

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0044295 (43) 공개일자 2016년04월25일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/506 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01) A61K 31/497 (2006.01)	(71) 출원인 계명대학교 산학협력단 대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)	
(21) 출원번호 10-2014-0139136	(72) 발명자	
(22) 출원일자 2014년10월15일	장병철	
심사청구일자 2014년10월15일	대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 계명대학교 의과대학 분자의학교실 M637호	
	이진호	
	대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 계명대학교 자연과학대학 화학과	
	(뒷면에 계속)	
	(74) 대리인	
	양부현	

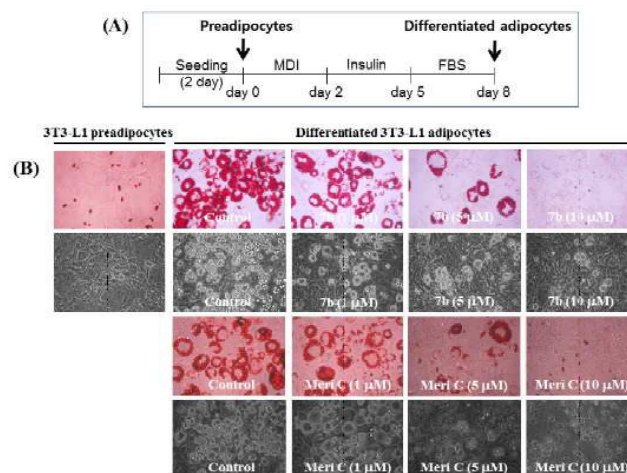
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 메리디아닌 C 유도체를 유효성분으로 포함하는 항 비만용 조성물

(57) 요약

본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 메리디아닌 C 유도체 화합물을 유효성분으로 포함하는 항비만용 조성물을 제공한다. 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 화학적 합성 방법에 의해 제공가능하다. 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 지방세포 분화시 지방생성을 강력하게 억제함으로써 비만의 치료, 예방, 개선 효과를 발휘할 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

홍빅터석봉

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 계명대학교 자
연대학 화학과 255호

박유경

대구광역시 수성구 수성로39안길 16 (중동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 No. 2014R1A5A2010008

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구지원센터(의과학연구센터) 사업

연구과제명 비만매개질환연구센터

기 여 율 1/1

주관기관 계명대학교

연구기간 2014.05.01 ~ 2014.10.01

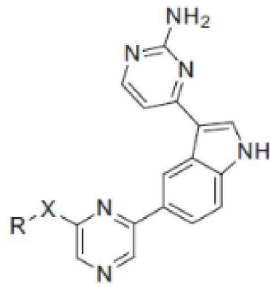
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 항비만용 조성물:

[화학식 1]



단, 상기 화학식 1에서 R은 C₁-C₅ 알킬, 비치환된 아미노 C₁-C₅ 알킬, 또는 C₁-C₃ 알킬 치환된 아미노 C₁-C₅ 알킬이고, X는 산소(O), NH, 또는 N(CH₂)_nCH₃이고, 상기 n은 0-3의 정수이다.

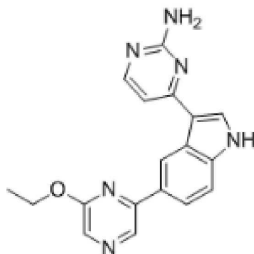
청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 화학식 1에서 R은 메틸, 에틸, 프로필, 디메틸아미노메틸, 디에틸아미노메틸, 디메틸아미노에틸, 디에틸아미노에틸, 디메틸아미노프로필, 또는 디에틸아미노프로필이고, X는 산소(O), NH, 또는 NCH₃인 것을 특징으로 하는 조성물.

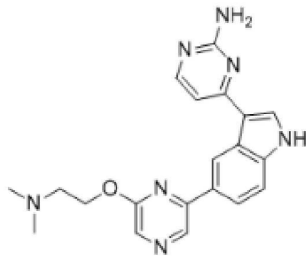
청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2 - 11 중 어느 하나의 화학식으로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 조성물.

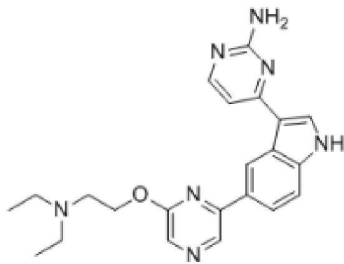
[화학식 2]



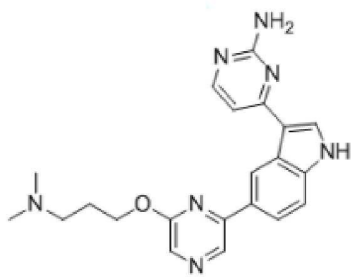
[화학식 3]



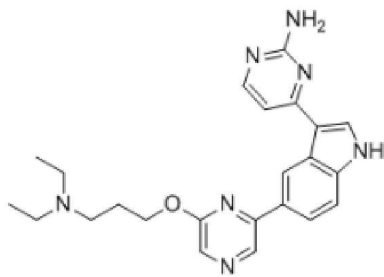
[화학식 4]



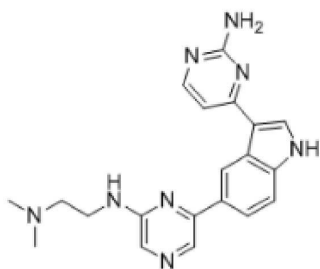
[화학식 5]



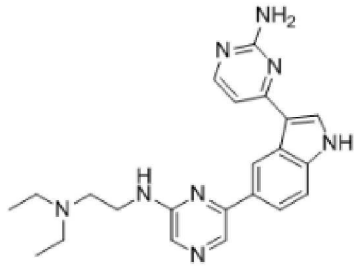
[화학식 6]



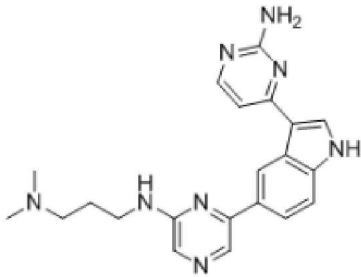
[화학식 7]



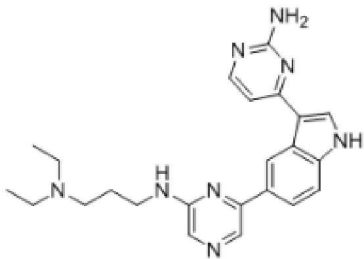
[화학식 8]



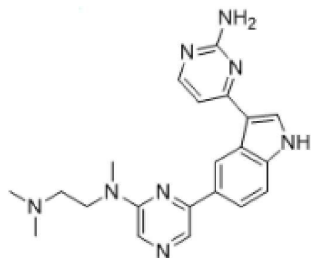
[화학식 9]



[화학식 10]



[화학식 11]



청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 화합물은 분화 유도된 지방전구세포에서 C/EBP(CCAAT-enhancer binding protein)- α 단백질 또는 PPAR(peroxisome proliferator-activated receptors)- γ 단백질의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 화합물은 분화 유도된 지방전구세포에서 STAT(Signal transducer and activator of transcription)-3 또는 STAT-5의 인산화 수준을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 화합물은 분화 유도된 지방전구세포에서 FAS (Fatty Acid Synthase) 또는 렙틴(leptin)의 단백질 및 mRNA의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 비만의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 비만의 개선 또는 예방용 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 메리디아닌 C 유도체를 유효성분으로 포함하는 항 비만용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비만은 인슐린 저항성, 타입 2 당뇨, 고지혈증 및 암과 같은 다양한 인간 질환 발달에 있어서 위험 요인이다(1). 비만은 유전적 이상 및 내분비 이상, 특정의 약물, 저대사율, 영양 및 환경 인자 뿐만 아니라 에너지 항상성의 불균형과 같은 다양한 요인에 의해 유도될 수 있다고 보고되고 있다(2, 3). 최근의 증거에 의하면 지방 조직은 에너지 저장소로 역할을 하며 또한 아디포카인(adipokine)을 분비함으로써 에너지 대사 조절에 중요한 역할을 한다는 것이 증명되고 있다(3, 4). 그러나, 대체적으로 과도한 지방세포 분화 및 지방세포 수와 크기의 증가 때문에 발생하는 지방조직의 비정상적 팽창/축적이 비만의 발달과 밀접하게 연관되어 있다(5, 6). 따라서, 과도한 지방세포 분화 및/또는 지방세포 수의 증가/비대를 억제하는 어떠한 화합물도 비만 및 비만과 관련된 질병의 예방 및/또는 치료 가능성을 가질 수 있다. 지방생성으로도 불리는 지방전구세포로부터 지방세포로의 분화가 전사인자, 지방세포 특이적 유전자, 지방생성 효소 및 신호전달 단백질과 같은 다양한 종류의 세포 단백질에 의해 조절된다. 예를 들어, C/EBP(CCAAT-enhancer binding protein)- α , - β 및 - γ , 단백질 패밀리와 PPAR(peroxisome proliferator-activated receptors)- γ , - α 및 - β 패밀리의 단백질들이 지방세포분화에 매우 중요한 역할을 한다(7, 8). 또한, 최근 JAK-2(Janus-activated protein kinase-2)/STAT-3(Signal transducer and activator of transcription-3) 및 STAT-5 신호전달 복합체가 지방세포의 분화에 관련된다는 강한 증거가 있다(9, 10). 또한, PKA, cAMP, PKCs, 및 ERK-1/2와 같은 증가하는 수의 신호전달 단백질 및 인자들이 지방세포분화 조절에 중요하다는 것이 밝혀지고 있다(11-13).

[0003] 해양으로부터 유래된 인돌 알칼로이드인 메리디아닌(Meridianins, A-G)는 *Aplidium meridianum* 으로부터 분리된 새로운 단백질 키나아제 패밀리아(14, 15)이고, 몇몇의 메리디아닌 및/또는 이들의 합성 유도체들이 항암 활성을 갖는 것으로 보고되었다(16, 17). 흥미롭게도, 메리디아닌 C 유도체인 3, 5-치환된 인돌이 pim-1, pim-2 및 pim-3를 포함하는 pan-pim 키나아제 패밀리의 강력하고 선택적인 억제자라는 것을 추가적으로 증명하는 증거가 있다(18). 메리디아닌 C와 이의 유도체들(화합물 7a - 7j)을 합성하고, 이들의 pim 키나아제 억제활성과 인간 백혈병 세포에 대한 항-증식활성이 보고되었다(19).

[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 공개특허 제10-2008-0080095호

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) [1] P.G. Kopelman, Obesity as a medical problem, Nature 404 (2000) 635-643.
- (비특허문헌 0002) [2] R.S. Ahima, J.S. Flier, Trends. Endocrinol. Metab. 11 (2000) 327-332.
- (비특허문헌 0003) [3] P.J. Havel, Curr. Opin. Lipidol. 13 (2002) 51-59.
- (비특허문헌 0004) [4] B.M. Spiegelman, J.S. Flier, Cell 104 (2001) 531-543.
- (비특허문헌 0005) [5] H.E. Bays, Am. J. Med. 122 (2009) S26-S37.
- (비특허문헌 0006) [6] I. Melnikova, D. Wages, Nat. Rev. Drug. Discov. 5 (2006) 369-370.
- (비특허문헌 0007) [7] Z. Cao, R.M. Umek, S.L. McKnight, Genes. Dev. 5 (1991) 1538-1552.
- (비특허문헌 0008) [8] S.R. Farmer, Cell. Metab. 4 (2006) 263-273.
- (비특허문헌 0009) [9] J.M. Stephens, et al., J. Biol. Chem. 271 (1996) 10441-10444.
- (비특허문헌 0010) [10] K. Zhang, W. Guo, Y. Yang, J. Wu, J. Cell. Biochem. 112 (2011) 488-497.
- (비특허문헌 0011) [11] C.N. Martini, et al., Mol. Cell. Endo. 298 (2009) 42-47.
- (비특허문헌 0012) [12] Y. Zhou, D. Wang, F. Li, J. Shi, J. Song, Int. J. Biochem. Cell. Biol. 38 (2006) 2151-2163.
- (비특허문헌 0013) [13] D. Prusty, et al., J. Biol. Chem. 277 (2002) 46226-46232.
- (비특허문헌 0014) [14] M. Gompel, et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 14 (2004) 1703-1707.
- (비특허문헌 0015) [15] S.B. Bharate, et al., Mini. Rev. Med. Chem. 12 (2012) 618-631.
- (비특허문헌 0016) [16] F. Giraud, et al., J. Med. Chem. 54 (2011) 4474-4489.
- (비특허문헌 0017) [17] M.A. Radwan, et al., Bioorg. Med. Chem. 15 (2007) 1206-1211.
- (비특허문헌 0018) [18] G.A. Nishiguchi, et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 21 (2011) 6366-6369.
- (비특허문헌 0019) [19] K.N. More, et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 24 (2014) 2424-2428.
- (비특허문헌 0020) [20] E.D. Rosen, et al., Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 16 (2000) 145-171.
- (비특허문헌 0021) [21] E.D. Rosen, et al., Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 7 (2006) 885-896.
- (비특허문헌 0022) [22] H.G. Linhart, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98 (2001) 12532-12537.
- (비특허문헌 0023) [23] E.D. Rosen, et al., Mol. Cell. 4 (1999) 611-617.
- (비특허문헌 0024) [23] W.C. Stewart, et al., Biochim. Biophys. Acta. 1452 (1999) 188-196.
- (비특허문헌 0025) [24] C.A. Shang, et al., Mol. Endocrinol. 17 (2003) 2494-2508.
- (비특허문헌 0026) [25] D. Wang, et al., Biol. Cell. 102 (2009) 1-12.
- (비특허문헌 0027) [26] R.J. Christy, et al., Genes. Dev. 3 (1989) 1323-1335.
- (비특허문헌 0028) [27] B. Gustafson, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 308 (2003) 933-939.
- (비특허문헌 0029) [28] C.S. Hwang, et al., Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 13 (1997) 231-259.

- (비특허문헌 0030) [29] M.R. Lakshmanan, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69 (1972) 3516-3519.
- (비특허문헌 0031) [30] C.S. Rubin, et al., J. Biol. Chem. 253 (1978) 7570-7578.
- (비특허문헌 0032) [31] F.M. Gregoire, et al., Physiol. Rev. 78 (1998) 783-809.
- (비특허문헌 0033) [32] A. Yadav, et al., Clin. Chim. Acta. 417 (2013) 80-84.
- (비특허문헌 0034) [33] M.E. Trujillo, et al., J. Intern. Med. 257 (2005) 167-175.
- (비특허문헌 0035) [34] A.H. Berg, et al., Nat. Med. 7 (2001) 947-953.
- (비특허문헌 0036)

발명의 내용

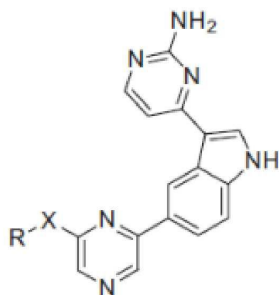
해결하려는 과제

- [0007] 본 발명자들은 강력하고 안전한 비만 치료제 후보물질을 개발하기 위해 메리디아닌(Meridianin) C 유도체들의 항-지방생성 효과를 조사하였다. 그 결과, 메리디아닌 C의 특정 유도체 화합물이 3T3-L1 세포의 지방세포로의 분화과정에서 지방생성을 가장 강력하게 억제하고 이러한 억제활성이 C/EBP- α , PPAR- γ , FAS, STAT-3, 및 STAT-5 인자들의 발현 및/또는 활성화 감소에 기인한다는 것을 실험적으로 입증하여 본 발명을 완성하였다.
- [0008] 따라서, 본 발명의 목적은 메리디아닌(Meridianin) C 유도체를 유효성분으로 포함하는 항 비만용 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [0009] 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기 화학식 1으로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 항비만용 조성물을 제공한다.

화학식 1



- [0011]
- [0012] 단, 상기 화학식 1에서 R은 C₁-C₅ 알킬, 비치환된 아미노 C₁-C₅ 알킬, 또는 C₁-C₃ 알킬 치환된 아미노 C₁-C₅ 알킬 이고, X는 산소(O), NH, 또는 N(CH₂)_nCH₃이고, 상기 n은 0-3의 정수이다.
- [0013] 본 발명에서 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 해양생물로부터 분리된 인돌 알칼로이드 화합물인 메리디아닌(Meridianin) C 화합물의 유도체이다. 본 발명의 화학식 1로 표시되는 메리디아닌 C 유도체는 화학적으로 합성될 수 있다(K.N. More, et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 24, 2014, 2424-2428.).

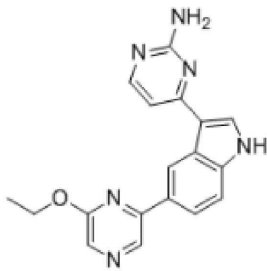
[0014] 본 명세서에서 용어 “C₁-C₅ 알킬”은 탄소수 1-5개의 탄소 및 수소로만 이루어진 1가 선형 또는 분지형의 포화 탄화수소 잔기를 지칭한다. 상기 C₁-C₅ 알킬기는 예를 들어 메틸, 에틸, 프로틸, 이소부틸, 펜틸 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0015] 본 명세서에서 용어 “아미노알킬”은 -R' -R” 잔기를 의미하는데, 여기에서 R”는 아미노 잔기이고, R'는 알킬렌이다. 상기 아미노알킬은 예컨대 아미노메틸, 아미노에틸, 1-아미노프로필, 2-아미노프로필 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 아미노알킬 기에서 아미노 잔기는 알킬로 1회 또는 2회 치환되어 알킬아미노알킬 또는 디알킬아미노알킬 잔기의 형태로 제공될 수 있다. 상기 알킬아미노알킬은 예를 들어 메틸아미노메틸, 메틸아미노에틸, 메틸아미노프로필, 에틸아미노에틸 등을 포함하며, 상기 디알킬아미노알킬은 디메틸아미노메틸, 디메틸아미노에틸, 디메틸아미노프로필, N-메틸-N-에틸아미노에틸 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0016] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1에서 R은 메틸, 에틸, 프로필, 디메틸아미노메틸, 디에틸아미노메틸, 디메틸아미노에틸, 디에틸아미노에틸, 디메틸아미노프로필, 또는 디에틸아미노프로필이고, X는 산소(O), NH, 또는 NCH₃이다.

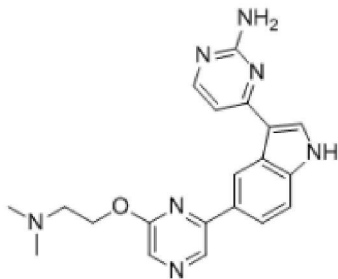
[0017] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2-11 중 어느 하나의 화학식으로 표시되는 화합물이다.

화학식 2



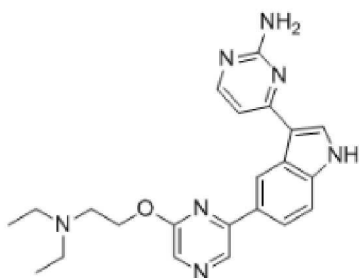
[0018]

화학식 3



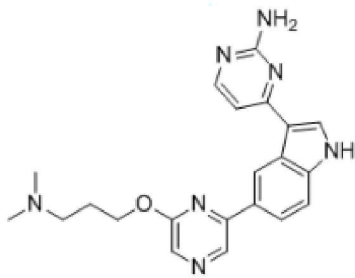
[0019]

화학식 4



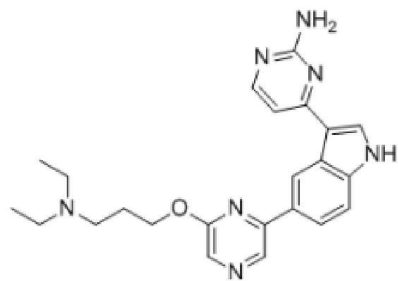
[0020]

화학식 5



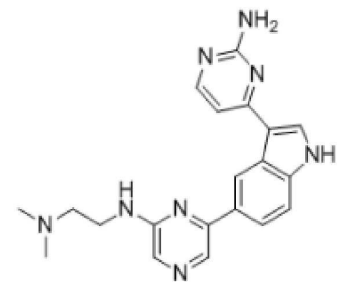
[0021]

화학식 6



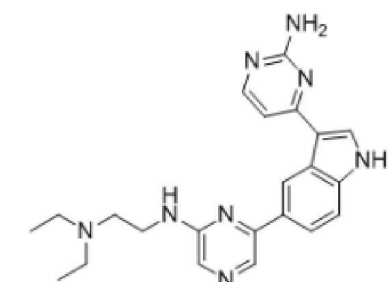
[0022]

화학식 7



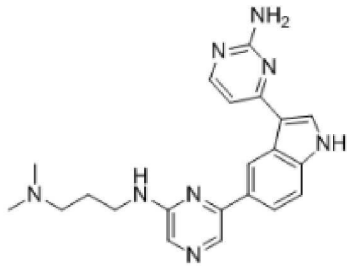
[0023]

화학식 8



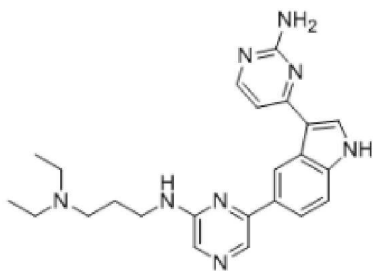
[0024]

화학식 9



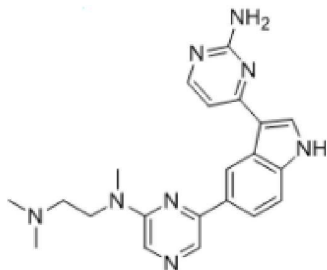
[0025]

화학식 10



[0026]

화학식 11



[0027]

[0028] 하기 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 실험적으로 입증되는 바와 같이, 상기 화학식 1의 화합물은 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포로의 분화과정에서 지방생성을 강력하게 억제하는 활성을 나타낸다.

[0029] 따라서, 본 발명의 상기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 비만을 치료, 예방, 또는 개선하는 용도로 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물은 분화 유도된 지방전구세포에서 C/EBP(CCAAT-enhancer binding protein)- α 단백질 또는 PPAR(peroxisome proliferator-activated receptors)- γ 단백질의 발현을 억제하는 활성을 갖는다.

[0031] 본 발명의 다른 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물은 분화 유도된 지방전구세포에서 STAT(Signal transducer and activator of transcription)-3 또는 STAT-5의 인산화 수준을 감소시키는 활성을 갖는다.

[0032] 본 발명의 다른 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물은 분화 유도된 지방전구세포에서 FAS (Fatty Acid Synthase) 또는 렙틴 (leptin)의 단백질 및 mRNA의 발현을 억제하는 활성을 갖는다.

[0033] 본 발명의 다른 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물 또는 식품 조성물의 형태로 제공될 수 있다.

- [0034] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물 형태로 제공되는 경우 (i) 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 약제학적 유효량; 및 (ii) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물로 제공된다.
- [0035] 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. 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.
- [0036] 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.
- [0037] 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.
- [0038] 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 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 조성물이 식품 조성물 형태로 제공되는 경우, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 비만의 개선용 식품 조성물로 제공된다.
- [0040] 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.
- [0041] 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.

[0042]

발명의 효과

- [0043] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0044] (i) 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 메리디아닌 C 유도체 화합물을 유효성분으로 포함하는 항비만용 조성물을 제공한다.
- [0045] (ii) 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 화학적 합성 방법에 의해 제공가능하다.
- [0046] (iii) 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 지방세포 분화시 지방생성을 강력하게 억제함으로써 비만의 치료, 예방, 개선 효과를 발휘할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0047] 도 1은 본 발명의 메리디아닌 C의 유도체 화합물 7a-7j의 트리글리세라이드(TG) 합성 및 3T3-L1 세포의 생존율에 미치는 영향을 측정한 결과이다.

도 2은 지방세포 분화 동안에 본 발명의 메리디아닌 C 유도체 화합물 7b 및 메리디아닌 C가 지방의 축적에 미치는 영향을 측정된 결과를 보여준다. 도 2의 패널 (A)는 3T3-L1 지방전구세포 분화에 대한 계획도(scheme)이다. 도 2의 패널 (B)는 3T3-L1 지방전구세포(분화되지 않은 세포) 또는 분화된 지방세포에서 8일째에 Oil Red O 염색에 의해 세포내 지방구(lipid droplet)를 측정된 결과를 보여준다. 세포 위상차 이미지를 시료 처리 후에 측정하였다. 패널 (B)에서 아래쪽 패널임. 패널 (B)에서 각 사진은 3회 독립실험의 대표 사진이다.

도 3는 지방세포 분화 동안에 화합물 7b와 메리디아닌 C가 트리글리세라이드(TG) 합성 및 세포 성장에 미치는 영향을 측정된 결과이다. 패널 (A) 및 패널 (B)는 AdipoRed 분석을 통해 화합물 7b 또는 메리디아닌 C로 처리된 3T3-L1 지방세포에서 세포내 TG 함량을 정량한 결과이다. 측정값들은 3회 반복 실험한 3개의 독립실험으로부터의 데이터의 평균±SE이다. *P < 0.05 vs. 대조군(화합물 처리하지 않음). 패널(C) 및 패널 (D)는 3T3-L1 지방전구세포를 상기 언급한 도 1의 패널 (A)에서의 3T3-L1 지방전구세포 분화 조건하에서 배양하였다. 8일째에, 트립판 블루 염색제(trypan blue dye)로 메리디아닌C-처리 또는 화합물 7b-처리된 3T3-L1 세포를 현미경하에서 계수하였다. 세포 계수 분석은 3회 반복하여 행하였다. 데이터는 3회 독립 실험의 평균±SE이다. *P < 0.05 vs. 대조군(화합물 처리하지 않음).

도 4은 3T3-L1 지방전구세포 분화 동안에 C/EBP- α , PPAR- γ , STAT-3, 및 STAT-5의 발현 및/또는 활성에 미치는 화합물 7b의 영향을 측정된 결과이다. 3T3-L1 지방전구세포들을 화합물 7b의 존재 또는 부존재하에서 MDI, 인슐린, 및 FBS를 포함하는 분화유도배지를 사용하여 분화시키고 2일, 5일, 및 8일째에 각각 회수하였다. 지정된 시점에서 세포 단백질을 추출하고 각각 웨스턴 블로팅 분석(패널 A) 및 RT-PCR 분석(패널 B)을 통해 분석하였다. (패널 A) 및 (패널 B)에서의 각 그림은 3회 독립 실험의 대표도이다.

도 5는 3T3-L1 지방세포 분화 동안에 FAS (Fatty Acid Synthase), 렙틴(leptin) 및 아디포넥틴(adiponectin)의 단백질 및/또는 mRNA 발현에 미치는 화합물 7b의 영향을 측정된 결과이다. 패널 A 및 패널 B: 3T3-L1 지방전구세포들을 화합물 7b의 존재 또는 부존재하에서 MDI, 인슐린, 및 FBS를 포함하는 분화유도배지를 사용하여 분화 유도시키고 각각 2일, 5일 및 8일째에 회수하였다. 지정 시점에서 세포 단백질을 추출하고 웨스턴 블로팅(패널 A) 및 RT-PCR(패널 B)으로 각각 분석하였다. 패널 A 및 패널 B에서 각 그림은 3회 독립 실험의 대표도이다.

도 6는 메리디아닌 C 유도체인 화합물 7b (패널 A)와 메리디아닌 C (패널 B)의 화학 구조를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 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.

[0049] 실시예

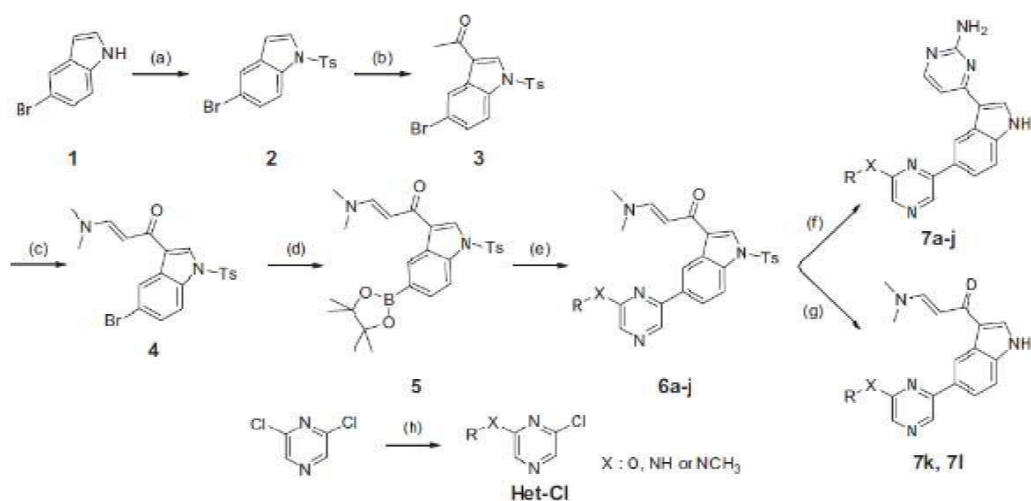
[0050] 실험 방법 및 재료

[0051] 1. 메리디아닌 C 유도체의 합성

[0052] 3-(2-아미노피리딘)-5-치환된 인돌 시리즈의 일반적인 합성 루트는 아래 반응도에 나타내었다. 간략히 설명하면 다음과 같다. 염기성 조건하에서 토실 클로라이드(tosyl chloride)로 5-브로모인돌을 보호하고, FriedelCrafts 아실화에 의해 C- 위치에서 아세틸화를 시켜 화합물 3을 생성시켰다. 화합물 3을 N,N-다이메틸포르마이드내에서 N,N-다이메틸포르마이드 다이에틸 아세탈과 반응시켜 엔아미논(enaminone) 화합물 4를 수득하였고, 이 엔아미논 화합물 4를 인돌의 C-3 위치에서 2-아미노피리딘 환(ring)의 합성을 위한 마지막 단계에서 사용하였다. Miyaura borylation에 의해 C-5 위치에서 피나콜 에스테르(pinacol ester)를 도입하였다. 화합물 6은 화합물 5와 6-치환된-2-클로로피라진(Het-Cl)을 팔라듐 촉매된 스즈키 타입(Suzuki type) 커플링 반응에 의해 수득하였다. 구아니딘(guanidine)과 K₂CO₃를 사용하여 토실기(tosyl group)를 동시에 절단하면서 2-아미노피리딘으로 고리를 형성시켜 최종 화합물들을 합성하였다. 본 발명의 메리디아닌 C 및 이의 유도체에 대한 구체적인 합성방법 및 합성후 화합물 데이터는 문헌 "K.N. More, et al. Pim kinase inhibitory and antiproliferative activity of a novel series of meridianin C derivatives, Bioorg. Med. Chem. Lett. 24

(2014) 2424-2428"에 기재되어 있으며, 이 문헌과 이 문헌에 첨부된 Supplementary data는 본 명세서에 참조로써 삽입된다.

[0053] [반응도]



[0054]

[0055] 상기 반응도에서, 각 단계에서 반응 조건 및 시약은 다음과 같다: (a) NaH, TsCl, DMF, 0°C-상온(RT); (b) AcCl, AlCl₃, CS₂, RT under N₂; (c) DMF-DEA, DMF, microwave; (d) bis(pinacolato)diboron, PdCl₂(dppf), KOAc, 1,4-dioxane, microwave; (e) Het-Cl, PdCl₂(PPh₃)₂, 2M K₂CO₃, 1,4-dioxane/EtOH (2:3), microwave; (f) guanidine carbonate, K₂CO₃, 2-methoxyethanol, microwave; (g) K₂CO₃, 2-methoxyethanol, microwave; (h) NaH, ROH, THF, microwave or RNH₂ (or RNHCH₃), K₂CO₃, DMF, RT.

[0056] 화합물 7a: 4-(5-(6-에톡시피라진-2-일)-1H-인돌-3-일)피리미딘-2-아민(화합물 7a)

[0057] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.88 (1H, d, J = 2.0 Hz), 9.27 (1H, d, J = 1.2 Hz), 9.00 (1H, s), 8.28 (1H, d, J = 2.8 Hz), 8.17 (1H, s), 8.14 (1H, d, J = 5.2 Hz), 8.04 (1H, dd, J₁ = 8.6 Hz, J₂ = 1.8 Hz), 7.57 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.06 (1H, d, J = 5.2 Hz), 6.59 (2H, br), 4.52 (2H, q, J = 6.9 Hz), 1.42 (3H, t, J = 7.0 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 164.06, 162.89, 159.32, 157.62, 149.97, 138.48, 133.47, 132.30, 129.91, 128.62, 126.08, 121.58, 121.35, 114.88, 112.91, 105.79, 62.04, 14.89; ESI-MS m/z = 333 (M+H)⁺.

[0058] 화합물 7b: 4-(5-(6-(2-(디메틸아미노)에톡시)피라진-2-일)-1H-인돌-3-일)피리미딘-2-아민

[0059] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆+CDCl₃) δ 11.83 (1H, s), 9.28 (1H, s), 8.97 (1H, s), 8.22 (1H, d, J = 2.4 Hz), 8.13 (1H, s), 8.11 (1H, d, J = 5.2 Hz), 8.02 (1H, dd, J₁ = 8.6 Hz, J₂ = 1.4 Hz), 7.54 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.03 (1H, d, J = 5.2 Hz), 6.54 (2H, br), 4.57 (2H, t, J = 5.8 Hz), 2.71 (2H, t, J = 5.8 Hz), 2.26 (6H, s); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆+CDCl₃) δ 164.04, 162.89, 159.19, 157.47, 149.86, 138.47, 133.46, 132.25, 129.71, 128.52, 126.07, 121.45, 121.37, 114.89, 112.80, 105.74, 63.75, 57.87, 45.98; ESI-MS m/z = 376 (M+H)⁺.

[0060] 화합물 7c: 4-(5-(6-(2-(디에틸아미노)에톡시)피라진-2-일)-1H-인돌-3-일)피리미딘-2-아민

[0061] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.90 (1H, d, J = 2.0 Hz), 9.30 (1H, s), 9.01 (1H, s), 8.30 (1H, d, J = 2.4 Hz), 8.18 (1H, s), 8.14 (1H, d, J = 5.2 Hz), 8.05 (1H, dd, J₁ = 8.4 Hz, J₂ = 1.6 Hz), 7.58 (1H, d,

$J = 8.8 \text{ Hz}$), 7.08 (1H, d, $J = 5.2 \text{ Hz}$), 6.60 (2H, br), 4.54 (2H, t, $J = 6.4 \text{ Hz}$), 2.85 (2H, t, $J = 6.4 \text{ Hz}$), 2.58 (4H, q, $J = 7.06 \text{ Hz}$), 0.97 (6H, t, $J = 7.2 \text{ Hz}$); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 164.06, 162.88, 159.30, 157.61, 149.88, 138.48, 133.49, 132.38, 129.93, 128.55, 126.09, 121.51, 121.38, 114.89, 112.89, 105.78, 64.35, 51.27, 47.47, 12.32; ESI-MS $m/z = 404 \text{ (M+H)}^+$.

[0062] **화합물 7d: 4-(5-(6-(3-(디메틸아미노)프로폭시)피라진-2-일)-1H-인돌-3-일)피리미딘-2-아민**

[0063] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.91 (1H, s), 9.29 (1H, d, $J = 0.8 \text{ Hz}$), 9.01 (1H, s), 8.30 (1H, d, $J = 1.6 \text{ Hz}$), 8.19 (1H, s), 8.15 (1H, d, $J = 5.2 \text{ Hz}$), 8.04 (1H, dd, $J_1 = 8.8 \text{ Hz}$, $J_2 = 1.6 \text{ Hz}$), 7.59 (1H, d, $J = 8.4 \text{ Hz}$), 7.08 (1H, d, $J = 5.2 \text{ Hz}$), 6.60 (2H, br), 4.50 (2H, t, $J = 6.6 \text{ Hz}$), 2.40 (2H, t, $J = 7.2 \text{ Hz}$), 2.16 (6H, s), 1.96 (2H, quint, $J = 6.9 \text{ Hz}$); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 164.06, 162.88, 159.44, 157.62, 149.94, 138.47, 133.48, 132.33, 129.92, 128.58, 126.08, 121.55, 121.35, 114.88, 112.91, 105.80, 64.64, 56.19, 45.70, 27.04; ESI-MS $m/z = 390 \text{ (M+H)}^+$.

[0064] **화합물 7e: 4-(5-(6-(3-(디에틸아미노)프로폭시)피라진-2-일)-1H-인돌-3-일)피리미딘-2-아민**

[0065] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 +CDCl $_3$) δ 11.85 (1H, s), 9.27 (1H, s), 9.00 (1H, s), 8.25 (1H, d, $J = 2.4 \text{ Hz}$), 8.14 (1H, s), 8.13 (1H, d, $J = 5.6 \text{ Hz}$), 8.04 (1H, dd, $J_1 = 8.6 \text{ Hz}$, $J_2 = 1.0 \text{ Hz}$), 7.56 (1H, d, $J = 8.8 \text{ Hz}$), 7.05 (1H, d, $J = 5.2 \text{ Hz}$), 6.58 (2H, br), 4.50 (2H, t, $J = 6.4 \text{ Hz}$), 2.57 (2H, t, $J = 7.0 \text{ Hz}$), 2.49 (4H, q, $J = 7.0 \text{ Hz}$), 1.93 (2H, quint, $J = 6.7 \text{ Hz}$), 0.96 (6H, t, $J = 7.0 \text{ Hz}$); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6 +CDCl $_3$) δ 164.03, 162.87, 159.43, 157.50, 149.92, 138.46, 133.40, 132.20, 129.72, 128.61, 126.04, 121.51, 121.26, 114.88, 112.80, 105.75, 64.60, 49.19, 46.81, 26.73, 12.20; ESI-MS $m/z = 418 \text{ (M+H)}^+$.

[0066] **화합물 7f: N^1 -(6-(3-(2-아미노피리미딘-4-일)-1H-인돌-5-일)피라진-2-일)- N^2, N^2 디메틸에탄-1,2-디아민**

[0067] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 +CDCl $_3$) δ 11.50 (1H, s), 9.13 (1H, s), 8.32 (1H, s), 8.10 (1H, d, $J = 5.2 \text{ Hz}$), 7.96 (1H, d, $J = 2.4 \text{ Hz}$), 7.87 (1H, dd, $J_1 = 8.6 \text{ Hz}$, $J_2 = 1.4 \text{ Hz}$), 7.80 (1H, s), 7.45 (1H, d, $J = 8.4 \text{ Hz}$), 6.93 (1H, d, $J = 5.2 \text{ Hz}$), 6.47 (1H, t, $J = 5.2 \text{ Hz}$), 6.04 (2H, br), 3.54 (2H, q, $J = 6.13 \text{ Hz}$), 2.57 (2H, t, $J = 6.4 \text{ Hz}$), 2.26 (6H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6 +CDCl $_3$) δ 163.76, 162.99, 157.27, 154.28, 150.09, 138.10, 130.46, 129.98, 128.60, 128.18, 125.85, 121.21, 120.67, 114.87, 112.25, 106.13, 58.25, 45.55, 38.66; ESI-MS $m/z = 375 \text{ (M+H)}^+$.

[0068] **화합물 7g: N^1 -(6-(3-(2-아미노피리딘-4-일)-1H-인돌-5-일)피라진-2-일)- N^2, N^2 -디에틸에탄-1,2-디아민**

[0069] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.83 (1H, s), 9.18 (1H, s), 8.46 (1H, s), 8.25 (1H, d, $J = 2.8 \text{ Hz}$), 8.14 (1H, d, $J = 5.2 \text{ Hz}$), 7.99 (1H, dd, $J_1 = 8.8 \text{ Hz}$, $J_2 = 1.6 \text{ Hz}$), 7.86 (1H, s), 7.52 (1H, d, $J = 8.4 \text{ Hz}$), 7.06 (1H, d, $J = 5.2 \text{ Hz}$), 6.97 (1H, t, $J = 5.6 \text{ Hz}$), 6.55 (2H, br), 3.49 (2H, q, $J = 6.66 \text{ Hz}$), 2.67 (2H, t, $J = 6.8 \text{ Hz}$), 2.58 (2H, q, $J = 7.06 \text{ Hz}$), 0.98 (6H, t, $J = 7.0 \text{ Hz}$); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 166.95, 166.47, 164.05, 162.96, 157.57, 154.54, 149.92, 138.15, 129.93, 129.62, 128.04, 125.93, 121.39, 120.74, 114.83, 112.49, 105.87, 51.66, 47.19, 38.86, 12.13; ESI-MS $m/z = 403 \text{ (M+H)}^+$.

[0070] **화합물 7h: N^1 -(6-(3-(2-아미노피리미딘-4-일)-1H-인돌-5-일)피라진-2-일)- N^3, N^3 -디메틸프로판-1,3-디아민**

[0071] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.84 (1H, s), 9.16 (1H, s), 8.45 (1H, s), 8.25 (1H, d, $J = 2.8 \text{ Hz}$), 8.14 (1H, d, $J = 5.2 \text{ Hz}$), 7.98 (1H, dd, $J_1 = 8.6 \text{ Hz}$, $J_2 = 1.4 \text{ Hz}$), 7.84 (1H, s), 7.53 (1H, d, $J = 8.4 \text{ Hz}$), 7.10-7.06 (2H, m), 6.53 (2H, br), 3.45-3.42 (2H, m), 2.40 (2H, t, $J = 7.2 \text{ Hz}$), 2.20 (6H, s), 1.79 (2H, quint, $J = 7.0 \text{ Hz}$); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 164.04, 162.96, 157.58, 154.63, 149.99, 138.15,

129.98, 129.62, 128.00, 125.91, 121.45, 120.70, 114.80, 112.54, 105.88, 57.27, 45.51, 38.92, 27.14; ESI-MS m/z = 389 (M+H)+.

[0072] **화합물 7i:** N¹-(6-(3-(2-아미노피리미딘-4-일)-1H-인돌-5-일)피라진-2-일)-N³,N³-디에틸프로판-1,3-디아민

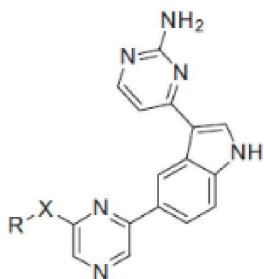
[0073] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.79 (1H, s), 9.13 (1H, s), 8.44 (1H, s), 8.23 (1H, d, J = 1.6 Hz), 8.13 (1H, d, J = 5.2 Hz), 7.98 (1H, dd, J₁ = 8.6 Hz, J₂ = 1.4 Hz), 7.82 (1H, s), 7.52 (1H, d, J = 8.8 Hz), 7.05 (2H, d, J = 5.2 Hz), 6.50 (2H, br), 2.48-2.44 (4H, m), 1.74 (2H, quint, J = 6.9 Hz), 0.94 (6H, t, J = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ 164.05, 162.95, 157.58, 154.66, 149.97, 138.16, 130.00, 129.60, 127.97, 125.90, 121.45, 120.64, 114.81, 112.52, 105.87, 50.64, 46.75, 26.84, 12.12; ESI-MS m/z = 417 (M+H)+.

[0074] **화합물 7j:** N¹-(6-(3-(2-아미노피리미딘-4-일)-1H-인돌-5-일)피라진-2-일)-N¹,N²,N² 트리메틸에탄-1,2-디아민

[0075] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.86 (1H, s), 9.22 (1H, s), 8.58 (1H, s), 8.25 (1H, s), 8.13 (1H, d, J = 5.6 Hz), 8.01-7.98 (2H, m), 7.53 (1H, d, J = 8.8 Hz), 7.05 (1H, d, J = 5.2 Hz), 6.58 (2H, br), 3.78 (2H, t, J = 6.8 Hz), 3.14 (3H, s), 2.50-2.48 (2H, m), 2.21 (6H, s); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 164.09, 162.98, 157.56, 153.47, 149.63, 138.26, 129.72, 128.12, 127.45, 125.98, 121.32, 120.90, 114.84, 112.63, 105.83, 56.44, 47.36, 46.02, 36.21; ESI-MS m/z = 389 (M+H)+.

[0076] 합성된 유도체들의 화학구조는 다음과 같다.

[0077] [화학식 1]



[0078]

메리디아닌 C 유도체	R	X
7a	Et	O
7b	Me ₂ N(CH ₂) ₂	O
7c	Et ₂ N(CH ₂) ₂	O
7d	Me ₂ N(CH ₂) ₃	O
7e	Et ₂ N(CH ₂) ₃	O
7f	Me ₂ N(CH ₂) ₂	NH
7g	Et ₂ N(CH ₂) ₂	NH
7h	Me ₂ N(CH ₂) ₃	NH
7i	Et ₂ N(CH ₂) ₃	NH
7j	Me ₂ N(CH ₂) ₂	NCH ₃

[0079]

[0080] 2. 실험재료

[0081] 폴리클로날 C/EBP-α, 모노클로날 PPAR-γ, 모노클로날 STAT-3, 모노클로날 phospho-STAT-3 (p-STAT-3), 폴리클로날 STAT-5, 및 폴리클로날 p-STAT-5 항체들은 Santa Cruz Biotechnology (Delaware, CA)로부터

구입하였다. 모노클로날 FAS 항체는 BD Bioscience (San Jose, CA)로부터 구입하였다. 모노클로날 β -액틴 항체는 Sigma (St. Louis, MO)로부터 구입하였다.

3. 세포 배양 및 분화

10% 송아지 혈청(Gibco) 및 페니실린-스트렙토마이신(Welgene, Daegu)이 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 3T3-L1 지방전구세포 (ATCC, Manassas, VA)를 접촉 억제 단계까지 배양하고, 2일간 컨플루언트 후 단계에 유지시켰다. 세포의 분화는 지정 농도의 메리디아닌 C 또는 화합물 7a-7j의 존재하에서 10% FBS (Welgene, Daegu)가 첨가된 DMEM 배지에 0.5 mM IBMX(M) (Sigma), 0.5 텍사메타손(D)(Sigma), 및 5 /ml 인슐린(I)(Sigma)을 포함하는 호르몬 콕테일(MDI)을 추가하여 변경시킴으로써 유도하였다. 48시간의 MDI-유도후에, 분화유도 배지는 지정 농도의 메리디아닌 C 또는 화합물 7a-7j의 존재 또는 부존재의 10% FBS 및 5 /ml 인슐린이 첨가된 DMEM으로 교환하였다. 이어서 세포는 지정 농도의 메리디아닌 C 또는 화합물 7a-7j의 존재 또는 부존재에서 10% FBS를 포함하는 DMEM으로 8일째가 될 때 까지 2일 마다 공급하였다. 8일째 시점에, 둥글고 많은 오일구로 채워진 성숙된 지방세포가 되었다.

4. Oil red O 염색

분화유도 8일째에 대조군 또는 시료(메리디아닌 C 또는 화합물 7b) 처리한 3T3-L1 세포를 PBS로 2회 세정하고, 상온에서 10% 포름알데히드로 2시간 동안 고정하고, 60% 이소프로판올로 세정한 후 완전히 건조시켰다. 고정된 세포는 Oil red O 작업 용액으로 상온에서 1시간 동안 염색한 후에 증류수로 2회 세척하였다. 지방구는 광학현미경(Nikon)으로 관찰하였다.

5. 세포 계수 분석

24-웰 플레이트에 접종한 3T3-L1 지방전구세포는 상기 언급한 분화 조건하에서 유사하게 성장하였다. 분화 8일째에, 트립판 블루 염료로 염색되지 않는 메리디아닌 C 또는 화합물 7b 처리한 3T3-L1 세포들을 현미경하에서 계수하였다. 세포 계수 분석은 3회 반복 수행하였다. 데이터는 3회 독립실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SE)이다.

6. AdipoRed 분석에 의한 세포내 트리글리세라이드(TG) 함량의 정량 분석

분화 8 일째에 상업적으로 구입가능한 AdipoRed Assay Reagent kit(Lonza)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 대조군 또는 화합물 7b 처리한 3T3 세포내의 지방함량을 측정하였다. 10 분간 인큐베이션 후에, 형광을 Victor3(Perkin Elmer)상에서 485 nm 여기 파장 및 572 nm 방출 파장으로 측정하였다.

7. 전세포 용해물의 제조

지정한 시점에서, 3T3-L1 세포를 PBS로 2회 세정하고, 변형 RIPA 완충액 [50 mM Tris-Cl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.1% 소듐 도데실 설페이트, 0.25% 소듐 테옥시콜레이트, 1% Triton X-100, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 프로테아아제 억제제 콕테일(1x)]에 노출시켰다. 세포용해물을 수집하고 12,000 rpm에서 4°C에서 20분간 원심분리하였다. 상등액을 취하고 단백질 농도를 Bradford reagent(Bio-Rad)로 측정하였다.

8. 웨스턴 블롯 분석

단백질(50 μ g)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)의 탈지유를 포함하는 TBST으로 블로킹 처리하였다. 멤브레인을 4°C에서 C/EBP- α (1:1,000), PPAR- γ (1:1,000), STAT-3(1:1,000), p-STAT-3(1:1,000), STAT-5(1:1,000), p-STAT-5 (1:1,000), FAS(1:1,000) 또는 β -액틴(1:10,000)에 특이적인 항체와 함께 인큐베이션하였다. 이어서, 멤브레인을 호오스래디쉬 퍼옥시다제

(horseradish peroxidase)에 커플링된 2차 항체에 상온에서 2시간 동안 노출시켰다. 멤브레인을 상온에서 TBST로 3회 세정하였다. 면역반응성은 ECL 시약으로 검출하였다. 단백질 로딩이 동일한 양으로 된 것인지 여부는 액틴(actin) 단백질의 발현 수준을 측정하여 확인하였다.

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

지정된 시점에서 대조군 세포 또는 화합물 7b 처리된 3T3-L1 세포로부터 총 세포 RNA를 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

RT-PCR에 이용된 프라이머

유전자	프라이머 서열
C/EBP- α	센스: 5' -TTACAACAGGCCAGGTTTC-3' (서열번호 1)
	안티센스: 5' -CTCTGGGATGGATCGATTGT-3' (서열번호 2)
PPAR- γ	센스: 5' -GGTGAAACTCTGGGAGATTC-3' (서열번호 3)
	안티센스: 5' -CAACCATTGGGTCAGCTCTC-3' (서열번호 4)
FAS (Fatty Acid Synthase)	센스: 5' -TTGCTGGCACTACAGAATGC-3' (서열번호 5)
	안티센스: 5' -AACAGCCTCAGAGCGACAAT-3' (서열번호 6)
렙틴 (Leptin)	센스: 5' -CCAAAACCCTCATCAAGACC-3' (서열번호 7)
	안티센스: 5' -CTCAAAGCCACCACCTCTGT-3' (서열번호 8)
아디포넥틴 (Adiponectin)	센스: 5' - GGAGATGCAGGTCTTCTTGGT-3' (서열번호 9)
	안티센스: 5' -TCCTGATACTGGTCGTAGGTGAA-3' (서열번호 10)
액틴 (Actin)	센스: 5' -GGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3' (서열번호 11)
	안티센스: 5' -GGTAGGAACCGGAAGGCCA-3' (서열번호 12)

적용한 PCR 조건은 다음과 같다: C/EBP- α: 95℃에서 변성 30초, 62℃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 변성 15초, 55℃에서 어닐링 40초, 및 68℃에서 연장 45초의 30 사이클. 렙틴: 95℃에서 변성 1분, 57℃에서 어닐링 1분, 및 72℃에서 연장 1분의 30 사이클. 아디포넥틴(Adiponectin): 95℃에서 변성 1분, 53℃에서 어닐링 1분, 및 72℃에서 연장 1분의 30 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. 통계 분석

세포 계수 분석은 3회 중복으로 행하였고, 3회 반복하였다. 데이터는 평균±표준편차(SE)으로 표시하였다. 유의한 차이는 일원 ANOVA에 의해 결정하였다. 모든 유의성 테스트는 p값 <0.05에 기초하였다.

실험결과

1. 메리디아닌 C 유도체 화합물들 7a-7j는 강력한 항-지방생성 효과를 갖는다.

3T3-L1 지방세포에서 지방생성을 억제할 수 있는 화합물들을 확인하기 위해서, AdipoRed 분석법을 사용하여 지방세포 분화 동안에 최종농도 10 µM에서 메리디아닌 C(meridianin C) 유도체로 합성한 화합물 7a-7j가 지방 축적에 미치는 영향을 조사하였다. 메리디아닌 C 유도체 화합물 7a-7j의 트리글리세라이드(TG, triglyceride) 생성 억제 활성과 이들이 3T3-L1 지방세포의 생존율에 미치는 영향을 측정한 결과는 도 1에 나타내었다. 도 1의 패널 A에 나타난 바와 같이, 본 발명의 유도체 화합물 7a-7j는 메리디아닌 C와 유사하거나 더 낮은 정도로 TG

합성을 억제하는 활성을 나타내었다. 또한, 도 1의 패널 B에 나타난 바와 같이, 본 발명의 유도체 화합물 7a-7j는 실험에 사용된 지방전구세포 3T3-L1 세포의 생존율에 거의 영향을 미치지 않았다. 그러나, 메리디아닌 C 화합물은 3T3-L1 세포에 대해 강한 세포독성을 나타내었다.

[0103] 테스트한 유도체들 중에서, 화합물 7b는 지방세포 분화 동안에 트리글리세라이드(TG, triglyceride) 수준을 가장 강력하게 감소시킨 화합물 중 하나이었다. TG 합성에 미치는 화합물 7b의 강한 억제 효과를 확인하였기 때문에, 본 발명자들은 화합물 7b가 3T3-L1 지방세포에서 지방을 감소시키는 효과를 Oil Red O 염색 방법을 통해 추가적으로 테스트하였다. 도 2의 패널 B(위쪽 패널)에서 나타난 바와 같이, 세포 분화 8일째에 유도배지만으로 배양한 3T3-L1 지방전구세포에서 다수의 지방구(lipid droplet)이 형성되었으나, 분화되지 않은 세포에서는 지방구가 형성되지 않았다. 그러나, mock-처리된 세포와 비교하여, 화합물 7b로 8일 동안 지방전구세포를 처리한 경우 농도 의존적 방식으로 지방구의 양이 현저하게 감소하였다. 확실하게, 화합물 7b는 10 μ M의 농도에서 지방구를 최대로 감소시켰다. 화합물 7b에 의해 매개된 지방 감소 효과는 광학 현미경 측정에서도 관찰되었다(도 2의 패널 B, 아래쪽 패널). 한편, 메리디아닌 C 화합물도 농도 의존적 방식으로 지방구의 양을 감소시켰으나, 광학 현미경 측정 결과 세포의 형태적 변화 및 다수의 세포질 액포(vacuole) 형성에 의해 입증되는 바와 같이, 메리디아닌 C는 5 μ M 또는 10 μ M의 농도에서 세포 독성을 유발하였다. 또한, 메리디아닌 C (5 μ M 또는 10 μ M)에 의한 세포 독성은 분화 2일째에서도 관찰되었다. AdipoRed 분석 및 세포 계수 분석 결과, 화합물 7b는 TG 함량 수준을 농도 의존적으로 감소시켰으며(도 3의 패널 A), 이 때 생존 지방세포의 수에는 아무런 변화가 없었다(도 3의 패널 C). 반면, 메리디아닌 C는 농도 의존적 방식으로 TG 함량(도 3의 패널 B) 및 생존 세포 수(도 3의 패널 D) 모두를 감소시켰다.

[0104] **2. 화합물 7b는 지방세포 분화 동안에 C/EBP- α 및 PPAR- γ 의 발현과 STAT-3 및 STAT-5의 인산화 수준을 감소시킨다.**

[0105] 화합물 7b 매개된 항-지방생성 효과의 분자 및 세포 수준의 기초적 메커니즘을 이해하기 위해, 다음으로 지방생성에 관련되어 있는 C/EBPs, PPARs 및 STATs 패밀리의 발현 및/또는 활성화(인산화)에 미치는 화합물 7b(10 μ M)의 효과를 조사하였다. 웨스턴 블로팅 분석 결과, MDI 및 인슐린 및 FBS를 포함하는 유도 배지 처리에 의해 각각 2일, 5일, 및 8일째에 3T3-L1 지방전구세포에서 생성되는 C/EBP- α 및 PPAR- γ 의 단백질 수준이 시간 의존적 방식으로 증가한다는 것을 확인하였다(도 4의 패널 A). 한편, 화합물 7b는 지방생성 의존적인 C/EBP- α 및 PPAR- γ 단백질의 발현을 억제하였다. RT-PCR 분석 결과도 지방세포 분화 동안에 C/EBP- α 및 PPAR- γ 의 mRNA 발현이 증가한다는 것을 보여주었다(도 3의 패널 B). 그러나, 화합물 7b는 C/EBP- α 및 PPAR- γ 의 mRNA 발현을 억제하였다. 이러한 결과들은 화합물 7b가 PPAR- γ 및 C/EBP- α 를 전사(transcription) 수준에서 하향 조절한다는 것을 암시한다. 대조군 액틴 단백질 및 mRNA 발현은 상기와 같은 실험조건하에서는 일정하게 유지되었다(도 4의 패널 A 및 패널 B). 3T3-L1 지방 전구세포를 MDI 및 인슐린 및 FBS를 포함하는 유도 배지로 분화 유도시켜, 2, 5, 및 8일째에 생성된 STAT-3 및 STAT-5의 인산화 수준은 더욱 높게 나타났다. 그러나, 화합물 7b는 지방세포 분화 동안에 5일 및 8일째에 STAT-3의 인산화 수준과 8일째에 STAT-5의 인산화 수준을 크게 감소시켰다. 화합물 7b는 지정된 시점에서 지방 세포 분화 동안에 STAT-3 및 STAT-5의 총 단백질 수준에는 영향을 미치지 않았다.

[0106] **3. 화합물 7b는 지방세포 분화 동안에 FAS(Fatty Acid Synthase) 및 렙틴(leptin)의 mRNA 발현을 억제한다.**

[0107] 다음으로, 본 발명자들은 화합물 7b(10 μ M)가 지방세포 분화 동안에 지방세포 특이적 유전자 및/또는 아디포카인의 발현을 조절할 수 있는지를 측정하였다. 도 5의 패널 A 및 패널 B에서 보여지는 바와 같이, 지방세포의 분화 동안에 FAS의 단백질 및 mRNA 발현에서 시간 의존적 증가가 관찰되었다. 그러나, 화합물 7b는 지방세포 분화 동안에 5일째 및 8일째에 FAS의 단백질 및 mRNA 수준을 크게 억제하였다. RT-PCR 분석 결과, 지방세포 분화 동안에 2일, 5일 및/또는 8일째에 렙틴(leptin) 및 아디포넥틴(adiponectin)의 mRNA 발현에서 시간 의존적 증가가 확인되었다. 주목할만하게도, 화합물 7b는 5일 및 8일 째에 인슐린-유도 및 FBS-유도된 렙틴(leptin)의 mRNA 발현을 억제하였다. 또한, 화합물 7b는 2일째에 MDI-유도된 아디포넥틴(adiponectin)의 mRNA 발현을 억제하였으나, 5일 및 8일째에 인슐린-유도 및 FBS-유도된 아디포넥틴의 mRNA 발현에 아무런 영향을 미치지 않았다. 상기한 실험조건하에서 대조군 액틴(actin)의 mRNA 발현은 일정하게 유지되었다.

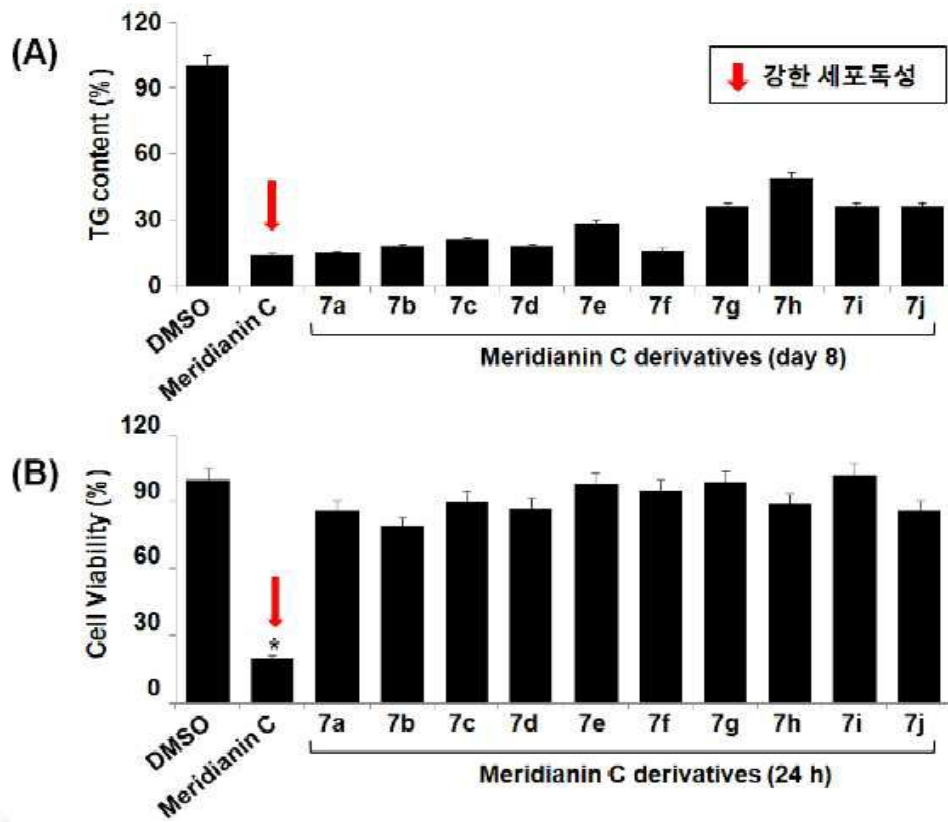
[0108] **고찰**

[0109] 지방세포의 과도한 분화는 지방조직의 비정상적인 팽창/축적을 제공하여 염증, 인슐린 내성 및 대사 질환에 관련된 아디포카인과 같은 병리학적 인자를 높은 농도로 분비하게 한다. 따라서, 지방세포 분화의 강력한 억제자는 항비만 약물로서 치료적 가능성을 가질 수 있다. 본 발명자들은 메리디아닌 C 유도체인 화합물 7b가 강력한 항비만 효과를 가지며, 이러한 효과는 C/EBP- α , PPAR- γ , FAS, STAT-3 및 STAT-5의 발현 및/또는 인산화의 조절을 통해 매개된다는 사실을 입증하였다. 성숙되거나 분화된 지방세포는 둥근 모양이고 많은 지방구(lipid droplet)로 채워져 있으며 섬유아세포 유사 지방전구세포와 구별된다(20). 본 발명의 연구 결과에 의하면, 화합물 7b(10 μ M)가 8일간의 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화하는 동안에 지방의 축적을 크게 억제한다는 결과를 확인하였는데(도 2의 패널 B, 도 2의 패널 A), 이러한 결과는 강력한 항-지방생성 효과를 암시하는 것이다. 세포계수 분석 데이터는 8일 동안의 화합물 7b 처리에 의해서 생존 3T3-L1 지방세포의 수에는 영향을 미치지 않는다는 것으로 보여주었다(도 3의 패널 C). 반면에, 메리디아닌 C(10 μ M)으로 8일간 처리한 경우도 지방 축적을 억제하였으나(도 2의 패널 B 및 도 3의 패널 B), 이러한 메리디아닌 C의 효과는 많은 수의 세포질 액포의 형성(도 2의 패널 B) 및 지방세포(도 3의 패널 D)의 소실에 의해 입증되는 바와 같이 세포독성 효과에 기인한 것으로 추정된다. 지방세포 분화가 C/EBP- α 및 PPAR- γ 의 발현 및/또는 활성화에 의해 크게 영향을 받는다는 사실을 증명하는 증거들이 증가하고 있다. 지방세포의 분화 동안에 상기 C/EBP- α 및 PPAR- γ 의 발현 및/또는 활성을 각각의 약리학적 억제자 또는 siRNA 트랜스펙션에 의해 차단하면 지방 축적이 억제된다는 사실이 보고되었고, 마우스에서 C/EBP- α 또는 PPAR- γ 를 녹아웃 시키면 백색 지방조직이 감소하거나 손상된다는 것이 보고되었다[7, 8, 21-23]. STAT-1, STAT-3, STAT-5, 및 STAT-6를 포함하는 STATs 패밀리가 3T3-L1 지방전구세포 및 지방세포 모두에서 발현되고[9], STAT-3 및 STAT-5를 포함하는 STAT 패밀리의 몇몇의 멤버들이 3T3-L1 지방세포 분화에 중요하다[10, 23-25]. 따라서, 화합물 7b가 지방세포 분화 동안에 C/EBP- α 및 PPAR- γ 의 단백질 및 mRNA의 발현과 STAT-3 및 STAT-5의 인산화를 억제한다는 사실을 발견하였다는 점을 고려하면(도 4의 패널 A 및 B), 화합물 7b에 의해 매개되는 항-지방생성 효과는 C/EBP- α , PPAR- γ , STAT-3, 및 STAT-5의 감소된 발현 및/또는 인산화와 매우 밀접하게 관련되어 있다고 할 수 있다. C/EBPs 및 PPARs의 발현 및/또는 활성의 증가가 FAS, 렙틴(leptin) 및 아디포넥틴(adiponectin)과 같은 지방세포 특이적 유전자 및 아디포카인들의 발현에 필수적이라는 사실을 입증하는 증거들이 있다[26-28]. 이들 중에서, FAS는 지방산 합성에 관련된 지방생성 효소이고, 이의 발현은 높은 지방산 합성율을 갖는 세포 또는 조직에서 크게 증가되어 있다[29]. 3T3-L1 지방전구세포가 텍사메타손 및 이소부틸잔틴 처리에 의해 분화유도되면, 인슐린에 대한 반응성 및 FAS 유도를 포함하여 진정한 지방세포로서의 특성을 습득한다고 제안되어 왔다[30]. 본 발명의 연구에서는 MDI 처리에 의해 지방세포 분화가 일어나도록 1차적으로 유도된 3T3-L1 세포를 인슐린과 FBS로 처리하는 경우 FAS의 mRNA의 발현이 유도된다는 사실도 증명하였다(도 4의 패널 A). 그러나, 본 발명의 화합물 7b는 3T3-L1 지방세포에서 인슐린-유도 및 FBS-유도된 FAS의 발현을 단백질 및 mRNA 수준에서 억제하였다. 이러한 결과는 화합물 7b가 FAS 발현을 억제함으로써 항-지방생성 효과를 갖는다는 점을 암시하는 것으로서, 이러한 사실은 화합물 7b 매개된 항-지방생성에 더욱 기여할 것이다. 성숙된(분화된) 지방세포는 에너지 항상성의 내분비 조절에 관련된 일정한 아디포카인들을 합성하고 분비하는 능력에 의해 특징 지워진다(31). 또한, 증가하는 증거들에 의해 렙틴(leptin)의 비정상적 발현/분비가 비만 및 비만-관련 질병에 연관되어 있다는 점이 입증되고 있으며, 반면 아디포넥틴이 비만의 조절에 중요한 역할을 하며(3, 32, 33), 이의 과발현이 일 부분 간에서의 글루코오스 생성에 미치는 영향을 통해 인슐린 민감성을 증진시킨다(34). 본 연구에서, 화합물 7b는 지방세포 분화 중에서 렙틴(leptin)의 mRNA 발현을 억제하지만 아디포넥틴(adiponectin)의 mRNA 발현은 억제하지 않았다. 본 연구에서 확인된 화합물 7b와 같은 특정 소분자 억제자가 렙틴의 과발현이 중요한 병인적 역할을 하는 비만과 이와 관련된 대사성 질환을 예방하고 치료할 수 있는 새로운 약물의 개발에 이용될 수 있을 것이다.

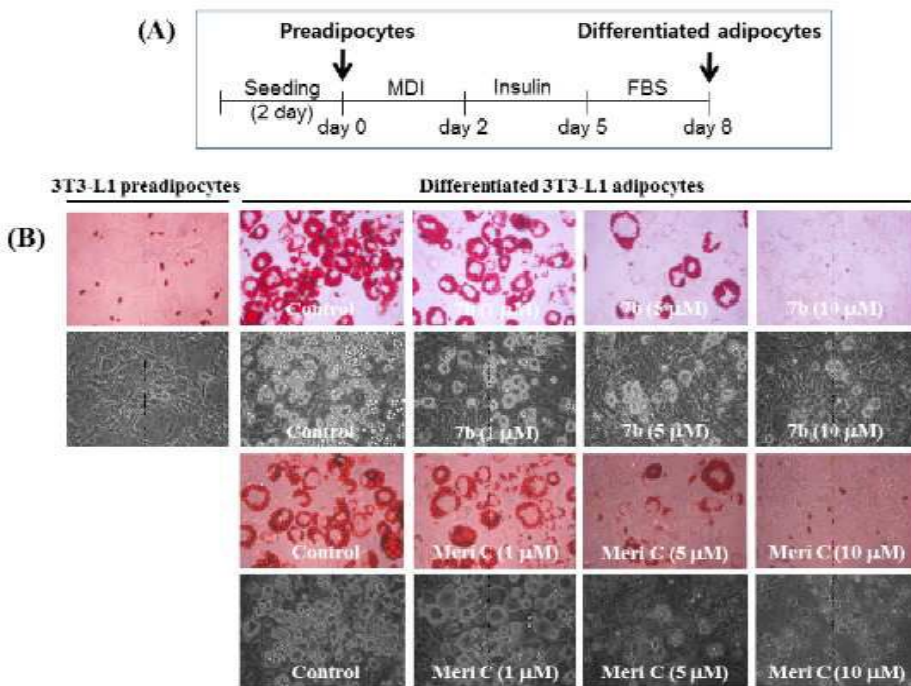
[0110] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

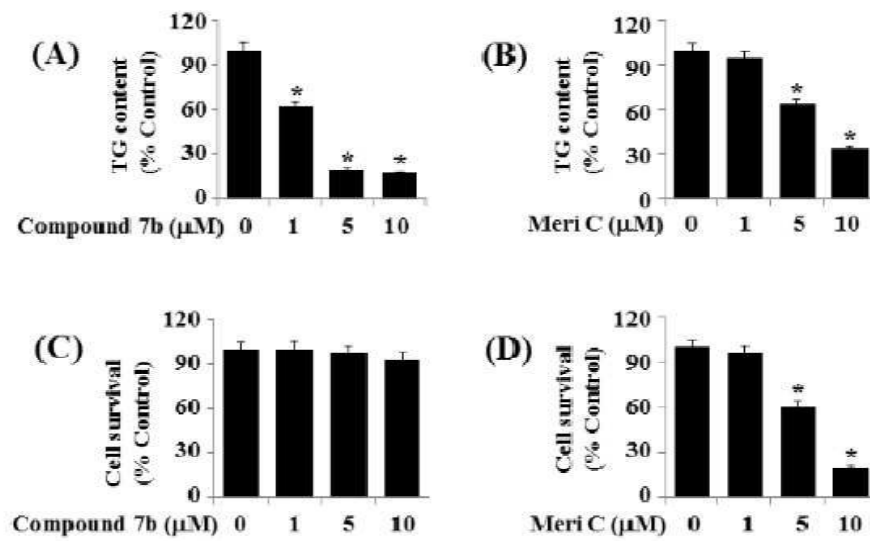
도면1



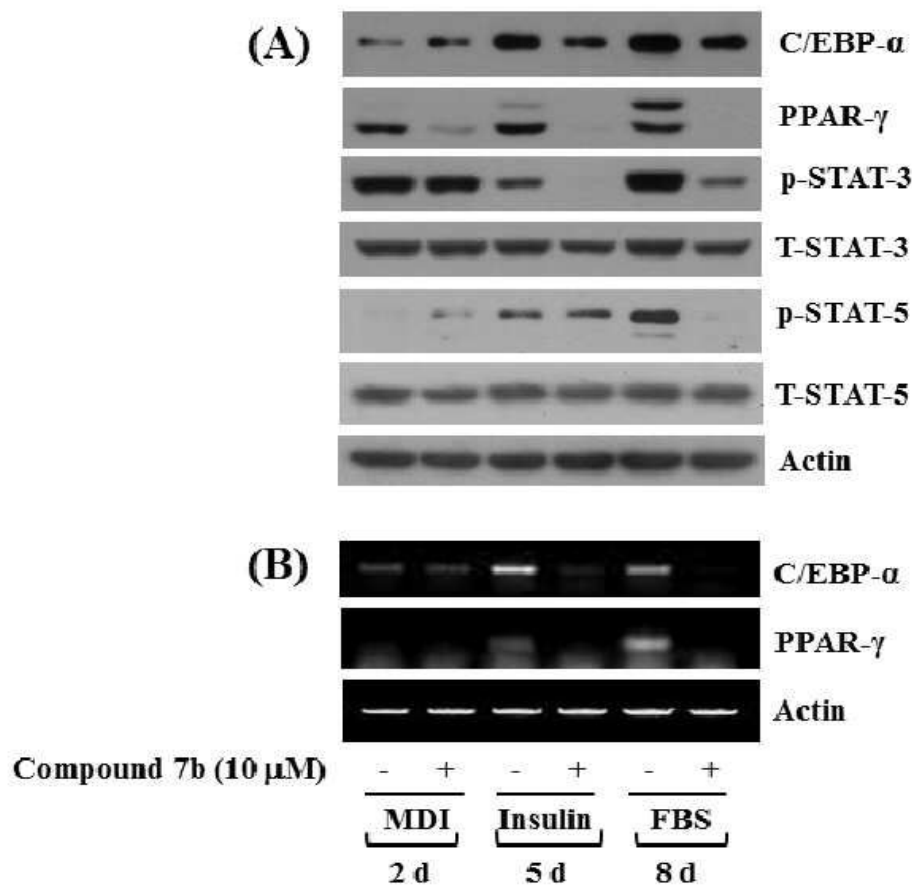
도면2



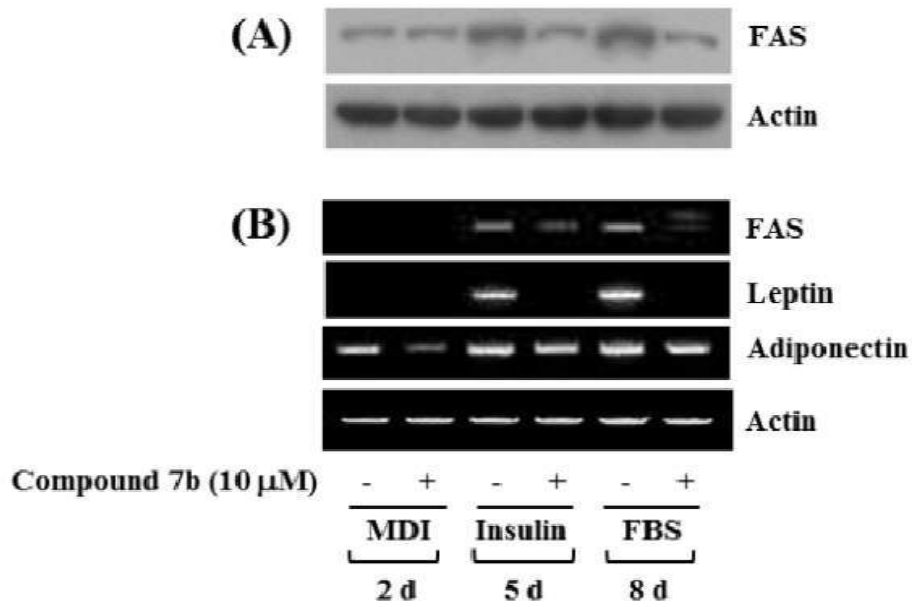
도면3



도면4



도면5



도면6

