



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0005137
 (43) 공개일자 2009년01월12일

(51) Int. Cl.
A61K 45/00 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2008-7026812
 (22) 출원일자 2008년10월31일
 심사청구일자 없음
 번역문제출일자 2008년10월31일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2007/067971
 국제출원일자 2007년05월02일
 (87) 국제공개번호 WO 2007/131005
 국제공개일자 2007년11월15일
 (30) 우선권주장
 60/797,228 2006년05월03일 미국(US)

(71) 출원인
노파르티스 아게
 스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라체 35
 (72) 발명자
랑왈라, 샤미나 엠.
 미국 02445 메사추세츠주 브루클린 킬시스 로드
 38 아파트먼트 33
스티븐슨, 수잔 씨.
 미국 01721 메사추세츠주 애쉬랜드 화이트 록 로
 드 8
우, 지단
 미국 02120 메사추세츠주 보스턴 트레몬트 로드
 1575 아파트먼트 410
 (74) 대리인
양영준, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 유기 화합물의 용도

(57) 요약

당뇨병, 인슐린 저항성, 대사 질병/대사 증후군, 이상지혈증, 비만, 과체중, 신경퇴행성 질병, 예컨대 파킨슨씨 병, 알츠하이머씨병, 헌팅턴씨병의 예방, 진행 지연 또는 치료, 또는 운동 지구력 향상을 위한, ERR γ 작용자 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 용도가 제공된다.

특허청구의 범위

청구항 1

치료 유효량의 ERR γ 작용자를 본 처치가 필요한 인간을 포함한 온혈 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 당뇨병, 인슐린 저항성, 대사 질병/대사 증후군, 이상지혈증, 비만, 과체중, 신경퇴행성 질병, 예컨대 파킨슨씨병, 알츠하이머씨병, 헌팅턴씨병으로부터 선택되는 질병 또는 상태의 예방, 진행 지연 또는 치료, 또는 운동 지구력 향상을 위한 방법.

청구항 2

당뇨병, 인슐린 저항성, 이상지혈증, 운동 지구력, 비만, 과체중, 신경퇴행성 질병, 예컨대 파킨슨씨병, 알츠하이머씨병, 헌팅턴씨병으로부터 선택되는 질병 또는 상태의 예방, 진행 지연 또는 치료, 또는 운동 지구력 향상을 위한, 치료 유효량의 ERR γ 작용자를 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체와 조합하여 포함하는 약학적 조성물.

청구항 3

당뇨병, 인슐린 저항성, 대사 질병/대사 증후군, 이상지혈증, 비만, 과체중, 신경퇴행성 질병, 예컨대 파킨슨씨병, 알츠하이머씨병, 헌팅턴씨병으로부터 선택되는 질병 또는 상태의 예방, 진행 지연 또는 치료, 또는 운동 지구력의 향상을 위한 의약을 제조하기 위한, ERR γ 작용자 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 용도.

청구항 4

피처치 질병이 2형 당뇨병, 대사 질병/대사 증후군, 이상지혈증, 신경퇴행성 질병, 예컨대 파킨슨씨병, 알츠하이머씨병, 헌팅턴씨병으로부터 선택되는, 제3항에 따른 용도, 제1항에 따른 방법, 또는 제2항에 따른 약학적 조성물.

청구항 5

운동 지구력 향상을 위한, 제3항에 따른 용도, 제1항에 따른 방법, 또는 제2항에 따른 약학적 조성물.

청구항 6

치료 유효량의 ERR γ 작용자를 IGM을 앓는 인간을 포함한 온혈 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 2형 당뇨병의 예방 또는 진행 지연을 위한 방법.

청구항 7

IGM을 앓는 환자의 2형 당뇨병의 예방 또는 진행 지연을 위한, 치료 유효량의 ERR γ 작용자를 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체와 조합하여 포함하는 약학적 조성물.

청구항 8

IGM을 앓는 환자의 2형 당뇨병의 예방 또는 진행 지연을 위한 의약을 제조하기 위한, ERR γ 작용자 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 용도.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, ERR γ 작용자가 GSK4716 또는 GSK9089, 또는 각 경우에 그들의 약학적으로 허용가능한 염으로부터 선택되는 용도, 처치 방법 또는 약학적 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, ERR γ 작용자의 1일 경구 용량이 10 내지 500 mg, 또는 10 내지 200 mg인 용도, 처치 방법 또는 약학적 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, ERR γ 작용자가 0.001 내지 10 μ M, 또는 0.001 내지 1 μ M에 포함

되는 EC₅₀을 나타내는 용도, 처치 방법 또는 약학적 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, ERR γ 작용자가 ERR γ FRET 검정법, 예를 들어 실시예 1의 검정법 또는 본원에 기재된 임의의 기타 검정법에서, 0.001 내지 10 μ M, 또는 0.001 내지 1 μ M에 포함되는 EC₅₀을 나타내는 용도, 처치 방법 또는 약학적 조성물.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 유효 용량의 하나 이상의 에스트로겐 관련 수용체 감마 작용자 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 본 처치가 필요한 동물에게 투여함으로써, 당뇨병, 바람직하게는 2형 당뇨병, 인슐린 저항성, 대사 질병/대사 증후군, 이상지혈증, 비만, 과체중, 신경퇴행성 질병, 예컨대 파킨슨씨병, 알츠하이머씨병, 헌팅턴씨병으로부터 선택되는 질병 또는 상태의 처치, 또는 운동 지구력 향상을 위한 에스트로겐 관련 수용체 감마(ERR γ) 작용자 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 용도에 관한 것이다.

배경기술

<2> 에스트로겐 관련 수용체(ER)는, 결합하는 천연 리간드가 아직 확인되지 않은 고아 핵 수용체의 하위계열을 형성하는 3개의 구성원 ER α , ER β 및 ER γ 를 포함한다. ER는 그들의 DNA 결합 도메인(DBD) 및 리간드 결합 도메인(LBD) 내에 에스트로겐 수용체(ER)와 유의적 아미노산 상동성을 가지나, 에스트라디올에는 반응하지 않는다. ER이 리간드-활성화 수용체인데 반해, ER은 구성적 방식으로 유전자 전사를 활성화할 수 있으며, 그들의 활성화 능력은 전사적 보조활성화제의 존재에 의해 결정될 수 있다. 구조적 연구가, ER γ LBD가 전사적 활성화 배치를 채택하여, 어떠한 리간드도 없이 스테로이드 수용체 보조활성화제 1(SRC-1)과 상호작용할 수 있음을 증명함으로써 상기 발견을 뒷받침한다.

<3> ER γ 는 그의 DBD 내에서 각각 ER α 및 ER β 와 93% 및 99% 아미노산 동일성을 공유한다. ER은 그의 LBD 내에서 덜 보존된다(각각 ER γ 대 ER α 및 ER β 와 61% 및 77% 아미노산 동일성을 공유함). 보조활성화제인 퍼옥시 증식자-활성화 수용체- γ 보조활성화제-1 α (PGC-1 α)가 ER α 및 ER γ 를 위한 내인성 단백질 리간드인 것으로 보고되었다(Hentschke M, 등(2002)-PGC-1 and PERC, coactivators of the estrogen receptor-related receptor γ . Biochem Biophys Res Commun; 299:872-9).

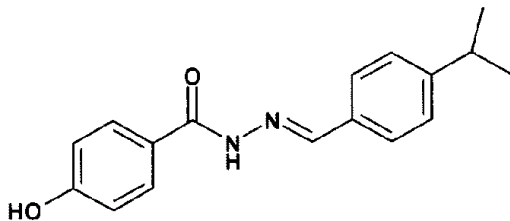
<4> 증거는 ER α 및 PGC-1 α 가 협력하여 미토콘드리아 생합성 및 산화적 인산화에 관여하는 유전자의 발현을 조절하는 작용을 함을 나타낸다. ER α , ER γ 및 PGC-1 α 는 그들의 주요 에너지 공급원으로서 미토콘드리아 지방산 산화를 이용하는 조직, 예컨대 골격근, 심장 및 신장에서 공동 발현되며(Hong H, Yang L, Stallcup MR(1999)-Hormone-independent transcriptional activation and coactivator binding by novel orphan nuclear receptor ERR3. J Biol Chem; 274:22618-26), 최근 ER γ 가 PGC-1 α 에 의해 증진되는 ER α 유전자 발현을 위한 강한 활성화제임이 나타났다(Liu D, Zhang Z, Teng CT(2005)-Estrogen-related receptor- γ and peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α regulate estrogen-related receptor- α gene expression via a conserved multi-hormone response element. J Mol Endocrinol; 34:473-87). ER γ LBD 단백질은 작용자의 부재 하에 활성인 것으로 나타났으나, 공지된 작용자 화합물 GSK4716(글락소-스미쓰-클라인(Glaxo-Smith-Kline; NVP-AJQ710) 및 GSK9089(글락소-스미쓰-클라인; NVP-LCN446)의 첨가로 활성이 증진되었다(Zuercher WJ, 등(2005) Identification and structure-activity relationship of phenolic acyl hydrazones as selective agonists for the estrogen-related orphan nuclear receptors ER β and ER γ . J Med Chem; 48:3107-9).

<5> 미국 특허 출원 제US 2005/0096384호는 ER 수용체를 표적화하는 리간드의 잠재적 용도를 고찰하였다. 이 출원은 특허 수가 지 징후의 처치를 위한 ER 작용자의 용도를 고찰하였다.

<6> 이 분야의 연구를 추적하면서, 본 출원인은 놀랍게도, US 제2005/0096384호의 교시와 대조적으로, ER γ 작용자의 사용에 의한 ER γ 활성화의 자극만이 미토콘드리아 생성을 증진시킴을 발견하였다.

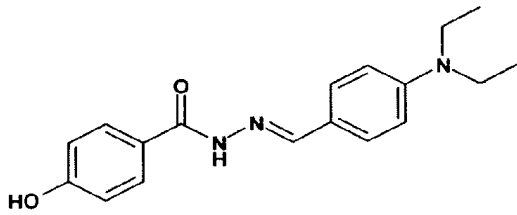
발명의 상세한 설명

- <7> 본 출원인은 또한 ERR γ 작용자를 이용한 ERR γ 활성화의 자극이, 당뇨병, 바람직하게는 2형 당뇨병, 인슐린 저항성, 대사 질병/대사 증후군, 이상지혈증, 비만/과체중, 신경퇴행성 질병으로부터 선택되는 질병의 처치, 또는 운동 지구력 향상에 예상치 못한 양호한 효과를 초래함도 발견하였다.
- <8> ERR γ 작용자의 프로파일링을 용이하게 하기 위해, 본 출원인은 리간드 결합에 반응하여 LBD 및 보조활성화제 펩티드 간의 상호작용의 변화를 측정하는 (이후 기재되는) 형광 공명 에너지 전이(FRET) 검정법을 개발하였다. 그 검정법(Zuercher 등, 2005, "Identification and structure-activity relationship of phenolic acyl hydrazones as selective agonists for the estrogen-related orphan nuclear receptors ERRbeta and ERRgamma."; *J. Med. Chem.* 2005 May 5;48(9):3107-9)은 ERR γ 의 2가지 공지된 소 작용자, 즉 GSK4716(글락소-스미쓰-클라인; AJQ710) 및 GSK9089(글락소-스미쓰-클라인; LCN446)을 사용하여 증명되었다.
- <9> ERR γ LBD 단백질은 작용자의 부재 하에 활성인 것으로 나타나지만, 활성은 공지된 작용자 화합물 GSK4716(글락소-스미쓰-클라인) 및 GSK9089(글락소-스미쓰-클라인)(Zuercher 등, 2005)의 첨가에 의해 강화된다.
- <10> 용어 "ERR γ 작용자(agonist)"는, ERR γ 활성의 활성화, 예컨대 1 내지 100% 활성화를 나타내며, 특히 기질 분자의 작용을 보존하는 분자를 가리키는 것으로 의도된다. 바람직하게는, ERR γ 작용자는 ERR γ FRET 검정법에서 0.001 내지 10 μ M(또는 0.001 내지 1 μ M)에 포함되는 EC₅₀(FRET 반응 증가를 유도하는 ERR γ 작용자의 능력)을 나타낸다. 바람직하게는, ERR γ 작용자는 하기 기재된 검정법에서 0.001 내지 10 μ M (또는 0.001 내지 1 μ M)에 포함되는 EC₅₀을 나타낸다. 바람직하게는, "ERR γ 의 작용자"는 ERR γ 의 LBD 서열에 결합할 때 ERR γ 의 양을 증가시키거나 그 지속시간을 연장하거나 활성을 증진시키는 분자를 지칭한다. 작용자는 폴리펩티드, 핵산, 탄수화물, 지질 또는 이들의 임의의 유도체, 또는 임의의 기타 분자를 포함할 수 있다.
- <11> ERR γ 작용자는 [Zuercher 등(2005)]에 의해, 또는 문헌 [Coward, P 등 2001, "4-Hydroxytamoxifen binds to and deactivates the estrogen-related receptor gamma." *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 Jul 17; 98(15):8880-4. Epub 2001 Jul 10], 및 문헌 [Zhou G. 등 1998, ("Characterization by Fluorescence Resonance Energy Transfer"; *Mol. Endocrin.* 1998, 12, 1594-1604)]에 기재된 바와 같이 화합물을 스크리닝함으로써 단리될 수 있으며, 이들 검정법은 본원에 참조 인용된다. 바람직하게, ERR γ 작용자는 본 출원인에 의해 개발된 하기 기재된 검정법(실험 파트 참조)에 기재된 바와 같이 화합물을 스크리닝함으로써 단리될 수 있다.
- <12> 본 문맥에서, "ERR γ 작용자"는 또한 활성 대사물 및 그의 프로드러그, 예컨대 ERR γ 작용자의 활성 대사물 및 프로드러그를 포함하는 것으로 의도된다. "대사물"은 ERR γ 작용자가 대사될 때 생성되는 ERR γ 작용자의 활성 유도체이다. "프로드러그"은 ERR γ 작용자로 대사되거나, ERR γ 작용자와 동일한 대사물(들)로 대사되는 화합물이다.
- <13> ERR γ 작용자는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, ERR γ 작용자는 각 경우에, 예를 들어 [Zuercher 등 (2005)]에서와 같이 포괄적이고 구체적으로 개시되어 있다.
- <14> 바람직한 ERR γ 작용자는 GSK4716 또는 GSK9089이다.
- <15> GSK4716은 화학식:



- <16>
- <17> 의 4-히드록시-N'-(4-이소프로필페닐메틸리덴)-벤조히드라지드로서 공지되어 있으며, [Zuercher 등(2005)]에 의해 기재되었다.

<18> GSK9089 (또는 DY131)는 화학식:



- <19>
- <20> 의 N'-(4-(디에틸아미노)페닐메틸리덴)-4-히드록시벤조히드라지드로서 공지되어 있으며, 095167-41-2의 CAS 등록 번호를 가진다. 화합물 GSK9089 및 ERR γ 에 대한 그의 활성은 또한 문헌 [D.D. Yu and col., Identification of an agonist ligand for estrogen-related receptors ERR β/γ Bioorg. Med. Chem. Lett. 15(2005) 1311-1313] 및 [Zuercher 등, 2005]에 의해 기재되었다
- <21> 경구적으로 활성인 ERR γ 작용자 억제제가 특히 바람직하다.
- <22> 본원에 참고로 포함되는, 상기 언급된 특허 문헌에 개시된 임의의 물질이 본 발명을 실시하기 위해 사용될 ERR γ 작용자로서 잠재적으로 유용한 것으로 간주된다.
- <23> 본 발명에 따라 단독으로 사용될 ERR γ 작용자는 담체와 결합하여 사용될 수 있다.
- <24> 본 문맥에서 담체는 매립되는 세포막을 통해 세포로 특이 물질을 수송하는 도구(천연, 합성, 펩티드성, 비펩티드성), 예를 들어 단백질이다. 각각의 하나는 한 물질만을 또는 유사한 물질들의 군을 인식하도록 설계되므로, 상이한 물질들을 수송하는 데에 상이한 담체들(천연, 합성, 펩티드성, 비펩티드성)이 요구된다.
- <25> 당업자에 의해 공지된 임의의 검출 수단이, 예를 들어 담체를 표지함으로써, 담체와 ERR γ 작용자의 결합을 검출하는 데 사용될 수 있다.
- <26> 경구적 활성인 ERR γ 작용자 및 그의 약학적으로 허용가능한 염이 가장 바람직하다.
- <27> 본 발명에 따른 활성 성분 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 용매화물, 예컨대 수화물의 형태로 사용되거나, 결정화에 사용되는 기타 용매를 포함할 수 있다.
- <28> 이제, 놀랍게도 ERR γ 작용자가 당뇨병, 바람직하게는 2형 당뇨병, 인슐린 저항성, 대사 질병/대사 증후군, 이상지혈증, 비만, 과체중, 신경퇴행성 질병, 예컨대 파킨슨씨병, 알츠하이머씨병, 헌팅턴씨병으로부터 선택되는 질병 또는 상태의 예방, 진행 지연 또는 치료, 또는 운동 지구력 향상에 유용하는 것이 밝혀졌다.
- <29> 이와 같이, 본 발명은 당뇨병, 바람직하게는 2형 당뇨병, 인슐린 저항성, 대사 질병/대사 증후군, 이상지혈증, 비만, 과체중, 신경퇴행성 질병, 예컨대 파킨슨씨병, 알츠하이머씨병, 헌팅턴씨병으로부터 선택되는 질병 또는 상태의 예방, 진행 지연 또는 치료, 또는 운동 지구력의 향상을 위한 의약을 제조하기 위한, ERR γ 작용자, 예컨대 GSK4716 또는 GSK9089, 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 용도에 관한 것이다.
- <30> 본 발명은 또한, 치료 유효량의 ERR γ 작용자, 바람직하게는 GSK4716 또는 GSK9089를 본 처치가 필요한 인간을 포함한 온혈 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 당뇨병, 바람직하게는 2형 당뇨병, 인슐린 저항성, 대사 질병/대사 증후군, 이상지혈증, 비만, 과체중, 신경퇴행성 질병, 예컨대 파킨슨씨병, 알츠하이머씨병, 헌팅턴씨병으로부터 선택되는 질병 또는 상태의 예방, 진행 지연 또는 치료, 또는 운동 지구력 향상을 위한 방법에 관한 것이다.
- <31> 추가 실시양태에서, 본 발명은 당뇨병, 바람직하게는 2형 당뇨병, 인슐린 저항성, 대사 질병/대사 증후군, 이상지혈증, 비만, 과체중, 신경퇴행성 질병, 예컨대 파킨슨씨병, 알츠하이머씨병, 헌팅턴씨병으로부터 선택되는 질병 또는 상태의 처치, 또는 운동 지구력 향상을 위한, 치료 유효량의 ERR γ 작용자를 하나 이상의 그의 약학적으로 허용가능한 담체와 조합하여 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- <32> 가장 바람직하게는, 본 발명에 따라, 피처치 질병 또는 손상은 2형 당뇨병, 대사 질병/대사 증후군, 이상지혈증, 신경퇴행성 질병, 예컨대 파킨슨씨병, 알츠하이머씨병, 헌팅턴씨병으로부터 선택되거나, ERR γ 작용자는 운동 지구력 향상에 사용된다.
- <33> 본 명세서에서 용어 "처치(treatment)"는 치유적 또는 질병 억제적 처치뿐만 아니라, 아픈 환자뿐만 아니라 질병과 접촉할 위험이 있거나 접촉한 것으로 의심되는 환자의 처치를 포함한 예방적 또는 방지적 처치를

포함한다.

- <34> 본원에 사용되는 용어 "치료적"은 진행하는 질병의 치료에 효과적임을 의미한다.
- <35> 용어 "방지"는 본원에 언급된 상태의 발발을 방지하기 위해 건강한 환자에게 조합물을 예방적으로 투여하는 것을 의미한다. 또한 용어 "방지"는 피처치 상태의 예비 단계에 있는 환자에게 상기 조합물을 예방적으로 투여하는 것을 의미한다.
- <36> 용어 "예방적"은 질병 또는 손상의 발병 또는 재발의 방지를 의미한다.
- <37> 본원에 사용되는 용어 "진행 지연"은, 예를 들어 환자의 상응하는 질병의 예비 형태를 진단되거나, 환자가 상응하는 질병이 발달하기 쉬운 사고로 인한 상태 또는 의료적 처치 동안의 상태에 처해 있는, 피처치 질병의 초기 단계 또는 예비 단계인 환자에게 활성 화합물을 투여하는 것을 의미한다.
- <38> 대사 증후군은 심혈관 질환의 발생의 위험을 매우 크게 증가시키는 위험 인자의 집단, 즉 당뇨병 또는 당뇨병 전증, 복부 비만, 콜레스테롤 변화 및 고혈압이다. 전세계 당뇨병을 갖는 거의 2억명의 성인 중 80% 이하가 심혈관 질병으로 사망하는 반면, 대사 증후군을 갖는 사람도 또한 증후군이 없는 사람에 비해 심장 발작 또는 뇌졸중으로 사망하는 비율의 2 내지 3배의 증가된 위험을 가진다. 대사 증후군을 갖는 사람은 2형 당뇨병이 진행될 위험이 (없는 경우에 비해) 5배 더 크다. 이것은 각 성분으로부터 예측되는 것 이상의 추가 위험(예를 들어, 콜레스테롤 측정시 높은 트리글리세리드)을 초래하는 것으로 나타나는 집단의 정확한 성질이다. 대사 증후군을 갖는 것으로서 정의되는 사람의 경우, 그 정의는 그 사람이 복부 비만에 더하여 4가지 추가 인자들, 즉 증가된 트리글리세리드, 감소된 HDL 콜레스테롤, 증가된 혈압 또는 증가된 공복 혈장 글루코스 수준 중 2가지를 가질 것을 요한다. 성별 및 민족성도 또한 대사 증후군의 정의에 고려되는 인자이다.
- <39> 본원에 사용되는 용어 "당뇨병"은 2형 당뇨병, 1형 당뇨병 및 성인의 잠재적인 자가면역 당뇨병(LADA)을 의미하고, 당뇨병은 바람직하게 2형 당뇨병이다.
- <40> 2형 당뇨병은 통상적으로 과체중(비만)인 사람 또는 40세 이상의 사람에게서 발병한다. 일반적으로, 2형 당뇨병 환자의 처치는 인슐린 치료를 포함하지 않으며, 특정 생활 방식(예, 운동, 체중 손실, 심한 식이법(diet))의 변형, 및 경우에 따라 경구 당뇨병 방지제가 혈중 글루코스 수준을 조절하기에 충분하다. 2형 당뇨병(성인-발병 당뇨병)은 일반적으로, 신체가 유전 인자 및 비만의 결과인 인슐린 저항이 발전할 때 발생하며, 전형적으로 성인기에 진단된다. 인슐린 저항은 고혈당을 유발하며, 인슐린 생성 요구가 연장됨에 따라, 췌장 베타 세포의 열화를 유발한다. 인슐린 저항 및 감소된 베타 세포 기능의 조합은 궁극적으로 2형 당뇨병을 일으킨다.
- <41> 1형 당뇨병은 종종 아동기에 진단되며, 이런 이유로 경우에 따라 연소성 당뇨병이라고 한다. 초기 진단이 심장 질병, 실명, 고혈압, 신경 손상 및 신부전을 포함한, 당뇨병의 더욱 심각한 합병증들 중 일부를 방지하기 위해 중요하다. 그러나, 1형 당뇨병이 대부분의 어린 여원 개체에게서 발생하는 경향이 있는 반면, 통상적으로 30세 이전의 더 나이든 환자도 또한 이러한 형태의 당뇨병이 존재한다. 이러한 유형의 1형 당뇨병은 통상적으로 성인의 잠재적 자가면역 당뇨병(LADA)으로 칭해진다. 더욱 흔한 연소성 1형 당뇨병과 마찬가지로, LADA는 인슐린 생성 췌장 베타 세포의 면역 중재 파괴로 인해 발생한다. LADA는 또한 느린 발병 1형 당뇨병, 성인의 늦은 발병 자가면역 당뇨병, 및 1형 당뇨병으로서 공지되어 있다. 연소성 1형 당뇨병과 LADA의 주요 차이점은 진단 연령이며, 일반적으로 30세 이상이다. LADA의 진단 방법은 예를 들어, 특허 출원 WO 2005054512 A2에 기재되어 있다. 이와 같이, 1형 당뇨병은 임의의 연령에 존재할 수 있으며, 임상적 명시의 연령을 결정하는 인자는 알려져 있지 않다.
- <42> 손상된 글루코스 대사(IGM)는, 정상 범위 초과이지만 2형 당뇨병에 대한 진단 기준을 충족시키기에 충분히 높지 않은 혈액 글루코스 수준에 의해 정의된다. IGM의 발생은 나라마다 다양하나, 통상적으로 명백한 당뇨병보다 2 내지 3배 더 빈번히 발생한다. 최근까지 IGM을 갖는 개체는 당뇨병 전증을 느꼈으나, 몇몇 전염병학 연구로부터의 데이터는 IGM을 갖는 개체가, 그들의 당뇨병 위험 및 심혈관 질병을 및 사망율의 위험에 관해서는 실질적임을 주장한다. 데이터는 IGM, 특히 IGT를 갖는 개체가 당뇨병을 항상 발전시키는 것은 아니지만, 이들이 당뇨병이건 아니건, 이들은 그럼에도 불구하고 심혈관 질병을 및 사망율이 높음을 제시한다.
- <43> IGM을 갖는 대상들 중 약 58%가 손상된 글루코스 내성(IGT)을 가지며, 또 다른 29%가 공복 글루코스 장애(IFG)를 가지며, 13%가 2가지 이상 모두(IFG/IGT)를 가진다. IGT는 상승된 식후 고혈당을 특징으로 하는 반면, IFG는 공복 혈당 값을 기초로 ADA(하기 표 참조)에 의해 정의된다.
- <44> 과체중: 당뇨병, 비만 및 과체중 개체의 경우에 체중 손실, 즉 과체중 치료/예방/지연이 요망된다. 체중 손실,

즉 과체중의 치료/예방/지연은 특히 당뇨병 및 심혈관 질병(CVD)과 관련된 이들 많은 해로운 결과를 방지하는 것을 도울 수 있다. 체중 손실은 또한 과체중 고혈압 및 비고혈압 개체 모두에게서 혈압; 혈청 트리글리세리드 수준을 감소시킬 수 있으며; 콜레스테롤의 이로운 고밀도 지질단백질(HDL)-형태를 증가시킨다. 체중 손실은 또한 일반적으로 총 혈청 콜레스테롤 및 저밀도 지질단백질(LDL)-콜레스테롤 수준을 다소 감소시킨다. 체중 손실은 또한 과체중 및 비만인 사람에게 있어 혈액 글루코스 수준을 감소시킬 수 있다.

- <45> 체중 손실 및 저칼로리 식이법은 또한 2형 당뇨병의 처치 시에 혈장 글루코스 수준의 조절을 위한 일차적 목표이다. 이와 같이 식욕 조절 및 체중 손실이 2형 당뇨병의 처치를 위해 바람직하다. 용어 "과체중의 처치"는 예를 들어 체지방 감소 또는 체중 손실을 포괄한다.
- <46> 용어 "체중 손실"은 총 체중의 일부의 손실을 말한다.
- <47> 용어 "체지방 감소"는 체지방의 일부의 손실을 의미한다.
- <48> 신체 질량 지수(BMI)를 위한 공식은 $[\text{중량(파운드)} \div \text{높이(인치)} \div \text{높이(인치)}] \times 703$ 이다. 인간 성인을 위한 BMI 차단점은 하기 지침을 사용한, 연령과 성별에 무관한 하나의 고정된 수이다: 과체중 인간 성인 개체는 25.0 내지 29.9의 BMI를 가진다. 비만 인간 성인은 30.0 이상의 BMI를 가진다. 저체중 성인은 18.5 미만의 BMI를 가진다. 성인에 대한 정상 체중 범위는 18.5 내지 25의 BMI로서 정의된다. 16세 이하 아동에 대한 BMI 차단점은 하기 백분위수에 따라 정의된다: 과체중은 그 연령에 대해 >85번째 백분위수보다 큰 BMI로서 정의되며, 비만은 그 연령에 대해 >95번째 백분위수에 대한 BMI로서 정의된다. 저체중은 그 연령에 대해 <5번째 백분위수에 대한 BMI로서 정의된다. 아동에 대한 정상 체중 범위는 5번째 백분위수 초과 85번째 백분위수 미만인 BMI로서 정의된다.
- <49> 바람직하게는 신경퇴행성 질병은 치매(예컨대 노인성 치매, 노인성 치매 전증(경증 인지 장애로도 알려져 있음), 알츠하이머 관련 치매(알츠하이머형 치매)), 헌팅턴씨병, 헌팅턴씨 무도병, 급성 착란 장애 및 특히 세포 피사가 작용하는 질병, 예컨대 근위축성 측삭 경화증, 녹내장, 다발성 경변, 편두통, 뇌졸중, 대뇌 국소빈혈 및 파킨슨씨병, 특히 알츠하이머씨병과 같은 질병 및 상태로부터 선택된다.
- <50> 더욱 바람직하게는, 신경퇴행성 질병은 알츠하이머씨병 및 치매, 바람직하게는 노인성 치매, 경증 인지 장애 또는 알츠하이머형 치매로부터 선택된다.
- <51> 더욱 바람직하게는, 신경퇴행성 질병은 알츠하이머씨병, 파킨슨씨병 또는 헌팅턴씨병이다.
- <52> 본 발명은 또한 활성 성분으로서 ERR γ 작용자를 유리 형태로 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염 형태로 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- <53> 본 발명의 또 다른 양태는 당뇨병, 바람직하게는 2형 당뇨병, 인슐린 저항성, 대사 질병/대사 증후군, 이상지혈증, 비만, 과체중, 신경퇴행성 질병, 예컨대 파킨슨씨병, 알츠하이머씨병, 헌팅턴씨병의 예방, 진행 지연 또는 치료, 또는 운동 지구력 향상을 위한 약학적 조성물의 제조를 위한, 활성 성분으로서 ERR γ 작용자, 바람직하게는 GSK4716 또는 GSK9089를 유리 형태로 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염 형태로 포함하는 약학적 조성물의 용도에 관한 것이다.
- <54> 본 발명은 또한 활성 성분으로서 ERR γ 작용자, 바람직하게는 GSK4716 또는 GSK9089를 유리 형태로 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 포함하는, 병합 치료 유효량의 약학적 조성물을, 본 처치가 필요한 인간을 포함한 온혈 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 당뇨병, 바람직하게는 2형 당뇨병, 인슐린 저항성, 대사 질병/대사 증후군, 이상지혈증, 비만, 과체중, 신경퇴행성 질병, 예컨대 파킨슨씨병, 알츠하이머씨병, 헌팅턴씨병의 예방, 진행 지연 또는 치료, 또는 운동 지구력 향상을 위한 방법에 관한 것이다.
- <55> 본 발명에 따른 약학적 조성물은 공지된 방법 그 자체로 제조될 수 있으며, 이는 치료학적 유효량의 약리학적으로 활성 화합물을 단독으로, 또는 경장(enteral) 또는 비경구 용도에 특히 적절한 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체와 조합하여 포함하는, 인간을 포함한 포유 동물(온혈 동물)에게 경장, 예컨대 경구 또는 직장, 및 비경구 투여하기에 적절한 조성물이다.
- <56> 이들 약학적 제제는, 온혈 동물에 대한 경장, 예컨대 경구 및 직장, 또는 비경구 투여를 위한 것들로서, 그 제제는 약리학적으로 활성 화합물을 단독으로 또는 통상적인 약학적 보조 물질과 함께 포함한다. 예를 들어, 약학적 제제는 약 0.1% 내지 90%, 바람직하게는 약 1% 내지 약 80%의 활성 화합물로 구성된다. 경장 또는 비경구 투여, 및 안구 투여를 위한 약학적 제제는, 예를 들어 단위 투약 형태, 예컨대 코팅된 정제, 정제, 캡슐 또는 좌약, 및 앰풀의 형태이다. 이들은 예를 들어 통상적 혼합, 과립화, 코팅, 용해 또는 동결건조 공정을 사용하

여, 공지된 방법 그 자체로 제조된다. 이와 같이, 경구용 약학적 제제는, 활성 화합물과 고체 부형제를 조합하고, 원할 경우, 수득한 혼합물을 과립화하고, 원하거나 필요에 따라 적절한 보조 물질을 첨가한 후 혼합물 또는 과립을 정제 또는 코팅된 정제 코어로 가공함으로써 수득될 수 있다.

- <57> 활성 화합물의 용량은 각종 인자, 예컨대 투여 방식, 온혈 동물의 종, 연령 및/또는 개별 상태에 의존할 수 있다.
- <58> 본 발명에 따른 용도 또는 방법에 바람직한 환자는 당뇨병(바람직하게는 2형 당뇨병), IGM(바람직하게는 IGT), 비만 또는 과체중, 대사 질병, 이상지혈증, 퇴행성 신경 질환 또는 낮은 운동 지구력을 앓는 환자 또는 동물이다.
- <59> 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 IGM(바람직하게는 IGT)을 앓는 환자의 당뇨병(바람직하게는 2형 당뇨병)의 예방 또는 진행 지연을 위한, 본 발명에 따른 조성물, 용도 또는 방법에 관한 것이다.
- <60> 그러므로, 본 발명은
- <61> - IGM, 바람직하게는 IGT를 앓는 인간을 포함한 온혈 동물에게 치료 유효량의 ERR γ 작용자를 투여하는 것을 포함하는 2형 당뇨병의 예방 또는 진행 지연을 위한 방법,
- <62> - IGM, 바람직하게는 IGT를 앓는 환자의 2형 당뇨병의 예방 또는 진행 지연을 위한, 치료 유효량의 ERR γ 작용자를 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체와 조합하여 포함하는 약학적 조성물,
- <63> - IGM, 바람직하게는 IGT를 앓는 환자의 2형 당뇨병의 예방 또는 진행 지연을 위한 의약을 제조하기 위한, ERR γ 작용자 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 용도에 관한 것이다.
- <64> 본 발명은 또한 ERR γ 작용자가 ERR γ FRET 검정법 또는 하기 기재된 임의의 검정법에서 0.001 내지 10 μ M에 포함되는 EC₅₀(FRET 반응 증가를 유도하는 ERR γ 작용자의 능력)을 나타내는, 본원에 기재된 약학적 조성물, 방법 또는 용도 중 임의의 것에 관한 것이다. 바람직하게는, ERR γ 작용자는 하기 기재된 검정법(예컨대 하기 실시예 1의 FERT 검정법)에서 0.001 내지 1 μ M에 포함되는 EC₅₀을 나타낸다.
- <65> 상업적으로 이용가능한, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 위한 이들 활성 성분에 대한 바람직한 용량은, 특히 상업적으로 이용가능한 치료 유효 용량이다.
- <66> 활성 화합물의 용량은 다양한 인자들, 예컨대 투여 방식, 온혈 동물의 종, 연령 및/또는 개별 상태에 의존할 수 있다.
- <67> 상응하는 활성 성분 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 또한 수화물의 형태로 사용되거나 결정화에 사용된 기타 용매를 포함할 수 있다.
- <68> 이들 지시사항에 있어, 정확한 용량은 물론 사용된 화합물, 투여 방식 및 원하는 처치에 따라 다양할 것이다. 화합물은 임의의 통상적인 경로, 비경구 또는 바람직하게는 경구로 투여될 수 있다.
- <69> 예측되는 치료 결과는 약 0.01 내지 100 mg/kg, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 50 mg/kg의 1일 용량으로 투여될 때 수득된다.
- <70> 대형 포유 동물의 경우, 지시된 총 1일 용량은 화합물 약 0.01 내지 100 mg/kg의 범위이며, 편의적으로는 지속적인 방출 형태로 예를 들어, 화합물 약 10 내지 약 100 mg을 함유하는 단위 투약 형태로 1일 2 내지 4회 분할 투여로 투여된다.
- <71> 인간의 또 다른 바람직한 1일 경구 용량은 1 mg 내지 1 g, 바람직하게는 10 mg 내지 500 mg, 예컨대 10 mg, 또는 10 mg 내지 200 mg이다.
- <72> 경구 투여에 적절한 단위 용량은 예를 들어, 약 10 내지 약 500 mg의 활성 성분, 즉 ERR γ 작용자를 함유한다. 비경구 투여에 적절한 용량은 예를 들어, 약 10 내지 약 500 mg 또는 10 내지 약 200 mg의 화합물을 함유한다.
- <73> 화합물은 이들 용도에 사용하기 위한 공지된 표준법과 유사한 방식으로 투여될 수 있다. 특정 화합물을 위한 적절한 1일 용량은 활성의 그 상대적 효능과 같은 다수의 인자들에 의존할 것이다. 당업자는 치료 유효 용량을 충분히 결정할 수 있다.
- <74> 본 발명의 화합물은 유리 염기로, 또는 약학적으로 허용가능한 산 부가 또는 4차 암모늄 염으로서 투여될 수 있다. 그러한 염은 통상적 방식으로 제조될 수 있으며, 유리 형태와 동일한 정도의 활성을 나타낸다. 이들 화합

물이 예를 들어, 하나 이상의 염기 중심을 가질 경우, 이들은 산 부가 염을 형성할 수 있다. 상응하는 산 부가 염은 또한 원할 경우 추가로 염기 중심이 존재하도록 형성될 수 있다. 산 기(예를 들어, COOH)를 갖는 화합물은 또한 염기와의 염을 형성할 수 있다. 예를 들어, 결합할 화합물은 나트륨염, 말레산염 또는 이염화물로서 존재할 수 있다. 활성 성분 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 수화물 형태로 사용되거나, 결정화를 위해 사용된 기타 용매를 포함할 수 있다.

<75> 본 발명에 따른 약학적 조성물은 공지된 방법 그 자체로 제조될 수 있으며, 이는 치료학적 유효량의 약리학적 활성 화합물을 단독으로, 또는 특히 경장 또는 비경구 투여에 적절한 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체와 조합하여 포함하는, 인간을 비롯한 포유 동물(온혈 동물)에게 경장, 예컨대 경구 또는 직장, 및 비경구 투여하기에 적절한 조성물이다.

<76> 코드 번호, 일반명 또는 상표명에 의해 식별된 활성제의 구조는 표준 명세표 "머크 인덱스(The Merck Index)"의 실제판으로부터, 또는 데이터베이스, 예컨대 국제 특허(예컨대 IMS 국제 공보)로부터 취할 수 있다. 그의 상응하는 내용이 본원에 참조 인용된다. 당업자는 이들 문헌을 기초로 활성제를 충분히 식별할 수 있으며, 마찬가지로 시험관내 및 생체내 모두에서 표준 시험 모델에서의 제조 및 약학적 지시 및 성질의 시험이 가능하다.

<77> 약리학적 활성은 예를 들어, 당업자에게 공지된 방식으로 이후에 본질적으로 기재된 바와 같은 임상 연구 또는 시험 절차에서 입증될 수 있다.

<78> 본 발명의 방법 및 용도에 바람직한 ERR γ 작용자는 GSK4716 또는 GSK9089, 및 임의적으로는 임의의 경우에 그들의 약학적 염이다.

<79> **실험 파트**

<80> 하기 실시예는 ERR γ 작용자를 사용하여 그들의 청구된 활성을 보여주기 위해 수행된다.

실시예

<81> 하기 실시예는 비제한적이며, 단지 본 발명의 다양한 측면 및 특성을 대표한다.

<82> **실시예 1-ERR γ 작용자를 단리하기 위한 스크리닝 검정법**

<83> 본 발명을 실시하기 위해 결합 및 유용한 화합물을 검출하기 위한 FRET 검정법(도 1.1 참고)

<84> 보조활성화제 펩티드 PGC-1 α 의 존재 하에 ERR γ 의 작용자 유도된 활성화를 검출하도록 FRET 검정법을 설계한다. 하기 성분들을 최종 부피 50 μ l로 첨가한다: (His) $_6$ -hERR γ LBD 또는 GST-hERR γ LBD, 유로폼-표지 항-(His) $_6$ 항체 또는 유로폼-표지 항-GST 항체 및 Cy5-표지 PGC-1 α 펩티드(C-말단 산을 갖는 Cy5-RPCSELLKYLTT(서열번호 4), 주문 제작되며, 아나스펙(AnaSpec)에서 표지됨). 믹스 1은 19 μ l 부피의 완충액에 항체 hERR γ LBD를 함유하며, 완충액 중에 Cy5-펩티드를 함유한 30 μ l의 믹스 2에 첨가하였다(1. 6xHis-ERR γ -LBD, 3.6 mg/ml, MW 27KDa; 2. Cy5-PGC-1 펩티드(아나스펙); 3. 기타 완충액 성분(시그마(Sigma))); 4. EU-항-His $_6$ -Ab(퍼킨 엘머(Perkin Elmer)); 및 5. 시험 화합물). 흑색 384-웰 플레이트에서 검정법을 수행하며, 3시간 동안 실온에서 배양한 후, FRET 신호를 월락 빅터 2(퍼킨 엘머) 플레이트 판독기를 사용하여 측정하였다. 방출 신호의 비(665 nm/615 nm)를 사용하여 FRET 검정 반응을 결정하였다. 일부 경우에, FRET 신호 대 배경 비를 사용하였고, 이는 간단히 단백질의 부재 하의 FRET 비율 또는 단백질의 존재 하의 FRET의 비로 정의된다. 시험 화합물을 10 mM로 DMSO에 용해하고, 지시된 바와 같이 사용하였다.

표 1

<85> (a) 시약 목록

시약	공급업자	카탈로그 번호
유로폼-표지 항-(His) $_6$ 항체	퍼킨 엘머	AD0110
유로폼-표지 항-GST 항체	퍼킨 엘머	AD0254
Cy5-표지 PGC-1 α 펩티드 (Cy5-RPCSELLKYLTT(서열번호 4); PGC-1 α 의 C-말단 산)	아나스펙	주문 제작
디티오프레이트	시그마	D-0632

트리스	시그마	T-2194
384-웰 플레이트	코닝	3654

<86> 유로폼-표지 항-(His)₆ 항체/(His)₆-hERR γ LBD 복합체 및 Cy5-RPCSELLKYLTT(서열번호 4) 간의 FRET 반응의 증가를 유도하는 작용자 화합물의 능력을, ERR γ 작용자로서 문헌에 기재된 2개의 화합물, 즉 GSK4716(글락소-스미쓰-클라인; AJQ710) 및 GSK9089(글락소-스미쓰-클라인; LCN446)을 사용하여 평가하였다. 문헌 [Zuercher WJ, Gaillard S, Miller-Orband LA, 등(2005), "Identification and structure-activity relationship of phenolic acyl hydrazones as selective agonists for the estrogen-related orphan nuclear receptors ERR β and ERR γ ", *J Med Chem*; 48:3107-9]을 참조한다. 화합물을 10 mM DMSO에 용해하고, 적정의 농도 범위를 100 μ M으로부터 2 nM으로 하였다. 최종 DMSO 농도는 2%였다. DMSO 대조구(화합물 부재)도 또한 2%로 제조하였다. 모든 샘플은 2벌로 제조하였다. 도 1.2에 나타난 바와 같이, AJQ710은 시험한 최고 농도에서, FRET 신호 중 60% 증가까지 유도할 수 있었다. FRET 반응은 용량 의존적이며, 데이터로부터 2.1 μ M의 EC₅₀이 유도되었다. 유사하게, LCN446이 또한 EC₅₀이 0.54 μ M이고, 화합물의 포화 농도에서의 70%의 최대 반응을 갖는 용량 의존적 FRET 반응을 유도하였다. 양 EC₅₀ 모두가 각각 AJQ710 및 LCN446 등가물에 대해 보고된 값 1.3 μ M 및 0.13 μ M과 유사하였다.

<87> **실시예 2**

<88> 일차적 마우스 근관(myotube) 내 미토콘드리아 기능에 대한 AJQ710의 특성분석

<89> FVB 마우스로부터의 일차적 마우스 근아세포를 [Bare 등]에 기재된 바와 같이 단리하고 유지하였다. 실험을 위해, 마우스 근아세포를 20% 소 태아 혈청, 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 2.5 ng/ml bFGF(인간 재조합)을 함유하는 F-10/헵 배지 중 80% 컨플루언스로 성장시켰다. 이어서, 세포를 6-웰 플레이트 중에서 웰 당 세포 700,000개로 도말하고, 5% 말 혈청 및 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 DMEM 중에 36 내지 48시간 동안 근관으로 분화하도록 하였다. 이어서, 세포를 24시간 동안 ERR γ / β 작용자 AJQ710으로 처리하였다. 행해진 검정법은 실시간 정량적 PCR(RT-PCR), 사이토크롬 c ELISA, 시트르산염 신타아제 검정법, 지방산 산화 검정법 및 호흡 검정법에 의한 유전자 발현 분석을 포함하였다. RT-PCR, 사이토크롬 c ELISA 및 시트르산염 신타아제 검정법을 위해, 근관을 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M 및 30 μ M의 농도로 AJQ710으로 처리하였다. 지방산 산화 검정법을 위해, 근관을 10 μ M 및 30 μ M 농도로 AJQ710으로 처리하였다. 호흡 검정법을 위해, 근관을 30 μ M 농도로 AJQ710으로 처리하였다. 각 용량은 3회씩 시험하였으며, 동 부피의 사용된 DMSO로 처리된 웰의 세트를 대조구 목적으로 실험 관독마다 포함시켰다.

<90> RT-PCR에 의한 유전자 발현을 평가하기 위한 목적으로, RNA를 세포 용균물로부터 단리하고, 이 RNA로부터 cDNA를 연속해서 합성하였다. RNA 단리를 위해, 세포를 트리졸(TRIzol)(인비트로젠(Invitrogen), 카탈로그 번호 15596-026, 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재) 중에서 균질화하였고, 총 RNA를 제조업자 사용설명서에 따라 단리하였다. 분광광도계를 사용하여 RNA를 정량화하였다.

<91> BD 바이오사이언시스(BD Biosciences)로부터의 BD 스프린트(Sprint)TM 파워스크립트(PowerScript)TM 키트(카탈로그 번호 639562)를 사용하여 역전사를 행하였다. 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems)로부터의 주문시 검정법 프라이머 프로브(카탈로그 번호에 대해 텍스트 후의 표 8-1 참조)을 사용하여, 하기 유전자에 대한 정량적 실시간 PCR을 행하였다: B2M, ERR γ , ERR β , ERR α , PGC-1 α , PGC-1 β , PPAR α , PPAR γ , PPAR δ , COX-4, 사이토크롬 c, UQCRB, CPT-1b, LCAD, MCAD, IDH3a, ATP-5b, UCP-2 및 UCP-3.

<92> 타크만 실시간 정량적 PCR을 제조업자 사용설명서(어플라이드 바이오시스템즈)에 따라 행하고 분석하였다. 구체적으로, 증폭을 10 μ l 반응 혼합물 중에서 3회씩 행하였다. 반응 혼합물은 1X 타크만(TaqMan)[®] 유니버살 PCR 마스터 믹스(어플라이드 바이오시스템즈, 카탈로그 번호 4304437), 1X 주문시 검정법 프라이머 프로브, 및 2 μ l의 cDNA 샘플을 포함하였다. B2M 내인성 대조구(어플라이드 바이오시스템즈, 카탈로그 번호 Mm00437762_m1)에 의해 측정되는 총 cDNA를 정규화함으로써 유전자 발현을 계산하였다. 샘플은 초기에 최적 우라실-N-글리코실라제 활성을 위해 50 $^{\circ}$ C에서 2분 동안 배양하였다. PCR 프로그램은 10분 동안 95 $^{\circ}$ C 변성으로 시작한 후, 384-웰 열 사이클러(퍼킨-엘머 어플라이드 바이오시스템즈) 중에서 40사이클을 95 $^{\circ}$ C/15초 및 60 $^{\circ}$ C/1분으로 행하였다. 각 증폭 실험은 "주형 불포함" 대조구(완충액 및 프라이머만 포함)를 함유하였다. 증폭 데이터를 7700 시퀀스 검출기에 의해 수집하고, 퍼킨-엘머(어플라이드 바이오시스템즈)에 의해 개발된 시퀀스 검출

시스템 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 양성 PCR 결과를 반영하는 분획 사이클 수를 사이클 역치(Ct)라고 부른다.

<93> 평균 유전자 발현 값을 1의 값으로 정규화된 비히클 처리 세포(0 μ M) 중의 발현과 함께 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (어플라이드 바이 오시스템즈(미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재)에 의해 기재된 바에 따름)를 사용하여, B2M에 대해 상대적으로 각 군에 대해 계산하였다. 데이터는 평균 \pm SEM(n=3회 반복 웰)로서 표현된다. 통계적 유의성을 스튜던트 t 테스트를 사용하여 측정하였다.

<94> 사이토크롬 c 효소-결합 면역흡수 검정법(ELISA)을 R&D 시스템즈(R&D Systems)로부터의 래트/마우스 사이토크롬 c 면역검정법 키트(카탈로그 번호 MCTCO, R&D 시스템즈, 미국 미네소타주 미네아폴리스 소재)를 사용하여, 제조업자 사용설명서에 따라 행하였다.

<95> 본원에서 상기 기재된 절차에 따라 시트르산염 신타아제 검정법을 행하였다.

<96> 변형이 가해진 공개 방법(St-Pierre, 등, *JBC*, 278(29): 26597-603(2003))에 따라 24시간 동안 AJQ710과 함께 인큐베이션한 근관에서 측정하였다. 세포를 인산염 완충 염수(PBS)로 1회 세척하고, 2 ml의 트립신(메디아테크, 카탈로그 번호 25-052-CI)로 37°C에서 5분 동안 처리하였다. 트립신을 제거하지 않고, 10 ml의 DMEM + 10% FBS를 각 웰에 첨가한다. 세포를 15 ml 관에 옮기고, 1000 rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 세포를 배지로 1회 세척하고 펠렛화한 후, D-PBS(인비트로젠, 카탈로그 번호 14040-133) 중 25 mM 글루코스(시그마, 카탈로그 번호 G-5400), 1 mM 피루브산염(인비트로젠, 카탈로그 번호 11360-070) 및 2% 소 혈청 알부민(BSA)(MP 바이오메디칼즈(MP Biomedicals), 카탈로그 번호 103703)을 함유하는 분석 완충액에 재현탁하였다. 세포 현탁액을 분석 완충액 ml 당 세포 1×10^6 개로 희석하고, 사용 시까지 37°C에서 유지하였다. 산소 소비량을 한사테크(Hansatech)(영국 노르포크 소재)에 의해 제공된 사용설명서에 따라 클라크 전극으로 측정하였다. 세포 현탁액의 절반이 각 측정에 사용되었다. 올리고마이신(MP 바이오메디칼즈, 카탈로그 번호 151786) 및 FCCP(4-(트리플루오로메톡시) 카르보닐 시아나이드 페닐히드라존)(시그마, 카탈로그 번호 C2920)의 농도는 각각 2 μ g/ml 및 2 내지 5 μ M이었다. 실험은 3별로 행하였다. 호흡율을, 제조업자에 의해 제공된 소프트웨어를 사용하여 산소 소비량의 흐름 기울기를 계산함으로써 측정하였다.

<97> 데이터 조작 및 그래프 생성을, 마이크로소프트 엑셀 및 그래프패드 프리즘 4 소프트웨어를 사용하여 행하였다. 데이터는 평균 \pm SEM으로 제시된다. 모든 실험에서 각 용량은 3별로 시험하였다. 이에 대한 예외는, 실험을 3회 반복한 호흡 측정이었다. 통계적 분석을 양측 스튜던트 t 테스트를 사용하여 행하였다.

<98> 결과

<99> 본 발명자들은 30 μ M, 10 μ M, 3 μ M 및 1 μ M의 농도의 AJQ710으로 처리한 분화 마우스 근관에서 미토콘드리아 유전자 발현의 다양한 마커의 발현을 조사하였다. 일정 부피의 약물 용액이 세포의 각 웰에 첨가되도록 스톱 용액을 제조하였다. 모든 효과는 비히클(DMSO) 단독에 대해 비교하였다. 조사된 미토콘드리아 경로/유전자는 산화 인산화, 지방산 산화, 크렙스(Krebs) 사이클, ATP 신타아제 및 커플링되지 않은 단백질을 포함하였다. 부가적으로, ERR γ 와 기능적으로 관련된 전사적 조절제의 발현을 조사하였다. 조사한 유전자들 거의 모두에 대해, 본 발명자들은 AJQ710을 이용한 처리 후에 유전자 발현에서 용량 의존적 증가를 발견하였다. 모든 유전자 발현 결과는 24시간 AJQ710 처리부터 이다.

<100> 산화적 인산화의 유전자는 AJQ710의 농도 증가와 함께 상승된 발현을 나타냈다. COX-4 발현은 2배 증가하였으며, 사이토크롬 c는 3.7배 증가하였으며(즉, AJQ710으로 처리하지 않았을 때 1.0 유전자/B2M으로부터 30 μ M 농도의 AJQ710으로 처리하였을 때 3.7 유전자/B2M로), UQCRB는 30 μ M 농도의 AJQ710으로 처리하였을 때 2배 증가하였다.

<101> 유사하게, 지방산 산화와 관련된, 조사한 3개의 유전자는 AJQ710으로 24시간 처리 후, 용량 의존적 방법으로 상향조절된 것으로 나타났다. AJQ710 30 μ M 처리 후, CPT-1b 발현은 3배 초과 증가하였고(즉, 처리하지 않았을 때 1.0 유전자/B2M으로부터 30 μ M의 농도로 AJQ710으로 처리하였을 때 3.0 유전자/B2M로), LCAD는 2.8배 증가하였으며, MCAD는 1.6배 증가하였다.

<102> 조사한 2개의 기타 미토콘드리아 유전자, 즉 크렙스 사이클의 한 성분인 IDH3 α 및 ATP-합성 효소인 ATP-5b가 AJQ710의 용량 증가에 따라 발현의 용량 의존적 유도를 나타냈다. IDH3 α 발현은 2배 초과로 증가하였고(즉, AJQ710으로 처리하지 않았을 때 1.0 유전자/B2M에서 30 μ M AJQ710으로 처리하였을 때 2.0 유전자/B2M로), ATP-5b는 AJQ710 30 μ M으로 24시간 처리한 후에 1.6배 증가하였다.

- <103> 본 발명자들은 커플링되지 않은 단백질 UCP-2 및 UCP-3에 대한 mRNA 발현을 측정하였다. UCP-2는 10 μ M 처리 후 그의 최대 발현 1.5배로, AJQ710의 모든 용량에서 발현의 한계 상향조절을 나타냈다. UCP-3은 AJQ710으로 처리하지 않았을 때 1.0 유전자/B2M으로부터 AJQ710의 30 μ M 처리 후에 3.0 유전자/B2M으로, 3배 초과로 증가하여, 발현의 용량 의존적 증가를 나타냈다.
- <104> 본 발명자들은 작용자를 이용한 근관의 처리에 대한 반응으로 ERR 계열의 발현을 측정하였다. AJQ710은 알려진 대로라면 ERR γ 및 ERR β 를 모두 활성화하나, ERR α 및 ER은 활성화하지 않는다(Zuercher 등, *J. Med. Chem.*, 48(9): 3107-9(2005)). ERR α 의 발현은 AJQ710으로 처리 후, ERR β 또는 ERR γ 보다 더 큰 정도로 증가하였다. AJQ710의 30 μ M 처리로, ERR γ 는 1.4배 발현으로 상승하였으며, ERR β 는 발현의 1.5배 증가를 나타냈으며, ERR α 는 발현의 3.7배 증가를 나타냈다.
- <105> 보조활성화제 PGC-1 α 및 PGC-1 β 를 또한 유전자 발현에 대해 조사하였다. 이들 전사체의 발현은 PGC-1 α 의 1.9-배 발현 상승(즉, 처리하지 않았을 때 1.0 유전자/B2M으로부터 30 μ M 농도로 AJQ710으로 처리하였을 때 1.9 유전자/B2M로) 및 PGC-1 β 의 1.8배 상승을 나타내어, 유사한 발현의 용량 의존적 증가를 나타냈다.
- <106> 본 발명자들은 추가로 지질 대사에서 중요한 역할을 하는 핵 수용체의 계열인 PPAR에 대한 유전자 발현을 조사하였다. PPAR α 및 PPAR δ 는 AJQ710 처리 후에 발현의 어떠한 변화도 나타나지 않았다. PPAR γ 는 최대 2.2배 발현(즉, AJQ710을 처리하지 않았을 때 1.0 유전자/B2M에서 30 μ M AJQ710로 처리한 후에 2.2 유전자/B2M으로)을 나타내어, 발현의 용량 의존적 증가를 나타냈다.
- <107> 단백질 수준에서 미토콘드리아 활성을 평가하기 위해, 사이토크롬 c ELISA를 행하였다. 사이토크롬 c는 전자 수송 사슬의 결정적 요소이며, 단백질의 양은 미토콘드리아 수 및 산화적 인산화 활성에 대한 바이오마커로서 작용한다. 본 발명자들은 근관을 24시간 동안 AJQ710 30 μ M으로 처리하였을 때 88% 증가를 나타내어, 화합물 처리에 의해 사이토크롬 c의 용량 의존적 증가를 관찰하였다(도 2.1).
- <108> 미토콘드리아 활성을 측정하기 위해, 시트르산염 신타아제 활성을 측정하였다. 이 효소는 종종 인간 근육에서의 미토콘드리아 함량 또는 활성의 지표로서 사용된다(Kelley, 등, *Diabetes*, 51(10): 2944-50(2002)). 시트르산염 신타아제는 산화적 인산화를 위한 기질을 제공하는 크렙스(Krebs) 사이클의 초기 단계를 촉매화한다. 30 μ M AJQ710으로 24시간 동안 처리한 근관은 시트르산염 신타아제 활성의 28% 증가를 나타낸 반면, 10 μ M 및 3 μ M 처리는 각각 8% 및 9%의 증가를 나타냈다(도 2.2).
- <109> 본 발명자들은 추가로 미토콘드리아 유전자 발현의 유도가 산화적 인산화에 대한 큰 영향을 미치는 지에 대해 조사하였다. 세포 호흡을 24시간 동안 AJQ710으로 처리한 마우스 주요 근관에서 측정한다. 호흡기 연쇄 성분의 발현의 유도와 일관되게, 기저 호흡은, 비히클 처리 대조구에 비해, AJQ710-처리 근육 세포에서 37% 증가하였다(도 2.3). 올리고마이신-비민감성 호흡인 양자 누출은, 통계학적으로 유의적인 것은 아니나, 36% 증가하였다. FCCP의 존재 하에, 호흡율은 비히클 처리 대조구 세포에 비해 AJQ710에 의해 32% 증가하였다(도 2.3). 이들 결과는, ERR γ 작용자가 결부된 호흡을 통해 미토콘드리아 산화 능력을 증가시킬 수 있음을 지시한다.
- <110> 상기 검정법으로부터 관찰될 수 있는 미토콘드리아 기능의 향상이 본원에 청구된 지시사항 중 치료적 효과를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

- <111> 도 1.1은 FRET 검정법 구성의 다이어그램을 나타낸다.
- <112> 도 1.2는 작용자-유도 FRET 반응을 나타낸다.
- <113> 도 2.1은 NVP-AJQ710-NX-2로 처리된 마우스 근관에서의 사이토크롬 c의 단백질 발현 수준을 나타낸다.
- <114> 도 2.2는 NVP-AJQ710-NX-2로 처리된 마우스 근관에서의 시트르산염 신타아제 활성을 나타낸다.
- <115> 도 2.3은 NVP-AJQ710-NX-2로 처리된 일차적 마우스 근관에서의 세포 호흡의 측정값을 나타낸다.

실시예 3 - 체중/비만

<117> 연구에 21 내지 23주령의 식이법-유도 비만 마우스를 사용한다. 연구의 첫째날에 동물을 오전 7:30에 금식시킨다. 체중 측정 및 기본 혈액 샘플 수집은 오전 10:30에 행한다. 동물들을 혈장 글루코스 값 및 체중이 2개 군간에 부합되도록 하여 2개 군(n=10/군)으로 나눈다. 동물에게 5 ml/kg의 용량 부피의 30 mg/kg의 화합물 또는 비히클(물)을 경구 투약한다. 비히클 또는 화합물의 1일 용량은 총 28일 동안 매일 동시에 투여한다. 1일 체

중 및 식품 섭취 측정값을 연구 기간 중에 취한다. 화합물은 처리한 동물의 체중을 감소시키나, 식품 섭취에는 영향을 미치지 않는다. 지방 및 근육 질량 분석을 EchoMRI 전진 조성 분석기를 사용하여 28일 기간 동안 주 간격으로 행한다. 스캔은 제조업자에 의해 제공된 적절한 크기의 홀더를 사용하여 행한다. 약물이 투여된 동물은 지방 질량의 감소를 나타내며, 근육 질량의 부수적인 증가를 나타낸다. 연구의 24일째, 동물을 밀봉된 챔버 중 공기 샘플링을 통해 소비된 산소 부피(VO_2) 및 생성된 이산화탄소 부피(VCO_2)를 측정하는 클램프(CLAMS) 시스템(콜럼버스 인스트루먼트(Columbus Instruments), 미국 오하이오주 콜럼버스 소재)에 둔다. VO_2 는 동물의 전체 산화 능력의 척도이다. 호흡율(RQ)은 생성된 CO_2 의 부피를 소비된 O_2 의 부피로 나눈 비로서 계산되며, 이는 기질 이용율의 척도이다. 동물이 주요 연료 공급원으로서 지방을 사용하면, 비는 0.7에 더 근접하는 반면, 연료 공급원이 탄수화물인 경우, RQ는 0.7에 더 근접한다. 약물로 처리된 동물은 대조구 동물에 비해 더 큰 산화 능력을 나타낸다. 처리한 동물은 지방 연소 능력이 더 크기 때문에, 더 낮은 RQ 수준을 나타낸다. 연구 마지막 날(28일)에, 동물에게 오전 10:30에 비히클 또는 화합물을 투약한다. 꼬리 혈액 샘플을 오후 12:30에 취한다. 이어서, 이산화탄소로 동물을 안락사시킨다. 혈액 분석 화학을 위해 말단 혈액 샘플을 심장 천자를 통해 수집한다.

<118> **실시예 4 - 2형 당뇨병/대사 이상**

<119> 연구에 21 내지 23주령의 식이법-유도 비만 마우스를 사용한다. 연구의 첫째날에 동물을 오전 7:30에 금식시킨다. 체중 측정 및 기본 혈액 샘플 수집은 오전 10:30에 행한다. 이어서 혈장 글루코스 값을 결정한다. 동물들을 혈장 글루코스 값 및 체중이 2개 군 간에 부합되도록 하여 2개 군($n=10/\text{군}$)으로 나눈다. 오후 12시에 동물에게 5 ml/kg의 용량 부피의 30 mg/kg의 화합물 또는 비히클(물)을 경구 투약한다. 오후 1:00에 혈액 샘플(0분)을 취한 후, 5 ml/kg의 용량 부피로 1g/kg(20% 수 중 글루코스)에서 경구 글루코스 내성 시험(OGTT)을 행한다. 혈액 샘플을 글루코스 투여 후 30, 60 및 120분에 수집한다. 동물을 OGTT 후 재급식한다. 동물에게 총 15일 동안 매일 오후 12시에 1일 용량의 화합물 또는 비히클을 투여한다. 매일의 체중 및 식품 섭취 측정을 연구 기간 중에 행한다. 2개의 추가 OGTT를 1일째 OGTT에 대해 상기 기재된 프로토콜에 따라 7일 및 14일째에 연구 기간 중에 행한다. 약물로 처리된 동물은 OGTT 동안 곡선 하의 영역에 의해 측정 시, 대조구 동물에 비해 향상된 글루코스 내성을 나타낸다. OGTT의 향상의 정도는 7일부터 14일까지 시간 의존적 방법으로 증가한다. 연구 마지막 날(15일)에 마우스를 오전 7:30에 금식시키고, 오전 10:30에 비히클 또는 화합물을 투약한다. 꼬리 혈액 샘플을 오후 12:30에 취한다. 이어서, 이산화탄소로 동물을 안락사시킨다. 혈액 분석 화학을 위해 말단 혈액 샘플을 심장 천자를 통해 수집한다.

<120> **혈액 수집 및 분석**

<121> 연구 기간 중에 꼬리 채혈을 통해 혈액 샘플을 취한다. 글루코스 측정기(아센시아 엘리트(Ascensia Elite), 바이엘 코퍼레이션(Bayer Corporation), 미국 인디애나주 미샤와카 소재)를 사용하여 혈장 글루코스 농도를 측정한다. 혈액 샘플은 혈액 응고를 방지하기 위해 리튬 헤파린을 함유한 관(마이크로베트(Microvette) CB300, 악티엔게젤샤프트 운트 콤파니(Aktiengesellschaft & Co.), 독일 뉘브레흐트 소재) 중에서 수집한다. 각 혈액 샘플 수집 전에 1 μl 의 1:10 희석된 프로테아제 억제제 각테일(시그마, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)을 샘플 관에 첨가한다. 혈액 샘플 수집 후, 관을 원심분리기 전에 얼음 위에 둔다. 혈액 샘플의 혈장 부분은 4°C에서 10분 동안 10,000 $\times g$ 에서 원심분리에 의해 수득한 다음, -80°C에서 저장한다. 혈장 인슐린 및 글루카곤 수준을 마우스 내분비 린코플렉스 키트(린코 리서치 인코포레이티드(Linco Research, Inc.), 미국 미주리주 세인트 찰스 소재)를 사용하여 루미넥스 검정법에 의해 결정한다. 약물, 즉 ERR γ 작용자로 처리된 동물은 대조구 동물에 비해 혈장 인슐린 수준의 저하를 나타낸다. 혈장 트리글리세리드, 지방산 및 총 콜레스테롤 수준을 암플렉스 레드 키트(Amplex Red kit)(몰레큘라 프로브스(Molecular Probes), 미국 오레곤주 유진 소재)에 기초한 형광 검정법을 사용하여 측정한다. 혈액 화학 분석을 자동화 건조 화학 시스템(스포트캠 이지 애널리저(SPOTCHEM EZ Analyzer), 헤스카, 미국 콜로라도주 포트 콜린스 소재)을 사용하여 행한다. ERR γ 작용자로 처리된 동물은 감소된 체중 또는 향상된 지질 프로파일을 나타낸다.

<122> **실시예 5 - 이상지혈증**

<123> 연구에 21 내지 23주령의 식이법-유도 비만 마우스를 사용한다. 연구의 첫째날에 동물을 오전 7:30에 금식시킨다. 체중 측정 및 기본 혈액 샘플 수집은 오전 10:30에 행한다. 동물들을 혈장 글루코스 값 및 체중이 2개 군 간에 부합되도록 하여 2개 군($n=10/\text{군}$)으로 나눈다. 동물에게 5 ml/kg의 용량 부피의 30 mg/kg의 화합물 또는 비히클(물)을 경구 투약한다. 비히클 또는 화합물의 1일 용량은 총 15일 동안 매일 동시에 투여한다. 1일 체

중 및 식품 섭취 측정값을 연구 기간 중에 취한다. 지방 및 근육 질량 분석을 EchoMRI 전신 조성 분석기를 사용하여 15일 동안 2벌로 행한다. 스캔은 제조업자에 의해 제공된 적절한 크기의 홀더를 사용하여 행한다. 연구 마지막 날(15일)에 마우스를 오전 7:30에 금식시키고, 오전 10:30에 비히클 또는 화합물을 투약한다. 꼬리 혈액 샘플을 오후 12:30에 취한다. 이어서, 이산화탄소로 동물을 안락사시킨다. 혈액 분석 화학을 위해 말단 혈액 샘플을 심장 천자를 통해 수집한다.

<124> 혈액 수집 및 분석

<125> 연구 기간 중에 꼬리 채혈을 통해 혈액 샘플을 취한다. 혈장 글루코스 농도는 글루코스 측정기(아센시아 엘리트, 바이엘 코포레이션, 미국 인디애나주 미사와카 소재)를 사용하여 측정한다. 혈액 샘플은 혈액 응고를 방지하기 위해 리튬 헤파린을 함유한 관(마이크로베트 CB300, 악티엔게젤샤프트 운트 컴파니, 독일 뉘브레르트 소재) 중에서 수집한다. 각 혈액 샘플 수집 전에 1 μ l의 1:10 희석된 프로테아제 억제제 카테일(시그마, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)을 샘플 관에 첨가한다. 혈액 샘플 수집 후, 관을 원심분리하기 전에 얼음 위에 둔다. 혈액 샘플의 혈장 부분은 4°C에서 10분 동안 10,000×g에서 원심분리에 의해 수득한 다음, -80°C에서 저장한다. 혈장 인슐린 수준은 마우스 내분비 링크플렉스 키트(링크 리서치 인코포레이티드, 미국 미주리주 세인트 찰스 소재)를 사용하여 루미넥스 검정법에 의해 결정한다. 혈장 트리글리세리드, 지방산 및 총 콜레스테롤 수준을 앰플렉스 레드 키트(몰레큘라 프로브스, 미국 오레곤주 유진 소재)에 기초한 형광 검정법을 사용하여 측정한다. 약물, 즉 ERR γ 작용자로 처리된 동물은 대조구 동물에 비해 혈장 트리글리세리드, 유리 지방산 및 콜레스테롤 수준의 저하를 나타낸다. 혈액 화학 분석을 자동화 건조 화학 시스템(스포트캠 이지 애널리저, 헤스카, 미국 콜로라도주 포트 콜린스 소재)을 사용하여 행한다.

<126> 실시예 6 - 운동 지구력

<127> 운동 능력을 측정하기 위해, 연령 및 중량에 부합하는 C57BI6 마우스를 쇼크-플레이트 자극성 동력화 트레이드밀 상에서 주행하게 한다(Exer-6, 콜럼버스 인스트루먼츠, 미국 오하이오주 콜럼버스 소재). 마우스를 실험 개시 1일 전에 트레이드밀에 순응화한다. 첫째날, 마우스를 오전 9:00에 시작하여 2시간 동안 운동시킨다. 트레이드밀의 속도는 처음 1시간 동안은 일정하고, 다음 시간에 걸쳐 매 15분마다 2 m/분씩 증가시킨다. 트레이드밀의 경사를 실험 동안 일정하게 유지시킨다. 마우스의 주행 능력을, 각 마우스가 지쳐서 트레이드밀 위에 머물지 못할 때까지의 시간 및 트레이드밀의 속도를 측정함으로써 평가한다. 총 주행 거리 및 수행 일을 운동 능력의 척도로서 계산한다. 최대 산화 능력이라고도 하는 운동 동안의 산소 소비량도 또한 운동을 위한 동물의 내인성을 결정하기 위해 측정한다. 이어서, 동물들을 2개 군 간의 운동 능력이 부합되도록 하여, 2개의 세트(각각 n=10)로 나눈다. 오후 12시에 동물에게 5 ml/kg의 용량 부피의 30 mg/kg의 화합물, 즉 ERR γ 작용자 또는 비히클(물)을 경구 투약한다. 비히클 또는 화합물의 1일 용량은 총 28일 동안 오후 12시에 투여한다. 1일 체중 및 식품 섭취 측정값을 연구 기간 중에 취한다. 연구의 14일 및 27일째에, 동물을 상기 기재된 바와 같이 운동 능력에 대해 평가한다. 약물로 처리된 동물은 대조구 동물에 비해 더 긴 시간 동안 더 긴 거리를 주행할 수 있다. 이들 동물은 또한 대조구 개체에 관해 최대 산화 능력의 증가를 나타낸다. 처리 및 대조구 동물 간의 이들 운동 능력 파라미터의 차이의 규모는, 연구의 14일로부터 27일까지 증가한다. 28일째에 동물에게 오후 12시에 비히클 또는 화합물을 투약하고, 꼬리 혈액 샘플을 오후 12:30에 취한다. 이어서, 동물을 이산화탄소로 안락사시키고, 대사산물 및 유전자 발현의 분석을 위해 조직을 수집한다. 혈액 화학 분석을 위해 말단 혈액 샘플을 심장 천자를 통해 수집한다. 혈액 샘플을 혈액 응고를 방지하기 위해 리튬 헤파린을 함유한 관(마이크로베트 CB300, 악티엔게젤샤프트 운트 컴퍼니, 독일 뉘브레르트 소재) 중에서 수집한다. 각 혈액 샘플 수집 전에 1 μ l의 1:10 희석된 프로테아제 억제제 카테일(시그마, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)을 샘플 관에 첨가한다. 혈액 샘플 수집 후, 관을 원심분리하기 전에 얼음 위에 둔다. 혈액 샘플의 혈장 부분은 4°C에서 10분 동안 10,000×g에서 원심분리에 의해 수득한 다음, -80°C에서 저장하였다. 혈장 트리글리세리드, 지방산 및 총 콜레스테롤 수준을 앰플렉스 레드 키트(몰레큘라 프로브스, 미국 오레곤주 유진 소재)에 기초한 형광 검정법을 사용하여 측정한다. 혈액 화학 분석을 자동화 건조 화학 시스템(스포트캠 이지 애널리저, 헤스카, 미국 콜로라도주 포트 콜린스 소재)을 사용하여 행하였다. 약물, 즉 ERR γ 작용자로 처리된 동물은 대조구 동물에 비해 혈장 트리글리세리드, 유리 산 및 콜레스테롤 수준의 감소를 나타낸다.

<128> 실시예 7 - 신경퇴행성 질병

<129> 신경퇴행성 질병에 대한 양성적 효과는 하기 실험에 의해 평가된다.

<130> 동물

- <131> 암컷 B6CBAF1/J 마우스에 암컷 B6CBATg(HDexon1)62Gpb/1J 마우스(R6/2, Mangiarini 등, 1996)로부터의 난소를 이식하고, 잭슨 래보러터리(Jackson Laboratories)(미국 메인주 바 하버 소재)로부터 수컷하고, 집에서 B6CBAF1/J(잭슨 래보러터리, 미국 메인주 소재) 수컷 마우스에 교배한다. 본 발명자들의 콜로니로부터의 45마리 마우스(수컷 및 암컷)의 샘플에서, 반복 길이는 119 내지 130 cm의 크기를 가진다. 7개 배(litters)로부터 유도된 마우스(R6/2 유전형질 전환(TG), n=27, 수컷=14, 암컷=13)를 21일령부터 70일령까지 시험하고, 84일에 안락사시킨다(시험 시간 지점의 상세한 것에 대해 도 1 참조). 마우스는 역전 명암 사이클(오전 10:00 소등, 오후 10:00 점등)을 사용하여, 임의로 이용가능한 물 및 사료와 함께 온도(21 내지 23°C) 및 습도(30 내지 70%) 조절된 실내에서 사육한다. 3주령에 취해진 싹둑 잘린 꼬리로부터의 DNA로부터 유전자형을 결정한다. 키아젠(Qiagen)(미국 캘리포니아주 발렌시아 소재)으로부터의 키트를 사용하여 DNA를 단리한다. CAG 반복체를 AM 완충액(67 mM 트리스-HCl[pH 8.8], 16.6 mM NH₄SO₄, 2.0 mM MgCl₂ 0.17 mg/ml BSA, 10 mM 2-메르캅토에탄올), 10% DMSO, 200 mM dNTP, 0.5 U/ml Taq 폴리머라제를 갖는 8 ng/ μ l 프라이머 중에서, FAM-표지 프라이머(5'-ATGAAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC-3') 및 (5'-GGCGGCTGAGGAAGCTGAGGA-3')를 사용하여 PCR에 의해 크기를 정한다. 사이클링 조건은 94°C에서 90", 25×(94°C에서 30", 65°C에서 30", 72°C에서 90"), 72°C에서 10'이다. PCR 생성물은 ABI 시퀀서 및 제네스칸 및 제노타이퍼 소프트웨어 패키지를 사용하여 크기가 정해진다. CAG 반복체의 크기는 PCR 생성물의 크기보다 85 bp 작다. 모든 실험들을 NIBRI에서 동물실험위원회에 따라, 또한 그에 의해 승인된 바에 따라 행한다.
- <132> 화합물 투약(예컨대 본원에 기재된 ERR γ 작용자 GSK4716 또는 GSK9089)
- <133> 21일령부터 84일령까지의 마우스를 매주 체중 측정한다. 21일령제, 동물을 2개 군으로 나누고, 5 ml/kg의 용량 부피로 30 mg/kg으로 화합물 또는 각 비히클(물)을 경구적으로 투약한다. 비히클 또는 화합물의 1일 용량은 총 63일 동안 매일 동시에 투여한다. 행동 표현형에 대한 시험을 처리 기간의 말기에 행한다. 각 마우스에 대한 사망 연령을 기록한다. 약물, 즉 ERR γ 작용자로 처리된 동물은 비처리 동물에 비해 연장된 생존율을 나타낸다.
- <134> **행동 시험**
- <135> **챗바퀴**
- <136> 챗바퀴(23 cm 직경, 미니 미터 컴퍼니 인코포레이티드(Mini Mitter Company Inc.), 미국 오레건주 벤드 소재)가 장치된 우리에 마우스를 개별적으로 둔다. 바퀴의 각 회전을 자석으로 검출하고, 바이탈뷰 데이터 습득 소프트웨어(VitalView Data Acquisition Software) V 4.0(상기 기재된 미니 미터 컴퍼니 인코포레이티드)에 의해 3분-빈(bin) 후 기록한다. 챗바퀴 우리를 캐비넷(8개 우리/캐비넷)에 두어, 빛 및 소음 방해(오전 10:00 소등, 오후 10:00 점등)를 최소화한다. 주행 활동성을 6 내지 8일 동안 연속적으로 기록한다(7 내지 8일 동안 WT에 대해 탑재된 대다수, n=12, R6/2 n=21). 명암 단계 동안 챗바퀴 주행 활동성을 액티브뷰(ActiView) V 1.2(상기 기재된 미니 미터 컴퍼니 인코포레이티드)를 사용하여 계산한다. 측정값은 1일 주행 활동성으로부터 또는 챗바퀴에 대한 각각의 노출의 중앙 구획으로부터 계산한다(4.5 내지 5.5주 또는 8.5 또는 9.5주에 챗바퀴의 3번째, 4번째 및 5번째 일의 중일). 측정 항목은 이하의 것들을 포함한다: (1) 3번째, 4번째 및 5번째 낮 동안의 시간-빈(3분) 당 최대 회전 수, (2) 챗바퀴의 각 연속적 낮으로부터 유도된 명 상태 및 암 상태 동안의 시간-빈 당 평균 활동성, (3) 챗바퀴 중 3번째, 4번째 및 5번째 낮에 걸쳐 평균을 구한 활동성으로부터 유도된, 시간-빈 당 평균 명 활동성 및 평균 암 활동성, (4) 3번째, 4번째 및 5번째 밤의 밤 상태 동안에 취해진 중단 수, (5) 챗바퀴 중 3번째, 4번째 및 5번째 일의 중일에 걸쳐 수행된 총 회전 수. 활동성(예컨대, 회전 수 및/또는 평균 활동성)은 ERR γ 작용자 화합물을 투여할 때 향상된다.
- <137> **로타로드(Rotarod)**
- <138> 로타로드 장치(유고 바실(Ugo Basile), 이탈리아 바레스 소재)를 사용하여, 운동 조정(motor coordination) 및 균형을 측정한다. 축을 부드러운 고무로 덮어 마우스가 축에 달라붙는 것을 방지한다. 시험은 조명을 위해 적색광(25 W)을 사용하여 암 상태를 통해 대략 반을 수행한다. 시험실에 15분 내지 20분간 익숙해지게 한 후, 마우스를 다른 공개된 프로토콜과 유사한 가속화 프로토콜(10분 간, 4 내지 40 rpm) 상에서 3회 시험(매 시험 사이의 시간: 10분 이상)에 제시한다. 하강 시까지의 잠복기를 측정한다. 마우스가 로타로드에서 20초 미만에 떨어지면, 즉시 다시 제자리에 놓는다(3회까지). 마우스는 기본선(4주령)에서 4일 간에 걸쳐 시험하며, 8주령에서 3일 간에 걸쳐 시험한다. 기본선 및 8주령의 마우스 당 평균 하강 시까지의 잠복기를 계산하여, 군 평균을 구하는 데 사용한다. 마우스가 로타로드 상에 있는 시간은 ERR γ 작용자 화합물에 의해 증가한다.

<139> 그림 강도

<140> 부착된 트래피즈가 있는 스프링 분동 눈금(피셔 사이언티픽(Fisher Scientific), 미국 캘리포니아주 투스틴 소재)을 벽 고정장치에 매단다. 관찰자가 마우스의 꼬리 위로 부드럽게 아래로 당겨 마우스가 그 앞발로 트래피즈를 잡도록 한다. 당겨진 분동에서 체중을 뺀 것을 분석에 사용한다. 마우스들이 5회 시험을 위해 제공되며, 이 중 3개의 가장 좋은 점수를 분석에 사용한다. ERR γ 작용자 화합물이 그림 강도를 향상시킨다.

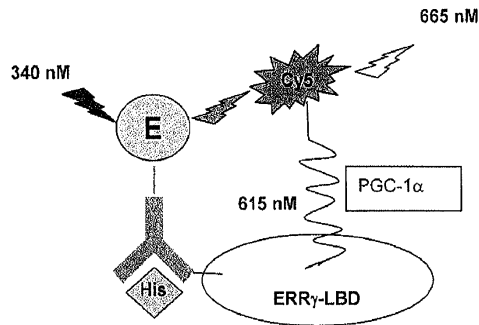
<141> 본 발명은 바람직한 실시양태를 참고로 상기 설명되었으나, 당업자가 인식하는 바와 같이, 하기 청구의 범위의 범주 내에서 많은 부가, 생략 및 변형이 모두 가해질 수 있다.

<142> 본 명세서에 인용된 모든 특허 및 문헌은 그 전체가 본원에 참조 인용된다. 상충하는 경우, 정의 및 해석을 포함한 본 명세서가 우선하게 된다.

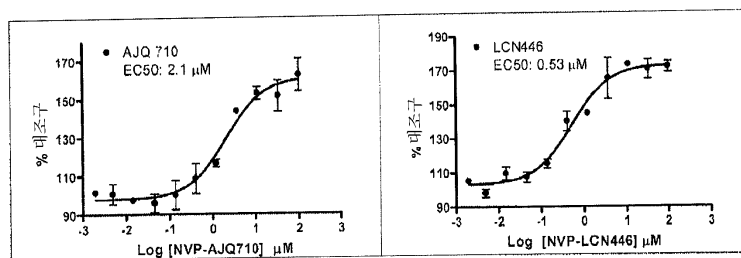
<143> 기타 실시양태들이 당업자에게 자명할 것이다. 상기 상세한 설명은 명료성을 위해 제공되며 단순히 예시적이라는 것을 이해해야 한다. 본 발명의 사상 및 범주는 상기 실시예들에 제한되지 않으며, 하기 청구의 범위 내에 포괄될 것이다.

도면

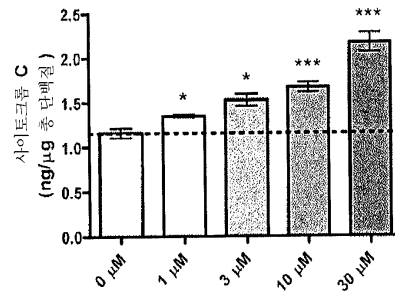
도면1



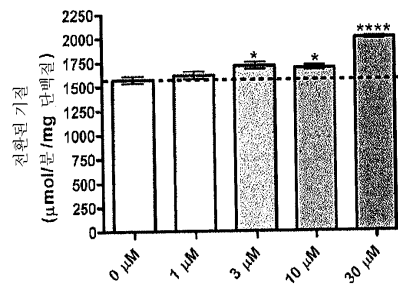
도면2



도면3



도면4



도면5

