

|                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <b>(19) 대한민국특허청(KR)</b><br><b>(12) 공개특허공보(A)</b>                                                                              | <b>(11) 공개번호</b> 10-2014-0031568<br><b>(43) 공개일자</b> 2014년03월13일                                                                                                                                                                                                       |
| <b>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)</b><br><i>C07C 49/603</i> (2006.01) <i>A61K 31/122</i> (2006.01)<br><i>A61P 3/06</i> (2006.01)<br><b>(21) 출원번호</b> 10-2012-0097941<br><b>(22) 출원일자</b> 2012년09월04일<br><b>심사청구일자</b> 없음 | <b>(71) 출원인</b><br><b>한국생명공학연구원</b><br>대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)<br><b>고려대학교 산학협력단</b><br>서울시 성북구 안암로 145 (안암동)<br><b>(72) 발명자</b><br><b>김영국</b><br>대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)<br><b>최용석</b><br>경기도 고양시 일산동구 일산자이아파트 409동 1604호<br>(뒷면에 계속)<br><b>(74) 대리인</b><br><b>손민</b> |

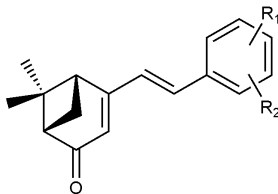
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제의 저해활성을 갖는 화합물 및 이를 포함하는 심혈관 질환 예방 또는 치료용 조성물**

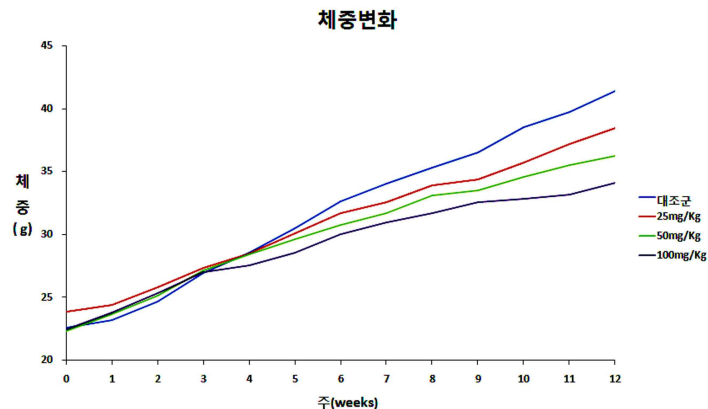
### (57) 요약

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 이를 유효성분으로 함유하는 심혈관 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 이에 따른, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제에 우수한 저해 효과가 있어 고콜레스테롤혈증에 기인하는 고지혈증, 동맥경화 등 각종 심혈관 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

[화학식 1]



대표도 - 도1



(72) 발명자

**김형진**

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

**김원기**

서울 강남구 압구정로11길 17, 2동 905호 (압구정동, 미성아파트)

**문옥성**

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

**송수미**

경기 광명시 철산로 57, 1306동 108호 (철산동, 주공아파트)

**윤원기**

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

**이성윤**

서울 강서구 까치산로18다길 69, (화곡동)

**주청**

서울 광진구 똑섬로36길 48-3, 101호 (자양동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGM1221211

부처명 교육과학기술부

연구사업명 주요사업(연구개발과제)

연구과제명 천연물 유리 의약활성 전임상 소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

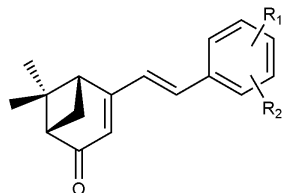
---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

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

[화학식 1]



상기 식에서,

$R_1$ 은 수소, 하이드록시,  $C_{1-4}$  알콕시, 할로젠, 페닐 또는 피롤이고,

$R_2$ 는 수소, 하이드록시 또는  $C_{1-4}$  알콕시이다.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

$R_1$ 은  $C_{1-4}$  알콕시이고,

$R_2$ 는 하이드록시인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

$R_1$ 은 피롤 또는 페닐이고,

$R_2$ 는 수소인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

$R_1$  및  $R_2$ 는 동시에 하이드록시인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

### 청구항 5

제1항에 있어서,

$R_1$ 은 수소, 하이드록시, 메톡시, 플루오로 또는 페닐인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

### 청구항 6

제1항에 있어서,

R<sub>2</sub>는 수소, 하이드록시 또는 메톡시인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 화합물은

- 1) (1S,5R)-4-(4-메톡시스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온,
- 2) (1S,5R)-6,6-디메틸-4-스티릴바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온,
- 3) (1S,5R)-4-((E)-2-(바이페닐-4-일)바이닐)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온,
- 4) (1S,5R)-4-(3,5-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온,
- 5) (1S,5R)-4-(4-플루오로스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온,
- 6) (1S,5R)-4-((E)-4-(1H-피롤-1-일)스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온,
- 7) (1S,5R)-4-((E)-4-하이드록시-2-메톡시스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온, 및
- 8) (1S,5R)-4-((E)-2-하이드록시스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온

으로 구성되는 군으로부터 선택되는 화합물인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 심혈관 질환은 고지혈증, 동맥경화 또는 뇌혈관 질환인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 심혈관 질환은 고지혈증, 동맥경화 또는 뇌혈관 질환인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

### 명세서

#### 기술분야

[0001]

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 이를 유효성분으로 함유하는 심혈관 질환 예방 또는 치료용 조성물 및 건강기능식품 조성물에 관한 것으로, 더 자세하게는 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제에 우수한 저해활성을 갖는 천연자원물질로부터 얻어진 모노 테르펜 화합

물로부터 합성한 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 이를 유효성분으로 함유하는 고지혈증, 동맥경화 등의 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0002] 인체가 필요로 하는 콜레스테롤은 음식물의 섭취에 의한 외인성 콜레스테롤과 생체내 간장에서 합성에 의한 내인성 콜레스테롤이 있다고 알려져 있다. 그러나, 중성지방과 콜레스테롤의 체내 유입이 지나쳐 고지혈증이 되면 혈중에 콜레스테롤이나 트리글리세라이드가 과다하게 높게 되며 동맥경화증을 일으키는 주요인이 된다. 이런 증상은 지단백질 (lipoprotein)의 형성, 운반 및 분해 과정 중에 이상이 생겨 지단백질의 대사가 비정상적으로 이루어지기 때문이다.
- [0003] 역학적 조사에 의하면, 허혈성 심장질환의 대부분은 관상동맥의 아테로마성 동맥경화증이 주류를 이루고 있고, 혈중 콜레스테롤의 상승이 병의 발생과 진전에 중요한 인자라고 알려져 있다. 따라서, 혈중 콜레스테롤을 저하시키기 위해서 소장에서 콜레스테롤의 흡수 저해, 간에서 콜레스테롤의 생합성 저해, 담즙산의 배설을 촉진시키는 방법들이 제시되고 있다.
- [0004] 현재 혈중 콜레스테롤 농도를 낮추기 위하여 사용되고 있는 의약품으로는 간장에서 생합성되는 콜레스테롤의 합성을 저해하는 것으로, 일본의 산쿄, 미국의 머크사의 제품으로 콤팩틴(compactin)의 생물학적 변형 유도체인 프라바스타틴 (pravastatin)과 심바스타틴(simvastatin)이 가장 높은 점유율과 신장물을 보이고 있다. 이들 의약품의 작용 기작은 간장에서 콜레스테롤의 생합성 과정 중 합성 중간단계에 관여하는 3-히드록시-3-메틸 글루타릴 Co-A 환원효소(이하 "HMG Co-A"라 한다)를 저해하는 것이다. 그러나, 작용 기작 상 HMG Co-A 환원효소 저해제를 장기간 사용하면 메바로네이트(mevalonate) 이후의 콜레스테롤 합성 중간단계의 부경로에서 생성되어야 할 인체가 필요한 우비퀴논(ubiquinone), 돌리콜(dolichol), 헴 에이 (haem A), 파네실화된 단백질 (farnesylated protein) 및 콜레스테롤에서 생성되는 스테로이드 호르몬, 비타민 D, 담즙산, 지단백질의 생산에 영향을 주는 것으로 보고되어 있다[Grunler J., J. Ericsson and G. Dalloner 1994. Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins: *Biochim. Biophys. Acta* 1212, 259-277]. 실제로, HMG Co-A 환원효소 저해제를 지속적으로 사용 시 심장기능과 면역기능에 중요한 역할을 하는 코엔자임 Q의 합성을 감소시키는 것으로 나타나, 동맥경화증 환자나 심장질환 환자에게는 악영향을 줄 수 있는 것으로 보고되어 있다[Willis R.A., K., Folkers. J.L. Tucker, C.Q. Ye, , L.J. Xia, and H Tamagawa. 1990. Lovastatin decreases coenzyme Q levels in rats: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 8928-8930].
- [0005] 한편, 현재 사용되고 있는 고지혈증 치료제로는 간장에서 합성되는 콜레스테롤의 생합성을 저해하는 저해제와, 간장에서 분비되어 음식을 소화시키고 대장에서 재흡수되는 담즙산에 결합하는 음이온 교환체가 콜레스테롤 재흡수 저해제로 임상적으로 사용되고 있으나, 보다 사용에 제한사항이 없고 작용기작이 확실하며 부작용이 적은 새로운 고지혈증 치료제의 개발이 요구되고 있다. 슬리스코빅의 연구에 의하면 고지혈증의 예방과 치료에 ACAT 활성 저해제가 효과가 있는 것으로 보고되었고[Sliskovic D. R. and A. D. White 1991. Therapeutic potential of ACAT inhibitors as lipid lowering and antiatherosclerotic agents: *Trends in Pharmacol. Sci.* 12:194-199], 특히 동맥경화 발생 기작에 직접적으로 관련되어 있는 새로운 작용기작을 갖는 고지혈증 치료제 개발의 일환으로 ACAT 저해제의 개발이 주목되고 있다.
- [0006] ACAT는 콜레스테롤의 아실화에 관여하여 소장에서 콜레스테롤의 흡수, 간장에서 VLDL(very low density lipoprotein)의 합성, 지방세포와 혈관내벽에 저장형 콜레스테롤의 축적에 관여하는 효소로 알려져 있다.
- [0007] 지금까지 연구되어진 ACAT 저해제들은 화학 합성품이 주로 연구대상이었으며, 워너람베르트, 화이자, 야마노우

치 등에서 우레아계, 아마이드계, 페놀계의 합성화합물이 주종을 이루고 있다[Matsuda K. 1994. ACAT inhibitors as antiatherosclerosis agent: compounds and mechanisms. 14, John Wiley & Son, Inc., 271-305]. 또한, 새로운 구조를 갖는 ACAT 저해 선도물질을 개발하기 위하여 미생물 자원을 대상으로 탐색연구가 진행되고 있으며, 일본 키타사토(Kitasato) 연구소의 퍼팩틴(purpactin)의 구조가 밝혀진 것을 시작으로 일본 산쿄사의 에피-콜리퀴논 에이(epi-cohliquinone A)[일본 공개특허공보 특개평 4-334383, 1992], 동경 농공대의 아카테린(acatelin), 헬민토스포롤(helmentosporol), 라테리틴(lateritin), 질세틴(gypsetin), 일본 키타사토 연구소의 엔니아틴(enniatins), 글리소프레닌(glisoprenins), 피리피로펜(pyripyropenes), 테르펜돌(terpendols), 일본 교와하코(Kyowa Hakko)사의 AS-183, AS-186, 한국생명공학연구원의 GERI-BP-001, GERI-BP-002 등이 보고되어 있다. 특히 최근 화이자가 개발 중인 ACAT 저해제 아바시미베(avasimibe)는 제 3상 임상실험에 들어가 고지혈증 치료의 새로운 의약품으로 관심을 모으고 있다[Heinonen TM., 2002. Acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase inhibition: potential atherosclerosis therapy or springboard for other discoveries: *Expert Opin Investig Drugs*. 11:1519-1527].

[0008] 이에, 본 발명자들은 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제(ACAT) 저해활성을 갖는 물질을 연구하던 중, 천연자원으로부터 얻어진 모노 테르펜 화합물로부터 합성한 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이 효과적인 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제(ACAT) 저해활성을 보이는 것을 생체외 및 생체내 실험을 통하여 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

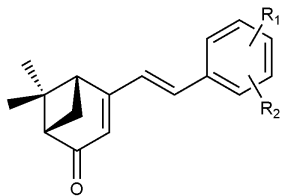
[0009] 본 발명의 목적은 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제에 대하여 우수한 저해 활성을 갖는 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 문제를 해결하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[0012] [화학식 1]



[0013]

[0014] 상기 화학식 1에서 R<sub>1</sub>과 R<sub>2</sub>는 각각 화학식 1의 페닐에 치환된 치환기를 의미한다.

[0015] 상기 식에서,

[0016] R<sub>1</sub>은 수소, 하이드록시, C<sub>1-4</sub> 알콕시, 할로젠, 페닐 또는 피롤이고,

[0017] R<sub>2</sub>는 수소, 하이드록시 또는 C<sub>1-4</sub> 알콕시이다.

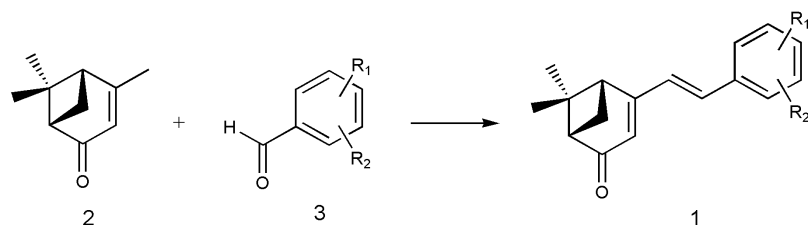
[0018] 바람직하게는, R<sub>1</sub>은 C<sub>1-4</sub> 알콕시이고, R<sub>2</sub>는 하이드록시이다.

- [0019] 바람직하게는,  $R_1$ 은 피롤 또는 페닐이고,  $R_2$ 는 수소이다.
- [0020] 바람직하게는,  $R_1$  및  $R_2$ 는 모두 하이드록시이다.
- [0021] 바람직하게는,  $R_1$ 은 수소, 하이드록시, 메톡시, 플루오로, 페닐 또는 피롤이며,  $R_2$ 는 수소, 하이드록시 또는 메톡시이다.
- [0022] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 중 바람직한 화합물은 구체적으로 하기와 같다;
- [0023] 1) (1S,5R)-4-(4-메톡시스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온,
- [0024] 2) (1S,5R)-6,6-디메틸-4-스티릴바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온,
- [0025] 3) (1S,5R)-4-((E)-2-(바이페닐-4-일)바인)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온,
- [0026] 4) (1S,5R)-4-(3,5-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온,
- [0027] 5) (1S,5R)-4-(4-플루오로스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온,
- [0028] 6) (1S,5R)-4-((E)-4-(1H-피롤-1-일)스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온,
- [0029] 7) (1S,5R)-4-((E)-4-하이드록시-2-메톡시스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온, 및
- [0030] 8) (1S,5R)-4-((E)-2-하이드록시스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온.

[0031] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 약학적으로 허용되는 염의 형태로 사용될 수 있으며, 이러한 염으로는 약학적으로 허용되는 유리산(free acid)에 의해 형성되는 산부가염 또는 염기에 의해 형성되는 금속염이 있다. 상기 유리산으로는 무기산과 유기산이 사용될 수 있으며 무기산으로는 염산, 황산, 브롬산, 아황산 또는 인산 등이 사용될 수 있고 유기산으로는 구연산, 초산, 말레인산, 후마산, 글루콘산, 메탄술폰산 등이 사용될 수 있다. 상기 금속염으로는 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염이 있으며, 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염이 유용하다.

[0032] 또한, 본 발명은 하기 반응식 1에 표시되는 바와 같이, 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 방법을 제공한다.

[0033] [반응식 1]



[0035] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 방법은, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물과 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 반응시켜 제조할 수 있다. 상기 식에서,  $R_1$  및  $R_2$ 는 앞서 정의한 바와 같다.

[0036] 또한, 본 발명은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 심혈관 질환은 심장과 주요 동맥에 발생하는 질환으로서, 본

발명의 심혈관 질환은 고지혈증, 동맥경화 또는 뇌혈관 질환인 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0037] 본 발명에서 사용되는 용어 '예방'은, 상기 화합물을 함유하는 조성물의 투여로 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 '치료'는, 상기 화합물을 함유하는 조성물의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.
- [0038] 본 발명의 조성물은 투여를 위하여, 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 보형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0039] 본 발명의 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사 용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는, 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로솔, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여 경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 상기 화합물의 일일 투여량은 바람직하게는 25 mg/kg 내지 100 mg/kg이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명은 상기의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0042] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알콜 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.
- [0043] 또한, 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 대한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0044] 상기 "식품첨가물공전"에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산 칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류들을 들 수 있다.

[0045] 이때, 건강기능식품을 제조하는 과정에서 음료를 포함한 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 바람직하게는 식품 100 중량%에 1 중량% 내지 15 중량% 포함되도록 첨가하는 것이 바람직하다.

### 발명의 효과

[0046] 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제에 우수한 저해 효과가 있다.

[0047] 또한, 본 발명의 화합물은 고콜레스테롤혈증에 기인하는 고지혈증, 동맥경화 등 각종 심혈관 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은, 본 발명의 일 실시예에 따른 화합물의 투여 농도에 따른 실험동물의 체중 변화를 나타낸 그래프이다.

도 2는, 본 발명의 일 실시예에 따른 화합물의 투여 농도에 따른 실험동물의 장기의 중량 변화를 나타낸 그래프이다.

도 3은, 본 발명의 일 실시예에 따른 화합물의 투여 농도에 따른 실험동물의 상대적인 장기 중량(장기중량/체중) 변화 비교율을 나타낸 그래프이다.

도 4는, 본 발명의 일 실시예에 따른 화합물의 투여 농도에 따른 혈청의 생화학 변화를 나타낸 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 이하, 하기 제조에 및 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 제조에 및 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0050] 실시예 1: (1S,5R)-4-(4-메톡시스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온의 제조

[0051] (1S)-(-)-버베논(Aldrich사 제품) 200 mg(1.33 mmol)을 메탄올 5 ml에 용해시키고 4-메톡시벤즈알데하이드(0.2 ml)를 가하여 실온에서 10분간 교반하였다. 온도를 60℃로 조절하고 수산화칼륨(149.4 mg)을 가한 후 6시간 동안 반응시켰다. 반응이 완결된 후 반응혼합물에 물을 첨가한 후 실온에서 24시간 교반하였다. 에틸아세테이트를 반응혼합물에 첨가하고 소금물을 첨가하여 분별 깔대기로 유기층을 분리하였다. 상기 유기층에 무수 황산 마그네슘을 가한 후 여과하여 여액을 컬럼 크로마토그래피에 통과시켜 불순물을 제거하고 농축액을 40℃ 이하에서 감압 농축시켜 87% 수율로 표제 화합물을 얻었다.

[0052] <sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>); δ 7.46 (d, J = 8.80 Hz, 2 H), 6.91 (d, J = 9.05 Hz, 2 H) 6.90 (d, J = 15.90 Hz, 1 H), 6.84 (d, J = 16.50 Hz, 1 H), 5.90 (s, 1 H), 3.85 (s, 3 H), 3.12 (td, J = 1.35, 5.81 Hz, 1 H), 2.92 (dt, J = 5.53, 9.48 Hz, 1 H), 2.73 (td, J = 1.71, 5.75 Hz, 1 H), 2.13 (d, J = 9.54 Hz, 1 H), 1.59 (s, 3 H), 1.03 (s, 3 H).

**[0053] 실시예 2: (1S,5R)-6,6-디메틸-4-스티릴바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온의 제조**

[0054] (1S)-(-)-버베논(Aldrich사 제품) 200 mg(1.33 mmol)을 메탄올 5 ml에 용해시키고 벤즈알데하이드(0.16 ml)를 가하여 실온에서 10분간 교반하였다. 온도를 60℃로 조절하고 수산화칼륨(149.4 mg)을 가한 후 6시간 동안 반응시켰다. 반응이 완결된 후 반응혼합물에 물을 첨가한 후 실온에서 24시간 교반하였다. 에틸아세테이트를 반응혼합물에 첨가하고 소금물을 첨가하여 분별 깔대기로 유기층을 분리하였다. 상기 유기층에 무수 황산 마그네슘을 가한 후 여과하여 여액을 컬럼 크로마토그래피에 통과시켜 불순물을 제거하고 농축액을 40℃ 이하에서 감압 농축시켜 수율 75%로 표제화합물을 수득하였다.

[0055]  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CDCl}_3$ ); d 7.50 (d, J = 7.09 Hz, 2 H), 7.35 - 7.40 (m, 2 H), 7.33 (d, J = 7.34 Hz, 1 H), 6.97 (d, J = 16.00 Hz, 1 H), 6.92 (d, J = 16.00 Hz, 1 H), 5.94 (s, 1 H), 3.12 (td, J = 1.47, 5.87 Hz, 1 H), 2.93 (dt, J = 5.62, 9.54 Hz, 1 H), 2.74 (td, J = 1.71, 5.75 Hz, 1 H), 2.13 (d, J = 9.29 Hz, 1 H), 1.59 (s, 3 H), 1.02 (s, 3 H).

**[0056] 실시예 3: (1S,5R)-4-((E)-2-(바이페닐-4-일)바이닐)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온의 제조**

[0057] (1S)-(-)-버베논(Aldrich사 제품) 27 mg(0.18 mmol)을 메탄올 2 ml에 용해시키고 바이페닐-4-카르보알데하이드(40 mg)를 가하여 실온에서 10분간 교반하였다. 온도를 60℃로 조절하고 수산화칼륨(20 mg)을 가한 후 6시간 동안 반응시켰다. 반응이 완결된 후 반응혼합물에 물을 첨가한 후 실온에서 24시간 교반하였다. 에틸아세테이트를 반응혼합물에 첨가하고 소금물을 첨가하여 분별 깔대기로 유기층을 분리하였다. 상기 유기층에 무수 황산 마그네슘을 가한 후 여과하여 여액을 컬럼 크로마토그래피에 통과시켜 불순물을 제거하고 농축액을 40℃ 이하에서 감압 농축시켜 수율 92%로 표제화합물을 수득하였다.

[0058]  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CDCl}_3$ ); d 7.55 - 7.65 (m, 6 H), 7.45 (t, J = 7.58 Hz, 2 H), 7.34 - 7.39 (m, 1 H), 7.01 (d, J = 16.50 Hz, 1 H), 6.96 (d, J = 16.50 Hz, 1 H), 5.95 (s, 1 H), 3.14 (t, J = 5.75 Hz, 1 H), 2.94 (dt, J = 5.50, 9.54 Hz, 1 H), 2.75 (t, J = 5.62 Hz, 1 H), 2.14 (d, J = 9.29 Hz, 1 H), 1.60 (s, 3 H), 1.03 (s, 3 H).

**[0059] 실시예 4: (1S,5R)-4-(3,5-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온의 제조**

[0060] (1S)-(-)-버베논(Aldrich사 제품) 200 mg(1.33 mmol)을 메탄올 5 ml에 용해시키고 3,5-디메톡시벤즈알데하이드(265.5 mg)를 가하여 실온에서 10분간 교반하였다. 온도를 60℃로 조절하고 수산화칼륨(149.4 mg)을 가한 후 6시간 동안 반응시켰다. 반응이 완결된 후 반응혼합물에 물을 첨가한 후 실온에서 24시간 교반하였다. 에틸아세테이트를 반응혼합물에 첨가하고 소금물을 첨가하여 분별 깔대기로 유기층을 분리하였다. 상기 유기층에 무수 황산 마그네슘을 가한 후 여과하여 여액을 컬럼 크로마토그래피에 통과시켜 불순물을 제거하고 농축액을 40℃ 이하에서 감압 농축시켜 88% 수율로 표제화합물을 수득하였다.

[0061]  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CDCl}_3$ ); d 6.93 (d, J = 16.00 Hz, 1 H), 6.85 (d, J = 16.00 Hz, 1 H), 6.65 (d, J = 2.20 Hz, 2 H), 6.45 (t, J = 2.20 Hz, 1 H), 5.94 (s, 1 H), 3.82 (s, 6 H), 3.10 (t, J = 5.75 Hz, 1 H), 2.92 (dt, J = 5.62, 9.54 Hz, 1 H), 2.74 (td, J = 1.59, 5.69 Hz, 1 H), 2.12 (d, J = 9.29 Hz, 1 H), 1.58 (s, 3 H), 1.02 (s, 3 H).

**[0062] 실시예 5: (1S,5R)-4-(4-플루오로스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온의 제조**

[0063] (1S)-(-)-버베논(Aldrich사 제품) 200 mg(1.33 mmol)을 메탄올 5ml에 용해시키고 4-플루오로벤즈알데하이드

(0.2 ml)를 가하여 실온에서 10분간 교반하였다. 온도를 60℃로 조절하고 수산화칼륨(149.4 mg)을 가한 후 6시간 동안 반응시켰다. 반응이 완결된 후 반응혼합물에 물을 첨가한 후 실온에서 24시간 교반하였다. 에틸아세테이트를 반응혼합물에 첨가하고 소금물을 첨가하여 분별 깔대기로 유기층을 분리하였다. 상기 유기층에 무수 황산 마그네슘을 가한 후 여과하여 여액을 컬럼 크로마토그래피에 통과시켜 불순물을 제거하고 농축액을 40℃ 이하에서 감압 농축시켜 수율 90%로 표제화합물을 수득하였다.

[0064]  $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ ; d 7.46 - 7.51 (m, 2 H), 7.04 - 7.09 (m, 2 H), 6.90 (d, J = 17.00 Hz, 1 H), 6.86 (d, J = 16.50 Hz, 1 H), 5.93 (s, 1 H), 3.10 (td, J = 1.35, 5.81 Hz, 1 H), 2.92 (dt, J = 5.62, 9.29 Hz, 1 H), 2.74 (td, J = 1.71, 5.75 Hz, 1 H), 2.12 (d, J = 9.29 Hz, 1 H), 1.59 (s, 3 H), 1.02 (s, 3 H).

[0065] **실시예 6: (1S,5R)-4-((E)-4-(1H-피롤-1-일)스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온의 제조**

[0066] (1S)-(-)-버베논(Aldrich사 제품) 100 mg(0.67 mmol)을 메탄올 4 ml에 용해시키고 4-(1H-피롤-1-일)벤즈알데하이드 (136.8 mg)를 가하여 실온에서 10분간 교반하였다. 온도를 60℃로 조절하고 수산화칼륨(74.7 mg)을 가한 후 6시간 동안 반응시켰다. 반응이 완결된 후 반응혼합물에 물을 첨가한 후 실온에서 24시간 교반하였다. 에틸아세테이트를 반응혼합물에 첨가하고 소금물을 첨가하여 분별 깔대기로 유기층을 분리하였다. 상기 유기층에 무수 황산 마그네슘을 가한 후 여과하여 여액을 컬럼 크로마토그래피에 통과시켜 불순물을 제거하고 농축액을 40℃ 이하에서 감압 농축시켜 수율 39%(80 mg)로 표제화합물을 수득하였다.

[0067]  $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ ; d 7.55 (d, J = 8.56 Hz, 2 H), 7.39 (d, J = 8.56 Hz, 2 H), 7.12 (t, J = 2.20 Hz, 2 H), 6.95 (d, J = 16.00 Hz, 1 H), 6.91 (d, J = 16.00 Hz, 1 H), 6.36 (t, J = 2.20 Hz, 2 H), 5.94 (s, 1H), 3.12 (t, J = 5.75 Hz, 1 H), 2.93 (td, J = 5.59, 9.35 Hz, 1 H), 2.74 (dt, J = 1.71, 5.75 Hz, 1 H), 2.13 (d, J = 9.29 Hz, 1 H), 1.59 (s, 3 H), 1.03 (s, 3 H).

[0068] **실시예 7: (1S,5R)-4-((E)-4-하이드록시-2-메톡시스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온의 제조**

[0069] 4-하이드록시-2-메톡시벤즈알데하이드 100 mg을 메틸렌클로라이드(4 ml)에 용해시키고 N,N-디아이소프로필에틸아민(0.2 ml)을 가하여 0℃에서 30분간 교반하였다. 반응혼합물에 클로로메틸메틸에테르(0.1 ml)를 천천히 적가한 후 천천히 상온으로 승온시켜 8시간 동안 교반하였다. 메틸렌클로라이드를 반응혼합물에 첨가하고 소금물을 첨가하여 분별 깔대기로 유기층을 분리하였다. 상기 유기층에 무수 황산 마그네슘을 가한 후 여과하여 여액을 컬럼 크로마토그래피에 통과시켜 불순물을 제거하고 농축액을 40℃ 이하에서 감압 농축시켜 중간화합물인 2-메톡시-4-(메톡시메톡시)벤즈알데하이드 121 mg을 얻었다.

[0070] (1S)-(-)-버베논(Aldrich사 제품) 77 mg(0.51 mmol)을 메탄올 3 ml에 용해시키고 상기 제조된 중간화합물인 2-메톡시-4-(메톡시메톡시)벤즈알데하이드 121 mg을 가하여 실온에서 10분간 교반하였다. 온도를 60℃로 조절하고 수산화칼륨(58 mg)을 가한 후 6시간 동안 반응시켰다. 반응이 완결된 후 반응혼합물에 물을 첨가한 후 실온에서 24시간 교반하였다. 에틸아세테이트를 반응혼합물에 첨가하고 소금물을 첨가하여 분별 깔대기로 유기층을 분리하였다. 상기 유기층에 무수 황산 마그네슘을 가한 후 여과하여 여액을 컬럼 크로마토그래피에 통과시켜 불순물을 제거하고 농축액을 40℃ 이하에서 감압 농축시켜 (1S,5R)-4-((E)-2-메톡시-4-(메톡시메톡시)스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 112mg(67% 수율)을 얻었다. 상기 수득한 (1S,5R)-4-((E)-2-메톡시-4-(메톡시메톡시)스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 100 mg(0.31 mmol)을 메탄올 2 ml에 용해시키고 묽은 염산을 천천히 가하여 24시간 교반하였다. 반응이 완결된 후 탄산수소나트륨수용액을 가하여 중화하고 소금물을 첨가하여 분별 깔대기로 유기층을 분리하였다. 상기 유기층에 무수 황산 마그네슘을 가한 후 여과하여 여액을 컬럼 크로마토그래피에 통과시켜 불순물을 제거하고 농축액을 40℃ 이하에서 감압 농축시켜 수율 97%(86 mg)로 표제화합물을 수득하였다.

[0071]  $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ ; d 7.45 (d, J = 8.07 Hz, 1 H), 7.24 (d, J = 16.63 Hz, 1 H), 6.88 (d, J = 16.38 Hz, 1 H), 6.42 - 6.48 (m, 2 H), 5.88 (s, 1 H), 3.86 (s, 3 H) 5.64 (br. s., 1 H), 3.16 (t, J = 5.75 Hz, 1 H),

2.91 (dt, J = 5.59, 9.35 Hz, 1 H), 2.72 (t, J = 5.60 Hz, 1 H), 2.12 (d, J = 9.29 Hz, 1 H), 1.58 (s, 3 H), 1.02 (s, 3 H).

[0072] **실시예 8: (1S,5R)-4-((E)-2-하이드록시스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온의 제조**

[0073] 2-하이드록시벤즈알데하이드 600 mg을 메틸렌클로라이드(10ml)에 용해시키고 N,N-디아이소프로필에틸아민(1.3 ml)을 가하여 0℃에서 30분간 교반하였다. 반응혼합물에 클로로메틸메틸에테르(0.5 ml)를 천천히 적가한 후 천천히 상온으로 승온시켜 8시간동안 교반하였다. 메틸렌클로라이드를 반응혼합물에 첨가하고 소금물을 첨가하여 분별 깔대기로 유기층을 분리하였다. 상기 유기층에 무수 황산 마그네슘을 가한 후 여과하여 여액을 컬럼 크로마토그래피에 통과시켜 불순물을 제거하고 농축액을 40℃ 이하에서 감압 농축시켜 중간화합물인 2-(메톡시메톡시)벤즈알데하이드 767 mg을 얻었다.

[0074] (1S)-(-)-버베논(Aldrich사 제품) 527 mg(3.51 mmol)을 메탄올 12 ml에 용해시키고 상기 제조된 중간화합물인 2-(메톡시메톡시)벤즈알데하이드 700 mg을 가하여 실온에서 10분간 교반하였다. 온도를 60℃로 조절하고 수산화 칼륨(394.1 mg)을 가한 후 6시간 동안 반응시켰다. 반응이 완결된 후 반응혼합물에 물을 첨가한 후 실온에서 24 시간 교반하였다. 에틸아세테이트를 반응혼합물에 첨가하고 소금물을 첨가하여 분별 깔대기로 유기층을 분리하였다. 상기 유기층에 무수 황산 마그네슘을 가한 후 여과하여 여액을 컬럼 크로마토그래피에 통과시켜 불순물을 제거하고 농축액을 40℃ 이하에서 감압 농축시켜 ((1S,5R)-4-((E)-2-(메톡시메톡시)스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 861mg(82% 수율)을 얻었다. 상기 수득한 ((1S,5R)-4-((E)-2-(메톡시메톡시)스티릴)-6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 861 mg(2.89 mmol)을 메탄올 15 ml에 용해시키고 묽은 염산을 천천히 가하여 24시간 교반하였다. 반응이 완결된 후 탄산수소나트륨수용액을 가하여 중화하고 소금물을 첨가하여 분별 깔대기로 유기층을 분리하고 유기층에 무수 황산 마그네슘을 가한 후 여과하여 여액을 컬럼 크로마토그래피로 불순물을 제거하고 농축액을 40℃ 이하에서 감압 농축시켜 100%(735 mg) 수율로 표제화합물을 수득하였다.

[0075]  $^1\text{H}$  NMR(CD<sub>3</sub>OD); d 7.56 (dd, J = 1.59, 7.70 Hz, 1 H), 7.42 (d, J = 16.14 Hz, 1 H), 7.15 (dd, J = 1.59, 15.53 Hz, 1 H), 7.13 (d, J = 16.38 Hz, 1 H), 6.80 - 6.87 (m, 2 H), 5.89 (s, 1 H), 3.25 (t, J = 5.87 Hz, 1 H), 2.99 (dt, J = 5.53, 9.48 Hz, 1 H), 2.65 (td, J = 1.71, 5.75 Hz, 1 H), 2.08 (d, J = 9.29 Hz, 1 H), 1.61 (s, 3 H), 1.01 (s, 3 H).

[0076] **실험예 1: *in-vitro***

[0077] **아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제(ACAT) 활성 실험**

[0078] 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 활성저해 물질의 활성측정은 브리쳐방법을 약간 수정하여 수행하였다[Brecher. P and C. Chen; Biochimica Biophysica Acta 617:458-471, 1980]. 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 활성 효소원으로는 흰쥐의 간으로부터 부분 정제한 마이크로솜을 사용하였으며, 기질로는 콜레스테롤과 방사능으로 표식된 올레오일(oleoyl) 코에이(Co-A)를 반응시키는 것으로, 반응생성물인 콜레스테롤 에스테르(cholesterol ester)에 포함된 방사능의 양으로 효소의 반응정도를 측정하였다.

[0079] 구체적으로, 아세톤에 용해시킨 콜레스테롤과 아세톤에 용해시킨 Triton WR-1339를 물에 현탁시켜 아세톤은 질소가스로 제거한 후 K-포스페이트 완충용액(pH 7.4, 최종농도 0.1 M)을 첨가하였다. 효소반응을 안정화시키기 위하여 bovine serum albumin을 최종농도로 30 μM을 넣고, DMSO 또는 MeOH로 녹인 시료를 단계적으로 희석하여 적량씩 넣어 37℃에서 30 분간 예비 반응시켰다. 상기 예비반응 후 본 반응은 기질인 [1-<sup>14</sup>C]oleoyl-Coenzyme A를 0.04 μCi가 되게 넣고 37℃에서 30분간 적당히 흔들어주면서 효소반응을 진행시켰다. 효소 반응의 종결은 각 시험관에 이소프로판올-헵탄 1 ml를 넣어 반응을 정지시킨 후 n-헵탄 0.6 ml와 KPB bufferf 0.4 ml 씩을 넣고 잘 섞은 후 2분간 방치하였다. 시험관의 액이 자연스럽게 분액이 되면 상등액 중 200 μl를 취하여 scintillation vial로 옮겨 넣었다. 여기에 scintillation cocktail(Lipoluma, Lumac Co.) 4 ml를 넣어 scintillation counter(Packard Delta-200)에서 방사능량을 측정하였다. 또한, 효소반응 후 생성된

cholesteryl oleate의 양을 측정하였으며 저해활성은 하기 수학식 1에 따라 계산하였다.

[수학식 1]

저해활성(%)=[1-(T-B/C-B)]×100

상기 식에서, T는 효소반응액에 시료를 넣은 시험구의 cpm값이고, C는 효소반응액에 시료를 넣지 않은 대조구의 cpm값이며, B는 효소원을 넣지 않고 시료를 넣은 대조구의 cpm값이다.

상기 식에 따라서, 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제(ACAT) 활성 저해율을 측정 한 결과, 상기 실시예 1 내지 8에서 제조한 화합물들을 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리하였을 때 여러 강도로 저해활성을 나타내었다. 하기 표 1에 상기 실시예 1 내지 8의 화합물의 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 저해활성을 나타내었다. 또한, 하기 표 1에 (+)는 실험에 사용한 기질과 효소원을 넣어 반응시킨 대조구를 의미하며, 시료를 넣지 않아 저해효과가 없을 때 나타나는 cpm 값(상기 수학식 1에서 C 값)을 나타낸다. 또한, 하기 표 1에 (-)는 실험에 사용한 기질만 넣고 반응시켜 나온 대조구(상기 수학식 1에서 B 값)를 의미한다.

표 1

| 시료    | 농도( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | DOM  | 저해율(%) |
|-------|-------------------------------|------|--------|
| (+)   | 25                            | 3727 | 0.0    |
| 실시예 1 |                               | 2033 | 46.4   |
| 실시예 2 |                               | 2537 | 32.6   |
| 실시예 3 |                               | 978  | 75.2   |
| 실시예 4 |                               | 1929 | 49.2   |
| 실시예 5 |                               | 2456 | 34.8   |
| 실시예 6 |                               | 1523 | 60.3   |
| 실시예 7 |                               | 1062 | 78.8   |
| 실시예 8 |                               | 1520 | 60.4   |
| (-)   |                               | 73   | 100.0  |

실험예 2: *in-vivo*

상기 실험예 1에서 분석한 결과에 따라, 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 저해활성이 높게 나타난 상기 실시예 7의 화합물을 시료로 사용하였다. 실험동물은 8주령의 수컷 B6.129P2-Apoe<sup>tm1Unc</sup> Knockoutmouse를 각 6, 6, 6 및 7 마리로 4 그룹으로 나누었으며, 각 그룹에 시료를 일일 25 mg/kg, 50 mg/kg 및 100 mg/kg으로 경구 투여하였으며, 하기 표 2에 시험군을 나타내었다.

표 2

| 구분    | 실시예 7의 화합물<br>투여량(mg/kg) |
|-------|--------------------------|
| 대조군   | 0                        |
| 시험군 1 | 25                       |
| 시험군 2 | 50                       |
| 시험군 3 | 100                      |

투여횟수 및 투여기간은 주에 5일간 매일 1회, 12주간 반복투여하였으며, 금속제 경구투여용 존데와 주사기를 이용하여 강제 경구투여하였다. 투여시간은 매일 오전 9시부터 오후12시 사이에 투여하였고, 투여액량은 가장 최근에 측정된 체중을 기준으로 체중 kg당 20  $\text{ml}$ 로 계산하였다. 사료는 고지방식이(high-fat diets: 60 kcal% fat) Research Diet Inc.(USA)를 자유 섭취하게 하였다. 일반증상 관찰은 시험기간 중 모든 동물에 대하여 매일 일반상태, 빈사 및 사망 유무 관찰을 하였다.

[0089] 1) 체중변화 분석

[0090] 각 동물의 체중은 전자저울을 이용하여 투여개시 직전에 측정하고 이후부터는 주 2회씩(매주 3일 및 7일째), 그리고 도살일에 측정하였다. 도살일 전날 저녁부터 하룻밤 동안은 절식시켰다. 체중변화 결과를 하기 표 3 및 도 1에 나타내었다.

표 3

[0091]

|       | 0주(g) | 1주(g) | 2주(g) | 3주(g)  | 4주(g)  | 5주(g)  | 6주(g) |
|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|-------|
| 대조군   | 22.62 | 23.22 | 24.69 | 26.97  | 28.55  | 30.50  | 32.59 |
| 시험군 1 | 23.85 | 24.42 | 25.80 | 27.32  | 28.48  | 30.07  | 31.70 |
| 시험군 2 | 22.35 | 23.63 | 25.15 | 27.11  | 28.39  | 29.63  | 30.77 |
| 시험군 3 | 22.44 | 23.78 | 25.31 | 27.00  | 27.54  | 28.56  | 29.99 |
|       | 7주(g) | 8주(g) | 9주(g) | 10주(g) | 11주(g) | 12주(g) |       |
| 대조군   | 34.01 | 35.31 | 36.48 | 38.50  | 39.72  | 41.42  | -     |
| 시험군 1 | 32.54 | 33.92 | 34.34 | 35.73  | 37.16  | 38.45  | -     |
| 시험군 2 | 31.68 | 33.12 | 33.51 | 34.59  | 35.49  | 36.21  | -     |
| 시험군 3 | 30.98 | 31.69 | 32.54 | 32.83  | 33.19  | 34.10  | -     |

[0092] 상기 표 3 및 도 1에 나타난 바와 같이, 실시예 7의 화합물을 경구투여하여 투여량에 따른 실험동물의 체중변화를 분석한 결과, 초기 3주간까지는 시험군 1 내지 시험군 3 사이에 체중의 차이가 없었다. 그러나, 3주 이후부터 투여량에 따라 농도 의존적으로 차이가 나기 시작하여 시험이 종료되는 12주에서는, 대조군의 평균 체중이 41.12 g이었고, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 투여한 시험군 1은 38.45 g로 6.49%의 체중감소율을 나타내었다. 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 투여한 시험군 2는 36.21 g으로 12.6%의 체중감소율을 나타내었으며, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 투여한 시험군 3은 34.10 g으로 17.7%의 체중감소율을 나타내었다.

[0093] 2) 장기중량의 변화 분석

[0094] 장기중량 측정은 부검 시 간장, 비장, 신장, 심장 및 폐장을 적출하여 습중량을 측정하고, 체중에 대한 상대중량을 산출하였다. 지방조직 중량 측정은 부검 시 신장주위와 부고환주위 및 견갑골 갈색 지방조직을 각각 분리 적출하여 중량을 측정하고, 체중대비 상대중량으로 환산하였다. 장기중량 변화 분석 결과를 하기 표 4 및 도 2에 나타내었다.

표 4

[0095]

|       | 간장(g) | 비장(g) | 신장(g) |      | 심장(g) | 폐(g) | 신장피막 지방(g) | 부고환주위 지방(g) | 견갑골 갈색 지방(g) | 체중(g) |
|-------|-------|-------|-------|------|-------|------|------------|-------------|--------------|-------|
|       |       |       | 왼쪽    | 오른쪽  |       |      |            |             |              |       |
| 대조군   | 1.77  | 0.11  | 0.15  | 0.16 | 0.15  | 0.17 | 1.27       | 2.22        | 1.32         | 40.70 |
| 시험군 1 | 1.58  | 0.11  | 0.16  | 0.17 | 0.16  | 0.17 | 0.98       | 1.89        | 1.46         | 38.25 |
| 시험군 2 | 1.54  | 0.11  | 0.19  | 0.19 | 0.18  | 0.17 | 0.62       | 1.34        | 0.67         | 35.85 |
| 시험군 3 | 1.48  | 0.10  | 0.18  | 0.18 | 0.16  | 0.15 | 0.38       | 1.09        | 0.48         | 33.33 |

[0096] 상기 표 4 및 도 2에 나타난 바와 같이, 상기 시험군 1 내지 시험군 3의 실험동물은 시료 투여 농도에 따라 체중이 농도 의존적으로 감소하는 것을 나타내었으나, 간장, 비장, 신장, 심장 폐장의 중량의 변화는 보이지 않았다. 반면, 신장피막 지방은 대조군이 1.27 g일 때, 시험군 1은 0.98 g, 시험군 2는 0.62 g 및 시험군 3은 0.38 g으로 중량이 감소하였으며, 이는 농도 의존적으로 나타났다. 또한, 부고환주위 지방 및 견갑골 갈색 지방조직에서도 신장피막 지방과 같이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0097] 또한, 상대 장기중량 변화 결과를 하기 표 5 및 도 3에 나타내었다.

표 5

|       | 간장(%)  | 비장(%)  | 신장(%)  |        | 심장(%)  | 폐(%)   | 신장피막<br>지방(%) | 부고환<br>주위 지<br>방(%) | 견갑골<br>갈색 지<br>방(%) |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------------|---------------------|---------------------|
|       |        |        | 왼쪽     | 오른쪽    |        |        |               |                     |                     |
| 대조군   | 0.0435 | 0.0026 | 0.0037 | 0.0039 | 0.0036 | 0.0041 | 0.0311        | 0.0546              | 0.0324              |
| 시험군 1 | 0.0404 | 0.0028 | 0.0042 | 0.0045 | 0.0042 | 0.0045 | 0.0256        | 0.0493              | 0.0380              |
| 시험군 2 | 0.0430 | 0.0030 | 0.0052 | 0.0053 | 0.0049 | 0.0046 | 0.0173        | 0.0375              | 0.0186              |
| 시험군 3 | 0.0445 | 0.0030 | 0.0053 | 0.0053 | 0.0049 | 0.0046 | 0.0114        | 0.0328              | 0.0144              |

상기 표 5 및 도 3에 나타난 바와 같이, 장기의 체중대비 상대 중량에서도 농도 의존적으로 지방의 중량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

### 3) 혈청 분석

채혈 및 혈청분리는 부검 시 복대정맥으로부터 주사기로 혈액을 채취하고 채취된 혈액을 원심분리하여 혈청을 얻었다. 분리된 혈청은 분석 시까지 deep-freezer(-80℃)에 보관하였다. 혈청생화학 검사는 분리된 혈청을 자동 혈청분석장치인 7020 Automatic Analyzer(Hitachi)를 이용하여 분석하였으며, 그 결과를 하기 표 6 및 도 4에 나타내었다.

표 6

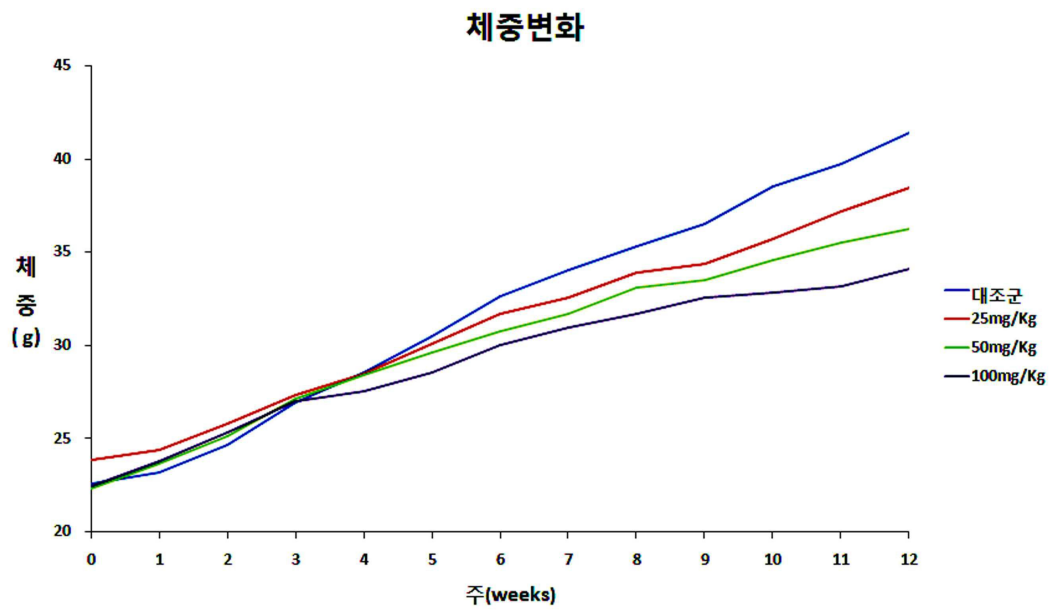
|       | GOT(IU/L) | GPT(IU/L) | CHO(mg/dl) | TG(mg/dl) | HDL(mg/dl) | LDL(mg/dl) |
|-------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|------------|
| 대조군   | 215.5     | 199.0     | 802.2      | 205.3     | 49.7       | 191.8      |
| 시험군 1 | 190.2     | 133.7     | 649.7      | 251.7     | 48.5       | 147.0      |
| 시험군 2 | 148.5     | 132.2     | 472.5      | 175.5     | 52.2       | 102.5      |
| 시험군 3 | 155.5     | 121.5     | 394.8      | 170.7     | 45.2       | 98.8       |

상기 표 6 및 도 4에 나타난 바와 같이, 혈청 중 간 기능 검사에 필수인 GOT 및 GPT는 시료 투여 농도에 의존적으로 감소하였으며, 고지혈증에 관련된 total cholesterol, LDL 또한 농도 의존적으로 감소하였다. 한편, triglyceride, HDL은 시료 농도에 따라 변화하지 않았으나, 상기 실시예 7에서 제조한 본 발명에 따른 시료 투여에 의해 간보호 효과 및 콜레스테롤 감소 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

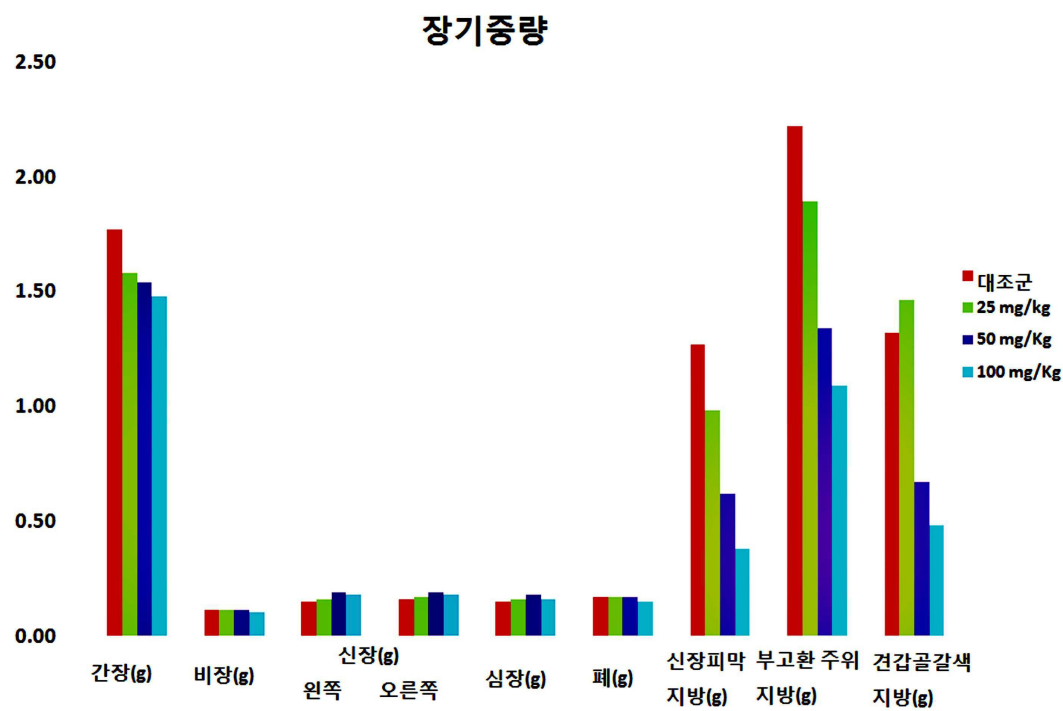
또한, 상기 실시예 7에서 제조한 화합물을 실험동물(랫트)에 경구투여하여 독성 실험을 수행한 결과, 50% 치사량(LD<sub>50</sub>)이 적어도 0.5 g/kg 이상으로 확인되었다. 따라서, 본 발명에 따른 화합물은 안전한 물질로 생각할 수 있다.

도면

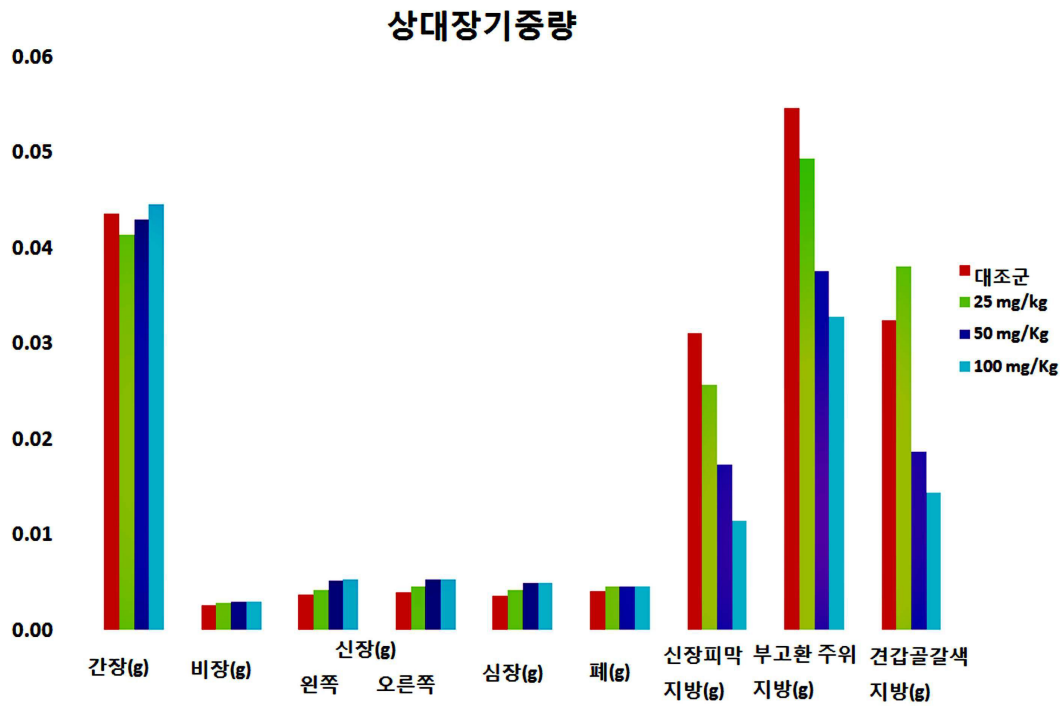
도면1



도면2



도면3



도면4

