

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0142830

(43) 공개일자 2019년12월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*A61K 31/4045* (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)*A61P 3/04* (2006.01)

(52) CPC특허분류

*A61K 31/4045* (2013.01)*A23L 33/10* (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0069999

(22) 출원일자 2018년06월19일

심사청구일자 2019년06월17일

(71) 출원인

연세대학교 원주산학협력단

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

(72) 발명자

김지현

강원도 원주시 단관공원길 111, 112동 103호(단구동, 중앙하이츠아파트)

이정근

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 청연학사 1717호

(74) 대리인

김보민

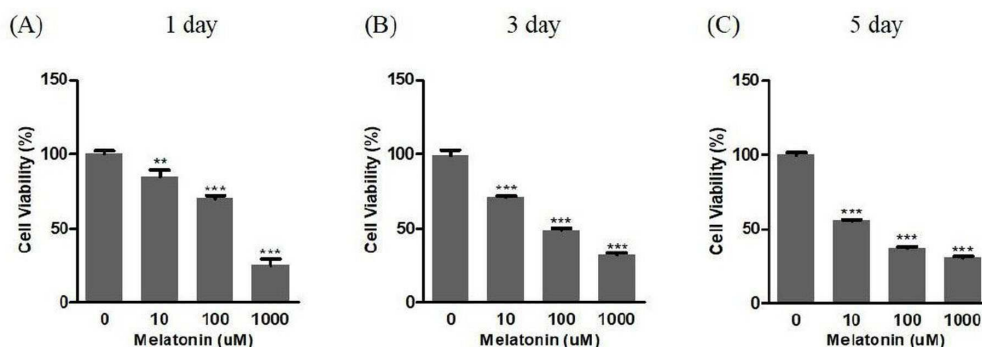
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 멜라토닌을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 조성물

## (57) 요약

본 발명은 멜라토닌을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 멜라토닌(melatonin)은 지방전구세포(pre-adipocytes)의 분화를 유의적으로 억제하고, 지방전구세포의 세포사멸을 유도하는 효과를 나타내므로, 상기 멜라토닌을 항비만용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용할 수 있다.

## 대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

**A61P 3/04** (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/332 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345270326

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원사업

연구과제명 생체주기 내 운동을 통한 비만 조절에서 근골격계 조직의 역할 규명

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교(원주캠퍼스)

연구기간 2017.11.01 ~ 2018.10.31

---

## 명세서

### 청구범위

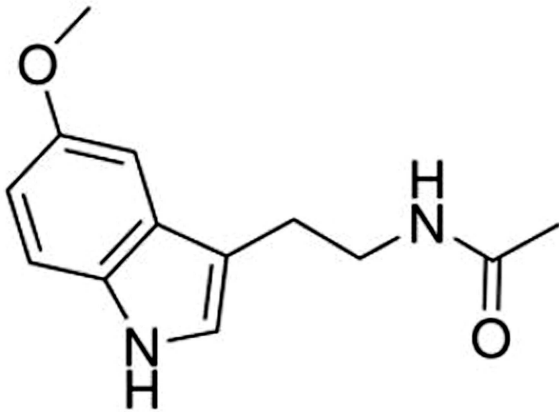
#### 청구항 1

멜라토닌(melatonin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 멜라토닌은 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



#### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 지방전구세포의 지방세포로의 분화를 억제하는 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 지방형성(adipogenesis) 후기 단계를 억제하는 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 지방전구세포의 세포사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 Bcl-2 단백질의 발현을 감소시키고, Bax 단백질의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 7

멜라토닌 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 개선용 건강식품.

#### 청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 건강식품은 지방전구세포의 지방세포로의 분화를 억제하는 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 개선용 건강식품.

#### 청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 조성물은 지방형성(adipogenesis) 후기 단계를 억제하는 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 개선용 건강식품.

#### 청구항 10

제 7항에 있어서, 상기 조성물은 지방전구세포의 세포사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 개선용 건강식품.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 멜라토닌(melatonin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물, 비만 예방 및 개선용 건강식품에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 전 세계적으로 비만 인구가 꾸준히 증가하고 있으며, 우리나라의 비만 인구는 32.7 %이며 미국의 경우 2017년 현재 성인 인구의 약 65 %가 과체중에 해당되고 있다. WHO 보고에 의하면 향후 10년 동안 비만 인구가 지금보다 50 % 증가할 것으로 예측하고 있다.

[0003] 비만은 음식물로 섭취한 에너지와 신체활동으로 소비한 에너지 간의 불균형에 의하여 과잉의 에너지가 체지방으로 축적되는 현상이다. 일반적으로 비만은 체내에 지방 조직이 과다한 상태를 의미하며, 이러한 비만 상태가 오랜 시간에 걸쳐 지속되면 당뇨병, 고지혈증, 심장병, 뇌졸중, 동맥경화증, 지방간 등의 각종 대사성질환과 성인병이 유발된다. 최근 과다한 열량 섭취와 운동 부족으로 인하여 서구 선진국뿐만 아니라 우리나라에서도 비만 인구가 급증하고 있으며 이는 심각한 사회문제로 대두 되고 있다.

[0004] 비만은 과잉의 에너지 공급이 지방세포 크기와 수의 증가를 유발하여 체내 지방으로 축적되는 것이 주된 발생원인으로 알려져 있으며, 이 외에도 유전적 요인, 서구화된 식생활에 의한 환경적 요인, 심리적 요인, 에너지 대사 이상 등 다양한 원인이 작용한다고 알려져 있다.

[0005] 전 세계적으로 비만 치료제의 개발을 위한 다각적인 측면의 연구가 진행되고 있다. 비만치료용 약물은 크게 지방흡수 억제, 지방 분해 및 열 발생 촉진, 식욕 및 포만감의 조절, 단백질 대사 저해 그리고 음식물의 섭취와

관련된 정서 조절 기전으로 나눌 수 있다. 대표적인 비만 치료제로는 오리스타트(orlistat)를 원료로 하여 지방 흡수를 억제하는 제니칼™(Xenical™)과 시부트라민(sibutramine)을 주원료로 교감신경계를 자극하여 식욕을 억제시키는 리덕틸™(Reductil™)이 있다. 그러나 제니칼™의 경우 지방변, 복부 통증, 구토, 가려움증, 간 손상 등의 부작용이 보고되어 있으며, 리덕틸™의 경우는 두통, 식욕부진, 불면, 변비 등의 부작용뿐만 아니라 심각한 심혈관계 부작용을 일으킨다는 이유로 최근 사용 기준이 강화되는 등의 논란이 일고 있다. 이러한 비만치료제를 통한 약물요법 이외에도 비만을 예방하고 치료하기 위한 방법으로 음식물의 섭취를 제한하는 식이요법, 에너지 소비를 증가시키는 운동요법이 있으며, 정신요법, 행동요법, 외과요법 등도 실시되고 있다.

[0006] 바람직한 비만의 치료 방법으로는 운동을 통한 에너지 소비 촉진과 부작용이 적은 비만치료용 약제를 병행하는 것이 가장 안전하고 효과적인 방법으로 제시되고 있다. 그러나 비만치료용 약제의 경우, 상기의 제니칼™과 리덕틸™의 예처럼 심각한 부작용들이 보고되고 있으며 안전성에 대한 명확한 신뢰가 뒷받침되지 않고 있는 실정이다. 따라서, 인체에 대해서 비만의 우수한 효능을 나타내면서도 안전성이 보장되는 소재에 대한 개발이 요구되고 있다.

[0007] 한편, 멜라토닌(melatonin)은 N-acetyl-5-methoxytryptamine으로도 알려져 있으며, 인간을 포함한 포유동물의 송과선(pineal gland)에서 분비되는 주요 신경호르몬이다. 멜라토닌은 어두울 때 분비되어 수면의 생리적 리듬(circadian rhythms), 순환 기능 및 몇몇 다른 생리 기능들을 조절한다. 또한, 멜라토닌은 효과적인 자유 라디칼 제거제이며, 멜라토닌의 대사물인 AFMK(N1-acetyl-N2-5-formyl-methoxykynuramine) 및 AMK(N1-아세틸-5-메톡시키투라민(N1-acetyl-5-methoxykynuramine)은 자유 라디칼 제거 기작을 활성화시켜 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 및 Aβ-유도성 신경퇴화에 대하여 신경보호 활성을 가지고 있다고 알려져 있으나, 멜라토닌을 포함하는 조성물의 현저한 항비만 효과에 대해서는 알려진 바 없다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 인체에 안전하고 유의적인 항비만 활성을 갖는 소재를 개발하기 위해 노력한 결과, 멜라토닌은 지방세포 분화를 유의적으로 억제하고, 지방전구세포(preadipocytes)의 세포사멸을 유도하는 효과를 나타내므로, 상기 멜라토닌을 항비만용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 멜라토닌(melatonin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항비만용 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 멜라토닌(melatonin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 아울러, 본 발명은 멜라토닌 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

### 발명의 효과

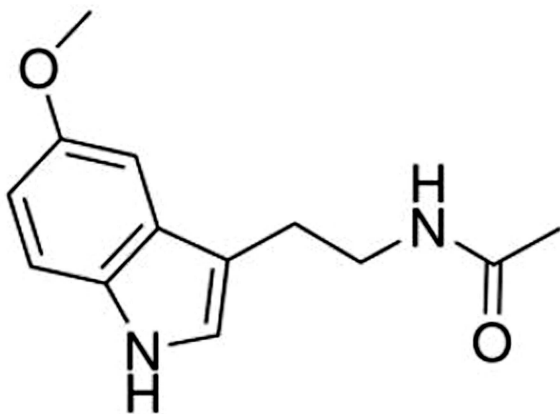
[0012] 본 발명의 멜라토닌(melatonin)은 지방전구세포(preadipocytes)의 분화를 유의적으로 억제하고, 지방전구세포의 세포사멸을 유도하는 효과를 나타내므로, 상기 멜라토닌을 항비만용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 멜라토닌을 지방전구세포에 처리하는 방법을 나타낸 도이다.
- 도 2는 멜라토닌의 지방전구세포의 분화 억제 효과를 확인한 도이다.
- 도 3은 멜라토닌의 지방전구세포의 분화 억제 작용 기전을 확인한 도이다.
- 도 4는 멜라토닌을 처리한 지방전구세포의 세포생존율을 확인한 도이다.
- 도 5는 DAPI 염색을 통한 세포 사멸 효과를 확인한 도이다.
- 도 6은 멜라토닌을 지방전구세포에 처리한 후, p-ERK 발현 변화를 확인한 도이다.
- 도 7은 멜라토닌을 지방전구세포에 처리한 후, Caspase 시리즈 단백질의 cleaved form의 발현 변화를 확인한 도이다.
- 도 8은 멜라토닌을 지방전구세포에 처리한 후, Bcl-2 및 Bax 단백질의 발현 변화를 확인한 도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 이하, 본 발명은 상세히 설명한다.
- [0015] 본 발명은 멜라토닌(melatonin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0016] 상기 멜라토닌은 하기 [화학적 1]로 기재되는 화합물로, 동물, 식물 및 미생물 등에서 자연적으로 합성되므로, 천연 물질에서 분리된 것 또는 인공적으로 합성된 것 어느 것을 사용하여도 무방하다.
- [0017] [화학적 1]



- [0018]
- [0019] 상기 멜라토닌은 지방세포로의 분화를 억제하고, 바람직하게는 지방형성(adipogenesis) 후기 단계를 억제하는 것이 바람직하다.
- [0020] 또한, 멜라토닌은 지방전구세포의 세포사멸을 유도하며, Bcl-2 단백질의 발현을 감소시키고, Bax 단백질의 발현을 증가시키는 것이 바람직하다.
- [0021] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 멜라토닌의 지방전구세포의 분화 억제 효과를 확인한 결과, 멜라토닌을 처리한 실험군에서 지방방울의 수가 유의적으로 감소하고(도 2 참조), 지방세포 분화와 관련된 단백질들의 발현이 멜라토닌 농도의존적으로 감소하며(도 3 참조), 멜라토닌의 지방전구세포 분화 억제 효과는 분화 초기단계보다 분화후기 단계에서 유의적인 효과를 나타냄을 확인하였다(도 3 참조).
- [0022] 또한, 본 발명자들은 멜라토닌의 지방전구세포 세포사멸 유도 효과를 확인한 결과, 본 발명의 멜라토닌은 지방

세포의 세포사멸을 농도의존적으로 유도하여 비만을 예방 및 치료할 수 있음을 확인하였다(도 4 내지 도 8 참조).

[0023] 결론적으로 본 발명의 멜라토닌은 지방전구세포의 분화를 유의적으로 억제하고, 지방전구세포의 세포사멸을 유도하는 효과를 나타내므로, 상기 멜라토닌을 항비만용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용할 수 있다.

[0024] 본 발명은 화학식 1로 표시되는 멜라토닌뿐만 아니라, 이의 약학적으로 허용되는 염, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 라세미체, 또는 입체이성질체를 모두 포함한다.

[0025] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 멜라토닌은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부탄-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만텔레이트를 포함한다.

[0026] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 화학식 1로 표시되는 멜라토닌을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시켜서 건조하거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0027] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0028] 상기 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.

[0029] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 화학식 1로 표시되는 멜라토닌에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스테arate 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0030] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다.

[0031] 비수성용제, 현탁용제로는 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, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.



- [0032] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0033] 구체적으로, 본 발명에 따른 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.1 mg 내지 100 mg, 바람직하게는 0.5 mg 내지 10 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0034] 아울러, 본 발명은 멜라토닌 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.
- [0035] 본 발명의 멜라토닌은 지방전구세포의 분화를 유의적으로 억제하고, 지방전구세포의 세포사멸을 유도하는 효과를 나타내므로, 상기 멜라토닌은 항비만용 건강식품의 유효성분으로도 유용하게 사용할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 멜라토닌이 첨가되는 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0037] 본 발명의 멜라토닌은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능식품 중의 상기 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0038] 본 발명에 따른 건강식품 조성물이 음료 조성물인 경우, 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 10 g이다.
- [0039] 또한, 본 발명에 따른 건강식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0040] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 제한되지 않으나, 본 발명의 멜라토닌 100 중량부 당 0.1 내지 약 1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0041] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.



[0042] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0043] <실시예 1> 세포 배양

[0044] 지방전구세포인 3T3-L1 세포를 한국세포주 은행에서 구입한 후, 10% bovine calf serum과 penicillin-streptomycin(Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)(ATCC, Manassas, VA, USA) 배지에 넣고 5% CO<sub>2</sub>, 37℃의 조건하에서 배양하였다.

[0045] 지방전구세포의 분화를 유도하기 위하여, 24-well plate에 5×10<sup>4</sup> 세포/well로 분주하고 100% confluent 상태에서 48시간 더 유지시켰다. 지방전구세포는 10% fetal bovine serum(FBS) DMEM 배지에 MDI(0.5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 1 μM dexamethasone(Calbiochem, Darmstadt, Germany), 1 μg/mL insulin(Sigma, St. Louis, MO, USA))를 3일 동안 처리하여 분화를 유도하였고, 이후에 1 μg/mL insulin이 함유된 10 % FBS DMEM으로 배지를 교체하여 2일 동안 배양하였다. 그 후 2일마다 10 % FBS DMEM 배양액으로 교체하면서 5일 추가 배양하여, 총 10일 동안 지방전구세포를 분화 유도하였다.

[0046] <실시예 2> 멜라토닌 처리

[0047] 지방전구세포에 멜라토닌 처리는 멜라토닌 농도를 토대로 0 μM, 10 μM, 100 μM, 1000 μM의 멜라토닌을 지방전구세포에 처리하였다. 멜라토닌은 DMSO에 희석하여 농도를 조절하였다.

[0048] 구체적으로, 도 1에 나타난 바와 같이 상기 <실시예 1>의 3T3-L1 지방전구세포를 배양하다가 성숙한 지방세포로 분화시키기 위하여 분화유도배지인 Induction Media와 Growing Media를 처리하였다. 이때 실험군 1(Early treatment)은 첫날 0일을 기준으로 3일 동안 멜라토닌을 0 μM, 10 μM, 100 μM, 1000 μM의 농도로 Media에 함께 처리하였다. 또한, 실험군 2(Late treatment)는 실험 전체 과정으로는 5일째 날에 3일 동안 실험군 1과 동일한 멜라토닌의 농도를 Media에 함께 처리하였다.

[0049] <실험예 1> 지방전구세포의 분화 억제 효과 확인

[0050] 멜라토닌의 지방전구세포의 분화 억제 효과를 확인하기 위하여, 상기 <실시예 2>의 8일 동안 지방세포로의 분화를 유도 과정에서 멜라토닌이 첨가된 실험군 1 및 실험군 2에서 배지를 제거한 뒤 10 % formaldehyde 용액을 30 분간 처리하여 세포를 고정시켰다. 상온에서 고정한 뒤 용액을 제거하고 phosphate-buffered saline (PBS)으로 2번 세척하고 이소프로필알코올로 2번 세척한 후 Oil Red O 용액을 이용하여 염색을 실시하였다. 염색된 세포는 광학현미경을 통해 200배 배율로 이미지를 관찰하였다.

[0051] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, Oil Red O 염색결과 멜라토닌 농도 의존적으로 염색된 지방방울의 수가 감소하였으며, 특히 분화 초기단계보다 분화후기 단계에서 멜라토닌을 처리한 실험군에서 지방방울의 수가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(도 2).

[0052] <실험예 2> 지방전구세포의 분화 억제 작용 기전 확인

[0053] 지방전구세포의 분화 억제 효과가 어떠한 작용기전에 의해 유도되는지 확인하기 위해 상기 <실험예 1>과 동일한 방법으로, 총 10일 동안 지방세포로의 분화를 유도하는 과정에서 멜라토닌이 첨가된 실험군 1 및 실험군 2에서 배지를 제거한 뒤, PBS로 세척 후 세포를 수확하였다. 이를 protease inhibitor(1 mM PMSF, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 mM NaF)가 포함된 RIPA buffer(Sigma)로 1시간 동안 ice에서 용해시킨 뒤 4℃에서 13,000 rpm으로 15분간 원심 분리하였다. 원심분리하여 얻어진 상층액은 9% SDS polyacrylamide gel로 전기영동을 통해 단백질을 분리한 뒤 PVDF membranes(Whatman, Dassel, Germany)으로 transfer하였다. 1차 항체는 anti-PPAR $\gamma$  및 anti-C/EBP $\alpha$  (1:1000, Cell signaling, Danvers, Massachusetts, USA)을 사용하였고 2차 항체로는 HRP-conjugated anti-rabbit (1:5000)을 사용하였다. 각각의 단백질 발현양은 SuperSignal west pico chemiluminescent substrate(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)와 Amersham image 600(GE Healthcare Life Sciences,

Chicago, IL, USA)을 통해 분석하였다.

[0054] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 지방전구세포 분화와 관련된 단백질들의 발현이 멜라토닌 농도의존적으로 감소하고, 또한 멜라토닌의 지방전구세포 분화 억제 효과는 분화 초기단계보다 분화후기 단계에서 유의적인 효과를 나타냄을 확인하였다(도 3).

[0055] 따라서, 본 발명의 멜라토닌은 지방전구세포의 분화후기단계에서 지방세포형성 억제를 통한 항비만 효과를 나타냄을 확인하였다.

### [0056] <실험예 3> 지방전구세포 세포사멸 효과 확인

#### [0057] <3-1> 지방전구세포 배양

[0058] 지방전구세포인 3T3-L1 세포를 한국세포주 은행에서 구입한 후, 5% calf serum(Gibco, USA) 및 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 DMEM 배지에 넣고 5% CO<sub>2</sub>, 37℃의 조건하에서 humidified incubator에서 배양하였다. 그런 다음, 상기 세포는 5% calf serum 및 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 DMEM에서 성장시키고, 96-well 마이크로플레이트에 5×10<sup>3</sup> 세포/well로 분주한 후 밤새 배양하고, 0 μM, 10 μM, 100 μM, 1000 μM의 멜라토닌을 각각 1, 3, 또는 5일 동안 처리하였다.

#### [0059] <3-2> 세포 생존율 확인

[0060] 멜라토닌의 지방전구세포 세포 사멸 유도 효과를 확인하기 위하여, 세포 생존율을 EZ-Cytox Cell viability assay kit(DAEIL Lab, Seoul, Korea)를 이용하여 확인하였다.

[0061] 구체적으로, 상기 실험예 <3-1>의 멜라토닌을 각각 1, 3, 5일 동안 세포에 처리한 후, WST reagent solution을 96-well 마이크로플레이트의 각각의 well에 첨가하였다. 그런 다음, 상기 마이크로플레이트는 37℃에서 1시간 동안 배양한 후, 마이크로플레이트 리더를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0062] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 멜라토닌을 각각 1, 3, 5일 처리군 모두에서 멜라토닌 농도의존적으로 세포 생존율이 감소하는 것을 확인하였다(도 4).

#### [0063] <3-3> DAPI 염색을 통한 세포 사멸 효과 확인

[0064] 상기 실험예 <3-1>의 1000 μM의 멜라토닌을 5일 동안 세포에 처리한 후 DAPI 염색 시약을 처리하여 핵을 염색하고 형광현미경으로 확인하였다.

[0065] 구체적으로, 세포를 4-well 플레이트에 1×10<sup>4</sup> 세포/well로 분주한 후 밤새 배양하고, 0 μM, 10 μM, 100 μM, 1000 μM의 멜라토닌을 각각 1, 3, 또는 5일 동안 처리하였다. 그런 다음, 상층액을 제거하고, 세포를 4% 포름알데하이드로 고정시키고, 상온에서 5분 동안 1 μg/mL DAPI 용액을 첨가한 후, DAPI-염색된 세포를 형광현미경으로 확인하였다.

[0066] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 멜라토닌을 처리하지 않은 군은 세포가 온전하고 핵이 동그랗게 보이지만(도 5a), 멜라토닌을 5일 동안 처리한 군은 세포사멸로 인해 핵이 잘게 쪼개져서 분해된 것을 확인하였다(도 5b).

#### [0067] <3-4> 세포사멸 관련 단백질의 발현 변화 확인

[0068] 멜라토닌을 다양한 농도로 각각 1, 3, 5일 동안 지방전구세포에 처리한 후 세포사멸과 관련된 단백질의 발현 변화를 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다.

[0069] 구체적으로, 웨스턴 블랏은 ERK (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); p-ERK (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology); Caspase-9 (1:1000) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA); Caspase-8 (1:1000) (Cell Signaling Technology); Caspase-3 (1:1000) (Cell Signaling Technology); Bcl-2 (1:1000)

(Santa Cruz Biotechnology); Bax (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology), and GAPDH (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology)을 사용하는 것을 제외하고는 상기 <실험예 2>와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0070] 그 결과, 도 6 및 도 7에 나타난 바와 같이, 세포활성과 생존에 관련된 p-ERK 발현이 멜라토닌 농도의존적으로 감소하고(도 6), 세포사멸로 증가하는 Caspase 시리즈 단백질의 cleaved form은 멜라토닌 농도의존적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 7).

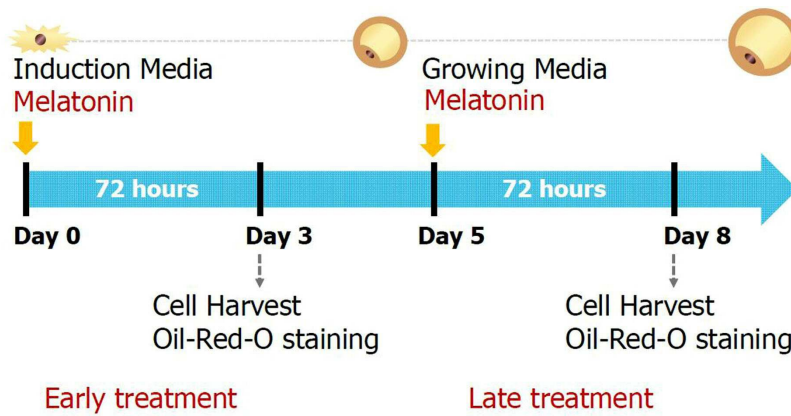
[0071] 또한, 도 8에 나타난 바와 같이 세포사멸을 억제하는 Bcl-2는 멜라토닌 농도의존적으로 감소하고, 세포사멸을 유도하는 Bax는 멜라토닌 농도의존적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 8).

[0072] 따라서, 본 발명의 멜라토닌은 지방세포의 세포사멸을 억제하여 비만을 예방 및 치료할 수 있음을 확인하였다.

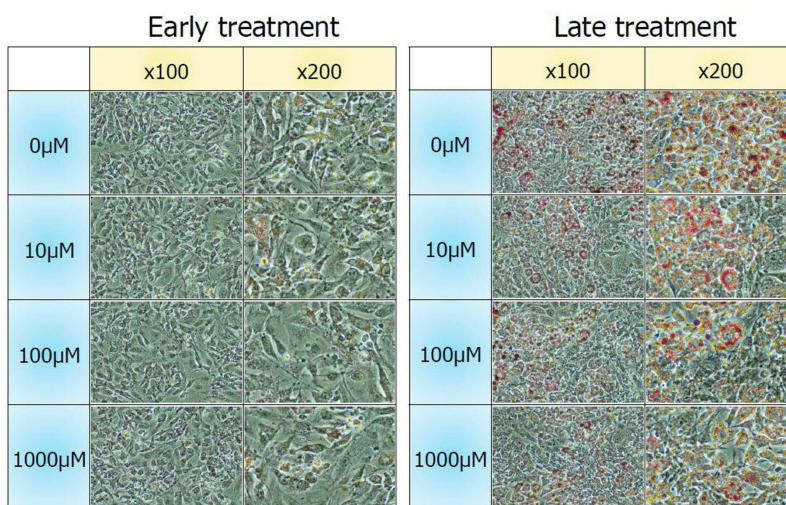
[0073]

## 도면

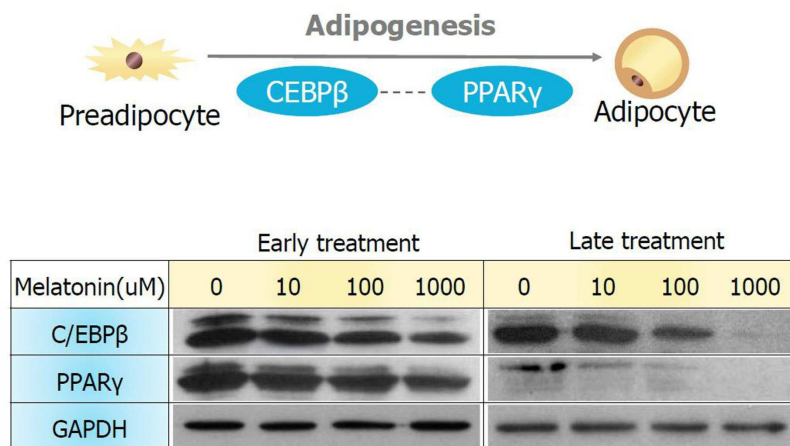
### 도면1



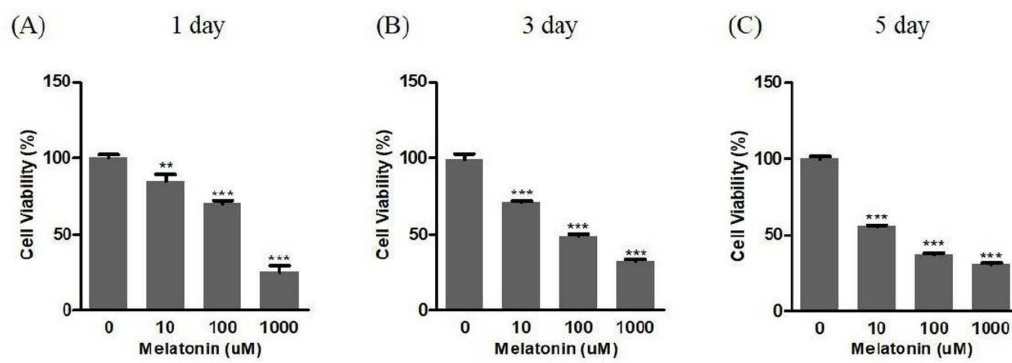
### 도면2



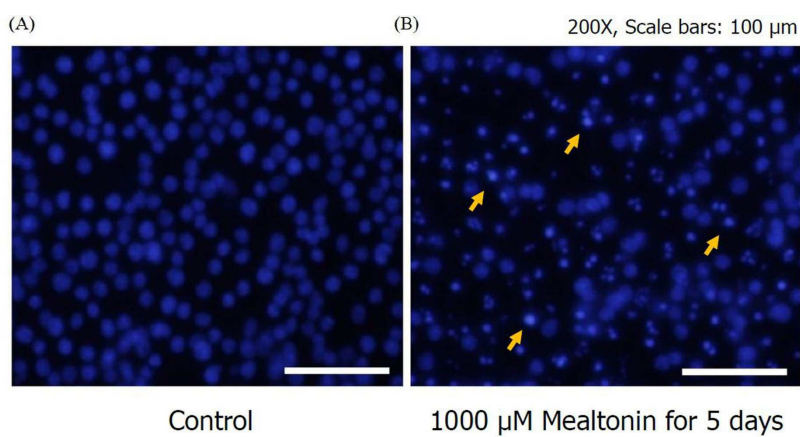
도면3



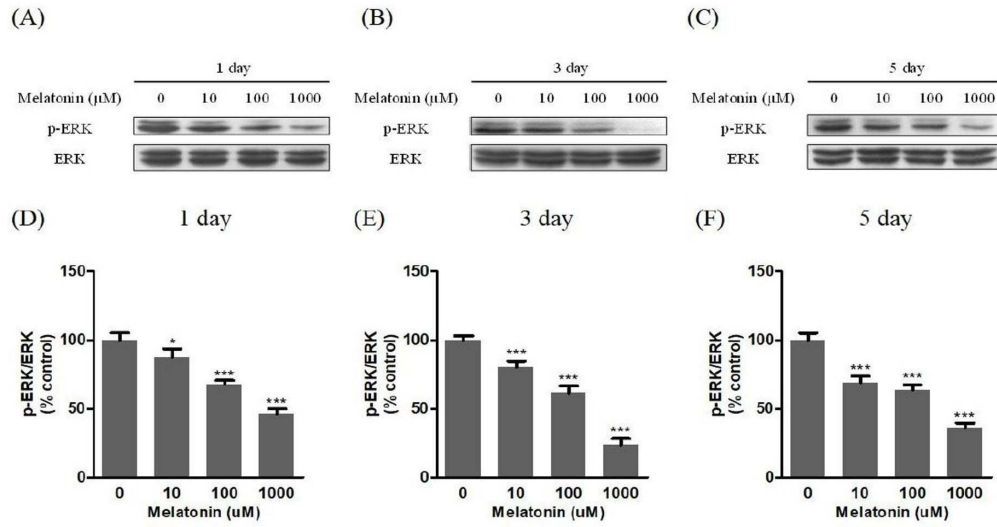
도면4



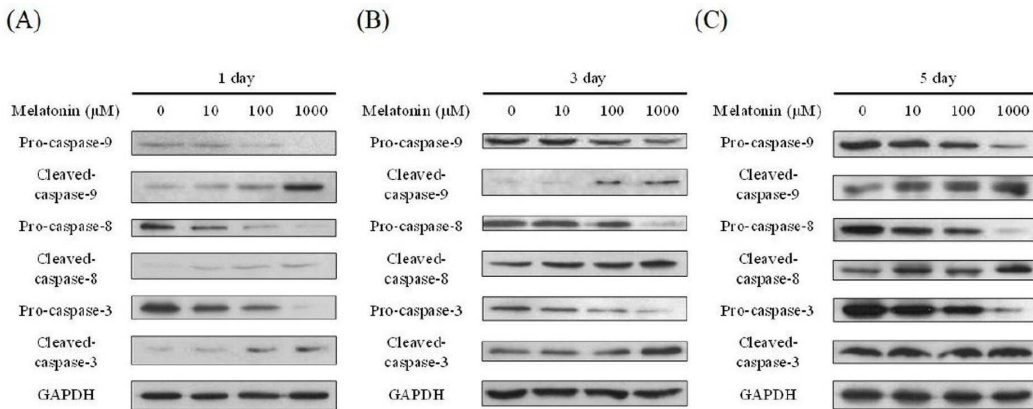
도면5



도면6



도면7



도면8

