



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년12월27일  
(11) 등록번호 10-2481705  
(24) 등록일자 2022년12월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 31/506 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)  
A61P 1/16 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
- (52) CPC특허분류  
A61K 31/506 (2013.01)  
A23L 33/10 (2022.01)
- (21) 출원번호 10-2020-0097358
- (22) 출원일자 2020년08월04일  
심사청구일자 2020년08월04일
- (65) 공개번호 10-2022-0017179
- (43) 공개일자 2022년02월11일
- (56) 선행기술조사문헌

- (73) 특허권자  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자  
전경희  
서울특별시 종로구 경교장길 35, 302동 405호(평동, 경희궁자이 3단지)  
백정환  
서울특별시 서대문구 독립문로8길 54, 104동 204호(천연동, 천연뜨란채)
- (74) 대리인  
파도특허법인유한회사, 특허법인충현

Jin Ah Lee, The study of molecular mechanism for deubiquitinating enzyme USP1 in regulating adipogenesis, 연세대학교, 석사학위논문 (2018.12.31.)\*

Thelma S. Angeles, et al., Recent advances in targeting the fatty acid biosynthetic pathway using fatty acid synthase inhibitors, Expert Opinion On Drug Discovery, 11(12), 1187-1199. (2016.10.18.)\*

Yoon Kwang Lee, et al., Hepatic lipid homeostasis by peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2, Liver Research, 2018, 2, 209-215. (2018.12.20.)\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 5 항

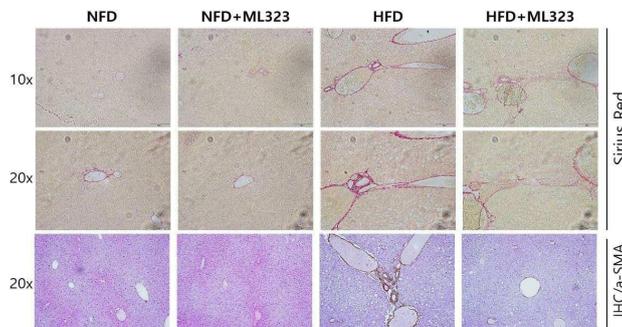
심사관 : 나영국

(54) 발명의 명칭 **트리아졸 유도체를 유효성분으로 포함하는 간 섬유증의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 지방간염, 간섬유증 및 간경변으로 구성된 군으로부터 선택되는 간 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물에 관한 것이다. 본 발명에서 발굴된 트리아졸 유도체 화합물은 간 조직에서 콜라겐 축적량을 저하시키고 염증인자의 발현을 현저히 억제함으로써, 단순한 지질 감소 효과에 그치던 종래 약물 (뒷면에 계속)

대표도



과 달리 양고 간 조직 내 과도한 섬유 생성(fibrogenesis)으로부터 조직 경화(cirrhosis)를 거쳐 간세포 수 감소 및 간기능의 상실로 이어지는 일련의 중증 간 질환의 진행 과정을 효과적으로 차단함으로써 간섬유증과 간경변에 대한 근원적인 치료 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

*A61P 1/16* (2018.01)

*G01N 33/5067* (2013.01)

*A23V 2002/00* (2013.01)

*A23V 2200/30* (2013.01)

*A23V 2250/30* (2013.01)

*G01N 2333/96466* (2013.01)

---

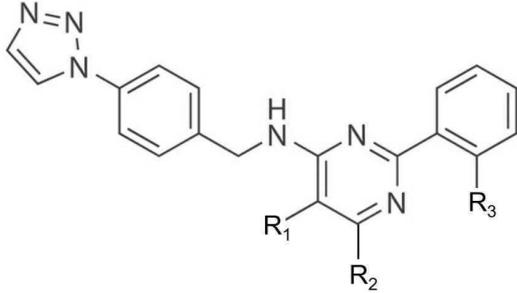
명세서

청구범위

청구항 1

하기 일반식 1 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 지방간염 (steatohepatitis), 간섬유증(hepatic fibrosis) 및 간경변(cirrhosis)으로 구성된 군으로부터 선택되는 간 질환의 예방 또는 치료용 조성물:

화학식 1



상기 일반식 1에서, R<sub>1</sub>은 C<sub>1</sub> 알킬이고, R<sub>2</sub>는 수소이며, R<sub>3</sub>는 이소프로필기이다.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 지방간염은 비알콜성 지방간염인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 혈액 내 ALT(alanine aminotransferase) 또는 AST(aspartate aminotransferase)의 양을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

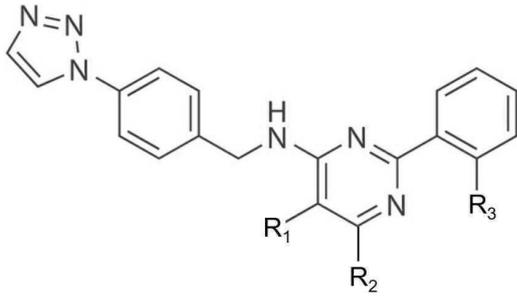
청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 간 조직 내 CCL2(C-C Motif Chemokine Ligand 2), TGF-β(Transforming growth factor-β) 또는 F4/80의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

하기 일반식 1 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 지방간염 (steatohepatitis), 간섬유증(hepatic fibrosis) 및 간경변(cirrhosis)으로 구성된 군으로부터 선택되는 간 질환의 개선용 기능성 식품 조성물:

화학식 1



상기 일반식 1에서, R<sub>1</sub>은 C<sub>1</sub> 알킬이고, R<sub>2</sub>는 수소이며, R<sub>3</sub>는 이소프로필기이다.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 트리아졸 유도체 화합물을 이용하여 간 조직에서의 염증, 섬유화 및 이로 인한 간 조직의 경화를 억제하는 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 국내에서 사망의 주요 원인을 차지하는 성인병 중 하나인 만성 간질환은 증상이 지속되면서 간경변으로 진행된 후에는 간질환의 예후를 결정하는 여러 합병증을 거쳐 간암으로까지 이어지는 심각한 질환이다. 만성 간염에서 간경변으로의 진행을 막는 것은 지질대사이상, B형 및 C형 간염 바이러스의 감염 등 다양한 원인으로 인한 간질환을 치료하기 위한 궁극적인 목표 중의 하나이다. 아울러, 여러 원인에 의해 지속되는 간섬유증(hepatic fibrosis) 과정을 거쳐 간경변이 유발되므로, 간섬유화의 진행을 효율적으로 차단하고 경감시키는 것이 간암 등의 중증 간질환을 예방하는 가장 기본적이고 중요한 단계이다.

[0004] 간섬유화는 만성적인 간내 염증으로 인해 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)이 간 조직에 과다하게 침착됨으로써 야기되며, 이러한 ECM의 과다 침착이 지속되면 결국은 간내 구조의 변형과 간세포수의 감소를 수반하는 간경변으로 진행되게 된다. 지방간염에서 간섬유화를 거쳐 간경변에 이르는 이러한 과정을 효율적으로 차단하는 치료제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있음에도, 현재까지 섬유화를 효과적으로 개선하면서 장기 투여에 적합한 안전성을 가지는 치료 후보물질은 개발되지 못하고 있다.

[0005] 예를 들어, PPAR- $\gamma$  아고니스트인 치아졸리딘디온(thiazolidinedione, TZD)은 아디포백틴의 분비를 촉진하여 지방조직, 근육 및 간에서 인슐린 저항성을 개선하여 지방간염 치료제로 가장 광범위하게 연구되고 있는 약물이나, 섬유화의 유의한 호전이 관찰되지 않았으며 투약중단 후 대부분 치료 전 상태로 복귀하였을 뿐 아니라 체중 증가, 골소실, 방광암 발병률 증가 등의 부작용이 보고되어 현재 개발이 중단된 상태이다. 바이구아니드계 경구용 당뇨 치료제로 개발된 메트포민(Metformin)은 AMPK 활성화제로서 지방간염과 간섬유증에 대한 효과

가 기대되었으나, 성인과 소아환자 대상의 임상 연구에서는 지방간염에 대한 조직학적 개선효과가 전혀 관찰되지 않았다. 또한, 고지혈증 치료제인 스타틴(Statin)은 비알콜성 지방간에 대한 효과가 뚜렷하지 않고, 일부 연구에서는 ALT가 감소되고 비타민 C, E와 함께 투여하였을 때 영상학적으로 지방증이 감소되었으나, 지방간염 환자에서는 지방간, 염증 활성 및 섬유화의 개선에 효과가 나타나지 않았다.

[0006] 이에, 간 조직 내 염증과 섬유화를 효율적으로 차단하면서도 만성질환의 치료를 위한 장기 투여에 적합한 안전성 높은 치료제 개발의 요구가 증가하고 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**

**특허문헌**

[0010] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 미국 특허등록공보 제9,802,904호

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0011] 본 발명자들은 간 조직에서의 염증, 섬유화 및 조직 경화로 이어지는 일련의 병적 단계의 진행을 효율적으로 차단하는 약제학적 조성물을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 상기 화학식 1 화합물을 개체에 투여할 경우 간 조직에서의 염증인자 및 콜라겐의 발현이 유의하게 감소하면서 섬유화의 진행이 현저히 억제됨을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0012] 따라서 본 발명의 목적은 지방간염, 간섬유증 및 간경변으로 구성된 군으로부터 선택되는 간 질환의 예방 또는 치료용 조성물 또는 기능성 식품 조성물을 제공하는 데 있다.

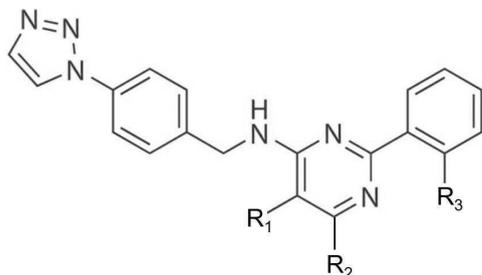
[0013] 본 발명의 다른 목적은 간 섬유화 억제용 조성물의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[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 일반식 1 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 지방간염(steatohepatitis), 간섬유증(hepatic fibrosis) 및 간경변(cirrhosis)으로 구성된 군으로부터 선택되는 간 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다:

[0018] **화학식 1**



[0019] [0020] 상기 일반식 1에서, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 각각 독립적으로 수소 또는 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬이고, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 동시에 수소가 아니며, R<sub>3</sub>는 C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 알킬이다.

[0021] 본 발명자들은 간 조직에서의 염증, 섬유화 및 조직 경화로 이어지는 일련의 병적 단계의 진행을 효율적으로 차단하는 약제학적 조성물을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 상기 화학식 1 화합물을 개체에 투여할 경우 간 조직에서의 염증인자 및 콜라겐의 발현이 유의하게 감소하면서 섬유화의 진행이 현저히 억제됨

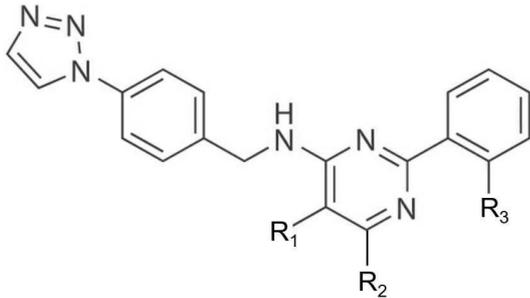
을 발견하였다.

- [0022] 본 명세서에서 용어 “알킬”은 직쇄 또는 분쇄의 포화 탄화수소기를 의미하며, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬은 탄소수 1 내지 3의 알킬 유닛을 가지는 알킬기를 의미하며, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.
- [0023] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 R<sub>1</sub>은 C<sub>1</sub> 알킬이고, 상기 R<sub>2</sub>는 수소이며, 상기 R<sub>3</sub>는 C<sub>3</sub> 알킬이다. 보다 구체적으로는, 상기 R<sub>3</sub>는 이소프로필기이다.
- [0024] R<sub>1</sub>은 C<sub>1</sub> 알킬(메틸)이고, R<sub>2</sub>는 수소이며, R<sub>3</sub>가 이소프로필기인 화학식 1 화합물은 “N-(4-(1H-1,2,3-트리아졸-1-일)벤질)-2-(2-이소프로필페닐)-5-메틸피리미딘-4-아민”의 IUPAC 명칭을 가지는 화합물(CAS 번호: 1572414-83-5)이다. 상기 화합물은 USP1(Ubiquitin specific protease 1)의 저해제 활성이 알려져 유방암, 난소암과 같은 USP1-매개 질환의 치료 효과가 제안되어 왔으나, 간섬유증과의 관계는 전혀 알려진 바가 없다.
- [0025] 본 명세서에서 용어 “약제학적으로 허용되는 염”은 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 의미한다. 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 툴루엔-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. 구체적으로는, 본 발명에서 사용되는 약제학적으로 허용되는 염은 나트륨염이다.
- [0026] 본 명세서에서 용어 “지방간염(steatohepatitis)”은 간내 지방축적에 의해 간 조직에 유발된 만성 염증을 의미한다. 지방간염은 간 조직 또는 간세포에 단순히 비정상적인 수준의 지방이 장기적으로 유지되는 간지방증(steatosis)과는 구별되는 병적 상태로서, 단지 지질을 감소시킴으로써 이의 증상을 개선시키거나 제거할 수 없으며, 활성화된 염증성 사이토카인과 활성 산소의 제어를 통해서만 근원적인 치료가 가능하다.
- [0027] 본 명세서에서 용어 “간섬유증(hepatic fibrosis)”은 간내 만성 염증으로 인해 세포외 기질(extracellular matrix)이 과도하게 침착되어 간 조직 내 과도한 섬유성 연결조직이 형성됨으로써 간의 정상적인 구조와 기능이 손상되는 질환을 의미한다.
- [0028] 본 명세서에서 용어 “간경변(cirrhosis)”은 간조직 내 염증 및 세포외 기질 침착이 장기간 지속되면서 정상 간 조직이 소실되고 반흔 조직(Scar tissue)이 이를 대체하면서 간조직이 정상적으로 기능하지 못하는 병적 상태를 의미한다.
- [0029] 간섬유증과 간경변은 별개의 병인을 가지는 독립적인 질환이라기보다는 만성 간염에서부터 섬유화를 거쳐 간경변증으로 진행되는 연속적인 질환의 성격을 가진다. 현재까지 지질 감소 효과가 입증되어 상용화된 다양한 대사질환 치료제들이 간의 섬유화와 간조직 경화를 효과적으로 개선시키지 못하고 있다.
- [0030]
- [0031] 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.
- [0032] 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 조성물이 대상체에 투여되면 피부 섬유아 세포의 증식 및 섬유생성 인자의 발현을 억제함으로써 피부에서의 과도한 섬유성 조직 생성을 개선시켜 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.
- [0033] 본 명세서에서 용어 “투여” 또는 “투여하다”는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.
- [0034] 본 발명에서 용어 “치료적 유효량”은 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하고자 하는 개체에게 조성물 내의 약리성분(예를 들어 에틸 피루베이트)이 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 정도로 함유된 조성물의 함량을 의미하며, 이에 “예방적 유효량”을 포함하는 의미이다.
- [0035] 본 명세서에서 용어 “투여” 또는 “투여하다”는 본 발명의 조성물의 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로

써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.

- [0036] 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.
- [0037] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료하고자 하는 지방간염은 비알콜성 지방간염이다.
- [0038] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 혈액 내 ALT(alanine aminotransferase) 또는 AST(aspartate aminotransferase)의 양을 감소시킨다. ALT 및 AST는 간세포 내에 존재하는 아미노기 전이효소로서, 간세포가 파괴될 때 혈액으로 유출되어 혈중 수치가 각각 증가되며, 이에 간기능 지표로 활용된다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 대조군보다 혈액내 AST 및 ALT의 양을 각각 55% 및 30% 유의하게 감소시킴으로써, 지방간염 및 간섬유화로 인한 간 기능 저하를 현저히 회복시킨다.
- [0040] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 간 조직 내 CCL2(C-C Motif Chemokine Ligand 2), TGF- $\beta$ (Transforming growth factor- $\beta$ ) 또는 F4/80의 발현을 감소시킨다.
- [0041] 하기 실시예에서 보는 바와 같이, 본 발명의 조성물은 주요 염증인자인 CCL2, TGF- $\beta$  및 F4/80의 발현을 현저하게 억제함으로써 단지 축적된 지질을 감소시키는 단순하고 정량적인 효과에 그치지 않고 염증의 진행 및 이로 인한 조직 손상을 효율적으로 차단함을 확인하였다.
- [0042] 본 명세서에서 용어 “발현의 감소”는 간 조직에서 병적인 염증 및 섬유화가 중단되거나 경감 또는 개선되거나 혹은 그 위험이 감소할 정도로, 염증의 지표 또는 원인이 되는 단백질 또는 유전자의 발현량이 감소하는 것을 의미한다. 구체적으로는 대조군에 비하여 발현량이 20% 이상 감소한 상태, 보다 구체적으로는 30% 이상 감소한 상태, 더욱 구체적으로는 40% 이상 감소한 상태를 의미할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.
- [0045] 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.
- [0046] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 구체적으로는 비경구 방식으로 투여되고, 보다 구체적으로는 피하 또는 경피 투여될 수 있다.
- [0047] 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.
- [0048] 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 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 일반식 1 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효 성분으로 포함하는 지방간염(steatohepatitis), 간섬유증(hepatic fibrosis) 및 간경변(cirrhosis)으로 구성된 군으로부터 선택되는 간 질환의 개선용 기능성 식품 조성물을 제공한다:

[0050] 화학식 1



- [0051]
- [0052] 상기 일반식 1에서, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 각각 독립적으로 수소 또는 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬이고, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 동시에 수소가 아니며, R<sub>3</sub>는 C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 알킬이다.
- [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 조성에 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 사용할 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 간 섬유화 억제용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0058] (1) USP1(Ubiquitin specific protease 1)를 발현하는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계;
- [0059] (2) 상기 시료 내 USP1의 활성 또는 발현량을 측정하는 단계,
- [0060] 상기 USP1의 활성 또는 발현량이 감소한 경우, 상기 시험물질을 간섬유화 억제용 조성물로 판정한다.
- [0061] 간섬유증과 같이 염증에 의해 촉발된 섬유화 질환과 USP1 효소 간의 상관관계에 대해서는 아직까지 알려진 바가 없다. 본 발명에 따르면, 본 발명자들은 USP1 저해 활성이 보고된 본 발명의 화합물이 간섬유화를 억제함을 관찰함으로써, USP1 효소가 간섬유증의 치료 타겟이 될 수 있음을 처음으로 입증하였다.
- [0062] 본 발명의 스크리닝 방법에 따르면, 우선 USP1 발현 세포를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시킨다. 본 발명에서 용어 “생물학적 시료”는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, USP1 발현 세포를 포함하고 있는 모든 시료로서, 조직, 기관, 세포 또는 세포 배양액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로는, 상기 생물학적 시료는 간세포(hepatocyte) 또는 그 배양액을 포함한다.
- [0063] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “시험물질”은 USP1의 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 USP1의 발현량 또는 활성을 측정하는데, 발현량의 측정은 당업계에서 공지된 다양한 면역분석(immunoassay) 방법 또는 서열이 알려진 유전자를 타겟으로 통상적으로 설계된 프라이머 또는 프로브를 이용한 다양한 유전자 검출방법을 통해 이루어질 수 있다. 측정 결과, USP1의 발현량 또는 활성이 감소하는 경우 상기 시험물질은 간섬유화 억제용 조성물로 판정될 수 있다.

[0064] 본 명세서에서 용어 “발현량 또는 활성의 감소”는 USP1에 의해 유도되는 조직의 섬유화가 유의하게 억제되어 간기능이 측정 가능한 수준으로 개선될 정도로 USP1의 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 지방간염, 간섬유증 및 간경변으로 구성된 군으로부터 선택되는 간 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물을 제공한다.

[0068] (b) 본 발명에서 발굴된 트리아졸 유도체 화합물은 간 조직에서 콜라겐 축적량을 저하시키고 염증인자의 발현을 현저히 억제함으로써, 단순한 지질 감소 효과에 그치던 종래 약물과 달리 않고 간 조직 내 과도한 섬유 생성(fibrogenesis)으로부터 조직 경화(cirrhosis)를 거쳐 간세포 수 감소 및 간기능의 상실로 이어지는 일련의 중증 간 질환의 진행 과정을 효과적으로 차단함으로써 간섬유증과 간경변에 대한 근원적인 치료 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0070] 도 1은 ML-323을 0, 1, 5, 10 및 25 μM로 처리한 LX-2 세포와 미처리 대조군 세포의 생존률을 분석한 결과를 보여주는 그림이다.

도 2은 LX-2 세포에 ML323을 처리한 뒤 섬유화에 관련된 인자인 COL1A1의 발현량을 mRNA 수준에서 측정한 결과를 보여주는 그림이다.

도 3은 ML-323의 경구투여에 의해 지방간 마우스 모델에서의 간 크기 변화를 관찰한 결과를 보여주는 그림이다.

도 4는 ML-323의 경구투여 후 지방간 마우스 모델의 혈청에서 AST 및 ALT 수준을 측정한 결과를 보여주는 그림이다.

도 5은 ML-323의 경구투여 후 지방간 마우스 모델의 간 조직에서 콜라겐(도 5a) 및 염증인자(도 5b)의 발현 변화를 관찰한 결과를 각각 나타낸다.

도 6는 ML-323의 경구투여 후 지방간 마우스 모델의 간 조직에서 섬유화 개선 효과를 콜라겐에 대한 면역조직화학염색 결과를 통해 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] 인간 간성상세포주인 LX-2 세포를 2% 우태아혈청(Gibco), 1% 페니실린-스트렙토마이신(Gibco)을 넣은 DMEM 배지(Welgene)로 96-웰 플레이트에 씨딩하여 24시간 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다. 그 후 ML323을 0, 1, 5, 10 및 25 μM 농도로 세포에 처리하였다. 48시간 후 세포 배양액에 EZ-Cytox를 10 μl씩 첨가하여 30분 동안 반응시키고 마이크로플레이트 리더를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0078] 세포 섬유화 측정

[0079] 인간 간성상세포주인 LX-2 세포를 2% 우태아혈청(Gibco), 1% 페니실린-스트렙토마이신 (Gibco)을 넣은 DMEM 배지(Welgene)로 6-웰 플레이트에 씨딩하여 24시간 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다. 그 후 기존

배지를 제거하고 혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지로 교체하여 세포를 24시간 동안 굶겼다. 이후 TGF-β를 2.5ng/ml의 농도로 처리하여 세포를 활성화시키고 동시에 ML323을 0, 1, 10 및 25 μM 농도로 세포에 처리하였다. 24시간 후 세포를 수집하여 유전자 발현 분석에 이용하였다.

- [0081] 동물 모델
- [0082] 6주령 C57BL/6 마우스 24마리를 1 주간의 순화기간을 거친 후 2군으로 나누어 1군(12마리)에는 정상식이, 다른 군(12마리)에는 고지방식을 9주 동안 먹였다. 9주 후 정상식이군과 고지방식이군을 다시 각각 2그룹으로 나누어 비이클과 50mg/kg의 ML323을 주 2회 경구투여를 7주 동안 실시하였다. 경구투여가 진행되는 동안 정상식 이와 고지방식은 계속 진행하였다.
- [0084] 간 무게 변화의 측정
- [0085] 실험 기간이 종료된 후 마우스를 희생시켜 간 조직을 적출한 후 무게를 측정하였다.
- [0087] 혈중 간기능 지표의 측정
- [0088] 실험 기간이 종료된 후 각 마우스에서 혈액을 채취하고 30분 뒤에 2000rpm으로 15분 동안 원심분리하여 상층액 (혈장)을 분리하였다. 분리한 혈장은 간기능 지표인 AST 및 ALT 측정을 위해 SCL(서울의과학연구소)에 분석을 의뢰하였다.
- [0090] 간섬유화 유발인자의 발현 측정
- [0091] 마우스에서 적출한 조직을 1ml Easy blue(Intron)에 넣은 후 균질기를 이용하여 분쇄하였다. 200 μl 클로로포름을 넣고 잘 섞어 준 후 3분 동안 반응시킨 뒤 4℃에서 15분 동안 13200rpm으로 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액만 새로운 튜브에 옮기고 동량의 아이소프로필 알코올을 넣어서 잘 섞어준다. 10분 동안 반응시킨 후 4℃에서 10분 동안 13200rpm으로 원심분리를 실시하였다. 상층액을 제거한 후 RNA 펠렛을 70% 에탄올로 세척하고 4℃에서 5분 동안 13200rpm으로 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 RNA 펠렛을 10분 동안 건조시킨 후 RNAase free water로 RNA 펠렛을 용해시켰다.
- [0092] 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 표 1에 정리하였다.

**표 1**

실시간 PCR에 사용된 프라이머 서열

유전자	방향	프라이머 서열
COL1A1	정방향	5' -GCTTCACCTACAGCACCCCTT-3'
	역방향	5' -GTCCGAATTCCTGGTCTGGG- 3'
CCL2	정방향	5' -TAAAAAACCTGGATCGGAACCAA-3'
	역방향	5' -GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT- 3'
TGF-β	정방향	5' -CCTGCAAGACCATCGACATG-3'
	역방향	5' -TGTTGTACAAAGCGAGACC- 3'
F4/80	정방향	5' -CGTCAGCCGATTTGCTATCT-3'
	역방향	5' -CGGACTCCGAAAGTCTAAG- 3'

- [0095] 면역조직화학 분석
- [0096] 마우스에서 적출한 간 조직을 10% 포르말린 용액에 넣어 고정시키고 고정이 완료된 간 조직으로 파라핀 블락과 슬라이드를 제작하였다. Sirius red 용액 염색과 α-SMA 면역염색법을 이용하여 간 조직내 섬유화 정도를 측정 하였다.
- [0098] 실험결과
- [0099] 세포 독성 측정 (WST 어세이)
- [0100] ML323을 0, 1, 5, 10 및 25 μM로 처리한 세포와 미처리 세포 간 유의한 생존률 차이가 관찰되지 않았다(도 1). 이에 ML323은 처리된 모든 농도에서 독성을 나타내지 않음을 확인하였다.
- [0102] 세포 섬유화 측정

[0103] TGF- $\beta$  미처리 대조군에 비하여, TGF- $\beta$ 를 처리한 군에서 콜라겐을 인코딩하는 COL1A1의 mRNA 발현이 정상적으로 증가되어 있는 것을 확인하였다. TGF- $\beta$ 를 처리시 ML323을 처리하지 않은 세포에 비해 ML323을 처리한 세포에서 COL1A1의 mRNA 발현이 현저하게 감소되어 있는 것을 확인하였다(도 2). 이를 통해 본 발명의 조성물이 간섬유화 세포 모델에서 간 섬유화를 효율적으로 제어함을 확인하였다.

[0105] *간 무게 변화의 측정*

[0106] 정상식이를 섭취한 군에서 ML323 투여군과 대조군 간 간 무게 또는 크기의 유의한 차이가 없었으나, 고지방식을 섭취한 군에서는 ML323의 투여에 의해 간 조직에서의 지방의 축적이 대조군에 비해 현저히 감소하고 무게 또한 감소한 것을 확인하였다(도 3).

[0108] *혈중 간기능 지표의 측정*

[0109] 고지방식에서 ML323을 투여한 마우스 혈액 내 AST 및 ALT의 수치가 비이콜을 투여한 대조군에 비해 각각 40% 및 70%로 현저히 감소함으로써, 본 발명의 화합물이 저하된 간기능을 유의하게 회복시킴을 알 수 있었다(도 4).

[0111] *간섬유화 유발인자의 발현 측정*

[0112] 고지방식에서 ML323을 투여한 마우스의 간 조직에서 1형 콜라겐을 인코딩하는 COL1A1 유전자의 mRNA 발현량을 크게 감소되었으며(도 5a), 염증 관련 유전자인 CCL2, TGF- $\beta$  및 F4/80의 mRNA 발현량 또한 대조군에 비해 현저히 저해됨을 관찰함으로써(도 5b), 본 발명의 조성물이 간 조직의 염증 및 섬유화를 효율적으로 제어함을 확인하였다.

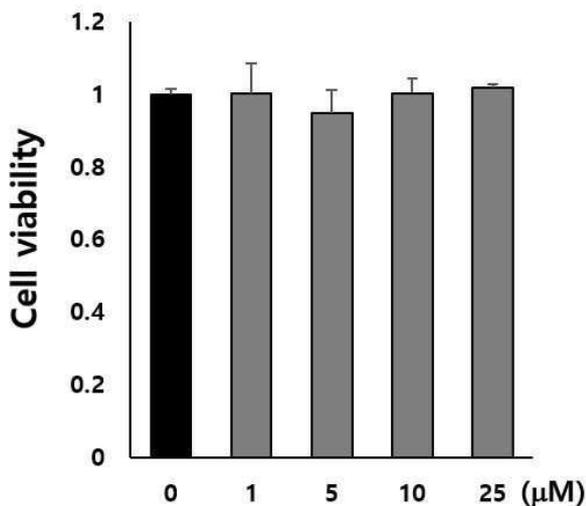
[0114] *면역조직화학 분석*

[0115] Sirius red 염색 및  $\alpha$ -SMA 면역염색 결과 ML323을 투여한 마우스의 간 조직에서 간섬유화가 현저하게 감소함을 확인함으로써(도 6), 본 발명의 조성물이 실제 간 섬유화에 대한 조직학적 개선 효과를 나타냄을 확인하였다.

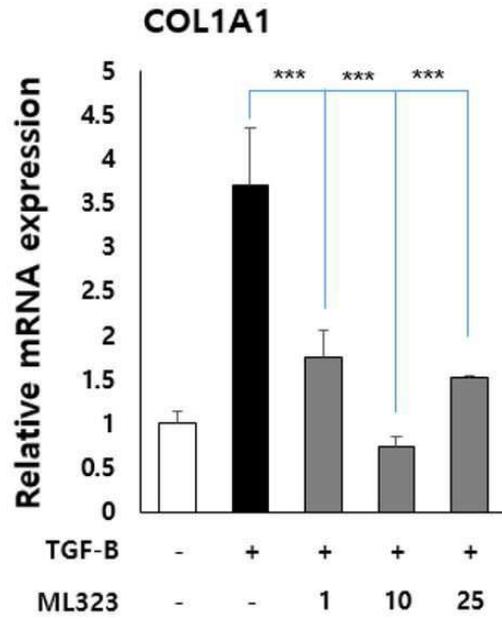
[0117] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

**도면**

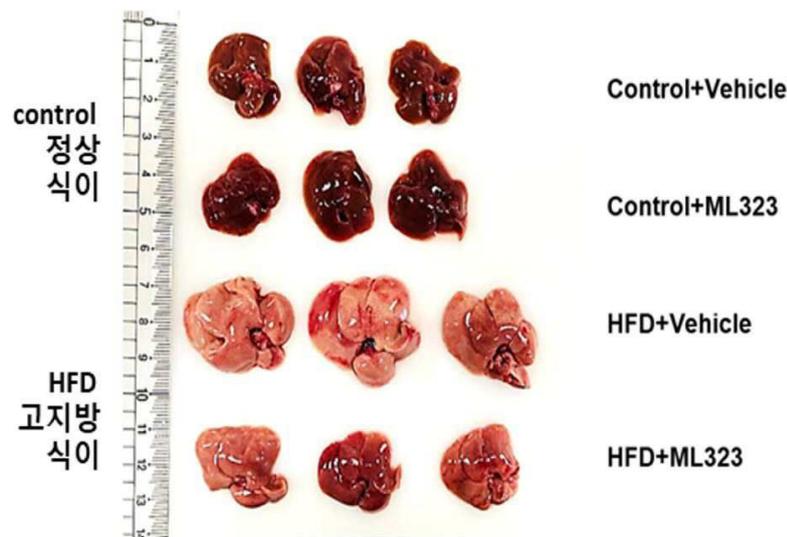
**도면1**



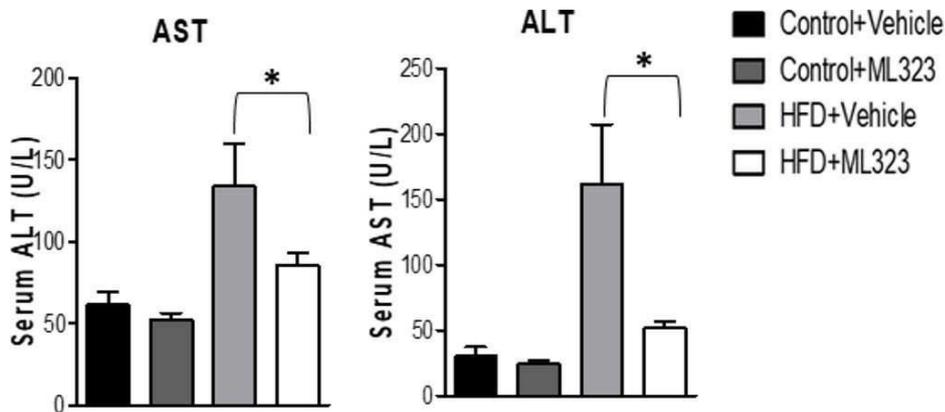
도면2



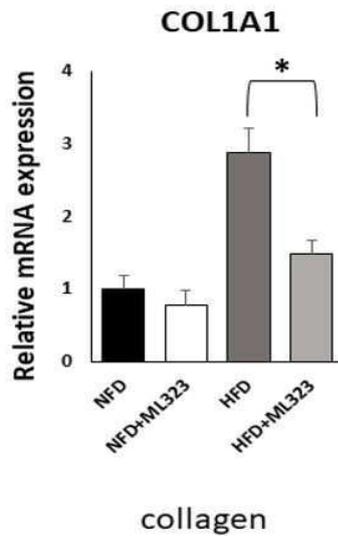
도면3



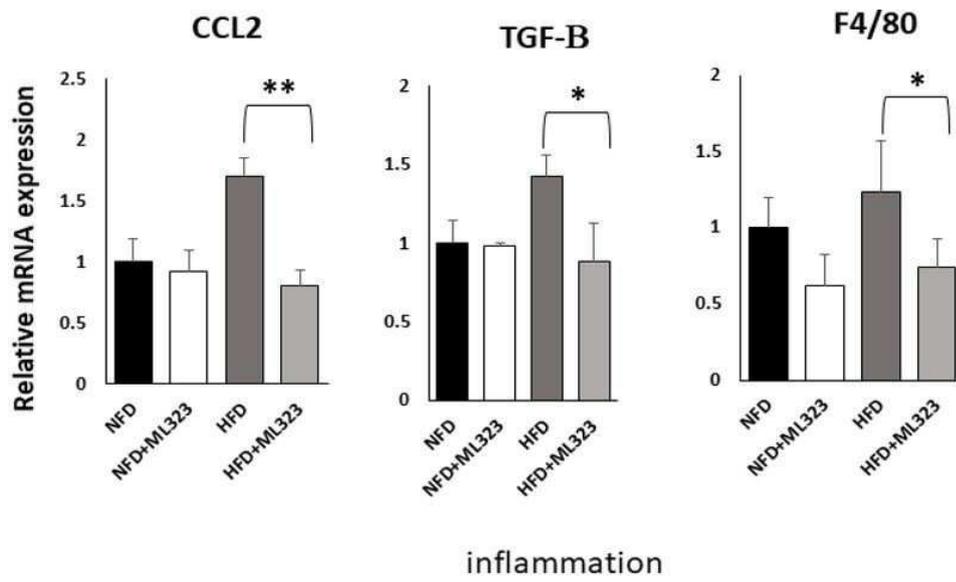
도면4



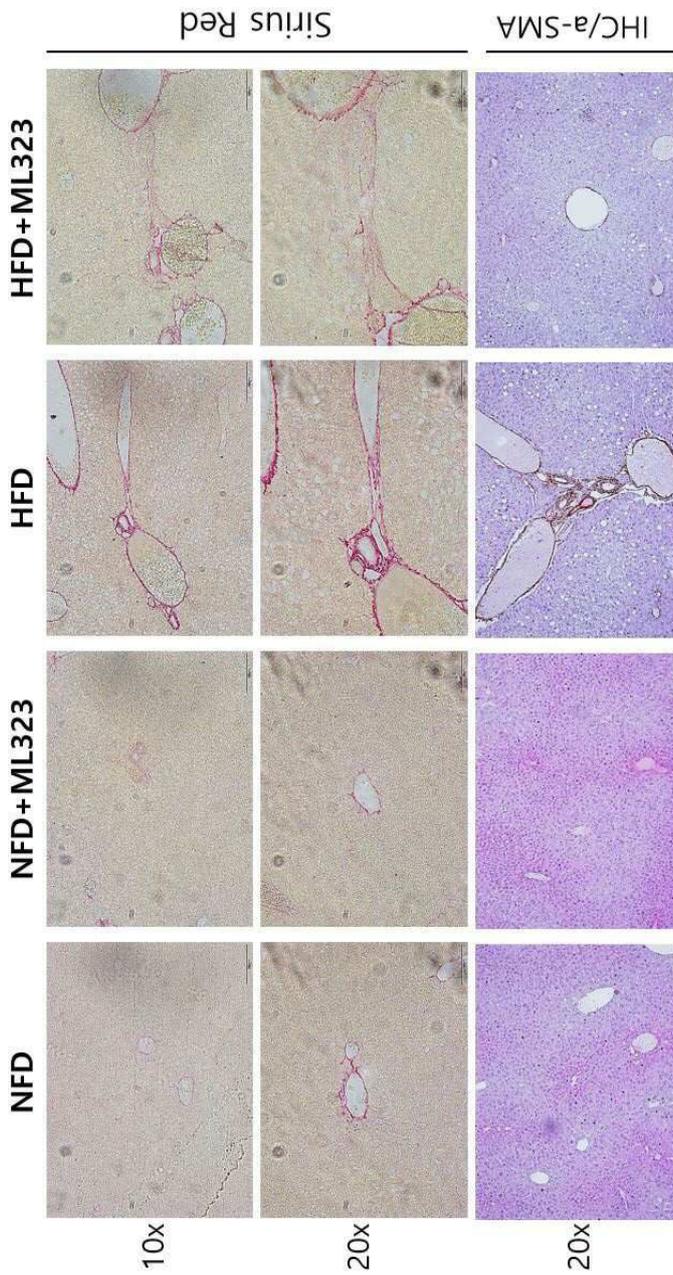
도면5a



도면5b



도면6



서열목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation Yonsei University
- <120> A Composition for Preventing or Treating Hepatic Fibrosis  
Comprising Triazole Derivatives as Active Ingredients
- <130> HPC-9414
- <160> 8
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> COL1A1 F primer  
 <400> 1  
 gcttcaccta cagcaccctt 20  
 <210> 2  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220><223> COL1A1 R primer  
 <400> 2  
 gtccgaattc ctggtctggg 20  
 <210> 3  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CCL2 F primer  
 <400> 3  
 taaaaaacct ggatcggaac caa 23  
 <210> 4  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CCL2 R primer  
 <400> 4  
 gcattagctt cagatttacg ggt 23  
  
 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> TGF-beta F primer  
 <400> 5  
 cctgcaagac catcgacatg 20  
 <210> 6

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> TGF-beta R primer  
 <400> 6  
 tgttgtacaa agcgagcacc 20  
 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> F4/80 F primer  
 <400> 7  
  
 cgtcagccga tttgctatct 20  
 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> F4/80 R primer  
 <400> 8  
 cggactccgc aaagtctaag 20