(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0001628
(43) 공개일자 2015년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4965 (2006.01) *A61K 31/495* (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0073388
(22) 출원일자 2014년06월17일
심사청구일자 2014년06월20일
(30) 우선권주장
1020130073711 2013년06월26일 대한민국(KR)

(71) 출원인
동아에스티 주식회사
서울특별시 동대문구 천호대로 64(용두동)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
차대룡
서울특별시 동작구 여의대방로44길 10, 104동 704호 (대방동, 대림아파트)
강영선
서울특별시 용산구 이촌로87길 14, 103동 1002호 (이촌동, 강촌아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

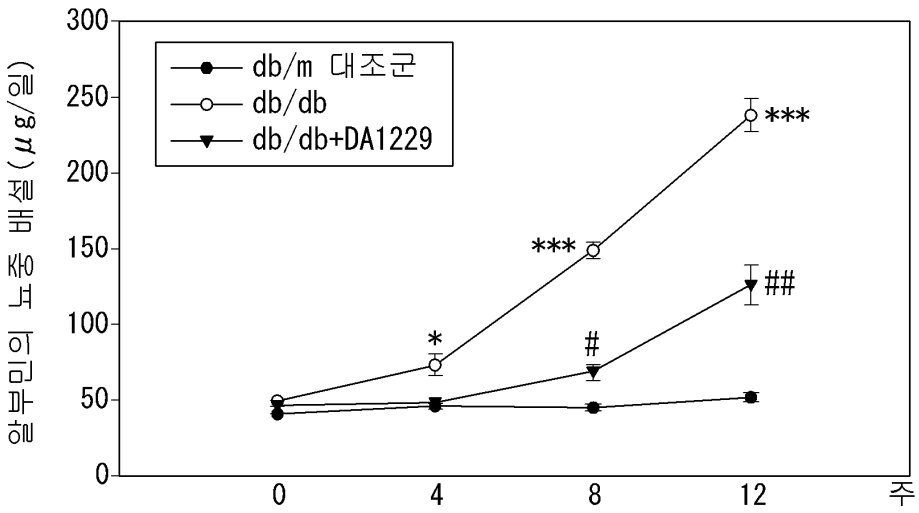
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **ＤＰＰ-ＩＶ 저해제를 함유하는 신장 질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명의 신장 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 지질 대사를 개선하고 신장의 섬유화를 비롯한 조직학적 손상을 막고 미세단백뇨를 개선하며 신사구체의 네프린을 유지하는 효과를 가진다. 따라서 신장질환의 치료에 유용하다.

대 표 도 - 도6



(72) 발명자

차진주

서울특별시 서초구 서초중앙로29길 28, 301동 105호 (반포동, 미도아파트)

이지은

서울특별시 강남구 광평로51길 22, 102동 903호 (수서동, 한아름아파트)

김현욱

서울특별시 영등포구 여의나루로 12, 1동 302호 (여의도동, 광장아파트)

이미화

경기도 안산시 단원구 화랑로 398, 1319호 (고잔동)

김정은

경기도 안산시 상록구 반석로 9, 201동 2104호 (본오동, 신안2차아파트)

김미경

경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 76, 6121동 2204호 (이의동, 이편한세상광교)

손문호

경기도 성남시 분당구 판교로 30, 202동 702호 (판교동, 판교원마을2단지아파트)

김순희

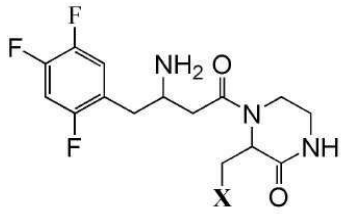
경기도 수원시 영통구 영통로 460, 316동 702호 (영통동, 청명마을3단지아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 그의 광학 이성질체, 이들의 약학적으로 허용되는 염, 또는 이들의 수화물 또는 용매화물을 유효성분으로 포함하는 신장 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



(상기 식에서, X는 OR^1이고, R^1은 각각 C1~C5의 저급알킬임.)

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 R^1은 3차 부틸(tert-butyl)인 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 약학적으로 허용되는 염은 아세트산, 벤젠술폰산, 벤조산, 캄포르술폰산, 시트르산, 에탄술폰산, 퓨마르산, 글루콘산, 글루탐산, 하이드로브롬산, 염산, 이세티온산, 락트산, 말레산, 말산, 만델산, 메탄술폰산, 뮤크산, 질산, 파모산, 판토텐산, 인산, 숙신산, 황산, 타르타르산, p-톨루엔술폰산, 아디프산 등을 포함한다. 아세트산, 시트르산, 염산, 말산, 인산, 숙신산, 타르타르산 및 아디프산으로 구성된 군으로부터 선택되는 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 그의 광학 이성질체, 이들의 약학적으로 허용되는 염, 또는 이들의 수화물 또는 용매화물은 DPP-IV(Dipeptidyl Peptidase-IV) 저해제인 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 다른 항 당뇨 약물을 더 포함하는 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 항 당뇨 약물은 비구아니드 약물(Biguanide), 인슐린 감작제(insulin sensitizer), 인슐린 분비 촉진제(insulin secretagogue), 알파-글루코시다제 저해제(α-glucosidase inhibitor) 및 카나비노이드 수용체-1 길항제(cannabinoid receptor 1 antagonist)로 구성된 군으로부터 선택되는 약학적 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 안지오텐신 전환효소 저해제 또는 안지오텐신 II 수용체 차단제를 더 포함하는 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 신장 질환은 사구체 신장 질환인 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 신장 질환은 당뇨병성 신장 질환인 약학적 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신장 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 신장은 생체의 항상성(homeostasis)을 유지하는 중요한 장기로, 체내 체액량, 혈액 내의 이온 농도와 pH를 조절하고, 대사성 노폐물, 독소, 약물 등의 노폐물을 배설하며, 혈압 조절 및 기타 대사성, 내분비 기능을 수행한다. 또한, 비타민 D를 활성화시켜서 소장에서 칼슘이 흡수되도록 도와주며 여러 가지 호르몬의 합성에도 관여한다.

[0003] 이러한 신장이 배설, 조절, 대사 및 내분비적 기능을 정상적으로 수행하지 못하고 전체적으로 기능이 저하되거나 이상이 초래된 상태를 신장 질환이라고 한다. 신장의 손상으로 인한 기능의 저하는 신장 및 관련 구조의 증대, 신장의 위축, 체액량의 변화, 전해질 불균형, 대사성 산증, 가스교환장애, 항감염 기능 손상, 요독성 독소의 축적 등을 초래한다.

[0004] 신장 질환은 진행 상태에 따라 급성신부전증, 만성신부전증으로 분류되며, 또는 발병 원인에 따라 혈관 복합체의 침착으로 인한 사구체 신염, 당뇨병에 수반되는 당뇨병성 신장 질환 또는 고혈압에 수반되는 고혈압성 신장 질환, 항생제 또는 항암제 등의 약물투여에 의한 독성신병증, 세균 감염 등으로 나뉜다. 원인이 되는 신장 질환의 종류에 관계없이 만성적으로 신기능 장애가 진행되어 사구체 여과율이 50% 이하로 감소하면, 대부분의 경우 계속적으로 사구체 여과율이 감소하게 되며, 궁극적으로 말기 신부전증에 도달하게 되고 혈액학적 이상, 신경계 합병증, 위장관계 합병증, 면역학적 합병증, 감염 또는 골이영양증 등의 합병증이 일어나 심한 경우 죽음에 이르게 된다.

[0005] 신장 질환은 전 세계적으로 매년 그 발병자가 증가하고 있으며 더욱이 증상이 나타나지 않거나 잘 인지하지 못하여 초기 발견하더라도 말기 신부전에 이르는 경우가 많다. 미국 신장 데이터 시스템(United States Renal Data System, USRDS)에 보고된 메디케어(Medicare) 수혜자를 대상으로 한 분석에 의하면 2000년 2.7%였던 만성신부전증의 유병율은 2009년 8.5%로 증가하였으며, 우리나라의 경우에도 2006년 대비 2010년에 만성신부전증으로 진료 받은 환자수는 총 37.1%, 연평균으로 환산 시 8.2%씩 증가한 것으로 보고된 바 있다. 이러한 현상은 비만 및 당뇨병 환자의 증가로 인한 당뇨병성 신장 질환의 발병 증가와도 밀접한 관련이 있다.

[0006] DPP-IV(Dipeptidyl peptidase-IV)는 adenosine deaminase complexing protein 2 또는 CD26으로도 알려져 있는 단백질로서, DPP-IV 유전자에 의해 암호화된다. DPP-IV는 면역반응에 관여하는 것으로 보고된 바 있고, 인슐린의 분비를 촉진하고 글루카곤의 분비를 억제하는 단백질인 GLP-1(Glucagon-like peptide-1)의 분해에 관여하여 당대사에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. DPP-IV는 신장의 근위세뇨관 세포(proximal tubule cell), 사구체 기저막 및 족세포(podocyte)에 다수 분포한다고 보고되어 있다. DPP-IV 저해제는 GLP-1이 분해되는 것을 막고 활성을 유지하게 하여 혈당을 낮추는 기능이 있으며, 저혈당을 유발하는 부작용이 없어 당뇨병 치료제로 현재 이용되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

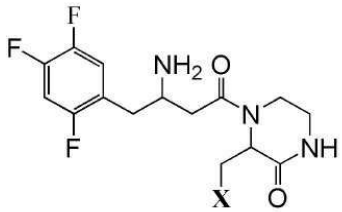
[0007] 본 발명은 신장 질환 예방 또는 치료에 효과적인 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 달성하기 위하여, 본 발명자들은 DPP-IV 저해제인 DA1229가 신장 질환의 예방 또는 치료 효과를 나타냄을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 이에 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 그의 광학 이성질체, 이들의 약학적으로 허용되는 염, 또는 이들의 수화물 또는 용매화물을 유효성분으로 포함하는 신장 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] [화학식 1]

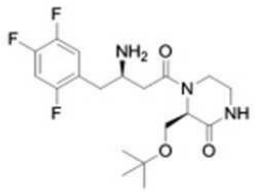


[0011]

[0012] (상기 식에서, X는 OR^1이고, R^1은 각각 C1~C5의 저급알킬임.)

[0013] 상기 화학식 1의 R^1은 3차 부틸(tert-butyl)이 될 수 있다. 이 화합물은 (*R*)-4-{(*R*)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorophenyl)butanoyl}-3-(t-butoxymethyl)piperazin-2-one 또는 DA1229로 지칭되며, 구조는 하기 화학식 2와 같다.

[0014] [화학식 2]



DA-1229

[0015]

[0016] DPP-IV 저해제는 종래에 혈당을 조절하는 당뇨병 치료제로만 인식되어 왔으나, 본 발명자들은 DPP-IV 저해제가 혈당 조절 효과와는 별개로 직접적으로 신장에 대한 보호 효과를 가짐을 실험을 통해 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다. 본 발명의 DPP-IV 저해제는 DPP-IV 활성을 억제하고 지질 대사를 증진시켜 혈장 및 간의 지질 농도를 낮춘다. 또한 신장 기능을 개선시키고 단백질 배설을 감소시켜 미세단백뇨를 개선하며 신장의 섬유화를 감소시키고 신장 비대(nephromegaly)를 개선하며 네프린 발현량을 증가시키고 네프린 배설을 막는 효과가 있다.

[0017] 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료할 수 있는 신장 질환은 다양한 원인에 의해 유발되어 다양한 임상 증상을 나타내는 것일 수 있으며, 당뇨병성 신장질환뿐 아니라 당뇨병과 무관하게 발생한 신장 질환, 즉 비당뇨병성 신장 질환도 될 수 있다. 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료할 수 있는 신장 질환은 예를 들어 당뇨병성 신장 질환(diabetic nephropathy), 사구체신염(glomerulonephritis), 고혈압성 신장 질환(hypertensive renal disease), 다낭신(polycystic kidney disease), 염증성 신장 질환(사구체 신염 등), 약물 또는 각종 독소에 의해 유발되는 독성신장병증(toxic nephropathy) 등일 수 있다. 임상적으로는 크게 단백뇨를 특징으로 하는 사구체의 이상에 기인한 사구체성 신장 질환(glomerular renal disease)과 세뇨관 혈관사이질의 이상에 기인한 세뇨관간질 질환(tubulointerstitial disease) 등일 수 있다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 약학적으로 허용되는 염은 아세트산, 벤젠술폰산, 벤조산, 캄포르술폰산, 시트르산, 에탄술폰산, 퓨마르산, 글루콘산, 글루탐산, 하이드로브롬산, 염산, 이세티온산, 락트산, 말레산, 말산, 만델산, 메탄술폰산, 뮤크산, 질산, 파모산, 판토텐산, 인산, 숙신산, 황산, 타르타르산, p-톨루엔술폰산, 아디프산 등을 포함한다. 아세트산, 시트르산, 염산, 말산, 인산, 숙신산, 타르타르산 및 아디프산으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 그의 광학이성질체 또는 이들의 약제학적으로 허용 가능한 염의 수화물은 비공유적 분자간 힘으로 결합되는 화학양론적 또는 비화학양론적 양의 물을 포함할 수 있다. 상기 수화물은 1당량 이상, 바람직하게는, 1 당량 내지 5 당량의 물을 함유할 수 있다. 이러한 수화물은 물 또는 물을 함유하는 용매로부터 본 발명의 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물, 그의 광학이성질체 또는 이들의 약제학적으로 허용 가능한 염을 결정화시켜 제조될 수 있다.

[0020] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 그의 광학이성질체 또는 이들의 약제학적으로 허용 가능한 염들의 용매화물은 비공유적 분자간 힘으로 결합되는 화학양론적 또는 비화학양론적 양의 용매를 포함할 수 있다. 상기

용매로 바람직한 것은 비휘발성, 비독성 또는 인간에게 투여되기에 적합한 용매들을 들 수 있으며, 예를 들면, 에탄올, 메탄올, 프로판올, 메틸렌클로라이드 등이 있다.

[0021] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 그의 광학 이성질체, 이들의 약학적으로 허용되는 염, 또는 이들의 수화물 또는 용매화물은 DPP-IV(Dipeptidyl Peptidase-IV) 저해제이다. DPP-IV 저해제는 GLP-1이 분해되는 것을 막고 활성을 유지하게 하여 혈당을 낮추는 기능이 있다.

[0022] 본 발명에서 상기 약학적 조성물은 화학식 1 외의 다른 추가적인 활성 성분을 포함할 수 있다. 상기 추가적인 활성 성분은 화학식 1과 동일한 활성 또는 상이한 활성을 가질 수 있다.

[0023] 예를 들어, 상기 추가적인 활성 성분은 항 당뇨 약물이 될 수 있다. 따라서 본 발명에서 상기 약학적 조성물은 다른 항 당뇨 약물을 더 포함할 수 있다. 상기 항 당뇨 약물은 비구아니드 약물(Biguanide), 인슐린 감작제(insulin sensitizer), 인슐린 분비 촉진제(insulin secretagogue), 알파-글루코시다제 저해제(α-glucosidase inhibitor) 및 카나비노이드 수용체-1 길항제(cannabinoid receptor 1 antagonist)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 본 발명의 비구아니드 약물은 비구아니드(biguanid) 구조를 포함하는 혐기성 해당 촉진작용, 말초에서 인슐린의 작용을 증강하는 효과, 장관으로부터 글루코오스 흡수억제 및 간에서의 당신생 억제 효과 등을 가지는 약물로서, 상기 비구아니드 약물은 메트포민(metformin), 부포르민(buformin), 펜포르민(phenformin)으로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0025] 본 발명의 인슐린 감작제는 인슐린 작용 부전을 개선하여 혈당 수치를 감소시키는 작용을 하는 약물로서, 공통적으로 티아졸리딘디온(thiazolidin-dione, TZD)구조를 갖는 특징이 있고, 퍼옥시좀 증식인자-활성화 수용체(Peroxisome Proliferator-activated receptor, PPAR)에 작용한다. 상기 인슐린 감작제는 트로글리타존(troglitazone), 시글리타존(ciglitazone), 로지글리타존(rosiglitazone), 피오글리타존(pioglitazone) 및 엔글리타존(englitazone)으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0026] 본 발명의 인슐린 분비 촉진제는 췌장의 베타-세포의 인슐린 분비를 촉진하는 약물로서, 술포닐 우레아 구조이거나 비-술포닐 우레아 구조 약물(Non-sulfonylurea)일 수 있으며, 바람직하게는, 글리벤클라미드(glybenclamide, glyburide), 글리피지드(glipizide), 글리클라지드(gliclazide), 글리메피리드(glimepiride), 톨라자미드(tolazamide), 톨부타미드(tolbutamide), 아세토헥사미드(acetohexamide), 카르부타미드(carbutamide), 클로르프로파미드(chlorpropamide), 글리보르누리드(glibornuride), 글리퀴돈(gliquidone), 글리센티드(glisentide), 글리소아미드(glisolamide), 글리속세피드(glisoxepide), 글리클로피아미드(glyclopyamide), 글리실아미드(glycylamide) 및 글리펜티드(glipentide) 로 구성된 군으로부터 선택되는 술포닐 우레아 구조의 약물이거나 레파글리니드(repaglinide) 또는 나테글리니드(nateglinide)의 비-술포닐 우레아 구조의 약물일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0027] 본 발명의 알파-글루코시다제 저해제는 장내 소화 효소의 일정인 알파-글루코시다제를 경쟁적으로 억제하여 전분, 이당류 등의 소화 및 흡수를 억제하는 기능을 가지는 약물로서, 상기 알파-글루코시다제 저해제는 아카보스(acarbose), 보글리보스(voglibose), 에미글리테이드(emiglitate) 및 미글리톨(miglitol)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0028] 본 발명의 카나비노이드 수용체-1 길항제는 내인성 카나비노이드(endocannabinoid)의 과도한 활성을 억제하여 체중, 에너지 균형 조절 뿐만 아니라 당 및 지질 대사를 조절하는 약물로서, 상기 카나비노이드 수용체-1 길항제는 리모나반트(Rimonabant), 오테나반트(Otenabant), 이비나반트(Ibinabant) 및 수리나반트(Surinabant)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0029] 또한 예를 들어 본 발명의 조성물의 추가적인 활성 성분은 안지오텐신의 작용을 억제할 수 있는 성분이 될 수 있다. 따라서 본 발명에서 상기 약학적 조성물은 안지오텐신 전환효소 저해제(Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor) 또는 안지오텐신 II 수용체 차단제(Angiotensin II Receptor Blocker)를 더 포함할 수 있다.

[0030] 상기 안지오텐신 전환효소 저해제는 캡토프릴(captopril), 에날라프릴(enalapril), 베나제프릴(benazepril), 이미다프릴(imidapril), 리시노프릴(lisinopril), 페리노도프릴(prinopril), 라미프릴(ramipril), 모엑시프릴(moexipril), 포시노프릴(fosinopril), 퀴나프릴(quinapril)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0031] 상기 안지오텐신 II 수용체 차단제는 칸데사르탄(candesartan), 에프로사르탄(eprosartan), 이르베사르탄

(irbesartan), 로살탄(losartan), 텔미사르탄(telmisartan), 발사르탄(valsartan)으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0032] 또한 예를 들어 본 발명의 조성물의 추가적인 활성 성분은 항고혈압제가 될 수 있다. 따라서 본 발명에서 상기 약학적 조성물은 항고혈압제인 칼슘 채널 차단제(Calcium Chanel Blocker, CCB), 베타 차단제(beta blocker), 또는 이뇨제를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 본 발명의 조성물과 관련하여 사용된 것으로 문구 "약학적으로 허용되는"은 포유동물(예를 들어, 인간)에게 투여하였을 때에 생리학적으로 허용되며, 일반적으로 바람직하지 않은 반응을 생성시키지 않는 이러한 조성물의 분자 본체 및 그 밖의 다른 성분을 의미한다.

[0034] 본 발명의 조성물은 담체를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 적용된 용어 "담체"는 활성 화합물과 함께 투여되는 희석제, 부형제 또는 비히클을 의미한다. 이러한 약제학적 담체는 물, 염수, 덱스트로즈 수용액, 글리세롤 수용액, 및 낙화생유, 대두유, 광유, 호마유 등과 같은 석유, 동물, 식물, 또는 합성 기원의 오일을 포함하는 오일과 같은 멸균 액체일 수 있다. 적합한 약제학적 담체는 문헌 ("Remington's Pharmaceutical Sciences"by E.W. Martin, 18th Edition)에 기술되어 있다. 본 발명에서 특히 바람직한 것은 즉시-방출, 즉 60분 이하와 같은 단시간에 걸쳐서 활성 성분의 대부분 또는 전부를 방출하는데 적합하며, 약물의 빠른 흡수를 가능하게 하는 담체이다.

[0035] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 그의 광학 이성질체, 이들의 약학적으로 허용되는 염, 또는 이들의 수화물 또는 용매화물은 조성물의 총 중량에 대하여 0.1 내지 50 중량%로 포함하는 것이 바람직하나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0036] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 본 발명의 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘, 스티레이드, 탈크 같은 윤활제도 사용될 수 있다.

[0037] 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0038] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 비경구 투여시 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사를 통하여 투여될 수 있다.

[0039] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 체중 70 kg의 성인 기준으로 1일 0.5 내지 100 mg 내에서 조절될 수 있다. 다만, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.

[0040] 본 발명은 치료가 필요한 대상체에 치료학적으로 유효한 양의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 그의 광학 이성질체, 이들의 약학적으로 허용되는 염, 또는 이들의 수화물 또는 용매화물을 투여하여 신장 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0041] 여기에서 사용된 "치료가 필요한 대상체"는 인간을 위시한 포유동물을 의미하고, "투여"는 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미한다. "치료학적으로 유효한 양"은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상의에 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 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다.

[0042] 본 발명은 신장 질환 치료를 위한 약제학적 제제를 제조하는데 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 그의 광학 이성질체, 이들의 약학적으로 허용되는 염, 또는 이들의 수화물 또는 용매화물을 사용하는 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0043] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 그의 광학 이성질체, 이들의 약학적으로 허용되는 염, 또는 이들의 수화물 또는 용매화물을 유효성분으로 포함하는 신장 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 지질 대사를 개선하고 신장의 섬유화를 비롯한 조직학적 손상을 막고 미세단백뇨를 개선하는 효과를 가진다. 따라서 신장질환의 치료에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 당뇨의 시기에 따른 혈장 DPP-IV 활성도의 변화를 나타낸 도이다.

도 2는 당뇨의 시기에 따른 신장, 간, 심장, 지방조직의 DPP-IV 활성도의 변화를 나타낸 도이다.

도 3은 DPP-IV 저해제 사용 후 신장, 간, 심장, 지방조직의 DPP-IV 활성도의 변화를 나타낸 도이다.

도 4는 DPP-IV 저해제 사용 후 지질 대사의 변화를 나타낸 도이다.

도 5는 DPP-IV 저해제 사용 후 간지방증을 관찰한 도이다.

도 6은 DPP-IV 저해제 사용 후 미세단백뇨의 변화를 나타낸 도이다.

도 7은 DPP-IV 저해제 사용 후 신장의 혈관사이질 확대를 나타낸 도 및 이를 스코어링(scoring)한 도이다.

도 8은 DPP-IV 저해제 사용 후 신장의 섬유화 단백 침착을 나타낸 도이다.

도 9는 도 8의 조직학적 변화를 스코어링한 도이다.

도 10은 DPP-IV 저해제 사용 후 신장의 섬유화 단백 유전자 발현을 나타낸 도이다.

도 11은 DPP-IV 저해제 사용 후 신장의 지질 대사 단백 유전자 발현을 나타낸 도이다.

도 12는 DPP-IV 저해제 사용 후 신장의 지질 대사 단백 유전자 발현 PCR 결과를 나타낸 도이다.

도 13의 좌측 도는 당뇨병성 신장애 마우스모델에서 DPP-IV 저해제 사용 후 뇨 중 네프린 배설량을 측정하여 나타낸 그래프이며, 우측 도는 DPP-IV 저해제 사용이 신사구체의 네프린 발현에 미치는 효과를 면역염색으로 확인한 도이다.

도 14는 비당뇨성 신장애 마우스 모델에서 신장애 유도와 동시에 DPP-IV 저해제 투여시 미세단백뇨(A) 및 네프린 배설(B)에 미치는 효과를 나타낸 도이다.

도 15는 비당뇨성 신장애 마우스 모델에서 신장애 유도 후에 DPP-IV 저해제 투여시 미세단백뇨(A) 및 네프린 배설(B)에 미치는 효과를 나타낸 도이다.

도 16은 신장의 족세포, 근위세뇨관 세포 및 혈관사이질 세포에 고포도당, 안지오텐신 II 및 지방산 자극을 가하고 DPP-IV 유전자 발현을 관찰한 도이다.

도 17은 기존의 DPP-IV 저해제(리나글립틴, 삭사글립틴, 및 시타글립틴)와 본 발명의 DPP-IV 저해제의 DPP-IV 활성 억제 효과를 비교한 도이다.

도 18은 신장의 족세포에 고포도당 및 안지오텐신 II 자극을 가하고 기존의 DPP-IV 저해제(리나글립틴, 삭사글립틴, 및 시타글립틴)와 본 발명의 DPP-IV 저해제의 네프린 발현에 미치는 효과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 본 발명을 실시예 및 시험예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 또한, 이하에서 언급된 시약 및 용매는 특별한 언급이 없는 한 Sigma-Aldrich Korea 로부터 구입한 것이다.

[0047] **[실시예]**

[0048] **<실시예 1> 체중, 음식 섭취량, 식수량, 공복혈당, 요량, 당화 혈색소량, 및 혈압의 평가**

[0049] **(1) 비당뇨 대조군, 당뇨군 및 DA1229 투여군의 준비**

[0050] 생후 6주된 마우스를 사용하였다. db/m 마우스를 비당뇨 대조군(각 시기별로 7마리, n=28)으로 하고, db/db 마우스를 당뇨군(각 시기별로 7마리, n=28)과 DA1229 투여군(n=8)으로 나누었다. DA1229 투여군에는 DPP-IV 저해제인 DA1229를 0.3%(W/W, 300mg/kg/day) 용량으로 사료에 섞어 공급하였고, 당뇨군에는 사료만을 공급하였다.

[0051] **(2) 체중, 음식 섭취량, 식수량, 공복 혈당, 요량, 당화 혈색소량 및 혈압을 측정**

[0052] 비당뇨 대조군(db/m 대조군) 및 당뇨군(db/db)에서 각각 투여 0, 4, 8, 12주차에 체중, 음식 섭취량, 식수량, 공복 혈당, 요량, 당화 혈색소량(HbA1c) 및 혈압(systolic blood pressure, SBP)을 측정하였고, DA1229 투여군에서는 투여 12주차에 측정하였다. 당화 혈색소량은 DCA 2000^{+} (Bayer Healthcare, Wuppertal, Germany) 혈당측정기로 측정하였다.

[0053] 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0054]

파라미터	주	db/m 대조군	db/db	db/db+DA1229
체중 (g)	0	24.3±0.5	36.1±1.0***	N.A.
	4	27.4±1.2	47.2±2.0***	N.A.
	8	30.7±0.9	54.9±1.2***	N.A.
	12	33.5±1.1	58.9±2.1***	57.2±2.5***
일일 음식 섭취량 (g)	0	2.36±0.14	5.44±0.34***	N.A.
	4	3.36±0.04	7.42±0.09***	N.A.
	8	3.90±0.15	7.15±0.09***	N.A.
	12	3.02±0.27	6.01±0.03***	5.67±0.08***
일일 식수량 (g)	0	5.5±0.3	12.9±0.6***	N.A.
	4	4.6±0.2	14.8±0.5***	N.A.
	8	4.7±0.1	15.1±0.0***	N.A.
	12	4.1±0.2	16.8±0.4***	8.6±0.4$^{**,\#}$
공복혈당 (ml/일)	0	163±15	248±13	N.A.
	4	190±11	472±43***	N.A.
	8	168±6	458±22***	N.A.
	12	153±6	562±53***	466±66$^{\#}$
요량 (ml/일)	0	0.30±0.09	0.42±0.07	N.A.
	4	0.23±0.05	1.84±0.28***	N.A.
	8	0.19±0.02	1.04±0.16*	N.A.
	12	0.21±0.02	1.25±0.36**	1.07±0.29**
HbA1c(%)	0	3.32±0.84	6.18±0.19**	N.A.
	4	4.56±0.09	8.90±0.36***	N.A.
	8	4.50±0.18	9.90±0.37***	N.A.
	12	5.14±0.19	9.21±0.43***	8.58±0.79***
SBP (mmHg)	12	118±16	115±15	124±11

[0055] 상기 표에서 각 값은 평균 ± SEM으로 표현되었고, 통계적 분석은 동일한 기간에 각 군에서 수행되었다. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 대(vs.) db/m 대조군; #P<0.05 대(vs.) db/db.

[0056] 비당뇨 대조군과 비교하여 당뇨군에서 체중이 증가되었고, 음식 섭취량, 식수량, 공복혈당, 요량이 크게 증가되었다.

[0057] 12주 동안 DA1229를 투여한 DA1229 투여군의 경우, 당뇨군과 비교하여 체중, 음식 섭취량, 요량에는 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그러나 식수량 및 공복혈당은 크게 감소되었다.

[0058] 상기 결과로부터 DA1229가 혈당량을 낮추고 당의 배설을 감소시키는 기능을 수행함을 알 수 있다.

[0059] **<실시예 2> DPP-IV 활성 평가**

[0060] DPP-IV(Dipeptidyl peptidase IV)는 인크레틴을 분해하는 효소이다. 인크레틴은 소장에서 분비되어 인슐린의 분비를 촉진하는 호르몬으로서, DPP-IV의 활성이 억제되면 인크레틴의 활성이 유지되어 인슐린의 분비가 촉진된다.

[0061] 따라서 DA1229에 의하여 DPP-IV의 활성이 효과적으로 억제되는지 여부를 확인하기 위하여 혈장 및 각 장기의 DPP-IV 활성을 평가하였다. 상기 실시예 1의 (1)에 기재된 것과 동일하게 비당뇨 대조군, 당뇨군 및 DA1229 투여군을 준비하여 실험에 사용하였다.

[0062] DPP-IV 활성도의 측정은 기존에 보고된 방법(J. Med. Chem. 2005, 48, 141-151) 대로 형광광도 검정(fluorophotometric assay) 방법을 사용하여 측정하였다. 도 1은 혈장 내의 DPP-IV 활성도를 나타낸 도이다. 비당뇨 대조군과 당뇨군은 당뇨 진행의 각 시기에 DPP-IV 활성도에 있어서 유의한 차이를 보이지 않았다(도 1A). 그러나 투여 20주차에 DA1229 투여군은 비당뇨 대조군 및 당뇨군과 비교하여 DPP-IV 활성이 현저히 억제됨을 확인할 수 있었다(도 1B).

[0063] 도 2는 비당뇨 대조군과 당뇨군의 신장, 간, 심장 및 지방조직에서의 당뇨 진행의 각 시기의 DPP-IV 활성도를 나타낸 도이다. 각 장기에서 DPP-IV 활성도는 높게 나타났다. 비당뇨 대조군과 당뇨군은 간, 심장 및 지방조직에서 DPP-IV 활성도에 있어서 군 간에 큰 차이를 보이지 않았으나(도 2B 내지 2D), 신장에서는 당뇨가 진행될수록 당뇨군의 DPP-IV 활성도가 유의하게 증가하였다(도 2A).

[0064] 도 3은 투여 20주차에 비당뇨 대조군, 당뇨군 및 DA1229 투여군의 신장, 간, 심장 및 지방조직에서의 DPP-IV 활성도를 나타낸 도이다. 각 장기에서 DA1229 투여군은 비당뇨 대조군 및 당뇨군과 비교하여 DPP-IV 활성도가 크게 감소되었으며, 이러한 감소는 신장에서 두드러지게 나타났다(도 3A).

[0065] 상기 결과로부터 DA1229는 모든 장기에서 DPP-IV 활성을 억제하며, 특히 신장에서 DPP-IV 활성을 효과적으로 억제함을 알 수 있다.

[0066] **<실시예 3> 지질 대사 평가**

[0067] 당뇨병에 걸리면 지질이 제대로 대사되지 않아 혈중 지질이 증가하고 간에 지질이 침착되는 경향(간지방증)이 있다. DA1229에 의해 지질 대사 개선 효과가 나타나는지 여부를 확인하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다. 상기 실시예 1의 (1)에 기재된 것과 동일하게 비당뇨 대조군, 당뇨군 및 DA1229 투여군을 준비하여 실험에 사용하였다.

[0068] **(1) 혈장 지질 농도 평가**

[0069] 총 콜레스테롤은 에스테르형 콜레스테롤과 비에스테르형(유리) 콜레스테롤을 포함하며, 이중 LDL-콜레스테롤의 농도가 증가하면 동맥경화 등의 문제가 발생한다.

[0070] 투여 12주차에 비당뇨 대조군, 당뇨군 및 DA1229 투여군에서 혈장에서 지질인 총 콜레스테롤, 트리글리세라이드, HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤의 농도를 측정하였다. 총 콜레스테롤과 트리글리세라이드의 농도는 GPO-Trinder 키트(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용한 후, ELISA 판독기(Micro-Quant, Bio-Tek Instruments, Colmar, France)로 측정하였고, HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤은 TBA-200FR NEO (Toshiba, Japan)로 측정하였다.

[0071] 비당뇨 대조군과 비교하여 당뇨군에서 총 콜레스테롤과 트리글리세라이드, LDL-콜레스테롤의 농도가 약 2배 이

상 증가하나, DA1229의 투여에 의해 이러한 증가가 비당뇨 대조군의 수준으로 회복됨이 관찰되었다(도 4).

[0072] **(2) 간지방증(hepatic steatosis) 평가**

[0073] 투여 12주차에 비당뇨 대조군, 당뇨군 및 DA1229 투여군에서 채취한 간 조직을 마이크로톰으로 절편화한 후, 알코올 탈수 과정을 거쳐, 파라핀 포매하였다. 이 절편을 헤마톡실린-에오신(Hematoxylin-eosin)으로 염색한 후, 현미경(STM6-LM Olympus NDT Inc, USA)으로 지질 침착 여부를 관찰하였다(도 5). 비당뇨 대조군과 비교하여 당뇨군에서 간 조직의 지질 침착이 증가하였으나, DA1229 투여군에서 이러한 증가가 비당뇨 대조군의 수준으로 회복됨이 관찰되었다.

[0074] 상기 결과로부터 DA1229가 당뇨병에 의해 감소된 지질 대사를 증가시키는 효과가 있음을 알 수 있다.

[0075] **<실시예 4> 신장 기능 평가**

[0076] DA1229 투여로 신장 질환에 의해 저하된 신장 기능이 개선되는지 여부를 확인하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다. 상기 실시예 1의 (1)에 기재된 것과 동일하게 비당뇨 대조군, 당뇨군 및 DA1229 투여군을 준비하였다.

[0077] **(1) 혈장 크레아티닌 평가**

[0078] 크레아틴은 신장에 의해 배설되는 물질로서, 신장 클리어런스에 문제가 생기면 혈장 중 크레아티닌의 농도가 높게 나타난다.

표 2

[0079]

파라미터	주	db/m 대조군	db/db	db/db+DA1229
혈장 크레아틴 (μmol/L)	12	35.0±4.0	45.0±6.0	29.0±2.0†

[0080] 상기 표에서 각 값은 평균 ± SEM으로 표현되었고, 통계적 분석은 동일한 기간에 각 군에서 수행되었다. † P<0.01 대(vs.) db/db.

[0081] 변형된 자페 방법(modified Jaffe method)(Kang YS et al., CCR2 antagonism improves insulin resistance, lipid metabolism, and diabetic nephropathy in type 2 diabetic mice. Kidney Int. 2010 Nov;78(9):883-894, Kang YS et al., Visfatin is upregulated in type-2 diabetic rats and targets renal cells. Kidney Int. 2010 Jul;78(2):170-181)으로 TBA-200FR NEO (Toshiba, Japan) 기계를 사용하여 혈장 중 크레아티닌 농도를 측정하였다.

[0082] 상기 표 2에서, 비당뇨 대조군과 비교하여 당뇨군에서 혈장 크레아티닌 농도가 증가하며, DA1229 투여군에서 혈장 크레아틴 농도가 크게 감소한 것을 확인할 수 있다.

[0083] **(2) 미세단백뇨 관찰**

[0084] 당뇨병이 진행되면 신장 사구체가 파괴되어 단백질(알부민)이 배설되는 현상이 나타나며, 적은 양이 배설되는 경우를 미세단백뇨라고 한다. 미세단백뇨는 신장 질환의 첫 지표 중의 하나이며, 당뇨병이 진행될수록 신장 사구체가 심하게 파괴되어 배설되는 단백질의 양이 증가한다. 상기 실시예 1의 (1)에 기재된 것과 동일하게 비당뇨 대조군, 당뇨군 및 DA1229 투여군을 준비하고 실험에 사용하였다.

[0085] 투여 0, 4, 8, 12주차에 비당뇨 대조군, 당뇨군 및 DA1229 투여군에서 24시간 동안 소변으로 배설되는 알부민의 양을 측정하여 미세단백뇨를 관찰하였다. ELISA 키트(Shibayagi, Shibukawa, Japan)를 사용한 후, ELISA 판독기(Micro-Quant, Bio-Tek Instruments, Colmar, France)로 배설되는 알부민의 양을 측정하였다.

[0086] 비당뇨 대조군과 비교하여 당뇨군에서 배설되는 알부민의 양이 증가하며, 이러한 증가는 당뇨가 진행될수록 두드러졌다. 그러나 DA1229 투여군에서는 4주차까지 미세단백뇨가 나타나지 않았으며, 그 이후에도 당뇨군보다 훨씬 적은 양의 알부민이 소변으로 배설되었다(도 6).

[0087] 상기 결과로부터 DA1229 투여에 의해 신장의 배설 기능이 개선되어 단백질 배설이 감소되는 것을 알 수 있다.

[0088] **<실시예 5> 신장의 혈관사이질 비대의 조직학적 평가**

[0089] 신장 질환에서 신장 파괴가 진행되면 신장에서 혈관사이질 비대(mesangial expansion)가 일어난다. 따라서 비당

뇨 대조군, 당뇨군 및 DA1229 투여군에서 사구체의 혈관사이질의 비대를 확인하고자 하였다. 상기 실시예 1의 (1)에 기재된 것과 동일하게 비당뇨 대조군, 당뇨군 및 DA1229 투여군을 준비하고 실험을 진행하고 투여 12주차에 확인하였다.

[0090] 신장 사구체 조직을 채취하여 마이크로톰으로 절편화한 후, 알코올 탈수 과정을 거쳐, 파라핀 포매하였다. 이 절편을 PAS(periodic acid-Schiff)로 염색하고 현미경(STM6-LM Olympus NDT Inc, USA)으로 관찰하고(도 7B), 병리학자가 이를 스코어링하였다(도 7A).

[0091] 비당뇨 대조군과 비교하여 당뇨군에서 혈관사이질 비대가 관찰되나, DA1229 투여군에서 이러한 효과가 비당뇨 대조군에 가까운 수준으로 개선되었다.

[0092] 상기 결과로부터 DA1229가 신장 사구체 파괴 효과를 개선하는 것을 알 수 있다.

[0093] **<실시예 6> 신장의 섬유화 평가**

[0094] 신장 질환에서 신장에 섬유화 단백질이 침착되어 병이 진행됨에 따라 신장이 파괴되는 증상이 나타난다.

[0095] TGF β1(Transforming Growth Factor β1)은 신장의 섬유화를 유발하는 사이토카인이고, Type IV 콜라겐은 섬유조직을 형성하는 기질이다. PAI-1(Plasminogen Activator Inhibitor-1)은 혈전 생성을 유발한다. 이 세 가지 단백질은 모두 신장 섬유화의 지표이다.

[0096] DA1229가 신장 섬유화를 억제하는 효과를 보이는지 확인하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다. 상기 실시예 1의 (1)에 기재된 것과 동일하게 비당뇨 대조군, 당뇨군 및 DA1229 투여군을 준비하고 실험을 진행하여 투여 12주차에 확인하였다.

[0097] **(1) 조직학적 평가**

[0098] 신장 사구체 조직을 채취하여 마이크로톰으로 절편화한 후, 알코올 탈수 과정을 거쳐, 파라핀 포매하였다. 이 절편을 면역조직화학 방법으로 염색하고 현미경 (STM6-LM Olympus NDT Inc, USA)으로 신장에 침착된 TGF β1, Type IV 콜라겐 및 PAI-1을 각각 확인하고(도 8), 염색된 정도 및 범위를 기준으로 병리학자가 이를 스코어링하였다(도 9).

[0099] 비당뇨 대조군과 비교하여 당뇨군에서 TGF β1이 증가하였으나, DA1229 투여군에서 이러한 효과가 크게 감소되었다(도 8A, 도 9).

[0100] 비당뇨 대조군과 비교하여 당뇨군에서 Type IV 콜라겐이 증가하였으나, DA1229 투여군에서 비당뇨 대조군의 수준으로 감소되었다(도 8B, 도 9).

[0101] 비당뇨 대조군과 비교하여 당뇨군에서 PAI-1이 증가하였으나, DA1229 투여군에서 비당뇨 대조군의 수준으로 감소되었다(도 8C, 도 9).

[0102] **(2) 유전자 발현 평가**

[0103] 상기 (1)에서 확인한 섬유화 단백질의 감소가 유전자 발현 수준에서 일어나는 것인지 확인하기 위하여 TGF β1, Type IV 콜라겐 및 PAI-1의 mRNA 발현을 확인하였다. 신장 조직 시료에서 mRNA를 추출하고 sybergreen 시약이 함유된 PCR 용기 내에서 Light Cycler 1.5 시스템 (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA) real-time PCR기계를 사용하여 mRNA를 증폭시켰다. 당뇨군과 비당뇨 대조군에서 각각의 표적 유전자의 발현 정도를 β-actin의 발현 정도를 나눈 값을 도 10에 나타내었다.

[0104] 비당뇨 대조군과 비교하여 당뇨군에서 TGF β1의 mRNA 발현이 증가하였으나, DA1229 투여군에서 크게 감소되었다.

[0105] 비당뇨 대조군과 비교하여 당뇨군에서 Type IV 콜라겐의 mRNA 발현이 2배 이상 증가하였으나, DA1229 투여군에서 감소되었다.

[0106] 비당뇨 대조군과 비교하여 당뇨군에서 PAI-1의 mRNA 발현이 약 2배 증가하였으나, DA1229 투여군에서 크게 감소되었다.

[0107] 상기 결과로부터 DA1229가 신장의 섬유화를 억제하는데 탁월한 효과를 발휘함을 알 수 있다.

[0108] **<실시예 7> 신장의 지질 대사 평가**

[0109] ABCA1은 조직으로부터의 지질 유출에 관여하는 단백질이고, HMG-CoA 리덕타제(reductase)는 지질 합성에 관여하는 단백질이다. ABCA1 유전자 및 HMG-CoA 리덕타제 유전자의 발현을 확인하여 신장에서 지질 대사가 감소되는지 여부 및 DA1229 투여에 의해 이러한 현상이 개선되는지 여부를 확인하기 위해 상기 유전자들의 mRNA 발현을 확인하였다. 상기 실시예 1의 (1)에 기재된 것과 동일하게 비당뇨 대조군, 당뇨군 및 DA1229 투여군을 준비하고 실험을 진행하였고, 투여 12주차에 확인하였다.

[0110] 신장 조직 시료에서 mRNA를 추출하고 sybergreen시약이 함유된 PCR 용기 내에서 Light Cycler 1.5 시스템(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA) real-time PCR기계를 사용하여 mRNA를 증폭시켰다. 결과는 도 11 및 도 12에 나타내었다.

[0111] 비당뇨 대조군과 비교하여 당뇨군에서 ABCA1의 mRNA 발현이 감소하였으나, DA1229 투여군에서 크게 증가되었다.

[0112] 비당뇨 대조군과 비교하여 당뇨군에서 HMG-CoA 리덕타제의 mRNA 발현이 증가하였으나, DA1229 투여군에서 비당뇨 대조군의 수준으로 감소되었다.

[0113] 상기 결과로부터 DA1229가 신장 조직에 지질이 침착되는 것을 막고 지질 합성을 감소시킴을 알 수 있다.

[0114] **<실시예 8> 네프린 배설 및 네프린 발현에 대한 영향 평가**

[0115] 네프린(nephrin)은 사구체의 여과막을 형성하는 족세포(podocyte)의 세포막에 발현되는 단백질로서 인접한 족세포와의 결합으로 여과장벽(filtration barrier)을 이룬다. 사구체 손상으로 단백뇨가 나타나는 경우 족세포의 네프린 발현이 감소하여 네프린 장벽이 손상되고 뇨 중으로 네프린 분비가 증가한다. 따라서 투여 12주차에 비당뇨 대조군, 당뇨군 및 DA1229 투여군에서 뇨 중 네프린 배설 및 신장에서의 네프린 발현을 확인하고자 하였다. 상기 실시예 1의 (1)에 기재된 것과 동일하게 비당뇨 대조군, 당뇨군 및 DA1229 투여군을 준비하고 실험에 사용하였다.

[0116] **(1) 네프린 배설 평가**

[0117] 비당뇨 대조군, 당뇨군 및 DA1229 투여군 각각의 뇨를 채취하고, Exocell 사 (Philadelphia, PA, USA) EIA 키트를 사용하여 뇨 중 네프린 함량을 정량하였다. 이를 뇨량에 비례하는 크레아티닌(creatinin) 배설량으로 보정(modified Jaffe 방법으로 측정)하여 도 13 좌측의 그래프로 나타내었다. 그래프에서 나타나는 바와 같이, 당뇨군에서는 비당뇨 대조군보다 뇨 중 네프린 함량이 증가하였으나, DA1229 투여군에서는 뇨 중 네프린 함량이 크게 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0118] **(2) 네프린 발현 평가**

[0119] 또한 각 군의 신장을 적출하고 신장 조직을 분리하고 네프린에 대해 특이적인 항체로 면역염색하여 현미경으로 관찰하고, 도 13 우측 도면에 나타내었다. 도 13의 우측 도면에서 당뇨군에서는 비당뇨 대조군과 비교하여 신사구체에서 네프린이 적게 관찰되나, DA1229 투여군에서는 네프린이 많이 관찰되는 것을 알 수 있다.

[0120] 상기 결과로부터 DA1229 투여에 의하여 사구체의 네프린 장벽이 보존되어 신사구체의 구조가 유지되고 뇨 중으로 네프린 배설이 감소함을 알 수 있다.

[0121] **<실시예 9> 비당뇨성 신장애 마우스 모델에서 미세단백뇨 관찰 및 네프린 배설에 대한 영향 평가**

[0122] 혈당 수치나 당뇨병과 무관하게 DA1229가 신장에 미치는 영향을 살펴보기 위해 비당뇨성 신장애 마우스 모델을 준비하여 하기의 실험을 진행하였다.

[0123] **(1) 비당뇨성 신장애 마우스 모델 준비**

[0124] 항암제 아드리아마이신(adriamycin. 이하 ADX)을 주사하면 사구체 족세포의 손상을 유발하여 비당뇨성 신장애를 일으킨다.

[0125] 생후 6주령 마우스 30마리에 ADX 13 mg/kg을 단회 정맥주사 후 3개 군으로 나누어(n=10/군) 제1군에는 즉시 DA1229 투여를 개시하여 3주 간 투여함으로써 신장애가 발생, 진행되는 동시에 DA1229 투여가 이루어지도록 하고, 제2군에는 3주간 기다려 신장애가 발생되는 것을 확인한 후 2주간 DA1229 를 투여하여 신장애가 어느 정도 진행된 후 DA1229 투여가 이루어지도록 하였다. 제3군은 아무런 추가적인 조치를 취하지 않고 대조군으로 하였다. 제1군 및 제2군에서 DA1229는 0.3%(W/W, 300 mg/kg/day) 용량으로 사료에 섞어 투여하였다. 대조군에는 사료만을 공급하였다. 투여 5주차에 제1군 내지 제3군에서 미세단백뇨 및 네프린 배설을 측정하였다.

[0126] **(2) 미세단백뇨 관찰 및 네프린 배설에 미치는 영향 평가**

[0127] 투여 3주차에, 제1군 내지 제3군에서 상기 실시예 4 (2)에 기재된 것과 동일한 방법으로 미세단백뇨(뇨 중 알부민)를 관찰하고 상기 실시예 8에 기재된 것과 동일한 방법으로 뇨 중 네프린 배설량에 미치는 영향을 평가하였다.

[0128] 신장애 유도와 동시에 DA1229를 투여한 제1군에 대한 결과는 도 14에 나타내었다(검은 막대는 대조군인 제3군, 흰 막대는 제1군에 해당). 도 14에서 DA1229 투여에 의해 뇨 중 알부민 배설량(A) 및 뇨 중 네프린 배설량(B)이 모두 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0129] 신장애 유도 후 DA1229를 투여한 제2군에 대한 결과는 도 15에 나타내었다(검은 막대는 대조군인 제3군, 흰 막대는 제1군에 해당). 도 15에서 DA1229 투여에 의해 뇨 중 알부민 배설량(A) 및 뇨 중 네프린 배설량(B)이 모두 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 좌측 도에서 DA1229에 의한 알부민 배설 감소 효과가 시간이 지날수록 두드러지게 나타남을 확인할 수 있다.

[0130] 상기 결과로부터 DA1229가 당뇨병성 신장질환뿐 아니라 비당뇨병성으로 사구체가 손상되어 나타나는 신장질환에서도 사구체를 보호하는 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[0131] **<실시예 10> 당뇨병에서 발생하는 자극시 신장 세포의 DPP-IV 발현 평가**

[0132] 당뇨병에서 발생하는 자극에 의해 신장을 구성하는 각 세포에서 DPP-IV 유전자 발현이 증가되는지 여부를 확인하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다.

[0133] 신장 조직을 이루는 세포인 족세포(podocyte), 근위세뇨관 세포(proximal tubule cell), 및 혈관사이질 세포(mesangial cell)에 각각 당뇨병에서 발생하는 자극과 같이 포도당 30 mM, 안지오텐신 II 100 nM, 유리 지방산(palmitic acid) 100 uM을 48시간 동안 가하였다. 그 후 DPP-IV 유전자 발현을 확인하였다. 각 세포에서 얻은 시료에서 mRNA를 추출하고 sybergreen시약이 함유된 PCR 용기 내에서 Light Cycler 1.5 시스템(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA) real-time PCR기계를 사용하여 mRNA를 증폭시켰다.

[0134] 혈관사이질 세포에서는 DPP-IV 유전자 발현 증가가 관찰되지 않았으나, 족세포 및 근위세뇨관 세포에서는 DPP-IV 유전자 발현 증가가 나타났다(도 16). 상기 결과로부터 당뇨병성 신장 질환에서 족세포를 포함하는 신장 세포의 DPP-IV 발현이 증가한다는 것을 알 수 있다.

[0135] **<비교예> DA1229와 기타 DPP-IV 저해제의 신장 보호 효과 비교**

[0136] DPP-IV 억제 기전으로 작용하는 약물인 리나글립틴(linagliptin), 삭사글립틴(saxagliptin), 및 시타글립틴(sitagliptin)과 DA1229의 효과를 하기와 같이 비교하였다.

[0137] **(1) 족세포에서의 DPP-IV 활성 억제 효과 비교**

[0138] DA1229, 리나글립틴, 삭사글립틴, 시타글립틴을 각각 0 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM의 농도로 포함하는 배지에서 족세포를 72시간 동안 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 족세포를 인산완충액으로 세척한 후 상기 실시예 2에서와 마찬가지로 기존의 보고된 방법(J. Med. Chem. 2005, 48, 141-151)대로 형광광도 검정 방법을 사용하여 DPP-IV의 활성을 측정하였다.

[0139] 결과는 도 17에 나타내었다. 도 17에서 DA1229가 농도 의존적으로 족세포에서 DPP-IV의 활성을 억제하며, 그 효과는 리나글립틴 및 시타글립틴보다 우수하고, 삭사글립틴과는 유사하게 나타남을 알 수 있다.

[0140] **(2) 당뇨병과 같은 자극시 네프린 발현량에 미치는 영향 비교**

[0141] DA1229, 리나글립틴, 삭사글립틴, 시타글립틴이 당뇨병에서 발생하는 자극과 같은 포도당 및 안지오텐신 II 자극 하에서 네프린의 발현량에 미치는 효과를 하기와 같이 확인하였다.

[0142] 포도당 30 mM, 안지오텐신 II 100 nM, 그리고 각각 DA1229 10 nM, 리나글립틴 10 nM, 삭사글립틴 1 nM, 시타글립틴 10 nM을 포함하는 배지에서 족세포를 72시간 동안 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 세포를 용해(lysis)시킨 후 세포내 발현된 네프린의 변화를 다클론항체 (SantaCruz, SC-19000)를 이용해서 웨스턴 블롯으로 측정했다.

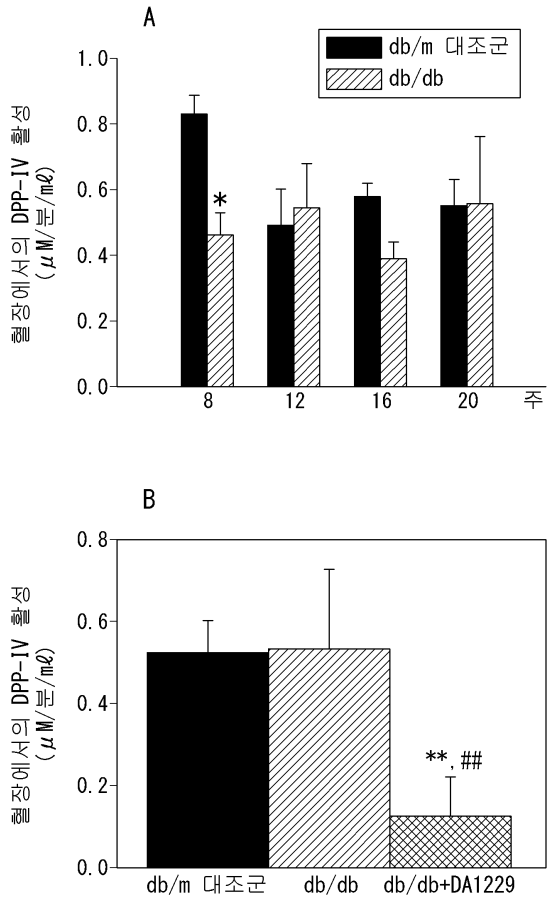
[0143] 결과는 도 18에 나타내었다. 도 18에서 아무런 처리를 하지 않은 대조군(NG, 좌측 첫번째)과 비교하여 포도당과 안지오텐신 II처리에 의해 네프린의 발현이 감소하나(좌측 두번째), DA1229에 의해서 대조군과 동등한 수준으로

네프린 발현량이 유지됨을 알 수 있다(좌측 세번째). 반면 리나글립틴, 삭사글립틴 처리군의 네프린 발현량은 포도당과 안지오텐신 II 만을 처리한 군보다는 높았으나 DA1229 처리군보다는 훨씬 낮았고, 시타글립틴 처리군의 네프린 발현량은 포도당과 안지오텐신 II 만을 처리한 군과 거의 차이가 없었다.

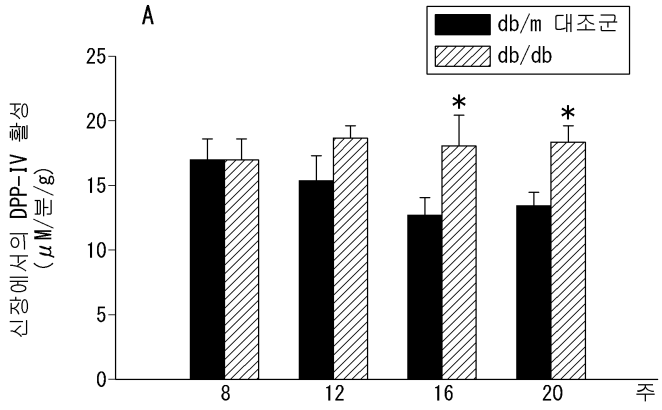
[0144] 상기 결과로부터, DA1229가 시판되는 기존의 DPP4저해제인 리나글립틴, 삭사글립틴, 및 시타글립틴보다 DPP-IV 활성 억제 효과가 뛰어나며, 당뇨병에서 발생하는 것과 같은 자극을 가한 경우에도 신사구체에서 네프린 발현을 유지하는 효과가 우수함을 알 수 있다.

도면

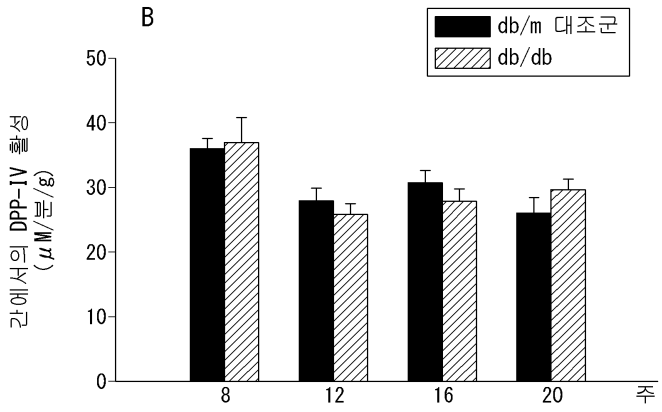
도면1



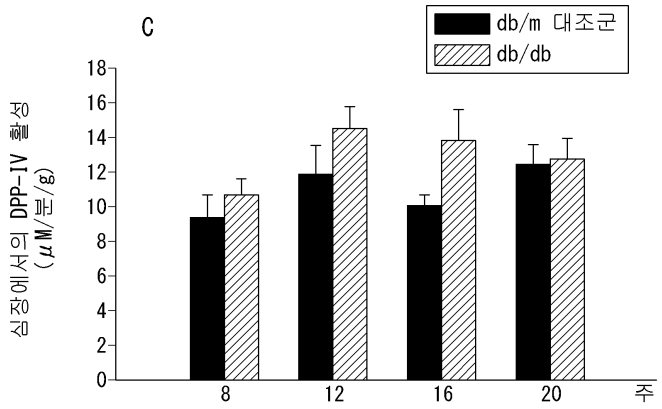
도면2a



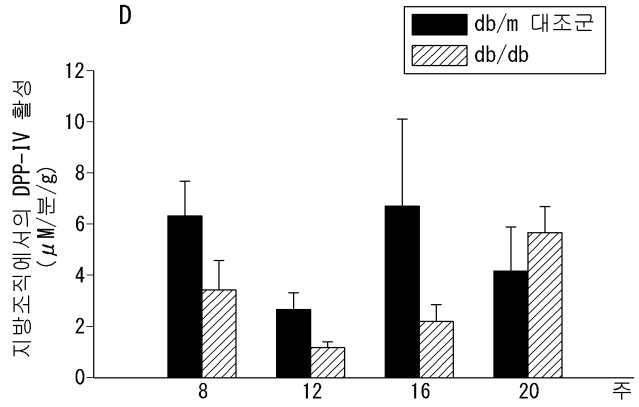
도면2b



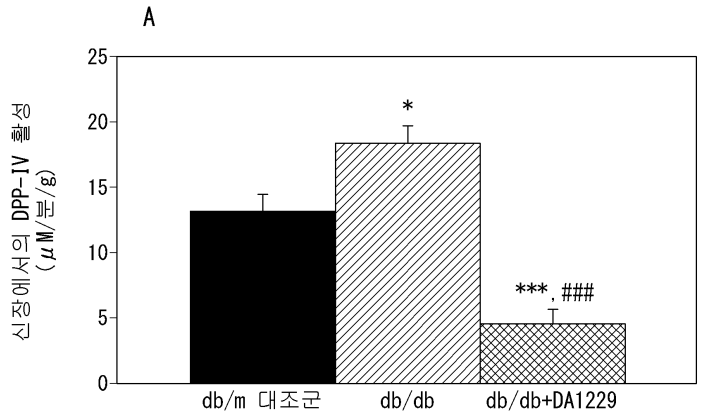
도면2c



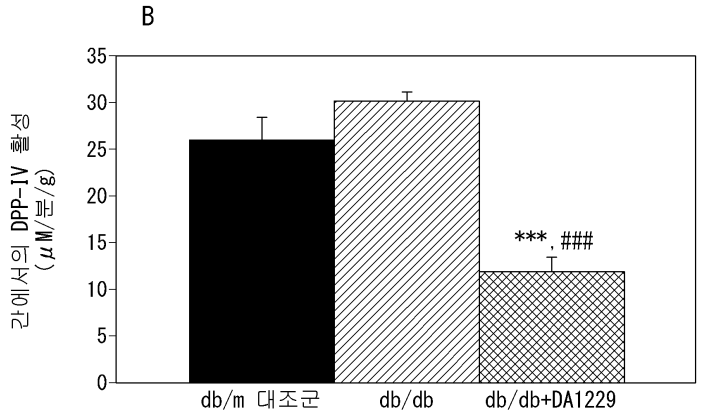
도면2d



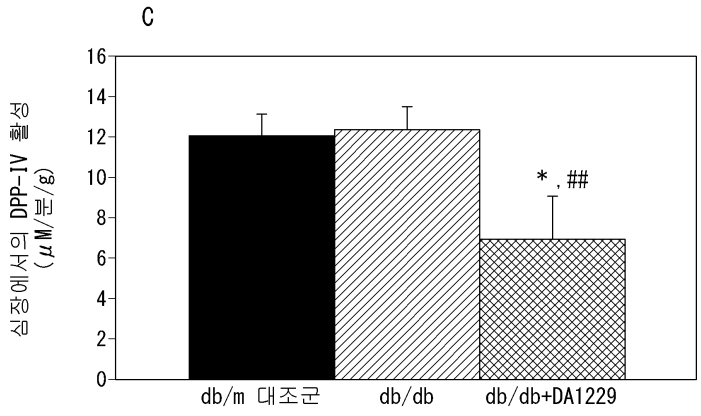
도면3a



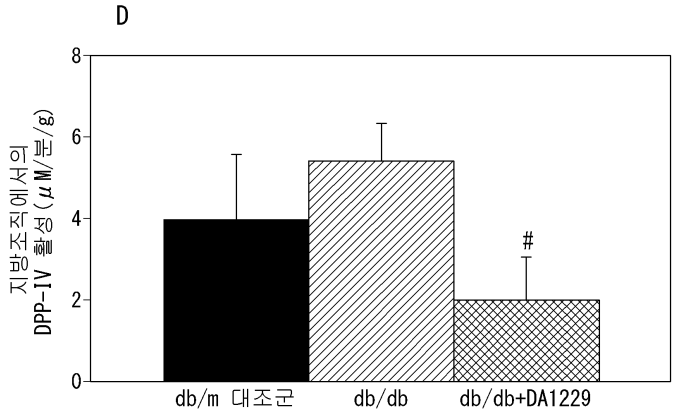
도면3b



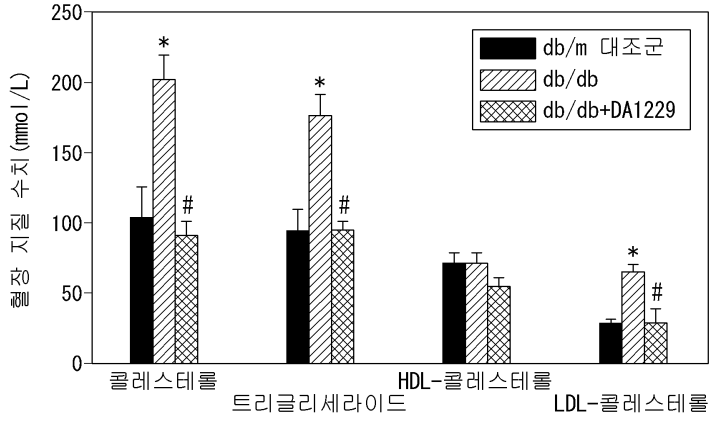
도면3c



도면3d


D
지방조직에서의
DPP-IV 활성(μM/분/g)
8
6
4
2
0
#
db/m 대조군
db/db
db/db+DA1229

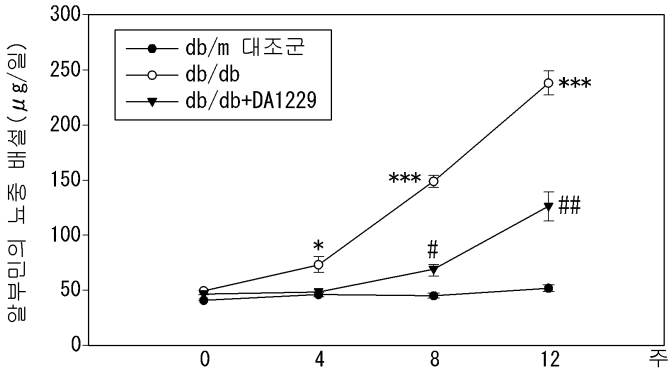
도면4


혈장 지질 수치(mmol/L)
250
200
150
100
50
0
*
#
db/m 대조군
db/db
db/db+DA1229
콜레스테롤
트리글리세라이드
HDL-콜레스테롤
LDL-콜레스테롤

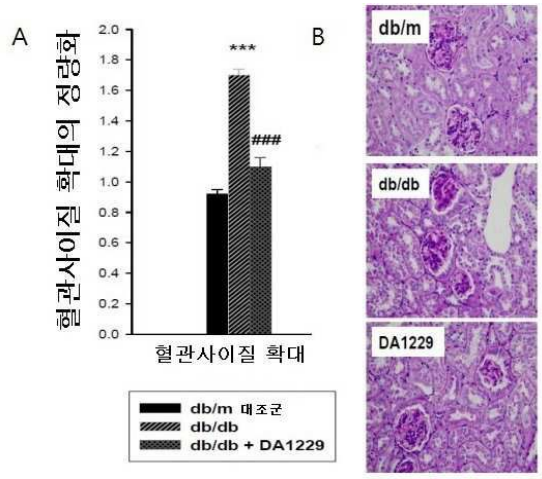
도면5


db/m
db/db
DA1229

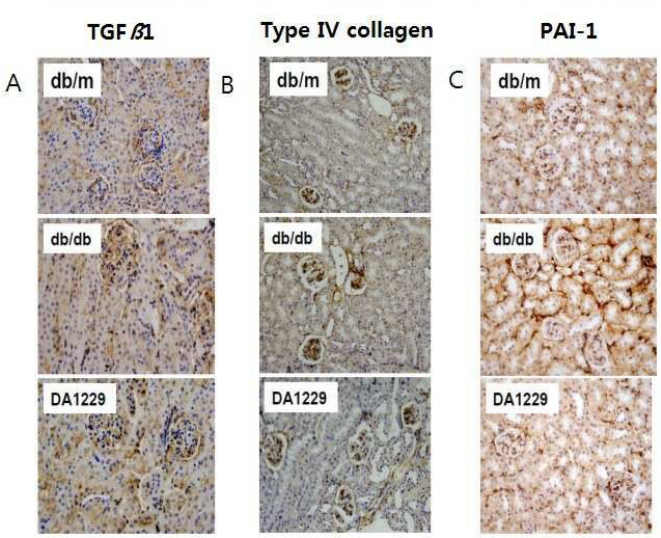
도면6


알부민의 노중 배설(μg/일)
300
250
200
150
100
50
0
db/m 대조군
db/db
db/db+DA1229
***
***
*
#
##
0
4
8
12
주

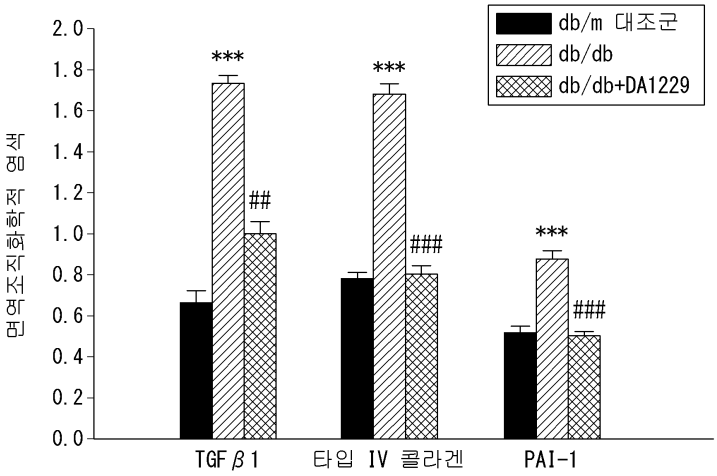
도면7


A
혈관사이질 확대의 정량화
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
***
###
혈관사이질 확대
db/m 대조군
db/db
db/db + DA1229
B
db/m
db/db
DA1229

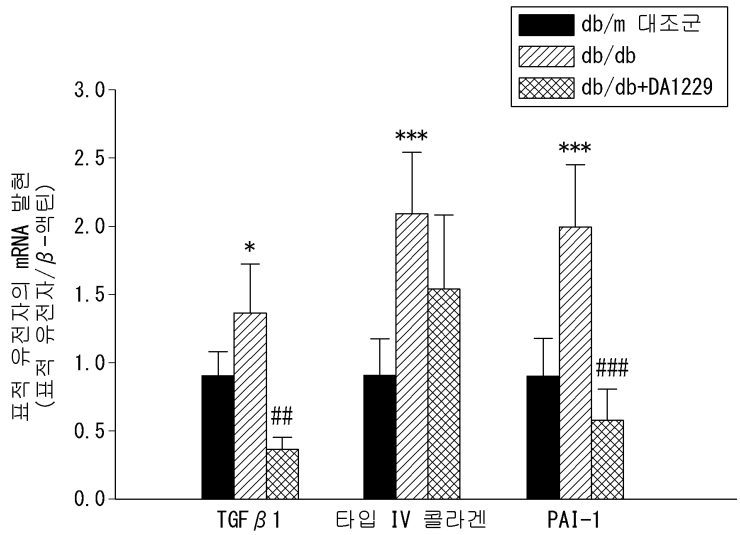
도면8


TGF β1
Type IV collagen
PAI-1
A
B
C
db/m
db/db
DA1229

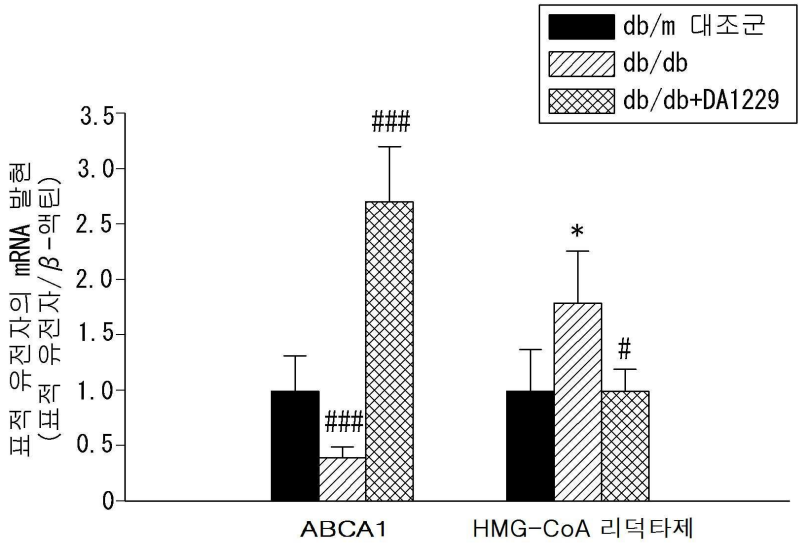
도면9


db/m 대조군
db/db
db/db+DA1229
면역조직화학적 염색
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
***
***
***
##
###
###
TGFβ1
타입 IV 콜라겐
PAI-1

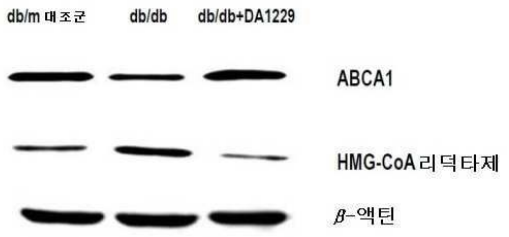
도면10


db/m 대조군
db/db
db/db+DA1229
표적 유전자의 mRNA 발현
(표적 유전자/β-액틴)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
***
***
##
###
TGFβ1
타입 IV 콜라겐
PAI-1

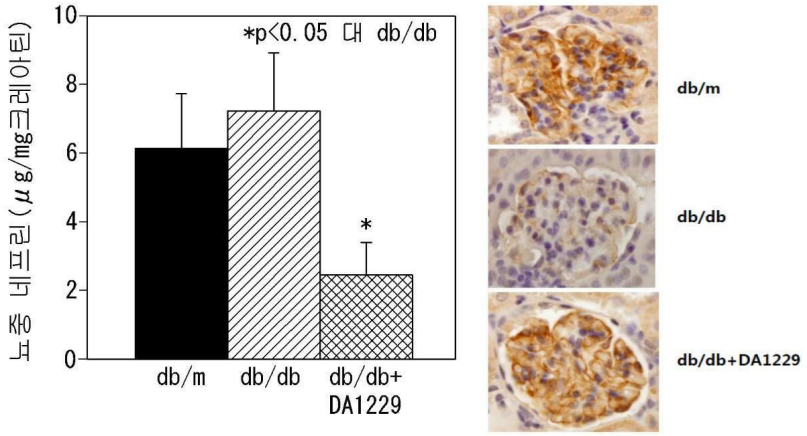
도면11



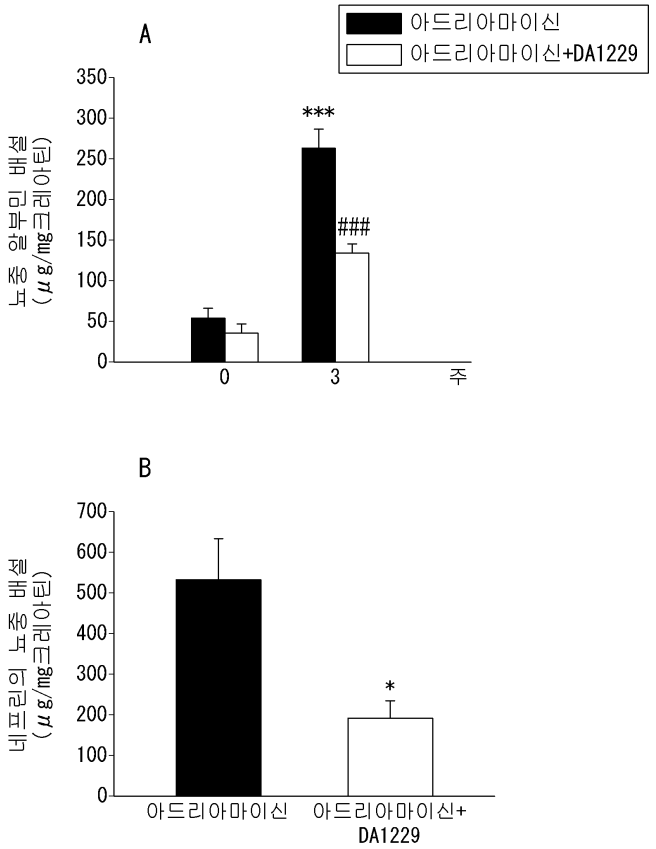
도면12



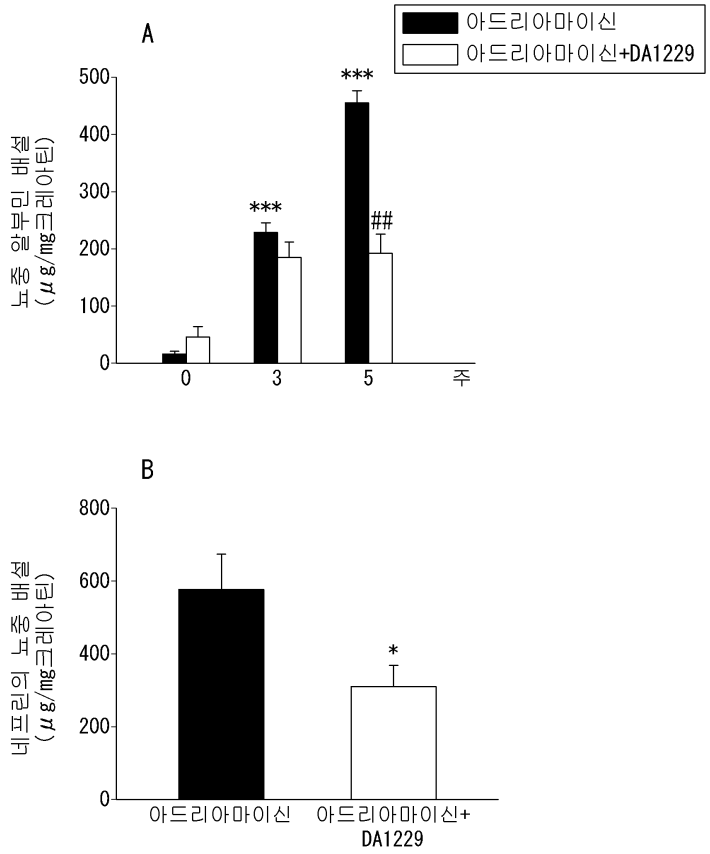
도면13



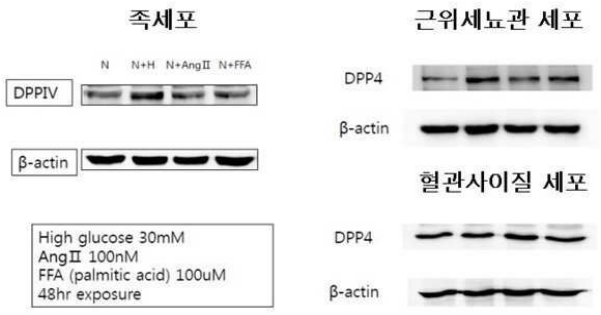
도면14


A
아드리아마이신
아드리아마이신+DA1229
뇌중 알부민 배설 (μg/mg크레아티)
350
300
250
200
150
100
50
0
***
###
0
3
주
B
네프린의 뇌중 배설 (μg/mg크레아티)
700
600
500
400
300
200
100
0
*
아드리아마이신
아드리아마이신+ DA1229

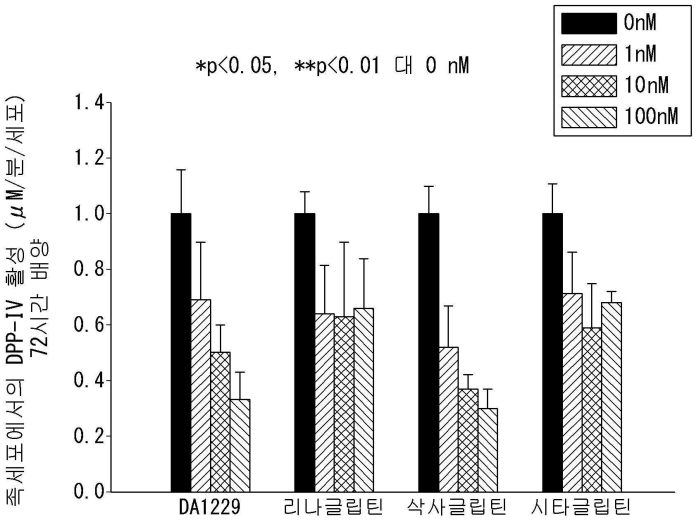
도면15


A
아드리아마이신
아드리아마이신+DA1229
노중 알부민 배설 (μg/mg크레아틴)
500
400
300
200
100
0
***
***
##
0
3
5
주
B
네프린의 노중 배설 (μg/mg크레아틴)
800
600
400
200
0
*
아드리아마이신
아드리아마이신+ DA1229

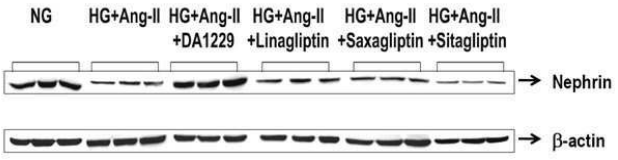
도면16


족세포
N
N+H
N+AngII
N+FFA
DPPIV
β-actin
High glucose 30mM
AngII 100nM
FFA (palmitic acid) 100uM
48hr exposure
근위세뇨관 세포
DPP4
β-actin
혈관사이질 세포
DPP4
β-actin

도면17


*p<0.05, **p<0.01 대 0 nM
0nM
1nM
10nM
100nM
즉세포에서의 DPP-IV 활성 (μM/분/세포)
72시간 배양
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
DA1229
리나글립틴
삭사글립틴
시타글립틴

도면18


NG
HG+Ang-II
HG+Ang-II +DA1229
HG+Ang-II +Linagliptin
HG+Ang-II +Saxagliptin
HG+Ang-II +Sitagliptin
Nephrin
β-actin