



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년01월03일

(11) 등록번호 10-2750114

(24) 등록일자 2024년12월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/19 (2016.01) A23L 29/00 (2016.01)(52) CPC특허분류
A23L 33/19 (2016.08)
A23L 29/06 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2023-0113212

(22) 출원일자 2023년08월28일

심사청구일자 2023년08월28일

(56) 선행기술조사문헌

Food Sci Anim. Resour. 2023.7, 43(4),
594-611.

CN110651830 A

JP2020198791 A

Food Chemistry 136 (2013) 1350-1357

(73) 특허권자

(주)네오크레마

서울특별시 강남구 도산대로89길 7, 2층 (청담동)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

한기수

서울특별시 송파구 중대로 211

김나리

서울특별시 송파구 중대로 211

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

공병욱

전체 청구항 수 : 총 12 항

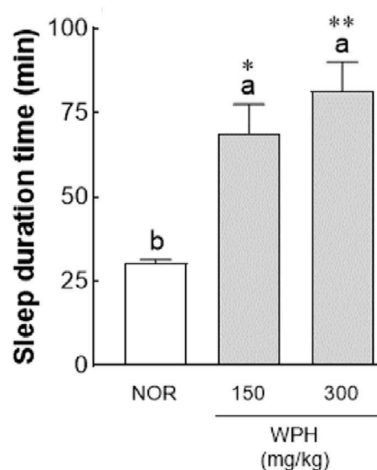
심사관 : 하혜경

(54) 발명의 명칭 유청 단백 가수분해물을 포함하는 수면장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 유청 단백 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 수면장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 유청 단백 가수분해물을 포함하는 조성물을 활용하면 약물 의존증 및 두통 등의 부작용이 적으면서 수면시간의 증가, 각성시간의 감소, NREM 수면시간의 증가, REM 수면시간의 감소, GABAA 수용체(gamma-aminobutyric acid A receptor) 유전자의 발현량 증가 및 세로토닌 수용체 유전자의 발현량 증가를 통하여 수면장애를 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/322 (2013.01)

A23V 2250/54252 (2013.01)

(72) 발명자

백영진

서울특별시 송파구 중대로 211

서민근

서울특별시 송파구 중대로 211

서형주

서울특별시 양천구 목동서로 70 목동신시가가지아파트2단지 233동 504호

이효원

서울특별시 중랑구 봉화산로35길 22

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545026767

과제번호 322011042SB010

부처명 농림축산식품부

과제관리(전문)기관명 농림식품기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품기술개발

연구과제명 [미래대응식품] 우유 유래 기능성 펩타이드의 대량생산 기술 확립 및 활용제품 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 (주)네오크레마

연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

유청 단백 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 수면장애의 예방, 개선 또는 치료용 약제학적 조성물에 있어서, 상기 유청 단백 가수분해물은 유청 단백질에 알칼레이즈(Alcalase) 및 프로자임(Prozyme) 효소를 처리하여 얻은 가수분해물인, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유청 단백 가수분해물은 글루타메이트(glutamate), 시스테인(cysteine), 및 GABA(γ -aminobutyric acid)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 글루타메이트는 600 내지 920 nM로 포함된 것인, 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 시스테인은 250 내지 350 nM로 포함된 것인, 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 GABA는 20 내지 35 nM로 포함된 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 수면장애의 예방, 개선 또는 치료는 수면시간의 증가, 각성시간의 감소, NREM 수면시간의 증가, REM 수면시간의 감소, GABA_A 수용체(gamma-aminobutyric acid A receptor) 유전자의 발현량 증가 및 세로토닌 수용체 유전자의 발현량 증가로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 위한 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 GABA_A 수용체(gamma-aminobutyric acid A receptor) 유전자는 Gabrg1인, 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 세로토닌 수용체 유전자는 Htr1a인, 조성물

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 수면장애는 불면증, 일주기 리듬 수면장애(circadian rhythm sleep disorders) 및 사건

수면(parasomnia)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 조성물.

청구항 10

유청 단백 가수분해물을 포함하는 수면장애의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 있어서,

상기 유청 단백 가수분해물은 유청 단백질에 알칼레이즈 및 프로자임 효소를 처리하여 얻은 가수분해물인, 조성물.

청구항 11

a) 유청 단백질에 알칼레이즈 효소를 처리하는 1차 가수분해 단계 ; 및

b) 상기 a) 단계의 결과물에 프로자임으로 효소를 처리하는 2차 가수분해 단계; 를 포함하는 유청 단백 가수분해물의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 b) 단계의 가수분해는 10시간 내지 12시간 동안 이루어지는 것인, 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유청 단백 가수분해물을 포함하는 수면장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 수면은 인간이 정상적인 활동을 영위하는데 필수적이다. 사회생활을 통해 누적된 신체적 피로와 심리적 스트레스를 수면을 통해 완화시킬 수 있다. 더 나은 삶의 질을 유지하기 위해서는 수면은 필수적인 요소이다.

[0004] 충분한 수면을 취하지 못하거나 수면을 유지하기 힘든 수면장애는 많은 사람들에게 아주 흔히 발생한다. 수면장애를 겪는 사람들 대부분은 전문의약품 치료를 받는 대신 음주 또는 비처방 일반의약품으로 극복하려는 경향이 있다. 수면장애를 개선하기 위해 전문의약품 치료를 받는 경우에는, 벤조디아제핀(benzodiazepines) 계열의 약물과 졸피뎀(zolpidem)이나 조피클론(zopiclone)과 같은 약물을 사용하기도 한다. 그러나 이러한 처방약은 약물 의존성을 유발하기도 하며 장기복용 시 두통, 약물, 낮 시간의 피로, 메스꺼움, 어지러움, 넘어짐 등의 부작용이 있다는 보고가 있다.

[0005] 수면 장애를 완화하는 방법으로 오랫동안 우유 섭취가 권장되어 왔다. 우유는 트립토판(Trp)의 함량이 높다. 트립토판은 단백질을 구성하는 아미노산의 한 종류로 세로토닌과 멜라토닌을 만드는 데 중요한 역할을 하는 아미노산이다. 기분이 가라앉을 때나 스트레스를 받을 때 트립토판이 풍부한 우유를 마시면 세로토닌 호르몬이 생성되어 기분이 좋아지는 효과가 있다.

[0006] 유 단백질인 카제인 가수분해물은 다양한 생리적 기능을 보유하는 펩타이드를 생성한다. 알파-카소제핀(alpha-casozepine)으로 알려진 αS1-카제인 트립신 가수분해물(αS1-casein tryptic hydrolysate)은 항불안, 항경련 및 항스트레스 효과가 있는 것으로 나타났다. 유청 단백질은 Ala(alpha-lactalbumin)를 36%로 함유하고 있다. ALA는 다른 단백질보다 트립토판(tryptophan), 리신(lysine), 시스테인(cysteine)과 BCAA(Branched-chain amino acids)를 고함량 함유하고 있다. ALA에는 달걀, 소고기, 대두 또는 wheat protein 보다 트립토판(Trp) 함량이 4배이상 높은 것으로 보고되고 있으므로 훌륭한 트립토판 공급원에 해당된다.

[0007] 따라서, 부작용이 적으면서 불면증에 효과를 지닌 우유와 같은 천연물 유래 대체 식품 및 의약품을 개발하는 것이 절실히 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-2157248호 (2020.06.09. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 약물 의존증 및 두통 등의 부작용이 적으면서 수면장애에 효과를 지닌 우유와 같은 천연물 유래 수면장애 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 개발하기 위해 예의 노력하였다. 그 결과, 본 발명의 유청 단백 가수분해물에 수면 촉진 물질인 GABA, GABA의 대사 전구체인 글루타메이트 및 시스테인 함량이 높고, 특히 알칼레이즈(Alcalase) 및 프로자임(Prozyme) 효소를 처리하여 가수분해한 경우에는, 수면시간의 증가, 각성시간의 감소, NREM 수면시간의 증가, REM 수면시간의 감소, GABAA 수용체(gamma-aminobutyric acid A receptor) 유전자의 발현량 증가 및 세로토닌 수용체 유전자의 발현량 증가에 현저한 효과가 있는 것을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 유청 단백 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 수면장애의 예방, 개선 또는 치료용 약제학적 조성물 및 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 a) 알칼레이즈 효소를 처리하는 1차 가수분해 단계 ; 및 b) 프로자임으로 효소를 처리하는 2차 가수분해 단계; 를 포함하는 유청 단백 가수분해물의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 유청 단백 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 수면장애의 예방, 개선 또는 치료용 약제학적 조성물에 있어서, 상기 유청 단백 가수분해물은 알칼레이즈(Alcalase) 및 프로자임(Prozyme) 효소를 처리하여 얻은 가수분해물인, 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명자들은 약물 의존증 및 두통 등의 부작용이 적으면서 수면장애에 효과를 지닌 우유와 같은 천연물 유래 수면장애 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 개발하기 위해 예의 노력하였다. 그 결과, 유청 단백 가수분해물의 수면 촉진 물질인 GABA, GABA의 대사 전구체인 글루타메이트 및 시스테인 함량이 높고, 특히 알칼레이즈(Alcalase) 및 프로자임(Prozyme) 효소를 처리하여 가수분해한 경우, 수면시간의 증가, 각성시간의 감소, NREM 수면시간의 증가, REM 수면시간의 감소, GABAA 수용체(gamma-aminobutyric acid A receptor) 유전자의 발현량 증가 및 세로토닌 수용체 유전자의 발현량 증가에 현저한 효과가 있는 것을 규명하였다.

[0016] 수면장애를 겪는 사람들 대부분은 전문의약품 치료를 받는 대신 음주 또는 비처방 일반의약품으로 극복하려는 경향이 있다. 수면장애를 개선하기 위해 전문의약품 치료를 받는 경우에는, 벤조디아제핀(benzodiazepines) 계열의 약물과 졸피뎀(zolpidem)이나 조피클론(zopiclone)과 같은 약물을 사용하기도 한다. 그러나 이러한 처방약은 약물 의존성을 유발하기도 하며 장기복용 시 두통, 악몽, 낮 시간의 피로, 메스꺼움, 어지러움, 넘어짐 등의 부작용이 있다는 보고가 있다. 따라서 이러한 부작용이 적으면서 수면장애에 효과를 지닌 천연물 유래 식품 또는 의약품 개발이 필요한 실정이다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 유청 단백 가수분해물은 글루타메이트(glutamate), 시스테인(cysteine), 및 GABA(γ -aminobutyric acid)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 유청 단백 가수분해물에 포함된 글루타메이트는 100 내지 1000 nM, 100 내지 980 nM, 100 내지 960 nM, 100 내지 940 nM, 100 내지 920 nM, 200 내지 1000 nM, 200 내지 980 nM, 200 내지 960 nM, 200 내지 940 nM, 200 내지 920 nM, 300 내지 1000 nM, 300 내지 980 nM, 300 내지 960 nM, 300 내지 940 nM, 300 내지 920 nM, 400 내지 1000 nM, 400 내지 980 nM, 400 내지 960 nM, 400 내지 940 nM, 400 내지 920 nM, 500 내지 1000 nM, 500 내지 980 nM, 500 내지 960 nM, 500 내지 940 nM, 500 내지 920 nM, 600 내지 1000 nM, 600 내지 980 nM, 600 내지 960 nM, 600 내지 940 nM일 수 있으며, 구체적으로는 600 내지 920 nM일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 유청 단백 가수분해물에 포함된 시스테인은 100 내지 400 nM, 100 내지

350 nM, 150 내지 400 nM, 150 내지 350 nM, 200 내지 400 nM, 200 내지 350 nM, 250 내지 400 nM일 수 있으며, 구체적으로는 250 내지 350 nM일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 유청 단백 가수분해물에 포함된 GABA는 10 내지 50 nM, 10 내지 45 nM, 10 내지 35 nM, 15 내지 50 nM, 15 내지 45 nM, 15 내지 35 nM, 20 내지 50 nM, 20 내지 45 nM, 20 내지 40 nM일 수 있으며, 구체적으로는 20 내지 35 nM일 수 있다.

[0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 유청 단백 가수분해물은 a) 알칼레이즈 효소를 처리하는 1차 가수분해; 및 b) 프로자임 효소를 처리하는 2차 가수분해를 통해 제조되는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 a) 1차 가수분해에서 처리하는 알칼레이즈 효소의 비율은 특별히 제한되지 아니하며, 예를 들어 기질대비 0.001% 내지 10%일 수 있으며, 구체적으로는 0.001% 내지 5%, 0.001% 내지 4%, 0.001% 내지 3%, 0.001% 내지 2.5%, 0.001% 내지 2%, 0.001% 내지 1%, 0.001% 내지 0.8%, 0.001% 내지 0.6%, 0.01% 내지 10%, 0.01% 내지 5%, 0.01% 내지 4%, 0.01% 내지 3%, 0.01% 내지 2.5%, 0.01% 내지 2%, 0.01% 내지 1%, 0.01% 내지 0.8%, 0.01% 내지 0.6%, 0.1% 내지 10%, 0.1% 내지 5%, 0.1% 내지 4%, 0.1% 내지 3%, 0.1% 내지 2.5%, 0.1% 내지 2%, 0.1% 내지 1%, 0.1% 내지 0.8%, 0.1% 내지 0.6%, 0.2% 내지 10%, 0.2% 내지 5%, 0.2% 내지 4%, 0.2% 내지 3%, 0.2% 내지 2.5%, 0.2% 내지 2%, 0.2% 내지 1%, 0.2% 내지 0.8%, 0.2% 내지 0.6%, 0.3% 내지 10%, 0.3% 내지 5%, 0.3% 내지 4%, 0.3% 내지 3%, 0.3% 내지 2.5%, 0.3% 내지 2%, 0.3% 내지 1%, 0.3% 내지 0.8%, 0.3% 내지 0.6%, 0.4% 내지 10%, 0.4% 내지 5%, 0.4% 내지 4%, 0.4% 내지 3%, 0.4% 내지 2.5%, 0.4% 내지 2%, 0.4% 내지 1%, 0.4% 내지 0.8%, 0.4% 내지 0.6%, 가장 구체적으로는 0.5% 일 수 있다.

[0023] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 a) 단계는 30℃ 내지 80℃의 온도 조건에서 수행할 수 있다. 보다 구체적으로, 30℃ 내지 80℃, 30℃ 내지 70℃, 30℃ 내지 60℃, 30℃ 내지 59℃, 30℃ 내지 58℃, 30℃ 내지 57℃, 30℃ 내지 56℃, 30℃ 내지 55℃, 40℃ 내지 80℃, 40℃ 내지 70℃, 40℃ 내지 60℃, 40℃ 내지 59℃, 40℃ 내지 58℃, 40℃ 내지 57℃, 40℃ 내지 56℃, 40℃ 내지 55℃, 42℃ 내지 60℃, 42℃ 내지 59℃, 42℃ 내지 58℃, 42℃ 내지 57℃, 42℃ 내지 56℃, 42℃ 내지 55℃, 44℃ 내지 60℃, 44℃ 내지 59℃, 44℃ 내지 58℃, 44℃ 내지 57℃, 44℃ 내지 56℃, 44℃ 내지 55℃, 46℃ 내지 60℃, 46℃ 내지 59℃, 46℃ 내지 58℃, 46℃ 내지 57℃, 46℃ 내지 56℃, 46℃ 내지 55℃, 48℃ 내지 60℃, 48℃ 내지 59℃, 48℃ 내지 58℃, 48℃ 내지 57℃, 48℃ 내지 56℃, 48℃ 내지 55℃, 50℃ 내지 80℃, 50℃ 내지 70℃, 또는 50℃ 내지 60℃, 50℃ 내지 59℃, 50℃ 내지 58℃, 50℃ 내지 57℃, 또는 50℃ 내지 56℃, 가장 구체적으로는 50℃ 내지 55℃의 온도 조건에서 수행할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 b) 2차 가수분해에서 처리하는 효소의 비율은 특별히 제한되지 아니하며, 예를 들어 기질 대비 0.001% 내지 10%일 수 있으며, 구체적으로는 0.001% 내지 5%, 0.001% 내지 4%, 0.001% 내지 3%, 0.001% 내지 2.5%, 0.001% 내지 2%, 0.001% 내지 1%, 0.001% 내지 0.8%, 0.001% 내지 0.6%, 0.01% 내지 10%, 0.01% 내지 5%, 0.01% 내지 4%, 0.01% 내지 3%, 0.01% 내지 2.5%, 0.01% 내지 2%, 0.01% 내지 1%, 0.01% 내지 0.8%, 0.01% 내지 0.6%, 0.1% 내지 10%, 0.1% 내지 5%, 0.1% 내지 4%, 0.1% 내지 3%, 0.1% 내지 2.5%, 0.1% 내지 2%, 0.1% 내지 1%, 0.1% 내지 0.8%, 0.1% 내지 0.6%, 0.2% 내지 10%, 0.2% 내지 5%, 0.2% 내지 4%, 0.2% 내지 3%, 0.2% 내지 2.5%, 0.2% 내지 2%, 0.2% 내지 1%, 0.2% 내지 0.8%, 0.2% 내지 0.6%, 0.3% 내지 10%, 0.3% 내지 5%, 0.3% 내지 4%, 0.3% 내지 3%, 0.3% 내지 2.5%, 0.3% 내지 2%, 0.3% 내지 1%, 0.3% 내지 0.8%, 0.3% 내지 0.6%, 0.4% 내지 10%, 0.4% 내지 5%, 0.4% 내지 4%, 0.4% 내지 3%, 0.4% 내지 2.5%, 0.4% 내지 2%, 0.4% 내지 1%, 0.4% 내지 0.8%, 0.4% 내지 0.6%, 가장 구체적으로는 0.5% 일 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 b) 단계는 30℃ 내지 80℃의 온도 조건에서 수행할 수 있다. 보다 구체적으로, 30℃ 내지 80℃, 30℃ 내지 70℃, 30℃ 내지 60℃, 30℃ 내지 59℃, 30℃ 내지 58℃, 30℃ 내지 57℃, 30℃ 내지 56℃, 30℃ 내지 55℃, 40℃ 내지 80℃, 40℃ 내지 70℃, 40℃ 내지 60℃, 40℃ 내지 59℃, 40℃ 내지 58℃, 40℃ 내지 57℃, 40℃ 내지 56℃, 40℃ 내지 55℃, 42℃ 내지 60℃, 42℃ 내지 59℃, 42℃ 내지 58℃, 42℃ 내지 57℃, 42℃ 내지 56℃, 42℃ 내지 55℃, 44℃ 내지 60℃, 44℃ 내지 59℃, 44℃ 내지 58℃, 44℃ 내지 57℃, 44℃ 내지 56℃, 44℃ 내지 55℃, 46℃ 내지 60℃, 46℃ 내지 59℃, 46℃ 내지 58℃, 46℃ 내지 57℃, 46℃ 내지 56℃, 46℃ 내지 55℃, 48℃ 내지 60℃, 48℃ 내지 59℃, 48℃ 내지 58℃, 48℃ 내지 57℃, 48℃ 내지 56℃, 48℃ 내지 55℃, 50℃ 내지 80℃, 50℃ 내지 70℃, 또는 50℃ 내지 60℃, 50℃ 내지 59℃, 50℃ 내지 58℃, 50℃ 내지 57℃, 또는 50℃ 내지 56℃, 가장 구체적으로는 50℃ 내지 55℃의 온도 조건에서 수행할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 b) 단계의 가수분해는 알칼레이즈(Alcalase), 컬립펄린(Collupulin), 푸드

프로(Foodpro), 프로타멕스(Protamex), 프로자임(Prozyme) 및 플라보자임(Flavourzyme)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 효소 처리에 의한 것일 수 있으며, 구체적으로는 프로자임 처리에 의한 것일 수 있다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 수면장애의 예방, 개선 또는 치료는 수면시간의 증가, 각성시간의 감소, NREM 수면시간의 증가, REM 수면시간의 감소, GABA_A 수용체(gamma-aminobutyric acid A receptor) 유전자의 발현량 증가 및 세로토닌 수용체 유전자의 발현량 증가를 위한 것을 특징으로 하는 것일 수 있다. 본 발명에서는 유청 단백질에 알칼레이즈 및 프로자임 효소를 처리하여 가수분해한 경우, 상기 효과가 나타나는 것을 확인하였다.

[0028] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 GABA_A 수용체(gamma-aminobutyric acid A receptor) 유전자는 Gabrg1이다.

[0029] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 세로토닌 수용체 유전자는 Htr1a이다.

[0030] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 수면장애는 불면증, 일주기 리듬 수면장애(circadian rhythm sleep disorders) 및 사건 수면(parasomnia)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.

[0031] 본 발명의 약제학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재 되어 있다.

[0032] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.001-1000 mg/kg(체중)일 수 있으며, 1 내지 50 mg/kg, 1 내지 45 mg/kg, 1 내지 40 mg/kg, 1 내지 35 mg/kg, 1 내지 30 mg/kg, 1 내지 25 mg/kg, 1 내지 20 mg/kg, 1 내지 15 mg/kg, 2 내지 50 mg/kg, 2 내지 45 mg/kg, 2 내지 40 mg/kg, 2 내지 35 mg/kg, 2 내지 30 mg/kg, 2 내지 25 mg/kg, 2 내지 20 mg/kg, 2 내지 15 mg/kg, 4 내지 50 mg/kg, 4 내지 45 mg/kg, 4 내지 40 mg/kg, 4 내지 35 mg/kg, 4 내지 30 mg/kg, 4 내지 25 mg/kg, 4 내지 20 mg/kg, 4 내지 15 mg/kg, 6 내지 50 mg/kg, 6 내지 45 mg/kg, 6 내지 40 mg/kg, 6 내지 35 mg/kg, 6 내지 30 mg/kg, 6 내지 25 mg/kg, 6 내지 20 mg/kg, 6 내지 15 mg/kg, 8 내지 50 mg/kg, 8 내지 45 mg/kg, 8 내지 40 mg/kg, 8 내지 35 mg/kg, 8 내지 30 mg/kg, 8 내지 25 mg/kg, 8 내지 20 mg/kg, 8 내지 15 mg/kg, 10 내지 50 mg/kg, 10 내지 45 mg/kg, 10 내지 40 mg/kg, 10 내지 35 mg/kg, 10 내지 30 mg/kg, 10 내지 25 mg/kg, 10 내지 20 mg/kg, 10 내지 15 mg/kg 일 수 있으며, 가장 바람직하게는 1일 당 12.5 mg/kg일 수 있다.

[0033] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 피부에 국소적으로 도포, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0034] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0036] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 유청 단백질 가수분해물을 포함하는 수면장애의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 있어서, 상기 유청 단백질 가수분해물은 알칼레이즈 및 프로자임 효소를 처리하여 얻은 가수분해물인, 조성물을 제공한다.

[0037] 상기 본 발명의 유청 단백질 가수분해물을 포함하는 수면장애의 예방 또는 개선용 식품 조성물은 상술한 본 발명의 유청 단백질 가수분해물을 포함하므로, 상기 유청 단백질 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 수면장애의 예방, 개선 또는 치료용 약제학적 조성물과 중복되는 내용을 원용하며, 본 명세서의 복잡성을 피하기 위하여 생략된다.

- [0038] 본 발명의 식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 등의 형태로 제조될 수 있다. 예컨대 캔디류의 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 또는 건강보조 식품류 등이 있다.
- [0039] 본 발명의 식품 조성물은 식품, 기능성 식품(functional food), 영양보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 천연소재의 가공 형태를 포함한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조될 수 있다. 예를 들면, 건강식품으로는 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 하거나, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 식품으로는 음료(알코올성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지 콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 요거트, 발효유, 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등 본 발명의 유청 단백질 가수분해물을 첨가하여 제조될 수 있다. 또한, 본 발명의 유청 단백질 가수분해물을 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 식품 조성물은 장기 복용할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 식품 조성물의 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 유청 단백질 가수분해물은, 식품 또는 음료의 제조시에 식품 또는 음료의 원료 100 중량%에 대하여 0.1 내지 70 중량%, 바람직하게는 2 내지 50 중량%로 첨가될 수 있다. 상기 본 발명의 펩타이드의 유효용량은 약제학적 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 식품 조성물은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함할 수 있다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 유청 단백질 가수분해물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 a) 알칼레이즈 효소를 처리하는 1차 가수분해 단계 ; 및 b) 프로자임으로 효소를 처리하는 2차 가수분해 단계; 를 포함하는 유청 단백질 가수분해물의 제조방법을 제공한다.
- [0045] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 b) 단계의 가수분해는 1시간 내지 24시간 동안 이루어지는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 1시간 내지 24시간, 1시간 내지 20시간, 1시간 내지 18시간, 1시간 내지 16시간, 1시간 내지 15시간, 1시간 내지 12시간, 5시간 내지 24시간, 5시간 내지 20시간, 5시간 내지 18시간, 5시간 내지 16시간, 5시간 내지 14시간, 5시간 내지 12시간, 10시간 내지 24시간, 10시간 내지 20시간, 10시간 내지 18시간, 10시간 내지 16시간, 10시간 내지 12시간, 가장 구체적으로는 12시간 동안 가수분해를 수행할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- 발명의 효과**
- [0047] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0048] (a) 본 발명은 유청 단백질 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 수면장애의 예방, 개선 또는 치료용 약제학적 조성물 및 식품 조성물에 있어서, 상기 유청 단백질 가수분해물은 알칼레이즈(Alcalase) 및 프로자임(Prozyme) 효소를 처리하여 얻은 가수분해물인, 조성물을 제공한다.
- [0049] (b) 본 발명은 a) 알칼레이즈 효소를 처리하는 1차 가수분해 단계 ; 및 b) 프로자임으로 효소를 처리하는 2차 가수분해 단계; 를 포함하는 유청 단백질 가수분해물의 제조방법을 제공한다.
- [0050] (c) 본 발명의 유청 단백질 가수분해물을 포함하는 조성물을 활용하면 약물 의존증 및 두통 등의 부작용이 적으면서 수면장애를 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0052]

도 1는 유청 단백 가수분해물의 가수분해도를 측정한 결과이다.

도 2는 초파리 모델에서 수면 활성을 평가하는 방법의 모식도이다.

도 3는 초파리 모델에서 수면 활성을 평가한 결과를 엑토그램으로 나타낸것이다.

도 4는 초파리 모델에 유청 단백 가수분해물 150 mg/kg을 경구투여하고 입면시간을 측정한 결과이다.

도 5는 초파리 모델에 유청 단백 가수분해물 300 mg/kg을 경구투여하고 수면시간을 측정한 결과이다.

도 6은 펜토바비탈 유도 수면 모델에 유청 단백 가수분해물을 농도별로 경구투여하고 수면시간을 측정한 결과이다(n=5, 평균 ± 표준편차, Turkey's test, *p<0.05, **p<0.01, 및 ***p<0.001).

도 7은 SD-rat에서 Alcalase 및 Prozyme에 의한 유청 단백질 가수분해물(WPH)을 각각 80 mg/kg(WPH_L), 및 100 mg/kg(WPH_H)로 경구투여하고 EEG 분석을 통해 각성시간을 측정한 결과이다(BDZ: 벤조디아제핀 투여 양성대조군, n=5, 평균 ± 표준편차, Turkey's test, *p<0.05, **p<0.01, 및 ***p<0.001).

도 8은 SD-rat에서 Alcalase 및 Prozyme에 의한 유청 단백질 가수분해물(WPH)을 각각 80 mg/kg(WPH_L), 및 100 mg/kg(WPH_H)로 경구투여하고 EEG 분석을 통해 수면시간을 측정한 결과이다.

도 9는 SD-rat에서 Alcalase 및 Prozyme에 의한 유청 단백질 가수분해물(WPH)을 각각 80 mg/kg(WPH_L), 및 100 mg/kg(WPH_H)로 경구투여하고 EEG 분석을 통해 REM 수면시간을 측정한 결과이다.

도 10은 SD-rat에서 Alcalase 및 Prozyme에 의한 유청 단백질 가수분해물(WPH)을 각각 80 mg/kg(WPH_L), 및 100 mg/kg(WPH_H)로 경구투여하고 EEG 분석을 통해 NREM 수면시간을 측정한 결과이다.

도 11은 SD-rat에서 Alcalase 및 Prozyme에 의한 유청 단백질 가수분해물(WPH)을 각각 80 mg/kg(WPH_L), 및 100 mg/kg(WPH_H)로 경구투여하고 EEG 분석을 통해 NREM의 δ 파가 측정된 시간을 나타낸 결과이다.

도 12은 SD-rat에서 Alcalase 및 Prozyme에 의한 유청 단백질 가수분해물(WPH)을 각각 80 mg/kg(WPH_L), 및 100 mg/kg(WPH_H)로 경구투여하고 EEG 분석을 통해 NREM의 θ 파가 측정된 시간을 나타낸 결과이다.

도 13은 카페인 유도 불면 모델에서 최면 용량의 펜토바비탈(42 mg/kg, i.p.)을 투여하고 Alcalase 및 Prozyme에 의한 유청 단백질 가수분해물(WPH)을 각각 80 mg/kg(WPH_L), 및 100 mg/kg(WPH_H)로 경구투여한 뒤 입면시간을 측정한 결과이다(n=5, 평균 ± 표준편차, Turkey's test, *p<0.05, **p<0.01, 및 ***p<0.001).

도 14는 카페인 유도 불면 모델에서 최면 용량의 펜토바비탈(42 mg/kg, i.p.)을 투여하고 Alcalase 및 Prozyme에 의한 유청 단백질 가수분해물(WPH)을 각각 80 mg/kg(WPH_L), 및 100 mg/kg(WPH_H)로 경구투여한 뒤 수면시간을 측정한 결과이다.

도 15는 ICR 마우스에서 Alcalase 및 Prozyme에 의한 유청 단백질 가수분해물(WPH)을 각각 80 mg/kg(WPH_L), 및 100 mg/kg(WPH_H)로 3주간 경구투여하고 Gabrg1의 발현량을 qRT-PCR로 측정한 결과이다(n=4, 평균 ± 표준편차, Turkey's test, *p<0.05, **p<0.01, 및 ***p<0.001).

도 16은 ICR 마우스에서 Alcalase 및 Prozyme에 의한 유청 단백질 가수분해물(WPH)을 각각 80 mg/kg(WPH_L), 및 100 mg/kg(WPH_H)로 3주간 경구투여하고 Gabbr1의 발현량을 qRT-PCR로 측정한 결과이다.

도 17은 ICR 마우스에서 Alcalase 및 Prozyme에 의한 유청 단백질 가수분해물(WPH)을 각각 80 mg/kg(WPH_L), 및 100 mg/kg(WPH_H)로 3주간 경구투여하고 Gabbr2의 발현량을 qRT-PCR로 측정한 결과이다.

도 18은 ICR 마우스에서 Alcalase 및 Prozyme에 의한 유청 단백질 가수분해물(WPH)을 각각 80 mg/kg(WPH_L), 및 100 mg/kg(WPH_H)로 3주간 경구투여하고 Htr1a의 발현량을 qRT-PCR로 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0055]

실시예

[0057]

실시예 1: 단백질 가수분해물 제조

[0058] 우유 유래 단백질인 유청 단백질(whey protein concentrate, WPC)은 네오크레마(Seoul, Korea)에서 제공받아 사용하였다.

[0059] 유청 단백질 10 g에 10배량의 증류수를 가한 후 기질 대비 0.5% 알칼레이즈(Alcalase)를 처리하고 50℃에서 8시간 동안 반응시켜 1차 가수분해를 진행하였다. 1차 가수분해가 끝난 후 6종의 효소를 기질 대비 0.5% 첨가하여 50℃에서 1 시간, 2 시간, 4 시간, 8 시간, 및 12시간 동안 반응시켜 2차 가수분해를 진행하였다. 반응이 끝난 후 100℃에서 15분간 가열하여 효소를 불활성화하고, 원심분리(4,000 rpm, 20 min, 4℃)하여 상층액을 회수한 후 동결 건조하여 분말화하였다. 사용한 효소의 정보는 다음과 같다: Alcalase (Novozyme, Fl, USA), Collupulin (DSM Food specialties, Delft, The Netherlands), Flavourzyme (Novozyme), Foodpro PNL (Bisionbiochem, Gyeonggi-do, Korea), Protamex (Novozyme), Prozyme 2000P (Bisionbiochem)

[0061] **실시예 2: 단백질 가수분해물의 아미노태 질소량(amino-nitrogen) 분석**

[0062] **2-1. 분석 방법**

[0063] 유청 단백 가수분해물의 아미노태 질소의 함량은 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid(TNBS)법으로 분석하였다. 시료 50 μL에 0.212 M phosphate buffer(pH 8.2) 400 μL 및 0.1% TNBS 400 μL을 가하여 50℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 0.1M HCl을 800 μL 첨가한 후, 340 nm에서 흡광도를 측정하였으며 L-leucine을 표준물질로 이용하였다.

[0065] **2-2. 분석 결과**

[0066] 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 유청 단백 가수분해물(WPC hydrolysate)의 아미노태 질소의 함량을 분석한 결과, 효소 처리 시간이 증가함에 따라서 아미노태 질소의 함량이 증가하는 것으로 확인되었다.

표 1

[0068] 유청 단백 가수분해물의 아미노태 질소의 함량

유청 단백 가수분해물의 아미노태 질소의 함량 (평균 ± 표준편차, mg/g)						
시간 (h)	Alcalase	Collupulin	Flavourzyme	Foodpro	Protamex	Prozyme
1	126.57±4.05	168.09±2.03	174.77±1.39	165.72±3.22	161.27±4.60	183.42±1.60
2	180.84±4.40	168.99±4.57	184.79±3.86	177.06±2.32	181.92±2.06	207.34±4.34
4	166.78±2.32	172.91±0.53	193.28±4.08	194.47±0.84	195.14±1.60	216.71±1.30
8	217.22±2.80	186.77±0.30	294.00±6.46	240.54±0.99	243.03±1.15	338.31±4.36
12	235.81±3.83	213.90±3.86	319.52±2.56	249.03±10.17	243.98±5.56	373.36±2.34

[0069] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, Flavourzyme 및 Prozyme 효소를 이용하여 12시간 가수분해하였을 때 아미노태 질소의 함량이 각각 319.52 및 373.36 mg/g으로 높게 나타났다.

[0071] **실시예 3: 단백질 가수분해물의 가수분해도(degree of hydrolysis, DH) 계산**

[0072] **3-1: 계산 방법**

[0073] 가수분해도는 다음의 식 1에 의하여 계산되었다.

[0075] [식 1]

[0076] $DH(\%) = [(L_{enzyme} - L_0) / (L_{max} - L_0)] \times 100$

[0078] 상기 식 1에서 상기 L_{enzyme} 은 효소별 단백질 가수분해물의 아미노태 질소의 함량이며, 상기 L_0 는 시료 자체의 아미노태 질소의 함량이다. 상기 L_{max} 는 단백질 산 가수분해(6 N HCl, 100℃, 24 h) 후의 아미노태 질소의 함량이다.

[0080] **3-2: 계산 결과**

[0081] 유청 단백 가수분해물의 가수분해도는 12시간의 효소처리시간을 기준으로 산출하였으며, 결과는 도 1에 도시하였다.

[0082] 도 1에 나타낸 바와 같이, Prozyme과 Flavourzyme 효소를 처리하였을 때 높은 가수분해도를 보이는 것으로 확인되었다.

[0084] 실시예 4: 가수분해물의 아미노산 분석

[0085] 4-1: 분석 방법

[0086] GABA는 중추 신경계에 억제성 신경전달 물질로 작용하는 대표적인 수면 촉진 물질이며, 글루타메이트는 GABA의 대사 전구체이다. 시스테인은 체내에서 산화 방지 기능을 나타내는 글루타치온(glutathione)의 환원에 영향을 미친다. 또한, 시스테인과 글루타메이트는 수면 증진에 도움을 주는 것으로 보고된 바 있는 아미노산의 일종이다(Petroff, 2002).

[0087] 표준품인 시스테인(cysteine), 글루타메이트(glutamate), GABA(γ -aminobutyric acid)은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)에서 구입하였다. 분석에는 Quaternary solvent delivery system(Waters alliance, e2695 separation module) 및 Auto-sampler and fluorescence detector(Waters alliance, e2475)가 장착된 HPLC를 사용하였다. AccQ-Tag Amino Acids C18 Column(3.9 X 150 mm, 4 μ m)에서 유속 1 mL/min으로 이동상을 흘려주었으며, 이동상은 (A) AccQ-Tag eluent A:water(v/v=1:10), (B) 아세토니트릴(acetonitrile), (C) 물(water)를 사용하였다. 용매의 기울기 용리는 하기 표 2에 도시하였다. 인젝션 볼륨(Injection volume)은 10 μ L이고 형광 탐지기(fluorescence detector)의 여기(excitation) 파장은 250 nm, 방출(emission) 파장은 395 nm으로 설정하여 분석하였다.

표 2

[0089] HPLC 시스템에 사용되는 이동상의 구성

시간 (분)	이동상의 구성			커브(Curve)
	A (%)	B (%)	C (%)	
0	100	0	0	
0.5	99	1	0	11
18.0	95	5	0	6
19.0	91	9	0	6
29.5	83	17	0	6
33.0	0	60	40	11
36.0	100	0	0	11
45.0	100	0	0	11

[0090] 표준품 및 시료의 유도체화를 위해 샘플 바이알(sample vial)에 시료를 10 μ L 주입하고 붕산염 버퍼(borate buffer)를 70 μ L를 넣은 후 혼합하고, AccQ Flour reagent를 20 μ L 넣고 10초간 잘 혼합한 후 상온에서 10분간 인큐베이션하였다. 이후에 55℃에서 10분간 인큐베이션한 후 방냉하여 HPLC 분석에 사용하였다.

[0092] 4-2: 분석 결과

[0093] 분석 결과는 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0095] 유청 단백질 가수분해물의 글루타메이트, 시스테인 및 GABA 함량

효소	함량 (n=3, 평균 $\pm$ 표준편차, nM)		
	글루타메이트	시스테인	GABA
Alcalase	923.47 $\pm$ 45.21 ^a	321.80 $\pm$ 13.99 ^a	23.65 $\pm$ 0.99 ^b
Collupulin	446.37 $\pm$ 36.80 ^c	77.68 $\pm$ 12.35 ^d	4.30 $\pm$ 0.07 ^d
Flavourzyme	715.53 $\pm$ 69.06 ^{cd}	119.22 $\pm$ 12.58 ^c	6.99 $\pm$ 0.42 ^c
Foodpro	878.68 $\pm$ 56.06 ^{ab}	70.83 $\pm$ 3.61 ^d	7.15 $\pm$ 0.20 ^c
Protamex	778.26 $\pm$ 36.50 ^{bc}	64.42 $\pm$ 3.45 ^d	8.03 $\pm$ 0.29 ^c
Prozyme	606.59 $\pm$ 31.32 ^d	287.45 $\pm$ 14.87 ^b	33.34 $\pm$ 0.61 ^a

- [0096] 상기 표 3에 있어서, 각 다른 알파벳은 일원분산분석과 Tukey's test 에서 유의미한 차이($p < 0.05$)가 있음을 나타내며, 동일한 알파벳으로 표시된 경우는 그룹간 평균의 차이가 유의미하지 않아 같은 집단으로 간주되는 것을 나타낸다.
- [0097] 상기 표 3에 나타난 바와 같이, Alcalase 처리 시료에서 글루타메이트 923.47 nM 및 시스테인 321.80 nM로, 함량이 가장 높은 것으로 확인되었으며, GABA의 함량 또한 23.65 nM로 높은 수준으로 확인되었다. Prozyme 처리 시료는 GABA 함량이 33.34 nM로 가장 높았으며, 시스테인의 함량도 287.45 nM로, 높은 것으로 확인되었다.
- [0099] **실시예 5: 초파리 모델에서의 수면 활성 평가**
- [0100] **5-1: 평가 방법**
- [0101] 초파리 모델에서의 수면 활성 평가의 모식도는 도 2에 나타내었다. 초파리는 Bloomington Drosophila Stock Center(Bloomington, IN, U.S.A.)의 wild-type Drosophila melanogaster Canton-S strain을 사용하였다. 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 60-70% 조건에서 12시간 간격으로 낮과 밤 주기를 조절하고 표준배지에서 생육하였으며 3일 된 수컷 초파리를 실험에 사용하였다. 상기 표준배지는 수크로오스(sucrose), 아가(agar), 콘 밀(corn meal), 건조 효모(dried yeast), 프로피온산(propionic acid), 및 p-하이드록시 벤조산 메틸에스테르 용액(p-hydroxybenzoic acid methyl ester solution)으로 구성되었다.
- [0102] DAM(Drosophila activity monitoring system)은 제한된 공간인 직경 0.5 cm에 길이 6.5 cm인 투명한 DAM 바이알에 초파리를 한마리씩 넣은 후 바이알 중앙에 센서가 위치하도록 조절한 뒤 1분 간격으로 측정하였다. 사용되는 초파리는 빛의 유무와 관계없이 일주기 리듬이 정상화되었는지 확인한 후 3 또는 4%의 유청 단백질 가수분해물(WPH, hydrolysate of whey protein concentrate)이 함유된 수크로오스-아가 배지(sucrose-agar media)를 5일간 제공하였다. 초파리에서의 시료의 수면활성은 총 수면시간의 합(Total night time sleep)을 통해 분석하여 평가하였다.
- [0104] **5-2: 활성 평가 결과**
- [0105] 평가 결과를 표 4 및 도 3의 액토그램(Actogram)으로 나타내었다.
- [0106] 도 3에서 검은색 바로 표시된 부분은 밤 시간대로 오후 10시부터 오전 10시 에 해당하며, 흰색 바로 표시된 부분은 낮 시간대로 오전 10시부터 오후 10시까지에 해당한다.

표 4

[0108] 유청 단백질 가수분해물이 초파리의 총 야간 수면시간(total night time sleep time)에 미치는 영향

Sample	총 수면시간 (평균 $\pm$ 표준편차, min)
NOR(normal control group, 정상 대조군)	421.60 $\pm$ 16.35
Alcalase 3%	396.87 $\pm$ 40.44
Alcalase 4%	468.20 $\pm$ 11.70 [*]
Collupulin 3%	482.80 $\pm$ 18.44
Collupulin 4%	470.87 $\pm$ 16.80
Flavourzyme 3%	339.13 $\pm$ 21.27 [*]
Flavourzyme 4%	492.27 $\pm$ 33.77
Foodpro 3%	524.27 $\pm$ 34.38 [*]
Foodpro 4%	446.40 $\pm$ 15.49
Protamex 3%	516.27 $\pm$ 39.35
Protamex 4%	483.07 $\pm$ 37.51
Prozyme 2000P 3%	587.67 $\pm$ 32.36 ^{**}
Prozyme 2000P 4%	548.87 $\pm$ 10.89 ^{***}

[0110] 상기 표 4에서 *와 **은 각각 Student's t-test 에 의하여 정상 대조군 대비 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 를 의미한다.

- [0111] 상기 표 4에 나타난 바와 같이, 유청 단백을 Alcalase 및 Prozyme로 가수분해한 가수분해물을 4%로 처리하였을 때 총 수면시간이 NOR군 대비 유의적으로 증가하는 것으로 확인되었다($p<0.05$). 특히 유청 단백 Prozyme 가수분해물을 4%로 처리하였을 때, 수면시간이 578.87분으로 가장 긴 것으로 나타났다. 반면, Collupulin, Flavourzyme, Foodpro, 및 Protamex 가수분해물을 4%로 처리하였을 때 총 수면시간이 NOR군 대비 증가하는 경향을 보였으나 유의미한 차이는 없는 것으로 확인되었다.
- [0113] 따라서, 무척추동물 모델을 이용한 유청 단백 가수분해물의 수면활성을 평가한 결과, Prozyme을 이용한 유청 단백 가수분해물이 우수한 수면 증진 활성을 보였으므로 이후 척추동물 모델에서의 수면활성 평가를 위한 시료로 선정하였다.
- [0115] **실시예 6: 펜토바비탈(Pentobarbital) 유도 수면 모델에서의 입면시간 및 수면시간 측정**
- [0116] **6-1: 측정 방법**
- [0117] ICR 수컷 마우스(5주령)는 오리엔트바이오(Seongnam, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 모든 동물 실험은 고려대학교 동물실험윤리위원회(KUIACUC-2022-0089)의 승인을 받아 진행되었다. 사육실은 온도 $21\pm1^{\circ}\text{C}$, 상대습도 50 내지 55%, 명암의 12시간 주기를 유지하고 식수와 사료를 임의로 제공하였다. 동물은 1주일의 적응 기간 후 실험에 사용되었다. 펜토바비탈(Pentobarbital) 유도 수면 검사 전 24시간 공복 후 pentobarbital sodium(Hanlim Pharm. Co., Ltd., Seoul, Korea) 주입 40분 전에 약용식물 추출물을 경구 투여하였다. 이후 펜토바비탈을 42 mg/kg 농도로 복강 내 주입하여 입면시간(sleep latency time)과 수면시간(sleep duration time)을 측정하였다(Choi 등, 2018). 수면시간은 직립 반사가 회복될 때까지 기록하였으며, 펜토바비탈 투여 후 15분 이내에 수면이 유도되지 않은 실험 동물은 실험에서 제외하였다.
- [0119] **6-2: 측정 결과**
- [0120] 유청 단백질 농축액(whey protein concentrate)을 Alcalase 및 Prozyme으로 처리하여 제조한 가수분해물인 WPH를 150 및 300 mg/kg 경구투여하여 수면활성을 평가하였고, 결과는 도 4 및 5에 나타내었다.
- [0121] 도 4에 나타난 바와 같이, NOR군 대비 WPH 투여군에서 입면시간이 감소하는 경향을 보이는 것으로 확인되었다.
- [0122] 도 5에 나타난 바와 같이, NOR군 대비 WPH를 150 및 300 mg/kg 으로 투여하였을 때, 농도에 의존하여 유의적인 수면시간의 증가를 보이는 것으로 확인되었다($p<0.05$ 및 $p<0.01$).
- [0123] 따라서, Alcalase 및 Prozyme을 이용한 유청 단백 가수분해물을 후속 실험의 시료로 선정하였다.
- [0125] **실시예 7: SD-rat 뇌전도(Electroencephalogram, EEG) 측정을 통한 수면 구조 분석**
- [0126] **7-1: 분석 방법**
- [0127] SD-rat(250 g, 5주령) 수컷을 대한바이오링크에서 구입하여 고려대학교 보건과학대학 실험동물자원센터에서 사육하였다. 모든 실험은 고려대학교 동물실험 윤리위원회의 승인(KUIACUC-2020-0006)을 받아 진행하였다. 동물 사육실 환경 온도는 $21\pm1^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 50 내지 55%, 명암은 12시간 주기로 조절하였고 음수와 사료는 자유 급식으로 하였다.
- [0128] 수면은 램수면과 비램수면으로 구분되며, 수면시간에 램수면-비램수면 주기가 4-5회 반복되고 비램수면은 4단계로 나뉘어지며 단계가 진행함에 따라 수면이 깊어진다. 1단계 수면은 4-7 Hz의 θ wave를 보이며 차츰 전위가 낮아지고 느린 안구운동을 동반하며, 제 3,4 단계 수면에서는 고진폭의 0.5-3 Hz의 δ wave가 증가하게 되며 이러한 수면을 깊은 수면이라 부르고, δ wave가 20~50%를 차지할 때 제 3단계 수면이라 하며, 50%가 넘으면 제 4단계 수면이라고 한다(Chae, 2007).
- [0129] 양성대조군으로 벤조다이아제핀(BDZ, benzodiazepine) 0.2 mg/kg을 투여하였다. 벤조다이아제핀계 약물은 중추 신경계의 GABA성 신경전달에 영향을 주어 특징적인 뇌파 효과를 나타낼 뿐만 아니라 수면과 같은 행동 효과를 동반한다. BDZ는 이온 채널을 통해 억제성 염소 이온의 흐름을 증가시키는 GABA의 기능을 증진시켜 총 수면시간과 수면의 연속성을 증진시키는 것으로 보고되었으나 낮 동안의 졸림이나 전향적 기억 상실증을 유발하고 신체적 의존과 남용과 같은 부작용도 함께 보고 되어있다(McKernan & Whiting, 1996).
- [0130] 수술 시 이소플루란(isoflurane)을 통한 흡입마취 후 정위고정기(stereotaxic device)에 고정하여 Paxinos 및 Watson 해부도에 따라 뇌전도(Electroencephalogram, EEG) 전극을 삽입하였다. 수술이 끝난 동물은 일주일의 회복 시간을 거친 후 뇌전도 무선 송출기(EEG transmitter)를 부착하고, 시료를 경구투여한 시점을 기준으로 오전

10시부터 오후 5시까지 7시간 동안 15 mm/sec으로 뇌전도를 측정하였다.

[0131] 수면구조 분석은 FFT(Fast fourier transform) 알고리즘에 의해 수행하였으며, ecgAUTO3 프로그램(Ver. 3.3, emka Technologies, Paris, France)을 사용하였다. 뇌전도 측정 후 기준기록(baseline recording), 대조기록(control recording), 실험기록(experimental recording)을 통한 뇌파의 전위 분석으로 총 수면시간(total sleep) 및 수면의 질(sleep quality)을 분석하여 소재의 수면 유도 활성을 평가하였다. 뇌파 분석은 sleep, awake, rapid eye movement(REM) sleep, non-rapid eye movement(NREM), θ wave, δ wave로 구분하여 분석하였다.

[0132] 분석에 사용할 유청 단백 가수분해물의 농도를 결정하기 위하여, 펜토바비탈 유도 수면 모델(pentobarbital induced sleep model)에서 Alcalase 및 Prozyme에 의한 유청 단백질 가수분해물(WPH)을 각각 50, 80, 100, 150 및 200 mg/kg으로 경구투여하고 입면시간 및 수면시간을 측정하였다.

[0133] 결과는 도 6에 나타난 바와 같이, WPH 투여군에서 농도에 비례하여 유의미한 수면시간의 증가를 보였으며, 특히 80 mg/kg 이상의 농도로 투여한 경우에 NOR군 대비 수면시간이 현저하게 증가하는 것으로 확인되었다.

[0134] 따라서, 유의미한 수면시간의 증가를 보인 80 및 100 mg/kg의 농도로 EEG 분석을 통한 수면의 질 평가를 진행하였다.

[0136] 7-2: 분석 결과

[0137] SD-rat에서 Alcalase 및 Prozyme에 의한 유청 단백질 가수분해물(WPH)을 각각 80, 및 100 mg/kg 로 경구투여하여 EEG 분석을 통해 수면 구조 분석을 진행하였다.

[0138] 결과는 도 7 내지 12에 나타내었다.

[0139] 도 7 및 8에 나타난 바와 같이, 양성대조군인 BDZ 처리군에서 각성시간이 유의적으로 감소하였고 수면시간 또한 NOR군 대비 유의적으로 증가한 것으로 확인되었다. WPH 투여군의 경우 모든 농도(WPH_L : 80 mg/kg, WPH_H: 100 mg/kg)에서 NOR군 대비 각성시간이 유의적으로 감소하였으며, 수면시간 또한 유의적으로 증가한 것으로 확인되었다.

[0140] 도 9에 나타난 바와 같이, REM 수면의 경우 NOR군 대비 모든 시료군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, WPH 투여군에서 감소하는 경향이 있는 것으로 확인되었다.

[0141] 도 10에 나타난 바와 같이, NREM 수면의 경우 모든 시료군에서 유의적으로 증가하였으며, WPH 처리군에서 NREM 수면시간이 가장 긴 것으로 확인되었다.

[0142] 도 11에 나타난 바와 같이, δ -wave 수면의 경우 NOR군 대비 BDZ군에서 유의적으로 증가하였으며, WPH 투여군 모두에서 δ -wave 수면시간이 NOR군 대비 유의적으로 증가한 것으로 확인되었다. 특히 WPH 100 mg/kg 투여군에서 δ -wave 수면시간이 가장 긴 것으로 확인되었다.

[0143] 도 12에 나타난 바와 같이, θ -wave의 경우에는 BDZ군 및 WPH 80 mg/kg투여군은 NOR군 대비 유의미한 차이를 보이지 않았으나, WPH 100 mg/kg 투여군에서 θ -wave 수면시간이 유의미하게 감소한 것으로 확인되었다.

[0145] 종합하면, WPH 투여군에서 NOR군 대비 총 수면시간이 증가하였으며, NREM 수면시간 또한 유의미하게 증가한 것으로 확인되었다($p < 0.001$). 특히, NREM 수면 중에도 깊은 수면에 관여하는 δ -wave를 증진시켜 수면의 질을 향상시키는 것으로 확인되었다(도 5 내지 도 12).

[0147] 실시예 8: 카페인(Caffeine)유도 불면 모델에서 유청 단백 가수분해물(WPH)의 수면활성 평가

[0148] 8-1: 분석 방법

[0149] 불면 척추모델에서 WPH의 수면활성을 평가하였다. 실험 그룹은 각 그룹당 7마리로, 정상대조군(NOR), 음성대조군(CON, caffeine 투여군), 양성대조군(BDZ, positive control; 20 mg/kg), 및 WPH 저농도 및 고농도 투여군(WPH_L: 80 mg/kg, WPH_H: 100 mg/kg)으로 구성하였다.

[0151] 8-2: 분석 결과

[0152] 카페인 유도 불면 모델에서 펜토바비탈(pentobarbital) 유도 수면실험 결과는 도 13 및 14에 나타내었다.

[0153] 도 13에 나타난 바와 같이, 카페인만을 투여한 CON군은 정상대조군인 NOR군보다 입면시간이 유의미하게 증가하

였고($p<0.001$), 도 14에 나타난 바와 같이, 수면시간은 유의미하게 감소하는 것으로 확인되어($p<0.001$), 카페인 투여로 인해 불면 모델이 유도되었음을 확인하였다.

[0154] 도 14에 나타난 바와 같이, 양성대조군인 BDZ군에서는 CON군 대비 유의미하게 수면시간이 증가하는 것으로 확인 되었으며($p<0.001$), Alcalase 및 Prozyme이 처리된 WPH의 경우 CON군 대비 유의적으로 수면시간이 증가하였으며, 80 mg/kg의 WPH는 BDZ군과 유사하게 수면시간을 증가시키는 것으로 확인되었다($p<0.001$).

[0156] 실시예 9: 유청 단백질 가수분해물(WPH)이 수면 관련 수용체 유전자 발현량에 미치는 영향 분석

[0157] 9-1: 분석 방법

[0158] 3주간 경구투여를 진행한 ICR 마우스의 뇌에서 수면 관련 수용체 발현량 분석을 위해 qRT-PCR을 진행하였다. Endogenous housekeeping gene으로 GAPDH (NM_001290631.1)를 사용하였으며, qRT-PCR에 사용된 타겟 유전자 (target gene)의 정보는 다음과 같다: gamma-aminobutyric acid A receptor, subunit gamma 1(Gabrg1, NM_010252.4), gamma-aminobutyric acid B receptor, 1(Gabbr1, NM_019439.3), gamma-aminobutyric acid C receptor, subunit rho 2(Gabbr2, NM_008076.3) 및 5-hydroxytryptamine receptor 1A(Htr1a, NM_008308.4).

[0160] 9-2: 분석 결과

[0161] 결과는 도 15 내지 18에 나타내었다.

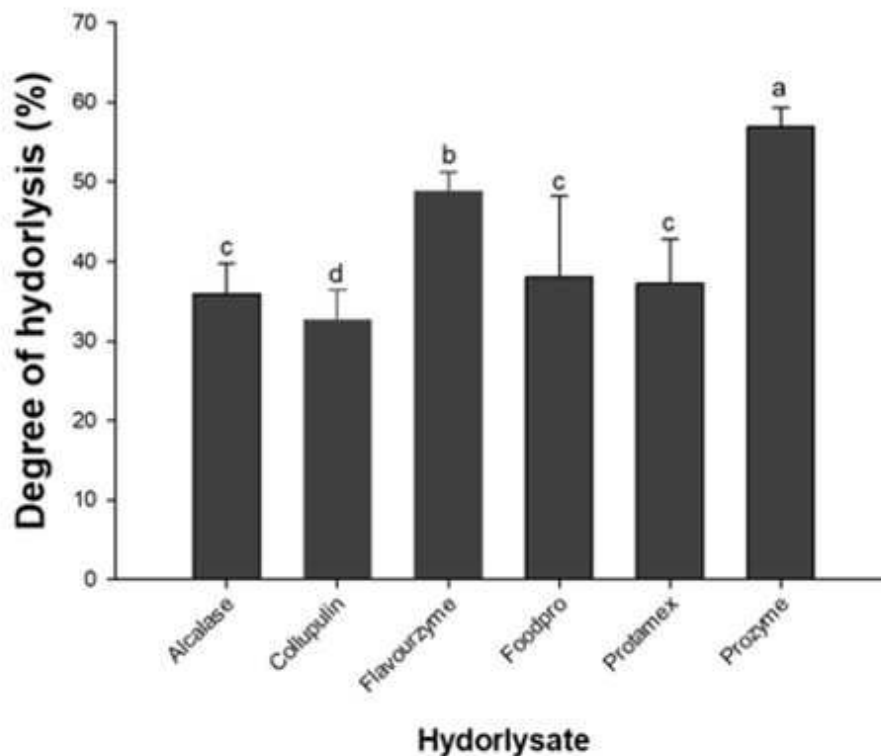
[0162] 도 15에 나타난 바와 같이, WPH를 투여한 군에서 GABA_A 수용체 유전자(Gabrg1)의 발현량이 NOR군 대비 유의미하게 증가한 것으로 확인되었다(WPH_L 및 WPH_H 각각 $p<0.01$ 및 $p<0.001$).

[0163] 또한, 도 18에 나타난 바와 같이, 세로토닌 수용체 유전자(Htr1a)의 경우, WPH 고농도 투여군(WPH_L)에서 NOR군 대비 유의미하게 발현량이 증가한 것으로 확인되었다($p<0.001$).

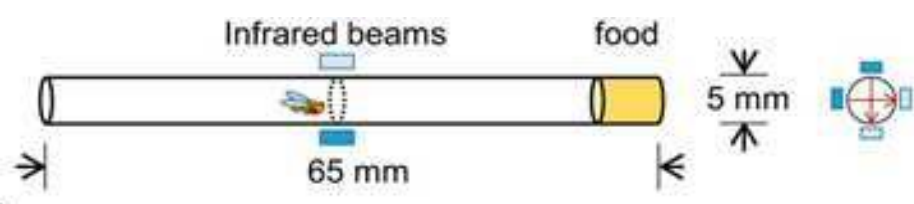
[0164] 따라서, WPH 투여 시 수면 관련 수용체 유전자의 발현량을 증가시켜, 수면장애의 개선, 예방 또는 치료에 효과가 있음을 확인하였다.

도면

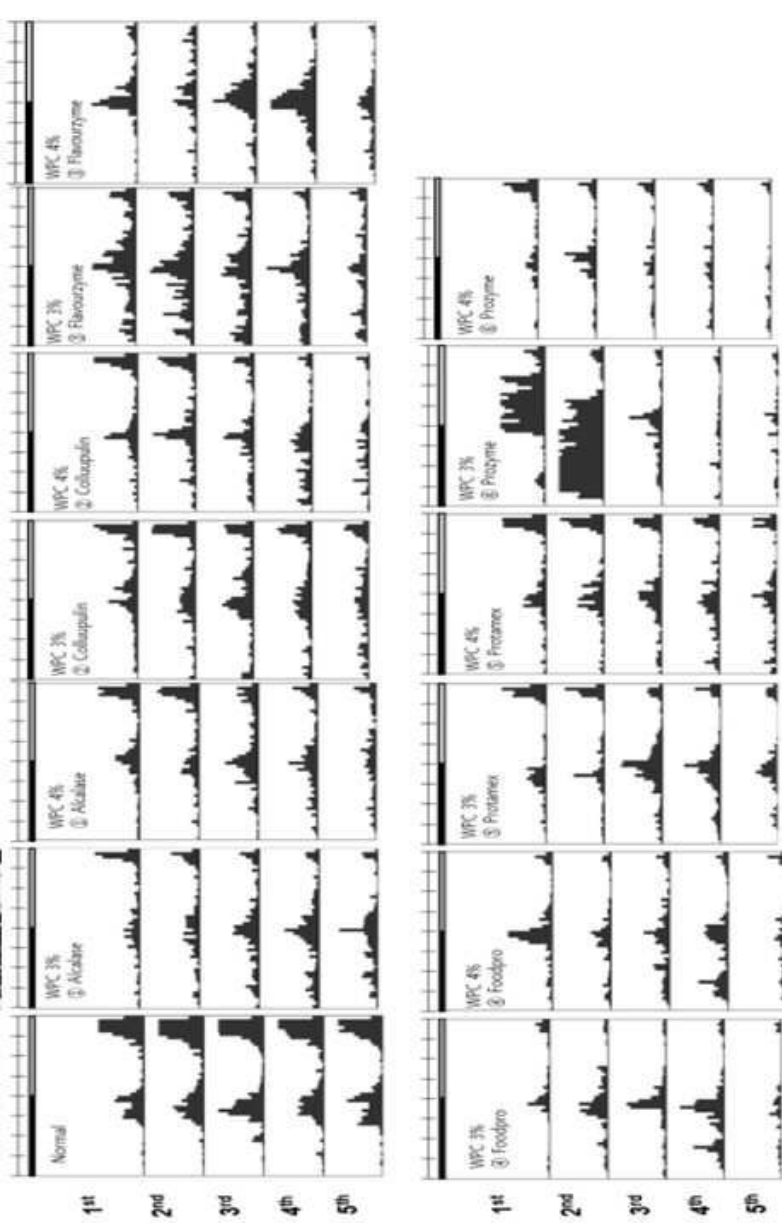
도면1



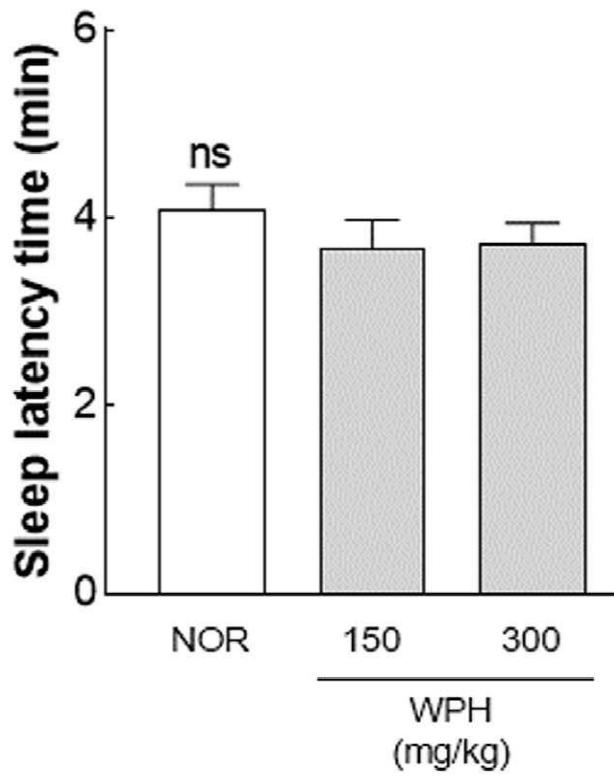
도면2



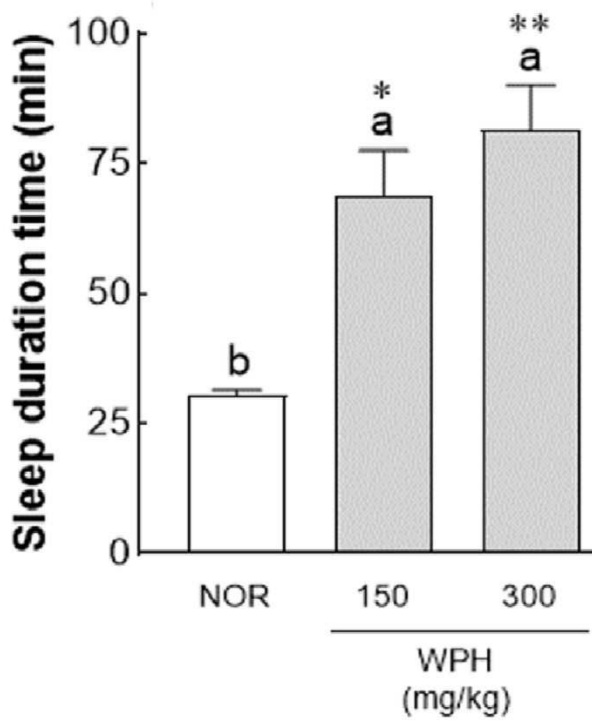
도면3



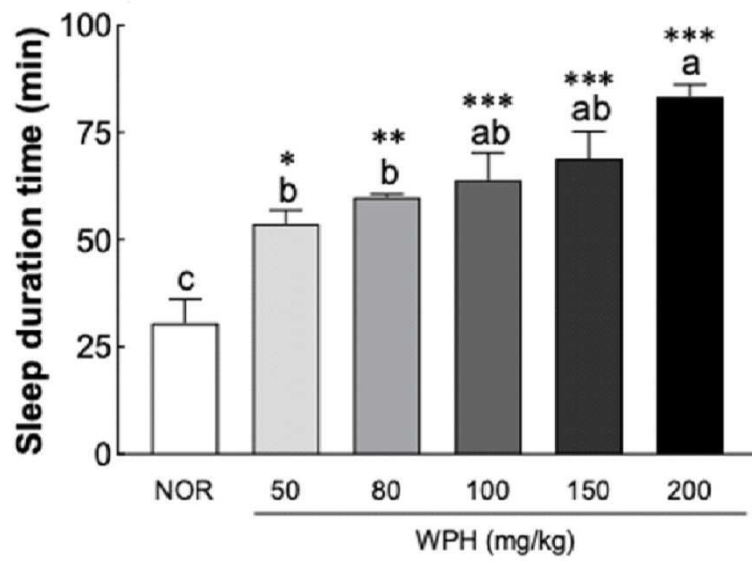
도면4



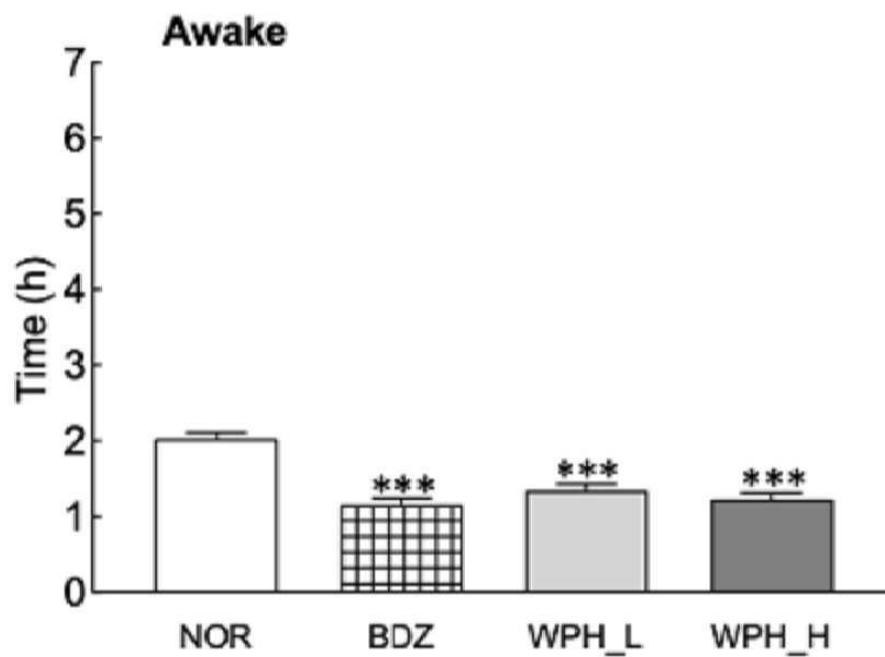
도면5



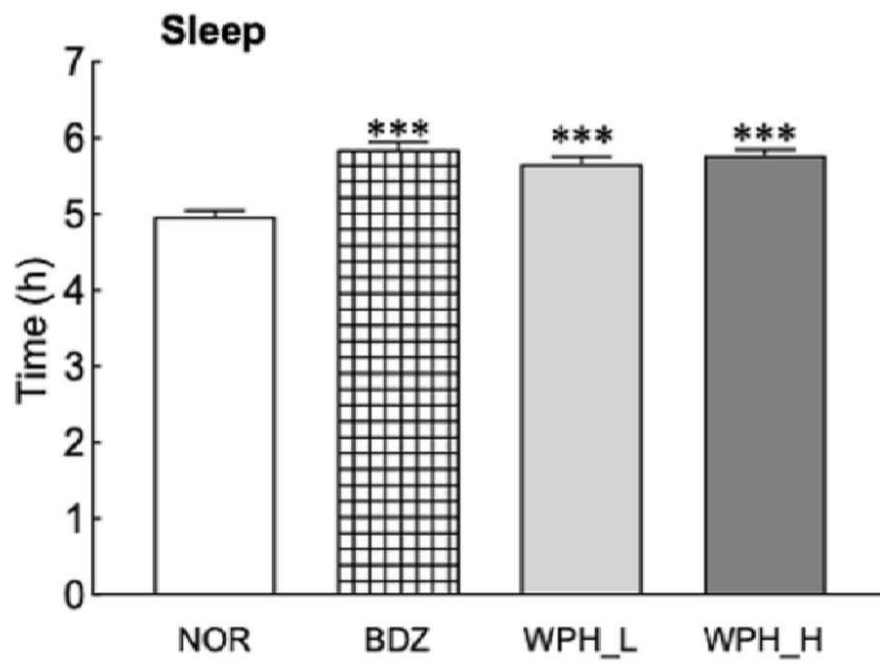
도면6



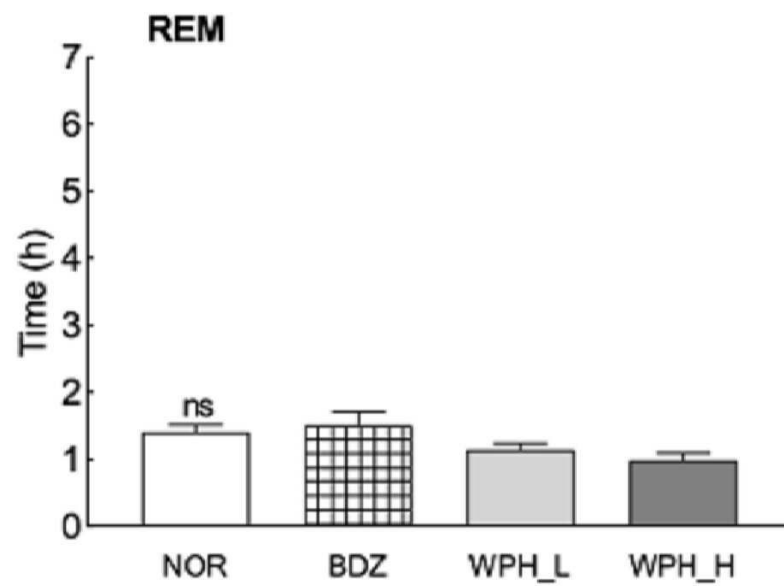
도면7



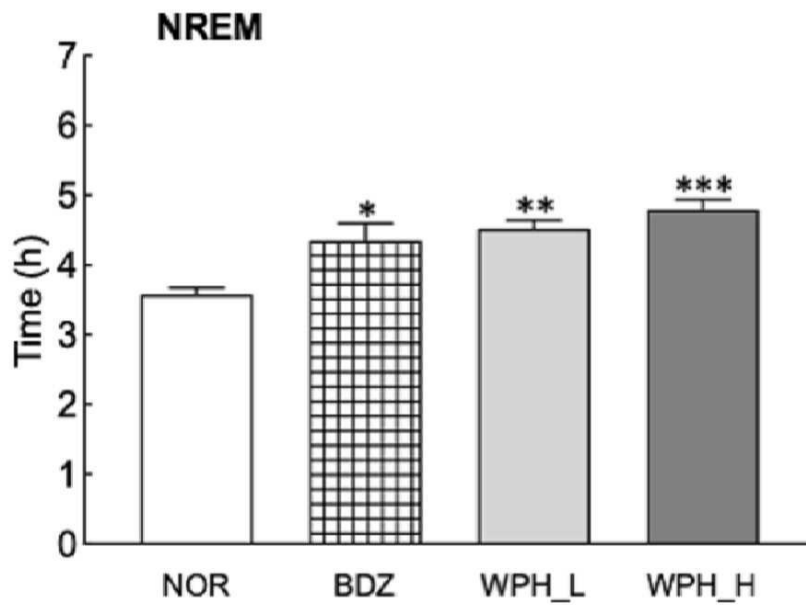
도면8



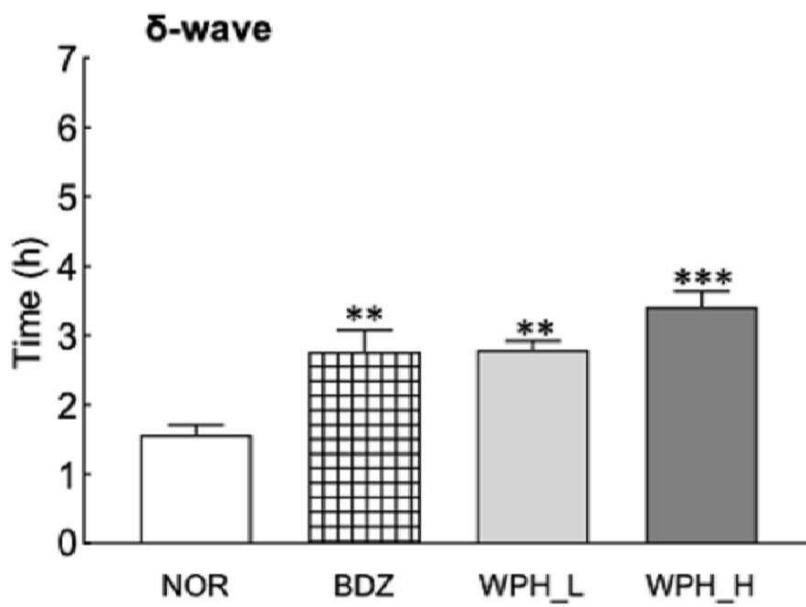
도면9



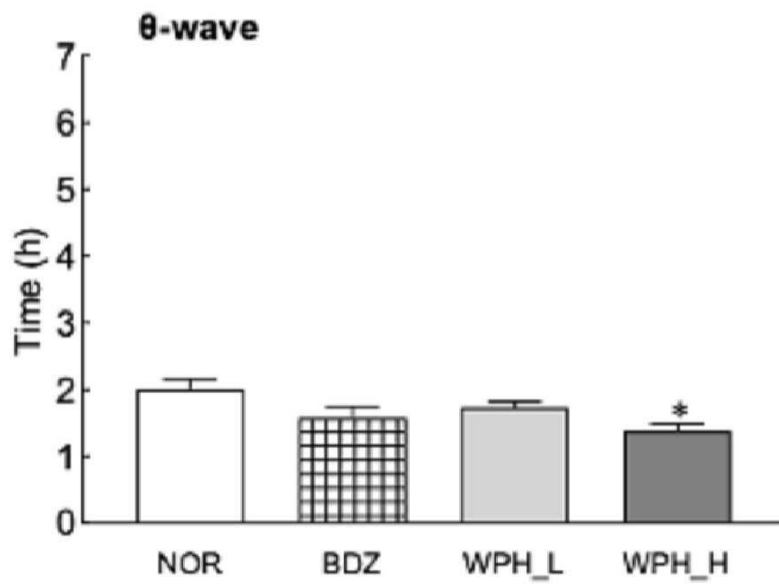
도면10



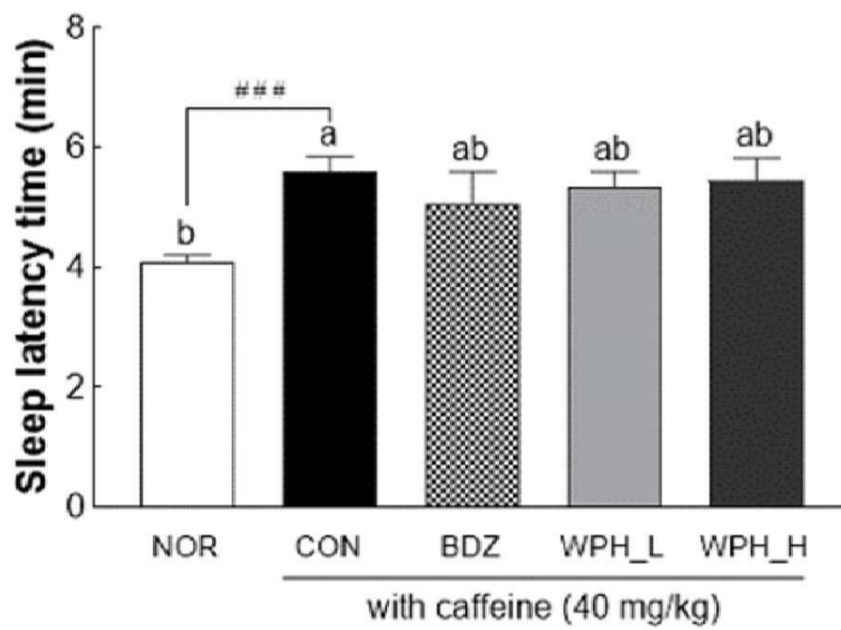
도면11



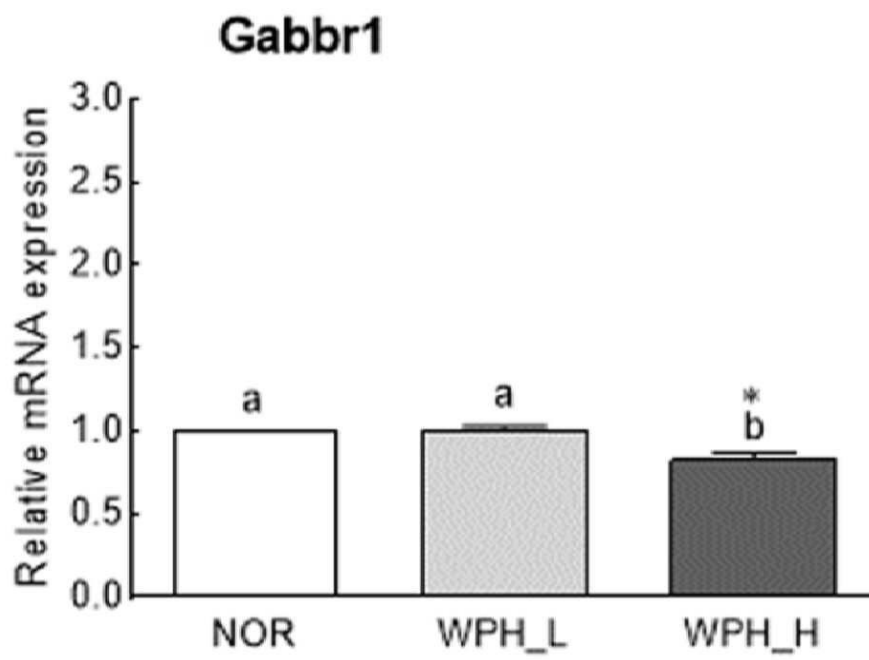
도면12



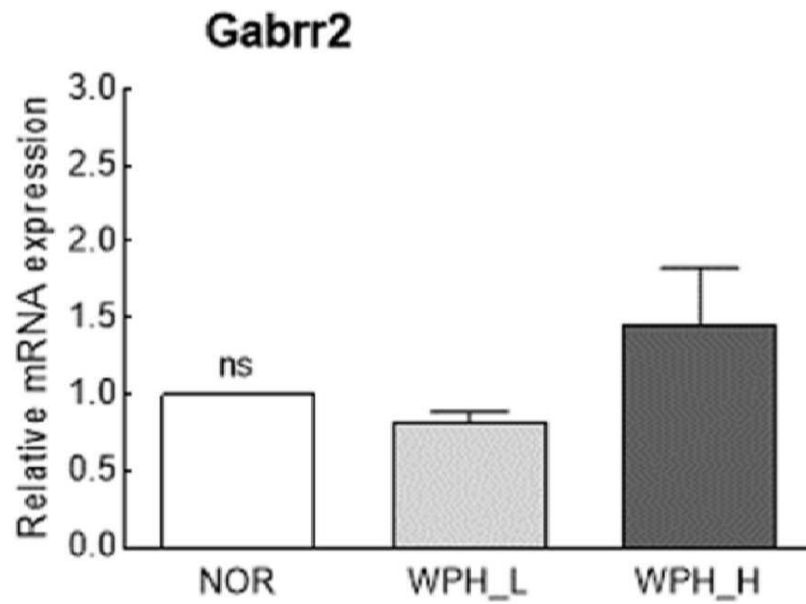
도면13



도면16



도면17



도면18

