8.39 (m, 1H), 8.08-8.10 (m, 1H), 7.68 (q, J = 2.9 Hz, 2H), 7.54 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.30 (q, J = 3.1 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 166.57, 150.81, 131.37, 131.16, 131.00, 130.23, 129.41, 127.58, 123.38, 52.44. ESI MS (m/z) 253.10 [M+H]⁺.

[0055] 2. 메틸 3-(1-메틸-1H-벤조[d]이미다졸-2-일)벤조에이트 [Methyl 3-(1-methyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)benzoate] (4)

[0056] 화합물 3(1.25 mmol)을 용해시킨 DMF (5 mL)에 DMF (5 mL)에 용해시킨 수소화나트륨(sodium hydride; 2.25 mmol)를 0℃, 아르곤 대기하에서 첨가한 후 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반시켰다. 이후 메틸 요오드화물 (1.38 mmol)을 실온에서 반응 혼합물에 첨가하여 8시간 동안 추가 교반하였다.

[0057] 교반 후 반응 혼합물을 에틸 아세테이트로 희석하고, 물로 세척한 후 과량의 Na₂SO₄로 건조시키고, 감압하에서 농축시킨 후 MPLC로 정제하여 화합물 4를 91% 수율로 얻었다. R_f = 0.25 (4:6 ethyl acetate: hexanes). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.44 (s, 1H), 8.19 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.85-7.83 (m, 1H), 7.63 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.43-7.41 (m, 1H), 7.37-7.33 (m, 2H), 4.0 (s, 3H), 3.90 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 166.6, 152.8, 143.0, 134.0, 130.9, 130.8, 130.4, 129.2, 123.2, 122.8, 120.1, 109.9, 52.5, 31.96. ESI MS (m/z) 267.11 [M+H]⁺.

- [0059] 3. N-하이드록시-3-(1-메틸-1H-벤조[d]이미다졸-2-일)벤즈아미드 [N-hydroxy-3-(1-methyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)benzamide] (화합물 14a)
- [0060] 하이드록실아민 용액에 다음과 같이 준비하였다. 0℃에서 하이드록실아민 하이드로클로라이드 (Hydroxylamine hydrochloride, 3.72 g, 53.5 mmol)를 용해시킨 메탄올 용액(5 mL)에 포타슘 하이드록사이드 (potassium hydroxide, 3.00 g, 53.5 mmol)를 용해시킨 메탄올 용액(5 mL)를 첨가한 후 혼합액을 15분간 교반시켰다.
- [0061] 침전된 포타슘 클로라이드를 여과하여 제거한 후 여과된 용액을 반응에 사용하였다. 신선하게 준비된 하이드록실아민 용액 (10 mL)에 THF (10 mL)에 용해시킨 화합물 4 (1.2 mmol)를 0℃에서 첨가한 후 2시간 동안 교반하였다.
- [0062] 교반 후 pH 7의 3N HCl로 반응 혼합물을 중화시키고, 물로 희석한 후 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 과량의 Na₂SO₄로 건조시키고, 감압하에서 농축한 후 MPLC로 정제하여 화합물 14a를 49% 수율로 얻었다. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ 11.45 (s, 1H), 9.24 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.01 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.62-7.71 (m, 3H), 7.25-7.33 (m, 2H), 3.90 (s, 3H) ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-D₆) δ 163.6, 152.4, 142.5, 136.5, 133.3, 131.9, 130.4, 129.0, 128.1, 127.7, 122.6, 122.2, 119.1, 110.8, 31.8. ESI MS (m/z) 268.11 [M+H]⁺.
- [0064] <실험예>
- [0065] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.
- [0067] 1. 동물
- [0068] 200-250g 체중의 수컷 Sprague-Dawley 랫트 (Hyochang Company, Daegu, Korea)를 온도 21-23 ℃ 및 습도 55-65%로 조절된 사육 시설에서 12/12 h 광/암 주기로 각각 사육하였다.
- [0069] 랫트는 식이 훈련기간을 제외하고 임의의 음식 및 물 섭취를 유지하였으며, MA 자기 관리 연구는 암주기 동안 수행되었다.
- [0070] 실험 절차 및 동물 관리는 계명대학교 기관 동물 관리 및 사용 위원회(Daegu, South Korea; EXP-IRB number: KM_2018-007; the date of approval: 12 June 2018)에 따라 수행되었으며, 실험은 대학의 과학 연구 지침 및 규정에 따라 수행되었다.
- [0072] 2. 화합물 14a 준비
- [0073] 메스암페타민 (Methamphetamine; MA)을 식품의약품안전청(Korea)에서 구입하였다. 화합물 14a는 계명대학교 약학과 교수 서영호 교수님께서로부터 정제 및 제공받았다. MA를 멸균생리식염수 용해시켰으며, 화합물 14a는 10% DMSO로 용해시켜 사용하였다.
- [0075] 3. 장치
- [0076] operant conditioning chambers (Med Associates, St. Albans, VT, USA)에서 랫트를 실험을 수행하였다. 각 챔버는 두 개의 반응 레버 (4.8 × 1.9 cm), 큐라이트 (3 W, 28 V) 및 하우스 라이트 (3 W, 28 V)가 갖추어져 있었다.
- [0077] 큐라이트는 각 반응 레버 위에 위치하였으며, 챔버의 모든 바닥은 목재 칩이 깔려있었으며, 금속 격자로 덮여 있었다. 챔버를 환기 팬이 갖추어진 소음 감소 목재 인클로저 내에 배치하였다.
- [0078] 주입 펌프 (Razel Scientific Instruments, Stamford, CT, USA)내 주사기를 타이콘 튜브로 fluid swivel (Med Associates, St. Albans, VT, USA)에 연결하였다.

- [0079] 금속 스프링이 있는 타이콘 튜빙 실드는 동물의 카테터 캐놀라 장치의 swivel에 연결하였다.
- [0081] 4. 정맥내 카테터 (Intravenous catheterization)
- [0082] 정맥내 카테터 설치를 위해, 트리도데실메틸 암모니움 클로라이드 헤파린 (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA)를 Silastic catheter (inner diameter, 0.02 in.; outer diameter, 0.037 in.; Dow Corning, Midland, MI, USA)에 처리하고, 나트륨 펜토바르비탈 마취 (50 mg/kg, i.p.)하에 오른쪽 외경정맥에 삽입하였다.
- [0083] 수술용 메쉬로 카테터를 경정맥에 고정시키고, 22-gauge stainless-steel cannula (Plastics One, Roanoke, VA, USA)를 통해 동물 등쪽 피부를 절개하여 몸 밖으로 꺼낸 후 치과용 시멘트로 헤드 접합체에 고정하고, 프롤렌 수술용 메쉬(Ethicon Inc.)로 고정하였다.
- [0084] 카테터의 개존율은 헤파린 (20 U/ml)과 젠타마이신 설페이트 (0.33 mg/ml)가 포함된 식염수 0.2 ml로 매일 세척하여 유지시켰다.
- [0086] 5. MA 자가투여 (self-administration)
- [0087] MA 자가 투여의 획득을 촉진시키기 위해 처음에는 랫트가 식품제한 하에서 매일 3시간 동안 45 mg 식품 펠릿 (Bio-serv, Frenchtown, NJ, USA)을 얻기 위한 레버를 누르도록 훈련되었다.
- [0088] 획득 기준(3회 연속 세션 동안 100개의 음식 펠릿)이 확립된 후, 카테터 삽입 수술 전 최소 1일 동안 랫트를 임의의 음식 및 물이 공급된 케이지에서 보관하였다.
- [0089] 수술 후 1주일의 회복기간을 거친 후 고정 비율 (FR1) 스케줄하에서 랫트가 MA에 대한 레버 누름 반응(0.1 ml 부피에서 5초 동안 0.1 mg/kg이 주입)을 얻도록 하였다.
- [0090] 레버를 누를 때마다 활성 레버 위에 위치한 큐 라이트의 조명이 켜지고 5 초 동안 하우스 라이트가 꺼졌다. 각 주입 후에는 하우스 라이트가 꺼진 상태에서 10초의 타임 아웃 기간이 추가되었다.
- [0091] 비활성 레버의 누름이 기록되었만 프로그램화된 결과는 없었다.
- [0092] 일반적으로 MA 자가 투여는 시작 후 14일이 소요되었으며, 안정적인 기준값의 확립 후 자가투여 실험 시작 30분 전 화합물 14a (10 mg/kg) 또는 비히클을 랫트에 복강내 주사하여 전처리하였다.
- [0094] 6. 웨스턴 블롯 분석
- [0095] 동결 조직 절편기를 이용하여 뇌를 절단하고 해마회 조직을 얻었으며, 데이터 분석에 사용하였다. 상기 조직을 단백질분해효소 및 인산가수분해효소 억제제가 포함된 단백질 추출 버퍼로 균질화하였다.
- [0096] BCA assay kit (Thermo Scientific, Waltham, MA)로 단백질 농도를 측정하였으며, 8% 또는 12% SDS-PAGE에서 단백질을 분리시킨 후 PVDF 막 (Merck Millipore)에 옮겼다.
- [0097] 실온에서 1시간 동안 상기 막을 5% 탈지유로 블로킹하고, 다음과 같은 1차 항체와 4℃에서 하룻밤동안 인큐베이션하였다: AMPA receptor 2 (GluA2; 1:1,000, 13607, Cell Signaling), BDNF (1:1,000, ab108319, Abcam), phospho-CREB (1:1,000, 9198, Cell Signaling), phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2; 1:1,000, 9101, Cell Signaling), p44/42 MAPK (ERK1/2; 1:1,000, 9102, Cell Signaling), NMDA receptor2B (GluN2B; 1:1,000, 4212, Cell Signaling), 및 β -액틴 (1:1,000, 4970, Cell Signaling).
- [0098] TBST로 20분 동안 막을 세척하고 HRP(Horseradish Peroxidase)가 결합된 2차 항체를 결합시켰다: Anti-Mouse IgG (1:5,000, 7076, Cell Signaling) 및 Goat Anti-Rabbit IgG (1:5,000, 7076, Cell Signaling); Rabbit Anti-Goat IgG H&L (HRP) (ab6741-Abcam).
- [0099] 화학 발광 기질(Amersham Bioscience, UK)을 막에 분산시킨 후 Fusion SOLO S system (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Germany)를 이용하여 이미지를 얻었으며, ImageJ software로 단백질 밴드를 정량하였다.

[0101] <실시예 1> 메타암페타민 자가 투여 억제 효과 확인

[0102] 랫트를 6 그룹으로 나누고, 도 1과 같이 14일 동안 매일 활성 레버 누름, 비활성 레버 누름 및 MA 자가 투여 랫트 주입에 대한 평균을 확인하였다.

[0103] 도 1B를 참고하면 랫트의 MA 자가 투여군(MA group)은 대조군($F [13,65] = 5.781, p < 0.0001$), 화합물 14a 투여군 ($F [13,65] = 9.330, p < 0.0001$), 화합물 14a 및 MA 투여군 ($F [13,65] = 9.330, p < 0.001$)과 비교하여 상당한 수의 주입 레버 누름으로 명확한 목표 지향적 행동이 발달한 것이 확인되었다. 또한, 도 1C를 참고하면 비활성 레버 누름의 빈도는 모든 그룹에서 유사하게 나타났다.

[0104] MA는 강력한 자가 투여 행동을 유지한 반면, 식염수 또는 화합물 14a 투여군에서는 나타나지 않았으며, MA 자가 투여하는 모든 동물은 대조군과 비교하여 활성 레버에 대한 상당히 높은 반응 속도를 나타내었다 ($F [13,65] = 5.886, p < 0.0001$).

[0105] 반면, 도 1D를 참고하면 자가 투여 기간의 시작 30분 전 화합물 14a를 매일 복강내 주입한 결과 MA 섭취량($F [13,65] = 2.373, p < 0.001$)이 유의하게 감소가 나타났다.

[0106] 상기 결과로부터 화합물 14a는 MA 중독을 효과적으로 조절하는 것이 확인되었다.

[0108] <실시예 2> GluN2B의 발현 억제 효과 확인

[0109] MA에 의한 글루타민산염 방출은 흥분독성을 유도하는 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 및 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) 수용체를 활성화시키는 것으로 알려져짐에 따라, 웨스턴 블롯 분석을 통하여 이를 확인하였다.

[0110] 그 결과, 도 2B 및 도 2A와 같이 각 그룹에서 NMDA 수용체 사브유닛 GluN2B 및 AMPA 수용체 서브유닛 GluA2의 단백질 발현이 확인되었다. MA 투여군은 대조군과 비교하여 GluA2 및 GluN2B 발현 수준을 유의하게 증가시켰다. 반면, 화합물 14a가 처리된 실험군에서는 MA 단독 투여군과 비교하여 GluN2B 수준이 감소된 것으로 나타났다.

[0111] 상기 결과로부터 화합물 14a는 GluN2B 조절을 통하여 MA의 자가투여를 억제하는 것으로 제안될 수 있다.

[0113] <실시예 3> ERK 활성화 억제 효과 확인

[0114] 앞선 연구에 따르면, 새로운 기억의 형성 및 통합에 참여하는 해마는 MAPK 및 ERK를 통하여 조절된다. 또한, ERK pathway는 GluN2B를 포함하는 수용체에 의해 활성화되는 것으로 알려져있다. 이에 따라, 화합물 14a가 MA 투여군에서 GluN2B 억제를 통하여 ERK의 인산화를 조절할 수 있는 지를 확인하였다.

[0115] 그 결과, 도 3A와 같이 MA 자가 투여를 통하여 ERK 인산화가 활성화되었으며, 화합물 14a 전처리를 통하여 상기 활성화가 억제되는 것이 확인되었다.

[0117] <실시예 4> CREB 인산화 억제 효과 확인

[0118] NMDA 수용체를 포함하는 CREB 신호과정은 MA에 의해 유도되는 행동 민감성 및 보상 효과에 대한 중요한 역할을 수행한다.

[0119] 이에 따라, CREB 인산화에 대한 MA 자가 투여의 효과를 확인하였다.

[0120] 그 결과, 도 3B와 같이 MA 투여군에서 CREB 인산화가 증가된 반면, 화합물 14a 처리를 통하여 CREB 인산화가 억제된 것이 확인되었다.

[0122] <실시예 5> BDNF 발현 억제 효과 확인

[0123] 피질과 해마에서 혈청 뇌 유래 신경영양 인자(BDNF)의 약물에 의해 유도되는 변화가 MA 사용자에게서 관찰되었으며, BDNF의 증가 수준은 NMDA 발현 및 세포 내 칼슘 농도 증가와 관련성이 있는 것으로 보고되었다.

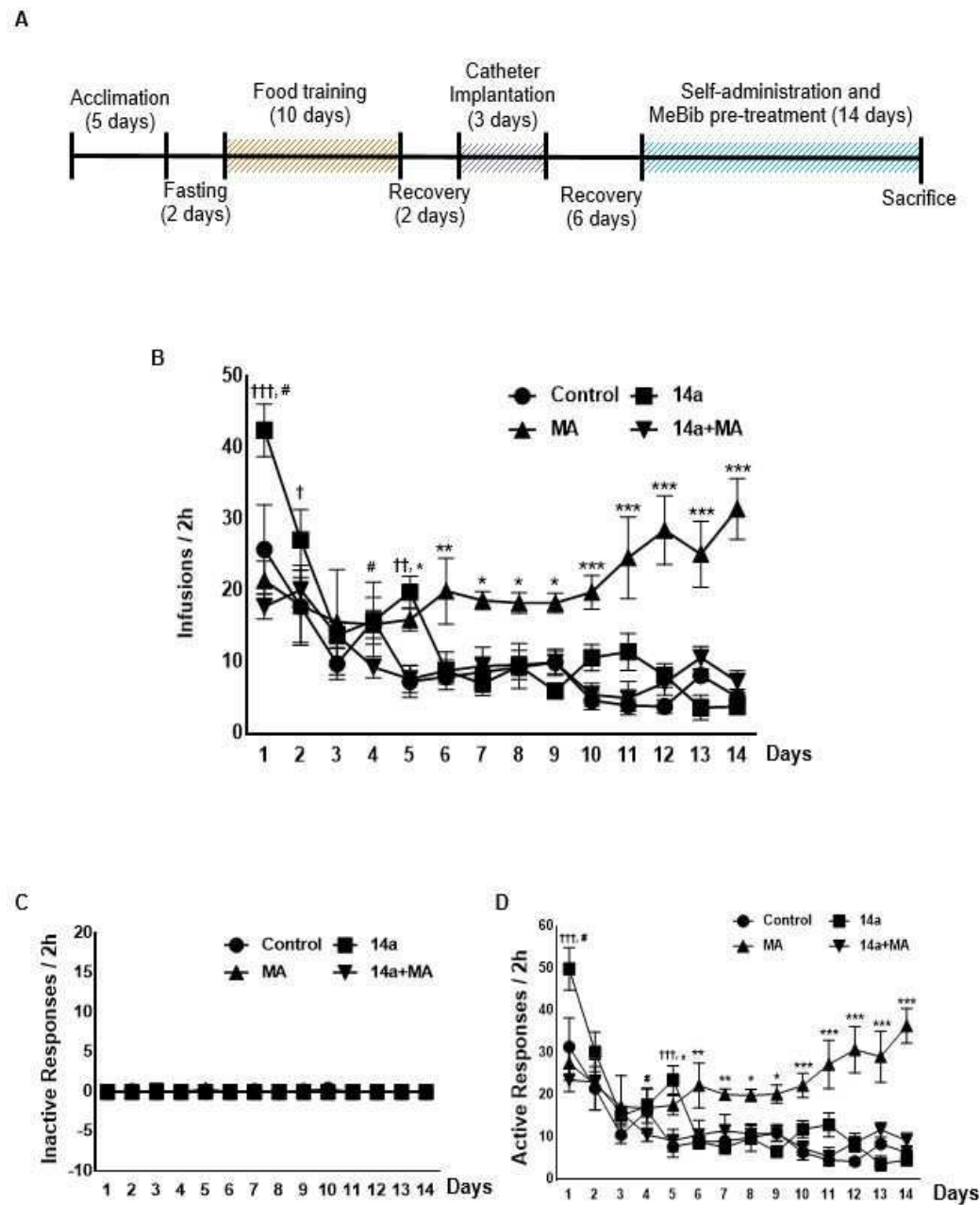
[0124] 이에 따라, 화합물 14a에 의한 GluN2B 발현 조절이 BDNF 발현에 영향을 줄 수 있는 지 여부를 확인하였다.

[0125] 그 결과, 도 3C와 같이 MA 자가 투여에 의한 BDNF 발현 증가는 화합물 14a 처리에 의해 억제되는 것이 확인되었다.

[0127] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

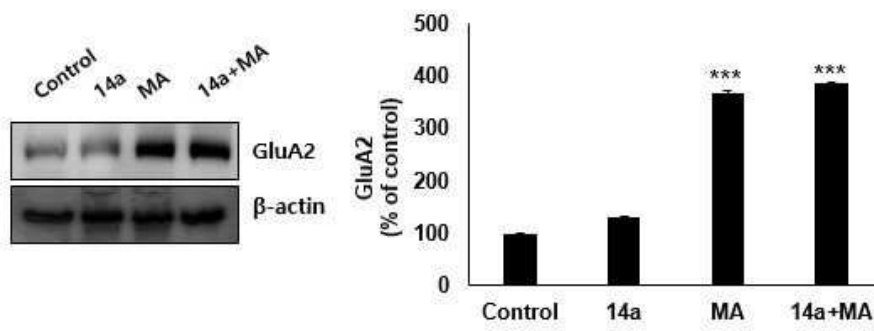
도면

도면1

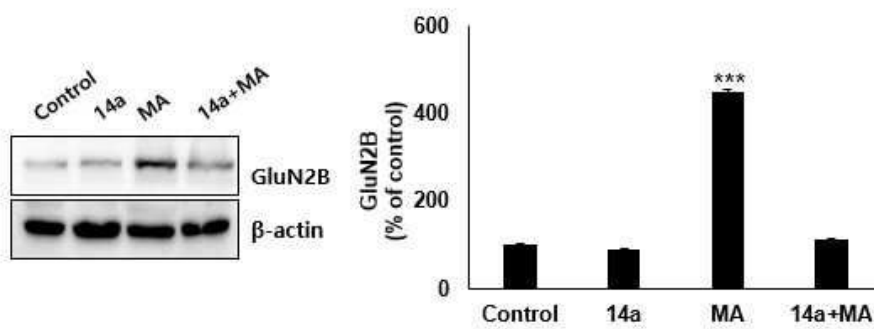


도면2

A



B



도면3

