



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0124962  
(43) 공개일자 2015년11월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 1/29 (2006.01) A23L 1/305 (2006.01)  
A61K 31/205 (2006.01) A61K 31/23 (2006.01)  
A61K 31/401 (2006.01) A61K 31/405 (2006.01)  
A61K 31/4172 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23L 1/293 (2013.01)  
A23L 1/305 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7024630

(22) 출원일자(국제) 2014년02월12일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2015년09월09일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/016025

(87) 국제공개번호 WO 2014/127000

국제공개일자 2014년08월21일

(30) 우선권주장

61/763,797 2013년02월12일 미국(US)

(71) 출원인

유니버시티 오브 쉐던 캘리포니아

미국, 캘리포니아주 90015, 로스앤젤레스, 사우스 올리브 스트리트 1150, 스위트 2300

(72) 발명자

론고, 발터 디.

미국, 캘리포니아 90293, 플라야 델 레이, 8240 지틀라 테라스

브랜드호스트, 세바스찬

미국, 캘리포니아 90006, 로스앤젤레스, #5, 950 매그놀리아 애비뉴

레바인, 모건 엘리스

미국, 캘리포니아 93101, 산타바바라, 637 더블유. 캐논 페르디도 에스티.

(74) 대리인

허용록

전체 청구항 수 : 총 43 항

(54) 발명의 명칭 화학 독성 및 연령 관련 질병으로부터 보호하기 위한 방법 및 규정식

(57) 요약

장수를 향상시키고/시키거나 노화의 증상을 완화시키거나 연령 관련 질환을 예방하는 방법이 제공된다. 본 방법은 대상체의, 일일 단백질 섭취량의 평균 및 유형, IGF-I 및 IGFBP1 수준과, 전체 사망률, 암 및 당뇨병에 대한 위험 인자를 결정하는 단계를 포함한다. 단백질 소비량과 관련하여, 동물성 및 식물성 소스로부터의 단백질 칼로리의 상대적인 양이 결정된다. 매 2주 내지 2개월의 빈도에 의한, 주기적인 정상 칼로리 또는 저 칼로리의, 그러나 저 단백질의 음식 모방 규정식은 대상체의 평균 일일 단백질 섭취 수준 및 유형 및/또는 IGF-I 수준, 및/또는 IGFBP1 수준이 소정의 컷오프 섭취량/수준보다 더 높거나 더 낮은 것으로 확인될 경우 및 대상체가 소정의 연령보다 더 어린 경우에 대상체에게 제공된다. 본 방법은 또한 화학독성의 증상을 완화시키는 것으로 밝혀졌다.

대표도

체 중	제 1 일	제 2 일	제 3 일	제 4 일	제 5 일	$\Delta 5\text{-day}^1$	$\Delta 5\text{-day}^2$
	kcal/일						
$\geq 200$ lb	1170	828	768	810	833	-5591	-9591
151-200 lb	1134	790	737	774	795	-5772	-7772
$\leq 150$ lb	1098	751	706	738	756	-5952	-5952
	kcal/lb						
250 lb	4.7	3.3	3.1	3.2	3.3		
200 lb	5.7	3.9	3.7	3.9	4.0		
150 lb	7.3	5.0	4.7	4.9	5.0		
	kcal/kg						
113 kg	10.3	7.3	6.8	7.1	7.3		
91 kg	12.5	8.7	8.1	8.5	8.8		
68 kg	16.1	11.0	10.4	10.8	11.1		

<sup>1</sup> 2,000 칼로리/일의 규정식을 기반으로 함

<sup>2</sup> 각각 200 lb 이상, 150 내지 200 lb 및 150 lb 이하의 사람 체중에 대하여 2,800, 2,400 및 2,000 칼로리의 규정식을 기반으로 함

표 9. 음식 모방 규정식(fasting mimicking diet: FMD), 프롤론(Prolone)은 영양분을 최대화하면서 음식-유사 응답을 유발하기 위하여 엘-뉴트라(L-Nutra)에 의해 개발됨

(52) CPC특허분류

*A61K 31/205* (2013.01)

*A61K 31/23* (2013.01)

*A61K 31/401* (2013.01)

*A61K 31/405* (2013.01)

*A61K 31/4172* (2013.01)

*G01N 33/68* (2013.01)

*G01N 2333/65* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

대상체에 있어서 장수를 증가시키는 방법으로서,

대상체의 평균 일일 단백질 섭취 수준이 소정의 컷오프(cutoff) 단백질 섭취 수준보다 더 큰지를 확인하는 단계;

대상체에 의해 소비되는 식물계 단백질 및 동물계 단백질의 양을 결정하는 단계;

대상체의 평균 일일 단백질 수준이 컷오프 단백질 섭취 수준보다 더 클 경우, 대상체가 소정의 연령보다 더 어리다면 대상체에게 저 단백질 규정식을 제공하는 단계 - 저 단백질 규정식은 소정의 컷오프 단백질 섭취 수준보다 더 적은 단백질로부터의 칼로리 퍼센트를 제공함 - ; 및

대상체의 IGF-1 수준을 모니터링하여 규정식의 빈도 및 유형을 결정하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 대상체의 연령이 소정의 연령보다 더 많을 경우, 고 단백질 규정식을 대상체에게 제공하며, 고 단백질 규정식은 소정의 컷오프 단백질 섭취 수준보다 더 큰 단백질 칼로리 백분율을 갖는 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 저 단백질 규정식을 소정의 일수 동안 대상체에게 제공하는 방법.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 저 단백질 규정식을 대상체에게 3 내지 7일 동안 제공하는 방법.

#### 청구항 5

제3항에 있어서, 저 단백질을 대상체에게 주기적으로 제공하는 방법.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 저 단백질 규정식을 대상체에게 제공하는 빈도는 대상체의 인슐린 내성 수준, 공복 글루코스 수준, IGF-I, IGFBP1, 비만, 체질량 지수(Body Mass Index), 이전 10년 내의 체중 감량, 암 가족력, 당뇨병 가족력, 조기 사망 가족력에 의해 결정되는 방법.

#### 청구항 7

제3항에 있어서, 저 단백질 규정식은 10% 미만의 단백질로부터의 칼로리를 제공하는 금식 모방 규정식이고/이거나 모든 단백질이 식물계인 방법.

#### 청구항 8

제3항에 있어서, 저 단백질 규정식은 당뇨병 또는 암을 예방 또는 치료하며, 연령-관련 사망 및 기타 연령-관련 질환을 지연시키는 방법.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 저 단백질 규정식은 저 단백질 규정식의 제1일 동안 대상체 1 파운드당 4.5 내지 7 kcal를 제공하고, 저 단백질 규정식의 제2일 내지 제5일 동안 대상체 1 파운드당 일일 3 내지 5 kcal를 제공하며, 저 단백질 규정식은

제1일에 30 g 미만의 당분;

제2일 내지 제5일에 20 g 미만의 당분;  
 제1일에 28 g 미만의 단백질 (모두 식물계);  
 제2일 내지 제5일에 18 g 미만의 단백질 (모두 식물계);  
 제1일에 20 내지 30 g의 단일불포화 지방;  
 제2일 내지 제5일에 10 내지 15 g의 단일불포화 지방;  
 제1일에 6 내지 10 g의 다중불포화 지방;  
 제2일 내지 제5일에 3 내지 5 g의 다중불포화 지방;  
 제1일에 12 g 미만의 포화 지방;  
 제2일 내지 제5일에 6 g 미만의 포화 지방; 및  
 제2일 내지 제5일에 일일 12 내지 25 g의 글리세롤을 포함하는 방법.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 제2 규정식을 제2 기간 동안 대상체에게 주는 단계를 추가로 포함하며, 제2 규정식은 저 단백질 규정식 후 25 내지 26일 동안 대상체의 정상 칼로리 소비량의 10% 이내인 전체 칼로리 소비량을 제공하는 방법.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 저 단백질 규정식과 제2 규정식의 조합은 대상체에게 대상체의 정상 칼로리 섭취량의 10% 이내인 총 칼로리수를 제공하는 방법.

#### 청구항 12

제9항에 있어서, 저 단백질 규정식은 모든 날에서의 식이 섭취의 일일 권고량의 50% 이상을 포함하는 방법.

#### 청구항 13

제9항에 있어서, IGF-I의 수준은 감소하고 IGFBP1의 수준은 증가하는 방법.

#### 청구항 14

제3항에 있어서, 저 단백질 규정식은 매우 낮은 단백질 양의 규정식 또는 단백질 무함유 규정식과 함께 2주 내지 2개월마다 5 내지 7일의 기간 동안 소비될 과도한 수준의 비필수 아미노산을 제공하는 보충제를 포함하는 방법.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 70% 초과 단백질 칼로리가 식물계인 방법.

#### 청구항 16

제14항에 있어서, 저 단백질 규정식은 정상 단백질 규정식과 교대되며, 저 단백질 규정식은 7일 동안 그리고 최대 2개월 동안 제공되고, 이때 5 내지 7일간의 보충제가 2주 내지 2개월마다 제공되며 그 사이에 1 내지 7주의 정상식이 있는 방법.

#### 청구항 17

제14항에 있어서, 보충제는 조합된 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페니알라닌, 트레오닌, 트립토판, 발린, 및 아르기닌이 대상체의 규정식의 총 중량의 5% 미만인 양으로 존재하도록 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페니알라닌, 트레오닌, 트립토판, 발린, 및 아르기닌을 실질적으로 제외하면서 질소원으로서 하기 아미노산, 즉, 알라닌, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글라이신, 히스티딘, 프롤린, 세린, 및 타이로신 중 1가지 이상을 제공하는 방법.



**청구항 18**

제17항에 있어서, 조합된 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페니알라닌, 트레오닌, 트립토판, 발린, 및 아르기닌은 대상체의 규정식의 총 중량의 3% 미만인 양으로 존재하는 방법.

**청구항 19**

제1항에 있어서, 대상체의 IGFBP1 수준을 모니터링하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 20**

제1항에 있어서, 소정의 연령은 65세인 방법.

**청구항 21**

제1항에 있어서, 소정의 컷오프 단백질 섭취 수준은 20%인 방법.

**청구항 22**

제1항에 있어서, 소정의 컷오프 단백질 섭취 수준은 15%인 방법.

**청구항 23**

제1항에 있어서, 컷오프 소정 컷오프 단백질 섭취 수준은 약 10% 미만인 방법.

**청구항 24**

제1항에 있어서, 컷오프 소정 컷오프 단백질 섭취 수준은 약 5% 미만인 방법.

**청구항 25**

제1항에 있어서, 저 단백질은 식물 소스(source)로부터 유래된 70% 이상의 단백질 칼로리를 갖는 방법.

**청구항 26**

제8항에 있어서, 식물성 단백질원은 대두를 포함하는 방법.

**청구항 27**

대상체에 있어서 글루코스 및/또는 IGF-1 수준을 저하시키는 방법으로서,

대상체에게 약 10% 미만의 단백질원으로부터의 칼로리를 갖는 저 단백질 규정식을 제공하는 단계; 및

대상체의 글루코스 및/또는 IGF-1 수준을 모니터링하여 단백질 규정식 섭취량을 증가시켜야 하는지 감소시켜야 하는지를 결정하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 28**

제27항에 있어서, 저 단백질 규정식은 0 내지 10%의 단백질원으로부터의 칼로리를 갖는 방법.

**청구항 29**

제27항에 있어서, 저 단백질 규정식은 0 내지 5%의 단백질원으로부터의 칼로리를 갖는 방법.

**청구항 30**

제27항에 있어서, 저 단백질 규정식은 약 0%의 단백질원으로부터의 칼로리를 갖는 방법.

**청구항 31**

제28항에 있어서, 저 단백질 규정식은 또한 50% 이상의 지방으로부터의 칼로리가 장쇄 불포화 지방산으로부터 유래되도록 하는 지방원을 포함하는 저 칼로리 규정식인 방법.

**청구항 32**

제31항에 있어서, 지방원은 야채유를 포함하는 방법.

#### 청구항 33

제32항에 있어서, 야채유는 대두유인 방법.

#### 청구항 34

제27항에 있어서, 저 단백질 규정식은 50% 이상의 지방으로부터의 칼로리가 탄소 원자수 13 내지 28의 장쇄 불포화 지방산으로부터 유래되도록 하는 지방원을 포함하는 방법.

#### 청구항 35

제27항에 있어서, 저 단백질 규정식은 25% 이상의 지방으로부터의 칼로리가 탄소 원자수 2 내지 7의 단쇄 지방산으로부터 및/또는 탄소 원자수 8 내지 12의 중쇄 포화 지방산으로부터 유래되도록 하는 지방원을 포함하는 방법.

#### 청구항 36

제35항에 있어서, 지방산은 라우르산 및/또는 미리스트산인 방법.

#### 청구항 37

제35항에 있어서, 지방산은 올리브유, 커넬유(kernel oil) 및/또는 코코넛유로부터 유래되는 방법.

#### 청구항 38

제27항에 있어서, 저 단백질 규정식은 지방으로부터의 칼로리를 상기 규정식에 함유된 총 칼로리의 약 0 내지 22%의 양으로 포함하는 방법.

#### 청구항 39

대상체에 있어서 화학독성의 증상을 완화시키는 방법으로서,

10% 미만의 단백질로부터의 칼로리를 포함하는 저 단백질 규정식을 제1 기간 동안 제공하는 단계; 및

저 단백질 규정식의 칼로리의 0 내지 50%를 갖는 칼로리 제한 규정식을 제2 기간 동안 제공하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 40

제39항에 있어서, 칼로리 제한 규정식은 0 내지 10%의 단백질원으로부터의 칼로리를 포함하는 방법.

#### 청구항 41

제39항에 있어서, 화학요법 치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 42

대상체에 있어서 화학독성을 치료하는 방법으로서,

10% 미만의 단백질로부터의 칼로리를 포함하는 저 단백질 규정식을 제1 기간 동안 제공하는 단계; 및

화학요법제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 43

제42항에 있어서, 화학요법제는 독소루비신, 시클로포스파미드, 시스플라틴, 5 플루오로우라실 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

### 발명의 설명

## 기술 분야

- [0001] 관련 출원과의 교차 참조
- [0002] 본 출원은 2013년 2월 12일자로 출원된 미국 가특허 출원 제61/763,797호의 이익을 청구하며, 상기 미국 가특허 출원의 개시 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.
- [0003] 미국 연방 정부에 의해 후원된 연구 또는 개발에 관한 진술
- [0004] 본 발명은 미국 국립 보건원에 의해 수여된 계약서 제P01 AG034906-01번 하에서의 연방 정부 지원에 의해 이루어졌다. 연방 정부는 본 발명에 대하여 특정한 권리를 갖는다.
- [0005] 1가지 이상의 측면에서, 본 발명은 연령 관련 질병 및 화학독성의 증상을 완화시키는 방법에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0006] 영양 실조가 없는 칼로리 제한(Caloric restriction; CR)은 일관되게 효모, 씨. 엘레간스(C. elegans) 및 생쥐를 포함하는 다수의 동물 모델에서 장수를 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 비-인간 영장류의 수명에 대한 CR의 영향은 여전히 논란이 많으며, 식이 조성물에 의해 대단히 많이 영향을 받을 수 있다. 유기체 모델에서 CR과 연관된 수명 연장은 GH에 대한 그의 영향, GHR에 대한 그의 영향 - 후속적인 IGF-1의 결핍을 초래함 - 및 인슐린 수준 및 시그널링(signaling)에 대한 그의 영향을 통하여 작동하는 것으로 생각된다. 장수에 대한 인슐린/IGF-1 경로의 영향은 영양소 이용가능성에 의해 조절되는 이 경로에서의 돌연변이가 수명의 2배 증가를 야기하였음을 밝힘으로써 씨. 엘레간스에서 발견되었다. 다른 연구는, Tor-S6K 및 Ras-cAMP-PKA를 포함하는, 성장 시그널링 경로에서 기능을 하는 유전자의 오르토로그(ortholog)의 돌연변이가 다수의 유기체 모델에서 노화를 촉진함을 나타냈으며, 이에 따라 프로(pro)-성장 영양소 시그널링 유전자에 의한 노화의 보존된 조절에 대한 증거가 제공되었다.
- [0007] 최근에, 혈청중 IGF-1 및 인슐린 수준의 주요 결핍을 나타내는 성장 호르몬 수용체 결핍(growth hormone receptor deficiency; GHRD)을 갖는 인간은 암 사망도 나타내지 않고 당뇨병도 나타내지 않으며, 더 높은 유병률의 비만을 가짐에도 불구하고, 이 군에서의 심장병 및 뇌졸중의 복합형(combined) 사망이 이들의 친척에서의 것과 유사함이 밝혀졌다. 암으로부터의 유사한 보호가 230 GHRD를 조사한 연구에서 또한 보고되었다.
- [0008] 단백질 제한 또는 메티오닌 및 트립토판과 같은 특정 아미노산의 제한은 장수 및 질환 위험성에 대한 칼로리 제한의 영향의 일부를 설명할 수 있으며, 그 이유는 단백질 제한이 IGF-1 수준을 감소시키고, 칼로리 섭취량과 관계없이 포유류에서 장수를 증가시킬 수 있으며, 또한, 설치류 모델에서 암 발생률을 감소시키는 것으로 밝혀졌기 때문이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0009] 따라서, 기꺼이 장기적으로 규정식을 변경시키는 대상체 및 단지 주기적인 개입을 고려하지만 달리 정상식을 계속하는 대상체 둘 모두에서 연령 관련 질병의 증상을 완화시킬 수 있는 식이 개입에 대한 필요성이 있다.

### 과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 1가지 이상의 실시 양태에 있어서, 노화 증상 또는 연령 관련 증상의 완화 방법을 제공함으로써 종래 기술의 1가지 이상의 문제점을 해결하며, 이러한 방법이 제공된다. 본 방법은 대상체의 평균 일일 단백질 섭취 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 1가지 개량에서, 평균 일일 단백질 섭취 수준은 대상체가 일일 평균 소비하는 단백질로부터의 칼로리 퍼센트로서 표현된다. 단백질 소비와 관련하여, 동물성 및 식물성 소스(source)로부터의 단백질 칼로리의 상대적인 양이 결정된다. 대상체의 평균 일일 단백질 섭취 수준이 소정의 컷오프(cutoff) 단백질 섭취 수준보다 더 높은 것으로 확인되는 경우 그리고 대상체가 소정의 연령보다 더 어릴 경우 대상체의 정상식의 치환에 있어서 주기적인 저 단백질 고 영양분 규정식이 대상체에게 제공된다.
- [0011] 또 다른 측면에서, 대상체에 있어서의 글루코스 및/또는 IGF-1 수준의 저하 방법이 제공된다. 본 방법은 식물계 단백질원으로부터의 약 10% 미만의 칼로리를 갖는 주기적인 저 칼로리 및/또는 저 단백질 규정식을 대상체에게 제공하는 단계를 포함한다. 대상체의 글루코스 및/또는 IGF-1 수준을 모니터링하여 단백질 섭취를 증가시켜야

하는지 감소시켜야 하는지를 결정한다.

[0012]

또 다른 측면에서, 저 단백질 규정식은 매우 낮은 단백질 양의 규정식 또는 단백질 무함유 규정식과 함께 5 내지 7일의 기간 동안 소비될 과도한 수준의 비필수 아미노산을 제공하는 보충제를 포함한다. 소정 개량에서, 저 단백질 규정식은 정상 단백질 규정식과 교대된다. 그러한 변동에서, 저 단백질 식물식(plant based diet)이 2주 내지 2개월마다 7일 동안 제공되며, 이때 그 사이에 1 내지 7주의 정상식이 있다. 전형적으로 보충제는, 조합된 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페니알라닌, 트레오닌, 트립토판, 발린, 및 아르기닌이 대상체의 규정식의 총 중량의 5% 미만인 양으로 존재하도록 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페니알라닌, 트레오닌, 트립토판, 발린, 및 아르기닌을 실질적으로 제외하면서 질소원으로서 하기 아미노산 중 1가지 이상을 제공한다: 알라닌, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글라이신, 히스티딘, 프롤린, 세린, 및 타이로신. 추가의 개량에서, 조합된 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페니알라닌, 트레오닌, 트립토판, 발린, 및 아르기닌은 대상체의 규정식의 총 중량의 3% 미만인 양으로 존재한다.

### 도면의 간단한 설명

[0013]

도 1. 인간 대상체에 대하여 조정된 금식 모방 규정식(fasting mimicking diet; FMD)의 칼로리에 관한 개관을 나타내는 표 9. 금식 모방 규정식(FMD), 프롤론(Prolon)은 영양분을 최대화하면서 금식-유사 응답을 유도한다. 각각 하나의 5일간의 규정식에 있어서의 소비된 칼로리와, 이외에도, 체중 1 파운드 및 1 킬로그램당 조정된 kcal가 예시되어 있다. 5일 식이 섭생법( $\Delta 5$ -day) 동안 소비되는 칼로리의 감소는 1) 일일 2,000 칼로리의 규정식을 기반으로 하거나, 또는 2) 각각 사람 체중 200 lb 이상, 150 내지 200 lb, 및 150 lb 이하에 대하여 2,800, 2,400, 및 2,000 칼로리의 규정식을 기반으로 하여 예시되어 있다.

도 2. 180 내지 200 lb의 인간 대상체에 대하여 조정된 각각의 규정식 일수에 대한 확정된 다량영양소 함량을 나타내는 표 10. 5일 FMD 섭생법의 각각의 날에 있어서의 다량영양소 함량은 평균 180 내지 200 lb의 사람을 기반으로 한다. 규정식의 제1일에서의 칼로리 섭취량은 저 칼로리 소비량에 대하여 신체가 조정되게 하기 위하여 그 다음날 (제2일 내지 제5일)과 비교하여 덜 감소된다. 프롤론 섭생법의 각각의 날에 있어서 지방, 탄수화물 (상세하게는 당분에 의한 것), 및 단백질이 기여하는 칼로리의 %가 제시되어 있다;

도 3. 본 발명의 변동에서 180 내지 200 lb의 인간 대상체에 대하여 조정된 각각의 규정식 날에 있어서의 확정된 다량영양소 함량을 나타내는 표 11. 5일 FMD 섭생법의 각각의 날에 있어서의 미량영양소 함량은 평균 180 내지 200 lb의 사람을 기반으로 한다. 일일 값의 퍼센트 (percent of the daily value; % DV)는 2,000 칼로리 규정식을 기반으로 하여 계산된다. \* 미량영양소 중 일부에 있어서, DV는 정의되지 않으며; 예시된 값은 기준 일일 섭취량(reference daily intake; RDI)을 기반으로 한다;

도 4. 콕스 비례 위험 모델(Cox Proportional Hazard Model)을 사용하면, 연령과 단백질 군 사이의 통계학적으로 유의한 ( $p < .05$ ) 상호작용이 전 원인 및 암 사망률에 대하여 발견되었다. 이러한 모델을 기반으로 하여, 예상 잔여 기대 수명을 기저선에서의 연령에 의한 각각의 단백질군에 대하여 계산하였다. 결과를 기반으로 하면, 저 단백질은 66세 이전에는 전 원인 및 암 사망률에 대하여 보호 효과가 있는 것으로 보이는데, 66세에는 이것은 해로워진다. 유의한 상호작용이 심혈관계 질환(cardiovascular disease; CVD) 및 당뇨병 사망률에 대해서는 발견되지 않았다;

도 5. 저 단백질 섭취량, 중간 정도 단백질 섭취량 또는 고 단백질 섭취량을 보고하는 50 내지 65세 및 66세 이상의 응답자에 있어서의 혈청중 IGF-1 수준. 50 내지 65세의 응답자에 있어서의 IGF-1은 고 단백질 섭취량 ( $P=0.004$ )과 비교할 때 단백질 섭취량이 적은 응답자 중에서 유의하게 더 낮다. 66세 이상에서, 고 섭취량과 저 섭취량 사이의 차이는 근소하게 유의해진다 ( $P=0.101$ ). IGF-1 수준을 계산하기 위한 코호트(cohort)는 2253명의 대상체를 포함한다. 50 내지 65세인 대상체 ( $n=1,125$ ) 중 89명은 저 단백질 카테고리에 있으며, 854명은 중간 정도 단백질의 카테고리에 있고, 182명은 고 단백질 카테고리에 있었다. 66세 이상인 대상체 ( $n=1,128$ ) 중, 80명은 저 단백질 카테고리에 있으며, 867명은 중간 정도 단백질의 카테고리에 있고, 181명은 고 단백질 카테고리에 있다.  $*P < 0.01$ ;

도 6a. 20,000개의 흑색종 (B16) 세포가 이식되고, 고 단백질 규정식 ( $n=10$ ) 또는 저 단백질 규정식 ( $n=10$ ) 중 어느 하나를 급이한 18주령 수컷 C57BL/6 생쥐에서의 종양 발생률. 도 6b. 고 단백질 규정식 ( $n=10$ ) 또는 저 단백질 규정식 ( $n=10$ ) 중 어느 하나를 급이한 (18주령) C57BL/6 수컷 생쥐에서의 B16 종양 체적 진행. 도 6c. 고 단백질 규정식 ( $n=5$ ) 또는 저 단백질 규정식 ( $n=5$ ) 중 어느 하나를 급이한 (18주령) 수컷 C57BL/6 생쥐에 있어서의 제16일에서의 IGF-1. 도 6d. 고 단백질 규정식 ( $n=10$ ) 또는 저 단백질 규정식 ( $n=10$ ) 중 어느 하나를 급이

한 수컷 (18주령) C57BL/6 생쥐에 있어서의 제16일에서의 IGFBP-1. 도 6e. 연령-매칭된(matched) 한배새끼 대조구 (Ctrl; n=7)에 대한 10개월령의 암컷 GHRKO 생쥐 (n=5)에 있어서의 B16 흑색종 종양 진행. 도 6f. 고 단백질 규정식 (n=10) 또는 저 단백질 규정식 (7%; n=10) 중 어느 하나를 급이한, 20,000개의 유방암 세포 (4T1)가 이식된 12주령 암컷 BALB/c 생쥐에 있어서의 종양 발생률. 도 6g. 고 단백질 규정식 (n=10) 또는 저 단백질 규정식 (n=10) 중 어느 하나를 급이한 암컷 (12주령) BALB/c 생쥐에 있어서의 4T1 유방암 진행. 도 6h. 고 카제인 단백질 규정식 (n=5) 또는 저 카제인 단백질 규정식 (n=5) 중 어느 하나를 급이한 암컷 (12주령) BALB/c 생쥐에 있어서의 제16일에서의 IGF-1. 도 6i. 고 카제인 단백질 규정식 (n=10) 또는 저 카제인 단백질 규정식 (n=10) 중 어느 하나를 급이한 암컷 (12주령) BALB/c 생쥐에 있어서의 제16일에서의 IGFBP-1. 도 6j. 고 대두 단백질 규정식 (n=5) 또는 저 대두 단백질 규정식 (n=5) 중 어느 하나를 급이한 암컷 (12주령) BALB/c 생쥐에 있어서의 제16일에서의 IGF-1. 도 6k. 고 대두 단백질 규정식 (n=10) 또는 저 대두 단백질 규정식 (n=10) 중 어느 하나를 급이한 암컷 (12주령) BALB/c 생쥐에 있어서의 제16일에서의 IGFBP-1. 도 6l. 0.5배 1배 또는 2배 농도의 표준 아미노산 믹스(mix)에 노출된 효모의 생존성 및 도 6m. 상기 효모의 DNA 돌연변이 빈도. 도 6n. 모든 아미노산의 존재 하에 성장시킨 효모와 비교하여 단지 Trp, Leu 및 His을 함유하는 배지에서 성장시킨 효모에 있어서의 PDS 및 STRE 활성. 도 6o. 1 mM의 H2O2에 장기간에 걸쳐 노출된 야생형 (DBY746) 및 ras2Δ 돌연변이체에 있어서 DNA 돌연변이 빈도 (Canr)로서 측정할 경우 Ras2 결실은 산화 스트레스-유발된 게놈 불안정성으로부터 보호한다. 도 6p. 에스. 세레비시애(*S. cerevisiae*)에 있어서 노화 및 게놈 불안정성에 대한 아미노산의 영향의 모델. 아미노산은 글루코스에 의해서도 활성화되는 Tor-Sch9 및 Ras-cAMP-PKA 경로를 활성화시키며, 부분적으로는 Gis1 및 Msn2/4의 감소된 활성을 통하여 연령- 및 산화 스트레스-의존성 게놈 불안정성을 촉진한다. \* P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\* P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001;

도 7a 및 도 7b. 어린 생쥐 및 늙은 생쥐에 있어서 체중에 대한 단백질 섭취량의 영향. 도 7a. 고 (18%) 단백질 규정식을 급이한 어린 (18주령) C57BL/6 생쥐 (n=10) 및 늙은 (24주령) C57BL/6 생쥐 (n=6). 도 7b. 저 (4%) 단백질 규정식을 급이한 어린 (18주령) C57BL/6 생쥐 (n=10) 및 늙은 (24주령) C57BL/6 생쥐 (n=6);

도 8. 표 12: 사망률과 단백질 섭취량 사이의 연관성;

도 9a. 단백질 함량이 고 (18%) 또는 저 (4%) 단백질 함량으로 다양한 등칼로리 규정식을 급이한 18주령의 수컷 C57BL/6 생쥐의 30일간 체중. 도 9b. 단백질 함량이 고 (18%) 또는 저 (4%) 단백질 함량으로 다양한 등칼로리 규정식을 급이한 18주령의 수컷 C57BL/6 생쥐의 30일간 음식물 섭취량 (kcal/일). 도 9c. 고 단백질 규정식 (n=10) 또는 저 단백질 규정식 (n=10) 중 어느 하나를 급이한 수컷 (18주령) C57BL/6 생쥐에 있어서의 제16일에서의 IGFBP-2. 도 9d. 고 단백질 규정식 (n=10) 또는 저 단백질 규정식 (n=10) 중 어느 하나를 급이한 수컷 (18주령) C57BL/6 생쥐에 있어서의 제16일에서의 IGFBP-3. 도 9e. 단백질 함량이 고 (18%) 또는 저 (7%) 단백질 함량으로 다양한 등칼로리 규정식을 급이한 12주령의 암컷 BALB/c 생쥐의 30일간 체중. 도 9f. 단백질 함량이 고 (18%) 또는 저 (4%) 단백질 함량으로 다양한 등칼로리 규정식을 급이한 12주령의 암컷 BALB/c 생쥐의 30일간 음식물 섭취량 (kcal/일). 도 9g. 고 단백질 규정식 (n=10) 또는 저 단백질 규정식 (n=10) 중 어느 하나를 급이한 12주령 암컷 BALB/c 생쥐에 있어서의 제16일에서의 IGFBP-3. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*p<0.0001; 분산 분석(ANOVA);

도 10. 연령-매칭된 야생형 대조구 (Wt; n=13)에 대한 10개월령 암컷 GHRKO 생쥐 (n=5)에서의 B16 흑색종의 종양 체적 진행. \*\*P<0.01;

도 11a. ras2Δ 돌연변이체와 비교하여 야생형 (DBY746)에 있어서 효모의 연대순 생존률 및 도 11b. ras2Δ 돌연변이체와 비교하여 야생형 (DBY746)에 있어서 CAN1 유전자에서의 돌연변이 빈도 (Canr 돌연변이체/106개의 세포로서 측정됨)로 나타난 약화된 연령-의존성 게놈 불안정성. 도 11c. 장기간에 걸쳐 1 mM H2O2로 처리된 야생형 및 ras2Δ 돌연변이체의 연대순 생존률. 도 11d. Ras2의 결여는 산화 스트레스-유발된 게놈 불안정성 (돌연변이 빈도 Canr)에 대하여 보호한다. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*\*P<0.0001;

도 12a 내지 도 12f. IGF-1은 단백질 소비와 사망률 사이의 연관성을 완화시킨다. 사망률에 대한 단백질과 IGF-1 사이의 상호작용의 콕스 비례 위험 모델로부터의 결과를 기반으로 하여, 예측된 위험 비를 저 단백질 군과 비교하여 중간 정도 단백질 군 및 고 단백질 군 둘 모두에 대하여 IGF-1에 의해 계산하였다. 50 내지 65세 연령군에 있어서 단백질과 IGF-1 사이의 유의한 상호작용은 전 원인 (3a) 또는 CVD 사망률 (3b)에 대하여 발견되지 않았다. 그러나, 저 단백질에 대한 고 단백질과 IGF-1에 있어서의 상호작용은 50 내지 65세의 대상체에 있어서 암 사망률 (3c)에 있어서 유의하였다 (p=.026). 결과는, IGF-1의 매 10 ng/ml 증가에 있어서 암 사망 위험이 저 단백질 군에 비하여 고 단백질 군에 있어서 9%만큼 증가함을 나타낸다 (HR고 단백질 x IGF-1: 95% CI: 1.01-

1.17). 단백질과 IGF-1 사이의 상호작용은 단지 CVD 사망률에 있어서 66세 이상의 응답자에 대하여 유의하였다. 고 단백질 규정식 또는 중간 정도 단백질 규정식을 갖는 이들은 IGF-1이 또한 낮을 경우 CVD 위험이 감소되었지만; IGF-1이 증가함에 따라 이익이 없었다;

도 13. 표 13: 샘플 특성;

도 14. 표 14: 단백질 섭취량과 사망률 사이의 연관성 (N=6,381);

도 15. 표 15: 사망률과 단백질 섭취량 사이의 연관성에 대한 IGF-I의 영향 (N=2,253);

도 16. 표 16: 사망률에 대한 단백질과 IGF-I 사이의 상호작용에 있어서의 위험 비;

도 17. 표 17: 사망률과 단백질 섭취량 사이의 연관성에 대한 동물성 및 식물성 단백질의 영향;

도 18. 표 18: 연령 및 단백질 섭취량에 의한 조정된 평균 HbA1c, 당뇨병 유병률, 및 평균 BMI;

도 19. 표 19: 기저선의 당뇨병을 갖지 않는 참가자 중에서 당뇨병 사망률과 단백질 섭취량 사이의 연관성;

도 20a 내지 도 20d. 인간 대상체는 저 단백질 저 칼로리 및 고 영양분의 5일 음식 모방 규정식 (FMD, 녹색으로 표시됨, 텍스트 참조), 이어서 대략 3주의 정상식 (갈색으로 표시됨)의 3회 사이클에 참가하였다 (도 20a). 혈액을 상기 5일 규정식 전 및 상기 5일 규정식의 마지막에 (시점 A 및 시점 B), 그리고 또한 세 번째 5일 FMD를 끝낸 지 5 내지 8일 후에 (시점 C) 채취하였다. 5일 다이어팅(dieting)은 혈당 (도 20b), IGF-1 (도 20c) 및 IGFBP-1 (도 1d) 수준을 유의하게 감소시켰다. 글루코스 \*,  $p < 0.05$ , N=18; IGF-1, \*\*,  $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , N=16; IGFBP-1, \*\*,  $p < 0.01$ , N=17; 모든 통계학적 검정을 원래 값에 대하여 양측 검정, 대응표본 t 검정(paired t test)으로서 수행하였다;

도 21. % 단위의, 실험용 규정식의 다량영양소에 의해 공급되는 칼로리. AIN93G 표준 차우(chow)가 기준 규정식이었으며, 이를 모든 생쥐에게 공급하였다. 다량영양소 조성 (지방, 단백질 및 탄수화물)이 변경된 실험용 규정식은 모두 이러한 규정식을 기반으로 하였다. 저 탄수화물 LCHP 규정식은 AIN93G 제형과 비교하여 20%까지 감소된 탄수화물로부터의 칼로리 (13% 대 63.9%)를 갖지만, 더 많은 단백질 (45.2%) 및 지방 (41.8%)을 함유하였다. 20% P-1 규정식 (지방원으로서 대두유) 및 20% P-2 규정식 (지방원으로서 코코넛유)은 AIN93G 제형과 비교하여 20%까지 감소된 단백질원으로부터의 칼로리를 가지며; 0% P 규정식은 단백질을 함유하지 않으며; 모든 이러한 규정식은 AIN93G 표준 차우와 등칼로리였다. 케톤 생성성(ketogenic) 고 지방 규정식 60% HF는 소비되는 지방원으로부터의 칼로리의 60%를 공급하도록 설계되었으며, 단백질 및 탄수화물에서 나오는 칼로리는 이에 비례해서 감소되었다. 90% HF 규정식은 단지 최소의 탄수화물 (1% 미만)을 공급하면서 90%의 지방을 함유하고 절반의 단백질 함량 (9%)을 함유하는 케톤 생성성 규정식이었다. 상세한 규정식 조성 및 칼로리 함량은 표 14에 요약되어 있다;

도 22a 내지 도 22d. 칼로리 제한은 체중, 글루코스 및 IGF-1을 감소시킨다. 도 22a) 12 내지 15주령의 암컷 CD-1 생쥐는 AIN93G 설치류용 표준 차우를 무제한 급이하거나 (회색 정사각형), 40%, 60%, 80% 및 90% 칼로리 제한 AIN93G 규정식에 노출시키거나 (삼각형) 또는 생쥐가 그의 처음 체중 (점선)의 20%를 체중 감량할 때까지 금식시켰다 (STS, 녹색 직사각형). 실험군당 N=5. 모든 데이터는 평균±SEM으로 제시되었다. 도 22b) 80% 체중이 도달될 때까지의 지속 시간 (일수)에 대한 CR 식이 섭생법의 엄정함 (severity)에 대한 선형 피팅(linear fit). 도 22c) 일단 80% 체중에 도달된 생쥐에 있어서의 혈당 수준. 적색 선은 평균을 나타낸다; \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , ANOVA, 터키 다중 비교(Tukey's multiple comparison); 도 22d) 일단 80% 체중에 도달된 생쥐에 있어서의 혈청중 IGF-1 수준. 적색 선은 평균을 나타낸다; \*  $p < 0.001$ , ANOVA, 터키 다중 비교;

도 23a 내지 도 23e. 체중, 음식물 섭취량, 글루코스 및 혈청중 IGF-1에 대한 다량영양소 확정식의 영향. 12 내지 15주령의 5마리의 암컷 CD-1 생쥐에게 AIN93G 설치류용 표준 차우 (흑색 원) 또는 도 23a) 2가지의 상이한 저 단백질 규정식 (20% P-1 및 20% P-2), 저 탄수화물, 고 단백질 (low in carbohydrates but high in protein; LCHP) 규정식, 단백질 결핍 규정식 (0% P) 또는 도 23b) 고 지방 규정식 (60% HF) 및 케톤 생성성 규정식 (90% HF)을 무제한 급이하였다. 다량영양소에 관한 상세한 개요는 표 1에 주어져 있다. 도 23c) AIN93G, 20% P-1, 20% P-2, LCHP 및 0% P 규정식에 있어서의 매일 무제한 칼로리 섭취량. 도 23d) 60% HF 및 90% HF 규정식에 있어서의 매일 무제한 칼로리 섭취량; AIN93G를 기준물로서 나타냄. 모든 데이터는 평균 ± SEM으로 제시되었다. 도 23e) 9일간의 무제한 급이 후 혈청중 IGF-1 수준. 선은 평균을 나타낸다; \* $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , ANOVA, AIN93G 대조구와 비교한 터키 다중 비교;

도 24a 및 도 24b. 도 24a) 칼로리 제한된 다량영양소 확정식에 있어서의 스트레스 내성 검정. 생쥐를 무제한

급여하거나 (AIN93G), 60시간 동안 금식시키거나 (STS) 확정된 다량영양소 조성을 갖는 50% 칼로리 제한 규정식 (AIN93G, LCHP, 0% P, 60% HF, 90% HF)을 3일 동안 급여하고 (녹색 박스) 그 후 독소루비신을 정맥내 주사하였다 (24 mg/kg, 적색 파선). 생존률을 주사 후 25일 동안 추적하였으며, 그 후 남아 있는 동물을 생존자로 간주하였다. 도 24b) 3일간의 무제한의 CR 규정식의 급여 후와, 60시간의 STS 후 혈당 수준. 선은 평균을 나타낸다. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , ANOVA, 터키 다중 비교. 생존성 데이터는 통계학적 소프트웨어 프리즘(Prism)(그래프패드 소프트웨어(GraphPad Software))을 이용하여 쌍-매칭된 풀링된(pooled) 실험으로부터 도시하였다;

도 25a 및 도 25b. 생체내에서(in vivo) GL26 신경교종 및 4T1 유방암의 종양 진행. 도 25a) 쥐과 GL26 신경교종의 피하 종양 진행을 mm3 단위의 총 종양 체적으로 나타낸다. 일단 종양이 제10일에 피부 아래에서 촉진가능해지게 되면 종양 측정을 시작하였다. 동물에게 대조구로서 AIN93G (N=5)를 무제한 급여하거나 저 단백질 규정식 20% P-1 (N=6)을 무제한 급여하였다. 모든 데이터는 평균  $\pm$  SEM으로 제시되었다. 도 25b) 쥐과 4T1 유방암의 피하 종양 진행을 mm3 단위의 총 종양 체적으로 나타낸다. 일단 종양이 제12일에 피부 아래에서 촉진가능해지게 되면 종양 측정을 시작하였다. 대조 동물 (N=10)은 치료제를 받지 않았으며, 종양이 빠르게 진행하여, 종양은 종양 이식 후 제54일까지 2000 mm3의 종점 체적에 도달하게 된다. 시스플라틴 (CDDP)을 동물 (N=9)에게 제15일, 제33일 및 제44일에 주사하였다. 제1 CDDP 용량은 정맥내 주사에 의해 12 mg/kg으로 전달되었으며, 2회의 후속 주사는 8 mg/kg으로 전달되어 화학독성을 회피하였다. 50% ICR+ CDDP 군의 생쥐 (N=9)는 시스플라틴 주사 이전에 3일 동안 대조군의 일일 칼로리 섭취량의 50%까지 감소된 AIN93G 규정식을 간헐적 섭생법으로 급여하였다 (ICR, 녹색 박스). 주사 일정은 CDDP 군에 대한 것과 동일하였다. 모든 데이터를 평균  $\pm$  SEM으로 제시하였다; \*\*\*  $p < 0.001$ , ANOVA, 터키 다중 비교, 대조구와 비교;

도 26a 및 도 26b. 도 26a) AIN93G 설치류용 표준 차우를 무제한 급여하거나 (회색 정사각형), 40%, 60%, 80% 및 90% 칼로리 제한 AIN93G 규정식을 무제한 급여하거나 (삼각형) 또는 생쥐가 그의 처음 체중의 20%를 체중 감량할 때까지 금식시킨 (STS, 녹색 직사각형) 동물에 있어서의 kcal/일 단위의 음식물 섭취량. 도 26b) 모든 실험용 규정식에 48시간 노출시킨 후 생쥐에 있어서의 혈당 수준. 선은 평균을 나타낸다; \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , ANOVA, 터키 다중 비교;

도 27. 지시된 실험용 규정식의 9일간의 무제한 급여 후 혈당 수준. 선은 평균을 나타낸다;

도 28a 및 도 28b. 도 28a) 무제한 급여되거나 (AIN93G), 확정된 다량영양소 조성을 갖는 50% 칼로리 제한 규정식 (60% HF, LCHP, 0% P)을 3일 동안 급여하고 (녹색 박스) 그 후 독소루비신을 정맥내 주사한 (24 mg/kg, 적색 파선) 생쥐에 있어서의 체중 프로파일. 도 28b) 무제한 급여되거나 (AIN93G), 확정된 다량영양소 조성을 갖는 50% 칼로리 제한 규정식 (AIN93G, 90% HF)을 3일 동안 급여하거나 60시간 동안 금식시키고 (녹색 박스) 그 후 독소루비신을 정맥내 주사한 (24 mg/kg, 적색 파선) 생쥐에 있어서의 체중 프로파일.

도 29. % 단위의, 고전적인 케톤 생성성 규정식 및 변형 아킨스(Atkins) 규정식의 다량영양소에 의해 공급되는 칼로리;

도 30. 표 20. 실험용 규정식에 포함된 다량영양소 및 칼로리에 관한 개요;

도 31. 표 21. 다량영양소 확정식의 상세한 조성;

도 32. 표 22. 다량영양소 확정식에 있어서의 조정 일정;

도 33. 표 23. 칼로리 제한 규정식의 조성;

도 34. 표 24. 칼로리 제한된 다량영양소 확정식의 조성.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014]

이제, 본 발명의 현재의 바람직한 조성물, 실시 양태 및 방법을 상세하게 언급할 것이다. 도면은 반드시 축척대로일 필요는 없다. 개시된 실시 양태는 다양한 그리고 대안적인 형태로 구현될 수 있는 본 발명의 예시일 뿐이다. 따라서, 본원에 개시된 특정한 세부 사항은 한정하는 것으로 해석되는 것이 아니라 단지 본 발명의 임의의 측면에 대한 대표적인 근거로서 및/또는 당업자에게 본 발명을 다양하게 이용하는 것을 교시하는 것에 대한 대표적인 근거로서 해석되어야 한다.

[0015]

실시예를 제외하고서, 또는 달리 명백하게 표시되는 경우를 제외하고서, 재료의 양 또는 반응 및/또는 사용 조건을 표시하는 이러한 [발명을 실시하기 위한 구체적인 내용]에서의 모든 수치적 양은 본 발명의 가장 넓은 범주를 기술함에 있어서 "약"이라는 단어로 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 진술된 수치적 한계치 내에서의 실



행이 일반적으로 바람직하다. 또한, 명백하게 반대로 진술되지 않으면, 퍼센트, "부", 및 비의 값은 중량 기준이며, 본 발명과 관련하여 주어진 목적에 적합하거나 바람직한 것으로 재료의 군 또는 부류를 기술한 것은, 그 군 또는 부류의 구성원 중 임의의 2가지 이상의 혼합물이 동일하게 적합하거나 바람직하며; 구성 성분을 화학 용어로 설명한 것은 상기 설명에 특정된 임의의 조합에의 첨가시의 구성 성분을 나타내고, 일단 혼합된 혼합물의 구성 성분 중에서의 화학적 상호작용을 반드시 배제하는 것은 아니며; 두문자어 또는 기타 약어의 첫 번째 정의는 상기 약어의 본원에서의 모든 후속적인 사용에 적용되고 처음에 정의된 약어의 정상적인 문법적 변동에 대하여 준용되며; 명백하게 반대로 진술되지 않으면, 특성의 측정치는 상기 특성에 대하여 이전에 또는 이후에 언급되는 것과 동일한 기술에 의해 결정된다.

[0016] 본 발명은 하기에 기술된 특정한 실시 양태 및 방법에 한정되지 않으며, 그 이유는 특정 성분 및/또는 조건이 물론 달라질 수 있기 때문이다. 더욱이, 본원에서 사용되는 용어는 단지 본 발명의 특정 실시 양태를 기술하기 위하여 사용되며, 어떠한 방식으로든지 한정하는 것으로 의도되는 것은 아니다.

[0017] 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용될 때, 단수형("a", "an" 및 "the")은 그 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않으면 복수의 지시 대상을 포함한다. 예를 들어, 단수형의 성분의 언급은 복수의 성분을 포함하는 것으로 의도된다.

[0018] "필수 아미노산"이라는 용어는 유기체에 의해 합성될 수 없는 아미노산을 나타낸다. 인간에 있어서, 필수 아미노산은 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트레오닌, 트립토판, 발린을 포함한다. 게다가, 하기 아미노산이 특정 조건 하에서 인간에 있어서 또한 필수적이다 - 히스티딘, 타이로신, 및 셀레노시스테인.

[0019] "킬로칼로리"(kcal) 및 "칼로리"라는 용어는 음식물 칼로리를 나타낸다. "칼로리"라는 용어는 소위 소칼로리를 나타낸다.

[0020] "대상체"라는 용어는 모든 포유류, 예컨대 영장류 (특히 고등 영장류), 양, 개, 설치류 (예를 들어, 생쥐 또는 쥐), 기니 피그(guinea pig), 염소, 돼지, 고양이, 토끼 및 소를 포함하는 인간 또는 동물을 나타낸다.

[0021] 본 발명의 일 실시 양태에서, 노화 증상 또는 연령 관련 증상을 완화시키는 방법이 제공된다. 예를 들어, 본 실시 양태의 방법은 당뇨병 또는 암을 예방하거나 치료할 수 있으며, 연령-관련 사망 및 기타 연령-관련 질환을 지연시킨다. 다른 변형에서, 본 방법은 대상체에 있어서 글루코스 및/또는 IGF-1 수준을 저하시키는 데 유용하다. 또 다른 변형에서, 본 방법은 대상체에 있어서 화학독성의 치료에 유용하다 (예를 들어, 화학독성의 증상을 완화시킨다). 전형적으로, 본 방법은 이러한 병태의 1가지 이상의 증상을 완화시킨다. 특히, 대상체에 있어서의 장수의 증가 방법이 제공된다. 본 발명의 문맥에서, 장수를 증가시킨다는 것은 대상체가 더 오래 살 기회를 향상시킴을 의미한다. 예를 들어, 그 대상체와 동일한 프로필 (체중, 연령, 글루코스 수준, 인슐린 수준 등, 하기 참조)을 갖는 많은 대상체가 본 발명의 방법을 받을 때, 평균 생존률이 증가한다. 본 방법은 대상체의 평균 일일 단백질 섭취 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 1가지 개량에서, 평균 일일 단백질 섭취 수준은 대상체가 하루당 평균적으로 소비하는 단백질로부터의 칼로리 퍼센트로서 표현된다. 대상체의 단백질 섭취량은 대상체의 매일 및 매주 단백질, 지방 및 탄수화물 소비와 관련하여 서면으로 된 설문지를 기입함으로써 또는 주체의 질의 응답에 의해 평가될 수 있다. 단백질 소비와 관련하여, 동물성 및 식물성 소스로부터의 단백질 칼로리의 상대적인 양이 결정된다.

[0022] 저 단백질 규정식은 대상체의 평균 일일 단백질 섭취 수준이 소정의 컷오프 단백질 섭취 수분보다 더 많은 것으로 확인될 경우 그리고 대상체가 소정의 연령보다 더 젊을 경우 대상체에게 제공된다. 전형적으로, 상기 소정의 연령은 60세 내지 70세이다. 상기 소정의 연령은 바람직함이 증가되는 순서대로, 60세, 61세, 62세, 63세, 64세, 66세, 67세, 68세, 69세, 70세, 및 65세와, 이보다 더 젊은 연령이다. 특징적으로, 저 단백질 규정식은 소정의 컷오프 단백질 섭취 수준보다 더 적은 단백질로부터의 칼로리 퍼센트를 제공한다. 전형적으로, 상기 소정의 컷오프 단백질 섭취 수준은 대상체에 의해 하루에 평균적으로 소비되는 총 칼로리의 20%의, 단백질로부터의 칼로리이다. 소정 개량에서, 상기 소정의 컷오프 단백질 섭취 수준은 대상체에 의해 하루당 평균적으로 소비되는 총 칼로리의 15%의, 단백질로부터의 칼로리이다. 소정 개량에서, 상기 소정의 컷오프 단백질 섭취 수준은 대상체에 의해 하루당 평균적으로 소비되는 총 칼로리의 10%의, 단백질로부터의 칼로리이다. 또 다른 개량에서, 상기 소정의 컷오프 단백질 섭취 수준은 대상체에 의해 하루당 평균적으로 소비되는 총 칼로리의 5%의, 단백질로부터의 칼로리이다. 일부 개량에서, 저 단백질 규정식은 바람직함이 증가되는 순서대로, 대두와 같은 식물성 소스인 단백질로부터의 40% 초과, 50% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과 및 90% 초과와 같은 식물성 소스인 단백질로부터의 약 100% 칼로리의 단백질을 제공한다.



- [0023] 대상체의 IGF-1 및/또는 IGFBP1 수준은 대상체가 먹어야 하는 규정식의 빈도 및 유형 (예를 들어, 하기 단백질 양을 참조)을 결정하기 위하여 그리고 구체적으로, 단백질 섭취량이 증가되어야 하는지 감소되어야 하는지를 결정하기 위하여 모니터링된다 (즉, 전형적으로, 대상체에게 저 단백질 규정식의 1회 이상의 사이클이 제공된 후 IGF-I의 수준은 감소하고 IGFBP1의 수준은 증가한다. 특히, 저 단백질 규정식은 IGF-I을 10% 이상만큼 저하시키고/시키거나 IGFBP1 수준을 50% 이상만큼 상승시킨다. 또 다른 개량에서, 저 단백질 규정식은 IGF-I을 20% 이상만큼 저하시키고/시키거나 IGFBP1 수준을 75% 이상만큼 상승시킨다. 또 다른 개량에서, 저 단백질 규정식은 IGF-I을 50% 이상만큼 저하시키고/시키거나 IGFBP1 수준을 2배 이상만큼 상승시킨다. IGF-I이 감소하고/하거나 IGFBP1 증가가 불충분한 것으로 결정된 경우, 저 단백질 규정식은 심지어 적은 양의, 단백질원으로부터의 칼로리를 제공하도록 조정될 수 있다.
- [0024] 본 실시 양태의 변동에서, 대상체의 연령이 소정의 연령보다 더 많아서 고 단백질 규정식을 대상체에게 제공하는 경우, 고 단백질 규정식이 대상체에게 제공되며, 고 단백질 규정식은 상기 소정의 컷오프 단백질 섭취 수준보다 더 큰 단백질 칼로리 백분율을 갖는다.
- [0025] 또 다른 변동에서, 소정의 일수 동안 저 단백질 규정식이 대상체에게 제공된다. 예를 들어, 저 단백질 규정식은 대상체에게 2 내지 10일 동안 제공된다. 또 다른 개량에서, 저 단백질 규정식은 대상체에게 3 내지 7일 동안 제공된다. 많은 상황에서, 저 단백질은 대상체에게 주기적으로 제공된다. 저 단백질 규정식이 대상체에게 제공되는 빈도는 인슐린 내성, 공복 혈당 수준, IGF-I, IGFBP1, 비만, 체질량 지수(Body Mass Index), 이전 10년 내의 체중 감량, 암 가족력, 당뇨병 가족력, 조기 사망 가족력에 의해 결정된다. 빈도는 고 IGF-I 수준 (예를 들어, 200 ng/ml 초과), 저수준 IGFBP1, 및/또는 인슐린 내성을 갖는 대상체의 경우 매월부터 120 내지 200 ng/ml의 IGF-I을 갖고 인슐린 내성을 갖지 않는 대상체의 경우 3개월마다 1회까지일 수 있다.
- [0026] 소정 개량에서, 저 단백질 규정식은 10% 미만의 단백질로부터의 칼로리를 제공하는 음식 모방 규정식이고/이거나 모든 단백질은 국제 특허 출원 제PCT/US 13/66236호에 개시된 바와 같이 식물-기반의 것인데, 이 특허 출원의 전체 개시 내용은 본원에 참고로 포함된다. 특히, 저 단백질 규정식은 첫 번째 기간 동안 대상체에게 투여된다. 본원에서 사용될 때, 때때로 이 실시 양태의 저 단백질 규정식). 소정 개량에서, 저 단백질 규정식은 첫날 (제1일) 동안 대상체 1 파운드당 4.5 내지 7 킬로칼로리, 그리고 그 후 두 번째 내지 다섯 번째 날 (제2일 내지 제5일) 동안 일일 대상체 1 파운드당 3 내지 5 킬로칼로리의 저 단백질 규정식을 제공한다. 제2 규정식은 제2 기간 동안 대상체에게 주어진다. 소정 개량에서, 제2 규정식은 저 단백질 규정식 이후에 (예를 들어, 직후에) 25 내지 26일 동안 대상체의 정상 칼로리 소비량의 20% 이내인 전체 칼로리 소비량을 제공한다. 특징적으로, IGF-I의 수준은 감소하고 IGFBP1의 수준은 증가함이 관찰된다. 소정 개량에서, 이러한 실시 양태의 방법은 1 내지 5회 반복된다. 또 다른 개량에서, 이러한 실시 양태의 방법은 2 내지 3회 반복된다. 또 다른 개량에서, 이러한 실시 양태의 방법은 단백질 섭취량 뿐만 아니라 대상체의 IGF-I 및 IGFBP1 수준에 따라 매 1 내지 3개월의 빈도로 수년의 기간 동안 또는 대상체의 일생 전체에 걸쳐 반복된다. 빈도는 고 단백질 섭취량 (15% 초과)의 단백질로부터의 칼로리) 및/또는 고 IGF-I 수준 (예를 들어, 200 ng/ml 초과), 및 저 수준의 IGFBP1 및/또는 인슐린 내성을 갖는 대상체의 경우 매월부터 칼로리 중 10 내지 15%를 나타내는 단백질 섭취량, 120 내지 200 ng/ml의 IGF-I 수준을 갖고 인슐린 내성을 갖지 않는 대상체의 경우 3개월마다 1회까지일 수 있다.
- [0027] 또 다른 개량에서, 저 단백질 규정식과 제2 규정식 (예를 들어, 대상체의 정상 규정식 및 칼로리 섭취량)의 조합은 대상체의 정상 칼로리 섭취량의 10% 이내인 총 칼로리수를 대상체에게 제공한다. 또 다른 개량에서, 저 단백질 규정식과 제2 규정식의 조합은 대상체의 정상 칼로리 섭취량의 5% 이내인 총 칼로리수를 대상체에게 제공한다. 또 다른 개량에서, 저 단백질 규정식과 제2 규정식의 조합은 대상체의 정상 칼로리 섭취량의 1% 이내인 총 칼로리수를 대상체에게 제공한다.
- [0028] 소정 개량에서, 음식 모방 규정식 (FMD)은 5일 동안의 대상체의 규정식의 완전한 대용을 포함한다. 이러한 5일의 기간 동안, 대상체는 많은 물을 소비한다. 정상 체중 (18.5 내지 25의 체질량 지수 또는 BMI)의 건강한 대상체에 있어서, 상기 규정식은 처음 3개월 동안 1개월에 1회 (상기 규정식을 5일간 먹고 정상식을 25 내지 26일간 먹음), 그리고 그 후 매 3개월에 1회 (매 3개월에 5일간) 소비된다. 대상체의 체중을 측정하며, 대상체는 다음 사이클이 시작되기 전에 규정식 동안 손실된 체중의 95% 이상을 회복하여야 한다. 18.5 미만의 BMI를 갖는 대상체는 의사가 권고하고 감독하지 않는다면 FMD를 착수하지 않아야 한다. 상기 요법 (3개월 동안 매 1개월에 1회, 이어서 그 후 매 3개월에 1회)은 본 특허 출원에 제시된 모든 병태의 치료 또는 치료의 지원에 채용될 수 있다.
- [0029] FMD의 소비 지침은 칼로리, 다량영양소 및 미량영양소와 관련한 영양 성분표(Nutrition Facts)를 포함한다. 칼로리는 사용자의 체중에 따라 소비된다. 총 칼로리 소비량은 제1일의 경우 4.5 내지 7 칼로리/파운드 (또는 10

내지 16 칼로리/킬로그램)이고, 제2일 내지 제5일의 경우 3 내지 5 칼로리/파운드 (또는 7 내지 11 칼로리/킬로그램)이다. 도 1 내지 도 3은 제1일 내지 제5일에 있어서의 영양소의 목록을 제공한다. 다량영양소에 대하여, 규정식은 제1일에 30 g 미만의 당분, 그리고 제2일 내지 제5일에 20 g 미만의 당분을 함유하여야 한다. 규정식은 제1일에 28 g 미만의 단백질, 그리고 제2일 내지 제5일에 18 g 미만의 단백질을 함유하여야 하는데, 이는 대부분 또는 완전히 식물계 소스로부터의 것이다. 규정식은 제1일에 20 내지 30 g의 단일불포화 지방, 그리고 제2일 내지 제5일에 10 내지 15 g의 단일불포화 지방을 함유하여야 한다. 규정식은 제1일에 6 내지 10 g의 다중불포화 지방, 그리고 제2일 내지 제5일에 3 내지 5 g의 다중불포화 지방을 함유하여야 한다. 규정식은 제1일에 12 g 미만의 포화 지방, 그리고 제2일 내지 제5일에 6 g 미만의 포화 지방을 함유하여야 한다. 전형적으로, 모든 날에서의 지방은 하기의 조합으로부터 유래된다: 아몬드, 마카다미아 너트, 피칸, 코코넛, 코코넛유, 올리브유 및 아마인. 소정 개량에서, FMD 규정식은 모든 날에 식이 섬유유의 권고된 매일 값의 50% 초과를 포함한다. 추가의 개량에서, 식이 섬유유의 양은 모든 5일에 일당 15 g 초과이다. 규정식은 제2일 내지 제5일에 일당 12 내지 25 g의 글리세롤을 함유하여야 한다. 소정 개량에서, 글리세롤은 체중 1 파운드당 0.1 g/일로 제공된다.

[0030]

소정 변동에서, FMD는 하기 다량영양소 (비-동물계, 95% 이상)를 포함한다: 5,000 IU 초과와 비타민 A/일 (제1일 내지 제5일); 60 내지 240 mg의 비타민 C/일 (제1일 내지 제5일); 400 내지 800 mg의 칼슘/일 (제1일 내지 제5일); 7.2 내지 14.4 mg의 철/일 (제1일 내지 제5일); 200 내지 400 mg의 마그네슘/일 (제1일 내지 제5일); 1 내지 2 mg의 구리/일 (제1일 내지 제5일); 1 내지 2 mg의 망간/일 (제1일 내지 제5일); 3.5 내지 7 mcg의 셀레늄/일 (제1일 내지 제5일); 2 내지 4 mg의 비타민 B1/일 (제1일 내지 제5일); 2 내지 4 mg의 비타민 B2/일 (제1일 내지 제5일); 20 내지 30 mg의 비타민 B3/일 (제1일 내지 제5일); 1 내지 1.5 mg의 비타민 B5/일 (제1일 내지 제5일); 2 내지 4 mg의 비타민 B6/일 (제1일 내지 제5일); 240 내지 480 mcg의 비타민 B9/일 (제1일 내지 제5일); 600 내지 1000 IU의 비타민 D/일 (제1일 내지 제5일); 14 내지 30 mg의 비타민 E/일 (제1일 내지 제5일); 80 mcg 초과와 비타민 K/일 (제1일 내지 제5일); 16 내지 25 mcg의 비타민 B 12가 전체 5일의 기간 동안 제공되며; 600 mg의 도코사헥사엔산 (DHA, 조류 유래됨)이 전체 5일의 기간 동안 제공된다. FMD 규정식은 대부분이 (즉, 50 중량% 초과) 하기를 포함하는 천연 소스 유래인 고 미량영양소 함량을 제공한다: 케일, 캐슈, 노란 피망(Yellow Bell Pepper), 양파, 레몬즙, 효모, 강황, 버섯, 당근, 올리브유, 비트즙, 시금치, 토마토, 콜라드(Collard), 네틀(Nettle), 타임(Thyme), 소금, 후추, 비타민 B12 (시아노코발아민), 비트, 버터넛 스쿼시(Butternut Squash), 콜라드, 토마토, 오레가노, 토마토즙, 오렌지즙, 셀러리, 로메인 상추(Romaine Lettuce), 시금치, 커민, 오렌지 껍질, 시트르산, 육두구, 정향 및 이들의 조합. 표 1은 FMD 규정식에서 제공될 수 있는 추가의 미량영양소 보충제의 예를 제공한다.

표 1

미량영양소 보충

	보충제	화합식	양	양의 범위	단위
Vit A			1250 IU	900-1600	IU
Vit C	아스코르브산	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	15.0000	10-20	mg
Ca	탄산칼슘	CaCO <sub>3</sub>	80.0000	60-100	mg
Fe	푸마르산제일철	C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> FeO <sub>4</sub>	4.5000	3-6	mg
Vit D3	콜레칼시페롤	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O	0.0025	0.001-0.005	mg
Vit E	dl-알파 토코페릴 아세테이트	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	5.0000	3-7	mg
Vit K	피토나디온 티아민		0.0200	0.1-0.04	mg
Vit B1	모노티레이트	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>7</sub> O <sub>4</sub> S	0.3750	0.15-0.5	mg
Vit B2	리보플라빈 E101	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	0.4250	0.2-0.6	mg
Vit B3	니아신아미드	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O	5.0000	3-7	mg
Vit B5	판토텐산칼슘	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> CaN <sub>2</sub> O <sub>10</sub>	2.5000	1.5-4.0	mg
Vit B6	피리독신 염산염	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> · HCl	0.5000	0.3-0.7	mg
Vit B7	비오틴	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	0.0150	0.01-0.02	mg
Vit B9	폴산	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	0.1000	0.07-0.14	mg
Vit B12	시아노코발아민	C <sub>63</sub> H <sub>88</sub> CoN <sub>14</sub> O <sub>14</sub> P	0.0015	0.001-0.002	mg
Cr	피콜린산크로뮴	Cr(C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	0.0174	0.014-0.022	mg
Cu	황산제이구리	CuSO <sub>4</sub>	0.2500	0.18-0.32	mg
I	요오드화칼륨	KI	0.0375	0.03-0.045	mg
Mg	산화마그네슘	MgO	26.0000	20-32	mg
Mn	황산망간	MnSO <sub>4</sub>	0.5000	0.3-0.7	mg
Mo	몰리브덴산나트륨	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.0188	0.014-0.023	mg
Se	셀렌산나트륨	Na <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Se	0.0175	0.014-0.023	mg
Zn	산화아연	ZnO	3.7500	3-5	mg

[0031]

[0032]

또 다른 실시 양태에서, 상기에 개시된 규정식 프로토콜의 구현을 위한 규정식 패키지(package)가 제공된다. 본 규정식 패키지는 대상체에게 제1 기간 동안 투여될 저 단백질 규정식의 정량의 제1 세트를 포함하며, 저 단백질 규정식은 저 단백질 규정식의 제1일의 경우 대상체 1 파운드당 4.5 내지 7 킬로칼로리, 그리고 저 단백질 규정식의 제2 내지 제5일의 경우 대상체 1 파운드당 3 내지 5 킬로칼로리를 제공한다. 본 규정식 패키지는 제1일에 30 g 미만의 당분; 제2일 내지 제5일에 20 g 미만의 당분; 제1일에 28 g 미만의 단백질; 제2일 내지 제5일에 18 g 미만의 단백질; 제1일에 20 내지 30 g의 단일불포화 지방; 제2일 내지 제5일에 10 내지 15 g의 단일불포화 지방; 제1일에 6 내지 10 g의 다중불포화 지방; 제2일 내지 제5일에 3 내지 5 g의 다중불포화 지방; 제1일에 12 g 미만의 포화 지방; 제2일 내지 제5일에 6 g 미만의 포화 지방; 및 제2일 내지 제5일에 일일 12 내지 25 g의 글리세롤을 제공하는 정량을 포함한다. 소정 개량에서, 본 규정식 패키지는 상기에 개시된 미량영양소를 제공하기에 충분한 정량을 추가로 포함한다. 추가의 개량에서, 본 규정식 패키지는 상기에 개시된 방법에 대한 상세 사항을 제공하는 설명서를 제공한다.

[0033]

상기에 개시된 실시 양태의 개량에서, 규정식의 5일 공급품은 수프/브로쓰(broth), 소프트 드링크(soft drink), 너트바(nut bar) 및 보충제를 포함한다. 상기 규정식은 하기와 같이 주어진다: 1) 제1일에 고 미량영양소 영양분을 갖는 1000 내지 1200 kcal 규정식이 제공되며; 2) 다음 4일 동안 650 내지 800 kcal의 매일용 규정식 + 글루코스 대용 탄소원 (글리세롤 또는 등가물)을 함유하는 드링크 - 60 내지 120 kcal를 제공함 - 이 제공된다. 대용 탄소원은 줄기 세포 활성화에 대한 금식의 영향을 간섭하지 않는다.

[0034]

상기에 개시된 실시 양태의 또 다른 개량에서, 6일 저 단백질 규정식 프로토콜은 수프/브로쓰, 소프트 드링크, 너트바 및 보충제를 포함한다. 상기 규정식은 하기와 같이 주어진다: 1) 제1일에 고 미량영양소 영양분을 갖는 1000 내지 1200 kcal 규정식 플러스가 제공됨; 2) 다음 3일 동안 200 kcal 미만의 매일용 규정식 + 글루코스 대용 탄소원을 함유하는 드링크 - 60 내지 120 kcal를 제공함 - . 글리세롤을 포함하는 이러한 대용 탄소원은 줄기 세포 활성화에 대한 금식의 영향을 간섭하지 않음; 3) 제5일에 대상체는 정상식을 소비함; 및 4) 제6일에 300 kcal의 고 지방원으로 이루어진 추가의 보충용 음식물과, 300 kcal의 고 지방원으로 이루어진 제6일에서의

보충용 음식물인 미량영양소 영양분의 믹스 및 미량영양소 영양분 믹스가 정상식에 더하여 제공됨.

[0035]

또 다른 개량에서, 규정식 프로토콜은 저 단백질 규정식의 6일 공급품을 포함하며, 이는 수프/브로쓰, 소프트 드링크, 너트바 및 보충제를 포함한다. 1) 제1일에 고 미량영양소 영양분을 포함하는 1000 내지 1200 kcal 규정식이 제공됨; 2) 다음 3일 동안 10 g 미만의 단백질을 함유하는 600 내지 800 kcal 및 당분으로부터의 200 kcal 미만의 매일용 규정식; 3) 제5일에 대상체는 정상식을 받음; 및 4) 제6일에 300 kcal의 고 지방원으로 이루어진 추가의 보충용 음식물과, 300 kcal의 고 지방원으로 이루어진 제6일에서의 보충용 음식물인 미량영양소 영양분의 믹스 및 미량영양소 영양분 믹스가 정상식에 더하여 제공됨.

[0036]

특히 유용한 규정식 프로토콜과 식이 패키지는 국제 특허 공개 W02011/050302호 및 그 안의 식이 프로토콜에 의해 제공된다. 국제 특허 공개 W02011/050302호는 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 특히, 대상체에게는 제1 기간 동안 저 단백질 규정식이 제공되고, 제2 기간 동안 제2 규정식이 제공되고, 제3 기간 동안 선택적 제3 규정식이 제공된다. 저 단백질 규정식은 대상체에게 대상체의 정상 칼로리 섭취량의 50% 이하를 제공하며, 이때 킬로칼로리의 50% 이상은 지방, 바람직하게는 단일불포화 지방으로부터 유래된다. 대상체의 정상 칼로리 섭취량은 대상체가 그의/그녀의 체중을 유지하기 위하여 소비하는 kcal 수이다. 대상체의 정상 칼로리 섭취량은 대상체를 면담함으로써 또는 대상체의 체중을 고려함으로써 추산될 수 있다. 대략적인 가이드(guide)로서, 대상체의 정상 칼로리 섭취량은 평균적으로 남성의 경우 2600 kcal/일, 그리고 여성의 경우 1850 kcal/일이다. 특정한 경우에, 저 단백질 규정식은 대상체에게 일일 700 내지 1200 kcal를 제공한다. 특히 유용한 개량에서, 저 단백질 규정식은 평균 체중의 남성 대상체에게 일일 약 1100 kcal, 그리고 평균 체중의 여성 대상체에게 일일 900 kcal를 제공한다. 전형적으로, 제1 소정 기간은 약 1일 내지 5일이다. 특정한 경우에, 제1 소정 기간은 1일이다. 저 단백질 규정식 중 지방의 수준의 시야를 넓히기 위하여, 미국 식품 의약국은 전형적인 2000 kcal/일의 규정식에 있어서 하기 영양 명세를 권고한다: 65 g의 지방 (약 585 kcal), 50 g의 단백질 (약 200 kcal), 300 g의 총 탄수화물 (약 1200 kcal). 따라서, 저 단백질 규정식의 1가지의 버전에서, 탄수화물 및 단백질로부터의 칼로리의 대다수가 배제된다.

[0037]

저 단백질 규정식은 실질적으로 임의의 지방원을 포함하지만, 단일불포화 및 다중불포화 지방원을 비롯한 불포화 지방이 많은 소스가 특히 유용하다 (예를 들어, 오메가-3/6 필수 지방산). 단일불포화 식품 소스의 적합한 예는 땅콩 버터, 올리브, 너트 (예를 들어, 아몬드, 피칸, 피스타치오, 캐슈), 아보카도, 씨 (예를 들어, 참깨), 오일 (예를 들어, 올리브유, 참깨유, 땅콩유, 카놀라유) 등을 포함하지만, 이로 한정되지 않는다. 다중불포화 식품 소스의 적합한 예는 호두, 씨 (예를 들어, 호박씨, 해바라기씨), 아마인, 생선 (예를 들어, 연어, 참치, 고등어), 오일 (예를 들어, 잇꽃유, 대두유, 옥수수유)을 포함하지만, 이로 한정되지 않는다. 저 단백질 규정식은 또한 야채 추출물, 미네랄, 오메가-3/6 필수 지방산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 성분을 포함한다. 1가지 개량에서, 그러한 야채 추출물은 5가지의 권고된 하루 야채 급식량의 등가물을 제공한다. 야채 추출물의 적합한 소스는 청경채, 케일, 상추, 아스파라거스, 당근, 버터넛 스쿼시, 알팔파, 푸른 완두콩, 토마토, 양배추, 콜리플라워, 비트를 포함하지만, 이로 한정되지 않는다. 오메가-3/6 필수 지방산의 적합한 소스는 생선, 예컨대 연어, 참치, 고등어, 블루피쉬(bluefish), 황새치 등을 포함한다. 추가의 개량에서, 저 단백질 규정식은 지방으로부터의 칼로리의 25% 이상이 탄소 원자수 2 내지 7의 단쇄 지방산으로부터의 것이고/것이거나 탄소 원자수 8 내지 12의 중쇄 포화 지방산으로부터의 것이도록 하는 지방원을 포함한다. 지방산의 구체적인 예는 라우르산 및/또는 미리스트산을 포함하며, 지방원은 올리브유, 커널유(kernel oil) 및/또는 코코넛유를 포함한다. 다른 개량에서, 저 단백질 규정식은 지방으로부터의 칼로리를 이 규정식에 함유된 총 칼로리의 약 0 내지 22%의 양으로 포함한다.

[0038]

소정의 개량에서, 대상체에게는 그 후에 제2 기간 동안 제2 규정식이 제공된다. 제2 규정식은 대상체에게 900 kcal/일 이하를 제공한다. 특정한 경우에, 제2 규정식은 대상체에게 200 kcal/일 이하를 제공한다. 전형적으로, 제2 소정 기간은 약 2일 내지 7일이다. 특정한 특별한 경우에, 제2 소정 기간은 3일이다. 또 다른 개량에서, 제2 규정식은 야채 추출물, 미네랄, 오메가-3/6 필수 지방산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 성분을 포함한다. 1가지 개량에서, 그러한 야채 추출물은 5가지의 권고된 하루 야채 급식량의 등가물을 제공한다. 야채 추출물의 적합한 소스는 청경채, 케일, 상추, 아스파라거스, 당근, 버터넛 스쿼시, 알팔파, 푸른 완두콩, 토마토, 양배추, 콜리플라워, 비트를 포함하지만, 이로 한정되지 않는다. 오메가-3/6 필수 지방산의 적합한 소스는 연어, 참치, 고등어, 블루피쉬, 황새치 등으로부터의 어유를 포함한다.

[0039]

본원의 식이 프로토콜의 유효성은 다수의 대상체 파라미터의 측정에 의해 모니터링된다. 예를 들어, 대상체의 혈청중 IGF-I 농도는 처음 IGF-I 및 단백질 섭취 수준에 따라 그리고 첨부된 간행물에 기술된 사망률에 대한 보호에 최적인 수준에 따라 제2 규정식 기간의 마지막에 25 내지 90%만큼 감소되는 것이 바람직하다. 대상체에



어서 혈당 농도가 제2 규정식 기간의 마지막에 25 내지 75%만큼 감소되는 것이 또한 바람직하다.

[0040]

본 발명의 실시 양태의 또 다른 변형에서, 저 단백질 규정식은 특정 아미노산을 갖는 아미노산 특이적 보충제를 포함한다. 전형적으로, 상기 보충제는 매우 낮은 단백질 양의 규정식 또는 단백질 무함유 규정식과 함께 5일 내지 7일의 기간 동안 소비될 과다한 수준의 비필수 아미노산을 제공한다. 소정의 개량에서, 저 단백질 규정식은 정상 단백질 규정식과 교대된다. 그러한 변형에서, 저 단백질 규정식은 매 2주 내지 2개월에 7일 동안 제공되며, 그 사이에 1 내지 7주의 정상식이 있다. 소정의 개량에서, 아미노산 특이적 보충제에서는 실질적으로 하기 아미노산, 즉 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페니알라닌, 트레오닌, 트립토판, 발린, 및 아르기닌이 제외된다. 이와 관련하여, "실질적으로 제외되는"이라는 것은 제외된 아미노산의 총계가, 바람직함이 증가하는 순서대로, 대상체의 규정식의 총 중량의 5 중량% 미만, 3 중량% 미만, 1 중량% 미만 및 0.5 중량% 미만임을 의미한다. 대신, 아미노산 특이적 규정식은 질소원으로서 하기 아미노산 중 1가지 이상을 제공한다: 알라닌, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글라이신, 히스티딘, 프롤린, 세린, 및 타이로신. 표 2 내지 표 4는 하기에 개시된 바와 같이 또한 단백질 제한된, 생쥐용의 아미노산 특이적 규정식의 특성을 제공한다. 전형적인 생쥐용 규정식은 약 19 kcal/일을 제공한다. 다른 포유류, 예컨대 인간에 있어서, 단백질 제한된 (PR) 규정식은 필요한 칼로리를 제공하도록 변경된다. 예를 들어, 미국에서 성인에 있어서의 전형적인 칼로리 섭취량은 약 2200 cal/일이다. 표 5는 인간 대상체에 있어서 각각의 소스로부터의 kcal/일을 제공하는 반면, 표 6은 인간에 있어서 각각의 소스로부터의 g/일을 제공한다.

표 2

	성분 (g/kg)		다량영양소 (g/kg)	
	정상식	PR 규정식	정상식	PR 규정식
옥수수 전분	397.49	397.49	탄수화물	601
말토덱스트린	132	149.88	질소원	177
수크로스	100	100	지방	72
대두유	70	72		
셀룰로오스	50	50	칼로리 밀도 (kcal/g)	
미네랄	35	35		
비타민	10	10	정상식	PR 규정식
콜린 비타르타레이트	2.5	2.5		
Tert-부틸히드로퀴논	0.01	.01	3.7600	3.7673

[0041]

표 3

각각의 음식물 소스로부터의 생쥐 1 kg에 있어서의 kcal

	정상식	PR
탄수화물	2404	2468
질소원	708	732
지방	648	648
계산	3760	3848

[0042]

표 4

각각의 소스로부터의 칼로리 퍼센트 (생쥐)

	정상식	PR
탄수화물	63.94	64.14
질소원	18.83	19.02
지방	17.23	16.84

[0043]

표 5

각각의 소스로부터의 일일 칼로리 (인간)

	정상식	PR
탄수화물	1406.60	1411.02
질소원	414.26	418.50
지방	379.15	370.48
총계 (kcal)	2200.00	2200.00

[0044]

표 6

각각의 소스로부터의 일일 g (인간)

	정상식	PR
탄수화물	351.65	352.75
질소원	103.56	104.63
지방	42.13	41.16
총계 (g)	497.34	498.54

[0045]

[0046]

소정의 개량에서, 생쥐용의 아미노산 특이적 규정식 1 kg은 약 2 g 내지 20 g의 알라닌, 10 g 내지 30 g의 아스파르트산, 2 g 내지 20 g의 시스테인, 40 g 내지 80 g의 글루탐산, 2 g 내지 20 g의 글라이신, 2 g 내지 20 g의 히스티딘, 15 g 내지 50 g의 프롤린, 5 g 내지 30 g의 세린, 및 5 내지 30 g의 타이로신을 포함한다. 인간 대상체에 있어서, 인간 대상체에 있어서의 일일 식이 제형 조성을 제공하기 위하여 이러한 범위에 인수 (즉, 약 0.572)를 곱한다. 예를 들어, 아미노산 특이적 규정식에 있어서의 인간에 대한 특정 아미노산의 일일 양 (2200 cal/일의 규정식)은 약 2 내지 12 g의 알라닌, 5 g 내지 30 g의 아스파르트산, 1 g 내지 7 g의 시스테인, 18 g 내지 73 g의 글루탐산, 2 g 내지 9 g의 글라이신, 2 g 내지 10 g의 히스티딘, 9 g 내지 37 g의 프롤린, 5 g 내지 21 g의 세린, 및 5 내지 21 g의 타이로신이다. 또 다른 개량에서, 아미노산 특이적 규정식은 규정식 1 kg당 특정 아미노산 약 160 내지 약 240 g을 포함한다. 따라서, 인간에 있어서, 아미노산 특이적 규정식은 규정식 1 kg당의 값을 약 2200 cal/일의 인간용 규정식을 대표하는 값으로 환산하기 위하여 인수 (0.572)를 사용하면 일일 약 80 내지 160 g의 특정 아미노산을 제공한다. 또 다른 변형에서, 아미노산 특이적 규정식은 상기에 개시된 양의, 알라닌, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글라이신, 히스티딘, 프롤린, 세린, 및 타이로신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 6가지 이상의 아미노산을 포함한다. 또 다른 변형에서, 아미노산 특이적 규정식은 표 7에 개시된 1일당 인간 체중 1 Kg당 아미노산의 양(g)을 제공한다. 특히, 아미노산 특이적 규정식은 하기의 g/인간 체중 (Kg)/일을 제공하였다: 0.06 g의 알라닌, 0.14 g의 아스파르트산, 0.04 g의 시스테인, 0.45 g의 글루탐산, 0.05 g의 글라이신, 0.06 g의 히스티딘, 0.23 g의 프롤린, 0.13의 세린, 및 0.13 g의 타이로신. 또 다른 개량에서, 이러한 아미노산 각각은 특정 값의  $\pm 30\%$ 의 범위 이내이다.

표 7

인간 수준. 치매 방지 규정식용으로 선택된 각각의 아미노산 (g)/인간 체중 (Kg)/일

제형 (g)/체중 (kg)			
아미노산	정상식	PR	인수
Ala	0.07	0.06	0.81
Asp	0.13	0.14	1.09
Cys	0.02	0.04	2.05
Glu	0.20	0.45	2.23
Gly	0.06	0.05	0.94
His	0.04	0.06	1.68
Pro	0.10	0.23	2.25
Ser	0.09	0.13	1.35
Tyr	0.06	0.13	2.19
Total	0.78	1.30	

[0047]

[0048]

또 다른 변동에서, 본 방법은 단백질 제한 (PR) 규정식을 대상체에게 제1 기간 동안 투여하는 단계를 포함한다. 소정 변동에서, 저 단백질 규정식은 특정 아미노산의 식이 보충제를 포함한다. 소정 개량에서, 제1 기간은 약 5 일 내지 14일이며, 이때, 7일이 전형적이다. 게다가, 저 단백질 규정식은 대상체에게 대상체의 정상 칼로리 섭취량의 70 내지 100%를 제공한다. 저 단백질 규정식은 실질적으로 아미노산만을 질소원으로 포함한다. 예를 들어, 단백질 제한 규정식은 그의 칼로리의 10% 미만이 단백질로부터 유래된다. 또 다른 개량에서, 단백질 제한 규정식은 그의 칼로리의 5% 미만이 단백질로부터 유래된다. 또 다른 개량에서, 단백질 제한 규정식은 그의 칼로리의 0%가 단백질로부터 유래된다. 특히, 단백질 제한 규정식에서는 실질적으로 하기 아미노산, 즉, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페니알라닌, 트레오닌, 트립토판, 발린, 및 아르기닌이 제외된다. 이와 관련하여, "실질적으로 제외되는"이라는 것은 제외된 아미노산의 총계가, 바람직함이 증가하는 순서대로, 5 중량% 미만, 3 중량% 미만, 1 중량% 미만 및 0.5 중량% 미만임을 의미한다. 대신, 단백질 제한 규정식은 질소원으로서 하기 아미노산 중 1가지 이상을 제공한다: 알라닌, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글라이신, 히스티딘, 프롤린, 세린, 및 타이로신. 표 2 내지 표 4는 하기에 개시된 생쥐 연구용의 식이 보충제를 포함하는 단백질 제한 규정식의 특성을 제공한다. 전형적인 생쥐용 규정식은 약 19 kcal/일을 제공한다. 다른 포유류, 예컨대 인간에 있어서, 저 단백질 규정식은 필요한 칼로리를 제공하도록 변경된다. 예를 들어, 미국에서 성인에 있어서의 전형적인 칼로리 섭취량은 약 2200 cal/일이다. 표 5는 인간 대상체에 있어서 각각의 소스로부터의 kcal/일을 제공하는 반면, 표 6은 인간에 있어서 각각의 소스로부터의 g/일을 제공한다.

[0049]

소정의 개량에서, 생쥐용 저 단백질 규정식 1 kg 중 아미노산이 표 8에 제공되어 있다. 소정의 개량에서, 생쥐용의 저 단백질 규정식 1 kg은 약 2 g 내지 20 g의 알라닌, 10 g 내지 30 g의 아스파르트산, 2 g 내지 20 g의 시스테인, 40 g 내지 80 g의 글루탐산, 2 g 내지 20 g의 글라이신, 2 g 내지 20 g의 히스티딘, 15 g 내지 50 g의 프롤린, 5 g 내지 30 g의 세린, 및 5 내지 30 g의 타이로신을 포함한다. 인간 대상체에 있어서, 인간 대상체에 있어서의 이러한 아미노산의 일일 매일 필요량을 제공하기 위하여 이러한 범위에 인수 (즉, 약 0.572)를 곱한다. 예를 들어, 저 단백질 규정식에 있어서의 인간에 대한 특정 아미노산의 일일 양 (2200 cal/일의 규정식)은 약 2 내지 12 g의 알라닌, 5 g 내지 30 g의 아스파르트산, 1 g 내지 7 g의 시스테인, 18 g 내지 73 g의 글루탐산, 2 g 내지 9 g의 글라이신, 2 g 내지 10 g의 히스티딘, 9 g 내지 37 g의 프롤린, 5 g 내지 21 g의 세린, 및 5 내지 21 g의 타이로신이다. 또 다른 개량에서, 단백질 제한 규정식은 규정식 1 kg당 특정 아미노산 약 160 내지 약 240 g을 포함한다. 따라서, 인간에 있어서, 저 단백질 규정식은 규정식 1 kg당의 값을 약 2200 cal/일의 인간용 규정식을 대표하는 값으로 환산하기 위하여 인수 (0.572)를 사용하면 일일 약 80 내지 160 g의 특정 아미노산을 제공한다. 또 다른 변동에서, 단백질 제한 규정식은 상기에 개시된 양의, 알라닌, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글라이신, 히스티딘, 프롤린, 세린, 및 타이로신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 6가지 이상의 아미노산을 포함한다. 표 8은 생쥐용 규정식을 위한 단백질 제한 규정식 중 아미노산 함량의 예를 제공한다. 또한 표 8은 단백질 제한 규정식 중 특정 아미노산 대 대조구 (정상식)의 특정 아미노산의 비인 인수를 제공한다. 이러한 비는 인간 대상체와 같은 다른 포유류에 동일하게 적용가능하다. 또 다른 변동에서, 저 단백질 규정식은 표 8에 개시된 1일당 인간 체중 1 Kg당 아미노산의 양(g)을 제공한다. 특히, PK 규정식은 하기의 g/인간 체중 (Kg)/일을 제공하였다: 0.06 g의 알라닌, 0.14 g의 아스파르트산, 0.04 g의 시스테인, 0.45 g의 글루탐산, 0.05 g의 글라이신, 0.06 g의 히스티딘, 0.23 g의 프롤린, 0.13의 세린, 및 0.13 g의 타이로신. 또 다른 개량에서, 이러한 아미노산 각각은 특정 값의  $\pm 30\%$ 의 범위 이내이다.

[0050]

또 다른 변동에서, 대상체에서 글루코스 및/또는 IGF-1 수준을 저하시키는 방법이 제공된다. 본 방법은 단백질 원으로부터의 약 10% 미만의 칼로리를 갖는 저 단백질 규정식을 대상체에게 제공하는 단계를 포함한다. 대상체의 글루코스 및/또는 IGF-1 수준은 단백질 섭취량을 증가시켜야 하는지 감소시켜야 하는지를 결정하기 위하여 모니터링된다. 소정의 개량에서, 저 단백질 규정식은 0 내지 10%의 단백질원으로부터의 칼로리를 갖는다. 추가의 개량에서 저 단백질 규정식은 0 내지 5%의 단백질원으로부터의 칼로리를 갖는다. 또 다른 개량에서, 저 단백질 규정식은 전형적으로 약 0%의 단백질원으로부터의 칼로리를 갖는다. 또 다른 개량에서, 저 단백질 규정식은 또한, 지방으로부터의 칼로리의 50% 이상이 탄소 원자수 13 내지 28의 상기에 개시된 장쇄 불포화 지방산으로부터의 것이도록 하는 지방원을 포함하는 저 칼로리 규정식이다. 전형적인 지방원은 대두유와 같은 야채유를 포함한다. 추가의 개량에서, 저 단백질 규정식은 지방으로부터의 칼로리의 25% 이상이 탄소 원자수 2 내지 7의 단쇄 지방산 및/또는 탄소 원자수 8 내지 12의 중쇄 포화 지방산으로부터의 것이도록 하는 지방원을 포함한다. 지방산의 구체적인 예는 라우르산 및/또는 미리스트산을 포함하며, 지방원은 올리브유, 커넬유 및/또는 코코넛유를 포함한다. 다른 개량에서, 저 단백질 규정식은 지방으로부터의 칼로리를 이 규정식에 함유된 총 칼로리의 약 0

내지 22%의 양으로 포함한다.

- [0051] 또 다른 실시 양태에서, 대상체에서 화학독성의 증상을 완화시키는 방법이 제공된다. 본 방법은 저 단백질 규정식을 제1 기간 동안 제공하는 단계를 포함하며, 저 단백질 규정식은 10% 미만의 단백질로부터의 칼로리를 포함한다. 칼로리 제한 규정식이 제2 기간 동안 대상체에게 제공되며, 칼로리 제한 규정식은 저 단백질 규정식의 칼로리의 0 내지 50%를 갖는다. 소정의 개량에서, 칼로리 제한 규정식은 0 내지 10%의 단백질원으로부터의 칼로리를 포함한다. 소정의 개량에서, 화학요법 치료제가 대상체에게 투여된다. 화학요법제의 예는 독소루비신, 시클로포스파미드, 시스플라틴, 5-플루오로우라실 및 이들의 조합을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0052] 하기 실시예는 본 발명의 다양한 실시 양태를 예시한다. 당업자라면, 본 발명의 사상 및 청구범위의 범주 내에 있는 많은 변동을 인식할 것이다.
- [0053] 저 단백질 섭취량에 관한 실험
- [0054] NHANES로부터의 50세 이상의 6,381명의 미국 남성 및 여성의 역학적 연구를 조합하였는데, 이는 미국에서 유일한 국가를 대표하는 식이 조사로서, 이때 단백질 아미노산의 수준 및 소스, 노화, 질환 및 사망률 사이의 관련성을 이해하기 위하여 생쥐 및 세포 연구를 이용하였다.
- [0055] 결과
- [0056] 인간 집단
- [0057] 연구 집단은 국가를 대표하는 단면 연구인 NHANES III으로부터의 50세 이상의 6,381명의 성인을 포함하였다. 본 출원인의 분석 샘플은 평균 연령이 65세이고, 민족, 교육 및 건강 특성 면에서 미국을 대표하는 집단이다 (표 13).
- [0058] 평균적으로 대상체는 1,823 칼로리를 소비하였으며, 상기 칼로리의 대다수는 탄수화물 (51%), 이어서 지방 (33%), 및 단백질 (16%) - 이때 11%는 동물성 단백질 유래의 것임 - 에서 온 것이었다. 단백질로부터의 칼로리 퍼센트를 이용하여 대상체를 고 단백질 군 (20% 이상의 단백질로부터의 칼로리), 중간 정도 단백질의 군 (10 내지 19%의 단백질로부터의 칼로리) 및 저 단백질 군 10% 미만의 단백질로부터의 칼로리)으로 분류하였다.
- [0059] 문헌[National Death Index up until 2006 (22)]을 이용하여 연관성을 통하여 모든 NHANES 참가자에 대한 사망 추적이 가능하였다. 이는 사망의 타이밍 및 원인을 제공하였다. 사망 추적 기간은 18년에 걸친 총 83,308명의 사람을 포함하였으며, 이때 40%는 전체 사망률, 19%는 심혈관계 질환 (CVD) 사망률, 10%는 암 사망률, 그리고 약 1%는 당뇨병에 의해 야기된 사망률이었다.
- [0060] 단백질과 사망률 사이의 연관성
- [0061] 콕스 비례 위험 모델을 이용하여 본 출원인 고 단백질 소비량 및 중간 정도 단백질의 소비량이 당뇨병 관련 사망률과 분명히 연관되었지만 전 원인, CVD 또는 암 사망률과는 연관되지 않았는데, 이는 50세 초과와 모든 대상체를 고려했을 때 그러하였다. 결과는, 중간 정도 단백질 섭취군 및 고 단백질 섭취군 둘 모두가 저 단백질 군 내의 참가자와 비교하여 더 높은 위험의 당뇨병 사망을 가짐을 나타냈다. 모두 종합해 보면 이러한 결과는 중간 정도 내지 고 단백질 섭취량이 당뇨병 사망을 촉진하지만, 이러한 가능성을 추가로 검증하기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다. 더 높은 단백질의 군에서의 상승된 당뇨병 사망률에 대한 대안적인 설명은, 당뇨병 진단 후, 개체가 더 높은 단백질, 더 낮은 지방, 및 저 탄수화물 섭취량으로 이루어진 규정식으로 바꿀 수 있다는 가능성이 있다. 이를 검증하기 위하여, 본 출원인은 기저선에서 당뇨병의 유병률을 갖지 않는 참가자에 있어서 단백질 섭취량과 당뇨병 사망률 사이의 연관성을 조사하였다 (표 19).
- [0062] 기저선의 당뇨병을 갖지 않는 대상체 중에서, 고 단백질 군 내의 대상체는 위험성이 73배 증가한 반면 (HR: 73.52; 95% 신뢰 구간(confidence interval; CI): 4.47-1209.7), 중간 정도 단백질 카테고리 내의 대상체는 당뇨병 사망 위험이 거의 23배 증가하였다 (HR: 22.93; 95% CI: 1.31-400.7). 본 출원인은 본 출원인의 위험 비 및 신뢰 구간이 본 출원인의 샘플 크기 및 저 단백질 군에서의 극도로 낮은 당뇨병 사망 발생률로 인하여 부풀려질 수 있음을 분명히 보여 준다. 전반적으로, 기저선의 당뇨병이 없는 사람 중에서는 단지 21명의 당뇨병 사망이 있었으며, 그 중 단지 1명이 저 단백질 군으로부터의 것이었다. 그럼에도 불구하고, 작은 샘플 크기에도 불구하고, 본 출원인의 결과는 증가된 단백질 섭취량과 단백질-관련된 사망률 사이의 강한 유의한 연관성을 여전히 보여 준다.
- [0063] 콕스 비례 위험 모델을 재실행하여 단백질 소비량과 연령 사이의 상호작용에 대하여 검증하고, 중년 성인 및 더



나이가 많은 성인에 있어서 단백질과 사망률 사이의 연관성이 상이한지를 결정하였다. 전 원인 및 암 사망률에 대하여 유의한 상호작용이 발견되었으며, 이는 저 단백질이 중년기에서 유익함을 나타내는 것이었지만; 그의 효과는 나이가 들어감에 따라 감소하였다 (도 4). 이러한 결과를 기반으로 하여, 본 출원인은 집단을 2개의 연령 군, 50 내지 65세의 것 (n=3,039), 및 66세 이상의 것 (n=3,342)으로 계층화하고, 단백질과 원인-특이적 사망률 사이의 관계를 재조사하였다. 50 내지 65세의 사람 사이에서, 더 높은 단백질 수준은 전 원인 및 암 사망의 유의하게 증가된 위험성에 연관되었다 (표 12). 이러한 연령 범위에서, 고 단백질 군 내의 대상체는 저 단백질 군 내의 대상체와 비교할 때, 그의 상대적인 전 원인 사망 위험성이 74% 증가하였으며 (HR: 1.74; 95% CI: 1.02-2.97), 암으로 사망할 가능성이 4배보다 더 많았다 (HR: 4.33; 95% CI: 1.96-9.56). 이들 연관성 중 어떠한 것도 전체 지방으로부터의 칼로리 퍼센트 또는 전체 탄수화물로부터의 칼로리 퍼센트의 제어에 의해 유의하게 영향을 받지 않았다. 그러나, 동물성 단백질로부터의 칼로리 퍼센트를 제어할 때, 전체 단백질과 전 원인 및 암 사망률 사이의 연관성은 각각 배제되거나 유의하게 감소되었으며, 이는 동물성 단백질이 이러한 관계의 유의한 부분을 매개함을 시사한다. 본 출원인이 식물계 단백질의 영향을 제어할 경우, 단백질 섭취량과 사망률 사이의 연관성은 변화하지 않는데, 이는 고 수준의 동물성 단백질이 사망을 촉진함을 나타내며, 식물계 단백질이 보호 효과를 가짐을 나타내는 것은 아니다 (표 17).

[0064]

저 단백질 규정식을 이용하는 대상체와 비교하여, 중간 정도 수준의 단백질을 소비한 대상체는 또한 3배 더 높은 암 사망률을 가졌지만 (HR: 3.06; 95% CI: 1.49-6.25) - 이는 지방으로부터의 칼로리 퍼센트 또는 탄수화물로부터의 칼로리 퍼센트 중 어느 하나에 의해 설명되는 것은 아님 -, 동물성 단백질로부터의 칼로리 퍼센트를 제어할 때 미미하게 감소되었다 (HR: 2.71; 95% CI: 1.24-5.91). 상기 효과의 크기는 고 단백질 군에서의 것만큼 큰 것은 아니었다. 종합해 보면, 이러한 결과는 고 수준의 동물성 단백질을 소비한 50 내지 65세의 응답자가 전체 및 암 사망의 위험성의 대다수 증가를 나타내지만, 상기 위험성은 단백질이 동물성 소스에서 오는 것이 아닐 경우 약간 감소할 수 있음을 나타낸다. 45 내지 65세의 집단을 고려할 경우 유사한 결과를 획득하였다 (테이 터는 예시되어 있지 않음).

[0065]

상기 발견과는 대조적으로, 기저선의 66세 이상인 응답자들 중에서, 더 높은 단백질 수준은 전체 및 암 사망률에 대한 반대의 영향과 연관되었지만, 당뇨병 사망률에 대해서는 유사한 영향과 연관되었다 (표 12). 저 단백질 소비량을 갖는 대상체와 비교하여, 많은 양의 단백질을 소비한 대상체는 전 원인 사망률이 28% 감소하한 반면 (HR: 0.72; 95% CI: 0.55-0.94), 중간 정도 양의 단백질을 소비한 대상체는 전 원인 사망률의 21% 감소를 나타냈다 (HR: 0.78; 95% CI: 0.62-0.99). 더욱이, 이것은 지방으로부터의 칼로리 퍼센트, 탄수화물로부터의 칼로리 퍼센트 또는 동물성 단백질로부터의 칼로리 퍼센트에 의해 영향을 받지 않았다. 고 단백질 소비량을 갖는 대상체는 또한 저 단백질 규정식을 이용한 대상체와 비교하여 암 사망률이 60% 감소하였는데 (HR: 0.40; 95% CI: 0.23-0.71), 이것도 또한 다른 영양소 섭취 또는 단백질원을 제어할 때 영향을 받지 않았다.

[0066]

단백질과 사망률 사이의 연관성에 대한 IGF-1의 영향

[0067]

조정된 평균 IGF-1 수준은 상기 둘 모두의 연령 군에 있어서 단백질 소비량과 명확하게 연관되었다 (도 5). IGF-1은 랜덤하게 선택된 하위샘플(subsample) (n=2,253)에 있어서 유일하게 이용가능하기 때문에, 본 출원인은 이 샘플에서 단백질과 원인-특이적 사망률 사이의 연령-특이적 연관성을 재조사하여, 약간 더 큰 효과적인 크기 이기는 하지만 상기 연관성이 전체 샘플 (full sample)에서 관찰된 것과 유사함을 밝혀 냈다 (표 15). 다음, 본 출원인은 IGF-1이 단백질과 사망률 사이의 연관성에 있어서 모데레이터(moderator)로서 작용하는지 매개자로서 작용하는지를 조사하였다. 본 발명자는 IGF-1이 단백질 소비량과 사망률 사이의 연관성을 설명하지 않지만 (표 15), 단백질과 IGF-1 수준 사이의 통계학적으로 유의한 상호작용 (표 16)에 의해 나타나는 바와 같이 IGF-1은 상기 연관성의 중요한 모데레이터임을 밝혀냈다.

[0068]

이러한 모델로부터, IGF 1 및 단백질 군에 의해 예측된 위험 비를 계산하였다 (도 12). 결과는, IGF-1의 매 10 ng/ml의 증가에 있어서 50 내지 65세의 대상체 사이에서 암 사망 위험성이 저 단백질 군에 대하여 고 단백질 군에 있어서 추가 9%만큼 증가함을 나타냈다 (HR고 단백질 x IGF-1: 1.09; 95% CI: 1.01-1.17). 대안적으로, 나이가 더 많은 대상체 (66세 이상) 사이에서, 저 단백질 군 내의 대상체와 비교할 때, 고 또는 중간 정도 단백질 규정식을 이용한 대상체는 IGF-1이 또한 낮을 경우 감소된 CVD 사망 위험성을 갖지만, IGF-1이 증가함에 따라 효과가 발견되지 않았다.

[0069]

생쥐에 있어서의 단백질 섭취량, IGF-1, 및 암

[0070]

기작의 추가의 본 출원인의 연구 및 인과관계를 확인하기 위하여, 본 출원인은 NHANES 연구에서의 대상체의 것과 유사한 범위의 단백질 섭취율 (4 내지 18%)의, 설치류에서의 순환 IGF-1의 수준, 암 발생률, 및 종양 진행에

대한 영향을 연구하였다. 18주령 수컷 C57BL/6 생쥐에게 CR을 부과하지 않고서 또는 영양실조를 야기하지 않고서 단백질로부터 유래된 고 (18%) 또는 저 (7%) 칼로리 양을 제공하도록 설계된 실험용의 등칼로리 규정식을 39일 동안 계속하여 급이하였다 (도 9a, 도 9b).

[0071] 새롭게 형성된 종양이 그의 각각의 규정식을 먹은지 1주일 후에 생존하고 성장하는 능력에 대하여 상이한 수준의 단백질 및 IGF-1 수준이 얼마나 영향을 줄 수 있는지를 이해하기 위하여, 상기 둘 모두의 군에게 20,000개의 동계 쥐과 흑색종 세포 (B16)를 피하 이식하였다. 종양 측정은 그의 각각의 규정식을 먹은지 22일째에 이식한지 15일 후에 시작하였는데, 이 시점에 발생률은 고 단백질 수준 군에서 100%이지만 저 단백질 수준 군에서는 단지 80%만이 밝혀졌다 (도 6a). 제5일에, 발생률은 저 단백질 군에서 90%로 상승하였으며, 실험 마지막까지 여기에 남아 있었다 (도 6a). 제2일로부터 실험의 마지막까지, 종양 크기는 더 적은 양의 단백질을 소비하는 군에서 유의하게 더 작았으며, 이는 훨씬 더 느린 종양 진행을 나타내는 것이었다. 제39일에, 평균 종양 크기는 고 단백질 군에서 78% 더 큰 것으로 관찰되었다 (제36일  $P=0.0001$ ; 제39일  $P<0.0001$ ) (도 6b). 제16일에 혈액 샘플을 수득하고 분석하여 IGF-1, 및 IGF-1 저해 단백질, IGFBP-1에 대한 단백질 섭취량의 영향을 결정하였다. 혈청중 IGF-1은 고 단백질 (18%) 규정식을 급이한 동물과 비교할 때 저 단백질 (4%) 군에서 35% 더 낮았다 ( $P=0.0004$ ) (도 6c). 역으로, 혈청중 IGFBP-1은 고 단백질 군과 비교하여 저 단백질 군에서 136% 더 높았다 ( $P=0.003$ ) (도 6d).

[0072] GHR-IGF-1 축이 암 진행을 촉진한다는 가설을 추가로 검증하기 위하여, 본 출원인은 GHR/IGF-1 결함 GHRKO 생쥐 및 그의 각각의 연령- 및 성별-매칭된 한배새끼 대조군 (18주령 수컷 C57BL/6 생쥐) 내에 흑색종 (B16)을 피하 이식하였다. 종양 측정은 이식한지 10일 후에 시작하여 제18일까지 계속하였다. 데이터는, 종양 진행이 대조군에서의 진행과 비교할 때 GHRKO 생쥐에서 강하게 저해되었음을 나타낸다 (도 6e;  $P<0.01$ ).

[0073] 또한 본 출원인은 유방암 생쥐 모델을 이용하여 단백질 수준, 종양 발생률 및 진행 사이의 관계를 검증하였다. 12주령 암컷 BALB/c 생쥐는, 상기 생쥐를 중량 손실의 방지를 위하여 첫 번째 주 내에 4%의 단백질로부터의 kcal의 규정식으로부터 7%의 단백질로부터의 kcal의 규정식으로 변화시켜야 한다는 것을 제외하고는 C57BL/6 생쥐에 대하여 설명한 것과 동일한 식이 요법 하에 두었다 (도 9e, 도 9f). 이러한 규정식을 급이한지 1주일 후, 생쥐에게 20,000개의 동계 전이성 쥐과 유방암 세포 (4T1)를 피하 이식하고, 15일 후에 종양에 대하여 평가하였다. 이식 후 제18일에 (규정식을 먹은지 제25일에) 종양 발생률은 고 단백질 군에서 100%이지만 저 단백질 군에서는 단지 70%였다. 저 단백질 군에서의 발생률은 제39일에 80%로 상승하였으며, 여기서, 상기 발생률은 실험 마지막까지 유지되었다 (도 6f). 종양 진행 데이터는 또한, 저 단백질 규정식을 먹은 군이 더 작은 평균 종양 크기를 가졌음을 나타낸다. 저 단백질 군은, 실험 마지막에 제53일에 고 단백질 군과 비교하여 45% 더 작은 평균 종양 크기가 관찰되었다 ( $P=0.0038$ ) (도 6g). C57BL/6 생쥐에 대해서는, 식이 단백질 제한 16일째에 IGF-1을 측정하였다. 저 단백질 섭취군에서, IGF-1 수준은 고 수준 군에서의 것과 비교하여 30%만큼 감소하였다 ( $P<0.0001$ ) (도 6h). 부가적으로, 저 단백질 섭취량은 C57BL/6 유전 배경 (도 6d)에서 관찰된 것과 유사한, 84%의 IGFBP1 증가 ( $P=0.001$ )를 또한 야기하였다 (도 6i). 이와 유사하게, 대두 단백질 섭취량을 고 수준으로부터 저 수준으로 감소시켰을 때, 본 출원인은 IGF-1의 30% 감소 ( $p<0.0001$ ) (도 6j) 및 IGFBP-1의 140% 증가 (도 6k)를 관찰하였다. IGF-I 및 IGFBP1에 대한, 동일 수준의 동물성 단백질을 식물성 단백질로 치환한 것의 영향에 있어서의 추세가 있지만, 그 차이는 유의하지 않았다. 이러한 데이터는 더 적은 단백질 섭취량이 부분적으로 IGF-1의 감소 및 IGF-1 저해자인 IGFBP1의 증가에 의해 암 발생률 및/또는 진행을 감소시키는 데 그 역할을 할 수 있음을 시사한다. 식물계 단백질에 대한 동물계 단백질의 다양한 유형에 대한 추가의 연구가 IGF-I 및 IGFBP1에 대한 그의 영향의 결정에 필요하다.

[0074] 세포 연구

[0075] 아미노산 수준과 수명 사이에 근본적인 연관성이 있는지를 이해하기 위하여, 효모 성장 및 발달에 대한 특정 농도의 아미노산의 존재의 영향을 생존률 및 돌연변이를 분석법에 의해 평가하였다. 야생형 DBY746 에스. 세레비지에 주를 절반 (0.5배), 표준 (1배) 및 두 배 (2배) 아미노산 농도의 존재 하에 성장시켰으며, 이때 모든 다른 영양소는 일정하게 유지하였다. 생존률을 제1일, 제3일, 제5일 및 제8일에 측정하였다. 제1일 및 제3일 동안 생존률 차이는 관찰되지 않았다. 제5일에, 2가지의 최고 아미노산 농도는 사망률 증가 추세를 나타냈으며, 이는 제8일까지 생존 세포를 10배 감소시켰다 (도 6l).

[0076] 아미노산, 노화, 및 연령-관련 DNA 손상 사이의 관계를 평가하기 위하여, 본 출원인은 노화 중인 에스. 세레비지에를 이용하여 자발적 돌연변이율을 측정하였다. 상기 돌연변이율은 0.5배 아미노산 농도에 노출시킨 세포와 비교하여, 각각 1배 및 2배 아미노산 수준에 노출시킨 5일 된 세포에서는 3배 및 4배 더 높았지만 이렇게 노출

시킨 어린 세포에서는 그러하지 않았다 (도 6m). 이러한 결과는, 심지어 단세포 유기체에서도 아미노산이 세포 노화 및 노화-의존성 계능 불안정성을 촉진함을 나타낸다.

[0077] 연령-관련 계능 불안정성을 촉진하는 데 연루된 경로들을 추가로 파악하기 위하여, 본 출원인은 아미노산의 존재 또는 부재 하에 Ras-PKA-Msn2-4 Tor-Sch9-Gis1 경로에 의해 조절되는 스트레스 응답성 유전자의 유도를 측정하였다. 단지 Trp, Leu, 및 His (이 주의 성장에 필수적임)을 함유하는 대조 배지에서 성장시킨 세포에 있어서, 배지 중 모든 아미노산의 존재는 스트레스 내성 유전자의 유도를 감소시켰으며, 이는 아미노산의 첨가가 세포 보호의 저해에 충분함을 나타내는 것이었다 (도 6n).

[0078] Tor-Sch9 경로는 장수를 연장시키지만 DNA 돌연변이를 또한 촉진한다. Ras-cAMP-PKA 시그널링(signaling)이 연령-관련 계능 불안정성을 또한 조절하는지를 결정하기 위하여, 본 출원인은 ras2 결함 돌연변이체를 연구하였다. 본 출원인은 ras2Δ 돌연변이체가 장수함을 확인하였지만 (도 11a) Ras 시그널링의 불활성화가 연령- 및 산화 스트레스-의존성 계능 불안정성을 약화시켰음을 또한 보여 준다 (도 11b, 도 11c, 60, 도 11d).

[0079] 종합하면, 이러한 결과는 적어도 부분적으로는 Tor-Sch9 및 Ras/PKA 경로의 활성화 및 감소된 스트레스 내성에 의한, 아미노산이 돌연변이 빈도, 그리고 그에 따라 계능 불안정성에 영향을 줄 수 있는 기작을 시사한다 (도 6p).

[0080] 늙은 생쥐에서의 저 단백질 섭취 및 중량 유지

[0081] 65세 이상의 대상체에 대한 50 내지 65세의 대상체에서의 저 단백질 규정식의 관찰된 반대 효과를 기반으로 하여, 그리고 65세 이후의 BMI 및 IGF-1 수준의 중대한 강하를 기반으로 하여, 본 출원인은 저 단백질 규정식을 먹은 더 나이가 많은 대상체가 영양 실조될 수 있고 충분한 양의 아미노산을 흡수 또는 프로세싱하는 것이 불가능해질 수 있다고 가정하였다. 생쥐에서의 이러한 가능성을 검정하기 위하여, 본 출원인은 어린 생쥐 (18주령) 및 늙은 생쥐 (24주령)에게 18% 또는 4% 동물성 단백질을 함유하는 등칼로리 규정식을 급이하였다. 매우 낮은 단백질의 규정식을 고의로 선택하여 늙은 유기체에서의 단백질 제한에 대한 임의의 민감성을 나타냈다. 늙은 생쥐는 30의 얻어진 중량에 대하여 고 단백질 규정식을 먹어서 유지한 반면, 저 단백질 규정식을 먹은 어리지 않은 늙은 생쥐는 제15일에 그의 중량의 10%를 상실하였으며 (도 4a, 도 4b), 이는 사망률에 대한 단백질 제한의 유익한 효과를 부정적인 효과로 만드는 데 대한 노화의 영향과 일치하였다.

[0082] 토론

[0083] 여기서, 미국의 집단에서의 영양에 대한 주요한 국가-대표적 연구를 이용하면, 본 출원인의 결과는 45세 이상인 이들 사이에서, 단백질 섭취 수준은 증가된 당뇨병 사망 위험성과 연관되지만, 전 원인, 암 또는 CVD 사망률의 차이와는 연관되지 않음을 나타낸다. 그럼에도 불구하고, 본 출원인은 단백질 소비량과 사망률 사이의 연관성에 있어서의 연령 상호작용을 발견하였으며, 이때, 50 내지 65세의 대상체는 저 단백질 섭취량으로부터의 이익을 경험하고 66세 이상의 대상체는 저 단백질 규정식으로부터의 손해를 경험하였다 - 적어도 전체 사망률 및 암. 이는 여기서 보고된 사망률, IGF-1 및 단백질 섭취량 사이의 강한 연관성이 이전에 기술되지 않았던 이유를 설명할 수 있다. 더욱이, IGF-1 수준을 측정된 2253명의 대상체 중에서, 저 단백질 섭취군과 비교하여 고 단백질 섭취량을 갖는 대상체에 있어서의 전 원인 및 암 사망 위험성은 고 수준의 IGF-1을 또한 갖는 대상체의 경우 훨씬 더 증가하였다. 이는 IGF-1 수준을 다양한 유형의 암과 연관시킨 이전의 연구와 일치한다.

[0084] 특히, 소비되는 단백질의 유형이 중요할 수 있다는 증거가 있었다. 본 출원인의 결과는, 동물성 소스로부터 유래된 단백질의 비율이 전체 단백질 섭취량과 전 원인 및 암 사망률 사이의 연관성의 유의한 비율을 설명함을 나타냈다. 이러한 결과는 붉은 고기 소비량과 전원인, CVD, 및 암에 의한 사망 사이의 연관성에 관한 최근 발견과 일치한다. 미국에서의 이전의 연구는 저 탄수화물 규정식이 전체 사망률 증가와 연관되며 그러한 규정식이 동물계 생성물의 증가된 소비를 수반할 때, 전체 사망 위험성과, CVD 및 암 사망 위험성이 훨씬 더 증가함을 밝혀냈다. 그러나, 본 출원인의 연구는 IGF-I, 노화, 당뇨병 및 암에 대한 동물성 단백질의 영향이 단백질 섭취량을 확립하는 조사 이후 18년 내에 45 내지 65세의 사람에게 있어서 사망의 주요 촉진자일 수 있음을 나타낸다. 그 때에는, 면담시에 65세였던 코호트는 83세가 될 것이며, 이는 고 단백질 섭취량이 65세 초과인 대상체에 있어서 사망을 촉진할 수 있음을 강조하는 것이다.

[0085] 효모 및 생쥐로부터의 본 출원인의 결과는 또한, 아미노산, 스트레스 내성, DNA 손상, 및 암 발생/진행 사이의 관계를 제공함으로써 단백질, 암 및 전체 사망률 사이의 근본적인 관련성의 적어도 일부를 설명할 수 있다. 생쥐에서, 감소된 단백질 수준에 의해 야기되는 변화는 심지어 20,000개의 중앙 세포가 피하 부위에 이미 존재할 경우라도, 종양의 10 내지 30%의 확립을 방지하기에 충분한 효과 잠재력을 가졌다. 더욱이, 흑색종 및 유방암

둘 모두의 진행은 저 단백질 규정식에 의해 강하게 저해되었으며, 이는 저 단백질 규정식이 암 예방 및 치료 둘 모두에 있어서 응용을 가질 수 있음을 나타낸다.

[0086]

단백질 섭취량이 기저선의 중년인 성인에 있어서의 증가된 사망률과 연관되지만, 저 단백질 규정식이 나이가 더 많은 성인에 있어서 위험할 수 있다는 증거가 또한 있다. 노인에 있어서 고 단백질 섭취량과 중간 정도 단백질 섭취량 둘 모두는 저 군과 비교하여 주요한 개선과 연관되었으며, 이는 소비되는 칼로리의 10% 이상을 나타내는 단백질 섭취량이 연령-의존성 체중 감량을 감소시키기 위하여 그리고 가능하게는 IGF-1 및 다른 중요한 인자의 과도한 손실을 방지하기 위하여 65세 또는 가능하게는 75세 이후에 필요할 수 있음을 시사한다. 이전의 연구에서는 증가된 단백질 섭취량 및 그 결과 생긴 IGF-1 증가가 노인에 있어서 유익한 것으로 입증될 수 있음이 주지되었다. 실제로, 저 단백질 규정식의 보호 효과로부터의 유해한 효과로의 극적인 변화는 중량이 안정화되고 그 후 감소하는 시점과 일치한다. 이전의 종단적 연구를 기반으로 하면, 중량은 50 내지 60세까지 증가하는 경향이 있는데, 상기 시점에 체중은 65세 초과의 이들에 있어서 연간 평균 0.5%만큼 꾸준히 감소하기 시작하기 전에 안정해지게 된다. 본 출원인은 이것이 체중 감량 및 유의한 백분율의 체중을 손실한 노쇠한 대상체에서 고려되는 대상체의 노쇠함에 의존적일 수 있고 단백질 영양실조에 더 민감한 저 BMI를 가질 수 있다고 추측한다. 또한, 염증 또는 유전 인자와 같은 다른 인자가 노인 대상체에서 단백질 제한에 대한 민감성에 기여할 수 있음이 가능한데, 이는 본 출원인의 생쥐 연구와 일치한다.

[0087]

다른 연구에서 pH 미세기후의 변화, 노화된 소화관에서의 손상된 적응 응답, 및 장의 형태의 변화와 관련된 설 치류에서의 영양소 흡수의 연령-관련 감소가 주지되었지만, 노화에 있어서 형태적 변화와 흡수성 변화 사이의 명확한 연관성은 여전히 없다. 인간에 있어서, 몇몇 연구에 의하면, 식이 단백질 소화 및 흡수 역학이 건강한 남성 노인에 있어서는 생체내에서 손상되지 않음이 밝혀졌지만, 이러한 연구에서는 말초 조직에의 감소된 이용 가능성으로 이어질 수 있는 아미노산의 증가된 내장 추출이 보고되었으며, 저 단백질 섭취량 또는 증가된 단백질 필요량의 경우에 식이 아미노산의 제한된 전신 이용가능성은 감소된 근육 단백질 합성에 기여할 수 있을 것으로 추측되었다. 더욱이, 인간에 있어서 다른 인자, 예컨대 불량한 치아 상태, 약물 치료, 및 심리사회적 쟁점이 또한 영양실조 속도에 상당한 역할을 한다.

[0088]

또한 IGF-1은 이전에 노령에서 감소하여 가능하게는 노쇠함 및 사망의 위험을 증가시키는 것으로 밝혀졌었다. 따라서, 본 출원인의 발견은 IGF-I 및 사망률에 관련된 논란을 설명할 수 있는데, 이는 최소 수준의 단백질 및 가능하게는 IGF-I이 노인에 있어서 중요하거나 저 순환 IGF-1이 영양실조 상태, 노쇠함 및/또는 이환율을 반영함을 나타낸다. 실제로, 염증 및 기타 장애는 IGF-1 수준을 감소시켜서 저 단백질 및 저 IGF-1 군이 유의한 수의, 주요 질환이 있거나 주요 질환의 발병 과정 중의 영양실조 개체 및 쇠약한 개체 둘 모두를 포함할 수 있는 가능성을 상승시킨다는 것이 공지되어 있다.

[0089]

인정되어야 하는 본 출원인의 연구에 대한 몇몇 제한이 있다. 첫째, 단일한 24시간 식이 리콜(recall), 이어서 18년 이하의 사망률 평가의 이용은 24시간의 기간이 평범한 날이 아닐 경우 식이 규범(dietary practice)을 잘못 분류할 잠재력을 갖는다. 그러나, 본 출원인의 샘플의 93%에서는 24시간의 기간이 평범한 날을 나타냄이 보고되었다. 또한 본 출원인은 이 변수를 본 출원인의 분석에서 대조구로서 포함한다. 더욱이, 24시간 식이 리콜은 대상체의 "통상식"을 확인하기 위한 매우 유효한 접근법인 것으로 밝혀졌다. 본 출원인은 식이 소비에 대한 종단적 데이터의 결여가 본 출원인의 연구의 잠재적인 한계임을 인정하여야 하지만, 노인 사이에서의 6년에 걸친 식이 일관성의 연구는 식습관이 시간이 지나도 거의 변화하지 않음을 나타냈다. 20년에 걸쳐서 식습관을 본 또 다른 연구는, 사람이 노화됨에 따라 단백질, 지방 및 탄수화물에 대하여 에너지 섭취량이 감소한 반면 상기 감소는 3가지 유형에 걸쳐 동일함을 나타냈다.

[0090]

본 출원인의 연구의 또 다른 한계는 응답자의 단백질 군으로의 분류, 그리고 그 후 분석용 샘플을 계층화하는 것이, 특히 기저선에서의 당뇨병이 없는 사람 또는 IGF-1 하위샘플 내의 참가자 사이에서의 당뇨병 사망률을 포함하는 분석에 있어서 상대적으로 작은 샘플 크기를 생성하였다는 것이다. 그 결과, 본 출원인의 위험 비 및 95% 신뢰 구간은 더 큰 샘플 크기에 의해 보여지는 것보다 훨씬 더 클 수 있다. 그럼에도 불구하고, 본 출원인의 힘을 감소시키고 연관성의 탐지를 더 어려워지게 하기 위하여 작은 샘플 크기를 기대할 것이다. 따라서, 유의성을 탐지하는 본 출원인의 능력은 단백질과 사망률 사이의 연관성이 강력함을 나타낸다. 더욱이, 본 출원인의 사망률 분석으로부터의 95% 신뢰 구간의 하한치는 1.0보다 충분히 큰 것이었으며, 이는 증가된 위험성이 아마도 크다는 것을 의미한다. 마지막으로, 이러한 한계가 주어질 경우, 본 출원인의 연구는 흔히 이전의 문헌으로부터 빠진 특징인 큰 국가 대표적 샘플의 그의 포함 뿐만 아니라 신뢰가능한 원인-특이적 사망률 데이터의 그의 이용에 의해 강화되었다.



- [0091] 전반적으로, 본 출원인의 인간 및 동물 연구는 중년의 저 단백질 규정식이 적어도 부분적으로는 순환 IGF-1 및 아마도 인슐린의 수준의 조절을 포함할 수 있는 과정을 통하여 암의 예방 및 전체 사망률에 유용할 수 있음을 나타낸다. 다른 역학적 연구 및 동물 연구와 일치하여, 본 출원인의 발견은 식물계 영양소가 대다수의 음식물 섭취량을 대표하는 규정식이 건강상의 이익을 최대화할 가능성이 있음을 시사한다. 그러나, 본 출원인은 65세, 그리고 아마도 75세 이하의, 건강 상태에 따라, 현재 최소 요건으로 보여지는, 미국 의학 협회의 식품 영양 위원회(Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine)에 의해 공개된 0.7 내지 0.8 g의 단백질/kg의 체중/일이 19세 내지 70세의 성인에 의해 소비되는 1 내지 1.3 g의 단백질/kg의 체중/일에 대하여 보호적일 수 있음을 제안한다. 또한 본 출원인은 건강한 체중의 유지 및 노쇠함으로부터의 보호를 허용하기 위하여 저 단백질 섭취량을 회피하고 점진적으로 중간 정도 내지 고 단백질 소비, 아마도 대체로 식물계 소비를 채용하는 것이 중요할 수 있다.
- [0092] 실험 절차
- [0093] 인간을 위한 영양소 섭취 데이터
- [0094] 영양소 섭취 데이터는 24시간의 기간 동안 식음료 섭취에 관한 보고서를 기반으로 한다. 80가지 초과 영양소에 관한 정보를 이용하여, 자동화된 마이크로컴퓨터 기반의 코딩 시스템을 통하여 데이터를 수집하였다. 식이 데이터를 수집하는 이러한 방법을 이용하는 것은 몇몇 이점이 있다. 소비와 리콜 사이의 경과 시간이 짧은 경우, 전형적으로 참가자는 더 많은 정보를 리콜할 수 있다. 또한, 보고 방법과는 달리, 24시간 식이 리콜은 소비 후 데이터 수집에 의존하며, 이는 식이 행동을 변경시키는 평가 잠재력을 감소시킨다. 더욱이, 24시간 리콜은 일반적으로 사용되는 식품 섭취빈도 설문지와 비교하여 총 에너지 및 단백질 소비의 더 강한 추정치인 것으로 밝혀졌으며 또한 블록 식품 섭취빈도 설문지와 미국 국립 암 연구소(National Cancer Institute)의 식사력 설문지(Diet History Questionnaire) 둘 모두보다 더 유효한, 총 에너지 및 영양 섭취의 척도인 것으로 밝혀졌다. 마지막으로, 이 접근법은 또한 체질량 지수와 상관없이, 에너지, 단백질, 지방 및 탄수화물 섭취량을 정확하게 평가하는 것으로 밝혀졌다.
- [0095] 역학적 사망률 추적
- [0096] 사망률 데이터는 미국 전국 사망 지수(National Death Index)로부터 입수가능하였다. 113가지의 잠재적인 근원적 사망 원인에 대한 정보 (UCOD-113)를 이용하여 전 원인 사망률, 심혈관계 질환 (CVD) 사망률, 암 사망률 및 당뇨병 사망률을 결정하였다.
- [0097] 인간에 대한 통계학적 분석 데이터
- [0098] 콕스 비례 위험 모델을 이용하여 단백질로부터의 칼로리의 섭취량과 후속 전 원인, CVD, 암 및 당뇨병 사망률 - 이때 후자의 3가지의 런(run)은 경쟁적 위험 구조를 이용함 - 사이의 연관성을 추정하였다. 다음, 본 출원인은 사망률과의 연관성에 대하여 연령과 단백질 소비량 사이의 상호작용을 검정하였다. 이러한 결과를 기반으로 하여, 본 출원인은 대상체를 2개의 연령군 (50 내지 65세 및 66세 이상)으로 분류하였으며, 이를 나머지 분석에서 사용하였다. 연령-계층화 비례 위험 모델을 이용하여 상기 2개의 연령군 내에서 단백질로부터의 칼로리 퍼센트와 사망률과의 연관성을 추정하고, 그 관계가 지방으로부터의 칼로리의 퍼센트, 탄수화물로부터의 칼로리의 퍼센트, 또는 동물성 단백질에 의해 영향을 받는지를 조사하였다. 위험 모델을 IGF-1 하위샘플에 대하여 재추정하여 IGF-1의 포함이 단백질 섭취량과 사망률 사이의 연관성을 변화시키는지를 결정하였다. 마지막으로, 비례 위험 모델을 이용하여 단백질과 IGF-1 사이의 상호작용을 조사하고, 이를 사용하여 다양한 IGF-1 수준에서 각각의 단백질 군에 있어서의 예측 위험 비를 계산하여서 단백질 섭취량이 IGF-1의 수준에 따라 사망률에 달리 영향을 주는지를 결정하였다. 모든 분석을 샘플링 설계를 설명하는 샘플 중량을 이용하여, 그리고 연령, 인종/민족, 교육, 성별, 질환 상태, 흡연, 식이 변화 및 총 칼로리 소비량을 제어하여 실행하였다.
- [0099] 효모 및 생쥐 실험을 위한 재료 및 방법
- [0100] 콕스 비례 위험 모델을 이용하여 본 출원인은 단백질 소비량과 전 원인, CVD 또는 암 사망률 사이의 연관성을 발견하지 못하였다 (표 14). 그러나, 고 및 중간 정도 단백질 소비량은 당뇨병-관련된 사망률과 명확하게 연관되었다. 1가지 설명은 당뇨병이 이러한 군에서 더 횡행할 수 있다는 것인데, 이는 아마도 당뇨병 진단 이후 더 많은 단백질, 더 낮은 지방, 및 더 낮은 탄수화물 섭취량으로의 변화 때문일 것이다.
- [0101] 마지막으로, 저 단백질 소비량에 대하여 고 단백질 소비량은 66세 이상의 대상체에 있어서 당뇨병 사망 위험성을 10배 초과로 증가시키는 것과 연관된 것으로 밝혀졌다. 그러나, 고 단백질 군 내의 당뇨병력이 있는 대상체

의 훨씬 더 많은 횡행과, 저 단백질 군 내의 당뇨병으로 사망한 대상체의 적은 수가 이것을 설명함으로써, 당뇨병 발생률 및 사망률 (HR: 10.64; 95% CI: 1.85-61.31)에 대한 단백질 섭취량의 역할을 결정하기 위한 추가의 연구에 대한 필요성을 강조할 수 있다.

[0102]

보충적 재료 및 방법

[0103]

인간에서의 IGF-I에 대한 데이터

[0104]

권고된 9시간의 금식 후, NHANES III에서의 대상체의 절반을 랜덤하게 선택하여 아침 조사에 참여시켰다. 이러한 하위샘플 중, 본 출원인의 연구에 포함된 2,253명의 대상체가 순응하였으며, IGF-I에 대한 공복 혈청중 데이터를 측정하였다. IGF-I을 표준 실험실 프로토콜을 이용하여 다이아그노스틱 시스템즈 레보러토리즈 인크.(Diagnostic Systems Laboratories Inc.)에 의해 측정하고, ng/ml 단위로 기록하였다.

[0105]

인간에 있어서의 잠재적인 교란 변수에 대한 데이터

[0106]

연령, 인종/민족, 교육, 성별, 질환 상태, 흡연, 식이 변화 및 총 칼로리 소비량을 잠재적인 교란 변수로서 분석에 포함시켰다. 연령을 연수로 보고하고, NHANES에 의한 데이터 세트에서 90으로 상단 코딩하여(top-coded) 응답자의 기밀을 보호하였다. 임시 변수(dummy variable)를 생성하여 대상체를 하기 3가지의 인종/민족 카테고리 분류하였다: 비히스패닉계 백인, 비히스패닉계 흑인 및 히스패닉계. 교육을 학교 교육 연수로 나타냈다. 임시 변수를 자기-기록된 흡연 상태에 대하여 하기와 같이 생성하였다: 결코 없음, 이전에 흡연함 및 현재 흡연. 또한 대상체에게 "의사가 당신에게 ...이 있음을 말한 적이 있습니까?"로 표현된 질문에서 그의 병력에 관하여 보고하도록 요청하였으며, 이를 이용하여 암, 심근 경색 및 당뇨병 병력의 존재에 대하여 3개의 임시 변수를 생성하였다. 식이 섭취량의 최근의 변화를 하기 3가지 질문에 대한 답을 이용하여 평가하였다 - 1) "지난 12개월 동안 체중을 체중 감량하기 위하여 노력하였습니까?"; 2) "지난 12개월 동안 임의의 의학적 이유 또는 건강 상태 때문에 먹는 것을 바꾼 적이 있습니까?"; 및 3) (24시간의 식이 리콜 후에) "어제 소비한 음식물을 보통의 것과 비교하시오". 지방과다증의 지표로서 BMI보다 선호되는 허리 둘레를 장골릉에서 신체의 우측에서 시작하여 0.1 cm까지 측정하였다.

[0107]

생쥐에서의 암 모델

[0108]

모든 동물 실험을 USC의 동물 실험 윤리 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)에 의해 승인된 절차에 따라 수행하였다. 피하 암 생쥐 모델을 확립하기 위하여, 본 출원인은 18주령 수컷 C57BL/6 생쥐와, 10주령 GHRKO 생쥐, 연령-매칭된 한배새끼 대조 생쥐, 및 야생형 한배새끼에게 B16 흑색종 세포를 주사하고, 12주령 암컷 BALB/c에게 4T1 유방암 세포를 주사하였다. 주사 전에, 로그 성장기의 세포를 수확하고, 혈청 무함유 고 글루코스 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM) 중에 2 x 10<sup>5</sup>개의 세포 또는 2 x 10<sup>6</sup>개의 세포로 현탁시키고, 후속적으로, 100  $\mu$ l (C57BL/6 또는 BALB/c 생쥐 1마리당 2 x 10<sup>4</sup>개의 세포; GHRKO 생쥐 1마리당 2 x 10<sup>5</sup>개의 세포)를 하부 등에 피하 주사하였다. 모든 생쥐는 피하 종양 주사 전에 면도를 하였다. 종양 발생을 주사된 영역의 측정에 의해 결정하고, 종양 크기를 이식한지 10 내지 15일 후에 시작하여 디지털 버니어(Vernier) 캘리퍼스(caliper)를 사용하여 측정하였다. C57BL/6 및 BALB/c에 대한 실험은 종양 크기 및 궤양에 대한 USC IACUC 승인된 인간 종점 기준을 기반으로 하여 상이한 시점에 종료하였다. GHRKO (C57BL/6 배경) 생쥐는 친절하게도 제이.제이. 콕(J.J. Kopchick) (미국 에선스 소재의 오하이오 유니버시티(Ohio University))에 의해 제공되었다.

[0109]

생쥐에 있어서의 단백질 제한

[0110]

AIN-93G 표준 음식물을 카제인-기반의 고 단백질 기준 규정식 (18% 단백질로부터의 kcal)으로서 사용하고, 저 단백질 규정식 1,0를 카제인-기반의 저 단백질 규정식 (4%의 단백질로부터의 kcal)으로서 사용하였다 (미국 위스콘신주 소재의 할란 레보러토리즈(Harlan Laboratories)). 규정식은 등칼로리였으며, 지방 또는 탄수화물로부터의 kcal의 변화가 단백질로부터의 kcal의 변화에 비례하여 일어났다. 매일 섭취량 측정은 기저선 섭취량을 확립하기 위하여 실험을 시작하기 1주일 전에 시작하였다. 모든 동물에게 실험의 지속 기간 동안 매일 급이하였으며, 그의 기저선 섭취량을 50% 초과하는 음식물을 제공하여 무제한, 칼로리 비제한 급이를 허용하였다. 종양 이식 전에 BALB/c 생쥐를 단백질 군으로부터의 상기 2가지 상이한 kcal 중 하나에 할당하고, 1주일 동안 사전 급이하였다. 이러한 생쥐의 급이를 상기에 기술한 바와 동일하게 실험 코스 전체에 걸쳐 계속하였다. 늙은 생쥐에 대한 저 단백질의 영향을 결정하기 위하여, 24개월령 C57BL/6 생쥐를 18% 또는 4%의 단백질 군으로부터의 kcal 중 어느 하나에 두고, 계속적인 규정식을 급이하였으며, 이는 상기에 기술된 바와 같았다. 체중 및 섭취량을 매일 결정하였다. 동물은 물에 항상 접근하였다.

- [0111] 생쥐에 있어서의 혈청중 mIGF-I 및 mIGFBP-1의 측정
- [0112] 생쥐를 3% 흡입 이소플루란으로 마취시키고, 온화하게 가온하여 정맥을 확장시키고, 혈액을 매주 꼬리 정맥으로부터 수집하여 혈청을 수득하였다. 알앤디 시스템즈(R&D systems) (미국 미네소타주 미니애폴리스 소재)로부터의 재조합 생쥐 IGF-I 또는 IGFBP-1 단백질 및 다클론 항체를 사용하여 사내(in-house) ELISA 분석법을 이용하여 이전에 기술된 바와 같이 (문헌[Hwang et al, 2008]) 혈청중 mIGF-I 및 mIGFBP-1 분석을 수행하였다.
- [0113] 생쥐에 대한 통계학적 분석의 데이터
- [0114] 군들 사이의 IGF-I 비교를 스튜던트 t 검정(Student's t test)을 사용해서 수행하고, IGFBP-1군 비교는 스튜던트 t 검정 및 ANOVA를 사용하여 수행하고, 중앙 체적 진행 군 비교를 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) v.6을 사용하여 이원 분산 분석(two-way ANOVA)을 이용하여 수행하였다. 모든 통계학적 분석은 양측 분석이었으며, 0.05 미만의 P 값은 유의한 것으로 간주되었다.
- [0115] 효모 생존률 및 돌연변이 빈도의 측정
- [0116] 널리 사용되는 DBY746 효모 주 (MAT $\alpha$  leu2-3,112 his3- $\Delta$ 1 trp1-289, ura3-52 GAL+)의 세포를 상응하는 플라즈미드를 이용한 형질전환에 의해 원형양성으로 만들고, 1 ml의 완전 합성 배지 (SDC) 상에 접종하고, 200 RPM에서 오비탈 진탕기(orbital shaker)에서 30℃에서 하룻밤 성장시켰다.
- [0117] 그 후, 이 시작 배양물을 0.5배, 1배 또는 2배의 표준 아미노산 농축물을 함유하는 신선 합성 SDC 배지 (문헌 [Hu et al., 2013]) 상에 5:1의 플라스크 체적:배지 체적의 비로 분주하고 (1:100), 똑같은 조건의 인큐베이터 내에 되돌려 놓았다. 각각의 배양물의 분취물을 격일로 수확하고, 적당한 희석물을 풍부 YPD 플레이트 상에 도말하였다. 콜로니 형성 단위 (C.F.U.)를 2일간의 성장 후 계수하였다. 생존 백분율은 제3일에서의 CFU를 100% 생존률로 간주하여 평가하였다. 모든 실험을 삼중으로 행하였으며, 표준 편차를 예시한다. 돌연변이 빈도 계산에 있어서, 107개의 세포를 수집하고, 각각의 생존 시점에 물로 세척하고, 아르기닌이 결여된 그리고 60  $\square$ liq-1의 카나바닌 (Can)이 보충된 합성 완전 (SDC) 배지 상에 도말하였다. Can 내성 콜로니를 30℃에서의 2 내지 3 일간의 성장 후 측정하고, 106개의 생존성 CFU 중 Can 내성 클론의 수로서 표현하였다.
- [0118] Ras2 실험 성장 조건
- [0119] 48시간마다 콜로니 형성 단위 (CFU)를 측정함으로써 호기 SDC 배지에서 효모의 연대순 수명을 모니터링하였다. 제1일에서의 CFU의 수를 초기 생존률(100%)로 간주하고, 이를 사용하여 연령-의존성 사망률을 결정하였다.
- [0120] Ras2 실험 Can1 돌연변이 빈도 측정
- [0121] 자발적 돌연변이 빈도를 CAN1 (YEL063) 유전자의 돌연변이 빈도의 측정에 의해 평가하였다. 간략하게는, 하룻밤 접종물을 액체 SDC 배지에 희석시키고, 30℃에서 인큐베이션하였다. 적절한 희석물을 효모 추출물 펩톤 텍스트로스 (YPD) 배지 플레이트 상에 도말하고 CFU를 계수함으로써 제1일에 시작하여 2일마다 세포의 생존성을 측정하였다. 액체 배양 중 카나바닌-내성 돌연변이체 (Canr)를 동정하기 위하여, 적절한 수의 세포 (2 x 107개의 세포의 출발 양)를 원심분리에 의해 수확하고, 살균수로 1회 세척하고, 선발 배지 (60  $\mu$ g/ml의 1-카나바닌 술페이트가 보충된 SDS-Arg) 상에 도말하였다. 3 내지 4일 후에 돌연변이 콜로니를 계수하였다. 돌연변이 빈도를 전체 생존성 세포에 대한 Canr의 비로서 표현하였다.
- [0122] 인간 저 단백질 섭취량 연구
- [0123] 인간 대상체는 저 단백질 저 칼로리 및 고 영양분의 5일 금식 모방 규정식 (FMD, 녹색으로 표시됨, 텍스트 참조), 이어서 대략 3주의 정상식 (갈색으로 표시됨)의 3회 사이클에 참가하였다. (a). 혈액을 상기 5일 규정식 전 및 상기 5일 규정식의 마지막에 (시점 A 및 시점 B), 그리고 또한 세 번째 5일 FMD를 끝낸 지 5 내지 8일 후에 (시점 C) 채취하였다. 5일 다이어팅(dieting)은 혈당 (b), IGF-1 (c) 및 IGFBP-1 (d) 수준을 유의하게 감소시켰다. 글루코스 \*, p<0.05, N=18; IGF-1, \*\*, p<0.01, \*p<0.05, N=16; IGFBP-1, \*\*, p<0.01, N=17; 모든 통계학적 검정을 원래 값에 대하여 양측 검정, 대응표본 t 검정으로서 수행하였다. 이 연구 결과는 도 20에서 발견된다.
- [0124] 화학독성 실험을 위한 재료 및 방법
- [0125] 2.1. 생쥐 모든 동물 프로토콜은 유니버시티 오브 서던 캘리포니아(University of Southern California)의 실험 동물 윤리 위원회(IACUC)에 의해 승인되었다. 12 내지 15주령의 암컷 CD-1, BalB/C 또는 C57BL/6N 생쥐 (찰

스 리버(Charles River))를 실험 전체에 걸쳐 무균 환경에서 유지하였다.

[0126] 2.2. 다량영양소 확정식 AIN93G 표준 차우 (할란)를 기준 규정식으로 사용하였으며, 달리 지시되지 않으면 모든 생쥐에게 이를 공급하였다. 다량영양소 조성 (지방, 단백질 및 탄수화물)이 변경된 규정식은 모두 AIN93G를 기반으로 하였다 (도 21 및 표 20). 20% P-1 규정식 (지방원으로서 대두유) 및 20% P-2 규정식 (지방원으로서 코코넛유)은 AIN93G 제형과 비교하여 20%까지 감소된 단백질원으로부터의 칼로리를 가지며; 0% P 규정식은 단백질을 함유하지 않으며; 모든 이러한 규정식은 AIN93G 표준 음식물과 등칼로리였다. 저 탄수화물 LCHP 규정식은 AIN93G 제형과 비교하여 20%까지 감소된 탄수화물로부터의 칼로리 (13% 대 63.9%)를 갖지만, 더 많은 단백질 (45.2%) 및 지방 (41.8%)을 함유하였다. 케톤 생성성 고 지방 규정식 60% HF는 지방원으로부터의 칼로리의 소비량의 60%를 공급하도록 설계되었으며, 단백질 및 탄수화물에서 나오는 칼로리는 이에 비례해서 감소되었다. 90% HF 규정식은 단지 최소의 탄수화물 (1% 미만)을 공급하면서 90%의 지방을 함유하고 절반의 단백질 함량 (9%)을 함유하는 케톤 생성성 규정식이었다. 상세한 규정식 조성 및 칼로리 함량은 표 S2에 요약되어 있다. 생쥐에게는 실험을 시작하기 전에 그리고 그의 처음 체중을 실험군으로 그룹화한 것 (N=5/군)을 기반으로 하여 AIN93G 대조 규정식을 급이하였다. 생쥐는 실험 1주일 전에 검정 규정식에 적응시켰다 (조정 일정을 표 22에 나타냄). 모든 규정식은 달리 지시되지 않으면 무제한 공급하였다.

[0127] 2.3. 칼로리 제한(CR) 및 단시간 단식(short-term starvation; STS) AIN93G 규정식을 이용한 칼로리 제한에 있어서, 표준 차우를 분말로 분쇄시키고, 히드로겔 (클리어 H2O) 중에 필요한 양으로 혼합하여 60%, 50%, 40%, 20%, 10% 칼로리 밀도의 AIN93G를 달성하였다 (표 23). 칼로리 제한된 다량영양소 변경 규정식을 이와 유사하게 제조하였다 (표 24). 영양실조를 회피하기 위하여, 모든 규정식에는 비타민, 미네랄, 섬유 및 필수 지방산을 보충하였는데, 이는 AIN93G에서의 것과 매칭되었다. 기저선 음식물 섭취량 (3.7 g 또는 14 kcal/일)을 실험 전에 AIN93G 급이에 의해 결정하였다 (데이터는 예시되어 있지 않음). 단시간 단식 (STS) 요법에 있어서, 생쥐는 60 시간 이하 동안 음식물 섭취에 접근이 없었다.

[0128] 모든 CR 및 STS 실험에 있어서, 생쥐를 표준 슈박스-케이지(shoebox-cage) 내에 단독으로 넣어두었는데, 이는 매일 리프레시시켜서 식분증을 회피하거나 잔여 차우를 상식으로 하는 것을 회피하였다. 동물은 항상 물에 접근이 있었으며 히드로겔을 공급하여 충분한 수화를 보장하였다. 각각의 개별 동물의 체중을 CR 또는 STS 요법 동안 일상적으로 측정하였다.

[0129] 2.4. 글루코스 및 IGF-1 측정을 위한 혈액 수집 생쥐를 2% 흡입 이소플루란으로 마취시키고 혈액을 좌심실 심장 천공에 의해 수집하였다. 혈액을 혈청 제조용의 K2-EDTA로 코팅된 튜브 (비디(BD)) 내에 수집하였다. 혈당을 프리시전 엑스트라(Precision Xtra) 혈당 모니터링 시스템 (애보트 래보러토리즈(Abbott Laboratories))으로 측정하였다. IGF-1을 생쥐 특이적 ELISA 키트 (알렌디 시스템즈)를 사용하여 측정하였다.

[0130] 2.5. 고용량 화학요법에 대한 내성 25 내지 32 g으로 칭량되는 12 내지 15주령 암컷 CD-1 생쥐를 60시간 이하 동안 굶거나 (STS) 또는 다량영양소 변형 50% CR 규정식을 3일 동안 급이한 후, 24 mg/kg의 독소루비신 (DXR, 베드포드 래보러토리즈(Bedford Laboratories))을 정맥내 주사하였다. 모든 실험에서, 화학 약물 주사 후 생쥐에게 AIN93G 표준 차우를 제공하고, 상기 생쥐를 매일 모니터링하였다. 심한 스트레스의 징후를 나타내고/나타내거나 건강 상태가 악화된 동물을 빈사 상태로 표기하고 안락사시켰다.

[0131] 2.6. 피하 종양 모델 쥐과 4T1 유방암 및 GL26 신경교종 세포를 10% 소 태아 혈청 (FBS)이 보충된 DMEM (인비트로젠(Invitrogen))에서 37°C에서 5% CO2 하에 유지하였다. 로그 성장기의 세포를 세척하고, PBS 중에 2 x 10<sup>6</sup>개의 세포/mL로 현탁시키고, 생쥐의 하부 등 영역에 피하 주사하였다 (s.c., 100  $\mu$ L PBS 중 2 x 10<sup>5</sup>개의 세포/생쥐). 종양 크기를 캘리퍼스를 사용하여 측정하였다. 인간에 있어서의 다중 사이클 치료를 모방하기 위하여, 종양을 체중 1 kg당 각각 12, 8 및 8 mg으로 점종한 후 제15일, 제33일 및 제44일에 생쥐를 시스플라틴 (테바 퍼렌터럴 메디슨즈 인크.(Teva Parenteral Medicines Inc.))으로 3회 정맥내 처리하였다 (i.v., 측면 꼬리 정맥). 생쥐를 매일 모니터링하고, 과도한 종양 로드 (2000 mm<sup>3</sup>), 건강 상태 악화 또는 심한 스트레스의 징후를 나타내는 동물을 빈사 상태로 표기하고 안락사시켰다.

[0132] 2.7. 통계학적 분석 글루코스 및 IGF-1 측정에 있어서 군들 사이의 비교를 ANOVA, 이어서 그래프패드 프리즘 v.5를 사용한 터키 다중 비교를 이용하여 행하였다. 모든 통계학적 분석은 양측 분석이었으며, 0.05 미만의 P 값은 유의한 것으로 간주하였다.

[0133] 3. 결과

[0134] 3.1. 글루코스 및 IGF-1 수준에 대한 칼로리 제한의 영향



- [0135] 단시간 단식 (STS)은 혈청중 글루코스 및 IGF-1 수준을 감소시키고, 고용량 화학요법에 대한 세포 보호를 증가시키고, 악성 세포를 화학요법 약물에 감작시킨다. 일단 동물의 체중이 대략 20% 체중 감량되었으면 글루코스 및 IGF-1에 대한 STS 영향은 일반적으로 달성된 것이다. 따라서, 20% 체중 감량은 칼로리 제한 규정식의 글루코스 및 IGF-1 수준을 60시간 STS 요법으로부터 수득된 것과 비교하기 위한 기준으로서 사용하였다.
- [0136] 20% 체중 감량 역치는 90% CR에 대하여 4일에, 80% CR에 대하여 6일에, 60% CR에 대하여 9일에, 또는 40% CR에 대하여 13일에 도달되었다 (도 22a 및 도 26a). 20% 체중 감량을 달성하는 시간은 칼로리 제한의 엄정함에 의존적이다 ( $r^2=0.9976$ 을 이용한 선형 피팅; 도 22b). 48시간에, 혈당 수준의 감소는 칼로리 제한의 엄정함과 상관된다 ( $r^2=0.7931$ ; 보충적 도 26b). 60시간 금식 요법 (STS)는 무제한 급이된 생쥐에서의 것과 비교하여 혈당 수준을 70%만큼 감소시킨다 (도 22c,  $P<0.001$ ). 상기 4일 90% CR 섭생법은 혈당을 대략 40%만큼 감소시켰으며, 이는 STS보다 유의하게 더 적었다 ( $P<0.05$ ). 게다가, CR-급이의 길이에 따라 혈당을 저하시키는 데 있어서의 CR의 영향에 대한 추세가 관찰되었으며, 13일 40% CR 급이에서의 글루코스 수준은 4일 90% CR 군에서보다 유의하게 ( $P<0.05$ ) 더 낮았다. 그러나, 칼로리 제한된 군은 60시간 금식 군에서보다 더 낮은 혈당 수준을 생성하지 않았으며; 9일 이상의 CR이 금식 군에서의 것의 범위 내의 글루코스 저하 효과를 수득하는 데 필요하였다 (도 22c). 제한의 엄정함과 관계 없이 모든 실험 CR 군의 생쥐는, 일단 20% 체중 감량 차이가 도달되었으면 유사한 혈청중 IGF-1 수준에 도달하였으며, 무제한 대조군에서의 생쥐보다 유의하게 ( $P<0.001$ ) 더 낮은 IGF-1 수준을 가졌다 (도 22d).
- [0137] 3.2. 글루코스 및 IGF-1 수준에 대한 다량영양소 확정식의 영향
- [0138] 다량영양소 확정식의 세트 (도 21 및 표 20)를 AIN93G 설치류용 차우를 기반으로 하여 설계하여 특정 식이 구성 성분의 제한이 혈당 및/또는 혈청중 IGF-1에 대한 STS 또는 단시간 CR의 영향을 모방할 수 있는지를 결정하였다. 저 단백질 규정식인 20% P-1 (지방원으로서 대두유) 및 20% P-2 (지방원으로서 코코넛유)는 원래의 AIN93G 제형과 비교하여 20%까지 감소된 단백질원으로부터의 칼로리를 갖는 반면, 탄수화물 및 지방은 AIN93G와 등칼로리인 규정식을 유지하도록 증가된다. 0% P 규정식은 단백질을 함유하지 않으며; 탄수화물과, 지방은 규정식이 상기 표준 차우와 등칼로리가 되도록 비례적으로 증가된다. LCHP 규정식은 원래의 AIN93G 제형과 비교하여 20%까지 감소된 탄수화물원으로부터의 칼로리 (13% 대 63.9%)를 갖지만, 더 많은 단백질 및 지방을 공급한다. 고 지방 케톤 생성성 규정식 60% HF는 소비되는 지방원으로부터의 칼로리의 60%를 공급하도록 설계되었으며, 단백질 및 탄수화물에서 나오는 칼로리는 이에 비례해서 감소되었다. 90% HF 규정식은 단지 최소의 탄수화물 (1% 미만)을 공급하면서 90%의 지방으로부터의 칼로리를 함유하고 9%의 단백질로부터의 칼로리를 갖는 케톤 생성성 규정식이다. 더 높은 지방 비율로 인하여, LCHP, 60% HF 및 90% HF 규정식은 AIN93G 표준 차우와 비교하여 고 칼로리-밀도를 갖는다. 상세한 규정식 조성 및 칼로리 함량이 표 21에 요약되어 있다.
- [0139] 암컷 CD-1 생쥐에게 실험용 규정식을 9일의 연속일 동안 무제한 급이하여 체중 프로필을 확립하고 (도 23a, 도 23b) 칼로리 섭취량을 모니터링하였다 (도 23c, 도 23d). 유의한 음식물 혐오는 관찰되지 않았지만, 단백질이 완전히 결여된 규정식 (0% P)을 급이한 생쥐는 6일 후에 음식물 소비량이 감소되었음이 주목되었다 (도 23c). 감소된 칼로리 섭취량은 이 실험군의 동물에 있어서 체중 감량을 야기하였다 (도 23a). 케톤 생성성 고 지방군 (60% HF 및 90% HF) 내의 생쥐는 9일간의 급이 동안 AIN93G 표준 차우를 급이한 생쥐보다 더 많은 칼로리를 소비하였으며 (도 23d) 케톤 생성성 90% HF 규정식을 무제한 급이한 생쥐는 4 내지 5일 후에 체중이 빠르게 늘었다 (도 23b). 20% P 규정식 및 LCHP 규정식을 급이한 실험군 내의 CD-1 생쥐는 AIN93G 대조 규정식을 급이한 생쥐와 비교하여 칼로리 섭취량 또는 체중 면에서 차이를 나타내지 않았다 (도 23a, 도 23c).
- [0140] 다량영양소 변형 규정식을 먹은 생쥐로부터의 제2일, 제5일 및 제9일에서의 혈당 수준은 표준 차우 규정식을 먹은 것과 다르지 않았다 (도 27, 데이터는 예시되어 있지 않음). 이와는 대조적으로, 혈청중 IGF-1 수준은 9일 동안 케톤 생성성 60% HF 규정식을 먹은 생쥐에서 유의하게 상승하였지만 ( $P<0.05$ ), 케톤 생성성 90% HF 규정식을 급이한 생쥐에 있어서는 그러하지 않았다 (도 23e). 흥미롭게도, 다량영양소 조성 (예를 들어, 단백질 함량) 뿐만 아니라 지방산 소스도 순환 IGF-1 수준을 별도로 조정하며, 저 단백질 규정식 20% P-1 (유일한 지방원으로서 대두유를 함유함)은 IGF-1 수준을 감소시키지 않았지만 저 단백질 규정식 20% P-2 (유일한 지방원으로서 코코넛유)는 IGF-1 수준을 유의하게 ( $P<0.05$ ) 감소시켰으며 상기 규정식에 있어서 지방원 이외에는 차이가 없다. 혈청중 IGF-1에 대한 가장 두드러진 영향은 9일 동안 단백질 결핍 규정식 0% P를 급이한 생쥐에서였다. 순환 IGF-1은 표준 차우를 먹은 생쥐에서의 것의 대략 30%까지 감소되었다 (도 23e). 단백질 결핍 규정식 0% P는 60시간 단시간 단식에 비견되게 혈청중 IGF-1 수준을 감소시킨 유일한 규정식이었다.
- [0141] 3.3. 단시간 칼로리 제한 및 금식은 스트레스 내성을 향상시킨다

- [0142] 생쥐에 있어서, 감소된 혈청중 IGF-1 및 혈당 수준은 고용량 화학요법제에 의해 유발된 독성에 대처하는 능력을 촉진한다. 단시간 칼로리 제한 규정식은, IGF-1 및 글루코스 수준을 감소시키기 때문에 - 그러나 다량영양소 확정식 (완전 단백질 제거를 제외함)은 아님 -, 조합 접근법을 이용하여, 규칙적인 일일 칼로리 섭취량의 50%로 급이되는, 확정 다량영양소 결핍을 갖는 규정식이 화학 독성 방지의 향상으로 이어질 수 있는지를 검정하였다. 20% P 규정식은 0% P 규정식이 혈청중 IGF-1에 대하여 훨씬 더 두드러진 영향을 나타낸다는 사실로 인하여 스트레스 내성 실험에 포함시키지 않았다.
- [0143] AIN93G 표준 차우 또는 정상 칼로리 섭취량의 50%까지 감소시킨 다량영양소 확정식을 무제한 급이한 CD-1 생쥐에서 스트레스 내성을 3일 동안 검정한 후 독소루비신 (DXR, 24 mg/kg, i.v.) 처리를 하였다 (도 24a). 50% 칼로리 제한 군에서, 생쥐는 3일 후에 그의 처음 체중의 12 내지 15%가 체중 감량되었으며, 반면에, STS 군에서 생쥐는 60시간 후에 그의 체중의 20%가 체중 감량되었다. DXR 처리 후, AIN93G 차우를 모든 동물에게 무제한 제공하였으며, 화학독성-유발된 체중 감량이 시작될 때까지 생쥐는 체중이 다시 늘어났다 (도 28a, 도 28b). 주사 후 제8일까지 모든 실험군에서 체중 감량이 계속되었으며, 그 후 많은 동물은 서서히 회복되었다. 칼로리 제한 0% P 및 LCHP 규정식을 급이한 생쥐는 그의 처음 체중을 완전히 회복하지 않았다 (도 28a). 동물은 주사한지 9 내지 18일 후에 화학독성에 굴복하기 시작하였으며 (도 24a) 이는 DXR 처리 후 골수-억제의 보고된 개시 및 천저 일수와 일치하였다 (<http://dailymed.nlm.nih.gov>). 생쥐는 생쥐가 DXR을 주사한지 25일 후에 살아있을 경우 생존자로 간주되었다. DXR 주사 3일 전에 AIN93G 규정식을 무제한 급이한 생쥐는 최악의 결과를 나타냈으며, 이때 단지 16%가 제25일까지 생존하였다 (도 24a). 무제한 급이 생쥐와는 대조적으로, 대다수 (89%)의 금식 (60시간) 생쥐는 고용량 화학요법에서 생존하였다. DXR로 처리한 대조 생쥐는 감소된 기동성, 부스스한 털 및 굽은 등의 자세를 포함하는 독성의 징후를 나타냈으며, 반면에, STS 군 내의 생쥐는 처리 후 스트레스 또는 통증의 가시적인 징후를 전혀 나타내지 않았다 (데이터는 예시되어 있지 않음). DXR 주사 전에 50% CR과 다량영양소 변형의 조합의 3일간의 급이는 생쥐에 있어서 스트레스 내성을 향상시켰으며, 45% 내지 55% 생존률로 이어졌다 (도 24a). 지방 또는 탄수화물 함량이 이 결과에 영향을 주었다는 조짐은 없었으며, 그 이유는 모든 규정식이 유사한 보호율을 달성하였기 때문이다. 상기 데이터는 규정식의 지방 또는 탄수화물 조성이 아니라 단시간 CR이 금식에 의해 야기되는 것만큼 강하지 않은 부분적 화학-보호를 부여함을 나타낸다. 50% CR LCHP 규정식을 급이한 생쥐는 모든 다른 CR 급이 군보다 더 나쁘게 수행하였으며, 아마도 이는 IGF-1에 대한 이 규정식의 고 단백질 함량의 영향 때문이다.
- [0144] 혈당 측정은, 칼로리 제한된 변형 규정식의 3일간의 급이가, 50% CR 케톤 생성성 90% HF 규정식을 제외하고는, 글루코스 수준을 유의하게 감소시키기에 충분하지 않음을 나타냈다 (도 24b). 케톤 생성성인 군에서의 글루코스 수준의 감소는 스트레스 내성을 향상시키는 것으로 보이지 않았다. STS 군 내의 생쥐는 모든 다른 실험군보다 유의하게 더 낮은 혈당 수준을 가졌다 (도 24b).
- [0145] 3.4. 저 단백질 규정식은 GL26 신경교종 진행을 지연시키는 것으로 보이지 않는다
- [0146] 저 단백질 규정식은 암 위험성을 저하시키는 것으로 밝혀진 반면 고 칼로리 및 고 단백질 규정식은 비만과 연관되고 발암을 조절하는 호르몬, 대사 및 염증에 의한 변화를 촉진한다. 신경교종 모델에서의 저 단백질 규정식의 영향을 검정하기 위하여, 종양이 촉진가능할 때 GL26 세포를 이식한지 10일 후에 생쥐는 표준 차우 (18.8%의 칼로리가 단백질로부터 유래됨, 표 1)로부터 저 단백질 규정식 (20% P-1, 3.9%의 칼로리가 단백질로부터 유래됨)으로 변화시켰다 (도 25a). 저 단백질 규정식을 급이한 생쥐는 AIN93G 규정식을 무제한 급이한 생쥐에서의 것과 구별가능하지 않은 종양 진행을 나타냈다 (도 25a). 이러한 결과는 일단 종양이 확립되면 단백질 제한에 의해 종양 진행이 지연될 수 없었음을 나타낸다.
- [0147] 3.5. 단시간의 간헐적 칼로리 제한은 유방암에 대한 화학요법의 효능을 향상시키지 않는다
- [0148] 다양한 암의 치료를 증강시키는 데 있어서의 STS의 효능은 2배이며, 이것은 정상 세포/조직에 대한 화학요법-유발된 독성으로부터 보호하고 악성 세포를 화학요법제에 감작시킨다. 그럼에도 불구하고, 심지어 짧은 간격의 금식 (예를 들어, 4일)도 대다수의 사람에게 있어서 어려울 수 있으며, 따라서 "더 온화한" 칼로리 제한 접근법이 더 실행가능한 해법일 수 있다. 단시간의 간헐적 50% CR (ICR) 규정식이 확립된 금식 프로토콜과 유사한 유익한 효과로 이어질 수 있는지를 검정하기 위하여, 쥐과 4T1 유방암 세포를 암컷 Balb/C 생쥐 내에 피하 이식하고, 종양 진행을 모니터링하였다. 종양을 이식한지 12일 후에, 종양 체적을 측정하고, 생쥐를 비처리 대조군 (AIN93G), 시스플라틴으로 처리된 군 (CDDP) 또는 시스플라틴 처리 전 3일 동안 50% CR을 간헐적으로 급이한 군 (ICR)으로 할당하였다. 비처리 대조군 내의 종양은 빠르게 진행하였으며, 종양을 이식한지 54일 후 2000 mm<sup>3</sup>의 실험 종점 체적에 도달하였다 (도 25b, 흑색 원). 시스플라틴 처리의 3회 사이클은 종양 진행을 지연시켰으며;

이러한 생쥐의 종양 체적은 비처리 생쥐에서의 것의 크기의 대략 절반이었다 (도 25b, 청색 정사각형). STS와는 대조적으로, 시스플라틴 주사 전 3일 동안 생쥐에게 급이된 간헐적 50% 칼로리 제한 AIN93G의 급이 섭생법은 종양의 감작으로 이어지지 않았으며, 화학요법을 증강시키지 않았다 (도 25b, 주황색 삼각형). 이 실험군에서의 종양 체적은 시스플라틴 단독으로 처리된 생쥐에 있어서의 종양 체적과 유의하게 다르지 않았다.

[0149]

#### 4. 토론

[0150]

혈당 및 IGF-1 수준의 중대한 감소가 동물 암 모델에 있어서 2 내지 3일간의 금식의 유의한 효과에 부분적으로 책임이 있다는 것이 이전에 밝혀져 있었다. 생쥐에서, 60시간의 단시간 금식은 체중을 20% 이상만큼 감소시키고 혈청중 IGF-1을 75% 이하만큼 감소시키고, 글루코스를 70% 이하만큼 감소시킨다. 이러한 상태 하에서, 동물은 효모에서의 결과와 일치하여 고도로 스트레스 내성으로 되고, 다양한 종양이 화학요법 및 방사선요법에 감작된다. 20% 체중 감량이 종점으로 이용될 때, 기대되는 바와 같이, 다양한 정도의 CR 섭생법이 점진적으로 더 빠른 체중 감량 뿐만 아니라 IGF-1 및 글루코스의 감소로 이어졌다. 그러나, 심지어 CR 규정식이 9 내지 13일 동안 유지되어 증가의 20% 체중 감량을 야기할 때에도 훨씬 더 짧은 STS 섭생법이 대부분의 CR 규정식보다 더 두드러지게 글루코스에 대하여 영향을 미쳤음이 또한 관찰되었다. 단시간 단식과 비교할 때 칼로리 제한 규정식의 덜 두드러진 효과는 영양소가 완전히 부재하는 조건에 독특한, 특유한 생리학적 응답에 의해 설명될 수 있다 (문헌 [Lee and Longo, 2011]). 예를 들어, 이 연구에 있어서 단시간 금식에 의해 야기되는 혈당의 감소율은, 96시간 후 90% CR 규정식에 의해 야기되는 40% 글루코스 감소율에 대하여, 70%였으며, 이는 60시간 내에 일어났다.

[0151]

음식물을 빼앗을 때, 포유류는 일반적으로 하기 3가지의 대사 단계를 겪는다: 1) 주요 저장 에너지원으로서 글리코겐을 사용하는 것을 포함하는, 음식물 섭취 후 10시간 이상 동안 지속되는 사후 흡수기, 2) 일단 간 글리코겐 저장물이 고갈되면 글루코스 신생 합성(gluconeogenesis)에 의한 아미노산-의존성 글루코스 생성, 및 3) 잔존 글루코스가 대부분 뇌에 의해 소비되는 반면 글리세롤 및 지방산은 지방 조직으로부터 방출되어 주요 에너지원이 되는 시기. 지방-유래된 케톤체는 수일의 금식에서 주요 탄소원이 된다. 신체 내에서, 이러한 변화는 게놈 안정성 및 세포 스트레스 내성을 동시에 증가시키면서 증식, 세포 성장 및 반응성 산소종의 감소된 생성에 연루된 경로의 하향 조절을 포함하는 세포 응답을 트리거링한다(trigger). 글루코스는 악성 세포와 같은 세포의 증식에 있어서 주요 에너지원이며, 상승된 혈당은 증가된 암 위험성과 연관되었다. 많은 암세포는 상승된 글루코스 흡수율을 가지며, 와버그(Warburg) 효과 (문헌[Oudard et al, 1997]; 문헌[Warburg, 1956])로도 공지된 현상인 당분해에 이은 피루베이트의 산화 대신, 심지어 산소의 존재 하에서도 당분해에 이은 락탄산 발효에 의존한다. 정상 세포에서, IGF-1 뿐만 아니라 혈당의 감소도 영양소 감지 경로 및 세포 주기 진행에 의해 부정적으로 조절되는 스트레스 내성 전사 인자의 활성화의 차별적 조절에 기여할 가능성이 있다. 암세포에서, 저 글루코스는 대신에 특정하고 주요한 난제를 제시하며; 이는 특히 화학요법 약물이 또한 존재할 때 그러하다.

[0152]

혈당 및 IGF-1에 대한 부분적인 영향과 일치하여, 본 개시 내용의 결과는 72시간의 50% CR 뿐만 아니라 탄수화물 또는 단백질 제한된 규정식도 스트레스 내성에 대하여 단지 부분적인 영향을 미친다는 것을 나타낸다. 단시간의 간헐적 50% CR 요법 및 시스플라틴 처리의 조합은 STS와 화학요법의 조합과는 대조적으로 화학요법 효능의 증강에서 보이지 않았다. 본 발명의 개시 내용은 3일간의 50% ICR이 혈당 수준을 유의하게 감소시키지 않았으며 따라서 이 간격 내에서 쥐와 유방암 세포에 의해 대사되는 탄소원의 충분한 감소를 야기할 수 없음을 시사한다. 케톤 생성성 90% HF 규정식을 제외하고는, 3일 동안 급이된 50% 식이 제한 규정식 및 다량영양소 확정식 중 어느 것도 혈당 수준을 저하시키지 않았는데, 이는 숙주-보호 및 종양 감작을 촉진하는 것으로 밝혀졌다. 흥미롭게도, 케톤 생성성 규정식에서의 소비 칼로리의 50% 감소는 3일간의 급이 후 혈당 수준의 30% 감소를 초래하는데, 이 효과는 아마도 이 규정식의 매우 낮은 탄수화물 함량 (1% 미만)으로 인한 것이다. 그러나, 본 발명에서의 스트레스 내성 실험은 이러한 감소가 생존률을 향상시키지 않았음을 나타낸다. 게다가, 임의의 CR 규정식으로부터의 생쥐는 본원에서 제시된 실험에서 60시간 금식 (STS)에 의해 야기되는 것과 등가인 보호를 달성하지 못하였다. 특정 규정식이 금식 사이클에 의해 야기되는 것에 가까운 DSR 및 DSS 효과를 달성하기에 충분할 수 있는지를 이해하기 위하여 장기간 급이 섭생법 및 더 큰 실험군 크기를 이용한 추가의 연구가 필요하다. 미래의 연구는 또한 ROS 생성, 종양 진행 및 스트레스 내성에 대한 다양한 다량영양소 확정식 및 CR 규정식의 영향을 평가할 수 있다.

[0153]

식이 단백질 및 생성된 아미노산 함량은 장수 및 건강한 노화에 영향을 주는 것으로 보인다. 단백질 섭취량 제한은 감소된 대사 속도, 감소된 산화적 손상, 발암성 상해 및 독소에 대한 향상된 간의 내성, 감소된 전암성 병변 및 종양을 포함하는, CR의 생리학적 효과 중 일부를 공유한다. 더욱이, CR 및 단백질 제한 둘 모두는 혈청중 IGF-1 수준을 감소시키는데, 이는 장수 연장에 대한 기여자 중 하나일 수 있으며, 그 이유는 IGF-1-유사 시그널링 경로가 다양한 유기체 모델, 예컨대 씨. 엘레간스, D. 멜라노가스터(D. melanogaster) 및 생쥐에서 수명을



조절하기 때문이다. IGF-1 경로는 동물 수명 및 산화 스트레스에 대한 민감성 둘 모두에 영향을 주는 것으로 밝혀졌으며, 이는 IGF-1 수용체 결합 생쥐에 있어서 산화 스트레스에 대한 내성이 더 크다는 것과 일치한다. IGF-1/AKT 시그널링의 하류 표적인 포크헤드 박스 단백질(forkhead box protein) O1(FOXO1)은 IGF-1/AKT 시그널링의 부재/감소 하에 핵에 들어갈 수 있으며, 여기서 이것은 산화 스트레스 내성, 장수, 및 대사에 연루된 다수의 유전자를 조절할 수 있으며, 따라서 이것은 연령 연관된 스트레스 및 질환의 발병으로부터의 보호에 연루된 핵심 기작이다. IGF-1 감소가 중앙 감각 뿐만 아니라 고용량 화학요법에 대한 향상된 스트레스 내성으로도 이어진다는 것이 이전에 제안되었다. IGF-1은 암세포의 증식 속도를 증가시키고 아포토시스(apoptosis)를 저해함으로써 다양한 암세포에 대한 강한 중앙 형성 효과를 발휘한다. 라파마이신 및 S6K1에 의한 mTOR 저해를 포함하는, IGF-R 시그널링의 하류 이펙터(effector)에 결합이 있는 생쥐에서의 연구는 수명 및 스트레스 내성을 조절하면서 이와 동시에 중앙 성장을 감소시키는 데 있어서 IGF-I의 하류의 세포내 분열촉진(mitogenic) 경로의 중추적 역할을 입증한다. 게다가, 성장 호르몬 수용체 결합을 갖는 인간은 순환 IGF-1 수준을 유의하게 저하시켰으며, 또한, 암 및 당뇨병의 대폭적으로 감소된 발생률을 나타내는데, 이는 온전한 성장 호르몬 수용체를 갖는 연령 매칭된 친척들 사이에서 더욱 일반적이다.

[0154] 칼로리 제한된 저 탄수화물 규정식 (LCHP)를 급이한 군 내의 생쥐는 대조군 내의 생쥐의 것과 비견되는, 모든 CR 군의 최악의 생존률을 가졌다. 이 군의 생쥐가 3일간의 급이 동안 유사하거나 더 많은 양의 지방-유래된 칼로리 (무제한 AIN93G 17.2%에 대하여 50% CR LCHP에서 20.9%), 그리고 더 중요하게는 단백질 유래된 칼로리 (무제한 AIN93G 18.8%에 대하여 50% CR LCHP에서 22.6%)를 소비하였다는 사실은 이러한 보호의 결여를 설명할 수 있다. 중요한 것은 스트레스 내성의 유발에 대하여 제시된 결과가 상대적으로 짧은 (72시간) 급이 기간을 기반으로 하며, 따라서 변경된 칼로리 및/또는 다량영양소 제한을 갖는 더 긴 CR 섭생법이 개선된 스트레스 내성으로 이어질 수 있다는 것이 배제될 수 없다는 것이다.

[0155] 케톤 생성성 규정식은 아동에 있어서의 내화성 간질의 치료에서 광범위하게 사용되지만, 또한 암 치료에서도 연구되어 왔다. 이러한 접근법이 본 출원인의 스트레스 내성 및 잠재적 중앙 감각 실험을 어떻게 비교하는지를 결정하기 위하여, 하기 2가지의 케톤 생성성 규정식을 설계하였다: 본 출원인의 90% HF 규정식 (지방: 탄수화물: 단백질의 칼로리 % 비: 90%: 1%: 9%; 도 21)은 각각 90%: 1.4%: 8.6%의 비를 갖는 고전적인 케톤 생성성 규정식과 거의 동일하다 ( $\pm 0.5\%$ 의 변동률) (도 29). 고 지방 규정식 60% HF (지방: 탄수화물: 단백질의 칼로리 % 비: 60%: 31%: 9%;)는 변형 아킨스 규정식 (지방: 탄수화물: 단백질의 칼로리 % 비: 60%: 5%: 35%; 도 29)에서 사용되는 지방 비와 유사한 지방 비를 함유하지만, 단백질 함량은 감소되었으며, 그 이유는 이전의 연구가 탄수화물이 아닌 단백질이 인간에 있어서 IGF-1 수준을 조절함을 확립하였기 때문이다. 본원에 기술된 결과는 9일의 연속일 동안 상기 둘 모두의 케톤 생성성 규정식을 급이한 후 글루코스 수준도 IGF-1 수준도 유의하게 감소되지 않았음을 보여 준다.

[0156] 포화 대 불포화 지방산과, 중쇄 대 장쇄 지방산의 암 치료에서의 효과를 평가하기 위하여, 2가지의 규정식을 설계하였으며, 이들은 지방원으로서 대두유 또는 코코넛유를 포함하는 대조 규정식과 등칼로리이지만 저 단백질 함량을 가졌다. 장쇄 불포화 지방산은 가장 일반적으로 사용되는 식이 지방 및 야채유, 예컨대 대두유에서 발견되는 반면 단쇄 및 중쇄 포화 지방산 (예를 들어, 라우르산 및 미리스트산)은 야자핵유 및 코코넛유에서 상대적으로 매우 풍부하게 발견된다. 중쇄 트리글리세라이드 (MCT)는 위장관에서 용이하게 가수분해될 수 있으며, 문정맥 계통을 통하여 간세포 쪽으로 수송될 수 있는 반면, 대부분의 장쇄 지방산은 림프계에서 유미입자로서 수송되어 간에서 트리글리세라이드로 패키징된다(packaged). MCT는 미토콘드리아  $\beta$ -산화로 용이하게 공급될 수 있는 반면, LCT는 간세포에서 미토콘드리아 기질로 들어가기 위하여 수송자, 예컨대 카르니틴에 의존한다. 인간 연구로부터의 데이터는 더 높은 불포화 대 포화 지방산의 비를 갖는 규정식 또는 MCT의 소비가 혈당 감소, 지질 프로필의 개선 및 비만 감소와 연관됨을 나타냈다. 복부 비만을 갖는 여성에서의 생화학적 및 인체측정학적 프로파일의 연구에서, 코코넛유에 의한 식이 보충은 복부 비만의 감소를 촉진하였다.

[0157] 현재 장시간 CR의 유익한 효과가 1세기가 넘도록 공지되어 있다. CR을 임의의 임상 응용으로 변환시키는 것과 연관된 문제점은 장시간 CR이 많은 악성 질환의 진행을 지연시키지만 상기 진행을 중단시키지는 않고, 악액질성 암환자, 또는 악액질성으로 될 위험이 있는 환자에 있어서 유해할 수 있는, 그러나 또한 특히 노인 환자에 있어서 노쇠함을 증가시킬 수 있는 지방 및 다른 비축물을 장기간에 걸쳐 감소시킬 수 있는 장기간에 걸친 체중 감소 상태와 연관되어 있다는 것이다. 실제로, 장시간 CR은 창상 치유 및 면역 기능을 지연시킬 수 있는데, 이는 화학요법을 받거나 수술을 받는 대다수의 환자에 있어서 추가의 장애물을 제시할 수 있다. 더욱이, 생쥐 및 인간에 있어서 2 내지 5일간의 금식에 의해 야기되는 혈청중 IGF-1의 75% 감소는 단백질 섭취량이 또한 제한되지 않는다면 인간에 있어서 IGF-1 수준을 감소시키지 않는 더 중간 정도 CR에 의해 달성될 수 없다. 심지어 단백질

제한과 조합될 때, 장기간에 걸친 CR은 인간에 있어서 단지 IGF-1의 30% 감소를 야기한다. 글루코스 및 IGF-1에 대한 일관된 영향 및 장기간에 걸친 표준 체중 미달 없이 정상 세포의 보호 및 암세포의 감작에 대한 결과적 영향 때문에, 주기적인 금식 사이클은 많은 종양의 치료에 있어서 그의 효능을 증강시키면서 다양한 화학요법 약물로 치료된 환자를 보호하는 데 최고의 잠재력을 갖는 것으로 보인다.

[0158]

예시적인 실시 양태가 상기에 기술되어 있지만, 이러한 실시 양태가 본 발명의 모든 가능한 형태를 기술하는 것으로 의도되는 것은 아니다. 오히려, 본 명세서에서 사용된 단어는 제한이라기보다는 오히려 설명하는 단어이며, 본 발명의 사상 및 범주로부터 벗어나지 않고서 다양한 변화가 이루어질 수 있음이 이해된다. 부가적으로, 다양한 구현 실시 양태의 특징들을 조합하여 본 발명의 추가의 실시 양태를 형성할 수 있다.

## 도면

### 도면1

체 중	제 1 일	제 2 일	제 3 일	제 4 일	제 5 일	$\Delta$ S-day <sup>1</sup>	$\Delta$ S-day <sup>2</sup>
	kcal/일						
$\geq 200$ lb	1170	828	768	810	833	-5591	-9591
151-200 lb	1134	790	737	774	795	-5772	-7772
$\leq 150$ lb	1098	751	706	738	756	-5952	-5952
	kcal/lb						
250 lb	4.7	3.3	3.1	3.2	3.3		
200 lb	5.7	3.9	3.7	3.9	4.0		
150 lb	7.3	5.0	4.7	4.9	5.0		
	kcal/kg						
113 kg	10.3	7.3	6.8	7.1	7.3		
91 kg	12.5	8.7	8.1	8.5	8.8		
68 kg	16.1	11.0	10.4	10.8	11.1		

<sup>1</sup> 2,000 칼로리/일의 규정식을 기반으로 함

<sup>2</sup> 각각 200 lb 이상, 150 내지 200 lb 및 150 lb 이하의 사람 체중에 대하여 2,800, 2,400 및 2,000 칼로리의 규정식을 기반으로 함

표 9. 금식 모방 규정식(fasting mimicking diet: FMD), 프로론(Proione)은 영양분을 최대화하면서 금식-유사 응답을 유발하기 위하여 엘-뉴트라(L-Nutra)에 의해 개발됨

도면2

표 10. 평균 180 내지 200 lb의 사람을 기반으로 한 5일 FMD 섭생법의 각각의 날에 있어서의 다량영양소 함량

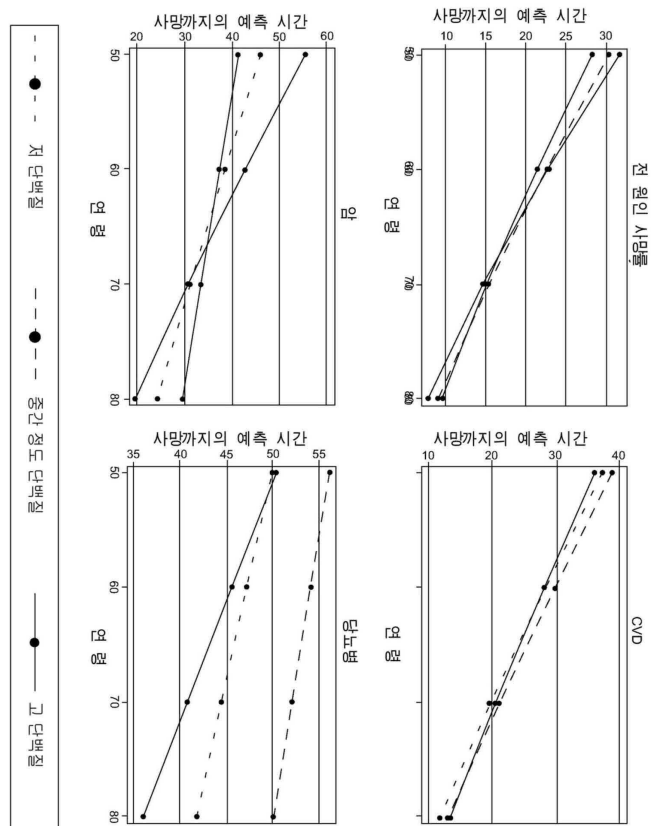
	제 1 일	제 2, 3, 4, 5일
<b>총 칼로리</b>	<b>1152</b>	<b>809</b>
지방	56%	46%
탄수화물	34%	46%
단백	10%	9%
단백질	10%	9%

도면3

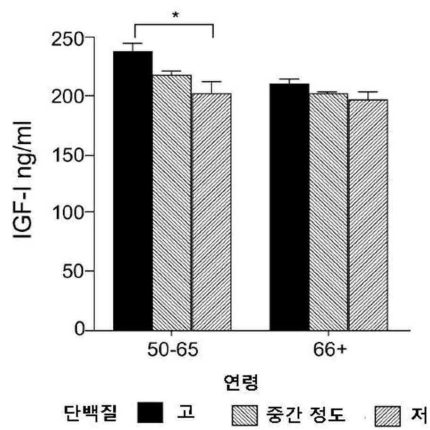
	단 위	제 1 일	% DV*	제2, 3, 4, 5일	% DV*	평균 % DV*
단백질	g	29		18		
지방	g	72		41		
탄수화물	g	98		91		
당분 유래의 것	g	29		17.6		
식이 섬유	g	22	86%	14	56%	62%
칼슘	mg	604	60%	426	43%	46%
철	mg	13	77%	10	55%	60%
마그네슘	mg	387	97%	230	58%	65%
인	mg	390	39%	276	28%	30%
칼륨 (K)	mg	2519	72%	1795	51%	55%
나트륨 (Na)	mg	2427	101%	1750	73%	79%
아연	mg	7	46%	4.2	28%	32%
구리	mg	1.5	76%	1.2	59%	63%
망간	mg	3	148%	1.9	95%	105%
셀레늄	mcg	7	10%	5.3	8%	8%
Vit A	IU	39254	785%	27549	551%	598%
Vit C	mcg	236	393%	137	229%	261%
Vit B1 티아민	mg	4	209%	2.2	113%	132%
Vit B2 리보플라빈 B2	mg	3.8	191%	2	109%	126%
Vit B3 니아신	mg	28.5	143%	18	92%	102%
Vit B5 판토텐산	mg	1.2	12%	1.0	10%	10%
Vit B6 피리독살 포스페이트	mg	4.0	200%	2.2	111%	129%
Vit B9 폴레이트	mcg	479	120%	317	79%	87%
B12 코발라민	mcg	16	227%	16	227%	227%
Vit D	IU	952	238%	952	238%	238%
Vit E	mcg	25	127%	16	80%	89%
Vit K	mg	1795	2243%	1110	1387%	1559%

표 11. 평균 180 내지 200 lb의 사람을 기반으로 한 5일 FMD 섭생법의 각각의 날에 있어서의 미량영양소 함량

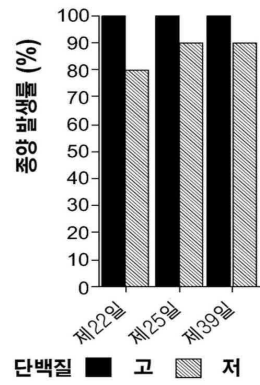
도면4



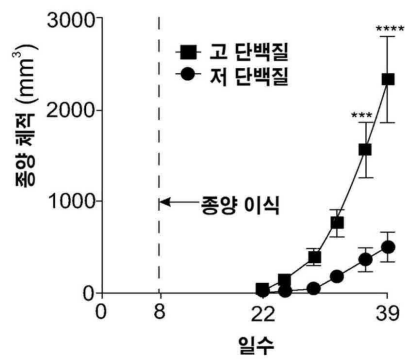
도면5



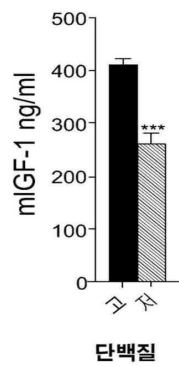
도면6a



도면6b

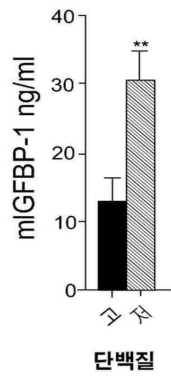


도면6c

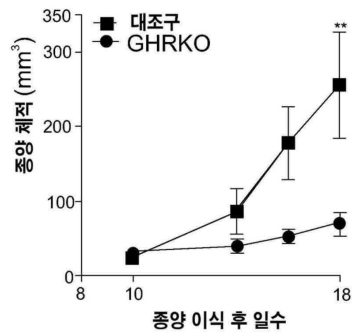




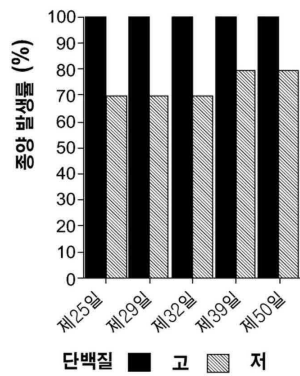
도면6d



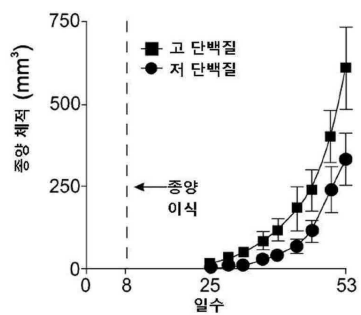
도면6e



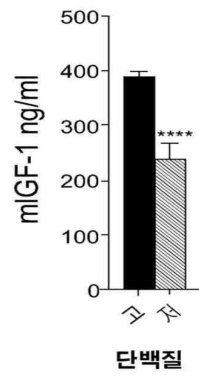
도면6f



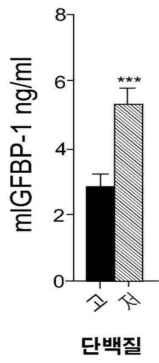
도면6g



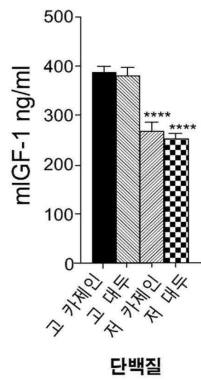
도면6h



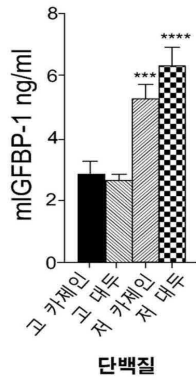
도면6i



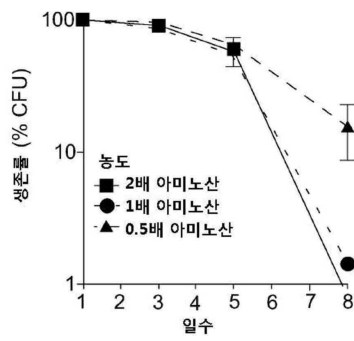
도면6j



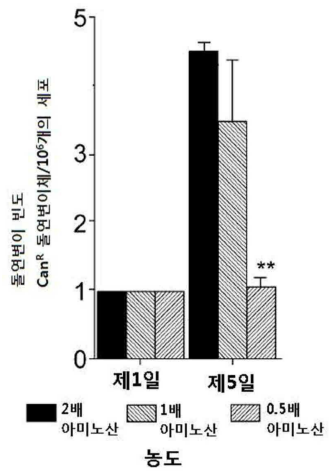
도면6k



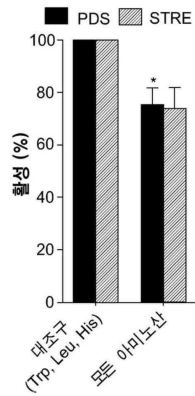
도면6l



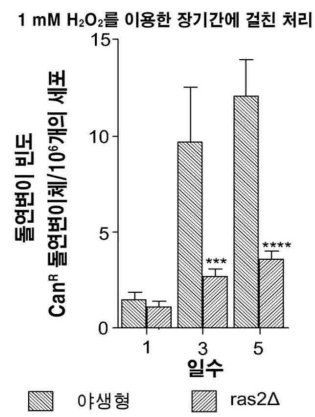
도면6m



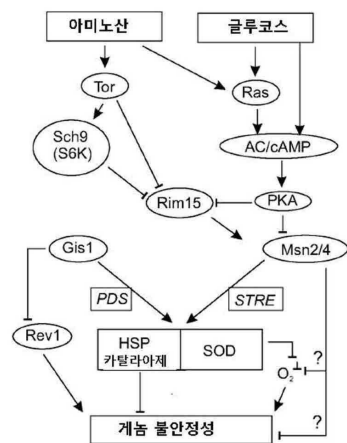
도면6n



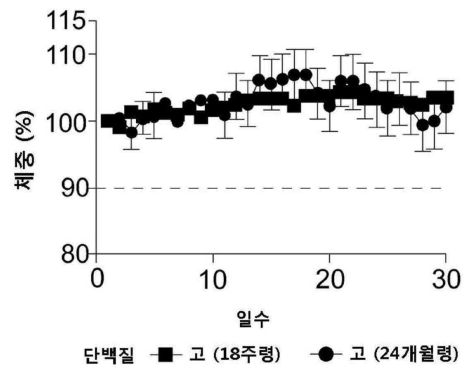
도면6o



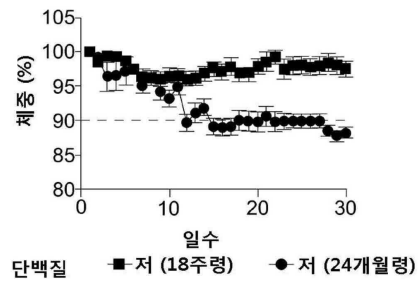
도면6p



도면7a



도면7b



도면8

표 12. 사망률과 단백질 섭취량 사이의 연관성

	위험비 (95% CI)							
	연령: 50세 내지 65세 (N=3,039)				연령: 66세 이상 (N=3,342)			
	모델 1	모델 2	모델 3	모델 4	모델 1	모델 2	모델 3	모델 4
<b>전 원인 사망률</b>								
중간 정도 단백질 (n=4,798)	1.34 (0.81-2.22)	1.37 (0.82-2.27)	1.35 (0.80-2.29)	1.15 (0.67-1.96)	0.79 (0.62-0.99)	0.79 (0.62-0.99)	0.79 (0.62-0.99)	0.79 (0.61-1.01)
고 단백질 (n=1,146)	1.74 (1.02-2.97)	1.77 (1.03-3.03)	1.74 (0.99-3.05)	1.18 (0.60-2.31)	0.72 (0.55-0.94)	0.73 (0.56-0.95)	0.72 (0.55-0.94)	0.72 (0.50-1.02)
지방의 kcal %		0.99 (0.98-1.01)				1.00 (0.99-1.01)		
탄수화물의 kcal %			1.00 (0.99-1.01)				1.00 (0.99-1.00)	
동물성 단백질의 kcal %				1.03 (1.00-1.06)				1.00 (0.98-1.02)
<b>CVD 사망률</b>								
중간 정도 단백질 (n=4,798)	0.79 (0.40-1.54)	0.83 (0.43-1.60)	0.81 (0.41-1.62)	0.61 (0.29-1.29)	0.80 (0.57-1.12)	0.80 (0.57-1.12)	0.80 (0.57-1.12)	0.80 (0.56-1.14)
고 단백질 (n=1,146)	1.03 (0.51-2.09)	1.08 (0.54-2.15)	1.10 (0.52-2.31)	0.55 (0.19-1.62)	0.78 (0.54-1.14)	0.79 (0.54-1.15)	0.78 (0.53-1.15)	0.77 (0.48-1.25)
지방의 kcal %		0.99 (0.97-1.01)				1.00 (0.99-1.01)		
탄수화물의 kcal %			1.00 (0.99-1.02)				1.00 (0.99-1.01)	
동물성 단백질의 kcal %				1.04 (0.99-1.11)				1.00 (0.98-1.02)
<b>암 사망률</b>								
중간 정도 단백질 (n=4,798)	3.06 (1.49-6.25)	3.13 (1.52-6.44)	3.56 (1.65-7.65)	2.71 (1.24-5.91)	0.67 (0.43-1.06)	0.67 (0.43-1.06)	0.67 (0.42-1.05)	0.66 (0.40-1.07)
고 단백질 (n=1,146)	4.33 (1.96-9.56)	4.42 (2.01-9.74)	4.98 (2.13-11.66)	3.19 (1.21-8.35)	0.40 (0.23-0.71)	0.41 (0.23-0.73)	0.39 (0.22-0.69)	0.38 (0.17-0.82)
지방의 kcal %		0.99 (0.98-1.01)				1.02 (1.01-1.03)		
탄수화물의 kcal %			1.00 (0.98-1.01)				1.00 (0.99-1.01)	
동물성 단백질의 kcal %				1.02 (0.97-1.07)				1.00 (0.97-1.04)
<b>당뇨병 사망률</b>								
중간 정도 단백질 (n=4,798)	3.43 (0.69-17.02)	3.36 (0.67-16.96)	3.41 (0.67-17.36)	2.99 (0.58-15.31)	5.38 (0.95-30.49)	5.05 (0.93-27.34)	4.93 (0.89-27.35)	6.20 (0.35-118.9)
고 단백질 (n=1,146)	3.93 (0.73-21.07)	3.88 (0.71-21.17)	3.90 (0.67-22.84)	2.77 (0.24-31.73)	10.64 (1.85-61.31)	10.42 (1.88-57.87)	9.07 (1.49-55.30)	15.16 (1.93-118.9)
지방의 kcal %		1.01 (0.97-1.05)						
탄수화물의 kcal %			1.00 (0.96-1.04)					
동물성 단백질의 kcal %				1.02 (0.92-1.14)				

기준=저 단백질 (상기 둘 모두의 연령 군에서 n=437)

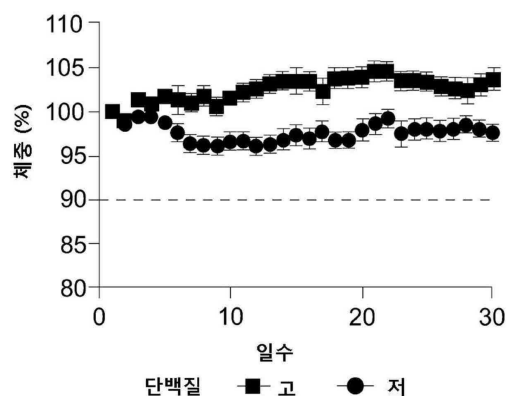
모델 1: (기준선 모델) 연령, 성별, 인종/민족, 교육, 허리 둘레, 흡연, 만성 병태 (당뇨병, 암, MI), 지난 해에 체중을 감량하려고 노력함, 지난 해에 규정식을 바꿈, 전형적인 규정식을 대표하는 섭취량의 보고, 총 칼로리에 대하여 조정함

모델 2: 공변인 및 전체 지방으로부터의 kcal %에 대하여 조정됨

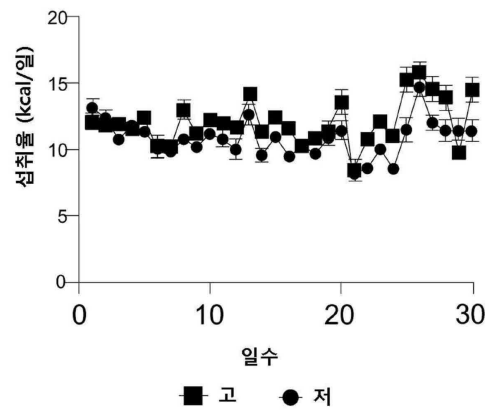
모델 3: 공변인 및 전체 탄수화물로부터의 kcal %에 대하여 조정됨

모델 4: 공변인 및 동물성 단백질로부터의 kcal %에 대하여 조정됨

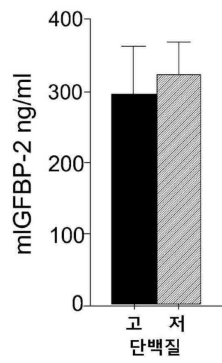
도면9a



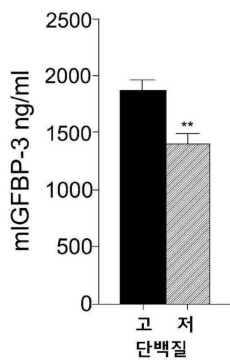
도면9b



도면9c

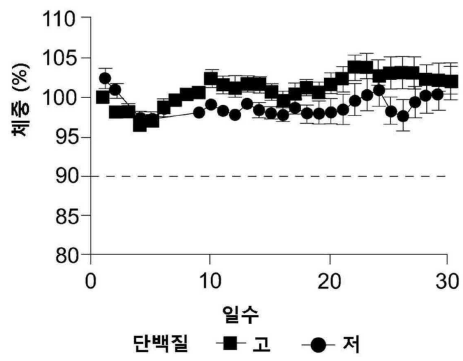


도면9d

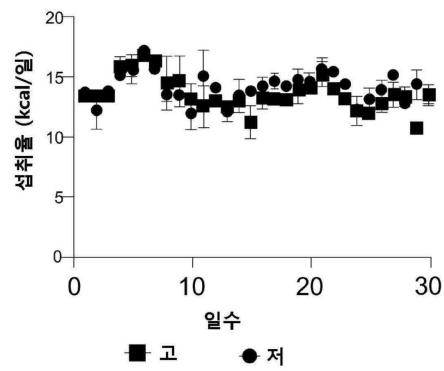




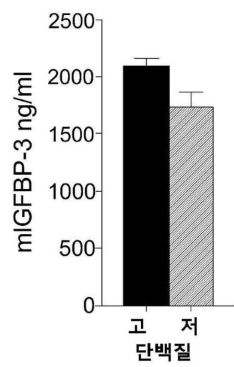
도면9e



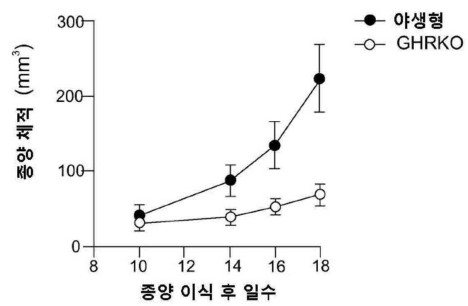
도면9f



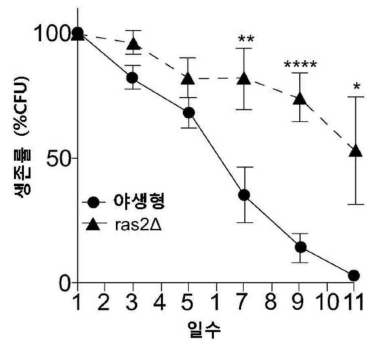
도면9g



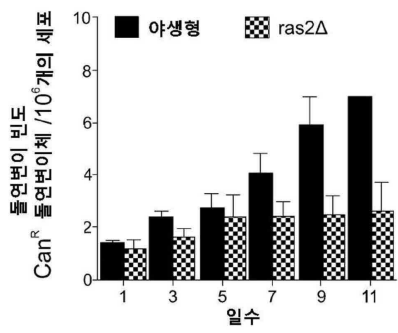
도면10



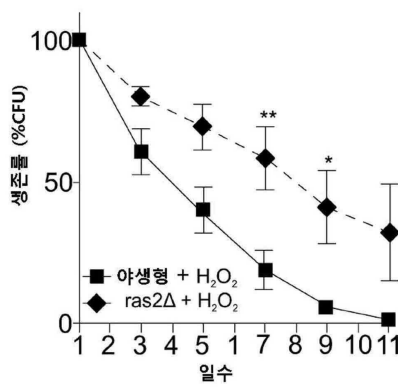
도면11a



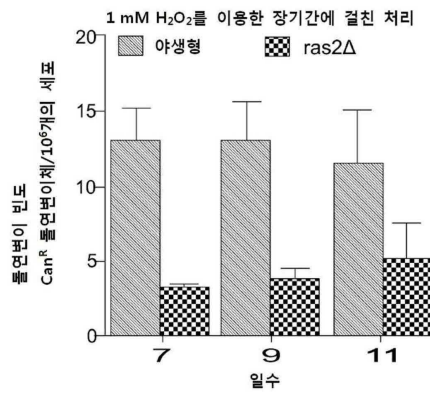
도면11b



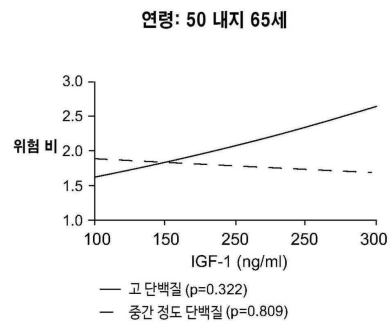
도면11c



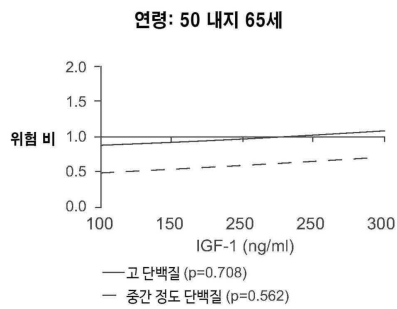
도면11d



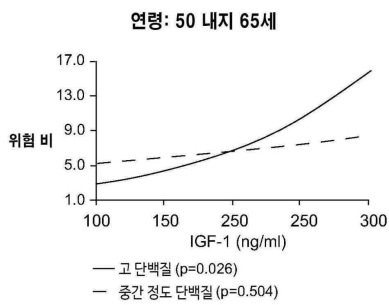
도면12a



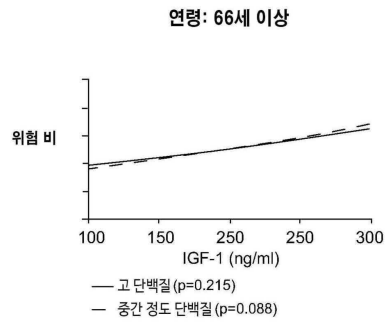
도면12b



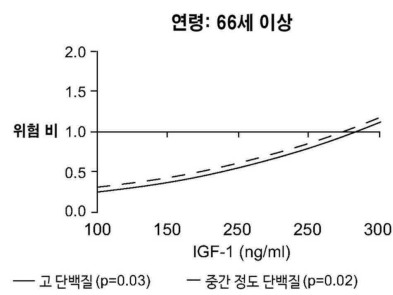
도면12c



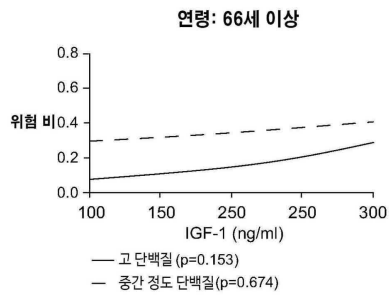
도면12d



도면12e



도면12f



도면13

표 13: 샘플 특성				
	전체 샘플 (N=6,381)	저 단백질 (N=437)	중간 정도 단백질 (N=4,798)	고 단백질 (N=1,146)
연령	64.8 (10.0)	65.3 (10.1)	64.8 (10.0)	64.5 (9.8)
여성	55.4	56.3	55.0	57.0
백인	85.1	81.6	86.5	80.3
흑인	8.7	12.3	7.9	10.9
히스패닉	6.2	6.1	5.6	8.8
교육	11.5 (3.6)	11.1 (3.3)	11.6 (3.5)	11.0 (3.8)
허리 둘레 (cm)	96.9 (13.2)	96.5 (13.5)	96.8 (13.2)	97.5 (13.0)
현재 흡연자	19.1	21.8	19.1	18.2
이전 흡연자	38.0	39.8	37.9	37.8
MI 병력	9.1	7.9	8.9	10.2
암 병력	7.3	11.7	7.5	5.0
당뇨병 병력	10.9	2.6	10.3	17.0
체중을 감량하려고 노력함	38.2	37.5	37.0	43.9
규정식을 바꿈 (건강상의 이유)	23.1	15.0	22.4	29.3
동물성 단백질로부터의 칼로리 %	10.6 (5.1)	4.1 (1.8)	9.5 (3.1)	18.3 (4.9)
단백질로부터의 칼로리 %	16.0 (4.8)	8.5 (1.4)	14.9 (2.6)	23.7 (4.1)
지방으로부터의 칼로리 %	33.0 (9.6)	31.9 (11.2)	33.6 (9.3)	31.0 (10.2)
탄수화물로부터의 칼로리 %	50.7 (11.6)	56.6 (13.5)	51.3 (11.0)	45.4 (11.4)
총 칼로리	1,822.9 (832.2)	1965.6 (1072.8)	1862.5 (807.4)	1593.6 (796.2)
더 많은 24시간 리콜(recall)	1.6	1.8	1.4	2.1
일반적인 24시간 리콜	93.3	83.0	93.9	94.6
더 적은 24시간 리콜	5.1	15.2	4.7	3.3
사망 (전 원인)	40.4	42.9	39.6	42.9
사망 (CVD)	18.7	21.3	18.0	20.7
사망 (암)	9.9	9.8	10.1	9.0
사망 (당뇨병)	1.0	0.2	0.9	2.0
사람의 연수	83,308	5,183	63,661	14,464

1. BMI: 체질량 지수; MI: 심근 경색; 24시간 리콜 (더 많음/일반적임/더 적음); 24시간 리콜 동안 보고된 음식물은 대상체의 정상식보다 (더 많음/동일함/더 적음); CVD: 심혈관계 질환

도면14

표 14. 단백질 섭취량과 사망 사이의 연관성 (N=6,381)

단백질 (% kcal)	위험 비 (95% CI)			
	전 원인 사망률	CVD 사망률	암 사망률	당뇨병 사망률
	기준	기준	기준	기준
<10 (n=436)				
10-19.9 (n=4,800)	0.90 (0.74-1.11)	0.82 (0.61-1.11)	0.98 (0.66-1.45)	3.23 (1.02-10.20)
20+ (n=1,145)	0.93 (0.74-1.19)	0.88 (0.63-1.22)	0.89 (0.56-1.44)	5.51 (1.69-17.99)

267.공변인: 연령, 성별, 인종/민족, 교육, 허리 둘레, 흡연, 만성 병태 (당뇨병, 암, MI), 지난 해에 체중을 감량하려고 노력함, 지난 해에 규정식을 바꿈, 전형적인 규정식을 대표하는 섭취량의 보고, 총 칼로리



도면15

표 15: 사망률과 단백질 섭취량 사이의 연관성에 대한 IGF-I의 영향  
(N=2,253)

	위험비 (95% CI)			
	연령: 50세 내지 65세 (N=1,125)		연령: 66세 이상 (N=1,128)	
	모델 1	모델 2	모델 1	모델 2
<b>전 원인 사망률</b>				
저 단백질	기준	기준	기준	기준
중간 정도 단백질	1.73 (0.91-3.30)	1.69 (0.90-3.20)	0.62 (0.41-0.94)	0.62 (0.40-0.94)
고 단백질	2.83 (1.39-5.76)	2.71 (1.34-5.47)	0.59 (0.36-0.95)	0.59 (0.37-0.95)
IGF-I (10 ng/ml)		1.01 (0.99-1.04)		1.00 (0.98-1.01)
<b>CVD 사망률</b>				
저 단백질	기준	기준	기준	기준
중간 정도 단백질	0.76 (0.33-1.74)	0.71 (0.33-1.54)	0.77 (0.43-1.38)	0.77 (0.43-1.37)
고 단백질	1.29 (0.49-3.40)	1.03 (0.39-2.75)	0.69 (0.36-1.34)	0.70 (0.36-1.35)
IGF-I (10 ng/ml)		1.04 (1.01-1.07)		0.99 (0.97-1.00)
<b>암 사망률</b>				
저 단백질	기준	기준	기준	기준
중간 정도 단백질	6.91 (1.56-30.68)	6.91 (1.56-30.72)	0.41 (0.18-0.92)	0.39 (0.18-0.86)
고 단백질	13.05 (2.77-61.40)	13.09 (2.80-61.13)	0.24 (0.08-0.68)	0.23 (0.08-0.67)
IGF-I (10 ng/ml)		1.00 (0.96-1.03)		0.97 (0.94-0.99)

모델 1: (가져선 모델) 연령, 성별, 인종/민족, 교육, 허리 둘레, 흡연, 만성 병태 (당뇨병, 암, MI), 지난 해에 체중을 감량하려고 노력함, 지난 해에 규정식을 바꿈, 전형적인 규정식을 대표하는 섭취량의 보고, 총 칼로리에 대하여 조정함  
모델 2: 공변인 및 IGF-I에 대하여 조정함

도면16

표 16: 사망률에 대한 단백질과 IGF-I 사이의 상호작용에 있어서의 위험 비

	연령: 50세 내지 65세		연령: 66세 이상	
	위험 비	P-값	위험 비	P-값
<b>전 원인</b>				
중간 정도	2.03	0.349	0.27	0.008
고	1.30	0.722	0.30	0.040
IGF-I	1.01	0.738	0.97	0.077
중간 정도 단백질 X IGF-I	<b>0.99</b>	<b>0.809</b>	<b>1.03</b>	<b>0.088</b>
고 단백질 X IGF-I	<b>1.02</b>	<b>0.322</b>	<b>1.03</b>	<b>0.215</b>
<b>CVD</b>				
중간 정도	0.39	0.379	0.16	0.008
고	0.77	0.802	0.13	0.020
IGF-I	1.02	0.520	0.93	0.007
중간 정도 단백질 X IGF-I	<b>1.02</b>	<b>0.562</b>	<b>1.07</b>	<b>0.020</b>
고 단백질 X IGF-I	<b>1.01</b>	<b>0.708</b>	<b>1.07</b>	<b>0.031</b>
<b>암</b>				
중간 정도	4.08	0.264	0.25	0.201
고	1.27	0.858	0.04	0.018
IGF-I	0.96	0.194	0.96	0.243
중간 정도 단백질 X IGF-I	<b>1.02</b>	<b>0.504</b>	<b>1.02</b>	<b>0.674</b>
고 단백질 X IGF-I	<b>1.09</b>	<b>0.026</b>	<b>1.06</b>	<b>0.153</b>

모든 모델은 연령, 성별, 인종/민족, 교육, 허리 둘레, 흡연, 만성 병태 (당뇨병, 암, MI), 지난 해에 체중을 감량하려고 노력함, 지난 해에 규정식을 바꿈, 전형적인 규정식을 대표하는 섭취량의 보고, 총 칼로리를 포함함

도면17

표 17: 사망률과 단백질 섭취량 사이의 연관성에 대한 동물성 및 식물성 단백질의 영향

	위험 비 (95% CI)					
	연령: 50세 내지 65세 (N=3,039)			연령: 66세 이상 (N=3,342)		
	모델1	모델4	모델5	모델1	모델4	모델5
<b>전 원인 사망률</b>						
중간 정도 단백질	1.34 (0.81-2.22)	1.15 (0.67-1.96)	1.33 (0.80-2.21)	0.79 (0.62-0.99)	0.79 (0.61-1.01)	0.80 (0.63-1.01)
고 단백질	1.74 (1.02-2.97)	1.18 (0.60-2.31)	1.73 (0.96-2.96)	0.72 (0.55-0.94)	0.72 (0.50-1.02)	0.73 (0.56-0.96)
동물성 단백질의 kcal %		1.03 (1.00-1.06)			1.00 (0.98-1.02)	
식물성 단백질의 kcal %			1.01 (0.96-1.06)			0.98 (0.95-1.01)
<b>CVD 사망률</b>						
중간 정도 단백질	0.79 (0.40-1.54)	0.61 (0.29-1.29)	0.77 (0.40-1.51)	0.80 (0.57-1.12)	0.80 (0.56-1.14)	0.82 (0.58-1.14)
고 단백질	1.03 (0.51-2.09)	0.55 (0.19-1.62)	1.02 (0.50-2.06)	0.78 (0.54-1.14)	0.77 (0.48-1.25)	0.79 (0.54-1.16)
동물성 단백질의 kcal %		1.04 (0.99-1.11)			1.00 (0.98-1.02)	
식물성 단백질의 kcal %			1.03 (0.96-1.10)			0.98 (0.94-1.02)
<b>암 사망률</b>						
중간 정도 단백질	3.06 (1.49-6.25)	2.71 (1.24-5.91)	3.03 (1.48-6.19)	0.67 (0.43-1.06)	0.66 (0.40-1.07)	0.68 (0.43-1.09)
고 단백질	4.33 (1.96-9.56)	3.19 (1.21-8.35)	4.30 (1.93-9.59)	0.40 (0.23-0.71)	0.38 (0.17-0.82)	0.41 (0.23-0.72)
동물성 단백질의 kcal %		1.02 (0.97-1.07)			1.00 (0.97-1.04)	
식물성 단백질의 kcal %			1.01 (0.91-1.12)			0.99 (0.92-1.06)
<b>당뇨병 사망률</b>						
중간 정도 단백질	3.43 (0.69-17.02)	2.99 (0.58-15.31)	3.64 (0.76-17.55)	5.38 (0.95-30.49)	6.20 (0.35-37.01)	5.50 (0.96-31.50)
고 단백질	3.93 (0.73-21.07)	2.77 (0.24-31.73)	3.97 (0.75-21.11)	10.64 (1.85-61.31)	15.16 (1.93-118.9)	10.71 (1.87-61.28)
동물성 단백질의 kcal %		1.02 (0.92-1.14)			0.98 (0.90-1.06)	
식물성 단백질의 kcal %			0.90 (0.75-1.07)			0.98 (0.84-1.14)

모델 1: (기저선 모델) 연령, 성별, 인종/민족, 교육, 허리 둘레, 흡연, 만성 병태 (당뇨병, 암, MI), 지난 해에 체중을 감량하려고 노력함, 지난 해에 규정식을 바꾼, 전형적인 규정식을 대표하는 섭취량의 보고, 총 칼로리에 대하여 조정됨  
 모델 4: 공변인 및 동물성 단백질로부터의 kcal %에 대하여 조정됨  
 모델 5: 공변인 및 식물성 단백질로부터의 kcal %에 대하여 조정됨  
 기준=저 단백질  
 연령: 50 내지 65세: 저 단백질(N=219), 중간 정도 단백질(N=2,277), 고 단백질(N=543),  
 연령: 66세 이상: 저 단백질(N=218), 중간 단백질(N=2,521), 고 단백질(N=603),

도면18

표 18. 연령 및 단백질 섭취량에 의한 조정된 평균 HbA1c, 당뇨병 유병률 및 평균 BMI

	HbA1c	당뇨병 (%)	BMI
<b>연령: 50 내지 65세</b>			
저 단백질 섭취량	5.52	2.8	27.65
중간 정도 단백질 섭취량	5.65	9.8	27.93
고 단백질 섭취량	5.90	10.7	27.98
P-값	<.001	<.001	.834
<b>연령: 66세 이상</b>			
저 단백질 섭취량	5.52	5.0	26.19
중간 정도 단백질 섭취량	5.81	11.6	26.70
고 단백질 섭취량	6.03	20.4	26.50
P-값	<.001	<.001	.401

연령, 성별, 인종/민족, 교육, 흡연, 질한, 총 칼로리 섭취량 및 다이어팅에 대하여 제어된 모델로부터 추정함

도면19

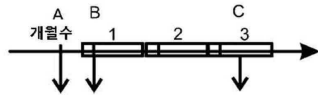
표 19. 기저선에서의 당뇨병이 없는 참가자 사이에서의 당뇨병 사망률과 단백질 섭취량 사이의 연관성

	위험 비 (95% 신뢰 구간)
고 단백질 (n=930)	73.52 (4.47-1209.7)
중간 정도 단백질 (n=4,441)	22.93 (1.31-400.7)

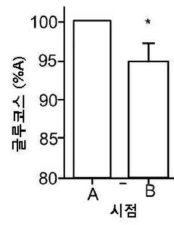
기준=저 단백질 (상기 둘 모두의 연령 군에서 n=449)

룩스 비례 위험 모델(Cox Proportional Hazard Model): 연령, 성별, 인종/민족, 교육, 허리 둘레, 흡연, 기타 만성 병태 (암, MI), 지난 해에 체중을 감량하려고 노력함, 지난 해에 규정식을 바꾼, 전형적인 규정식을 대표하는 섭취량의 보고, 총 칼로리에 대하여 조정함

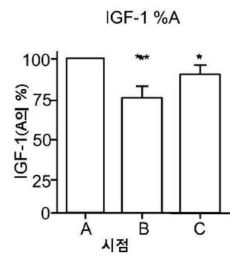
도면20a



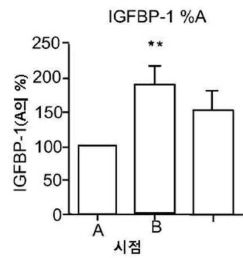
도면20b



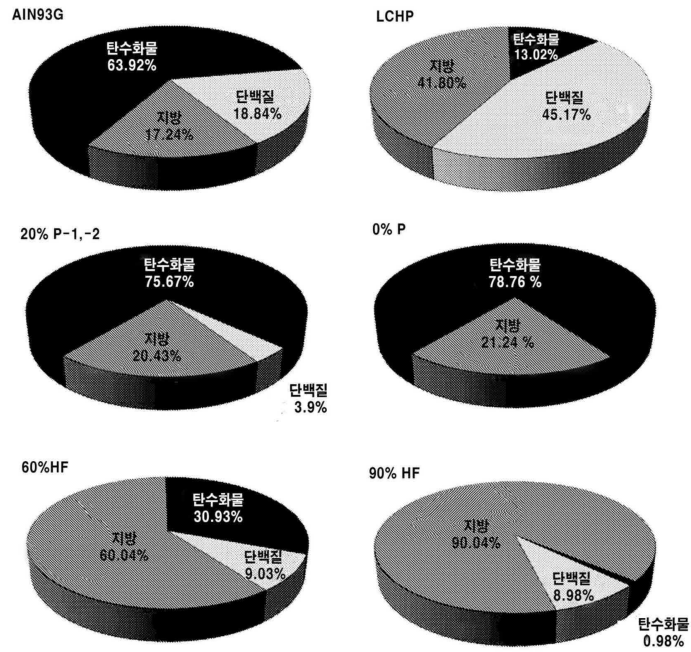
도면20c



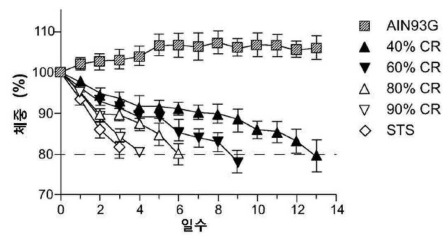
도면20d



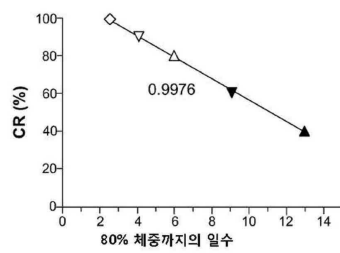
도면21



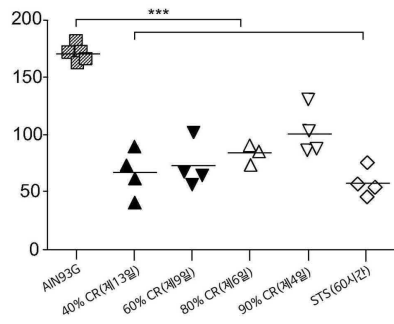
도면22a



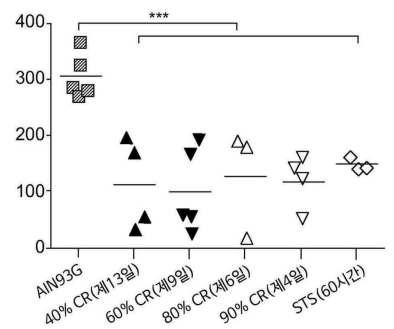
도면22b



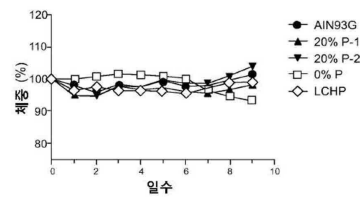
도면22c



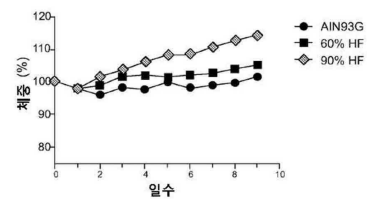
도면22d



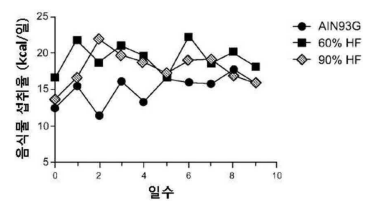
도면23a



도면23b

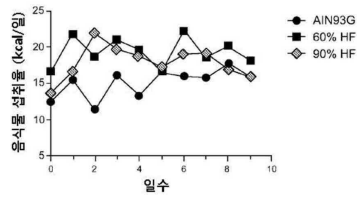


도면23c

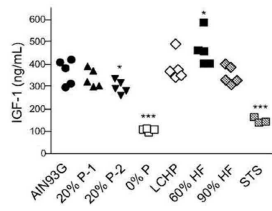




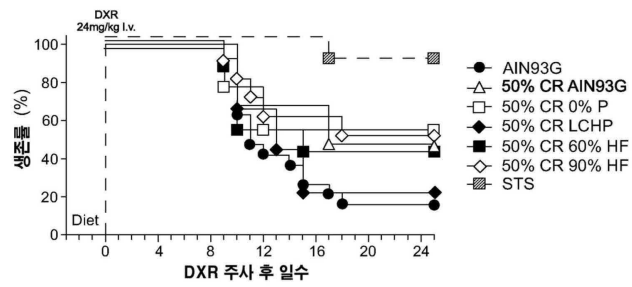
도면23d



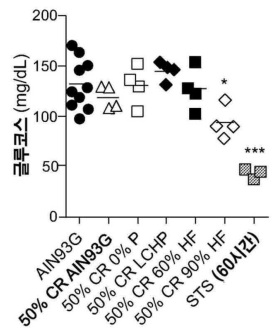
도면23e



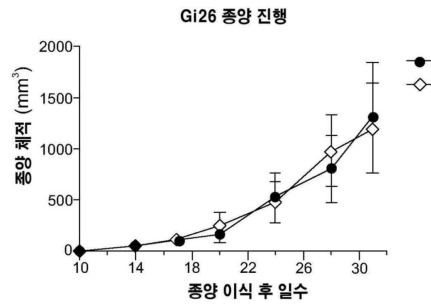
도면24a



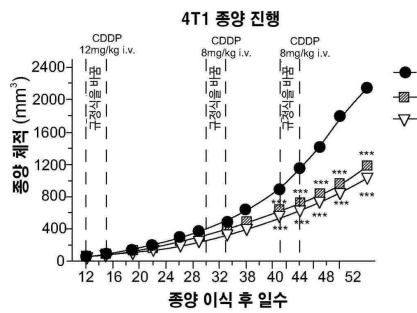
도면24b



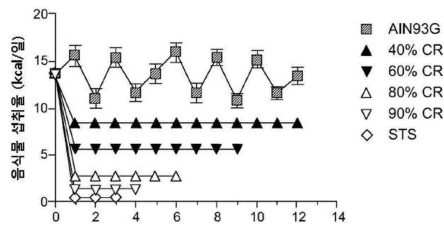
도면25a



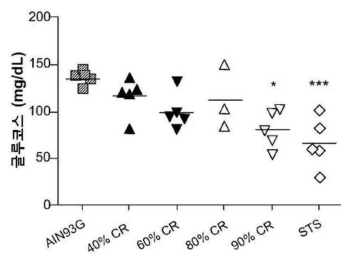
도면25b



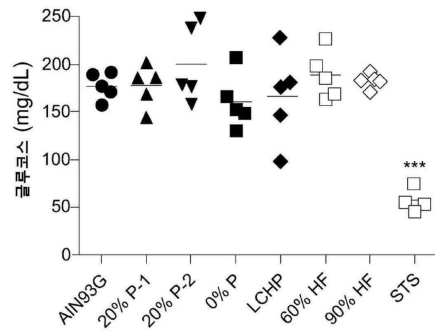
도면26a



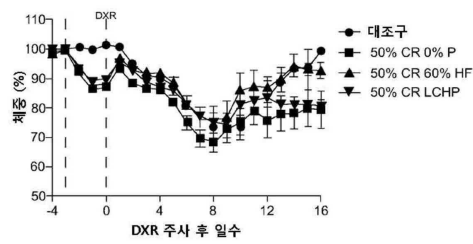
도면26b



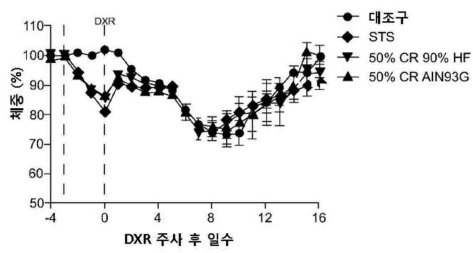
도면27



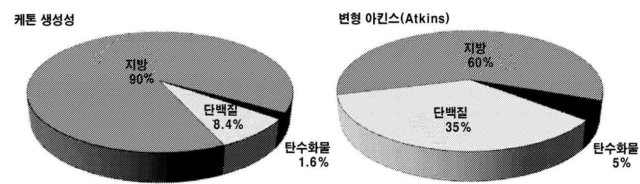
도면28a



도면28b



도면29



도면30

하기로부터의 규정식의 칼로리 %				
규정식	단백질	탄수화물	지방	kcal/g
AIN93G	18.8	63.9	17.2	3.8
<sup>a</sup> 20% P-1	3.9	75.7	20.4	3.9
<sup>b</sup> 20% P-2	3.9	75.7	20.4	3.9
0% P	0	78.8	21.2	3.9
LCHP	45.2	13	41.8	4.4
60% HF	9	30.9	60	5.3
90% HF	9	0.99	90.1	7.1

<sup>a</sup> 지방원으로서 대두유  
<sup>b</sup> 지방원으로서 코코넛유

도면31

g/kg의 규정식	AIN93G	20% P-1	20% P-2	0% P	LCHP	60% HF	90% HF
옥수수 전분	397.486	487.222	487.222	511.636	85.406	179.886	
덱스트린 처리된 옥수수 전분	132.000	181.994	181.994	170.000	28.380	170.000	
수크로스	196.000	122.700	122.700	128.700	21.500	86.200	
카제인	200.000	40.000	40.000		566.000	133.200	180
지방	76.000	87.500	87.500	92.050	198.100	350.000	709.37
셀룰로오스	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	80
미네랄 (AIN-93G-MX)	35.000	35.000	35.000	35.000	35.000	35.000	35.000
비타민 (AIN-93-VX)	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
L-시스테인	3.000	3.000	3.000		3.000	3.000	3
콜린 타르테이트	2.500	2.500	2.500	2.500	2.500	2.500	2.500
Tert-부틸히드로퀴논	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.130
인산칼슘	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
음식물 색상		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
총계(g)	1000.00	1000.00	1000.00	1000.000	1000.00	1000.00	1000.000

도면32

규정식	신규	AIN93G	신규	신규	AIN93G	AIN93G	AIN93G
일	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
생쥐/케이지	5	5	5	5	1	1	1

도면33

전체 규정식 (kg)에 대하여		0.2					STS
		40% CR	50% CR	60% CR	80% CR	90%CR	
AIN-93G (g)		116.20	95.60	74.80	33.40	12.60	0.00
필수 지방산(ml)		0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43
섬유 (g)		4.19	5.22	6.26	8.33	9.37	10.00
AIN-93G-MX (g)		2.93	3.85	4.38	5.83	6.56	7.00
AIN-93-VX (g)		0.84	1.04	1.25	1.67	1.87	2.00
히드로젤 (g)		75.44	94.08	112.91	150.37	169.20	180.60

도면34

하기를 기반으로 하는 50% CR 규정식					
	AIN93G	0% P	LPHC	60% HF	90% HF
kcal/g	3.76	3.90	4.39	5.25	7.11
규정식 (g)	95.6	92.1	81.9	68.5	50.5
필수 지방산 (ml)	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43
섬유 (g)	5.22	5.22	5.22	5.22	5.22
AIN-93G-MX (g)	3.65	3.65	3.65	3.65	3.65
AIN-93-VX (g)	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04
히드로겔 (g)	94.1	97.6	107.8	121.2	139.1
합계 (g)	200	200	200	200	200