



등록특허 10-2054399



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년12월10일

(11) 등록번호 10-2054399

(24) 등록일자 2019년12월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07C 217/64 (2006.01) A61K 31/137 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)

C07C 209/60 (2006.01) C07C 45/68 (2006.01)

C07C 47/575 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07C 217/64 (2013.01)

A61K 31/137 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0034615

(22) 출원일자 2019년03월26일

심사청구일자 2019년03월26일

(65) 공개번호 10-2019-0112673

(43) 공개일자 2019년10월07일

(30) 우선권주장

62/648,381 2018년03월26일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현

KR1020170021525 A

US20150175607 A1

US5576340 A

JP1994329535 A

(73) 특허권자

주식회사 프로텍바이오

서울특별시 종로구 대학로 103, 융합관 408호(연
건동, 서울대학교의과대학)

(72) 발명자

권용태

서울특별시 종로구 대학로 103, 융합관 408호

가니피세티 스리니바스라오

서울특별시 종로구 대학로 103, 융합관 408호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 이선희

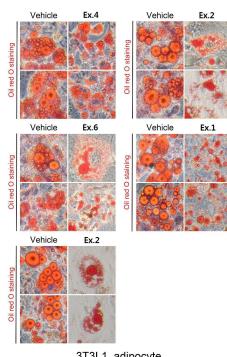
(54) 발명의 명칭 신규한 화합물 및 이를 포함하는 비만 또는 대사증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 비만 또는 대사증후군의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물

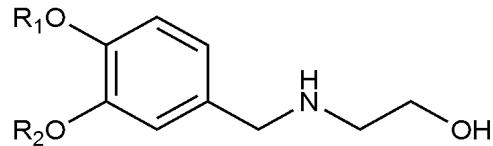
(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 이를 포함하는 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서, R_1 및 R_2 는 명세서에서 정의한 바와 같다.

(52) CPC특허분류

A61P 3/00 (2018.01)

A61P 3/10 (2018.01)

C07C 209/60 (2013.01)

C07C 45/68 (2013.01)

C07C 47/575 (2013.01)

(72) 발명자

성기운

서울특별시 종로구 대학로 103, 융합관 408호

정의정

서울특별시 종로구 대학로 103, 융합관 408호

배태현

서울특별시 종로구 대학로 103, 융합관 408호

문수란

서울특별시 종로구 대학로 103, 융합관 408호

정찬훈

서울특별시 종로구 대학로 103, 융합관 408호

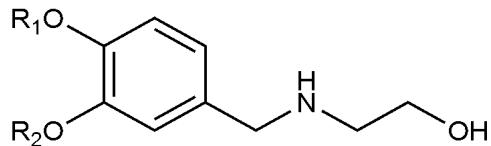
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R_1 은 $-\text{L}_1-$ (페닐)이고,

R_2 는 수소, 또는 $-\text{L}_2-$ (페닐)이고,

L_1 은 C_{1-5} 알킬렌이고,

L_2 은 C_{1-5} 알킬렌이고,

단, R_1 및 R_2 가 모두 벤질은 아니다.

청구항 2

제1항에 있어서,

L_1 은 $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, 또는 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 인,

화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 3

제1항에 있어서,

L_2 는 $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, 또는 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 인,

화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 4

제1항에 있어서,

R_1 은 $-\text{CH}_2-$ (페닐)이고,

R_2 는 수소, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (페닐), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (페닐), 또는 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (페닐)인,

화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 5

제1항에 있어서,

R_1 및 R_2 는 서로 동일한,

화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 6

제5항에 있어서,

R_1 및 R_2 는 $-CH_2CH_2-$ (페닐), $-CH_2CH_2CH_2-$ (페닐), 또는 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ (페닐)인,

화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 화합물은,

- 1) 2-(3,4-디펜에톡시벤질아미노)에탄올,
- 2) 2-(3,4-비스(3-페닐프로포시)벤질아미노)에탄올,
- 3) 2-(3,4-비스(4-페닐부톡시)벤질아미노)에탄올,
- 4) 2-(벤질옥시)-5-((2-하이드록시에틸아미노)메틸)페놀,
- 5) 2-(4-(벤질옥시))-3-펜에톡시벤질아미노)에탄올,
- 6) 2-(4-(벤질옥시))-3-(3-페닐프로포시)벤질아미노)에탄올, 및
- 7) 2-(4-(벤질옥시))-3-(4-페닐부톡시)벤질아미노)에탄올,

으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인,

화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 비만 또는 대사증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 대사증후군은 심근경색, 동맥경화증, 고지혈증, 고혈압, 뇌경색, 뇌출혈, 지방간, 및 2형 당뇨병으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인,

약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비만 또는 대사증후군의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있는 신규한 화합물 및 이를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 단순 질환으로만 여겨지던 비만은 최근 질병으로 분류되고 있으며 2형 당뇨병, 심혈관 질환과 같은 대사증후군 및 특정 암의 발병과 연관성이 있는 것으로 보고되고 있다[1]. 비만은 사회 환경적, 유전적, 정신적, 내분비적 원인 등 다양한 원인이 복합적으로 작용하여 발생하는 질병이다. 세계보건기구(World Health Organization, WHO)에 따르면 전 세계적으로 비만 인구가 1980년대 이후 2배로 증가하였으며[2], 미국의 경우 2013년 기준 전체 인구의 약 34%가 비만으로 분류되었다[3]. 미국 정부는 비만으로 인한 사회 경제적 손실을 줄이기 위해 매년 국가 전체 의료비의 10%를 비만 관련 의료 서비스 및 캠페인 등에 사용하고 있는 실정이다. 최근에는 아시아 및 아프리카 국가들의 비만율의 증가 또한 두드러지고 있는데, 영국의학전문지 'Lancet'에 따르면 2014년 중국 내 비만 인구는 약 9000만명에 달하는 것으로 조사되었다[4]. WHO는 이처럼 점진적으로 증가하고 있는 비만의 심각성을 인식하고 2004년 5월에 '다이어트, 운동, 건강에 대한 세계 전략'을 의제화 하고 비만의 해결을 위한 노력을 기울여 왔다. 하지만 현재까지 비만이 감소한 나라는 전세계적으로 단 한 곳도 보고되지 않고 있다.

[0004] 맥킨지 보고서에 따르면 2012년 비만으로 인해 발생하는 건강 문제를 관리하는데 사용된 경제적 비용이 한 해 약 2조 달러에 이르는 것으로 분석되었다[5]. 이는 한국의 연간 GDP를 크게 상회하는 수치이며 알코올의 섭취에 의해 발생하는 사회 경제적 비용보다 높은 수치이다. 이처럼 비만은 전 세계적으로 대두되고 있는 건강 문제임에도 불구하고 연구 개발을 통해 미국 FDA로부터 임상적 사용이 허가된 약물은 총 5가지에 그치고 있는 실정이다[6].

[0006] 그러나, 미국 FDA로부터 승인을 받아 사용되고 있는 약물들의 작용 기전은 섭취된 음식물들을 통해 소장으로부터 지방이 흡수됨을 저해하는 방법과 뇌의 중추신경 내 섭식 중추의 활성을 변화시켜 허구적 포만감을 유발함으로써 영양분의 섭취를 감소시켜 체중 감소를 유도하는 방법 및 체내 유입된 에너지를 지방의 형태로 저장하지 않고 열에너지로 방출하도록 하는 방법으로 나눌 수 있다. 하지만 이러한 약물들은 영양 불균형과 같은 대사적 문제점 및 무기력감 혹은 우울감과 같은 감정의 변화가 동반되는 부작용이 발생할 수 있는 가능성이 있다[6].

[0008] 따라서, 비만의 가장 효과적인 치료 및 예방법은 생체 내 시스템을 이용하여 원인 물질인 잉여 체지방을 원천적으로 제거하는 것이다. 하지만 현재까지 외과적 처치 외에는 초과 축적된 지방만을 선택적으로 제거할 수 있는 효과적이며 안정성이 확보된 방법이 없는 실정이다. 따라서, 부작용이 없이 잉여 지방의 선택적 제거라는 난제를 해결할 수 있다면 개인의 건강 문제를 넘어 비만으로 인해 발생하는 사회적 비용 등을 절감할 수 있을 것이다. 또한 비만이 주된 원인으로 알려진 심혈관 및 뇌혈관계 질환, 제2 형 당뇨병 및 지방간 등과 같은 대사증후군의 경감에도 효과가 있을 것이다.

[0010] 조직 및 혈중에 과잉 축적된 지방은 체중의 증가와 더불어 다양한 대사증후군의 주된 원인이다. 고지방식이에 의해 증가된 복부지방은 체내 지방과 당대사에 영향을 미치게 되고 혈중 중성 지방의 농도를 증가시킨다. 혈액 내 중성 지방의 증가는 다양한 조직에서 중성 지방의 축적을 야기한다. 조직 내 축적된 지방이 질환의 직접적인 원인이 되는 대표적인 대사증후군으로 간질환을 들 수 있다. 간세포 내에 중성 지방이 5% 이상 축적된 상태를 지방간이라 정의하며 지방간염으로 발전할 수 있다[7]. 따라서, 간질환을 예방 및 치료하기 위해서는 조직 내 축적된 지방을 효과적으로 제거하는 것이 가장 효과적인 방법일 것이다. 비만을 예방 또는 치료하는데 있어 약물을 사용하는 주목적은 단순 체중 감량이 아니라 축적된 과잉 체지방으로 인한 대사 이상을 교정하는 것이 목표가 되어야 하며, 궁극적으로 비만으로 인해 유발될 수 있는 당뇨병, 간질환과 같은 대사증후군의 예후를 양호하게 하는데 초점이 맞추어져야 한다. 따라서 항-비만 약물의 경우 전체적인 대사 작용의 변화 없이, 잉여 지방에 대한 선택적 감소가 이루어지는 것이 우선 목표가 되어야 한다.

[0012] 현재까지 체내 과도하게 축적된 잉여 지방만을 선택적으로 제거할 수 있는 기술은 전무한 상태이며 이에 대한 연구 또한 부재한 상태이다. 표준 체지방을 유지하며 불필요한 지방만을 제거하기 위해서는 세포 내 항상성 유지를 위해 존재하는 시스템을 활용하는 방법이 가장 효과적일 것이다. 세포 내에는 손상되거나 불필요한 세포 소기관 및 단백질 등과 같은 구성 성분들을 리소좀이라는 기관을 활용하여 분해하고 재활용하는 자가포식 작용 기전이 존재한다. 세포가 스트레스 상황에 노출되거나 영양 결핍 상황에 놓여졌을 때 활성화되며 세포는 이러한 기전을 이용하여 세포 내 환경을 적절하게 유지한다. 분해되는 기질에 따라 미토파지(Mitophagy), 제노파지(Xenophagy), 리포파지(Lipophagy) 등으로 다양하게 분류된다[8]. 리포파지(Lipophagy) 시스템은 세포 내 축적된 지방 과립을 제거하는 기능을 하는 것으로 알려져 있으며, 2009년 네이처(Nature) 저널에 Mark J. Czaja와

Ana Maria Cuervo 연구진이 공동 연구를 통해 세포 내 축적된 지방 과립이 리포파지 작용에 의해 제거된다는 연구결과를 발표한 뒤 그의 기전 및 활성 방법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 기술적인 방법으로 리포파지 과정을 조절할 수 있다면 섭식 형태 및 에너지 대사의 조정을 통해 지방의 축적을 막는 기존의 비만 치료제들을 대체할 수 있는 효과적인 치료제로 사용될 수 있을 것이다.

[0014] 이에 본 발명자들은 상기와 같은 약물을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 후술할 신규한 화합물이 상기와 같은 특성을 충족함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0016] [참고 문헌]

[0017] 1. Cummings DE, and Schwartz MW. Genetics and pathophysiology of human obesity. *Annu Rev Med* 2003;54:453-471

[0018] 2. World Health Organization: Regional for Europe. Obesity [Internet]. Geneva: World Health Organization, c2013 [cited 2013 Mar 30]. Available from: <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/healthtopics/noncommunicable-disease/obesity/facts-and-figures>.

[0019] 3. Centers for Disease Control and Prevention. Overweight and Obesity: Adults Obesity Facts [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention 2012 [updated 2012; cited 2013 Mar 6]. Available from <http://www.cdc.gov/obesity/data/adult.html>.

[0020] 4. Ng M, Fleming T, Robinson M, Graetz N, Margono C, Mullany EC et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet* 2014;384:766–781

[0021] 5. Dobbs R. et al., Overcoming obesity: An initial economic analysis. McKinsey Global Institute, 2014

[0022] 6. Daneschvar HL, Smetana GW. FDA-approved anti-obesity drugs in the United States. *The Am J Med* 2016;129:879.e1-879.e6

[0023] 7. Kneeman JM, Misdraji J, Corey KE. Secondary cause of nonalcoholic fatty liver disease. *Therap. Adv. Gastroenterol* 2012;5:199–207

[0024] 8. Anding AL, Baehrecke EH. Cleaning House: Selective autophagy of organelles. *Developmental cell* 2017;10:41:10–22

[0025] 9. Kaushik S, Cuervo AM. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nat cell Biol* 2015;17:759–770

발명의 내용

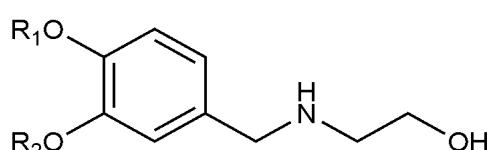
해결하려는 과제

[0026] 본 발명은 비만 또는 대사증후군의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있는 신규한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 이를 포함하는 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0027] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0028] [화학식 1]



[0029]

상기 화학식 1에서,

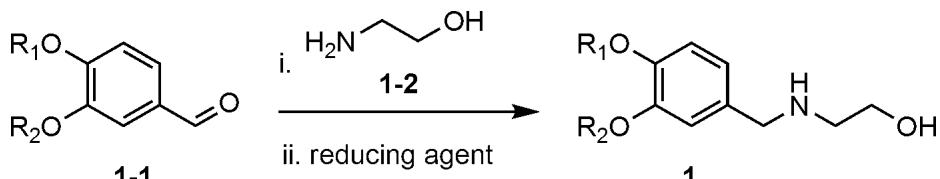
- [0031] R_1 은 $-L_1-$ (페닐)이고,
- [0032] R_2 는 수소, 또는 $-L_2-$ (페닐)이고,
- [0033] L_1 은 C_{1-5} 알킬렌이고,
- [0034] L_2 은 C_{1-5} 알킬렌이고,
- [0035] 단, R_1 및 R_2 가 모두 벤질은 아니다.
- [0037] 바람직하게는, L_1 은 직쇄 C_{1-5} 알킬렌이다. 보다 바람직하게는, L_1 은 $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, 또는 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 이다.
- [0039] 바람직하게는, L_2 는 직쇄 C_{1-5} 알킬렌이다. 보다 바람직하게는, L_2 는 $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, 또는 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 이다.
- [0041] 바람직하게는, R_1 은 $-CH_2-$ (페닐)이고; R_2 는 수소, $-CH_2CH_2-$ (페닐), $-CH_2CH_2CH_2-$ (페닐), 또는 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ (페닐)이다.
- [0043] 바람직하게는, R_1 및 R_2 는 서로 동일하다. 보다 바람직하게는, R_1 및 R_2 는 $-CH_2CH_2-$ (페닐), $-CH_2CH_2CH_2-$ (페닐), 또는 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ (페닐)이다.
- [0045] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 대표적인 예는 하기와 같다:
- 1) 2-(3,4-디펜에톡시벤질아미노)에탄올,
 - 2) 2-(3,4-비스(3-페닐프로포시)벤질아미노)에탄올,
 - 3) 2-(3,4-비스(4-페닐부톡시)벤질아미노)에탄올,
 - 4) 2-(벤질옥시)-5-((2-하이드록시에틸아미노)메틸)페놀,
 - 5) 2-(4-(벤질옥시)-3-펜에톡시벤질아미노)에탄올,
 - 6) 2-(4-(벤질옥시)-3-(3-페닐프로포시)벤질아미노)에탄올, 및
 - 7) 2-(4-(벤질옥시)-3-(4-페닐부톡시)벤질아미노)에탄올.
- [0054] 한편, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산, 아인산 등과 같은 무기산류, 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 히드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류 등과 같은 무독성 유기산, 아세트산, 안식향산, 구연산, 젖산, 말레인산, 글루콘산, 메탄설폰산, 4-톨루엔설폰산, 주석산, 푸마르산 등과 같은 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염의 종류로는 셀페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설플라이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 다이하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로파울레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 히드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크릴렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -히드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트, 만델레이트 등을 포함한다.
- [0056] 상기 산 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 화학식 1의 유도체를 메탄올, 에탄올, 아세톤, 디클로로메탄, 아세토니트릴 등과 같은 유기용매에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조시켜 제조하거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조시켜 유기 용매 하에서 결정화시켜서 제조할 수 있다.

- [0058] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속 염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

- [0060] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라, 이로부터 제조될 수 있는 용매화물, 광학 이성질체, 수화물 등을 모두 포함한다.

- [0062] 또한, 본 발명은 일례로 하기 반응식 1과 같은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조 방법을 제공한다.

- [0063] [반응식 1]



- [0064]

- [0065] 상기 반응식 1에서, R_1 및 R_2 는 앞서 정의한 바와 같다.

- [0067] 상기 반응은, 상기 화학식 1-1로 표시되는 화합물과 상기 화학식 1-2로 표기되는 화합물을 반응시켜 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 반응으로서, 실질적으로 2단계로 이루어진다. 구체적으로, 상기 화학식 1-1로 표시되는 화합물과 상기 화학식 1-2로 표기되는 화합물을 반응시켜 이민 화합물을 제조한 다음 이를 환원시켜 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조한다.

- [0069] 상기 반응에서 사용할 수 있는 용매로는 물, 에탄올, 테트라하이드로퓨란, 디클로로메탄, 툴루엔, 또는 아세토니트릴을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 반응 온도는 특별한 제약은 없으나, 10°C 내지 90°C, 바람직하게는 10°C 내지 30°C 또는 60°C 내지 80°C에서 수행할 수 있다. 또한, 상기 환원제(reducing agent)는 특별한 제한이 없으며, 일례로 NaBH_4 를 사용할 수 있다. 또한, 상기 반응 후, 필요에 따라 정제 단계가 포함될 수 있다.

- [0071] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 비만 또는 대사증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [0073] 후술할 실험예와 같이, 본 발명에 따른 화합물은 Oil red O 염색법으로 확인한 바와 같이, 지방 세포(adipocyte)에서 과잉 축적된 지방과립(lipid droplet)을 선택적으로 분해하여 축적된 지방 과립의 크기가 작아지는 것을 확인하였다. 또한, 고지방사료 섭취 생쥐에서 본 발명의 화합물의 체중 감량 효과를 확인한 바와 같이, 고지방사료를 통해 비만을 유도한 생쥐에 복강 내 투여 방식으로 주입하였을 때, 대조군 약물 투여 생쥐들에 비해 통계적으로 유의한 체중 감량 효과를 확인하였다.

- [0075] 이러한 결과들은 본 발명에 따른 화합물이 과잉 축적된 지방 세포들, 즉 질병 유발의 원인이 될 수 있는 지방 세포들만 선택적으로 감소 또는 제거할 수 있다는 증거이며, 따라서 대사 과정의 변화를 통한 에너지 소비량의 증가나 섭식 형태의 변화를 유도함으로써 부작용의 발생의 우려되는 기존의 약물들에 대한 효과적인 대안이 될 수 있다.

- [0077] 상기 대사증후군의 예로는, 심근경색, 동맥경화증, 고지혈증, 고혈압, 뇌경색, 뇌출혈, 지방간, 및 2형 당뇨병으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 들 수 있다. 이러한 대사증후군은 고지방 식이 섭취와 더불어 신체활동의 감소로 인한 비만이 주된 원인으로 작용하며 체지방의 증가, 혈압 상승, 혈중 지질 이상 등의 대사 기능 이상이 동반되는 질병이다. 따라서 과잉 축적된 체지방의 제거를 통한 비만의 치료 또는 예방은 대사증후군의 예후 또한 향상시키는데 효과적일 것이다.

- [0079] 본 발명의 용어 "예방"은 본 발명의 약학적 조성물의 투여로 상술한 질환의 발생, 확산 및 재발을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"는 본 발명의 약학적 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

- [0081] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 표준 약학적 실시에 따라 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화 할 수 있다. 이

들 제형은 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 담체, 보조제 또는 희석액 등의 첨가물을 함유할 수 있다. 적당한 담체로는 예를 들어, 생리식염수, 폴리에틸렌글리콜, 에탄올, 식물성 오일 및 아이소프로필미리스테이트 등이 있고, 희석액으로는 예를 들어 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 화합물들은 주사 용액의 제조에 통상적으로 사용되는 오일, 프로필렌글리콜 또는 다른 용매에 용해시킬 수 있다. 또한, 국소 작용을 위해 본 발명의 화합물을 연고나 크림으로 제형화할 수 있다.

[0083] 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물의 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물을 1일 0.0001 내지 100 mg/kg(체중), 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg(체중)으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 1일 1회 또는 분할하여 경구 또는 비경구적 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0085] 투여 방법에 따라, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 0.001 내지 99 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 60 중량% 함유할 수 있다.

[0087] 본 발명의 약학적 조성물은 쥐, 생쥐, 가축 및 인간 등을 비롯한 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들어, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 주사에 의해 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0088] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 비만 또는 대사증후군의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0089] 도 1 및 도 2는 Oil Red O 염색을 통해 본 발명의 화합물들이 3T3L1 지방 세포와 Hep G2 간 세포에서 지방과립의 크기를 감소시키는 효능을 확인한 결과이다.

도 3은 BODIPY 염색을 통해 3T3L1 지방 세포에서 본 발명의 화합물들이 지방과립의 크기와 수를 감소시키는 효능을 확인한 결과이다.

도 4는 3T3L1 지방 세포(도 4a)와 Hep G2 간 세포(도 4b)에서 면역형광염색법을 통해 본 발명의 화합물들이 리포파지 과정을 활성화하며 활성화된 리포파지 과정이 세포 내 축적된 지방과립의 크기 및 수를 감소시키는 현상을 확인한 결과이다.

도 5는 본 발명의 화합물들이 리포파지 과정을 통해 지방과립을 제거하였음을 검증하기 위해, 본 발명의 화합물과 리포파지 작용의 억제제인 Bafilomycin을 함께 처리하여 지방과립의 제거가 일어나지 않음을 확인한 결과이다.

도 6은 본 발명의 화합물의 항비만 효과를 생체 수준에서 확인하기 위해 야생형 생쥐에 고지방사료의 공급을 통해 비만을 유도하며 위약과 본 발명에 따른 화합물을 처리한 뒤 체중 및 복부 지방 조직의 크기가 감소하였음을 확인한 결과이다.

도 7은 위약과 본 발명의 화합물 처리에 의한 각각의 체중 변화를 주차별로 기록하여 나타낸 결과이다.

도 8은 본 발명의 화합물의 처리에 의해 나타난 체중 감소 효과가 지방조직 무게의 감소로부터 기인한 것임을 확인하기 위해 각 조직의 무게를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 9는 본 발명의 화합물에 의해 감소한 지방 조직의 무게를 그래프를 통해 비교한 결과이다.

도 10은 지방 조직만의 무게가 감소하였음을 확인하기 위해 적출한 각 조직의 실제 모습을 비교한 사진이다. 각 사진에서 좌측이 vehicle을 우측이 본 발명의 화합물을 처리한 것이다.

도 11은 본 발명의 화합물을 통해 감소한 체중의 비율을 나타낸 그래프이다. 또한 투여 기간 중의 발달 정도를 비교하기 위해 신장을 측정한 결과를 나타내었다. 체중 감소 효과가 사료 섭취의 감소에서 기인한 것인지를 판단하기 위해 사료 섭취량을 조사한 결과를 나타내었다.

도 12는 본 발명의 화합물에 의한 체중 감소 효과가 혈중 지질 성분 및 혈당, 조직의 병적 상태를 파악하기 위

해 위약군과 화합물 투여군 생쥐의 혈액을 채취하여 검사한 항목들에 대한 결과이다.

도 13은 본 발명의 화합물에 의해 조직 내 축적된 지방과립의 제거 효과를 확인하기 위해 HnE 염색법을 통해 생쥐의 간 조직을 관찰한 결과이다. 노란색의 화살표로 표시된 흰색의 원형 구조물들이 지방과립을 나타낸다.

도 14는 본 발명의 화합물에 의해 지방 세포의 크기가 감소하였음을 확인하기 위해 HnE 염색법을 통해 생쥐의 지방 조직을 관찰한 결과이다. 푸른색의 화살표와 검은색 및 노란색의 점으로 표시된 구조물들이 지방 조직내의 지방 세포들을 나타낸다.

도 15는 본 발명의 화합물에 의해 나타난 체중 감소 및 지방 과립의 감소 효과가 리포파지 작용에 의한 것임을 확인하기 위해 조직면역화학염색법을 통해 리포파지 활성의 표지자인 LC3 단백질의 발현 양상을 확인한 결과이다.

도 16은 과도한 지방 과립의 축적에 의해 야기되는 간 조직 내의 염증 증상에 있어 본 발명의 화합물의 완화 효과를 관찰하기 위해 조직면역화학염색법을 통해 염증세포인 대식세포의 발현 양상을 관찰한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0090]

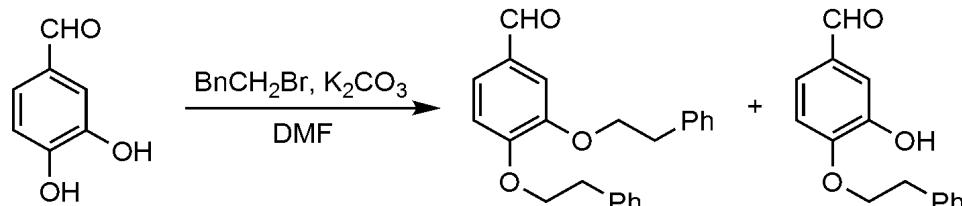
이하, 본 발명의 실시예 및 실험예에 대해 상세히 설명한다. 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0092]

실시예 1: 2-(3,4-디펜에톡시벤질아미노)에탄올 염산염의 제조

[0093]

단계 1) 3,4-디펜에톡시벤즈알데하이드 및 3-하이드록시-4-펜에톡시벤즈알데하이드의 제조



[0094]

3,4-디하이드록시벤즈알데하이드(0.50 g, 3.62 mmol) 용액을 DMF(10 mL)로 희석하며 교반하였다. (2-브로모에틸)벤젠(1.24 mL, 9.05 mmol)을 천천히 첨가하고 무수 K_2CO_3 (2.5 g, 18.1 mmol)를 첨가하였다. 상기 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하고 K_2CO_3 (2.4 g, 17.3 mmol)를 더 첨가하고 70°C로 30분간 가열한 후 실온으로 냉각시켰다. 혼합물을 물 및 에테르(각각 120 mL) 사이로 분할하였다. 유기층을 분리하고 물층을 에테르(3×50 mL)로 추출하였다. 추출된 유기층을 물(2×50 mL)로 세척하고 NaCl 수용액(50 mL)으로 포화시켰다. 연담황색 추출물을 무수 황산나트륨에서 건조시키고 헥세인(75 mL)으로 세척한 후 농축하였다. 생성된 잔류물을 에틸 아세테이트:헥세인(1:4)을 이용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 크림색의 고체 3,4-디펜에톡시벤즈알데하이드(6.57 g, 95%) 및 크림색의 고체 3-하이드록시-4-펜에톡시벤즈알데하이드를 각각 제조하였다.

[0096]

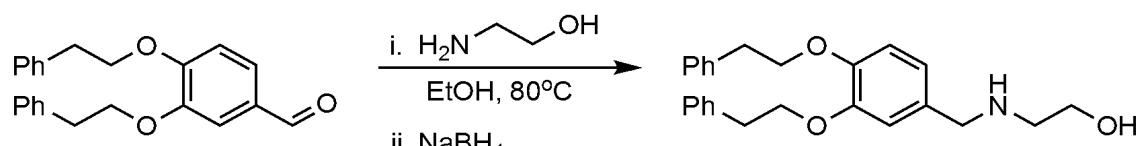
3-하이드록시-4-펜에톡시벤즈알데하이드: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ 9.78 (s, 1H), 7.22-7.40 (m, 12H), 6.91 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz), 4.23 (td, 4H, $J = 3.0$ and 6.0 Hz), 3.15 (td, 4H, $J = 3.0$ and 6.0 Hz); ESI MS: m/z 243.17 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0097]

3,4-디펜에톡시벤즈알데하이드: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ 9.84 (s, 1H), 7.26-7.43 (m, 7H), 6.96 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 5.62 (s, 1H), 4.36 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.17 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz); ESI MS: m/z 347.33 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0099]

단계 2) 2-(3,4-디펜에톡시벤질아미노)에탄올의 제조



[0100]

[0101] 에탄올(5 mL) 중의 앞서 단계 1에서 제조한 3,4-디펜에톡시벤즈알데하이드(100 mg, 0.3 mmol)에 2-아미노에탄올(27 mg (27 μ L), 0.45 mmol)을 첨가하여 교반하였다. 80°C에서 12시간 동안 교반한 후 실온으로 냉각하였다. NaBH₄(17 mg, 0.45 mmol)를 첨가하고 추가로 12시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 중에서 증발시키고 잔류물을 물에 용해시킨 후 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 결합하고 Na₂SO₄로 건조하였으며 진공 중에서 증발시켰다. 잔류물을 플래쉬 컬럼으로 정제하여 2-(3,4-디펜에톡시벤질아미노)에탄올(96 mg, 85%)을 제조하였다.

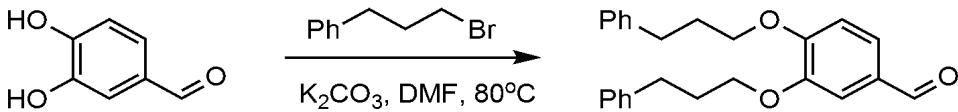
[0102] ESI MS: m/z 392.92 [M+H]⁺

[0104] 단계 3) 2-(3,4-디펜에톡시벤질아미노)에탄올 염산염의 제조

[0105] 앞서 단계 2에서 제조한 2-(3,4-디펜에톡시벤질아미노)에탄올(1.0 g, 2.75 mmol)을 메탄올(25 mL)에 용해시키고 HCl 가스를 1시간 동안 주입하였다. 혼합물을 2시간 동안 더 교반하고 약 1 mL로 증발시킨 후 헥세인을 첨가하여 고체를 제조하고 여과하고 건조하여 최종 화합물 2-(3,4-디펜에톡시벤질아미노)에탄올 염산염(720 mg, 65%)를 제조하였다.

[0107] 실시예 2: 2-(3,4-비스(3-페닐프로포시)벤질아미노)에탄올 염산염의 제조

[0108] 단계 1) 3,4-비스(3-페닐부록시)벤즈알데하이드의 제조

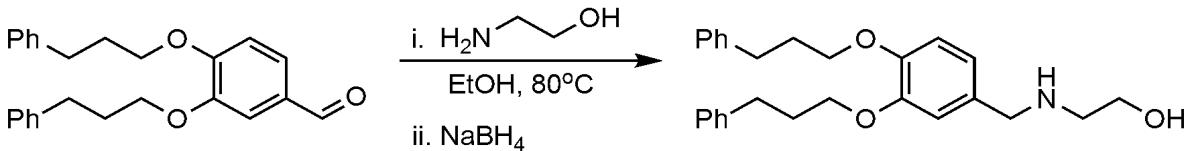


[0109]

[0110] 3,4-디하이드록시벤즈알데하이드(500 mg, 3.62 mmol)을 DMF(10 mL)로 희석하고 무수 K₂CO₃(1.5 g, 10.86 mmol) 및 (3-브로모프로필)벤젠(1.2 mL, 7.96 mmol)을 차례로 천천히 첨가하였다. 혼합물을 80°C까지 가열하고 2시간 동안 교반한 후 실온으로 냉각하였다. 혼합물을 물 및 에테르(각각 50 mL) 사이로 분할하고, 유기층을 분리하고 물을 에테르(3×50 mL)로 추출하였다. 추출된 유기층을 물(2×50 mL)로 세척하고 NaCl 수용액(50 mL)으로 포화시켰다. 연 담황색의 추출물을 무수 황산나트륨에서 건조시키고 헥세인(75 mL)으로 세척한 후 농축시켰다. 잔류물은 에틸아세테이트:헥세인(1:4)을 이용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 크림색 고체인 3,4-비스(3-페닐부록시)벤즈알데하이드(1.3 g, 96%)를 제조하였다.

[0111] ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 9.86 (s, 1H), 7.45 (dd, 1H, J = 3.0 and 9.0 Hz), 7.41 (d, 1H, J = 3.0 Hz), 7.22-7.34 (m, 10H) 6.95 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 4.12 (td, 4H, J = 3.0 and 9.0 Hz), 2.87 (td, 4H, J = 3.0 and 9.0 Hz), 2.17-2.28 (m, 4H).

[0113] 단계 2) 2-(3,4-비스(3-페닐프로포시)벤질아미노)에탄올의 제조



[0114]

[0115] 에탄올(5 mL) 중의 앞서 단계 1에서 제조한 3,4-비스(3-페닐프로포시)벤즈알데하이드(100 mg, 0.27 mmol)에 2-아미노에탄올(25 mg (25 μ L), 0.40 mmol)을 교반하여 첨가하고 60°C에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 실온까지 냉각하고 NaBH₄(15.2 mg, 0.40 mmol)를 천천히 첨가하고 12시간 동안 더 교반하였다. 용매를 진공에서 증발시키고 잔류물을 물에 녹이고 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 결합하고 Na₂SO₄로 건조시킨 후 여과하고 진공에서 증발시켰다. 잔류물을 플래쉬 컬럼으로 정제하여 2-(3,4-비스(3-페닐프로포시)벤질아미노)에탄올(96 mg, 86%)을 제조하였다.

[0116] ESI MS: m/z 421.0 [M+2H]⁺

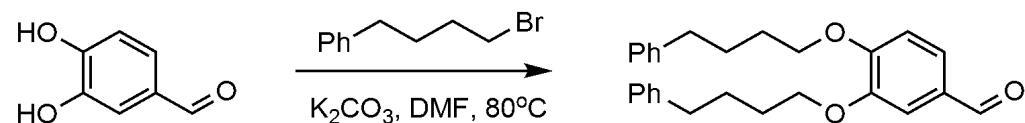
[0118] 단계 3) 2-(3,4-비스(3-페닐프로포시)-벤질아미노)에탄올 염산염의 제조

[0119] 앞서 단계 2에서 제조한 2-(3,4-비스(3-페닐프로포시)벤질아미노)에탄올(1.0 g, 2.75 mmol)을 메탄올(25 mL)에 용해시키고 HCl 가스를 1시간 동안 주입하였다. 혼합물을 2시간 동안 추가로 교반하고 약 1 mL로 증발시키고 헥

세인을 첨가하여 고체를 얻고 여과하고 건조하여 2-(3,4-비스(3-페닐프로록시)-벤질아미노)에탄올을 염산염(720 mg, 65%)을 제조하였다.

[0121] 실시예 3: 2-(3,4-비스(4-페닐부록시)벤질아미노)에탄올의 제조

[0122] 단계 1) 3,4-비스(4-페닐부록시)벤즈알데하이드의 제조

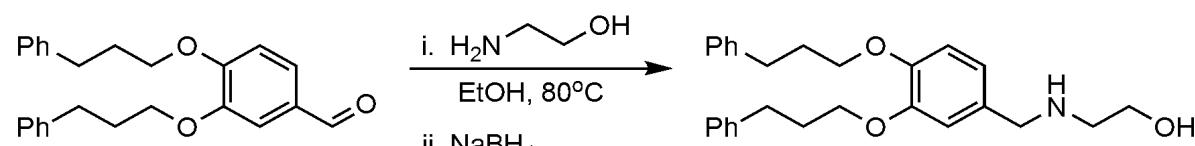


[0124] 3,4-디하이드록시벤즈알데하이드(147 mg, 1.07 mmol)을 DMF(10 mL)로 희석하고 무수 K_2CO_3 (442 mg, 3.20 mmol) 및 (4-브로모부틸)벤젠(0.4 mL, 2.35 mmol)을 차례로 천천히 첨가하였다. 혼합물을 80°C까지 가열하고 2시간 동안 교반한 후 실온으로 냉각하였다. 혼합물을 물 및 에테르(각각 50 mL) 사이로 분할하고, 유기층을 분리하고 물을 에테르(3×50 mL)로 추출하였다. 추출된 유기층을 물(2×50 mL)로 세척하고 $NaCl$ 수용액(50 mL)으로 포화시켰다. 연 담황색의 추출물을 무수 황산나트륨에서 건조시키고 헥세인(75 mL)으로 세척한 후 농축시켰다. 잔류물을 메탄올(1% to 5% in DCM)을 이용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 크림색 고체인 3,4-비스(4-페닐부록시)벤즈알데하이드(398 mg, 93%)를 제조하였다.

[0125] 1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 7.46–7.26 (m, 10H), 6.84 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 6.59 (d, 1H, J = 3.0 Hz), 6.38 (dd, 1H, J = 3.0 and 9.0 Hz), 5.12 (s, 1H), 5.07 (s, 1H), 4.03 (td, 1H, J = 3.6 and 5.1 Hz), 3.93–3.86 (m, 2H), 3.25 (s, 2H), 2.92–2.86 (m, 2H), 2.72 (dd, 1H, J = 8.1 and 12.0 Hz), 1.12 (d, 6H, J = 6.3 Hz)

[0126] ESI MS m/z: 496 [$M+H$]⁺

[0128] 단계 2) 2-(3,4-비스(4-페닐부록시)벤질아미노)에탄올의 제조

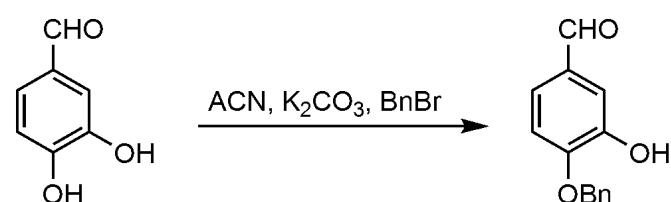


[0130] 에탄올(5 mL) 중의 앞서 단계 1에서 제조한 3,4-비스(4-페닐부록시)벤즈알데하이드(0.35 g, 0.87 mmol)에 2-아미노에탄올(106 mg, 1.74 mmol)을 교반하며 첨가하고 60°C에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 실온까지 냉각하고 $NaBH_4$ (33 mg, 0.87 mmol)를 천천히 첨가하고 12시간 동안 더 교반하였다. 용매를 진공에서 증발시키고 잔류물을 물에 녹이고 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 결합하고 Na_2SO_4 로 건조시킨 후 여과하고 진공에서 증발시켰다. 잔류물을 플래쉬 컬럼으로 정제하여 2-(3,4-비스(4-페닐부록시)벤질아미노)에탄올(0.33 g, 85%)을 제조하였다.

[0131] ESI MS: m/z 449.0 [$M+2H$]⁺

[0133] 실시예 4: 2-(벤질옥시)-5-((2-하이드록시에틸아미노)메틸)페놀 염산염의 제조

[0134] 단계 1) 4-벤질옥시-3-하이드록시벤즈알데하이드의 제조



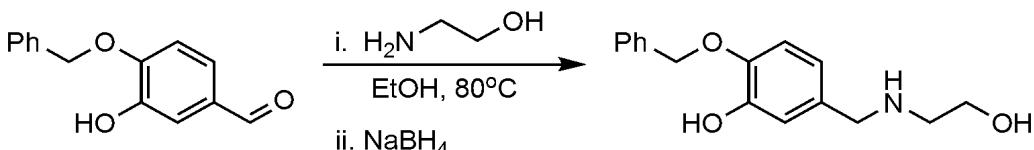
[0136] 불활성 가스(N_2) 분위기 하의 실온에서 무수 아세토니트릴(30 mL) 중의 3,4-디하이드록시벤즈알데하이드(2.5 g, 18.1 mmol) 용액에 교반하면서 K_2CO_3 (2.5 g, 18.1 mmol)를 첨가하고, 벤질브로마이드(3.44 mL, 29.0 mmol)를 천

천히 첨가하였다. 가열하며 환류하며 2시간 동안 교반하여 반응을 진행하였다. 반응 용매를 감압 증발시킴으로써 제거하고 결과물에 차가운 10% NaOH 용액을 첨가하고 10분 동안 교반한 후, 에틸 아세테이트(100 mL)를 첨가하였다. 생성된 이상(biphasic)의 혼합물을 분리하고 수성층을 4N HCl로 산성화시키고 DCM(3×300 mL)으로 추출하였다. 유기층을 염수, 및 물로 세척하고 Na_2SO_4 에서 건조시키고 감압 농축하여 잔류물을 수득하고, 에틸 아세테이트로 결정화하여 정제함으로써 흰색 분말의 4-벤질옥시-3-하이드록시벤즈알데하이드(2.90 g, 70 %)를 제조하였다.

[0137] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 9.83 (s, 1H, CHO), 7.39–7.46 (m, 7H, ArH), 7.03 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, ArH), 5.88 (s, 1H, OH), 5.20 (s, 2H, OCH_2Ph)

[0138] ESI MS: m/z 229.25 [$\text{M}+\text{H}]^+$

[0140] 단계 2) 2-(벤질옥시)-5-((2-하이드록시에틸아미노)메틸)페놀의 제조



[0141] [0142] 에탄올(5 mL) 중의 앞서 단계 1에서 제조한 4-(벤질옥시)-3-하이드록시벤즈알데하이드(200 mg, 0.88 mmol)를 교반하면서 2-아미노에탄올(81 mg (80 μL), 1.32 mmol)을 첨가하고 60°C에서 12시간 동안 교반한 후 실온으로 냉각하였다. NaBH_4 (50 mg, 1.32 mmol)를 천천히 첨가하고 12시간 동안 더 교반하였다. 용매를 진공 상태에서 증발시키고 잔류물을 물에 녹이고 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 결합하고 Na_2SO_4 로 건조시킨 후 여과하고 진공에서 증발시켰다. 잔류물을 플래쉬 컬럼으로 정제하여 2-(벤질옥시)-5-((2-하이드록시에틸아미노)메틸)페놀(0.22 g, 92%)을 제조하였다.

[0143] ESI MS: m/z 274.75 [$\text{M}+\text{H}]^+$

[0145] 단계 3) 2-(벤질옥시)-5-((2-하이드록시에틸아미노)메틸)페놀 염산염의 제조

[0146] 앞서 단계 2에서 제조한 2-(벤질옥시)-5-((2-하이드록시에틸아미노)메틸)페놀(1.0 g, 2.75 mmol)을 메탄올(25 mL)에 용해시키고 1시간 동안 HCl 가스를 주입하였다. 혼합물을 2시간 동안 교반하고 약 1 mL로 증발시킨 후 헥세인을 첨가하여 고체를 수득하고, 여과하고 건조하여 2-(벤질옥시)-5-((2-하이드록시에틸아미노)메틸)페놀 염산염(720 mg, 65%)을 제조하였다.

[0148] 실시예 5: 2-(4-(벤질옥시)-3-펜에톡시벤질아미노)에탄올 염산염의 제조

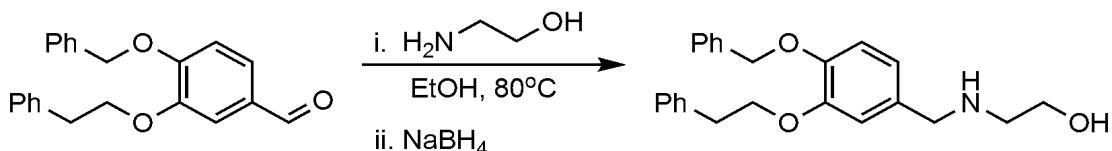
[0149] 단계 1) 4-(벤질벤질옥시)-3-펜에톡시벤즈알데하이드의 제조



[0150] [0151] 4-(벤질벤질옥시)-3-하이드록시벤즈알데하이드(0.50 g, 2.19 mmol)를 DMF(10 mL)로 희석시키고 무수 K_2CO_3 (604 mg, 4.38 mmol) 및 (2-브로모에틸)벤젠(0.36 mL, 2.63 mmol)을 차례로 천천히 첨가하였다. 혼합물을 70°C에서 2시간 동안 가열하고 실온까지 냉각하였다. 혼합물을 물 및 에테르(각각 20 mL) 사이로 분할하고 유기층을 분리하고 물층을 에테르(3×20 mL)로 추출하였다. 추출된 유기층을 물(2×20 mL)로 세척하고 NaCl 수용액(20 mL)으로 포화시켰다. 연 담황색 추출물을 무수 황산나트륨에서 건조시키고 농축하였다. 잔존물을 에틸 아세테이트:헥세인(1:9)을 이용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 크림색 고체인 4-(벤질벤질옥시)-3-펜에톡시벤즈알데하이드(0.66 g, 90%)를 제조하였다.

[0152] ^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 9.80 (s, 1H), 7.21–7.39 (m, 12H), 6.98 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz), 5.17 (s, 2H), 4.27 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.14 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz)

[0154] 단계 2) 2-(4-(벤질옥시)-3-펜에톡시벤질아미노)에탄올의 제조



[0155]

[0156] 에탄올(5 mL) 중의 앞서 단계 1에서 제조한 4-(벤질벤질옥시)-3-펜에톡시벤즈알데하이드(100 mg, 0.30 mmol) 용액에 2-아미노에탄올(22 mg (22 μL), 0.36 mmol)을 첨가하고 교반하였다. 반응 혼합물을 60°C에서 12시간 동안 교반하고 실온까지 냉각시켰으며 NaBH_4 (17.1 mg, 0.45 mmol)를 교반하면서 천천히 첨가하고 12시간 동안 추가로 교반하였다. 용매를 진공에서 증발시키고 잔류물을 물에 용해시키고 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 결합하고 Na_2SO_4 로 건조시킨 후 여과하고 진공에서 증발시켰다. 잔류물을 플래쉬 컬럼으로 정제하여 2-(4-(벤질옥시)-3-펜에톡시벤질아미노)에탄올(0.10 g, 90%)을 제조하였다.

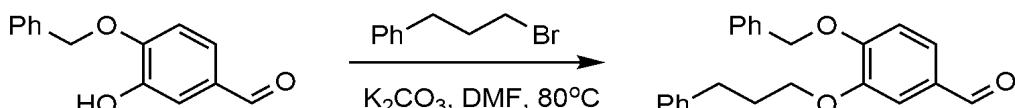
[0157] ESI MS: m/z 378.9 [M+H]⁺

[0159] 단계 3) 2-(4-(벤질옥시)-3-펜에톡시벤질아미노)에탄올 염산염의 제조

[0160] 앞서 단계 2에서 제조한 2-(4-(벤질옥시)-3-펜에톡시벤질아미노)에탄올(1.0 g, 2.75 mmol)를 메탄올(25 mL)에 용해시키고 HCl 가스를 1시간 동안 주입하였다. 2시간 동안 교반하고 약 1 mL로 증발시킨 후 헥세인을 첨가하여 고체를 수득하고, 이를 여과하고 건조하여 2-(4-(벤질옥시)-3-펜에톡시벤질아미노)에탄올 염산염(720 mg, 65%)을 제조하였다.

[0162] 실시예 6: 2-(4-(벤질옥시)-3-(3-페닐프로포ksi)벤질아미노)에탄올 염산염의 제조

[0163] 단계 1) 4-(벤질벤질옥시)-3-(3-페닐프로포ksi)벤즈알데하이드의 제조

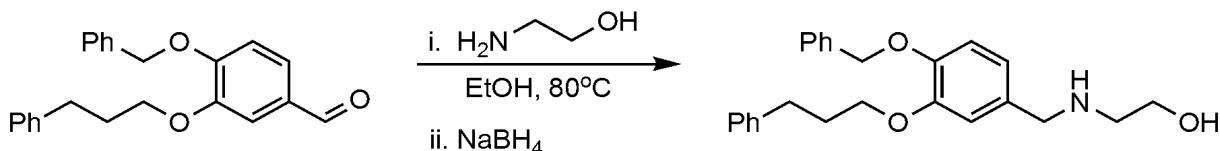


[0164]

[0165] 4-(벤질벤질옥시)-3-하이드록시벤즈알데하이드(0.50 g, 2.19 mmol)를 DMF(10 mL)으로 희석시키고 무수 K_2CO_3 (604 mg, 4.38 mmol) 및 (3-브로모프로필)벤젠(0.4 mL, 2.63 mmol)을 차례로 천천히 첨가하였다. 혼합물을 70°C에서 2시간 동안 가열하고 실온까지 냉각하였다. 혼합물을 물 및 에테르(각각 20 mL) 사이로 분할하고 유기 층을 분리하고 물층을 에테르(3×20 mL)로 추출하였다. 추출된 유기층을 물(2×20 mL)로 세척하고 NaCl 수용액(20 mL)으로 포화시켰다. 연 담황색 추출물을 무수 황산나트륨에서 건조시키고 농축하였다. 잔존물을 에틸 아세테이트:헥세인(1:9)을 이용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 크림색 고체인 4-(벤질벤질옥시)-3-(3-페닐프로포ksi)벤즈알데하이드(0.68 g, 90%)를 제조하였다.

[0166] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ 9.81 (s, 1H), 7.18–7.38 (m, 12H), 7.00 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 5.23 (s, 2H), 4.09 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.14 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 2.12–2.22 (m, 2H)

[0168] 단계 2) 2-(4-(벤질옥시)-3-(3-페닐프로포ksi)벤질아미노)에탄올의 제조



[0169]

[0170] 에탄올(5 mL) 중의 앞서 단계 1에서 제조한 4-(벤질벤질옥시)-3-(3-페닐프로포ksi)벤즈알데하이드(100 mg, 0.29 mmol)에 2-아미노에탄올(22 mg (22 μL), 0.36 mmol)을 첨가하여 교반하였다. 60°C에서 12시간 동안 교반한 후 실온으로 냉각하였다. NaBH_4 (16.7 mg, 0.44 mmol)를 천천히 첨가하고 추가로 12시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 중에서 증발시키고 잔류물을 물에 용해시킨 후 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 결합하고 Na_2SO_4 로 건조시킨 후 여과하고 진공에서 증발시켰다. 잔류물을 플래쉬 컬럼으로 정제하여 2-(4-(벤질옥시)-3-(3-페닐프

로폭시)벤질아미노)에탄올(93 mg, 82%)을 제조하였다.

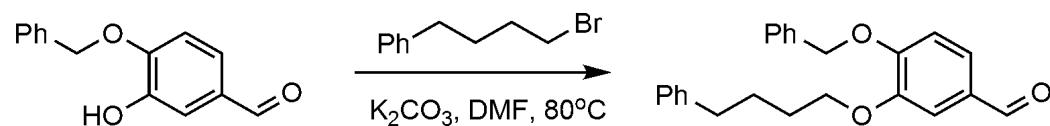
[0171] ESI MS: m/z 392.92 [M+H]⁺

[0173] 단계 3) 2-(4-(벤질옥시)-3-(3-페닐프로폭시)벤질아미노)에탄올 염산염의 제조

[0174] 앞서 단계 2에서 제조한 2-(4-(벤질옥시)-3-(3-페닐프로폭시)벤질아미노)에탄올(1.0 g, 2.75 mmol)을 메탄올(25 mL)에 용해시키고 HCl 가스를 1시간 동안 주입하였다. 혼합물을 2시간 동안 더 교반하고 약 1 mL로 증발시킨 후 헥세인을 첨가하여 고체를 수득하고 여과하고 건조하여 2-(4-(벤질옥시)-3-(3-페닐프로폭시)벤질아미노)에탄올 염산염(720 mg, 65%)을 제조하였다.

[0176] 실시예 7: 2-(4-(벤질옥시)-3-(4-페닐부톡시)벤질아미노)에탄올의 제조

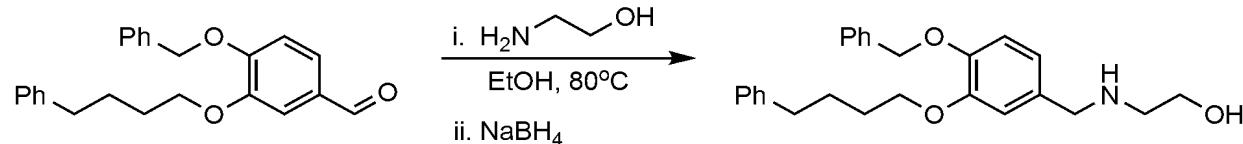
[0177] 단계 1) 4-(벤질벤질옥시)-3-(4-페닐부톡시)벤즈알데하이드의 제조



[0178] [0179] 4-(벤질벤질옥시)-3-하이드록시벤즈알데하이드(0.50 g, 2.19 mmol)를 DMF(10 mL)으로 희석시키고 무수 K_2CO_3 (604 mg, 4.38 mmol) 및 (4-브로모프로필)벤젠(0.46 mL, 2.63 mmol)을 차례로 천천히 첨가하였다. 혼합물을 70°C에서 2시간 동안 가열하고 실온까지 냉각하였다. 혼합물을 물 및 에테르(각각 20 mL) 사이로 분할하고 유기층을 분리하고 물층을 에테르(3×20 mL)로 추출하였다. 추출된 유기층을 물(2×20 mL)로 세척하고 $NaCl$ 수용액(20 mL)으로 포화시켰다. 연 담황색 추출물을 무수 황산나트륨에서 건조시키고 농축하였다. 잔존물을 에틸 아세테이트:헥세인(1:9)을 이용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 크림색 고체인 4-(벤질벤질옥시)-3-(4-페닐부톡시)벤즈알데하이드(0.69 g, 88%)를 제조하였다.

[0180] 1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 9.86 (s, 1H), 7.29–7.48 (m, 8H), 7.22–7.24 (m, 3H), 7.03 (d, 1H, J = 6.0 Hz), 5.25 (s, 2H), 4.14 (t, 2H, J = 6.0 Hz), 2.74 (t, 2H, J = 6.0 Hz), 1.87–1.94 (m, 4H)

[0182] 단계 2) 2-(4-(벤질옥시)-3-(4-페닐부톡시)벤질아미노)에탄올의 제조



[0183] [0184] 에탄올(5 mL) 중의 앞서 단계 1에서 제조한 4-(벤질벤질옥시)-3-(4-페닐부톡시)벤즈알데하이드(100 mg, 0.28 mmol)에 2-아미노에탄올(25.6 mg (25 μ L), 0.42 mmol)을 첨가하여 교반하였다. 60°C에서 12시간 동안 교반한 후 실온으로 냉각하였다. $NaBH_4$ (16 mg, 0.42 mmol)를 천천히 첨가하고 추가로 12시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 중에서 증발시키고 잔류물을 물에 용해시킨 후 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 결합하고 Na_2SO_4 로 건조시킨 후 여과하고 진공에서 증발시켰다. 잔류물을 플래쉬 컬럼으로 정제하여 2-(4-(벤질옥시)-3-(4-페닐부톡시)벤질아미노)에탄올(99 mg, 89%)을 제조하였다.

[0185] 1H NMR (CD_3OD , 300 MHz): δ 7.44–7.41 (m, 2H), 7.32–7.14 (m, 8H), 7.05 (d, 1H, J = 1.8 Hz), 7.00 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 6.90 (dd, 1H, J = 1.8 & 8.1 Hz), 5.10 (s, 2H), 4.09–4.05 (m, 2H), 3.90 (s, 2H), 3.72 (t, 2H, J = 5.4 Hz), 2.88 (t, 2H, J = 5.4 Hz), 2.70–2.65 (m, 2H), 1.85–1.81 (m, 4H)

[0186] LC-MS (ESI): m/z 406 ($M + H$)⁺ and 345 ($M - 60$)⁺

[0188] 실험예 1: o11 red 0 염색법을 통한 3T3-L1 지방전구 세포에서 본 화합물의 지방 과립 제거 효과 분석

[0189] 본 발명의 화합물들이 세포 내에 축적된 지방 과립을 감소시키는 효과를 평가하기 위하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.

[0191] 지방전구세포 3T3-L1을 한국 세포주 은행으로부터 구입하였고, 10% 신생우아혈청(NCS, Invitrogen

Corporation, Auckland, New Zealand)과 고 글루코오스 DMEM(high glucose Dulbecco's modified Eagle's Medium, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)에 배양하고 유지하였다. 지방 세포로 분화시키기 위해서 10만개 세포 /ml 밀도의 3T3-L1을 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS)과 고 글루코오스 DMEM으로 2일 동안 세포를 밀집(confluence) 시킨 후, 0.5 mM IBMX(3-isobutyl-1-methyl xanthine), 0.5 μM 덱사메타손(dexamethasone), 5 μg/ml 인슐린(MDI)을 첨가한 10% FBS/고 글루코오스 DMEM을 넣어 2일 동안 배양하고 5 μg/ml 인슐린(I)만 첨가한 10% FBS/고 글루코오스 DMEM에 4일 더 배양한 후에, 10% FBS/고 글루코오스 DMEM 만을 넣어 다시 6일을 더 배양하여, 총 10일 동안 배양하여 지방 세포로 분화시켰다. 세포를 밀집시켜 배양 시킨 후에 배지를 갈아줄 때마다 화합물들을 10 μM의 농도로 처리하였다. 분화 10일째 배양 세포를 4% 파라포름알데하이드로 고정시킨 후, Oil Red O 염색 용액으로 염색하였다. Oil Red O 염색용액은 0.5 g/200 ml 이소프로판올의 표준 용액(stock solution)을 60%로 중류수로 희석하여 염색하고 400X 배율에서 현미경 관찰을 하였으며, 결과는 도 1에 나타내었다.

[0193] 도 1에서, 붉은색 원형의 구조물이 세포 내 축적된 지방 과립을 나타낸다. 도 1에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 화합물 처리에 의해 지방 과립의 크기와 수가 감소함을 나타내며, 따라서 본 발명에 따른 화합물은 3T3-L1 지방전구세포에서 지방 과립 제거 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

실험 예 2: Oil red O 염색법을 통한 Hep G2 간 세포에서 본 화합물의 지방 과립 제거 효과 분석

[0196] 본 발명의 화합물들이 간 세포 내에 축적된 지방 과립을 제거하는 효과를 평가하기 위해 하기와 같이 실험을 수행하였다.

[0198] 구체적으로, Hep G2 세포를 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, Hyclone, 미국), 100 U/ml 페니실린(penicillin), 100 mg/ml 스트렙토마이신(streptomycin, Hyclone, 미국)이 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였고, 세포가 50% 정도 찼을 때 세포 내 지방 축적을 유도하기 위해 1 mM의 oleic acid와 0.5 mM의 palmitic acid가 혼합된 DMEM 배지로 교체하여 24시간을 배양한 뒤, 본 발명을 통해 합성된 각각의 화합물들이 10 μM 포함된 DMEM 배지로 교체하여 24시간을 추가로 배양하였다. 종료 후 세포를 4% 파라포름알데하이드로 10 분간 고정시킨 후 PBS로 세 번 세척하였다. 그 후 세포를 60% 이소프로판올로 행군 뒤, 희석된 오일 레드 오 용액(stock solution, 3 mg/ml in isopropanol; working solution, 60% Oil Red O stock solution diluted in water)으로 1시간 동안 염색하였다. Oil Red O 염색 용액으로 염색하였다. Oil Red O 염색용액은 0.5 g/200 ml 이소프로판올의 표준 용액(stock solution)을 60%로 중류수로 희석하여 염색하고 400X 배율에서 현미경 관찰을 하였으며 결과는 도 2에 나타내었다.

[0200] 도 2에서, 붉은색 원형의 구조물이 세포 내 축적된 지방 과립을 나타낸다. 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 화합물 처리에 의해 지방 과립의 크기와 수가 감소함을 나타내며, 따라서 본 발명에 따른 화합물은 Hep G2 간 세포에서 지방 과립 제거 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

실험 예 3: BODIPY 염색법을 통한 3T3-L1 지방전구 세포 및 Hep G2 간 세포에서 본 화합물의 지방 과립 제거 효과 분석

[0203] 본 발명의 화합물들이 세포 내에 축적된 지방 과립을 감소시키는 효과를 면역형광염색법을 통하여 평가하기 위하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.

[0205] 지방전구세포 3T3-L1을 한국 세포주 은행으로부터 구입하였고, 10% 신생우아혈청(NCS, Invitrogen Corporation, Auckland, New Zealand)과 고 글루코오스 DMEM(high glucose Dulbecco's modified Eagle's Medium, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)에 배양하고 유지하였다. 지방 세포로 분화시키기 위해서 10만개 세포 /ml 밀도의 3T3-L1을 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS)과 고 글루코오스 DMEM으로 2일 동안 세포를 밀집(confluence) 시킨 후, 0.5 mM IBMX(3-isobutyl-1-methyl xanthine), 0.5 μM 덱사메타손(dexamethasone), 5 μg/ml 인슐린(MDI)을 첨가한 10% FBS/고 글루코오스 DMEM을 넣어 2일 동안 배양하고 5 μg/ml 인슐린(I)만 첨가한 10% FBS/고 글루코오스 DMEM에 4일 더 배양한 후에, 10% FBS/고 글루코오스 DMEM 만을 넣어 다시 6일을 더 배양하여, 총 10일 동안 배양하여 지방 세포로 분화시켰다. 세포를 밀집시켜 배양 시킨 후에 배지를 갈아줄 때마다 화합물들을 10 μM의 농도로 처리하였다. 분화 10일째 배양 세포를 4% 포름알데하이드로 고정시킨 후, 지방과립의 표지자인 BODIPY를 이용하여 지방과립을 염색하고 DAPI 염색을 통해 세포의 핵을 표지하였다. 결과는 도 3에 나타내었다.

[0207] 도 3에서, 녹색의 원형 구조물이 세포 내 축적된 지방과립을 나타내며 본 발명에 따른 화합물 처리에 의해 크기와 수가 감소됨을 나타낸다. 따라서, 본 발명에 따른 화합물은 지방전구세포에서 지방 과립 제거 효과가 있음을

확인할 수 있었다.

[0209] 실험 예 4: 본 발명의 화합물들의 3T3L1 지방 세포 및 Hep G2 간 세포에서 리포파지 작용에 의한 지방 과립 제거 효과 분석

[0210] 본 발명의 화합물들에 의해 제거된 세포 내 지방 과립이 리포파지 작용에 의해 감소하였음을 확인하기 위해 이하의 실험을 수행하였다.

[0212] 지방전구세포 3T3-L1을 한국 세포주 은행으로부터 구입하였고, 10% 신생우아혈청(NCS, Invitrogen Corporation, Auckland, New Zealand)과 고 글루코오스 DMEM(high glucose Dulbecco's modified Eagle's Medium, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)에 배양하고 유지하였다. 지방 세포로 분화시키기 위해서 10만개 세포 /ml 밀도의 3T3-L1을 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS)과 고 글루코오스 DMEM으로 2일 동안 세포를 밀집(confluence) 시킨 후, 0.5 mM IBMX(3-isobutyl-1-methyl xanthine), 0.5 μ M 덱사메타손(dexamethasone), 5 μ g/ml 인슐린(MDI)을 첨가한 10% FBS/고 글루코오스 DMEM을 넣어 2일 동안 배양하고 5 μ g/ml 인슐린(I)만 첨가한 10% FBS/고 글루코오스 DMEM에 4일 더 배양한 후에, 10% FBS/고 글루코오스 DMEM 만을 넣어 다시 6일을 더 배양하여, 총 10일 동안 배양하여 지방 세포로 분화시켰다. 세포를 밀집시켜 배양 시킨 후에 배지를 갈아줄 때마다 화합물을 10 μ M의 농도로 처리하였다.

[0214] 또한, Hep G2 간 세포를 cover slip이 포함된 24 well cell culture plate에 접종하고 1 mM의 oleic acid와 0.5 mM의 palmitic acid가 혼합된 DMEM 배지에서 24시간 배양하여 지방 축적을 유도한 뒤 각각의 화합물을 10 μ M 처리하여 24시간을 추가로 배양하였다.

[0216] 이후 각 세포를 PBS 용액으로 2회 세척한 뒤 4% 파라포름알데하이드 용액을 이용하여 15분간 고정하고 2% BSA가 함유된 PBS용액에서 1시간 blocking 하였다. Blocking이 완료된 후, 1차 항체와 반응시켰다. 1차 항체 반응은 LC3 rabbit polyclonal antibody(1:300, Sigma-aldrich, USA)를 이용하여 4°C에서 하룻밤 동안 수행하였다. 1 차 항체 반응이 끝난 cover slip을 PBS를 이용하여 2회 세척하고 2차 항체 (1: 500, goat anti rabbit Alexa flour 555, Thermo Fisher, US)를 상온에서 1시간 반응시켰다. 2차 항체 반응 종료 후, PBS로 2회 세척한 뒤, BODIPY 493/503을 상온에서 10분간 반응시킨 뒤 마운팅 매질을 이용하여 slide glass에 마운트하였다. 염색된 세포는 전포卡尔 현미경을 이용하여 이미지를 촬영하였고 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0218] 도 4a에서 녹색의 원형 구조물들은 세포 내 축적된 지방 과립을 나타내는데 3T3-L1 지방전구세포로부터 지방세포로의 분화 과정에 따라 축적되었음을 확인할 수 있다. 지방 세포로의 분화 완료와 함께 본 발명의 화합물을 처리할 경우 위약을 처리한 세포에 비해 리포파지의 활성 정도를 추적할 수 있는 표지자인 붉은색으로 염색된 LC3가 증가한 것을 확인할 수 있다. 또한 지방과립과 LC3의 중첩된 정도를 비교해보면 위약을 처리한 세포에 비해 본 발명의 화합물을 처리할 경우 중첩된 정도가 현저히 증가한 것을 확인할 수 있다. 따라서 3T3-L1 지방세포에 생성된 지방과립이 본 발명에 의한 화합물에 의해 증가된 리포파지 작용을 통해 크기와 수가 감소되었음을 알 수 있었다.

[0220] 또한, 도 4b에서, 녹색의 원형 구조물들은 세포 내 축적된 지방 과립을 나타내는데 지방산의 한 종류인 oleic acid와 palmitic acid를 처리함에 따라 BSA를 처리한 통제군에 비해 지방 과립의 축적이 유도된 것을 확인할 수 있다. Oleic acid와 palmitic acid를 처리한 뒤 본 발명에 따른 화합물을 처리할 경우 리포파지의 활성 정도를 추적 할 수 있는 표지자인 붉은색으로 염색된 LC3가 증가한 것을 확인할 수 있다. 또한 녹색으로 염색된 지방과립의 이미지와 붉은색으로 염색된 LC3의 이미지를 중첩하여 나타낸 이미지를 통해 리포파지의 표지자인 LC3가 지방과립의 표면에 위치해있는 것을 알 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물에 의해 나타난 지방과립의 수와 크기의 감소 효과는 리포파지 작용에 의해 매개되었음을 알 수 있었다.

[0222] 또한, 본 발명에 따른 화합물의 처치에 따른 지방 과립의 제거가 리포파지 작용에 의한 결과임을 확인하기 위해, 지방 전구 세포로부터 분화되어 지방 과립이 축적된 지방 세포에 본 발명에 따른 화합물과 함께 리포파지 작용의 억제제인 Bafilomycin을 5 nM의 농도로 처리한 뒤, 지방 과립의 제거 효과가 나타나지 않음을 확인하여 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0224] 도 5에서, 붉은색 원형 구조물들이 지방과립을 나타내며 본 발명의 화합물에 의해 감소한 지방과립이 bafilomycin을 처리함에 따라 감소하지 않음을 나타낸다. 따라서, 본 발명에 따른 화합물을 처리하였을 경우 지방 과립의 수와 크기의 감소 효과가 나타나지 않음을 보아 본 화합물의 지방 과립 제거 효과는 리포파지 작용에 의해 일어났음을 알 수 있었다.

[0226] 실험예 5: 고지방사료 섭취 생쥐에서 본 발명의 화합물의 체중 감량 효과 분석

실험용 생쥐에 비만을 유도하기 위하여 6주령의 야생형 C57BL6 생쥐를 서울대학교 실험 동물 자원 연구센터로부터 분양 받아, 무선 배정을 통해 일반 사료 섭취 그룹(LFD)과 고 열량 식이 섭취그룹(HFD)으로 나눈 뒤 고지방 섭취 그룹은 다시 위약 처리군과 본 발명의 화합물의 처리군으로 분류하여 총 3개의 그룹으로 나누어 비만 유도 및 화합물 처리를 동시에 진행하였다. 이를 통해 본 화합물이 과도하게 유입되는 지방을 효과적으로 제거하여 비만을 예방할 수 있는지 분석하였다.

구체적으로, 분양 받은 생쥐는 사육 케이지에서 1주일의 적응 기간을 거친 후, 수분의 섭취는 자유롭게 이루어 지도록 하였으며, 사료는 총 열량(4.60 kcal/g)의 60%가 지방으로 구성된 고지방 사료(단백질: 10%, 탄수화물: 30%)와 총 열량(3.8 kcal/g)의 17.2%가 지방으로 구성된 일반 사료(단백질: 18.8%, 탄수화물: 63.9%)를 각각 공급하였다. 비만의 예방 및 치료 효과 등을 평가하기 위해 본 발명의 화합물을 DMSO에 1 μ L/mg (v/w)로 녹인 뒤 PBS에 희석하여 생쥐의 몸무게 1 g 당 20 μ g의 농도로 주 3회 복강 투여하였다. 위약 처리군은 동량의 DMSO를 PBS에 희석하여 투여하였다. 고지방식이 섭취에 따른 체중의 증가 및 본 발명의 화합물 투여에 따른 체중 증가 저해 효과를 평가하기 위하여 주 3회 생쥐의 몸무게를 측정하였고 생쥐의 체내 지방 제거 효과를 검증하기 위해 최종 투여 후 8시간의 공복시간을 포함하여 24시간 뒤 CO₂의 과다 공급을 통한 안락사를 유도하고 개복하여 체지방의 변화를 관찰하였다. 고지방 사료 및 본 발명에 따른 화합물의 투여에 따른 체지방 제거 효과에 대한 결과, 몸무게 변화, 사료 섭취량의 차이 및 신장의 차이는 각각 도 6, 7, 8, 9, 10, 11에 나타내었다.

[0231] 도 6에 나타난 바와 같이 본 발명에 따른 화합물을 투여하였을 경우, 위약 처리군에 비해 축적된 복부 지방의 크기가 현저하게 감소되었음을 확인할 수 있다. 체지방의 현저한 감소는 궁극적으로 체중 감소를 야기하였고 이에 대한 결과는 도 7에서 나타났다.

[0233] 사료의 섭취량에는 유의한 차이가 나타나지 않은 것으로 보아, 도 8 내지 10에 나타난 바와 같이, 백색 지방 조직의 무게 감량으로 인한 체중의 감소가 지방의 체내 유입량의 감소에 의한 현상이 아닌 체내에서 백색 지방 조직의 소멸이 직접 발생하고 있음을 알 수 있었다. 이를 통해 다른 조직에는 영향을 미치지 않으며 지방조직의 무게만을 감소시켰음을 알 수 있었다.

[0235] 또한, 본 발명에 따른 화합물을 통해 감소한 체중의 비율, 신장의 변화, 사료 섭취량의 변화를 도 11에 나타내었다. 이러한 결과는 체중 감소 효과가 사료 섭취의 감소에서 기인한 것인지를 판단하기 위해 사료 섭취량을 조사한 결과이며, 유의한 차이가 나타나지 않았음을 나타내었다.

[0237] 또한, 본 발명의 화합물에 의한 체중 감소 효과가 혈중 지질 성분 및 혈당, 조직의 병적 상태를 파악하기 위해 위약군과 화합물 투여군 생쥐의 혈액을 채취하여 검사한 항목들에 대한 결과를 도 12에 나타내었다. 이를 통해 혈중 중성 지방의 수치가 유의하게 감소하였음을 확인하였다.

[0239] 실험예 6: HnE 염색법을 이용하여 고지방 사료 섭취 생쥐의 조직에서 본 발명의 화합물의 지방과립 제거 효과 분석

[0240] 본 발명의 화합물에 의해 조직 내 축적된 지방과립의 제거 효과를 확인하기 위해 HnE 염색법을 통해 앞서 실험 예 5의 생쥐의 간 조직을 관찰하여 그 결과를 도 13에 나타내었다. 도 13에서 노란색의 화살표로 표시된 흰색의 원형 구조물들이 지방과립을 나타내며 본 발명의 화합물의 처리에 의해 간 세포 내에 축적된 지방과립의 크기와 수가 감소하였음을 알 수 있다.

[0242] 본 발명의 화합물에 의해 지방 세포의 크기가 감소하였음을 확인하기 위해 HnE 염색법을 통해 앞서 실험 예 5의 생쥐의 지방 조직을 관찰하여 그 결과를 도 14에 나타내었다. 도 14에서 푸른색의 화살표와 검은색 및 노란색의 점으로 표시된 구조물들이 지방 조직내의 지방 세포들을 나타내며 화합물의 처리에 의해 지방 세포의 크기가 감소하였음을 알 수 있다.

[0244] 실험예 7: 면역조직화학 염색법을 이용하여 리포파지 작용에 의한 지방 과립 제거 효과 분석

[0245] 앞서 실험 예 5의 생쥐를 부검하여 간에서 지방 과립의 크기 감소 또는 제거가 일어나는지 면역조직화학염색법을 통해 분석하였다. 면역조직화학염색법을 위해 사용된 염색 용액은 Sigma-aldrich로부터 구입하였다. 모든 과정은 실온에서 파리핀에 포매시킨 간 조직의 5 μ m 절편 상에서 수행되었다. 항원재생은 면역조직화학염색법에 앞서 워터배스로 100°C에서 15분간 포르말린 고정 조직 상에서 수행되었다. 세포내 과산화효소 활성(endogenous peroxidase activity)을 수소 과산화효소로 차단하였다. 일차 항체를 HRP-결합 중 합체로 검출하고 DAB로 현상하였다. 이후 슬라이드를 혜마토자일린으로 대조 염색하고, 다단계 알코올로 탈수시킨 후, 마운팅 매질로 마운

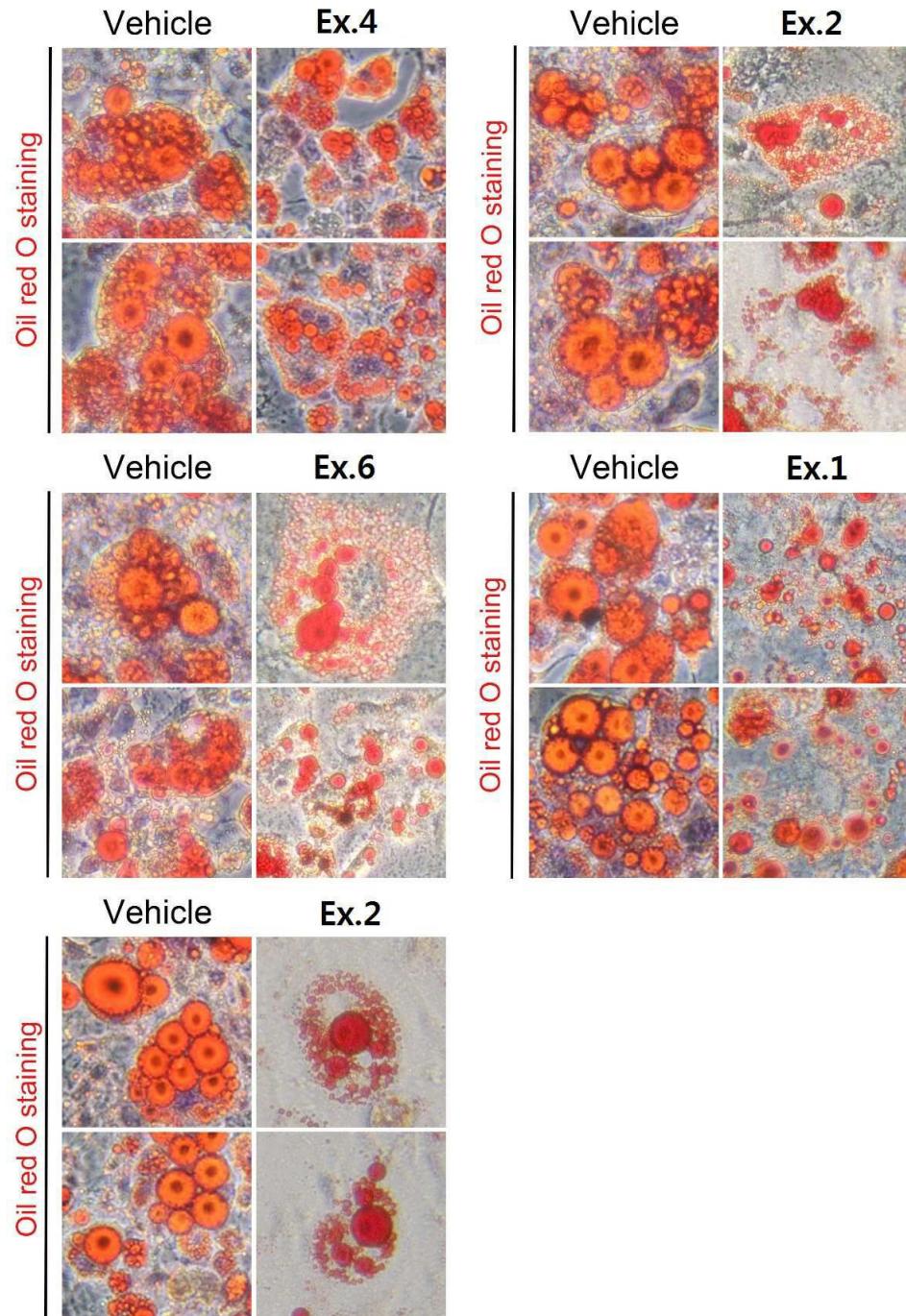
트하였다. 그 결과를 도 15에 나타내었다. 도 15에서, 노란색 사각형으로 표시된 지역에서 지방과립의 표면에 갈색으로 염색된 LC3 단백질이 위치하고 있음을 알 수 있었다. 이를 통해 지방과립의 표면에서 발생하는 리포파지 작용에 의해 직접적으로 지방과립의 제거가 일어나고 있음을 알 수 있었다.

[0247]

또한, 과도한 지방과립의 축적에 의해 야기되는 간 조직 내의 염증증상에 있어 본 발명의 화합물의 완화효과를 관찰하기 위해 조직면역화학염색법을 통해 염증세포인 대식세포의 발현양상을 관찰하여 그 결과를 도 16에 나타내었다. 도 16에서, 갈색으로 표지된 세포들이 대식세포를 나타내며 본 발명에 따른 화합물의 처리에 의해 간 조직에 축적된 대식세포가 감소됨을 알 수 있었다. 이를 통해 본 발명의 화합물의 처리에 의해 간 조직에 축적된 대식세포가 감소됨을 알 수 있다.

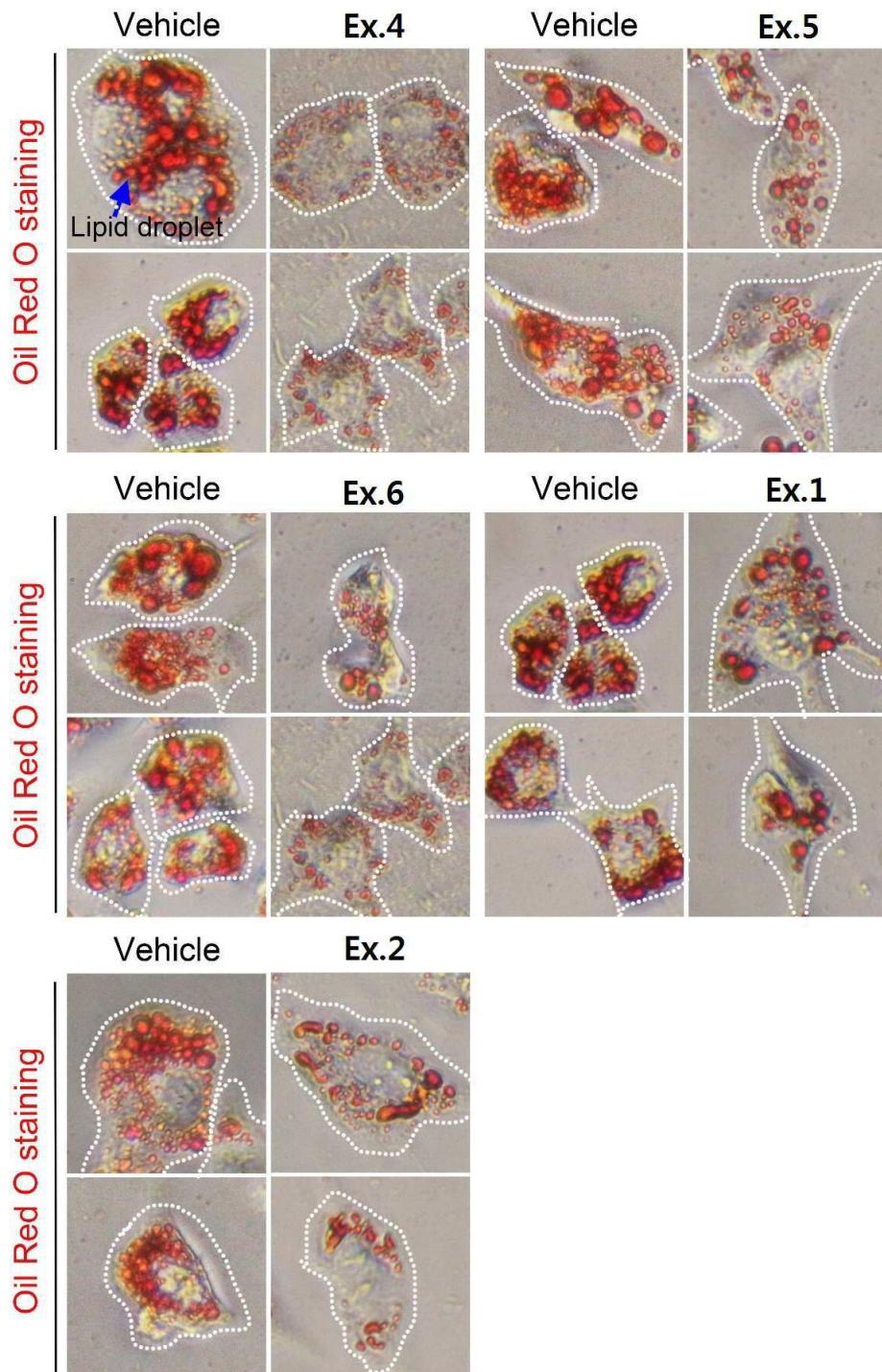
도면

도면1



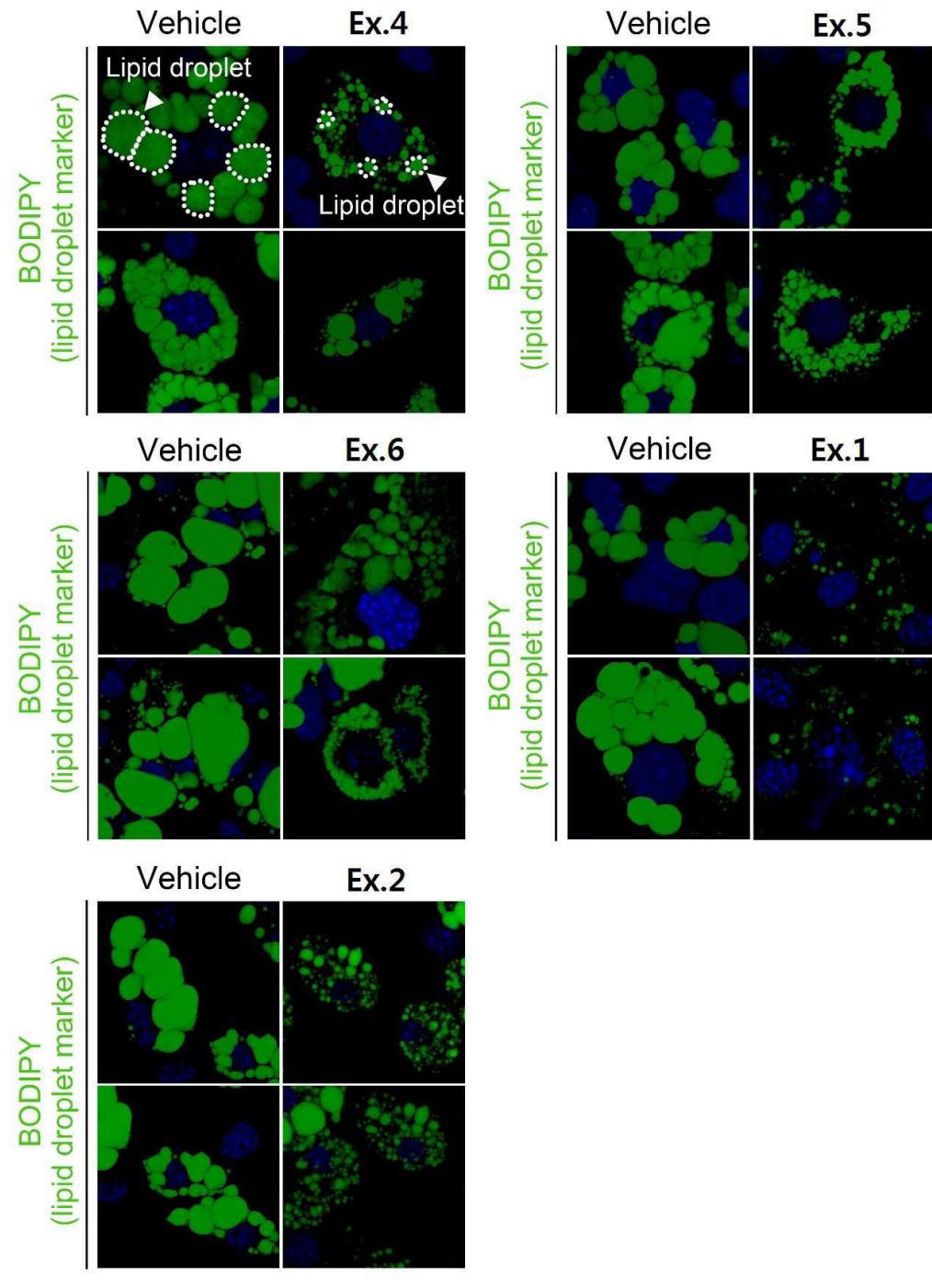
3T3L1, adipocyte

도면2



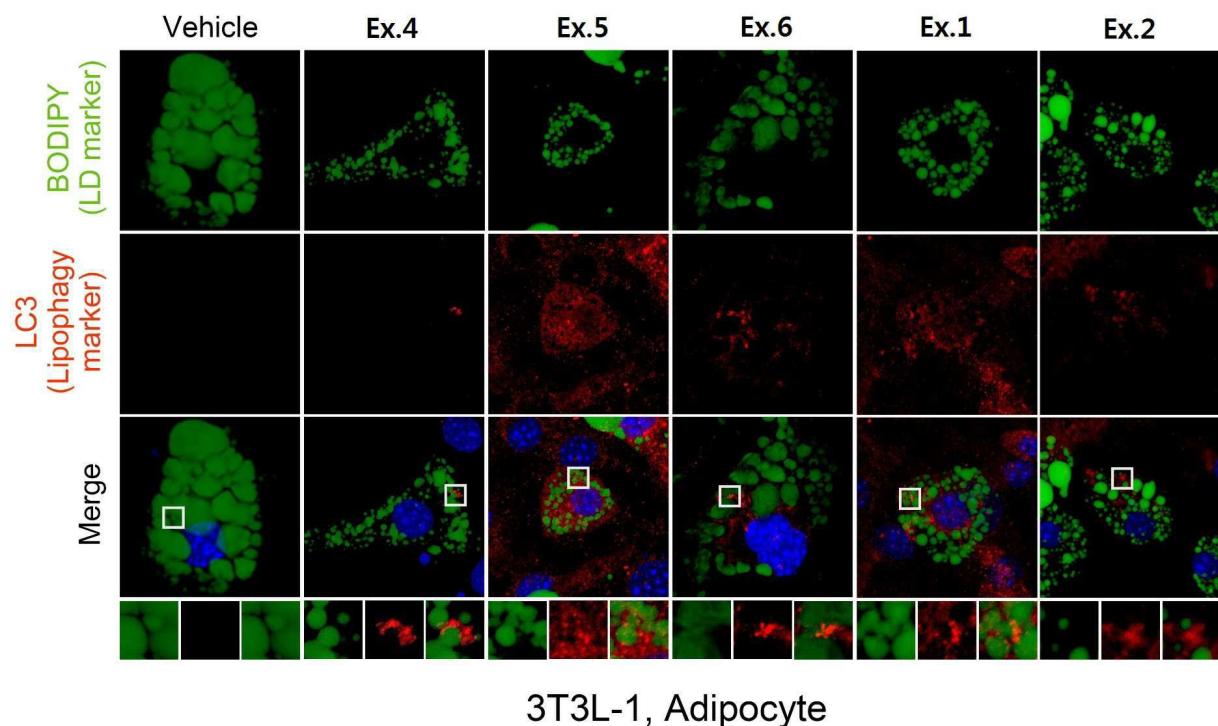
Hep G2 cell, hepatocyte

도면3



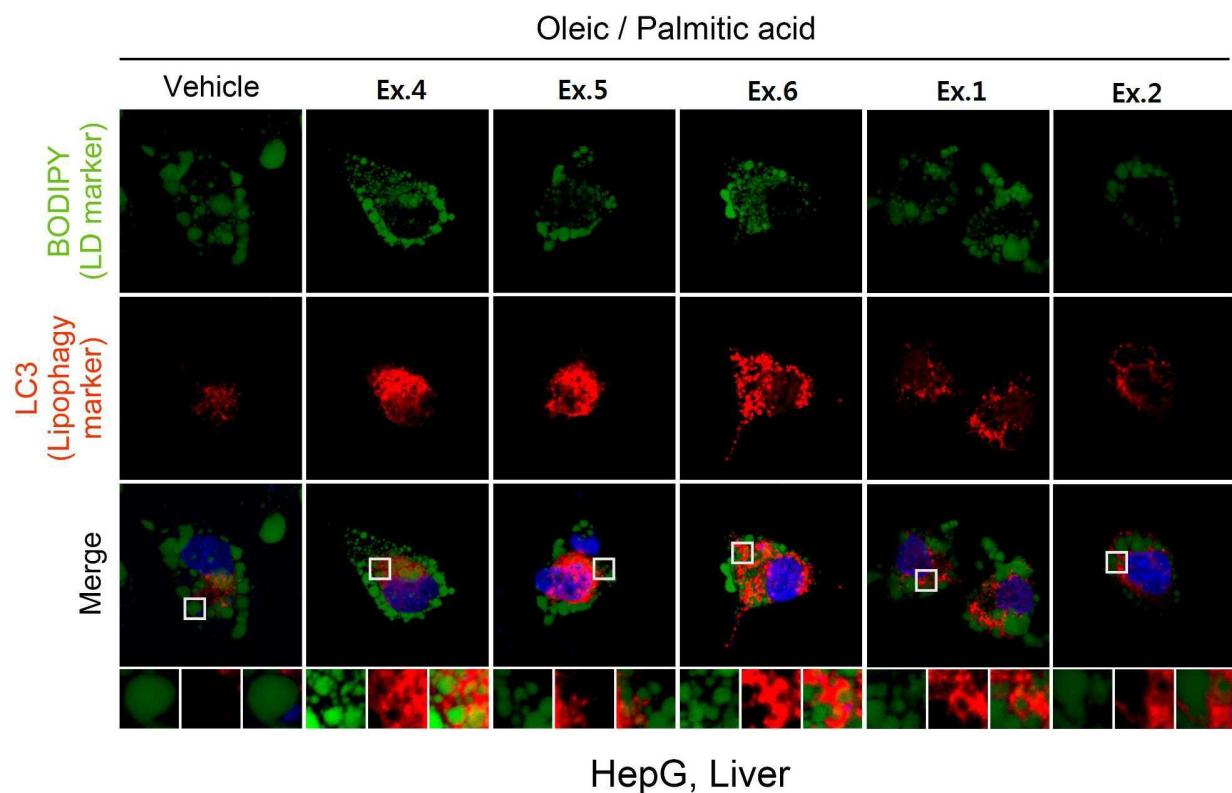
3T3L1, adipocyte

도면4a



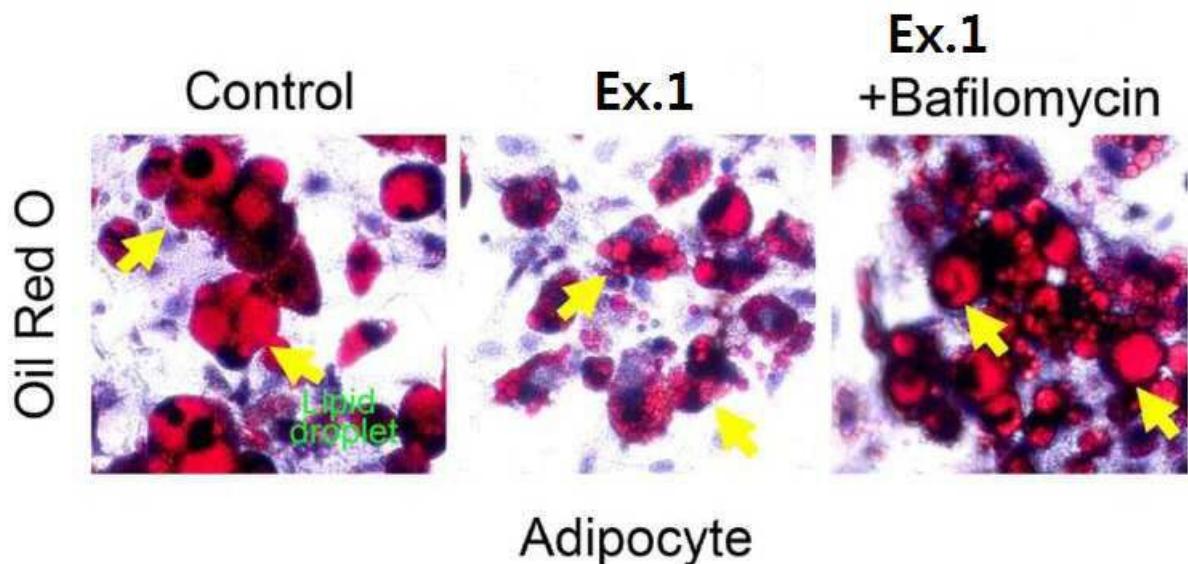
3T3L-1, Adipocyte

도면4b

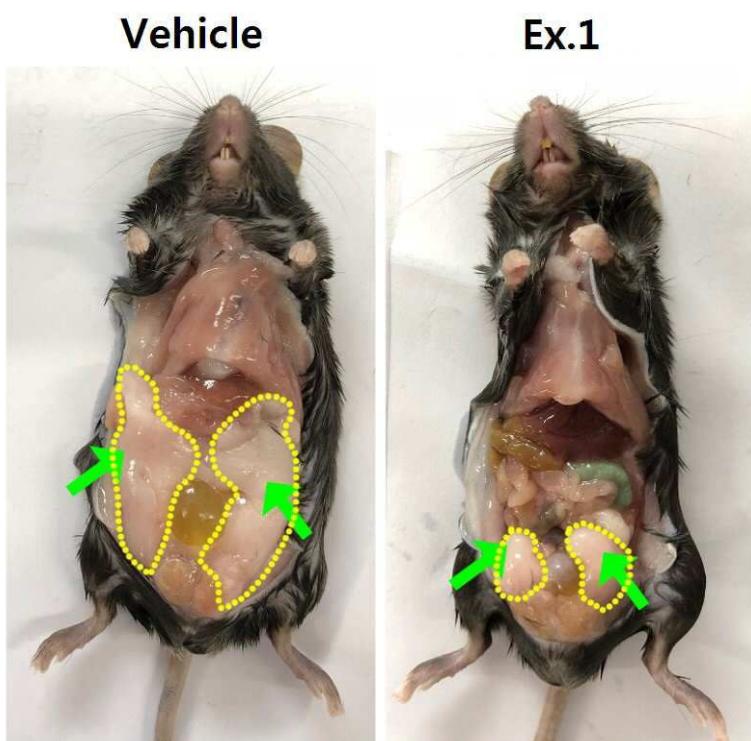


HepG, Liver

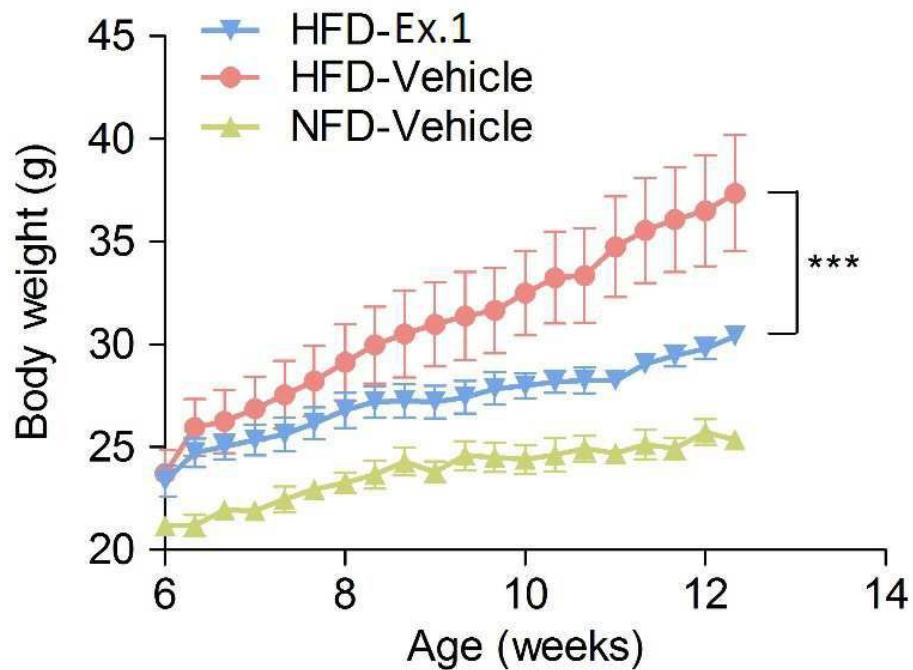
도면5



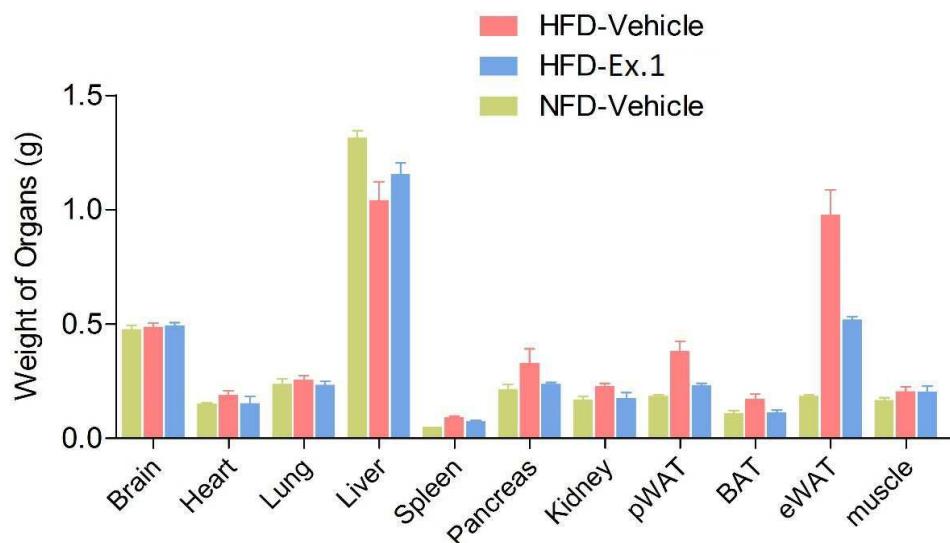
도면6



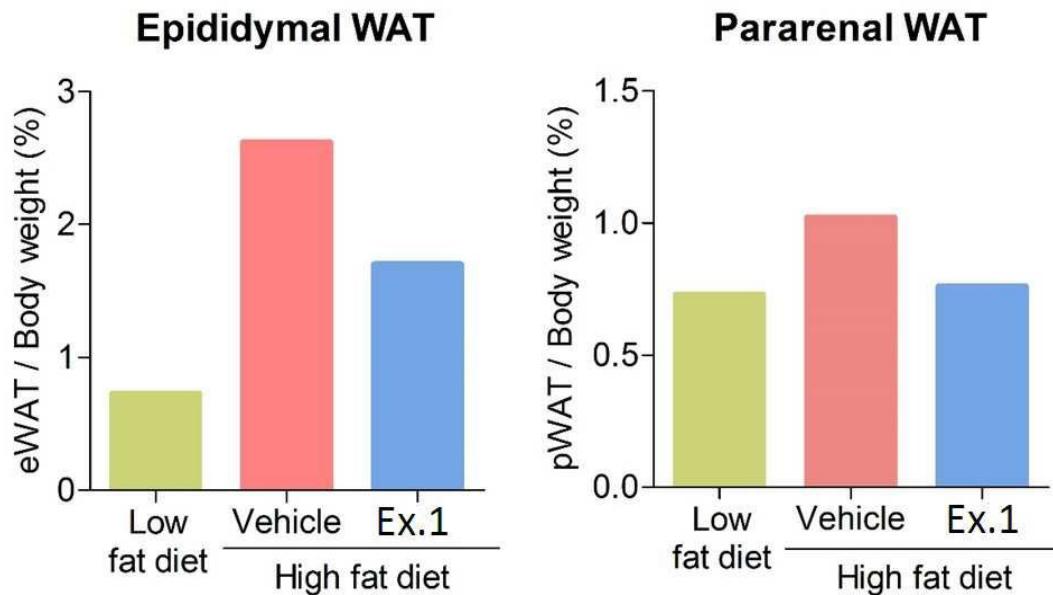
도면7



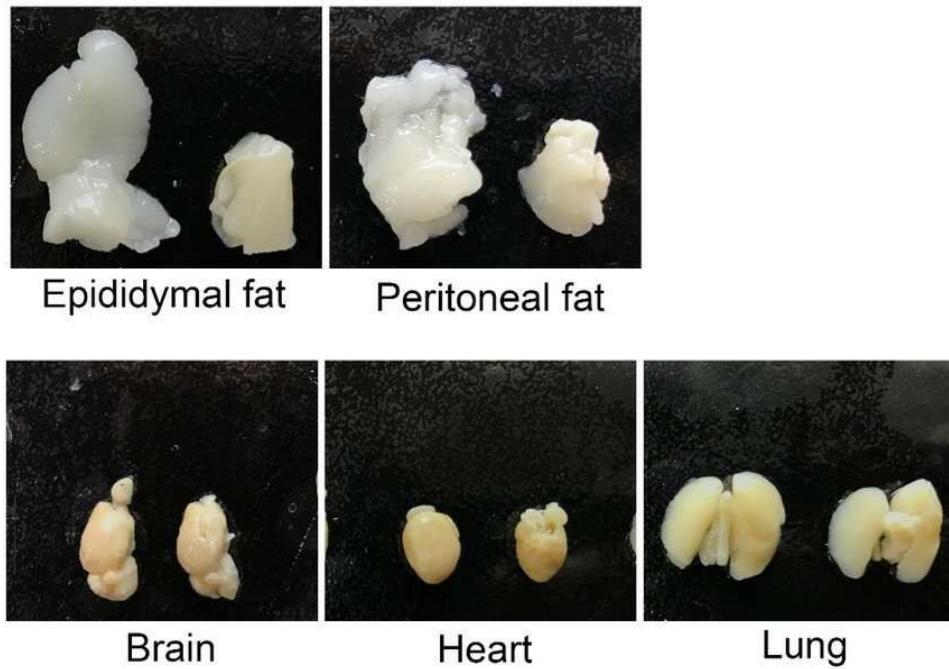
도면8



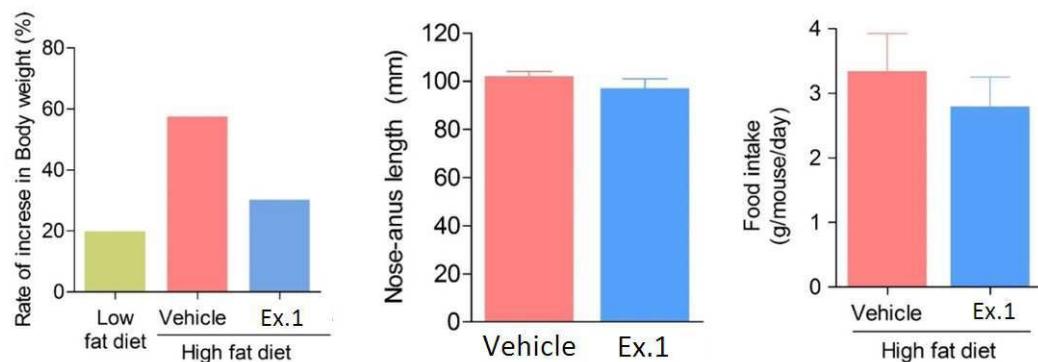
도면9



도면10



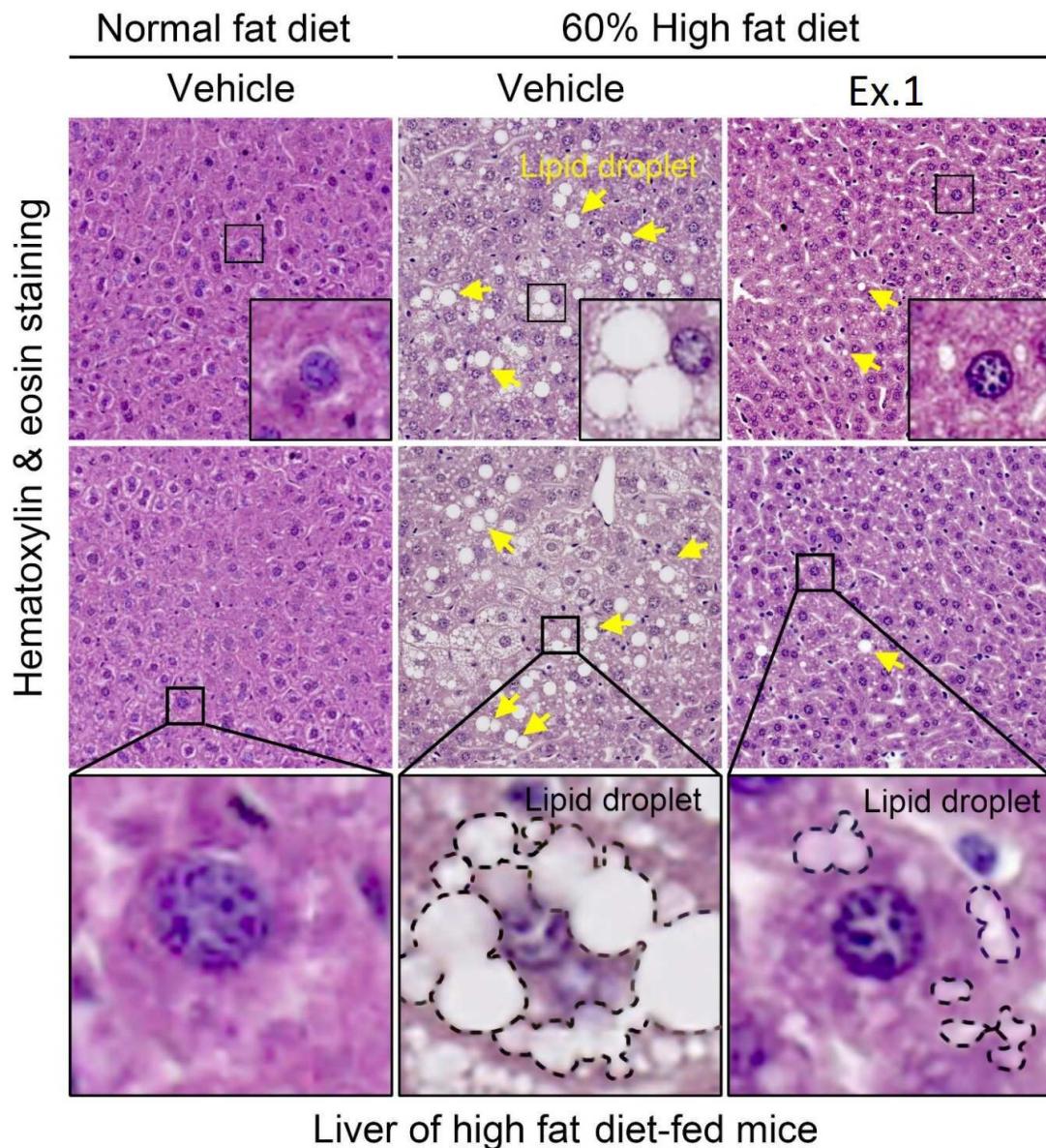
도면11



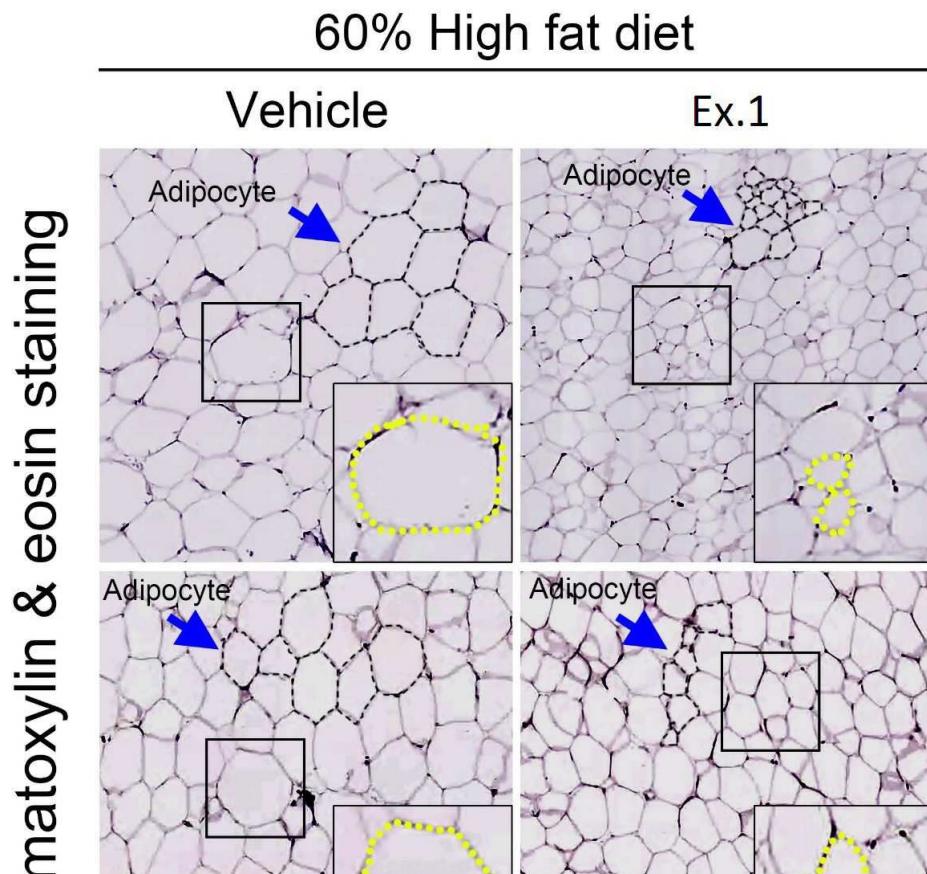
도면12

	Vehicle	Ex.1
Inorganic phosphorus (2.5-4.5 mg/dl)	8.57	8.37
Blood urea nitrogen (7-20 mg/dl)	24.33	29.87
Uric acid (0.5-1.5 mg/dl)	2.00	2.00
Total protein (6.4-8.0 g/dl)	4.77	4.77
Albumin (3.5-4.5 g/dl)	1.80	1.80
Glucose (70-100 mg/dl)	151.33	142.00
Triglyceride (3.89 mmol/L)	17.67	14.00

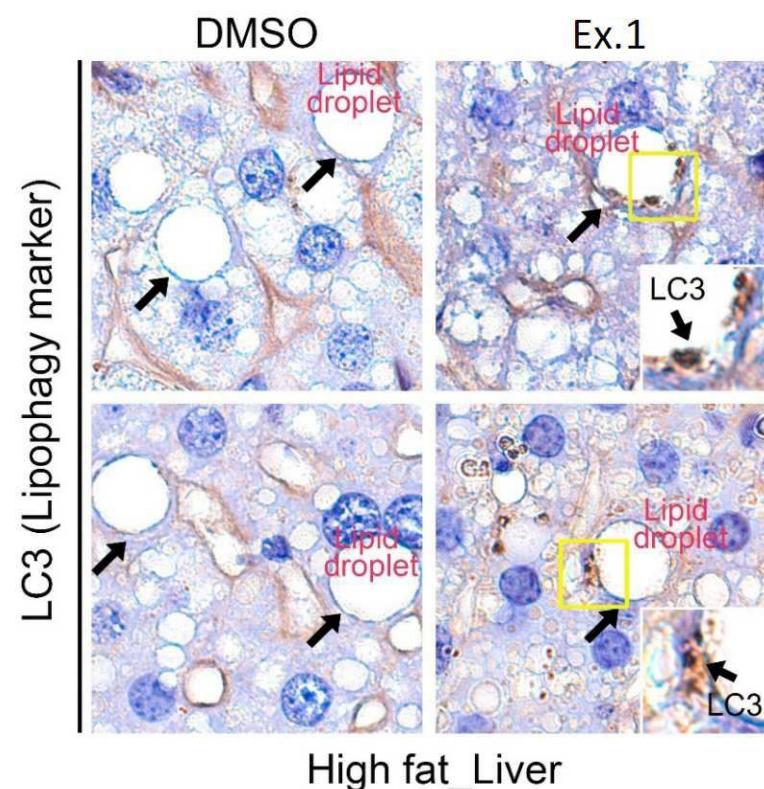
도면13



도면14



도면15



도면16

