



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0008423
(43) 공개일자 2020년01월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/045 (2006.01) A61K 31/404 (2006.01)

A61K 36/185 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/045 (2013.01)

A61K 31/404 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0082515

(22) 출원일자 2018년07월16일

심사청구일자 2018년07월16일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

백남인

경기도 화성시 동탄순환대로21길 53 1306동 403호(청계동, 롯데캐슬 알바트로스)

고정환

경기도 고양시 덕양구 호국로 1059-72

강동호

서울특별시 마포구 광성로6길 16 . (신수동)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 9 항

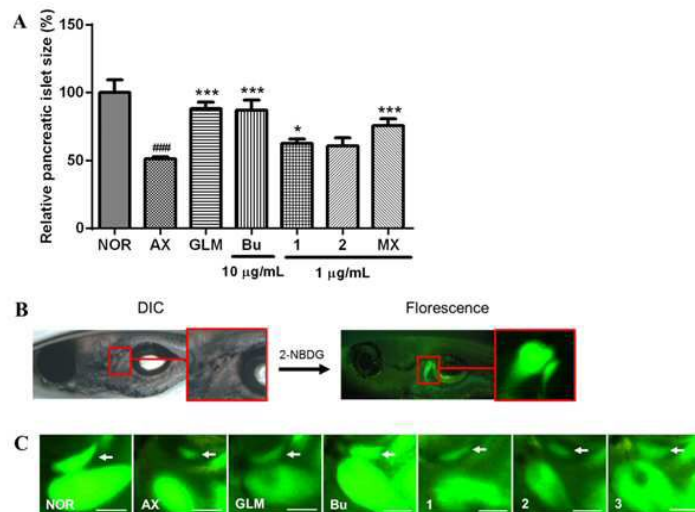
(54) 발명의 명칭 (3S,5R,6R,7E,9R)-3,5,6,9-테트라하이드록시-7-메가스티그멘을 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 아욱으로부터 유래된 3,5,6,9-테트라하이드록시-메가스티그만-7-엔(3,5,6,9-tetrahydroxy-megastigman-7-ene)을 유효성분으로 포함하는, 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에서 아욱 분획물로부터 유래된 화합물에 의해 손상된 췌장도가 회복되고 췌장도 세포 내 글루코스의 흡수가 증가하는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 조성물은 항당뇨용 조성물 및 건강기능식품의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 36/185 (2013.01)

A61P 3/10 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/328 (2013.01)

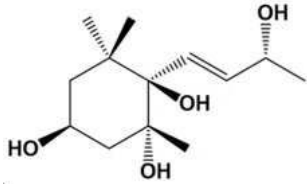
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



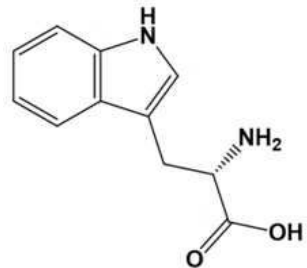
청구항 2

제1항에 있어서, 화학식 1로 표시되는 화합물은 아욱 추출물 또는 이의 분획물로부터 유래된 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 하기 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 추가로 포함하는, 조성물.

[화학식 2]



청구항 4

제3항에 있어서, 화학식 1로 표시되는 화합물과 화학식 2로 표시되는 화합물의 중량비는 5 : 1 내지 1 : 1인, 조성물.

청구항 5

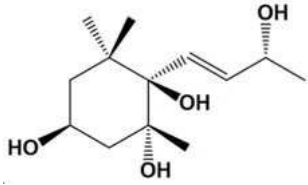
제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 손상된 체장도의 크기를 증가시키는 것인, 조성물.

청구항 6

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방

또는 개선용 식품 조성물.

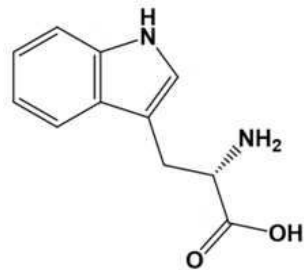
[화학식 1]



청구항 7

제6항에 있어서, 하기 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 추가로 포함하는, 조성물.

[화학식 2]



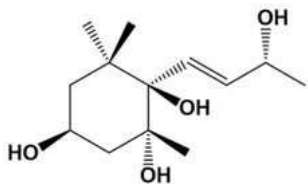
청구항 8

제7항에 있어서, 화학식 1로 표시되는 화합물과 화학식 2로 표시되는 화합물의 중량비는 5 : 1 내지 1 : 1인, 조성물.

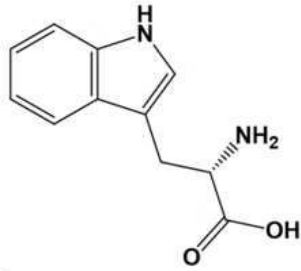
청구항 9

아욱 추출물 또는 이의 분획물로부터 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 하기 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이들의 혼합물을 분리하는 단계를 포함하는, 화학식 1로 표시되는 화합물, 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이들의 혼합물을 제조하는 방법.

[화학식 1]



[화학식 2]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아욱으로부터 유래된 (3S,5R,6R,7E,9R)-3,5,6,9-테트라하이드록시-7-메가스티그멘 [(3S,5R,6R,7E,9R)-3,5,6,9-tetrahydroxy-7-megastigmen]을 유효성분으로 포함하는, 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 및 예방 또는 개선용 식품 조성물;에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 당뇨병 (Diabetes mellitus)은 인슐린이 부족하거나 인슐린에 대한 감수성이 떨어져 탄수화물 대사 (carbohydrate metabolism)에 이상이 생기는 질환이다. 폴리펩티드성 호르몬인 인슐린은 췌장에 있는 췌장도 (Pancreatic islets: PI)의 β -세포에서 만들어지는데, 혈중 글루코스 농도가 증가하면 분비되며 감소하면 분비가 억제되어 에너지원의 적절한 활동을 조절하게 된다. 당뇨병 환자의 경우 β -세포 수의 감소와 이의 기능 이상이 생긴 것이다.

[0004] 미국 당뇨병 협회는 당뇨병에 대한 의학적 분류를 인슐린 의존형 당뇨병 (제1형)과 인슐린 비의존성 당뇨병 (제2형) 두 가지로 구분하고 있다. 당뇨병의 95% 이상을 차지하는 인슐린 비의존성 당뇨병 (제2형)의 병인은 두 가지 원인, 즉 인슐린 분비장애 및 인슐린 저항성의 복합 장애로 알려져 있다. 인슐린 분비장애란 혈당 농도에 따라 췌장의 β -세포에서 적절한 양의 인슐린이 분비되지 않는 상황을 말하며, 이는 인슐린을 분비하는 β -세포의 양적인 감소나 기능적인 분비 장애를 모두 포함한다. 인슐린 저항성이란 분비된 인슐린이 혈류를 타고 표적장기에 도달했으나 그 표적세포에서 인슐린 작용 및 민감성이 저하된 상황을 의미하는데, 일반적으로 세포막 수용체 결합 후의 신호전달장애로 생각되며, 그 원인으로 유전적인 소인, 비만, 육체적 활동저하 및 고혈당 또는 이상 지질혈증 등이 있다. 인슐린 저항성이 있으면 저항성을 극복하기 위해 더 많은 양의 인슐린이 분비되어야 하고, 반대로 인슐린 분비가 충분하지 않아 생긴 고혈당 자체가 다시 인슐린 저항성을 악화시킬 수 있다. 당뇨병을 치료하지 않고 방치하면 당뇨병성 망막증, 신장병, 유선증, 심장혈관 합병증 및 미세혈관 합병증이 발생할 수 있다. 그러므로 인슐린제제나 저혈당 약물의 조절을 통해서 당뇨에 의한 사망을 예방하고 사망률을 줄일 수 있다.

[0005] 따라서, 손상된 췌장 β -세포를 회복시키거나 췌장도 세포 내 글루코스 흡수를 증가시키는 것은 당뇨병의 의미 있는 치료법이 될 수 있다 (Sunil C et al., Effect of ethanolic extract of Pisonia alba Span. leaves on blood glucose levels and histological changes in tissues of alloxan-induced diabetic rats. Int J Appl Res Nat Prod 2009;2:4-11). 현재까지 당뇨병 치료제에 사용되는 물질은 인슐린 분비를 증가시키거나 인슐린에 대한 감수성을 높이는 약제들로서, 인슐린의 반응을 증강시키는 피오글리타존 (pioglitazone)과 로지글리타존 (rosiglitazone), 인슐린 저항성을 개선시키는 메트포민 (metformin), 췌장의 β -세포에서 인슐린분비를 자극하는 설폰요소제 (sulfonylurea)와 메글리티나이드 (meglitinide)계열 등이 있다. 그러나, 이러한 약물은 간이나 신장, 근육 및 심장에 대한 독성과 함께 체중증가 증상 등의 부작용을 가지기 때문에, 부작용이 적고 체중증가 등을 유발하지 않으면서 효과적으로 당뇨병을 치료 또는 예방할 수 있는 당뇨병 치료제에 대한 개발의 필요성이 절실이 요구되고 있다.

[0006] 상기와 같은 배경 하에, 본 발명자들은 천연물 유래 항당뇨 효과를 가진 물질을 찾고자 예의 노력한 결과, 아욱 지상부 분획물로부터 유래된 (3S,5R,6R,7E,9R)-3,5,6,9-테트라하이드록시-7-메가스티그멘 및 L-트립토판을 분리 및 동정하였으며, (3S,5R,6R,7E,9R)-3,5,6,9-테트라하이드록시-7-메가스티그멘을 처리하였을 때 손상된 췌장도의 크기가 회복되고, 특히, L-트립토판을 함께 혼합하여 사용할 경우 (3S,5R,6R,7E,9R)-3,5,6,9-테트라하이드록

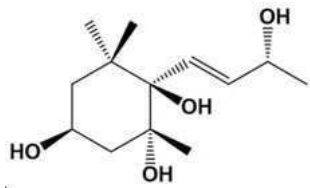
시-7-메가스티그멘을 단독으로 사용하는 것에 비하여 더욱 높은 항당뇨 효과가 나타남을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] [화학식 1]



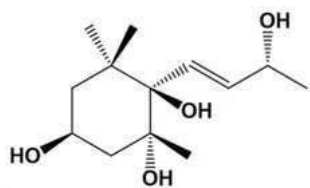
[0011]

[0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 당뇨병 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 (이하, '화합물 1') 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] [화학식 1]

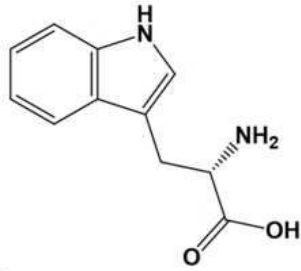


[0018]

[0020] 상기 '화합물 1'은 (3S,5R,6R,7E,9R)-3,5,6,9-테트라하이드록시-7-메가스티그멘 [(3S,5R,6R,7E,9R)-3,5,6,9-tetrahydroxy-7-megastigmenol]으로서, 상기 화합물 1의 당뇨병 치료 효과는 기존에 알려진 바 없고 본 발명에서 최초로 확인하였다.

[0022] 또한, 본 발명의 조성물은 하기 하기 화학식 2로 표시되는 화합물(이하, '화합물 2') 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 추가로 포함할 수 있다.

[0024] [화합식 2]



[0025]

[0027] 상기 '화합물 2'는 α-아미노산의 하나인 L-트립토판 (L-tryptophan)으로서, 체내에서 합성되지 않는 필수 아미노산이다.

[0029] 본 발명은 아욱 추출물 또는 이의 분획물로부터 분리하여 동정한 화합물 1이 당뇨병을 치료하는 효능이 있고, 더욱이 화합물 1과 화합물 2를 혼합하여 사용할 경우 화합물 1 또는 화합물 2를 단독 사용한 경우에 비하여 항당뇨 효과가 더욱 향상된다는 기술사상에 기초하며, 이는 본 발명자들에 의하여 최초로 규명된 것이다.

[0031] 본 발명에서 상기 화합물 1과 화합물 2는 아욱 추출물 또는 이의 분획물로부터 분리하여 동정한 것일 수 있다. 이 때, '아욱 (*Malva verticillata*)'은 상업적으로 판매되는 것을 구입하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있다. 상기 아욱 추출물은 천연, 잡종, 변종 식물의 다양한 기관으로부터 추출될 수 있고, 예를 들어, 지상부, 뿌리, 줄기, 잎 뿐만 아니라 아욱 조직 배양물로부터 추출하여 생산할 수 있고, 특히 아욱 지상부를 사용한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명에서 '아욱 추출물'은 아욱 지상부를 대상으로 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 에틸아세테이트, 부탄올, 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택되는 용매, 보다 구체적으로, 메탄올을 용매로 하여 추출한 결과물일 수 있다. 또한, 추출 온도는 20 내지 100℃, 20 내지 80℃, 30 내지 60℃, 40 내지 50℃일 수 있고, 추출 기간은 약 1시간 내지 4일 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출 방법을 사용하여 추출할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 당뇨병 치료 효과를 가지는 화합물 1을 분리하기 위해 아욱 추출물을 생산하는 방법이라면 제한되지 않고 이용할 수 있다.

[0033] 본 발명에서 '분획물'은 다양한 구성성분을 포함하는 혼합물로부터 특정성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획 방법에 의하여 얻어진 결과물을 의미한다. 구체적으로, 본 발명에서는 아욱 추출물을 용매 분획법, 한외여과 분획법, 크로마토그래피 분획법 등의 다양한 방법으로 분획한 결과물 등을 포함하며, 구체적으로 상기 아욱 추출물의 *n*-부탄올 분획물일 수 있다.

[0034] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 아욱의 메탄올 추출물을 수득하고 이의 *n*-부탄올 분획물을 수득한 후, 상기 분획물에 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 적용하여 화합물 1 및 화합물 2를 분리하였다.

[0035] 이외에도, 본 발명의 화합물 1과 화합물 2는 아욱을 제외한 다른 천연 공급원으로부터 분리된 것일 수 있고, 당 업계에 공지된 방법을 통해 화학적으로 합성하거나 시판되는 물질일 수 있으며, 이를 포함하여 입수 경로에 관계없이 본 발명에서 사용할 수 있다.

[0037] 본 발명에서 '약학적으로 허용 가능한 염'은 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하고 있는 물질인 염 중에서도 약제학적으로 사용될 수 있는 형태의 염을 의미하는데, 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 화합물 1, 화합물 2의 이로온 효능을 저하시키지 않는 상기 화합물의 임의의 모든 유기 또는 무기부가염을 의미한다. 이러한 염으로는 약학적으로 허용되는 유리산 (free acid)에 의해 형성되는 산부가염 또는 염기에 의해 형성되는 금속염이 있다.

[0038] 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산 (maleic acid),

숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산 (fumaric acid), 만데르산, 프로피온산 (propionic acid), 구연산 (citric acid), 젖산 (lactic acid), 글리콜산 (glycollic acid), 글루콘산 (gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산 (glutaric acid), 글루쿠론산 (glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 요오드화수소산 (hydroiodic acid) 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0039] 또한, 염기를 사용하여 약학적 또는 식품학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 특히 나트륨, 칼륨, 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상, 또는 식품상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염 (예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0040] 본 발명의 화합물 1 또는 화합물 2의 약학적으로 허용 가능한 염은 달리 명시되지 않는 한, 상기 화합물 1 또는 화합물 2에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 포함한다. 예를 들어, 약학적 또는 식품학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드로브롬화물, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄술포네이트 (메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트 (토실레이트) 염 등이 있으며, 당업계에서 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다.

[0042] 본 발명에서 '당뇨병'은 인슐린의 분비량이 부족하거나 인슐린의 작용 및 기능이 충분히 이루어지지 않을 때 나타나는 질병을 의미한다. 당뇨병에 걸릴 경우 글리코젠, 단백질 및 지방질의 과도한 분해로 간 또는 혈액 중 글루코스 농도의 비정상적인 증가를 일으켜 당뇨 및 케톤뇨를 초래하고, 수분 및 전해질 대사의 이상으로 전해질 상실에 의한 혈액 농축 상태와 함께 순환장애, 신장장애 등의 병적 상태를 가져오게 된다. 인슐린은 췌장 내에 존재하는 췌장도의 β -세포에서 분비되고 혈중 글루코스 농도가 증가하면 분비되며, 감소하면 분비가 억제되어 에너지원의 적절한 활동을 조절하게 된다. 당뇨병 진단은 일반적으로 혈중 글루코스 농도 측정을 통해서 가능한데, 인간에게서는 일반적으로 혈중 글루코스가 평소 200 mg/dl 이상, 공복시 140 mg/dl 이상일 때 당뇨병으로 진단한다. 따라서, 손상된 췌장 β -세포를 회복시키거나 췌장도 세포 내 글루코스 흡수를 증가시켜 당뇨병을 치료 또는 예방 용도에 유용하게 사용될 수 있다.

[0043] 본 발명에서 '예방'은 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물의 투여로, 당뇨병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 '치료'는 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물의 투여로 당뇨병의 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.

[0045] 본 발명에서 당뇨병 예방 또는 치료는 손상된 췌장도의 크기를 증가시킴으로써 달성되는 것일 수 있다. 본 발명의 화합물 1을 처리할 경우 손상된 췌장도가 회복되어 췌장도의 크기가 22.3% 증가하고 글루코스의 흡수가 향상된다. 또한, 화합물 1과 화합물 2를 혼합한 조성물을 처리할 경우, 췌장도의 크기가 48.6% 증가하고 글루코스의 흡수가 향상됨을 확인하였다. 즉, 화합물 1은 당뇨병 치료 효능을 나타내어 항당뇨용 조성물의 유효성분으로 사용할 수 있고, 특히 화합물 1과 화합물 2를 혼합하여 사용함으로써 항당뇨 효과를 보다 향상시킨 조성물을 제조할 수 있는 것이다.

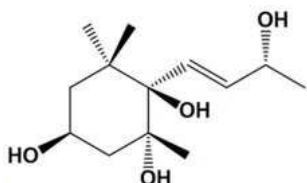
[0047] 나아가, 본 발명에서 화합물 1과 화합물 2를 혼합하는 혼합 비율은 당뇨병 치료 효과에 영향을 미칠 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서 화합물 1과 화합물 2의 혼합 비율은 중량 기준으로 5 : 1 내지 1 : 1, 4 : 1 내지 1 : 1, 4 : 1 내지 1.5 : 1, 3.5 : 1 내지 1.5 : 1, 3 : 1 내지 1.5 : 1, 2.5 : 1 내지 1.5 : 1, 2 : 1 내지 1.5 : 1, 2.2 : 1 내지 1.8 : 1, 또는 1.96 : 1일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 치료 대상, 병의 중증도, 치료 환경 등에 따라 화합물 1과 화합물 2의 혼합비는 변경될 수 있으며, 당뇨병 치료 효과를 구현할 수 있는 범위라면 적절한 혼합비율을 당업자가 결정하여 사용할 수 있다.

[0048] 본 발명의 일 실시예에서는, 아욱 추출물의 *n*-부탄올 분획물에 포함된 화합물 1과 화합물 2의 중량을 분석하여 화합물 1과 화합물 2가 각각 $5.58 \pm 0.16\%$ 및 $2.85 \pm 0.13\%$ 포함되어 있음을 확인하였다. 즉, 아욱 추출물의 *n*-부탄올 분획물에는 화합물 1과 화합물 2가 약 1.96 : 1로 혼합되어 있으며, 이 경우 화합물 1의 단독 처리에

비하여 더욱 우수한 당뇨병 치료 효과가 나타나는 것이다.

- [0050] 본 발명에서 '약학적 조성물'은 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 실제 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0051] 또한, 각각의 제형에 따라 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다.
- [0052] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 혼합 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘카보네이트 (Calcium carbonate), 수크로스 (Sucrose), 락토오스 (Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0053] 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜 (Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구투여하거나 비경구투여할 수 있으며, 비경구투여시 피부 외용 또는 복강 내 주사, 직장 내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택할 수 있다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다. 상기 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수해/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로 또는 당뇨병 예방, 치료, 또는 개선 효과를 나타내는 기타 약학적 활성 화합물과 결합하여 또는 적당한 집합을 이루어 사용될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여할 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용을 유발하지 않으면서 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 다른 양태로서, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 당뇨병 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0060] [화학식 1]

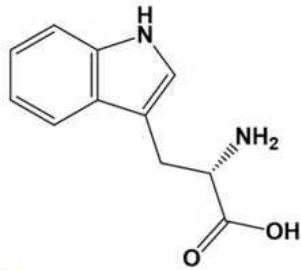


[0061]

[0063] 또한, 본 발명의 조성물은 하기 하기 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 추가로 포함할 수 있다.

[0065] [화학식 2]

[0066]



[0068] 화합물 1, 화합물 2, 약학적으로 허용 가능한 염, 당뇨병, 예방에 대한 설명은 전술한 바와 같다. 또한, 화합물 1의 당뇨병 치료 효과, 화합물 1과 화합물 2을 혼합하였을 때의 당뇨병 치료 효과에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0070] 본 발명에서 '개선'은 상기 식품 조성물의 섭취로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0071] 본 발명에서 식품 조성물은 유효성분인 화합물 1 및/또는 화합물 2 이외에 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함할 수 있다.

[0072] 본 발명에서 '식품보조첨가제'란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 건강기능 식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의 예로는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 향신제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.

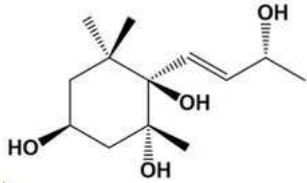
[0073] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 '건강기능식품'이란 특정보건용 식품, 기능성 식품, 건강식품과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미하는데, 상기 식품은 탈모 관련 질환의 예방 또는 개선에 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다. 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강기능식품은 당뇨병 예방 또는 개선을 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0074] 본 발명의 건강기능식품이 취할 수 있는 형태에는 제한이 없으며, 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있고, 기능성 식품 등 당업계에 알려진 용어와 혼용 가능하다. 구체적으로, 상기 식품은 본 발명의 식품 조성물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등으로 사용될 수 있다. 당업자의 선택에 따라 식품에 포함될 수 있는 적절한 기타 보조성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 동물을 위한 사료로 이용되는 식품도 포함한다.

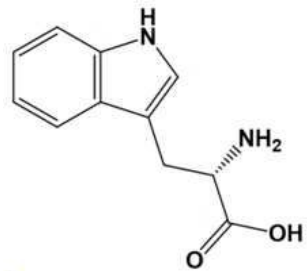
[0076] 본 발명의 다른 양태로서, 아욱 추출물 또는 이의 분획물로부터 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 하기 화학식

2로 표시되는 화합물 또는 이들의 혼합물을 분리하는 단계를 포함하는, 화학식 1로 표시되는 화합물, 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이들의 혼합물을 제조하는 방법을 제공한다.

[화학식 1]



[화학식 2]



아욱, 추출물, 분획물, 화합물 1, 화합물 2에 대한 설명은 전술한 바와 같다. 또한, 화합물 1의 당뇨병 치료 효과, 화합물 1과 화합물 2을 혼합하였을 때의 당뇨병 치료 효과에 대해서는 전술한 바와 같다.

더 나아가, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 당뇨병 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 당뇨병 치료 방법을 제공한다.

약학적 조성물, 당뇨병에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

본 발명에서 개체는 당뇨병이 발병되었거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 상기 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 약학적 조성물을 개체에게 투여함으로써 당뇨병을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 기존의 치료제와 병행하여 투여함으로써 시너지적인 효과를 나타낼 수 있다.

발명의 효과

본 발명에서 아욱 분획물로부터 유래된 화합물에 의해 손상된 췌장도가 회복되고 췌장도 세포 내 글루코스의 흡수가 증가하는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 조성물은 항당뇨용 조성물 및 건강기능식품의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 아욱 지상부의 *n*-BuOH 분획물 (1000 ppm)의 HPLC 크로마토그램 (280 nm)을 나타낸 것이다 (화합물 1, RT: 6.87; 화합물 2, RT: 8.04).

도 2은 췌장도 면적 및 형광 강도 이미지를 나타낸 도로서, (A) 췌장도 면적 ($p < 0.001$; 정상군과 비교됨),

($^*p < 0.05$, $^{***}p < 0.001$; 알록산 유도군과 비교됨), (B) 췌장도의 DIC 이미지 및 형광 이미지, (C) 췌장도의 형광 이미지를 나타낸 것이다.

도 3는 알록산 (Alloxan; AX) 및 다이아조옥사이드 (Diazoxide; DZ)로 처리한 제브라피쉬 치어에 대한 화합물 1, 2, 및 이의 혼합물의 회복 효과를 나타낸 것으로서, (A) 췌장도 면적 ($^{***}p < 0.001$; 정상군과 비교됨), ($^*p < 0.05$, $^{***}p < 0.001$; 알록산 유도군과 비교됨), ($^+p < 0.05$, $^{++}p < 0.01$), (B) 췌장도의 형광 이미지를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0093] 이하, 본 발명을 하기 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

[0095] <실시예 1> 재료, 기기, 및 시약

[0097] 1-1. 식물 재료

[0099] 본 실시예에서 사용한 아욱 (*Malva verticillata*) 지상부는 2016년 4월에 한국 남양주시의 상업 농장에서 수집하였고, 표본 시료 (KHU20160419)는 경희대학교 천연물 화학 (Natural Product Chemistry) 실험실에 보관되어 있다.

[0101] 1-2. 기기

[0103] 화합물 1과 2는 UV lamp Spectroline Model ENF-240 C/F (Spectronics Corporation, USA) 및 10% H₂SO₄ 용매로 검출하였다. 광회전 (Specific optical rotation)은 JASCO P-1010 digital polarimeter (Jasco, Japan) 상에서 조사하였다.

[0104] Infrared (IR) 스펙트럼은 Perkin Elmer Spectrum One FT-IR spectrometer (England)로 수행하였다. 녹는점은 Fisher-John's Melting Point Apparatus (Fisher Scientific, USA) 및 언코르 (uncorr) 상에서 결정하였다. EI-MS는 JEOL JMSAX-700 (Japan)로 수행하였다. ¹H NMR 스펙트럼 (400 MHz)과 ¹³C NMR 스펙트럼 (100 MHz) 및 2D NMR 스펙트럼은 Varian Unity Inova AS-400 FT-NMR spectrometer (USA)로 수행하였다 (Park JH et al., Inhibition of NO production in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophage cells with curcuminoids and xanthorrhizol from the rhizome of Curcuma xanthorrhiza Roxb. and quantitative analysis using HPLC. Appl Biol Chem 2014;57:407-412).

[0106] 1-3. 시약

[0108] 모든 실험에서 증류수를 사용하였다. HPLC-구배 물, 아세토니트릴, 및 메탄올은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였다. 알록산 모노하이드레이트 (Alloxan monohydrate) 및 해수 (sea salt)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[0109] 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose (2-NBDG)는 Invitrogen (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 글리메피리드 (Glimepiride; GLM)는 Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였다. 다이아조옥사이드 (Diazoxide; DZ)는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다.

[0110] HPLC (Shimadzu, Japan)를 위해 HPLC 기기를 사용하고, 형광 현미경은 Olympus 1X70 microscope (Olympus, Japan)을 사용하였다. 이미지 분석에는 Focus Lite (Focus Co, Daejeon, 85 Korea) 및 Image J software (National Institutes of Health)을 사용하였다 (Nam YH et al., Synergistic potentials of coffee on injured pancreatic islets and insulin action via K_{ATP} channel blocking in zebrafish. J Agric Food Chem 2015;63:5612-5621).

[0112] <실시예 2> 아욱의 추출 및 분획

[0114] 건조한 아욱의 지상부 (3.1 kg)를 80% 메탄올 (MeOH, 54.0 L $\times$ 5)로 실온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출물을 여과지를 통해 여과하고 43 °C에서 감압 하에 증발시켜 794g의 추출물을 수득하였다. 수득한 메탄올 추출물을 물 (2 L)에 현탁시키고, 에틸아세테이트 (EtOAc, 2 L $\times$ 4) 및 *n*-부탄올 (*n*-BuOH, 2 L $\times$ 4)로 연속하여 추출하였다. 각 층을 농축시켜 에틸아세테이트 분획물 (MVE, 80g), *n*-부탄올 분획물 (MVB, 77g) 및 물 분획물 (MVW, 637g)을 수득하였다.

[0116] <실시예 3> 아욱의 *n*-BuOH 분획물로부터 화합물의 분리 및 동정

[0118] 3-1. 아욱의 *n*-BuOH 분획물로부터 화합물의 분리

[0120] 상기 실시예 2의 *n*-부탄올 분획물 (MVB, 77g)을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (ϕ 10 $\times$ 15cm)에 적용시키고 클로로포름(CHCl₃)-메탄올(MeOH)-물(H₂O) (25 : 3 : 1 $\rightarrow$ 22 : 3 : 1 $\rightarrow$ 20 : 3 : 1 $\rightarrow$ 18 : 3 : 1 $\rightarrow$ 15 : 3 : 1 $\rightarrow$ 12 : 3 : 1, 각각 18.8L)를 용리액으로 하여 분리한 결과, 14개의 분획물 (MVB-1 내지 MVB-14)을 수득하였다.

[0121] 분획물 MVB-12 (11.0 g, 용출 부피/총 부피(V_e/V_t) 0.756-0.898)을 역상 크로마토그래피 (ϕ 6.5 $\times$ 5cm)에 적용시키고 메탄올-물 (1 : 1 $\rightarrow$ 2 : 1 $\rightarrow$ 3 : 1 $\rightarrow$ 5 : 1, 각각 3.8 L)로 용출시켜 분리한 결과 18개의 분획물 (MVB-12-1 내지 MVB-12-18)을 수득하였다.

[0122] 이 중, 분획물 MVB-12-1 (450.3 mg, V_e/V_t 0.001-0.006)을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (ϕ 3.0 $\times$ 18 cm)에 처리하고 에틸아세테이트-*n*-부탄올-물 (10 : 3 : 1, 4.6 L)로 용출시켜, 11개의 분획물 (MVB-12-1-1 내지 MVB-12-1-11)과 함께 정제된 화합물 1 [MVB-12-1-6, 84.4 mg, V_e/V_t 0.139-0.200, TLC (SiO₂) R_f 0.61, 에틸 아세테이트-*n*-부탄올-물 (2 : 3 : 1), TLC (ODS) R_f 0.90, 메탄올-물 (5 : 10)] 및 화합물 2 [MVB-12-1-9, 64.3 mg, V_e/V_t 0.296-0.517, TLC (SiO₂) R_f 0.45, 에틸아세테이트-*n*-부탄올-물 (2 : 3 : 1), TLC (ODS) R_f 0.75, 메탄올-물 (5:10)]를 수득하였다.

[0124] 3-2. 분리된 화합물의 동정

[0126] 실시예 3-1에서 수득한 화합물 1 및 2를 대상으로 NMR, IR 및 FAB-MS 분석을 수행하여, 각 화합물의 구조를 동정하였다.

[0128] 화합물 1을 분석한 결과는 다음과 같다.

[0129] - 어두운 갈색 분말 (dark brown powder)

[0130] - $[\alpha]_D^{+35.1^\circ}$ (c 0.10, MeOH)

- [0131] - 녹는점 98-100 °C
- [0132] - UV $\lambda_{\max}$ = 232, 280 nm
- [0133] - positive FAB-MS m/z 245 $[M+H]^+$
- [0134] - IR (KBr, ν) 3383, 1623 cm^{-1}
- [0135] - ^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz, δ_{H} , coupling pattern, J in Hz): 0.97 (3H, s, H-13), 1.15 (3H, s, H-12), 1.18 (3H, s, H-11), 1.21 (3H, d, 6.8, H-10), 1.41 (1H, dd, 9.6, 13.0, H-2b), 1.76 (1H, dd, 2.0, 13.0, H-2a), 1.89 (1H, dd, 8.0, 14.6, H-4b), 2.45 (1H, dd, 5.6, 14.6, H-4a), 4.48 (1H, m, H-3), 4.28 (1H, m, H-9), 5.67 (1H, dd, 6.0, 15.4, H-8), 5.89 (1H, d, 15.4, H-7);
- [0136] - ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD , δ_{C}): 20.2 (C-13), 23.8 (C-10), 25.4 (C-12), 29.4 (C-11), 35.8 (C-1), 38.9 (C-4), 44.2 (C-2), 67.3 (C-5), 68.6 (C-9), 71.1 (C-6), 73.3 (C-3), 125.5 (C-7), 139.2 (C-8).
- [0138] 분석 결과, 화합물 1은 (3S,5R,6R,7E,9R)-3,5,6,9-테트라하이드록시-7-메가스티그렌임을 확인하였다 (D'Abrosca B et al., Structure elucidation and phytotoxicity of C_{13} nor-isoprenoids from *Cestrum parqui*. Phytochem 2004;65:497-505; Greca MD et al., Stratioides II-a C_{13} Norterpene Glucoside from *Pistia stratiotes*. Nat Prod Lett 1996;8:83-86).
- [0140] 화합물 2를 분석한 결과는 다음과 같다.
- [0142] - 어두운 황색 분말 (dark yellow powder)
- [0143] - 녹는점 280-285 °C
- [0144] - $[\alpha]_{\text{D}} -33.0^\circ$ (c 0.20, H_2O)
- [0145] - UV $\lambda_{\max}$ = 280 nm
- [0146] - positive FAB-MS m/z 205 $[M+H]^+$
- [0147] - IR (KBr, ν) 3404, 3254, 1730, 1631, 1588 cm^{-1}
- [0148] - ^1H -NMR (CD_3OD 및 D_2O , 400 MHz, δ_{H} , coupling pattern, J in Hz): 3.20 (1H, dd, 9.7, 15.0, H-8b), 3.46 (1H, dd, 4.5, 15.0, H-8a), 3.91 (1H, dd, 4.5, 8.7, H-9), 7.09 (1H, dd, 7.8, 7.8, H-5), 7.17 (1H, dd, 7.8, 7.8, H-6), 7.25 (1H, s, H-2), 7.42 (1H, d, 7.8, H-4), 7.70 (1H, d, 7.8, H-7)
- [0149] - ^{13}C -NMR (CD_3OD 및 D_2O , 100 MHz, δ_{C}): 27.9 (C-8), 57.9 (C-9), 108.8 (C-3), 111.8 (C-7), 118.8 (C-4), 119.7 (C-5), 122.1 (C-6), 124.3 (C-2), 127.7 (C-3a), 138.0 (C-7a), 173.6 (C-10).
- [0151] 분석 결과, 화합물 2는 L-트립토판임을 확인하였다 (Wang X et al., Isolation, purification and identification of antioxidants in an aqueous aged garlic extract. Food Chem 2015;187:37-43).
- [0153] <실시예 4> 화합물 1 및 2의 HPLC 분석

- [0155] HPLC 분석을 통해, 아욱의 *n*-BuOH 분획물에 함유된 화합물 1과 화합물 2의 상대적인 양을 계산하였다.
- [0156] 각 화합물 (1.0mg)을 메탄올 및 물의 6 : 4 혼합물 1 mL에 용해시키고, 125, 62.5, 31.3, 15.6 μ g/mL의 순차적인 농도로 희석한 화합물 1, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9 μ g/mL 의 순차적인 농도로 희석한 화합물 2 표준 용액을 주입함으로써 보정 곡선을 작성하였다. 표준 용액으로부터 생성된 평균 면적 ($n=3$)을 농도 대 피크 영역으로 플로팅하여, 화합물 1 및 화합물 2의 보정 방정식을 수립하였다.
- [0157] 각 화합물의 정량 분석을 위해, 건조한 아욱의 지상부 1 g을 80% 메탄올 (100 mL $\times$ 3)로 실온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출물을 여과지를 통해 여과하고 43 $^{\circ}$ C에서 감압 하에 증발시켜 234 mg의 추출물을 수득하였다. 수득한 메탄올 추출물을 물 100 mL에 현탁시키고, 에틸 아세테이트 (EtOAc, 100 mL $\times$ 3) 및 *n*-부탄올 (*n*-BuOH, 100 mL $\times$ 3)로 연속하여 추출하였다. 각 층을 농축시켜 에틸아세테이트 분획물 (MVE, 58.2 mg), *n*-부탄올 분획물 (MVB, 41.3 mg) 및 물 분획물 (MVW, 134.5 mg)을 수득하였다.
- [0158] *n*-부탄올 분획물 용액 (500 μ g/mL)의 10- μ L 분취액 (aliquot)을 HPLC 시스템에 주입하였다. 분석은 Shimadzu LC-20 (Kyoto, Japan)와 Shimadzu SPD-20AV UV detector (280 nm)을 사용하여 분석을 수행하였다. 컬럼은 Shim-pack GIS (250 mm $\times$ 4.6 mm, 입자 크기 5 μ m)을 사용하였다. 이동상은 물 중 0.01% TFA (용매 A) 및 아세트니트릴 (용매 B)를 사용하였고, 유속 1.0 mL/분에서 B: 15% (0.01분) $\rightarrow$ B: 15% (10분) $\rightarrow$ B: 90% (40분) $\rightarrow$ B: 15% (50분)의 구배 용출로 용출하였다. 정량 분석을 3회 반복하였다.
- [0160] HPLC 크로마토그램을 도 1에 나타내었다. 화합물 1과 화합물 2에 대한 회귀 방정식과 상관 계수 (r^2 , 0.998-1.000)를 표 1에 나타내었다. 높은 r^2 값을 통해 분석을 신뢰할 수 있음을 확인하였다.

표 1

화합물	체류 시간(분)	회귀 방정식	r^2	농도(%)
1	6.87	$y = 824.98x + 32719$	$r^2=0.998$	5.58 ± 0.16
2	8.04	$y = 10956x + 9986.3$	$r^2=1.000$	2.85 ± 0.13

- [0163] 화합물 1과 화합물 2의 상대 농도는 크로마토그램 및 표 1의 회귀 방정식에서 피크 면적을 사용하여 각각 $5.58 \pm 0.16\%$ 및 $2.85 \pm 0.13\%$ 로 결정되었다.

[0165] <실시예 5> 제브라피쉬에서 췌장도 (pancreatic islet) 회복능 측정

[0167] 5-1. 제브라피쉬 (Zebrafish, ZF) 관리 및 유지 보수

- [0169] 성체 제브라피쉬는 S 타입 ZF 시스템 (1500[W] $\times$ 400[D] $\times$ 2050[H] mm) (대전, 한국)에서 유지하였고, 28.5 $^{\circ}$ C에서 14시간 빛과 및 10시간 암흑의 광주기를 반복하였다. 제브라피쉬 치어 (larvae)를 얻기 위해, 성체 제브라피쉬 두 쌍을 밤새도록 산란상자에 두었다. 제브라피쉬는 빛을 주는 동안 30분 동안 알을 낳았다. 배양을 위해, 수정 3시간 후에 제브라피쉬 배아를 채취하고, 28.5 $^{\circ}$ C에서 14시간 빛과 및 10시간 암흑의 광주기로, 0.03% 해수 용액에서 유지시켰다. 제브라피쉬는 표준 제브라피쉬 프로토콜에 따라 처리하였고, 모든 실험은 경희대학교의 동물 관리 및 사용 위원회 (Animal Care and Use Committee)의 승인을 받았다 (KHUASP [SE] -15-10).

[0171] 5-2. 통계 분석

- [0173] 통계 분석은 Graphpad Prism (version 5)을 사용하여 수행하였다. 데이터는 3회 반복시 평균의 표준 오차

(standard error of the mean; SEM)를 평균으로 표현하였다. 유효성은 반복적인 일원 분산 분석 (one-way ANOVA)과 Tukey test를 사용하여 확인하였다. $p < 0.05$ 는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0175] 5-3. 제브라피쉬 체장도 크기 변화 측정

[0177] 상기 *n*-BuOH 분획물 중에 함유된 화합물 1과 화합물 2의 혼합 비율에 따라 (약 1.96 : 1), 화합물 1과 화합물 2가 1.96 : 1 비율로 혼합된 조성물(이하, 'MX'라 함)을 제조하였다.

[0178] 제브라피쉬 치어는 정상군 (NOR), 알록산 유도군 (AXI), 알록산 유도 후 *n*-BuOH 분획물 처리군 (Bu), 화합물 1 처리군 (1), 화합물 2 처리군 (2), MX 처리군 (MX), 글리메피리드 처리군 (GLM)의 총 7개의 그룹으로 분류하였다.

[0179] 수정 후 5일이 된 자연상태 (Wild-type) 제브라피쉬 치어를 96-웰 플레이트에 두었다. 제브라피쉬 치어를 600 μ M 알록산에 3시간 동안 노출시켜 체장도 손상을 유도하였다.

[0180] 이후, *n*-BuOH 분획물 및 화합물의 회복 효능을 확인하기 위해, *n*-BuOH 분획물 (10 μ g/mL), 화합물 1 (1 μ g/mL), 화합물 2 (1 μ g/mL), MX (1 μ g/mL)를 상기 7개의 그룹 분류에 따라 12시간 동안 처리하였다.

[0182] 제브라피쉬 치어에 알록산을 처리한 결과, 체장도의 크기는 정상군에 비하여 48.9% ($p < 0.0001$)까지 감소하였다. *n*-BuOH 분획물을 처리한 경우, 손상된 체장도의 크기가 알록산 유도군에 비하여 70.4% ($p = 0.0008$) 증가하였다. 화합물 1을 처리한 그룹에서는, 손상된 체장도의 크기가 알록산 유도군에 비해 22.3% ($p = 0.0114$) 증가하였고, 화합물 2 처리군에서는 18.9% ($p = 0.1522$) 증가하였다.

[0183] 또한, MX를 처리한 결과, 체장도의 크기가 알록산 유도군에 비하여 48.6% ($p = 0.0004$) 증가함을 확인하였다.

[0185] 5-4. 제브라피쉬 체장도 세포 내 글루코스 흡수능력 분석

[0187] 세포 내 글루코스 흡수능력을 분석하기 위해, 형광 염색 강도를 측정하여 형광 염색 강도 변화를 분석하였다. 형광 물질은 2-[N-(7-니트로벤조-2-옥사-1,3-디아졸-4-일)아미노]-2-데옥시글루코스 (2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxyglucose, 2-NBDG)를 사용하였다. 제브라피쉬 치어를 40 μ M의 2-NBDG로 30분 동안 염색하고, 20분 동안 0.03% 해수 용액으로 행켰다.

[0188] 염색된 체장도를 형광 현미경으로 관찰하고, Focus Lite 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 체장도의 형광 강도를 조사하기 위하여, 형광이 나타내고 있는 픽셀 강도 (초록색) 0에서 255까지에 대하여 Image J 소프트웨어의 히스토그램을 사용하였다.

[0190] 알록산 유도군은 정상군에 비하여 체장 β -세포의 형광 강도가 감소하였다. 반면, 알록산 유도 후 글리메피리드, 화합물 1, 및 화합물 2로 처리한 경우, 처리 전에 비하여 체장도 크기가 증가함을 확인하였다. 또한, *n*-BuOH 분획물과 MX로 처리한 경우에는, 보다 유의한 체장도 증가가 관찰되었다 (도 2).

[0192] <실시예 6> 제브라피쉬에서 다이아조옥사이드(diazoxide, DZ)의 작용

[0194] K_{ATP} 채널 (ATP dependent K^+ channel)에 작용하여 K_{ATP} 채널 자극으로 인한 인슐린 분비를 억제하고 체장 β -세포를 회복시키는 다이아조옥사이드를 이용하여, 체장도 회복 효과의 메커니즘을 규명하였다.

[0195] 제브라피쉬 치어는 총 14 그룹으로 분리하였다. 구체적으로, 정상군 (NOR), 다이아조옥사이드로 처리한 정상군 (NOR + DZ), 알록산 유도군 (AX), 알록산 유도 후 다이아조옥사이드 처리군 (AX + DZ), 글리메피리드 처리군

(GLM), 글리메피리드 및 다이아조옥사이드 처리군 (GLM + DZ), *n*-BuOH 분획물 처리군 (Bu), *n*-BuOH 분획물 및 다이아조옥사이드 처리군 (Bu + DZ), 화합물 1 처리군 (1), 화합물 1 및 DZ 처리군 (1 + DZ), 화합물 2 처리군 (2), 화합물 2 및 다이아조옥사이드 처리군 (2 + DZ), MX 처리군 (MX), MX 및 다이아조옥사이드 처리군 (MX + DZ)으로 분류하였다.

[0196] 수정 후 5일이 된 자연상태 (Wild-type) 제브라피쉬 치어를 96-웰 플레이트에 웰당 10 제브라피쉬 치어를 넣었다. 제브라피쉬 치어를 600 μ M 알록산에 3시간 동안 노출시켜 췌장도 손상을 유도하고 0.03% 해수로 행구었다. 3시간 경과 후, *n*-BuOH 분획물 (10 μ g/ml), 화합물 1 (1 μ g/ml), 화합물 2 (1 μ g/ml), MX (1 μ g/ml), 다이아조옥사이드 (25 μ M)를 사용하여, 상기 14 그룹의 분류에 맞게 12시간 동안 처리하였다.

[0197] 처리 완료 후, 제브라피쉬 치어를 30분 동안 40 μ M 2-NBDG로 염색하고 췌장도 이미지를 얻기 위해 0.03% 해수 용액으로 20분 동안 행구었다. 형광 현미경을 사용하여 췌장도 이미지를 캡처하고 Focus Lite 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0199] 다이아조옥사이드 치료를 받지 않은 정상군에 비해, 다이아조옥사이드를 처리한 경우 췌장도의 크기가 45.7% 감소함을 확인하였다 (45.7%, $p = 0.0001$).

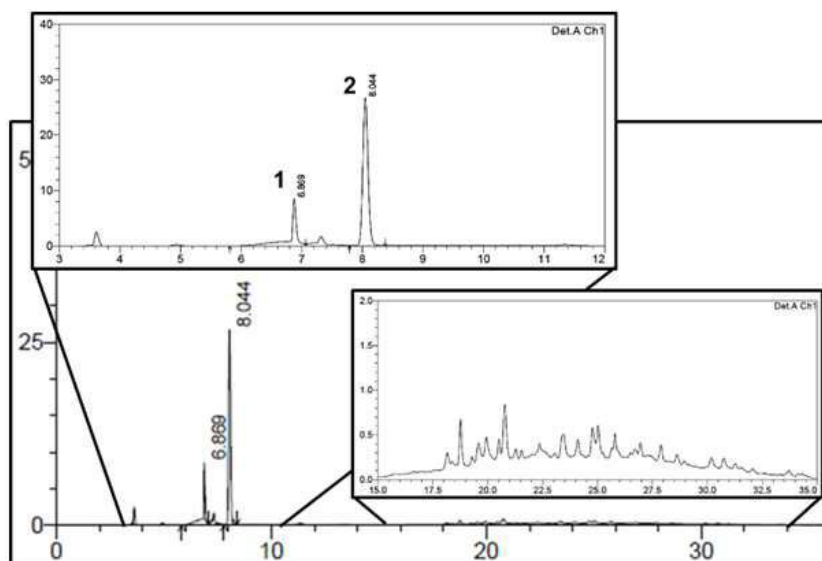
[0200] 다이아조옥사이드를 글리메피리드, *n*-BuOH 분획물, 또는 MX와 함께 처리한 경우, 글리메피리드, *n*-BuOH 분획물, 또는 MX를 단독으로 처리한 것과 비교하여, 각각 31.4% ($p < 0.0001$), 30.2% ($p = 0.0004$), 28.3% ($p < 0.0001$) 췌장도의 크기가 감소하였다 (도 3).

[0201] 즉, *n*-BuOH 분획물 또는 MX를 다이아조옥사이드와 함께 처리한 경우, 단독 처리에 비하여 췌장도 회복 효과가 다소 저하된 결과가 나타났다. 이를 통해, *n*-BuOH 분획물과 MX는 췌장도의 β -세포에서 K_{ATP} 채널을 폐쇄하여 인슐린 분비를 자극함으로써, 당뇨병 치료 효과를 나타내는 것임을 알 수 있었다.

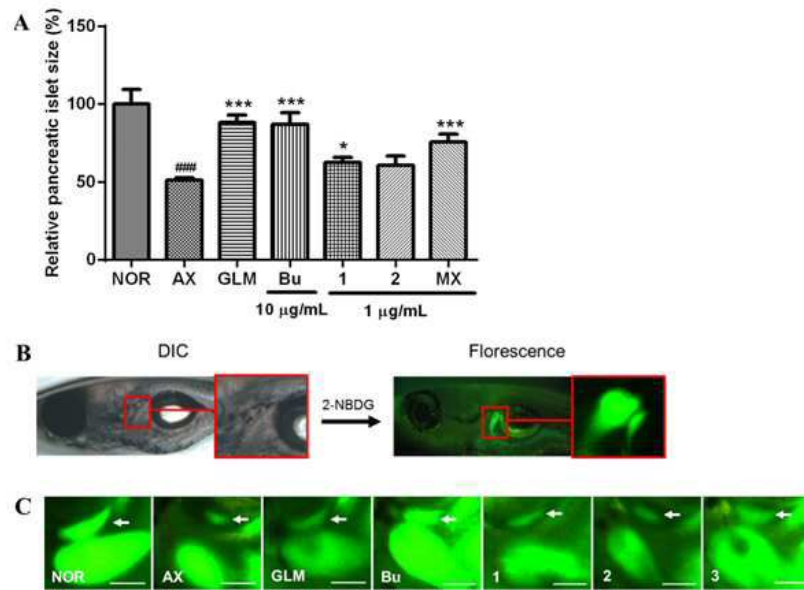
[0203] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



도면2



도면3

