(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0055666
(43) 공개일자 2015년05월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/39 (2006.01) *A61K 38/38* (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0137694
(22) 출원일자 2013년11월13일
심사청구일자 2013년11월13일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
남명수
대전광역시 유성구 지족동 열매마을4단지아파트 102동 402호
유재민
충북 제천시 장락로 62, 101동 11-2호 (장락동, 장락e-편한세상)
(74) 대리인
백경업

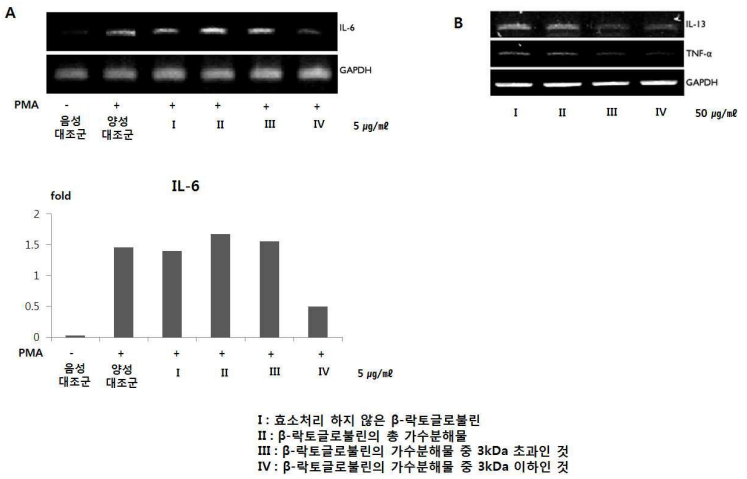
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **알칼라아제를 이용한 유청 단백질의 가수분해물을 함유하는 아토피 피부염 또는 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 알칼라아제를 이용한 유청 단백질의 가수분해물을 함유하는 아토피 피부염 또는 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상기 유청 단백질의 가수분해물 중 분자량 3kDa 이하인 것을 선택적으로 추출한 가수분해물이 특히 IL-6, TNF-α 및 IL-13의 발현 억제 효과가 우수하여, 아토피 피부염 또는 알레르기 질환의 치료용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



I : 효소처리 하지 않은 β-락토글로불린
II : β-락토글로불린의 총 가수분해물
III : β-락토글로불린의 가수분해물 중 3kDa 초과인 것
IV : β-락토글로불린의 가수분해물 중 3kDa 이하인 것

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ907176032013
부처명 농림부
연구관리전문기관 충남대학교 산학협력단
연구사업명 FTA 대응 경쟁력 향상 기술개발
연구과제명 유청단백질의 분리기술 및 면역활성 기능연구
기 여 율 1/1
주관기관 국립축산과학원
연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

β-락토글로불린(β-lactoglobulin, β-LG) 및 소혈청알부민(Bovine Serum Albumin, BSA) 중 1종 이상의 유청 단백질에 알칼라아제(alcalase)를 처리하여 얻은 가수분해물을 함유하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 또는 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 가수분해물은 분자량 3kDa 이하인 것만 선택적으로 추출한 가수분해물인 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 또는 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 알레르기 질환은 아나필락시스 쇼크, 식품 알레르기, 알레르기성 비염, 화분증, 기관지천식, 약제 알레르기, 식물 알레르기, 두드러기, 습진 및 알레르기성 접촉성 피부염에서 선택되는 질환인 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 또는 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

β-락토글로불린(β-lactoglobulin, β-LG) 및 소혈청알부민(Bovine Serum Albumin, BSA) 중 1종 이상의 유청 단백질에 알칼라아제(alcalase)를 처리하여 얻은 가수분해물을 함유하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 또는 알레르기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 가수분해물은 분자량 3kDa 이하인 것만 선택적으로 추출한 가수분해물인 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 또는 알레르기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서,

상기 알레르기 질환은 아나필락시스 쇼크, 식품 알레르기, 알레르기성 비염, 화분증, 기관지천식, 약제 알레르기, 식물 알레르기, 두드러기, 습진 및 알레르기성 접촉성 피부염에서 선택되는 질환인 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 또는 알레르기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 알칼라아제(alcalase)를 이용한 유청 단백질의 가수분해물을 함유하는 아토피 피부염 또는 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 우유는 건강에 유익한 효과를 나타내는 기능성 식품이며(Gill *et al.*, 2000), 기능성 식품과 건강음료의 첨가제로서의 가치가 있는 것으로 알려져 있다(Huth *et al.*, 2004). 또한 우유에 함유된 유청 단백질은 대사활동에서

폭 넓게 생리활성 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 유청은 치즈제조공정에서 얻어지는 부산물로 버려지는 산물로 여겨졌지만, 근래에 영양학적으로 응용가치를 높일 수 있는 기능성 식품으로서 재발견되면서 이에 대한 연구가 급증하고 있다(Walzem *et al.*, 2002).

[0003] 유청(whey)은 우유를 치즈로 가공할 때 형성되는 부산물이다. 우유에는 수분, 단백질, 지방, 탄수화물, 무기질, 비타민, 효소 등이 포함되어 있다. 지방은 가장 중요한 성분이며 이것을 제외한 것을 탈지유라고 한다. 탈지유에 산 또는 응유효소를 첨가하면 응고물이 생기는데 이것을 응유(curd)라 하며 우유의 주단백질인 카세인이 주성분이다. 응유를 제외한 수용액을 유청이라 하고 전 단백질의 20%를 포함한다. 유청에는 유당, 무기질, 각종 유청 단백질 등이 포함되어 있다. 유청에 포함된 유청 단백질은 β-락토글로불린(β-lactoglobulin), α-락타알부민(α-lactalbumin), BSA(bovine serum albumin), 락토페린(lactoferrin), 면역글로불린(immunoglobulin), 효소(enzyme), GMP(glycomacropeptide) 등이 있으며, 면역글로불린은 특히 초유에 다량 함유되어 있다. 유청은 다양한 필수아미노산을 함유하고 있으며, 면역 증진 효과가 있다고도 보고된 바 있다(Marshall, 2004).

[0004] 우유 단백질의 가수분해물에 대한 생리활성 기능연구는 많이 진행되어 왔는데 지금까지 가장 잘 알려진 것은 면역조절 펩티드로서 β-카세인(β-casein, f1-28) 유래 CPP(casein phosphopeptide)이다. CPP는 마우스 비장과 토끼 Peyer's patch 세포에서 세포분열물질 촉진제(mitogen)로서의 활성을 나타내고 IgA 생산을 활성화한다고 보고된 바 있다(Hata *et al.*, 1998). 또한 β-카세인 유래의 β-카소케모타이드-1(β-casochemotide-1)이라는 펩티드가 단핵구(monocyte)와 대식세포(macrophage)에서의 주화성을 높인다고 보고되기도 하였다(Kitazawa *et al.*, 2007).

[0005] 알레르기(allergy)는 어떤 외래성 물질과 접한 생체가 그 물질에 대하여 정상과는 다른 반응을 나타내는 현상으로서, 생물체(生物體)가 어떤 외래성 물질과 접하게 되면 항원항체반응(抗原抗體反應)에 의하여 생체 내에 급격한 반응 능력의 변화가 생기는데, 이를 알레르기라고 한다. 생체는 이종물질에 대해서는 그 항원(抗原)에 특이적으로 반응하는 항체(抗體)와 림프구를 생산하고 재차 항원과 접하면 여러 가지 면역반응을 일으킨다. 이 면역응답 또는 면역반응은 생체의 자기 보존을 위한 중요한 방어메커니즘의 하나인데, 보통 생체에 대해 보호적으로 작용하지만 때로는 이 메커니즘이 생체에 불리하게 작용하여 장애를 일으키는 경우가 있다. 알레르기는 "과민 반응"이라는 뜻이으로서, 그리스어 낱말 allos가 어원이며, 이는 "변형된 것"을 뜻한다. 알레르기라는 용어는 1906년 프랑스 학자 폰 피르케가 처음으로 사용하였다. 알러지 또는 앨러지는 영어 발음, 알레르기는 독일어식 발음으로 한국어에선 둘 다 혼용되어 통용된다. 알레르기 반응을 유발하는 항원은 알레르겐(allergen)이라고 하며, 전형적인 알레르겐은 꽃가루, 약물, 식물성 섬유, 세균, 음식물, 염색약, 화학물질 등이 있다. 면역계에는 항원에 대항하여 신체를 지키기 위한 몇 가지 방어 메커니즘이 있다. 이들 중 가장 많은 종류는 림프구로, 특정 항원에 반응하기 위해 특이화되어 있으며, B세포와 T세포가 이에 해당한다. B세포는 항원에 결합하여 항원을 파괴시키고 중화시키는 단백질인 항체를 생성한다. T세포는 항체를 생산하는 대신에 항원에 직접 결합하여 공격을 자극한다. 알레르기 반응은 즉시형 알레르기 또는 지연형 알레르기로 나타나는데, 항원이 B세포나 T세포 중 어느 세포와 반응하는지에 따라 결정된다. 알레르기로 인해 일어나는 질환에는 자가면역질환, 교원병 등을 포함하여 여러 가지 질환이 있으나, 일반적으로 알레르기성 질환이라고 하는 경우에는 고전적 알레르기성 질환인, 아나필락시스 쇼크, 식품 알레르기, 알레르기성 비염, 화분증, 기관지천식, 약제 알레르기, 식물 알레르기, 두드러기, 습진, 알레르기성 접촉성 피부염 등이 이에 해당된다. 이들은 알레르기가 병의 원인인 질환이지만 그 발증(發症)에는 그 밖의 생체측 조건이 필요한 경우도 있다. 또한 비(非)알레르기적 메커니즘에 의해서도 동일한 증상이 나타날 수 있다.

[0006] 아토피 피부염은 주로 유아기 혹은 소아기에 시작되는 만성적이고 재발성이 강한 염증성 피부질환으로 소양증(가려움증)과 피부건조증, 특징적인 습진을 동반한다. 유아기에는 얼굴과 팔다리의 펼쳐진 쪽 부분에 습진으로 시작되지만, 성장하면서 특징적으로 팔이 굽혀지는 부분과 무릎 뒤의 굽혀지는 부위에 습진의 형태로 나타나게 되며, 많은 경우에 성장하면서 자연히 호전되는 경향을 보인다. 어른의 경우 접히는 부위 피부가 두꺼워지는 태선화(lichenification)가 나타나고, 유소아기에 비해 얼굴에 습진이 생기는 경우가 많다. 아토피 피부염은 세계적으로 증가하는 추세이며 유병률이 인구의 20%라는 보고도 있다.

[0007] 한편, 본 발명자들은 치즈 제조시 생성되는 부산물인 유청 단백질 중에서, β-락토글로불린(β-lactoglobulin, β-LG) 또는 소혈청알부민(Bovine Serum Albumin, BSA)을 알칼라아제로 분해한 가수분해물이 아토피 피부염 또는 알레르기 질환 관련 사이토카인을 억제하는 효과가 있음을 확인하고, 상기 가수분해물이 아토피 피부염 또는 알레르기 질환의 치료제로 이용될 수 있음을 밝힘으로서, 본 발명을 완성할 수 있었다.

[0008] 유청 단백질을 효소분해한 가수분해물에 대해 분석된 선행문헌으로서, 효소가수분해에 의한 초유 유청으로부터

철-결합 펩티드(iron-binding peptide)의 생성에 관한 연구에서는 알칼라아제(alcalase)를 이용한 가수분해가 유청 단백질의 주요 성분들을 가수분해시킬 수 있음이 기재되어 있다. 여기에서 열처리된 초유 유청을 120분 동안 가수분해한 가수분해도는 알칼라아제(alcalase) 25.31%, 펩신(pepsin) 12.42%, 파파인(papain) 10.66%, 트립신(trypsin) 10.83%로 확인되고, 다른 단백질 분해효소에 비해 알칼라아제에 의한 유청 단백질의 가수분해가 우수하다고 보고된 바 있다(Smyth 및 Fitz-Gerald, 1998; Kim *et al.*, 2007). 이러한 선행기술에서는 기능성 식품들과 의약품 소재로서 유청 단백질 가수분해물이 산업적으로 응용 가능함을 제시하고 있다. 그러나, 상기 선행문헌들에서는 알칼라아제를 이용하여 유청 단백질을 가수분해하여 얻은 가수분해물이 항아토피 또는 항알레르기 효과가 있다는 것은 개시되어 있지 않다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009]

(비특허문헌 0001) Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML. 2000. Bovine milk : a unique source of immunomodulatory ingredients for functional foods. In Buttriss J, Saltmarsh M, eds. Functional Food II-Claims and Evidence. Cambridge, England: Royal Society of Chemistry Press pp. 82-90. Royal Society of Chemistry Press, Cambridge, England.

(비특허문헌 0002) Hata I, Higashiyama S, Otani H. 1998. identification of a phosphopeptide in bovine alpha s1-casein digest as a factor influencing proliferation and immunoglobulin production in lymphocyte cultures. J. Dairy Res. 65:569-578.

(비특허문헌 0003) Huth PJ, Layman DK, Brown PH. 2004. The emerging role of dairy proteins and bioactive peptides in nutrition and health. J. Nutr. 134: 961S.

(비특허문헌 0004) Kim SB, Ku MJ, Cho WM, Ki KS, Kim HS, Nam MS. 2010. Production of Iron-Binding Peptides from Colostral Whey by Enzymatic Hydrolysis. Kor. J. Animal Food Sci. Resour. 20: 566-577.

(비특허문헌 0005) Kim SB, Seo IS, Khan MA, Ki KS, Nam MS, Kim HS. 2007. Separation of iron-binding protein whey through enzymatic hydrolysis. Internat.Dairy J. 17: 625-631.

(비특허문헌 0006) Kitazawa H, Yonezawa K, Tohno M, Shimosato T, Kawai Y, saito T, Wang JM. 2007. Enzymatic digestion of the milk protein β-casein releases potent chemotactic peptide(s) for monocytes and macrophages. Inter. Immunopharmac. 7: 1150-1159.

(비특허문헌 0007) Kunitz M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. J. Gen. Physiol. 30: 291-297.

(비특허문헌 0008) Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

(비특허문헌 0009) Marshall K. 2004. Therapeutic applications of whey protein. Alternative Medicine Review. 9: 136-156.

(비특허문헌 0010) Smyth M, Fitz-Gerald RJ. 1998. Relationship between some characteristics of WPC hydrolysates and the enzyme complement in commercially available proteinase preparations. Internat. Dairy J. 8: 819-827.

(비특허문헌 0011) Walzem RL, Dillard CJ, German JB. 2002. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 42: 353-375.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010]

본 발명의 목적은 알칼라아제를 이용한 유청 단백질의 가수분해물을 함유하는 아토피 피부염 또는 알레르기 질

환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 β-락토글로불린(β-lactoglobulin, β-LG) 및 소혈청알부민(Bovine Serum Albumin, BSA) 중 1종 이상의 유청 단백질에 알칼라아제(alcalase)를 처리하여 얻은 가수분해물을 함유하는 아토피 피부염 또는 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0012] 상기 가수분해물은 분자량 3kDa 이하인 것만 선택적으로 추출한 가수분해물일 수 있다.

[0013] 상기 알레르기 질환은 아나필락시스 쇼크, 식품 알레르기, 알레르기성 비염, 화분증, 기관지천식, 약제 알레르기, 식물 알레르기, 두드러기, 습진 및 알레르기성 접촉성 피부염에서 선택되는 질환일 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명은 알칼라아제(alcalase)를 이용한 β-락토글로불린(β-lactoglobulin, β-LG) 및 소혈청알부민(Bovine Serum Albumin, BSA)에서 선택되는 1종 이상의 유청 단백질의 가수분해물을 함유하는 아토피 피부염 또는 알레르기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0015] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0016] 본 발명은 알칼라아제를 이용한 유청 단백질의 가수분해물을 함유하는 아토피 피부염 또는 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 알칼라아제를 이용한 유청 단백질의 가수분해물을 포함하는 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 알칼라아제를 이용한 유청 단백질의 가수분해물을 함유하는 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 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. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0017] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01㎎/㎏/일 내지 대략 2000㎎/㎏/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 1㎎/㎏/일 내지 500㎎/㎏/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0018] 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0019] 또한, 본 발명은 알칼라아제를 이용한 유청 단백질의 가수분해물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 아토피 피부염 또는 알레르기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다. 상기 알칼라아제를 이용한 유청 단백질의 가수분해물은 본 발명의 건강기능식품에 0.001~100 중량%로 하여 첨가될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성식품류 등이 있다.

발명의 효과

[0020] 본 발명은 알칼라아제를 이용한 유청 단백질의 가수분해물을 함유하는 아토피 피부염 또는 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상기 유청 단백질의 가수분해물 중 분자량 3kDa 이하인 것을 선택적으로 추출한 가수분해물이 특히 IL-6, TNF-α 및 IL-13의 발현 억제 효과가 우수하여, 아토피 피부염 또는 알레르기 질환의 치료용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 β-락토글로불린, BSA 및 이들을 실시예 1에서 알칼라아제로 가수분해한 것(총 가수분해물)의 HPLC 분석 결과이다.

도 2A 및 도 2B의 그림들은 β-락토글로불린, 이를 실시예 1에서 알칼라아제로 가수분해한 것(총 가수분해물), 상기 총가수분해물을 3kDa 초과 또는 이하인 것으로 분리정제한 것들의 아토피 피부염 또는 알레르기 질환 관련 사이토카인의 발현을 분석한 RT-PCR 결과이며, 도 2A 하단의 그래프는 이를 수치화한 결과이다.

도 3의 왼쪽 그림은 BSA, 이를 실시예 1에서 알칼라아제로 가수분해한 것(총 가수분해물), 상기 총 가수분해물을 3kDa 초과 또는 이하인 것으로 분리정제한 것들의 아토피 피부염 또는 알레르기 질환 관련 사이토카인의 발현을 분석한 RT-PCR 결과이며, 오른쪽의 그래프는 이를 수치화한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0023] **<실시예 1. 알칼라아제를 이용한 β-락토글로불린 또는 BSA의 가수분해물 제조>**

[0024] 0.5M NaOH을 사용하여 β-락토글로불린(시그마, L3908) 또는 BSA(시그마, A7906)을 증류수에 20mg/mℓ 농도로 β-락토글로불린 용액 또는 BSA 용액을 제조하여 각각의 pH를 8.0으로 조정하였다. 알칼라아제(시그마, A30079)를 증류수에 1%(w/v)로 녹여 알칼라아제 용액 상태로 만들고, 상기 알칼라아제 용액과 상기 β-락토글로불린 용액 또는 BSA 용액(기질) 각각을 1:100의 부피비로 혼합하였다. 각 단백질 용액의 효소반응(가수분해)은 40℃에서 시간별로(5, 60, 120, 240분) 수행하였고, 효소반응을 마친 후에는 90℃에서 10분간 가열하여 효소활성을 실활시켰으며, 상등액을 β-락토글로불린 또는 BSA의 총 가수분해물로 취하였고 침전물은 버렸다. 한편, 상기 가수분해물의 일부를 분자량 3kDa 용 비바스핀 농축기 20(Vivaspin concentrator 20, GE Healthcare, Sweden)을 이용하여 3kDa 초과하는 것과 3kDa 이하인 것으로 선택적으로 분리추출하였다. 상기 β-락토글로불린 또는 BSA의 가수분해물들은 모두 동결건조하여 보관하였다.

[0025] **<실시예 2. HPLC를 이용한 유청 단백질의 알칼라아제의 가수분해물의 분석>**

[0026] 하기 조건을 이용하여 β-락토글로불린, BSA 및 실시예 1에서 얻은 이들의 알칼라아제 총 가수분해물(180분 반응)의 HPLC를 수행하였다. 알칼라아제에 의한 가수분해물의 HPLC 결과는 도 1에 나타내었다. HPLC 기기는 RP-HPLC 시스템(Waters 2487 Dural Dector, 600 Controller, 2410 Refractive index Detector, Milford, MA, USA)으로 분석하였다.

[0027] Column : protein C18 (4.6×250㎜, Vydac, Hesperia, CA. U.S.A)

[0028] Flow rate : 1mℓ/min

[0029] Elution solution : solution A - 0.1% of TFA in distilled water

[0030] solution B - 0.1% of TFA in acetonitrile

[0031] Elution condition : linear gradient

[0032] Elution time : 40min

[0033] Infection volume : 20㎕ of sample, concentrated 5 times in freezing drying machine

[0034] Absorbance of the elute column : 214nm

[0035] 도 1을 참고하면, β-락토글로불린 및 BSA를 180분 동안 가수분해시킨 가수분해물은 대조구에 비해 여러 종류의 피크(peak)가 나타남으로써 분자량이 작은 펩티드가 많이 생성되었음을 알 수 있다.

[0036] **<실시예 3. 유청 단백질 가수분해물의 알레르기 또는 아토피 관련 사이토카인의 억제 효과 확인>**

[0037] 유청 단백질이 알러지와 관련된 싸이토카인의 분비에 미치는 영향을 비만세포인 RBL-2H3 세포와 HMC-1(Human mast cell-1) 세포를 이용하여 확인하였다. HMC-1은 12웰(well) 세포배양접시에 4×10^5/웰(well)로 조정하여 10% FBS 함유 IMDM(Gibco, USA)배지로 5% CO_2, 37℃ 세포배양기에서 배양하였다. RBL 2H3 세포는 12웰 세포배양접시에 4×10^5/웰로 조정하여 10% FBS 함유 MEM(Gibco, USA)배지로 5% CO_2, 37℃ 세포배양기에서 배양하였다.

[0038] 각 세포를 배양 8시간 후에 각 유청 단백질 및 이의 가수분해물(5~50㎍/㎖)을 시료로서 처리하여 30분간 반응시키고 PMA(Phorbol 12-myristate 13-acetate)를 처리하고 6시간 반응시킨 후 세포를 취하고 RNA 분리키트(Invitregon, USA)를 이용하여 총 RNA를 분리하였다. 이 후, 상기 총 RNA를 Promega사(USA)의 cDNA 합성 키트(oligo dT, dNTP, M-MLV RT, RNAs inhibitor)를 이용하여 RT-PCR을 수행하여 TNF-α(tumor necrosis factor-α), IL-6(interleukin-6) 및 IL-13(interleukin-13)의 발현을 조사하여 도 2 및 3에 나타내었다. RT-PCR 조건은 94℃에서 5분(1 cycle), 94℃에서 30초; 58℃에서 30초; 72℃에서 30초(22~23 cycle 반복), 72℃에서 7분(1 cycle)로 하였고 사용한 PCR용 프라이머(primer)는 하기 표 1에 나타난 것을 이용하였다.

표 1

[0039]

타겟 유전자	Size (bp)	Forward	Reverse
GAPDH	346	CCATCACCATCTTCCAGGAG	ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT
TNF-α	354	TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC	GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG
IL-6	139	TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC	GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG
IL-13	482	ACGGTCATTGCTCTCACTTGCC	CTTCCCGCCTACCCAAGACATT

[0040] 도 2A의 상단 그림은 HMC-1 세포에 β-락토글로불린을 5㎍/㎖ 처리하였을 경우 발현되는 IL-6의 발현량을 확인한 것이며 하단 그림은 이를 수치화하여 나타낸 것이다. 도 2B는 RBL-2H3 세포에 β-락토글로불린을 50㎍/㎖ 처리하였을 경우 발현되는 TNF-α 및 IL-13의 발현량을 확인한 것이다.

[0041] 상기 도 2의 결과를 참고하면, β-락토글로불린의 알칼라아제 가수분해물 중 3kDa 이하인 가수분해물이 IL-6, TNF-α 및 IL-13의 발현 억제 효과가 우수한 것으로 확인된다.

[0042] 도 3의 왼쪽 그림은 HMC-1 세포에 BSA를 5㎍ 처리하였을 경우 발현되는 TNF-α의 발현량을 확인한 것으로서, BSA의 알칼라아제 가수분해물 중 3kDa 이하인 가수분해물이 TNF-α의 발현 억제 효과가 우수함을 알 수 있다. 도 3의 오른쪽 그림은 이 결과를 수치화하여 나타낸 것이다.

[0043] 따라서, 상기 결과들을 통해, β-락토글로불린 또는 BSA의 알칼라아제 가수분해물 중 3kDa 이하인 것이 항아토피 피부염 또는 항알레르기 질환의 조성물로서 이용하기에 적합한 것으로 판단된다.

[0044] **<실시예 4. 독성실험>**

[0045] **실시예 4-1. 급성독성**

[0046] 본 발명의 β-락토글로불린 또는 BSA의 가수분해물 중 3kDa 이하인 가수분해물을 단기간에 과량을 섭취하였을 때 급성적(24시간 이내)으로 동물체내에 미치는 독성을 조사하고, 치사율을 결정하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 일반적인 마우스인 ICR 마우스 계통 30마리를 대조군과 실험군에 각각 10마리씩 배정하였다. 대조군에는 PEG-400:tween-80:에탄올(8:1:1, v:v:v) 만을 투여하고, 실험군은 본 발명의 β-락토글로불린 또는 BSA의 가수분해물 중 3kDa 이하인 가수분해물을 상기 PEG-400:tween-80:에탄올(8:1:1, v:v:v)에 녹여 각각 경구투여하였다. 투여 24시간 후에 각각의 치사율을 조사한 결과, 대조군과 2g/kg/day 농도의 본 발명의 β-락토글로불린 또는 BSA의 가수분해물 중 3kDa 이하인 가수분해물을 투여한 실험군에서 마우스가 모두 생존하는 것으로 확인되었다.

[0047] **실시예 4-2. 실험군 및 대조군의 장기 및 조직 독성 실험**

[0048] 장기 독성 실험은 본 발명의 β-락토글로불린 또는 BSA의 가수분해물 중 3kDa 이하인 가수분해물을 각 농도로 8주 동안 C57BL/6J 마우스(각 군당 10마리)에 투여하여 실험하였다. 동물의 각 장기(조직)에 미치는 영향을 조사하기 위하여 본 발명의 β-락토글로불린 또는 BSA의 가수분해물 중 3kDa 이하인 가수분해물을 투여한 실험군과

PEG-400:tween-80:에탄올(8:1:1, v:v:v)만을 투여한 대조군의 동물들로부터 8주 후 혈액을 채취하여 GPT(glutamate-pyruvate transferase) 및 BUN(blood urea nitrogen)의 혈액 내 농도를 Select E(Vital Scientific NV, Netherland) 기기를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 간독성과 관계있는 것으로 알려진 GPT와 신장독성과 관계있는 것으로 알려진 BUN의 경우, 대조군과 비교하여 실험군은 별다른 차이를 보이지 않았다. 또한, 각 동물로부터 간과 신장을 절취하여 통상적인 조직절편 제작과정을 거쳐 광학현미경으로 조직학적 관찰을 시행하였으며 모든 조직에서 특이한 이상이 관찰되지 않았다.

[0049] **<제제예 1. 약학적 제제>**

[0050] **제제예 1-1. 정제의 제조**

[0051] 본 발명의 실시예 1의 β-락토글로불린 또는 BSA의 3kDa 이하의 가수분해물 200g을 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0052] **제제예 1-2. 주사액제의 제조**

[0053] 본 발명의 실시예 1의 β-락토글로불린 또는 BSA의 3kDa 이하의 가수분해물 1g, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100㎖를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[0054] **<제제예 2. 식품 제조>**

[0055] **제제예 2-1. 조리용 양념의 제조**

[0056] 본 발명의 실시예 1의 β-락토글로불린 또는 BSA의 3kDa 이하의 가수분해물을 조리용 양념에 1 중량%로 첨가하여 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

[0057] **제제예 2-2. 밀가루 식품의 제조**

[0058] 본 발명의 실시예 1의 β-락토글로불린 또는 BSA의 3kDa 이하의 가수분해물을 밀가루에 0.1 중량%로 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0059] **제제예 2-3. 스프 및 육즙(gravies)의 제조**

[0060] 본 발명의 실시예 1의 β-락토글로불린 또는 BSA의 3kDa 이하의 가수분해물을 스프 및 육즙에 0.1 중량%로 첨가하여 건강 증진용 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0061] **제제예 2-4. 유제품(dairy products)의 제조**

[0062] 본 발명의 실시예 1의 β-락토글로불린 또는 BSA의 3kDa 이하의 가수분해물을 우유에 0.1 중량%로 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0063] **제제예 2-5. 야채주스 제조**

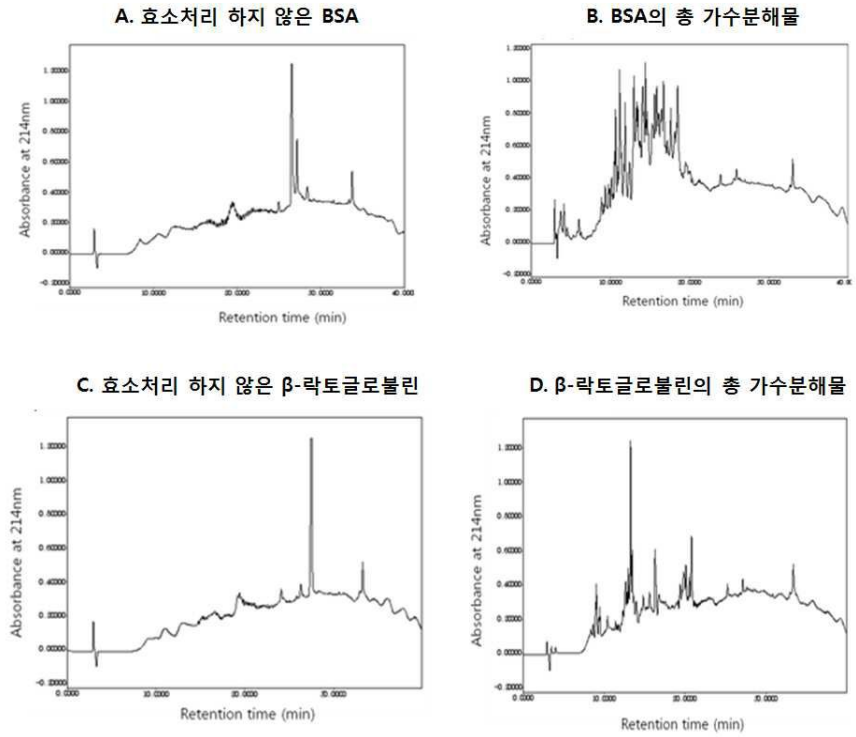
[0064] 본 발명의 실시예 1의 β-락토글로불린 또는 BSA의 3kDa 이하의 가수분해물 0.5g을 토마토주스 또는 당근주스 1,000㎖에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

[0065] **제제예 2-6. 과일주스 제조**

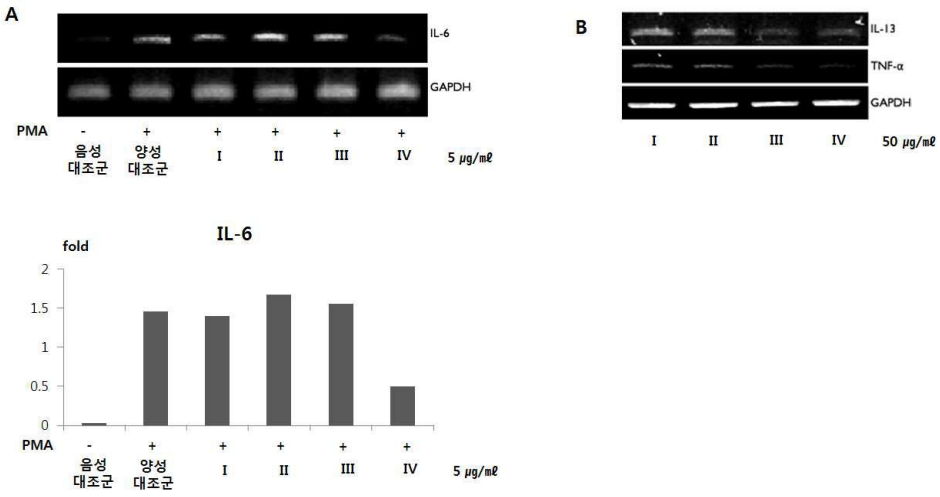
[0066] 본 발명의 실시예 1의 β-락토글로불린 또는 BSA의 3kDa 이하의 가수분해물 0.1g을 사과주스 또는 포도주스 1,000㎖에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

도면

도면1

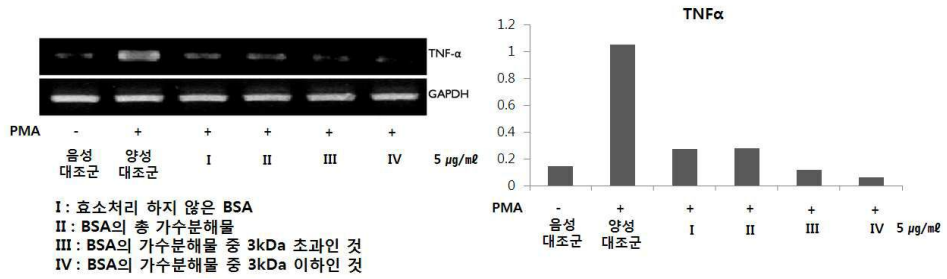


도면2



I : 효소처리 하지 않은 β-락토글로불린
II : β-락토글로불린의 총 가수분해물
III : β-락토글로불린의 가수분해물 중 3kDa 초과인 것
IV : β-락토글로불린의 가수분해물 중 3kDa 이하인 것

도면3



I : 효소처리 하지 않은 BSA
II : BSA의 총 가수분해물
III : BSA의 가수분해물 중 3kDa 초과인 것
IV : BSA의 가수분해물 중 3kDa 이하인 것