



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0018794
(43) 공개일자 2023년02월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/137 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61P 1/16 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 31/137 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2021-0100728
(22) 출원일자 2021년07월30일
심사청구일자 2021년07월30일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자
전경희
서울특별시 종로구 경교장길 35 경희궁자이 302동 405호

백정환
서울특별시 서대문구 독립문로8길 54 천연뜨란채 104동 204호

(74) 대리인
파도특허법인유한회사

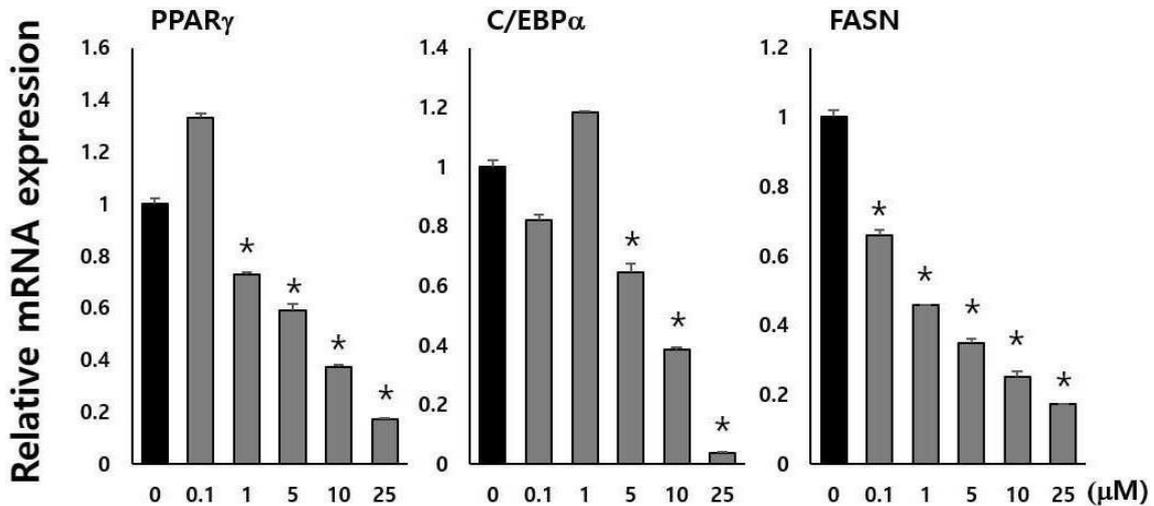
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 벤질아미노에탄올 유도체를 유효성분으로 포함하는 대사질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 벤질아미노에탄올 유도체를 유효성분으로 포함하는 대사질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 기능성 식품 조성물을 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 지방세포 분화와 지방 축적을 유의하게 억제하여 대사 질환 지표를 현저히 개선하면서도 세포 독성을 거의 나타내지 않아, 장기 투여 시에도 부작용이 적은 효율적 대사질환 치료제로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 1/16 (2018.01)

A61P 3/04 (2018.01)

A61P 3/06 (2018.01)

A61P 3/10 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/3262 (2013.01)

A23V 2200/328 (2013.01)

A23V 2200/332 (2013.01)

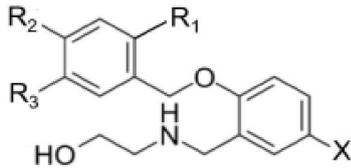
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨, 이상지방혈증(dyslipidemia), 지방간 및 인슐린 저항성 증후군(인슐린 resistance syndrome)으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환(metabolic disorder)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물:

화학식 1



상기 화학식 1에서, R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 수소 또는 할로젠이고, R₃는 수소, 할로젠, 비치환되거나 할로젠으로 치환된 C₁ - C₃ 알킬이며, X는 할로젠이다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 화학식 1의 R₁은 수소이고, R₂는 플루오로이며, R₃는 할로젠으로 치환된 C₁ - C₃ 알킬이고, X는 브롬인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 R₃는 트리플루오로메틸인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 이상지방혈증은 고지혈증인 것을 특징으로 하는 조성물.

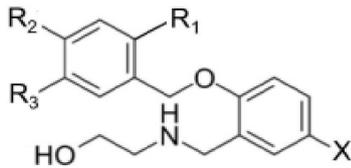
청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 지방간은 비알콜성 지방간인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨, 이상지방혈증(dyslipidemia), 지방간 및 인슐린 저항성 증후군(인슐린 resistance syndrome)으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환(metabolic disorder)의 개선 또는 완화용 식품 조성물:

화학식 1



상기 화학식 1에서, R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 수소 또는 할로젠이고, R₃는 수소, 할로젠, 비치환되거나 할로겐으로 치환된 C₁ - C₃ 알킬이며, X는 할로젠이다.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 화학식 1의 R₁은 수소이고, R₂는 플루오로이며, R₃는 할로겐으로 치환된 C₁ - C₃ 알킬이고, X는 브롬인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 6 항에 있어서, 상기 R₃는 트리플루오로메틸인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

다음의 단계를 포함하는 비만, 당뇨, 이상지방혈증(dyslipidemia), 지방간 및 인슐린 저항성 증후군(인슐린 resistance syndrome)으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환(metabolic disorder)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 스크리닝 방법:

(1) USP(Ubiquitin specific protease)25, USP28 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 탈유비퀴틴화 효소를 발현하는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계;

(2) 상기 시료 내 상기 탈유비퀴틴화 효소의 활성 또는 발현량을 측정하는 단계,

상기 탈유비퀴틴화 효소의 활성 또는 발현량이 감소한 경우, 상기 시험물질을 상기 대사질환의 예방 또는 치료용 조성물로 판정한다.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 지방세포(adipocyte) 또는 그 배양액을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 USP25 및 USP28의 억제제인 벤질아미노에탄올 유도체를 유효성분으로 포함하는 대사질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 당뇨, 고혈압, 지질대사이상, 인슐린저항성 등을 수반하는 대사증후군(metabolic syndrome)은 그 높은 유병률로 인해 인류의 건강을 위협하는 주요 질환군으로 떠올랐으며 미국, 유럽 등 선진국에서는 국가 경쟁력을 위협하는 심각한 보건 문제로 간주되어 이의 해결에 막대한 인적, 물적 역량이 투입되고 있다. 대사증후군에 속하는 질환들은 상호 간의 발생위험을 증가시키며, 노화, 스트레스 및 면역기능저하 등의 다원적인 생체대사변화와 관련

이 있는 공통 질환군이다.

- [0004] 2017년 OECD 통계에 따르면 한국의 고도 비만 인구는 전 인구의 5.3% 가량으로 OECD 평균 비만율에 비해 높은 편은 아니나, 남자 아동 및 청소년 비만율(26%, 과체중 포함)은 OECD 평균(25.6%)수준보다 높으며, 비만율은 매년 증가추세를 보이면서 2030년에는 고도비만 인구가 2배로 증가할 것으로 예측하였다. 뿐만 아니라 비만으로 인한 사회경제적 손실은 2015년 기준 9조 2천억원으로 최근 10년간 2배로 증가되었고, 고령화 등으로 더욱 가속화 될 전망이다.
- [0005] 한편, 유비퀴틴(Ubiquitin, Ub)은 진핵 생물의 대부분의 기관 또는 세포에서 단백질의 선택적인 분해 및 세포 분열의 조절과 같은 다양한 세포 내의 기능에 관여하는, 76개의 아미노산으로 구성된 단백질로서, 인간의 경우 UBB, UBC, UBA52 및 RPS27A의 4가지 유전자에 의해 인코딩된다. 유비퀴틴화(ubiquitination)란, 유비퀴틴 활성화 효소(E1), 유비퀴틴 결합 효소(E2) 및 유비퀴틴 접합 효소(E3)에 의해 유비퀴틴과 기질 단백질의 공유 결합이 순차적으로 일어나는 것을 의미하고, 이의 가역적 과정으로서 기질 단백질로부터 유비퀴틴을 제거하는 것을 탈유비퀴틴화(deubiquitination)라고 한다.
- [0006] 탈유비퀴틴화를 촉발하는 효소인 탈유비퀴틴화 효소(deubiquitinase, DUB)는 USP(Ub-specific processing protease), UCH(UbC-terminal hydrolase), Otubain(OTU-domain Ub-aldehyde-binding protein), MJD(Machado-Joseph disease) 및 JAMM(Jab1/Pad1/MPN domain metallo-enzyme)의 다섯 개 패밀리로 구분되는데, 이중 가장 큰 패밀리를 구성하는 USP는 시스테인 박스(Cysteine box) 및 히스티딘 박스(Histidine box)와 같은 활성-도메인 외에 아직 그 기능이 밝혀지지 않은 도메인들을 다수 포함하고 있으며, 특히 일부 아형을 제외하고는 대사 질환과의 상관 관계가 거의 연구되지 못하고 있다.
- [0008] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1. Jonathan D. Wrigley et al., ACS Chem. Biol. 12, 3113-3125 (2017)

발명의 내용

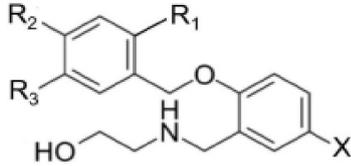
해결하려는 과제

- [0011] 본 발명자들은 비만, 당뇨, 이상지방혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군 을 포함하는 대사질환에 대한 우수한 치료 활성을 가지면서 장기 투여 시에도 부작용이 적어 만성 질환의 치료에 적합한 효율적인 치료제 조성물을 개발하기 위해 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 후술하는 화학식 1 구조의 벤질아미노에탄올 유도체 화합물이 세포 독성을 거의 나타내지 않으면서도 지방세포의 분화를 유의하게 억제하고 지방 축적량을 크게 감소시켜 대사질환의 지표를 현저히 개선을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0012] 따라서 본 발명의 목적은 대사질환(metabolic disorder)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 대사질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨, 이상지방혈증(dyslipidemia), 지방간 및 인슐린 저항성 증후군(인슐린 resistance syndrome)으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환(metabolic disorder)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물:

[0018] 화학식 1



[0019]

[0020] 상기 화학식 1에서, R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 수소 또는 할로젠이고, R₃는 수소, 할로젠, 비치환되거나 할로젠으로 치환된 C₁ - C₃ 알킬이며, X는 할로젠이다.

[0021] 본 발명자들은 비만, 당뇨, 이상지방혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군 을 포함하는 대사질환에 대한 우수한 치료 활성을 가지면서 장기 투여 시에도 부작용이 적어 만성 질환의 치료에 적합한 효율적인 치료제 조성물을 개발하기 위해 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 상기 화학식 1의 구조를 가지는 벤질아미노에탄올 유도체가 세포 독성을 거의 나타내지 않으면서도 지방세포의 분화를 유의하게 억제하고 지방 축적량을 크게 감소시켜 대사질환의 지표를 현저히 개선함으로써 지질대사이상으로 인한 대사질환의 효율적인 치료 조성물로 이용될 수 있음을 발견하였다.

[0022] 본 명세서에서 용어 “대사질환”은 신진대사 이상을 원인으로 발생하는 각종 심혈관 질환과 제2형 당뇨병의 위험 요인들이 서로 균형을 이루는 현상을 한 가지 질환군으로 개념화시킨 것으로 인슐린 저항성 및 이와 관련된 복잡하고 다양한 여러 대사이상과 임상 양상을 모두 포괄하는 개념이다.

[0023] 본 명세서에서 용어 “비만(obesity)” 장기간에 걸쳐 에너지 섭취량이 에너지 소비량을 초과하여 잉여 에너지가 지방으로 저장됨으로써 체내에 지방조직이 과다해지는 상태를 의미한다. 통상 체질량지수(Body mass index: 체중(kg)/[신장(m)]²)가 25 이상이면 임상적으로 비만으로 정의된다.

[0024] 본 명세서에서 용어 “당뇨”은 포도당-비관용(intolerance)을 초래하는 인슐린의 상대적 또는 절대적 부족으로 특징되는 만성질환을 의미한다. 본 발명의 조성물로 치료 또는 예방되는 당뇨는 모든 종류의 당뇨병을 포함하며, 예를 들어, 제1형 당뇨, 제2형 당뇨 및 유전성 당뇨를 포함한다. 제1형 당뇨는 인슐린 의존성 당뇨병으로서, β-세포의 파괴에 의해 주로 초래된다. 제2형 당뇨는 인슐린 비의존성 당뇨병으로서, 식사 후 불충분한 인슐린 분비에 의해 초래되거나 또는 인슐린 내성에 의해 초래된다.

[0025] 본 명세서에서 용어 “이상지방혈증(dyslipidemia)”은 혈액 내의 지방농도 수치가 정상범위 밖에 있는 병적 상태(pathologic condition)를 의미하며, 예를 들어 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증, 저-HDL-콜레스테롤혈증 및 고-LDL-콜레스테롤혈증 외에도 지단백의 대사이상을 원인으로 하는 비정상적 지질상태를 모두 포함한다.

[0026] 본 명세서에서 용어 “지방간”은 간의 지방대사 장애로 지방이 간세포에 과도한 양으로 축적된 상태를 말하며, 이는 협심증, 심근경색, 뇌졸중, 동맥경화, 지방간 및 체장염 등과 같은 다양한 질병의 원인이 된다.

[0027] 본 명세서에서 용어 “인슐린 저항성”은 혈당을 낮추는 인슐린의 기능이 떨어져 세포가 포도당을 효과적으로 연소하지 못하는 상태를 의미한다. 인슐린 저항성이 높을 경우, 인체는 너무 많은 인슐린을 만들어 내고 이로 인해 고혈압이나 이상지방혈증은 물론 심장병, 당뇨병 등까지 초래할 수 있다. 특히 제2형 당뇨병에서는 근육과 지방조직에서 인슐린의 증가를 알아채지 못하여, 인슐린의 작용이 일어나지 않는다. 용어 “인슐린 저항성 증후군”은 상기 인슐린 저항성에 의하여 유발된 질환을 총칭하는 개념으로 인슐린 작용에 대한 세포의 저항성, 고인슐린혈증 및 초저밀도지단백(very low density lipoprotein, VLDL)과 중성지방의 증가, 고밀도지단백(high density lipoprotein, HDL)의 감소 및 고혈압 등을 특징으로 하는 질환을 의미하며, 심혈관질환과 제2형 당뇨병의 위험인자로 인식되고 있는 개념이다(Reaven GM, Diabetes, 37: 1595-607, (1988)).

[0028] 본 명세서에서 용어 “알킬”은 직쇄 또는 분쇄의 포화 탄화수소기를 의미하며, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필 등을 포함한다. C₁-C₃ 알킬은 탄소수 1 내지 3의 알킬 유니트를 가지는 알킬기를 의미하며, C₁-C₃ 알킬이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.

- [0029] 본 명세서에서 용어 “할로겐”은 할로젠족 원소를 나타내며, 예컨대, 플루오로, 클로로, 브로모 및 요오도를 포함한다.
- [0030] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 화학식 1의 R₁은 수소이고, R₂는 플루오로이며, R₃는 할로겐으로 치환된 C₁ - C₃ 알킬이고, X는 브롬이다.
- [0032] 보다 구체적으로는, 상기 R₃는 트리플루오로메틸이다.
- [0033] R₁은 수소이고, R₂는 플루오로이며, R₃는 트리플루오로메틸이고, X는 브롬인 화학식 1 화합물은 2-(5-브로모-2-(4-플루오로-3-(트리플루오로메틸)벤질옥시)벤질아미노)에탄올”의 IUPAC 명칭을 가지는 화합물(CAS 번호: 2165322-94-9)로서, “AZ1”으로도 불린다. 상기 화합물은 USP(Ubiquitin specific protease)25 및 USP 28의 이중 저해제 활성이 몇몇 암종에 대한 치료 효과가 제안되어 왔으나, 대사 질환과의 관계는 전혀 알려진 바가 없다.
- [0034] 본 명세서에서 용어 “약제학적으로 허용되는 염”은 약제학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다. 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 트리플루로초산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 이상지방혈증은 고지혈증이다.
- [0036] 본 명세서에서 사용되는 용어 “고지혈증”은 중성지방과 콜레스테롤 등의 지방대사가 제대로 이루어지지 않아 혈액 중에 높은 지질농도가 유지되어 유발되는 질환을 의미한다. 보다 구체적으로 고지혈증이란 혈액내의 중성 지방, LDL 콜레스테롤, 인지질 및 유리 지방산 등의 지질 성분이 증가된 상태로 발생빈도가 높은 고콜레스테롤혈증 또는 고중성지방혈증을 포함한다.
- [0037] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 지방간은 비알콜성 지방간이다.
- [0038] 본 명세서에서 용어 “비알콜성 지방간(Non-alcoholic fatty liver, NAFL)”은 알코올의 흡수와 무관하게 간세포에 과도한 양의 지방이 축적되는 질환을 의미하고, 여기에는 단순지방간(steatosis)과 비알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)이 포함된다. 단순 지방간은 임상적으로 예후가 양호한 편이나, 염증 혹은 섬유화를 동반하는 NASH는 진행성 간질환으로 간경변 또는 간암을 유발하는 전구질환으로 인지되고 있다. 비만과 인슐린저항성은 대표적인 비알콜성 지방간질환의 위험인자이다. 간섬유증 진행의 위험인자로는 가령, 비만(BMI>30), 혈중 간기능지표 비율(AST/ALT >1) 및 당뇨를 들 수 있고, 특히 C형 간염 보균자가 비알콜지방간일 경우 간암까지 진행될 수 있다. 비알콜성 지방간 환자의 69-100%는 비만환자이고, 비만환자의 20-40%는 비알콜성 지방간을 동반하며, 특히 유럽, 미국, 아시아의 비만아동의 10~77%가 비알콜성 지방간 병변을 보이는데, 이는 비알콜성 간질환의 가장 중요한 위험인자가 비만이기 때문이다.
- [0040] 본 명세서에서 용어 “예방”은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [0041] 본 명세서에서 용어 “치료”는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하면 TUFM에 직접적으로 결합함으로써 오토파지의 유입을 활성화하고 지질 분해를 유도하여, 과도한 지방의 축적으로 인한 대사 질환 증상의 발전을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 이들 질환 치료의 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 상기 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 “치료” 또는 “치료제”는 “치료 보조” 또는 “치료 보조제”의 의미를 포함한다.
- [0042] 본 명세서에서 용어 “투여” 또는 “투여하다”는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.
- [0043] 본 발명에서 용어 “치료적 유효량”은 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하고자 하는 개체에게 조성물 내의 약

리성분이 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 정도로 함유된 조성물의 함량을 의미하며, 이에 “예방적 유효량”을 포함하는 의미이다.

[0044] 본 명세서에서 용어 “대상체”는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.

[0045] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.

[0046] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

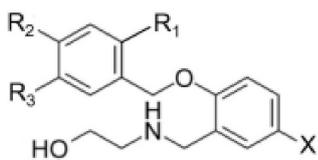
[0047] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 구체적으로는 비경구 방식으로 투여되고, 보다 구체적으로는 피하 또는 경피 투여될 수 있다.

[0048] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 mg/kg 범위 내이다.

[0049] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0050] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨, 이상지방혈증(dyslipidemia), 지방간 및 인슐린 저항성 증후군(인슐린 resistance syndrome)으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환(metabolic disorder)의 개선 또는 완화용 식품 조성물을 제공한다:

[0051] **화학식 1**



[0052] [0053] 상기 화학식 1에서, R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 수소 또는 할로젠이고, R₃는 수소, 할로젠, 비치환되거나 할로젠으로 치환된 C₁ - C₃ 알킬이며, X는 할로젠이다.

[0054] 본 발명에서 이용되는 화학식 1 화합물 및 이를 이용하여 개선하고자 하는 간질환에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0055] 본 명세서에서 용어 “식품학적으로 허용되는 염”은, 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하는 염 중에서도 식품 조성물에 사용될 수 있는 형태의 염을 의미하며, 그 구체적인 예는 상술한 “약제학적으로 허용되는 염”의 예를 포함한다.

[0056] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 본 발명의 화합물 뿐 만 아니라, 식품 제조시에 통상적으로 첨가되는 탄수화물, 조미제 및 향미제를 포함할 수 있다. 탄수화물의 예는 포도당, 과당 등의 단당류; 말토스, 수크로스 등의 이당류 및 텍스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 다당류 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 향미제로서 천연 향미제[타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용

할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 유효성분인 소나무 수피 추출물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0057] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 비만, 당뇨, 이상지방혈증(dyslipidemia), 지방간 및 인슐린 저항성 증후군(인슐린 resistance syndrome)으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환(metabolic disorder)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0058] (1) USP(Ubiquitin specific protease)25, USP28 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 탈유비퀴틴화 효소를 발현하는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계;

[0059] (2) 상기 시료 내 상기 탈유비퀴틴화 효소의 활성 또는 발현량을 측정하는 단계,

[0060] 상기 탈유비퀴틴화 효소의 활성 또는 발현량이 감소한 경우, 상기 시험물질을 상기 대사질환의 예방 또는 치료용 조성물로 판정한다.

[0061] 지질대사 이상을 원인으로 하는 비만 등의 대사질환과 USP25 또는 USP28 효소 간의 상관관계에 대해서는 아직까지 알려진 바가 없다. 본 발명에 따르면, 본 발명자들은 USP25 및 USP28에 대한 저해 활성이 보고된 본 발명의 화합물이 지방세포 분화를 억제하고 지방축적을 감소시킴을 관찰함으로써, 이들 효소가 대사 질환의 치료 타겟이 될 수 있음을 처음으로 제안하였다.

[0062] 본 발명의 스크리닝 방법에 따르면, 우선 USP25 및/또는 USP28을 발현하는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시킨다. 본 발명에서 용어 “생물학적 시료”는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, USP25 및/또는 USP28 발현 세포를 포함하고 있는 모든 시료로서, 조직, 기관, 세포 또는 세포 배양액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로는, 상기 생물학적 시료는 지방세포(adipocyte) 또는 그 배양액을 포함한다.

[0063] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “시험물질”은 USP25/28의 활성이나 발현량에 유전자 또는 단백질 수준에서 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화합물, 뉴클레오타이드, 항체, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이어, 시험물질을 처리한 생물학적 시료에서 USP25 및/또는 USP28의 발현량 또는 활성을 측정하는데, 발현량의 측정은 당업계에 공지된 다양한 면역분석(immunoassay) 방법 또는 서열이 알려진 유전자를 타겟으로 통상적으로 설계된 프라이머 또는 프로브를 이용한 다양한 유전자 검출 방법을 통해 이루어질 수 있다. 측정 결과, USP25 및/또는 USP28의 발현량 또는 활성이 감소하는 경우 상기 시험물질은 대사 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 판정될 수 있다.

[0064] 본 명세서에서 용어 “발현량 또는 활성의 감소”는 체중, 체지방량, 간지질 무게, 백색지방 무게를 비롯한 다각적인 지질대사 지표가 측정 가능한 수준으로 개선될 정도로 USP25 및/또는 USP28의 발현량 또는 생체 내 고유한 기능이 감소하는 것을 의미한다. 활성(activity)의 감소는 단순한 기능(function)의 감소 뿐 아니라 안정성(stability)의 감소로 기인한 궁극적인 활성 저하를 포함한다. 구체적으로는 대조군에 비하여 활성 또는 발현량이 20% 이상 감소한 상태, 보다 구체적으로는 40% 이상 감소한 상태, 더욱 구체적으로는 60% 이상 감소한 상태를 의미할 수 있다.

발명의 효과

[0066] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0067] (a) 본 발명은 벤질아미노에탄올 유도체를 유효성분으로 포함하는 대사질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 기능성 식품 조성물을 제공한다.

[0068] (b) 본 발명의 조성물은 지방세포 분화와 지방 축적을 유의하게 억제하여 대사질환 지표를 현저히 개선하면서도 세포 독성을 거의 나타내지 않아, 장기 투여 시에도 부작용이 적은 효율적 대사질환 치료제로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0070] 도 1은 AZ1 화합물을 0, 0.1, 1, 5, 10 및 25 μM 로 처리한 3T3-L1 세포와 미처리 대조군 세포의 생존률을 분석한 결과를 보여주는 그림이다.

도 2는 3T3-L1 세포에 AZ1 화합물을 처리한 뒤 Oil-Red-O 염색을 통해 지방세포 분화를 관찰한 결과(도 2a) 및 지방 축적량을 측정된 결과(도 2b)를 각각 보여주는 그림이다(도 2b).

도 3은 3T3-L1 세포에 AZ1 화합물을 처리한 뒤 지방세포의 분화 및 지방의 축적에 관련된 인자인 PPAR γ , C/EBP α , FASN의 발현량을 단백질 수준(도 3a) 및 mRNA 수준(도 3b)에서 측정된 결과를 보여주는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0071] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0073] **실시예**

[0074] **실험방법**

[0075] *세포 독성 측정*

[0076] 3T3-L1 세포를 10% 송아지 혈청(Gibco), 1% 페니실린-스트렙토마이신 (Gibco)을 넣은 DMEM 배지(Welgen)로 96-웰 플레이트에 씨딩하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 그 후 AZ1 화합물을 0, 0.1, 1, 5, 10 및 25 μM 농도로 세포에 처리하였다. 48시간 후 세포 배양액에 EZ-Cytox를 10 μl 씩 첨가하여 30분 동안 반응시키고 마이크로플레이트 리더를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0078] *지방세포 분화의 분석*

[0079] 3T3-L1 세포를 10% 송아지 혈청(Gibco), 1% 페니실린-스트렙토마이신 (Gibco)을 넣은 DMEM 배지(Welgen)로 6-웰에 6 x 10⁴개씩 씨딩하여 37°C, 5% CO₂ 에서 48시간 동안 인큐베이터에서 배양하였다. 세포 밀도가 100%에 도달하면, 기존 배지를 제거하고 새로운 DMEM (10% 송아지 혈청, 1% 페니실린-스트렙토마이신)을 넣어주고 다시 48시간 배양하였다. 다시 기존 배양액을 제거하고 분화 유도 물질(인슐린, 텍사메타손, 3-이소부틸-1-메틸잔틴)과 AZ1(0, 0.1, 1, 5, 10 및 25 μM)가 포함된 DMEM(10% 우태아혈청(Gibco), 1% 스트렙토마이신)을 세포에 처리하였다. 48시간 후 인슐린과 AZ1(0, 0.1, 1, 5, 10 및 25 μM)가 포함된 DMEM(10% 우태아혈청(Gibco), 1% 스트렙토마이신)로 배지를 교체하였다. 48시간 다시 후 AZ1(0, 0.1, 1, 5, 10 및 25 μM)이 포함된 DMEM(10% 우태아혈청(Gibco), 1% 스트렙토마이신)으로 배지를 교체하였다. 48시간 후 분화가 완료 되면 이를 수집하여 유전자 및 단백질 발현 분석에 이용하였다.

[0081] *지방세포 염색 및 지방 축적량 측정*

[0082] 분화가 완료된 3T3-L1 세포의 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 10% 포르말린으로 20분동안 세포를 고정하였다. 포르말린을 제거한 후 증류수로 세척한 다음 플레이트를 건조시켰다. Oil-Red-O(Sigma)를 100% 이소프로판올에 녹여서 100% Oil-Red-O 저장액을 제조한 뒤, 저장액에 증류수를 섞어 60% Oil-Red-O 용액을 제작하여 세포에 처리한 다음 30분 간 반응시켰다. 염색이 완료되면 증류수로 세포를 3회 세척하였다. 이후 세포에 100% 이소프로판올을 처리하여 Oil-Red-O dye를 녹인 후 마이크로플레이트 리더를 이용해 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0084] *유전자 발현 측정*

[0085] 분화가 완료된 3T3-L1 세포에 1ml Easy blue(Intron)를 처리한 후 균질기를 이용하여 분쇄하였다. 200 μl 클로로포름을 넣고 잘 섞어 준 후 3분 동안 반응시킨 뒤 4°C에서 15분 간 13200rpm으로 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액만 새로운 튜브에 옮기고 동량의 아이소프로필 알코올을 넣어서 잘 섞어주었다. 다시 10분 동안 반응시킨 후 4°C에서 10분 동안 13200rpm으로 원심분리를 실시하였다. 상층액을 제거한 후 RNA 펠렛을 70% 에탄올

로 세척하고 4℃에서 5분 동안 13200rpm으로 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 RNA 펠렛을 10분 동안 건조시킨 후 RNAase free water로 RNA 펠렛을 용해시켰다.

[0086] ReverTraAce RT master mix (TOYOBO)를 이용하여 추출한 RNA로부터 cDNA 합성한 후 실시간 PCR 장비(ABI)를 이용해 유전자의 발현 변화를 측정하였다. 사용된 프라이머 세트는 아래 표 1에 정리하였다.

표 1

유전자	방향	프라이머 서열
PPARg	정방향	5' -AGGGCGATCTTGACAGGAAA-3'
	역방향	5' -CGAAACTGGCACCCCTGAAA- 3'
C/EBPa	정방향	5' -GTGACTTTGACTACCCGGGA-3'
	역방향	5' -GGGGCTCTTGTTGATCACC- 3'
FASN	정방향	5' -TGGGTCTAGCCAGCAGAGT-3'
	역방향	5' -ACCACCAGAGACCGTTATGC- 3'

[0089] 단백질 발현 측정

[0090] 분화가 완료된 3T3-L1 세포에 RIPA 완충액(Biosesang)을 넣어 1.5 ml EP-튜브에 수집한 후 세포를 용해시켰다. 세포 용해물을 얼음에서 20분 동안 반응시킨 후 4℃에서 25분 동안 13200rpm으로 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 새로운 EP-튜브로 옮긴 다음 Bradford 시약(Thermo Fisher Scientific)을 이용해 상층액에 포함된 단백질을 정량하였다. 새로운 EP-튜브에 동량의 단백질을 넣어주고 5X SDS 시료 완충액을 넣어 100℃에서 5분 동안 가열하여 웨스턴 블롯팅에 사용할 시료를 만들었다. 단백질 시료를 SDS 폴리아크릴아마이드 겔에 전기영동시킨 후 PVDF 막(Merck)으로 옮겼다. PVDF 막을 5% 탈지유로 1시간 동안 블로킹시킨 후 5% BSA 용액에 1차 항체(Santacruz)를 넣어 막에 부어 4℃에서 0/N 반응시켰다. PBST를 이용해 10분씩 3번 세척한 후 2차 항체(Bethyl)가 포함된 5% 탈지유를 넣어 막을 1시간 동안 반응시켰다. 이 후 PBST로 10분씩 3번 세척하고 ECL 용액(Bio-Rad)에 막을 반응시켜 LAS(Vilber)를 이용해 단백질을 검출하였다.

[0092] 실험결과

[0093] 세포 독성 측정 (WST assay)

[0094] AZ1 화합물을 0, 0.1, 1, 5, 10 및 25 μM로 처리한 세포와 미처리 세포 간 유의한 생존률 차이가 관찰되지 않았다(도 1). 이에 AZ1은 처리된 모든 농도에서 독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

[0096] 지방세포 염색 및 지방축적량 측정

[0097] 3T3-L1 세포에 대한 Oil-Red-O 염색 결과, AZ1을 5 μM 이상 처리한 세포들의 지방세포 분화가 처리하지 않은 세포에 비해 현저하게 감소되어 있는 것을 확인하였다(도 2a). 아울러, 5 μM 이상의 농도에서 AZ1은 농도 의존적으로 지방 축적량을 감소시켰다(도 2b).

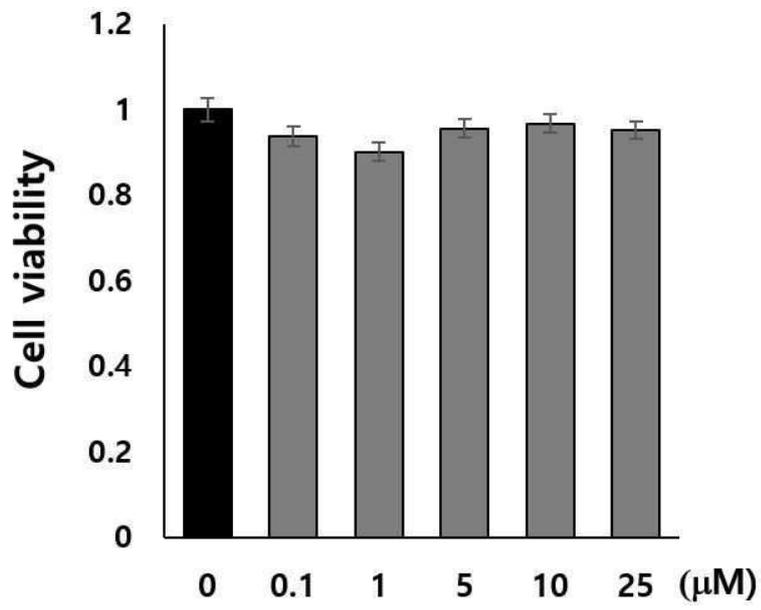
[0099] 유전자 및 발현 측정

[0100] AZ1 미처리 대조군에 비하여, AZ1을 5 μM 이상 처리한 3T3-L1 세포에서 지방세포의 분화 및 지방의 축적에 관련된 인자인 PPARg, C/EBPa, FASN가 단백질 수준(도 3a) 및 mRNA 수준(도 3b)에서 모두 용량 의존적으로 현저하게 감소되어 있음을 확인하였다.

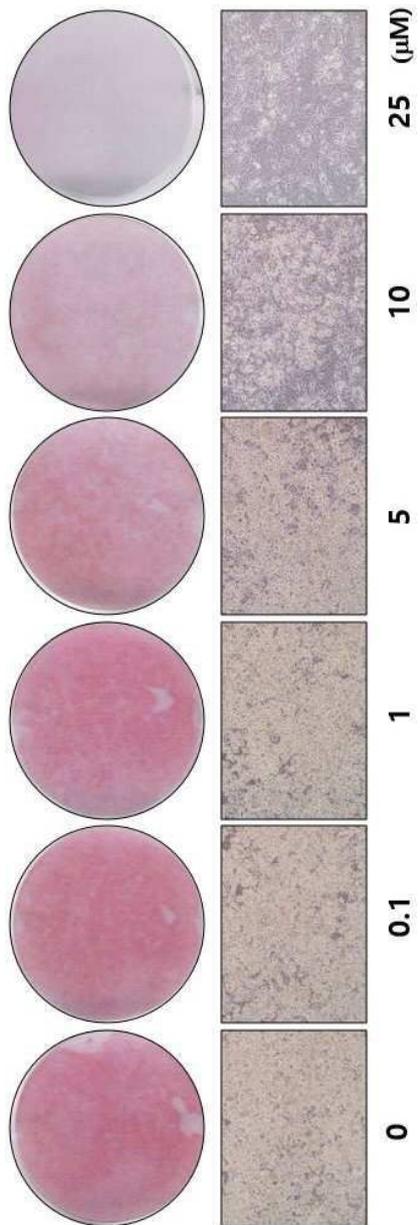
[0102] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

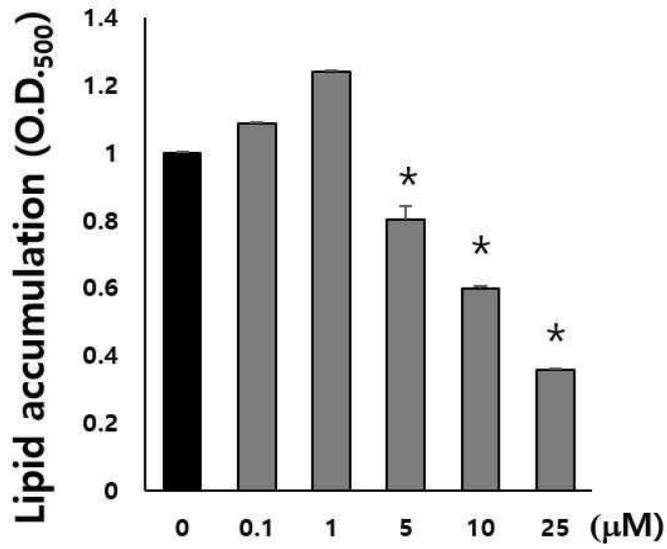
도면1



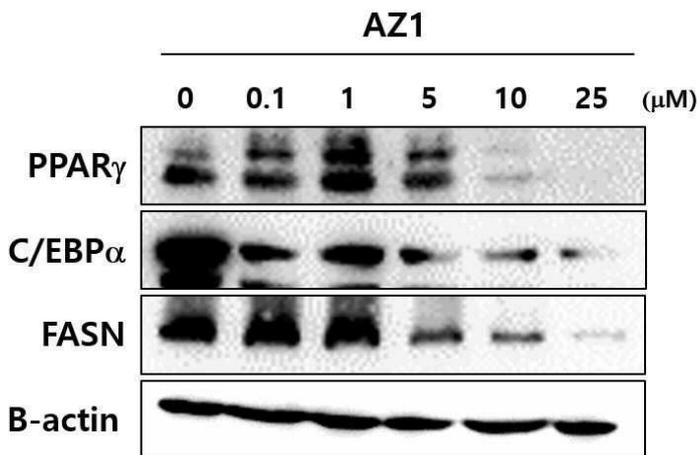
도면2a



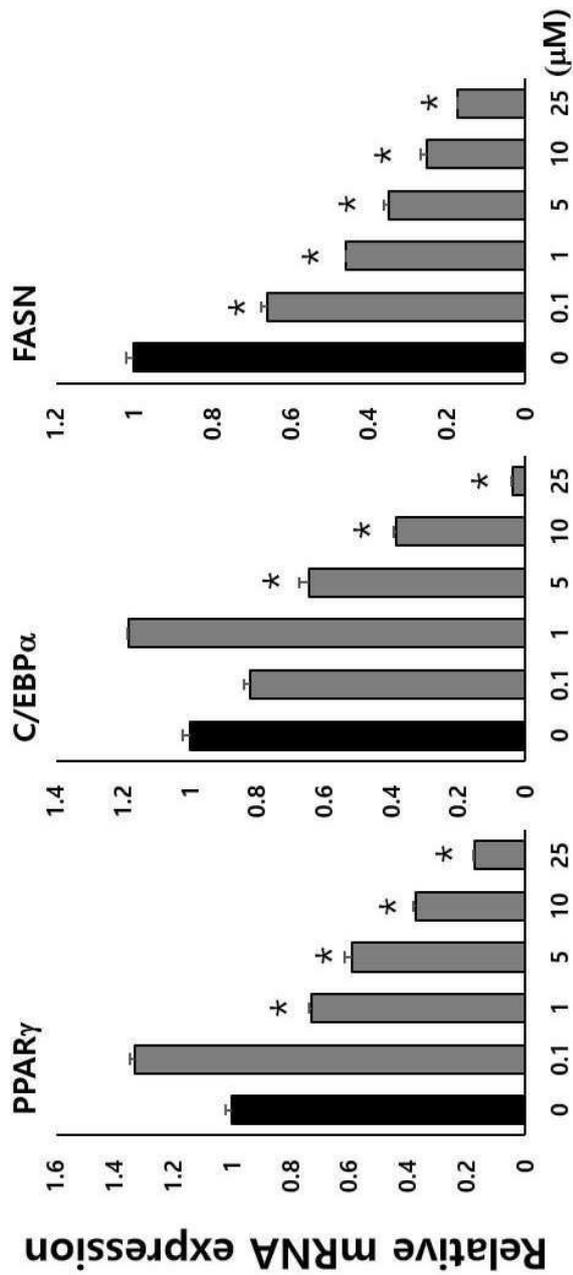
도면2b



도면3a



도면3b



서열목록

- <110> Industry-Academic cooperation foundation Yonsei university
- <120> A Composition for Preventing or Treating Metabolic Disorders
Comprising Benzylaminoethanol Devatives as Active Ingredients
- <130> PDPB214169
- <160> 6
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> PPARg F primer
 <400> 1
 agggcgatct tgacaggaaa 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PPARg R primer
 <400> 2
 cgaaactggc acccttgaaa 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C/EBPa F primer
 <400> 3
 gtgactttga ctacccggga 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C/EBPa R primer
 <400> 4
 ggggctcttg tttgatcacc 20

 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FASN F primer
 <400> 5
 tgggttctag ccagcagagt 20
 <210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FASN R primer

<400> 6

accaccagag accgttatgc

20