



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0116680
(43) 공개일자 2022년08월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/215 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61P 1/16 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 31/215 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2021-0019832
(22) 출원일자 2021년02월15일
심사청구일자 2021년02월15일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

주식회사 아론티어
서울특별시 서초구 강남대로 241, 15층(서초동, 세원빌딩)

(72) 발명자
구철룡
서울특별시 용산구 이촌로71길 10, 210동 2005호 (이촌동, 한가람아파트)

강찬우
서울특별시 마포구 만리재로 60, 304동 (신공덕동, 신공덕3차삼성래미안아파트)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
이처영, 장제환

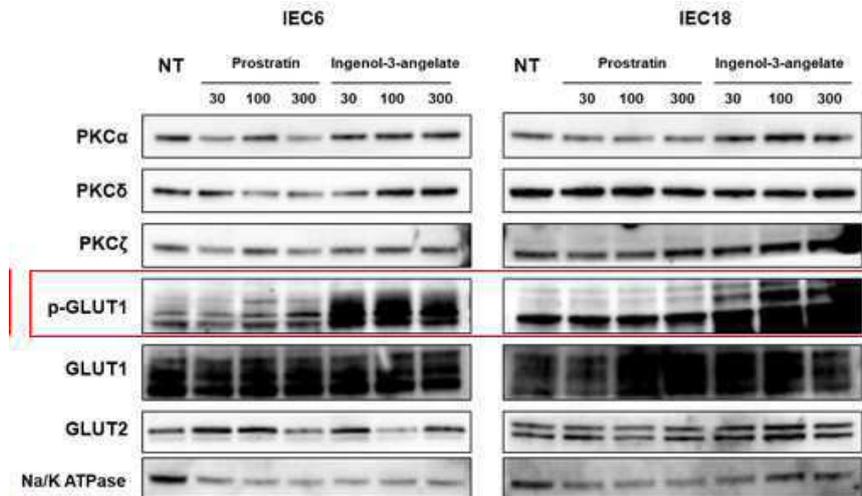
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 비정형 PKC 활성화제를 함유하는 당 조절용 조성물

(57) 요약

본 발명은 소장에서 대사되는 포도당의 양을 조절하는 당 조절용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 소장에서 포도당의 대사를 개선시키고, 혈중 포도당이 대변으로 배출되는 것을 촉진함으로써, 혈액 내 포도당 농도를 저하시켜 대사성 질환을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 1/16 (2018.01)
A61P 3/00 (2018.01)
A61P 9/10 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/326 (2013.01)
A23V 2200/3262 (2013.01)
A23V 2200/328 (2013.01)
A23V 2200/332 (2013.01)

(72) 발명자

왕은경

서울특별시 성동구 마장로27길 18-1 (마장동)

오주현

서울특별시 서대문구 연희로 63, 303호 (연희동, 연희체스트빌)

홍진우

서울특별시 강남구 논현로26길 46, 405호 (도곡동)

손인석

서울특별시 강남구 양재대로55길 12, 115동 1504호 (일원동, 수서아파트)

강은호

서울특별시 강남구 자곡로 192, 422호 (자곡동, 강남푸르지오시티2차)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465030973
과제번호	HI18C1603
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원육성(R&D)
연구과제명	장내 다중 표적 효소 조절 시스템 기반 당뇨병 및 대사 제어기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 세브란스병원
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

비정형 PKC 활성화제를 유효성분으로 함유하는 당 조절용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 비정형 PKC는 PKC zeta(PKC ζ) 또는 PKC iota(PKC ι)인 것을 특징으로 하는 당 조절용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 당 조절은 소장에서의 당의 흡수 또는 당 배출을 조절하는 것을 특징으로 하는 당 조절용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 비정형 PKC 활성화제는 프로스트라틴(prostratin) 또는 그의 염 및 프로스트라틴 유도체 또는 그의 염, 인지놀-3-엔젤레이트(Ingenol-3-angelate) 또는 그의 염 및 인지놀-3-엔젤레이트 유도체 또는 그의 염으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 당 조절용 조성물.

청구항 5

비정형 PKC 활성화제를 유효성분으로 함유하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 비정형 PKC는 PKC zeta(PKC ζ) 또는 PKC iota(PKC ι)인 것을 특징으로 하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 소장에서의 당 흡수를 조절하는 것을 특징으로 하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 비정형 PKC 활성화제는 프로스트라틴(prostratin) 또는 그의 염 및 프로스트라틴 유도체 또는 그의 염, 인지놀-3-엔젤레이트(Ingenol-3-angelate) 또는 그의 염 및 인지놀-3-엔젤레이트 유도체 또는 그의 염으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 9

제5항에 있어서, 소장에서의 당의 흡수 또는 당 배출을 조절하는 것을 특징으로 하는 대사성 질환의 예방 또는

치료용 조성물.

청구항 10

제5항에 있어서, 상기 대사성 질환은 당뇨병, 비만, 고혈압, 고지혈증, 고중성지방혈증, 고콜레스테롤증, 동맥경화증 또는 지방간 질환인, 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 당뇨병 질환은 당뇨병, 당뇨병성 케톤산증, 당뇨병성 산성증, 당뇨병성 황색증, 당뇨병성 근육 위축, 당뇨병성 케토시스, 당뇨병성 혼수, 당뇨병성 위장 장애, 당뇨병성 괴저, 당뇨병성 궤양, 당뇨병성 합병증, 당뇨병성 설사증, 당뇨병성 미세혈관병증, 당뇨병성 자궁 체 경화증, 당뇨병성 심근 경색증, 당뇨병성 신경병, 당뇨병성 신부전, 당뇨병성 물집, 당뇨병성 백내장, 당뇨병성 피부 질병, 당뇨병성 경화부종, 당뇨병성 망막증, 당뇨병성 리포이드류 괴사증 및 당뇨병성 혈액 순환장애로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

비정형 PKC 활성화제를 유효성분으로 함유하는 대사성 질환의 예방 또는 개선용 기능성 식품 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 소장에서의 당 흡수 또는 당 배출을 조절하는 것을 특징으로 하는 대사성 질환의 예방 또는 개선용 기능성 식품 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 비정형 PKC 활성화제는 프로스트라틴(prostratin) 또는 그의 염 및 프로스트라틴 유도체 또는 그의 염, 인지놀-3-엔젤레이트(Ingenol-3-angelate) 또는 그의 염 및 인지놀-3-엔젤레이트 유도체 또는 그의 염으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 대사성 질환의 예방 또는 개선용 기능성 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 소장에서 대사되는 포도당의 양을 조절하는 당 조절용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 비정형 PKC 활성화제를 유효성분으로 함유하는 당 조절용 조성물 및 비정형 PKC 활성화제를 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 당뇨병이란 다양한 유발 인자로부터 유래되며 혈액 중 높은 당 수치가 오랜 시간 지속되는 것(고혈당증)을 특징으로 하는 만성적인 대사 질환이다. 혈중 포도당이 세포에서 이용되기 위해서는 인슐린이 필요하며, 인슐린은 췌장 랑게르한스섬에서 분비되어 식후 혈당을 저하시키는 효과를 가진다. 인슐린은 췌장의 베타세포에서 분비되어 탄수화물과 지방대사를 조절하는 호르몬으로서 표적세포(간, 근육 및 지방세포 등)를 자극하여 혈류로부터 포도당을 유입하고 또한 저장하는 역할을 한다. 정상인의 경우 체내 혈당을 에너지로 전환하여 강하시키는 작용을 하는데 반해, 당뇨병 환자의 경우 인슐린 분비가 정상적으로 이루어지지 않거나, 인슐린이 정상적으로 분비가 되어도 수용체에 문제가 생겨 혈당 제어 능력을 잃어 혈중 포도당 수치가 높아지는 경우가 있다. 이처럼 당뇨병은 크게 두 가지 유형으로 구분할 수 있다. 제 1형 당뇨병 또는 인슐린-의존성 당뇨병(IDDM)에서는, 환자는 포도당 이용을 조절하는 호르몬인 인슐린을 거의 또는 전혀 생성하지 못한다. 자가 면역 기전에 의해 췌장의 베타

타 세포가 파괴되어, 이에 따른 인슐린 결핍으로 발생한다. 따라서 혈중 포도당이 세포 내로 흡수되지 않아 당뇨병으로 연결된다. 이에 반하여, 제 2 형 당뇨병 또는 비인슐린-의존성 당뇨병(NIDDM)에서는, 인슐린은 여전히 체내에서 생산된다. 이는 후천성 당뇨병으로 전체 당뇨병의 80 % 이상의 비율을 차지하고 있다. 췌장의 베타 세포에서 충분한 양의 인슐린을 분비함에도 불구하고, 이를 세포에서 받아들이지 못하여 결과적으로 고혈당 상태가 되는 것이다. 제 2 형 당뇨병을 앓는 환자는 근육, 간 및 지방 조직인 주요 인슐린-감수성 조직에서 포도당 및 지질 대사를 자극하는 인슐린의 효과에 대한 저항성을 갖는다. 이러한 인슐린에 대한 반응성 부족은 근육에서의 포도당의 흡수, 산화 및 저장의 불충분한 인슐린-매개 활성화 및 지방 조직에서의 지방 분해 및 간에서의 포도당 생산 및 분비의 부적당한 인슐린-매개 억제를 일으키게 된다.

[0003] 세계적으로 당뇨병은 1 억 5 천만명 이상이 앓고 있으며, 최근 당뇨병 환자수가 빠르게 증가하고 있으며, WHO 에서 조사한 자료의 수치에 의하면 2030 년에는 약 3 억 6 천명 이상의 당뇨 환자가 발생할 것으로 예상하고 있다. 뿐만 아니라 우리나라에서도 생활양식이 바뀌고 육류 위주의 식습관 및 운동 부족현상이 증가하면서 당뇨 환자 발생률이 급격히 높아지고 있으며, 발병 연령도 낮아지고 있다. 당뇨병으로 진단된 이후에는 혈당 조절을 위해 자유로운 식이가 제한되고, 삶의 질이 저하되며, 다양한 합병증의 위험이 야기되므로, 혈중 당 수치를 정상 범위로 조절하기 위한 기술 개발이 지속되고 있다. 예를 들어, 한국 등록특허 제 10-1983982호에는 desPro36 엑센딘-4(1-39)-Lys6-NH2 및 글리타존을 이용한 당뇨치료 기술을 개시하고 있고, 한국 공개특허 제 10-2006-0020548 호에는 흰목이 버섯(Tremellafuciformis) 조다당체 추출물을 이용한 당뇨 치료 기술을 개시하고 있으나, 종래의 관련 기술은 이미 혈중에 고농도로 존재하는 당을 신체 내 다른 부위로 이동시키는 것일 뿐, 신체 외부로 당을 배출하지는 못한다는 문제점이 있었다.

[0004] 이에, 본 발명에서는 소장에서의 포도당 흡수율 증가를 유도하는 약물을 선별하고자 예의 노력한 결과, PKC 활성화제인 프로스트라틴(prostratin)과 인지놀-3-엔젤레이트(ingenol-3-angelate)를 당 조절능을 가지는 화합물로 선별하고, 상기 프로스트라틴(prostratin)을 투여한 당뇨병 모델 마우스의 소장에서 포도당 흡수율이 증가하고, 대변으로의 포도당 배출율이 증가하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 소장에서의 포도당 흡수율 증가를 유도하는 당 조절용 조성물을 제공하는데 있다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 당조절용 화합물을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 당조절용 화합물을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 개선용 기능성 식품 조성물을 제공하는데 있다.

[0008] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 비정형 PKC 활성화제를 유효성분으로 함유하는 당 조절용 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, 비정형 PKC 활성화제를 유효성분으로 함유하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한, 비정형 PKC 활성화제를 유효성분으로 함유하는 대사성 질환의 예방 또는 개선용 기능성 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, 소장에서 포도당의 대사를 개선시키고, 혈중 포도당이 대변으로 배출되는 것을 촉진함으로써, 혈액 내 포도당 농도를 저하시켜 대사성 질환을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다

도면의 간단한 설명

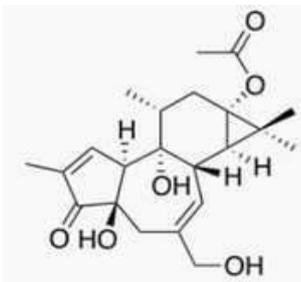
- [0013] 도 1은 PKC 아형들의 분류를 나타낸 것으로, PKC는 크게 Classical 그룹, 신규 그룹 및 비정형(atypical)그룹으로 나뉘며, 각각의 유전자, 단백질 이름과 도메인 및 각각의 리간드를 나타낸 것이다.
- 도 2는 IEC-6 및 IEC-18 세포에 프로스트라틴과 인지놀-3-엔젤레이트를 처리한 후, 세포용해물의 단백질 변화를 웨스턴블롯으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 IEC-6 및 IEC-18 세포에 프로스트라틴과 인지놀-3-엔젤레이트 처리에 의한 2-DG 흡수율을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 IEC-18 세포에 프로스트라틴과 인지놀-3-엔젤레이트를 처리에 의한 PKC zeta와 GLUT1의 활성을 증가를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5의 A는 PKC zeta 형질감염 IEC-6 세포 및 IEC-18 세포에서 PKC zeta 및 p-GLUT1 및 GLUT1의 발현을 확인한 결과이고, B는 PKC zeta 형질감염 HEK293 세포에서 PKC zeta 및 p-GLUT1 및 GLUT1의 발현을 확인한 결과이며, C는 PKC zeta 형질감염 IEC-18 세포에서 2-DG 흡수율을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 프로스트라틴과 인지놀이 처리된 EC-6 세포 및 IEC-18 세포에 PKC zeta 억제제(ZIP)를 처리한 후, 포도당 흡수율을 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 PKC α , PKC δ , PKC ζ 및, PKC ι 각각에 대한 siRNA를 IEC-6 세포주에 형질감염시킨 후, 각 세포주에 프로스트라틴을 처리한 후, p-GLUT1 및 GLUT1의 발현 변화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 PKC α , PKC δ , PKC ζ 및, PKC ι 각각에 대한 siRNA를 IEC-6 세포주에 형질감염시킨 후, 각 세포주에 프로스트라틴과 인지놀을 처리한 후, 2-DG 흡수율 변화를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9의 A는 C57BL6 마우스에 인지놀 또는 프로스트라틴을 단회 피하 주사하고, 마우스 kg당 포도당 2g(2g/kg glucose)을 복강투여한 후, IP glucotolerance test를 수행한 결과를 나타낸 것이고, B는 C57BL6 마우스에 프로스트라틴을 2주간 투여하고, 마우스 kg당 포도당 2g(2g/kg glucose)을 복강투여한 후, IP glucotolerance test를 수행한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 10은 당뇨모델 마우스에 40일간 매일 프로스트라틴(0.5mg/kg) 및 인지놀(1 μ g/kg)을 각각 복강 내 주사한 후 체중(좌측) 및 복강 내 포도당 내성검사(우측)를 수행한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 11의 A는 당뇨모델 마우스에 1개월간 프로스트라틴을 투여한 후 장을 적출하여 18FDG에 대한 방사선을 촬영을 수행한 결과를 나타낸 것이고, B는 적출한 소의 대변샘플에서의 18FDG 양을 측정된 결과를 나타낸 것이며, C는 소장의 십이지장(duodenum), 공장(jejunum) 및 회장(ileum)의 18FDG 업테이크 양을 감마 카운터로 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- 도 12는 당뇨모델 마우스에 1개월간 프로스트라틴을 투여한 후, 소장을 적출하고, 십이지장(duodenum), 공장(jejunum) 및 회장(ileum)을 PKC zeta에 대한 항체로 면역조직화학 염색을 수행한 결과이다. 좌측은 광학현미경으로 100배 촬영결과이고, 우측은 400배 촬영결과이다.
- 도 13은 당뇨모델 마우스에 1개월간 프로스트라틴을 투여한 후, 적출된 소장의 공장(jejunum)에서 루멘(lumen)의 막 정점(apical membrane)부분을 전자현미경으로 촬영한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0015] 본 발명에서는 소장 내에 포도당 흡수율 증가를 유도하는 EGFR 리간드인 Hb-EGF와 유사한 또는 더욱 우수한 효과를 보이는 약물을 선별하고자 AI 기반 약물스크리닝을 실시하여, 후보 약물로 프로스트라틴과 인지놀-3-엔젤레이트(Ingenol-3-angelate, 이하, "인지놀"이라함)를 선별하였다. 프로스트라틴과 인지놀-3-엔젤레이트(Ingenol-3-angelate)는 모두 PKC(protein kinase C)의 활성화제로 작용한다.
- [0016] 본 발명의 일 구현 예에서는 프로스트라틴과 인지놀을 처리한 장 상피세포 주(IEC-6 및 IEC-18)에서 세포막에서 포도당 흡수에 관여하는 단백질인 p-GLUT1과 GLUT1의 발현이 증가하는 것을 확인하였으며, 포도당 유사체인 2-DG의 업테이크 또한 증가하는 것을 확인하였다.

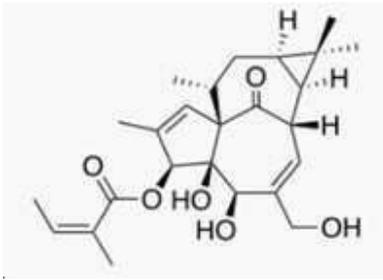
- [0017] 본 발명의 다른 구현 예에서는 당뇨 모델 마우스(db/db 마우스)에 프로스트라틴을 투여한 경우, 복강 내 포도당 내성이 증가하여 당 대사가 개선되는 것을 확인하였으며, 프로스트라틴 투여군 마우스의 체중이 유의미하게 감소하는 것을 확인하였다.
- [0018] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 비정형 PKC 활성화제(Atypical PKC activator)를 유효성분으로 함유하는 당 조절용 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 비정형 PKC는 PKC zeta(PKC ζ) 또는 PKC iota(PKC ι)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0020] PKC 서브패밀리는 Classical 그룹 (PKC α, PKC β 및 PKC γ), Novel 그룹(PKC δ, PKC ε, PKC η 및 PKC θ) 및 비정형(Atypical) 그룹(PKC ζ 및 PKC λ/ι)으로 분류되며, 각각의 아형 PKC를 활성화하는 리간드는 서브패밀리 그룹에 따라 상이하다. Classical 그룹은 Ca²⁺, DAG, PIP2에 의해 활성화되고, novel 그룹은 DAG, lipid에 의해 활성화된다. 비정형(atypical) PKC의 경우 C2와 C1 도메인 없어, Ca²⁺과 DAG에 활성화되지 않는 특성을 갖는다. 또한 Phox and Bem 1 (PB1) 도메인을 포함하고 있어, polarity regulator (PAR6)와 같은 단백질들과 상호작용하는 것으로 알려져 있다(도 1).
- [0021] 본 발명의 일 구현예에서는 convention PKC(PKC α), novel PKC(PKC δ) 및 비정형 PKC(PKC ζ 및 PKC ι) 각각에 대한 siRNA를 IEC-6 세포주에 형질감염하여, 48 시간 후, 프로스트라틴(1 μM)를 처리하고, 총 단백질을 용출하여, 웨스턴 블롯을 수행하였으며, 그 결과, 음성대조군(siNeg)에서 프로스트라틴에 의해 증가되었던 GLUT1 (p-GLUT1)의 발현이 비정형 PKC인 PKC ζ와 PKC ι의 siRNA를 처리한 세포군에서는 프로스트라틴을 처리하여도 증가하지 않는 것으로 확인되었다(도 7). 따라서, 프로스트라틴에 의한 GLUT1 (p-GLUT1)의 활성 증가 기작에서는 PKC ζ, PKC ι가 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 당 조절은 소장에서의 당의 흡수 또는 당 배출을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에서는 당뇨 모델 마우스(db/db 마우스)에 1개월간 프로스트라틴(0.5 mg/kg)를 투여한 후, 장을 적출한 후의 방사선 촬영 결과에서, 프로스트라틴을 처리한 db/db 마우스의 소장에서 포도당 흡수가 대조군(vehicle군)보다 월등히 높은 것을 확인하였다. 아울러, 프로스트라틴을 투여한 마우스의 대변 세척물에서 포도당이 더 많이 배출되는 것을 확인하였다(도 11).
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 비정형 PKC 활성화제는 프로스트라틴(prostratin) 또는 그의 염 및 프로스트라틴 유도체 또는 그의 염, 인지놀-3-엔젤레이트(Ingenol-3-angelate) 또는 그의 염 및 인지놀-3-엔젤레이트 유도체 또는 그의 염으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0025] 상기 "프로스트라틴(prostratin)"은 화학식 1의 구조를 가지는 화합물로, 단백질 키나아제 C의 조절제로서 암 및 알츠하이머 병과 같은 다른 질병에 대해 유망한 치료 잠재력을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 경구투여 된 프로스트라틴이 인간 체장 중양을 억제하는 것으로 발표된 바 있다(Wang, Man-Tzu *et al.*, *Cell*. 16: 1237, 2015).

화학식 1



- [0026] .
- [0027] 본 발명에서 사용되는 상기 "인지놀-3-엔젤레이트(Ingenol-3-angelate)"는 화학식 2의 구조를 가지고, '인지놀 메부테트(ingenol mebutate)'로 알려져 있으며, 'Picato'라는 브랜드 이름으로 판매되고 있다. *Euphorbia peplus* 식물의 수액에서 발견되는 물질이며 세포사멸을 유도한다고 알려져 있으며, 약물의 겔 제형은 광선 각화증의 국소치료용으로, 미국 식품의약국(FDA) 및 유럽의 EMA의 승인을 받은 바 있다.

화학식 2



[0028]

[0029]

본 발명에서 상기 당 조절용 조성물은 소장, 바람직하게는 소장의 십이지장, 공장, 회장 내에서 혈중 포도당의 소장 세포로의 흡수 및 변으로의 배출을 유도할 수 있다.

[0030]

본 발명에서 "회장(ileum)"은 소장의 말단 부위로 공장과 대장의 연결 부위에 위치한다. 소장은 위와 대장 사이에 위치한 소화 기관으로 해부학적으로 십이지장(duodenum), 공장(jejunum), 회장(ileum) 3 부위로 이루어져 있다. 보통 5세 이상의 인간의 소장은 대략 7 m 정도로 대장보다 4 내지 5 배 길지만, 굵기는 평균 7.6 cm인 대장에 비해 2.5 내지 3 cm로 훨씬 가늘다. 십이지장은 약 25 내지 30 cm이며, 공장은 소장의 중간 부분으로 약 2.5 m이다. 회장은 약 3.6 m이며, 회장맹장관막에서 결장과 연결된다. 회장맹장관막은 내용물이 큰 창자로 유입되게 하며 작은 창자로 역류를 방지한다. 소화 작용으로 영양분은 소장 내부의 돌출된 융기를 통해 혈액 내부로 확산, 전달된다. 소장 내 점막에는 수많은 주름이 있으며 그 표면에 융모라고 하는 것이 있는데, 보통 위로부터 들어온 유미즙은 소장 시작 부분과 중간 부분에 해당하는 십이지장과 공장에서 대부분이 소화 흡수된다. 이에 반해, 회장 부분에서의 소화 흡수는 상대적으로 적다고 알려져 있다(Diabetes Management Interactive Case Study, 2016). 본 발명의 조성물은 상기 십이지장, 공장 및 회장 부분에서의 포도당 흡수를 증가시키는 효과가 있다.

[0031]

또한, 본 발명의 상기 당 조절용 조성물은 혈중 포도당이 대변으로 배출되는 것을 촉진할 뿐만 아니라 포도당의 대사를 개선하는 효과가 있어, 대사성 질환을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료하는 데에 사용될 수 있다.

[0032]

따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 비정형 PKC 활성화제를 유효성분으로 함유하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0033]

본 발명에 있어서, 상기 비정형 PKC는 PKC zeta(PKC ζ) 또는 PKC iota(PKC ι)인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0034]

본 발명에 있어서, 당 조절은 소장에서의 당의 흡수 또는 당 배출을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0035]

본 발명에 있어서, 상기 비정형 PKC 활성화제는 프로스트라틴(prostratin) 또는 그의 염 및 프로스트라틴 유도체 또는 그의 염, 인지놀-3-엔젤레이트(ingenol-3-angelate) 또는 그의 염 및 인지놀-3-엔젤레이트 유도체 또는 그의 염으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0036]

본 발명에서 상기 "대사성 질환"은 에너지 과잉 섭취 또는 호르몬 불균형 등 다양한 원인으로 체내 에너지 대사가 비정상적으로 일어나 지방이 과다하게 합성되거나 축적되어 발생하는 질환을 의미한다. 상기 대사성 질환은 구체적으로는 비만, 당뇨병성 질환, 고혈압, 고지혈증, 고중성지방혈증, 고콜레스테롤증, 지방간 또는 동맥경화증일 수 있다.

[0037]

본 발명에서 상기 "당뇨성 질환"은 당뇨병과, 급성 고혈당에 의한 합병증으로 당뇨병성 케톤산증(diabetic ketoacidosis), 당뇨병성 산성증(diabetic acidosis), 당뇨병성 황색종(diabetic xanthoma), 당뇨병성 근육 위축(diabetic amyotrophy), 당뇨병성 케토시스(diabetic ketosis), 당뇨병성 혼수(diabetic coma), 당뇨병성 위장 장애(diabetic gastric disorder), 당뇨병성 괴저(diabetic gangrene), 당뇨병성 궤양(diabetic ulcer), 당뇨병성 합병증, 당뇨병성 설사증(diabetic diarrhea), 당뇨병성 미세혈관병증(diabetic microangiopathy), 당뇨병성 자궁 체 경화증(diabetic uterine body sclerosis), 당뇨병성 심근 경색증(diabetic cardiomyopathy), 당뇨병성 신경병(diabetic neuropathy), 당뇨병성 신부전(diabetic nephropathy), 당뇨병성 물집(bullosis diabeticorum), 당뇨병성 백내장(diabetic cataract), 당뇨병성 피부 질병(diabetic dermatopathy), 당뇨병성 경화부종(diabetic scleredema), 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy), 당뇨병성 리포이드류 괴사증(necrobiosis lipoidica diabeticorum), 또는 당뇨병성 혈액 순환장애(diabetic blood circulation disorder)

등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0038] 본 발명에서 상기 “당뇨” 또는 “당뇨병”은 혈중 내 포도당 농도를 증가시켜 발생하는 질병으로서, 이러한 당뇨병은 유병기간이 길어질수록 만성 합병증에 의한 실명, 말기 신부전증, 신경질환, 하지 절단 및 감염질환 등이 급증하게 된다. 특히 당뇨 합병증으로서 뇌혈관질환 및 심혈관계 질환이 가장 많은 부분을 차지하고 있는데, 질환 사망자의 약 3/4 은 당뇨 합병증에 의한 사망자이며, 심혈관계 합병증에 의한 사망 위험도 또한 당뇨 유병기간이 10 년 증가할 때마다 24 % 씩 증가하는 것으로 보고되었다. 당뇨환자는 정상인에 비해 관상동맥 질환의 유병률이 2 배나 높고 말초혈관질환에 대한 유병률은 약 3 배 이상인 것으로 보고되었으며, 당뇨병에서 이러한 증상 동맥경화를 일으키는 원인으로는 고혈당, 지질대사 이상, 고인슐린혈증, 고혈압, 혈액응고 기전의 변화 등 다양하게 알려져 있다. 당뇨병의 95 % 이상을 차지하는 제 2 형 (인슐린 비의존형) 당뇨병의 병인은 두 가지 원인, 즉 인슐린 분비장애 및 인슐린 저항성의 복합 장애로 알려져 있다. 즉, 당뇨병은 이 복합적인 장애로 인해 만성 고혈당 증상을 보이는 질환이다.
- [0039] 본 발명에서 상기 “당뇨병성 케톤산증”은 당뇨병 환자에서 발생하는 가장 중요한 급성 대사성 합병증으로 신체에 필요한 에너지를 당보다 지방을 사용함으로써 야기되는 지나친 혈류 속의 산 대사물의 축적과 수분과 당의 손실에 의해 발생하는 질환이다. 당뇨병성 케톤산증은 인슐린에 대한 저항이나 인슐린 부재로 인해 발생한다. 인슐린이 적으면 포도당이 세포 내로 들어갈 수 없어 혈중에 축적된다. 그 결과 세포는 포도당을 공급받지 못하여 에너지원으로 지방을 사용하게 된다. 지방 대사는 지방산과 글리세롤을 만드는데, 글리세롤은 세포에 약간의 에너지를 공급하지만 지방산은 케톤산으로 대사되어 결과적으로 산독증을 일으킨다. 산독증은 세포 안에서 혈관 내로 칼륨 이동을 증가시키게 되고, 이노작용에 의하여 과칼륨血症을 초래하여 전신의 칼륨 고갈 상태를 초래한다.
- [0040] 본 발명에서 상기 “비만”은 에너지 불균형으로 의하여 과다한 체지방을 가진 상태(condition) 또는 질환(disease)을 의미할 수 있으며, 다양한 원인으로 체내 에너지 대사가 원활하지 아니하여 지방이 과다하게 합성되거나 축적되는 질환을 의미한다.
- [0041] 또 다른 관점에서, 본 발명은 비정형 PKC 활성화제를 유효성분으로 함유하는 대사성 질환의 예방 또는 개선용 기능성 식품 조성물에 관한 것이다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 비정형 PKC는 PKC zeta(PKC ζ)또는 PKC iota(PKC ι)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 당 조절은 소장에서의 당의 흡수 또는 당 배출을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 비정형 PKC 활성화제는 프로스트라틴(prostratin) 또는 그의 염 및 프로스트라틴 유도체 또는 그의 염, 인지놀-3-엔젤레이트(Ingenol-3-angelate) 또는 그의 염 및 인지놀-3-엔젤레이트 유도체 또는 그의 염으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 일 구체예에서 “예방”이란, 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 대사성 질환에 의해 기인된 증상을 차단하거나, 그 증상을 억제 또는 지연시킬 수 있는 모든 행위라면 제한없이 포함될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 일 구체예에서 “개선”이란, 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 대사성 질환에 의해 기인된 증상이 호전될 수 있도록 하거나, 이롭게 될 수 있도록 하는 모든 행위라면 제한없이 포함될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 일 구체예에서 “치료”란, 목적하는 질병의 완화 또는/및 개선을 위해 수행되는 일련의 활동을 의미한다. 본 발명의 목적상 치료는 장 내 흡수되는 포도당의 양을 현저히 증가시켜 포도당 대사를 개선시키는 활동을 포함한다.
- [0048] 본 발명의 일 구체예에서 “약학 조성물”이란, 특정한 목적을 위해 투여되는 조성물을 의미한다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 약학 조성물은 당뇨 또는 당뇨로 인한 합병증을 예방 또는 치료하는 것이며, 이에 관여하는 화합물 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.
- [0049] 또한 본 발명에 따른 약학 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 본 발명의 유효성분을 0.1 내지 50 중량 %로 포함한다. 본 발명의 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 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명의 일 구체예에서 “투여”란, 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 조성물을 도입하는 것을 의미

하며, 본 발명의 조성물의 투여경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0051] 경구 투여, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 장내 투여, 강내 투여, 복강 내 투여, 경막 내 투여가 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에서 유효량은 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 또한 본 발명의 약학 조성물은 목적하고자 하는 대사성 질환의 치료를 위해 단독 또는 당업계에 공지된 다른 치료법, 예를 들어 화학요법제, 및 수술과 같이 투여될 수 있다. 또한 본 발명의 약학 조성물은 혈당 강하를 촉진하기 위하여 고안된 다른 치료, 예를 들어 당업계에 주지된 것과 혼합하여 투여될 수 있다. 바이오리스팅(biolytic) 전달 또는 생체 외(ex vivo) 처리와 같은 다른 표준 전달 방법들이 사용될 수도 있다.

[0052] 본 발명의 일 구체예에서 "식품 조성물"이란, 본 발명에서 목적으로 하는 대사성 질환의 예방 또는 개선을 위해 다양하게 이용되는 것으로서, 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 독성 및 부작용이 거의 없는 기존의 식품용 섭취물로부터 개량되어 구성된 것이므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다. 본 발명의 조성물이 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 100 %의 비율로 첨가할 수 있다. 여기서, 상기 식품 조성물이 음료형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 함유하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 즉, 천연탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성향미제(사카린, 아스파탐 등) 등을 들 수 있다. 그 외 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성풍미제 및 천연풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 통상적으로 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 100 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] [실시예]

[0054] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0055] 실시예 1: 소장 회장(Ileum) 내 포도당 흡수율을 증가시키는 약물 선별

[0056] 회장 내 포도당 흡수율의 증가를 유도하는 EGFR 리간드인 Hb-EGF와 유사한 혹은 더 우수한 효과를 보이는 약물을 선별하고자 아론티어의 A.I. 기반 약물 스크리닝(아론티어, 한국)을 실시하였다.

[0057] 아론티어사가 개발한 REMEDY platform (Lamb *et al.*, *Science*, 313:1929~1935, 2006; Subramanian *et al.*, *Cell*, 171:1437~1452, 2017) 을 이용하여 Hb-EGF와 유사한 후보 화합물을 선별하였다.

[0058] 그 결과, 비정형 PKC 활성화제(atypical PKC activator)로 작용하는 프로스트라틴(protsratin)과 인지놀-3-엔젤레이트(Ingenol-3-angelate)를 선별하였다.

[0059] 실시예 2: 소장 세포주에서 프로스트라틴 및 인지놀(Ingenol-3-angelate) 처에 의한 포도당수송체 (GLUT transporter) 발현량 확인

[0060] 장 상피세포인 IEC-6 세포(ATCC CRL-1592)와 IEC-18 세포(ATCC CRL-1589)의 배양을 위해, 10% 소태아 혈청(FBS)과 페니실린-스트렙토마이신이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle 배지(DMEM)를 사용하여, 10% CO₂와 90% 공기를 포함하는 가습 분위기에서 37℃로 유지하면서 배양하였으며, 보존 배양은 3-4일마다 계대배양하였다. 실험을 위해, IEC-6 세포 및 IEC-18 세포를 2 × 10⁵ 세포/접시의 밀도로 6-웰 접시에 접종하였다. 세포 밀도가 1.5 × 10⁵ 세포/cm² 일 때 도말 6일 후에 배양액을 사용하였다. 프로스트라틴은 Sigma-Aldrich(Cat.No. P007

7)에서 구입하여 사용하였다. 인지놀은 Sigma-Aldrich(Cat.No. SML1318)에서 구입하여 사용하였다.

- [0061] IEC-6 세포 및 IEC-18 세포에 프로스트라틴과 인지놀을 각각 30nM, 100nM 및 300nM로 30 분 처리 후에 세포 용해물물을 수득하여, 웨스턴 블랏을 통해 단백질 발현량을 확인하였다.
- [0062] 웨스턴 블랏을 다음과 같이 수행하였다.
- [0063] 전체 세포 단백질 용해물을 제조하고, 표준 절차에 따라 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다. 간략하게는, 세포를 얼음 상에서 냉각시키고, 빙냉된 인산-완충 식염수로 2회 세척하고, 1mM 페닐메틸설포닐플루오라이드 및 1x 프로테아제 억제제(Sigma-Aldrich)를 함유하는 완충액에서 용해시켰다. 단백질 농도는 Bradford 분석 키트(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 측정하였다. 세포 용해물에 동량의 단백질을 도데실황산나트륨 폴리아크릴아미드겔 전기영동으로 분리하고 1차 항체로 각각 항 PKC α (Cell signalin Tecnology, 미국), 항 PKC δ (Cell signalin Tecnology, 미국), 항 PKC ζ (Cell signalin Tecnology, 미국), 항 p-GLUT1(abcam, 영국), 항 GLUT1(abcam, 영국) 및 항 GLUT2(Novus Biological, 미국) 와 함께 4°C에서 밤새 반응시킨 막으로 옮겼다.
- [0064] 블랏을 TBST(0.05% Tween 20을 함유하는 트리스-완충된 식염수)로 3회 세척한 후, 25°C에서 1시간 동안 호스래 디쉬 퍼옥시다아제(HRP)-컨쥬게이트된 2차 항체로 반응시켰다. 2차 항체는 당나귀 항-토끼 IgG-HRP 항체(1:5000, Santa Cruz), 당나귀 항-마우스 IgG-HRP 항체(1:5000, Santa Cruz)를 사용하였다. 면역반응성은 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)로 검출하였다.
- [0065] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, IEC-6 및 IEC-18 세포는 Ingenol-3-angelate과 prostratin에 의해서는 모든 농도 (30, 100, 300 nM)에서 GLUT1 인산화가 촉진되는 것을 확인하였다. 단백질 정량 마커인 Na/K ATPase에 대비했을 때 프로스트라틴과 인지놀-3-엔젤레이트에 의해서 당수송체인 p-GLUT1과 GLUT1의 발현이 증가되는 것을 확인하였다.
- [0066] **실시예 3: 소장 세포주에서 프로스트라틴 및 인지놀(Ingenol-3-angelate) 처에 의한 세포내 포도당 흡수율 확인**
- [0067] IEC-6 세포 및 IEC-18 세포에 프로스트라틴과 인지놀(100nM)을 10분 처리 후에 수득한 세포 용해물에서 2-DG(2-deoxy-D-glucose) 흡수율을 확인하였다.
- [0068] 포도당 농도를 측정하여, 프로스트라틴과 인지놀 처리에 의한 포도당 흡수율(2-DG uptake) 변화를 확인하였다.
- [0069] 세포 용해물 중의 IEC-6 세포 및 IEC-18 세포의 용해물 중의 포도당 유사체인 2DG
- [0070] 포도당의 양은 저농도 포도당 배지와 무혈청 DMEM에서 24시간 동안 프로스트라틴 및 인지놀을 처리한 후에 측정 하였다. IEC-6, IEC-18 세포 포도당 수준은 제조사의 지침에 따라 Glucose Assay Kit(Cayman Chemical)를 사용하여 검출하였다. 흡광도 신호는 Gen 5 발광 분광기(BioTek, Winooski, VT, USA)로 측정하였다.
- [0071] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 프로스트라틴과 인지놀 처리에 의해 세포내 포도당(2-DG) 흡수율이 증가되는 것을 확인하였다.
- [0072] **실시예 4: 소장 세포주에서 프로스트라틴 및 인지놀(Ingenol-3-angelate)에 의한 PKC와 GLUT1의 활성화 확인**
- [0073] IEC-18 세포에 프로스트라틴(2 μ M)과 인지놀(0.1 μ M)을 각각 0분, 15분 및 60분 처리 후에 PKC와 GLUT1의 단백질 발현을 웨스턴 블랏으로 확인하였다.
- [0074] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 프로스트라틴과 인지놀이 PKC zeta와 GLUT1의 활성을 증가시키는 것을 확인 하였다. 또한, 프로스트라틴은 인지놀에 비해 더 빠르게 PKC와 GLUT1을 세포막으로 이동(translocation)시키는 것을 확인하였다.
- [0075]
- [0076] **실시예 5: 소장 세포주에서 PKC 제타가 GLUT1 매개 포도당 흡수를 유도하는 것을 확인**
- [0077] 형질감염을 통해 PKC zeta를 일시적으로 IEC-6 세포, IEC-18 세포 및 HEK293(ATCC CRL-1573)세포에서 과발현 되도록 형질감염 세포주를 제작하였다.
- [0078] 랫트 PKC zeta를 발현하는 플라스미드(한국유전자은행)를 pCDNA3.1(Addgene, 미국)에 서브클로닝하였다. IEC-6 세포 및 IEC-18 세포는 형질감염 1일 전에 6-웰당 0.5 $\times 10^6$ 의 밀도로 도말하였다. 세포는 제조사의 지시에 따라 Polyjet 형질감염 시약(SignaGen)를 사용하여 발현 플라스미드로 형질감염시켰다. 형질감염된 세포는 용균 전에 37°C에서 48시간 동안 배양하였으며, 인지놀(0.1 μ M)을 처리하였다. 대조군으로 empty vector 감염군 세포

군, PKC zeta 형질감염 세포 그룹 및 야생형 세포에 인지놀 처리군, 형질감염 세포에 인지놀 처리군에 대하여, 세포용해물을 수득하고, 웨스턴 블랏을 수행하였다.

[0079] 웨스턴 블랏에서 Na/K ATPase를 막에서의 loading control로 사용하였다.

[0080] 그 결과, 도 5A 및 도 5B에 나타난 바와 같이, empty vector를 처리한 음성 대조군에 비해 인지놀을 처리한 군에서 세포막으로 PKC zeta가 활성화되어 이동하고, GLUT1의 막이동(translocation)을 확인할 수 있었다. PKCzeta 과발현된 세포주에서는 인지놀을 처리하지 않은 군에서도 p-GLUT1, GLUT1이 음성대조군보다 많이 발현되었다.

[0081] 또한, PKC zeta를 과발현시킨 형질감염 IEC-18 세포주에서 2-DG 흡수율을 측정하였다. 그 결과, 도 5C에 나타난 바와 같이, 대조군에 비해 PKC zeta를 과발현 IEC-18 세포주에서 2-DG 흡수율이 유의미하게 증가되는 것을 확인하였다.

[0082] 따라서, 비정형 PKC 발현이 많은 세포주에서 2-DG 흡수율이 확연하게 증가하는 것을 확인하였다.

[0083] **실시예 6: PKC zeta 억제제 처리에 따른 프로스트라틴 및 인지놀의 포도당 흡수 효과 억제 확인**

[0084] 프로스트라틴(100nM)과 인지놀(100nM)처리에 의하여 비정형 PKC(atypical PKC)가 활성화된 EC-6 세포 및 IEC-18 세포에 PKC zeta를 특이적으로 억제하는 ZIP(pseudosubstrate-derived PKC ζ -inhibitory peptide, R&D system, USA)를 1 μ M 농도로 처리한 후, 포도당 흡수율을 측정하였다.

[0085] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, IEC-6, IEC-18세포에 프로스트라틴(100nM)과 인지놀(100nM) 처리시 세포내 6-인산포도당이 증가했으나, PKC zeta 억제제인 ZIP를 병용처리시 세포내 6-인산포도당의 흡수율이 음성대조군(NT) 정도까지 감소하는 것을 확인하였다.

[0086] **실시예 7: 프로스트라틴 매개 GLUT1 활성화에서 비정형 PKC(zeta +iota)의 역할 확인**

[0087] 프로스트라틴과 인지놀에 의한 GLUT1 활성화가 어떤 종류의 PKC subtype을 통해 유도되는지 확인하기 위하여, convention PKC(PKC α), novel PKC(PKC δ) 및 비정형 PKC(PKC ζ 및 PKC ι) 각각에 대한 siRNA을 IEC-6 세포주에 50nM 농도로 RNAiMax(Invitrogen)을 이용하여 형질감염하여, 48 시간 후, 프로스트라틴(1 μ M)를 처리하고, 총 단백질을 용출하여, 웨스턴 블랏을 수행하였다.

[0088] 사용된 siRNA 서열을 하기에 나타내었다.

[0089] PKC α siRNA: GGG AUGUCAGAGAGCAUGCCUUCUU (서열번호 1)

[0090] PKC δ siRNA: CUCACAGUACUCCUCUGU (서열번호 2)

[0091] PKC ζ siRNA: GCUGAGAUUCUGUAUCGCUCUCAACU (서열번호 3)

[0092] PKC ι siRNA: GGACAAUGUACUGCUAGACUCUGAA (서열번호 4)

[0093] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 음성대조군(siNeg)에서 프로스트라틴에 의해 증가되었던 GLUT1 (p-GLUT1)의 발현이 비정형 PKC인 PKC ζ 와 PKC ι 의 siRNA를 처리한 세포군에서는 프로스트라틴을 처리하여도 증가하지 않는 것으로 확인되었다.

[0094] 따라서, 프로스트라틴에 의한 GLUT1 (p-GLUT1)의 활성 증가 기작에서는 PKC ζ , PKC ι 가 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었다.

[0095] **실시예 8: 프로스트라틴 및 인지놀에 의한 포도당 흡수율 증가에서 비정형 PKC(zeta +iota)의 역할 확인**

[0096] IEC 세포에서 프로스트라틴과 인지놀 처리에 의해 증가된 포도당 흡수율(2DG uptake)이 어떤 subtype의 PKC를 통해 유도되는지 확인하기 위하여, 실시예 7과 같이 convention PKC(PKC α), novel PKC(PKC δ) 및 비정형 PKC(PKC ζ 및 PKC ι) 각각에 대한 siRNA을 IEC-6 세포주에 형질감염하여 48 시간 후, 프로스트라틴(1 μ M) 또는 인지놀(100nM)을 처리하고, 2DG 업테이크를 확인하였다.

[0097] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 음성대조군(siNeg)에서 프로스트라틴과 인지놀 처리에 의해 2DG 흡수가 증가되었으나, 비정형 PKC(PKC ζ 및 PKC ι)를 녹다운시킨 군에서는 프로스트라틴과 인지놀을 처리하여도 2DG 흡수가 증가되지 않았다.

[0098] 따라서, 프로스트라틴과 인지놀 처리에 의해 유도되는 포도당 흡수에 있어서, PKC ζ 및 PKC ι 가 모두 중요하게

작용한다는 것을 확인하였다.

[0099] **실시예 9: 마우스 동물 모델에서 프로스트라틴과 인지놀 투여에 따른 포도당 대사 향상 효과 확인**

[0100] 9-1: 단회 투여에 의한 포도당 대사개선 확인

[0101] C57BL6 마우스 12마리를 12시간 금식시킨 후, 복강 포도당 검사를 시행하여 공복혈당을 측정하였다. 이 후, 인지놀투여군(4 마리)과 프로스트라틴 4마리 투여군에 각각 인지놀(4ug/kg) 및 프로스트라틴(1mg/kg)을 단회 피하 주사하고, 마우스 kg당 포도당 2g(2g/kg glucose)을 생리 식염수에 희석하여 복강투여하였다. 이후, 15분, 30분, 60분, 90분 및 120분에 각각 IP glucotolerance test를 수행하였다.

[0102] 그 결과, 도 9A에 나타난 바와 같이, 프로스트라틴 투여군 에서는 30 분 및 60 분에 음성대조군(Vehicle)에 비해 현저하게 포도당 대사가 개선되는 것을 확인하였고, 인지놀 투여군에서도 음성대조군 보다 포도당 대사가 개선되는 것을 확인하였다.

[0103] 9-2: 2주간 투여 후 포도당 개사 개선 확인

[0104] C57BL6 마우스에 프로스트라틴을 0mg/kg, 0.5mg/kg 및 1 mg/kg의 농도로 삼투압 펌프를 이용하여 2주간 투여하고, 12시간을 금식시킨 후에, 마우스 kg당 포도당 2g(2g/kg glucose)을 생리 식염수에 희석하여 복강투여하였다. 이후, 15분, 30분, 60분, 90분 및 120분에 각각 IP glucotolerance test를 수행하였다.

[0105] 그 결과, 도 9B에 나타난 바와 같이, 2시간 동안 혈당 변화 및 포도당 변화 곡선하면적 값 모두 호전되는 것을 확인하였다.

[0106] **실시예 10: 당뇨 모델 마우스에서 프로스트라틴과 인지놀 투여에 따른 체중 및 포도당 대사 향상 효과 확인**

[0107] 렙틴 수용체가 결핍되어 되어 대표적인 당뇨모델로 알려져 있는 db/db 마우스(Jackson laboratory)에 40일간 매일 프로스트라틴(0.5mg/kg) 및 인지놀(1ug/kg)을 각각 복강 내 주사한 후 체중을 측정하였다.

[0108] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 인지놀은 투여 28일 째에 2ug/kg로 농도를 올리고서부터 30일째 체중 감소가 통계적 유의미성을 보였다. 프로스트라틴 0.5mg/kg 투여군은 투여 11일 차부터 체중 감소가 대조군(vehicle 군)에 비해 통계적 유의미성을 보였다.

[0109] 약물 투여 후 17일차에 복강 내 포도당 내성 검사(intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT)를 수행하였다. IPGTT 진행 전 12 시간 금식 후, 프로스트라틴과 인지놀 주사 후, 15 분 뒤에 2 g/kg IPGTT 를 수행한 결과를 도 10에 나타내었다. 인지놀 1 ug/kg 투여군에서는 포도당 투여후 240 분에서 당개선 효과를 보였다. 프로스트라틴(0.5 mg/kg)투여 군에서는 30~ 240분 동안 전 시간에 걸쳐 대조군(vehicle군)보다 당개선이 우수한 것을 확인하였다.

[0110] **실시예 11: 당뇨 모델 마우스에서 프로스트라틴 투여에 의한 포도당 흡수 및 배출 향상 효과 확인**

[0111] db/db 마우스(Jackson laboratory)에 1개월간 프로스트라틴 0.5 mg/kg를 투여한 마우스의 장을 적출하여 18FDG(Fluorodeoxyglucose, 듀캠바이오)에 대한 방사선을 촬영하였다. 18FDG는 듀캠바이오에서 구매하여 마리당 200 μCi 꼬리 정맥을 통해 주사하였다.

[0112] 또한, 적출한 소장을 5mL의 PBS로 세척하여 수득한 대변 샘플(Fecal sample)에서의 18FDG를 측정하였으며, 소장 및 십이지장(duodenum), 공장(jejunum) 및 회장(ileum)의 18FDG 업테이크 양을 감마 카운터로 측정하였다.

[0113] 그 결과, 도 11A에 나타난 바와 같이, 방사선 촬영 결과에서, 프로스트라틴을 처리한 db/db 마우스의 소장에서 포도당 흡수가 대조군(vehicle군)보다 월등히 높은 것을 확인하였다.

[0114] 또한, 도 11B에 나타난 바와 같이, 대변 샘플의 포도당 배출량을 확인했을 때 프로스트라틴을 투여한 마우스의 대변 세척물에서 포도당이 더 많이 배출되었다. 아울러, 도 11C에 나타난 바와 같이, 소장의 십이지장(duodenum), 공장(jejunum) 및 회장(ileum)에서 모두 2배 이상으로 포도당 흡수가 증가되었다.

[0115]

[0116] **실시예 12: 당뇨 모델 마우스의 공장과 회장에서 프로스트라틴 투여에 의한 비정형 PKC의 막 이동 효과 확인**

[0117] db/db 마우스에 1개월간 프로스트라틴(0.5 mg/kg) 또는 vehicle을 투여한 후, 소장을 적출하고, 십이지장, 공장 및 회장을 포르말린으로 고정된 후 PKC zeta에 대한 항체(abcam, USA)로 면역조직화학 염색을 수행하고, 광학현미경으로 100배, 400배 확대하여 촬영하였다.

[0118] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, 십이지장에서는 프로스트라틴 투여군과 대조군(vehicle) 간에 큰 차이가 없었고, 공장과 회장은 프로스트라틴 투여군에서 PKC zeta의 위치가 세포질에서 루멘(lumen)의 막 정점(apical membrane)에 집중되는 경향을 확인할 수 있었다.

[0119] 실시예 13: 프로스트라틴을 투여한 당뇨 모델 마우의 공장(jejunum)의 루멘의 전자현미경적 관찰

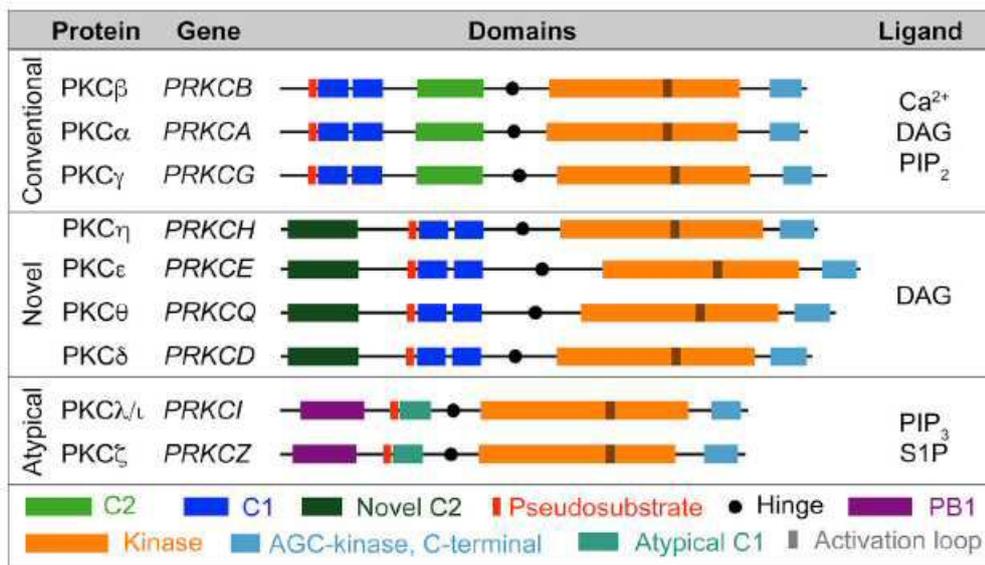
[0120] db/db 마우스에 1개월간 프로스트라틴(0.5 mg/kg) 또는 vehicle을 투여한 후, 소장을 적출하고, 공장(jejunum)에서 루멘(lumen)의 막 정점(apical membrane)부분을 전자현미경으로 관찰하였다.

[0121] 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이, 대조군(vehicle)에 비해 프로스트라틴 투여군의 공장의 미세융모(microvilli) 근처의 당질피질(glycocalyx)가 많이 분비되고 있는 것을 확인하였으며, 프로스트라틴 투여군의 소장 세포 내에서 미토콘드리아 개수가 증가되어 있어, 세포내 대사가 활발하게 일어나고 있는 것을 알 수 있었다.

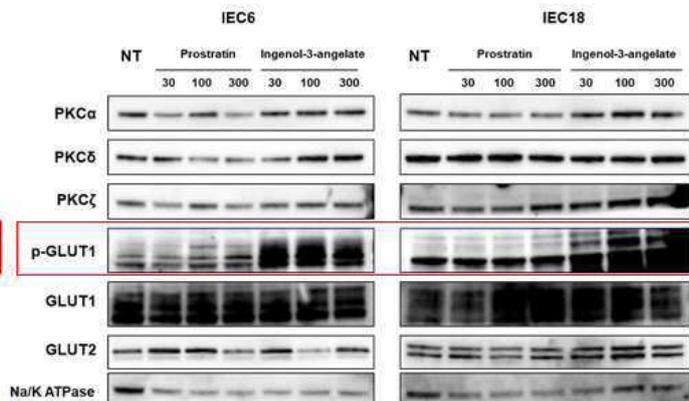
[0122] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

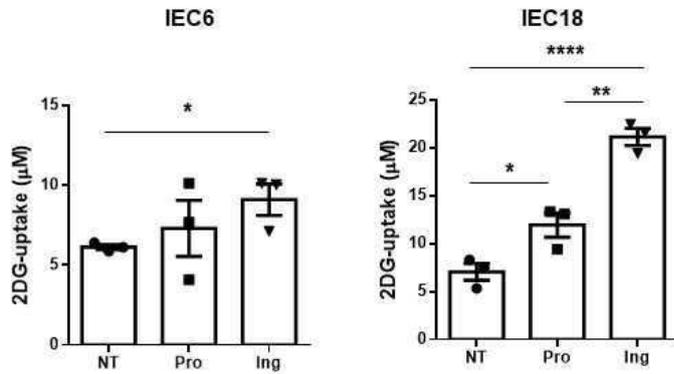
도면1



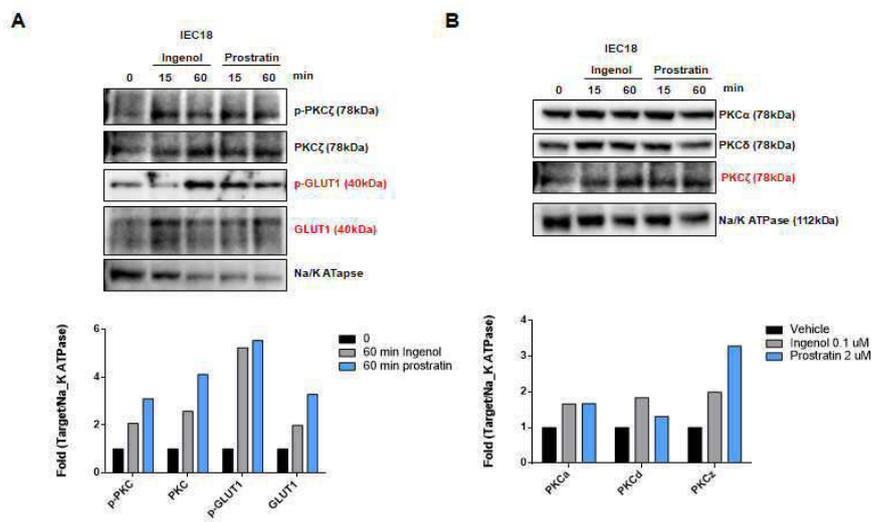
도면2



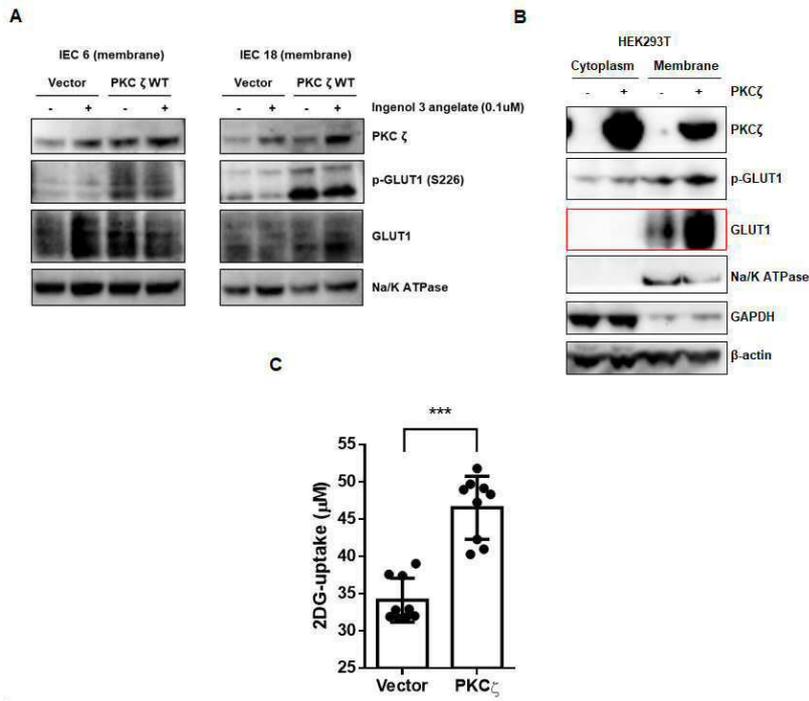
도면3



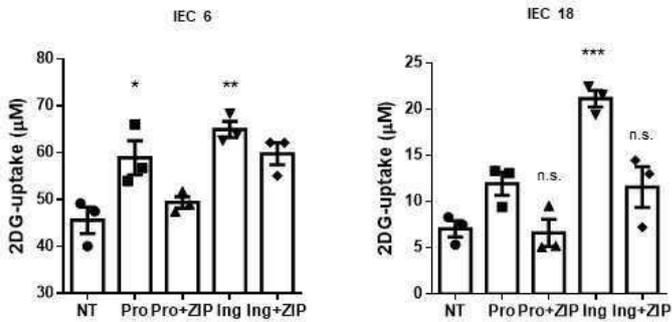
도면4



도면5

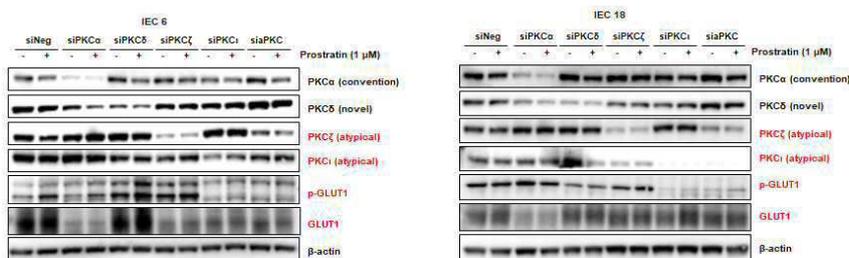


도면6

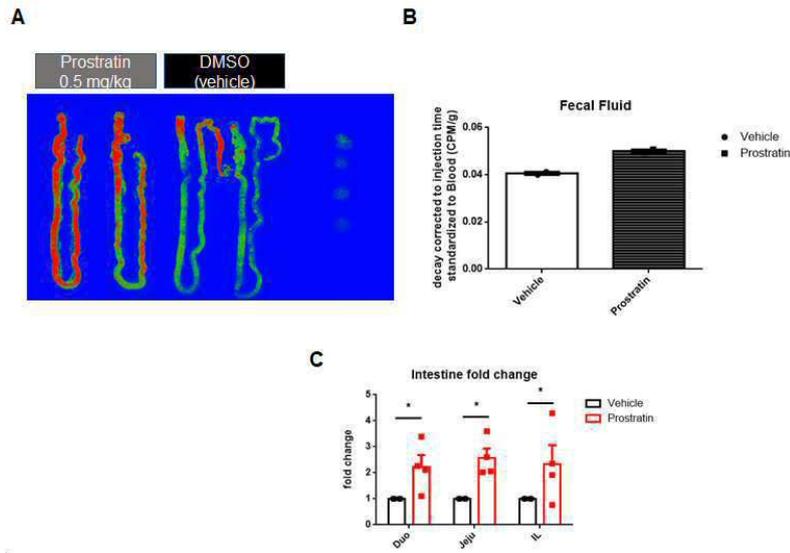


ZIP: pseudosubstrate-derived ζ -inhibitory peptide

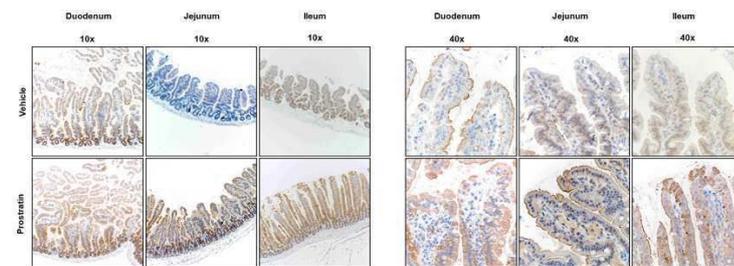
도면7



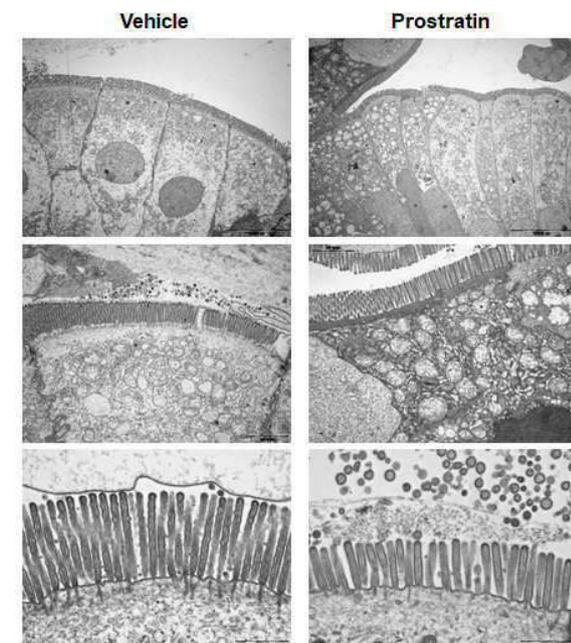
도면11



도면12



도면13



서열목록

<110> Yonsei University Industry Foundation

<120> Compositon for Controlling Sugar Containing Atypical PKC
Activator

<130> P20-B205

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PKC siRNA

<400> 1

gggaugucag agagcaugcc uucuu 25

<210> 2

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PKC siRNA

<400> 2

cucacaguac uuccucugu 19

<210> 3

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PKC siRNA

<400> 3

gcugagaucu guaucgcucu caacu 25

<210> 4

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PKC siRNA

<400> 4

ggacaaugua cugcuagacu cugaa 25