



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년07월24일
 (11) 등록번호 10-1423228
 (24) 등록일자 2014년07월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 31/04 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)
 A61P 19/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-0092020
 (22) 출원일자 2012년08월22일
 심사청구일자 2012년08월22일
 (65) 공개번호 10-2014-0025834
 (43) 공개일자 2014년03월05일
 (56) 선행기술조사문헌
 US20100247462 A1
 KR100592805 B1

(73) 특허권자
 한국화학연구원
 대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
 (72) 발명자
 김성환
 대전 유성구 가정로 65, 101동 801호 (신성동, 대림두레아파트)
 손유화
 대전 유성구 신성로68번길 23, 203호 (신성동)
 허정녕
 대전 서구 둔산북로 160, 7동 1106호 (둔산동, 한마루삼성아파트)
 (74) 대리인
 손민

전체 청구항 수 : 총 10 항

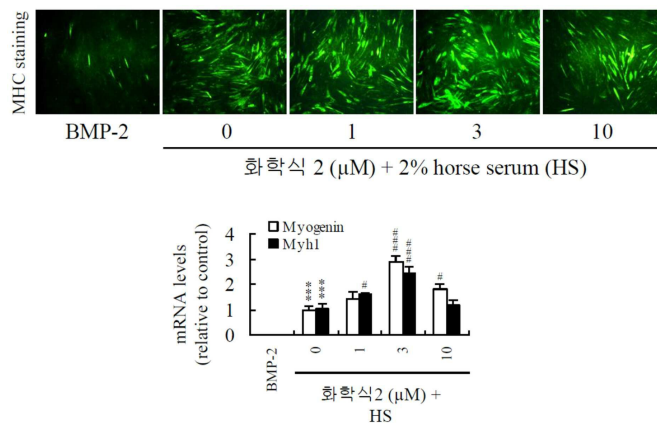
심사관 : 나영민

(54) 발명의 명칭 **인텐은 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 분화 촉진용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 인텐은 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 성체줄기세포의 분화 촉진용 조성물, 상기 조성물의 존재 하에 성체줄기세포를 배양하는 것을 포함하는, 성체줄기세포의 근세포, 지방세포 또는 파골세포로의 분화를 촉진하는 방법, 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 근육 또는 지방 조직 재생용 조성물, 근육 질환의 예방 또는 치료용 조성물, 지방결핍 질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 파골세포결핍 질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 배지에서 성체줄기세포를 배양하는 단계; 상기 배지에 후보물질을 처리하는 단계 및 후보물질을 처리하기 전과 처리한 후에 근세포, 지방세포 또는 파골세포로의 분화 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 성체줄기세포의 근세포, 지방세포 또는 파골세포로의 분화를 억제 또는 유도하는 후보물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A080216-0902-0000100

부처명 보건복지부

연구사업명 보건의료기술연구사업

연구과제명 골다공증 전임상 후보물질 발굴 연구

기 여 율 1/1

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2009.04.01 ~ 2010.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

3-(3,5-디메톡시페닐)-4,6-디메톡시-2-(4-메톡시페닐)-1H-인덴-1-온의 인덴온 유도체 또는 이의 염을 포함하는 분리된 성체줄기세포의 분화 촉진용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 분화는 근세포, 지방세포 또는 파골세포로의 분화인 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 성체줄기세포는 근육세포, 지방세포 또는 파골세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포인 것인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 성체줄기세포는 근육전구세포, 지방전구세포 또는 파골전구세포인 것인 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 분화 촉진은 ERK(extracellular signal regulated kinase)의 인산화 촉진에 의한 것인 조성물.

청구항 8

3-(3,5-디메톡시페닐)-4,6-디메톡시-2-(4-메톡시페닐)-1H-인덴-1-온의 인덴온 유도체 또는 이의 염의 존재 하에 성체줄기세포를 배양하는 것을 포함하는, 분리된 성체줄기세포의 근세포, 지방세포 또는 파골세포로의 분화를 촉진하는 방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

3-(3,5-디메톡시페닐)-4,6-디메톡시-2-(4-메톡시페닐)-1H-인덴-1-온의 인덴온 유도체 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 근질환, 근이영양증, 근위축, X-연관 척수구근 근위축(SBMA: Xlinked spinal-bulbar muscular atrophy), 약액질 및 근육 감소증으로 구성된 군으로부터 선택되는 근육 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

3-(3,5-디메톡시페닐)-4,6-디메톡시-2-(4-메톡시페닐)-1H-인덴-1-온의 인덴온 유도체 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 피부염, 성장저해, 우울증, 기억력 감소 및 학습장애로 구성된 군으로부터 선택되는 지방결핍 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

3-(3,5-디메톡시페닐)-4,6-디메톡시-2-(4-메톡시페닐)-1H-인덴-1-온의 인덴온 유도체 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 골화석증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 15

삭제

청구항 16

3-(3,5-디메톡시페닐)-4,6-디메톡시-2-(4-메톡시페닐)-1H-인덴-1-온의 인덴온 유도체 또는 이의 염을 포함하는 배지에서 성체줄기세포를 배양하는 단계; 상기 배지에 후보물질을 처리하는 단계 및 후보물질을 처리하기 전과 처리한 후에 근세포, 지방세포 또는 파골세포로의 분화 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 성체줄기세포의 근세포, 지방세포 또는 파골세포로의 분화를 억제 또는 유도하는 후보물질을 스크리닝하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 인덴온 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 성체줄기세포의 분화 촉진용 조성물, 상기 조성물의 존재 하에 성체줄기세포를 배양하는 것을 포함하는, 성체줄기세포의 근세포, 지방세포 또는 파골세포로의 분화를 촉진하는 방법, 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 근육 또는 지방 조직 재생용 조성물, 근육 질환의 예방 또는 치료용 조성물, 지방결핍 질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 파골세포결핍 질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 배지에서 성체줄기세포를 배양하는 단계; 상기 배지에 후보물질을 처리하는 단계 및 후보물질을 처리하기 전과 처리한 후에 근세포, 지방세포 또는 파골세포로의 분화 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 성체줄기세포의 근세포, 지방세포 또는 파골세포로의 분화를 억제 또는 유도하는 후보물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 줄기세포는 무한한 범위까지 분열하는 능력이 있고 다른 유형의 세포를 형성하기 위해 적합한 환경 하에서 적합한 자극을 통해 분화하는 능력을 가지는 세포이다. 줄기세포는 특징적인 형상과 특화된 기능을 가지는 세포로 발달하는 잠재력을 가지며, 다양한 질병에서 효율적인 치료수단으로 많은 연구가 행해지고 있다.

[0003] 다른 유형의 세포로 분화하기 위한 줄기세포들의 잠재력의 차이를 기준으로, 지금까지 배아줄기세포와 성체줄기세포 사이에 구분이 있어 왔다. 수정란 세포로부터 배아단계로, 성체 유기체로 발달하면서 줄기세포의 잠재력이

줄어든다는 것이 일반적으로 일치된 의견이다. 이러한 성질에 따라, 수정란세포는 만능(totipotent)이라 일컬어지고, 배아줄기세포는 전분화능(pluripotent)이라 일컬어지고, 성체줄기세포는 다능성(multipotent)이라 일컬어진다.

[0004] 만능 줄기세포는 완전한 유기체로 발달할 수 있는 세포이다. 만능세포는 수정란세포와 함께 초기 배아단계의 세포들을 포함한다. 전분화능은 전형적으로 분열된 배반포의 내세포덩이(internal cell mass)로부터 얻어지는 배아줄기세포가 중배엽, 내배엽 및 외배엽의 세 가지 배엽 세포 모두로 분화할 수 있는 줄기세포를 말한다.

[0005] 한편, 성체 줄기세포는 발생과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계 혹은 성체단계에서 나타나는 줄기세포로서, 그 분화능이 일반적으로 특정 조직을 구성하는 세포로만 한정된다. 이러한 성체 줄기세포는 성인이 된 후에도 대부분의 장기에 남아 정상적으로 혹은 병리적으로 발생하는 세포의 손실을 보충하는 역할을 담당한다. 대표적인 성체 줄기세포에는 조혈모세포(hematopoietic stem cells; HSCs)와 중간엽(간엽) 줄기세포(mesenchymal stem cells; MSCs)가 있다.

[0006] 성체 줄기세포를 얻을 수 있는 대표적인 조직으로 골수가 알려져 있으며, 이러한 골수에는 조혈줄기세포, 중간엽(간엽) 줄기세포, 다분화능 성체전구세포(multipotent adult progenitor cells; MAPCs) 등의 존재가 보고되어 있다. 특히, 골수 유래 다분화능 성체 전구세포가 중간엽(간엽) 줄기세포와 같이 골모세포, 연골모세포, 지방세포 등으로 분화할 뿐만 아니라 신경세포, 내피세포, 간세포 등 다른 조직의 세포로도 분화가 가능하다는 연구가 발표되면서 많은 관심을 끌고 있다(Reyes M. et al., Blood 98: 2615-2625, 2001; Reyes M. et al., J. Clin. Invest. 109: 337-346, 2002). 또한 이외에 신경줄기세포, 피부줄기세포, 모낭줄기세포, 유방줄기세포, 태반 줄기세포 등 모든 성인의 장기에 성체줄기세포가 존재하는 것이 확인되었다. 최근에는 성체 줄기세포를 이용, 간세포 등 각종 여러 조직으로 분화시키는 실험이 성공을 거두고 있어 주목된다. 제대혈 유래 간엽 줄기세포는 골수 유래 간엽 줄기세포와 함께, 다양한 세포로 분화 유도되어 혈액 관계 질환의 치료 등에 필요한 세포 치료제로써 활용 가능성이 높아, 성체 줄기세포를 확보할 수 있는 공급원으로써 중요성이 높아지고 있다.

[0007] 실질적으로, 성체줄기세포의 세포치료제로서의 활용 가능성은 환자로부터 채취가능하므로 면역거부반응 등의 걱정이 없다는 점에서 주목받고 있다. 따라서, 줄기세포의 운명을 조절하고 원하는 조직으로의 분화를 향상시킬 수 있는 수단 또는 방법이 새로운 줄기세포-기반 치료제 발굴을 위해 개발되고 발전되어야 할 것이다.

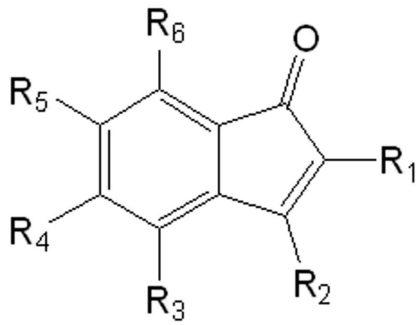
[0008] 이에 본 발명자들은 줄기세포가 어떠한 형태의 세포로 분화할 것인가를 결정할 때 줄기세포의 분화를 향상시킬 수 있는 생리활성 소분자를 발굴하기 위한 하나의 시도로서, 인텐온 유도체 화합물이 분화과정을 향상시킬 수 있는 잠재력을 가짐을 확인하였고, 이는 손상조직의 복구 및 재생에 유용하게 사용될 수 있음을 제시하였다. 나아가, 본 발명의 인텐온 유도체 화합물이 분화 조건에 따라 근형성, 지방형성 또는 파골세포형성을 포함하는 다양한 세포로의 분화를 널리 향상시킬 수 있음에 착안하여, 본 발명의 화합물이 ERK와 같은 다양한 분화 조절망에 공통으로 관여하는 신호분자를 조절함으로써 분화를 향상시키는 활성을 나타냄을 확인하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 인텐온 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 성체줄기세포의 분화 촉진용 조성물을 제공하는 것이다:

화학식 1



[0010]

[0011] 상기 화학식 1에서,

[0012] R₁ 및 R₂는 서로 독립적으로 같거나 다르며, 각각 C₁-C₄의 저급알킬, C₁-C₄의 알콕시, 할로젠, 시아노, 니트로, C₁-C₄의 할로알킬 및 C₁-C₄의 할로알콕시로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 또는 그 이상의 기로 치환 또는 비치환된 C₆-C₂₀의 아릴이며,

[0013] R₃, R₄, R₅ 및 R₆은 서로 독립적으로 같거나 다르며, 각각 수소, 할로젠, C₁-C₄의 저급알킬, C₁-C₄의 알콕시, C₁-C₄의 할로알킬, C₃-C₆의 시클로알킬, 니트로, 시아노, 아미노 또는 히드록시이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 분화 촉진용 조성물의 존재 하에 성체줄기세포를 배양하는 것을 포함하는, 성체줄기세포의 근세포, 지방세포 또는 파골세포로의 분화를 촉진하는 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 분화 촉진용 조성물을 유효성분으로 포함하는 근육 또는 지방 조직 재생용 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 분화 촉진용 조성물을 유효성분으로 포함하는 근육 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 분화 촉진용 조성물을 유효성분으로 포함하는 지방결핍 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

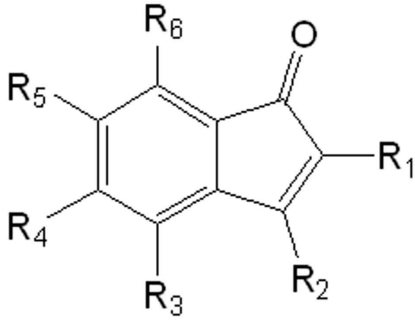
[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 분화 촉진용 조성물을 유효성분으로 포함하는 파골세포결핍 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 분화 촉진용 조성물을 포함하는 배지에서 성체줄기세포를 배양하는 단계; 상기 배지에 후보물질을 처리하는 단계 및 후보물질을 처리하기 전과 처리한 후에 근세포, 지방세포 또는 파골세포로의 분화 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 성체줄기세포의 근세포, 지방세포 또는 파골세포로의 분화를 억제 또는 유도하는 후보물질을 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 하나의 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 인텐은 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 성체줄기세포의 분화 촉진용 조성물을 제공한다:

[0021] [화학식 1]



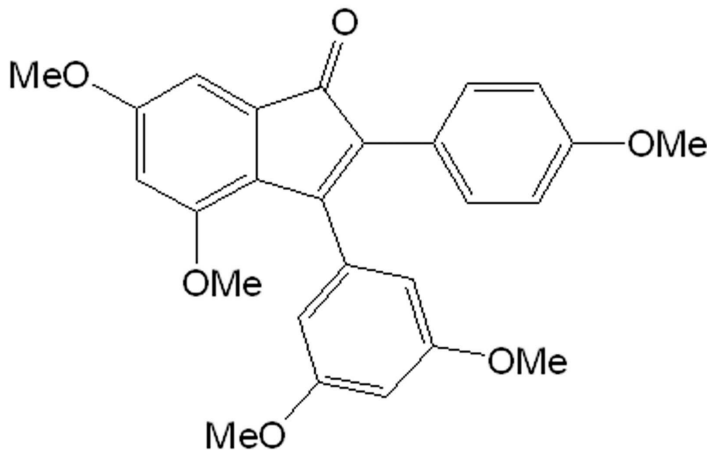
[0022]

[0023] 상기 화학식 1에서, R₁ 및 R₂는 서로 독립적으로 같거나 다르며, 각각 C₁-C₄의 저급알킬, C₁-C₄의 알콕시, 할로젠, 시아노, 니트로, C₁-C₄의 할로알킬 및 C₁-C₄의 할로알콕시로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 또는 그 이상의 기로 치환 또는 비치환된 C₆-C₂₀의 아틸이며, R₃, R₄, R₅ 및 R₆는 서로 독립적으로 같거나 다르며, 각각 수소, 할로젠, C₁-C₄의 저급알킬, C₁-C₄의 알콕시, C₁-C₄의 할로알킬, C₃-C₆의 시클로알킬, 니트로, 시아노, 아미노 또는 히드록시일 수 있다.

[0024] 바람직하게, 상기 화학식 1에서 R₁ 및 R₂는 서로 독립적으로 같거나 다르며, 각각 C₁-C₄의 저급알킬, C₁-C₄의 알콕시, 할로젠, 시아노, 니트로, C₁-C₄의 할로알킬 및 C₁-C₄의 할로알콕시로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 또는 그 이상의 기로 치환 또는 비치환된 페닐인 것인 조성물일 수 있다.

[0025] 보다 바람직하게, 상기 인텐온 유도체는 화학식 2의 구조를 갖는 3-(3,5-디메톡시페닐)-4,6-디메톡시-2-(4-메톡시페닐)-1H-인덴-1-온(3-(3,5-dimethoxyphenyl)-4,6-dimethoxy-2-(4-methoxyphenyl)-1H-inden-1-one)일 수 있다.

화학식 2



[0026]

[0027] 본 발명에서 사용된 용어, "C₁-C₄의 저급알킬"은 1 내지 4개의 탄소원자의 포화(saturated) 직쇄(linear) 또는 분지(branched) 구조를 의미한다. 예를 들어, 메틸, 에틸, n-프로필(노말프로필), i-프로필(이소프로필), n-부틸, i-부틸, t-부틸(tertiary butyl) 등이 이에 해당한다.

[0028] 본 발명에서 사용된 용어, "C₁-C₄의 알콕시"는 상기 C₁-C₄의 알킬이 산소원자에 단일결합으로 연결된 치환기를 의미한다. 예를 들어, 메톡시(methoxy)로부터 부톡시(butoxy)까지 직쇄 또는 분지구조의 치환기가 모두 이에 해당한다.

[0029] 본 발명에서 사용된 용어, "할로젠"은 주기율표 17족의 일련의 비금속원소를 의미한다. 상기 할로젠은 플루오린

(fluorine; F), 클로린(chlorine; Cl), 브로민(bromine; Br) 및 요오드(iodine; I) 등을 포함한다.

[0030] 본 발명에서 사용된 용어, "C₁-C₄의 할로알킬" 및 "C₁-C₄의 할로알콕시"는 각각 상기 C₁-C₄의 알킬 및 C₁-C₄의 알콕시의 탄소에 결합된 하나 이상의 수소원소가 할로겐원소로 치환된 작용기를 의미한다.

[0031] 본 발명의 인텐은 유도체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 조성물은 성체줄기세포의 근세포, 지방세포 또는 파골세포로의 분화를 촉진시킬 수 있다.

[0032] 본 발명에서 사용된 용어, "성체줄기세포"는 성체로부터 분리될 수 있는, 다양한 조직으로 분화가 가능한 미분화세포를 의미한다. 바람직하게 본 발명의 성체줄기세포는 근육세포, 지방세포 또는 파골세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포일 수 있고, 보다 바람직하게는 근육전구세포, 지방전구세포 또는 파골전구세포일 수 있다. 일반적으로 성체줄기세포는 성체 즉, 발생 및 분화가 온전히 진행되어 각 조직 및 장기가 형성되는 단계 또는 성체 단계에서 나타나는 줄기세포이다. 성체에서 나타난다고는 하나 분화능과 자기재생능 등의 줄기세포능을 가지고 있어 여전히 새로운 조직으로 분화가 가능하며, 이러한 성체줄기세포는 성체의 대부분의 장기에 남아 정상적 혹은 병리적으로 발생하는 세포의 손실을 보충한다. 본 발명에 따른 성체줄기세포의 대표적인 공급원은 골수 또는 지방조직이나 이에 제한되지 않으며, 양수, 태반, 제대혈 등으로부터 성체줄기세포를 얻을 수 있다.

[0033] 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면, 2% 말혈청을 포함하는 근육세포 분화용 배지에 본 발명의 조성물을 첨가하여 근육모세포(myoblast)를 분화시킨 경우 현저히 높은 비율로 근육세포로의 분화가 일어나는 것을 확인하였다(실시예 1, 도 1). 나아가, 칼슘채널 억제에 의해 근육세포형성을 억제하는 것으로 알려진 니페디핀에 의한 효과를 저해하는 것을 확인함으로써 본 발명의 조성물은 칼슘채널을 활성화 함으로 근육세포로의 분화 촉진시키는 것을 확인하였다(도 2). 한편, 소태아혈청(FBS), IBMX(3-isopropyl-1-methylxanthine), 텍사메타손(dexamethasone) 및 인슐린(insulin)을 포함하는 지방세포 분화용 배지에 본 발명의 조성물을 첨가하여 지방전구세포를 분화시킨 경우 현저히 높은 비율로 지방세포로의 분화가 일어나는 것을 확인하였다(실시예 2 및 도 3). 또한, 파골전구세포인 RAW264.7 세포를 100 ng/ml의 NF-κB 리간드의 수용체 활성화제(receptor activator of NF-κB; RANKL; R&D Systems, MN)를 포함하는 파골세포 분화용 배지에 본 발명의 조성물을 첨가하여 분화시킨 경우 파골세포로의 분화가 현저히 높은 비율로 일어나는 것을 확인하였다(실시예 3 및 도 4). 이는, 본 발명에 따른 인텐은 유도체가 첨가되는 배지의 환경에 따라, 성체줄기세포의 근육세포, 지방세포 또는 파골세포로의 분화를 촉진시킬 수 있음을 의미한다. 즉, 근육세포 분화용 배지에 첨가되는 경우 근육세포로의 분화를 촉진시키는 한편, 지방세포 분화용 배지에 첨가되는 경우 지방세포로의 분화를 촉진시킬 수 있으며, 파골세포 분화용 배지에 첨가되는 경우에는 파골세포로의 분화를 촉진시킬 수 있음을 의미한다.

[0034] 본 발명의 인텐은 유도체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 조성물은 ERK 인산화를 촉진함으로써 성체줄기세포의 분화를 촉진시킬 수 있다.

[0035] 본 발명에 사용된 용어, "ERK(extracellular signal regulated kinase; 세포 외 신호 조절 활성화효소)"는 광범위하게 분화세포에서 유사분열, 감수분열 및 감수분열 후 기능 조절 등에 관여하는 단백질 활성화효소 세포내 신호전달 분자(protein kinase intracellular signalling molecule)를 의미한다. 상기 ERK는 MAPK(mitogen activated protein kinase; 마이트젠 활성화화 단백질 활성화효소)의 동의어로 사용되기도 한다. ERK는 ELK1 등의 많은 전사인자(transcription factor) 및 몇몇 하류 단백질 활성화효소를 활성화하는 것으로 알려져 있으며, 신호분자로서 다양한 분화 조절망에 공통으로 관여하여 조절할 수 있다. 상기 ERK는 인산화에 의해 활성화되며 활성화된 ERK는 다른 다양한 전사인자의 활성화를 유발한다.

[0036] 본 발명에 사용된 용어, "인산화(phosphorylation)"는 단백질 또는 다른 유기분자에 인산기(phosphate group)이 결합하는 것을 의미한다. 상기 인산화는 많은 단백질 효소의 작동 및 차단을 조절하여 기능 및 활성을 변화시킬 수 있다. 이러한 인산화는 다양한 세포 과정(cellular process)에서 중요한 역할을 한다.

[0037] 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면, 본 발명에 따른 인텐은 유도체가 근육세포 분화용 배지, 지방세포 분화용 배지 또는 파골세포 분화용 배지에 첨가되어 상기 모든 분화조건 하에서 ERK의 인산화를 증가시키는 것을 확인하였다(도 6). 즉, 본 발명의 인텐은 유도체는 다양한 분화에 관여하는 신호분자인 ERK의 인산화를 촉진시킴으로 각각의 분화조건 하에서 해당 세포로의 분화를 촉진시킬 수 있음을 의미한다.

- [0038] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 분화 촉진용 조성물의 존재 하에 성체줄기세포를 배양하는 것을 포함하는, 성체줄기세포의 근세포, 지방세포 또는 파골세포로의 분화를 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0039] 또한 다른 양태로서, 본 발명은 상기 분화 촉진용 조성물을 유효성분으로 포함하는 근육 또는 지방 조직 재생용 조성물을 제공한다.
- [0040] 본 발명에서 사용된 용어, "재생"은 일반적으로 생물체가 몸의 일부 또는 그 기능을 상실하였을 때, 그 부분의 조직이나 기관을 다시 만들어 원래 상태로 복구시키거나 그 기능을 회복하려는 작용을 의미한다. 이러한 재생능력은 체계가 간단하고 계통적으로 진화의 정도가 낮은 것일수록 강하다. 본 발명의 조성물은 각각의 조직으로의 분화조건에 첨가되어 성체줄기세포의 해당 세포로의 분화를 촉진시킬 수 있으므로, 성체줄기세포를 채취하여 필요에 따라 근육세포 또는 지방세포 분화용 배지에 본 발명의 조성물을 첨가하여 배양하여 근육세포 또는 지방세포로 분화시킨 후 재생이 필요한 조직에 투여할 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 특정 조직으로의 분화만 촉진하는 것이 아니라 분화 환경이 갖춰지기만 하면 그에 상응하는 세포로의 분화를 촉진시킬 수 있으므로 직접 환부에 투여하여 조직 내에 존재하는 성체줄기세포의 분화를 촉진시킬 수 있다.
- [0041] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 분화 촉진용 조성물을 유효성분으로 포함하는 근육 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0042] 본 발명에서 사용된 용어, "근육 질환"은 근육세포의 결핍 또는 비정상적인 감소로 인해 발생할 수 있는 질병으로, 퇴행성 근질환, 근이영양증, 근위축, X-연관 척수구근 근위축(SBMA: Xlinked spinal-bulbar muscular atrophy), 악액질, 영양실조, 나병, 당뇨병, 신질환, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 암, 말기 신부전, 근육 감소증, 폐기종, 골연화증, HIV 감염, AIDS 또는 심근증일 수 있다. 본 발명의 분화 촉진용 조성물은 근육세포로의 분화를 촉진시킴으로 근육세포의 부족으로 인해 발생하는 근육 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0043] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 분화 촉진용 조성물을 유효성분으로 포함하는 지방결핍 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0044] 본 발명의 용어, "지방결핍 질환"은 지방세포의 결핍 또는 비정상적으로 과다한 감소로 발생할 수 있는 질병으로, 피부염, 성장장애, 우울증, 기억력 감소 또는 학습장애일 수 있다. 본 발명의 분화 촉진용 조성물은 지방세포로의 분화를 촉진시킴으로 지방세포의 부족으로 인해 발생하는 지방결핍 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0045] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 분화 촉진용 조성물을 유효성분으로 포함하는 파골세포결핍 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0046] 본 발명의 용어, "파골세포결핍 질환"은 파골세포의 결핍, 비정상적인 감소 또는 기능부진으로 발생할 수 있는 질병으로 골화석증이 대표적인 질환이다. 골화석증은 유전적으로 또는 돌연변이에 의해 발병할 수 있다. 파골세포는 조골세포와 상보적으로 작용하여 지속적인 골흡수 및 골형성을 통한 항상성 유지작용에 중요한 역할을 한다. 혈중 칼슘이온 부족시 골흡수를 통해 칼슘을 공급할 수 있다. 본 발명의 분화 촉진용 조성물은 파골세포분화를 유도하는 RANKL의 활성을 향상시켜 파골세포로의 분화를 촉진시킴으로 파골세포의 부족 또는 기능부진으로 인해 발생하는 파골세포결핍 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0047] 본 발명에서 사용된 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 조성물을 개체에 투여하여 근육 질환, 지방결핍 질환 또는 파골세포결핍 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 상기 조성물의 투여에 의해 근육 질환, 지방결핍 질환 또는 파골세포결핍 질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0048] 본 발명에서 용어, "개체"란 근육 질환, 지방결핍 질환 또는 파골세포결핍 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다. 본 발명의 조성물을 개체에게 투여하여 상기 근육 질환, 지방결핍 질환 또는 파골세포결핍 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명의 조성물은 기존의 근육 질환, 지방

결핍 질환 또는 파골세포결핍 질환 치료제와 병행하여 투여될 수 있다.

[0049] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"란, 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0050] 상기 본 발명의 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어, "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간 등의 개체에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기체, 부형제, 유헬제 등 당업계에 공지된 것이라면 제한없이 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0051] 또한, 본 발명의 조성물을 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있다.

[0052] 경구 투여를 위하여 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등의 고형 제제로 제조할 수 있다. 이러한 고형제제는 상기 조성물 이외에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로스, 또는 락토즈, 젤라틴 등을 섞어 조제한다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 유헬제도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 그러나 경구 투여시, 펩타이드는 소화되기 쉽기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 하는 것이 바람직하다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 펩타이드의 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스, 텍스트란 등의 카보하이드레이트, 아스코르빅산, 글루타치온 등의 항산화제, 킬레이팅 물질, 저분자 단백질 또는 다른 안정화제들을 사용할 수 있다.

[0053] 또한, 본 발명의 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내 주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제(예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.

[0054] 한편, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 상기 용어 "약학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 체중, 건강상태, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로, 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 활성물질을 약 0.01 mg/kg/일 내지 1000 mg/kg/일의 용량으로 투여할 수 있다. 경구 투여하는 경우, 50 내지 500 mg/kg의 범위가 적합할 수 있으며, 1일 1회 이상 투여할 수 있다.

[0055] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 분화 촉진용 조성물을 포함하는 배지에서 성체줄기세포를 배양하는 단계; 상기 배지에 후보물질을 처리하는 단계 및 후보물질을 처리하기 전과 처리한 후에 근세포, 지방세포 또는 파골세포로의 분화 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 성체세포의 근세포, 지방세포 또는 파골세포로의 분화를 억제 또는 유도하는 후보물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0056] 본 발명의 조성물은 근육세포, 지방세포 및 과골세포로 분화를 유도할 수 있는 다양한 분화조건에 첨가되어 각각의 세포로의 분화를 촉진시킬 수 있으므로, 다양한 조직의 재생 및 해당 조직세포의 결핍 또는 비정상적으로 과다한 감소로 발생할 수 있는 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 근세포 분화조건에서 화학식 2의 화합물의 첨가량에 따른 미오신 중쇄(myosin heavy chain; MHC) 염색 정도, 및 미오게닌 및 Myh1 mRNA 발현수준을 나타낸 도이다.

도 2는 니페디핀(nifedipine)에 의한 근세포분화 억제조건에서 화학식 2의 화합물의 첨가량에 따른 회복효과를 나타낸 도이다.

도 3은 지방세포 분화조건에서 화학식 2의 화합물의 첨가량에 따른 오일 레드 O 염색 정도, 및 PPAR2 mRNA 발현수준을 나타낸 도이다.

도 4는 과골세포 분화조건에서 화학식 2의 화합물의 첨가량에 따른 액틴 염색 정도, 및 DC-STAMP 및 OC-STAMP mRNA 발현수준을 나타낸 도이다.

도 5는 과골세포 분화조건에서 화학식 2의 화합물의 첨가량에 따른 TRAP 활성, 및 Fra-2 및 카텡신 K mRNA 발현수준을 나타낸 도이다.

도 6은 다양한 분화조건에서 본 발명의 인텐온 유도체(화학식 2) 첨가에 따른 ERK 인산화의 증가를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0059] **제조예 1: 인텐온 유도체 3-(3,5-디메톡시페닐)-4,6-디메톡시-2-(4-메톡시페닐)-1H-인덴-1-온(3-(3,5-dimethoxyphenyl)-4,6-dimethoxy-2-(4-methoxyphenyl)-1H-inden-1-one)의 합성**

[0060] 화학식 2의 화합물 3-(3,5-디메톡시페닐)-4,6-디메톡시-2-(4-메톡시페닐)-1H-인덴-1-온은 이전에 보고된 바와 같이 Lee 등에 기재된 방법으로 합성하였다(Lee, B. H. *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2011, 76(16): 6611-6618). 본 발명에서는 상기 화학식 2의 화합물의 근형성, 지방형성 및 과골세포형성에 대한 향상효과를 확인하였다.

[0061] 구체적으로, 먼저 중간체 화합물로서 3-아릴-1-인다논(3-aryl-1-indanone) 화합물인 3-(3,5-dimethoxyphenyl)-4,6-dimethoxy-1H-inden-1-one(3-(3,5-디메톡시페닐)-4,6-디메톡시-1H-인덴-1-온)을 합성하기 제조하기 위하여 아세트페논 유도체(acetophenone derivative)인 1-(3,5-dimethoxyphenyl)ethanone(1-(3,5-디메톡시페닐)에타논)과 벤즈알데히드(benzaldehyde) 화합물의 일종인 3,5-dimethoxybenzaldehyde(3,5-디메톡시벤즈알데히드)를 NaOH 존재 하에 90% 에탄올 수용액에서 12시간 동안 환류시켜 알돌축합반응(aldol condensation)을 수행하여 1,3-비스(3,5-디메톡시페닐)프로프-2-엔-1-온(1,3-bis(3,5-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one)을 수득하였다. 이후 CF₃COOH을 이용하여 100℃에서 1시간 동안 반응시켜 산-매개 고리화반응을 수행하여 중간체 화합물인 3-(3,5-dimethoxyphenyl)-4,6-dimethoxy-1H-inden-1-one(3-(3,5-디메톡시페닐)-4,6-디메톡시-1H-인덴-1-온)을 수득하였다.

[0062] 상기 중간체 화합물은 팔라듐 촉매 하에 4-브로모아니솔(4-bromoanisole)과의 α-아릴화 반응을 통해 최종산물인 3-(3,5-디메톡시페닐)-4,6-디메톡시-2-(4-메톡시페닐)-1H-인덴-1-온을 생성하였다. 상기 Pd-촉매 α-아릴화 반응은 Pd(OAc)₂ 4 몰%, X-Phos 8 몰% 및 Na^tBu 1.5 당량을 포함하는 톨루엔 용액을 사용하여 80℃에서 3시간 동안 수행되었다. 상기 3-(3,5-디메톡시페닐)-4,6-디메톡시-2-(4-메톡시페닐)-1H-인덴-1-온은 시스 형태인

(2R,3S)-3-(3,5-디메톡시페닐)-4,6-디메톡시-2-(4-메톡시페닐)-2,3-디히드로인덴-1-온((2R,3S)-3-(3,5-dimethoxyphenyl)-4,6-dimethoxy-2-(4-methoxyphenyl)-2,3-dihydroinden-1-one), 트랜스 형태인 (2S,3S)-3-(3,5-디메톡시페닐)-4,6-디메톡시-2-(4-메톡시페닐)-2,3-디히드로인덴-1-온((2S,3S)-3-(3,5-dimethoxyphenyl)-4,6-dimethoxy-2-(4-methoxyphenyl)-2,3-dihydroinden-1-one) 및 (2R,3S)-3-(3,5-디메톡시페닐)-2-히드록시-4,6-디메톡시-2-(4-메톡시페닐)-2,3-디히드로인덴-1-온((2R,3S)-3-(3,5-dimethoxyphenyl)-2-hydroxy-4,6-dimethoxy-2-(4-methoxyphenyl)-2,3-dihydroinden-1-one)과의 혼합물 형태로 얻어졌으며 컬럼 크로마토그래피를 통하여 분리 정제하여 순수한 화학식 2의 화합물 3-(3,5-디메톡시페닐)-4,6-디메톡시-2-(4-메톡시페닐)-1H-인덴-1-온을 획득하였다.

[0063] 실시예 1: 근형성(myogenesis)

[0064] 근형성은 새로운 근육세포를 생성하기 위한 과정이다. 줄기세포 기능화를 통하여 근형성 조절은 퇴행성 근질환 및 이상증에 대한 연구를 위한 성장하는 분야로 주목받고 있다. 미오게닌(myogenin) 및 미오신(myosin) 중쇄(MHC or 미오신 중쇄 1; Myosin heavy chain 1; MYH1)는 골격근모세포 분화(skeletal myoblast differentiation)의 마커로 알려져 있다(Miller, J. B., *J. Cell Biol.*, 1990, 111(3): 1149-1159; Porter, G. A. Jr. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2002, 277(32): 28942-28947). 흥미롭게도, 이분화능(bi-potent) C2C12 중간엽 전구체 세포(mesenchymal progenitor cell)는 자극에 따라 조골세포로 뿐만 아니라 근육세포로 분화할 수 있다. 따라서, C2C12 세포를 이용하여 근형성에 대한 화학식 2의 화합물의 효과를 확인할 수 있다.

[0065] 구체적으로, 마우스 근육모세포 세포주(murine myoblast cell line)인 C2C12 세포를 5×10^3 세포/웰의 농도로 96-웰 플레이트에 분주하고 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지로 배양하였다. 상기 성장배지(GM)에 배양하면서 90% 세포 컨플루언시에 달했을 때, 근형성 분화배지인 2% 말혈청(horse serum)을 포함하는 DMEM 배지로 교환하였다. 배지는 21일마다 교환하였다. 분화 3일째에 세포를 고정시키고 근세포-특이적 미오신 중쇄(myosin heavy chain; MHC)를 검출하기 위하여 MF20-항체를 염색하였다. Alexa Fluor 488 이차 항체를 이용하여 MHC 양성 세포를 가시화하였다. 염색된 세포의 이미지는 DP 콘트롤러를 구비한 형광 현미경(IX51)으로 캡처하였다. 음성대조군은 상기 성장배지(GM)를 이용하여 배양하였고, 실험군은 상기 근형성 분화배지에 화학식 2의 화합물을 각각 0, 1, 3 및 10 μ M의 농도로 첨가한 배지를 사용하여 배양하였다.

[0066] 도 1에 나타낸 바와 같이, MHC 특이적 항체를 이용하여 MHC의 발현을 가시화함으로써 화학식 2의 화합물이 C2C12 세포의 근모세포로의 말혈청-유도 분화(horse serum-induced differentiation)를 현저히 향상시키는 효과를 나타냄을 관찰하였다. 근형성에 대한 화학식 2의 화합물의 향상효과는 실시간 PCR 분석에 의해서도 확인할 수 있었다. 표현형 분석(phenotype assay)으로부터 얻어진 결과와 일치하게 3 μ M 수준의 화학식 2의 화합물이 미오게닌 및 MYH1의 말혈청-활성화 mRNA 유도를 현저히 향상시킴을 확인하였다.

[0067] 또한, 화학식 2의 화합물은 Myh1의 mRNA 유도를 수반하는 근형성에 대한 니페디핀(nifedipine)의 저해효과를 회복시켰다(도 2). 니페디핀은 L-타입 칼슘채널 차단제의 일종으로 미오게닌 및 MHC의 발현을 차단함으로써 근세포(myocyte) 분화를 저해하는 것으로 알려져 있다(Porter, G. A. Jr. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2002, 277(32): 28942-28947).

[0068] 본 발명의 인덴은 유도체의 첨가에 의한 근육세포로의 분화 촉진에 대한 기작을 확인하기 위하여 ERK 인산화 정도를 확인하고 그 결과를 도 6(A)에 나타내었다. 도 6(A)에 나타낸 바와 같이, 근육세포 분화배지에 화학식 2의 인덴은 유도체를 첨가한 경우 ERK의 인산화가 보다 증가하는 것을 확인하였다.

[0069] 따라서, 화학식 2의 화합물은 근세포 분화배지에 첨가되어 근세포 분화를 촉진시킬 뿐만 아니라, 니페디핀 등이 포함된 근세포 분화를 저해하는 조건하에서 이를 상쇄시켜 근세포로의 분화를 유지시킬 수 있으므로, 퇴행성 근질환 및 이상증을 위한 신규한 치료제로 사용될 수 있는 가능성을 가지며, 이는 ERK의 활성화에 의한 것임을 확인하였다.

[0070] 실시예 2: 지방형성(adipogenesis)

- [0071] 인슐린(insulin), 덱사메타손(dexamethasone) 및 3-이소부틸-1-메틸크산틴(3-isobutyl-1-methylxanthine; IBMX)의 자극에 의해 전지방세포(preadipocyte)인 3T3-L1 세포는 트리글리세라이드(또는 중성지방; triglyceride)의 합성 및 축적이 증가시키는 지방세포로 분화한다. 상기 세포-기반 지방형성 모델 및 지방 축적을 가시화하기 위한 오일 레드 0 염색을 이용하여, 본 발명자들은 화학식 2의 화합물이 지방형성의 조절인자(regulator)로 알려진(Fajas, L. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1997, 272(30): 18779-18789; Cowherd, R. M. *et al.*, *Semin. Cell Dev. Biol.*, 1999, 10(1): 3-10; Jones, J. R. *et al.*, *Pros. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102(17): 6207-6212) PPAR2(peroxisome proliferator-activated receptor-2; 또는 PPAR- γ 2) 유도를 수반하는 지방형성(또는 지방세포 분화)를 현저히 그리고 용량 의존적으로 향상시킴을 확인하였다.
- [0072] 마우스 3T3-L1 세포를 1×10^4 세포/웰의 농도로 성장배지(growth medium; GM)인 10% 송아지태아혈청(fetal calf serum; FCS)을 포함하는 DMEM 배지를 채운 96-웰 플레이트에 분주하였다. 육안으로 세포 컨플루언시를 확보한 후, 세포를 GM으로 2일간 항온배양하고 배지를 10% FBS, 0.5 mM IBMX(3-isopropyl-1-methylxanthine), 1 μ M 덱사메타손(dexamethasone) 및 10 μ g/ml 인슐린(insulin)을 포함하는 지방형성 분화배지(adipocyte differentiation medium; ADM)로 교환하였다. 2일간 항온배양 후, 배지를 신선한 ADM으로 교환하였고, 2일 더 배양시킨 후, 세포를 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지인 GM으로 3일간 항온배양하였다. 세포에 축적된 지방을 가시화하기 위하여 오일 레드 0 염색(oil red O staining)을 사용하였다. 구체적으로, 세포를 10% 포름알데히드(formaldehyde)를 포함하는 PBS로 4°C에서 1시간 동안 고정시키고, PBS로 2회 세척한 후 60% 이소프로판올(isopropanol)로 제조한 오일 레드 0 용액으로 10분간 염색하고 물로 수회 반복하여 세척하였다. 염색된 세포의 이미지는 DP 콘트롤러를 구비한 형광 현미경(IX51)으로 캡처하였다. 음성대조군은 상기 성장배지(GM)를 이용하여 배양하였고, 실험군은 상기 지방형성 분화배지에 화학식 2의 화합물을 각각 0, 1, 3 및 10 μ M의 농도로 첨가한 배지를 사용하여 배양하였다.
- [0073] 그 결과를 도 3에 나타내었다. PPAR2는 지방조직에서 가장 많이 관찰되는 것으로 PPAR2-활성화 분자(PPAR2-activated molecule)는 지방 섭취(lipid uptake) 및 지방형성을 자극한다. 화학식 2의 화합물은 PPAR2의 발현을 용량 의존적으로 증가시킬 수 있는 잠재력을 가지고 지방형성을 향상시키므로, 이는 지방형성과 PPAR2의 생물학적 관련성을 연구하기 위한 수단으로서 사용될 수 있으며, 아울러 지방결핍으로 인해 발생하는 질환의 치료제로서의 활용 가능성을 가진다.
- [0074] 상기 본 발명의 인텐은 유도체의 첨가에 의한 지방형성 촉진에 대한 기작을 확인하기 위하여 ERK 인산화 정도를 확인하고 그 결과를 도 6(B)에 나타내었다. 도 6(B)에 나타낸 바와 같이, 지방형성 분화배지에 화학식 2의 인텐은 유도체를 첨가한 경우 ERK의 인산화가 보다 증가하는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 인텐은 유도체에 의한 지방형성 촉진효과는 ERK의 활성화에 의한 것임을 확인하였다.
- [0075] **실시예 3: 파골세포형성(osteoclastogenesis)**
- [0076] 골 발달 및 재형성(bone development and remodeling)은 파골세포-매개 골 재흡수(osteoclast-mediated bone resorption) 및 조골세포-매개 골 형성(osteoblast-mediated bone formation) 사이의 섬세한 균형에 의존한다. 과도한 파골성 골 재흡수는 골다공증(osteoporosis), 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis), 치주질환(periodontal disease) 및 전이성 암(metastatic cancers)과 같은 병리적 골질환을 야기하는 골 파괴에서 중요한 역할을 한다(Teitelbaum and Ross, 2003). 파골세포는 골수 줄기세포로부터 유래한다. 혈액순환을 통해 말초 혈액 중의 파골전구세포가 골 재흡수를 요구하는 골격 전체에 걸쳐 내부 또는 외부 골표면에 도입된다. 이후, RANKL(receptor activator of NF- κ B ligand) 및 그의 수용체 RANK(receptor activator of NF- κ B) 사이의 상호작용이 파골세포형성에 요구되는 신호전달 연쇄반응(signaling cascade)을 유발한다(Wada *et al.*, 2006; Lee and Kim, 2003). 마우스 단핵세포/대식세포 RAW264.7 세포는 RANKL 존재 하에 파골세포-유사 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지는 것으로 보고되었으므로(Hsu *et al.*, 1999), RANKL 존재 하에 RAW264.7 세포를 이용하여 파골세포를 생성할 수 있다.
- [0077] 마우스 단핵구/대식세포 RAW264.7 세포(murine monocyte/macrophage RAW264.7 cells)를 37°C의 5% 이산화탄소를 포함하는 습식대기에서 성장배지(GM)인 10% FBS, 100 U/ml 페니실린(penicillin) 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신(streptomycin)을 포함하는 DMEM 배지에 배양하였다. 배지는 3일마다 교환하였다. 파골세포로의 분화를 위하여, RAW264.7 세포를 100 ng/ml의 NF- κ B 리간드의 수용체 활성화제(receptor activator of NF- κ B; RANKL;

R&D Systems, MN) 존재하에 10% FBS를 포함하는 α-최소필수배지(α-minimal essential medium; α-MEM)에 현탁시키고 96-웰 플레이트에 1×10^3 세포/웰의 농도로 분주하였다(분화 0일). 기본적으로 다핵 파골세포는 분화 4일에 관찰된다. 그러나 본 발명에서는 분화 2일에 분화를 중지시켰다. 성숙한 파골세포를 가지화하기 위하여, 세포를 PBS로 2회 세척하고 10% 포르말린으로 5분간 고정시켰다. 0.1% 트리톤 X-100(triton X-100)을 포함하는 PBS에서 5분간 투과성을 높인 후(permeabilized) PBS로 다시 세척하였다. 이후, 액틴 고리(actin ring)를 빛을 차단하고 40분간 50 mg/ml 팔로이딘-FITC(phalloidin-FITC; Sigma)로 염색하였다. PBS로 2회 세척 후, 10 μg/ml Hoechst 33342로 핵을 5분간 염색하였다. 염색된 세포 이미지는 DP 콘트롤러를 구비한 형광 현미경(IX51)으로 캡처하였다. 파골세포의 중요한 세포화학적(cytochemical) 마커로 여겨지는 타르타르산염-내성 산성 포스파타제(tartrate-resistant acid phosphatase; TRAP)의 활성을 측정하기 위하여, 세포를 10% 포르말린으로 10분간 그리고 95% 에탄올로 1분간 고정시켰다. 이후, 10 mM 타르타르산 나트륨 및 5 mM p-니트로페닐포스페이트(p-nitrophenylphosphate; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 포함하는 시트르산 완충액(50 mM, pH 4.6) 100 μl을 고정시킨 세포를 포함하는 96-웰 플레이트에 가하였다. 1시간 동안 인큐베이션시킨 후, 웰 내의 효소반응 혼합물을 동일한 부피의 0.1 N NaOH를 포함하는 새로운 플레이트로 옮겼다. Wallac EnVision HTS 마이크로플레이트 리더(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 3회 반복하여 수행하였다. 음성대조군은 상기 성장배지(GM)를 이용하여 배양하였고, 실험군은 상기 파골세포형성 분화배지에 화학식 2의 화합물을 각각 0, 3, 10 및 30 μM의 농도로 첨가한 배지를 사용하여 배양하였다.

[0078] 도 4에 나타난 바와 같이, 화학식 2의 화합물은 용량 의존적으로 RANKL-유도 다핵성 파골세포의 형성을 향상시켰다. 분화 초기단계(분화 2일)에서도 다핵성 파골세포는 30 μM 화학식 2의 화합물에 의해 완전히 포화되었다. 또한, 화학식 2의 화합물은 수지상세포-특이적 막관통 단백질(dendritic cell-specific transmembrane protein; DC-STAMP) 및 파골세포 자극 막관통 단백질(osteoclast stimulatory transmembrane protein; OC-STAMP)의 RANKL-유도 mRNA 발현을 현저히 그리고 용량 의존적으로 향상시켰다. 상기 두 가지 단백질 모두 파골세포를 형성하기 위하여 세포-세포 융합을 조절하는 것으로 알려져 있다(Kukita et al., 2004; Yang et al., 2008; Kim et al., 2011; Miyamoto et al., 2012). 또한, 화학식 2의 화합물은 RANKL-유도 TRAP(tartrate resistant acid phosphatase) 활성 및 Fra-2 및 카텡신(cathepsin) K와 같은 파골세포형성-관련 분자의 mRNA 발현을 용량 의존적으로 그리고 현저히 향상시켰다(도 5). Fra-2는 파골세포 분화를 위한 필수적인 요소인 c-Fos 손실을 보상하여 c-Fos-결핍 파골세포 전구체에서의 분화차단을 억제하였다. 골 기질을 분해하는 몇몇 단백질분해효소 중 카텡신 K는 파골세포에서 가장 높은 발현수준을 나타낸다. 카텡신 K 녹아웃 마우스는 성숙한 파골세포 활성의 억제로 인한 뚜렷한 골경화증을 나타내었다. 따라서, 화학식 2의 화합물은 RANKL의 활성을 향상시키기 위한 수단으로 사용될 수 있으며, 나아가 실험실 수준의 연구에 있어서 고가의 RANKL 사용을 감소시킬 수 있다.

[0079] 상기 본 발명의 인텐은 유도체의 첨가에 의한 파골세포 형성 촉진에 대한 기작을 확인하기 위하여 ERK 인산화 정도를 확인하고 그 결과를 도 6(C)에 나타내었다. 도 6(C)에 나타난 바와 같이, 파골세포 분화배지에 화학식 2의 인텐은 유도체를 첨가한 경우 ERK의 인산화가 보다 증가하는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 인텐은 유도체에 의한 파골세포 분화 촉진효과는 ERK의 활성화에 의한 것임을 확인하였다.

[0080] **실시예 4: 실시간 PCR 분석(real-time PCR analysis)**

[0081] 온라인 프라이머 3 디자인 프로그램(Rozen and Skaletsky, 2000)을 이용하여 프라이머를 선택하였다. 본 발명에 사용된 프라이머 세트들 표 1에 나타내었다. 옴니스크립트 RT 키트(Omniscrypt RT kit; Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 제조업자의 프로토콜에 따라, 2 μg 총 RNA, 1 μM 올리고-dT18 프라이머 및 10 유닛 RNA분해효소 억제제 RNasin(RNase inhibitor RNasin; Promega, Madison, WI, USA)로부터 제1가닥 cDNA를 합성하였다. 1:50으로 희석한 cDNA와 10 pmol 프라이머를 가지고 Stratagene Mx3000P 실시간 PCR 시스템 및 브릴리언트 SYBR 그린 마스터 믹스(Stratagene, La Jolla, CA, USA)를 이용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 SYBR 그린-기반 QPCR을 수행하였다. PCR 반응은 3개의 구간으로 구성된다. 첫 번째 구간은 중합효소의 활성화를 위하여 95°C에서 10분간 수행된다. 두 번째 구간은 94°C에서 40초(변성; denaturation), 53°C에서 40초(어닐링; annealing) 및 72°C에서 1분간(신장; extension) 수행되는 3-단계 순환(40 순환)에 해당한다. 세 번째 구간은 95°C에서 1분, 55°C에서 30초 및 95°C에서 30초간 수행하여 PCR 생성물 온도 해리곡선(일명 '용해곡선(melting curve)')

를 생성하기 위한 단계이다. 모든 반응은 3회 반복하여 수행하였고 데이터는 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 법에 의해 분석하였다 (Livak, K. J. and Schmittgen, T. D., *Methods*, 2001, 25(4): 402-408). 내부 표준 유전자로 글리세르알데하이드-3-인산 탈수소효소(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH)를 사용하였다. GAPDH-표준화 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 값을 가지고 스튜던트 t-테스트에 의해 통계적 유의성을 결정하였다. PPAR2의 mRNA 발현을 확인하기 위하여 라이보솜 단백질 RPL19A(ribosomal protein RPL19A)를 내부 표준 유전자로 사용하였다. 음성 대조군 대 분화 대조군; *, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$. 분화 대조군 대 화합물 처리군; #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$.

표 1

Target gene	Forward (5'-3')		Reverse (5'-3')	
Myogenin	CTACAGGCCTTGCTCAGCTC	서열번호 1	ACGATGGACGTAAGGGAGTG	서열번호 2
Myh1	CCCCTGAATGAGACTGTGGT	서열번호 3	CGTACAAAGTGGGGTGAGT	서열번호 4
PPAR2	GCGGAAGCCCTTTGGTGACT	서열번호 5	TTGAGCTGCAGTTCAGGGC	서열번호 6
DC-STAMP	CCAAGGAGTCGTCCATGATT	서열번호 7	GGCTGCTTTGATCGTTTCTC	서열번호 8
OC-STAMP	ACTCCTGGGATCAACGTGAC	서열번호 9	CTACGCGGTACAGTGCAAAA	서열번호 10
Fra-2	ATCCACGCTCACATCCCTAC	서열번호 11	GTTTCTCTCCCTCCGGATTG	서열번호 12
Cathepsin K	GGCCAACTCAAGAAGAAAAC	서열번호 13	GTGCTTGCTTCCCTTCTGG	서열번호 14
GAPDH	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	서열번호 15	ACACATTGGGGGTAGGAACA	서열번호 16
RPL19A	ATCAGGAAGCTGATCAAAGA	서열번호 17	ACAGGCTGTGATACCTATGG	서열번호 18

[0082]

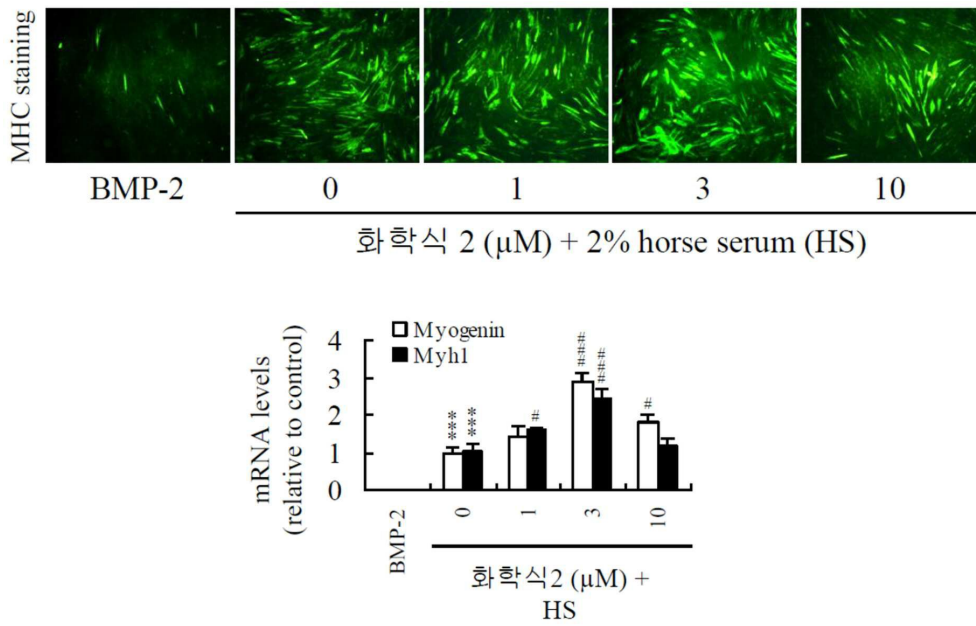
[0083] 실시예 5: 웨스턴 블롯 분석(western blot analysis)

[0084]

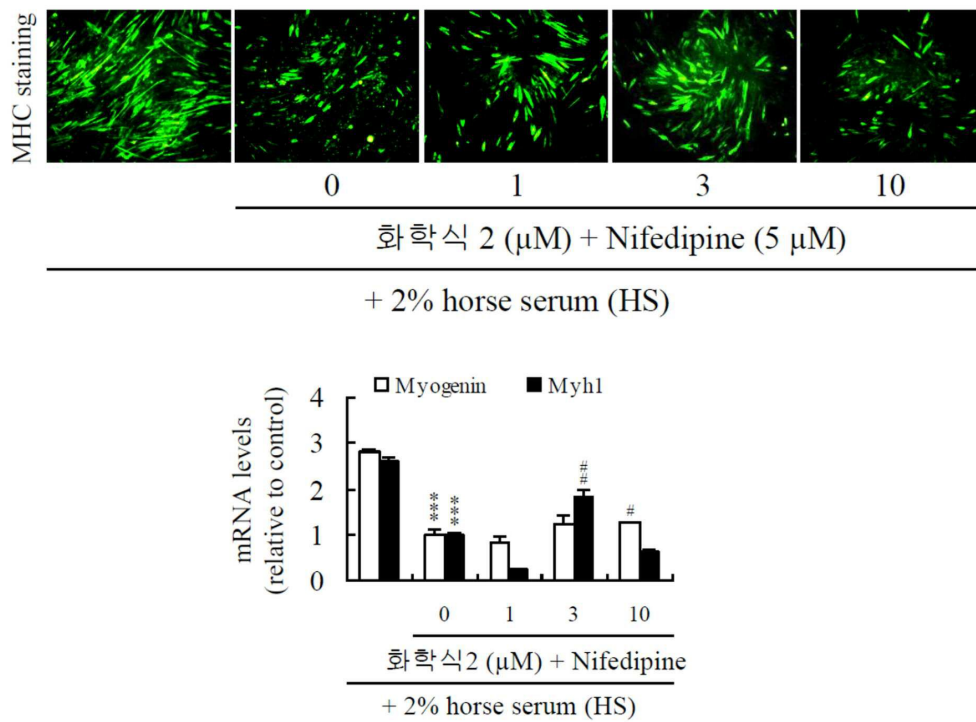
4°C에서 10 mM Tris-HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) 트윈 20, 1 mM PMSF(phenylmethanesulfonyl fluoride 또는 phenylmethylsulfonyl fluoride) 및 일종의 단백질분해효소 억제제 콕테일 정제(protease inhibitor cocktail tablet; Roche, Mannheim, Germany)로 구성된 완충액을 이용하여 세포를 균질화(homogenize)하고 10,000 ×g에서 15분간 원심분리하였다. 상층액 중의 단백질 농도는 BCA 단백질 분석 키트(Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 측정하였다. 시료를 시료 완충액(100 mM Tris-HCl, 2% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1% 2-머캅토에탄올(2-mercaptoethanol), 2% 글리세롤(glycerol), 0.01% 브로모페놀 블루(bromophenol blue), pH 7.6)과 혼합하여 95°C에서 15분간 인큐베이션시킨 후 10% 폴리아크릴아미드 겔(polyacrylamide gel)에 로딩하였다. 미니 Protean 3 Cell(Bio-Rad, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 전기영동을 수행하였다. 분리된 단백질을 PVDF 막(polyvinylidene fluoride membrane; Millipore, Temecula, CA, USA)에 옮겼다. 로딩된 단백질 양과 이동 효율을 확인하기 위하여 폰슈 S 염색 용액(Ponceau S staining solution)으로 막을 염색하였다. 면역분석을 위하여 막을 세척하고 차단 완충액(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% 트윈 20, 3% 탈지분유(nonfat dry milk))에서 인큐베이션시켰다. 이후, 희석시킨 일차 항체(1:1,000)와 실온에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 항체는 산타(Santa)로부터 구입하였다. 일차 항체 반응 후, 막을 차단 완충액으로 3회 세척하고 희석된 이차 항체(1:2,000)로 1시간 동안 표지하였다. 막을 3회 세척하고(각 15분) LAS-3000 발광 이미지 분석기(LAS-3000 Luminescent image analyzer; fuji Photo Film Co., Ltd., Kanagawa, Japan)를 사용하여 SuperSignal West Fento Maximum Sensitivity Substrate(Pierce)로 현상하였다.

도면

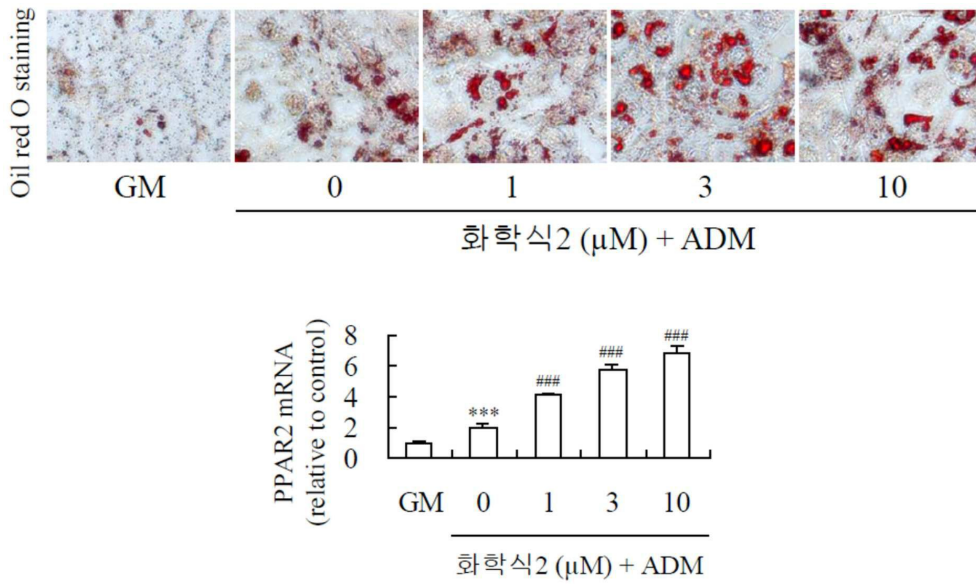
도면1



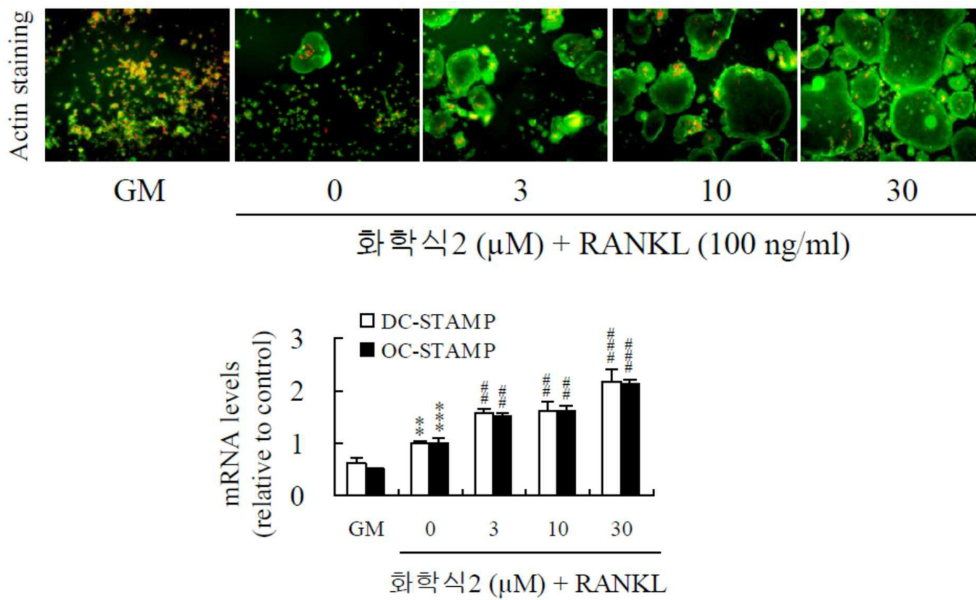
도면2



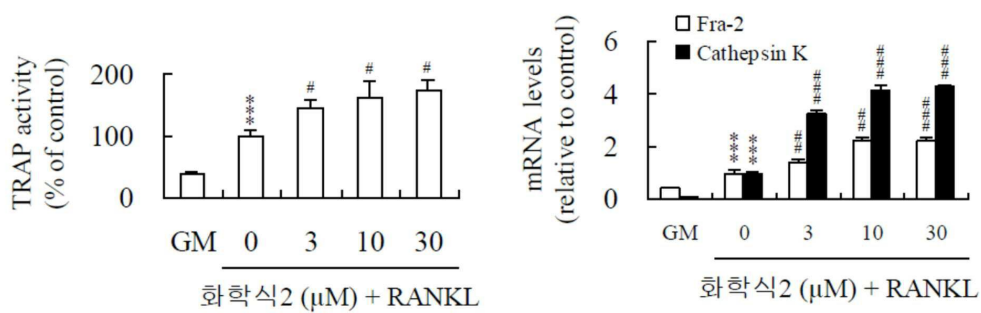
도면3



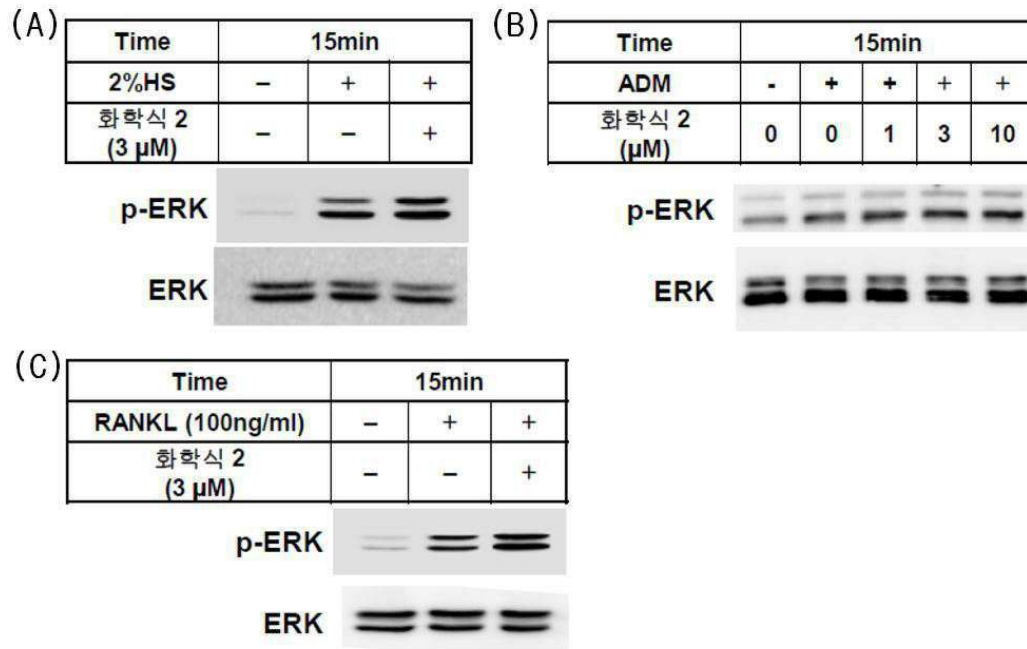
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY

<120> A composition for promoting differentiation comprising indenone derivatives or pharmaceutically acceptable salt thereof

<130> PA120474/KR

<160> 18

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Myogenin forward primer

<400> 1

ctacaggcct tgetcagetc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Myogenin reverse primer

<400> 2
 acgatggacg taaggagtg 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Myh1 forward primer
 <400> 3
 cccctgaatg agactgtggt 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Myh1 reverse primer
 <400> 4
 cgtacaaagt ggggtgagt 20

 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PPAR2 forward primer
 <400> 5
 gcggaagccc tttgtgact 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PPAR2 reverse primer
 <400> 6
 ttgagctgca gttccaggc 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> DC-STAMP forward primer

<400> 7
ccaaggagtc gtccatgatt 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> DC-STAMP reverse primer

<400> 8
ggctgctttg atcgtttctc 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> OC-STAMP forward primer

<400> 9
actcctggga tcaacgtgac 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> OC-STAMP reverse primer

<400> 10
ctacgcgta cagtgcaaaa 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Fra-2 forward primer

<400> 11
atccacgctc acatccctac 20

<210> 12
<211> 20

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Fra-2 reverse primer	
<400>		
	12	
	gtttctctcc ctccgattc	20
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Cathepsin K forward primer	
<400>	13	
	ggccaactca agaagaaaac	20
<210>	14	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Cathepsin K reverse primer	
<400>	14	
	gtgcttgctt cccttctgg	19
<210>		
	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH forward primer	
<400>	15	
	aactttggca ttgtggaagg	20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH reverse primer	
<400>	16	
	acacattggg gtaggaaca	20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> RPL19A forward primer

<400> 17
atcaggaagc tgatcaaaga 20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> RPL19A reverse primer

<400> 18
acagctgtg atacctatgg 20