



2025년 3월 6일 (06.03.2025)

WIPO | PCT

(51) 국제특허분류:

C12N 1/20 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
A61K 35/742 (2015.01) *A23L 33/135* (2016.01)
A61K 31/4985 (2006.01) *C12R 1/07* (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/012832

(22) 국제출원일:

2023년 8월 29일 (29.08.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2023-0114027 2023년 8월 29일 (29.08.2023) KR

(71) 출원인:

주식회사 엠바이옴제라퓨틱스
(MBIOMETHERAPEUTICS CO., LTD.) [KR/KR];
 16950 경기도 용인시 기흥구 흥덕중앙로 120,
 19층 1911호, Gyeonggi-do (KR). 경희대학교
 산학협력단 (**UNIVERSITY-INDUSTRY COOPER-**
ATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY)
 [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732,
 Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 강세찬 (**KANG, Se Chan**); 16710 경기도 수원시
영통구 청명로 16, 405호, Gyeonggi-do (KR). 전혜린

(**JEON, Hye Lin**); 04420 서울특별시 용산구 독서당로
 34길 22, 2동 402호, Seoul (KR). 권정은 (**KWON, Jeong**
Eun); 18378 경기도 화성시 영통로27번길 20, 405동
 1702호, Gyeonggi-do (KR). 김지선 (**KIM, Ji Seon**);
 15235 경기도 안산시 단원구 선부광장북로 67, 238동
 1502호, Gyeonggi-do (KR).

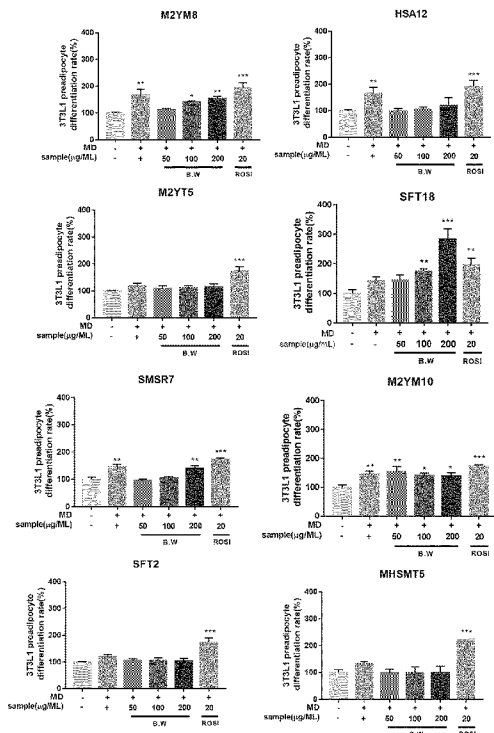
(74) 대리인: 차준용 (**CHA, Joon Yong**); 08390 서울특별시
구로구 디지털로26길 111, 1809호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,
 AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
 CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,
 EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
 HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH,
 KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,
 MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
 NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
 SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
 TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,
 KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ,

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING DIABETES COMPRISING NOVEL BACILLUS WIEDMANNII
 MBT09 STRAIN AND CULTURE THEREOF AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 신규한 바실러스 위드만니 MBT09 균주 및 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병
 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing or treating diabetes, comprising a novel *Bacillus Wiedmannii* MBT09 strain and a culture thereof as an active ingredient. According to the present invention, unlike rosiglitazone, which only targets PPAR γ to increase various types of insulin-responsive proteins, stimulation was carried out through a pathway that encompasses both the activation of PPAR γ through ERK and the increase of the PI3K/AKT pathway, which is a downstream regulatory pathway targeting IRS that initiates by binding to insulin receptors, to synthesize various types of insulin-responsive proteins, and thus it was concluded that insulin-dependent cellular signaling pathways are significantly activated.

(57) 요약서: 본 발명은 신규한 바실러스 위드만니 MBT09 균주 및 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 PPAR γ 하나만을 표적으로 인슐린에 반응하는 여러 종류의 단백질을 증가시키는 Rosiglitazone와는 다르게 ERK를 통한 PPAR γ 의 활성화와 함께 인슐린 수용체에 결합하여 시작되는 IRS를 표적으로 하위조절 경로인 PI3K/AKT 경로의 증가로 두가지 모두를 아우르는 경로로 인슐린에 반응하는 여러 종류의 단백질을 합성하도록 자극하여 그 결과 인슐린 의존적 세포신호전달경로를 유의적으로 활성화시킨다는 결론을 얻었다.

UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 신규한 바실러스 워드만니 MBT09 균주 및 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 신규한 바실러스 워드만니 MBT09 균주 및 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 당뇨병은 현재까지 완벽히 정복되지 않은 질병으로 여러가지의 환경적 혹은 유전적인 원인에 따라 치료 및 완치의 여부가 낮아 세계적으로 많은 사상자를 낳고 있으며, 그 중 제2형 당뇨병은 전체 당뇨의 사망률의 90%를 차지할만큼 당뇨병, 심장질환과 관련된 질병과 뇌졸중과 같은 합병증을 유발함에 따라 관심을 가져야 하는 질병중 하나인 대사질환이다.
- [3] 즉, 당뇨병은 고혈당이 만성으로 지속되면서 당질대사뿐만 아니라 지질 및 단백질 대사 장애도 함께 일으킨다. 그 병태는 다양하며 직접 고혈당에 기인하는 것으로 망막, 신장, 신경, 심혈관계 등에서 당뇨병성 말초신경장해, 당뇨병성 망막증, 당뇨병성 신증, 당뇨병성 백내장, 각막증, 당뇨병성 동맥경화증 등이 있다.
- [4] 현재 당뇨병 치료제의 문제점은 기존의 약물에 있어서의 부작용이다. 치료제는 설폰요소제, 바이구아나이드계, 알파글루코시다제 억제제, 티아졸리딘디온계, 글리나이드계 등이 있으며 이번 연구에서 사용되어진 티아졸리딘디온계의 대조군의 Rosiglitazone의 기전으로는 지방조직이나 근육등과 같은 말초조직에서 인슐린에 대한 감수성을 증가시켜 인슐린 저항성을 개선하는 메커니즘을 이용한다. 부작용으로는 중성지방 농도를 증가시키고 심혈관 질환과 심근경색, 황반부종, 골절의 위험을 증가시킨다고 한다. 이러한 문제들을 해결할 수 있는 새로운 치료제의 개발이 요구된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명자는 105 종 미생물 중 지방전구 세포인 3T3-L1 에 가장 높은 PPAR γ agonist 효과를 나타낸 미생물인 *Bacillus Wiedmannii* MBT09 를 동정하고, 유효성분인 Cyclo(L-Pro-L-Try)을 분리하였다. *Bacillus Wiedmannii* MBT09와 Cyclo(L-Pro-L-Try)에 의해 활성화되는 수용체의 결합과 함께 지질관련 마커 증가와 인슐린 의존성 경로인 IRS, PI3K, AKT를 증가시킨다는 것을 입증하였으며 동시에 세포막에 존재하는 GLUT4 또한 증가시킨다는 것을 입증하였다.

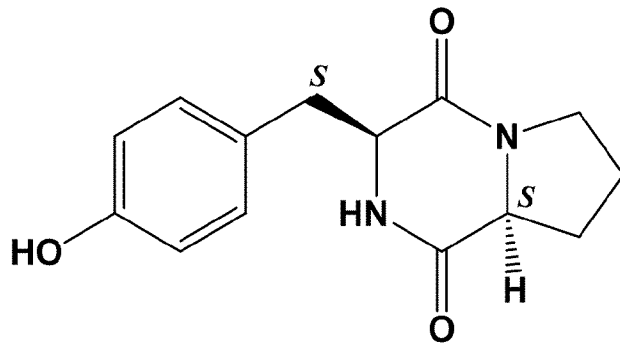
과제 해결 수단

- [6] 본 발명은 수탁번호 KCCM13378P로 기탁된, 신규한 바실러스 워드만니 MBT09(*BACILLUS WIEDMANNII* MBT09) 균주를 제공한다.

- [7] 상기 균주 배양액은 지방세포(Adipocyte)의 분화율을 증가시키는 것을 특징으로 한다.
- [8] 상기 균주 배양액은 PPAR γ , AP2, LPL, CD36, FAS, C/EBP α , FAS, IRS-1, PI3K 유전자 발현을 증가시키는 것을 특징으로 한다.
- [9] 상기 균주 배양액은 인슐린 신호전달 경로를 상향 조절시키는 것을 특징으로 한다.
- [10] 상기 균주 배양액은 IRS, PI3K, p-AKT/AKT, p-ERK/ERK 유전자 발현을 증가시키는 것을 특징으로 한다.
- [11] 상기 균주 배양액은 AKT 또는 GLUT4 유전자 발현을 증가시키는 것을 특징으로 한다.
- [12] 상기 균주 배양액은 세포 내 포도당 흡수율을 증가시키고, 세포의 인슐린 저항성을 감소시키는 것을 특징으로 한다.
- [13] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 균주, 또는 상기 균주의 배양액을 유효 성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [14] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 균주, 또는 상기 균주의 배양액을 유효 성분으로 포함하는 당뇨병 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [15] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, [화학식 1]의 화합물을 유효 성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다;

[16] [화학식 1]

[17]



[18]

발명의 효과

- [19] 본 발명은 PPAR γ 하나만을 표적으로 인슐린에 반응하는 여러 종류의 단백질을 증가시키는 Rosiglitazone와는 다르게 ERK를 통한 PPAR γ 의 활성화와 함께 인슐린 수용체에 결합하여 시작되는 IRS를 표적으로 하위조절 경로인 PI3K/AKT 경로의 증가로 두가지 모두를 아우르는 경로로 인슐린에 반응하는 여러 종류의 단백질을 합성하도록 자극하여 그 결과 인슐린 의존적 세포신호전달경로를 유의적으로 활성화시킨다는 결론을 얻었다. 이로써 해당 미생물인 *Bacillus Wiedmannii* MBT09와 Cyclo(L-Pro-L-Try)는 항 당뇨 치료제로써 사용될 수 있다.
- 도면의 간단한 설명

- [20] 도 1은 3T3-L1 세포에 항당뇨병 효과가 있는 미생물 스크리닝 결과로, 선택된 8종의 미생물에 대한 MCS(50, 100 또는 200 μ g/mL) 처리 후 3T3-L1 세포에 대한 세포독성 효과를 나타내는 그래프이다.
- [21] 도 2는 *B. wiedmannii* MBT09 활성 성분 정제 방법의 MCS 요약 다이어그램이다.
- [22] 도 3은 (A) *B. wiedmannii* MBT09 및 (B) cyclo(L-pro-L-tyr) 존재 하의 세포 생존력을 나타내는 그래프이다.
- [23] 도 4는 지방세포 분화에 대한 *B. wiedmannii* MBT09 및 cyclo(L-pro-L-tyr)의 효과를 나타낸다; (A) *B. wiedmannii* MBT09를 이용한 지방세포 분화율. (B) 사이클로(L-pro-L-tyr)를 이용한 지방세포 분화율. (C) 형광현미경 이미지. 3T3-L1 세포에 *B. wiedmannii* MBT09를 5일간 분화 유도 기간 동안 처리하였다.
- [24] 도 5는 3T3-L1 세포의 당뇨병 바이오마커에 대한 *B. wiedmannii* MBT09의 MCS 효과를 나타낸다. 3T3-L1 세포를 *B. wiedmannii* MBT09의 MCS(20, 100 또는 500 μ g/mL)로 처리했다.
- [25] 도 6은 3T3-L1 세포에서 인슐린 신호 전달 경로의 활성화에 대한 *B. wiedmannii* MBT09의 MCS 효과를 나타낸다. (A, C) 3T3-L1 세포에서 IRS, PI3K, p-AKT, AKT, p-ERK, ERK 및 PPAR γ 의 단백질 발현에 대한 *B. wiedmannii* MBT09의 MCS 효과. (B) 인슐린 신호전달 경로에 관한 바이오마커의 개략도.
- [26] 도 7은 3T3-L1 세포에서 포도당 신호 전달 경로의 활성화에 대한 *B. wiedmannii* MBT09의 MCS 효과를 나타낸다. (A, C) 3T3-L1 세포에서 p-AKT, AKT 및 GLUT4의 단백질 발현에 대한 *B. wiedmannii* MBT09의 MCS 효과. (B) 인슐린 신호전달 경로에 관한 바이오마커의 개략도.
- [27] 도 8은 3T3-L1 세포의 당뇨병 바이오마커에 대한 cyclo(L-pro-L-tyr)의 효과를 나타내는 그래프이다. 3T3-L1 세포를 2, 20 또는 200 μ g/mL의 cyclo(L-pro-L-tyr)로 처리했다. mRNA 발현 수준은 qRT-PCR을 이용하여 확인하였다.
- [28] 도 9는 3T3-L1 세포에서 인슐린 신호 전달 경로의 활성화에 대한 cyclo(L-pro-L-tyr)의 효과를 나타낸다. (A, B) 3T3-L1 세포에서 IRS, PI3K, p-AKT, AKT, p-ERK, ERK 및 PPAR γ 의 단백질 발현에 대한 cyclo(L-pro-L-tyr)의 효과.
- [29] 도 10은 3T3-L1 세포에서 포도당 신호전달 경로의 활성화에 대한 Cyclo(L-Pro-L-Tyr)의 효과를 나타낸다. (A, B) 3T3-L1 세포에서 p-AKT, AKT 및 GLUT4의 단백질 발현에 대한 Cyclo(L-Pro-L-Tyr)의 효과.
- [30] 도 11의 경우 *B. wiedmannii* MBT09 배양액 및 Cyclo(L-pro-L-tyr)의 2-NBDG 흡수 효과를 나타내는 그래프이다.

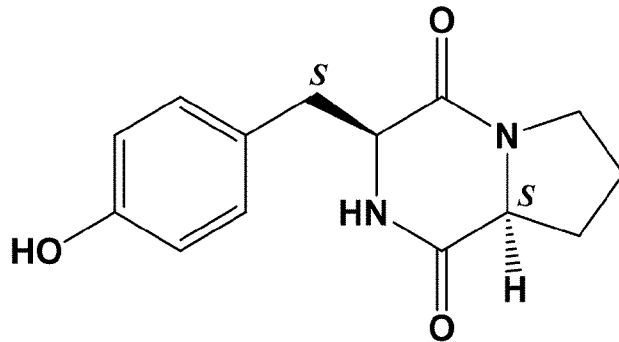
발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 본 발명은 수탁번호 KCCM13378P로 기탁된, 신규한 바실러스 위드만니 MBT09(*BACILLUS WIEDMANNII* MBT09) 균주를 제공한다.

- [32] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 균주, 또는 상기 균주의 배양액을 유효 성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [33] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 균주, 또는 상기 균주의 배양액을 유효 성분으로 포함하는 당뇨병 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [34] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, [화학식 1]의 화합물을 유효 성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다;

[35] [화학식 1]

[36]



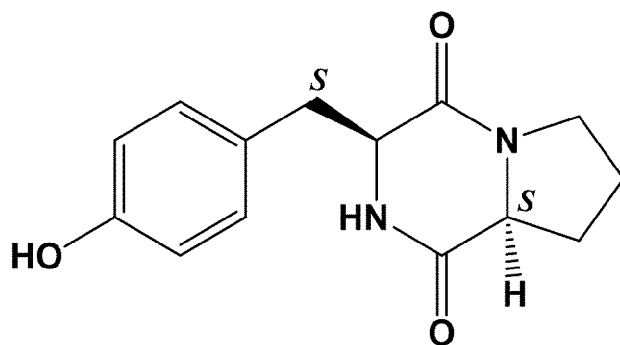
발명의 실시를 위한 형태

- [37] 이상의 본 발명은 이하의 실시예를 통해 보다 구체적으로 설명된다. 그러나 본 발명은 실시예에 한정되지 않고 어떠한 형태로든 구체화될 수 있다. 소개된 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위해 제시되는 것이다.
- [38]
- [39] 본 발명은 수탁번호 KCCM13378P로 기탁된 신규한 바실러스 위드만니 MBT09(*BACILLUS WIEDMANNII* MBT09) 균주를 제공한다. 상기 균주는 ERK를 통한 PPAR γ 의 활성화와 함께 인슐린 수용체에 결합하여 시작되는 IRS를 표적으로 하위조절 경로인 PI3K/AKT 경로의 증가로 두가지 모두를 아우르는 경로로 인슐린에 반응하는 여러 종류의 단백질을 합성하도록 자극하여 그 결과 인슐린의 존적 세포신호전달경로를 유의적으로 활성화시킨다.
- [40] 상기 균주 배양액은 세포 내 포도당 흡수율을 증가시키고, 세포의 인슐린 저항성을 감소시키는 것을 특징으로 하며, 따라서 상기 균주 또는 균주 배양액은 당뇨병 예방 또는 치료용도로 사용될 수 있다.
- [41] 본 발명의 용어 "배양물"은 바실러스 위드만니 MBT09(*BACILLUS WIEDMANNII* MBT09) 균주(기탁번호: KCCM13378P) 균주가 성장 및 생존할 수 있도록 영양분을 공급할 수 있는 배지에 상기 균주를 일정기간 배양하여 얻는 상기 균주, 균추출물, 이의 대사물, 여분의 영양분 등을 포함하는 전체 배지를 의미하나, 균주 배양 후 균주를 제거한 배양액도 포함하는 의미이다.
- [42] 상기 배양액은 일정시간 가만히 두어 하층에 가라앉은 부분을 제외한 상층의 액체만을 취하거나, 여과를 통해 균체를 제거하거나, 배양액을 원심분리하여 하부의 침전을 제거하고 상부의 액체만을 의미할 수도 있다. 이러한 배양액은 통상의 방법으로 농축하여 농축액으로 이용할 수도 있다.

- [43] 상기 배양액 또는 배양액의 농축물은 통상의 방법으로 건조하여 건조물로 제공될 수 있다.
- [44] 본 명세서에서 언급하는 "배양물"은 특별한 언급이 없는 한, 전술한 균체의 배양액, 배양액의 농축물, 상기 배양액 또는 농축물의 건조물을 포함하는 의미이다. 상기 배양물에는 경우에 따라 균체가 포함될 수도 있고, 포함되지 않을 수도 있으며, 특별히 균체의 포함여부는 문제되지 않는다.
- [45] 상기 균주 배양액은 지방세포(Adipocyte)의 분화율을 증가시키고, PPAR γ , AP2, LPL, CD36, FAS, C/EBP α , FAS, IRS-1, PI3K 유전자 발현을 증가시키는 것을 특징으로 한다. PPAR γ 과발현은 3T3-L1 세포에서 지방세포 발달을 촉진하는 반면, PPAR γ 억제제는 지방 형성(adipogenesis)을 억제한다. 즉 상기 균주는 지방세포의 인슐린 의존성 유전자 발현과 관련된 인자를 조절하고, 세포내 지방산 및 중성지방 대사에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.
- [46] 상기 균주 배양액은 IRS, PI3K, p-AKT/AKT, p-ERK/ERK 유전자 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하며, 이는 인슐린 신호전달 경로를 상향 조절한다는 것을 의미한다.
- [47] 또한 상기 균주 배양액은 AKT 또는 GLUT4 유전자 발현을 증가시키는 것을 특징으로 한다. AKT는 포도당에서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 인슐린 민감성과 인슐린 분비의 하류 산화 대사 사이의 변화된 반응을 유발한다. 이러한 발견은 상기 균주가 세포에서 포도당 신호 전달 경로를 상향 조절한다는 것을 의미한다.
- [48] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 균주, 또는 상기 균주의 배양액을 유효 성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [49] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 균주, 또는 상기 균주의 배양액을 유효 성분으로 포함하는 당뇨병 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [50] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, [화학식 1]의 화합물을 유효 성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다;

[51] [화학식 1]

[52]



- [53] 상기 [화학식 1]의 화합물은 ERK를 통한 PPAR γ 의 활성화와 함께 인슐린 수용체에 결합하여 시작되는 IRS를 표적으로 하위조절 경로인 PI3K/AKT 경로의 증가로 두가지 모두를 아우르는 경로로 인슐린에 반응하는 여러 종류의 단백질을

합성하도록 자극하여 그 결과 인슐린 의존적 세포신호전달경로를 유의적으로 활성화시킨다.

- [54] 상기 [화학식 1]의 화합물은 세포 내 포도당 흡수율을 증가시키고, 세포의 인슐린 저항성을 감소시키는 것을 특징으로 하며, 따라서 상기 [화학식 1]의 화합물은 당뇨병 예방 또는 치료용도로 사용될 수 있다.
- [55] 상기 [화학식 1]의 화합물은 지방세포(Adipocyte)의 분화율을 증가시키고, PPAR γ , AP2, LPL, CD36, FAS, C/EBP α , FAS, IRS-1, PI3K 유전자 발현을 증가시키는 것을 특징으로 한다. PPAR γ 과발현은 3T3-L1 세포에서 지방세포 발달을 촉진하는 반면, PPAR γ 억제제는 지방 형성(adipogenesis)을 억제한다. 즉 상기 [화학식 1]의 화합물은 지방세포의 인슐린 의존성 유전자 발현과 관련된 인자를 조절하고, 세포내 지방산 및 중성지방 대사에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.
- [56] 상기 [화학식 1]의 화합물은 IRS, PI3K, p-AKT/AKT, p-ERK/ERK 유전자 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하며, 이는 인슐린 신호전달 경로를 상향 조절한다는 것을 의미한다.
- [57] 또한 상기 [화학식 1]의 화합물은 AKT 또는 GLUT4 유전자 발현을 증가시키는 것을 특징으로 한다. AKT는 포도당에서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 인슐린 민감성과 인슐린 분비의 하류 산화 대사 사이의 변화된 반응을 유발한다. 이러한 발견은 상기 [화학식 1]의 화합물이 세포에서 포도당 신호 전달 경로를 상향 조절한다는 것을 의미한다.
- [58] 상기 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 주성분인 본 발명의 바실러스 위드만니 MBT09(*BACILLUS WIEDMANNII* MBT09) 균주(기탁번호: KCCM13378P), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액, 상기 배양물의 건조물, 상기 배양물의 추출물, 상기 균주의 사균체 및 [화학식 1]의 화합물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 유효성분 유효량에 1종 또는 2종 이상의 약제학적으로 허용 가능한 통상적인 담체 또는 1종 또는 2종 이상의 첨가제를 선택하여 통상적인 제형의 조성물로 제조할 수 있다.
- [59] 담체는 희석제, 활택제, 결합제, 붕해제, 감미제, 안정제, 방부제 중에서 1종 또는 2종 이상을 선택하여 사용할 수 있으며, 첨가제로는 향료, 비타민류, 항산화제 중에서 1종 또는 2종 이상을 선택하여 사용할 수 있다.
- [60] 본 발명에 있어서, 상기 담체 및 첨가제는 약제학적으로 허용 가능한 것은 모두 사용이 가능하며, 구체적으로는 희석제로는 유당(lactose monohydrate), 트레할로스(Trehalose), 옥수수 전분(cornstarch), 콩기름(soybean oil), 미결정 셀룰로오스(microcrystalline cellulose) 또는 만니톨(D-mannitol)이 좋고, 활택제로는 스테아린산 마그네슘(magnesium stearate) 또는 탈크(talc)가 바람직하며, 결합제로는 폴리비닐 피롤리돈(PVP:polyvinyl pyrrolidone) 또는 하이드록시프로필셀룰로오스(HPC: hydroxypropylcellulose) 중에서 선택함이 바람직하다. 또한, 붕해제로는 카르복시메틸셀룰로오스칼슘(Ca-CMC: carboxymethylcellulose calcium), 전분글리콜산나트륨(sodium starchglycolate), 폴라크릴린칼륨(polacrylin

potassium) 또는 크로스폴리머(cross-linkedpolyvinylpyrrolidone)중에서 선택 함이 바람직하고, 감미제로는 백당, 과당, 소르비톨(sorbitol) 또는 아스파탐 (aspartame) 중에서 선택되고, 안정제로는 카르복시메틸셀룰로오스나트륨(Na-CMC: carboxymethylcellulosesodium), 베타-싸이클로덱스트린(β -cyclodextrin), 백 납(white bee's wax) 또는 잔탄검(xanthan gum) 중에서 선택되며, 방부제로는 파라옥시안식향산메틸(methyl p-hydroxy benzoate, methylparaben), 파라옥시안식향 산프로필(propylp-hydroxybenzoate, propylparaben), 또는 소르빈산칼륨(potassium sorbate) 중에서 선택하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [61] 본 발명의 약학적 조성물은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여 될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)이 장기간 투여되는 분할 치료 방법 (fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기에서 '약학적으로 유효한 양'이란 음성 대조군에 비해 그 이상의 반응을 나타내는 양을 말하며 바람 직하게는 염증성 질환의 예방 또는 치료하기에 충분한 양을 말한다. 또한, 상기 약학적으로 유효한 양은 질환 및 이의 중증정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성 별, 투여 경로 및 치료기간 등과 같은 여러 인자에 따라 적절히 변화될 수 있다.
- [62] 본 발명의 조성물은 상기 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법으로 투여경로에 따라 다양하게 제형화될 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허 용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 활성성분의 작용을 저 해하지 않으며 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다. 본 발명의 조성물은 상 기 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법으로 투여경로에 따 라 다양하게 제형화될 수 있다. 투여 경로로는 이에 한정되지는 않으나 경구적 또는 비경구적으로 투여될 수 있다.
- [63] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 바실러스 위드만니 MBT09(*BACILLUS WIEDMANNII* MBT09) 균주(기탁번호: KCCM13378P), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액, 상기 배양물의 건조물, 상기 배양물의 추출물, 상기 균주의 사 균체 및 [화학식 1]의 화합물로 이루어지는 균에서 선택된 1종 이상을 유효성분 으로 포함하는 당뇨병 예방용 식품 조성물을 제공한다.
- [64] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 바실러스 위드만니 MBT09(*BACILLUS WIEDMANNII* MBT09) 균주(기탁번호: KCCM13378P), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액, 상기 배양물의 건조물, 상기 배양물의 추출물, 상기 균주의 사 균체 및 [화학식 1]의 화합물로 이루어지는 균에서 선택된 1종 이상을 유효성분 으로 포함하는 당뇨병 예방용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [65] 본 발명의 건강기능식품은 상기 식품 조성물을 포함한 음료(차 또는 알콜성 음 료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품 (예: 햄, 소시지, 콘드비프 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) 등일 수 있다.

[66] 또한, 본 발명의 건강기능식품은 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제, 액제 제형 등으로 제형화된 것일 수도 있다. 이들은 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 더 포함하여 제형화될 수 있다.

[67] 상기 담체, 부형제, 희석제 및 첨가제의 구체적인 예로는 이에 한정하는 것은 아니나, 락토즈, 텍스트로즈, 슈크로즈, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세 결정성 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸셀룰로즈, 메틸 하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아트산 마그네슘 및 미네랄 오일로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상이 사용되는 것이 바람직하다.

[68]

[69] <실험방법>

[70] 1. 세포 생존율 분석

[71] *Bacillus wiedmannii* 배양액의 세포독성을 확인하기 위해 MTT 시약을 사용하였다. 3T3-L1 세포를 1×10^4 세포/웰로 96-웰 플레이트에 플레이트팅하였다. 밤새 배양한 후 배지를 교체하고 샘플을 다양한 농도로 분주했다. 48시간 배양 후, 각 웰에 5mg/mL MTT 스톡 용액 10 μ L를 처리하고, 샘플을 37°C에서 2시간 동안 배양했다. 배지를 제거한 후 각 웰에 DMSO 100 μ L를 첨가했다. Formazan을 DMSO로 용해시키고 마이크로플레이트 리더(TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 사용하여 540 nm에서 검출했다.

[72]

[73] 2. 2-NBDG 흡수 분석

[74] 지방세포로의 포도당 흡수는 수정된 실험을 사용하여 측정되었다. 간단히 말해서, C2C12 세포가 100% 가득 찰 때까지 3일을 기다렸다. 그 후, 분화 배지 처리 후 2일 후에 세포가 분화되었음을 확인하였다. 세포를 무혈청 배지에서 24시간 동안 배양한 후, *B. wiedmannii* MBT09, cyclo(L-pro-L-tyr) 존재 또는 부재 하에서 24시간 동안 2-NBDG(50 μ M)로 처리했다. 인슐린(100nM)을 포도당 흡수에 대한 양성 대조군으로 사용했습니다. 인산염 완충 식염수로 세포를 두 번 세척하여 2-NBDG의 흡수를 중단했다. 세포 단층의 나머지 형광 활성은 485 및 535 nm에서 형광 마이크로플레이트 리더로 기록되었다. 2-NBDG가 없을 때의 형광 활성을 얻은 모든 값에서 뺀다.

[75]

[76] 3. 개방형 컬럼 크로마토그래피

[77] *Bacillus wiedmannii* MBT09는 3L의 9L 발효기에서 121°C에서 15분간 고압멸균된 트립신 대두 배지에서 배양되었다. 배양 조건은 다음과 같다: 37°C에서 4시간 동안 배양; 100rpm; pH, 6.9-7.2. 48시간 후, *B. wiedmannii*의 MCS를 3,000rpm에서

20분간 원심분리하고 여과했다. 여과된 MCS를 상온에서 에틸아세테이트로 3회 추출하였다. 용해되지 않은 잔사(residue)를 제거한 후, 에틸아세테이트 추출물을 진공에서 농축하여 건조된 잔사를 얻었다. 이어서, 잔류물을 클로로포름/메탄올(10:1) → 클로로포름/메탄올/물(30:3:1)로 용출시키는 SiO₂ 컬럼(Φ 4 x 20 cm) 크로마토그래피에 적용시켰다. 두 번째 컬럼에는 아세톤/물(1:1) → (2:1)을 포함하는 ODS 컬럼(Φ 2x7cm)을 사용했다. 세 번째 컬럼은 클로로포름/메탄올/물(30:3:1)로 용출된 SiO₂ 컬럼(Φ 2x12cm) 크로마토그래피를 사용했다. 생리활성이 있는 분획은 3TL-1 세포에서 AdipoRed 분석에 따라 측정하였고, UV Spectronic Co.(Westbury, NY, USA)를 사용하여 TLC 패턴을 모니터링하여 측정하였다.

[78]

[79] **4. 동물 실험**

[80] (1) 실험적인 식단과 동물 사육

[81] 실험동물로 7주령 수컷 dbdb 마우스(라운바이오텍동물주식회사, 서울, 한국)를 구입하여 1주일 동안 순화시킨 후 5군으로 나누었다(정상군 1개, 검체군 3개, 양성대조군 1개). 각 그룹에 3마리의 동물을 배정하였고, 실험은 5주 동안 진행되었다. 동물실험실의 사육조건은 22.0±1.0°C 습도 50.0%±10.0%, 명암주기 12시간으로 유지하였다. 마우스에게 양의 제한 없이 기본사료를 먹였으며, 식수는 각각 200g과 250mL로 측정하였고, 체중은 주 1회 정해진 시간에 기록하였고, 음식과 물 섭취량도 매일 정해진 시간에 측정하였다.

[82]

[83] (2) 체중, 물 소비량, 음식 소비량 측정

[84] 실험동물의 체중은 실험 시작과 동시에 5주 동안 주 1회 측정하였고, 실험기간 동안 1일 1회 사료 및 수분섭취량을 측정하였다. 음식물과 음용수 섭취량은 이전 섭취량에 따른 잔여량에 따라 측정하였다.

[85]

[86] (3) 공복 혈당 변화

[87] 혈당은 1주 간격으로 4회 측정하였다. 6시간 동안 절식시킨 후, 실험동물의 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하고, 혈당측정기(Accu-Check Active; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하여 공복혈당을 측정하였다.

[88]

[89] **<실험결과>**[90] **1. 3T3-L1 세포에 PPAR γ 아고니스트 효과를 갖는 미생물 스크리닝**

[91] 3T3-L1 세포에 대해 PPAR γ 아고니스트 효과가 있는 미생물을 선택하기 위해 세포를 10 μ g/mL의 MCS(Microbial culture supernatant)로 5일 동안 처리하고 AdipoRed 분석으로 분석했다. 그 결과, 37개 미생물 중 8개(has12, SMSR7, MHSMT5, M2YM8, M2YM10, SFT18, M2YT5, SFT2)의 MCS가 PPAR γ 아고니스트 효과를 나타내는 것으로 나타났다. 8종의 미생물의 MCS를 다양한 농도(50,

100, 200 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하여 3T3-L1 세포의 PPAR γ 작용제의 효과를 구체적으로 나타내는 미생물을 선별하였다(도 1). 그 중 SFT18이 가장 효과적이었다.

[92] 본 발명자는 상기 미생물의 계통발생을 확인하기 위해 16S rRNA 유전자 서열을 분석하였다(서열목록 1). 16S rRNA 유전자 서열 분석 결과, SFT18 균주는 *Bacillus Wiedmannii* 로 확인되었고, 최종적으로 *Bacillus Wiedmannii* MBT09로 명명되었으며, 기탁번호 KCCM13378P로 2023년 08월 17일자로 한국미생물보존센터에 기탁하였다.

[93] [서열목록 1]

[94] AGGTGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTG
GGTTAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTGCA
TCATTAGTGGGGCACTCTAAGTGACTGGCGGTGACAACGG
GAGAGTGGGATGACGTCGATCATCATGCCGATGACCTTGG
CTACACCACCGTGCTACAATTGAACCGTACAGAGCCGTCT
GCCAGAGCATATCTGTACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAA
AGGTTACCCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGG
TGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCAC
CGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTC
ATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACGTAGAACGG
TTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTGCAGCTCTT
TGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAA
GGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGT
TTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTTAATGAT
GGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAA
CCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACC
ACCTGTCACTCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAG
GGTTTTAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCG
TTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG
CCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTAC
TCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAA
AGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACG
GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCAC
GCTTTCGCGCCTCAGTGTGAGTTACAGACCAGAAAGTCGC
CTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCGCTACACAT.

[95]

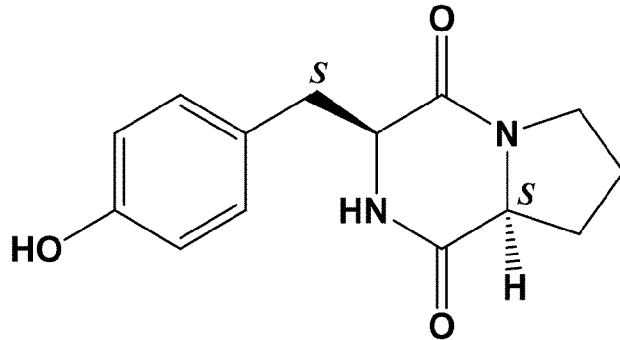
[96] 2. 개방형 컬럼 크로마토그래피 분석

[97] 90% 에틸 아세테이트 추출물(*B. wiedmannii* MBT09)은 *B. wiedmannii* 균주 9L로부터 얻어졌다. 전체적으로, 본 발명자는 에틸 아세테이트 추출물을 분별하고 도 2에 표시된 흐름에 따라 각 화합물을 분리했다. 10개의 1차 분획 샘플 중 no. 7이

가장 효과적인 PPAR γ 작용제였다. 두 번째 라운드에서는 샘플 중 no. 1(7-1)이 최고였고, 3라운드에서는 4번(7-1-4)이 최고였다. 또한, NMR 결과를 토대로 유효성분을 정제한 결과 [화학식 1]의 cyclo(L-pro-L-tyrosine)인 것으로 확인되었다;

[98] [화학식 1]

[99]



[100]

[101] **3. 3T3-L1 세포 생존 능력에 대한 *B. wiedmannii* MBT09 및 cyclo(L-pro-L-tyr)의 효과**

[102] 다음 샘플과 함께 48시간 동안 최대 500($\mu\text{g/mL}$)의 농도로 배양하여, MTT 분석은 24시간 동안 배양된 3T3-L1 세포에서 *B. wiedmannii* 및 cyclo(L-pro-L-tyr)의 세포 생존력을 결정하는데 사용되었다. 테스트된 농도 범위(15.6~500 $\mu\text{g/mL}$) 내에서 *B. wiedmannii* MBT09 처리된 세포는 처리되지 않은 대조 세포와 유사한 생존력을 나타냈습니다(도 3A). 또한, 테스트된 농도(6.25-200 $\mu\text{g/mL}$)의 cyclo(Lpro-L-tyr)는 처리되지 않은 대조군 세포와 유사한 생존력을 보여주었다(도 3B).

[103]

[104] **4. 지방세포 분화에 대한 *B. wiedmannii* MBT09 및 cyclo(L-pro-L-tyr)의 효과**
 [105] MTT 분석 결과를 바탕으로 전체 농도 500의 1/5로 생존율을 낮추어 3가지 농도를 설정하였다. *B. wiedmannii* MBT09와 cyclo(L-pro-L-tyr)은 각각 20, 100, 500과 25, 50, 100, 200의 농도로 투여되었다. *B. wiedmannii* 및 cyclo(L-pro-L-try)가 분화율에 미치는 영향은 도 4A 및 B에 나와 있다. 세포질 내 녹색 영역으로 표시되는 지질 방울을 관찰하기 위해 5일째에 세포를 AdipoRed로 염색했다.

[106] 5일째에는 본 발명자는 성숙한 지방 세포의 정상적인 표현형과 모양을 유지함에도 불구하고 샘플 처리 그룹(20, 100 및 500 $\mu\text{g/mL}$)의 지질 방울의 수와 크기가 대조군에 비해 증가한 것을 발견했습니다(도 4C). 더욱이, 시료 처리군(20, 100, 500 $\mu\text{g/mL}$ 및 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g/mL}$)은 처리되지 않은 군에 비해 지방세포 분화율이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났습니다(그림 A, B).

[107]

[108] **5. 지방 세포에서 전사 인자의 유전자 발현에 대한 *B. wiedmannii* MBT09의 효과**

[109] 이전 실험 결과를 바탕으로 *B. wiedmannii* MBT09의 MCS에 의해 유발된 3T3-L1 세포의 PPAR γ 아고니스트, 지방 형성(adipogenesis), 지질합성(lipogenesis) 및

인슐린 신호 전달 경로의 효과를 밝히기 위해 메신저 RNA(mRNA) 발현 수준을 조사했다.

- [110] 지방세포로 분화된 후, PPAR γ 아고니스트의 주요 표적인 PPAR γ 와 지방생성의 하위 인자인 FAS, LPL, CD36, AP2, C/EBP α 의 발현이 증가하였다(도 5). 또한, 인슐린 신호전달 체계에서 중요한 역할을 하는 PI3K와 IRS는 *B. wiedmannii* MBT09 처리 후 의존적으로 증가하는 경향이 있었다(도 5). PPAR γ 과발현은 3T3-L1 세포에서 지방세포 발달을 촉진하는 반면, PPAR γ 억제제는 지방 형성(adipogenesis)을 억제한다. 이러한 PPAR γ 경로 이론을 통해 분화된 3T3-L1 세포로부터 전체 RNA를 정제하고 qRT-PCR을 수행하였다. 이러한 결과로부터, 시료는 지방세포의 인슐린 의존성 유전자 발현과 관련된 인자를 조절하고, 세포내 지방산 및 중성지방 대사에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

[111]

- [112] **6. *B. wiedmannii* MBT09 배양액에 의한 3T3-L1 세포에서 인슐린 신호 전달 경로의 상향 조절**

- [113] *B. wiedmannii* MBT09의 MCS에 의해 유발된 3T3-L1 세포의 인슐린 신호전달 경로에 대한 효과를 조사하기 위해 웨스턴 블롯으로 IRS, PI3K, p-AKT/AKT, p-ERK/ERK 및 PPAR γ 의 발현 수준을 평가했다. 웨스턴 블롯 분석에서는 *B. wiedmannii* MBT09의 MCS(20, 100 또는 500 μ g/mL)가 인슐린 수용체 IRS-1; 인슐린의 중앙 조절자인 PI3K; 및 에너지 대사 조절제인 AKT의 발현 수준을 증가시키는 것으로 나타났다. 지방 조직은 또한 인슐린 감각 관련 PPAR γ 와 그 하위 인자인 p-ERK/ERK를 증가시켰다(도 6). 이러한 발견은 *B. wiedmannii* MBT09의 MCS가 3T3-L1 세포에서 인슐린 신호 전달 경로를 상향 조절한다는 것을 시사한다. 따라서 *B. wiedmannii* MBT09의 MCS는 3T3-L1 세포에서 항당뇨병 효과를 나타낼 수 있다.

[114]

- [115] **7. *B. wiedmannii* MBT09 배양액에 의한 3T3-L1 세포에서 포도당 신호 전달 경로의 상향 조절**

- [116] *B. wiedmannii* MBT09의 MCS에 의해 유발된 3T3-L1 세포의 포도당 신호 전달 경로에 미치는 영향을 조사하기 위해 웨스턴 블롯 분석을 통해 p-AKT, AKT 및 GLUT4의 발현 수준을 평가했다. 웨스턴 블롯 분석에 따르면 *B. wiedmannii* MBT09의 MCS(20, 100 및 500 μ g/mL)로 처리하면 p-AKT, AKT 및 GLUT4의 발현 수준이 증가하는 것으로 나타났다(도 7). 또한, 위의 경로에 따라 AKT는 포도당에서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 인슐린 민감성과 인슐린 분비의 하류 산화 대사 사이의 변화된 반응을 유발한다. 이러한 발견은 *B. wiedmannii* MBT09의 MCS가 3T3-L1 세포에서 포도당 신호 전달 경로를 상향 조절한다는 것을 시사한다. 따라서 *B. wiedmannii* MBT09의 MCS는 3T3-L1 세포에서 항당뇨병 효과를 가질 수 있다.

[117]

[118] 8. 지방 세포에서 전사 인자의 유전자 발현에 대한 cyclo(L-pro-L-tyr)의 효과

[119] 이전 실험 결과를 바탕으로 cyclo(L-pro-L-tyr)의 MCS에 의해 유발된 3T3-L1 세포의 PPAR γ 아고니스트, 지방 형성(adipogenesis), 지질합성(lipogenesis) 및 인슐린 신호 전달 경로의 효과를 밝히기 위해 메신저 RNA(mRNA) 발현 수준을 조사했다. cyclo(L-pro-L-tyr) 처리 후 PPAR γ 아고니스트의 중심축인 PPAR γ 의 발현이 증가하였고, 인슐린 신호전달의 구성요소인 IRS의 발현도 증가하였다. 또한, 지방분화의 하위인자인 LPL, AP2, Cd36의 발현량도 증가한 반면, FAS의 발현량은 감소하는 경향을 보였다(도 8). PPAR γ 과발현은 3T3-L1 세포에서 지방세포 발달을 촉진하는 반면, PPAR γ 억제제는 지방생성을 억제합니다. 이러한 PPAR γ 경로 이론을 통해 분화된 3T3-L1 세포로부터 전체 RNA를 정제하고 qRT-PCR을 수행하였다.

[120]

[121] 9. Cyclo(L-pro-L-tyr)에 의한 3T3-L1 세포에서 인슐린 신호 전달 경로의 상향 조절

[122] IRS-1은 PI3K 수용체이며 인슐린에서 매우 중요한 역할을 한다. 3T3-L1 세포에 대한 cyclo(L-pro-L-tyr)의 효과가 이 경로와 관련이 있는지 여부를 확인하기 위해 Western blot 분석을 수행했다. 인슐린 수용체 IRS-1의 활성화는 cyclo(L-pro-L-tyr) 치료 후에 상향 조절되었다. 이는 cyclo(Lpro-L-tyr)가 PI3K 및 AKT(IRS-1의 하류 인자)의 인산화를 상향 조절한 후 IRS-1, PI3K 및 AKT 경로의 상향 조절을 나타냄을 나타낸다. 또한 지방조직에서는 인슐린 감수성과 관련된 PPAR γ 와 그 하위 인자인 p-ERK/ERK가 증가하였고, 인슐린 매개 포도당 섭취를 증가시키고 인슐린 저항성을 개선시키는 PPAR이 농도 의존적으로 증가하였다(도 9). 따라서 cyclo(L-pro-L-tyr)은 효과적인 항당뇨병 물질이라고 할 수 있다.

[123]

[124] 10. Cyclo(L-pro-L-tyr)에 의한 3T3-L1 세포에서 포도당 신호 전달 경로의 상향 조절

[125] 지방세포에서 GLUT4 전위는 PI3K/AKT 신호 전달 경로를 통해 체장에 의해 가속화된다. AMPK-매개 GLUT4 전좌(translocation)는 세포내 칼슘 농도의 일시적인 증가를 통한 근육 수축에 의해 촉진된다. 이러한 이론을 바탕으로 포도당 흡수 메커니즘과 관련된 인자는 p-AKT/AKT, GLUT4, p-AMPK/AMPK로 확인되었다. GLUT4의 하위인자인 AKT와 PI3K가 모두 증가하였고, 포도당 대사에서 독립적으로 인산화되어 지방산 산화를 촉진하는 AMPK도 농도 의존적으로 증가하였다(도 10). 따라서 cyclo(L-pro-L-tyr)은 효과적인 항당뇨병 물질로 여겨진다.

[126]

[127] 11. *B. wiedmannii* MBT09 배양액 및 Cyclo(L-pro-L-tyr)의 2-NBDG 흡수 효과

[128] 도 11을 참고하면, 3T3-L1 세포 및 C2C12 세포에 *B. wiedmannii* MBT09 배양액 및 Cyclo(L-pro-L-tyr)를 처리한 경우 세포의 당 흡수가 촉진되는 것을 확인할 수 있었다(도 11). 따라서 *B. wiedmannii* MBT09 배양액 및 Cyclo(L-pro-L-tyr)의 경우

세포로의 당 흡수를 촉진함으로써 혈액 내 당 농도를 저하시켜 당뇨병 치료 효과를 나타낸다는 것을 알 수 있다.

[129]

[130] **12. *B. wiedmannii* MBT09가 체중, 음식 섭취량 및 물 소비량에 미치는 영향 및 혈당에 미치는 영향**

[131] 실험기간 동안 4주간 주 1회, 3회씩 체중과 식수를 측정하였다. 통계처리 결과, NaCl을 투여한 대조군과 로시글리타존을 투여한 대조군을 고려하면(표 1), 실험군의 체중은 이전군과 비슷했고, 로시글리타존 투여군보다는 낮았다. 둘째, 식이요법에 있어서 대조군과 표본군 사이에는 차이가 없었다. 마지막으로 식수의 양을 보면 실험군은 NaCl을 투여한 대조군에 비해 상대적으로 적은 양을 섭취하였지만, 로시글리타존을 투여한 군보다는 많은 양을 섭취하였다.

[132] 시료가 혈당에 미치는 영향을 확인하기 위해 일주일에 한 번씩 실험동물의 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 혈당 농도를 측정하였다. 순응(acclimatization) 후 대조군 db/db 마우스의 혈당 농도는 실험 시작부터 해부까지 594 ± 5.6 으로 유지되었다.

[133] 반면에, 시료 처리군(20, 100, 500)과 로시글리타존 투여군의 혈당 농도는 순차적으로 541 ± 18.7 , 466 ± 25.5 , 480 ± 16.3 , 386.4 ± 56.05 로 낮아졌다(표 1).

[134] [표1]

그룹	Food consumption(g/week)	Body weight Gain(g/week)	Water consumption(g/week)	Blood sugar
db/db mouse (each n=3)				
대조군	15.32 ± 4.53	0.26 ± 0.21	67.6 ± 10.63	594 ± 5.6
ROSI(mg/kg/day)	14.4 ± 3.69	1.15 ± 0.58	14.7 ± 5.60	386 ± 56.05
MBT09(mg/kg/day)				
20	16.4 ± 5.05	1.79 ± 0.36	44.7 ± 15.7	541 ± 18.77
100	16.4 ± 5.35	1.37 ± 0.36	40 ± 15.4	466.2 ± 25.55
500	14.5 ± 4.96	2.61 ± 0.6	35.7 ± 12.5	480.6 ± 16.3

[135]

[136] <결론>

[137] 본 발명에서는 당뇨병 연구에 흔히 사용되는 마우스 전구세포주인 3T3-L1을 이용하여 효능 미생물을 스크리닝하였다. 또한, 세포가 분화 유도에 의해 지방 세포로 분화되면 인슐린 수용체의 수가 급격히 증가하는데, 이는 당뇨병 연구에서 포도당 흡수 및 인슐린 신호 전달의 변화를 측정하는 데 사용된다. 스크리닝을 위해 1단계에서 105종 중 37종을 선정하였고, 2단계에서 9종을 선정하였다(도 1). 그 중 농도 처리 시 가장 높은 농도 의존적 효능을 보인 미생물인 SFT18을 선

정하였다. 16S rRNA로 미생물의 염기서열 및 특성을 확인한 결과, *B. wiedmannii* MBT09로 동정되었다.

- [138] 본 발명자는 *B. wiedmannii* MBT09의 MCS를 사용하여 3T3-L1 세포의 세포 독성, 유전자 발현 및 단백질 발현을 통해 당뇨병 관련 인슐린 메커니즘 및 포도당 흡수 메커니즘의 효능을 입증할 수 있는 경로를 식별했다.
- [139] 또한, 미생물의 MCS로부터 유효성분인 cyclo(L-pro-L-tyr)을 분리하여 확인하였다(도 2). 분리를 통해 얻은 유효성분 역시 *B. wiedmannii* MBT09의 MCS와 동일한 유전자 및 단백질 발현을 통해 효능기전의 경로를 확인하였다. 먼저, 본 발명자는 인슐린 수용체 기질로 작용하는 IRS를 살펴보았다; 자극에 의해 활성화되는 인슐린 메커니즘 PI3K의 경로; 및 하류 단백질인 AKT. 인슐린 자극 전달 경로로 작용하는 AKT의 활성화는 용량 의존적으로 인슐린 저항성을 개선하는 역할을 하는 ERK와 PPAR γ 를 증가시켰다. 마지막으로, 포도당 흡수 속도를 조절하는 단계에서 포도당 수송체 역할을 하며 세포 내 포도당 흡수 과정에서 필수 발현 인자이자 인슐린 신호 전달 시스템의 필수 구성 요소인 Glut4도 증가했다.
- [140] 이러한 결과를 토대로 기존 당뇨병치료제 로시글리타존과 미생물 시료의 차이점은 전자는 PPAR γ 에만 결합해 인슐린 저항성을 완화시키는 반면, IRS, PI3K, AKT는 순차적으로 직접 작용해 인슐린 감수성 포인트를 높이는 점이다. 차이점은 AKT가 증가함에 따라 ERK를 통해 PPAR γ 를 활성화하는 로시글리타존의 기존 메커니즘을 포함하여 위의 경로에도 두 가지 유전자 전사 경로가 있다는 것이다. 제2형 당뇨병에서는 인슐린 저항성과 정상적인 포도당 대사를 위해 다량의 인슐린이 필요한 상태가 동시에 발생하며, 인슐린 작용 감소로 인해 포도당 항상성이 유지되지 않는다. 당뇨병이 조기에 발병하는 주요 원인이기도 하다. 당뇨병은 사망 원인 1위로 분류되며, 당뇨병 환자의 90%를 차지한다. 인슐린은 IRS에 대한 인슐린 수용체의 결합, 다중 경로를 통한 GLUT4의 전위 및 일정한 혈당 농도 유지를 유도함으로써 포도당의 조직 활용을 증가시키는 데 중요한 역할을 합니다. 본 결과를 바탕으로 인슐린 저항성이나 당뇨병에 관여하는 아디포넥틴 관련 인자, 인슐린 관련 인자, 포도당 관련 인자가 인슐린 저항성을 개선하고 포도당 이용률을 높이는 데 효과가 있음을 확인하였다.
- [141]
- [142] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.
- [143]
- [144] [수탁번호]
- [145] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)
- [146] 수탁번호 : KCCM13378P
- [147] 수탁일자 : 20230817

[148]
[149] [미생물 기탁증]
[150]

특허 출원을 위한 미생물기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트조약

국제적 양식

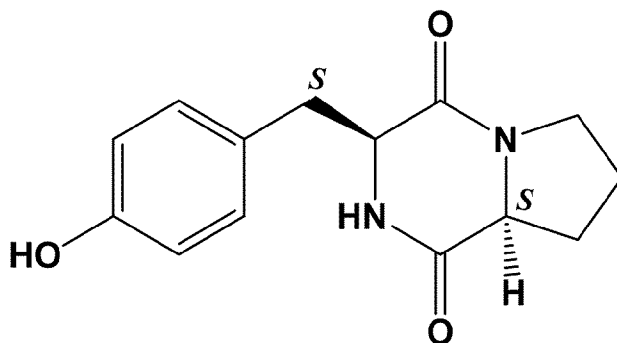
주식회사 엠바이옴씨라퓨틱스 대한민국, 13488, 경기도, 성남시, 분당구, 판교로 289번길 20, 경기스타트업캠퍼스 2동 5층	하기 국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 의거 발행된 수탁증 원본
---	--

1. 미생물의 표시	
기탁자가 제공한 참조표시: 바실러스 워드만니 MBT09	국제기탁기관에서 제공한 수탁번호: KCCM13378P
2. 과학적인 성질 및/또는 제안된 분류학적 명명	
상기 1에 표시된 미생물은 다음이 첨부된다: ☐ 과학적인 성질 ☐ 제안된 분류학적 명명 (해당란에 X 표시함.)	
3. 수탁 및 수령	
본 국제기탁기관은 상기 1에 표시된 미생물을 수령하며, 그것은 2022년 10월 25일에 수탁되었다 (최초 기탁일)	
4. 전환 요청의 접수	
상기 1에 표시된 미생물이 국제기탁기관에서 _____ (최초 기탁일)에 수탁되었으며, 원 기탁의 부다페스트 조약에 의한 기탁으로의 전환 요청서를 _____에 접수하였다. (전환요청서 수령 날짜)	
5. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 03641 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩	국제기탁기관을 대표할 권한을 가진 자 또는 권한 있는 자의 서명 날짜: 2023년 08월 17일

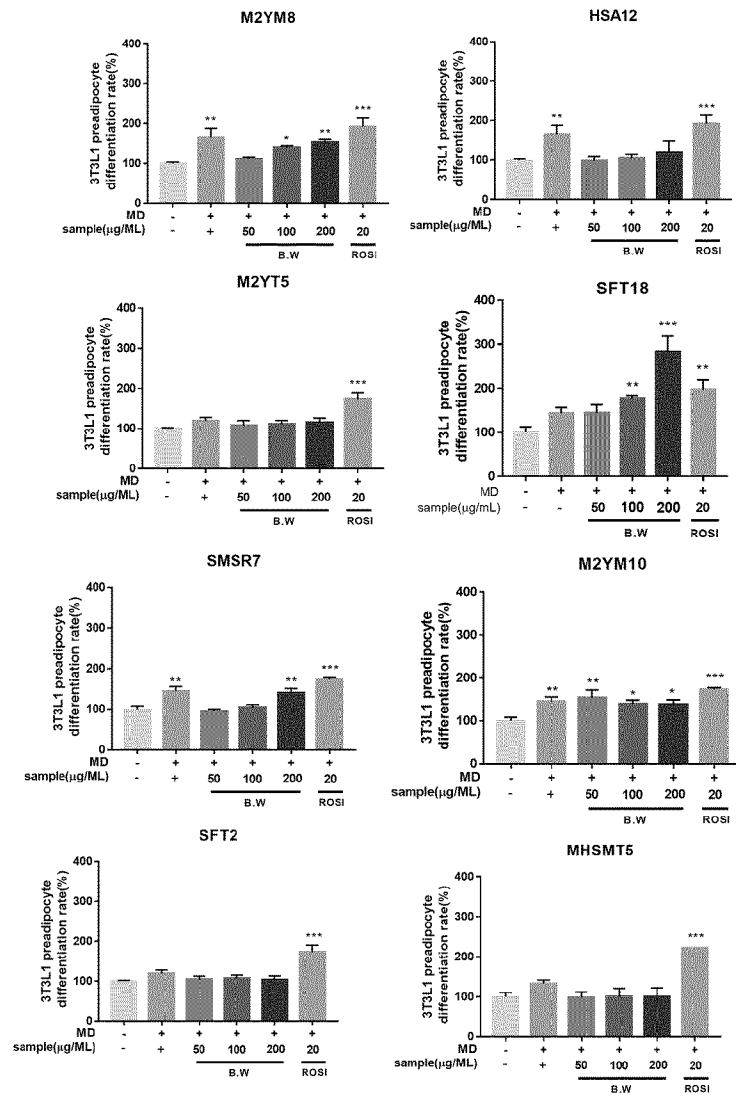
양식 BP/4

청구범위

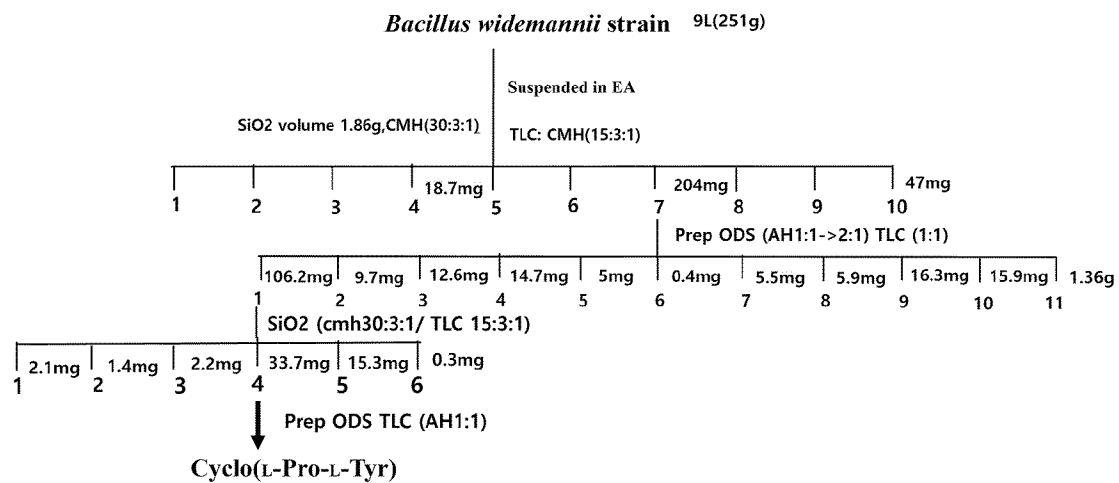
- [청구항 1] 수탁번호 KCCM13378P로 기탁된, 신규한 바실러스 위드만니 MBT09(BACILLUS WIEDMANNII MBT09) 균주.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 균주 배양액은 지방세포(Adipocyte)의 분화율을 증가시키는 것을 특징으로 하는 바실러스 위드만니 MBT09 균주.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 균주 배양액은 PPAR γ , AP2, LPL, CD36, FAS, C/EBP α , FAS, IRS-1, PI3K 유전자 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 균주 배양액은 인슐린 신호전달 경로를 상향 조절시키는 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 균주 배양액은 IRS, PI3K, p-AKT/AKT, p-ERK/ERK 유전자 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 균주 배양액은 AKT 또는 GLUT4 유전자 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 균주 배양액은 세포 내 포도당 흡수율을 증가시키고, 세포의 인슐린 저항성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 8] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 균주, 또는 상기 균주의 배양액을 유효 성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 9] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 균주, 또는 상기 균주의 배양액을 유효 성분으로 포함하는 당뇨병 개선용 식품 조성물.
- [청구항 10] [화학식 1]의 화합물을 유효 성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물;
[화학식 1]



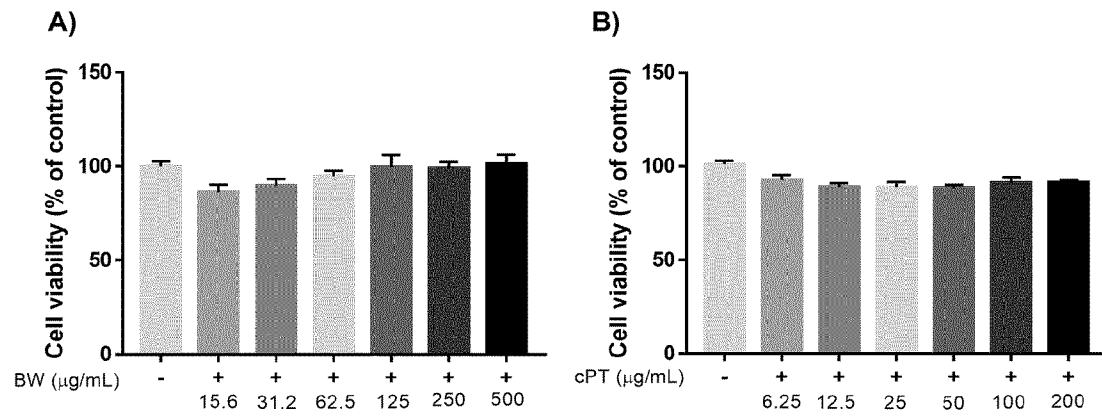
[도1]



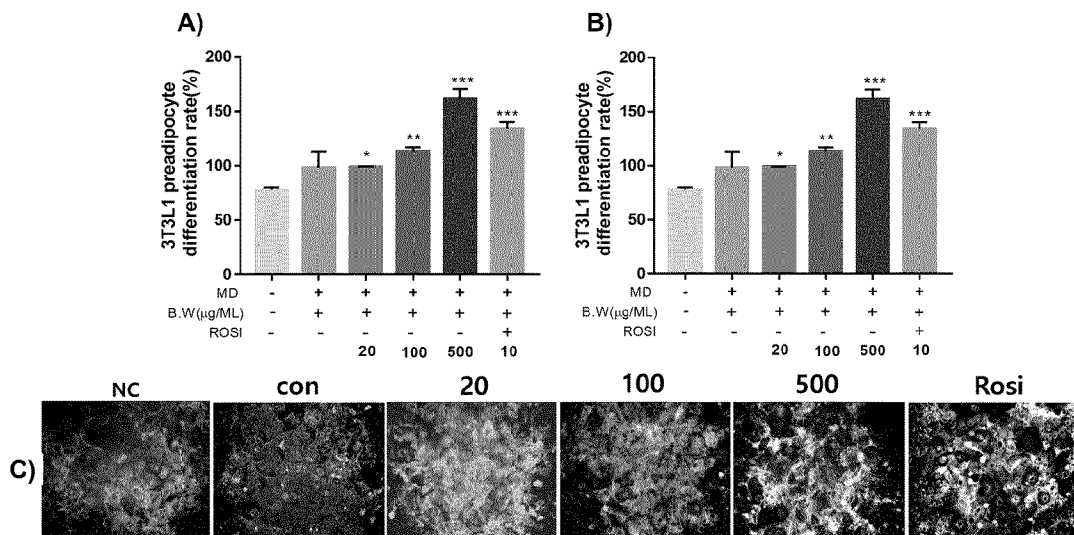
[도2]



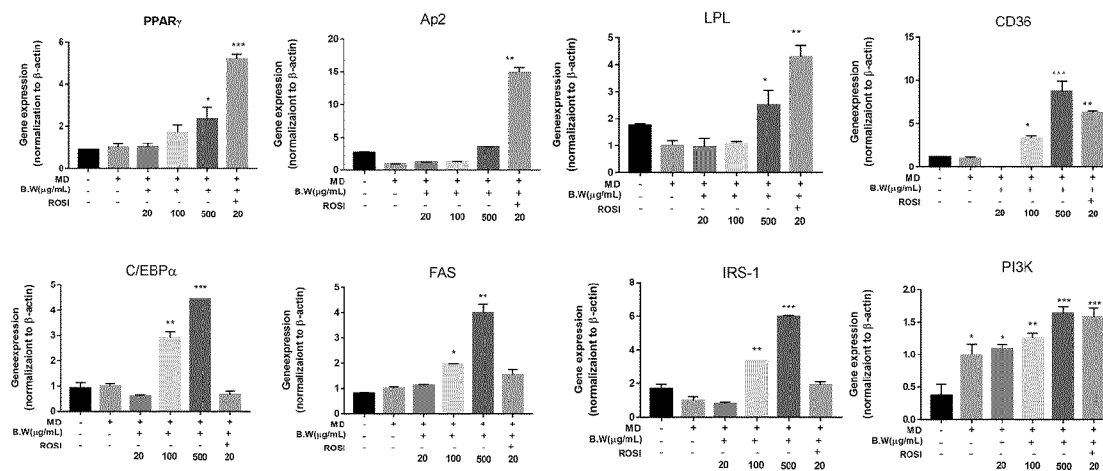
[도3]



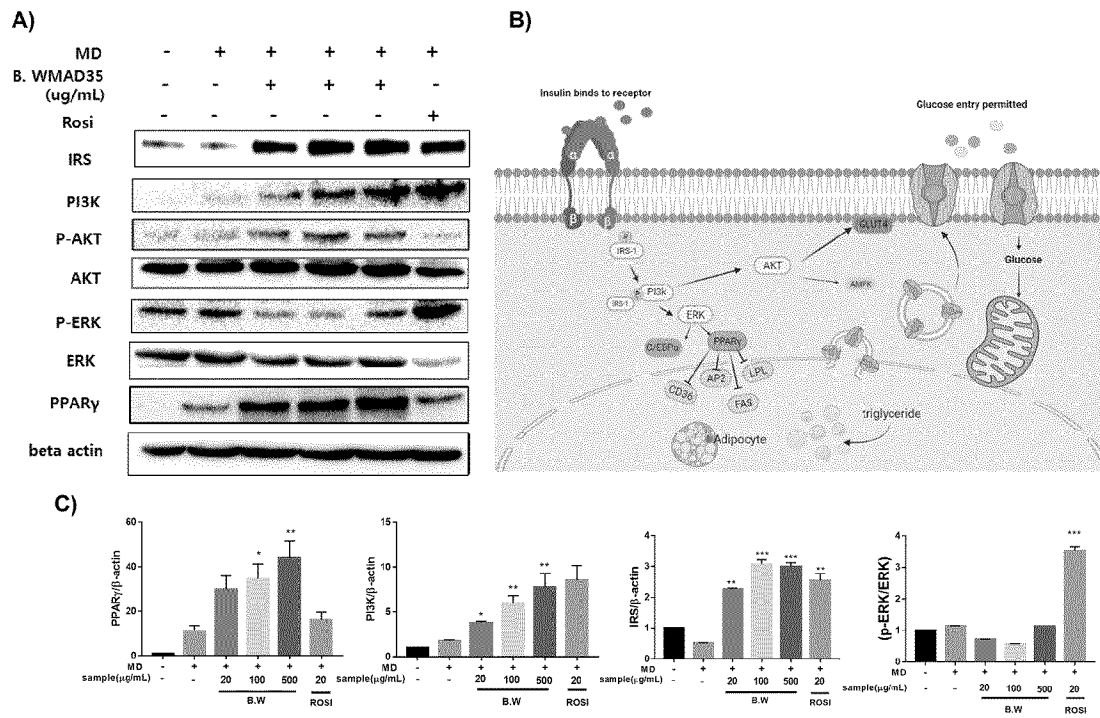
[도4]



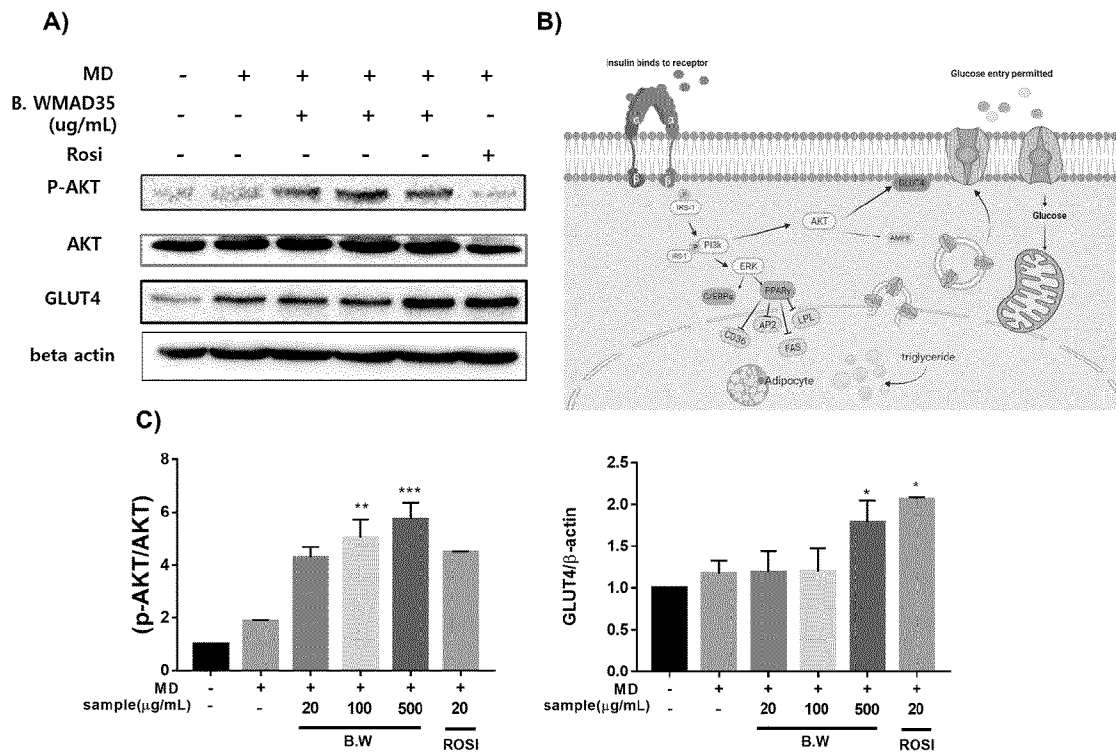
[도5]



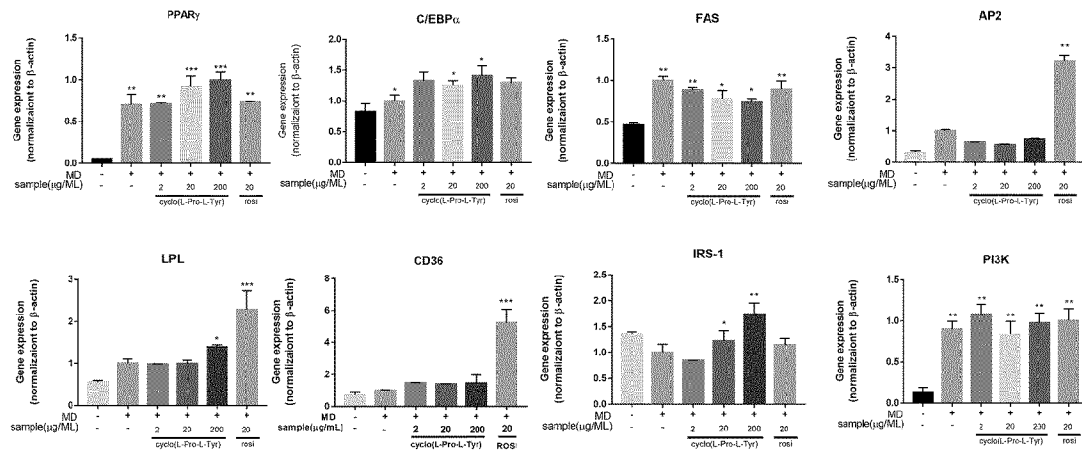
[도6]



[도7]

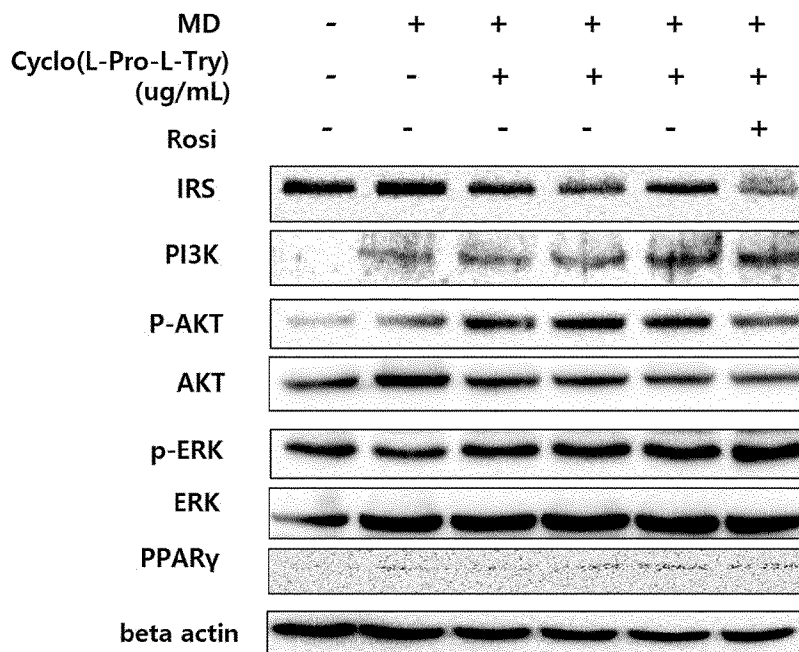


[도8]

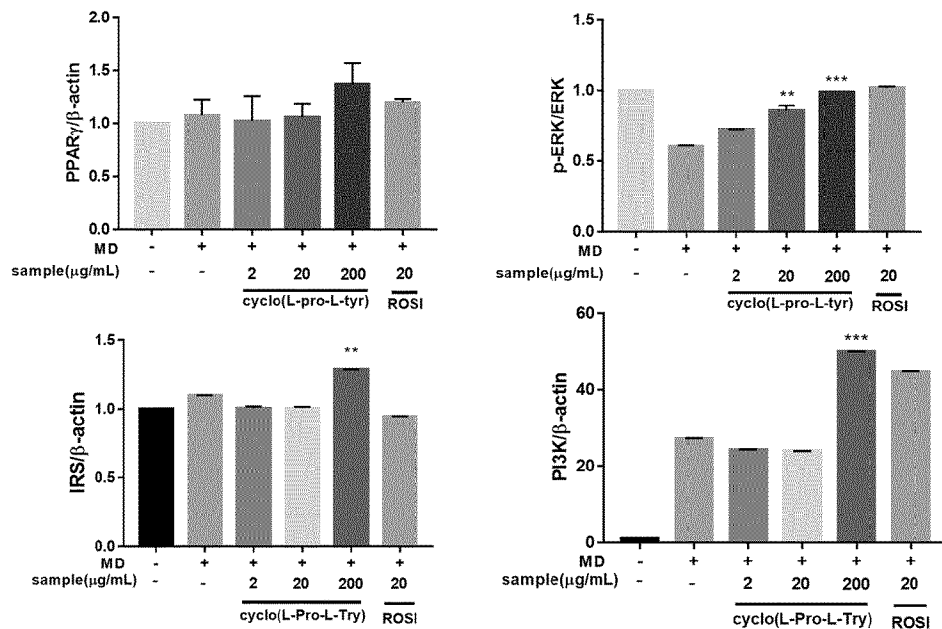


[도9]

A)

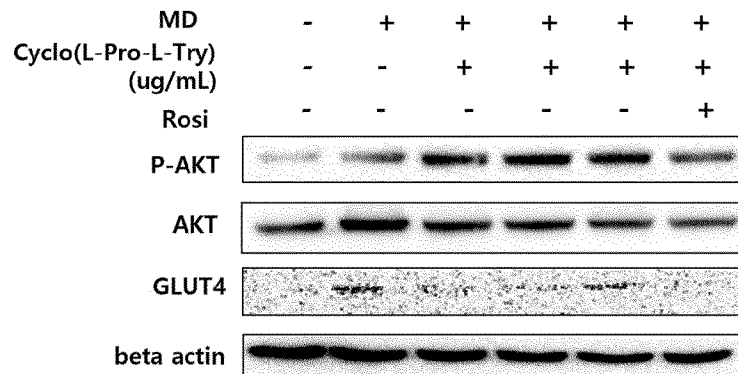


B)

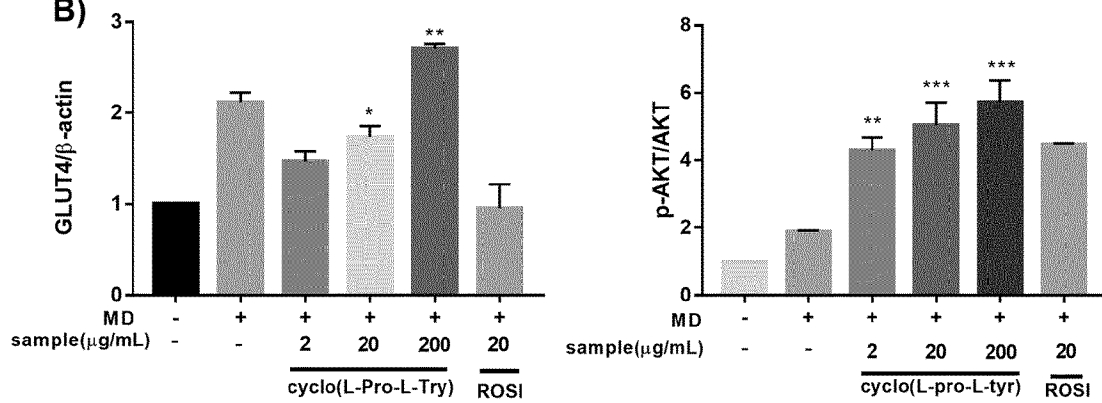


[도10]

A)

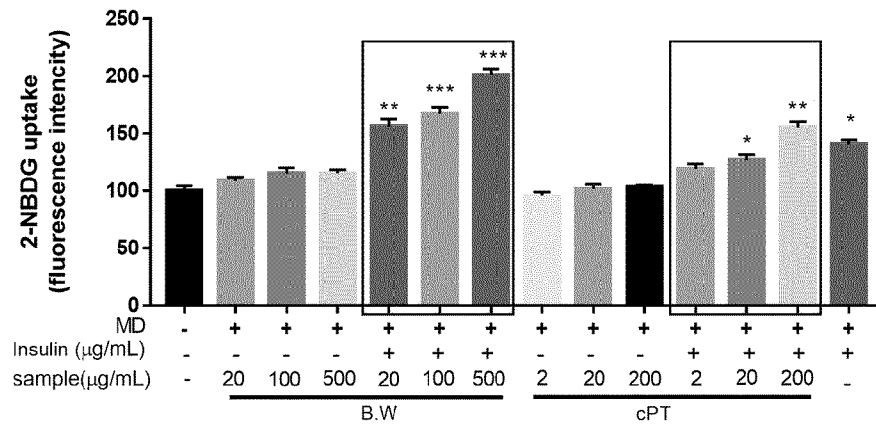


B)

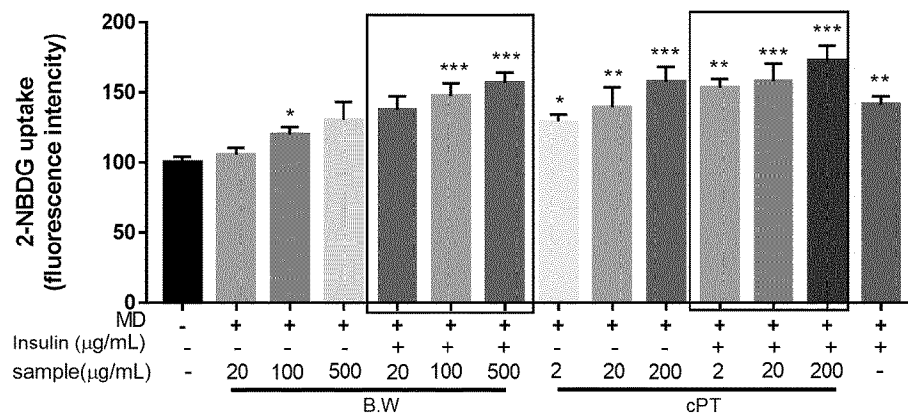


[도11]

3T3-L1



C2C12



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/012832

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i; **A61K 35/742**(2015.01)i; **A61K 31/4985**(2006.01)i; **A61P 3/10**(2006.01)i; **A23L 33/135**(2016.01)i;
C12R 1/07(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 1/20(2006.01); A61K 31/4985(2006.01); C07D 487/04(2006.01); C12Q 1/18(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), STN (Registry, Caplus, Marpat), Google & keywords: 당뇨병 (diabetes), 바실러스 위드만니 (bacillus wiedmannii), 지방전구세포 (preadipocyte)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KARANAM, G. et al. Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction for the initiation of apoptotic cell death in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by a cyclic dipeptide Cyclo(-Pro-Tyr). Molecular biology reports. 2020, vol. 47, pp. 3347-3359. See abstract; page 3353; and figure 7.	1-10
A	KR 10-2023-0084861 A (KOREA FOOD RESEARCH INSTITUTE) 13 June 2023 (2023-06-13) See entire document.	1-10
A	KR 10-2009-0035323 A (KONKUK UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION CORP.) 09 April 2009 (2009-04-09) See entire document.	1-10
A	HUANG, X. et al. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. International journal of biological sciences. 2018, vol. 14, 1483, pp. 1483-1496. See entire document.	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 May 2024

Date of mailing of the international search report

27 May 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

**Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208**

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/012832

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LU, X. et al. α -Glucosidase inhibitors from two mangrove-derived actinomycetes. <i>Molecules</i> . 29 April 2023, vol. 28, 3822, pp. 1-17. See entire document.	1-10
X	KIM, Jiseon. Novel microorganism: <i>Bacillus wiedmannii</i> AD35 regulates glucose metabolism and attenuates insulin resistance. 석사학위논문, 경희대학교 일반대학원, 생명공학원 (Master's thesis, Kyung Hee Graduate School of Biotechnology). 2022. See abstract; table 2; and figures 4-13. *This document is a known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/012832

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/012832

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2023-0084861	A	13 June 2023	None			
KR	10-2009-0035323	A	09 April 2009	KR	10-1372887	B1	10 March 2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 1/20(2006.01)i; A61K 35/742(2015.01)i; A61K 31/4985(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i; A23L 33/135(2016.01)i; C12R 1/07(2006.01)n		
B. 조사된 분야		
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/20(2006.01); A61K 31/4985(2006.01); C07D 487/04(2006.01); C12Q 1/18(2006.01)		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부검색 시스템), STN (Registry, Caplus, Marpat), Google & 키워드: 당뇨병 (diabet), 바실러스 위드만니 (bacillus wiedmannii), 지방전구세포 (preadipocyte)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KARANAM, G. 등, "Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction for the initiation of apoptotic cell death in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by a cyclic dipeptide Cyclo (-Pro-Tyr)", Molecular biology reports, 2020, 47권, 페이지 3347-3359 초록; 페이지 3353; 도면 7	1-10
A	KR 10-2023-0084861 A (한국식품연구원) 2023.06.13 전문	1-10
A	KR 10-2009-0035323 A (건국대학교 산학협력단) 2009.04.09 전문	1-10
A	HUANG, X. 등, "The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes", International journal of biological sciences, 2018, 14권, 1483, 페이지 1483-1496 전문	1-10
A	LU, X. 등, "α-Glucosidase inhibitors from two mangrove-derived actinomycetes", Molecules, 2023.04.29, 28권, 3822, 페이지 1-17 전문	1-10
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2024년05월27일 (27.05.2024)	국제조사보고서 발송일 2024년05월27일 (27.05.2024)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373	

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2023-0084861 A	2023/06/13	없음	
KR 10-2009-0035323 A	2009/04/09	KR 10-1372887 B1	2014/03/10