



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0020742

(43) 공개일자 2016년02월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07C 235/64 (2006.01) *A61K 31/165* (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01) *C07C 233/64* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0105852

(22) 출원일자 2014년08월14일

심사청구일자 2014년08월14일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)

(72) 발명자

장병철

대구광역시 달서구 상화로58길 86, 105동 2001호
(도원동, 롯데캐슬레이크)

이진호

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 계명대학교
자연과학대학 화학과

박유경

대구광역시 수성구 수성로39안길 16 (중동)

(74) 대리인

양부원

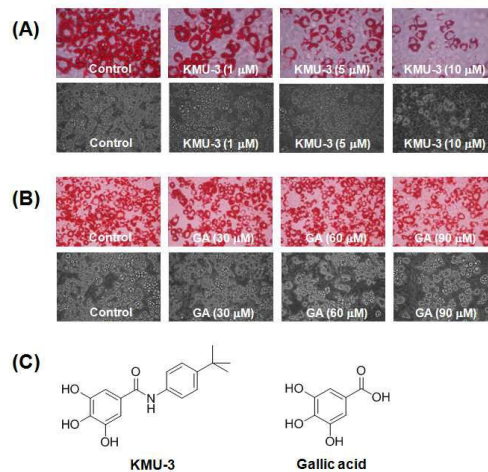
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **항비만 활성을 갖는 신규한 갈산 유도체 및 이 유도체 화합물을 유효성분으로 포함하는 항비만 조성물**

(57) 요약

본 발명은 항비만 활성을 갖는 신규 갈산 유도체 화합물 및 이 유도체 화합물을 유효성분으로 포함하는 항비만용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 유효성분인 갈산 유도체 화합물은 지방전구세포에서 지방세포로 분화 과정 중에서 지방의 생성 및 축적을 억제함으로써 항비만 활성을 나타낸다. 본 발명의 갈산 유도체 화합물의 항비만 효과는 매우 우수하여 항비만용 약제 및 기능성 식품의 활성성분으로 개발될 수 있다.

대표도 - 도3



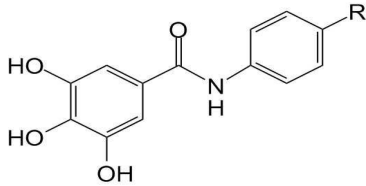
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 R은 C₃-C₆의 직쇄 또는 분지쇄 알킬기이다.

청구항 2

상기 청구항 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 항비만용 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 화합물은 분화 유도된 지방전구세포에서 C/EBP(CCAAT-enhancer binding protein)-α 단백질 및 PPAR(peroxisome proliferator-activated receptors)-γ 단백질의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 2 항에 있어서, 상기 화합물은 분화 유도된 지방전구세포에서 PPAR(peroxisome proliferator-activated receptors)-γ 유전자의 mRNA 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 2 항에 있어서, 상기 화합물은 분화 유도된 지방전구세포에서 STAT-3(signal transducer and activator of transcription-3)의 인산화를 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 2 항에 있어서, 상기 화합물은 분화 유도된 지방전구세포에서 FAS(fatty acid synthase), 렙틴(leptin), RBP4, 또는 RANTES 유전자의 mRNA 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 2 항에 있어서, 상기 조성물은 비만의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 2 항에 있어서, 상기 조성물은 비만의 개선용 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 항비만 활성을 갖는 신규한 갈산(gallic acid) 유도체 및 이 유도체 화합물을 유효성분으로 포함하는 항비만 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

비만은 인슐린 저항성, 타입 2 당뇨, 고지혈증, 고혈압, 심혈관질환 및 암을 포함한 다양한 인간의 질환의 위험 요인이다(1, 2). 비만이 다양한 유전적 이상 및 내분비 이상, 의약, 저대사율, 영양 및 환경 인자 뿐만 아니라 에너지 항상성의 불균형에 의해 발생하는 다인성 질환이라는 증거들이 증가하고 있다(3, 4). 많은 연구결과 지방세포들은 아디포카인(adipokine)을 분비함으로써 에너지 대사에서 중요한 역할을 한다는 것이 증명되고 있다(4, 5, 6). 그러나, 대체로 지방세포의 과도한 분화와 연관된 지방조직의 비정상적 팽창/축적, 지방세포 수의 증가(세포수의 과형성) 및 지방세포에서 지질 함량의 증가(비대)가 비만의 발달과 밀접하게 연관되어 있다는 것을 시사하는 강한 증거가 있다(3, 7, 8). 따라서, 지방세포의 과도한 분화 및/또는 지방세포 수의 증가/비대를 억제하는 어떠한 화합물도 비만 및 비만-관련 질병의 예방 및/또는 치료 가능성을 가질 수 있다.

[0003]

지방전구세포로부터 지방세포로의 분화가 전사인자, 세포 주기 관련 단백질, 지방세포 특이 유전자, 지방생성 효소 및 신호전달 단백질과 같은 다양한 세포 단백질의 복잡한 네트워크에 의해 조절된다는 것을 보여주는 연구 결과들이 보고되어 있다. 예를 들어, C/EBP(CCAAT-enhancer binding protein) - α , - β 및 - γ , 단백질 패밀리와 PPAR(peroxisome proliferator-activated receptors)- γ , - α 및 - β 패밀리 단백질들이 지방세포분화에 매우 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다(9-11). 또한, 최근 JAK-2(janus-activated protein kinase-2)/STAT-3(signal transducer and activator of transcription-3) 신호전달 복합체가 지방세포의 분화 특히 지방생성의 초기 단계에 관련되어 있다는 것을 제시하는 보고가 있다(12). cAMP(adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate), PKCs(protein kinase Cs), 및 ERK-1/2(extracellular-signal regulated protein kinase-1/2)와 같은 다수의 신호전달 단백질 및 인자들이 지방세포의 분화 조절에 중요한 역할을 한다는 것이 알려져 있다(13-16). 3T3-L1는 잘 알려진 지방전구세포이고(17), 지방세포 분화의 분자 조절을 이해하고, 항비만 가능성이 있는 약물이나 제제를 스크리닝하는데 폭 넓게 사용되어 왔었다. 입체 다양성 조합화학을 사용하여 갈산(gallic acid)을 포함한 몇가지 천연물에 기초하여 53가지의 신규한 화합물로 이루어지는 라이브러리를 구축하였다. 본 발명의 연구에서 각각의 53개의 화합물의 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화하는 동안에 지질의 축적에 미치는 영향을 조사하였다. 53개의 화합물 중에서 최초로 갈산 유도체인 N-(4-(tert-부틸)페닐)-3,4,5-트리히드록시벤즈아미드(KMU-3)가 세포독성 없이 지방생성을 강하게 억제한다는 것을 발견하였다. 본 발명의 데이터는 KMU-3 매개 항-지방생성 효과는 PPAR- γ , C/EBP- α , 및 STAT-3의 하향조절과 밀접하게 관련되어 있다는 것을 나타낸다.

[0004]

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005]

(특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0914213호

비특허문헌

[0006]

- (비특허문헌 0001) 1. Kopelman, P.G. 2000. Nature. 404: 635-643.
- (비특허문헌 0002) 2. Cao, Y. 2010. Nat Rev Drug Discov. 9: 107-115.
- (비특허문헌 0003) 3. Ahima, R.S., and J. S. Flier. 2000. Trends Endocrinol Metab. 11:327-332.
- (비특허문헌 0004) 4. Havel, P.J. 2002. Curr Opin Lipidol. 13:51-59.
- (비특허문헌 0005) 5. Spiegelman, B.M., and J. S. Flier. 2001. Cell. 104: 531-543.
- (비특허문헌 0006) 6. Ouchi, N., et al., 2001. Nat Rev Immunol. 11: 85-97.
- (비특허문헌 0007) 7. Bays, H.E. 2009. Am J Med. 122: S26-S37.
- (비특허문헌 0008) 8. Melnikova, I., and D. Wages. 2006. Nat Rev Drug Discov. 5: 369-370.
- (비특허문헌 0009) 9. Cao, Z., R. M. Umek, and S. L. McKnight. 1991. Genes Dev. 5: 1538-1552.
- (비특허문헌 0010) 10. Farmer, S.R. 2006. Cell Metab. 4: 263-273.
- (비특허문헌 0011) 11. Stephens, J.M., et al., 1996. J Biol Chem. 271: 10441-10444.
- (비특허문헌 0012) 12. Zhang, K., et al., 2011. Cell Biochem. 112:488-497.
- (비특허문헌 0013) 13. Martini, C. N., et al., 2009. Mol Cell Endo. 298: 42-47
- (비특허문헌 0014) 14. Zhou, Y., et al., 2006. Int J Biochem Cell Biol. 38: 2151-2163.
- (비특허문헌 0015) 15. Sale, E.M., et al., 1997. Mol Cell Biol. 17: 6068-6075.
- (비특허문헌 0016) 16. Prusty, D., et al., 2002. J Biol Chem. 277: 46226-46232.
- (비특허문헌 0017) 17. Green, H., and M. Meuth. 1974. Cell. 3: 127-133.
- (비특허문헌 0018) 18. Rosen, E.D., and B.M. Spiegelman. 2000. Annu Rev Cell Dev Biol. 16: 145-171.
- (비특허문헌 0019) 19. Konishi, Y., et al., 2003. Biosci Biotechnol Biochem. 67: 2317-2324.
- (비특허문헌 0020) 20. Tammela, P., et al., 2004. Arch Biochem Biophys. 425: 193-199.
- (비특허문헌 0021) 21. Rosen, E.D., and O.A. MacDougald. 2006. Nat Rev Mol Cell Biol. 7: 885-896.
- (비특허문헌 0022) 22. Lehrke, M., and M. A. Lazar. 2005. Cell. 123: 993-999.
- (비특허문헌 0023) 23. Linhart, H.G. et al., 2001. Proc Natl Acad Sci USA. 98: 12532-12537.
- (비특허문헌 0024) 24. Rosen, E.D. et al., 1999. Mol Cell. 4: 611-617.
- (비특허문헌 0025) 25. Tanaka, T. et al., 1997. EMBO J. 16: 7432-7443.
- (비특허문헌 0026) 26. Christy, R. J. et al., 1991. Proc Natl Acad Sci USA. 88: 2593-2597.
- (비특허문헌 0027) 27. Clarke, S. L. et al., 1997. Biochem Biophys Res Commun. 240: 99-103.
- (비특허문헌 0028) 28. Christy, R. J. et al., 1989. Genes Dev. 3: 1323-1335.
- (비특허문헌 0029) 29. Gustafson, B., et al., Biochem Biophys Res Commun. 308: 933-939.
- (비특허문헌 0030) 30. Hwang, C., T. et al., 1997. Annu Rev Cell Dev Biol. 13: 231-259.
- (비특허문헌 0031) 31. Lakshmanan, M. R., et al., 1972. Proc Natl Acad Sci USA. 69: 3516-3519.
- (비특허문헌 0032) 32. Coe, N.R., and D. A. Bernlohr. 1998. Biochim Biophys Acta. 1391: 287-306.

- (비특허문헌 0033) 33. Rubin, C. S., et al., 1978. J Biol Chem. 253: 7570-7578.
- (비특허문헌 0034) 34. Gregoire, F. M. et al., 1998. Physiol Rev. 78: 783-809.
- (비특허문헌 0035) 35. F, B. 2005. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 19: 483-499.
- (비특허문헌 0036) 36. Trujillo, M. E., and P. E. Scherer. 2005. J Intern Med. 257: 167-175.
- (비특허문헌 0037) 37. Berg, A.H. et al., 2001. Nat Med. 7: 947-953.
- (비특허문헌 0038) 38. Combs, T.P. et al., 2001. J Clin Invest. 108: 1875-1881.
- (비특허문헌 0039) 39. Satoh, H. et al., 2005. Diabetes. 54: 1304-1313.
- (비특허문헌 0040) 40. Yadav, A. et al., 2013. Clin Chim Acta. 417: 80-84.
- (비특허문헌 0041) 41. Wang, S.N. et al., 2010. J Formos Med Assoc. 109: 422-429.
- (비특허문헌 0042) 42. Cai, G., et al., 2008. Cytokine. 44: 242-247.
- (비특허문헌 0043) 43. Stewart, W.C. et al., 1999. Biochim Biophys Acta. 1452: 188-196.
- (비특허문헌 0044) 44. Shang, C.A. and M. J. Waters. 2003. Mol Endocrinol 17: 2494-2508.
- (비특허문헌 0045) 45. Zhang, K. et al., 2011. J Cell Biochem. 112: 488-497.
- (비특허문헌 0046) 46. Deo, D.D. et al., 2002. J Biol Chem. 277: 21237-21245
- (비특허문헌 0047) 47. Wang, D. et al., 2009. Biol Cell. 102: 1-12.
- (비특허문헌 0048) 48. Mayr, B., and M. Montminy. 2001. Nat Rev Mol Cell Biol. 2: 599609.
- (비특허문헌 0049) 49. Xu, H., S. Washington, M. F. Verderame, and A. Manni. 2008. Breast Cancer Res Treat. 107: 63-70.
- (비특허문헌 0050) 50. Matsuda, M. and I. Shimomura. 2013. Obes Res Clin Pract. 7: 330-341.
- (비특허문헌 0051) 51. Behloul, N. and G. Wu. 2013. Eur J Pharmacol. 698:31-38.
- (비특허문헌 0052) 52. Koh, E. H. et al., . 2011. Am. J. Med. 124: 85.e1-8.
- (비특허문헌 0053) 53. Lee, J.H. et al., 2013. Cancer Lett. 345: 140-8
- (비특허문헌 0054) 54. Song, N.J. et al., 2013. J Lipid Res. 54:1385-1396.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 비만 억제에 효과적인 후보물질을 개발하기 위해 연구 노력하였다. 그 결과, 천연 화합물인 갈산(gallic acid)으로부터 유도된 신규 화합물들을 성공적으로 합성하였으며, 이 합성된 화합물들이 지방전구세포의 지방세포로의 분화 유도 과정에서 지방의 생성 및 축적을 억제함으로써 우수한 항비만 활성을 가짐을 실험적으로 입증하여 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 항비만 활성을 갖는 신규 화합물을 제공하는데 있다.

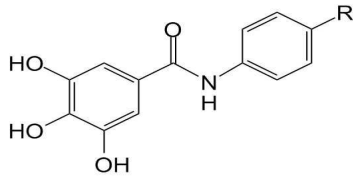
[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 항비만용 조성물을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다:

화학식 1



[0012]

[0013] 상기 화학식 1에서 R은 C₃-C₆의 직쇄 또는 분지쇄 알킬기이다.

[0014] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 천연 화합물인 갈산(gallic acid)을 출발물질로하여 합성된 신규한 갈산 유도체 화합물이다.

[0015] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 항비만용 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 화학식 1에서 치환기 R이 프로필, n-부틸, tert-부틸, n-펜틸, 또는 n-헥실기인 화합물을 유효성분으로 포함하는 항비만용 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 상기 화합물은 분화 유도된 지방전구세포에서 지방의 생성 및 축적을 억제한다.

[0018] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 상기 화합물은 분화 유도된 지방전구세포에서 C/EBP- α 단백질 및 PPAR- γ 단백질의 발현을 억제하며, 상기 PPAR- γ 유전자의 mRNA 발현을 억제한다.

[0019] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 상기 화합물은 분화 유도된 지방전구세포에서 STAT-3 단백질의 인산화를 억제한다.

[0020] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 상기 화합물은 분화 유도된 지방전구세포에서 FAS(fatty acid synthase), 렙틴(leptin), RBP4, 또는 RANTES 유전자의 mRNA 발현을 억제한다.

[0021] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 상기 조성물은 약제학적 조성물 또는 식품 조성물의 형태로 제공될 수 있다.

[0022] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물 형태로 제공되는 경우 (a) 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 형태로 제공된다.

[0023] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0025] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 따라 다양한 방법으로 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.001-1000 mg/kg(체중)이다.

[0026] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0027] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로

제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명의 조성물이 식품 조성물 형태로 제공되는 경우, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 비만의 개선용 식품 조성물의 형태로 제공된다.

[0029] 본 발명의 식품 조성물은 상술한 유효성분 이외에 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함한다. 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 감미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다.

[0030] 감미제로서 천연 감미제[타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리진 등)] 및 합성 감미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 유효성분 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

발명의 효과

[0031] 본 발명은 항비만 활성을 갖는 신규 갈산 유도체 화합물 및 이 유도체 화합물을 유효성분으로 포함하는 항비만용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 유효성분인 갈산 유도체 화합물은 지방전구세포에서 지방세포로 분화 과정에서 지방의 생성 및 축적을 억제함으로써 항비만 활성을 나타낸다. 본 발명의 갈산 유도체 화합물의 항비만 효과는 매우 우수하여 항비만용 약제 및 기능성 식품의 활성성분으로 개발될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 53개의 신규 화합물들이 3T3-L1 지방전구세포의 생존능에 미치는 영향을 측정한 결과이다. 3T3-L1 지방전구세포들을 최종농도 10 μ M의 테스트 화합물로 24시간 동안 처리하거나 처리하지 않았다. 세포 생존능은 MTS 분석으로 측정하였다. 데이터는 3번의 독립적인 실험을 3회 반복하여 평균 $\pm$ SE으로 나타내었다.

도 2는 3T3-L1 지방세포의 분화동안에 세포내 트리글리세라이드(TG)의 함성에 미치는 53개의 신규 화합물들의 영향을 측정한 결과이다. 3T3-L1 지방전구세포를 MDI (M, IBMX (0.5mM); D, 텍사메타손(0.5 μ M); I, 인슐린(5 μ g/ml)), 인슐린(5 μ g/ml) 및 FBS(10%)를 포함하는 유도배지로 최종농도 10 μ M의 테스트 화합물의 존재 또는 부존재하에서 8일간 분화를 유도하였다. 8일째날에, 세포내 TG 함량을 AdipoRed 분석법으로 정량하였다. 측정값들은 3번의 독립적 실험의 3회 반복의 평균 $\pm$ SE으로 나타내었다. *P < 0.05 및 **P < 0.01 vs. 대조군(화합물 무처리군).

도 3은 갈산의 신규 합성 유도체 KMU-3 화합물이 3T3-L1 지방전구세포 분화동안에 지질 축적에 미치는 영향을 측정한 결과이다(패널 A 및 패널 B). 3T3-L1 지방전구세포들을 MDI, 인슐린 및 FBS를 포함하는 유도배지로 지정한 농도의 KMU-3 (A) 또는 갈산(GA)(B)의 존재 또는 부존재하에서 8일간 분화를 유도하였다. 8일째 날에, 세포내 지질 함량은 Oil Red O 염색에 의해 분석하였다. 분화유도 처리 이후에 세포의 위상차 이미지도 얻었다((A) 또는 (B)의 하부 패널들). (A) 및 (B)에서의 각 사진은 3회 독립 실험의 대표도이다. (C): KMU-3 및 갈산(GA)의 화학구조를 나타내었다.

도 4는 3T3-L1 지방세포 분화동안에 C/EBP- α , C/EBP- β , PPAR- γ , 및 STATs의 발현 및/또는 활성에 미치는 KMU-3의 영향을 측정한 결과이다. (A,B,C) 3T3-L1 지방전구세포들을 MDI, 인슐린, 및 FBS를 포함하는 유도배지로, KMU-3(10 μ M)의 존재 또는 부존재하에서 분화를 유도하고, 각각 2일, 5일 및 8일 시점에서 세포들을 회수하였다. 지정된 시점에서 세포 단백질을 추출하고, 웨스턴 블롯 분석(패널 A 및 패널 C) 및 RT-PCR 분석(패널 B)을 행하였다. 패널 A, B, 및 C에서의 각 사진은 3회 독립실험의 대표도이다.

도 5a - 도 5c는 MDI 및/또는 IBMX와 함께 인큐베이션한 3T3-L1 지방전구세포에서 STATs, JAKs, Src, SHP-1, 및 ERK-1/2의 발현 및/또는 활성에 미치는 KMU-3의 영향을 측정한 결과이다.

도 5a는 MDI를 포함하는 유도배지와 함께, KMU-3(10 μ M)의 존재 또는 부존재하에서 3T3-L1 지방전구세포를 처리하고, 각각 45분, 2시간, 8시간, 및 48시간의 시점에서 세포들을 회수하였으며, 지정된 시점에서 세포단백질을 추출하고 웨스턴 블롯에 의해 분석한 결과이다. 3회 독립적 실험의 대표도이다.

도 5b는 3T3-L1 지방전구세포를 처리물질 부존재(N), IBMX(0.5 mM), 텍사메타손(Dex, 0.5 μ M) 및 인슐린(Ins, 5 μ g/ml)으로 각각 2시간 동안 처리하고, 세포 단백질을 추출한 후에 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다. 3회 독립적 실험의 대표도이다.

도 5c는 KMU-3 (10 μ M)의 존재 또는 부존재하에서 2시간 동안 IBMX(0.5 mM)으로 3T3-L1 지방전구세포를 처리하고, 세포 단백질을 추출한 후에 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다. 3회 독립적 실험의 대표도이다.

도 6a - 도 6c는 3T3-L1 지방전구세포 분화 동안에 지질 축적 및/또는 STAT-3 인산화에 미치는 KMU-3 또는 AG490의 영향을 측정된 결과이다.

도 6a는 MDI, 인슐린 및 FBS를 포함하는 유도배지로 KMU-3의 존재 또는 부존재하에서 하기 실시예에서 설명된 a 내지 g의 프로토콜에 따라 지정된 시점(2일, 5일, 및 8일)에서 3T3-L1 지방전구세포를 분화를 유도한 결과이다. 각 시점에서의 세포 지질 함량은 Oil Red O 염색에 의해 평가하였다.

도 6b 및 도 6c는 MDI, 인슐린, 및 FBS를 포함하는 유도배지로, 지정된 농도의 AG490(JAK-2/STAT-3 억제자)의 존재 또는 부존재하에서 8일간 3T3-L1 지방전구세포의 분화를 유도하고, 8일째에 지질 축적 및 트리글리세라이드(TG) 함량을 각각 Oil Red O 염색 또는 AdipoRed 분석으로 분석한 결과이다. 도 6b의 아래쪽 패널은 처리 후에 세포들의 위상차 이미지를 나타낸 결과이다.

도 6d는 3T3-L1 지방전구세포를 지정된 농도의 AG490, KMU-3 또는 갈산(GA)의 존재 또는 부존재하에서 2시간 동안 MDI로 처리하거나 MDI로 처리하지 않은 후에, 세포 단백질을 추출하고 웨스턴 블롯 분석으로 분석한 결과이다.

도 7은 3T3-L1 지방세포분화 동안에 지방세포 특이 유전자 및 아디포카인(adipokines)의 mRNA 발현에 미치는 KMU-3 화합물의 영향을 측정된 결과이다. 3T3-L1 지방전구세포를 MDI, 인슐린 및 FBS를 포함하는 유도 배지로 KMU-3(10 μ M)의 존재 또는 부존재하에서 분화를 유도하고, 각각 2일, 5일, 및 8일 시점에서 세포를 회수하였다. 각 시점에서 세포 mRNA를 추출하고 RT-PCR에 의해 분석하였다. 각 사진은 3회 독립 실험의 대표값이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

실험 재료 및 방법

1. 실험재료

폴리클로날 C/EBP- α 항체, 모노클로날 C/EBP- β 항체, 모노클로날 PPAR- γ 항체, 모노클로날 STAT-3 항체, 모노클로날 phospho-STAT-3 (p-STAT-3) 항체, 폴리클로날 STAT-1 항체, 모노클로날 p-STAT-1 항체, 폴리클로날 STAT-5 항체, 폴리클로날 p-STAT-5 항체, 폴리클로날 JAK-2 항체, 폴리클로날 p-JAK-2 and 폴리클로날 Src-homology 2 (SH2) domain phosphatase-1 (SHP-1) 항체 들은 Santa Cruz Biotechnology사(Santa Cruz, CA)로부터 구입하였다. 폴리클로날 JAK-1 항체, 폴리클로날 p-JAK-1 항체, 폴리클로날 Src 항체, 폴리클로날 p-Src 항체, 폴리클로날 ERK-1/2 항체 및 폴리클로날 p-ERK-1/2 항체 들은 Cell Signaling (Danvers, MA)으로부터 구입하였다. 모노클로날 β -액틴(actin) 항체, 갈산(gallic acid) 및 AG490은 Sigma사(St. Louis, MO)로부터 구입하였다.

2. N-(4-(터트-부틸)페닐)-3,4,5-트리히드록시벤즈아미드(KMU-3)의 합성

갈산(0.20 g, 1.1 mmol)의 10 mL N,N-디메틸포름아미드 용액에, 1-히드록시벤조트리아졸(0.28 g(2.12 mmol),

1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보이미드(0.19 g(1.59 mmol), 및 4-터트-부틸아닐린(0.96 mL, 8.1 mmol)을 첨가하였다. 반응혼합물을 상온에서 2시간 동안 교반한 후에, 용매를 감압하에서 제거하였다. 잔존물을 에틸아세테이트에 녹이고, 이를 포화 수성 소듐바이카보네이트 용액, 및 5% 시트르산 용액, 물, 및 브라인(brine)으로 순차적으로 세정하였다. 유기층은 마그네슘 설페이트를 사용하여 건조하고 여과하였다. 여과물을 감압하에서 농축하고, 헥산:에틸아세테이트:메탄올(7:7:1) 혼합물을 용출용매로 사용한 플래시 컬럼 크로마토그래피(flash column chromatography)에 의해 정제하여, 0.070g의 산물을 28% 수율로 제조하였다. ¹HNMR(CDCl₃+CD₃OD, 400MHz) δ 7.54 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.37(d, J=8.8Hz, 2H), 6.96(s, 2H), 1.32(s, 9H); ¹³CNMR(CDCl₃+CD₃OD, 100MHz) δ 171.05, 151.26, 148.85, 140.58, 139.47, 129.52, 129.33, 124.47, 110.80, 38.20, 35.11; ESI-MS:m/z 302(M+H)⁺, 324(M+Na)⁺. 본 발명의 실험에서 사용한 다른 갈산 유도체 화합물들은 모화합물을 제외하고 KMU-3 화합물의 제조와 유사한 제조방법으로 제조하였다. KMU-3 및 다른 유도체 화합물들을 100% DMSO에 용해시키고 10 mM 스탁 용액으로 제조하였다.

3. 세포 배양 및 분화

3T3-L1 지방전구세포(ATCC, Manassas, VA)를 접촉 억제 단계까지 성장시키고, 10% 송아지혈청(BCS, Gibco) 및 페니실린-스트렙토마이신(Welgene, Daegu)이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 2일간 포스트-컨플루언트(post-confluent) 단계에서 유지하였다. 이어서, 배지를 10%우태아혈청(FBS, Welgene, Daegu)과, 0.5 mM 3-이소부틸-1-메틸잔틴(M)(Sigma), 0.5 텍사메타손(D)(Sigma) 및 5 /ml 인슐린(I)(Sigma)을 포함하는 호르몬 콕테일(MDI)이 첨가된 DMEM으로 교체하고, 지정 농도의 KMU-3의 존재 또는 부존재하에서 분화를 유도하였다. 48 시간(2 일간) MDI-유도를 행한 후에, 분화 유도 배지를 10% FBS 및 5 /ml의 인슐린이 첨가된 DMEM으로 교체하여 지정된 농도의 KMU-3의 존재 또는 부존재하에서 배양하였다. 이어서, 세포에 지정된 농도의 KMU-3가 포함되거나 포함되지 않은 10% FBS가 첨가된 DMEM을 배양 8일째가 될 때까지 격일로 교체하여 주었다. 8일째에 지방전구세포는 둥글고 지방구로 채워진 성숙한 지방세포가 되었다.

4. 세포생존능 분석

3T3-L1 지방전구세포를 96-웰 플레이트에 접종하고 하룻밤 배양하였다. 세포를 지정된 농도로 53개의 화합물의 존재 또는 부존재하에서 24시간 동안 배양하고, MTS (3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-5-(3-카복시메톡시페닐)-2-(4-설포페닐)-2H-테트라졸리움) 시약(Promega, Madison, WI)으로 37℃에서 1.5시간 동안 추가 배양하였다. 흡광도를 마이크로플레이트 리더(microplate reader, Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 490 nm에서 측정하였다.

5. Oil red O 염색

분화유도 8일째에 3T3-L1 세포를 PBS로 2회 세정하고, 10% 포르말데히드로 상온에서 2시간 동안 고정시키고, 60% 이소프로판올로 세정한 후 완전히 건조시켰다. 이어서 고정된 세포는, 99% 이소프로판올내의 0.5% 스탁 용액을 증류수로 6:4 비율로 1시간 동안 상온에서 희석하여 제조한 Oil red O 작용시약으로 염색한 후에, 증류수로 2회 세정하였다. 지방구는 광학현미경(Nikon)을 사용하여 관찰하였다.

6. AdipoRed 분석법에 의한 세포내 트리글리세라이드(TG) 함량의 정량분석

처리 후 8일이 지난 시점에, 상업적으로 구입가능한 AdipoRed Assay Reagent kit(Lonza)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 지방 함량을 측정하였다. 10분간의 인큐베이션 후에, 플레이트를 Victor3(Perkin Elmer)에 두고, 형광을 485 nm의 여기 파장 및 572 nm의 방출 파장으로 측정하였다.

7. 전세포 용해물의 제조

지정한 시점에서, 3T3-L1 세포를 PBS로 2회 세정하고, 변경한 RIPA 완충액 [50 mM Tris-Cl (pH 7.4), 150 mM

NaCl, 0.1% 소듐 도데실 설페이트, 0.25% 소듐 디옥시콜레이트, 1% Triton X-100, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 프로테아제 억제제 콕테일(1x)]에 노출시켰다. 세포용해물을 1.5 mL 튜브에 수집하고 12,000 rpm에서 4℃에서 20분간 원심분리하였다. 상등액을 취하고 단백질의 농도를 Bradford reagent(Bio-Rad)로 측정하였다.

8. 웨스턴 블롯 분석

단백질(50 µg)을 SDS-PAGE(10%)으로 분리한 후 니트로셀룰로오스 멤브레인(Millipore)상으로 이전시켰다. 멤브레인을 0.05%(vol/vol) Tween 20(TBST)이 첨가된 TBS(10 mM Tris, 150 mM NaCl)으로 세정하고 5%(wt/vol) 탈지유를 포함하는 TBST으로 블로킹하였다. 멤브레인을 4℃에서 C/EBP-α (1:1,000), C/EBP-β (1:1,000), PPAR-γ (1:1,000), STAT-3 (1:1,000), p-STAT-3 (1:1,000), STAT-1 (1:1,000), p-STAT-1 (1:1,000), STAT-5 (1:1,000), p-STAT-5 (1:1,000), JAK-2 (1:1,000), p-JAK-2 (1:1,000), SHP-1 (1:1,000), JAK-1 (1:2,000), p-JAK-1 (1:2,000), Src (1:2,000), p-Src (1:2,000), ERK-1/2 (1:2,000), p-ERK-1/2 (1:2,000), β-액틴 (1:10,000)에 특이적인 항체와 함께 하룻밤 인큐베이션하였다. 이어서, 멤브레인을 호오스래디쉬 퍼옥시다제에 커플링된 2차 항체에 상온에서 2시간 동안 노출시켰다. 멤브레인을 상온에서 TBST로 3회 세정하였다. 면역반응성은 ECL 시약으로 검출하였다. 동일량의 단백질 로딩량의 확인은 액틴(actin) 단백질의 발현 수준을 측정하여 행하였다.

9. RT-PCR(Reverse transcription-polymerase chain reaction)

지정된 시점에서 총 세포 RNA를 대조군 세포 또는 KMU-3 처리된 3T3-L1 세포로부터 RNAzol-B(Tel-Test, Friendswood, TX)을 사용하여 분리하였다. 3 µg의 총 RNA를 랜덤 헥사데옥시뉴클레오타이드 프라이머 및 역전사 효소를 사용하여 역전사하였다. 단일쇄 cDNA를 다음의 프라이머들을 사용하여 PCR에 의해 증폭하였다. 증폭에 사용된 프라이머 서열은 다음의 표 1에 정리하였다.

표 1

유전자	프라이머 서열
C/EBP-α	센스: 5' -TTACAACAGGCCAGGTTTCC-3' (서열번호 1)
	안티센스: 5' -CTCTGGGATGGATCGATTGT-3' (서열번호 2)
C/EBP-β	센스: 5' -CGAGCGCAACAATCGCGG-3' (서열번호 3)
	안티센스: 5' -TACTCAGGCGCCGGCTGACA-3' (서열번호 4)
PPAR-γ	센스: 5' -GGTGAACTCTGGGAGATTTC-3' (서열번호 5)
	안티센스: 5' -CAACCATTTGGTCAGCTCTC-3' (서열번호 6)
FAS(Fatty Acid Synthase)	센스: 5' -TTGTGGGACTACAGAATGC-3' (서열번호 7)
	안티센스: 5' -AACAGCCTCAGAGCGACAAT-3' (서열번호 8)
aP2(fatty acid binding protein)	센스: 5' -AGTGGGAGTGGGCTTTGCCA-3' (서열번호 9)
	안티센스: 5' -GGGCCCCGCATCTAGGGTTA-3' (서열번호 10)
아디포넥틴(Adiponectin)	센스: 5' -GGAGATGCAGGTCTTCTGGT-3' (서열번호 11)
	안티센스: 5' -TCCTGATACTGGTCGTAGGTGAA-3' (서열번호 12)
렙틴(Leptin)	센스: 5' -CCAAAACCCCTCATCAAGACC-3' (서열번호 13)
	안티센스: 5' -CTCAAAGCCACCCTCTGT-3' (서열번호 14)
RBP4(retinol binding protein-4)	센스: 5' -ACTGGGGTGTAGCCTCCTTT-3' (서열번호 15)
	안티센스: 5' -GGTGTCTAGTCCGTGTCG-3' (서열번호 16)
RANTES(regulated on activation, normal T cell expressed and secreted)	센스: 5' -TCCAATCTTGAGTCGTGTTG-3' (서열번호 17)
	안티센스: 5' -TCTGGTTGGCACACACTTG-3' (서열번호 18)
액틴(Actin)	센스: 5' -GGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3' (서열번호 19)
	안티센스: 5' -GGTAGGAACACGGAAGGCCA-3' (서열번호 20)

적용한 PCR 조건은 다음과 같다: C/EBP-α: 95℃에서 변성 30초, 62℃에서 어닐링 30초, 및 72℃에서 연장 30초의 30 사이클. C/EBP-β: 95℃에서 변성 30초, 53℃에서 어닐링 30초, 및 72℃에서 연장 30초의 30 사이클. PPAR-γ: 95℃에서 변성 30초, 53℃에서 어닐링 30초, 및 72℃에서 연장 30초의 30 사이클. FAS: 95℃에서 변

성 15초, 55℃에서 어닐링 40초, 및 68℃에서 연장 45초의 30 사이클. aP2: 95℃에서 변성 30초, 59℃에서 어닐링 30초, 및 72℃에서 연장 30초의 30 사이클. 아디포넥틴(Adiponectin): 95℃에서 변성 1분, 53℃에서 어닐링 1분, 및 72℃에서 연장 1분의 30 사이클. 렙틴(Leptin): 95℃에서 변성 1분, 57℃에서 어닐링 1분, 및 72℃에서 연장 1분의 30 사이클. RBP4: 95℃에서 변성 1분, 53℃에서 어닐링 1분, 및 72℃에서 연장 1분의 35 사이클. RANTES: 95℃에서 변성 1분, 56℃에서 어닐링 1분, 및 72℃에서 연장 1분의 35 사이클. 액틴(Actin): 95℃에서 변성 30초, 57℃에서 어닐링 30초, 및 72℃에서 연장 1분의 25 사이클. 액틴 mRNA의 발현수준을 지방세포 특이 유전자 및 아디포카인 mRNA의 상대적 발현을 평가하는데 내부 대조군으로 사용하였다.

10. 통계분석

MTS 분석을 3회 중복 수행하였고 3회 반복하였다. 데이터는 평균±표준편차(SE)으로 표시하였다. 유의한 차이는 일원 ANOVA에 의해 결정하였다. 모든 유의성 테스트는 p 값 <0.05에 기초하였다.

실험결과

1. 신규 화합물들은 3T3-L1 지방전구세포에 대해 세포독성을 갖지 않았다.

본 실험의 목적은 3T3-L1 세포에서 지방생성을 억제할 수 있는 화합물들을 확인하는 것이다. 먼저, 테스트 화합물들이 세포독성을 갖는지에 대해 확인하고자, 지방전구세포들을 53개 합성한 각 화합물들을 10 μM의 농도로 24시간 처리하거나 처리하지 않은 후에, MTS 분석법을 사용하여 세포 생존능 변화를 측정하였다. 도 1에서 보여지는 바와 같이, 이들 화합물들은 3T3-L1 지방전구세포에 세포독성을 나타내지 않았으며, 오히려 이들 화합물들중에서 KMU-37은 세포 생존능을 실제 향상시켰다.

2. 갈산 유도체인 신규 합성 화합물 KMU-3 강력한 항-지방생성 효과를 나타내었다.

다음으로 AdipoRed 분석법을 사용하여 최종 10 μM의 농도에서 각 화합물들이 지방세포 분화 과정 동안에 지방의 축적에 미치는 영향을 조사하였다. 지방생성 각테일 및 유도제(MDI, 인슐린, 및 FBS)를 포함하는 유도배지와 함께 인큐베이션한 3T3-L1 지방전구세포에서 세포분화 8일째에 트리글리세라이드(TG) 함량이 높게 나타났다(도 2). 그러나, 신규 합성한 갈산 유도체 KMU-3로 처리한 세포는 mock-처리된 세포와 비교하여 TG 함량이 크게 감소하였음을 보여주었다. KMU-7도 TG 함량을 실질적으로 감소시켰다. 반면에, KMU-10 및 KMU-11와 같은 다른 화합물로 처리한 경우 유도배지와 함께 인큐베이션한 지방전구세포에서 TG 함량이 증가하였는데, 이러한 결과는 상기 화합물들이 친-지방생성 효과를 갖는다는 것을 시사한다. 다른 화합물들로 처리한 경우 지방생성 유도 실험의 조건하에서 TG 함량에 별다른 영향을 미치지 않았다. KMU-3이 매우 강력한 TG 합성 저해 효과를 보였기 때문에, 이를 선택하여 추가 실험을 진행하였다.

다음으로 KMU-3의 지방-감소 효과는 Oil Red O 염색에 의해 측정하였다. 도 3의 (A)에 나타난 바와 같이, 지방구(lipid droplet)들은 3T3-L1 지방전구세포에서 유도배지로 세포 분화를 유도한 8일째에만 다수 형성되었다. 그러나, 지방전구세포를 KMU-3로 처리한 경우 지방구의 양이 용량 의존적 방식으로 현저하게 감소하였다. 확실하게, 10 μM 농도의 KMU-3로 처리한 경우 지방구가 최대로 감소하였다. 홍미롭게도, 모 화합물인 갈산(gallic acid, GA)을 30 μM, 60 μM 또는 90 μM의 농도로 유도배지 배양과 함께 처리하였을 때, 지방전구세포에서의 지방구 생성에는 영향이 없었다. KMU-3의 지방감소효과 및 GA의 효과 없음은 광학현미경측정에 의해서도 관찰할 수 있었다(도 3의 (A) 및 (B)의 아래쪽 패널들). KMU-3 및 GA의 화학구조는 도 3의 (C)에 각각 나타내었다.

3. KMU-3는 지방세포 분화 동안에 C/EBP-α 및 PPAR-γ의 발현과 STAT-3의 인산화를 차별적으로 억제한다.

KMU-3-매개된 항 지방생성 효과의 분자 및 세포 메커니즘을 이해하기 위해, KMU-3(10 μM)가 지방생성에 관여하는 C/EBPs, PPARs, 및 STATs 패밀리의 발현 및/또는 활성화(인산화)에 미치는 영향을 조사하였다. 웨스턴 블롯 분석 결과 MDI, 인슐린 및 FBS를 포함하는 유도배지의 처리에 의해 3T3-L1 지방전구세포에서 생산되는 C/EBP-α, C/EBP-β 및 PPAR-γ 단백질 수준이 2일, 5일, 및 8일 시점에서 시간 의존적 방식으로 증가하였다는 것을 확인하였다(도 4의 패널 A). 중요하게, KMU-3은 C/EBP-α 및 PPAR-γ의 지방생성 의존성 단백질 발현을 억제하였으나, C/EBP-β의 발현에는 영향을 미치지 않았다. RT-PCR 분석 결과, 도 4의 패널 B에서 보여지는 바

와 같이, 지방세포 분화 동안에 C/EBP- α , C/EBP- β , 및 PPAR- γ 의 mRNA 발현이 시간 의존적으로 증가되는 것이 입증되었다. 그러나, KMU-3은 지방세포 분화 동안에 PPAR- γ 의 mRNA 발현을 억제하였으나, C/EBP- α 및 C/EBP- β 의 mRNA 발현에는 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 KMU-3가 PPAR- γ 및 C/EBP- α 를 각각 전사 수준 및 전사 후(번역) 수준에서 하향 조절한다는 것을 시사한다. 대조군 액틴 단백질 및 mRNA 발현은 이러한 실험 조건들하에서 일정하게 유지되었다(도 4의 패널 A 및 패널 B). 도 4의 패널 C에서 보여지는 바와 같이, MDI, 인슐린 및 FBS를 포함하는 유도 배지로 3T3-L1 지방전구세포를 분화유도 시켰을 때에 2일, 5일 및 8일에 생성된 STAT-3의 인산화 수준이 STAT-1 및 STAT-5의 인산화 수준보다 각각 더욱 높았다. 그러나, KMU-3는 지방세포 분화 동안에 지정된 시점에서 STAT-1, STAT-3, 및 STAT-5의 인산화 수준 및 총 단백질 수준에 아무런 영향을 주지 않았거나 영향을 거의 주지 않았다.

[0066]

다음으로 MDI에 의해 유도되는 지방생성의 초기 단계 동안에 45분, 2시간, 8시간 및 48시간의 처리시간 각각에서 어떠한 신호전달 단백질들이 활성화/발현되는지와 KMU-3가 이들을 억제하는지를 조사하였다. 도 5a에서 보여지는 바와 같이, 놀랍게도, STAT-3 인산화가 시간 의존적 방식으로 증가하고 2시간 시점에서 최고점에 이르지 만, MDI에 의해 유도된 STAT-3 인산화는 KMU-3에 의해 억제되었다. STAT-1, STAT-5, JAK-1, JAK2, Src, SHP-1 및 ERK-1/2을 포함하는 다른 신호전달 단백질들도 실제 인산화되었지만, 이들의 인산화 수준은 MDI에 의해 처리된 지방전구세포에서 KMU-3가 처리된 시점에서 KMU-3의 존재 또는 부존재에 의해 큰 영향을 받지 않았다. STAT-3을 포함하여 이들 신호전달 단백질들의 총 단백질 수준은 이들 실험 조건하에서 일정하게 유지되었다. MDI 중의 어떠한 성분(들)이 3T3-L1 지방전구세포에서 STAT-3 인산화를 매개하는지와 KMU-3가 이 과정을 억제하는지를 테스트하였다. 텍사메타손 또는 인슐린이 아니라 IBMX로 처리한 경우에 강한 STAT-3 인산화가 유도되었고, IBMX-유도된 STAT-3 인산화는 KMU-3에 의해 차단되었다(도 5b 및 도 5c).

[0067]

4. 초기 지방생성 과정 및 STAT-3 인산화의 억제는 KMU-3 매개된 항 지방생성 작용에서 중요하다.

[0068]

MDI-유도된 STAT-3 인산화에 미치는 KMU-3의 억제 효과를 고려하여(도 5a), KMU-3가 초기 지방생성 과정을 억제하는지를 추가적으로 조사하였다. 이를 위해, 도 6a에서 도시된 바와 같이, 3T3-L1 지방전구세포를 유도배지(MDI, 인슐린, 및 FBS)와 함께 KMU-3의 존재(10 μ M) 또는 부존재하에서 지정된 시점에서 인큐베이션하였다.

[0069]

예상된 바와 같이, mock-처리된 세포를 2일, 5일, 및 8일 시점에서 MDI, 인슐린, 및 FBS으로 인큐베이션하였을 때, 지방의 축적이 높게 나타났다(a).

[0070]

그러나, 3T3-L1 지방전구세포를 MDI와 함께 KMU-3을 2일간 첨가하고, 5일 및 8일 시점에서 KMU-3의 부존재하에서 인슐린과 FBS로 각각 처리한 경우 지방 함량이 (a)보다 적었다(b). 또한, 3T3-L1 지방전구세포를 2일 및 5일 시점에 KMU-3의 존재하에서 MDI 및 인슐린과 함께 초기부터 인큐베이션하고, 이어서 8일 시점에서 KMU-3의 부존재하에서 FBS로 처리한 경우 지방 함량이 (a) 보다 적었다(c). 또한, 2일, 5일 및 8일 시점에서 KMU-3의 존재 하에서, MDI, 인슐린 및 FBS와 함께 인큐베이션한 지방전구세포에서 지방 함량이 (a) 보다 낮았다(d). 그러나, 초기 2일 동안 MDI를 첨가시킨 3T3 세포에 3일 동안 인슐린과 KMU-3를 함께 처리하고, 이어서 3일 동안 FBS만과 함께 생장시킨 경우 지방함량이 높았다(e). 또한, 2일에만 MDI로 초기에 인큐베이션하고, 5일 및 8일에 KMU-3의 존재하에서 인슐린과 FBS으로 각각 처리한 지방전구세포는 지방함량이 높았다(f). 마지막으로, 3T3-L1 세포를 2일 및 5일에 KMU-3의 부존재하에서 MDI 및 인슐린과 인큐베이션하고, 8일에 FBS와 KMU-3으로 처리한 경우 여전히 지방함량이 높았다(g).

[0071]

상기한 결과들은 종합적으로 KMU-3가 지방생성의 초기 단계에서 지방 생성을 억제한다는 것을 시사한다. JAK-2/STAT-3의 억제자인 AG490을 사용하여 KMU-3 매개된 항-지방생성에서 STAT-3 억제의 역할을 확인하였다. mock-처리된 세포와 비교하여, AG490으로 처리된 세포는 최대 억제가 100 μ M의 농도에서 나타나는 농도 의존적 방식으로 지질의 축적이 감소하였음을 보여주었다. AG490의 지질-감소효과는 광학 현미경의 측정에 의해 명확하게 나타났다(도 6b, 아래쪽 패널). AG490은 농도 의존적 방식으로 세포내 TG 함량을 극적으로 감소시켰다(도 6c). 또한, AG490은 AG490 농도 의존적 방식으로 MDI-유도된 STAT-3 인산화를 억제하였으며, 약물의 효과를 시사하였다(도 6d). 예상된 바와 같이, KMU-3(10 μ M)는 MDI-유도된 STAT-3 인산화도 차단하였으나, 갈산(GA)(90 μ M)은 이와 같은 효과는 보여주지 않았다. 일견하여, 지질 축적과 MDI-유도된 STAT-3 인산화를 억제하는데 있어서, 50 μ M의 AG490과 10 μ M의 KMU-3 사이에 비슷한 정도의 효과가 있는 것 같았다.

[0072]

5. KMU-3는 지방세포 분화 동안에 FAS, 렙틴(leptin), RBP4, 및 RANTES의 mRNA 발현을 억제한다.

[0073]

다음으로, KMU-3($10\mu\text{M}$)가 지방세포 분화 동안에 지방세포 특이적 유전자 및/또는 아디포카인의 발현을 조절하는지에 대해 조사하였다. RT-PCR 분석 결과, MDI, 인슐린, 및 FBS와 함께 2일, 5일, 및 8일 시점에서 인큐베이션한 3T3-L1 지방전구세포에서 FAS, aP2, 아디포넥틴(adiponectin), 렙틴(leptin), RBP4, 및 RANTES의 mRNA 발현이 시간 의존적 방식으로 증가하였다(도 7). 주목할만하게도, KMU-3은 인슐린-유도된 FAS의 mRNA 발현을 차단하였으나, aP2의 mRNA 발현은 차단하지 않았다. 그러나, KMU-3은 5일 및 8일 시점에서 인슐린-유도된 및 FBS-유도된 아디포넥틴 mRNA 발현에는 영향이 없었다. KMU-3은 5일 시점에 인슐린에 의해 유도된 렙틴의 mRNA 발현을 약간 감소시켰으나, 8일 시점의 FBS-유도된 렙틴 mRNA 발현에 아무런 영향을 미치지 않았다. KMU-3은 5일 및 8일 시점에서 인슐린-유도된 및 FBS-유도된 RBP4의 mRNA 발현도 각각 강하게 억제하였다. 2일, 5일 및 8일 시점에서 MDI-유도된, 인슐린-유도된 및 FBS-유도된 RANTES의 mRNA 발현은 시간이 지남에 따라 KMU-3에 의해 부분적으로 억제되었다. 대조군 액틴 mRNA 발현은 이러한 실험 조건하에서 일정하게 유지되었다.

[0074]

고찰

[0075]

과도한 지방세포 분화는 지방조직의 비정상적인 팽창/축적을 가져오고 이는 염증, 인슐린 내성 및 대사 질환과 관련되어 있는 병인성 아디포카인(adipokines)의 분비를 증가시킨다. 따라서, 지방세포 분화의 강력한 억제자는 항비만 약물로서 치료적 가능성을 갖는다. 이러한 개념을 기초로 폴리페놀성 천연화합물로부터 53개의 화합물을 신규 합성하였고, 이들 화합물들로부터 우수한 항비만 활성을 갖는 본 발명의 화합물들을 스크리닝하였고, KMU-3로 명명된 화합물이 가장 우수한 지방생성 억제 활성을 가짐을 확인하였다. 스크리닝된 화합물들이 C/EBP- α 및 PPAR- γ 의 발현 및 STAT-3의 인산화의 조절을 통해 항비만 활성을 나타내는지에 대해 추가 실험을 행하였다. 성숙되거나 분화된 지방세포는 둥근 모양이며 많은 지방구(lipid droplet)으로 채워져 있다(18). 본 발명자들은 가장 우수한 항-지방생성 활성을 보인 KMU-3 화합물($10\mu\text{g}$)이 세포독성 없이 8일간의 3T3-L1 지방세포에서 지방축적을 억제함을 확인하였다(도 2 및 도 3A). 이 결과는 강력한 항-지방생성 효과를 보여주는 것이다. 이와 대조적으로 KMU-3의 모화합물인 갈산(GA)은 $90\mu\text{M}$ 의 농도에 까지 지방생성에 대해 억제 효과를 나타내지 않았다(도 3B 및 도 3D). 지방세포의 분화 및 성숙은 C/EBPs 또는 PPAR- γ 를 녹아웃시킨 마우스에서 백색의 지방조직이 감소 또는 손상되는 것으로부터 입증되는 바와 같이 C/EBPs 및 PPARs 패밀리의 발현 및/또는 활성에 의해 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다(9-11, 21, 22, 23-25). 축적되는 증거들에 의해, C/EBP- β 및 C/EBP- δ 들이 지방생성 단계의 초기에 유도되고, 이어서 이들이 C/EBP- α 및 PPAR- γ 의 발현을 상향조절한다(9, 19, 24, 26, 27). 본 발명에서는 KMU-3 화합물이 지방세포의 분화동안에 C/EBP- α 및 PPAR- γ 의 발현을 블로킹하고, C/EBP- β 의 발현은 블로킹하지 않았는데(도 4A 및 도 4B), 이러한 사실은 KMU-3-매개된 항-지방생성 효과가 대체적으로 C/EBP- α 및 PPAR- γ 의 발현 감소에 기인한 것이며, KMU-3 화합물의 C/EBP- α 및 PPAR- γ 발현에 대한 억제 효과가 C/EBP- β 와는 독립적이라는 점을 시사한다. 최근의 연구결과에 의하면, C/EBPs 및 PPARs의 발현 및/또는 활성의 증가가 FAS, aP2, 렙틴(leptin), 아디포넥틴(adiponectin), RBP4, 및 RANTES과 같은 지방세포 특이 유전자 및 아디포카인의 발현에 필수적이라는 것이 규명되고 있다(28-30). 이들 중에서, FAS는 지방산 합성에 관여하는 지방생성 효소이고, 이의 발현은 지방산 합성이 높은 세포 또는 조직에서 크게 증가되어 있다(31). aP2는 장래 지방산에 대한 담체(carrier) 단백질이다(32). 3T3-L1 지방전구세포가 텍사메타손 및 이소부틸잔틴(isobutylxanthine, IBMX)에 의해 분화 유도되면, 지방전구세포는 인슐린에 대한 반응성 및 FAS 및 aP2의 유도를 포함하여 진정한 지방세포의 특성을 획득하게 된다(33). 이러한 사실에 근거하여, 본 발명자들은 MDI로 처리하여 지방세포 분화를 진행하도록 먼저 유도된 3T3-L1 세포를 인슐린으로 처리하면 FAS 및 aP2의 mRNA 발현이 유도된다는 것을 증명하였다(도 7). 그러나, KMU-3 화합물은 인슐린 유도된 FAS의 mRNA 발현을 억제한 반면, aP2의 mRNA 발현에는 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과들은 KMU-3 화합물이 FAS 발현을 억제함으로써 항-지방생성 효과를 발휘한다는 것을 시사한다. 지방세포 분화의 성숙은 세포가 에너지 항상성의 내분비계 조절에 관련되어 있는 일정의 아디포카인(adipokines)의 합성과 분비 능력에 특징이 있다는 것이 제안되어 있다(34, 35). 따라서, 본 발명에서 KMU-3 화합물이 지방세포 분화 과정 중에 렙틴(leptin), RBP4, 및 RANTES의 mRNA 발현을 감소시킨다는 점을 고려하면, KMU-3 화합물은 지방세포 분화 성숙 과정을 더욱 억제할 수 있다. 다수의 문헌들에서 아디포넥틴이 비만의 조절에 양성적 역할을 하며 이의 과발현이 간에서의 글루코오스 생성에 미치는 영향을 통해 부분적으로 인슐린 민감도를 증가시킨다는 것을 보고하고 있다(36-39). 반면에, 렙틴, RBP4 및 RANTES와 같은 일정의 아디포넥틴의 비정상적 발현/분리가 비만 및 비만과 관련된 질환에 관련되어 있다(40-42). 따라서, 본 발명에서 확인된 KMU-3과 같은 특이적 소분자 억제자는 렙틴, RBP4 및/또는 RANTES의 과발현이 병인적으로 중요한 역할을 하는 비만 및/또는 비만 관련 질환의 예방 및/또는 치료를 위해 약물 개발의 선구 물질로 활용될 수 있을 것이다. STAT-1, STAT-3, STAT-5, 및 STAT-6을 포함하여 STATs 패밀리

3T3-L1 지방전구세포 및 지방세포에서 모두 발현되고(11), STAT-1 및 STAT-5를 포함하는 STAT 패밀리 일원들은 3T3-L1 지방세포 분화에 매우 중요하다(43, 44). 흥미롭게도, 최근의 증거들은 STAT-3이 몇 시간내에 빠르게 활성화(인산화)되고, 활성화(인산화)된 STAT-3이 지방생성의 초기 단계 동안에 매우 중요한 역할을 한다는 것을 제시하였다(12, 45). 최근 연구 결과에 의하면, STAT-3는 MDI 처리된 3T3-L1 지방전구세포에서 매우 초기 단계에서(2시간 및 8시간) 고도로 인산화 되고(도 5A), 8일 시점까지 고도의 인산화상태를 유지한다(도 4C). 본 발명에서 발견한 놀라운 사실은 KMU-3 화합물이 3T3-L1 세포에서 인슐린이나 FBS가 아닌 MDI의 STAT-3 활성화 신호를 간접하고(도 4C 및 도 5A) 지방생성의 초기 과정도 차단한다는 것이다(도 6A).

[0076]

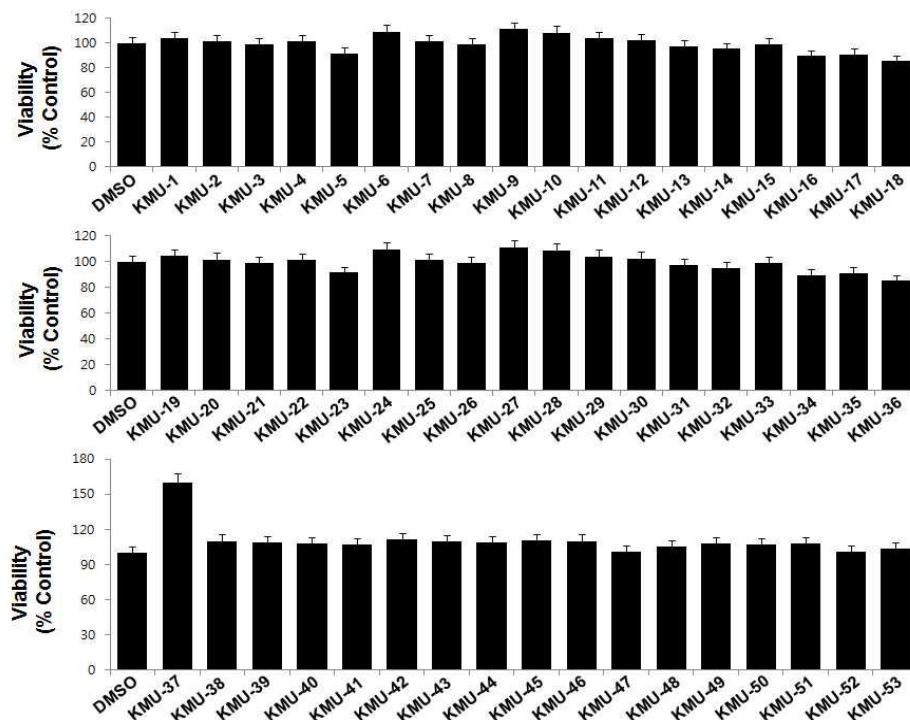
본 발명의 실험에서는 AG490을 100 μ M의 농도로 처리하면 지방축적을 억제하고(도 6B 및 도 6C), MDI-유도된 STAT-3 인산화를 억제한다는 것을 확인하였으며(도 6D), 이는 STAT-3의 억제가 KMU-3의 항지방생성 억제 활성에서 중요한 역할을 한다는 것을 강하게 뒷받침한다. STAT-3가 PPAR- γ 를 통해 지방세포 분화를 조절하고(47), STAT-3 활성이 C/EBP- α 및 PPAR- γ 의 지방생성 유도된 발현에 필수적이다(45, 47). 따라서, KMU-3가 초기의 지방생성 과정에서 STAT-3의 억제와 이에 의한 C/EBP- α 및 PPAR- γ 의 발현의 하향 조절을 통해 지방생성을 억제하는 것으로 보여진다. 이전의 연구결과들은 MDI 중의 어떠한 성분들이 3T3-L1 세포에서 STAT-3 인산화를 매개하는지 확실히 증명하고 있지 않지만, 본 발명의 결과에서 텍사메타손이나 인슐린이 아니라 IBMX가 지방전구세포에서 STAT-3를 인산화시키며(도 5B), KMU-3 화합물이 이를 차단한다는 것을 보였다(도 5C). 지방전구세포에서 IBMX가 칼슘/cAMP/PKA 신호의 활성화를 빠르게 개시하고, 이는 STAT-3을 활성화시키며, KMU-3 화합물이 초기 지방생성 과정에서 IBMX-유도된 칼슘/cAMP/PKA 신호를 방해함으로써 STAT-3 인산화를 억제할 수 있다. 본 발명에서는 갈산 유도체 화합물, 특히 KMU-3로 명명된 화합물이 강력한 항-지방생성 효과를 가지며, 이러한 효과는 STAT-3, PPAR- γ , C/EBP- α , 및 FAS의 하향 조절을 통해 매개된다는 것을 규명하였다.

[0077]

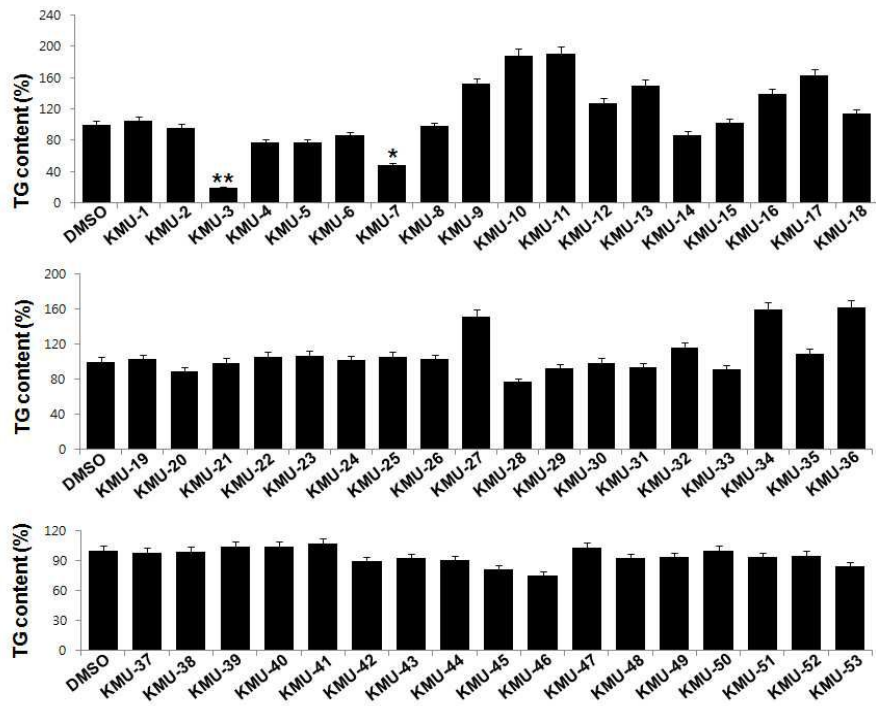
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

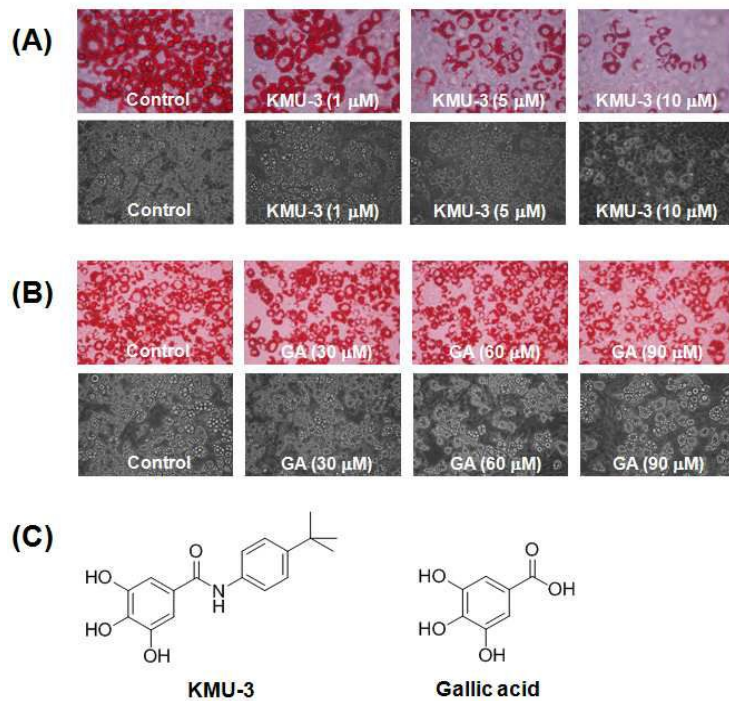
도면1



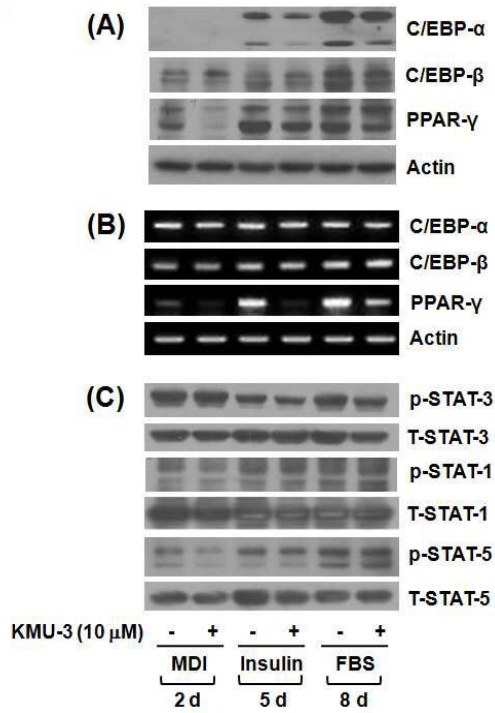
도면2



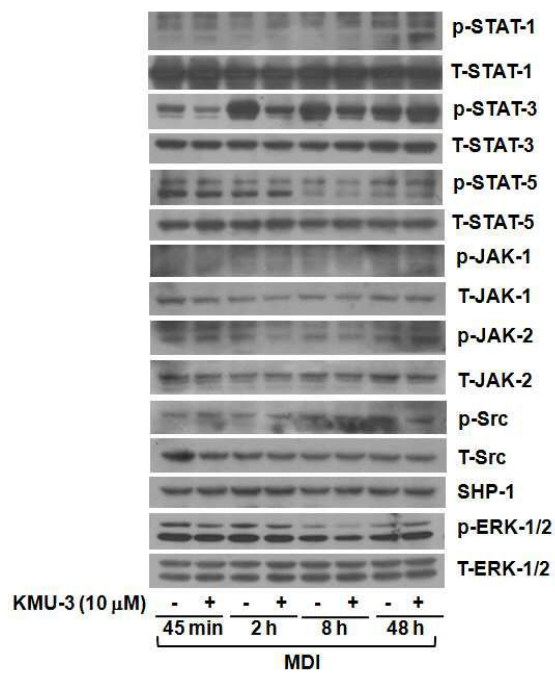
도면3



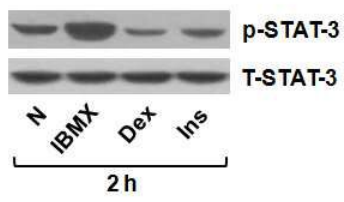
도면4



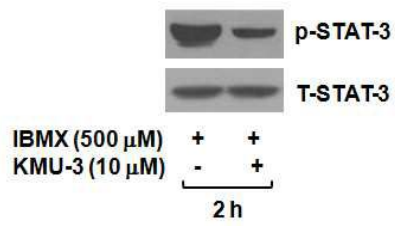
도면5a



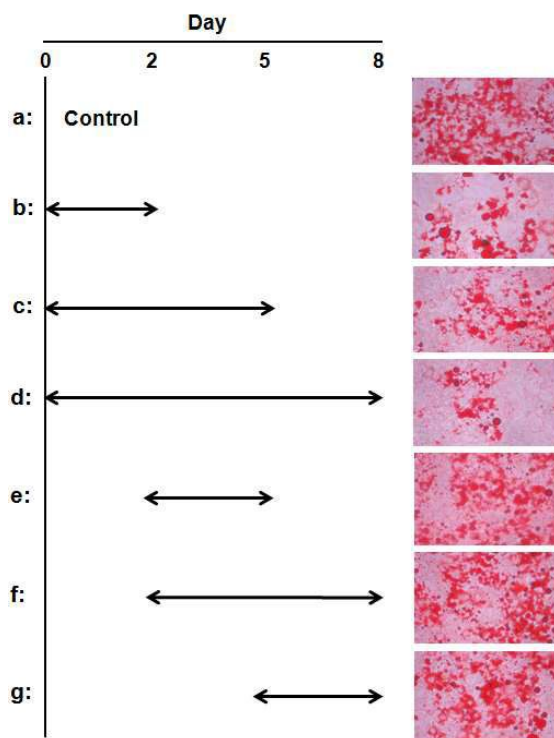
도면5b



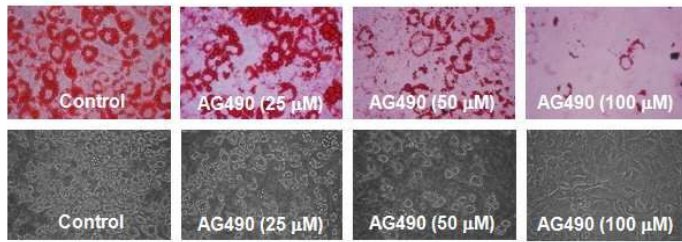
도면5c



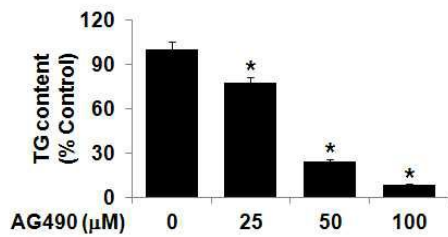
도면6a



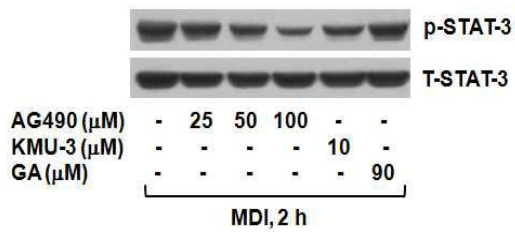
도면6b



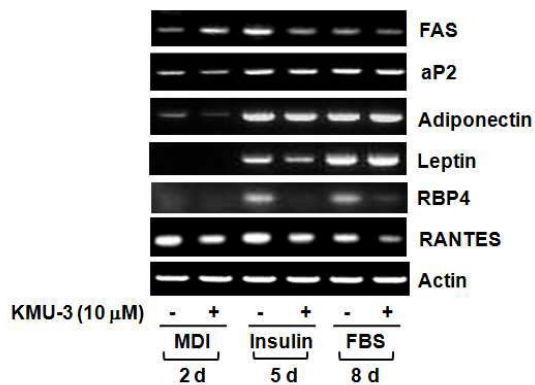
도면6c



도면6d



도면7



서열 목록

- <110> Keimyung University Industry Academic Cooperation Foundation
- <120> Novel Gallic Acid Derivatives Having Anti-Obesity Activity and Composition for Anti-Obesity Comprising the Same Derivatives

<130> PN140174
 <160> 20
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 1
 ttacaacagg ccaggtttcc 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <
 213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 2
 ctctgggatg gatcgattgt 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 3
 cgagcgcaac aacatcgagg 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 4
 tactcagggc ccggctgaca 20
 <210> 5
 <211> 20

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	5	
	ggtgaaactc tgggagattc	20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	6	
	caaccattgg gtcagctctc	20
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	7	
	ttgctggcac tacagaatgc	20
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	8	
	aacagcctca gagcgacaat	20
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	9	
	agtgggagtg ggctttgcca	20
<210>	10	

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 10
 gggcccccgc atctagggtt a 21

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 11
 ggagatgcag gtcttcttgg t 21

<210> 12
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 12
 tctgatact ggtcgtaggt gaa 23

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 13
 ccaaaaccct catcaagacc 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 14

ctcaaagcca ccacctctgt	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 15	
actgggggtgt agcctccttt	20
<210> 16	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 16	
ggtgtcgtag tccgtgtcg	19
<210> 17	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 17	
tccaatcttg cagtcgtgtt tg	22
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 18	
tctgggttgg cacacacttg	20
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	

<400> 19

ggtgaaggtc ggtgtgaacg

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 20

ggtaggaaca cggaaggcca

20