



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년12월11일

(11) 등록번호 10-2740503

(24) 등록일자 2024년12월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 21/06 (2006.01) *A23J 1/20* (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12P 21/06 (2013.01)
A23J 1/205 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-0021379

(22) 출원일자 2024년02월14일

심사청구일자 2024년02월14일

(56) 선행기술조사문헌

US06919314 B1*

KR1020210036293 A

KR1020030046442 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

(주)네오크레마

서울특별시 강남구 도산대로89길 7, 2층 (청담동)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

서형주

서울특별시 양천구 목동서로 70, 233동 504호

장역부

서울특별시 광진구 아차산로 637, 22동 102호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

공병욱

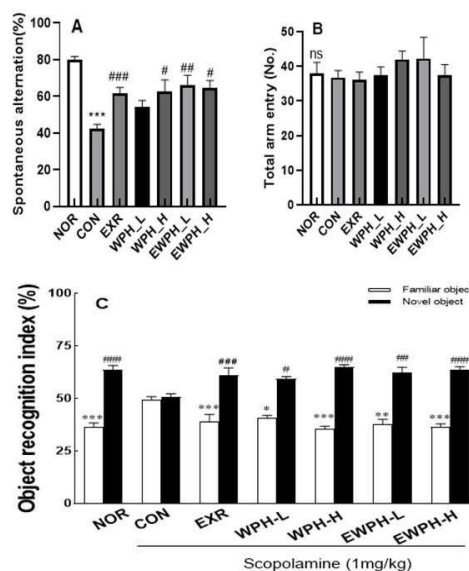
전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 **유청단백질 가수분해물 또는 유청단백질 가수분해물 유래 펩타이드를 포함하는 퇴행성 신경 질환 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 유청단백질 가수분해물 또는 유청단백질 가수분해물 유래 펩타이드를 포함하는 퇴행성 신경 질환 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드, 또는 이를 포함하는 유청단백질 가수분해물을 이용하는 경우, 퇴행성 신경질환을 효과적으로 예방, 치료 및 개선할 수 있다.

대표도 - 도11

(52) CPC특허분류

C07K 7/06 (2013.01)

(72) 발명자

한기수

서울특별시 송파구 중대로 211

김나리

서울특별시 송파구 중대로 211

서민근

서울특별시 송파구 중대로 211

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545026767

과제번호 322011042SB010

부처명 농림축산식품부

과제관리(전문)기관명 농림식품기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품기술개발

연구과제명 우유 유래 기능성 펩타이드의 대량생산 기술 확립 및 활용제품 개발

과제수행기관명 (주)네오크레마

연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 억제학적 조성물은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 유청단백질 가수분해물을 포함하는 것인, 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 유청단백질 가수분해물은 세포 생존율 상승, 산화 스트레스 완화, 세포 내 칼슘 이온 농도 감소, 세포 사멸인자 발현량 감소, 신경전달물질 발현 조절, 인지 능력 향상, 타우 단백질 인산화 감소, 또는 이들의 조합의 특성을 갖는 것인, 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 펩타이드의 함량은 유청단백질 가수분해물 총 중량을 기준으로 0.5 mg/g 내지 40 mg/g인 것인, 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 유청단백질 가수분해물은 유청단백질을 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도 프로테이스(Endo protease)로 1차 가수분해하고, 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소 프로테이스(Exo protease)로 2차 가수분해한 것인, 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도 프로테이스(Endo protease)는 알칼레이스(Alcalase), 프로타맥스(Protamex), 또는 이들의 혼합효소이고; 상기 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소 프로테이스(Exo protease)는 플라보자임(Flavourzyme)인 것인, 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 혼합효소는 알칼레이스(Alcalase)와 프로타맥스(Protamex)가 1:0.5 내지 1:2의 중량비로 혼합된 것인, 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 8

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 식품 조성물은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 유청단백질 가수분해물을 포함하는 것인, 퇴행성 신경질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유청단백질 가수분해물 또는 유청단백질 가수분해물 유래 펩타이드를 포함하는 퇴행성 신경 질환 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 최근 의학과 생명과학의 발달로 인구의 노령화가 증가함에 따라 퇴행성 질환에 대한 관심이 집중되고 있다. 대표적인 퇴행성 질환으로 기억력 장애를 일으키는 것을 인지기능장애라고 한다. 알츠하이머 병이 가장 일반적인 인지기능장애 유형이며 사회적인 문제로 대두되고 있다. 인지기능장애는 인지능력 저하 및 언어장애를 통해 일상 생활에 장애를 일으키는 특징을 가지고 있다. 인지기능장애 발생 원인이 정확하게 밝혀지지 않았으며, 일치되는 가설이 없다. 이런 이유는 여러 원인이 동시에 관여하기 때문이다. 보고된 인지기능 장애 발병 기전은 산화적 스트레스에 의한 뇌신경세포의 사멸, 신경세포의 아밀로이드 베타 단백질로 구성된 노인성 반점(senile plaque)과 과인산화된 타우 단백질로 구성된 신경섬유매듭(neurofibrillary tangle)의 축적 그리고 AchE(acetylcholinesterase)에 의한 신경 전달 물질인 아세틸콜린(Ach)의 감소 등이 있다. 현재 비타민 E와 셀레질린(Selegiline) 같은 항산화제나 AchE 억제제인 타크린(Tacrine)과 아리셉트(Aricept) 등이 치료제로 사용되고 있다. 이들 치료제는 완벽하게 치매를 치료하는 것이 아니라 치매를 늦추거나 예방하는 정도의 효과를 나타낸다. 또한 일시적인 간독성, 위장관 장애 그리고 심장 서맥 유발 등의 부작용을 일으키기 때문에 새로운 치료제의 개발이 요구되는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-2565470호 (2023.08.04 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명자들은 효과적인 퇴행성 신경 질환 치료제를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 유청단백질 가수분해물 또는 유청단백질 가수분해물 유래 펩타이드를 사용하는 경우, 효과적으로 퇴행성 신경질환을 치료할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0007] 따라서, 본 발명의 목적은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 유청단백질 가수분해물을 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 퇴행성 신경 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 유청단백질 가수분해물을 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 제공한다.
- [0015] 본 발명자들은 효과적인 퇴행성 신경 질환 치료제를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 유청단백질 가수분해물 또는 유청단백질 가수분해물 유래 펩타이드를 사용하는 경우, 효과적으로 퇴행성 신경질환을 치료할 수 있음을 규명하였다.
- [0016] 본 명세서에서, 펩타이드는 펩타이드의 C-말단 및 /또는 N-말단에 적어도 하나의 추가적인 아미노산을 포함할 수 있다. 상기의 추가적인 아미노산 잔기는 예를 들어, 생산성, 정제(purification), 생체 내 또는 생체 외에서의 안정화, 복합체의 커플링 또는 검출을 향상시키기 위한 목적으로 개별적 또는 집합적으로 추가될 수 있다. 예컨대 상기 펩타이드는 상기 펩타이드의 C-말단 및/또는 N-말단에 시스테인 잔기를 추가적으로 포함할 수 있다. 추가적인 아미노산 잔기는 정제 또는 펩타이드의 검출을 위한 "태그(tag)"를 제공할 수도 있으며, 예를 들어 그 태그는 그 태그와 특이적인 항체와의 상호작용을 위한 것이다. His₆ 태그의 경우 고정화된 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)를 위하여, His₆ 태그, (HisGlu)₃ 태그 ("HEHEHE" tag) 또는 "myc"(c-myc) 태그 또는 "FLAG" 태그와 같은 태그를 제공할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고, 서열번호 1의 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 바람직하게는 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 85%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열 비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981); Needleman and Wunsch, J. Mol. Bio. 48:443(1970); Pearson and Lipman, Methods in Mol. Biol. 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, Gene 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, CABIOS 5:151-3(1989); Corpet et al., Nuc. Acids Res. 16:10881-90(1988); Huang et al., Comp. Appl. BioSci. 8:155-65(1992) and Pearson et al., Meth. Mol. Biol. 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10(1990))은 NCBI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastn, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다.

- [0018] 본 발명에서 이용되는 펩타이드로서, 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 균등한 생물학적 활성을 발휘하는 아미노산 서열 변이체인 생물학적 기능 균등물도 이용될 수 있다. 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 갖으며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.
- [0019] 변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스(hydrophathy index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 아이소루이신(+4.5); 발린(+4.2); 루이신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스테인(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글라이신(-0.4); 쓰레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 타이로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르테이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5). 단백질의 상호적인 생물학적 기능(interactive biological function)을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 인덱스는 매우 중요하다. 유사한 소수성 인덱스를 가지는 아미노산으로 치환하여야 유사한 생물학적 활성을 보유할 수 있다는 것은 공지된 사실이다. 소수성 인덱스를 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.
- [0020] 한편, 유사한 친수성 값(hydrophilicity value)을 가지는 아미노산 사이의 치환이 균등한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 초래한다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제4,554,101호에 개시된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 부여되어 있다: 아르기닌(+3.0); 라이신(+3.0); 아스파르테이트(+3.0 ± 1); 글루타메이트(+3.0 ± 1); 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글라이신(0); 쓰레오닌(-0.4); 프롤린(-0.5 ± 1); 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 루이신(-1.8); 아이소루이신(-1.8); 타이로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5); 트립토판(-3.4). 친수성 값을 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 친수성 값 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.
- [0021] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.
- [0022] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 유청단백은 일반유청분말(Normal whey powder), 탈염유청분말(Demineralized whey powder), 유청단백 농축물(Whey protein concentrate) 또는 유청단백 분리물(Whey protein isolate)일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 펩타이드는 세포 사멸인자 발현량 감소, 세포 내 칼슘이온 농도 감소, 또는 이들의 조합의 특성을 갖는 것이다.
- [0024] 본 명세서의 용어 '발현'은 단백질의 발현 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현을 의미하며, "유전자 발현"은 유전자가 폴리뉴클레오티드로 전사, 폴리펩티드로의 번역, 또는 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드의 변형(예컨대, 폴리펩티드의 번역 후 변형을 포함)을 지칭할 수 있다. "발현된 유전자"는 유전자가 mRNA로서 전사되고, 이어서 폴리펩티드로 번역되는 것, 또는 RNA로 전사되지만 폴리펩티드로 번역되지 않는 것(예컨대, tRNA 및 rRNA)을 포함한다.
- [0025] 본 명세서에서 용어 유전자 또는 단백질의 발현 억제 또는 감소는 시험군에서 유전자 또는 단백질의 발현 정량 값이 대조군에 비하여 측정 가능할 정도로 감소한 경우를 의미한다. 예를 들어, 시험군에서 대조군에 비해 유전자 또는 단백질의 발현량이 90% 이하인 경우, 80% 이하인 경우 또는 70% 이하인 경우를 의미할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0027] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 제공한다.
- [0028] 본 명세서에서 용어 "핵산 분자"는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변

형된 유사체(analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).

- [0029] 본 발명의 상기 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열인 것으로 족하며, 어느 특정 뉴클레오타이드 서열에 한정되지 않는다는 것은 당업자에게 자명하다.
- [0030] 이는 뉴클레오타이드 서열의 변이가 발생하더라도 변이된 뉴클레오타이드 서열을 단백질로 발현하면 단백질 서열에서 변화를 가져오지 않는 경우도 있기 때문이다. 이를 코돈의 축퇴성이라고 한다. 따라서 상기 뉴클레오타이드 서열은 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈 (예를 들어, 코돈의 축퇴성에 의해, 아르기닌 또는 세린에 대한 코돈은 여섯 개이다), 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0031] 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자는 상기한 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 61%의 상동성, 보다 바람직하게는 70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.
- [0033] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0034] 본 명세서에서 용어 "벡터"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단으로 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 그리고 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터 등을 포함한다.
- [0035] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터에서 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자는 상기 벡터의 프로모터와 작동적으로 결합(operatively linked)되어 있다.
- [0036] 본 명세서에서, 용어 "작동적으로 결합"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사 조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [0037] 본 발명의 재조합 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., *Molecular Cloning*, 2nd Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0038] 본 발명의 벡터는 전형적으로 유전자 클로닝을 위한 벡터 또는 단백질의 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다.
- [0039] 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터, 베타 액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈 프로모터 및 사람 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터 엡스타인 바 바이러스(EBV)의 프로모터 및 로우스 사코마 바이러스(RSV)의 프로모터)가 이용될 수 있으며, 이들은 일반적으로 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 갖는다.
- [0040] 본 발명의 벡터는 그로부터 발현되는 펩타이드 또는 단백질의 정제를 용이하게 하기 위하여, 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은 예컨대, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), FLAG(IGI, USA) 및 6-His(hexahistidine; Qiagen, USA) 등이 있다.
- [0041] 한편, 본 발명의 발현 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 제네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [0043] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일 구현예에 있어

서, 상기 숙주 세포는 상기 재조합 벡터로 형질전환된 것이다.

- [0044] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 있으며, 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있다. 예컨대, 상기 벡터의 적합한 진핵세포 숙주 세포는 원숭이 신장 세포7(COS7: monkey kidney cells), NSO 세포, SP2/0, 차이니스 햄스터 난소(CHO: Chinese hamster ovary) 세포, W138, 어린 햄스터 신장(BHK: baby hamster kidney) 세포, MDCK, 골수종 세포주, HuT 78 세포 및 HEK-293 세포를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0045] 본 명세서에서 용어 "형질전환된", "형질도입된" 또는 "형질감염된" 은 외인성 핵산이 숙주세포 내로 전달되거나 도입되는 과정을 지칭한다. "형질전환된", "형질도입된" 또는 "형질감염된" 세포는 외인성 핵산으로 형질전환, 형질도입 또는 형질감염된 세포이며, 상기 세포는 당해 세포 및 그의 계대 배양으로 인한 자손 세포를 포함한다.
- [0047] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0048] 본 명세서의 용어 '예방'은 질환 또는 질환 상태의 방지 또는 보호적인 치료를 의미한다. 본 명세서의 용어 '치료'는 질환 상태의 감소, 억제, 진정 또는 근절을 의미한다. 예를 들면, 치료제를 대상체에 투여함으로써 초래되는 질환의 확산 또는 악화를 최소화하는 것을 의미한다.
- [0049] 본 명세서의 용어 "대상체" 또는 "환자"는 인간, 돼지, 침팬지, 개, 고양이, 소, 마우스, 토끼 또는 래트를 포함하는 동물, 바람직하게는 포유동물을 지칭한다.
- [0050] 본 발명의 약학 조성물은 분말, 과립, 정제, 피복정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 현탁액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 좌약, 관장제, 에멀전제, 페이스트제(pastes), 연고제, 크림제, 로션제, 산제, 분무제 또는 현탁액으로 제형화될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 팜물유 등이다.
- [0052] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비용, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 상기 조성물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 펩타이드가 암의 치료에 유용한 혈중 농도가 되도록 충분한 양을 1일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.
- [0053] 상기 조성물의 투여량은 투여 경로, 질병의 정도, 성별 체중, 나이 등에 따라 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.001 내지 100mg/kg(체중)이고 상술한 투여량의 약제학적 조성물을 적용을 원하는 부위에 대해, 적용 목적에 따라 국소적으로 적용할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 약제학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 뇌내 투여, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼 점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다. 바람직하게는, 정맥 주사일 수 있다.
- [0056] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0057] 본 명세서에서, '퇴행성 신경질환'은 신경세포의 기능 감소 또는 신경세포 사멸에 의해 나타나는 운동조절능력, 인지기능, 지각기능, 감각기능 및 자율신경의 기능 이상을 의미하며, '퇴행성 뇌질환'과 동일한 의미로 사용된

다. 상기

- [0058] 퇴행성 신경질환은 임상적 특징으로 분류할 수 있다. 주요 증상으로 진행성 인지기능 장애를 나타내는 질환에는, 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 치매(전두측두엽치매(frontotemporal degeneration), 루이소체 치매(Lewy body dementia), 피질기저퇴행증(corticobasal degeneration) 등이 있고, 진행성 운동실조를 나타내는 질환에는 파킨슨병, 다계통위축증(multiple system atrophy), 헌팅턴병(Huntington's disease), 진행성핵상마비(progressive supranuclear palsy) 등이 있다. 근력저하 및 근위축 증상을 나타내는 신경퇴행성 질환으로는 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 척수성근위축증(Spinal Muscular Atrophy, SMA) 등이 있다.
- [0059] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 퇴행성 신경질환은 파킨슨병, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 경도인지장애(mild cognitive impairment), 대뇌 아밀로이드 맥관병증, 다운 증후군, 아밀로이드성 뇌졸중(stroke), 전신성 아밀로이드병, 노인성 치매, 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 척수소뇌성 운동실조증(spinocerebellar atrophy), 뚜렛 증후군(Tourette's syndrome), 프리드리히 보행실조(Friedrich's ataxia), 루이소체치매(Lewy Body dementia), 진행성핵상마비(progressive supranuclear palsy) 및 전두측두엽치매(frontotemporal dementia)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0061] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 유청단백질 가수분해물을 포함하는 것이다.
- [0062] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 유청단백질 가수분해물은 세포 생존율 상승, 산화 스트레스 완화, 세포 내 칼슘 이온 농도 감소, 세포 사멸인자 발현량 감소, 신경전달물질 발현 조절, 인지 능력 향상, 타우 단백질 인산화 감소, 또는 이들의 조합의 특성을 갖는 것이다.
- [0063] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 펩타이드의 함량은 유청단백질 가수분해물 총 중량을 기준으로 0.5 mg/g 내지 40 mg/g인 것이다.
- [0064] 보다 구체적으로, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드의 함량은 유청단백 가수분해물 총 중량을 기준으로 0.5 mg/g 내지 40 mg/g, 0.5 mg/g 내지 25 mg/g, 0.5 mg/g 내지 15 mg/g, 0.5 mg/g 내지 10 mg/g, 0.5 mg/g 내지 8 mg/g, 0.5 mg/g 내지 7 mg/g, 0.5 mg/g 내지 6 mg/g, 1.0 mg/g 내지 40 mg/g, 1.0 mg/g 내지 25 mg/g, 1.0 mg/g 내지 15 mg/g, 1.0 mg/g 내지 10 mg/g, 1.0 mg/g 내지 8 mg/g, 1.0 mg/g 내지 7 mg/g, 1.0 mg/g 내지 6 mg/g, 1.5 mg/g 내지 40 mg/g, 1.5 mg/g 내지 25 mg/g, 1.5 mg/g 내지 15 mg/g, 1.5 mg/g 내지 10 mg/g, 1.5 mg/g 내지 8 mg/g, 1.5 mg/g 내지 7 mg/g, 1.5 mg/g 내지 6 mg/g, 2.0 mg/g 내지 40 mg/g, 2.0 mg/g 내지 25 mg/g, 2.0 mg/g 내지 15 mg/g, 2.0 mg/g 내지 10 mg/g, 2.0 mg/g 내지 8 mg/g, 2.0 mg/g 내지 7 mg/g, 2.0 mg/g 내지 6 mg/g, 3.0 mg/g 내지 40 mg/g, 3.0 mg/g 내지 25 mg/g, 3.0 mg/g 내지 15 mg/g, 3.0 mg/g 내지 10 mg/g, 3.0 mg/g 내지 8 mg/g, 3.0 mg/g 내지 7 mg/g, 3.0 mg/g 내지 6 mg/g, 4.0 mg/g 내지 40 mg/g, 4.0 mg/g 내지 25 mg/g, 4.0 mg/g 내지 15 mg/g, 4.0 mg/g 내지 10 mg/g, 4.0 mg/g 내지 8 mg/g, 4.0 mg/g 내지 7 mg/g, 또는 4.0 mg/g 내지 6 mg/g인 것일 수 있다.
- [0065] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 유청단백질 가수분해물은 유청단백질을 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도 프로테이스(Endo protease)로 1차 가수분해하고, 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소 프로테이스(Exo protease)로 2차 가수분해한 것이다.
- [0066] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도 프로테이스(Endo protease)는 알칼레이스(Alcalase), 프로타맥스(Protamex), 또는 이들의 혼합효소이고; 상기 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소 프로테이스(Exo protease)는 플라보자임(Flavourzyme)인 것이다.
- [0067] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 혼합효소는 알칼레이스(Alcalase)와 프로타맥스(Protamex)가 1:0.5 내지 1:2의 중량비로 혼합된 것이다. 보다 구체적으로, 상기 혼합효소는 알칼레이스(Alcalase)와 프로타맥스(Protamex)가 1:0.5 내지 1:2, 1:0.5 내지 1:1.75, 1:0.5 내지 1:1.5, 1:0.5 내지 1:1.25, 1:0.5 내지 1:1, 1:0.75 내지 1:2, 1:0.75 내지 1:1.75, 1:0.75 내지 1:1.5, 1:0.75 내지 1:1.25, 1:0.75 내지 1:1, 1:1 내지 1:2, 1:1 내지 1:1.75, 1:1 내지 1:1.5, 또는 1:1 내지 1:1.25의 중량비로 혼합된 것일 수 있다.
- [0069] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0070] 본 발명의 식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 등의 형태로 제조될 수 있다. 예컨대 캔디류의 각

중 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 또는 건강보조 식품류 등이 있다.

[0071] 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 서열번호 1로 표시되는 아미노산으로 이루어진 펩타이드 또는 서열번호 1로 표시되는 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 포함하는 유청단백 가수분해물을 첨가하여 첨가하여 제조될 수 있다. 또한, 본 발명의 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 아미노산으로 이루어진 펩타이드 또는 서열번호 1로 표시되는 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 포함하는 유청단백 가수분해물을 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다.

[0072] 본 발명의 식품 조성물은 장기 복용할 수 있다.

[0073] 본 발명의 식품 조성물의 유효 성분의 혼합양은 그의 사용 목적(예방, 개선 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 유청 가수분해물은, 식품 또는 음료의 제조 시에 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 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0074] 본 발명의 식품 조성물은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 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 서열번호 1로 표시되는 아미노산으로 이루어진 펩타이드 또는 서열번호 1로 표시되는 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 포함하는 유청단백 가수분해물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0075] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 식품 조성물은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 유청단백질 가수분해물을 포함하는 것이다.

발명의 효과

[0077] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0078] (a) 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 제공한다.

[0079] (b) 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0080] (c) 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 유청단백질 가수분해물을 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0081] (d) 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0082] (e) 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 유청단백질 가수분해물을 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0083] (f) 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드, 또는 이를 포함하는 유청단백질 가수분해물을 이용하는 경우, 퇴행성 신경질환을 효과적으로 예방, 치료 및 개선할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0085]

도 1a는 유청 단백질 가수분해물의 Q-Sepharose HiL0ad 16/10 컬럼 크로마토그래피를 나타낸다. 도 1b는 분획 Ex1~Ex7이 Ca^{2+} 유입에 미치는 영향을, 도 1c는 Ex4의 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를. 도 1d는 분획 S14~S21이 Ca^{2+} 유입에 미치는 영향을, 도 1e는 펩타이드 LDIQK(서열번호 1)의 MS/MS 스펙트럼을, 도 1f는 펩타이드 LDIQK(서열번호 1)의 아미노산 서열 및 화학 구조를 나타낸다.

도 2는 펩타이드 LDIQK(서열번호 1) (A) 및 유청단백질 가수분해물(B)의 HPLC 크로마토그램을 나타낸다.

도 3은 HT22 세포에서 WPC 가수분해물이 세포 생존력에 미치는 영향을 나타낸다. NOR, 정상; CON, 대조군; WPC, 유청 단백질 농축물. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 표시된다. 다른 기호는 유의미한 *** $p < 0.001$ 대비 NOR 그룹, ### $p < 0.001$ 대비 CON 그룹을 나타낸다.

도 4는 유청단백질 가수분해물이 H_2O_2 에 의한 산화적 손상 HT22 세포에서 ROS 생성에 미치는 영향을 분석한 것이다. NOR, 정상; CON, 대조군; WPC, 유청 단백질 농축액. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 표시된다. 다른 기호는 유의한 *** $p < 0.001$ 대비 NOR 그룹, ### $p < 0.001$ 대비 CON 그룹을 나타낸다. 일원분산분석(ANOVA) 후 사후 투기 검정을 실시했다.

도 5는 유청단백질 가수분해물이 H_2O_2 에 의한 산화적 손상 HT22 세포의 Ca^{2+} 에 미치는 영향을 나타낸다. NOR, 정상; CON, 대조군; WPC, 유청 단백질 농축물. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 표시된다. 다른 기호는 유의한 *** $p < 0.001$ 대비 NOR 그룹, ### $p < 0.001$ 대비 CON 그룹을 나타낸다.

도 6은 펩타이드 LDIQK(서열번호 1)의 세포 내 칼슘 농도에 미치는 영향을 분석한 것을 나타낸다. NOR, 정상; CON, 대조군. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 표시된다. 다른 기호는 *** $p < 0.001$ 대비 NOR 그룹, # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ 대비 CON 그룹을 나타낸다.

도 7은 유청단백질 가수분해물이 HT22 세포에서 H_2O_2 에 의한 세포사멸 반응에 미치는 영향을 분석한 것이다. NOR, 정상; CON, 대조군; WPC, 유청 단백질 농축액. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 표시된다. 다른 기호는 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 대비 NOR 그룹, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ 대비 CON 그룹을 나타낸다.

도 8은 HT22 세포에서 H_2O_2 에 의한 세포사멸 반응에 대한 펩타이드 LDIQK(서열번호 1)의 효과를 분석한 것이다. NOR, 정상; CON, 대조군. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 표시된다. 다른 기호는 *** $p < 0.001$ 대비 NOR 그룹, # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ 대비 CON 그룹을 나타낸다.

도 9는 유청단백질 가수분해물이 신경전달물질의 발현에 미치는 영향을 나타낸다.

도 10은 유청단백질 가수분해물이 항산화 관련 인자의 발현에 미치는 영향을 나타낸다.

도 11은 유청단백질 가수분해물과 트레드밀 운동이 인지 능력 개선에 미치는 영향을 나타낸다.

도 12는 유청단백질 가수분해물과 트레드밀 운동이 ROS와 MDA에 미치는 영향을 분석한 것이다. NOR, 정상; CON, 대조군; WPC, 유청 단백질 농축물. 데이터는 평균 $\pm$ SE로 표시된다. 다른 기호는 유의한 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 을 나타낸다. *** $p < 0.001$ vs. NOR 그룹, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. CON 그룹.

도 13은 유청단백질 가수분해물과 트레드밀 운동이 아세틸콜린 함량, AChE 활성 및 ChAT 단백질 수치에 미치는 영향을 분석한 것이다. NOR, 정상; CON, 대조군; WPC, 유청 단백질 농축물. 데이터는 평균 $\pm$ SE로 표시된다. 다른 기호는 유의한 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 을 나타낸다. *** $p < 0.001$ vs. NOR 그룹, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. CON 그룹.

도 14는 유청단백질 가수분해물이 세포사멸 인자의 발현에 미치는 영향을 나타낸다.

도 15는 유청단백질 가수분해물 처리시 MAPK pathway에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸다.

도 16 내지 도 18은 유청단백질 가수분해물과 트레드밀 운동이 장내 미생물 군집에 미치는 영향을 나타낸 것이다. NOR, 정상; CON, 대조군; WPC, 유청 단백질 농축물. 데이터는 평균 $\pm$ SE로 표시된다. 다른 기호는 유의미한 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 을 나타낸다. *** $p < 0.001$ vs. NOR 그룹, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. CON 그룹.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0086] 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.
- [0088] 실시예
- [0089] 실시예 1: 재료 및 방법
- [0090] 1-1. 시약 및 재료
- [0091] 세포 배양액으로 사용되는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), L-glutamate, 0.25% trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin(P/S)은 Welgene사 (Welgene, Gyeonsan-si, Korea)으로부터 구입하였다. H_2O_2 는 Sigma(St. Louis, U.S.A)으로부터 구입하였다.
- [0093] 1-2. 유청단백질 가수분해물 제조
- [0094] 유청단백질의 가수분해를 위한 효소는 1차 분해효소로 0.2% 알칼레이스(Alcalase)와 0.2%의 프로타멕스(Protamex)를 사용하여 50~55℃에서 4시간 가수분해하여 1차 가수분해물을 얻었다. 1차가수분해물은 0.2% 플레이버자임(Flavourzyme)을 사용하여 50~55℃에서 15시간 가수분해하여 2차 가수분해물을 얻었다. 2차 가수분해물은 90℃에서 10분동안 효소를 실활시킨 후 실온으로 냉각시켰다. 2차 가수분해물을 1 μ m의 하우징 필터로 여과하고 90℃에서 30분 동안 살균처리한 후 inlet 온도 190 $\pm$ 10℃, outlet 온도 95 $\pm$ 5℃에서 분무건조하였다. 분무건조물은 8,000 GAUS의 자석봉으로 금속 이물질을 제거한 후 포장하여 분석용 시료로 사용하였다.
- [0096] 1-3. 아미노산 조성분석
- [0097] 구성아미노산 조성은 유청단백질 가수분해물을 산가수분해법으로 분해한 후 아미노산 자동분석기로 조성을 측정하였다. 즉 유청단백질 가수분해물 25 mg을 캡 튜브(cap tube)에 정확히 칭량하여 넣은 후 2.5 mL의 6 N HCl을 가하고 110℃에서 24시간 가수분해하였다. 3G-4 glass filter로 미가수분해물질을 제거한 여액은 회전진공증발기(N-1110, EYELA, Tokyo, Japan)로 50℃에서 완전히 용매를 휘발시킨 후 0.01 N HCl를 사용하여 25 mL로 정용하여 아미노산 분석용 시료로 사용하였다. 아미노산 분석은 시료 용액 40 μ L를 주입하여 아미노산 자동분석기(Biochrom 30, Cambridge, UK)로 분석하였다.
- [0099] 1-4. 유청단백질 가수분해물의 분리 및 정제
- [0100] 유청단백질 가수분해물 펩타이드를 음이온교환크로마토그래피, 젤여과크로마토그래피와 역상크로마토그래피를 사용하여 단계별로 분리정제하였다. Q-Sepharose HiLoad 16/10 이온크로마토그래피 칼럼으로 유청단백질의 펩타이드를 0.6M NaCl을 포함한 25 mM Tris-Cl (pH 8.0)용매로 균배용출하여 분리한 결과, 총 7개의 분획을 얻었으며, 그 중 EX-4 분획을 Superdex peptide 10/30 칼럼에 1 mL 주입하여 hplc급 증류수로 용출하면서 280 nm와 220 nm에서 용출하는 피크를 검출하였다. 젤여과크로마토그래피에서 얻은 활성 분획물 EX-4/S16 을 speed vac에서 용매를 완전히 증발시키고 source 5 RPC ST칼럼(4.6x150, 4.5 μ m)에서 각각 100~300 μ L의 0.1% TFA를 포함하는 acetonitrile용매에 용해하여 280 nm와 220 nm에서 용출하는 피크를 검출하여 펩타이드를 분리하였다.
- [0102] 1-5. HT22 세포배양 및 세포생존율 평가
- [0103] 해마 유래 HT22 신경세포(mouse hippocampus-derived neuronal cells)는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 10% FBS(fetal bovine serum), 1% penicillin-streptomycin(P/S), 및 1% L-glutamate를 함유한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지를 사용하여 인큐베이터(5% CO_2 , 37 °C)에서 배양하였다.
- [0104] 유청 단백질 가수분해물의 H_2O_2 에 의한 세포 사멸 억제 효과를 평가하기 위해 96-웰 플레이트에 1×10^4 cells/mL의 농도로 시딩하고 유청단백질 농축물(whey protein concentrate, WPC) 및 탈지유(skim milk) 가수분해물을 농도별 (50, 100, 200, 400, 및 800 μ g/mL)로 처리하였다. 시료 처리 2시간 뒤에 300 μ M의 H_2O_2 를 처리하여 산화적 스트레스를 유도하였다. H_2O_2 처리 후 24시간 뒤에 WST-1 assay를 통해 세포 생존율을 평가하였다.
- [0106] 1-6. ROS (Reactive Oxygen Species) 분석 (세포)

- [0107] 유청단백질 가수분해물의 ROS 소거활성을 측정하기 위하여 HT22 세포주를 이용하여 2,7-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA) assay를 실시하였다. HT22 세포주를 6 웰 플레이트에 1×10^5 cells/mL로 분주하여 37° C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 배양하였다. WPC 가수분해물을 농도별(50, 100, 및 200 µg/mL)로 처리하여 2시간 배양한 뒤 300 µM H₂O₂를 처리하고 24시간 동안 배양하였다. ROS의 양을 측정하기 위하여 DMSO로 희석된 10 µM DCF-DA 시약을 처리하여 30분간 배양하고 상등액을 취해 형광 플레이트로 옮긴 후 fluorescence microplate reader를 사용하여 형광강도 (excitation 485 nm, emission 535 nm)를 측정하였다.
- [0109] 1-7. 세포 내 Ca²⁺ 측정
- [0110] HT22 세포에 존재하는 세포내 Ca²⁺의 농도는 Ca²⁺에 민감하게 반응하는 형광물질인 Fura-2AM을 사용하여 측정하였다. HT22 세포주를 6 웰 플레이트에 1×10^5 cells/mL로 분주하여 37° C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 배양하였다. 유청단백질 가수분해물(50, 100, 및 200 µg/mL)과 LDIQK 펩타이드(1.25, 2.5, 5, 및 10 µg/mL)를 처리하여 2시간 배양한 뒤 300 µM H₂O₂를 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 이후 HT22 세포에 20 µM의 Fura-2AM 10µl를 투여한 후 1 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건의 CO₂ 배양기에서 반응시켰다. 1 시간 반응 후 배지를 제거하였고 PBS로 3 회 세척한 후 1.0%의 triton X-100으로 세포를 37°C에서 15 분간 녹여 내었다. 녹여낸 용액을 96 웰 플레이트에 옮겨 담고 fluorescence microplate reader를 사용하여 형광강도 (excitation 340 nm, emission 510 nm)를 측정하였다.
- [0112] 1-8. 웨스턴 블랏 (세포 실험)
- [0113] HT22 세포주를 6 웰 플레이트에 1×10^5 cells/mL로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 배양하였다. 유청단백질 가수분해물을 농도별(50, 100, 및 200 µg/mL)로 처리하여 2시간 배양한 뒤 300 µM H₂O₂를 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 이후 용해 버퍼 [200 mM Tris (pH8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM NaF, 1% NP40, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, proteaseinhibitorcocktail] 600 µL을 넣어 균질화한 후 원심분리 (12,000 rpm, 5 min, 4° C)하여 상층액을 회수하였다.
- [0114] 샘플은 BCA method로 단백질 정량 후 30 µg의 단백질을 10% SDS-PAGE에서 전기영동을 진행하였다. PVDF membrane에 transfer 시킨 후 5% 탈지유(skim milk)및 소 혈청 알부민(bovine serum albumin)으로 1시간 블로킹(blocking)을 거치고 1차 항체[Beta-actin(Cell Signaling Technology, Inc., Cat.#4967), BAX(Cell Signaling Technology, Inc., Cat.#2772), BCL-2(Cell Signaling Technology, Inc., Cat.#2876), Nrf2(Cell Signaling Technology, Inc., Cat.#4399), HO-1(Cell Signaling Technology, Inc., Cat.#70081), PARP(Cell Signaling Technology, Inc., Cat.#9553), BDNF(Cell Signaling Technology, Inc., Cat.#47808), phosphor-tau(Cell Signaling Technology, Inc., Cat.#29957), tau(Cell Signaling Technology, Inc., Cat.#4019), ChAT(abcam, ab183591)]를 4° C에서 16시간 반응시켰다. TBST로 3회 세척 후 2차 항체(Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody(Cell Signaling Technology, Inc., Cat.#7074)를 처리해 실온에서 2시간 반응시켰다. 이후 SuperSignal™ Western Blot Enhancer(Thermo. Scientific, Cat.#46641)를 분주한 후, FluorChem M Fluorescent Western Imaging System(Protein Simple, California, USA)을 이용해 단백질 밴드를 확인하였다. 사용한 항체는 각 항체의 data sheet에 따라 5% 탈지유 및 소 혈청 알부민에 희석해 사용하였다.
- [0116] 1-9. 실험동물 및 동물실험디자인
- [0117] 특정 병원체가 없는 체중이 20~25 g의 4주령 수컷 생쥐(C57BL/6계)를 오리엔트바이오(Seongnam, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험동물은 온도 23±3°C, 상대습도 50±10 %, 환기회수 10~15회/시간, 조명시간 12시간 (08:00~20:00), 조도 150~300 Lux로 설정된 사육환경에서 사육하였다. 1주간의 적응 기간 동안 실험동물은 실험동물용 고형사료(Cargil Agri Purina, Inc., Seongnam, Korea)와 음수를 자유 섭취하도록 하였다. 1주간의 적응 기간을 거친 후 7개의 실험군(대조군, 스코폴라민 투여군, 스코폴라민+운동군, 스코폴라민 +WPH투여군, 스코폴라민 + 운동 +WPH 투여군)으로 분류하였고, 각 실험군 당 8마리의 실험동물을 사용하였다. 유청단백질 가수분해물(whey protein hydrolysate, WPH) 투여군에는 체중과 식이섭취량에 근거하여 1일에 동물의 체중 1kg당 WPH 100 mg, 200mg을 경구투여하였다. 트레드밀 운동은 4주간의 실험기간 동안 15m/min의 속도로 30분간 주 5회 실시하였다. 기억 손상을 유발하기 위해 인지시험 30분전에 스코폴라민(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO,

USA)을 몸무게 1kg당 1mg이 되도록 복강투여 하였다. 본 발명에서의 모든 동물 실험은 고려대학교 동물실험윤리 위원회의 승인 하에 수행되었다(KIACUC-2022-0076).

[0119] 1-10. Y-미로 실험

[0120] Y maze 동물행동실험은 단기기억형태의 순간 공간 인지력을 평가하기 위해 수행되었다. 사용된 미로는 세 개의 가지로 구성되어 있는 하얀색의 플라스틱 소재로서 각 가지의 길이는 50 cm, 높이는 20 cm, 그 리고 넓이는 10 cm이며, 세 가지가 접히는 각도는 120° 로 구성되어 있다. 각 가지를 A, B, C로 정한 후, 시작 부분에 마우스를 두고 60 초 동안 마우스가 미로를 자유롭게 돌아다니도록 하였으며, 각 미로에 들어간 횟수 및 순서를 측정하여 변경 행동력을 평가하였다. 세 주로의 다른 영역에 순차적으로 들어간 경우 1 점을 부여하였고, 연속되게 들어 가지 않은 경우는 점수로 인정하지 않았다. 시험 수행자는 학습 및 기억 능력 평가 기준에 있어서 기본 조건을 수립하고 시험방법의 합리성, 정확성 및 재현성을 고려하여 검증하였다.

[0122] 1-10. 새로운 물체 인지 시험(Novel Object Recognition Test)

[0123] 새로운 물체 인지 시험은 하얀색 폴리비닐 플라스틱으로 만든 박스(30 X 30 X 30 cm)에서 진행하였다. 실험동물을 박스에 적응시키기 위해 2일 동안 마우스를 10분간 자유롭게 탐색할 수 있게 하였다. 실험 3일차가 되는 날, 마우스를 박스에 위치시키기 1시간 전에 100 및 200mg/kg 농도의 WPH를 투여하였다. 대조군을 제외한 모든 실험군에 각각 실험 시작 30분 전에 0.9% saline 수용액에 녹인 scopolamine(1 mg/kg)을 복강 투여한 뒤 박스 정중앙에 위치시킨 후, 박스의 양 대각선 꼭지점으로부터 같은 거리(5 cm)에 동일한 물체를 제공하여 5분간 자유롭게 물체를 탐색하게 하였다. 탐색 24시간 후 박스 안의 물체 중 하나만 다른 모양의 새로운 물체로 바꾼 뒤, 다시 마우스로 하여금 5분간 자유롭게 물체를 탐색할 수 있게 하였다. 5분 동안 마우스가 기존에 있던 물체(familiar object)와 새로운 물체(novel object)에 대한 접촉, 냄새 맡기, 핥기 등의 탐색행동을 보이는 시간을 측정하였다. 물체 선호도(object preference ratio)와 물체 분별 척도(discrimination index)를 계산하여, 분별 척도가 높을수록 새로운 물체에 대한 인식이 높음을 의미한다.

[0125] 1-11. 아세틸콜린 함량 측정

[0126] 뇌 내 아세틸콜린 양을 측정하였다. Vincent와 Newsom-Davis의 방법을 변형하여 측정하였다. 적출한 뇌조직을 1mL의 PBS로 균질화 후 원심분리 하였으며(12,000rpm, 10min), 상층액을 얻어 분석에 사용하였다. 상층액에 alkaline hydroxylamine reagent[3.5 N sodium hydroxide and 2 M hydroxylamine in HCl]를 첨가하고 1분 동안 상온에서 반응시킨 후, 0.5 N HCl(pH 1.2)과 0.37 M FeCl₃ in 0.1 N HCl을 첨가하고 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0128] 1-12. 아세틸콜린에스테레이스(Acetylcholinesterase) 활성도 분석

[0129] 아세틸콜린에스테레이스 활성도는 아세틸콜린에스테레이스 활성도 분석 키트 (BM-ACH-100, BIOMAX, Seoul, South Korea)을 이용하여 측정하였다. 실험에 사용한 샘플은 뇌조직을 1% Triton X-100(sigma Aldrich)가 포함된 1mL의 PBS에서 균질화 후 원심분리(12,000rpm, 10min)하여 상층액을 얻어 사용하였다. 상층액 50uL에 assay buffer와 Enzyme mix, substrate solution, 그리고 프로브가 포함된 reaction mix와 섞어준 후 빛을 차단하여 37°C에서 30 min 동안 Kinetic mode에서 Microplate reader로 흡광도 570 nm에서 측정하였다.

[0131] 1-13. ROS 및 MDA(Malondialdehyde) 분석 (동물 실험)

[0132] 조직 100 mg에 40 mM Tris-HCl buffer 1 mL를 첨가한 후 조직을 갈고 원심분리하여 상층액을 회수함. 상층액 50 μ L에 40 mM Tris-HCl buffer 500 μ L와 10 μ M DCF-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) 10 μ L 첨가하여 37° C에서 30분간 반응시켰다. excitation = 482 nm, emission = 535 nm에서 형광측정하여 ROS 표준곡선과 비교하여 조직내 ROS 함량을 정량하였다.

[0133] 뇌 조직 내 MDA 함량은 Oxitec™ TBARS Assay kit(BIOMAX Co, Ltd., UK)를 이용하여 분석하였음. 피부 조직 100 mg에 PBS 1 mL를 첨가한 후 조직을 갈고 원심분리하여 상층액을 회수함. 상층액 200 μ L에 indicator 용액 200 μ L를 첨가하여 65° C에서 45분간 반응시켰다. 이후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 MDA 표준곡선과 비교하여 조직내 MDA 함량을 정량하였다.

[0135] 1-14. 웨스턴 블랏 (동물 실험)

[0136] 약 50mg의 뇌조직에 용해 버퍼 [200 mM Tris (pH8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM NaF, 1% NP40, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, proteaseinhibitorcocktail] 1000 μ L을 넣어 균질화한 후 원심분리(12,000 rpm, 5 min, 4

° C)하여 상층액을 회수하였다.

[0137] 샘플은 BCA method로 단백질 정량 후 30 μ g의 단백질을 10% SDS-PAGE에서 전기영동을 진행하였다. PVDF membrane에 transfer 시킨 후 5% 탈지유 및 소 혈청 알부민으로 1시간 블로킹을 거치고 1차 항체[Alpha-tubulin(Cell Signaling Technology, Inc., Cat.#2144), BAX(Cell Signaling Technology, Inc., Cat.#2772), BCL-2(Cell Signaling Technology, Inc., Cat.#2876), PARP(Cell Signaling Technology, Inc., Cat.#9553), BDNF(Cell Signaling Technology, Inc., Cat.#47808), phosphor-tau(Cell Signaling Technology, Inc., Cat.#29957), tau(Cell Signaling Technology, Inc., Cat.#4019), ChAT(abcam, ab183591)]를 4° C에서 16시간 반응시켰다. TBST로 3회 세척 후 2차 항체(Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody(Cell Signaling Technology, Inc., Cat.#7074)를 처리해 실온에서 2시간 반응시켰다.이후 SuperSignal™ Western Blot Enhancer(Thermo Scientific, Cat.#46641)를 분주한 후, FluorChem M Fluorescent Western Imaging System(Protein Simple, California, USA)을 이용해 단백질 밴드를 확인하였다. 사용한 항체는 각 항체의 data sheet에 따라 5% 탈지유 및 소 혈청 알부민에 희석해 사용하였다.

[0139] 1-15. 장내 미생물 분석

[0140] DNA 추출과 16S rRNA gene sequencing dsDNA는 100mg의 맹장으로부터 QIAamp Power Fecal Pro DNA Kit (QIAGEN, Frederick, MD, USA)를 사용하여 제조사의 프로토콜을 따라 진행하였다. 모든 샘플의 DNA농도는 5ng/ μ L로 맞추었으며, 농도를 균일하게 맞춘 DNA는 16S rRNA 유전자의 가변부위(Variable region) 중 V3-4를 증폭하기 위해 341F와 806R 프라이머세트를 이용하여 2 step PCR로 시행되었다. Illumina MiSeq (Illumina) 라이브러리 제작을 제조사의 프로토콜을 통해 수행하였으며, 마크로젠(Seoul, Korea)에 의뢰하여 시퀀싱을 수행하였다.

[0142] 1-16. 통계 처리

[0143] 실험 자료 분석은 SPSS 프로그램(SPSS 12.0 for windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다. 각 실험 데이터는 백분율과 mean $\pm$ SD으로 나타내었고 모든 측정값은 One-way ANOVA를 실시하였으며 Turkey's test를 이용하여 유의성을 검증하였다. 통계적 유의성 판정을 위한 유의 수준은 p<0.05로 하였다.

[0145] 실시예 2: 유청단백질 가수분해물의 아미노산 조성 분석

[0146] 유청단백질 가수분해물의 아미노산 조성을 분석하였다.

[0147] 결과는 표 1에 나타내었다.

[0148] 표 1에 나타낸 바와 같이, 유청단백질 가수분해물의 총아미노산 함량은 80.11 $\pm$ 2.41 g/100 g으로서 bovine whey protein의 74.09 g/100 g에 비하여 다소 높았고, 난, 밀과 대두단백질의 64.45 g/100 g, 60.53 g/100 g 및 61.57/100 g에 비하여 상당히 높았다. 특히 aspartic acid, glutamic acid, lysin과 branched chain amino acids(Isoleucine, leucine, valine)의 함량이 높음을 확인하였다.

표 1

[0149] 유청단백질 가수분해물의 아미노산 조성 (g/100g)

Amino acid	WPC hydrolysate
Asp	8.61 $\pm$ 0.28
Thr	5.61 $\pm$ 0.16
Ser	4.28 $\pm$ 0.14
Glu	14.49 $\pm$ 0.45
Pro	4.11 $\pm$ 0.01
Gly	1.51 $\pm$ 0.05
Ala	3.90 $\pm$ 0.11
Cys	0.69 $\pm$ 0.02
Val	4.47 $\pm$ 0.16
Met	1.69 $\pm$ 0.06
Ile	4.85 $\pm$ 0.15
Leu	8.59 $\pm$ 0.26
Tyr	2.45 $\pm$ 0.08
Phe	2.84 $\pm$ 0.08

His	1.53±0.11
Lys	7.29±0.28
NH3	1.10±0.04
Arg	2.08±0.05
Trp	-
Ile+Leu+Val	17.91
Total	80.11±2.41

[0150] 데이터는 mean±SD로 나타내었음.

[0152] **실시예 3: 유청단백질의 분리 및 정제**

[0153] 유청단백질을 분리 및 정제하여 분획물을 획득하였다.

[0154] 결과는 도 1a 내지 도 1f에 나타내었다.

[0155] 도 1a에 나타낸 바와 같이, Q-Sepharose HiLoad 16/10 이온크로마토그래피 칼럼으로 유청단백질의 펩타이드를 0.6M NaCl을 포함한 25 mM Tris-Cl (pH 8.0)용매로 균배용출하여 분리한 결과, 총 7개의 분획을 얻었다. 도 1b에 나타낸 바와 같이, 획득한 분획 중 HT22세포에서 Ca^{2+} 농도를 제일 감소시킨 것은 EX-4 분획이었다. 도 1c에 나타낸 바와 같이, Superdex peptide 10/30 칼럼에 1 mL 주입하여 hplc급 증류수로 용출하면서 S14~S21 분획물을 얻었다. 도 1d에 나타낸 바와 같이, 분획물 중 HT22세포에서 Ca^{2+} 농도를 제일 감소시킨 분획은 S16로 나타났다. 도 1e에 나타낸 바와 같이, S16 분획물을 speed vac에서 용매를 완전히 증발시키고 각각 100~300 μ L의 0.1% TFA를 포함하는 아세토니트릴(acetonitrile) 용매에 용해하여 역상크로마토그래피 분석조건에 따라 펩타이드 RPC2를 분리하였다. 도 1e 및 도 1f에 나타낸 바와 같이, 2차 분획물 EX4/S16/RPC2의 대표적인 펩타이드의 아미노산 서열은 LDIQK로서 99%의 신뢰도로 확인되었다. LDIQK(서열번호 1)는 β -lactoglobulin의 f26~30에 해당한다. 유청단백질 가수분해물과 LDIQK 펩타이드의 크로마토그램은 도 2에 나타내었다.

[0157] 추가적으로 유청단백질 가수분해물 내 LDIQK의 함량을 HPLC 분석을 통해 측정하였다.

[0158] 결과는 표 2에 나타내었다.

[0159] 펩타이드 LDIQK은 retention time 10.4 min에서 검출되었다. 유청단백질 가수분해물로 LDIQK 함량을 3회 측정한 결과, LDIQK함량은 14.2 ± 0.7 mg/g이다.

표 2

[0161] 유청단백질 가수분해물에 포함된 LDIQK 분석(mg/g)

Trial	RT, min	LDIQK-mg/g-sample
1	13.65	13.6
2	13.75	14.0
3	13.96	14.9
AVE	13.79	14.2 ± 0.7
RSD, %	1.16	4.51

[0163] **실시예 4: 유청단백질 가수분해물의 세포 독성 및 세포 보호 효과**

[0164] HT22 세포에 유청단백질 가수분해물을 농도별(50, 100, 200, 400 및 800 μ g/mL)로 처리하여 세포생존율 및 H_2O_2 처리에 의한 세포독성에 따른 세포생존율을 WST assay 방법으로 평가하였다.

[0165] 결과는 도 3에 나타내었다.

[0166] 도 3의 A에 나타낸 바와 같이, 유청단백질 가수분해물을 HT22 세포에 처리하였을 때 정상대조군과 비교하여 세포생존율이 유의적으로 증가하여($p<0.001$) 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다. 도 3의 B에 나타낸 바와 같이, H_2O_2 로 산화 유도된 HT22 세포에 유청단백질 가수분해물을 처리하여 산화 독성으로부터 보호하는지 확인하였다. 그 결과, H_2O_2 와 유청단백질을 동시에 처리한 처리 군에서 대조군 대비 유의적으로 세포생존율이 증가

하여($p < 0.001$), H_2O_2 가 유도하는 산화 독성으로부터 세포를 보호하는 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.

[0168] **실시예 5: 세포 내 ROS 생성량 측정**

[0169] DCF-DA((2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)는 세포막을 통과하여 세포 내에서 에스테라아제(esterase)에 의해 DCFH((2',7'-dichlorodihydrofluorescein)로 탈아세틸화된 뒤, 활성산소종에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 DCF(2',7'-dichlorofluorescein)로 변환된다. 따라서 각 처리군의 DCF-DA 형광 방출을 비교하였다.

[0170] 결과는 도 4에 나타내었다.

[0171] 도 4에 나타난 바와 같이, 세포에 H_2O_2 를 처리하였을 때 NOR군 대비 185.01%까지 증가했던 ROS생성량이 유청단백질 가수분해물을 50, 100, 200 $\mu g/mL$ 농도로 세포에 처리하였을 때 각각 162.06, 126.57, 118.02% 까지 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0173] **실시예 6: 세포 내 Ca^{2+} 측정**

[0174] 유청단백질 가수분해물과 LDIQK가 H_2O_2 로 세포 사멸을 유도한 HT22 세포에서 세포 내 Ca^{2+} 이온의 농도에 미치는 영향을 평가하기 위하여 형광 염료인 Fura-2AM을 사용하여 확인하였다.

[0175] 결과는 도 5 및 도 6에 나타내었다.

[0176] 도 5에 나타난 바와 같이, 세포에 H_2O_2 를 처리하였을 때 NOR군 대비 221.12%까지 증가했던 Ca^{2+} 이 유청단백질 가수분해물을 50, 100, 200 $\mu g/mL$ 농도로 세포에 처리하였을 때 각각 146.52, 149.11, 121.38% 까지 유의적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.001$).

[0177] 또한 도 6에 나타난 바와 같이, 유청단백질 가수분해물에서 분리 및 정제를 하여 얻은 펩타이드 LDIQK를 1.25, 2.5, 5, 10 $\mu g/mL$ 농도로 처리하였을 때 각각 134.40, 135.01, 136.40, 101.43% 까지 유의적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.001$).

[0179] **실시예 7: 세포사멸 관련 인자 발현량 분석**

[0180] 유청단백질 가수분해물에 의한 세포의 세포사멸(apoptosis) 기작 변화를 관찰하기 위하여 미토콘드리아 기능 조절과 관련된 Bcl-2 family protein의 발현량을 측정하였다.

[0181] 결과는 도 7 및 도 8에 나타내었다.

[0182] 도 7에 나타난 바와 같이, NOR군 대비 H_2O_2 를 처리한 CON군에서 BAX/BCL-2의 비율이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다($p < 0.001$). 유청단백질 가수분해물 고농도 투여군에서 BAX/BCL-2 비율이 CON군 대비 유의적으로 감소하였으며($p < 0.05$), PARP의 단백질 발현량은 WPC200군에서 CON군 대비 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다($p < 0.05$).

[0183] 도 8에 나타난 바와 같이, 유청단백질에서 분리 정제한 펩타이드(LDIQK)를 HT22세포에 투여하였을 때 H_2O_2 를 처리한 CON군 대비 BAX/Bcl-2의 발현량이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.001$).

[0185] **실시예 8: 신경전달물질 관련 인자 발현량 분석**

[0186] 유청단백질 가수분해물이 신경전달물질에 미치는 영향을 ChAT, BDNF, p-Tau, 및 Tau의 단백질 발현량을 통해 평가하였다.

[0187] 결과는 도 9에 나타내었다.

[0188] 도 9에 나타난 바와 같이, HT22세포에서 BDNF와 ChAT의 단백질 발현량을 측정한 결과, NOR군과 비교하였을 때 CON군에서 유의적으로 감소함을 확인하였고($p < 0.001$), Tau의 인산화 정도는 NOR군대비 CON군에서 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다($p < 0.001$). H_2O_2 로 산화적 스트레스가 유도된 HT22세포에 유청단백질(WPC) 가수분해물을 처리하였을 때, WPC200군에서 BDNF와 ChAT 단백질 발현량이 유의적으로 증가하였으며($p < 0.01$, $p < 0.05$ respectively), p-Tau의 발현량은 CON군 대비 WPC200군에서 유의적으로 감소하였음을 확인할 수 있었다($p < 0.001$).

[0190] 실시예 9: 항산화 관련 인자 발현량 분석

[0191] 유청단백질 가수분해물이 항산화 관련 인자들에 미치는 영향을 Nrf2와 HO-1의 단백질 발현량을 통해 평가하였다.

[0192] 결과는 도 10에 나타내었다.

[0193] 도 10에 나타난 바와 같이, HT22 세포에서 H_2O_2 를 처리한 CON군에서 NOR군 대비 Nrf2와 HO-1의 발현량이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다($p < 0.001$, $p < 0.05$). 그리고 유청단백질 가수분해물을 고농도로 세포에 투여하였을 때 Nrf2와 HO1의 발현량이 CON군 대비 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다($p < 0.001$).

[0195] 본 발명에서는 H_2O_2 로 산화적 스트레스가 유발된 HT22세포에서 유청단백질가수분해물의 신경세포 보호효과를 평가하였다. 실험에서는 유청단백질 가수분해물이 H_2O_2 로 인해 산화적 스트레스가 유발된 HT22세포에서 BAX, p-Tau의 단백질 발현과 세포 내 ROS와 Ca^{2+} 을 억제하며, Bcl-2, BDNF, ChAT, PARP의 발현을 증가시켜 세포사멸을 억제하는 것을 확인하였다. 그리고 추가적으로 유청단백질 가수분해물에서 세포사멸억제 기능을 갖는 활성 펩타이드(LDIQK)를 규명하였다.

[0196] 신경 변성에서 신경세포의 사멸을 유도하는 가장 중요한 병리학적 요인 중 하나는 산화적 스트레스이며, ROS의 과도한 생성에 의한 세포사멸 신호 전달 경로의 활성화는 신경세포의 사멸을 유발하는데 가장 중요한 기전으로 입증되었다. H_2O_2 는 신호전달 물질(세포의 운동이나 기능조절)로 작용하기도 하지만 강한 산화력 때문에 hydroxyl radical로 전환될 수 있으며, 인체 내에서 과도하게 축적되면 산화적 스트레스를 유발하게 되며 ROS를 생성하며 세포내 Ca^{2+} 수준을 상승시킨다. 따라서 H_2O_2 는 산화적 스트레스가 유발된 조건에서 여러가지 약리활성을 모니터링하기 위해 in vitro 및 cellular system에서 많이 이용되고 있는 물질 중의 하나이다. 산화적 스트레스로 인한 신경세포 손상은 활성산소가 세포의 주요 구성물질(지질, 단백질 및 핵산 등)의 손상을 초래하고 결국 세포사멸을 유발한다. 본 발명에서는 유청단백질 가수분해물이 H_2O_2 처리로 인해 증가된 ROS와 Ca^{2+} 을 유의적으로 감소시킴을 확인하였다.

[0197] 세포사멸의 촉진과 억제를 조절하는 단백질로 구성된 Bcl-2 family 단백질들(Bcl-2 family proteins)은 세포사멸의 진행을 결정짓는데 핵심적인 역할을 한다. 그 중에서 대표적인 세포사멸의 촉진 인자인 Bax는 미토콘드리아 외막에 위치하며 미토콘드리아 투과성 전이를 촉진하거나 미토콘드리아 외막의 장벽 기능을 약화시켜 세포사멸 촉진 인자의 방출을 유도한다. 반대로, Bcl-2와 같은 세포사멸 억제 단백질들은 세포사멸 촉진 인자의 방출을 억제하기 위해 미토콘드리아 투과성 및 막 장벽 안정화를 유지하는데 필수적이다. 그러므로, Bax 계열 단백질과 Bcl-2 계열 단백질 사이의 발현 균형은 세포사멸 유도 및 억제의 중요한 결정 인자로서 작용한다. 본 실험에서는 유청단백질 가수분해물과 펩타이드 LDIQK가 H_2O_2 로 산화적 스트레스가 유발된 HT22세포에서 Bax의 단백질 발현을 유의적으로 감소시키고 Bcl-2의 단백질 발현을 유의적으로 증가시키는 것을 확인하였다.

[0198] HO-1은 항산화 시스템에 주요한 역할을 하는 단백질로서, 현재 많은 연구에 의하면 HO-1 단백질의 발현에 대한 메커니즘은 nuclear factor-E2-related factor2(Nrf2)의 핵 내 전사가 가장 직접적인 관련이 있는 것으로 알려져 있다. Nrf2는 전사인자로서 HO-1과 같은 항산화 단백질의 유전자에 존재하는 ARE(Antioxidant ResponseElement)에 결합하여 이들 유전자의 발현을 조절하고 단백질 발현을 항진시킴으로써 산화적 스트레스에 대한 생체방어기구에 중심적 역할을 담당하고 있다. 본 발명에서는 유청단백질 가수분해물의 투여가 HT22 세포에서 H_2O_2 로 인한 산화적 스트레스로 감소된 HO-1과 Nrf2의 발현을 증가시킴을 확인하였다.

[0199] 인지기능장애의 요인으로 해마의 세포사멸뿐만 아니라 BDNF(brain driven neurotrophic factor)의 감소, 타우 단백질의 과인산화, 아세틸콜린 생성의 감소등이 요인으로 제시되고 있다. BDNF(brain driven neurotrophic factor)는 신경성장인자의 일종으로 신경세포의 성장(growth), 발달(development), 가소성(plasticity), 생존(survival) 등에 중요한 역할을 하고 있다. 뇌의 해마 영역에서 연령의 증가에 따라 신경세포의 가소성(neuroplasticity) 감소 및 신경세포재생(neurogenesis)의 감소로 인해 학습, 기억 및 인지 기능의 저하를 초래하게 되며, 더 나아가 알츠하이머 질환과 같은 신경퇴행성 질환을 유발한다. 본 발명에서는 유청단백질 가수분해물의 투여가 산화적 스트레스가 유발된 HT22세포에서 BDNF의 발현을 유의적으로 감소시킴을 확인했다.

[0200] Tau는 중추 신경계 특히 신경세포의 축색돌기에 주로 발현되는 미세소관 결합 단백질(microtubule-associated protein, MAP)로서 마이크로튜브(microtubules, MT)를 안정화시키는 역할을 한다(Drechsel et al., 1992). 인

간에서 발현되는 Tau는 단일 유전자의 exon 2, 3, 10번 alternative splicing으로 인한 6개의 아형을 가진다 (Goedent et al., 1989). 특히 exon 10의 splicing에 따라 3개 또는 4개의 microtubule-binding repeats을 가지는 아형이 형성된다. Tau 응집의 원인은 정확히 밝혀지지 않았지만 모든 타우병증(tauopathies)에서 보이는 Tau의 과인산화 현상이 MT binding을 약화시키고 응집 현상을 증가시킨다고 보고되고 있다 (Lonso et al., 1996; Aonso et al., 1994). Tau의 과인산화는 Tau 단백질의 기능 상실(Loss of function, LOF)로 인해 MT로부터 떨어져 MT의 안전성을 약화시키게 되고 이는 신경세포의 축삭이동(axonal transport)이상을 가져와 퇴행을 야기하게 된다. 본연구에서는 유청단백질 가수분해물의 투여가 HT22세포에서 타우의 과인산화를 유의적으로 감소시킴을 확인하였다.

[0201] 아세틸콜린(ACh)은 모든 콜린성 신경에 의해 사용되는 신 경전달물질로서 말초신경과 중추신경계에서 중요한 역할을 하는데 시냅스 간극 중에서 AChE에 의해 분해되며, 콜린 아세틸트랜스퍼라제(ChAT)는 신경전달물질인 아세틸콜린을 합성하는 효소로서 콜린성 신경세포의 기능적 상태를 관찰할 수 있는 인자이다(Ferreira-Vieira 등, 2016; Lim 등, 2016). AD에서 대뇌 피질과 해마의 콜린아세틸트랜스퍼라제의 활성 소실은 치매 정도와 기간과 관련되므로 치료의 기초가 되는데, 전뇌 피질과 해마의 ChAT 활성을 높이는 것은 경도인 지장애인이 AD로 전이 되는 것을 막는 주요한 인자이다. 본 발명에서 HT22세포에서 유청단백질 가수분해물의 투여가 ChAT의 단백질 발현을 유의적으로 증가시킴을 확인하였다.

[0202] 유청 단백 가수분해물의 활성물질로 추정되는 LDIQK에 의해 Ca 유입이 억제되며, 세포 사멸관련인자인 Bax와 Bcl-2를 조절하는 효과를 보였다. 즉, 유청 단백질에 함유된 LDIQK에 의해 인지기능개선 효과를 확인할 수 있었다

[0204] 실시예 10: 인지능력 개선 효과 검증

[0205] 스코폴라민으로 기억 손상을 유발한 마우스에서 Y-미로 테스트 및 새로운 물체 인지 테스트 (novel object recognition test, NORT)를 이용하여 in vivo에서 기억력 개선 효능을 측정하였다.

[0206] 결과는 도 11의 A 및 도 11의 B에 나타내었다.

[0207] 도 11의 A에 나타난 바와 같이, 스코폴라민 투여에 의한 인지기능장애 모델에서 유청단백질 가수분해물(WPH) 투여의 효과를 확인하기 위해 Y-maze를 통해 행동분석을 한 결과, 정상군인 NOR군의 변경 행동력은 79.99%인 반면에 스코폴라민을 투여한 CON군의 변경 행동력은 42.25%로 감소한 것을 확인하였다. WPH를 100, 200 mg/kg으로 투여 후 스코폴라민을 투여한 실험군에서는 54.1%, 62.7%로 농도 의존적으로 증가하였으며, 트레드밀 운동을 진행한 EXR군과 트레드밀 운동과 WPH투여를 병행한 EWPHL_EWPHH그룹에서는 각각 61.4%, 66.1%, 그리고 64.7%로 CON군대비 유의적으로 행동력이 증가함을 확인하였다($p < 0.001$). 또한 모든 실험군에서 각 가지에 입장한 총 횟수가 군간 차이가 나타나지 않았다(도 11의 B). 유청단백질 가수분해물과 운동을 병행할 경우 spontaneous alternation 이 증가하는 경향을 보였다.

[0209] 스코폴라민 투여에 의한 인지기능장애 모델에서 유청단백질 가수분해물 투여의 장기기억 및 인지기억의 개선효과를 확인하기 위해 새로운 사물 인지시험을 실시하였다.

[0210] 결과는 도 11의 C에 나타내었다.

[0211] 도 11의 C에 나타난 바와 같이, 새로운 물체와 기존 물체를 탐색하는시간을 분석함으로써 분별척도(discrimination index, 기존 물체 또는 새로운 물체를 탐색하는데 걸리는 시간/전체 실험 시간 * 100)를 계산한 결과 스코폴라민 투여한 CON군은 정상군에 비해 사물 분별척도가 유의적으로 감소하였으며($p < 0.05$), 새로운 물체와 기존 물체를 탐색하는 시간에 유의적 차이가 없는 것을 통해 인지기억의 손상이 유도되었음을 확인할 수 있었다. 반면, EXR, WPHL, WPHH, EWPL, 그리고 EWPH군에서 분별척도가 con군 대비 유의적으로 증가하여 스코폴라민으로 유도된 인지기억 손상이 유의적으로 회복되는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.001$).

[0213] 실시예 11: 항산화 효과 분석

[0214] 유청단백질 가수분해물의 항산화 효과 및 인지기능개선 효과를 검증하기위해 뇌조직의 ROS함량을 DCF-DA 형광염료를 이용하여 ROS생성량 및 MDA함량을 측정하였다.

[0215] 결과는 도 12에 나타내었다.

[0216] 도 12에 나타난 바와 같이, 측정결과 스코폴라민을 투여한 CON군에서 NOR군대비 ROS함량이 185.6% 증가한 것을 확인했으며, 100, 200mg/kg의 WPH 투여시 ROS함량이 132.1%, 129.4%까지 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 트레드밀 운동만 진행한 EXR군과 유청단백질 가수분해물과 운동을 병행한 EWPHL, EWPHH군에서 각각 124.0%,

129.6%, 109.8%으로 CON군대비 ROS함량이 유의적으로 감소하였다($p<0.001$). 이러한 결과는 WPH의 투여가 ROS로 인한 산화적 스트레스를 완화시킴을 의미한다.

[0217] 도 12에 나타난 바와 같이, 스코폴라민을 투여한 CON군의 MDA함량은 52.6 μM 으로 12.1 μM 인 NOR군보다 유의적으로 높았다($p<0.001$). 반대로, 운동 및 WPH를 투여한 EXR, WPHH, EWPHL, EWPHH군의 MDA함량은 27.1, 34.6, 29.9, 24.8 μM 로 CON군 대비 유의적으로 감소하였다($p<0.001$). 상기 결과는 유청단백질 가수분해물의 산화적 스트레스 완화 효과 및 인지기능 개선 효과를 의미한다. 또한 유청단백질 가수분해물 투여와 운동을 병행할 경우 시너지 효과를 기대할 수 있었다.

[0219] 실시예 12: 아세틸콜린 활성화도 검증

[0220] 유청단백질 가수분해물 투여에 따른 아세틸콜린 활성화도 변화를 확인하였다.

[0221] 결과는 도 13에 나타내었다.

[0222] 도 13에 나타난 바와 같이, 스코폴라민을 투여한 CON군의 마우스의 뇌조직에서 아세틸콜린 농도가 NOR군보다 0.6배 유의적으로 감소되었고, 아세틸콜린 분해효소인 Ache의 활성을 2.7배 증가시키고, 아세틸콜린 합성 효소 ChAT의 단백질 발현은 3.3배 감소하였다. 이러한 결과는 스코폴라민의 투여가 아세틸콜린 수용체의 길항제로 작용하여 인지기능장애가 유발된 것을 의미한다. 그러나, WPH의 투여는 스코폴라민 투여로 인해 낮아진 아세틸콜린을 회복시켰다. 아세틸콜린 농도는 EXR군과 WPH_L군 EWPH_L군에서 CON군대비 1.3배씩 유의적으로 증가하였다($p<0.01$). Ache의 활성은 EXR, WPHL, WPHH, EWPHL, EWPHH 군에서 0.8배, 0.8배, 0.5배, 0.5배, 0.4배로 유의적으로 감소하였다($p<0.001$). ChAT의 단백질 발현은 CON군대비 EWPHH 군에서 309.12% 유의적으로 증가한 것을 확인하였다($p<0.05$). 이러한 결과는 WPH의 투여가 낮아진 아세틸콜린 농도를 증가시킴을 의미한다.

[0224] 실시예 13: 유청단백질 가수분해물의 세포사멸에 미치는 영향 분석

[0225] 유청단백질 가수분해물의 세포사멸에 미치는 영향을 분석하였다.

[0226] 결과는 도 14의 A 및 도 14의 B에 나타내었다.

[0227] 도 14의 A 및 도 14의 B에 나타난 바와 같이, 스코폴라민을 투여한 CON군은 NOR군에 비해 BAX/BCL2 비율이 유의적으로 증가하였다. 그러나 트레드밀 운동을 시킨 EXR군과 WPH를 투여한 WPH_L, WPH_H군, 운동과 WPH를 투여한 EWPH_L, EWPH_H군에서 BAX/BCL2비율(31.6%, 32.7%, 31.3%, 41.6%, 그리고 27.6%, respectively; $p<0.001$, fig.)이 유의적으로 감소하였다. 이러한 결과는 WPH투여가 스코폴라민으로 유도된 세포사멸을 억제시킬 수 있음을 의미한다.

[0229] 실시예 14: 유청단백질 가수분해물의 신경세포 기능에 미치는 영향 분석

[0230] 유청단백질 가수분해물의 신경세포 기능에 미치는 영향을 분석하였다.

[0231] 결과는 도 14의 A, 도 14의 C 및 도 14의 D에 나타내었다.

[0232] 도 14의 A, 도 14의 C 및 도 14의 D에 나타난 바와 같이, 유청단백질 가수분해물은 신경세포 기능과 관련된 조절 인자(p-tau와 BDNF)를 조절하였다. 스코폴라민의 투여는 NOR군에 비해 뇌에서 신경 퇴행성 지표인 p-tau/tau 단백질 비율을 유의하게 증가(3.4-fold)시켰다. 트레드밀 운동과 WPH(100 and 200mg/kg)투여와 운동과 WPH(100 and 200mg/kg)의 병행하여 처리하였을 때 농도의존적으로 p-tau/tau 비율(33.4%, 32.5%, 24.6%, 41.9%, and 28.9%, 각각)이 감소하였다.

[0233] 스코폴라민은 BDNF의 발현을 유의적으로 감소시켜 신경 가소성 인자의 장애를 유발시킨다. 그러나 WPH(100 and 200mg/kg) 투여와 트레드밀운동을 병행하였을 때 BDNF의 발현을 유의적으로 감소시켰다(150.8%, 151.1%, 153.3%, and 168.3%, 각각, $p<0.05$, fig.). 이러한 결과는 손상된 신경세포 기능을 WPH의 투여로 개선시킬 수 있다는 것을 나타낸다.

[0235] 실시예 15: 유청단백질 가수분해물의 MAPK pathway에 미치는 영향 분석

[0236] 유청단백질 가수분해물이 MAPK 신호전달 경로에 미치는 영향을 뇌 조직에서 평가하였다.

[0237] 결과는 도 15에 나타내었다.

[0238] 도 15에 나타난 바와 같이, 스코폴라민의 투여는 NOR군에 비해 MAPK 신호 전달 경로의 핵심 구성 요소인 p-JNK, p-ERK, p-P38의 단백질 발현을 유의적으로 증가시켰다 (각각 2.3, 2.8, 1.9배, $p<0.01$). 그러나 트레드밀 운동

을 시킨 EXR군과 WPH를 투여한 WPH_L, WPH_H군, 운동과 WPH를 동시에 투여한 EWPH_L, EWPH_H군에서 CON군 대비 p-JNK 발현을 각각 53.3%, 50.9%, 42.4%, 41.1%, 그리고 39.8%로 감소 시키고, p-ERK의 발현을 각각 50.7%, 71.8%, 50.3%, 57.2%, 그리고 51.1% 감소시켰고, p-P38의 발현은 각각 70.2%, 78.2%, 75.3%, 59.5%, 그리고 47.3% 감소되었다. 이러한 결과는 운동과 유청단백질 가수분해물의 투여가 산화적 스트레스로 인해 활성화된 MAPK 신호 전달 경로를 억제함을 나타낸다.

[0240] 실시예 16: 유청단백질 가수분해물이 장내미생물에 미치는 영향 분석

[0241] 유청단백질 가수분해물이 장내미생물에 미치는 영향을 cecum 조직에서 평가하였다.

[0242] 결과는 도 16, 도 17 및 도 18에 나타내었다.

[0243] 도 16에 나타낸 바와 같이, 마이크로바이옴의 다양성을 나타내는 Shannon과 풍부도를 나타내는 CHAO 지수가 CON군에서 NOR군대비 감소하는 경향이 나타났다. 트레드밀운동과, WPH(100 and 200mg/kg)투여와 운동과 WPH(100 and 200mg/kg)의 병행 처리 하였을 때 CON군 대비 Shannon지수에서 각각 112%, 112%, 114%, 108%, 그리고 110% 증가하였고, CHAO지수는 각각 123%, 114%, 120%, 113%, 그리고 116% 증가하였다. 베타 다양성과 관련하여 PcoA 분석을 하였을 때 스코폴라민을 투여한 CON군과 NOR군과 마이크로바이옴의 커뮤니티 구조가 달라진 것을 확인할 수 있었으며, 트레드밀과 운동과 WPH의 투여가 CON군과 또다른 커뮤니티 구조로 변형시키는 것을 확인하였다.

[0244] 도 17에 나타낸 바와 같이, CON군에서 증가한 Verrucomicrobiota의 비율이 운동을 시킨 EXR군과 WPH를 투여한 WPH_L, WPH_H군, 운동과 WPH를 투여한 EWPH_L, EWPH_H군에서 유의적으로 감소하는 것을 확인하였으며, EWPH_H군에서 Actinomyceotota의 비율이 CON군 대비 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(p<0.01).

[0245] 도 18에 나타낸 바와 같이, Genus수준에서는 Lactobacillus의 비율이 운동과 200mg/mL농도의 WPH를 동시 처리하였을 때 CON군 대비 증가하는 경향을 보였으며, Eubacterium이 100mg/kg농도의 WPH투여 및 운동과 200mg/kg농도의 WPH 동시처리 하였을 때 CON군 대비 유의적으로 증가함을 확인하였다 (p<0.01). 추가적으로 Clostridium은 200mg/kg농도의 WPH를 처리하였을 때 CON군 대비 유의적으로 증가함을 확인하였다 (p<0.01) 이러한 결과는 트레드밀운동이 스코폴라민으로 변화된 장내미생물 군총을 변화시킴을 의미한다.

[0247] 본 발명에서, 본 발명자들은 스코폴라민으로 유도된 인지기능장애에서 유청단백질 가수분해물(WPH)의 효과에 대해 연구하였다. 무스카린성 콜린 수용체(muscarinic cholinergic receptor) 길항제로 사용되는 스코폴라민(scopolamine)은 뇌에서 콜린성 기능 장애, 산화적 스트레스 등을 유도하여 기억력 손상을 유도하는 것으로 보고되고 있다. 그리고, 스코폴라민을 투여한 동물 모델은 대표적인 기억력 손상 동물 모델로써 AD 예방 및 치료를 위한 소재의 기억력 개선 효능 평가 및 메커니즘 규명 연구에 다양하게 이용되고 있다.

[0248] 본 발명에서 Y-미로(Y-maze), Novel object recognition(NOR) test을 실시한 결과 스코폴라민으로 유도된 기억력 손상에 대한 유청단백질 가수분해물, 트레드밀 운동과 이들의 병합에 대한 인지기능개선효과를 측정하였다. Y형 미로에 실험동물을 넣고 자유롭게 움직일 수 있게 하고 순차적으로 Y형 미로에 들어간 횟수를 측정하여 백분율로 나타낸 자발적 변경 행동력이 NOR군에 비하여 CON군에서 유의적으로 감소하는 것을 확인하여 기억력 및 인지 손상 모델이 잘 정립된 것을 확인할 수 있었다. 그리고 트레드밀 운동을 진행한 EXR군과 WPH 100 및 200mg/kg 투여한 WPH_L, WPH_H군과 운동과 WPH 100 및 200 mg/kg를 동시에 처리한 EWPH_L, EWPH_H군에서 NOR군과 비슷한 수준으로 회복됨을 확인하여 기억력을 개선시키는 것을 확인하였다. NOR test에서 스코폴라민을 투여하였을 때 새로운 물체에 비해 기존의 물체를 탐색하는데 걸리는 시간은 유의적인 차이가 없었다. 이러한 결과는 콜린성 기능 장애 및 산화적 스트레스를 유발하는 스코폴라민을 투여한 동물 그룹에서 변별 지수가 유의하게 감소하여 학습 및 인식 과정에 장애가 있음을 시사한다. 그러나 EXR군, WPH_L, WPH_H, EWPH_L, EWPH_H군에서 새로운 물체를 탐색하는 시간이 기존의 물체에 탐색하는 시간보다 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 이것은 운동과 WPH투여가 스코폴라민으로 인해 유도된 인지 장애를 완화시켜줄 것을 의미한다.

[0249] 콜린신경계는 인지 및 기억력과 관련한 대표적인 신경계로 scopolamine은 AChE의 수치를 증가시키고 ACh와 ChAT의 수치를 감소시킨다. 아세틸콜린(acetylcholine, Ach)은 신경계의 주요 신경전달물질이자 조절물질로 알려져 있으며 신경 근육 접합과 부교감 신경계에서 학습과 기억과 같은 인지기능에 중요한 역할을 담당하고 있다고 알려져 있다. 뇌에서 acetylcholinesterase(AChE), butyrylcholinesterase(BuChE) 등의 효소 활성의 증가는 신경전달 물질인 아세틸콜린(acetylcholine)을 콜린(choline)과 아세틸 CoA(acetyl CoA)로 분해시켜 콜린성 기능 장애를 유도하며, 이는 기억력 및 인지기능 손상에 영향을 미친다고 알려져 있다. 본 발명에서는 WPH의 투여가 AChE의 활성을 유의적으로 감소시키며 ChAT의 단백질 발현을 유의적으로 증가시켜 아세틸콜린의 농도를 증가시

키는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 앞선 행동분석 결과와 유사하게 트레드밀 운동과 WPH가 콜린신경계를 조절하여 인지기능을 보호하는 것을 의미한다.

[0250] 인지기능에 관여하는 아세틸콜린은 뇌속의 산화스트레스와 밀접한 관계를 가지고 있다. 뇌 조직은 불포화 지방산이 풍부하여 산화적 스트레스에 대하여 민감하기 때문에 증가된 활성산소로 인하여 지질과산화물 축적, 단백질 변성, DNA 산화 및 세포 손상을 나타내어 생리 활성을 억제시킨다. 이러한 산화적 스트레스에 의해 신경세포를 둘러싸고 있는 불포화지방산의 과산화가 일어나고, 아세틸콜린 분해효소의 활성이 증가하게 되어 아세틸콜린의 분해를 촉진시켜 신경전달에 장애를 나타내어 최종적으로 기억 및 학습 능력이 감퇴되는 현상이 발생한다. 본 연구의 결과로 운동과 유청단백질 가수분해물(WPH)의 투여가 스코폴라민으로 증가한 ROS와 MDA를 유의적으로 감소시키는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 트레드밀 운동과 WPH가 ROS와 MDA를 감소시켜 아세틸콜린의 분해를 억제하여 인지기능을 개선시키는 것을 의미한다.

[0251] 또한 산화적 스트레스에 의해 증가되는 Bax/Bcl-2 비율은 세포자멸사를 조절하는 중요한 요소이다. Bcl-2, Bcl-xL 등은 세포자멸사를 억제하며, Bax, Blk, Bad 등은 세포자멸사를 촉진시킨다. Bax는 미토콘드리아 내로 이동하여 활성화된 monodimer가 되어 세포자멸사를 촉진시키고, 이러한 Bax에 의한 세포자멸은 Bcl-2와의 heterodimer형성에 의해 억제된다. 운동과 시냅스 가소성 및 세포증식에 관련된 선행연구에서 운동은 뇌 주요 부위에서 시냅스 효능과 학습에 관여하는 단백질 발현 및 anti-apoptosis 지표인 Bcl-2의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. 이에 반해 pro-apoptotic pathway downstream으로서 세포사멸에 주요한 촉진인자인 Bax, caspase family의 발현을 억제시켜 인지기능 장애를 완화시키는 것으로 나타났다. 본 발명에서 트레드밀운동과 100, 200mg/kg 농도의 WPH투여가 BAX/Bcl-2의 비율을 유의적으로 낮추는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 WPH가 세포사멸을 억제하여 인지기능에 대한 긍정적인 효과를 나타내는 것을 의미한다.

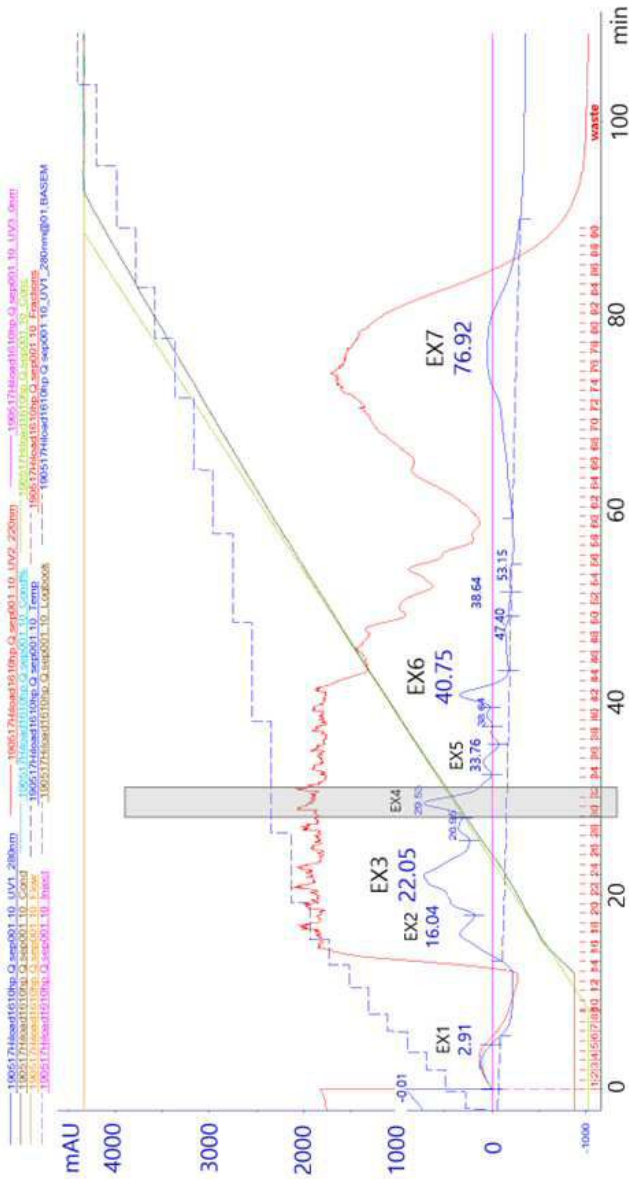
[0252] 인지기능에 관여하는 산화스트레스는 brain내 A β 및 타우(tau) 단백질의 침착으로 발생한다타우 단백질의 과인산화는 시냅스 손실과 신경세포의 사멸에 원인이 되어 신경 퇴행성 질환과 연관성이 있는 것으로 보고한다. 본 발명에서는 4주간의 중강도의 트레드밀 운동과, 100, 200mg/kg 농도의 유청단백질 가수분해물의 투여가 타우단백질의 과인산화를 유의적으로 억제하는 것을 확인하였다.

[0253] 산화스트레스하에서 미토겐 활성화 단백질 키나제(MAPK)는 세포 사멸을 조절하는 신호전달물질들로 JNK 및 p38 MAP 키나제는 중추적인 역할을 수행한다. MAPk pathway (extracellular-signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2), c-Jun NH2-terminal kinase (JNK), and p38 MAP kinase) 활성화는 알츠하이머 환자들에게서 관찰되는 증상 중 하나인 것으로 알려져있다. 중강도의 트레드밀운동과 유청단백질 가수분해물의 투여가 활성화된 MAPk 를 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 유청단백질 가수분해물이 인지기능 개선에 효과가 있음을 의미한다.

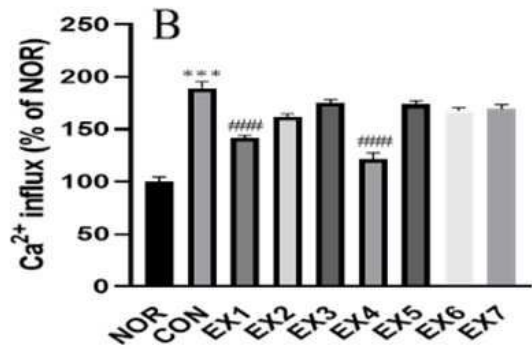
[0254] 장내 미생물은 인체 마이크로바이옴의 95%를 함유하며, cytokine, 면역, 호르몬, 신경 신호를 통해 양방향 소통하는 마이크로바이옴-장 축을 형성한다. 인간의 삶과 공존하는 장내미생물은 고령화에 따라 종 다양성이 소실되며 일차적으로 소화력 저하 등의 장관계 문제를 일으킨다. 최근 장내미생물 및 이들의 대사산물이 뇌에 영향을 미친다는 다양한 연구결과가 보고되었으며 이러한 상관관계를 장-뇌 축(gut-brain axis)으로 설명하고 있다. 현재 인지기능과 관련된 장내미생물로 알려진 것은, AD환자와 노인등에서 특징적으로 증가하는 verrucomicrobiota와 아세틸콜린을 분해하는 효소인 AchE 활성을 억제하는 역할을 하는것으로 알려진 Actinobacterota, 항염증 역할을 하는 유익균으로 알려진 eubacterium등이 있다. 본 발명에서 α -diversity를 기반으로 Chao index와 Shannon index를 이용하여 종의 풍부도와 균등도를 각각 조사한 결과 트레드밀 운동과 WPH투여가 스코폴라민의 투여로 감소된 종의 풍부도와 균등도를 증가시키는 것을 확인하였다. 또한, 트레드밀운동과 200mg/kg농도의 WPH를 동시에 처리하였을 때 verrucomicrobiota의 비율이 유의적으로 감소하였고, actinobacterota와 eubacterium의 비율이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 WPH가 인지기능과 관련된 장내미생물들을 조절하여 인지기능개선에 효과를 나타내는 것을 의미한다.

도면

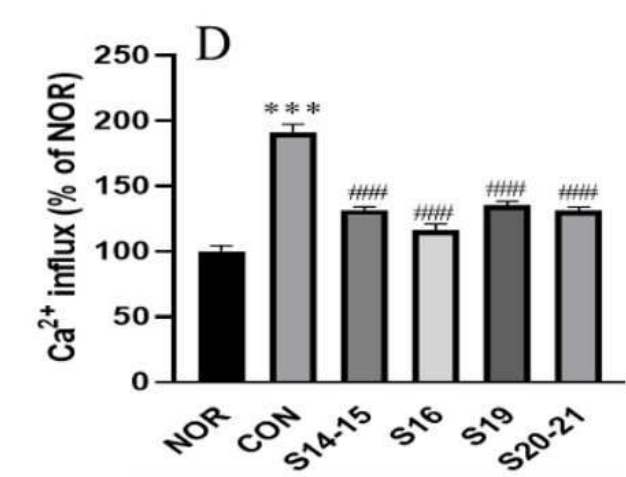
도면1a



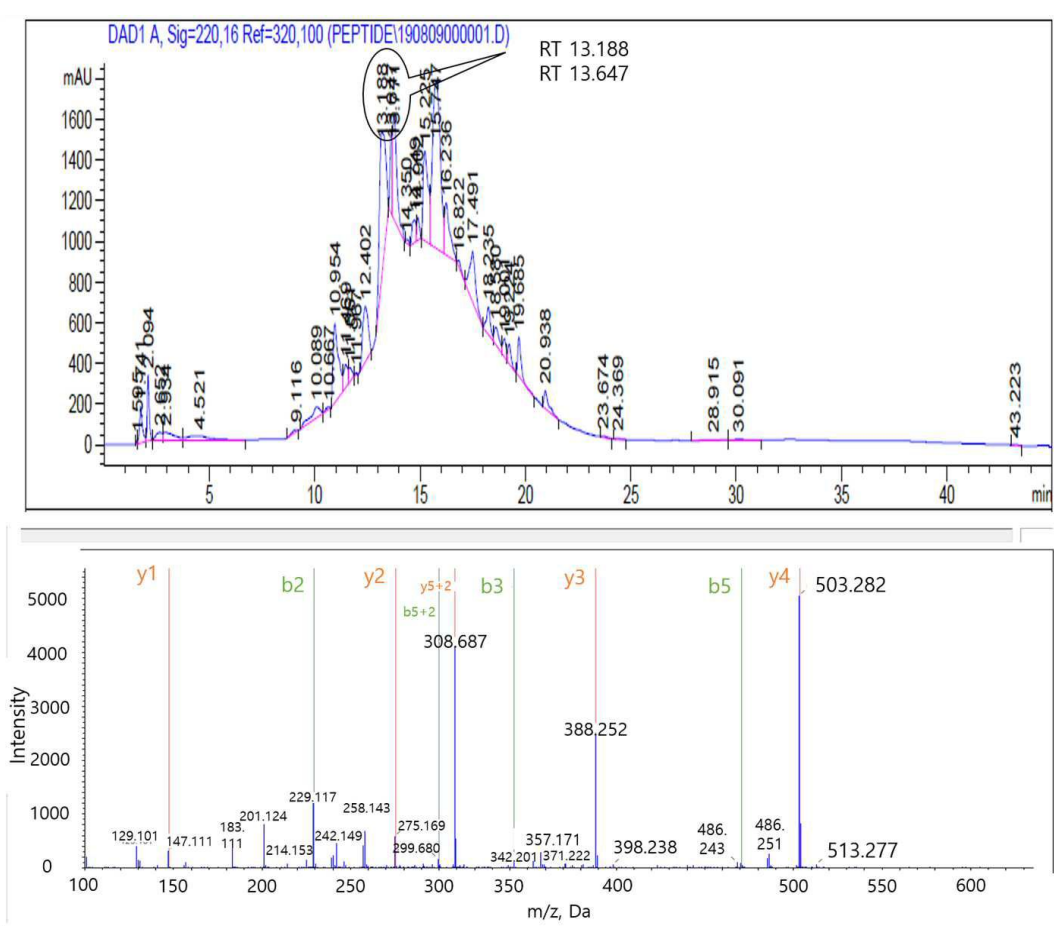
도면1b



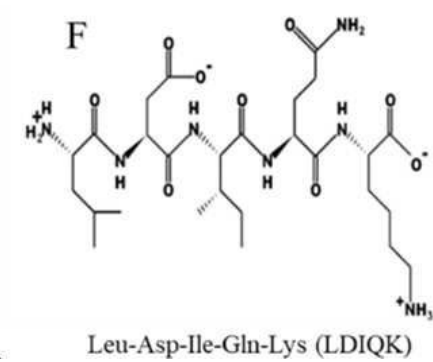
도면1d



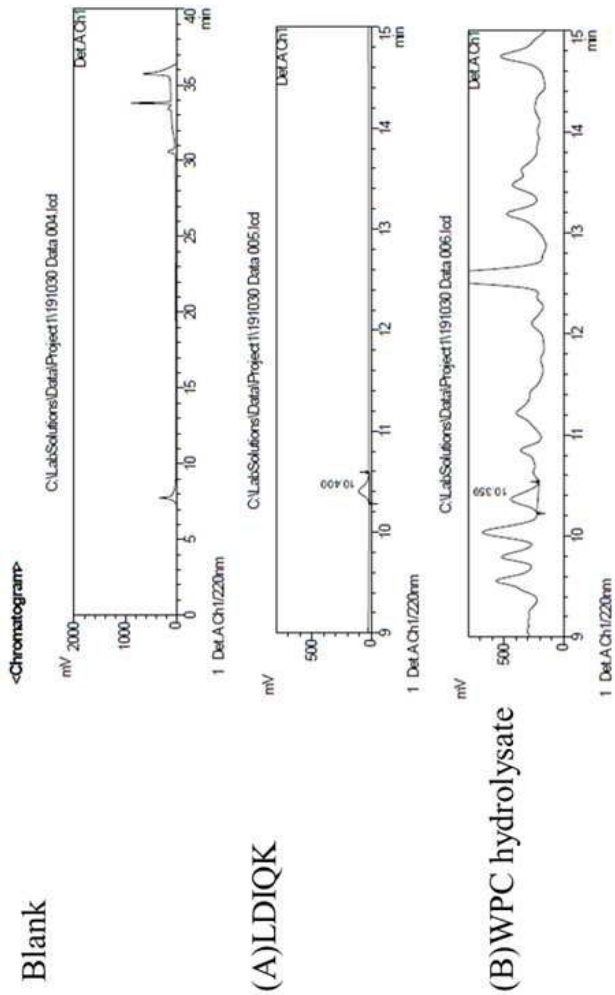
도면1e



도면1f



도면2



(B)WPC hydrolysate

C:\LabSolutions\Data\Project\119\030 Data 006.lcd

1

Det.A:Ch1/220nm

mV

500

0

min

15

14

13

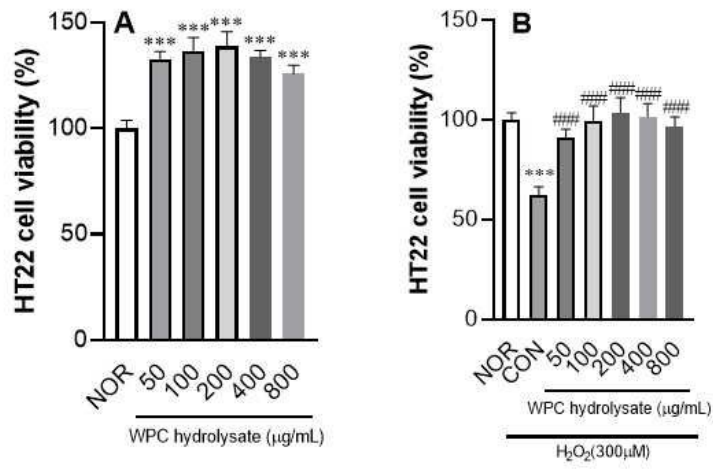
12

11

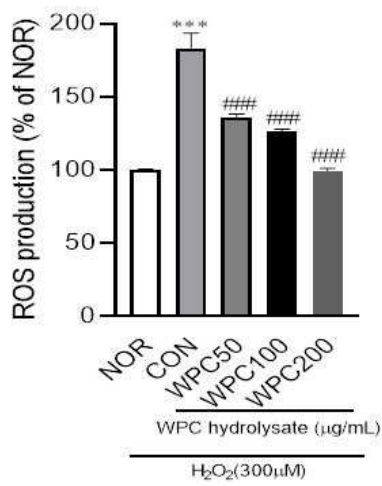
10

9

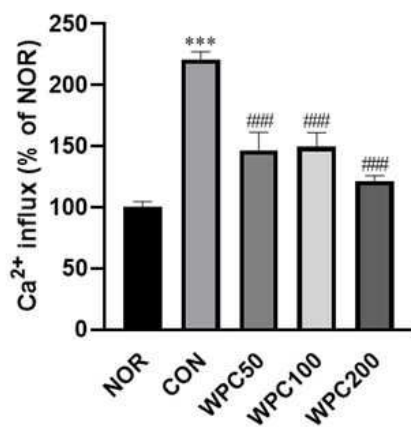
도면3



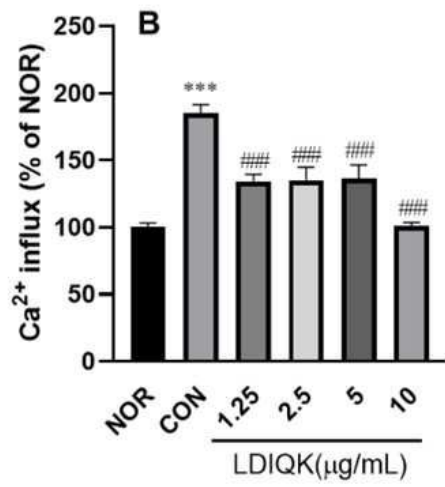
도면4



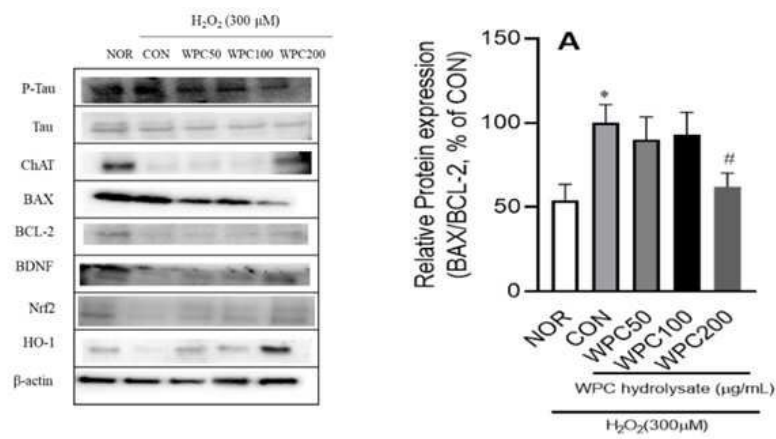
도면5



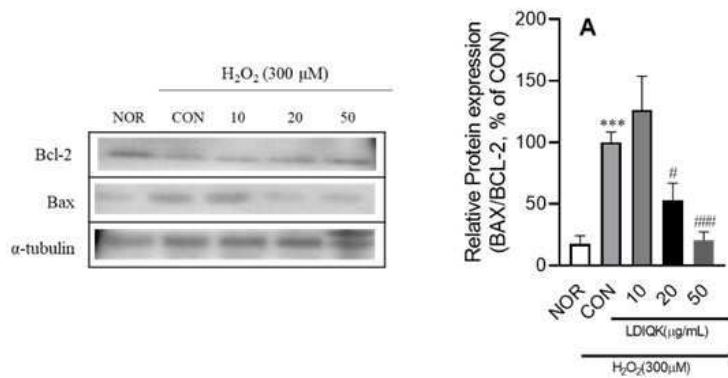
도면6



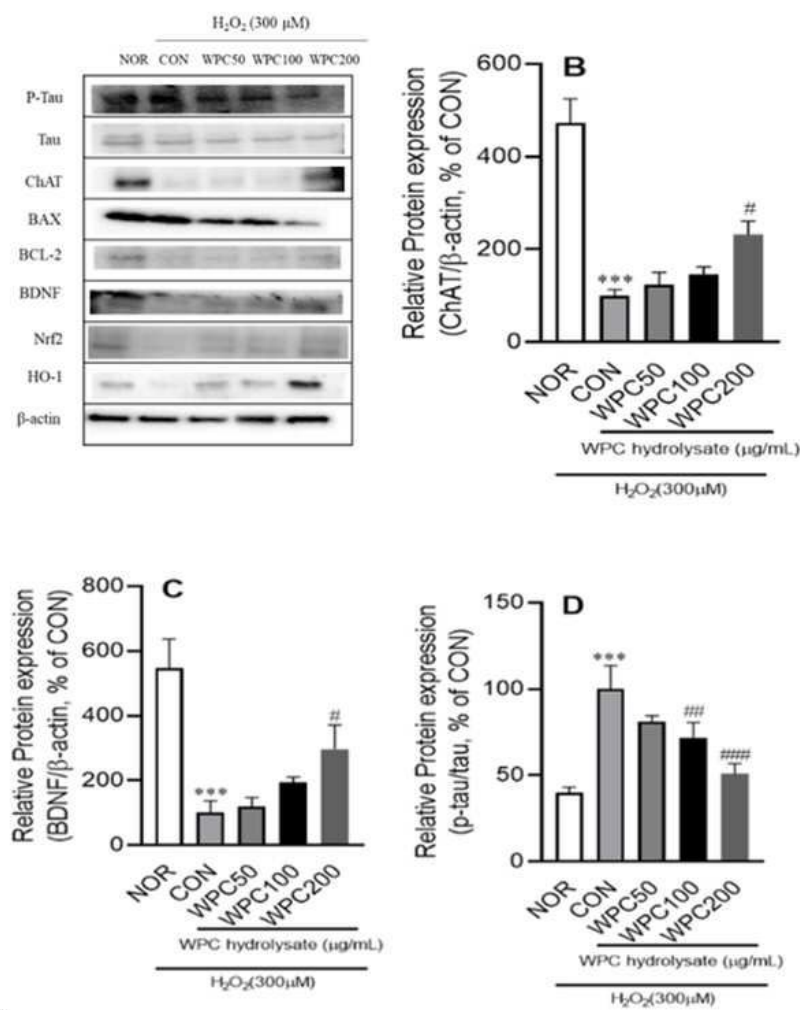
도면7



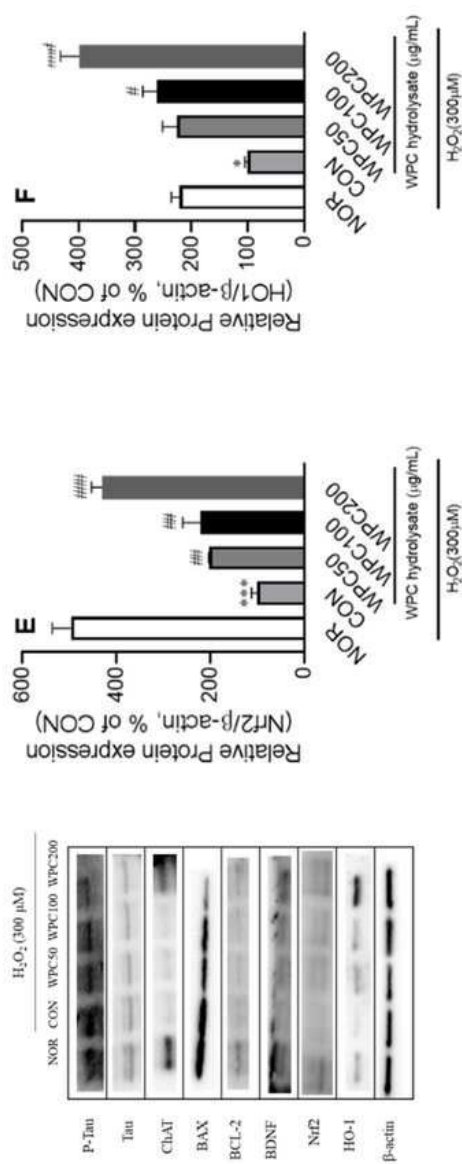
도면8



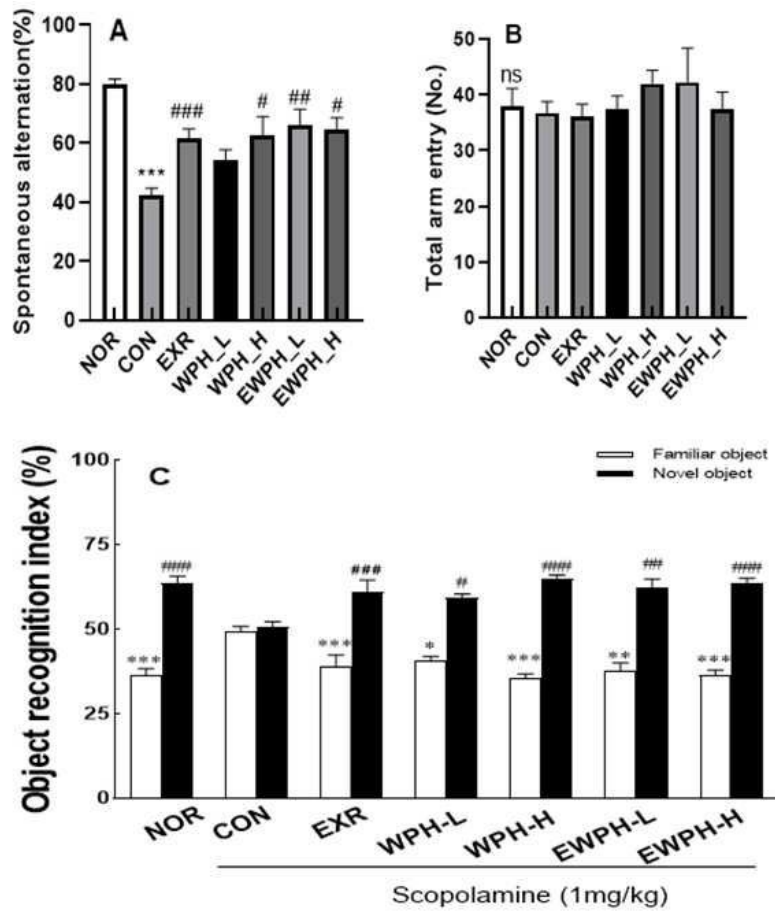
도면9



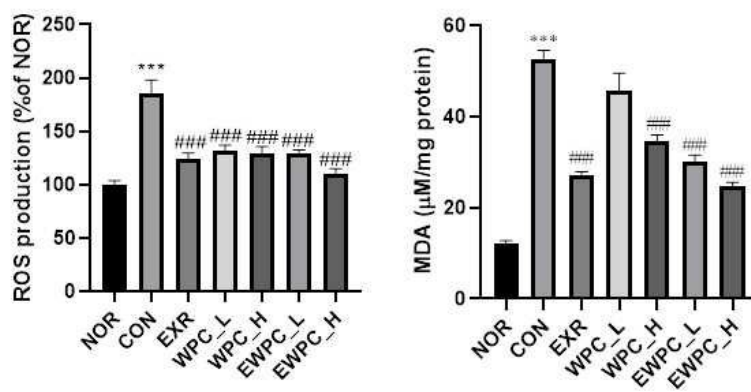
도면10



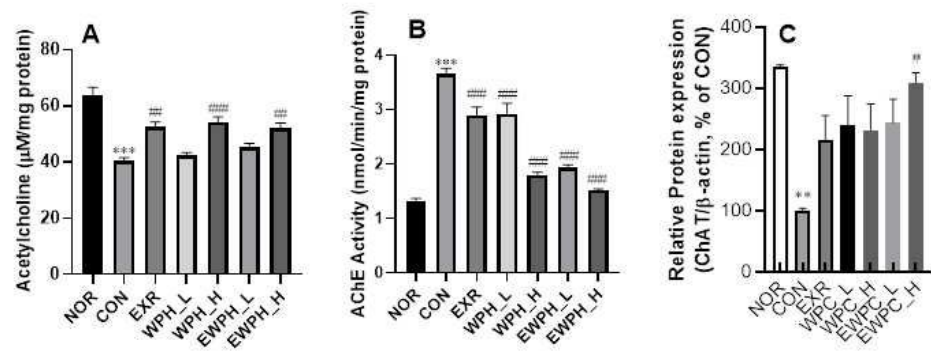
도면11



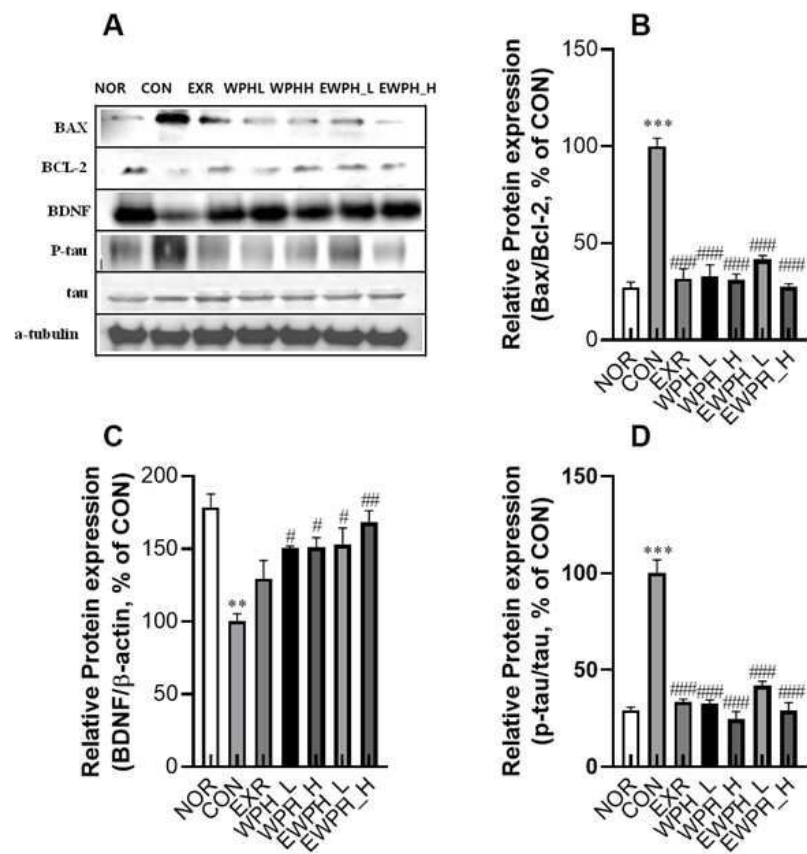
도면12



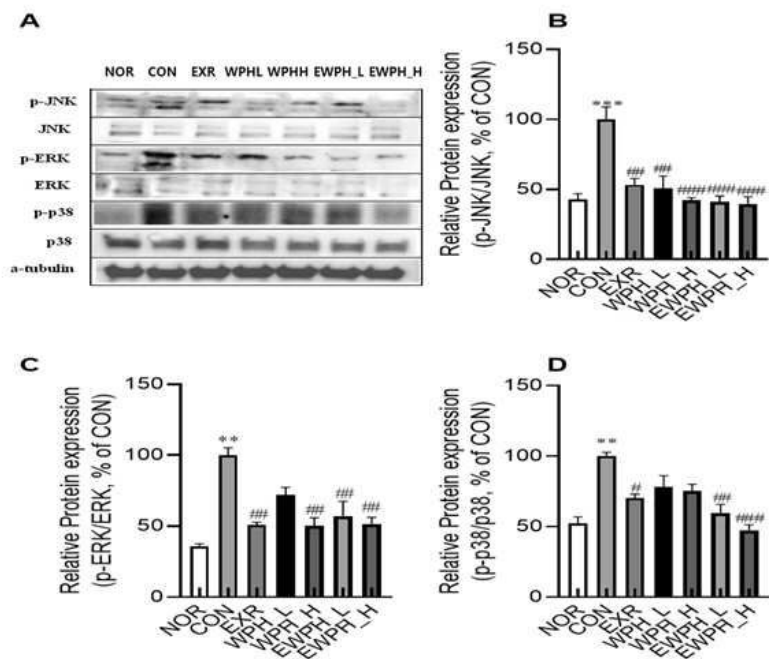
도면13



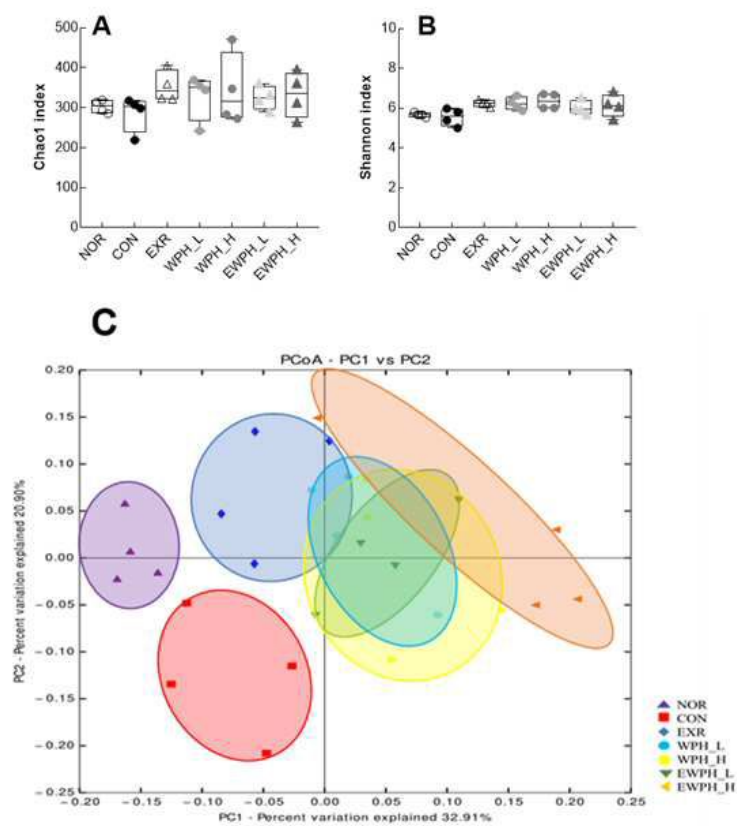
도면14



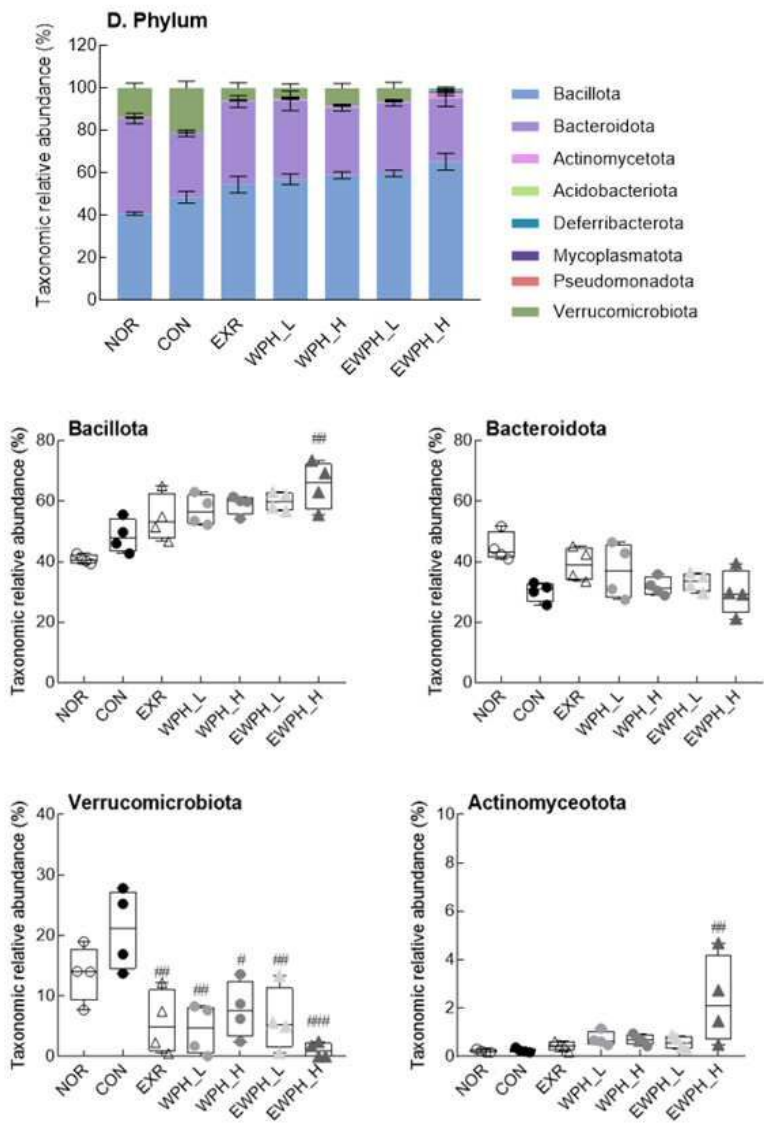
도면15



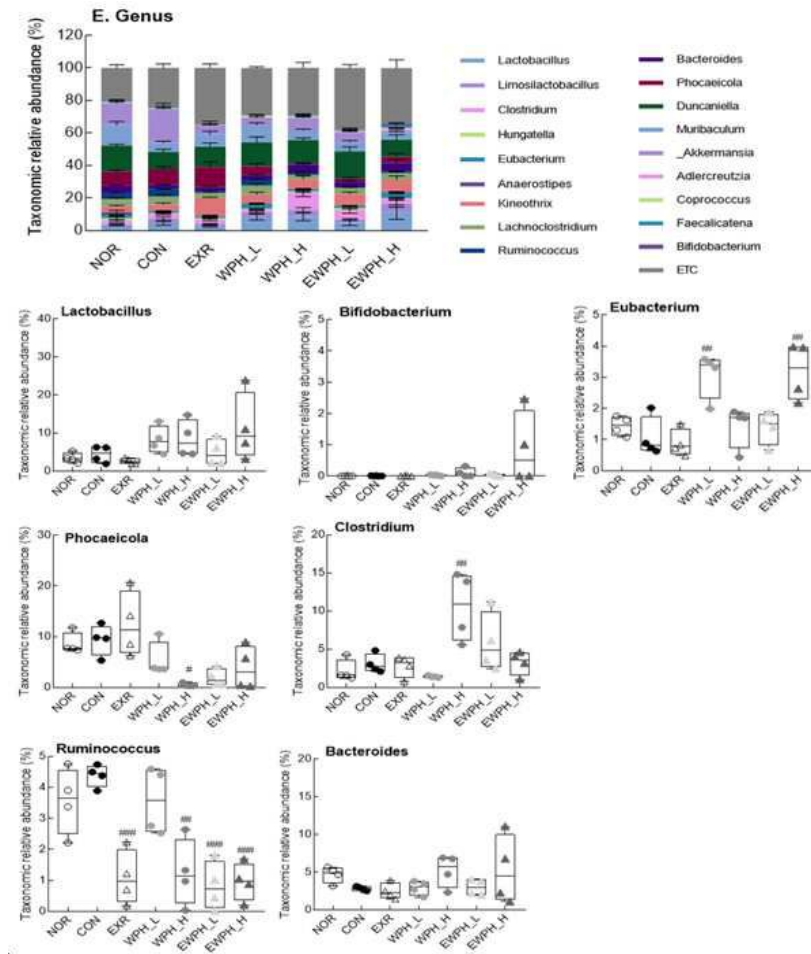
도면16



도면17



도면18



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.