



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0001100  
(43) 공개일자 2012년01월04일

(51) Int. Cl.

A61K 31/343 (2006.01) A61K 36/258 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0061730

(22) 출원일자 2010년06월29일

심사청구일자 2010년06월29일

기술이전 희망 : , 실시권하여, 기술지도

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교

(72) 발명자

강영희

강원도 춘천시 한림대학길 1, 생명과학관 8513호  
(옥천동, 한림대학교)

성혜영

경상북도 경산시 진량읍 대구대로 111-4

전종갑

강원도 춘천시 한림대학길 1, 화학과 (옥천동, 한림대학교)

전체 청구항 수 : 총 4 항

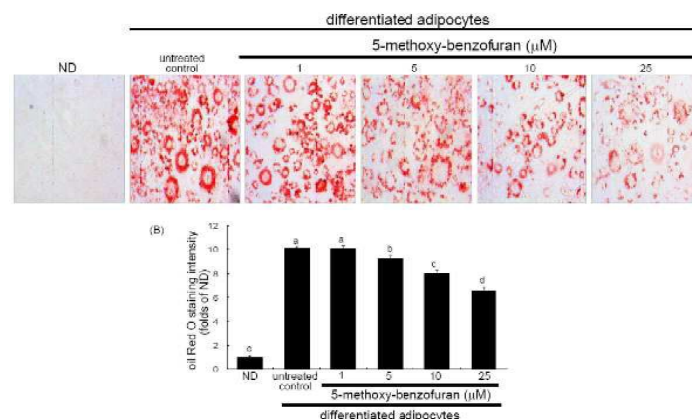
(54) 단삼성분의 유도체를 함유하는 비만 억제 및 예방 조성물

### (57) 요약

본 발명은 지방전구세포(pre-adipocyte, 마우스 섬유아세포인 3T3-L1) 분화를 억제하고 염증성 아디포카인(adipokine)인 비스파틴(visfatin)과 레지스틴(resistin)의 발현을 감소시키는

단삼성분[2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxybenzo[b]furan-3-carbaldehyde(XH-14)]의 유도체[2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[b]furan(5-methoxybenzofuran)]를 함유한 조성물에 대한 것이다. 더 상세하게는, 단삼성분의 유도체인 methoxybenzofuran이 지방전구세포의 분화와 밀접하게 관련된 PPAR $\gamma$ (peroxisome proliferator activated receptors $\gamma$ )와 C/EBP $\alpha$ (CCAAT enhancer binding protein  $\alpha$ )의 발현을 억제시키고, 내장지방조직에 존재하여 지방형성(lipogenesis)과 인슐린 저항성 및 염증반응을 유도시킨다고 보고되고 있는 새로운 아디포카인인 비스파틴(PBEF, pre-B cell colony-enhancing factor; Nampt, nicotinamide phosphoribosyl-transferase)과 레지스틴 발현을 억제시킴으로서 지방전구세포의 분화 및 지방축적을 억제하고 비만으로 인한 염증반응을 감소시킬 수 있는 단삼성분 XH-14의 유도체인 5-methoxybenzofuran를 함유한 조성물에 대한 것이다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관

연구사업명 의료바이오신소재융복합연구사업/지역거점연구사업단

연구과제명 강원도 자원을 이용한 혈관기능개선을 위한 기능성소재 개발

기여율

주관기관 강원대학교 산학협력단

연구기간 2010년 4월 1일 ~ 2011년 3월 31일

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

지방전구세포의 분화 조절 단백질인 PPAR  $\gamma$ 와 C/EBP  $\alpha$  발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는 단삼성분의 유도체 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[b]furan (5-methoxybenzofuran)을 함유한 비만 예방 및 억제용 조성물.

### 청구항 2

지방세포의 염증성 아디포카인인 비스파틴과 레지스틴 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는 단삼성분의 유도체 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[b]furan (5-methoxybenzofuran)을 함유한 비만 예방 및 억제용 조성물.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[b]furan(5-methoxybenzofuran)은 2,5-dimethoxybenzaldehyde로부터 Wittig-Horner반응, 수소환원반응, LAH 환원반응, benzylation, 위치선택적 요오드화반응, Sonogashira coupling, iodine-induced cyclization, LAH 환원반응 및 debenzoylation 모두 9단계의 효율적 방법으로 합성된 것을 특징으로 하는 단삼성분의 유도체를 함유한 비만 예방 및 억제용 조성물.

### 청구항 4

제2항에 있어서,

상기 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[b]furan은 2,5-dimethoxybenzaldehyde로부터 Wittig-Horner반응, 수소환원반응, LAH 환원반응, benzylation, 위치선택적 요오드화반응, Sonogashira coupling, iodine-induced cyclization, LAH 환원반응 및 debenzoylation 모두 9단계의 효율적 방법으로 합성된 것을 특징으로 하는 단삼성분의 유도체를 함유한 비만 예방 및 억제용 조성물.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 지방전구세포 분화를 억제하고 염증성 아디포카인(adipokine)인 비스파틴(visfatin)과 레지스틴(resistin)의 발현을 감소시키는 단삼성분[2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxybenzo[b]furan-3-carbaldehyde(XH-14)]의 유도체2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[b]furan(5-methoxybenzofuran)를 함유한 조성물에 대한 것이다. 보다 구체적으로, 단삼성분으로 benzoofuran carbaldehyde 계통의 천연물질인 XH-14을 motive로 잡고 작용기의 위치를 바꾸거나 C3 위치의 deformylated된 합성 유도체5-methoxybenzofuran가 지방전구세포(마우스 섬유아세포인 3T3-L1)의 분화와 밀접하게 관련된 PPAR  $\gamma$ 와 C/EBP  $\alpha$ 의 발현을 억제시키고, 내장지방조직에 존재하여 지방형성(lipogenesis)과 인슐린 저항성 및 염증반응을 유도시킨다고 보고되고 있는 새로운 아디포카인인 비스파틴(PBEF, pre-B cell colony-enhancing factor; Nampt, nicotiamide phosphoribosyl-transferase)과 레지스틴 발현을 억제시킴으로서 지방전구세포의 분화 및 지방축적을 억제하고 비만으로 인한 염증반응을 감소시킬 수 있는 단삼성분 XH-14의 유도체인 5-methoxybenzofuran를 함유한 조성물에 대한 것이다.

### 배경기술

[0002] 최근 비만 인구가 급격히 증가하면서 비만의 치료 및 예방에 관한 관심이 증가되고 있다. 비만인은 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 심장질환, 관절염, 호흡기질환, 성기능 장애, 암 등의 질병에 대한 발병율이 높고 평균 수명도 감소된다(Weisberg SP et al., J. Clin. Invest. 112, 1796-1808, 2003). 이와 같이 비만과 함께 수반되는 대사 장애가 관심사로 집중되면서, 지방조직은 지방 저장소로서의 역할뿐 아니라, 대사조절하는 내분비기관으로서

연구 대상이 되고 있다. 지방조직에서 생성, 분비되는 adiponectin, leptin, resistin, adipsin과 같은 adipocytokines(adipokines)들이 밝혀져서 많은 연구들이 이루어지고 있다. 최근 새로운 adipokine으로 알려진 비스파틴과 레지스틴은 내장지방조직에 존재하며 지방형성 (lipogenesis)을 증가시키고, 인슐린 저항성을 유도하여 지방조직과 염증반응을 연결하는 고리로 보고되고 있다( Lee WJ et al., Int. J. Obesity 33, 46572, 2009; Bastard JP et al., Eur. Cytokine Netw. 17, 4-12, 2006). 또한 지방조직에서 분비하는 비스파틴은 혈관조직의 염증반응에 관여하여 죽상경화에 관련된 adhesion molecules 발현을 증가시킨다는 보고가 있다(Chudek J & Wiecek A, Pharmacol. Reports 58, 81-88, 2006).

[0003]

지방세포 특이 전사인자(transcription factor)들은 분화과정에 따라 발현량에 변화가 나타나는데, 지방전구세포의 분화 조절은 C/EBP  $\alpha$ 와 PPAR  $\gamma$ 가 중추적인 역할을 담당하고 있으며, 지방전구세포 분화과정 중 각기 다른 시점에서 발현이 유도되며 서로 상호 작용을 통하여 특이 유전자들의 발현을 조절하고, 지방대사의 활성화와 지방전구세포의 분화를 점진적으로 유도해 나가는 것으로 잘 알려져 있다. PPAR  $\gamma$ 에 의해 유도되는 지방전구세포 분화능력은 다른 어떤 전사인자보다 강력하며, PPAR  $\gamma$ 의 발현은 C/EBP family에 의해 조절되며, 특히 C/EBP  $\beta$ 가 PPAR  $\gamma$ 의 지방세포 분화의 초기 발현을 유도하는 중요한 기능을 수행한다. 이 전사인자의 발현증가는 PPAR  $\gamma$ 의 발현을 증가시키며, 이어 C/EBP  $\alpha$ 의 발현도 증가하게 된다. 따라서, 지방전구세포 분화 과정에 있어서 초기단계의 C/EBP  $\delta$ 와 C/EBP  $\beta$ 는 PPAR  $\gamma$ 의 발현을 유도하며, PPAR  $\gamma$ 의 발현 증가는 C/EBP  $\alpha$ 의 발현에 의한 지방세포 분화 후기를 담당하는 것으로 보고되고 있다(Cowherd RM et al., Cell DEV. Biol. 10, 3-10, 1999; Tang QQ et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 319, 235239, 2004; Lowell BB, Cell 99, 239-242, 1999).

[0004]

현재 비만치료를 위해 임상에서 여러가지 비만치료제들이 사용되고 있으나 변비, 기름기 많은 변, 복부 팽만감, 잦은 방귀, 복통, 입마름, 불면증 등의 여러 가지 부작용을 일으키고 있다. 따라서 비만의 치료를 위해서는 부작용이 없고 다양한 기전을 지닌 약제나 기능성 원료의 개발이 필요하며 다양한 성분을 함유하고 있는 천연물로부터의 유효성분을 분석하여 비만 치료제의 개발이 요구되는 실정이다. 천연물을 이용하여 인체에 대하여 안전하고 부작용이 없으며, 지방전구세포 분화 억제, 분화된 지방세포에서의 지방축적을 억제하는 새로운 물질을 개발할 필요성이 대두되고 있다.

[0005]

본 연구에서는 단삼성분 XH-14의 유도체인 5-methoxybenzofuran을 지방전구세포의 분화과정 동안 처리하여 지방전구세포의 분화와 비스파틴과 레지스틴의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 지방전구세포의 분화과정에 미치는 영향은 지방축적 정도와 분화과정에서 발현이 증가되는 것으로 잘 알려져 있는 PPAR  $\gamma$ 와 C/EBP  $\alpha$  단백질 발현정도를 측정하였다. 이 연구를 통해 단삼성분의 유도체인 5-methoxybenzofuran이 지방분화를 억제하고, 지방세포에서 분비되어 염증반응을 야기하는 비스파틴과 레지스틴의 발현을 감소시키는 것으로 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006]

본 발명은 종래 알려진 비만억제제들 보다 효과가 우수하면서 부작용이 없는 천연물의 유도체를 찾고자 연구를 거듭한 결과, 단삼성분(XH-14)의 유도체인 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[b]furan(5-methoxybenzofuran)이 지방전구세포의 분화와 세포내 지방축적을 억제하고, 염증성 아디포카인인 비스파틴과 레지스틴을 억제시키면서 세포 독성이 없는 탁월한 비만 억제능을 나타내는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다. 따라서, 본 발명은 단삼성분의 유도체인 5-methoxybenzofuran을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

### 과제의 해결 수단

[0007]

단삼성분 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxybenzo[b]furan-3-carbaldehyde(XH-14)의 유도체인 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[b]furan(5-methoxybenzofuran)이 지방전구세포의 분화와 관련된 PPAR  $\gamma$ 와 C/EBP  $\alpha$  발현과 지방축적을 억제하고 염증성 비스파틴과 레지스틴의 발현을 감소시켰다. 이로써 단삼성분 XH-14의 유도체인 5-methoxybenzofuran이 지방전구세포의 분화를 억제하여 비만을 예방하고 개선하는 효능과 비만으로 인한 염증반응을 감소시키는 역할을 지닌다는 것을 확인하였다.

### 발명의 효과

[0008] 본 발명에 의한 천연 약용소재 및 식품에 널리 분포되어 있는 benzofuran carbaldehyde 계통의 단삼성분 XH-14의 유도체 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[b]furan(5-methoxybenzofuran)이 지방전구세포의 분화와 관련된 PPAR  $\gamma$ 와 C/EBP  $\alpha$ 의 발현과 지방축적을 억제하고, 염증성 비스파틴과 레지스틴의 발현을 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 단삼성분 유도체 5-methoxybenzofuran은 지방전구세포의 분화를 억제하고 비만으로 인한 염증반응을 해소시키는 효능을 지니고 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 지방세포 분화과정에서 단삼성분의 유도체인 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[b]furan(5-methoxybenzofuran)의 세포독성의 안전성 평가를 나타낸 도이다. 여기에는 MTT assay를 통한 세포생존율에 대한 결과를 나타낸다.

도 2는 지방세포 분화과정에서 단삼성분의 유도체인 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxybenzo[b]furan(7-methoxybenzofuran)와

2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-6-methoxybenzo[b]furan(6-methoxybenzofuran)의 세포독성의 안전성 평가를 나타낸 도이다. 여기에는 MTT assay를 통한 세포생존율에 대한 결과를 나타낸다.

도 3은 지방세포 분화과정에서 단삼성분의 유도체인 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxybenzo[b]furan(7-methoxybenzofuran)와

2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-6-methoxybenzo[b]furan(6-methoxybenzofuran)의 Oil Red O 염색을 통한 지방축적 억제 정도를 나타낸 결과이다.

도 4는 지방세포 분화과정에서 단삼성분의 유도체인 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[b]furan(5-methoxybenzofuran)의 Oil Red O 염색을 통한 축적된 지방형성을 현미경으로 관찰한 결과와 염색정도를 농도로 나타낸다.

도 5는 단삼성분의 유도체인 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxybenzo[b]furan(7-methoxybenzofuran)와

2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-6-methoxybenzo[b]furan(6-methoxybenzofuran)의 지방전구세포의 분화에 관여하는 PPAR  $\gamma$ 와 C/EBP  $\alpha$  발현의 감소 효과를 나타낸 도로 웨스턴 블롯 분석에 의해 얻어진 결과이다. 정량적 결과는 덴시토미터로 측정하여 나온 것이다.

도 6은 단삼성분의 유도체인 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[b]furan(5-methoxybenzofuran)의 지방전구세포의 분화에 관여하는 PPAR  $\gamma$ 와 C/EBP  $\alpha$  발현의 감소 효과를 나타낸 도로 웨스턴 블롯 분석에 의해 얻어진 결과이다. 정량적 결과는 덴시토미터로 측정하여 나온 것이다.

도 7은 단삼성분의 유도체인 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[b]furan(5-methoxybenzofuran)의 지방전구세포의 분화에 관여하는 PPAR  $\gamma$ 와 C/EBP  $\alpha$  mRNA 발현의 감소 효과를 나타낸 도로 역전사중합효소연쇄반응으로 얻어진 결과를 나타낸다. 정량적 결과는 덴시토미터로 측정하여 나온 것이다.

도 8은 단삼성분의 유도체인 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[b]furan(5-methoxybenzofuran)의 농도에 따른 염증성 비스파틴 발현의 감소 효과를 나타낸 도이다. 여기에서 웨스턴블롯 분석으로 얻어진 결과를 나타낸다. 정량적 결과는 덴시토미터로 측정하여 나온 것이다.

도 9는 단삼성분의 유도체인 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[b]furan(5-methoxybenzofuran)의 농도에 따른 염증성 레지스틴 발현의 감소 효과를 나타낸 도이다. 이것은 웨스턴블롯 분석으로 얻어진 결과를 나타낸다. 정량적 결과는 덴시토미터로 측정하여 나온 것이다.

도 10은 단삼성분의 유도체인 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[b]furan(5-methoxybenzofuran)의 농도에 따른 염증성 비스파틴과 레지스틴의 mRNA 발현의 감소 효과를 나타낸 도이다. 이것은 역전사중합효소연쇄반응으로 얻어진 결과를 나타낸다.

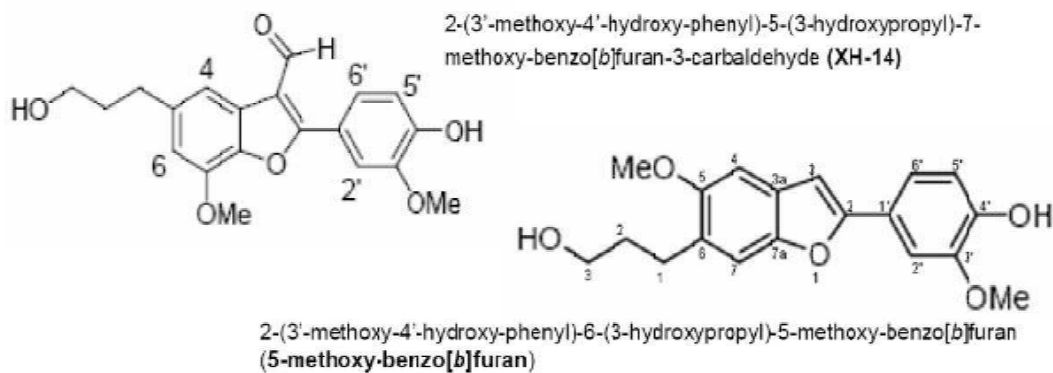
# 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 상기와 같은 발명 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 benzofuran carbaldehyde 계통의 단삼성분 XH-14의 유도체 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[b]furan(5-methoxybenzofuran)를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 개선용 조성물을 지방전구세포(3T3-L1 pre-adipocyte)의 분화과정에 제공한다.

[0011] 보다 상세하게는 benzofurna carbaldehyde 계통의 단삼성분 XH-14 유도체 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[b]furan(5-methoxybenzofuran)를 지방전구세포의 분화 관련 단백질 PPAR  $\gamma$  와 C/EBP  $\alpha$  발현과 세포내 지방축적을 억제하고, 염증성 비스파틴과 레지스틴의 발현과 이것의 mRNA 수준을 감소시키면서 세포 독성이 없는 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0012] 단삼 성분 XH-14 유도체인 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[b]furan (5-methoxybenzofuran)은 하기 화학식 1과 같은 구조를 갖고 있고 기존의 보유한 기술적 방법(특허등록번호 10-0914379)에 따라 XH-14를 합성하여 변형을 유도한 유도체를 합성하여 사용 할 수 있다.

[0013] 화학식 1



[0014]

[0015] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명의 benzofuran carbaldehyde 계통의 단삼성분 XH-14 유도체 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[b]furan(5-methoxybenzofuran)을 지방세포의 분화관련 단백질 PPAR  $\gamma$  와 C/EBP  $\alpha$  발현과 지방세포내 지방축적을 억제하고, 염증성 비스파틴과 레지스틴의 발현과 이것의 mRNA 수준을 감소시키면서 세포 독성이 없는 유효성분으로 하여 지방전구세포의 분화를 조절하며 지방축적을 억제하고 비만으로 인한 염증반응을 감소시키는 비만 예방 또는 개선하는 효과를 나타내는 것이다.

[0017] 본 발명의 조성물은 단삼성분 XH-14 유도체 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[b]furan(5-methoxybenzofuran)을 0.01 ~ 99.9% 함유하는 것이 바람직하고, 0.1 ~ 90% 함유하는 것이 더욱 바람직하다.

[0018] 그러나 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 변할 수 있다.

[0019] 본 발명의 단삼성분 XH-14 유도체 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-

methoxybenzo[*b*]furan(5-methoxybenzofuran)을 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명에 의한 비만억제제와 비만으로 기인하는 염증반응 억제 활성을 갖는 단삼성분 XH-14의 유도체인 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[*b*]furan(5-methoxybenzofuran)을 함유하는 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 음료, 분말, 농축, 캡슐, 의약으로 하는 것이다.

[0021] 본 발명에 다음의 실시 예에 의거하여 더욱 상세히 설명되나, 본 발명이 이에 의해 제한되지는 않는다.

[0022] (실시 예 1) 단삼성분의 유도체 합성

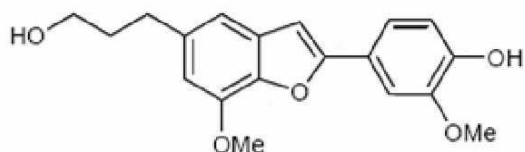
[0023] Benzo[*b*]furan은 heterocyclic 물질로서, 자연계에서 특별한 생리활성을 지니고 있는 alkaloid 구조의 흥미로운 물질이다. Benzo[*b*]furan 구조를 지니는 천연 물질로는 단삼에 함유되어 있는 XH-14인 2-(3'-methoxy-4'-hydroxy-phenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-benzo[*b*]furan-3-carbaldehyde에서 변형된

[0024] 2-(3'-methoxy-4'-hydroxy-phenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-benzo[*b*]furan(7-methoxybenzofuran)와

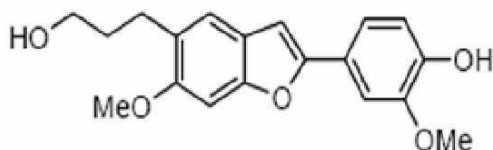
[0025] 2-(3'-methoxy-4'-hydroxy-phenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-6-methoxy-benzo[*b*]furan(**6-methoxybenzofuran**), 그리고 2-(3'-methoxy-4'-hydroxy-phenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxy-benzo[*b*]furan(**5-methoxybenzofuran**)을 합성하여 이들의 효능을 비교하였다.

[0026]

[0027] 화학식 II



2-(3'-methoxy-4'-hydroxy-phenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-benzo[*b*]furan  
(7-methoxybenzofuran)



2-(3'-methoxy-4'-hydroxy-phenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-6-methoxy-benzo[*b*]furan  
(6-methoxybenzofuran)

[0028]

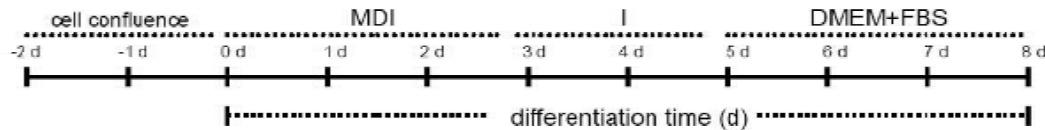
[0029] 이 중에서 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-(3-hydroxypropyl)-5-methoxybenzo[*b*]furan(**5-methoxybenzofuran**)은 2,5-dimethoxybenzaldehyde로부터 Wittig-Horner 반응, 수소환원반응, LAH 환원반응, benzylation, 위치선택적 요오드화반응, Sonogashira coupling, iodine-induced cyclization, LAH 환원반응 및 debenzylation 모두 9단계를 거쳐서 총 59%의 수율의 효율적 방법으로 합성하였다.

[0030] (실시 예 2) 지방전구세포의 배양 실험

[0031] 마우스 섬유아세포 3T3-L1(mouse fibroblast pre-adipocyte cell line 3T3-L1)는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)에서 구입하여 배양하였다. 지방전구세포 3T3-L1은 10% new born calf serum (NCS, Invitrogen Corporation, Auckland, New Zealand)와 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml

streptomycin이 첨가되어 있는 high glucose Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)에 배양하고 유지하였다. 지방세포로 분화시키기 위해서 10만개 세포/ml 밀도의 3T3-L1을 10% fetal bovine serum (FBS)/high glucose DMEM으로 2일 동안 post confluence 시킨 후, 0.5 mM IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine), 0.5  $\mu$ M dexamethasone, 5 마이크로그램/ml insulin (MDI)을 첨가한 10% FBS/high glucose DMEM을 넣어 2일 동안 배양하고 5  $\mu$ g/ml insulin(I) 만 첨가한 10% FBS/high glucose DMEM에 2일 더 배양한 후에, 10% FBS/high glucose DMEM 만을 넣어 다시 2일을 더 배양하여, 총 6일 동안 배양하여 지방세포로 분화시켰다. Post confluence 시킨 후에 배지를 갈아줄 때마다 단삼성분 유도체를 1, 5, 10, 25 마이크로몰의 농도별로 처리하였다.

[0032] 실험 프로토콜 I



[0033]

[0034] (실시 예3) 단삼성분 유도체의 안전성 및 지방축적 억제 효과

[0035] (3-1) 세포독성실험 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay

[0036] 단삼성분 유도체인 5-methoxybenzofuran, 7-methoxybenzofuran 및 6-methoxybenzofuran의 세포생존율에 미치는 영향을 측정하기 위해 100,000개 세포/well의 세포밀도로 지방전구세포 3T3-L1을 96 well에 분주하고 분화과정에서 1, 5, 10, 25 마이크로몰 농도로 3가지 유도체를 각각 처리하여 분화 6일째 MTT(1 mg/ml PBS) 용액에 4시간 동안 배양한 후 0.04 N HCl/isopropanol로 녹여 570 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하는 MTT assay를 시행하였다. MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띄는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로 MTT formazan의 흡광도를 측정하며, 측정된 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영하는 것으로 잘 알려져 있다.

[0037] 그 결과는 도 1과 도 2에 나타내었다.

[0038] 도 1과 도 2에 나타난 바와 같이 지방전구세포의 분화과정에서 단삼성분 유도체를 1, 5, 10, 25 마이크로몰 농도별로 처리한 결과 유도체 각각은 통계학적으로 세포독성이 없고 안전한 것으로 나타났다.

[0039] (3-2) Oil Red O 염색을 통해 지방축적 정도 측정

[0040] 지방전구세포의 분화과정에서 단삼성분의 유도체 각각을 처리하여 지방축적 억제 정도를 측정하였다. 분화 6일째 배양 세포를 10% formalin으로 고정시킨 후, Oil Red O 염색용액으로 염색하였다. Oil Red O 염색용액은 0.7 g/200 ml isopropanol의 stock solution을 60% 증류수로 희석하여 염색하고 200X 배율에서 현미경 관찰을 하였으며, 염색된 Oil Red O를 100% isopropanol로 녹여내어 490 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 비교 분석하였다.

[0041] 그 결과는 도 3와 도4에 나타내었다.

[0042] 지방분화를 시키지 않은 세포(non-differentiation)와 지방전구세포의 분화과정에서 단삼성분 유도체를 1, 5, 10, 25 마이크로몰 농도별로 각각 처리한 6일째 세포내 지방을 Oil Red O 염색하여 지방축적 정도를 흡광도로 측정한 결과와 현미경으로 관찰한 결과에서 나타내었다. 1, 5, 10, 25 마이크로몰 농도로 처리된 7-methoxybenzofuran와 6-methoxybenzofuran는 지방축적을 억제시키지 못하지만 (도 3), 5-methoxybenzofuran는 분화된 세포에 비해 5 마이크로몰 농도 이상에서 지방세포의 지방축적을 유의적인 수준으로 억제한 것으로 나타

났다 (도 4).

[0043] (실시 예 4) 단삼성분과 단삼유도체의 지방전구세포 분화와 관련된 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 발현 억제

[0044] (4-1) 웨스턴블롯(Western blot) 분석

[0045] 지방세포 분화에 따라 발현이 증가되는 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  발현 정도를 측정하기 위해 200,000개 세포/35 mm dish 세포밀도의 지방전구세포 3T3-L1에 단삼성분 유도체 각각을 처리하였다. 배양 처리된 세포에 lysis 완충액을 가하여 세포 추출물을 준비하여 10-12% SDS-PAGE gel을 수행하였다. 전기영동하여 나온 단백질 밴드들은 nitrocellulose membrane으로 전이시키고, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 5% 탈지유(skim milk)를 처리한 다음 마우스 일차 항체 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA)를 1,000 배로 희석하여 교반하면서 반응시키고, goat anti-rabbit horseradish peroxidase (1:10,000, Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, PA, USA)의 이차항체로 1시간 반응시켰다. Nitrocellulose membrane에 있는 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 단백질은 Supersignal West pico chemiluminescence (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)로 검출하여 X-ray 필름 (Konica Co., Tokyo, Japan)으로 촬영하였다.

[0046] 그 결과는 도5와 6에 나타내었다.

[0047] 분화된 지방세포에서의 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 는 미분화된 세포에 비해 4배에서 6배 정도 발현이 증가하였으나, 단삼성분의 유도체 5-methoxybenzofuran를 처리한 세포에서는 농도 의존적으로 이들 전사인자들의 발현 수준이 현저히 감소되었다 (도 6) 그러나 7-methoxybenzofuran와 6-methoxybenzofuran 유도체는 효과가 없었다 (도 5).

[0048] (4-2) 역전사중합효소연쇄반응[Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis]

[0049] 세포의 총 RNA 추출을 위해 Trizol reagent kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였다. 추출된 RNA 5  $\mu$ g로부터 cDNA를 합성하는 역전사반응을 200 unit의 역전사효소와 0.5 mg/mL oliogo-(dT) 15 primer(Bioneer Co., Korea)를 사용하여 수행하였다. PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 mRNA 발현에 사용한 primer의 염기서열은 다음과 같다.

[0050] PPAR $\gamma$  (forward primer: 5'-ACCACTCGCATTCCTTTGAC

[0051] -3', reverse primer: 5'-TCAGCGGAAGGACTTTATG

[0052] -3', 606 bp), C/EBP $\alpha$ (forward primer: 5'-GGTGCTGGAGTT GACCAGTG-3', reverse primer: 5'-CGGAATCTCCTAGTCCTGGC-3', 256 bp), GAPDH (forward primer: 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGGG-3', reverse primer: 5'-GACACATTGGGG GTAGGAACA-3', 224 bp)과  $\beta$ -actin (primer: 5'-GACTACCTCATGAAGATC-3', reverse primer: 5'-GATCCACATCTGCTGGAA-3', 516 bp)으로 역전사중합효소연쇄반응을 시행하였다. 중합효소 연쇄반응은 30-33 cycles로 시행하였고, 반응물은 ethidium bromide 가 포함된 1% agarose gel에서 확인하였다.

[0053] 그 결과 6일 동안 분화된 지방세포에서 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  mRNA는 미분화된 지방세포에서보다 증가하였으나, 단삼성분 유도체 5-methoxybenzofuran을 10 마이크로몰 이상 처리시 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  mRNA를 유의적으로 감소시켰다 (도 7).

[0054] (실시 예 5) 염증을 야기하고 인슐린 저항성을 올리는 염증성 비스파틴과 레지스틴의 발현 억제 효과

[0055] (5-1) 웨스턴블롯 분석

[0056] 5-methoxybenzofuran을 1, 5, 10, 25 마이크로몰 농도로 지방분화 과정에 처리하였다. 배양 처리된 세

포에 lysis 완충액을 가하여 세포 추출물을 준비하여 10-12% SDS-PAGE gel을 80 V로 전기영동 하였다. Gel상에 있는 단백질은 nitrocellulose membrane으로 전이시킨 다음, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 5% 탈지유에 3 시간 동안 blocking하였다. 비스파틴의 일차항체 (Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA, USA)와 레지스틴의 일차항체 (Santa Cruze, Santa Cruze, CA, USA)로 각각 nitrocellulose membrane과 교반하면서 3시간 배양한 후 4℃에서 하룻밤 배양하고 다시 실온에서 3시간 배양한 후 이차항체인 goat anti-rabbit horseradish peroxidase와 donkey anti-goat horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, PA, USA)로 1시간 동안 배양하였다. Nitrocellulose membrane에 전이된 단백질은 Supersignal West pico chemiluminescence (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)로 검출하여 X-ray 필름 (Konica Co., Tokyo, Japan)으로 촬영하였다.

[0057]

[0058]

그 결과는 도 8과 도 9에 나타내었다.

[0059]

도 8에 나타난 바와 같이 분화하지 않은 지방전구세포에서는 비스파틴 단백질의 발현이 거의 없었으나, 분화한 지방세포에서는 현저하게 증가하였다. 그에 비해 5 마이크로몰 이상의 5-methoxybenzofuran를 처리하였을 때 발현 양상이 현저히 억제시키는 것으로 나타났다. 또한 도 9에서는 분화하지 않은 지방전구세포에서는 레지스틴 단백질의 발현이 거의 없었으나, 분화한 지방세포에서는 현저하게 증가하였다. 그에 비해 10 마이크로몰 이상의 5-methoxybenzofuran를 처리하였을 때 발현 양상이 현저히 억제시키는 것으로 나타났다.

[0060]

(5-2) 역전사증합효소연쇄반응(RT-PCR)

[0061]

세포내 비스파틴의 mRNA 정도를 측정하기 위해 200,000개 세포/35 mm dish 세포밀도의 지방전구세포 3T3-L1에 Trizol reagent kit(Invitrogen)를 처리하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA 5 마이크로그램으로 cDNA를 합성하는 역전사반응을 200 unit의 역전사효소와 0.5 mg/ml oligo-(dT) 15 primer (Bioneer Co.)를 이용하여 수행하였다. 비스파틴과 레지스틴 mRNA 발현에 사용한 primer의 염기서열은 다음과 같다.

[0062]

비스파틴(forward primer:5'-CAGTGCCTGTGTCTGTGGTCA-3, reverse primer: 5'-CTAATGAGGTGCCACGTCTG-3', 665 bp)과 레지스틴(forward primer:5'-ACACACACCCTTCTCCACTA

[0063]

-3, reverse primer: 5'-CAAACAAGACTTCAACTCCC

[0064]

-3', 415 bp)과 GAPDH (forward primer: 5'-AACTTGGCATTGTGGAAGGG-3', reverse primer: 5'-GACACATTGGGGTAGGAACA-3', 224 bp)의 역전사증합효소 연쇄반응을 시행하였다. 증합효소 연쇄반응은 25-30 PCR cycles을 시행하였고, 반응물은 ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel에서 확인하였다.

[0065]

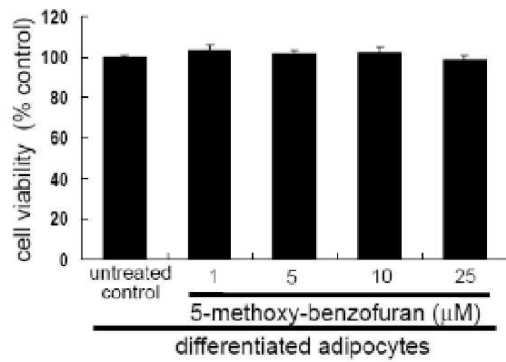
도 10에 결과를 나타내었다.

[0066]

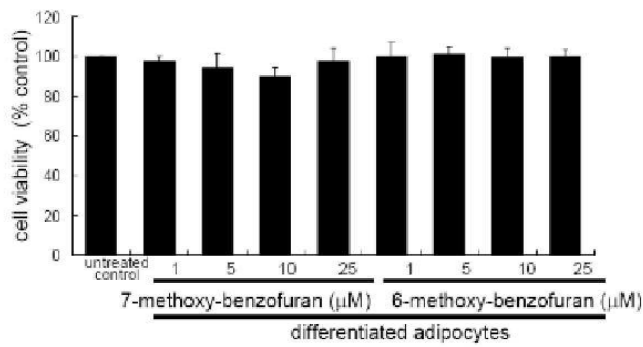
비스파틴과 레지스틴의 mRNA 수준을 살펴본 결과 분화된 지방세포에서는 비스파틴 mRNA 발현이 증가하는 반면에 5-methoxybenzofuran을 처리한 세포에서는 농도 의존적으로 비스파틴 mRNA 발현을 억제시키는 효과가 나타났다. 또한, 분화된 지방세포에서 증가된 레지스틴 mRNA 발현은 5-methoxybenzofuran 처리한 세포에서 25 마이크로몰 농도 에서 레지스틴 mRNA 발현을 억제시키는 효과가 나타났다.

## 도면

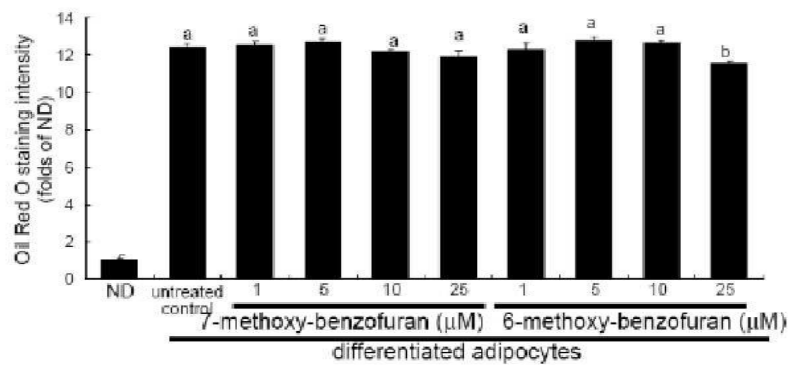
### 도면1



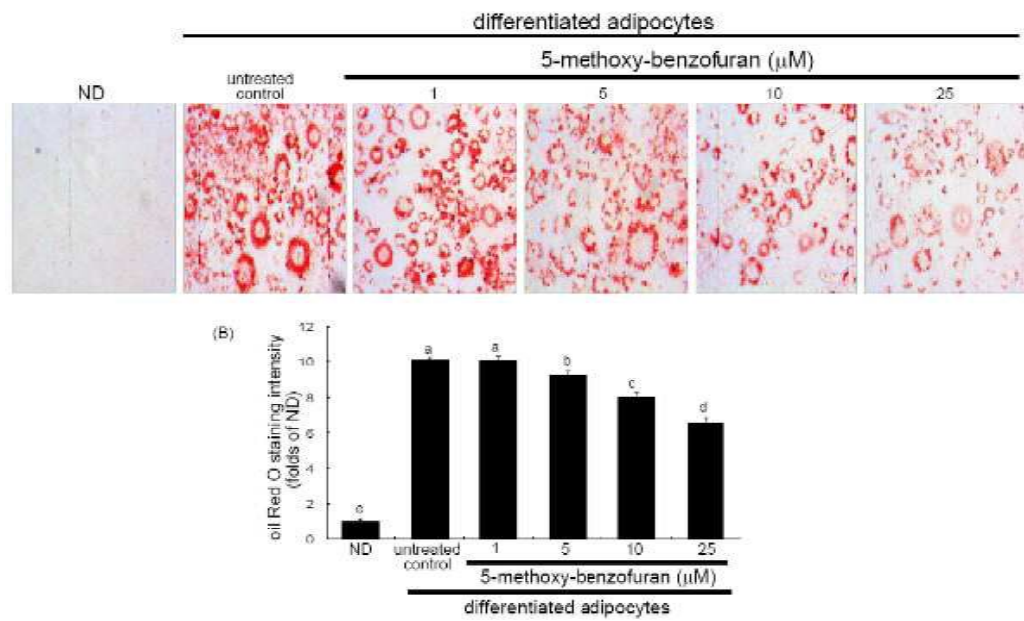
### 도면2



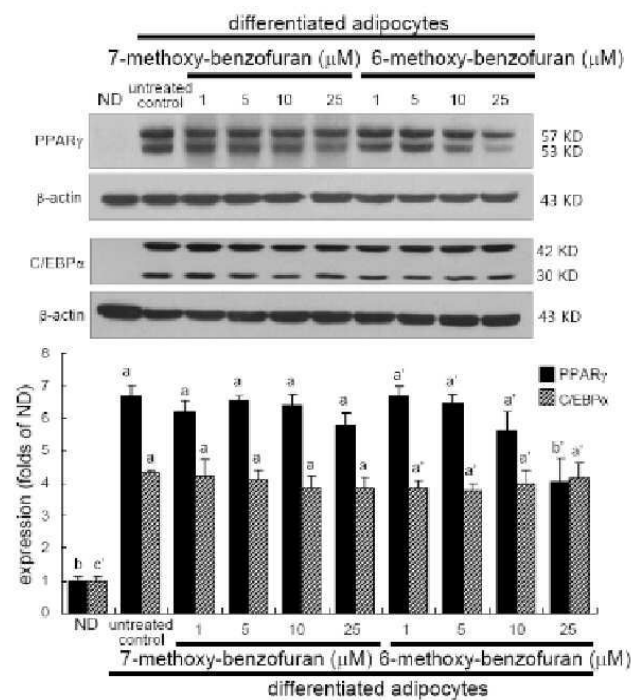
### 도면3



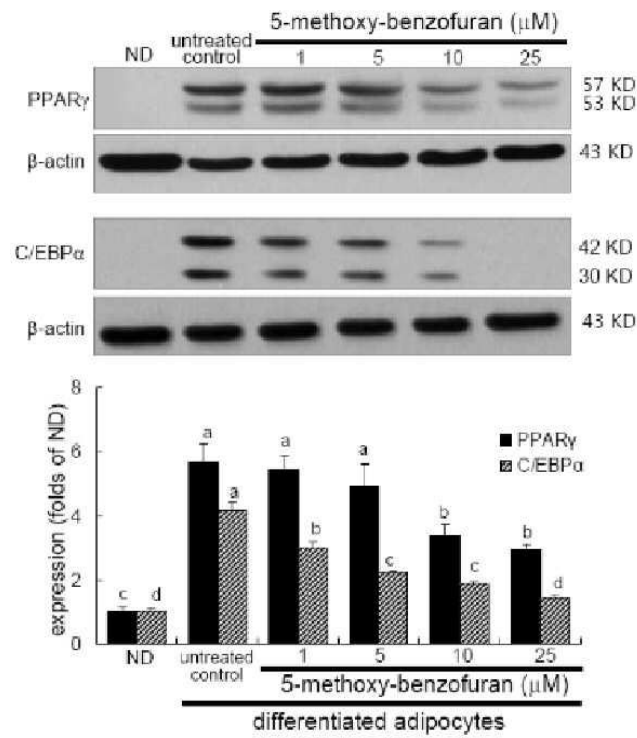
도면4



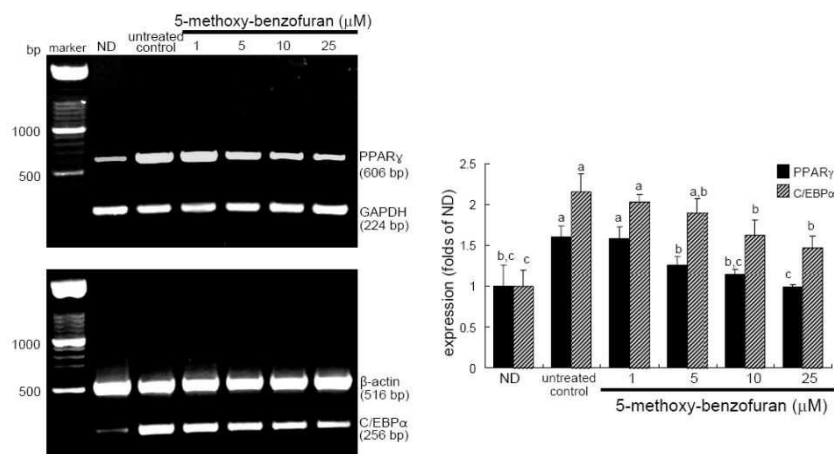
도면5



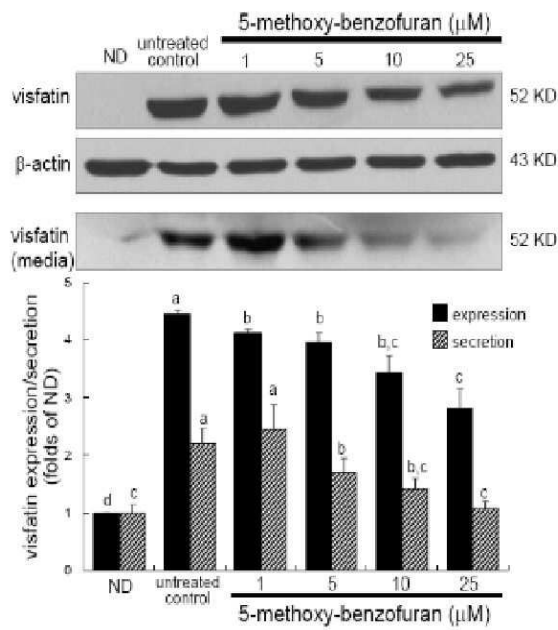
도면6



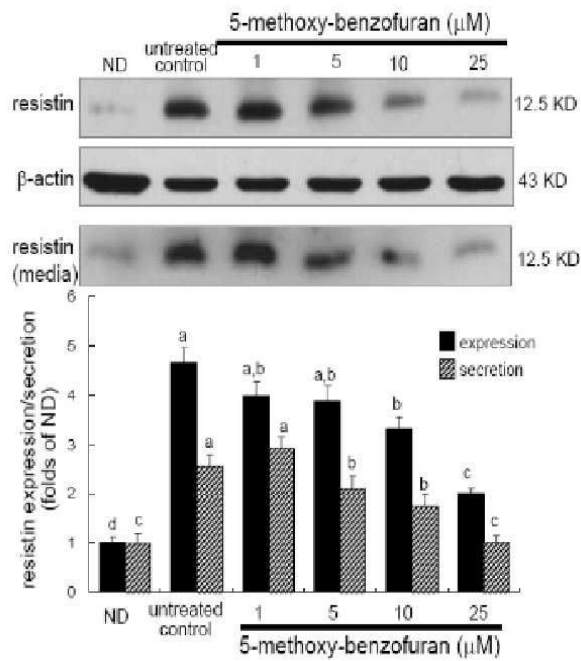
도면7



도면8



도면9



도면10

