

명세서

발명의 명칭: GPR119 리간드를 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 GPR119(G protein coupled receptor 119) 리간드를 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 식품 조성물 및 사료 조성물; 비알콜성 지방간 질환의 치료 방법 및 개선 방법; 또는 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 지방간은 간세포에 중성지방이 과다하게 축적되는 병적 상태로서 의학적으로는 중성지방이 간 무게의 5% 이상을 차지하는 상태로 정의된다. 지방간은 과도한 알콜 섭취에 기인한 것인지 여부에 따라 알콜성과 비알콜성 지방간으로 분류된다. 비알콜성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)은 비알콜성 지방간에서 지방간염, 간경변까지 전체 질환의 양상을 포괄하는 질환군이다. 간 내 지방침착만 있고 간세포 손상 및 섬유화 소견이 없이 인슐린 저항성 등의 원인으로 간 조직에 지방침착만 높아져있는 단순 비알콜성 지방간(non-alcoholic fatty liver)은 산화적 스트레스 등에 따른 염증반응으로 인한 간세포 손상과 때로는 섬유화를 동반하는 비알콜성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis; NASH)으로 진행되고, 적절한 치료를 받지 못하면 비가역적 간 손상을 동반하는 간경변증(liver cirrhosis)으로 진행될 수 있다.
- [3] 최근 전 세계적으로 비알콜성 지방간 질환의 유병율도 급격하게 증가하는 추세로, 단순 지방간의 유병율은 6.3 ~ 33%로 추정되며 염증을 동반하는 비알콜성 지방간염은 3 ~ 5%로 보고되었다(Hepatology, 2012(55): 2005-2023). 단순 지방간은 심각한 간질환으로의 진행이 매우 늦으며 간질환과 연관된 사망률을 높이지는 않지만, 지방간염의 경우 간경변 및 간암으로 진행될 수 있으며 간질환과 연관된 사망률 및 전체적인 사망률을 높인다. 또한 단순 지방간은 일반적인 생활습관 교정을 통해 3 ~ 5% 체중감량을 하는 경우 쉽게 개선되기도 하지만, 염증 감소를 위해서는 최소 10% 이상의 체중감소를 권고하고 있으나, 이러한 체중감소가 간 내 염증 및 섬유화의 개선을 유도할 수 있는지에 대해서는 명확하지 않다(Korean J Gastroenterol, 2012(60): 64-66).
- [4] 아직까지 비알콜성 지방간염을 대상으로 개발된 치료제는 없으며, 질병이 악화되면 간 이식을 받게 되는데 미국의 통계자료에 따르면 2013년 현재 간 이식의 원인 질환으로서 C형 간염에 이어 비알콜성 지방간염이 두 번째로 많은 상황이다. 또한, 2004년부터 10년간 간 이식 증가율이 C형 간염은 14%인 반면 비알콜성 지방간염은 170%로 급격하게 증가하고 있으며 2020년 이후는 C형

간염을 제치고 간 이식의 첫 번째 원인질환이 될 것으로 예상되고 있어, 비알콜성 지방간염을 비롯한 비알콜성 지방간 질환의 효과적인 치료제 개발이 시급한 상황이다.

- [5] 현재 비알콜성 지방간염의 약물요법은 비알콜성 지방간염 환자를 대상으로 소규모 임상시험을 통해 지방축적과 염증개선 소견이 확인된 인슐린 저항성 개선제(예컨대, 피오글리타존)나 항산화제(예컨대, 비타민 E)를 복용하는 방법이 있으나 염증 및 섬유화를 개선하는 효과가 뚜렷하지 않고, 장기 복용에 대한 안전성 우려로 인해 적극적인 약물요법을 통한 치료가 불가능한 상황이다.
- [6] GPR119(G protein-coupled receptor 119)는 소장 L세포, K세포에 분포하며 중성지방 대사물(2-monoacylglycerol) 등에 의해 활성화되면 GLP-1(glucagon-like peptide-1)이나 GIP(Glucose-dependent insulintropic polypeptide)와 같은 인크레틴 호르몬 분비를 증가시킨다. GPR119는 췌장베타세포와 알파세포에도 분포하며 포도당 의존적으로 인슐린 분비와 글루카곤 분비를 조절하여 혈당을 유지하는데 기여한다. 또한, 사람의 대식세포주에 GPR119를 과발현시키면 GLP-1수용체 발현을 증가시켜 콜레스테롤을 세포 밖으로 퍼내는 수송체인 ABCA1(ATP-binding cassette protein A1)을 높이고 이로 인해 ApoA1을 매개한 콜레스테롤의 회수를 증가시켜 지질대사를 개선하여 혈중 염증성 사이토카인 농도를 낮추는 것이 보고되었다(J Lipid Res, 2014(55): 681-697).
- [7] 그러나, 아직까지 GPR119 리간드가 직접적으로 염증반응을 억제해서 비알콜성 지방간 질환의 간세포 손상의 핵심이 되는 염증반응을 억제하는지는 보고된 바 없으며, 비알콜성 지방간 질환이 유발된 후 GPR119 리간드에 의해 염증 및 섬유화를 개선할 수 있는지에 대해서도 보고된 바 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

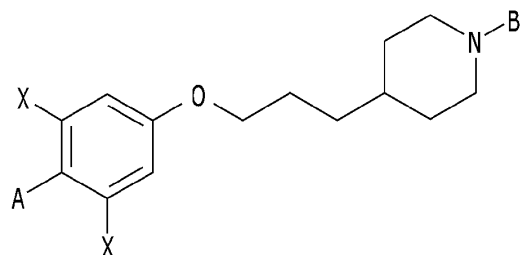
- [8] 본 발명의 목적은 GPR119 리간드를 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

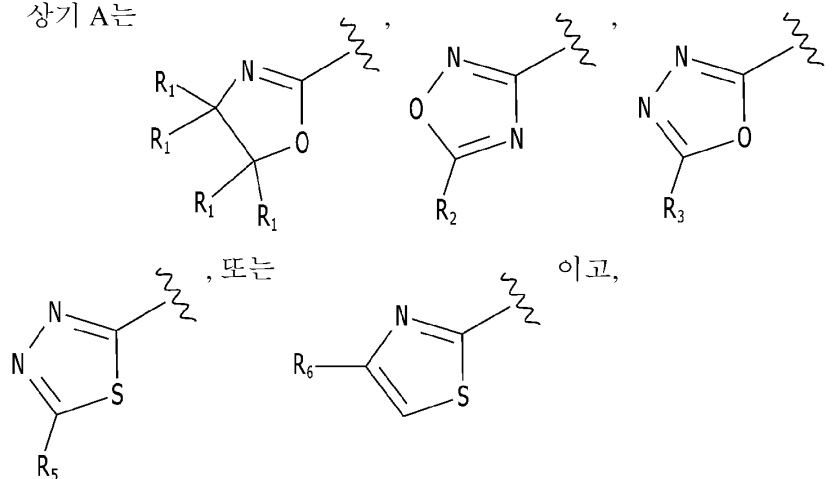
- [9] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 이들의 광학 이성질체, 이들의 수화물 또는 용매화물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [10] [화학식 1]

- [11]



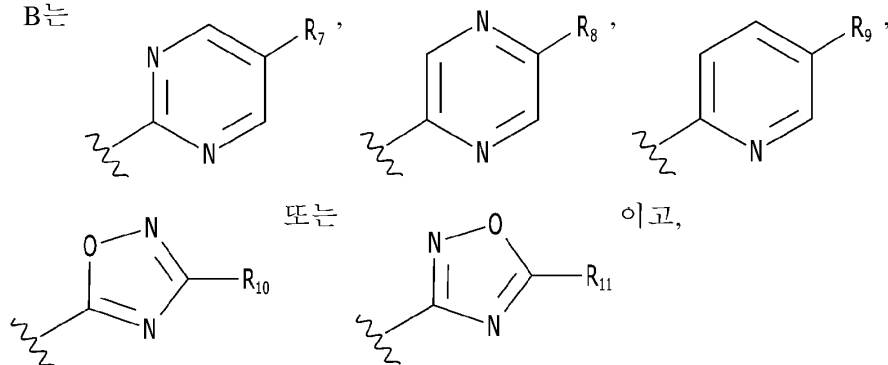
- [12] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 간 조직 중 중성지방 침착, 염증 및 섬유화를 현저히 억제하여 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료용도로 유용하게 사용될 수 있다.
- [13] 상기 화학식 1에서,
- [14] A는 옥사디아졸(oxadiazole), 디히드로옥사졸(dihydrooxazole), 티아졸(thiazole) 또는 티아디아졸(thiadiazole)이고, 상기 A는 독립적으로 비치환되거나 또는 할로젠, C1-C6 직쇄 또는 분지쇄 알킬 및 C1-C6 알코올로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 치환기로 치환될 수 있으며, 상기 알킬 또는 알코올기는 독립적으로 비치환되거나 또는 할로젠 또는 C1-C6 알콕시기로 치환될 수 있으며,
- [15] B는 피리딘(pyridine), 피리미딘(pyrimidine), 피라진(pyrazine) 또는 옥사디아졸(oxadiazole)이고, 상기 B는 독립적으로 비치환되거나 또는 할로젠, C1-C6 직쇄 또는 분지쇄 알킬, C1-C6 알코올, C1-C6 알콕시 및 옥사디아졸기로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 치환기로 치환될 수 있으며, 상기 C1-C6 직쇄 또는 분지쇄 알킬, C1-C6 알코올, C1-C6 알콕시 또는 옥사디아졸기는 독립적으로 비치환되거나 또는 할로젠, C1-C6 알킬 또는 C1-C6 알콕시기로 치환될 수 있으며,
- [16] X는 각각 독립적으로 F, Cl, Br 또는 I일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [17] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1에서,
- [18] 상기 A는



- [19] R1 내지 R3, R5, 및 R6는 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C1-C6 직쇄 또는 분지쇄 알킬 및 C1-C6 알코올로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 치환기이며, 알킬 또는 알코올기는 독립적으로 비치환되거나 또는 할로젠 또는 C1-C6 알콕시기로 치환될 수 있다.

[20] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 화학식 1에서,

[21] B는



- [22] 상기 R7 내지 R11은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C1-C6 직쇄 또는 분지쇄 알킬, C1-C6 알코올, C1-C6 알콕시 및 옥사디아졸기로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 치환기로 치환될 수 있으며, 상기 알킬, 알코올, 알콕시 또는 옥사디아졸기는 독립적으로 비치환되거나 또는 할로젠, C1-C6 알킬 또는 C1-C6 알콕시기로 치환될 수 있다.
- [23] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 화학식 1에서 A는 C1-C6 직쇄 또는 분지쇄 알킬로 치환된 옥사디아졸이고, B는 C1-C6 직쇄 또는 분지쇄 알킬로 치환된 피리미딘이고, X는 F일 수 있다.
- [24] 본 발명에서 용어, "할로젠"은 불소, 염소, 브롬 또는 요오드를 의미한다.
- [25] 본 발명에서 용어, "알킬"은 다른 언급이 없으면, 직쇄형 또는 분지형의 탄화수소 잔기를 의미한다. 상기 C1-C6 알킬의 예는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 펜틸, 헥실 등을 포함한다.
- [26] 본 발명에서 용어, "알콕시"는 다른 언급이 없는 한, 상기와 같이 정의되어 있는 알킬을 갖는 알킬-산소 라디칼을 포함한다. 상기 C1-C6 알콕시의 예는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 부톡시, 펜톡시 등을 포함한다.
- [27] 본 발명에서 용어, "헤테로사이클" 또는 "헤테로사이클릭"은 다른 언급이 없으면, N, O, 및 S로 구성된 군으로부터 선택되는 1 내지 3개의 헤테로 원자를 포함하는 5 내지 13원의 헤테로방향족 또는 비방향족 화합물을 의미한다.
- [28] 본 발명에 있어, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 구체적으로 하기 화합물들로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물일 수 있다.
- [29] 2-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-4,5-디히드로옥사졸,
- [30] (R)-2-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로

- 페닐)-4-메틸-4,5-디히드로옥사졸,
- [31] (S)-2-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-4-메틸-4,5-디히드로옥사졸,
- [32] (S)-2-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-5-메틸-4,5-디히드로옥사졸,
- [33] (R)-2-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-5-메틸-4,5-디히드로옥사졸,
- [34] 2-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-5,5-디메틸-4,5-디히드로옥사졸,
- [35] (R)-(2-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-4,5-디히드로옥사졸-5-일)메탄올,
- [36] (S)-(2-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-4,5-디히드로옥사졸-5-일)메탄올,
- [37] (R)-3-(2-(4-(3-(3,5-디플루오로-4-(5-메틸-4,5-디히드로옥사졸-2-일)페녹시)프로필)피페리딘-1-일)피리미딘-5-일)-5-이소부틸-1,2,4-옥사디아졸,
- [38] (R)-5-(4-(3-(3,5-디플루오로-4-(4-메틸-4,5-디히드로옥사졸-2-일)페녹시)프로필)피페리딘-1-일)-3-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [39] (S)-5-(4-(3-(3,5-디플루오로-4-(5-메틸-4,5-디히드로옥사졸-2-일)페녹시)프로필)피페리딘-1-일)-3-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [40] 5-(4-(3-(4-(5,5-디메틸-4,5-디히드로옥사졸-2-일)-3,5-디플루오로페녹시)프로필)피페리딘-1-일)-3-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [41] 3-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-5-메틸-1,2,4-옥사디아졸,
- [42] 3-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-5-프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [43] 3-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-5-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [44] 5-(tert-부틸)-3-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-1,2,4-옥사디아졸,
- [45] (3-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-1,2,4-옥사디아졸-5-일)메탄올,
- [46] 2-(3-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-1,2,4-옥사디아졸-5-일)에탄-1-올,
- [47] (S)-1-(3-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-1,2,4-옥사디아졸-5-일)프로판-1-올,
- [48] (R)-1-(3-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-1,2,4-옥사디아졸-5-일)프로판-2-올,
- [49] (S)-1-(3-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오

- 로페닐)-1,2,4-옥사디아졸-5-일)프로판-2-올,
- [50] 2-(3-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-1,2,4-옥사디아졸-5-일)-2-메틸프로판-1-올,
- [51] 3-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(5-프로필피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-5-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [52] 3-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(5-펜틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-5-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [53] 3-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(5-(트리플루오로메틸)피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-5-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [54] 3-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(5-메톡시피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-5-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [55] 3-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(5-이소프로폭시피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-5-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [56] 3-(4-(3-(1-(5-클로로피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-5-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [57] 3-(4-(3-(1-(5-브로모피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-5-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [58] 3-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(5-(5-이소부틸-1,2,4-옥사디아졸-3-일)피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-5-메틸-1,2,4-옥사디아졸,
- [59] 3-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(5-(5-이소부틸-1,2,4-옥사디아졸-3-일)피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-5-에틸-1,2,4-옥사디아졸,
- [60] 3-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(5-(5-이소부틸-1,2,4-옥사디아졸-3-일)피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-5-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [61] 5-(세크-부틸)-3-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(5-(5-이소부틸-1,2,4-옥사디아졸-3-일)피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-1,2,4-옥사디아졸,
- [62] 3-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(5-(5-이소부틸-1,2,4-옥사디아졸-3-일)피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-5-(메톡시메틸)-1,2,4-옥사디아졸,
- [63] (S)-1-(3-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(5-(5-이소부틸-1,2,4-옥사디아졸-3-일)피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-1,2,4-옥사디아졸-5-일)프로판-1-올,
- [64] 2-(3-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(5-(5-이소부틸-1,2,4-옥사디아졸-3-일)피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-1,2,4-옥사디아졸-5-일)-2-메틸프로판-1-올,
- [65] 3-(4-(3-(1-(5-클로로피라진-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-5-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [66] 3-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(5-(트리플루오로메틸)피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-5-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [67] 3-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(3-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸-5-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-5-메틸-1,2,4-옥사디아졸,
- [68] 3-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(3-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸-5-일)피페리딘-4-일)

- 프로폭시)페닐)-5-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [69] (3-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(3-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸-5-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-1,2,4-옥사디아졸-5-일)메탄올,
- [70] 2-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-5-메틸-1,3,4-옥사디아졸,
- [71] 2-에틸-5-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-1,3,4-옥사디아졸,
- [72] 2-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-5-이소프로필-1,3,4-옥사디아졸,
- [73] 5-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-N-이소프로필-1,3,4-옥사디아졸-2-아민,
- [74] 2-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(5-(트리플루오로메틸)피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-5-메틸-1,3,4-옥사디아졸,
- [75] 2-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(5-(트리플루오로메틸)피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-5-에틸-1,3,4-옥사디아졸,
- [76] 2-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(5-(트리플루오로메틸)피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-5-이소프로필-1,3,4-옥사디아졸,
- [77] 2-(4-(3-(1-(5-클로로피라진-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-5-메틸-1,3,4-옥사디아졸,
- [78] 2-(4-(3-(1-(5-클로로피라진-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-5-에틸-1,3,4-옥사디아졸,
- [79] 2-(4-(3-(1-(5-클로로피라진-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-5-이소프로필-1,3,4-옥사디아졸,
- [80] 5-(4-(3-(3,5-디플루오로-4-(5-메틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)페녹시)프로필)피페리딘-1-일)-3-프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [81] 5-(4-(3-(3,5-디플루오로-4-(5-에틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)페녹시)프로필)피페리딘-1-일)-3-프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [82] 5-(4-(3-(3,5-디플루오로-4-(5-이소프로필-1,3,4-옥사디아졸-2-일)페녹시)프로필)피페리딘-1-일)-3-프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [83] 5-(4-(3-(3,5-디플루오로-4-(5-메틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)페녹시)프로필)피페리딘-1-일)-3-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [84] 5-(4-(3-(4-(5-에틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)-3,5-디플루오로페녹시)프로필)피페리딘-1-일)-3-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [85] 5-(4-(3-(3,5-디플루오로-4-(5-이소프로필-1,3,4-옥사디아졸-2-일)페녹시)프로필)피페리딘-1-일)-3-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸,
- [86] 5-(4-(3-(3,5-디플루오로-4-(5-메틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)페녹시)프로필)피페리딘-1-일)-3-(2,2,2-트리플루오로에틸)-1,2,4-옥사디아졸,
- [87] 3-(4-(3-(3,5-디플루오로-4-(5-이소프로필-1,3,4-옥사디아졸-2-일)페녹시)프로필)

- 피페리딘-1-일)-5-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸,
 [88] 2-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-5-이소프로필-1,3,4-티아디아졸,
 [89] 2-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(5-프로필피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-5-이소프로필-1,3,4-티아디아졸,
 [90] 2-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(5-펜틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-5-이소프로필-1,3,4-티아디아졸,
 [91] 2-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(5-플루오로피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-5-이소프로필-1,3,4-티아디아졸,
 [92] 2-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(5-(트리플루오로메틸)피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-5-이소프로필-1,3,4-티아디아졸,
 [93] 2-(2,6-디플루오로-4-(3-(1-(5-(트리플루오로메틸)피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)페닐)-5-이소프로필-1,3,4-티아디아졸, 및
 [94] 4-에틸-2-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)티아졸.
 [95] 본 발명의 구현예에 있어, 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 구체적으로 3-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-5-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸일 수 있다.
 [96] 본 발명에 있어, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염의 비제한적인 예로는, 염산, 브롬산, 인산 또는 황산과 같은 무기산과의 염; 아세트산, 트리플루오로아세트산, 구연산, 말레인산, 수산, 호박산, 벤조산, 주석산, 푸마르산, 만델산, 아스코르브산 또는 말산과 같은 유기 카르복실산이나, 메탄설폰산 또는 파라-톨루엔설폰산과 같은 설폰산과의 염; 나트륨, 칼륨 또는 리튬과 같은 알칼리 금속과의 염; 혹은 기타 약제학적으로 허용 가능한 염을 형성할 수 있는 것으로 알려진 다양한 산과의 염 등을 포함할 수 있다.
 [97] 본 발명의 구체적인 일 실시 예에서는, 특수사료 공급에 따라 비알콜성 지방간 질환이 유도된 ob/ob 마우스 모델에서 조직학적 검사, 혈중 ALT 및 AST 농도의 측정, 염증 및 섬유화 관련 유전자 및 단백질 발현량 측정 실험 등을 통해, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 질환유도 과정에서 투여함에 따라 간 조직의 손상, 간 조직 내 중성지방 침착, 염증세포 침윤 및 섬유화가 현저히 억제되는 것을 확인하였다 (실시예 1).
 [98] 본 발명의 구체적인 일 실시 예에서는, 염증반응 억제기전으로 사람 단핵구 세포의 분화 및 분화된 대식세포의 염증인자에 대한 활성화능을 화학식 1로 표시되는 화합물이 농도 의존적으로 억제함을 최초로 확인하였다. (실시예 2)
 [99] 본 발명의 구체적인 일 실시 예에서는, 특수사료 공급에 따라 비알콜성 지방간 질환이 유도된 C57BL6 마우스 모델에서 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을

질환유도 후 투여함에 따라 간 조직의 손상, 간 조직 내 중성지방 침착, 염증세포 침윤 및 섬유화가 현저히 개선되는 것을 확인하였다 (실시예 3).

- [100] 본 발명에 따른 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 의약품 제제는 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있으며, 제형은 사용방법에 따라 다양하게 결정될 수 있다.
- [101] 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 제제화할 경우에는 일반적으로 사용하는 충전제, 희석제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 부형제를 사용하여 제조할 수 있다.
- [102] 경구투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있으며, 이러한 고형 제제는 상기 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 제조할 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 등의 활택제들도 사용된다.
- [103] 또한, 경구투여를 위한 액상 제제로는 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.
- [104] 비경구 투여를 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. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [105] 또한, 본 발명에 따른 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약 1 내지 약 1,000 mg 투여 범위에서 유효량을 나타낼 수 있다. 투여량 또는 복용량은 대상체의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 하루 일회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있는 등 다양한 투여용량 및 방법으로 투여 가능하다.
- [106] 본 발명에서 비알콜성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 원발성과 속발성에 따른 비알콜성 지방간 질환을 모두 포함한다. 구체적으로, 본 발명에서 비알콜성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 단순 지방간(simple steatosis), 비알콜성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 및 이러한 질환의 진전에 의해 발생하는 간섬유화(liver fibrosis)와 간경화(liver cirrhosis)를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [107] 본 발명의 약학적 조성물은 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [108] 본 발명은 또한, 치료학적으로 유효한 양의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 이들의 광학 이성질체, 이들의 수화물 또는

용매화물 또는 이들의 혼합물을 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

- [109] 본 명세서에서 용어 "치료가 필요한 대상체"는, 인간을 위시한 포유동물을 의미하고, 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 대상체에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미한다. 용어 "치료학적으로 유효한 양"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상가에 의해 생각되는 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 활성 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여 횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다.
- [110] 본 발명에서 용어, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [111] 경구 투여, 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 내피 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강내 투여, 경막내 투여될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [112] 본 발명의 약학적 조성물은 1일 1회 또는 일정한 시간 간격을 두고 1일 2회 이상 투여될 수 있다.
- [113] 본 발명의 약학적 조성물은 비알콜성 지방간 질환의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [114] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 이들의 광학 이성질체, 이들의 수화물 또는 용매화물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [115] 본 발명의 용어, "개선"은 상기 조성물의 투여로 질환이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [116] 본 발명의 용어, "식품"은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료, 비타민 복합제, 건강 기능 식품, 건강 식품 및 건강 보조 식품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.
- [117] 상기 "건강기능(성)식품(functional food)"은 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료 효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.
- [118] 상기 "건강식품(health food)"은 일반식품에 비해 적극적인 건강 유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, "건강보조식품(health supplement food)"은 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강기능식품, 건강식품,

건강보조식품의 용어는 혼용될 수 있다.

- [119] 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 구체적으로, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제, 및 향미제를 포함할 수 있으며, 상기 탄수화물의 예는 포도당, 과당, 말토스, 수크로스, 올리고당, 덱스트린, 사이클로덱스트린, 자일리톨, 소르비톨, 에리트룰, 사카린, 또는 합성 향미제가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 식품 조성물은 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있다.
- [120] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 이들의 광학 이성질체, 이들의 수화물 또는 용매화물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물을 개선이 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 개선하는 방법을 제공한다.
- [121] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 이들의 광학 이성질체, 이들의 수화물 또는 용매화물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.
- [122] 본 발명의 용어, "사료"는 가축이 섭취하고, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미한다. 상기 사료는 사료 첨가제 또는 보조사료를 포함할 수 있다.
- [123] 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [124] 본 발명은 또한, 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료를 위한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 이들의 광학 이성질체, 이들의 수화물 또는 용매화물 또는 이들의 혼합물의 용도를 제공한다.
- [125] 본 발명은 또한, 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 제제를 제조하기 위한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 이들의 광학 이성질체, 이들의 수화물 또는 용매화물 또는 이들의 혼합물의 용도를 제공한다.
- [126] 상기 치료 방법, 식품 조성물, 개선 방법, 사료 조성물 및 용도에서 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 구체적으로
3-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-5

-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸일 수 있다.

- [127] 본 발명의 약학적 조성물, 치료 방법, 식품 조성물, 개선 방법, 사료 조성물 및 용도에서 언급된 사항은 서로 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.

발명의 효과

- [128] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 지질 대사를 개선하고, 간 조직 중 지방축적을 줄이며, 간 조직의 염증과 섬유화를 통한 조직학적 손상을 막는 우수한 효과를 나타내므로, 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [129] 도 1은 비알콜성 지방간염이 유도된 마우스 모델에서 본 발명의 화합물에 의한 중성지방 감소 및 염증세포 침윤억제 효과를 나타낸 조직 표본 사진이다.
- [130] 도 2는 비알콜성 지방간염이 유도된 마우스 모델에서 본 발명의 화합물에 의한 염증세포 침윤억제 효과 및 섬유화 억제 효과를 나타낸 분석 그래프이다 (#, $p<0.05$ vs. Normal; * & **, $p<0.05$ & $p<0.01$ vs. Ob-NASH).
- [131] 도 3은 비알콜성 지방간염이 유도된 마우스 모델에서 본 발명의 화합물에 의한 섬유화 억제 효과를 나타낸 조직 표본 사진이다.
- [132] 도 4는 비알콜성 지방간염이 유도된 마우스 모델에서 본 발명의 화합물에 의한 AST 및 ALT의 감소 효과를 나타낸 것이다 (#, $p<0.05$ vs. Normal; *, $p<0.05$ vs. Ob-NASH).
- [133] 도 5는 비알콜성 지방간염이 유도된 마우스 모델에서 염증 및 섬유화 관련 단백질의 농도를 측정한 결과를 나타낸 것이다 (###, $p<0.001$ vs. Normal; ** & ***, $p<0.01$ & $p<0.001$ vs. Ob-NASH).
- [134] 도 6은 비알콜성 지방간염이 유도된 마우스 모델에서 염증 및 섬유화 관련 유전자의 발현량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [135] 도 7은 사람 단핵구세포주를 대식세포로 분화시키기 전, 24시간, 48시간 분화 후 시점에서 세포 내 GPR119의 유전자 발현을 평가한 결과를 나타낸 것이다.
- [136] 도 8은 사람 단핵구를 대식세포로 분화시키는 동안 본 발명의 화합물 처리에 의한 영향을 평가한 결과를 나타낸 것이다.
- [137] 도 9는 본 발명의 화합물 처리에 따라 분화된 대식세포 활성화에 대한 영향을 평가한 결과를 나타낸 것이다.
- [138] 도 10은 비알콜성 지방간염이 유도된 마우스 모델에서 본 발명의 화합물에 의한 간 조직 중 중성지방 감소 및 염증세포 침윤억제 효과를 나타낸 조직 표본 사진이다.
- [139] 도 11은 비알콜성 지방간염이 유도된 마우스 모델에서 간 조직 내 트리글리세리드 함량을 측정한 결과를 나타낸 것이다 (** & ***, $p<0.01$ & $p<0.001$ vs. DIO-NASH).
- [140] 도 12는 비알콜성 지방간염이 유도된 마우스 모델에서 동일개체의 투여 전·후

NAS(NAFLD activity score)변화를 나타낸 것이다.

- [141] 도 13은 비알콜성 지방간염이 유도된 마우스 모델에서 본 발명의 화합물에 의한 섬유화 억제 효과를 나타낸 조직표본 사진이다.
- [142] 도 14는 비알콜성 지방간염이 유도된 마우스 모델에서 간 조직 중 type I collagen의 함량을 측정된 결과를 나타낸 것이다 (* & ***, $p < 0.05$ & $p < 0.001$ vs. DIO-NASH).
- [143] 도 15는 비알콜성 지방간염이 유도된 마우스 모델에서 혈중 AST 및 ALT의 농도를 측정된 결과를 나타낸 것이다 (** & ***, $p < 0.01$ & $p < 0.001$ vs. DIO-NASH).
- [144] 도 16은 비알콜성 지방간염이 유도된 마우스 모델의 간 조직 중 단핵구 유인인자, 대식세포지표 및 섬유화지표의 유전자 발현량을 측정된 결과를 나타낸 것이다 (*, ** & ***, $p < 0.05$, $p < 0.01$ & $p < 0.001$ vs. DIO-NASH).

발명의 실시를 위한 형태

- [145] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시 예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시 예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시 예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [146] <실시예 1> 특수사료를 공급한 지방간염 유도 마우스 모델에서 **GPR119** 리간드의 효능 확인
- [147] 본 발명에 따른 GPR119 리간드 화합물의 비알콜성 지방간 질환에 대한 예방 효과를 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.
- [148] 비알콜성 지방간염 마우스 모델의 제조
- [149] 6주령 웅성의 렙틴이 결손된 ob/ob 마우스에 고지방, 고과당, 고콜레스테롤의 특수사료를 10주간 공급하여 비알콜성 지방간염을 유발시켰다. 화학식 1로 표시되는 화합물 중
 3-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-5-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸
 (3-(4-(3-(1-(5-ethylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)propoxy)-2,6-difluorophenyl)-5-isopropyl-1,2,4-oxadiazole; 이하, '화합물 1'이라 함)을 1일 용량이 100 mg/kg/day이 되도록 혼합 사료 형태로 제작하여 특수사료 공급개시 시점부터 10주간 공급하였다.
- [150] 조직학적 검사
- [151] 조직학적 검사를 위해 상기 제조한 비알콜성 지방간염 유도 마우스 모델을 부검하여 분리한 간 조직을 10% 포르말린에 고정하고 파라핀 블록을 제조하여 2

μm 두께의 조직절편을 얻고, 염증세포 침윤을 확인하기 위해 자동염색기(Autostainer XL, Leica)를 이용하여 Hematoxylin and Eosin (HE) Stain을 실시하였으며, 그 결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다.

- [152] 도 1 및 도 2에서 확인되는 바와 같이, 특수사료를 10주간 공급한 ob/ob 마우스(Ob-NASH)는 정상사료를 급이한 C57BL/6 마우스(Normal)에 비해 간 조직 중 중성지방구가 현저히 증가되어 있으며, 염증세포의 침윤도 확인되었다. 반면, 특수사료와 함께 본 발명의 화합물 1을 동시에 공급한 경우(Ob-NASH + Compd 1), 염증세포의 침윤이 유의적으로 억제됨을 확인하였다.
- [153] 다음으로, 섬유화 평가를 위해 Masson's Trichrome stain 또는 Sirius Res stain을 이용하여 간 조직 중 섬유질을 특이적으로 염색하였으며, 그 결과를 도 2 및 도 3에 나타내었다.
- [154] 도 2 및 도 3에서 확인되는 바와 같이, 특수사료를 10주간 공급한 ob/ob 마우스는 정상사료를 급이한 C57BL/6 마우스와 달리 간 조직이 전반적으로 보라색을 띠며 섬유화가 현저히 진행되어 있었으나, 특수사료와 함께 본 발명의 화합물 1을 동시에 공급한 경우 간 조직 섬유화가 유의적으로 억제됨을 확인하였다.
- [155] 혈중 AST 및 ALT 측정
- [156] 상기 비알콜성 지방간염 유도 마우스 모델을 부검 후 혈장을 분리하여 자동 혈액분석기(Konelab 20i)를 이용해 AST(aspartate aminotransferase) 및 ALT (alanine aminotransferase)를 정량하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [157] 도 4에서 확인되는 바와 같이, 특수사료를 10주간 공급한 ob/ob 마우스는 정상사료를 급이한 C57BL/6 마우스와 달리 간 조직 손상으로 인해 간 손상 지표인 혈중 ALT 및 AST 농도가 유의적으로 증가한 반면, 특수사료와 함께 본 발명의 화합물 1을 투여한 경우 ALT 및 AST의 증가가 유의적으로 억제되어 간세포 손상이 경감됨을 확인하였다.
- [158] 염증 및 섬유화 관련 단백질 농도 확인
- [159] 간 조직 중 염증 관련 유전자 및 섬유화 관련 단백질의 발현에 대한 영향을 평가하기 위해 상기 마우스 모델에서 획득한 간 조직을 RIPA buffer (Cell Signaling)에 넣어 TissueLyser IITM(Quigen)로 분쇄한 다음 Pierce BCA Protein Assay Kit(Thermo Fisher Scientific)으로 총 단백질 농도를 정량한 후 상용화된 ELISA kit을 이용하여 간 조직 중 마우스 Ccl2(=Mcp1; R&D Systems, MJE00) 및 Timp1(R&D Systems, MTM100) 단백질 농도를 정량 하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [160] 도 5에서 확인되는 바와 같이, 특수사료를 공급한 마우스에서는 간 조직으로 염증세포를 유인하는 인자인 Ccl2(=Mcp1)와 간 조직에 침착된 섬유질을 분해하는 효소를 억제하는 내인성 저해제인 Timp1의 간 조직 중 단백질 농도가 증가한 반면, 특수사료와 함께 본 발명의 화합물 1을 투여한 경우 Ccl2 및 Timp1의 농도가 유의적으로 억제됨을 확인하였다.

- [161] 염증 및 섬유화 관련 유전자 발현 확인
- [162] 간 조직 중 염증 관련 유전자 및 섬유화 관련 유전자의 발현량을 측정하기 위해 상기 마우스 모델에서 분취한 간 조직에 Trizol[®](Invitrogen)을 가한 후 제조사가 제공한 방법에 따라 조직 중 총 RNA를 추출하고 역전사효소를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 그 다음 SYBR Green I Master Mix(Roche, 04707516001) 시약을 이용하여 LightCycler[®]480 InstrumentII(RocheLifeScience)장비에서 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time polymerase chain reaction)을 실시하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [163] 도 6에서 확인되는 바와 같이, 특수사료를 10주간 공급한 마우스에서는 염증 관련 마우스 유전자(*Ccl2*, *Lgals3*, *Tnfa*) 및 섬유화 관련 유전자(*Tgfb1*, *Colla*, *Timp1*, *Timp2*, *Acta2*)의 발현이 증가한 반면, 특수사료와 함께 본 발명의 화합물 1을 투여한 경우는 염증 및 섬유화 관련 유전자의 발현 증가가 유의적으로 억제됨을 확인하였다.
- [164] 상기와 같은 결과는 본 발명의 화합물이 간 조직의 손상, 염증 및 섬유화를 억제하여 비알콜성 지방간 질환에 대해 우수한 효과가 있음을 시사하는 것이다.
- [165] **<실시예 2> 사람 단핵구세포의 분화 및 분화된 대식세포의 활성화 억제 효과 확인**
- [166] 본 발명에 따른 화합물의 직접적인 항염증 효과를 평가하기 위해 사람 단핵구세포의 분화 및 이의 활성화에 미치는 효과를 확인하였다.
- [167] 먼저, 사람 단핵구세포주(THP-1, ATCC[®]TIB-202[™])를 PMA(Phorbol 12-myristate 13-acetate)를 이용하여 대식세포로 분화시키기 전, 24시간, 48시간 분화 후 시점에서 세포 내 GPR119의 유전자 발현을 평가한 결과, 단핵구에서 대식세포로 분화함에 따라 GPR119 수용체의 발현이 경시적으로 증가함을 확인하였다(도 7).
- [168] 다음으로, THP-1 단핵구를 PMA(50 ng/ml)로 48시간 처리하여 대식세포로 분화시키는 동안 화합물 1을 병용 처리한 다음 혈청이 포함되지 않은 배지로 교체하고 LPS(Lipopolysaccharides; 0.5 ng/ml)를 4시간 처리하여 배지 중으로 분비된 IL-1 β (interleukin-1 β ; R&D Systems, DY201)를 상용화된 ELISKA kit로 정량하여 단핵구 분화에 대한 영향을 평가하였으며, 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- [169] 도 8에서 확인되는 바와 같이, 단핵구가 대식세포로 분화하는 과정에서 본 발명의 화합물을 처리한 경우, 농도 의존적으로 대식세포 활성화에 따른 IL-1 β 분비가 감소됨을 확인하였다.
- [170] 또한, 분화된 대식세포에 48시간 동안 화합물 1을 처리한 다음 LPS에 의한 면역세포활성화를 상기와 동일한 방법으로 분비된 IL-1 β 를 정량하여 분화된 대식세포 활성화에 대한 영향을 평가하였으며, 그 결과를 도 9에 나타내었다.
- [171] 도 9에서 확인되는 바와 같이, 본 발명의 화합물을 분화된 대식세포에 처리한 경우에도, 농도 의존적으로 대식세포 활성화에 따른 IL-1 β 분비가 감소됨을

확인하였다.

- [172] 상기와 같은 결과는 본 발명의 화합물이 면역세포 분화 및 활성화를 직접적으로 억제하여 비알콜성 지방간 질환의 예방 및 치료에 우수한 효과를 나타낼 수 있음을 시사하는 것이다.
- [173] **<실시예 3> 특수사료를 공급한 지방간염 유도 마우스 모델에서 GPR119 리간드 효능 확인**
- [174] 본 발명에 따른 GPR119 리간드 화합물의 비알콜성 지방간 질환에 대한 치료 효과를 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.
- [175] 비알콜성 지방간염 마우스 모델의 제조 및 실험군 설정
- [176] 6주령 웅성의 C57BL/6J 마우스에 고지방, 고과당, 고콜레스테롤의 특수사료를 최소 26주간 공급하여 비알콜성 지방간염을 유발시켰다. 약물 공급 3주 전에 간 조직 생검을 통해 지방간, 염증 섬유화가 유발됨을 확인하고 간 조직 중 콜라겐 염색 면적을 기준으로 마우스를 각 군에 고르게 배분하였다. 특수사료에 본 발명에 따른 화합물들을 혼합한 사료를 제작하여 추가로 8주간 공급하였다. 마우스에 공급한 식이에 따라 각 군을 정상사료를 공급한 대조군(normal), 특수사료로 비알콜성 지방간염을 유발한 마우스에 약물을 공급하지 않은 양성 대조군(DIO-NASH) 및 비알콜성 지방간염을 유발한 마우스에 화합물 1을 30 mg/kg/day(L), 100 mg/kg/day(H)로 공급한 군(각각, Cmpd1(L) 및 Cmpd1(H))로 분류하였다.
- [177] 조직학적 검사
- [178] 조직학적 검사를 위해 상기 제조한 C57BL/6J 마우스 모델을 부검하여 분리한 간 조직을 10% 포르말린에 고정하고 파라핀 블록을 제조하여 2 μ m 두께의 조직 절편을 얻고, 이를 자동염색기(Autostainer XL, Leica)를 이용하여 Hematoxylin and Eosin (HE) Stain을 실시하였으며, 그 결과를 도 10에 나타내었다. 또한, C57BL/6J 마우스 모델에서 분리한 간 조직을 Triglyceride reagent(Roche Diagnostics, #22-045-795)를 이용하여 간 조직 내 트리글리세리드 함량을 측정하였으며, 그 결과를 도 11에 나타내었다.
- [179] 도 10 및 도 11에서 확인되는 바와 같이, 특수사료만을 공급한 마우스(DIO-NASH)는 정상사료를 공급한 마우스(normal)에 비해 간 조직 중 지방 침착 및 염증세포의 침윤이 현저히 증가된 반면, 특수사료와 함께 본 발명의 화합물 1을 동시에 공급한 DIO-NASH_Cmpd1(H)군은 지방침착 및 염증세포의 침윤이 유의적으로 감소하였다.
- [180] 또한, 상기 조직학적 검사를 토대로 지방구의 비율, 염증세포 침윤과 간세포 손상을 반영한 NAS(NAFLD activity score)를 투여 전, 후로 계산한 결과, DIO-NASH 군의 50%에서 질병이 더 악화된 반면, 화합물을 투여한 경우 악화된 개체는 없었으며, DIO-NASH_Cmpd1 군에서는 약 50%가 개선되었다(도 12).
- [181] 다음으로, 섬유화 평가를 위해 Sirius Res stain을 이용하여 상기 각 군의 마우스 간 조직 중 섬유질을 특이적으로 염색하였고, 간 조직 중 type I 콜라겐의 함량은

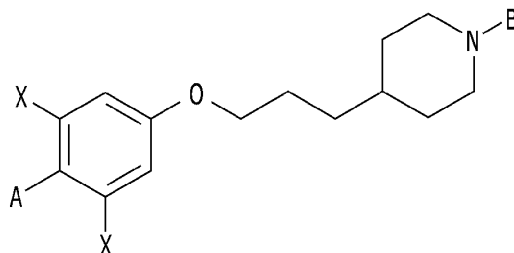
면역염색 후 영상분석 방법으로 측정하였으며, 그 결과를 도 13 및 도 14에 나타내었다.

- [182] 도 13 및 도 14에서 확인되는 바와 같이, 특수사료만을 공급한 마우스(DIO-NASH)는 정상사료를 공급한 마우스(normal)에 비해 간 조직 중 섬유화가 현저히 진행된 반면, 특수사료와 함께 본 발명의 화합물 1을 동시에 공급한 군(DIO-NASH_Compd1)에서는 간 조직 중 섬유질의 가교 형성이 현저히 감소되고 type I 콜라겐 또한 유의적으로 감소하였다.
- [183] 혈중 AST 및 ALT 측정
- [184] 상기 각 마우스 군을 부검 후 혈장을 분리하여 자동 혈액분석기(Konelab 20i)를 이용해 AST(aspartate aminotransferase) 및 ALT(alanine aminotransferase)를 정량하였으며, 그 결과를 도 15에 나타내었다.
- [185] 도 15에서 확인되는 바와 같이, 특수사료만을 공급한 DIO-NASH 군은 정상사료를 공급한 마우스와 비교하여 혈중 ALT 및 AST 농도가 유의적으로 증가한 반면, 특수사료와 함께 본 발명의 화합물 1을 투여한 군(DIO-NASH_Compd1)은 ALT 및 AST의 증가가 유의적으로 억제되었다.
- [186] 유전자 발현 변화 확인
- [187] 약물투여 8주 후 상기 마우스 모델에서 분리한 간 조직 중 전체 유전자발현의 변화를 분석하기 위해, 분리한 RNA분획을 NeoPrep(Illumina)을 이용해서 library를 생성하고 NexSeq 500(Illumina)를 통해 RNAseq profiling을 실시 후 bioinformatics 분석을 실시했으며, 주요 유전자그룹의 변화를 기능별로 분류하여 도 16에 나타내었다.
- [188] 도 16에서 확인되는 바와 같이, 특수사료만을 공급한 마우스(DIO-NASH)는 정상사료를 공급한 마우스(normal)에 비해 간 조직 중 단핵구 유인인자, 대식세포지표 및 섬유화지표의 발현이 증가된 반면, 특수사료와 함께 본 발명의 화합물 1을 동시에 공급한 DIO-NASH_Compd1 군에서는 상기 지표들이 현저히 감소되었다.
- [189] 상기와 같은 결과는 간 조직의 손상, 염증 및 섬유화를 억제하여 본 발명의 화합물이 비알콜성 지방간 질환에 대해 효과가 있으며, DPPIV 저해제를 병용 투여함으로써 더욱 우수한 치료효과를 나타낼 수 있음을 시사하는 것이다.

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 이들의 광학 이성질체, 이들의 수화물 또는 용매화물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

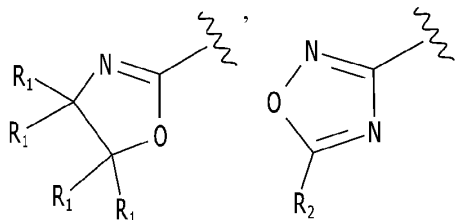
A는 옥사디아졸(oxadiazole), 디히드로옥사졸(dihydrooxazole), 티아졸(thiazole) 또는 티아디아졸(thiadiazole)이고, 상기 A는 독립적으로 비치환되거나 또는 할로젠, C1-C6 직쇄 또는 분지쇄 알킬 및 C1-C6 알코올로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 치환기로 치환될 수 있으며, 상기 알킬 또는 알코올기는 독립적으로 비치환되거나 또는 할로젠 또는 C1-C6 알콕시기로 치환될 수 있으며,

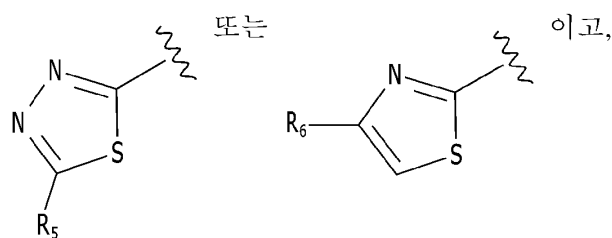
B는 피리딘(pyridine), 피리미딘(pyrimidine), 피라진(pyrazine) 또는 옥사디아졸(oxadiazole)이고, 상기 B는 독립적으로 비치환되거나 또는 할로젠, C1-C6 직쇄 또는 분지쇄 알킬, C1-C6 알코올, C1-C6 알콕시 및 옥사디아졸기로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 치환기로 치환될 수 있으며, 상기 C1-C6 직쇄 또는 분지쇄 알킬, C1-C6 알코올, C1-C6 알콕시 또는 옥사디아졸기는 독립적으로 비치환되거나 또는 할로젠, C1-C6 알킬 또는 C1-C6 알콕시기로 치환될 수 있으며, X는 독립적으로 F, Cl, Br 또는 I이다.

[청구항 2]

제1항에 있어서,

상기 화학식 1에서 A는



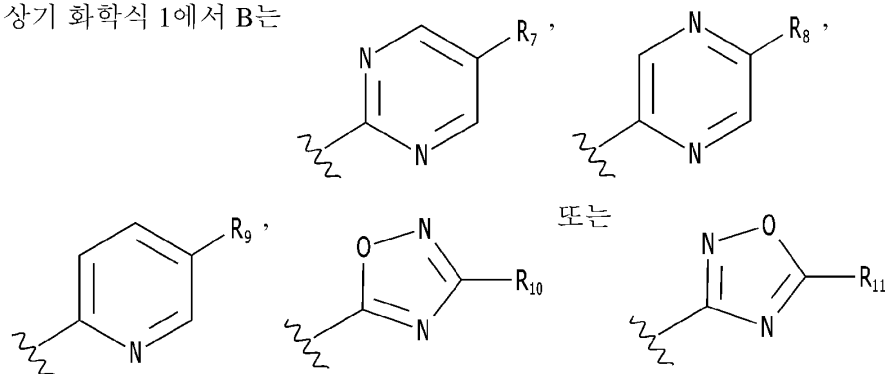


R1 내지 R3, R5, 및 R6는 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C1-C6 직쇄 또는 분지쇄 알킬 및 C1-C6 알코올로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 치환기이며, 알킬 또는 알코올기는 독립적으로 비치환되거나 또는 할로젠 또는 C1-C6 알콕시기로 치환될 수 있는, 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 3]

제1항에 있어서,

상기 화학식 1에서 B는



이고,

상기 R7 내지 R11은 수소, 할로젠, C1-C6 직쇄 또는 분지쇄 알킬, C1-C6 알코올, C1-C6 알콕시 및 옥사디아졸기로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 치환기로 치환될 수 있으며, 상기 알킬, 알코올, 알콕시 또는 옥사디아졸기는 독립적으로 비치환되거나 또는 할로젠, C1-C6 알킬 또는 C1-C6 알콕시기로 치환될 수 있는, 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 4]

제1항에 있어서,

상기 화학식 1에서 X는 F인, 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 5]

제1항에 있어서,

상기 화학식 1에서 A는 C1-C6 직쇄 또는 분지쇄 알킬로 치환된 옥사디아졸이고, B는 C1-C6 직쇄 또는 분지쇄 알킬로 치환된 피리미딘이고, X는 F인, 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

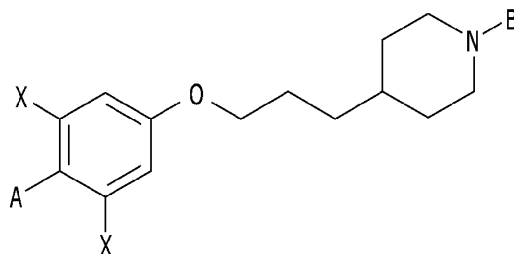
[청구항 6]

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은

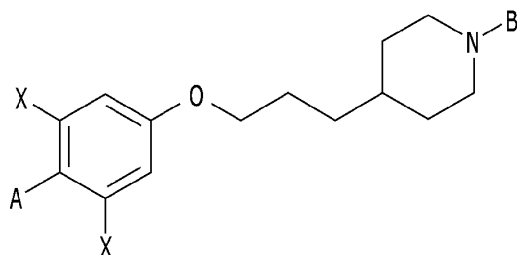
3-(4-(3-(1-(5-에틸피리미딘-2-일)피페리딘-4-일)프로폭시)-2,6-디플루오로페닐)-5-이소프로필-1,2,4-옥사디아졸인, 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 비알콜성 지방간 질환은 단순 지방간, 비알콜성 지방간염, 간섬유화 및 간경화로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 간 조직 내 중성지방 침착을 억제하는 것인, 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 간 조직 내 염증세포 침윤을 억제하는 것인, 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 간 조직의 섬유화를 억제하는 것인, 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 11] 치료학적으로 유효한 양의 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 이들의 광학 이성질체, 이들의 수화물 또는 용매화물 또는 이들의 혼합물을 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료하는 방법:
[화학식 1]



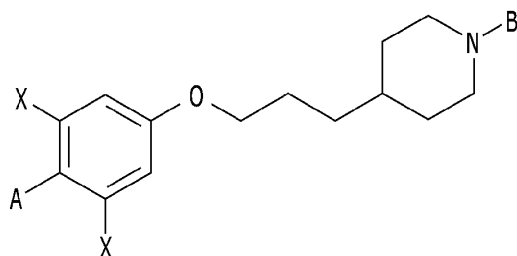
상기 화학식 1에서 A, B, 및 X는 제1항과 동일함.

- [청구항 12] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 이들의 광학 이성질체, 이들의 수화물 또는 용매화물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물:
[화학식 1]



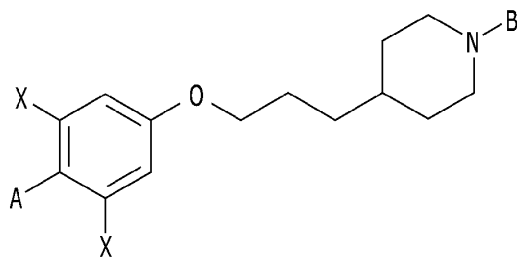
상기 화학식 1에서 A, B, 및 X는 제1항과 동일함.

- [청구항 13] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 이들의 광학 이성질체, 이들의 수화물 또는 용매화물 또는 이들의 혼합물을 포함하는 식품 조성물을 개선이 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 개선하는 방법:
[화학식 1]



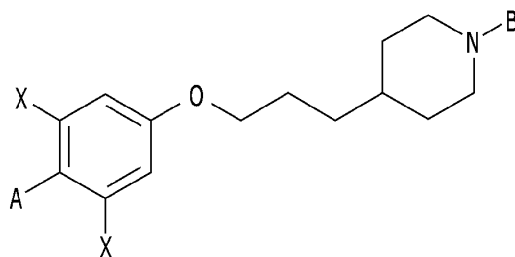
상기 화학식 1에서 A, B, 및 X는 제1항과 동일함.

- [청구항 14] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 이들의 광학 이성질체, 이들의 수화물 또는 용매화물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 개선용 사료 조성물:
[화학식 1]



상기 화학식 1에서 A, B, 및 X는 제1항과 동일함.

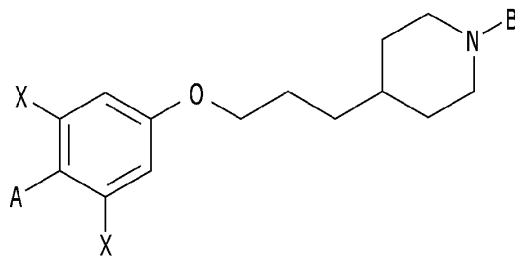
- [청구항 15] 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료를 위한 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 이들의 광학 이성질체, 이들의 수화물 또는 용매화물 또는 이들의 혼합물의 용도:
[화학식 1]



상기 화학식 1에서 A, B, 및 X는 제1항과 동일함.

[청구항 16] 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 제제를 제조하기 위한 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 이들의 광학 이성질체, 이들의 수화물 또는 용매화물 또는 이들의 혼합물의 용도:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 A, B, 및 X는 제1항과 동일함.