



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0074209
(43) 공개일자 2017년06월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) A23L 33/18 (2016.01)
A61K 38/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0175466
(22) 출원일자 2016년12월21일
심사청구일자 2016년12월21일
(30) 우선권주장
1020150182707 2015년12월21일 대한민국(KR)

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

전체 청구항 수 : 총 9 항

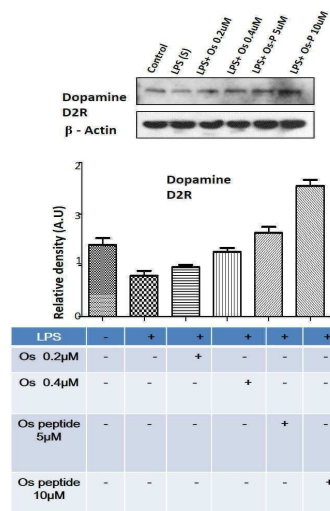
(54) 발명의 명칭 오스모틴 또는 이의 활성화된 펩타이드를 함유하는 우울증 예방, 개선 또는치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 서열번호1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴 또는 서열번호2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴-펩타이드를 유효성분으로 함유하는 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 대한 것이다.

또한, 본 발명은 서열번호1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴 또는 서열번호2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴-펩타이드를 유효성분으로 함유하는 우울증 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물에 대한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 38/08 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016M3C7A1904391

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발사업

연구과제명 퇴행성 뇌질환 및 대사조절 신규 제어물질 개발 및 효과 검증, 에너지 대사 활성화 물질 개발을 통한 실용화 기반 확립

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교

연구기간 2016.06.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴(osmotin) 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴-펩타이드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 오스모틴 또는 오스모틴-펩타이드는 조성물의 총 중량에 대하여 0.1~100 중량% 함유되는 것을 특징으로 하는 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 담체를 더 함유하는 것을 특징으로 하는 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 보조제를 더 함유하는 것을 특징으로 하는 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴(osmotin) 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴-펩타이드를 유효성분으로 함유하는 조성물을 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 우울증 예방 또는 치료방법.

청구항 6

서열번호1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴(osmotin) 또는 서열번호2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴-펩타이드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 우울증 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 오스모틴 또는 오스모틴-펩타이드는 조성물의 총 중량에 대하여 0.1~100 중량% 함유되는 것을 특징으로 하는 우울증 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 조성물은 음료, 타블렛, 캡슐제, 산제 중에서 선택된 어느 하나의 제형인 것을 특징으로 하는 우울증 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 9

제 6항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 보조제를 더 함유하는 것을 특징으로 하는 우울증 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 오스모틴(osmotin) 및 활성화된 오스모틴 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 우울증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 및 우울증의 예방 또는 개선을 위한 건강기능성식품에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 현대사회에 만연한 각종 스트레스는 우울증을 유발하는 원인이 된다. 이미 서구사회에서는 우울증과 관련된 약물처방이 급증하고 있으며, 상당히 높은 처방률을 보이고 있다. 세계보건기구(WHO)는 2020년에 이르면 우울증이 미국 및 서구 유럽에서 가장 유병률이 높은 질환이 될 것으로 추정하고 있다. 우리나라도 도시화가 가속되면서 빈부격차, 소외감 등이 심화되어 우울증의 발병율이 급격히 증가하고 있으며 현재 우리나라는 OECD 국가 중 자살율이 가장 높은 나라에 속한다.
- [0003] 현재까지 우울증의 발생기전은 명확히 밝혀져 있지 않았지만, 일반적으로 중추신경계의 시냅스 내에 모노아민(monoamine)계 신경전달물질(neurotransmitter)인 세로토닌(serotonin), 노르에피네프린(norepinephrin), 도파민(dopamine) 등이 부족하게 되면 우울증이 유발된다는 가설이 있다. 그래서 현재의 항우울제는 대부분 중추 세로토닌 또는 노르아드레날린 시냅스에서 신경전달물질의 농도를 높이는 약리작용을 가지고 있다. 항우울제는 신경전달물질의 농도를 높여주는 메카니즘에 따라 크게 삼환계 항우울제(TCA; tricyclic antidepressants), 모노아민 옥시다제 억제제(MAOI; monoamine oxidase inhibitors), 또는 선택적 세로토닌 재흡수 억제제(SSRI; selective serotonin reuptake inhibitors) 등이 많이 사용되고 있다.
- [0004] 이러한 기존의 항우울제가 비교적 효과적이기는 하나, 일부에서 심한 부작용 및 기대에 미치지 못하는 효과가 나타나는 경우가 있다. 약물투여로 인해 시냅스 내 모노아민의 농도는 즉시 증가하나 우울감의 개선 등 증상의 호전에는 통상 2 주 가량의 기간이 필요하다. 또한 항우울증 약물에 잘 반응하지 않거나, 재발율이 높으며, 심한 부작용에 의해 약물복용이 불가능한 환자들도 많다. 삼환계 항우울제인 이미프라민(imipramine), 데시프라민(desipramine) 등은 저혈압, 심장기능장애 등의 부작용이 심하게 나타난다. 가장 널리 쓰이는 플루옥세틴(fluxetine)이나 설트랄린(sertraline) 등의 선택적 세로토닌 재흡수 억제제는 구역, 위장관 출혈 또는 성기능장애 등을 유발한다. 따라서 기존 우울제보다 효과적이고 부작용이 적은 새로운 약물 개발이 지속적으로 시도되고 있다.
- [0005] 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 가지며, 따라서 소화에 의해 분쇄될 염려없이 신체를 순환할 수 있다는 것을 의미한다. 이러한 오스모틴은 동물에 존재하는 아디포넥틴과 상동체로 알려져 있는데, 아디포넥틴의 경우 일부 항-염증, 항-당뇨, 항-죽상경화 능력을 가질 가능성이 있다고 밝혀진 바 있다. 그러나 오스모틴과 관련하여서는 주로 비만이나 당뇨병과 관련된 효과가 연구되었을 뿐, 그 외의 효과에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.
- [0006] 이에 본 발명자들은 오스모틴-펩타이드가 우울증이 유도된 세포의 세포사멸을 억제하고 우울증을 개선 또는 치료하는 효과가 있음을 확인하고, 이를 이용하여 우울증 예방 또는 개선용 약학적 조성물 또는 건강기능성 식품에 적용할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0575229호 (뇌신경질환의 예방 또는 치료용 식품 조성물)에서는 펩타이드를 유효성분으로 포함하여 신경세포의 사멸을 억제하는 것을 통해 치매, 뇌졸중, 우울증과 같은 뇌신경질환을 예방하는 우울증 치료제가 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 서열번호1 또는 서열번호2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴(osmotin)(서열번호1) 또는 활성화된 오스모틴-펩타이드(서열번호2)를 유효성분으로 함유하는 우울증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[0009] 본 발명의 또다른 목적은 서열번호1 또는 서열번호2로 표시되는 아미노산서열로 이루어진 오스모틴 또는 오스모틴-펩타이드를 유효성분으로 함유하는 우울증 개선 또는 예방용 건강기능성 식품을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호1 또는 서열번호2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴(osmotin)(서열번호1) 또는 활성화된 오스모틴-펩타이드(서열번호2)를 유효성분으로 함유하는 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 서열번호1 또는 서열번호2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴 또는 오스모틴-펩타이드를 유효성분으로 함유하는 우울증 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.

[0012] 또한 본 발명은 하기 서열번호1 또는 서열번호2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴 또는 오스모틴-펩타이드를 포함하는 조성물을 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 우울증의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 서열번호1의 오스모틴 또는 서열번호2의 오스모틴-펩타이드는 신경보호활성(neuroprotective) 및 우울증 개선 또는 치료효과를 가지고 있어 우울증 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물 및 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0015] 또한, 상기 오스모틴 및 오스모틴-펩타이드는 우울증 치료를 위한 치료방법에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 오스모틴 또는 오스모틴-펩타이드를 첨가한 경우의 LPS로 우울증이 유도된 PC-12 세포주의 세포생존율을 보기 위한 MTT 어세이의 결과이다.

도 2는 ApoTox-GLO 어세이에 대한 것으로, 도 2(a)는 오스모틴 또는 오스모틴-펩타이드를 처리한 경우의 세포생존율에 대한 결과이며, 도 2(b)는 세포독성에 대한 결과이며, 도 2(c)는 세포사멸과 관련된 카스파제3/7 활성화에 대한 결과이다.

도 3는 오스모틴 또는 오스모틴-펩타이드를 처리한 경우의 Dopamine receptor 2 단백질 분비 활성화에 대한 결과이다.

도 4는 FST, TST 행동학적 변화를 살펴보기 위한 in vivo 실험결과이다.

도 5는 Anhedonia, olfactory test를 통해 행동학적 변화를 살펴보기 위한 in vivo 실험결과이다.

도 6은 마우스 뇌에서 오스모틴에 의한 시냅스 후부 기능장애(postsynaptic dysfunction) 활성을 살펴보기 위한 in vivo 실험결과이다.

도 7은 LPS / HFD 처리 마우스에 대한 BDNF / Akt / PI3K 신호전달경로상에서의 오스모틴-펩타이드의 효과를 살펴보기 위한 실험결과이다.

도 8은 9개의 아미노산으로 이루어진 활성화된 오스모틴-펩타이드에 대한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0019] 본 발명은 서열번호1 (SEQ ID NO:1)로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴 또는 서열번호2 (SEQ ID NO:2)로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴(osmotin)-펩타이드를 유효성분으로 함유하는 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명에서, 오스모틴은 포도등 숙성한 과일에 다량으로 함유되어 있는 단백질로서, 개체에 따라 약 150개 내지 250개의 아미노산으로 구성되는 단백질이다.

- [0021] 상기 서열번호2로 이루어진 오스모틴-펩타이드는 오스모틴 단백질의 서열중에서 157번째 부터 165번째까지의 9개 아미노산으로 이루어진 펩타이드이다.
- [0022] 본 발명의 오스모틴 또는 오스모틴-펩타이드는 정제된 천연 생성물 또는 화학적으로 합성된 생성물일 수 있으며, 제조합 기법을 통해서 제조될 수 있다.
- [0023] 본 발명에서, LPS(lipopolysaccharide)로 우울증이 유도된 PC-12 세포주에 오스모틴-펩타이드를 처리한 결과, PC-12 세포주의 세포생존을 유지하고, 세포독성이 감소되며, 카스파제 3/7의 활성을 억제시켜 세포사멸을 억제하는 신경보호활성을 내포하며 우울증 개선 또는 치료효과를 갖는다.
- [0024] PC-12 세포주는 쥐 신장선 수질(rat adrenal medulla)의 크롬 친화성 세포종 (pheochromocytoma)에서 유래된 세포주이며, 신경아세포(neuroblastic cells) 및 신경모세포(neuroblastic cells)의 혼합형태의 신경능(neural crest)으로부터 배아 기원(embryonic origin)을 가지고 있다.
- [0025] 뇌에서의 염증 면역반응과 우울증은 밀접한 관련이 있으며, 대표적인 염증유발인자인 LPS는 우울증 유사 행동을 일으키는 것으로 이미 알려져 있다. LPS의 뇌실주입은 TNF- α , IL-6 의 전사를 증가시키며 indoleamine 2,3 dioxygenase(IDO) 발현을 증가시켜 마우스의 우울증 유사행위를 유발한다. clomipramine, imipramine, 혹은 citalopram 등의 항우울제가 LPS로 처리시 유발된 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생산을 현저하게 억제하고, T 세포에서 분비되는 IL-2와 IFN- γ 도 항우울제에 의해 분비가 억제된다.
- [0026] 이렇게 LPS로 우울증이 유도된 PC-12 세포주에서 서열번호 1로 표시되는 아미노산서열로 이루어진 오스모틴 또는 서열번호2로 표시되는 오스모틴-펩타이드를 처리하는 경우 LPS로 인한 세포사멸이 억제하고 신경보호효과 및 우울증 개선효과를 발휘한다.
- [0027] 바람직하게 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 조성물은 투여경로에 따라 당업자의 선택에 의해 경구 또는 비경구의 제형으로 제조될 수 있다. 또한 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 진분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 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. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0030] 아울러, 본 발명은 서열번호1 (SEQ ID NO:1)로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴 또는 서열번호2 (SEQ ID NO:2)로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴(osmotin)-펩타이드를 유효성분으로 함유하는 우울증 예방 및 개선용 건강식품용 조성물을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 건강기능식품용 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0033] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

- [0035] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.
- [0037] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명은 서열번호1 (SEQ ID NO:1)로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴 또는 서열번호2 (SEQ ID NO:2)로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 오스모틴(osmotin)-펩타이드를 유효성분으로 함유하는 조성물을 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 우울증의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.
- [0039] 상기 동물은 바람직하게는 포유동물, 더 바람직하게는 인간을 포함할 수 있다.
- [0041] 이하, 본 발명을 하기 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0042] 단, 하기 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0044] <실험예 1> 세포배양 및 약물처리
- [0045] PC-12 세포주가 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 항생제(페니실린 및 스트렙토마이신)을 포함하는 DMEM 배지에서 수확되었고, 4일간 배양되었다. 이후 다음과 같이 약물처리하였다.
- [0046] 대조군(control): DMEM 배지에서 48시간 배양
- [0047] LPS-처리군(LPS-treatment): LPS-상층액(LPS와 상층액을 각각 1:4(부피비)의 비율로 혼합된 용액)을 포함하는 DMEM 배지에서 48시간 배양
- [0048] LPS+ 오스모틴 처리군(LPS+osmotin treatment): LPS-상층액(LPS와 상층액을 각각 1:4(부피비)의 비율로 혼합된 용액)을 함유하는 DMEM 배지에서 48시간 배양하되 마지막 24시간은 오스모틴과 함께 배양하였다. 이때 오스모틴의 농도는 0.4uM, 0.2uM, 0.1uM 및 0.05uM이다.
- [0049] LPS+ 오스모틴-펩타이드(9개의 아미노산) 처리군(LPS+ osmotin-peptide-9 treatment): LPS-상층액(LPS와 상층액을 각각 1:4(부피비)의 비율로 혼합된 용액)을 함유하는 DMEM 배지에서 48시간 배양하되 마지막 24시간은 오스모틴-펩타이드와 함께 배양하였다. 이때 오스모틴-펩타이드의 농도는 10uM, 5uM, 1uM 및 0.5uM이다.
- [0050] 모든 세포들은 6일후 수확되었고 하기 분석을 위해 사용되었다.
- [0052] <실험예2> 세포생존율 측정을 위한 MTT 어세이
- [0053] MTT 시약(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)은 살아있는 세포를 측정하기 위해 사용되었다. PC12 세포주는 100 μ l DMEM 배지의 96-웰 플레이트(1 x 105 세포/웰)에 분주하였다. 실험예1과 같이 개별적으로 웰에 약물 처리한 후, MTT 시약 (5 mg/ml 포스페이트 버퍼 식염수, PBS)이 각각의 웰에 첨가되었고, 37° C에서 4시간동안 배양되었다. 포르마잔(formazan)이 DMSO에 용해되었고, 각각의 웰에 첨가되었다. 플레이트는 10~20분동안 로타리 교반기에 의해 교반되었다. 550~570 nm (L1) 및 620~650 nm (L2)에서 모든 세포에 대한 흡광도를 측정하였다. 최종 OD값을 계산하였고 (OD = L1 - L2), 대조군과 비교한 세포 생존율에 대한 백분율이 최종계산되었다.

- [0055] <실험예3> ApoTox-Glo, triplex assay
- [0056] ApoTox-GLO 트리플렉스 어세이 (Promega, Promega BioSciences, LLC. San Luis Obispo, CA, USA). 간단하게는 10%의 소태아혈청 (FBS) 와 항생제 (페니실린 및 스트렙토마이신)을 포함하는 200 μ l DMEM에 PC12 세포주는 96-웰 플레이트 (1 x 10⁵ 세포/웰)로 분주되었다. 실험예1과 같이 각각의 웰에 약물처리한 후, GF-AFC 기질 및 bis-AAF-R110 기질을 모두 포함하는 생존율/독성 시약이 모든 웰에 첨가되었고, 30초동안 교반된 후 1시간동안 37℃에서 배양되었다. 형광 스펙트럼은 생존율 분석을 위해 400/505 nm 에서 측정되었고, 독성 분석을 위해서 485/520nm에서 측정되었다. 그 다음에 카스파제3/7 (caspase 3/7) 활성을 판단하기 위해, caspase-Glo 3/7 시약 (100 μ l)이 모든 웰에 추가되었고, % 세포 생존율, % cytotoxicity, % 카스파제-3/7 활성을 계산하였다.
- [0058] <실험예4> dopamine receptor 2 단백질 분비 활성화
- [0059] 도파민을 분비하는 PC-12세포에서, LPS로 우울증을 유발한 다음, 오스모틴(0.2 μ M, 0.4 μ M) 또는 오스모틴-펩타이드(5 μ M, 10 μ M)로 처리하여 Dopamine receptor 2 단백질 분비 활성을 측정하였다.
- [0061] <실험예5> Forced Swim Test
- [0062] 강제 수영 시험 (forced swim test, FST)은 원칙적으로 Porsolt RD 2000에서 기술한 바와 같이 수행되었다. 요약하자면, 각 마우스를 23 $\pm$ 1℃로 유지된 15cm의 물을 담고 있는 실린더 (직경 23cm, 높이 31cm)에 개별적으로 놓았다. 테스트 세션간에 물은 교체되었다. 마우스를 6분 동안 물에 넣은 후, 케이지로 복귀되었다. 시험 중, 상기 마우스를 위에서 비디오로 기록하고, 부동 시간을 마지막 5 분 동안 측정하였다.
- [0064] <실험예6> Tail Suspension Test
- [0065] 케이지에서 꺼낸 마우스의 꼬리의 말단부로부터 2cm가량 떨어진 부위에 접착테이프를 붙였다. 테이프에 1개의 구멍을 뚫고, 상기 마우스를 변형 측정기(strain gauge)에 연결된 고리에 10분간 매달았다. 측정기상에 작용된 외력들을 처리하기 위한 컴퓨터 시스템이 각각의 쥐들의 움직임을 수집하고 분석하였다. 부동 시간은 실험군을 보지 못한 사람에 의해 수동으로 측정되었다.
- [0067] <실험예7> Sucrose preference Test
- [0068] 자당 선호 테스트(sucrose preference)를 수행하기 위해, 마우스들에게 두가지 용액(볼타입 빨대 튜브(ball-type sipper tube)가 장착된 50ml 원추형 튜브안의 물 또는 2% 자당이 첨가된 물)을 투여하였다. 본 테스트를 하기에 앞서, 모든 마우스는 2개의 보틀 선택 테스트에 순응되었다. 모든 마우스는 물과 2% 자당 용액을 모두 마셨으나, 물보다는 자당을 마시는 것을 선호하였다. 테스트 당일, 마우스에게 테스트 전 두시간동안 유체 및 먹이를 주지 않았다. 광주기의 암단계의 시작부에, 마실 물과 2% 자당 용액이 홈 케이지에 밤새도록(15시간) 배치되었다. LPS 투여하기 전에, 마우스에게 2일간 연이어 24시간 동안 물/물(w/w) 또는 물/자당(w/s)을 제공하여 마우스가 자당 용액에 친숙하게 하였다. 각각의 테스트 종료시에 원추형 튜브의 유체량이 측정되었고, 자당선호도는 자당 섭취량/전체 유체 섭취량(물+자당 섭취)*100을 사용하여 측정되었다.
- [0070] <실험예8> Olfactory Test/ Buried Food Test
- [0071] 후각 테스트 / 매장 식품 검사(Olfactory Test/ buried food test)는 밤새 금식한 동물이 침구류 밑에 숨겨진 친숙하고 기호에 맞는 음식을 얼마나 빨리 찾을 수 있는지를 측정한다. 15분 내에 음식을 찾기 위해, 냄새신호를 이용하지 못하는 금식 생쥐는 후각 능력에 결함이 있을 수 있다고 가정한다. 정상적인 후각을 가진 생쥐의 대부분은 몇 분 이내에 숨겨진 음식 조각을 찾을 수 있다.
- [0073] <실험예9> In vivo model an drug treatment

- [0074] 실험 시작시 체중이 25-30g 인 C657LB 수컷 마우스 (경상 대학교 동물 사육 센터, 한국, 진주, 40 마리)를 온도가 조절된 환경에 보관하고, 12시간의 명암주기상에서 (오전 6시에 불 켜짐) 음식을 자유롭게 먹을 수 있도록 관리하였다. 마우스를 아래에서 설명하는 대로 4개의 그룹으로 무작위로 나누었다.
- [0075] 1. Control group (i.p. saline for 1 week)
- [0076] 2. LPS group (i.p. 250 ug/kg for 1 week)
- [0077] 3. HF diet (4week, oral) + LPS (i.p. 250 ug/kg for 1 week)+ osmotin (i.p. 10 ug/g, 2 times weekly X 2 week)
- [0078] 4. Osmotin peptide (i.p. 3 ug/g, 3 times weekly) X 4 week
- [0080] 실험 절차는 경상 대학교 생물학과 응용생명과학부 동물 윤리위원회 (IACUC)가 제정한 규칙에 따라 수행되었다. 경상대학교의 생물학과 응용생명과학부 동물 윤리위원회 (IACUC)에서 모든 생체 내 실험 기법을 승인 (승인 ID : 125) 받았다.
- [0082] <실험예10> Western blot analysis
- [0083] 마우스를 치료 후 마취시키고, 희생시키고, 뇌 샘플을 분화시켰다. cortices와 hippocampi를 제거하고 드라이아이스로 동결시켰다. 모든 뇌 조직을 pro-prep 추출 용액 (iNtRON Biotechnology)에서 균질화시켰다. 단백질을 전술한 바와 같이 면역 블로팅을 위해 처리하였다.
- [0085] <실험예10> Data analysis and statistics
- [0086] Western-blot band를 컴퓨터 기반 Sigma Gel System (SPSS Inc., Chicago, IL)에서 밀도측정법(densitometry)를 사용하여 스캔하고 분석했다. Immunofluorescence 결과는 컴퓨터 기반 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 평가되었으며 밀도는 임의의 단위로 계산되었다. 데이터는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차 (SEM)로 나타낸다. 데이터는 ANOVA와 Student's t-test를 사용하여 분석하였다.
- [0088] <PC-12 세포주에서 LPS로 유도된 세포사멸에 있어서 오스모틴과 오스모틴-펩타이드의 효과>
- [0089] 1. MTT 어세이의 결과
- [0090] PC12 세포주의 증식에 미치는 LPS-상등액의 효과 및 오스모틴과 오스모틴-펩타이드의 효과를 알아보기 위해 세포 생존율(MTT 어세이)분석을 실시하였다.
- [0091] 분광광도분석(Spectrophotometric analysis)에서 LPS 처리된 그룹은 대조군과 비교시 % 세포 생존율 수치가 급격하게 감소되었다. 오스모틴 또는 오스모틴-펩타이드를 처리한 그룹은 LPS-처리 그룹과 비교시, % 세포생존율이 용량의존적으로 증가하였다 (그림 1).
- [0093] 2. ApoTox- Glo triplex assay의 결과
- [0094] Apo-Tox Glo 트리플렉스 어세이 키트는 대조군, LPS 및 오스모틴 처리그룹, LPS 및 오스모틴-펩타이드 처리그룹의 PC12 세포 생존율, 세포 독성, 카스파제 3/7 활성을 측정하는데 사용되었다. 오스모틴 또는 오스모틴-펩타이드는 LPS 처리이후 세포생존을 유지하고(그림 2A), 세포독성을 감소시키며(그림 2B), 카스파제 3/7 활성을 억제시키는(그림 2C) 잠재적 신경보호활성을 내포하고 있다. 게다가 오스모틴 및 오스모틴-펩타이드의 용량의존적인 신경보호활성이 0.4uM (오스모틴) 및 10uM (오스모틴-펩타이드) 농도에서 가장 우수함을 입증하였다.
- [0096] 3. Dopamine receptor 2 단백질 분비 활성 실험의 결과
- [0097] 도파민을 분비하는 PC-12세포를 LPS로 우울증을 유발한 다음, 오스모틴 또는 9개 아미노산으로 이루어진 활성화

된 오스모틴-펩타이드를 처리한 결과 Dopamine receptor 2 단백질 분비 활성이 증가되었다. LPS만 처리한 PC-12 세포보다 오스모틴을 처리한 세포에서 더 많은 Dopamine receptor 2 단백질이 분비되었고, 오스모틴-펩타이드를 처리한 세포에서 가장 많은 Dopamine receptor 2 단백질이 분비되었다(도3).

[0099] <in vivo 마우스 테스트 결과>

[0100] 1. Forced Swim Test(FST) 및 Tail Suspension Test (TST)

[0101] HFD(고칼로리 식이 처리, HF diet)처리 또는 LPS + HFD 처리가 급성 행동 장애(acute behavioral despair)에 기여하는지를 판단하기 위해 강제 수영 테스트 (Forced Swim Test, FST)와 테일 서스펜션 테스트 (Tail suspension test, TST)를 사용하였다. 본 출원인은 오스모틴으로 처리한 마우스에서 HFD 처리된 마우스 및 LPS + HFD 처리된 마우스보다 부동 기간이 감소된 것을 발견하였다(도 4a 및 도4b).

[0103] 2. Sucrose preference Test 및 Olfactory Test/ Buried Food Test

[0104] 우울증의 핵심 증상 중 하나인 무력증(기쁨을 경험하는 능력이 감소하는 현상)과 관련하여, HFD 처리된 마우스 또는 LPS + HFD 처리된 마우스는 자당 선호도가 크게 감소한다. 오스모틴 또는 오스모틴-펩타이드의 투여는 HFD 처리된 마우스에서 자당 선호도를 유의하게 증가시켰으며 LPS + HFD 처리된 마우스에는 거의 영향을 미치지 않았다.(도5a)

[0105] 또한, 후각테스트에서는 HFD 처리된 마우스 또는 LPS + HFD 처리된 마우스는 음식물을 찾는 데 시간이 상당히 소요되었다. 그러나 오스모틴을 투여한 마우스에서는 음식물 탐색시간이 크게 감소되었다(도5b).

[0107] 3. postsynaptic dysfunction 활성 실험결과

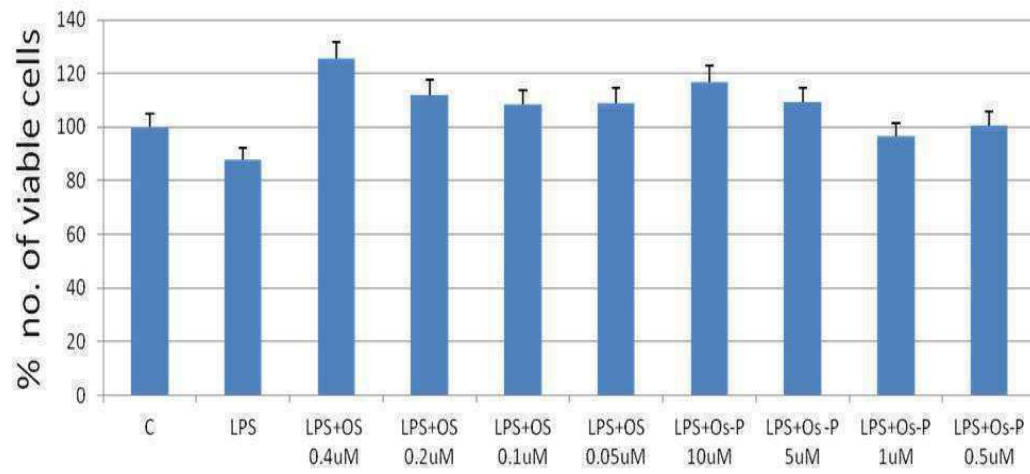
[0108] 시냅스 보전성은 마우스 두뇌 해마 영역에서 postsynaptic 마커 Postsynaptic Density Protein 95 (PSD95)로 검사하였다. 웨스턴 블롯 분석은 대조군과 비교시, HFD 처리된 마우스와 LPS 처리된 마우스에서 PSD95 수준이 유의미하게 감소되었음을 밝혔다. HFD 처리와 LPS 처리가 시냅스 기능 장애를 유발할 수 있음을 나타내었지만, HFD 또는 LPS 와 함께 오스모틴을 처리하는 것이 PSD 95의 발현을 크게 증가시켰다(도6).

[0110] 4. LPS / HFD 처리된 마우스에 대한 BDNF / Akt / PI3K 신호 전달 경로상에서 Osmotin 펩타이드의 효과

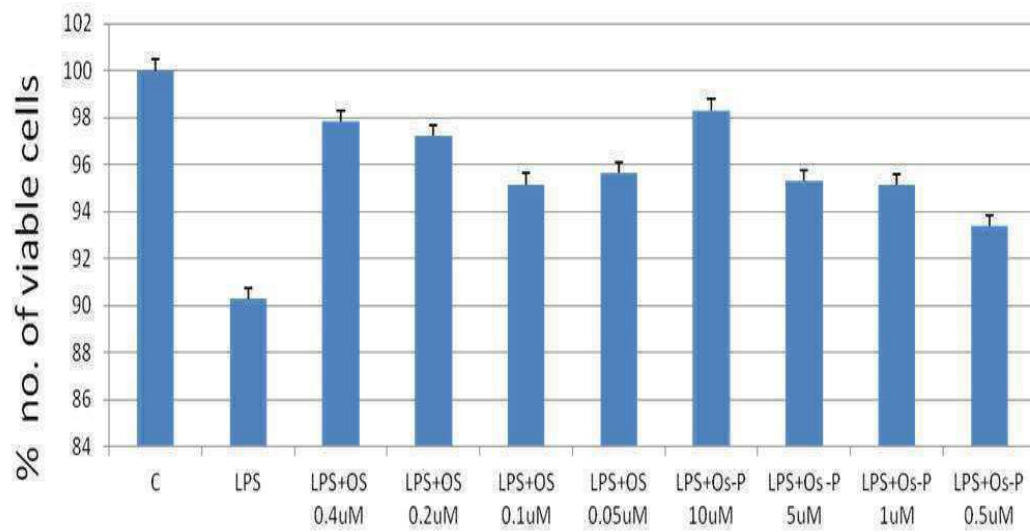
[0111] BDNF / PI3k 신호 전달에 대한 HFD 처리 / LPS 처리 및 오스모틴-펩타이드의 영향을 웨스턴 블롯 기술을 통해 마우스의 뇌 해마 영역에서 평가하였다. 면역 블랏 결과는 HFD 처리와 LPS 처리가 BDNF의 발현을 감소시켜 궁극적으로 PI3k를 억제했음을 나타낸다. 오스모틴-펩타이드(9aa)의 투여시 BDNF-PI3k 신호전달상에서 HFD 처리, HFD 처리/ LPS 처리(HFD 처리+LPS 처리)에 의한 효과를 모두 반전시켰다(도7).

도면

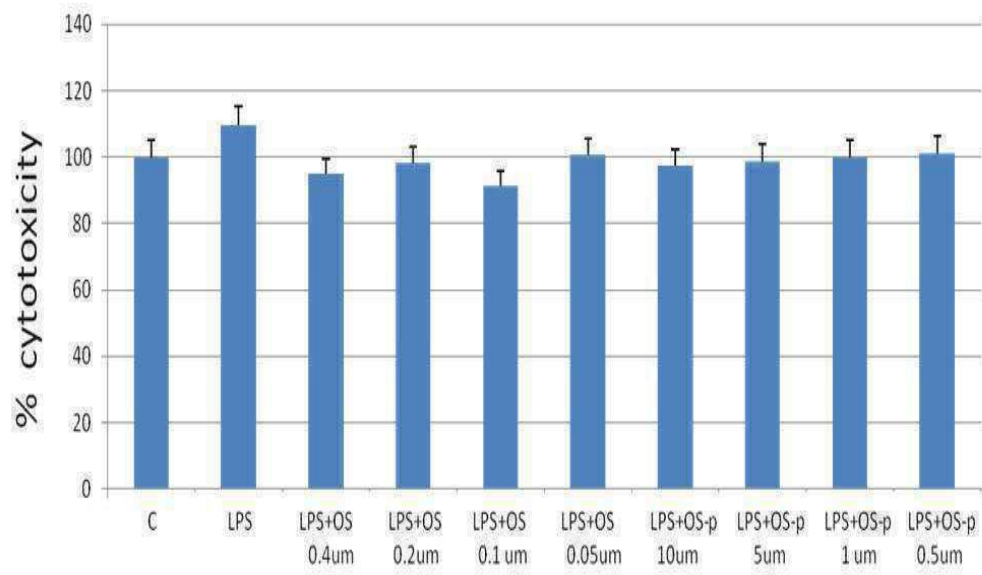
도면1



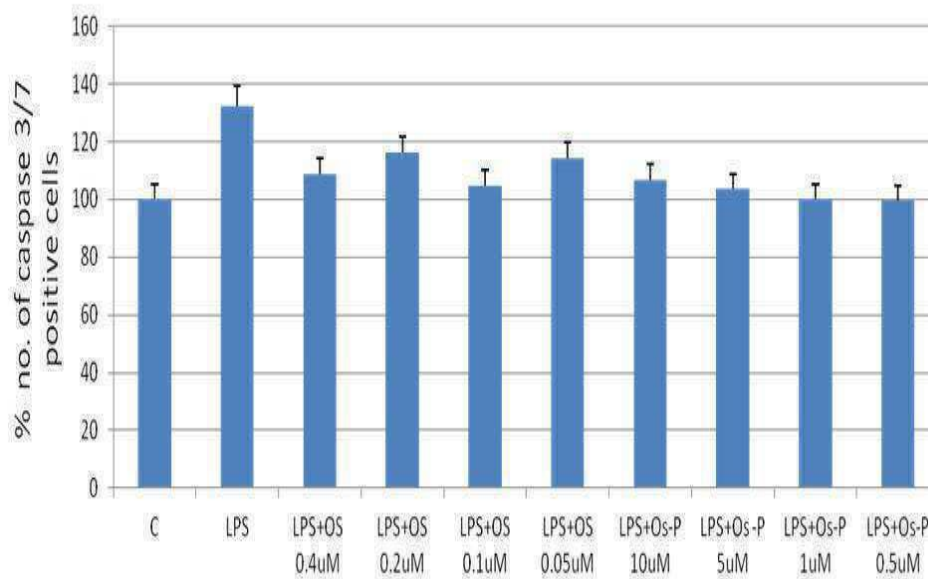
도면2a



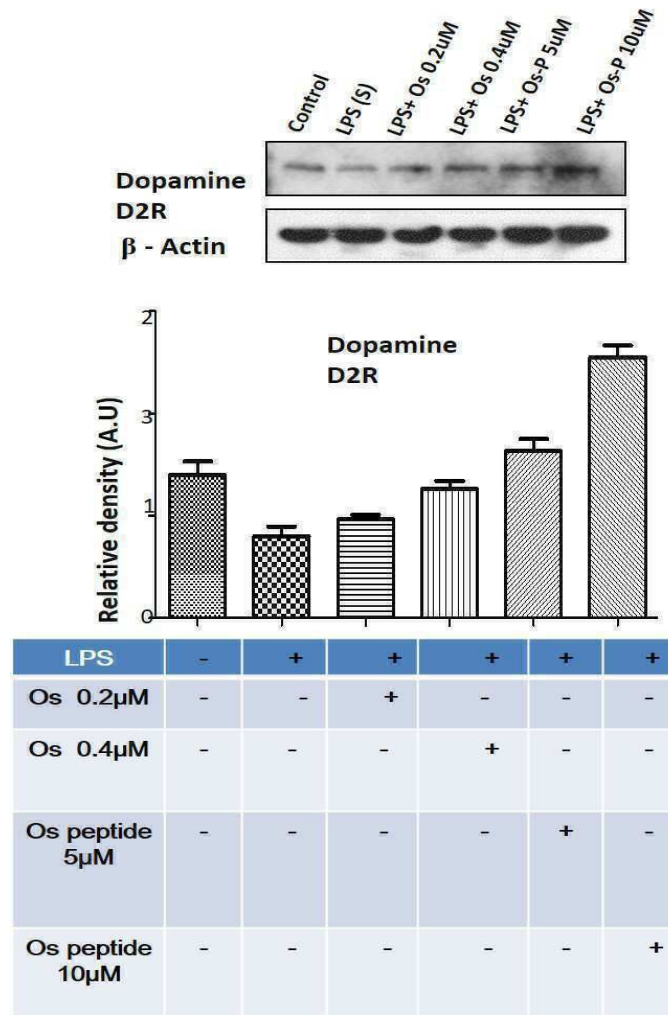
도면2b



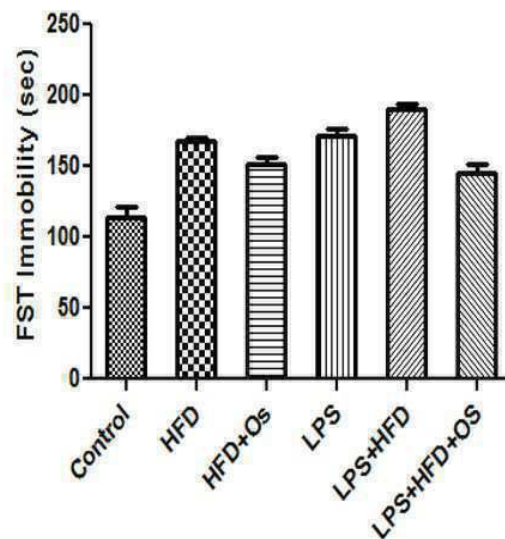
도면2c



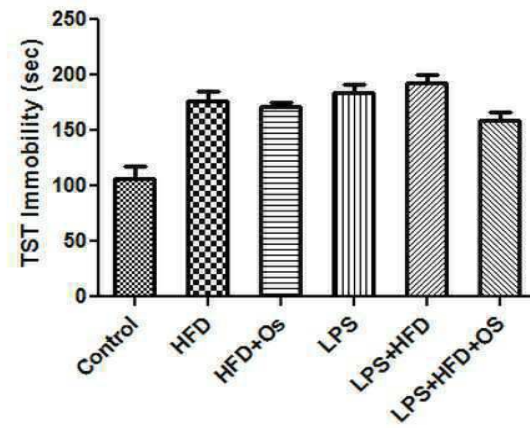
도면3



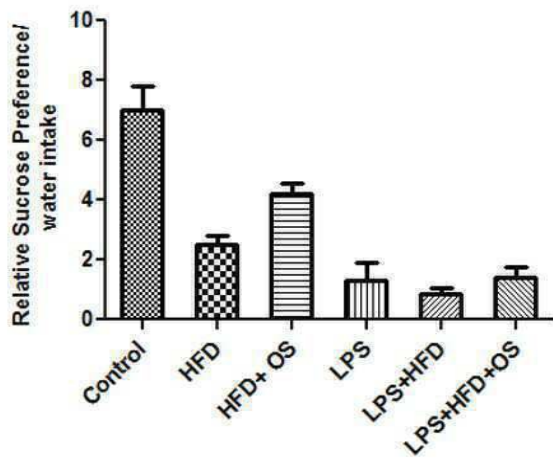
도면4a



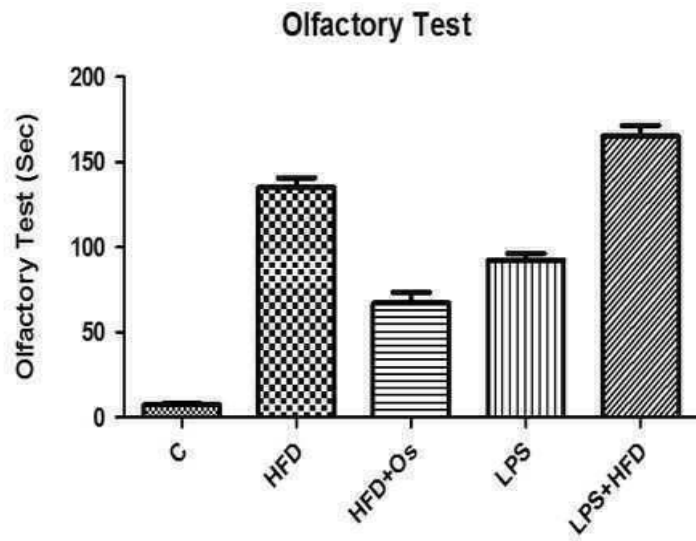
도면4b



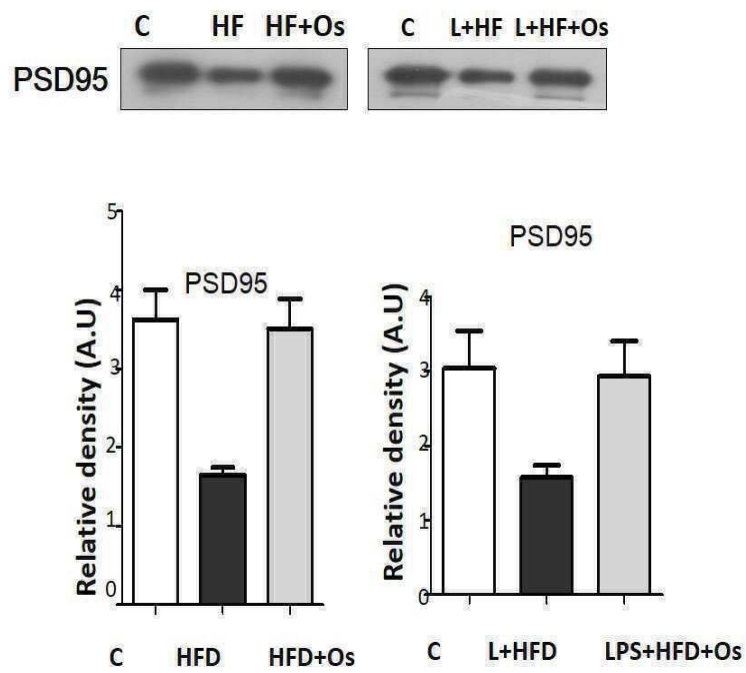
도면5a



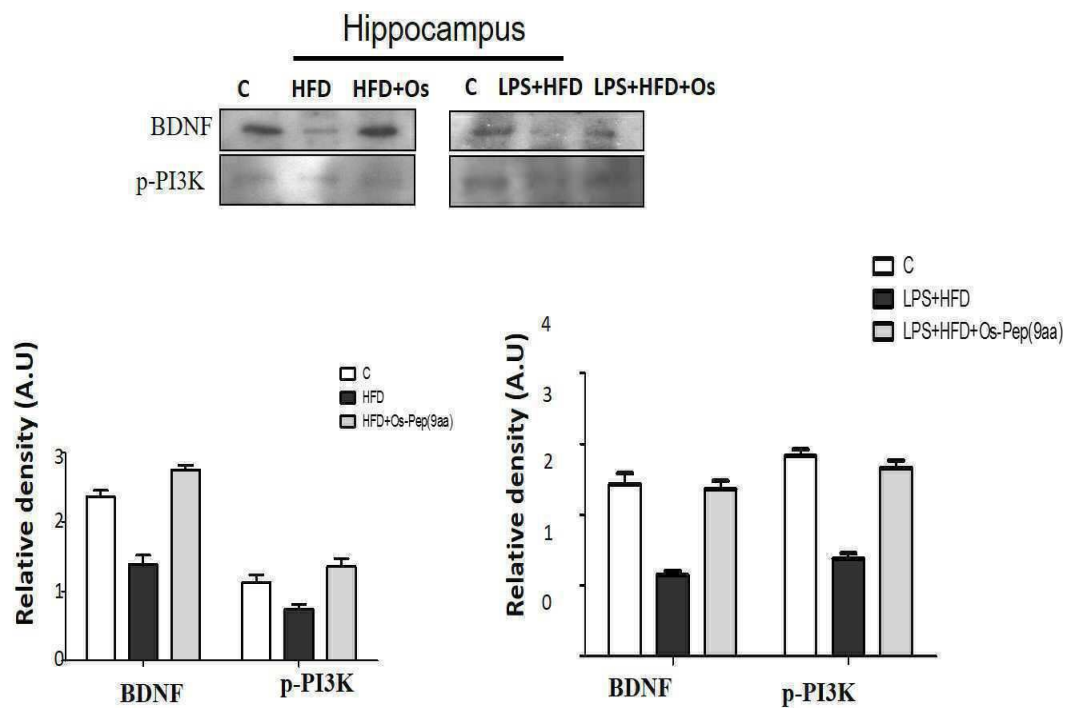
도면5b



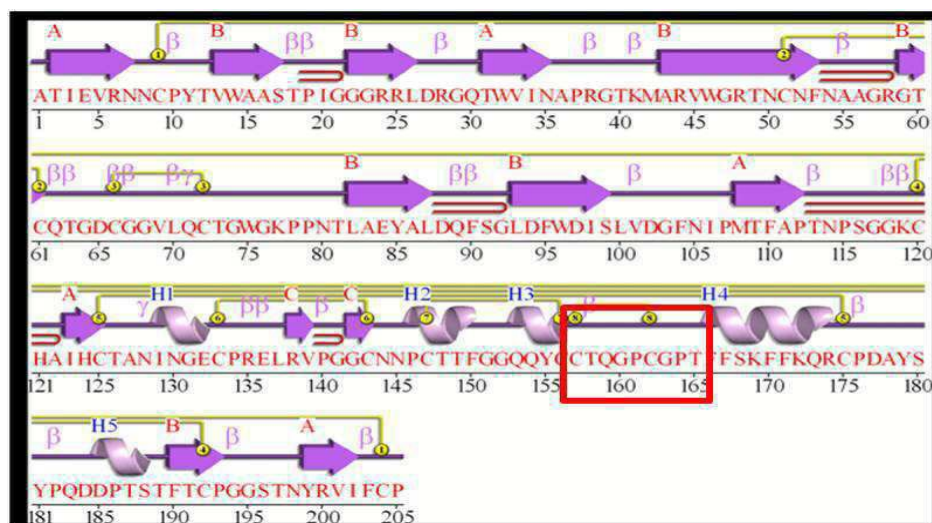
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Composition for preventing, improving or treating depressive disorder comprising osmotin peptide
- <130> 16P1257
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1

<211> 205

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 1

Ala Thr Ile Glu Val Arg Asn Asn Cys Pro Tyr Thr Val Trp Ala Ala

1 5 10 15

Ser Thr Pro Ile Gly Gly Gly Arg Arg Leu Asp Arg Gly Gln Thr Trp

20 25 30

Val Ile Asn Ala Pro Arg Gly Thr Lys Met Ala Arg Val Trp Gly Arg

35 40 45

Thr Asn Cys Asn Phe Asn Ala Ala Gly Arg Gly Thr Cys Gln Thr Gly

50 55 60

Asp Cys Gly Gly Val Leu Gln Cys Thr Gly Trp Gly Lys Pro Pro Asn

65 70 75 80

Thr Leu Ala Glu Tyr Ala Leu Asp Gln Phe Ser Gly Leu Asp Phe Trp

85 90 95

Asp Ile Ser Leu Val Asp Gly Phe Asn Ile Pro Met Thr Phe Ala Pro

100 105 110

Thr Asn Pro Ser Gly Gly Lys Cys His Ala Ile His Cys Thr Ala Asn

115 120 125

Ile Asn Gly Glu Cys Pro Arg Glu Leu Arg Val Pro Gly Gly Cys Asn

130 135 140

Asn Pro Cys Thr Thr Phe Gly Gly Gln Gln Tyr Cys Cys Thr Gln Gly

145 150 155 160

Pro Cys Gly Pro Thr Phe Phe Ser Lys Phe Phe Lys Gln Arg Cys Pro

165 170 175

Asp Ala Tyr Ser Tyr Pro Gln Asp Asp Pro Thr Ser Thr Phe Thr Cys

180 185 190

Pro Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Arg Val Ile Phe Cys Pro

195 200 205

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 2

Cys Thr Gln Gly Pro Cys Gly Pro Thr

1

5