



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0037846
(43) 공개일자 2023년03월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/5025 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)

A61P 3/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/5025 (2013.01)

A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2021-0120901

(22) 출원일자 2021년09월10일

심사청구일자 2021년09월10일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)

(72) 발명자

장병철

대구광역시 달서구 조암남로16길 20, 201동 1001호(월성동, 월성코오롱하늘채아파트 2단지)

(74) 대리인

특허법인태백

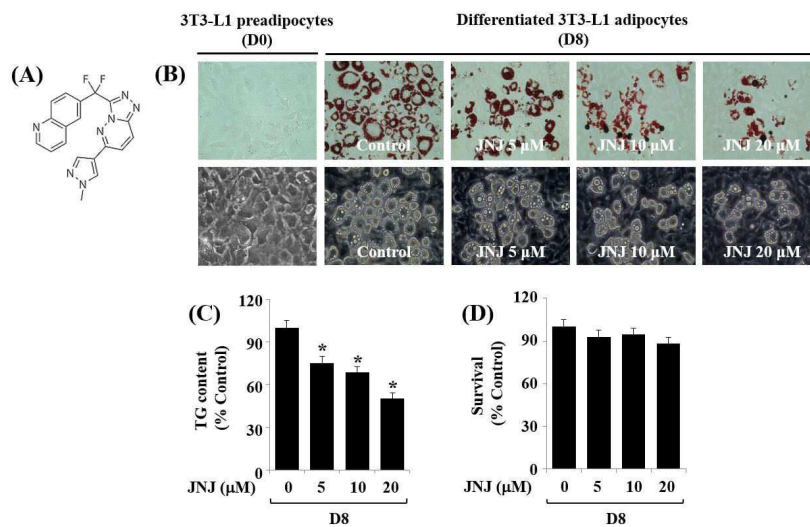
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 JNJ38877605를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 JNJ38877605를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 JNJ38877605는 세포 독성 없이 지방전구세포의 지방세포로의 분화를 유도하는 전사 인자들의 발현을 억제하여 지방전구세포의 분화 및 지질 축적을 억제시키는 것을 확인함에 따라, 상기 JNJ38877605를 유효성분으로 함유하는 조성물은 비만 치료 또는 개선용 약학조성물 및 건강식품 조성물로 제공될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 3/04 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/332 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345316405
과제번호	2018R1D1A1B07051333
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	c-Met 표적을 이용한 새로운 지방세포 분화 억제제 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	계명대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

JNJ38877605를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 JNJ38877605는 지방전구세포의 분화 및 지질 축적을 억제시키는 것을 특징으로 하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 JNJ38877605는 분화가 유도된 지방전구세포에서 C/EBP- α 및 PPAR- γ 의 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 JNJ38877605는 분화가 유도된 지방전구세포에서 AMPK 및 LKB-1의 인산화를 증가시키고, ACC의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 JNJ38877605는 분화가 유도된 지방전구세포에서 FAS, 페리리핀 A (perilipin A) 및 렙틴 (leptin) 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 약학조성물은 약학조성물 총 100 중량부에 대하여 JNJ38877605를 0.0001 내지 10 중량부로 포함하는 것을 특징으로 하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 7

JNJ38877605를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 JNJ38877605를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비만은 고지혈증, 제2형 당뇨병 및 암의 주요 원인으로, 증가된 열량 불균형은 지방세포 분화와 주로 트리글리세라이드 (TG) 축적의 형태로 과도한 지방을 유발하여 궁극적으로 비만의 발달을 초래한다.

[0003] 지방세포 분화 (adipogenesis)는 섬유아세포와 유사한 지방전구세포가 성숙한 지방세포로 발달하는 과정으로, 지방세포 분화는 다음과 같은 전사 인자 그룹에 의해 조절된다: CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBPs), peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) 및 Janus-activated protein kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT) 신호 복합체; 지방생성 효소로 fatty acid synthase (FAS), acetyl CoA carboxylase (ACC), 및 lipid droplet (LD) 안정화 단백질 유사 페리리핀 A (perilipin A)가 지방세포 분화에 요구된다. 또한, 효소 및 대사 조절제인 adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP)-activated protein kinase (AMPK), protein kinase A (PKA), 및 extracellular signal-regulated protein kinase-1/2 (ERK-1/2)가 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 비만을 치료하기 위한 약물로는 시상하부를 자극하여 식욕을 억제시키는 식욕억제제로 시부트라민

(sibutramine), 펜터마인(phentermine), 다이에틸프로피온(diethyl-propion), 펜디메트라진(phendimetrazine), 벤즈페타민(benzphetamine), 메타페타민(methamphetamine) 등이 알려져 있으며, 췌장의 지방소화(분해)효소 활성 저해를 통해 섭취된 지방의 흡수를 억제시키는 올리스타트(orlistat) 및 알파-글루코시다제 저해제로 당뇨병에 사용하는 아카보스(acarbose) 등이 알려져 있다.

[0005] 그러나 이러한 약물들은 장기간 복용시 불면증, 신경 불안, 두통, 혈압 상승, 위장 장애, 지방변, 과민증 및 담즙 분비 장애와 같은 심각한 부작용이 동반되는 문제가 지적됨에 따라, 인체에 부작용이 없는 신규한 비만치료제의 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2016-0007979호 (2016.01.21. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 세포 독성과 같은 부작용을 해결하여 인체에 안전하면서 효과적으로 비만을 예방하거나 치료할 수 있는 항비만용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 JNJ38877605를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 JNJ38877605를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따르면, JNJ38877605는 세포 독성 없이 지방전구세포의 지방세포로의 분화를 유도하는 전사 인자들의 발현 및 활성을 억제하여 지방전구세포의 분화 및 지질 축적을 억제시키는 것을 확인함에 따라, 상기 JNJ38877605를 유효성분으로 함유하는 조성물은 비만 치료 또는 개선용 약학조성물 및 건강식품 조성물로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 3T3-L1 지방전구세포 분화 동안 JNJ38877605가 세포내 지질 축적과 TG 함량 및 세포 성장에 미치는 영향을 확인한 결과로, 도 1A는 JNJ38877605 (JNJ) 화합물 구조이며, 도 1B는 JNJ가 존재하거나 존재하지 않는 분화 유도 배지에서 8일 동안 3T3-L1 지방전구세포를 분화시키고 분화 8일째 (D8) 세포 지질 축적을 오일 레드 O 염색 및 위상차 이미지 분석으로 확인한 결과이며, 도 1C는 분화 8일째 세포 내 TG 함량을 정량한 AdipoRed 분석 결과로, 결과 값은 3번의 반복적인 실험으로 부터 얻은 데이터를 평균 $\pm$ SE로 나타낸 결과이며(*P < 0.05 vs. control), 도 1D는 분화 8일째, 생존한 대조군 (DMSO, 0.1%) 또는 JNJ 처리된 3T3-L1 지방세포의 수를 세포 계수 분석으로 확인한 결과로, 세포 수 분석을 3회 수행하여 얻은 결과 값을 평균 $\pm$ SE로 나타낸 결과이다 (*P < 0.05 vs. control).

도 2는 3T3-L1 지방전구세포 분화 동안 JNJ가 C/EBP- α , PPAR- γ 및 STAT-3/5의 발현 및 인산화에 미치는 영향을 확인한 결과로, 도 2A와 도 2G 및 도 2B는 JNJ가 존재하거나 존재하지 않는 분화 유도 배지에서 분화를 유도시킨 3T3-L1 지방전구세포를 2일 (D2), 5일 (D5) 및 8일 (D8)에 각각 수집하고 상기 시간 포인트마다 전체 세포내 단백질 및 mRNA를 분리하여 각각 웨스턴 블롯 및 RT-PCR 분석을 진행한 결과이며, 도 2C 및 도 2D는 각각 분화 8일째(D8) 3회 반복 실험한 웨스턴 블롯 및 RT-PCR 분석 결과이며, 도 2E 및 도 2F는 각각 도 2C 및 도 2D의 3회 반복 실험한 웨스턴 블롯 및 RT-PCR 결과를 정량 분석한 결과이며, *p<0.05는 지정된 날짜의 JNJ 비처리 대조군의 값과 비교한 것이다.

도 3은 JNJ가 존재하거나 존재하지 않는 분화 유도 배지에서 분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포를 2일 (D2), 5일 (D5) 및 8일 (D8) 째에 각각 수집하고, 상기 시간 포인트마다 전체 세포내 단백질 및 mRNA를 분리하여 3T3-

L1 지방전구세포 분화 동안 FAS, 페리리핀 A (perilipin A), 렙틴 (leptin) 및 아디포넥틴 (adiponectin)의 단백질 및 mRNA 발현에 JNJ가 미치는 영향을 확인한 결과로, 도 3A는 웨스턴 블롯 분석 결과이며, 도 3B는 RT-PCR 분석 결과이며, 도 3C 및 도 3D는 각각 분화 8일째(8D) 3회 반복 실험한 웨스턴 블롯 및 RT-PCR 분석 결과이며, 도 3E 및 도 3F는 각각 도 3C 및 도 3D의 3회 반복 실험한 웨스턴 블롯 및 RT-PCR 결과를 정량 분석한 결과이며, * $p < 0.05$ 는 지정된 날짜의 JNJ 비처리 대조군의 값과 비교한 것이다.

도 4는 JNJ가 존재하거나 존재하지 않는 분화 유도 배지로 분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포를 2일 (D2), 5일 (D5) 및 8일 (D8)째에 각각 수집하고, 상기 시간 포인트마다 전체 세포 단백질 및 mRNA를 분리하여 3T3-L1 지방전구세포 분화 동안 JNJ가 AMPK, ACC 및 LKB-1의 발현 및 인산화와 ATP 함량에 미치는 영향을 확인한 결과로, 도 4A는 웨스턴 블롯 분석 결과이며, 도 4B는 RT-PCR 분석 결과이며, 도 4C는 분화 8일째 (8D) 3회 반복 실험한 웨스턴 블롯 분석 결과이며, 도 4D는 도 4C의 3회 반복 실험한 웨스턴 블롯 분석 결과를 정량 분석한 결과로, * $p < 0.05$ 는 지정된 날짜의 JNJ 비처리 대조군의 값과 비교한 것이며, 도 4E는 JNJ 또는 ATP 감소 물질로 알려진 2-deoxyglucose (2-DG)가 존재하거나 존재하지 않는 분화 배지로 분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포를 2일 (D2), 5일 (D5) 및 8일 (D8)째에 각각 수집하고, 상기 시간 포인트마다 세포내 ATP 함량을 확인한 결과로, * $p < 0.05$ 는 지정된 날짜의 JNJ 또는 2-DG 비처리 대조군의 값과 비교한 결과이다.

도 5는 3T3-L1 지방전구세포 분화 동안 JNJ와 다른 기존 c-Met 억제제 (PHA, SU11274)가 지방 축적 및 세포 성장에 미치는 영향을 비교한 결과로, 도 5A의 왼쪽 도면은 20 μ M 농도의 JNJ, PHA 또는 SU11274가 존재하거나 존재하지 않는 분화 유도 배지에서 8일 동안 분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포의 세포내 지질 축적을 확인한 오일 레드 O 염색 결과이며, 아래 도면은 위상차 이미지 결과이며, 도 5B는 20 μ M 농도의 JNJ, PHA 또는 SU11274가 존재하거나 존재하지 않는 분화 유도 배지에서 3T3-L1 지방전구세포의 분화를 유도하고 2일째 및 5일째 세포 지질 축적을 확인한 위상차 이미지 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0014] 본 발명은 JNJ38877605를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.
- [0015] 상기 JNJ38877605는 지방전구세포의 분화 및 지질 축적을 억제시키는 것일 수 있다.
- [0016] 보다 상세하게 상기 JNJ38877605는 분화가 유도된 지방전구세포에서 C/EBP- α 및 PPAR- γ 의 발현을 억제시키는 것일 수 있다.
- [0017] 상기 JNJ38877605는 분화가 유도된 지방전구세포에서 AMPK 및 LKB-1의 인산화를 증가시키고, ACC의 발현을 감소시키는 것일 수 있다.
- [0018] 상기 JNJ38877605는 분화가 유도된 지방전구세포에서 FAS, 페리리핀 A (perilipin A) 및 렙틴 (leptin) 발현을 감소시키는 것일 수 있다.
- [0019] 상기 약학조성물은 약학조성물 총 100 중량부에 대하여 JNJ38877605를 0.0001 내지 10 중량부로 포함하는 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 실시예에 따르면, c-Met 억제제인 JNJ38877605 (JNJ)을 다양한 농도 (5, 10 및 20 μ M)로 처리하여 3T3-L1 세포 분화가 유도된 8일 동안 지질 축적과 TG 함량 및 세포 성장에 미치는 영향을 오일 레드 O 염색, AdipoRed 및 세포 수 분석으로 각각 확인하였다.
- [0021] 그 결과, 도 1B 및 도 1C와 같이 vehicle 처리된 세포와 비교하여 JNJ 처리군에서는 농도의존적으로 지질 축적 및 TG 함량이 감소되었으며, 도 1D와 같이 JNJ를 20 μ M까지 증가시켜도 3T3-L1 세포에 대한 세포독성은 나타나지 않았다.
- [0022] 상기 결과로부터 JNJ 20 μ M이 세포독성 없이 강력한 지질 축적 억제와 TG 함량 감소를 나타내는 것이 확인되었다.
- [0023] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 JNJ를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.

- [0024] 본 발명의 다른 구체예에서, JNJ를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0025] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 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 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.
- [0027] 상기 JNJ38877605의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명은 JNJ38877605를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공할 수 있다.
- [0031] 상기 건강식품은 상기 JNJ38877605 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0032] 상기 건강식품에 함유된 화합물의 유효용량은 상기 치료제의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.
- [0033] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제등을 들 수 있다.
- [0035] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0037] <실험예>
- [0038] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.
- [0040] 1. 약물 및 항체

[0041] JNJ38877605 (JNJ)는 Selleckchem (Houston, TX, USA)에서 구입하였다. 항-C/EBP- α , 항-PPAR- γ , 항-phospho (p)-STAT-3 (Y705) 및 항-STAT-3에 대한 일차 항체와 이차 고트 항-래빗 및 고트 항-마우스 IgG 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Delaware, CA, USA)에서 구입하였다. 항-p-AMPK (T172), 항-AMPK, 항-p-ACC (S79) 및 항-ACC 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였으며, 항-perilipin A 항체는 Bio Vision (Milpitas, CA, USA)에서 구입하였다. 항-FAS 항체는 BD Bioscience (San Jose, CA, USA)에서 구입하였으며, 항- β -액틴 항체, 3-이소부틸-1-메틸잔틴 (IBMX), 덤사메타손 (dexamethasone) 및 인슐린은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[0043] 2. 세포 배양 및 분화

[0044] 3T3-L1 지방전구세포 (3T3-L1 preadipocytes, ATCC, Manassas, VA, USA)를 10% FCS (heat-inactivated fetal calf serum, Gibco, Grand Island, NY, USA) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Welgene, Daegu, Korea)이 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에서 접촉 억제 단계까지 배양하였다.

[0045] 3T3-L1 분화는 10% FBS (heat-inactivated fetal bovine serum, Welgene)와 호르몬 콕테일 (0.5 mM IBMX (M), 0.5 μ M dexamethasone (D) 및 5 μ g/ml insulin (I))이 포함된 DMEM로 유도되었다. 48시간 후 분화배지를 10% FBS 및 5 μ g/ml 인슐린이 포함된 DMEM로 교체한 후 3일간 추가 배양하였다.

[0046] 세포 배지는 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 8일까지 격일 교체하였다.

[0047] 일부 실험에서 배지에 다른 농도 (5, 10 및 20 μ M) 또는 20 μ M의 JNJ가 첨가되어 모든 시점에 보충되었다.

[0049] 3. 오일 레드 O (Oil Red O) 염색

[0050] 오일 레드 O 작업 용액 (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 2차 증류수 4 ml와 0.1% 오일 레드 O가 용해된 이소프로판올 6 ml를 혼합하여 준비하였다. 분화 8일째에 3T3-L1 세포를 PBS로 세척하고, 10% 포름알데하이드로 실온에서 2시간 동안 고정한 후 60% 이소프로판올로 세척하여 건조시켰다.

[0051] 고정된 세포를 오일 레드 O 작업 용액으로 실온에서 1시간 동안 염색하고 증류수로 세척하였다. 광학 현미경 (Nikon, TS100, Tokyo, Japan)을 이용하여 지질 방울을 확인하였다.

[0053] 4. 세포 수 분석 (Cell count analysis)

[0054] 3T3-L1 지방전구세포 (preadipocytes)를 24웰 플레이트에 분주하고 상기 과정으로 분화시켰다. 분화 8일째에 트리판 블루 염료로 세포를 염색한 후 광학현미경을 이용하여 염료 제외하고 계수하였다.

[0056] 5. AdipoRed 분석을 통한 세포 내 트리글리세라이드 (triglyceride) 함량 확인

[0057] 분화 8일째에 AdipoRed Assay Reagent kit (Lonza, Basel, Switzerland)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 세포 내 지방 함량을 확인하였다.

[0058] 인큐베이션 10분 후 여기 485 nm 및 방출 572 nm의 Victor3 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)에서 형광을 측정하였다.

[0060] 6. 전체 세포 단백질 분리

[0061] 3T3-L1 세포를 PBS로 세척하고 변형된 방사선 면역 침전 분석 완충액 (radioimmunoprecipitation assay buffer, Sigma)으로 계획된 시간 마다 용해시켰다. 세포 용해물을 수집하고 12,000 rpm으로 4 °C에서 15분간 원심분리한 후 상층액 단백질 농도를 bicinchoninic acid assay kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 확인하였다.

[0063] 7. 웨스턴 블롯 분석 (Western blot analysis)

[0064] 단백질을 SDS-PAGE 전기영동으로 분리하고 니트로셀룰로스 막 (Millipore, Bedford, MA, USA)으로 옮겼다. 막을 0.05% (v/v) Tween 20이 포함된 Tris-buffered saline (TBS, 10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7.5) (TBS T)로 세척하고 5% (w/v) 탈지방 건조 우유를 용해시킨 TBST로 블로킹하였다.

[0065] 상기 막을 특이적 1차 항체와 4℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션한 후 TBST로 세척한 후 HRP가 결합된 2차 항체 (anti-goat IgG, anti-mouse IgG 또는 anti-rabbit IgG)와 실온에서 2시간 동안 추가 인큐베이션하였다. 이후 TBST로 막을 3회 세척하고 enhanced chemiluminescence reagents로 현상하였다.

[0066] β -액틴 발현 수준을 사용하여 동량의 단백질이 로딩을 조절하였다.

[0068] 8. 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

[0069] RNAiso Plus (TaKaRa, Kusatsu, Shiga, Japan)로 전체 세포 RNA를 분리하였다. 3 μ g의 전체 RNA를 랜덤 헥사데옥시뉴클레오타이드 프라이머와 역전사 효소를 이용하여 앞서 보고된 방법[Cho H. et al., *Int. J. Oncol.* **56**, 368-378 (2020).]으로 역전사하였다.

[0070] 단일 가닥 상보적 DNA를 다음의 프라이머와 PCR을 사용하여 증폭시켰다: C/EBP- α sense 5' - TTACAACAGGCCAGGTTTC-3' ; antisense 5' -CTCTGGGATGGATCGATTGT-3' ; PPAR- γ sense 5' - GGTGAAACTCTGGGAGATTC-3' ; antisense 5' -CAACCATGGGTCAGCTCTC-3' ; FAS sense 5' -TTGCTGGCACTACAGAATGC-3' ; antisense 5' -AACAGCCTCAGAGCGACAAT-3' ; perilipin A sense 5' - CTTTCTCGACACACC ATGGAAACC -3' ; antisense 5' - CCACGTTATCCGTAACACCCTTCA -3' ; leptin sense 5' -CCAAAACCTCATCAAGACC-3' ; antisense 5' -CTCAAAGCCACCACCTCTGT-3' ; adiponectin sense 5' -GGAGATGCAGGTCTTCTTGGT-3' ; antisense 5' - TCCTGATACTGGTCGTAGGTGA-3' ; actin sense 5' -GGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3' ; antisense 5' - GGTAGGAACACGGAAGGCCA-3' . 액틴 (actin) mRNA 발현 수준을 내부 대조군으로 사용하였다.

[0072] 9. 세포 내 ATP 수준 확인

[0073] 3T3-L1 지방전구세포를 96-웰 플레이트에 분주하고 JNJ 또는 2-deoxyglucose (2-DG)가 존재하거나 존재하지 않는 분화 배지에서 성장시켰다.

[0074] 분화 2, 5 및 8째에, 세포내 ATP 수준을 제조사 (ATPLite-1step, PerkinElmer, CT, USA)의 설명서에 따라 루시페라아제 활성을 확인하였다.

[0075] 인큐베이션 2분 후, Victor3 (PerkinElmer)으로 발광을 확인하였다.

[0077] **<실시예 1> 3T3-L1 지방전구세포 분화 기간 동안 JNJ에 의한 지질 축적 및 TG 함량 변화 확인**

[0078] 먼저, c-Met 억제제인 JNJ38877605 (JNJ)을 다양한 농도 (5, 10 및 20 μ M)로 처리하여 3T3-L1 세포 분화가 유도된 8일 동안 지질 축적과 TG 함량 및 세포 성장에 미치는 영향을 오일 레드 O 염색, AdipoRed 및 세포 수 분석으로 각각 확인하였다.

[0079] 그 결과, 도 1B 및 도 1C와 같이 vehicle 처리된 세포와 비교하여 JNJ 처리군에서는 농도의존적으로 지질 축적 및 TG 함량이 감소되었으며, 도 1D와 같이 JNJ를 20 μ M까지 증가시켜도 3T3-L1 세포에 대한 세포독성은 나타나지 않았다.

[0080] 상기 결과로부터 JNJ 20 μ M이 세포독성 없이 가장 강력한 지질 축적 억제와 TG 함량 감소를 나타내는 것이 확인됨에 따라, 상기 농도를 선택하여 추가 실험을 진행하였다.

[0082] **<실시예 2> 3T3-L1 지방전구세포의 분화기간 동안 JNJ의 분화 관여 전사인자 C/EBP- β 의 발현 조절 확인**

[0083] JNJ (20 μ M)가 3T3-L1 지방전구세포의 분화기간 동안 분화 관여 전사인자 C/EBP- β 발현에 미치는 영향을 확인하였다.

- [0084] 그 결과, 도 2A 및 도 2B와 같이 시간 경과에 따라 JNJ는 분화 2일째, 5일째 및 8일째에 3T3-L1 세포 내 C/EBP- α 및 PPAR- γ 단백질 및 mRNA 발현을 억제시키는 것이 확인되었으며, 도 2C 내지 도 2F와 같이 분화 8일째에는 3번 반복 실험을 통해 C/EBP- α 및 PPAR- γ 단백질 및 mRNA 발현 억제를 재확인하였다.
- [0085] 대조적으로, 도 2G와 같이 20 μ M의 JNJ는 분화 관여 또 다른 전사인자 STAT-3/5 인산화에는 영향을 미치지 않았다. 분화 8일째 STAT-3 인산화를 강력하게 증가시켰으나 STAT-3/5 총 단백질 발현 수준은 변하지 않았다.
- [0087] <실시예 3> 3T3-L1 지방전구세포 분화기간 동안 JNJ의 FAS, 페리리핀 A (perilipin A) 및 렙틴 (leptin) 발현에 미치는 영향 확인
- [0088] JNJ (20 μ M)가 존재하거나 존재하지 않은 분화배지로 분화 유도 배지로 분화시킨 3T3-L1 지방전구세포에서 JNJ의 FAS, 페리리핀 A (perilipin A) 및 렙틴 (leptin) 발현에 미치는 영향을 확인하였다.
- [0089] 그 결과, 도 3A 및 도 3B와 같이 JNJ는 분화 5일째 및 8일째에 FAS 및 페리리핀 A의 단백질 및 mRNA 발현을 억제하였다.
- [0090] 또한, 3T3-L1 지방전구세포 분화 기간 동안 아티포사이토키인으로 잘 알려진 렙틴과 아디포넥틴의 mRNA 발현에 대한 JNJ (20 μ M)의 영향을 추가로 확인하였다.
- [0091] 그 결과, 도 3B와 같이 분화 5일째 및 8일째 3T3-L1 세포에서 JNJ는 렙틴을 강하게 억제한 반면, 아디포넥틴 mRNA 발현은 억제하지 못하였다.
- [0092] 또한, 도 3C, 도 3D, 도 3E 및 도 3F와 같이 3번의 반복 실험을 수행하여 3T3-L1 지방전구세포 분화 8일째에 JNJ가 FAS 및 페리리핀 A (perilipin A)의 단백질 mRNA 발현을 억제하는 것을 확인하였으며, 또한, JNJ가 렙틴 (leptin)의 mRNA 발현을 억제하는 것을 확인하였다.
- [0094] <실시예 4> 3T3-L1 지방전구세포 분화기간 동안 JNJ가 AMPK, LKB-1 및 ACC의 인산화 및 발현에 미치는 영향 확인
- [0095] 도 4A를 참고하면, JNJ (20 μ M)는 시간의존적으로 3T3-L1 세포 분화 2일째, 5일째 및 8일째 총 AMPK 단백질 발현 변화 없이 AMPK 인산화 증가를 유도하였다.
- [0096] 3T3-L1 지방전구세포 분화 과정에서 ACC는 AMPK의 하향조절 인자이며, LKB-1는 AMPK의 상향조절 활성인자로, 분화 2일째 및 분화 5일째에는 JNJ 투여시킨 3T3-L1 지방전구세포에서 ACC 및 LKB-1의 단백질 인산화 및 발현 변화가 확인되지 않았으나, 분화 8일째 JNJ 투여시킨 3T3-L1 지방전구세포에서 ACC의 단백질 인산화 및 발현을 현저하게 감소시켰으며, 동일한 조건에서 총 LKB-1 단백질 발현은 큰 변화가 없었으나 LKB-1 인산화는 시간 의존적으로 증가시켰다.
- [0097] 그러나 도 4B와 같이 JNJ는 3T3-L1 지방전구세포 분화과정에서 ACC의 mRNA 발현에 큰 영향을 미치지 않았음이 확인되었다.
- [0098] 상기 결과를 추가로 확인하기 위해 3번의 반복실험을 수행한 결과, 도 4C 및 도 4D와 같이 JNJ는 3T3-L1 지방전구세포 분화 8일째에 AMPK 및 LKB-1 인산화를 증가시키는 반면, ACC 인산화와 발현은 감소시키는 것을 확인하였다.
- [0099] 상기 결과로부터 JNJ는 3T3-L1 지방전구세포 분화 동안 AMPK 및 LKB-1 인산화를 증가시키는 반면, ACC 발현은 감소시키는 것이 확인되었다.
- [0100] AMPK 인산화가 세포 내 AMP/ATP 비율 변화에 의해 조절된다는 점을 고려하여, 3T3-L1 지방전구세포 분화 동안 세포 내 ATP 함량에 대한 JNJ의 영향을 확인하였다. 세포 내 ATP 함량을 감소시키는 글루코오스 모방체 2-DG (2-Deoxyglucose)을 대조군에 포함시켰다.
- [0101] 그 결과, 도 4E와 같이 분화 0일째 3T3-L1 세포와 비교하여 JNJ (20 μ M)는 2-DG와 유사하게 세포 분화 2일째 (D2), 5일째 (D5) 및 8일째 (D8)에서 ATP 수준을 크게 감소시켰다.

[0103] <실시예 5> 다른 c-Met 억제제가 3T3-L1 지방전구세포의 지질 축적 및 성장에 미치는 영향 확인

[0104] PHA 및 SU11274를 이용하여 다른 c-Met 억제제가 3T3-L1 지방전구세포에서 지질 감소 효과를 나타낼 수 있는 가를 확인하였다.

[0105] 그 결과, 도 5A와 같이 대조군과 비교하여 JNJ (20 μ M) 처리는 분화 8일째 3T3-L1 세포에서 지질 축적을 크게 억제하였다. 현미경 관찰 결과, 대조군과 비교하여 JNJ (20 μ M)이 처리된 분화 8일째 3T3-L1 세포에서는 지질 축적이 매우 적었으며, 세포의 형태 및 수적 변화가 나타나지 않았다.

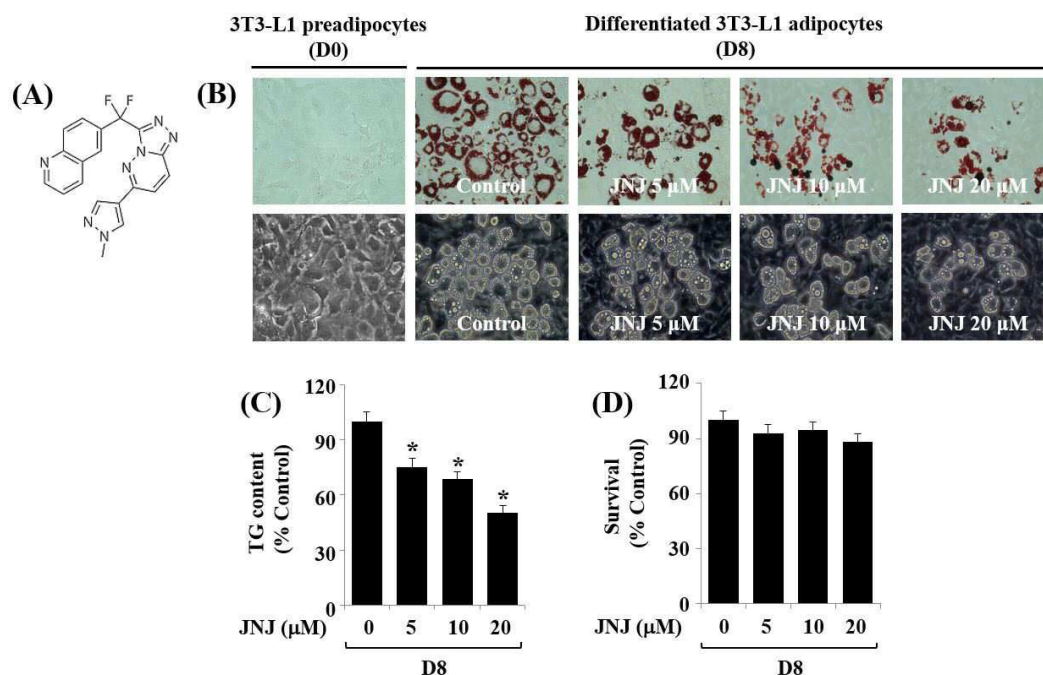
[0106] 그러나 도 5A 및 도 5B와 같이 PHA (20 μ M) 또는 SU11274 (20 μ M)가 처리된 분화 8일째 3T3-L1 세포에서는 매우 높은 세포 독성(소실)이 확인되었다. 현미경 관찰 결과, JNJ (20 μ M) 처리는 분화 2일째 및 분화 5일째 3T3-L1 세포의 형태 및 성장에 영향을 미치지 않은 반면, PHA (20 μ M) 또는 SU11274 (20 μ M) 처리는 각각 분화가 유도된 2일째 및 5일째 3T3-L1 세포의 형태를 변화시키고 세포 수를 감소시켰다.

[0107] 상기 결과로부터 JNJ는 다른 c-Met 억제제와 비교하여 세포 독성 없이 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포로의 분화(과정)에서 우수한 지질 감소 효과를 나타내는 것이 확인되었다.

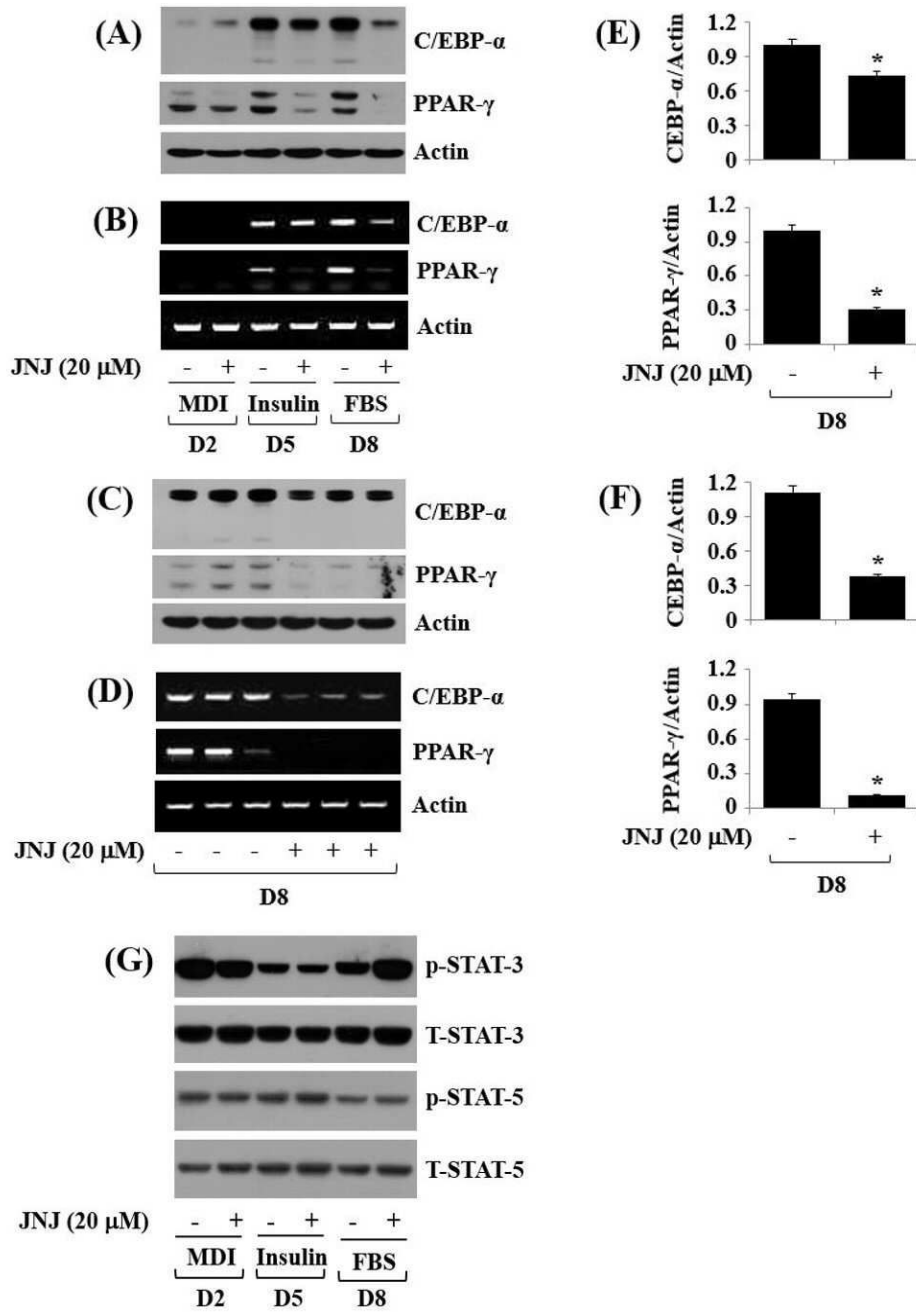
[0109] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

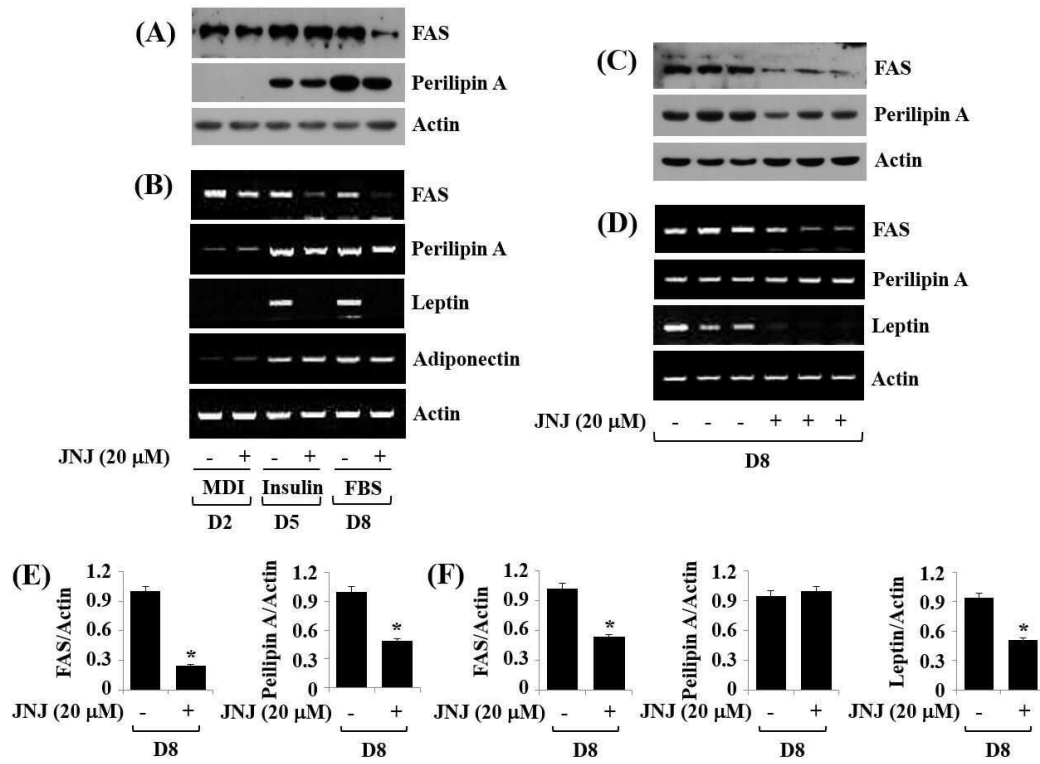
도면1



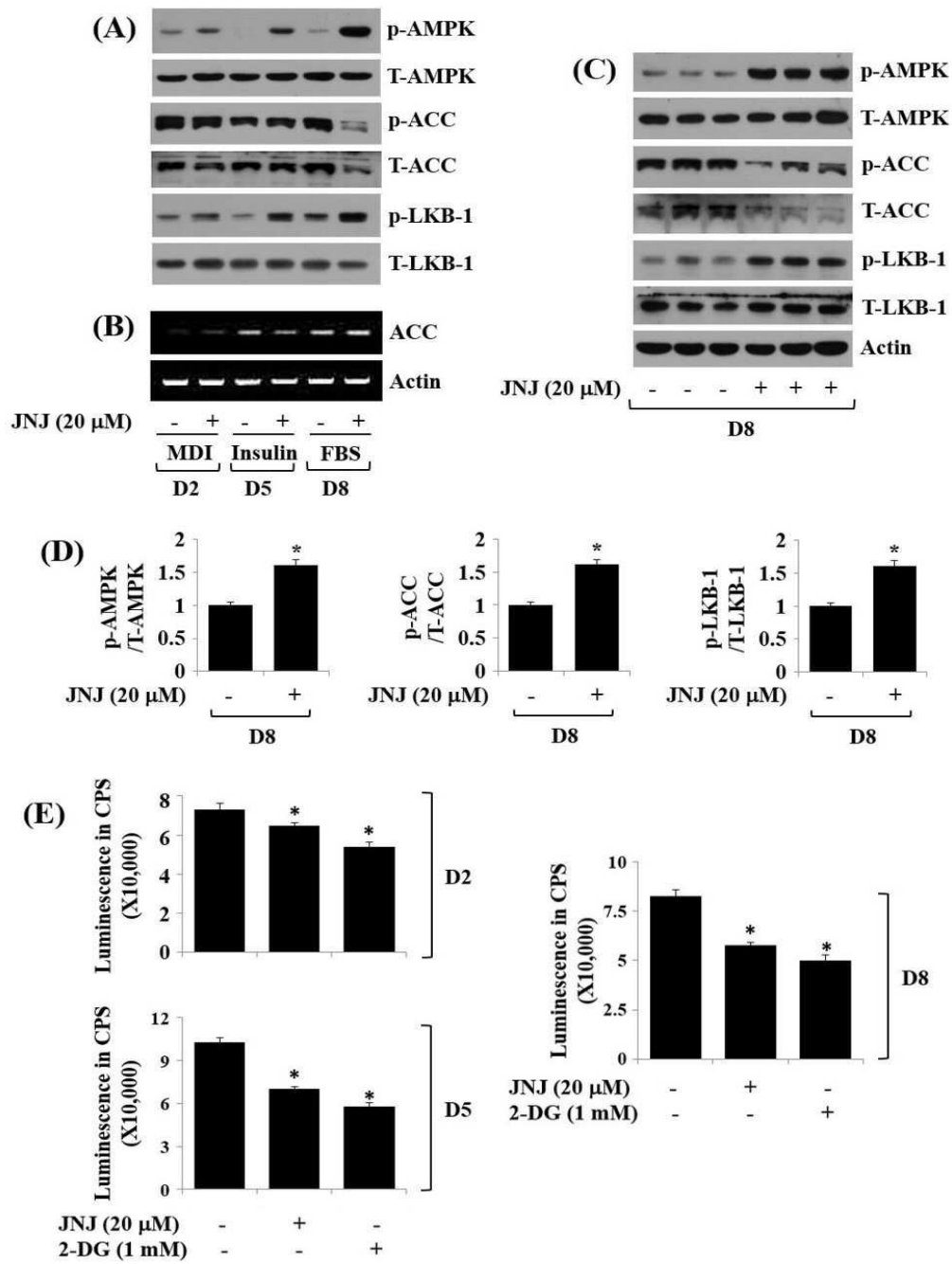
도면2



도면3



도면4



도면5

