



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0101642  
(43) 공개일자 2024년07월02일

- |  |  |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>A61K 31/53 (2006.01) A61K 47/20 (2017.01)<br/>A61P 1/16 (2006.01) C07D 403/12 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/>A61K 31/53 (2013.01)<br/>A61K 47/20 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-7018844</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2022년11월11일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2024년06월05일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/CN2022/131297</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2023/083288<br/>국제공개일자 2023년05월19일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>PCT/CN2021/130083 2021년11월11일 중국(CN)<br/>PCT/CN2022/097426 2022년06월07일 중국(CN)</p> | <p>(71) 출원인<br/>테른스 파마슈티칼스, 인크.<br/>미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 스위트 100<br/>이스트 힐스테일 블러바드 1065</p> <p>(72) 발명자<br/>존스, 크리스토퍼 티.<br/>미국 94404 캘리포니아 포스터 시티 이스트 힐즈<br/>데일 블러바드 1065 스위트 100<br/>클루처, 케빈<br/>미국 94404 캘리포니아 포스터 시티 이스트 힐즈<br/>데일 블러바드 1065 스위트 100<br/>(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/>양영준, 이상남</p> |
|--|--|

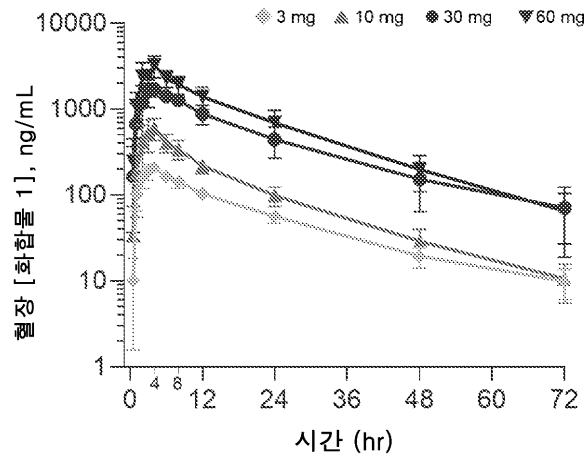
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 THR-β 작용제를 이용한 간 장애의 치료

(57) 요약

본원은 THR-β 작용제를 이용한 치료를 활용하는 환자에서 비-알콜성 지방간염을 포함한 간 장애, 및 이의 증상 및 징후를 치료하기 위한 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61P 1/16* (2018.01)

*C07D 403/12* (2013.01)

*C07B 2200/13* (2013.01)

(72) 발명자

**크리텐던, 디. 배리**

미국 94404 캘리포니아 포스터 시티 이스트 힐즈데  
일 블러바드 1065 스위트 100

**퀴크, 에린 케이.**

미국 94404 캘리포니아 포스터 시티 이스트 힐즈데  
일 블러바드 1065 스위트 100

**진, 썩**

미국 94404 캘리포니아 포스터 시티 이스트 힐즈데  
일 블러바드 1065 스위트 100

**듀안, 매트**

미국 94404 캘리포니아 포스터 시티 이스트 힐즈데  
일 블러바드 1065 스위트 100

**귀, 성**

미국 94404 캘리포니아 포스터 시티 이스트 힐즈데  
일 블러바드 1065 스위트 100

**벤, 쟈웨이**

미국 94404 캘리포니아 포스터 시티 이스트 힐즈데  
일 블러바드 1065 스위트 100

**동, 천천**

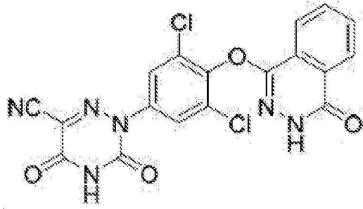
미국 94404 캘리포니아 포스터 시티 이스트 힐즈데  
일 블러바드 1065 스위트 100

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

비-알콜성 지방간염(NASH)의 치료를 필요로 하는 환자에서 비-알콜성 지방간염을 치료하는 방법으로서, 상기 환자에 하기 화학식의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 1일 1회 약 0.5 mg 내지 약 25 mg의 용량으로 경구 투여하는 단계를 포함하는, 방법:



**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 1일 1회 약 1 mg 내지 약 15 mg의 용량으로 투여되는, 방법.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 1일 1회 약 2 mg 내지 약 10 mg의 용량으로 투여되는, 방법.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 1일 1회 약 1 mg의 용량으로 투여되는, 방법.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 1일 1회 약 3 mg의 용량으로 투여되는, 방법.

**청구항 6**

제1항에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 1일 1회 약 6 mg의 용량으로 투여되는, 방법.

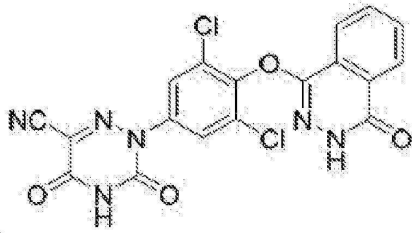
**청구항 7**

제1항에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 1일 1회 약 10 mg의 용량으로 투여되는, 방법.

**청구항 8**

비-알콜성 지방간염(NASH)의 치료를 필요로 하는 환자에서 비-알콜성 지방간염을 치료하는 방법으로서, 상기 환자에 하기 화학식의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 경구 투여하여, 약 2,500 ng<sup>\*</sup>/mL 내

지 약 50,000 ng<sup>\*</sup>h/mL의 정상 상태의 0으로부터 무한대까지의 곡선하 면적(AUC<sub>0-∞</sub>)을 획득하는 단계를 포함하는, 방법:



**청구항 9**

제8항에 있어서,

상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 약 5,000 ng<sup>\*</sup>h/mL 내지 약 50,000 ng<sup>\*</sup>h/mL의 정상 상태 AUC<sub>0-∞</sub>를 획득하기 위한 용량으로 투여되는, 방법.

**청구항 10**

제8항에 있어서,

상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 약 5,000 ng<sup>\*</sup>h/mL 내지 약 25,000 ng<sup>\*</sup>h/mL의 정상 상태 AUC<sub>0-∞</sub>를 획득하기 위한 용량으로 투여되는, 방법.

**청구항 11**

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화합물이 1일 1회 경구 투여되는, 방법.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화합물이 포타슘 염으로서 투여되는, 방법.

**청구항 13**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화합물이 소듐 염으로서 투여되는, 방법.

**청구항 14**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화합물이 이온성 계면활성제를 포함하는 약학 조성물로 투여되는, 방법.

**청구항 15**

제14항에 있어서,

상기 이온성 계면활성제가 소듐 라우릴 설페이트인, 방법.

**청구항 16**

제15항에 있어서,

상기 소듐 라우릴 설페이트가 조성물 중에 중량 대비 약 1% 내지 약 8%로 존재하는, 방법.

**청구항 17**

제15항에 있어서,

상기 소듐 라우릴 설페이트가 조성물 중에 중량 대비 약 1% 내지 약 5%로 존재하는, 방법.

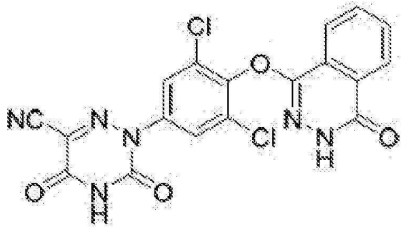
**청구항 18**

제15항에 있어서,

상기 소듐 라우릴 설페이트가 조성물 중에 중량 대비 약 5%로 존재하는, 방법.

**청구항 19**

하기 화학식의 화합물의 결정질 포타슘 염:



**청구항 20**

제19항에 있어서,

실시에 8의 방법에 의해 생산된, 결정질 포타슘 염.

**청구항 21**

제19항 또는 제20항의 화합물을 포함하는 약학 조성물.

**청구항 22**

제21항에 있어서,

상기 약학 조성물 중 화합물의 양이 약 1 mg 내지 약 15 mg인, 약학 조성물.

**청구항 23**

제21항에 있어서,

상기 약학 조성물 중 화합물의 양이 약 2 mg 내지 약 10 mg인, 약학 조성물.

**청구항 24**

제21항에 있어서,

상기 약학 조성물 중 화합물의 양이 약 1 mg인, 약학 조성물.

**청구항 25**

제21항에 있어서,

상기 약학 조성물 중 화합물의 양이 약 3 mg인, 약학 조성물.

**청구항 26**

제21항에 있어서,

상기 약학 조성물 중 화합물의 양이 약 6 mg인, 약학 조성물.

**청구항 27**

제21항에 있어서,  
상기 약학 조성물 중 화합물의 양이 약 10 mg인, 약학 조성물.

**청구항 28**

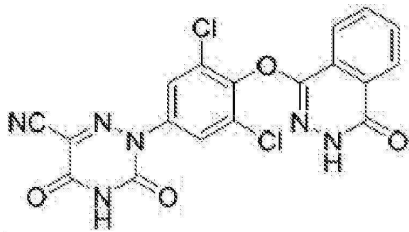
제21항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,  
이온성 계면활성제를 추가로 포함하는, 약학 조성물.

**청구항 29**

제28항에 있어서,  
상기 이온성 계면활성제가 소듐 라우릴 설페이트인, 약학 조성물.

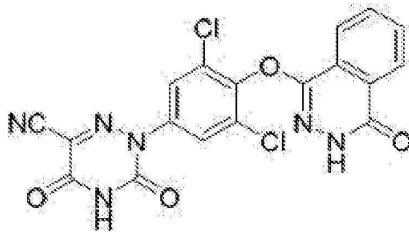
**청구항 30**

하기 화학식의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 소듐 라우릴 설페이트를 포함하는 약학 조성물:



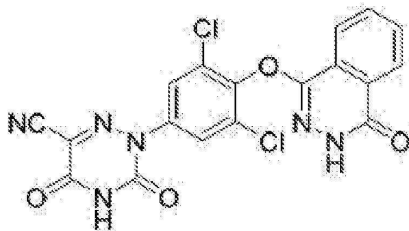
**청구항 31**

실질적으로 도 16에 도시된 바와 같은 XRPD 스펙트럼을 갖는 하기 화학식의 화합물의 결정질 포타슘 염:



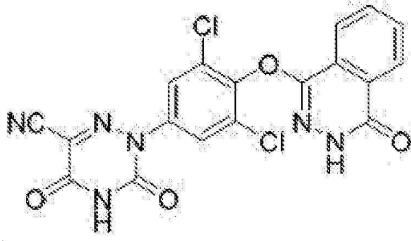
**청구항 32**

6.78±0.20, 11.35±0.20, 및 20.51±0.20 도의 2-세타 각도에서의 피크를 포함하는 XRPD 스펙트럼을 갖는 하기 화학식의 화합물의 결정질 포타슘 염:



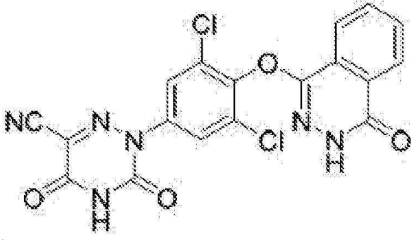
**청구항 33**

실질적으로 도 18에 도시된 바와 같은 XRPD 스펙트럼을 갖는 하기 화학식의 화합물의 결정질 소듐 염:



**청구항 34**

5.51±0.20, 8.47±0.20, 및 16.57±0.20 도의 2-세타 각도에서의 피크를 포함하는 XRPD 스펙트럼을 갖는 하기 화학식의 화합물의 결정질 소듐 염:



**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 2021년 11월 11일에 출원된 PCT/CN2021/130083 및 2022년 6월 7일에 출원된 PCT/CN2022/097426의 이익 및 우선권을 주장한다. 전술한 특허 출원의 내용은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 환자의 간 장애를 치료하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

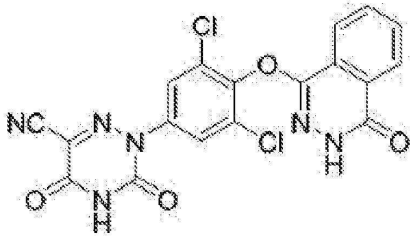
[0005] 배경

[0006] 지방간 질환 (FLD)은 간에 염증을 종종 동반하는 과도한 지방의 축적을 특징으로 하는 광범위한 질환 상태를 포함한다. FLD는 인슐린 저항성을 특징으로 할 수 있는 비-알콜성 지방간 질환 (NAFLD)을 야기할 수 있다. 치료되지 않는 경우, NAFLD는 지속적인 염증 반응 또는 비-알콜성 지방간염 (NASH), 진행성 간 섬유증, 그리고 결국에는 간경변증으로 진행될 수 있다. 유럽 및 미국에서, NAFLD는 간 이식의 두 번째로 가장 흔한 이유이다. 따라서, 치료에 대한 필요성이 시급하지만, 환자에서 명백한 증상의 결여로 인해 치료 레지멘, 특히 부담스러운 치료 레지멘, 예컨대, 주사제, 1일 다수회 투여되는 의약, 또는 위험하거나 자극적인 부작용을 생산하는 임의의 것을 유지할 동기가 환자에게 결여될 수 있다. 현재 NASH의 승인된 치료법은 없다.

[0007] 갑상선 호르몬 수용체-베타 (THR-β) 작용제는 최근 NASH를 포함한 간 질환의 치료에서 조사되고 있다. THR-β는 간에서의 THR의 주요 형태이며, 에너지 균형, 및 지방산 및 지질의 대사에 중요한 역할을 하는 반면, THR-α는 심장에서 우세하며, 갑상선 호르몬 자극의 원치 않는 심혈관 효과의 대부분을 담당한다. 극복해야 할 유의한 문제는 THR-α 작용(agonism)과 연관된 바람직하지 않은 부작용을 생산하지 않을 NASH 치료용 THR-β 작용제를 개발하는 것을 수반한다.

**발명의 내용**

[0008] 본원은 간 장애의 치료를 필요로 하는 환자에서 간 장애를 치료하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 방법은 환자에 화합물 1로서 본원에 지칭되는 갑상선 호르몬 수용체 베타 (THR-β) 작용제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 투여하는 단계를 포함한다.



화합물 1

[0009]

[0010]

[0011]

[0012]

[0013]

[0014]

화학명 2-(3,5-디클로로-4-((4-옥소-3,4-디하이드로프탈라진-1-일)옥시)페닐)-3,5-디옥소-2,3,4,5-테트라하이드로-1,2,4-트리아진-6-니트릴을 갖는 화합물 1은 미국 특허 제11,084,802호에 기재되어 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

본 발명자들은 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 물질이 간 장애를 앓고 있는 환자에 놀랍게도 적은 용량으로 투여되면서 여전히 원하는 수준의 효험을 유지할 수 있음을 발견하였다. 결과적으로, 화합물 1은 일반적으로 THR 작용과 연관된 바람직하지 않은 부작용 없이 간 장애를 치료하는 데 사용될 수 있다.

본 개시내용의 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 1일 1회 1 mg 이하의 적은 용량으로 환자에 경구 투여될 수 있으며, 여전히 아민 옥시다제 활성을 충분히 감소시키고 림프구 접착 및 이행을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 1 mg 내지 약 60 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 0.5 mg 내지 약 25 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 1 mg 내지 약 15 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 3 mg 내지 약 10 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 1 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 3 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 4 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 5 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 6 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 10 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 15 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 20 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 30 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 50 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 60 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다.

다른 양태에서, 본 개시내용은 NASH의 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에서 NASH의 치료 또는 예방의 방법을 제공하며, 상기 방법은 환자에 치료적 유효량의 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시양태에서, 이를 필요로 하는 환자는 지방간 질환, 예컨대, NAFLD를 앓고 있는 환자이다. 다른 실시양태에서, 이를 필요로 하는 환자는 대사 증후군을 앓고 있는 환자이다.

일 양태에서, 본 개시내용은 간 염증의 감소를 필요로 하는 환자에서 간 염증을 감소시키는 방법을 제공하며, 이는 환자에 치료적 유효량의 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 투여하는 단계를 포함한다. 간 염증의 감소는 간에서의 염증 유전자, 및 백혈구 활성화의 마커의 감소된 발현을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 간 염증은 환자의 혈액 중 저-밀도 지질단백질 콜레스테롤 (LDL-C) 수준을 증가시키지 않으면서 감소된다.

[0015] 다른 양태에서, 본 개시내용은 간의 섬유증을 특징으로 하는 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 이는 환자에 치료적 유효량의 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 투여하는 단계를 포함한다. 섬유증의 감소는 조직학적 개선 및 간에서의 섬유증-유발 유전자의 감소된 발현을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 간 섬유증은 환자의 혈액 중 저-밀도 지질단백질 콜레스테롤 (LDL-C) 수준을 증가시키지 않으면서 감소된다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는 간 섬유증 및 간 염증의 감소를 초래한다.

[0016] 일부 실시양태에서, 환자는 간 장애 및 진성 당뇨병을 갖는다. 일부 실시양태에서, 환자는 간 장애 및 심혈관 장애를 갖는다. 일부 실시양태에서, 치료 기간은 환자의 남은 수명이다. 일부 실시양태에서, 방법은 항히스타민제, 면역억제제, 스테로이드, 리팜피신, 오피오이드 길항제 또는 선택적 세로토닌 재흡수 억제제 (SSRI)를 투여하는 단계를 포함하지 않는다.

[0017] 일부 실시양태에서, 화합물 1은 약학적으로 허용가능한 염으로서 환자에 투여된다. 일부 실시양태에서, 약학적으로 허용가능한 염은 포타슘 염이다. 일부 실시양태에서, 약학적으로 허용가능한 염은 소듐 염이다.

[0018] 또한, 본 개시내용은 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신규 조성물을 제공한다. 화합물 1은 염 형태로 투여되는 경우에도 매우 낮은 수성 용해도를 갖는다. 특정 이온성 계면활성제는 화합물의 분해를 최소화하거나 전혀 분해하지 않으면서 화합물 1 및 이의 약학적 염을 효과적으로 가용화할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 일부 실시양태에서, 이온성 계면활성제는 소듐 라우릴 설페이트이다. 일부 이러한 실시양태에서, 조성물 중 SLS의 양은 중량 대비 약 1% 내지 약 8%이다. 다른 이러한 실시양태에서, 조성물 중 SLS의 양은 중량 대비 약 5%이다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 화합물 1의 포타슘 염 및 SLS를 포함한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 단일 용량의 화합물 1의 투여 이후 최대 72시간까지 환자의 화합물 1의 혈장 농도를 도시한다.
- 도 2는 투여된 용량에 대해 플롯팅된 환자에서의 화합물 1의 곡선하 면적 (AUC<sub>inf</sub>) 및 최대 혈장 농도 (C<sub>max</sub>)를 도시한다.
- 도 3은 단일 용량의 화합물 1 투여 4일 후 성호르몬 결합 글로불린 (SHBG)의 평균 변화 퍼센트를 도시한다.
- 도 4는 단일 용량의 화합물 1의 투여 4일 후 아포지단백질 B (Apo B)의 평균 변화 퍼센트를 도시한다.
- 도 5는 인간에서의 화합물 1 또는 위약의 매일 투여의 14일 후 15일차에 대한 유리 T3, T4 및 TSH를 도시한다.
- 도 6은 인간에서의 화합물 1 또는 위약의 매일 투여의 14일 후 15일차에 대한 기준선으로부터의 유리 테스토스테론, 총 테스토스테론 및 성호르몬 결합 글로불린 (SHBG)의 변화 퍼센트를 도시한다.
- 도 7은 화합물 1을 1일 1회 투약한 다중 증량 용량 연구의 1일차 및 14일차에 시간 경과에 따른 화합물 1의 혈장 농도를 도시한다.
- 도 8은 인간에서의 화합물 1 또는 위약의 매일 투여의 14일 후 15일차에 대한 기준선으로부터의 약력학적 마커 (성호르몬 결합 글로불린, ApoB, 총 콜레스테롤, LDL-c, HDL-c 및 트리글리세리드)의 변화 퍼센트를 도시한다.
- 도 9는 마우스 NASH 모델에서 체중 및 기관 중량에 대한 화합물 1의 효과를 도시한다.
- 도 10은 마우스 NASH 모델에서 간 지방증, 염증 및 섬유증에 대한 화합물 1의 효과를 도시한다.
- 도 11은 마우스 NASH 모델에서 지질 및 간 손상의 지표 (ALT)에 대한 화합물 1의 효과를 도시한다.
- 도 12는 콜라겐 세포의 기질 및 간 성상 세포 활성화와 연관된 유전자의 발현에 대한 화합물 1의 효과를 도시한다.
- 도 13은 2개의 경구 제형 (P01 또는 P02) 중 하나로 제공된 단일 50 mg 용량의 투여 이후 비글견에서의 화합물 1의 혈장 농도를 도시한다.
- 도 14는 경구 제형 P03으로 제공된 단일 10 mg 용량의 투여 이후 2 개의 그룹의 비글견에서의 화합물 1의 혈장 농도를 도시한다. 하나의 그룹은 펜타가스트린으로 사전치료하였고, 다른 그룹은 파모티딘으로 사전치료하였다.
- 도 15는 경구 제형 P03으로 제공된 단일 10 mg 용량의 투여 이후 공복 및 섭식 비글견에서의 화합물 1의 혈장 농도를 도시한다.

- 도 16은 화합물 1, 포타슘 염 형태, 유형 A의 XRPD 스펙트럼을 도시한다.
- 도 17은 화합물 1, 유리산 형태, 유형 A의 XRPD 스펙트럼을 도시한다.
- 도 18은 화합물 1, 소듐 염 형태, 유형 A의 XRPD 스펙트럼을 도시한다.
- 도 19는 화합물 1, L-아르기닌 염 형태, 유형 A의 XRPD 스펙트럼을 도시한다.
- 도 20은 화합물 1, 마그네슘 염 형태, 유형 A의 XRPD 스펙트럼을 도시한다.
- 도 21은 화합물 1에 대한 전반적인 연구 설계를 도시한다.
- 도 22는 화합물 1에 대한 인구통계적 및 기준선 특성화를 도시한다.
- 도 23은 화합물 1에 대한 14일차의 혈장 농도-시간 프로파일을 도시한다.
- 도 24는 14일차, 화합물 1의 PK 매개변수를 도시한다.
- 도 25는 성호르몬 결합 글로불린 (SHBG)(기준선으로부터 15일차까지의 변화 퍼센트)을 도시한다.
- 도 26은 LDL-c (기준선으로부터 15일차까지의 변화 퍼센트)를 도시한다.
- 도 27은 화합물 1 용량당 SHBG 및 LDL-c에 대한 치료 종료 시 (15일차) 기준선으로부터의 변화 퍼센트를 도시한다.
- 도 28은 화합물 1 용량당 총 콜레스테롤 (TC), Apo B 및 트리글리세리드 (TG)의 감소를 도시한다.
- 도 29는 치료-유발 이상 사례가 경도였고 활력 징후의 유의한 변화 없이 대부분 관련이 없음을 도시한다.
- 도 30a 및 도 30b는 생검-확인된 수컷 DIO-NASH 마우스의 체중 변화를 도시한다. 화합물 2 단독 및 화합물 1과의 조합은 체중을 감소시켰다. 체중은 연구 동안 매일 측정되었다. 연구 동안의 체중 변화는 도 30a에 도시되어 있으며, 여기서 점은 기준선에 대한 평균 체중 변화를 나타낸다 (n=그룹당 10-16 마리의 마우스). 도 30b에서, 막대는 연구의 11 주차에 측정된 평균 (SD) 체중을 나타낸다. 제지방(lean) 비히클 대조군, 백색; DIO-GAN 비히클 대조군, 회색; 화합물 2, 청색; 화합물 1-저, 연한 주황색; 화합물 1-중간, 주황색; 화합물 1-고, 짙은 주황색; Combo-저, 연한 자색; Combo-중, 자색; Combo-고, 짙은 자색. ANOVA에 의해 결정된 DIO-GAN 비히클 대조군에 대한 통계적 비교 후, 다중 비교를 위한 Tukey 보정이 뒤따랐다. \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; \*\*\*\* p<0.0001.
- 도 31은 연구 동안 별개의 주간 음식 섭취량을 도시한다. 점은 그램 단위의 주간 평균 음식 섭취량을 나타낸다 (n=그룹당 10-16 마리의 마우스). 제지방 비히클 대조군, 백색; DIO-GAN 비히클 대조군, 회색; 화합물 2, 청색; 화합물 1-저, 연한 주황색; 화합물 1-중간, 주황색; 화합물 1-고, 짙은 주황색; Combo-저, 연한 자색; Combo-중, 자색; Combo-고, 짙은 자색.
- 도 32a 및 도 32b는 간 및 비장의 중량을 도시한다. 화합물 2 및 화합물 1 단독 및 조합은 비장 중량의 변화 없이 간비대를 유의하게 감소시켰다. 막대는 연구 종료 시 결정된 평균 (SD) 간 (도 32a) 및 비장 (도 32b) 기관 중량을 나타낸다 (n=그룹당 10-16 마리의 마우스). ANOVA에 의해 결정된 DIO-GAN 비히클 대조군에 대한 통계적 비교 후, 다중 비교를 위한 Tukey 보정이 뒤따랐다. \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; \*\*\*\* p<0.0001.
- 도 33a 및 도 33b는 기준선에서의 체질량 조성을 도시한다. 체질량 조성은 기준선 (-1주차)에서 치료 그룹 전체에 걸쳐 잘 균형을 이루었다. 막대는 연구의 -1주차에 전신 EchoMRI에 의해 결정된 체중의 백분율 (%BW, n=그룹당 10-16 마리의 마우스)로서 평균 (SD) 지방 조직 (도 33a) 및 제지방 조직 (도 33b) 질량을 나타낸다. ANOVA에 의해 결정된 DIO-GAN 비히클 대조군에 대한 통계적 비교 후, 다중 비교를 위한 Tukey 보정이 뒤따랐다. \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; \*\*\*\* p<0.0001.
- 도 34a 및 도 34b는 11주차의 체질량 조성을 도시한다. 화합물 2 단독 및 화합물 1과의 조합은 지방 조직 질량을 유의하게 감소시켰다. 막대는 연구의 11주차에 전신 EchoMRI에 의해 결정된 체중의 백분율 (%BW, n=그룹당 10-16 마리의 마우스)로서 평균 (SD) 지방 조직 (도 34a) 및 제지방 조직 (도 34b) 질량을 나타낸다. ANOVA에 의해 결정된 DIO-GAN 비히클 대조군에 대한 통계적 비교 후, 다중 비교를 위한 Tukey 보정이 뒤따랐다. \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; \*\*\*\* p<0.0001.

도 35a 및 도 35b는 혈장 및 간의 총 콜레스테롤을 도시한다. 화합물 2 및 화합물 1 단독 및 조합은 총 콜레스테롤을 유의하게 감소시켰다. 막대는 혈장 (도 35a) 및 간 (도 35b)에서 연구 종료 시 측정된 평균 (SD) 총 콜레스테롤 수준을 나타낸다 (n=그룹당 10-16 마리 마우스). ANOVA에 의해 결정된 DIO-GAN 비히클 대조군에 대한 통계적 비교 후, 다중 비교를 위한 Tukey 보정이 뒤따랐다. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

도 36a 및 도 36b는 혈장 및 간 트리글리세리드를 도시한다. 화합물 2 단독 및 화합물 1과의 조합은 혈장 트리글리세리드를 유의하게 감소시켰다. 막대는 혈장 (도 36a) 및 간 (도 36b)에서 연구 종료 시 측정된 평균 (SD) 트리글리세리드 수준을 나타낸다 (n=그룹당 10-16 마리 마우스). ANOVA에 의해 결정된 DIO-GAN 비히클 대조군에 대한 통계적 비교 후, 다중 비교를 위한 Tukey 보정이 뒤따랐다. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

도 37a 및 도 37b는 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT) 및 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST) 수준을 도시한다. 화합물 1 단독은 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT) 수준을 유의하게 감소시켰다. 막대는 연구 종료 시 결정된 평균 (SD) ALT (도 37a) 및 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST)(도 37b) 수준을 나타낸다 (n=그룹당 10-16 마리의 마우스). ANOVA에 의해 결정된 DIO-GAN 비히클 대조군에 대한 통계적 비교 후, 다중 비교를 위한 Tukey 보정이 뒤따랐다. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

도 38은 알칼리성 포스포타제 수준을 도시한다. 알칼리성 포스포타제 (ALP) 수준은 치료에 의해 유의하게 변화되지 않았다. 막대는 연구 종료 시 결정된 평균 (SD) ALP 수준을 나타낸다 (n=그룹당 10-16 마리의 마우스). ANOVA에 의해 결정된 DIO-GAN 비히클 대조군에 대한 통계적 비교 후, 다중 비교를 위한 Tukey 보정이 뒤따랐다. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

도 39a 및 도 39b는 기준선에서 그리고 치료 종료 시 NAFLD 활성 점수 (NAS)를 도시한다. NAFLD 활성 점수 (NAS)는 기준선에서 잘 균형을 이루었고, 조합 치료 그룹에서 유의하게 개선되었다. 팽만(ballooning), 지방증 및 소엽 염증 조직학적 점수의 종합적 비가중 합계로서 정의되는 NAS를 기준선에서 (도 39a) 그리고 12-주의 치료 후 (도 39b)에 결정하였다. 점은 각각의 치료 그룹의 개별 마우스를 나타낸다 (n=14-16). ANOVA에 의해 결정된 DIO-GAN 비히클 대조군에 대한 통계적 비교 후, 다중 비교를 위한 Tukey 보정이 뒤따랐다. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

도 40a 및 도 40b는 조직학적 형태계측 분석에 의한 간 지방증을 도시한다. 화합물 2 및 화합물 1의 조합은 조직학적 형태계측 분석에 의해 결정된 바와 같이 간 지방증의 더 큰 감소를 초래하였다. 지질 방울을 갖는 간세포의 백분율 및 간 지질 함량을 퍼센트 분율 면적 (FA)으로서 포함하는 간세포 지방증은 연구 종료 시 간 조직학적 샘플의 형태계측 분석에 의해 결정되었다. ANOVA에 의해 결정된 DIO-GAN 비히클 대조군에 대한 통계적 비교 후, 다중 비교를 위한 Tukey 보정이 뒤따랐다. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

도 41은 간세포 지질 방울 크기를 도시한다. 조합 치료는 간세포 지질 방울 크기를 유의하게 감소시킨다. 지질 방울 크기는 연구 종료 시 간 조직학적 샘플의 형태계측 분석에 의해 결정되었다. ANOVA에 의해 결정된 DIO-GAN 비히클 대조군에 대한 통계적 비교 후, 다중 비교를 위한 Tukey 보정이 뒤따랐다. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

도 42는 혈장 CK18 M30을 도시한다. 아포토시스 바이오마커 사이토케라틴 18 M30 (CK18 M30) 수준은 치료에 의해 유의하게 변화되지 않았다. 아포토시스 바이오마커인 CK18 M30은 연구 종료 시 혈장 샘플에서 측정되었다. ANOVA에 의해 결정된 DIO-GAN 비히클 대조군에 대한 통계적 비교 후, 다중 비교를 위한 Tukey 보정이 뒤따랐다. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

도 43a 및 도 43b는 갈락틴-3 및 평활근 액틴 단백질의 간 단백질 발현을 도시한다. 화합물 2 치료는 갈락틴-3 (Gal-3)의 발현을 감소시킨다. Gal-3 (도 43a) 및 α-평활근 액틴 (α-SMA)(도 43b)의 발현은 연구 종료 시 치료된 마우스의 간의 면역조직화학적 (IHC) 염색에 의해 평가되었다. ANOVA에 의해 결정된 DIO-GAN 비히클 대조군에 대한 통계적 비교 후, 다중 비교를 위한 Tukey 보정이 뒤따랐다. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

도 44는 간에서의 에너지 및 지질 대사 유전자의 발현을 도시한다. 에너지 및 지질 대사에 관여하는 선택된 유전자에 대한 화합물 1-고 및 Combo-고 치료 그룹 사이의 유전자 발현 값의 비교. 간 샘플을 종결 시 RNAseq에

의한 전사체학 분석을 위해 가공하였다. 점은 DIO-GAN 비히클 대조군에 대한 평균 배수-변화 발현 값을 나타낸다 (n=그룹당 10 마리의 마우스). 적색 및 청색 색상은 DIO-GAN 비히클 및 제지방 대조군 그룹 간의 변화 방향 (적색 = 증가된 발현; 청색 = 감소된 발현)을 나타낸다. 점선은 아이덴티티의 선을 나타낸다. 화합물 1-고 및 Combo-고 치료 그룹에서 선택된 유전자에 대한 배수-변화 발현 값의 선형 회귀 분석에 의해 실선을 생성하였다. 에너지 및 지질 대사에 관여하는 유전자를 선택한다. 스쿠알렌 에폭시다제 (Sqle), 7-데하이드로콜레스테롤 (Dhcr7), 하이드록시메틸글루테르아틸-CoA 신타제 (Hmgcs1) 및 스테아로일-CoA 불포화효소 (Scd1).

도 45a, 도 45b, 도 45c 및 도 45d는 에너지 및 지질 대사에 관여하는 선택된 유전자의 발현을 도시한다. 에너지 및 지질 대사에 관여하는 유전자의 간 발현. 간 샘플을 종결 시 RNAseq에 의한 전사체학 분석을 위해 가공하였다. 막대는 도시된 에너지 및 지질 대사에 관여하는 선택된 유전자에 대한 평균 (SD) 발현 (FPKM) 값을 나타낸다. 스쿠알렌 에폭시다제 (Sqle, 도 45a), 7-데하이드로콜레스테롤 (Dhcr7, 도 45b), 하이드록시메틸글루테르아틸-CoA 신타제 (Hmgcs1, 도 45c), 및 스테아로일-CoA 불포화효소 (Scd1, 도 45d). 제지방, 백색 (가장-왼쪽 막대); DIO-GAN 비히클 대조군, 회색 (왼쪽으로부터 두 번째); 화합물 2, 청색 (왼쪽으로부터 세 번째); 화합물 1-저, 연한 주황색 (왼쪽으로부터 네 번째); 화합물 1-중, 주황색 (왼쪽으로부터 다섯 번째); 화합물 1-고, 짙은 주황색 (오른쪽으로부터 네 번째); Combo-저, 연한 자색 (오른쪽으로부터 세 번째); Combo-중간, 자색 (오른쪽으로부터 두 번째); Combo-고, 짙은 자색 (가장-오른쪽 막대). 개별 치료 그룹에 대한 통계적 비교는 DIO-GAN 비히클 대조군에 관하여 도시된다. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. 조합 치료 그룹을 추가적으로 화합물 2 (+p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.0001, ++++p<0.00001) 또는 각각의 화합물 1 단일 약제 치료 그룹 (즉, 화합물 1-저 대 Combo-저)과 비교하였다; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.0001, ####p<0.00001.

도 46은 섬유증 및 염증에 관여하는 유전자의 발현을 도시한다. 섬유증 및 염증에 관여하는 유전자의 간 발현. 간 샘플을 종결 시 RNAseq에 의한 전사체학 분석을 위해 가공하였다. 막대는 섬유증 및 염증에 관여하는 선택된 유전자에 대한 평균 (SD) 발현 (FPKM) 값을 나타낸다. 콜라겐 유형 I 알파 1 (Col1a1), 액틴 알파 2 평활 액틴 (Acta2), 갈락틴 3 (Lgals3) 및 흑색종 세포 부착 분자 (CD146). 제지방, 백색 (가장 왼쪽 막대); DIO-GAN 비히클 대조군, 회색 (왼쪽으로부터 두 번째); 화합물 2, 청색 (왼쪽으로부터 세 번째); 화합물 1-저, 연한 주황색 (왼쪽으로부터 네 번째); 화합물 1-중, 주황색 (왼쪽으로부터 다섯 번째); 화합물 1-고, 짙은 주황색 (오른쪽으로부터 네 번째); Combo-저, 연한 자색 (오른쪽으로부터 세 번째); Combo-중, 자색 (오른쪽으로부터 두 번째); Combo-고, 짙은 자색 (가장 오른쪽 막대). 개별 치료 그룹에 대한 통계적 비교는 DIO-GAN 비히클 대조군에 관하여 도시된다. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### [0020] 정의

[0021] 본원에 사용된 바와 같이, 달리 나타내지 않는 한, 다음의 정의가 적용될 것이다. 추가로, 본원에 사용된 임의의 용어 또는 기호가 아래에 제시된 바와 같이 정의되지 않는 경우, 이는 본 기술 분야의 통상적인 의미를 가질 것이다

[0022] "포함하는"은 조성물 및 방법이 언급된 요소를 포함하지만, 다른 요소를 배제하지 않음을 의미하는 것으로 의도된다. 조성물 및 방법을 정의하기 위해 사용될 때 "본질적으로 이로 이루어지는"은 조합에 임의의 본질적인 유의성의 다른 요소를 배제하는 것을 의미할 것이다. 예를 들어, 본원에 정의된 바와 같은 요소로 본질적으로 이루어지는 조성물은 청구된 발명의 기본 및 신규 특징(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 다른 요소를 배제하지 않을 것이다. "~로 이루어지는"은 예컨대, 언급된 다른 성분 및 실질적인 방법 단계를 미량 초과하는 것을 배제하는 것을 의미할 것이다. 이러한 전환 용어 각각에 의해 정의된 실시양태는 본 발명의 범주 내에 있다.

[0023] "조합 요법" 또는 "조합 치료"는 치료에서 2 개 이상의 약물 또는 약제의 사용을 지칭하며, 예컨대, 간 장애, 예컨대, NAFLD, NASH, 및 이들 각각의 증상 및 징후를 치료하는 데 유용한 다른 약제와 함께 본원에 활용된 바와 같은 화합물 1의 사용은 조합 요법이다. "조합" 투여는 두 약제 모두의 약리학적 효과가 환자에서 동시에 나타나는 임의의 방식으로서의 2 개의 약제 (예컨대, 본원에 활용된 바와 같은 화합물 1, 및 다른 약제)의 투여를 지칭한다. 따라서, 조합 투여는 두 약제 모두의 투여에 단일 약화 조성물, 동일한 투여량 형태, 또는 심지어 동일한 투여 경로가 사용되어야 하거나, 2 개의 약제가 정확히 동시에 투여되어야 하는 것을 필요로 하지 않는다. 두 약제 모두는 또한 단일 약학적으로 허용가능한 조성물로 제형화될 수 있다. 이러한 단일 조성물의 비-제한적인 예는 경구 조성물 또는 경구 투여량 형태이다. 예를 들어, 그리고 제한 없이, 화합물 1은 본 발명에 따른 다

른 약제와 조합 요법으로 투여될 수 있음이 고려된다.

- [0024] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "부형제"는 활성 성분으로서 본 발명의 화합물을 함유하는 정제와 같은 약물 또는 약의 생산에 사용될 수 있는 불활성 또는 비활성 물질을 의미한다. 용어 부형제는 제한 없이 결합제, 봉해제, 코팅제, 압축/캡슐화 보조제, 크립 또는 로션, 윤활제, 비경구 투여용 용액, 씹을 수 있는 정제용 재료, 감미료 또는 향료, 현탁화제/겔화제 또는 습식 과립화제로서 사용되는 임의의 물질을 포함하는 다양한 물질을 포괄할 수 있다. 결합제는 예컨대, 카보머, 포비돈, 크산탄 검 등을 포함하고; 코팅제는 예컨대, 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트, 에틸셀룰로스, 젤란 검, 말토덱스트린, 장용 코팅제 등을 포함하고; 압축/캡슐화 보조제는 예컨대, 칼슘 카보네이트, 텍스트로스, 프럭토스 dc (dc = "직접 압축성"), 꿀 dc, 락토스 (무수화물 또는 일수화물; 임의로 아스파탐, 셀룰로스 또는 미세결정질 셀룰로스와 조합됨), 전분 dc, 수크로스 등을 포함하고; 봉해제는 예컨대, 크로스카르멜로스 소듐, 젤란 검, 소듐 전분 글리콜레이트 등을 포함하고; 크립 또는 로션은 예컨대, 말토덱스트린, 카라기난 등을 포함하고; 윤활제는 예컨대, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산, 소듐 스테아릴 푸마레이트 등을 포함하고; 씹을 수 있는 정제용 재료는 예컨대, 텍스트로스, 프럭토스 dc, 락토스 (일수화물, 임의로 아스파탐 또는 셀룰로스와 조합됨) 등을 포함하고; 현탁화제/겔화제는 예컨대, 카라기난, 소듐 전분 글리콜레이트, 크산탄 검 등을 포함하고; 감미료는 예컨대, 아스파탐, 텍스트로스, 프럭토스 dc, 소르비톨, 수크로스 dc 등을 포함하고; 습식 과립화제는 예컨대, 칼슘 카보네이트, 말토덱스트린, 미세결정질 셀룰로스 등을 포함한다.
- [0025] "환자"는 포유류를 지칭하고, 인간 및 비-인간 포유류를 포함한다. 환자의 예는 마우스, 랫트, 햄스터, 기니피그, 돼지, 토끼, 고양이, 개, 염소, 양, 소 및 인간을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 환자는 인간을 지칭한다.
- [0026] "약학적으로 허용가능한"은 바람직하게는 생체내, 보다 바람직하게는 인간 투여용으로 안전하고 비-독성인 것을 지칭한다.
- [0027] "약학적으로 허용가능한 염"은 약학적으로 허용가능한 염을 지칭한다. 본원에 기재된 화합물은 약학적으로 허용가능한 염으로서 투여될 수 있다.
- [0028] "염"은 산과 염기 사이에 형성된 이온성 화합물을 지칭한다. 본원에 제공된 화합물이 산성 기능을 함유하는 경우, 이러한 염은 제한 없이, 알칼리 금속, 알칼리 토금속 및 암모늄 염을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 암모늄 염은 양성자화된 질소 염기 및 알킬화된 질소 염기를 함유하는 염을 포함한다. 약학적으로 허용가능한 염에 유용한 예시적이고 비-제한적인 양이온은 Na, K, Rb, Cs, NH<sub>4</sub>, Ca, Ba, 이미다졸륨, 및 자연 발생 아미노산에 기반한 암모늄 양이온을 포함한다. 본원에 활용된 화합물이 염기성 기능을 함유하는 경우, 이러한 염은 제한 없이, 카복실산 및 설폰산과 같은 유기산의 염, 및 하이드로젠 할라이드, 황산 및 인산 등과 같은 무기산의 염을 포함한다. 약학적으로 허용가능한 염에 유용한 예시적이고 비-제한적인 음이온은 옥살레이트, 말레에이트, 아세테이트, 프로피오네이트, 석시네이트, 타르트레이트, 클로라이드, 설페이트, 바이설페이트, 일-, 이- 및 삼염기성 포스페이트, 메실레이트, 및 토실레이트 등을 포함한다.
- [0029] 화합물 또는 조성물의 "치료적 유효량" 또는 용량은 환자에게 증상의 감소 또는 억제, 또는 생존의 연장을 초래하는 화합물 또는 조성물의 양을 지칭한다. 결과는 화합물 또는 조성물의 다중 용량을 필요로 할 수 있다.
- [0030] "치료" 또는 "치료하는"은 임상 결과를 포함하여 유익하거나 원하는 결과를 수득하기 위한 접근법을 지칭한다. 본 발명의 목적을 위해, 유익하거나 원하는 결과는 다음 중 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되지 않는다: 질환 또는 장애로 인해 발생하는 하나 이상의 증상의 감소, 질환 또는 장애의 정도의 축소, 질환 또는 장애의 안정화 (예컨대, 질환 또는 장애의 악화의 예방 또는 지연), 질환 또는 장애의 발생 또는 재발의 지연, 질환 또는 장애의 진행의 지연 또는 둔화, 질환 또는 장애 상태의 호전, 질환 또는 장애의 관해 (부분적이든 전체적이든)의 제공, 질환 또는 장애를 치료하는 데 필요한 하나 이상의 다른 의약의 용량의 감소, 질환 또는 장애를 치료하는 데 사용되는 다른 의약의 효과의 향상, 질환 또는 장애의 진행의 지연, 삶의 질의 증가, 및/또는 환자의 생존의 연장. 또한, "치료"에는 질환 또는 장애의 병리학적 결과의 감소가 포함된다. 본 발명의 방법은 이러한 치료의 양태 중 임의의 하나 이상을 고려한다.
- [0031] 본원에 사용된 바와 같이, 질환의 발달을 "지연시키는 것"은 질환의 발달을 미루고/미루거나, 방해하고/하거나, 둔화시키고/시키거나, 지체시키고/시키거나, 안정화시키고/시키거나, 연기시키고, 그리고/또는 일단 발달되면, 진행을 둔화시키거나 기저 질환 과정 및/또는 추이를 변경시키는 것을 의미한다. 이러한 지연은 질환의 이력 및/또는 치료 중인 개체에 따라 다양한 시간 길이일 수 있다. 당업자에게 자명한 바와 같이, 충분하거나 유의한

지연은 개체가 질환과 연관된 임상 증상을 발달시키지 않는다는 점에서 사실상 예방을 포함할 수 있다. 질환으로 인해 발생하는 하나 이상의 증상을 안정화시키는 것을 포함하여, 질환의 발달을 "지연시키는" 방법은 본 방법을 사용하지 않을 때와 비교하여, 주어진 시간 프레임에서 질환 발달의 가능성을 감소시키고/시키거나, 주어진 시간 프레임에서 질환의 정도를 감소시키는 방법이다.

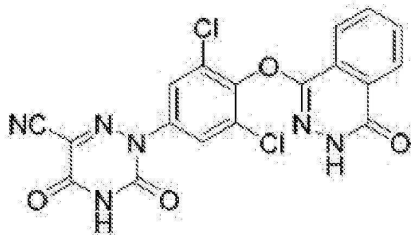
[0032] 질환이 발달할 "위험이 있는" 개체는 검출가능한 질환을 가질 수 있거나 갖지 않을 수 있고, 본원에 기재된 치료 방법 이전에 검출가능한 질환을 나타낼 수 있거나 나타내지 않을 수 있다. "위험이 있는"은 개체가 질환의 발달과 상관관계가 있는 측정가능한 매개변수인 하나 이상의 소위 위험 인자를 갖고 있음을 나타낸다. 이러한 위험 인자 중 하나 이상을 갖는 개체는 이러한 위험 인자(들)가 없는 개체보다 질환이 발달할 확률이 더 높다. 이러한 위험 인자는 연령, 성별, 인종, 식이, 이전 질환의 병력, 전조 질환의 존재, 및 유전적 (즉, 유전성) 고려사항을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 화합물은 일부 실시양태에서, 위험이 있거나 질환 또는 병태의 가족력을 갖는 대상체 (인간 포함)에 투여될 수 있다.

[0033] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 바와 같은 용어 "임의적" 또는 "임의로"는 후속적으로 기재되는 사건 또는 상황이 일어날 수 있지만, 반드시 일어날 필요는 없으며, 그 설명이 사건 또는 상황이 일어나는 경우 및 일어나지 않는 경우를 포함한다는 것을 의미한다. 예를 들어, "질소 원자는 N-옥사이드 (N→O) 모이어티를 제공하기 위해 임의로 산화된다"는 질소 원자가 산화될 수 있지만 반드시 산화될 필요는 없다는 것을 의미하고, 이 설명은 질소 원자가 산화되지 않는 상황 및 질소 원자가 산화되는 상황을 포함한다.

[0034] 본원에 사용된 바와 같이, 예를 들어, XRPD 패턴을 언급할 때 용어 "실질적으로 ~에 도시된 바와 같은"은 본원에 묘사된 것들과 반드시 동일할 필요는 없지만 당업자가 고려할 때 실험적 오류 또는 편차의 한계 내에 속하는 패턴 또는 그래프를 포함한다.

[0035] **약학적으로 허용가능한 조성물 및 제형**

[0036] 갑상선 호르몬 수용체 베타 (THR-β) 작용제인 하기 화합물 1의 약학적으로 허용가능한 조성물 또는 간단히 "약학 조성물"은 본 발명에 포함된다:



화합물 1

[0037] 따라서, 본 발명은 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약학 조성물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 약학적으로 허용가능한 염은 무기 또는 유기 염기로 형성된 염과 같은 염기 부가염이다. 일부 실시양태에서, 약학적으로 허용가능한 염은 화합물 1의 포타슘 염이다. 일부 실시양태에서, 약학적으로 허용가능한 염은 화합물 1의 소듐 염이다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 경구, 흡입, 비경구, 비강, 국부 또는 직장 투여에 적합한 형태 또는 흡입에 의한 투여에 적합한 형태를 취할 수 있다.

[0039] 본원에 상세하게 설명된 바와 같은 화합물 1은 일 양태에서 정제된 형태일 수 있고, 정제된 형태의 화합물 1을 포함하는 조성물이 본원에 상세하게 설명되어 있다. 본원에 상세히 설명된 바와 같은 화합물 1 또는 이의 염을 포함하는 조성물, 예컨대, 실질적으로 순수한 화합물의 조성물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에 상세히 설명된 바와 같은 화합물 1 또는 이의 염을 함유하는 조성물은 실질적으로 순수한 형태이다. 일 변형예에서, "실질적으로 순수한"은 35% 이하의 불순물을 함유하는 조성물을 의도하며, 여기서 불순물은 조성물의 대부분을 구성하는 화합물 또는 이의 염 이외의 화합물을 나타낸다. 예를 들어, 실질적으로 순수한 화합물의 조성물은 35% 이하의 불순물을 함유하는 조성물을 의도하며, 여기서 불순물은 그 화합물 또는 이의 염 이외의 화합물을 의미한다. 일 변형예에서, 실질적으로 순수한 화합물 또는 이의 염의 조성물은 25% 이하의 불순물을 함유하는 것이 제공된다. 다른 변형예에서, 실질적으로 순수한 화합물 또는 이의 염의 조성물은 20% 이하의 불순물을 함유하는 것이 제공된다. 또 다른 변형예에서, 실질적으로 순수한 화합물 또는 이의 염의 조성물은 10% 이하의 불순물을 함유하는 것이 제공된다. 추가 변형예에서, 실질적으로 순수한 화합물 또는 이의 염의 조성물은 5% 이하

의 불순물을 함유하는 것이 제공된다. 다른 변형예에서, 실질적으로 순수한 화합물 또는 이의 염의 조성물은 3% 이하의 불순물을 함유하는 것이 제공된다. 또 다른 변형예에서, 실질적으로 순수한 화합물 또는 이의 염의 조성물은 1% 이하의 불순물을 함유하는 것이 제공된다. 추가 변형예에서, 실질적으로 순수한 화합물 또는 이의 염의 조성물은 0.5% 이하의 불순물을 함유하는 것이 제공된다. 또 다른 변형예에서, 실질적으로 순수한 화합물의 조성물은 조성물이 15% 이하, 또는 바람직하게는 10% 이하, 또는 보다 바람직하게는 5% 이하, 또는 보다 더 바람직하게는 3% 이하, 그리고 가장 바람직하게는 1% 이하의 불순물을 함유하는 것을 의미한다.

[0040] 일 변형예에서, 화합물 1은 인간과 같은 개체에 대한 투여용으로 제조된 합성 화합물이다. 다른 변형예에서, 실질적으로 순수한 형태의 화합물 1을 함유하는 조성물이 제공된다. 다른 변형예에서, 본 발명은 화합물 1 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약학 조성물을 포괄한다. 다른 변형예에서, 화합물 1을 투여하는 방법이 제공된다. 정제된 형태, 약학 조성물 및 화합물을 투여하는 방법은 본원에 상세히 설명된 임의의 화합물 또는 이의 형태에 적합하다.

[0041] 화합물 1은 경구, 점막 (예컨대, 비강, 설하, 질, 협측 또는 직장), 비경구 (예컨대, 근육내, 피하 또는 정맥내), 국부 또는 경피 전달 형태를 포함하는 임의의 이용가능한 전달 경로용으로 제형화될 수 있다. 화합물 1은 적합한 담체와 제형화되어, 비제한적으로 정제, 당의정, 캡슐 (예컨대, 경질 젤라틴 캡슐 또는 연질 탄성 젤라틴 캡슐), 카세, 트로키, 로젠지, 검, 분산액, 좌약, 연고, 습포제 (찜질제), 페이스트, 분말, 드레싱, 크림, 용액, 패치, 에어로졸 (예컨대, 비강 스프레이 또는 흡입기), 젤, 현탁액 (예컨대, 수성 또는 비-수성 액체 현탁액, 수-중-유 에멀전 또는 유-중-수 액체 에멀전), 용액 및 엘릭시르를 포함하는 전달 형태를 제공한다.

[0042] 화합물 1은 활성 성분으로서의 화합물 1을 위에 언급된 것들과 같은 약학적으로 허용가능한 담체와 조합함으로써 제형, 예컨대, 약학 제형의 제조에 사용될 수 있다. 시스템의 치료적 형태 (예컨대, 경피 패치 대 경구 정제)에 따라, 담체는 다양한 형태일 수 있다. 또한, 약학 제형은 보존제, 가용화제, 안정화제, 재-습윤화제, 유화제, 감미제, 염료, 조절제 및 삼투압 조절용 염, 완충액, 코팅제 또는 항산화제를 함유할 수 있다. 화합물 1을 포함하는 제형은 또한 가치가 큰 치료적 특성을 갖는 다른 물질을 함유할 수 있다. 약학 제형은 알려진 약학적 방법에 의해 제조될 수 있다. 적합한 제형은 예컨대, 본원에 참조로 포함된 *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams & Wilkins, 21<sup>st</sup> ed. (2005)에서 찾아볼 수 있다.

[0043] 본원에 기재된 바와 같은 화합물은 정제, 코팅된 정제, 및 경질 또는 연질 셀 중의 젤 캡슐, 에멀전 또는 현탁액과 같은 일반적으로 허용되는 경구 조성물의 형태로 개체 (예컨대, 인간)에 투여될 수 있다. 이러한 조성물의 제조에 사용될 수 있는 담체의 예는 미세결정질 셀룰로스, 만니톨, 락토스, 옥수수 전분 또는 이의 유도체, 탈크, 스테아레이트 또는 이의 염 등이다. 연질 셀을 갖는 젤 캡슐에 허용가능한 담체는 예를 들어, 식물성 오일, 왁스, 지방, 반고체 및 액체 폴리올 등이다. 또한, 약학 제형은 보존제, 가용화제, 안정화제, 재-습윤화제, 유화제, 감미제, 염료, 조절제 및 삼투압 조절용 염, 완충액, 코팅제 또는 항산화제를 함유할 수 있다.

[0044] 화합물 1은 염 형태로 투여되는 경우에도 매우 낮은 수성 용해도를 갖는다. 화합물 1의 포타슘 염은 pH 6.0 완충액에서 대략 2.2 µg/mL의 용해도를 가지며, pH 8.0 완충액에서 대략 8.0 µg/mL의 용해도를 갖는다. 폴록사머 188과 같은 가용화제는 화합물 1의 유의한 분해를 초래한다. 소듐 라우릴 설페이트 (SLS)와 같은 특정 이온성 계면활성제는 화합물 1과 양립가능하고 화합물의 분해가 최소화되거나 분해되지 않으면서 화합물 1 및 이의 약학적으로 허용가능한 염과 공동-제형화될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 화합물 1 또는 이의 약학적 염과 이온성 계면활성제 (예컨대, SLS)의 공동-제형화는 모든 pH 수준에서 용해도의 극적 향상을 초래한다.

[0045] 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 중량 대비 약 1% 내지 중량 대비 약 10%의 SLS를 포함하는 제형이 제공된다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 중량 대비 약 1% 내지 중량 대비 약 8%의 SLS를 포함하는 제형이 제공된다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 중량 대비 약 1.5% 내지 중량 대비 약 8%의 SLS를 포함하는 제형이 제공된다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 중량 대비 약 5%의 SLS를 포함하는 제형이 제공된다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 중량 대비 약 5%의 SLS를 포함하는 제형이 제공된다. 일부 실시양태에서, 화합물 1의 포타슘 염 및 중량 대비 약 1.5%의 소듐 라우릴 설페이트 (SLS)를 포함하는 제형이 제공된다.

[0046] 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합하여 사용될 수 있는 다른 잠재적인 가용화제는 도쿠세이트 소듐, 폴리소르베이트, 인지질 또는 D-α-토코페릴 폴리리에틸렌 글리콜 석시네이트 (비타민 E TPGS)를 포함한다.

[0047] 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 소듐 라우릴 설페이트를 포함하는 제형이 제공된다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 소듐 라우릴 설페이트 및 크로스카르멜로스 소듐을 포함하는 제형이 제공된다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 소듐 라우릴 설페이트, 크로스카르멜로스 소듐, 콜로이드성 실리카온 디옥사이드 및 마그네슘 스테아레이트를 포함하는 제형이 제공된다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 소듐 라우릴 설페이트, 크로스카르멜로스 소듐, 콜로이드성 실리카온 디옥사이드, 마그네슘 스테아레이트, 하이프로멜로스 (HPMC) 캡슐, 만니톨 및 미세결정질 셀룰로스를 포함하는 제형이 제공된다.

[0048] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 투여량 형태로 캡슐 내에 제형화된 화합물 1이 제공된다. 일부 실시양태에서, 약 0.5 mg 내지 약 50 mg의 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 캡슐 제형이 제공된다. 일부 실시양태에서, 약 0.5 mg, 약 1 mg, 약 2 mg, 약 3 mg, 약 5 mg, 약 6 mg, 약 10 mg, 약 15 mg, 약 25 mg 또는 약 50 mg의 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 캡슐 제형이 제공된다.

[0049] 일부 실시양태에서, 아래 표 A에 나열된 바와 같은 다양한 다른 구성요소 중 하나 이상과 함께 캡슐로 제형화된 화합물 1이 제공된다. 일부 실시양태에서, 아래 표 A에 기재된 바와 같은 양으로 다양한 다른 구성요소 중 하나 이상과 함께 캡슐로 제형화된 화합물 1이 제공된다.

[0050] 표 A.

구성요소	중량/mg
화합물 1	1.1-54.3
미세결정질 셀룰로스	59.3-177.9
만니톨	29.6-88.8
소듐 라우릴 설페이트	5.0-15.0
크로스카르멜로스 소듐	3.0-9.0
콜로이드성 실리카온 디옥사이드	1.0-3.0
마그네슘 스테아레이트	1.0-3.0
HPMC 캡슐, 크기 0	1 캡슐
총	100      300

[0051]

[0052] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 투여량 형태로 정제로 제형화된 화합물 1이 제공된다. 일부 실시양태에서, 약 0.5 mg 내지 약 50 mg의 화합물 1을 함유하는 정제 제형이 제공된다. 모든 실시양태에서, 화합물 1의 중량은 분자의 활성 부분 (유리산)을 지칭하는 것으로 이해될 것이다. 화합물 1의 염 형태가 사용되는 실시양태에서, 염의 중량은 활성 화합물의 적절한 양이 조성물에 있도록 조정될 것이다. 일부 실시양태에서, 약 0.5 mg, 약 1 mg, 약 2 mg, 약 3 mg, 약 5 mg, 약 6 mg, 약 10 mg, 약 15 mg, 약 25 mg 또는 약 50 mg의 화합물 1을 함유하는 정제 제형이 제공된다.

[0053] 본 개시내용은 키트 (예컨대, 약학적 패키지)를 추가로 포함한다. 제공된 키트는 본원에 기재된 약학 조성물 또는 화합물 및 용기 (예컨대, 약물병, 앰플, 병, 주사기 및/또는 서브패키지 또는 기타 적합한 용기)를 포함할 수 있다.

[0054] **사용 방법 및 용도**

[0055] 본원에 기재된 화합물 및 조성물은 일부 양태에서 간 장애의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 간 장애의 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에서 간 장애를 치료 또는 예방하는 방법은 환자에 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 투여하는 단계를 포함한다.

[0056] 간 장애는 제한 없이, 간 염증, 섬유증 및 지방간염을 포함한다. 일부 실시양태에서, 간 장애는 간 염증, 간 섬유증, 알콜 유도된 섬유증, 지방증, 알콜성 지방증, 원발성 경화성 담관염 (PSC), 원발성 담즙성 간경변증 (PBC), 비-알콜성 지방간 질환 (NAFLD), 및 비-알콜성 지방간염 (NASH)으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 간 장애는 간 섬유증, 알콜 유도된 섬유증, 지방증, 알콜성 지방증, NAFLD 및 NASH로부터 선택된다. 일 실시양태에서, 간 장애는 NASH이다. 다른 실시양태에서, 간 장애는 간 염증이다. 다른 실시양태에서, 간 장애는 간 섬유증

유증이다. 다른 실시양태에서, 간 장애는 알콜 유도된 섬유증이다. 다른 실시양태에서, 간 장애는지방증이다. 다른 실시양태에서, 간 장애는 알콜성 지방증이다. 다른 실시양태에서, 간 장애는 NAFLD이다. 일 실시양태에서, 본원에 제공된 치료 방법은 NAFLD에서 NASH로의 진행을 방해하거나 둔화시킨다. 일 실시양태에서, 본원에 제공된 치료 방법은 NASH의 진행을 방해하거나 둔화시킨다. NASH는 예컨대, 간경변증, 간암 등 중 하나 이상으로 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 간 장애는 NASH이다. 일부 실시양태에서, 환자는 간 생검을 받은 적이 있다. 일부 실시양태에서, 방법은 간 생검의 결과를 취득하는 단계를 추가로 포함한다.

[0057] 일부 실시양태에서, 간 장애의 치료를 필요로 하는 환자에서 간 장애를 치료하는 방법이 제공되고, 여기서 간 장애는 간 염증, 간 섬유증, 알콜 유도된 섬유증, 지방증, 알콜성 지방증, 원발성 경화성 담관염 (PSC), 원발성 담즙성 간경변증 (PBC), 비-알콜성 지방간 질환 (NAFLD) 및 비-알콜성 지방간염 (NASH)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0058] 본원은 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 이용하여 간 장애의 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에서 간 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 제공하며, 이는 치료적 유효량의 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 간 장애는 간 염증, 간 섬유증, 알콜 유도된 섬유증, 지방증, 알콜성 지방증, 원발성 경화성 담관염 (PSC), 원발성 담즙성 간경변증 (PBC), 비-알콜성 지방간 질환 (NAFLD), 및 비-알콜성 지방간염 (NASH)으로부터 선택된다.

[0059] 또한, 본원은 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 투여하는 단계를 포함하는, 진행의 방해 또는 둔화를 필요로 하는 환자 (예컨대, 인간 환자)에서 비-알콜성 지방간 질환 (NAFLD)에서 비-알콜성 지방간염 (NASH)으로의 진행을 방해하거나 둔화시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 치료적 유효량의 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 투여하는 단계를 포함한다. 또한, 본원은 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 투여하는 단계를 포함하는, 진행의 방해 또는 둔화를 필요로 하는 환자 (예컨대, 인간 환자)에서 NASH의 진행을 방해하거나 둔화시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 치료적 유효량의 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 투여하는 단계를 포함한다.

[0060] 일부 실시양태에서, 본원은 간 손상의 감소를 필요로 하는 개체에 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 투여하는 단계를 포함하는, 간 손상을 감소시키는 방법을 제공하며, 여기서 섬유증은 감소된다. 일부 실시양태에서, 섬유증에 대한 하나 이상의 마커의 발현의 수준은 감소된다. 일부 실시양태에서, Ccr2, Colla1, Colla2, Colla3, Cxcr3, Dcn, Hgf, I11a, Inhbe, Lox, Lox11, Lox12, Lox13, Mmp2, Pdgfb, Plau, Serpine1, Perpinh1, Snai, Tgfb1, Tgfb3, Thbs1, Thbs2, Timp2, 및/또는 Timp3 발현의 수준은 감소된다. 일부 실시양태에서, 콜라겐의 수준은 감소된다. 일부 실시양태에서, 콜라겐 단편의 수준은 감소된다. 일부 실시양태에서, 섬유증 마커의 발현의 수준은 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 또는 적어도 5-배 감소된다. 일부 실시양태에서, 섬유증 마커의 발현의 수준은 약 2-배, 약 3-배, 약 4-배, 또는 약 5-배 감소된다.

[0061] 일부 실시양태에서, 본원은 간 손상의 감소를 필요로 하는 개체에 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 투여하는 단계를 포함하는, 간 손상을 감소시키는 방법을 제공하며, 여기서 염증은 감소된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 염증의 마커는 감소된다. 일부 실시양태에서, Adgre1, Ccr2, Ccr5, I11A 및/또는 T1r4의 발현의 수준은 감소된다. 일부 실시양태에서, 염증 마커의 발현의 수준은 적어도 2-, 적어도 3-, 적어도 4- 또는 적어도 5-배 감소된다. 일부 실시양태에서, 섬유증 마커의 발현의 수준은 약 2-배, 약 3-배, 약 4-배, 또는 약 5-배 감소된다.

[0062] 환자에서, 알칼리성 포스파타제, 감마-글루타밀 트랜스퍼라제 (GGT), 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT) 및/또는 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST) 수준은 상승될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원은 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 투여하는 단계를 포함하는 간 손상을 감소시키는 방법을 제공하며, 여기서, GGT, ALT 및/또는 AST 수준은 치료하기 전에 상승된다. 일부 실시양태에서, 환자의 ALT 수준은 정상 수준의 상한보다 약 2-4-배 더 크다. 일부 실시양태에서, 환자의 AST 수준은 정상 수준의 상한보다 약 2-4-배 더 크다. 일부 실시양태에서, 환자의 GGT 수준은 정상 수준의 상한보다 약 1.5-3-배 더 크다. 일부 실시양태에서, 환자의 알칼리성 포스파타제 수준은 정상 수준의 상한보다 약 1.5-3-배 더 크다. 이러한 분자의 수준을 결정하는 방법은 잘 알려져 있다. 혈중 ALT의 정상 수준은 약 7-56 단위/리터의 범위이다. 혈중 AST의 정상 수준은 약 10-40 단위/리터의 범위이다. 혈중 GGT의 정상 수준은 약 9-48 단위/리터의 범위이다. 혈중 알칼리성 포스파타제의 정상 수준은 20- 내지 50-세 남성의 경우, 약 53-128 단위/리터의 범위이고, 20- 내지 50-세 여성의 경우 약 42-98 단위/리터의 범위이다.

[0063] 갑상선 호르몬 결핍은 NAFLD 및 NASH 환자에서 더 흔하다 (Pagadala MR, Zein CO, Dasarathy S, Yerian LM,

Lopez R, McCullough AJ. Prevalence of hypothyroidism in nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci.* 2012;57:528-34.). 갑상선은 시상하부로부터의 티로트로핀-방출 호르몬 (TRH)에 반응하여 뇌하수체 전엽으로부터의 티로트로핀 (갑상선 자극 호르몬, [TSH])의 제어 하에서 트리아이오도티로닌 (T3) 및 티록신 (T4)을 생산한다. 임의의 특정 이론에 얽매이지 않고, 간에서의 THR-β 작용은 T3 또는 TSH의 변화 없이 유리 T4를 낮추는 것과 관련되어 있으며, 이는 말초 갑상선 호르몬 조절에 기인할 수 있다 (Taub R, Chiang E, Chabot-Blanchet M, Kelly MJ, Reeves RA, Guertin MC, et al. Lipid lowering in healthy volunteers treated with multiple doses of MGL-3196, a liver-targeted thyroid hormone receptor-β agonist. *Atherosclerosis.* 2013;230:373-80.; Berry MJ, Kates AL, Larsen PR. Thyroid hormone regulates type I deiodinase messenger RNA in rat liver. *Mol Endocrinol* 1990;4:743-748.). 중앙 갑상선 축에 대한 영향의 증거는 바람직하지 않은 효과를 나타낼 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는 환자의 혈청 TSH, 유리 T3 또는 T4의 정상 범위 밖의 수준으로의 변화를 초래하지 않는다.

[0064] 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는 CK, CK-MB 및 트로포닌 I을 포함하는 환자의 심장 바이오마커의 정상 범위 밖의 수준으로의 변화를 초래하지 않는다.

[0065] 성호르몬 결합 글로불린 (SHBG)은 간에서 생산되고 안드로겐 및 에스트로겐을 포함한 성호르몬에 결합하여 안정화시켜, 순환 호르몬의 전체 분획 및 유리 분획에 영향을 준다 (Hammond 2016). THR-β 작용은 SHBG 발현을 상향조절하여, 유용한 PD 마커로 만든다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는 환자의 혈청 SHBG의 증가를 초래한다. 일부 실시양태에서, 환자의 혈청 SHBG의 증가는 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 투여의 4일 이내에 일어난다. 일부 실시양태에서, 환자의 혈청 SHBG는 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 투여 후 기준선에 비해 적어도 5% 증가한다. 일부 실시양태에서, 환자의 혈청 SHBG는 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 투여 후 기준선에 비해 적어도 10% 증가한다. 일부 실시양태에서, 환자의 혈청 SHBG는 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 투여 후 기준선에 비해 적어도 25% 증가한다.

[0066] 일부 실시양태에서, 환자는 인간이다. 비만은 NAFLD 및 NASH와 높은 상관관계가 있지만, 제지방 사람이 또한 NAFLD 및 NASH에 영향을 받을 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 환자는 비만이다. 일부 실시양태에서, 환자는 비만이 아니다. 비만은 진성 당뇨병 또는 심혈관 장애와 같은 다른 질환과도 상관관계가 있거나, 이를 유발할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 환자는 또한 진성 당뇨병 및/또는 심혈관 장애를 갖는다. 이론에 얽매이지 않고, 비만, 진성 당뇨병 및 심혈관 장애와 같은 동반질환이 NAFLD 및 NASH를 치료하기가 더 어렵게 할 수 있는 것으로 여겨진다. 반대로, NAFLD 및 NASH를 해결하기 위해 현재 인정되는 유일한 방법은 중량 손실이며, 이는 제지방 환자에게는 거의 또는 전혀 영향을 미치지 않을 것이다.

[0067] NAFLD 및 NASH에 대한 위험은 연령에 따라 증가하지만, 아동이 또한 NAFLD 및 NASH를 앓을 수 있으며, 문헌은 2세 정도의 어린 아동에 대해 보고하고 있다 (Schwimmer, et al., *Pediatrics*, 2006, 118:1388-1393). 일부 실시양태에서, 환자는 2-17세, 예컨대, 2-10, 2-6, 2-4, 4-15, 4-8, 6-15, 6-10, 8-17, 8-15, 8-12, 10-17 또는 13-17세이다. 일부 실시양태에서, 환자는 18-64세, 예컨대, 18-55, 18-40, 18-30, 18-26, 18-21, 21-64, 21-55, 21-40, 21-30, 21-26, 26-64, 26-55, 26-40, 26-30, 30-64, 30-55, 30-40, 40-64, 40-55 또는 55-64세이다. 일부 실시양태에서, 환자는 65세 이상, 예컨대, 70세 이상, 80세 이상 또는 90세 이상이다.

[0068] NAFLD 및 NASH는 간 이식의 흔한 원인이지만, 이미 간 이식을 한 번 받은 환자는 종종 NAFLD 및/또는 NASH가 다시 발달한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 환자는 간 이식을 받은 적이 있다.

[0069] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법에 따른 치료는 환자에서 감소된 NAFLD 활성 (NAS) 점수를 초래한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 지방증, 염증 및/또는 팽만은 치료 시 감소된다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 치료의 방법은 간 섬유증을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 혈청 트리글리세리드를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 방법은 간 트리글리세리드를 감소시킨다.

[0070] 상승된 저-밀도 지질단백질 (LDL) 콜레스테롤 및 트리글리세리드를 특징으로 하는 이상지질혈증은 심혈관 질환의 핵심 위험 인자이고 (Nelson RH. Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease. *Prim Care.* 2013 March; 40(1):195-211.), NASH 환자에서 흔히 볼 수 있다 (Loomba R. Nonalcoholic fatty liver disease progression rates to cirrhosis and progression of cirrhosis to decompensation and mortality: a real world analysis of Medicare data. *Aliment Pharmacol Ther.* 2020;51:1149-59.). 더욱이, 이상지질혈증은 NASH의 기저에 있는 간 염증의 잠재적인 병원성 동인이다 (Walenberg S. Cholesterol is a significant risk factor for nonalcoholic steatohepatitis. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology.* 2015;

9:11:1343-46.). 아포지단백질 B (Apo B)는 혈액 중 LDL 콜레스테롤과 연관되어 있으며, 환자의 지질 프로파일을 평가하는 데 유용할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는 환자의 혈청 Apo B를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는 투여의 4일 이내에 환자의 혈청 Apo B의 감소를 초래한다. 이러한 일부 실시양태에서, 환자의 혈청 Apo B 감소는 기준선에 비해 적어도 5%이다. 이러한 일부 실시양태에서, 환자의 혈청 Apo B 감소는 기준선에 비해 적어도 10%이다. 이러한 일부 실시양태에서, 환자의 혈청 Apo B 감소는 기준선에 비해 적어도 15%이다.

[0071] 일부 실시양태에서, 환자는 본원에 제공된 방법에 따른 투여 이전에 유해 효과가 발달할 위험이 있다. 일부 실시양태에서, 유해 효과는 신장, 폐, 심장 및/또는 피부에 영향을 미치는 유해 효과이다. 일부 실시양태에서, 유해 효과는 소양증이다.

[0072] 일부 실시양태에서, 환자는 하나 이상의 이전 요법을 받은 적이 있다. 일부 실시양태에서, 간 장애는 요법 동안 진행되었다. 일부 실시양태에서, 환자는 하나 이상의 이전 요법 중 적어도 하나 동안 소양증을 앓았다.

[0073] 화합물 1을 이용한 전임상 동물 모델은 대략 3,320 ng<sup>\*</sup>hg/mL의 정상 상태 혈장의 0시간차로부터 무한대까지의 곡선하 면적 (AUC<sub>0-∞</sub>)이 아래 실시예에 기재된 바와 같이 다양한 약력학 마커에 기반한 효험을 보장하기에 충분한 노출이었음을 확립하였다. 3,320 ng<sup>\*</sup>hg/mL 이상의 화합물 1 노출은 종종 THR 작용과 연관된 바람직하지 않은 갑상선 호르몬 효과를 초래하지 않는다. 예를 들어, 실시예에 기재된 단일 증량 용량 연구에서, 최대 대략 50,000 ng<sup>\*</sup>hg/mL의 화합물 1의 정상 상태 혈장 AUC<sub>0-∞</sub>는 임의의 유의한 부작용을 초래하지 않았다.

[0074] 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 약 2,500 ng<sup>\*</sup>h/mL 내지 약 50,000 ng<sup>\*</sup>h/mL의 정상 상태 혈장의 0시간차로부터 무한대까지의 곡선하 면적 (AUC<sub>0-∞</sub>)을 획득하기 위한 용량으로 이를 필요로 하는 개체 (예컨대, NASH를 갖는 환자)에 매일 투여된다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 약 3,000 ng<sup>\*</sup>h/mL 내지 약 50,000 ng<sup>\*</sup>h/mL의 정상 상태 혈장의 0시간차로부터 무한대까지의 곡선하 면적 (AUC<sub>0-∞</sub>)을 획득하기 위한 용량으로 이를 필요로 하는 개체 (예컨대, NASH를 갖는 환자)에 매일 투여된다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 약 5,000 ng<sup>\*</sup>h/mL 내지 약 50,000 ng<sup>\*</sup>h/mL의 정상 상태 혈장의 0시간차로부터 무한대까지의 곡선하 면적 (AUC<sub>0-∞</sub>)을 획득하기 위한 용량으로 이를 필요로 하는 개체 (예컨대, NASH를 갖는 환자)에 매일 투여된다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 약 5,000 ng<sup>\*</sup>h/mL 내지 약 30,000 ng<sup>\*</sup>h/mL의 정상 상태 혈장의 0 시간차로부터 무한대까지의 곡선하 면적 (AUC<sub>0-∞</sub>)을 획득하기 위한 용량으로 이를 필요로 하는 개체 (예컨대, NASH를 갖는 환자)에 매일 투여된다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 약 5,000 ng<sup>\*</sup>h/mL 내지 약 25,000 ng<sup>\*</sup>h/mL의 정상 상태 혈장의 0시간차로부터 무한대까지의 곡선하 면적 (AUC<sub>0-∞</sub>)을 획득하기 위한 용량으로 이를 필요로 하는 개체 (예컨대, NASH를 갖는 환자)에 매일 투여된다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 약 5,000 ng<sup>\*</sup>h/mL 내지 약 20,000 ng<sup>\*</sup>h/mL의 정상 상태 혈장의 0시간차로부터 무한대까지의 곡선하 면적 (AUC<sub>0-∞</sub>)을 획득하기 위한 용량으로 이를 필요로 하는 개체 (예컨대, NASH를 갖는 환자)에 매일 투여된다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 약 3,000 ng<sup>\*</sup>h/mL 내지 약 10,000 ng<sup>\*</sup>h/mL의 정상 상태 혈장의 0시간차로부터 무한대까지의 곡선하 면적 (AUC<sub>0-∞</sub>)을 획득하기 위한 용량으로 이를 필요로 하는 개체 (예컨대, NASH를 갖는 환자)에 매일 투여된다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 약 5,000 ng<sup>\*</sup>h/mL 내지 약 10,000 ng<sup>\*</sup>h/mL의 정상 상태 혈장의 0시간차로부터 무한대까지의 곡선하 면적 (AUC<sub>0-∞</sub>)을 획득하기 위한 용량으로 이를 필요로 하는 개체 (예컨대, NASH를 갖는 환자)에 매일 투여된다.

[0075] 놀랍게도, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 매우 적은 용량에서 원하는 노출을 달성할 수 있음이 발견되었다. 본 개시내용의 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 1 mg 이하만큼 적은 용량으로 환자에 1일 1회 경구 투여될 수 있으며, 여전히 아민 옥시다제 활성을 충분히 감소시키고 림프구 접촉 및 이행을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애

(예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 1 mg 내지 약 60 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 0.5 mg 내지 약 25 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 1 mg 내지 약 15 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 2 mg 내지 약 10 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 1 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 3 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 4 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 5 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 6 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 10 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 15 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 20 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 모든 실시양태에서, 화합물 1의 중량은 분자의 활성 부분 (유리산)을 지칭하는 것으로 이해될 것이다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 30 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 50 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간 장애 (예컨대, NASH)를 갖는 환자에 약 60 mg의 용량으로 1일 1회 경구 투여될 수 있다. 화합물의 염 형태가 사용되는 실시양태에서, 염의 중량은 활성 화합물의 적절한 양이 조성물에 있도록 조정될 것이다.

[0076] 치료 기간은 일반적으로 1주 이상이 될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료 기간은 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 1년, 2년, 3년 또는 4년 이상이다. 일부 실시양태에서, 치료 기간은 약 1주 내지 약 1개월, 약 1개월 내지 약 1년, 약 1년 내지 약 수년이다. 일부 실시양태에서, 치료 기간은 적어도 약 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 1년, 2년, 3년 또는 4년 이상 중 임의의 것이다. 일부 실시양태에서, 치료 기간은 환자의 남은 수명이다.

[0077] 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는 1주 이상의 치료 기간 동안 1일 1회, 1일 2회 또는 격일로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여는 1주 이상의 치료 기간 동안 매일 화합물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 투여는 1주 이상의 치료 기간 동안 화합물을 1일 2회 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 투여는 1주 이상의 치료 기간 동안 격일로 화합물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0078] 일부 실시양태에서, 치료 기간의 1일차에 투여되는 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 양은 치료 기간의 모든 후속 일에 투여되는 양보다 크거나 동일하다. 일부 실시양태에서, 치료 기간의 1일차에 투여되는 양은 치료 기간의 모든 후속 일에 투여되는 양과 동일하다.

[0079] 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는 개체에서 지방증을 감소시킨다. 지방증을 평가하는 방법은 당업자에게 알려져 있으며, 조직학적 분석 및 조직학적 점수의 지정을 포함할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 상세히 설명된 치료의 방법은 치료를 필요로 하는 개체의 간 장애, 예컨대, 간 염증, 간 섬유증, 알콜 유도된 섬유증, 지방증, 알콜성 지방증, 원발성 경화성 담관염 (PSC), 원발성 담즙성 간경변증 (PBC), 비-알콜성 지방간 질환 (NAFLD), 및 비-알콜성 지방간염 (NASH)을 치료하는 단계를 포함하는 것으로 이해되며, 여기서 치료는 지방증과 연관된 조직학적 마커를 감소시키는 것을 포함한다.

[0080] 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는 개체에서 간 염증을 감소시킨다. 간 염증을 평가하는 방법은 당업자에게 알려져 있으며, 조직학적 분석 및 소염 염증의 조직학적 점수의 지정을 포함할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 상세히 설명된 치료의 방법은 치료를 필요로 하는 개체의 간 장애, 예컨대, 간 염증, 간 섬유증, 알콜 유도된 섬유증, 지방증, 알콜성 지방증, 원발성 경화성 담관염 (PSC), 원발성 담즙성 간경변증 (PBC), 비-알콜성 지방간 질환 (NAFLD), 및 비-알콜성 지방간염 (NASH)을 치료하는 단계를 포함하는 것으로 이해되며, 여기서 치료는 소염 염증 또는 소염 염증과 연관된 조직학적 마커를 감

소시키는 것을 포함한다.

- [0081] 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는 개체에서 간 섬유증을 감소시킨다. 간 섬유증을 평가하는 방법은 당업자에게 알려져 있으며, 조직학적 분석을 포함할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 상세히 설명된 치료의 방법은 치료를 필요로 하는 개체의 간 장애, 예컨대, 간 염증, 간 섬유증, 알콜 유도된 섬유증, 지방증, 알콜성 지방증, 원발성 경화성 담관염 (PSC), 원발성 담즙성 간경변증 (PBC), 비-알콜성 지방간 질환 (NAFLD), 및 비-알콜성 지방간염 (NASH)을 치료하는 단계를 포함하는 것으로 이해되며, 여기서 치료는 섬유증 또는 섬유증과 연관된 조직학적 마커를 감소시키는 것을 포함한다.
- [0082] 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는 개체에서 간 지방증, 염증 및 섬유증 중 적어도 하나 또는 적어도 2개를 감소시킨다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 상세히 설명된 치료의 방법은 치료를 필요로 하는 개체의 간 장애, 예컨대, 간 염증, 간 섬유증, 알콜 유도된 섬유증, 지방증, 알콜성 지방증, 원발성 경화성 담관염 (PSC), 원발성 담즙성 간경변증 (PBC), 비-알콜성 지방간 질환 (NAFLD), 및 비-알콜성 지방간염 (NASH)을 치료하는 단계를 포함하는 것으로 이해되며, 여기서 치료는 지방증, 소염 염증, 섬유증, 또는 전술한 것들 중 임의의 것의 조직학적 마커 중 적어도 하나 또는 적어도 2개를 감소시키는 것을 포함한다.
- [0083] 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는 개체에서 혈청 트리글리세리드를 감소시킨다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 상세히 설명된 치료의 방법은 치료를 필요로 하는 개체의 간 장애, 예컨대, 간 염증, 간 섬유증, 알콜 유도된 섬유증, 지방증, 알콜성 지방증, 원발성 경화성 담관염 (PSC), 원발성 담즙성 간경변증 (PBC), 비-알콜성 지방간 질환 (NAFLD), 및 비-알콜성 지방간염 (NASH)을 치료하는 단계를 포함하는 것으로 이해되며, 여기서 치료는 혈청 트리글리세리드를 감소시키는 것을 포함한다.
- [0084] 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는 개체에서 혈청 총 콜레스테롤을 감소시킨다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 상세히 설명된 치료의 방법은 치료를 필요로 하는 개체의 간 장애, 예컨대, 간 염증, 간 섬유증, 알콜 유도된 섬유증, 지방증, 알콜성 지방증, 원발성 경화성 담관염 (PSC), 원발성 담즙성 간경변증 (PBC), 비-알콜성 지방간 질환 (NAFLD), 및 비-알콜성 지방간염 (NASH)을 치료하는 단계를 포함하는 것으로 이해되며, 여기서 치료는 혈청 콜레스테롤을 감소시키는 것을 포함한다.
- [0085] 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는 개체에서 혈청 알라닌 아미노트랜스퍼라제를 감소시킨다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 상세히 설명된 치료의 방법은 치료를 필요로 하는 개체의 간 장애, 예컨대, 간 염증, 간 섬유증, 알콜 유도된 섬유증, 지방증, 알콜성 지방증, 원발성 경화성 담관염 (PSC), 원발성 담즙성 간경변증 (PBC), 비-알콜성 지방간 질환 (NAFLD), 및 비-알콜성 지방간염 (NASH)을 치료하는 단계를 포함하는 것으로 이해되며, 여기서 치료는 혈청 알라닌 아미노트랜스퍼라제를 감소시키는 것을 포함한다.
- [0086] 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는 개체에서 혈청 트리글리세리드, 총 콜레스테롤 및 알라닌 아미노트랜스퍼라제 중 적어도 하나 또는 적어도 2개를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는 개체에서 혈청 트리글리세리드, 총 콜레스테롤 및 알라닌 아미노트랜스퍼라제를 감소시킨다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 상세히 설명된 치료의 방법은 치료를 필요로 하는 개체의 간 장애, 예컨대, 간 염증, 간 섬유증, 알콜 유도된 섬유증, 지방증, 알콜성 지방증, 원발성 경화성 담관염 (PSC), 원발성 담즙성 간경변증 (PBC), 비-알콜성 지방간 질환 (NAFLD), 및 비-알콜성 지방간염 (NASH)을 치료하는 단계를 포함하는 것으로 이해되며, 여기서 치료는 혈청 트리글리세리드, 총 콜레스테롤 및 알라닌 아미노트랜스퍼라제 중 적어도 하나 또는 적어도 2개를 감소시키는 것을 포함한다.
- [0087] 전술한 것들 중 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 투약 이전에 적어도 10시간 동안 식사를 하지 않은 환자에 투여된다. 일부 실시양태에서, 화합물 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 투약 전 30분 미만에 고-지방, 고-칼로리 식사를 섭취한 환자에 투여된다.
- [0088] **다형체**
- [0089] 일 양태에서, 본원은 화합물 1의 다형체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다. 다형체는 의학적 또는 약학적 용도에 적합한 특정 조건 하에서 생체이용률 및 안정성과 같은 특성을 가질 수 있다.
- [0090] 일부 실시양태에서, 본원은 화합물 1의 포타슘 염의 다형성 유형 A를 제공한다. 일부 실시양태에서, 화합물 1의 포타슘 염의 유형 A는 실질적으로 도 16에 도시된 바와 같은 XRPD 패턴을 갖는다. XRPD를 사용하여 화합물 1의

포타슘 염의 유형 A에 대해 관찰할 수 있는 2-세타 각도 및 상대적 피크 강도가 아래 표 B에 도시되어 있다.

[0091] 표 B

각도 [° 2θ]	상대적 강도 [%]
6.16	37.17
6.78	61.40
8.49	14.10
11.35	79.68
13.51	28.22
14.44	43.58
15.76	27.65
16.81	13.90
19.77	8.02
20.51	100.00
24.63	32.19
25.97	38.26
26.68	15.27
29.13	42.93
31.00	6.24
31.75	10.08
34.09	9.97
35.67	16.95
36.47	8.52
37.74	10.88
38.90	10.20

[0092]

[0093]

일부 실시양태에서, 화합물 1의 포타슘 염의 다형성 유형 A는 도 16에 도시된 바와 같은 또는 표 B에 제공된 바와 같은 XRPD 패턴에서 가장 큰 강도를 갖는 2-세타 각도에서의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 적어도 10개의 피크를 나타내는 XRPD 패턴을 갖는다.

[0094]

일부 실시양태에서, 화합물 1의 포타슘 염의 다형성 유형 A는 6.78±0.20, 11.35±0.20 및 20.51±0.20 도의 2-세타 각도에서의 피크를 포함하는 XRPD 패턴을 갖는다. 일부 실시양태에서, 화합물 1의 포타슘 염의 다형성 유형 A는 6.78±0.20, 11.35±0.20, 14.44±0.20, 20.51±0.20 및 29.13±0.20 도의 2-세타 각도에서의 피크를 포함하는 XRPD 패턴을 갖는다. 일부 실시양태에서, 화합물 1의 포타슘 염의 다형성 유형 A는 6.16±0.20, 6.78±0.20, 11.35±0.20, 13.51±0.20, 14.44±0.20, 15.76±0.20, 20.51±0.20, 24.63±0.20, 25.97±0.20, 및 29.13±0.20 도의 2-세타 각도에서의 피크를 포함하는 XRPD 패턴을 갖는다.

[0095]

일부 실시양태에서, 본원은 화합물 1의 소듐 염의 다형성 유형 A를 제공한다. 일부 실시양태에서, 화합물 1의 소듐 염의 유형 A는 실질적으로 도 18에 도시된 바와 같은 XRPD 패턴을 갖는다. XRPD를 사용하여 화합물 1의 소듐 염의 유형 A에 대해 관찰할 수 있는 2-세타 각도 및 상대적 피크 강도는 아래 표 C에 도시되어 있다.

[0096] 표 C

위치 [ $^{\circ}$ 2 $\theta$ ]	상대적 강도 [%]
5.51	100.00
6.99	62.36
8.47	98.20
11.04	7.64
13.12	55.02
15.24	60.80
16.57	72.37
17.78	24.26
20.42	34.10
21.02	27.00
22.19	24.02
23.07	7.67
25.69	7.77
27.21	17.97
27.99	4.80
28.55	37.46
29.58	6.95
31.33	31.60
32.49	3.54
33.51	6.13
34.16	6.34

[0097]

[0098]

일부 실시양태에서, 화합물 1의 소듐 염의 다형성 유형 A는 도 18에 도시된 바와 같은 또는 표 C에 제공된 바와 같은 XRPD 패턴에서 가장 큰 강도를 갖는 2-세타 각도에서의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 적어도 10개의 피크를 나타내는 XRPD 패턴을 갖는다.

[0099]

일부 실시양태에서, 화합물 1의 소듐 염의 다형성 유형 A는  $5.51 \pm 0.20$ ,  $8.47 \pm 0.20$  및  $16.57 \pm 0.20$  도의 2-세타 각도에서의 피크를 포함하는 XRPD 패턴을 갖는다. 일부 실시양태에서, 화합물 1의 소듐 염의 다형성 유형 A는  $5.51 \pm 0.20$ ,  $6.99 \pm 0.20$ ,  $8.47 \pm 0.20$ ,  $15.24 \pm 0.20$  및  $16.57 \pm 0.20$  도의 2-세타 각도에서의 피크를 포함하는 XRPD 패턴을 갖는다. 일부 실시양태에서, 화합물 1의 소듐 염의 다형성 유형 A는  $5.51 \pm 0.20$ ,  $6.99 \pm 0.20$ ,  $8.47 \pm 0.20$ ,  $13.12 \pm 0.20$ ,  $15.24 \pm 0.20$ ,  $16.57 \pm 0.20$ ,  $20.42 \pm 0.20$ ,  $21.02 \pm 0.20$ ,  $28.55 \pm 0.20$  및  $31.33 \pm 0.20$  도의 2-세타 각도에서의 피크를 포함하는 XRPD 패턴을 갖는다.

[0100]

상대적 강도는 샘플 준비, 장착, 및 스펙트럼을 획득하기 위해 사용되는 기기 및 분석 절차 및 설정을 포함한 다수의 인자에 따라 달라질 수 있다는 점을 이해해야 한다. 상대적 피크 강도 및 피크 할당은 실험 오차에서 달라질 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 1의 포타슘 염의 다형성 유형 A 또는 화합물 1의 소듐 염의 다형성 유형 A를 포함하여, 본원에 나열된 XRPD 피크 할당은  $\pm 0.6$  도,  $\pm 0.4$  도,  $\pm 0.2$  도 또는  $\pm 0.1$  도 2-세타만큼 달라질 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 나열된 피크 할당은  $\pm 0.6$  도 2-세타만큼 달라질 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 나열된 피크 할당은  $\pm 0.4$  도 2-세타만큼 달라질 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 나열된 피크 할당은  $\pm 0.2$  도 2-세타만큼 달라질 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 나열된 피크 할당은  $\pm 0.1$  도 2-세타만큼 달라질 수 있다.

[0101]

**조합물**

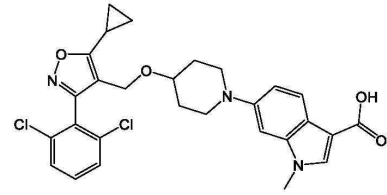
[0102]

본 개시내용은 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 간 질환을 치료하는 데 사용되는 다른 치료제의 조합물을 추가로 제공한다. 특히, 본 개시내용은 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 NASH의 치료에 사용되는 다른 치료제의 조합물을 제공한다. 본원에 개시된 바와 같이, 이의 적은 임상 용량으로 인해, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 NASH의 치료를 위한 고정된 용량의 조합물에 사용하기 위한 매력적인 후보이다.

[0103]

일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 파네소이드 X 수용체 (FXR) 작용제와 조합하여 투여된다. 일부 실시양태에서, FXR 작용제는 오베티콜산이다. 일부 실시양태에서, FXR 작용제는 실로팍소

르이다. 일부 실시양태에서, FXR 작용제는 트로피펙소르이다. 일부 실시양태에서, FXR 작용제는 EYP001 (보나펙소르, 제안된 INN)이다. 일부 실시양태에서, FXR 작용제는 MET409 (메타크린)이다. 일부 실시양태에서, FXR 작용제는 EDP-305 (Enanta에 의함)이다. 일부 실시양태에서, FXR 작용제는 "화합물 2" 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이다.



용제는 EDP-305 (Enanta에 의함)이다. 일부 실시양태에서, FXR 작용제는 "화합물 2" 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이다.

[0104] 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 피옥시즘 증식인자-활성화된 수용체 (PPAR) 작용제와 조합하여 투여된다. 일부 실시양태에서, PPAR 작용제는 피옥글리타존이다. 일부 실시양태에서, PPAR 작용제는 로시글리타존이다. 일부 실시양태에서, PPAR 작용제는 엘라라피브라노르이다. 일부 실시양태에서, PPAR 작용제는 사로글리타자르이다. 일부 실시양태에서, PPAR 작용제는 라니피브라노르이다. 일부 실시양태에서, PPAR 작용제는 엘라피브라노르이다. 일부 실시양태에서, PPAR 작용제는 셀라텔파르이다.

[0105] 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 판-카스파제 억제제와 조합하여 투여된다. 일부 실시양태에서, 판-카스파제 억제제는 엠리카산이다.

[0106] 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 갈렉틴-3 억제제와 조합하여 투여된다. 일부 실시양태에서, 갈렉틴-3 억제제는 벨라팍틴이다.

[0107] 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 스테아로일 Co-A 불포화효소 1 억제제와 조합하여 투여된다. 일부 실시양태에서, 스테아로일 Co-A 불포화효소 1 억제제는 아르마콜이다.

[0108] 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 케모카인 수용체 유형 2 및 5 (CCR2/CCR5 케모카인) 길항제와 조합하여 투여된다. 일부 실시양태에서, CCR2/CCR5 케모카인 작용제는 세니크리비톡이다.

[0109] 일부 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 항산화제와 조합하여 투여된다. 일부 실시양태에서, 항산화제는 비타민 E이다.

[0110] 일부 실시양태에서, 화합물 1은 콜레스테롤 저하 약물과 공동-투여된다. 일부 실시양태에서, 콜레스테롤 저하 약물은 스타틴이다. 일부 이러한 실시양태에서, 일부 실시양태에서, 스타틴은 아토르바스타틴, 심바스타틴 또는 로수바스타틴이다.

[0111] **제조 물품 및 키트**

[0112] 본 개시내용은 적합한 패키징에 본원에 기재된 화합물 또는 이의 염, 본원에 기재된 조성물, 또는 본원에 기재된 하나 이상의 유닛 투여량을 포함하는 제조 물품을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 제조 물품은 본원에 기재된 방법 중 임의의 것에 사용하기 위한 것이다. 적합한 패키징 (예컨대, 용기)은 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어, 바이알, 용기, 앰플, 병, 단지 및 가요성 패키징 등을 포함한다. 제조 물품은 추가로 멸균 및/또는 밀봉될 수 있다.

[0113] 본 개시내용은 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물을 포함하는, 본 개시내용의 방법을 수행하기 위한 키트를 추가로 제공한다. 키트는 본원에 기재된 용도 중 어느 하나 이상을 위해 사용될 수 있으며, 따라서 본원에 기재된 바와 같은 치료에 대한 설명서를 함유할 수 있다.

[0114] 키트는 일반적으로 적합한 패키징을 포함한다. 키트는 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 하나 이상의 용기를 포함할 수 있다.

[0115] 키트는 유닛 투여량 형태, 벌크 패키지 (예컨대, 다중-용량 패키지) 또는 서브-유닛 용량일 수 있다. 예를 들어, 연장된 기간 동안, 예컨대, 1주, 2주, 3주, 4주, 6주, 8주, 3개월, 4개월, 5개월, 7개월, 8개월 또는 9개월 이상 중 임의의 기간 동안 개체의 효과적인 치료를 제공하기 위한, 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및/또는 본원에 상세히 설명된 질환에 유용한 추가적인 약학적으로 활성인 화합물의 충분한 투여량을 함유하는 키트가 제공될 수 있다. 키트는 또한 화합물의 다중 유닛 용량 및 사용 설명서를 포함할 수 있고, 약국 (예컨대, 병원 약국 및 조제 약국)에서 보관 및 사용하기에 충분한 수량으로 패키징될 수 있다.

- [0116] 키트는 임의로 일련의 설명서, 일반적으로 종이 설명서를 포함할 수 있지만, 본 개시내용의 방법의 구성요소(들)의 용도와 관련하여, 설명서를 함유한 전자 저장 매체 (예컨대, 자기 디스켓 또는 광 디스크)가 또한 허용가능하다. 키트에 포함된 설명서는 일반적으로 구성요소 및 개체에 대한 이들의 투여에 관한 정보를 포함한다.
- [0117] **실시예**
- [0118] **실시예 1: 건강한 인간 대상체에서의 화합물 1의 단일 증량 용량 시험**
- [0119] **방법**
- [0120] 화합물 1 (포타슘 염)의 단일-증량 용량 임상 시험을 수행하였다. 8명의 건강한 참가자의 4개의 그룹은 무작위화되어, 화합물 1 (3 mg, 10 mg, 30 mg 또는 60 mg 캡슐) 또는 3:1 비 (n=6 활성 및 n=2 위약)의 매칭 위약을 제공받고, 연구의 1일차에 공복 상태 동안 시행되었다. 화합물 1 및 PD 바이오마커의 혈장 수준을 투약-전 및 투약-후 다양한 시점에서 결정하였다.
- [0121] 이상 사례 (AE) 모니터링, 일상적인 임상 실험실 테스트 (갑상선 축 테스트 [유리 및 총 갑상선 호르몬 트리아이오도티로닌 (T3), 유리 및 총 갑상선 호르몬 티록신 (T4), 갑상선 자극 호르몬 (TSH)] 심장 바이오마커 [CK-MB, 트로포닌 I] 및 간 생화학 포함), 집중 활력 징후, 심장 원격측정 및 심전도를 연구 전반에 걸쳐 평가하였다. 검증된 액체 크로마토그래피-탠덤 질량 분석법 검정을 사용하여 화합물 1 혈장 및 소변 농도를 결정하였다.
- [0122] 화합물 1 농도 및 PK 샘플링을 위한 혈장 샘플을 연구 의약 (위약 또는 화합물)의 투약-전 및 단일 용량의 투여 후 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48 및 72시간째에 수집하였다. 화합물 1 농도 및 PK 샘플링을 위한 소변 샘플을 투약-전 및 다음의 시점에 수집하였다: 0-6 시간, 6-12 시간, 12-24 시간 및 24-48시간. PK 매개변수를 Phoenix<sup>®</sup> WinNonlin<sup>®</sup> (Certara, LP, Princeton, NJ)을 사용하여 비구획 방법을 통해 추정하였다. 혈청 약력학 (PD) 바이오마커인 아포지단백질 B (Apo B) 및 성호르몬 결합 글로불린 (SHBG)의 농도를 면역검정을 사용하여 측정하고, 혈청 지질을 분광광도법을 사용하여 결정하였다.
- [0123] PD 샘플링을 투약-전, 및 투약-후 48 시간 및 72시간째에 수행하였다. PD 마커에 대한 기준선으로부터의 변화 퍼센트는 종속 변수로서 기준선으로부터의 변화 퍼센트, 고정 효과로서 치료 그룹, 그리고 공변량으로서 기준선을 이용하는 ANCOVA 모델을 사용하여 계산되었다. 분석은 누락된 데이터에 대한 대치 없이 관찰된 데이터만 사용하였다.
- [0124] **결과**
- [0125] **치료-유발 이상 사례 모니터링**
- [0126] 모든 이상 사례는 중증도가 경도 또는 중등도였으며, 연구 약물과 크게 관련이 없었다. 심장 관련된 AE (예컨대, 빈맥, 부정맥)는 보고되지 않았으며, 활력 징후 또는 ECG 매개변수의 현저한 변화가 관찰되지 않았다 (표 1 참조).

[0127] 표 1; 화합물 1의 다양한 용량에서의 안전성 모니터링

	위약 (n=8)	3 mg 화합물 2 (n=6)	10 mg 화합물 2 (n=6)	30 mg 화합물 2 (n=6)	60 mg 화합물 2 (n=6)
임의의 AE, 모든 CTCAE 등급	1 (12.5%)	2 (33.3%)	0	2 (33.3%)	0
CTCAE 등급 1	0	0	0	1 (16.7%)	0
CTCAE 등급 2	0	0	0	1 (16.7%)	0
CTCAE 등급 3 이상	0	0	0	0	0
심각한 AE	0	0	0	0	0
약물에 대한 관계별 AE					
관련 없음	1 (12.5%)	2 (33.3%)	0	1 (16.7%)	0
관련 가능성 낮음	0	0	0	0	0
관련 가능성 있음	0	0	0	1 (16.7%)*	0
관련 있음	0	0	0	0	0

[0128]

[0129] \*한 명의 대상체는 1일차 및 3일차에 두통이 자발적으로 해소되었다고 보고하였고, 2일차에 흉막통 (좌측 겨드랑이)이 몇 시간 지속되었다가 아세트아미노펜의 1회 용량 (1000 mg) 후에 해소되었다고 보고하였다.

[0130] 안전성 및 갑상선 축 모니터링

[0131] 심박수는 위약 그룹에서 볼 수 있는 것과 유사한 패턴을 따라 화합물 1을 이용한 투약 후 24 시간 동안 정상 범위 내에서 그리고 안정적으로 유지되었다. TSH, 유리 T3 및 유리 T4 수준은 정상 범위 내에서 유지되었다. 정상 상한치 (ULN)보다 2-배 초과 더 큰 ALT의 증가를 경험한 대상체는 없었으며; 정상 범위 초과 빌리루빈 수준을 나타낸 대상체는 없었다. 또한, 심장 바이오마커 (트로포닌 I, CK-MB) 또는 기타 임상 안전성 테스트에서는 눈에 띄는 변화가 관찰되지 않았다.

[0132] 약동학

[0133] 화합물 1은 공복 조건 하에서 적은 변동성 (%CV ≤33%)으로 흡수되었다. 노출 (AUC, C<sub>max</sub>)은 대략 용량-비례적이었다. 화합물 1의 중앙값 반감기는 13.8 내지 17.3시간의 범위였으며, 이는 1일 1회 투약을 지지한다. 최소 신장 배설은 모든 용량에서 결정되었다. 표 2, 도 1, 도 2를 참조한다.

[0134] 표 2: 약동학적 결과

화합물 1의 용량	AUC <sub>inf</sub> (hr*ng/mL)	C <sub>max</sub> (ng/mL)	T <sub>max</sub> (h)	t <sub>1/2</sub> (h)	f <sub>e</sub> (%용량, 소변)
3 mg (n=6)	4060 (16.6)	217 (13.9)	4.00 (3.00- 4.00)	17.3 (13.8 - 20.1)	2.95 (62)
10 mg (n=6)	8110 (23.9)	614 (29.0)	4.00 (3.00- 4.03)	14.4 (11.5 - 16.2)	2.05 (74)
30 mg (n=6)	33000 (33.0)	1800 (23.7)	4.00 (3.00- 6.00)	15.7 (11.3 - 23.1)	1.78 (35)
60 mg (n=6)	50000 (31.4)	3300 (33.2)	4.00 (3.00- 4.00)	13.8 (10.5- 16.9)	1.53 (53)

[0135]

[0136] 매개변수는 중앙값 (최소-최대 범위)으로서 표시되는 T<sub>max</sub> 및 t<sub>1/2</sub>를 제외하고 평균 (%CV)으로서 3개의 유효 숫자

로 표시된다.  $f_e$ 는 변형되지 않은 화합물 1로서 소변으로 배설되는 용량의 비율이다.

[0137] 약리학

[0138] 연구의 1일차에 화합물 1의 단일 투여 후 3일차에 성호르몬 결합 글로불린 (SHBG) 및 아포지단백질 B (Apo B)의 평균 변화 퍼센트는 각각 도 3 및 도 4에 도시되어 있다. 평균 변화 퍼센트는 ANCOVA 모델로부터의 최소 제곱 평균 (LSM) 및 표준 오차 (SE)를 지칭한다. P-값 대 위약: \* <0.05; \*\* <0.01; \*\*\* <0.001; \*\*\*\* <0.0001. 위약에 비해  $\geq 10$  mg의 화합물 1의 단일 용량 후 SHBG의 유의한 증가가 관찰되었다. LDL-c, 총 콜레스테롤 및 Apo-B의 용량-의존적 감소는 화합물 1의 단일 용량 투여 후 3일차에 관찰되었으며, 4일차에도 유사한 결과가 나타났다. 화합물 1의 단일 용량 후 트리글리세리드 수준의 유의한 변화는 관찰되지 않았다 (표 3 참조).

[0139] 표 3: PD 마커 변화, 3일차

	위약 (PBO) (n=8)	3 mg (n=6)	10 mg (n=6)	30 mg (n=6)	60 mg (n=6)
<b>SHBG</b>					
기준선 (nmol/L)	35.0 (17.97)	46.7 (26.30)	55.0 (20.63)	26.0 (11.19)	39.3 (31.97)
변화 (nmol/L)	-0.77 (2.17)	0.20 (2.51)	15.8 (2.61)	6.0 (2.6)	5.05 (2.49)
LSM %변화	-3.8 (3.91)	6.3 (4.52)	31.3 (4.69)	16.5 (4.67)	13.8 (4.48)
P-값 대 PBO	-	0.11	<0.0001	0.0023	0.0064
<b>LDL-c</b>					
기준선 (nmol/L)	106.1 (36.06)	137.5 (17.4)	133.7 (18.2)	123.3 (23.55)	125.2 (45.96)
변화 (nmol/L)	5.8 (3.44)	-3.98 (3.39)	0.68 (3.34)	-15.7 (3.32)	N/A
LSM %변화	5.6 (2.85)	-3.1 (2.80)	0.70 (2.76)	-12.5 (2.75)	N/A
P-값 대 PBO	-	0.048	0.24	0.0002	N/A
<b>HDL-c</b>					
기준선 (nmol/L)	45.4 (11.40)	51.0 (22.53)	63.7 (23.55)	49.5 (7.82)	48.2 (13.93)
변화 (nmol/L)	0.29 (0.93)	0.87 (0.91)	-1.1 (0.96)	-6.1 (0.91)	N/A
LSM %변화	1.7 (1.77)	2.4 (1.73)	-1.0 (1.83)	-12.1 (1.74)	N/A
P-값 대 PBO	-	0.78	0.3027	<0.0001	N/A
<b>TC</b>					
기준선 (nmol/L)	171.7 (45.05)	216.5 (29.87)	217.7 (38.10)	196.2 (31.2)	191.2 (51.68)
변화 (nmol/L)	2.3 (4.73)	-1.85 (4.59)	-1.93 (4.61)	-24.14 (4.52)	N/A
LSM %변화	1.6 (2.15)	-0.88 (2.09)	-0.84 (2.09)	-11.84 (2.06)	N/A
P-값 대 PBO	-	0.44	0.45	0.0002	N/A
<b>Apo B</b>					
기준선 (nmol/L)	86.7 (23.18)	113.5 (20.06)	105.8 (9.26)	101.2 (15.89)	92.3 (24.9)
변화 (nmol/L)	3.8 (2.72)	-1.5 (3.14)	-5.6 (3.0)	-11.5 (2.97)	-13.9 (3.0)
LSM %변화	5.5 (2.63)	-2.7 (3.04)	-6.0 (2.91)	-11.0 (2.9)	-15.75 (2.91)
P-값 대 PBO	-	0.064	0.0081	0.0003	<0.0001

[0140]

[0141] 결론

[0142] 최대 60 mg까지의 화합물 1의 단일 증량 용량은 전반적으로 안전하고 잘 용인되었으며, 적은 변동성을 갖는 선형 및 용량-비례적 혈장 노출을 나타냈다. 반감기는 모든 단일 용량 수준에서 >13시간이었고, 이는 1일 1회 경

구 투약을 지지한다. 변화되지 않은 화합물 1의 신장 배설은 최소였으며, 이는 신장 제거가 소수 경로를 나타낸다.

[0143] SHBG, Apo B 및 LDL-c에 대한 유의한 용량-의존적 효과는 화합물 1의 단일 용량 후에 관찰되었으며, 이는 효험에 대한 잠재력을 나타낸다. 전임상 모델에서 화합물 1의 유효량 (3,320 ng<sup>\*</sup>h/mL의 역치 AUC가 NASH의 마우스 모델에서 유의한 조직학적 개선을 달성하였음)에 비해, 모든 화합물 1 용량 전체에 걸쳐 인간 대상체에서 충분한 노출 수준이 달성되었다.

[0144] 안전성, PK 및 PD 결과는 화합물 1의 지속적인 개발을 지지하며, 경구의, 1일 1회 고정된 용량 조합물로서 다른 경구 소분자 NASH 약제와의 공동-제형에 매우 적합하다는 것을 나타낸다.

[0145] **실시예 2: 건강한 인간 대상체에서의 화합물 1의 다중 증량 용량 시험**

[0146] 화합물 1의 다중-증량 용량 임상 시험을 수행하였다. 8명의 건강한 참가자의 4개의 그룹은 무작위화되어, 화합물 1 (1 mg, 3 mg, 6 mg 또는 10 mg 캡슐) 또는 3:1 비 (n=6 활성 및 n=2 위약)의 매칭 위약을 제공받고, 14일간 공복 상태 동안 1일 1회 시행되었다. 화합물 1 및 PD 바이오마커의 혈장 수준을 투약-전 및 투약-후 다양한 시점에서 결정하였다.

[0147] 이상 사례 (AE) 모니터링 (표 4), 일상적인 임상 실험실 테스트 (갑상선 축 테스트 [유리 및 총 갑상선 호르몬 트리아이오도티로닌 (T3), 유리 및 총 갑상선 호르몬 티록신 (T4), 갑상선 자극 호르몬 (TSH)], 심장 바이오마커 [CK-MB, 트로포닌 I] 및 간 생화학 포함)(도 5, 도 6), 집중 활력 징후, 심장 원격측정 및 심전도를 연구 전반에 걸쳐 평가하였다. 검증된 액체 크로마토그래피-텐덤 질량 분석법 검정을 사용하여 화합물 1 농도를 결정하였다.

[0148] 화합물 1 농도 및 PK 샘플링을 위한 혈장 샘플을 연구 의약 (위약 또는 화합물)의 투약-전 및 제1 용량 후 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 및 24시간째에, 투약의 3, 4, 5, 8, 11 및 13일차에 대한 투약-전, 및 투약-전 및 1일 1회 투여의 14일 후 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48 및 72시간째에 수집하였다. (표 5, 도 7 참조) PK 매개 변수를 Phoenix<sup>®</sup> WinNonlin<sup>®</sup> (Certara, LP, Princeton, NJ)을 사용하여 비구획 방법을 통해 추정하였다. 혈청 약력학 (PD) 바이오마커인 아포지단백질 B (Apo B) 및 성호르몬 결합 글로불린 (SHBG)의 농도를 면역검정을 사용하여 측정하고, 혈청 지질을 분광광도법을 사용하여 결정하였다.

[0149] PD 샘플링을 또한 수행하였다. PD 마커에 대한 기준선으로부터의 변화 퍼센트는 종속 변수로서 기준선으로부터의 변화 퍼센트, 고정 효과로서 치료 그룹, 그리고 공변량으로서 기준선을 이용하는 ANCOVA 모델을 사용하여 계산되었다. 분석은 누락된 데이터에 대한 대처 없이 관찰된 데이터만 사용하였다. 연구의 15일차에 대한 PD 데이터는 도 8에 도시되어 있다.

[0150] **결과 및 결론**

[0151] **안전성**

[0152] 표 4: 안전성 및 유해 효과

카테고리별 대상체 AE 발생률	위약 (N=6) n (%)	3 mg (N=6) n (%)	6 mg (N = 6) n (%)	10 mg (N=6) n (%)
임의의 AE, 모든 CTCAE 등급	0	1 (16.7%)	1 (16.7%)	2 (33.3%)
등급 1	0	1 (16.7%)	1 (16.7%)	2 (33.3%)
등급 2 이상	0	0	0	0
심각한 AE	0	0	0	0
약물에 대한 관계별 AE				
관련 없음	0	1 (16.7%)	0	2 (33.3%)
관련 가능성 낮음	0	0	0	0
관련 가능성 있음	0	0	1 (16.7%)	0
관련 있음	0	0	0	0

[0153]

[0154] \*어지럼증이 한 명의 대상체에서 보고되었다.

[0155] CTCAE = 이상 사례에 대한 일반적인 용어 기준, AE = 이상 사례; 치료-유발 이상 사례 (TEAE)는 연구 약물의 제

1 용량의 시점에서 또는 그 이후에 발생하는 것들이며; 이상 사례의 중증도는 CTCAE 버전 5에 따라 등급이 매겨졌다.

[0156] 최대 10 mg까지의 위약 또는 화합물 1의 14-일 일일 투약은 전반적으로 잘 용인되었다. 연구 정지 기준 또는 용량 단계적 확대 정지 기준이 충족되지 않았다. 모든 AE는 등급 1이었으며, 대부분 연구 약물과 관련이 없는 것으로 간주되었다. 화합물 1에 대해 무작위화된 모든 대상체는 연구 약물 중단 없이 연구를 완료하였다. 심박수 및 혈압은 연구 전반에 걸쳐 안정적으로 유지되었다. 유리 T4는 TSH 또는 유리 T3의 명확한 변화 없이 용량-의존적 방식으로 축소되었으며; T4 변화는 무증상이었고 임상적으로 유의한 것으로 간주되지 않았으며, 이는 말초 갑상선 호르몬 조절이 T3 또는 TSH의 변화 없이 더 적은 유리 T4를 야기함을 시사한다.

[0157] 평균 ALT 값은 그룹 전체에 걸쳐 유사하였고, 위약과 유의하게 상이하지 않았으며; 치료된 대상체는 ALT가  $\geq 2 \times$  ULN으로 증가하지 않았다. 용량-의존적 GGT 증가가 나타났으며, 치료된 환자의 경우 값이 ULN 미만으로 유지되었다. 용량-의존적 총 테스토스테론 증가가 관찰되었으나, 유리 수준에서의 유의한 변화는 식별되지 않았다.

[0158] ECG, 심장 바이오마커 또는 기타 임상 실험실 테스트에서 현저한 변화가 식별되지 않았다.

[0159] 약동학 및 약력학

[0160] 표 5: 약동학

14 일차 PK 매개변수	1 mg, QD	3 mg, QD N=6	6 mg, QD N=6	10 mg, QD N=6
AUC <sub>0-24</sub> (hr·ng/mL) (평균, % CV)	1090 (15.7)	3600 (26.9)	8310 (44.4)	10600 (21.1)
C <sub>max</sub> (ng/mL) (평균, %CV)	80.3 (20.0)	291 (30.9)	699 (35.1)	996 (18.0)
C <sub>t,24</sub> (ng/mL) (평균, %CV)	25.7 (28.6)	77.9 (37.6)	175 (64.7)	196 (38.0)
t <sub>1/2</sub> (hr) (중앙값, 최소-최대)	19.5 (17.0- 23.8)	16.0 (14.1 - 19.6)	15.8 (12.7 - 17.6)	15.4 (13.1-18.5)

[0161]


[0162]

[0163] 약동학적 데이터는 적은 PK 변동성과 함께 양호한 경구 생체이용률을 나타냈다. 화합물 1의 다중 용량은 3 mg QD의 적은 용량에서도 SHBG의 유의한 그리고 용량-의존적 증가를 야기하였다. 총 콜레스테롤, LDL-c, Apo B 및 트리글리세리드의 감소는 화합물 1의 모든 용량 수준에서 관찰되었으며, 10 mg 용량 코호트에서는 15일차에 유의한 감소가 관찰되었다. HDL-c는 15일차까지 유의하게 변화하지 않았다. 이러한 결과는 화합물 1의 낮은 1일 1회 용량이 효과적임을 지지한다.

[0164] **실시예 3: 건강한 인간에서 화합물 1을 이용한 약물-약물 상호작용 연구**

[0165] 생체의 연구에서는 화합물 1이 유기 음이온 수송 폴리펩티드 (OATP) 1B1/1B3의 제1 통과 억제 및 지방암 저항성 단백질 (BCRP) 수송체의 장 억제 (OATP1B1 IC<sub>50</sub>=2.01 마이크로몰; OATP1B3 IC<sub>50</sub>=0.71 마이크로몰; BCRP IC<sub>50</sub>=9.37 마이크로몰)에 대한 잠재력을 가짐을 나타냈다. 건강한 참가자에서 항고지혈증 약물 및 OATP 및 BCRP의 기질인 공동투여된 로수바스타틴 (ROS)의 약동학에 대한 화합물 1의 효과는 표 6에 기재된 바와 같이 화합물 1 및 ROS를 PK 샘플링과 조합하여 투여함으로써 결정된다.

[0166] 표 6: 화합물 1과 로수바스타틴 (ROS)의 공동-투여

연구 일수	1	2	3-8	9	10-11	12
코호트 1 (n=10)	10 mg ROS PO의 단일-용량	치료 없음	최대 90 mg의 화합물 1, QD PO	최대 90 mg의 화합물 1의 단일-용량 + 10 mg ROS PO의 단일-용량	치료 없음	진료소 퇴원

[0167]

[0168] PO = 입으로; QD = 1일 1회

[0169] 또한, 화합물 2는 장에서 발견되는 수송체 P-당단백질 (P-gp) 및 BCRP의 억제제 (P-gp IC50=3.92 마이크로몰; BCRP IC50=4.39 마이크로몰)이다. 생체의 연구에 기반하여, 화합물 2에 의한 이들 수송체의 억제는 공동-투여된 화합물 1의 흡수를 증가시킬 잠재력을 갖는다. 따라서, 표 7에 기재된 바와 같이, 장 P-gp 및 BCRP의 억제를 통해 화합물 2가 화합물 1의 흡수를 향상시킬 잠재력을 평가하기 위한 약물-약물 상호작용 (DDI) 연구를 실시한다.

[0170] 표 7: 화합물 1 및 화합물 2의 공동-투여

연구 일수	1	2-6	7-12	13	14-16	17
코호트 2	최대 90 mg의 화합물 1 PO의 단일-용량	치료 없음	15 mg의 화합물 2 QD PO	최대 90 mg의 화합물 1의 단일-용량 + 15 mg의 화합물 2의 단일 용량	치료 없음	진료소 퇴원

[0171]

[0172] **실시예 4: 건강한 인간에서 화합물 1에 대한 음식 효과**

[0173] 건강한 참가자에서 화합물 1의 흡수 및 약동학에 대한 음식 효과는 표 8에 기재된 바와 같이 섭식 및 공복 상태 동안 화합물 1을 PK 샘플링과 조합하여 투여함으로써 결정된다.

[0174] 표 8: 음식 효과 연구

연구 기간/연구 일수	기간 1/1 일차	2-8 일차	기간 2/9 일차	10-11 일차	12 일차
코호트 3 순서 A (n=4)	최대 90 mg의 화합물 1 PO (공복)	세척	최대 90 mg의 화합물 1 (섭식)	치료 없음	진료소 퇴원
코호트 3 순서 B (n=4)	최대 90 mg의 화합물 1 PO (섭식)	세척	최대 90 mg의 화합물 1 PO (공복)	치료 없음	진료소 퇴원

[0175]

[0176] 참가자는 밤새 공복을 겪는다 (투약 전 적어도 10시간 동안 물을 제외한 음식 또는 액체 없음). 순서 A의 9일차 및 순서 B의 1일차에, ~1000 kcal 및 45% 내지 55% 지방을 함유하는 고-지방/고-칼로리 아침 식사가 연구 약물 투여 30분 전에 제공된다. 연구 약물은 참가자가 아침 식사를 완료 (100% 소비)한 후 5분째에 또는 그 이내에 투여된다.

[0177] 갑상선 축 안전성 모니터링 및 심혈관 안전성 모니터링은 이전 실시예에 기재된 바와 같이 실시된다.

[0178] **실시예 5: 마우스 NASH 모델에 대한 화합물 1의 효과**

[0179] C57BL/6J 마우스에 비만 (>38 g BW)을 유도하기 위해 10주 동안 고지방식을 공급하였다. 비만 마우스에 섬유증을 유도하기 위해 0.5 μl/g 25% CCl<sub>4</sub> (올리브 오일로 체형화됨)를 4주 동안 일주일에 2회 복강내 (i.p.) 주사하였고, 정상 BW 마우스의 하나의 그룹에 건강한 대조군 역할을 하기 위해 올리브 오일을 4주 동안 일주일에 2

회 i.p. 주사하였다. 동일한 투약 기간 동안, 비만 마우스에 비히클 또는 다양한 용량의 화합물 1을 28일 동안 1일 1회 경구 공급하였다. CCl<sub>4</sub> 투약 일에는, CCl<sub>4</sub>를 화합물 또는 비히클 투약 후 4시간째에 투여하였다. 27일차에, 모든 동물은 약 16시간 동안 단식된 후 최종 안락사되었다. 28일차에, 모든 동물을 희생시키고, 다양한 생물학적 매개변수를 분석하였다. 총 체중, 간, 심장 및 뇌의 중량을 측정하였고, 간 및 심장의 중량의 변화를 뇌 중량을 사용하여 정규화하였다.

[0180] 화합물 1은 총 체중 또는 심장/뇌 중량에 영향을 미치지 않으면서 간/뇌 중량을 유의하게 감소시켰다 (도 9). 지방증, 염증 및 섬유증에 대한 화합물 1의 효과에 대해 간 조직 조직학을 분석하였다. 화합물 1은 테스트된 모든 용량에서 지방증을 유의하게 감소시켰고, 염증 감소의 경향을 보였고, 3 및 10 mpk에서 간 섬유증을 유의하게 감소시켰다(도 10). 화합물 1은 또한 테스트된 모든 용량에서 혈청 총 콜레스테롤, 트리글리세리드 및 ALT를 유의하게 감소시켰다 (도 11).

[0181] RNA 시퀀싱 (RNAseq)에 의한 전체 전사체 분석을 위해 간 샘플을 수집하였다. Illumina 표준 프로토콜을 사용하여 RNAseq 라이브러리 (n=그룹당 5 개) 제조 및 시퀀싱을 수행하였다. 시퀀싱 판독의 정렬은 STAR 정렬기 소프트웨어를 사용하여 수행하였고, 판독 카운트는 RSEM을 사용하여 추정하였다. (비히클-처리된 NASH 대조군 마우스와 비교하여) 차등 발현된 유전자는 EdgeR 소프트웨어를 사용하여 결정하였다. 유전자 온톨로지 분석은 배수-변화 및 각각 >1.5 및 <0.05의 조정된 p-값 컷오프로 Advaita 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. 유전자 온톨로지는 Gene Ontology Consortium 데이터베이스 (2019-Apr26) (Ashburner et al., Gene ontology: Tool for the unification of biology. Nature Genetics 25(1): 25-9 (2000); Gene Ontology Consortium, Creating the Gene Ontology Resource: Design and Implementation. Genome Research 11: 1425-1433 (2001))로부터 유래되었다. 화합물 1은 콜라겐 세포외 기질 및 간 정상 세포 활성화와 연관된 유전자의 발현에 대해, 주로 NASH 대조군 마우스에 비해 발현 수준을 감소시킴으로써, 유의한 영향을 미쳤다 (도 12).

[0182] **실시예 6: 화합물 1 용해도에 대한 pH 및 가용화제 효과**

[0183] 화합물 1 (포타슘 염)의 용해도를 다양한 pH 수준에서 평가하였다. 표 9에 도시된 바와 같이 수용액 중 화합물 1의 용해도는 pH 의존적이었고, pH에 따라 증가하였다. 가용화제 (소듐 라우릴 설페이트, SLS)의 존재 하에, 화합물 1의 용해도는 24시간 후 25°C에서 pH 10.0 완충액 + 2 wt% SLS 중 308 µg/mL로 추가로 개선되었다.

[0184] 표 9: 화합물 1의 용해도에 대한 pH 및 가용화제 효과. (화합물 1의 대략적인 pKa = 4.12.)

용매	용해도 (µg/mL)	
	24 시간 (2 wt% SLS 포함하지 않음)	24 시간 (2 wt% SLS 포함함)
0.1 N HCl	<0.03	5.7
pH 2.0 완충액	<0.07	5.5
pH 4.0 완충액	<0.07	10.0
pH 6.0 완충액	2.2	42.3
pH 8.0 완충액	10.8	301.9
pH 10.0 완충액	10.2	308.2

[0185] **실시예 7: 화합물 1 제형, 약동학, 비글견에서의 음식 효과**

[0187] 화합물 1의 흡수에 대한 가용화제 (SLS)의 효과를 결정하기 위해, 50 mg (유리산 기준)의 화합물 1을 5 wt% SLS가 포함되거나 포함되지 않은 캡슐로 제형화하고 (표 10 참조), 펜타가스트린으로 사전-치료된 공복의 비글견에 투여하였다 (6 µg/kg, 화합물 1의 투여 30±2 분 전에 근육내 주사에 의해 투여됨). 화합물 1의 혈장 농도를 24시간에 걸쳐 측정하였다 (도 13 참조). 5 wt% SLS를 포함하는 제형은 화합물 1의 노출 (C<sub>max</sub>, AUC)을 70% 초과 증가시켰다 (표 11 참조).

[0188] 표 10: 50 mg의 화합물 1 캡슐 제형의 조성.

	제형 1 (P01) (wt%)	제형 2 (P02) (wt%)
화합물 1	18.25	18.25
미세결정질 셀룰로스 PH-102	51.16	47.83
만니톨 200SD	25.58	23.92
소듐 라우릴 설페이트 SLS Fine	0	5.0
크로스카르멜로스 소듐	3.0	3.0
콜로이드성 실리카 디옥사이드 Aerosil 200 Pharma	1.0	1.0
마그네슘 스테아레이트 LIGAMED MF-2-V	1.0	1.0

[0189]

[0190] 표 11: 비글견 (n=5)에서의 50 mg 캡슐 투약 후 화합물 1의 약동학.

	제형 1	제형 2
C <sub>max</sub> (ng/mL)	572	1010
T <sub>max</sub> (h)	3.60	3.20
t <sub>1/2</sub> (h)	4.46	4.11
AUC <sub>0-12h</sub> (ng*h/mL)	3420	6210
AUC <sub>0-inf</sub> (ng*h/mL)	3700	6360

[0191]

[0192] PK 성능에 대한 pH 효과를 결정하기 위해, 비글견을 2개의 그룹으로 나누었다 (n=그룹당 3마리). 그룹 1의 경우, 개를 펜타가스트린 (6 µg/kg, 화합물 1의 투여 30±2분 전 근육내 주사)으로 사전-치료하였다. 그룹 2의 경우, 개를 파모티딘 (2개의 정제, 20 mg/정제, 화합물 1의 투여 180±10분 전 경구 투여)으로 사전-치료하였다. 화합물 1 (10 mg 캡슐, 5% SLS)을 투여하고, 화합물 1의 혈장 농도를 24시간 동안 모니터링하였고, 도 14에 묘사하였다. 연구 조건 하에서 개에서 최소 pH 효과가 발생하였다.

[0193] PK 성능에 대한 음식 효과를 결정하기 위해, 비글견을 2개의 그룹으로 나누었다 (n=그룹당 3마리). 공복 그룹의 경우, 개를 투약 후 4-시간 내내 밤새 단식시켰다. 섭식 그룹의 경우, 개에 투여 30분 전에 고지방 음식을 공급하였다. 화합물 1의 혈장 농도를 24시간 동안 모니터링하였다. 화합물 1 (10 mg 캡슐, 5% SLS)을 투여하고, 화합물 1의 혈장 농도를 24 시간 동안 모니터링하였고, 도 15에 묘사하였다. 음식 섭취는 화합물 1의 T<sub>max</sub>를 지연시켰지만, 혈장 노출에는 영향을 미치지 않았다.

[0194] **실시예 8. 화합물 1의 포타슘 염의 생산**

[0195] 에틸 (E)-(2-시아노-2-(2-(3,5-디클로로-4-((4-옥소-3,4-디하이드로프탈라진-1-일)옥시)페닐)하이드라진일리덴)아세틸)카바메이트 (7.4 kg, 0.99-1.01 X), 포타슘 아세테이트 (7.4 kg, 0.95-1.00 X) 및 DMAc (41 kg, 5.6-6.0 X)를 500 L GL 반응기에 충전하였다. 생성된 혼합물을 80-90°C에서 12-16시간 동안 유지하였다. 혼합물을 20-30°C로 조정하였다. 공정수 (8 kg, 1.0-1.5 X) 중 KOH (0.85 kg, 0.11-0.17 X)의 용액을 20-30°C에서 1-2시간 동안 첨가하였다. 혼합물을 20-30°C에서 1-2시간 동안 교반하였다. 공정수 (39 kg, 5.0-5.5 X)를 20-30°C에서 4-6시간 동안 첨가하였다. 혼합물을 20-30°C에서 2-3 시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 스테인리스-강 원심분리기로 원심분리하였다. 습윤 케이크를 공정수로 2회 (18+20 kg, 2-3 X) 행구었다. 습윤 케이크 및 공정수 (38 kg, 5.0-6.0 X)를 500 L GL 반응기에 충전하였다. 혼합물을 20-30°C에서 2-3시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 스테인리스-강 원심분리기로 원심분리하였다. 습윤 케이크를 공정수로 2회 (18+22 kg, 2-3 X) 행구고, 스테인리스 강 건조기로 55-65°C에서 감압 하에서 건조하여, 화합물 1의 조질의 포타슘 염 (5.45 kg, 순도: 98.4%; 검정: 95.9%; 수율: 72%)을 수득하였다.

[0196] 화합물 1의 조질의 포타슘 염 (5.3 kg, 0.99-1.01 X) 및 DMSO (43 kg, 6.0-8.0 X)를 250 GL 반응기 (R1)에 충전하였다. 생성된 혼합물을 40-50°C에서 0.5-1시간 동안 유지하여, 투명한 용액을 제공하였다. 에틸 아세테이트 (EA)(22 kg, 4.0-4.5 X)를 40-50°C에서 1-2시간에 걸쳐 첨가하였다. 생성된 혼합물을 인라인 필터를 통해 여과하고, 250 GL 반응기 (R2)로 옮겼다. R1을 DMSO (1.8 kg, 0.2-0.5 X)로 행구고, 인라인 필터를 통해 재료를 여

과한 후, R2로 옮겼다. 40-50℃로 조정하고, 1-2시간에 걸쳐 40-50℃에서 R2에 EA (22 kg, 4.0-4.5 X)를 충전하였다. R2에 화합물 1 씨드 (0.010 kg, 0.001-0.002 X)를 충전하였다. 생성된 혼합물을 40-50℃에서 1-2 시간 동안 교반하였다. EA (67 kg, 12.0-13.0 X)를 40-50℃에서 12-15시간에 걸쳐 R2에 충전하고, 40-50℃에서 2-3시간 동안 교반하였다. 분석을 위해 샘플링하였다 (사양: 습윤 케이크의 XRPD: 참조 형태 A와 일치함). EA (27 kg, 1.0-5.0 X)를 40-50℃에서 2시간에 걸쳐 R2에 충전하고, 40-50℃에서 2-3시간 동안 교반하였다. R2를 2 시간에 걸쳐 20-30℃로 조정하고, 20-30℃에서 4-6시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 스테인리스-강 필터 건조기에서 여과하였다. 습윤 케이크를 EA로 2회 (16+14 kg, 2-3 X) 행구었다. EA (36 kg, 6-7 X)를 스테인리스 강 필터 건조기에 충전하였다. 20-30℃로 조정하고, 20-30℃에서 2-3시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 스테인리스 강 필터 건조기에서 여과하였다. 습윤 케이크를 EA (16 kg, 2-3 X)로 행구고, 스테인리스 강 필터 건조기로 60-70℃에서 감압 하에서 건조하였다. 재료를 체질하여, 정제된 화합물 1의 포타슘 염 (4.16 kg, 순도: 99.81%; 검정: 97.6%; 수율: 80%)을 제공하였다. 도 16을 참조한다.

[0197] 실시예 9. 화합물 1에 대한 염 스크리닝 연구

[0198] 화합물 1의 여러 염 형태를 실시예 8에서 제조된 포타슘 염 형태에 대한 이들의 특성 (용해도, 안정성 및 흡습성 포함)에 기반하여 평가하였다 (도 16, 표 12 참조).

[0199] 표 12: 피크 목록: (화합물 1의 포타슘 염의 형태 A)

위치 [° 2θ]	높이 [cts]	FWHM 왼쪽 [° 2θ]	d-간격 [Å]	상대적 강도 [%]
6.16	320.90	0.1023	14.34	37.17
6.78	530.15	0.1023	13.04	61.40
8.49	121.75	0.1023	10.41	14.10
11.35	687.96	0.1023	7.79	79.68
13.51	243.61	0.1279	6.56	28.22
14.44	376.23	0.1279	6.13	43.58
15.76	238.73	0.1279	5.62	27.65
16.81	119.97	0.2047	5.27	13.90
19.77	69.22	0.2047	4.49	8.02
20.51	863.38	0.1535	4.33	100.00
24.63	277.93	0.1279	3.61	32.19
25.97	330.30	0.1279	3.43	38.26
26.68	131.82	0.1535	3.34	15.27
29.13	370.67	0.1791	3.07	42.93
31.00	53.89	0.3070	2.88	6.24
31.75	87.04	0.1535	2.82	10.08
34.09	86.07	0.1535	2.63	9.97
35.67	146.38	0.2047	2.52	16.95
36.47	73.59	0.2047	2.46	8.52
37.74	93.93	0.1535	2.38	10.88
38.90	88.02	0.2047	2.32	10.20

[0200]

[0201] <sup>1</sup> XRPD 비교에 따르면, 암모늄 염 유형 A의 명칭을 갖는 샘플은 유리형태 유형 D 및 암모늄 염의 혼합물로서 추측되었다.

[0202] 출발 재료로서 유리산 형태 A (도 17)를 사용하여, 10개의 염 형성제 및 5개의 용매를 이용하여 총 50회의 염 스크리닝 실험을 수행하였다. 특성화 결과에서는 염 스크리닝 및 재-제조 실험에서 암모늄 염 유형 B/C1, L-리신 염 유형 A/B/C, 마그네슘 염 유형 A, 콜린 염 유형 A, 칼슘 염 유형 A, L-아르기닌 염 유형 A/B, 소듐 염 유형 A, 트리스 염 유형 A/B, 디에틸아민 염 유형 A, 및 유리산 유형 A/B/C/D를 포함한 4개의 형태의 유리산을 포함하여 총 14개의 염을 수득하였음을 보여주었다.

[0203] 특성화 데이터 (양호한 결정성, 순수(neat) DSC 신호, 정수 물비, 높은 안전성 등급 및 단순한 다형성을 기준으

로 사용)에 기반하여, 소듐 염 유형 A (도 18, 표 13), L-아르기닌 염 유형 A (도 19) 및 마그네슘 염 유형 A (도 20)를 재-제조 및 속도론적 용해도 평가를 위해 선택하였고, 비교 시 포타슘 염을 참조로서 포함하였다. 용해도 평가의 결과에서는 소듐 염이 실온에서 24시간 동안 물에서의 가장 높은 용해도를 나타냈음을 보여주었다 (~0.4 mg/mL, 37°C의 물에서의 포타슘 염의 용해도와 유사함). 37°C의 시뮬레이션된 위액 (SGF)에서, 포타슘 염이 가장 높은 용해도 (0.11 mg/mL)를 나타냈고, 소듐 염이 그 뒤를 따랐다. 37°C의 공복-상태 시뮬레이션된 장액 (FaSSIF)에서, 마그네슘 염이 가장 높은 용해도 (~0.04 mg/mL)를 나타냈고, 유리산이 그 뒤를 따랐다. 37°C의 섭취-상태 시뮬레이션된 장액 (FeSSIF)에서, 4개의 염 및 유리산에서 유사한 용해도 (~0.02 mg/mL)가 관찰되었다. XRPD 결과에서는 유리산을 제외하고 상이한 테스트 배지 중 모든 염에서 형태 변화가 관찰되었음을 보여주었다.

[0204] 표 13: 피크 목록: (화합물 1의 소듐 염의 형태 A)

위치 [° 2θ]	높이 [cts]	FWHM 왼쪽 [° 2θ]	d-간격 [Å]	상대적 강도 [%]
5.51	1473.10	0.1279	16.02	100.00
6.99	918.64	0.1535	12.64	62.36
8.47	1446.52	0.1023	10.44	98.20
11.04	112.50	0.1535	8.01	7.64
13.12	810.51	0.1791	6.75	55.02
15.24	895.67	0.1535	5.82	60.80
16.57	1066.13	0.1279	5.35	72.37
17.78	357.33	0.1023	4.99	24.26
20.42	502.33	0.1279	4.35	34.10
21.02	397.74	0.1791	4.23	27.00
22.19	353.84	0.1023	4.01	24.02
23.07	113.00	0.1535	3.86	7.67
25.69	114.50	0.2303	3.47	7.77
27.21	264.78	0.1023	3.28	17.97
27.99	70.75	0.8187	3.19	4.80
28.55	551.84	0.2047	3.13	37.46
29.58	102.40	0.1535	3.02	6.95
31.33	465.57	0.1535	2.86	31.60
32.49	52.21	0.2047	2.76	3.54
33.51	90.30	0.2047	2.67	6.13
34.16	93.36	0.1535	2.62	6.34

[0205]

[0206] 속도론적 용해도 평가의 결과에 따라, (유리산과 비교하여) 높은 용해도 및 단순한 다형성을 기준으로서 이용하여, 무수 소듐 염 유형 A를 물리화학적 안정성 평가, 흡습성 및 PLM 테스트에 대한 후보로서 선택하고, 포타슘 염 유형 A와 비교하였다 (표 14). 이들 테스트의 결과는 다음을 나타냈다:

[0207] 1) 물리화학적 안정성 평가: 60°C/밀봉 및 60°C/75%RH 하에서 1주 및 2주 동안 보관한 후, 소듐 염 유형 A에 대해 HPLC 순도의 약간의 감소 (<0.1 변적%)가 관찰되었고, 형태 변화는 관찰되지 않았다.

[0208] 2) 흡습성 : 동적 증기 흡착 (DVS) 결과에서는 소듐 염 유형 A가 DVS 테스트 후 형태 변화 없이 약간 흡습성이 있었음을 보여주었다.

[0209] 3) PLM: 소듐 염 유형 A 샘플은 <20 μm의 입자 크기를 갖는 불규칙한 결정으로 이루어졌다. 소듐 염 및 포타슘 염의 특성화 및 평가 데이터 비교는 표 14에 도시되어 있다.

[0210] 표 14. 소듐 염 및 포타슘 염 특성화의 데이터 요약

특성 \ 결정 형태	포타슘 염 유형 A	소듐 염 유형 A
결정성	높음	높음
TGA 손실	2.1% (최대 300°C)	1.6% (최대 180°C)
DSC 흡열 신호, °C (피크)	--	110.9 <sup>#</sup>
HPLC 순도, 면적%	99.95	99.72
물비 (API/형성제)	1:1	1:1
추측된 형태	무수화물	무수화물
속도론적 용해도	37°C에서 물 및 SGF에서의 용해도는 37°C에서 FaSSIF/FeSSIF에서의 용해도보다 최대 ~0.37 mg/mL (유리산의 농도) 더 높았다.	RT에서 물에서의 용해도는 37°C에서 SGF/FaSSIF/FeSSIF에서의 용해도보다 최대 ~0.36 mg/mL (유리산 농도) 더 높았다.
DVS 후 80%RH/형태 변화에서의 흡습성/물 흡수	비-흡습성/0.08%/없음	약간 흡습성/0.9%/없음
물리화학적 안정성	60°C/밀봉 및 60°C/75%RH 하에서 1 주 및 2 주 동안 보관한 후, HPLC 순도의 약간의 감소 (<0.1 면적%)가 관찰되었고, 형태 변화는 관찰되지 않았음	

[0211]

[0212] --: 분해 전에 뚜렷한 열 신호가 검출되지 않았다 (용점은 >350°C인 것으로 추측되었음).

[0213] #: 흡열은 잔류 용매 또는 물의 손실과 관련이 있는 것으로 추측되었으며, 용점은 >350°C인 것으로 추측되었다.

[0214] **실시예 10. 임상 시험에 사용된 화합물 1의 제형**

[0215] 화합물은 중등도 내지 중증의 비-간경변성 비알콜성 지방간염 (NASH)을 갖는 성인의 치료를 위한 경구적으로 생체이용가능한 갑상선 호르몬 수용체 베타 (THR-β) 선택적 작용제이다. 화합물 1은 BCS 클래스 IV 화합물로서 분류되며, 즉시 방출 캡슐로서 제형화되었다. 활성 물질의 고유 용해도를 향상시키기 위해, 화합물 1을 약물 물질의 포타슘 염 형태로서 단리하고, 즉시 방출 제형에서 소듐 라우릴 설페이트를 가용화제로서 사용한다. 제형화된 생성물은 크기 0 HPMC (하이드록시프로필 메틸셀룰로스) 캡슐 중 0.5 내지 50 mg의 화합물 1 (유리산 등가물)을 함유하는 건조 블렌드이다. 가용화제 외에, 부형제의 다른 부류, 예컨대, 희석제 (예컨대, 미세결정질 셀룰로스 (MCC), 만니톨 등), 붕해제 (예컨대, 크로스카멜로스 소듐 등), 활주제 (콜로이드성 실리콘 디옥사이드 등), 및 윤활제 (예컨대, 마그네슘 스테아레이트 등)를 또한 조사하고, 화합물 1 제형에 사용하였다. 활성 캡슐의 정량적 유닛 용량 제형 조성은 아래 표 15에 기재되어 있다.

[0216] 표 15. 화합물 1의 조성, 캡슐, 1 mg, 3 mg, 10 mg 및 50 mg

구성요소	1 mg		3 mg		10 mg		50 mg	
	중량/mg	% w/w	중량/mg	%w/w	중량/mg	%w/w	중량/mg	%w/w
화합물 1 <sup>[1]</sup>	1.1	1.1	3.3	1.1	10.9	3.6	54.3	18.1
미세결정질 셀룰로스	59.3	59.3	177.9	59.3	172.7	57.6	143.8	47.9
만니톨	29.6	29.6	88.8	29.6	86.4	28.8	71.9	24.0
소듐 라우릴 설페이트	5.0	5.0	15.0	5.0	15.0	5.0	15.0	5.0
크로스카르멜로스 소듐	3.0	3.0	9.0	3.0	9.0	3.0	9.0	3.0
폴로이드성 실리콘 디옥사이드	1.0	1.0	3.0	1.0	3.0	1.0	3.0	1.0
마그네슘 스테아레이트	1.0	1.0	3.0	1.0	3.0	1.0	3.0	1.0
HPMC 캡슐, 크기 0	1 캡슐		1 캡슐		1 캡슐		1 캡슐	
총	100.0	100.0	300.0	100.0	300.0	100.0	300.0	100.0

[0217]

[0218] <sup>[1]</sup> 1 mg, 3 mg, 10 mg 및 50 mg의 강도는 유리산에 기반한다. 포타슘 염 중 화합물 1 유리산의 이론적 함량은 92.1%이고, 실제 양은 약물 제품에 사용된 약물 물질 배치의 검정에 좌우된다.

[0219] **실시예 11. 화합물 1 직접 캡슐화 제형 연구**

[0220] 화합물 1의 직접 캡슐화 (DE) 제형 연구를 수행하였다. 이 작업은 반-자동 또는 자동 캡슐 충전 기계에 의해 1 mg, 3 mg, 10 mg, 50 mg 및 위약 캡슐을 제조하기 위한 DE 공정 개발을 포함하였다. 제형의 성분, 비, 충전 중량, 유동성 및 균일성을 모두 평가하였다. 개발된 공정은 향후 임상 연구를 위한 화합물 1 약물 제품의 제조에 적합하다. 프로토타입 확인 배치 제조, 단기 안정성 연구, GMP 확인 및 시연 안정성 배치 제조를 실시하여, GMP 배치의 제조의 성공 및 의도된 임상 용도의 품질을 보장하였다.

[0221] 화합물 1의 초기 제형 연구 동안, 가용화제, 예컨대, 폴록사머 188 및 음이온성 계면활성제 소듐 라우릴 설페이트 (SLS)를 포함하는 가용화제의 유형을 조사하였다. SLS는 화합물 1과의 양호한 양립가능성을 나타냈고, 화합물 1의 수성 용해도를 증가시켰다. 1.5% 내지 5.0% w/w의 SLS의 수준을 조사하였다. 약동학 데이터에서는 제형에 특정 양의 SLS를 사용하는 것이 생체내에서 생체이용률을 유의하게 개선시켰음을 나타냈다. 따라서, 1.5% 내지 5.0% SLS는 화합물 1을 이용한 추가 제형 개발에 적합하였다.

[0222] 상이한 용량 수준에서 용량 균일성의 어려움을 충족시키기 위해 효율적인 블렌딩 공정이 개발되었다. 0.5 mg 내지 10 mg 용량 수준에 대해, 동등한 수량의 블렌딩 공정이 개발되었다. 화합물 1을 초기에 전체 양의 SLS 및 일부 양의 MCC와 동등한 수량으로 블렌딩하였다. 그런 다음, 혼합물을 남은 부형제와 블렌딩하고, 스크린을 통과시킨 다음, 다시 혼합하였다 (블렌딩-체질-블렌딩 공정). 화합물 1을 단독으로 사용하는 대신 부형제와 함께 조합함으로써, 블렌딩 공정 동안 화합물 1의 수율 손실을 효율적으로 감소시켰다. 블렌딩-체질-블렌딩 공정은 저용량 화합물 1을 부형제와 함께 더 높은 수율로 제형에 균일하게 효과적으로 통합하여, 다운스트림 직접 캡슐 충전 또는 직접 타정을 가능하게 하였다. 10 mg 내지 50 mg 제형의 경우, 위에서 개발되고 기재된 동등한 수량의 블렌딩 공정 외에도 유사한 블렌딩 및 체질 절차를 사용하였다. 각각의 용량 강도의 시연 배치 및 GMP 배치는 이 블렌딩 공정을 사용한 최종 블렌드의 블렌드 균일성 결과가 원하는 생성물 사양을 충족함을 보여주었다.

[0223] 상이한 용량의 화합물 1 및 위약을 함유하는 제형의 캡슐 충전 중량은 300 mg인 것으로 설계되었는데, 이는 이 재료의 부피가 최종 블렌드의 벌크 밀도에 기반하여 No. 0 캡슐을 이용한 반-자동 충전의 요구를 충족시킬 수 있기 때문이다. 반-자동 충전은 작은 배치 크기의 임상 약물 제품만이 필요한 초기 임상 단계에 사용될 수 있다. 또한, 후기-단계 임상 연구의 큰-스케일의 요구를 충족하기 위해 완전 자동 캡슐 충전 공정이 또한 개발되었다.

[0224] 60°C/75% RH의 스트레스 조건 하에서의 단기 안정성 연구에서는 2주 후에 3 mg 강도에 대해 분해 불순물이 형성됨이 드러났다. 후속적으로 패키징용으로 실리카 겔 건조제가 제안되었으며, 불순물의 형성을 완화시키는 데 효

과적인 것으로 입증되었다.

- [0225] GMP 화합물 1을 사용한 1 mg, 3 mg, 10 mg 및 50 mg 강도의 시연 안정성 및 GMP 배치의 후속 제조를 최종 제형화 및 공정에 따라 실시하였다. 분해를 최소화하는 데 있어서 실리카 겔 건조제의 유효성을, 일차 패키징에 건조제를 포함하거나 포함하지 않은 비교 안정성 연구를 통해 평가하였다. 안정성 데이터에서는 건조제를 이용한 패키징이 40°C/75% RH 조건에서 분해 불순물의 형성을 유의하게 지체시켰음을 분명히 보여주었다. 따라서, 생성물 품질을 개선하고 생성물 유통 기한을 증가시키기 위해 1 g의 건조제를 이용한 패키징이 결정되었다.
- [0226] **실시예 12. 상승된 LDL-c를 갖는 건강한 대상체에서의 화합물 1의 임상 평가**
- [0227] 목적: 상승된 LDL-c를 갖는 건강한 대상체에서 화합물 1의 다중 증량 용량의 전반적인 안전성 및 내약성을 평가함.
- [0228] 이차 목적: 화합물 1의 다중 증량 용량 이후 상승된 LDL-c를 갖는 건강한 대상체에서의 화합물 1의 PK 및 PD를 평가함.
- [0229] 일차 엔드포인트: 치료-유발 이상 사례 (TEAE), 활력 징후, 임상 실험실 매개변수 및 심전도 (ECG) 모니터링.
- [0230] 이차 엔드포인트: 화합물 1에 대한 혈장 PK 매개변수, LDL-c 및 기타 지질 매개변수 및 성호르몬 결합 글로불린 (SHBG)을 포함하는 THR-β 작용제 표적 인게이지먼트의 PD 마커.
- [0231] 약간 상승된 LDL-c를 갖는 건강한 지원자를 화합물 1 (n=6) 또는 위약 (n=2)으로 3:1로 무작위화하였다. 연구의 MAD 코호트에서 화합물 1에 무작위화된 지원자들은 14일 동안 1일 1회 1, 3, 6 또는 10 mg의 화합물 1의 다중 용량을 받았다.
- [0232] **결과**
- [0233] 화합물 1은 모든 화합물 1 치료 그룹 및 위약 전체에 걸쳐 유사한 AE 발생률로 일반적으로 안전하고 내약성이 우수하였다. 모든 AE는 경도 내지 중등도였으며, 뚜렷한 용량 관계는 없었다. 한 명의 위약 대상체 (1 mg 코호트)는 동의 철회로 인해 연구를 조기에 종결하였으며, 모든 화합물 1 대상체는 조기 중단 없이 연구를 완료하였다. 연구 정지 기준 또는 용량 단계적 확대 정지 기준이 충족되지 않았다.
- [0234] 간 생화학: ALT, AST, ALP 및 총 빌리루빈 값은 치료 그룹 전체에 걸쳐 전반적으로 유사하였다. 화합물 1을 받은 대상체는 ALT가 ≥2 배 ULN으로 증가하지 않았다. DILI의 증거가 없다. 갑상선 호르몬: 갑상선 기능 항진증/갑상선 기능 저하증의 증상 없음. 평균 TSH 및 유리 T3 값은 고도로 가변적이었지만, 일반적으로 그룹 전체에 걸쳐 유사하였다. 유리 T4의 용량-의존적 축소는 다른 THR-β 작용제를 이용하여 관찰된 말초 갑상선 호르몬 조정과 일치하는 화합물 1 그룹에서 관찰되었다. 기타 실험실 평가 (예컨대, 임상 화학, 혈액학)에서는 뚜렷한 경향이 나타나지 않았다.
- [0235] 14일 동안 1, 3, 6 및 10 mg의 화합물 1의 1일 1회 투약은 전반적으로 안전하였고, 갑상선 기능 저하증/갑상선 기능 항진증 또는 THR-α 작용의 임상 징후 또는 증상 없이 잘 용인되었다. 화합물 1은 적은 변동성으로 용량-비례적 PK 및 1일 1회 투약에 적합한 반감기를 나타냈다. 화합물 1은 간 THR-β 인게이지먼트의 핵심 마커인 SHBG를 용량-의존적 방식으로 증가시켰다. 화합물 1은 LDL-c, Apo B, 총 콜레스테롤 및 트리글리세리드를 포함한 순환 죽종형성(atherogenic) 지질 수준의 유의한 감소를 야기하였다. 종합하면, PD 데이터에서는 화합물 1의 투여가 간에서 강력한 THR-β 표적 인게이지먼트를 야기하였음을 나타낸다.
- [0236] **실시예 13: 수컷 생검-확인된 DIO-NASH 마우스에서 대사 매개변수, 간 병리학 및 섬유증 단계를 포함하는 NAFLD 활성 점수에 대한 화합물 2 및 화합물 1을 이용한 12주의 단일- 및 조합-치료의 효과**
- [0237] **약어의 목록**
- [0238] Acta2 액틴 알파 2 평활 액틴
- [0239] ALP 알칼리성 포스파타제
- [0240] ALT 알라닌 트랜스아미나제
- [0241] ANOVA 분산 분석
- [0242] AST 아스파테이트 트랜스아미나제
- [0243] BW 체중

- [0244] CD146 흑색종 세포 접착 분자
- [0245] cDNA 상보적 DNA
- [0246] CK18 M30 사이토케라틴 18 M30
- [0247] Col1a1 콜라겐 유형 I 알파 1
- [0248] DAB 3,3'-디아미노벤지딘
- [0249] DEG 차별적으로 발현되는 유전자
- [0250] Dhcr7 7-테하이드로콜레스테롤
- [0251] DIO 식이-유도된 비만
- [0252] DIO-GAN 식이-유도된 비만 구브라 아밀린 NASH 모델
- [0253] ELISA 효소-연결된 면역흡착 검정
- [0254] FFPE 포르말린-고정된 파라핀-임베딩된
- [0255] FPKM 백만 개의 매핑된 판독물당 전사물의 킬로베이스당 단편수
- [0256] FXR 파네소이드 X 수용체
- [0257] g g-힘
- [0258] Gal-3 갈렉틴-3
- [0259] GAN 구브라 아밀린 NASH
- [0260] H&E 헤마톡실린 및 에오신 염색
- [0261] HDL-c 고-밀도 지단백질 콜레스테롤
- [0262] Hmgcs1 하이드록시메틸글루테르아릴-CoA 신타제
- [0263] HPMC 하이드록시프로필 메틸셀룰로스
- [0264] HRP 홀스래디쉬 퍼옥시다제
- [0265] IHC 면역조직화학
- [0266] kg 킬로그램
- [0267] LDL-c 저-밀도 지단백질 콜레스테롤
- [0268] Lgals3 갈렉틴-3
- [0269] mg 밀리그램
- [0270] NA 해당 사항 없음
- [0271] NAFLD 비알콜성 지방간 질환
- [0272] NAS NAFLD 활성 점수
- [0273] NASH 비알콜성 지방간염
- [0274] NP-40 노니데트 P-40
- [0275] PO 경구로 (경구 투약)
- [0276] PSR 피크로시리우스 레드
- [0277] QD 1일 1회
- [0278] 도입
- [0279] 간 지방증의 맥락에서 간 염증 및 손상에 의해 나타나는 질환인 비알콜성 지방간염 (NASH)은 높은 수준의 질환

해소를 달성하기 위해 질환의 다중 양태를 표적화하는 조합 요법을 필요로 할 가능성이 있을 것이다. NASH의 치료를 위해 대사 경로의 항상성을 유지하는 핵 호르몬 수용체인 파네소이드 X 수용체 (FXR) 및 FXR에 상보적인 대사 경로를 조절하는 핵 호르몬 수용체인 갑상선 호르몬 수용체 베타 (THR-β)의 소분자 작용제가 개발 중이다. FXR의 비-스테로이드성 작용제인 화합물 2 및 THR-β의 간 분포된 선택적 작용제인 화합물 1을 단독으로 그리고 NASH의 식이-유도된 마우스 모델과 조합하여 평가하였다.

[0280] 재료 및 방법

[0281] 동물 취급 및 연구 설계

[0282] C57BL/6JRj 수컷 마우스 (n=138)에 치료 시작 전 35주 동안 구브라 아밀린 NASH (GAN) 식이 (40% 지방, 22% 프럭토스, 2% 콜레스테롤 [D09100310, Research Diets]) 또는 제지방 음식 식이를 공급하였다. 치료 전에 모든 동물은 조직학적 확인 (지방증 점수  $\geq 2$  및 섬유증 단계  $\geq 1$ ) 및 비알콜성 지방간 질환 (NAFLD) 활성 점수 (NAS) 및 섬유증 병기 결정 시스템을 사용한 계층화를 위해 간 생검을 겪었다. GAN 식이에 대한 식이-유도된 비만 (DIO-GAN) 마우스를 피크로시리우스 레드 (PSR) 염색의 면적 퍼센트에 기반하여 8개의 치료 그룹으로 무작위화하였다 (표 16). DIO-GAN 마우스 (n=그룹당 16 마리)는 12주 동안 비히클 (Tris 완충액 [50 mM, pH 8] 중 0.5% HPMC + 0.2% Tween-80), 화합물 2 (10 mg/kg), 화합물 1 (0.3 mg/kg [저], 2 mg/kg [중] 또는 10 mg/kg [고]), 또는 화합물 2와 화합물 1의 조합 치료 (Combo-저, Combo-중 또는 Combo-고)를 이용한 치료 (PO, QD)를 받았다. 비히클-투약된 제지방 음식-공급된 대조군은 건강한 대조군의 역할을 하였다 (n=10). 연구의 지속기간 동안 마우스는 각각의 식이 (GAN 또는 제지방 음식)를 유지하였다. 간 생검 조직병리학적 점수에 대해 대상체-내 비교 (치료-전 대 치료-후)를 수행하였다. 종결 정량적 엔드포인트는 혈장/간 생화학, 간 조직형태측정 및 RNAseq에 의한 간 전사체 분석을 포함하였다.

[0283] 표 16. 치료 그룹

그룹	용량	N
제지방 음식 비히클 대조군	NA	10
DIO-GAN 비히클 대조군	NA	16
화합물 2	10 mg/kg	16
화합물 1-저	0.3 mg/kg	16
화합물 1-중	2 mg/kg	16
화합물 1-고	10 mg/kg	16
Combo-저	10 mg/kg 화합물 2 + 0.3 mg/kg 화합물 1	16
Combo-중	10 mg/kg 화합물 2 + 2 mg/kg 화합물 1	16
Combo-고	10 mg/kg 화합물 2 + 10 mg/kg 화합물 1	16

[0284]

[0285] 치료 그룹을 연구에 할당하였다. DIO-GAN 비히클 대조군에 1일 1회 비히클 (Tris 완충액 [pH 8] 중 0.5% HPMC + 0.2% Tween 80)을 투여하였다. NA, 해당 없음.

[0286] 간 생검 가공 및 스코어링

[0287] 간 샘플을 ~24시간 동안 10% 중성 완충된 포르말린에 넣은 다음, 70% 에탄올로 옮긴 후 4C에서 보관함으로써 포르말린-고정된 파라핀-임베딩된 (FFPE) 간 생검을 준비하였다. FFPE를, 블록에 임베딩하기 전에 침윤시키기 위해 Histokinette에 넣었다. 그런 다음, 생검 조직을 마이크로톰을 사용하여 3 μm로 절단하고, 절편을 슬라이드에 장착하였다. 간 절편을 헤마톡실린 및 에오신 (H&E)으로 염색하여, 지방증, 염증 및 팽만을 평가하고, PSR를 사용하여 섬유증을 평가하였다. 추가적으로, 슬라이드를 가공하여, 면역조직화학 (IHC)에 의해 유형 I 콜라겐 (Col1a1), 갈렉틴-3 (Gal-3) 및 평활근 액틴 (α-SMA) 단백질 발현을 검출하였다. H&E 염색을 위해, 슬라이드를 Mayer의 헤마톡실린 (Dako)에서 항온처리하고, 수돗물로 세척하고, 에오신 Y 용액 (Sigma-Aldrich)에서 염색하고, 탈수하고, 커버슬립하였다. PSR의 경우, 슬라이드를 Weigert의 철 헤마톡실린 (Sigma-Aldrich)에서 항온처리하고, 수돗물로 세척하고, 피크로-시리우스 레드 (Sigma-Aldrich)로 염색하고, 산성수로 2 회 세척하였다. 슬라이드를 진탕시킴으로써 과잉의 물을 제거한 다음, 슬라이드를 에탄올로 탈수시키고, 크실렌으로 클리어링하고, 커버-슬립하였다. NAS 및 섬유증 단계는 이전에 기재된 바와 같이 스코어링되었다 (Kleiner et al. 2005). NAS는 지방증, 염증 및 팽만 점수의 비가중 합계를 나타내고, 0-8에 대한 범위를 나타내며 (표 17);

섬유증 단계의 범위는 0 (섬유증 없음) 내지 4 (간경변증)이다. Colla1, Gal-3 및  $\alpha$ -SMA의 검출을 위해, IHC를 표준 절차에 따라 수행하였다. 간략하게, 항원 회수 및 내인성 퍼옥시다제 활성의 차단 후, 슬라이드를 일차 항체 (Colla1: Southern Biotech, Cat. 1310-01; Gal-3: Biolegend, Cat. 125402;  $\alpha$ -SMA: Abcam Cat. Ab124964)와 함께 항온처리하였다. 일차 항체를 중합체성 HRP-링커 항체 컨주게이트를 사용하여 검출하였다. 일차 항체는 발색제로서 DAB를 사용하여 시각화되었다. 마지막으로, 절편을 헤마톡실린으로 대조염색하고, 커버슬립하였다.

[0288] 표 17: NAS 및 섬유증의 조직학적 스코어링

특징	정도	점수
지방증 (지질 방울이 있는 간세포의 백분율)	<5%	0
	5-33%	1
	>33-66%	2
	>66%	3
소엽 염증	병소 없음	0
	<2 병소	1
	2-4 병소	2
팽만 변성	없음	0
	약간	1
	많은 세포/두드러진 팽만	2
섬유증	없음	0
	동양혈관주위 또는 문맥주위	1
	동양혈관주위 &	2
	문맥/문맥주위	3
	브릿지된 섬유증 경화증	4

[0289]

[0290] 간 효소, 혈장 지질 및 CK18 M30의 분석

[0291] 이소플루란 (2-3%)으로 마취된 마우스로부터 심장 천자에 의해 말단 혈액을 수확하고, 항응고제와 혼합하고, 4C에 놓은 후, 3000 x g에서 10분 동안 원심분리하였다. 혈장 상층액을 새로운 튜브로 옮기고, 즉시 드라이아이스에서 냉동시키고, -80C에서 보관하였다. 알려진 트랜스아미나제 (ALT), 아스파테이트 트랜스아미나제 (AST), 알칼리성 포스파타제 (ALP), 트리글리세리드 (TG), 총 콜레스테롤 (TC), 고-밀도 지질단백질 (HDL-c) 및 저-밀도 지질단백질 (LDL-c)을, 제조업체의 설명서에 따라 Cobas c 501 자동분석기에서 상업적 키트 (Roche Diagnostics)를 사용하여 측정하였다. 사이토케라틴 18 M30 (CK18 M30)을, 제조업체의 설명서에 따라 상업적 ELISA 키트 (Cusabio)를 사용하여 혈장으로부터 측정하였다.

[0292] 간 지질의 분석

[0293] 간 샘플을 균질화하고, TG 및 TC를 90C에서 가열 (2회)하여 5% NP-40에서 추출하였다. 샘플을 원심분리하고, 제조업체의 설명서에 따라 Cobas c 501 자동 분석기에서 상업적 키트 (Roche Diagnostics)를 사용하여 상층액에서 TG 및 TC 함량을 측정하였다.

[0294] RNAseq에 의한 간 전사체 분석

[0295] 조직을 수집하고, 액체 질소에서 급속 냉동하고, 가공할 때까지 -80C에서 보관하였다. NucleoSpin 키트 (MACHEREY-NAGEL)를 사용하여 RNA를 단리하였다. 각각의 샘플로부터의 총 10 ng 내지 1  $\mu$ g의 정제된 RNA를 사용하여, Illumina용 NEBNext Utra II 방향성 RNA 라이브러리 준비 키트 (New England Biolabs)를 사용하여 cDNA 라이브러리를 생성하였다. 그런 다음, NextSeq 500/550 High Output 키트 V2 (Illumina)를 사용하여 NextSeq 500에서 cDNA 라이브러리를 시퀀싱하였다. 참조에 대한 스플라이싱된 전사물 정렬 (STAR) 소프트웨어를 사용하여 시퀀싱 데이터를 마우스 게놈에 정렬하였다. R-패키지 DESeq2를 사용하여 차등적으로 발현된 유전자를 식별하였다.

[0296] 최저점 혈장 화합물 수준의 분석

[0297] 말단 혈장 샘플을 화합물(들)의 마지막 투여 대략 21-24시간 후에 심장 천자에 의해 수확하였다. 말단 혈장 샘플을 Triple Quad 6500+ 기기를 사용하여 고해상도 LC-MS/MS로 분석하였다. 20  $\mu$ L의 혈장 샘플을 200  $\mu$ L의 내부 표준 용액 (아세트오닐트릴 중 100 ng/mL 라베탈롤 + 100 ng/mL 톨부타미드)과 혼합하고, 불택싱하고, 4,000 rpm에서 4C에서 15분 동안 원심분리하였다. 상층액 (100  $\mu$ L)을 샘플 플레이트로 옮기고, 물 (100  $\mu$ L)과 혼합

하고, 10분 동안 진탕 (800 rpm)한 후, 물 중 0.1% 포름산 (이동상 A) 및 아세트니트릴 중 0.1% 포름산 (이동상 B)의 구배 (표 18) 이동상을 0.6 mL/분의 유속으로 사용하는 1.7  $\mu$ m, 2.1 x 50 mm ACQUITY UPLC BEH C18 컬럼 (Waters)에 주입 (2  $\mu$ L)하였다. 화합물 2 (체류 시간: 0.87분) 및 화합물 1 (체류 시간: 0.97분)의 정량화에 2 개의 내부 표준물질 표준 1 (체류 시간: 0.87분) 및 표준 2 (체류 시간: 0.96분)를 각각 사용하였다. 화합물 2 (체류 시간: 0.77분)의 글루쿠로니드 대사산물의 정량화에 내부 표준 (체류 시간: 0.76분)을 사용하였다. 각각의 분석물에 대한 마우스 혈장의 기질 (폴딩된 비히클 대조군)에서 보정 곡선 (1-3000 ng/mL)을 생성하였다.

**표 18: LC-MS/MS 구배**

시간 (분)	이동상 B (%)
초기	35
1.00	98
1.70	98
1.71	35
2.20	정지

**결과**

**연구 설계 개요**

식이-유도된 비만인 구브라 아밀린 NASH 모델 (DIO-GAN)은 인간 NASH의 많은 조직병리학적 특징을 개괄한다 (Hansen 2020). DIO-GAN 모델을 사용하여, FXR 작용제인 화합물 2 및 THR- $\beta$  작용제인 화합물 1의 단일 약제 및 조합으로서의 효험을 평가하였다. NASH 질환을 유도하기 위해, C57BL/6JRj 마우스에 >35주 동안 지방, 콜레스테롤 및 프럭토스가 높은 식이 (GAN 식이)를 유지시켰다. 치료적 개입 전에, 마우스를 생검하여, NASH 질환 및 섬유증 중증도를 평가하였으며; <2의 지방증 점수 및 <1의 섬유증 단계를 갖는 마우스를 연구에서 제외시켰다. 그런 다음, DIO-GAN 마우스를 치료-전 생검의 피크로시리우스 레드 (PSR) 염색의 분율 면적 퍼센트뿐만 아니라 전신 에코-자기 공명 이미징 (EchoMRI)에 의해 결정된 체지방 조직 질량에 기반하여 8개의 치료 그룹 (n= 그룹당 16마리)으로 무작위화하였다. 단일 약제 치료 아암에서, 화합물 2는 10 mg/kg의 용량으로 1일 1회 경구 위관 영양법으로 투여된 반면, 화합물 1은 0.3 (화합물 1-저), 2 (화합물 1-중) 또는 10 (화합물 1-고) mg/kg의 용량 수준으로 1일 1회 경구 위관 영양법으로 투여되었다. 조합 치료 아암에서, 일정한 용량 수준의 화합물 2 (10 mg/kg)를 저, 중 및 고 용량의 화합물 1 (즉, 각각 Combo-저, Combo-중, Combo-고)과 조합하였다. 1일 1회 경구 위관 영양법에 의해 비히클이 투여된 DIO-GAN 마우스가 대조군의 역할을 하였다. 마우스는 총 12주 동안 치료되었고, 연구 전반에 걸쳐 GAN 식이를 유지하였다. 연구 전반에 걸쳐 정상적인 음식 식이를 유지한 제지방 마우스 (n=10)는 건강한 대조군의 역할을 하였다.

**체중, 음식 섭취 및 간 중량에 대한 치료의 효과**

화합물 2 단독 및 화합물 1과의 조합 (Combo-저, Combo-중, Combo-고 용량)을 이용한 치료는 연구 동안 체중을 감소시켰다 (도 30a). 연구 종료 시, 화합물 2, Combo-중 및 Combo-고 치료 그룹은 DIO-GAN 비히클 대조군보다 유의하게 낮았다 (도 30b). 체중의 감소는 음식 섭취의 감소와 연관이 있는 것으로 보이지 않았다 (도 31). 모든 치료 그룹은 간 비대를 유의하게 개선시켰으며 (도 32a), 조합 치료 그룹 (Combo-중 및 Combo-고)에서 간 중량의 가장 큰 감소가 관찰되었으며; 비장 중량의 변화는 유의하지 않았다 (도 32b).

**체질량 구성에 대한 치료의 효과**

신체 구성을 연구의 기준선 (-1주차) 및 11 주차에 전신 EchoMRI에 의해 결정하여, 제지방 및 지방 조직의 상대적 수준을 체중의 백분율로서 결정하였다. 제지방 및 지방 조직의 기준선 수준은 치료 그룹 전체에 걸쳐 잘 균형을 이루었다 (도 33a 및 33b). 화합물 2 그리고 화합물 1과의 조합을 이용한 치료는 11주차에 지방 조직의 수준을 감소시켰으며 (도 34a); 상대적 제지방 조직 질량의 유의한 증가가 화합물 2 및 조합 치료 그룹에서 관찰되었다 (도 34b).

**혈장 및 간 지질 수준에 대한 치료의 효과**

모든 치료 그룹은 혈장 총 콜레스테롤을 유의하게 감소시켰으며 (TC, 도 35aa), 조합 치료 (Combo-중 및 Combo-고)에서 가장 큰 감소가 나타났으며; 간에서의 TC에 대해서도 유사한 경향이 관찰되었다 (도 35b). 혈장 저-밀도 및 고-밀도 지단백질 콜레스테롤 (각각 HDL-c 및 LDL-c)의 감소는 TC에서 나타난 효과와 일치하였다. 화합물 2 및 화합물 1-고뿐만 아니라 조합 치료는 혈장 트리글리세리드를 유의하게 감소시켰으며 (TG, 도 36a); 간 TG

수준은 Combo-고 그룹에서만 유의하게 감소되었다 (도 36b).

[0309] 살아있는 효소에 대한 치료의 효과

[0310] 화합물 1 (저, 중 및 고)을 이용한 단일 약제 치료는 DIO-GAN 비히클 대조군에 비해 ALT 수준을 유의하게 낮추었으며 (도 37a); ALT 수준은 조합 치료에 의해 유의하게 감소하지 않았다. 치료 그룹 중 어느 것도 DIO-GAN 비히클 대조군과 유의하게 상이하지 않았지만 AST 수준은 ALT와 유사한 경향을 보였다 (도 37b). ALP 수준은 치료 그룹 중 임의의 것에서 DIO-GAN 비히클 대조군과 유의하게 상이하지 않았지만, ALP는 DIO-GAN 비히클 대조군에 비해 단일 약제 치료 아암 (화합물 2, 화합물 1-저 및 화합물 1-중)에서 수치적으로 더 낮았고, Combo-중 및 Combo-고 치료 그룹에서는 더 높았다 (도 38).

[0311] 간 조직학

[0312] NAFLD 활성 점수 (NAS)

[0313] NAFLD 활성 점수 (NAS)를 사용하여, 치료의 조직학적 효과를 평가하였다. NAS는 지방증, 염증 및 팽만 조직학적 점수의 비가중 합계로서 정의되며, 0-8의 범위일 수 있다. NAS는 연구 종료 시 치료 전 (기준선) 및 12-주의 치료 후에 각각의 동물에 대해 결정되었다. NAS는 대부분의 마우스에서, 기준선에서 5-6의 NAS 범위를 갖는 치료 그룹 전체에 걸쳐 잘 균형을 이루었다 (도 39a). 12-주의 치료 후, NAS는 대부분의 치료 그룹에서 유의하게 개선되었으며, 조합 치료에서 가장 근본적인 개선이 나타났다 (도 39b). 화합물 1-저, 화합물 1-중 및 화합물 1-고 치료 그룹에서 각각 31%, 27% 및 62%와 비교하여, 화합물 2 치료 그룹에서, 동물의 56%가  $\geq 1$ -pt NAS 개선을 보였다 (표 19). 조합 치료는 Combo-저, Combo-중 및 Combo-고 조합 치료 그룹에서 각각 69%, 81% 및 100%의 마우스가  $\geq 1$ -pt NAS 개선을 보여 더 효과적이었다. 또한, NAS 개선의 규모는 조합 치료 그룹에서 더 컸다. 화합물 2 치료 그룹에서 0%의 마우스가  $> 1$ -pt 만큼의 NAS를 개선한 반면, Combo-저, Combo-중 및 Combo-고 조합 아암에서는 각각 19%, 25% 및 43%의 마우스가  $\geq 2$ -pt NAS 개선을 달성하였다. 이러한 결과는 화합물 1 단일 약제 치료 아암보다 우수하였으며, 마우스의 0%, 7% 및 25%가 화합물 1-저, 화합물 1-중 및 화합물 1-고 용량 그룹에서 각각  $\geq 2$ -pt NAS 개선을 달성하였다.

[0314] 표 19: NAFLD 활성 점수 (NAS)에 대한 치료의 효과

치료 (n)	변화 없음 % (n)	악화 % (n)	개선 % (n)		
		$\geq 1$ -pt	1-pt	$\geq 2$ -pt	총
제지방 대조군 (10)	80% (8)	10% (1)	10% (1)	0	10% (1)
DIO-GAN 대조군 (16)	68.75% (11)	25% (4)	6.25% (1)	0	6.25% (1)
화합물 2 (16)	43.7% (7)	0	56.25% (9)	0	56.25% (9)
화합물 1-저 (16)	56.25% (9)	12.5% (2)	31.25% (5)	0	31.25% (5)
화합물 1-중 (15)	73.33% (11)	0	20% (3)	6.7% (1)	26.7% (4)
화합물 1-고 (16)	31.25% (5)	6.25% (1)	37.5% (6)	25% (4)	62.5% (10)
Combo-저 (16)	18.75% (3)	12.5% (2)	50% (8)	18.75% (3)	68.75% (11)
Combo-중 (16)	18.75% (3)	0	56.25% (9)	25% (4)	81.25% (13)
Combo-고 (14)	0	0	57.1% (8)	42.9% (6)	100% (14)

[0315] 지방증

[0317] NAS 개선은 주로 지방증의 더 큰 감소에 의해 구동되었다 (표 20). 화합물 2 그룹에서, 치료 종료 시 81%가 지방증 개선을 보였지만, 최대 개선은 1-pt였다. 화합물 1 단일 약제 치료 그룹에서, 지방증 개선을 보이는 마우스의 백분율의 용량-의존적 증가가 나타났으며, 이는 화합물 1-저, 화합물 1-중 및 화합물 1-고 용량 그룹 각각에서 31%, 47% 및 81%의 마우스에 상응하였다. 각각의 화합물 1 단일 약제 치료 그룹에서, 한 마리의 마우스 (즉, ~6%)가 지방증의  $\geq 2$ -pt 개선을 보였다. 대조적으로, Combo-저, Combo-중 및 Combo-고 치료 그룹에서 25%, 31% 및 71%의 마우스가 각각  $\geq 2$ -pt 지방증 개선을 보였다. 이러한 효과는 정량적 간 조직형태측정법에 의

해 지지되었으며, 이는 지질 방울을 함유하는 간세포의 감소된 백분율 (도 40a) 및 더 낮은 수준의 간 지질 (도 40b)뿐만 아니라 더 작은 지질 방울 크기 (도 41)를 보여주었다.

[0318] 표 20: 조직학적 지방증 점수에 대한 치료의 효과

치료 (n)	변화 없음 % (n)	개선 % (n)		
		1-pt	≥2-pt	총
제지방 대조군 (10)	100% (10)	0	0	0
DIO-GAN 대조군 (16)	81.25% (13)	18.75% (3)	0	18.75% (3)
화합물 2 (16)	18.75% (3)	81.25% (13)	0	81.25% (13)
화합물 1 저 (16)	68.75% (11)	25% (4)	6.25% (1)	31.25% (5)
화합물 1 중 (15)	53.33% (8)	40% (6)	6.7% (1)	46.7% (7)
화합물 1 고 (16)	18.75% (3)	75% (12)	6.25% (1)	81.25% (13)
Combo 저 (16)	6.25% (1)	68.75% (11)	25% (4)	93.75% (15)
Combo 중 (16)	6.25% (1)	62.5% (10)	31.25% (5)	93.75% (15)
Combo 고 (14)	0	28.6% (4)	72.4% (10)	100% (14)

[0319]

[0320]

화합물 2 및 화합물 1의 조합은 간 지방증의 더 큰 개선을 초래하였다. 간 지방증은 각각의 개별 마우스에 대한 기준선 및 치료 종료 시 조직학에 의해 결정되었다. 표 29는 각각의 치료 그룹 내에서 지방증 점수에 변화가 없거나 개선 (기준선으로부터 1-pt 및 ≥2-pt 감소)된 마우스의 백분율을 도시한다. 총계는 각각의 치료 그룹에서 기준선으로부터 적어도 1-pt의 지방증 개선을 보이는 마우스의 백분율을 나타낸다.

[0321]

팽만, 염증 및 섬유증

[0322]

아폽토시스의 지표인 간세포 팽만은 드물게 관찰되었으며, 치료법 중 임의의 것에 의해서도 유의하게 변화되지 않았다. 아폽토시스와 연관된 혈장 바이오마커인 CK18 M30은 또한 치료 그룹 및 DIO-GAN 비히클 대조군 간에 유의하게 상이하지 않았다 (도 42). 소엽 염증은 치료에 의해 유의하게 개선되지 않았지만, 비록 드물기는 하지만 화합물 1-저, 화합물 1-중, 화합물 1-고 치료 그룹뿐만 아니라 Combo-중 조합 그룹에서 염증 점수의 개선이 관찰되었다 (표 21). 염증을 추가로 평가하기 위해, 염증성 림프구 침윤의 마커인 갈렉틴-3 (Gal-3) 단백질 발현을 간의 면역조직화학 (IHC) 염색에 의해 결정하였다. 화합물 2 단독 그리고 화합물 1과의 조합 (Combo-저)을 이용한 치료는 DIO-GAN 비히클 대조군에 비해 간에서 더 낮은 Gal-3 발현의 수준을 초래하였다 (도 43a).

[0323] 표 21: 소엽 염증에 대한 치료의 효과

치료 (n)	악화 % (n)	변화 없음 % (n)	개선 % (n)
제지방 대조군 (10)	10% (1)	80% (8)	10% (1)
DIO-GAN 대조군 (16)	31.25% (5)	68.75% (11)	0
화합물 2 (16)	31.25% (5)	68.75% (11)	0
화합물 1 저 (16)	25% (4)	68.75% (11)	6.25% (1)
화합물 1 중 (15)	20% (3)	73.3% (11)	6.7% (1)
화합물 1 고 (16)	31.25% (5)	56.25% (9)	12.5% (2)
Combo 저 (16)	31.25% (5)	68.75% (11)	0
Combo 중 (16)	31.25% (5)	62.5% (10)	6.25% (1)
Combo 고 (14)	35.7% (5)	64.3% (9)	0

[0324]

[0325]

염증은 치료에 의해 유의하게 개선되지 않았다. 소엽 염증은 기준선에서 그리고 치료 종료 시 조직학에 의해 결정되었다. 표 30은 소엽 염증 점수가 악화되거나 (기준선으로부터  $\geq 1$ -pt 증가), 변화가 없거나, 개선 (기준선으로부터  $\geq 1$ -pt 감소)된 각각의 치료 그룹 내의 마우스의 백분율을 보여준다.

[0326]

섬유증 단계의 개선은 단일 약제 아암에 비해 조합 약제 치료 그룹에서 더 빈번히 관찰되었지만, 차이는 유의성에 도달하지 못하였다 (표 22). 간의 IHC 염색에 의해 결정된 바와 같은 Col1a1 단백질 발현의 변화는 치료 그룹 간에 유의하게 상이하지 않았다. 간 정상 세포 활성화의 마커인  $\alpha$ -SMA의 수치적 감소는 화합물 2, 화합물 1-저 및 화합물 1-중 치료 그룹에서 관찰되었다. 유의한 감소는 Combo-저 치료 그룹에서만 관찰되었다 (도 43b).

[0327]

표 22: 간 섬유증에 대한 치료의 효과

치료 (n)	악화 % (n)	변화 없음 % (n)	개선 % (n)
제지방 대조군 (10)	0	100% (10)	0
DIO-GAN 대조군 (16)	31.25% (5)	68.75% (11)	0
화합물 2 (16)	37.5% (6)	56.25% (9)	6.25% (1)
화합물 1 저 (16)	31.25% (5)	62.5% (10)	6.25% (1)
화합물 1 중 (15)	26.7% (4)	60% (9)	13.33% (2)
화합물 1 고 (16)	25% (4)	68.75% (11)	6.25% (1)
Combo 저 (16)	37.5% (6)	43.75% (7)	18.75% (3)
Combo 중 (16)	18.75% (3)	75% (12)	6.25% (1)
Combo 고 (14)	21.4% (3)	50% (7)	28.6% (4)

[0328]

[0329]

섬유증 개선은 조합 치료에서 더 빈번히 관찰되었다. 간 섬유증 단계는 기준선에서 그리고 치료 종료 시 조직학에 의해 결정되었다. 표 31은 섬유증이 악화되거나 (기준선으로부터  $\geq 1$ -단계 증가), 변화가 없거나, 개선 (기

준선으로부터  $\geq 1$ -단계 감소)된 각각의 치료 그룹 내의 마우스의 백분율을 보여준다.

[0330]

*RNAseq에 의한 간 전사체학 분석*

[0331]

치료 그룹으로부터의 말단 간 샘플 (n=10)을 RNAseq에 의한 전사체학 분석을 위해 가공하였다. DIO-GAN 비히클 대조군과 비교하여 차등적으로 발현된 유전자 (DEG)를 식별하였다. 모든 치료 그룹에서 DEG를 식별하였으며; 화합물 1-저에서 가장 적었고 (987), Combo-고 치료 그룹에서 가장 많은 수 (3533)의 DEG가 있었다. Combo-고에 대한 화합물 1-고의 비교는 에너지 및 지질 대사에 관여하는 유전자가 조합 치료에 의해 더 큰 정도로 차등적으로 발현된다는 것을 나타냈다 (도 44). 이는 동일성의 선 (점선, 기울기 = 1)에 대한 기울기를 배수-변화 값의 선형 회귀 선 (실선, 기울기 = 0.55)과 비교하여 표시된다. 콜레스테롤 대사에 관여하는 효소인 스쿠알렌 에폭시다제 (Sqle) 및 7-데하이드로콜레스테롤 환원효소 (Dhcr7)는 단일 약제 치료에 비해 조합 그룹에서 유의하게 더 높은 수준으로 발현되었다 (도 45a 및 45b). 에너지 대사의 핵심 효소인 하이드록시메틸글루타릴-CoA 신타제 (Hmgcs1)는 유사한 발현 패턴을 보여주었다 (도 45c). 지방산 대사에 관여하는 효소인 스테아로일-CoA 불포화효소 (Scd1)는 화합물 2 치료에 의해 감소되었고, 조합 치료에 의해 추가로 감소되었다 (도 45d).

[0332]

마지막으로, 본 발명자들은 콜라겐 유형 I 알파 1 (Col1a1), 액틴 알파 2 평활 액틴 (Acta2), 갈락틴 3 (Lgals3) 및 흑색종 세포 접착 분자 (CD146)를 포함하여 섬유증 및 염증과 연관된 선택된 유전자의 발현을 검토하였다. 일반적으로, 화합물 2 단독 그리고 화합물 1과의 조합은 DIO-GAN 비히클 대조군에 비해 이들 유전자의 발현을 유의하게 감소시켰으며 (도 46); 조합 치료 아암은 화합물 2 단독 치료와 유의하게 상이하지 않았다.

[0333]

*요약*

[0334]

마우스 식이-유도된 비만 구브라-아밀린 NASH (DIO-GAN) 모델을 사용하여, NASH 및 섬유증의 대사 및 조직병리학적 매개변수에 대한 단일 약제로서의 그리고 조합으로서 화합물 2 및 화합물 1의 효능을 평가하였다. 이 모델은 질환을 유도하기 위해 간독성 약제를 사용하지 않고 인간 NASH (Hansen 2020)의 다수의 양태를 광범위하게 특성화하고 개괄한다. 이 모델에서, 마우스는 >35주 동안 지방, 콜레스테롤 및 프럭토스가 높은 식이 (GAN 식이)를 유지하였다. 치료적 개입 전에, 마우스를 생검하여, NAFLD 활성 점수 (NAS) 및 조직학에 의해 섬유증 중증도를 평가하였으며; >2의 기준선 지방증 점수 및 >1의 섬유증 단계를 갖는 마우스만을 연구에 사용하였다. 중요한 것은, 이 사전선택 단계가 유의한 NAFLD 활성을 갖는 마우스만이 연구에 사용되었음을 보장한다는 것이다. 또한, 기준선 NAS의 지식은 치료적 반응을 DIO-GAN 비히클 대조군뿐만 아니라 개별 기준선 값과 비교하여 평가하는 것을 가능하게 한다. DIO-GAN 마우스를 화합물 2 및 화합물 1 단독으로, 그리고 조합하여 12 주 동안 치료하고, 연구 전반에 걸쳐 GAN 식이를 유지하였다. 잠재적인 부가 치료적 효과를 구별하는 능력을 최대화하기 위해, 단일 용량 수준의 화합물 2를 단독으로 또는 3 개의 용량 수준 (저 [0.3 mg/kg], 중 [2 mg/kg] 및 고 [10 mg/kg])의 화합물 1과 조합하여 마우스를 치료하였다.

[0335]

화합물 2 및 화합물 1의 조합은 NAS의 감소를 나타내는 마우스의 백분율 및 NAS 개선 규모 둘 모두의 측면에서 단일 약제 치료에 비해 NAS의 더 큰 감소를 나타냈다. NAS의 개선은 주로 혈장 및 간의 총 콜레스테롤 및 트리글리세리드의 더 큰 감소와 연관된 지방증의 더 큰 감소에 의해 구동되었다. 조합 치료에서 나타난 더 큰 전체 효과는 조합 치료 그룹에서 개별 약물의 더 많은 노출에 의해 구동된 것으로 보이지 않는다 (표 23). 또한, 체중의 변화가 NAS 개선에 기여했을 수 있지만, 체중 감소는 화합물 2 및 조합 치료 그룹 (Combo-저 및 Combo-중) 간에 유사하였으며, 이는 중량 손실만으로는 조합 치료의 더 큰 항-지방증 활성을 완전히 설명하지 못함을 시사한다. 대신, 조합 치료는 에너지 및 지질 대사와 관련된 유전자의 발현에 더 큰 효과를 가졌다. 이러한 결과는 화합물 2 및 화합물 1의 조합이 이들 경로에 대해 적어도 부가 효과를 갖고 관찰된 더 큰 항-지방증 활성의 원인이 될 가능성이 있음을 시사한다.

[0336]

염증 및 섬유증의 조직학적 개선은 치료에 의해 유의하게 개선되지 않았다. 그러나, 조합을 이용하여 섬유증 개선을 보인 더 많은 수의 마우스를 포함하여 섬유증 개선의 증거가 나타났다. 또한, 전사체학 분석에서는 조합 치료에 의해 감소된 섬유증 및 염증의 핵심 마커를 식별하였다. 이들 유전자의 발현은 또한 화합물 2 치료에 의해 감소되었으며, 이는 FXR 작용이 유전자 발현 수준에서 섬유증 및 염증에 대한 효과의 주요 동인일 수 있음을 시사한다. 이 경우에, FXR 작용은 THR- $\beta$  작용의 더 많은 항지방증 기전과 보완적인 것으로 간주될 수 있다. 화합물 2 및 화합물 1을 조합함으로써 관찰된 더 큰 항지방증 효과와 함께, 이들 결과는 이 조합이 NASH 질환의 다중 양태를 해결할 수 있음을 시사한다.

[0337]

*참고문헌*

[0338]

Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson

MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2005 Jun;41(6):1313-21.

[0339] Hansen, H.H., Aegidius, H.M., Oró, D. et al. Human translatability of the GAN diet-induced obese mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. BMC Gastroenterol 20, 210 (2020).

[0340] 보충

[0341] 표 23: LC-MS/MS에 의해 결정된 최저점 혈장 약물 농도

치료 그룹 (n)	평균 최저점 분석물 농도 (SD), ng/mL		
	화합물 2	화합물 2 글루쿠로니드 대사산물	화합물 1
화합물 2 (16)	7.4 (3.8)	52.7 (26.0)	ND
화합물 1-중간 (15)	ND	ND	135.5 (62.0)
화합물 1-고 (16)	ND	ND	320.0 (189.9)
Combo-중간 (16)	5.8 (3.5)	53.1 (36.8)	49.5 (42.9)
Combo-고 (14)	3.3 (1.8)	49.0 (23.7)	143.0 (87.9)

[0342]

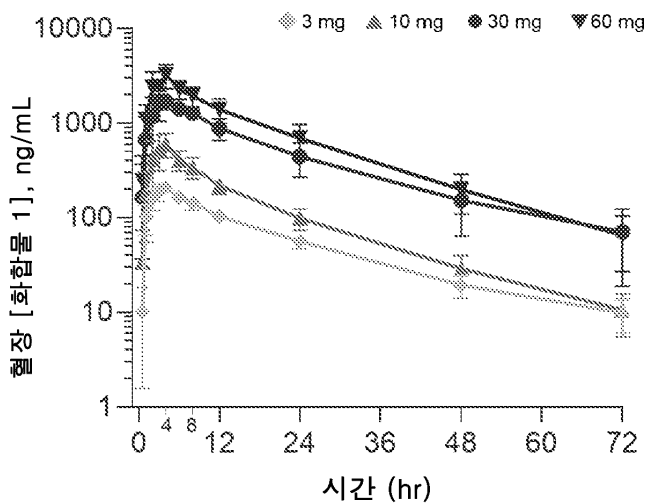
[0343] 최종 치료 용량 (즉, 최저점) 21-24 시간 후에 심장 천자에 의해 수집된 말단 혈장 샘플을 LC-MS/MS로 분석하였다. 값은 평균 및 표준 편차 (SD)를 나타낸다. ND, 결정되지 않음.

[0344] 본 명세서에 언급된 특허, 특허 출원 및 과학 논문을 포함한 모든 공개물은, 특허, 특허 출원 또는 과학 논문을 포함한 각각의 개별 공개물이 참조로 포함되도록 구체적이고 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

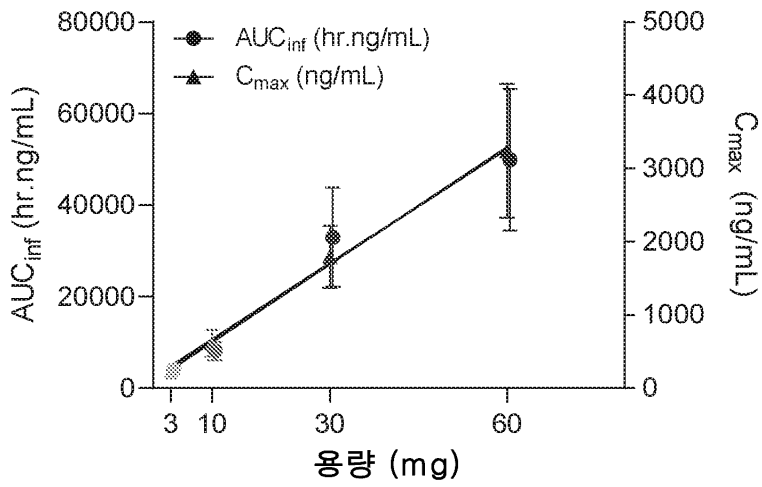
[0345] 전술한 발명은 발명은 이해의 명확성을 위해 예시 및 실시예에 의하여 일부 상세하게 기재되었으나, 위의 교시에 비추어 특정 사소한 변화 및 변형이 실시될 것임은 당업자에게 명백하다. 따라서, 설명 및 실시예는 본 발명의 범주를 제한하는 것으로서 해석되어서는 안 된다.

**도면**

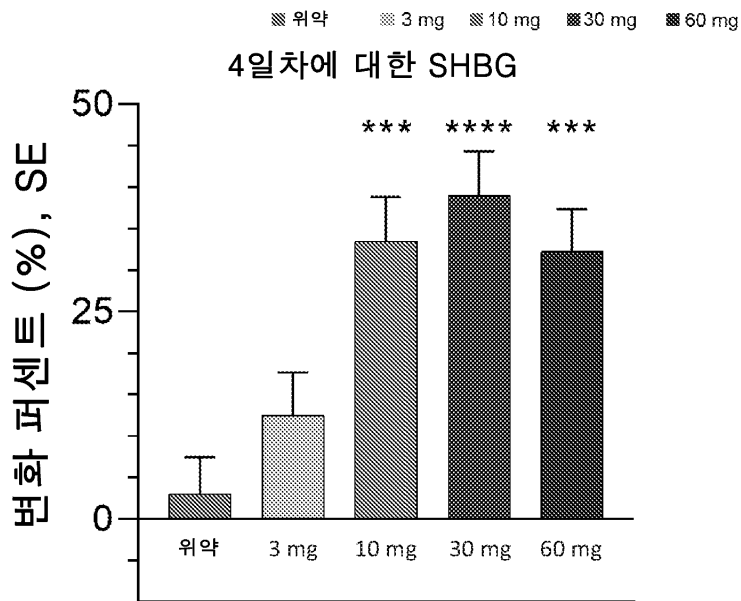
**도면1**



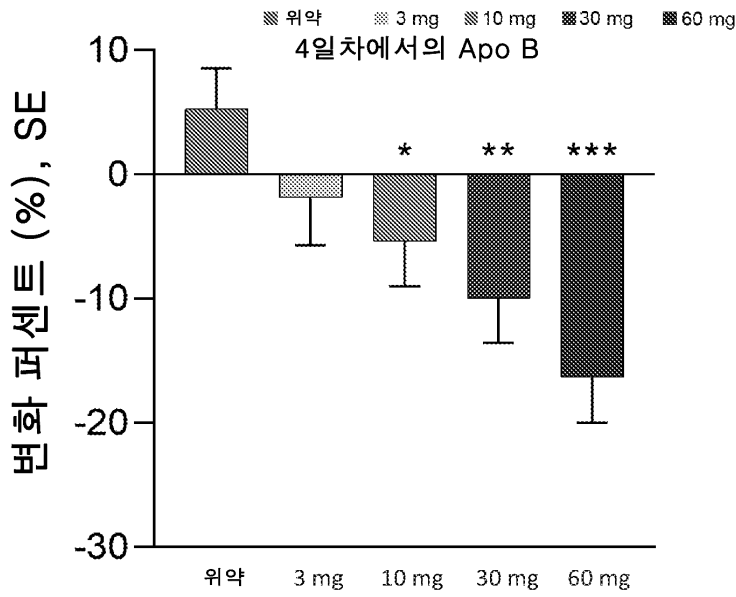
도면2



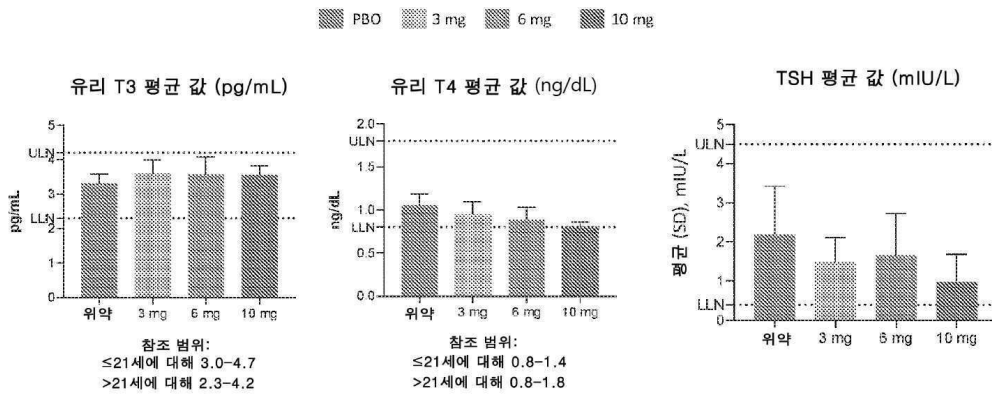
도면3



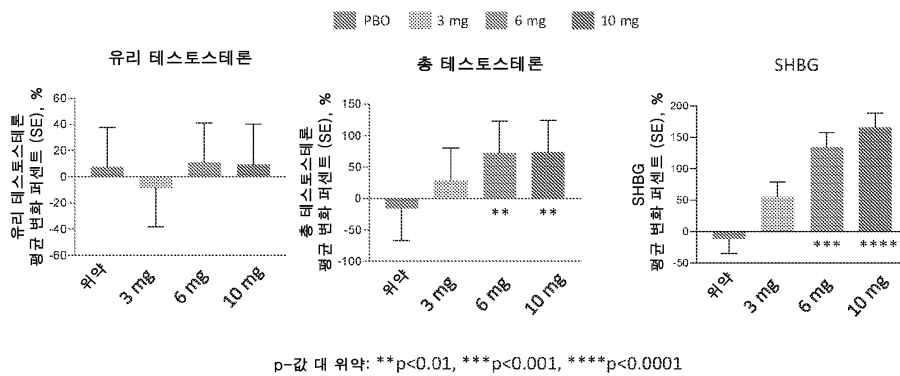
도면4



도면5

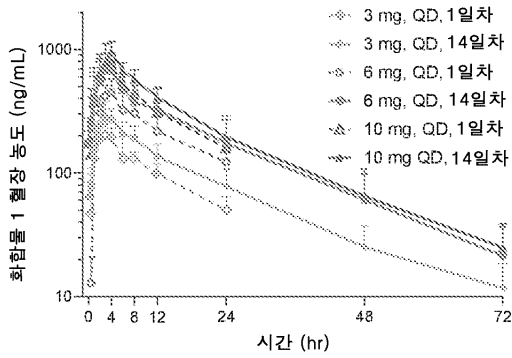


도면6

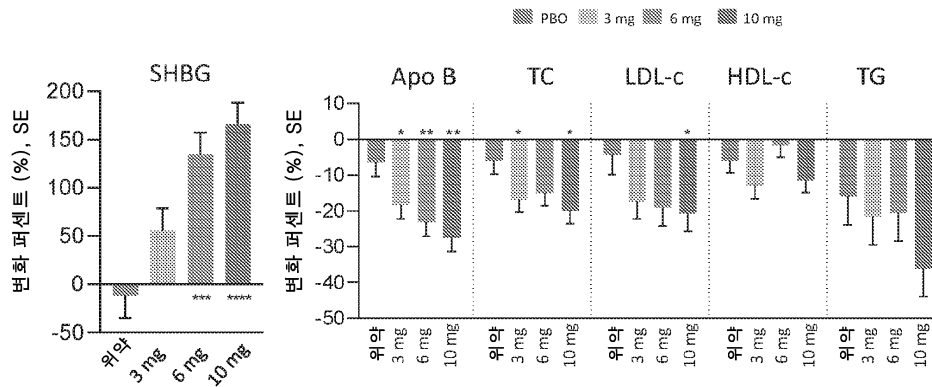


p-값 대 위약: \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001

도면7

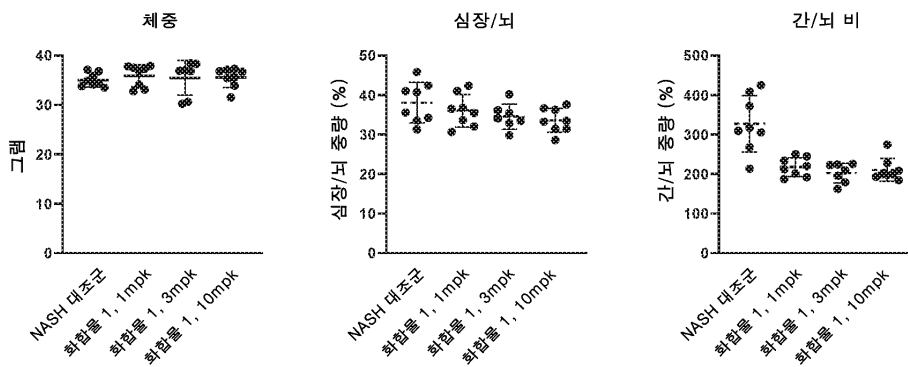


도면8

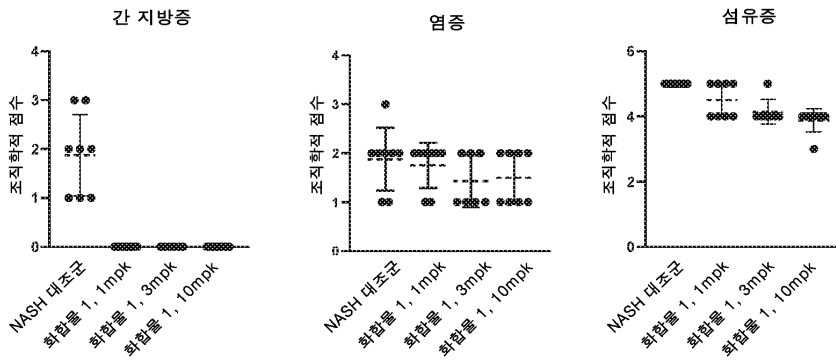


p-값 대 위약: \*<0.05; \*\*<0.01; \*\*\*<0.001; \*\*\*\*<0.0001

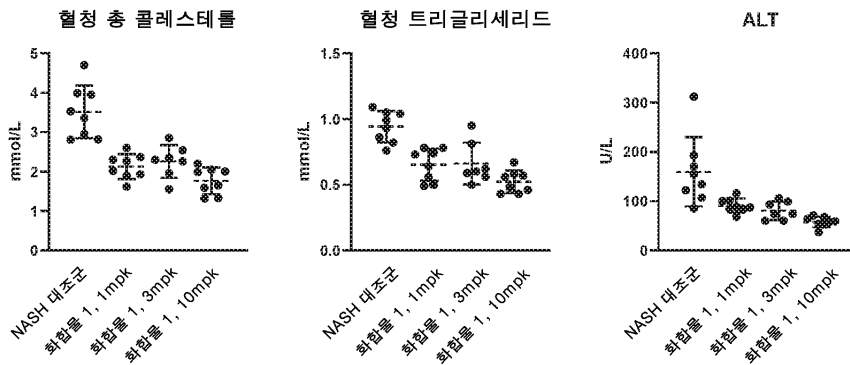
도면9



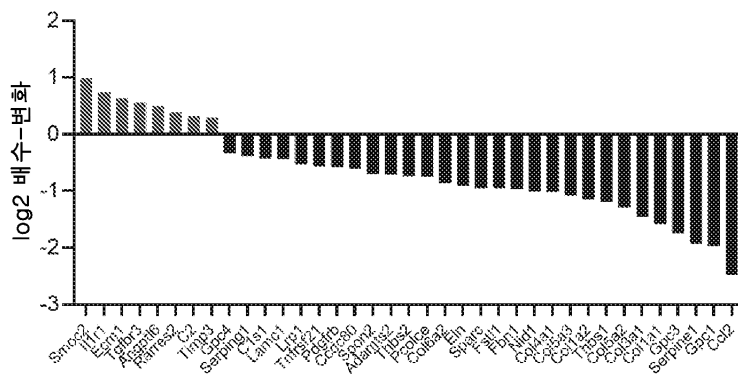
도면10



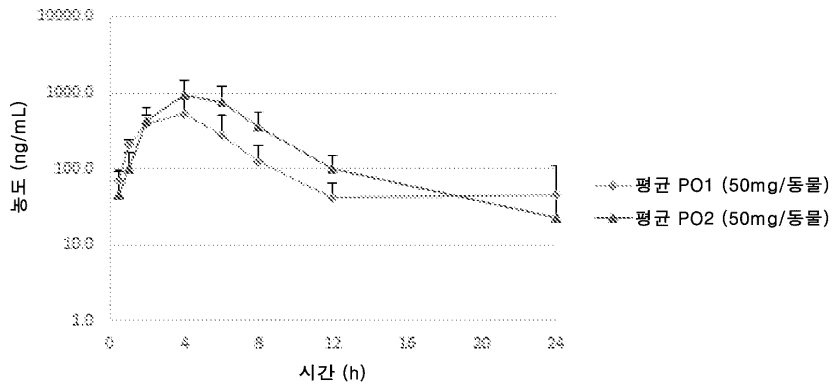
도면11



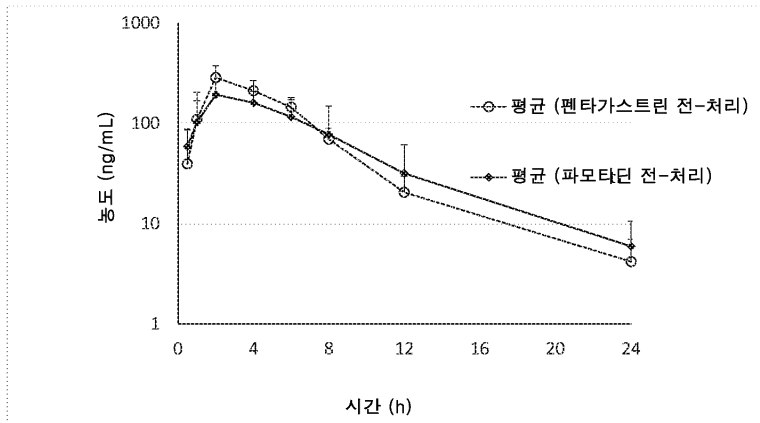
도면12



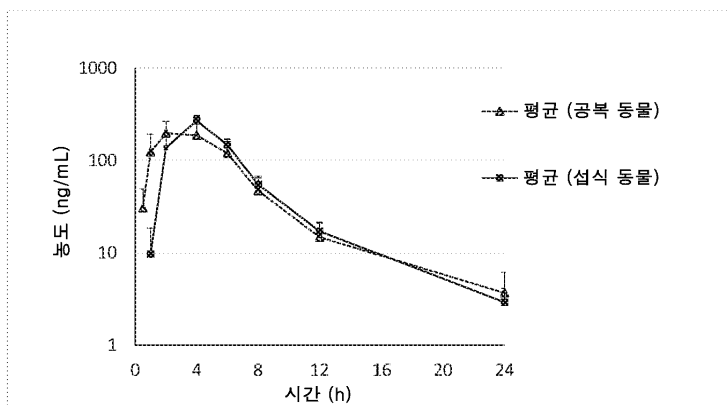
도면13



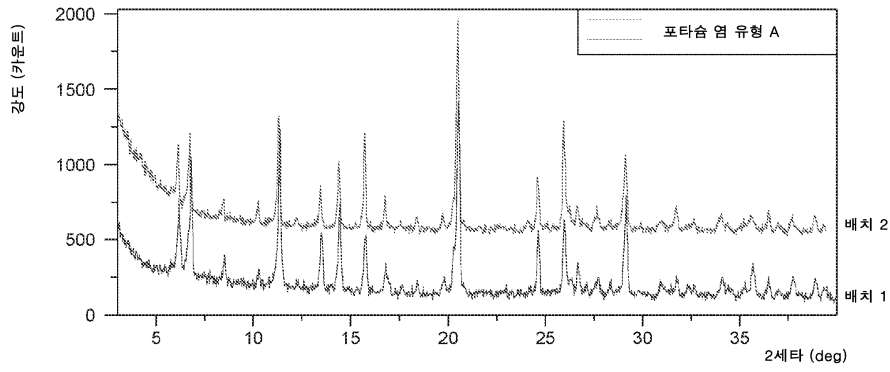
도면14



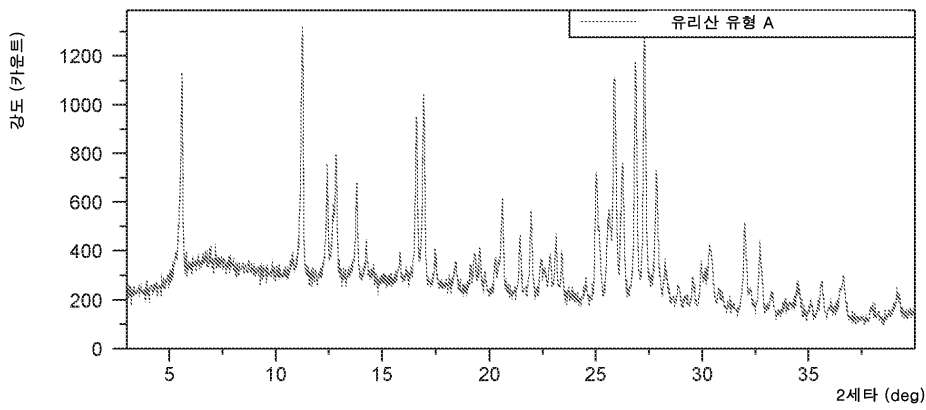
도면15



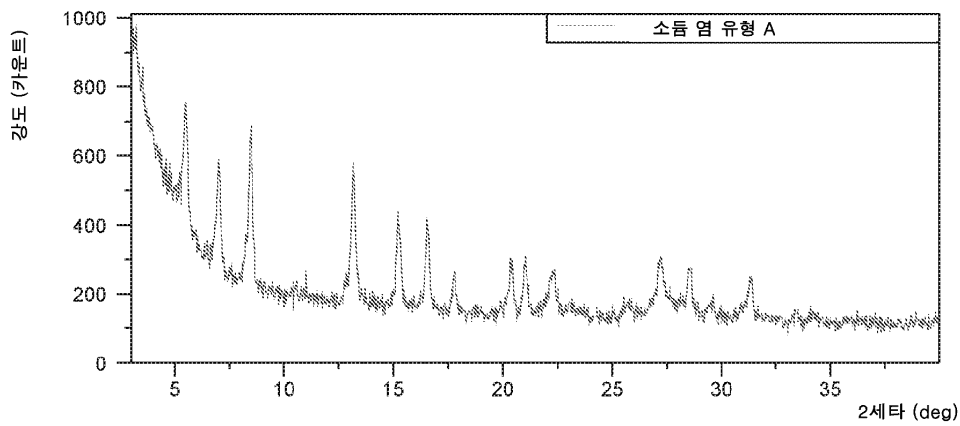
도면16



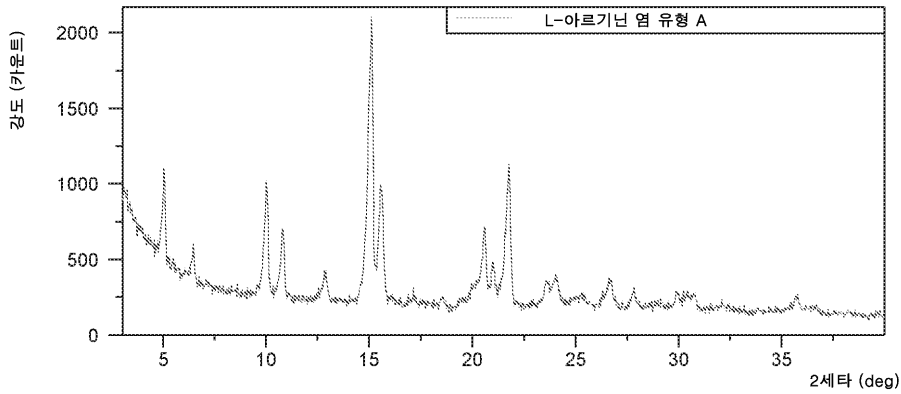
도면17



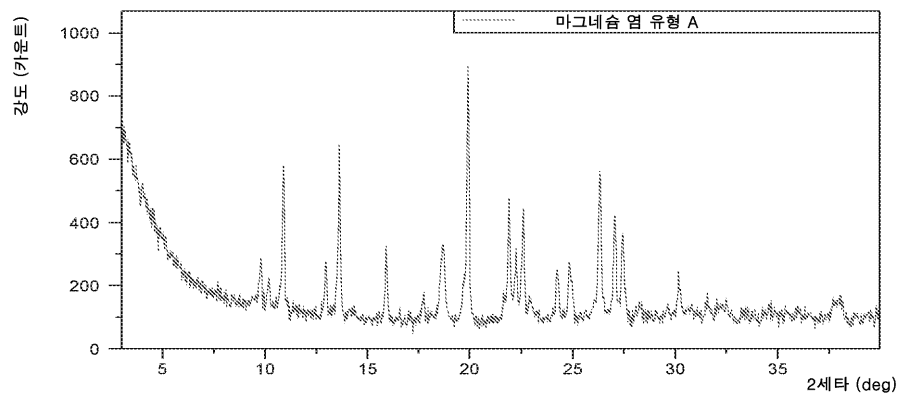
도면18



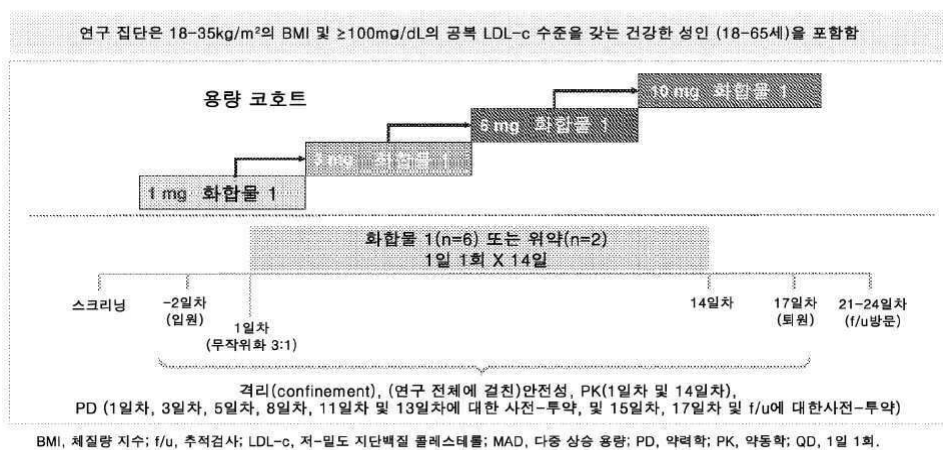
도면19



도면20



도면21

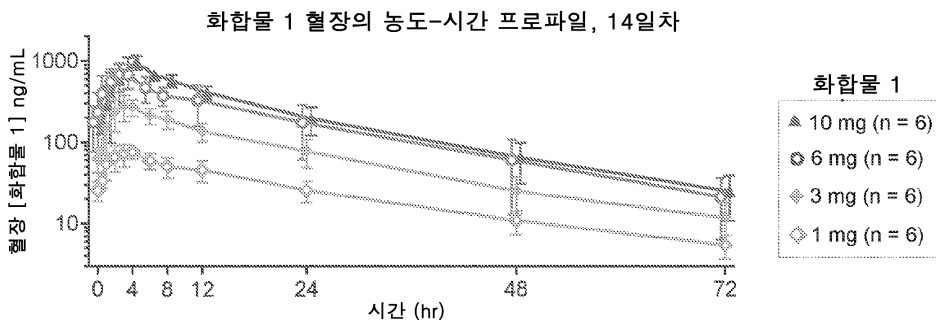


도면22

특질	화합물 1				
	0 mg (n=0)	1 mg (n=6)	3 mg (n=6)	6 mg (n=6)	10 mg (n=6)
연령, 평균(SD) [연령]	45.9 (12.3)	44.7 (16.4)	43.3 (12.9)	44.5 (14.9)	39.5 (9.1)
남성, n (%)	7 (87.5%)	5 (83.3%)	5 (83.3%)	5 (83.3%)	5 (83.3%)
인종, n (%)					
백인	5 (62.5%)	6 (100%)	3 (50.0%)	6 (100%)	2 (33.3%)
흑인 또는 아프리카계 미국인	2 (25.0%)	0	3 (50.0%)	0	2 (33.3%)
아메리칸 인디언 또는 알래스카 원주민	0	0	0	0	2 (33.3%)
아시아인	1 (12.5%)	0	0	0	0
민족성, n (%)					
히스패닉 또는 라틴계	4 (50.0%)	1 (16.7%)	0	1 (16.7%)	0
BMI, 평균 (SD) [kg/m <sup>2</sup> ]	28.6 (3.5)	28.1 (3.8)	27.1 (2.5)	26.3 (4.2)	27.0 (4.0)
APO B mg/dL (SD)	118.8 (26.69)	95.8 (20.17)	107.8 (12.83)	100.3 (39.83)	104.8 (12.25)
LDL-c, 평균 (SD) [mg/dL]	143.1 (32.2)	121.5 (31.3)	131.8 (13.8)	129.9 (49.8)	126.7 (15.9)
TC mg/dL (SD)	222.5 (41.35)	187.3 (41.38)	209.7 (13.05)	188.0 (61.99)	197.2 (15.54)
TG mg/dL (SD)	125.8 (63.73)	112.0 (36.39)	107.7 (50.61)	123.8 (77.41)	116.3 (63.68)
SHBG, 평균 (SD) [nmol/L]	28.0 (6.8)	39.8 (17.9)	42.2 (11.0)	38.8 (15.1)	33.3 (19.1)

BMI, 체질량 지수; LDL-c, 저-밀도 지단백질 콜레스테롤; SHBG, 성호르몬 결합 글로불린; APO-B, 아포지단백질 B; TG, 트리글리세리드; TC, 총 콜레스테롤; SD, 표준 편차

도면23



- PK의 변동성은 일반적으로 낮았음 (AUC<sub>0-24</sub> 및 C<sub>max</sub>의 경우 16 내지 44%의 CV).
- 화합물 1 반감기(중앙값 15 내지 21시간)는 1일 1회 투약을 지지함

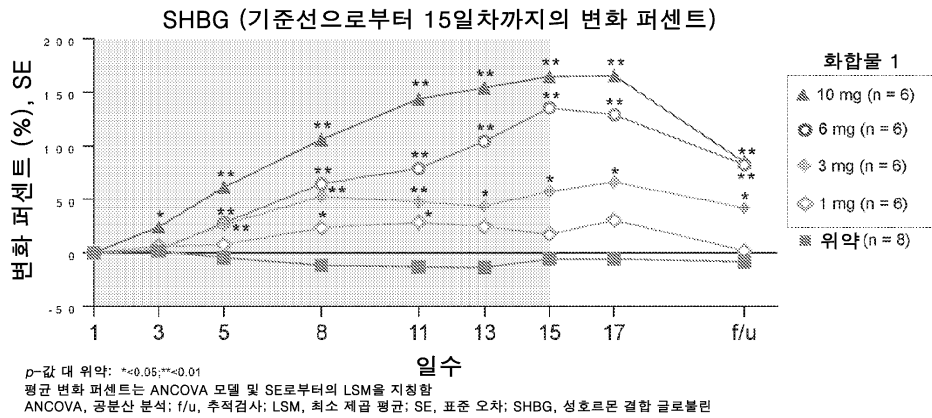
도면: 평균(SD)으로서 표시된 데이터  
AUC<sub>0-24</sub>: 0시간으로부터 투약 기간의 종료까지 농도-시간 곡선하 면적; hr, 시간; PK, 약동학

도면24

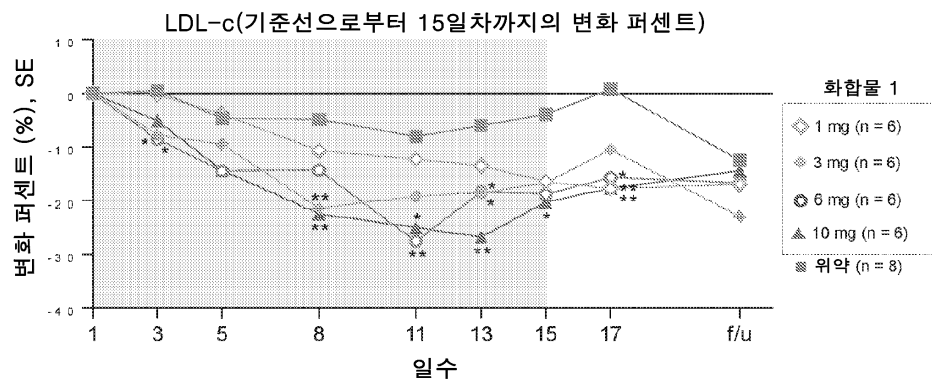
14일차 PK 매개변수	화합물 1			
	1 mg QD n = 6	3 mg QD n = 6	6 mg QD n = 6	10 mg QD n = 6
AUC <sub>0-24</sub> (hr·ng/mL)	1090 (15.7)	3600 (26.9)	8310 (44.4)	10600 (21.1)
C <sub>max</sub> (ng/mL)	80.3 (20.0)	291 (30.9)	699 (35.1)	996 (18.0)
t <sub>1/2</sub> (hr)	21.3 (17.0-23.8)	17.1 (15.3-19.6)	16.4 (12.7-17.6)	15.4 (13.1-18.5)

AUC<sub>0-24</sub>: 0시간으로부터 투약 기간의 종료까지 농도-시간 곡선하 면적; C<sub>max</sub>, 최대 관찰된 농도; CV, 변동계수; hr, 시간; PK, 약동학; QD, 1일 1회; t<sub>1/2</sub>, 말단 반감기.  
매개변수는 중앙값(범위)으로서 표시되는 t<sub>1/2</sub>를 제외하고 평균(CV)으로서 3개의 유의한 수치로 표시됨.

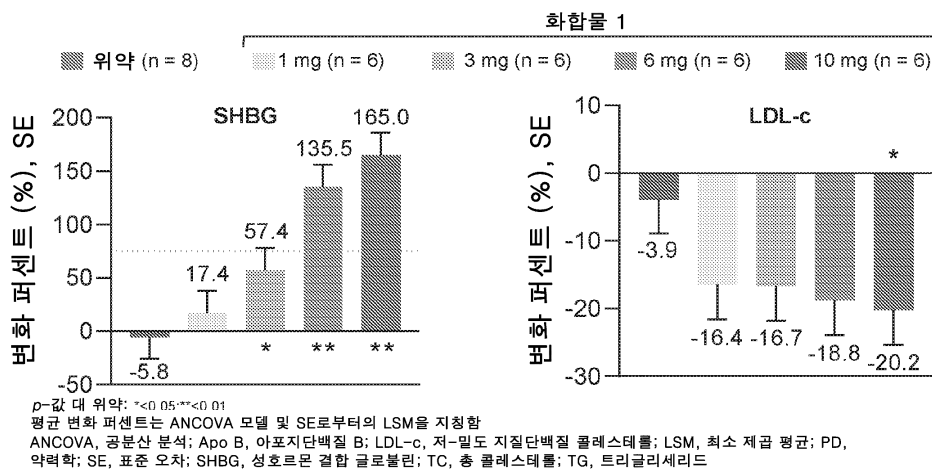
도면25



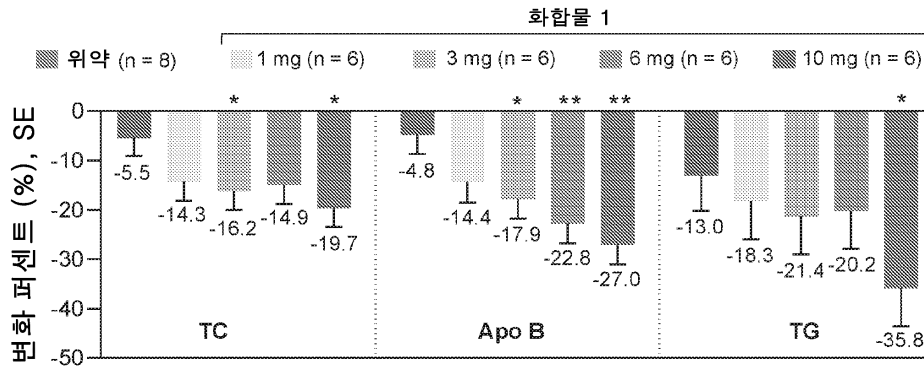
도면26



도면27



도면28



\* HDL 콜레스테롤에서의 유의한 변화가 관찰되지 않았음  
 p-값 대 위약: \*<0.05, \*\*<0.01  
 평균 변화 퍼센트는 ANCOVA 모델 및 SE로부터의 LSM을 지칭함  
 ANCOVA, 공분산 분석; Apo B, 아포지단백질 B; LDL-c, 저-밀도 지질단백질 콜레스테롤; LSM, 최소 제곱 평균; PD, 약력학; SE, 표준 오차; SHBG, 성호르몬 결합 글로불린; TC, 총 콜레스테롤; TG, 트리글리세리드

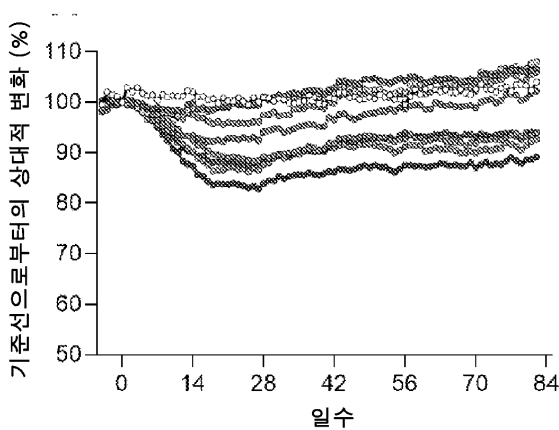
도면29

카테고리별 대상체 AE 발생률, n (%)	위약 (n=8)	1 mg (n=6)	3 mg (n=6)	6 mg (n=6)	10 mg (n=6)
임의의 AE, 모든 CTCAE 등급	1 (12.5%)	3 (50.0%)	1 (16.7%)	1 (16.7%)	2 (33.3%)
CTCAE 등급 1	1 (12.5%)	3 (50.0%)	1 (16.7%)	1 (16.7%)	2 (33.3%)
CTCAE 등급 2 이상	0	0	0	0	0
심각한 AE	0	0	0	0	0
약물과의 관계별 AE					
관련 없음	1 (12.5%)	2 (33.3%)	1 (16.7%)	0	2 (33.3%)
관련이 있을 것 같지 않음	0	1 (16.7%)	0	0	0
아마도 관련되어 있음	0	0	0	1 (16.7%) <sup>a</sup>	0
관련되어 있음	0	0	0	0	0

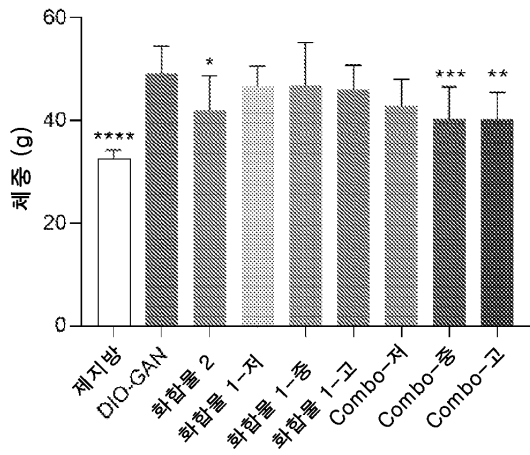
- 치료군 전반에 걸쳐 심박수 및 혈압은 전반적으로 안정적으로 유지되었으며 임상적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았음
- ECG 매개변수에는 유의한 변화가 나타나지 않았음

<sup>a</sup>어지럼증이 한 명의 대상체에서 보고되었음.  
 AE, 이상 사례; CTCAE, 이상 사례에 대한 공통 용어 기준; ECG, 심전도.

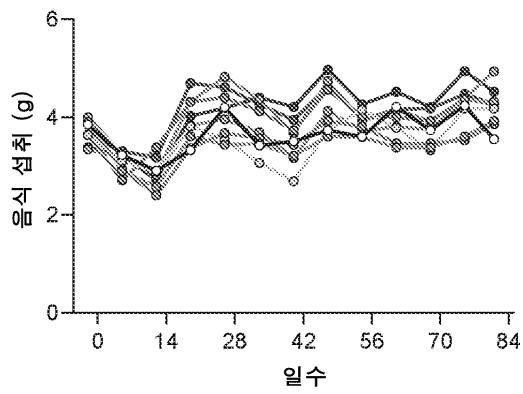
도면30a



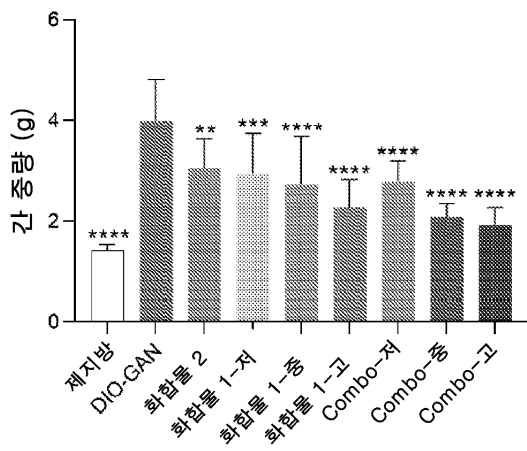
도면30b



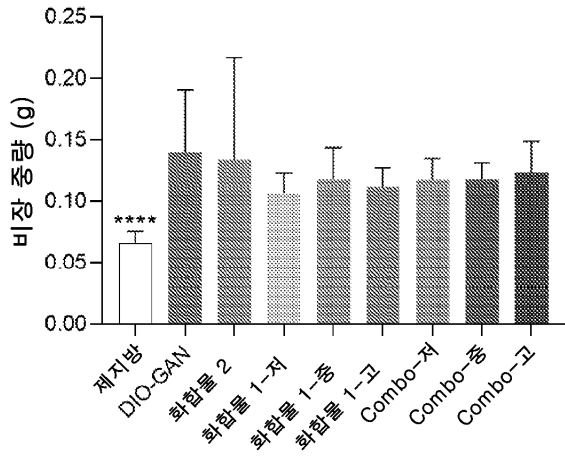
도면31



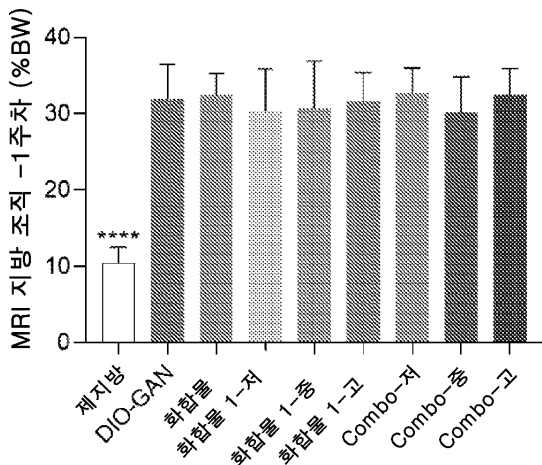
도면32a



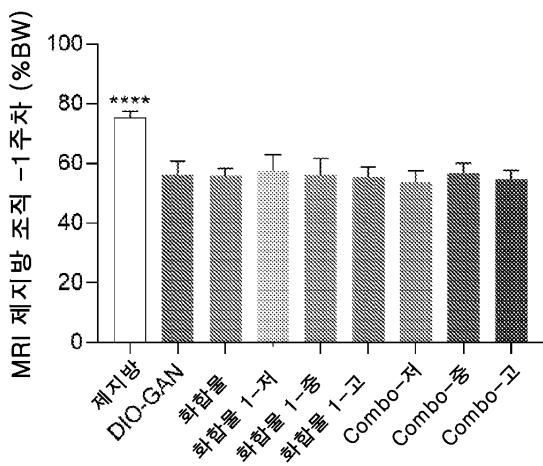
도면32b



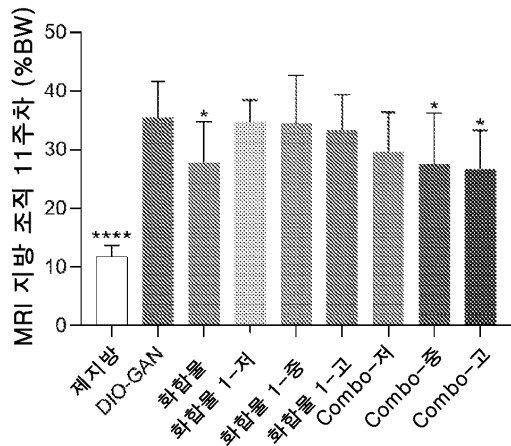
도면33a



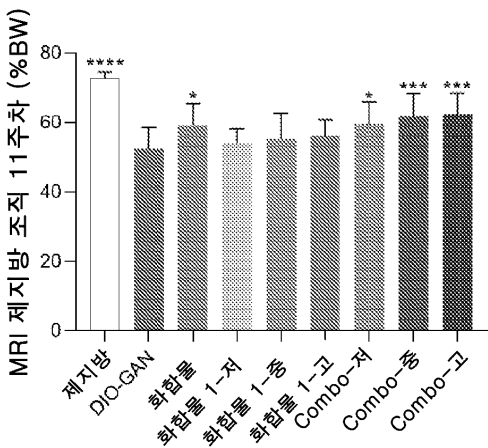
도면33b



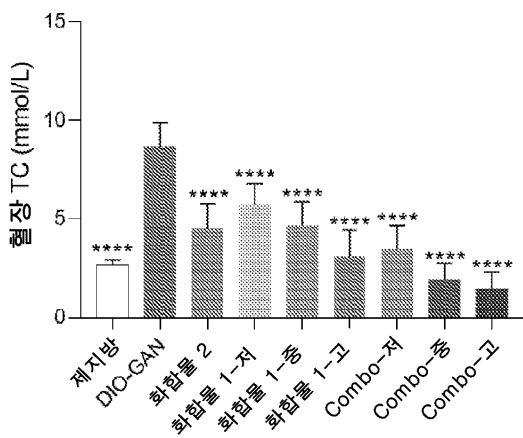
도면34a



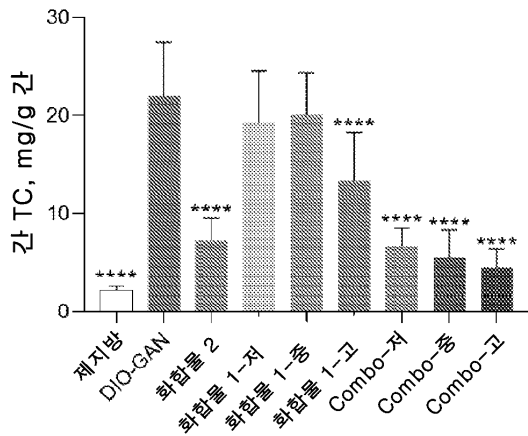
도면34b



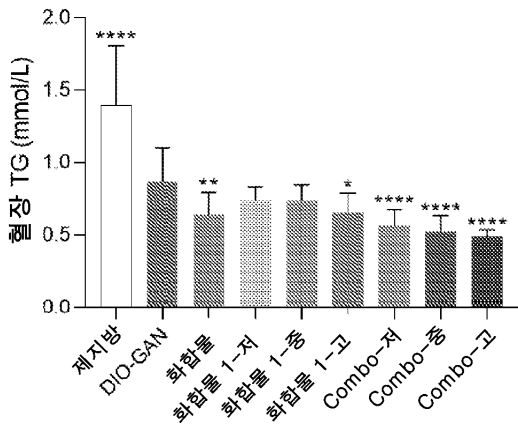
도면35a



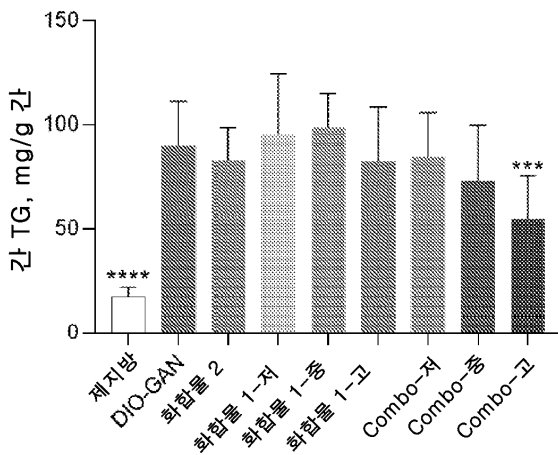
도면35b



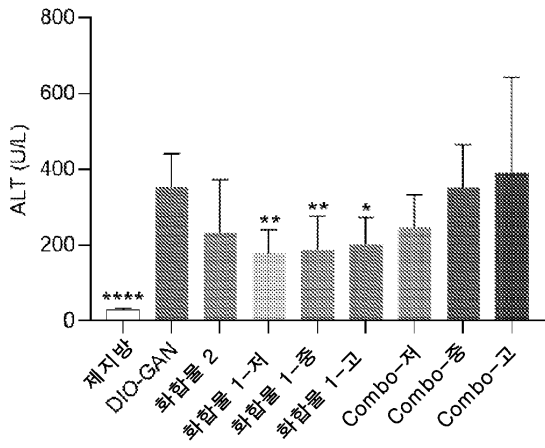
도면36a



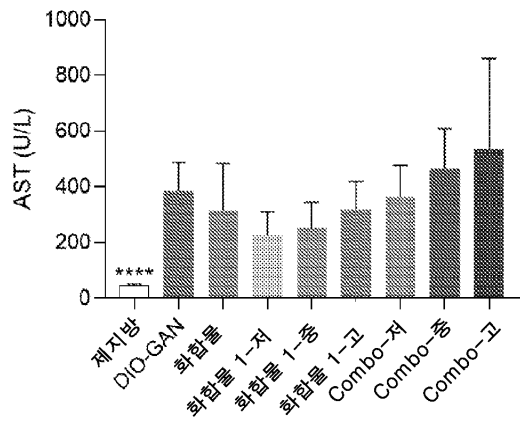
도면36b



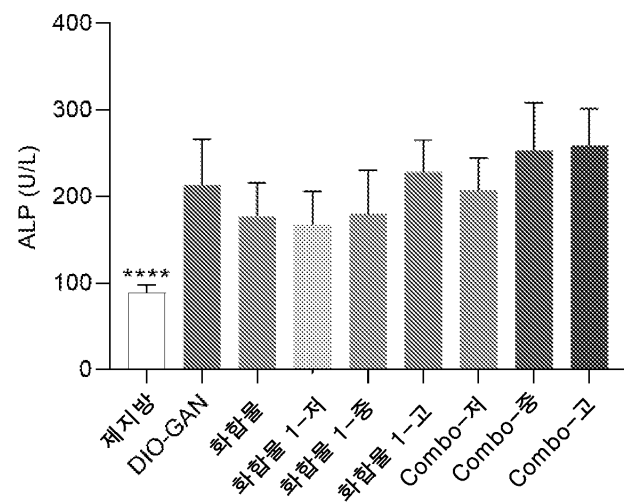
도면37a



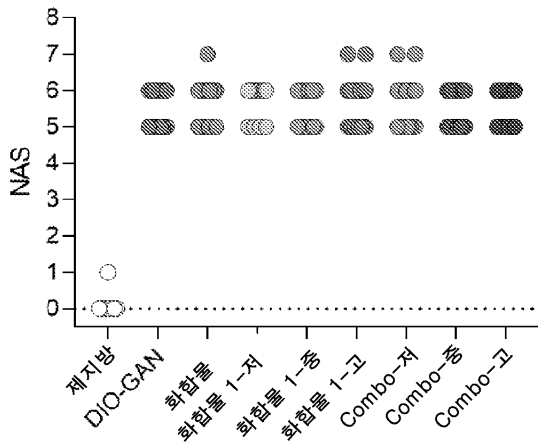
도면37b



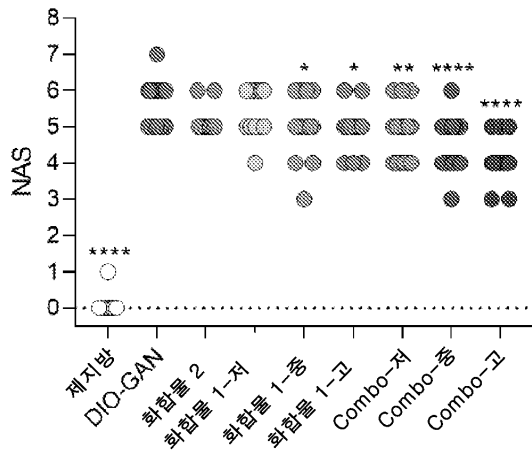
도면38



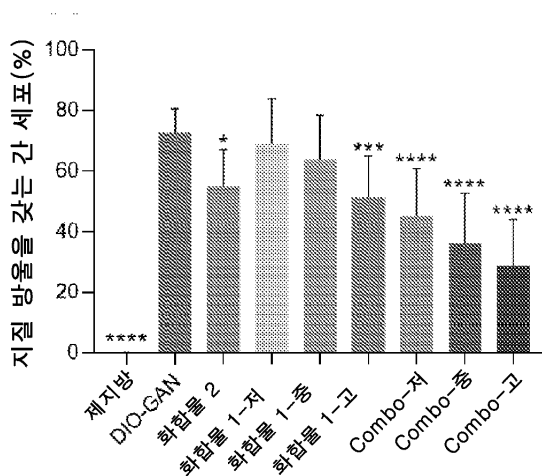
도면39a



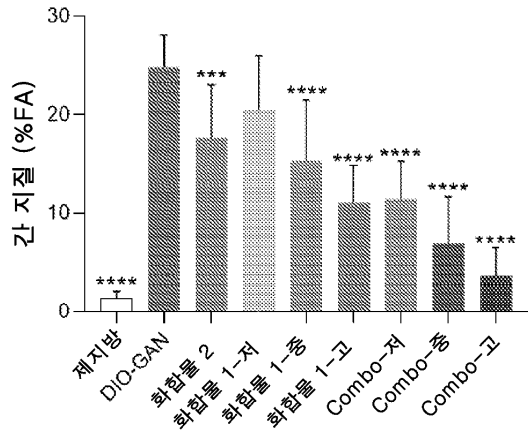
도면39b



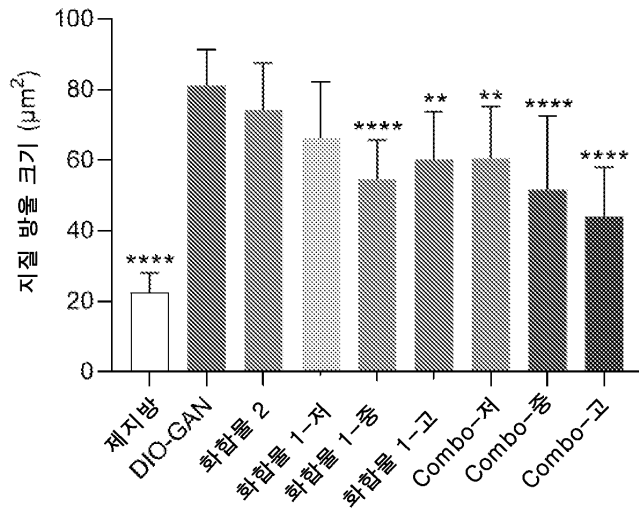
도면40a



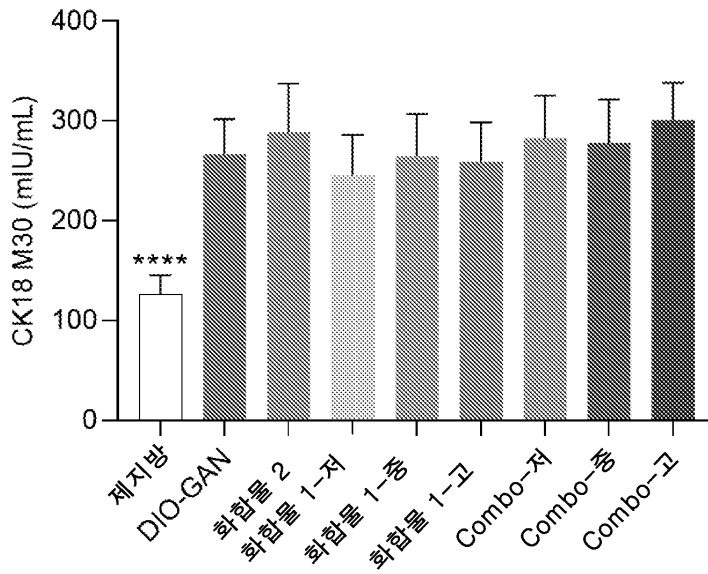
도면40b



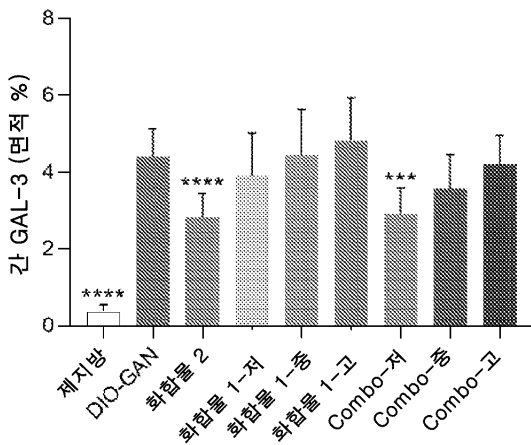
도면41



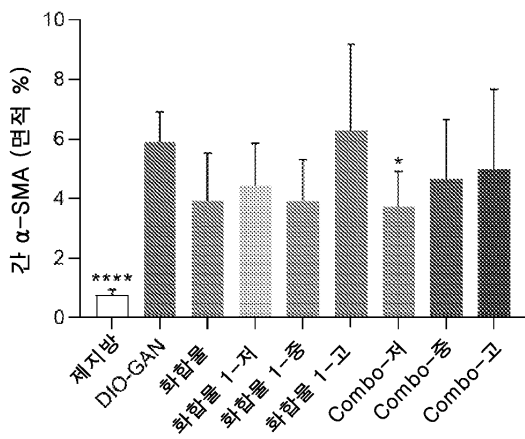
도면42



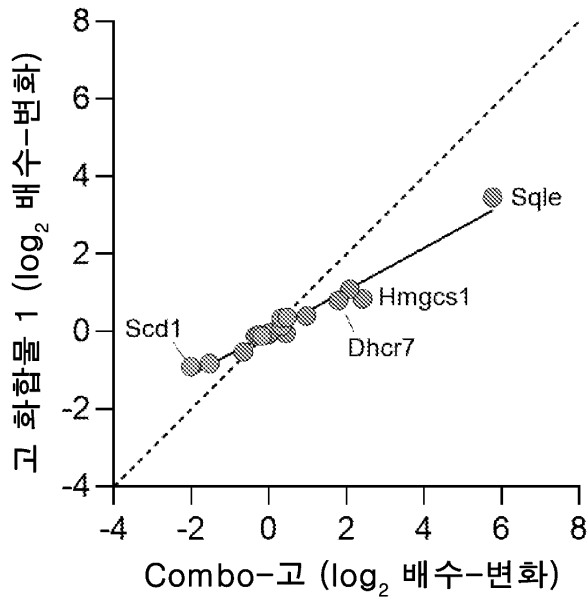
도면43a



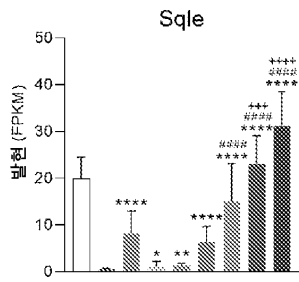
도면43b



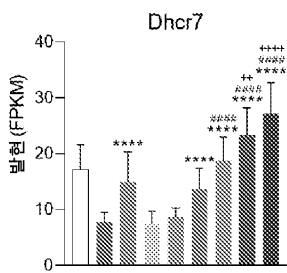
도면44



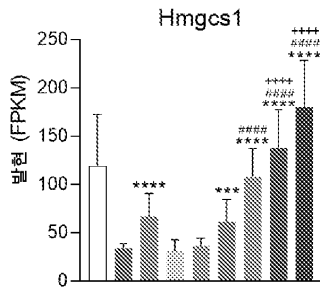
도면45a



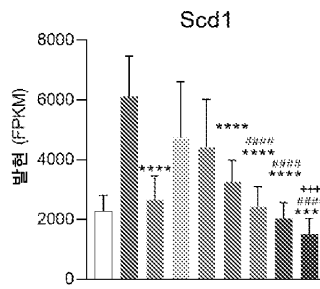
도면45b



도면45c



도면45d



도면46

