

최 종

연구보고서

AMP-activated protein kinase 활성화 소재 발굴
및 이를 이용한 당뇨병 예방 및 치료제 개발

엠디바이오알파

농림자료실



0013425

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “AMP-activated protein kinase 활성화 소재 발굴 및 이를 이용한 당뇨병 예방 및 치료제 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5 월 24 일

주관연구기관명 : 엠디바이오알파
총괄연구책임자 : 박 명 규
위탁연구책임자 : 손 건 호
연 구 원 : 노 태 철
연 구 원 : 오 승 현
연 구 원 : 정 민 숙
연 구 원 : 전 수 진

요 약 문

I. 제 목

AMP-activated protein kinase 활성화 소재 발굴 및 이를 이용한 당뇨병 예방 및 치료제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

운동(physical exercise)을 통하여 당뇨병 환자의 상태를 호전시킬 수 있다는 사실은 오랜 기간 알려져 있고 또한 정기적인 운동은 NIDDM의 예방에도 큰 효과가 있다고 알려져 있다. 하나의 단적인 예로서 인슐린과 마찬가지로 운동은 포도당 흡수를 촉진시키는 glucose transport 4 (Glut4) 단백질의 세포막으로의 이동을 촉진시켜 줌으로써 혈당량을 저하시킬 수 있다고 알려져 있다. 이러한 효과는 NIDDM 환자에서도 관찰되어 지고 있으며 이러한 관찰은 **운동에 의해서 혈당량이 감소하는 기전은 인슐린의 기전과 독립적이라는 사실**을 말해 주며 실제로 많은 실험 결과가 이를 뒷받침해 주고 있다. 현재 시판되고 있는 **당뇨병 치료제의 대부분은 인슐린 분비 촉진 혹은 세포의 인슐린 반응성을 높이는 작용**을 하는 반면 본 과제를 통해서 개발 예정인 기능성소재 및 식품은 **운동모방 효과를 목표로** 하고 있기 때문에 국내외적으로 경쟁력이 있는 분야로 판단되며 또한 실질적인 유효 소재 개발은 당뇨병 치료를 위한 국내외적으로 새로운 시장을 개척할 것으로 예상된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 식품소재를 기초로 한 추출물 library 구축
2. 유효활성 소재 선별
 - 1) Cell based assay system을 이용한 AMPK 활성화 소재검색
 - 2) AMPK 활성화 소재를 이용한 포도당 흡수 촉진소재 선별
 - 3) 세포 및 동물모델을 이용한 효력검증
3. AMPK 활성화제 생산공정 개발
 - 1) 생리활성물질 분리 및 정제
 - 2) 유효성분 및 지표물질 분석법 개발
 - 3) 대량생산 공정 개발
 - 4) 유효성분 분리 물질 규명
4. 원료 및 시제품 제조
 - 1) 당뇨질환 식품의 제형 및 소재개발
 - 2) 작용기전 규명

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

식용가능한 소재로부터 AMP-activated protein kinase를 활성화시키는 소재를 검색 발굴하여 비만, 당뇨 및 대사성질환의 예방 및 치료제를 개발하고자 하였다.

1) 검색 대상 소재:

-700여종의 식품원료, 첨가물, 농수산물 및 식용으로 허용된 한약재를 대상으로 1차 검색

-대조군 대비 2.0 이상의 활성을 보이는 소재를 대상으로 질환동물을 통하여 in vivo 효능평가 실시하여 10개의 후보 소재 도출

-3개의 소재(F0218, F0475, F0330)를 최종 후보로 선정하였으며 나머지는 단일물질 분리 수준에서 실험진행

2) 추출물을 이용한 효능평가 실험

F0330, F0218 & F0475를 추출물로 제조한 후 질환동물을 대상으로 다양한 효력실험을 진행-비만, 당뇨, 고혈압, 지구력, 운동능력, 지질대사

3) 단일물질분리 및 물질규명

10여개의 소재로부터 물질분리를 시도하였으나 5개의 소재에서만 단일물질을 분리하였음. 총 9개의 단일물질을 분리하였으나 1개는 동일물질로 중복되었으며 1물질은 구조결정에 실패함. 물질을 특성별로 분류하면 플라보노이드류, 쿠마린류 및 알칼로이드 등임.

4) 단일물질 대량 생산 공정 개발

F0218C에 대하여 대량 생산공정을 개발하여 경제적으로 생산하는 공정을 개발하였다. 순도는 35%내외이며 수율은 75%정도이다.

이를 이용하여 고순도의 F0218C를 대량으로 회수하는 공정을 개발하여 순

도 99.9%를 대량으로 회수하는 공정을 확보하였다. 수율은 40% 순도에서 시작할 경우 70% 정도이다.

5) 단일물질의 작용기전 및 효능평가

F0218C 및 F0475C3의 단일물질을 질환동물에 경구투여하여 비만, 당뇨, 지방간, 고혈압, 지구력, 운동능력등을 확인하여 추출물에서 도출된 결과를 동일하게 재현하는 것을 확인하였으며 이들의 활성은 에너지대사, 지방산화 및 미토콘드리아생성에 관여하는 유전자 및 단백질의 조절을 통하여 이루어지는 것을 확인하였다.

6) F0218C의 유도체 합성 및 효능비교

F0218C를 원료로 다수의 유도체를 합성하여 신약으로의 가능성, 작용기전 및 moiety 변화에 따른 활성의 변화를 확인하고자 하였으며 F0218C보다 효능이 우수하며 세포수준에서 세포독성을 나타내지 않는 후보를 확보하여 향후 합성신약을 위한 가능성을 확보하였다.

7) AMPK활성화제를 근거로 한 당뇨용 생식 및 떡 제품개발

AMPK를 활성화시키는 것으로 확인된 소재를 대상으로 당뇨질환동물을 이용하여 혈당조절능력을 평가하였으며, 맛, 식감, 색상 및 풍미등을 고려하여 최적의 생식배합을 도출하여 당뇨질환동물, 운동능력 및 지구력등을 평가하여 제품으로의 가능성을 확인하였다. 한편 기능성 떡을 만들기 위하여 소재를 대상으로 최적화한 결과 3-5%의 범위에서 첨가할 경우 맛, 식감 및 색상에서 제품으로의 응용가능성을 확인하였다.

8) 지적재산권

현재까지 4건의 국내특허를 출원하였으며 1건의 PCT 출원이 진행중에 있으며 향후 4건 이상의 특허를 출원할 계획을 갖고 있다.

활용방안에 대한 건의

현재 F0218과 F0475에 대하여 기능성식품으로 인증을 받기 위하여 독성평가를 진행할 예정이며 특히 F0218을 우선적으로 실시하고자 한다.

한편 F0218의 경우 신약으로의 가능성을 확인하기 위한 보완실험을 통하여 천연물신약 및 합성신약을 동시에 추진할 계획이다.

F0475의 대량생산공정 보완을 통하여 제품화를 하고자하며 동시에 moiety의 합성을 통하여 신약으로의 가능성을 확인하고자 한다.

당뇨용 개발 생식의 경우 유통과의 협의를 통하여 제품화를 시도하고자 한다.

개별소재를 발효유, 기능성음료 및 기능성식품으로의 용도를 확보하여 제품화를 가속화하고자 하며 이를 위한 추가적인 보완실험을 계획 중이다.

Summary

I . Title

Assay of Material of Activating AMP-activated Protein Kinase and Development of Drug for Prevention and Treatment of Diabetes Using the Same

II. Objective and necessity of research and development

It has been well known that physical exercise can make a patient suffered from diabetes better, and also that the regular physical exercise is greatly helpful to prevent NIDDM. For example, it has been known that physical exercise facilitates the glucose transport 4 (Glut 4) protein, which accelerates absorption of glucose, to move toward cell membrane, likewise insulin. This phenomenon is also observed in a patient suffered from NIDDM, and it can be understood from this observation that the mechanism involving reduction of the blood sugar level is independent from the mechanism involving insulin, which is substantially supported by a lot of experimental results. While most commercially available drugs for diabetes treatment act to accelerate secretion of insulin or increase the sensitivity of cells to insulin, the functional materials or foods to be developed through the instant project target a mimic effect to physical exercise therefore, this new art is believed to have sufficient competitiveness in the foreign market as well as domestic market, and development of substantially effective materials

will make new domestic and foreign markets.

III. Contents and scope of research and development

1. Establishment of Extract Library based upon Food Stock

2. Selection of Effective Active Materials
 - 1) Assay of AMPK-activating material using Cell-based assay system
 - 2) Assay of materials accelerating absorption of glucose using AMPK activation material
 - 3) Verification of effect using cells and animal models

3. Development of production process of AMPK activation agent
 - 1) Isolation and purification of physiological activation materials
 - 2) Development of analysis method of effective components and index materials
 - 3) Development of mass production process
 - 4) Identification of isolated materials containing effective component

4. Preparation of raw material and commercial product
 - 1) Development of formulation and foods for treatment of diabetes-related diseases
 - 2) Verification of function mechanism

IV. Suggestion on the result and utilization of research and development

It has been intended to search materials activating the AMP-activated protein kinase from edible stock and develop drugs for prevention and treatment of obesity, diabetes and metabolic syndromes using them.

1) Search Target:

- 1st search about 700 or more raw food materials, additives, agricultural and marine products and edible herb medicine (Chinese medicine)

- selection of 10 candidates by performing the effectiveness test *in vivo* about diseased animals with materials showing the activity of 2.0 or more in comparison with control group

- Selection of three materials (F0218, F0475, F0330) as final candidates and performance of experiments about the other materials at the level of isolating a single component

2) Experiments of Effectiveness Test with Extracts

- Preparation of F0330, F0218 and F0475 as extracts and then performance of various effectiveness testes about diseased animals in view of obesity, diabetes, hypertension, stamina, lipid metabolism, physical exercise ability and the like.

3) Isolation of Single Compound and Identification thereof

- Isolation of single compound was tried about 10 and more materials, but the trial succeeded about only 5 materials. Total 9 single compounds were isolated, and one compound was identified to be the

same compound, and the other compound failed to be obtained in view of crystal determination. The single compounds were categorized to Flavonoid-based compound, Coumarin-based compound, Alkaloid-based compound, etc.

4) Development of Mass Production Process of Single Compound

- The mass production process was developed capable of producing economically F0218C of a high purity. The purity is approximately 35% and the yield is about 75%.

- Based upon the above, established was a process in which F0218C of a high purity was obtained at a purity of 99.9% in a mass production. The yield is about 70% when starting the process with one of 40% purity.

5) Function Mechanism and Effectiveness Measurement

- Single compounds from F0218C and F0475C3 were orally administered to diseased animals to see the effectiveness in association with obesity, diabetes, hypertension, endurance, lipid metabolism, physical exercise ability and the like. It was ascertained from these experiments that the same results as those of extract-related experiments as mentioned above are reproduced and also that the relevant activities are obtained through control of genes and proteins involving energy metabolism, lipid oxidation and mitochondria generation.

6) Synthesis of F0218C Derivatives and Comparison of

Effectiveness

- A variety of derivatives were synthesized using F0218C as a raw material so as to see a possibility of new drug, a functional mechanism, and the variation of effectiveness according to change of moiety, and some candidates were established showing the more excellent effectiveness than F0218C but not exhibiting the cell toxicity at the level of cells, which suggests a possibility of new synthesized drugs in the future.

7) Development of Natural Food and Rice Cake for Treatment of Diabetes with AMPK Activation Agent

- The ability of controlling the blood sugar level, physical exercise ability and endurance were tested about diabetes-diseased animals with compounds having been confirmed to activate AMPK, and also an optimal composition for natural food was determined in consideration with taste, rheology color, flavor, etc., and also, and from these results, a possibility of preparation for commercial product was confirmed. Also, as an example for optimization, a possibility of application to commercial product was confirmed in view of taste, rheology and color when the compounds are added to a functional rice food in the range of 3 ~ 5%.

8) Intellectual Property Rights

- Four domestic patent applications has been filed, and one PCT international application is now being prepared, and more than four patent applications will be filed in the near future.

<Suggestion about Uses and Applications>

The toxicity test regarding F0218 and F0475 will be performed to get the certification to functional food, and among them, F0218 will be first handled.

In the case of F0218, the natural drug project and synthesis drug project will be simultaneously carried out through supplemental experiments to confirm a possibility of new drug,

In the case of F0475, the commercial product preparation will be planned based upon supplementation to a mass production process, and also a possibility of new drug will be confirmed through synthesis of moiety.

In the case of natural food associated with the treatment of diabetes, the commercial product preparation will be tried through cooperation with the existing product-selling companies.

The uses and applications to fermentation foods, functional beverages and functional foods will be secured to accelerate the commercial product prepared, and for the purpose of this plan, additional experiments is now being prepared.

CONTENTS

I. Summary of Research Development Project-----	22
A. Object of Research Development-----	22
B. Necessity for Research Development-----	23
C. Contents and Range of Research Development -----	27
II. Current Domestic and Foreign State of Technique Development--	31
III. Contents and Results of Research Development Performance-----	34
A. Establishment of Extract Library Based upon Food Stock-----	34
B. Selection of Materials Capable of Activating AMPK-----	34
C. Effectiveness Experiments Using Obesity-, Diabetes-diseased Animals-----	37
1. Effectiveness Experiments of F0330 Candidate -----	37
a) Absorption Experiments of AMPK and Glucose in Cells-	37
b) Effectiveness Test about Anti-obesity and Anti-diabetes in Zucker fa/fa rat-----	38
c) AMPK Activity of F0330 Fraction-----	40
d) Anti-obesity Effectiveness of F0330 Fraction-----	40
e) Anti-diabetes Effectiveness of F0330 Fraction-----	41
2. Effectiveness Experiments of F0475 candidate-----	42
a) Absorption Experiments of AMPK and Glucose in Cells -	42
b) Effectiveness Test about Anti-obesity and Anti-diabetes in Zucker fa/fa rat-----	43
3. Effectiveness Experiments of F0218 candidate-----	45
a) Anti-diabetes Effectiveness about STZ-induced Diabetes-diseased model-----	45

b)	Effect to Blood Sugar of 2-typed Diabetes db/db Mice	45
c)	Effect to Blood Sugar Control of ZDF Rat as 2-typed Diabetes Model	47
d)	Effect to Weight Control of ob/ob Mice as Obesity Animal Model	48
e)	Effect to Endurance	48
f)	Effect to Activity	49
D.	Isolation and Purification of Active Compound	51
1.	Isolation and Purification of Active Compound from F0475	51
a)	Isolation of F0475 Compound	51
b)	Crystal Assay of F0475 Compound	51
c)	AMPK Activity of each Single Compound of F0475	53
d)	Effectiveness Measurement of Extracted F0475 Compound	53
i)	Diabetes-related Experiments of Isolated Compound	53
ii)	Effect to Weight Control of ob/ob mice as Obesity-diseased Animal	56
iii)	Effect to Weight Control of DIO mice as Obesity-induced Animal	56
iv)	Effect to Blood Sugar of ZDF rat as 2-typed Diabetes-diseased Animal	57
v)	Blood Analysis of ZDF rat as 2-typed Diabetes-diseased Animal	59
2.	Isolation and Purification of Active Compound from F0218	60
a)	Isolation of F0218 Compound	60
b)	Crystal Assay of F0218 Compound	60
c)	AMPK Activity of each Single Compound of F0218	61

d) Effectiveness Measurement of Extracted F0218 Compound	61
i) Effect to Weight Control of ob/ob mice as Obesity-diseased Animal	61
ii) Effect to Weight Control of DIO mice as Obesity-induced Animal	62
iii) Blood Analysis of DIO mice as Obesity-diseased Animal	63
iv) Effect to Blood Sugar of 1-typed, Diabetes-induced Animal	66
v) Effectiveness Comparison Experiments in db/db mice as Obesity- & Diabetes-diseased Animal in Comparison with Commercial Drugs for Diabetes Treatment	67
vi) Effect to Weight and Blood Pressure of SHR rat as Hypertension-diseased Animal	68
vii) Effect to Activity	69
3. Isolation and Purification of Active Compound from F0479	71
a) Isolation of F0479 Compound	71
b) Crystal Assay of F0479 Compound	72
c) AMPK Activity of each Single Compound of F0479	73
4. Isolation and Purification of Active Compound from F0546	74
a) Isolation of F0546 Compound	74
b) Crystal Assay of F0546 Compound	74
c) AMPK Activity of each Single Compound of F0546	75
E. Development of Production Process	76
1. Mass Production Process of F0475	76

2. Mass Production Process of F0218-----	77
F. Identification of Functional Mechanism -----	78
G. Development of Formulation and Raw Materials for Food Associated with Diabetes Treatment-----	83
1. Development of Drug Formulation (Micronization)-----	83
a) Experimental Animals and Feed-----	83
b) Breeding Condition of Experimental Animals and Method of Drug Administration-----	83
c) Preparation of Vehicle-----	83
d) Preparation of Experimental Materials-----	83
e) Effectiveness Test-----	84
2. Development of Natural Food for Obesity & Diabetes Treatment-----	85
a) Effectiveness Measurement of each Nature Food Stock--	85
i) Effect to Weight and Blood Sugar of db/db mice as Obesity- & Diabetes-diseased Animal-----	85
b) Effectiveness Measurement of Nature Food Formula----	87
i) Effect to Weight and Blood Sugar of db/db mice as Obesity- & Diabetes-diseased Animal -----	87
ii) Effect to Blood Sugar of ZDF rat as 2-typed Diabetes-diseased Animal-----	88
iii) Measurement of O ₂ Consumption-----	89
iv) Effect to Activity-----	91
v) Effect to endurance-----	92
3. Optimization for Development of Function Rice Cake-----	93

IV. Achievement Degree of Objects and Attribution Degree to Relevant

Arts-----	94
V. Plan of Application for Research Development-----	96
VI. Foreign Science & Technology Information Collected during Research Development Procedure-----	97
VII. Reference-----	98

목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요 -----	22
제 1 절 연구개발의 목적 -----	22
제 2 절 연구개발의 필요성 -----	23
제 3 절 연구의 개발 내용 및 범위 -----	27
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	31
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 -----	34
제 1 절 식품소재를 기초로 한 추출물 library 구축-----	34
제 2 절 AMPK를 활성화 시키는 소재선별-----	34
제 3 절 비만, 당뇨질환 동물모델을 이용한 효력실험-----	37
1. F0330 후보소재의 효력실험-----	37
가. 세포에서의 AMPK 및 포도당 흡수실험-----	37
나. Zucker fa/fa rat에서 항비만 및 항당뇨 효과 측정-----	38
다. F0330 분획의 AMPK 활성화-----	40
라. F0330 분획의 항비만 효과-----	40
마. F0330 분획의 항당뇨효과-----	41
2. F0475 후보소재의 효력실험 -----	42
가. 세포에서의 AMPK 및 포도당 흡수실험-----	42
나. Zucker fa/fa rat에서 항비만 및 항당뇨 효과 측정-----	43
3. F0218 후보소재의 효력실험-----	45
가. STZ 유발 당뇨질환 모델에 미치는 항당뇨효과-----	45
나. 2형당뇨 db/db 마우스의 혈당조절에 미치는 영향-----	45
다. 2형당뇨 동물모델인 ZDF rat 혈당조절에 미치는 영향-----	47
라. 비만 동물도넬 ob/ob 마우스의 체중조절에 미치는 영향---	48
마. 지구력(endurance)에 미치는 영향-----	48
바. 활동성(activity)에 미치는 영향 -----	49
제 4절 활성물질 분리정제-----	51

1. F0475의 활성물질 분리정제-----	51
가. F0475 화합물 분리-----	51
나. F0475 화합물의 구조동정-----	51
다. F0475 single compound 별 AMPK 활성-----	53
라. F0475 분리 물질의 효능평가-----	53
1) 분리물질의 당뇨관련성실험-----	53
2) 비만질환동물인 ob/ob mice의 체중조절 영향-----	56
3) 비만유도질환 동물인 DIO mice의 체중조절 영향-----	56
4) 2형당뇨질환동물인 ZDF rat에서의 당뇨영향-----	57
5) 2형 당뇨질환동물인 ZDF rat에서의 혈액분석-----	59
2. F0218의 활성물질 분리정제-----	60
가. F0218 화합물 분리-----	60
나. F0218 화합물의 구조동정-----	60
다. F0218 single compound 의 AMPK 활성-----	61
라. F0218 분리 물질의 효능평가-----	61
1) 비만질환동물인 ob/ob mice의 체중조절 영향-----	61
2) 비만유도질환 동물인 DIO mice의 체중조절 영향-----	62
3) 비만유도질환 동물인 DIO mice의 혈액분석-----	63
가) 생화학지표성분분석-----	63
나) 혈액 내 insulin 분석-----	65
4) 1형 당뇨 유도동물의 당뇨영향-----	66
5) 비만, 당뇨질환동물인 db/db mice에서 시판당뇨치료제와 의 효력비교실험 -----	67
6) 고혈압 질환모델인 SHR rat의 체중 및 혈압 영향-----	68
7) 활동성(activity)에 미치는 영향 -----	69
8) F0218 유도체의 합성 및 활성비교 실험-----	70
3. F0479의 활성물질 분리정제-----	71

가. F0479 화합물 분리-----	71
나. F0479 분리물질 AMPK 활성-----	72
다. F0479 화합물의 구조동정-----	72
라. F0479 single compound AMPK 활성-----	73
4. F0546의 활성물질 분리정제-----	74
가. F0546 화합물 분리-----	74
나. F0546 분리물질 AMPK 활성-----	74
다. F0546 화합물의 구조동정-----	75
라. F0546 single compound 별 AMPK 활성-----	75
제 5절 공정개발-----	76
1. F0475 대량생산공정-----	76
가. 공정도-----	76
2. F0218 대량생산공정-----	77
가. 공정도-----	77
제 6절 작용기전 규명-----	78
제 7절 당뇨질환 식품의 제형 및 소재개발-----	83
1. 제형개발(micronization 제형개발)-----	83
가. 실험동물 및 식이-----	83
나. 실험동물의 사육 및 약물투여 방법-----	83
다. Vehicle 조제-----	83
라. 실험물질 조제-----	83
마. 효능평가-----	84
2. 비만 당뇨용 생식개발-----	85
가. 생식원료별 효능평가-----	85
1) 비만,당뇨질환동물인 db/db mice의 체중 및 당뇨 영향	85
나. 생식 formular 효능평가-----	87
1) 비만,당뇨질환동물인 db/db mice의 체중 및 당뇨 영향	87

2) 2형당뇨질환동물인 ZDF rat에서의 당뇨 영향-----	88
3) O2 consumption 측정-----	89
4) 활동성(activity)에 미치는 영향 -----	91
5) 지구력(endurance)에 미치는 영향-----	92
다. 기능성 떡 개발을 위한 최적화-----	93
제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	94
제 5장 연구개발의 활용계획 -----	96
제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	97
제 7장. 참고문헌 -----	98

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적

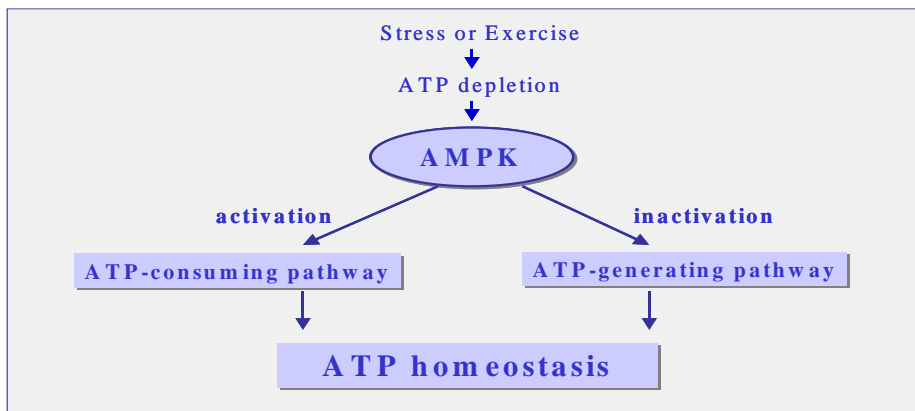
당뇨병은 인구의 5% 이상을 차지할 정도로 빈도가 매우 높고 치명적인 급만성 합병증을 초래하는 질환으로서 당뇨병 환자의 90% 이상이 인슐린 비의존형 (NIDDM: non-insulin-dependent diabetes mellitus)으로 추정된다. NIDDM의 병태생리에 대해 수많은 연구가 이루어져 왔고 이러한 결과로 인슐린 저항성과 결핍 등이 중요한 결합인자로 알려지고 있으나 NIDDM의 발병 원인에 대한 근본적인 결합에 대한 이해가 아직 미미한 상태이며 그 치료 방법 혹은 치료 약물 또한 제한적으로 사용되고 있는 현실이다. 또한 국내에서도 식생활 서구화 및 운동량 부족한 생활양식으로 인하여 매년 당뇨병 환자가 급증하고 있는 상태여서 당뇨병 예방 및 치료를 위한 새로운 기능성식품소재의 발굴 및 신약 개발이 절실한 상황이다.

운동(physical exercise)을 통하여 당뇨병 환자의 상태를 호전시킬 수 있다는 사실은 오랜 기간 알려져 있고 또한 정기적인 운동은 NIDDM의 예방에도 큰 효과가 있다고 알려져 있다. 하나의 단적인 예로서 인슐린과 마찬가지로 운동은 포도당 흡수를 촉진시키는 glucose transport 4 (Glut4) 단백질의 세포막으로의 이동을 촉진시켜 줌으로써 혈당량을 저하시킬 수 있다고 알려져 있다. 이러한 효과는 NIDDM 환자에서도 관찰되어 지고 있으며 이러한 관찰은 **운동에 의해서 혈당량이 감소하는 기전은 인슐린의 기전과 독립적이라는 사실**을 말해 주며 실제로 많은 실험 결과가 이를 뒷받침해 주고 있다. 현재 시판되고 있는 **당뇨병 치료제의 대부분은 인슐린 분비 촉진 혹은 세포의 인슐린 반응성을 높이는 작용**을 하는 반면 본 과제를 통해서 개발 예정인 기능성소재 및 식품은 **운동모방 효과를 목표로** 하고 있기 때문에 국내외적으로 경쟁력이 있는 분야로 판단되며 또한 실질적인 유효 소재 개발은 당뇨병 치료를 위한 국내외적으로 새로운 시장을 개척할 것으로 예상된다.

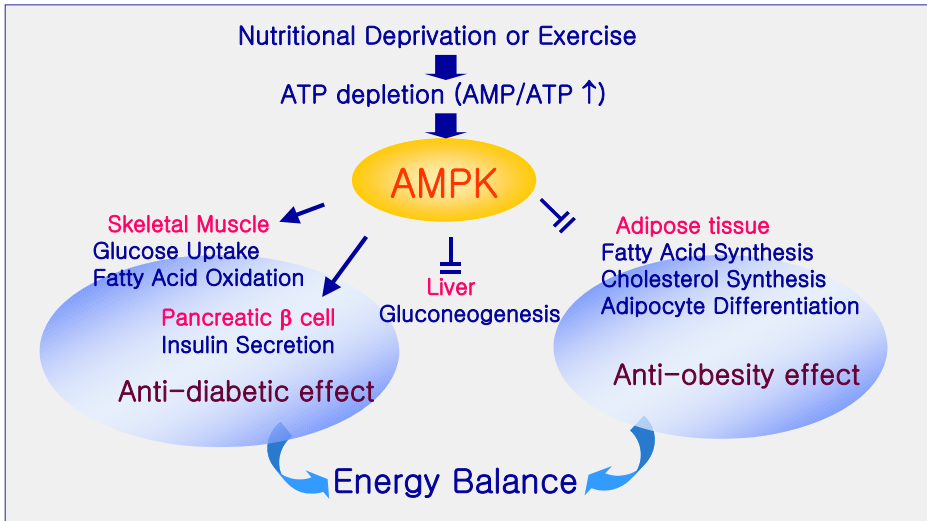
제 2절 연구개발의 필요성

AMP-activated protein kinase (AMPK)는 1973년 처음으로 관찰되었으며 지방산 합성과 콜레스테롤 합성 과정의 rate-limiting step 효소인 acetyl-CoA carboxylase (ACC)와 HMG-CoA reductase (HMGCR)를 인산화시켜 각 target 효소의 활성화를 억제시켜서 당시에는 ACC kinase 혹은 HMGCR-kinase라 불리기도 하였으나 그 후 동일한 효소로 밝혀졌다. AMPK는 그 이름에서 시사하는 바와 같이 muscle contraction 이나 운동 후 세포내에서 에너지 고갈의 결과로 축적된 AMP에 의해 활성화되어 다음의 대사과정들을 조절하고 있으며 이러한 결과가 당뇨병과 관련된 의미는 다음과 같다.

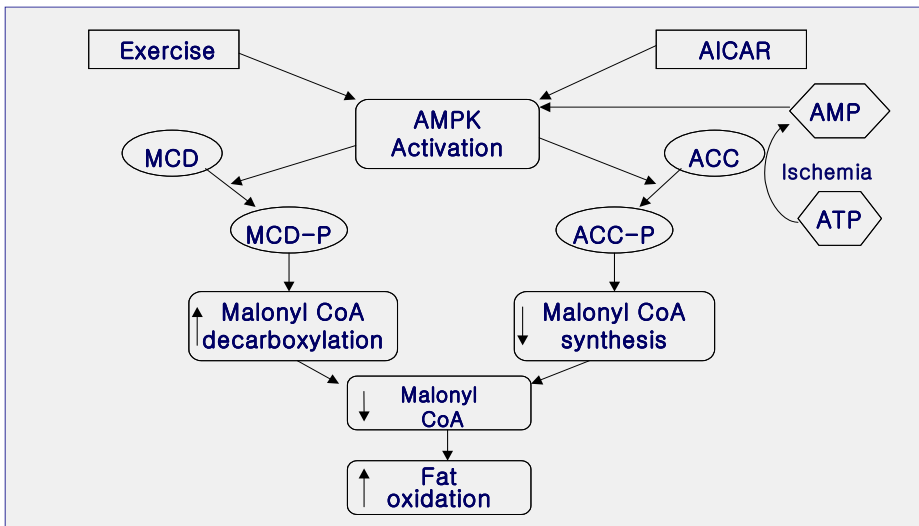
1. AMPK의 역할



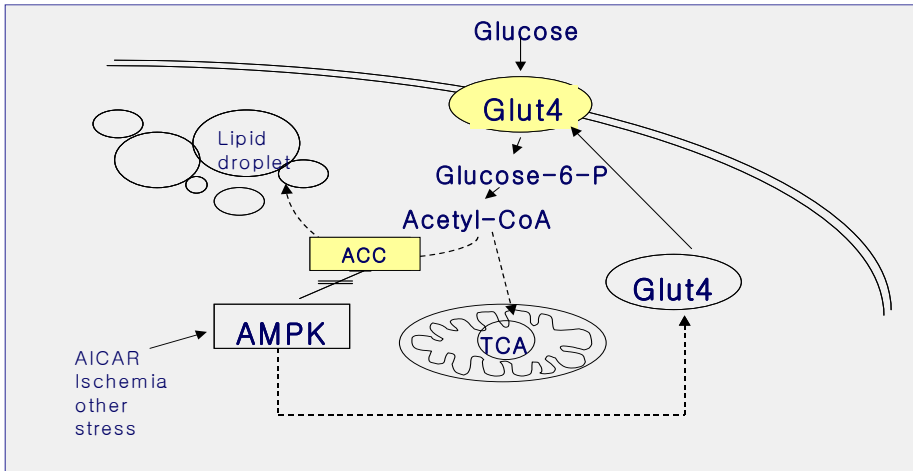
2. Multiple effect of AMPK



3. Regulation of AMP-Activated protein kinase



4. Glucose Uptake



당사는 AMP-activated protein kinase의 세포내 활성을 측정하는 Elisa 방법을 세계최초로 개발하여 기존의 방사선 동위원소에 의하여 측정하는 방법을 대체하는 high through-put screening system을 구축하였다.

당사가 보유하고 있는 한약, 자생, 일부 식품 추출물 그리고 단일화합물 등 약 1,000여종을 대상으로 AMP-activated protein kinase 활성을 검색하였으며 AMP-activated protein kinase 활성화 소재를 대상으로 포도당 흡수 활성을 측정하여 당뇨병 예방 및 치료를 위한 소재를 검색하여 항당뇨 후보 소재를 도출하였다. 도출된 후보소재를 대상으로 in vivo 활성을 측정하여 생체내에서 유의적인 혈당강하 효과가 있음을 확인하였다.

따라서 본 연구소에서는 AMP-activated protein kinase를 활성화시키는 소재가 당뇨병 예방 및 치료 약물의 개발에 매우 효과적인 system임을 확인하였다.

최근 식품성분에 대해 새로운 관점에서 계통적, 조직적인 연구가 발전함에 따라 식품유래의 특정성분들이 인체의 신경계, 순환계, 내분비계, 생체방어계, 세포분화 등 각종 생리기능 조절계에 작용하여 직·간접으로 생체조절기능 효과를 나타낸다는 사실이 밝혀지고 있다. 이들 특정성분들에 의한 생체조절계 및 생체방어계에 대한 적절한 조절이 가능하게 된다면 가장 자연스러운 건강유지를 위한 강력한 수단이 될 수 있음을 의미한다. 따라서 식품유래의 생체조절기능인자들의 작용기구, 작용부위, 구조해석 등의 해명은 대단히 중요하다 하겠다.

본 연구소는 식품 및 농산물 유래의 소재를 대상으로 체계적인 소재 검색을 통하여 당뇨질환의 예방 및 치료를 할 수 있는 기능성 식품 및 소재의 개발이 중요하다고 판단하여 식품 유래의 소재를 이용한 library를 구축하여 AMP-activated protein kinase activator를 high through-put screening assay system을 활용 검색하여 생체내 유효한 소재를 도출할 경우 당뇨질환에 유효한 농산물을 소재화하고 이들 소재를 중심으로 기능성식품을 개발함으로써 국내 농업의 발전모델을 제시하고 국민보건 향상 및 관련 산업의 경쟁력을 제고시킴에 두고자 하였다. 따라서 식품 및 농산물 중에서 AMP-activated protein kinase를 활성화시키는 것과 이를 근거로 포도당 흡수를 촉진하는 소재를 도출하여 항 당뇨 질환을 위한 기능성식품 및 소재를 개발하고자 한다.

제 3절 연구의 개발 내용 및 범위

1. AMP-activated protein kinase 활성화 소재의 library 구축

식품공정에 기재된 소재, 식품첨가물, 허브, 미생물 배양물 등을 원료로 한 library를 구축하였고, 용매별 분획물의 library를 구축하였다.

2. Cell based assay system을 이용한 AMPK 활성화 소재 검색

AMPK 활성을 측정하는 방법은 현재 방사선동위원소를 이용한 방법이 주로 공인된 분석방법으로 이들 방법을 이용한 분석으로는 AMPK 소재를 개발하는 것이 경쟁력이 없으며 시간과 비용이 과다 소비되는 비경제적인 방법이다.

당사는 cell based ELISA 방법 및 protein based ELISA 방법을 동시에 개발하여 target specific activator를 개발하는 기반을 확보하였다. 현재 당사의 개발방법은 세계에서 유일한 ELISA 방법으로 AMPK를 base로 한 activator를 개발하였다. 이와 같은 AMPK 분석방법을 통하여 500여개의 추출물 library를 검색한 결과 in vitro에서 AMPK를 대조군 대비 1.5배 이상 활성화시키는 추출물을 선별하여 포도당 흡수와의 연관성을 비교하였다.

3. AMPK 활성화를 이용한 포도당 흡수 촉진소재 선별

AMPK를 활성화시키는 소재를 대상으로 포도당 흡수를 촉진시키는지를 근육세포를 이용하여 확인하였다. AMPK 활성과 비교하여 연관이 있는 소재를 대상으로 우선하여 실험동물 모델을 이용한 효능검증을 하고자 하였다.

4. 세포 및 동물모델을 이용한 효능검증

AMPK 및 포도당 흡수 촉진에서 동시에 만족을 나타낸 소재를 중심으로 우선 동물에서의 효능평가를 실시하였다. 동물에서의 활성 평가를 통하여 후보물질 선정하였다. 동물모델은 비만 당뇨 질환모델인 db/db, 비만모델인 ob/ob 마우스 그리고 비만 당뇨모델인 zucker fa/fa 랫트를 이용하여 효능평가를 실시하였다.

5. 생리활성물질 분리 및 정제

AMPK를 활성화시키는 것으로 확인된 후보 소재들 중에서 비만, 당뇨 질환동물실험에서 효과를 나타낸 후보들을 대상으로 단일화합물을 얻기 위하여 분리정제를 실시하였다. 후보소재를 메탄올 추출한 후 농축하여 일련의 저분자물질을 분리하는 방법에 따라 실시하였으며 각 공정별 얻어진 분획들을 모아 AMPK 활성화 정도를 측정하여 단일물질을 분리정제하였다. 단일물질임이 확인된 시료를 사용하여 MS, NMR 등을 사용하여 분자량 및 구조를 규명하였다.

6. 단일물질의 작용기전규명

분리된 단일물질을 대상으로 에너지 대사, 지방산화 및 미토콘드리아생성에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀진 유전자 및 단백질의 발현정도를 근육세포인 C212세포를 이용하여 확인하였다.

7. 대량생산공정 개발

단일물질이 다량으로 함유된 소재를 검색하여 경제적으로 대량으로 생산할 수 있는 공정을 개발하고자 하였다. 기능성 식품으로 사용할 수 있을 정도의 순도를 함유하면서 경제성을 갖출 수 있는 공정을 개발하는 것을 목표로 하였다.

8. AMPK 활성화제를 기초로 한 당뇨용 생식 및 떡 개발

식품으로 사용될 수 있는 소재를 대상으로 AMPK를 활성화 시키는 소재를 개발함으로써 다양한 용도 및 응용이 가능할 것으로 판단된다. 본과제에서 개발된 후보 소재를 이용하여 향후 다양한 식품에 응용하고자 한다. 기능성 발효유, 기능성 추출음료, 떡, 기능성 과자, 껌, 면류, 빵 등에서 다양하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

일차적으로 AMPK를 활성화시키는 소재를 다양하게 그리고 심도있게 활용할 수 있는 분야가 생식일 것으로 판단되어 우선적으로 적용대상으로 삼았으며 일반 떡을 제조하는 공정에 첨가하여 맛과 색상에 미치는 영향을 더불어 검토하였다.

생식에 적합만 맛과 향을 가지고 있는 AMPK를 활성화시키는 소재를 우선적으로 선별하였으며 배합기준 및 최종적인 선택은 질환동물실험을 통하여 배합비율, 맛, 색상 및 효능을 종합적으로 검토하여 최적화를 시도하였다.

이외에 상기에서 선택된 소재를 기초로 하여 가래떡을 대상으로 첨가량, 식감, 맛 및 색상에 미치는 영향을 검토하여 응용 가능성을 확인하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

당뇨와 당뇨의 원인 중 하나인 비만은 유전적 소인이 크다는 사실에 근거하여 genomics와 proteomics 기술을 활용하여 candidate gene을 찾아내는 연구가 활발히 진행되고 있다. 당뇨관련 중요 작용기전별 당뇨병치료제 개발이 거대 제약사를 중심으로 이루어지고 있다. 당뇨질환 치료제 개발의 현황에 대한 pharmaproject(2002년)조사 결과를 다음의 표에 요약하였다.

1. 작용기전별 당뇨병치료제의 개발현황

작용기전	L	III	II	I	P	선두기업
α -Glucosidase inhibitor	3				1	Bayer, Takeda, Chong Kun Dang
Insulin aginist	13	5	11	4	27	Chiron, Eli Lily, Aventis, IDEA ZymoGenetics, Novo Nordisk, Akzo Nbbel, Biobras, Alkemes, Merck KGaA
Glucagon like peptide-1 agonist		1	4	1	4	Amylin, Eli Lily, Novo Nordisk, Restoragen, Zaeland Phamaceuticals
β 3-Adrenoreceptor agonist			1	2	1	Dainippon, Asahi, GlaxoSmithKime
Dipeptidyl peptidase IV inhibitor			2		1	Bristol-Mers Squbb, Novarts
P e r o x i s o m e proliferator-activated receptor α agonist		2	2		6	Novarts, Kyonin, BMS, GlaxoSmithKime
Protein tyrosine phosphatase - 1 B inhibitor			1		7	썬소, ISIS Phamaceuticals, ontogen, Abbott, Kaken Phamaceuticals

Leptin stimulator			1		1	Amgen, Tulank
Melanocortin-4 agonist					1	Neurocnine Biosciences
Peroxisome proliferator activated receptor γ agonist	3	0	4		9	GlaxoSmithKime, Samchundang, BMS, Japan Tabacco, D-Reddts, Kyonin

2. 현재 시판되는 당뇨병 치료제의 종류와 문제점

현재 세계적으로 사용되는 당뇨병 치료제는 그 기전에 따라 크게 세 가지로 나눌 수 있다.

가. Sulfonylurea drug: 이 계통의 약물은 췌장 세포의 인슐린 분비를 촉진시키는 작용을 하고 있으나 구토 및 저혈당 증상을 일으키는 부작용이 보여진다.

나. Metformin 과 thiazolidinediones 계통의 약물들: 이 약물들은 인슐린의 표적 장기인 근육조직이나 지방조직의 인슐린 반응성을 높여주는 기능을 하고 있으나 metformin의 경우는 설사를 동반하며 thiazolidinediones 계통의 약물들은 간조직에서 심각한 부작용을 일으킨다고 보고되고 있다.

다. alpha-glucosidase 억제제: 약물들은 starch 및 다른 당의 분해를 억제하여 식후 혈당량이 증가하는 속도를 늦추는 역할을 하고 있으나 동시에 다양한 부작용 또한 보고되고 있다.

위에서 언급한 약물들이 혈당량을 조절하는 기전이 모두 다르고 또한 당뇨병의 병리기전이 매우 다양하기 때문에 이러한 약물들을 조합하여 처방될 때가 많으며 동시에 부작용의 위험을 증가시키고 있는 현실이다. 또한 이러한 약물들이 모든 당뇨병 환자에서 그 증상을 호전시키지 못하기 때문에 당뇨병 치료를 위한 새로운 약제의 개발이 끊임없이

요구되는 현실이다.

3. 시장규모

가. 주시장(국가 또는 지역) : 미국 유럽을 포함한 선진국

나. 시장규모

구 분	현재의 시장규모 (2003 년)	예상 시장규모 (2012 년)
세 계 시 장 규 모	135억불	474억불
한 국 시 장 규 모	350억원	1000억원

* 산출근거 : IMS Health report 2000 자료를 근거로 예측함.

다. 세계시장의 성격(해당란에 모두 표시)

- 안정성이 큼 ■ 영속성이 있음
- 성장성이 있음 ■ 독점성(또는 과점성)이 있음

라. 본 기술을 보유하고 있는 국내외 회사는?

5개사 미만 ■

회사 : (국명 :)외

5개사 이상 □

4. 새로운 당뇨병 치료제 개발의 국내외 상황

당뇨병의 병리기전은 매우 다양하기 때문에 이로 인해 세포내의 다양한 목표 물질을 대상으로 많은 종류의 신약 개발이 시도되고 있긴 하나 국내에서는 뚜렷한 성과가 없는 실정이다. 국내에서도 한약재나 자생식물을 포함한 천연물의 항당뇨 효과가 분석되고 있으나 당뇨 치료를 위한 세포내의 뚜렷한 목표 물질의 이해 부족으로 인해 유도체의 개발 혹은 나아

가 신약 개발로 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 이런 점에서 AMP-activated Protein Kinase와 같이 뚜렷한 목표 물질이 부각된 경우는 이를 target으로 하는 약제 개발의 성공률이 높을 것으로 예상되며 현재 외국에서도 이 molecule을 대상으로 새로운 신약 개발이 이제 시도되고 있는 실정이다.

최근 애보트사에서는 AMPK 활성화제 및 저해제를 검색할 수 있는 microarrayed compound screening 방법을 개발하였다고 보고하였다. 그러나 이 방법은 기존의 방사선 동위원소법을 개량하여 대량검색을 하고자 하였으나 본 과제에서 개발하고자하는 방법하고는 상이할 뿐 아니라 동일하게 동위원소를 사용하는 단점을 갖고 있다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 식품소재를 기초로 한 추출물 library 구축

산야채류, 과일류, 곡류, 해산물, 식용한약재 및 기타 등을 대상으로 하여 식품 추출물 library를 구축하였다. 예상 목표치에 해당하는 식품관련 소재를 대상으로 한 library를 구축하였으며 이들 라이브러리를 대상으로 근육세포를 이용하여 독자적으로 개발한 AMPK ELISA assay system으로 검색하였다. 라이브러리 구축은 식품소재를 구입하여 메탄올을 원료대비 10배 이상을 가하여 72시간 이상 상온에서 주기적으로 진탕하면서 추출하였다. 고형분과 추출상등액을 여과하여 분리한 후 50도에서 진공 농축하였다. 농축물을 라이브러리 vial에 옮겨 4도에서 보관하여 실험에 사용하였다.

제 2 절 AMPK를 활성화 시키는 소재 선별

AMPK 활성 측정은 독자적으로 개발한 AMPK ELISA assay 방법을 도입하여 근육세포와 콜론세포를 이용하여 AMPK의 활성을 측정하였다. 대조군 대비 1.5배 이상의 활성을 보이는 소재 57개를 일차 선발대상으로 하였다. 이들을 대상으로 포도당 흡수를 촉진시키는 정도를 확인하였다

일련번호	AMPK assay	glucose uptake	일련번호	AMPK assay	glucose uptake
F 0018	2.7	1.5	F 0364	2.4	1
F 0023	2.4	2	F 0381	2.0	1
F 0024	3.0	1.5	F 0385	1.5	1
F 0025	1.6	1.3	F 0392	2.7	1

F 0029	2.1	1.2	F 0394	1.5	1
F 0040	2.4	2.2	F 0396	1.7	1
F 0054	1.6	1.4	F 0397	1.9	1
F 0070	1.5	1.6	F 0401	1.8	1
F 0075	1.9	1.5	F 0417	1.5	2.5
F 0089	1.8	1.6	F 0428	1.5	1
F 0101	2.0	1.5	F 0435	2.2	1.5
F 0176	2.7	1.9	F 0448	1.7	1
F 0213	1.6	1.3	F 0450	1.5	1
F 0218	1.6	1	F 0453	1.8	1
F 0259	1.7	1	F 0465	1.9	1
F 0260	2.2	1	F 0470	2.8	1
F 0263	2.1	1	F 0471	2.9	1.5
F 0267	1.9	1	F 0474	1.6	1
F 0269	1.6	1	F 0475	1.8	1.5
F 0276	2.4	1.5	F 0476	1.9	1
F 0297	1.5	1	F 0477	2.6	1.5
F 0298	1.6	1	F 0478	2.5	1
F 0300	1.8	1	F 0480	2.23	1
F 0316	1.5	1	F 0482	3.26	1.5
F 0320	2.7	1	F 0485	2.26	1
F 0321	2.6	1	F 0487	2.74	1.2
F 0324	2.2	1	F 0493	1.70	1
F 0326	2.3	1	F 0496	2.42	1.5
F 0330	2.8	1.5	F 0534	3.64	1.6
F 0332	1.6	1	F 0536	1.52	2
F 0334	1.5	1	F 0539	3.00	1.2
F 0335	2.2	1	F 0546	4.04	1

F 0338	1.6	1	F 0548	2.72	1
F 0339	1.5	1	F 0552	2.39	1.5
F 0341	2.3	1			

제 3 절 비만, 당뇨병 동물모델을 이용한 효력실험

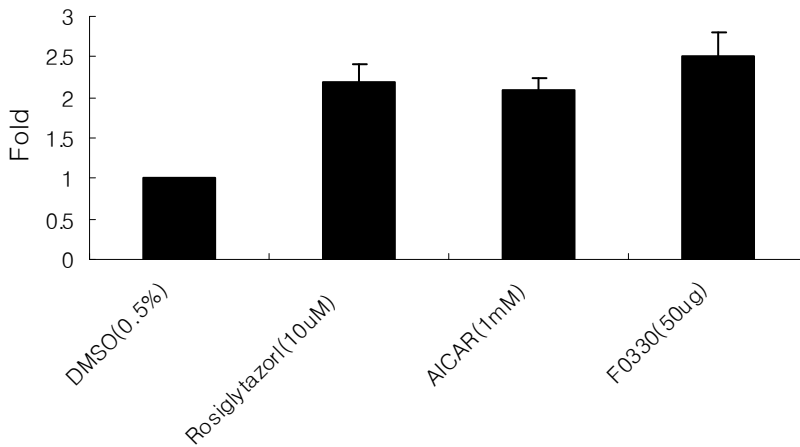
이들 중에서 일부를 현재 동물실험을 통하여 비만과 혈당의 변화를 db/db & ob/ob 마우스와 zucker fa/fa rat을 이용하여 in vivo에서의 효능을 평가하여 in vitro 후보들 중에서 in vivo에 활성이 있는 소재를 선정하고자 하였다.

한편 in vitro에서의 활성은 좋으나 동물실험에서 효과를 보이지 않는 소재들의 활성 여부를 재확인하기 위하여 당사가 개발한 흡수촉진제와 formulation을 하여 흡수 문제로 인한 효능평가의 장애여부를 확인하고자 한다

1. F0330 후보소재의 효력실험

가. 세포에서의 AMPK 및 포도당 흡수 활성

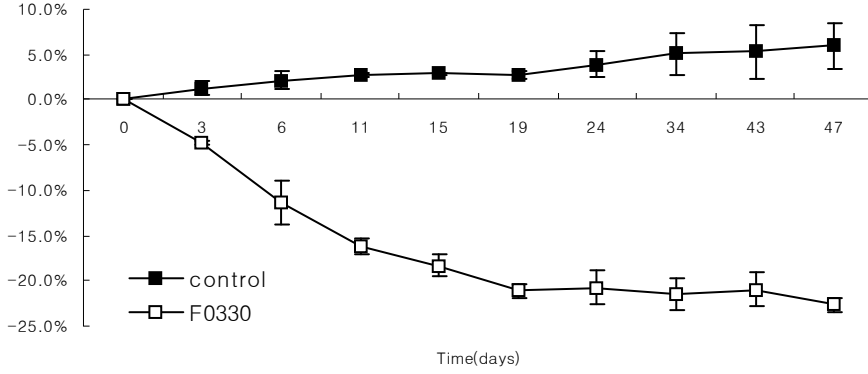
F0330(하수오)의 근육세포에서의 AMPK를 인산화시키는 활성을 양성 대조군인 AMP의 아날로그인 AICAR와 당뇨병 치료제로 사용 중인 PPAR γ agonist인 rosiglitazone을 사용하여 AMPK의 활성정도를 비교하였다. F0330의 AMPK를 효과적으로 활성화 시키는 것을 확인하였다. 한편 F0330의 포도당 흡수 촉진에 미치는 영향을 근육세포를 이용하여 확인한 결과 효과적으로 포도당의 흡수를 촉진시키는 것으로 확인되어 당 소재를 이용하여 향후 실험을 진행하기로 하였다.



나. Zucker fa/fa rat에서 항비만 및 항당뇨 효과 측정

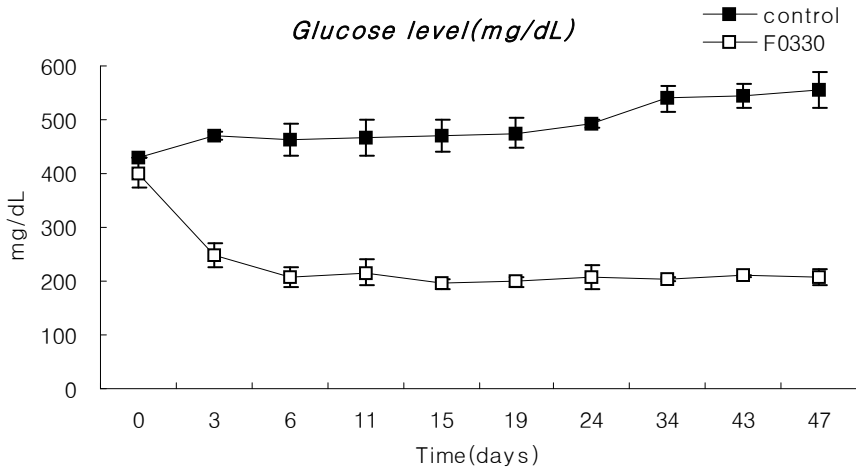
F0330 메탄올 추출물을 비만 당뇨 모델인 Zucker fa/fa rat에서 항비만 및 항당뇨 효과를 *in vivo*에서 확인하고자 하였다. F0330원료를 주정으로 추출한 후 고형분을 제거하고 농축 건조하였다. F0330을 경구투여하여 항비만 및 항당뇨 효과를 확인하고자 하였다. F0330의 투여 후 식이섭취량의 변화와 더불어 체중의 감소가 일어나는 것으로 판단되며 이는 AMPK가 식이섭취와 연관성이 있다는 보고와 일치하는 것으로 판단된다. F0330의 경우 식품에서 사용되는 소재이며 안전한 소재로서 입증되어 있으나 이들이 물이 아닌 용매 추출에 의한 추출물이므로 독성에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

체중감소율(%)



F0330은 항비만 뿐 아니라 항당뇨효과가 우수한 것으로 확인되어 비만과 당뇨를 동시에 조절할 수 있는 전천 후 소재인 것으로 판단된다. 혈당의 변화를 보면 대조군에 비하여 혈당의 변화가 유의성 있게 감소되며 시간의 경과에 따라 당의 변화가 안정적으로 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 한편 혈당과 체중의 변화가 동일한 경향성을 나타내는 것으로 판단된다.

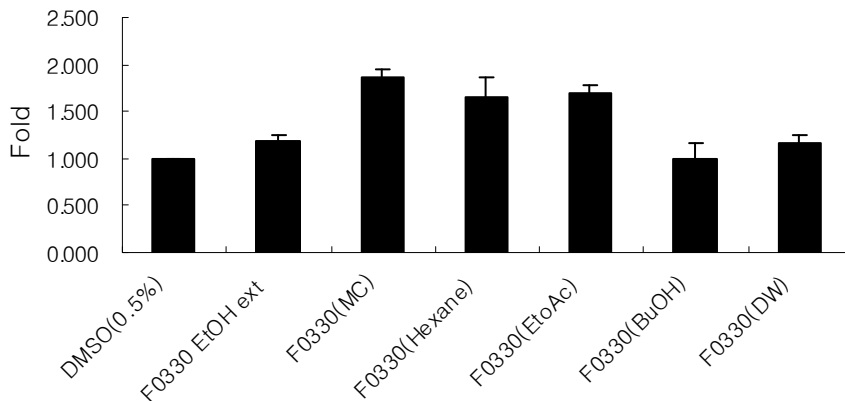
Glucose level(mg/dL)



다. F0330 분획의 AMPK 활성

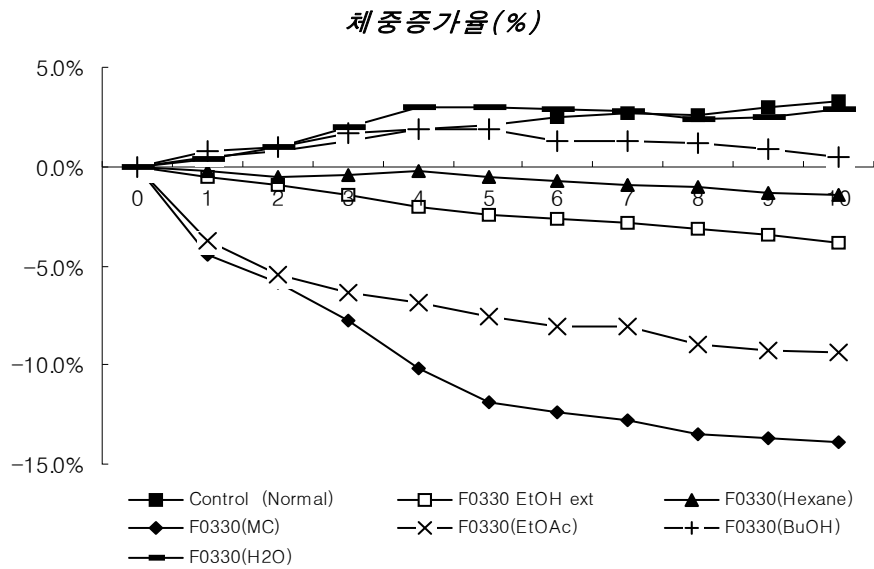
F0330의 경우 비만과 당뇨 모두에서 탁월한 효능이 있는 것으로 확인이 되어 활성물질의 규명을 위하여 정제공정을 시작하였으며 정제 방법은 일반적인 방법에 의거하여 실시하고자 하였다. 현재 F0330에탄올 추출물을 용매별로 분획하여 AMPK 활성과 항당뇨 및 비만과의 연계성이 있는가를 확인하고자 하였다. 분획별 AMPK 활성을 측정한 결과 methylen chloride 분획에서 AMPK를 가장 활성화 시키는 것으로 확인되었다.

AMPK ELISA(Colon26-M3.1)



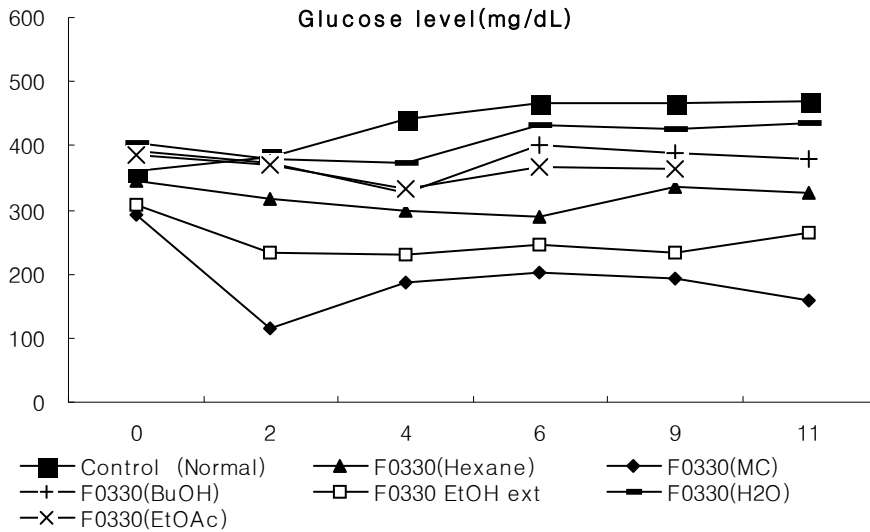
라. F0330 분획의 항비만 효과

F0330의 용매별 분획을 ob/ob 마우스에 경구 투여하여 체중의 변화를 측정하였다. 아래의 표와 그림의 결과에서 보듯이 메탄올, 헥산, 메틸렌 클로라이드와 에틸아세테이트 분획에서 항비만 활성이 확인되었으며 특히 메틸렌클로라이드와 에틸아세테이트 분획에서 활성이 가장 높은 것으로 확인되었는데 이는 AMPK의 활성과 일치하는 것으로 나타났다.



마. F0330분획의 항당뇨효과

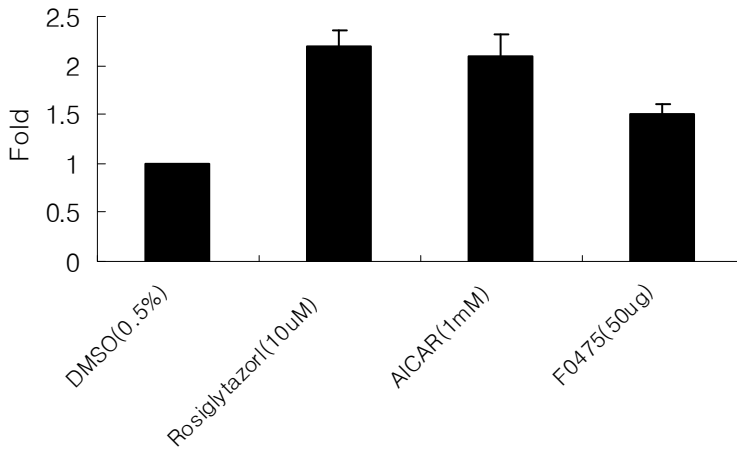
F0330의 용매 분획을 이용하여 비만 당뇨 질환 모델인 db/db 마우스를 이용하여 항당뇨효과를 평가하였다. F0330의 용매별 항당뇨 활성이 AMPK의 활성과의 연관성을 확인한 결과 AMPK의 활성 의존적으로 실제적으로 in vivo에서 혈당강하 효과가 있음을 확인하였다. 특히 메틸렌클로라이드 분획에서 항당뇨 활성이 가장 높은 것으로 확인되었으며 당 분획을 이용하여 silica 분획을 하여 활성의 변화를 확인하고자 한다. 따라서 F0330의 항당뇨 및 항비만 활성은 AMPK 의존적인 활성을 in vivo에서도 갖고 있는 것으로 확인되었다.



2. F0475 후보소재의 효력실험

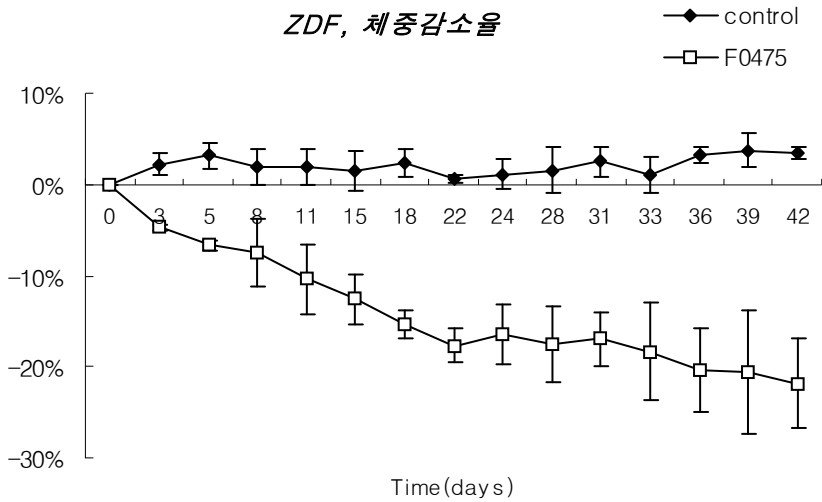
가. 세포에서의 AMPK 및 포도당 흡수 활성

F0475의 근육세포에서의 AMPK를 인산화시키는 활성을 양성 대조군인 AMP의 아날로그인 AICAR와 당뇨병 치료제로 사용 중인 PPAR γ agonist인 rosiglitazone을 사용하여 AMPK의 활성정도를 비교하였다. F0475의 AMPK를 효과적으로 활성화 시키는 것을 확인하였다. 한편 F0475의 포도당 흡수 촉진에 미치는 영향을 근육세포를 이용하여 확인한 결과 효과적으로 포도당의 흡수를 촉진시키는 것으로 확인되어 당 소재를 이용하여 향후 실험을 진행하기로 하였다.

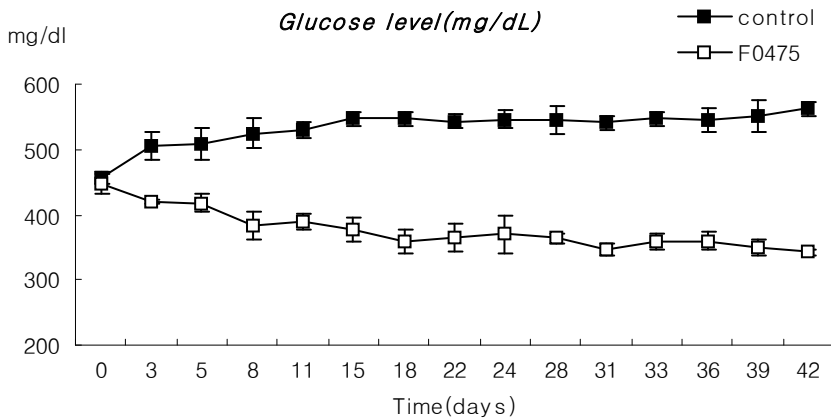


나. Zucker fa/fa rat에서 항비만 및 항당뇨 효과 측정

F0475 메탄올 추출물을 비만 당뇨 모델인 Zucker fa/fa rat에서 항비만 및 항당뇨 효과를 *in vivo*에서 확인하고자 하였다. F0475원료를 주정으로 추출한 후 고형분을 제거하고 농축 건조하였다. F0475을 경구투여하여 항비만 및 항당뇨 효과를 확인하고자 하였다. F0475의 투여 후 식이섭취량의 변화와 더불어 체중의 감소가 일어나는 것으로 판단되며 이는 AMPK가 식이섭취와 연관성이 있다는 보고와 일치하는 것으로 판단된다. F0475의 경우 식품에서 사용되는 소재이며 안전한 소재로서 입증되어 있으나 이들이 물이 아닌 용매 추출에 의한 추출물이므로 독성에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다.



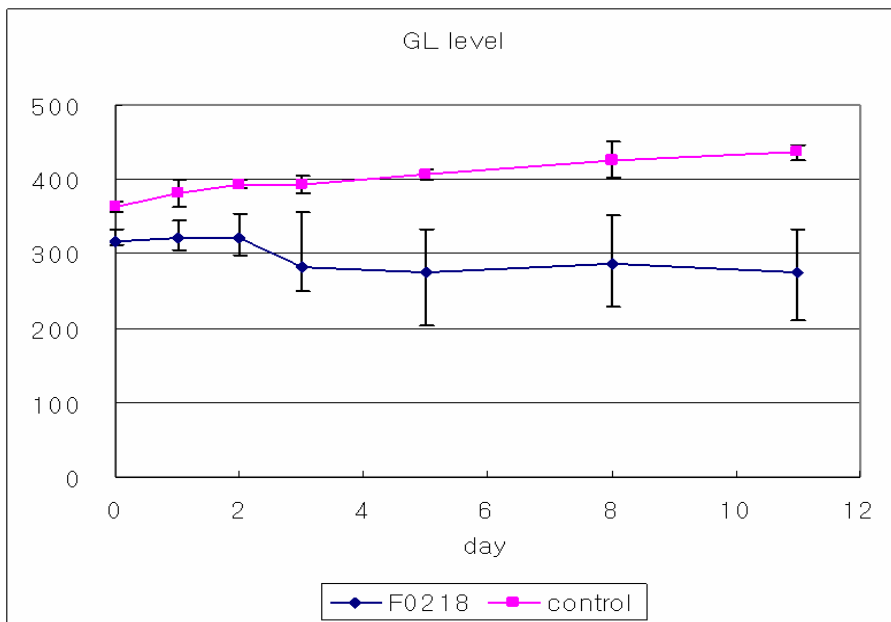
F0475은 항비만 뿐 아니라 항당뇨효과가 우수한 것으로 확인되어 비만과 당뇨를 동시에 조절할 수 있는 전천 후 소재인 것으로 판단된다. 혈당의 변화를 보면 대조군에 비하여 혈당의 변화가 유의성 있게 감소되며 시간의 경과에 따라 당의 변화가 안정적으로 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 한편 혈당과 체중의 변화가 동일한 경향성을 나타내는 것으로 판단된다.



3. F0218 후보소재의 효력실험

가. STZ 유발 당뇨병환 모델에 미치는 항당뇨효과

일본 SLC사 6주령 Crl:CD(SD) rat 수컷을 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주며 5일에 적응기간을 가졌다. 적응 후 streptozotocin(STZ)를 60mg/kg 으로 유발시켜 10일이 지나고 실험을 시작했다. 사료는 고형사료(5053, Labdiet)를 사용하였다. 대조군, F218추출물 두 군으로 나뉘었으며 F218 400mg/kg 을 경구투여 하였다. 실험은 20일간 진행하였다.



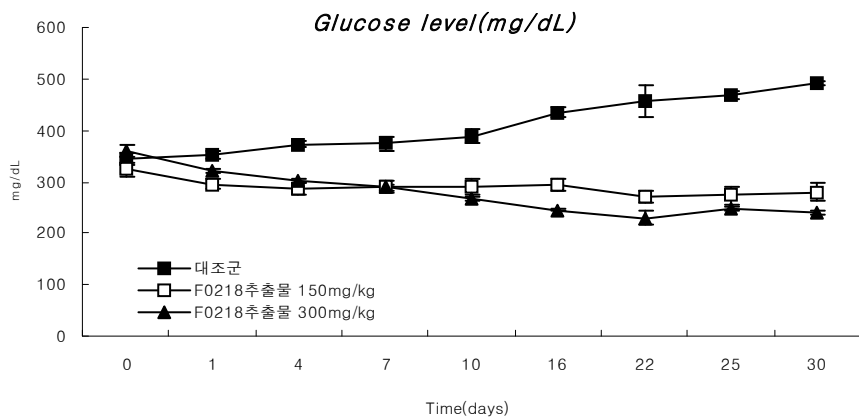
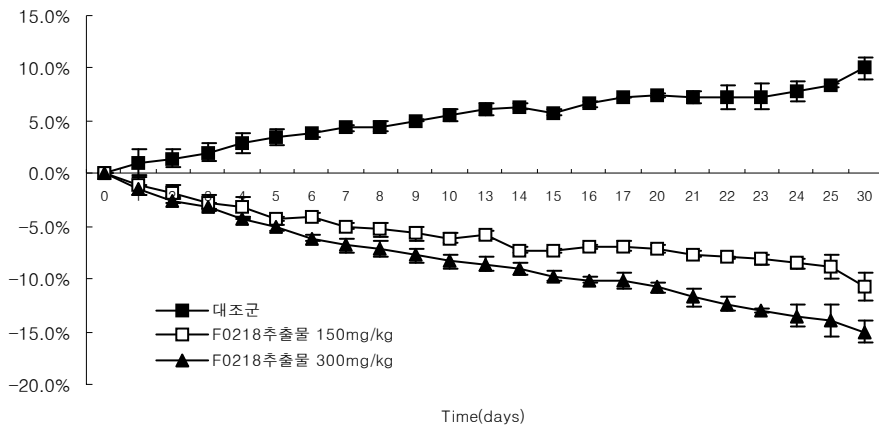
나. 2형당뇨 db/db 마우스의 혈당조절에 미치는 F218추출물의 영향

일본 SLC사 10주령 db/db mice 수컷을 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기

로 명암을 바꾸어 주며 5일에 적응기간을 가졌다. 사료는 고품사료(5053, Labdiet)를 사용하였다. 대조군 및 F218 추출물 150mg/kg, 그리고 300mg/kg 등 3군으로 나뉘었으며 시료는 경구 투여하였다. 대조군은 F218에 첨가한 부형제를 생리식염수에 녹여 투여하였다. 실험은 4주 동안 진행 후 종료하였다

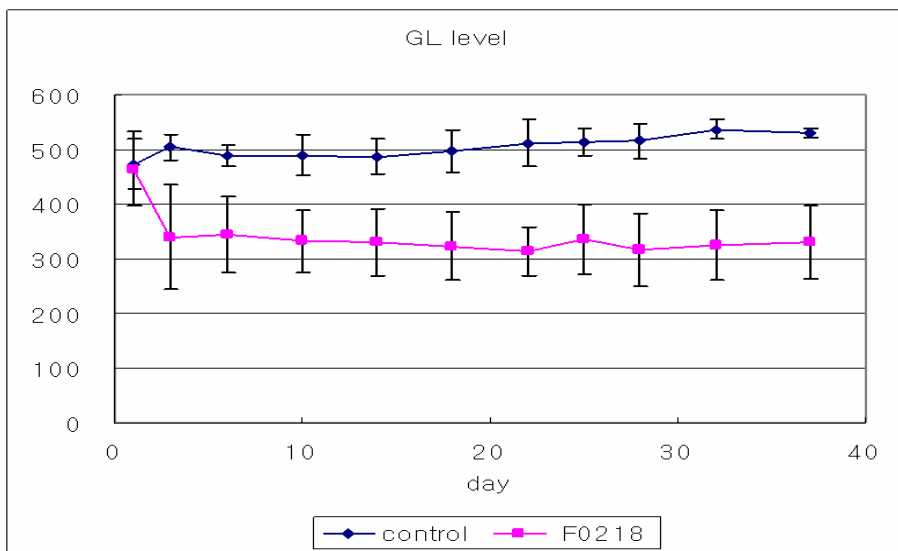
하기의 결과는 F218추출물 투여에 의한 db/db 마우스에서의 체중감소 및 혈당조절 결과이다.

2형당뇨 db mice, 체중증가율(%)



다. 2형 당뇨 동물모델인 ZDF RAT의 혈당조절에 미치는 영향

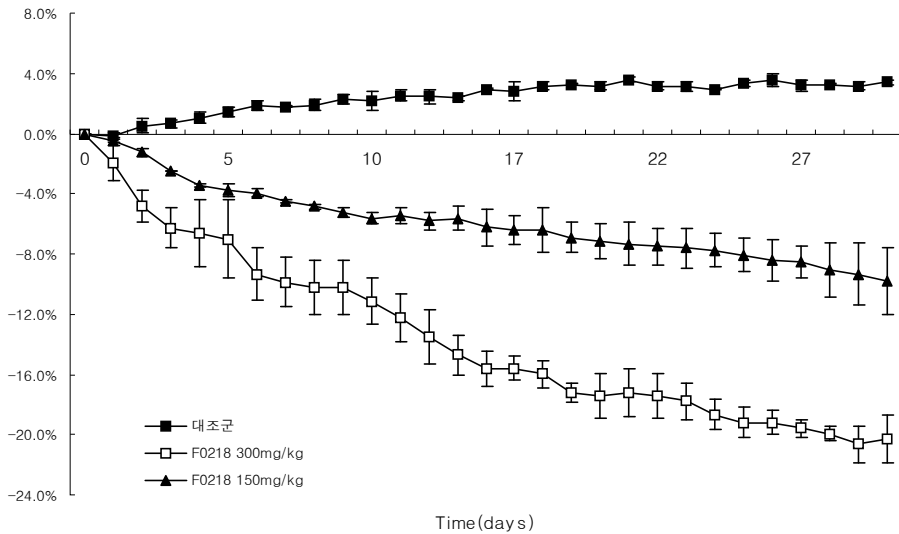
찰스리버사 10주령 ZDF rat 수컷을 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주며 5일에 적응기간을 가졌다. 사료는 고탄사료(5053, Labdiet)를 사용하였다. 대조군, F218 추출물 두 군으로 나뉘었으며 F218 400mg/kg을 경구투여하며 자유급식하였다. 실험은 40일간 진행 후 종료하였다.



라. 비만 동물 모델 ob/ob 마우스의 체중조절에 미치는 영향

10주령 C57BL/6J-ob/ob mice 수컷을 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주며 5일에 적응기간을 가졌다. 사료는 고품사료(5053, Labdiet)를 사용하였다. 대조군, F218추출물(150mg/kg, 300mg/kg) 3군으로 나뉘었으며 시료는 경구투여 하였다. 실험은 30일간 진행 후 종료하였다.

ob mice , 체중증가율(%)



마. 지구력(Endurance)에 미치는 F218추출물의 영향

AMPK가 생체내의 에너지 대사에 중요한 역할을 하는 것으로 보고 되었으며 따라서 AMPK를 활성화시키는 약물이 당대사 뿐 아니라 지구력 등에도 영향을 미칠 것으로 판단되어 F218추출물이 지구력에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

Panlab s.l - Smart version 2.5

Forced Swimming Test

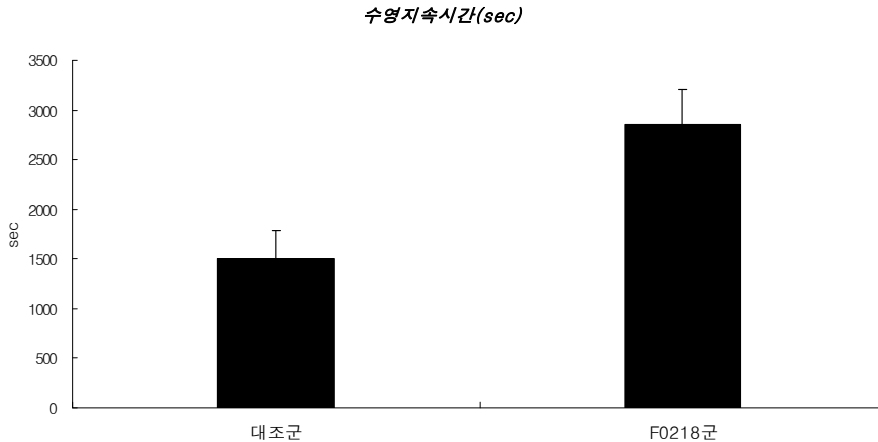
Mouse를 깊이 26cm, 폭 10cm chamber에 Forced swimming test 실시
물온도 - 25~30도,

Treatment Time -F218 투여 후 3hr,

Age - lean mouse 8주령,

Sex - male (18~20g)

일본 SLC사 8 주령 C57BL/6 수컷을 온 도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주며 5일에 적응기간을 가졌다. 적응기가 끝난 후 대조군, 부형제군, 그리고 F218추출물(30mg/kg)군 3군으로 나누어 실험을 실시하였다. 샘플 단회투여 후 3시간 사료 공급을 제한한 후 Forced swimming test를 실시하였다.



바. 활동성(Activity)에 미치는 영향

AMPK 활성화제가 지구력 뿐 아니라 활동에 대해서도 긍정적인 영

향을 미칠 것으로 판단되어 F218 추출물이 활동성에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

Med Associates' Activity Monitor **version5.**

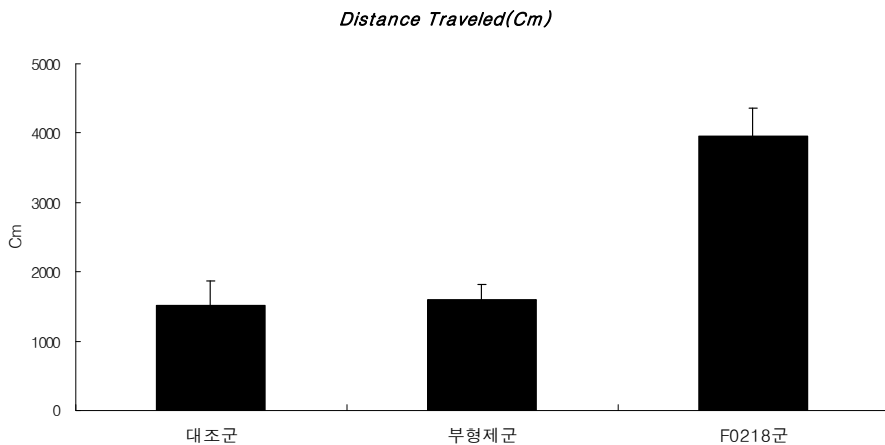
Actual Run Time : 720min.

Data Save Interval : 600sec.

Units : Cm

Detail Reporting Mode : Absolute

F218 추출물을 투여하고 3시간 후부터 12시간(PM 8:00부터 AM 8:00까지)을 operation 하였다. 일본 SLC사 8 주령 C57BL/6 수컷을 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주며 5일에 적응기간을 가졌다. 적응기가 끝난 후 대조군, 부형제군, 그리고 F218추출물(30mg/kg)군 3군으로 나누어 실험을 실시하였다. 샘플 단회투여 후 3시간 사료 공급을 제한한 후 활동성을 측정하였다.



제 4 절 활성물질 분리정제

1. F0475의 활성물질 분리정제

가. F0475 화합물 분리

F0475 건량 4.9kg을 MeOH로 1주일간 3회추출하여 그 추출액을 rotary vacuum evaporator로 농축하여 MeOH추출물 1.2kg을 얻었다. MeOH추출물을 물에 녹여 여기에 n-Hexane를 가하여 분획깔대기로 n-Hexane과 수층으로 분획한 다음 n-Hexane층을 감압농축하여 n-Hexane extract(86.39g)을 얻었고 다시 수층은 상기와 같은 방법으로 CHCl_3 , EtOAc, n-BuOH순으로 추출하여 CHCl_3 extract 388.79g, EtOAc extract 15.25g, n-BuOH extract 77.74g 과 H_2O extract 632g을 얻었다. 이중 CHCl_3 분획(200g)을 silica gel column chromatography 하였다. 용매 Hexane : EtOAc = 10:1~8:2 gradient를 사용하여 9개의 소분획으로 나눈 다음 이중 5번 소분획을 다시 Hexane : EtOAc = 10:0.2 용매로 silica gel column chromatography 하였다. 이렇게 하여 얻어진 5개의 소분획으로 나눈 뒤 이중 5-3번 소분획을 MeOH:H₂O=1:1~6:4 gradient 용매를 사용하여 RP-18 column chromatography하여 compound 1(60mg)을 분리하였고 5-5번 소분획을 다시 Hexane : EtOAc = 4 : 1 용매로 silica gel column chromatography 하여 compound 3(1g)를 분리하였으며 5-4번 소분획을 silica gel column을 이용해 용매 hexane : EtOAc = 5 : 1 하에서 chromatography하였다. 그 결과 compound 2(20g)를 얻었다. 또한 7번 소분획을 용매 H₂O:MeOH (gradient)를 사용하여 RP-18 column chromatography하였다. 그 결과 compound 4 (2g)을 분리하였다.

나. F0475 화합물의 구조동정

F0475 Compound 1 ; mp: 109°C; ¹H-NMR(400MHz, CDCl₃) δ:1.70(3H, s, H-6''), 1.80(3H, s, H-5''), 4.92(2H, d, J=7.2Hz, H-2''),

5.54(1H, t-like, $J=7.2\text{Hz}$, H-3''), 6.27(1H, d, $J=10\text{Hz}$, H-3), 6.96(1H, d, $J=2.4\text{Hz}$, H-3'), 7.16(1H, s, H-8), 7.60(1H, d, $J=2.4\text{Hz}$, H-2'), 8.16(1H, d, $J=10\text{Hz}$, H-4)

$^{13}\text{H-NMR}(100\text{MHz}, \text{CDCl}_3)\delta$:161.5(C-2), 158.3(C-7), 152.9(C-9), 149.2(C-5), 145.1(C-2'), 140.1(C-4''), 139.8(C-4), 119.3(C-3''), 114.4(C-6), 112.8(C-3), 107.7(C-10), 105.3(C-3'), 94.4(C-8), 69.9(C-2''), 26.1(C-6''), 18.5(C-5'')

F0475Compound 2 ; mp: 102°C ; $^1\text{H-NMR}(400\text{MHz}, \text{CDCl}_3)\delta$:1.72(3H, s, H-6''), 1.74(3H, s, H-5''), 5.01(2H, d, $J=7.2\text{Hz}$, H-2''), 5.61(1H, t-like, $J=7.2\text{Hz}$, H-3''), 6.37(1H, d, $J=9.4\text{Hz}$, H-3), 6.82(1H, d, $J=2.4\text{Hz}$, H-3'), 7.36(1H, s, H-5), 7.69(1H, d, $J=2.4\text{Hz}$, H-2'), 7.76(1H, d, $J=9.4\text{Hz}$, H-4)

$^{13}\text{H-NMR}(100\text{MHz}, \text{CDCl}_3)\delta$:160.8(C-2), 148.8(C-7), 146.8(C-9), 144.6(C-8), 144.0(C-2'), 140.0(C-4''), 131.9(C-4), 126.1(C-3''), 120.0(C-6), 116.7(C-3), 114.9(C-10), 113.4(C-3'), 106.9(C-5), 70.4(C-2''), 26.0(C-6''), 18.3(C-5'')

F0475 Compound 3: mp. 82-83 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.65 (3H, s, H-5'), 1.82 (3H, s, H-4'), 3.51 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1'), 3.90 (3H, s, 7-OMe), 5.20 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-2'), 6.21 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-3), 6.81 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6), 7.27 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 7.59 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-4)

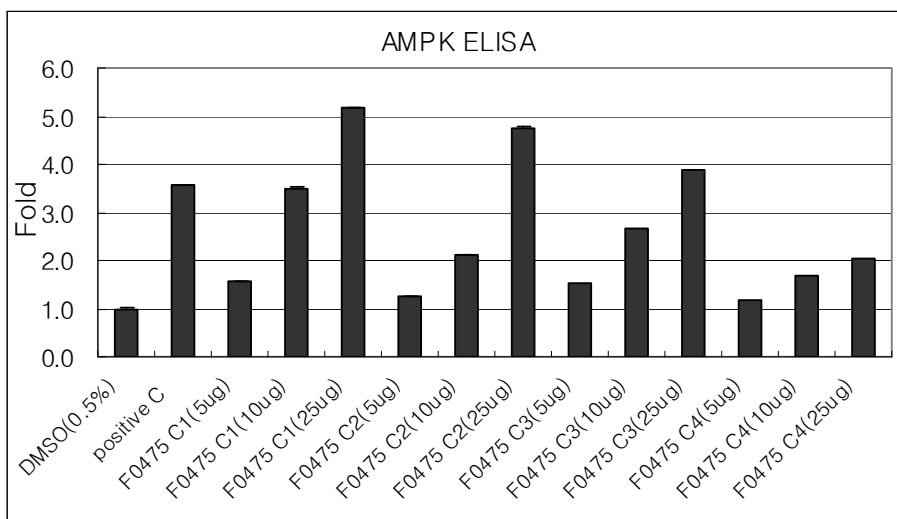
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 161.6 (C-2), 160.4 (C-7), 153.0 (C-9), 144.0 (C-4), 132.9 (C-3'), 126.4 (C-5), 121.3 (C-2'), 118.2 (C-8), 113.2 (C-10), 113.2 (C-3), 107.5 (C-6), 56.3 (7-OMe), 26.1 (C-5'), 22.1 (C-1'), 18.2 (C-4').

F0475 Compound 4 ; $^1\text{H-NMR}(400\text{MHz}, \text{CDCl}_3)\delta$:1.34(3H, s, gem- CH_3), 1.36(3H s, gem- CH_3), 1.85(3H, s, 4''- CH_3), 2.12(3H, s,

3''-CH₃), 2.84(1H, dd, J=17.0 and 4.8Hz, H-4'_b), 3.17 (1H, dd, J=17.0, 4.8Hz, H-4'_a), 5.06(1H, t, J=4.6Hz, H-3'), 5.64(1H, s, H-2''), 6.20(1H, d, J=9.2Hz, H-3), 6.77(1H, s, H-8), 7.12(1H, s, H-5), 7.56(1H, d, J=9.2Hz, H-4)

¹³C-NMR(100MHz, CDCl₃)δ:166.0(C-1''), 161.6(C-2), 158.7(C-3''), 156.7(C-7), 154.4(C-9), 143.4(C-4), 128.9(C-5), 116.0(C-6), 115.7(C-2''), 113.5(C-3), 113.0(C-10), 104.9(C-8), 76.9(C-2'), 69.3(C-3'), 28.1(C-4'), 27.7(4''-CH₃), 25.2(gem-CH₃), 23.4(gem-CH₃), 20.6(3''-CH₃)

다. F0475 single compound 별 AMPK 활성



라. F0475분리 물질의 효능평가

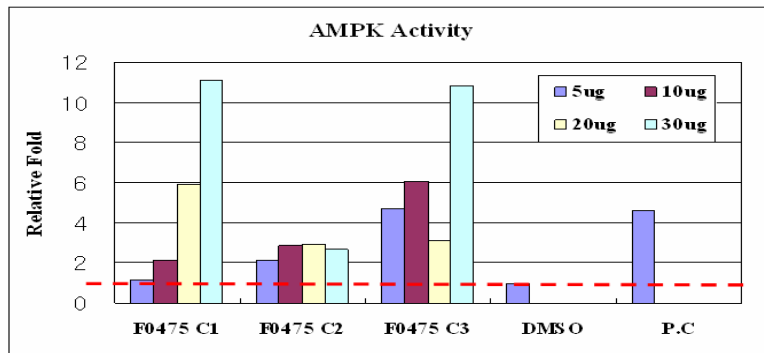
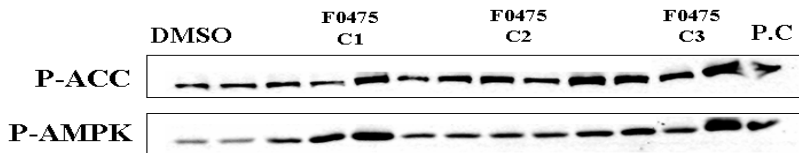
1) 분리물질의 당뇨 관련성 실험

F0475로부터 분리 정제한 단일화합물F475-C1부터 F475-C3의 화합물을 대상으로 AMPK의 활성을 측정 한 결과 F475-C1, F475-C2, F475-C3의 세 개의 단일화합물에서 AMPK를 활성화시키는 것으로 확인되어 이들

을 대상으로 p-AMPK, p-ACC, Akt, 포도당 흡수 등을 확인하여 당뇨관련 성이 있는지를 확인하고자 하였다.

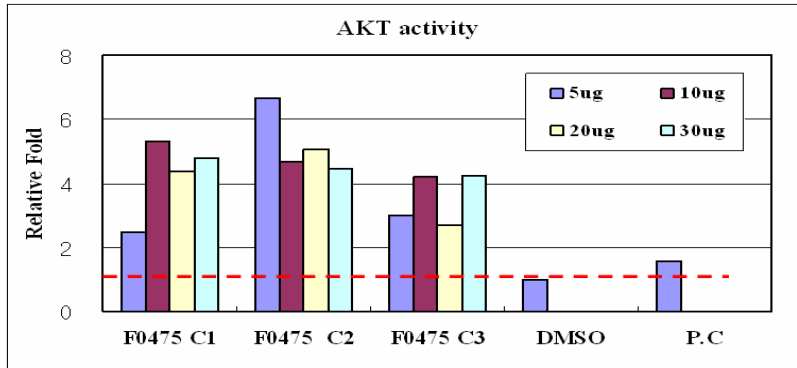
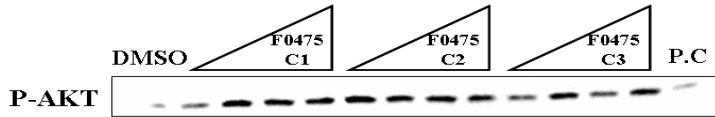
AMPK는 인산화에 의해서 활성을 나타내는데 인산화된 AMPK는 지방합성효소인 Acetyl-CoA Carboxylase를 인산화시켜 지방합성을 억제시키는 것으로 알려지고 있다. 한편 AMPK는 근육세포에서의 포도당의 흡수를 위하여 GLUT1, 4의 세포막으로의 이동을 위해 Akt를 활성화시키는 것으로 알려지고 있다. 따라서 furanocoumarin 유도체의 GLUT1, 4의 세포막으로의 이동을 유도하기위한 Akt의 활성화를 촉진시키는지 농도별로 확인하였다. 한편 Akt의 활성화로 실제적으로 근육세포에서 포도당의 흡수가 촉진되는지를 확인하였다. furanocoumarin 유도체사이의 활성에서의 차이는 있지만 포도당 흡수촉진에 관여하는 단백질을 활성화시켰으며 포도당의 흡수 또한 촉진시켜 당대사 조절에 유효할 것으로 판단된다.

■ AMPK 및 ACC의 인산화에 미치는 영향



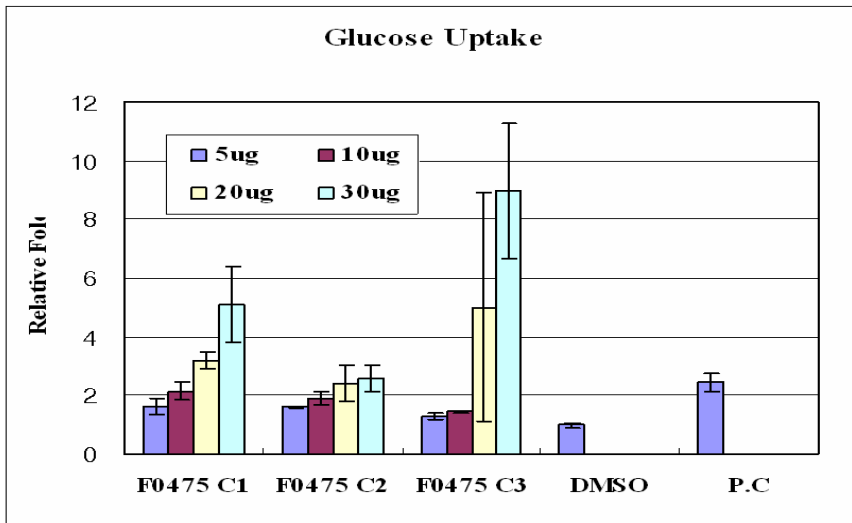
▲ : 5,10,20,30 µg P.C : Positive Control

■ AKT의 인산화에 미치는 영향



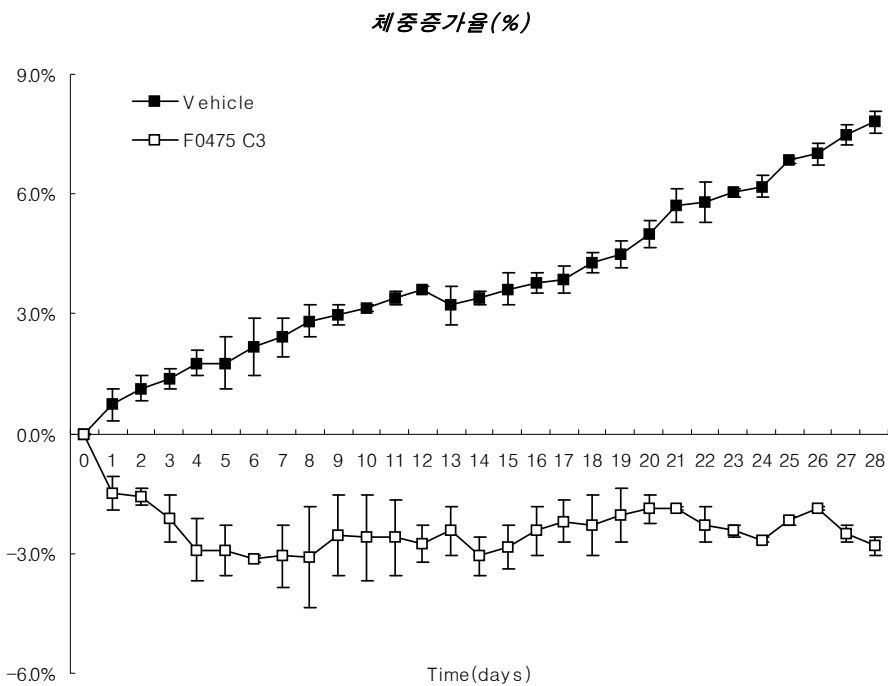
▲ : 5,10,20,30 μg P.C : Positive Control

■ 근육세포에서 포도당 흡수에 미치는 영향



2) 비만질환동물인 ob/ob mice의 체중조절 영향

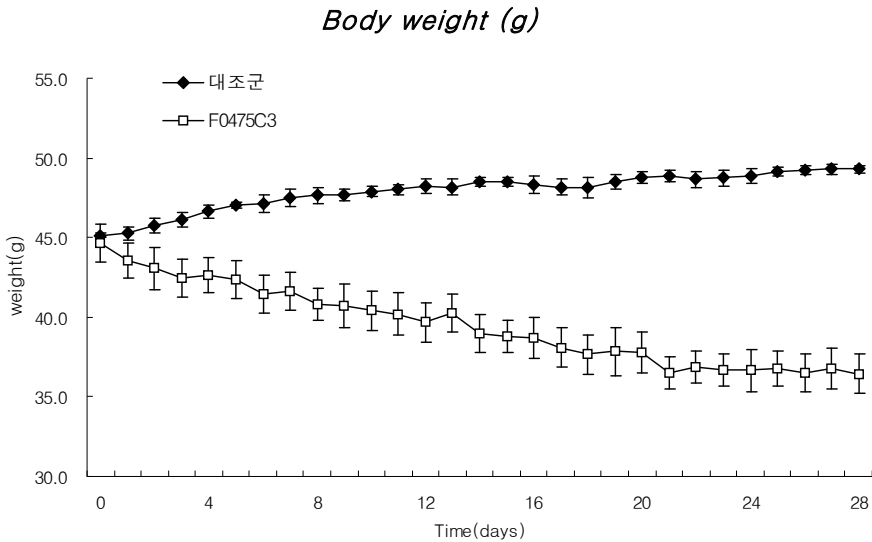
10주령 C54BL/6J-ob/ob mice 수컷을 온도 22±2℃, 습도55±5% 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주며 5일에 적응기간을 가졌다. 사료는 고형사료를 사용하였다. Vehicle, F0475C3 300mg/kg 2군으로 나뉘었으며 샘플은 oral투여하였다. 실험은 28일간 진행 후 종료하였다.



3) 비만유도질환 동물인 DIO mice의 체중조절 영향

4주령된 C54BL/6J mice 수컷을 온도 22±2℃, 습도55±5% 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주며 5일에 적응기간을 가졌다. 사료는 45kcal% fat 고지방사료(D12451, Research diet사)를 사용하였다. 10주간 고지방식으로 DIO(Diets induced obesity)를유도 시킨 후 체중 45g 이상인 동물을 난괴법으로 선별 후 대조군, F0475C3 150mg/kg 2군으로 나뉘

으며 샘플은 oral 투여하였다. 실험은 28일 진행하였다.

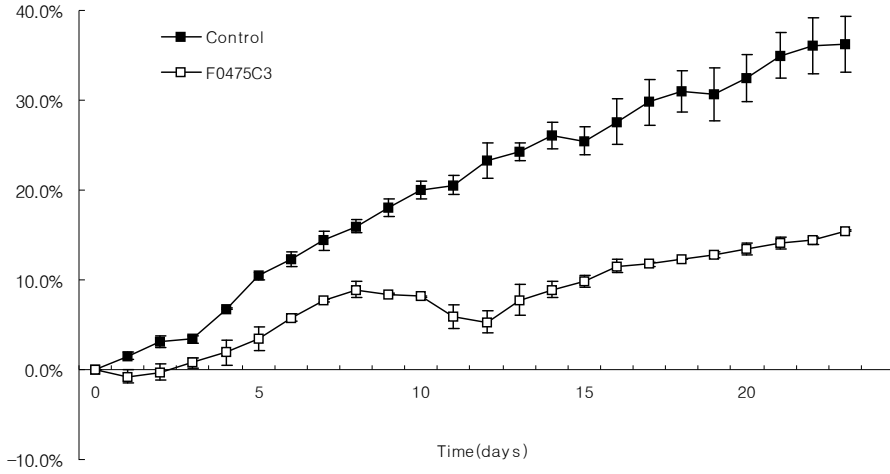


4) 2형당뇨질환동물인 ZDF rat에서의 당뇨 영향

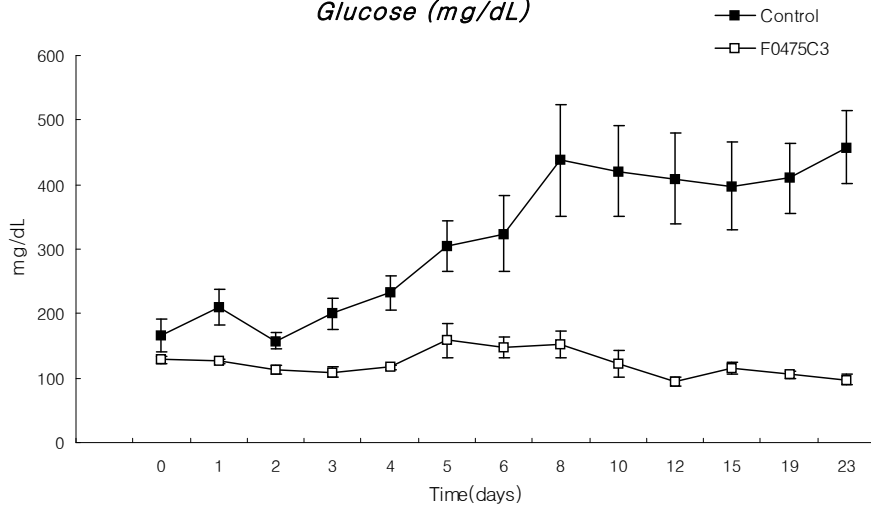
6주령 ZDF rat 수컷을 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주며 5일에 적응기간을 가졌다. 사료는 고탄사료(5053, Labdiet)를 사용하였다. 대조군, F0475C3 400mg/kg 2군으로 나뉘었으며 sample은 oral 투여중이다. 이 실험은 2형당뇨질환 예방실험을 목적으로 하고 있다. 실험은 25일차 진행 중이다.

실험결과 유전적으로 변형된 비만, 당뇨 질환 동물에서 F0475C3 투여 시 혈당이 증가하기 전에 예방 측면에서 투여한 경우 매우 효과적으로 혈당이 조절되는 것을 확인하여 치료 및 예방 모두에서 효과적인 약물로서의 가능성을 확인하였다.

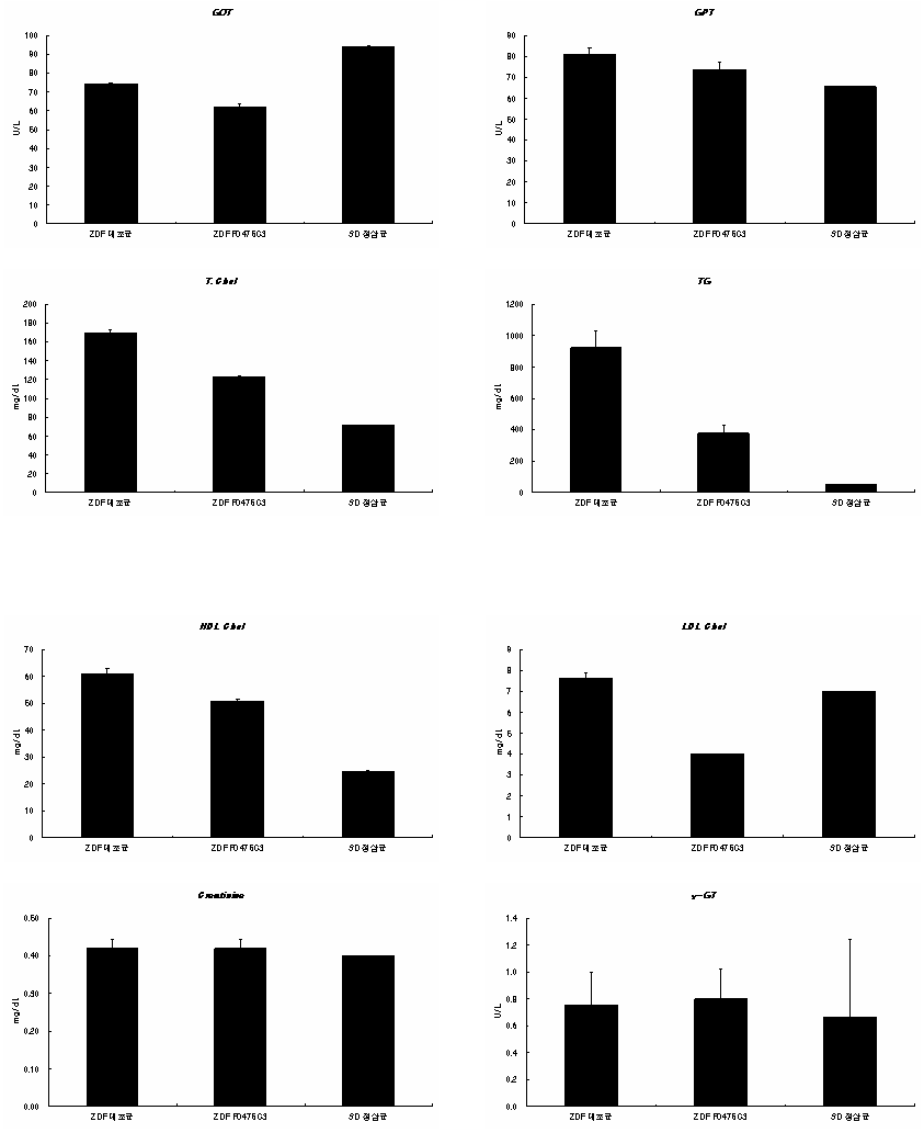
체중증가율(%)



Glucose (mg/dL)



5) 2형당뇨질환동물인 ZDF rat에서의 혈액 분석



2. F0218의 활성물질 분리정제

가. F0218 화합물 분리

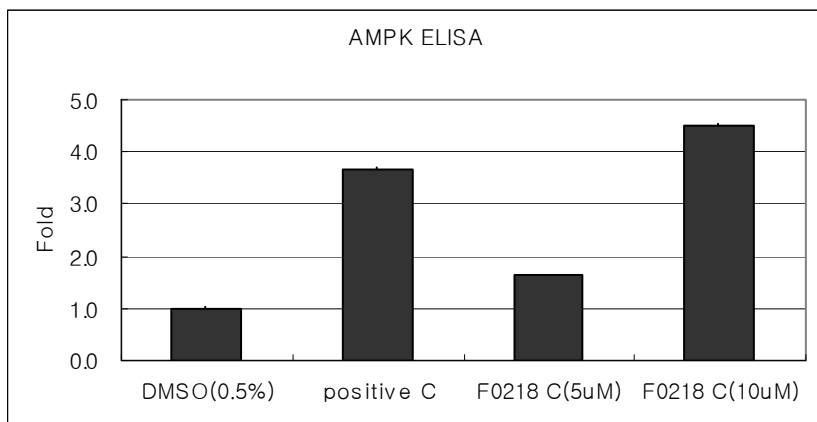
F0218를 MeOH로 1주일간 3회추출하여 그 추출액을 rotary vacuum evaporator로 농축하여 MeOH추출물을 얻었다. MeOH추출물을 물에 녹여 여기에 n-Hexane를 가하여 분획깔대기로 n-Hexane과 수층으로 분획한 다음 n-Hexane층을 감압농축하여 n-Hexane extract를 얻었고 다시 수층은 상기와 같은 방법으로 CH₂Cl₂, EtOAc, BuOH순으로 단계적으로 분획하여 각각의 분획물을 얻었으며 이중 CH₂Cl₂분획물을 silica gel column chromatography하였다. CH₂Cl₂ : MeOH gradient용매시스템을 이용하여 6개의 소분획을 얻었고 이중 5번 소분획을 다시 RP-18 column chromatography하였다. 용매는 CH₃CN: H₂O gradient를 사용하여 총 10개의 소분획을 얻었으며 이중 5번째 소분획을 용매 H₂O:MeOH (gradient)를 사용하여 sephadex LH-20 column을 사용하여 compound 1(20g)를 분리하였다.

나. F0218 화합물의 구조동정

F0218Compound 1 ; ¹H-NMR(250MHz, DMSO)δ: 1.32(3H×2, s, CH₃-2''), 2.68(1H, dd, J=15.6 and 4Hz, H-4), 2.88(1H, dd, J=15.6 and 11Hz, H-4), 3.29(1H, m, H-3), 3.91(1H, t, J=10.2Hz, H-2), 4.21(1H, br d, J=10.2Hz, H-2), 5.63(1H, d, J=10Hz, H-3''), 6.17(dd, J=8.2Hz and 2.2Hz, H-5'), 6.25~6.32(2H, overrapped H-6 and H-3'), 6.52(1H, d, J=10Hz, H-4''), 6.82(1H, d, J=7.7Hz, H-5), 6.85(1H, d, J=8.2Hz, H-6')

¹³H-NMR(62.5MHz, DMSO)δ: 70.0(C-2), 31.1(C-3), 30.2(C-4), 115.0(C-10), 129.6(C-5), 102.7(C-6), 149.5(C-7), 109.3(C-8), 157.1(C-9), 117.7(C-1'), 151.4(C-2'), 106.5(C-3'), 156.1(C-4'), 108.3(C-5'), 129.5(C-6'), 116.7(C-4''), 127.8(C-3''), 75.5(C-6''), 27.6(2''-CH₃), 27.5(2''-CH₃)

다. F0218 single compound의 AMPK 활성



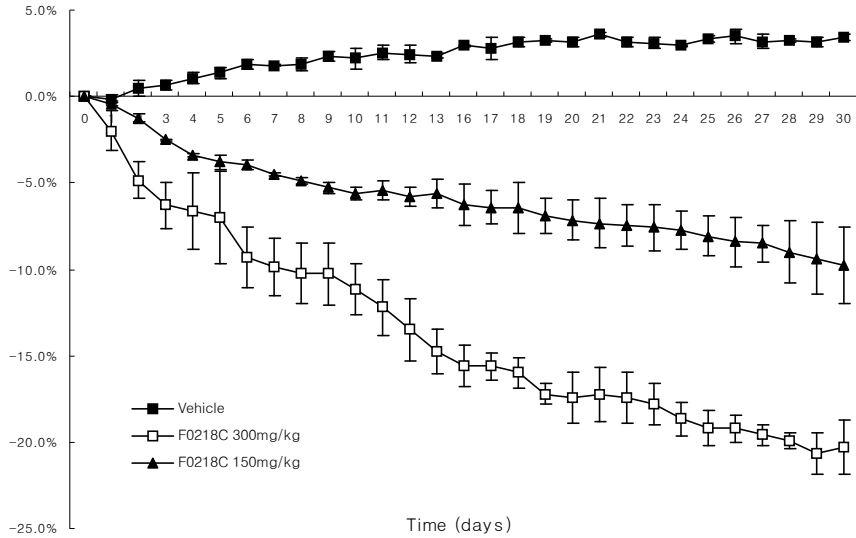
라. F0218 분리 물질의 효능평가

1) 비만질환동물인 ob/ob mice의 체중조절 영향

10주령 C54BL/6J-ob/ob mice 수컷을 온도 22±2℃, 습도55±5% 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주며 5일에 적응기간을 가졌다. 사료는 고형사료를 사용하였다. Vehicle, F0218C 150mg/kg, 300mg/kg 3군으로 나뉘었으며 샘플은 oral투여하였다. 실험은 30 일간 진행 후 종료하였다.

실험결과 아래의 그림에서 보듯이 농도 의존적으로 체중감소 효과가 있음을 알 수 있다.

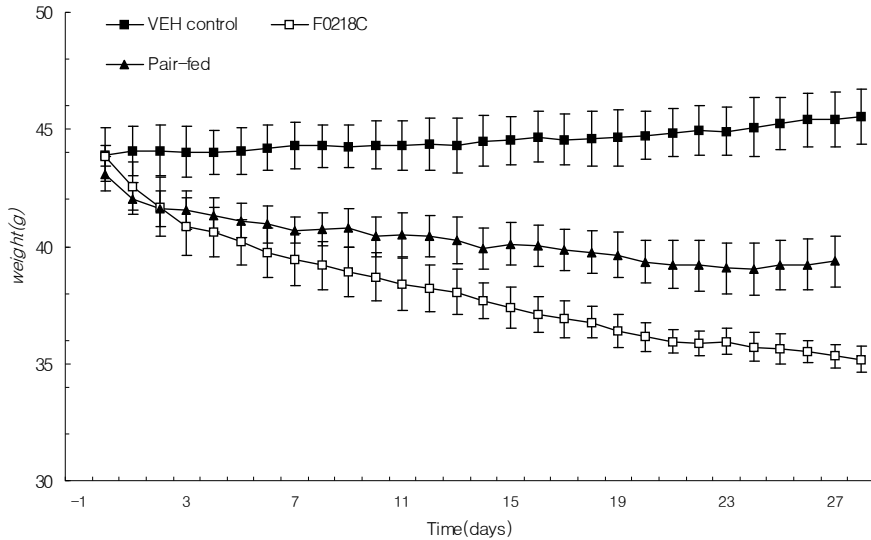
체중증가율(%)



2) 비만유도질환 동물인 DIO mice의 체중조절 영향

4주령된 C54BL/6J mice 수컷을 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주며 5일에 적응기간을 가졌다. 적응기를 두고 8주간 고지방식으로 DIO(Diets induced obesity) 모델을 유도 후 13주령이 된 체중 42g 이상된 수컷을 사용하였다. 사료는 45kcal% fat 고지방사료(D12451, Research diet사)를 사용하였다. Vehicle, F0218C 100mg/kg, Pair-fed 3군으로 나뉘었으며 샘플은 oral 투여하였다. 실험은 28일 진행하였다.

체중증가량 (g)

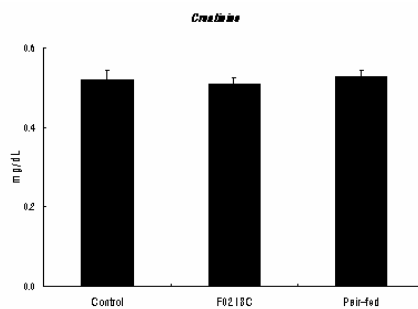
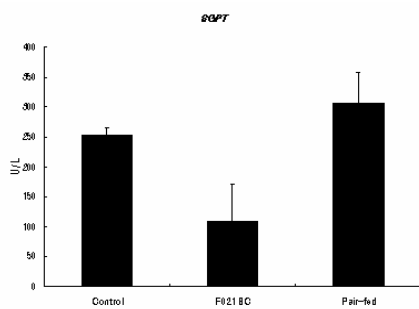
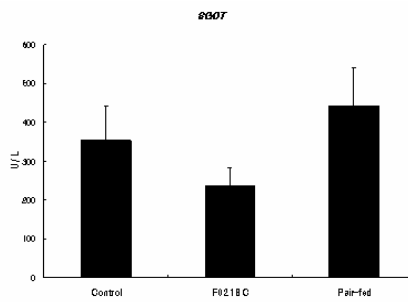
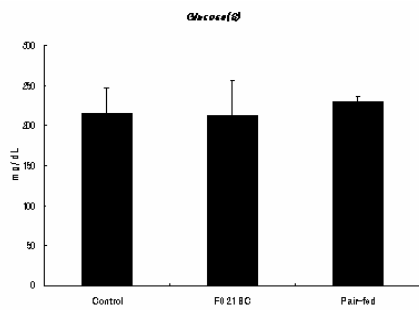
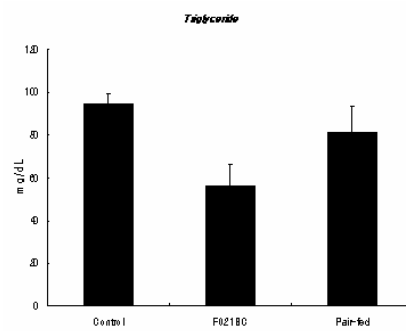
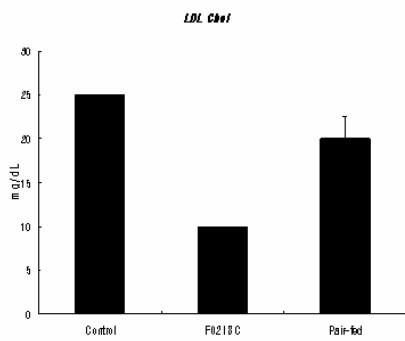
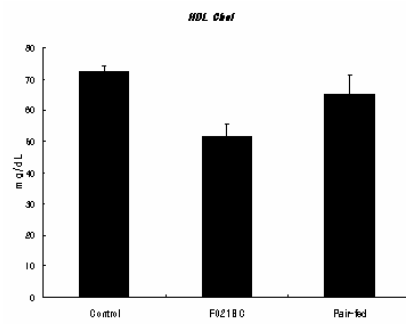
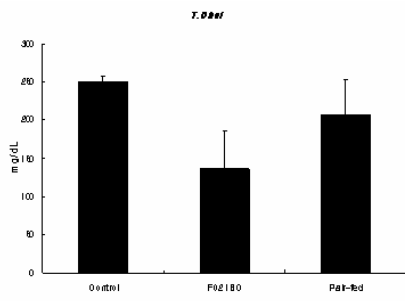


3) 비만유도질환 동물인 DIO mice의 혈액 분석

가) 생화학지표성분분석

실험동물을 실험종료 후 12시간 절식후 전신호흡마취제 이소푸르란을 기화시켜 18G로 후대동맥에 삽입하여 심박동에 맞추어 혈액을 받은 후 시험관에 옮겨 3000rpm에 20분동안 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청(serum)은 분석기 모델명-HITACHI 7020 로 생화학지표 (SGOT, SGPT, Creatinine, Cholesterol total, HDL Cholesterol, LDL Cholesterol, Triglyceride, Glucose)를 측정하였다.

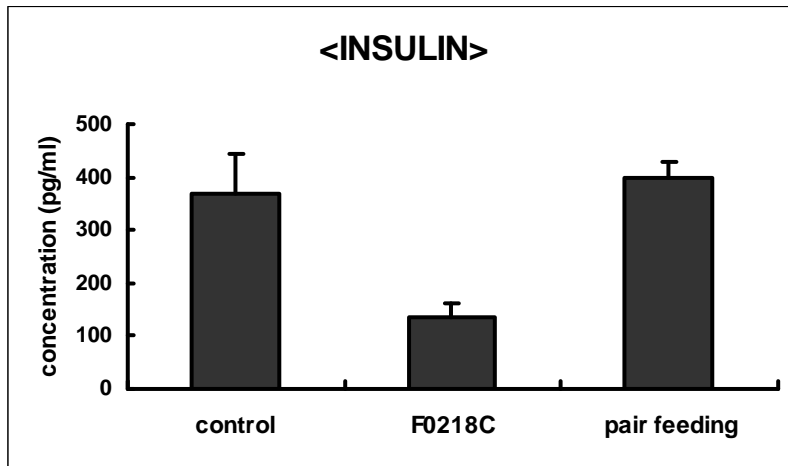
혈중의 생화학지표에서 보듯이 F0218C를 투여한 군이 대조군과 pair-feeding 군에 비하여 염증지표, 혈중지질지표 및 대사물에서 유의적으로 효과가 있음을 확인하여 체중조절, 혈당조절과 더불어 혈중에서의 지질 및 염증관련 지표를 동시에 향상시켜 비만, 당뇨 및 대사성질환을 획기적으로 향상시킬 수 있는 물질임을 확인할 수 있었다.



나) 혈액 내 insulin 분석

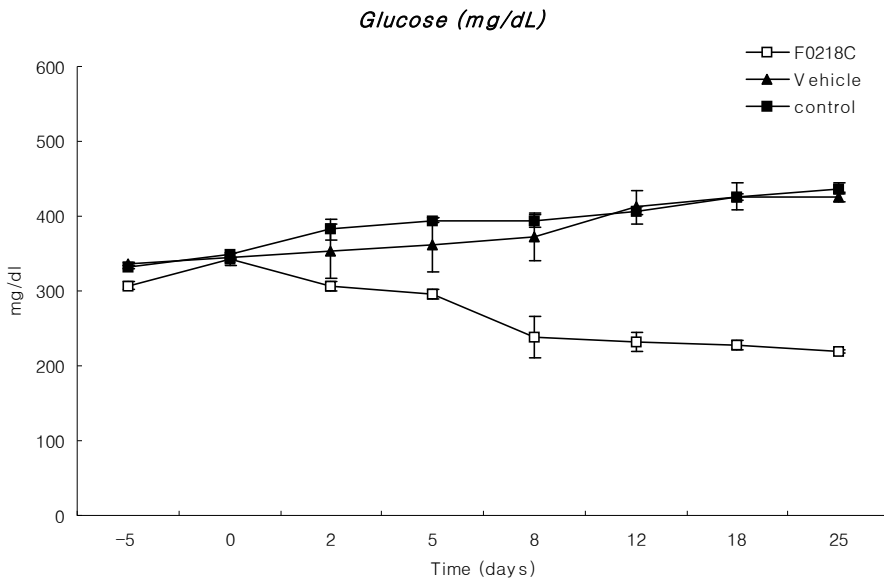
동물 혈청내 insulin 값은 Linco Research사에서 판매하고 있는 mouse serum adipokine lincoplex kit을 이용하여 측정하였다. 바닥 부분이 0.2 uM pore size filter로 만들어진 96-well에 serum, standards, 그리고 kit에 들어있는 QC control I,II를 동량으로 각각 넣고, insulin Ab가 부착된 bead를 첨가하여 약 16시간 동안 냉장 상태로 회전 진탕하여 반응시켰다. 진공 흡입기를 이용하여 반응하고 남은 액을 제거하고 다시 detection Ab와 streptavidin-phycoerythrin을 넣고 각각 30분간 상온에서 회전 진탕하여 반응시켰다. 마지막으로 3회 세척한 뒤, BIO-PLEX 200 luminex xMAP technology(BIO-RAD 사에서 판매)로 측정하였다.

실험결과 아래 도표에서 보듯이 인슐린의 생성량이 대조군과 pair-feeding 그룹에 비하여 매우 낮는데 이는 혈당을 조절하는데 인슐린의 민감도가 매우 향상됨을 뜻하는 것으로 인슐린 생성을 위하여 췌장에 부담을 주지 않으면서 혈당을 효과적으로 조절할 수 있음을 알 수 있다.



4) 1형당뇨 유도동물의 당뇨 영향

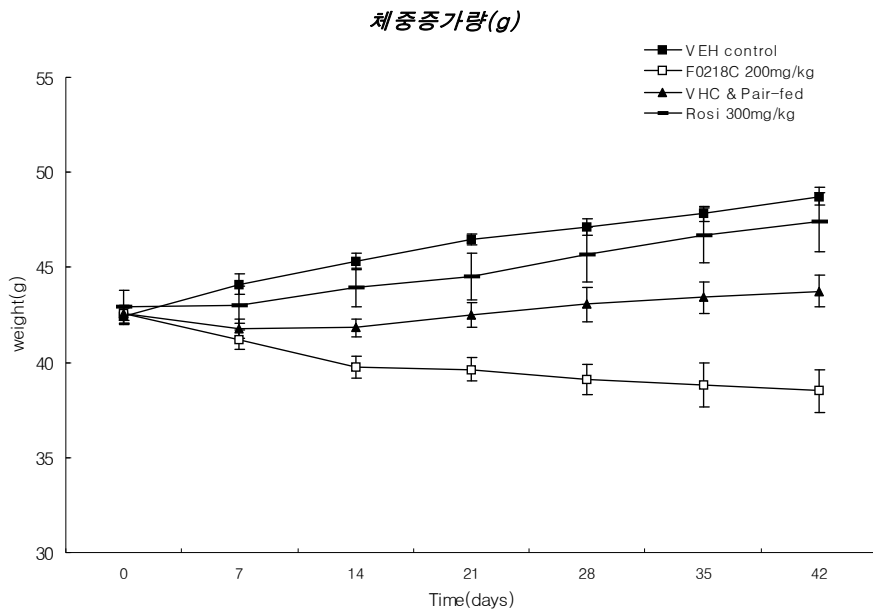
6주령 SD rats 수컷을 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주며 5일에 적응기간을 가졌다. 사료는 고형사료(5553, Labdiet)를 사용하였다. 평균체중 200-220g인 동물을 선별하여 6hr 절식 후 0.1M citrate buffer(pH4.5)에 용해시킨 streptozotocin(STZ, sigma co..USA,30mg/kg)을 혈관주사 한 후 대조군, vehicle, F0218C(300mg/kg)3군으로 나누어 +10일후부터 샘플을 oral투여하였다. 실험은 1형 당뇨유발 후 28일간 진행하였다.

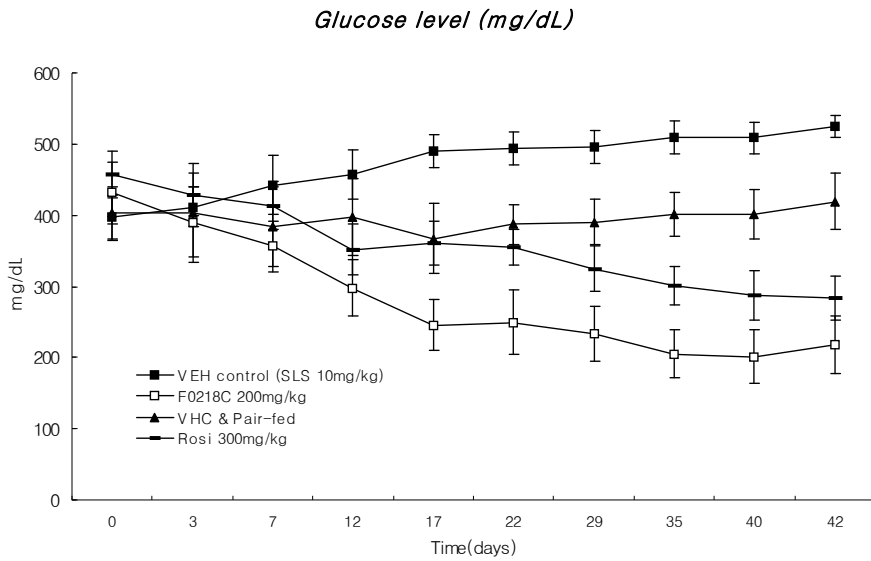


5) 비만, 당뇨질환동물인 db/db mice에서 시판당뇨치료제와의 효력비교실험

10주령 C57BLKS/J-db/db mice 수컷을 온도 22±2℃, 습도55±5% 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주며 5일에 적응기간을 가졌다. 사료는 고품사료(5053, Labdiet)를 사용하였다. Vehicle, F0218C 200mg/kg, Pair-Fed, Rosiglitazone 300mg/kg 4군으로 나뉘었으며 샘플은 oral 투여하였다. 실험은 42일간 진행하였다.

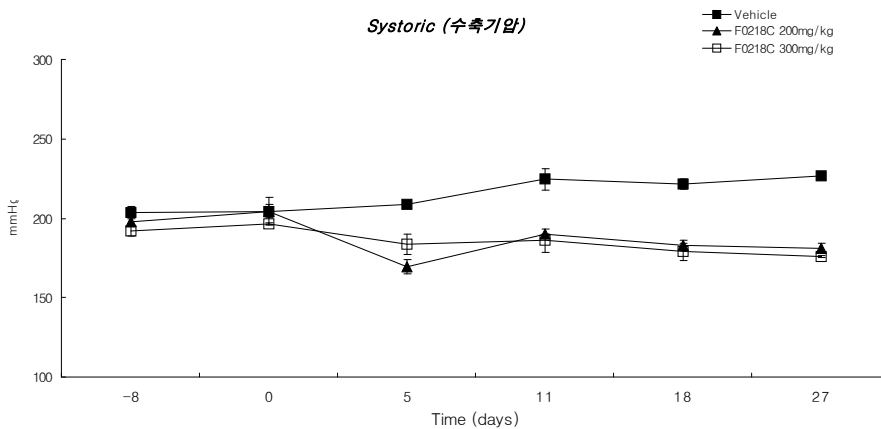
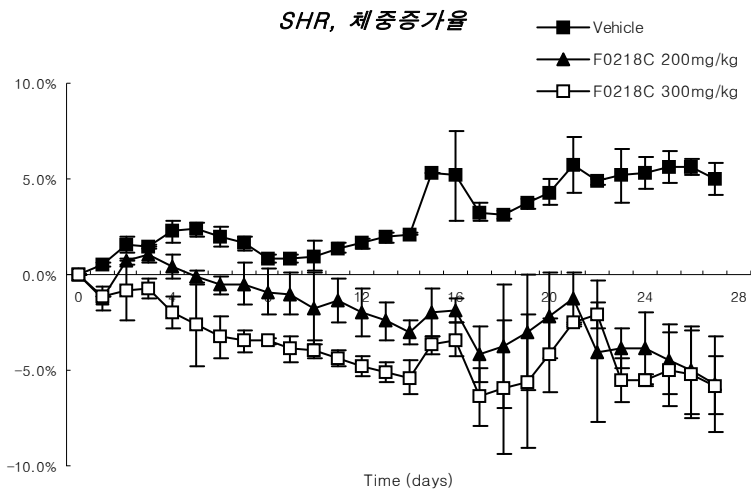
실험결과 시판 중인 대조약물인 rosiglitazone에 비하여 체중감소가 전혀 없으며 오히려 체중을 조절함과 동시에 혈당을 조절하는 이상적인 약물임을 확인하였으며 혈당 조절에서도 시판약물에 비하여 우수한 것으로 확인되어 F0218C가 비만, 당뇨 치료제로의 가능성과 유용성이 높음을 확인하였다.





6) 고혈압 질환모델인 SHR rat의 체중 및 혈압 영향

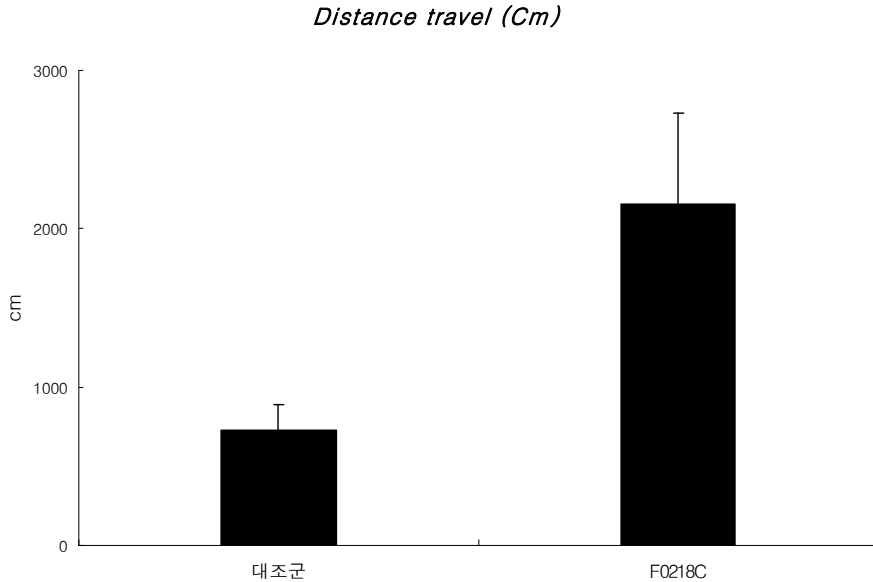
6주령 SHR rat 수컷을 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주며 5일에 적응기간을 가졌다. 사료는 고형사료(5053, Labdiet)를 사용하였다. Vehicle, F0218C 200mg/kg, 300mg/kg 3군으로 나뉘었으며 샘플은 oral투여하였다. 스페인 LSI LWTICA사 LE5002 혈압계로 7일간격으로 혈압을 측정하였고 실험은 30일간 진행 후 종료하였다.



7) 활동성(activity)에 미치는 영향

F0218C을 처리 후 12시간을 측정하였다. 일본 찰스리버스 10주령 ob/ob 수컷을 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주며 5일에 적응기간을 가졌다. 적응기가 끝

난 후 대조군, 0.3% F0218C 2군으로 나뉘었으며 샘플은 30일간 실험한 동물로 실시하였다. 샘플 투여 후 12시간 동안 사료 공급을 제한한 후 activity를 측정하였다.

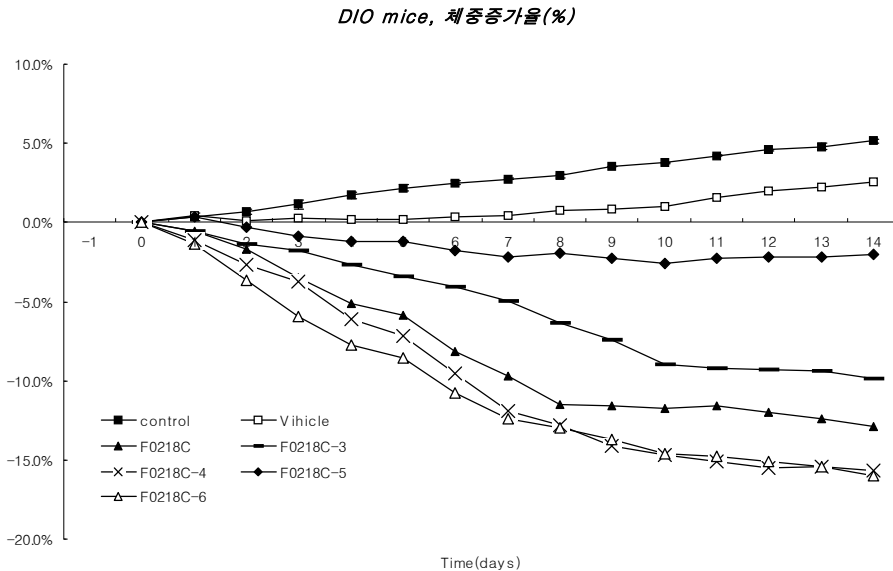


8) F0218 유도체의 합성 및 활성비교 실험

flavonoid인 F0218C의 hydroxyphenyl기의 methyl 혹은 benzyl화를 유도하였으며 한편 isoprenyl기를 변형시켜 F0218C와의 활성을 비교함과 동시에 작용기전 및 활성부위에서의 역할을 규명하고자 하였다. 현재 동 실험은 작용기전 및 활성평가가 진행 중에 있다.

4주령된 C57BL/6 mice 수컷을 온도 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$ 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주며 7일에 적응기간을 가졌다. 적응기를 두고 8주간 고지방사료로 DIO 모델을 유도후 13주령이 된 체중 42g 이상 된 수컷을 사용하였다. 사료는 45kcal% fat 고지방사료(D12451, Research diet사)를 사용하였다. 대조군, Vehicle, F0218C (150mg/kg), F0218C-3, F0218C-4, F0218C-5,

F0218C-6군으로 나뉘었으며 sample은 oral 투여 중이다. 실험은 14일차 진행 중이다.



3. F0479의 활성물질 분리정제

가. F0479 화합물 분리

F0479(탕자) 건조중량(6kg)을 MeOH로 상온에서 1주일간 3회추출하여 그 여액을 농축하여 1.068kg의 MeOH 추출물을 얻었다. MeOH추출물을 물에 현탁시켜 동량의 Hexane을 넣고 분획하여 Hexane 추출물 49.26g을 얻었고 상기와 같은 방법으로 CH₂Cl₂, EtOAc, BuOH순으로 순차적으로 분리하여 195.37g, 102.16g, 504.66g을 각각 얻었으며 나머지 물층은 184.17g을 얻었다. 활성이 나온 CH₂Cl₂ 분획 50g을 column chromatography하였다. silica gel(No. 7734,)column에 넣고 용매 Hexane: EtOAc = 10:0.5로 용리시켜 총 15개의 소분획을 얻었으며 이중 6번째 소분획을 MeOH로 재

결정하여 compound 6을 얻었다. 4번 소분획을 다시 Hexane : EtOAc = 4 : 1 용매로 silica gel column chromatography 하여 compound 1을 분리하였다.

나. F0479 분리물질 AMPK 활성

sample name	sample weight(mg)	AMPK 활성	prep TLC solvent
F0479 CH ₂ Cl ₂ 분획- 1	8.8	1.18	Hexane : EtOAc = 1 : 1
F0479 CH ₂ Cl ₂ 분획- 2	8.3	3.20	
F0479 CH ₂ Cl ₂ 분획- 3	7.3	1.26	
F0479 CH ₂ Cl ₂ 분획- 4	10.7	3.76	
F0479 CH ₂ Cl ₂ 분획- 5	18.3	5.14	
F0479 CH ₂ Cl ₂ 분획- 6	10.6	4.35	
F0479 Hexane 분획 - 1	4.7	2.29	Hexane : EtOAc = 8 : 5
F0479 Hexane 분획 - 2	10.4	3.02	
F0479 Hexane 분획 - 3	9.9	3.48	
F0479 Hexane 분획 - 4	12.3	3.47	
F0479 Hexane 분획 - 5	9.6	2.97	
F0479 Hexane 분획 - 6	9.9	4.11	
F0479 Hexane 분획 - 7	13.7	2.09	

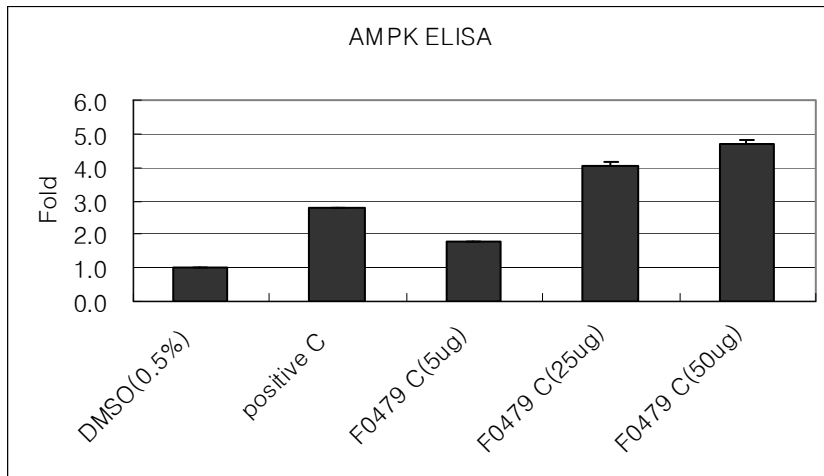
다. F0479 화합물의 구조동정

F0479 Compound 1 ¹H-NMR(400MHz, CDCl₃)δ:7.64(1H, d, J=9.4Hz, H-4), 7.36(1H, d, J=8.4Hz, H-5), 6.86(1H, m, H-6), 6.82(1H, m, H-8), 6.25(1H, d, J=9.4Hz, H-3), 5.47(1H, t, J=6.4Hz, H-2'), 5.08(1H, t, J=6.4Hz, H-6'), 4.61(2H, d, J=6.4Hz, H-1'), 2.11(4H, m, H-4', 5'), 1.76(3H, s, 10'-CH₃), 1.67(3H, s, 8'-CH₃), 1.61(3H, s, 9'-CH₃)

¹³C-NMR(100MHz, CDCl₃)δ:162.4(C-7), 161.5(C-2), 156.1(C-9), 143.7(C-4), 142.6(C-3'), 132.2(C-7'), 128.9(C-5), 123.8(C-6'), 118.6(C-2'), 113.5(C-6), 113.2(C-3), 112.6(C-10), 101.8(C-8), 65.7(C-1'), 39.7(C-5'),

26.4(C-4'), 25.9(C-9'), 17.9(C-8'), 17.0(C-10')

라. F0479 sing compound AMPK 활성



4. F0546의 활성물질 분리정제

가. F0546 화합물 분리

F0546(후추)건량 1.3kg을 MeOH로 1주일간 3회추출하여 그 추출액을 rotary vacuum evaporator로 농축하여 MeOH추출물 16.61g을 얻었다. MeOH추출물을 물에 녹여 여기에 n-Hexane를 가하여 분획갈대기로 n-Hexane과 수층으로 분획한 다음 n-Hexane층을 감압농축하여 n-Hexane extract(4.02g)을 얻었고 다시 수층은 상기와 같은 방법으로 CH₂Cl₂, EtOAc, n-BuOH순으로 추출하여 CH₂Cl₂ extract 8.18g, EtOAc extract 0.35g, n-BuOH extract 0.49g을 얻었다. 이중 Hexane과 CH₂Cl₂ 분획을 합쳐서 silica gel column chromatography를 Hexane : EtOAc(gradient)용매시스템을 이용하여 분리하였다. 그 결과 총 13개의 소분획을 얻었으며 이중 7번 소분획을 RP-18 column을 사용하여 MeOH : H₂O = 6 : 4 ~ 7 : 3 용매로 용리시킨 결과 총 8개의 소분획을 얻었으며 5번 소분획에서 compound 1을 분리하였다.

나. F0546 분리물질 AMPK 활성

sample name	sample weight(mg)	AMPK 활성	prep TLC solvent
F0546 Hexane분획 - 1	5.9	1.40	Hexane : EtOAc = 8 : 5
F0546 Hexane분획 - 2	5.5	1.21	
F0546 Hexane분획 - 3	6.2	1.41	
F0546 Hexane분획 - 4	9.3	2.38	
F0546 Hexane분획 - 5	4.8	3.61	
F0546 Hexane분획 - 6	13.6	4.38	
F0546 Hexane분획 - 7	15.6	2.16	
F0546 Hexane분획 - 8	13.2	2.08	
F0546 CH ₂ Cl ₂ 분획 - 1	4.9	1.61	Hexane : EtOAc = 1 : 1
F0546 CH ₂ Cl ₂ 분획 - 2	4.0	1.51	
F0546 CH ₂ Cl ₂ 분획 - 3	4.9	3.33	
F0546 CH ₂ Cl ₂ 분획 - 4	4.4	5.00	

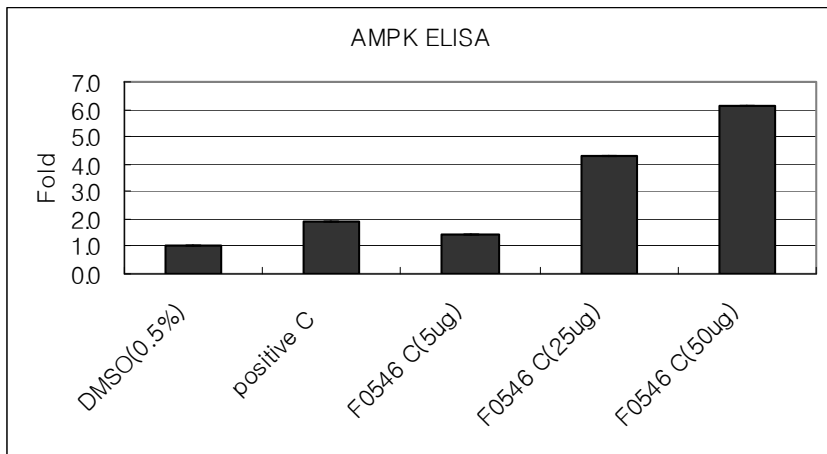
F0546	CH ₂ Cl ₂ 분획 - 5	7.0	4.91
F0546	CH ₂ Cl ₂ 분획 - 6	11.2	2.61
F0546	CH ₂ Cl ₂ 분획 - 7	8.3	3.96
F0546	CH ₂ Cl ₂ 분획 - 8	7.9	1.63

다. F0546 화합물의 구조동정

F0546 Compound 1 ¹H-NMR(400MHz, DMSO-*d*₆) δ:6.97(1H, dd, J=15.2Hz and 10.4Hz), 6.21-6.04(2H, m), 5.94(1H, d, J=14.8Hz), 2.94(2H, t, J=6.4Hz)

¹³C-NMR(100MHz, DMSO-*d*₆) δ:165.9(C-1), 142.2(C-5), 139.7(C-3), 129.3(C-4), 124.1(C-2), 46.8(C-1'), 32.9(C-6), 31.5(C-8), 28.8(C-2'), 28.7(C-7), 22.6(C-9), 20.8(2'-CH₃×2), 14.6(C-10)

라. F0546 single compound AMPK 활성



제 5 절 공정개발

1. F0475 대량생산공정

가. 공정도

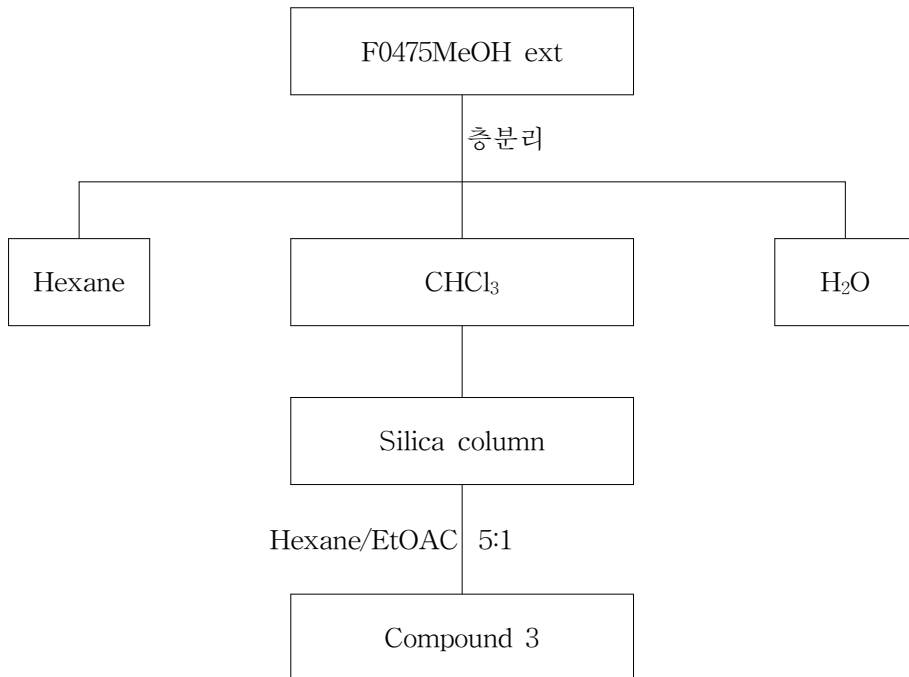


표 . 원료 4.9Kg 추출 시 수율

	건조 원료	MeOH ext.	CHCl ₃ 층	Compound 3
원료량	4,900g	1,200g	389g	39g
정제 효율	100%	24.5%	7.9%	0.8%

2. F0218 대량생산공정

가. 공정도

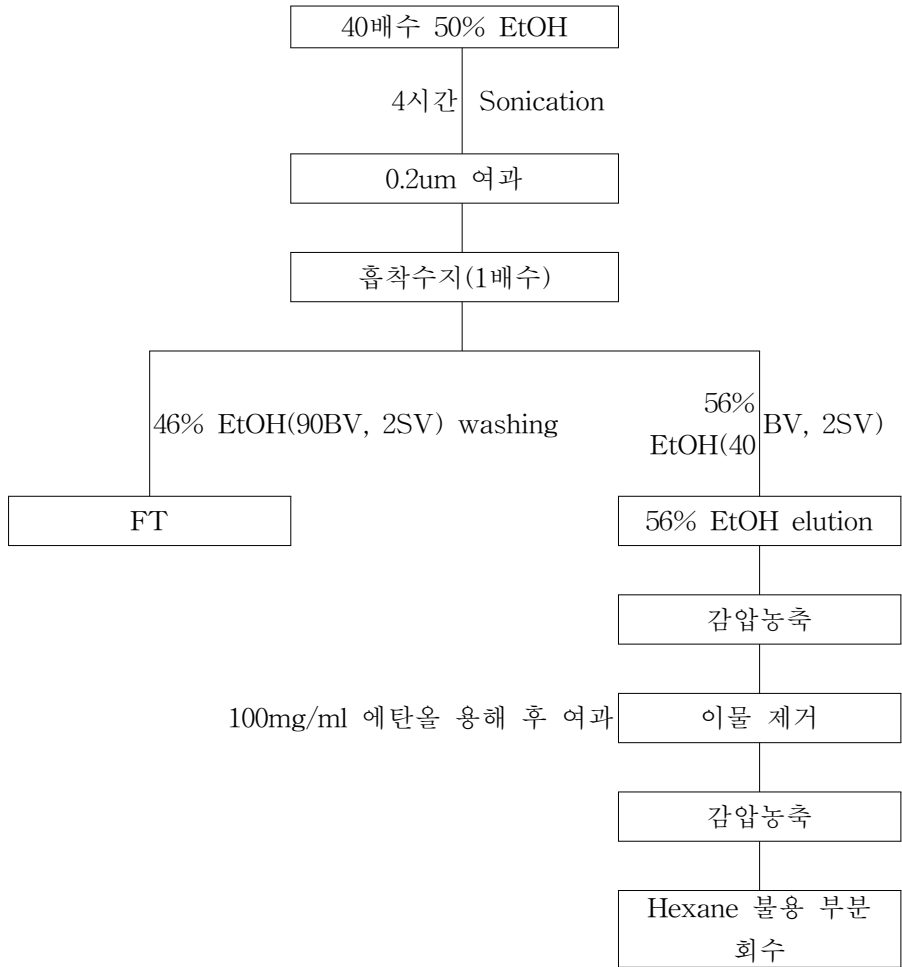


표. 원료 100g 추출 시 수율

	50% Ethanol 추출	46% EtOH FT	56% EtOH Elution
F0218함량	0.5%	0.0%	36.7%
원료 량	35.8g	33.7g	0.4g
공정수율	100%	0.0%	73%

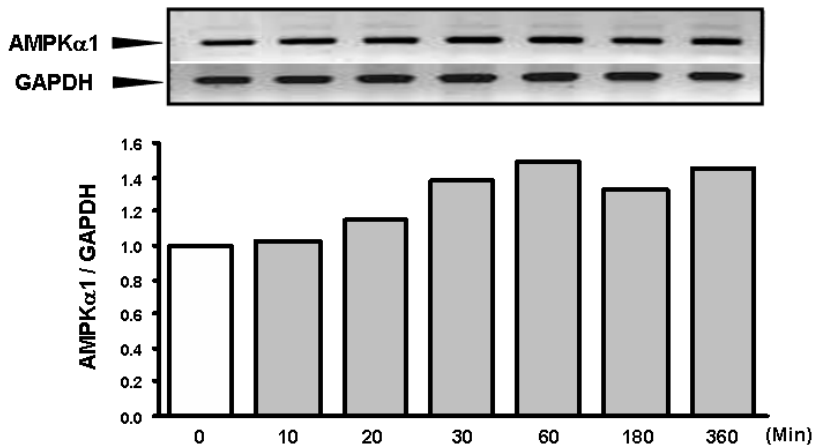
제 6 절 작용기전 규명

상기의 소재로부터 분리 정제된 AMPK를 활성화시키는 F0218C와 F0475C3의 에너지 소비 및 지방대사에 관여하는 유전자 및 단백질의 변화를 보고자 근육세포인 C2C12세포를 이용하여 실험하였다.

현재까지 지방산화에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 UCP1,3, AMPK, 미토콘드리아의 생성 및 당, 지방대사에 중요한 인자인 PGC1-a, 지방합성억제 및 지방산화의 핵심인 acetyl CoA carboxylase의 인산화여부, AMPK의 인산화여부등을 확인하여 F0218C 및 F0475C3의 에너지 대사 및 지방산화에서의 활성을 확인하였다.

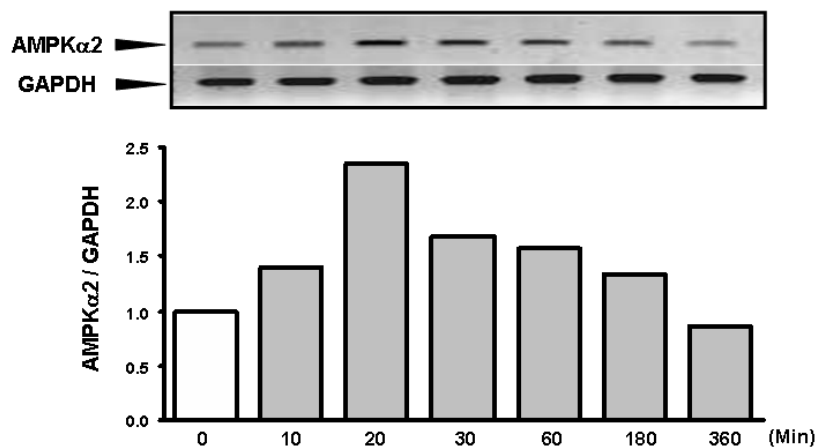
실험결과 아래 결과에서 보듯이 F0218C 혹은 F0475C3 화합물 모두 C2C12세포에서 에너지 대사, 지방산화 및 미토콘드리아 생성에 관여하는 주요유전자 및 단백질의 발현에 유의적인 활성을 갖고 있는 것으로 확인되어 세포 및 동물에서의 효력실험을 입증하는 근거자료를 확보할 수 있었다.

1. Effect of F0281C on AMPK α 1/GAPDH in C2C12 by RT-PCR



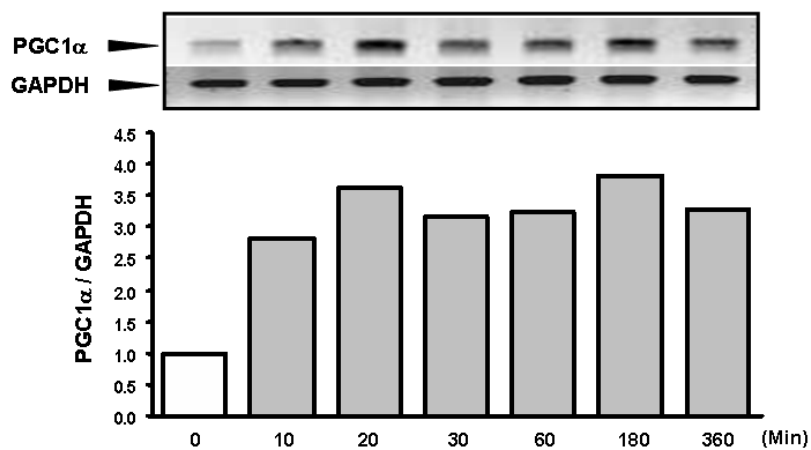
Cell were treated of F0218C(20 μ M) for 10min ~ 360min in DMEM 0.5%FBS medium

2. Effect of F0281C on AMPK α 2/GAPDH in C2C12 by RT-PCR



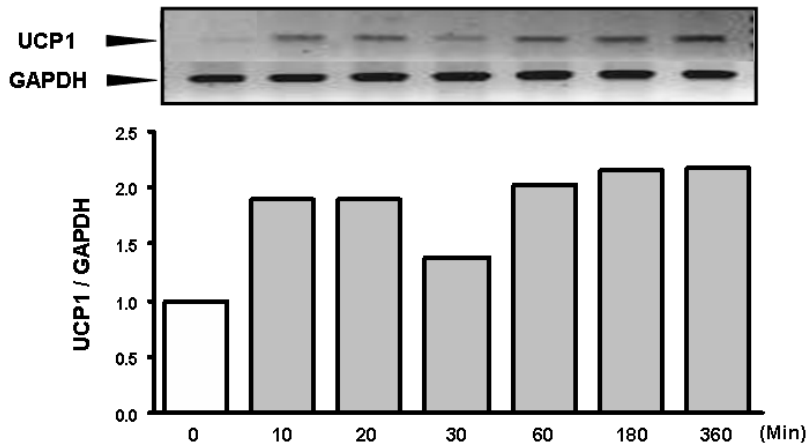
Cell were treated of F0218C(20uM) for 10min ~ 360min in DMEM 0.5%FBS medium

3. Effect of F0281C on PGC1/GAPDH in C2C12 by RT-PCR



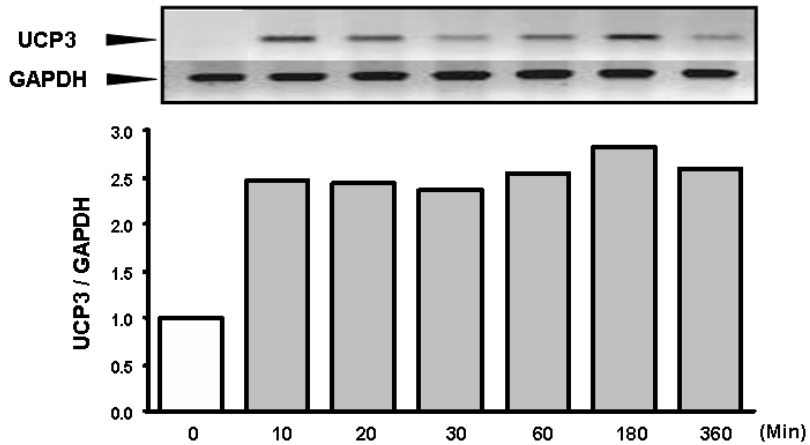
Cell were treated of F0218C(20uM) for 10min ~ 360min in DMEM 0.5%FBS medium

4. Effect of F0281C on UCP1/GAPDH in C2C12 by RT-PCR



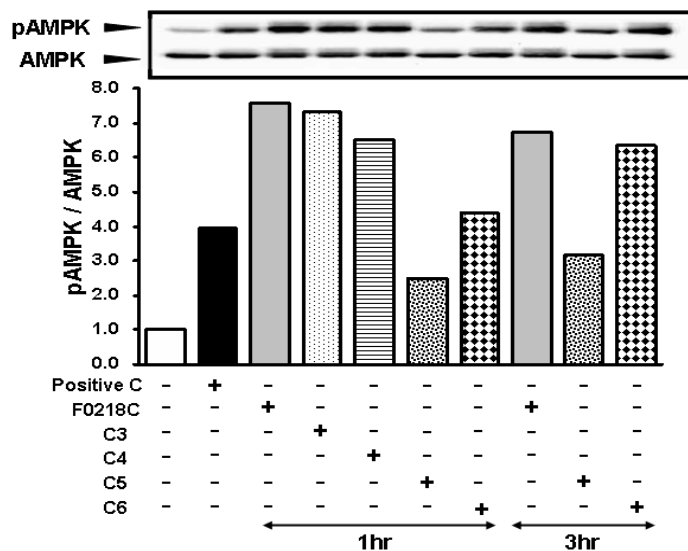
Cell were treated of F0281C(20uM) for 10min ~ 360min in DMEM 0.5%FBS medium

5. Effect of F0281C on UCP3/GAPDH in C2C12 by RT-PCR



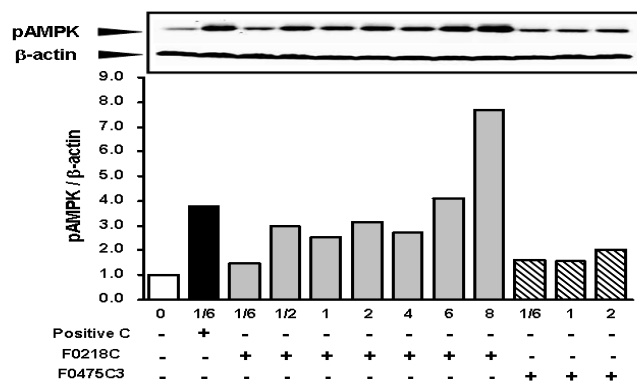
Cell were treated of F0281C(20uM) for 10min ~ 360min in DMEM 0.5%FBS medium

6. Effect of F0281C and derivative on pAMPK/AMPK in C2C12 by western blot



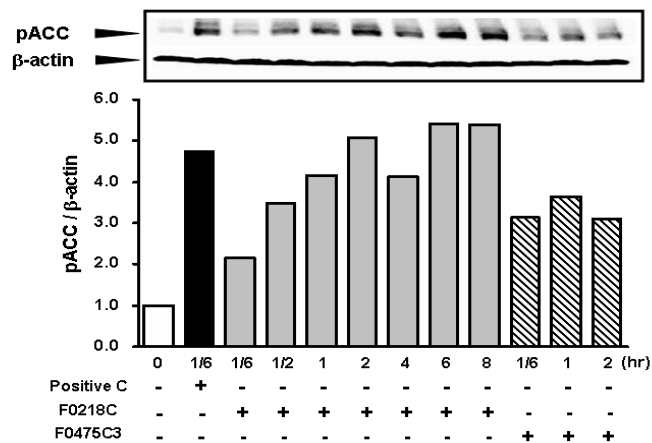
C2C12 were treated of Positive C(5uM), F0218C(20uM) & products(20uM) for 1hr~3hr in DMEM 0.5% FBS medium

7. Effect of F0281C and F0475C3 on pAMPK/ β actin in C2C12 by western blot



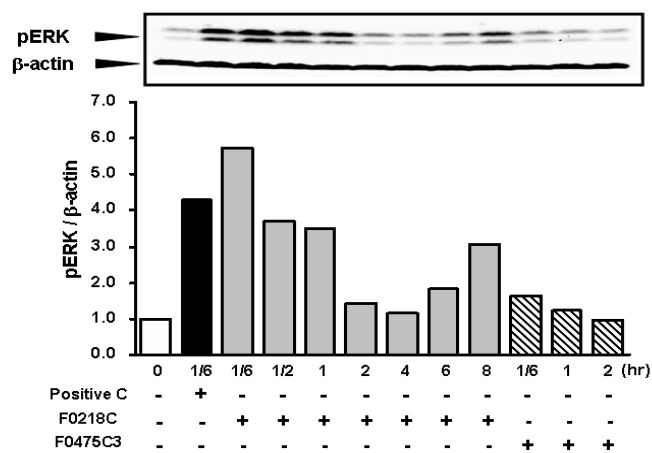
Cell were treated of Positive C (5uM), F0218C(20uM) and F0475C3(20uM) for 10min ~ 8hr in DMEM 0.5%FBS medium

8. Effect of F0281C and F0475C3 on pACC/ β actin in C2C12 by western blot



Cell were treated of Positive C (5 μ M), F0218C(20 μ M) and F0475C3(20 μ M) for 10min ~ 8hr in DMEM 0.5%FBS medium

9. Effect of F0281C and F0475C3 on pERK/ β actin in C2C12 by western blot



Cell were treated of Positive C (5 μ M), F0218C(20 μ M) and F0475C3(20 μ M) for 10min ~ 8hr in DMEM 0.5%FBS medium

제 7절 당뇨병환 식품의 제형 및 소재개발

1. 제형개발(micronization제형개발)

가. 실험동물 및 식이

10주령된 비만, 2형당뇨모델인 수컷의 *ob/ob* mice (Jackson Lab)를 (주) 오리엔트에서 구입하여 10일 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험식은 고형사료(P5053, Labdiet)를 기본식으로 사용하였다

나. 실험동물의 사육 및 약물 투여 방법

ob/ob mice는 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어주며 10일에 적응기간을 가졌다. 환경에 적응시킨 *ob/ob* mice는 난괴법에 따라 비투여 대조군과 F0218C 샘플투여대조군, Micro Fluidizer로 micronization 한 F0218C 200mg/kg군으로 군당 7마리씩 3그룹으로 나눈 후 20일간 경구투여(PO) 하였고 물과 사료는 자유로이 섭취하도록 하였다.

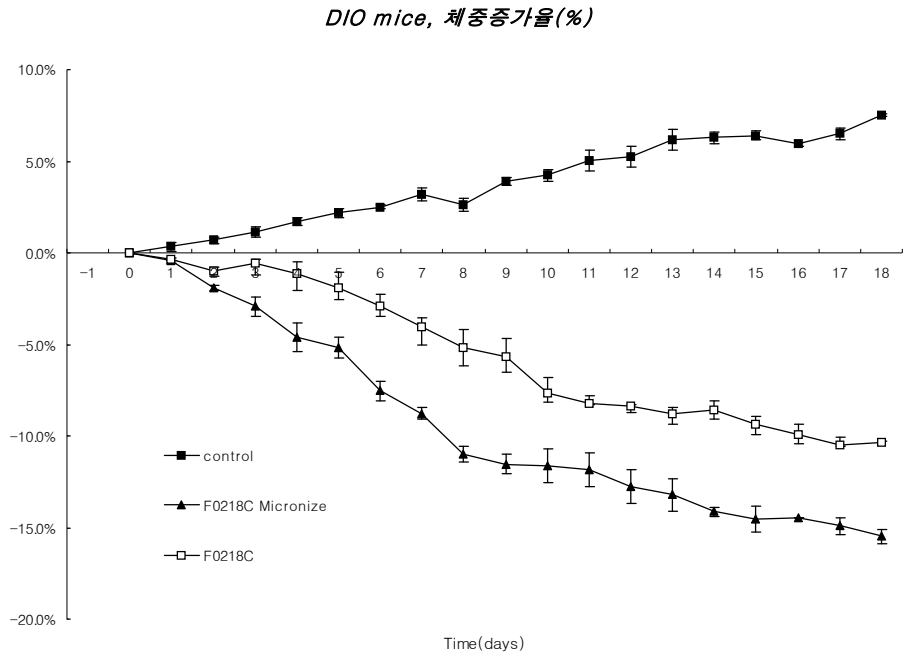
다. Vehicle조제

폴리텍스트로스(52.3%), HPMC 2910(Shin-Etsu Chemical 606), Lecithin, Poloxamer 188, 크로스카멜로스나트륨, 경질무수규산, 폴리에틸렌 글리콜 #6,000을 정제수에 균질 하게 분산한 후 Microfluidizer M-110 EHs를 사용하여 압력 5,000 PSI에서 3회 통과시켜 균질화 하였다.

라. 실험물질조제

F0218C(52.3%), HPMC 2910(Shin-Etsu Chemical 606), Lecithin, Poloxamer 188, 크로스카멜로스나트륨, 경질무수규산, 폴리에틸렌글리콜 #6,000 을 정제수에 균질 하게 분산한 후 Microfluidizer M-110 EHs를 사용하여 압력 5,000 PSI에서 3회 통과시켜 균질화 하였다.

마.효능평가



실험결과 마이크로 균질화 및 제형의 최적화를 통하여 F0218C의 약효를 효과적으로 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

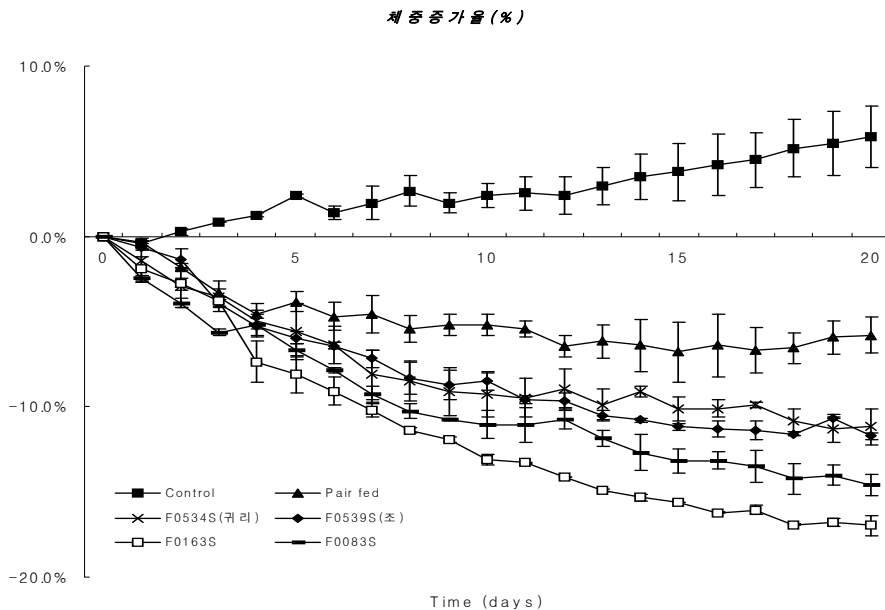
2. 비만 당뇨용 생식개발

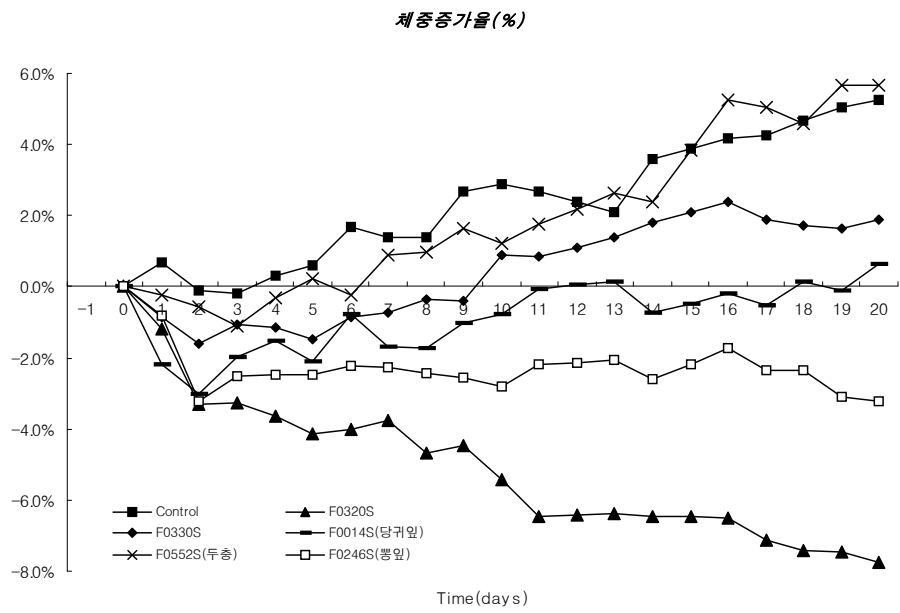
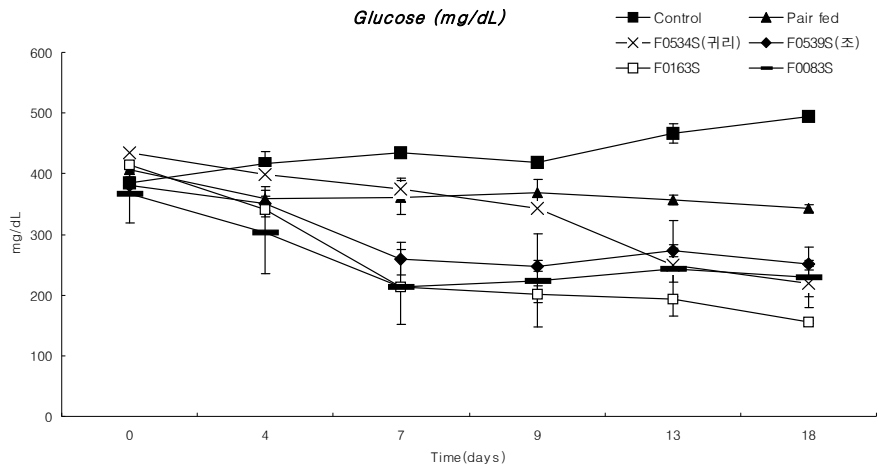
가 생식원료별 효능평가

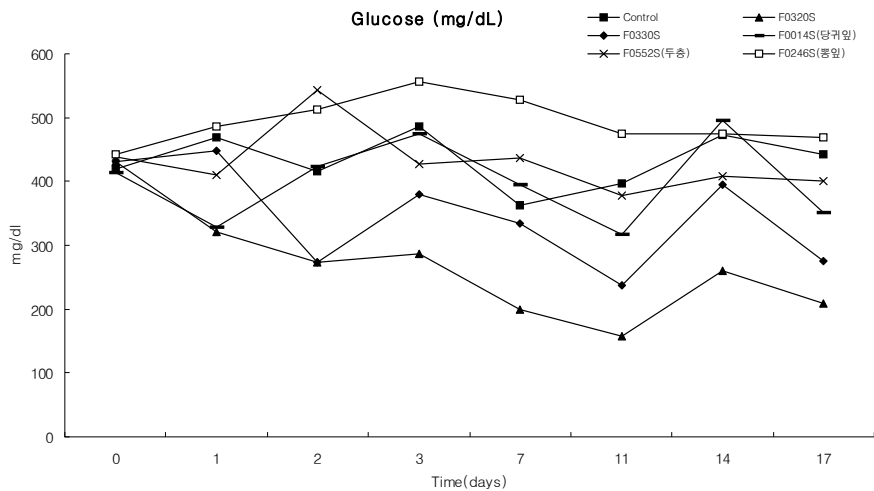
1) 비만, 당뇨질환 동물인 db/db mice의 체중 및 당뇨 영향

10주령 C57BLK/J-db/db mice 수컷을 온도 22±2℃, 습도55±5% 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주며 5일에 적응기간을 가졌다. 사료는 분말사료(5053, Labdiet)를 사용하였다. 대조군, 천연물 곡류 F0163S, F0083S, F0539S(조), F0534S(귀리), 천연물 한약재류 F0330S(하수오), F0320S(삼백초), F0014S(당귀잎), F0552S(두충), F0246S(뽕잎), Pair-Fed 군으로 나뉘었으며 sample은 사료에 섞어 투여하였다. 실험은 20일간 진행하였다.

실험 결과 곡류 및 식용 한약재로부터 유의적인 체중조절 및 혈당조절 소재를 확보할 수 있었다.







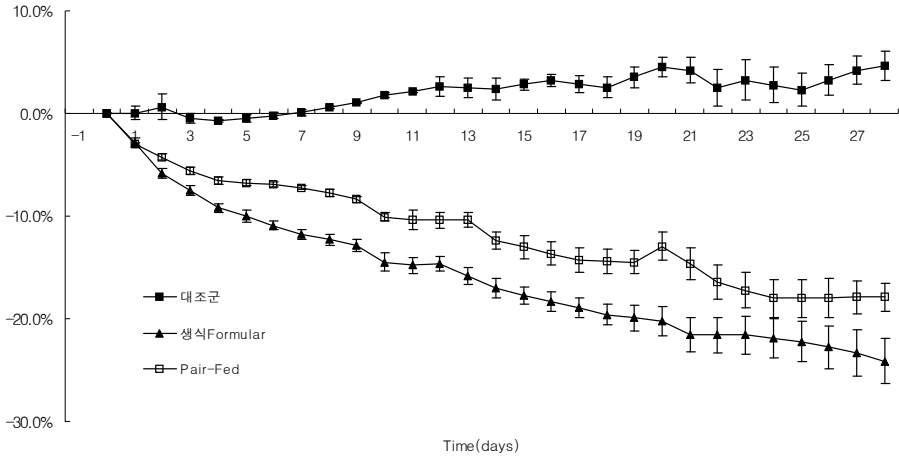
나. 생식 formular 효능평가

1. 비만, 당뇨질환동물인 db/db mice의 체중 및 당뇨 영향

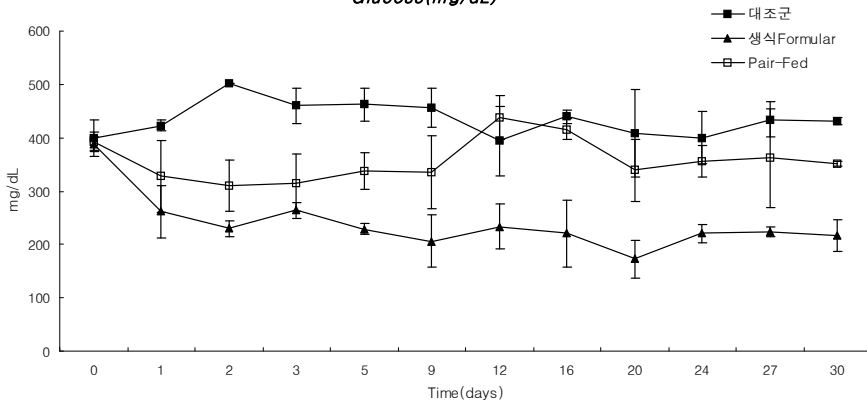
10주령 C57BLK/J-db/db mice 수컷을 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주며 5일에 적응기간을 가졌다. 사료는 분말사료(5053, Labdiet)를 사용하였다. 대조군, 50% 생식 formular, pair fed 3군으로 나뉘었으며, 샘플은 사료에 섞어 투여하였다. 실험은 28일간 진행하였다.

실험결과 혈당이 대조군과 pair-feeding 그룹 대비 효과적으로 조절되는 것을 확인할 수 있었다.

체중증가율(%)



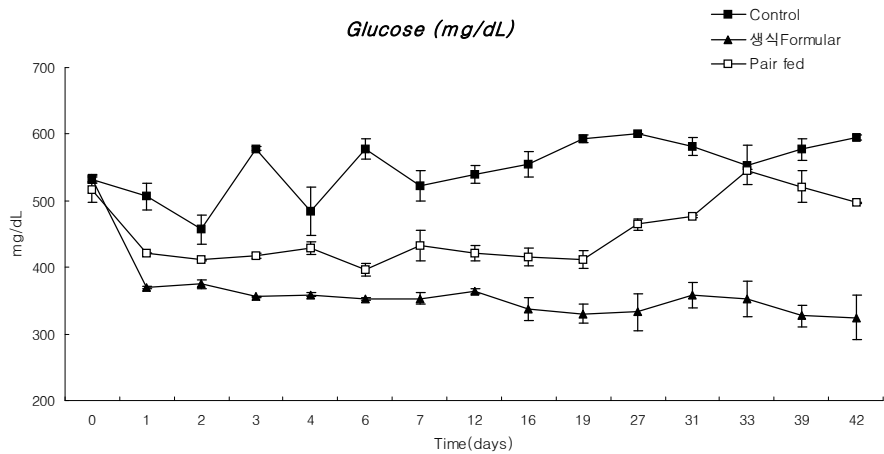
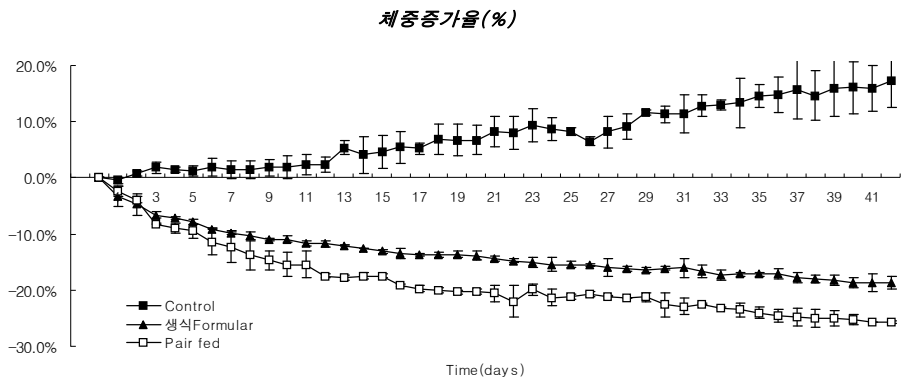
Glucose(mg/dL)



2) 2형당뇨질환동물인 ZDF rat에서의 당뇨 영향

찰스리버사 10주령 ZDF rat 수컷을 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주며 5일에 적응기간을 가졌다. 사료는 고탄사료(5053, Labdiet)를 사용하였다. 대조군, 생식 formular, pair-fed 3군으로 나뉘었으며 샘플은 사료에 섞어 투여하였다. 실험은 40일간 진행 후 종료하였다.

실험결과 혈당이 대조군과 pair-feeding 그룹 대비 효과적으로 조절되는 것을 확인할 수 있었다.



3) O₂consumption 측정

가) 분석조건:

AccuScan Instruments' PhysioPlot version 1.50

Experiment Duration : 720 (minutes)

Channel scan time : 24 (seconds)

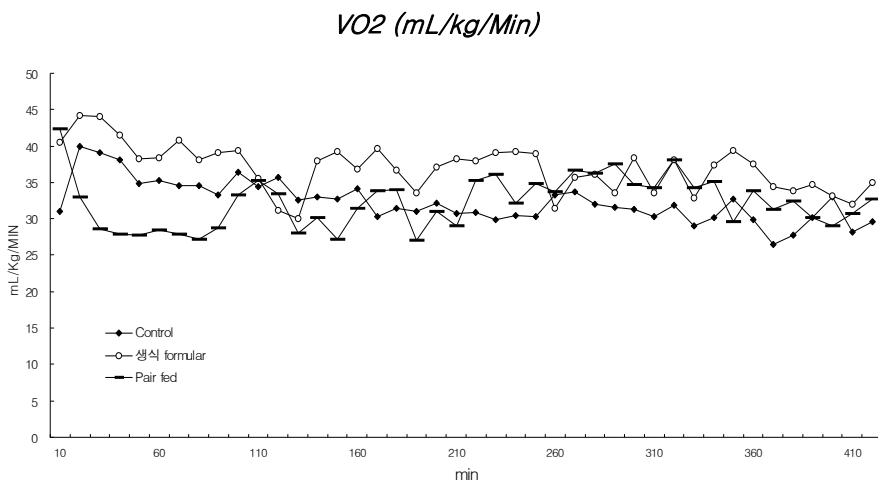
Cycle delay time : 0 (seconds)

O₂ - 20.0%에 ±2%, CO₂ - 0.4996%에 ±2%의 Tank(RIGAS제조)로 LOW CAL을 O₂값 20.170%, STPD(Flow) 0.5이하로 Calibration 하고 HIGHCAL을 room air로 20.940% STPD(Flow) 0.5로 Calibration 하여 12시간(PM 8:00부터 AM 8:00까지)을 operation 하였다.

나) 실험조건

일본 찰스리버사 10 주령 ob/ob 수컷을 온도 22±2°C, 습도 55±5% 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주며 5일에 적응기간을 가졌다. 적응기가 끝난 후 대조군, 50% 생식Formular, pair fed 3군으로 나뉘었으며 실험은 3일간 투여한 동물로 실시하였다. 샘플 투여 후 12시간 동안 사료 공급을 제한한 후 12시간의 변화를 진행하였다.

실험결과 생식을 투여한 그룹에서의 산소소비량이 대조군과 pair-feeding 그룹에 비하여 유의적으로 증가하는 것으로 나타났는데 이는 생식 formula를 복용하므로 기인된 결과이다.



4) 활동성(activity)에 미치는 영향

Med Associates' Activity Monitor **version5.**

Actual Run Time : 720min.

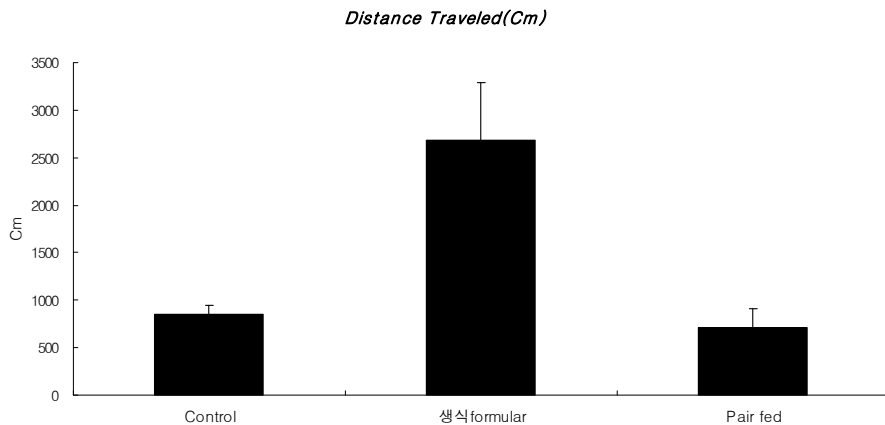
Data Save Interval : 600sec.

Units : Cm

Detail Reporting Mode : Absolute

생식 formular을 3일간 처리후 12시간(PM 8:00부터 AM 8:00까지)을 operation 하였다. 일본 찰스리버스 10주령 ob/ob 수컷을 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주며 5일에 적응기간을 가졌다. 적응기가 끝난 후 대조군, 50% 생식 formular, pair fed 3군으로 나뉘었으며 실험은 3일간 투여한 동물로 실시하였다. 샘플 투여 후 12시간 동안 사료 공급을 제한한 후 activity를 측정하였다.

측정결과

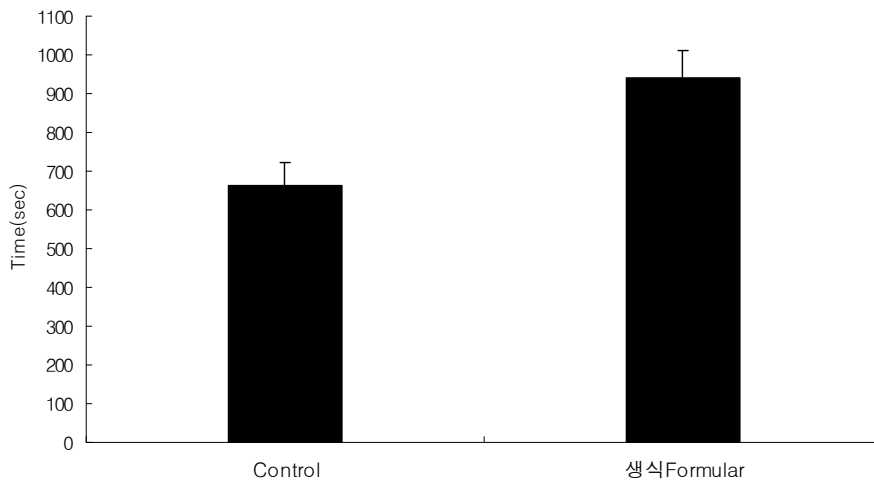


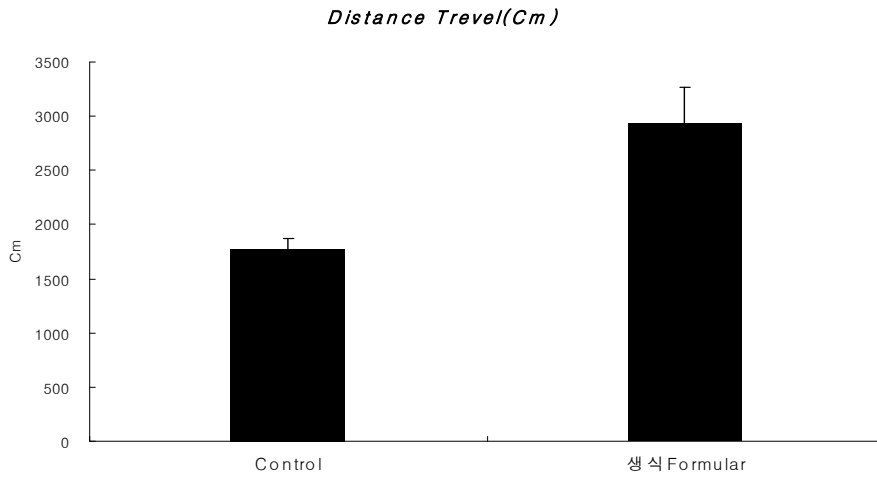
5) 지구력(Endurance)에 미치는 영향

일본 찰스리버스 10 주령 C57BL/6 수컷을 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 환경의 사육실에서 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주며 5일에 적응기간을 가졌다. 적응기가 끝난 후 대조군, 50% 생식 formular 2군으로 나뉘었으며 실험은 3일간 투여한 동물로 실시하였다. 샘플 투여 후 4시간 동안 사료 공급을 제한 한 후 강제수영을 시켜 지구력 테스트를 하였다.

생식 투여 후 수영을 통한 지구력을 측정한 결과 수영지속시간에서 대조군 대비 30% 정도 증가하였으며 수영에 따른 이동거리를 환산하여 비교한 경우 약 40%정도 증가한 것으로 확인되어 생식이 혈당 조절이외에 지구력 증강에 도움이 되는 것을 알 수 있다.

수영지속시간(sec)





다. 기능성 떡 개발을 위한 최적화

하수오, 당귀, 삼백초, 귀리 및 콩을 대상으로 가래떡에 1, 5, & 10%로 첨가하여 맛, 식감, 색상 및 기호성 등을 평가하였다. 귀리 및 콩을 제외한 나머지 소재의 경우 3-5%에서 맛, 식감, 기호성에서 무첨가군과 비슷한 것으로 확인되어 가능성을 확인하였다.

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> ○식품유래 library 구축 ○AMPK 활성 검색 ○포도당 흡수 촉진제 검색 ○in vivo 활성 측정 ○특허출원 	500개 이상 library 구축(30) 활성 2배이상-20개 이상 도출(20) 활성 2배이상-10개 이상 도출(20) 대조군 대비 20%이상 경구 혈당 조절 소재 3개 이상 확보(30) 특허출원 2건이상
2차년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> ○후보소재 분리 정제 ○단일물질 구조 및 특성 규명 ○지표물질 분석 및 QC 항목 설정 ○공정개발 ○효능평가(in vitro/in vivo) ○작용기작 규명 	단일물질 2개 이상 확보(30) 물질 구조 2개 이상 확보(10) HPLC 분석법 및 QC(10) purity 20%이상 공정개발(30) 30%이상 경구 혈당 조절(10) insulin independent 혈당조절 (10)
3차년도 (2006)	<ul style="list-style-type: none"> ○독성 및 안정성 평가 ○formulation ○임상평가 ○제품화 	기능성식품 가능물질 2개 이상 (20) 혈당조절 30%이상 향상 제제 (20) 유효성 50%이상(50) 최소 1제품이상 상품화(10)
최 중 평	○library 구축	500개 이상 library 구축(30)

가	<ul style="list-style-type: none"> ○in vivo 경구투여 활성소재 ○단일물질분리 및 구조결정 ○독성 및 안전성 평가 ○임상평가 및 제품화 ○특허출원 	<p>대조군 대비 30%이상 경구 혈당 조절 소재 3개 이상 확보(30)</p> <p>단일물질 및 구조결정 2개이상(20)</p> <p>기능성 소재 2개 이상(10)</p> <p>유효성 50% 이상 소재 제품화 (30)</p> <p>국내 5건이상, 국외 2건이상</p>
---	--	--

제 5장 연구개발의 활용계획

1. 활용방안

- 건강기능성식품으로의 개발
- 천연물신약 및 합성신약 개발
- 당뇨용 생식개발제품의 제품화
- 기능성식품, 음료 및 기호식품으로의 개발을 위한 보강실험

2. 특허 출원

특허/프로그램명	출원 등록일	출원인	발명자	출원번호	비 고
F0218C를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료 조성물	2005.11.16	엠디바이오 알파	박명규 유상구	10-2005-0109 393	출원
F0218C를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료 조성물	2006.11.15	엠디바이오 알파	박명규 유상구	PCT/KR2006/0 04820	PCT 출원
쿠마린유도체를 유효성분으로 함유 하는 비만 및 대사증후군 치료제	2007.05.07	엠디바이오 알파	박명규	10-2007-0043 924	출원
쿠마린 유도체를 유효성분으로 함유 하는 당뇨병 치료제	2007.05.07	엠디바이오 알파	박명규	10-2007-0043 935	출원

3. 향후 연구 계획

- 건강기능성식품으로의 개발
- 천연물신약 및 합성신약 개발
- 기능성식품, 음료 및 기호식품으로의 개발을 위한 보강실험

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7장 참고문헌

1. Fujioka, T., Furumi, K., Fujii, H., Okabe, H., Mihashi, K., Nakano, Y., Matsunaga, H., Katano, M., and Mori M., Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants. V. A new furanocoumarin and falcarindiol furanocoumarin ethers from the root of *Angelica japonica*. *Chem. Pharm. Bull.*, 47, 96-100 (1999).
2. Razdan, T. K., Qadri, B., Harkar, S. and Waight, E. S. Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*. *Phytochemistry*, 26, 2063-2069 (1987).
3. Chen, I.S., Lin, Y.C., Tsai I.L., Teng, C.M., Ko, F.N., Ishikawa, T. and Ishii, H., Comarins and anti-platelet aggregation constituents from *Zanthoxylum schinifolium*, *Phytochemistry*, 39(5), 1091-1097 (1995).
4. Konoshima, M., Chi, H. J. and Hata, K., Coumarins from the root of *Angelica gigas* Nakai. *Chem. Pharm. Bull.*, 16, 1139-1140(1968)
5. Okada, K., Tamura, Y., Yamamoto, M., Inoue, Y., Takagaki, R., Takahashi, K., Demizu, S., Kajiyama, K., Hiraga, Y. and Kinoshita T., Identification of antimicrobial and antioxidant constituents from licorice of Russian and Xinjing origin. *Chem. Pharm. Bull.*, 37(9), 2525-2530 (1989).
6. Yasuda, I., Takeya, K. and Itokawa, H., Structures of Amides from *Asiasarum heterotropoides* Maek. var. *mandshuricum* Maek. *Chem. Pharm. Bull.*, 29(2), 564-566 (1981).