(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0000143
(43) 공개일자 2017년01월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/305 (2006.01) *A61K 38/08* (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/18 (2016.08)
A61K 38/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0088960
(22) 출원일자 2015년06월23일
심사청구일자 2015년06월23일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김명옥
경상남도 진주시 가호로44번길 7 대동아파트 102동 303호
(74) 대리인
최규환

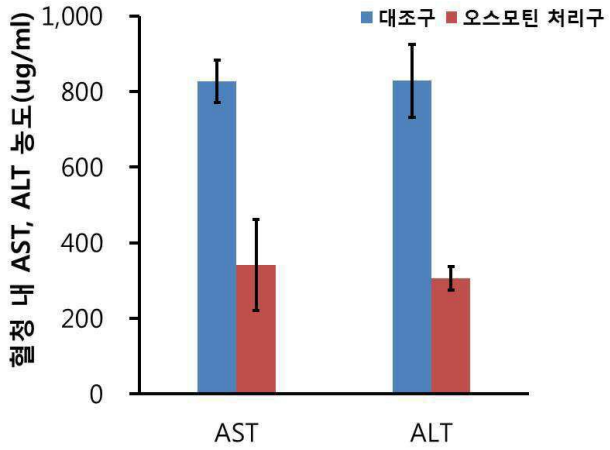
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **오스모틴 단백질 또는 오스모틴 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 간기능 및 신장기능 장애의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 오스모틴 단백질 또는 오스모틴 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 간기능 및 신장기능 장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 오스모틴 펩타이드를 투여한 비만 모델 쥐의 혈액에서 AST, ALT, BUN 및 크레아틴 수치를 감소시키고, pAMPK, PPAR-α 및 PGC1-α 단백질의 발현량을 증가시켜 간 대사를 활성화시키는 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
A23V 2200/332 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012-0009521
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 미래유망 융합기술 파이오니어사업
연구과제명 치매(뇌기능항진 조절) 치료 천연신물질 소재개발 ; 나노담체 적합형 약물 기술개발
기 여 율 7/10
주관기관 경상대학교
연구기간 2012.09.01 ~ 2018.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015-0364
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 연구성과실용화진흥원
연구사업명 2015년 연구성과사업화지원사업 기술업그레이드 R&D
연구과제명 오스모틴 치매치료제 상용화 위한 생산성의 극대화 및 권리권 확대
기 여 율 3/10
주관기관 경상대학교
연구기간 2015.04.27 ~ 2017.04.26

명 세 서

청구범위

청구항 1

오스모틴 단백질 또는 오스모틴 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 간기능 및 신장기능 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 오스모틴 펩타이드는 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴 펩타이드이거나, (b) 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 삽입되고, 간기능 및 신장기능 장애를 예방 또는 개선할 수 있으며, (a)로부터 유도된 오스모틴 펩타이드인 것을 특징으로 하는 간기능 및 신장기능 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 간기능 및 신장기능 장애는 비만에 의해 발생한 것을 특징으로 하는 간기능 및 신장기능 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 오스모틴 단백질 또는 오스모틴 펩타이드는 조성물의 중량에 대하여 0.1 내지 100 중량% 함유되는 것을 특징으로 하는 간기능 및 신장기능 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 오스모틴 단백질 또는 오스모틴 펩타이드는 AST 또는 ALT의 혈액 내 함량을 감소시키고, 혈액(Blood) 속에 있는 요소질소(Urea Nitrogen)의 함량 또는 크레아틴의 함량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 간기능 및 신장기능 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 음료, 환, 정제(tablet), 캡슐제(capsule), 산제 중에서 선택된 어느 하나의 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 간기능 및 신장기능 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

오스모틴 단백질 또는 오스모틴 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 간기능 및 신장기능 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 오스모틴 펩타이드는 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴 펩타이드이거나, (b) 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 삽입되고, 간기능 및 신장기능 장애를 예방 또는 치료할 수 있으며, (a)로부터 유도된 오스모틴 펩타이드인 것을 특징으로 하는 간기능 및 신장기능 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 간기능 및 신장기능 장애는 비만에 의해 발생한 것을 특징으로 하는 간기능 및 신장기능 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 오스모틴 단백질 또는 오스모틴 펩타이드는 조성물의 중량에 대하여 0.1 내지 100 중량% 함유되는 것을 특징으로 하는 간기능 및 신장기능 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 오스모틴 단백질 또는 오스모틴 펩타이드는 AST 또는 ALT의 혈액 내 함량을 감소시키고, BUN 또는 크레아틴의 혈액 내 함량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 간기능 및 신장기능 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

제7항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 추가로 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 것을 특징으로 하는 간기능 및 신장기능 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 간장 및 신장기능 장애 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는 오스모틴 단백질 또는 오스모틴 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 간기능 및 신장기능 장애의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 단독으로 발생하는 간기능 및 신장기능 장애 각각에 대해서뿐만 아니라, 양 장기의 기능 장애에도 우수한 예방 및 치료효과를 발휘하는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 생체에서 간(liver)은 담즙을 분비하여 소장에서의 지방의 소화 및 흡수를 돕고, 각종 영양소의 화학적 변화, 저장 및 이용 등 중간대사에 관여한다. 또한, 체외에서 유입된 독물 등의 유해물질 및 체내에 만들어진 유독물질의 산화, 환원 및 응집 등의 해독처리를 가하거나 이를 담즙에 섞어서 폐기 또는 신장으로 보내 뇨로 배설한다. 신장(kidney)은 세뇨관에서 여과 및 분비기구에 의해 혈액으로부터 유입된 노폐물 및 생체 내로 들어온 유해물질인 약물 또는 독물을 뇨로 배설하는 기능을 갖는다.

[0003] 상기한 바와 같이, 상기 노폐물 및 약물 등에 의한 간 및 신장 각각의 단독 질환뿐만 아니라, 양 장기의 병적인 장애 또는 질환이 다발하기 쉽다. 하지만, 아직까지는 양 장기의 장애 또는 질환을 동시에 치유할 수 있는 약물 또는 약제 등의 개발은 전무한 실정이다.

[0004] 한편, 식물에서 유래된 오스모틴은 지방산 산화 조절, 글루코오스 수득, 인산화(AMP 키나아제) 및 신호 변환 경로에 관여한다. 오스모틴(24 kDa)은 당분-측정 단백질 타우마틴(sweet-testing protein thaumatin)과 상동성을 가지는 PR-5 패밀리에 포함되는 안정한 단백질이고, 효모에서 세포 내 신호 전달을 유도하는 것으로 알려져 있다. 오스모틴은 열, 산성 및 효소에 저항성을 가지므로 소화에 의해 분해되지 않고 신체를 순환할 수 있다. 이러한 오스모틴은 동물에 존재하는 아디포넥틴과 상동체로 알려져 있는데, 아디포넥틴의 경우 일부 항-염증, 항-당뇨, 항-죽상경화 능력을 가질 가능성이 있다고 밝혀진 바 있다. 또한 오스모틴은 주로 비만이나 당뇨병과 관련된 효과가 널리 알려져 있으며, 한국등록특허 제1308232호에 오스모틴을 함유하는 신경질환의 예방 및 치료용 조성물로 알려져 있으나, 오스모틴 단백질 및 오스모틴 펩타이드가 간기능 및 신장기능 장애의 예방 또는 치료용 조성물로서 알려진 바는 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 오스모틴 단백질 또는 오스모틴 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 간기능 및 신장기능 장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 유효성분인 오스모틴 펩타이드가 비만 모델 쥐의 혈액에서 AST, ALT, BUN 및 크레아틴 수치를 감소시키고, 간대사를 활성화시키는 관련 단백질인 pAMPK(phospho-Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase(pAMPK), PPAR-α(Peroxisome proliferator-activated receptor alpha) 및 PGC1-α(Peroxisome proliferator-activated receptor-ɣ coactivator 1-α) 단백질의 발현량이 비만 모델 쥐에서 감소 되었으며, 오스모틴 단백질의 처리에 의해 상승하는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 오스모틴 단백질 또는 오스모틴 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 간

기능 및 신장기능 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 오스모틴 단백질 또는 오스모틴 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 간기능 및 신장기능 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명은 오스모틴 단백질 또는 오스모틴 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 간기능 및 신장기능 장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 간, 신장 단독의 기능적 장애에 효과가 있을 뿐만 아니라, 동시에 두 기관의 장애를 예방, 개선 또는 치료하는 효과가 있는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 OB/OB 마우스에 오스모틴 단백질을 처리한 후, 혈청 내 AST(aspartate aminotransferase) 및 ALT(alanine aminotransferase)의 농도 변화를 확인한 그래프이다.

도 2는 DB/DB 마우스에 오스모틴 단백질을 처리한 후, 혈청 내 AST(aspartate aminotransferase) 및 ALT(alanine aminotransferase)의 농도 변화를 확인한 그래프이다.

도 3은 고칼로리 식이법으로 과체중을 만든 모델 마우스에 오스모틴 펩타이드를 처리한 후, 혈청 내 AST(aspartate aminotransferase) 및 ALT(alanine aminotransferase)의 농도 변화를 확인한 그래프이다.

도 4는 고칼로리 식이법으로 과체중을 만든 모델 마우스를 2달간 고칼로리 식이법으로 과체중으로 만든 후, 오스모틴 단백질을 10일 간 복강 내 주사 투여하고, 혈액을 채취하여 혈 중의 총콜레스테롤(A), 중성지질(B), 고밀도지단백 콜레스테롤(C) 및 저밀도지단백 콜레스테롤(D)의 함량을 측정한 결과를 나타낸 것이다. 대조군은 오스모틴 펩타이드를 투여하지 않은 군이고, 실험군은 오스모틴 펩타이드를 투여한 군이다.

도 5는 오스모틴 단백질의 처리에 따른 OB/OB 마우스 및 DB/DB 마우스의 혈청 내 BUN의 농도의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 6은 오스모틴 단백질의 처리에 따른 OB/OB 마우스 및 DB/DB 마우스의 혈청 내 크레아틴의 농도의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 7은 OB/OB 마우스에서 오스모틴 단백질을 투여하고, 간 조직에서의 pAMPK(A), PPARα(B) 및 PGC1-α(C)의 발현량을 웨스턴 블랏으로 확인한 결과이다.

C는 음성 대조군으로 정상 쥐이고, OB/OB는 양성 대조군으로 비만 모델 쥐이며, OB/OB+OS는 OB/OB 마우스의 복강 내(intraperitoneal Administration; I.P.) 150㎕의 오스모틴 단백질을 투여한 실험군이다.

도 8은 DB/DB 마우스에서 오스모틴 단백질을 투여하고, 간 조직에서의 pAMPK(A), PPARα(B) 및 PGC1-α(C)의 발현량을 웨스턴 블랏으로 확인한 결과이다.

C는 음성 대조군으로 정상 쥐이고, DB/DB는 양성 대조군으로 비만 모델 쥐이며, DB/DB+OS는 OB/OB 마우스의 복강 내(intraperitoneal Administration; I.P.) 150㎕의 오스모틴 단백질을 투여한 실험군이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명은 오스모틴 단백질 또는 오스모틴 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 간기능 및 신장기능 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0011] 상기 오스모틴 단백질은 식물에서 유래된 것으로, 개체에 따라 약 150 내지 250개의 아미노산으로 이루어진 단백질로서, 식물의 종류에 따라 아미노산의 구성은 상이하다. 상기 오스모틴 단백질은 식물체의 숙성한 과일에 함유되어 있는 것으로, 예를 들면, 포도 등의 과일, 재배 담배(*Nicotiana tabacum*), 오렌지(*Citrus sinensis*), 중국 해당화(*Rosa roxburghii*), 감자(*Solanum tuberosum*), 후추과(*Piper colubrinum*), 피마자(*Ricinus communis*), 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 등에 존재하는 것으로 알려져 있으나, 상기 예에 의해 본 발명에서 사용되는 오스모틴 단백질의 종류가 제한되는 것은 아니다. 즉, 본 발명의 오스모틴 단백질은 그 기원에 제한이 없으며, 상기와 같은 다양한 식물체로부터 유래된 오스모틴 단백질이 사용될 수 있고, 공지된 유전공학적 방법에 따라 인위적으로 합성되어 사용될 수도 있다.

[0012] 상기 오스모틴 펩타이드는 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴 펩타이드이거나, (b) 서열번호

1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 삽입되고, 간기능 및 신장기능 장애를 예방 또는 개선할 수 있으며, (a)로부터 유도된 오스모틴 펩타이드인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다. 상기 오스모틴 단백질 또는 오스모틴 펩타이드는 조성물의 중량에 대하여 0.1 내지 100 중량% 함유되는 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다. 상기 오스모틴 단백질 또는 오스모틴 펩타이드는 AST 또는 ALT의 혈액 내 함량을 감소시키고, BUN 또는 크레아틴의 혈액 내 함량을 감소시키는 것을 특징으로 한다. 아미노전이 효소인 AST(aspartate aminotransferase) 및 ALT(alanine aminotransferase)는 일반적으로 30~40U/ℓ의 범위일 때, 정상적인 간기능을 하고 있는 것으로 간주한다. AST 및 ALT는 아스파르트산 및 알라닌으로부터 옥살로아세트산 및 피루브산을 생성하여 최종적으로 당을 만드는데 사용되는 효소로, AST는 간, 심근, 횡문근, 신장, 뇌, 췌장, 폐, 백혈구, 적혈구 순으로 존재하며, ALT는 간에 가장 많이 존재한다. 이들 아미노전이 효소는 세포가 깨지면서 안에 들어있는 효소가 혈액으로 들어가게 되므로, 간세포의 손상 정도에 대한 지표로 사용될 수 있는 것이며, AST 보다는 ALT가 '간 손상'에 대하여 보다 더 특이적이다. 간 또는 신장 기능 수치의 상승원인으로는 1) 만성 B형 간염 또는 만성 C형 간염을 포함하는 만성 바이러스성 간염, 2) 알코올성 간질환, 3) 약인성 간 손상, 4) 지방간 및 비알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis; NASH), 5) 자가면역성 간염, 6) 혈색소침착증, 7) 윌슨씨병 8) 비만 등이 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.

[0013] 한편, 요소는 단백질의 대사 산물로, 탈아미노에 의해 생긴 암모니아가 독성이 강하기 때문에 간에서 요소로 전환된 후, 신장으로 이동해 배출하고, 크레아틴(creatine)은 주로 근육의 크레아틴으로부터 비효소적 탈수 반응에 의해 생산되며, 신장을 통해 배출되는데, 재흡수되지 않기 때문에 신장 기능의 이상을 감지하는 지표로 사용된다.

[0014] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 음료, 환, 정제(tablet), 캡슐제(capsule), 산제 중에서 선택된 어느 하나의 제형인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않으며, 본 발명의 건강기능식품 조성물은 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 제조될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 제조될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 카라멜, 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 중에서 선택된 어느 하나의 형태일 수 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다. 즉, 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다.

[0015] 상기 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 및 천연 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알킨산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 또한, 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 상기의 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있으며, 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 단당류, 말토스, 슈크로스와 같은 이당류, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 다당류, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이 있다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 오스모틴 단백질 또는 오스모틴 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 간기능 및 신장기능 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0017] 상기 오스모틴 펩타이드는 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴 펩타이드이거나, (b) 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 삽입되고, 간기능 및 신장기능 장애의 예방 또는 치료할 수 있으며, (a)로부터 유도된 오스모틴 펩타이드인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다. 상기 간기능 및 신장기능 장애는 비만에 의해 발생한 것이 특징이지만 이에 한정하는 것은 아니며, 상기 오스모틴 단백질 또는 오스모틴 펩타이드는 조성물의 중량에 대하여 0.1 내지 100 중량% 함유되는 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다. 상기 오스모틴 단백질 또는 오스모틴 펩타이드는 혈액 내 AST 또는 ALT의 함량을 감소시키고, 혈액 내 BUN(Blood Urea Nitrgen) 또는 크레아틴의 함량을 감소시키는 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명의 약학 조성물은 추가로 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 계면활성제, 결합제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여 방식으로 적용된다. 본 발명의 약학 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.

[0021] 상기 간기능 장애는 간기능의 일부 또는 전부에 이상이 있는, 급성 또는 만성 간질환을 포함하는 의미로서, 알콜성 또는 비알콜성 지방간, A형 B형, 또는 C형 급성간염, 만성 간염, 간경변, 간섬유화 및 간경화, 독성간질환 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 마찬가지로 신장기능 장애는 신장기능의 일부 또는 전부에 이상이 있는, 급성 또는 만성 신장질환을 포함하는 것을 의미하며, 일례로 약물 등에 의해 생기는 급성 신우염 및 만성 신우염, 세균 및 바이러스 감염에 의한 급성 신우염 등 사구체, 세뇨관, 루프스 등의 신장 분에 기능장애를 나타내는 것을 의미하지만 이에 한정하지 않는다.

[0022] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0023] [시료]

[0024] 본 발명에 사용된 오스모틴 단백질(DOI:10.2210/pdb1pcv/pdb)은 담배(*Nicotiana Tabacum*) 종자로부터 유래한 것을 사용하였고, 오스모틴 펩타이드는 상기 오스모틴 단백질의 아미노산 서열 중에서 157번째 부터 165번째의 서열인 -CTQGPCGPT-의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 합성하여 사용하였다.

[0025] [실험모델]

[0026] 고칼로리 식이를 2달간 실시하여 과체중으로 만든 모델쥐, 렙틴(leptin) 결함이 있는 동물모델인 OB/OB 마우스와 렙틴 수용체(leptin receptor)에 결함이 있는 동물모델인 DB/DB 마우스를 사용하였다.

[0027] 실험군은 고칼로리 식이를 2달간 실시하여 과체중으로 만든 모델쥐 5마리, OB/OB 마우스 5마리와 DB/DB 마우스 5마리를 사용하였으며, 5㎍/g의 오스모틴 펩타이드를 주사하여 실험하였다. 대조군은 오스모틴 펩타이드 대신에 염수(Saline)를 주사하였다.

[0028] [환경설정]

[0029] 대조군과 실험군은 동일하게 1일 사료량을 측정하여 일일 기본 식이량이 초과하지 않도록 제공하였다.

[0030] 식이 제한 기준은 고지방 식이 동물모델을 만드는 기준으로 일주일 간의 평균 식이량(케이지당 일주일 간 감소하는 평균 사료량 12.8g)의 측정결과를 기준으로 13g의 사료를 제공하였다. 사료를 제외한 나머지 요소는 일반적인 실험동물과 동일한 환경을 제공하였다. 수분보충에는 제한을 하지 않았고, 12시간 주기로 낮과 밤을 유지하도록 하였다.

[0031] 약물의 투여량은 대조군은 150㎕의 염수(Saline)를 복강 내(intraperitoneal Administration; I.P.) 투여하였고, 실험군은 150㎕의 오스모틴 단백질을 복강 내 (intraperitoneal Administration; I.P.) 투여하였다.

[0032] 약물의 투여기간은 OB/OB 마우스의 경우, 2주간 총 4회 투여하였고, DB/DB 마우스는 3주간 총 6회 투여하였다.

[0033] [혈액검사]

[0034] 1) 검사항목은 간기능 검사로, 혈청 내의 AST와 ALT의 수치를 측정하고, 신장기능 검사로 BUN 및 크레아틴(Creatine) 검사를 실시하였다.

[0035] 2) 혈액의 채취방법: 23gage 바늘이 부착된 5cc 주사기로 심장천공(heart puncture) 하여 혈액을 채취하였다.

[0036] 3) 혈액의 분리방법: 채취한 전혈이 굳기 전에, SST 튜브에 담고, 3000rpm으로 5분간 원심분리 후, 상층액인 혈청만을 분리하여 사용하였다.

[0037] [웨스턴 블랏(Western Blot) 분석]

[0038] OB/OB 마우스 및 DB/DB 마우스에서 오스모틴 단백질 투여 여부에 따른, pAMPK, PPAR-α 및 PGC1-α 단백질의 발현량 변화를 웨스턴 블롯 기법으로 확인하였다.

[0039] 상기 모델 쥐의 조직으로부터 추출한 단백질을 10% SDS-PAGE를 이용해서 분리하였고, 니트로셀룰로오스 멤브레인에 이동시켰다. 단백질이 이동한 멤브레인은 Tris-buffer saline/Tween 20 용액이 함유된 3% skim milk로 블로킹하고 TBS 완충용액으로 3번 세척하였다.

[0040] pAMPK 항체(Santa Cruz Biotechnology), PPAR-α항체(Santa Cruz Biotechnology) 및 PGC1-α 항체(Santa Cruz Biotechnology)를 도포하여 항원항체반응시켰다. 면역반응성 밴드를 나타내기 위해 Horseradish perosidase-conjugated 2차 항체를 처리한 후, WEST-ZOL plus Western Blot Detection System(iNtRON Biotechnology)으로 검출하였다.

[0041] **실시예 1. 간기능 검사**

[0042] 도 1 및 2에 개시한 바와 같이, OB/OB 마우스와 DB/DB 마우스에서 오스모틴 단백질의 처리에 의해, 아미노전이효소인 AST(aspartate aminotransferase) 및 ALT(alanine aminotransferase)의 혈청 내 함량이 감소하였음을 확인하였다.

[0043] 또한, 도 3에 개시한 바와 같이, 고칼로리 식이법으로 과체중을 만든 비만 모델 마우스에서 오스모틴 펩타이드의 처리에 의해, 아미노이 효소인 AST 및 ALT의 혈청 내 함량이 현저하게 감소하였음을 확인하였다.

[0044] 또한, 도 4에 개시한 바와 같이, 모델쥐(마우스)를 2달간 고칼로리 식이법으로 과체중으로 만든 후, 5㎍/g의 오스모틴 펩타이드를 150㎕의 양으로, 2일에 1회씩, 총 10일 동안 5회 복강 내 주사 투여하고, 혈액을 채취하여 혈중의 총콜레스테롤(A), 중성지질(B), 고밀도지단백 콜레스테롤(C) 및 저밀도지단백 콜레스테롤(D)의 함량을 측정한 결과 총콜레스테롤, 중성지질 및 저밀도지단백 콜레스테롤의 함량이 감소되었고, 고밀도지단백 콜레스테롤의 함량이 증진된 것을 확인하였다.

[0045] **실시예 2. 신장기능 검사**

[0046] 혈액(Blood) 속에 있는 요소질소(Urea Nitrogen)의 함량 및 크레아틴의 혈액 내 함량을 측정함으로써, 신장기능을 확인하고자 하였다.

[0047] 도 5 및 6에 개시한 바와 같이, OB/OB 마우스와 DB/DB 마우스에 오스모틴 단백질 처리에 의해 BUN(Blood Urea Nitrogen) 및 크레아틴(creatin)의 함량이 감소하였음을 확인하였다.

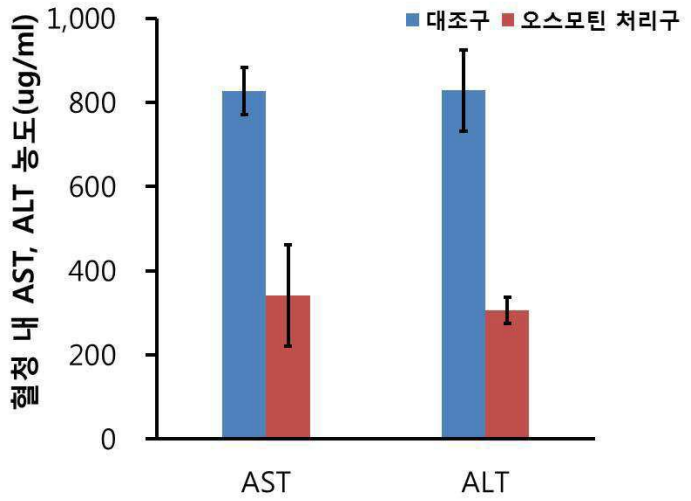
[0048] **실시예 3. 간 대사 조절에 영향을 미치는 단백질들의 발현량 확인**

[0049] 도 7 및 도 8에 개시한 바와 같이, 정상 쥐보다 비만 쥐인 OB/OB 마우스와 DB/DB 마우스에서 pAMPK, PPAR-α 및 PGC1-α 단백질의 발현량이 감소되었으며, 오스모틴 단백질의 처리에 의해 상승하는 것을 확인하였다.

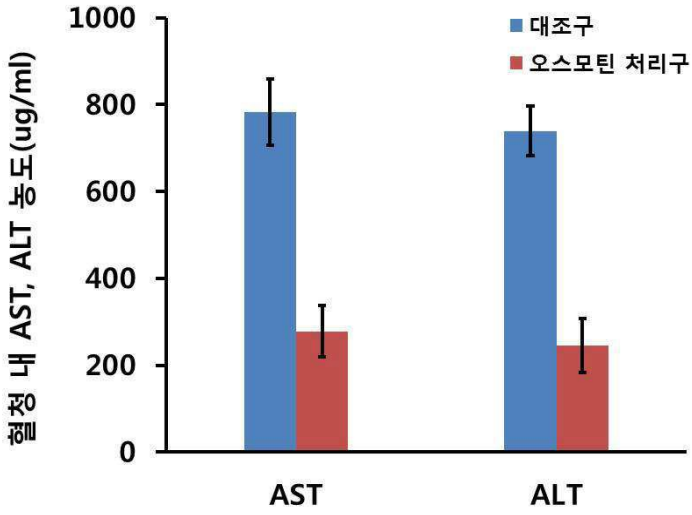
[0050] 상기 3종의 단백질은 지방산 산화(F.A-oxidation) 뿐만 아니라 미토콘드리아에서의 생체 내 합성(biogenesis)의 활성화에 관여하는 것이다. 이들 단백질의 발현량이 정상 쥐에 비해 감소하였으나, OB/OB 마우스와 DB/DB 마우스에 오스모틴 단백질 처리에 의해 pAMPK, PPAR-α 및 PGC1-α 단백질의 발현량이 상승한 것을 확인하였다.

도면

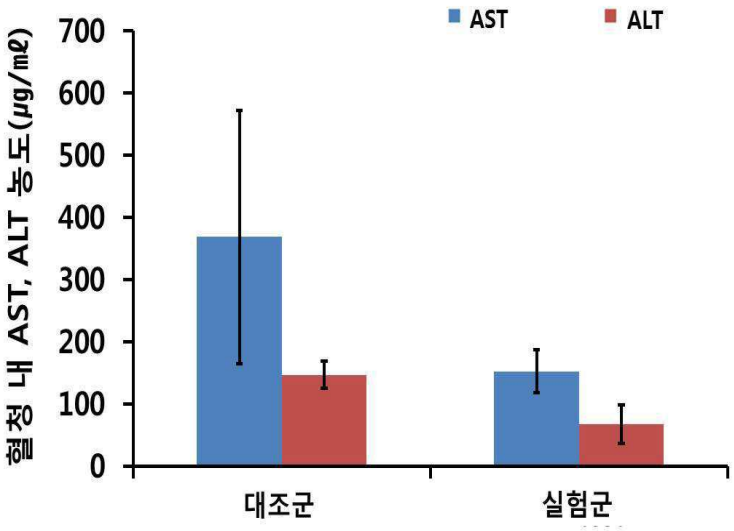
도면1


혈청 내 AST, ALT 농도(ug/ml)
1,000
800
600
400
200
0
대조구
오스모틴 처리구
AST
ALT

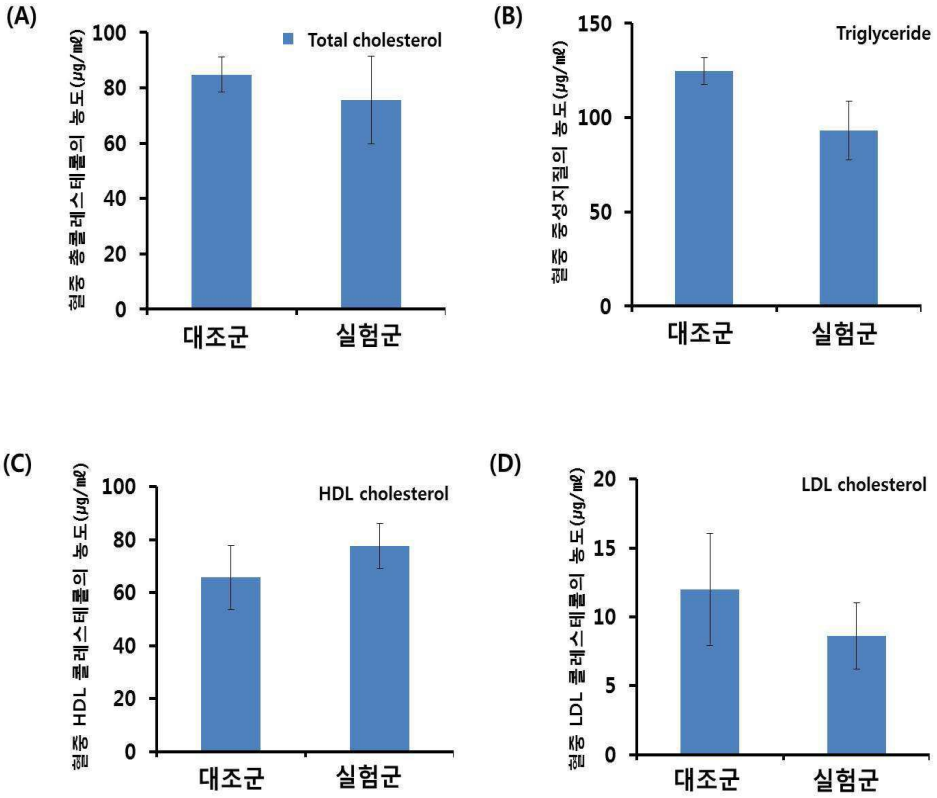
도면2


혈청 내 AST, ALT 농도(ug/ml)
1000
800
600
400
200
0
대조구
오스모틴 처리구
AST
ALT

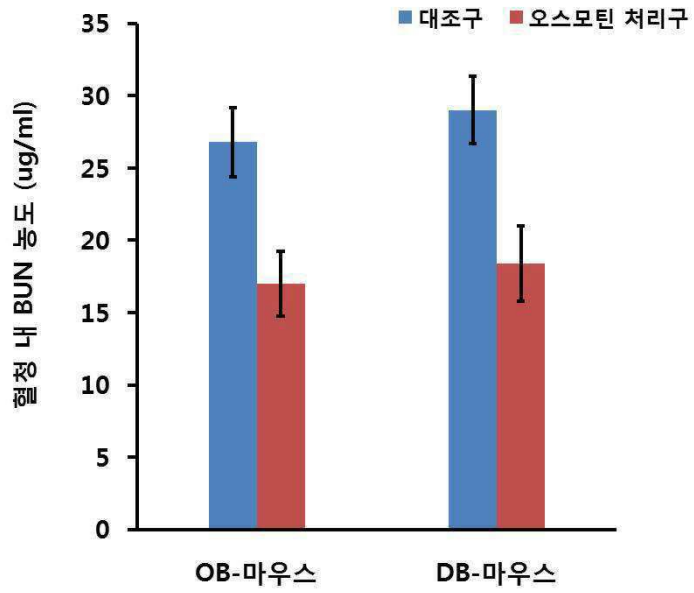
도면3


AST
ALT
혈청 내 AST, ALT 농도(㎍/㎖)
700
600
500
400
300
200
100
0
대조군
실험군

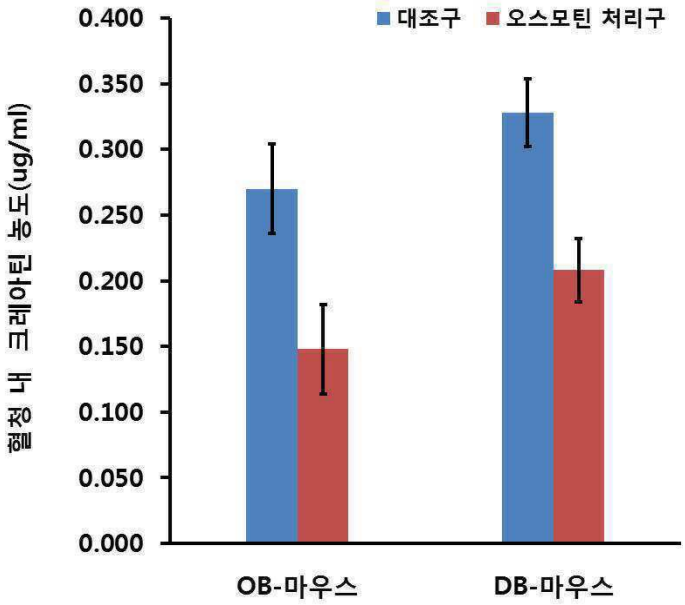
도면4


(A)
Total cholesterol
혈중 총콜레스테롤의 농도(㎍/㎖)
100
80
60
40
20
0
대조군
실험군
(B)
Triglyceride
혈중 중성지질의 농도(㎍/㎖)
150
100
50
0
대조군
실험군
(C)
HDL cholesterol
혈중 HDL 콜레스테롤의 농도(㎍/㎖)
100
80
60
40
20
0
대조군
실험군
(D)
LDL cholesterol
혈중 LDL 콜레스테롤의 농도(㎍/㎖)
20
15
10
5
0
대조군
실험군

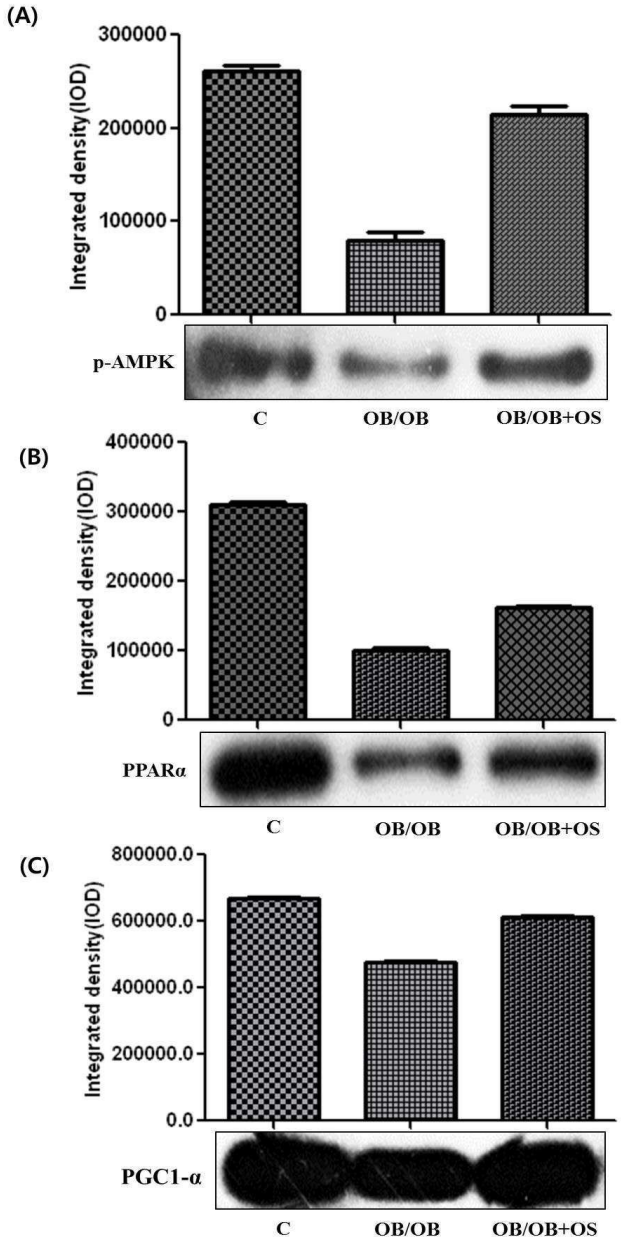
도면5


대조구
오스모틴 처리구
혈청 내 BUN 농도 (ug/ml)
35
30
25
20
15
10
5
0
OB-마우스
DB-마우스

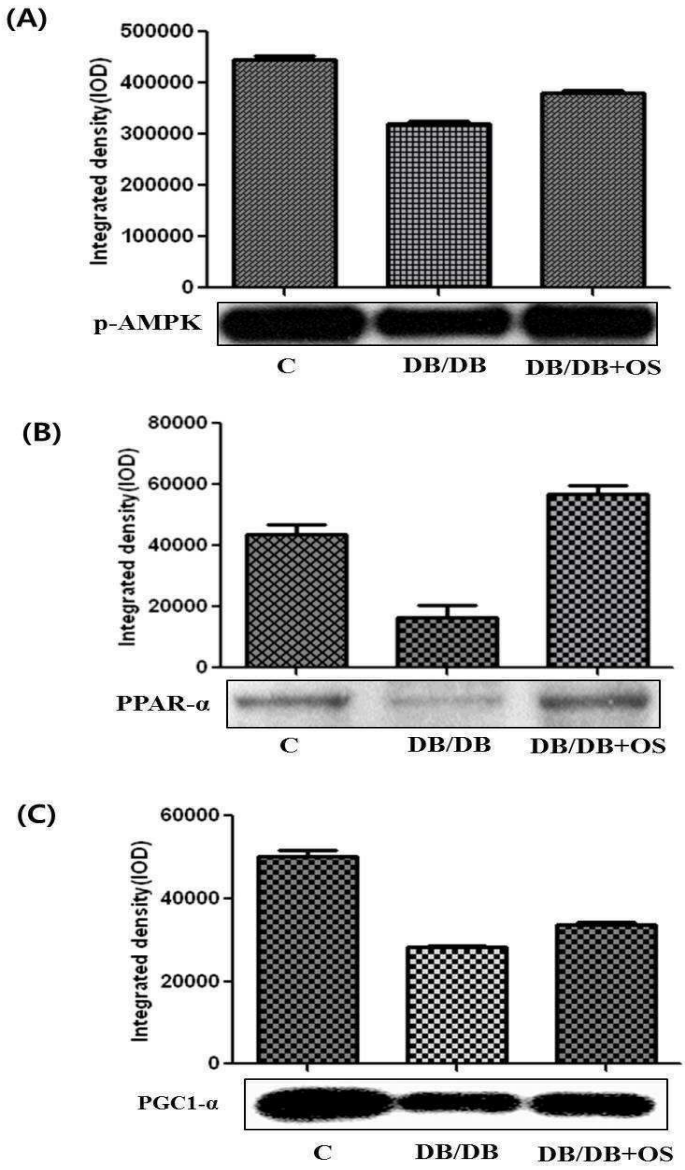
도면6


대조구
오스모틴 처리구
혈청 내 크레아틴 농도(ug/ml)
0.400
0.350
0.300
0.250
0.200
0.150
0.100
0.050
0.000
OB-마우스
DB-마우스

도면7


(A)
Integrated density(IOD)
300000
200000
100000
0
p-AMPK
C
OB/OB
OB/OB+OS
(B)
Integrated density(IOD)
400000
300000
200000
100000
0
PPARα
C
OB/OB
OB/OB+OS
(C)
Integrated density(IOD)
800000.0
600000.0
400000.0
200000.0
0.0
PGC1-α
C
OB/OB
OB/OB+OS

도면8



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Composition for preventing or treating liver and kidney disorder comprising osmotin protein or osmotin peptide as effective component

<130> PN15118

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 1

Cys Thr Gln Gly Pro Cys Gly Pro Thr

1 5