

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2012년 7월 5일 (05.07.2012)



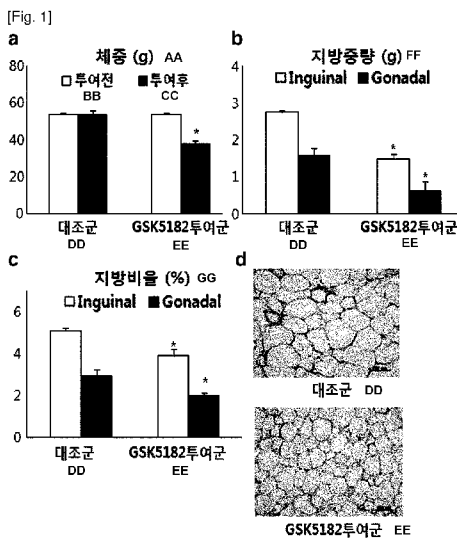
(10) 국제공개번호  
WO 2012/091425 A2

- (51) 국제특허분류: A61K 31/138 (2006.01) A61P 3/06 (2006.01)  
A61P 3/04 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/010179
- (22) 국제출원일: 2011년 12월 27일 (27.12.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2010-0135875 2010년 12월 27일 (27.12.2010) KR  
10-2011-0054178 2011년 6월 3일 (03.06.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 전남대학교산학협력단 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 광주광역시 북구 용봉동 300, 500-757 Gwangju (KR). 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 서울대학교산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 서울특별시 관악구 신림동 산 56-1, 151-010 Seoul (KR). 성균관대학교산학협력단 (SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY FOUNDATION FOR CORPORATE COLLABORATION) [KR/KR]; 경기도 수원시 장안구 천천동 300 성균관대학교내, 440-746 Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 곁
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 최홍식 (CHOI, Hueng Sik) [KR/KR]; 광주광역시 북구 우산동 현대아파트 104동 1203호, 500-718 Gwangju (KR). 박승범 (PARK, Seung Bum) [KR/KR]; 서울특별시 용산구 이촌1동 300-27 리바뷰아파트 808호, 140-854 Seoul (KR). 이철호 (LEE, Chul Ho) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 구승희 (KOO, Seung Hoi) [KR/KR]; 서울특별시 서초구 잠원동 동아아파트 107동 1001호, 137-948 Seoul (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 서울 강남구 삼성동 159-9도림공항타워 6층 한일국제특허사무소, 135-973 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION CONTAINING A 4-HYDROXYTAMOXIFEN ANALOG OR THE PHARMACEUTICALLY ACCEPTABLE SALTS THEREOF AS AN ACTIVE INGREDIENT FOR PREVENTING OR TREATING DISEASES ASSOCIATED WITH METABOLIC SYNDROME

(54) 발명의 명칭 : 4-하이드록시 타목시펜 유사체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 대사증후군 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물



AA ... Weight (g)  
 BB ... Before administration  
 CC ... After administration  
 DD ... Control group  
 EE ... Group administered with GSK5182  
 FF ... Fat weight (g)  
 GG ... Fat ratio (%)

(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition containing a 4-hydroxytamoxifen analog or the pharmaceutically acceptable salts thereof as an active ingredient for preventing or treating diseases associated with metabolic syndrome, to a method for preventing or treating diseases associated with metabolic syndrome using the composition, to a food composition containing a 4-hydroxytamoxifen analog for preventing or ameliorating diseases associated with metabolic syndrome, to a composition containing a 4-hydroxytamoxifen analog for lowering cholesterol levels in the blood, and to a composition containing a 4-hydroxytamoxifen analog for reducing glucose levels in the liver or in the blood.

(57) 요약서: 본 발명은 4-하이드록시 타목시펜 유사체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대사증후군 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 상기 조성물을 이용한 대사증후군 관련 질환의 예방 또는 치료 방법, 4-하이드록시 타목시펜 유사체를 포함하는 대사증후군 관련 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물, 4-하이드록시 타목시펜 유사체를 포함하는 혈액 내의 콜레스테롤 감소용 조성물, 및 4-하이드록시 타목시펜 유사체를 포함하는 간 또는 혈액에서의 글루코스 수치 감소용 조성물에 관한 것이다.

WO 2012/091425 A2



SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,  
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의  
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,  
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,

**공개:**

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를  
별도 공개함 (규칙 48.2(g))

## 명세서

**발명의 명칭: 4-하이드록시 타목시펜 유사체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 대사증후군 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물**

### 기술분야

- [1] 본 발명은 4-하이드록시 타목시펜 유사체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대사증후군 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 상기 조성물을 이용한 대사증후군 관련 질환의 예방 또는 치료 방법, 4-하이드록시 타목시펜 유사체를 포함하는 대사증후군 관련 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물, 4-하이드록시 타목시펜 유사체를 포함하는 혈액 내의 콜레스테롤 감소용 조성물, 및 4-하이드록시 타목시펜 유사체를 포함하는 간 또는 혈액에서의 글루코스 수치 감소용 조성물에 관한 것이다.

[2]

### 배경기술

- [3] 최근 경제적 발전과 식습관 등의 변화에 따라 비만, 고지혈증, 고혈압, 동맥경화, 고인슐린혈증, 당뇨병 또는 간질환 등 다양한 질환을 포함하는 대사증후군 관련 질환의 발병이 급증하고 있는 상황이다. 이와 같은 질환들은 각각 발생하기도 하지만 일반적으로는 서로 밀접한 관련을 맺고 있으면서 여러 증상들을 동반하여 발생하는 경우가 대부분이다.

[4]

- [5] 비만은 지방간, 고혈압, 당뇨병, 심혈관계질환 등의 만성질환을 유발하는 것으로 널리 알려져 있으며, 최근 보건복지가족부의 2007년 국민건강·영양조사결과에 의하면 한국성인의 31.7%가 비만으로 나타났다. 또한, 전 세계인구의 약 25%에 해당하는 17억명이 현재 과체중(BMI> 25)이고, 미국, 유럽, 일본 등 주요 국가들의 1억2천명을 포함한 서구지역 3억명 이상이 비만환자(BMI> 30)로 분류되고 있다. 중국은 7천만명이 비만인구인 것으로 알려져 있으며, 세계적으로는 어린이 5명 중 1명이 소아비만에 해당되며 급속도로 증가하고 있어 소아비만이 심각한 사회문제로 대두되고 있는 상황이다. 국내외에서 판매되는 비만치료제로는 미 FDA에서 승인을 받은 orlistat을 주원료로 하는 ‘제니칼’이 있는데, 리파아제작용을 억제하는 제니칼의 경우 지방변, 가스생성, 지용성비타민 흡수저하 등의 위장계 부작용이 있다.

- [6] 고지혈증은 혈중 콜레스테롤과 같은 지질성분이 증가하면서 혈액의 흐름이 원활하지 않게 되고 동맥벽에 지질성분들이 부착되면서 만성적인 염증반응을 일으키게 되고 동맥내벽이 좁아지면서 혈관이 굳어지는 동맥경화가 유발되고 장기적으로는 이로부터 생성된 혈전이 심장관상동맥이나 뇌혈관 등을 막아 심근경색, 뇌졸중이나 뇌경색 등을 일으키는 원인이 된다. 현재

고지혈증치료제는 간에서의 콜레스테롤의 합성과정에 중요한 역할을 하고 있는 에이치엠지코에이리덕테이즈(HMG-CoA reductase)를 억제활성을 갖고 있는 ‘스타틴’ 계열의 약물들이 사용되고 있는데 장기간 사용할 경우 간독성이나 근육독성 등의 부작용이 있는 것으로 알려져 있다.

[7]

[8] 고혈압은 동맥의 혈압이 만성적으로 높은 상태로서, 18세 이상의 성인에서 수축기 혈압이 140mmHg 이상이거나 확장기 혈압이 90mmHg 이상인 경우를 말하며, 비만 등에 의해 발생하기도 한다. 현재 고혈압 치료제는 레닌 저해제 약물, 안지오텐신전환효소 활성 저해 약물, 안지오텐신과 안지오텐신 수용체간의 결합을 저해하는 약물들이 개발되어 있으나, 여전히 보다 효과적인 치료제의 개발의 필요성이 대두되고 있다.

[9]

[10] 동맥경화는 콜레스테롤, 인지질, 칼슘 등을 함유한 지방성 물질 (plaque)이 혈관 내막에 축적되어 동맥은 단단해져 탄력성을 잃고 좁아져서 혈액공급이 저해되거나 압력이 높아져 동맥이 파열, 박리 등이 일어나는 상태를 말한다. 현재 동맥경화 치료제로 HMG-CoA reductase 저해제인 다양한 스타틴 (statin)류 등이 개발되어 있으나, 여전히 보다 효과적인 치료제의 개발의 필요성이 대두되고 있다.

[11]

[12] 고인슐린혈증은 혈중 인슐린치가 높은 상태로서, 교감 신경 활성 항진이나 신장에 있어서의 나트륨 흡수 등을 촉진시키는 등 비만 또는 당뇨병 등에 수반되는 질병으로, 부작용이 적고 체중증가 등을 유발하지 않으면서, 동시에 효과적으로 인슐린치를 낮출 수 있는 치료제에 대한 개발의 필요성이 절실히 요구되고 있다.

[13]

[14] 당뇨병은 인슐린이 부족하거나 인슐린에 대한 감수성이 떨어져 탄수화물대사에 이상이 생기는 질환으로서 두 가지 유형이 있다. I형은 전에는 연소당뇨병이라 부르던 인슐린의존성 당뇨병(insulin-dependent diabetes mellitus/IDDM)으로, 인슐린 주사가 필요하다. 이는 췌장에서 인슐린이 분비되지 않기 때문에 주사를 통해 인슐린을 공급해주어야 한다. II형은 성인형당뇨병이라 일컬어지던 인슐린비의존성 당뇨병(non-insulin-dependent diabetes mellitus/NIDDM)으로, 식이요법으로 조절이 가능하다. 이것은 췌장의 인슐린 분비 기능이 떨어지거나 인슐린에 대한 조직의 거부반응에서 비롯되며, 베타세포가 인슐린을 분비하는 데 일어나는 미묘한 변화로 인해 더욱 악화된다. 2종의 당뇨병을 이전에는 연소당뇨병과 성인형당뇨병으로 분류했지만, 2종 모두 어느 나이에서나 발생할 수 있다. 그렇지만 전체 당뇨병 환자 중 90%를 차지할 정도로 인슐린비의존성 당뇨병이 훨씬 더 흔하다. 인슐린의존성 당뇨병 즉, 타입 1(I형) 당뇨병의 치료 방법으로는 현재까지 인슐린 주사가 거의

대부분이다. 한편, 종래 인슐린비의존성 당뇨병 즉, 타입 2(II형) 당뇨병을 치료하기 위한 물질로서는 PPAR- $\gamma$  활성제, GLP-1 유도체, DPP-IV 저해제, PTP1B 저해제 등이 주요 당뇨병 치료제들로서 개발되어 있으나 이러한 종래의 약제들은 각각의 기작에 기인한 부작용을 보이고 있다. 예를 들어, 간이나 신장, 근육 및 심장에 대한 독성과 함께 체중증가 증상 등이 대표적인 부작용이라 할 수 있다. 따라서, 부작용이 적고 체중증가 등을 유발하지 않으면서, 동시에 효과적으로 당뇨병을 치료 또는 예방할 수 있는 당뇨병 치료제에 대한 개발의 필요성이 절실히 요구되고 있다.

[15]

[16] 간은 영양소 대사의 중심 역할을 하는 장기로 정상적인 사람의 간은 약 1,500g의 무게를 가지며 간 기능의 이상이 초래되면 생체의 영양소 대사에 문제를 유발하여, 포도당을 글리코젠으로 만들거나 또는 단백질을 알부민으로 전환하거나 불필요한 것을 분해하여 쓸개즙으로 전달하는 등의 간의 기능이 이상이 생긴다. 정신적 휴식을 가질 경우 경미한 간 손상의 경우, 간세포는 다시 복구 될 수 있지만, 바쁜 현대사회에서는 휴식을 취할 여유를 가질 수 없어서 간질환이 가중되기도 한다. 일반적으로 간에 염증이 생기는 간염이 간질환의 대부분을 차지하며, 양상에 따라 급성 간염과 만성 간염, 원인에 따라 바이러스성 간염, 알코올성 간염, 약물성 간염 등으로 나눌 수 있다. 이런 이상으로 유발되는 간질환에는 지방간, 간염, 간경변증, 간암 등이 있다. 운동이나 금주, 식이요법 등과 약물 치료 등을 병행해서 간질환을 치료하고는 있지만, 근본적으로 완전히 치유가 되기는 어렵기 때문에 효과적이고 개선된 간질환 치료제 또는 보호제의 개발이 계속적으로 필요하다.

[17]

[18] 아울러, 최근 경제발전 에 따른 생활수준의 향상으로 인하여 위생환경이 개선되고 식생활의 향상으로 섭취열량 또한 급속한 증가가 이루어지고 있는 반면, 운동은 부족하고 소비되는 열량은 적어 체내에 과도한 영양분의 축적 등으로 인한 각종 성인병의 발생이 증가하고 있다. 이와 같은 성인병 중 특히 지방간은 과도한 지방이나 알코올 섭취, 간의 지방합성 증가, 중성지방 배출 및 연소 감소 등으로 인하여 간에 지방이 축적되어 발생하며, 일반적으로 간에서 축적된 지방의 비중이 5%이상일 때 지방간으로 정의된다.

[19]

[20] 지방간에서 축적된 지방의 대부분은 중성지방 (triglyceride)이며, 지방간은 크게 과음으로 인한 알코올성 지방간과 비만, 당뇨병, 고지혈증 또는 약물 등으로 인한 비알코올성 지방간으로 나눌 수 있다. 알코올성 지방간은 알코올을 과다 섭취하여 간에 지방 합성이 촉진되고 정상적인 에너지 대사가 이루어지지 않아 발생하게 된다. 일부에서는 지방간이 단순히 간에 지방이 축적되는 현상 정도로 생각하고 있으나, 알코올성 지방간으로 판명된 환자의 50%, 비알코올성 지방간으로 판명된 환자의 30%는 간경변으로 발전한다는 사실을 고려할 때,

지방간은 매우 심각한 간질환의 하나라고 보아야 할 것이다. 현재 지방간을 약물학적으로 치료하는데 유용한 약제는 거의 없는 상태이며 운동과 식이요법만이 권장되고 있으나, 실제로 이러한 방법에 의한 지방간의 치료효율은 매우 낮아 유효한 치료제 개발이 요구된다. 지방간이 당뇨병 및 비만상태에서 관찰되는 세포의 인슐린 저항성과 관련성이 있다고 확인되면서 일부 메트포르민 (metformin)과 같은 혈당 강하제가 지방간 치료에 효과가 있는 것으로 보고되었으나, 상기 약물은 간 독성 또는 젓산증과 같은 부작용을 유발한다는 문제점이 있다. 이외에 대체 약물보조요법으로서 베타인 (betaine), 글루쿠로네이트 (glucuronate), 메티오닌 (methionine), 콜린 (choline) 및 친지방 (lipotropic) 제제가 보조적으로 이용되기도 하지만, 이들에 대한 의약학적 근거가 완전히 증명된 것은 아니다. 따라서, 효과가 탁월하면서도 부작용을 유발하지 않는 안전한 지방간 치료제의 개발이 절실한 실정이다.

[21]

### 발명의 상세한 설명 기술적 과제

[22] 본 발명자들은 상기와 바와 같은 다양한 질환에 대한 문제점들을 감안하여 비만, 고지혈증, 고혈압, 동맥경화, 고인슐린혈증, 당뇨병 및 간질환 등을 포함하는 대사증후군 관련 질환에 효과적인 물질을 찾기 위해 예의 노력한 결과, 4-하이드록시 타목시펜 유사체인 GSK5182가 체중을 감소시키고, 혈액 중 글루코스와 콜레스테롤 수치를 낮추며, 지방간을 억제하고 간손상 마커인 혈중 GOT (glutamyl oxaloacetic transaminase) 및 GPT (glutamyl pyruvate transaminase) 수치를 감소시켜 비만, 고지혈증, 당뇨병, 지방간 또는 간질환 등의 치료에 효과를 나타낼 수 있음이 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[23]

### 과제 해결 수단

[24] 본 발명의 하나의 목적은 4-하이드록시 타목시펜 유사체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 대사증후군 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[25] 본 발명의 또 하나의 목적은 4-하이드록시 타목시펜 유사체 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 대사증후군 관련 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[26] 본 발명의 또 하나의 목적은 4-하이드록시 타목시펜 유사체를 포함하는, 혈액 내의 콜레스테롤 감소용 조성물을 제공하는 것이다.

[27] 본 발명의 또 하나의 목적은 4-하이드록시 타목시펜 유사체를 포함하는, 간 또는 혈액에서의 글루코스 수치 감소용 조성물을 제공하는 것이다.

[28] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 대사증후군 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는,

대사증후군 관련 질환의 치료 방법을 제공하는 것이다.

[29]

### 발명의 효과

[30] 본 발명은 4-하이드록시 타목시펜 유사체인 GSK5182가 체지방 감소, 혈중 총콜레스테롤 감소, 간의 글루코스 생성 유전자 발현을 억제하고, 혈액 중 글루코스 수치를 낮추며, SREBP1c (sterol regulatory element binding protein 1c)의 발현을 저해하여 간세포에서의 지방합성을 억제하고, 간손상 마커인 혈중 GOT (glutamyl oxaloacetic transaminase) 및 GPT (glutamyl pyruvate transaminase)의 수치를 감소 및 알코올로 유도되는 간의 CYP2E1 효소의 발현을 억제시켜서 간손상이나 간질환의 예방 및 치료에 효과적임을 확인함으로써, 4-하이드록시 타목시펜 유사체인 GSK5182를 유효성분으로 포함하는 대사증후군 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공할 수 있는 효과가 있다. 이는 또한 비만, 고지혈증, 당뇨병, 지방간 또는 간질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 응용될 수 있다.

[31]

### 도면의 간단한 설명

- [32] 도 1은 GSK5182(40mg/kg/일)를 C57BL/6 마우스에 15주 동안 고지방식이로 섭취시켜 비만을 유도한 다음, 대조군(n=5)에는 vehicle을, GSK5182 투여군(n=8)에는 GSK5182를 40 mg/kg의 농도로 각각 1일 1회씩 30일간 복강으로 투여한 후, 체중변화(a), 지방조직무게(b), 체중대비 지방조직의 비율(c) 및 지방조직의 병리조직학관찰 소견(d) 등을 분석하여 GSK5182(40mg/kg/일) 투여가 지방세포의 크기 및 지방조직의 무게 감소시켜 비만을 치료 또는 억제할 수 있음을 보여주는 결과이다.
- [33] 도 2은 도 1에서와 동일한 실험군으로부터 각각의 혈액을 채취하여 혈액 내 총콜레스테롤의 양을 측정된 결과, 대조군과 비교하여 GSK5182를 투여한 실험군에 현저하게 감소되어 고콜레스테롤혈증과 같은 고지혈증을 치료 또는 억제할 수 있음을 보여주는 결과이다.
- [34] 도 3은 GSK5182(40mg/kg/일)를 db/db 마우스(n=6)에 5일 동안 복강 내로 투여한 다음, 뒤이어 4시간의 금식 이후 혈액 중 글루코스를 측정함으로써 GSK5182가 *in vivo*에서 혈액 중 글루코스 수치를 낮출 수 있음을 확인한 결과이다.
- [35] 도 4는 GSK5182(40mg/kg/일)를 db/db 마우스(n=6)에 5일 동안 복강 내로 투여한 다음, 간에서 GSK5182 처리에 의한 글루코스 생성 유전자 발현이 의미있게 감소된 것을 보여주는 그래프이다. 이때 Q-PCR은 db/db 마우스의 간으로부터 분리된 총 RNA를 이용하여 수행하였다.
- [36] 도 5는 GSK5182(40mg/kg/일)를 db/db 마우스(n=6)에 5일 동안 복강 내로 투여한 db/db 마우스의 간에서 *PEPCK* 프로모터의 ERRE 상에서 PGC-1 $\alpha$ 의 점유를 보여주는 ChIP 분석 결과이다.
- [37] 도 6은 GSK5182가 피루베이트 켈린지에 대하여 글루코스 생성을 억제함을

- 보여주는 그래프이다. 이때 17 시간 동안 금식시킨 DIO 마우스(n=5)는 비히클 또는 GSK5182(40 mg/kg)을 투여한 후 1g/kg의 피루베이트로 챌린지되었다.
- [38] 도 7은 *db/db* 마우스 ( $n=5$ )에서 GSK5182 및 metformin의 항-당뇨 효과를 나타내는 그래프이다. 상기 항당뇨 효과는 혈액 중 글루코스 수치를 21일 동안 비히클, GSK5182(40mg/kg/일) 또는 metformin(40mg/kg/일)을 투여한 *db/db* 마우스에서 4시간 동안 금식 후 측정하였다.
- [39] 도 8은 GSK5182(40mg/kg/일) 또는 metformin(40mg/kg/일)을 복강 내로 21일 동안 투여한 *db/db* 마우스의 간 RNA를 사용한 글루코스 생성 유전자 발현의 Q-PCR 분석 결과이다.
- [40] 도 9는 GSK5182(40mg/kg/일) 또는 metformin(40mg/kg/일)을 복강 내로 21일 동안 투여하기 전의 *db/db* 마우스 혈액 글루코스 수치 및 체중을 측정 한 결과이다. 이때 혈액 글루코스 수치(a) 및 체중(b)은 GSK5182 또는 metformin의 투여 1일 전에 *ad libitum* 하에서 측정하였다.
- [41] 도 10은 GSK5182 (40mg/kg/일) 또는 metformin (40mg/kg/일)을 복강 내로 21일 동안의 투여에 따른 식이 섭취량(a)과 체중(b)에 대한 영향을 보여주는 그래프이다. 이때 식이 섭취량과 체중은 21일 동안 측정하였다.
- [42] 도 11은 293T 세포주에 transient transfection 방법을 통하여 4-하이드록시 타목시펜 유사체인 GSK5182가  $ERR\gamma$ 로 유도되는 SREBP1c의 프로모터의 활성의 저해 (a) 및 rat primary cell에서  $ERR\gamma$ 로 유도되는 SREBP1c의 단백질 발현을 억제 (b)한다는 것을 나타낸 그래프이다.
- [43] 도 12는 선천적으로 비알콜성 지방간을 갖고 있는 7주령의 *db/db* 수컷마우스를 이용하여 대조군 ( $n=5$ )에는 vehicle을, GSK5182 투여군에는 GSK5182 40 mg/kg의 농도로 30일간 복강으로 투여한 다음, 간조직을 절취하여 냉동조직절편을 제작하여 Oil-Red O (ORO) 염색을 실시하고, 이미지 분석프로그램을 이용하여 현미경으로 관찰한 전체부위에서 ORO에 붉은 색으로 염색된 부위가 차지하는 비율을 비교분석한 결과, GSK5182의 투여에 의하여 *db/db* 수컷마우스의 비알콜성 지방간이 뚜렷하게 억제된다는 것을 나타낸 그래프이다.
- [44] 도 13은 7주령의 *db/db* 수컷마우스를 이용하여 대조군 ( $n=5$ )에는 vehicle을, GSK5182 투여군에는 GSK5182 40 mg/kg의 농도로 30일간 복강으로 투여한 동물들의 혈액 내 GOT (glutamyl oxaloacetic transaminase) (a) 및 GPT (glutamyl pyruvic transaminase) (b)를 비교분석한 결과, GSK5182의 투여한 군에서 유의하게 감소된 것을 나타낸 그래프이다.
- [45] 도 14는 8주령의 C57BL/6 수컷마우스를 이용하여 농도별 알콜 액체식이 (liquid alcohol diet)에 적응을 시킨 다음, 4주 동안 5.0% 알콜 액체 식이를 공급하면서 마지막 2주 동안 대조군 ( $n=5$ )에는 vehicle을, 실험군 ( $n=5$ )에는 GSK5182를 40 mg/kg의 농도로 경구로 투여한 다음, 간조직을 절취하여 냉동조직절편을 제작하여 Oil-Red O (ORO) 염색을 실시하고, 이미지 분석프로그램을 이용하여 현미경으로 관찰한 전체부위에서 ORO에 붉은 색으로 염색된 부위가 차지하는

비율을 비교분석한 결과 GSK5182의 투여에 의하여 C57BL/6 마우스를 이용한 알콜성 지방간이 뚜렷하게 억제된다는 것을 나타낸 그래프이다.

[46] 도 15는 8주령의 C57BL/6 수컷마우스를 이용하여 농도별 알콜 액체식이 (liquid alcohol diet)에 적응을 시킨 다음, 4주 동안 5.0% 알콜 액체식을 공급하면서 마지막 2주 동안 대조군 (n=5)에는 vehicle을, 실험군 (n=5)에는 GSK5182를 40 mg/kg의 농도로 경구로 투여한 동물들의 혈액 내 GOT (glutamyl oxaloacetic transaminase) (a) 및 GPT (glutamyl pyruvic transaminase) (b)를 비교 분석한 결과, GSK5182의 투여한 군에서 유의하게 감소된 것을 나타낸 그래프이다.

[47] 도 16은 8주령의 C57BL/6 수컷마우스를 이용하여 실험군 (n=5)에는 GSK5182 (40 mg/kg)을, 대조군 (n=5)에는 vehicle을 3일 동안 복강으로 투여하고 알코올을 6 g/kg 농도로 공급한 다음 24시간 후에 간조직을 채취하여 western blot을 시행하여 CYP2E1 효소의 단백질 발현을 비교 분석한 결과, GSK5182를 투여한 군에서 유의하게 억제된 것을 나타낸 그래프이다.

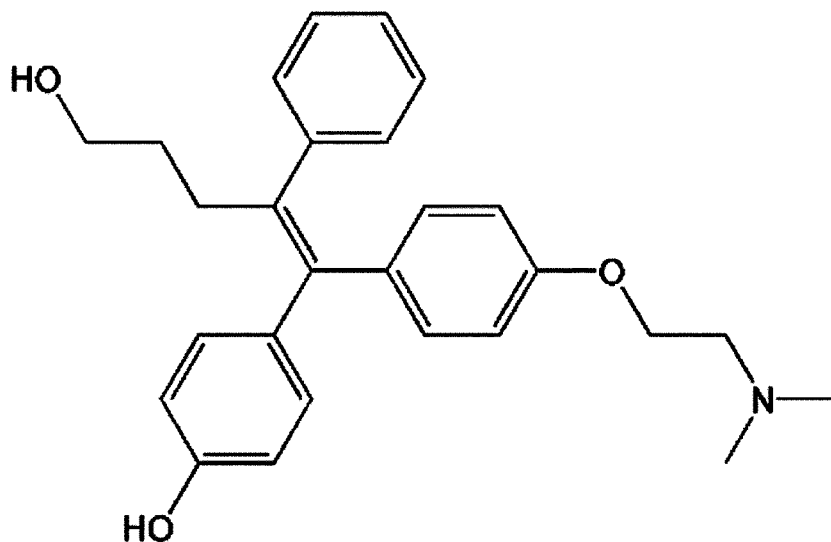
[48]

#### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

[49] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1의 4-하이드록시 타목시펜 유사체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 대사증후군 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[50] [화학식 1]

[51]



[52]

[53] 본 발명에서, 상기 4-하이드록시 타목시펜 유사체는 (Z)-4-(1-(4-[2-(디메틸아미노)에톡시]페닐)-5-하이드록시-2-페닐펜트-1-에닐)페놀[(Z)-4-(1-{4-[2-(dimethylamino)ethoxy]phenyl}-5-hydroxy-2-phenylpent-1-enyl)phenol]로 명명되는 화합물이다. 상기 화학식 1의 화합물은 GSK5182로도 불린다. GSK5182는 ERR $\gamma$  (estrogen-related receptor gamma)의 억제제로 알려져 있으나,

대사증후군 관련 질환 등의 치료 또는 예방의 용도에 대해 개시된 바는 없으며, 본 발명자들에 의해 최초로 비만, 고지혈증, 당뇨병, 동맥경화, 고인슐린혈증, 당뇨병 및 간질환 등을 포함하는 대사증후군 관련 질환의 치료 또는 예방의 용도가 있음이 규명되었다.

- [54] 본 발명에서 용어, "대사증후군 관련 질환"은 대사에 문제가 있어서 발생하는 다양한 질환을 통칭하는 것으로, 본 발명의 상기 화학식 1의 화합물로 치료 또는 예방할 수 있는 질환은 제한 없이 포함되나, 그 예로 비만, 고지혈증, 고혈압, 동맥경화, 고인슐린혈증, 당뇨병 및 간질환 등이 있을 수 있다. 간질환은 비알콜성 지방간, 알콜성 지방간, 비알콜성 지방간염, 말기 섬유화 간질환, 비바이러스 만성 간염, 간경변 또는 간암일 수 있다.
- [55] 본 발명에서, GSK5182는 공지된 합성 방법으로 합성하여 사용할 수도 있고, 또는 상업적으로 입수하여 사용할 수도 있다. 본 발명에서, GSK5182는 당해 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 약학 또는 식품학적으로 허용 가능한 염 및 용매화물로 제조될 수 있다.
- [56] 약학 또는 식품학적으로 허용 가능한 염으로는 유리산 (free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알콜 (예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.
- [57] 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 메탄설폰산, *p*-톨루엔설폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산 (maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산 (propionic acid), 젖산 (lactic acid), 글리콜산 (glycollic acid), 글루콘산 (gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산 (glutaric acid), 글루쿠론산 (glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르빈산, 카본산, 바닐릭산, 히드로 아이오딕산 등을 사용할 수 있다.
- [58] 또한, 염기를 사용하여 약학 또는 식품학적으로 허용 가능한 금속염을 제조할 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염 (예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.
- [59] 본 발명의 상기 조성물 GSK5182는 ERR $\gamma$ -특이적 역작용제로서 지방세포 크기 및 체지방 무게를 감소시켜 체중을 줄여주는 효과로 비만을 예방 또는 치료할 수

있다.

- [60] 본 발명의 상기 조성물은 혈중 콜레스테롤을 낮추어 고지혈증의 예방 및 치료에 활용될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 혈중 콜레스테롤을 낮추어 고혈압, 동맥경화, 고인슐린혈증의 예방 및 치료에 활용될 수 있다.
- [61] 본 발명의 상기 조성물은 간에서의 글루코스 수치를 감소시켜서 당뇨병을 예방 또는 치료할 수 있는 특징이 있으며, 또한 혈액에서의 글루코스 수치를 감소시켜서 당뇨병을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [62] 본 발명의 상기 조성물은 비만, 고지혈증 및 고혈당 등의 증상을 억제하여 이와 같은 증상들을 수반하는 대사증후군을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [63] 본 발명의 상기 조성물은 간세포의 SREBP1c(sterol regulatory element binding protein 1c)의 발현을 저해하여 간세포에서의 지방합성 억제할 수 있다.
- [64] 본 발명의 상기 조성물은 간에서의 지방축적을 감소시킬 수 있으며, 바람직하게는 알콜성 지방간 또는 비알콜성 지방간의 지방축적을 억제할 수 있다.
- [65] 본 발명의 상기 조성물 GSK5182은 (i) 간손상 마커인 GOT (glutamyl oxaloacetic transaminase) 또는 (ii) GPT (glutamyl pyruvate transaminase)의 수치를 감소시키거나, (iii) CYP2E1 단백질의 발현을 억제하는 특성을 하나 이상 갖고 있어서 간질환을 치료 또는 예방할 수 있다.
- [66] 본 발명에서 용어 "비만 (obesity)"이란 체지방 또는 지방조직이 체내에 과다하게 축적되어 있는 상태를 말하며, 일반적인 비만의 기준은 자신의 정상체중(표준체중)의 20%를 초과했을 때를 말하며, 최근에는 진단장비의 발전으로 인해 체지방량을 기준으로 볼 때, 남자는 체지방량이 25% 이상, 여자는 30% 이상을 비만으로 보고 있다. 이외에 체질량지수(BMI)와 허리둘레 (waist circumference), 그리고 체지방지수가 비만지표로 많이 사용되고 있다.
- [67] 본 발명에서 용어 "고지혈증"은 중성 지방과 콜레스테롤 등의 지방대사가 제대로 이루어지지 않아 혈액 중에 지방량이 많아 유발되는 질환을 말한다. 구체적으로는 혈액내의 중성지방, LDL 콜레스테롤, 인지질 및 유리 지방산 등의 지질 성분이 증가된 상태로서 발생빈도가 높은 고콜레스테롤혈증 또는 고중성지방혈증을 포함한다.
- [68] 본 발명에서 용어 "고혈압"은 고혈압은 동맥의 혈압이 만성적으로 높은 상태로서, 18세 이상의 성인에서 수축기 혈압이 140mmHg 이상이거나 확장기 혈압이 90mmHg이상인 경우를 말하며, 비만 등에 의해 발생하기도 한다.
- [69] 본 발명에서 용어 "동맥경화"는 동맥경화는 콜레스테롤, 인지질, 칼슘 등을 함유한 지방성 물질 (plaque)이 혈관 내막에 축적되어 동맥은 단단해져 탄력성을 잃고 좁아져서 혈액공급이 저해되거나 압력이 높아져 동맥이 파열, 박리 등이 일어나는 상태를 말한다.
- [70] 본 발명에서 용어 "고인슐린혈증"은 혈중 인슐린치가 높은 상태로서, 교감 신경 활성화 향진이나 신장에 있어서의 나트륨 흡수 등을 촉진시키는 등 비만 또는

당뇨병 등에 수반되는 질병이다.

- [71] 본 발명의 실시예에서는 GSK5182가 고지방식이 섭취로 비만 및 고지혈증을 유발한 마우스모델에서 서혜부 피하지방(inguinal fat) 및 부고환 복부지방(gonadal fat)의 무게를 감소시키고, 지방세포의 크기를 억제하여 투여이전 대비 약 29%의 체중을 감소시켰으며, 또한 혈액 내 총콜레스테롤 양을 고지방식이 대조군의 45% 수준으로 낮추어 비만 및 고지혈증을 치료 또는 예방하는 효과를 갖고 있음을 확인할 수 있었다 (도 1 및 도 2).
- [72] 본 발명에서 용어 "당뇨병"이란 인슐린의 분비량이 부족하거나 인슐린의 작용 및 기능이 충분히 이루어지지 않을 때 나타나는 질병을 의미하며, 이 병에 걸릴 경우 글리코젠, 단백질 및 지방질의 과도한 분해로 간 또는 혈액 중 글루코스 농도의 비정상적인 증가를 일으켜 당뇨 및 케톤뇨를 초래하고, 수분 및 전해질 대사의 이상으로 전해질 상실에 의한 혈액 농축 상태와 함께 순환장애, 신장장애 등의 병적 상태를 가져오게 된다. 인슐린은 췌장 내에 존재하는 랑게르한스섬의 베타 세포에서 분비되고, 혈중 글루코스 농도가 증가하면 분비되며, 감소하면 분비가 억제되어 에너지원의 적절한 활동을 조절하게 된다. 이 병은 인슐린 의존형 당뇨병 (I형)과 인슐린 비의존성 당뇨병(II형)으로 구분된다. 당뇨병 진단은 일반적으로 혈중 글루코스 농도 측정을 통해서 가능한데, 기준에 따라서 차이를 나타낸다. 인간에게서는 일반적으로 혈중에서 글루코스가 평소 200 mg/dl 이상, 공복시 140 mg/dl 이상일 때 당뇨병으로 진단한다. 따라서, 혈액 내 또는 간에서의 글루코스 농도를 낮추면 당뇨병의 치료 또는 예방을 할 수 있다.
- [73] 본 발명의 실시예에서는, GSK5182가 글루코스 생성 유전자 발현을 억제하고, 혈액 또는 간에서 글루코스 수치를 낮추어 당뇨병 치료에 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다. 특히, 본 발명의 일 실시예에서는 글루코스 생성의 조절에서 GSK5182의 역할을 확인하기 위한 실험한 결과, 대조군과 비교하여 혈액 중 포도당 수치의 피루베이트-의존적 유도를 강하게 억제한 것을 확인하였다(도 6). 또한, GSK5182와 제 2 당뇨병 치료제인 metformin의 항-당뇨 효과 및 독성을 마우스에서 비교 실험 한 결과, GSK5182가 정상적 음식 포도당수치 범위내로 정상 혈당을 복구 시킨 것을 확인하였으며, GSK5182가 당뇨병 표현형에 의해 초래된 간 독성에 관해서 metformin에 비해 큰 개선을 보이는 것을 확인하였다(도 7, 8, 9a 및 9b).
- [74] 본 발명의 실시예에서는 상기한 비만, 고지혈증, 당뇨 등과 같은 다양한 요소들이 포괄된 대사증후군에 대하여, GSK5182가 고지방식이로 유도된 비만 및 고지혈증을 억제할 뿐만 아니라 당뇨병 모델동물에서의 간의 글루코스 생성 유전자 발현의 억제 및 혈액 또는 간에서 글루코스 수치를 낮추어 당뇨병 치료에 효과를 나타내어, GSK5182가 이와 같은 여러 증상들을 포괄하는 대사증후군의 치료 및 예방에 유용한 활성이 있음을 확인할 수 있었다.
- [75] 본 발명에서 용어 간질환이란 본 발명의 조성물에 의해 치료될 수 있는 간질환은 제한없이 포함되나, 그 예로 비알콜성 지방간, 알콜성 지방간,

비바이러스성 만성 간염, 간경변, 만성 간질환, 간암 등이 있을 수 있다.

바람직하게는 비알콜성 지방간, 또는 알콜성 지방간일 수 있다.

[76] 본 발명에서 용어, 비바이러스성이란 알코올성, 비알코올성 (비만, 당뇨병, 고지혈증) 혹은 기타 (독성, 공해, 약물, 신경성, 과로) 원인으로 생기는 병을 말한다.

[77] 본 발명에서 용어, 지방간은 중성지방이 정상적인 경우와는 다르게 간 세포 내에 비정상적으로 침착되어 보이는 현상이 나타난 것을 말한다. 정상 간은 약 5%가 지방조직으로 구성되어 있으며 중성지방, 지방산, 인지질, 콜레스테롤 및 콜레스테롤 에스터가 지방의 주성분이나, 일단 지방간이 발생되면 대부분의 성분이 중성지방으로 대체되며, 중성지방의 양이 간 중량의 5% 이상이면 지방간으로 진단된다. 지방간은 간세포 내의 지방대사 장애나 과잉지방을 운반하는 과정에서의 결함 등에 의하여 초래되는 것으로서, 주로 간에서의 지방대사 장애로 인하여 발생한다. 상기 지방간에서 축적된 지방의 대부분은 중성지방 (triglyceride)이며, 지방간은 크게 비만, 당뇨병, 고지혈증, 약물 등으로 인한 비알코올성 지방간과 과음으로 인한 알코올성 지방간으로 나눌 수 있다. 상기 비알코올성 지방간알코올 섭취 과거력이 없으면서 지방간을 동반하는 경우를 말하며, 비만, 당뇨, 고지혈증 등 대사성 질환과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 비알코올성 지방간에는 단순히 간 내에 지방이 축적된 것 뿐만 아니라, 비알코올성 지방간염 (non-alcoholic steatohepatitis) 또는 말기 섬유화 간질환 등이 여기에 속한다. 알코올성 지방간은 알코올을 많이 섭취하게 되어 간에서 지방 합성이 촉진되고 정상적인 에너지 대사가 이루어지지 않아 발생하게 되는 것을 말한다. 알코올은 체내에 저장되지 못하고 간에서 산화작용에 의하여 완전히 없어지게 되는데, 구체적으로 보면, 간에서 알코올은 크게 알코올 탈수소효소 (alcohol dehydrogenase : ADH) 경로, 미소체 알코올 산화체계 (microsomal ethanol oxidizing system : MEOS) 경로 및 카탈라제 (catalase) 경로의 세가지 경로에 의해 대사되어 아세트알데히드로 변환되고, 이는 다시 탈수소효소 (aldehyde dehydrogenase : ALDH)에 의하여 아세트염으로 대사된다. 이때, 아세트알데히드는 독성이 있어 간세포에 손상을 줄 수 있고, 또한, 미소체 알코올 산화체계 경로에서는 사이토크롬 P450-2E1 (CYP2E1; cytochrome P450 2E1)의 활성화로 알코올이 대사되는 과정에서 슈퍼옥사이드( $O_2^-$ ), 과산화수소 ( $H_2O_2$ ) 및 퍼옥시나이트리트(peroxynitrite) 등과 같은 활성산소종 (ROS; reactive oxygen species)이 생성되어 산화적 스트레스를 유발하여 간손상을 일으키게 되는 것으로 알려져 있다. 더불어, 이와 같은 알코올의 대사 결과 지방산이 많이 만들어져 간에 지방이 축적되게 되는데, 상기와 같은 원인으로 간에 축적된 지방간을 알코올성 지방간이라고 한다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 비알코올성 지방간 외에도 액체 알코올 다이어트를 이용하여 알코올성 지방간이 유도된 마우스 모델에 4-하이드록시 타목시펜 유사체인 GSK5182를 투여한 결과, 각각의 지방간이 억제되는 효과를 확인하였다 (도 12

- 및 도 14).
- [78] 지방간은 대부분 비만과 관련이 있는 것으로 알려져 있으나, 이외에도 마르거나 정상인 사람에게서도 나타날 수 있는 질환이다. 이와 같은 사실은 지방간이 있는 환자의 40% (32/81)가 정상 체질량 지수를 보였다는 보고에 의해서도 뒷받침 될 수 있다 (Nucl. Med. Mol. Imaging., 40, 243 ~ 248 (2006)). 특히 비만이 아닌 군에서 중성지방이 주요 요소로 작용하는 것으로 보고 (J. Clin. Gastroenterol., 40, 745 ~ 752 (2006)) 되었으며, 지방간이 있는 환자의 경우 정상군보다 콜레스테롤, 중성지방의 수치가 통계적으로 유의하게 높게 나타나 비만이 아닌 경우에 있어서, 지방간과 중성지방 간의 연관성이 높다는 사실을 보여주고 있다.
- [79] 본 발명의 일 실시예에서는, GSK5182가 ERR $\gamma$ -특이적 역작용제로서 SREBP1c (sterol regulatory element binding protein 1c)의 발현을 저해하여 간세포에서의 지방합성을 억제함으로써 간질환의 일종인 지방간의 치료 또는 예방에 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다 (도 11).
- [80] 특히, 본 발명의 실시예에서는 비알콜성지방간 및 알콜성지방간에서의 GSK5182의 역할을 확인하기 위하여 마우스 모델을 이용하여 실험한 결과, 대조군과 비교할 때 지방간을 현저히 억제하는 것을 확인하였다 (도 12 및 도 14). 또한, GSK5182의 투여에 따른 간독성에 대하여 혈액 내 GOT 및 GPT를 분석한 결과, GSK5182 투여군에서 대조군 보다 유의하게 감소하여 거의 정상적인 수준으로 낮추는 것을 관찰하여 GSK5182가 비알콜성 및 알콜성 지방간에 의하여 초래된 간 독성에 관해서 뚜렷한 개선효과를 보인다는 것을 확인하였다 (도 13 및 도 15). 아울러 GSK5182 투여가 알코성 간손상을 일으키는 CYP2E1 효소의 발현을 유의하게 억제하는 효과를 갖고 있음을 확인하였다 (도 16).
- [81] 본 발명에서 용어, 만성 간질환이란 만성 간염, 간경변, 간암을 포함하는 말로써 간경화증이라고도 불리는 간경변이란 상당량의 간세포의 상실, 섬유조직의 증식, 재생결절을 특징으로 하는 모든 형태의 간질환을 말한다. 간경변의 주된 원인은 간염 바이러스나 알코올 등이며 각각 항바이러스 치료나 금주/영양공급 등의 치료 방법을 통해서 치료한다. 합병증인 복수(배에 물이 차는 증상), 정맥류 출혈, 간성혼수 등으로 사망에 이를 수 있다.
- [82] 본 발명에서 용어, 간암이란 간경변환자, 알코올 등의 원인에 의한 만성 간질환 환자로부터 생기는 병을 말한다. 전형적인 간종괴가 보이거나 혈액 검사에서 알파태아단백질 (AFP)가 증가되어 있다면 간암으로 진단할 수 있으며 간암 부위를 잘라내는 수술 등으로 치료한다.
- [83] 이 모든 간질환은 발생 원인은 환자마다 다를 수 있지만, 만성화가 되면 간염, 간경화증, 간암으로 점점 병의 진행이 되므로 본 발명의 실시예에서 확인한 결과인 GSK5182가 를 포함하는 조성물이 간에서 간손상 마커인 GOT (glutamyl oxaloacetic transaminase) 및 GPT (glutamyl pyruvate transaminase)의 수치를 감소시켜서 간질환을 치료 또는 예방할 수 있을 것을 시사한다.

- [84] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 비만, 고지혈증, 고혈압, 동맥경화, 고인슐린혈증, 당뇨병, 간질환 등의 대사증후군 관련 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다. 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 상기 질환들의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 말한다.
- [85]
- [86] 본 발명의 바람직한 양태로서, 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물이다.
- [87] 상기 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물인 경우 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 상기 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스 (sucrose) 또는 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [88] 상기 약제학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [89] 상기 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 상기 화학식 1의 4-하이드록시 타목시펜 유사체 또는 그의 염은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다.
- [90] 본 발명의 비만, 고지혈증, 고혈압, 동맥경화, 고인슐린혈증, 당뇨병, 간질환 등의 대사증후군 관련 질환의 예방제 또는 치료제는, 매일 투여 또는 간헐적으로 투여해도 좋고, 1일당 투여 횟수는 1회 또는 2~3회로 나누어 투여하는 것이

가능하다. 두 유효성분이 각각 단제인 경우의 투여횟수는 같은 횟수여도 좋고, 다른 횟수로 해도 된다. 또한, 본 발명의 조성물은 간질환 질환의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 다른 약물 치료와 병용하여 사용할 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[91]

[92] 본 발명의 바람직한 양태로서, 본 발명의 조성물은 식품 조성물이다.

[93] 즉, GSK5182 또는 이의 염은 비만, 고지혈증, 고혈압, 동맥경화, 고인슐린 혈증, 당뇨병, 간질환 등의 대사증후군 관련 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 식품 조성물에 첨가될 수 있다. GSK5182 또는 이의 염을 식품 첨가물로 사용할 경우, GSK5182 또는 이의 염을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 GSK5182 또는 이의 염은 원료 조성물 중 0.0001~1 중량%, 바람직하게는 0.001~0.1중량%의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하로도 사용될 수 있다.

[94] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 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 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[95] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 당 일반적으로 약 0.01~0.04 g, 바람직하게는 약 0.02~0.03 g 이다.

[96] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 과육의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01~10 중량부의 범위에서 선택되는

것이 일반적이다. 이들 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[97]

[98] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 4-하이드록시 타목시펜 유사체를 포함하는, 혈액 내의 콜레스테롤 감소용 조성물을 제공한다.

[99]

[100] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 4-하이드록시 타목시펜 유사체를 포함하는, 간 또는 혈액에서의 글루코스 수치 감소용 조성물을 제공한다.

[101]

[102] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 4-하이드록시 타목시펜 유사체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대사증후군 관련 질환의 치료 방법을 제공한다.

[103]

본 발명에서 용어, "개체"란 대사증후군 관련 질환이 이미 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하고 GSK5182 또는 이의 염을 포함하는 조성물을 개체에게 투여함으로써, 상기 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.

[104]

본 발명 화합물의 개별적인 투약의 최적량 및 투약 간격은 치료되고 있는 병의 성질 및 정도, 투여 제형, 경로 및 부위, 그리고 치료되고 있는 특정 환자의 나이와 건강상태에 의해 결정될 것이고, 의사가 궁극적으로 사용될 적절한 투약을 결정할 것이라는 것은 당해 분야의 당업자가 알 수 있을 것이다. 이러한 투약은 적절할 정도로 자주 반복될 수 있다. 부작용이 생긴다면, 보통의 임상 진료에 따라서 투여량 및 빈도를 변경하거나 또는 감소시킬 수 있다.

[105]

상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[106]

### 발명의 실시를 위한 형태

[107]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[108]

[109] 재료 및 방법

[110]

[111] 실시예 1: 화합물의 준비

- [112] 인슐린, 8-브로모아데노신 3', 5'-시클릭 모노포스페이트(8-Br-cAMP) 및 텍사메타손은 Sigma로부터 구입하였고 권고된 용매에 녹여 사용하였다.
- [113] GSK5182는 HCl 염 형태로 사용하였고, *in vivo* 실험을 위하여 무균의 여과된 30% PEG-400 수용액에 용해시켜 40mg/kg의 농도로 제조하여 사용하였다. 또한 항-당뇨 및 독성제거 효능 등에 비교분석을 위하여 당뇨병 치료제로서 널리 사용되고 있는 메트포민(metformin)을 Sigma로부터 구입하여 사용하였다.
- [114]
- [115] **실시예 2: 크로마틴 면역침강법(ChIP) 분석**
- [116] 간 샘플 상의 핵 분리 및 교차결합을 이전 공지된 바와 같이 수행하였다(Dufour C.R. et al. *Cell Metab*, 2007, 5, p. 345-356; Lee Y.S. et al. *Biochem J*, 2008, 413, p. 559-569). 초음파 분해 처리 후에, anti-PGC-1 $\alpha$ (Santa Cruz)을 이용한 면역침강법을 위해, 가용성 크로마틴을 넣어주었다. DNA는 페놀/클로로포름 추출물로 회복시켜주고 상응하는 프로모터에 대한 프라이머를 사용하여 PCR 또는 Q-PCR에 의해서 분석하였다.
- [117]
- [118] **실시예 3: 정량적 PCR**
- [119] 정량적 PCR을 위하여 *db/db* 마우스의 간으로부터 일차적으로 총 RNA를 RNeasy mini-kit(Qiagen)를 사용하여 추출하였다. 그 후 Superscript II 효소(Invitrogen)를 사용해 cDNA를 만들고 SYBR green PCR 키트와 TP800, Thermal Cycler DICE Real Time system(TAKARA)을 사용해서 Q-PCR에 의해서 분석하였다. 모든 데이터는 리보솜 L32 발현으로 표준화시켰다.
- [120]
- [121] **실시예 4. SREBP1c 프로모터 활성 및 단백질발현 분석**
- [122] GSK5182가 지방합성에 중심적인 역할을 수행하는 스테롤 조절 요소 결합단백질1c (SREBP1c; sterol regulatory element binding protein 1c) 유전자 프로모터 활성 저해 및 단백질 발현 억제 효과가 있는지 여부에 대하여 알아보기 위하여, 293T 세포주에 리포팩틴 (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.)을 이용하여 ERR $\gamma$  및 pGL4/hSREBP-luc 등의 플라스미드 DNA를 트랜지엔트 트랜스펙션 시킨 다음, GSK5182 처리에 따른 luciferase 발현을 비교 분석하였다. 또한, GSK5182에 의한 SREBP1c 단백질 발현 억제에 대한 실험은 랫트의 간으로부터 primary hepatocyte를 분리하여 배양하면서 Ad-GFP or Ad-ERRg을 접종하고 GSK5182 처리군과 대조군의 시료의 단백질을 추출한 다음 웨스턴 블릿 방법으로 SREBP1c 단백질의 발현을 비교 분석하였다.
- [123]
- [124] **실시예 5: 비만 및 고지혈증 동물효능 평가**
- [125] 8주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 이용하여, 15주 동안 고지방식이 (Research diets, D12492, USA)를 섭취시켜 비만 및 고지혈증을 유도한 다음, 대조군 (n=5)에는 vehicle을, 양성대조군 (n=4)에는 metformin을 40 mg/kg 농도로,

GSK5182 실험군 (n=8)에는 GSK5182를 40 mg/kg의 농도로 각각 1일 1회씩 30일간 복강으로 투여하였다. 실험종료 후, 각 군의 동물들의 체중을 측정하고, 혈액을 채취하여 원심분리시켜 혈장을 분리한 다음, 혈액 중 대표적인 지질인 총콜레스테롤을 혈액화학분석기(Hidachi 7150, Japan)로 직접 분석하였다. 한편, 각 군의 동물들은 안락사 시킨 후, 부검을 실시하여 좌측 피하지방(inguinal fat)과 복부지방(gonadal fat)을 각각 분리하여 중량을 측정하고, 체중대비 피하 및 복부지방의 상대적인 중량을 비교 분석하였다. 또한, 복부지방을 포르말린 고정 후 병리조직표본을 제작하여 H&E 염색을 시행하여 광학현미경으로 지방조직의 크기를 관찰하여 비교분석하였다.

[126]

[127]     **실시예 6: 당뇨병 동물효능 평가**

[128]     당뇨병 모델동물로서 널리 사용되고 있는 7주령의 수컷 *db/db* 마우스와 식습관-유도적 비만모델동물(DIO)로서 사용되는 8주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 Charles River laboratories로부터 도입하여 12시간씩 명/암 주기에서 유지하면서 충분히 사료를 섭취토록 하여 실험을 실시하였다. 먼저, *db/db* 마우스를 활용한 실험은, 단기간의 GSK5182 투여에 따른 항-당뇨병 효능을 관찰하기 위하여 그룹당 n=6마리씩 배정하여 실험군에는 GSK5182(40mg/kg/일)를, 대조군에는 비히클을 5일 동안 투여하면서 2, 3, 4 및 5일째에 4시간 동안 금식한 상태의 혈액 내 글루코스 수치를 측정하였다. 또한, 장기간의 GSK5182 투여에 의한 지속적인 항-당뇨병 효능을 알아보기 위하여 *db/db* 마우스를 그룹당 5마리씩 배정하고, GSK5182(40mg/kg/일), 당뇨병 치료제로서 널리 사용되고 metformin(40mg/kg/일) 및 대조군에는 비히클을 3주간(21일) 복강으로 투여하면서 2일 간격으로 혈당 및 체중변화를 측정하였다. GSK5182와 metformin을 21일간 처리한 후에는 *db/db* 마우스의 조직 또는 장기 등에 대한 독성관련 효능 분석을 위하여 *db/db* 마우스를 희생시켜 혈장을 수거하였고, GOT, GPT, BUN, CRE 및 CK 등의 혈액화학지표 등을 자동혈액화학분석기(automatic blood chemistry analyzer)를 사용해 측정하였다(Hitachi7150, Japan). 한편, 피루베이트 켈린지에 대한 간에서의 글루코스 생성억제에 대한 분석을 위한 동물실험은, 8주령의 수컷 C57BL/6마우스를 그룹별로 n=5로 배정하여 8주 동안 고지방 식이(60 kcal % 지방, D12492, Research Diets)를 지속적으로 공급하여 식습관-유도적 비만(DIO) 모델을 얻고, 17시간 동안 금식시킨 후에, GSK4182 (40mg/kg)을 투여한 후 1g/kg의 피루베이트로 켈린지 하고 30, 60, 90, 120, 150 및 180분에 혈액의 글루코스 농도를 측정하였다.

[129]

[130]     **실시예 7: 지방간 동물효능 평가 및 간의 CYP2E1 효소 발현 분석**

[131]     GSK5182의 비알콜성 지방간에 대한 억제 효능을 알아보기 위하여 비만 및 당뇨가 동반되는 비알콜성 지방간 모델인 7주령의 *db/db* 수컷마우스를

이용하여, 대조군 (n=5)에는 vehicle을, 실험군 (n=5)에는 GSK5182 40 mg/kg의 농도로 30일간 복강으로 투여하였다. 또한, 알콜성 지방간에 대한 GSK5182의 억제 효능을 알아보기 위하여 1 kcal/ml을 기준으로 에탄올 36%, 지방 35%, 단백질 18% 및 탄수화물이 11%의 조성으로 이루어진 알콜 액체식이 (Lieber-DeCarli Regular Ethanol diet, Dyets Inc)를 8주령의 수컷 C57BL/6 10 마리의 마우스에 0.5%에서부터 5.0%까지 2주 동안 농도 단계별로 알콜 농도를 증가시키면서 적응을 시킨 다음, 이후 4주 동안 5.0% 알콜 액체食이를 공급하면서 마지막 2주 동안 대조군 (n=5)에는 vehicle을, 실험군 (n=5)에는 GSK5182를 40 mg/kg의 농도로 경구로 투여하였다.

[132] 비알콜성 및 알콜성 지방간 마우스 모델에 GSK5182를 투여한 후 혈액 내 간손상과 관련된 대표적인 지표인 GOT (glutamyl oxaloacetic transaminase)와 GPT (glutamyl pyruvic transaminase)에 대한 분석을 위하여 각 동물의 안와정맥총 (retro-orbital sinus)으로부터 헤파린 (heparin)이 처리된 캐필러리 튜브 (capillary tube)를 이용하여 혈액을 채취한 다음, 3,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 상층부의 혈장을 얻어 자동혈액분석기 (Hitachi 7150, Japan)를 이용하여 직접 분석하였다.

[133] GSK5182의 투여에 따른 비알콜성 및 알콜성 지방간에 대한 병리조직학적인 소견을 분석하기 위하여 실험종료 후, 각 동물들을 희생시킨 다음, 간조직을 절취하여 급속 냉동하여 냉동절편기 (Tissue-Tek, SAKURA, Japan)로 10  $\mu$ m 두께의 냉동조직절편을 제작하고 Oil-Red O (ORO) 염색하고 헤마토실린으로 대조염색을 실시한 광학현미경으로 관찰하였다. 지방간 조직 소견은 이미지 분석프로그램 (Image Inside, GS media, Korea)을 이용하여 현미경으로 관찰한 전체부위에서 ORO에 염색된 부위가 차지하는 비율을 비교분석하였다.

[134] 한편, 알코올을 산화시켜 활성산소를 생성함으로써 간손상을 일으키는 것으로 알려진 CYP2E1 효소에 대한 GSK5182의 억제 활성 분석을 위하여 8주령의 C57BL/6 수컷마우스를 이용하여 실험군 (n=5)에는 GSK5182 (40 mg/kg)를, 대조군 (n=5)에는 vehicle을 3일 동안 복강으로 투여하고, 6 g/kg 농도의 알코올을 공급한 다음 24시간 후에 간조직을 채취하여 western blot을 시행하여 CYP2E1 효소의 단백질 발현을 비교 분석하였다.

[135]

[136] 실시예 8: 통계적 분석

[137] 모든 수치는 평균값 $\pm$ 표준 오차(S.E.M)로 나타내었다. 평균 값 간의 유의성은 two-tailed unpaired Students *t*-test에 또는 Wilcoxon/Kruskal-Wallis test에 의하여 분석 평가하였다.

[138]

[139] 결과

[140]

[141] 실시예 1: *In vivo* 모델에서의 GSK5182의 비만 및 고지혈증 치료 효능분석

- [142] 고지방식이를 15주간 섭취시켜 비만 및 고지혈증을 유도시킨 C57BL/6 마우스에 30일간 GSK5182를 투여한 결과, 체중의 경우에는 대조군의 체중이  $53.7 \pm 0.7 \text{ g} \rightarrow 53.9 \pm 1.4 \text{ g}$ 으로 체중변화가 거의 없는데 반하여, GSK5182 투여군에서는  $53.5 \pm 0.7 \text{ g} \rightarrow 38.2 \pm 1.0 \text{ g}$ 으로 29%의 뚜렷한 체중감소를 보여 비만억제 및 치료에 효과가 있음을 나타내었다 ( $p < 0.005$ , student's *t*-test)(도 1a). 비만억제 및 치료효과와 관련하여 체내의 대표적인 피하지방인 inguinal fat과 복부지방인 gonadal fat의 무게를 측정 한 결과, 대조군의 경우  $2.75 \pm 0.04 \text{ g}$ 과  $1.59 \pm 0.18 \text{ g}$  으로서 체중대비  $5.10 \pm 0.14\%$  및  $2.95 \pm 0.29\%$ 를 나타낸 반면, GSK5182 투여군에서는 inguinal 및 gonadal fat의 중량이  $1.49 \pm 0.12 \text{ g}$ 과  $0.64 \pm 0.08 \text{ g}$ 으로 각각 체중대비  $3.90 \pm 0.29\%$ 를  $2.02 \pm 0.13\%$ 를 나타내었다. 이와 같은 결과는 GSK5182 투여에 의한 비만모델동물의 체중감소는 주로 지방조직의 감소로 기인한 것이라는 것을 알 수 있었다 ( $p < 0.05$ , student's *t*-test)(도 1b 및 도 1c). 또한 GSK5182 투여에 따른 지방조직의 세포형태 변화에 대한 관찰을 위하여 복부지방의 병리조직 표본을 제작하여 광학현미경으로 관찰한 결과, GSK5182를 투여한 동물의 지방세포 크기가 뚜렷하게 감소된 것을 확인할 수 있었다 (도 1d).
- [143] 한편, 고지혈증에 대한 GSK5182의 효능을 알아보기 위하여 GSK5182를 투여한 실험군과 고지방식이 대조군의 동물들을 대상으로 혈액 내 총콜레스테롤을 분석을 시행한 결과,  $213 \pm 25 \text{ mg/dl}$ 를 나타낸 대조군 보다 현저하게 감소된  $99 \pm 5 \text{ mg/dl}$  를 나타내었다 ( $p < 0.05$ , student's *t*-test)(도 2).
- [144]
- [145] 실험예 2: *In vivo* 모델에서의 GSK5182의 단기투여 혈당강하 효능 및 간의 글루코스 생성억제 분석
- [146] GSK5182가 *in vivo* 당뇨병 동물모델로서 *db/db* 마우스에 5일간 복강 내 투여를 통해 GSK5182를 처리하지 않은 경우와 처리한 경우의 마우스의 금식 혈액 중의 글루코스 수치를 측정하였다. 실제로, GSK5182-투여된 마우스는 대조군 그룹과 비교하였을 때 금식 혈액 중 글루코스 수치가 현저하게 감소를 보였다(도 3). 또한, GSK5182는 글루코스 생성 유전자의 발현(도 4) 및 *db/db* 마우스에서 *PEPCK ERREs* 상에 *PGC-1 $\alpha$* 의 점유(도 5)를 유의하게 감소시켰다.
- [147] 또한, 간의 글루코스 생성의 조절에서 GSK5182의 역할을 확인하기 위해서, 본 발명자들은 식습관-유도적 비만(DIO) 모델을 이용하여 글루코스 생성을 위한 전구체인, 피루베이트의 투여에 반응하는 혈액 중 글루코스 수치의 변화를 모니터링하기 위해서 피루베이트 챌린지 테스트를 수행하였다. 기대한 바와 같이 GSK5182는 대조군과 비교할 때 혈액 중 글루코스 수치의 피루베이트-의존적 유도를 강하게 억제하였다(도 6).
- [148]
- [149] 실험예 3: GSK5182의 항-당뇨 효과 및 독성 조사 결과
- [150] GSK5182의 항-당뇨 효과 및 독성을, 표준 항-당뇨 약물인 metformin과

직접적으로 평가하고 비교하기 위하여, 본 발명자들은 *db/db* 마우스에 21일 동안 GSK5182 또는 metformin을 복강 내로 투여하였다. GSK5182에 의한 혈액 중 글루코스 및 글루코스 생성 유전자 억제의 정도를 metformin에 의한 것과 비교하였다(도 7, 도 8, 도 9a 및 도 9b). 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다. 놀랍게도, GSK5182의 처리는 *db/db* 마우스(110 대 241 mg/dl)에서 정상적인 혈당수준으로 거의 복구시켰다(110 mg/dl의 금식 혈액 중 글루코스는 사람에서 정상적 금식 글루코스 수치(72-126 mg/dl) 범위 이내임). 반면에, metformin의 21일간의 처리는 혈액 중 글루코스 수치를 유의하게 감소시켰음에도 불구하고(154 대 241 mg/dl), 글루코스 수치는 정상적인 생리학 범위에 다다르지 못했다. 또한, *db/db* 마우스에서 당뇨 표현형의 발현에 의해 초래된 간 독성은, GOT 및 GPT 테스트에 의해 증명된 바와 같이, GSK5182 처리 시에는 크게 개선되었으나, metformin 처리 시에는 아니었다. 실제로, GSK5182 처리는 혈장 GPT 수치를 정상적 생리학 범위까지 복구시켰고(9-60 IU/L 사이), 혈장 GOT 수치를 유의미하게 감소시켰다. 본 발명에서 사용된 GSK5182 또는 metformin의 투여량에 대해서는 신장, 근육 및 심장 독성에 대한 징후가 나타나지 않았다.

[151] 표 1

[Table 1]

|                            | GOT(IU/L)<br>(9-60) | GPT(IU/L)<br>(5-40) | BUN(mg/dl)<br>(>60) | CRE(mg/dl)<br>(0.6-1.2) | CK(U/L)(6<br>0-400) | GLU(mg/dl)<br>(72-126) |
|----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|------------------------|
| 대조군(비<br>히클)               | 123±10              | 90±11               | 24.8±1.3            | 0.48±0.02               | 950±171             | 241±27                 |
| Metformin<br>(40<br>mg/kg) | 118±18              | 117±27              | 18±1.1*             | 0.36±0.03*              | 1323±729            | 154±17                 |
| GSK5182(<br>40 mg/kg)      | 83±4**              | 41±2**              | 20.4±1.3            | 0.37±0.02*<br>*         | 405±114*            | 110±6.5*               |

[주] GOT: glutamic-oxaloacetic transaminase GPT: glucamic-pyruvic transaminase  
BUN: blood urea nitrogen CRE: creatinine CK: creatin kinase GLU: blood glucose ( ):  
normal physiological range \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  by two-tailed Student *t*-test  
데이터는 평균±표준오차로 기재됨.

[152]

[153] 한편, GSK5182 처리 시 식품섭취 및 체중에 있어 어떠한 유의적인 변화도 나타나지 않았다(도 10a 및 도 10b).

[154] 종합적으로, 이러한 결과들은 GSK5182가 타입 2 당뇨병 마우스에서 간의 글루코스 생성을 조절함으로써 고혈당 표현형을 개선한다는 것을 시사한다.

- [155] 아울러, GSK5182가 당뇨병을 치료할 수 있을 뿐만 아니라, 이와 같은 GSK5182가 독성이 없으며, 섭취에 따른 생체 내 부작용이 없다는 것을 시사한다.
- [156]
- [157] **실험예 4: GSK5182의 SREBP1c 프로모터 활성화 및 단백질발현 억제**
- [158] 세포주를 이용한 SREBP1c 유전자 프로모터 활성을 분석한 결과, GSK5182처리에 따라 SREBP1c 유전자 프로모터의 활성이 유의하게 억제되는 것으로 나타났다 (two-tailed unpaired Students *t*-test,  $p < 0.01$ ) (도 11a). 또한, Rat primary hepatocyte를 이용한 SREBP1c 단백질 발현에 대한 영향을 살펴본 결과, GSK5182 처리에 따라 SREBP1c 단백질 발현이 의미있게 억제되는 것을 확인하였다 (two-tailed unpaired Student's *t*-test,  $p < 0.01$ ) (도 11b). 이와 같은 결과는 GSK5182가 ERR $\gamma$ 의 inverse agonist로서 ERR $\gamma$ 를 억제하게 되어 ERR $\gamma$ 로 유도되는 SREBP1c 유전자의 프로모터의 활성을 저해함으로써 SREBP1c 단백질 발현을 억제하는 것으로 판단되었다.
- [159]
- [160] **실험예 5: GSK5182의 지방간 억제효능, 혈액 내 GOT/GPT 농도 및 간의 CYP2E1 효소 발현 분석**
- [161] 본 발명자들은 비알콜성 지방간에 대한 GSK5182의 억제효능을 알아보기 위하여 7주령의 수컷 *db/db* 마우스에 30일 동안 40 mg/kg 농도의 GSK5182를 복강으로 투여하고 간조직의 냉동절편을 제작하여 지방을 염색시키는 ORO로 염색한 후 병리조직학적인 관찰을 시행한 결과, vehicle을 투여한 대조군의 *db/db* 마우스의 간조직에서는 대부분의 간세포가 ORO 염색으로 붉은색을 나타내어 지방간이 심한 것으로 관찰된 반면, GSK5182를 투여한 *db/db* 마우스의 간조직은 ORO로 염색되는 부위가 감소된 것으로 관찰되었으며, 이에 대한 이미지 프로그램을 이용하여 분석한 결과, GSK5182 투여군에서 뚜렷하게 줄어든 것으로 확인되었다 ( $p < 0.05$ , Wilcoxon/Kruskal-Wallis tests) (도 12). 또한, 알콜성 지방간에 대한 GSK5182의 억제 효능을 관찰하기 위하여 8주령의 C57BL/6 수컷마우스에 2주 동안의 알콜 액체식이 적응기간을 거쳐 이후 4주 동안 5.0% 알콜다이어트 (liquid alcohol diet) 급이를 하면서 마지막 2주 동안 대조군에는 vehicle을, 실험군에는 GSK5182를 40 mg/kg의 농도로 경구투여하고 비알콜성 지방간 실험에서와 마찬가지로 간조직의 냉동절편을 제작하여 ORO 염색에 이어 병리조직학적인 관찰을 시행한 결과, 대조군의 간조직은 알콜성 지방간이 매우 심하게 형성된 것으로 관찰된 반면, GSK5182를 투여한 마우스의 간조직은 지방간이 현저히 줄어든 것으로 나타났으며, 이미지 분석에서도 GSK5182 투여군에서 통계학적으로도 매우 의미 있게 감소된 것으로 관찰되었다 ( $p < 0.05$ , Wilcoxon/Kruskal-Wallis tests) (도 14).
- [162] 이와 같은 결과들은 GSK5182가 비알콜성 및 알콜성 지방간을 억제하는 효능이 있다는 것을 시사한다. 한편, 비알콜성 및 알콜성 지방간 실험에서 사용된

마우스들의 혈액 내 GOT 및 GPT 농도를 측정한 결과, 비알콜성 및 알콜성 지방간 모두 GSK5182를 투여한 실험군에서 대조군과 비교하여 크게 개선된 것으로 나타났다 (도 13 및 도 15).

[163] 또한, 알콜성 간손상을 일으키는 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 CYP2E1 효소의 발현을 8주령의 C57BL/6 수컷마우스를 이용하여 실험군 (n=5)에는 GSK5182 (40 mg/kg)를, 대조군 (n=5)에는 vehicle을 3일 동안 복강으로 투여하고 알코올을 6 g/kg 농도로 공급한 다음 24시간 후에 간조직을 채취하여 CYP2E1 효소의 단백질 발현을 비교 분석한 결과, GSK5182의 투여한 군에서 유의하게 억제된 것으로 나타났다 (도 16).

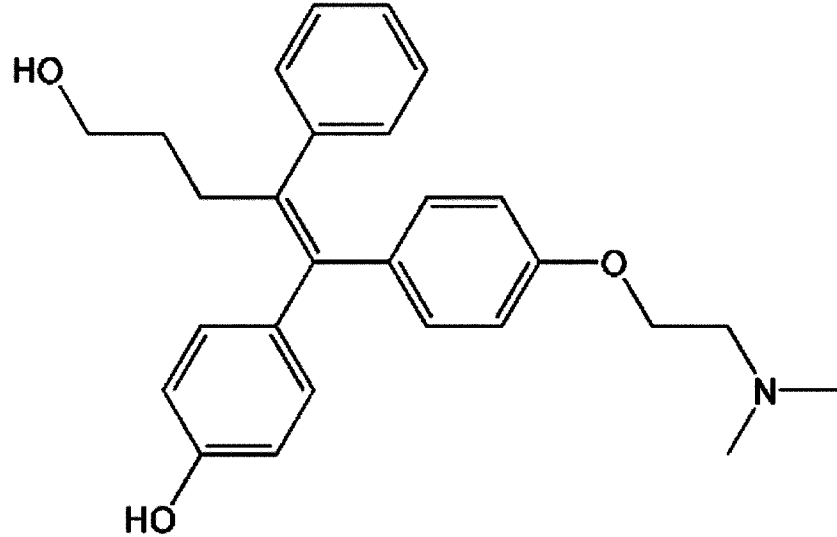
[164]

[165] 종합적으로, 이상의 실험 결과들은 GSK5182가 비알콜성 및 알콜성 지방간 마우스 모델에서 간조직의  $ERR\gamma$ 를 억제하고, 이로 인하여  $ERR\gamma$ 로 유도되는 지방합성에 중심적인 역할을 수행하는 전사인자인 SREBP1c 유전자 프로모터의 활성 저해 및 SREBP1c 단백질 발현을 억제함으로써 간질환의 일종인 지방간을 예방 또는 치료할 수 있다는 것을 시사하며, 또한 알콜성 간손상을 일으키는 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 CYP2E1 효소의 발현을 억제하여 간손상이나 간질환의 예방 또는 치료에 사용 될 수 있다는 것을 시사하는 것이라고 할 수 있다.

## 청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1의 4-하이드록시 타목시펜 유사체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 대사증후군 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

[화학식 1]



[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것인 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 대사증후군 관련 질환은 비만, 고지혈증, 고혈압, 동맥경화, 고인슐린혈증, 당뇨병 및 간질환으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 질환인 조성물.

[청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 간질환은 비알콜성 지방간, 알콜성 지방간, 비알콜성 지방간염, 말기 섬유화 간질환, 비바이러스 만성 간염, 간경변 및 간암으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 질환인 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 지방세포 크기 및 체지방을 감소시키며 지방축적을 억제하는 특징을 갖는 조성물.

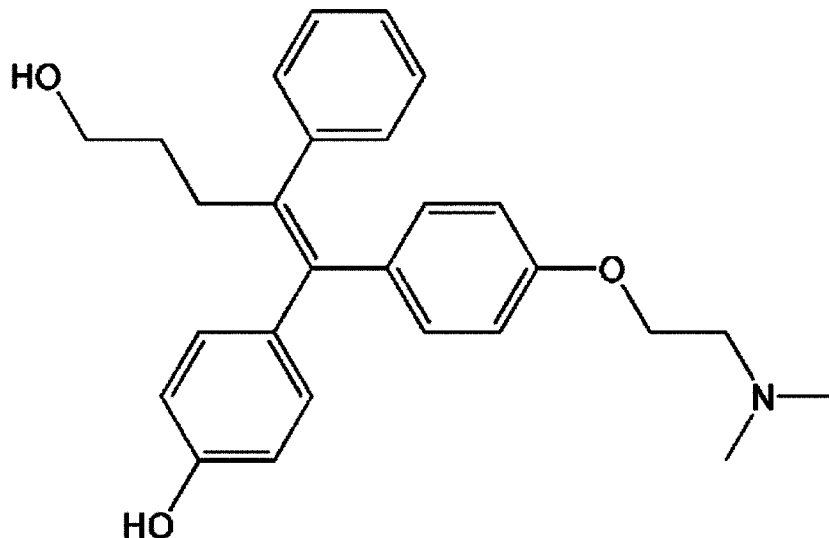
[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 하기 특징 중 하나 이상을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물:

- (i) 혈액에서의 간손상 마커인 GOT (glutamyl oxaloacetic transaminase)의 수치 감소;
- (ii) 혈액에서의 간손상 마커인 GPT (glutamyl pyruvic transaminase)의 수치 감소; 및
- (iii) 간에서 CYP2E1 (Cytochrome P450-2E1) 단백질의 발현 억제.

[청구항 7] 하기 화학식 1의 4-하이드록시 타목시펜 유사체 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는,

대사증후군 관련 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[화학식 1]



[청구항 8]

제7항에 있어서, 상기 조성물은 식품학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것인 조성물.

[청구항 9]

제7항에 있어서, 상기 대사증후군 관련 질환은 비만, 고지혈증, 고혈압, 동맥경화, 고인슐린혈증, 당뇨병 및 간질환으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 질환인 조성물.

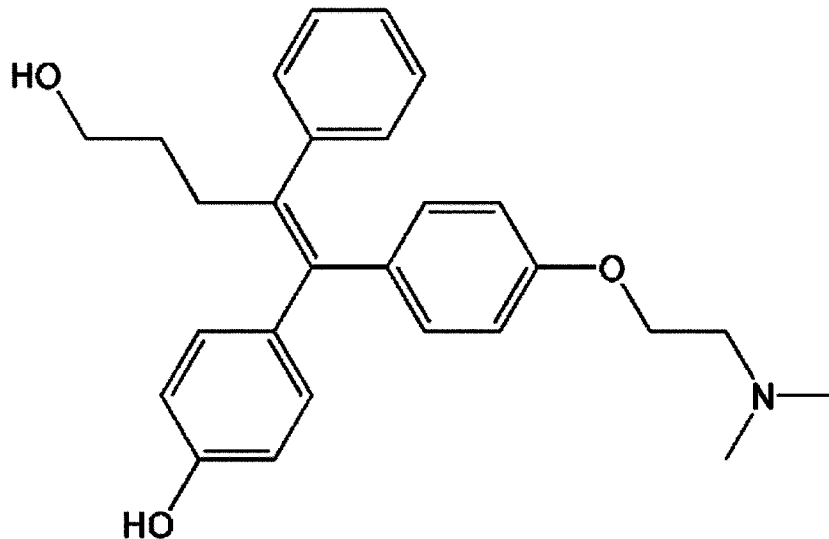
[청구항 10]

제9항에 있어서, 상기 간질환은 비알콜성 지방간, 알콜성 지방간, 비알콜성 지방간염, 말기 섬유화 간질환, 비바이러스 만성 간염, 간경변 및 간암으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 질환인 조성물.

[청구항 11]

하기 화학식 1의 4-하이드록시 타목시펜 유사체를 포함하는, 혈액 내의 콜레스테롤 감소용 조성물.

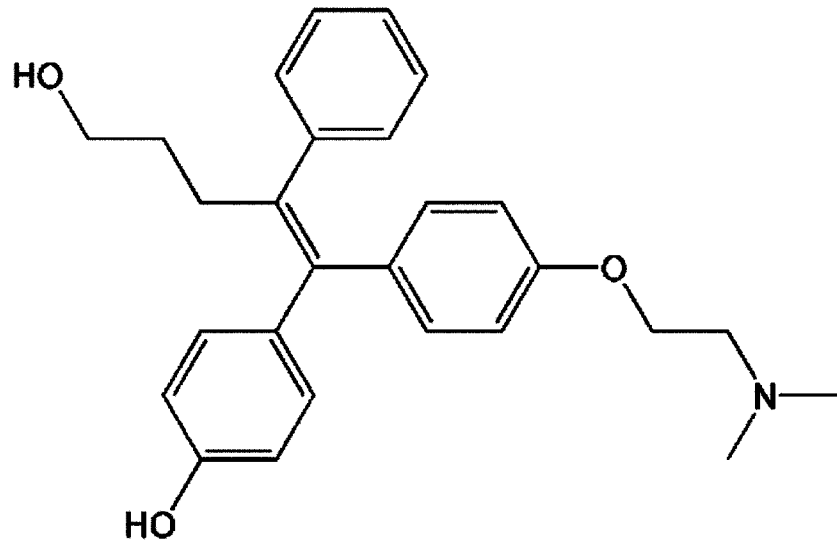
[화학식 1]



[청구항 12]

하기 화학식 1의 4-하이드록시 타목시펜 유사체를 포함하는, 간 또는 혈액에서의 글루코스 수치 감소용 조성물.

[화학식 1]



[청구항 13]

제1항의 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대사증후군 관련 질환의 치료 방법.

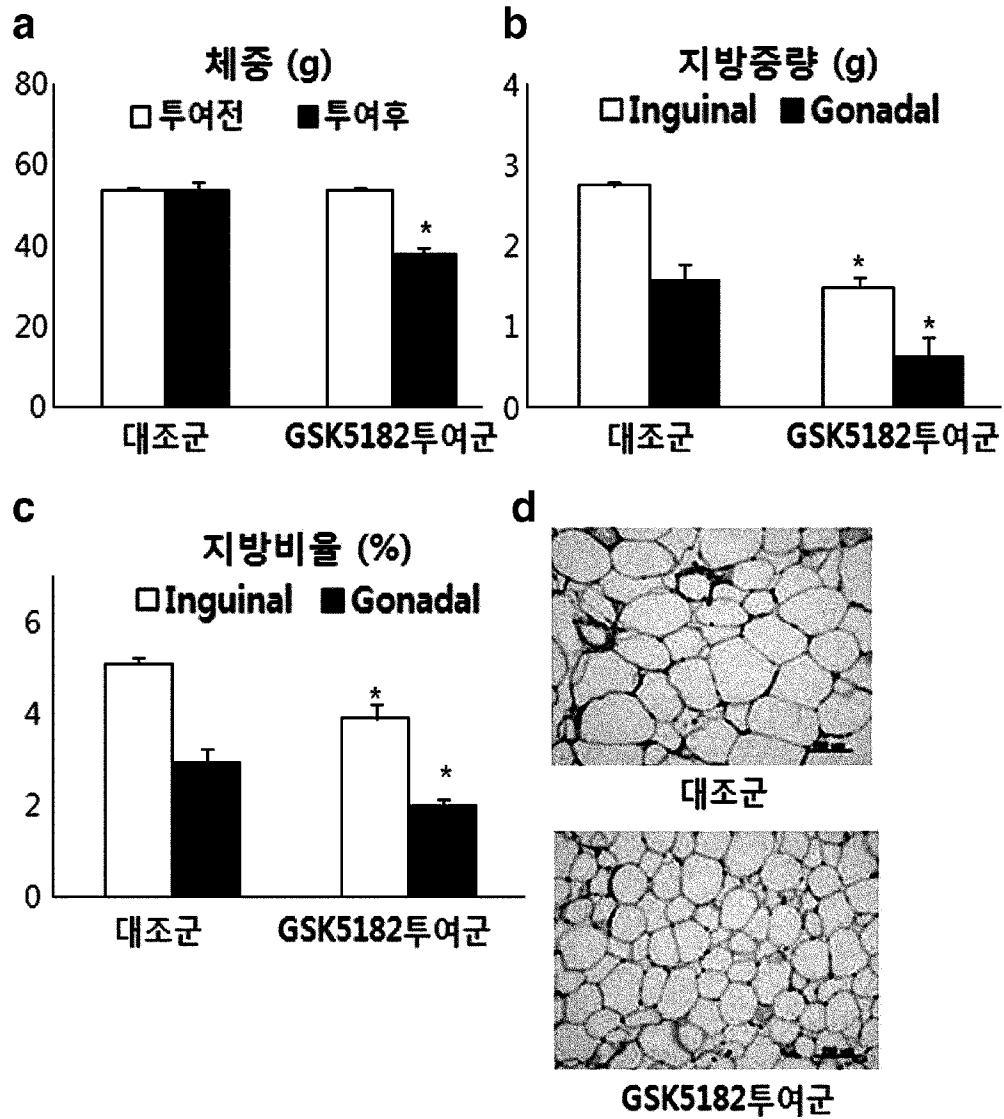
[청구항 14]

제13항에 있어서, 상기 대사증후군 관련 질환은 비만, 고지혈증, 고혈압, 동맥경화, 고인슐린혈증, 당뇨병 및 간질환으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 질환인 방법.

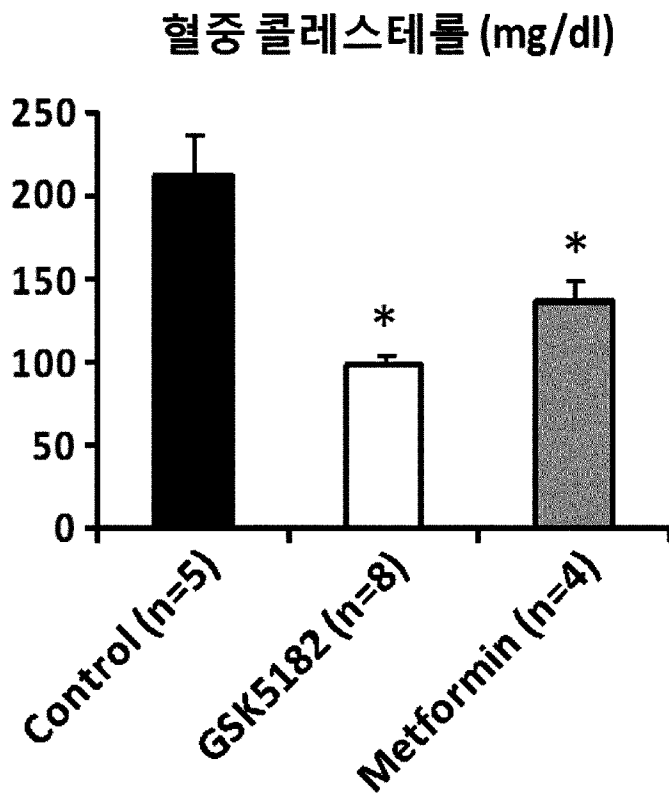
[청구항 15]

제14항에 있어서, 상기 간질환은 비알콜성 지방간, 알콜성 지방간, 비알콜성 지방간염, 말기 섬유화 간질환, 비바이러스 만성 간염, 간경변 및 간암으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 질환인 방법.

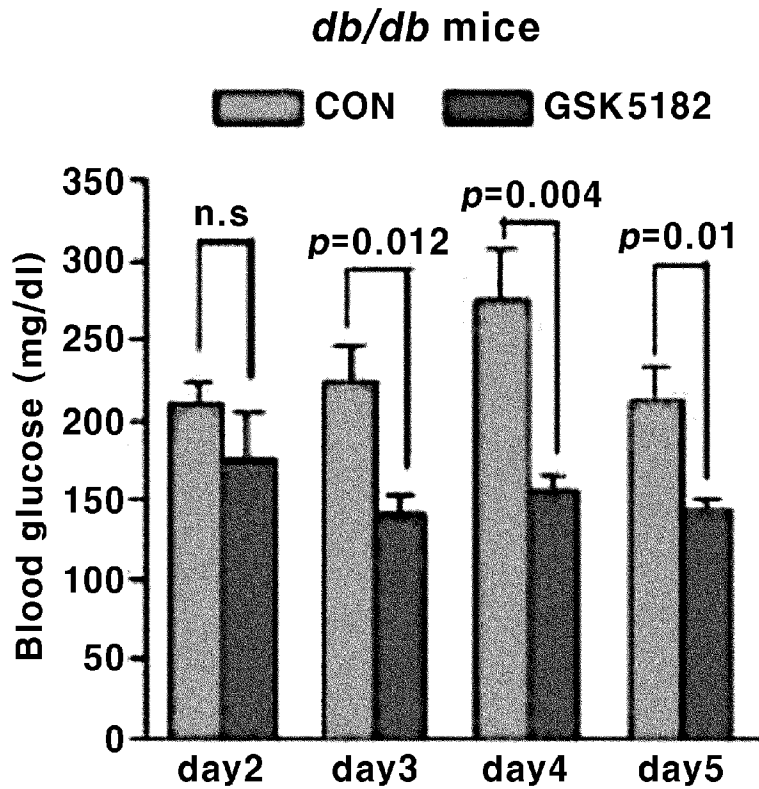
[Fig. 1]



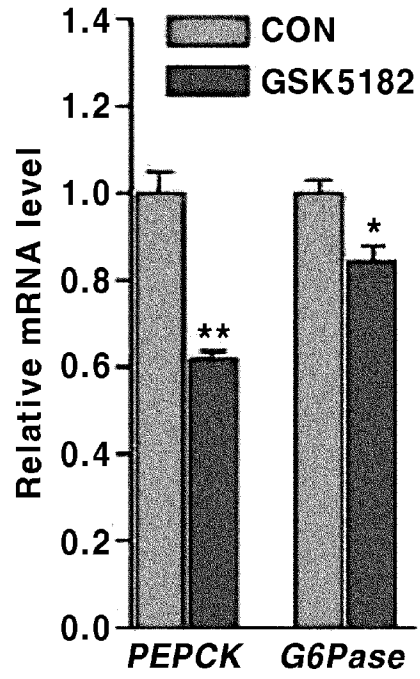
[Fig. 2]



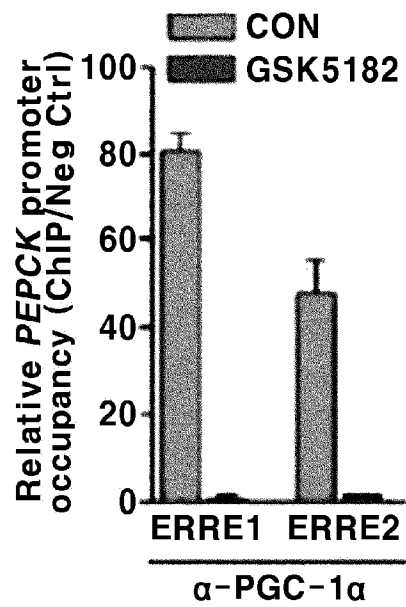
[Fig. 3]



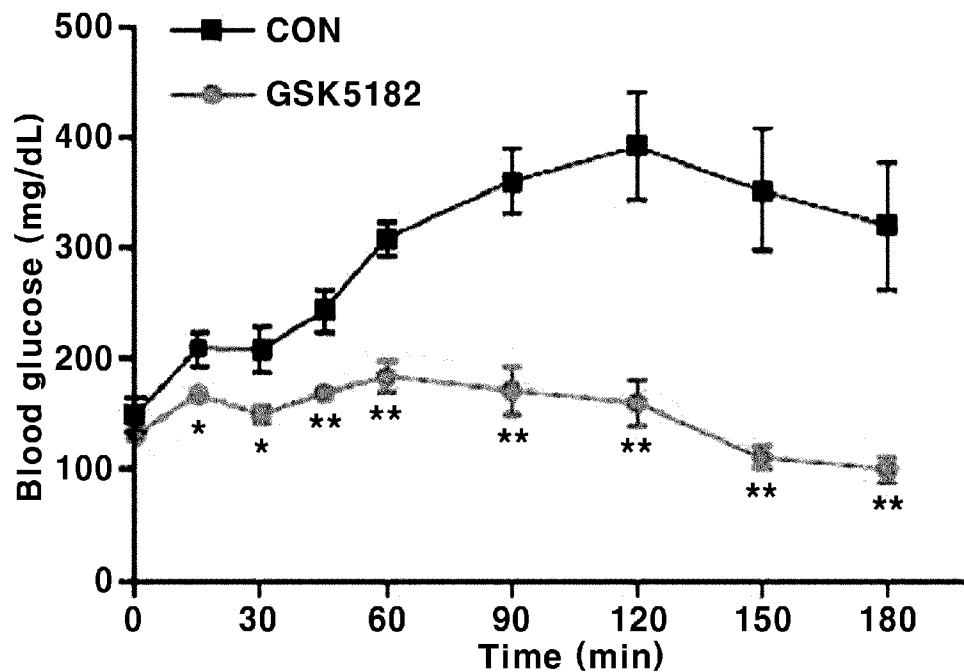
[Fig. 4]



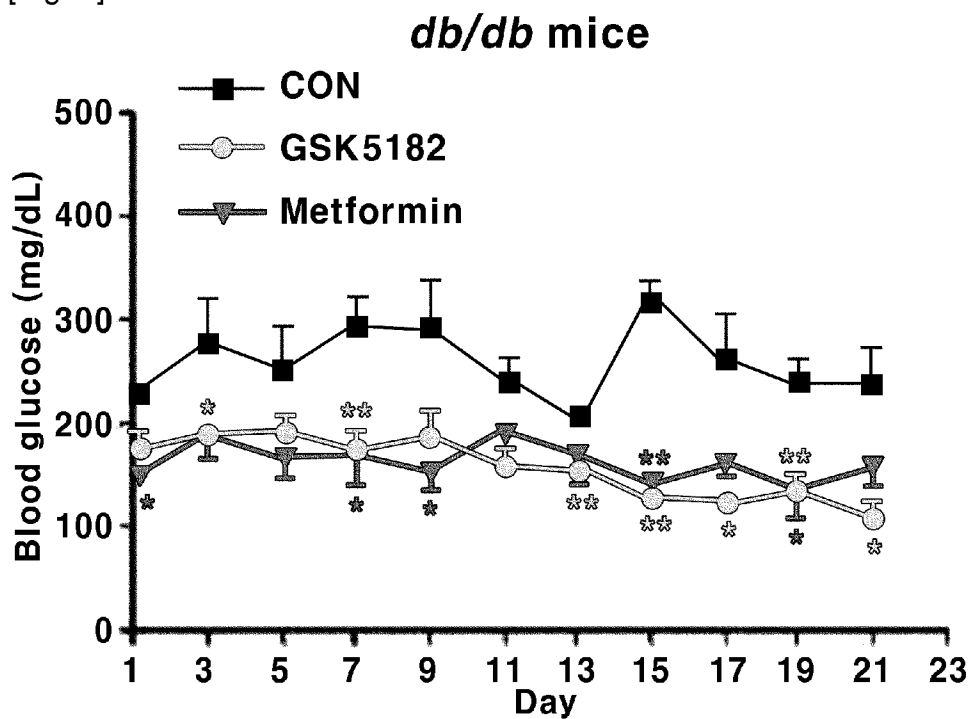
[Fig. 5]



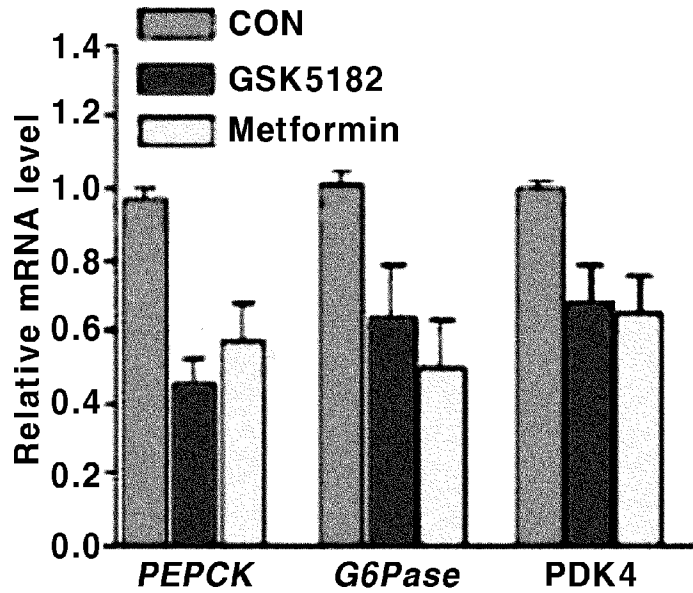
[Fig. 6]



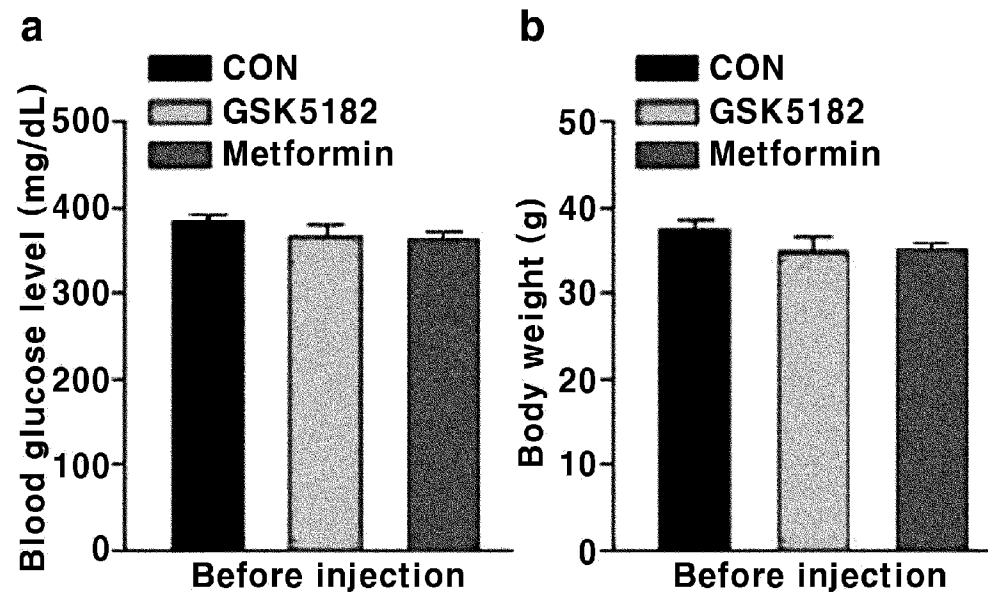
[Fig. 7]



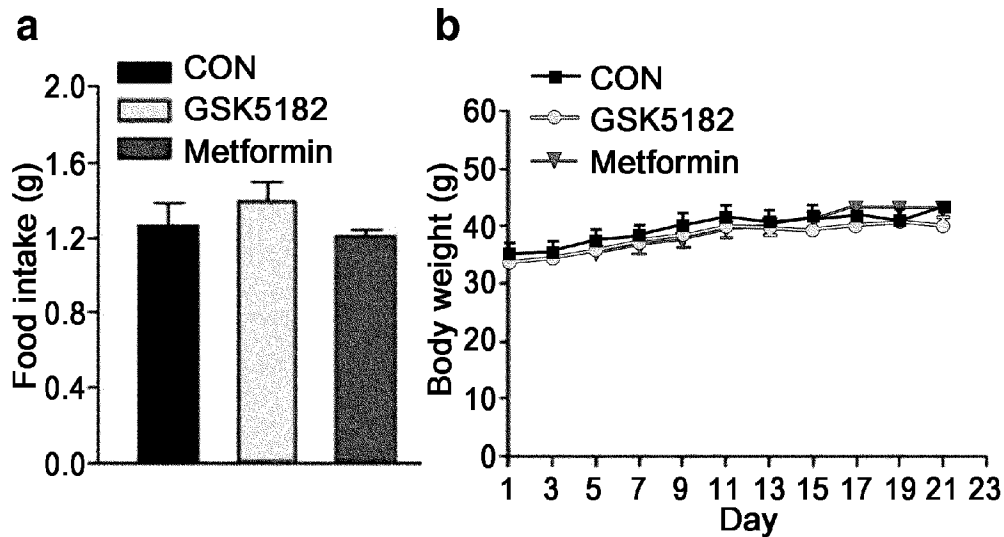
[Fig. 8]



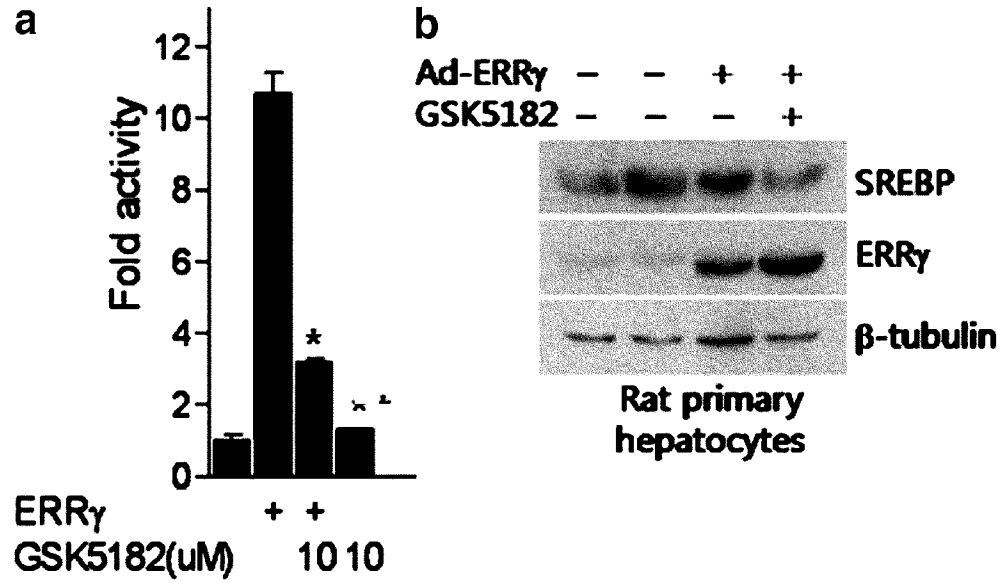
[Fig. 9]



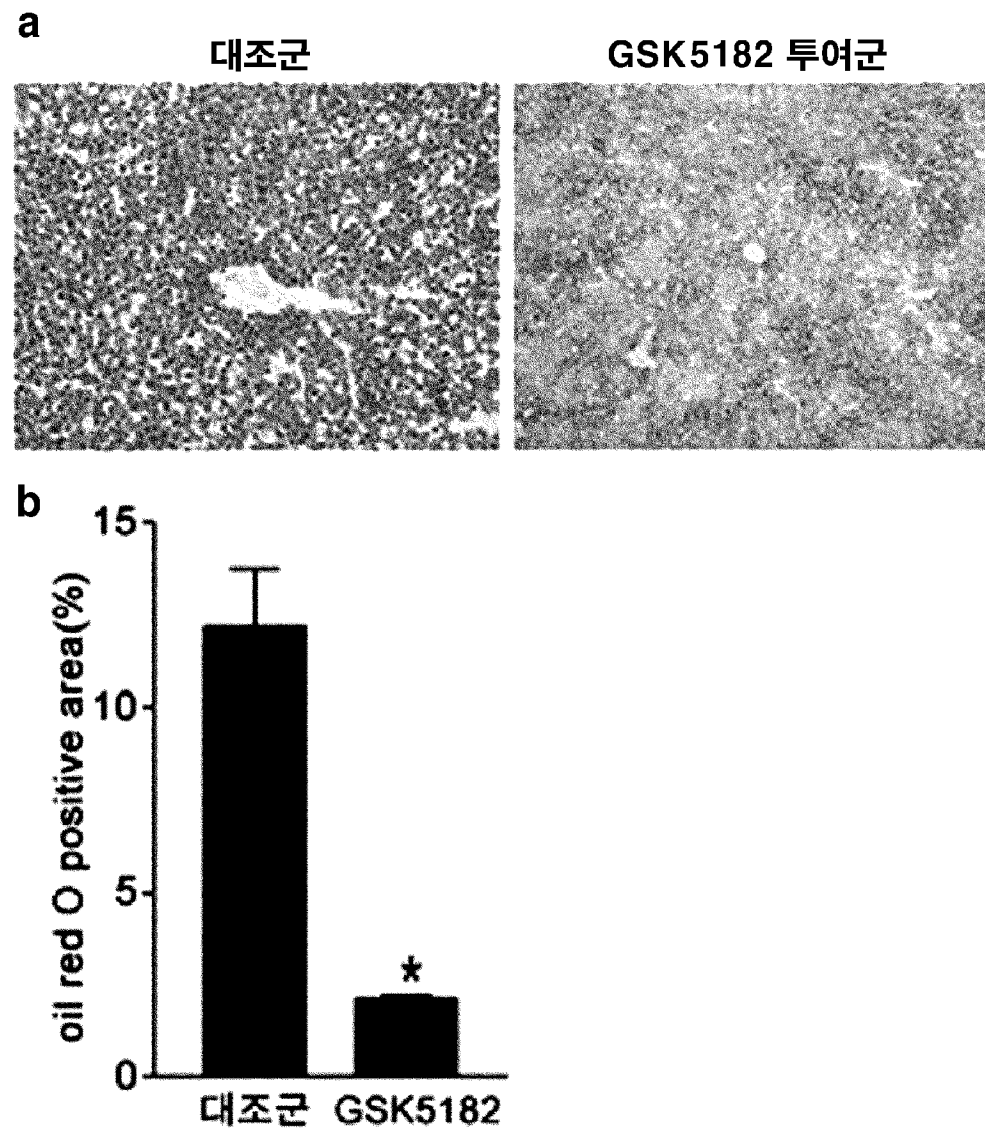
[Fig. 10]



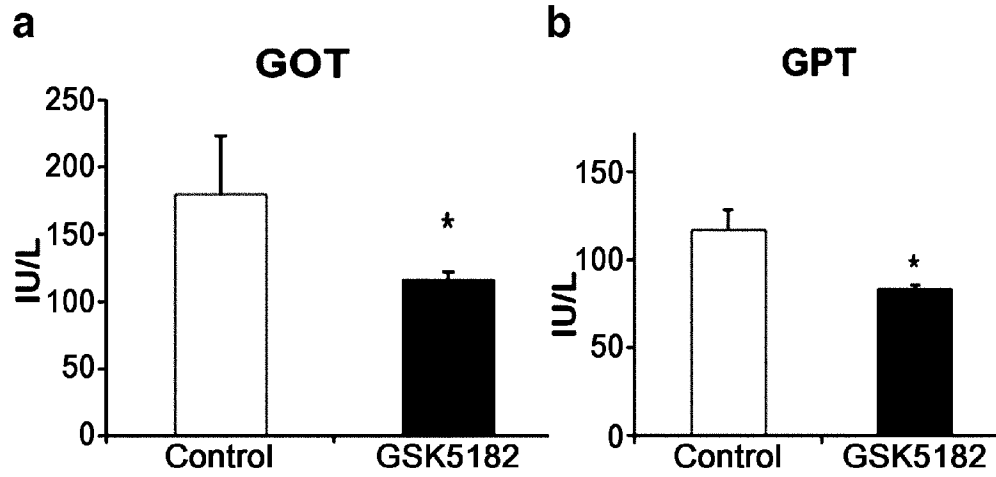
[Fig. 11]



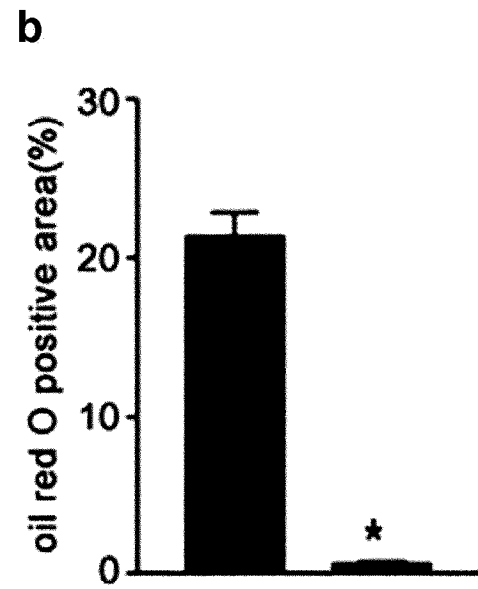
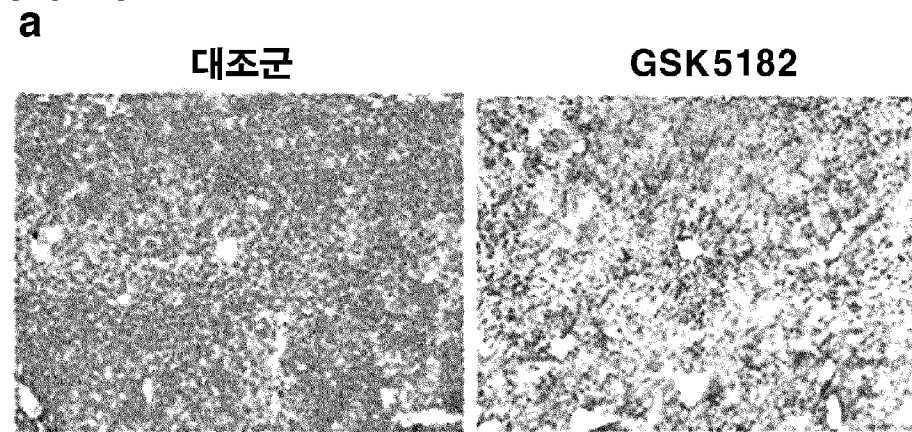
[Fig. 12]



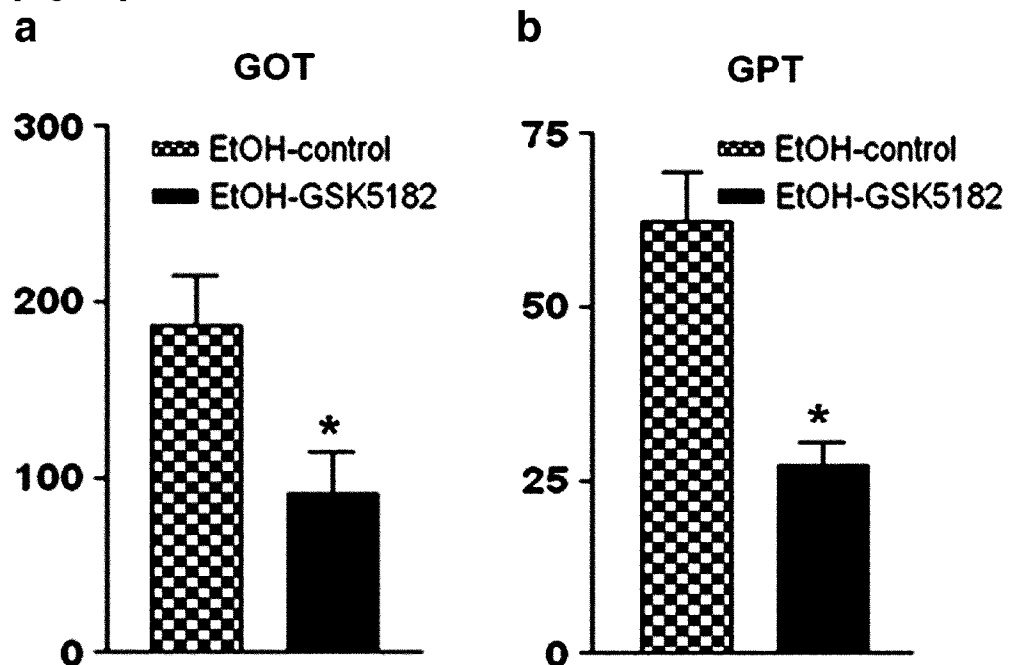
[Fig. 13]



[Fig. 14]



[Fig. 15]



[Fig. 16]

