



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년01월17일
(11) 등록번호 10-1692680
(24) 등록일자 2016년12월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/165 (2006.01) A61K 38/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/165 (2013.01)
A61K 38/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0137763
(22) 출원일자 2016년10월21일
심사청구일자 2016년10월21일
(56) 선행기술조사문헌
US 20080280955 A1

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
서홍석
서울특별시 용산구 한강대로 211, 101동 2804호(한강로1가, 대우 월드마크 용산)
(74) 대리인
특허법인 다해

전체 청구항 수 : 총 5 항

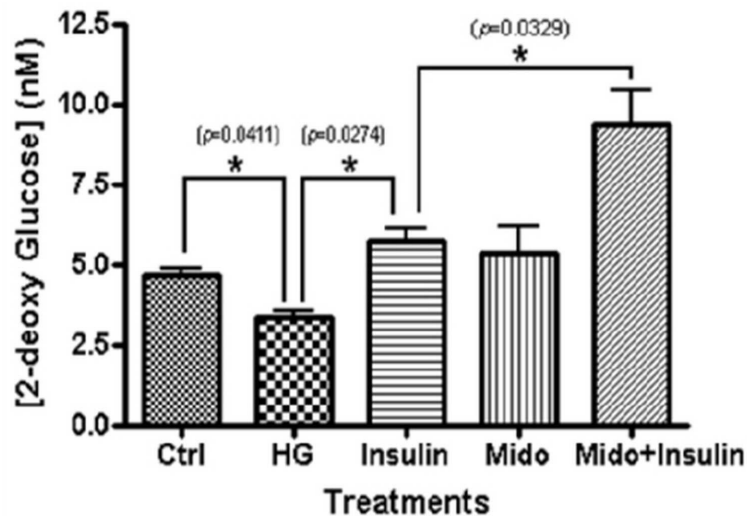
심사관 : 박제현

(54) 발명의 명칭 미도드린 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 당뇨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 미도드린 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 당뇨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 미도드린 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물은 생체 내 에너지 대사활성 유지와 조절에 핵심적인 작용을 하는 p-AMPK, PPAR- δ , PGC-1 α 의 발현을 증가시킴으로써, 골격근 세포 내로의 포도당 흡수율을 높이고, 미토콘드리아의 대사적 장애를 조절할 수 있는바, 당뇨병의 예방 및 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류
Y10S 514/866 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

미도드린(midodrine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 당뇨병의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 미도드린(midodrine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 AMPK 활성화를 유도하는 것을 특징으로 하는, 당뇨병의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 미도드린(midodrine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 PPAR- δ 또는 PGC-1 α 의 발현을 유도하는 것을 특징으로 하는, 당뇨병의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 인슐린(insulin)을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 당뇨병의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 약학적 조성물 전체 중량부에 대하여 미도드린 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 20 내지 40 중량부; 및 인슐린(insulin) 60 내지 80 중량부를 포함하는 것을 특징으로 하는, 당뇨병의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미도드린 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 당뇨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 운동 훈련은 골격근에서 표현형 변화를 일으키는 리모델링 프로그램을 활성화시킴으로써 운동 내성을 향상시키고, 적당한 운동은 대사성 질환이나 심질환 등의 병리 상태를 호전시키는데 효과적이다.

[0003] 특히, AMPK(AMP-activated protein kinase), PPAR- δ (Peroxisome Proliferator activated Receptor- δ), PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator-1 α)는 운동 내성을 위한 골격근의 표현형 변화에 관여하는 중요 인자들로 알려져 있다.

[0004] 이때, AMPK는 $\alpha/\beta/\gamma$ 서브유닛들로 이루어진 헤테로트라이머성(heterotrimeric) 복합체로서 근육 수축 및 운동시 AMPK의 상위효소인 LKB1 및 CaMKK(Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase)에 의한 인산화에 의해 활성화되며, 글루코오스 항상성, 식욕, 및 운동 생리에 대한 세포/기관 대사의 주된 조절자이다. PPAR- δ 는 골격근 대사의 전사 조절에 있어서 핵심적인 역할을 수행하며, PGC-1 α 는 미토콘드리아 생합성 및 기능의 조절자로서 에너지 대사에 관여하고, 골격근의 내성 운동에 의해서 활성화되는 유전자들을 조절하는 전사 공동활성화 인자이다.

[0005] AMPK는 동시에 여러 전사 프로그램들을 타겟팅할 수 있는 것으로 알려져 있는데, 이러한 전사 프로그램들은 PPAR- δ , PGC-1 α 와 같은 기질들에 의해서 조절되어 운동과 유사한 유전적 효과를 유발한다. 이와 관련하여, AMPK-PPAR- δ 신호 경로를 타겟팅하는 운동-유사 약물들이 내성 표현형에 대한 근육을 다시 프로그래밍하는 새로운 약제학적 전략이 될 수 있다는 점이 보고된 바 있다(비특허문헌 1).

[0006] 또한, A-769662, 메트포르민(metformin), 5-아미노이미다졸-4-카르복시아미드-1-β-D-리포푸라노사이드(AICAR) 및 레스베라트롤(resveratrol)과 같은 AMPK 활성화를 촉진하는 몇몇 약물들이 심부전증에 대해서 치료 효과를 발휘하는 것으로 보고된 바 있다. 심질환에 대한 AMPK의 보호 기능은 세포질 중 활성산소종 생산의 감소, 안지오텐신 II의 활성억제, 심장 트로포닌 I의 인산화, PGC-1α의 활성화, eNOS-NAD(P)H 산화효소 발현의 조절, 에스트로젠-관련 수용체의 조절 및 에너지 균형과 심장 내 신호전달의 조절 등의 중요한 기능들을 통해서 달성될 수 있는 바, AMPK 활성화는 직간접적으로 심근 기능을 향상시킬 수 있다.

[0007] 이와 같이, AMPK 활성화(인산화) 및 이와 관련된 인자들(PPAR-δ, PGC-1α)은 골격근 내에서의 글루코스 섭취(uptake), 에너지 대사 항상성 유지, 심기능 증대 등의 운동-유사 효과를 유도하기 때문에, 운동-유사 효과에 의해 치료될 수 있는 질환의 타겟으로서 AMPK를 활성화시키는 약물에 대한 요구가 꾸준히 있어왔다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Vihang A. Narkar et al., AMPK and PPARδ Agonists Are Exercise Mimetics, Cell, Volume 134, Issue 3, 8 August 2008, Pages 405-415.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에, 본 발명자는 α1-아드레날린 수용체(α1-AR)를 이의 효능제(agonist)인 미도드린(midodrine)을 통해 활성화시킬 경우 당뇨병이 개선될 수 있음을 발견하고 그 작용 메커니즘을 예의 연구한 결과, α1-아드레날린 수용체가 활성화되면 활성화형-AMPK, PPAR-δ 및 PGC-1α의 발현이 증가되고 이를 통해서 골격근, 심근, 간 등의 다기관에서 운동-유사 효과를 일으킬 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

[0010] 본 발명의 목적은 미도드린 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 당뇨병의 치료 및 예방을 위한 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 유효성분인 미도드린 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 인슐린(insulin)을 추가로 포함하는, 당뇨병의 치료 및 예방을 위한 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

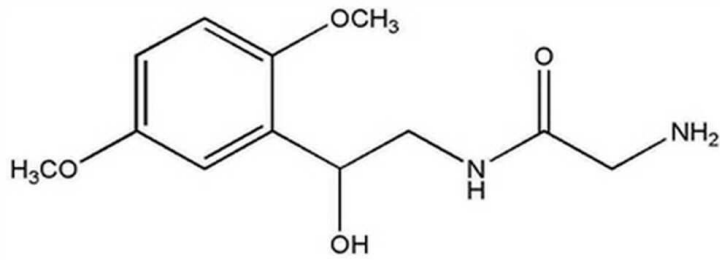
과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 미도드린(midodrine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 당뇨병의 치료 및 예방을 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명에 있어서, α1-아드레날린 수용체(α1-AR) 효능제는 α1-아드레날린 수용체에 작용하여 활성화시키는 물질이면 특별한 제한은 없다. 아드레날린 수용체는 α1, α2, β라는 3가지 타입이 있으며, 본 발명에서는 α1 타입의 수용체를 활성화시키는 공지의 화합물들을 제한 없이 이용할 수 있으나, 바람직하게는 미도드린(midodrine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염일 수 있다.

[0015] 미도드린 화합물은 아마틴(amatine), 프로아마틴(proamatine), 구트론(gutron) 등의 상표명으로 판매되고, 그 IUPAC 명은 (RS)-N-[2-(2,5-디메톡시페닐)-2-히드록시에틸]글리신아미드 ((RS)-N-[2-(2,5-dimethoxyphenyl)-2-hydroxyethyl]glycinamide)으로서, 하기 화학식 I로 표시된다.

[0016] [화학식 1]



[0017]

[0018] 미도드린은 투여 후 생체 내에서 목적 화합물로 변화되는 약물 전구체(prodrug)이며, 생체 내 투여후 활성대사 산물인 데스글리미도드린(desglymidodrine)으로 변화되어 α1-아드레날린 수용체를 활성화시키고, 이어서 AMPK 활성화, PPAR-δ, 또는 PGC-1α의 발현을 유도를 통하여 최종적으로 운동-유사 효과를 유도할 수 있다.

[0019] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 "약학적으로 허용가능한 염"을 형성할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용 가능한 염은 산 부가 염과 같이, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 것으로 특별히 제한되는 것은 아니다. 바람직한 약학적으로 허용 가능한 산 부가 염으로는, 예를 들어 염산, 황산, 질산, 인산, 과염소산, 또는 브롬산과 같은 무기산; 초산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 푸마린산, 말레산, 말론산, 프탈산, 숙신산, 젖산, 구연산, 시트르산, 글루콘산, 타타르산, 살리실산, 말산, 옥살산, 벤조산, 엠본산, 아스파르트산, 또는 글루탐산과 같은 유기산을 들 수 있다. 유기염기 부가염 제조에 사용될 수 있는 유기염기로는 트리 스(히드록시메틸)메틸아민, 디시클로헥실아민 등을 예로 들 수 있다. 아미노산 부가염기 제조에 사용될 수 있는 아미노산으로는 알라닌, 글라이신 등의 천연아미노산을 예로 들 수 있다.

[0020] 상기 미도드린(midodrine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 AMPK 활성화를 유도하는 것일 수 있다.

[0021] AMPK는 생체 내 에너지 상태를 감지하여 이를 일정한 수준으로 유지시키는 에너지 센서(energy sensor) 역할을 하며, 예를 들어 대사성 스트레스나 운동에 의해 세포 내의 에너지가 감소하는 경우 즉 ATP가 고갈되어 AMP/ATP 비율이 증가하는 경우에 활성화되어 ATP를 소비하는 과정(예를 들어, 지방산 산화와 해당과정)을 촉진한다. AMPK의 활성화는 근육과 같은 주요 표적 장기에 대사적으로 중요한 결과를 유도하는데, 특히 골격근에서 지방산의 산화와 당 흡수를 촉진하는 것으로 알려져 있다.

[0022] 상기 미도드린(midodrine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 PPAR-δ 또는 PGC-1α의 발현을 유도하는 것일 수 있다.

[0023] PPAR-δ는 AMPK를 조절하여 세포 내 이화적 에너지 대사를 촉진하고, 항염증 작용 등 생체 대사의 균형(항상성) 유지에 필수적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0024] PGC-1α는 미토콘드리아 증식의 주요한 조절물질로서 운동, 굶주림, 추위 등과 같은 심한 대사적 변화에 반응하여 발현이 유도되며, AMPK, PPAR-δ, NAD-dependent deacetylase sirtuin-1(SIRT1) 등의 조절을 받는 것으로 알려져 있다.

[0025] 본 발명에 따른 유효성분은 운동-유사 효과를 유도할 수 있으며, 상기 운동-유사 효과는 AMPK 활성화가 필요한 질환의 예방 또는 치료 효과일 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, 운동-유사 효과란 근육의 인슐린 예민도 증가 및 산화인산화기능 증진 등 운동 시 발휘되는 생리효과를 의미하며 특별한 제한은 없다.

[0027] 본 발명에 있어서, AMPK 활성화가 필요한 질환이란 AMPK의 비활성화에 의해 생길 수 있는 다양한 질환으로서 특별한 제한은 없으며, 예를 들면 당뇨병을 포함하는 대사성 질환일 수 있다.

[0028] 본 발명에서 "약학적 조성물"은 기존 치료 활성 성분, 기타 보조제, 약제학적으로 허용가능한 담체 등의 성분을 추가로 포함할 수 있다. 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 및 에탄올 등을 포함한다.

[0029] 상기 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명에서 "투여량"은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여횟수, 투여방법, 배설율 및 질환의 중

증도 등에 따라 그 범위가 다양하게 조절될 수 있음은 당업자에게 명백하다.

- [0031] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0032] 본 발명에서 "약학적 유효량"은 투여되는 질환 종류 및 증정도, 환자의 연령 및 성별, 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 결정되며 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최대 효과를 얻을 수 있는 양으로, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 조성물은 목적 조직에 도달할 수 있는 한 "투여방법"에는 제한이 없다. 예를 들면, 경구 투여, 동맥 주사, 정맥 주사, 경피 주사, 비강 내 투여, 경기관지 투여 또는 근육 내 투여 등이 포함된다. 일일 투여량은 약 0.0001 내지 100mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10mg/kg이며, 하루 일회 내지 수회 나누어 투여하는 것이 바람직하다.
- [0034] 상기 약학적 조성물은 인슐린(insulin)을 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0035] 상기 약학적 조성물은 약학적 조성물 전체 중량부에 대하여 미도르린 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 20 내지 40 중량부; 및 인슐린(insulin) 60 내지 80 중량부를 포함하는 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일실시예에서, 미도르린 및 인슐린을 혼합 투여 시 세포 내 포도당 흡수가 증가하여, 당뇨병의 예방 또는 치료에 유효함을 확인하였다.
- [0037] 본 발명의 일실시예에서는, $\alpha 1$ -AR 자극 효과가 심근세포, 골격근 세포에서 운동-유사 유전자들의 발현에 미치는 효과를 분석하였으며, 이를 사람의 대사증후군과 유사한 증상을 보이는 동물인 자발성 고혈압 래트(SHR)를 사용하여 *in vivo*에서 심장, 골격근 및 간에 미치는 효과와 비교하였다.
- [0038] 그 결과, 사람의 대사증후군에 해당하는 자발성 고혈압 래트(SHR)는 미도르린에 의해 $\alpha 1$ -AR를 자극 시 심장, 골격근, 간에서 AMPK, PPAR- δ , PGC-1 α 의 활성화 및 발현 증가를 야기한다는 사실을 밝혔다.
- [0039] 또한, $\alpha 1$ -AR 자극 시 심근에서 AMPK 자극에 대한 PPAR- δ 및 PGC-1 α 활성화의 비율이 골격근과 간에서의 수치보다 더 높음을 확인하였다. 이러한 결과들은 운동-유사 AMPK-PPAR- δ 활성화와 관련되며, $\alpha 1$ -AR 자극에 의한 근육수축 효과와는 독립적인 것임을 의미하고, 약리학적으로 자극된 심근 수축작용이 심장 AMPK-PPAR- δ -PGC1 α 활성화에 기여한다는 점을 최초로 보고한 것이다.
- [0040] 또한, 본 발명에서는, 미도르린이 다른 운동-유사 효과 유발 약물들(아테놀롤)에 비해서 더욱 효과적이라는 사실을 밝혔는데, 이는 미도르린이 심장 수축성을 향상시키는 이중 효과를 가지는 반면에, 다른 약물들은 심장 근육 수축에 대한 직접적인 수축 작용 없이 운동-유사 효과만을 발휘하기 때문이다. 또한, 다른 운동-유사제는 각각의 기능을 높이기 위하여 여러 약물을 혼합하여 사용되고 있으나, 미도르린은 한종류의 물질로도 이러한 운동 효과를 다기관에 동시다발로 나타내는 장점이 있다.
- [0041] 또한, 본 발명에서는, *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통해서, 근육 운동과는 무관하게, 미도르린을 통한 $\alpha 1$ -AR 자극이 골격근에서 AMPK-PPAR- δ -PGC-1 α 발현을 활성화시킨다는 점을 최초로 밝혔다. 이러한 운동 관련 유전자 발현이 지구적 운동(endurance exercise)을 유지하기 위한 적응 반응 중 하나라는 점에 대해서는 이미 보고된 바 있다.
- [0042] 또한, 본 발명에서는, 미도르린을 통한 $\alpha 1$ -AR 자극시, 간에서 AMPK-PPAR- δ -PGC-1 α 활성화가 유도되었으며, 인슐린과의 복합투여에 의해 포도당 흡수가 증가함을 확인하였는 바, 이로써 당뇨병의 예방 또는 치료에 유효함을 알 수 있다.
- [0043] 더하여, 기존 당뇨병 치료제는 부작용으로 체중 증가 및 심부전이 발생되었으나, 미도르린 사용 시에는 혈당 감소와 더불어 체중 감소, 심부전 예방 및 항염증 효과가 같이 발휘되어, 기존 당뇨병 치료제에 비하여 당뇨 조절에 매우 유리하다.

발명의 효과

- [0044] 본 발명의 미도르린 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물은 생체 내 에너지 대사활성 유지와 조절에 핵심적인 작용을 하는 p-AMPK, PPAR- δ , PGC-1 α 의 발현을 증가시킴으로써, 골격근 세포 내로의 포도당 흡수율을 높이고, 미토콘드리아의 대사적 장애를 조절할 수 있는 바, 당뇨병의 예방 및 치료에

유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0045] 도 1a 및 1b는 각각 마우스 골격근 세포주(C2C12)와 마우스 심근 세포주(HL1)에서, 미도드린에 의해 $\alpha 1$ -아드레날린 수용체($\alpha 1$ -AR)를 활성화시킬 경우 AMPK 활성화형(인산화형)인 p-AMPK 및 PPAR- δ 의 단백질 발현이 증가됨을 보여주는 웨스턴 블랏 결과이다.
- 도 2a는 기저 4주령 대조군 래트(I), 미도드린 투여 래트(II), 아테놀롤 투여 래트(III) 및 미투여 8주령 대조군 래트(IV)의 골격근에서 $\alpha 1$ -AR의 단백질 발현상태를 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과이고, 도 2b 내지 2e는 상기 래트 그룹의 심근, 골격근, 지방 및 간 각각에서 AMPK-PPAR- δ -PGC1 α 의 단백질 발현상태를 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과이다.
- 도 3a는 기저 4주령 래트(I), 미도드린 투여 래트(II), 아테놀롤 투여 래트(III) 및 미투여 8주령 대조군 래트(IV)의 골격근에서 SDH(succinate dehydrogenase) 효소 활성도를 측정한 결과이며, 도 3b는 상기그룹의 골격근 조직에서 cytochrome c oxidase에 대한 면역조직화학 염색한 결과이다.
- 도 4는 기저 4주령 래트(I), 미도드린 투여 래트(II), 아테놀롤 투여 래트(III) 및 미투여 8주령 대조군 래트(IV)의 심근, 골격근 및 간에서 ELISA 방법으로 ATP 수준을 측정한 결과이다.
- 도 5는 마우스 골격근 세포(C2C12 세포)에서 인슐린의 포도당 흡수에 미치는 미도드린 효과를 확인한 결과이다.
- 도 6은 4주령 래트로 이루어진 3개의 그룹의 1개월간 심장박동수를 측정한 결과이다(청색: 대조군, 적색: 미도드린 투여군, 녹색: 아테놀롤 투여군).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0046] 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.
- [0047] **실시예 1: 세포배양 및 동물실험 준비**
- [0048] **1-1. 세포배양**
- [0049] 래트 골격근 세포주(L6), 마우스 심근 세포주(HL1) 및 마우스 골격근 세포주(C2C12)는 37℃ CO₂ 배양기 안에서 6웰 플레이트(well plate) 혹은 24웰 플레이트에 각 세포를 분주하였다.
- [0050] 이후, L6, HL1 및 C2C12 세포들은 10% FBS(fetal bovine serum), 1% 항생제를 포함하는 배지(DMEM)에서 배양접시 바닥에 80% 정도 포화될 때까지 자라게 한 뒤, 배지를 1% FBS를 포함하는 배지로 교체하여 4일간 분화시키는 데 분화 3일째에 약물을 처리하였다. L6, HL1 및 C2C12 세포들을 이용한 모든 *in vitro* 실험은 약물 처리 후 24시간 뒤에 수행하였다.
- [0051] **1-2. 동물실험**
- [0052] 자발성 고혈압 래트(Spontaneously Hypertensive Rat; SHR)는 유전성 고혈압이 발현되는 실험동물로서, 인간의 원발성 고혈압과 가장 유사한 고혈압을 발현시키는 것으로 알려져 있다. SHR은 대개 4~6주령에 혈압이 상승하기 시작하여, 8~12주령에 본격적인 고혈압이 발현된다. SHR은 심비대, 심부전 및 신장에 등과 같은 고혈압성 표적장기의 손상을 흔히 동반하기 때문에 관련 연구에 폭넓게 사용되고 있다.
- [0053] 3주령의 자발적 고혈압 래트(SHRs)를 표준화된 조건(21℃, 41% 내지 62% 습도) 하에서 방치하되, 규칙적인 낮/밤(10/14 시간) 사이클을 가하고, 물 및 먹이에 자유롭게 접근하도록 하였다. 모든 동물실험들은 고려대학교 동물과학 규칙에 부합하도록 수행하였다(KUIACUC-2012-100). 실험 과정들 및 수용 조건들은 고려대학교 동물실험위원회의 승인을 받았다.
- [0054] 적응 1주 후에, 래트들은 하기와 같이 4개 군들 중 하나(군 당 6 마리 래트)에 할당하였다: 그룹 I(기저 대조군(basal control), 4주령에 희생), 그룹 II(4주 동안 미도드린 투여), 그룹 III(4주 동안 아테놀롤(atenolol) 투여), 및 그룹 IV(4주 동안 약제 투여 없는 대조군(control)). 그룹 I 및 그룹 IV는 어떠한 약물의 투여 없이 표준 유지 먹이를 주었고(K-H4 펠렛, sniff), 그룹 II는 미도드린을 포함하는 음용수(0.2 mg/kg/d)와 함께 동일

한 먹이를 주었으며, 그룹 III은 아테놀롤을 포함하는 음용수(1 mg/kg/d)와 함께 동일한 먹이를 주었다.

[0055] 그룹 I 중의 래트들은 4주령에서 안락사시킨 반면, 다른 그룹들의 래트들은 4주 동안 약물을 처방한 다음, 8주령에서 안락사시켰다. 혈액 샘플들은 하대 정맥으로부터 채취하였으며, 심장, 대동맥, 간, 골격 근육은 깨끗하게 절개하여 실험에 사용하였다. 수거된 장기들은 -80 °C 냉장고 또는 침지 고정을 위한 10% 포르말린에서 보관하였다.

[0056] **실시예 2: 실험방법**

[0057] **2-1. ATP 측정을 위한 ELISA 방법**

[0058] 실시예 1-2의 래트로부터 분리한 간조직 0.02g을 500 μ l의 PBS 중에서 균질화하였다. 균질액을 1500×g (또는 5000 rpm)에서 15분 동안 원심분리한 이후에, 상등액에 대해서 측정을 수행하였다. 기준 물질 또는 샘플들 100 μ l를 항체 사전-코팅된 마이크로적정 플레이트 중의 적당한 웰에 부은 후 잔여 용액 10 μ l를 샘플에 첨가하였다. 50 μ l의 컨주게이트를 각 웰에 첨가하고 혼합한 다음, 커버를 덮은 플레이트를 37 °C에서 1시간 동안 배양하였다. 각각 50 μ l의 기질 A 및 B를 각각의 웰에 첨가하고, 37 °C에서 15 분 동안 배양하였다. 각각의 웰에 정지 용액을 첨가한 후, 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 450 nm에서 광학 밀도를 측정하였다.

[0059] **2-2. SDH(succinate dehydrogenase) 효소 활성도 측정**

[0060] 웰 내 PBS(phosphate buffer saline) 용액 1 ml 당 단백질을 분해 효소 저해제 각테일 10 μ l를 첨가하여 웰 당 500 μ l이 되도록 준비하고, 1 M 인산완충용액 25 μ l×25 = 625 μ l, 0.2M 소듐 숙시네이트 125 μ l×25 = 3125 μ l, NBT 25 μ l×25 = 625 μ l, D.W 235 μ l×25 = 5875 μ l를 섞어 만든 배양용액을 웰 당 410 μ l이 되도록 준비하여, 반응 20 분 전에 37°C로 데워두었다. 실시예 1-2의 래트로부터 분리한 골격 근육 조직 0.02 g 당 위에서 미리 준비한 PBS 500 μ l를 넣고 파쇄기로 갈고, 짧은 시간 동안 나누어 갈아서 온도가 상승하여 효소가 파괴되지 않게 준비했다. 13000 rpm, 4 °C에서 5분 동안 원심분리 후 상층액을 수득하여 새로운 튜브에 옮겼다. 배양용액 410 μ l를 미리 튜브에 넣어두고 샘플 90 μ l를 넣어 효소반응 시켰다. 또 다른 튜브에 증류수(DW) 410 μ l를 넣고 샘플 90 μ l를 첨가한 후 희석액의 흡광도를 측정하였다. 앞서 준비한 효소반응의 튜브와 다른 튜브를 각각 37°C 물 중탕에 넣고 30 분 동안 반응시키고, 얼음에 튜브를 삽입하여 반응을 종료시킨 후, 96 웰 플레이트에 200 μ l씩 분주하여 흡광도 550nm로 측정하고, 결과값을 다음과 같은 식에 적용하여 숙신산 데하이드로게나아제(SDH)의 효소 활성도를 계산하였다.

[0061]

[0062] 효소 활성도 = (효소반응 흡광도 값 - 효소액 희석액 흡광도 값) / 단백질 정량값 (브래드포드 595nm)

[0063] **2-3. 웨스턴 블랏**

[0064] 단백질들은 세포로부터 PREP™ 단백질 추출 용액(iNtRON Biotechnology, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea)을 이용하여 수득한 후 단백질 20 ~ 30 ug을 10% SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) 겔 상에 로딩하여 분리하고 니트로셀룰로오스 페이퍼(GE Healthcare, 영국)에 트랜스퍼(transfer)하였다. 멤브레인은 5% (w/v) 스킴 밀크, 0.05% (v/v) tween-20을 포함하는 TBS(Tris-buffered saline)에서 4°C에서 하룻밤 또는 실온에서 2 시간 동안 블로킹(blocking)한 후 AMPK α (전체 형태의 α 서브유닛), 인산화된 AMPK α (Thr172에서 인산화), PPAR- δ 및 PGC-1 α 에 대한 1차 항체(Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA)를 투입하고 실온에서 2 시간 또는 4°C에서 하룻밤 배양한 뒤, 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase)가 결합된 항-토끼 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)로 반응시켰다. 검출 시약(detection reagent)으로 Clarity Western ECL Substrate 키트(Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 이용하였다. 영상들은 Kodak GBX 현상 및 고정 시약(Kodak, Rochester, NY, USA)을 사용하여 수동으로 수득하였다. X-선 필름은 Agfa(Mortsel, Belgium)로부터 구입하였다. 세포 유래 각 단백질의 함량은 브래드포드 방법을 사용하여 측정하였다.

[0065] **2-4. 세포 내 포도당 흡수율 측정**

[0066] 실시예 1-1의 방법으로 배양한 마우스 골격근 세포(C2C12 세포)에 인슐린 100 μ M/L, 미도드린 30 μ M/L, 미도드린 30 μ M/L 및 인슐린 100 μ M/L의 혼합물(1:2(w/w))을 각각 처리한 뒤, 2-데옥시 포도당(2-deoxy glucose)으로 포도당 흡수(uptake) 수준을 측정하였다.

[0067] **2-5. 심장 기능 및 체중 측정**

[0068] 실시예 1-2의 8주령 래트에 조레틸(zoletil)(8 mg/kg) 및 xylzine(2 mg/kg)을 근육 주사하여 마취시킨 후, 래

트들을 좌측으로 눕혀놓고 M-모드 에코 영상들을 얻었다. 모든 검사는 12 MHz 트랜스듀서를 구비한 vivid 7(GE Medical Systems, Milwaukee, WI, USA)을 사용하여 수행하였다. 유두근 수준에서 좌심실에 대한 최적 2차원 단축 영상을 획득한 이후에, M-모드 트레이싱을 수행하는 동시에 심전도 기록을 수행하면서 100 mm/s의 속도로 기록하였다. M-모드 트레이싱에 대한 적어도 3회 연속 심장 사이클로부터 에코심초음파검사를 이용하여(American Society for Echocardiography) 측정방법을 적용하여, 심장벽 두께, 좌심실 구혈율(수축 기능) 및 질량을 측정하였다.

[0069] 체중은 상기 심장 기능을 측정한 래트와 동일한 래트를 대상으로 측정하였다.

[0070] 또한, 실시예 1-2의 4주령 래트를 대상으로 1개월에 걸쳐 심장박동수를 측정하였다.

[0071] 2-6. 통계적 분석

[0072] 연속적 변수들은 평균 $\pm$ 표준편차 (SD)로 기록하였다. 4개 군들에 걸친 변수들의 전반적 차이값들은 Kruskal-Wallis 테스트를 사용하여 분석하였다. 두 개 군들 사이의 차이값들은 Mann-Whitney U-테스트를 사용하여 평가하였다. 0.05 미만의 p -수치들은 통계적으로 유의미한 것으로 간주하였다. 모든 통계적 분석은 SPSS (ver. 20.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 수행하였다.

[0073] 실시예 3: 실험결과

[0074] 3-1. *in vitro*에서 골격근 세포 또는 심근 세포에 미도드린 투여 시 AMPK의 인산화에 대한 효과 검증

[0075] AMPK 및 AMPK 인산화(활성화)에 대한 $\alpha 1$ -AR 자극 효과를 *in vitro*에서 확인하기 위하여, 실시예 1-1에서 배양한 마우스 골격근 세포주(C2C12)와 마우스 심근 세포주(HL1)에 $\alpha 1$ -AR 효능제인 미도드린 30 μ M을 처리한 후 실시예 2-3의 방법으로 웨스턴 블랏을 수행하였다.

[0076] 그 결과, 도 1a 및 1b에 나타난 바와 같이, 골격근 세포의 AMPK가 $\alpha 1$ -AR 자극에 의하여 발현되었으며, 인산화된 AMPK 발현이 미도드린의 농도에 따라 증가되었는 바, $\alpha 1$ -AR 자극이 AMPK의 활성화에 관여함을 알 수 있었다. 또한, 미도드린 투여로 인한 $\alpha 1$ -AR 자극은 골격근 이외에 심근 세포에서도 같은 양상으로 AMPK의 발현 및 인산화 반응이 나타났다.

[0077] 이와 같이, 골격 근육에서 미도드린이 작용하여 나타나는 변화(AMPK 활성화)가 심근에서도 기존에 알려진 심근 수축기능 향상과 동시에 나타나므로(AMPK 활성화 + 심근 수축 증가), $\alpha 1$ -AR 자극으로 추가적인 심근 운동 효과가 나타나고 있다는 것을 알 수 있었다. 즉, *in vitro* 실험에서 이제까지는 단순히 심근 세포의 수축력만 증가할 가능성만 알려진 바 있으나, 본 실시예에 따른 결과에서는 골격근 및 심근 세포에서 AMPK 증가 및 인산화가 증가되어 운동효과 관련 작용이 예상되었다.

[0078] 3-2. 심근, 골격근, 지방 및 간에서 AMPK, PPAR- δ , PGC-1 α 단백질 발현 검증

[0079] 골격근에서 $\alpha 1$ -AR의 존재를 확인하기 위하여, 기저 4주령 대조군 래트(I), 미도드린 투여 래트(II), 아테놀롤 투여 래트(III) 및 미투여 8주령 대조군 래트(IV)의 골격근에서 $\alpha 1$ -AR의 단백질 발현상태를 실시예 2-3의 방법으로 웨스턴 블랏팅을 수행하여 확인한 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이, 그룹 IV에서 $\alpha 1$ -AR가 가장 높은 발현을 나타내었다.

[0080] 또한, 상기 4개 군의 래트 유래 심근, 골격근, 지방 및 간에서 AMPK, PPAR- δ , PGC-1 α 단백질의 발현상태를 각각 실시예 2-3의 방법으로 웨스턴 블랏팅을 수행하여 확인한 결과, 도 2b(심근), 도 2c(골격근), 도 2d(지방) 및 도 2e(간)에 나타난 바와 같이, 심근의 경우에 인산화된 AMPK 단백질의 발현은 그룹 I이 그룹 IV보다 높았으며($p<0.05$), 미도드린 투여 그룹 II는 대조군 그룹 IV보다 심근, 골격근, 지방에서 현저하게 높은 AMPK 발현을 나타내었으나, 아테놀롤 투여 그룹 III는 동일한 나이의 대조군 그룹 IV와 비교할 때 해당 기관들에서 더 높은 AMPK 단백질의 발현을 나타내지는 않았다.

[0081] 특이한 점은, 심근에서는 AMPK 증가에 비하여 PGC-1 α 와 PPAR- δ 의 증가가 훨씬 크지만, 골격근에서는 AMPK 증가에 비하여 PGC-1 α 와 PPAR- δ 의 증가가 훨씬 덜하다는 점이다. 이는, 심근의 운동효과가 AMPK 활성화와 더불어 직접적으로 PGC-1 α 와 PPAR- δ 의 발현을 증가시키는데 반하여, 골격근은 운동을 상대적으로 많이 하고 있지 않았기 때문에 비교적 AMPK에 비하여 PGC-1 α 와 PPAR- δ 가 증가하지 않음을 의미한다.

[0082] 3-3. 골격근의 미토콘드리아 산화효소 발현 변화

[0083] 미토콘드리아 산화과정(TCA 회로) 효소인 SDH 효소 활성도를 골격근에서 실시예 2-2의 방법으로 측정한 결과,

도 3a에 나타낸 바와 같이, 미도드린 투여그룹 II에서 가장 높게 증가함을 알 수 있었다.

[0084] 또한, 미토콘드리아 산화과정 효소인 cytochrome c oxidase 효소에 대하여 골격근 조직에서 면역조직화학 염색한 결과, 도 3b에 나타낸 바와 같이, 미도드린 투여그룹 II에서 가장 높게 증가함을 알 수 있었다.

[0085] 이러한 결과로부터, 미도드린이 대사 작용을 증진시킴을 알 수 있었다.

[0086] 3-4. 조직 내 ATP 수준 비교

[0087] 기저 4주령 래트(I), 미도드린 투여한 래트(II), 아테놀롤 투여 래트(III) 및 미투여 8주령 대조군 래트(IV)에 대하여, 심장, 골격근 및 간에서 ATP 수준을 ELISA 방법을 이용하여 실시예 2-1의 방법으로 측정하여 비교하였다.

[0088] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 미도드린 또는 아테놀롤 투여 그룹의 심장 조직에서는 ATP 수준이, 심장의 더 높은 수축 활성에도 불구하고 대조군 SHRs의 수치보다 높게 관찰되었다.

[0089] 3-5. 세포 내 포도당 흡수 효과 검증

[0090] 마우스 골격근 세포(C2C12 세포)에서 인슐린의 포도당 흡수에 미치는 미도드린 효과를 확인한 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 인슐린 단독보다 인슐린과 미도드린의 혼합물을 처리할 경우, 포도당 흡수율이 현저히 증가함을 확인하였다.

[0091] 이와 같은 결과로부터, 미도드린이 당뇨병 치료에 유효함을 알 수 있었다.

[0092] 3-6. *in vivo* 동물모델에서 심장 기능 및 체중에 대한 미도드린 투여 효과 검증

[0093] 미도드린 투여시 *in vivo* 심장근에서도 AMPK, PPAR- δ (Peroxisome Proliferator activated Receptor- δ) 및 PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator-1 α)가 증가된다면, 골격근에서 운동 효과가 이미 증명된 AMPK-PPAR- δ -PGC1 α 동시발현 캐스캐이드가 심근 수축기능 향상에 영향을 준다고 간주할 수 있을 것이므로, 실시예 2-5의 방법으로 *in vivo*에서 심장 기능 및 체중을 확인하였다.

[0094] 그 결과, 하기 표 1에 나타낸 바와 같이 8주령 래트의 에코심박동 데이터로부터, 미도드린 투여 래트 그룹 II 및 아테놀롤 투여 래트 그룹 III의 좌심실 성능이 미투여 대조그룹 IV의 해당 수치보다 더 높은 것으로 나타났다.

[0095] 좌심실 질량은 그룹 II에서 가장 낮았으나, 심장 질량은 그룹들 사이에서 유의미한 차이점이 관찰되지 않았으며, 그룹 III이 가장 높은 체중을 나타내었다.

[0096] 또한, 4주령의 래트로 이루어진 3개의 그룹(청색: 대조군, 적색: 미도드린 투여군, 녹색: 아테놀롤 투여군)에서 1개월에 걸쳐 심장박동수를 측정한 결과, 실험 말미에 아테놀롤 그룹에서 가장 낮았다(도 6).

표 1

패러미터	미도드린 (그룹 II)	아테놀롤 (그룹 III)	대조군 (그룹 IV)	p-수치
확장기 좌심실 격막, mm	1.46 $\pm$ 0.13 ^a	1.50 $\pm$ 0.13 ^a	1.45 $\pm$ 0.11 ^a	0.3256
확장기 좌심실 후벽, mm	1.54 $\pm$ 0.13 ^a	1.67 $\pm$ 0.16	1.54 $\pm$ 0.15 ^a	0.0046
확장기 좌심실 내부 크기, mm	6.06 $\pm$ 0.42 ^a	6.33 $\pm$ 0.35 ^a	6.37 $\pm$ 0.72 ^a	0.1082
수축기 좌심실 내부 크기, mm	3.32 $\pm$ 0.54 ^a	3.43 $\pm$ 0.28 ^a	3.82 $\pm$ 1.01	0.0445
좌심실 구획 단축률, %	45.48 $\pm$ 6.25 ^a	45.70 $\pm$ 5.82 ^a	38.77 $\pm$ 8.59	0.0019
좌심실 박출 계수, %	81.55 $\pm$ 6.12 ^a	82.00 $\pm$ 5.31 ^a	73.87 $\pm$ 10.13	0.0007
ASE에 의한 좌심실 질량, g	1.04 $\pm$ 0.06	1.10 $\pm$ 0.07 ^a	1.07 $\pm$ 0.12 ^a	0.0313
체중, g	238.24 $\pm$ 11.69 ^a	296.46 $\pm$ 16.73 ^b	236.20 $\pm$ 7.58 ^a	0.009
심장 무게, g	1.47 $\pm$ 0.16 ^a	1.47 $\pm$ 0.15 ^a	1.78 $\pm$ 0.35 ^a	0.062

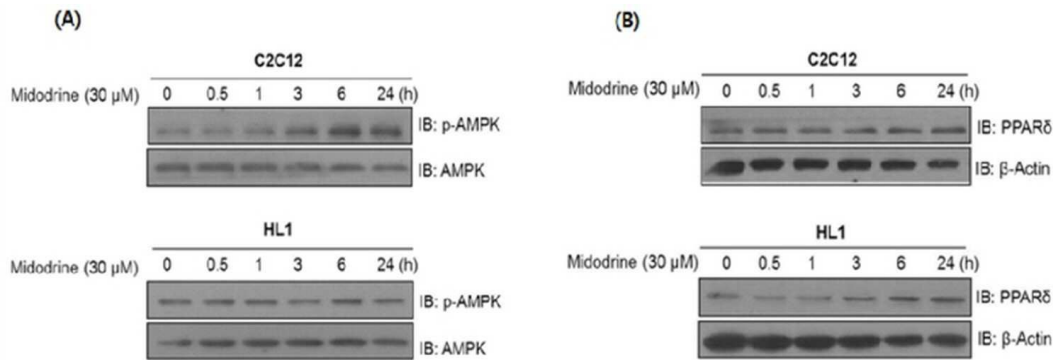
[0098] 이와 같은 결과로부터, 미도드린 사용 시에는 혈당감소와 더불어 체중 감소, 심부전 예방 효과가 동시에 발휘되는 것을 확인하였다.

[0099] 이상의 결과들에 의하면, $\alpha 1$ -AR 효능제인 미도드린 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 의한 $\alpha 1$ -AR 자극은, 골격근 및 간에 운동 시 발휘되는 생리효과를 초래하며, 자발성 고혈압 래트의 초기 생애 중 초기 고혈압 시기에 생화학적 반응들을 변화시킴을 알 수 있다. 이는, 직접적으로 자극된 AMPK 활성화와 관련된다.

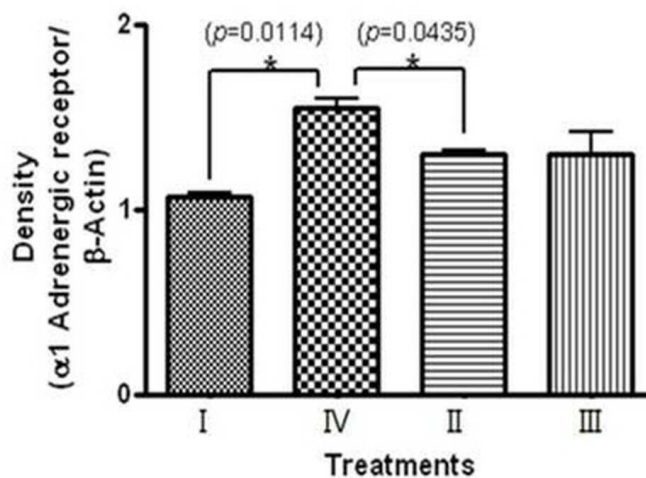
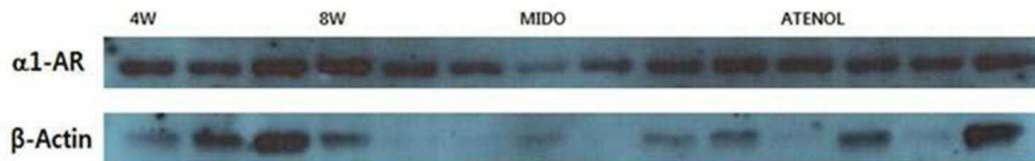
[0100] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

도면

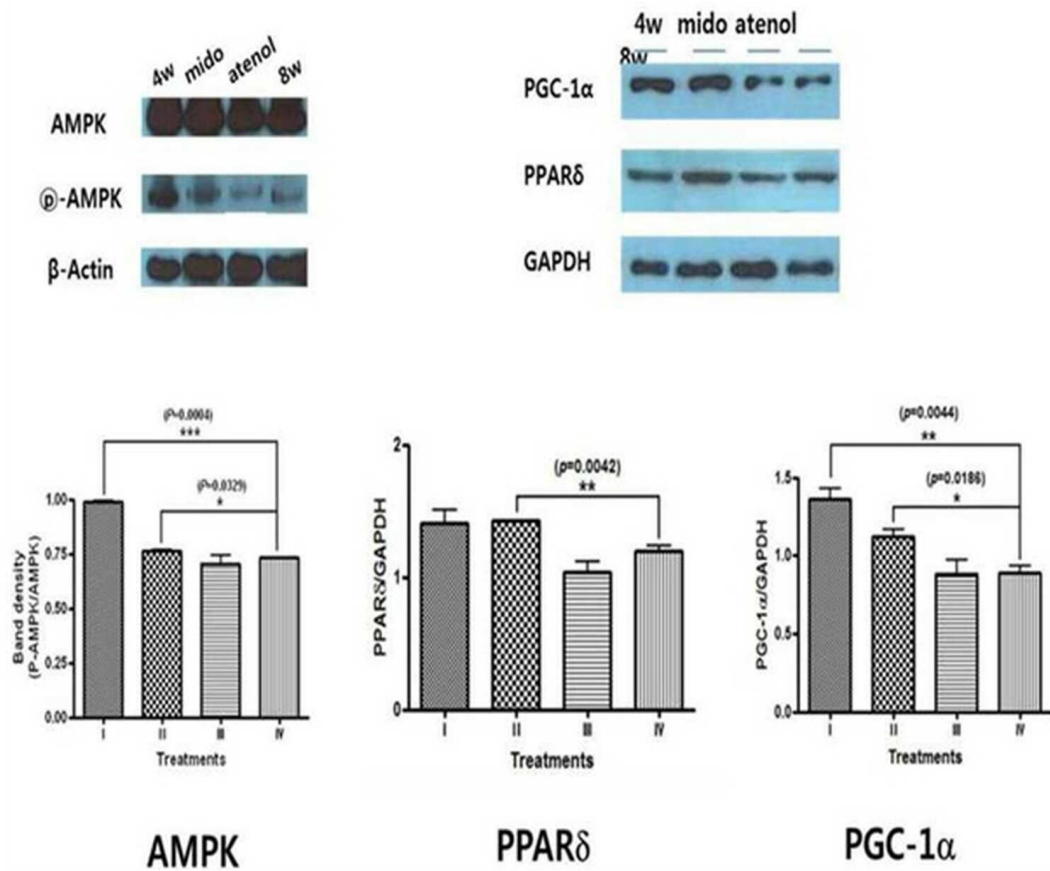
도면1



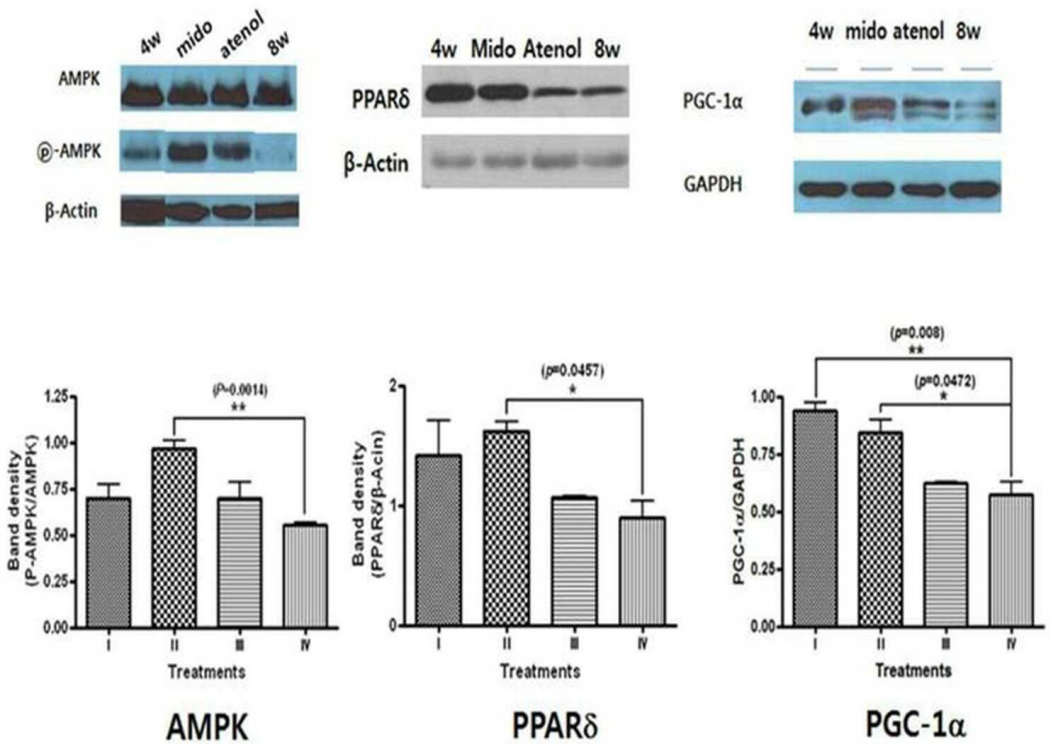
도면2a



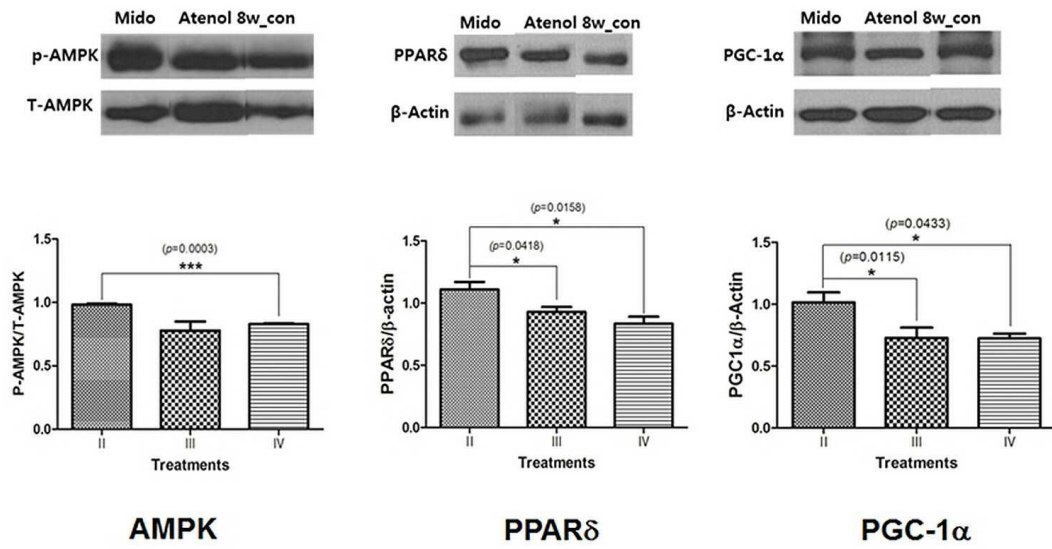
도면2b



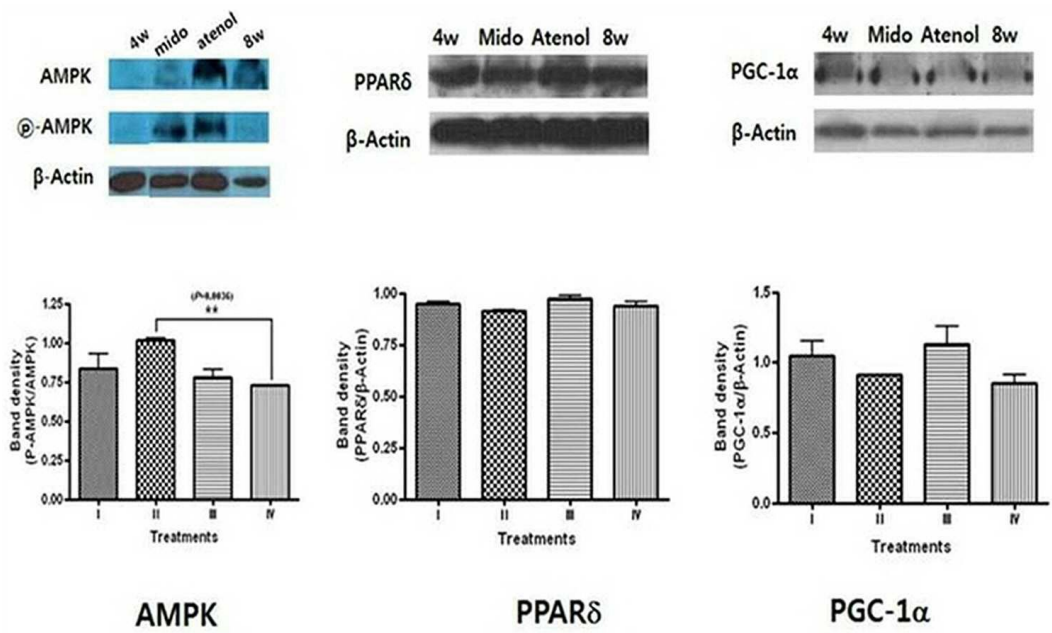
도면2c



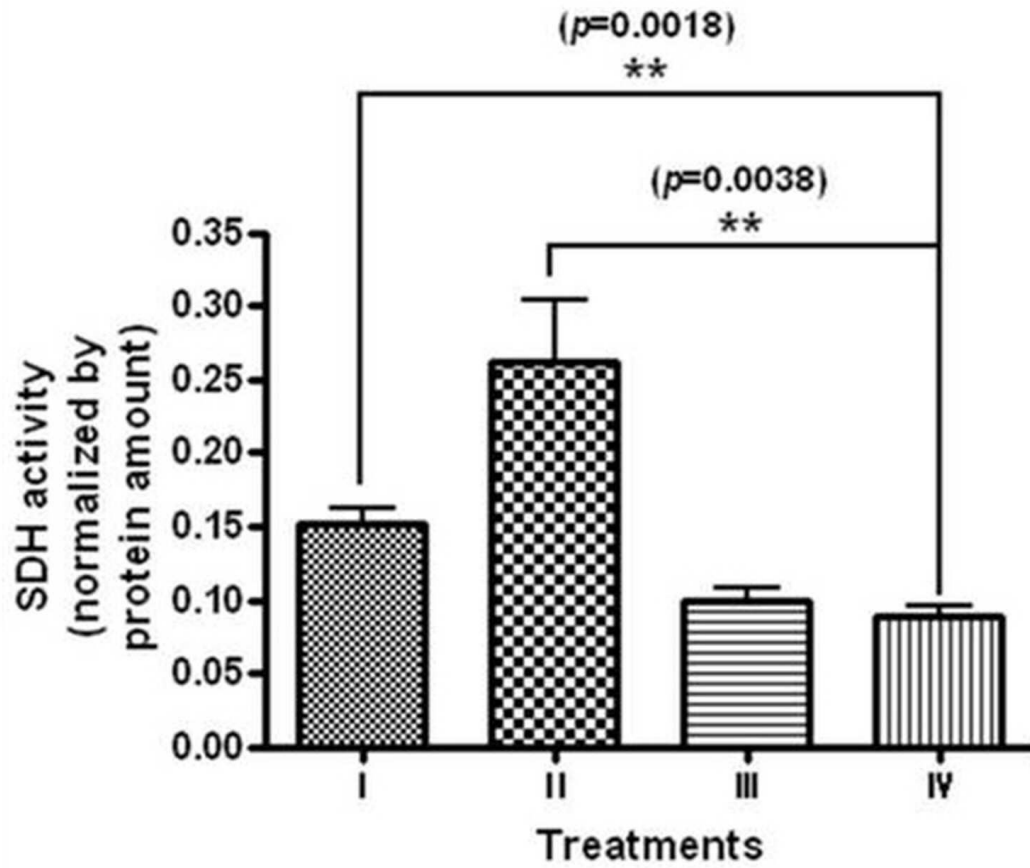
도면2d



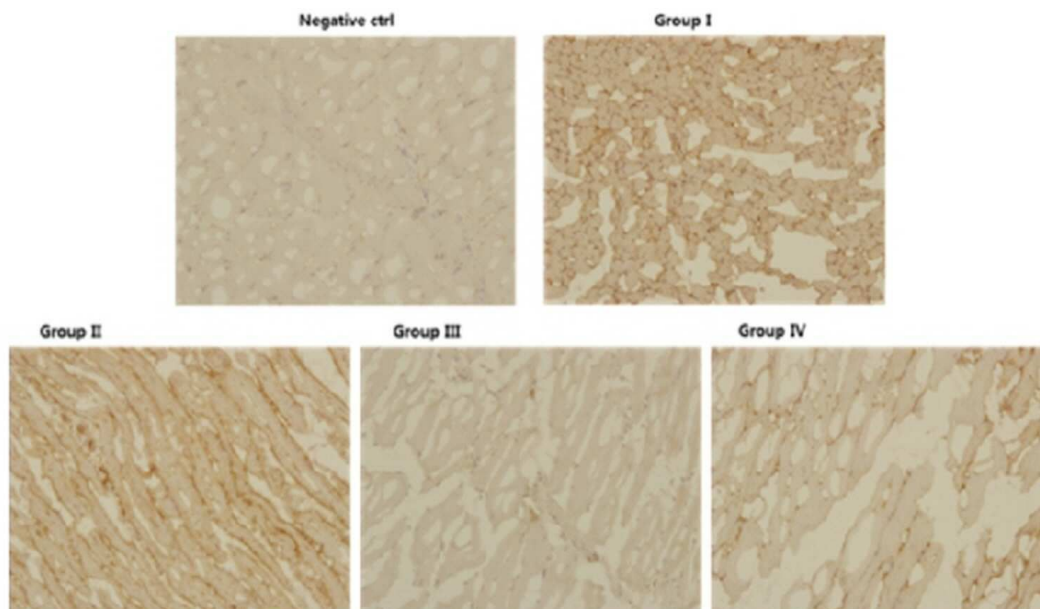
도면2e



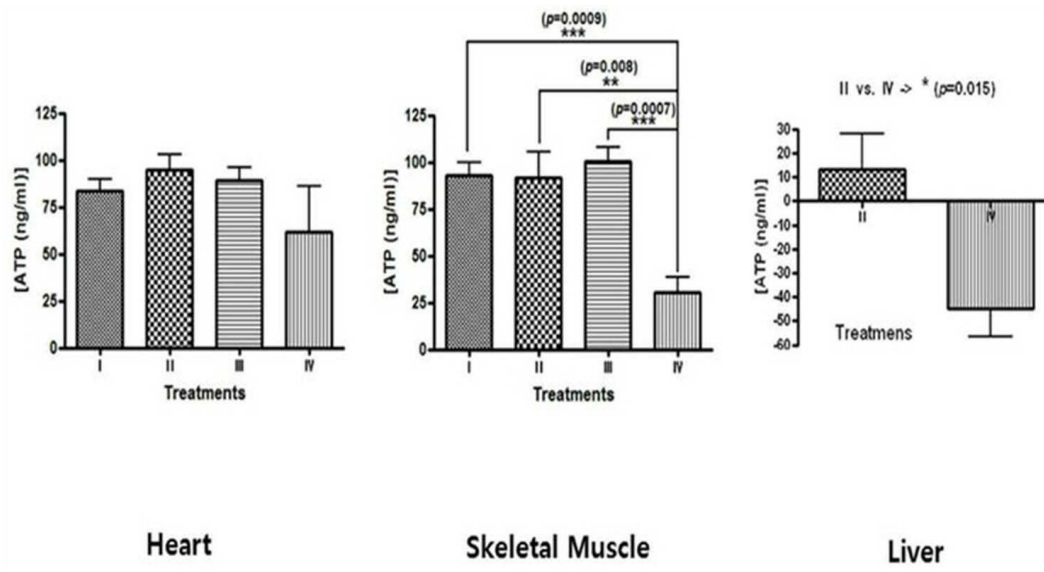
도면3a



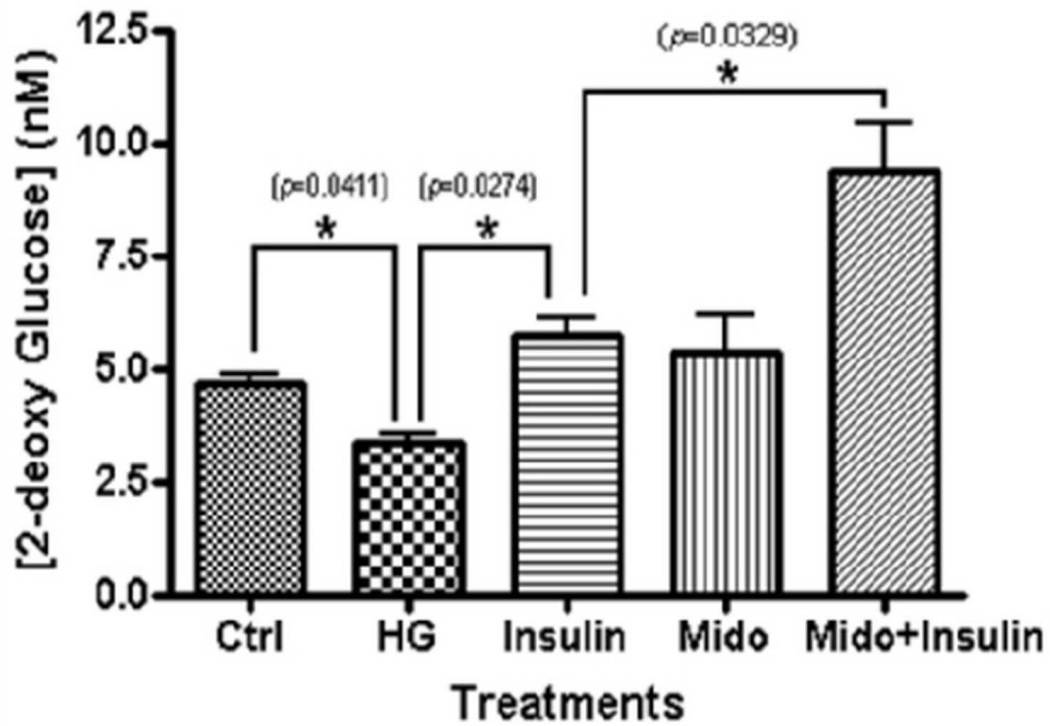
도면3b



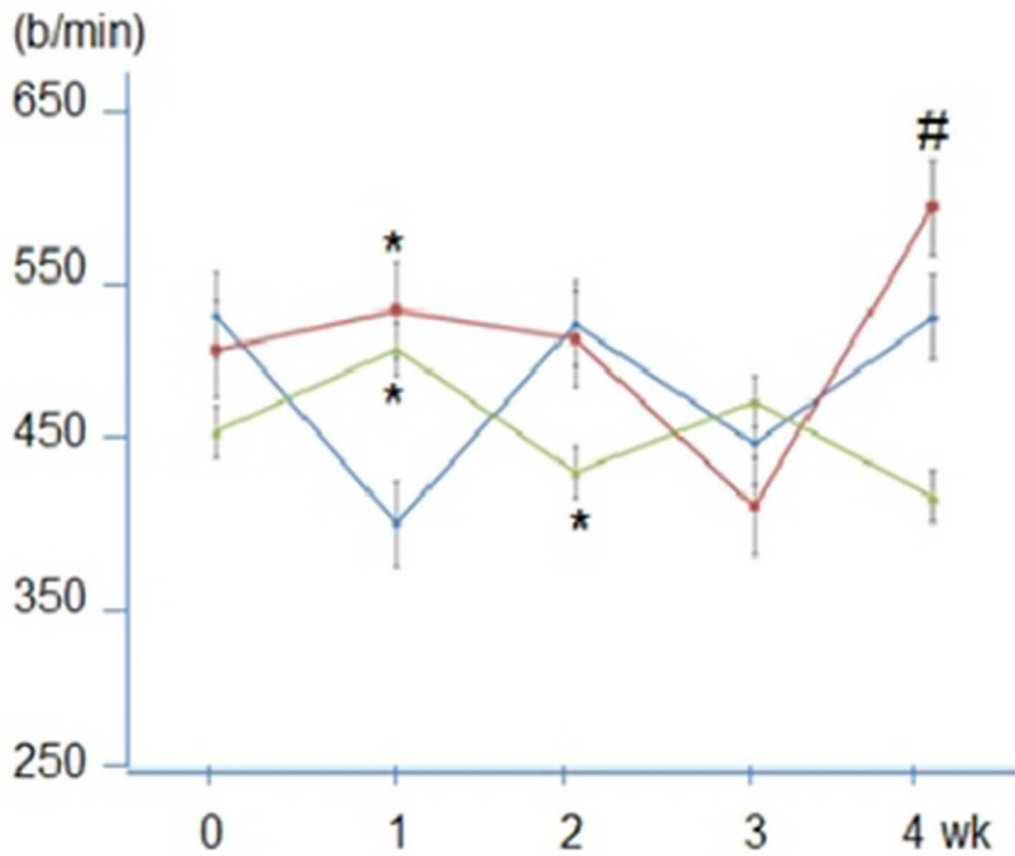
도면4



도면5



도면6



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 제1항 내지 제5항

【변경전】

치료 및 예방

【변경후】

예방 또는 치료