(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년12월27일
(11) 등록번호 10-1689803
(24) 등록일자 2016년12월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/10 (2006.01) *A23L 1/305* (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/10 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0161139
(22) 출원일자 2015년11월17일
심사청구일자 2015년11월17일
(56) 선행기술조사문헌
WO2009046824 A2*
CN104436158 A*
KR1020080045185 A*
Peptides. Vol. 32, No. 8, pp. 1634-1639 (2011)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김현수
서울특별시 노원구 중계4동 131번지
이정옥
서울특별시 성북구 보문로 128, 2층 (보문동1가)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영, 장제환

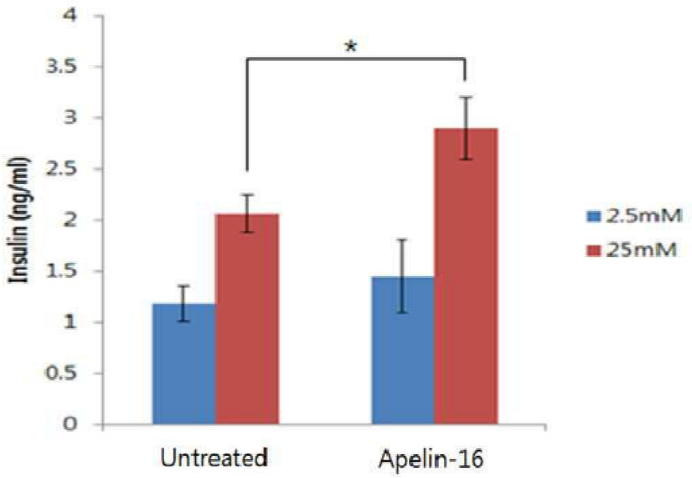
전체 청구항 수 : 총 12 항 심사관 : 김은영

(54) 발명의 명칭 **아펠린-16을 유효성분으로 함유하는 당뇨 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 아펠린-12(apelin-12), 아펠린-16(apelin-16) 또는 아펠린-36(apelin-36)을 유효성분으로 함유하는 당뇨 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 고농도 당에 의한 인슐린 분비를 더욱 촉진시켜 상승효과를 나타내는 아펠린-12(apelin-12), 아펠린-16(apelin-16) 또는 아펠린-36(apelin-36)을 함유하는 당뇨 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 아펠린-12(apelin-12), 아펠린-16(apelin-16) 또는 아펠린-36(apelin-36)은 인슐린 분비 촉진을 통하여, 혈중 콜레스테롤, 중성지방 수치 및 혈당의 감소 뿐만 아니라 지방 축적, 지방간 및 신장손상 억제 등의 우수한 항당뇨 및 항비만 효과를 나타내므로, 당뇨, 당뇨 합병증 또는 비만의 예방 또는 치료제로 매우 유용하다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61K 38/16 (2013.01)
A61K 38/1709 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/328 (2013.01)
A23V 2200/332 (2013.01)

(72) 발명자
김수진
서울특별시 동대문구 한천로 224, 15동 1203호 (장안동, 현대아파트)
이혜정
서울특별시 성북구 인촌로22길 31, 303호 (안암동5가)
이용우
경기도 고양시 덕양구 고양대로1384번길 30, 901동 1401호 (성사동, 어울림마을9단지아파트)
김신애
서울특별시 성북구 안암동 57-3 B02
유연승
서울특별시 노원구 노원로22길 34, 109동 905호 (중계동, 롯데우성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013004796
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 (이공)후속연구지원 (개인)
연구과제명 신규발굴된 AMPK 활성인자 및 결합단백질의 혈당 및 암세포사멸 제어인자로서의 활용가능성 탐색
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교
연구기간 2015.05.01 ~ 2016.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

아펠린-16(apelin-16)을 유효성분으로 함유하는 당뇨, 당뇨 합병증 또는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 당뇨는 제1형 당뇨 또는 초기 제2형 당뇨인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 당뇨 합병증은 당뇨성 신증, 당뇨성 망막증, 고지혈증, 지방간, 동맥경화 및 고혈압으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 아펠린-16(apelin-16)은 인슐린 분비를 촉진하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 아펠린-16(apelin-16)은 혈중 총콜레스테롤 또는 중성지방을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 아펠린-16(apelin-16)은 지방축적을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

아펠린-16(apelin-16)을 유효성분으로 함유하는 당뇨, 당뇨 합병증 또는 비만의 예방 또는 개선용 식품.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 당뇨는 제1형 당뇨 또는 초기 제2형 당뇨인 것을 특징으로 하는 식품.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 당뇨 합병증은 당뇨성 신증, 당뇨성 망막증, 고지혈증, 지방간, 동맥경화 및 고혈압으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 식품.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 아펠린-16(apelin-16)은 인슐린 분비를 촉진하는 것을 특징으로 하는 식품.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 아펠린-16(apelin-16)은 혈중 총콜레스테롤 또는 중성지방을 감소시키는 것을 특징으로 하는 식품.

청구항 12

제7항에 있어서, 상기 아펠린-16(apelin-16)은 지방축적을 억제하는 것을 특징으로 하는 식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 아펠린-12(apelin-12), 아펠린-16(apelin-16) 또는 아펠린-36(apelin-36)을 유효성분으로 함유하는 당뇨 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 고농도 당에 의한 인슐린 분비를 더욱 촉진시켜 상승효과를 나타내는 아펠린-12(apelin-12), 아펠린-16(apelin-16) 또는 아펠린-36(apelin-36)을 함유하는 당뇨 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 제2형 당뇨병은 체내로 흡수된 포도당을 제대로 이용하지 못하여 여러 합병증을 유발시켜 환자의 사망률에 영향을 주는 질병이다. 실제 임상에서는 당뇨병 치료의 가장 중요한 부분인 혈당 조절이 어려운 실정으로, 당뇨병환자의 약 40%만이 당화혈색소 목표치인 7.0% 미만에 도달되어 있어 혈당관리를 위한 다각적 노력이 필요한 상태이다. 이러한 당뇨병을 치료하기 위해, 최근에는 인크레틴 호르몬 기반 치료제들이 널리 사용되고 있다.

[0004] 인크레틴 호르몬은 음식을 섭취하면 소장에서 분비되는 호르몬으로, 췌장에서 인슐린이 분비되는 것을 도와 최근 들어 당뇨병 치료의 새로운 대안으로서 각광받고 있다. 인크레틴 호르몬을 이용한 당뇨병 치료의 가장 큰 장점은 인슐린 호르몬 치료의 맹점인 저혈당, 체중 증가 등의 부작용이 적고, 당뇨병으로 손상된 췌장의 베타세포도 재생되며, 특히 고령인 환자에도 비교적 안전하게 사용될 수 있다는 점이다. 대표적인 인크레틴 호르몬인 glucagon-like peptide-1(GLP-1)과 glucose dependent insulinotropic polypeptide(GIP)은 영양소(nutrient)에 반응하여 장에서 생성되고 분비되는 것으로 알려져 있다. GLP-1과 GIP는 포도당 의존적인 방식으로 인슐린 분비의 증대 및 글루카곤 분비의 감소를 통해서 혈당을 낮추며, 또한 위배출(gastric emptying) 속도를 지연시키고, 포만감을 증가시켜 체중 증가에도 영향을 주지 않는 특징을 가지고 있다. 그러나, 두 호르몬 모두 dipeptidyl peptidase-4(DPP-4)에 의하여 빠르게 분해되기 때문에 치료 목적으로 사용하기에 어렵다는 문제점이 있다.

[0005] 이러한 문제점을 극복하기 위해, DPP-4 억제제 또는 DPP-4에 의해서 분해가 되지 않는 GLP-1 유사체(analogue)들이 개발되었다. DPP-4억제제는 영양소(nutrient)에 의한 active GLP-1의 분해를 억제하여 HbA1c를 최대 0.7% 정도 개선하며, GLP-1 유사체(analogue)는 HbA1c를 최대 1% 정도 개선하는 것으로 알려져 있다. 그러나 현재 사용되고 있는 GLP-1 유사체(analogue)나 DPP-4 억제제는 그 효과가 낮거나 췌장염 또는 췌장암 등의 위험성이 보고되고 있어, 새로운 당뇨병 치료제 개발이 필요하다.

[0006] 현재까지 혈당조절에 관여하는 주요 단백질로는 Akt, AS(Akt substrate) 160, PKCzeta 등이 있고, 주로 포도당 수송체(glucose transporter) 단백질의 수송에 작용한다고 알려져 있다. 또한, 당, 뇨 등에 대한 분자 수준에서의 발생기전은 인슐린 수용체 자체의 결함보다는 수용체 이후의 과정, 특히 PI-3 kinase(phosphoinositide-3 kinase)를 통한 단백질들 간의 신호전달 이상이 질병의 원인으로 여겨지고 있다. 따라서, 당뇨에 대한 인슐린의 치료 효과는 제한적이므로 혈당 조절과 관련된 신규 타켓 단백질 발굴 및 그 분자적 메커니즘을 밝히는 것이 중요하다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 혈당 조절을 타겟으로 하는 새로운 제1형 및 제2형 당뇨, 당뇨 합병증 또는 비만 치료제를 개발하고자 예의 노력한 결과, 아펠린-12(apelin-12), 아펠린-16(apelin-16) 또는 아펠린-36(apelin-36)이 인슐린 분비를 촉진하며, 특히 고혈당 조건에서 인슐린 분비의 상승효과를 나타낸다는 것을 확인하고, 본 발명을

완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 인슐린 분비를 촉진함으로써 혈당을 조절할 수 있는 아펠린-12(apelin-12), 아펠린-16(apelin-16) 또는 아펠린-36(apelin-36)을 함유하는 당뇨, 당뇨 합병증 또는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 식품을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 아펠린-12(apelin-12), 아펠린-16(apelin-16) 또는 아펠린-36(apelin-36)을 유효성분으로 함유하는 당뇨, 당뇨 합병증 또는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 아펠린-12(apelin-12), 아펠린-16(apelin-16) 또는 아펠린-36(apelin-36)을 유효성분으로 함유하는 당뇨, 당뇨 합병증 또는 비만의 예방 또는 개선용 식품을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 아펠린-12(apelin-12), 아펠린-16(apelin-16) 또는 아펠린-36(apelin-36)은 인슐린 분비 촉진을 통하여, 혈중 콜레스테롤, 중성지방 수치 및 혈당의 감소 뿐만 아니라 지방 축적, 지방간 및 신장손상 억제 등의 우수한 항당뇨 및 항비만 효과를 나타내므로, 당뇨, 당뇨 합병증 또는 비만의 예방 또는 치료제로 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 췌장 베타 세포주(INS-1)에 아펠린-16을 투여 후, 인슐린 양을 측정한 것이다.

도 2는 동물에서 분리한 islets에 아펠린-16을 처리 후, 인슐린 양을 측정한 것이다.

도 3은 고농도의 당(25 mM 글루코스) 조건에서 아펠린-16에 의해 유도되는 인슐린 분비 상승 효과를 확인한 것이다.

도 4는 고지방식이 마우스 모델에 아펠린-16을 투여한 후, 복부, 부고환, 간 및 신장에서 지방 축적을 관찰한 것이다.

도 5는 고지방식이로 비만이 유도된 마우스 모델에 아펠린-16을 투여한 후, 단백뇨 수치를 확인한 것이다.

도 6은 췌장 베타 세포주(INS-1)에 다양한 종류의 아펠린(36, 16, 12)을 투여 후, 인슐린 양을 측정한 것이다.

도 7은 동물에서 분리한 islets에 다양한 종류의 아펠린(36, 16, 12)을 처리 후, 인슐린 양을 측정한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0019] 아펠린(APLN)은 인간 *APLN* 유전자에 의해 암호화되는 펩타이드로(Tatemoto K *et al.*, *BBRC.* 251(2):471-6, 1988), G-단백질-결합 APJ 수용체에 대한 내인성 리간드이다(Lee *et al.*, *J. Neurochem.* 74(1):34-41, 2000; Szokodi *et al.*, *Circ. Res.* 91(5):434-40, 2002; Kleinz *et al.*, *Pharmacol. Ther.* 107(2):198-211, 2005). 아펠린 유전자는 N-말단 부위에 신호 펩타이드를 가지는 77개 아미노산의 프레프로단백질(preproprotein)을 인코딩한다. 신호 펩타이드가 절단되어 소포체로 전좌(translocation) 후에, 55개 아미노산의 프로단백질 아펠린은 여러개의 활성 단편을 생성하며, 서열 42-77에 대응하는 36개 아미노산 펩타이드는 아펠린-36, 서열 61-77에 대응하는 17개의 아미노산 펩타이드는 아펠린-17, 서열 65-77에 대응하는 13개 아미노산 펩타이드는 아펠린-13으로 명명하였다. 최근 아펠린-55(프로아펠린)부터 아펠린-12까지 46개의 다른 아펠린 펩타이드가 확인되었다(Mesmin C *et al.*, *J Proteome Res* 10(11):5222-31, 2011)

[0020] 아펠린/APJ 경로는 심혈관계에서 광범위하게 발현되고 아펠린은 전임상 모델에서 유익한 심혈관 효과를 나타내

었다. 인간에서 급성 아펠린 투여는 말초 및 관상동맥 혈관확장을 야기하고 심장 박출량을 증가시킨다. APJ 효능작용은 심부전을 앓고 있는 환자에 대한 치료 표적으로 부상하고 있다.

[0021] 또한, 아펠린은 새로운 마이오카인(myokine) 단백질 중 하나로 밝혀졌다 (A Basse-Patin *et al., Int J Obes.* 38(5): 707-13, 2014). 마이오카인은 신체 활동, 즉 운동에 따라 골격근으로부터 발현되거나 합성, 분비되는 활성물질이다 (Pedersen *et al., Journal of Applied Physiology,* 103(3): 1093-98, 2007). 대표적인 마이오카인으로는 IL-6가 알려져 있고, 이러한 마이오카인은 면역력을 높이고, 체중 조절 및 동맥경화 등을 예방한다. 따라서, 운동에 의해 당뇨 또는 비만 등이 예방되는 효과는 아펠린과 같은 마이오카인의 분비에 의한 것임을 알 수 있다.

[0023] 본 발명에서는 췌장 베타 세포주 및 마우스에서 분리한 islet에 아펠린-12, -16, -36의 처리 또는 고농도 당 조건의 아펠린-12, -16, -36을 처리하여 인슐린 분비 촉진을 확인하였다. 또한, 이에 따른 지방 축적 및 신장 손상 억제 효과를 확인함으로써, 아펠린-12, -16, -36의 당뇨, 비만 또는 신장 손상 등에 대한 치료 또는 예방 효과를 규명하였다.

[0024] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 아펠린-12(apelin-12), 아펠린-16(apelin-16) 또는 아펠린-36(apelin-36)을 유효성분으로 함유하는 당뇨, 당뇨 합병증 또는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 당뇨는 제1형 당뇨 또는 초기 제2형 당뇨인 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 당뇨 합병증은 당뇨성 신증, 당뇨성 망막증, 고지혈증, 지방간, 동맥경화, 고혈압으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 아펠린-12(apelin-12), 아펠린-16(apelin-16) 또는 아펠린-36(apelin-36)은 인슐린 분비를 촉진하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 고농도 당에 의한 인슐린 분비를 더욱 촉진하는 상승효과를 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 아펠린-12(apelin-12), 아펠린-16(apelin-16) 또는 아펠린-36(apelin-36)은 혈중 총콜레스테롤 또는 중성지방을 감소시키는 것을 특징으로 할 수 있으며, 또한, 지방 축적을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0028] 본 발명에 있어서, 상기 아펠린-12(apelin-12), 아펠린-16(apelin-16) 또는 아펠린-36(apelin-36)은 인슐린 분비 증가로 인해 혈당을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 또한, 고혈당에 의해 유발되는 신장 독성을 예방하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0029] 본 발명의 아펠린-12(apelin-12), 아펠린-16(apelin-16) 또는 아펠린-36(apelin-36)을 함유하는 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가적으로 포함할 수 있다. 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0030] 본 발명의 아펠린-12(apelin-12), 아펠린-16(apelin-16) 또는 아펠린-36(apelin-36)을 함유하는 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 환제, 과립제, 캡슐제, 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수용액제, 현탁액, 동결 건조제 및 좌제로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[0031] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 60, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 화합물은 1일 0.001~100 mg/kg으로 바람직하게는 0.01~10mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 경구 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 조성물은 당뇨, 당뇨 합병증 또는 비만의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0034] 본 발명은 다른 관점에서, 아펠린-12(apelin-12), 아펠린-16(apelin-16) 또는 아펠린-36(apelin-36)을 유효성분으로 함유하는 당뇨, 당뇨 합병증 또는 비만의 예방 또는 개선용 식품에 관한 것이다.

[0035] 본 발명의 식품은, 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태로 제조할 수 있다. 예를 들면, 건강식품으로는 본 발명의 Rad51을 차, 쥬스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 하거나, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 기능성 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과실 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지, 콘비프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 아펠린을 첨가하여 제조할 수 있다.

[0036] 상기 건강 기능식품 또한, 식품조성물로써 기능성 식품, 영양보조제, 건강식품, 식품 첨가제 등의 다양한 형태를 포함하는 것이며, 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태, 예컨대, 앞서 언급한 아펠린-12(apelin-12), 아펠린-16(apelin-16) 또는 아펠린-36(apelin-36)을 차, 쥬스, 드링크의 형태로 제조하거나, 과립화, 캡슐화, 분말화 하거나, 이러한 화합물 또는 추출물을 음료, 과실 및 가공식품, 어유, 육류 및 그 가공식품, 빵류, 면류, 조미료 등 각종 식품에 첨가하여 제조함으로써 제공될 수 있다.

[0038] **[실시예]**

[0039] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0041] **실시예 1: 아펠린-16에 의한 인슐린 분비 측정**

[0042] 본 실시예에서는 아펠린-16에 의한 인슐린 분비 증가를 확인하기 위하여, 췌장 베타 세포주(INS-1) (ATCC, American type culture collection) 및 마우스 (중앙실험동물, 한국)에서 분리된 islets에 아펠린-16을 처리한 후, 인슐린 양을 측정하였다.

[0044] 1-1 : 췌장 베타 세포주(INS-1)에서의 인슐린 분비

[0045] 2 X 10^6개의 췌장 베타 세포주(INS-1)를 6-웰 플레이트에 접종하고 6mM 글루코스가 포함된 RPMI1640 배지에서 3일간 배양하였다. 배양한 췌장 베타 세포주(INS-1)는 글루코스가 없는 KRBS 버퍼로 2번 세척한 후, 2.5mM 글루코스 (음성 대조군), 25mM 글루코스 (양성 대조군) 및 10ng/ml의 아펠린-16을 KRBS 버퍼에 희석하여 각각을 1시간 동안 처리하였다. 그 다음, 분비된 인슐린 양을 측정하기 위해, 각각의 세포에 처리한 버퍼 1ml을 취하여 효소면역분석법(enzyme immunoassay)으로 인슐린 양을 측정하였다.

[0046] 그 결과, 대조군 (2.5mM 글루코스 처리군)과 비교하여, 아펠린-16에 의해 인슐린 분비가 약간 증가한 것을 확인할 수 있었다 (도 1).

[0048] 1-2 : 마우스로부터 분리된 islets에서의 인슐린 분비

[0049] 마우스(중앙실험동물, 한국)의 쓸개관 (common bile duct)에 콜라게나제 P 용액 (Collagenase P solution)을 주입한 후, 췌장을 적출하였다. 적출한 췌장은 37℃ 항온수조 (water bath)에서 13분 20초 동안 반응시킨 후, 5% FBS-HBSS를 채운 뒤, 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 차가운 FBS-HBSS로 펠렛(pellet)을 재현탁(resuspend)시킨 후, 서로 다른 gradient 6ml을 섞어 원심분리하였다. 원심분리한 다음 RPMI1640 배지 10ml에 부유시켜, 100mm 배양접시에 접종하였다. 이렇게 분리하여 배양한 마우스의 islets는 실시예 1-1과 동일한 방법으로 인슐린 분비를 측정하였다.

[0050] 마우스로부터 분리하여 배양한 islets을 글루코스가 없는 KRBS 버퍼로 2번 세척한 후, 2.5mM 글루코스 (음성 대조군), 25mM 글루코스 (양성 대조군) 및 10ng/ml의 아펠린-16을 KRBS 버퍼에 희석하여 각각을 1시간 동안 처리하였다. 그 다음, 분비된 인슐린 양을 측정하기 위해, 각각의 세포에 처리한 버퍼 1ml을 취하여 효소면역분석법(enzyme immunoassay)으로 인슐린 양을 측정하였다.

[0051] 그 결과, 음성 대조군 (2.5mM 글루코스 처리군) 및 양성 대조군 (25mM 글루코스 처리군)과 비교하여, 아펠린-16에 의해 인슐린 분비가 증가한 것을 확인할 수 있었다 (도 2).

[0053] **실시예 2: 고농도 당으로 유도되는 인슐린 분비에 대한 아펠린-16의 효과 확인**

[0054] 본 실시예에서는 췌장 베타 세포주(INS-1)를 고농도의 당(25mM 글루코스)에서 배양하여, 고농도 당 조건에서 아펠린-16에 의한 인슐린 분비를 확인하였다.

[0055] 췌장 베타 세포주(INS-1)를 2.5mM 글루코스 조건 및 25mM 글루코스 조건 각각에 10ng/ml 아펠린-16을 1시간 동안 처리하여, 실시예 1-1과 동일한 방법으로 인슐린 분비를 측정하였다.

[0056] 그 결과, 2.5mM 글루코스 조건에서 아펠린-16을 처리한 경우보다, 25mM 글루코스 조건에서 아펠린-16을 처리한 경우, 인슐린 분비가 현저히 증가하는 것을 알 수 있었다 (도 3). 즉, 고농도 당으로 유도되는 인슐린 분비에서 아펠린-16에 의한 상승 효과를 확인할 수 있었다.

[0058] **실시예 3: 아펠린-16의 지방 축적 억제에 대한 효과 확인**

[0059] 본 실시예에서는 아펠린-16의 비만에 대한 효과를 확인하기 위하여, 고지방식이로 비만이 유도된 마우스의 복강에 아펠린-16을 투여한 후, 혈액검사 및 장기 내 지방 축적 상태를 관찰하였다. 고지방식이 C57BL/6 마우스는 초기 제2형 당뇨(early stage type2 diabetes)가 유발된다고 보고(*Diabetologia* 47:1541-1549, 2004)되어 있으므로, 본 실시예의 고혈당 동물모델로 선택하였다.

[0060] 6주령 C57BL/6 마우스 20 마리에 2주간 일반 사료를 급여하여 적응시키고, 이후 8주령부터 20주령이 될때까지 12주간 60% 고지방식이를 급여하였다. 10 마리는 고지방식이(HFD)만 섭취하게 하고, 나머지 10 마리는 고지방식이(HFD)와 동시에 아펠린-16 (0.5㎍/g/day)을 12주간 복강(ntra-peritoneal)투여하였다. 12주간의 고지방식이 및 아펠린 투여가 완료된 20주령의 마우스는 혈액검사 및 개복하여 관찰하였다.

[0061] 혈액검사 결과, 총 콜레스테롤(CHO), 글루코스(GLU) 및 중성지방(TG) 수치는 대조군에 비해 고지방식이 그룹에서 증가하였으며, 아펠린-16을 투여한 그룹에서는 총 콜레스테롤(CHO), 글루코스(GLU) 및 중성지방(TG) 수치가 고지방식이 그룹에 비해 감소하였다. 또한, 인슐린 수치는 고지방식이 그룹에 비해, 아펠린-16을 투여한 그룹에서 증가한 것을 알 수 있었다 (표 1). 즉, 이는 아펠린-16에 의해 인슐린 분비가 촉진됨으로써 당의 농도가 감소하였음을 보여주는 것이다.

표 1

[0062] Blood chemistry

	CHO (mg/dL)	GLU (mg/dL)	TG (mg/dL)	Insulin (uIU/ml)
Normal	95.53	301.15	61.04	3.19
HFD	150.70	352.06	102.76	4.70
HFD+Apelin-16	125.23	304.43	82.76	4.99

[0063] 다음으로, 마우스를 개복하여 관찰한 결과, 고지방식이 그룹에서는 복부 내, 부고환(epididymal), 간 및 신장 주위에 지방이 많이 축적되어 복부비만 및 지방간이 관찰되었으며, 아펠린-16을 투여한 그룹에서는 이러한 지방 축적이 여러 장기에서 억제되어 있는 것을 확인할 수 있었다 (도 4). 즉, 아펠린은 지방축적에 대해 억제 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0065] **실시예 4: 아펠린-16의 신장 손상에 대한 효과 확인**

[0066] 당뇨가 오래 진행되면 고혈당에 의해 신장조직이 손상되고 단백뇨가 나타나므로, 당뇨성 신증과 같은 당뇨 합병증에 대한 아펠린-16의 효과를 확인하였다. 실시예 3의 고지방식이 C57BL/6 마우스는 비만이 유도된 고혈당 동물모델이므로, 동일한 실험군으로 당뇨성 신증에 대한 효과를 확인하였다.

[0067] 실시예 3의 12주간의 고지방식이 및 아펠린 투여가 완료된 20주령의 마우스를 희생시키기 1주일 전, 소변

(urine)을 채취하여 소변내 알부민 농도(UAC; Urinary Albumin Concentration)를 측정하였다.

[0068] 그 결과, 고지방식이로 비만이 유도된 마우스 그룹의 소변에서는 알부민 수치가 정상식이 마우스(대조군)보다 증가한 반면, 아펠린-16을 투여한 마우스 그룹의 소변에서는 알부민 수치가 대조군과 거의 비슷하게 감소한 것으로 나타났다 (도 5). 이는, 아펠린-16이 인슐린 분비를 촉진하여 당 수치를 감소시킴으로써, 고농도의 당에 의해 유발되는 신장 손상을 어느 정도 예방한다는 것을 알 수 있다.

[0070] **실시예 5: 다양한 종류의 아펠린 효과 비교**

[0071] 본 실시예에서는 여러 종류의 아펠린에 의한 인슐린 분비 증가를 비교하기 위하여, 췌장 베타 세포주(INS-1) 및 마우스에서 분리된 islets에 다양한 종류의 아펠린을 처린한 후, 인슐린 양을 측정하였다.

[0073] 5-1 : 췌장 베타 세포주(INS-1)에서의 인슐린 분비

[0074] 2 X 10^6개의 췌장 베타 세포주(INS-1)를 6-웰 플레이트에 접종하고 6mM 글루코스가 포함된 RPMI1640 배지에서 3일간 배양하였다. 배양한 췌장 베타 세포주(INS-1)는 글루코스가 없는 KRBS 버퍼로 2번 세척한 후, 2.5mM 글루코스 (음성 대조군), 25mM 글루코스 (양성 대조군) 및 10ng/ml의 아펠린-36, -16, -12를 KRBS 버퍼에 희석하여 각각을 1시간 동안 처리하였다. 그 다음, 분비된 인슐린 양을 측정하기 위해, 각각의 세포에 처리한 버퍼 1ml을 취하여 효소면역분석법(enzyme immunoassay)으로 인슐린 양을 측정하였다.

[0075] 그 결과, 대조군 (2.5mM 글루코스 처리군)과 비교하여, 아펠린에 의해 인슐린 분비가 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 아펠린-16이 상대적으로 인슐린 분비능력이 가장 우수함을 알 수 있었다 (도 6). 이는 아펠린-12와 아펠린-16 사이의 아미노산 서열이 인슐린 분비 능력에 중요하다는 것을 의미한다.

[0077] 5-2 : 마우스로부터 분리된 islets에서의 인슐린 분비

[0078] 마우스의 쓸개관 (common bile duct)에 콜라게나제 P 용액 (Collagenase P solution)을 주입한 후, 췌장을 적출하였다. 적출한 췌장은 37℃ 항온수조 (water bath)에서 13분 20초 동안 반응시킨 후, 5% FBS-HBSS를 채운 뒤, 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 차가운 FBS-HBSS로 펠렛(pellet)을 재현탁(resuspend)시킨 후, 서로 다른 gradient 6ml을 섞어 원심분리하였다. 원심분리한 다음 RPMI1640 배지 10ml에 부유시켜, 100mm 배양접시에 접종하였다. 이렇게 분리하여 배양한 마우스의 islets는 실시예 5-1과 동일한 방법으로 인슐린 분비를 측정하였다.

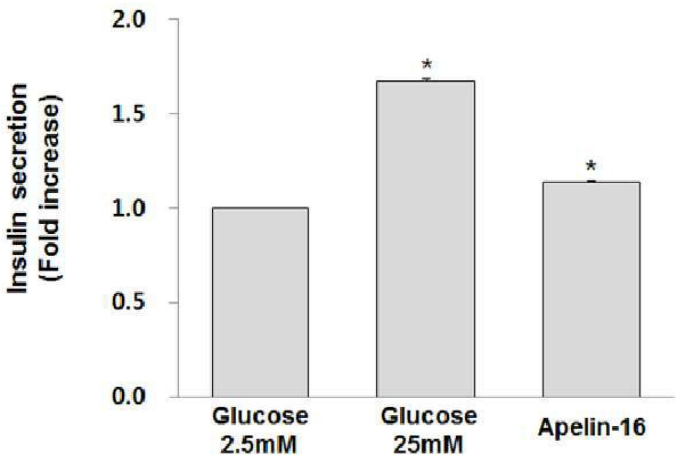
[0079] 마우스로부터 분리하여 배양한 islets을 글루코스가 없는 KRBS 버퍼로 2번 세척한 후, 2.5mM 글루코스 (음성 대조군), 25mM 글루코스 (양성 대조군) 및 10ng/ml의 아펠린-36, -16, -12를 KRBS 버퍼에 희석하여 각각을 1시간 동안 처리하였다. 그 다음, 분비된 인슐린 양을 측정하기 위해, 각각의 세포에 처리한 버퍼 1ml을 취하여 효소면역분석법(enzyme immunoassay)으로 인슐린 양을 측정하였다.

[0080] 그 결과, 음성 대조군 (2.5mM 글루코스 처리군) 및 양성 대조군 (25mM 글루코스 처리군)과 비교하여, 아펠린에 의해 인슐린 분비가 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 아펠린-16이 상대적으로 인슐린 분비능력이 가장 우수함을 알 수 있었다 (도 7). 이는 아펠린-12와 아펠린-16 사이의 아미노산 서열이 인슐린 분비 능력에 중요하다는 것을 의미한다.

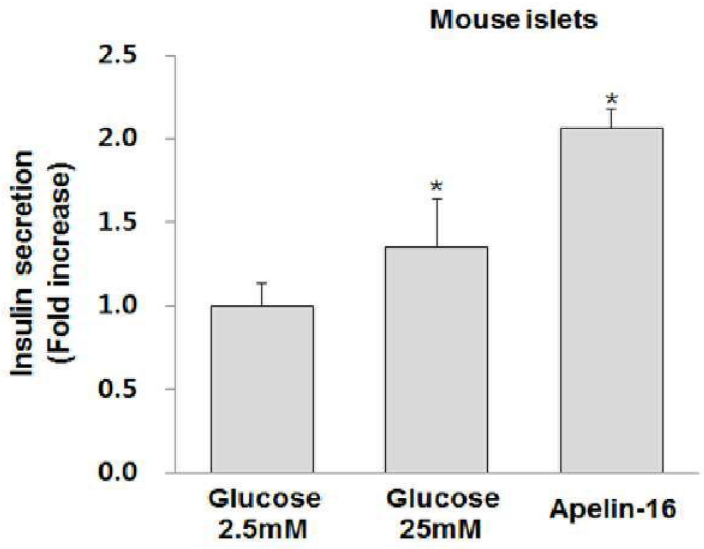
[0082] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

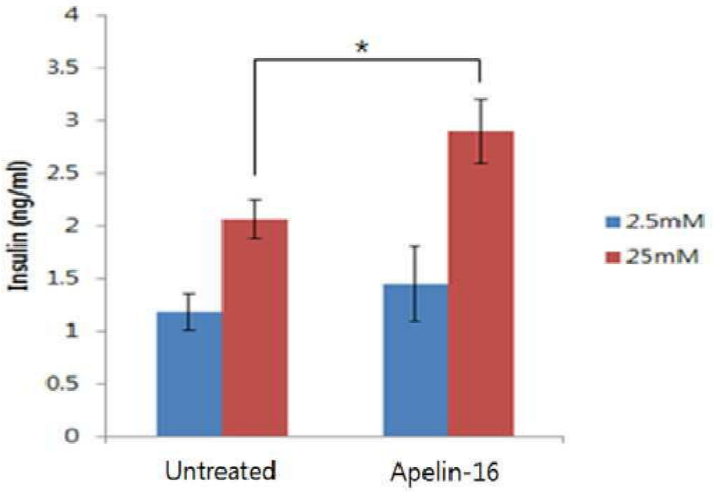
도면1


Insulin secretion
(Fold increase)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
Glucose
2.5mM
Glucose
25mM
Apelin-16

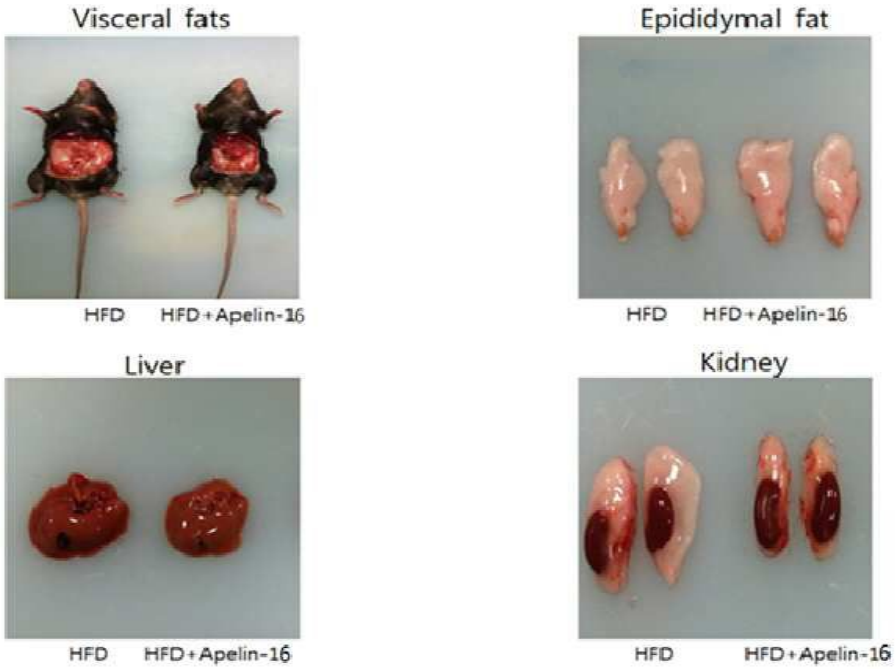
도면2


Mouse islets
Insulin secretion
(Fold increase)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
Glucose
2.5mM
Glucose
25mM
Apelin-16

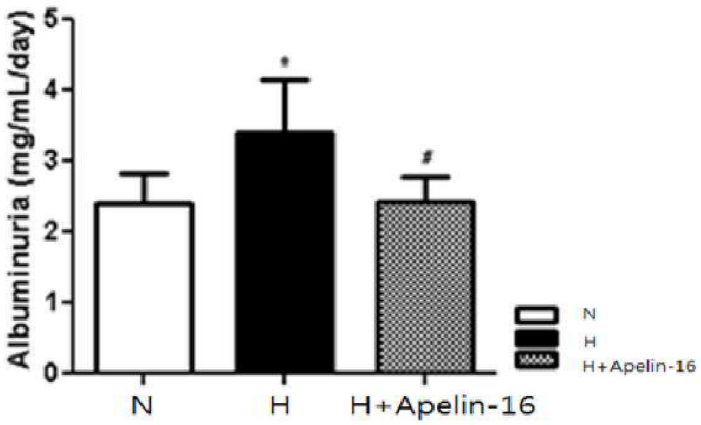
도면3


4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Insulin (ng/ml)
*
2.5mM
25mM
Untreated
Apelin-16

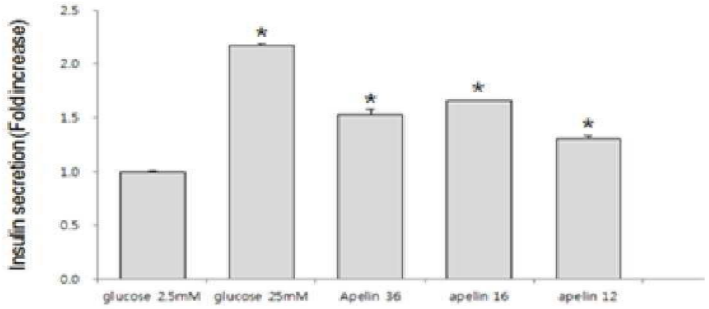
도면4


Visceral fats
HFD
HFD+Apelin-16
Epididymal fat
HFD
HFD+Apelin-16
Liver
HFD
HFD+Apelin-16
Kidney
HFD
HFD+Apelin-16

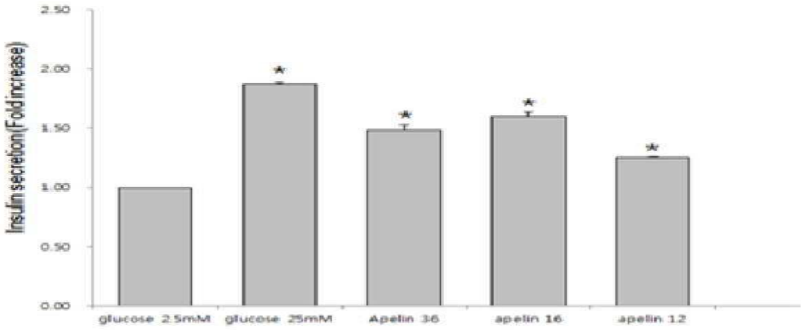
도면5


Albuminuria (mg/mL/day)
5
4
3
2
1
0
*
#
N
H
H+Apelin-16
N
H
H+Apelin-16

도면6


Insulin secretion(Fold increase)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
*
*
glucose 2.5mM
glucose 25mM
Apelin 36
apelin 16
apelin 12

도면7


Insulin secretion(Fold increase)
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
*
*
*
*
glucose 2.5mM
glucose 25mM
Apelin 36
apelin 16
apelin 12