



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0051669
(43) 공개일자 2019년05월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/744 (2014.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61K 35/747 (2014.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/744 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0147555
(22) 출원일자 2017년11월07일
심사청구일자 2017년11월07일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
김민석
서울특별시 양천구 안양천로 1071, A동 305호 (목동)
(74) 대리인
김순용

전체 청구항 수 : 총 10 항

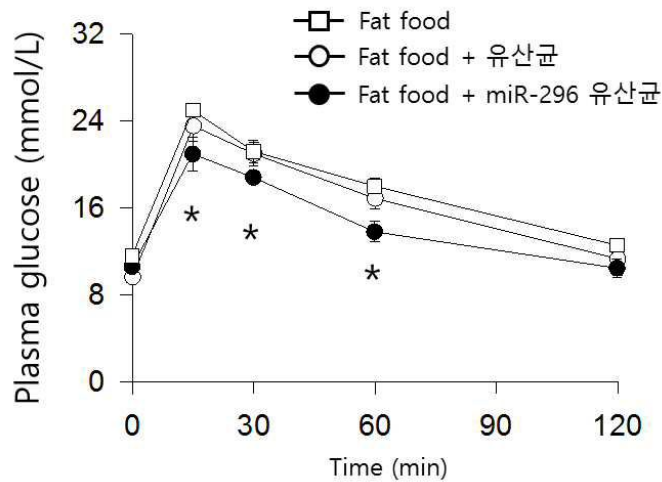
(54) 발명의 명칭 miR-296을 발현하는 재조합 유산균의 항당뇨 용도

(57) 요약

본 발명은 당뇨병의 예방 또는 치료를 위한 miR-296을 발현하는 유전자를 포함하는 플라스미드 또는 상기 플라스미드를 포함하는 유산균을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 조성물은 유전물질을 직접 투여하지 않고 형질전환된 유산균을 이용하여 경구 투여가 가능하고, 유전물질의 직접 투여에 따른 부작용을 나타내지 않으면서 우수한 혈당 강하 효과를 나타내, 안전하고 효과가 우수한 당뇨병 치료제 및 건강기능식품으로 활용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 35/747 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/328 (2013.01)

Y10S 514/866 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0027945

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구지원센터사업

연구과제명 조직손상방어연구센터

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2017.09.01 ~ 2018.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

miR-296을 발현하는 유전자를 포함하는 플라스미드를 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

miR-296을 발현하는 유전자를 포함하는 플라스미드가 형질전환된 유산균을 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 miR-296을 발현하는 유전자는 서열번호 3의 염기서열로 구성되는 유전자인, 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 유산균은 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물인, 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 유산균은 락토코커스(*Lactococcus*) 속인, 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 락토코커스(*Lactococcus*) 속 유산균은 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*)인, 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*)는 락토코커스 락티스 아종 크레모리스(*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), 락토코커스 락티스 아종 호르드니아에(*Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*), 락토코커스 락티스 아종 락티스(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 및 락토코커스 락티스 아종 트럭타(*Lactococcus lactis* subsp. *tructae*)를 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상인, 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제2항에 있어서, 상기 유산균은 락토코커스 락티스 아종 락티스(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) (수탁번호 KCCM 40104)인, 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제2항에 있어서, 상기 당뇨병은 제2형 당뇨병인, 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

miR-296을 발현하는 유전자를 포함하는 플라스미드가 형질전환된 유산균을 포함하는 당뇨병 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 miR-296을 발현하는 유전자를 포함하는 플라스미드를 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성

물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 상기 플라스미드를 포함하는 유산균을 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 당뇨병(diabetes mellitus)은 인슐린의 분비량이 부족하거나 정상적인 기능이 이루어지지 않는 등에 따른 대사 질환의 일종으로, 혈중 포도당의 농도가 높아지는 고혈당을 특징으로 하며, 고혈당으로 인하여 여러 증상 및 징후를 일으키고 소변에서 포도당을 배출하게 된다. 당뇨병은 제1형과 제2형으로 구분되는데, 제1형 당뇨병은 이전에 '소아 당뇨병'이라고 불렸으며, 인슐린을 생산하지 못하는 것이 원인이 되어 발생하는 질환이다. 제2형 당뇨병은 인슐린 저항성(insulin resistance; 세포가 인슐린을 인식하는 기능이 떨어져 세포가 포도당을 효과적으로 연소하지 못하는 것)을 특징으로 한다. 제2형 당뇨병은 식생활의 서구화에 따른 고열량, 고지방, 고단백의 식단, 운동 부족, 스트레스 등 환경적인 요인이 크게 작용하는 것으로 보이지만, 이 외에 특정 유전자의 결합에 의해서도 당뇨병이 생길 수 있으며, 췌장 수술, 감염, 약제에 의해서도 생길 수 있다.

[0003] 당뇨병은 최근 고령화 사회에서 큰 문제로 대두되고 있으며, 당뇨병 자체의 문제 뿐만 아니라 신증, 망막증 등의 만성 합병증을 유발하는 심각성을 나타낸다. 따라서, 당뇨병의 치료를 위한 연구가 지속적으로 이루어지고 있으며, 그 결과 국내공개특허 제10-2017-0012682호를 비롯하여 경구용 혈당강하제, 인슐린주사, 췌장 또는 췌도세포이식 등의 다양한 치료법이 개발되었다. 그러나, 상기 치료법들은 당뇨병의 증상을 완화시켜주거나, 합병증의 발생시기만을 늦추주는 한계가 있다.

[0004] 한편, 당뇨병을 완치하기 위한 치료 방안으로서 유전자 치료법을 도입한 연구가 이루어지고 있다. 그러나, 대부분의 유전자 치료는 질병을 유발하는 인자를 직접적인 타겟으로 하는데, 기존의 유전자 치료법의 개념을 당뇨병 치료에 그대로 도입할 경우, 인슐린의 과발현이 고혈당을 정상 수준으로 유지하는 것을 넘어 저혈당을 초래할 수 있는 위험성이 있다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 인슐린을 타겟으로 하지 않으면서도 유전물질에 따른 당뇨병 치료 효과를 달성할 수 있는 치료제의 연구를 지속적으로 수행한 결과, miR-296의 발현이 가능한 플라스미드를 삽입한 형질전환된 유산균이 혈당 강하효과를 나타냄을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 국내공개특허 제10-2017-0012682호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 miR-296을 발현하는 유전자를 포함하는 플라스미드를 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 플라스미드가 형질전환된 유산균을 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 수행하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 miR-296을 발현하는 유전자를 포함하는 플라스미드를 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 miR-296을 발현하는 유전자를 포함하는 플라스미드가 형질전환된 유산균을 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명자들은 miR-296의 발현이 가능한 플라스미드가 형질전환된 유산균이 혈당 강하 효과를 나타냄을 확인하였다. 이는 유전물질을 활용한 당뇨병 치료제의 직접 투여시 발생할 수 있는 부작용을 극복하면서도 우수한 혈당 강하 효과가 발휘됨을 최초로 입증하는 것이다.

- [0012] 본 발명에서 상기 당뇨병은 제1형 당뇨병 또는 제2형 당뇨병일 수 있으며, 바람직하게는 제2형 당뇨병일 수 있다.
- [0013] 구체적으로 본 발명의 실시예에서, miR-296의 발현이 가능한 플라스미드가 형질전환된 유산균을 인슐린 저항성 유도 동물모델에 투여한 경우, 우수한 혈당 강하 효과를 나타내므로, 상기 플라스미드 및 플라스미드가 형질전환된 유산균이 당뇨병 치료제로 활용될 수 있음을 확인하였다(도 2).
- [0014] 본 발명에서 사용되는 용어, "miR-296"은 RNA 간섭을 일으키는 RISC와 연관된, 인간을 포함하는 포유류에서 발견되는 microRNA 전구체 패밀리의 일종을 의미한다. 상기 miR-296은 서열번호 1의 서열 또는 서열번호 2의 서열로 구성되는 microRNA일 수 있다.
- [0015] 서열번호 1의 서열: 5'-AGGGCCCCCCCUCAAUCCUGU-3'
- [0016] 서열번호 2의 서열: 5'-GAGGGUUGGGUGGAGGCUCUCC-3 '
- [0017] 본 발명에서 사용되는 용어, "플라스미드"는 일반적으로 목적하는 유전자가 숙주에서 정상적으로 발현될 수 있도록 작동 가능하게 연결될 수 있는 환상의 DNA 분자로서, 목적하는 유전자를 숙주 내로 안정적으로 운반할 수 있는 운반체인 벡터이다. 본 발명에서는 플라스미드와 벡터가 상호 교환적으로 사용될 수 있고, 본 발명의 통상의 지식을 가진 자는 상호 교환적인 사용으로도 의미를 충분히 이해할 수 있다.
- [0018] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 발명의 목적하는 유전자의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.
- [0019] 본 발명에서 사용되는 목적하는 유전자는 플라스미드에 포함되어 miR-296의 발현이 가능한 유전자로서, 구체적으로 상기 miR-296의 발현이 가능한 유전자는 서열번호 3의 염기서열로 구성되는 유전자일 수 있다.
- [0020] 서열번호 3의 서열: 5'-AGGACCTTCCAGAGGGCCCCCCTCAATCCTGTTGTCCTAATCAGAGGGTTGGGTGGAGGCTCTCCTGAAGGGCTCT-3'
- [0021] 본 발명에 따른 miR-296의 발현이 가능한 유전자를 포함하는 플라스미드는 당해 분야에 공지된 방법으로 제조할 수 있다. 구체적으로, 정상적으로 miR-296을 발현할 수 있도록 재조합적으로 제작된 플라스미드는 유산균 내에서의 복제를 위한 복제 오리진, 상기 유산균 내에서 정상적인 유전자 발현을 위한 작동가능한 프로모터, 상기 유산균 내에서 발현 여부를 확인하기 위한 마커 유전자 및 miR-296의 발현이 가능한 유전자를 포함할 수 있다. 상기 miR-296의 발현이 가능한 유전자는 제한 효소에 의해 플라스미드에 도입될 수 있다.
- [0022] 상기 제한 효소는 DNA 분자의 특정 염기서열을 인식하여 인식된 부분 또는 인식된 주변의 절단을 촉매하는 효소를 의미한다. 상기 제한 효소는 목적하는 유전자를 플라스미드에 삽입하기 위하여 통상적으로 사용되는 제한 효소일 수 있고, 구체적으로 EcoR I, BamH I, HindIII, kpn I, Not I, Pst I, Sma I, Xho I 또는 이들의 2 이상의 조합일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로, 본 발명의 miR-296의 발현이 가능한 유전자를 플라스미드에 삽입하기 위하여 사용되는 제한 효소는 BamH I 및 Xho I 일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 유산균은 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물일 수 있고, 당뇨병의 예방 또는 치료 효과를 달성할 수 있는 유산균의 형태라면 제한없이 사용될 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 사용되는 용어, "배양물"은 유산균을 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 배양시켜 수득한 사물을 의미하며, 본 발명에서는 miR-296의 발현이 가능한 플라스미드가 형질전환된 유산균을 포함하는 개념이다.
- [0025] 본 발명의 약학적 조성물에서 사용되는 플라스미드와 유산균은 목적하는 유전자가 정상적으로 작동할 수 있도록 설계되는 범위 내에서 제한없이 사용될 수 있다. 구체적으로 목적하는 유전자, 즉 miR-296의 발현이 가능한 유전자가 포함된 플라스미드는 유산균에 형질전환 된 상태에서 목적하는 유전자가 정상적으로 miR-296을 발현할 수 있도록 하는 플라스미드일 수 있고, 상기 플라스미드가 형질전환된 유산균은 miR-296의 발현을 개시하는 전사인자를 발현하는 유산균일 수 있다.
- [0026] 상기 플라스미드는 원핵 세포를 숙주로 하는 경우 전사를 진행시킬 수 있는 프로모터를 갖는 플라스미드로서, 상기 프로모터는 pL λ 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, T7 프로모터, tac 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 상기 miR-296의 발현이 가능하도록 설계되는 플라스미드와 유산균의 일례로, miR-296의 발현이 가능한 유전자

가 삽입된 플라스미드는 전사조절인자들이 결합하는 특정 프로모터 부위를 포함할 수 있고, 유산균은 상기 특정 프로모터에 결합하여 전사를 개시할 수 있는 전사조절인자의 발현이 가능한 유산균일 수 있다. 구체적으로, 상기 특정 프로모터 부위는 니신 프로모터 (nisin promoter)이고, 전사조절인자는 니신(nisin)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0028] 구체적으로 본 발명의 실시예에서, 니신 프로모터를 포함하는 miR-296의 발현이 가능한 플라스미드가 형질전환된 니신의 발현이 가능한 유산균이 miR-296을 발현할 수 있음을 확인하였다.
- [0029] 본 발명의 플라스미드가 니신 프로모터(nisin promoter)를 포함하여 니신-조절 발현 시스템(nisin-controlled expression system, NICE)이 작동하는 플라스미드일 경우(Xu Xia Zhou et al., 2005), 상기 플라스미드는 pNZ123, pNZ273, pNZ8020, pNZ8037, pNZ8048, pNZ8110, pNZ8112, pNZ8113, pNZ8148, pNZ8150, pNZ9530, pNZ9520, pNZ9500, pGIP013, pREXC3H, pREXNH3, pMSP3545 또는 pMSP3535일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 구체적으로 상기 플라스미드는 pMSP3535일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 유산균은 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속, 락토코커스(*Lactococcus*) 속, 류코노스톡(*Leuconostoc*) 속, 페디오코커스(*Pediococcus*) 속, 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속 등의 당류를 발효하여 에너지를 획득하고 다량의 락트산을 생성하는 균을 의미한다.
- [0031] 상기 유산균은 본 발명에서 사용되는 플라스미드의 프로모터의 종류에 따라 달라질 수 있다. 일례로, 본 발명에서 사용되는 플라스미드가 니신 프로모터를 포함하는 플라스미드인 경우, 상기 유산균은 상기 프로모터에 결합하여 전사의 개시가 가능한 니신을 발현할 수 있는 유산균일 수 있다. 이 경우, 상기 유산균은 락토코커스 속 유산균으로서, 락토코커스 락티스 (*Lactococcus lactis*)일 수 있다. 구체적으로, 상기 락토코커스 락티스는 락토코커스 락티스 아종 크레모리스(*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), 락토코커스 락티스 아종 호르드니아에(*Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*), 락토코커스 락티스 아종 락티스(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 및 락토코커스 락티스 아종 트럭타(*Lactococcus lactis* subsp. *tructae*)를 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 구체적으로, 상기 유산균은 수탁번호 KCCM 40104의 락토코커스 락티스 아종 락티스 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 일 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 사용되는 용어, "형질전환"은 목적하는 유전자를 포함하는 벡터를 숙주에 도입하여 숙주 내에서 상기 목적하는 유전자가 정상적으로 발현할 수 있도록 하는 일련의 작업을 의미하며, 본 발명에서 상기 숙주는 유산균일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 플라스미드를 유산균 내로 형질전환하는 방법은, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포솜-매개 형질감염법, 아그로박테리움-매개 형질 감염법, DEAE-텍스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 약학적 조성물은 miR-296을 발현하는 유전자를 포함하는 플라스미드 또는 상기 플라스미드가 형질전환된 유산균을 유효성분으로 포함하는 것 이외에 상기 플라스미드 또는 유산균의 활성을 저해하지 않는 범위 내에서 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 사용될 수 있는 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 말토 텍스트린, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 필요한 경우, 부형제, 희석제, 항산화제, 완충액 또는 정균제 등 기타 약학적으로 허용 가능한 첨가제들을 첨가하여 사용할 수 있으며, 충전제, 증량제, 습윤제, 붕해제, 분산제, 계면 활성제, 결합제 또는 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 사용할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, miR-296을 발현하는 유전자를 포함하는 플라스미드가 형질전환된 유산균은 약학적 조성물의 전체의 중량을 기준으로 0.00001 중량% 내지 99.99 중량%로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 90 중량%, 보다 바람직하게는 0.1 중량% 내지 70 중량%, 더욱 바람직하게는 0.1 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으나 이에 한정되지 않으며, 투여 대상의 상태, 구체적인 병증의 종류, 진행 정도 등에 따라 다양하게 변경될 수 있다. 필요한 경우, 약학적 조성물의 전체 함량으로도 포함될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 약학적 조성물은 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다. 구체적으

로, 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여(예를 들어, 도포 또는 정맥 내, 피하, 복강 내 주사)할 수 있으나 경구 투여가 바람직하다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡슐제, 환제 등이 포함될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 에어로졸 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제로는 각각 통상의 방법에 따라 멸균된 수용액, 액제, 비수성유제, 현탁제, 에멀전, 점안제, 안연고제, 시럽, 좌제, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사제제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 안연고제, 점안제, 파스타제 또는 카타폴 라스마제의 약제학적 조성물을 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 약학적 조성물의 약학적 유효량, 유효 투여량은 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식 및/또는 투여 시간 등에 의해 다양해질 수 있으며, 약학적 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의학 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다.

[0040] 본 발명의 약학적 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양으로 투여할 수 있으며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 구체적으로, 경구 투여제의 경우 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1 kg당 본 발명의 조성물을 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여할 수 있다. 상기와 같이 투여제를 투여할 경우, 본 발명의 miR-296을 발현하는 유전자를 포함하는 플라스미드가 형질전환된 유산균을 1일 1×10^1 CFU/kg 내지 1×10^{13} CFU/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0041] 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로 사용하여도 우수한 효과를 발휘할 수 있으나, 치료 효율을 증가시키기 위하여 추가적으로 호르몬 치료, 약물 치료 등의 다양한 방법들과 병용하여 사용될 수 있다.

[0042] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 miR-296을 발현하는 유전자를 포함하는 플라스미드가 형질전환된 유산균을 포함하는 당뇨병 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0043] 상기 건강기능식품은 식품의 생체 조절 기능을 강조한 식품으로 물리적, 생화학적, 생물공학적인 방법을 이용하여 특정 목적에 작용 및 발현하도록 부가가치를 부여한 식품이다. 이러한 건강기능식품의 성분은 생체 방어와 신체 리듬의 조절, 질환의 방지 및 회복에 관계하는 신체 조절 기능을 생체에 대하여 충분히 발휘하도록 설계하여 가공하게 되며, 식품으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제, 감미료 또는 기능성 원료를 함유할 수 있다.

[0044] 본 발명의 miR-296을 발현하는 유전자를 포함하는 플라스미드가 형질전환된 유산균을 건강기능식품(또는 건강기능 음료 첨가물)으로 사용할 경우, 상기 유산균을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용하고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 상기 유산균의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 개선, 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0045] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 점증제, pH 조절제, 안정화제, 보존제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 건강기능식품은 과일 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 단독으로 또는 조합으로 사용될 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 조성물 전체 중량당 0.001 내지 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0046] 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 유산균을 첨가할 수 있는 식품은 소세지, 육류, 빵, 초콜릿류, 스낵류, 캔디류, 과자류, 라면, 피자, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있다. 음료수로 제형화할 경우에 신규한 유산균 이외에 첨가되는 액체 성분으로는 이에 한정되지는 않으나, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예, 포도당, 과당

등), 디사카라이드(예, 말토오스, 수크로오스 등) 및 폴리사카라이드(예, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당), 및 자일리톨, 소르비톨, 에리스리톨 등의 당 알코올일 수 있다.

[0047] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 miR-296을 발현하는 유전자를 포함하는 플라스미드가 형질전환된 유산균을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 당뇨병의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0048] 상기 개체는 동물을 말하며, 전형적으로 본 발명의 신규한 유산균을 이용한 치료로 유의한 효과를 나타낼 수 있는 포유동물일 수 있다. 이러한 개체의 바람직한 예로 인간과 같은 영장류, 랫트, 마우스, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 또는 염소가 포함될 수 있다. 또한 이와 같은 개체들에는 뇌신경질환 또는 염증 질환의 증상을 갖거나 이와 같은 증상을 가질 위험이 있는 개체들이 모두 포함될 수 있다.

발명의 효과

[0049] 본 발명의 miR-296을 발현하는 유전자를 포함하는 플라스미드가 형질전환된 유산균은 유전물질의 직접 투여에 따른 부작용을 나타내지 않으면서 우수한 혈당 강하 효과를 나타내어, 안전하면서도 당뇨병 치료 효과가 우수한 치료제 및 당뇨병 개선 효과가 우수한 건강기능식품으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 miR-296 유전자가 삽입된 플라스미드를 나타낸 도이다.

도 2는 니신 프로모터를 포함하는 플라스미드가 니신의 존재 하에서 miR-296의 발현이 가능함을 확인한 그래프이다.

도 3은 miR-296을 발현하는 플라스미드가 형질전환된 유산균을 인슐린 저항성이 있는 마우스에 투여한 경우 혈당 수준이 감소함을 확인한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 실시예 1: miR-296을 발현하는 플라스미드의 제조

[0053] Origene Technologies에서 구입한 서열번호 3의 miR296-DNA(MI0000747)과 Addgene에서 구입한 pMSP3535(#46886) 플라스미드를 준비하였다. 상기 miR296-DNA 및 pMSP3535 플라스미드를 제한 효소인 BamHI 및 XhoI으로 절단한 후 2% 아가로즈 겔에 로딩하여 잘려진 DNA와 플라스미드를 분리하였다. 아가로즈 겔에서 절단된 pMSP3535 플라스미드와 miR296-DNA를 면도칼로 잘라낸 후 Gel extraction kit (#28704, QIAGEN)으로 회수하였다. 회수된 miR296-DNA와 pMSP3535를 ligation (#M2200S, NEB) 효소와 섞어서 miR296-DNA를 pMSP3535에 삽입한 후 2% 아가로즈 겔에 로딩하여 성공적으로 삽입된 플라스미드를 분리하였다. 면도칼로 겔을 자른 후 Gel extraction kit을 사용하여 miR-296의 발현이 가능한 플라스미드를 회수하였다 (도 1).

[0054] 상기 플라스미드는 니신 프로모터를 포함하고 있으므로, 니신의 작용으로 miR-296의 발현이 가능하며, 실제 니신의 존재 하에 miR-296의 발현을 확인한 결과, 상기 제조한 플라스미드(pMSP3535_miR296-DNA)의 경우 miR-296을 발현하는 반면, 제조되지 않은 플라스미드(pMSP3535)는 miR-296을 발현하지 않음을 확인하였다 (도 2).

[0055] 실시예 2: miR-296을 발현하는 플라스미드가 형질전환된 유산균의 제조

[0056] 상기 실시예 1과 같이 제조된 플라스미드를 한국미생물보존센터에서 분양받은 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*, 수탁번호 KCCM40104)에 전기 천공 방법을 사용하여 삽입 및 형질전환하였다. 제조된 플라스미드는 에리스로마이신(erythromycin) 항생제에 저항을 나타내는 유전자가 있으므로 에리스로마이신 항생제가 있는 배지에서 성장한 유산균을 형질 전환된 유산균으로 선별하였다.

[0057] 실시예 3: 혈당 강하 효과

[0058] 고지방식을 먹여 인슐린 저항성이 있는 마우스를 제조하였다. 상기 마우스에 상기 실시예 2와 같이 제조된 miR-296을 발현하는 플라스미드가 형질 전환된 유산균을 구강 투여하였다. 구체적으로, 고지방식을 10주 동안 먹인 후 (생후 14주), 1×10^{10} cfu 정도의 유산균을 200ul씩 일주일간 구강 투여하였다. 혈당측정 당일 8시간 금식을 시킨 후 20% 설탕용액 (1mg/g body weight)을 복강 내 주사하였다. 각각 0, 15, 30, 60, 90, 120분에 마우스

꼬리에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다.

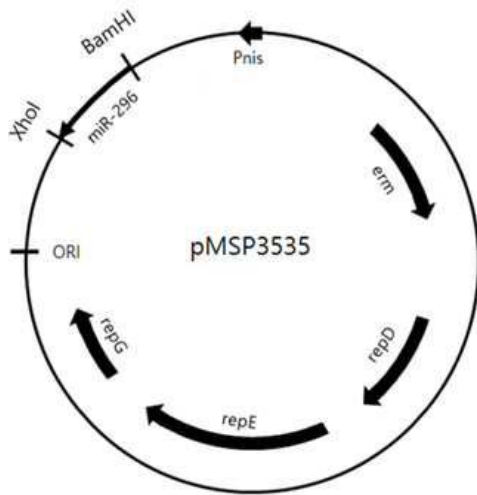
[0059] 측정 결과, 플라스미드가 형질전환되지 않은 유산균을 투여한 군은 고지방 식이군(형질전환된 유산균을 투여하지 않은 군)과 유사한 수준의 혈당 수치를 나타냄을 확인하였다. 그러나, miR-296을 발현하는 플라스미드가 형질전환된 유산균을 투여한 군의 경우 혈당 수준이 현저히 감소됨을 확인하였다 (도 3).

[0060] 이를 통해, miR-296을 발현하는 플라스미드가 형질전환된 유산균은 혈당 강하 효과를 나타내 당뇨병의 예방 및 치료에 우수한 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

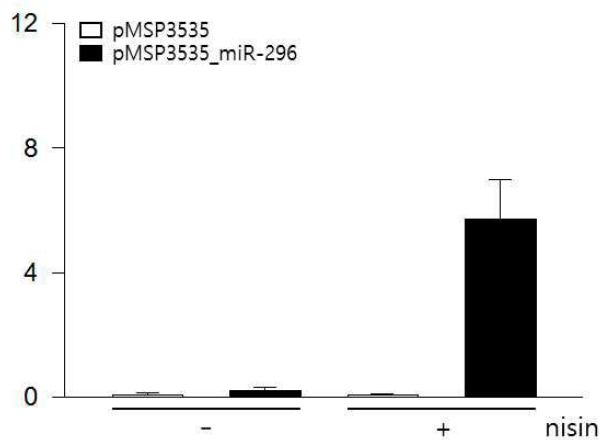
[0061] 본 명세서는 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 내용은 그 상세한 기재를 생략하였으며, 본 명세서에 기재된 구체적인 예시들 이외에 본 발명의 기술적 사상이나 필수적 구성을 변경하지 않는 범위 내에서 보다 다양한 변형이 가능하다. 따라서 본 발명은 본 명세서에서 구체적으로 설명하고 예시한 것과 다른 방식으로도 실시될 수 있으며, 이는 본 발명의 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자이면 이해할 수 있는 사항이다.

도면

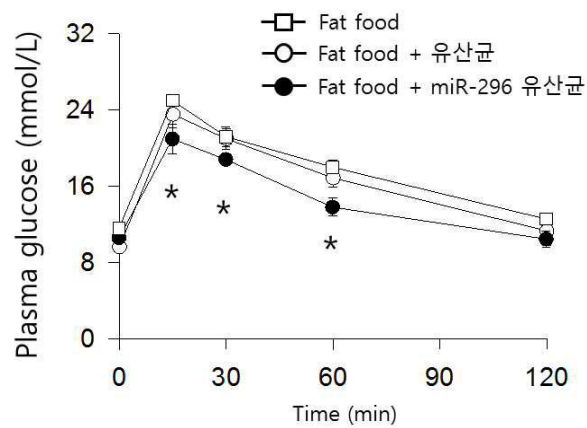
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> EWhA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION

<120> Antidiabetic uses of recombinant lactic acid bacteria producing
miR-296

<130> P17-146-EWhA

<160> 3

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-296

<400> 1

aggggccccc cucaauccug u

21

<210> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-296

<400> 2

gaggguuggg uggaggcucu cc

22

<210> 3

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-296 expression

<400> 3

aggacccttc cagagggccc cccctcaatc ctgttgtgcc taattcagag ggttggtgg 60

aggctctcct gaagggtct 80