

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 M2010-01

부처명 해양바이오프로세스연구단

연구사업명 해양생명공학기술개발사업

연구과제명 해양생물 유래 생리활성물질의 임상평가를 통한 제품화 및 산업화

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

해마(seahorse) 단백질 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 해마는 *Hippocampus trimaculatus*인 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단백질 가수분해물은 해마의 트립신 가수분해물, 해마의 알파-키모트립신 가수분해물, 해마의 파파인 가수분해물 및 해마의 프로나아제 E 가수분해물로 이루어진 군으로부터 선택된 1종인 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 펩타이드는 *Hippocampus trimaculatus* 유래인 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 펩타이드는 뇌세포 보호활성, 산화적 스트레스 완화 활성, 항염증 활성 및 프로테아제(protease) 억제 활성을 통해 퇴행성 신경질환을 예방 또는 치료 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 뇌세포 보호활성은 미세교세포의 활성화로 인한 신경독소 방출을 억제시키는 기작을 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 산화적 스트레스 완화는 자유 라디칼 소거활성을 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 항염증 활성은 염증 관련 매개인자인 NO, PGE₂, iNOS, COX-2, TNF- α 및 IL-1 β 의 발현 억제 및 항-염증 사이토카인인 TGF- β 및 IL-4의 발현 증대를 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 프로테아제(protease) 억제 활성은 Aβ42 생성 과정에 관여하는 카텝신 B 및 카텝신 D의 발현 억제를 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 11

제4항에 있어서,

상기 펩타이드는 조성물 내에 10 내지 10000 μM의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭 질환, 헌팅톤 질환, 근위축성 측삭 경화증, 다발성 경화증, 면역계이상 뇌기능 부진, 진행성 신경퇴행질환, 대사성 뇌질환, 니만-픽병, 뇌 허혈 및 뇌출혈로 인한 치매로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 13

서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 펩타이드는 *Hippocampus trimaculatus* 유래인 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 펩타이드는 뇌세포 보호활성, 산화적 스트레스 완화 활성, 항염증 활성 및 프로테아제(protease) 억제 활성을 통해 퇴행성 신경질환을 예방 또는 개선 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 16

제13항에 있어서,

상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭 질환, 헌팅톤 질환, 근위축성 측삭 경화증, 다발성 경화증, 면역계이상 뇌기능 부진, 진행성 신경퇴행질환, 대사성 뇌질환, 니만-픽병, 뇌 허혈 및 뇌출혈로 인한 치매로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 17

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 떡류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 주류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 해마(seahorse)로부터 유래된 단백질 가수분해물 및 펩타이드의 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료의 신규 용도에 관한 것으로, 자세하게는 해마(seahorse) 단백질 가수분해물 또는 이로부터 분리 정제된 펩타이드

를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물, 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 퇴행성 신경질환은 중추신경계의 신경세포에 퇴행성 변화가 나타나면서 운동 및 감각기능의 손상, 기억, 학습, 연산 처리 등의 고차적원인 기능의 저해와 같은 여러 가지 증상을 유발하는 질환이다. 대표적인 질환으로는 파킨슨 질환(Parkinson's disease), 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease) 및 기억장애 등이 있다. 퇴행성 신경질환은 급격히 혹은 천천히 진행되는 괴사(necrosis)나 아포토시스(apoptosis)에 의한 신경 세포의 사멸로 특징지어진다. 따라서 신경세포의 사멸기전에 대한 이해는 중추신경계 질환의 예방, 조절 및 치료법 개발을 위하여 반드시 이루어져야 한다.
- [0003] 중추신경계는 신경세포와 신경교세포로 이루어져 있다. 신경교세포는 뇌 속에 가장 많이 분포되어 있는 세포로서 전체 뇌세포의 90%, 부피로는 뇌 전체의 50%를 차지하고 있다. 이 세포들은 그 자체로는 신경충격을 생성시키지 못하지만 신경원들이 고유의 기능을 수행하는데 도움을 주며, 뇌 조직이 손상되었을 때 이를 회복시키는데도 매우 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 상기 신경교세포는 다시 성상세포(astrocytes), 미세교세포(microglia) 및 희소돌기아교세포(oligodendrocytes)의 세 종류로 구성되어 있다.
- [0004] 이들 중에서 미세교세포(microglia)는 미세아교세포, 또는 소교세포로도 불리며 중추신경계(central nervous system, CNS)에 상재하는 면역세포로서(Stoll and Jander, Prog Neurobiol 58:233-247, 1999; Kim and de Vellis, J Neurosci Res 81:302-313, 2005) 전체 뇌 세포의 5-10%를 차지한다.
- [0005] 상기 미세교세포는 CNS에서 일차 방어라인으로서 기능한다. 미세교세포는 CNS에서 염증 매개자의 주요 세포 내 공급원이다. 미세교세포는 일산화질소(NO), 반응성 산소종(reactiveoxygen species, ROS), 전염증성 사이토카인 및 프로스타글란딘을 생산함으로써 신경염증에 관여한다. 활성화된 미세교세포는 손상된 신경 조직 영역으로 이동하여 미생물 및 세포 파편(cell debris)을 포식하고 파괴한다(Gehrmann et al., Brain Res Rev 20:269-287, 1995).
- [0006] 그러나 염증세포로서의 미세교세포의 역할은 항상 유익한 것만은 아니다. 현재, 조절되지 않은 미세교세포의 활성화와 지속적인 과도한 신경염증은 퇴행성 신경질환(neurodegenerative diseases)을 포함하는 다양한 CNS 병리의 원인으로 여겨지고 있다(Gonzalez-Scarano and Baltuch, Annu Rev Neurosci 22:219-240, 1999). 즉, 기능적으로 활성화된 미세교세포는 염증매개물질을 생성 및 분비하여 신경세포 사멸을 초래하는 것으로 알려져 있다. 따라서 미세교세포의 활성화는 다양한 종류의 퇴행성 신경질환과 관련이 있다. 예를 들어, 알츠하이머 질환의 경우에도 노용균반점(senile plaque)의 형성에 소교세포가 중요한 역할을 한다는 것은 매우 잘 알려져 있다(Wegiel, J. et al., Acta Neuropathol (Berl), 100(4):356-64, 2000). 이브프로펜 등과 같은 소염제가 노용균반점의 형성을 억제하며 치매 발병을 예방할 수 있다는 것이 중요한 예이다(Weggen, S. et al., Nature, 414:212-216, 2001; Wyss-Coray, T. and Mucke, L., Nat. Med., 6:973-974, 2000; Lim, G. P. et al., J. Neurosci 20:5709-5714, 2000).
- [0007] 한편, 해마(seahorse)는 실고기목 실고기과의 바닷물고기로서 몸길이가 대략 6cm 내지 10.5cm이고 눈의 가시가 뚜렷하고 등지느러미의 기저(base) 길이가 매우 짧은 것이 가장 큰 특징이다. 가늘고 긴 주둥이는 눈 뒤쪽의 머리 길이와 같고 머리가 다른 어류에 비하여 거의 직각으로 구부러져 있으며 몸은 많은 골판으로 구성되어 있다. 몸 빛깔은 여러 가지 색깔이고 특히 연한 갈색에 조금 짙은 갈색이 섞여 있으며 작은 반점 또는 무늬가 있다. 해마의 다른 이름으로는 수마(水馬), 용락자(龍落子), 마두어(馬頭魚)가 있다.
- [0008] 이러한 해마는 독이 없으며 따뜻한 성질을 가지고 있어 혈이 멎친 것을 풀어주고 양기를 북돋는데 효능이 있어 약제로도 사용된다. 예로부터 임산부가 난산할 때 사용하였다고 전해지며 주로 보양제로 널리 인식되어 있다. 또한, 해마는 남자의 양기를 보하고 정력을 증강시키며 신장 기능을 증강시키는 효능과 소변이 자기도 모르게 나오는 증상이나 몸이 허하여 기침을 할 때 신장의 기능을 도와줌으로써 그 근본을 치료한다고 알려져 있다.
- [0009] 해마와 관련한 몇몇 연구에서는 항-피로 활성화, 항-노화 활성화, 호흡기질환 치료 효능, 발기부전 개선 효능 및 항암 활성화 등이 있는 것으로 조사되었으며, 최근 연구에 따르면 해마로부터 분리 정제된 바이오 펩타이드가 콜라겐 방출 및 MMP 억제 활성을 갖는 것으로 보고되었다.
- [0010] 그러나 이러한 해마관련 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료 효과에 대해서는 연구된 바 없다.
- [0011] 이에 본 발명자들은 천연물질로부터 유래되어 인체에 안정하면서도, 탁월한 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있는 소재를 찾고자 모색하던 중, 해양 동물인 해마(*Hippocampus trimaculatus*)로부터 분리 동

정한 펩타이드에 주목하여 그것의 뇌세포 보호 활성, 산화적 스트레스 완화 활성, 항염증 활성 및 프로테아제 억제 활성을 실험하였다. 그 결과 본 발명의 해마 유래 펩타이드가 신경독소 물질 및 산화적 스트레스로부터 뇌세포를 보호할 수 있으며, 염증 매개인자 발현을 억제시키고 항염증 사이토카인의 발현을 증대시킴으로서 우수한 항염증 활성을 가질 뿐만 아니라, 신경독소 물질인 A β 42의 생성 과정에 관여하는 카텝신 B 및 카텝신 D의 발현을 억제할 수 있다는 사실을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2007-0100871호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 따라서 본 발명의 목적은 인체에 안정하면서 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료에 효과적인 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 인체에 안정하면서 퇴행성 신경질환 예방 또는 개선에 효과적인 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 해마(seahorse) 단백질 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 해마는 *Hippocampus trimaculatus*일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 단백질 가수분해물은 해마의 트립신 가수분해물, 해마의 알파-키모트립신 가수분해물, 해마의 파파인 가수분해물 및 해마의 프로나아제 E 가수분해물로 이루어진 군으로부터 선택된 1종일 수 있다.

[0018] 또한 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 *Hippocampus trimaculatus* 유래일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 뇌세포 보호활성, 산화적 스트레스 완화 활성, 항염증 활성 및 프로테아제(protease) 억제 활성을 통해 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료 효과를 가질 수 있다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 뇌세포 보호활성은 미세교세포의 활성화로 인한 신경독소 방출을 억제시키는 기작을 통해 이루어질 수 있다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 산화적 스트레스 완화는 자유 라디칼 소거활성을 통해 이루어질 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항염증 활성은 염증 관련 매개인자인 NO, PGE2, iNOS, COX-2, TNF- α 및 IL-1 β 의 발현 억제 및 항-염증 사이토카인인 TGF- β 및 IL-4의 발현 증대를 통해 이루어질 수 있다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 프로테아제(protease) 억제 활성은 A β 42 생성 과정에 관여하는 카텝신 B 및 카텝신 D의 발현 억제를 통해 이루어질 수 있다.

[0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 조성물 내에 10 내지 10000 μ M의 농도로 포함될 수 있다.

[0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭 질환, 헌팅톤 질환, 근위축성 측삭 경화증, 다발성 경화증, 면역계이상 뇌기능 부전, 진행성 신경퇴행질환, 대사성 뇌질환, 니만-픽병, 뇌 허혈 및 뇌출혈로 인한 치매로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0027] 또한 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 퇴행성

신경질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0028] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 *Hippocampus trimaculatus* 유래일 수 있다.

[0029] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 뇌세포 보호활성, 산화적 스트레스 완화 활성, 항염증 활성 및 프로테아제(protease) 억제 활성을 통해 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선 효과를 가질 수 있다.

[0030] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭 질환, 헌팅톤 질환, 근위축성 측삭 경화증, 다발성 경화증, 면역계이상 뇌기능 부전, 진행성 신경퇴행질환, 대사성 뇌질환, 니만-픽병, 뇌 허혈 및 뇌출혈로 인한 치매로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0031] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 떡류, 김류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 주류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

발명의 효과

[0032] 본 발명의 해마(seahorse) 유래 바이오활성 펩타이드는 신경독소 물질 및 산화적 스트레스로부터 뇌세포를 보호할 수 있으며, 염증 매개인자 발현을 억제시키고 항염증 사이토카인의 발현을 증대시킴으로서 우수한 항염증 활성을 가질 뿐만 아니라, 신경독소 물질인 A β 42의 생성 과정에 관여하는 카텝신 B 및 카텝신 D의 발현을 억제할 수 있다. 따라서 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 뇌세포 보호활성, 산화적 스트레스 완화 활성, 항염증 활성 및 프로테아제 억제 활성을 통해 우수한 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료/개선 효과를 나타낼 수 있어 기능성 의약품 조성물 및 식품 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다. 특히 본 발명의 펩타이드는 독성이 없고 약제로도 사용되는 해마(seahorse)로부터 유래된 물질로서, 세포독성 없이 안정성을 가지므로, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 장기적 사용에도 안전한 이점을 가진다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 본 발명의 *Hippocampus trimaculatus* 해마를 나타낸 사진이다.

도 2는 신경세포로 분화된 PC12 세포에 A β 42를 농도별(0.5, 1, 5, 10, 20 μ M)로 처리한 후 PC12 세포들의 세포생존율을 MTT 에세이를 통해 측정한 것이다.

도 3은 신경독성이 유발된 PC12 세포에 각각의 해마 단백질 가수분해물을 처리한 후 신경독성 억제 정도를 MTT 에세이를 통해 측정한 것이다.

도 4는 신경독성이 유발된 PC12 세포에 해마 단백질 가수분해물을 농도별(10, 50, 100 μ M)로 처리한 후 신경독성 억제 정도를 MTT 에세이를 통해 측정한 것이다.

도 5는 해마 프로파아제 E 가수분해물을 Hiprep 16/10 DEAE FF 이온교환 컬럼 크로마토그래피를 통해 분획화한 분획 패턴을 나타낸 것이다.

도 6은 신경독성이 유발된 PC12 세포에 이온교환 컬럼 크로마토그래피를 통해 분획화된 5개의 분획물들(Fr. I, Fr. II, Fr. III, Fr. VI, Fr. V)을 각각 처리한 후 신경독성 억제 정도를 MTT 에세이를 통해 측정한 것이다.

도 7은 이온교환 컬럼 크로마토그래피를 통해 분획화된 5개의 분획물 중 5번째 분획물(Fr. V)을 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 세부 분획화한 분획 패턴을 나타낸 것이다.

도 8은 신경독성이 유발된 PC12 세포에 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 통해 분획화된 5개의 세부 분획물들(Fr. V-1, -2, -3, -4, -5)을 각각 처리한 후 신경독성 억제 정도를 MTT 에세이를 통해 측정한 것이다.

도 9 및 도 10은 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 통해 분획화된 5개의 세부 분획물 중 2번째 및 3번째 분획물을 역상 컬럼크로마토 그래피(RP-HPLC)를 이용하여 단일 펩타이드 성분으로 분리/정제한 피크를 보여주는 것이다.

도 11은 본 발명의 펩타이드 HTP-1의 분자량 스펙트럼 및 아미노산 서열을 나타낸 것이다(MS/MS 분석은 나노-ESI 소스가 장착된 Q-TOF 질량분광기를 통해 수행되었으며, 아미노산 서열 분석은 PepSeq de novo sequencing algorithm을 이용하여 수행됨).

도 12는 본 발명의 펩타이드 HTP-2의 분자량 스펙트럼 및 아미노산 서열을 나타낸 것이다(MS/MS 분석은 나노-

ESI 소스가 장착된 Q-TOF 질량분광기를 통해 수행되었으며, 아미노산 서열 분석은 PepSeq de novo sequencing algorithm을 이용하여 수행됨).

도 13은 미세교세포인 BV2 세포에 본 발명의 펩타이드(HTP-1, HTP-2) 각각을 농도별(10, 50, 100 μ M)로 처리한 후 BV2 세포의 세포생존율을 MTT 에세이를 통해 측정한 것이다.

도 14는 미세교세포인 BV2 세포에 A β 42를 농도별(0.1, 0.5, 1, 5, 10 μ M)로 처리한 후 BV2 세포의 세포생존율을 MTT 에세이를 통해 측정한 것이다.

도 15는 BV2 세포와 PC12 세포(NGF에 의해 분화된 PC12 세포)를 공배양하는 모식도를 나타낸 것이다.

도 16은 BV2 세포와 PC12 세포(NGF에 의해 분화된 PC12 세포)의 공배양 시, 본 발명의 펩타이드(HTP-1, HTP-2) 농도별 처리에 따른 PC12 세포의 세포생존율을 MTT 에세이를 통해 측정한 것이다(blank: 공배양 하지 않은 PC12 세포, 대조군: 본 발명의 펩타이드 처리 없이 공배양된 PC12 세포).

도 17은 BV2 세포에 본 발명의 펩타이드 HTP-1을 농도별(10, 50, 100 μ M)로 전처리한 후 A β 42로 자극하는 경우 BV2 세포내 산화 스트레스 완화 정도를 DCF 형광도 측정을 통해 나타낸 것이다.

도 18은 BV2 세포에 본 발명의 펩타이드 HTP-1을 농도별(10, 50, 100 μ M)로 전처리한 후 A β 42로 자극하는 경우 NO 생성량 변화를 측정한 것이다.

도 19는 BV2 세포에 본 발명의 펩타이드 HTP-1을 농도별(10, 50, 100 μ M)로 전처리한 후 A β 42로 자극하는 경우 염증 관련 매개인자(PGE2, TNF- α , IL-6, IL-1 β)의 생성량 변화를 효소면역분석법을 통해 측정한 것이다.

도 20은 BV2 세포에 본 발명의 펩타이드 HTP-1을 농도별(10, 50, 100 μ M)로 전처리한 후 A β 42로 자극하는 경우 염증 관련 매개인자(iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6, IL-1 β)의 mRNA 발현양 변화를 RT-PCR을 이용하여 측정한 것이다.

도 21은 BV2 세포에 본 발명의 펩타이드 HTP-1을 농도별(10, 50, 100 μ M)로 전처리한 후 A β 42로 자극하는 경우 염증 관련 매개인자(iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6, IL-1 β)의 단백질 발현양 변화를 웨스턴 블랏을 이용하여 측정한 것이다.

도 22는 BV2 세포에 본 발명의 펩타이드 HTP-1을 농도별(10, 50, 100 μ M)로 전처리한 후 A β 42로 자극하는 경우 카텝신 B 및 카텝신 D의 생성량 변화를 효소면역분석법을 통해 측정한 것이다.

도 23은 BV2 세포에 본 발명의 펩타이드 HTP-1을 농도별(10, 50, 100 μ M)로 전처리한 후 A β 42로 자극하는 경우 카텝신 B 및 카텝신 D의 발현양 변화를 RT-PCR(a) 및 웨스턴 블랏(b)을 이용하여 측정한 것이다.

도 24는 BV2 세포에 본 발명의 펩타이드 HTP-1을 농도별(10, 50, 100 μ M)로 전처리한 후 A β 42로 자극하는 경우 항염증 사이토카인인 IL-4 및 IL-13의 생성량 변화를 효소면역분석법을 통해 측정한 것이다.

도 25는 BV2 세포에 본 발명의 펩타이드 HTP-1을 농도별(10, 50, 100 μ M)로 전처리한 후 A β 42로 자극하는 경우 항염증 사이토카인인 TGF- β , IL-4 및 IL-13의 발현양 변화를 RT-PCR(a) 및 웨스턴 블랏(b)을 이용하여 측정한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 본 발명은 해마(seahorse) 단백질 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료(개선)용 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.
- [0035] 본 발명의 해마 단백질 가수분해물은 공지된 단백질 가수분해 효소를 해마에 처리하는 일련의 과정을 통해 수득할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 해마는 *Hippocampus trimaculatus*일 수 있으며, 상기 해마에 단백질 가수분해 효소로서 트립신, 알파-키모트립신, 파파인 또는 프로나아제 E를 처리하여 수득할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 하기 실시예<1-2>에서는, 인도네시아에서 채집한 *Hippocampus trimaculatus*를 동결건조하고 분쇄하여 파우더로 제조한 다음, 여기에 알파-키모트립신, 파파인 및 프로나아제 E 각각을 파우더 대비 1:100 중량비로 혼합한 후 일정시간 반응시킨 후 불활성화시키는 과정을 통해 제조하였다. 그 결과 해마의 트립신 가수분해물, 해마의 알파-키모트립신 가수분해물, 해마의 파파인 가수분해물 및 해마의 프로나아제 E 가수분해물을 수득할 수 있었으며, 이들 4가지 해마 가수분해물 모두가 뇌세포 보호효과를 가지는 것을 실험을 통해 확인할 수 있었

다(도 3 참조).

- [0038] 본 발명은 또한 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0039] 본 발명의 펩타이드는 해마인 *Hippocampus trimaculatus*로 부터 일련의 과정을 통해 수득하거나 또는 당업계에 공지된 화학적 합성 방법을 통해 제조할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 펩타이드를 해마로부터 수득하고자 하는 경우, (a) 해마인 *Hippocampus trimaculatus*를 동결건조 후 분쇄하여 파우더로 제조하는 단계; (b) 상기 파우더에 프로나아제 E를 첨가 반응시켜 해마 프로나아제 E 가수분해물을 제조하는 단계; (c) 해마 프로파아제 E 가수분해물을 이온교환 컬럼 그래마토그래피를 이용 분획화하는 단계; (d) 상기 분획물을 다시 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 추가 정제하는 단계; 및 (e) 상기 정제물을 역상 컬럼크로마토 그래피(RP-HPLC)를 이용하여 단일 펩타이드 성분으로 분리하는 단계를 통해 제조할 수 있다.
- [0041] 본 발명자들은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드가 신경독소 물질 및 산화적 스트레스로부터 뇌세포를 보호할 수 있으며, 염증 매개인자 발현을 억제시키고 항염증 사이토카인의 발현을 증대시킴으로서 우수한 항염증 활성을 가질 뿐만 아니라, 신경독소 물질인 A β 42의 생성 과정에 관여하는 카텡신 B 및 카텡신 D의 발현 억제 효과가 우수함을 확인함으로써, 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료(개선)에 효과적이라는 사실을 최초로 규명하였다.
- [0042] 보다 구체적으로, 하기 실시예 <2-3>에서는, 본 발명의 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드의 뇌세포 보호효과를 살펴본 결과, 본 발명의 펩타이드 처리 농도에 의존적으로 뇌세포의 세포생존율이 증가되는 것을 통해 뇌세포 보호효과가 증대되는 것을 확인할 수 있었다(도 16 참조).
- [0043] 또한 하기 실시예 <2-4>에서는, 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드의 세포내 산화 스트레스 억제 효과를 살펴본 결과, 본 발명의 펩타이드 처리 농도에 의존적으로 뇌 미세교세포인 BV2 세포에서 활성 산소종이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(도 17 참조).
- [0044] 또한 하기 실시예 <2-5> 내지 <2-7>에서는, 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드의 염증 관련 매개인자 억제 효과를 살펴본 결과, 본 발명의 펩타이드 처리 농도에 의존적으로 NO, PGE2, iNOS, COX-2, TNF- α 및 IL-1 β 의 생성량 및 발현양이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(도 18 내지 도 21 참조).
- [0045] 또한 하기 실시예 <2-8>에서는, 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드의 프로테아제(A β 42 생성 과정에 관여)인 카텡신 B 및 D의 억제 효과를 살펴본 결과, 본 발명의 펩타이드 처리 농도에 의존적으로 카텡신 B 및 D의 생성량 및 발현양이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(도 22 및 23 참조).
- [0046] 또한 하기 실시예 <2-9>에서는, 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드의 항-염증 사이토카인의 증대 효과를 살펴본 결과, 본 발명의 펩타이드 처리 농도에 의존적으로 IL-4 및 TGF- β 의 생성량 및 발현양이 증가되는 것을 확인할 수 있었다(도 24 및 도 25 참조).
- [0047] 이와 같은 결과를 통해, 본 발명자들은 해마(seahorse) 단백질 가수분해물 및 이로부터 분리 정제된 서열번호 1/또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드가 뇌세포 보호효과를 가진다는 사실을 실험적으로 입증하였으며, 특히 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드가 뇌세포 보호활성, 산화적 스트레스 완화 활성, 항염증 활성 및 프로테아제(protease) 억제 활성을 통해 퇴행성 신경질환을 예방 또는 치료(개선)에 효과적이라는 사실을 실험적으로 입증하였다.
- [0048] 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물이나 식품 조성물일 수 있다.
- [0049] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0050] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0051] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될

수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[0052] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드는 조성물에 10 내지 10000 μ M 농도로 포함될 수 있으며, 조성물 총 중량에 대하여 0.1 ~ 95 중량%로 포함될 수 있다.

[0053] 본 발명의 약제학적 조성물이 치료효과를 나타낼 수 있는 퇴행성 신경질환으로는 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭 질환, 헌팅톤 질환, 근위축성 측삭 경화증, 다발성 경화증, 면역계이상 뇌기능 부전, 진행성 신경 퇴행질환, 대사성 뇌질환, 니만-픽병, 뇌 허혈 및 뇌출혈로 인한 치매 등을 들 수 있되, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 본 발명의 조성물은 또한 식품 조성물일 수 있는데, 이러한 식품 조성물은 유효성분인 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0055] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0056] 본 발명의 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초콜렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강 보조식품류 등이 있다.

[0057] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 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. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0058] 본 발명은 또한 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0059] 본 발명의 건강기능식품은 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선을 목적으로, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[0060] 본 발명에서 “건강기능식품” 이라 함은 건강기능식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0061] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0062] 상기 “식품 첨가물 공전” 에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등

의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.

[0063] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 부형제, 결합제, 봉해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.

[0064] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분인 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 상기 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0065] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.

[0066] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0067] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.

[0068] 본 발명의 건강기능식품이 예방 또는 개선효과를 나타낼 수 있는 퇴행성 신경질환으로는 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭 질환, 헌팅톤 질환, 근위축성 측삭 경화증, 다발성 경화증, 면역계이상 뇌기능 부전, 진행성 신경퇴행질환, 대사성 뇌질환, 니만-픽병, 뇌 허혈 및 뇌출혈로 인한 치매 등을 들 수 있되, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0069] 또한 본 발명은 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료(개선)용 의약 또는 식품의 제조를 위한 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 상기한 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 퇴행성 신경질환의 예방의 예방 및 치료(개선)용 의약 또는 식품의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.

[0070] 또한 본 발명은 포유동물에게 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 투여하는 것을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0071] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.

[0072] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약제학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.

[0073] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 복강내, 국소, 피내, 흡입 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0074] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0075] <실시예>

[0076] 시약

[0077] 세포배양배지(DMEM), 페니실린/스트렙토마이신, 소태아혈청(FBS) 및 기타 세포배양에 필요한 물질들은 Gibco BRL, Life Technologies(Grand Island, US)에서 구입하였다. 말혈청(Horse serum), NGF, 소혈청알부민(BSA), 단백질 가수분해 효소(트립신, 알파-키모트립신, 파파인 및 프로나아제 E), 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(HFIP), 폴리-D-라이신, A β 42, 디메틸설폭사이드(DMSO), H₂O₂ 및 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 모든 다른 시약들은 분석 등급을 사용하였다.

[0078] 세포배양

[0079] 뇌 미세교세포(Murine microglia)인 BV2세포는 인제대학교 최일환 교수님으로부터 기증 받았으며, 크롬친화세포종(Rat pheochromocytoma)인 PC12 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, USA)에서 구입하였다. BV2 세포는 5% FBS, 2 mM 글루타민 및 100 μ g/ml 페니실린-스트렙토마이신이 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였으며, PC12 세포는 10% 말혈청(horse serum), 5% FBS, 2 mM 글루타민 및 100 μ g/ml 페니실린-스트렙토마이신이 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였다.

[0080] <실시예 1>

[0081] 해마(Hippocampus trimaculatus)로부터 바이오활성 펩타이드 동정

[0082] <1-1> 해마 시료 준비

[0083] *H. trimaculatus*는 2011년 5월 인도네시아 Karimun Jawa 섬에서 채집하였다. 채집한 *H. trimaculatus*는 인도네시아 Ocky Karna Radjasa 교수 (Marine biologist, Diponegoro University-Indonesia)가 동정하였다. 채집한 샘플은 흐르는 물에 소금기를 제거하고 그늘에서 2주 동안 건조시킨 후 3일 동안 동결건조하고 분쇄한 뒤 파우더로 제조하여 하기 실험에서 시료로 사용하였다.

[0084] <1-2> 해마(*H. trimaculatus*) 가수분해물

[0085] 본 발명자들은 해마 가수분해물 중 신경보호 효과가 가장 우수한 가수분해물을 선택하기 위하여, 상기 실시예 <1-1>에서 준비한 해마 시료를 다양한 단백질 가수분해 효소를 이용하여 가수분해물을 제조한 후 이들의 신경보호 효과를 신경독소 억제 실험을 통해 조사하였다.

[0086] 이를 위하여, 단백질 가수분해 효소로는 트립신, 알파-키모트립신, 파파인 및 프로나아제 E를 사용하였다. 간략하게는 상기 실시예<1-1>에서 준비한 해마 시료 250mg에 트립신, 알파-키모트립신, 파파인 및 프로나아제 E 각각을 시료 대비 1:100 중량비로 혼합한 후 상기 혼합물을 교반하면서 6시간 동안 반응시킨 후 효소 불활성화를 위해 boiling water bath에서 10분간 가열하였다.

[0087] 상기 과정을 통해 제조된 각각의 해마 가수분해물의 신경보호 효과는 아밀로이드-베타 42(A β 42)에 의해 유도된 PC12 세포의 신경독성을 억제하는 정도로서 평가되었다. PC12 세포는 크롬친화세포종(pheochromocytoma)을 클론화한 세포주로서 PC12 세포에 신경성장인자(NGF, nerve growth factor)를 처리하면 신경세포로 최종 분화(terminal differentiation)한다. 이러한 특성으로 인해 PC12 세포는 신경분화 연구의 모델로도 유용하게 사용되고 있다. 아밀로이드-베타 42는 아밀로이드 베타 피브릴의 10%를 구성하는 펩티드로, 인 비보(in vivo)나 인 비트로(in vitro)에서 강한 신경독성을 보이며 응집력이 좋고 뇌세포 사멸을 유도하는 물질로 알려져 있다. 이하에서는 간편하게 'A β 42'로 표기한다.

[0088] 본 발명자들은 PC12 세포에 NGF를 처리하여 PC12 세포를 신경분화한 후 여기에 A β 42를 20 μ M 농도로 24시간 동안 처리함에 따라 PC12 세포에서 신경독성을 유발하였다. 이렇게 신경독성이 유발된 PC12 세포에 각각의 해마

가수분해물(트립신, 알파-키모트립신, 파파인 및 프로나아제 E)을 처리하여 신경독성을 억제하는 정도를 MTT 에세이를 통해 측정하였다.

[0089] MTT 에세이를 위하여 먼저 신경독성이 유발된 PC12 세포들을 96-웰 플레이트에 2×10^4 cells/웰의 밀도로 분주한 후, 각각의 해마 가수분해물(트립신, 알파-키모트립신, 파파인 및 프로나아제 E)을 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 PBS로 상기 배양된 세포들을 세척하고, 100 μ l MTT 용액(1mg/ml)을 각각의 웰에 첨가한 뒤 세포들을 4시간 동안 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 각각의 웰에 첨가된 MTT 용액을 제거하고, 100 μ l 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide)를 첨가하여 formazan crystal을 녹인 후, 광학 밀도는 UV 마이크로 플레이트 리더(Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austria)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 상대적 세포 생존율을 대조군인 무처리군(blank) 세포의 생존율에 대한 백분율로 계산하였다.

[0090] 그 결과 도 3에서 나타낸 바와 같이, 4가지 해마 가수분해물 모두에서 세포보호효과를 나타내었으며, 특히 프로파아제 E를 이용하여 가수분해한 해마 가수분해물에서 신경독성이 유발된 PC12 세포 생존율 $88.33 \pm 3.33\%$ 로 나타나 가장 높은 세포보호 효과를 확인할 수 있었다. 또한 도 4에서 나타낸 바와 같이, 신경독성이 유발된 PC12 세포 생존율이 해마 가수분해물의 처리 농도에 의존적으로 증대되는 것을 확인할 수 있었다.

[0091] <1-3> 효소 가수분해를 위한 반응 최적화

[0092] 본 발명자들은 해마 단백질 가수분해를 위한 반응 최적조건을 규명하기 위하여 반응표면분석법을 실시하였으며, 이를 통해 가수분해를 위한 반응 최적조건을 도출하였으며, 그 결과는 하기 표 1에서 나타내었다.

표 1

[0093] 해마 단백질 가수분해를 위한 효소 반응 최적조건

responses	target value	optimal conditions	predicted value
cell viability(Y)	maximum	X1 = 36.69(온도)	$94.61 \pm 2.12\%$
		X2 = 20.01h(시간)	
		X3 = 2.02% (효소)	
		X4 = 7.34 (pH)	

[0094] <1-4> 해마 프로파아제 E 가수분해물로부터 활성을 가지는 펩타이드의 분리

[0095] 상기 실시예 <1-2>를 통해 수득한 해마 가수분해물 중 효소로서 프로파아제 E를 사용하여 가수분해한 가수분해물이 신경독성이 유발된 PC12 세포를 가장 효과적으로 보호하는 것으로 증명되었으므로, 본 발명자들은 이러한 해마 프로파아제 E 가수분해물로부터 바이오활성 펩타이드를 얻고자 단계적인 크로마토그래피를 통해 분획화한 후 각각의 분획들 중 세포보호 효과가 뛰어난 분획에서 본 발명의 최종 펩타이드를 분리하였다.

[0096] 먼저, 건조된 해마 프로파아제 E 가수분해물 40 mg/ml을 20mM 농도의 소듐 아세테이트(pH4)에 녹여, Hiprep 16/10 DEAE FF 이온교환 컬럼에 로딩한 다음, NaCl (0-2 M)을 이용하여 기울기 용리 모드로 4 ml/min의 속도로 분리정제를 진행하였다. 흡광도는 280nm로 설정하고 자동 분취장치를 이용하여 5 ml씩 분취하였다. 그런 다음 피크에 따라 각각의 분획을 나눈 뒤 로터리 진공 에바포레이터를 이용하여 농축하였다.

[0097] 그 결과 도 5에서 나타낸 바와 같이, 해마 프로파아제 E 가수분해물 스펙트럼은 5개의 분획으로 분리되었으며, 이러한 분획들 각각을 신경독성이 유발된 PC12 세포에 처리하여 신경독성을 억제하는 정도로서 세포보호 활성을 측정하였다. 그 결과 도 6에서 나타낸 바와 같이, 5번째 분획을 처리한 실험군에서 신경독성이 유발된 PC12 세포의 세포 생존율이 $85.52 \pm 2.22\%$ 로 나타나, 가장 높은 세포보호 활성을 보여주었다.

[0098] 이에, 가장 높은 세포보호 활성을 보여준 5번째 분획을 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 추가 정제하였으며, 이때 아세토나이트릴을 기울기 용리 모드로 (0-30 %) 45분간 수행하였으며 이때 용매의 용출속도는 1.0 ml/min였다. 용리된 피크는 215 nm에서 검출하였고, 활성피크를 로터리 에바포레이터를 이용하여 농축하였다.

[0099] 그 결과 도 7에서 나타낸 바와 같이, 5개의 세부 분획(Fr V-1, Fr V-2, Fr V-3, Fr V-4, Fr V-5)으로 분리되었으며, 이러한 분획들 각각을 신경독성이 유발된 PC12 세포에 처리하여 신경독성을 억제하는 정도로서 세포보호

활성을 측정하였다. 그 결과 도 8에서 나타난 바와 같이, 2번째 분획 및 3번째 분획을 처리한 실험군에서 신경 독성이 유발된 PC12 세포의 세포 생존율이 우수한 것을 확인할 수 있었다(Fr V-2: $79.43 \pm 3.59\%$, Fr V-3: $74.23 \pm 5.67\%$).

[0100] 마지막으로 본 발명자들은 역상 컬럼크로마토 그래피(RP-HPLC) (Dionex Ltd., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 상기 과정을 통해 수득한 Fr V-2 및 Fr V-3분획물에서 단일 펩타이드 성분을 분리 정제하였다. 자세하게는, Nucleosil C18 (10mm×250mm, MackereyNagel-Nucleosil, Duren, Germany) 컬럼과 아세트나이트릴을 기울기 용리 모드로 (020 %) 45분간 수행하였으며 이때 용매의 용출속도는 1.0 ml/min였다. 그런 다음, 0.1% TFA가 포함된 아세트나이트릴을 등용매 용리 모드로 (15%)로 하여 추가 정제를 45분간 수행하였으며 이때 용매의 용출속도는 1.0 ml/min이었다. 용리된 피크는 215 nm에서 검출하였고, 활성피크를 로터리 에바포레이터를 이용하여 농축하였다.

[0101] 그 결과 도 9 및 10에서 나타난 바와 같이, Fr V-2 및 Fr V-3 분획물에서 단일 펩타이드 성분을 분리 정제할 수 있었다.

[0102] <1-5> 바이오활성 펩타이드의 동정

[0103] 상기 실시예<1-4>를 통해 수득한 정제된 펩타이드의 아미노산 서열분석을 실시하였다.

[0104] 정확한 아미노산의 분자 서열 및 분자량을 알기위해 펩트론 Pepton, Inc. (Daejeon, Korea)에 분석을 의뢰하였다. 분자량의 분석은 Q-TOF 질량분광기 (Micromass, Altrincham, UK)와 전기 분무 이온화 (ESI) 소스를 이용하였다. 상기 실시예<1-4>를 통해 정제된 펩타이드는 물과 메탄올(1:1, v/v),로 희석하여 전기분무로 퓨전시켰고 분자량은 질량분석기로 측정하였다. 이때 분자량은 이중 전하상태(M+2H)²⁺로 측정되었다.

[0105] 그 결과 도 11 및 도 12에서 나타난 바와 같이, Fr V-2 분획물로부터 정제된 펩타이드는 8개의 아미노산으로 이루어진 GTEDELDK로 동정되었으며, Fr V-5 분획물로부터 정제된 펩타이드는 6개의 아미노산으로 이루어진 FLHDVQ로 동정되었다. 본 발명에서는 이들은 각각 HTP-1(GTEDELDK) 및 HTP-2(FLHDVQ)로 명명하였다. 또한, 본 발명의 HTP-1 펩타이드는 906.4 Da의 분자량 및 +25.39 Kcal/mol의 소수성을 나타냈으며, 본 발명의 HTP-2 펩타이드는 997.4 Da의 분자량 및 +11.22 Kcal/mol의 소수성을 나타내었다.

표 2

[0106] 본 발명의 펩타이드

본 발명의 펩타이드	아미노산 서열	서열번호
HTP-1	GTEDELDK	서열번호 1
HTP-2	FLHDVQ	서열번호 2

[0107] <실시예 2>

[0108] 본 발명 펩타이드의 뇌질환모델 세포에서 바이오활성 실험

[0109] 본 연구자들은 상기 실시예 1을 통해 동정한 본 발명의 펩타이드가 뇌질환모델 세포에서 어떠한 영향을 미치는지를 실험하기 위하여, 뇌질환모델 세포에 본 발명의 펩타이드 처리에 따른 세포독성 평가, 세포보호 효과, 활성산소종 억제 효과, 항염증 효과를 조사하였다.

[0110] <2-1> 본 발명의 HTP-1 및 HTP-2 펩타이드의 세포독성 평가

[0111] 본 실험에서는 상기 실시예 1을 통해 분리 정제한 본 발명의 펩타이드 HTP-1 및 HTP-2가 뇌세포에 독성을 나타내지 않는 안전한 물질임을 확인하기 위하여, 뇌 미세교세포(Murine microglia)인 BV2의 MTT 에세이를 통해 세포 생존율을 측정하였다.

[0112] MTT 에세이를 위하여 먼저 뇌 미세교세포(Murine microglia)인 BV2세포들을 96-웰 플레이트에 2×10^4 cells/웰의 밀도로 분주한 후, 본 발명의 펩타이드 HTP-1 및 HTP-2 각각을 농도별(10, 50, 100 μ M)로 첨가하여 24시간

및 48시간 동안 배양하였다. 그 후 PBS로 상기 배양된 세포들을 세척하고, 100 μ l MMT 용액(1mg/ml)을 각각의 웰에 첨가한 뒤 세포들을 4시간 동안 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 각각의 웰에 첨가된 MMT 용액을 제거하고, 100 μ l 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide)를 첨가하여 formazan crystal을 녹인 후, 광학 밀도는 UV 마이크로 플레이트 리더(Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austria)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 상대적 세포 생존율을 대조군인 무처리군(blank) 세포의 생존율에 대한 백분율로 계산하였다.

[0113] 그 결과 도 13에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 펩타이드 HTP-1 및 HTP-2는 모든 처리 농도에서 BV2 세포에 독성을 나타내지 않는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 결과를 통해, 본 발명의 펩타이드 HTP-1 및 HTP-2가 10 내지 100 μ M 농도에서 안전하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0114] <2-2> A β 42가 BV2 세포에 미치는 영향

[0115] 본 실험에서는 신경독성을 보이며 응집력이 좋고 뇌세포 사멸을 유도하는 물질로 알려져 있는 A β 42가 뇌 미세교세포(Murine microglia)인 BV2에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, BV2 세포에 A β 42를 농도별로 처리한 후 MTT 에세이를 통해 세포 생존율을 측정하였다.

[0116] MTT 에세이는 상기 실시예 <2-1>에서 동일한 방법으로 측정하였으며, 시료로서 펩타이드 HTP-1 및 HTP-2 대신 A β 42를 첨가하였다.

[0117] 그 결과 도 14에서 나타낸 바와 같이, A β 42의 모든 처리 농도에서 BV2 세포에 독성을 나타내지 않는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는, 신경세포로 분화된 PC12 세포에서 10 μ M 농도의 A β 42 처리에 따라 세포생존율이 크게 감소되는 것과는 대조되는 결과이다(도 2 참조).

[0118] <2-3> 활성화된 뇌 미세교세포(BV2)의 신경독성 및 본 발명의 HTP-1 및 HTP-2 펩타이드가 미치는 영향

[0119] 일반적으로 뉴런이 꼬인 곳이나 접힌 곳에는 신경교세포(glial cell)와 같은 다른 종류의 세포들이 존재한다. 신경교세포는 뇌 속에 가장 많이 분포되어 있는 세포로서 크기는 신경세포(뉴런)의 1/10 정도이나 수적으로는 약 10배 정도이다. 이러한 신경교세포는 신경의 발판 기능을 하며 뉴런 1개마다 약 10개씩의 신경교세포가 자리 잡고 있어, 신경조직의 결합, 지지, 영양 공급 등을 담당한다. 신경교세포의 종류로는 펄스기 교세포(oligodendroglia), 성상 교세포(astrocyte), 및 미세 교세포(microglia)로 나뉘며, 특히 미세교세포는 뇌에서 면역기능을 담당하는 신경원세포의 일종으로 알려져 있다.

[0120] 본 발명에서는 in vitro 실험에 있어서, in vivo와 조건을 유사하게 만들기 위하여 신경세포의 일종인 분화된 PC12세포와 미세교세포로서의 BV2 세포를 공배양한 후, A β 42 및 본 발명의 HTP-1 및 HTP-2 펩타이드를 처리하여 활성화된 미세교세포의 신경독성 평가 및 본 발명의 펩타이드의 신경독성 억제 효과를 살펴보았다.

[0121] 먼저, 활성화된 뇌 미세교세포(BV2)의 신경독성을 평가하기 위해 BV2 세포와 PC12 세포를 공배양하였다. 우선 뇌 미세교세포인 BV2 세포를 세포배양 인서트 (구멍크기0.2 ; , SPL 제품)에 배양하고 본 발명의 펩타이드 시료 존재 또는 부존재 하에서 A β 42 5 μ M 농도를 처리한 뒤 24시간동안 배양하였다. PC12 세포의 단층위로 뇌 미세교세포가 있는 인서트를 올려놓음으로써 BV2 세포와 PC12 세포를 공배양하였다(도 15 참조).

[0122] 상기 공배양된 PC12 세포의 세포생존율을 측정하기 위하여 MTT 에세이를 실시하였다. MTT 에세이는 상기 실시예 <2-1>에서 동일한 방법으로 측정하였다.

[0123] 그 결과 도 16에서 나타낸 바와 같이, BV2 세포와 공배양된 PC12 세포(NGF에 의해 분화된 PC12 세포)는 시간 경과에 따라 세포생존율이 감소되는 것을 확인할 수 있었으며(대조군), 또한 본 발명의 HTP-1 및 HTP-2 펩타이드 처리 농도에 의존적으로 세포생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 본 발명의 HTP-1 및 HTP-2 펩타이드 100 μ M을 48시간 동안 처리한 경우, 각각의 세포생존율이 82.49 $\pm$ 3.05% 및 75.19 $\pm$ 2.55%로 나타났다.

[0124] 이러한 결과를 통해, A β 42에 의해 자극된 BV2 세포의 경우 신경을 손상할 수 있는 인자를 분비함으로써 신경세포 일종인 분화된 PC12 세포의 생존에 영향을 미칠 수 있으며, 본 발명의 HTP-1 및 HTP-2 펩타이드가 이러한 신경독소 물질을 감소시킬 수 있다고 판단되었다. 따라서 본 발명자들은 이러한 가정을 실험으로 입증하기 위하여 하기 실험에서는 A β 42에 의해 자극된(활성화된) BV2 세포에서 본 발명의 HTP-1 펩타이드가 미치는 영향을 조사하였다.

- [0125] <2-4> A β 42 자극에 의한 BV2 세포 활성화에 있어서 본 발명의 HTP-1 펩타이드 전처리에 따른 세포 내 산화 스트레스 억제 효과
- [0126] 본 실험에서는 A β 42의 자극을 통한 BV2 세포 활성화 과정에 있어서, 본 발명의 HTP-1 펩타이드 처리에 따른 세포내 산화 스트레스 억제 효과를 살펴보기 위해, 자유 라디칼 소거활성을 측정하였다. BV2 세포 내 활성산소종(reactive oxygen species: ROS) 생성 수준은 산화-민감성 염료인 DCFH-DA(2',7'-dichlorofluorescein diacetate)를 사용하여 검출하였다.
- [0127] DCFH-DA는 세포막 투과성이 좋아 세포로의 전달이 용이하고 일단 세포 내로 들어가면 에스테라제(esterase)에 의해 DCFH로 가수분해되고 이 가수분해 생성물은 전하를 띠게 되어 세포 밖으로 잘 유출되지 않으므로 세포 내에 남아있게 된다. 기질인 DCFH는 형광물질이 아니지만 산화된 생성물인 DCF는 형광이 강하므로 쉽게 감지할 수 있다. DCFH가 DCF로 산화되는 것은 superoxide anion, H₂O₂, peroxy radical, peroxynitrite, nitric oxide 등 세포의 산화스트레스 하에서 생성될 수 있는 여러 가지의 유리 라디칼들의 작용에 의해 일어나므로, 이를 이용한 DCF 형광도의 측정에 의해 세포의 총체적인 산화성 스트레스를 정량하는 것이 가능하다.
- [0128] 먼저, BV2 세포를 24시간 동안 96-웰 마이크로플레이트에서 배양한 후 본 발명의 HTP-1 펩타이드를 농도별(10, 50, 100 μ M)로 전처리하고 6시간 뒤 5 μ M 농도의 A β 42에 노출시켰다. 그 다음 PBS에 용해된 20 μ M DCFH-DA를 처리하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 습도 대기 조건의 암실에서 30분 동안 반응시켰다. 최종적으로, 세포를 PBS로 2회 세척하고 PBS에 용해된 DCF의 형광을 GENios 형광 마이크로플레이트 판독기(Tacan Austria GmbH, Salzburg, Austria)를 사용하여 485 nm의 여기 파장 및 535 nm의 방사 파장에서 검출하였다. Blank는 무처리군이며, 대조군은 본 발명의 HTP-1 펩타이드의 처리 없이 A β 42에 노출시켜 활성화된 BV2 세포를 나타낸 것이다.
- [0129] 그 결과 도 17에서 나타낸 바와 같이, 대조군과 비교하여 본 발명의 HTP-1 펩타이드를 처리한 실험군에서 농도 의존적으로 활성산소종이 억제되는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과를 통해 본 발명의 HTP-1 펩타이드가 세포내 산화적 스트레스를 완화할 수 있음을 확인할 수 있었다.
- [0130] <2-5> A β 42 자극에 의한 BV2 세포 활성화에 있어서 본 발명의 HTP-1 펩타이드 전처리에 따른 염증 관련 매개인자 억제 효과
- [0131] 본 실험에서는 A β 42의 자극을 통한 BV2 세포 활성화 과정에 있어서, 본 발명의 HTP-1 펩타이드가 염증 관련 매개인자인 NO, PGE₂, TNF- α , IL-6, IL-1 β 생성량에 어떠한 영향을 미치는지를 살펴보았다.
- [0132] NO 생성량 측정은 배양된 BV2 세포의 상등액에 분비된 NO량을 Griess 반응을 이용하여 측정하였다. 간단히, BV2 세포를 24-웰 플레이트에 페놀 레드가 포함되지 않은 DMEM을 이용하여 2×10^5 cells/ml 밀도로 배양한 뒤 본 샘플로서 발명의 HTP-1 펩타이드를 농도별(10, 50, 100 μ M)로 전처리하였다. 샘플 처리 후 6시간 뒤, NO의 분비를 유도하기 위해 A β 42 (1)를 처리한 뒤 48 시간동안 방치하였다. 그 후 50의 배양 상등액을 취하고 동량의 Griess 시약 [1% sulfanilamide/0.1% N-1-naphthyl]-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% phosphoric acid]을 첨가한 뒤 15분간 방치하였다. 마이크로플레이트 판독기(Tacan Austria GmbH, Salzburg, Austria)를 사용하여 540 nm에서 OD(optical density)를 측정하였다. Blank는 무처리군이며, 대조군은 본 발명의 HTP-1 펩타이드의 처리 없이 A β 42에 노출시켜 활성화된 BV2 세포를 나타낸 것이다.
- [0133] PGE₂ 생성량은 상용화 제품인 PGE₂ 효소 면역분석 키트(R&D Systems Inc, Minneapolis, USA)를 이용하여 측정하였다. BV2 세포에 본 발명의 HTP-1 펩타이드를 전처리하고 6시간 뒤 A β 42(1)를 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. 세포 배양 상등액을 이용하여 PGE₂ 함량을 제조업자의 지시에 따라 측정하였다. PGE₂ 농도는 EIA 키트에서 PGE₂ 표준 용액을 이용, 표준곡선플롯(standard curve plot)으로부터 얻어진 방정식을 이용하여 계산되었다.
- [0134] 또한, 전염증성 사이토카인 분비를 측정하기 위해 전염증성 사이토카인 분석 키트를 이용하였다. BV2 세포에 본 발명의 HTP-1 펩타이드를 전처리하고 6시간 뒤 A β 42(1)를 첨가하였다. 세포 배양 상등액을 이용하여 TNF- α , IL-6, IL-1 β 분비량을 제조업자의 지시에 따라 사용하였다 (R&D Systems Inc, Minneapolis, USA).
- [0135] 그 결과 도 18에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 HTP-1 펩타이드의 처리 농도에 의존적으로 NO 생성량이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 즉, BV2 세포를 A β 42로 자극한 경우 NO 생성량이 $24.59 \pm 2.54 \mu$ M로 측정되어 무처리군($5.45 \pm 1.14 \mu$ M)에 비해 NO 생성량이 증대되었으며, BV2 세포에 본 발명의 HTP-1 펩타이드를 처리한 후 A β

42로 자극한 실험군에서는 처리된 펩타이드 농도가 증가할수록 NO생성량이 감소되는 것으로 나타났다(10: $16.05 \pm 1.75 \mu\text{M}$, 50: $13.27 \pm 1.81 \mu\text{M}$, 100: $10.17 \pm 2.06 \mu\text{M}$). 본 발명의 HTP-1 펩타이드의 처리에 따른 NO 생성량 감소는 iNOS 발현 감소에 기인한 것으로 판단되었으며, 하기 실험에서 이를 자세히 알아보았다. 또한, 도 19에서 나타낸 바와 같이, PGE2, TNF- α , IL-1 β 생성량도 본 발명의 HTP-1 펩타이드 처리 농도에 의존하여 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[0136] <2-6> A β 42 자극에 의한 BV2 세포 활성화에 있어서 본 발명의 HTP-1 펩타이드 전처리에 따른 염증 관련 매개인자 mRNA 발현 변화량 측정

[0137] 본 실험에서는 A β 42의 자극을 통한 BV2 세포 활성화 과정에 있어서, 본 발명의 HTP-1 펩타이드가 염증 관련 매개인자인 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6, IL-1 β mRNA 발현에 미치는지를 영향을 살펴보기 위하여 RT-PCR을 실시하였다.

[0138] 먼저, BV2 세포에 본 발명의 HTP-1 펩타이드를 농도별로 전처리하고 2시간 뒤 A β 42(5)를 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. 이렇게 배양된 총 세포의 RNA를 Trizol 시약(Invitrogen Co., CA, USA)을 사용하여 분리하였다. 2 μg 의 분리된 RNA를 올리고-(dT) 프라이머(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 cDNA로 역전사시켰다. 표적 cDNA를 하기 표 3에서 나타낸 포워드 및 리버스 프라이머 서열을 사용하여 증폭시켰다. 그런 다음, 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 45초, 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 50초 및 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60초의 사이클 30사이클 수행하여 증폭을 실시하였다. 증폭 단계 후에, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 연속적으로 연장 단계를 실행하였다. PCR 산물을 100V에서 10분 동안 1.5% 아가로스겔 상에서 전기영동하여 분리하였다. 겔을 1 mg/ml의 EtBr로 염색한 후 AlphaEase겔 이미지 분석 소프트웨어 (Alpha Innotech., San Leandro, CA, USA)를 사용하여 UV 조명하에서 사진 촬영하였다. β -액틴은 대조군으로 사용하였다.

표 3

[0139] RT-PCR을 위한 프라이머 서열-1

유전자	프라이머 서열	
iNOS	포워드	5'-CCC-TTC-CGA-AGT-TTC-TGG-CAG-CAG-C-3'
	리버스	5'-GGC-TGT-CAG-GCC-TCG-TGG-CTT-TGG-3'
COX-2	포워드	5'-GGG-GTA-CCT-TCC-AGC-TGT-CAA-AAT-CTC-3'
	리버스	5'-GAA-GAT-CTC-GCC-AGG-TAC-TCA-CCT-G-3'
TNF- α	포워드	5'-ATG-AGC-ACA-GAAAGC-ATG-ATC-3'
	리버스	5'-TAC-AGG-CTT-GTC-ACT-CGA-ATT-3'
IL-1 β	포워드	5'-ATG-GCA-ACT-GTT-CCT-GAA-CTC-AAC-T-3'
	리버스	5'-TTT-CCT-TTC-TTA-GAT-ATG-GAC-AGG-AC-3'
IL-6	포워드	5'-AGT-TGC-CTT-CTT-GGG-ACT-GA-3'
	리버스	5'-CAG-AAT-TGC-CAT-TGC-ACA-AC-3'
β -actin	포워드	5'-GTT-GGG-ATG-AAC-CAG-AAG-GA-3'
	리버스	5'-CTT-ACA-ATT-TCC-CGC-TCT-GC-3'

[0140] 그 결과 도 20에서 나타낸 바와 같이, A β 42 자극에 의해 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6, IL-1 β mRNA 발현량이 증대되었으며, 본 발명의 HTP-1 펩타이드를 전처리한 실험군에서 처리 농도에 의존적으로 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β mRNA 발현이 효과적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 염증 반응을 매개하는 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 의 mRNA 발현량이 100 μM HTP-1 처리군에서 가장 높은 비율로 억제되는 것으로 나타났다. 다만 IL-6의 mRNA 발현량은 큰 변화를 보이지 않는 것으로 나타나, 상기 실시예<2-5>에서 ELISA 결과와 유사한 결과를 보여주었다.

[0141] <2-7> A β 42 자극에 의한 BV2 세포 활성화에 있어서 본 발명의 HTP-1 펩타이드 전처리에 따른 염증 관련 매개인자 단백질 발현 변화량 측정

[0142] 본 실험에서는 A β 42의 자극을 통한 BV2 세포 활성화 과정에 있어서, 본 발명의 HTP-1 펩타이드가 염증 관련 매

개인자인 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6, IL-1 β 단백질 발현에 미치는지를 영향을 살펴보기 위하여 웨스턴 블랏을 실시하였다.

[0143] 먼저, BV2 세포에 본 발명의 HTP-1 펩타이드를 농도별로 전처리하고 2시간 뒤 A β 42(5)를 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. 이렇게 배양된 총 세포를 RIPA 완충용액(Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA)에 용균시켰다. 원심분리 후에, 세포 용균물의 총 단백질을 Lowry method (BioRad Laboratories, Hercules, CA)을 사용하여 측정하였다. 동량의 단백질(15 μ g)을 함유하는 분취량의 상청액을 10% 또는 12% SDS-PAGE 겔에 전기영동하고 니트로셀룰로 스막 (Amersham Pharmacia Biotech., England, UK)으로 옮긴 후, 0.1% 트윈 20 (TBS-T)을 함유하는 TBS에 용해된 5% skim milk로 적어도 1시간 동안 차단시키고 일차 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA)와 혼성화시켰다. 모든 일차 모노클로날 항체를 1:1000 비율로 TBS-T로 희석시켰다. 결합된 항체를 실온에서 1시간 동안 호스레이쉬 퍼옥시다아제-결합 이차 항체로 검출하고 면역반응성 단백질을 화학형광 ECL 검정 키트(Amersham Pharmacia Biosciences, England, UK)를 제조업자의 지시사항에 따라 사용하여 검출하였다. 웨스턴 블롯 밴드를 LAS3000발광 이미지 분석(Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)을 사용하여 시각화하였다.

[0144] 그 결과 도 21에서 나타난 바와 같이, A β 42 자극에 의해 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6, IL-1 β 단백질 발현량이 증대되었으며, 본 발명의 HTP-1 펩타이드를 전처리한 실험군에서 처리 농도에 의존적으로 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β 단백질 발현량이 두드러지게 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 다만 IL-6의 단백질 발현량은 상기 실시예<2-5> 및 실시예<2-6>과 유사하게 큰 변화를 보이지 않는 것으로 나타났다.

[0145] <2-8> A β 42 자극에 의한 BV2 세포 활성화에 있어서 본 발명의 HTP-1 펩타이드의 전처리가 카텡신 B 및 D의 생성량 및 발현량에 미치는 영향

[0146] 본 실험에서는 A β 42의 자극을 통한 BV2 세포 활성화 과정에 있어서, 본 발명의 HTP-1 펩타이드 전처리가 프로테아제(A β 42 생성 과정에 관여)인 카텡신 B 및 D의 생성량 및 발현량에 영향을 미치는지를 살펴보았다.

[0147] 카텡신 패밀리의 프로테아제(protease)는 산성 pH에서 라이소좀 내 펩타이드 및 단백질을 분해하는 라이소좀 가수분해효소이다. 카텡신은 그들의 활성 부위 아미노산에 따라 3개의 서브그룹으로 나뉜다; 즉, 시스테인 카텡신(B, C, H, F, K, L, O, S, V 및 W), 아스파르트산 카텡신(D 및 E) 또는 세린 카텡신(G). 아스파르트산 프로테아제로서 카텡신 D는 활성 부위의 깊은 틈새 내에 2개의 아스파르트산 잔기를 갖는다. 카텡신 D의 주요 기능은 라이소좀 구획 내 세포 내 이화작용이지만, 알츠하이머 질환(AD) 및 간질과 같은 CNS 장애에도 관여한다고 알려져 있다 (Dreyer et al., Eur J Biochem 1994, 224, 265-271; Hetman et al., Exp Neurol 1995, 136,53-63). 또한 최근 연구에서 알츠하이머질환자의 뇌에서 프로테아제로서 Cathepsin B를 차단하는 경우 뇌 속 베타아밀로이드 단백질이 감소했고 또한 기억력이 크게 향상된 것으로 나타났다.

[0148] 카텡신 B 및 D의 생성량 측정을 위해 효소 면역 분석법을 이용하였다. 간단히, BV2 세포에 본 발명의 HTP-1 펩타이드를 전처리하고 2시간 뒤 A β 42(5)를 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. 세포 배양 상등액에서 카텡신 B와 D의 양을 상용화 키트(Senso440 cathepsin B assay kit and Senso520 cathepsin B assay kit)를 이용하여 제조업자의 지시에 따라 측정하였다.

[0149] 그 결과 도 22에서 나타난 바와 같이, A β 42 자극에 의해 카텡신 B 및 D 생성량이 증대되었으나, 반면에 본 발명의 HTP-1 펩타이드를 전처리한 실험군에서는 처리 농도에 의존적으로 카텡신 B 및 D 생성량이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 카텡신 B의 생성량이 처리 농도가 증가할수록 두드러지게 감소되는 것으로 나타났다(10 μ M: 94.93 $\pm$ 2%, 50 μ M: 68.46 $\pm$ 5.51%, 100 μ M: 46.91 $\pm$ 2.98%).

[0150] 또한, 카텡신 B 및 D의 mRNA 발현량은 RT-PCR을 이용하여 측정하였으며, 단백질 발현량은 웨스턴 블랏 분석을 통해 측정하였다. RP-PCR은 하기 표 4의 프라이머 서열을 이용하여 상기 실시예<2-6>과 동일한 방법으로 실시하였으며, 웨스턴 블랏은 상기 실시예<2-7>과 동일한 방법으로 실시하였다.

표 4

[0151]

RT-PCR을 위한 프라이머 서열-2

유전자	프라이머 서열	
cathepsin B	포워드	5'-CAC-AAC-TTC-TAC-AAC-GTG-G-3'
	리버스	5'-GTA-GAT-CTC-GGC-CAT-GAT-G-3'
cathepsin D	포워드	5'-CAA-CAG-AAG-CTG-GTG-GAC-AA-3'
	리버스	5'-AGA-TAC-GAC-AGC-ATT-GGC-A-3'
β -actin	포워드	5'-GTT-GGG-ATG-AAC-CAG-AAG-GA-3'
	리버스	5'-CTT-ACA-ATT-TCC-CGC-TCT-GC-3'

[0152]

그 결과 도 23에서 나타난 바와 같이, A β 42 자극에 의해 카텡신 B 및 D의 mRNA 및 단백질 발현이 증대되었으나, 본 발명의 HTP-1 펩타이드를 전처리한 실험군에서는 처리 농도에 의존적으로 카텡신 B 및 D의 mRNA 및 단백질 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 카텡신 B의 발현양이 처리 농도가 증가할수록 두드러지게 감소되었다. 도 23에서 (a)는 PCR 결과이며, (b)는 웨스턴 블랏 결과를 나타낸다.

[0153]

<2-9> A β 42 자극에 의한 BV2 세포 활성화에 있어서 본 발명의 HTP-1 펩타이드의 전처리가 항-염증 사이토카인 생성량 및 발현량에 미치는 영향

[0154]

본 실험에서는 A β 42의 자극을 통한 BV2 세포 활성화 과정에 있어서, 본 발명의 HTP-1 펩타이드 전처리가 항-염증 사이토카인인 IL-4, IL-13 및 TGF- β 의 생성량 및 발현량에 미치는지를 영향을 살펴보았다.

[0155]

IL-4 및 IL-13의 생성량 측정을 위해 효소 면역 분석법을 이용하였다. 간단히, BV2 세포에 본 발명의 HTP-1 펩타이드를 농도별(10, 50, 100 μ M)로 전처리하고 2시간 뒤 A β 42(5)를 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. 세포 배양 상층액을 이용하여 IL-4 및 IL-13 분비량을 제조업자의 지시에 따라 측정하였다 (R&D Systems Inc, Minneapolis, USA).

[0156]

그 결과 도 24에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 HTP-1 펩타이드를 전처리한 실험군에서 처리 농도에 의존적으로 IL-4의 생성량이 증대되는 것을 확인할 수 있었다. 다만, IL-13 생성량은 본 발명의 HTP-1 펩타이드 전처리에 따라 거의 변화하지 않는 것으로 나타났다.

[0157]

또한, IL-4, IL-13 및 TGF- β 의 mRNA 발현량은 RT-PCR을 이용하여 측정하였으며, 단백질 발현량은 웨스턴 블랏 분석을 통해 측정하였다. RT-PCR은 하기 표 5의 프라이머 서열을 이용하여 상기 실시예<2-6>과 동일한 방법으로 실시하였으며, 웨스턴 블랏은 상기 실시예<2-7>과 동일한 방법으로 실시하였다.

표 5

[0158]

RT-PCR을 위한 프라이머 서열-3

유전자	프라이머 서열	
TGF- β	포워드	5'-CGA-GTG-CCA-AAT-GAA-GAG-GAC-C-3'
	리버스	5'-AAA-CCT-GAG-CCA-GAA-CCT-GAC-G-3'
IL-4	포워드	5'-GTA-CTG-TGC-AGC-CCT-GGA-AT-3'
	리버스	5'-TTT-AGA-AAC-TGG-GCC-ACC-TC-3'
IL-13	포워드	5'-GAA-TTT-GAG-CGT-CTC-TGT-CGA-A-3'
	리버스	5'-GGT-TAT-GCC-AAA-TGC-ACT-TGA-G-3'
β -actin	포워드	5'-GTT-GGG-ATG-AAC-CAG-AAG-GA-3'
	리버스	5'-CTT-ACA-ATT-TCC-CGC-TCT-GC-3'

[0159]

그 결과 도 25에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 HTP-1 펩타이드를 전처리한 실험군에서 처리 농도에 의존적으로 TGF- β 및 IL-4의 mRNA 및 단백질 발현이 상향 조절되는 것을 확인할 수 있었다. 다만, IL-13의 mRNA 및 단백질 발현량은 본 발명의 HTP-1 펩타이드 전처리에 따라 거의 변화하지 않는 것으로 나타났다. 도 25에서 (a)는 PCR 결과이며, (b)는 웨스턴 블랏 결과를 나타낸다.

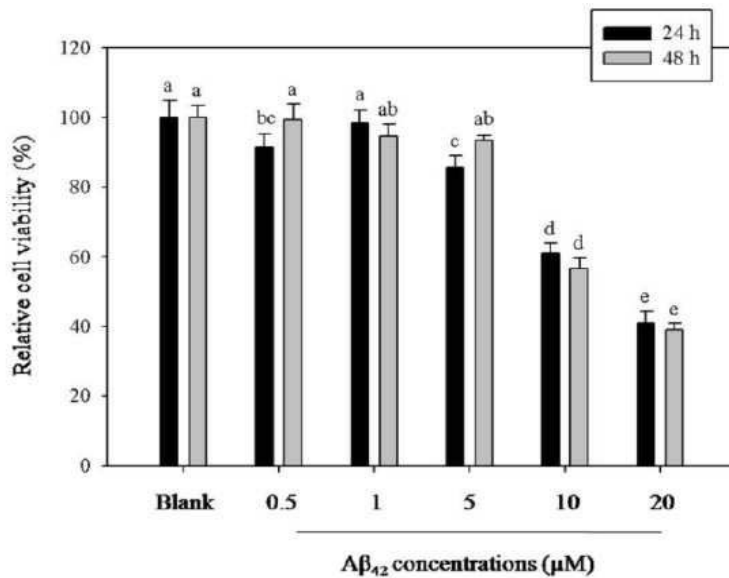
[0160] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

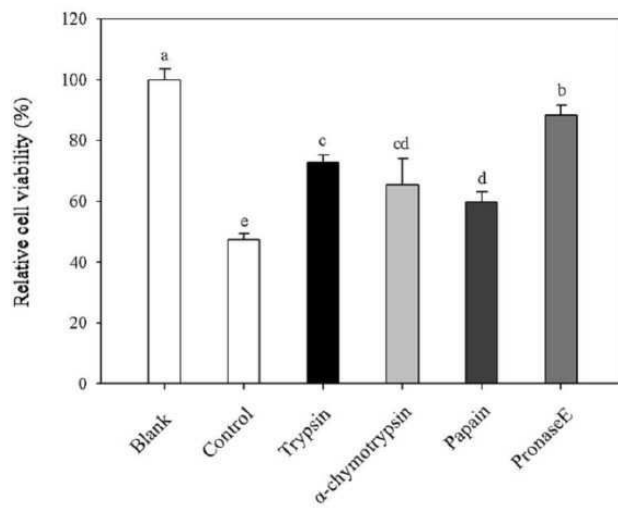
도면1



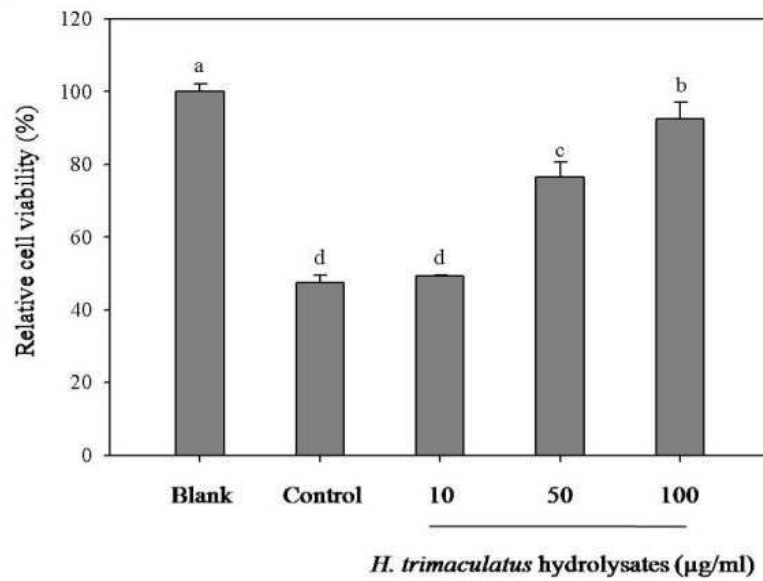
도면2



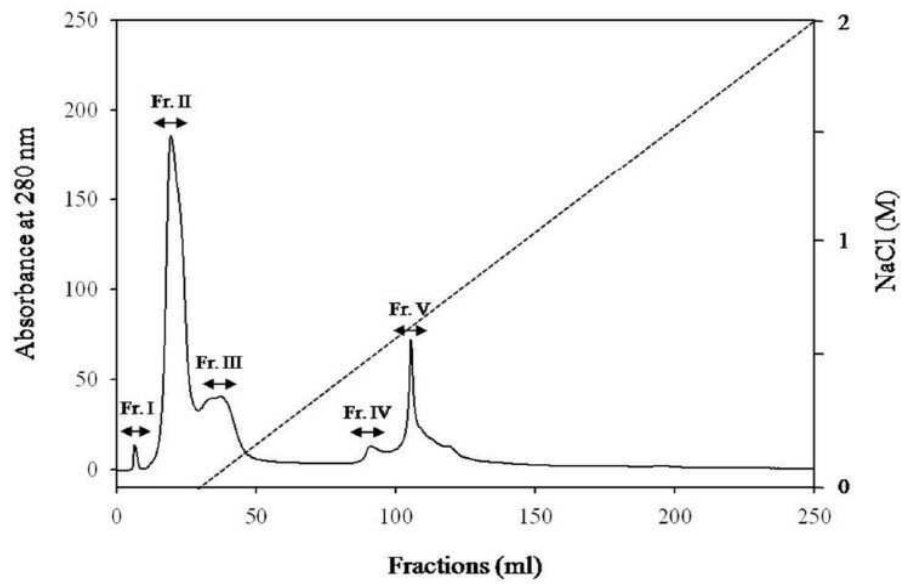
도면3



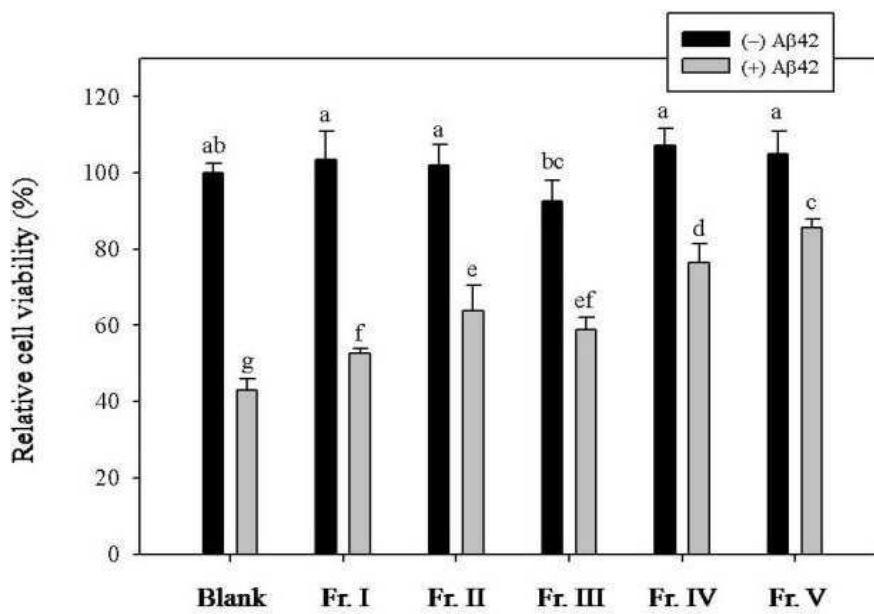
도면4



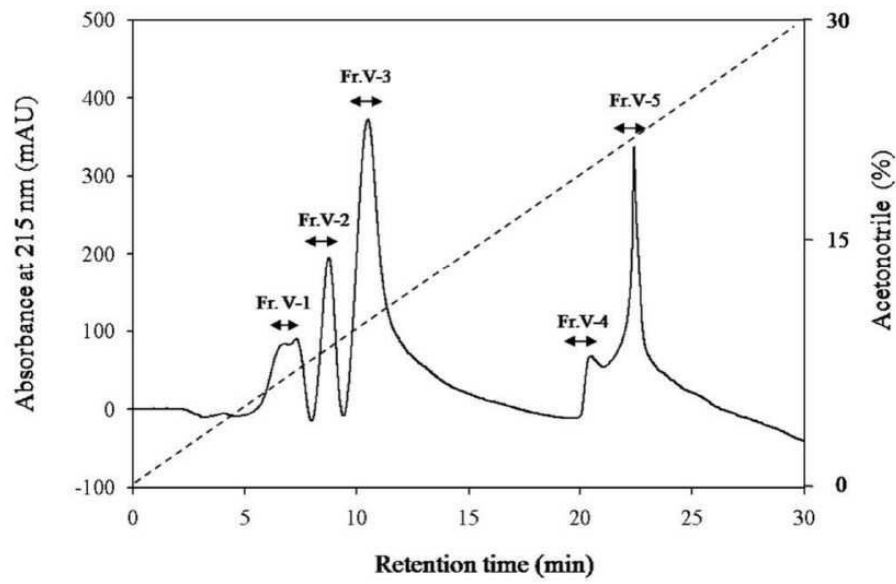
도면5



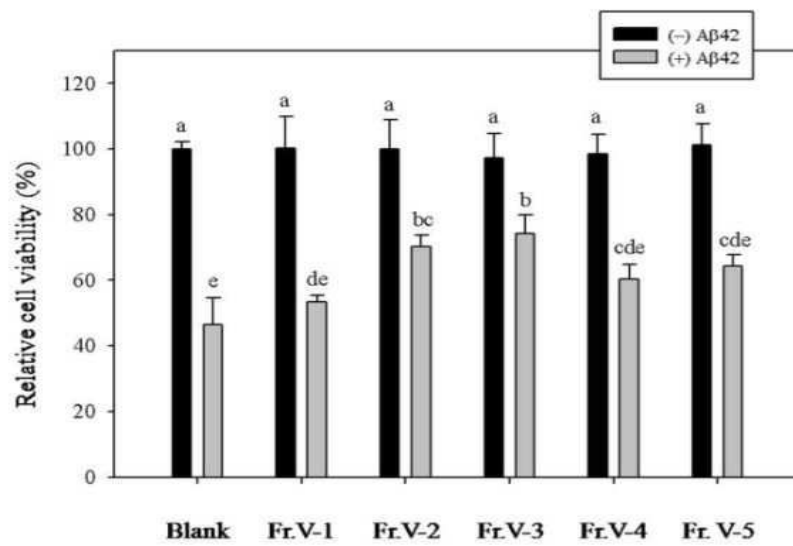
도면6



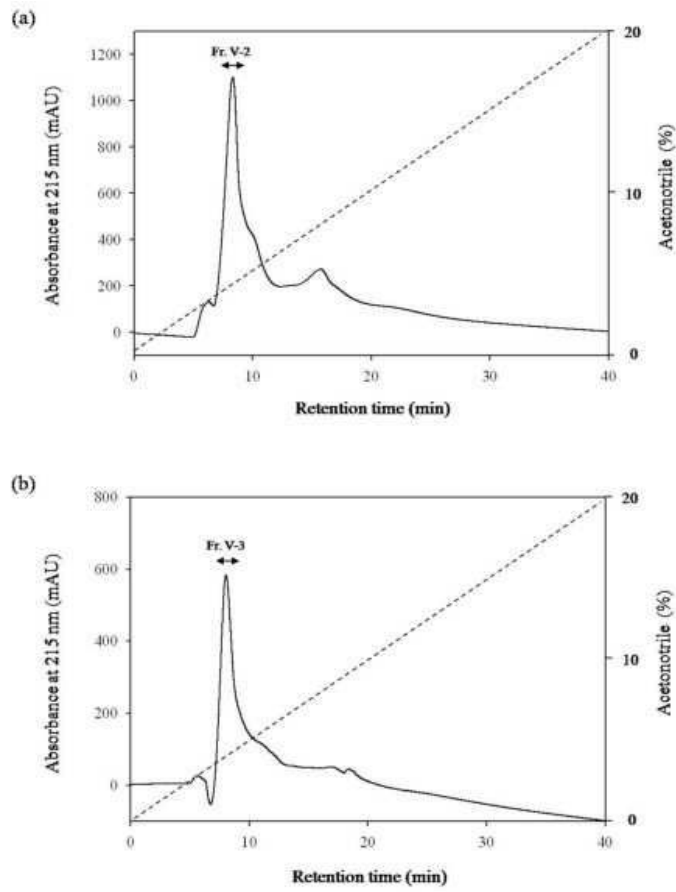
도면7



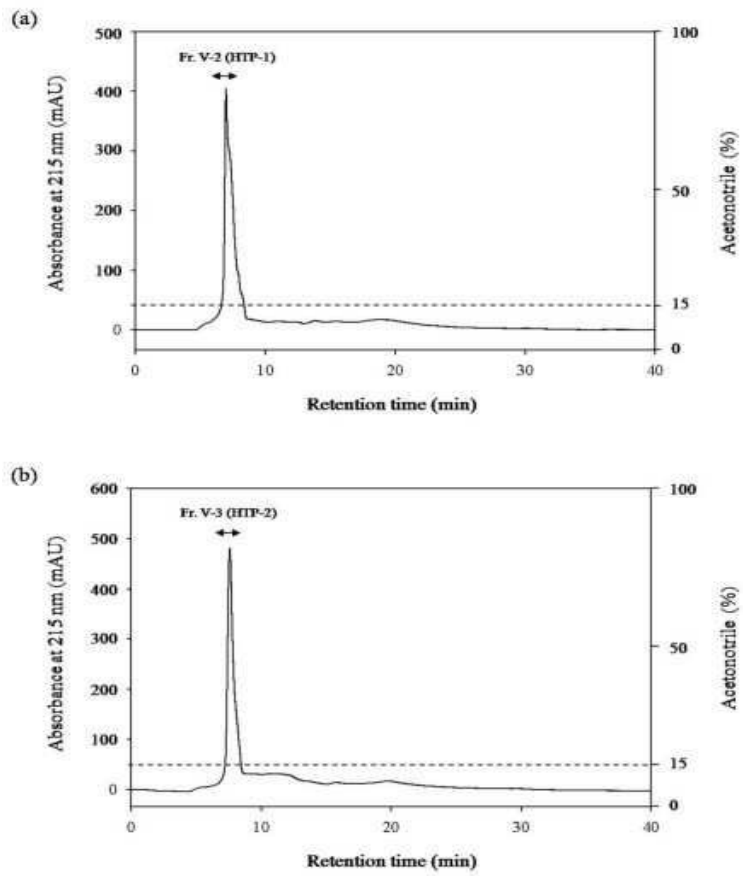
도면8



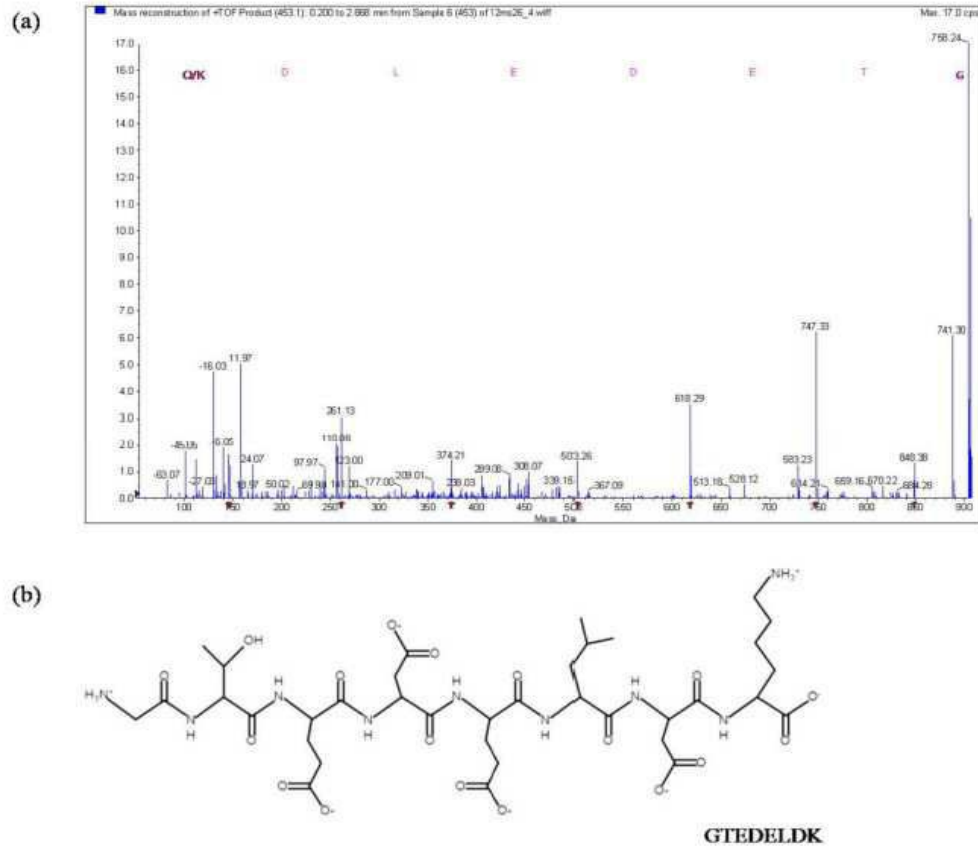
도면9



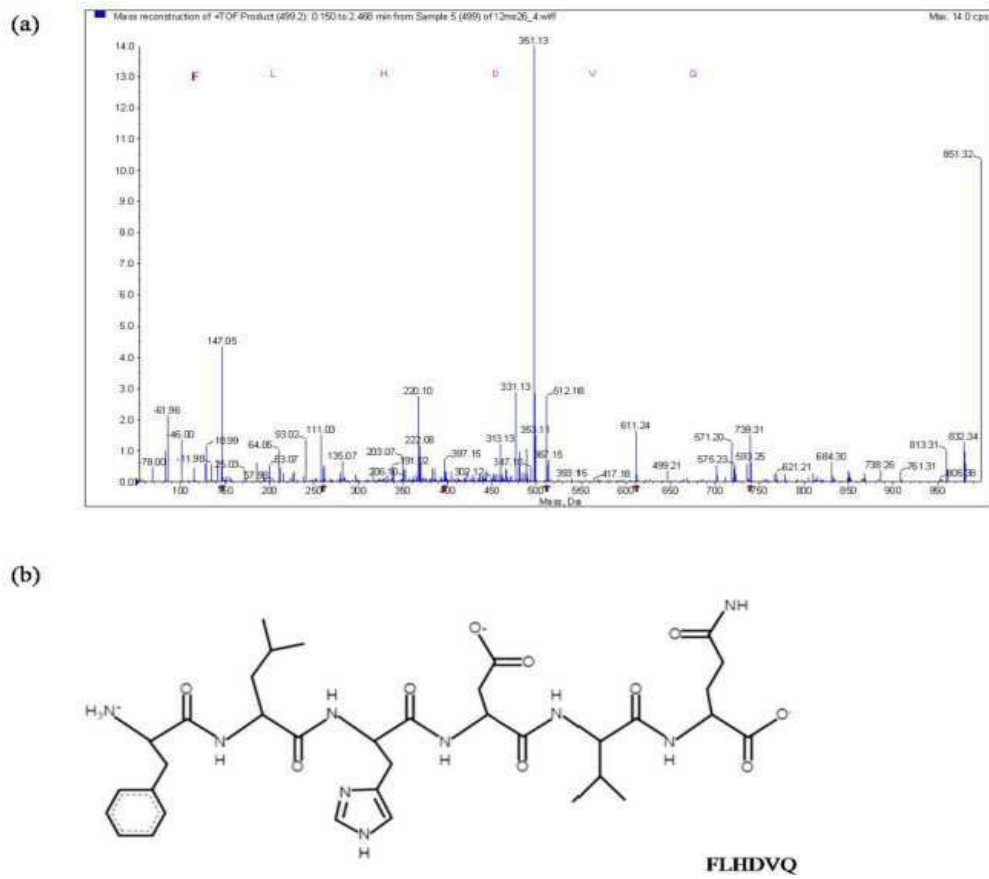
도면10



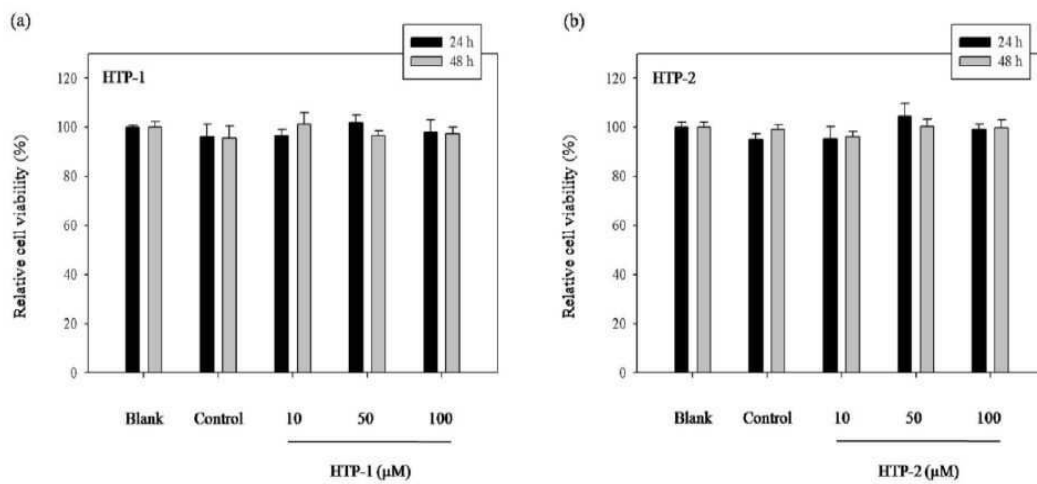
도면11



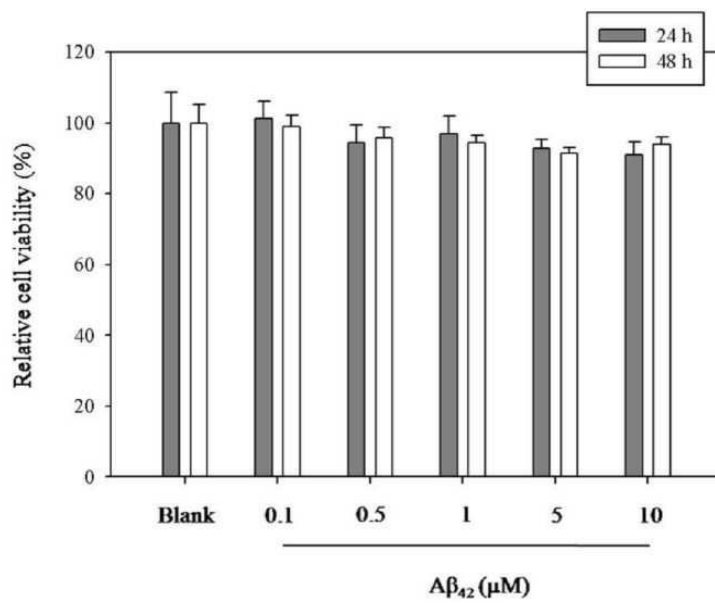
도면12



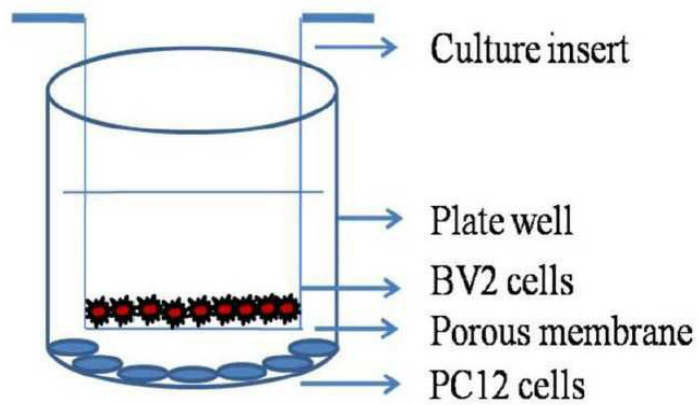
도면13



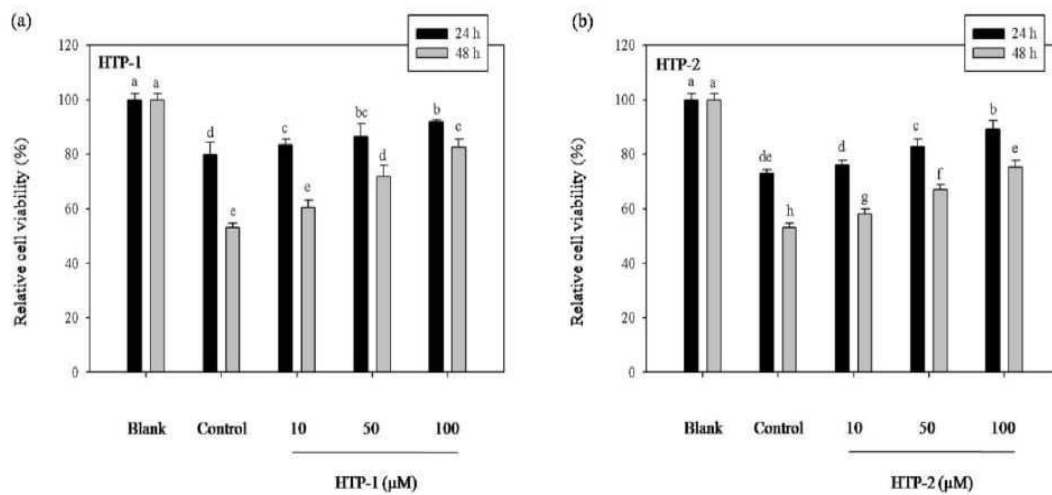
도면14



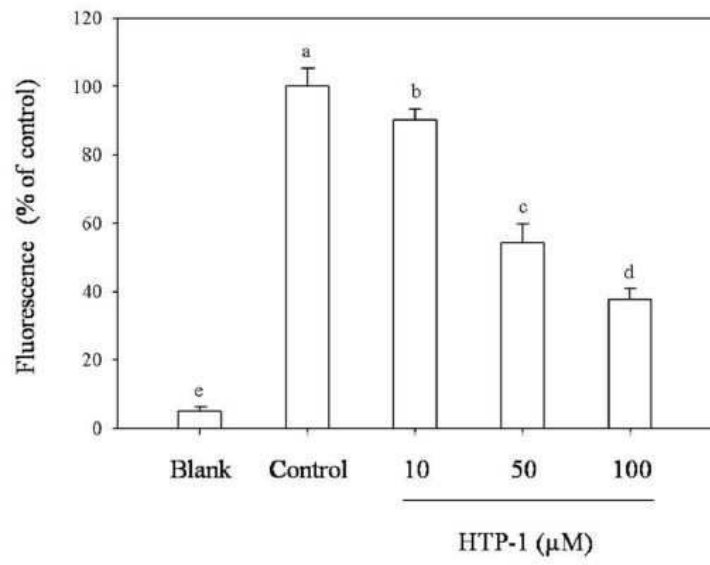
도면15



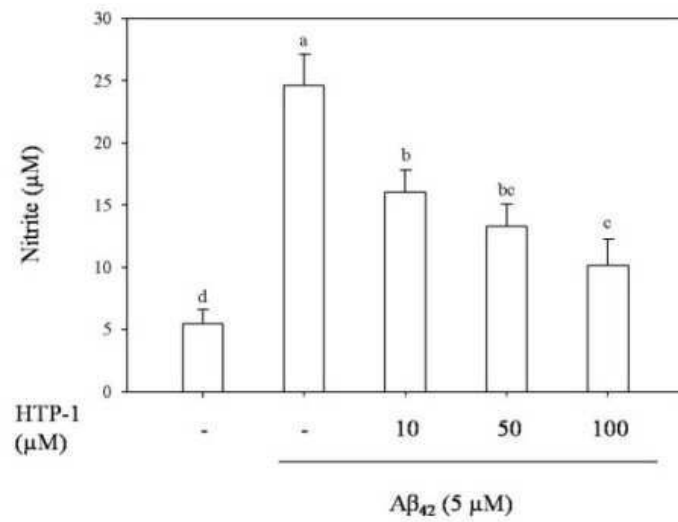
도면16



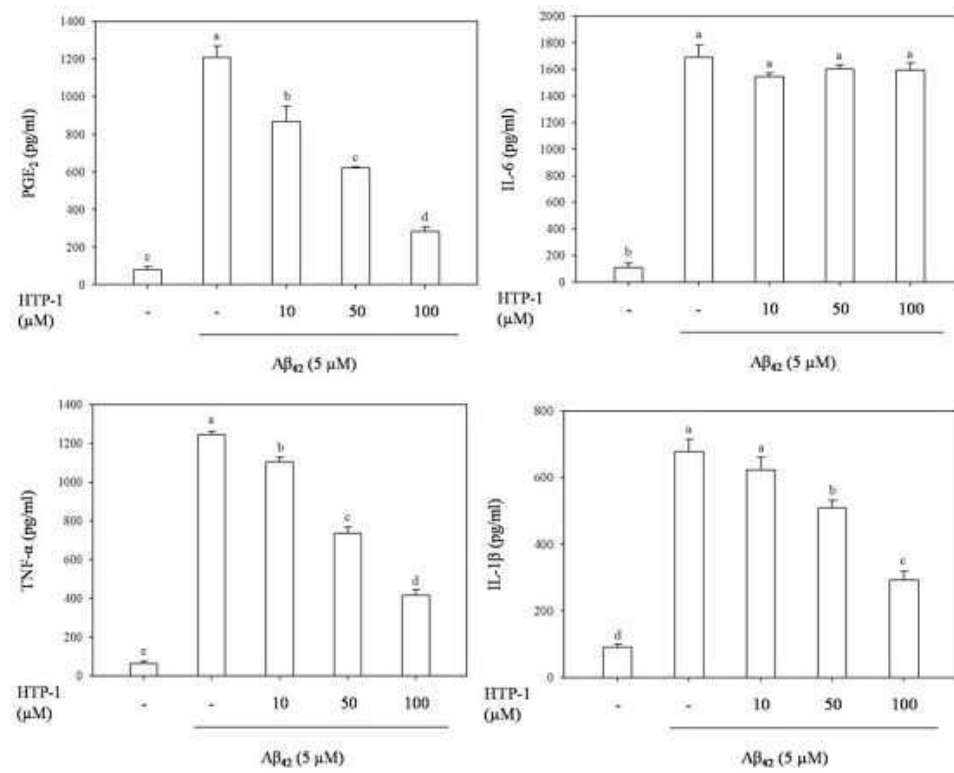
도면17



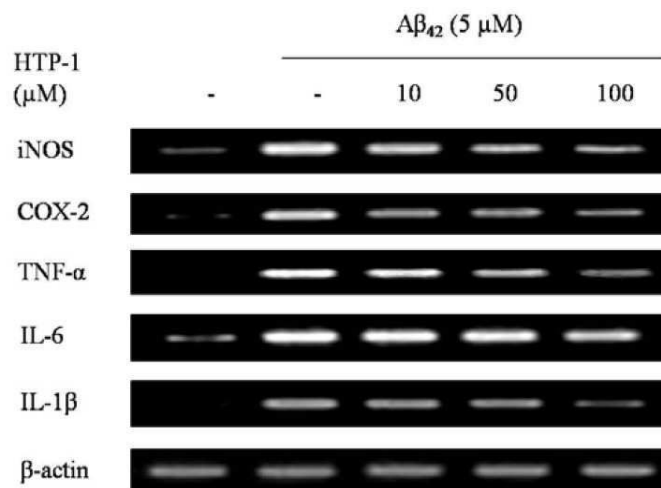
도면18



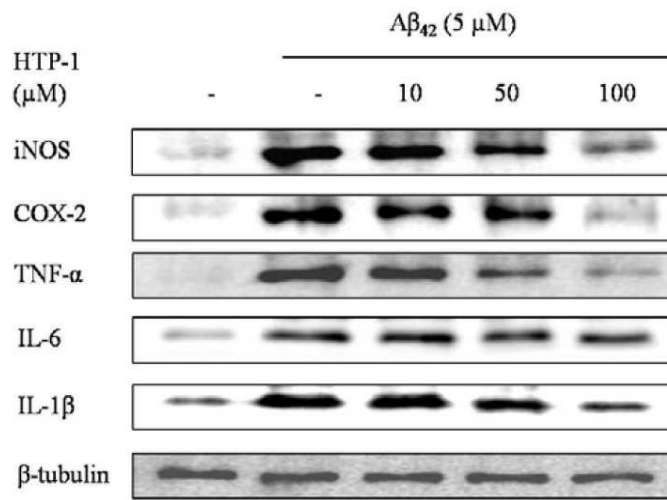
도면19



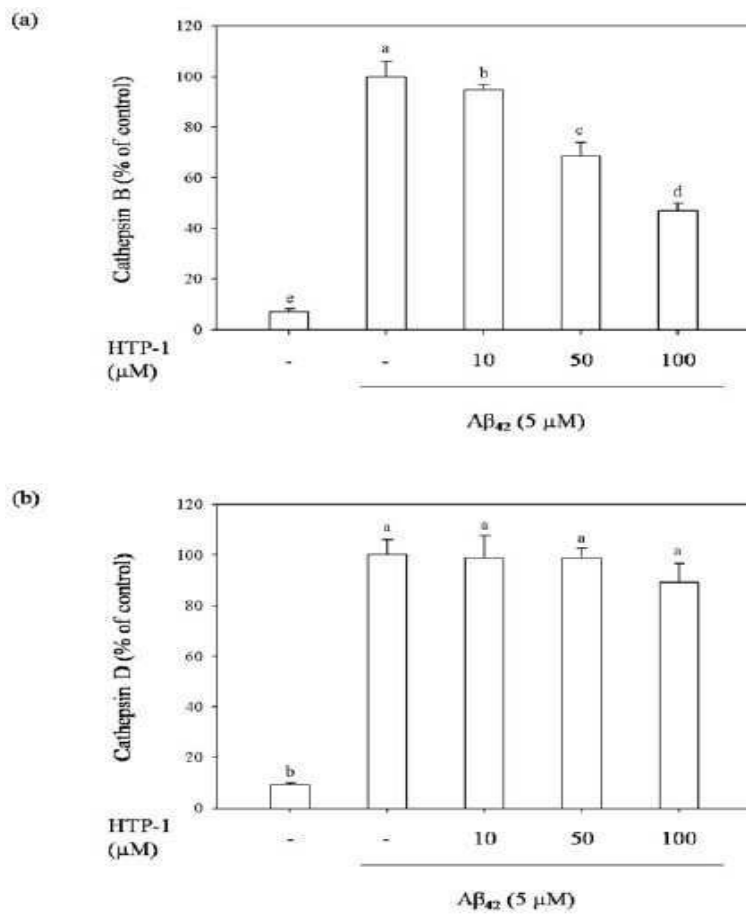
도면20



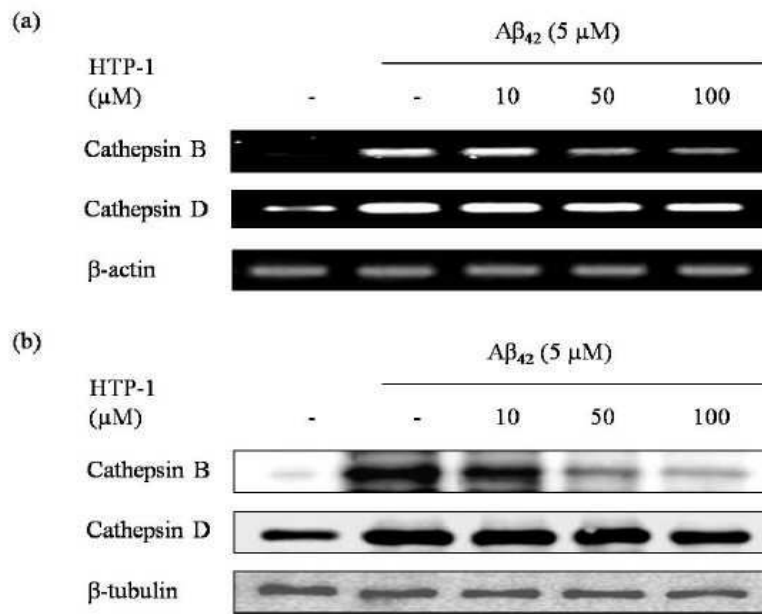
도면21



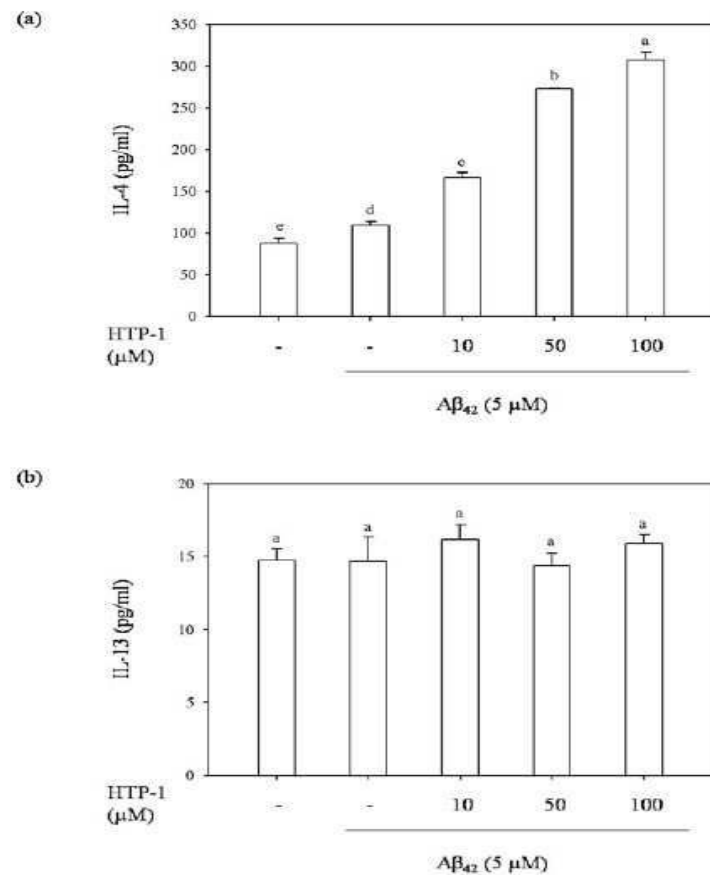
도면22



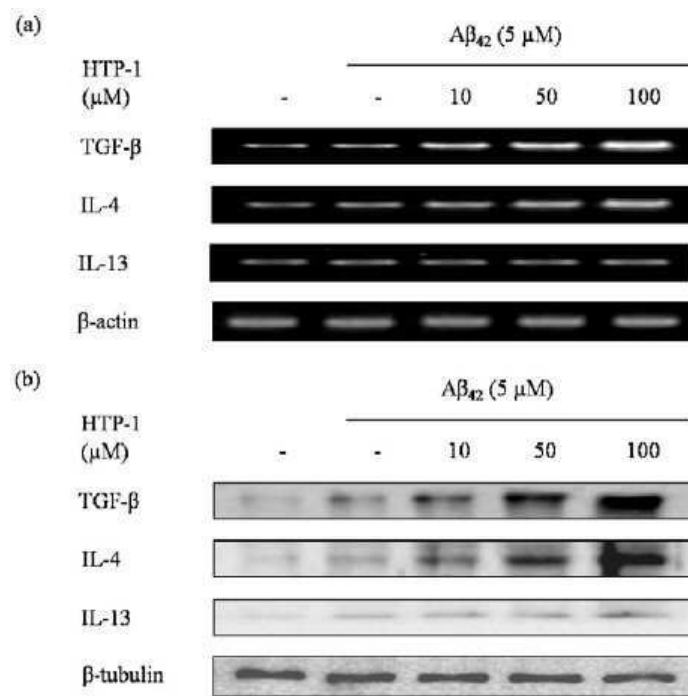
도면23



도면24



도면25



서열 목록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> Composition for prevention or treatment of neurodegenerative
disease comprising bioactive peptide

<130> PN1206-344

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HTP-1 peptide

<400> 1

Gly Thr Glu Asp Glu Leu Asp Lys

1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HTP-2 peptide

<400> 2

Phe Leu His Asp Val Gln

1

5