

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0131723 (43) 공개일자 2013년12월04일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/35 (2006.01) A61K 31/425 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)		(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(21) 출원번호 10-2012-0055473	(22) 출원일자 2012년05월24일 심사청구일자 2012년05월24일	(72) 발명자 하주현 서울특별시 용산구 이촌1동 강촌아파트 105동 502호 이수호 서울특별시 강서구 내발산동 마곡수명산파크 1단지아파트 102동 401호
		(74) 대리인 안소영

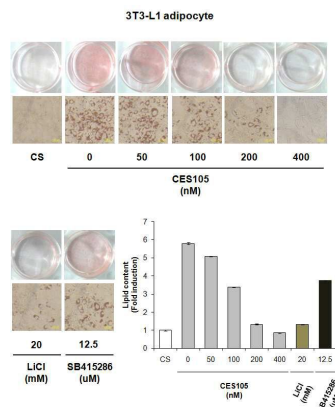
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 3-히드록시크로몬 유도체를 함유하는 항비만 및/또는 항당뇨용 조성물

(57) 요약

본 발명은 명세서에 기재된 식 I의 3-히드록시크로몬 유도체를 유효성분으로 포함하는 항비만 또는 항당뇨 조성물을 제공한다. 본 발명에서, 식 I의 3-히드록시크로몬 유도체는 GSK-3 억제제를 선택적으로 억제하여, 당뇨병 치료, 2형 당뇨병의 인슐린 저항성 치료와 같은 항당뇨 효과를 나타내며, 지방세포 분화 억제, 지방조직 내 지방 축적 감소, 체중 감소 등 항비만 효과를 나타낸다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0030722

부처명 기초연구사업

연구사업명 기초의과학분야

연구과제명 산화스트레스에 의한 산화환원 균형 및 에너지 항상성 조절 장애 발전기전 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

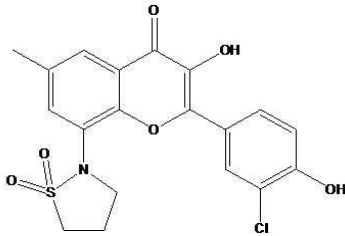
연구기간 2011.09.07 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 식 I의 3-히드록시크로몬 유도체를 유효성분으로 포함하는 항비만 또는 항당뇨용 약학적 조성물:

[식 I]



청구항 2

제1항에 있어서, 항당뇨 또는 항비만 효과는 GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase-3)억제에 의한 것인 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 기재된 식 I의 3-히드록시크로몬 유도체를 유효성분으로 포함하는, 비만 또는 당뇨의 예방 또는 완화를 위한 식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 3-히드록시크로몬 유도체를 함유하는 항비만 및/또는 항당뇨용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 글리코겐 합성효소 키나아제-3 (Glycogen Synthase Kinase-3; 이하 "GSK-3"라고도 함)는 세린/트레오닌 (serine/threonine) 단백질 인산화 효소로서, 세포의 글리코겐 생성, 세포 사멸, 그리고 줄기 세포 유지와 같은 다양한 신호 전달 경로에서 중요한 역할을 하며 이러한 경로 중의 일부는 인간의 대사성 질환과 밀접한 연관을 이루고 있다.

[0003] 최근에 GSK-3가 지방 세포의 발달과정에 중요한 역할을 한다는 것이 보고된 바 있다. 지방 세포에서 GSK-3 억제제에 의해 유도되는 세포 신호 전달 경로에서의 인위적인 조작은 지방 세포의 발달을 억제시킴으로써 항비만 효과를 증가시킨다.

[0004] 최근에는 대사성 질환들이 급증하고 있는데, 그 기전은 정확히 밝혀지지 않았지만, 몇몇 연구에서 GSK-3의 이상발현이 관여하는 것으로 밝혀지고 있다.

[0005] 현재, 이러한 대사성 질환들 중의 하나로 비만이 문제시 되고 있기 때문에, 본 발명자들에 의해 개발된 특이적 GSK-3 억제제가 지방 세포내 발현 단백질의 조절에 의한 항비만 치료 효과를 더욱 개선할 것으로 기대하고 있다.

[0006] 또한, GSK-3 억제제가 2형 당뇨병의 치료에 사용될 수 있음이 다수의 문헌을 통해 보고되어 있다 (Peat 등, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14 (2004) p.2127-2130; Ring 등, Diabetes 등, Vol. 52, March 2003, p.588-594 등).

[0007] 하지만, 대다수의 GSK-3 억제제들의 주요 문제로 표적으로 하는 GSK-3에 대한 특이성(specificity) 부재에 따른 약물학적 효능 저하를 들 수 있다. 따라서, 약물학적 효능이 우수한 당뇨 또는 비만 치료제의 개발을 위하여 GSK-3의 선택적 억제제의 개발이 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 10-2006-0073834호 (2006.06.29 공개)
 (특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 10-2006-0079121호 (2006.07.05 공개)
 (특허문헌 0003) 대한민국 공개특허공보 10-2006-0079122호 (2006.07.05 공개)

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) J. Lee 등, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 17 (2007), p.1284-1287

발명의 내용

해결하려는 과제

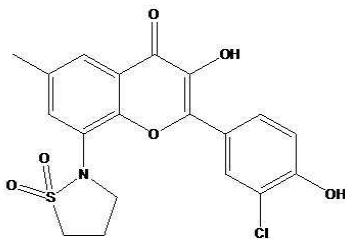
- [0010] 본 발명은 항비만 및/또는 항당뇨용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 기존의 억제제들과 비교하여 보다 높은 GSK-3의 특이성을 가지는 신규 억제제를 확인하여, 지방 세포 및 비만 동물모델에서 약물학적 효능 평가를 통해 이 제제의 비만억제 분자기전을 최초로 규명하였다.

- [0012] 본 발명은 하기 식 I의 3-히드록시크로몬 유도체{2-(3-클로로-4-히드록시-페닐)-8-(1,1-디옥소-1λ⁶-이소티아졸리딘-2-일)-3-히드록시-6-메틸-크로멘-4-온}를 유효성분으로 포함하는 항비만 및/또는 항당뇨용 조성물을 제공한다.

- [0013] [식 I]



- [0014]
- [0015] 상기 3-히드록시크로몬 유도체와 유사한 구조를 갖는 크로멘-4-유도체의 혈압 강하 작용과 당뇨병 치료 용도가 알려져 있었으나, 본 발명의 상기 식 I을 갖는 화합물의 GSK-3 선택적 억제 작용, 이에 의한 당뇨병 치료제로써의 용도, 및 항비만 효과는 알려진 바 없었다(GSK-3 억제에 의한 항당뇨 효과 기전에 관하여는 [Peat 등, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14 (2004) p.2127-2130]; [Ring 등, Diabetes 등, Vol. 52, March 2003, p.588-594] 등 참조).

- [0016] 본 발명에서, 상기 식 I의 3-히드록시크로몬 유도체는 그의 유리 형태 뿐 아니라 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염의 형태도 포함한다.

- [0017] 본 발명에서, 상기 식 I의 3-히드록시크로몬 유도체는 당 분야에 알려진 방법에 의하여 합성될 수 있으며(J. Lee 등, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 17 (2007), p.1284-1287 등 참조), 또한, 시판되는 것을 사용할 수 있다.

- [0018] 본 발명의 항당뇨 또는 항비만 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 식 I의 3-히드록시크로몬 유도체를 조성물 총 중량에 대하여 약 0.01~60 중량%, 바람직하게 약 0.1~30 중량% 로 포함한다.

- [0019] 상기 식 I의 3-히드록시크로몬 유도체는 GSK-3 억제제를 선택적으로 억제하여, 당뇨병 치료 효과 내지 2형 당뇨

병의 인슐린 저항성 치료 효과 등 항당뇨 효과를 나타내며, 지방세포 분화 억제, 지방조직 내 지방 축적 감소, 체중 감소 등 항비만 효과를 나타낸다.

- [0020] 본 발명의 항비만 및/또는 항당뇨용 조성물은 약학적 조성물, 식품 조성물, 또는 건강기능식품 등의 형태일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 한 구현형태로써, 본 발명은 상기 식 I의 3-히드록시크로몬 유도체를 유효성분으로 함유하는 항비만 또는 항당뇨용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있으며, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화될 수 있다. 제제화에 관한 내용은 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA 등의 문헌을 참조할 수 있다.
- [0023] 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 당업계에서 통상적으로 사용되는 것들, 예컨대 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다.
- [0024] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제, 기타 약제학적으로 허용가능한 첨가제를 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 약학적 조성물이 경구용 고형 제제로 제제화된 경우, 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토즈, 젤라틴 등을 포함할 수 있으며, 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다.
- [0026] 본 발명의 약학적 조성물이 경구용 액상 제제화된 경우, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하며, 물, 리퀴드 파라핀 등의 희석제, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다.
- [0027] 본 발명의 약학적 조성물이 비경구용으로 제제화된 경우, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제를 포함하며, 상기 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르류 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있으나 이에 국한되지 않는다.
- [0028] 본 발명의 약학적 조성물에 함유되는 상기 식 I의 3-히드록시크로몬 유도체의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 연령, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 1일 약 5 내지 1000 mg/kg으로, 바람직하게는 약 50 내지 500 mg/kg의 용량으로 투여할 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한번 또는 수회일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 약학적 조성물은 랫트, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로, 예를 들면, 경구, 복강 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내, 직장 내 등으로 투여될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 다른 구현형태로써, 본 발명은 상기 식 I의 3-히드록시크로몬 유도체를 유효성분으로 함유하는 항비만 또는 항당뇨용 식품용 조성물을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0032] 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0033] 상기 "식품 첨가물 공전"에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨

제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.

- [0034] 본 발명의 식품 조성물은 항비만 또는 항당뇨를 목적으로, 조성물 총 중량에 대하여 상기 식 I의 3-히드록시크로몬 유도체를 약 1 내지 60 중량%, 바람직하게는, 1 내지 10 중량%, 보다 바람직하게는 5 내지 8 중량% 로 포함할 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0036] 예를 들어, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 유효성분, 부형제, 결합제, 붕해제, 및 다른 첨가제와의 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축성형할 수 있다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수 있으며, 필요에 따라 적당한 제피제로 제피할 수도 있다.
- [0037] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질캡셀제는 통상의 경질캡셀에 유효성분, 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물 또는 그의 입상물 또는 제피한 입상물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질캡셀제는 유효성분 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0038] 환 형태의 건강기능식품은 유효성분, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수도 있다.
- [0039] 과립형태의 건강기능식품은 유효성분, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다. 과립형태의 건강기능식품은 12호 (1680 μm), 14호 (1410 μm) 및 45호 (350 μm) 체를 써서 다음 입도시험을 할 때에 12호체를 전량 통과하고 14호체에 남는 것이 전체량의 5.0 %이하이고 또 45호체를 통과하는 것은 전체량의 15.0 %이하일 수 있다.
- [0040] 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다 (대한약전 해설편, 문성사, 한국약학대학협의회, 제 5 개정판, p33-48, 1989).
- [0041] 이상 기술한 내용 뿐 아니라, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 명세서에 기재된 바로부터 발명의 구현 형태를 적절히 변경 내지 응용할 수 있으며, 이 또한 본 발명의 범주 내에 포함된다.

발명의 효과

- [0042] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명의 식 I의 3-히드록시크로몬 유도체는 GSK-3의 선택적 억제제로써, 기존 억제제들이 표적 특이성 부재 및 효용성 저하의 한계를 나타냈던 것과 달리, 효과적으로 항비만 및/또는 항당뇨 효과를 나타내며, 또한, 우수한 지방 세포의 분화 및/또는 발달 억제, 지방 조직 내 지방 축적 억제, 및 체중 감소 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

- [0043] 도 1은 CES105의 GSK-3에 대한 선택적인 잠재적 억제(potential inhibitory) 여부를 확인하기 위하여 GSK-3을 포함한 다양한 단백질들을 이용하여 시험관내 키나아제 검정을 수행한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 2는 CES105의 지방 세포 분화 및/또는 발달 억제 활성을 3T3-L1 미분화 지방세포에서 Oil-Red O 염색을 통해 확인한 도이다.
- 도 3은 CES105에 의한 지방 세포의 분화억제 분자기전을 확인하기 위하여, 웨스턴 블롯 분석법으로 각종 단백질을 측정된 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 4는 GSK-3을 중심으로 작용하는 CES105의 지방 세포 분화억제 분자기전을 나타낸 도이다.
- 도 5는 분화된 C2C12 근육 세포에 CES105 농도별 처리 후 당 흡수능을 측정된 결과를 나타낸 도이다.
- 도 6은 고지방 사료를 먹인 C57BL/6J 마우스에서 CES105에 의한 체중 감소 효과를 확인한 도이다.
- 도 7은 고지방 사료를 먹인 C57BL/6J 마우스에서 CES105에 의한 효과를 나타내는, 복부단면 X-ray 촬영 영상 및 지방분포 면적을 나타낸 그래프이다.

도 8은 고지방 사료를 먹인 C57BL/6J 마우스에 CES105에 의한 영향을 나타내는, 다양한 조직들의 중량 퍼센트를 나타낸 도이다.

도 9는 고지방 사료를 먹인 C57BL/6J 마우스에 CES105에 의한 총 콜레스테롤, LDL/HDL 비율 및 HDL/총콜레스테롤 비율의 변화를 나타낸 도이다.

도 10은 흰지방조직(WAT) 및 간의 H&E 염색 및 Oil-red O 염색을 통해 고지방 사료를 먹인 C57BL/6J 마우스에 CES105에 의한 지방의 분포도와 양의 변화를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 본 발명을 실시예 및 시험예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 시험예에 한정되는 것은 아니다.

[0045] [제조예] 화합물 CES105의 합성

[0046] 후술하는 In vitro 및 in vivo 실험을 수행하기 위해 CES105 {2-(3-클로로-4-히드록시-페닐)-8-(1,1-디옥소-1λ⁶-이소티아졸리딘-2-일)-3-히드록시-6-메틸-크로멘-4-온}는 연세대학교 약학대학 정진현 교수팀에 의뢰하여 합성한 것을 입수하였다. HPLC에 의한 95%이상의 순도를 확인하였으며, DMSO 스톱 용액으로 희석하여 냉동·보관하였다. 최종 DMSO의 농도는 0.5%를 넘지 않도록 하였다.

[0047] [실시예]

[0048] <실시예 1> CES105의 GSK-3 선택적 억제 활성 확인: 인비트로 키나아제 검정 (In Vitro Kinase Assays) (효능 및 특이성 검정)

[0049] 합성된 화합물 CES105의 특정 키나아제에 대한 선택적 반응성을 측정하기 위하여, 인비트로 키나아제 검정을 MDS Pharma Services사에 의뢰하였고, 그 회사에 의해 독자 개발된 SelectSmart[™] 방식과 형광 편광 (fluorescence polarization) 방법 (IMAP, Molecular Devices Corp.) 또는 변형된 EIA 방법을 이용하여 합성 화합물 CES105의 키나아제에 대한 억제 프로파일링을 수행하였다(MDS Pharma, WA, USA). 합성된 화합물 CES105는 검정 버퍼 (IMAP 검정용 50 mM HEPES pH 7.3, 20 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.01% Tween-20, 또는 EIA 검정용 50 mM HEPES pH 7.3, 20 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 200 uM Na₃VO₄)에 희석되었고, 그 분석은 50 uM ATP (IMAP) 또는 100 uM ATP (EIA)를 첨가함으로써 진행하였다. IMAP 검정의 경우, 37℃에서 1시간 동안 반응시키고, IMAP 비드 (Molecular Devices Corp.)를 첨가하여 반응을 종결시키고 편광 비율(polarization ratio)을 측정하였다. EIA 검정의 경우는 상온에서 반응시키고, 세척함으로써 반응을 종결시킨다. 그 후, HRP 활성을 관찰하여 정량화하였다. 분석에 사용된 모든 효소들은 인간 기반이었고, Invitrogen 또는 Upstate Cell Signaling Solutions에서 시판되는 것을 사용하였다.

[0050] 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1에 나타난 바와 같이, 화합물 CES105는 다른 키나아제에 대한 억제 활성의 변화보다는 GSK-3β에 대하여 높은 선택적 억제활성을 지닌 화합물임을 확인하였다.

[0051] <실시예 2> CES105의 지방세포 분화 억제 효과 확인: Oil-red O 염색법

[0052] 마우스 3T3-L1 지방전구세포(pre adipocytes; American Type Culture Collection (ATCC) #F8979)를 10% calf serum (CS; Invitrogen)와 antibiotic solution (100 units/mL penicillin, 100 ug/mL streptomycin; Invitrogen)이 포함된 돌베코 변형 이글 배지 (Dulbecco's modified Eagle medium: DMEM; Invitrogen)를 이용하여 37℃ CO₂ 배양기 (5% CO₂ : 95% air)에서 유지시켰다. 3T3-L1 지방전구세포의 분화유도는 MDI-분화 배지 (DMEM (Invitrogen), 10% FBS (Invitrogen), 1 uM dexamethasone (Sigma-Aldrich), 0.5 mM IBMX (Sigma-Aldrich), 및 5 ug/ml insulin (Sigma-Aldrich))으로 2일 동안 유지시켜 수행하였다. 이들 후, 텍사메타손과 IBMX를 제거되고 인슐린만 포함된 정상 배지(regular medium)로 이전 배지를 교환하고 추가로 2일을 유지시켰다. 그 다음, 10% FBS/DMEM으로 배지를 교환하고 추가적으로 4일 동안 배양시켰다. 이 시기에는 90%이상의 세포들이 지방 방울들(fat droplets)이 축적된 성숙한 지방세포(mature adipocytes)로 분화가 된 상태였다. 지방세포의 분화억제 기전을 살펴보기 위하여, 각각의 배지 교환 시점과 동시에 이들에 한번씩 화합물 CES105를 농도별(0, 50, 100, 200 nM)로 처리하였다. 양성 대조군으로 LiCl 20 mM, SB415286 12.5 μM을 각각 처리하였다. LiCl, SB415286 는 Sigma-Aldrich에서 시판되는 알려진 GSK-3 억제제이다.

- [0053] 지방세포의 분화유도 8일째 날, 지방 세포를 얼음-냉각 PBS로 두 번 세척하고, 10% 포르말린으로 상온에서 1시간 동안 고정시켰다. 그 후, 60% 이소프로판올에 녹인 0.6% Oil-red O (Sigma-Aldrich)로 1시간 동안 염색하였다. 세포를 물로 세척하였다. 사진은 Olympus microscope (Tokyo, Japan)로 촬영하였다. 빨간색으로 염색된 지방 방울들은 이소프로판올로 용해한 후, 분광광도계(spectrophotometer)를 사용하여 540 nm에서 정량화하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0054] 도 2에 나타난 바와 같이, CES105 가 농도 의존적으로 지방세포의 분화 및 발달을 효과적으로 억제하였음을 확인할 수 있었다. 특히, CES105는 대조군으로 사용된 GSK-3 억제제인 LiCl, SB415286 과 비교하여, 훨씬 더 낮은 농도에서 강력한 지방세포의 분화 및 발달 억제 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.
- [0055] <실시예 3> CES105의 지방세포 분화 억제 기전 확인: 웨스턴 블롯 분석
- [0056] CES105의 농도별 처리에 의한 지방세포의 분화억제 기전을 살펴보기 위해서, 위 실시예 2의 지방세포로부터 총 단백질을 RIPA 용해 버퍼(lysis buffer) (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 5 mM sodium fluoride, 2 mM sodium orthovanadate, 1% NP-40, 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS], 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 및 단백질 억제제 콕테일 [Roche Diagnostics, Heidelberg, Germany])를 이용하여 얻어냈다. 단백질의 농도를 바이오-래드 색소결합 미량정량법 (Bio-Rad dye binding microassay)을 사용하여 결정하였다. 웨스턴 블롯을 수행하기 위해서, 총 30 ug의 단백질은 8% SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE)을 통해 분리되었다. 분리된 단백질을 Hybond-ECL 니트로셀룰로스 멤브레인 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, U.K.) 위로 트랜스퍼하였다. 멤브레인을 0.1% Tween 20과 5% nonfat dry milk가 포함된 TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl)에서 블로킹하였고, 블로킹 버퍼 속에 희석된 1차 항체들 (p-GSK-3 β (Ser9), p-GS (Ser641), total GS, total β -catenin 항체: Cell Signaling Technology에서 시판; total GSK-3 β 항체, Santa Cruz Biotechnology에서 시판; β -actin 항체: Abcam에서 시판)과 함께 4℃에서 하룻밤 동안 배양시켰다. 다음날, 멤브레인을 세척하고 적절한 2차 항체들과 상온에서 1시간동안 배양시키고 난 후, 세척을 하고, ECL 검출 시약을 이용하여 블로팅된 단백질을 확인하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0057] 도 3에 나타난 바와 같이, CES 105의 농도별 처리로 GSK-3의 활성 억제정도를 나타내는 GSK-3 β Ser-9 잔기의 인산화 정도가 증가되는 동시에 하위 단백질인 GS Ser-641 잔기의 인산화 정도가 감소하는 것이 확인되었다. 또한, 놀랍게도, 지방 세포 특이적으로 GS의 총 단백질의 양이 감소하고 있음이 확인되었다. GSK-3의 또다른 하위 단백질로 작용하는 β -catenin의 총 단백질의 양은 GSK-3의 활성 억제 증가와 비례하여 증가하고 있음이 확인되었다.
- [0058] 위 결과로부터 도출된, GSK-3을 중심으로 작용하는 CES105의 지방 세포 분화억제 분자기전을 도 4에 나타내었다.
- [0059] <실시예 4> CES105의 근육세포에 당흡수능 억제 효과 확인: 2-데옥시-D-글루코스-1,2-3H(N)을 이용한 글루코스 흡수 검정
- [0060] 마우스 C2C12 근세포(myocytes) (American Type Culture Collection (ATCC), CRL-1772)는 10% FBS와 antibiotic solution (100 units/mL penicillin, 100 ug/mL streptomycin)이 포함된 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM; Invitrogen)를 이용하여 37℃ CO₂ 배양기 (5% CO₂ : 95% air)에서 유지시켰다. C2C12 근세포의 분화는 1% FBS가 포함된 DMEM으로 유도하였으며, 이 DMEM은 이틀에 한 번씩 새롭게 교환하여 주었다.
- [0061] 24-웰 플레이트에서 마우스 C2C12 근세포를 완전히 분화유도 후, 4 시간동안 저 글루코스 배지에서 배양시켰다. 그 세포들은 크랩스 링거 인산 버퍼 Kreb's Ringer phosphate (KRPH) buffer) (136 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.4, 5 mM sodium phosphate, pH 7.4, 4.7 mM KCl, 1 mM MgSO₄, and 1 mM CaCl₂)로 세척을 한 후, KRPH 버퍼속 CES105의 농도별 (0.002, 0.02, 0.2, 2 μ M)로 처리하고, 1시간동안 세포에 유지시켰다. 음성 대조군으로 CES105를 용해시 사용되었던 DMSO 용매를 사용하고, 양성 대조군으로 인슐린 (100 mM, 1시간)을 처리하였다.
- [0062] 그 다음, 세포에 0.5 μ Ci 2-데옥시-D-글루코스-1,2-3H(N) (PerkinElmer Inc.)를 10분 동안 함께 처리하였다. 세포를 얼음-냉각 인산 완충 염수 (PBS)로 세 차례 세척한 후, 0.1% SDS 300 μ L로 세포를 용해시켰다. CES105 처리로 인해 세포 안으로 흡수된 2-데옥시-D-글루코스-1,2-3H(N)는 Ready Safe liquid scintillation cocktail (Beckman Coulter, USA) 3 mL를 용해물과 혼합함으로써 섬광계수기(scintillation counter)로 정량하여, CES105의 농도별 처리에 따른 분화된 C2C12 근육 세포의 당 흡수능을 측정하였다. 그 결과를 도 5에

나타내었다.

[0063] 도 5에 나타난 바와 같이, CES105는 인슐린과 비교하여 유의적으로 당 흡수능을 증가시키는 것으로 확인되었다.

[0064] 상기 결과는 CES105 화합물이 우수한 항당뇨 제제임을 시사한다.

[0065] <실시예 5> CES105의 항비만 효과 확인-동물실험

[0066] 모든 동물 실험은 경희대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 수행하였다. 수컷 6주령 C57BL/6J 마우스는 The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)에서 구매하였고, 온도 $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 12시간의 낮/밤 주기를 유지시켜 주었다. 구매한 마우스는 본 동물실에 대한 1주 동안의 적응기간을 두었고, 그 이후 다음과 같이 세 그룹 (각 그룹별 $n=6$)으로 나누어 실험을 진행하였다: 10% 지방이 포함된 먹이를 제공받는 정상군 (D12450B NFD; Research Diets, New Brunswick, NJ, USA), 60% 지방이 포함된 먹이를 제공받는 고지방군 (D12492 HFD; Research Diets, New Brunswick, NJ, USA), 고지방군 + CES105 (10 mg/kg).

[0067] 비만모델을 만들기 위해서, 수컷 8주령 C57BL/6J 마우스는 10주 동안 그룹별 지정된 먹이를 임의로 먹였다. 동일한 기간 동안, 폴리에틸렌 글리콜 400 (PEG400)에 녹여진 CES105와 비히클을 각각 해당 그룹에 복강주사하였다 (10 mg/kg body weight/day, every two days, 3 times). 몸무게와 먹이 섭취량은 매일 기록하였다. 체중측정 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6에 나타난 바와 같이, 고지방 사료만을 먹인 그룹과 비교하여 CES105를 투여한 마우스에서 체중 감소가 확인되었다.

[0068] 실험이 종료되는 날, 일부 마우스는 컴퓨터단층촬영(Computed tomography: CT) 영상을 촬영하였다 (도 7). 도 7에서 나타난 바와 같이, 복부단면을 X-ray로 촬영한 결과, 고지방 사료만을 먹인 그룹과 비교하여 CES105를 투여한 마우스에서 내장 지방 및 전체 지방 면적의 현저한 감소가 확인되었다.

[0069] 나머지 마우스는 12시간의 절식 후 다음에 에테르를 사용하여 마취시키고, 심장채혈을 통해 혈액을 확보하였다. 그 이후, 마우스를 해부하였고 각 군별 조직들의 무게를 측정하였다 (도 8). 도 8에서 확인되는 바와 같이, 각 군별 다양한 조직들 중에서 부고환 지방과 간은 CES105에 큰 영향을 받은 것으로 나타났다.

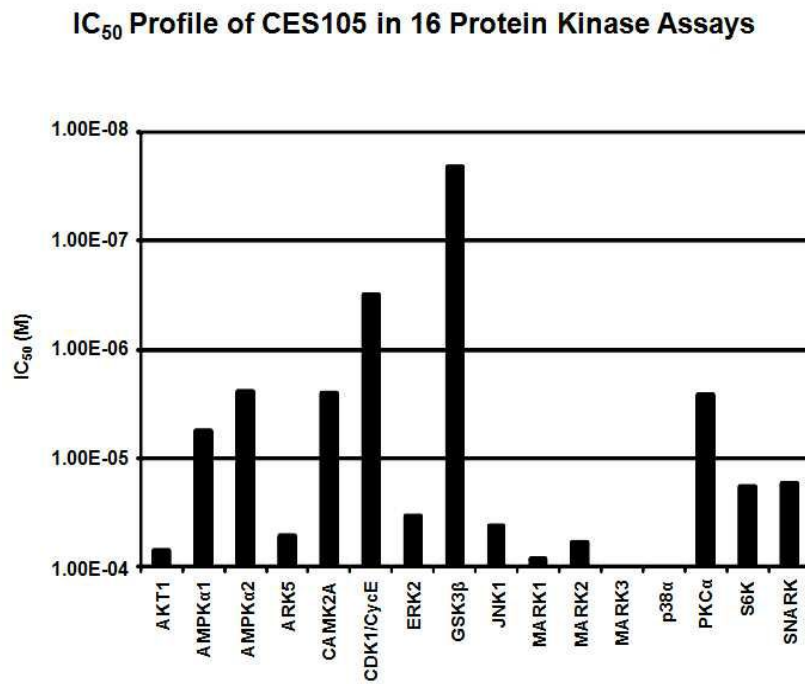
[0070] 그리고 각 조직들은 즉시 액체질소에 얼려져 -80°C 에 냉동·보관하였다. 보관된 각 군별 혈액 샘플 속에서의 총 콜레스테롤 및 트리글리세리드 (TG) 수준을 자동화 혈액 화학 분석기 (automated blood chemistry analyzer) (Hitachi 7150; Tokyo, Japan)를 사용하여 정량하였다. (도 9) 도 9에 나타난 바와 같이, CES105를 투여한 마우스에서 총 콜레스테롤 및 LDL/HDL 비율의 감소, 및 HDL/총콜레스테롤 비율의 증가가 확인되었다.

[0071] 또한, 비만에 따른 지방조직의 지방축적(adiposity)을 살펴보기 위하여, 각 군별로 확보된 흰지방조직 (white adipose tissues: WAT)을 조직-냉동 배지 (Leica)에 넣고 즉시 액체질소에 집어넣어 얼렸다. 조직 절편은 동결 절단기(cryostat microtome)를 사용하여 준비하였고, 젤라틴-코팅 유리 슬라이드(gelatin-coated glass slides) 위에 올려놓았다. 파라포름알데히드로 고정시키고, 조직 절편은 헤마톡실린 및 에오신 (H&E) 염색법으로 염색하였으며, 이를 200배 확대하여 사진을 찍었다. 비만에 따른 간조직의 지방증(steatosis)과 그에 따른 손상(damage)을 살펴보기 위하여, 각 군별로 확보된 간은 위 지방 조직과 동일한 방식으로 냉동 절단이 진행되었고 Oil-red O 염색과 H&E 염색을 각각 수행하였다. 그 결과를 도 10에 나타내었다. 도 10에 나타난 바와 같이, CES105 처리군은 전체적인 지방의 분포도와 그 양이 현저히 감소하였음이 확인되었다.

[0072] 상기 결과들은 CES105 화합물이 우수한 항비만 제제임을 시사한다.

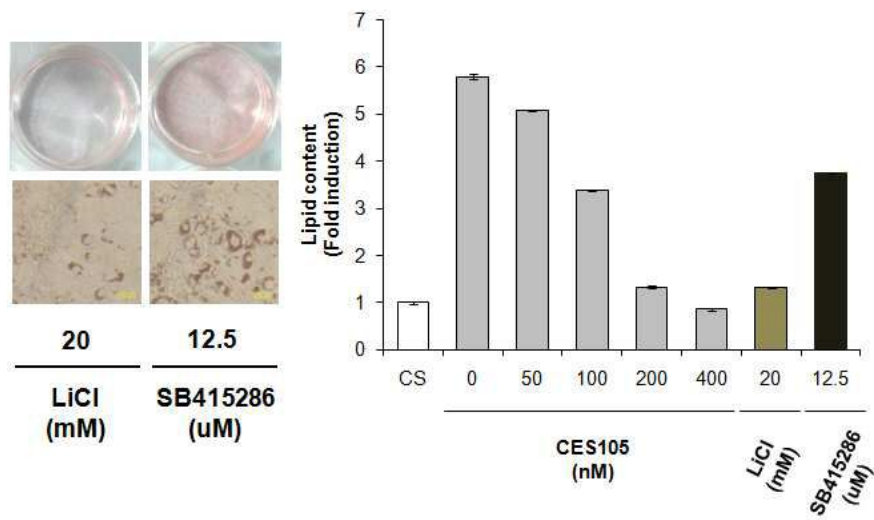
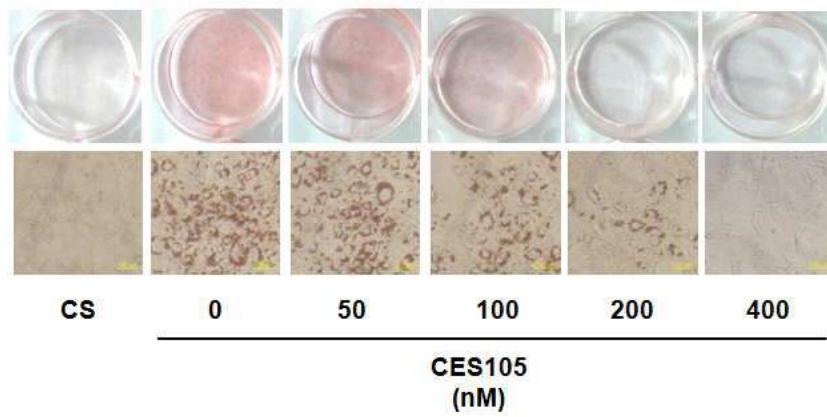
도면

도면1

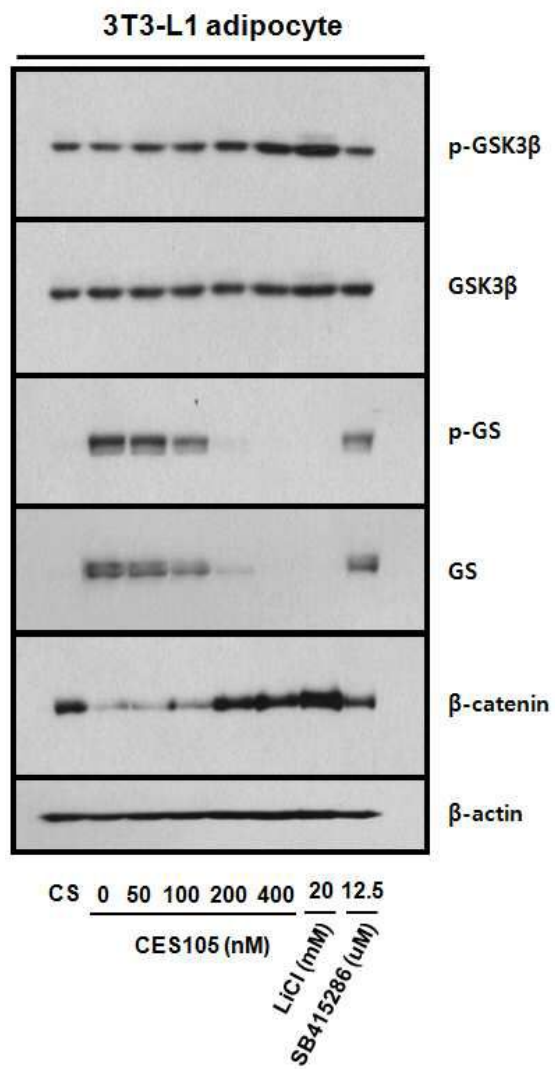


도면2

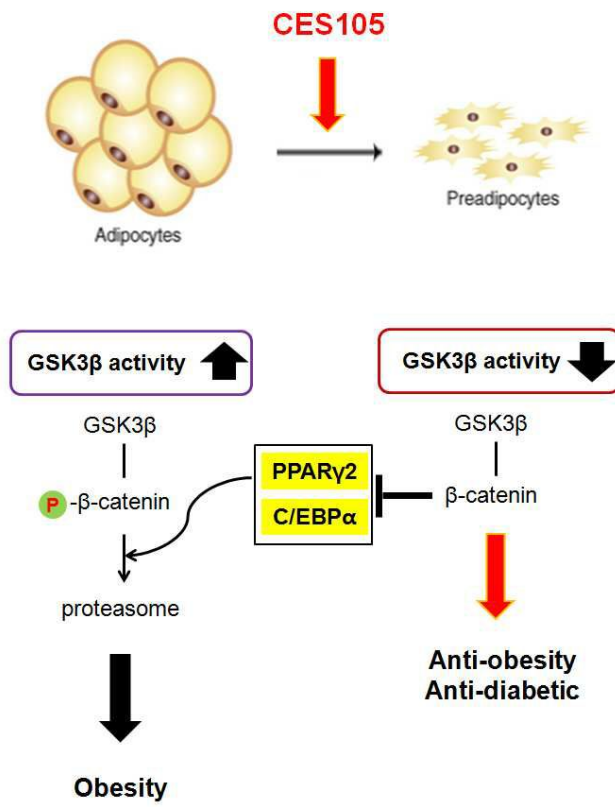
3T3-L1 adipocyte



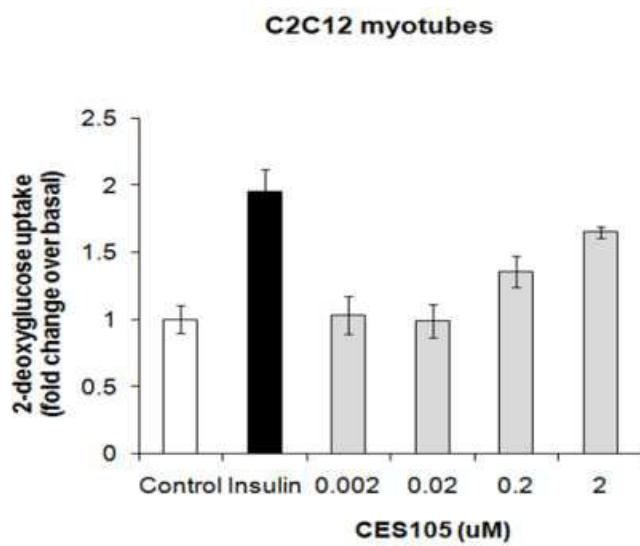
도면3



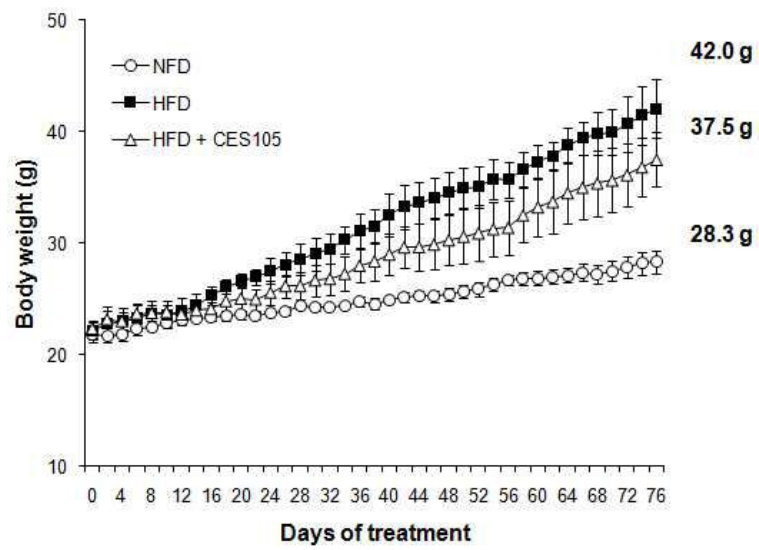
도면4



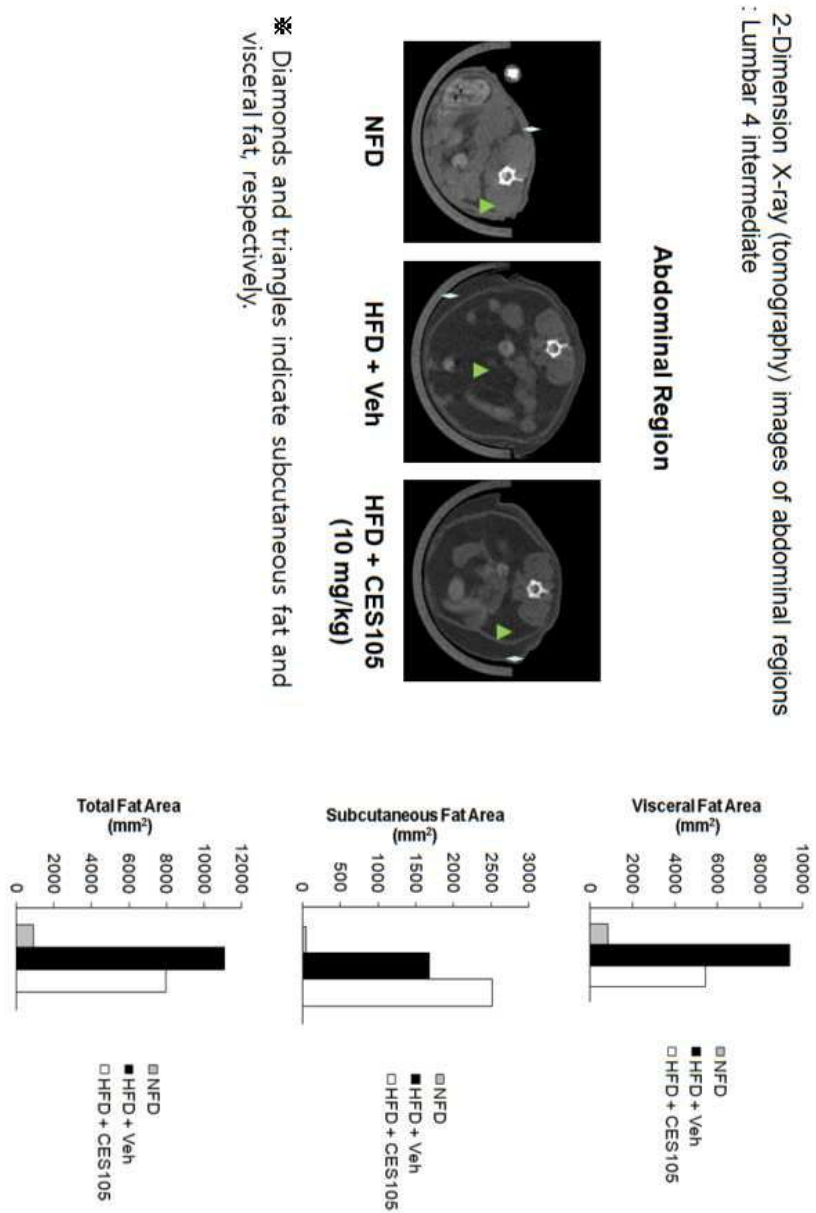
도면5



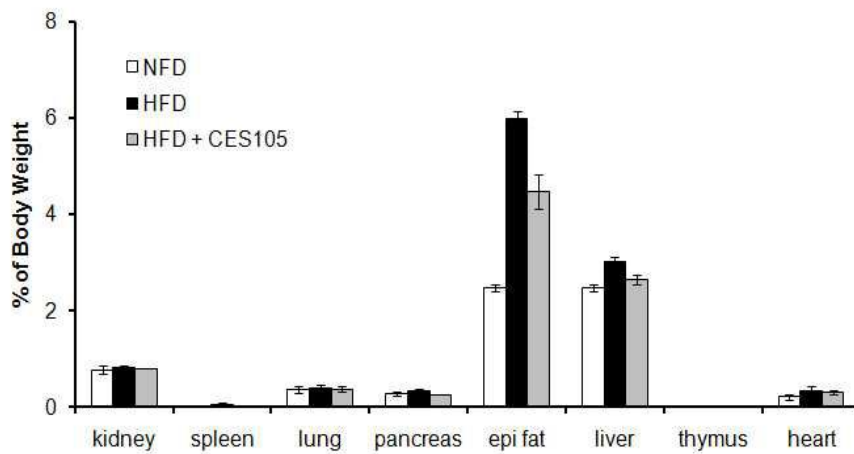
도면6



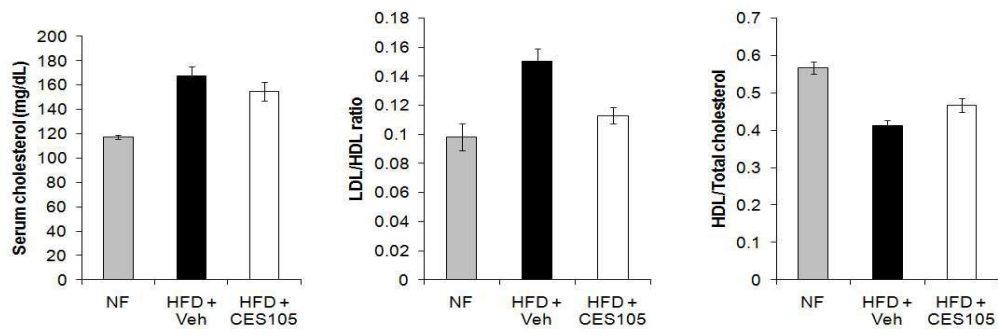
도면7



도면8



도면9



도면10

