(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년11월04일
(11) 등록번호 10-2028532
(24) 등록일자 2019년09월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07F 9/28 (2006.01) *A61K 31/66* (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01) *C07C 11/24* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0142143
(22) 출원일자 2012년12월07일
심사청구일자 2017년12월07일
(65) 공개번호 10-2014-0074015
(43) 공개일자 2014년06월17일
(56) 선행기술조사문헌
Nature, 1990, 347, p. 645-650
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001, 98, p. 5306-5311

(73) 특허권자
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
강헌중
서울특별시 서초구 서초대로33길 84-24 , B동 602호 (방배동, 상지4차)
김희영
서울 관악구 관악로 1, 관악사 902동 102호 (신림동, 서울대학교)
백경렬
경기 용인시 수지구 상현로 59, 151동 1102호 (상현동, 금호베스트빌1차아파트)
(74) 대리인
특허법인 플러스

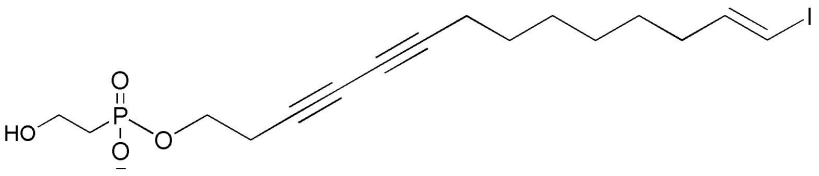
전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 방성철

(54) 발명의 명칭 **퍼록시솜 증식자 활성화 수용체 리간드 폴리아세틸렌 유도체 및 이들 화합물의 용도**

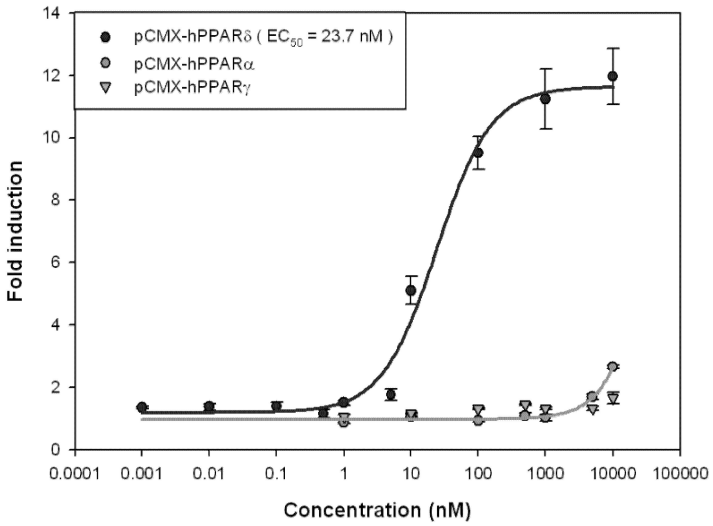
(57) 요 약

본 발명은 퍼록시솜 증식자 활성화 수용체 (Peroxisome Proliferator Activated Receptor, 이하 'PPAR'로 표시함)에 활성을 갖는 하기 화학식 I의 구조로 표시되는 신규한 폴리아세틸렌 유도체, 그의 수화물, 그의 용매화물, 그의 입체 이성체, 그의 약학적으로 허용되는 염 및 이를 포함하는 의약, 화장품 조성물, 기능성 식품, 기능성 음료 및 동물용 사료로서의 용도에 관한 것이다.

[화학식 I]



대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 0552-20120001
부처명 국토해양부
연구관리전문기관 KIMST-해양과학기술진흥원
연구사업명 해양생명공학사업
연구과제명 해양천연물신약개발사업
기 여 율 1/1
주관기관 서울대학교
연구기간 2004.10.01 ~ 2013.12.31

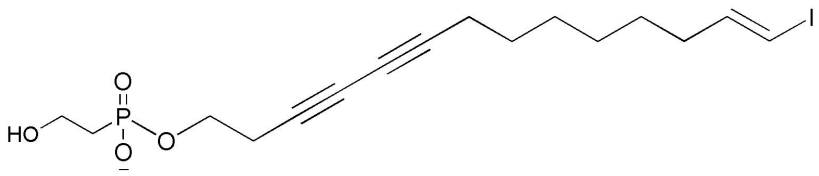
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 I의 폴리아세틸렌 유도체, 그의 수화물, 그의 용매화물, 그의 입체 이성체 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

[화학식 I]



청구항 2

제 1항의 화학식 I 으로 표시되는 폴리아세틸렌 유도체, 그의 수화물, 그의 용매화물, 그의 입체 이성체 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 하는 동맥경화증 또는 고지혈증 치료 및 예방용, 고콜레스테롤증 치료 및 예방용, 지방간 치료 및 예방용, 당뇨병 치료 및 예방용, 비만 치료 및 예방용, 근육강화용, 근질환 치료 및 예방용, 지구력증진용, 기억력 증진용, 상처 치료용, 치매 또는 파킨슨병 치료 및 예방용 의약 조성물.

청구항 3

제 1항의 화학식 I 으로 표시되는 폴리아세틸렌 유도체, 그의 수화물, 그의 용매화물, 그의 입체 이성체 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 하는 기능성 식품 보조제, 기능성 음료, 식품첨가물, 또는 동물용 사료용 조성물.

청구항 4

제 1항의 화학식 I 으로 표시되는 폴리아세틸렌 유도체, 그의 수화물, 그의 용매화물, 그의 입체 이성체 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 하는 비만 예방 및 비만 개선, 지방간 개선 및 예방, 상처 개선, 근육강화, 근질환 개선 또는 지구력 증진을 위한 기능성 화장품 조성물.

청구항 5

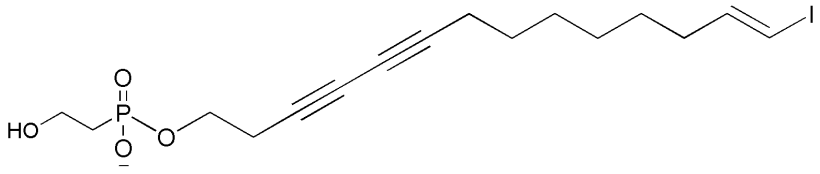
삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 비만, 고지혈증, 지방간, 동맥경화, 당뇨병, 근질환, 치매 및 파킨슨병와 상처 치료 및 근육강화, 기억력 증진, 등에 사용될 수 있는 퍼록시솜 증식자 활성화 수용체 (Peroxisome Proliferator Activated Receptor : PPAR) 활성화 리간드인 하기 화학식 I 의 폴리아세틸렌 유도체 화합물, 그의 수화물, 그의 용매화물, 그의 입체 이성체, 그의 약학적으로 허용되는 염 및 이를 포함하는 의약, 화장품 조성물, 기능성 식품 및 동물용 사료로서의 용도에 관한 것이다.

[0002] [화학식 I]



[0003]

배 경 기 술

[0004] 핵 수용체 중 퍼록시솜 증식자 활성화 수용체(Peroxisome Proliferator Activated Receptor: PPAR)는 3종의 subtype인 PPARα, PPARɣ, PPARδ가 알려져 있다(*Nature*, **1990**, *347*, p645-650., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, p7335-7359). PPARα, PPARɣ 와 PPARδ는 생체 내 조직에 따른 구별된 기능을 가지며, 발현부위 또한 차이를 보인다. PPARα는 인간에서 심장, 신장, 골격근, 대장에서 주로 발현 되고(*Mol. Pharmacol.* **1998**, *53*, p14-22., *Toxicol. Lett.* **1999**, *110*, p119-127, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, p16710-16714), 퍼록시좀(peroxisome)과 미토콘드리아의 β-산화와 관련이 있다(*Biol. Cell.* **1993**, *77*, p67-76., *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, p27307-27312). PPARɣ는 골격근에서는 약하게 발현되나, 지방조직에서는 다량으로 발현되어 지방세포의 분화와 에너지를 지방형태로 저장, 그리고, 인슐린과 당의 항상성 조절에 관여를 하는 것으로 알려져 있다(*Moll. Cell.* **1999**, *4*, p585-594., p597-609., p611-617). PPARδ는 생식세포의 발현과정 중 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(*Genes Dev.* **1999**, *13*, p1561-1574.), 중추신경계(Central Nervous System: CNS)에서 신경세포의 분화(*J. Chem. Neuroanat* **2000**, *19*, p225-232), 소염효과를 통한 상처의 치유(*Genes Dev.* **2001**, *15*, p3263-3277, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, p6295-6296) 등의 생리적 기능을 수행하는 것으로 보고되었다. 최근 연구에 의하면 PPARδ가 지방세포 분화 및 지방의 대사 작용에 관련 있다는 것이 증명되었는데(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, p303-308., *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, p5119-5128), 이는 PPARδ가 지방산 분해과정에서 β-oxidation과 관련된 핵심유전자와 에너지 대사와 관련된 유전자인 uncoupling proteins (UCPs)의 발현을 활성화하여 비만을 개선하고, 지방간을 치료하며, 근지구력을 향상시키는 것으로 밝혀졌다(*Nature* **2000**, *406*, p415-418, *Cell* **2003**, *113*, p159-170, *PLoS Biology* **2004**, *2*, e294, *Cell*, **2008**, 134, 405415). 또한 PPARδ를 활성화하면 HDL을 높이고, 체중변화가 없는 상태에서 제2형 당뇨병을 개선시키며(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, p5306-5311, **2003**, *100*, p15924-15929, **2006**, *103*, p3444-3449), 동맥경화 질환 관련 유전자를 억제시켜 동맥경화 치료도 가능하다 (*Science*, **2003**, *302*, p453-457, *PNAS*, **2008**, 105, 42714276). 따라서 PPARδ을 선택적으로 활성화시키는 물질은 비만, 당뇨, 고지혈증, 징방간, 동맥경화, 치매, 파킨슨병 및 상처를 치료할 수 있는 신약으로 개발될 수 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005]

(비특허문헌 0001) Nature, 1990, 347, p645-650

(비특허문헌 0002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, p7335-7359

(비특허문헌 0003) Mol. Pharmacol. 1998, 53, p14-22

(비특허문헌 0004) Toxicol. Lett. 1999, 110, p119-127

(비특허문헌 0005) J. Biol. Chem. 1998, 273, p16710-16714

(비특허문헌 0006) Biol. Cell. 1993, 77, p67-76

(비특허문헌 0007) J. Biol. Chem. 1997, 272, p27307-27312

(비특허문헌 0008) Moll. Cell. 1999, 4, p585-594., p597-609., p611-617

(비특허문헌 0009) Genes Dev. 1999, 13, p1561-1574.

(비특허문헌 0010) J. Chem. Neuroanat 2000, 19, p225-232

(비특허문헌 0011) Genes Dev. 2001, 15, p3263-3277

(비특허문헌 0012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003, 100, p6295-6296

(비특허문헌 0013) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002, 99, p303-308

(비특허문헌 0014) Mol. Cell. Biol. 2000, 20, p5119-5128

(비특허문헌 0015) Nature 2000, 406, p415-418

(비특허문헌 0016) Cell 2003, 113, p159-170

(비특허문헌 0017) PLoS Biology 2004, 2, e294

(비특허문헌 0018) Cell, 2008, 134, 405415

(비특허문헌 0019) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001, 98, p5306-5311

(비특허문헌 0020) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003, 100, p15924-15929

(비특허문헌 0021) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006, 103, p3444-3449

(비특허문헌 0022) Science, 2003, 302, p453-457

(비특허문헌 0023) PNAS, 2008, 105, 42714276

발명의 내용

해결하려는 과제

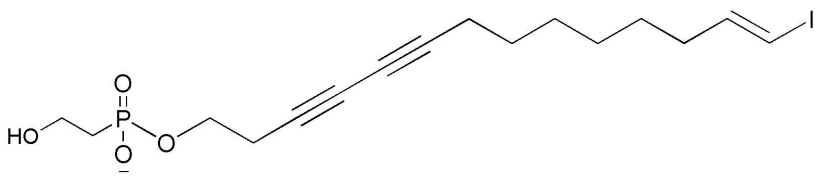
[0006] 본 발명에서는 퍼록시솜 증식자 활성화 수용체(Peroxisome Proliferator Activated Receptor δ, 이하 'PPARδ'로 표시함)에 선택적 활성을 갖는 리간드(ligands)가 대사성 질환(비만, 지방간, 당뇨, 동맥경화, 고지혈증 등), 신경성 질환(치매 및 파킨슨씨병), 근질환 및 상처 치료제와 기능성 화장품, 기능성 식품, 기능성 음료 및 동물용 사료 등의 유효성분으로서 이용될 수 있으므로 해면동물로부터 PPARδ에 선택적 활성을 갖는 신규한 화합물을 분리 정제하고자 하였다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 PPARδ에 선택적 활성화도가 높은 신규한 화합물을 제공하는 것이며, 또한, 본 발명의 목적은 해양해면류 *Placospongia* sp. 로부터 신규한 화합물을 분리하는 방법을 제공하는 것이며, 또한 본 발명에 따른 신규 화합물을 포함하는 의약, 화장품 조성물, 기능성 식품, 기능성 음료 및 동물용 사료의 유효성분으로서의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 퍼록시솜 증식자 활성화 수용체 (Peroxisome Proliferator Activated Receptor, 이하 'PPAR'로 표시함)에 활성을 갖는 하기 화학식 I의 구조로 표시되는 신규한 폴리아세틸렌 유도체, 그의 수화물, 그의 용매화물, 그의 입체 이성체, 그의 약학적으로 허용되는 염, 해양해면류 *Placospongia* sp.로부터 신규한 화합물을 분리하는 방법 및 이를 포함하는 의약, 화장품 조성물, 기능성 식품, 기능성 음료 및 동물용 사료로서의 용도에 관한 것이다.

[0009] [화학식 I]

[0010] 

[0011] 본 발명에 따른 화학식 I의 폴리아세틸렌 유도체는 해양해면류 *Placospongia* sp. 로부터 분리되어지며, 상기 화학식 I의 폴리아세틸렌 유도체는 해양에 서식하는 해면동물인 *Placospongia* sp.를 동결 건조하여 수분을 완전히 제거한 후, 메탄올과 디클로로메탄 혼합용매로 추출하여 감압하에서 용매를 증발시킨 후, 그 잔류물을 n-헥산과

메탄올로 분배추출하여 얻어진 메탄올 층의 용매를 증발시킨 후 이를 다시 에틸아세테이트(EtOAc)와 물로 분배추출하고 얻어진 에틸아세테이트 층의 용매를 다시 증발시킨 잔류물로부터 분리되는 것으로, 상기 잔류물은 에틸아세테이트와 n-헥산의 배합을 단계적으로 달리 해준 용리액을 사용하여 순상 실리카 플래시 컬럼 크로마토그래피로 1차 정제된 후, 아세토니트릴과 물의 배합을 단계적으로 달리 해준 용리액을 사용하여 C18 역상 고성능 액체 크로마토그래피로 2차 정제되어 화학식 I의 폴리아세틸렌 유도체를 수득한다.

[0012] 본 발명에 따른 상기 화학식 I 으로 표시되는 폴리아세틸렌 유도체, 그의 수화물, 그의 용매화물, 그의 입체 이성체 또는 그의 약학적으로 허용되는 염은 퍼록시솜 증식자 활성화 수용체 (Peroxisome Proliferator Activated Receptor: PPAR)를 활성화시킴으로서 동맥경화증 또는 고지혈증 치료 및 예방용, 고콜레스테롤증 치료 및 예방용, 지방간 치료 및 예방용, 당뇨병 치료 및 예방용, 비만 치료 및 예방용, 근육강화용, 근질환 치료 및 예방용, 지구력증진용, 기억력 증진용, 상처 치료용, 치매 또는 파킨슨병 치료 및 예방용 의약 조성물과 기능성 식품 보조제, 기능성 음료, 식품첨가물, 기능성 화장품 및 동물용 사료 조성물로서 유용하다. 또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 I 으로 표시되는 폴리아세틸렌 유도체, 그의 수화물, 그의 용매화물, 그의 입체 이성체 또는 그의 약학적으로 허용되는 염은 비만 예방 및 비만 개선, 지방간 개선 및 예방, 상처 개선, 근육강화, 근질환 개선 또는 지구력 증진을 위한 기능성 화장품 조성물로서 유용하고, 근육강화, 근질환 개선 및 지구력 증진을 위해서 상기 기능성 화장품 조성물은 연고제형이나, 로션 또는 크림제형으로서 운동전/후 원하는 신체부위에 도포할 수 있으며, 원하는 효과를 달성하기 위하여 장기간 사용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 I 으로 표시되는 폴리아세틸렌 유도체, 그의 수화물, 그의 용매화물, 그의 입체 이성체 또는 그의 약학적으로 허용되는 염은 당뇨병 또는 diabetic ulcer라 불리는 당뇨로 인한 족부궤양증을 예방 또는 치료하기 위하여 연고제형으로 제형화되어 신체의 각 부위에 도포될 수 있다.

[0013] 본 발명에 따른 상기 화학식 I 으로 표시되는 폴리아세틸렌 유도체, 그의 수화물, 그의 용매화물, 그의 입체 이성체 또는 그의 약학적으로 허용되는 염은 퍼록시솜 증식자 활성화 수용체 (Peroxisome Proliferator Activated Receptor : PPAR)의 활성화제 조성물로서 유용하다.

[0014] 상기 약학적으로 허용하는 염은 상기 화학식 I 으로 표시되는 폴리아세틸렌 유도체와 염을 이룰 수 있고 약학적으로 허용되는 유기염을 모두 포함하며, 무기염으로는 알칼리금속 및 알칼리토금속이온으로서 Li^{+}, Na^{+}, K^{+}, Ca^{2+}, Mg^{2+} 등이 바람직하다.

[0015] 본 발명에 따른 활성화합물인 상기 화학식 I 으로 표시되는 폴리아세틸렌 유도체, 그의 수화물, 그의 용매화물, 그의 입체 이성체 또는 그의 약학적으로 허용되는 염의 양은 물론 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 다양하게 조절될 수 있으나, 보다 바람직하게는 상기 화학식 I 으로 표시되는 폴리아세틸렌 유도체의 유효투입량은 0.0001 mg/Kg 내지 1000 mg/Kg(몸무게)/1일 범위 내에서 투여된다. 그리고, 1일 유효투입량 범위 내에서 하루에 한번 또는 하루에 여러 번 나누어 투입한다. 또한, 제형에 따라 경구투여 또는 국소 투여용 모두 가능하다. 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 경구투여 경우 기존의 모든 다양한 형태로 제조가능하며 예를 들어 정제, 분말제, 건조시럽, 씹을 수 있는 정제, 과립제, 츄잉정, 캡슐제, 연질캡슐제, 환제, 드링크제, 설하정 등의 여러 가지 형태로 존재할 수 있다. 본 발명에 따른 정제는 유효량으로 생체이용성이 있는 임의의 형태 또는 방식, 즉, 경구경로로 환자에게 투여될 수 있으며, 치료 또는 예방하려는 질병 상태의 특성, 질병의 단계, 및 그 밖의 관련 사정에 따라 적합한 투여 형태 또는 방식을 용이하게 선택할 수 있으며, 본 발명에 따른 조성물이 정제인 경우 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함할 수 있으며, 이러한 부형제의 비율 및 성질은 선택된 정제의 용해도 및 화학적 특성, 선택된 투여경로 및 표준 약제 실무에 의해 결정될 수 있다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 화학식 I의 폴리아세틸렌계 화합물은 신규 화합물로, 해양해면류 *Placospongia* sp.로부터 추출되며, 퍼록시솜 증식자 활성화 수용체(PPAR)에 대하여 매우 우수한 활성을 가지므로, 동맥경화증 또는 고지혈증 치료 및 예방용, 고콜레스테롤증 치료 및 예방용, 지방간 치료 및 예방용, 당뇨병 치료 및 예방용, 비만 치료 및 예방용, 근육강화용, 근질환 치료 및 예방용, 지구력증진용, 기억력 증진용, 상처 치료용, 치매 또는 파킨슨병 치료 및 예방용 의약 조성물과 기능성 식품 보조제, 기능성 음료, 식품첨가물, 기능성 화장품 및 동물용 사

료 조성물의 유효성분으로 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1 -시험예 1에서 트랜스팩션 어세이(Transfection assay)를 통한 화학식 I 화합물의 PPAR 활성 그래프

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 실시예를 이용하여 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로서 본 발명은 하기 실시예에 의해 한정되지 않고 다양하게 수정 및 변경될 수 있다.

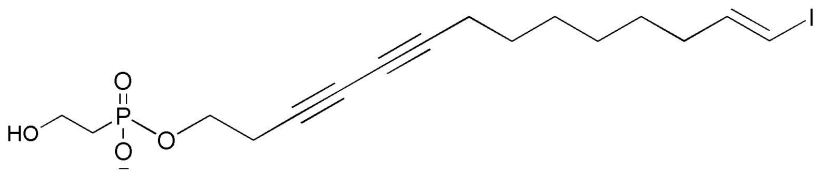
[0019] **[실시예]**

[0020] 신규화합물인 화학식 I의 폴리아세틸렌 유도체는 하기 실시예 1에 기재된 바와 같이 분리되었다. 세포독성은 MTT 분석으로 측정되었고, 화학식 I의 폴리아세틸렌 유도체는 PPARδ에 매우 선택적이었다.

[0021] **[실시예 1] 화학식 I의 폴리아세틸렌 유도체의 추출, 정제 및 동정**

[0022] 동결 건조된 해면[*Placospongia* sp., 940 g]을 작은 조각으로 절단하였다. 상기 시료는 각각 1:1 부피비율의 메탄올과 디클로로메탄 혼합용매를 가하여 12시간 동안 상온에서 3차례에 걸쳐 추출되었다. 상기 추출액을 여과하여 합한 뒤 실온에서 용매를 감압 증발시켜 제거하고, n-헥산과 메탄올로 3차례에 걸쳐 분배 추출하였다. 메탄올 층의 용매를 감압 하에서 제거한 후, 다시 에틸아세테이트(EtOAc)와 물로 3차례에 걸쳐 분배 추출하였다. 상기한 과정에서 얻어진 에틸아세테이트 층의 용매를 감압 하에서 제거하였다. 상기 잔류물은 순상 실리카 플래쉬 컬럼크로마토그래피 상에서 에틸아세테이트와 n-헥산의 단계적 구배 용매 시스템으로 용리시켜 10개의 분획(fraction)을 얻었다. 상기 10개의 분획 중에서 에틸아세테이트 70% 로 용출된 분획을 C-18 역상 고성능 액체크로마토그래피(YMC ODS C-18, 입자직경 5um, 250 × 10 mm, 자외선검출기, 용출 속도 2.5 ml/min) 상에서 40% 아세토니트릴 수용액으로 용리시켜, 머무름시간 15분 용출물을 감압 하에서 용매를 제거하여 무정형 고체 상태로 화학식 I의 폴리아세틸렌 유도체를 7.0 mg으로 얻었다.

[0023] [화학식 I]

[0024] 

[0025] 상기 얻어진 신규한 폴리아세틸렌계 화합물의 동정(同定)과정은 ^{1}H-NMR(nuclear magnetic resonance; 핵자기공명), ^{13}C-NMR 및 HRFABMS 실험결과를 분석함으로써 이루어졌다. ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, COSY, HSQC 및 HMBC 실험을 통하여 화학구조를 결정하였다.

[0026] 화학식 I의 폴리아세틸렌 유도체는 무정형의 고체로 분리되었고 분자식은 HRFABMS 데이터를 기초로 하여 $C_{16}H_{23}O_4PI$로 결정되었다. ^{13}C 스펙트럼에서 네 개의 완전히 치환된 탄소의 화학적 이동값 (δ_C 73.1, 66.1, 64.8, 77.1)으로부터 다이엔 유닛을 확인하였다. 또한 C-1, C-2, C-1', C-2' 카본 커플링 컨스탄트 (5~133 Hz)로부터 분자 내 인이 존재하며, J = 133.4 를 가지는 C-1'는 인과 직접 본드를 이루는 것을 확인하였다. 마지막으로 C-13의 화학적 이동값 (δ_H 6.52, δ_C 146.5)과 C-14의 화학적 이동값 (δ_H 6.10, δ_C 73.6)으로부터 요오드가 C-14에 붙어 있음을 알 수 있다. 따라서 화합물 1의 구조는 (*E*)-14-아이오도테트라데카 13-엔-3,5-다인-1-일(2-하이드록시 에틸)포스페이트로 결정되었다.

[0027] 화학식 I의 폴리아세틸렌 유도체 : ^{1}H NMR (700 MHz, DMSO-d_6) δ 6.52 (dt, 14.4, 7.1), 6.10 (d,14.4), 3.94 (dt, 7.0, 6.8), 3.14 (dt, 13.2, 7.5), 2.60 (t, 6.6), 2.25 (t, 6.9), 2.07 (qd, 6.7, 1.0), 1.89 (dt, 17.4, 7.5), 1.50 (q, 7.5), 1.43 (m), 1.39 (m), 1.32 (m). ^{13}C NMR (175 MHz, DMSO-d_6) δ 146.5, 77.1, 73.6, 73.1, 66.1, 64.8, 61.9, 35.5, 35.5, 28.2, 28.0, 28.0, 27.9, 24.5, 21.2, 18.2.

[0028] **[시험예 1] 활성 및 독성 시험**

[0029] 트랜스팩션 어세이(Transfection assay)를 통하여 본원발명의 화학식 I 화합물의 PPARδ 활성을 확인하였다. PPAR subtype 사이의 선택성은 PPARα와 PPARɣ에 대한 활성 실험을 통하여 확인하였다. MTT assay를 통하여 화학식 I 화합물의 독성 검증을 수행하였다.

[0030] **[Transfection assay]**

[0031] CV-1세포를 이용하여 assay를 수행하였으며, 세포배양은 5%의 이산화탄소가 포함된 37℃ 배양기에서 10% FBS, DBS(delipidated)와 1% 페니실린/스트렙토마이신을 넣은 DMEM 배지를 이용하여 96 웰 플레이트에서 수행하였다. 실험은 세포 접종, 트랜스팩션, 본 발명의 화학식 I의 폴리아세틸렌 유도체 처리, 결과 확인의 4단계 나누어 수행하였다. CV-1세포를 96웰 플레이트에 5,000 cell/well로 접종하고, 24시간 후에 트랜스팩션 하였다. full length의 PPARs 플라스미드 DNA와 루시퍼라제 활성(Luciferase activity)을 가지고 있어서 PPARs의 활성을 확인할 수 있는 Reporter DNA, Transfection 효율 정보를 제공해 줄 β-galactosidase DNA를 Transfection Reagent를 이용하여 수행하였다. 본 발명의 화학식 I의 폴리아세틸렌 유도체를 디메틸설폭시드(DMSO)에 녹였으며, media를 이용하여 다양한 농도로 세포에 처리하였다. 24시간 동안 인큐베이터에서 배양한 후, lysis buffer를 이용하여 세포를 용해하였고, Luminometer와 microplate reader를 이용하여 luciferase와 β-galactosidase 활성을 측정하였다. 측정된 luciferase 값은 β-galactosidase 값을 이용하여 보정하였으며, 이 값을 이용하여 그래프를 그리고, EC_{50}값을 구하였다.

표 1

[0032] PPAR에 대한 EC_{50} 값

화합물	hPPARδ	hPPARα	hPPARɣ
화학식 I의 폴리아세틸렌 유도체	23.7 nM	>10	>10

[0033] 상기 표 1에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 화학식 I의 폴리아세틸렌 유도체는 PPARδ에 매우 선택적이다.

[0034] **[MTT assay]**

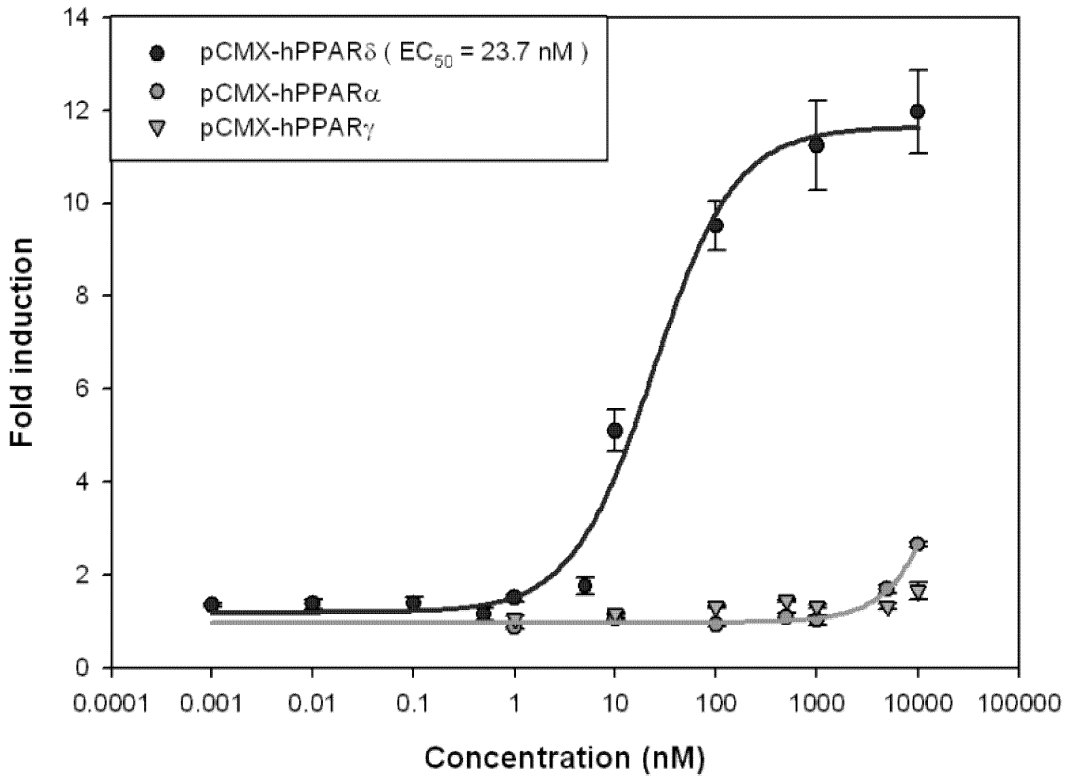
[0035] 본 발명에 따른 화학식 I의 폴리아세틸렌 유도체에 대한 독성 Test는 MTT assay를 이용하여 실시하였다. MTT는 물에 용해되는 노란색의 물질이나, 살아있는 세포에 유입될 경우 미토콘드리아에 있는 탈수소효소에 의해 물에 용해되지 않는 보라색의 결정으로 변성된다. 이 물질을 디메틸설폭시드에 용해시킨 후, 550 nm에서 흡광도를 측정하면 세포 독성을 확인할 수 있다. 실험방법은 다음과 같다.

[0036] 먼저 CV-1 세포를 96웰 플레이트에 5,000 cell/well로 접종하였다. 24시간 동안 5%의 이산화탄소가 함유된 가습된 37℃ 배양기에서 배양한 후, 화학식 I의 폴리아세틸렌 유도체를 다양한 농도로 배양한 CV-1세포에 넣어준다. 다시 24시간 동안 배양을 하고, MTT 시약을 넣어주었다. 15분 정도 배양한 후, 생성된 보라색의 결정을 디메틸설폭시드에 용해시킨 다음, microplate reader를 사용하여 흡광도를 측정하였고, 이것으로부터 세포독성을 확인하였다.

[0037] 실험 결과, 본 발명에 따른 화학식 I의 폴리아세틸렌 유도체는 PPARδ에 대한 EC_{50} 농도보다 1000배 이상의 농도에서도 독성이 나타나지 않았다.

도면

도면1



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 제3항

【변경전】

제 1항의 화학식 I 으로 표시되는 폴리아세틸렌 유도체, 그의 수화물, 그의 용매화물, 그의 입체 이성체 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 하 는 기능성 식품 보조제, 기능성 음료, 식품첨가물 및 동물용 사료용 조성물.

【변경후】

제 1항의 화학식 I 으로 표시되는 폴리아세틸렌 유도체, 그의 수화물, 그의 용매화물, 그의 입체 이성체 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 하 는 기능성 식품 보조제, 기능성 음료, 식품첨가물, 또는 동물용 사료용 조성물.