(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년09월14일
(11) 등록번호 10-1898610
(24) 등록일자 2018년09월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/426 (2006.01) *A61K 31/427* (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0087596
(22) 출원일자 2011년08월31일
심사청구일자 2016년08월31일
(65) 공개번호 10-2012-0023569
(43) 공개일자 2012년03월13일
(30) 우선권주장
1020100085085 2010년08월31일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020060094922 A*
KR1020080065234 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
강헌중
서울특별시 서초구 남부순환로297라길 9, 401호 (방배동)
황후상
경기도 군포시 당산로 102, 202호 (금정동, 일흥빌라)
진정욱
서울특별시 송파구 올림픽로 212, A동 738호 (잠실동, 갤러리아팰리스)
(74) 대리인
특허법인 플러스

전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 이형준

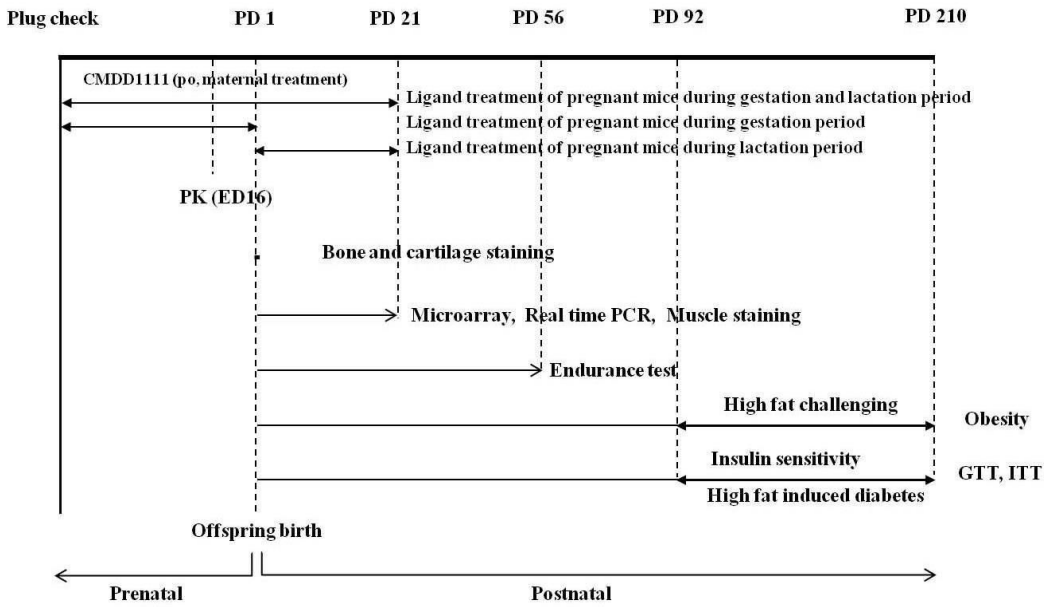
(54) 발명의 명칭 **ＰＰＡＲδ 활성물질의 태자 재프로그래밍 용도**

(57) 요 약

본 발명은 피피에이알 델타(PPARδ) 활성물질(agonist)의 새로운 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 PPARδ 활성물질의 태자 재프로그래밍(fetal reprogramming) 효능에 대한 것이다. 본 발명에 따르면, PPARδ 활성물질은 태자 발생 및 초기 발육 시기에 칼슘이온을 조절하여 지근 섬유를 증가시켜 근 지구력을 향상시킴으로써 지질 및

(뒷면에 계속)

대 표 도



당 대사능력을 향상시키고 몸 전체의 대사를 재프로그래밍(metabolic reprogramming)하여 성인 또는 성체에서 고지방 식이 및 운동 부족에 의한 비만당뇨 등의 대사성 질환의 발병을 예방/억제하고, 기억력을 증가시킨다. 또한 PPARδ 활성물질을 이용한 태자 재프로그래밍은 당뇨 질환모델 마우스에서도 당뇨의 발병을 예방/억제시킨다. 따라서 PPARδ 활성물질은 태아/태자 재프로그래밍에 의한 인간 및 동물의 지구력 증진, 비만·당뇨·동맥경화·지방간 등의 대사성질환 예방/억제, 기억력 증진을 목적으로 하는 의약 조성물, 임산부용 보조제, 식품첨가제, 기능성 식품 보조제 또는 기능성 음료 조성물, 동물용 의약 조성물, 동물용 지구력 증진제, 분유 및 이유식 조성물, 동물사료 조성물 등으로 사용할 수 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	D10402010H320000110
부처명	국토해양부
연구관리전문기관	한국해양과학기술진흥원
연구사업명	해양생명공학사업
연구과제명	해양천연물신약연구개발
기 여 율	1/1
주관기관	서울대학교
연구기간	2010.01.01 ~ 2010.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

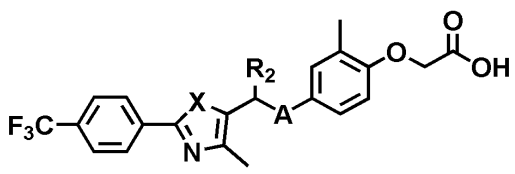
청구항 11

삭제

청구항 12

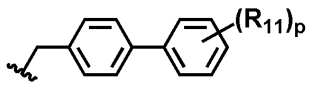
하기 화학식 V로 나타내어지는 화합물을 임신기, 수유기 또는 임신수유기의 포유동물 모체에 투여하여 출산 또는 생산된 개체의 근 지구력 향상을 가져오기 위한 의약 조성물.

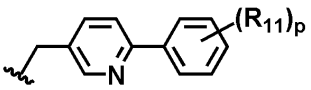
[화학식 V]

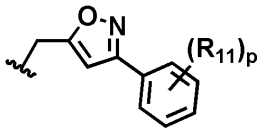


[상기 화학식 V에서 A는 황(S)이며;

R_2은 하기 구조로부터 선택되며;







X는 황(S)이며;

R_{11}은 수소, 할로겐 또는 C_1-C_5의 알킬이며;

p는 1-5의 정수이고;

상기 R_{11}의 알킬은 하나 이상의 할로겐이 더 치환될 수 있다.]

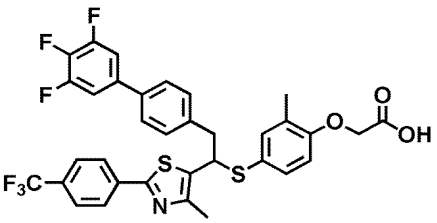
청구항 13

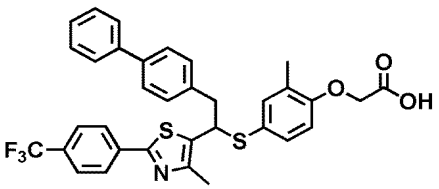
삭제

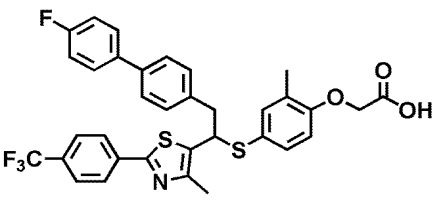
청구항 14

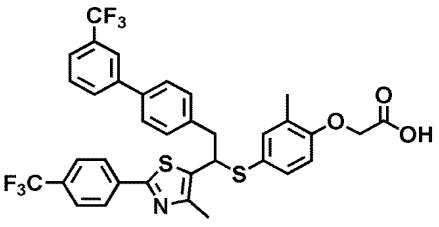
제12항에 있어서,

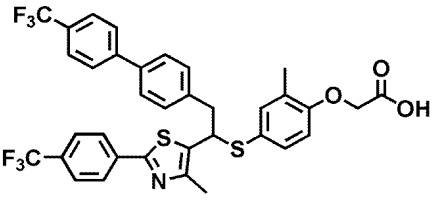
상기 화학식 V의 화합물은 하기 구조의 화합물들로부터 선택되는 것인, 의약 조성물.

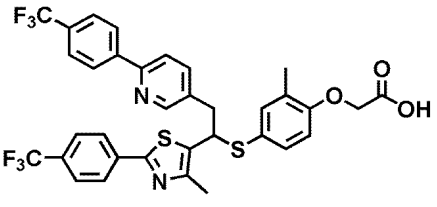


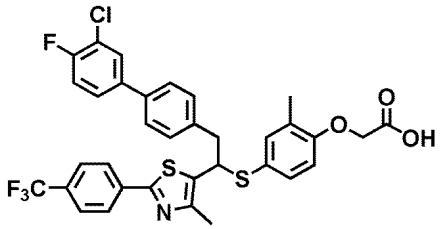


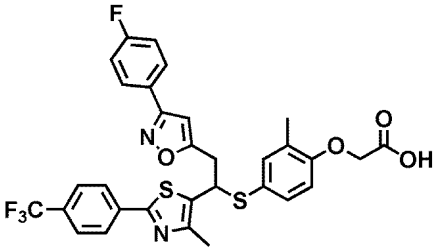








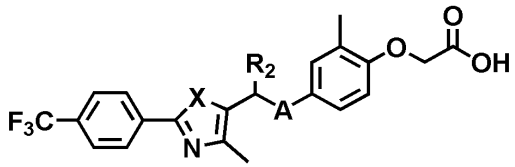




청구항 15

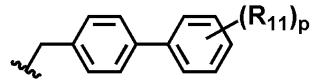
화학식 V로 나타내어지는 유도체, 그의 수화물, 그의 용매화물, 그의 입체 이성체 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

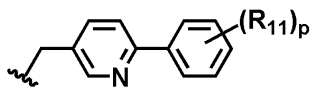
[화학식 V]

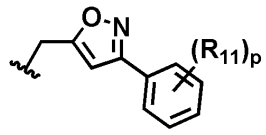


[상기 화학식 V에서 A는 황(S)이며;

R_2은 하기 구조로부터 선택되며;







X는 황(S)이며;

R_{11}은 수소, 할로겐 또는 C_1-C_5의 알킬이며;

p는 1-5의 정수이고;

상기 R_{11}의 알킬은 하나 이상의 할로겐이 더 치환될 수 있다.]

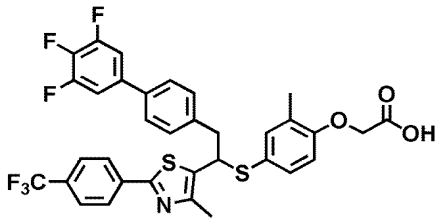
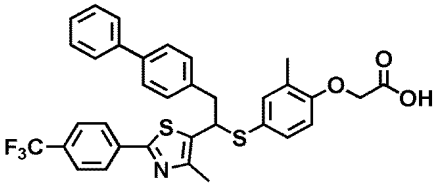
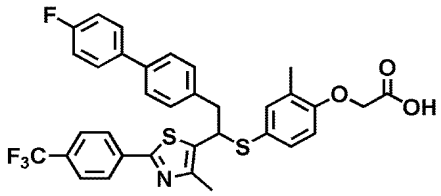
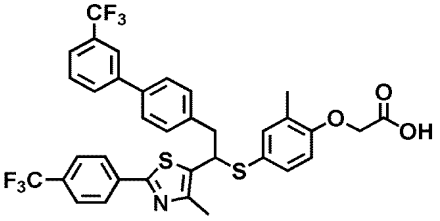
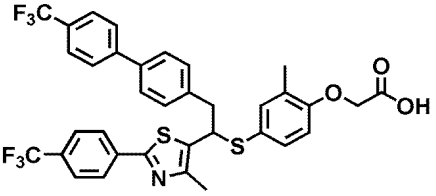
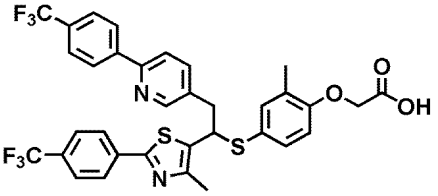
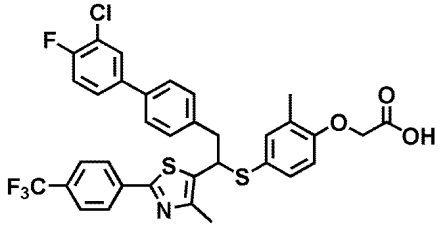
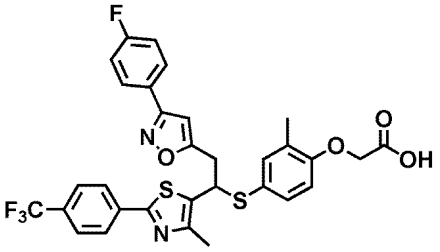
청구항 16

삭제

청구항 17

제15항에 있어서,

하기 구조의 화합물들로부터 선택되는 유도체, 그의 수화물, 그의 용매화물, 그의 입체 이성체 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 18

제15항의 화학식 V의 유도체, 그의 수화물, 그의 용매화물, 그의 입체 이성체 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 근육강화용, 근질환 치료 및 예방용 또는 지구력증진용 의약 조성물.

청구항 19

제15항의 화학식 V의 유도체, 그의 수화물, 그의 용매화물, 그의 입체 이성체 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 근 지구력 향상용 기능성 식품 보조제, 기능성 음료 또는 식품첨가물 조성물.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

제15항의 화학식 V의 유도체, 그의 수화물, 그의 용매화물, 그의 입체 이성체 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 근 지구력 향상용 동물용 사료용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 피피에이알 델타(PPARδ) 활성물질(agonist)의 태자 재프로그래밍(fetal reprogramming) 효능에 관한 것으로, 보다 상세하게는 태자 발생 또는 초기 발육 시기에 칼슘이온을 조절하여 지근 섬유를 증가시켜 근 지구력을 향상시킴으로써 지질 및 당 대사능력을 향상시키고 몸 전체의 대사를 재프로그래밍(metabolic reprogramming)하여 성인 또는 성체에서 고지방 식이 및 운동 부족에 의한 비만당뇨 등의 대사성 질환의 발병을 예방/억제하고, 기억력을 증진시키는 PPARδ 활성물질의 새로운 용도에 관한 것이다. 본 발명에 의하면 PPARδ 활성물질은 정상 마우스에서의 태자 재프로그래밍 뿐만 아니라, 선천적으로 당뇨질환을 가지고 있는 마우스의 경우에서도 당뇨의 발병을 예방/억제함으로써 인간 및 동물에서 태자 재프로그래밍을 통한 비만, 당뇨 등과 같은 대사성질환 예방 및 조숙아 치료에 효과적이며, 인간 및 동물의 지구력 및 기억 증진에 효과적이다.

배 경 기 술

[0002] 골격근(Skeletal muscle)은 수축 속도와 대사 특성에 따라 지근과 속근으로 나눌 수 있다(Schiaffino & Reggiani *Physiol. Rev.*, 1996, 76, 371-423). 속근인 Type II muscle은 에너지원으로 포도당을 사용하며, 단거리 달리기와 같이 빠른 움직임을 필요로 하는 근육에 많이 존재한다. 이와 달리 지근은 주요 에너지원으로 지

방을 사용하며, 지속된 운동을 하는 근육에 많이 존재한다. 지근은 속근에 비해 미토콘드리아를 많이 가지고 있기 때문에 속근에 비해 붉게 보이며, 운동 시 젖산에 의한 피로에 저항성을 가지고 있어서 지구력을 필요로 하는 운동에 적합하다(Costill, DL. *et al.*, *J. Appl. Pysiol.*, 1976, 40, 149-154; Saltin B *et al.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1977, 301, 3-44). 또한 지근은 속근에 비해 지방산 산화 능력 및 인슐린 민감성이 크기 때문에, 고지방(부피비율 35% 지방) 사료 섭취에도 비만 및 당뇨와 같은 대사성 질환의 발병이 현저히 억제되었다(Wang, YX. *et al.*, *PlosBiol.*, 2004, 2, e294; Vihang A. Narkar *et al*, *Cell*, 2008, 134, 405-415).

[0003] 속근의 지근화(Fast-to-slow muscle fiber transformation)에 관여하는 유전자로는 Calcineurin(Serrano, AL. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2001, 98, 13108-13113), calmodulin-dependentkinase(Wu, H. *et al.*, *Science.*, 2002, 296, 349-352), PGC-1α(Lin, J. *et al.*, *Nature.*, 2002, 418, 797-801), AMPK(Vihang A. Narkar *et al*, *Cell*, 2008, 134: 405-415), Sirt1 및 Adiponectin(Masato Iwabu *et al.*, *Nature*, 2010, 464, 1313-1319), PPARδ(Wang, YX. *et al.*, *PlosBiol.*, 2004, 2, e294) 등이 알려져 있다. 그 중 PPARδ는 과다발현이나 이 유전자의 선택적인 제거 연구를 통해서 이 유전자가 속근의 지근화에 매우 중요한 조절자임이 밝혀져 있다. PPARδ는 지근에 많이 발현되는 리간드(ligand) 의존적 전사인자이다. 근육 특이적인 PPARδ 형질전환마우스(transgenic mice)의 경우 지근섬유의 생성이 현저히 증가되었으며, 이로 인해 달리는 시간과 거리가 각각 67%, 92%가 증가된다는 결과가 보고되어 있다(Wang, YX. *et al.*, *PlosBiol.*, 2004, 2. e294). 반면, PPARδ 유전자가 선택적으로 제거된 마우스의 경우 정상 마우스에 비해 달리는 시간이 62% 감소하였으며, 달린 거리 역시 66% 감소한다는 것이 보고되었다(Wang, YX. *et al* .,*PlosBiol.*, 2004, 2. e294). 따라서, PPARδ가 지근 생성 및 운동능력 조절에 중요한 유전자임을 알 수 있다.

[0004] 하지만 PPARδ의 활성물질(agonist)을 이용한 연구결과에서는 기존 연구에 의한 예측과 전혀 다른 결과가 보고되었다. GW501516은 현재까지 문헌에 보고된 PPARδ 활성물질 중 가장 효능이 우수한 물질이다(William R. Oliver, Jr. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2001, 98, 5306-5311). 이 물질을 이용한 실험에서 기존 PPARδ 형질전환 마우스를 이용한 결과와 다른 결과가 보고되었다. 즉, 성체에 GW501516의 단독 투여만으로는 지근 및 지구력 향상 효과가 나타나지 않으며, 운동과 GW501516 투여를 동시에 조합했을 경우에만 지근 생성 및 지구력이 증진되었다(Vihang A. Narkar *et al*, *Cell*, 2008, 134, 405-415). 따라서 현재까지 PPARδ 활성물질(agonist)만으로 지구력 향상 효능을 입증한 예가 없다.

[0005] 태자 프로그래밍(fetal programming)이란, 임신기에 태자에 노출된 환경이 태아와 성인의 건강을 결정한다는 것으로, 처음 영국 사우스 햄튼과 킹스 컬리지에서 처음 논의된 학설이며, 현재 발생 프로그래밍(developmental programming), 태아 발생 프로그래밍(fetal developmental programming)이라는 용어로 혼용 사용되고 있다. 좀 더 자세히 정의하자면, 발생과정에 태자에 노출된 환경이 태자의 기관 및 장기의 형성에 영향을 주게 되고, 이러한 변화가 삶의 전반에 걸쳐 영향을 미치는 것을 의미한다(Mc-Millen and Robinson, *Physiol Rev.*, 2005, 85, 571-633; Plagemann, *Horm Res.*, 2006, 65, 8389; Taylor and Poston, *Exp Physiol*, 2007, 92, 287298). 역학조사 결과에 의하면 태자 프로그래밍시기에 적정 영양분 보다 과잉공급을 받거나 혹은 적게 공급을 받게 되면, 성체가 되었을 때 비만, 심혈관 질환, 당뇨, 고혈압, 동맥경화, 암 등과 같은 심각한 질환의 발병이 증가한다는 것이 보고되어 있다. 따라서 현재 이를 예방하고자 다양한 연구가 진행되고 있으며, 대표적인 예로 타우린(taurine) 등이 있다. 발생기간 중 타우린을 섭취하면 당뇨 발병에 억제되는 것이 알려져 있고(Cherif *et al.*,*J Endocrinol.*, 1998, 159, 341-348), arginine의 경우 당뇨와 심혈관계 이상(cardiovascular disorder)이 개선되는 것이 알려져 있다(Wu *et al.*, *J Nutr.*, 2004, 134, 2169-2172). 또한 유산 억제를 위해 산모가 많이 복용하고 있는 엽산(folic acid)의 경우도 당뇨의 예방에 효과적인 것으로 알려져 있다(Lillycrop *et al.*, *J Nutr.*, 2005, 135, 1382-1386). 매우 흥미롭게도 GLP-1의 활성물질로서 당뇨 치료효과를 가지고 있는 exedin-4를 쥐(rat)의 발생기간에 투여한 결과 산화스트레스(oxidative stress)가 감소하고, 이에 따라 태자의 당뇨가 예방될 수 있음이 보고되었다(Stoffers DA *et al.*, *Diabetes*. 2003, 52, 734-740; Raab EL *et al.*, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2009, 297, 1785-1794).

[0006] 본 발명자들은 PPARδ 활성물질(agonist)의 태자 재프로그래밍 효능을 입증하여 본 발명을 완성하였다. 본 발명에서는 임신기 및 수유기에 어미에게 활성물질을 투여하는 방법(maternal treatment)을 사용하여 PPARδ의 효능을 확인하였다. 그 결과, PPARδ의 활성물질만으로도 칼슘이온을 조절하여 지근 생성이 증가하였다. PPARδ 활성물질에 의해 태자 재프로그래밍이 된 새끼 마우스는 성체로 성장 후, 더 이상 PPARδ 활성물질을 투여 받거나 운동을 시키지 않았음에도 불구하고 지구력이 크게 향상되었다. 또한 고지방 섭취 및 운동 부족에 의한 비만 및 당뇨와 대사성질환의 발병이 현저히 예방 또는 억제되었으며, 기억력을 증진시키는 새로운 효능이 입증되었다. 더욱이 정상 마우스뿐만 아니라, 선천적당뇨 질환모델인 db/db 마우스의 경우에서도 PPARδ의 활성물질만으로

태자의 출생 후 성체에서 당뇨 발병이 예방/억제되는 것을 입증하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007]

(비특허문헌 0001) Schiaffino & Reggiani Physiol. Rev., 1996, 76, 371-423

(비특허문헌 0002) Costill, DL. et al., J. Appl. Pysiol., 1976, 40, 149-154

(비특허문헌 0003) Saltin B et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1977, 301, 3-44

(비특허문헌 0004) Wang, YX. et al., PlosBiol., 2004, 2, e294

(비특허문헌 0005) Vihang A. Narkar et al, Cell, 2008, 134, 405-415

(비특허문헌 0006) Serrano, AL. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2001, 98, 13108-13113

(비특허문헌 0007) Wu, H. et al., Science., 2002, 296, 349-352

(비특허문헌 0008) Lin, J. et al., Nature., 2002, 418, 797-801

(비특허문헌 0009) Masato Iwabu et al., Nature, 2010, 464, 1313-1319

(비특허문헌 0010) William R. Oliver, Jr. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2001, 98, 5306-5311

(비특허문헌 0011) Mc-Millen and Robinson, Physiol Rev., 2005, 85, 571-633

(비특허문헌 0012) Plagemann, Horm Res., 2006, 65, 8389

(비특허문헌 0013) Taylor and Poston, Exp Physiol, 2007, 92, 287298

(비특허문헌 0014) Cherif et al.,J Endocrinol., 1998, 159, 341-348

(비특허문헌 0015) Wu et al., J Nutr., 2004, 134, 2169-2172

(비특허문헌 0016) Lillycrop et al., J Nutr., 2005, 135, 1382-1386

(비특허문헌 0017) Stoffers DA et al., Diabetes. 2003, 52, 734-740

(비특허문헌 0018) Raab EL et al., Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 2009, 297, 1785-1794

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 PPARδ 활성물질의 태자 재프로그래밍 효능에 관한 것으로, 인간 및 동물의 발생과정에서 화합물을 이용하여 PPARδ 단백질의 활성을 증가시킴으로써 지근 섬유를 증가시키고 지구력을 증가하여 대사질환의 발병을 원천적으로 예방 또는 감소시키며, 기억력을 증진시키는 것이다. 본 발명에서는 운동 없이 오직 PPARδ 활성물질만을 이용하여 인간이나 동물의 지근 섬유를 증가시켜 지구력을 크게 향상시키고, 몸 전체의 대사를 재프로그래밍하여 대사성질환(metabolic diseases)의 발병을 원천적으로 예방 또는 억제시켰으며, 기억력을 증진시킨 것이 기존 발명(WO 2009/086526, WO2008/083330)에서 보고된 바와 완전히 차별되는 것이다. 더욱 진보적인 것은 PPARδ의 태자 재프로그래밍 효능이 선천적으로 당뇨질환을 가지고 태어나는 마우스의 경우에서도 정상 마우스와 동일하게 나타난다는 것이다.

[0009] 즉, 본 발명의 목적은 유효성분으로서 퍼옥시좀 증식인자 활성화 수용체 δ(peroxisome proliferator activated receptor δ, PPARδ) 활성제(agonist)를 포함하는, 포유동물의 태자 재프로그래밍(fetal reprogramming)용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 인간을 제외한 포유동물에게 PPARδ 활성제를 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 포유동물의 태자 재프로그래밍 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 PPARδ 활성제를 포함하는, 인간을 포함하는 포유동물의 태자 재프로그래밍 방법에 의해 생산된 개체의 근 지구력 향상, 대사성 질환 예방, 또는 기억력 증진용 식품 첨가제, 기능성 식품 보조제 또는 기능성 음료 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 첨가제로서 PPARδ 활성제를 포함하는, 포유동물의 태자 재프로그래밍 방법에 의해 생산된 개체의 근 지구력 향상, 대사성 질환 예방, 또는 기억력 증진용 사료 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 첨가제로서 PPARδ 활성제를 포함하는, 포유동물의 태자 재프로그래밍 방법에 의해 생산된 개체의 근 지구력 향상, 대사성 질환 예방, 또는 기억력 증진용 분유 또는 이유식 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 유효성분으로서 PPARδ 활성제를 포함하는, 인간을 포함하는 포유동물의 태자 재프로그래밍 방법에 의해 생산된 개체의 지구력 증진제을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 유효성분으로서 PPARδ 활성제를 포함하는, 인간을 제외하는 포유동물의 태자 재프로그래밍 방법에 의해 생산된 개체의 지구력 증진제을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 신규한 PPARδ 활성물질, 그의 수화물, 그의 용매화물, 그의 입체 이성체 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 제공하는 것이고, 또 다른 목적은 상기 신규한 PPARδ 활성물질을 유효성분으로 포함하는 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, 치매 또는 파킨슨병 치료 및 예방용 의약 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 다른 목적은 상기 신규한 PPARδ 활성물질을 유효성분으로 포함하는 기능성 식품 보조제, 기능성 음료, 식품첨가물 및 동물용 사료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 다른 목적은 상기 신규한 PPARδ 활성물질을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 및 비만 개선, 지방간 예방 및 개선, 근육강화, 근질환 예방 및 개선 또는 지구력 증진을 위한 기능성 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0020] 본 발명은 포유동물의 발생 시기 동안 PPARδ 활성물질의 태자 재프로그래밍 효능에 관한 것으로, 인간을 포함한 모든 동물의 발생 시기에 PPARδ 활성물질에 의한 태자 재프로그래밍을 통하여 근 지구력 증진, 비만당뇨동맥경화지방간 등의 대사성질환 예방 및 억제, 기억력 증진 효능에 관한 것이다.

[0021] 본 발명자들은 임신한 어미에 약물을 투여하는 방법(maternal treatment) 및 수유시기에 어미에 투여하는 방법을 이용하였다. 하지만 본 발명은 언급된 두 가지 방법에 한정되지 않으며, 본 발명에서 사용한 투여 방법 이외의 다른 경로를 통한 PPARδ 태자 재프로그래밍 방법을 모두 포함한다. 예를 들면 어미를 통해 태자의 PPARδ 발현과 활성을 증가시키는 방법, 분유와 이유식 등의 형태로 태자에게 직접 PPARδ의 발현과 활성을 증가시키는 방법을 모두 포함한다. 또한 본 발명에 사용된 활성물질[CMDD1111, 1112, 1226] 뿐만 아니라 PPARδ 활성물질을 유효성분으로 하는 임신한 동물어미 및 임신부용 주사제, 복용제, 피부 투과용 연고제제, PPARδ 활성물질을 함유하는 음료, 식품을 이용한 PPARδ 태자 재프로그래밍을 모두 포함한다.

[0022] 기존 연구결과에서는 성체에게 PPARδ의 활성물질을 경구 투여한 후, 근섬유의 변화를 확인해 보았으나, 지근생성이 증가하지 않았다(Vihang A. Narkar *et al*, *Cell*, 2008, 134, 405-415). 본 발명에서는 임신 중에 PPARδ의 활성물질을 어미에만 투여하거나 또는 수유시기에 어미에 투여하였음에도 불구하고, 태어난 태자의 지근크게 증가하였다. 따라서 PPARδ에 의한 태자 재프로그래밍 결과는 주로 지근의 증가로 나타나며, 가장 중요한 작용 시기는 근육형성기(myogenesis) 임을 알 수 있다.

[0023] 지근은 지방산 산화, 미토콘드리아 생합성, slow myosin heavy chain 및 slow contraction에 관련된 단백질이 증가되어 있는 특징을 가진다. PPARδ에 의해 태자 재프로그래밍이 이루어진 마우스는 상기 모든 유전자군의 발현이 증가되었다. 또한 근육의 외형 비교 및 조직 염색결과에서도 PPARδ 활성물질에 의해 지근의 형성이 증가된 것을 확인 할 수 있었다. 위 두 실험을 종합하여 볼 때, PPARδ 활성물질에 의한 태자 재프로그래밍은 지근형성을 촉진시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0024] 칼슘은 속근의 지근화를 촉진시키는 주요 조절자로 알려져 있다. 본 발명자들의 연구 결과에 의하면, PPARδ 활성물질에 의한 태자 재프로그래밍 결과, 마우스의 근육에서 세포질 칼슘 농도를 조절하는 RYR, ATP2A2, PLN 등의 유전자 발현이 현저히 증가되었고, 이에 따라 세포질 내 칼슘이온의 지속시간이 크게 증가되었다. 이러한 세포 내 칼슘이온 증가는 칼슘 신호를 활성화시켜 지근의 생성을 증가시켰다.

[0025] 본 발명에서 지근이 증가한 마우스는 대조군 쥐에 비해 2.9배의 운동시간이 증가하였다. 작용 기작을 밝혀내기 위하여 골격근 조직을 이용한 유전자 분석(microarray) 실험을 수행하였다. 그 결과, 투여군 마우스 집단에서 심장근육에 많이 발현된다고 알려진 RYR2, ATP2A2, PLN, MYBPC3 등의 유전자 발현이 현저히 증가한 것을 확인하였다. 위 결과를 종합해 볼 때, PPARδ 활성물질에 의한 태자 재프로그래밍은 마우스에서 근 기능 개선뿐만 아니라, 심장 기능의 개선도 동시에 가져왔다.

[0026] 본 발명의 가장 큰 의미는 PPARδ 활성 화합물에 의한 태자 재프로그래밍을 통해 성장 후 인간이나 동물의 건강과 삶의 질을 향상시킬 수 있다는 것이다. PPARδ에 의해 태자 재프로그래밍이 된 마우스는 성체가 된 이후 PPARδ 활성 화합물의 투여하거나 운동을 시키지 않았음에도 불구하고, 성체가 되었을 때 지근 발생 및 지구력이 현저히 증가하였으며, 고지방 및 운동 부족에 의한 비만 및 당뇨 질환과 같은 대사성 증후군의 발병이 현저히 억제되었다.

[0027] 비만은 단지 당뇨뿐만 아니라, 고지혈증, 동맥경화, 심근경색과 같은 대사성 질환의 직접적인 발병 원인이다. 따라서 본 발명은 PPARδ 활성물질에 의한 태자 재프로그래밍을 통해 지방 대사 능력이 증가된 마우스는 비단 비만뿐만 아니라, 모든 대사증후군(metabolic syndrome)에 대한 예방 효과를 가져 올 수 있다.

[0028] 지근은 속근에 비해 많은 미토콘드리아를 함유하고 있다. 미토콘드리아는 모계 유전되는 특성을 가지고 있다. 따라서 PPARδ 활성물질에 의해 태자 재프로그래밍이 이루어져 미토콘드리아가 증가된 마우스는 다음 세대의 미토콘드리아 형성에 영향을 줄 수 있으며, PPARδ 활성물질을 전혀 투여 받지 않은 후대의 지구력 증가 및 대사성 증후군 발병을 미연에 예방할 수 있다.

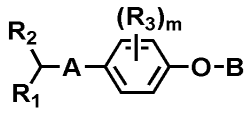
[0029] 즉, 본 발명은 유효성분으로서 퍼옥시좀 증식인자 활성화 수용체 δ(peroxisome proliferator activated receptor δ, PPARδ) 활성제(agonist)를 포함하는, 포유동물의 태자 재프로그래밍(fetal reprogramming)용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 인간을 제외한 포유동물에게 PPARδ 활성제를 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 포유동물의 태자 재프로그래밍 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 PPARδ 활성제를 포함하는, 인간을 포함하는 포유동물의 태자 재프로그래밍 방법에 의해 생산된 개체의 근 지구력 향상, 대사성 질환 예방, 또는 기억력 증진용 식품 첨가제, 기능성 식품 보조제 또는 기능성 음료 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 첨가제로서 PPARδ 활성제를 포함하는, 포유동물의 태자 재프로그래밍 방법에 의해 생산된 개체의 근 지구력 향상, 대사성 질환 예방, 또는 기억력 증진용 사료 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 첨가제로서 PPARδ 활성제를 포함하는, 포유동물의 태자 재프로그래밍 방법에 의해 생산된 개체의 근 지구력 향상, 대사성 질환 예방, 또는 기억력 증진용 분유 또는 이유식 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 유효성분으로서 PPARδ 활성제를 포함하는, 인간을 포함하는 포유동물의 태자 재프로그래밍 방법에 의해 생산된 개체의 지구력 증진제를 제공한다. 또한, 본 발명은 유효성분으로서 PPARδ 활성제를 포함하는, 인간을 제외하는 포유동물의 태자 재프로그래밍 방법에 의해 생산된 개체의 지구력 증진제를 제공한다.

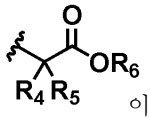
[0030] 본 발명에서 말하는 PPARδ 활성물질을 예시하면 아래와 같다, 하지만, 본 발명은 이하 예시된 물질에만 국한되지 않으며, 모든 PPARδ 활성물질에 적용된다[PPARδ 활성물질 예시: WO 2010/039789, WO 2010/028761, WO 2010/023572, WO 2010/009215, WO 2010/009212, WO 2010/009210, WO 2010/008299, WO 2009/155709, WO 2009/140342, WO 2009/136290, WO 2009/114173, WO 2009/098000, WO 2009/097999, WO 2009/097998, WO 2009/097997, WO 2009/097995, WO 2009/091550, WO 2009/078981, WO 2009/039944, WO 2009/039943, WO 2009/039942, WO 2009/027785, WO 2009/024287, WO 2009/016216, WO 2009/006483, WO 2008/144925, WO 2008/135141, WO 2008/122014, WO 2008/115574, WO 2008/104557, WO 2008/089892, WO 2008/085316, WO 2008/079293, WO 2008/070150, WO 2008/060476, WO 2008/058631, WO 2008/058630, WO 2008/058629, WO 2008/058628, WO 2008/052658, WO 2008/017381, WO 2008/000484, WO 2007/131622, WO 2007/131621, WO 2007/131620, WO 2007/131619, WO 2007/130075, WO 2007/121432, WO 2007/110216, WO 2007/110215, WO 2007/107869, WO 2007/105050, WO 2007/105049, WO 2007/089857, WO 2007/089667, WO 2007/087448, WO 2007/087204, WO 2007/059871, WO 2007/056496, WO 2007/056210, WO 2007/047432, WO 2007/033231, WO 2007/016538, WO 2006/137796, WO 2006/137795, WO 2006/124490, WO 2006/123185, WO 2006/123184, WO 2006/123183, WO 2006/123182, WO 2006/113919, WO 2006/111321, WO 2006/111261, WO 2006/104826, WO

2006/102067, WO 2006/098912, WO 2006/097220, WO 2006/092507, WO 2006/091506, WO 2006/087630, WO 2006/084176, WO 2006/083645, WO 2006/078605, WO 2006/078575, WO 2006/076681, WO 2006/056854, WO 2006/055187, WO/2006/041197, WO 2006/040002, WO 2006/034128, WO 2006/033004, WO 2006/033062, WO 2006/032987, WO 2006/032384, WO 2006/032023, WO 2006/031969, WO 2006/018174, WO 2006/017055, WO 2005/115983, WO 2005/113506, WO 2005/105754, WO 2005/105736, WO 2005/105726, WO 2005/103022, WO 2005/097784, WO 2005/092317, WO 2005/092316, WO 2005/091857, WO 2005/077925, WO 2005/066136, WO 2005/065683, WO 2005/063762, WO 2005/063761, WO 2005/060958, WO 2005/041959, WO 2005/037763, WO 2005/037199, WO 2005/030694, WO 2005/007628, WO 2005/007111, WO 2004/101752, WO 2004/096137, WO 2004/093799, WO 2004/092117, WO 2004/073606, WO 2004/067482, WO 2004/066929, WO 2004/063184, WO 2004/063166, WO 2004/063165, WO 2004/063155, WO 2004/033438, WO 2004/033416, WO 2004/018421, WO 2004/007430, WO 2003/094845, WO 2003/074495, WO 2003/072100, WO 2003/048108, WO 2002/102813, WO 2002/092590, WO 2001/070754, WO 2001/070753, WO 1998/049555, WO 1998/27974, WO 1997/28149, WO 1997/28115, WO 1997/27857, WO 1997/27847, WO 1997/28137, WO 1996/001317 등].

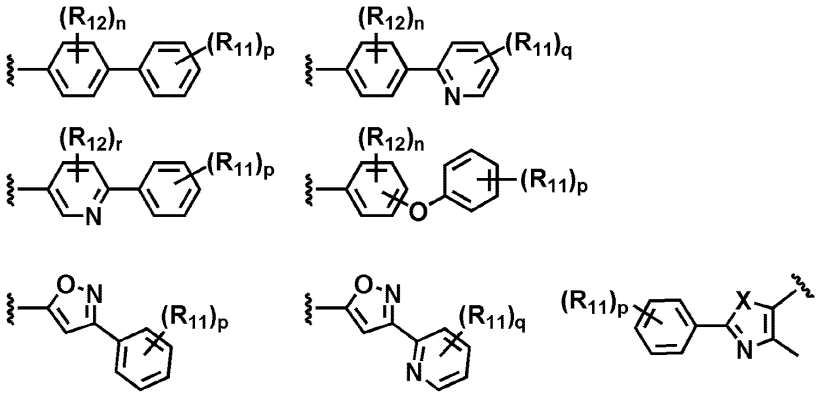
[0031] 상기 PPARδ 활성물질 중 일부는 하기 화학식 I으로 표시된다.

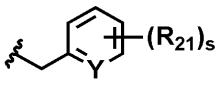
[0032] [화학식 I]

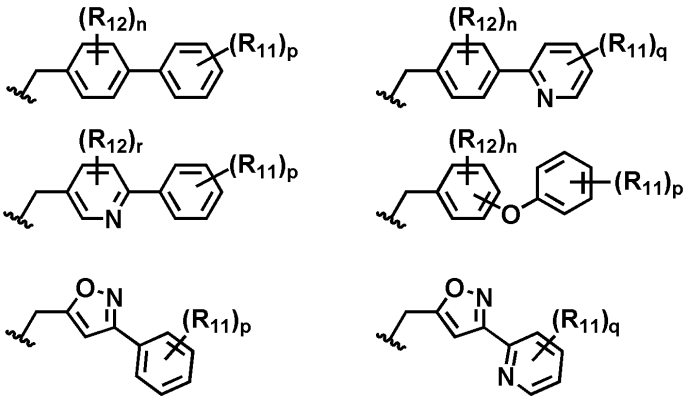
[0033] 

[0034] [상기 화학식 I에서 A는 산소(O), 질소(NH), 황(S) 또는 셀레늄(Se)이고; B는  이며;

[0035] R_1은 하기 구조로부터 선택되며,

[0036] 

[0037] R_2는 수소, C_1-C_5 알킬기,  또는 하기 구조로부터 선택되며;



[0038]

[0039] X는 황(S) 또는 셀레늄(Se)이며;

[0040] Y는 탄소(CH) 또는 질소(N)이며;

[0041] R_3는 수소, C_1-C_8의 알킬 또는 할로겐이고;

[0042] R_4 및 R_5는 서로 독립적으로 수소, 할로겐 또는 C_1-C_8의 알킬이며;

[0043] R_6은 수소, C_1-C_8의 알킬, C_2-C_7의 알케닐, 알칼리금속, 알칼리토금속 또는 유기산이고;

[0044] R_{11} 및 R_{12}는 서로 독립적으로 수소, 할로겐, C_1-C_8의 알킬 또는 C_1-C_8의 알콕시이며;

[0045] R_{21}은 수소, 할로겐, C_1-C_7의 알킬, 헤테로고리기, C_1-C_7의 알콕시, 할로겐이 치환된 C_1-C_5의 알킬 또는 할로겐이 치환된 페닐이며;

[0046] m 및 n은 서로 독립적으로 1-4의 정수이며;

[0047] p는 1-5의 정수이고;

[0048] q는 1-4의 정수이고;

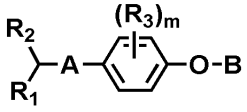
[0049] r은 1-3의 정수이고;

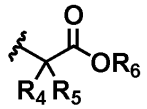
[0050] s는 1-5의 정수이고;

[0051] 상기 R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_{11}, R_{12} 및 R_{21}의 알킬 및 알콕시는 하나 이상의 할로겐 또는 C_1-C_5의 알킬아민이 더 치환될 수 있다.]

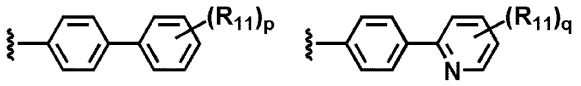
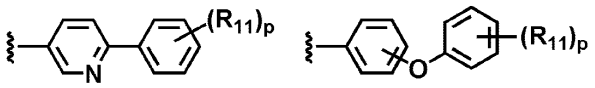
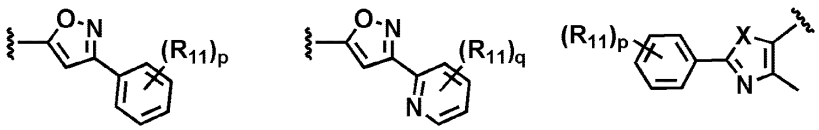
[0052] 상기 PPARδ 활성물질 중 일부는 하기 화학식 II로 표시된다.

[0053] [화학식 II]

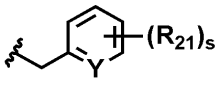
[0054] 

[0055] [상기 화학식 I에서 A는 황(S) 또는 셀레늄(Se)이고; B는  이며;

[0056] R_1은 하기 구조로부터 선택되며;

[0057]

[0058] R_2는 수소, C_1-C_5 알킬기,  또는 하기 구조로부터 선택되며;





[0059]

[0060] X는 황(S) 또는 셀레늄(Se)이며;

[0061] Y는 탄소(CH) 또는 질소(N)이며;

[0062] R_3는 수소, C_1-C_5의 알킬 또는 할로겐이고;

[0063] R_4 및 R_5는 서로 독립적으로 수소 또는 C_1-C_5의 알킬이며;

[0064] R_6은 수소, C_1-C_5의 알킬, C_2-C_5의 알케닐, 알칼리금속 또는 알칼리토금속이고;

[0065] R_{11}은 수소, 할로겐, C_1-C_5의 알킬 또는 C_1-C_5의 알콕시이며;

[0066] R_{21}은 수소, 할로겐, C_1-C_5의 알킬, 헤테로고리기, C_1-C_5의 알콕시, 할로겐이 치환된 C_1-C_5의 알킬 또는 할로겐이 치환된 페닐이며;

[0067] m은 1-4의 정수이며;

[0068] p는 1-5의 정수이고;

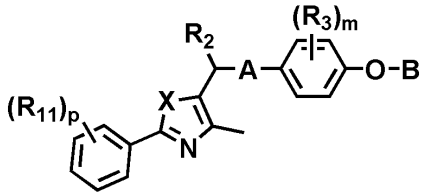
[0069] q는 1-4의 정수이고;

[0070] s는 1-5의 정수이고;

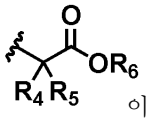
[0071] 상기 R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_{11} 및 R_{21}의 알킬 및 알콕시는 하나 이상의 할로겐 또는 C_1-C_5의 알킬아민이 더 치환될 수 있다.]

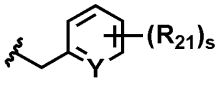
[0072] 상기 PPARδ 활성물질 중 일부는 하기 화학식 III로 표시된다.

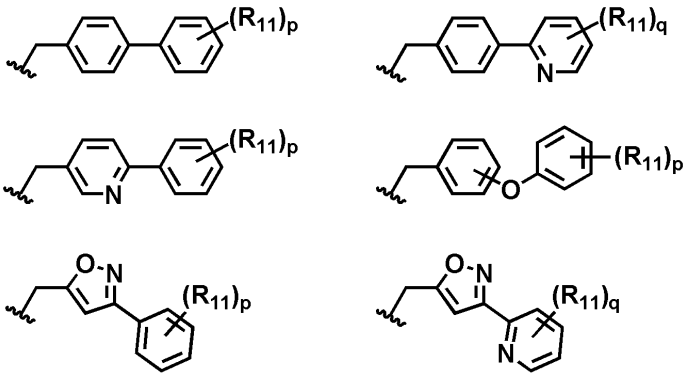
[0073] [화학식 III]



[0074]

[0075] [상기 화학식 III 에서 A는 각각 독립적으로 황(S) 또는 셀레늄(Se)이고 B는  이며;

[0076] R_2은 수소, C_1-C_5 알킬기,  또는 하기 구조로부터 선택되며;



[0077]

[0078] X는 황(S) 또는 셀레늄(Se)이며;

[0079] Y는 탄소(CH) 또는 질소(N)이며;

[0080] R_3는 수소, C_1-C_5의 알킬 또는 할로겐이고;

[0081] R_4 및 R_5는 서로 독립적으로 수소 또는 C_1-C_5의 알킬이며;

[0082] R_6은 수소, C_1-C_5의 알킬, C_2-C_5의 알케닐, 알칼리금속 또는 알칼리토금속이고;

[0083] R_{11}은 수소, 할로겐, C_1-C_5의 알킬 또는 C_1-C_5의 알콕시이며;

[0084] R_{21}은 수소, 할로겐, C_1-C_5의 알킬, 헤테로고리기, C_1-C_5의 알콕시, 할로겐이 치환된 C_1-C_5의 알킬 또는 할로겐이 치환된 페닐이며;

[0085] m은 1-4의 정수이며;

[0086] p는 1-5의 정수이고;

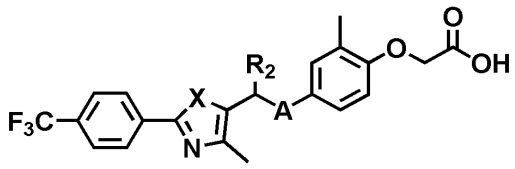
[0087] q는 1-4의 정수이고;

[0088] s는 1-5의 정수이고;

[0089] 상기 R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_{11} 및 R_{21}의 알킬 및 알콕시는 하나 이상의 할로겐 또는 C_1-C_5의 알킬아민이 더 치환될 수 있다.]

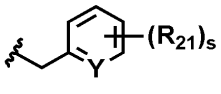
[0090] 상기 PPARδ 활성물질 중 일부는 하기 화학식 IV로 표시된다.

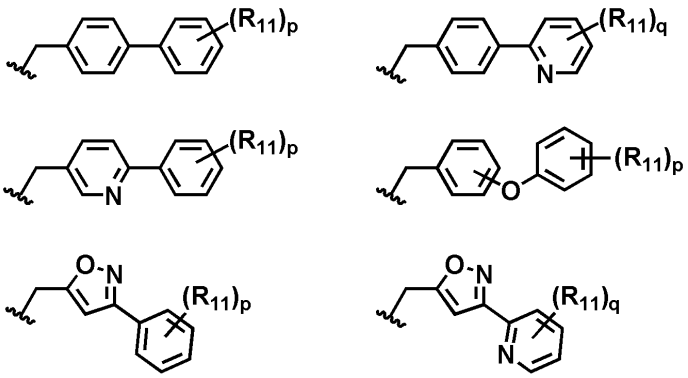
[0091] [화학식 IV]



[0092]

[0093] [상기 화학식 IV에서 A는 각각 독립적으로 황(S) 또는 셀레늄(Se)이며;

[0094] R_2은 수소, C_1-C_5 알킬기,  또는 하기 구조로부터 선택되며;



[0095]

[0096] X는 황(S) 또는 셀레늄(Se)이며;

[0097] Y는 탄소(CH) 또는 질소(N)이며;

[0098] R_{11}은 수소, 할로겐, C_1-C_5의 알킬 또는 C_1-C_5의 알콕시이며;

[0099] R_{21}은 수소, 할로겐, C_1-C_5의 알킬, 헤테로고리기, C_1-C_5의 알콕시, 할로겐이 치환된 C_1-C_5의 알킬 또는 할로겐이 치환된 페닐이며;

[0100] p는 1-5의 정수이고;

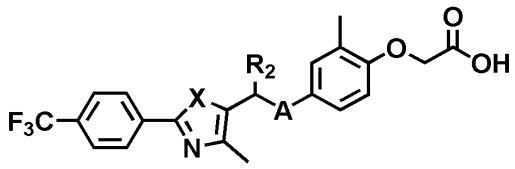
[0101] q는 1-4의 정수이고;

[0102] s는 1-5의 정수이고;

[0103] 상기 R_{11} 및 R_{21}의 알킬 및 알콕시는 하나 이상의 할로겐 또는 C_1-C_5의 알킬아민이 더 치환될 수 있다.]

[0104] 상기 PPARδ 활성물질 중 신규 화합물은 하기 화학식 V로 표시된다.

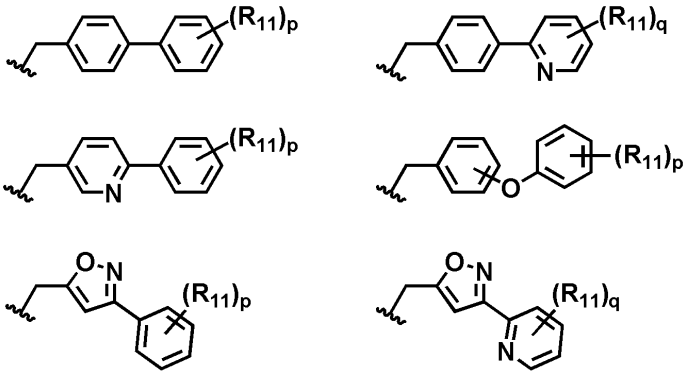
[0105] [화학식 V]



[0106]

[0107] [상기 화학식 V에서 A는 각각 독립적으로 황(S) 또는 셀레늄(Se)이며;

[0108] R_2은 하기 구조로부터 선택되며;



[0109]

[0110] X는 황(S) 또는 셀레늄(Se)이며;

[0111] R_{11}은 수소, 할로겐, C_1-C_5의 알킬 또는 C_1-C_5의 알콕시이며;

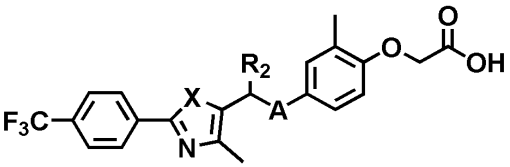
[0112] p는 1-5의 정수이고;

[0113] q는 1-4의 정수이고;

[0114] 상기 R_{11}의 알킬 및 알콕시는 하나 이상의 할로겐 또는 C_1-C_5의 알킬아민이 더 치환될 수 있다.]

[0115] 상기 PPARδ 활성물질 중 신규물질은 보다 구체적으로 하기 화학식 VI로 표시된다.

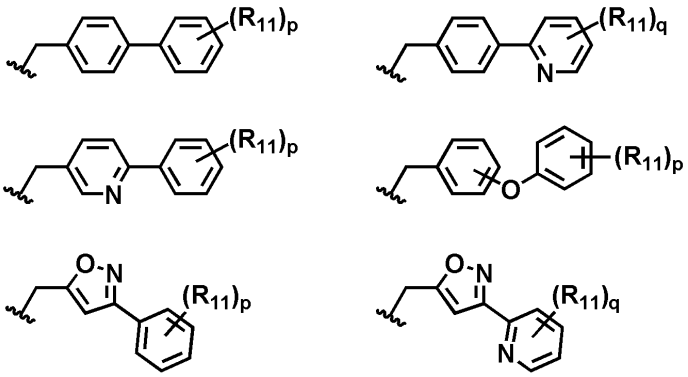
[0116] [화학식 VI]



[0117]

[0118] [상기 화학식 VI에서 A는 각각 독립적으로 황(S) 또는 셀레늄(Se)이며;

[0119] R_2은 하기 구조로부터 선택되며;



[0120]

[0121] X는 황(S) 또는 셀레늄(Se)이며;

[0122] R_{11}은 수소, C_1-C_3의 알킬 또는 할로겐이며;

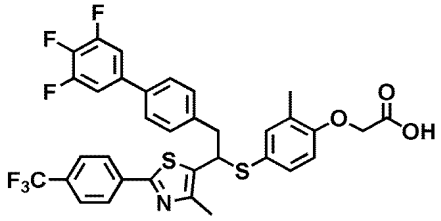
[0123] p는 1-5의 정수이고;

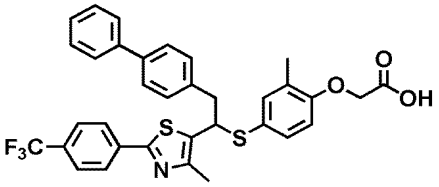
[0124] q는 1-4의 정수이고;

[0125] 상기 R_{11}의 알킬은 하나 이상의 할로겐 또는 C_1-C_5의 알킬아민이 더 치환될 수 있다.]

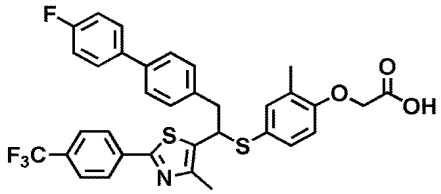
[0126] 상기 PPARδ 활성물질 중 신규물질은 보다 구체적으로는 하기 화합물들과 같다.

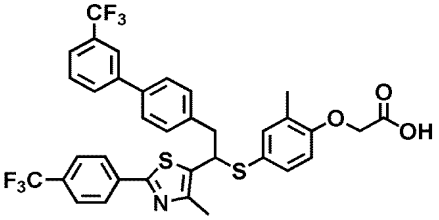
[0127]



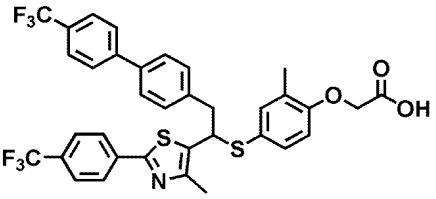


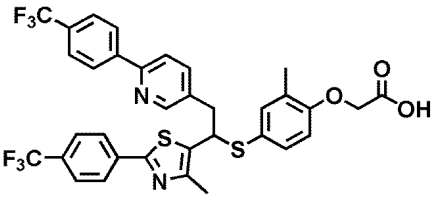
[0128]



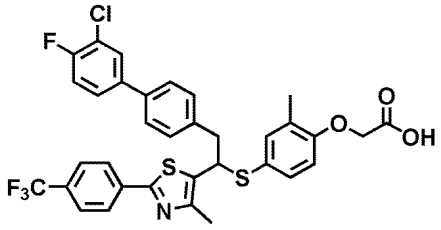


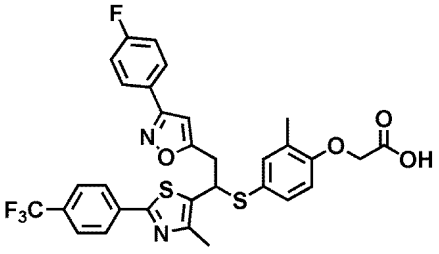
[0129]



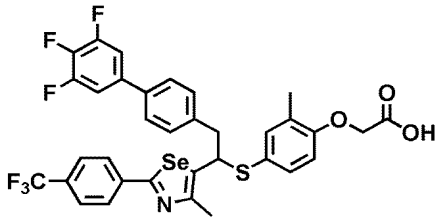


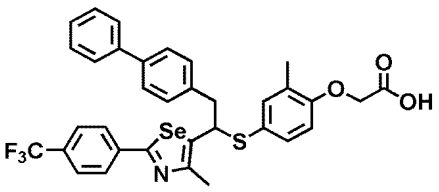
[0130]



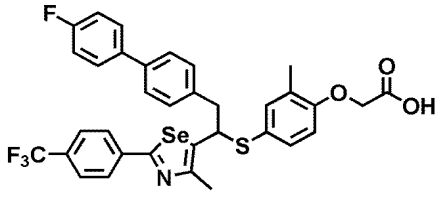


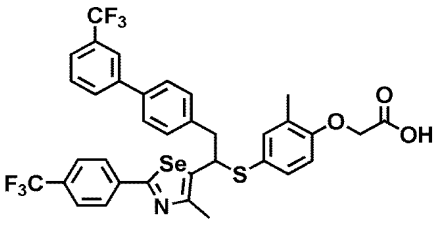
[0131]



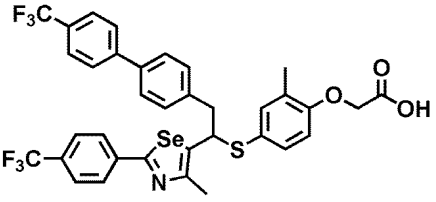


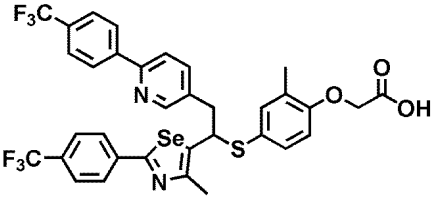
[0132]



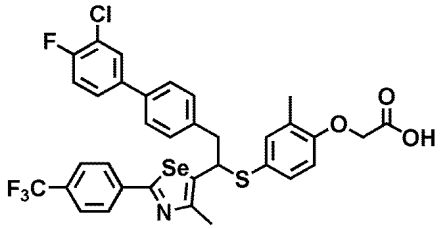


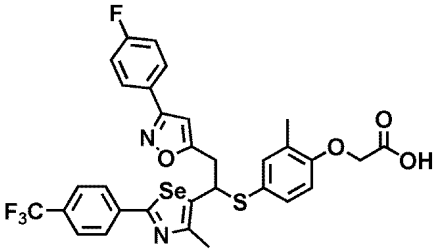
[0133]



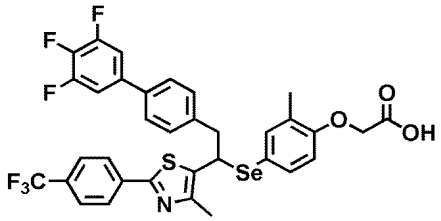


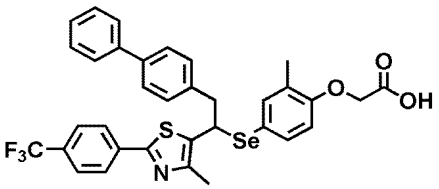
[0134]



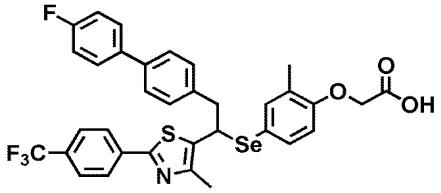


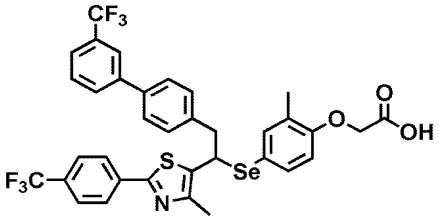
[0135]



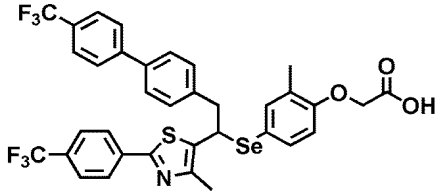


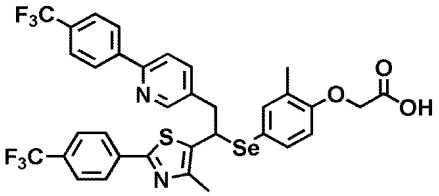
[0136]



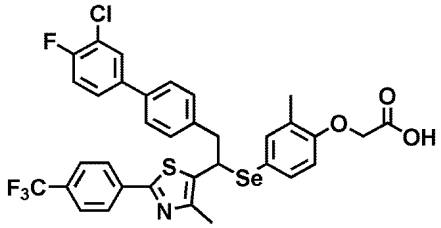


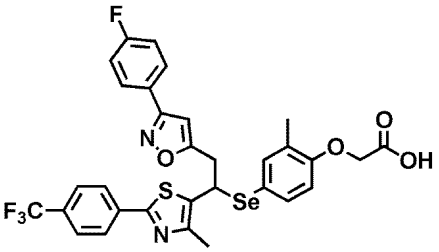
[0137]



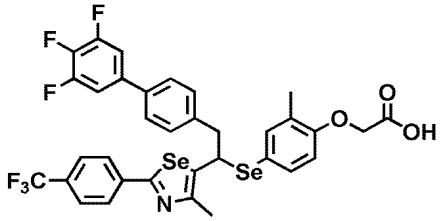


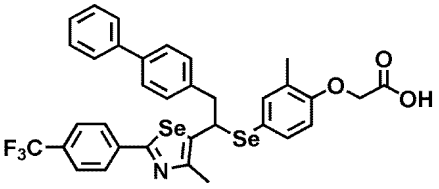
[0138]



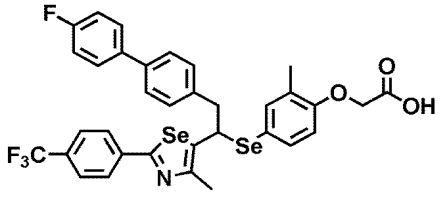


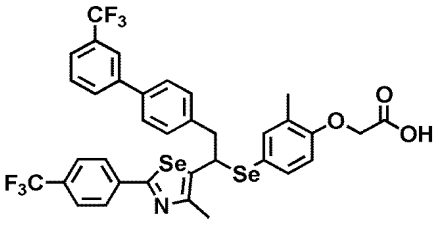
[0139]

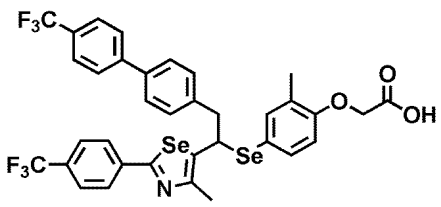


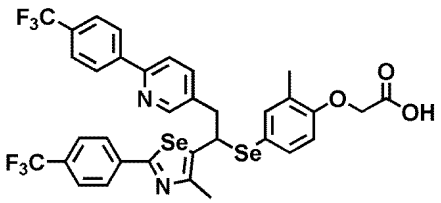


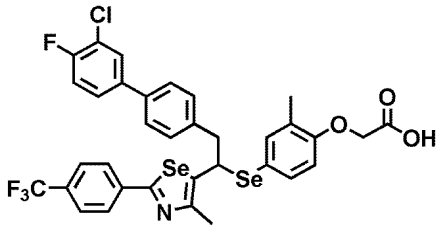
[0140]

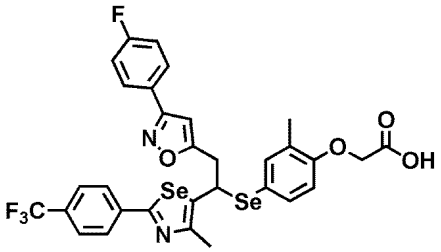




[0141] 



[0142] 



[0143] 또한, 본 발명은 상기 화학식 V로 표시되는 PPARδ 활성물질을 유효성분으로 포함하는 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, 치매 또는 파킨슨병 치료 및 예방용 의약 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 신규한 PPARδ 활성물질을 유효성분으로 포함하는 기능성 식품 보조제, 기능성 음료, 식품첨가물 및 동물용 사료용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 신규한 PPARδ 활성물질을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 및 비만 개선, 지방간 예방 및 개선, 근육강화, 근질환 예방 및 개선 또는 지구력 증진을 위한 기능성 화장품 조성물을 제공한다.

[0144] 본 발명에 따른 치료학적 효과를 달성하는데 사용되는 PPARδ 활성물질의 양은 물론 특정 화합물, 투여 방법, 치료할 대상, 및 치료할 질환에 따라 달라지나, 통상적인 의약의 투여량에 의존하나, 보다 바람직하게는 상기 PPARδ 활성물질의 유효투입량은 1 내지 100 ㎎/㎏(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

[0145] 본 발명에 따르면, PPARδ 활성물질은 태자 발생 및 초기 발육 시기에 칼슘이온을 조절하여 지근 섬유를 증가시켜 근 지구력을 향상시킴으로써, 지질 및 당 대사능력을 향상시키고 몸 전체의 대사를 재프로그래밍(metabolic reprogramming)하여 성인 또는 성체에서 고지방 식이 및 운동 부족에 의한 비만·당뇨 등의 대사성 질환의 발병을 예방/억제하고, 기억력을 증가시킨다. 따라서 PPARδ 활성물질은 태자 재프로그래밍에 의한 인간 및 동물의 지구력 증진, 비만·당뇨·동맥경화·지방간 등의 대사성질환 예방/억제, 기억력 증진을 목적으로 하는 의약 조성물, 임산부용 보조제, 동물용 의약 조성물, 동물용 지구력 증진제, 분유 및 이유식 조성물, 동물사료 조성물 등으로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0146] 도 1 - 실시예 1의 실험과정 모식도 [a. 임신기간과 수유기간 동시 투여, b. 임신기간 투여, c. 수유기간 투여].

도 2 - 임신한 어미에 투여된 PPARδ 활성물질의 태반 통과 여부를 확인하기 위하여 실시한 약물동력학적 실험결과.

도 3 - 도 1의 방법에 따라 실시된 실험에서 PPARδ 활성물질에 의해 태자 재프로그래밍된 마우스 태자의 출생 직후 체중 측정 결과 (n = 8).

도 4 - 도 1의 방법에 따라 실시된 실험에서 태자의 체중 변화를 2주간 관찰한 결과 (n = 8).

도 5 - 도 1의 방법에 따라 실시된 실험에서 태자가 6주까지 자랐을 때 체중을 비교한 결과 (n = 8).

도 6 - 도 1의 방법에 따라 실시된 실험에서 골격발생 이상 유무를 확인하기 위하여 태자의 골격을 염색한 사진.

도 7 - 도 1의 방법에 따라 실시된 실험에서 태자 재프로그래밍된 태자의 성장 후, 근섬유 type 분석 결과. (A, B) 등쪽 부위의 피부와 앞다리를 절제한 후 근육의 변화를 관찰한 결과. (C, D) 뒷다리를 절제한 후, metachromatic 염색 및 면역염색법(immunohistochemistry)을 통해 Gastrocnemius 근육에서 지근 섬유의 변화를 관찰한 결과.

도 8 - 도 1의 방법에 따라 실시된 실험에서 micro-array 결과를 정리한 표.

도 9 - 도 1의 방법에 따라 실시된 실험에서 real-time PCR 분석법을 이용하여 근육에서 지방산 산화와 thermogenesis에 중요한 유전자의 발현을 비교한 결과(**, $P < 0.01$;***,$P < 0.001$).

도 10 - 도 1의 방법에 따라 실시된 실험에서 real-time PCR 분석법을 이용하여 지근의 발생에 중요한 유전자의 발현을 비교한 결과 (*, $P < 0.05$;**,$P < 0.01$;***,$P < 0.001$).

도 11 - 도 1의 방법에 따라 실시된 실험에서 real-time PCR 분석법을 이용하여 slow type 근육의 기능에 중요한 유전자의 발현을 비교한 그래프 (*, $P < 0.05$;***,$P < 0.001$).

도 12 - 도 1의 방법에 따라 실시된 태자 재프로그래밍 실험의 결과가 PPARδ 의존적인 것임을 입증하기 위하여 PPARδ가 결여된 근세포의 유전자 발현을 real-time PCR 이용해 분석한 결과임 (*, $P < 0.05$;**,$P < 0.01$;***,$P < 0.001$)

도13 - 도 1의 방법에 따라 실시된 태자 재프로그래밍 실험에서 PPARδ에 의한 세포질 내 칼슘이온의 양적 변화를 확인하기 위해 공초점 현미경(confocal microscope)을 이용한 실험결과 (*, $P < 0.05$).

도 14 - 도 1의 방법에 따라 실시된 태자 재프로그래밍 실험에서 PPARδ에 의해 지근이 증가한 수컷(male) 마우스의 지구력을 treadmill을 이용하여 측정한 결과임(***, $P < 0.001$,n = 4-5).

도 15 - 도 1의 방법에 따라 실시된 태자 재프로그래밍 실험에서 PPARδ에 의해 지근이 증가한 암컷(female) 마우스의 지구력을 treadmill을 이용하여 측정한 결과임(***, $P < 0.001$,n = 4-5).

도 16 - 도 1의 방법에 따라 실시된 실험에서 oximax를 이용하여 호흡교환율을 측정한 결과임(**, $P < 0.01$,n = 4).

도 17 - 도 16의 결과를 면적 값으로 환산하여 비교한 결과임(**, $P < 0.01$,n = 4).

도 18 - 도 1의 방법에 따라 실시된 태자 재프로그래밍 실험에서 지방이 35%인 고지방사료를 섭취시키면서 체중 증가 추이를 기록한 결과(*, $P < 0.05$,n = 5).

도 19 - 도 1의 방법에 따라 실시된 태자 재프로그래밍 실험에서 고지방 섭취에 의해 당뇨가 유발된 생쥐의 포도당 저항성 테스트를 수행한 결과(**, $P < 0.01$,n = 6).

도 20 - 도 1의 방법에 따라 실시된 태자 재프로그래밍 실험에서 고지방 섭취에 의해 당뇨가 유발된 생쥐의 인슐린 민감도 테스트를 수행한 결과(***, $P < 0.001$,n = 6).

도 21 - 도 1의 방법에 따라 실시된 태자 재프로그래밍 실험에서 CMDD1226 효능 입증 결과(**, $P < 0.01$,n=4).

도 22 - 도 1의 방법에 따라 실시된 태자 재프로그래밍 실험에서 GW501516의 투여 시기(1: Vehicle treatment of pregnant mice during gestation and lactation period; 2: GW501516 treatment of pregnant mice during lactation; 3: GW501516 treatment of pregnant mice during gestation; 4: GW501516 treatment of pregnant mice during gestation and lactation period)에 따른 지구력 증가 효능 차이를 비교한 실험결과(**, $P < 0.01$;***,$P < 0.001$,n=4).

도 23 - 도 1의 방법에 따라 실시된 태자 재프로그래밍 실험에서 CMDD1112의 투여 농도와 성별(male)에 따른 지구력 증강 효능의 차이(***, $P < 0.001$,n=4).

도 24 - 도 1의 방법에 따라 실시된 태자 재프로그래밍 실험에서 CMDD1112의 투여 농도와 성별(female)에 따른

지구력 증강 효능의 차이(***, $P < 0.001$,n=4).

도 25 - 제 2형 당뇨모델을 이용한 실험과정 모식도.

도 26 - 도 25의 방법에 따라 실시된 실험에서 제2형 당뇨모델 생쥐의 포도당 저항성 테스트를 수행한 결과(*, $P < 0.05$,n = 6 ~ 9).

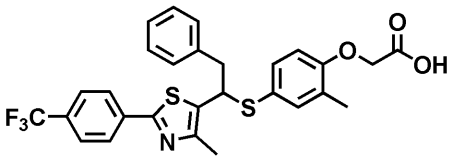
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0147] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

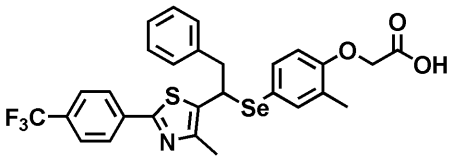
[0148] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0149] **1. PPARδ 활성물질에 의한 태자 재프로그래밍 효능**

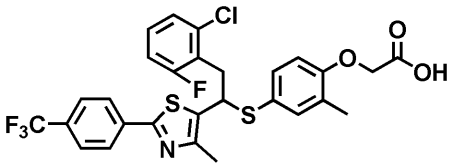
[0150] 하기 실시예에서 사용된 PPARδ 활성물질의 구조는 하기와 같다.

[0151] 

CMDD1111



CMDD1226

[0152] 

CMDD1112

[0153] <실시예 1> PPARδ 활성물질을 이용한 마우스의 태자 재프로그래밍

[0154] 본 발명자들은 포유동물 발생과정에서 PPARδ의 태자 재프로그래밍에 대한 역할 규명을 위해 임신기 어미에 PPARδ 활성물질을 투여하는 법(maternal treatment)을 이용하였다. 태자 재프로그래밍을 위해 임신한 암컷 마우스에 PPARδ 활성물질을 매일 10 mg/kg의 농도로 경구 투여하였으며, 구체적인 실험방법은 도 1에 정리하였다.

[0155] (1) PPARδ 활성물질의 태반 통과 여부 확인

[0156] 본 연구에 사용한 PPARδ 활성물질인 CMDD1111의 태반 통과여부를 확인하기 위하여 약물동력학(Pharmacokinetics) 실험을 수행하였다. 임신 후 16 일이 지난 마우스에 CMDD1111을 10 mg/kg 농도로 경구 투여한 후, 24 시간 동안 모체동물과 태자의 혈액에 분포하는 화합물의 농도를 분석하였다. 그 결과 모체의 최대혈중농도(C_{max})가 38 μM 이었으며, 최대혈중농도에 도달하는 시간(T_{max})은 1 시간이었고, 반감기($t_{1/2}$)는 9 시간이었다. 태자의 경우는 모체와 달리 시간에 따라 혈중 농도가 증가하는 경향이 보였으며, 최대혈중농도는 8.9 μM 이었다. 이 농도는 태자에서 PPARδ를 충분히 활성화 시킬 수 있는 농도이므로, 본 실시예에 사용된 화합물은 태반을 통과하는 물질임을 확인하였다(도 2).

[0157] (2) 임신한 어미에 PPARδ 활성물질 투여(Maternal treatment)를 통한 마우스 태자의 재프로그래밍

[0158] 가임기 암컷 마우스와 수컷 마우스를 교배시킨 후, 플러그(plug) 확인을 통해 임신 유무를 확인하였다. 임신이 확인된 암컷 마우스에게 6주(임신기간 및 수유기간) 동안 CMDD1111을 매일 1 회씩 10 mg/kg의 농도로 경구 투여하였다. 임신기간 동안 투여물질에 의한 부작용은 관찰할 수 없었다. 임신 기간 중 Vehicle을 투여한 태자 그룹의 무게는 1.33 ± 0.11 그램이었고, CMDD1111을 투여한 태자의 무게는 1.37 ± 0.09 그램으로, 두 그룹 사이의 무게 차이는 보이지 않았다(도 3). 또한 3 주간 태자의 성장 속도를 비교한 결과에서도 투여물질에 의한 성장 저해나 촉진은 관찰되지 않았으며(도 4), 성체가 되었을 때에도 두 그룹 사이에 체중 차이가 나지 않았고(도 5), Alizaren red S와 Alician blue 염색약을 이용한 골격염색 결과에서도 투여물질에 의한 기형을 관찰할 수 없었다(도 6).

[0159] <실시예 2> PPARδ를 활성화를 통해 태자 재프로그래밍된 마우스의 지근섬유 증가 효능 입증

[0160] 지근은 산소 전달 단백질인 미오글로빈을 많이 가지고 있기 때문에 속근에 비해 붉게 보인다. 태자의 피부를 제거하고 근육을 관찰한 결과 투여군의 마우스가 더 붉은 근육을 가지고 있음을 알 수 있었다 (도 7의 A 및 B). 투여물질(CMDD1111)에 의한 지근의 생성이 증가되었는지를 확인하기 위하여 태자의 뒷다리를 적출한 후, OCT에 넣고 동결시켰다. 동결한 근육조직은 동결박편기(cryotome)을 이용하여 8 mm 두께로 절편 한 후, 슬라이드로 제작하였고, 이것을 이용하여 metachromatic 염색을 수행하였다. 지근은 Metachromatic 염색을 하면 속근에 비해 짙은 푸른색으로 염색이 된다. 도 7의 C에서 확인할 수 있는 것처럼, 투여물질(CMDD1111)에 의해 gastrocnemius 근육에서 짙은 푸른색의 근섬유의 생성이 증가된 것을 확인할 수 있다. 근섬유의 구분은 myosin heavy chain (MHC)의 isoform 항체를 이용한 면역염색으로도 구분이 가능하다. 본 발명자들은 투여물질(CMDD1111)에 의한 지근 근섬유의 증가를 한 번 더 확인하기 위하여 slow type MHC를 이용한 면역염색을 수행하였다. 그 결과 도 7의 D에서 볼 수 있는 것처럼, 투여군의 gastrocnemius 근육에서 slow type MHC에 반응을 보이는 근섬유가 증가한 것을 알 수 있었다. 이 결과는 metachromatic 염색 결과와 동일한 형태를 보이며, 이 두 가지 실험결과 투여물질(CMDD1111)에 의해 지근의 생성이 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0161] <실시예 3> 칼슘이온 조절을 통한 지근 섬유 증가 효능 입증

[0162] 본 발명자들은 PPARδ 활성화에 의해 태자 재프로그래밍된 마우스에서 지근 생성 증가 원인을 밝히기 위해서 유전자 발현 분석을 수행하였다.

[0163] (1) Microarray를 이용한 유전자 발현 분석

[0164] 동물에서 PPARδ 활성물질(CMDD1111)에 의해 태자 재프로그래밍된 3 주령 마우스의 gastrocnemius 근육을 적출한 후, Trizol 시약(Gibco)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 분리한 RNA는 정량 및 순도 검증 과정을 거친 후, Mouse 430 2.0(Affimatrix) 칩을 이용한 유전자 발현 분석을 위해 사용하였다.

[0165] 일반적으로 지근은 속근에 비해 많은 미토콘드리아를 가지고 있고, 지방산 산화가 증가되어 있으며 contraction 속도가 늦은 특징을 가지고 있다. 분석결과 위 세 가지 조절에 관련된 유전자 발현이 모두 증가하였음을 확인하였다(도 8).

[0166] 지방산 산화와 미토콘드리아 호흡을 위해 필수적인 효소인 Pantothenate kinase 1(PANK1: 2.4배), carnitine palmitoyl transferase 1a(CPT-1a: 1.4배), acyl CoA dehydrogenase(ACAD: 1.7배), acyl CoA synthetase(ACSL: 1.5배), cytochrome 8a(COX8A: 1.7배), ubiquinone(2.0배), 그리고 uncoupling protein 2, 3(UCP2, 3: 1.5배, 2.3배)의 발현이 증가하였다.

[0167] 지근의 발생을 증가시키는 것으로 알려진 PPARɣ coactivator 1a (1.7배), CamIIb (1.4배), CamIId (1.8배), Mef2a (1.4배) 발현이 증가하였으며, 음성조절자(negative regulator)로 알려진 HDAC4 (-1.5배)의 발현은 감소하였다.

[0168] 지근은 속근에 비해 많은 칼슘을 가지고 있으며, slow subtype의 칼슘 조절 단백질을 가지고 있다. 흥미롭게도 본 발명에 의해 지근이 증가한 마우스는 myosin binding protein C3(MYBPC3: 2.8배), Troponin T2(2.3배), Troponin I(3.2배), myosin heavy chain 6(Myh6: 2.7배), myosin light chain 7(Myl7: 2.9배)과 같은 slow type의 칼슘 조절 단백질의 발현뿐 만 아니라, 세포질의 칼슘농도 조절자인 ryanodine receptor 2, 3(RYR2, 3: 2.8배, 2.0배), ATPase, Ca2+ transporting(SERCA: 1.4배), phospholamban(PLN: 2.8배)의 발현이 증가되었다.

[0169] (2) Real-time PCR을 이용한 유전자 발현 분석

[0170] Miroarray 분석 결과를 추가적으로 검증하기 위하여 real-time PCR을 이용한 유전자 발현 분석 실험을 수행하였다. 근육의 발생기간 중 PPARδ 활성물질(CMDD1111)을 투여로 태자 재프로그래밍이 된 마우스 그룹은 Carnitine palmitoyl transferase 1a(CPT-1a: 1.5배), Uncoupling protein 3(UCP3: 4.2배), Acyl CoA synthetase(ACSL: 1.4배), Acyl CoA dehydrogenase(ACAD10: 2.0배), 그리고 NDUFA12(1.3배)와 같이 지방산 산화와 thermogenesis에 핵심 조절자의 발현이 증가하였다. 또한 지근에서 많이 발현되며 근육에서 지방산의 산화를 증가시켜 당뇨를 개선시키는 것으로 알려진 adiponectin (ADIPOQ: 2.5배)의 발현이 현저히 증가하였다(도 9).

[0171] PGC-1α는 지방산 산화의 co-activator 뿐만 아니라, 미토콘드리아 생합성과 지근의 발생을 증가시키는 핵심 조

절자로 밝혀진 유전자이다. 이 유전자의 발현이 PPARδ 활성물질(CMDD1111)에 의해서 1.6배 증가하였다. 또한 근육의 remodeling 과정에서 속근의 지근화를 증가시키는 것으로 알려진 CaMKIIb, d의 발현 역시 각각 4.5배, 3.2배 증가하였다. 반면 이미 loss of function study를 통해 지근 생성을 억제시키는 것으로 알려진 HDAC4의 발현은 0.6배로 감소하였다(도 10).

[0172] 골격근에서 세포질의 칼슘 농도는 excitation-contraction coupling에 필수적이며, 이 자체가 근육의 유연성(plasticity)을 조절하는 중요 조절자이다. 본 발명에서 지근이 증가한 마우스는 근육세포의 cytosolic 칼슘을 조절하는 것으로 알려진 factor들의 발현이 증가하였다. RYR2 및 RYR3은 sarcoplasmic membrane에서 칼슘의 efflux를 조절하는 유전자로서 대조군에 비해 각각 2.2배, 3.6배 증가하였다. ATP2A2는 칼슘을 cytoplasm에서 sarcoplasmic reticulum으로 influx하는 유전자로서 2.2배 발현이 증가하였으며, 이 유전자의 활성을 조절하며 지근 특이적인 유전자인 phospholamban의 발현이 3.2배 증가하였다. 또한 slow muscle에서 칼슘과 결합하여 근육의 수축에 관여하는 TNNI3(5.8배), MYH6(6.8배), 그리고 Myl7(4.8배)의 발현이 증가하였다(도 11).

[0173] (3) Primary cell culture 및 유전자 발현 분석

[0174] Microarray 분석과 real-time PCR 분석을 통해 PPARδ 활성물질(CMDD1111)에 의해 태자 재프로그래밍이 된 마우스에서 세포질의 칼슘 농도 조절에 핵심 유전자인 RYR3, ATP2A2, PLN의 발현이 크게 증가되었다는 것을 알았다. 하지만 이 세 유전자의 프로모터에 PPRE(PPARs response element)가 보고된 적이 없다. 따라서 본 발명자들은 위 세 유전자의 발현이 PPARδ 의존적으로 증가하는지를 확인하고자 PPARδ 유전자가 제거된 마우스의 근육을 적출하여 primary culture를 실시하였다. 생후 5 일째인 태자의 뒷다리를 적출한 후, Rando 등에 의해 개발된 방법과 동일한 방법으로 primary culture를 수행하였다(Rando *et al*, *J. Cell. Biol.*, 1994, 125, 1275-1287). Myoblast 배양 후, 6 well plate로 옮겨 PPARδ 활성물질(CMDD1111)을 300 nM의 농도로 처리해 주면서 myotube로 분화시켰다. 분화된 myotube에 2일 동안 300 nM의 PPARδ 활성물질(CMDD1111)을 추가로 처리해 준 다음, TRIzol 시약(Gibco)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 역전사(reverse transcription) 과정을 거쳐 cDNA로 합성한 후, real-time PCR 분석을 위한 template로 이용하였다.

[0175] Real time PCR 분석 결과, PPARδ에 의해서 직접적으로 조절된다고 알려진 PDK4와 CPT-1의 발현이 각각 2.2배, 1.5배 증가하였다. 하지만 PPARδ가 결여된 세포에서는 변화가 없었다. 이것은 PDK4와 CPT-1의 발현이 PPARδ에 의존적으로 조절된다는 것을 의미하는 것이다. 이러한 경향은 도 12에서 볼 수 있는 것처럼 RYR(2.2배), PLN(1.7배), TNNI3(1.7배), ATP2A2(4.3배) 유전자에도 동일하게 나타났다. 따라서 PPARδ는 세포질에서 칼슘 농도를 조절하는 유전자의 발현을 직접적으로 제어한다.

[0176] (4) 심근 세포의 재생 효능 입증

[0177] PPARδ 활성물질(CMDD1111)에 의해 태자 재프로그래밍된 마우스 군에서 심장근육에 많이 발현된다고 알려진 RYR2, ATP2A2, PLN 등의 유전자 발현이 현저히 증가한 것을 확인하였다.

[0178] (5) 세포질 내 칼슘 분석

[0179] RYR, SERCA, PLN의 변화가 세포질의 칼슘농도에 미치는 영향을 확인하기 위하여 칼슘 특이적인 염색시료인 Flou4(Molecular probe)를 이용한 실험을 수행하였다. 실험방법은 다음과 같다. Primary culture를 통해 분리한 근육세포를 유리 슬라이드가 부착된 배양용 플레이트에서 키운 후, PPARδ 활성물질(CMDD1111)을 300 nM의 농도로 처리해 주면서 myotube로 분화시켰다. 분화된 근육세포에 Flou4(최종 농도: 5 μM) 염색 시약을 넣어준 후, 30분 동안 배양시켜 주었다. 세포질 내의 칼슘 변화를 측정하기 위하여 칼슘이 없는 Kreb 용액을 배양액으로 이용하였고, 칼슘채널을 활성화시켜 주기 위해서 10 mM의 카페인을 처리해 주었다. 세포 내 칼슘이온의 변화를 공초점 현미경을 이용하여 측정하였다. 측정결과 PPARδ 활성물질(CMDD1111)을 넣어 준 근육세포에서 세포질 내 칼슘의 머무름 시간이 43 % 증가 (592 ± 60 versus 847 ± 77 sec) 하였다(도 13). 이것은 sarcoplasmic membrane에서 칼슘의 배출을(efflux)를 조절하는 RYR과 칼슘의 유입(influx)를 억제하는 PLN의 발현이 PPARδ에 의해서 증가하였기 때문이다. 근육세포에서 세포질 내의 칼슘이온 농도는 힘을 생성하거나 피로를 억제시키는 등의 효과를 나타내며, 특히 근육의 remodeling 과정에서는 지근 생성을 촉진시킨다는 사실이 이미 잘 밝혀져 있다. 따라서 본 발명에서 PPARδ 활성화를 통한 태자 재프로그래밍이 된 마우스는 세포질 내 증가된 칼슘 이온의 영향으로 지근의 생성이 증가한 것으로 보인다.

[0180] <실시예 4> PPARδ 활성화를 통한 태자 재프로그래밍 마우스의 지구력 증강 효능 입증

[0181] 지근은 지방 분해능이 크고, 운동으로 인한 피로에 저항성이 있기 때문에 마라톤과 같이 지구력을 필요로 하는 운동에 적합하다. 본 발명자들은 PPARδ 활성물질에 의해 태자 재프로그래밍된 마우스의 지구력 증강 효과를 측정하기 위하여 treadmill을 이용한 실험을 수행하였다.

[0182] 실험에 앞서 마우스가 운동기구에 적응할 수 있는 기간을 주기 위하여, 2 일 동안 7 meter/min의 속도로 5 분간 운동을 시켰다. 3 일째 본 실험을 수행하였으며, 실험방법은 10 meter/min의 속도로 60 분을 달리게 한 후, 그 후부터 최대속도가 15 meter/min이 될 때까지 15 분에 한 번씩 1 meter/min의 속도로 증가시켰다. 수컷의 경우, PPARδ 활성물질(CMDD1111) 투여군 그룹의 마우스가 대조군 그룹의 마우스에 비해 달린 시간이 2.9배 (235 ± 26 versus 677 ± 78 min, P < 0.0001, n = 6) 증가하였고, 달린 거리는 3.0배 (9927 ± 1168 versus 3303 ± 394 m, P < 0.0001) 증가하였다. 암컷의 경우 달린 시간은 2.0배 (376 ± 19 versus 761 ± 17 min, P < 0.0001, n = 4) 증가하였고, 달린 거리 역시 2.1배 (5419 ± 291 versus 11194 ± 261 m, P < 0.0001) 증가하여 수컷과 동일한 경향의 결과가 관찰되었다(도 14, 15).

[0183] <실시예 5> PPARδ 활성화를 통한 태자 재프로그래밍 마우스의 호흡교환율[respiratory exchange ratio (RER)] 측정

[0184] RER은 호흡에 사용되는 산소와 배출되는 이산화탄소의 양을 비교한 값이다. RER 값은 생물이 에너지 생산을 위하여 주로 탄수화물을 이용할 때는 1.0의 값을 가지며, 지방을 이용할 경우는 0.7의 값을 갖는다. 본 발명에서 태자 재프로그래밍 마우스의 지근의 생성이 증가하였다. 이러한 지근의 증가가 실제적으로 마우스의 에너지 대사에 영향을 주었는지에 대한 평가를 하기 위하여 Oximax(Columbus)를 이용한 RER 실험을 수행하였다. 그 결과 Vehicle을 투여한 마우스의 그룹에 비해 PPARδ 활성물질(CMDD1111)을 투여한 마우스의 그룹이 더 작은 RER 값을 갖는 것으로 보아 탄수화물 보다 지방을 더 많이 사용하는 것을 알 수 있었다(도 16). RER은 시간에 따른 주기 값을 가지므로, 이 두 그룹의 RER 차이를 보다 명확하게 확인해보기 위하여 AUL을 이용하여 비교해 보았다. 대조군의 평균 AUL 값은 107.4 ± 1.4이었고, 반면 태자재프로그래밍된 마우스 그룹은 102.2 ± 2.8로 대조군 마우스에 비해 낮은 RER 값을 갖는다(도 17).

[0185] 본 발명자들은 아래 식을 이용하여 두 그룹 사이에 지방 산화 능력의 차이를 확인해 보았다.

[0186] Carbohydrate oxidation = $(4.51 \cdot RER - 3.18) \cdot VO_2$

[0187] Lipid oxidation = $1.67 \cdot (1-RER) \cdot VO_2$

[0188] 계산결과 태자 프로그래밍 시기에 PPARδ 활성물질(CMDD1111)을 투여한 마우스 그룹이 vehicle을 투여한 대조군 마우스에 비해 평균 44% 지방을 더 사용하였으며 (6.6 mg/kgmin vs. 9.5 mg/kgmin), 반대로 탄수화물은 20% 적게 사용하는 것을 알 수 있었다(48 mg/kgmin vs. 38 mg/kgmin). 따라서 본 발명에서 태자의 프로그래밍 기간 동안 PPARδ를 활성화 시켜 준 마우스는 단순히 지근이 증가한 것뿐만 아니라, 이로 인해 지방 대사가 증가되어 있음을 알 수 있다.

[0189] <실시예 6> PPARδ 활성화를 통해 태자 재프로그래밍된 마우스의 비만 및 당뇨 예방/억제 효능 입증

[0190] 본 발명을 통해 PPARδ에 의해 태자 재프로그래밍이 된 마우스는 단지 임신과 수유기간 동안에만 PPARδ 활성화합물을 투여 받았음에도 불구하고, 성체가 되었을 때에도 지방대사 능력의 증가가 지속되었다. 지방대사는 비만과 당뇨의 발병과 깊은 연관성을 가지고 있다. 따라서 본 발명자들은 PPARδ의 태자 재프로그래밍이 성체의 대사증후군의 발병에 미치는 영향을 확인해 보았다. 13 주령의 대조군과 투여군 마우스에 총 84 일간 고지방 사료(지방 함량: 35%)를 섭취시키면서 일주일에 한 번씩 체중을 측정하였다. 그 결과, 도 18에서 볼 수 있는 것처럼 PPARδ 활성화합물(CMDD1111)에 의한 태자 재프로그래밍 마우스의 체중 증가가 대조군에 비해 8 % 억제됨을 알 수 있었다.

[0191] 본 연구자들은 또한 마우스에게 17 주 동안 고지방 사료를 섭취시켜 당뇨를 유발한 후, 포도당 저항성 테스트(GTT: glucose tolerance test)를 수행하였다. 실험방법은 Kelly에 의해 제안된 방법에 따라 수행하였고, 근육

에서의 역할을 확인하기 위하여 over-night fasting을 시켰다. 복강 주사를 이용하여 포도당(1 mg/kg)을 투여한 후, 2시간 동안 혈당의 변화를 측정하였다. 그 결과 투여군의 마우스가 대조군의 마우스에 비해 공복 혈당이 낮았을 뿐만 아니라 최고혈당 농도도 낮았으며, 포도당 clearance가 나타나는 시간도 더 짧았다(도 19). 동시에 인슐린저항성 실험도 병행하였다 (도 20). 위 결과를 종합하여 볼 때, PPARδ에 의해 태자 재프로그래밍이 된 동물은 지근 증가로 인한 지구력 증강 효과뿐만 아니라, 고지방 식이에 의한 비만당뇨의 발병이 예방 및 억제됨을 알 수 있었다.

[0192] <실시예 7> PPARδ 활성화를 통한 태자 재프로그래밍 마우스의 기억력 증진 효능 입증

[0193] 본 발명에서 PPARδ 활성물질에 의한 태자 재프로그래밍 마우스의 기억력 증진 효능를 검증하기 위하여 동물실험을 수행하였다. 뇌의 생성단계에서 발명물질의 효능을 입증하고자 임신된 쥐에 임신기간 및 수유기간 동안 PPARδ 활성물질인 CMDD1111을 10 mg/kg/day 농도로 경구 투여하였다. 태자가 8주령의 성체가 되었을 때, 모리스 수미로 (Morris water maze) 테스트를 수행하여 대조군과 투여군의 기억력을 비교해 보았다. 이 방법은 공간학습 및 기억을 확인할 수 있는 테스트 방법으로 뇌중에서 주로 해마 의존적 수행 방법이다. 실험결과 플랫폼을 찾는데 소요되는 평균 시간이 대조군의 경우 26, 22(수, 암)초 이었고, 투여군은 9, 6(수, 암)초 이었다. 따라서 PPARδ의 활성화 물질은 태자 프로그래밍 시기에 기억력 증진효과가 있음을 입증하였고, 이 효과는 성체까지 유지되었다.

표 1

[0194] 수미로 테스트 결과

실험 그룹		모리스 수미로 실험 결과
Vehicle	수	26초
	암	22초
CMDD1111	수	9초
	암	6초

[0195] <실시예 8> 구조가 다른 PPARδ 활성물질에 대한 태자 프로그래밍 효능 검증

[0196] 본 발명을 완성하기 위하여, 앞서 언급한 CMDD1111과 화학구조가 다른 PPARδ 활성물질에 대한 태자 프로그래밍 효능을 확인해보았다.

[0197] (1) PPARδ 활성물질 CMDD1226을 이용한 태자 재프로그래밍 효능 입증

[0198] CMDD1226의 태자 재프로그래밍에 의한 지구력 증진 효능을 입증하기 위하여, 임신한 C57BL/6 마우스를 이용한 실험을 진행하였다. 임신 마우스의 임신기간과 수유기간 동안에 CMDD1226을 10 mg/kg/day의 농도로 매일 경구 투여한 후, 7주령의 성체가 된 태자의 지구력을 트래드밀을 사용하여 측정하였다. 그 결과 태자 재프로그래밍된 그룹이 대조군에 비해 달린 시간이 1.9배 증가하였고, 달린 거리는 2.0배 증가하여, PPARδ 활성물질에 의한 지구력 증가 효능을 입증할 수 있었다 (도 21).

[0199] (2) GW501516을 이용한 태자 프로그래밍 (효능 입증 및 최적 투여시기 결정)

[0200] GW501516의 태자 재프로그래밍 효능을 확인하고, 최적 투여시기를 결정하기 위한 실험을 진행하였다. 실험방법은 도 1과 같으며, 투여시기를 세 가지(임신기, 수유기, 임신기와 수유기)로 나누어 실험을 수행하였다. 실험결과 임신기에만 PPARδ 활성물질을 투여 받은 그룹은 대조군에 비해 달린 시간과 거리가 각각 2.6배, 3.2배 증가하였고, 수유기만 PPARδ 활성물질을 투여 받은 그룹은 2.4배와 3.0배가 증가하였다. 지구력의 증가가 가장 확연히 증가한 그룹은 임신기와 수유기 모두 PPARδ 활성물질을 투여 받은 그룹이었으며, 대조군에 비해 각각 5.1배, 6.6배 증가하였다 (도 22).

[0201] (3) PPARδ 활성물질 CMDD1112을 이용한 태자 재프로그래밍(효능 입증 및 최적 투여농도 결정)

[0202] GW501516에 비해 PPARδ에 선택성이 우수한 CMDD1112 물질의 태자 재프로그래밍 효능을 입증하고, PPARδ 활성

물질의 최적 투여농도를 결정하기 위하여, 4가지 농도(1, 2, 5, 10 mg/kg/day)를 이용한 실험을 수행하였다. 실험결과 1, 2 mg/kg/day 농도에서는 지구력 향상 효과가 나타나지 않았으며, 5 mg/kg/day 이상에서만 지구력(달린시간: 1.4배, 달린거리: 1.5배)이 증가하는 것을 확인하였다 (도 23, 도 24).

[0203] 본 발명에서는, PPARδ 활성물질에 의한 동물의 태자 재프로그래밍 결과, 지구력 향상 효능을 확인해 보기 위하여 구조가 서로 다른 3가지 물질에 대한 실험을 실시하였다. 실험결과 3가지 PPARδ 활성물질 모두 지구력 향상 효능을 보이는 것으로 보아, 모든 PPARδ 활성화 물질은 지근 발생 증가, 지구력 향상, 비만·당뇨·동맥경화·지방간 등과 같은 대사증후군 예방, 기억력 증진 효과를 가질 수 있다. GW501516을 이용한 실험결과, 임신기와 수유기 모두 PPARδ 활성화 물질을 투여한 경우, 우수한 효능을 확인할 수 있었다. 또한 CMDD1112를 이용한 실험 결과, 태자 재프로그래밍 과정 중 5 mg/kg/day 이상의 농도에서만 효능이 관찰되었다. 하지만, 모든 활성화 물질의 활성농도가 다르기 때문에 구조가 다른 물질의 경우 보다 낮은 활성농도를 가질 수 있다.

[0204] <실시예 9> 제2형 당뇨 질환모델 생쥐에서 태자 재프로그래밍에 의한 당뇨질환 예방/억제 효능 입증

[0205] 본 발명을 통해 개발된 PPARδ의 태자 재프로그래밍 방법은 유전적인 결함으로 인해서 선천적으로 당뇨가 유발되는 db/db 마우스에서도 당뇨의 발병이 예방/억제됨을 확인하였다. 본 연구자들은 렙틴 리셉터(Leptin receptor)가 결핍된 마우스(db/db)를 사용하여 PPARδ의 태자 재프로그래밍 효능을 확인해 보았다. 헤테로 타입의 암컷과 수컷을 교배한 후, 수유기간 동안에만 PPARδ 활성물질(CMDD1111)을 암컷 마우스에게 투여하였다. 유전자 분석과 혈당분석을 통해 당뇨가 유발된 호모 수컷 태자만을 이용하여 포도당 저항성 테스트(GTT)를 수행하였다. 그 결과, 도 26에서 볼 수 있는 것처럼 PPARδ의 태자 재프로그래밍에 의해서 포도당 저항성이 개선되었다.

[0206] <실시예 10> 태자 재프로그래밍을 위한 신규 PPARδ 활성물질 개발

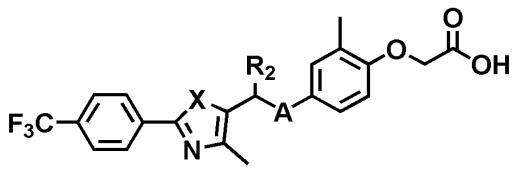
[0207] 앞서 상술한 바와 같이 PPARδ을 활성화 시키는 물질(agonists)은 인간을 포함한 포유동물을 태자 재프로그래밍하여 태자의 지근 발생을 증가시키고, 지구력을 향상시키며, 비만·당뇨·동맥경화·지방간 등과 같은 대사증후군을 미연에 예방하고, 기억력을 증진시킬 수 있다.

[0208] 또한, 본 발명에서는 포유동물의 태자 재프로그래밍을 위한 새로운 PPARδ 활성물질을 개발하였으며, 이 물질에 대한 *in vitro* 및 *in vivo* 효능을 입증하였다.

[0209] **2. PPARδ 활성화 물질 개발**

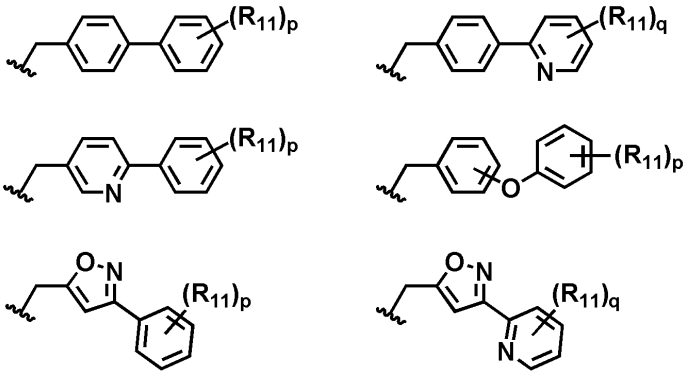
[0210] 본 발명에서는 태자 재프로그래밍을 보다 효율적으로 달성하기 위하여 하기 화학식 V로 표시되는 신규 PPARδ 활성물질을 개발하였다.

[0211] [화학식 V]

[0212] 

[0213] [상기 화학식 V에서 A는 각각 독립적으로 황(S) 또는 셀레늄(Se)이며;

[0214] R_2은 하기 구조로부터 선택되며;



[0215]

[0216] X는 황(S) 또는 셀레늄(Se)이며;

[0217] R_{11}은 수소, 할로겐, C_1-C_5의 알킬 또는 C_1-C_5의 알콕시이며;

[0218] p는 1-5의 정수이고;

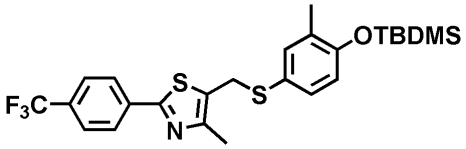
[0219] q는 1-4의 정수이고;

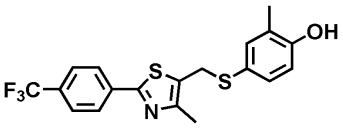
[0220] 상기 R_{11}의 알킬 및 알콕시는 하나 이상의 할로겐 또는 C_1-C_5의 알킬아민이 더 치환될 수 있다.]

[0221] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

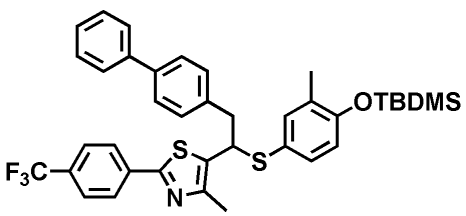
[0222] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0223] <실시예 11> 화합물 1 제조

[0224] 

[0225] 기존 방법(WO2006/091047)을 이용하여 얻어진 화합물() 500mg(1.26 mmol)과 이미다졸 172 mg(2.0당량)을 디메틸포름아미드 20ml에 완전히 녹인다. *tert*-부틸디메틸실릴클로라이드 210mg(1.1당량)을 천천히 가하고 실온에서 4시간 교반 시킨다. 반응 완결 후 염화암모늄 수용액과 에틸아세테이트를 이용하여 추출하고, 유기층에서 황산마그네슘으로 수분을 제거한다. 실리카겔 컬럼을 이용한 정재 후 용매를 감압 증류하여 표제화합물을 얻었다.

[0226] <실시예 12> 화합물 2 제조

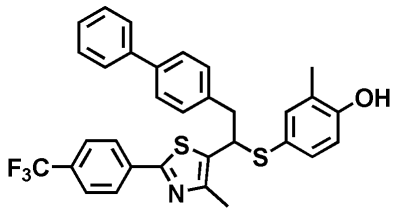
[0227] 

[0228] 상기 실시예 11에서 제조된 화합물 1 500mg(0.98 mmol)을 무수 테트라하이드로퓨란 20ml에 녹이고, 온도를 -78

℃로 내린다. 여기에 리튬 디이소프로필 아미드(LDA) 1.1 ml(1.8*M*,2.0당량) 천천히 부가한다. 그 후 반응용액에 4-페닐벤질클로라이드 199 mg(0.98 mmol)을 넣고 반응온도를 서서히 실온으로 올린다. 30 분간 더 반응을 시킨 뒤, 염화암모늄 수용액으로 반응을 종결시키고 에틸아세테이트와 소금 수용액을 사용하여 유기용매를 추출하고 황산마그네슘으로 유기층의 수분을 제거한다. 여과 후, 용매를 감압 증류하고, 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0229] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.98 (t, 2H), 7.65 (t, 2H), 7.52~7.23 (m, 6H), 7.14 (t, 2H), 7.05 (t, 2H), 6.63 (t, 1H), 4.54 (m, 1H), 3.40 (m, 1H), 3.14 (m, 1H), 2.11 (s, 3H), 1.89 (s, 3H), 0.99 (s, 9H), 0.18 (s, 6H)

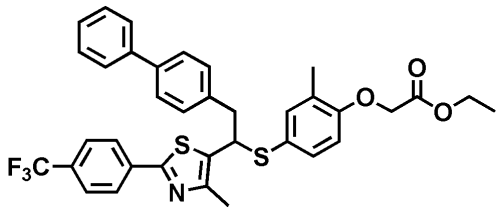
[0230] <실시예 13> 화합물 3 제조

[0231] 

[0232] 상기 실시예 12에서 제조된 화합물 2 500mg(0.74 mmol)을 테트라하이드로퓨란 10ml에 완전히 녹인다. 실온에서 테트라부틸암모늄플로라이드(TBAF) 1.8ml(1 *M*-테트라하이드로퓨란 용액, 2.5 당량)을 천천히 부가한다. 30 분간 반응 후 염화암모늄 수용액과 에틸아세테이트를 이용하여 추출하고 유기층을 황산마그네슘으로 수분을 제거한다. 여과 후 용매를 감압 증류하고 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0233] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.98 (t, 2H), 7.65 (t, 2H), 7.54~7.31 (m, 6H), 7.17 (t, 3H), 7.07 (t, 1H), 6.61 (t, 1H), 4.95 (s, 1H), 4.54 (m, 1H), 3.40 (m, 1H), 3.13 (m, 1H), 2.17 (s, 3H), 1.89 (s, 3H)

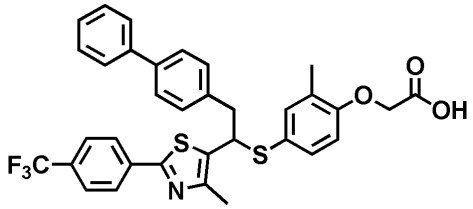
[0234] <실시예 14> 화합물 4 제조

[0235] 

[0236] 상기 실시예 13에서 제조된 화합물 3 300mg(0.53 mmol)과 5% 물을 포함한 아세톤 10ml, 탄산칼륨 185mg(0.53 mmol, 2.5 당량)을 실온에서 잘 섞는다. 브로모아세트산에틸에스테르 71 ul(0.64 mmol, 1.2 당량)를 부가하고, 4시간 강렬히 교반하여 준다. 반응 종결 후, 소금 수용액과 에틸아세테이트를 사용하여 추출하고, 황산마그네슘으로 수분을 제거한다. 여과 후, 용매를 감압 증류하고, 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0237] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.98 (d, 2H), 7.65 (d, 2H), 7.54~7.23 (m, 6H), 7.18 (t, 2H), 7.05 (t, 2H), 6.62 (t, 1H), 4.60 (s, 2H), 4.24 (q, 2H), 4.12 (q, 1H), 3.43 (d, 1H), 3.14 (d, 1H), 2.21 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.25 (t, 3H)

[0238] <실시예 15> 화합물 5 제조

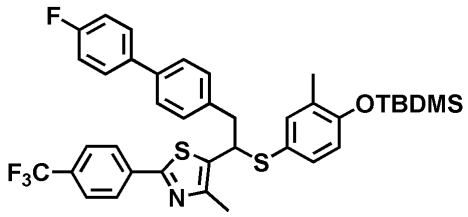


[0239]

[0240] 상기 실시예 14에서 제조된 화합물 4 300 mg(0.46 mmol)을 THF 15 ml및 물 10 ml에 잘 섞은 후, 0℃에서 60분 더 교반 후, 반응이 종결되면 0.5M $NaHSO_4$ 2.5ml를 가한 후 소금 수용액과 에틸아세테이트를 이용하여 추출한 뒤 여과 후, 용매를 감압 증류하고, LH-20 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0241] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.95(d, 2H), 7.66(d, 2H), 7.53(d, 2H), 7.46(d, 2H), 7.41(t, 2H), 7.39(t, 1H), 7.26(d, 3H), 7.05(d, 1H), 6.52(d, 1H), 4.56(m, 3H), 3.40(q, 1H), 3.12(q, 1H), 2.15(s, 3H), 1.79(s, 3H)

[0242] <실시예 16> 화합물 6 제조

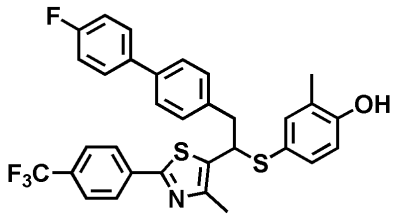


[0243]

[0244] 상기 실시예 11에서 제조된 화합물 1 500mg(0.98 mmol)을 무수 테트라하이드로퓨란 20ml에 녹이고, 온도를 -78℃로 내린다. 여기에 리튬 디이소프로필 아미드(LDA) 1.1 ml(1.8*M*,2.0당량) 천천히 부가한다. 그 후 반응용액에 4-(4-플루오르페닐)-벤질클로라이드 216 mg(0.98 mmol)을 넣고 반응온도를 서서히 실온으로 올린다. 30 분간 더 반응을 시킨 뒤, 염화암모늄 수용액으로 반응을 종결시키고 에틸아세테이트와 소금 수용액을 사용하여 유기용매를 추출하고 황산마그네슘으로 유기층의 수분을 제거한다. 여과 후, 용매를 감압 증류하고, 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0245] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.96 (d, 2H), 7.66 (d, 2H), 7.45 (m, 2H), 7.38 (d, 2H), 7.13~7.06 (m, 6H), 6.64 (t, 1H), 4.54 (m, 1H), 3.42 (m, 1H), 3.13 (m, 1H), 2.15 (s, 3H), 1.87 (s, 3H), 0.97 (s, 9H), 0.16 (s, 6H)

[0246] <실시예 17> 화합물 7 제조



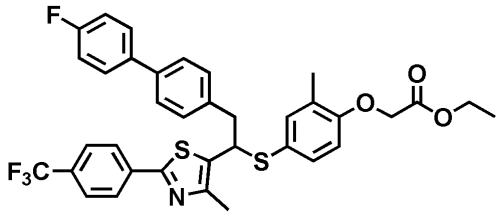
[0247]

[0248] 상기 실시예 16에서 제조된 화합물 6 500mg(0.72 mmol)을 테트라하이드로퓨란 10ml에 완전히 녹인다. 실온에서 테트라부틸암모늄플로라이드(TBAF) 1.8 ml(1 *M*-테트라하이드로퓨란 용액, 2.5 당량)을 천천히 부가한다. 30 분간 반응 후 염화암모늄 수용액과 에틸아세테이트를 이용하여 추출하고 유기층을 황산마그네슘으로 수분을 제거한다. 여과 후 용매를 감압 증류하고 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0249] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.80 (d, 2H), 7.67 (d, 2H), 7.50 (m, 2H), 7.41 (d, 2H), 7.17~7.05 (m, 6H),

6.63 (t, 1H), 4.95 (s, 1H), 4.54 (m, 1H), 3.40 (m, 1H), 3.13 (m, 1H), 2.17 (s, 3H), 1.89 (s, 3H)

[0250] <실시예 18> 화합물 8 제조

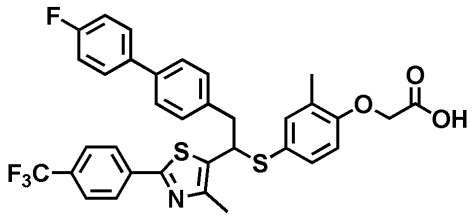


[0251]

[0252] 상기 실시예 17에서 제조된 화합물 7 300mg(0.52 mmol)과 5% 물을 포함한 아세톤 10ml, 탄산칼륨 179 mg(1.29 mmol, 2.5 당량)을 실온에서 잘 섞는다. 브로모아세트산에틸에스테르 69 ul(0.62 mmol, 1.2 당량)를 부가하고, 4시간 강렬히 교반하여 준다. 반응 종결 후, 소금 수용액과 에틸아세테이트를 사용하여 추출하고, 황산마그네슘으로 수분을 제거한다. 여과 후, 용매를 감압 증류하고, 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0253] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.80 (d, 2H), 7.67 (d, 2H), 7.50 (m, 2H), 7.41 (d, 2H), 7.17~7.05 (m, 6H), 6.63 (t, 1H), 4.59 (s, 2H), 4.55 (q, 1H), 4.23 (q, 2H), 3.40 (q, 1H), 3.11 (q, 1H), 2.20 (s, 3H), 1.87 (s, 3H), 1.26 (t, 3H)

[0254] <실시예 19> 화합물 9 제조

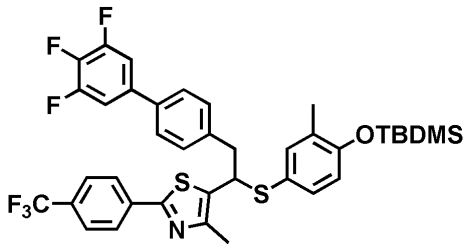


[0255]

[0256] 상기 실시예 18에서 제조된 화합물 8 300 mg(0.45 mmol)을 THF 15 ml및 물 10 ml에 잘 섞은 후, 0℃에서 60분 더 교반 후, 반응이 종결되면 0.5M $NaHSO_4$ 2.5ml를 가한 후 소금 수용액과 에틸아세테이트를 이용하여 추출한 뒤 여과 후, 용매를 감압 증류하고, LH-20 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0257] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.76 (d, 2H), 7.46 (d, 2H), 7.37 (m, 2H), 7.31 (d, 2H), 7.04~6.88 (m, 6H), 6.35 (t, 1H), 4.50 (t, 1H), 3.91 (S, 2H), 3.30 (q, 1H), 3.01 (q, 1H), 1.84 (S, 3H), 1.70 (S, 3H)

[0258] <실시예 20> 화합물 10 제조



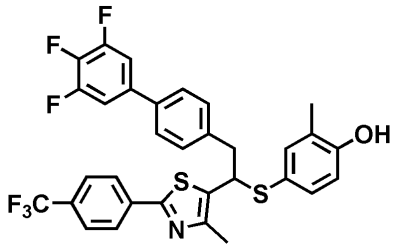
[0259]

[0260] 상기 실시예 11에서 제조된 화합물 1 500mg(0.98 mmol)을 무수 테트라하이드로퓨란 20ml에 녹이고, 온도를 -78℃로 내린다. 여기에 리튬 디이소프로필 아미드(LDA) 1.1 ml(1.8*M*,2.0당량) 천천히 부가한다. 그 후 반응용액에 4-(3,4,5-트라이플루오르페닐)벤질클로라이드 252 mg(0.98 mmol)을 넣고 반응온도를 서서히 실온으로 올린다. 30 분간 더 반응을 시킨 뒤, 염화암모늄 수용액으로 반응을 종결시키고 에틸아세테이트와 소금 수용액을 사용하

여 유기용매를 추출하고 황산마그네슘으로 유기층의 수분을 제거한다. 여과 후, 용매를 감압 증류하고, 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0261] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.98 (d, 2H), 7.66 (d, 2H), 7.38 (d, 2H), 7.18~7.04 (m, 6H), 6.63 (t, 1H), 4.54 (m, 1H), 3.41 (q, 1H), 3.13 (q, 1H), 2.11 (s, 3H), 1.88 (s, 3H), 0.99 (s, 9H), 0.18 (s, 6H)

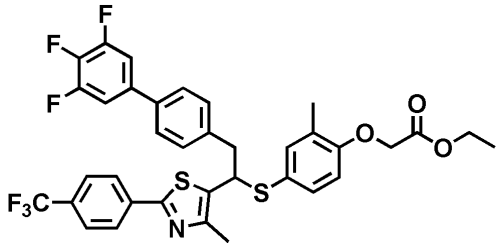
[0262] <실시예 21> 화합물 11 제조

[0263] 

[0264] 상기 실시예 20에서 제조된 화합물 10 500mg(0.69 mmol)을 테트라하이드로퓨란 10ml에 완전히 녹인다. 실온에서 테트라부틸암모늄플로라이드(TBAF) 1.7 ml(1 *M*-테트라하이드로퓨란 용액, 2.5 당량)을 천천히 부가한다. 30분간 반응 후 염화암모늄 수용액과 에틸아세테이트를 이용하여 추출하고 유기층을 황산마그네슘으로 수분을 제거한다. 여과 후 용매를 감압 증류하고 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0265] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.98 (d, 2H), 7.66 (d, 2H), 7.38 (d, 2H), 7.18~7.04 (m, 6H), 6.63 (t, 1H), 5.01 (s, 1H), 4.53 (m, 1H), 3.41 (q, 1H), 3.13 (q, 1H), 2.15 (s, 3H), 1.86 (s, 3H)

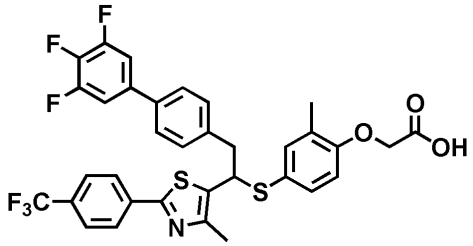
[0266] <실시예 22> 화합물 12 제조

[0267] 

[0268] 상기 실시예 21에서 제조된 화합물 11 300mg(0.49 mmol)과 5% 물을 포함한 아세톤 10ml, 탄산칼륨 146 mg(1.29 mmol, 2.5 당량)을 실온에서 잘 섞는다. 브로모아세트산에틸에스테르 65 ul(0.58 mmol, 1.2 당량)를 부가하고, 4시간 강렬히 교반하여 준다. 반응 종결 후, 소금 수용액과 에틸아세테이트를 사용하여 추출하고, 황산마그네슘으로 수분을 제거한다. 여과 후, 용매를 감압 증류하고, 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0269] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.98 (d, 2H), 7.66 (d, 2H), 7.38 (d, 2H), 7.17~7.06 (m, 6H), 6.55 (t, 1H), 4.57 (s, 2H), 4.53 (q, 1H), 4.23 (q, 2H), 3.41 (q, 1H), 3.13 (q, 1H), 2.20 (s, 3H), 1.88 (s, 3H), 1.25 (t, 3H)

[0270] <실시예 23> 화합물 13 제조

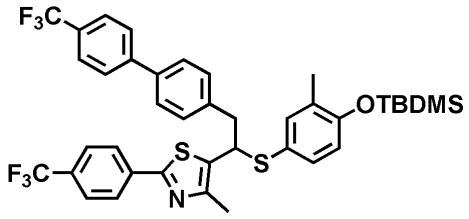


[0271]

[0272] 상기 실시예 22에서 제조된 화합물 12 300 mg(0.43 mmol)을 THF 15 ml및 물 10 ml에 잘 섞은 후, 0℃에서 60분 더 교반 후, 반응이 종결되면 0.5M $NaHSO_4$ 2.5ml를 가한 후 소금 수용액과 에틸아세테이트를 이용하여 추출한 뒤 여과 후, 용매를 감압 증류하고, LH-20 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0273] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.98 (d, 2H), 7.66 (d, 2H), 7.38 (d, 2H), 7.17~7.06 (m, 6H), 6.55 (t, 1H), 4.57 (s, 2H), 4.51 (t, 1H), 4.20 (s, 2H), 3.33 (q, 1H), 3.06 (q, 1H), 1.96 (s, 3H), 1.72 (s, 3H)

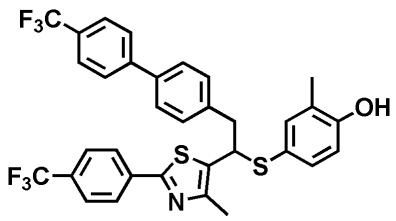
[0274] <실시예 24> 화합물 14 제조



[0275]

[0276] 상기 실시예 11에서 제조된 화합물 1 500mg(0.98 mmol)을 무수 테트라하이드로퓨란 20ml에 녹이고, 온도를 -78℃로 내린다. 여기에 리튬 디이소프로필 아미드(LDA) 1.1 ml(1.8*M*,2.0당량) 천천히 부가한다. 그 후 반응용액에 4-(4-트라이플루오르메틸)페닐벤질클로라이드 265 mg(0.98 mmol)을 넣고 반응온도를 서서히 실온으로 올린다. 30 분간 더 반응을 시킨 뒤, 염화암모늄 수용액으로 반응을 종결시키고 에틸아세테이트와 소금 수용액을 사용하여 유기용매를 추출하고 황산마그네슘으로 유기층의 수분을 제거한다. 여과 후, 용매를 감압 증류하고, 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

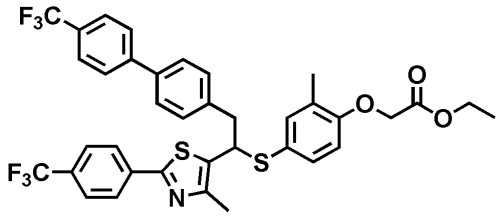
[0277] <실시예 25> 화합물 15 제조



[0278]

[0279] 상기 실시예 24에서 제조된 화합물 14 500mg(0.67 mmol)을 테트라하이드로퓨란 10ml에 완전히 녹인다. 실온에서 테트라부틸암모늄플로라이드(TBAF) 1.68 ml(1 *M*-테트라하이드로퓨란 용액, 2.5 당량)을 천천히 부가한다. 30분간 반응 후 염화암모늄 수용액과 에틸아세테이트를 이용하여 추출하고 유기층을 황산마그네슘으로 수분을 제거한다. 여과 후 용매를 감압 증류하고 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

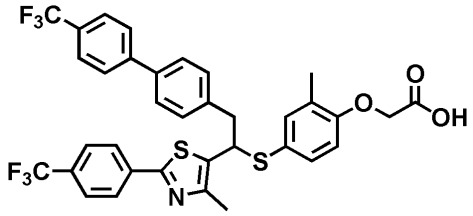
[0280] <실시예 26> 화합물 16 제조



[0281]

[0282] 상기 실시예 25에서 제조된 화합물 15 300mg(0.48 mmol)과 5% 물을 포함한 아세톤 10ml, 탄산칼륨 164 mg(1.19 mmol, 2.5 당량)을 실온에서 잘 섞는다. 브로모아세트산에틸에스테르 63 ul(0.57 mmol, 1.2 당량)를 부가하고, 4시간 강렬히 교반하여 준다. 반응 종결 후, 소금 수용액과 에틸아세테이트를 사용하여 추출하고, 황산마그네슘으로 수분을 제거한다. 여과 후, 용매를 감압 증류하고, 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0283] <실시예 27> 화합물 17 제조

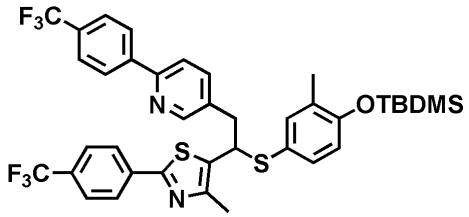


[0284]

[0285] 상기 실시예 26에서 제조된 화합물 16 300 mg(0.42 mmol)을 THF 15 ml및 물 10 ml에 잘 섞은 후, 0℃에서 60분 더 교반 후, 반응이 종결되면 0.5M $NaHSO_4$ 2.5ml를 가한 후 소금 수용액과 에틸아세테이트를 이용하여 추출한 뒤 여과 후, 용매를 감압 증류하고, LH-20 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0286] ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.77 (d, 2H), 7.59 (d, 2H), 7.50 (m, 4H), 7.38 (d, 2H), 7.10 (d, 2H), 6.90 (m, 2H), 6.38 (t, 1H), 4.50 (t, 1H), 4.07 (s, 2H), 3.33 (q, 1H), 3.06 (q, 2H), 1.69 (s, 3H), 1.24 (s, 3H)

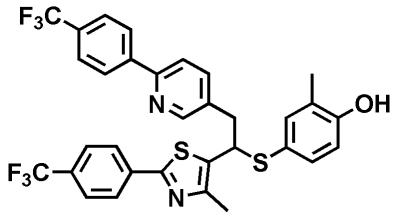
[0287] <실시예 28> 화합물 18 제조



[0288]

[0289] 상기 실시예 11에서 제조된 화합물 1 500mg(0.98 mmol)을 무수 테트라하이드로퓨란 20ml에 녹이고, 온도를 -78℃로 내린다. 여기에 리튬 디이소프로필 아미드(LDA) 1.1 ml(1.8*M*,2.0당량) 천천히 부가한다. 그 후 반응용액에 5-(클로로메틸)-2-(4-(트라이프루오르메틸)페닐)피리딘 266 mg(0.98 mmol)을 넣고 반응온도를 서서히 실온으로 올린다. 30 분간 더 반응을 시킨 뒤, 염화암모늄 수용액으로 반응을 종결시키고 에틸아세테이트와 소금 수용액을 사용하여 유기용매를 추출하고 황산마그네슘으로 유기층의 수분을 제거한다. 여과 후, 용매를 감압 증류하고, 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

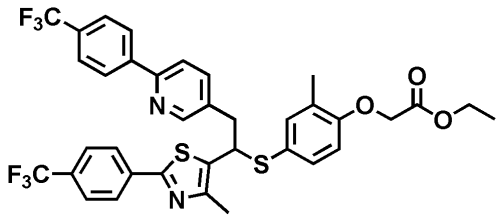
[0290] <실시예 29> 화합물 19 제조



[0291]

[0292] 상기 실시예 28에서 제조된 화합물 18 500mg(0.67 mmol)을 테트라하이드로퓨란 10ml에 완전히 녹인다. 실온에서 테트라부틸암모늄플로라이드(TBAF) 1.68 ml(1 M-테트라하이드로퓨란 용액, 2.5 당량)을 천천히 부가한다. 30분간 반응 후 염화암모늄 수용액과 에틸아세테이트를 이용하여 추출하고 유기층을 황산마그네슘으로 수분을 제거한다. 여과 후 용매를 감압 증류하고 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

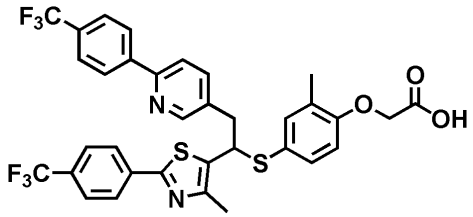
[0293] <실시예 30> 화합물 20 제조



[0294]

[0295] 상기 실시예 29에서 제조된 화합물 19 300mg(0.48 mmol)과 5% 물을 포함한 아세톤 10ml, 탄산칼륨 164 mg(1.19 mmol, 2.5 당량)을 실온에서 잘 섞는다. 브로모아세트산에틸에스테르 63 ul(0.57 mmol, 1.2 당량)를 부가하고, 4시간 강렬히 교반하여 준다. 반응 종결 후, 소금 수용액과 에틸아세테이트를 사용하여 추출하고, 황산마그네슘으로 수분을 제거한다. 여과 후, 용매를 감압 증류하고, 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0296] <실시예 31> 화합물 21 제조

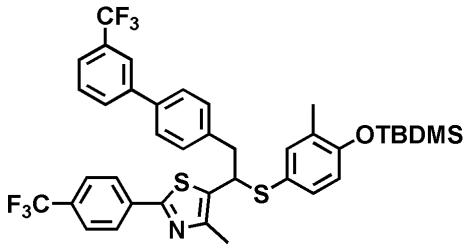


[0297]

[0298] 상기 실시예 30에서 제조된 화합물 20 300 mg(0.42 mmol)을 THF 15 ml및 물 10 ml에 잘 섞은 후, 0℃에서 60분 더 교반 후, 반응이 종결되면 0.5M $NaHSO_4$ 2.5ml를 가한 후 소금 수용액과 에틸아세테이트를 이용하여 추출한 뒤 여과 후, 용매를 감압 증류하고, LH-20 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0299] ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.38 (s, 1H), 7.94 (d, 2H), 7.78 (d, 2H), 7.61~7.47 (m, 5H), 7.33 (d, 1H), 6.89 (d, 2H), 6.38 (t, 1H), 4.46 (t, 1H), 4.04 (s, 2H), 3.27 (q, 1H), 3.02 (q, 2H), 1.84 (s, 3H), 1.75 (s, 3H)

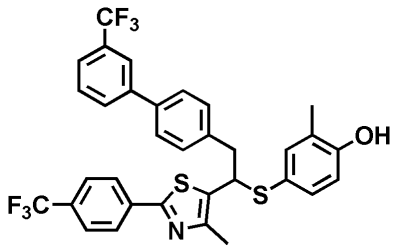
[0300] <실시예 32> 화합물 22 제조



[0301]

[0302] 상기 실시예 11에서 제조된 화합물 1 500mg(0.98 mmol)을 무수 테트라하이드로퓨란 20ml에 녹이고, 온도를 -78 ℃로 내린다. 여기에 리튬 디이소프로필 아미드(LDA) 1.1 ml(1.8*M*,2.0당량) 천천히 부가한다. 그 후 반응용액에 4-(3-트라이플루오르메틸)페닐벤질클로라이드 266 mg(0.98 mmol)을 넣고 반응온도를 서서히 실온으로 올린다. 30 분간 더 반응을 시킨 뒤, 염화암모늄 수용액으로 반응을 종결시키고 에틸아세테이트와 소금 수용액을 사용하여 유기용매를 추출하고 황산마그네슘으로 유기층의 수분을 제거한다. 여과 후, 용매를 감압 증류하고, 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

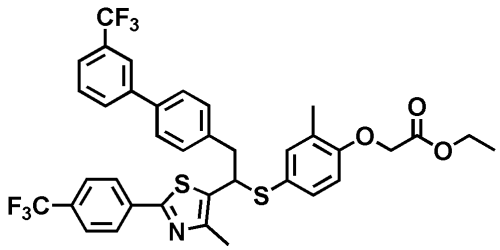
[0303] <실시예 33> 화합물 23 제조



[0304]

[0305] 상기 실시예 32에서 제조된 화합물 22 500mg(0.67 mmol)을 테트라하이드로푸란 10ml에 완전히 녹인다. 실온에서 테트라부틸암모늄플로라이드(TBAF) 1.68 ml(1 *M*-테트라하이드로퓨란 용액, 2.5 당량)을 천천히 부가한다. 30 분간 반응 후 염화암모늄 수용액과 에틸아세테이트를 이용하여 추출하고 유기층을 황산마그네슘으로 수분을 제거한다. 여과 후 용매를 감압 증류하고 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

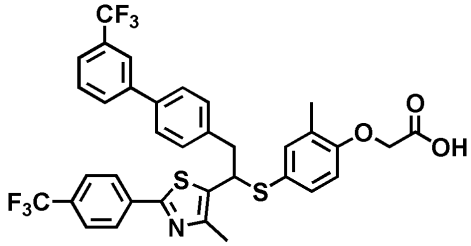
[0306] <실시예 34> 화합물 24 제조



[0307]

[0308] 상기 실시예 33에서 제조된 화합물 23 300mg(0.48 mmol)과 5% 물을 포함한 아세톤 10ml, 탄산칼륨 164 mg(1.19 mmol, 2.5 당량)을 실온에서 잘 섞는다. 브로모아세트산에틸에스테르 63 ul(0.57 mmol, 1.2 당량)를 부가하고, 4시간 강렬히 교반하여 준다. 반응 종결 후, 소금 수용액과 에틸아세테이트를 사용하여 추출하고, 황산마그네슘으로 수분을 제거한다. 여과 후, 용매를 감압 증류하고, 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0309] <실시예 35> 화합물 25 제조

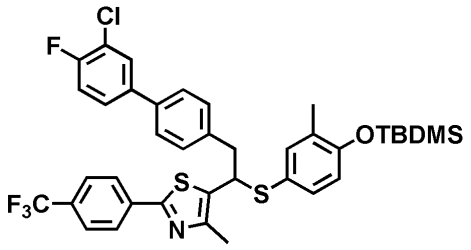


[0310]

[0311] 상기 실시예 34에서 제조된 화합물 24 300 mg(0.42 mmol)을 THF 15 ml및 물 10 ml에 잘 섞은 후, 0℃에서 60분 더 교반 후, 반응이 종결되면 0.5M $NaHSO_4$ 2.5ml를 가한 후 소금 수용액과 에틸아세테이트를 이용하여 추출한 뒤 여과 후, 용매를 감압 증류하고, LH-20 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0312] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.96 (d, 2H), 7.78 (s, 1H), 7.68 (m, 3H), 7.58~7.45 (m, 4H), 7.20 (d, 3H), 7.07 (t, 1H), 6.57 (t, 1H), 4.70 (s, 2H), 4.57 (t, 1H), 3.43 (q, 1H), 3.15 (q, 1H), 2.18 (s, 3H), 1.81 (s, 3H)

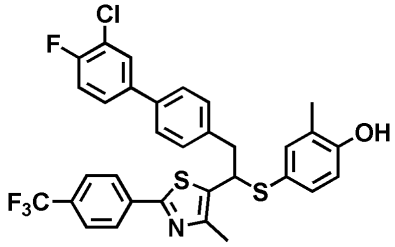
[0313] <실시예 36> 화합물 26 제조



[0314]

[0315] 상기 실시예 11에서 제조된 화합물 1 500mg(0.98 mmol)을 무수 테트라하이드로퓨란 20ml에 녹이고, 온도를 -78℃로 내린다. 여기에 리튬 디이소프로필 아미드(LDA) 1.1 ml(1.8*M*,2.0당량) 천천히 부가한다. 그 후 반응용액에 4-(3-클로로-4-트라이플루오르메틸)페닐벤질클로라이드 250 mg(0.98 mmol)을 넣고 반응온도를 서서히 실온으로 올린다. 30 분간 더 반응을 시킨 뒤, 염화암모늄 수용액으로 반응을 종결시키고 에틸아세테이트와 소금 수용액을 사용하여 유기용매를 추출하고 황산마그네슘으로 유기층의 수분을 제거한다. 여과 후, 용매를 감압 증류하고, 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0316] <실시예 37> 화합물 27 제조

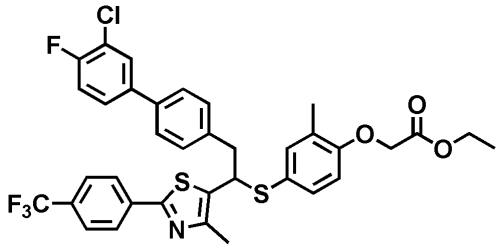


[0317]

[0318] 상기 실시예 36에서 제조된 화합물 26 500mg(0.69 mmol)을 테트라하이드로푸란 10ml에 완전히 녹인다. 실온에서 테트라부틸암모늄플로라이드(TBAF) 1.72 ml(1 *M*-테트라하이드로퓨란 용액, 2.5 당량)을 천천히 부가한다. 30분간 반응 후 염화암모늄 수용액과 에틸아세테이트를 이용하여 추출하고 유기층을 황산마그네슘으로 수분을 제거한다. 여과 후 용매를 감압 증류하고 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0319] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.96 (d, 2H), 7.67 (d, 2H), 7.56 (q, 1H), 7.37 (m, 3H), 7.22~7.05 (m, 5H), 6.58 (t, 1H), 5.17 (s, 1H), 4.54 (q, 1H), 3.42 (q, 1H), 3.13 (q, 1H), 2.17 (s, 3H), 1.87 (s, 3H)

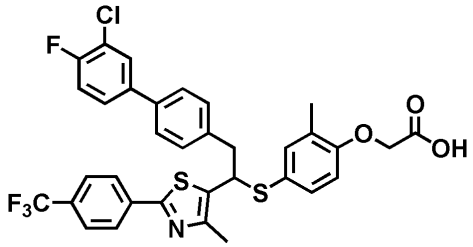
[0320] <실시예 38> 화합물 28 제조



[0321]

[0322] 상기 실시예 37에서 제조된 화합물 27 300mg(0.49 mmol)과 5% 물을 포함한 아세톤 10ml, 탄산칼륨 169 mg(1.19 mmol, 2.5 당량)을 실온에서 잘 섞는다. 브로모아세트산에틸에스테르 65 ul(0.59 mmol, 1.2 당량)를 부가하고, 4시간 강렬히 교반하여 준다. 반응 종결 후, 소금 수용액과 에틸아세테이트를 사용하여 추출하고, 황산마그네슘으로 수분을 제거한다. 여과 후, 용매를 감압 증류하고, 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0323] <실시예 39> 화합물 29 제조

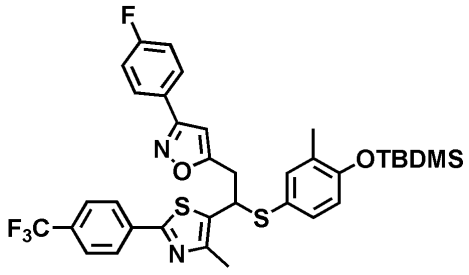


[0324]

[0325] 상기 실시예 38에서 제조된 화합물 28 300 mg(0.43 mmol)을 THF 15 ml및 물 10 ml에 잘 섞은 후, 0℃에서 60분 더 교반 후, 반응이 종결되면 0.5M $NaHSO_4$ 2.5ml를 가한 후 소금 수용액과 에틸아세테이트를 이용하여 추출한 뒤 여과 후, 용매를 감압 증류하고, LH-20 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0326] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.96 (d, 2H), 7.67 (d, 2H), 7.56 (q, 1H), 7.37 (m, 3H), 7.22~7.05 (m, 5H), 6.58 (t, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.56 (q, 1H), 3.42 (q, 1H), 3.14 (q, 1H), 2.19 (s, 3H), 1.81 (s, 3H)

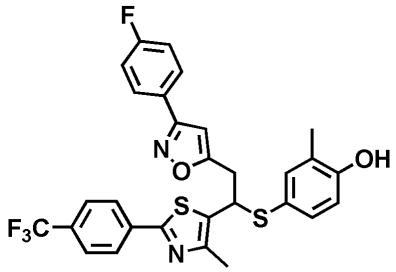
[0327] <실시예 40> 화합물 30 제조



[0328]

[0329] 상기 실시예 11에서 제조된 화합물 1 500mg(0.98 mmol)을 무수 테트라하이드로푸란 20ml에 녹이고, 온도를 -78℃로 내린다. 여기에 리튬 디이소프로필 아미드(LDA) 1.1 ml(1.8*M*,2.0당량) 천천히 부가한다. 그 후 반응용액에 5-(클로로메틸)-3-(4-(트라이플루오르메틸)페닐)이소옥사졸 257 mg(0.98 mmol)을 넣고 반응온도를 서서히 실온으로 올린다. 30 분간 더 반응을 시킨 뒤, 염화암모늄 수용액으로 반응을 종결시키고 에틸아세테이트와 소금 수용액을 사용하여 유기용매를 추출하고 황산마그네슘으로 유기층의 수분을 제거한다. 여과 후, 용매를 감압 증류하고, 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

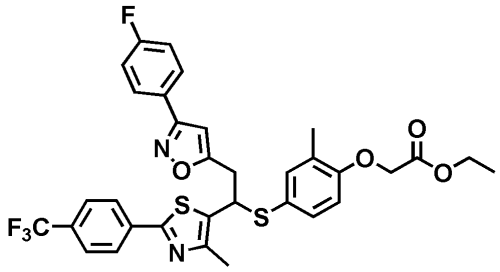
[0330] <실시예 41> 화합물 31 제조



[0331]

[0332] 상기 실시예 40에서 제조된 화합물 30 500mg(0.72 mmol)을 테트라하이드로푸란 10ml에 완전히 녹인다. 실온에서 테트라부틸암모늄플로라이드(TBAF) 1.80 ml(1 *M*-테트라하이드로퓨란 용액, 2.5 당량)을 천천히 부가한다. 30분간 반응 후 염화암모늄 수용액과 에틸아세테이트를 이용하여 추출하고 유기층을 황산마그네슘으로 수분을 제거한다. 여과 후 용매를 감압 증류하고 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0333] <실시예 42> 화합물 32 제조

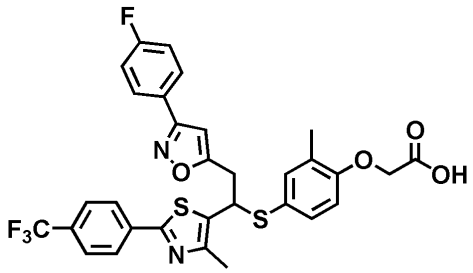


[0334]

[0335] 상기 실시예 41에서 제조된 화합물 31 300mg(0.53 mmol)과 5% 물을 포함한 아세톤 10ml, 탄산칼륨 182 mg(1.19 mmol, 2.5 당량)을 실온에서 잘 섞는다. 브로모아세트산에틸에스테르 70 ul(0.63 mmol, 1.2 당량)를 부가하고, 4시간 강렬히 교반하여 준다. 반응 종결 후, 소금 수용액과 에틸아세테이트를 사용하여 추출하고, 황산마그네슘으로 수분을 제거한다. 여과 후, 용매를 감압 증류하고, 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0336] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.96 (d, 2H), 7.66 (m, 2H), 7.20~7.08 (m, 4H), 6.58 (t, 1H), 6.22 (s, 1H), 4.61 (s, 2H), 4.57 (t, 1H), 4.25 (m, 2H), 3.42 (q, 1H), 3.14 (q, 1H), 1.88 (s, 3H), 1.57 (s, 3H), 1.27 (t, 3H)

[0337] <실시예 43> 화합물 33 제조



[0338]

[0339] 상기 실시예 34에서 제조된 화합물 32 300 mg(0.46 mmol)을 THF 15 ml및 물 10 ml에 잘 섞은 후, 0℃에서 60분 더 교반 후, 반응이 종결되면 0.5M $NaHSO_4$ 2.5ml를 가한 후 소금 수용액과 에틸아세테이트를 이용하여 추출한 뒤 여과 후, 용매를 감압 증류하고, LH-20 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물을 얻었다.

[0340] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.96 (d, 2H), 7.66 (m, 2H), 7.20~7.08 (m, 4H), 6.58 (t, 1H), 6.22 (s, 1H), 4.70 (q, 1H), 4.63 (s, 2H), 3.44 (q, 1H), 3.25 (q, 1H), 2.21 (s, 3H), 2.02 (s, 3H)

[0341] <실시예 44> 개발물질의 *in vitro* 활성 검증 (Transfection assay)

[0342] CV-1세포를 이용하여 assay를 수행하였다. 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, 개발 물질 처리, 결과 확인의 4단계 나누어 수행하였다. CV-1세포를 96웰 플레이트에 5,000 cell/well로 접종하고, 24시간 후에 트랜스팩션 하였다. PPARs 플라스미드 DNA와 reporter DNA, β-galactosidase DNA를 Transfection reagent와 혼합하여 세포에 처리하였다. 개발 물질을 디메틸설폭시드(DMSO)에 녹인 후, 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 2

[0343] EC_{50}데이터

화합물 번호	hPPARδ (nM)	hPPARa	hPPARg
5	3.3	ia	ia
9	3.9	ia	ia
13	8.8	ia	ia
17	6.4	ia	ia
21	10.6	ia	ia
25	6.1	ia	ia
28	4.6	ia	ia
33	41.4	ia	ia

[0344] 상기 표 2에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 화합물은 PPARδ에 매우 선택적이며, PPARδ에 대하여 2 - 200 nM 사이의 활성을 가지고 있다.

[0345] <실시예 45> 개발물질의 *in vivo* 활성 검증

[0346] *In vitro* 실험결과 우수한 PPARδ 활성을 보이는 화합물 5, 9에 대한 *in vivo* 활성을 확인하고자 동물 실험을 수행하였다.

[0347] (1) 비만 억제효능 검증

[0348] 본 발명에 따른 물질에 대한 in vivo 효과를 검정하기 위해서 mouse를 이용한 실험을 수행하였다. 8주령의 C57BL/6 마우스를 이용하였고, 비만을 유도하기 위하여 35%의 지방이 함유된 사료를 사용하였다. 60일 동안 고지방을 섭취시키면서 vehicle과 화합물 5, 화합물 9(10mg/Kg/day)를 경구 투여하였다. 실험결과 화합물 5를 투여한 그룹은 vehicle을 투여한 대조군 그룹에 비해 35% 비만 억제효과가 있었으며, 화합물 9번을 투여한 그룹은 33%의 억제 효능이 있음을 입증하였다.

[0349] (2) 당뇨개선효과 검증

[0350] 본 발명에 따른 물질에 대한 당뇨개선 효과를 검증하기 위하여 포도당 저항성 테스트 (GTT: glucose tolerance test)를 실시하였다. 70일 동안 약물을 경구 투여한 고지방 유도 당뇨 마우스에 포도당(1.5g/Kg)을 복강 투여한 후, 2시간 동안 혈당 변화를 측정하였다. 그 결과 화합물 5, 9(10mg/Kg/day)를 투여한 그룹은 대조군에 비해 20-40분 사이에 혈당이 급속히 감소하였고, 100분 후에는 포도당 clearance가 완벽히 일어났다. 하지만 vehicle

을 투여한 대조군 쥐의 그룹은 120분 후에도 정상혈당을 유지하지 못하였다. 이러한 결과로부터 개발물질인 화합물 5, 9의 당뇨개선 효과를 있음을 입증하였다.

[0351] (3) 고지혈증

[0352] 고밀도 콜레스테롤(HDL)은 체내에서 표피 세포의 콜레스테롤 수치를 낮추고, 염증반응을 완화하는 등의 역할을 하면서 동맥경화, 고지혈증과 같은 지방대사질환을 치료하는데 중요한 역할을 하는 것이 알려져 있다. 본 발명의 개발물질인 화합물 5, 9의 고밀도 콜레스테롤 증가효과를 확인하기 위하여 10% 지방이 포함된 사료를 6주간 섭취시킨 마우스의 혈청을 분리하였다. 혈청 내의 고밀도 콜레스테롤(HDL)의 농도를 분석한 결과 GW501516을 투여한 그룹은 29%의 고농도 콜레스테롤이 증가하였으나, 화합물 5, 9을 투여한 그룹은 각각 68, 62%가 증가하였다.

[0353] (4) 동맥경화 예방 및 치료 효능

[0354] 본 발명의 개발물질인 화합물 5, 9의 동맥경화 예방 및 치료 효능을 검증하기 위하여 ApoE-/- 마우스를 이용한 *in vivo* 실험을 진행하였다. 동맥경화 질환 모델인 ApoE-/- 마우스에게 고농도 콜레스테롤 사료(21%의 고지방, 1.25%의 고콜레스테롤 사료)를 14주 동안 섭취시켜 동맥경화를 유발한 후, 마지막 4주 동안 화합물 5, 9을 투여하였다. 약물을 처리하는 방식을 택하였다. 마우스의 동맥을 적출하여 en face 방법으로 분석한 결과 동맥경화의 발병이 화합물 5, 9에 의해 각각 23, 18% 감소된 것을 확인하였다.

[0355] (5) 근 지구력 증진 효능 입증

[0356] 본 발명에 따른 물질에 대한 근 지구력 강화 및 근 기능 증진효과를 검증하기 위하여 동물실험을 수행하였다. 태자 재프로그래밍 효능을 확인하기 위해 화합물 5, 9를 10 mg/kg/day 농도로 경구 투여하였다. 피부 제거 후 근육을 관찰한 결과, 투여군이 대조군에 비해 더 붉은 것이 관찰 관찰되었다. 이러한 근섬유의 변화가 근 지구력 및 근 기능 개선효과에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Treadmill을 이용한 실험을 수행하였다. 그 결과 아래 결과와 같이 개발 물질에 달린 시간과 달린 거리가 현저히 증가한 것을 확인하였고, 이로부터 개발물질의 지구력 증진 효능을 입증하였다.

표 3

[0357] Treadmill을 이용한 지구력 테스트 결과

증가율 (투여군/대조군)	임신기간		수유기간		임신 + 수유기간	
	시 간	거 리	시 간	거 리	시 간	거 리
화합물 5	2.4배	2.5배	2.1배	2.2배	3.6배	3.9배
화합물 9	1.9배	1.9배	1.5배	1.5배	2.8배	3.0배

[0358] 또한 개발물질을 근 지구력 강화 및 근 기능 증진효과가 입증되었다. 10주령의 C57BL/6 쥐에게 개발물질을 10 mg/kg/day 농도로 경구 투여하면서 운동 시켰다. 운동은 30일 동안 하루에 한번, 30분씩 Treadmill을 이용하여 시켰다. 운동 조건은 2 meter/min 속도로 5분, 5 meter/min 속도로 5분, 8 meter/min 속도로 5분, 20 meter/min 속도로 5분 동안 운동시켰다. 실험 종료 시점에서 Treadmill을 이용하여 근 지구력 강화 및 근 기능 증진효과를 테스트 하였다. 그 결과 대조군에 비해 처리군의 운동시간 (화합물 5: 1.7배, 화합물 9: 1.5배) 및 운동거리 (화합물 5: 1.8배, 화합물 9: 1.5배)가 모두 증가하였다.

[0359] (6) 기억력 증진 효능 입증

[0360] 본 발명에 따른 물질의 기억력 증진 효능을 검증하기 위하여 동물실험을 수행하였다. 태자 재프로그래밍 기간 중 개발물질 화합물 5, 9를 10 mg/kg/day 농도로 어미에 경구 투여하였다. Morris water maze 테스트를 이용하여 대조군과 투여군 사이의 뇌기능 차이를 확인해보았다. 그 결과 개발물질을 투여 한 그룹(화합물 5: 8.2초, 화합물 9: 9.7초)의 기억력이 대조군 그룹(Vehicle: 28초)에 비해 현저히 증가하였다.

[0361] <실시예 46> PPARδ 활성물질을 유효성분하는 제제 제조

[0362] 본 발명의 PPARδ 활성물질은 인간을 포함하는 포유 동물에 경구적 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. PPARδ 활성물질을 유효성분으로 하는 조성물은 특별한 제제로 한정되지 않고, 경구 투여제, 점적액제, 정제, 분제, 액제 좌약, 외용제, 첩포제, 정맥 주사액, 산제, 과립제, 당의정, 캡슐제, 알약, 현탁제, 액제, 앰플, 주사액 등으로 조제할 수 있으며, 그 이외 어떠한 형상의 의약품에도 응용할 수 있다.

[0363] 제조예 1: 정제 제조

[0364] 하기 성분을 혼합하여 통상적 방법으로 정제를 제조하였다.

[0365] 화학식 I 화합물 (예시: 5, 9번 화합물) 15 mg

[0366] 유당 95 mg

[0367] 히드록시프로필셀룰로오스 3 mg

[0368] 칼슘 카르복시메칠셀룰로오스 8 mg

[0369] 스테아린산 마그네슘 0.5 mg

[0370] 제조예 2: 산제 제조

[0371] 하기 성분을 혼합하여 통상적 방법으로 산제를 제조하였다.

[0372] 화학식 I 화합물 (예시: 5, 9번 화합물) 30 mg

[0373] 유당 20 mg

[0374] 전분 15 mg

[0375] 스테아린산 마그네슘 적량

[0376] 제조예 3. 캅셀제 제조

[0377] 하기 성분을 혼합하여 통상적인 방법으로 경캅셀을 제조하였다.

[0378] 화학식 I 화합물 (예시: 5, 9번 화합물) 80 mg

[0379] 유당 30 mg

[0380] 전분 25 mg

[0381] 탈크 2 mg

[0382] 스테아린산 마그네슘 적량

[0383] 제조예 4. 연질캅셀제 제조

[0384] 하기 성분을 혼합하여 통상적인 방법으로 연질캅셀의 내용물을 준비하였다. 1캅셀당 젤라틴 132 mg, 농글리세린 50 mg, 70% 디솔비톨액 6 mg 및 착향제로 에틸바닐린 적량, 코팅기제로 카르나우바납을 사용하여 통상적인 방법으로 연질캅셀을 제조하였다.

[0385] 화학식 I 화합물 (예시: 5, 9번 화합물) 80 mg

[0386] 폴리에틸렌글리콜 400 400 mg

[0387] 농글리세린 50 mg

[0388] 정제수 35 mg

[0389] 제조예 5. 현탁제 제조

[0390] 하기 성분을 혼합하여 통상적인 방법으로 현탁제를 제조하였다.

[0391] 화학식 I 화합물 (예시: 5, 9번 화합물) 50 mg

[0392] 이성화당 10 g

[0393] 설탕 25 mg

[0394] 칼슘 카르복시메칠셀룰로오스 50 mg

[0395] 레몬향 적량

[0396] 정제수를 이용하여 총 제조용량을 100 ml로 맞춤.

[0397] 제조예 6. 주사제 제조

[0398] 하기 성분을 혼합하여 통상적인 방법으로 1 앰플당(2 ml) 하기의 성분 함량으로 제조하였다.

[0399] 화학식 I 화합물 (예시: 5, 9번 화합물) 20 mg

[0400] 만니톨 180 mg

[0401] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0402] 제2인산나트륨 26 mg

[0403]

[0404] 제조예 7. 연고제 제조

[0405] 하기 성분을 혼합하여 통상적인 방법으로 연고제(예시 1 내지 3)를 제조하였다.

[0406] [예시 1]

[0407] 화학식 I 화합물 (예시: 5, 9번 화합물) 0.5 wt%

[0408] 백색 페트롤라텀 70 wt%

[0409] 광유 5 wt%

[0410] 폴리옥실스테아릴에테르 5 wt%

[0411] 폴리에틸렌글리콜 (예: PEG 400 또는 USP) 19.2 wt%

[0412] 부틸하이드록시아니솔 0.3 wt%

[0413]

[0414] [예시 2]

[0415] 화학식 I 화합물 (예시: 5, 9번 화합물) 0.5 wt%

[0416] 백색 페트롤라텀 70 wt%

[0417] 광유 5 wt%

[0418] 폴리옥실스테아릴에테르 5 wt%

[0419] 폴리에틸렌글리콜 (예: PEG 400 또는 USP) 19.2 wt%

[0420] 부틸하이드록시아니솔 0.2 wt%

[0421] 파라벤(예: 메틸파라벤 또는 프로필파라벤) 0.1 wt%

[0422] [예시 3]

[0423] 화학식 I 화합물 (예시: 5, 9번 화합물) 0.01 내지 2 wt%

[0424] 백색 페트롤라텀 30 내지 75 wt%

[0425] 광유 2 내지 10 wt%

[0426] 폴리옥실스테아릴에테르 0.3 내지 10 wt%

[0427] 폴리에틸렌글리콜 (예: PEG 400 또는 USP) 2 내지 45 wt%

[0428] 부틸하이드록시아니솔 0 wt% 또는 0.002 내지 2.5 wt%

[0429] 파라벤(예: 메틸파라벤 또는 프로필파라벤) 0 wt% 또는 0.01 내지 1.5 wt%

[0430] 제조예 8. 크림제 제조

[0431] 하기 성분을 혼합하여 통상적인 방법으로 외부 국소용 크림제(예시 1내지 2)를 제조하였다.

[0432] [예시 1]

[0433] 화학식 I 화합물 (예시: 5, 9번 화합물) 0.1 wt%

[0434] 백색 페트롤라텀 40 wt%

[0435] 광유 11 wt%

[0436] 폴리옥실스테아릴에테르 8.5 wt%

[0437] 프로필렌글리콜 18 wt%

[0438] 부틸하이드록시아니솔 0.02 wt%

[0439] 정제수 적당량(22.38 wt%)

[0440] [예시 2]

[0441] 화학식 I 화합물 (예시: 5, 9번 화합물) 0.01 내지 3 wt%

[0442] 백색 페트롤라텀 30 내지 75 wt%

[0443] 광유 2 내지 10 wt%

[0444] 폴리옥실스테아릴에테르 0.3 내지 10 wt%

[0445] 프로필렌글리콜 0.3 내지 45 wt%

[0446] 부틸하이드록시아니솔 0.002 내지 2.5 wt%

[0447] 파라벤(예: 메틸파라벤 또는 프로필파라벤) 0.01 내지 3.5 wt%

[0448] 정제수 적당량(2 내지 30 wt%)

[0449] 제조예 9. 음료 제조

[0450] 하기 성분에 정제수를 적량 혼합하여 통상적인 방법으로 총 100 mL이 되도록 음료를 제조하였다.

[0451] 화학식 I 화합물 (예시: 5, 9번 화합물) 2 mg

[0452] 구연산 9 g

[0453] 백당 9 g

[0454] 포도당 2.8 g

[0455] DL-사과산 0.25 g

[0456] 정제수 적량

[0457] 제조예 9. 식품 제조

[0458] 9-1. 조리용 양념 제조

[0459] 화학식 I 화합물 (예시: 5, 9번 화합물)을 0.001~0.2 중량부로 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

[0460] 9-2. 분식 식품 제조

[0461] 화학식 I 화합물 (예시: 5, 9번 화합물)을 0.001~0.2 중량부로 밀가루에 첨가하고, 이를 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0462] 9-3. 유제품(dairy products) 제조

[0463] 화학식 I 화합물 (예시: 5, 9번 화합물)을 0.001~0.2 중량부로 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터, 아이스크림, 분유 및 이유식과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0464] 9-4. 쥬스 제조

[0465] 화학식 I 화합물 (예시: 5, 9번 화합물)을 0.001~0.2 중량부로 토마토, 당근 등의 채소나, 사과, 포도, 오렌지, 파인애플 등의 과일 쥬스 1,000 ㎖에 가하여 건강 증진용 쥬스를 제조하였다.

[0466] 제조예 10. 동물사료 제조

[0467] 하기 성분을 혼합하여 통상적인 방법으로 동물용 사료 1 kg을 제조하였다.

[0468] 화학식 I 화합물 (예시: 5, 9번 화합물) 0.1 g

[0469] 카제인 200 g

[0470] 옥수수전분(cornstarch) 400 g

[0471] 디이에트로즈(dyetrose) 130 g

[0472] 설탕 100 g

[0473] 셀룰로오스 50 g

[0474] 대두유(soybean oil) 70 g

[0475] 항산화제(예: t-butylhydroquinone) 0.02 g

[0476] 무기물(예: salt mix) 35 g

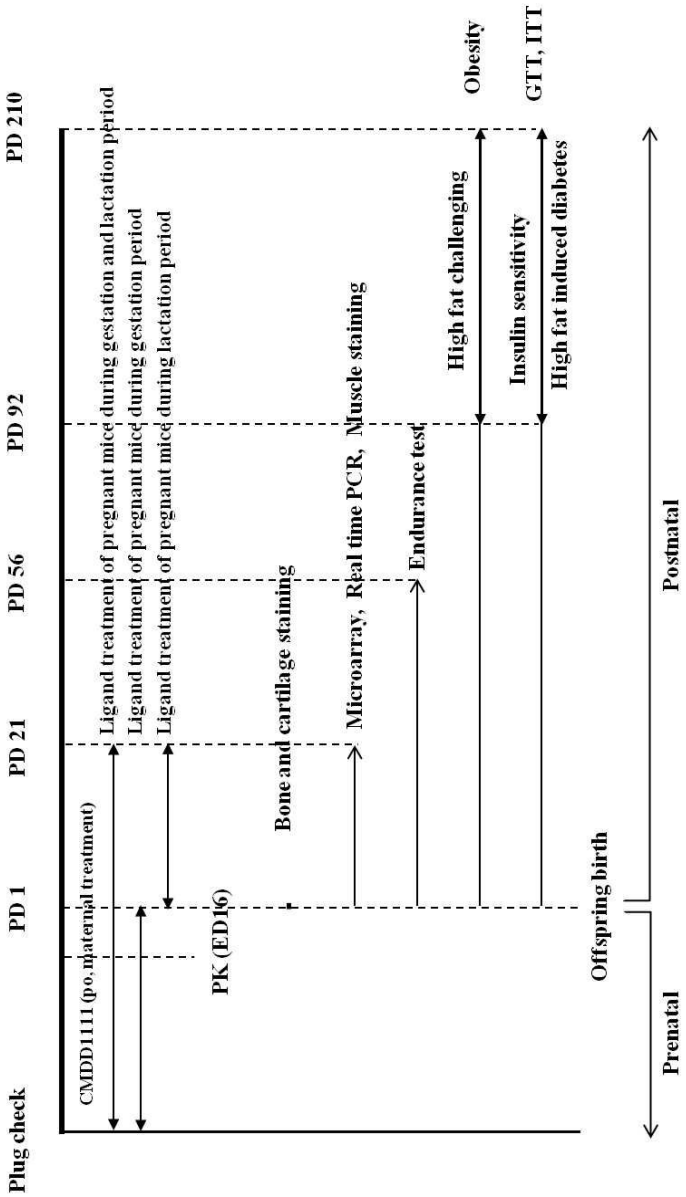
[0477] 비타민(예: vitamin mix) 10 g

[0478] L-시스틴(L-cystine) 3 g

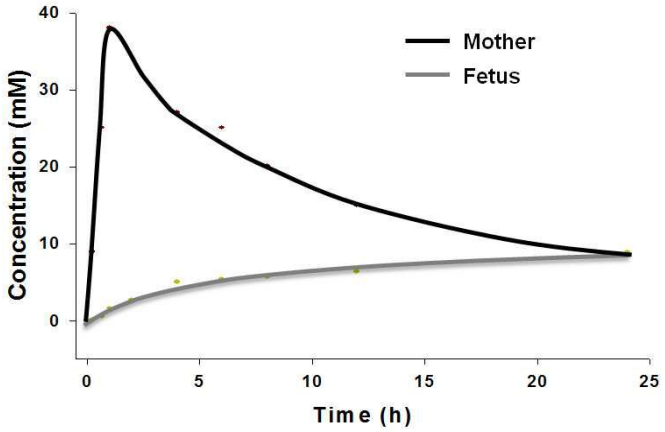
[0479] 콜린바이타트레이트(choline bitartrate) 2 g

도면

도면1


Plug check
PD 1
PD 21
PD 56
PD 92
PD 210
CMDD1111 (po, maternal treatment)
Ligand treatment of pregnant mice during gestation and lactation period
Ligand treatment of pregnant mice during gestation period
Ligand treatment of pregnant mice during lactation period
PK (ED16)
Bone and cartilage staining
Microarray, Real time PCR, Muscle staining
Endurance test
High fat challenging
Insulin sensitivity
High fat induced diabetes
Obesity
GTT, ITT
Offspring birth
Postnatal
Prenatal

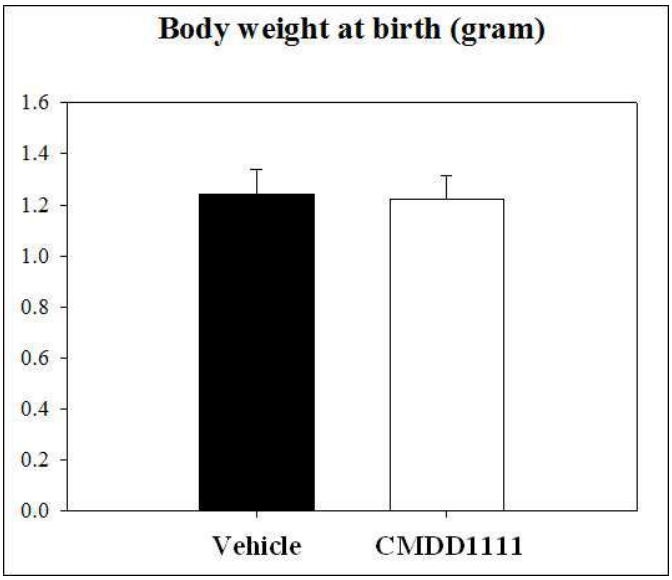
도면2



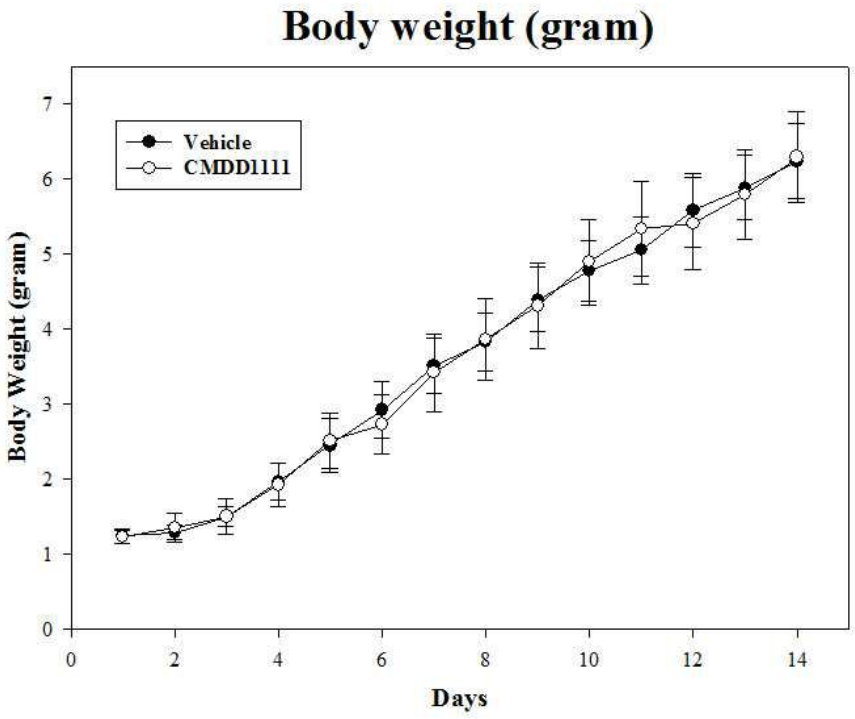
Mother
T_{max} : 1 h
C_{max} : 38 μM
$T_{1/2}$: 9 h

Fetus
T_{max} : 24 h
C_{max} : 9 μM

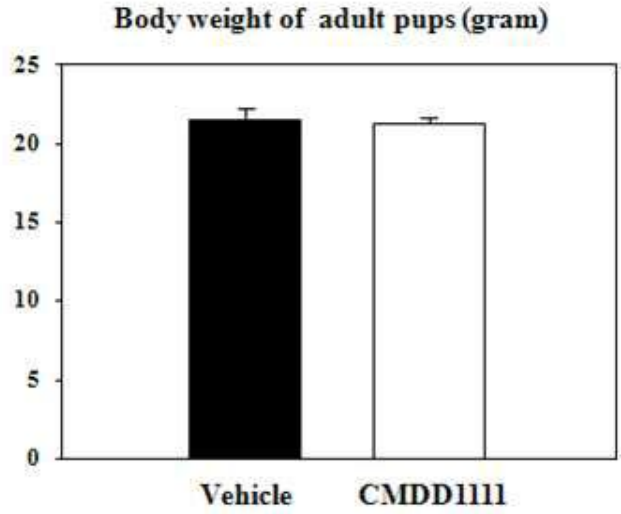
도면3



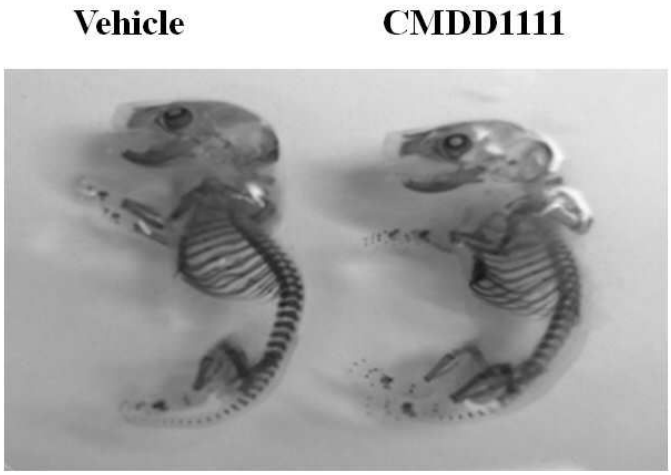
도면4


Body weight (gram)
Vehicle
CMDD1111
Body Weight (gram)
Days
0
1
2
3
4
5
6
7
0
2
4
6
8
10
12
14

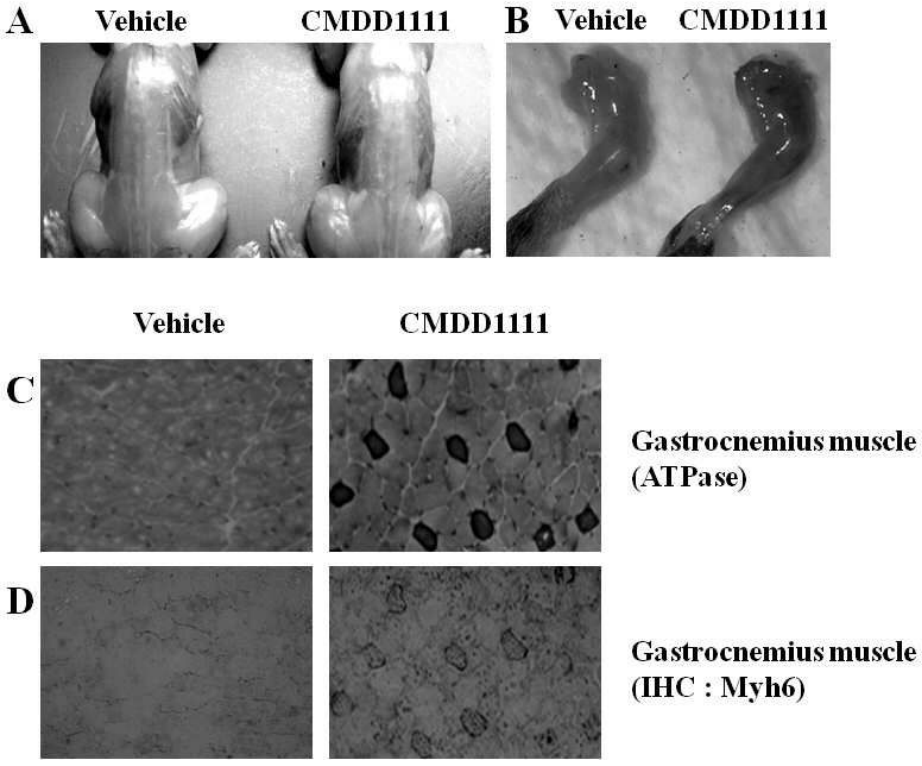
도면5


Body weight of adult pups (gram)
25
20
15
10
5
0
Vehicle
CMDD1111

도면6


Vehicle
CMDD1111

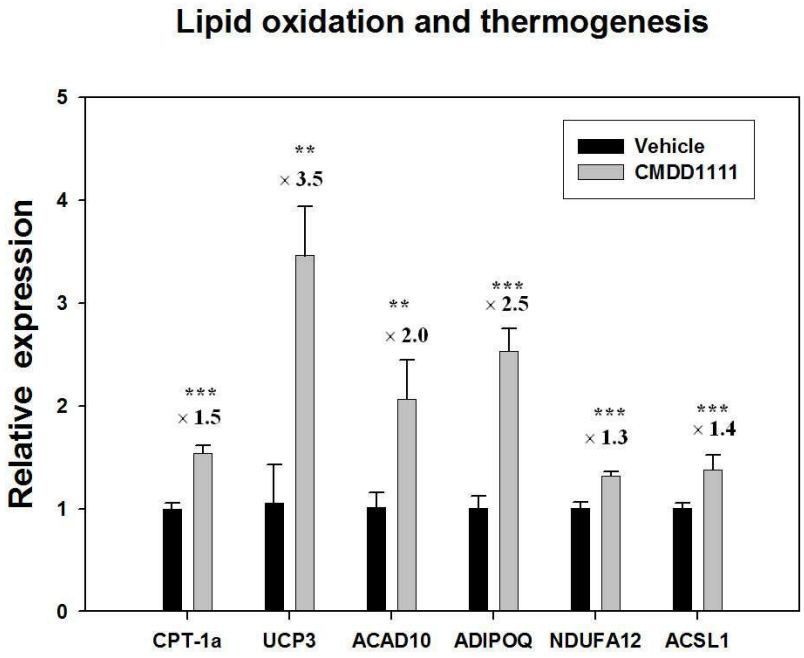
도면7


A
Vehicle
CMDD1111
B
Vehicle
CMDD1111
Vehicle
CMDD1111
C
Gastrocnemius muscle
(ATPase)
D
Gastrocnemius muscle
(IHC : Myh6)

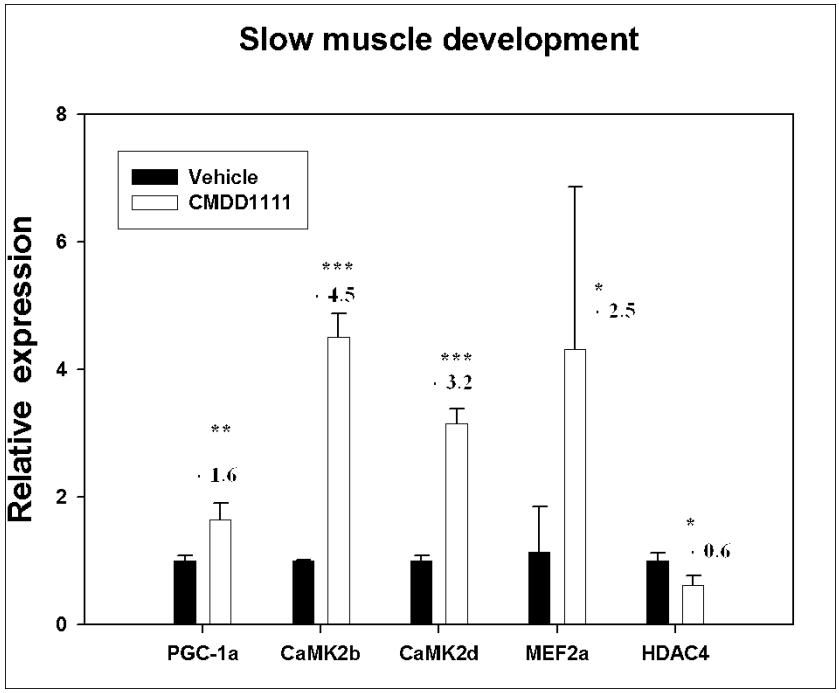
도면8

	Array (fold)
Lipid oxidation and thermogenesis	
Pantothenate kinase 1 (Mm.24742)	2.4
Carnitine palmitoyltransferase 1a (Mm.18522)	1.4
Cytochrome c oxidase 8a (Mm.29625)	1.7
AcylCoA Dehydrogenase (Mm.390367)	1.7
AcylCoA Synthase (Mm.007981)	1.5
Ubiquinone (Mm.347976)	2.0
Uncoupling protein 2 (Mm.171378)	1.5
Uncoupling protein 3 (Mm.6254)	2.3
Slow muscle development	
PPARgcoactivator 1 α (Mm.259072)	1.7
NFATC2 (Mm.116802)	1.7
NFAT3C (Mm.383185)	1.3
Mef2a (Mm.121691)	1.4
HDAC4 (Mm.318567)	-1.5
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta (Mm.255822)	1.8
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, beta (Mm.4857)	1.4
Muscle contraction	
Myosin binding protein C (Mm.10728)	2.8
Ryanodine receptor 2 (Mm.239871)	2.0
Ryanodine receptor 3 (Mm.246589)	1.5
Troponin T2 (Mm.247470)	2.3
Troponin I (Mm.27674)	3.2
Myosin heavy chain 6 (Mm.290003)	2.7
Myosin light chain 7 (Mm.46514)	2.9
ATPase, Ca++ transporting (Mm.227583)	1.4
Phospholamban (Mm.34145)	2.8

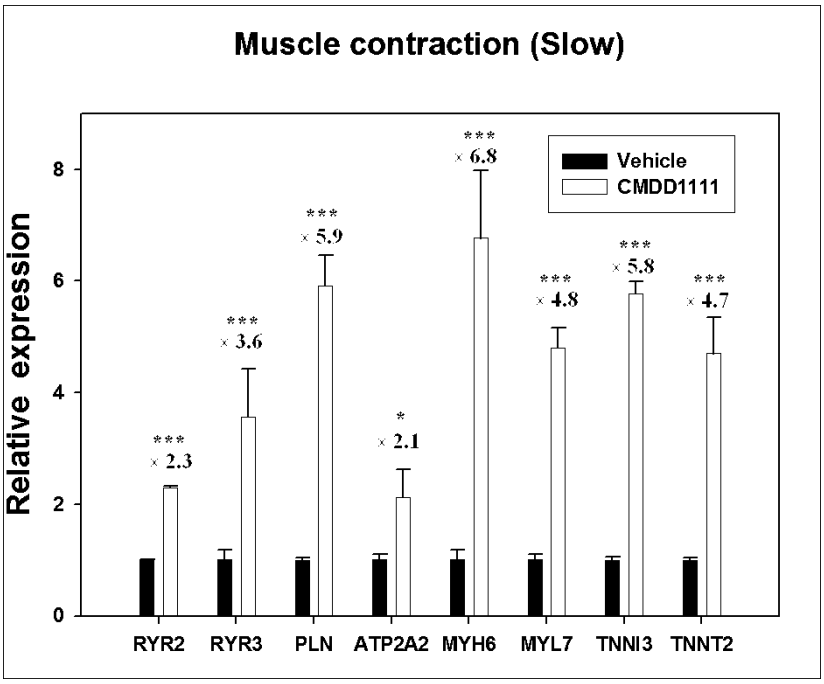
도면9


Lipid oxidation and thermogenesis
Relative expression
Vehicle
CMDD1111
***
× 1.5
**
× 3.5
**
× 2.0
***
× 2.5
***
× 1.3
***
× 1.4
CPT-1a
UCP3
ACAD10
ADIPOQ
NDUFA12
ACSL1

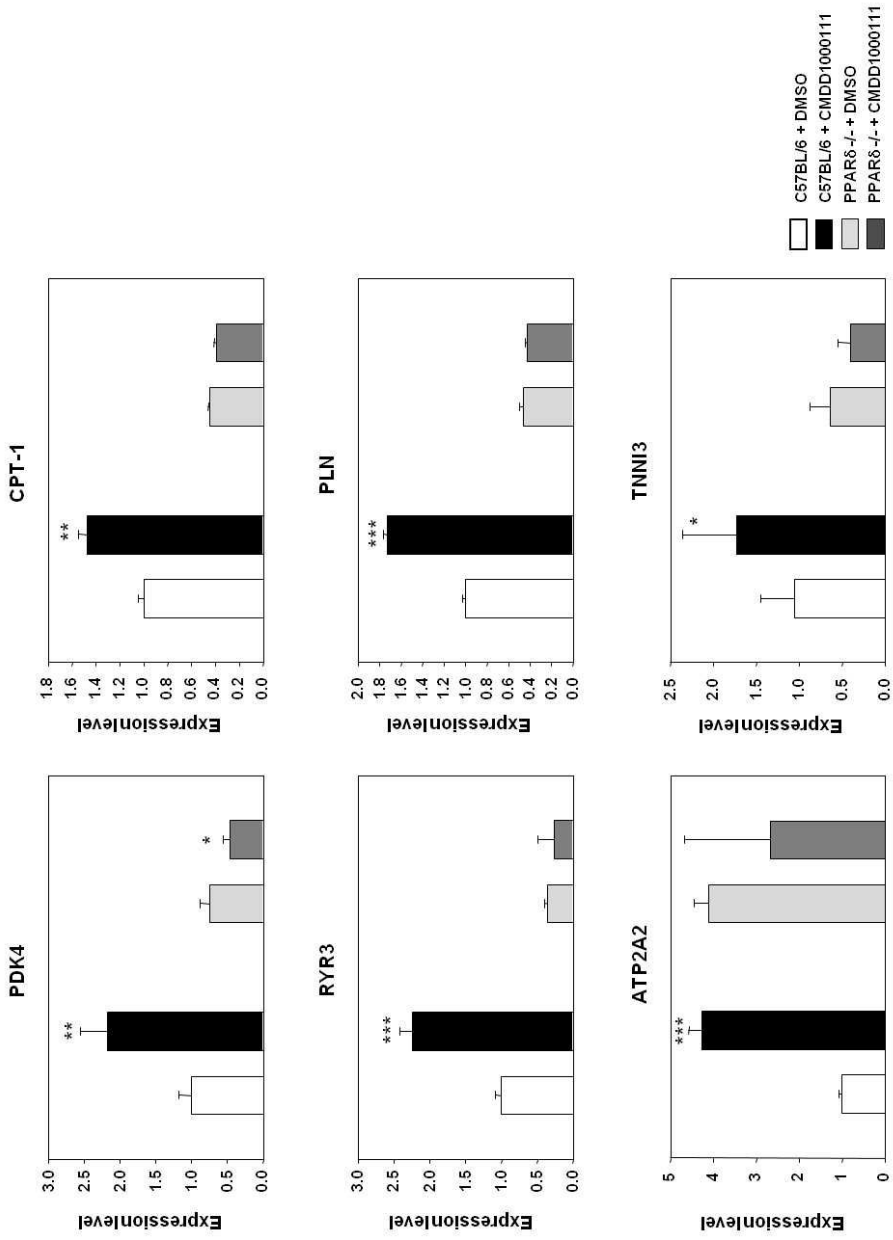
도면10


Slow muscle development
Relative expression
Vehicle
CMDD1111
**
1.6
***
4.5
***
3.2
*
2.5
*
0.6
PGC-1a
CaMK2b
CaMK2d
MEF2a
HDAC4

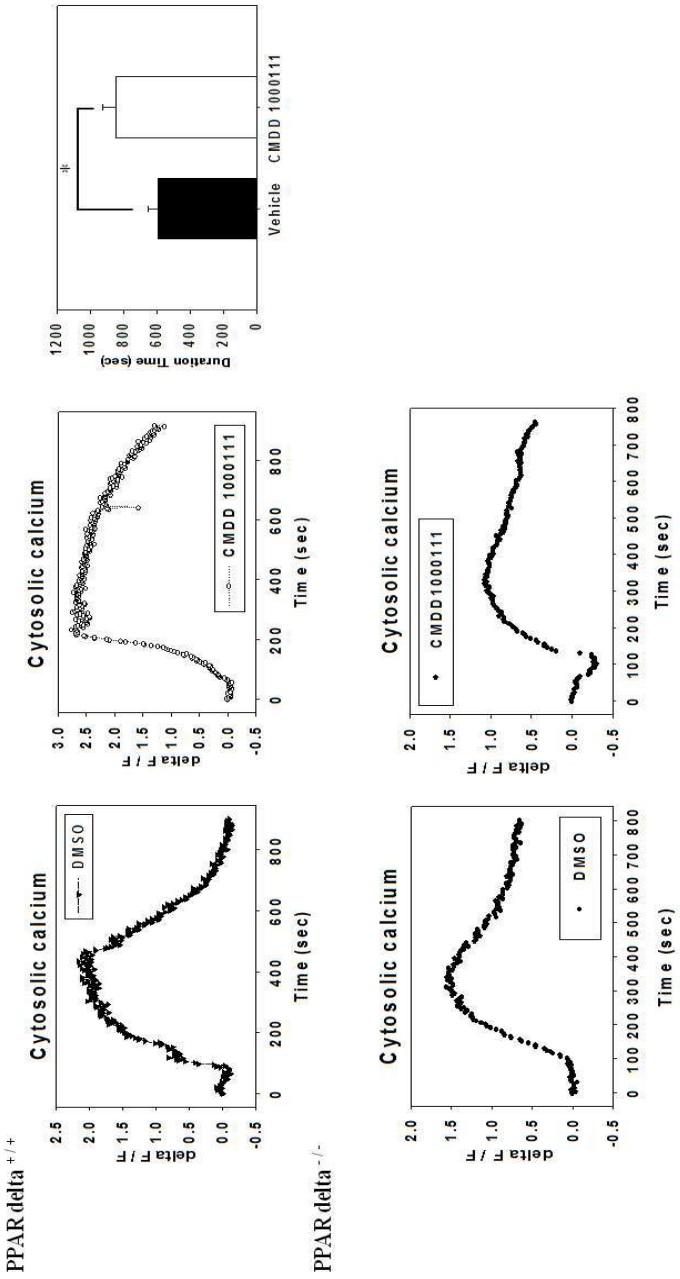
도면11


Muscle contraction (Slow)
Relative expression
0
2
4
6
8
Vehicle
CMDD1111
*** × 2.3
*** × 3.6
*** × 5.9
* × 2.1
*** × 6.8
*** × 4.8
*** × 5.8
*** × 4.7
RYR2
RYR3
PLN
ATP2A2
MYH6
MYL7
TNNI3
TNNT2

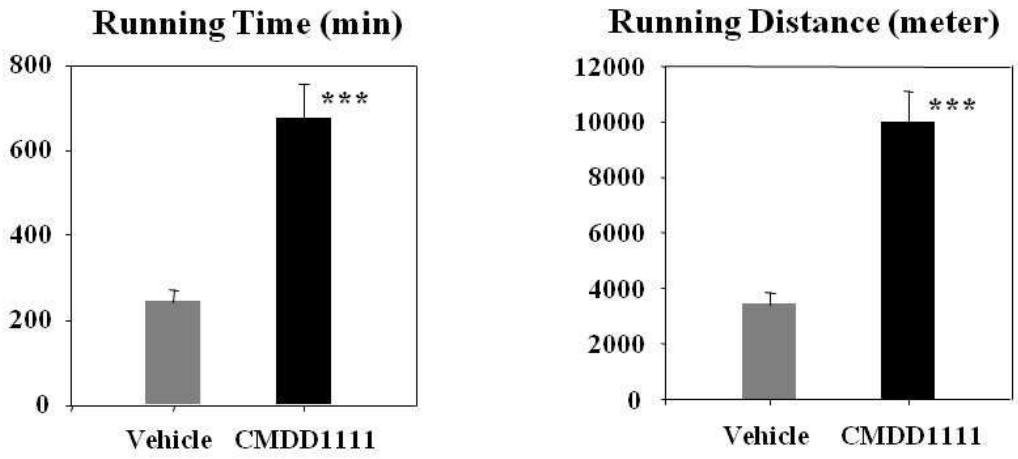
도면12


C57BL/6 + DMSO
C57BL/6 + CMDD1000111
PPARδ-/- + DMSO
PPARδ-/- + CMDD1000111
CPT-1
PLN
TNNI3
PDK4
RYR3
ATP2A2
Expressionlevel

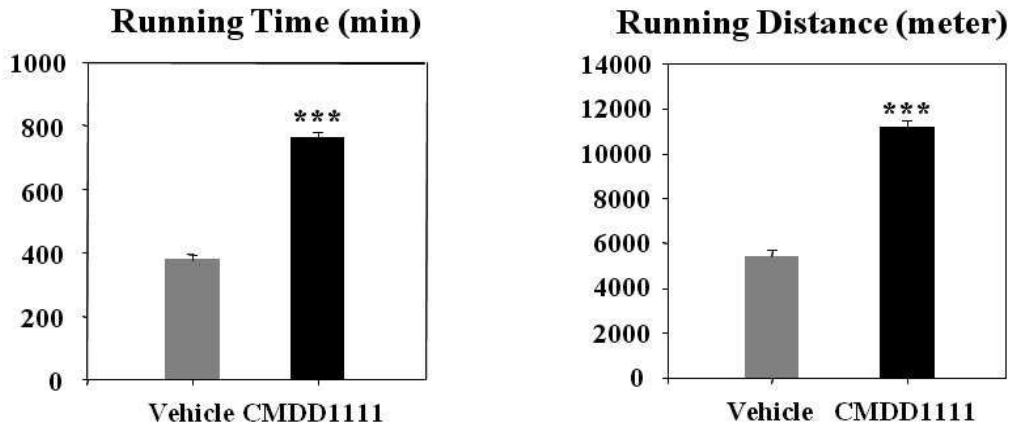
도면13


PPAR delta +/+
PPAR delta -/-
Cytosolic calcium
DMSO
CMDD 1000111
CMDD1000111
delta F / F
Time (sec)
Duration Time (sec)
Vehicle
CMDD 1000111

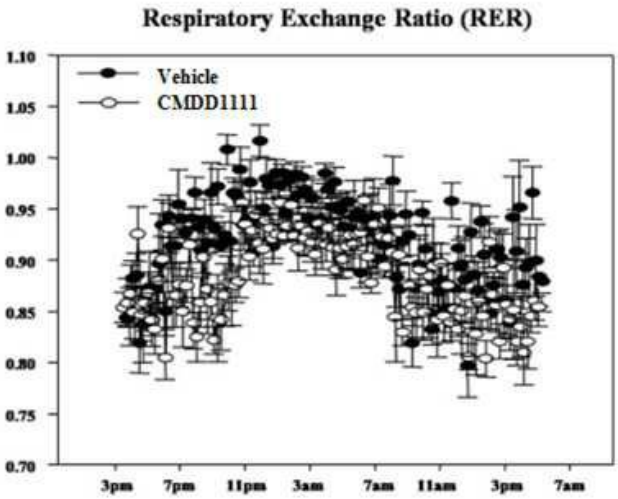
도면14



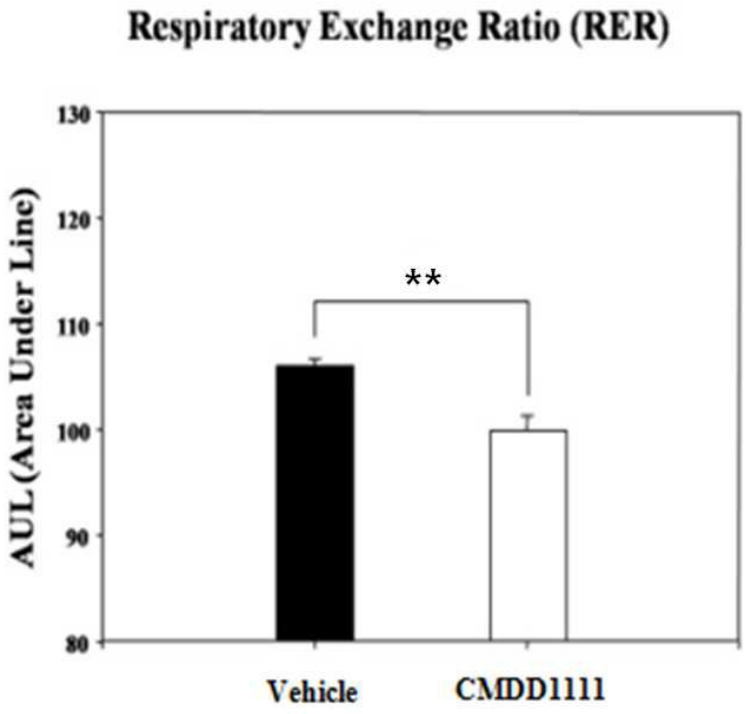
도면15



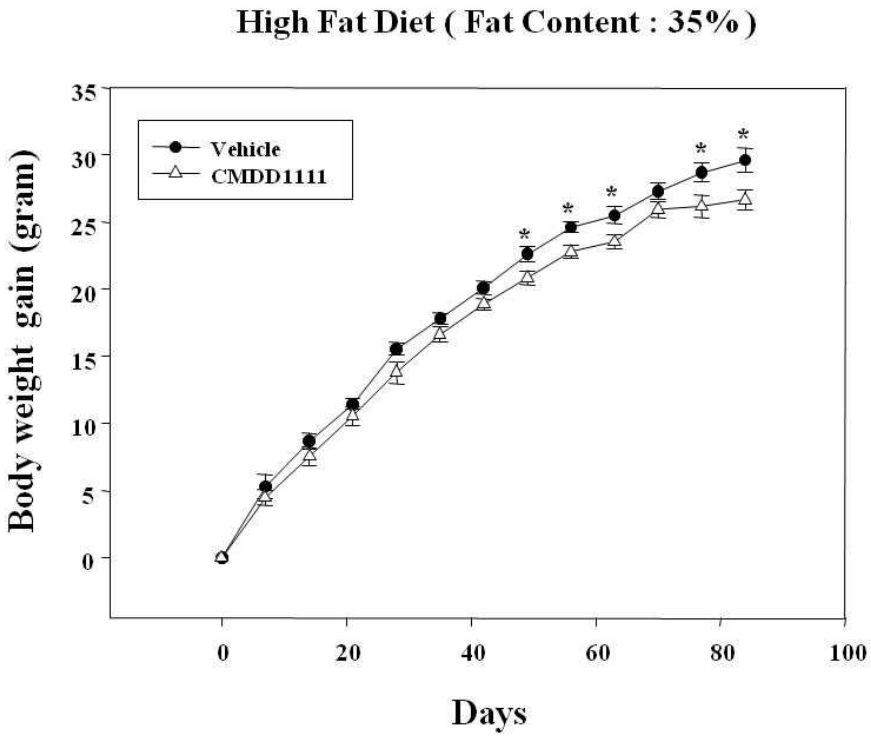
도면16



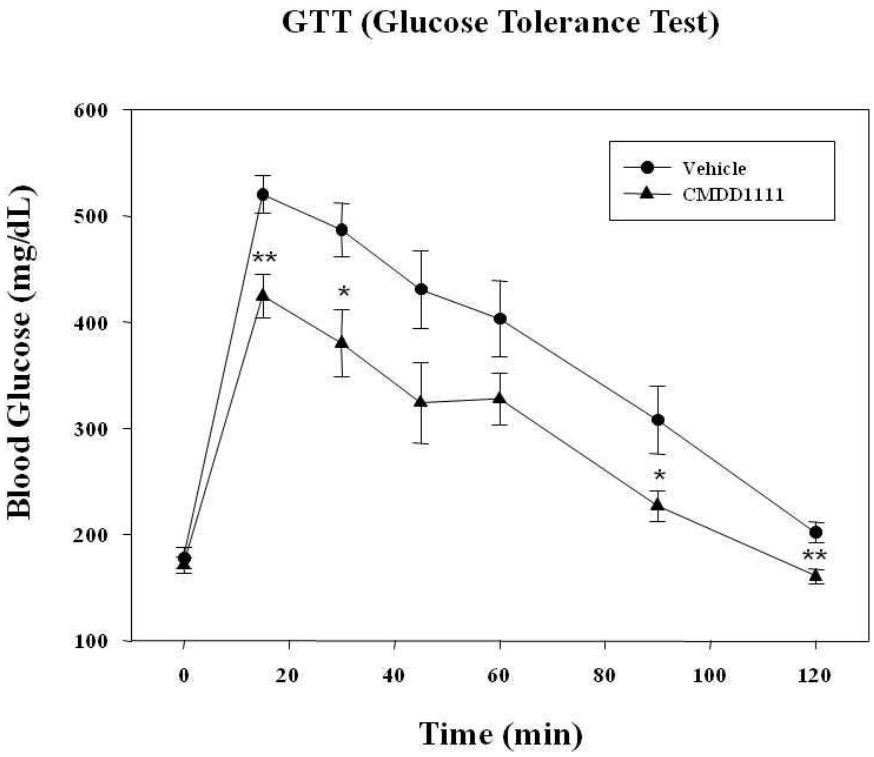
도면17


Respiratory Exchange Ratio (RER)
AUL(Area Under Line)
130
120
110
100
90
80
**
Vehicle
CMDD1111

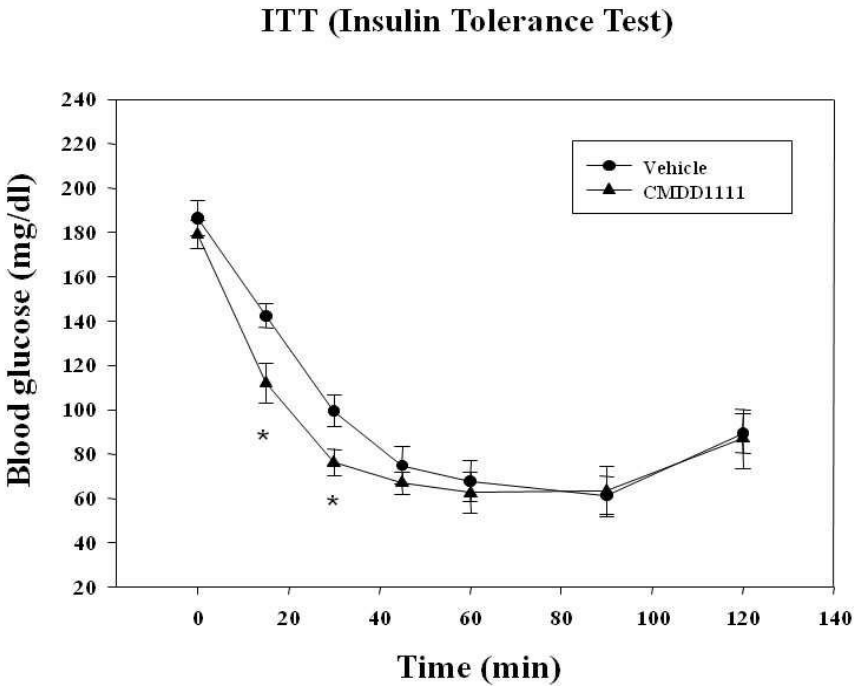
도면18


High Fat Diet (Fat Content : 35%)
Body weight gain (gram)
35
30
25
20
15
10
5
0
Vehicle
CMDD1111
0
20
40
60
80
100
Days

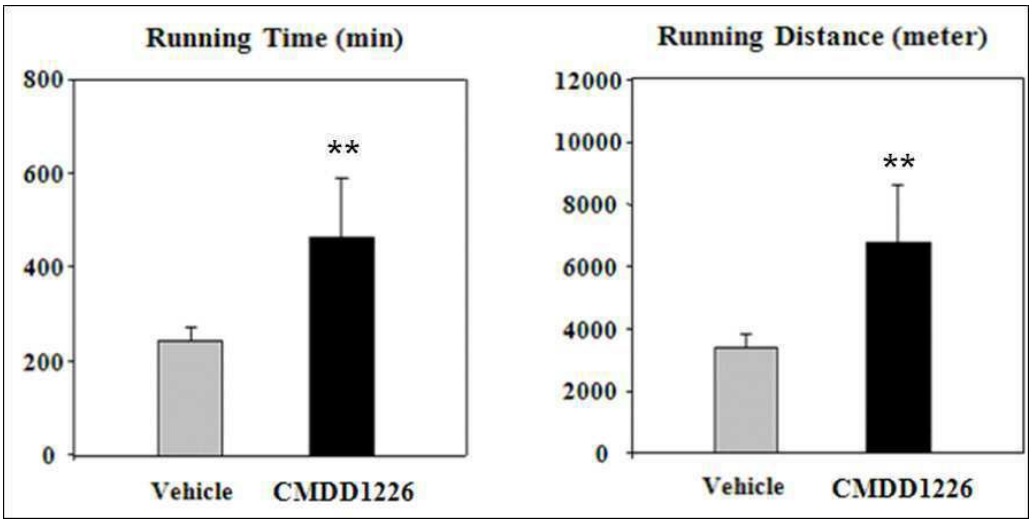
도면19


GTT (Glucose Tolerance Test)
Blood Glucose (mg/dL)
Time (min)
Vehicle
CMDD1111
600
500
400
300
200
100
0
20
40
60
80
100
120
**
*
*
**

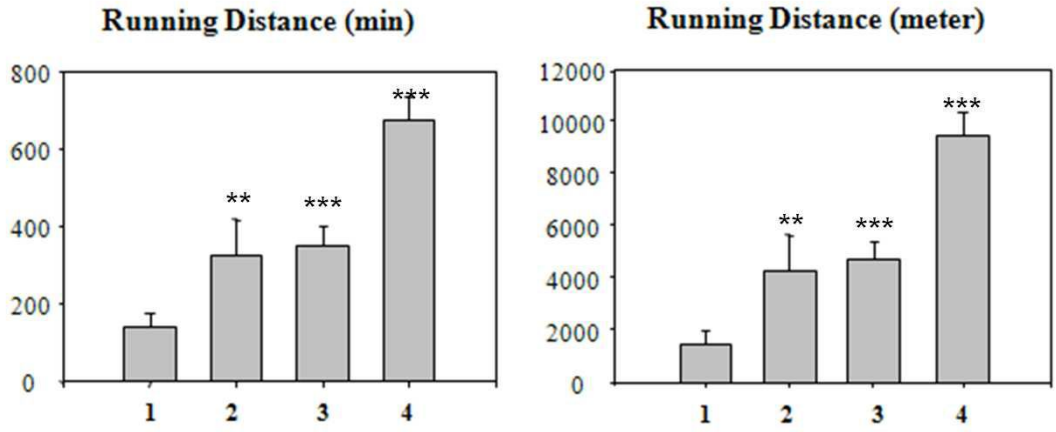
도면20


ITT (Insulin Tolerance Test)
Blood glucose (mg/dl)
Time (min)
Vehicle
CMDD1111
240
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
20
40
60
80
100
120
140
*
*

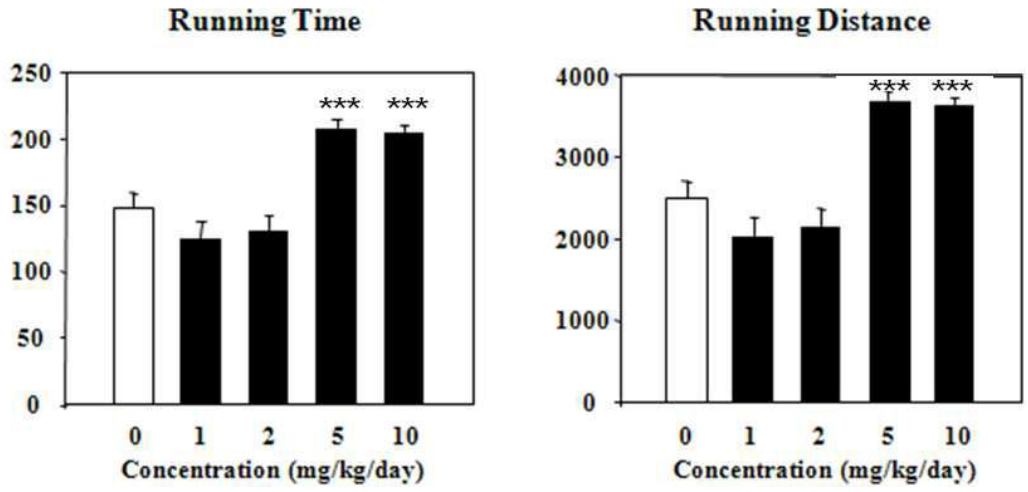
도면21



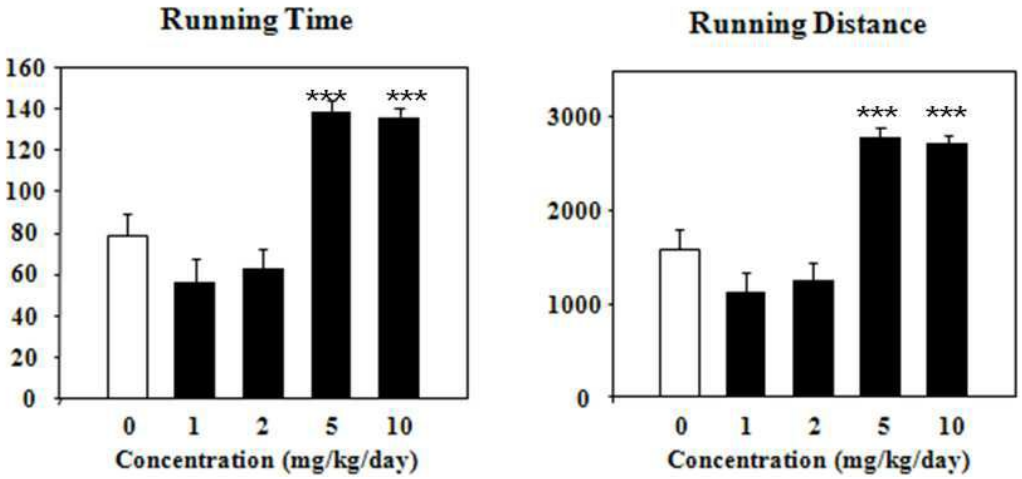
도면22



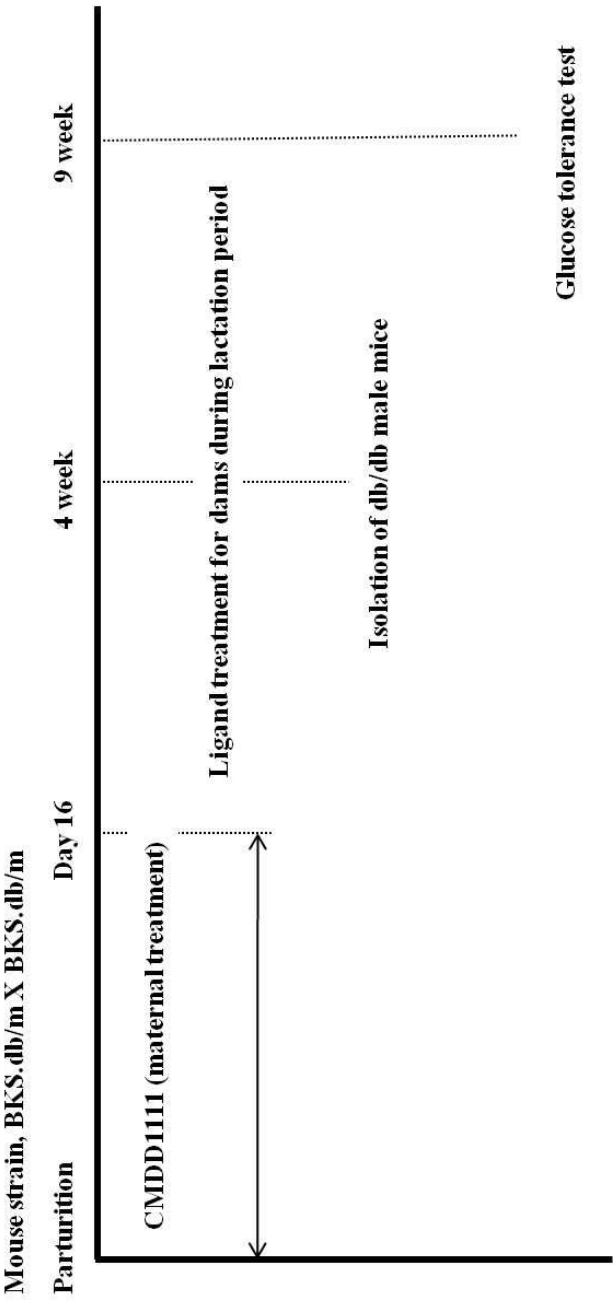
도면23



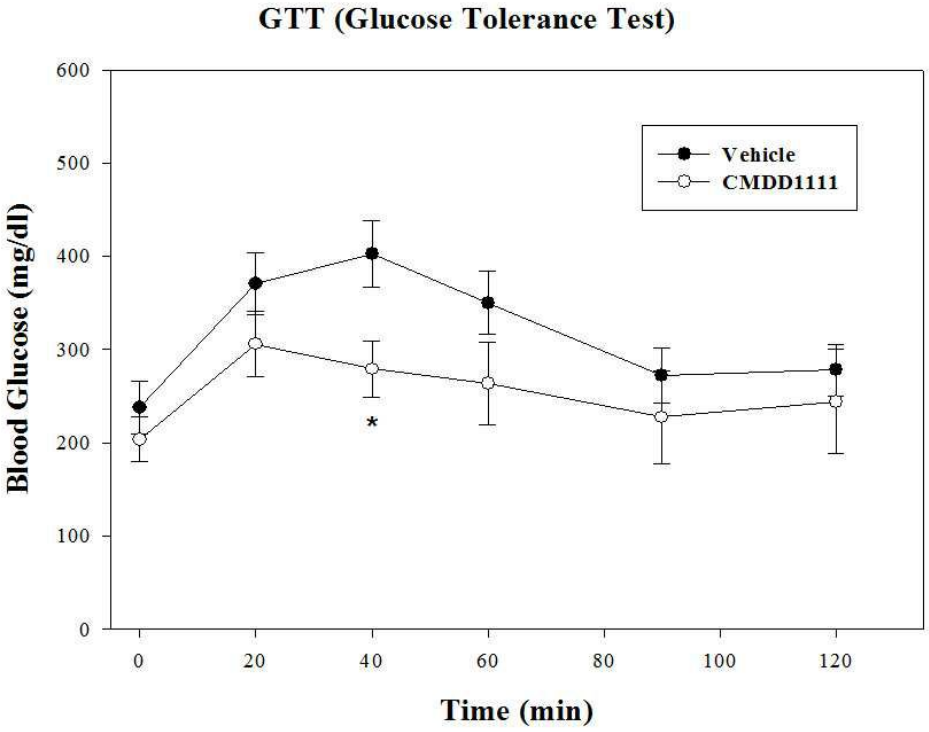
도면24


Running Time
160
140
120
100
80
60
40
20
0
***
***
0
1
2
5
10
Concentration (mg/kg/day)
Running Distance
3000
2000
1000
0
***
***
0
1
2
5
10
Concentration (mg/kg/day)

도면25


Mouse strain, BKS.db/m X BKS.db/m
Parturition
Day 16
4 week
9 week
CMDD1111 (maternal treatment)
Ligand treatment for dams during lactation period
Isolation of db/db male mice
Glucose tolerance test

도면26


GTT (Glucose Tolerance Test)
Blood Glucose (mg/dl)
600
500
400
300
200
100
0
0
20
40
60
80
100
120
Time (min)
Vehicle
CMDD1111
*