



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0108191
(43) 공개일자 2016년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/305 (2006.01) A23L 1/00 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 1/3053 (2013.01)
A23L 1/0014 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0025527
(22) 출원일자 2016년03월03일
심사청구일자 2016년03월03일
(30) 우선권주장
1020150030455 2015년03월04일 대한민국(KR)

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

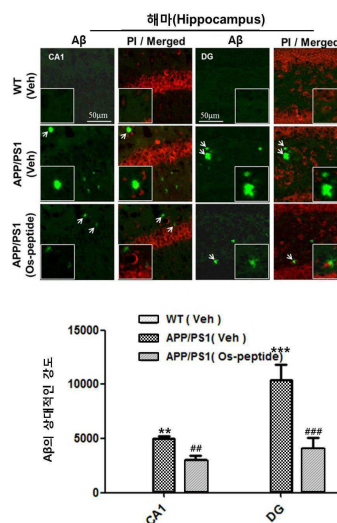
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 오스모틴 펩티드를 유효성분으로 함유하는 신경질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 오스모틴 펩티드를 유효성분으로 함유하는 신경질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 상세하게는 상기 오스모틴 펩티드는 9개의 아미노산으로 이루어진 오스모틴 펩티드이며, 오스모틴 펩티드를 처리하는 경우, 신경세포의 성장률이 증가하고, 세포 독성은 거의 없으며, 세포사멸을 억제하였고, 동물모델에 투여하여, 뇌의 해마, 대뇌피질, 뇌의 심부인 시상하부까지 상기 오스모틴 펩티드가 침투하므로 신경질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61K 38/168 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-0009521

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래유망 융합 기술 파이오니어사업

연구과제명 치매(뇌기능향진 조절) 치료 천연신물질 소재개발 ; 나노담체 적합형 약물기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교

연구기간 2012.09.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

하기로부터 선택되는 오스모틴 펩티드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 오스모틴 펩티드; 또는 (b) 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 삽입을 갖고, 신경질환을 예방 또는 개선할 수 있는 (a)로부터 유도된 오스모틴 펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 신경질환은 알츠하이머병, 치매, 파킨슨병, 간질, 정신분열증, 우울증, 조울증, 신경발생장애, 자폐증, 뇌졸중, 루게릭, 헌팅턴병 및 다발성경화증으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 오스모틴 펩티드는 조성물의 총 중량에 대하여 0.1 내지 100 중량% 함유되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 음료, 환, 정제(tablet), 캡슐제(capsule), 산제 중에서 선택된 어느 하나의 제형인 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 오스모틴 펩티드는 뇌의 해마와 대뇌피질에서의 A β 올리고머, p-Tau(Ser413) 또는 BACE-1 단백질의 발현량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 오스모틴 펩티드는 SNAP25 또는 PSD95 단백질의 발현량을 증가시키는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 오스모틴 펩티드는 AdipoR1, pAMPK, total-AMPK, p-PI3K 또는 pAkt(Ser473) 단백질의 발현량을 증가시키고, pJNK 또는 TNF- α 단백질의 발현량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

하기로부터 선택되는 오스모틴 펩티드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 오스모틴 펩티드; 또는 (b) 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 삽입을 갖고, 신경질환을 예방 또는 치료할 수 있는 (a)로부터 유도된 오스모틴 펩티드.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 신경질환은 알츠하이머병, 치매, 파킨슨병, 간질, 정신분열증, 우울증, 조울증, 신경발생장애, 자폐증, 뇌졸중, 루게릭, 헌팅턴병 및 다발성경화증으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 오스모틴 펩티드는 조성물의 총 중량에 대하여 0.1 내지 100 중량% 함유되는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 중에서 선택된 1종 이상의 담체를 더 함유하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 계면활성제, 결합제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 및 보존제 중에서 선택된 1종 이상의 보조제를 더 함유하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 13

하기로부터 선택되는 오스모틴 펩티드를 포함하는 조성물을 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료방법: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 오스모틴 펩티드; 또는 (b) 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 삽입을 갖고, 신경질환을 예방 또는 치료할 수 있는 (a)로부터 유도된 오스모틴 펩티드.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 오스모틴 펩티드를 유효성분으로 함유하는 신경질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 퇴행성 신경질환은 신경세포(뉴런)의 점진적인 구조적, 기능적인 손실을 의미한다. 퇴행성 신경질환은 신경계의 특정부위를 주로 침범하여 치매, 추체외로 이상, 소뇌 이상, 감각 장애, 운동 장애 등의 증상을 동반하며, 동시에 여러 부위가 침범되어 복합적인 증상이 나타날 수도 있다. 환자가 보이는 임상 양상에 따라 진단을 하게 되는데, 이 경우 증상이 다양하고 서로 다른 질환들이 공통적인 임상 증상을 보이는 경우가 많아 진단이 어렵다 (Soc. Sci. Med. Vol. 40. No. 6, pp. 847-858, 1995).

[0003] 신경질환 중의 하나인 치매(dementia)는 기억력 장애, 판단력 상실 등 전신기능의 전반적인 장애를 동반하는 질환이다. 50세 이전에는 증상이 거의 나타나지 않지만 60세 이후로는 발생 빈도가 점진적으로 증가하는 노인성 질환으로서, 의학기술의 발전 및 삶의 질 향상으로 인한 노인 인구의 증가에 따라 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 발병 인구가 급속히 증가하고 있는 질환이다. 2008년에 등록된 국내의 65세 이상 치매 환자 수는 421,000명으로 노인 전체 인구의 8.4%를 차지하고 있으며, 2030년에는 1,135,000명으로 전체 노인 인구의 9.6%를 넘어설 것으로 예측된다. 2008년 보건복지부의 치매 유병률 조사 결과, 치매의 발병 형태는 매우 다양한데, 국내 발병하는 치매의 약 70% 정도는 알츠하이머형 치매(dementia of Alzheimer type)이며, 약 25% 정도는 혈관성 치매(dementia of Vascular type), 기타 알코올성 치매 및 파킨슨병 치매는 5% 이하로 집계되고 있다.

[0004] 치매의 가장 주요한 발병 형태인 알츠하이머병(Alzheimer disease, AD)은 두 가지 특징적인 병변을 보이게 되는데 하나는 뇌의 대뇌피질과 해마 부위의 신경세포에서 타우(tau) 단백질의 과인산화 및 응집에 의해 나타나는 세포 내의 신경섬유수초(Neurofibrillary tangle) 형성이고 다른 하나는 아밀로이드 β -1/42(amyloid β -1/42)의 응집에 의해 세포 외부에 형성되는 플라그(plaque)이다.

[0005] 알츠하이머병의 원인은 아직 확실하게 규명되어 있지 않으나, 응집에 관여되는 두 단백질의 응집된 형태인 tangle이나 플라그(plaque), 또는 전구체들이 뇌의 기억 및 인식을 담당하는 신경세포 부위에 침적되어 신경세포의 기능저하 및 사멸을 일으켜 알츠하이머를 일으킨다는 것이다. 응집된 tau 단백질의 경우 미세소관과의 안

정화를 담당하는데, 응집으로 감소된 tau 단백질이 정상적인 기능을 수행하지 못함에 따라 미세소관의 결합력이 약해지고 기능 이상이 긴 시간에 걸쳐 작용하여 개별 신경 세포의 기능저하, 나아가서 사멸에 이르게 된다는 것이다.

[0006] 한편, 식물에서 유래된 오스모틴은 지방산 산화 조절, 글루코오스 수득, 인산화(AMP 키나아제) 및 신호 변환 경로에 관여한다. 오스모틴(24 kDa)은 당분-측정 단백질 타우마틴(sweet-testing protein thaumatin)과 상동성을 가지는 PR-5 패밀리에 포함되는 안정한 단백질이고, 효모에서 세포 내 신호 전달을 유도하는 것으로 알려져 있다. 오스모틴은 열, 산성 및 효소에 저항성을 가지므로 소화에 의해 분해되지 않고 신체를 순환할 수 있다. 이러한 오스모틴은 동물에 존재하는 아디포넥틴과 상동체로 알려져 있는데, 아디포넥틴의 경우 일부 항-염증, 항-당뇨, 항-죽상경화 능력을 가질 가능성이 있다고 밝혀진 바 있다. 또한 오스모틴은 주로 비만이나 당뇨병과 관련된 효과가 널리 알려져 있으며, 한국등록특허 제1308232호에 오스모틴을 함유하는 신경질환의 예방 및 치료용 조성물로 알려져 있으나, 오스모틴 펩티드만으로 신경질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로는 알려진 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴 펩티드가 신경세포의 생존률을 증가시키고, 세포독성은 거의 없으며, 세포사멸을 억제하고, 동물모델에 투여하여 뇌의 해마, 대뇌피질, 뇌의 심부인 시상하부까지 침투하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기로부터 선택되는 오스모틴 펩티드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 오스모틴 펩티드; 또는 (b) 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 삽입을 갖고, 신경질환을 예방 또는 개선할 수 있는 (a)로부터 유도된 오스모틴 펩티드.

[0009] 또한, 본 발명은 하기로부터 선택되는 오스모틴 펩티드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 오스모틴 펩티드; 또는 (b) 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 삽입을 갖고, 신경질환을 예방 또는 치료할 수 있는 (a)로부터 유도된 오스모틴 펩티드.

[0010] 또한, 본 발명은 하기로부터 선택되는 오스모틴 펩티드를 포함하는 조성물을 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 오스모틴 펩티드; 또는 (b) 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 삽입을 갖고, 신경질환을 예방 또는 치료할 수 있는 (a)로부터 유도된 오스모틴 펩티드.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 오스모틴 펩티드를 함유하는 조성물을 사용하는 경우, 신경세포의 정상적인 발생, 발달 및 성장을 저해하는 외부의 자극 또는 독성으로부터 보호할 수 있어, 신경질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 오스모틴 펩티드는 9개의 아미노산 서열로 이루어져 있으므로, 단백질 합성 등을 통한 생산성이 높아 산업적 이용가치가 매우 높다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 인간 신경아세포주 SH-SY5Y(A) 및 해마 세포주 HT22(B)에 오스모틴 펩티드를 0.5 내지 20 μ M의 농도로 처리하여 24시간 후에 확인한 세포 생존률을 나타낸 결과이다.

도 2는 인간 신경아세포주 SH-SY5Y에 오스모틴 펩티드-FITC를 1, 5 및 10 μ g 처리하여 형광이미지를 확인한 결과이다. 코발트는 신경아세포주 SH-SY5Y이고, 녹색은 오스모틴 펩티드가 결합한 모습이다.

도 3은 마우스에 꼬리정맥주사(IV)(a-c) 및 복강주사(IP)(d-f)하여 오스모틴 펩티드-FITC를 투여하고, 뇌의 해마부위까지 이동한 오스모틴 펩티드-FITC를 확인한 형광이미지이다.

도 4는 오스모틴 펩티드-FITC를 마우스에 정맥주사로 투여하고, 투여된 오스모틴 펩티드-FITC가 뇌의 대뇌피질

(a~c) 및 시상하부(d~f)까지 이동한 것을 나타내는 형광이미지이다. a는 대뇌피질을 저배율로 관찰한 것이고, b 및 c는 대뇌피질을 고배율로 관찰한 것이며, d는 시상하부를 저배율로 관찰한 것이고, e 및 f는 시상하부를 고배율로 관찰한 것이다.

도 5는 APP/PS1 마우스에 오스모틴 펩티드를 처리하여 대뇌피질 및 해마 부위에서 Tau-46 단백질의 발현이 감소하는 것을 확인한 결과이다. ***는 WT(정상 대조구)에 비해 APP/PS1 모델에서 Tau-46의 발현이 통계적으로 유의하게 증가한다는 것을 의미하며, p값이 0.001미만이다. 또한, ###은 APP/PS1 모델에 비해 오스모틴 펩티드를 처리했을 때, Tau-46의 발현이 통계적으로 유의하게 감소한다는 것을 의미하며, p값이 0.001미만이다.

도 6은 APP/PS1 마우스에 오스모틴 펩티드를 처리하여 대뇌피질 및 해마 부위에서 p-Tau(Ser 404) 단백질의 발현이 감소하는 것을 확인한 결과이다. ***는 WT(정상 대조구)에 비해 APP/PS1 모델에서 p-Tau(Ser 404)의 발현이 통계적으로 유의하게 증가한다는 것을 의미하며, p값이 0.001미만이다. 또한, ###은 APP/PS1 모델에 비해 오스모틴 펩티드를 처리했을 때, p-Tau(Ser 404)의 발현이 통계적으로 유의하게 감소한다는 것을 의미하며, p값이 0.001미만이다.

도 7은 APP/PS1 마우스에 오스모틴 펩티드 처리에 의해 뇌의 해마부위인 CA1과 DG 지역에서 A β 플라그(plaque)가 현저하게 감소한 것을 확인한 것이다. **, ***는 WT(정상 대조구)에 비해 APP/PS1 모델에서 A β 플라그(plaque)의 발현이 통계적으로 유의하게 증가한다는 것을 의미하며, **은 p값이 0.01미만이고, ***은 p값이 0.001미만이다. 또한, ##, ###은 APP/PS1 모델에 비해 오스모틴 펩티드를 처리했을 때, A β 플라그(plaque)의 발현이 통계적으로 유의하게 감소한다는 것을 의미하며, ##은 p값이 0.001미만이고, ###은 p값이 0.001미만이다.

도 8은 APP/PS1 마우스에 오스모틴 펩티드를 처리하여 대뇌피질 부위에서 A β 플라그(plaque)가 감소하는 것을 확인한 결과이다. ***는 WT(정상 대조구)에 비해 APP/PS1 모델에서 A β 플라그(plaque)의 발현이 통계적으로 유의하게 증가한다는 것을 의미하며, ***은 p값이 0.001미만이다. 또한, ###은 APP/PS1 모델에 비해 오스모틴 펩티드를 처리했을 때, A β 플라그(plaque)의 발현이 통계적으로 유의하게 감소한다는 것을 의미하며, ###은 p값이 0.001미만이다.

도 9는 APP/PS1 마우스 뇌의 해마(hippocampus) 및 대뇌피질(cortex)에서 생성된 p-Tau(Ser 413) 및 p-Tau(Ser 404) 단백질이 오스모틴 펩티드 처리에 의해 감소한 것을 확인한 결과이다.

도 10은 APP/PS1 마우스 뇌의 해마(hippocampus) 및 대뇌피질(cortex)에서 생성된 아밀로이드 베타 올리고머(amyloid- β oligomer, A β oligomer), APP 및 BACE-1 단백질이 오스모틴 펩티드 처리에 의해 감소한 것을 확인한 결과이다.

도 11은 APP/PS1 마우스에 오스모틴 펩티드를 처리하여 시냅스 기능(synaptic function)의 향상에 의해 발현되는 SNAP25 및 PSD95 단백질의 발현량이 증가하는 것을 확인한 결과이다.

도 12는 APP/PS1 마우스에 오스모틴 펩티드를 처리하여 AdipoR1, pAMPK 및 total-AMPK의 발현량이 증가하는 것을 확인한 결과이다.

도 13은 APP/PS1 마우스에 오스모틴 펩티드를 처리함으로써 p-JNK, TNF- α , NF- κ B 및 pIKK β 단백질의 발현량이 감소한 것을 확인한 결과이다.

도 14는 APP/PS1 마우스에 오스모틴 펩티드를 처리함으로써 p-PI3K 및 pAkt(Ser473) 단백질의 발현량이 증가한 것을 확인한 결과이다.

도 15는 알츠하이머 마우스에 본 발명의 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)를 45일간 IP 투여 후, 행동학적 변화를 확인하기 위하여 모리스 수중 미로 실험의 잠재기(latency)를 측정한 결과(A), 모리스 수중 미로 실험의 프로브 테스트에서 플랫폼 교차로를 통과한 횟수를 측정한 결과(B), 모리스 수중 미로 실험에서 타겟 사분면에서 머무르는 시간을 측정한 결과(C) 및 Y-미로 테스트의 자발적 변경(Spontaneous Alteration(%))을 측정한 결과(D)를 나타낸 것이다.

도 16은 모델 마우스의 해마 신경세포를 배양하여 전기생리학적으로 LTP를 측정한 결과로, 본 발명의 오스모틴 펩티드를 처리한 군에서 mEPSC frequency(Hz)가 증진된 것을 확인한 것이다.

도 17은 *In vivo* LTP를 측정한 결과로, 정상군, APP/PS1 마우스 모델군, 및 APP/PS1 마우스 모델군에 오스모틴 펩티드를 처리한 군에서의 EPSC 증강 정도를 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명은 하기로부터 선택되는 오스모틴 펩티드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 오스모틴 펩티드; 또는 (b) 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 삽입을 갖고, 신경질환을 예방 또는 개선할 수 있는 (a)로부터 유도된 오스모틴 펩티드.
- [0014] 본 발명에서, 오스모틴(osmotin)은 포도 등 숙성한 과일에 다량으로 함유되어 있는 단백질로서, 개체에 따라 약 150개 내지 250개의 아미노산으로 구성되는 단백질이다. 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴 펩티드는 오스모틴 단백질의 서열 중에서 157번째부터 165번째까지의 9개 아미노산으로 이루어진 펩티드(서열번호 1)이다.
- [0015] 본 발명의 오스모틴 펩티드는 정제된 천연 생성물 또는 화학적으로 합성된 생성물일 수 있거나, 또는 원핵 또는 진핵 숙주 세포 (예를 들어, 박테리아, 효모, 고등 식물, 곤충 및 포유류 세포)로부터 재조합 기법을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0016] 본 발명에서, 오스모틴 펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 비교해 5개 이하, 가장 바람직하게는 3개 이하의 아미노산이 관련 또는 유사 특성을 가진 아미노산으로 치환된 펩티드를 지칭한다.
- [0017] 상기 신경질환은 알츠하이머병, 치매, 파킨슨병, 간질, 정신분열증, 우울증, 조울증, 신경발생장애, 자폐증, 뇌졸중, 루게릭, 헌팅턴병 및 다발성경화증으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 질환인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 알츠하이머병이지만 이에 한정하지 않는다. 상기 오스모틴 펩티드는 조성물의 총 중량에 대하여 0.1 내지 100 중량% 함유되는 것이 바람직하다.
- [0018] 상기 조성물은 뇌의 해마와 대뇌피질에서의 AB 올리고머, p-Tau(Ser413) 및 BACE-1 단백질의 발현량을 감소시키고, SNAP25 및 PSD95 단백질의 발현량을 증가시키며, AdipoR1, pAMPK, total-AMPK, p-PI3K 또는 pAkt(Ser473) 단백질의 발현량을 증가시키고, pJNK 또는 TNF- α 단백질의 발현량을 감소시키는 것을 특징으로 한다.
- [0019] 상기 건강기능식품 조성물은 음료, 환, 정제(tablet), 캡슐제(capsule), 산제 중에서 선택된 어느 하나의 식품으로 제조하거나, 다른 식품 또는 식품의 성분에 첨가하여 제조될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 제조될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 일례로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 중에서 선택된 어느 하나의 형태일 수 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0021] 상기 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 및 천연 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알킨산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있고, 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드; 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 하기로부터 선택되는 오스모틴 펩티드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 오스모틴 펩티드; 또는 (b) 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 삽입을 갖고, 신경질환을 예방 또는 치료할 수 있는 (a)로부터 유도된 오스모틴 펩티드.
- [0023] 상기 약학 조성물의 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 락토스, 텍스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 중에서 선택된 1종 이상의 담체를 더 함유할 수 있으며, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 향

산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 계면활성제, 결합제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 및 보존제 중에서 선택된 1종 이상의 보조제를 더 함유할 수 있다.

[0024] 상기 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 경구 또는 비경구의 제형으로 투여될 수 있으며, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 또한, 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 하기로부터 선택되는 오스모틴 펩티드를 포함하는 조성물을 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 오스모틴 펩티드; 또는 (b) 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 삽입을 갖고, 신경질환을 예방 또는 치료할 수 있는 (a)로부터 유도된 오스모틴 펩티드.

[0026] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0027] 실시예 1. 인간 신경아세포주 SH-SY5Y 세포의 배양

[0028] 인간 신경아세포주인 SH-SY5Y 세포를 10%(v/v) fetal bovine serum(FBS) 및 1%(w/v) 항생제(페니실린-스트렙토마이신)를 함유한 100 μ l의 Dulbecco Modified Eagle Medium(DMEM) 배지를 사용하여 온도가 37℃이고, 5% CO₂인 조건 하에서 배양하였다.

[0029] 실시예 2. ApoTox-GloTM Triplex 어세이

[0030] 성장배지[10% FBS, 100 Units/ml의 페니실린(Penicillin) 및 100mg/ml의 스트렙토마이신(Streptomycin)을 포함하는 DMEM 배지]가 들어있는 96웰 플레이트에 2 × 10⁴ 개의 세포가 포함되도록 100 μ l씩 분주하고, 37℃에서 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 세포가 70~90% 정도 밀집되었을 때, 제조자의 지시에 따라 리포펙타민 3000(Lipofectamine 3000)을 이용하여 8시간 동안 pCAX-APP Swe/Ind로 형질전환하였다. 그리고 나서 배지는 흡입하여 제거하고, 0.5 내지 20 μ M의 오스모틴-펩티드를 포함하는 신선한 100 μ l의 성장배지로 교환하고 24시간 동안 인큐베이션하였다.

[0031] 24시간 후에, 세포 생존율(Cell viability), 세포독성(cytotoxicity assay) 및 caspase-3 활성도를 확인하기 위하여 제조자의 지시에 따라 Glomax-Multi Detection 시스템을 이용하는 ApoTox-GloTM Triplex 어세이(promega)를 수행하였다.

[0032] 결과는 도 1에 개시한 바와 같이, 오스모틴 펩티드 처리 농도에 비례하여 세포의 생존율(cell viability)이 증가하는 것을 확인하였다.

[0033] 실시예 3. *in vitro*에서의 면역형광법을 이용한 형태학적 분석(Morphological Analysis)

[0034] 형태학적 분석을 위하여 인간 신경아세포주인 SH-SY5Y 세포를 96웰 플레이트에 2 × 10⁴ cells/well씩 분주한 다음, 농도별(1, 5 및 10 μ g)로 오스모틴 펩티드를 처리하여 37℃, 5% CO₂인 조건 하에서 규칙적으로 하루에 7번씩

배지[10% FBS, 100Units/ml의 페니실린(Penicillin) 및 100mg/ml의 스트렙토마이신(Streptomycin)을 포함하는 DMEM 배지]를 교환하면서 24시간 동안 배양하였다.

[0035] 상기 세포가 70~90% 정도 밀집하여 생장되었을 때, 배지를 FITC-태깅된 오스모틴-펩티드(1, 5 및 10 μ g)를 포함하는 신선한 배지로 교환하고 24시간 동안 더 배양하였다. 상기 세포는 PBS 완충용액으로 세척하고, 4%(v/v)의 파라포름알데히드(Paraformaldehyde)로 30분 동안 상온에서 고정하였다. 4%(v/v)의 파라포름알데히드(Paraformaldehyde)를 제거한 후, 세포를 PBS 완충용액으로 5분 동안 세척하고, 상온에서 15분 동안 0.1%(v/v)의 Triton X-100을 침투시켰다. 이후, 1%의 BSA 블로킹 용액을 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 커버슬립을 마운팅한 후 색상은 공초점 현미경(Flouview FV1000)으로 관찰하였다.

[0036] 결과는 도 2에 개시한 바와 같이 오스모틴 펩티드가 상기 세포의 세포질에 결합하는 것을 확인할 수 있었다.

[0037] 실시예 4. 동물모델을 이용하여 오스모틴 펩티드의 복강주사 및 꼬리정맥주사 후, 뇌의 면역형광 분석

[0038] 10주령 APP/PS1 마우스의 복강(IP)에 1일 1회씩 45일 동안 오스모틴-펩티드를 처리한 후, 슬라이드 섹션을 제작하였다. 아밀로이드 플라그(amyloid plaques)를 관찰하기 위한 thioflavin-S 염색은 수분 동안 흐르는 수돗물에서 세척한 동결절편(cryosection)을 이용하였다.

[0039] 5분 동안 0.25%의 과망간산 칼륨(potassium permanganate)에서 인큐베이션 하고 나서, 섹션은 1%의 K₂S₂O₅ 및 1%(v/v)의 옥살산(oxalic acid)를 포함하는 용액에서 5분 동안 인큐베이션 하고 0.02%의 thioflavine-S 용액에 8분동안 정치하였다.

[0040] 이후, 뇌 섹션은 80%(v/v)의 에탄올로 1분 동안 세척하기를 두번하였고, 이후 4~5분 동안 천천히 흐르는 수돗물에서 세척하였다. 그리고 나서 알코올의 함량을 순차적으로 올려가면서(70, 80 및 95%(v/v)) xylene으로 무수화시켰다. 커버 슬립(slip)으로 마운팅하고, 섹션은 공초점 레이저-스캐닝 현미경(Flouview FV 1000)으로 관찰하였다.

[0041] 또한, 마우스에 복강주사(IP) 및 꼬리정맥주사(IV)하여 오스모틴 펩티드-FITC를 투여하였다. 4시간 후, 마우스를 4%(v/v)의 ice-cold 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 경심관류로 관류시키고, 뇌를 채취하여 4%(v/v)의 파라포름알데히드(paraformaldehyde)에서 72시간 동안 사후 고정하고, 마지막으로 72시간 동안 20%(w/v)의 수크로스로 옮겨 수집하였다.

[0042] 뇌는 액체질소 하에서 OCT(optimal cutting temperature compound)에 침윤 시키고, 14 μ m coronal 섹션은 ProbeOn Plus slide에 마운트하였다.

[0043] 면역형광 분석을 위한 슬라이드는 0.01M의 PBS 완충용액으로 15분 동안 두번 세척하였다. 상기 섹션을 단백질분해효소(proteinase K)로 덮고 5분 동안 37 $^{\circ}$ C에서의 습한 챔버 안에서 인큐베이션하였다. PBS 완충용액에 용해시킨 5%(v/v)의 정상 염소 혈청과 0.3%(v/v)의 Triton X-100을 포함하는 블로킹 용액에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 블로킹 과정 이후에, 마운팅 커버슬립과 섹션을 공초점 레이저-스캐닝 현미경(Flouview FV 1000)에서 관찰하였다.

[0044] 도 3에 개시한 바와 같이 본 발명의 오스모틴-펩티드가 마우스에 복강주사(IP) 및 꼬리정맥주사(IV) 후, 뇌의 해마부위까지 이동한 것을 확인할 수 있었으며, 정맥 주사 시, 뇌의 대뇌피질 부위 및 시상하부까지 이동하는 것을 확인할 수 있었다(도 4).

[0045] 또한, 도 5 내지 도 8에 개시한 바와 같이, 뇌의 해마 및 대뇌피질 부위에서 생성된 Tau-46, p-Tau(Ser 404) 및 아밀로이드 베타(A β) 플라그가 오스모틴 펩티드 처리에 의해 현저하게 감소하는 것을 확인하였다.

[0046] 실시예 5. 웨스턴 블랏(Western Blot) 분석

[0047] 10mg의 조직을 4 $^{\circ}$ C에서 600 μ l의 PRO-PRO-PREP(Intron Biotech) 단백질 추출 용액에서 제조자의 지시에 따라 추출하였다. 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 어레이 키트를 이용하여 결정하였다. 20mg의 단백질 분해물은 4~12%(v/v)의 SDS-PAGE로 분리하였다. 이후에 상기 SDS-PAGE gel을 멤브레인에 이동시키고, 5% 탈지유(skim milk)로 블로킹하였다.

[0048] 4 $^{\circ}$ C에서 1차 항체를 처리하고 밤새도록 인큐베이션하였고, HRP(horseradish peroxidase)가 융합된 2차 항체와

반응시키고 ECL 용액을 처리하여 단백질을 관찰하였다. 1차 항체는 phospho-Tau(Ser 413), phospho-Tau(Ser 404), BACE-1(Beta-secretase 1), 아밀로이드 베타(A β) oligomer, APP, BACE-1, Synaptophysin, SNAP25(Synaptosomal-Associated Protein 25), PSD95(postsynaptic density protein 95), AdipoR1(Adiponectin receptor 1), phospho-AMPK, AMPK(AMP-activated protein kinase), β -actin, phospho-JNK, TNF- α , NF- κ B, phospho-IKK β 를 사용하였다.

[0049] 음성 대조군에는 APP를 공급하지 않은 정상배지를 사용하였고, 양성대조군에는 APP를 공급한 배지를 사용하였고, 실험군에는 오스모틴(0.1~20 μ M)을 공급한 배지를 사용하였다.

[0050] 결과는 도 9 내지 도 11에 개시하였으며, 우선적으로 해마와 대뇌피질에서의 p-Tau(Ser413), p-Tau(Ser404), A β 올리고머, APP 및 BACE-1 단백질의 발현량이 현저하게 감소하는 것을 확인하였으며(도 9 및 도 10), 시냅스 기능을 향상시키는 단백질인 SNAP25 및 PSD95 단백질의 발현량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 11).

[0051] 또한, 오스모틴 펩티드 처리에 의해 AdipoR1, pAMPK 및 total-AMPK 단백질의 발현량이 증가하였고(도 12), pJNK, TNF- α , NF- κ B 및 p-IKK β 단백질의 발현량이 감소하였으며(도 13), p-PI3K 및 pAkt(Ser473) 단백질의 발현량이 증가한 것을 확인함으로써(도 14), 오스모틴 펩티드가 신경세포 내 신호 전달을 조절한다는 것을 알 수 있었다.

[0052] 실시예 6. 행동분석

[0053] 1) 모델동물 및 약물 처리

[0054] 본 발명의 유효성분인 오스모틴 펩티드의 처리에 따른 행동분석을 확인하기 위하여, 수컷 C57BL/6J 야생형 마우스와 이중형질전환(double transgenic) B6.Cg-Tg (APP^{swe}, PSEN^{dE9})85Dbo/Mmjax (APP/PS1) AD-모델 마우스를 잭슨 실험실(Bar Harbor, ME, USA)로부터 구입하였다. 상기 이중형질전환 마우스는 뇌에 스웨디쉬 돌연변이(Swedish mutation)를 포함하는 마우스-인간 융합 아밀로이드 전구체 단백질(chimeric mouse-human amyloid precursor protein, Mo/HuAPP695^{swe})뿐만 아니라 돌연변이체 인간 프레세닐린 1 단백질(mutant human presenilin 1 protein, PS1-dE9)도 발현하는 것이며, 구입 후, 상기 마우스는 12h/12h 명암주기로 23 $^{\circ}$ C, 60 $\pm$ 10%의 상대 습도 조건 하에서 대학의 동물 사육장에서 음식과 물을 무제한으로 공급하여 사육하였다. 상기 마우스가 10개월령에 도달했을 때, 순화를 위해 1주일 동안 주사 및 행동관찰실로 옮겨졌으며, 마우스 유지 관리 및 처리는 한국 경상대학교 생물학과 응용 생명과학부에서 발행된 동물윤리위원회(IACUC)의 지침에 따라 수행하였다. 본 발명에서는 한국경상대학교 생물학과 응용생명과학부의 동물윤리위원회(IACUC)에서 승인한 지침(승인 ID: 125)에 따라 마우스 실험을 수행하였다.

[0055] 본 발명의 실시예 6에서 사용된 동물은 하기와 같이 그룹화되었다.

[0056] 1) 정상군: 야생형(WT) 군(group)으로 본 발명의 오스모틴 펩티드를 처리하지 않은 군

[0057] 2) APP/PS1 형질전환된 군으로 본 발명의 오스모틴 펩티드를 처리하지 않은 군

[0058] 3) APP/PS1가 형질전환된 군에 본 발명의 유효성분인 오스모틴 펩티드를 처리한 군 및

[0059] 4) 야생형 군에 본 발명의 유효성분인 오스모틴 펩티드를 처리한 군

[0060] 본 발명의 오스모틴 펩티드는 이중 탈이온 증류수(bi-deionised distilled water)에 용해시켰고, 최종적으로 생리식염수에 제조하여 투여하였다. 본 발명의 오스모틴 펩티드는 체중에 따라 APP/PS1 및 야생형(WT) 마우스에 5mg/kg/일의 용량으로 45일 동안 복강 내(i.p.) 투여하였다. 야생형 마우스 및 APP/PS1 형질전환된 마우스는 동일한 부피의 생리식염수가 처리되었으며, 행동분석 후, 상기 실험 동물들은 추가의 생화학적 및 면역조직화학적 분석을 위해 희생되었다.

[0061] 본 실시예 6의 행동 분석(Behavioral study)은 그룹당 13마리의 마우스를 이용하여 모리스 수중미로(Morris water maze; MWM) 시험 및 Y-미로 시험을 이용하여 수행하였다.

[0062] 1) 모리스 수중 미로 시험

[0063] 모리스 수중 미로 시험 장치는 흰색 잉크를 첨가하여 불투명해진 15.5cm 깊이의 물(수온 $23 \pm 1^\circ\text{C}$)이 담긴 직경 100cm, 높이 40cm의 원형수조로 구성하였다. 투명한 탈출 플랫폼(직경 10cm, 높이 20cm)은 수면 1cm 아래에 숨겨져 있고, 사분면 중 하나의 중앙에 위치하도록 하였다. 각 마우스는 회전하며 시작하는 세 사분면(three quadrants of rotational starting)과 한 사분면에 숨겨진 하나의 플랫폼을 이용하여 5일 동안 연속적으로 매일 훈련 받았다. 수중 미로로부터 탈출하는 지연시간(숨겨진 탈출 플랫폼을 찾는 시간)은 매 시도마다 계산되었다. 5일째의 24시간 후에, 기억 강화 평가를 위해 프로브(probe) 실험을 수행하였다. 프로브 실험은 플랫폼을 제거하고, 각 마우스가 60초 동안 자유롭게 수영하도록 허용하였으며, 목표 사분면에서 마우스가 소모한 시간 및 지나친 플랫폼 위치(숨겨진 플랫폼 훈련 동안 플랫폼이 위치했던 곳)의 수를 측정하였다. 목표 사분면에서 소모한 시간은 기억 강화의 정도를 나타내는 것으로 기준하였다. 모든 데이터는 비디오-추적 소프트웨어(SMART, Panlab Harward Apparatus, Bioscience Company, Holliston, MA, USA)를 사용하여 기록하였다.

[0064] 결과는 도 15에 개시한 바와 같이, 수중 미로로부터 탈출하는 지연시간(숨겨진 탈출 플랫폼을 찾는 시간)인 잠재기(Latency)가 정상 마우스에서는 5일 동안 훈련에 의해 잠재기 시간이 매우 감소하여, 20초 이내이지만, APP/PS1 모델 마우스에서는 약 45초 정도라는 것을 확인할 수 있고, 본 발명의 아디포넥틴 수용체 활성화 오스모틴 펩티드가 처리된 APP/PS1 모델 마우스에서는 잠재기 시간이 약 33초까지 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 15A). 또한, 프로브 실험결과에서도 정상 마우스에 비해 APP/PS1 모델 마우스에서 플랫폼이 위치했던 곳에 머무르는 수가 현저하게 감소하는 경향을 확인하였고, 상기 APP/PS1 모델 마우스에 오스모틴 펩티드를 처리한 경우, 플랫폼이 위치했던 곳에 머무르는 수가 APP/PS1 모델 마우스에 비해 증가함을 확인할 수 있었다(도 15B). 정상 마우스에 비해 APP/PS1 모델 마우스에서 목표 사분면에서 보내는 시간이 현저하게 감소하였으나, 본 발명의 유효성분인 오스모틴 펩티드를 처리한 마우스에서는 목표 사분면에서 보내는 시간이 정상 마우스와 거의 비슷한 수준으로 증가한 것을 확인하였다(도 15C).

[0065] 2) Y-미로 시험

[0066] Y-미로는 검은색 페인트칠 된 나무로 제작하였고, 상기 Y-미로의 각 가지 (arm)는 50cm의 길이, 20cm의 높이 및 10cm의 바닥과 상단의 폭으로 이루어진 것이다. 각 마우스는 미로 장치의 중앙에 위치시켰고, 3회 8분 회기동안 미로를 자유롭게 이동할 수 있도록 하였다. 미로 가지로의 연속적 입장(series of arm entries)을 육안으로 관찰하였다. 자발적 변경(Spontaneous alteration)은 중복적 3중 세트 (overlapping triplet sets)에서 3개의 다른 가지에 마우스가 차례로 들어간 경우로 정의하였다.

[0067] 변경 행동 비율(%)은 [중복적인 3중 세트(3개의 다른 가지에 연속적으로 입장한 경우)/총 입장-2] $\times$ 100으로 계산하였다. 높은 자발적 변경 행동 비율은 기억 기능이 향상된 것으로 간주하였다.

[0068] Y-미로 실험결과, 도 15D에 개시한 바와 같이 정상 마우스에 비해 APP/PS1 모델 마우스에서 자발적 변경 (spontaneous alteration)이 줄어들고, 오스모틴 펩티드의 처리에 의해 회복됨을 확인할 수 있었다.

[0069] APP 모델 마우스의 행동분석으로부터 본 발명의 오스모틴 펩티드의 처리가 인지 또는 기억 등을 향상시키는 것으로 판단하였다.

[0070] 실시예 7. *In vitro* 전기생리학 분석(LTP; Long Term Potentiation)

[0071] 본 실시예 7에서는 *In vitro* 전기생리학 분석을 위하여, E19 Sprague-Dawley 쥐(Rat)로부터 분리한 일차 해마 뉴런을 150 세포/mm^2 의 밀도까지 배양하였다. 기존의 전세포 기술(whole-cell techniques)을 사용하여 AMPA 수용기(AMPA)가 매개된 소형 흥분성 시냅스 후전류(miniature excitatory postsynaptic currents, mEPSCs)를 기록하였다. 내부용액(internal solution)으로 채워졌을 때, 전극 저항은 3~5 MΩ까지 다양하였다.

[0072] 본 실시예 7에서는 Axopatch 200A 패치-클램프 증폭기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 전류를 측정하였다.

[0073] 막 전압과 전류의 전압, 코멘드 및 디지털화는 IBM-호환 컴퓨터 상의 pClamp 소프트웨어 패키지의 Clampex 9.2(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)와 접속된 Digidata 1322A를 이용하여 조절하였으며, Clampfit(Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 및 Prism 4.0(GraphPad, San Diego, CA)을 이용하여 데이터를 분석하였고, 증폭기의 4극 베셀 필터(four-pole Bessel filter)를 이용하여 2kHz에서 전류를 저역(low-pass) 필터

터링하였다.

[0074] AMPAR-mEPSCs는 1mM의 테트로도톡신을 첨가하고, 본 발명의 내부 및 외부 용액 배치에서 Cl^- 평형 전위 (equilibrium potential)인 막 전위 -70mV를 유지하여 전기 생리학적으로 분리하였다. 세포 내 기록 용액(패치 전극)은 125mM의 Cs 메탄술포네이트, 8mM NaCl, 10mM HEPES, 0.5mM EGTA, 4mM Mg-ATP, 0.3mM Na-GTP 및 5mM QX-315 Cl (pH 7.25, CsOH로 적정, 285mosmol⁻¹)을 포함하였다. 세포 외 기록 용액은 134mM NaCl, 5.4mM KCl, 2.5mM CaCl₂, 1.2mM MgCl₂, 10mM D-글루코오스 및 10mM HEPES(pH 7.4, NaOH로 적정)을 포함하였다. 각 세포에 대해, 데이터는 2kHz에서 필터링되었고, Clampfit 9.0 소프트웨어(Molecular Devices, Union City, CA)에서 시행된 주형-기반 소형 시냅스 전류 검출 알고리즘(template-based miniature synaptic current detection algorithms)을 사용하여 분석되었다. 소프트웨어로 검출된 각각의 추정 mEPSC는 시각적으로 이의 일반적인 형태가 시냅스 현상에 대해 예상된 것과 같은지 여부를 기반으로 받아들여지거나 거절되었다. 상승 시간 기준 (rise time criteria)에 맞는 300개의 연속적인 mEPSC가 각 세포에서 분석되었다. AMPAR 매개 EPSC 진폭(amplitude)은 -70mV에서 전류의 정점에서 측정되었다(도 16).

[0075] mEPSCs의 누적 확률 커브(cumulative probability curves)는 Clampfit 9.0 소프트웨어 및 Prism 4.0(GraphPad, San Diego, CA)으로 계산되었다. 도 16에 개시한 바와 같이, 본 실시예 7에서의 Aβ 군은 정상군(Vehicle)에 비해 frequency(Hz)가 현저하게 감소하였으며, 감소된 frequency(Hz)가 오스모틴 펩티드의 처리에 의해 증진된 효과가 통계적으로 유의하게 나타났다. 본 발명자는 두 그룹의 비교를 위해 Student's *t*-검정을 사용하였다. 차이는 $p < 0.05$ 에서 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0076] 실시예 8. *In vivo* 전기생리학 및 LTP(Long Term Potentiation) 분석

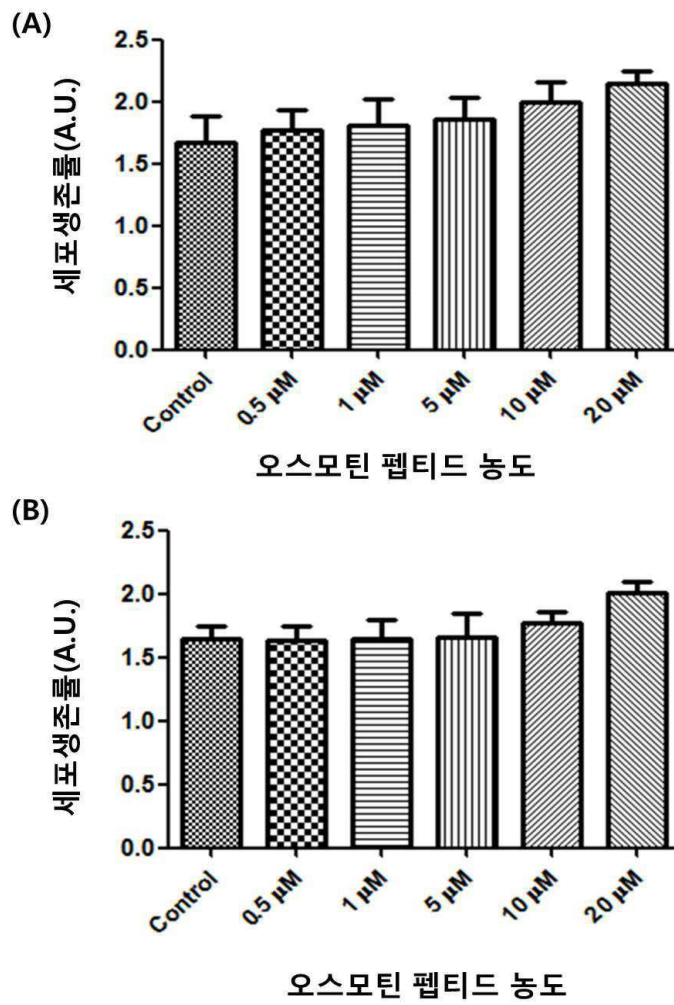
[0077] 해마 절편(400 μm 두께)에서 횡단 새피 결가지(schaffer collateral, SC) 입력(input)으로부터 CA1 회로를 조사하기 위해, 해마 절편을 성체 마우스로부터 준비하였다. 간단하게는, 마우스를 아이소플루레인(isoflurane)으로 마취한 후, 뇌를 빙냉 수크로스-인공 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF)을 이용한 경심관류(transcardiac perfusion)로 신속하게 냉각시켰다. 상기 뇌를 제거한 후, 빙냉 수크로스-인공 CSF에 보관하였다. 관상(coronal) 절편을 35℃의 인공 CSF에서 30분 동안 배양하고, 기록 챔버로 옮겨지기 전에 1~4시간 동안 상온(23~25℃)의 인공 CSF에서 배양하였다. 상기 표준 인공 CSF는 95% O₂ 및 5% CO₂로 포화된 119mM NaCl, 2.5mM KCl, 2.5mM CaCl₂, 1.3mM MgSO₄, 1.0mM NaH₂PO₄, 26.2mM NaH₂CO₃, 11mM 글루코오스, 1mM Na 피루빈산, 0.4mM Na 아스코르브산을 포함하는 것이고, 수크로스-인공 CSF는 95% O₂ 및 5% CO₂로 포화된 198mM 수크로스, 2.5mM KCl, 1mM NaH₂PO₄, 26.2mM NaHCO₃, 11mM 글루코오스, 1mM Na 피루빈산, 0.4mM Na 아스코르브산을 포함하는 것이다.

[0078] LTP 실험은 27~29℃에서 수행되었다. 전기생리학적 실험을 위해, 3~6MΩ 피펫 저항성을 갖는 전극이 사용되었고, 전세포 기록(whole-cell recordings)은 적외선 (IR)-차동 간섭 대비(differential interference contrast, DIC) 광학 지침을 이용하여 시각적 지도 하에서 뉴런으로부터 획득되었다. CA3 및 DG 영역은 CA1 병변을 분리하기 위하여 LTP(장기 강화현상, long-term potentiation) 실험을 시작하기 직전에 절단되었다. 자극은 기록된 세포의 소마(soma)로부터 100~200μm에 위치한 집중 양극성 전극(concentric bipolar electrode)을 사용한 새피-결가지(SC) 경로에 적용되었다. 전세포 기록 용액은 하기와 같다: 135mM Cs 메탄술포네이트, 8mM NaCl, 10mM HEPES, 0.5mM EGTA, 4mM Mg-ATP, 0.3mM Na-GTP 및 5mM QX-315 Cl(pH 7.25, CsOH로 적정, 285 mOsm). 달리 표시되지 않는 한 세포는 기록하는 동안 -70 mV에서 유지되었다. 기록은 10kHz에서 디지털화되고, 2kHz에서 필터링되는 multiclamp 700B(Molecular devices, Sunnyvale, CA)를 사용하여 만들어졌다. 입력 저항 및 직렬 저항(series resistance)은 기록하는 동안 계속 관찰되었다. 모든 EPSC 실험의 시험 자극은 0.1Hz로 설정되었고, 0.2ms의 지속시간 및 이의 강도 (100~900 μA)는 -70mV의 유지 전위로 50~100pA까지 EPSC(excitatory postsynaptic current) 진폭을 유도하기 위해 조정되었다. LTP 실험에서는 접합 자극(pairing stimuli, 2Hz, 2분 자극 및 0mV까지 시냅스 후 탈분극)을 적용하기 전 기준선(baseline) EPSCs가 3분 동안 측정되었다. 접합 자극(2Hz, 2분 자극 및 0mV까지 시냅스 후 탈분극) 후, EPSCs는 30분 동안 매 10분마다 수집되었다.

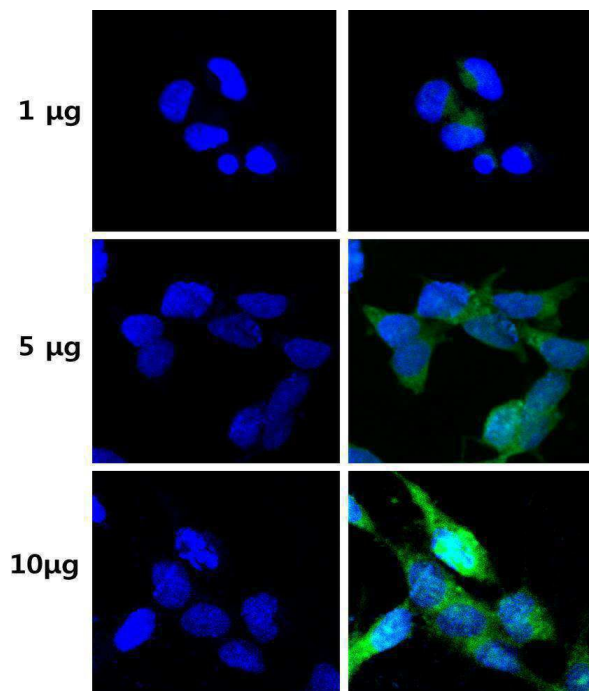
[0079] 결과는, 도 17에 개시한 바와 같이 정상(Normal) 군에서는 접합 자극의 입력에 의해 시냅스 전달이 장기적으로 증강되지만, APP/PS1 모델군에서는 EPSC 증강이 통계적으로 유의하게 감소하였고, 이에 대비하여 APP/PS1 모델군에 아디포넥틴 수용체 활성화 오스모틴 펩티드를 처리한 실험군에서는 정상군과 비교하여 거의 동일한 수준으로 EPSC 증강을 확인하였다.

도면

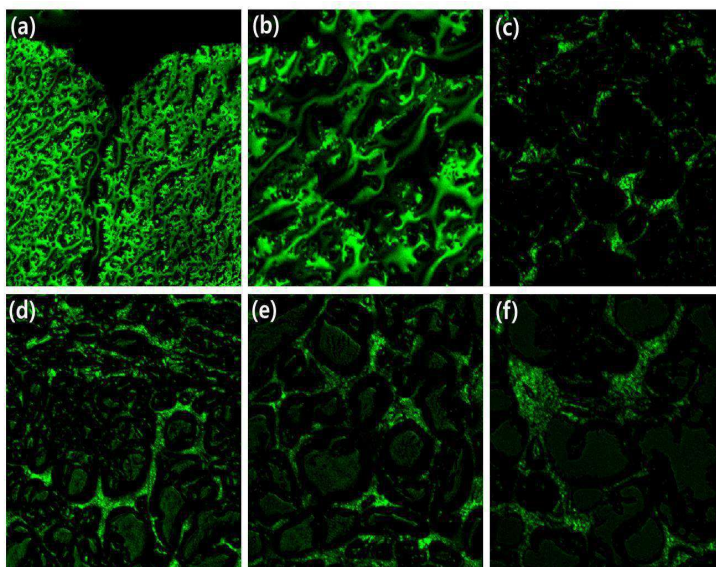
도면1



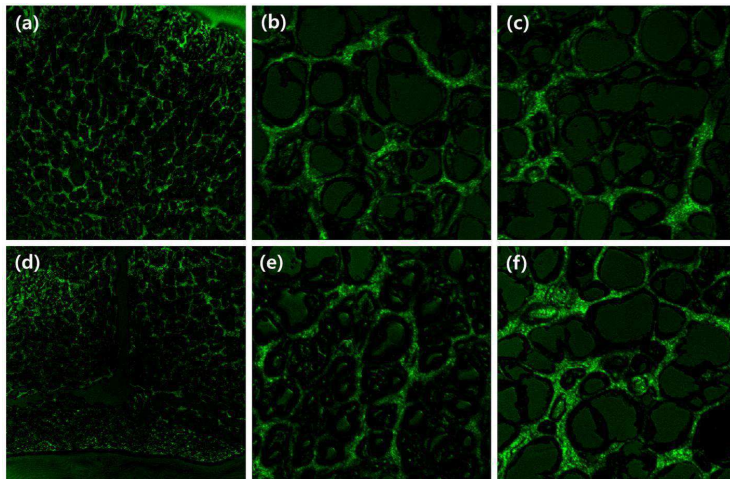
도면2



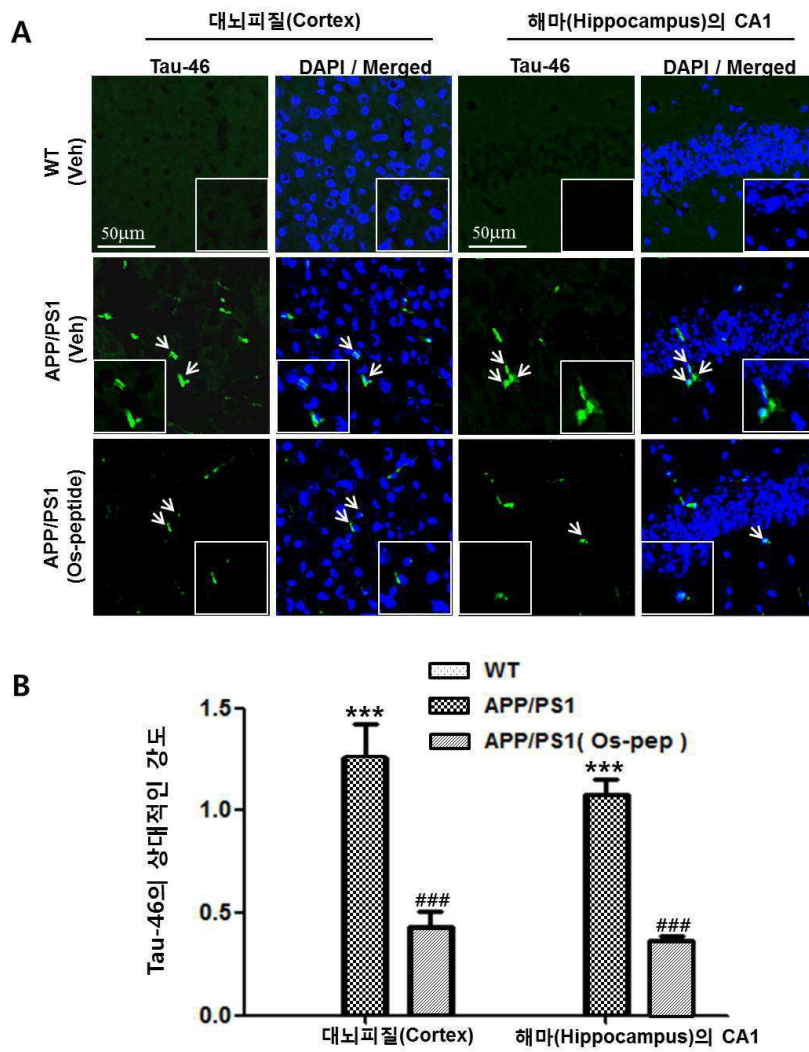
도면3



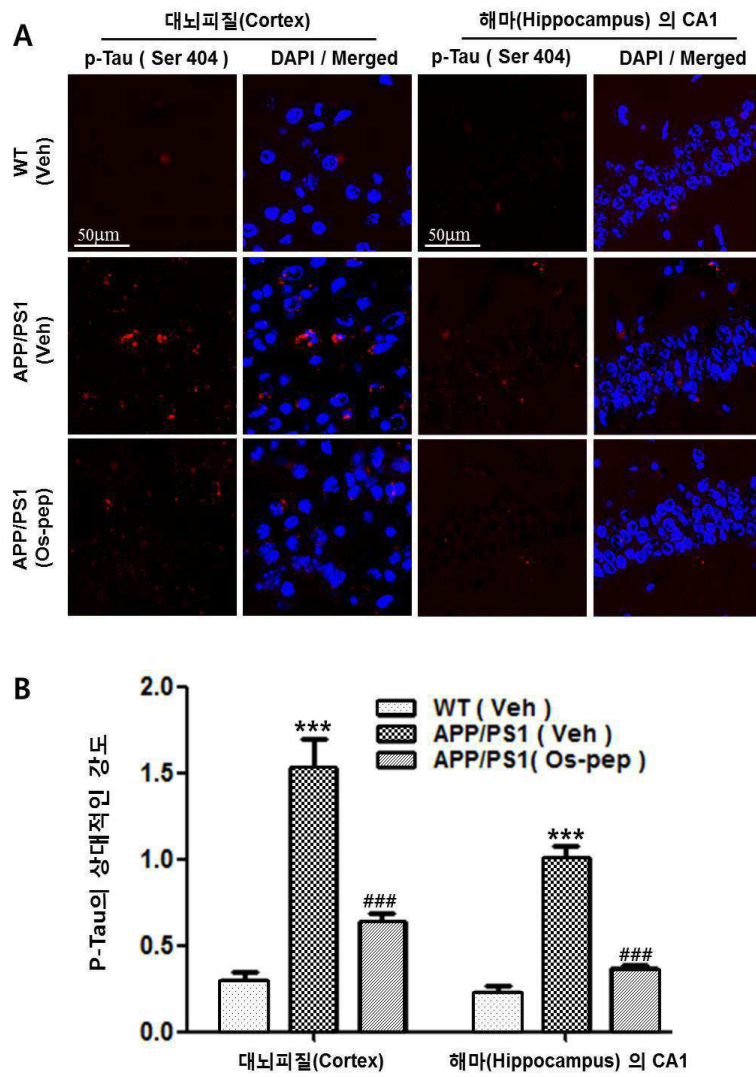
도면4



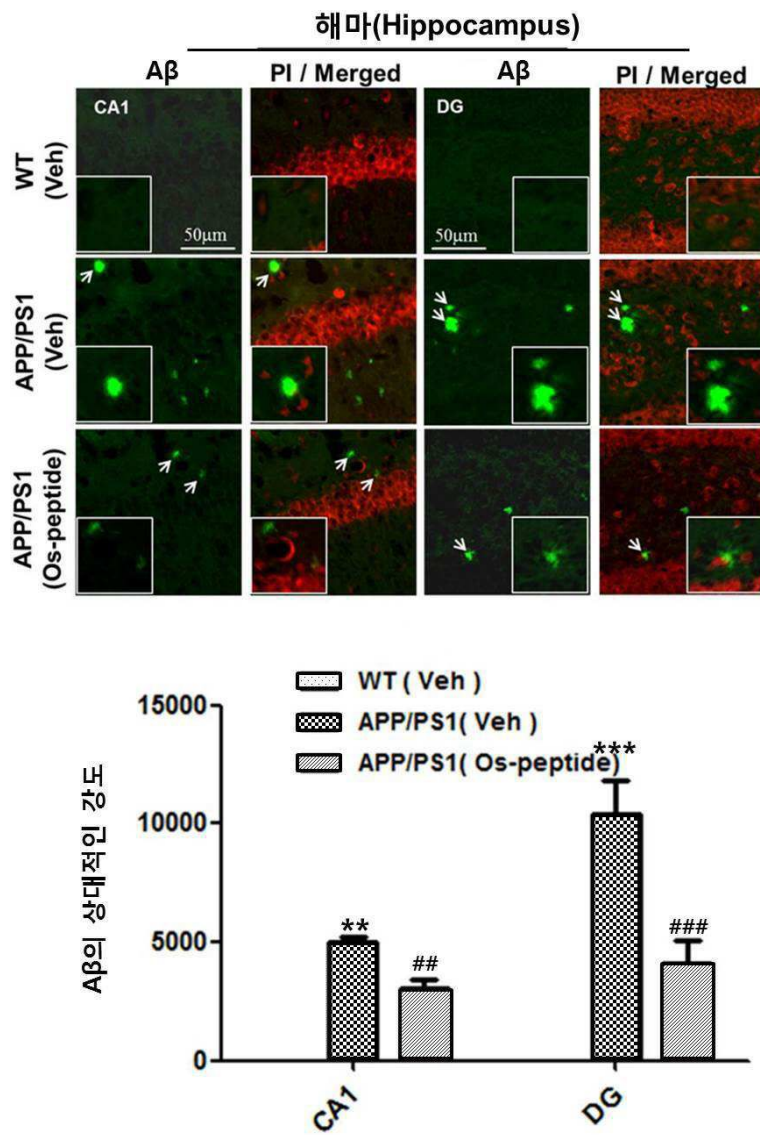
도면5



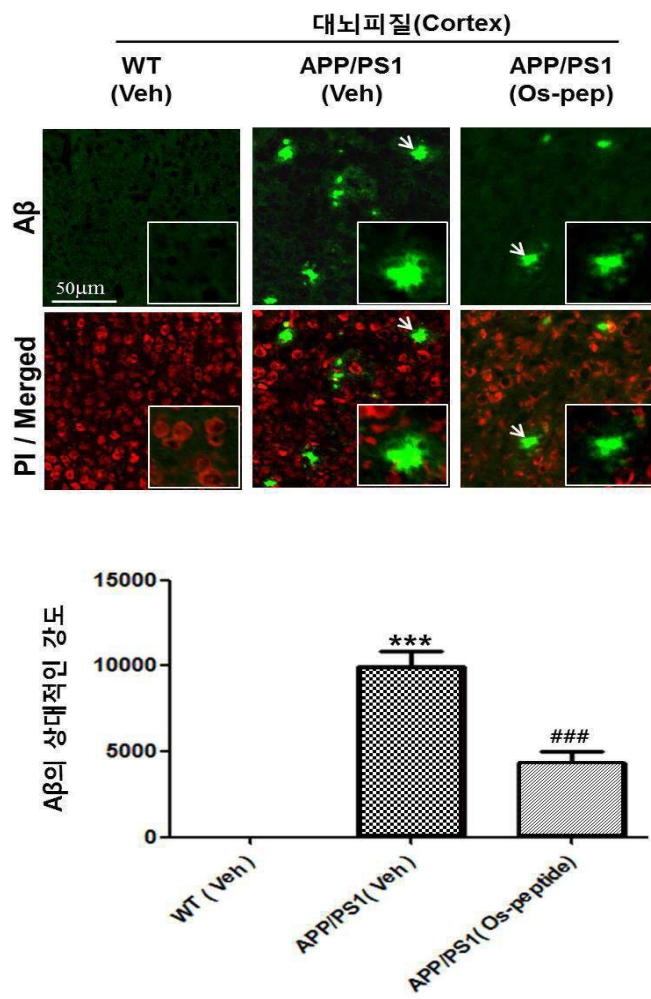
도면6



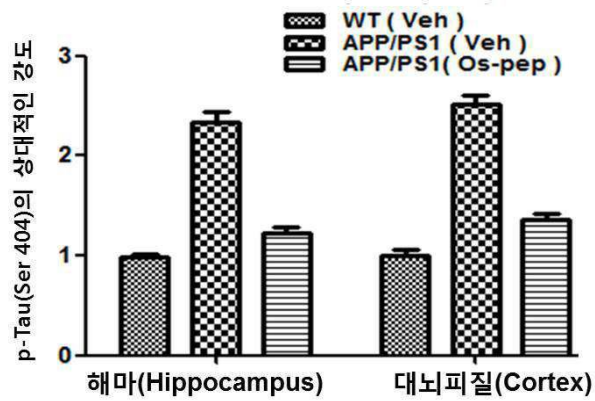
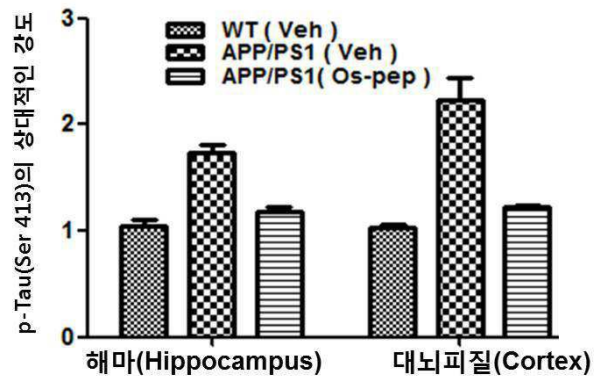
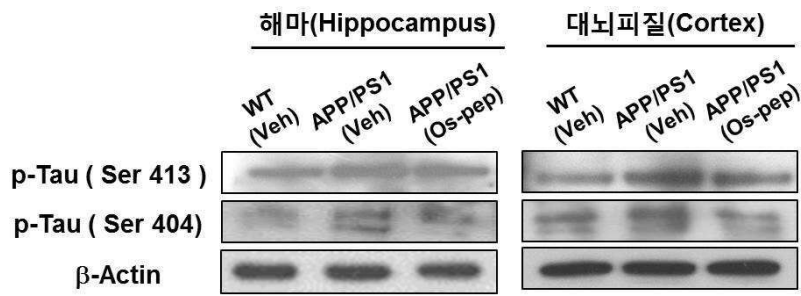
도면7



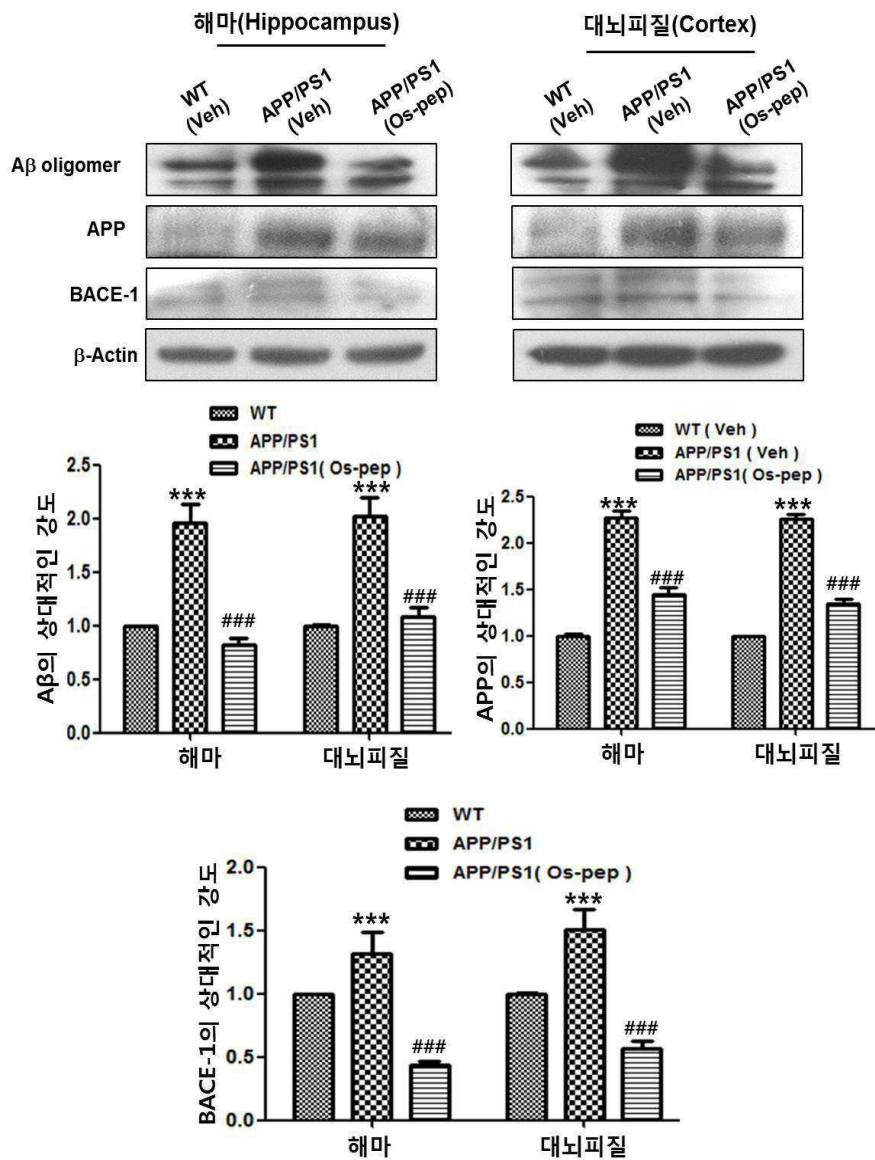
도면8



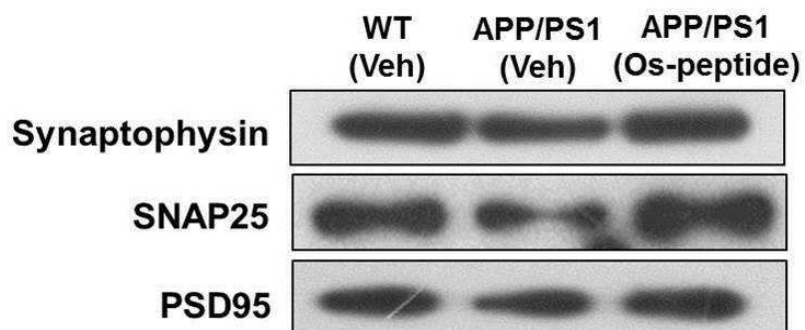
도면9



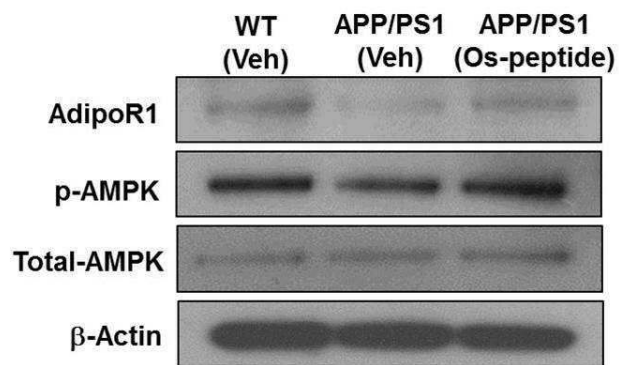
도면10



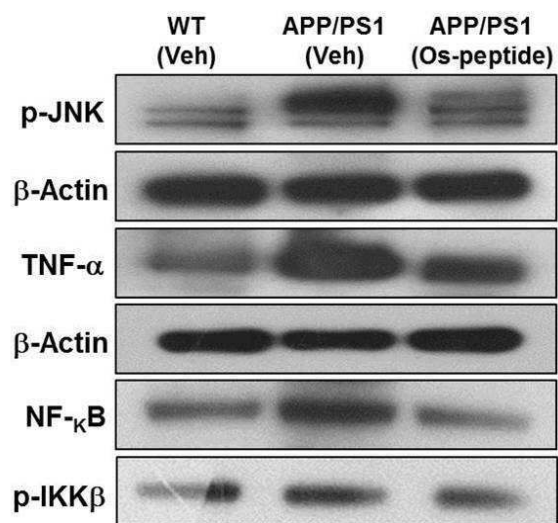
도면11



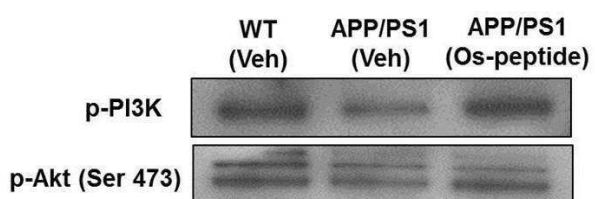
도면12



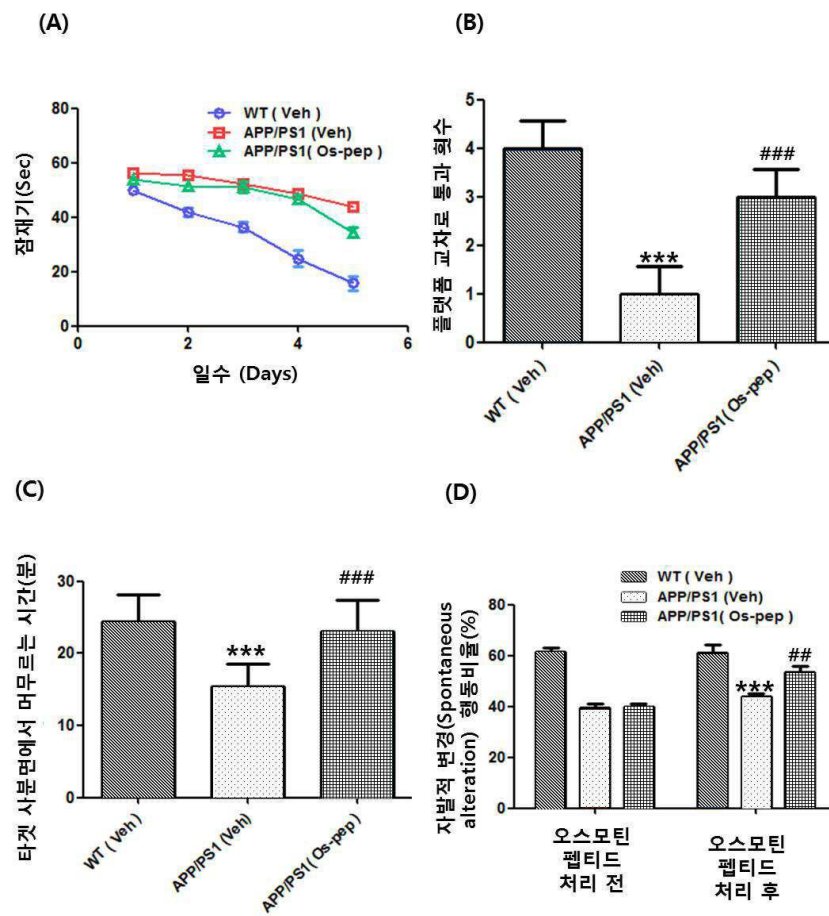
도면13



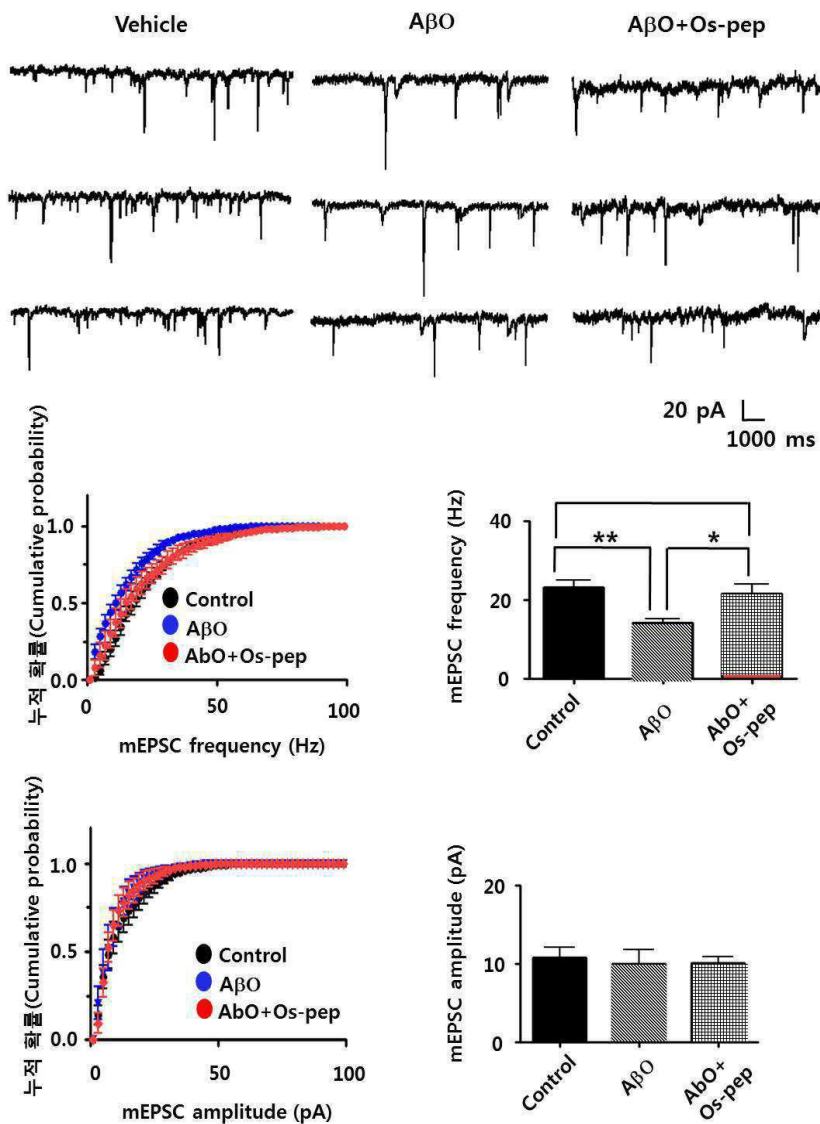
도면14



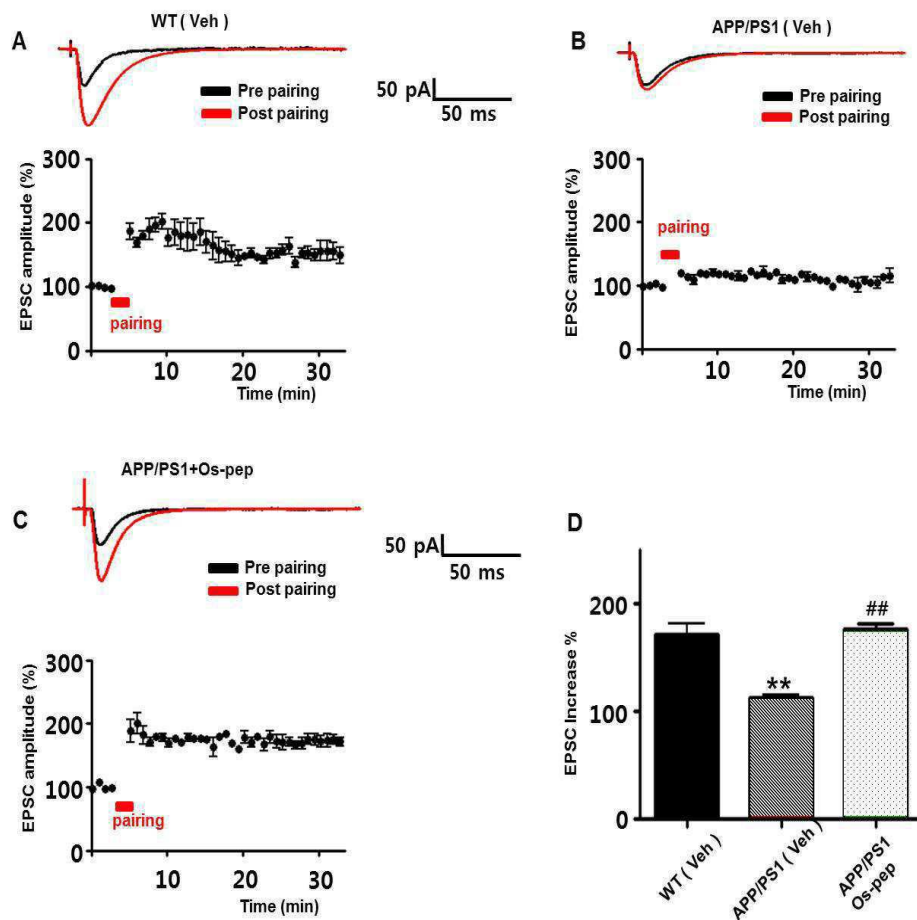
도면15



도면16



도면17



서열목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Composition for preventing, improving or treating
neurodegenerative disorder comprising osmotin peptide as
effective component

<130> PN16021

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 1

Cys Thr Gln Gly Pro Cys Gly Pro Thr

1

5