



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년11월26일
 (11) 등록번호 10-1465559
 (24) 등록일자 2014년11월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4025 (2006.01) *A61K 31/40* (2006.01)
A61K 31/34 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-0052506
 (22) 출원일자 2012년05월17일
 심사청구일자 2013년03월12일
 (65) 공개번호 10-2013-0128640
 (43) 공개일자 2013년11월27일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR100936278 B1
 HWANGSEO PARK et al, Bull. Korean Chem. Soc.,
 2010, 31, 12, 3785-7

(73) 특허권자
 한국생명공학연구원
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 (72) 발명자
 정대균
 대전광역시 유성구 과학로 125
 윤대성
 대전광역시 유성구 과학로 125
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 이원희

전체 청구항 수 : 총 4 항

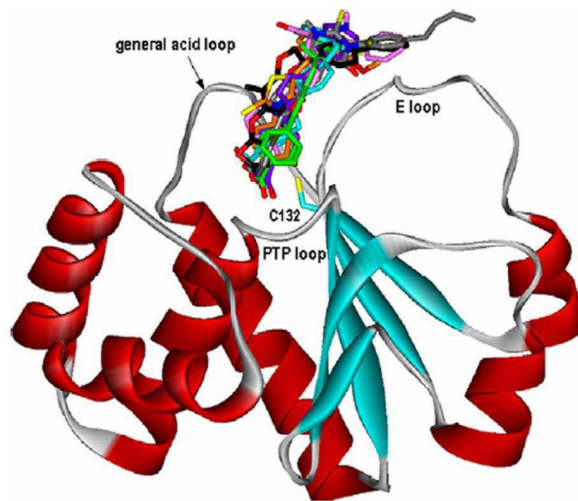
심사관 : 최영희

(54) 발명의 명칭 당뇨병 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물은 PTPMT1(Protein Tyrosine Phosphatase localized to Mitochondrion 1)을 억제하는 우수한 활성을 가져, 당뇨병 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

강성현

대전광역시 유성구 과학로 125

경아영

대전광역시 유성구 과학로 125

김송이

대전광역시 유성구 과학로 125

류성언

서울 성동구 왕십리로 222, 공과대학 생명공학과
(행당동, 한양대학교)

박황서

서울 성동구 고산자로 164, 115동 301호 (행당동,
행당한신아파트)

이승구

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345163818

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단(대전)

연구사업명 원천기술개발사업(글로벌프론티어)

연구과제명 지능형 바이오시스템 구성 고기능 바이오부품/소자 및 분자공학기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

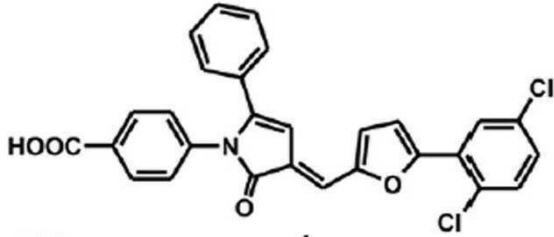
연구기간 2011.09.29 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

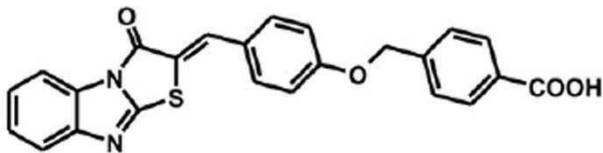
하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 하기 화학식 2로 표시되는 화합물, 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하고, 상기 화합물은 PTPMT1(Protein Tyrosine Phosphatase localized to Mitochondrion 1)을 억제하는 것을 특징으로 하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



; 및

[화학식 2]



청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 당뇨병은 제 2형 당뇨병인 것을 특징으로 하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학적 조성물.

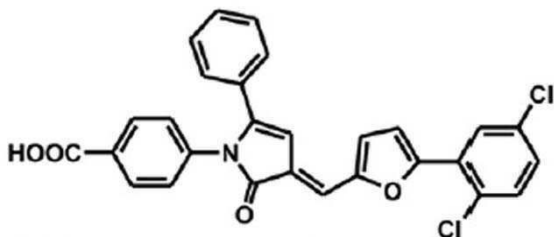
청구항 3

삭제

청구항 4

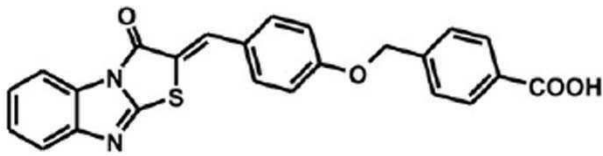
하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 하기 화학식 2로 표시되는 화합물, 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하고, 상기 화합물은 PTPMT1(Protein Tyrosine Phosphatase localized to Mitochondrion 1)을 억제하는 것을 특징으로 하는 당뇨병 예방 및 개선용 건강식품:

[화학식 1]



; 및

[화학식 2]



청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 당뇨병은 제 2형 당뇨병인 것을 특징으로 하는 당뇨병 예방 및 개선용 건강식품.

청구항 6

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 PTPMT1(Protein Tyrosine Phosphatase localized to Mitochondrion 1)을 억제하는 화합물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 당뇨병은 제1형과 제2형으로 구분되는데, 제1형 당뇨병은 '소아당뇨'라고도 불리며, 인슐린을 전혀 생산하지 못하는 것이 원인이 되어 발생하는 질환이다. 인슐린이 상대적으로 부족한 제2형 당뇨병은 인슐린 저항성(insulin resistance; 혈당을 낮추는 인슐린 기능이 떨어져 세포가 포도당을 효과적으로 연소하지 못하는 것)을 특징으로 한다. 제2형 당뇨병은 식생활의 서구화에 따른 고열량, 고지방, 고단백의 식단, 운동 부족, 스트레스 등 환경적인 요인이 크게 작용하는 것으로 보이지만, 이 외에 특정 유전자의 결합에 의해서도 당뇨병이 생길 수 있으며, 췌장 수술, 감염, 약제에 의해서도 생길 수 있다.

[0003] 인슐린 저항성이란 주어진 인슐린 농도하에서 인슐린에 대한 반응이 정상보다 감소되어 있는 상태를 지칭한다. 1960년대 인슐린의 방사선 면역측정법이 개발된 후 혈중 인슐린이 오히려 증가되어 있는 당뇨 환자들이 발견되었으며, 이들 인슐린의 조직반응성이 감소되어 있다는 주장이 제기되었다. 인체에서 인슐린저항성이 증명된 것은 최근 비만환자에 인슐린을 직접 주사한 후, 근육에서의 포도당 흡수를 측정한 결과 정상인에 비해 감소되어 있음을 발견한 것이다. 더불어 제2형 당뇨병에서 말초조직에서의 인슐린에 대한 저항성이 중요 원인이 확실히 되었으며, 또한 고혈압, 고지혈증, 죽상동맥경화증등 심혈관계질환을 일으키는 위험인자의 중심적 병인으로 인슐린저항성이 강조되고 있다. 정상인이 하루에 분비하는 인슐린양이 60 U을 초과할 경우 인슐린저항성이 있다고 보며, 당뇨환자의 경우에는 인슐린요구량이 2 U/kg 이상이면 인슐린저항성으로 간주된다.

[0004] 현행 당뇨병 약물치료법을 보면, 2형 당뇨병의 경우 재평가된 metformin과 thiazolidinedione(TZD)계열의 약물이 상당한 유용성을 보이고 있으나, 인슐린저항성 발생 등 당뇨병의 근본적 원인 치료에는 이르지 못하고 있으며, 여러 부작용 또한 보고되고 있어 인슐린저항성을 획기적/근본적으로 해결할 수 있는 보다 효능이 우수하고 안전한 약물의 개발이 필요하다. 일부 약물이 인슐린 내성을 부분적으로 극복하였으나 효과가 미약한 단점이 있다.

[0005] 단백질 인산화 및 탈인산화는 세포 기능의 여러 단계 가운데 세포에 의한 신호를 유도하기 위하여 활용되는 중요한 메카니즘으로서 널리 알려져 있다. 세포에 의한 신호는 주로 키나제가 관여하는 인산화 및 단백질 포스포

타제가 관여하는 탈인산화 과정을 통해 전달된다. 특히, 상기 탈인산화 과정에 작용하는 단백질 포스파타제는 생체 내에서 이들의 독특한 활성으로 인해 대사, 성장, 증식 및 분화에 포함된 기본적인 세포 신호화 메카니즘의 세포 내 조정 및 조절에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 상기 포스파타제로는 아미노산 티로신으로부터 인산염(phosphate)을 제거하는 Cdc25(Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C)를 비롯하여 그의 PTP1B, Prl-3, LAR, CD45, Yop, PP1, VHR과 같은 단백질 포스파타제가 있다.

[0006] 이하에서 상기 단백질 포스파타제에 종래의 연구 결과를 살펴본다.

[0007] 1. Cdc25

[0008] Cdc25 포스파타제는 단백질 기질의 인산화된 티로신 또는 트레오닌에 모두 작용하기 때문에 이중 특이적 포스파타제(dual specific phosphatase)에 속한다. 상기 Cdc25 포스파타제는 세포 분열 주기에(cell division cycle)에 관여하는 싸이클린 의존성 키나제(cyclin dependent kinase, CDK)의 티로신과 트레오닌(threonine) 잔기로부터 저해적 인산염(inhibitory phosphate)을 제거함으로써 CDK 활성에 관여한다. CDK가 활성화되면 세포 주기에서 MPF(M기 촉진 인자)가 활성화되어 M기의 유사분열 활성(mitotic activity)이 증가하여 결과적으로 세포 증식이 일어난다. 따라서, 상기 Cdc25 포스파타제의 활성을 억제하면 결과적으로 세포 분열을 저해하여 세포 증식을 막을 수 있다. Cdc25는 사람 세포에서는 Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C의 세 종류가 있는 것으로 보고되어 있다. 이들 중 Cdc25A 또는 Cdc25B가 암세포, 예를 들면 유방암, 직장암, 비호지킨 임파종(non-Hodgkin's lymphoma), 전립선암, 췌장 관세포암(pancreatic ductal adenocarcinoma), 폐암 등의 암세포에서 높게 발현되며, 최근 연구에는 Cdc25A가 민감한 골수 백혈병 세포(myeloid leukaemia cell)의 유착-의존 증식(adhesion-dependent proliferation)에도 포함된다고 알려져 있어 발암과정에 관여한다고 추정된다. 그러므로, Cdc25 억제제는 M기 정체(M phase arrest)를 유도하여 유망한 항암제 개발 목표가 될 수 있는 바, 여러 연구를 통하여 이에 대한 억제제 연구가 진행되고 있다[Otani, T. et al., *J. of Antibiotics* 2000, 53, 337; Lazo, J. S. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000, 8, 1451].

[0009] 2. PTP1B

[0010] PTP1B는 여러가지 단백질 포스파타제 가운데 처음으로 정제되고 특성이 확인된 세포 내 단백질 포스파타제로서, 사람의 태반에서 단리된 ~50 Kda의 분자량을 가지며, 이후 클로닝되었다.

[0011] PTP1B는 여러 가지 인간 세포에 풍부하게 존재하고 있다. 특히, PTP1B는 인슐린의 신호 전달 과정에 있어서 인슐린 수용체(IR)의 인산화 및 인슐린 수용체 기질(IRS-1)의 인산화를 억제하는 작용을 한다. Kennedy와 Ramachandran은 PTP1B 유전자를 녹아웃(knock-out)시킨 쥐를 이용한 생화학적 실험을 통하여(*Science* 1999, 283, 1544) 인슐린의 감도(sensitivity)가 증가하고, 상기 쥐에 인슐린을 처리할 경우 간 및 근육 세포에서 인슐린 수용체 단백질의 인산화가 증가하는 것을 발견하여 이를 증명하였다. 제2형 당뇨병은 인슐린 비의존성 당뇨병으로서, 인슐린을 분비하는 췌장에서는 정상적으로 인슐린을 분비하지만, 인슐린이 작용하는 장기(근육, 간, 지방세포 등)에서 인슐린에 대한 저항성이 생겨 인슐린이 제 기능을 발휘하지 못하여 생기는 당뇨병인데, 인슐린 수용체(IR)의 탈인산화는 인슐린 내성(resistance)에 직접적인 관계가 있고, 이는 제2형 당뇨병에 관여함을 확인하였다. 따라서, PTP1B 저해제는 인슐린 수용체의 탈인산화 과정에서 작용을 하는 바, 잠재적으로는 인슐린 내성을 극복하고, 혈당의 당과 인슐린을 저혈당을 유발함이 없이 정상화시킬 수 있기 때문에, 제2형 당뇨병 치료제로써 유용할 것으로 기대되어 이 분야에 대한 연구가 매우 광범위하게 이루어지고 있다.

[0012] 3. CD45

[0013] 세포가 정상적으로 자라서 세포를 만들기 위해서는 매우 정교한 신호들 간의 균형이 필요하다. 그러나, 이러한 균형이 깨져 활성화 신호만 남게 되면 세포들은 견잡을 수 없이 자라서 질병을 일으키게 된다. CD45는 바로 이러한 신호를 멈추는 역할을 하고 있다. CD45는 막에 위치한 PTPase(Protein Tyrosine Phosphatase)의 일종으로 T 세포나 B 세포의 신호전달에 관련된 것으로 알려져 있었다. 생쥐에서 CD45 단백질을 제거하자 사이토카인과 인터페론에 의해 야누스 키나제(Janus kinase; JAK)와 STAT(signal transducer and activators of transcription)가 활성화되었으며, 이로부터 CD45가 야누스 키나제를 억제함으로써 사이토카인의 신호를 억제한다는 사실이 알려졌다.

[0014] 4. LAR

[0015] PTPase 계열의 LAR은 원상태의 세포에서 인슐린 수용체의 생리적 조절에 기여할 것으로 생각되었다. 그들은 LAR가 세포질성 도메인뿐만 아니라 재조합 PTP1B를 사용하여 정제된 IR의 탈인산화/비활성화 속도를 비교함으로써 위의 결론에 도달하였다. 쥐의 간중양 셀라인의 인슐린 신호화에 미치는 LAR의 효과를 연구하기 위하여 안

티센스 억제제가 최근에 사용되었다. LAR 단백질 수준을 약 60 % 억제하고 인슐린에 의한 자가 인산화를 대략 150 % 증가시키는 것이 병행되었다. 그러나, 인슐린 수용체 티로신 키나제(insulin receptor tyrosine kinase, IRTK) 활성화에서 단지 중간 정도인 35 %만의 증가가 관찰된 반면, 인슐린-의존성 포스포티딜이노시톨 3-키나제(phosphatidyl inositol 3-kinase, PI 3-키나제) 활성화는 350 %나 증가되었다. 상기 저자들은 LAR이 인슐린 수용체 자체 또는 다음에 일어나는 기질상에서의 PI 3-키나제 활성화에 결정적인 티로신 잔기들을 특이적으로 탈인산화시킬 수 있다고 예측하였다. 따라서, LAR 억제제는 비만(Obesity), 손상된 글루코오스 내성(glucose intolerance), 당뇨병(diabetes mellitus), 고혈압(hypertension) 또는 혈관의 부분적 허혈(ischemic disease)의 치료제로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대되었다. 그러나, 이러한 많은 연구 결과에도 불구하고 여전히 임상과정까지 진행된 물질이 존재하지 않아 새로운 물질의 개발이 시급한 실정이다.

[0016] 5. VHR

[0017] 이중 특이적 포스포타제인 VHR은 미토겐 활성화 단백질 키나제(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 계열의 키나제인 세포 외 신호 수용체 키나제(extracellular signal receptor kinase 1, ERK1)과 ERK2를 세포 외에서 조절함으로써 미토겐 시그널링(mitogenic signaling)을 조절한다. VHR은 세포 주기를 조절하고 있기 때문에 이의 억제제는 상술한 Cdc25 억제제와 마찬가지로 항암제 등에 이용할 수 있다(Osada, H. et al., *FEBS Letters* 1995, 372, 54).

[0018] 6. Pr1-3

[0019] 지금까지 결장암에서 나타나는 유전자 수준의 변화는 주로 종양 억제 유전자(tumor suppressor) 단백질들의 불활성화이었으나, 이들은 저분자 물질들에 의한 신약 표적으로 삼기에는 문제가 있었다. 최근 연구보고(Saha et al., *Science* 2001, 294, 1343)에서 Pr1-3이라는 새로운 포스포타제가 여러 가지 결장암 세포의 전이에서 공통적으로 과발현되어 있음이 밝혀졌다. Pr1-3의 활성화는 결장암 전이에서 필수적인 것으로 보이므로, Pr1-3의 효과적인 저해제 개발은 전이 단계의 결장암을 치료하는데 새로운 전기를 마련할 수 있는 중요한 신약표적이 될 수 있다.

[0020] 7. PTPMT1

[0021] 이중 특이성 단백질 티로신 포스포타제(dual-specificity protein tyrosine phosphatases)(DUSPs)는 다양한 단백질 기질에서 포스포티로신 잔기(phosphotyrosine residues) 뿐만 아니라 포스포세린 및 포스포트레오닌의 탈인산화 반응을 촉진하는 특유의 효소 활성을 가진다. DUSPs는 암, 당뇨병, 면역 결핍을 포함한 다양한 질병에 있어서 비정상적으로 조절되는 중요한 신호전달 경로의 주요 조절자 중의 하나이다. 미토콘드리아 1에 국소화된 단백질 티로신 포스포타제(PTPMT1)는 DUSP에 속하고, PTEN(phosphatase and tensin homologues deleted on chromosome 10)의 촉매적 모티프(motif)의 서열에 기초하여 새로운 DUSPs를 스크리닝하던 중 발견되었다. 또한 PTPMT1은 췌장섬(pancreatic islets)에서 동정되었고 미토콘드리아 매트릭스를 대면하고 있는 내부 막에 존재하는 것으로 알려져 있다. PTPMT1 발현의 낙다운(Knockdown)은 세포의 ATP 수준 및 생체 내의 단독 인슐린 생산 세포(베타 세포)에서의 인슐린 분비를 실질적으로 증가시켰고, 이것은 PTPMT1은 당뇨병의 치료에 잠재적인 타겟이 될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0022] 최근에, 마우스 PTPMT1의 엑스-레이 크리스탈 구조(X-ray crystal structure)가 휴식 상태 및 기질 유사체로 작용하는 포스포티딜이노시톨 5-포스페이트(phosphatidylinositol 5-phosphate)와의 결합 상태에서 보고되었다. 인간 PTPMT1의 3차원 구조 또한 기질 포스페이트 그룹에 대한 효과적인 대리(surrogate)로 활성화 자리에서 설페이트 이온 결합과의 복합체에서 보고되었다. PTPMT1 및 작은 분자 리간드 상호작용의 본질에 대한 더 많은 구조적 정보의 존재는 항당뇨병 약물로 개발될 수 있는 잠재적 억제제를 디자인하는 일을 수월하게 한다. 그럼에도 PTPMT1 억제제의 개발은 약학적, 구조적 연구에 뒤쳐져 있다. PTPMT1의 억제제로 현재까지 알려진 것은 디비구아나이드(dibiguanide) 그룹이 유일하다. 이러한 억제제들을 분리된 랫드의 췌장섬에 처치한 결과 용량 의존적 양상으로 인슐린 분비가 증가하였고, 이것은 항당뇨병 약물의 개발에 있어서 PTPMT1이 유망한 타겟이 되어야 한다는 것을 확인시켜준다. PTPMT1의 억제에 있어서, 효력 및 선택성에도 불구하고 이들 분자 구조의 양전하 및 긴 알킬 사슬의 존재 때문에 이러한 억제제들을 임상에 적용하는데에는 어려움이 있다.

[0023] 이에 본 발명자들은 PTPMT1(Protein Tyrosine Phosphatase localized to Mitochondrion 1) 도킹 모의 실험(docking simulations)를 이용한 가상검색(virtual screening) 및 인 비트로(in vitro) 효소 검정을 이용하여 구조에 기초한 약물 디자인 프로토콜의 방법으로 PTPMT1 및 추정되는 리간드 간의 결합 자유 에너지를 계산하는

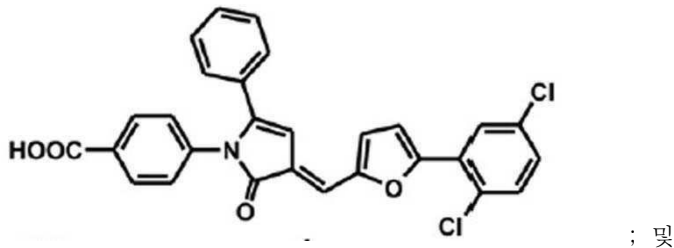
데 있어서 정확한 용매 모델(solvation model)을 수행하여 높은 효소 검정 적중률의 효과를 가지는 PTPMT1 억제제의 새로운 균을 동정하여 본 발명을 완성하였다. 본 발명에 따른 PTPMT1의 억제제는 기존 당뇨병 치료제의 인슐린 저항성을 극복할 수 있어 당뇨병 치료제로 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 내용

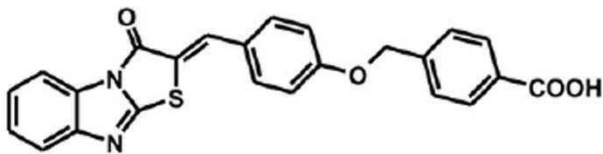
해결하려는 과제

[0024] 본 발명의 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 하기 화학식 2로 표시되는 화합물, 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다:

[화학식 1]



[화학식 2]

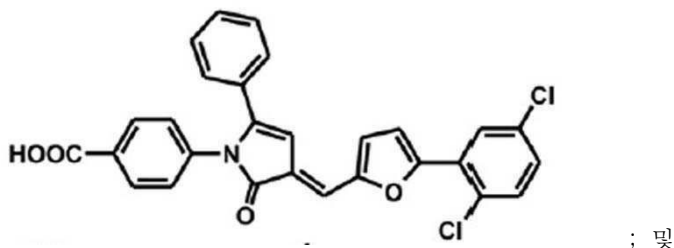


[0025] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 및 개선용 건강식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

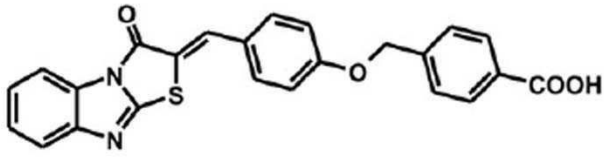
[0026] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 하기 화학식 2로 표시되는 화합물, 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[0027] [화학식 1]



[0028] [화학식 2]

[0029] [화학식 2]



[0030]

[0031] 또한 본 발명은 상기 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0032]

본 발명의 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물은 PTPMT1(Protein Tyrosine Phosphatase localized to Mitochondrion 1) 효소 검정에서 PTPMT1을 현저히 억제하는 효과를 가져 당뇨병에서 과발현되는 PTPMT1을 효과적으로 억제하고, 인슐린분비를 증가시켜 당뇨병 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033]

도 1은 PTPMT1(Protein Tyrosine Phosphatase localized to Mitochondrion 1) 억제제 결합모드의 비교 도이다; 화학식 1은 초록색이고 화학식 2는 청록색이다.

도 2는 PTPMT1 활성 자리에서의 화학식 1의 계산된 결합 모드를 나타내는 도이다; 단백질의 탄소 원자는 청록색으로 나타내었고, 리간드의 탄소 원자는 초록색으로 나타내었으며, 각 점선은 수소결합을 나타낸다.

도 3은 PTPMT1 활성 자리에서의 화학식 2의 계산된 결합 모드를 나타내는 도이다; 단백질의 탄소 원자는 청록색으로 나타내었고, 리간드의 탄소 원자는 초록색으로 나타내었으며, 각 점선은 수소결합을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

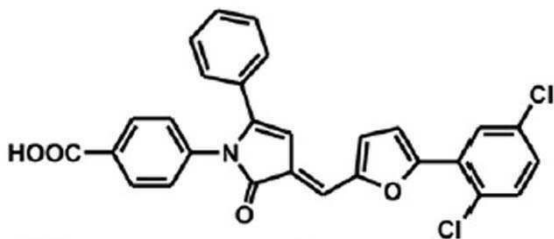
[0034]

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0035]

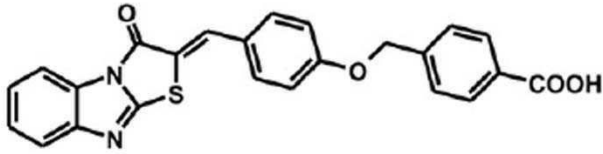
본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 하기 화학식 2로 표시되는 화합물, 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

화학식 1



[0036]

화학식 2

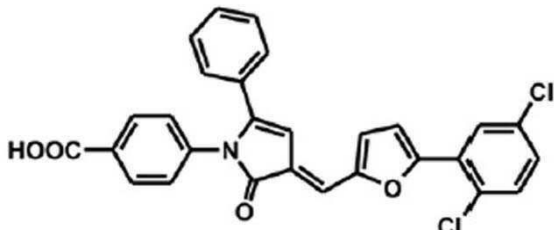


- [0037]
- [0038] 본 발명에 따른 상기 화합물은 유기합성 분야에서 당업자에게 알려진 방법을 통해 제조하거나, 상업적으로 판매되는 것을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0039] PTPMT1은 미토콘드리아 1에 국소화된 단백질 티로신 포스파타제(PTPMT1)로 DUSP에 속하고, PTEN(phosphatase and tensin homologues deleted on chromosome 10)의 촉매적 모티프(motif)의 서열에 기초하여 새로운 DUSPs를 스크리닝하던 중 발견되었다. 또한 PTPMT1은 췌장섬(pancreatic islets)에서 동정되었고 미토콘드리아 매트릭스를 대면하고 있는 내부 막에 존재하는 것으로 알려져 있다. PTPMT1 발현의 낙다운(Knockdown)은 세포의 ATP 수준 및 생체 내의 단독 인슐린 생산 세포(베타 세포)에서의 인슐린 분비를 실질적으로 증가시켰다.
- [0040] 또한 제 2형 당뇨병에서의 인슐린 저항성이 일어나는 주요 장소인 골격근에서 PTPMT1 mRNA이 발현되기 때문에, PTPMT1을 억제함으로써, 인슐린 저항성을 극복할 수 있다. 인슐린 저항성을 나타내는 환자에서는 감소된 산화적 인산화가 일어나며, 이것은 근세포내 지질의 축적을 의미한다. 그러므로, PTPMT1을 억제하면 ATP의 생산을 증가시켜 증가된 기질 활용이 일어나고, 이것은 근세포내 지질의 축적을 감소시킬뿐만 아니라, 인슐린 저항성을 극복할 수 있다. 따라서, 본 발명의 PTPMT1을 억제하는 화합물은 제 2형 당뇨병에서의 인슐린 저항성을 극복할 수 있다.
- [0041] PTPMT1 억제제들을 분리된 랫드의 췌장섬에 처치한 결과 용량 의존적 양상으로 인슐린 분비가 증가하였고, 따라서 PTPMT1 억제 화합물은 당뇨병의 예방 및 치료용 약학적 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명에 따른 상기 화합물들은 PTPMT1 효소 검정에서 70%이상 PTPMT1의 촉매적 활성을 억제하였고, IC₅₀도 현저하게 낮은 값을 나타내어 PTPMT1을 유의적으로 억제함을 알 수 있었다(표 1참조).
- [0043] 또한 본 발명의 일실시예에 있어서, 이러한 PTPMT1 억제 화합물은 구조적으로 다양하고 약물 물질로 좋은 물리 화학적 성질을 가지는 것으로 밝혀졌다.
- [0044] 따라서 본 발명에 따른 화합물은 PTPMT1을 유의적으로 억제하여, 인슐린 분비를 증가시킬 수 있으므로 당뇨병 예방 및 치료에 유용하게 이용될 수 있으며, 상기 당뇨병은 바람직하게는 제 2형 당뇨병이다.
- [0045] 본 발명은 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물뿐만 아니라, 이의 약학적으로 허용되는 염, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 라세미체, 또는 입체이성질체를 모두 포함한다.
- [0046] 본 발명의 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설포산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에

이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만텔레이트를 포함한다.

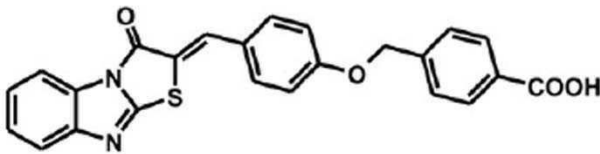
- [0047] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 화학식 1의 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다.
- [0048] 동량의 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물 및 산 수용액 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조하거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.
- [0049] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비 용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다.
- [0050] 상기 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 조성물을 0.1 내지 50 중량%로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0051] 본 발명의 약학적 조성물은 약제의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0052] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화 하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0053] 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 본 발명의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘(calcium carbonate), 슈크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여법이라면 어느 것이나 사용 가능하고, 전신 투여 또는 국소 투여가 가능하나, 전신 투여가 더 바람직하며, 정맥 내 투여가 가장 바람직하다.
- [0055] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물은 1일 0.0001 내지 0.03 g/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 8 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 하기 화학식 2로 표시되는 화합물, 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다:

[0057] [화학식 1]



[0058] ; 및

[0059] [화학식 2]



[0060]

[0061] 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 본 발명의 화합물은 시험관 내 실험(in vitro) 실험에서 PTPMT1을 유의적으로 억제시키므로 채장 내 베타 섬에서 인슐린 분비를 증가시켜 당뇨병 예방 및 개선용 건강식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0062] 본 발명에 따른 화합물은 당뇨병 예방 및 개선 목적으로, 상기 화합물을 식품, 음료 등의 건강보조 식품에 첨가할 수 있다.

[0063] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0064] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0065] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0066] 상기 외에 본 발명의 화합물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 화합물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수

있다.

[0067] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 화합물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0068] 이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.

[0069] 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 설명하는 것일 뿐, 이에 한정되지 않는다.

[0070] <실시예 1> PTPMT1(Protein Tyrosine Phosphatase localized to Mitochondrion 1)에 대한 도킹 모의 실험을 이용한 가상 검색

[0071] 본 발명자들은 약 477,000개의 합성 및 천연 화합물을 포함하는 인터바이오스크린(Interbioscreen)(<http://www.ibscreen.com>)에 의해 분배된 화학 데이터베이스의 가장 최근 버전으로 24만 화합물을 포함하는 PTPMT1(Protein Tyrosine Phosphatase localized to Mitochondrion 1)에 대한 도킹 라이브러리(docking library)를 건설하였다. 기질 유사체인 설페이트 이온과 함께 복합체를 형성하는 인간 PTPMT1의 엑스레이 크리스탈 구조에서의 3차원 원자 좌표를 도킹 모의 실험 가상검색에서의 수용체 모델로 선택하였다. 용매 분자를 제거한 후에, 수소 원자를 각 단백질 원자에 첨가하였다. PTPMT1의 원래 엑스레이 구조에서의 이온화될 수 있는 Asp, Glu, His 및 LYS 잔기의 양성자 첨가 상태에 주목하였다. 만약 Asp 및 Glu 잔기의 결사슬의 카복실레이트 산소 중의 하나가 뼈대 아미노카보닐 산소(backbone aminocarbonyl oxygen)를 포함한 수소 결합 수용 작용기를 향하여 일반적으로 수용되는 중등도 강도의 수소 결합에서의 제한 거리인 3.5 Å 거리 이내로 가리키고 있다면 Asp 및 Glu 잔기의 옆 사슬은 중성으로 가정되었다. 비슷하게, NZ 원자가 수소 결합 주는기(hydrogen-bond donating group)에 근접하여 있지 않다면, 라이신 결사슬은 양성자 첨가된 것으로 가정되었다. 또한 His 잔기에서의 ND 및 NE 원자의 양성자 첨가 상태를 결정하기 위해 똑같은 과정을 적용하였다.

[0072] 도킹 모의 실험으로 가상 검색하기 전에, 잠재적 약물 후보물질의 물리화학적 성질을 가진 화합물만을 선정하기 위해 리핀스키의 '5의 법칙'(Lipinski's 'Rule of Five')에 기초하여 여과하였다. 알데하이드(aldehyde), 산성 할라이드(acid halide) 및 비고리형 이원자-이원자 결합과 같은 반응성 화학 작용기를 포함한 화합물을 또한 배제하였는데 그 이유는 효소 검정에서 의양성을 보일 수 있기 때문이다. 도킹 라이브러리에 포함되어 있는 모든 화합물들을 그 이후에 3차원 원자 좌표를 생성하기 위해 CORINA 프로그램에 적용하였고, 그 이후에 가스테인-마실리(Gasteiger-Marsilli) 원자 전하를 배정하였다. 다른 PTPMT1 억제제에 대한 점수 기능(scoring function)의 수행이 더 좋다는 것이 몇몇 타겟 단백질에서 밝혀졌기 때문에 본 발명자들은 PTPMT1 억제제의 가상 스크리닝에서의 오토도크 프로그램(AutoDock program)을 이용하였다. 오토도크 프로그램에 수행된 반데르발스 상호작용 및 리간드의 내부 에너지에 대한 계산을 위해 AMBER 포스 필드(AMBER force field) 파라미터를 이용하였다. 계산된 결합 친화도에 따라서 도킹 라이브러리의 화합물에 점수 및 순위를 매기기 위해 PTPMT1의 활성 자리에서 오토도크를 이용한 도킹 모의 실험을 수행하였다.

[0073] 도킹 라이브러리의 화합물의 실제적인 도킹 모의 실험에 있어서, 본 발명자들은 화합물에 대한 새로운 용매 모델을 도입하여 형성된 새로운 실증적인 오토도크 점수 기능을 이용하였다. 수정된 점수 기능은 하기 수학적 식 1로 기재된다.

[0074] [수학적 식 1]

$$\Delta G_{bind}^{aq} = W_{vdw} \sum_i \sum_j \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{hbond} \sum_i \sum_j E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{elec} \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + W_{tor} N_{tor} + W_{sol} \sum_i S_i \left(Occ_i^{max} - \sum_{j>i} V_j e^{-\frac{r_{ij}^2}{2\sigma^2}} \right)$$

[0076] 여기에서 W_{vdw} , W_{hbond} , W_{elec} , W_{tor} 및 W_{sol} 은 각각 억제제의 반데르발스, 수소 결합, 정전기적 상호작용, 비틀림 용어(torsional term) 및 탈용매 에너지의 무게 요소(weighting factors)이다. r_{ij} 는 상호작용 거리를

나타내고, A_{ij} , B_{ij} , C_{ij} 및 D_{ij} 는 두 원자 사이에 평형 분리 및 잠재적 에너지 웰(potential energy well)의 깊이와 연관되어 있다. 수소결합 용어는 부가적인 무게 요소인 $E(t)$ 를 가지고, 각-의존성 방향성을 나타낸다. PTPMT1 및 리간드 분자 간의 정전기적 상호작용을 계산하는데 요구되는 유전체 상수(dielectric constant)를 얻기 위해 3차 방정식 접근법을 적용하였다. 엔트로피 용어에 있어서, N_{tor} 는 리간드에서의 회전가능한 결합의 수를 나타낸다. 탈용매 용어에서 S_i 및 V_i 는 각각 용매 파라미터 및 원자 i 의 부분 용적이며, Occ_i^{max} 는 최대 원자 사용을 나타낸다. 분자 용매 자유 에너지를 계산하는데 있어서, 본 발명자들은 Kang et al에 의해 개발된 원자 파라미터를 이용하였는데 그 이유는 탄소를 제외한 원자는 오토도크의 최신버전에서 사용할 수 없기 때문이다. 이러한 용매 자유 에너지 용어의 변형은 가상 검색에서의 정확도를 증가시키는데 왜냐하면 리간드 용매의 과소 평가는 종종 많은 극성 원자에서 리간드의 결합친화도를 과대평가하게 만들기 때문이다.

[0077] 그 결과, 도킹 모의실험을 이용한 가상 검색이 수행된 24만 개의 화합물 중에서, 200개의 가장 점수가 높은 화합물을 가장 적중률에 따라 선택하였다.

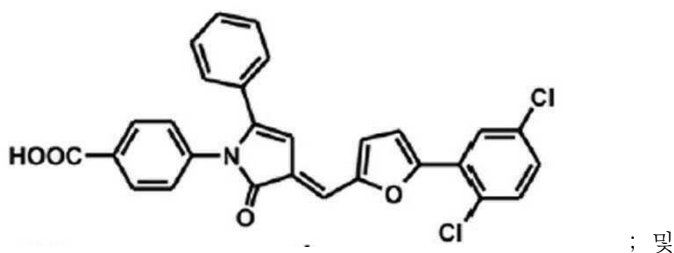
[0078] <실시예 2> 가상 검색을 통해 선별된 화합물의 효소 검정

[0079] 도킹 모의실험을 이용한 가상 검색이 수행된 24만 개의 화합물 중에서, 200개의 가장 점수가 높은 화합물을 가장 적중률에 따라 선택하였다. 이 중 191개를 화합물 공급처로부터 얻었고 50 μ M의 농도에서 PTPMT1에 대한 시험을 하였다.

[0080] 인간 PTPMT1(PTPMT1-CD, 잔기 31-190)의 촉매적 도메인을 pET28a에 서브클론하였고, 대장균 BL21(DE3) 균주를 이용하여 과발현시켰다. 세포를 0.1mM IPTG와 함께 16시간 동안 유도 후 291K에서 성장시켰다. His 태그된 PTPMT1-CD는 니켈-어피니티 크로마토그래피(nickel-affinity chromatography)로 정제되었고 20mM Tris-HCL(pH 7.0), 0.2M NaCl, 5% glycerol 및 2mM DTT를 포함하는 버퍼에 대하여 투석하였다. 상기 가상 검색을 통해 선별된 191개의 화합물의 재조합 인간 PTPMT1에 대한 인비트로(in vitro) 억제 활성을 평가하였다. 효소 검정 동안 작은 분자 응집체에 의한 임의적인 억제가 생길 수 있다. 그러므로 상기 가상 검색을 통해 선별된 191개의 화합물 중에서 분광광도계 분석을 통해서 5% DMSO 용액에서 응집체를 형성하지 않는 것을 더 스크리닝하였다. 6개의 화합물이 효소 억제 검정에서 제외되었는데 왜냐하면 이 화합물들은 5% DMSO 용액에서 응집체를 형성하였기 때문이다. 남은 185개의 화합물은 매우 수용성인 것으로 밝혀졌기 때문에 효소 억제 검정에서 PTPMT1의 촉매적 활성에 대한 작은 분자 응집체의 효과가 유의적이지 않을 것으로 보인다.

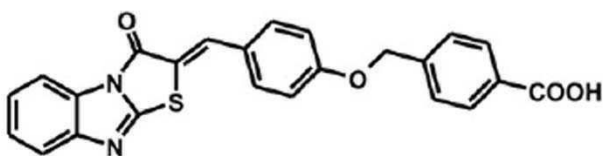
[0081] 그 결과, 본 발명자들은 50 μ M의 농도에서 70%이상 PTPMT1의 촉매적 활성을 억제하는 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 2개의 화합물을 동정하였다:

[0082] [화학식 1]



[0083]

[0084] [화학식 2]



[0085]

[0086] <실험예 1> 화합물의 IC₅₀ 값 분석

[0087] 본 발명자들은 Doughty-Shenton et al. 에 의해 제안된 형광분광광도계를 이용한 OMFP(3-O-methylfluorescein phosphate)의 가수분해 정도를 관찰함으로써 효소 검정을 수행하였다. 정제된 PTPMT1-CD(100 nM), OMFP(25 μM) 및 억제 후보물질을 50mM Tris-HCL(pH 7.0), 0.1M NaCl, 5% 글리세롤 및 5mM DTT가 포함되어 있는 반응성 혼합물에 15분 동안 배양하였다. 이러한 효소적 반응은 소듐 히드록사이드(0.2M)의 첨가와 함께 중지하였다. 그 이후에 기질의 가수분해에 의해서 변화하는 흡광도를 535nm에서 측정함으로써 포스파타제의 활성을 확인하였다. 억제제의 IC₅₀ 값은 직접적인 회귀 곡선 분석(direct regression curve analysis)으로부터 결정되었다.

[0088] 그 결과, 본 발명자들은 상기 2개 화합물들의 IC₅₀ 값을 결정하였다. 새롭게 동정된 억제제들의 억제 활성을 표 1에 나타내었다. 상기 PTPMT1 억제 화합물들은 분자 구조의 끝에 벤조산 작용기를 공유하였다. 말단 카복실레이트 모이어티(carboxylate moiety)는 음전하를 가지는 기질 포스페이트에 대한 대리 역할을 하는 것으로 보인다. 현재까지 화합물 1 또는 2는 포스파타제 억제제로 알려지지 않았다. 표 1에서 알 수 있듯이 14개 억제제는 IC₅₀ 값이 0.7 내지 17.3 μM의 범위를 가지고 PTPMT1에 대한 강력한 효력을 보였다. 이러한 억제제는 구조적으로 다양하고 약물 후보물질로 좋은 물리화학적 성질을 가지는 것으로 밝혀졌기 때문에, 항당뇨병 약으로 사용될 수 있다.

표 1

[0089] 화학식 1 및 화학식 2의 PTPMT1에 대한 IC₅₀ 값

화합물	IC ₅₀
화학식 1	0.7±0.0
화학식 2	2.8±0.1

[0090] <실험예 2> PTPMT1 억제제의 억제 메커니즘에 대한 구조적 정보

[0091] 동정된 PTPMT1(Protein Tyrosine Phosphatase localized to Mitochondrion 1) 억제제의 억제 메커니즘에 대한 구조적 정보를 얻기 위해, 활성형 자리에서의 결합 모드를 비교 방법(comparative fashion)으로 조사하였다. 도 1은 변형된 오토도크 프로그램으로 계산된 PTPMT1의 활성 자리 틈에서 화학식 1 또는 2의 가장 낮은 에너지 구조를 보여준다. 이러한 도킹 모의실험의 결과는 비슷한 화학적 성질의 작용기가 단백질 그룹과의 비교적인 상호작용과 비슷한 방법으로 놓아졌다는 점에서 일관성이 있다. 이들의 도킹된 구조의 중첩에서 나타났듯이 예를 들면, 억제제의 카르복실레이트기는 활성 자리 위에 두 개의 루프 구조(loop structure)(일반적 산 및 E 루프) 사이에 존재하는 수소성 그룹과 함께 촉매적 시스테인 잔기(cystein residue)(Cys132)를 향하여 가리키고 있다. 가장 좋은 점수의 구조에서 억제제 카르복실레이트기의 Cys132에 대한 근접성은 기질 포스페이트 그룹에 대한 대리로서의 PTPMT1의 억제에서의 그들의 필요성을 나타낸다. 동정된 억제제에 의한 PTPMT1의 알로스테릭(allosteric) 억제의 가능성을 진단하기 위해서 도킹 모의실험을 수용체 모델에 대한 좌표 맵을 가지고 수행하였는데 이것은 PTPMT1의 촉매적 도메인의 모든 부분을 포함한다. 그러나 억제제가 활성 자리 밖에 존재하는 결합 배열은 어떠한 새로운 억제제에서도 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 억제제가 활성 자리에 대한 특이적인 결합을 통해 PTPMT1의 촉매적 활성을 손상시켰다는 것을 지지한다.

[0092] 본 발명자들은 또한 활성 자리에서의 각 억제제의 안정화에 관련된 자세한 상호작용을 확인하였다. PTPMT1의 활성자리에서의 화학식 1의 계산된 결합 모델을 도 2에 나타내었다. 억제제는 각각 PTP, 일반적 산 및 E 루프에 속하는 Cys132-Arg138, Asp101-Met 102 및 Arg78-Phe79와 가깝게 접촉하는 것으로 나타났다. 화학식 1의 카르복실레이트 산소 중 하나는 두 갈래로 갈라진 형태의 결사슬 구아니디늄 이온(guanidinium ion) 및 Arg138의 뼈대 아마이드 그룹과 함께 두 개의 수소 결합을 형성한다. 다른 카르복실레이트 산소는 또한 Ser137의 뼈대 아마이드 그룹과 함께 수소결합을 하여 안정화된다. 억제제의 카르복실레이트 탄소가 3.5Å의 관련된 원자내 거리로 Cys132의 결가지 티올레이트 그룹과 근접해 존재한다. Cys132에 대한 근접성 및 복수의 수소결합 형성으로 판단해 보건데, 카르복실레이트 모이어티는 기질 포스페이트 그룹에 효과적인 대리인 것으로 보인다. 또한

안정적인 수소 결합은 화학식 1의 푸란 고리에 있는 산소 원자 및 Lys133의 암모니아 그룹의 곁가지 사이에 형성된다. 화학식 1은 Phe79, Met102, Ala134 및 Tyr168의 곁가지와 함께 비극성 그룹의 소수성 상호작용에 의해 활성자리에서 더 안정화 될 수 있다. 도킹 모의실험에서 유래한 전체적인 구조적 특성은 화학식 1의 서브마이크로몰라(submicromolar) 억제 활성이 활성 자리에서의 복수의 수소 결합 및 동시에 형성되는 소수성 상호작용에 의해 일어난다는 것을 나타낸다.

[0093] 도 3은 PTPMT1의 활성자리에서의 화학식 2의 가장 낮은 에너지의 결합 모드를 나타낸다. 화학식 2의 결합 모드는 억제제의 카르복실레이트 산소 중의 하나에 관하여 Arg138 대신에 Arg172의 곁가지 구아니디움 이온에 의한 수소 결합 공여체의 역할의 관점에서 화학식 1의 그것과 다르다. 그러나, PTPMT1-화학식 1 복합체에 있어서, 화학식 2의 다른 카르복실레이트 산소는 Arg138의 뼈대 아미드 질소(amidic nitrogen)으로부터 수소결합을 받는다. PTPMT1의 활성자리에서 화학식 2를 안정화시키는 결합 힘인 부가적인 수소 결합은 Arg78의 곁가지 구아니디움 이온 및 화학식 2의 말단 이미다질 모이머티 사이에 형성되어 나타낸다. 수소결합의 수는 PTPMT1-화학식 1 복합체의 4개에서 PTPMT-1 화학식 2 복합체에서는 3개로 감소하는데 이것은 작아진 억제 활성의 효과에 의한 것이다. 또한 소수성 상호결합은 PTPMT1-화학식 2 복합체의 안정화에 중요한 역할을 한다. 화학식 2의 아로마 고리는 Phe79, Val 100, Met102 및 Ala134의 곁 사슬과 함께 반 데르 발스 접촉을 형성한다. 그러므로 수소결합 하나의 손실은 화학식 1보다 상대적으로 작은 화학식 2의 억제 활성을 설명한다. 화학식 1 또는 2의 결합모드에 있어서, 공통된 특징은 수소 결합 및 소수성 상호작용이 협동적인 방법으로 활성자리에서 억제제의 안정화에 기여한다는 것이다.

[0094] <제제에 1> 약학적 제제의 제조

[0095] 1-1. 산제의 제조

[0096]	화합물 1	500 mg
[0097]	유당	100 mg
[0098]	탈크	10 mg

[0099] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0100] 1-2. 정제의 제조

[0101]	화합물 1	500 mg
[0102]	옥수수전분	100 mg
[0103]	유당	100 mg
[0104]	스테아린산 마그네슘	2 mg

[0105] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0106] 1-3. 캡셀제의 제조

[0107]	화합물 1	500 mg
[0108]	옥수수전분	100 mg
[0109]	유당	100 mg
[0110]	스테아린산 마그네슘	2 mg

[0111] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0112] **1-4. 주사제의 제조**

[0113]	화합물 1	500 mg
[0114]	주사용 멸균 증류수	적량
[0115]	pH 조절제	적량

[0116] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0117] **1-5. 액제의 제조**

[0118]	화합물 1	100 mg
[0119]	이성화당	10 g
[0120]	만니톨	5 g
[0121]	정제수	적량

[0122] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬 향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색 병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0123] **<제제예 2> 건강식품의 제조**

[0124]	화합물 1	1000 mg
[0125]	비타민 혼합물	적량
[0126]	비타민 A 아세테이트	70 μ g
[0127]	비타민 E	1.0 mg
[0128]	비타민	0.13 mg
[0129]	비타민 B2	0.15 mg
[0130]	비타민 B6	0.5 mg
[0131]	비타민 B12	0.2 μ g
[0132]	비타민 C	10 mg
[0133]	비오틴	10 μ g
[0134]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0135]	엽산	50 mg
[0136]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0137]	무기질 혼합물	적량
[0138]	황산제1철	1.75 mg
[0139]	산화아연	0.82 mg

[0140]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0141]	제1인산칼륨	15 mg
[0142]	제2인산칼슘	55 mg
[0143]	구연산칼륨	90 mg
[0144]	탄산칼슘	100 mg
[0145]	염화마그네슘	24.8 mg

[0146] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0147] **<제제예 3> 건강 음료의 제조**

[0148]	화합물 1	1000 mg
[0149]	구연산	1000 mg
[0150]	올리고당	100 g
[0151]	매실농축액	2 g
[0152]	타우린	1 g
[0153]	정제수를 가하여 전체	900 ml

[0154] 통상의 건강 음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 건강 음료 조성물 제조에 사용하였다.

[0155] 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호 도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

[0156] **<제제예 4> 기타 건강식품의 제조**

[0157] **4-1. 음료의 제조**

[0158]	꿀	522 mg
[0159]	치옥토산아미드	5 mg
[0160]	니코틴산아미드	10 mg
[0161]	염산리보플라빈나트륨	3 mg
[0162]	염산피리독신	2 mg
[0163]	이노시톨	30 mg
[0164]	오르트산	50 mg
[0165]	화합물 1	0.48~1.28 mg
[0166]	물	200 ml

[0167] 상기 조성 및 함량으로 하여 통상적인 방법을 사용하여 음료를 제조하였다.

[0168] **4-2. 츄잉검의 제조**

[0169]	껌베이스	20 %
[0170]	설탕	76.36~76.76 %
[0171]	화합물 1	0.24~0.64 %
[0172]	후르츠향	1 %
[0173]	물	2 %

[0174] 상기 조성 및 함량으로 하여 통상적인 방법을 사용하여 츄잉검을 제조하였다.

[0175] **4-3. 캔디의 제조**

[0176]	설탕	50~60 %
[0177]	물엿	39.26~49.66 %
[0178]	화합물 1	0.24~0.64 %
[0179]	오렌지향	0.1 %

[0180] 상기 조성 및 함량으로 하여 통상적인 방법을 사용하여 캔디를 제조하였다.

[0181] **4-4. 밀가루 식품의 제조**

[0182] 화합물 1 0.5 내지 5 중량부를 밀가루 100 중량부에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0183] **4-5. 유제품(dairy products)의 제조**

[0184] 화합물 1 5 내지 10 중량부를 우유 100 중량부에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0185] **4-6. 선식의 제조**

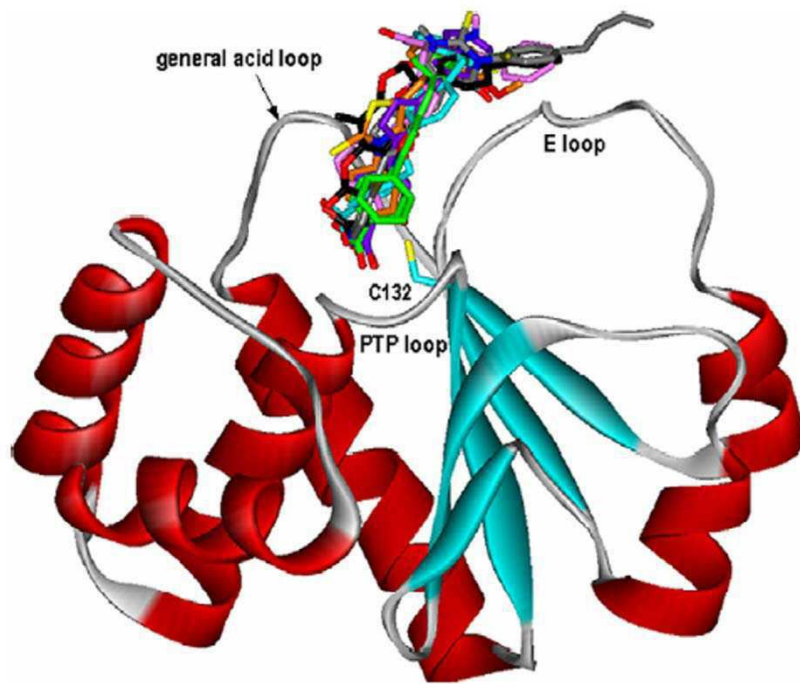
[0186] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화 시켜서 건조한 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메시의 분말로 제조하였다. 검은콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조한 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메시의 분말로 제조하였다. 상기에서 제조한 곡물류 및 종실류와 본 발명의 화합물 1을 다음과 같은 비율로 배합하여 제조하였다.

[0187]	현미	30 %
[0188]	율무	15 %
[0189]	보리	20 %
[0190]	들깨	7 %

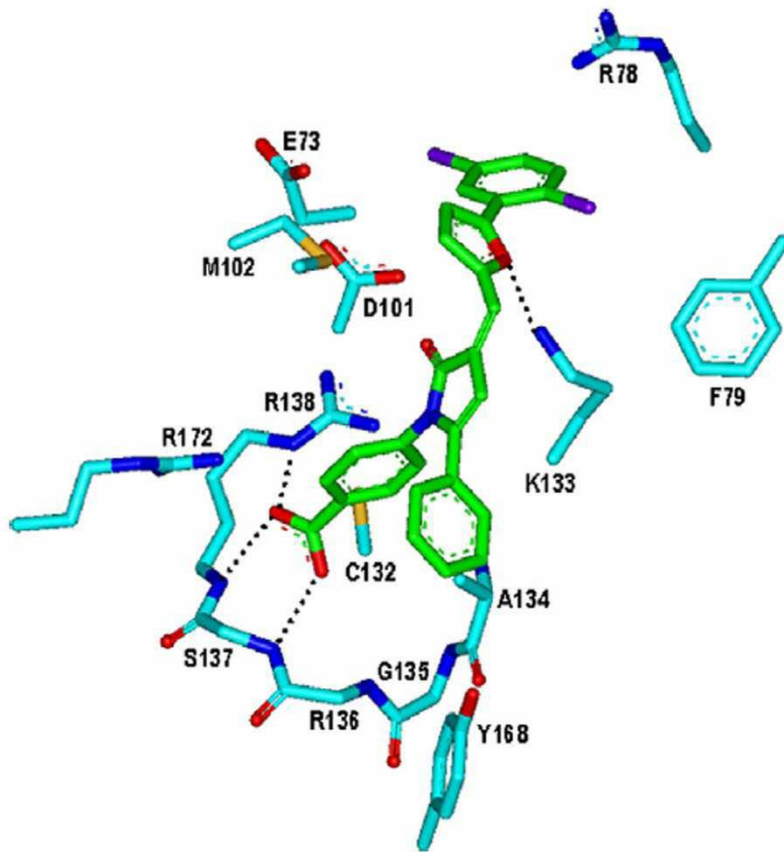
[0191]	검정콩	7 %
[0192]	검은깨	7 %
[0193]	화합물 1	3 %
[0194]	영지	0.5 %
[0195]	지황	0.5 %

도면

도면1



도면2



도면3

