(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0125239
(43) 공개일자 2020년11월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 5/06 (2006.01) *A23L 33/18* (2016.01)
A61K 38/00 (2006.01) *C07K 5/062* (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 5/06008 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0049237
(22) 출원일자 2019년04월26일
심사청구일자 2019년04월26일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
이승욱
대구광역시 달성군 다사읍 대실역북로 26, 207동 102호 (대실역청아람 2단지)
조혜린
대구광역시 수성구 달구벌대로 3280, 104동 505호 (신매동, 시지 효성 백년가약 1단지)
(74) 대리인
특허법인태백

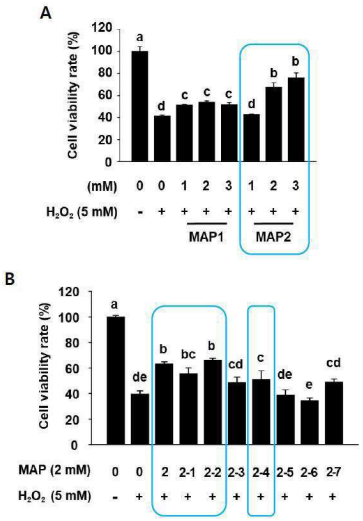
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **갈색거저리 유충의 단백가수분해물로부터 분리된 펩타이드 및 이를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 갈색거저리 유충의 단백가수분해물로부터 분리된 펩타이드 및 이를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 갈색거저리 유충 단백가수분해물은 1 kDa 이하 크기의 생리활성 펩타이드를 포함하여 활성산소의 생성을 감소시키고 항산화 효소들의 발현과 활성을 증가시킴으로써 산화적 스트레스로부터 간세포를 효과적으로 보호하는 바, 간 손상 예방 또는 치료용 조성물, 간 손상 예방 또는 개선용 건강식품 조성물, 간 보호용 건강식품 조성물, 항산화용 건강식품 조성물 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도11



(52) CPC특허분류
A61K 38/00 (2013.01)
A61P 1/16 (2018.01)
C07K 5/06034 (2013.01)
C07K 5/06043 (2013.01)
C07K 7/06 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016R1D1A1B03933985
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구
연구과제명 천연물 유래 NR4A1 저해제로부터 종양유전자인 β-catenin 및 Kras를 이중표적하는 대장암 치료용 식의약 소재 개발
기 여 율 50/100
과제수행기관명 계명대학교
연구기간 2018.09.01 ~ 2019.06.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ012284012018
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 국립농업과학원
연구사업명 공동연구사업
연구과제명 곤충 단백질로부터 비소세포폐암에 대한 표적 항암 펩타이드 개발
기 여 율 50/100
과제수행기관명 계명대학교
연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 서열번호 5로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 단백질 가수분해효소인 알칼라아제(Alcalase)로 가수분해된 갈색거저리(Tenebrio molitor) 유충의 단백가수분해물로부터 분리된 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 1 kDa 이하의 크기를 가지는 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 간세포 보호 활성을 나타내는 것을 특징으로 펩타이드.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 활성산소의 생성을 감소시키고 항산화 효소의 발현과 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 항산화 효소는 글루타치온 합성효소(glutathione synthetase), 글루탐산염 시스테인 연결효소(glutamate-cysteine ligase), 글루탐산염 시스테인 변경 서브유닛(glutamate-cysteine ligase modifier subunit) 및 카탈라아제(catalase)로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 7

제 1항에 따른 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 간 손상은 산화적 스트레스, 과로, 약물, 독성물질, 알코올, 비알코올, 지방간, 간경화 또는 감염으로 유도되는 것을 특징으로 하는 간 손상 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 산화적 스트레스는 활성산소에 기인한 것을 특징으로 하는 간 손상 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제 1항에 따른 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

청구항 11

제 1항에 따른 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 보호용 건강식품 조성물.

청구항 12

제 1항에 따른 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항산화용 건강식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 갈색거저리 유충의 단백가수분해물로부터 분리된 펩타이드 및 이를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 국제식량농업기구(FAO)에서는 질병이나 환경오염으로 인한 식량부족 문제를 해결하기 위한 정책으로 미래 식량자원으로서의 식용 곤충의 활성화 방안을 발표한 바 있고, 이에 대한 관심이 전 세계적으로 증대되고 있다. 이와 발맞추어 국내에서는 농림수산식품부가 “곤충산업육성 5개년 종합계획”을 발표하였고, 그에 따라 곤충 산업에 대한 지원이 이루어져 왔다.

[0003] 곤충은 약 100만 종 이상 보고되었음에도 100만 종 이상이 아직 보고되지 않은 상태로 남아있다고 예측될 정도로 지구상에서 가장 다양성이 풍부한 종이다. 예로부터 곤충은 약용으로 사용해 왔으며, 그 중 누에, 메뚜기, 굼벵이, 지네 등은 당뇨, 염증성 질환, 간 질환 및 동맥경화 등의 만성 질환 치료에 효과적이라는 연구결과가 보고되었다.

[0004] 한편, 갈색거저리(Tenebrio molitor)는 딱정벌레목 거저리과의 곤충으로 "갈색쌀거저리"라고도 불린다. 현재 한국을 비롯한 전 세계에 분포되어 있으며, 강한 적응력, 짧은 변태 기간 및 연중 사육으로 인해 산업화에 용이한 곤충이다. 또한, 갈색거저리의 영양성분은 수분이 2.90%, 조단백질이 50.32%, 조지방이 33.70%, 조회분이 3.76%, 조섬유가 4.81%로, 매우 높은 영양성분들을 가지고 있다. 이와 관련하여, 갈색거저리가 단백질 함량이 매우 높은 고단백질 소재로 2016년 식용곤충원료로 식품공전에 등록됨으로써 갈색거저리의 활용에 대한 관심이 높아지고 있다. 갈색거저리 유충(mealworm)은 대두보다 필수 아미노산을 많이 함유하고 있고, 육류에 비해 불포화 지방산 함량이 높으며, 비타민 A와 철, 식이섬유 등이 비교적 풍부하다. 더욱이, 가축 사육과는 달리 곤충 사육에 필요한 땅을 개선할 필요가 없고, 적은 사료만으로도 간편하게 많은 양의 곤충을 사육하여 보급할 수 있으므로 경제적 부담이 적은 장점도 있다.

[0005] 갈색거저리 유충에 관한 연구로는 갈색거저리 유충 추출물의 간암세포에 대한 세포 독성 효능, 갈색거저리 에탄올 추출물의 멜라닌 생성 저해 효과 등이 있으나, 갈색거저리 유충의 가수분해물로부터 분리된 생리활성 펩타이드 및 이를 이용한 간 손상 치료 또는 간 보호 효과에 대한 연구는 부족한 실정이다.

[0006] 생리활성 펩타이드는 일반적으로 생리적 활성을 가지는 분자량이 작은 펩타이드로 정의되며, 보통 3-20개의 아미노산으로 구성되고 아미노산의 조성이나 서열에 따라 그 활성이 다양하다. 또한, 크기가 작아 생체 내로 쉽게 흡수되어 다양한 기능적 특성을 나타낸다. 지금까지 연구된 생리활성 펩타이드의 효과로는 우유 단백질 가수분해물의 체내 항산화 기능 향상과 가공식품에서의 산화 반응 방지, 달걀흰자 가수분해물의 새로운 항균 펩타이드 등이 있으며, 그 외에도 항 고혈압, 항 혈전, 면역조절 등의 생리활성 펩타이드의 기능성 연구가 활발하게 진행되고 있다.

[0007] 즉, 갈색거저리 유충은 사육이 용이하고 다양한 영양소를 함유하고 있는 바, 갈색거저리 유충에서 분리된 생리활성 펩타이드 획득을 위한 기술 개발 및 이를 이용한 새로운 간 손상 치료제 또는 간 보호제 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2009-0109020호 (2009.10.19. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 갈색거저리 유충의 단백가수분해물로부터 분리된 펩타이드를 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 보호용 건강식품 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항산화용 건강식품 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 5로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 보호용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항산화용 건강식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따르면, 갈색거저리 유충 단백가수분해물은 1 kDa 이하 크기의 생리활성 펩타이드를 포함하여 활성산소의 생성을 감소시키고 항산화 효소들의 발현과 활성을 증가시킴으로써 산화적 스트레스로부터 간세포를 효과적으로 보호하는 바, 간 손상 예방 또는 치료용 조성물, 간 손상 예방 또는 개선용 건강식품 조성물, 간 보호용 건강식품 조성물, 항산화용 건강식품 조성물 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 H_2O_2에 대한 갈색거저리 유충 단백가수분해물의 간세포 보호 활성을 확인한 결과이다.

도 2 및 도 3은 H_2O_2에 대한 갈색거저리 유충 저분자 알칼라아제 단백가수분해물의 간세포 보호 활성을 확인한 결과이다.

도 4는 알코올에 대한 갈색거저리 유충 저분자 알칼라아제 단백가수분해물의 간세포 보호 활성을 확인한 결과이다.

도 5는 갈색거저리 유충 저분자 알칼라아제 단백가수분해물의 활성산소 생성 감소 및 항산화 효소 증가를 확인한 결과이다.

도 6은 갈색거저리 유충 저분자 알칼라아제 단백가수분해물의 총 GSH 함량, 카탈라아제 활성 및 Ho-1 단백질의 증가를 확인한 결과이다.

도 7은 갈색거저리 유충 저분자 알칼라아제 단백가수분해물의 Nrf2 단백질 발현 증가 및 핵 내 이동(활성화)을 확인한 결과이다.

도 8은 H_2O_2에 대한 갈색거저리 유충 저분자 알칼라아제 단백가수분해물 분획물의 간세포 보호 활성을 확인한 결과이다.

도 9는 상기 분획물을 역상 HPLC로 분리하여 머무름 시간별로 제조된 총 4종의 분획물(fr. 0-4)의 간세포 보호 활성을 확인한 결과이다.

도 10은 상기 fr. 2 분획물 내에 함유되어 있는 헥사머 1종(MAP1) 및 다이머 1종(MAP2)의 펩타이드 및 이의 서열을 확인한 결과이다.

도 11은 상기 MAP2 구조를 기초로 합성한 아미노산 결실 변이체의 간세포 보호 활성을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명의 발명자들은 갈색거저리 유충의 저분자 단백가수분해물이 1 kDa 이하 크기의 생리활성 펩타이드를 포함하며, 산화적 스트레스로부터 간세포 보호 활성을 나타내는 것을 확인하며 본 발명의 완성하였다.

[0022]

[0023] 이에, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 5로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 제공한다.

[0024] 상기 펩타이드는 단백질 가수분해효소인 알칼라아제(Alcalase)로 가수분해된 갈색거저리(Tenebrio molitor) 유충의 단백가수분해물로부터 분리된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0025] 상기 알칼라아제는 박테리아나 진균에서 생성되는 단백질 가수분해 효소로, pH 7-9 부근의 조건에서 강한 단백질 분해능을 나타낼 수 있다.

[0026] 상기 펩타이드는 1 kDa 이하의 크기를 가지는 펩타이드일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0027] 상기 펩타이드는 간세포 보호 활성을 나타낼 수 있고, 활성산소의 생성을 감소시키고 항산화 효소의 발현과 활성을 증가시킬 수 있다.

[0028] 상기 항산화 효소는 글루타치온 합성효소(glutathione synthetase), 글루탐산염 시스테인 연결효소(glutamate-cysteine ligase), 글루탐산염 시스테인 변경 서브유닛(glutamate-cysteine ligase modifier subunit) 및 카탈라아제(catalase)로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0031] 상기 간 손상은 산화적 스트레스, 과로, 약물, 독성물질, 알코올, 비알코올, 지방간, 간경화 또는 감염으로 유도되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0032] 상기 산화적 스트레스는 활성산소에 기인한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0034] 본 발명의 조성물이 약학 조성물인 경우, 투여를 위하여, 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0035] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충진제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형 제제는 상기 유효성분 외에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로솔, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0036] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 시간에 따라 다르지만, 당 업자에 의해 적절하게 선택될 수 있는 바, 상기 조성물의 일일 투여량은 바람직하게는 0.001 mg/kg 내지 50 mg/kg이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0038] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0040] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 보호용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0042] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항산화용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0044] 본 발명의 조성물이 건강식품 조성물인 경우, 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 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, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

[0045] 또한, 상기 건강식품 조성물은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, 식품첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전처에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0046] 상기 식품첨가물공전에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산 칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.

[0047] 이때, 건강식품 조성물을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 조성물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있다.

[0049] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0051] **실시예 1: 갈색거저리 유충 단백가수분해물 제조**

[0052] 본 실험에서 사용된 갈색거저리 유충은 영농조합법인 예천곤충나라에서 생산, 판매된 것으로 열풍건조된 형태로 구입하였으며, -20℃ 동결고에 저장하여 실험에 사용하였다.

[0053] 상기 열풍건조된 유충을 증류수에 현탁하여 4%(w/v)의 기질용액으로 제조한 후, 95℃에서 20분간 중탕시켜 자가효소를 불활성화 시켰다. 기질용액에 기질 대비 1%의 효소(알칼라아제, 뉴트라아제, 플라보르자임)(w/w)를 각각 첨가하고, 55℃, 100 rpm에서 8시간 동안 가수분해시켰다. 이후 95℃에서 20분간 효소를 불활성화 시켰다. 방랭한 후 단백가수분해물을 4℃, 12,000 xg로 15분 동안 원심분리하여 고형분을 제거하고 상등액을 획득하였으며, 상등액은 저분자 펩타이드의 분리를 위해 cell strainer로 필터하였다. Membrane filter를 이용하여 4℃, 5,000 xg로 1시간 동안 원심분리 함으로써 최종적으로 분자량 3 kDa 이하와 1 kDa 이하의 단백가수분해물을 각각 획득하였다.

[0055] **실시예 2: 세포 배양**

[0056] 마우스 유래 정상 간세포인 AML-12 세포는 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 분양 받아 사용하였으며, 분양 받은 후 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS), 1% 인슐린-트랜스퍼린-셀레늄(insulin-transferrin-selenium; ITS), 1% 항생제(페니실린/스트렙토마이신) 및 덱사메타손(40 ng/mL)이 포함

된 DMEM/F-12 배지를 사용하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

[0058] **실시예 3: 산화적 스트레스에 대한 갈색거저리 유충 단백가수분해물의 간세포 보호 활성 분석**

[0059] 활성산소로 인한 세포독성으로부터 갈색거저리 유충 단백가수분해물의 간세포 보호 효과를 분석하기 위하여, AML-12 세포를 2×10^4 세포/웰의 밀도로 96-웰 플레이트에 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 이후, 알칼라아제, 뉴트라아제 및 플라보르자임 처리 단백가수분해물을 각 농도 별로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 이후, 7 mM의 H_2O_2를 1시간 처리하고, MTT 시약(2.5 mg/mL)을 각 웰에 20 μL씩 첨가하여 3시간 동안 반응시킨 다음, 상층액을 제거하고 각 웰에 생성된 포르마잔(formazan) 결정을 디메틸설폭사이드(dimethyl sulforxide; DMSO)로 용해시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 간세포 보호 효과는 H_2O_2 무처리군(대조군)의 생존율을 기준으로 각 처리군의 상대적인 세포 생존율(cell viability)을 평가하여 계산하였다.

[0060] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 7 mM H_2O_2를 처리한 세포의 경우 생존율이 22% 정도로 감소한 반면, 각 단백가수분해물을 처리한 세포의 경우 세 가지 효소 처리군 모두에서 유의적으로 세포 생존율의 증가를 나타내었다. 특히, 그 중 알칼라아제 처리 단백가수분해물은 2.5와 5 mg/mL의 농도에서 다른 두 효소 가수분해물에 비해 유의적($P < 0.05$)으로 높은 간세포 보호 효과를 나타내었다. 알칼라아제 처리 단백가수분해물은 2.5와 5 mg/mL의 농도에서 각각 69 및 78%의 세포 생존율을 나타내는 바, 활성산소에 의한 세포독성으로부터 간세포를 보호하는 효과가 가장 큰 것을 확인할 수 있었다.

[0061] 즉, 알칼라아제, 뉴트라아제 및 플라보르자임 처리 단백가수분해물이 간세포 보호 효과를 나타내는 것을 확인하였으며, 특히 알칼라아제 처리 단백가수분해물의 간세포 보호 효과가 가장 큰 것으로 나타났다.

[0063] **실시예 4: 산화적 스트레스에 대한 갈색거저리 유충 저분자(MW<1 kDa) 단백가수분해물의 간세포 보호 활성 분석**

[0064] 산화적 스트레스에 대한 간세포 보호 활성이 가장 우수한 갈색거저리 유충의 알칼라아제 단백가수분해물을 대상으로 자세한 간세포 보호 활성을 분석하였다

[0065] 먼저, 한외 여과막을 이용하여 알칼라아제 단백가수분해물을 순차적으로 1-3 kDa과 1 kDa 이하 크기로 분리한 후 H_2O_2에 대한 간세포 보호 활성을 비교하였다. 그 결과, 도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, 1-3 kDa 크기의 단백가수분해물보다 1 kDa 이하 크기의 저분자 단백가수분해물이 상대적으로 우수한 간세포 보호 활성을 나타내었으며, 0.1-5.0 mg/mL 처리 농도에서 농도 의존적인 간세포 보호 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[0066] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이, 1 kDa 이하 크기의 저분자 알칼라아제 단백가수분해물은 알코올에 대해서도 유의적인 간세포 보호 활성을 나타내었다.

[0067] 즉, 상기 결과들로부터 갈색거저리 유충에 알칼라아제 처리 시, 간세포 보호 활성을 가지는 펩타이드가 생성되고, 1 kDa 이하 크기의 저분자 펩타이드의 간세포 보호 활성이 상대적으로 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0069] **실시예 5: 산화적 스트레스에 대한 갈색거저리 유충 저분자(MW<1 kDa) 단백가수분해물의 간세포 보호 활성 기전 분석**

[0070] 단백가수분해물의 간세포 보호 활성 기전을 분석하기 위하여, AML12 세포에 알칼라아제 단백가수분해물을 처리하고 24시간 동안 배양한 후, 7 mM의 H_2O_2를 처리하여 1시간 동안 추가 배양한 후 세포 내 ROS 생성량을 측정하였다.

[0071] 그 결과, 도 5A에 나타난 바와 같이, H_2O_2 단독 처리구에 비해 저분자 알칼라아제 단백가수분해물을 전처리한 세포에서 ROS의 생성량이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과는 저분자 알칼라아제 단백가수분해물(MW<1 kDa)이 세포 내 ROS 생성을 유의적으로 감소시킴으로써 산화적 스트레스로부터 AML12 세포를 보호한다는 것을 의미한다.

[0073] 더불어, AML12 세포에 알칼라아제 단백가수분해물을 처리하고 18시간 동안 배양한 후 mRNA 발현 수준을 qPCR로 측정하였다. ROS 생성 억제에 관여하는 기전을 분석하기 위하여, 대표적인 세포 내 항산화 시스템을 구성하는 유전자들의 발현에 미치는 단백가수분해물의 영향을 분석하였다. 이를 위해 q-PCR 분석법을 이용하였으며, 분석 대상이 된 유전자는 하기 표 1에 나타낸 바와 같이, 항산화 물질인 GSH의 합성에 관여하는 Gss, Gclc, Gclm과 세포 내 ROS 대사에 관여하는 대표적인 항산화 효소로 알려진 Sod1, Sod2, Gpx2, Cat, Gr 그리고 Ho-1 총 9종의 유전자이다.

[0074] 그 결과, 도 5B에 나타난 바와 같이, GSH 합성에 관여하는 효소들인 Gss, Gclc와 Gclm과 항산화 효소인 Cat과 Ho-1의 유전자 발현이 저분자 알칼라아제 단백가수분해물(5 mg/mL) 처리에 의해 대조구 대비 2배 이상 증가하는 것을 확인하였다.

[0075] 또한, AML12 세포에 알칼라아제 단백가수분해물을 처리하고 24시간 동안 배양한 후 총 GSH 함량과 카탈라아제 활성을 측정하였으며, 세포 용해물은 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 저분자 알칼라아제 단백가수분해물 처리에 따라 세포 내 총 GSH 함량과 카탈라아제 활성 그리고 Ho-1 단백질 발현량이 증가하는 것을 추가적으로 확인하였다.

[0077] 이들 항산화 효소들의 발현은 일차적으로 전사인자인 Nrf2(nuclear factor-E2-related factor 2)에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 즉 Nrf2는 이들 항산화 유전자의 프로모터에 존재하는 항산화 반응 요소(antioxidant response element; ARE)에 결합하여 이들 유전자의 발현과 단백질 생성을 조절함으로써 산화적 스트레스에 대한 생체방어기전에 핵심적 역할을 담당하고 있다.

[0078] 알칼라아제 단백가수분해물이 Nrf2의 활성화에 미치는 영향을 분석하기 위하여, AML12 세포에 알칼라아제 단백가수분해물을 처리하고 4시간 동안 배양한 후 웨스턴 블롯 및 면역형광염색을 수행하였다. Nrf2 활성화제로 알려진 설포라판(Sulforaphane)은 대조군으로 사용하였다.

[0079] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 저분자 알칼라아제 단백가수분해물을 전처리한 간세포에서 Nrf2 단백질 발현의 증가와 핵 내 이동(활성화)이 관찰되었다.

[0080] 상기 결과들로부터 갈색거저리 유충의 저분자 알칼라아제 단백가수분해물(MW<1 kDa)이 Nrf2의 활성화를 유도하여 항산화 효소들(Gss, Gclc, Gclm, Cat, Ho-1)의 발현과 활성을 증가시킴으로써 산화적 스트레스로부터 간세포를 효과적으로 보호함을 확인하였다.

표 1

[0081]

타겟 유전자		프라이머 서열
Tbp	Sence	5’-GTATGACTCCACTCACGGCA-3’
	Antisence	5’-GGTCTCGCTCCTGGAAGATG-3’
Gss	Sence	5’-GAAGCAGCTCGAAGAACTGG-3’
	Antisence	5’-AGCACTGGGTACTGGTGAGG-3’
Gclc	Sence	5’-CTGCACATCTACCACGCAGT-3’
	Antisence	5’-GTCTCAAGAACATCGCCTCC-3’
Gclm	Sence	5’-CCAAAACATCTGGAAACTCCC-3’
	Antisence	5’-CGGGAACCTGCTCAACTG-3’
Sod1	Sence	5’-ACCATCCACTTCGAGCAGAA-3’
	Antisence	5’-AAAATGAGGTCCTGCACTGG-3’
Sod2	Sence	5’-AACTCAGGTCGCTCTTCAGC-3’
	Antisence	5’-GCTTGATAGCCTCCAGCAAC-3’
Gpx2	Sence	5’-AGGTCGGACATACTTGAGGC-3’
	Antisence	5’-GGTAGTTCTCGGCTTCCCTT-3’
Cat	Sence	5’-CCCGCGGTCATGATATTAAGT-3’
	Antisence	5’-GATGAAGCAGTGGAAGGAGC-3’
Gr	Sence	5’-ATCGTGCATGAATTCCGAGT-3’
	Antisence	5’-GGTGGTGGAGAGTCACAAGC-3’
Ho-1	Sence	5’-ACAACCAGTGAGTGGAGCCT-3’
	Antisence	5’-TCAAGGCCTCAGACAAATCC-3’

[0082] * Gapdh; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Tbp; TATA-binding protein, Gss; glutathione synthetase, Gclc; glutamate-cysteine ligase, Gclm; glutamate-cysteine ligase modifier subunit, Sod1; superoxide dismutase 1 (soluble), Sod2; superoxide dismutase 2 (mitochondrial), GPx2; glutathione peroxidase 2, Cat; catalase, Gr; glutathione reductase, Ho-1; heme oxygenase-1

[0084] **실시예 6: 저분자 알칼라아제 단백가수분해물로부터 활성 펩타이드 분리 및 정제**

[0085] 갈색거저리 유충 저분자 알칼라아제 단백가수분해물(MW<1 kDa)은 Sep-pak C18 카트리지와 메탄올(MeOH)을 이용하여 극성 차에 따라 부분적으로 분리하였다. 즉, 하기에 기재한 바와 같은 조건에서 역상 HPLC 분석을 수행하였는데, 카트리지에 상기 단백가수분해물을 주입한 후 물(SFM0), 10% MeOH(SFM10), 60% MeOH(SFM60) 및 100% MeOH(SFM100)로 각각 용출시켜 각 분획물을 제조하였다.

[0086] <역상 HPLC 분석 조건>

[0087] - 칼럼: AKZO NOBEL KR100-5C18 (4.6 x 250 mm), 30℃

[0088] - 분석기: UV 220 nm

[0089] - 용매: A, 0.1% 트리플루오로 아세트산(TFA) 수용액

[0090] B, 0.1% TFA를 포함하는 아세토니트릴(ACN)

[0091] - 용매 농도구배: A 용매는 농도를 95%에서 35%까지 그리고 B 용매는 농도를 5%에서 65%까지 60분간 농도 경사를 줌

[0092] - 유속: 1 mL/min

[0093] - 주입 부피: 100 μl (50 mg/mL).

[0095] 이후, 도 8에 나타난 바와 같이, 상기에 개시된 방법대로 각 분획물의 간세포 보호 활성을 확인하였고, 도 9A에 나타난 바와 같이, 이중 가장 높은 간세포 보호 활성을 나타낸 SFM0를 역상 HPLC로 분리한 후 머무름 시간별로 총 4종의 분획물(fr. 0-4)을 제조하였다. 도 9B에 나타난 바와 같이, 상기 5종의 분획물(1 mg/mL)로 간세포 보호 활성을 재차 평가한 결과, fr. 2가 가장 우수한 간세포 보호 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[0097] 이후, fr. 2를 LC-MS/MS로 분석한 결과, 분획물 내에 2종의 펩타이드가 포함되어 있음을 확인하였고, 펩타이드 맵핑 및 de-novo 시퀀싱을 통해 이들 펩타이드들의 아미노산 서열을 확인하였다. 그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, 최종 확인된 펩타이드는 헥사머 1종(MAP1)과 다이머 1종(MAP2)으로, 각각의 아미노산 서열은 AKKHKE와 LE였다.

[0098] 이들을 대상으로 간세포 보호 활성을 분석한 결과, 도 11A에 나타낸 바와 같이, 두 펩타이드 모두 유의적인 간세포 보호 활성을 나타냈으며, 특히 MAP1에 비해 MAP2의 간세포 보호 활성이 상대적으로 높은 것을 확인하였다.

[0100] 또한, MAP2 구조를 기초로 7종의 아미노산 결실 변이체(MAP2-1~2-7)를 합성하여 간세포 보호 활성을 비교하였으며, 이때 각 결실 변이체의 아미노산 서열은 하기 표 2에 나타내었다. 그 결과, 도 11B에 나타난 바와 같이, MAP2-1, 2-2 및 2-4만이 유의적인 간세포 보호 활성을 나타내었으며, 이중 MAP2-1와 2-2는 MAP2와 유사한 간세포 보호 활성을 나타내는 것을 확인하였다(P<0.05).

표 2

[0102]

펩타이드	m/z	서열
MAP2-1	246.26	LD

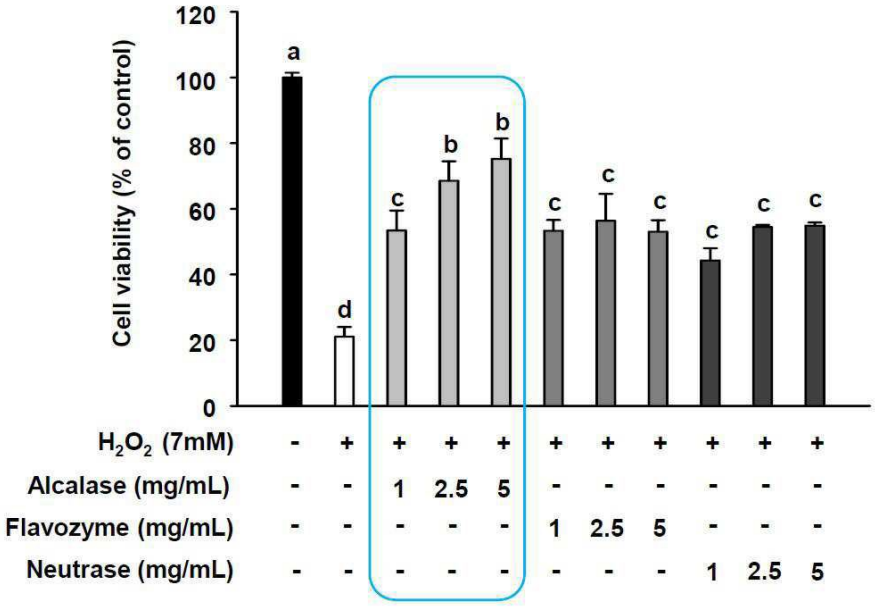
MAP2-2	260.29	IE
MAP2-3	246.26	ID
MAP2-4	260.29	EL
MAP2-5	260.29	EI
MAP2-6	246.26	DL
MAP2-7	246.26	DI

[0104] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

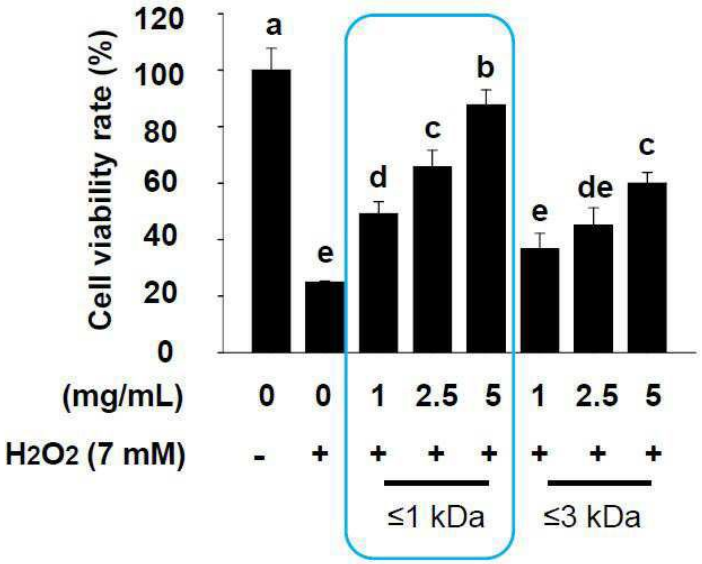
[0105] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

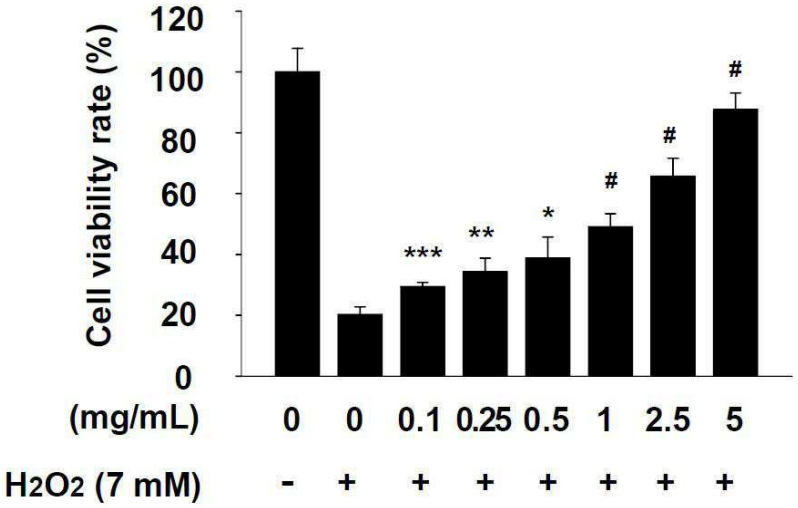
도면1


Cell viability (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
a
d
c
b
b
c
c
c
c
c
c
H_2O_2 (7mM) - + + + + + + + + + +
Alcalase (mg/mL) - - 1 2.5 5 - - - - - -
Flavozyme (mg/mL) - - - - - 1 2.5 5 - - -
Neutrase (mg/mL) - - - - - - - - 1 2.5 5

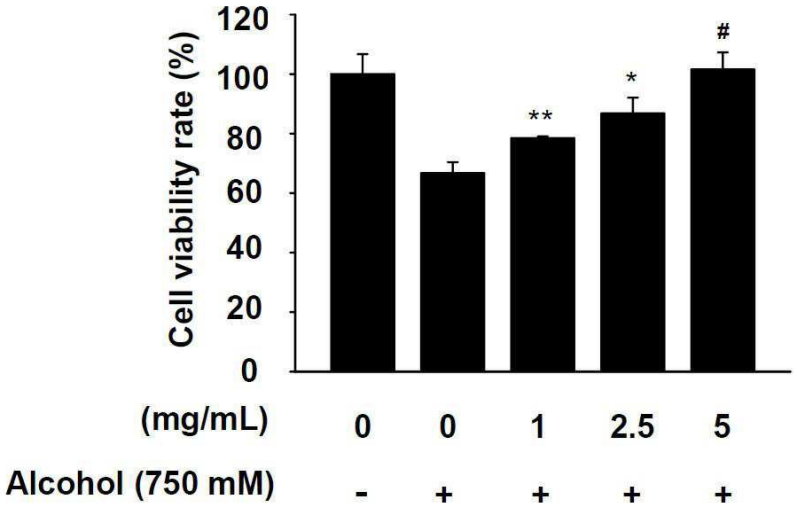
도면2


Cell viability rate (%)
120
100
80
60
40
20
0
a
e
d
c
b
e
de
c
(mg/mL) 0 0 1 2.5 5 1 2.5 5
H2O2 (7 mM) - + + + + + + +
≤1 kDa
≤3 kDa

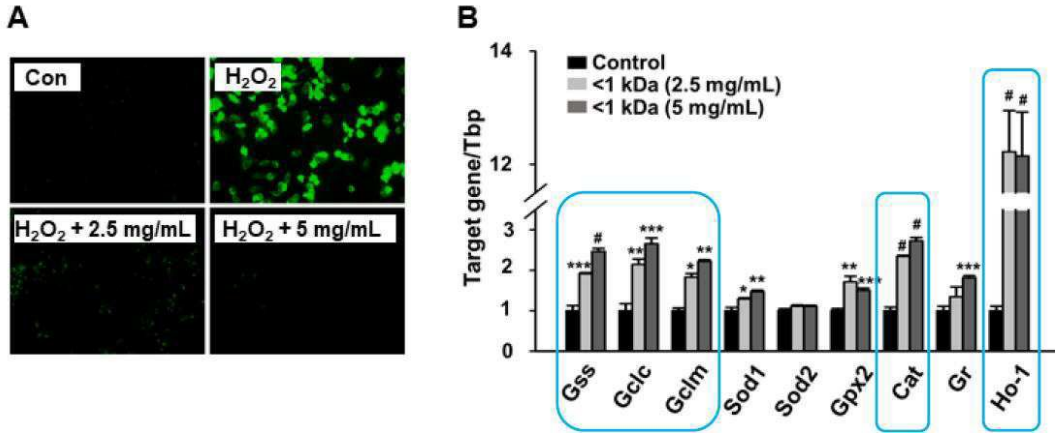
도면3


Cell viability rate (%)
120
100
80
60
40
20
0
***
**
*
#
#
#
(mg/mL)
0 0 0.1 0.25 0.5 1 2.5 5
H2O2 (7 mM)
- + + + + + + +

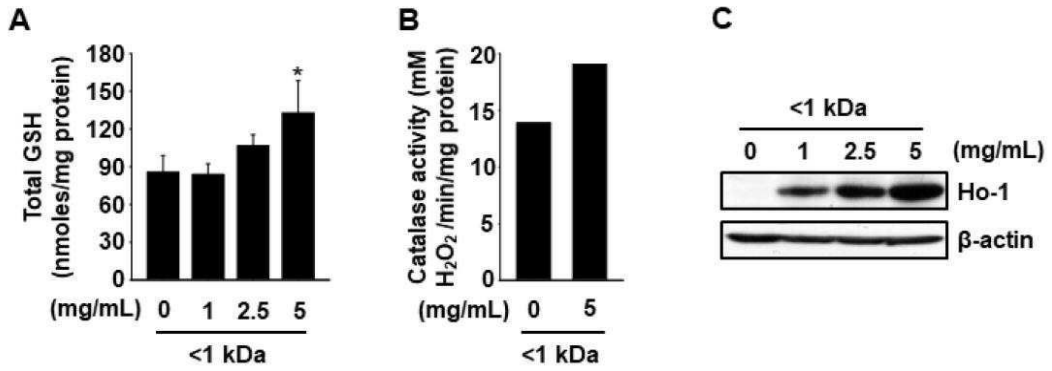
도면4


Cell viability rate (%)
120
100
80
60
40
20
0
**
*
#
(mg/mL)
0 0 1 2.5 5
Alcohol (750 mM)
- + + + +

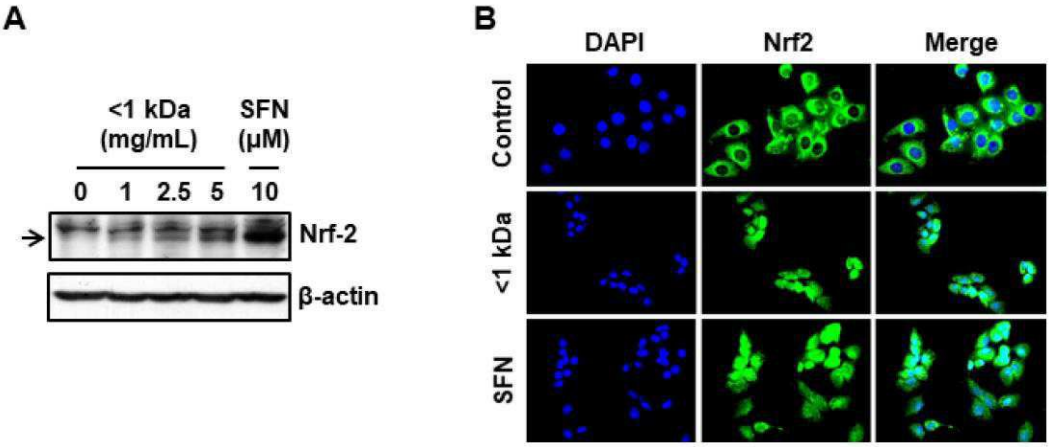
도면5


A
Con
H2O2
H2O2 + 2.5 mg/mL
H2O2 + 5 mg/mL
B
Control
<1 kDa (2.5 mg/mL)
<1 kDa (5 mg/mL)
Target gene/Tbp
14
12
3
2
1
0
Gss
Gclc
Gclm
Sod1
Sod2
Gpx2
Cat
Gr
Ho-1

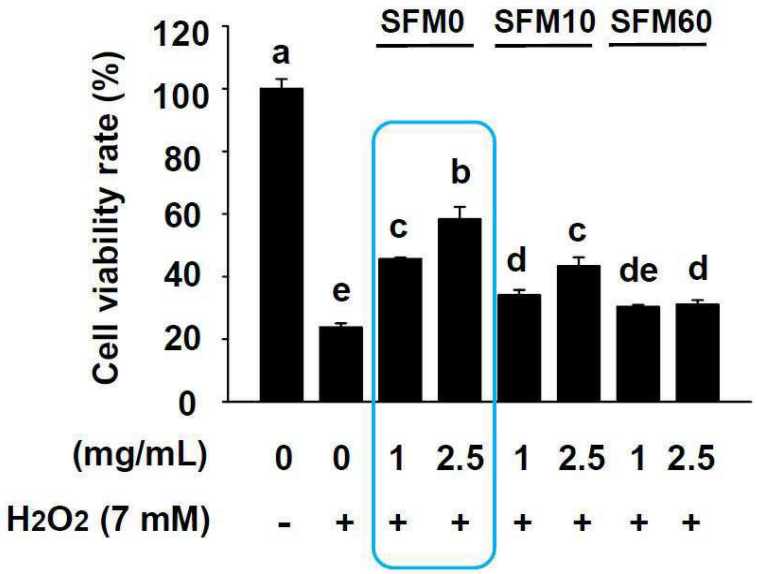
도면6


A
Total GSH (nmoles/mg protein)
180
150
120
90
60
30
0
*
(mg/mL) 0 1 2.5 5
<1 kDa
B
Catalase activity (mM H_2O_2 /min/mg protein)
20
15
10
5
0
(mg/mL) 0 5
<1 kDa
C
<1 kDa
0 1 2.5 5 (mg/mL)
Ho-1
β-actin

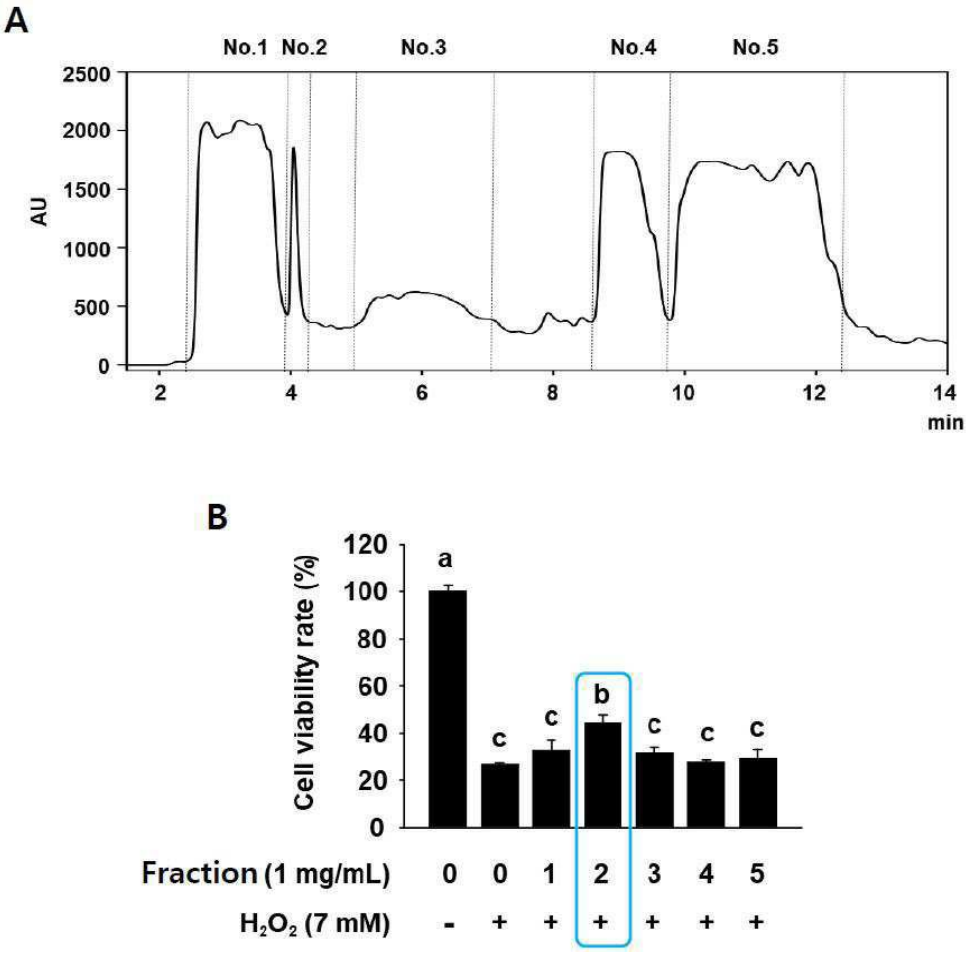
도면7


A
<1 kDa (mg/mL)
SFN (μM)
0 1 2.5 5 10
Nrf-2
β-actin
B
DAPI
Nrf2
Merge
Control
<1 kDa
SFN

도면8


SFM0
SFM10
SFM60
Cell viability rate (%)
120
100
80
60
40
20
0
a
e
c
b
d
c
de
d
(mg/mL) 0 0 1 2.5 1 2.5 1 2.5
H2O2 (7 mM) - + + + + + + +

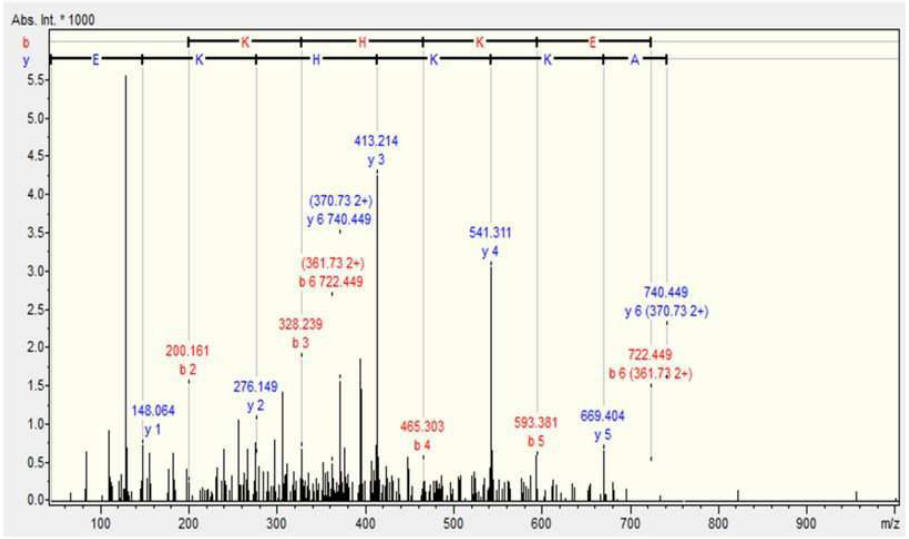
도면9


A
No.1
No.2
No.3
No.4
No.5
AU
2500
2000
1500
1000
500
0
2
4
6
8
10
12
14
min
B
Cell viability rate (%)
120
100
80
60
40
20
0
a
c
c
b
c
c
c
Fraction (1 mg/mL)
0
0
1
2
3
4
5
H2O2 (7 mM)
-
+
+
+
+
+
+

도면10

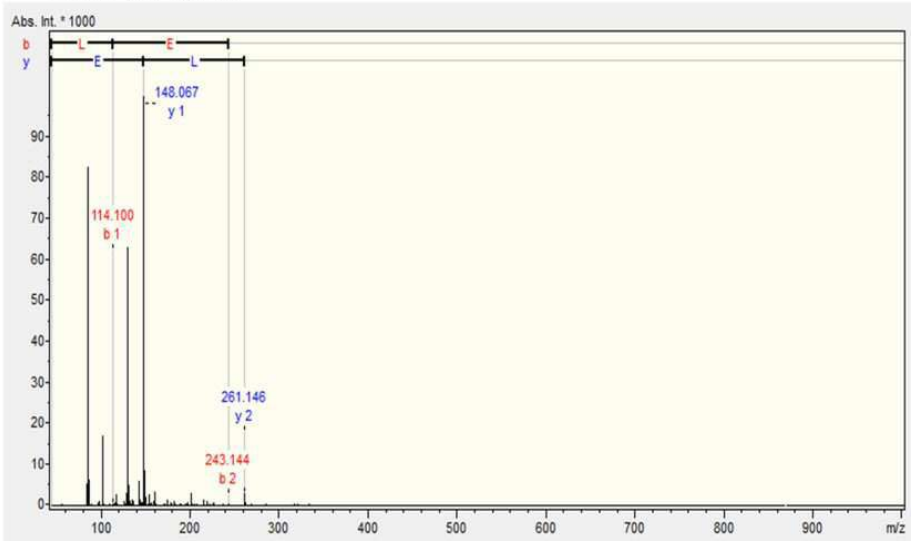
A

370.72 [M+2H] : AKKHKE

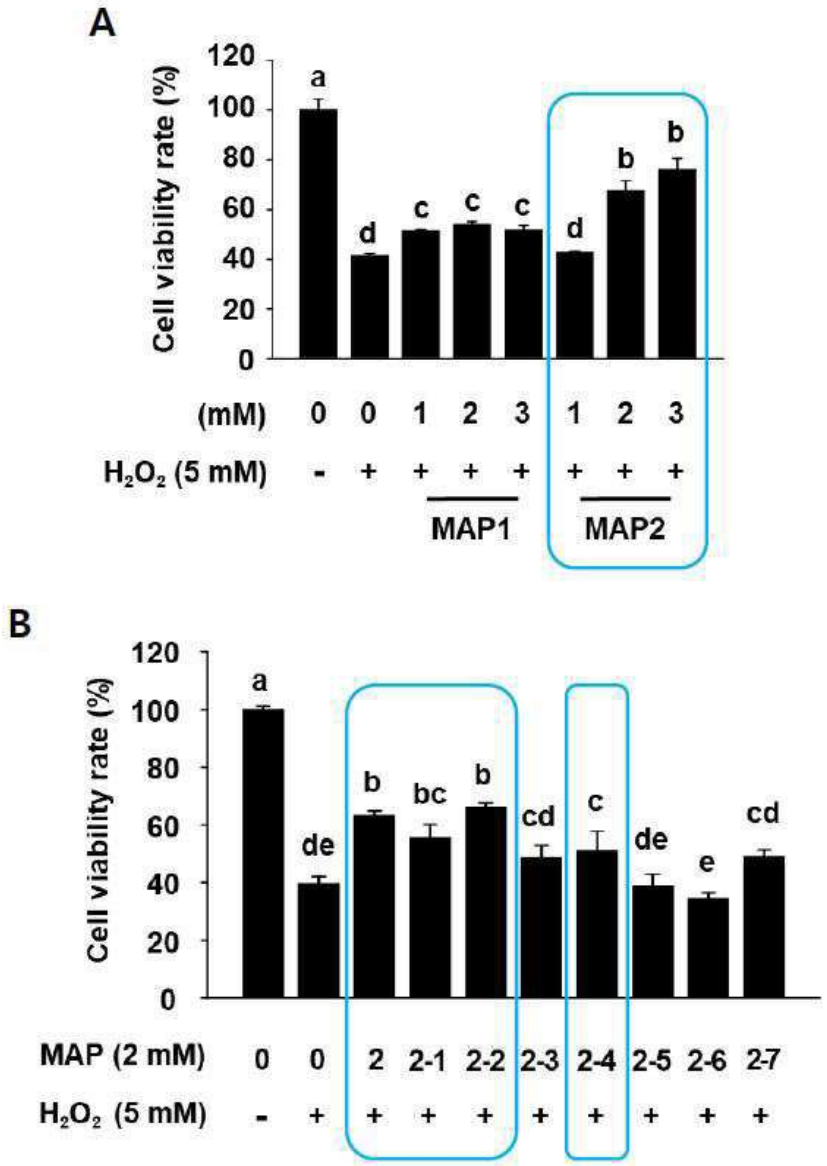


B

261.14 [M+H] : LE



도면11



서 열 목 록

<110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY

<120> Peptide isolated from protein hydrolysate of Tenebrio molitor mealworm and composition for preventing or treating liver injury comprising the same

<130> ADP-2019-0128

<160> 5

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide 1

<400> 1

Ala Lys Lys His Lys Glu

1 5

<210> 2

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide 2

<400> 2

Leu Glu

1

<210> 3

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide 3

<400> 3

Leu Asp

1

<210> 4

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide 4

<400> 4

Ile Glu

1

<210> 5

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide 5

<400> 5

Glu Leu

1