



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0089751
(43) 공개일자 2019년07월31일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 31/726</i> (2006.01) <i>A23L 33/10</i> (2016.01)
 <i>A23L 33/125</i> (2016.01) <i>A61P 3/10</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 31/726</i> (2013.01)
 <i>A23L 33/10</i> (2016.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-0007425
 (22) 출원일자 2019년01월21일
 심사청구일자 2019년01월21일</p> <p>(30) 우선권주장
 1020180007619 2018년01월22일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)</p> <p>(72) 발명자
 김현수
 서울특별시 노원구 중계4동 131번지</p> <p>(74) 대리인
 이처영, 장제환</p> |
|--|--|

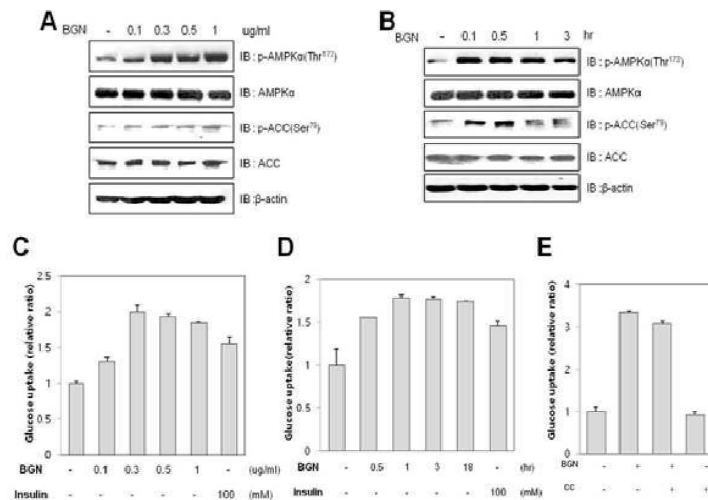
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **비글리칸을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요약

본 발명은 비글리칸 (biglycan)을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 비글리칸은 AMPK 인산화 및 글루코스 흡수 증가를 통해 혈당강하를 유도하므로, 인슐린 저항성 당뇨병의 치료제로 유용하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/125 (2016.08)

A61P 3/10 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/328 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017049191

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)중견연구자지원사업

연구과제명 신규 마이카인 발굴 및 대사 질환 관련 특성 규명

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2017.06.01 ~ 2018.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

비글리칸 (biglycan)을 유효성분으로 함유하는 인슐린 저항성 특이적 당뇨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 비글리칸은 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, AMPK의 발현 또는 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 당뇨병은 제2형 당뇨병인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

비글리칸 (biglycan)을 유효성분으로 함유하는 인슐린 저항성 특이적 당뇨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 비글리칸은 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 7

제5항에 있어서, AMPK의 발현 또는 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 당뇨병은 제2형 당뇨병인 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 비글리칸 (biglycan)을 유효성분으로 함유하는 인슐린 저항성 특이적 당뇨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 AMPK 인산화 및 글루코스 흡수 (glucose uptake) 증가를 통해 혈당 강하를 유도하는 비글리칸의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 제2형 당뇨병은 체내로 흡수된 포도당을 체내로 이용하지 못하여 여러 합병증을 유발시켜 환자의 사망률에 영향을 주는 질병이다. 실제 임상에서는 당뇨병 치료의 가장 중요한 부분인 혈당 조절이 어려운 실정으로, 당뇨병 환자의 약 40%만이 당화혈색소 목표치인 7.0% 미만에 도달되어 있어 혈당관리를 위한 다각적 노력이 필요한 상태이다. 이러한 당뇨병을 치료하기 위해, 인크레틴 호르몬 기반 치료제들이 널리 사용되고 있다. 그러나, 대표적인 인크레틴 호르몬인 glucagon-like peptide-1(GLP-1)과 glucose dependent insulintropic polypeptide(GIP)은 dipeptidyl peptidase-4(DPP-4)에 의하여 빠르게 분해되기 때문에 치료 목적으로 사용하기에 어렵다는 문제점이 있다 (Kazafeos K, *Diabetes Res Clin Pract.*, 93; Suppl 1:S32-6, 2011). 이러한 문제점을 극복하기 위해, 새로운 당뇨병 치료제 개발이 필요하다.
- [0004] 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 결합보다는 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 타겟 단백질 발굴 및 그 분자적 메커니즘을 밝히는 것이 중요하다.
- [0005] 최근, 인슐린-저항성 환자를 대상으로 하는 치료제 개발의 표적 단백질로 AMPK가 큰 주목을 받고 있다. AMPK(AMP-activated protein kinase)는 serine/threonine 키나아제(kinase)의 일원으로 골격근, 심장과 간 등 대사성 장기에 주로 분포하고 있으며, 단백질의 활성화는 AMP 및 상방향 키나아제인 AMPK kinase(AMPKK)에 의한 인산화 과정을 통하여 일어난다. 또한, AMPK는 세포 내의 작은 AMP 농도 변화에도 민감하게 반응하는 에너지 센서로, 운동이나 저산소증, 허혈 등 세포 내 에너지가 부족한 상황에서 활성화되어 ATP를 소비하는 과정을 억제하고 ATP를 생성하는 과정을 활성화시킨다. 따라서, AMPK는 당뇨치료제 연구의 중요 표적 허브 단백질이다 (Kahn B.B *et al.*, *Cell Metab.* 1:15-25 2005).
- [0006] 한편, 비글리칸 (biglycan)은 콘드로이틴황산/테르만탄황산의 혼성사슬이 있는 소형의 프로테오글리칸으로, 기능은 잘 알려져 있지 않다. 류신이 많은 24개의 아미노산을 포함한 구조로 12회 반복배열이 있으며, 유사한 프로테오글리칸에는 테코린(PG-II)과 피브로모듈린 등이 있는데, 조직분포와 콜라겐 섬유와의 결합능에서 뚜렷한 차이가 있다. 프로테오글리칸은 매우 많이 당화된 단백질로 글리코사미노글리칸 결사슬이 단백질에 공유결합한 분자군의 총칭이다. 프로테오글리칸은 결합조직에서 발견되며, 다양한 세포생리기능을 담당한다 (Fisher L.W *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264:4571-4576, 1989).
- [0007] 또한, 비글리칸은 새로운 마이오카인(myokine) 단백질 중 하나로, 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 등이 예방되는 효과는 비글리칸과 같은 마이오카인의 분비에 의한 것임을 알 수 있다.
- [0008] 이에, 본 발명자들은 AMPK 활성 조절을 통해 새로운 당뇨병 치료제를 개발하고자 예의 노력한 결과, 비글리칸이 AMPK 인산화 및 글루코스 흡수 증가를 통하여 혈당강하를 유도하므로 비글리칸이 인슐린 저항성 특이적 당뇨병 치료제로 사용될 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 AMPK 인산화 및 글루코스 흡수 (glucose uptake) 증가를 통해 혈당강하를 유도하는 비글리칸 (biglycan)을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 비글리칸 (biglycan)을 유효성분으로 함유하는 인슐린 저항성 특이적 당뇨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, 비글리칸을 유효성분으로 함유하는 인슐린 저항성 특이적 당뇨병의 예방 또는 개선용 건강기능 식품을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한, 비글리칸을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 인슐린 저항성 특이적 당뇨병의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한, 인슐린 저항성 특이적 당뇨병의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 비글리칸의 용도를 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한, 인슐린 저항성 특이적 당뇨병의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 비글리칸의 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명에 따른 비글리칸 (biglycan)은 AMPK 인산화 및 글루코스 흡수 (glucose uptake) 증가를 통해 혈당강하를 유도하므로, 당뇨병 치료제로 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 비글리칸에 의한 AMPK 인산화 (A 및 B) 및 글루코스 흡수 (C-E) 증가를 확인한 결과이다.
- 도 2는 근육세포에서 비글리칸에 의한 칼슘 변화를 확인한 결과이다.
- 도 3은 비글리칸에 의한 AKT 인산화를 확인한 결과이다.
- 도 4는 근육세포에서 비글리칸에 의한 Glut4 이동을 확인한 결과이다.
- 도 5는 근육세포에서 전기 자극에 의한 AMPK 인산화 (A), 비글리칸의 발현 (B), Ionomycin과 Forskolin에 의한 AMPK 인산화 (C) 및 비글리칸의 발현 (D) 정도를 나타낸 결과이다.
- 도 6은 Primary 세포에서 비글리칸에 의한 AMPK 인산화 (A) 및 칼슘 변화 (B)를 확인한 결과이다.
- 도 7은 운동 후 마우스에서 비글리칸의 농도를 측정된 결과이다.
- 도 8은 TGF- β 로 유도된 smad3의 인산화 (A-B) 및 비글리칸에 의한 smad3 인산화의 감소 (C)를 확인한 결과이다.
- 도 9는 연어 프로테오글리칸과 본 발명의 비글리칸에 의한 AMPK 인산화를 비교한 것이다.
- 도 10은 제2형 당뇨 모델 마우스에 본 발명의 비글리칸을 투여한 후, 복강내 당하부 검사를 한 결과이다.
- 도 11은 제2형 당뇨 모델 마우스에 본 발명의 비글리칸을 투여한 후, 혈중 혈당을 측정된 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 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.
- [0023] 본 발명에서는 AMPK 인산화 및 글루코스 흡수 (glucose uptake) 증가를 통해 혈당강하를 유도하는 근육세포 분비 단백질인 비글리칸 (biglycan)을 발굴하고, 운동한 동물의 혈액 내에서도 비글리칸의 농도가 증가함을 확인하였다. 또한, 당뇨 동물모델에서 비글리칸의 투여에 의해 인슐린 저항성을 억제하는 것을 확인하고, 비글리칸의 당뇨 치료 효과를 규명하였다.
- [0024] 따라서, 본 발명은 일관점에서 비글리칸 (biglycan)을 유효성분으로 함유하는 인슐린 저항성 특이적 당뇨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 비글리칸은 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 AMPK (AMP-activated protein kinase)의 발현 또는 활성을 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0027] 상기 AMPK의 활성 증가는 AMPK의 인산화인 것이며, 이러한 인산화는 근육의 글루코스 흡수를 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0028] 또한, AMPK의 인산화는 ACC (acetyl-co A)의 인산화를 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다. ACC는 인산화된 AMPK에 의하여 활성화되는 단백질로, 지방산의 합성을 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 당뇨병은 제2형 당뇨병인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 인슐린 저항성 당뇨병 및 눈, 신장, 신경 등에 발생하는 당뇨 합병증의 유발에는 TGF- β 가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Huei-Min Lin *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1:284(18):12246-57, 2009). 즉, TGF- β 는 smad3의 인산화를 통해 인슐린 저항성을 유발한다.
- [0031] 따라서, 본 발명의 비글리칸은 TGF- β 에 의해 증가한 smad3의 인산화를 감소시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 비글리칸을 함유하는 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가적으로 포함할 수 있다. 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 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.
- [0033] 본 발명의 비글리칸을 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.
- [0034] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 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 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 60, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0035] 본 발명은 다른 관점에서, 비글리칸을 유효성분으로 함유하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 인슐린 저항성 특이적 당뇨병의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.
- [0036] 본 발명은 또 다른 관점에서, 비글리칸을 유효성분으로 함유하는 조성물을 인슐린 저항성 특이적 당뇨병의 예방 또는 치료에 사용하는 용도에 관한 것이다.
- [0037] 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.
- [0038] 본 발명의 조성물은 당뇨의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0040] 본 발명은 또 다른 관점에서, 인슐린 저항성 특이적 당뇨병의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 비글리칸의 용도

에 관한 것이다.

- [0041] 본 발명은 또 다른 관점에서, 인슐린 저항성 특이적 당뇨병의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 비글리칸의 용도에 관한 것이다.
- [0043] 본 발명은 또 다른 관점에서, 비글리칸 (biglycan)을 유효성분으로 함유하는 인슐린 저항성 특이적 당뇨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 비글리칸은 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 당뇨병은 제2형 당뇨병인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 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 비글리칸을 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 하거나, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 기능성 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과일 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 비글리칸을 첨가하여 제조할 수 있다.
- [0047] 상기 건강 기능식품 또한, 식품조성물로서 기능성 식품, 영양보조제, 건강식품, 식품 첨가제 등의 다양한 형태를 포함하는 것이며, 당업계에서 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태, 예컨대, 앞서 언급한 비글리칸을 차, 주스, 드링크의 형태로 제조하거나, 과립화, 캡슐화, 분말화 하거나, 이러한 화합물 또는 추출물을 음료, 과일 및 가공식품, 어유, 육류 및 그 가공식품, 빵류, 면류, 조미료 등 각종 식품에 첨가하여 제조함으로써 제공될 수 있다.
- [0049] **[실시예]**
- [0050] 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.
- [0052] **실시예 1: 비글리칸에 의한 AMPK 인산화 및 글루코스 흡수 증가**
- [0053] 1-1: 비글리칸에 의한 AMPK 인산화
- [0054] L6 근육전구세포 (ATCC, US)를 10% FBS가 포함된 DMEM에 배양 후, 0 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 0.3 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 1 μ g/ml의 비글리칸 (Flarebio, US)을 각각 1시간 동안 처리하였다. 세포 용해물에서 웨스턴 블롯을 이용하여 AMPK와 ACC 활성 변화를 측정하였다. 인산화된 AMPK 단백질과 ACC 단백질 검출에는 각각 AMPK 인산화 항체 (Threonine 172번, Millipore-Upstate, US)와 ACC 인산화 항체 (Millipore-Upstate, US)를 사용하였다.
- [0055] 그 결과, 비글리칸의 농도에 따라 AMPK와 ACC의 인산화는 증가하였고, AMPK 인산화의 최대치는 0.3 μ g/ml 비글리칸에서 나타났다 (도 1A).
- [0056] 그 다음, 0.3 μ g/ml 비글리칸을 각각 0시간, 0.5시간, 1시간, 3시간 동안 처리한 후, AMPK와 ACC 활성 변화를 측정하였다.
- [0057] 그 결과, AMPK 인산화는 비글리칸 처리 1시간에서 최대치를 나타냈다 (도 1B).
- [0059] 1-2: 비글리칸에 의한 글루코스 흡수
- [0060] L6 근육전구세포를 10% FBS가 포함된 DMEM에 배양 후, 다음날부터 2일마다 한번씩 2% FBS가 포함된 DMEM에서 6일 동안 분화시켰다. 0 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 0.3 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 1 μ g/ml의 비글리칸을 각각 1시간 동안 처리하여

글루코스 흡수를 동위원소를 이용해 측정하였다.

[0061] 그 결과, 0.3 μ g/ml 비글리칸에서 글루코스 흡수 최대치를 나타냈다 (도 1C).

[0062] 그 다음, 0.3 μ g/ml 비글리칸을 각각 0시간, 0.5시간, 1시간, 3시간, 18시간 동안 처리한 후, 글루코스 흡수를 측정하였다.

[0063] 그 결과, 글루코스 흡수는 비글리칸 처리 1시간에서 최대치를 나타냈다 (도 1D).

[0064] AMPK의 저해제인 Compound C (CC) 30 μ M (Merck, US)를 비글리칸과 같이 처리한 결과 AMPK의 인산화가 감소하는 것을 확인하였다 (도 1E).

[0065] 이러한 결과는 비글리칸이 AMPK의 인산화를 증가시키며, 글루코스 흡수 또한 증가시킴을 나타낸다.

[0067] 실시예 2: 비글리칸에 의한 칼슘 변화

[0068] L6 근육전구세포를 배양하여 다음날 칼슘 지표인 fluo-3 AM (Invitrogen, US) 5 μ M로 세포를 1시간 동안 염색한 후, 비글리칸을 처리하고 공초점현미경을 이용해 실시간으로 세포를 관찰 하였다.

[0069] 그 결과, 비글리칸이 세포 내 칼슘을 증가시키는 것을 확인하였다 (도 2A).

[0070] 그 다음, CaMKK를 선택적으로 저해하는 STO-609 5 μ M (SignalChem, US)를 비글리칸과 함께 처리한 후, 실시예 1과 동일한 방법으로 AMPK의 인산화 및 글루코스 흡수를 측정하였다.

[0071] 그 결과, AMPK의 인산화가 감소하는 것을 확인하였으며 (도 2B), STO-609는 비글리칸에 의해 증가한 글루코스 흡수를 저해하는 것을 알 수 있었다 (도 2C).

[0072] 이러한 결과는 비글리칸이 세포 내 칼슘을 증가시킴을 나타낸다.

[0074] 실시예 3: 비글리칸에 의한 AKT 인산화

[0075] 실시예 1과 동일한 방법으로 비글리칸에 의한 AKT 인산화 정도 측정하였다. 0 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 0.3 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 1 μ g/ml의 비글리칸의 농도와 0시간, 0.5시간, 1시간, 3시간에서 확인하였다. 인산화된 AKT 단백질 검출에는 AKT 인산화 항체 (Serine 473번, cell signaling, US)를 사용하였다.

[0076] 그 결과, 비글리칸의 농도에 따라 AKT의 인산화는 증가하였고, AKT 인산화의 최대치는 0.3 μ g/ml 비글리칸에서 나타났다 (도 3A). 또한, AKT 인산화는 비글리칸 처리 1시간에서 최대치를 나타냈다 (도 3B).

[0077] 그 다음, AKT 저해제인 LY-294002 20 μ M (Sigma, US)를 비글리칸과 함께 처리한 후, 실시예 1과 동일한 방법으로 글루코스 흡수를 측정하였다.

[0078] 그 결과, 비글리칸에 의해 증가했던 글루코스 흡수가 LY-294002에 의해 저해되었다 (도 3C).

[0079] 이러한 결과는 비글리칸에 의한 AKT의 인산화가 글루코스 흡수에 중요하다는 것을 알 수 있다.

[0081] 실시예 4: 비글리칸에 의한 Glut4 이동 (translocation)

[0082] Myc-Glut4가 세포표면에 발현하는 L6 근육전세포를 10% FBS가 포함된 DMEM에 배양 후, 다음날부터 2일마다 한번 씩 2% FBS가 포함된 DMEM에서 6일 동안 분화시켰다. 0.3 μ g/ml 비글리칸을 처리한 후, 세포표면으로 이동하는 Glut4를 Myc 단백질 항체 (Santa cruz, US)를 이용해 측정하였다.

[0083] 그 결과, 비글리칸에 의해 Glut4 이동 (translocation)이 증가하는 것을 확인하였다 (도 4A). 그러나, AMPK 억제제인 Compound C 30 μ M를 비글리칸과 함께 처리하거나 (도 4B), CaMKK 억제제인 STO-609 5 μ M를 비글리칸과 함께 처리하였을 때 (도 4C), 또는 AKT 억제제인 LY-29004를 비글리칸과 함께 처리하였을 때도 (도 4D) Glut4 이동이 감소하는 것을 알 수 있었다.

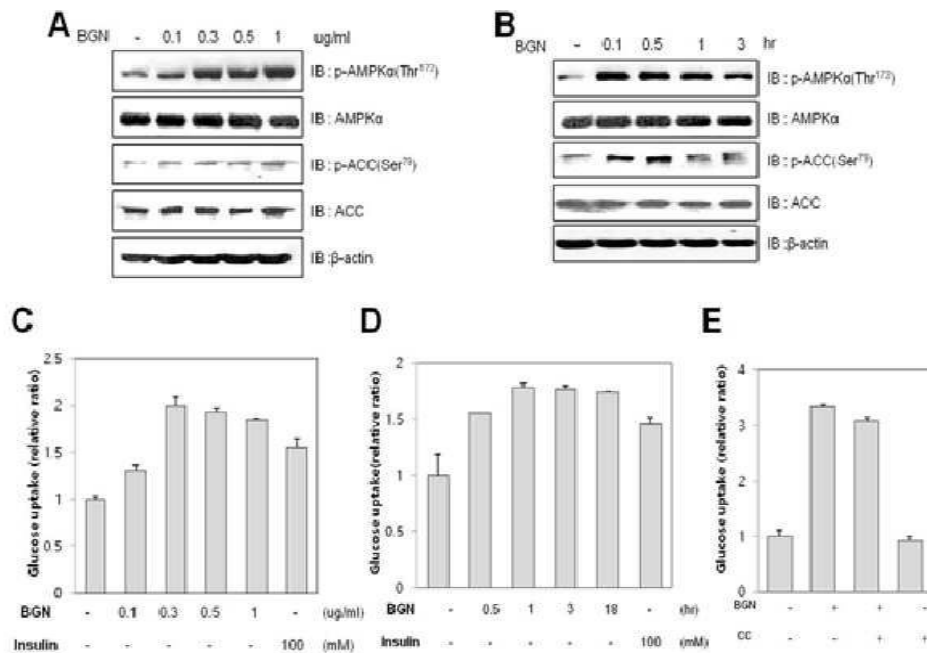
[0085] 실시예 5: 전기자극에 의한 AMPK 인산화 및 비글리칸의 발현

- [0086] L6 근육전구세포에 세포 내 운동과 비슷한 효과를 주는 전기자극을 ionomycin 0.5 μ M (Sigma, US)과 forskolin 1 μ M (Sigma, US)과 함께 1시간, 3시간, 6시간 동안 처리 후, 실시예 1과 동일한 방법으로 AMPK의 인산화를 측정하였다.
- [0087] 그 결과, AMPK의 인산화는 전기 자극 (IonOptix, US) 25V/cm, 5ms, 1Hz 을 준 시간 대비 증가하였고, 3시간에서 최대치를 나타냈다 (도 5A).
- [0088] 그 다음, 1시간, 3시간, 6시간 동안 전기 자극을 준 L6 근육전구세포에서 RNA를 RNeasy Mini Kit (Qiagen, US)를 이용해 분리하고, 분리한 RNA를 이용해 cDNA를 AMV Reverse Transcriptase (Promega, US) 이용해 합성한 후, cDNA를 이용해 비글리칸의 mRNA 발현 정도를 PCR로 확인하였다. PCR 조건은 95℃에서 10분 동안 초기 변성; i) 95℃에서 30초 동안 변성, ii) 58℃에서 30초 동안 어닐링 및 iii) 72℃에서 1분 동안 연장의 30주기; 및 72℃에서 10분 동안 최종 연장;의 단계로 수행하였다. 프라이머는 F :5' -TGT GGC TAC TCA CCT TGC TG-3' (서열번호 1) 및 R: 5' -ACT TTG CTT ATA CGG TTG TC- 3' (서열번호 2)를 사용하였다.
- [0089] 그 결과, 전기 자극 3시간 후에 비글리칸 발현의 최대치가 나타났다 (도 5B).
- [0091] **실시예 6: 일차배양 근육 세포에서 비글리칸에 의한 AMPK 인산화 및 비글리칸의 발현**
- [0092] 생후 3-5일 된 BALB/c 마우스 대퇴부에서 분리한 근육조직 세포에 0.3 μ g/ml의 비글리칸을 각각 0시간, 0.1시간, 0.5시간, 1시간, 3시간 동안 처리한 후, AMPK, ACC, AKT 인산화 정도를 실시예 1 및 3과 동일한 방법으로 확인하였다.
- [0093] 그 결과, AMPK, ACC, AKT 인산화는 비글리칸 처리 1시간에서 최대치를 나타냈다 (도 6A).
- [0094] 그 다음, 실시예 2와 동일한 방법으로 일차배양 근육 세포에 비글리칸을 처리하고, 공초점현미경을 이용해 실시간으로 세포에서 칼슘의 발현을 확인하였다.
- [0095] 그 결과, 비글리칸이 세포 내 칼슘을 증가시키는 것을 확인하였다 (도 6B).
- [0097] **실시예 7: 운동 후 혈액 내 비글리칸의 농도**
- [0098] 운동 후 혈액 내 비글리칸의 농도를 확인하기 위하여, BALB/c 마우스를 하루에 1시간씩 한 달간 운동시킨 다음, 운동을 시킨 마우스와 시키지 않은 마우스 각각 6마리의 혈액을 채취하였다. 혈액을 원심분리하여 분리한 후, 분리한 혈액을 마우스 BGN ELISA kit (Elabscience, China)를 이용하여 혈액으로 나오는 비글리칸의 농도를 측정하였다.
- [0099] 그 결과, 비글리칸은 운동을 하지 않은 그룹에 비해 운동을 한 그룹에서 농도가 증가하는 것을 확인하였다 (도 7A).
- [0101] **실시예 8: TGF- β 에 의한 smad3 인산화에 대한 비글리칸의 효과**
- [0102] L6 근육 전구세포에 인슐린 저항성 유발에 중요한 역할을 하는 TGF- β (sigma, US)를 0 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 0.3 μ g/ml, 1 μ g/ml, 3 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml 씩 농도별로 1시간 동안 처리하고, TGF- β 1 μ g/ml을 시간별로 0분, 10분, 30분, 60분, 180분 동안 처리하였다. TGF- β 는 smad3의 인산화를 유발하여 인슐린 저항성을 유발한다고 알려져 있기 때문에, 그 사실을 확인하기 위하여 인산화된 smad3 단백질 검출에는 smad3 인산화 항체 (Serine 423 변/425변, cell signaling, US)를 사용하였다.
- [0103] 그 결과, TGF- β 농도에 따라 smad3의 인산화는 증가하였고, smad3 인산화의 최대치는 1 μ g/ml TGF- β 에서 나타났다 (도 8A). 또한, smad3 인산화는 TGF- β 처리 1시간에서 최대치를 나타냈다 (도 8B).
- [0104] 다음으로, TGF- β 1 μ g/ml을 1시간 처리한 L6 근육 전구 세포에 비글리칸 0.3 μ g/ml을 1시간 처리한 결과, smad3의 인산화가 감소함을 확인할 수 있었다 (도 8C). 이 결과는 비글리칸이 인슐린 저항성을 극복할 수 있음을 보여주고 당뇨병 합병증의 진행 또한 억제할 수 있음을 의미한다.

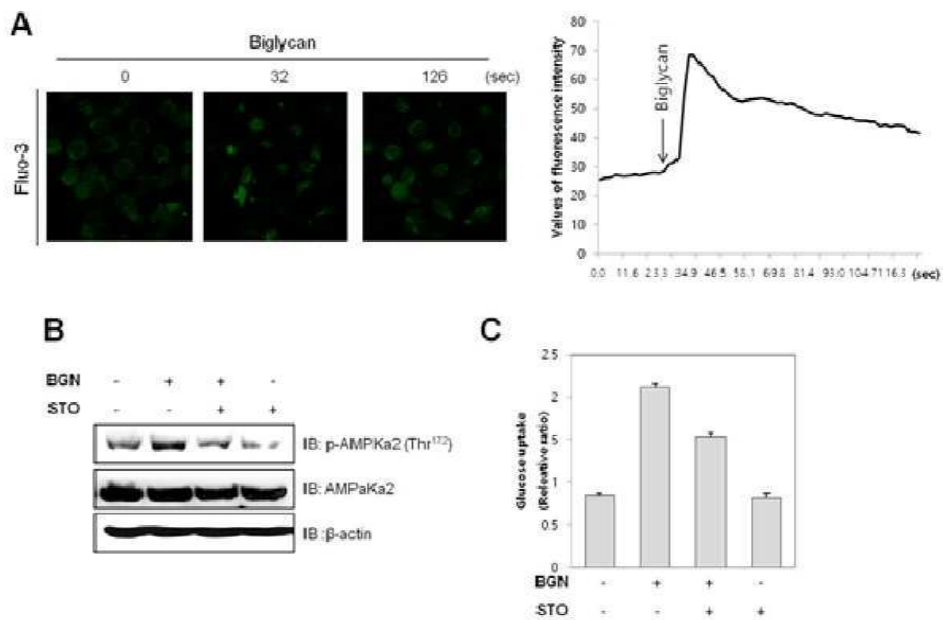
- [0106] **실시예 9: 비글리칸과 연어 나잘 (nasal) 유래 프로테오글리칸의 비교**
- [0107] L6 근육 전구세포에 비글리칸과 연어 나잘 (nasal) 유래 프로테오글리칸 (Cosmobio, US)을 0 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 0.3 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 1 μ g/ml로 각각 1시간 동안 처리하였다. 세포 용해물에서 웨스턴 블롯을 이용하여 AMPK 활성 변화를 측정하였다. 인산화된 AMPK 단백질 검출에는 AMPK 인산화 항체 (Threonine 172번, Millipore-Upstate, US)를 사용하였다.
- [0108] 그 결과, 연어 나잘 프로테오글리칸의 AMPK 인산화의 최대치는 0.1 μ g/ml에서 나타났으며, 이는 비글리칸 0.1 μ g/ml과 비슷한 AMPK 인산화 정도였다. 그러나, 연어 나잘 프로테오글리칸은 농도 증가에 따라 AMPK와 ACC의 인산화가 더 이상 증가하지 않고 오히려 감소하는 경향을 나타냈다. 반면, 비글리칸은 농도가 증가함에 따라 AMPK 인산화 정도도 함께 증가하였다 (도 9).
- [0109] 결론적으로 비글리칸이 연어 나잘 프로테오글리칸에 비해 당 조절 표적 단백질인 AMPK 인산화 증가 정도가 더욱 강력하여 당 조절 능력이 우수함을 보여주는 것이다.
- [0110] 또한, 구조적으로 보았을 때, 연어 나잘 프로테오글리칸 (Gene bank Accession No. AB571294)은 1324개 아미노산이고 (Ikuko Kakizak *et al.*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 506:58-65, 2011), 본 발명의 비글리칸 (서열번호 3)은 394개 아미노산으로 길이 및 서열에 차이가 있다.
- [0112] **실시예 10: 당뇨 모델에서 비글리칸의 효과 확인**
- [0113] 본 실시예에서는 고지방식으로 유도된 제2형 당뇨 동물모델에서 마이오카인인 비글리칸의 항당뇨 효과를 확인하였다.
- [0114] 제2형 당뇨 동물모델로는 6 주령 마우스를 사용하였으며, 고지방식 (High fat diet, HFD) 대조군과 비글리칸 (BGN) 투여군 (HFD+BGN)의 총 2그룹으로 나누어 8주간 고지방 식이로 사육하여 비만을 유도하였다. 그 다음, 비글리칸 투여는 2mg/kg으로 일주일에 3번씩 4주간 복강으로 투여하였다.
- [0115] 복강내 당하부 검사 (Intraperitoneal Glucose Tolerance Test, IPGTT)를 하기 위하여, 비글리칸 또는 생리식염수를 2주간 투여한 후 마우스를 검사 전 16시간 절식시키고, 포도당을 2g/kg의 용량으로 복강 투여하였다. 혈액은 포도당 투여 후 각 시간 당 120분까지 꼬리 정맥을 통하여 채취하였으며, Accu-Chek Go 혈당 측정기를 사용하여 혈당을 측정하였다. 또한, 복강내 당하부 검사 실험이 종료된 후 16시간 절식시킨 다음 실험용 에테르를 이용하여 흡입 마취하고, 주사기를 사용하여 심장채혈을 통해 혈액을 적출 후 원심분리한 뒤 혈장을 얻어 혈중 혈당을 분석하였다.
- [0116] 비글리칸 투여에 의한 인슐린 감수성 촉진 효과를 확인하기 위하여 복강내 당하부 검사를 실시하여, 포도당 주입 후 각군의 포도당 처리 추이를 비교하였다.
- [0117] 그 결과, 포도당 주입 60분과 90분 후 비글리칸 투여군의 포도당 처리속도가 비투여군과 비교할 때, 유의적으로 개선되어 비글리칸이 고지방식으로 인해 유발되는 인슐린 저항성을 억제하여 내당능 장애를 개선해주는 것을 확인할 수 있었다 (도 10). 동시에 공복 혈당이 대조군에 비해 비글리칸 투여군에서 감소한 것을 확인할 수 있었다 (도 11).
- [0119] 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

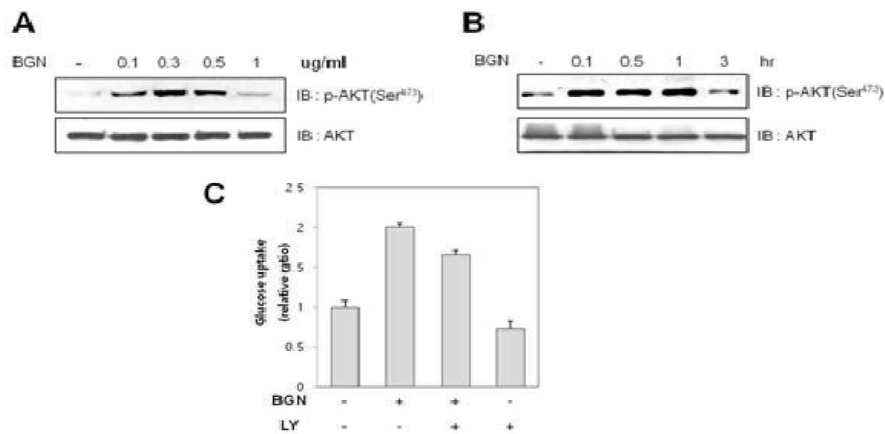
도면1



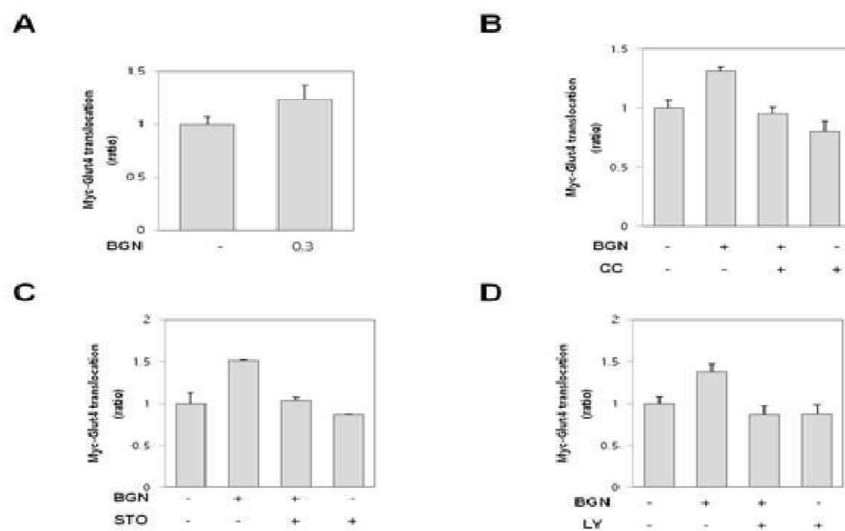
도면2



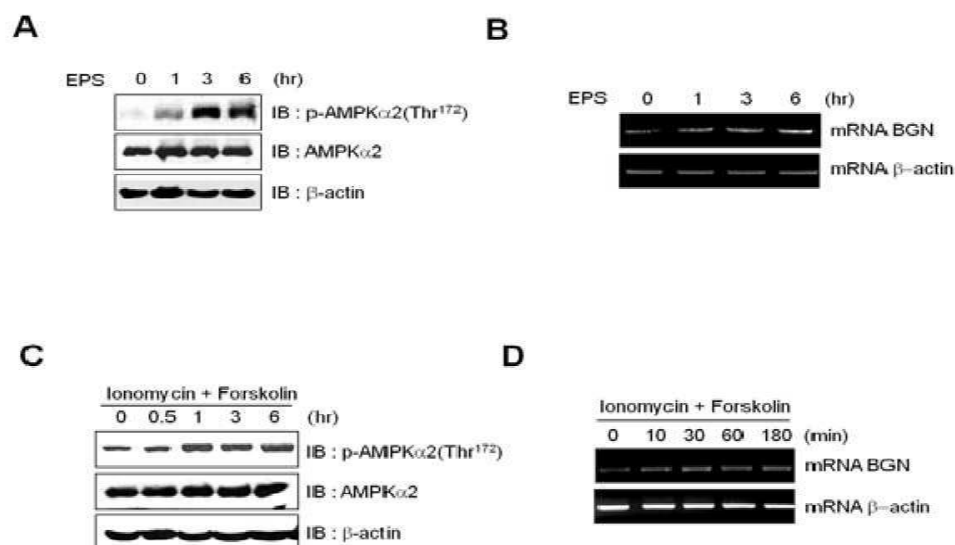
도면3



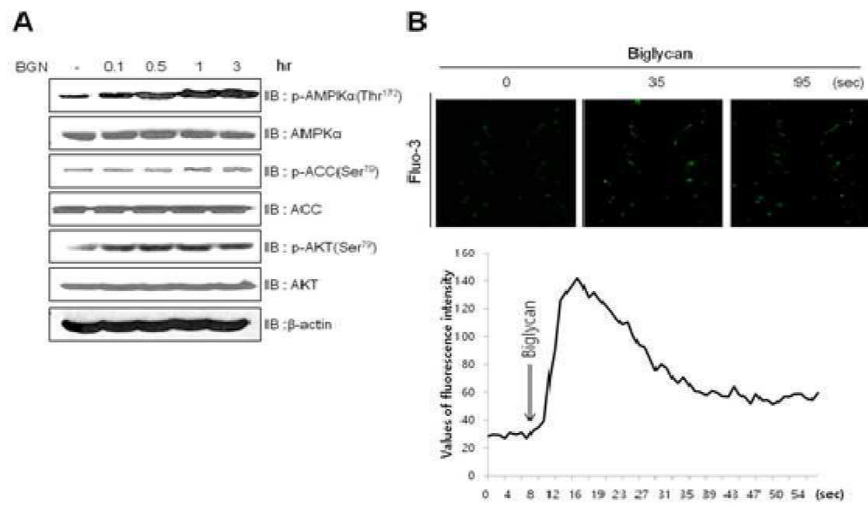
도면4



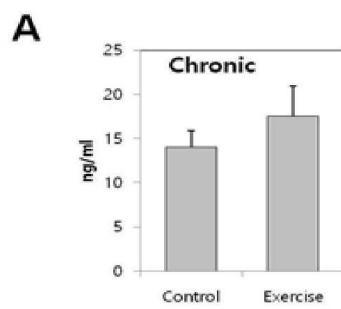
도면5



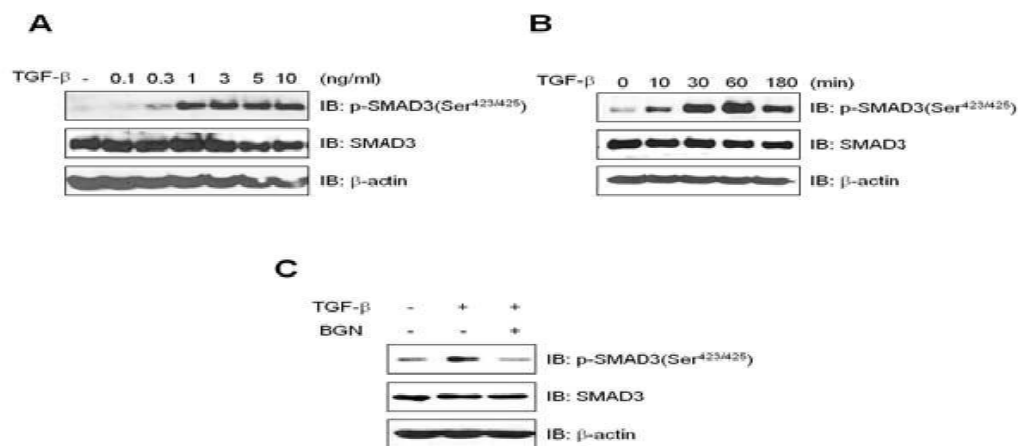
도면6



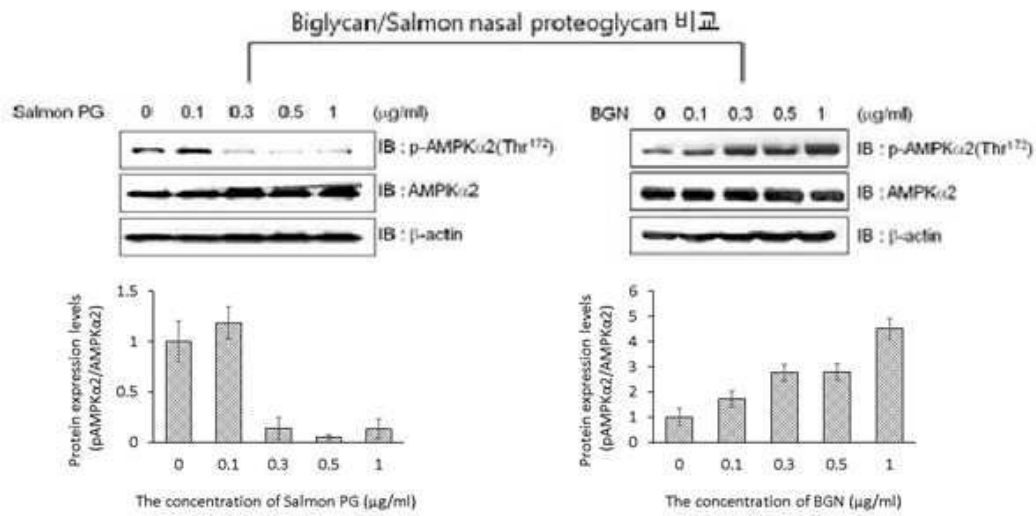
도면7



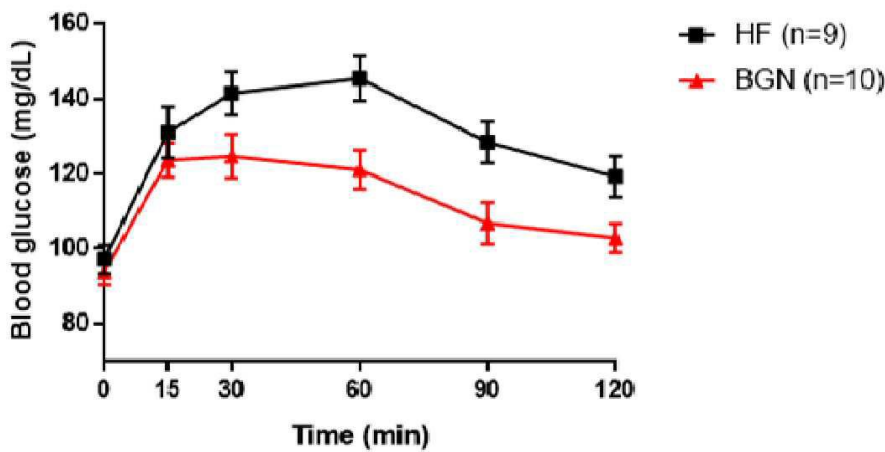
도면8



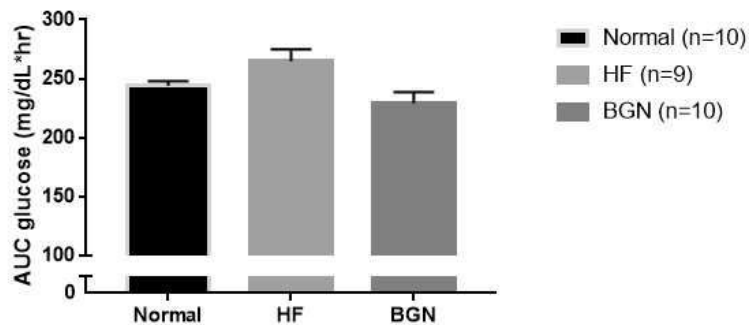
도면9



도면10



도면11



서열 목록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Composition for Preventing or Treating Diabetes Comprising

Biglycan

<130> P19-B014

<150> KR 10-2018-0007619

<151> 2018-01-22

<160> 3

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P1

<400> 1

tgtggctact caccttgctg 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P2

<400> 2

actttgctta tacggttgctc 20

<210> 3

<211> 394

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> biglycan

<400> 3

Met Trp Pro Leu Trp Arg Leu Val Ser Leu Leu Ala Leu Ser Gln Ala

1 5 10 15

Leu Pro Phe Glu Gln Arg Gly Phe Trp Asp Phe Thr Leu Asp Asp Gly

20 25 30

Pro Phe Met Met Asn Asp Glu Glu Ala Ser Gly Ala Asp Thr Ser Gly

35 40 45

Val Leu Asp Pro Asp Ser Val Thr Pro Thr Tyr Ser Ala Met Cys Pro

50 55 60
 Phe Gly Cys His Cys His Leu Arg Val Val Gln Cys Ser Asp Leu Gly
 65 70 75 80
 Leu Glu Phe Met Leu Val Val Gly Val Gly Pro Leu Gly Leu Lys Phe
 85 90 95
 Met Leu Val Met Gly Val Gly Pro Leu Gly Leu Lys Ser Val Pro Lys
 100 105 110

 Glu Ile Ser Pro Asp Thr Thr Leu Leu Asp Leu Gln Asn Asn Asp Ile
 115 120 125
 Ser Glu Leu Arg Lys Asp Asp Phe Lys Gly Leu Gln His Leu Tyr Ala
 130 135 140
 Leu Val Leu Val Asn Asn Lys Ile Ser Lys Ile His Glu Lys Ala Phe
 145 150 155 160
 Ser Pro Leu Arg Asn Val Gln Lys Leu Tyr Ile Ser Lys Asn His Leu
 165 170 175
 Val Glu Ile Pro Pro Asn Leu Pro Ser Ser Leu Val Glu Leu Arg Ile

 180 185 190
 His Asp Asn Arg Ile Arg Lys Val Pro Lys Gly Val Phe Ser Gly Leu
 195 200 205
 Arg Asn Met Asn Cys Ile Glu Met Gly Gly Asn Pro Leu Glu Asn Ser
 210 215 220
 Gly Phe Glu Pro Gly Ala Phe Asp Gly Leu Lys Leu Asn Tyr Leu Arg
 225 230 235 240
 Ile Ser Glu Ala Lys Leu Thr Gly Ile Pro Lys Asp Leu Pro Glu Thr
 245 250 255

 Leu Asn Glu Leu His Leu Asp His Asn Lys Ile Gln Ala Ile Glu Leu
 260 265 270
 Glu Asp Leu Leu Arg Tyr Ser Lys Leu Tyr Arg Leu Gly Leu Gly His
 275 280 285
 Asn Gln Ile Arg Met Ile Glu Asn Gly Ser Leu Ser Phe Leu Pro Thr
 290 295 300
 Leu Arg Glu Leu His Leu Asp Asn Asn Lys Leu Ala Arg Val Pro Ser

305 310 315 320
 Gly Leu Pro Asp Leu Lys Leu Leu Gln Val Val Tyr Leu His Ser Asn

 325 330 335
 Asn Ile Thr Lys Val Gly Val Asn Asp Phe Cys Pro Met Gly Phe Gly
 340 345 350
 Val Lys Arg Ala Tyr Tyr Asn Gly Ile Ser Leu Phe Asn Asn Pro Val
 355 360 365
 Pro Tyr Trp Glu Val Gln Pro Ala Thr Phe Arg Cys Val Thr Asp Arg
 370 375 380
 Leu Ala Ile Gln Phe Gly Asn Tyr Lys Lys
 385 390