



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2014-0136402  
(43) 공개일자 2014년11월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 31/53 (2006.01) A61K 31/7028 (2006.01)  
A61K 31/70 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2014-0107162(분할)  
(22) 출원일자 2014년08월18일  
심사청구일자 2014년08월18일  
(62) 원출원 특허 10-2013-0056552  
원출원일자 2013년05월20일  
심사청구일자 2013년05월20일

(71) 출원인  
광주과학기술원  
광주광역시 북구 첨단과기로 123 (오룡동)  
(72) 발명자  
다린 알. 윌리엄스  
광주광역시 북구 첨단과기로 261(오룡동) 국제관 801호  
정다운  
광주광역시 북구 첨단과기로 261(오룡동) 국제관 801호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
양부현

전체 청구항 수 : 총 4 항

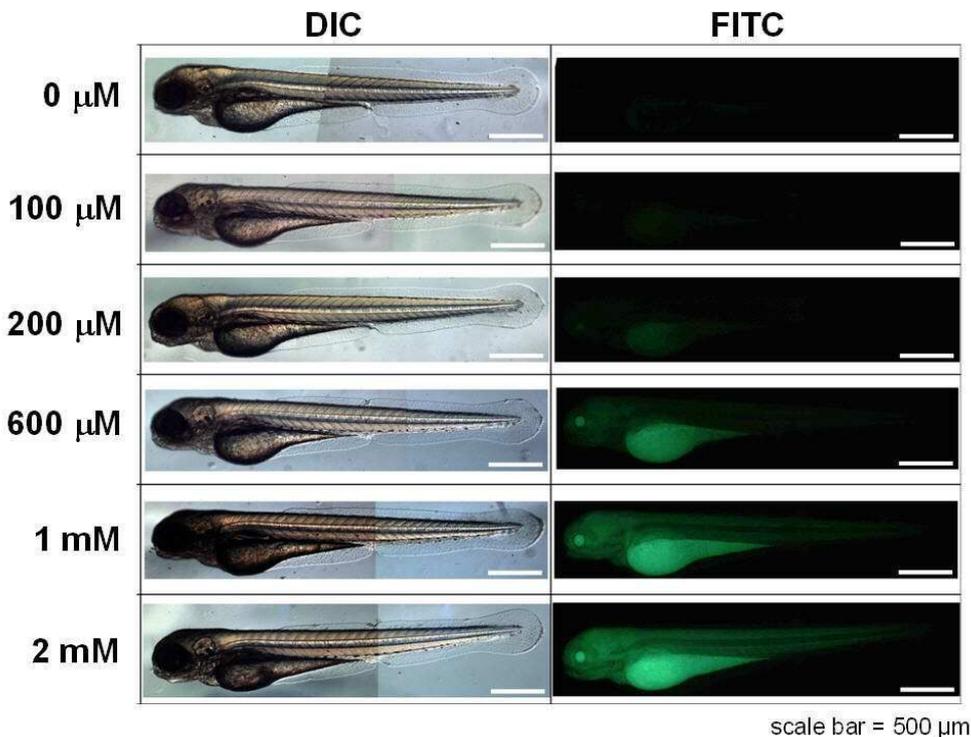
(54) 발명의 명칭 **당뇨병 치료제의 제브라피시-기반된 스크리닝 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 당뇨병 치료제의 제브라피시-기반된 스크리닝 방법 및 당뇨 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 형광물질-태그된 글루코오스 아날로그인 형광성 글루코오스 유도인자와 제브라피시 동물 모델의 실험적 유용성을 조합한 제브라피시-기반된 스크리닝 시스템을 설립하여 척추동물에서 활성이 있는

(뒷면에 계속)

**대표도** - 도2a



항-당뇨 약제 후보물질을 빠르고 편리하게 검출할 수 있는 효과가 있다. 또한, 형광성 글루코오스 유도인자를 사용하여 이의 제브라피시 내 섭취된 양을 형광측정 함으로써 편리하고 빠르게 글루코오스 유도인자 섭취량을 측정 가능하며, 종래의 방사성 글루코오스 추적자의 사용으로 인한 부수적 시설 및 방사능 정화 처리의 필요성을 제거하는 이점이 있다. 더불어, 제브라피시-기반된 시스템은 수반되는 독성 분석이 가능하고, 하우징이 간편하며, 제브라피시와 형광성 글루코오스 유도인자 접촉 시 글루코오스 섭취가 가능하여 미세주입과 같은 고도의 기술이 불필요한바, 척추동물-기반된 대규모 스크리닝 수행 시 투입 비용 및 시간을 감소시킬 수 있는 이점이 있다.

(72) 발명자

**이진호**

광주광역시 북구 첨단과기로 261(오룡동) 생명과학부 309호

**임순호**

광주광역시 북구 첨단과기로 261(오룡동) 과학기술 응용연구소

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012-003460

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 당뇨병 치료제 개발을 위한 인슐린양(樣) 작용 저분자 화합물의 탐색과 특성 규명

기여율 1/2

주관기관 광주과학기술원

연구기간 2012.05.01 ~ 2015.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A120326

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 저분자 분화조절제를 이용한 환자 자가유래 iPSCs의 생산과 심근 경색 세포 치료에의 응용

기여율 1/2

주관기관 광주과학기술원

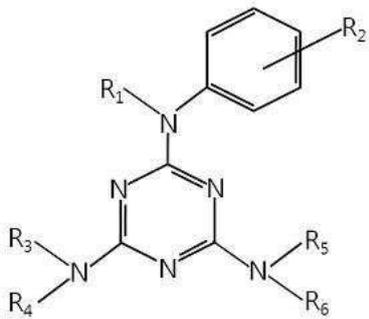
연구기간 2012.08.01 ~ 2014.07.31

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

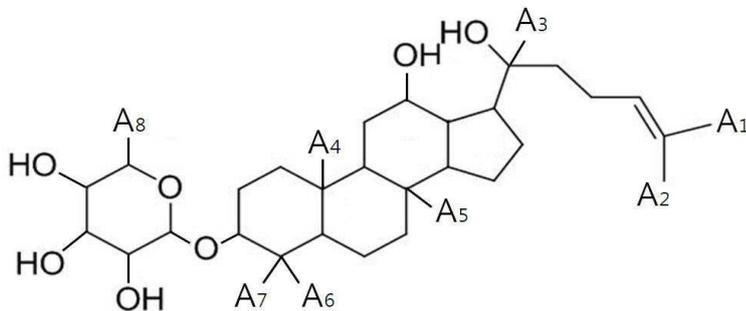
(a) 하기 화학식 I 또는 II로 표시되는 화합물의 치료학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 당뇨 예방 또는 치료용 약제학적 조성물:

**화학식 I**



상기 화학식 I에서, R<sub>1</sub>은 H이고; R<sub>2</sub>는 -(CONH)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O]<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-NH<sub>2</sub>(상기 m, n 및 p는 각각 1-5의 정수이다)이고; R<sub>3</sub>은 H이고; R<sub>4</sub>는 C<sub>7</sub>-C<sub>16</sub> 아랄킬(aralkyl)이고; 상기 아랄킬의 아릴기는 할로젠으로 치환될 수 있고; R<sub>5</sub>는 H이고; R<sub>6</sub>은 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 직쇄 또는 가지쇄의 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 직쇄 또는 가지쇄 알케닐, 아릴, C<sub>7</sub>-C<sub>16</sub> 아랄킬(aralkyl) 또는 C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> 사이클로알킬이고; 상기 아릴은 할로젠으로 치환될 수 있고;

**화학식 II**



상기 화학식 II에서, A<sub>1</sub>-A<sub>7</sub>은 각각 독립적으로 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 직쇄 또는 가지쇄의 알킬이고; 그리고 A<sub>8</sub>은 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 직쇄 또는 가지쇄의 알킬알코올이다.

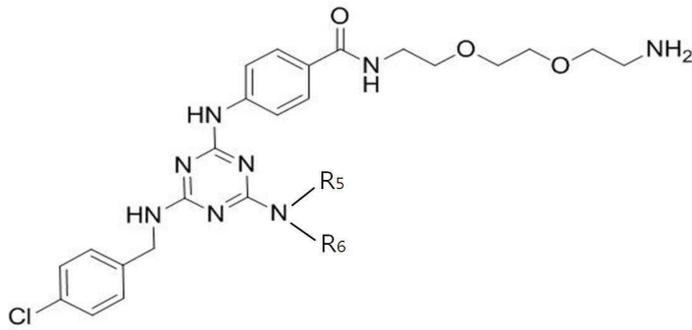
**청구항 2**

제 1 항에 있어서, 상기 화학식 I의 R<sub>2</sub>는 -(CONH)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O]<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-NH<sub>2</sub>(상기 m, n 및 p는 각각 1-3의 정수이다)인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

**청구항 3**

제 1 항에 있어서, 상기 화학식 I은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물:

화학식 1

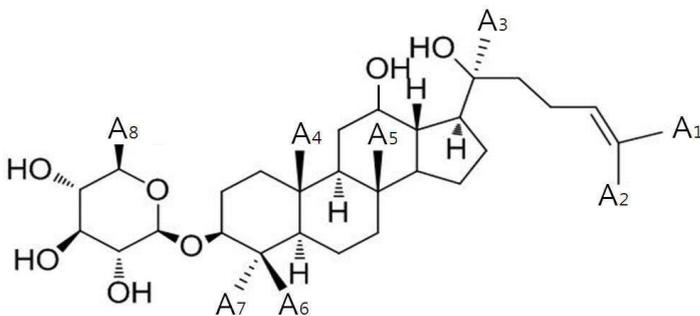


상기 화학식 1에서, R<sub>5</sub>는 H이고; R<sub>6</sub>은 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 직쇄 또는 가지쇄의 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 직쇄 또는 가지쇄 알케닐, 아릴, C<sub>7</sub>-C<sub>16</sub> 아랄킬(aralkyl) 또는 C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> 사이클로알킬이고; 상기 아틸은 할로겐으로 치환될 수 있다.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 화학식 II는 하기 화학식 9로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물:

화학식 9



상기 화학식 9에서, A<sub>1</sub>-A<sub>7</sub>는 각각 독립적으로 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 직쇄 또는 가지쇄의 알킬이고; 그리고 A<sub>8</sub>은 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 직쇄 또는 가지쇄의 알킬알코올이다.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 당뇨병 치료제의 제브라피시-기반된 스크리닝 방법 및 당뇨병 치료, 개선 또는 완화용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인슐린은 연소성 발병 당뇨병(제1형) 또는 후발성 당뇨(제2형)를 치료하기 위하여 개발된 유일한 제제이다(1). 제2형 당뇨병에 대한 많은 약제들이 개발되어 왔으나, 상기 약제들은 부작용(예컨대, 총 사망 위험 증가(2), 저혈당증(3) 및 위장 질환(4))을 동반하거나, 피하 전달을 필요로 한다(5). 당뇨병에 대한 외과적 개입은 문제가 있다. 예컨대, 제1형 당뇨병에 대한 췌장 이식은 장기 기증자가 부족하고, 제2형 당뇨병에 대한 위 우회술은 영양결핍증을 발생시킬 수 있다(6). 따라서 인슐린 효과를 개괄하는 신규한 화합물(요컨대, 인슐린 모방체)의 발견이 임상적으로 긴급히 요구된다.

[0003] 약물(drugs) 발견 과정에서 통상적인 ‘병목’은 후보 약제의 동물 실험에서의 실패이다. 이는 섭취, 용해도, 대사 안정성 또는 독성과 관련된 문제에 의하여 발생한다(7, 8). 이러한 문제는 신규한 약물의 발견에서 보고된 둔화의 주요한 원인 요소이다(9, 10). 작은 설치 포유류에서의 대규모 후보 약물 스크리닝은 이러한 문제

를 다루는 것이 가능하다. 그러나 작은 포유류는 과도한 비용 및 물리적 문제(요컨대, 특수 설비 내 하우스(housing)이 요구되는 기관의 지침 및 기술적 지원을 제공하기 위한 추가적인 인력) 때문에 큰-규모 스크리닝 프로그램에 적합하지 않다. 결과적으로, 높은 번식력 및 단순한 하우스가 장점이 될 수 있는 작은 사이즈의 동물 모델이, 약물 발견 연구를 위한 스크리닝 도구로서 개발되고 있다(11). 또한, 작은 유기체-기반된 약물 스크리닝은 약물 타겟 동정이 불필요하고(9), 포유류 실험 모델에서 유효성 검사를 위한 신규한 활성 화합물의 발견을 촉진할 수 있기 때문에 유용하다.

[0004] 당뇨병 연구의 맥락에서, 항-당뇨 약제에 대한 화학적 라이브러리 스크리닝 시스템은 세포의 글루코오스 섭취(glucose uptake) 측정(12, 13)을 기반으로 발전되어왔다. 이는 두 형광물질-태깅된 글루코오스 생물탐침(fluorescein-tagged glucose bioprobe; 2-데옥시-2-[(7-니트로-2,1,3-벤조사디아졸-4-일)아미노]-D-글루코오스(2-NBDG) 및 6-데옥시-2-[(7-니트로-2,1,3-벤조사디아졸-4-일)아미노]-D-글루코오스(6-NBDG))의 개발에 의하여 급속화되었다. 방사성 글루코오스 추적자(tracer)를 대신하여 이러한 NBDG 탐침을 사용할 수 있고, 글루코오스 유량의 편리하고 빠른 측정을 제공할 수 있다(14). 세포 내 글루코오스 운반체(GLUT: glucose transporter)에 대한 NBDG 탐침의 친화성이 유리 글루코오스보다 300배 높다는 사실의 입증(14, 15)에 의하여 비정상적인 NBDG 탐침의 동역학적 거동에 관한 종전의 우려가 완화되었다. 더욱이, 세포의 6-NBDG 섭취의 온도 계수(Q10)는 적혈구 내 GLUT1의 Q10과 유사함이 판명되었고(단순 확산에 대한 Q10 보다 매우 높음), 이는 단순 확산이 NBDG 섭취에서 사소한 역할을 함을 나타낸다(15).

[0005] 1980년대 초반에 동물 모델이 설립된 이래로, 제브라피시(*Danio rerio*)는 약물 스크리닝을 위한 중요한 유기체로 개발되어 왔다(16). 제브라피시는 유일하게 96-웰 또는 384-웰 플레이트 구성방식에서 스크리닝이 가능하기 때문에 다른 척추동물 모델과 비교하여 상당한 장점을 가지고 있다(17). 더욱이, 제브라피시의 지놈은 인간의 지놈과 약 80%의 상동성이 있어, 초파리인 *Drosophila melanogaster*(60%) 및 선충인 *Caenorhabditis elegans*(36%)과 같은 인기 있는 작은 유기체 모델과 비교하여 호의적이다(18-20). 또한, 제브라피시 및 인간은 글루코오스 항상성 조절에 있어 유사한 메카니즘을 공유한다(21, 22).

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 인슐린 모방 화합물의 발견을 위한 단순한 척추동물-기반된 스크리닝 시스템을 구축하기 위하여 제브라피시 및 글루코오스 유도인자인 NBDG 탐침의 실험적 유용성을 조합하였다. 그 결과, 균질화된(homogenized) 제브라피시 유생(larvae) 및 눈(GLUT 발현이 상대적으로 높은 조직)에서의 NBDG 축적의 형광 분석에 의하여 글루코오스 섭취 조절인자(regulator)들을 검출할 수 있고, 이러한 NBDG 섭취는 GLUT 수용체에 대한 경쟁을 억제할 수 있음을 확인하였다. 또한, 본 발명자들은 본 발명의 시스템에서 종래 글루코오스 섭취를 유발하는 것으로 규명된 화합물인 마슬린산(Maslinic acid)의 검출이 가능함을 확인함으로써 신규한 항-당뇨 약물 후보의 빠른 동정을 위한 매우 단순하고, 경제적이며 효과적인 제브라피시-기반된 스크리닝 시스템을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 제브라피시-기반된 당뇨병 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 당뇨 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

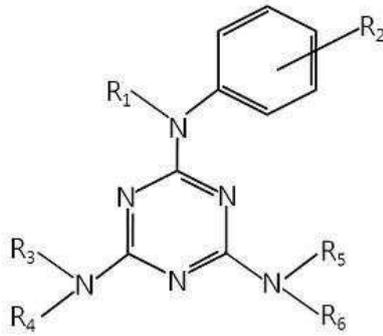
#### 과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 당뇨병 치료제의 제브라피시-기반된 스크리닝 방법을 제공한다: (a) 제브라피시와 시험물질을 접촉시키는 단계; (b) 상기 단계 (a)의 결과물과 형광성 글루코오스 유도인자를 접촉시키는 단계; 및 (c) 상기 제브라피시 내로 섭취(uptake)된 상기 형광성 글루코오스 유도인자의 양을 형광측정을 통하여 측정하는 단계; 상기 시험물질이 상기 형광성 글루코오스 유도인자의 제브라피시 내 섭취를 증가시키면, 당뇨병 치료제로 판단된다.
- [0012] 본 발명자들은 인슐린 모방 화합물의 발견을 위한 단순한 척추동물-기반된 스크리닝 시스템을 구축하기 위하여 제브라피시 및 글루코오스 유도인자인 NBDG 탐침의 실험적 유용성을 조합하였다. 그 결과, 균질화된 제브라피시 유생(larvae) 및 눈(GLUT 발현이 상대적으로 높은 조직)에서의 NBDG 축적의 형광 분석에 의하여 글루코오스 섭취 조절인자(regulator)들을 검출 할 수 있고, 이러한 NBDG 섭취는 GLUT 수용체에 대한 경쟁을 억제할 수 있음을 확인하였다. 또한, 본 발명자들은 본 발명의 시스템에서 종래 글루코오스 섭취를 유발하는 것으로 규명된 화합물인 마슬린산(Maslinic acid)의 검출이 가능함을 확인함으로써 본 발명의 제브라피시-기반된 스크리닝 시스템이 신규한 항-당뇨 약물 후보를 빠르고, 단순하며, 경제적이고 효과적으로 동정할 수 있음을 확인하였다.
- [0013] 따라서, 본 발명은 제브라피시 내로 섭취된 글루코오스 글루코오스 유도인자를 이용하여 당뇨병을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 화합물을 동정하는 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 방법을 각각의 단계별로 상세히 설명하면 다음과 같다:
- [0015] 단계 (a): 제브라피시와 시험물질을 접촉
- [0016] 우선 제브라피시와 시험물질을 접촉시킨다.
- [0017] 본 명세서의 용어 “접촉”이란, 물질과 물질이 맞닿는 것을 의미한다. 상기 단계 (a)에서 제브라피시와 시험물질을 접촉시키는 방법은 제브라피시와 시험물질을 맞닿게 할 수 있는 어떠한 경우도 포함되며, 예컨대 제브라피시가 배양 또는 유지되는 배지(예컨대, E3 물과 같은 피시 워터(fish water) 등)에 상기 시험 물질을 첨가(add) 또는 투여(administer)하여 제브라피시와 시험물질이 맞닿을 수 있는 상태에 놓이게 하는 것을 포함한다.
- [0018] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 제브라피시는 제브라피시 유생이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 제브라피시 유생은 24-168 hpf(hour post fertilization), 24-144 hpf, 24-120 hpf, 48-120 hpf, 48-96 hpf, 60-96 hpf, 60-84 hpf, 64-80 hpf 또는 68-76 hpf 유생이다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 시험물질은 1-15 mg/mL 농도로 접촉시킨다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 농도는 1-13 mg/mL 또는 1-11 mg/mL이다. 본 발명의 어떠한 구현예에 따르면, 상기 농도는 3-15 mg/mL, 5-15 mg/mL 또는 8-15 mg/mL이다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 농도는 3-13 mg/mL, 5-13 mg/mL, 8-13 mg/mL이다. 본 발명에서 상기 시험물질은 상기의 농도범위 내에서 독성 활성을 갖지 않는다.
- [0020] 단계 (b): 형광성 글루코오스 유도인자와 접촉
- [0021] 단계 (a)의 실시 이후, 상기 단계 (a)의 결과물과 형광성 글루코오스 유도인자를 접촉시킨다.
- [0022] 상기 단계 (b)에서 상기 단계 (a)의 결과물과 형광성 글루코오스 유도인자를 접촉시키는 방법은 상기 단계 (a)의 결과물과 형광성 글루코오스 유도인자를 맞닿게 할 수 있는 어떠한 경우도 포함되며, 예컨대 상기 단계 (a)의 결과물이 존재하는 배지(예컨대, E3 물과 같은 피시 워터(fish water) 등)에 상기 시험 물질을 첨가(add) 또는 투여(administer)하여 상기 단계 (a)의 결과물과 형광성 글루코오스 유도인자가 맞닿을 수 있는 상태에 놓이게 하는 것을 포함한다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 형광성 글루코오스 유도인자는 2-데옥시-2-[(7-니트로-2,1,3-벤조사디아졸-4-일)아미노]-D-글루코오스(2-NBDG) 또는 6-데옥시-2-[(7-니트로-2,1,3-벤조사디아졸-4-일)아미노]-D-글루코오스(6-NBDG)이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 형광성 글루코오스 유도인자는 2-NBDG이다.
- [0024] 본 발명의 2-NBDG 및 6-NBDG은 형광물질-태깅된 글루코오스 유사체(analogues)로 글루코오스 트랜스포터 1(GLUT 1)를 연구하기 위하여 6-NBDG가 1985년에 개발되었고, 박테리아에서 글루코오스 섭취를 연구하기 위하여 2-NBDG가 1996년에 개발되었다. 2-NBDG 및 6-NBDG의 운명은 세포 내 섭취에 따라 달라지는데, 2-NBDG는 당분해 경로에

서 핵소키나아제에 의해 인산화된 후 비-형광성 산물로 빠르게 분해되나, 6-NBDG는 핵소키나아제에 의해 인산화되지 않기 때문에 형광성 형태로 세포질에 축적된다. 2-NBDG의 화학식은  $C_{12}H_{14}N_4O_8$ 이고, 6-NBDG의 화학식은  $C_{12}H_{14}N_4O_8$ 이며 화학 구조는 도 1에 개시하였다.

- [0025] 상기 2-NBDG 및 6-NBDG는 환경에 민감할 지라도 약 465/540 nm에서 전형적인 여기/발광 스펙트라를 나타내기 때문에, 형광물질(fluorescein)용 광학 필터를 이용하여 현미경 하에서 시각화할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 형광성 글루코오스 유도인자는 100  $\mu$ M-5 mM의 농도로 접촉시킨다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 농도는 100  $\mu$ M-3 mM, 100  $\mu$ M-2.5 mM 또는 100  $\mu$ M-2 mM이다. 본 발명의 어떠한 구현예에 따르면, 상기 농도는 200-5 mM, 300  $\mu$ M-5 mM, 400  $\mu$ M-5 mM 또는 500  $\mu$ M-5 mM이다. 본 발명의 어떠한 구현예에 따르면, 상기 농도는 150  $\mu$ M-3 mM, 150  $\mu$ M-2.5 mM, 200  $\mu$ M-2.5 mM, 200  $\mu$ M-2 mM, 300  $\mu$ M-2 mM, 400  $\mu$ M-2 mM, 500  $\mu$ M-2 mM, 500  $\mu$ M-1.5 mM, 500  $\mu$ M-1 mM, 500  $\mu$ M-800  $\mu$ M, 또는 500  $\mu$ M-700  $\mu$ M이다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 농도는 500  $\mu$ M-3 mM, 500  $\mu$ M-2.5 mM, 550  $\mu$ M-2.5 mM, 550  $\mu$ M-2 mM, 550  $\mu$ M-1.5 mM, 550  $\mu$ M-1 mM, 550  $\mu$ M-800  $\mu$ M, 550  $\mu$ M-700  $\mu$ M 또는 550  $\mu$ M-650  $\mu$ M이다.
- [0027] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 단계 (b)의 접촉은 0.1-20시간 실시한다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)의 접촉은 0.1-15 시간 또는 0.1-13시간 실시한다. 본 발명의 어떠한 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)의 접촉은 0.5-20 시간, 0.5-15 또는 0.5-13시간 실시한다.
- [0028] 단계 (c): 제브라피시 내로 섭취(uptake)된 형광성 글루코오스 유도인자의 양을 측정
- [0029] 단계 (b)의 실시 결과, 제브라피시 내로 섭취된 형광성 글루코오스 유도인자의 양을 형광측정을 통하여 측정한다. 상기 측정 결과, 측정된 상기 형광성 글루코오스 유도인자의 양이 시험물질과 접촉시키지 않은 대조군 내로 섭취된 형광성 글루코오스 유도인자의 양과 비교하여 증가된 경우, 상기 시험물질은 당뇨병 치료제로 판단된다.
- [0030] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 형광측정은 형광신호(fluorescence signal) 측정 또는 형광 이미지(fluorescence image) 측정을 통해 실시한다.
- [0031] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 형광신호는 균질화된 제브라피시에서 발생하는 형광신호이다. 본 발명의 어떠한 구현예에 따르면, 상기 형광신호는 균질화된 제브라피시 유생에서 발생하는 형광신호이다. 본 발명의 형광신호 측정으로 형광측정을 한 경우, 제브라피시 내로 섭취된 형광성 글루코오스 유도인자의 양의 증가는 제브라피시 내로 섭취된 글루코오스 유도인자로부터 방출되는 형광 신호의 증가를 나타낸다.
- [0032] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 형광 이미지는 제브라피시 눈에서 발생하는 형광 이미지이다. 본 발명의 어떠한 구현예에 따르면, 상기 형광 이미지는 제브라피시 유생 눈에서 발생하는 형광 이미지이다. 본 발명의 형광 이미지 측정으로 형광측정을 한 경우, 제브라피시 내로 섭취된 형광성 글루코오스 유도인자의 양의 증가는 제브라피시 내로 섭취된 글루코오스 유도인자로부터 방출되는 형광 강도(intensity)가 증가한 것을 나타낸다.
- [0033] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 당뇨병 치료제는 인슐린 저항성에 의한 후발성 당뇨(제2형 당뇨)병 치료제이다.
- [0034] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 하기 화학식 I 또는 II로 표시되는 화합물의 치료학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다:

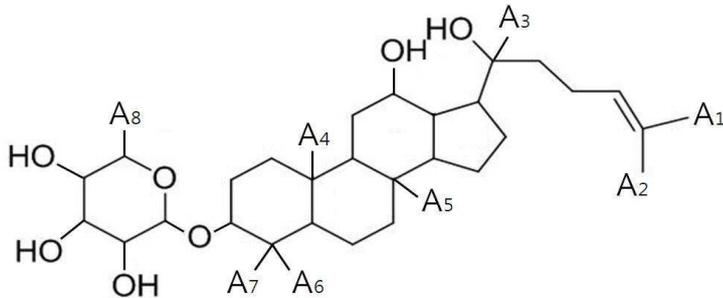
[0035] 화학식 I



[0036]

[0037] 상기 화학식 I에서, R<sub>1</sub>은 H이고; R<sub>2</sub>는 -(CONH)-[(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O]<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-NH<sub>2</sub>(상기 m, n 및 p는 각각 1-5의 정수이다)이고; R<sub>3</sub>은 H이고; R<sub>4</sub>는 C<sub>7</sub>-C<sub>16</sub> 아랄킬(aralkyl)이고; 상기 아랄킬의 아릴기는 할로겐으로 치환될 수 있고; R<sub>5</sub>는 H이고; R<sub>6</sub>는 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 직쇄 또는 가지쇄의 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 직쇄 또는 가지쇄 알케닐, 아릴, C<sub>7</sub>-C<sub>16</sub> 아랄킬(aralkyl) 또는 C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> 사이클로알킬이고; 상기 아릴은 할로겐으로 치환될 수 있고;

[0038] 화학식 II



[0039]

[0040] 상기 화학식 II에서, A<sub>1</sub>-A<sub>7</sub>은 각각 독립적으로 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 직쇄 또는 가지쇄의 알킬이고; 그리고 A<sub>8</sub>은 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 직쇄 또는 가지쇄의 알킬알코올이다.

[0041] 본 명세서에서 용어 “C<sub>7</sub>-C<sub>16</sub> 아랄킬(aralkyl)”은 임의의 위치에서 하나 또는 둘 이상의 페닐환으로 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬을 의미하며, 예를 들어, 벤질(benzyl), 2-페닐에틸, 3-페닐(n-프로프(prop)-1-일(y1)), 4-페닐(헥(hex)-1-일(y1)), 3-페닐(n-아(am)-2-일(y1)), 3,3-디페닐프로필 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0042] 본 명세서에서 용어 “아릴(aryl)”은 전체적으로 또는 부분적으로 불포화된 치환 또는 비치환된 모노사이클릭 또는 폴리사이클릭 탄소 고리를 의미하며, 바람직하게는 모노아릴 또는 비아릴이다. 아릴기는 페닐기, 치환된 페닐기, 나프틸기, 치환된 나프틸기를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 본 명세서에서 용어 “C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 직쇄 또는 가지쇄 알킬”은 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, sec-부틸, tert-부틸, n-아밀(amy1), tert-아밀, 헥실 등의 직쇄(straight chain) 또는 가지쇄(branched chain)의 알킬기를 의미한다.

[0044] 본 명세서에서 용어 “C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> 사이클로알킬”은 3-10개의 탄소원자로 이루어지는 단일환(mono ring) 또는 다중환(multi rings)의 포화탄화수소를 의미하며, 예를 들어, 사이클로프로필환, 사이클로부틸환, 사이클로부틸환, 사이클로헥실환, 또는 사이클로헵틸환 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 사이클로알킬은 3-6개의 탄소원자로 이루어진 단일환의 포화탄화수소이고, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 사이클로알킬은 사이클로헥실이다.

[0045] 본 명세서에서, 화학식 I에서 사용되는 용어 “할로겐”은 할로젠족 원소를 나타내며, 예컨대, F, Cl, Br 및 I를 포함한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 할로겐은 F 또는 Cl이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 R<sub>4</sub>의 C<sub>7</sub>-C<sub>16</sub> 아랄킬(aralkyl)의 아릴기는 Cl로 치환될 수 있다. 본 발명의 다른 구현예에

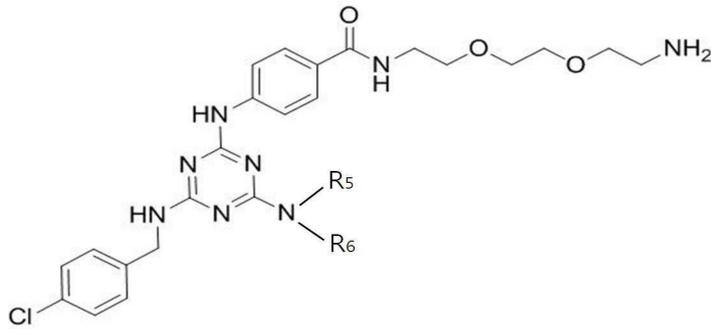
따르면, 본 발명의 R<sub>6</sub>의 아틸은 F로 치환될 수 있다.

[0046] 본 명세서에서 화학식 II에서 사용되는 용어 알킬알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 및 이의 유사체를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 알킬 알코올은 메탄올이다.

[0047] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 I의 R<sub>2</sub>는 -(CONH)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-NH<sub>2</sub>(상기 m, n 및 p는 각각 1-3의 정수이다)이고, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 m, n 및 p는 각각 정수 2이다.

[0048] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 I는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이다.

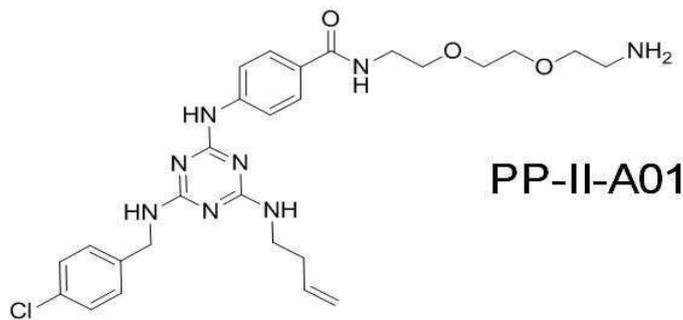
[0049] **화학식 1**



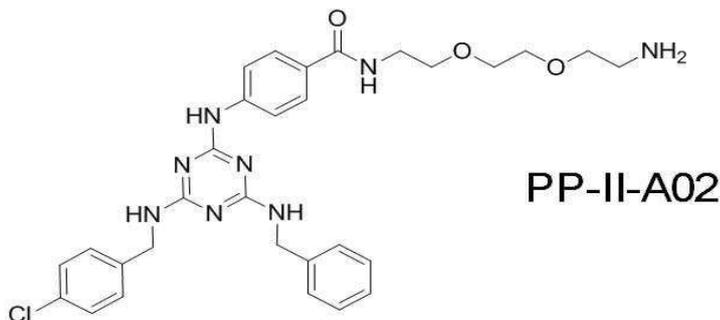
[0050] 상기 화학식 1에서, R<sub>5</sub>는 H이고; R<sub>6</sub>은 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 직쇄 또는 가지쇄의 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 직쇄 또는 가지쇄 알케닐, 아틸, C<sub>7</sub>-C<sub>16</sub> 아랄킬(aralkyl) 또는 C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> 사이클로알킬이고; 상기 아틸은 할로젠으로 치환될 수 있다.

[0052] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 1은 하기 화학식 2-6으로 표시되는 화합물 중 어느 하나이다.

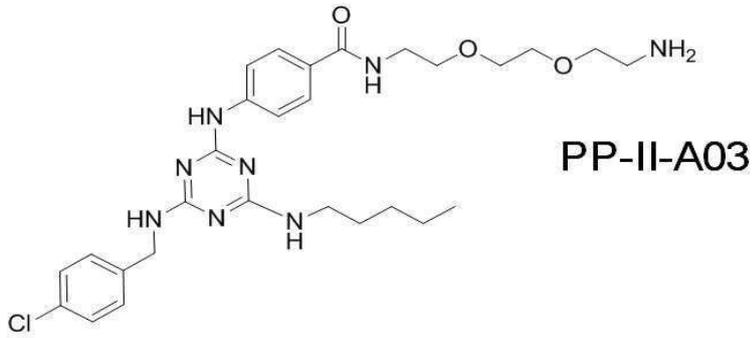
[0053] **화학식 2**



[0054] **화학식 3**

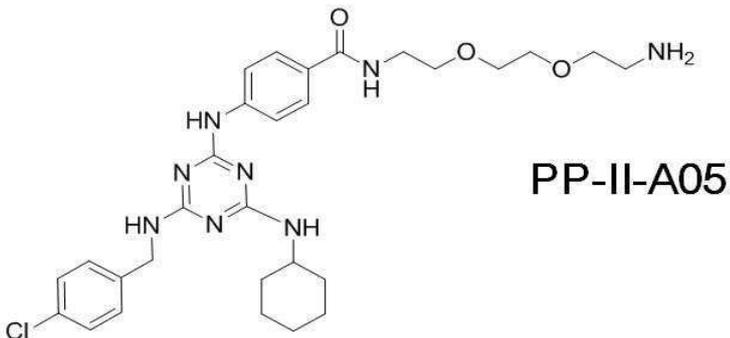


[0056] **화학식 4**



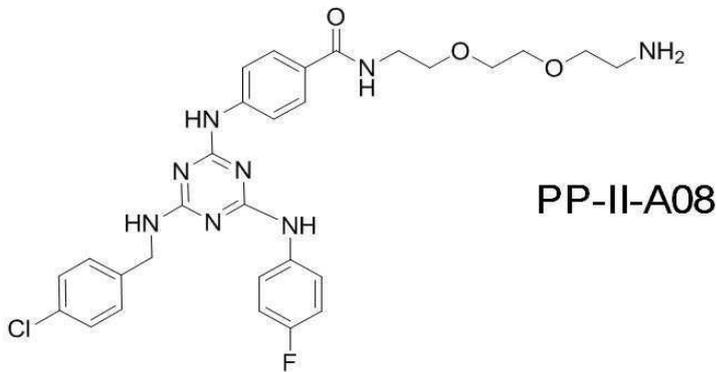
[0058]

[0059] 화학식 5



[0060]

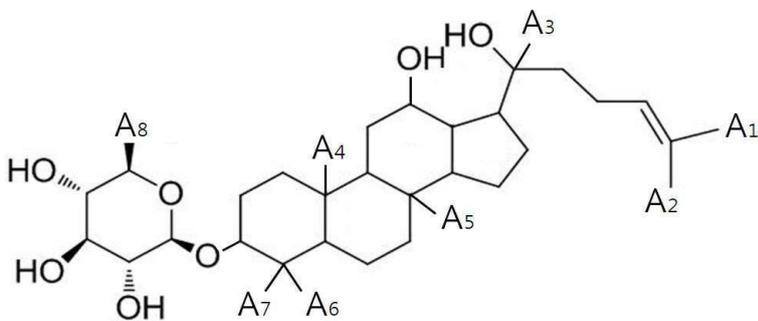
[0061] 화학식 6



[0062]

[0063] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 II는 하기 화학식 7로 표시되는 화합물이다.

[0064] 화학식 7

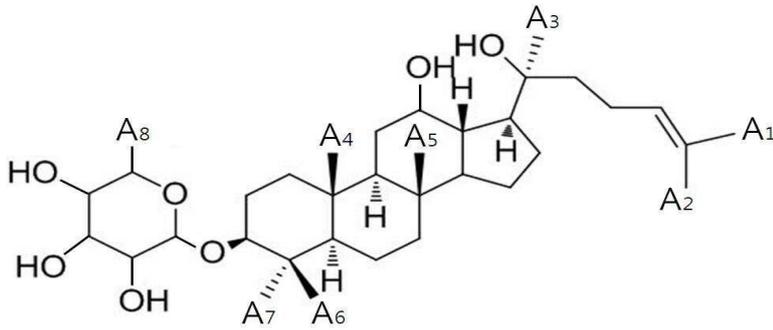


[0065]

[0066] 상기 화학식 7에서, A<sub>1</sub>-A<sub>7</sub>은 각각 독립적으로 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 직쇄 또는 가지쇄의 알킬이고; 그리고 A<sub>8</sub>은 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 직쇄 또는 가지쇄의 알킬알코올이다.

[0067] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 II는 하기 화학식 8로 표시되는 화합물이다.

[0068] 화학식 8

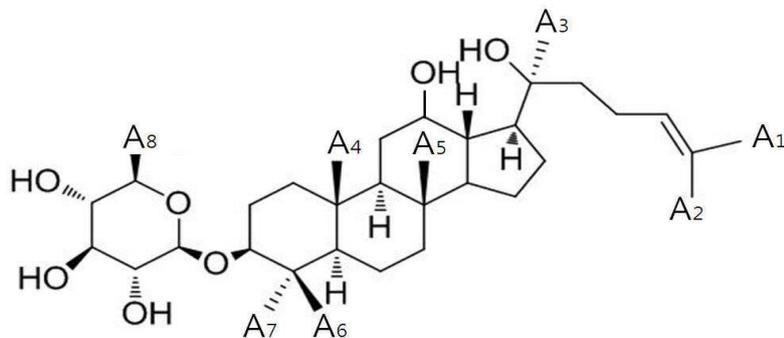


[0069]

[0070] 상기 화학식 8에서, A<sub>1</sub>-A<sub>7</sub>은 각각 독립적으로 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 직쇄 또는 가지쇄의 알킬이고; 그리고 A<sub>8</sub>은 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 직쇄 또는 가지쇄의 알킬알코올이다.

[0071] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 II는 하기 화학식 9로 표시되는 화합물이다.

[0072] 화학식 9

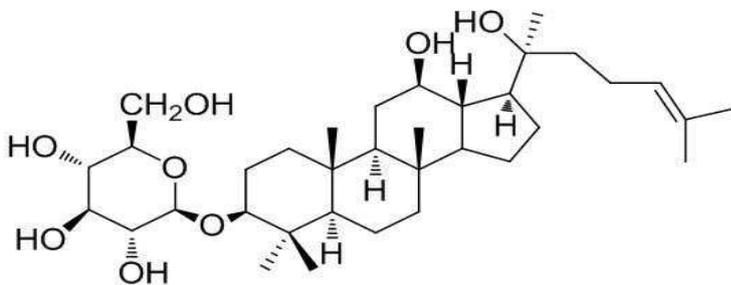


[0073]

[0074] 상기 화학식 9에서, A<sub>1</sub>-A<sub>7</sub>은 각각 독립적으로 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 직쇄 또는 가지쇄의 알킬이고; 그리고 A<sub>8</sub>은 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 직쇄 또는 가지쇄의 알킬알코올이다.

[0075] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 II는 하기 화학식 10으로 표시되는 20(S)-진세노사이드 Rh2이다.

[0076] 화학식 10



[0077]

[0078] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 방법에 의하여 스크리닝된 시험물질은 인슐린 모방 활성(예컨대, 세포 내 글루코오스 섭취를 증가시키는 활성)을 갖는다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 글루코오스 섭취가 증가되는 세포는 포유류의 지방세포(adipocyte)이다. 본 발명의 어떠한 구현예에 따르면, 본 발명의 포유류는 마우스이다.

**발명의 효과**

- [0079] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0080] (a) 본 발명은 당뇨병 치료제의 제브라피시-기반된 스크리닝 방법 및 당뇨 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0081] (b) 본 발명은 형광물질-태그된 글루코오스 아날로그인 형광성 글루코오스 유도인자와 제브라피시 동물 모델의 실험적 유용성을 조합한 제브라피시-기반된 스크리닝 시스템을 설립하여 척추동물에서 활성이 있는 항-당뇨 약제 후보물질을 빠르고 편리하게 검출할 수 있는 효과가 있다.
- [0082] (c) 본 발명은 형광성 글루코오스 유도인자를 사용하여 이의 제브라피시 내 섭취된 양을 형광측정 함으로써 편리하고 빠르게 글루코오스 유도인자 섭취량을 측정 가능하며, 종래의 방사성 글루코오스 추적자의 사용으로 인한 부수적 시설 및 방사능 정화 처리의 필요성을 제거하는 이점이 있다.
- [0083] (d) 본 발명의 제브라피시-기반된 시스템은 수반되는 독성 분석이 가능하고, 하우징이 간편하며, 제브라피시와 형광성 글루코오스 유도인자 접촉 시 글루코오스 섭취가 가능하여 미세주입과 같은 고도의 기술이 불필요한바, 척추동물-기반된 대규모 스크리닝 수행 시 투입 비용 및 시간을 감소시킬 수 있는 이점이 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0084] 도 1은 본 발명에 개시되어 있는 화합물의 화학적 구조를 나타낸다.
- 도 2는 72 hpf(hour post fertilization) 제브라피시 유생에서의 2-NBDG 섭취의 투여량-의존적 연구를 나타낸다. 도 2a는 2-NBDG의 투여량을 증가시키면서 유생에 3시간 처리하는 경우 200 mM 투여량에서 형광 현미경에 의하여 글루코오스 섭취를 시각화할 수 있음을 나타낸다. 2-NBDG 형광은 1 mM 투여량까지 현저하게 증가하였다. 도 2b는 72 hpf 제브라피시 유생에서 2-NBDG 섭취가 투여량 의존적으로 일어나고 용해된 유생의 형광 마이크로플레이트 판독기 분석에 의하여 정량화할 수 있음을 보여준다. 도 2c는 제브라피시 눈에서의 2-NBDG 신호(signal)를 정량화한 것으로, 이 역시 투여량-의존적 2-NBDG 섭취가 200 mM부터 일어남을 보여준다.
- 도 3은 72 hpf 제브라피시 유생에서 2-NBDG 섭취의 시간-의존적 연구를 나타낸다. 도 3a는 형광 현미경에 의하여 시각화할 수 있는 형광 글루코오스 탐침인 2-NBDG의 12시간에 걸친 처리가 시간-의존적 섭취 결과를 가져오는 것을 보여준다. 도 3b는 용해된 유생의 형광 마이크로플레이트 판독기 분석을 나타내며, 72 hpf 제브라피시 유생에서의 12시간에 걸친 2-NBDG 섭취 역시 용해된 유생의 형광 마이크로플레이트 판독기 분석에 의하여 정량화 가능함을 나타낸다. 도 3c는 유생 눈에서의 2-NBDG 신호의 이미지 분석을 나타내며, 유생에서의 2-NBDG 신호의 시간-의존적 섭취가 유생 눈에 2-NBDG 신호의 이미지 분석에 의하여도 정량 가능함을 나타낸다.
- 도 4는 6-NBDG를 3시간 동안 유생에 처리한 결과를 나타내며, 6-NBDG 섭취는 형광 현미경에 의하여 72 hpf 제브라피시 유생에서 시각화할 수 없음을 보여준다. 6-NBDG 섭취 이미지는 2-NBDG 섭취의 이미지 분석의 경우(도 2a)와 동일한 현미경 설정(노출 시간: 500 ms; 배율: 50X; 이미지 포착을 위하여 사용된 이미지 소프트웨어: LAS 4.0 Leica Application Suite)을 사용하였다.
- 도 5는 72 hpf 및 120 hpf 제브라피시 유생에서의 2-NBDG 섭취의 비교를 나타낸다. 분석을 위하여 글루코오스 섭취 유도인자(inducer)로 알려진 에모딘을 3시간 처리하였다. 도 5a는 72 hpf 유생의 경우, 에모딘 처리가 2-NBDG 섭취를 증가시킴을 형광 현미경에 의하여 나타냈다. 반면, 도 5b에서 120 hpf 유생의 경우, 에모딘 처리와 관계없이 소화관에서 높은 레벨의 2-NBDG 형광이 나타났다. 도 5c는 용해된 유생의 형광 마이크로플레이트 판독기 분석을 나타내며, 72 hpf 및 120 hpf 제브라피시 유생에서의 에모딘 처리가 2-NBDG 섭취를 유도하는 것을 보여준다(\* $P < 0.05$  DMSO 처리된 유생과 비교). 도 5d는 제브라피시 유생 눈에서의 2-NBDG 신호의 이미지 분석을 나타내며, 에모딘 처리가 72 hpf 및 120 hpf 유생에서 글루코오스 섭취를 유도함을 보여준다. 120 hpf 유생에서의 에모딘-글루코오스 섭취 규모는 72 hpf 유생과 비교하는 경우 감소하였다(\* $P < 0.05$ 는 DMSO 처리된 유생과 비교).
- 도 6은 과다 유리 글루코오스가 2-NBDG 섭취에 미치는 영향을 보여준다. 도 6a는 72 hpf 제브라피시 유생에서 3시간 동안의 2-NBDG 섭취가 유리 글루코오스와의 경쟁에 의하여 감소됨을 현미경 분석으로 나타낸 것이다. 도

6b은 과다 글루코오스와 함께 인큐베이션한 경우 2-NBDG 섭취가 감소함을 유생 눈의 이미지 분석으로 확인한 것을 나타낸다(\*= $P < 0.05$ 는 2-NBDG 단독 처리 유생과 비교).

도 7은 글루코오스 섭취 조절인자를 동정하기 위한 방법으로서 본 발명의 제브라피시-기반된 2-NBDG 섭취 시스템의 유효성 검사를 나타낸다. 도 7a는 *C. crenata*로부터 화합물을 분리 및 정제하는 과정을 나타낸 모식도이다. 도 7b는 메탄올 분획으로 나타내어진 일본 밤나무인 *Castanea crenata*에서 유래한 내피의 활성 인도된 분획(Activity guided fractionation)이 2-NBDG 섭취를 가장 잘 유도함을 보여준다. 도 7c는 메탄올 분획에서 더욱 정제한 하기 8개의 화합물을 나타낸다: UP2.2(스코폴레틴), UP3.1.1.1(마슬린산), UP3.5.3(프라그란신 A<sub>2</sub>), UP4.2.3(4-케토노노닌산), UP5.2.1(4-히드록시-5-메톡시신남산), UP3.2(프락시딘), UP3.3(6, 7, 8-트리메톡시쿠마린) 및 UP5.2.3(3, 4, 5-트리메톡시신남산). 제브라피시 유생 내로 2-NBDG 섭취를 유도하는 상기 화합물의 능력을 글루코오스 섭취 유도인자로 알려져 있는 에모딘(36) 10 μg/mL를 처리한 유생과 비교하였다. 프락시딘 및 마슬린산은 글루코오스 섭취를 매우 높은 레벨로 유도함을 발견하였다. 그래프의 적색 줄은 ‘히트’ 약물을 선별하기 위한 기준치를 나타낸다(즉, 2-NBDG 섭취 값이 화합물을 처리하지 않은 유생 2-NBDG 섭취와 비교하여 100% 증가하는 범위 내에 속해야 함). 도 7d는 추가적인 비교를 위하여, 동양의 현화(flowering) 뽕나무인 *Morinda longissima* 뿌리에서 분리한 4가지 화합물(ML-4, ML-6, ML-6, ML-11)을 10 μg/mL 투여량에서 시험한 결과를 나타낸다. *M. longissima*의 추출물에 속한 어떠한 화합물도 글루코오스 섭취를 유도하지 못했다. 도 7e는 상기 ML 화합물(ML-4, ML-6, ML-6 및 ML-11)의 화학 구조를 나타낸다.

도 8은 인 *비보*에서 글루코오스를 유도하는 프락시딘(UP3.2)이 신규한 인슐린 모방 화합물임을 확인함을 보여준다. 도 8a의 형광 현미경은 10 μg/mL 마슬린산(UP3.1.1.1) 또는 10 μg/mL 프락시딘(UP3.2) 처리 후 포유류의 지방세포가 2-NBDG 섭취를 증가시킬 수 있음을 보였다. 글루코오스 섭취 유도에 대한 양성 대조군으로서 10 μM 베르베린을 사용하였다. 각 화합물을 지방세포에 30분 동안 처리하였다. 기준 자(scale bar)=100 μm. 도 8b는 10 μg/mL 프락시딘으로 처리한 포유류 지방세포의 2-NBDG 섭취가 인슐린 모방 활성의 지표인 인슐린 저항성 유도에 민감함을 나타낸다. 양성 대조군으로 100 nM 인슐린을 처리하고, 음성 대조군으로 10 μg/mL ML-6을 처리하였다. 상술한 바와 같이 인슐린 저항성 유도를 위하여 2.5 ng/mL TNF-α를 5일 동안 처리하였다(37). \*= $P < 0.05$ 는 TNF-처리된 세포와 비교함. 도 8c는 지방세포로부터 10 mM 에피네프린-매개된 FFA 방출 억제 능력에 의하여 프락시딘이 인슐린 모방 화합물임을 확인함을 나타낸다. 100 nM 인슐린을 양성 대조군으로 사용하고, 10 μg/mL ML-6을 음성대조군으로 사용하였다. 570 nm에서 증가된 흡광도는 프락시딘이 처리된 지방세포에 의하여 FFA 유치가 더 좋음을 나타냈다. 오류=SD. \*= $P < 0.05$ 는 비처리 세포(에피네프린만 처리)와 비교함. 도 8d는 본 발명의 신규한 항-당뇨 화합물 검출을 위한 제브라피시-기반된 접근방식을 도식화한 것이다.

도 9는 포유류 조직에서 글루코오스 섭취를 유도하는 것으로 알려진 베르베린이 72 hpf 제브라피시 유생에서 2-NBDG 섭취를 유도할 수 있음을 보여준다. 유생에 10 mM 베르베린을 1 시간 동안 처리하였다. 도 9a는 현미경 이미지를 나타내고, 도 9b는 유생 눈에서의 2-NBDG 신호의 이미지 분석을 나타낸다. 오류=SD; \*= $P < 0.05$ 는 비처리 세포와 비교함.

도 10은 *C. crenata*로부터 분리한 화합물의 독성 분석 결과를 나타낸다. 도 10a는 화합물이 처리된 제브라피시 유생에서 발생한 표현형을 요약한 것이다. 8-세포기(4/5 hpf)에서 72시간 동안 화합물을 처리하였다. 도 10b는 화합물이 처리된 제브라피시의 현미경 이미지를 나타낸다. 이미지가 빈 칸은 유생이 죽은 것을 나타낸다.

도 11은 제브라피시 유생으로의 2-NBDG 섭취 유도에 대한 사포닌-기반된 천연물질의 스크리닝 결과를 나타낸다. 도 11a는 2-NBDG를 단독 처리한 유생과 비교하여 2-NBDG 섭취 값이 100% 증가하는 범위 내에 속하는 ‘히트’ 화합물인 사포닌 cpp532(적색 화살표)를 동정한 것을 나타낸다. 그래프의 적색 줄은 ‘히트’ 화합물 선별을 위한 기준선을 나타낸다. 적색 별표는 독성 화합물을 표시한 것이다. 에모딘을 양성 대조군으로 사용하였다. 도 11b는 2-NBDG를 단독 처리한 유생과 비교하여 2-NBDG 섭취가 증가한 cpp532 처리된 제브라피시의 형광 현미경 이미지를 나타낸다. 기준 자=500 nm. 도 11c는 히트 화합물인 사포닌 cpp532(20(S)-진세노사이드 Rh2)의 화학 구조를 보여준다.

도 12는 제브라피시 유생으로의 2-NBDG 섭취 유도에 대한 트리아진-기반된 합성 화합물의 스크리닝 결과를 나타낸다. 도 12a는 2-NBDG를 단독 처리한 유생과 비교하여 2-NBDG 섭취 값이 100% 증가하는 범위 내에 속하는 ‘히트’ 화합물을 적색 화살표로 표시한 것이다. 그래프의 적색 줄은 ‘히트’ 화합물 선별을 위한 기준선을 나타낸다. 적색 별표는 독성 화합물을 표시한 것이다. 에모딘을 양성 대조군으로 사용하였다. 도 12b는 2-

NBDG를 단독 처리한 유생과 비교하여 2-NBDG 섭취가 증가한 ‘히트’ 화합물 PP-II-A01, PP-II-A02, PP-II-A03, PP-II-A05 및 PP-II-A08 처리된 제브라피시의 형광 현미경 이미지를 나타낸다. 기준 자=500 mm. 도 12c는 히트 화합물인 PP-II-A01, PP-II-A02, PP-II-A03, PP-II-A05 및 PP-II-A08의 화학 구조를 보여준다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0085] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0086] **실시예**

[0087] **실험 재료**

[0088] **식물 재료**

[0089] 건조된 밤나무(*Castanea crenata*) 내피를 대한민국 광주시의 민속 약재 시장(광주광역시 북구 말바우시장)에서 구입하였다. 상기 시료를 동정하고, 대한민국 조선대학교 약학부에 증거표본(voucher specimen)을 위탁하였다.

[0090] **기구 및 시약**

[0091] 분광기(SHIMADZU CORPORATION, 일본)를 이용하여 MeOH에서 UV 스펙트럼을 얻고, 편광계(Autopol IV Polarimeter, Rudolph Research Analytical, 미국)를 이용하여 MeOH에서 선광(optical rotation)을 얻었다. 한국기초과학지원연구원(KBSI: Korea Basic Science Institute, 대한민국 광주)에서 TMS(Trimethyl Silane)를 내부 표준으로 사용하여 300 MHz JEOL FT NMR 분광기 및 Varian Inova 500 MHz에서 NMR(nuclear magnetic resonance) 스펙트럼을 얻었다.

[0092] Micromass QTOF2 질량 분석기(Micromass, 영국)로 모든 질량 실험을 수행하였다. 컬럼크로마토그래피(column chromatography)에 HP-20, 실리카겔(63-200 mm 입자크기, Merck, 독일) 및 RP-C18(75 mm 입자크기, Merck, 독일)을 사용하였다. Merck 실리카겔 60 F254 및 RP-18 F254 플레이트를 이용하여 선도장된(Pre-coated) TLC를 수행하였다. UV 검출기 및 Optima Pak C18 컬럼(10×250 mm, 10 mm 입자 크기, RS Tech, 한국)으로 Gilson 시스템을 이용하여 HPLC를 수행하였다. HPLC 용매는 Burdick & Jackson(미국)로부터 구입하였다.

[0093] 2-NBDG 및 비대사성 6-NBDG를 Invitrogen(미국)으로부터 구입하였다. 베르베린(berberine) 및 이모딘(emodin)은 오원근 교수(조선대학교 약학대학)로부터 구입하였다. 소 체장으로부터 유래한 인슐린, 2-페닐티오우레아(2-phenylthiourea), 에피네프린(epinephrine) 및 TNF-α(human tumor necrosis factor-α)는 Sigma-Aldrich(미국)로부터 구입하였다.

[0094] **실험 방법**

[0095] ***C. Crenata*로부터 화합물 추출 및 분리**

[0096] MeOH(5 L x 3 번)로 50℃에서 소니케이션(각 단계 별 5 시간)하여 건조된 밤나무 내피(2.4 kg)를 추출하였다. 상기 메탄올 용액 추출물을 필터링하고, 건조된 상태로 철저히 농축하여 MeOH 추출물을 얻었다(490 g). 상기 메탄올 추출물을 물(1 L)로 녹인 후 HP-20 컬럼(10 x 60 cm)에 걸쳐 MeOH-H<sub>2</sub>O(0:100, 25:75, 50:50, 75:25 및 100:0, 각 2 L)로 용리하고, 최종적으로 아세톤(2 L)으로 세척하여 6개의 분획으로 분리하였다. 이후, 상기 100% 메탄올 분획(UP-MeOH fr, 100% MeOH로 분리, 2 L)을 n-헥세인/아세톤(20:1-0:10)의 농도 기울기를 이용하여 실리카 겔 컬럼(6 × 60 cm; 입자 크기 63200 μm)에서 크로마토그래프 하여 TLC 프로파일에 따라 6개의 분획(UP.1UP.6)을 얻었다. MeOH-H<sub>2</sub>O(1:2, 1:1.5 및 1:1, 각 2.5 L)로 역상 ODS-A 컬럼(5.0 × 60 cm; 12 nm, S150 μm 입자 크기)을 이용하여 분획 1(UP.1, 550 mg)의 크로마토그래피를 더 용리하여 화합물 1(스코폴레틴(Scopoletin, UP2.2))을 분리하였다(85 mg).

- [0097] 유사한 방법에 의하여, MeOH-H<sub>2</sub>O(40:60, 45:55, 50:50 및 70:30 각 2.5 L)로 역상 ODS-A 컬럼(5.0 × 60 cm; 12 nm, S150 μm 입자 크기)을 이용하여 분획 2(UP.2)에서 화합물 2(프락시딘(Fraxidin, UP-3.2))를 분리하였다(75 mg).
- [0098] MeOH-H<sub>2</sub>O(50:50, 55:45, 60:40 및 100:0 각 2.5 L)로 역상 ODS-A 컬럼(5.0 × 60 cm; 12 nm, S150 μm 입자 크기)을 통하여 분획 3을 크로마토그래피하여 화합물 3(6,7,8-트리메톡시쿠마린(6,7,8-Trimethoxycoumarin, UP-3.3))(50 mg), 화합물 4(4-하이드록시-5-메톡시신남산(4-hydroxy-5-methoxycinnamic acid, UP-5.2.1))(10 mg) 및 4개의 서브분획(UP.3.4UP.3.7)을 얻었다.
- [0099] 분획 5(UP.5)도 RP-C18 컬럼 크로마토그래피(4.0 × 60 cm, 150 μm 입자크기)를 통하여 분획하고 MeOH/H<sub>2</sub>O(1:2, 1:1.5, 1:1 및 2:1)로 용리하여 5개의 서브분획(UP.5.1UP.5.5)을 획득하였다. 화합물 5(3,4,5-트리메톡시신남산(3,4,5-trimethoxycinnamic acid, UP-5.2.3))(10.9 mg, *t<sub>R</sub>*22.0 min), 화합물 6(프라그란신 A<sub>2</sub>(Fragransins A<sub>2</sub>, UP-3.5.3))(17.7 mg, *t<sub>R</sub>*39.0 min) 및 화합물 7(마슬린산(Maslinic acid, UP-3.1.1.1))(12.0 mg, *t<sub>R</sub>*45.1 min)을 각각 획득하기 위하여 OptimaPak\_C18 컬럼(10 × 250 mm, 10 μm 입자크기)으로 60분에 걸쳐 2 mL/min의 유속으로, 205 nm 및 254 nm에서 UV-탐지하는 물에 용해한 42 % MeCN+0.1 % 포름산의 등용매를 이용한 세미 분취용 Gilson HPLC 시스템에 의하여 서브 분획 2(UP.5.2)를 정제하였다.
- [0100] **화합물 1(스코폴레틴, UP2.2):** 노란색 결정; <sup>1</sup>H NMR(300 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm):
- [0101] 9.74(1H, s, OH), 7.79(1H, d, *J*=9.3, H-4), 7.27(1H, s, H-5), 6.75(1H, s, H-8), 6.11(1H, d, *J*=9.3, H-3), 3.85(3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR(75 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 161.3(C-2), 152.0(C-9), 150.5(C-7), 146.1(C-6), 144.6(C-4), 113.2(C-3), 113.0(C-10), 111.9(C-5), 109.8(C-8), 56.6(6-OCH<sub>3</sub>).
- [0102] **화합물 2(프락시딘UP-3.2):** 노란색 분말; <sup>1</sup>H NMR(300 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm):
- [0103] 7.83(1H, d, *J*=9.6, H-4), 6.98(1H, s, H-5), 6.18(1H, d, *J*=9.6, H-3), 3.93(3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>), 3.88(3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR(75 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 160.8(C-2), 146.4(C-6), 144.9(C-8), 144.4(C-7), 144.1(C-4), 135.7(C-9), 113.3(C-3), 111.6(C-10), 105.0(C-5), 56.7(6-OCH<sub>3</sub>), 61.3(7-OCH<sub>3</sub>)
- [0104] **화합물 3(6,7,8-트리메톡시쿠마린, UP-3.3):** 노란색 무정형 분말; <sup>1</sup>H NMR(300 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 7.87(1H, d, *J*=9.6, H-4), 7.16(1H, s, H-5), 6.21(1H, d, *J*=9.6, H-3), 3.93(3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>), 3.85(3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 3.81(3H, s, 8-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR(75 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 160.5(C-2), 151.2(C-6), 145.9(C-9), 143.4(C-4), 143.1(C-7,C-8), 114.8(C-3), 113.2(C-10), 105.8(C-5), 56.3(7-OCH<sub>3</sub>), 61.4(6-OCH<sub>3</sub>), 61.8(8-OCH<sub>3</sub>)
- [0105] **화합물 4(4-하이드록시-5-메톡시신남산, UP-5.2.1):** 무정형 분말; <sup>1</sup>H NMR(300 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 7.58(1H, d, *J*=15.9, H-8), 7.32(1H, d, *J*=1.8, H-3), 7.13(1H, dd, *J*=8.1, 1.8, H-5), 6.86(1H, d, *J*=8.1, H-6), 6.36(1H, d, *J*=15.8, H-7), 3.90(3H, s, 2-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR(75 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 170.6(COOH), 151.3(C-2), 148.0(C-7), 144.9(C-1), 128.8(C-4), 119.7(C-5), 116.8(C-6), 115.6(C-8), 111.8(C-3), 56.3(2-OCH<sub>3</sub>)
- [0106] **화합물 5(3,4,5-트리메톡시신남산, UP-5.2.3):** 무정형 분말; <sup>1</sup>H NMR(300 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 7.67(1H, d, *J*=15.9, H-7), 6.76(2H, br, s, H-3/H-5), 6.34(1H, d, *J*=15.9, H-8), 3.8881(9H, br, s, 1/2/6-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR(75MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 171.2(COOH), 150.4(C-2/6), 148.9(C-7), 138.3(C-1), 129.5(C-4), 115.6(C-8), 106.5(C-3/5), 56.3(1-OCH<sub>3</sub>), 56.2(2/6-OCH<sub>3</sub>)

[0107] **화합물 6(프라그란신 A<sub>2</sub>, UP-3.5.3):** 무색 오일;  $[\alpha]_D^{25}$  69.0(c 1.24, CHCl<sub>3</sub>); HREIMS  $m/z$  344.1633(calcd for C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>, 344.1622); <sup>1</sup>H- 및 <sup>13</sup>C-NMR, 표 1 참조

**표 1**

CD<sub>3</sub>OD에서의 프라그란신 A<sub>2</sub>(UP3.5.3) 의 <sup>1</sup>H-(500 MHz) 및 <sup>13</sup>C-(125 MHz) NMR 데이터

position	UP-3.5.3	
	d <sub>c</sub>	d <sub>H</sub> (J in Hz)
1		
2	88.9	4.44, d, 6.6
3	45.6	2.30, m
4	45.6	2.30, m
5	88.9	4.44, d, 6.6
1'	134.6	
2'	115.9	7.00, d, 1.8
3'	148.9	
4'	147.2	
5'	111.2	6.80, d, 8.1
6'	120.3	6.87, dd, 1.8, 8.1
1"	134.6	
2"	115.9	7.00, d, 1.8
3"	148.9	
4"	147.2	
5"	111.2	6.80, d, 8.1
6"	120.3	6.87, dd, 1.8, 8.1
3-Me	13.1	0.99, d, 6.6
4-Me	13.1	0.99, d, 6.6
3'-OMe	56.3	3.82, s
4'-OMe		
4/4'-OH		5.60, br, s
3"-OMe	56.3	3.83, s

[0108]

[0109] **화합물 7(마슬린산, UP-3.1.1.1):** 백색 무정형 분말; LREIMS  $m/z$  432[M<sup>+</sup>]; <sup>1</sup>H NMR(500 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 0.90(1H, m, H-1a), 1.90(1H, m, H-1b), 3.59(1H, ddd, *J*=3.0, 4.5, 10.5, H-2), 2.91(1H, d, *J*=10.0, H-3), 0.87(1H, m, H-5), 1.54(1H, m, H-6a), 1.14(1H, m, H-6b), 1.31(2H, m, H-7), 1.65(1H, m, H-9), 1.91-1.93(2H, m, H-11), 5.25(1H, t, 3.5, H-12), 1.05(m, H-15), 1.59-1.62(1H, m, H-16a), 2.00-2.03(1H, m, H-16b), 2.88(1H, d, H-18), 1.12(1H, m, H-19a), 1.71(1H, m, H-19b), 1.21(1H, m, H-21a), 1.41(1H, m, H-21b), 1.53(1H, m, H-22a), 1.76(1H, m, H-22b), 1.02(3H, s, H3-23), 0.81(3H, s, H3-24), 0.99(3H, s, H3-25), 0.80(3H, s, H3-26), 1.17(3H, s, H3-27), 0.94(3H, s, H3-29), 0.91(3H, s, H3-30); <sup>13</sup>CNMR(125 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 179.0(28-COOH), 145.1(C-13), 123.0(C-12), 84.0(C-3), 68.9(C-2), 56.2(C-5), 48.6(C-9), 47.7(C-1), 46.9(C-19), 46.8(C-17), 42.6(C-14), 42.3(C-18), 40.3(C-8), 39.9(C-4), 39.0(C-10), 34.5(C-21), 33.6(C-30), 33.4(C-22), 31.4(C-20), 29.3(C-23), 28.5(C-15), 26.4(C-27), 24.3(C-11), 23.9(C-16), 23.8(C-29), 19.2(C-6), 17.7(C-26), 17.5(C-24), 17.1(C-25)

[0110]

**제브라피시 유지**

[0111] 표준 지침에 따라서 제브라피시를 유지하였다(39). 대한민국 광주과학기술원(Gwangju Institute of Science

and Technology) 지침에 따라서 제브라피시를 보존 및 처리하였다. 온도 28.5°C의 여과된 수돗물 및 14/10시간의 광/암 주기로 10 L 유리 탱크에서 야생형 제브라피시(*Danio rerio*)를 유지하였다. 브라인쉬림프(*Artemia salina*)(Inve Aquaculture Nutrition, 미국) 및 건조 음식(아마존 플레이크, 푸소(쥬), 대만)의 조합으로 하루에 두 번 상기 제브라피시에게 먹이를 주었다(40).

[0112] **제브라피시에서의 NBDG 섭취 평가**

[0113] 제브라피쉬 알을 0.2 mM 2-페닐티오우레아(유생의 투명성을 증가시키는 탈색소 화합물)가 보충된 E3 물(증류수 내 5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl<sub>2</sub> 및 0.33 mM MgSO<sub>4</sub>)에서 인큐베이션 하였다. 96-웰 플레이트에 4 알 / 웰(eggs/well)의 밀도로 200 μL E3 물에 72 hpf 유생을 분주하였다. 이후 시험 화합물을 첨가하고, 상기 유생을 시험 화합물에 1시간 동안 노출시켰다. 다음으로, 시험 화합물을 포함하는 E3 물을 제거하고, E3 물에 용해된 NBDG로 교체하였다. 유생을 3시간 동안 NBDG와 함께 인큐베이션 하였다. NBDG를 포함하는 E3 물을 제거하고 이후 상기 유생을 E3 물로 세척한 다음, E3 물에 용해된 0.02 % 트리카인으로 마취하시켰다. 이후 E3 물에 용해된 3% 메틸셀룰로오스를 포함하는 플라스틱 챔버(1.6 cm 직경 및 3 mm 깊이) 내 유리 현미경 슬라이드에 상기 유생을 위치시켰다. 디지털 카메라(DFC425C, Leica, 독일)가 장착된 형광 현미경(DM2500, Leica, 독일)을 이용하여 NBDG 섭취 이미지를 포착하였다. Leica Application Suite 소프트웨어(Leica Microsystems, 독일) 및 포토샵 CS4(Adobe Systems Incorporated, 미국)을 이용하여 이미지를 획득하였다. 유생으로의 NBDG 섭취는 이미지 J 소프트웨어(National Institutes of health, 미국)로 정량하였다.

[0114] 형광 마이크로플레이트 판독기(SpectraMAX Gemini XS, Molecular Devices, 미국)를 이용한 NBDG 섭취 측정을 위한 제브라피시 유생의 균질화(homogenization)를 위하여, 상기 유생을 1.5 mL 마이크로퓨즈 튜브(Microfuge Tube)에 위치시키고, 120 μL CellLytic Mn 용액(Sigma-Aldrich, 미국)에서 용해한 후, 위치메이커 포셉(watchmaker forceps)을 이용하여 분해하였다. 상기 유생을 10분 동안 10" /5" 펄스로 4°C에서 Vibra-Cell VCX500(Sonics & Materials, Inc., 미국)을 이용하여 소니케이션 한 후 10000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 상등액을 96-웰 플레이트로 옮기고 형광 마이크로플레이트 판독기로 NBDG 신호를 측정(lex=466 nm, lem=540 nm)하였다.

[0115] **지방세포 배양**

[0116] 3T3-L1 설치류의 지방전구세포(대한민국 연세의료원 이현철 교수로부터 구입)를 10% 송아지 혈청(Calf Serum; Invitrogen, 미국), 50 units/mL 페니실린 및 50 μg/mL 스트렙토마이신(PenStrep, Life Technologies Corporation., 미국)이 보충된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Invitrogen, 미국) 배지에서 배양 하였다. 10% FBS 및 지방세포화 인자(adipogenic factors) 각테일(0.5 mM 3-이소부틸-1-메틸-크산틴, 2 /mL 텍사메타손(Sigma-Aldrich, 미국), 1 /mL 인슐린, 50 /mL 페니실린 및 50 /mL 스트렙토마이신)를 포함하는 PenStrep이 첨가된 DMEM에서 배양함으로써 3T3-L1를 48시간 포스트-컨플루언트에서 지방세포로 분화 유도하였다. 48시간 후, 상기 세포를 10% FBS, PenStrep 및 1 μg/mL 인슐린을 포함하는 신선한 DMEM에서 인큐베이션 하였다. 8일 후, 분화된 지방세포를 실험에 사용하였다.

[0117] **NBDG 섭취의 지방세포-기반된 측정**

[0118] 종래 개시된 바에 따라 3T3-L1에서의 NBDG 섭취를 측정하였다(38). 지방세포를 96-웰 조식 배양 플레이트에 5000 세포/웰의 농도로 분주하고, 지질생성을 하도록 유도하였다. 이후 상기 배양 배지를 혈청-부재 및 저농도 글루코오스 DMEM으로 3시간 동안 교체하였다. 다음으로 상기 배양 배지를 시험 화합물을 포함하는 DMEM 배지로 교체하였다. 30분 후, 상기 배지를 50 μM 2-NBDG를 포함하는 DMEM 배지로 교체하였다. 1 시간 후, 지방세포를 예열된 PBS(phosphate buffered saline)로 두 번 세척하고 암전상태에서 10분 동안 70 μL 0.1M 인산 칼륨 및 1% 트리톤 X-100이 포함된 pH 10의 PBS를 처리하여 용해하였다. 30 μL DMSO를 첨가하고 멀티-채널 피펫을 이용하여 상기 용액을 조심스럽게 혼합하였다. 형광 마이크로플레이트 판독기(SpectraMAX Gemini XS, lex=466 nm, lem=540 nm, Molecular Devices, 미국)를 이용하여 NBDG 신호를 측정하였다.

[0119] PBS 세척 단계 후, 형광 현미경(IX81, Olympus, 일본) 및 Metamorph 소프트웨어(version 7.5, Molecular Devices, 미국)를 이용하여 NBDG 섭취의 세포 이미지를 얻었다.

[0120] **유리 지방산 방출 어세이**

[0121] 지방세포로부터 방출되는 에피네프린-자극된 유리 지방산(FFA: free fatty acid)을 유리 지방산 정량 키트 (Biovision, 미국)를 이용하여 종래 개시된 방법(41)에 따라서 측정하였다. 종래 개시된 방법은 하기와 같다: 24-웰 플레이트에서 컨플루언트(confluent) 3T3-L1 지방전구세포를 혈청-부재 배양 배지에서 3시간 동안 배양하였다. 이후, FFA 방출을 유도하기 위하여 염에 용해된 10  $\mu$ M 에피네프린을 지방세포에 처리하였다. 에피네프린을 처리하기 10분 전에 목적 약물을 첨가하였다. 세포 용해물을 수득하여 50 mL 유상(organic phase)을 분석에 이용하였다.

[0122] **제브라피시 기반 독성 시험**

[0123] 독성 분석을 위한 본 발명자들의 프로토콜은 종래의 문헌을 기반으로 하였다(35). 산란 후, 96-웰 플레이트에 1 알/웰로 제브라피시 배아(embryo)를 200  $\mu$ L E3 물에 분주하였다. 화합물을 8-세포기(5/4 hpf)에 72시간 동안 첨가하였다. 각 화합물을 포함한 E3 물을 매일 새로 보급하였다. 스테레오 마이크로현미경(Zeiss Stemi 2000-C, Edmund Optics Inc., 미국)을 이용하여 화합물 첨가 후 각 24시간 마다 확인하고, 하기 발생상 및 해부학적 파라미터를 관찰하였다: 1) 체절 발생(somite development), 2) 꼬리 분리(tail detachment), 3) 이소포(otic vesicles), 이석(otoliths) 및 눈의 발달, 4) 심박동, 5) 순환, 6) 부화 지연, 7) 골격 기형의 존재, 8) 몸의 자세(body position), 9) 수영 능력. 초기 사망률(IMR: Initial Mortality Rate)을 확인하기 위하여 화합물을 처리하지 않은 50 마리의 유생을 동일한 조건에서 인큐베이션 하였다. 발생상 및 해부학적 파라미터의 평가 이후, 상기 유생을 0.02% 트리케인을 포함하는 E3 물에서 10분 동안 인큐베이션하여 마취하고, E3에 용해된 3% 메틸셀룰로오스를 포함하는 플라스틱 챔버(1.6 cm 직경 및 3 mm 깊이) 내 유리 현미경 슬라이드에 위치시켰다. 디지털 카메라(DFC425C, Leica, Wetzlar, 독일)가 장착된 차등간섭대비(DIC: differential interference contrast) 현미경(DM2500, Leica, 독일)으로 화합물이 처리된 유생의 이미지를 촬영하였다. Leica Application Suite 소프트웨어(Leica Microsystems, 독일) 및 포토샵 CS4(Adobe Systems Incorporated, 미국)을 이용하여 이미지를 획득하였다.

[0124] **통계 분석**

[0125] 실험군의 비교를 위하여 student' s t-test(Microsoft Excel, 2010 버전)를 이용하였다. 0.05 이하의 P 값을 유의한 것으로 간주하였다. 다른 언급이 없다면, 모든 결과는 세 번의 개별적 실험의 평균이고, 오차구간(error bars)은 평균의 표준편차이다.

[0126] **실험 결과**

[0127] **제브라피시 유생은 2-NBDG을 투여량-의존적으로 섭취할 수 있다.**

[0128] 본 발명에서 사용된 화합물의 화학적 구조를 도 1에 나타내었다. 제브라피시 유생에서 글루코오스 섭취를 기반으로 한 형광물질-기반된 스크리닝 시스템을 설립하기 위한 본 발명의 첫 번째 실험은 2-NBDG 섭취의 정확한 측정이 가능한지를 확인하는 것이었다. 본 발명자들은 72 hpf 유생을 선택하였는데, 이는 종래 연구에서 상기 발달 시점에서의 GLUT 트랜스포터 발현 및 글루코오스 대사를 수행하였기 때문이다(21, 23). 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)를 사용한 종래 인 *비보*에서의 2-NBDG 섭취 연구는 200 mM 투여량을 사용하였다(24). 따라서 본 발명자들은 하기 투여량의 2-NBDG와 함께 제브라피시를 인큐베이션 하였다: 0, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 600  $\mu$ M, 1 mM 및 2 mM. 도 2a에 나타난 바와 같이, 2-NBDG 섭취는 200  $\mu$ M의 투여량에서 형광 현미경에 의한 시각화가 가능했고, 상기 형광 신호는 투여량을 2 mM 증가시킨 경우까지 유지되었다. 본 발명의 다음 과정은 72 hpf 유생에서 글루코오스 섭취의 정량이 가능한 방법을 개발하는 것이었다. 종래 연구는 세포 용해물의 형광 마이크로플레이트 판독기 분석을 이용한 세포 내 2-NBDG 섭취를 측정하는 것이 가능함을 보였다(14). 본 발명의 결과는 형광 마이크로플레이트 판독기를 이용한 균질화된 제브라피시 유생에서 2-NBDG 섭취를 탐지할 수 있음을 보였다(도 2b). 2-NBDG 형광 신호의 두드러진 증가는 600  $\mu$ M 투여량에서 탐지되었고, 이는 2-NBDG 섭취의 본 발명의 미시적 분석의 결과와 유사하다. 72 hpf에서 제브라피시 유생 눈은 트랜스포터의 GLUT 패밀리의 다른 멤버의 풍부한 발현 원료로 알려져 있다(23). 도 2a로부터 유생 눈이 2-NBDG 섭취에서 투여량 의존적

증가를 보임을 관찰할 수 있었다. 상기 72 hpf 유생에서 눈의 형상은 형광 강도의 이미지 분석을 위하여 필요하다. 이미지 J 소프트웨어(National Institutes of health)를 이용하여, 본 발명자들은 2-NBDG 섭취에서 투여량 의존적 증가를 정량화할 수 있었다(도 2b).

[0129] **제브라피시는 2-NBDG 섭취에서 시간-의존적 증가를 보인다.**

[0130] NBDG 탐침은 D-글루코오스보다 훨씬 높은 친화력으로 GLUT 수용체에 결합됨을 보였지만, GLUT을 통한 NBDG 전달은 훨씬 느리다(15). 또한, 2-NBDG는 세포 섭취 이후 헥소키나아제(hexokinase)에 의하여 인산화되고, 이후 해당 경로(glycolytic pathway)에 의하여 비-형광성 물질로 매우 빠르게 분해된다(14). 따라서 본 발명자들은 2-NBDG가 72 hpf 유생 내로 섭취된 후 2-NBDG 신호의 시간-의존적 변화를 측정하였다. 본 발명자들은 NBDG 신호의 포화 없이 2-NBDG 섭취를 시각화할 수 있는 600  $\mu$ M 2-NBDG를 투여량으로 선택하였다(도 2a). 본 발명자들은 처리 이후 0.5시간에 2-NBDG 섭취를 시각화할 수 있었고, 처리 8시간 이후까지 2-NBDG 섭취가 증가함을 관찰하였다(도 3a). 또한, 마이크로플레이트 판독기 분석은 2-NBDG 신호가 30분 이후 빠르게 증가하여, 처리 1시간 이후에도 여전히 유지되며, 처리 4시간 이후 다시 증가하기 시작함을 보였다. 이후 2-NBDG 명도는 처리 후 8-12 시간에도 유지되었다(도 3b). 본 발명자들은 상기 제브라피시 유생에서의 2-NBDG 투여량 의존적 섭취 분석과 유사한 접근 방식을 채택하여, 2-NBDG 섭취의 시간 의존적 증가의 정량에 이미지 J 소프트웨어를 이용하였다(도 3c). 눈에서의 2-NBDG 섭취는 처리 1시간 이후 탐지되었고, 상기 균질화된 유생의 마이크로플레이트 판독기 분석에 비하여 더욱 시간-의존적 섭취의 선형적 양상(linear pattern)을 보였다(도 3b 및 3c 비교).

[0131] **제브라피시 유생의 글루코오스 섭취 관찰을 위하여 6-NBDG보다 2-NBDG가 바람직하다.**

[0132] 세포에서의 글루코오스 섭취를 측정하기 위하여 2-NBDG 및 6-NBDG를 사용하였다(14). 본 발명자들은 72 hpf 제브라피시 유생에서 6-NBDG 섭취를 시험하였다. 그러나 2-NBDG 섭취에 대한 실험에서 사용한 것과 동일한 이미지 캡처 파라미터를 사용한 경우(DM2500, Leica, 500 ms 노출), 6-NBDG의 신호가 훨씬 약했다. 6-NBDG 신호는 1 mM 투여량에서 거의 관찰되지 않았다(도 4). 따라서 본 발명자들은 유생에서 글루코오스 섭취를 시각화하기 위하여 2-NBDG를 선택하였다.

[0133] **2-NBDG 섭취 관찰에 있어 72 hpf 제브라피시의 유생이 120 hpf 제브라피시의 유생보다 바람직하다.**

[0134] 본 발명자들은 제브라피시 유생에서 2-NBDG 섭취 분석을 위하여 처음에 72 hpf 시점을 선택하였는데, 이는 발생의 상기 단계에서 글루코오스 전달 발현 및 포유류-유사 글루코오스 항상성 메커니즘을 평가하여왔기 때문이다(21, 23). 그러나 본 발명자들은 이보다 늦은 시점이 더 바람직한지 여부를 확인하기 위하여 120 hpf 에서의 2-NBDG 섭취도 시험하였다(도 5a 내지 5d). 본 시험을 위하여 본 발명자들은 2-NBDG 섭취에 대한 에모딘(6-메틸-1,3,8-트리하이드록시안트라퀴논 3) 처리 효과를 비교하였다. 에모딘은 동물 모델에서 글루코오스 섭취를 유도하고 당뇨를 개선할 수 있는 식물-유래 하제 수지이다(24). 72 hpf 및 120 hpf 유생에 대한 에모딘 처리는 균질화된 유생의 플레이트 판독기 분석 및 눈에서의 2-NBDG 형광 신호에서 관찰된 바와 같이 2-NBDG 섭취를 유도하였다(도 5c 및 5d). 그러나 120 hpf 유생의 눈에서의 에모딘-유도된 2-NBDG 섭취 규모는 72 hpf 유생보다 적었다.

[0135] **제브라피시 유생에서 2-NBDG 섭취는 유리 글루코오스와의 경쟁에 의하여 감소될 수 있다.**

[0136] 형광-표시된 글루코오스 섭취가 글루코오스 전달 활성화에 의존함을 입증하는 중요한 시험은 과다 유리 글루코오스와의 경쟁이다(14). 72 hpf 제브라피시 유생을 600  $\mu$ M 2-NBDG 및 30 mM D-글루코오스와 함께 3시간 동안 인큐베이션 하였다(도 6). 유생의 눈 내로의 2-NBDG 섭취에 대한 이미지 분석은 유리 글루코오스와의 인큐베이션이 2-NBDG 섭취를 감소시키는 것을 보여주는데, 이는 글루코오스 전달 메커니즘이 유생 내로의 2-NBDG 섭취에 중요한 요소임을 제시한다.

[0137] **제브라피시에서 2-NBDG 섭취 측정은 신규한 인슐린 모방 화합물을 동정할 수 있게 한다.**

[0138] 글루코오스 섭취 조절을 확인하는 방법으로서 본 발명의 제브라피시-기반된 2-NBDG 섭취 시스템의 유효성을 검사하기 위하여, 본 발명자들은 일본 밤나무인 *Castanea crenata*로부터 유래한 내피의 활성 인도된 분획(Activity guided fractionation)을 채택하였다. 도 7a는 *C. crenata*로부터 분리된 화합물에 대한 전체 실험 계획을 나타낸다. 제브라피시 유생 내로의 2-NBDG 섭취 효과에 대하여 세 가지 분획(메탄올, 에틸 아세테이트 및 헥세인)을 시험하였다(도 7b). 본 발명의 제브라피시-기반된 분석에 대하여, 2-NBDG 섭취에서의 100% 증가를 ‘히트’ 약물 선택을 위한 기준으로 선택하였다. 메탄올 분획이 2-NBDG 섭취를 최고로 유도함을 발견하고, 상기 메탄올 분획을 더욱 정제하여 하기 8개의 화합물을 획득하였다: UP2.2(스코폴레틴), UP3.1.1.1(마슬린산), UP3.5.3(프라그란신 A<sub>2</sub>), UP4.2.3(4-케토노나논산), UP5.2.1(4-히드록시-5-메톡시신남산), UP3.2(프락시딘), UP3.3(6, 7, 8-트리메톡시쿠마린) 및 UP5.2.3(3, 4, 5-트리메톡시신남산). 도 7c에서 제브라피시 유생에서의 2-NBDG 섭취에 대한 결과를 나타냈다. 글루코오스 섭취의 유도인자로 알려져 있는 양성 대조군인 에모딘(24)과 2-NBDG 섭취를 비교하였다. 더불어, 추가적인 비교를 위하여 동양의 현화 뽕나무인 *Morinda longissima*의 뿌리로부터 분리한 4개의 화합물 또한 시험하였다(도 7d). *Morinda longissima*는 종래 항-당뇨 활성을 가진다는 보고가 없기 때문에 선택하였다. *C. crenata*의 메탄올 분획으로부터는 2-NBDG 섭취를 100% 이상 증가시키는 프락시딘 및 마슬린산을 발견하였으나, *M. longissima*의 어떠한 화합물도 글루코오스 섭취를 유도하지 못하였다(도 7d).

[0139] 본 발명자들은 본 발명의 스크리닝 시스템을 이용하여 프락시딘이 포유류 지방세포 시스템에서 글루코오스 섭취를 유도할 수 있음을 보였다. 지방세포는 인슐린-매개 글루코오스 섭취를 위한 작용의 주요 위치이고(14), 프락시딘(UP3.2) 처리가 2-NBDG 섭취를 유도함을 보였다(도 8a). 글루코오스 섭취의 유도인자로 알려진 베르베린 12(26)를 양성 대조군으로 사용하였다(본 발명의 제브라피시 시스템 상에서 글루코오스 섭취를 유도하는 베르베린의 능력도 검증함(도 9)). 인슐린 모방 약제는 세포 생리에서의 인슐린 효과를 대체하고 항-당뇨 약제 개발을 위한 이상적인 후보물질을 대표한다(13). 따라서 본 발명자들은 프락시딘(UP3.2)의 인슐린 모방 활성을 시험하였다(도 8b 및 8c). 지방세포에서 프락시딘-유도된 글루코오스 섭취는 인슐린 저항성을 유도하고 인슐린 모방 활성을 위한 시험인 TNF- $\alpha$ 에 민감함을 보였다(도 8b)(27). 인슐린 유도 활성에 대한 두 번째 시험은 지방세포로부터 에피네프린-자극된 유리 지방산 분비를 억제하는 능력이다(28). 프락시딘으로 지방세포를 전처리한 경우 에피네프린에 의하여 유도된 유리 지방산 분비가 줄었다(도 8c).

[0140] 제브라피시-기반된 분석의 매우 유용한 다른 특징은 발달된 유생에서 쉽게 독성을 시험할 수 있는 것이다(25). 본 발명의 독성 분석은 상기 화합물에 대하여 10 mg/mL이 적합한 투여량을 제안하였다(도 10의 독성 데이터에 의하여 선택됨).

[0141] **신규한 인슐린 모방 약제 후보 발견을 위한 제브라피시-기반된 스크리닝**

[0142] 본 발명자들은 제브라피시 유생으로의 2-NBDG 섭취 유도에 대한 사포닌-기반된 천연물질(3 시간 동안 10  $\mu$ g/mL 투여량)을 스크리닝하였다. 2-NBDG만을 단독 처리한 유생과 비교하여 2-NBDG 섭취 값이 100% 증가하는 범위 내에 속하는 경우 ‘히트’ 화합물로 선정하였다. 그 결과, 사포닌 cpp532(20(S)-진세노사이드 Rh2)을 ‘히트’ 화합물로 동정하였다.

[0143] 또한, 본 발명자들은 제브라피시 유생으로의 2-NBDG 섭취 유도에 대한 트리아진-기반된 합성 화합물(3 시간 동안 20  $\mu$ M 투여량)을 스크리닝하였다. 그 결과, 화합물 PP-II-A01, PP-II-A02, PP-II-A03, PP-II-A05 및 PP-II-A08을 ‘히트’ 화합물로 동정하였다.

[0144] **고찰**

[0145] 본 발명에서, 본 발명자들은 척추동물에서 활성이 있는 항-당뇨 약제 후보물질의 빠르고 편리한 검출을 위한 신규한 시스템의 설립을 개시하였다. 본 발명자들은 형광물질-태그된 글루코오스 아날로그인 2-NBDG와 제브라피시 동물 모델의 실험적 유용성을 조합하였다(방사성 글루코오스 추적자는 전문 실험 기기 및 방사능 정화가 필요하고 시간적/공간적 해상도가 허용되지 않음을 참고(14)). 본 발명의 프로토콜은 당뇨 연구에 있어 약제 발견 접근방식을 상당히 촉진시킬 수 있다.

[0146] 본 발명의 결과는 제브라피시 유생에서 글루코오스 전달의 변동을 관찰하기 위한 2-NBDG의 적정 농도가 600  $\mu$ M 임을 나타낸다(도 2b). PubMed.Gov 데이터베이스(US National Library of Medicine National Institutes of

health)의 검색은 *Drosophila melanogaster*에서 2-NBDG 섭취에 대한 연구가 없음을 나타낸다. 글루코오스 섭취를 조절하는 화합물 검출을 위한 본 발명의 프로토콜은 피시 워터(fish water)에 대한 2-NBDG의 단순한 추가에 의존한다. 상기 본 발명의 프로토콜 길이의 단순함 및 간단함은 2-NBDG의 미세주입(microinjection)의 필요를 제거함에 있다. 제브라피시는 마우스를 넘어서는 항-당뇨 약제 후보물질의 초기 시험에 대한 뚜렷한 장점(예컨대, 상대적으로 단순한 하우징 및 시험 화합물과 2-NBDG의 소량 필요)을 제시한다.

[0147] 본 발명의 제브라피시 유생에서 2-NBDG 섭취의 분석은 상대적으로 빠른 초기 섭취로 안정기에 도달하기 시작하고, 이후 다시 증가함을 보였다(도 3b 및 3c). 이러한 시간 경과에는 2-NBDG의 세포 내 운명을 반영할 수 있는데, 2-NBDG는 핵소키나아제에 의하여 빠른 인산화 및 뒤이은 해당을 통한 비-형광성 물질로 분해되는 과정을 겪는다(14). 즉, 빠른 초기 섭취 이후 2-NBDG는 해당 과정에 의하여 분해되고 처리 몇 시간 후, 상기 해당과정은 세포 내에서 포화에 이를 수 있고, 이는 2-NBDG의 추가적인 축적을 허용할 수 있다. 따라서 본 발명자들은 본 발명의 프로토콜을 위하여 3 시간 동안의 2-NBDG 처리를 선택하였는데, 이는 항-당뇨 약물 후보물질의 효능에 의하여 2-NBDG 신호가 쉽게 탐지되나, 추가적인 세포의 축적 능력을 여전히 갖기 때문이다.

[0148] 본 발명은 하기 두 가지 방법에 의하여 제브라피시 유생에서 2-NBDG 섭취가 측정 가능함을 보여준다: 균질화된 유생의 형광 플레이트 판독기 분석 또는 유생 눈에서의 2-NBDG 섭취의 이미지 분석. 후자는 처리된 유생이 다수인 경우의 분석에 더욱 적합한데, 이는 상기 분석이 상대적으로 빠르고 GLUT 발현이 특징지어졌기 때문이다(72 hpf 유생은 *zglut1b*, *zglut6* 및 *zglut12*와 같은 제브라피시 GLUT들의 범위를 발현함(23)) 더욱이, 본 발명의 데이터는 글루코오스 섭취를 유도하는 화합물로 알려져 있는 에모딘 및 베르베린 모두가 유생의 눈으로 2-NBDG 섭취를 유도할 수 있음을 보여준다(도 5d 및 도 9).

[0149] 본 발명에서, 본 발명자들은 하기 두 발달 시기(72 hpf 및 96 hpf)에서 에모딘-유도된 2-NBDG 섭취를 비교하였다(도 5). 72 hpf가 더욱 적합함을 발견하였는데, 이는 96 hpf보다 대조군에 대한 에모딘-유도된 2-NBDG 섭취 차이가 더 컸기 때문이다. 96 hpf 제브라피시의 이용에 있어 복잡한 요소는 발달의 상기 단계에서 소화기관이 기능화 되어 제브라피시가 외부 물질들을 삼킬 수 있는 것이다(29). 따라서 120 hpf 유생에서 2-NBDG 섭취의 마이크로플레이트 판독기 기반 분석은 제브라피시의 2-NBDG 용액 소화 능력에 의하여 복잡해질 수 있다. 이는 형광 현미경에 의하여 관찰되는 2-NBDG 신호가 소화관에서보다 더 밝은 것에 의하여 설명할 수 있다(도 5b).

[0150] 글루코오스 탐침을 평가할 때 중요한 고려사항은 세포의 글루코오스 전달 메커니즘이 탐침 섭취에 포함되어 있는 것의 입증이다(14). 본 발명의 데이터는 제브라피시 유생에서 2-NBDG 섭취가 과도한 세포 외 글루코오스에 의하여 억제될 수 있음을 보여준다(도 6). 상기 시험은 Cy5.5-D-글루코사민, IRDye 800CW 2-DG 및 CyNE 2-DG와 같은 신규한 글루코오스 탐침의 유효성을 검사하는데 이용된다(14). 2-NBDG는 상업적으로 이용가능하고, 상대적으로 저렴하게 구입할 수 있으며, 여러 연구 발표에서 특징지어져있기 때문에 이를 글루코오스 탐침으로 선택하였다. 본 발명은 제브라피시 유생에서 변화되는 항-당뇨 화합물을 탐지하기 위하여 2-NBDG가 사용될 수 있음을 처음으로 입증하였다.

[0151] 본 발명자들은 글루코오스 섭취의 신규한 조절인자의 탐지를 위한 본 발명의 실험 시스템의 유용성을 설명하기 위하여 식물 재료로부터 활성 인도된 분획(activity guided fractionation)을 이용하였다(도 7). 본 발명의 제브라피시 기반 글루코오스 섭취 분석 시스템은 *Castanea crenata*에서 유래한 내피의 메탄올 분획이 글루코오스 섭취를 촉진하는 화합물을 포함함을 보였다. 또한, 본 발명자들은 상기 분획에서 대부분의 잠재적인 글루코오스 섭취-유도 화합물이 프락시딘 및 마슬린산임을 보였다. 종래의 연구는 마슬린산이 항-당뇨 화합물임을 보였다(30). 항-당뇨 화합물 또는 글루코오스 섭취 유도인자로서 보고되지 않은 *C.crenata*의 다른 화합물들(프라그란신 A<sub>2</sub>, 4-케토노나논산, 4-히드록시-5-메톡시신남산, 6,7,8-트리메톡시쿠마린 및 3,4,5-트리메톡시신남산)은 본 발명의 제브라피시 분석에서 ‘히트’ 화합물이 아니었다. 스키포레틴은 간세포주에서 AKT 인산화의 활성제로서 보고되어 있는데, 이는 글루코오스 섭취를 잠재적으로 유도할 수 있다. 그러나 스키포레틴에 대한 어떠한 잠재적 항-당뇨 활성도 설명되어진 적이 없다(31).

[0152] 본 발명에서, 본 발명자들은 신규한 인슐린 모방 약제로서 프락시딘의 유효성을 검사하였다(도 8). 본 발명자들은 인 *비보*에서 활성이 있는 인슐린 모방 약제로서 프락시딘의 발견이 본 발명의 형광물질-기반된 신규한 항-당뇨 약물 발견에 대한 신규한 항-당뇨 약물 발견에 대한 제브라피시 시험의 우수한 잠재성을 입증하고 있다고 믿는다.

[0153] 요컨대, 본 발명자들은 척추동물에서 활성이 있는 항-당뇨 화합물의 발견을 위한 첫 번째 분석을 개발하였다(도 8d). 제브라피시의 인슐린 신호전달 시스템의 주요 단백질 구성요소가 포유동물과 구조적 및 기능적으로 유사성을 나타내기 때문에(21, 32) 본 발명의 프로토콜은 제브라피시를 이용한다. 더욱이, 본 발명의 제브라피시-

기반된 시스템은 수반되는 독성 분석을 가능하게 하여 포유류의 약물 반응을 정확히 예측하는 것이 가능하다.

- [0154] 본 발명자들의 지식에 의하면, 항-당뇨 약제를 개발하기 위한 다른 작은 유기체 기반 시험은 누에, 누에나방 (*Bombyx mori*) 및 선충인 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)을 이용한다(33, 34). 따라서 본 발명의 척추동물-기반된 접근방식인 제브라피시-기반된 스크리닝 시스템은 주요한 기술적 진보를 나타낸다. 나아가, 본 발명의 글루코스 탐침인 2-NBDG를 이용하는 방법은 제브라피시 유생에서 단순하고, 저비용이며 고속 글루코오스 유량의 시각화를 가능하게 한다. 이는 당뇨 연구를 위한 약물 발견 접근방식을 매우 촉진시킬 수 있다.
- [0155] **참고문헌**
- [0156] 1. Umpierrez, G. E., Palacio, A., and Smiley, D. (2007) Sliding scale insulin use: myth or insanity?, *Am J Med* 120, 563-567.
- [0157] 2. Pantalone, K. M., Kattan, M. W., Yu, C., Wells, B. J., Arrigain, S., Jain, A., Atreja, A., and Zimmerman, R. S. (2012) Increase in overall mortality risk in patients with type 2 diabetes receiving glipizide, glyburide or glimepiride monotherapy versus metformin: a retrospective analysis, *Diabetes Obes Metab* 14, 803-809.
- [0158] 3. Blickle, J. F. (2006) Meglitinide analogues: a review of clinical data focused on recent trials, *Diabetes Metab* 32, 113-120.
- [0159] 4. Bolen, S., Feldman, L., Vassy, J., Wilson, L., Yeh, H. C., Marinopoulos, S., Wiley, C., Selvin, E., Wilson, R., Bass, E. B., and Brancati, F. L. (2007) Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus, *Ann Intern Med* 147, 386-399.
- [0160] 5. Briones, M., and Bajaj, M. (2006) Exenatide: a GLP-1 receptor agonist as novel therapy for Type 2 diabetes mellitus, *Expert Opin Pharmacother* 7, 1055-1064.
- [0161] 6. Poitou Bernert, C., Ciangura, C., Coupaye, M., Czernichow, S., Bouillot, J. L., and Basdevant, A. (2007) Nutritional deficiency after gastric bypass: diagnosis, prevention and treatment, *Diabetes Metab* 33, 13-24.
- [0162] 7. Bleicher, K. H., Bohm, H. J., Muller, K., and Alanine, A. I. (2003) Hit and lead generation: beyond high-throughput screening, *Nat Rev Drug Discov* 2, 369-378.
- [0163] 8. Jung, D. W., Oh, E. S., Park, S. H., Chang, Y. T., Kim, C. H., Choi, S. Y., and Williams, D. R. (2012) A novel zebrafish human tumor xenograft model validated for anti-cancer drug screening, *Mol Biosyst* 8, 1930-1939.
- [0164] 9. Giacomotto, J., and Segalat, L. (2010) High-throughput screening and small animal models, where are we?, *Br J Pharmacol* 160, 204-216.
- [0165] 10. Lindsay, M. A. (2003) Target discovery, *Nat Rev Drug Discov* 2, 831-838.
- [0166] 11. Segalat, L. (2007) Invertebrate animal models of diseases as screening tools in drug discovery, *ACS Chem Biol* 2, 231-236.
- [0167] 12. Kanwal, A., Singh, S. P., Grover, P., and Banerjee, S. K. (2012) Development of a cell-based nonradioactive glucose uptake assay system for SGLT1 and SGLT2, *Anal Biochem* 429, 70-75.
- [0168] 13. Jung, D. W., Ha, H. H., Zheng, X., Chang, Y. T., and Williams, D. R. (2011) Novel use of fluorescent glucose analogues to identify a new class of triazine-based insulin mimetics possessing useful secondary effects, *Mol Biosyst* 7, 346-358.
- [0169] 14. Kim, W. H., Lee, J., Jung, D. W., and Williams, D. R. (2012) Visualizing sweetness: increasingly diverse applications for fluorescent-tagged glucose bioprobes and their recent structural modifications, *Sensors(Basel)* 12, 5005-5027.
- [0170] 15. Barros, L. F., Bittner, C. X., Loaiza, A., Ruminot, I., Larenas, V., Moldenhauer, H., Oyarzun,

C., and Alvarez, M. (2009) Kinetic validation of 6-NBDG as a probe for the glucose transporter GLUT1 in astrocytes, *J Neurochem* 109 Suppl 1, 94-100.

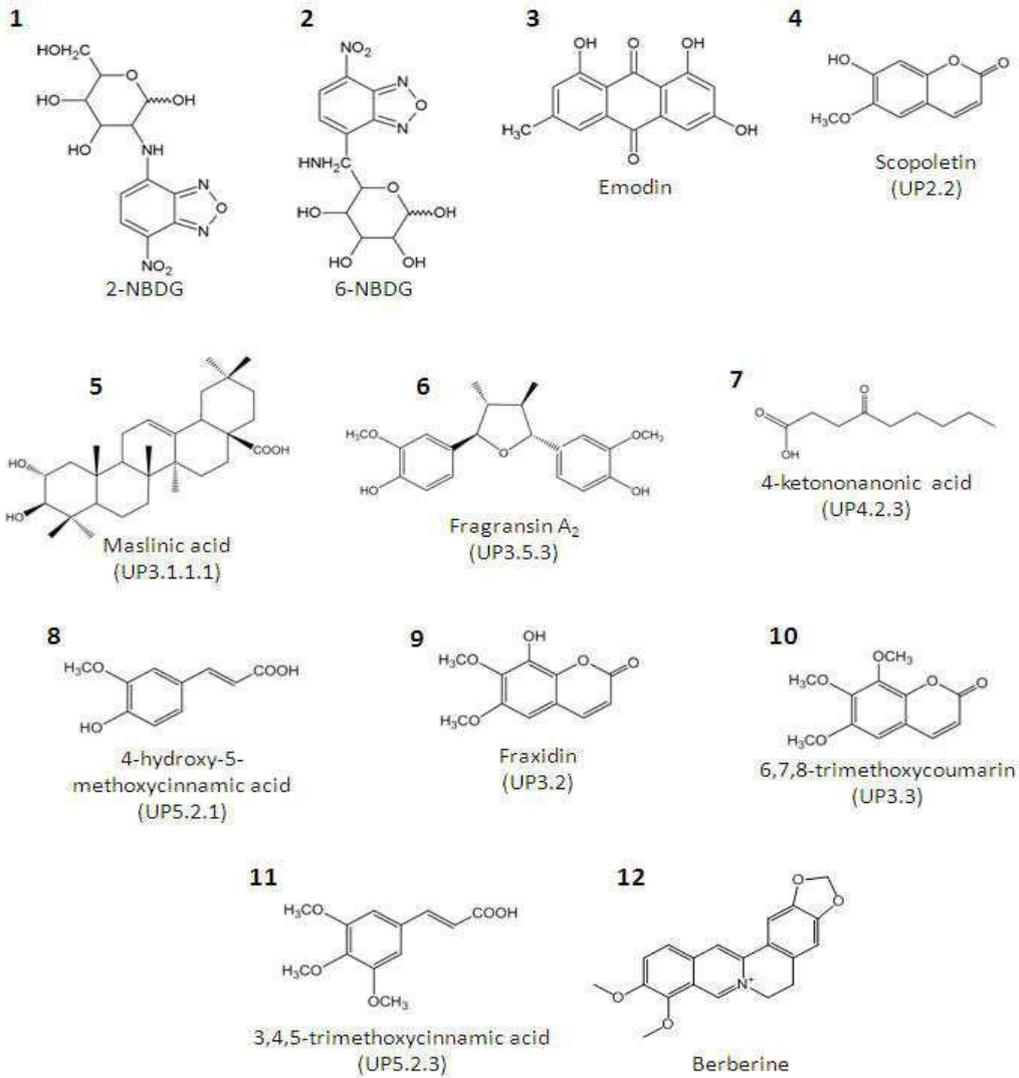
- [0171] 16. Delvecchio, C., Tiefenbach, J., and Krause, H. M. (2011) The zebrafish: a powerful platform for in vivo, HTS drug discovery, *Assay Drug Dev Technol* 9, 354-361.
- [0172] 17. Yanik, M. F., Rohde, C. B., and Pardo-Martin, C. (2011) Technologies for micromanipulating, imaging, and phenotyping small invertebrates and vertebrates, *Annu Rev Biomed Eng* 13, 185-217.
- [0173] 18. Mackay, T. F., and Anholt, R. R. (2006) Of flies and man: *Drosophila* as a model for human complex traits, *Annu Rev Genomics hum Genet* 7, 339-367.
- [0174] 19. Barbazuk, W. B., Korf, I., Kadavi, C., Heyen, J., Tate, S., Wun, E., Bedell, J. A., McPherson, J. D., and Johnson, S. L. (2000) The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes, *Genome Res* 10, 1351-1358.
- [0175] 20. Consortium, C. e. S. (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology, *Science* 282, 2012-2018.
- [0176] 21. Elo, B., Villano, C. M., Govorko, D., and White, L. A. (2007) Larval zebrafish as a model for glucose metabolism: expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase as a marker for exposure to anti-diabetic compounds, *J Mol Endocrinol* 38, 433-440.
- [0177] 22. Jurczyk, A., Roy, N., Bajwa, R., Gut, P., Lipson, K., Yang, C., Covassin, L., Racki, W. J., Rossini, A. A., Phillips, N., Stainier, D. Y., Greiner, D. L., Brehm, M. A., Bortell, R., and diIorio, P. (2011) Dynamic glucoregulation and mammalian-like responses to metabolic and developmental disruption in zebrafish, *Gen Comp Endocrinol* 170, 334-345.
- [0178] 23. Tseng, Y. C., Chen, R. D., Lee, J. R., Liu, S. T., Lee, S. J., and Hwang, P. P. (2009) Specific expression and regulation of glucose transporters in zebrafish ionocytes, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297, R275-290.
- [0179] 24. Xue, J., Ding, W., and Liu, Y. (2010) Anti-diabetic effects of emodin involved in the activation of PPARgamma on high-fat diet-fed and low dose of streptozotocin-induced diabetic mice, *Fitoterapia* 81, 173-177.
- [0180] 25. Sipes, N. S., Padilla, S., and Knudsen, T. B. (2011) Zebrafish: as an integrative model for twenty-first century toxicity testing, *Birth Defects Res C Embryo Today* 93, 256-267.
- [0181] 26. Cok, A., Plaisier, C., Salie, M. J., Oram, D. S., Chenge, J., and Louters, L. L. (2011) Berberine acutely activates the glucose transport activity of GLUT1, *Biochimie* 93, 1187-1192.
- [0182] 27. Hotamisligil, G. S., Murray, D. L., Choy, L. N., and Spiegelman, B. M. (1994) Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor, *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 4854-4858.
- [0183] 28. Nishide, M., Yoshikawa, Y., Yoshikawa, E. U., Matsumoto, K., Sakurai, H., and Kajiwara, N. M. (2008) Insulinomimetic Zn(II) complexes as evaluated by both glucose-uptake activity and inhibition of free fatty acids release in isolated rat adipocytes, *Chem Pharm Bull(Tokyo)* 56, 1181-1183.
- [0184] 29. Howarth, D. L., Passeri, M., and Sadler, K. C. (2011) Drinks like a fish: using zebrafish to understand alcoholic liver disease, *Alcohol Clin Exp Res* 35, 826-829.
- [0185] 30. Liu, J., Sun, H., Duan, W., Mu, D., and Zhang, L. (2007) Maslinic acid reduces blood glucose in KK-Ay mice, *Biol Pharm Bull* 30, 2075-2078.
- [0186] 31. Zhang, W. Y., Lee, J. J., Kim, Y., Kim, I. S., Park, J. S., and Myung, C. S. (2010) Amelioration of insulin resistance by scopoletin in high-glucose-induced, insulin-resistant HepG2 cells, *Horm Metab Res* 42, 930-935.
- [0187] 32. Gerhard, G. S. (2003) Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging

research, *Exp Gerontol* 38, 1333-1341.

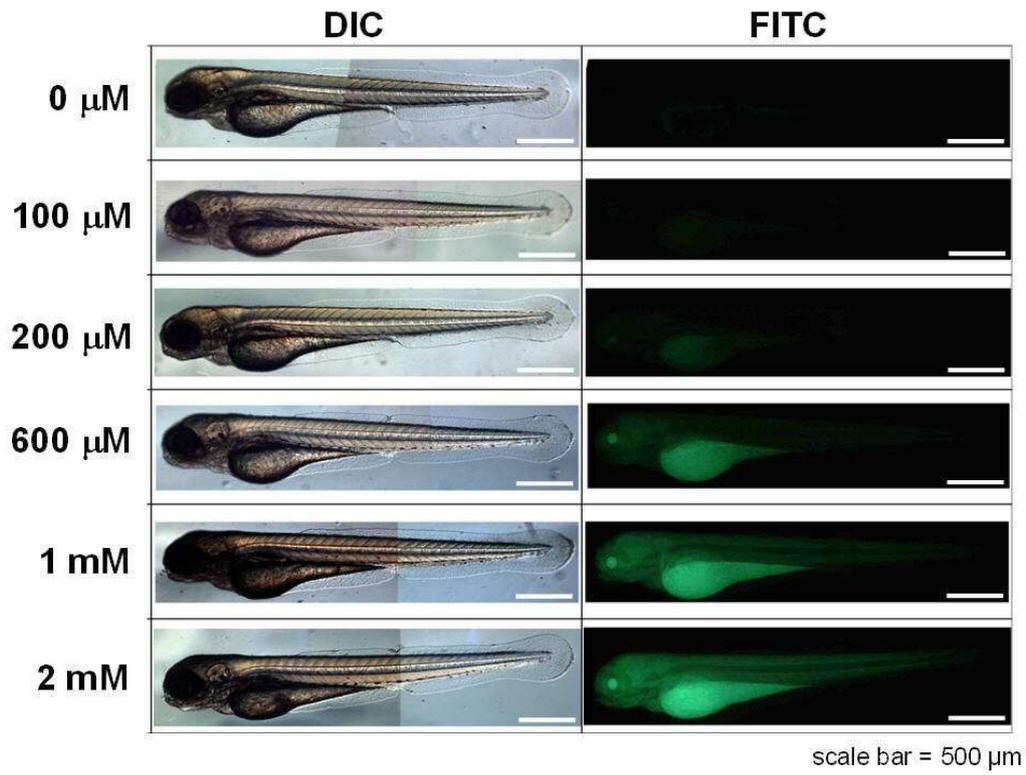
- [0188] 33. Matsumoto, Y., Sumiya, E., Sugita, T., and Sekimizu, K. (2011) An invertebrate hyperglycemic model for the identification of anti-diabetic drugs, *PLoS One* 6, e18292.
- [0189] 34. 분, J., Kyung Kim, Y., Cipriani, P. G., Kang, M., Khersonsky, S. M., Walsh, D. P., Lee, J. Y., Niessen, S., Yates, J. R., 3rd, Gunsalus, K., Piano, F., and Chang, Y. T. (2007) Forward chemical genetic approach identifies new role for GAPDH in insulin signaling, *Nat Chem Biol* 3, 55-59.
- [0190] 35. Selderslaghs, I. W., Blust, R., and Witters, H. E. (2012) Feasibility study of the zebrafish assay as an alternative method to screen for developmental toxicity and embryotoxicity using a training set of 27 compounds, *Reprod Toxicol* 33, 142-154.
- [0191] 36. Yang, Y., Shang, W., Zhou, L., Jiang, B., Jin, H., and Chen, M. (2007) Emodin with PPARgamma ligand-binding activity promotes adipocyte differentiation and increases glucose uptake in 3T3-L1 cells, *Biochem Biophys Res Commun* 353, 225-230.
- [0192] 37. Stephens, J. M., Lee, J., and Pilch, P. F. (1997) Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction, *J Biol Chem* 272, 971-976.
- [0193] 38. Jung, D. W., Ha, H. H., Zheng, X., Chang, Y. T., and Williams, D. R. (2011) Novel use of fluorescent glucose analogues to identify a new class of triazine-based insulin mimetics possessing useful secondary effects, *Mol Biosyst* 7, 346-358.
- [0194] 39. Nusslein-Volhard, C., and Dahm, R. (2002) *Zebrafish(Practical Approach Series)*, OUP Oxford
- [0195] 40. Westerfield, M. (2007) *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish(Daniorerio)*., 5ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.
- [0196] 41. Nakai, M., Sekiguchi, F., Obata, M., Ohtsuki, C., Adachi, Y., Sakurai, H., Orvig, C., Rehder, D., and Yano, S. (2005) Synthesis and insulin-mimetic activities of metal complexes with 3-hydroxypyridine-2-carboxylic acid, *J Inorg Biochem* 99, 1275-1282.
- [0197] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

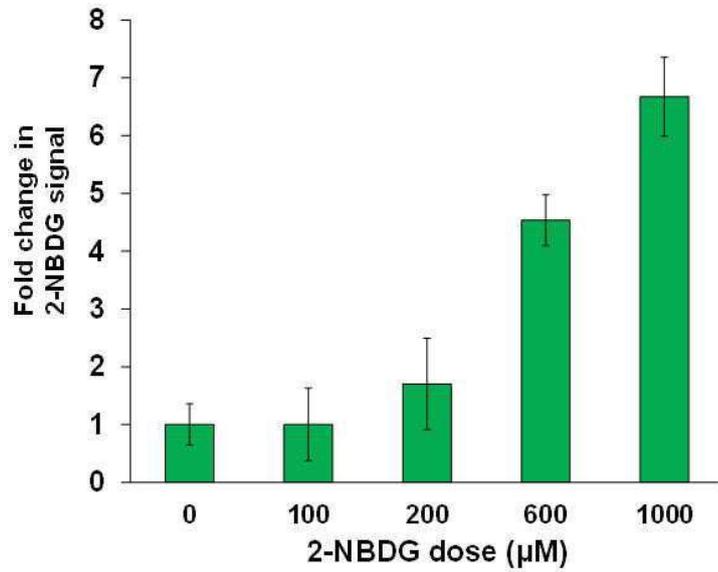
도면1



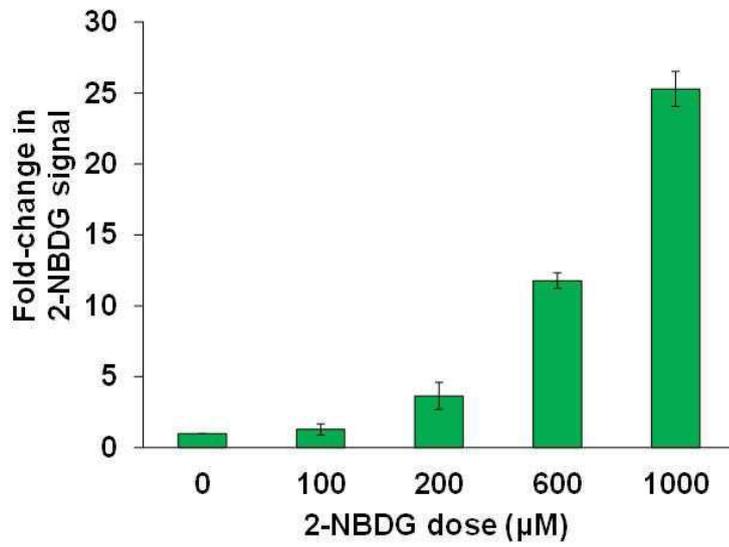
도면2a



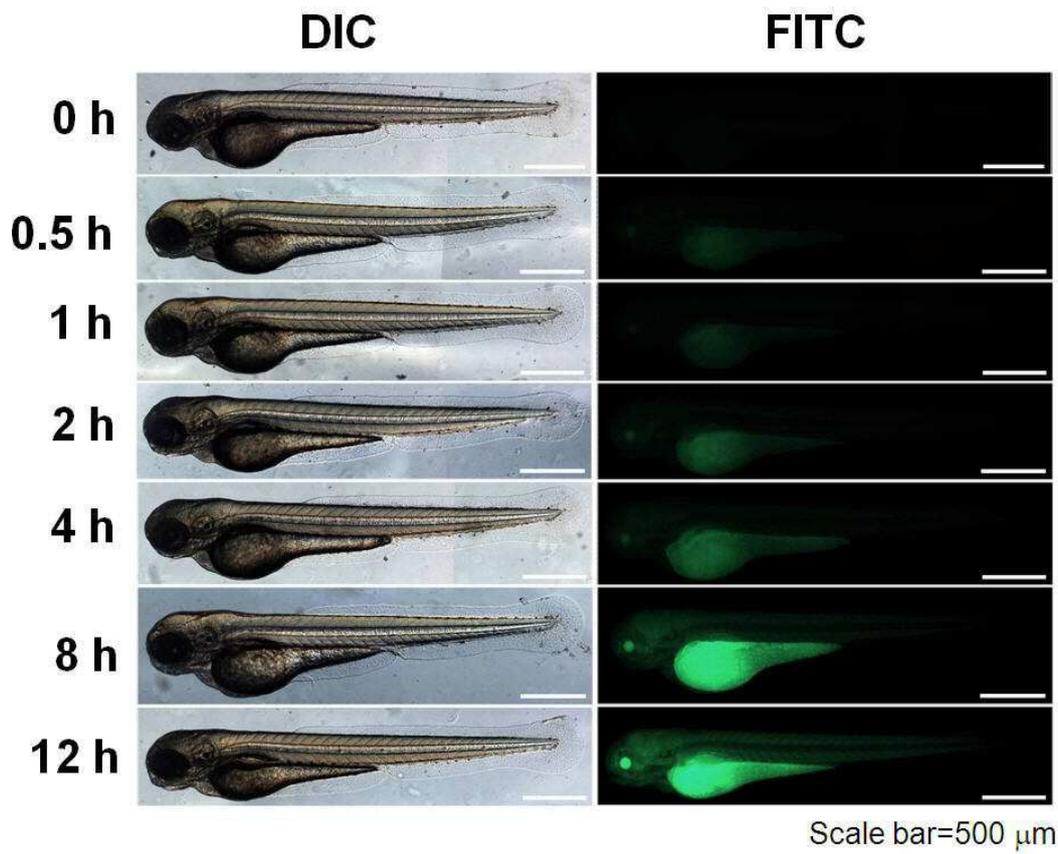
도면2b



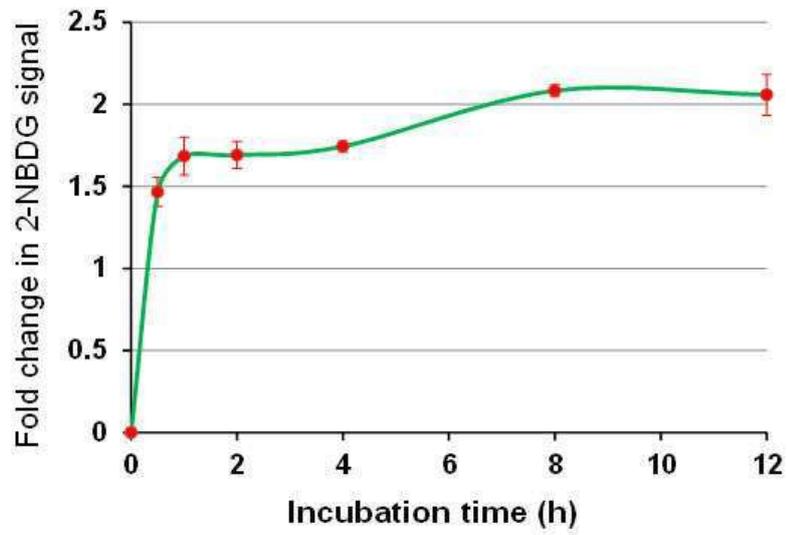
도면2c



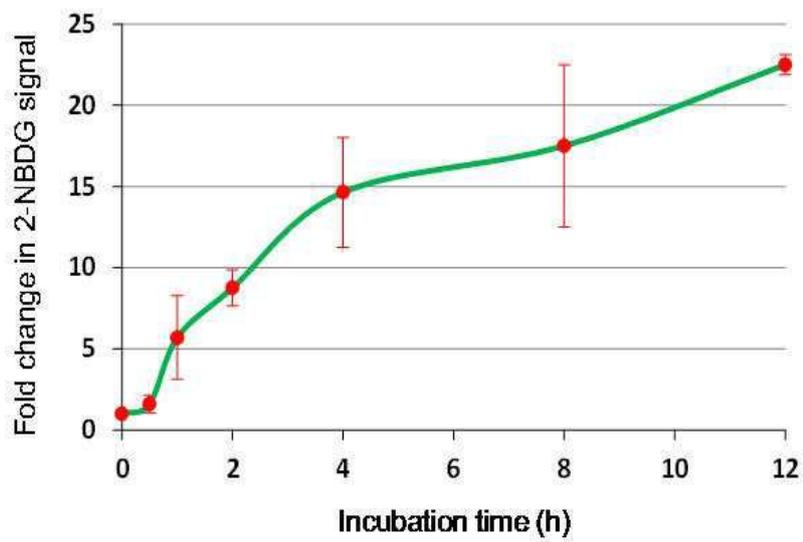
도면3a



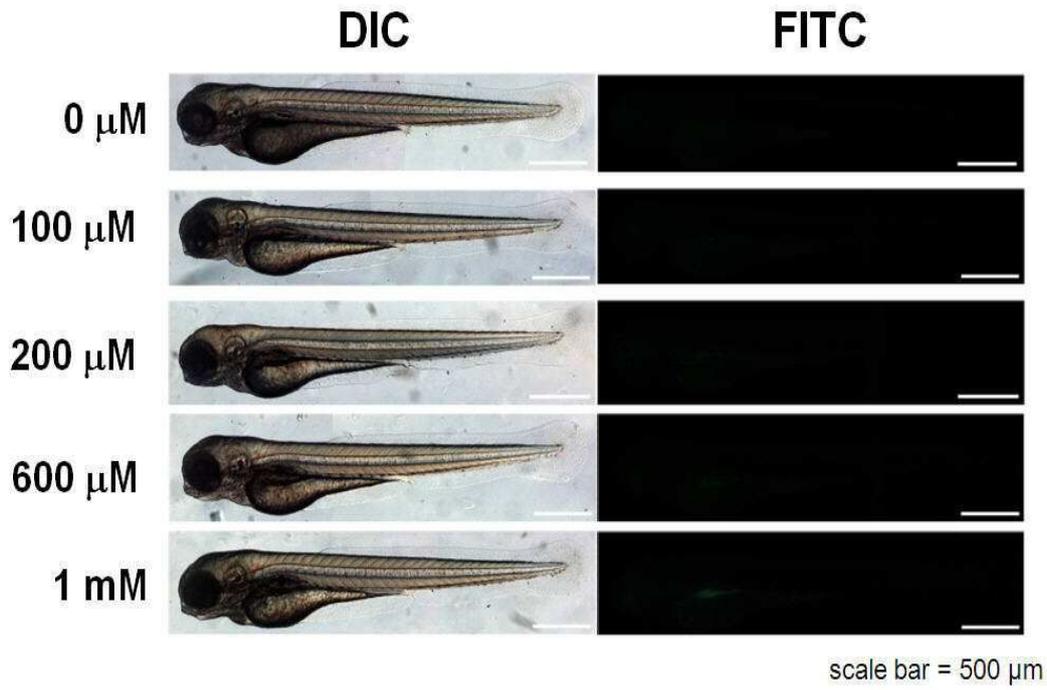
도면3b



도면3c



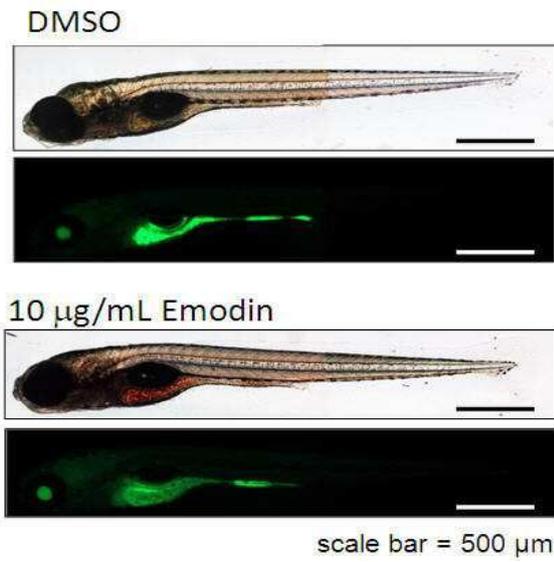
도면4



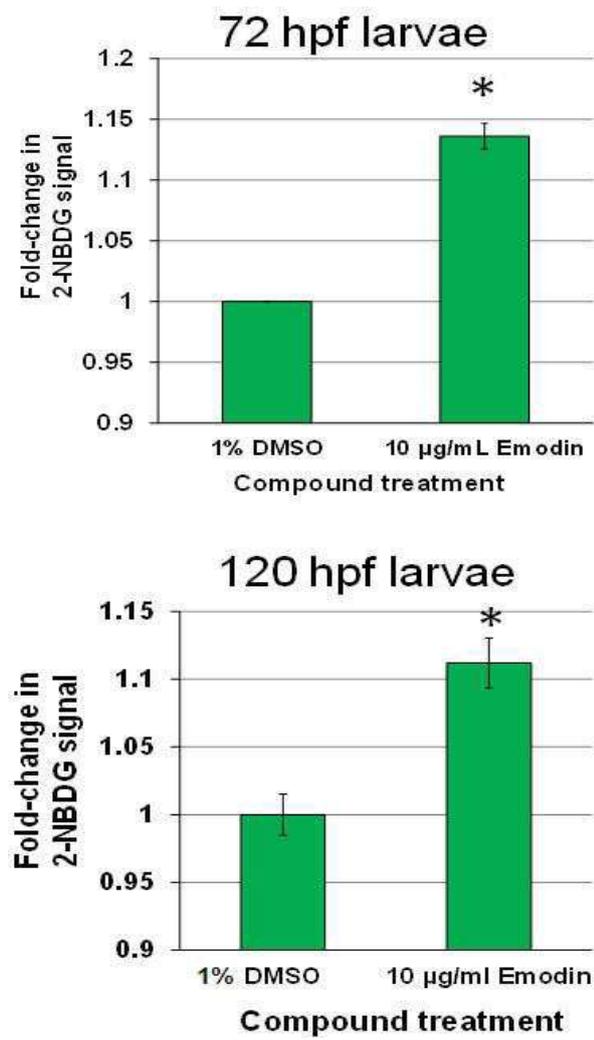
도면5a



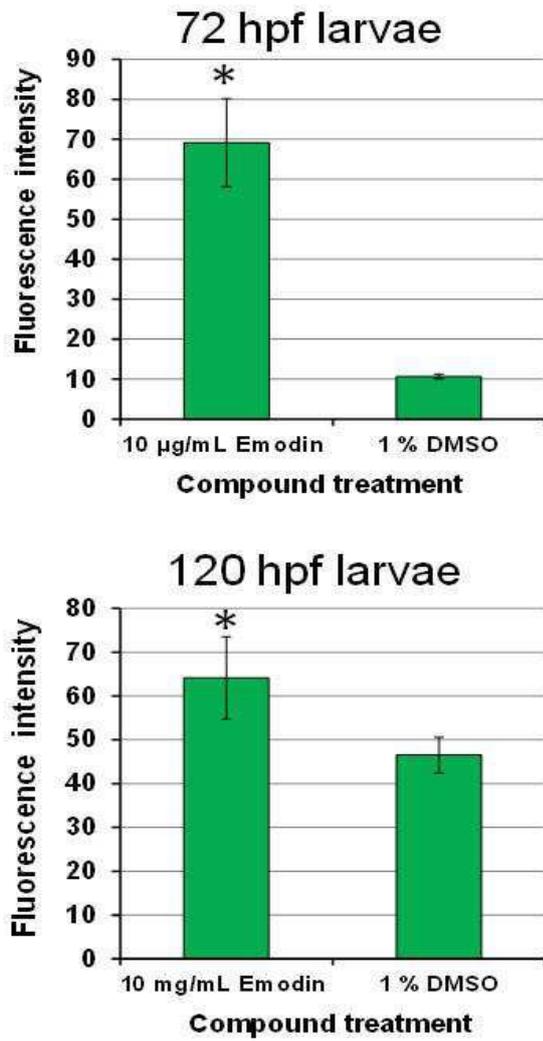
도면5b



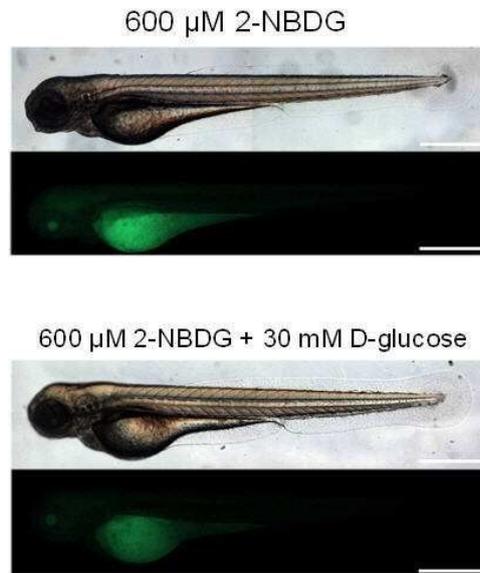
도면5c



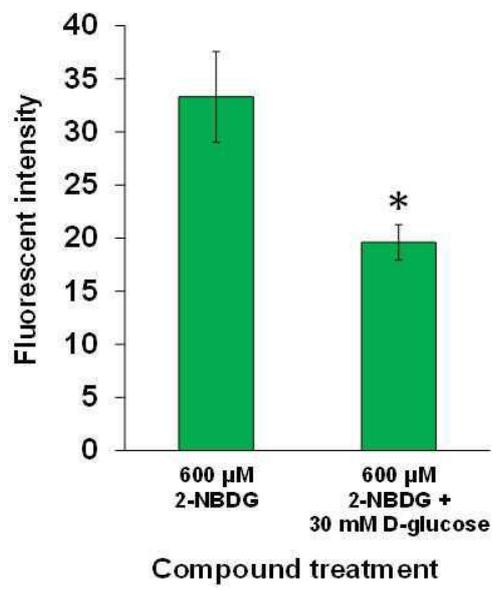
도면5d



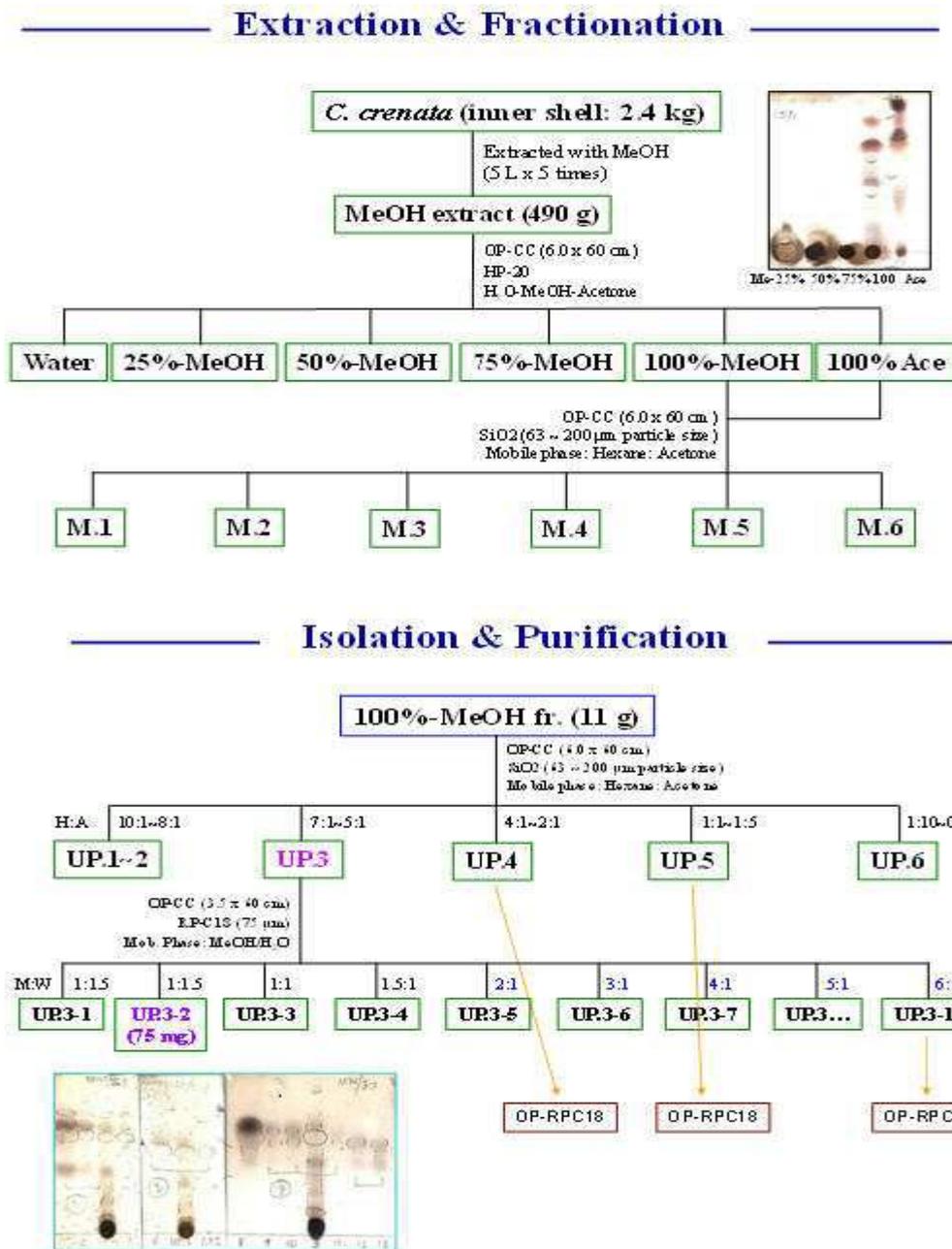
도면6a



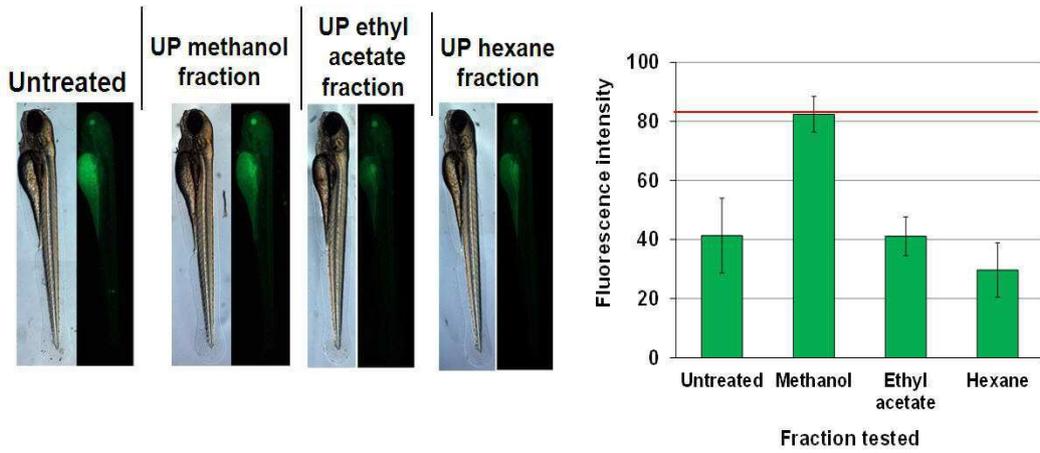
도면6b



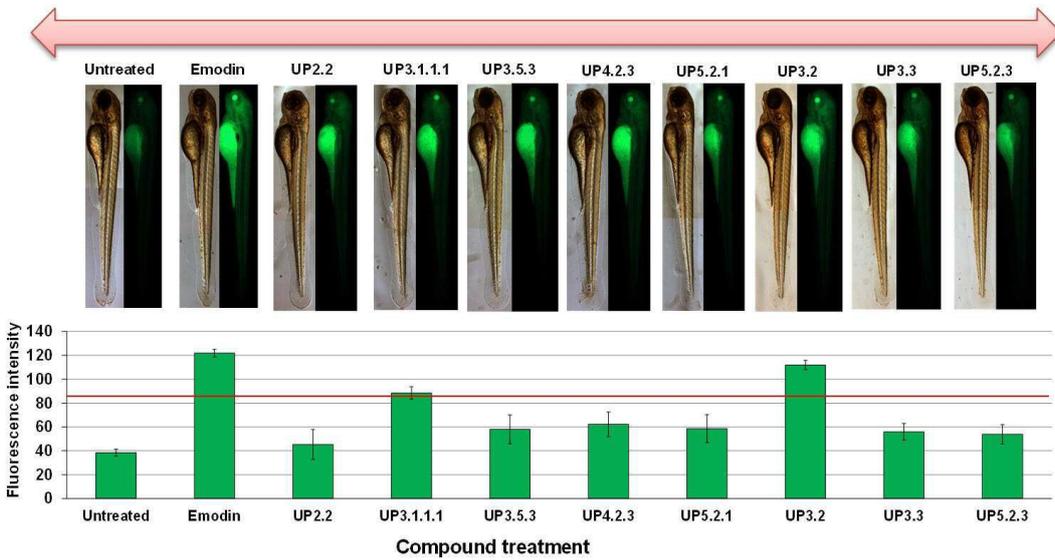
도면7a



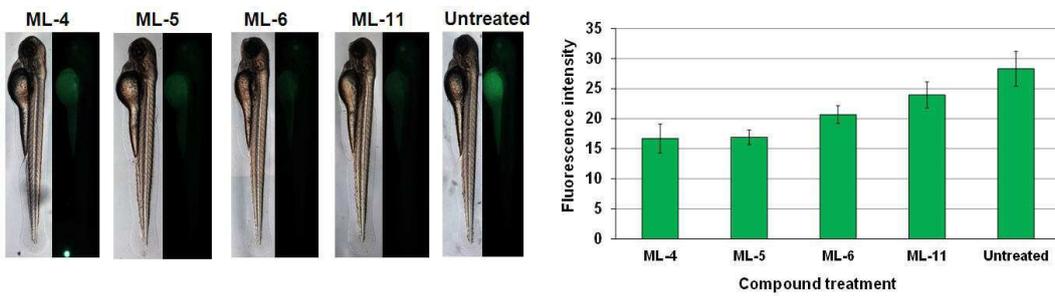
도면7b



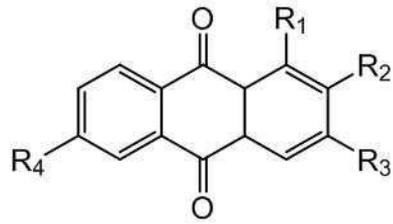
도면7c



도면7d



도면7e



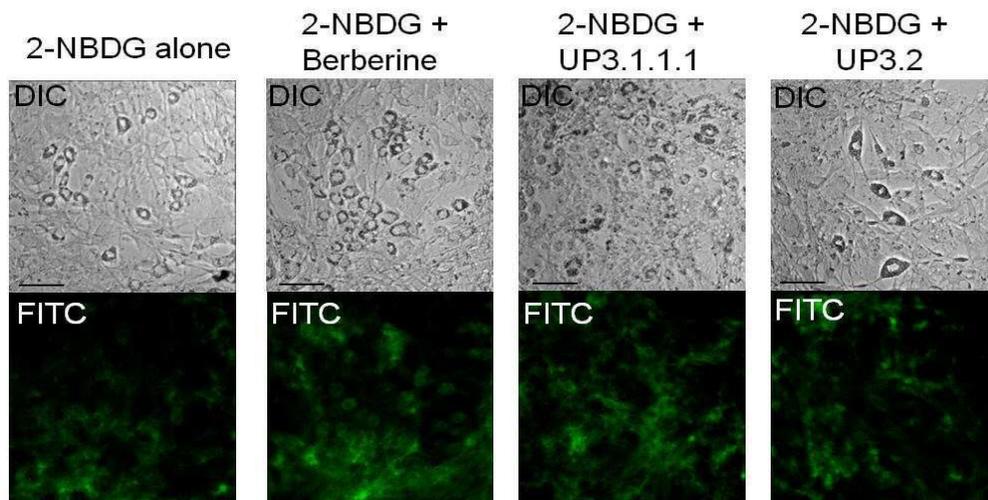
**ML-4** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H

**ML-5** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = H

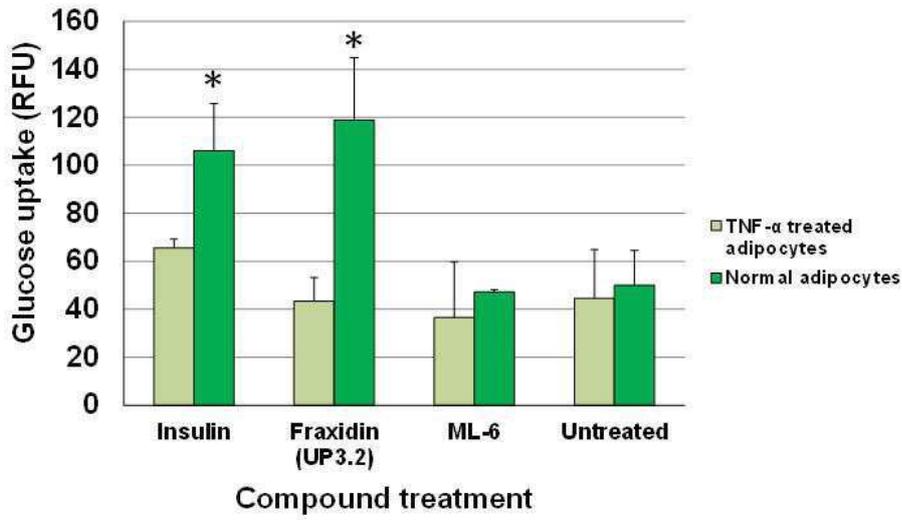
**ML-6** R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OH, R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = H

**ML-11** R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = OH, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = H

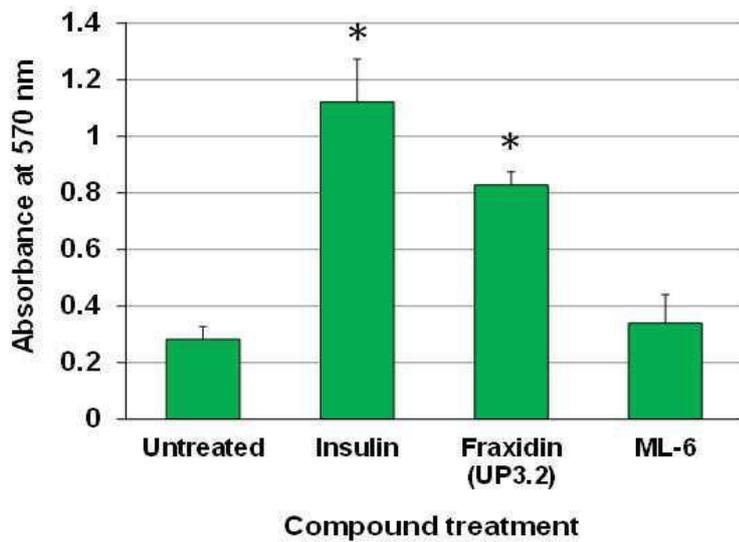
도면8a



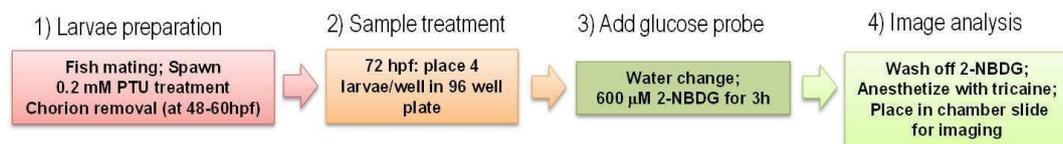
도면8b



도면8c



도면8d

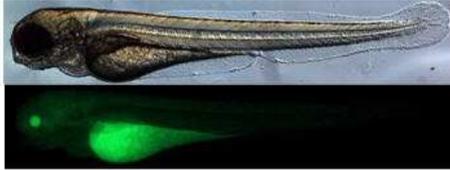


도면9a

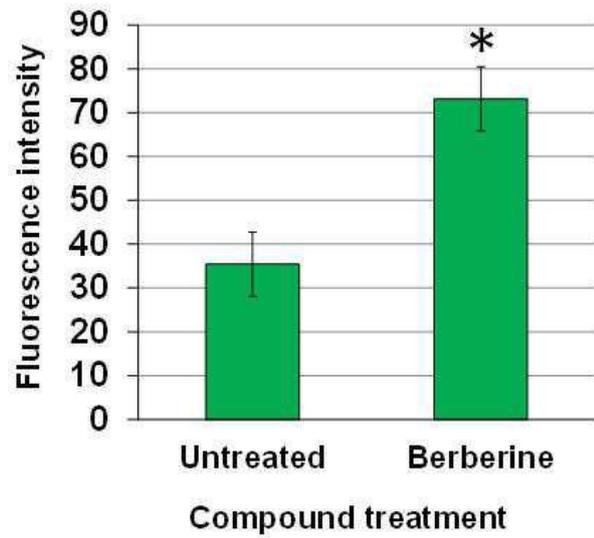
Untreated



Berberine

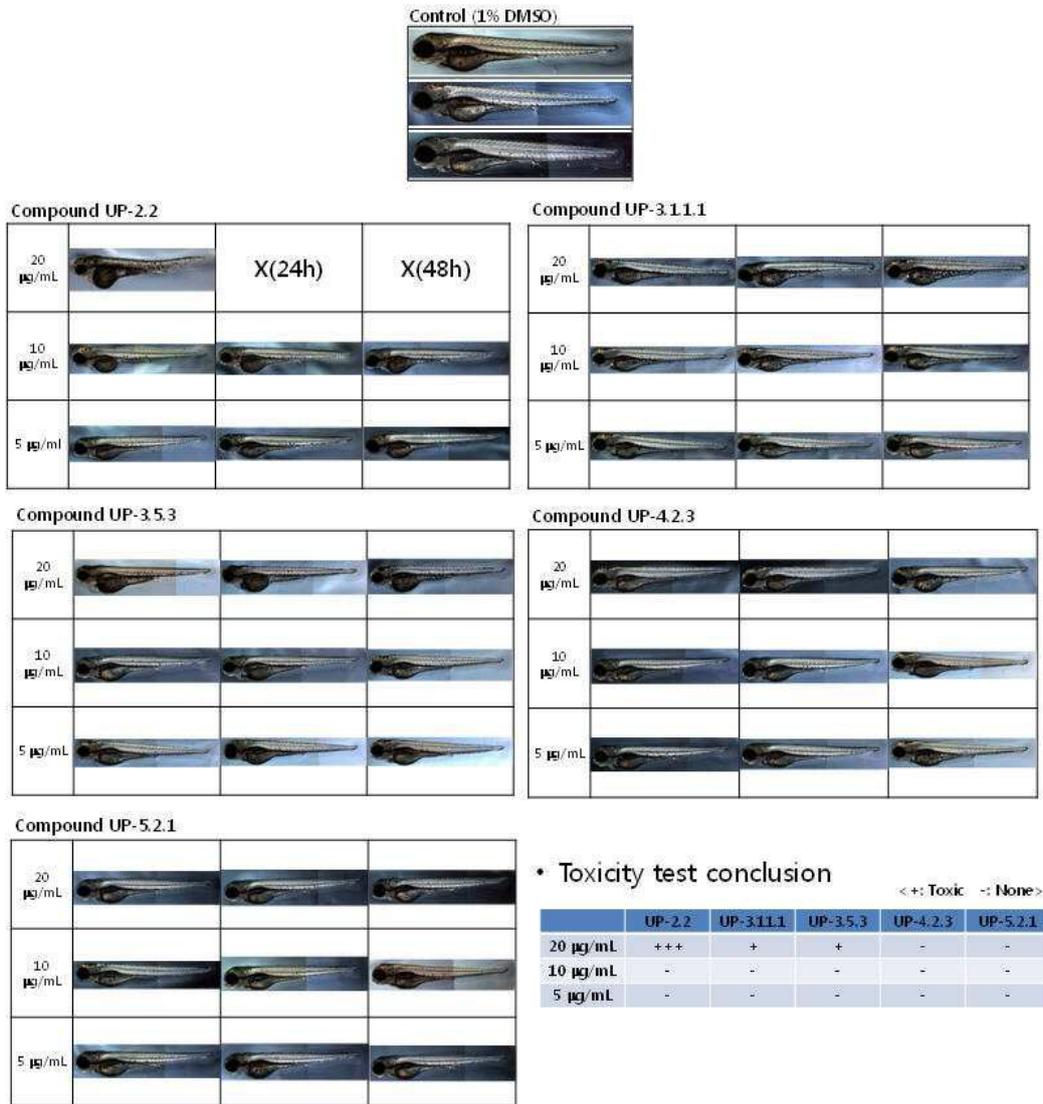


도면9b

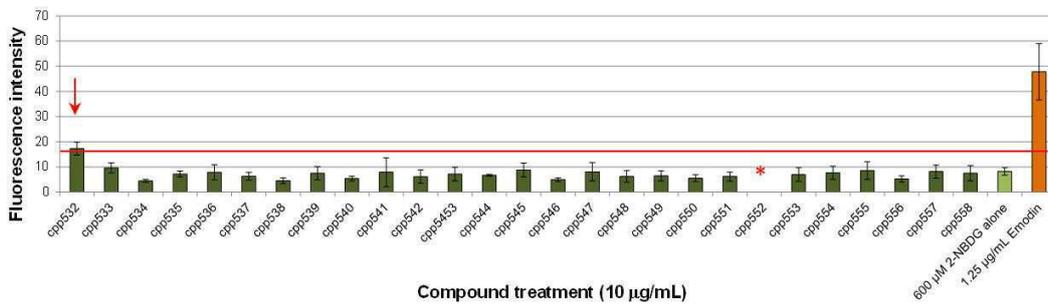




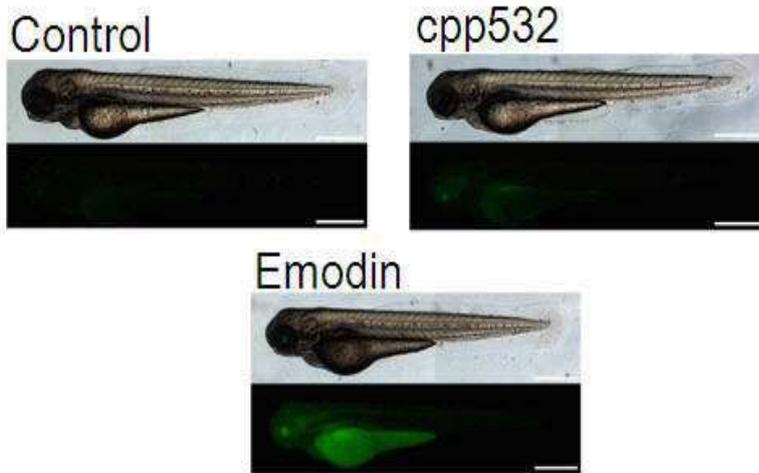
도면10b



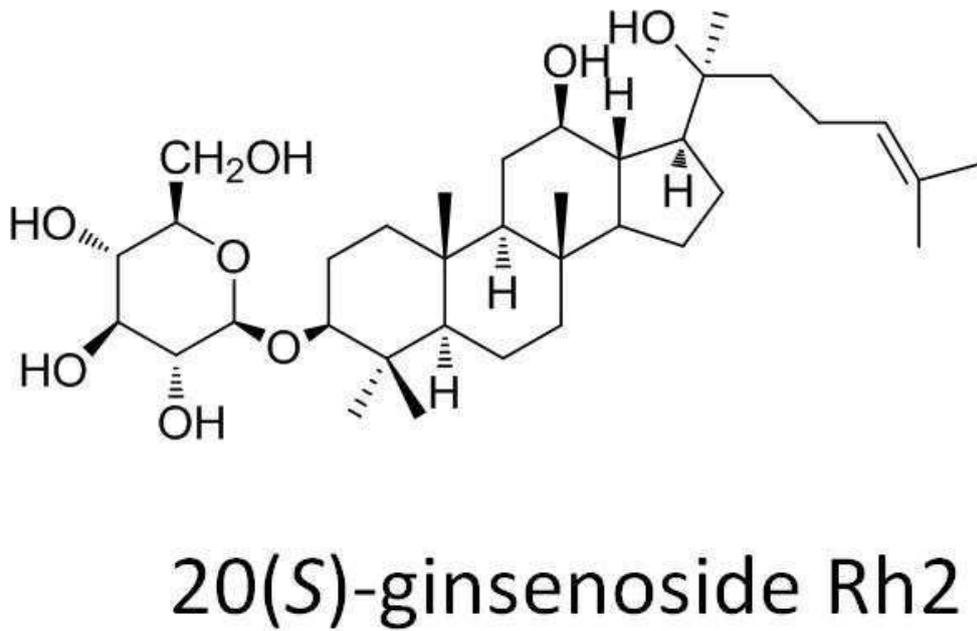
도면11a



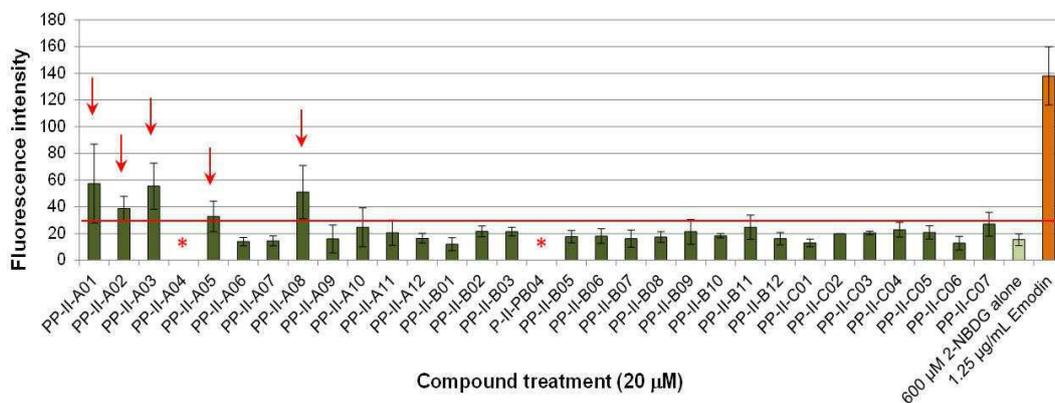
도면11b



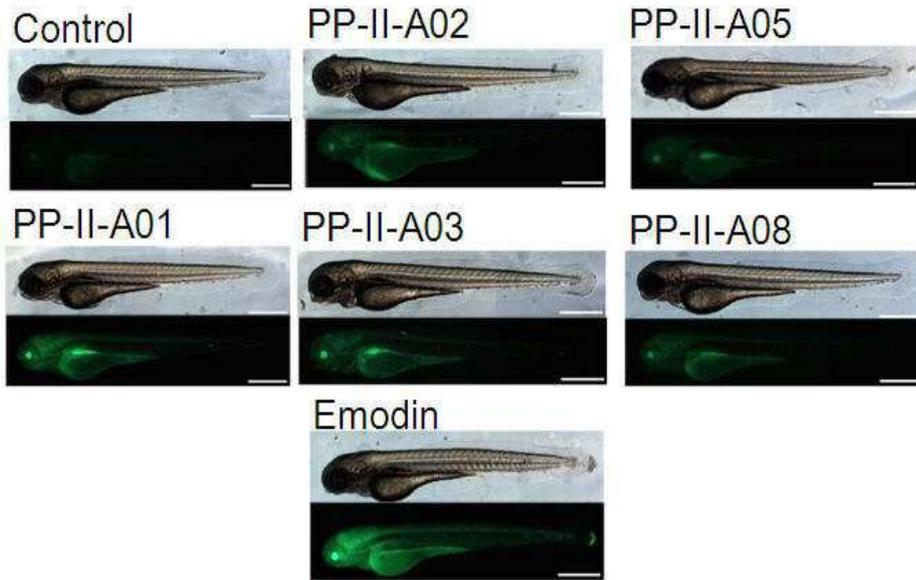
도면11c



도면12a



도면12b



도면12c

