



등록특허 10-2282972



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년07월28일

(11) 등록번호 10-2282972

(24) 등록일자 2021년07월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/17 (2006.01) *A23L 1/305* (2006.01)

A61K 35/20 (2015.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/1709 (2020.05)

A23L 33/19 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2015-7036746

(22) 출원일자(국제) 2014년05월30일

심사청구일자 2019년05월17일

(85) 번역문제출일자 2015년12월28일

(65) 공개번호 10-2016-0024884

(43) 공개일자 2016년03월07일

(86) 국제출원번호 PCT/NZ2014/000102

(87) 국제공개번호 WO 2014/193248

국제공개일자 2014년12월04일

(30) 우선권주장

61/829,764 2013년05월31일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현

KR101065099 B1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문현

(73) 특허권자

디 에이2 밀크 컴퍼니 리미티드

뉴질랜드 오클랜드 쇼트랜드 스트리트 51 레벨 10
(우: 1010)

(72) 발명자

클라크, 앤드류 존

뉴질랜드 1052 파넬 오클랜드 클리블랜드 로드 14
트리베디, 말라브 수친

미국 33020 플로리다 헬리우드 매디슨 스트리트
2401

(74) 대리인

특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 정혜진

(54) 발명의 명칭 베타 - 카세인 A2 및 창자의 염증 예방

(57) 요 약

본 발명은 동물에서 창자의 염증을 예방하거나 염증 위험을 감소시키기 위한 조성물의 용도에 관한 것이고, 상기 조성물은 베타-카세인을 함유하며 베타-카세인은 적어도 50중량%의 베타-카세인 A2를 포함한다.

(52) CPC특허분류

A61K 35/20 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

동물에서 창자의 염증을 예방하거나 염증 위험을 감소시키는 조성물로서, 조성물이 베타-카세인을 함유하고 베타-카세인이 적어도 50중량%의 베타-카세인 A2를 포함하는 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 베타-카세인이 적어도 90중량%의 베타-카세인 A2를 포함하는 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 베타-카세인이 적어도 99%의 베타-카세인 A2를 포함하는 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 베타-카세인이 50중량% 미만의 베타-카세인 A1을 포함하는 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 베타-카세인이 10중량% 미만의 베타-카세인 A1을 포함하는 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서, 베타-카세인이 1중량% 미만의 베타-카세인 A1을 포함하는 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 조성물이 밀크 또는 유제품인 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 밀크가 신선한 밀크, 분유, 분말에서 재구성된 액상유, 탈지유, 균질화 밀크, 연유, 무가당 밀크, 저온살균 밀크, 비-저온살균 밀크, 또는 UHT 밀크인 조성물.

청구항 9

제 7항에 있어서, 유제품이 크림, 요구르트, 쿼크, 치즈, 베터, 또는 아이스크림인 조성물.

청구항 10

제 1항에 있어서, 창자의 염증이 염증성 창자병인 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서, 염증성 창자병이 크론병 또는 궤양성 대장염인 조성물.

청구항 12

제 1항에 있어서, 창자의 염증이 과민대장증후군인 조성물.

청구항 13

제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 있어서, 동물이 인간, 개, 또는 고양이인 조성물.

청구항 14

비인간 동물에서 창자의 염증을 예방하거나 염증 위험을 감소시키는 방법으로서, 베타-카세인을 함유하는 조성물의 동물에 의한 소비, 또는 소비를 위해 조성물을 동물에 제공하는 것을 포함하고, 베타-카세인이 적어도 50

중량%의 베타-카세인 A2를 포함하는, 방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 창자의 염증을 예방하거나 염증 위험을 감소시키기 위한 유단백질 베타-카세인 A2의 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 밀크 및 밀크 유래 식품 및 창자의 즉각적이고 지속적인 염증 둘 모두를 야기하는 것으로 나타난 높은 수준의 단백질 베타-카세인 A1을 함유하는 밀크 및 유제품의 소비를 회피하는 것에 관한 것이다. 본 발명은 일반적인 창자 과민증 뿐만 아니라 염증성 창자병을 포함하는 창자 염증 및 과민대장증후군의 예방에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

창자의 염증은 결장 및 소장의 염증을 특징으로 하는 다양한 장애 또는 질환으로부터 발생할 수 있다. 그러나 장애 또는 질환은 염증성 창자병 (IBD) 및 과민대장증후군 (IBS)을 포함한다. IBD는 일반적으로 임상적으로 정의되는 지속적인 질환, 주로 크론병(Crohn's disease) 및 궤양성 대장염(ulcerative colitis)을 나타낸다. IBD는 일반적으로 신체 자신의 면역 시스템이 소화 시스템의 구성요소를 공격하는 자가면역 질환으로 고려된다. IBS는 복부 통증 또는 불편함 변화된 창자 습관을 특징으로 하는 장애이다 (일반적으로 만성 또는 재발성 설사, 변비, 또는 둘 모두). IBS는 미국에서만 25 백만 내지 45 백만명의 사람에게 영향을 준다고 한다. 세 명의 IBS 환자 중 대략 두 명은 여성이다. IBS는 소아를 포함하는 모든 연령의 사람에게 영향을 미친다. 전세계 인구의 약 10 내지 25%가 IBS를 앓고 있는 것으로 추정된다. IBS의 영향력은 경증 불편부터 중증 쇠약의 범위일 수 있다. 중간 내지 심각한 IBS를 지닌 사람은 종종 이들의 신체적, 정서적, 경제적, 교육적, 사회적 웰빙을 해치는 증상에 시달린다.

[0003]

창자 염증의 정확한 원인은 잘 이해되어 있지 않다. 그러나, 특히 IBS의 경우, 식이가 중요한 것으로 보인다. 밀크 및 유지방이 특히 하나의 기여 요인인 것으로 여겨진다. 다수의 창자 염증 질환은 치유된다거나 보다는 관리된다. 상기 치료는 종종 식이 관리, 스트레스 관리, 및 약물 요법의 조합을 포함한다.

[0004]

전세계 인구에서 소비되는 밀크, 주로 우유는 인간의 식이에서 단백질의 주요 공급원이다. 우유는 통상적으로 리터 당 약 30 그램의 단백질을 포함한다. 카세인은 단백질의 가장 큰 구성요소를 차지한다 (80%). 지난 20년간 많은 건강 장애는 카세인 단백질, 특히 베타-카세인과 관련이 있다는 증거가 점점 커져 왔다.

[0005]

베타-카세인은 베타-카세인 A1 및 베타-카세인 A2로서 분류될 수 있다. 이러한 2개의 단백질은 대부분의 인간 접단에서 소비되는 밀크 중의 우세한 베타-카세인이다. 베타-카세인 A1은 단일 아미노산만큼 베타-카세인 A2와 상이하다. 히스티딘 아미노산이 베타-카세인 A1의 209개 아미노산 서열의 위치 67에 위치하는 반면, 베타-카세인 A2의 동일한 위치에는 프롤린이 위치한다. 그러나 이러한 단일 아미노산 차이는 창자에서 베타-카세인들의 효소적 분해에 매우 중요하다. 위치 67에서의 히스티딘의 존재는 베타-카소모르핀-7 (BCM-7)로서 공지된, 7개의 아미노산을 포함하는 단백질 단편이 효소적 분해시에 생성되는 것을 허용한다. 따라서, BCM-7은 베타-카세인 A1의 분해 생성물이다. 베타-카세인 A2의 경우에, 위치 67은 그 위치에서 아미노산 결합의 절단을 방해하는 프롤린이 차지하고 있다. 따라서, BCM-7은 베타-카세인 A2의 분해 생성물이 아니다.

[0006]

베타-카세인 B 및 C와 같은 다른 베타-카세인 변이체도 위치 67에 히스티딘을 갖고, A3, D 및 E와 같은 다른 변이체는 위치 67에 프롤린을 갖는다. 그러나, 이러한 변이체들은 유럽 원산지의 젖소로부터의 밀크에서, 매우 낮은 수준으로만 발견되거나, 전혀 발견되지 않는다. 따라서, 본 발명의 문맥에서, 용어 베타-카세인 A1은 위치 67에 히스티딘을 갖는 임의의 베타-카세인을 나타내고, 용어 베타-카세인 A2는 위치 67에 프롤린을 갖는 임의의 베타-카세인을 나타낸다.

[0007] BCM-7은 아편유사 펩티드이고 몸 전체에 걸쳐 아편유사 수용체를 강력하게 활성화시킬 수 있다. BCM-7은 위장벽을 건너 순환으로 들어가는 능력을 지녀서 아편유사 수용체를 통해 전신 및 세포 활성에 영향을 미칠 수 있다. 본 출원인 등은 밀크 및 유제품 중의 베타-카세인 A1의 소비 및 타입 I 당뇨병 (WO 1996/014577), 관상동맥 심질환 (WO 1996/036239) 및 신경 질환 (WO 2002/019832)을 포함하는 특정한 건강 질환의 이환율 간의 관련성을 이전에 확인하였다.

[0008] 또한 BCM-7이 소화 기능에 영향을 줄 수 있다는 의견이 있었다. 아편유사 수용체는 위장관 운동, 점액 생산 및 호르몬 생산을 조절하는 것을 포함하여, 위장관 기능에서 역할을 담당하는 것으로 보고되었다 (예를 들어, 문헌 [Mihatsch, W.A., et al., *Biol. Neonate*, 2005, 87(3):160-3]). 밀크에서 발견된 카세인은 장 운동을 억제하는 것과 관련되어, 변비를 발생시킬 수 있는 것으로 여겨지고 (Gunn T.R. and Stunzer D., *NZ Med. J.*, 1986, 99(813):843-6) 카소모르핀 및 합성 카소모르핀 유도체에 대한 연구는 BCM-7이 이러한 아편유사 수용체 매개 효과에 기여함을 나타낸다 (Charlin V. et al., *Rev. Med. Chil.*, 1992, 120(6):666-9). 그러나, 카소모르핀 및 장에서의 통과 시간 사이의 관계에 대한 일부 시험관내 증거가 존재하지만, 그 효과로부터 반드시 인간에서의 생체내 효과를 추정할 수 있는 것은 아님이 명백하다. 예를 들어, 적어도 한 연구는 베타-카세인 A1 또는 베타-카세인 A2 소비 및 변비 간의 관계를 입증하는데 실패하였다 (Crowley, E.T., *Nutrients*, 2013, 5, 253-266). BCM-7은 mu-오피에이트 수용체 매개 경로를 통해 점액의 생산을 자극하고 (Zoghbi, S., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2006, 290(6):G1105-13), 면역 시스템과 관련된 세포인 점막 고유층(lamina propria) 림프구의 증식을 조절하는 것으로 나타났다 (Elitsur, Y. and Luk, G.D., *Clin. Exp. Immunol.*, 1991, 85(3):493-7).

[0009] 상기 보고는 카세인 및 카소모르핀 (BCM-7 포함)과 위장관 기능 간의 관계를 나타낸다. 이러한 보고는 일반적으로 유단백질 또는 카세인을 이용한 연구 또는 BCM-7 자체를 이용한 연구에 기반한다. 그러나, 지금까지, 베타-카세인 A1의 소비를 창자 염증과 직접 관련시킨 보고는 없었다. 또한, 위장관 기능이 베타-카세인 A2가 높은 밀크 (및 거꾸로 베타-카세인 A1은 낮음)를 마신 후 개선되었다고 하는 소비자로부터의 입증되지 않은 보고가 있었으나, 이것은 비과학적인 보고이며 이들은 기능에서의 어떤 개선의 원인에 관해 비특이적이다. 또한, 그러한 밀크의 소비시에 어떤 개선 효과도 없는 많은 입증되지 않은 보고도 있다. 이러한 보고는 이들이 변비로부터 설사까지, 연속되는 소화 효과에 걸친 결과를 포함한다는 점에서 상충된다. 특히 잠재적으로 결과에 영향을 줄 수 있는 변수의 수가 매우 많은 식품 및 생리학적 기능의 경우에, 입증되지 않은 보고를 신뢰하여 결론을 내릴 수 없다.

[0010] 본 출원인은 이제 베타-카세인 A2의 소비에 비해 베타-카세인 A1의 소비와 창자의 염증 사이의 직접적인 관련성에 대한 결정적인 과학적 증거를 발견하였다. 창자 건강에 영향을 줄 수 있는 인간 식이에서의 수많은 인자, 및 밀크 및 유제품이 광범한 정렬의 단백질 구성요소 및 다른 구성요소를 함유함을 감안할 때, 본 출원인의 베타-카세인 A1 소비 및 창자의 염증성 질환 간의 뚜렷한 직접적인 연관성의 발견은 놀라운 것이다. 주목할 만하게는, 본 출원인은 베타-카세인 A1의 섭취에 대한 급성 창자 염증 반응 뿐만 아니라 베타-카세인 A1으로의 단기 노출로부터 초래된 창자의 장기 지속적인 염증의 증거를 발견하였다.

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 창자의 염증을 예방하거나 염증 위험을 감소시키는 방법을 제공하거나, 적어도 기존의 예방 또는 치료 요법에 대한 유용한 대안을 제공하는 것이다.

발명의 내용

발명의 개요

[0013] 본 발명의 첫 번째 양태에서, 동물에서 창자의 염증을 예방하거나 염증 위험을 감소시키는 조성물의 용도가 제공되고, 이 때 조성물은 베타-카세인을 함유하며 베타-카세인은 적어도 50중량%의 베타-카세인 A2를 포함한다.

[0014] 본 발명의 두 번째 양태에서, 동물에서 창자의 염증을 예방하거나 염증 위험을 감소시키는 조성물이 제공되고, 이 때 조성물은 베타-카세인을 함유하며 베타-카세인은 적어도 50중량%의 베타-카세인 A2를 포함한다.

[0015] 본 발명의 또 다른 양태에서, 동물에서 창자의 염증을 예방하거나 염증 위험을 감소시키는 조성물의 제조에서의 밀크의 용도가 제공되고, 이 때 밀크는 베타-카세인을 함유하며 베타-카세인은 적어도 50중량%의 베타-카세인 A2를 포함한다.

[0016] 본 발명의 추가의 양태에서, 베타-카세인을 함유하는 조성물을 동물에 의해 소비시키는 것을 포함하거나, 소비를 위해 조성물을 동물에 제공하는, 동물에서 창자의 염증을 예방하거나 염증 위험을 감소시키는 방법이 제공되

고, 이 때 베타-카세인은 적어도 50중량%의 베타-카세인 A2를 포함한다.

[0017] 베타-카세인 A2의 양은 베타-카세인 중 50% 내지 100중량% 범위의 임의의 양, 예를 들어 적어도 90%, 적어도 99%, 또는 심지어 100%의 양일 수 있다.

[0018] 본 발명의 특정 구체예에서, 조성물은 밀크 또는 유제품이다. 밀크는 분유 또는 액상유일 수 있다. 액상유는 신선한 밀크, 분말에서 재구성된 액상유, 탈지유, 균질화 밀크, 연유, 무가당 밀크, 저온살균 밀크 또는 비-저온살균 밀크, UHT 밀크의 형태 또는 임의의 다른 형태의 밀크일 수 있다. 유제품은 크림, 요구르트, 퀴크(quark), 치즈, 버터, 아이스크림, 또는 임의의 다른 유제품일 수 있다.

[0019] 창자의 염증은 염증성 창자병 또는 과민대장증후군일 수 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 염증성 창자병은 크론병 또는 궤양성 대장염일 수 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명의 대부분의 구체예에서, 동물은 인간이다. 그러나, 다른 구체예에서, 동물은 개, 고양이, 또는 사료에 밀크가 보충되는 임의의 다른 애완 동물일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 실시예 1의 식이가 공급된 래트에서 결장 미엘로페옥시다제 활성을 도시한다.

도 2는 실시예 1의 식이가 공급된 래트에서 공장 미엘로페옥시다제 활성을 도시한다.

도 3은 실시예 1의 식이가 공급된 래트의 혈장에서 혈청 아밀로이드 A의 수준을 도시한다.

도 4는 실시예 1의 식이가 공급된 래트로부터 취해진 장 섹션에 대한 조직학적 점수를 도시한다.

도 5는 뉴런 세포 및 GI 상피 세포에서 시스테인의 모르핀 및 BCM-7 농도 의존적 흡수를 도시한다.

도 6은 시간 경과에 따른 뉴런 세포 및 GI 상피 세포에서의 시스테인의 흡수를 도시한다.

도 7은 시간 경과에 따른 시스테인, GSH/GSSG 및 SAM/SAH에 대한 BCM-7 및 모르핀의 효과를 도시한다.

도 8은 BCM-7의 영향 하에 염증성 반응과 관련된 유전자 (NFkappaB 및 IL10)에서의 CpG 메틸화 변화를 도시한다.

도 9는 염증성 반응과 관련된 유전자 (MPO) 및 면역 반응과 관련된 유전자 (IL1R)에서의 CpG 메틸화 변화를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

상세한 설명

[0023] 본 발명은 단백질 베타-카세인을 함유하는 조성물 및 창자의 염증을 예방하거나 적어도 창자의 염증이 발생할 위험을 감소시키는 이의 용도에 관한 것이다. 중요하게는, 베타-카세인은 베타-카세인의 A2 변이체이거나, 조성물에 존재하는 총 베타-카세인 변이체의 적어도 50중량%를 구성한다. 조성물에서 A2 변이체의 우세함의 중요성은 본 출원인이 A1 변이체 및 인간에서 창자의 염증에 대한 생물학적 마커 간에 직접적인 관련성이 존재함을 밝혀 내었다는 사실에 기인하다. 따라서, 창자 건강에서의 개선은 A1 변이체의 소비가 회피되는 경우에 기대될 수 있다.

[0024] 본 명세서에서 사용되는 용어 "창자의 염증"은 결장 및/또는 소장의 급성, 일시적 또는 만성 및 지속적인 염증을 특징으로 하는 임의의 질환, 장애 또는 병태를 의미하기 위한 것이다. 그러한 질환, 장애 또는 병태는 창자의 비특이적 과민증 외에, 염증성 창자병 (IBD) 및 과민대장증후군 (IBS)을 포함하지만 이로 제한되는 것은 아니다. IBD는 일반적으로 임상적으로 정의되는 지속적인 질환, 주로 크론병 및 궤양성 대장염을 나타낸다.

[0025] 본 명세서에서 사용되는 용어 "A1 밀크"는 베타-카세인을 함유하는 밀크로서, 그 베타-카세인이 현저하게 베타-카세인 A1 (또는 209개 아미노산 서열의 위치 67에 히스티딘을 갖는 임의의 다른 베타-카세인 변이체)의 형태인 밀크를 의미하기 위한 것이다. A1 밀크는 50% 초과, 전형적으로 90% 초과 (이상적으로 100%)의 베타-카세인 A1인 베타-카세인 구성요소를 지닐 수 있다.

[0026] 본 명세서에서 사용되는 용어 "A2 밀크"는 베타-카세인을 함유하는 밀크로서, 그 베타-카세인이 현저하게 베타-카세인 A2 (또는 209개 아미노산 서열의 위치 67에 프롤린을 갖는 임의의 다른 베타-카세인 변이체)의 형태인 밀크를 의미하기 위한 것이다. A2 밀크는 50% 초과, 전형적으로 90% 초과 (이상적으로 100%)의 베타-카세인 A2

인 베타-카세인 구성요소를 지닐 수 있다.

[0027] 대부분의 인간 집단의 식이에서 베타-카세인의 일차적인 공급원은, 유일한 것은 아니지만, 밀크 또는 밀크에서 유래된 제품이고, 소비되는 대부분의 밀크는 베타-카세인의 A1 및 A2 변이체의 혼합물만을 함유하므로, 높은 함량의 A2 변이체를 지닌 밀크 (또는 그러한 밀크에서 제조된 제품)의 소비는 반드시 A1 변이체의 소비가 낮음을 의미할 것이다. 이러한 분석을 추가로 인용하면, 베타-카세인의 유일한 식이 공급원이 A2 변이체를 함유하고 다른 변이체를 함유하지 않는 경우, A1 변이체의 식이 섭취는 제거되고 따라서 베타-카세인 A1 소비로부터 발생하는 창자 염증의 건강상 해로운 결과는 제거될 것으로 예상될 수 있다.

[0028] 따라서, 본 출원의 발명은 동물 (특히 인간)의 식이에서 베타-카세인 A1의 감소 또는 제거에 기반하고, 이는 베타-카세인 함유 식품 조성물, 특히 밀크 및 유제품 중의 베타-카세인이 주로 또는 심지어 전적으로 베타-카세인 A2임을 보장함에 의해 달성된다.

[0029] 이상적으로는, 조성물 중의 베타-카세인은 100% 베타-카세인 A2이다. 따라서, 베타-카세인 A1의 완전한 제거는 베타-카세인 A1 (및 BCM-7)에 의해 야기되는 창자의 염증 위험을 감소시키거나 전부 제거함에 의해 관련된 건강상의 이익을 최대화시킨다. 그러나, 상기 위험은 베타-카세인이 주로 베타-카세인 A2이고, 다시 말해 베타-카세인 A2가 비제한적으로 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98% 및 99중량%를 포함하는 50중량% 내지 100% 사이의 임의의 양인 임의의 조성물에서 감소될 수 있다.

[0030] 본 발명은 베타-카세인이 적어도 50중량%의 베타-카세인 A2를 포함하는 베타-카세인을 함유하는 조성물의 용도에 관한 것이고, 상기 설명된 대로 베타-카세인 A1 및 베타-카세인 A2는 대부분의 집단이 소비하는 밀크에 존재하는 본질적으로 유일한 베타-카세인 변이체이므로, 본 발명은 또한 베타-카세인이 50중량% 미만의 베타-카세인 A1을 포함하는 베타-카세인을 함유하는 조성물의 용도에 관한 것이다. 바람직하게는, 조성물은 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99중량% 미만의 베타-카세인 A1을 함유하고, 이상적으로는 베타-카세인 A1을 전혀 함유하지 않는다.

[0031] 본 발명의 조성물은 전형적으로 밀크이지만, 크림, 요구르트, 퀘크, 치즈, 버터, 또는 아이스크림과 같은 임의의 밀크-유래 제품일 수도 있다. 조성물은 또한 밀크로부터 수득된 베타-카세인을 함유하는 밀크가 아닌 제품일 수 있다. 조성물은 베타-카세인 자체일 수 있거나, 베타-카세인으로부터 제조될 수 있으며, 베타-카세인은 분말 또는 과립과 같은 고체 형태 또는 고체 케익의 형태일 수 있다.

[0032] 밀크는 인간, 염소, 돼지 및 버팔로를 포함하는 임의의 포유동물로부터 수득될 수 있고, 본 발명의 바람직한 구체예에서 밀크는 우유이다.

[0033] 밀크는 신선한 밀크, 분유, 분말에서 재구성된 액상유, 틸지유, 균질화 밀크, 연유, 무가당 밀크, 저온살균 밀크 또는 비-저온살균 밀크, UHT 밀크의 형태 또는 임의의 다른 형태의 밀크일 수 있다.

[0034] 본 발명의 조성물은 주로 인간에 의한 소비에 이용가능하지만, 건강상의 이익은 고양이, 개 및 다른 애완 동물과 같은 일부 다른 동물에도 적절함이 이해되어야 한다.

[0035] 본 발명에 대한 증거는 실시예에 기재된 실험에서 발견된다.

[0036] 특히, 실시예 2는 래트의 결장에서 미엘로페옥시다제 (MPO) 활성에 대한 베타-카세인 A1 및 베타-카세인 A2 식이의 효과에 관한 것이다. MPO 활성은 염증에 대한 마커이다 (Krawisz, *et al.*, *Gastroenterology*, 1984, 87(6):1344-1350 and Dommels, Y.E.M., *et al.*, *Genes Nutr.*, 2007, 2(2):209-223). 결장 MPO 활성은 베타-카세인 A2-공급된 래트에 비해 베타-카세인 A1-공급된 래트에서 증가한 것이 발견되었는데, 이는 다시 염증성 반응의 지시인자인 베타-카세인 A1-공급된 래트에서 호중구 세포의 증가된 수준을 나타낸다. 상기 효과는 날록손 (공지된 아편유사 수용체 길항제)으로 처리된 래트에서 관찰되지 않았고, 이는 상기 효과가 BCM-7과 μ -오피에이트 수용체의 상호작용을 통해 매개됨을 입증한다.

[0037] 실시예 3은 공장에서 MPO 활성에 대한 효과에 관한 것이다. 본 결과는 베타-카세인 A1의 소비시에 소장에서 염증의 증가가 관찰될 수 없었음을 나타낸다. 이는 결장에서 염증을 나타낸 실시예 2와 대비된다. 실시예 3의 결과는 베타-카세인 A1의 소비에 의해 유도된 염증이 결장에 국한되고 장 전체에 퍼지지 않음을 증명한다.

[0038] 실시예 4는 염증의 급성 단계 동안, 주로 간에 의해 분비되는 단백질인 혈청 아밀로이드 A (SAA)의 농도에 관한 것이다 (Uhlar, C.M. and Whitehead, A.S., *Eur. J. Biochem.*, 1999, 265(2):501-523). SAA 수준은 전신 염증의 지시인자이다. 실시예 4는 임의의 치료 그룹들 간에 혈장 SAA 농도의 현저한 차이는 없었음을 나타낸다.

다시 말해, 이러한 연구로부터 전신 염증에 대한 명백한 증거는 없었다.

[0039] 조직학 연구에 관한 실시예 5는 결장의 염증이 회복하고 이것이 제시하는 방법에서 무증상일 수 있음을 반영한다. 조직의 염증성 반응을 증명하는 MPO 데이터에도 불구하고, 이는 광범한 범위의 데이터 세트로 인한 유의성 부족에 의해 입증된 바와 같이 시각적으로 명백하지 않았다.

[0040] SAA 및 소장 MPO 실험의 의의는 어느 전신 염증 연구에서도 증거가 관찰되지 않았다는 것이다. 이는 BCM-7 매개된 염증 반응과 일치한다. 어떤 이론에 구속되길 원치 않으며, 이는 BCM-7에 의해 매개된 장의 염증이 국소 염증성 반응이라는 이유로 설명될 수 있다. 다시 말해, 국소 염증의 증거 (MPO 연구)와 결합된, 전신 염증의 증거 (SAA 및 조직학 연구)의 부족은 베타-카세인 A1을 함유하는 식품의 섭취에서 유래된 BCM-7이 전신 효과 또는 소장에 대한 효과를 갖지 않으며 창자의 염증을 일으킨다는 강력한 표시이다.

[0041] 상기 발견은 BCM-7이 염증에 대응할 수 있다는 공개된 증거에 비추어 더 놀라운 것이다. 예를 들어, BCM-7은 신장에서 산화 스트레스를 감소시킨다고 보고되었다 (Zhang, W., et al., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23658831>). 산화 스트레스는 염증 효과이다. 따라서, BCM-7이 이러한 염증 효과를 감소시킨다고 보고된 발견은 건강과 관련된 생리학적 과정의 인자로서 BCM-7의 예측불가능성을 강조한다.

[0042] 실시예 6은 베타-카세인 A1 함유 밀크가 베타-카세인 A2 함유 밀크에 비해 위장관 증상에 효과를 갖는지를 조사하는 시험을 기재한다. 중요한 발견은 100% 베타-카세인 A1 밀크 및 100% 베타-카세인 A2 밀크의 소비 이후에 대변 농도(consistency)에서의 통계적으로 유의한 차이이다 ($p=0.038$). 이에 대한 통계적 증거는 여성만을 고려할 때 심지어 더 강하다 ($p=0.013$). 자신이 밀크에 불내성이라고 여기는 사람을 분석에서 제외했을 때 증거는 강하게 유지된다 ($p=0.044$). 베타-카세인 A2 밀크 요법에 비해 베타-카세인 A1 밀크 요법이 전반적으로 더 무른 대변을 발생시킨 것은 명백하다. 더 무른 대변을 발생시킨 손상된 수분 흡수 기능은 베타-카세인 A2에 비해 베타-카세인 A1이 소비될 때의 더 높은 창자 염증 수준의 증거이다.

[0043] 본 출원인은 또한 BCM-7 (베타-카세인 A1으로부터)과 시스테인 및 글루타치온 (GSH) 수준과 같은 염증 지시인자 간의 직접적인 관련성을 조사하고 발견하였다.

[0044] 산소 이온 및 퍼옥사이드와 같은 산소를 함유하는 화학적 반응성 분자인 반응성 산소 종 (ROS) 및 IBD 간의 연관성은 증가된 ROS 수준 및 감소된 항산화제 수준이 IBD, 크론병 및 궤양성 대장염의 병원성 메커니즘에 대한 주요 기여 인자라는 증거로부터 추론될 수 있다. ROS는 또한 염증성 백혈구를 상승시킴에 의해 IBD에서 면역 반응을 증강시킬 수 있다. 추가로, 염증 및 염증 질환의 진행은 또한 점막 항산화 방어에서의 결합, 특히 점막 GSH 수준과 관련된다. 항산화 특성을 갖는 약물은 IBD의 치료에서 유리한 효과를 나타내는 것으로 보고된다.

[0045] 시스테인 및 셀레늄의 혈중 수준은 GSH 합성의 지지 및 유지에 중요하고, 이는 다시 장 상피 경계 표면 상에서 상이한 수송체를 통한 위장 (GI)관으로부터의 식품-유래 항-함유 아미노산 시스테인 및 메티오닌의 흡수에 의존적이다.

[0046] 필수 미량 원소 셀레늄 (Se)의 결핍은 산화 스트레스와 관련된 여러 만성 질환 및 크론병을 포함하는 인간에서의 염증에 대한 위험 인자로 고려된다. Se는 글루타치온 퍼옥사이드 GPX2 또는 GPX1의 활성에 필수적이고, GPX2 및 GPX1 둘 모두는 뇌 및 점막에서 GSH의 수준을 조절하는데 관여하는 중요한 효소이다. GPX1은 IBD와 관련이 있는 것으로 공지되며, 이의 활성은 Se의 존재에 의존적이다.

[0047] GI 상피 세포의 다양한 아미노산 수송체 중에서, EAAT3 (홍분성 아미노산 수송체 3, EAAC1)은 시스테인 수송에 선택적이고 GI 상피 세포로부터 초기에 클로닝되었다. EAAT3은 소장, 특히 말단 회장에서 가장 현저하게 발현되고, 가장 높은 수준은 움 세포 및 하부 용모 영역에 존재한다. 이는 창자의 상피 라이닝을 지지하는 다능성 줄기 세포를 위한 주요 부위이다. 따라서, 낮은 GSH 수준의 국소 및 전신 결과와 함께, 시스테인의 감소된 EAAT3-의존성 흡수가 존재한다.

[0048] 상기 기재된 효과는 특히 GI 관에서, EAAT3의 임의의 조절체에 의해 매개되는 변화의 급성 효과이다. 그러나, 필수적인 GSH 전구체인 시스테인의 손상된 GI 흡수는 국소 및 전신 산화 스트레스를 발생시킬 뿐만 아니라, 후속하여 유전자 발현의 정상적인 후성적 조절의 파괴도 유도할 것이다. 이는 메티오닌 합성효소 효소 활성 및 S-아데노실메티오닌 (SAM) 수준의 조절을 통해 발생한다. SAM은 DNA 및 히스톤 메틸화를 위한 메틸 공여체로서 작용하고, S-아데노실호모시스테인 (SAH)으로 전환된다. 세포의 메틸화 능력은 SAM/SAH로서 언급된다. 레독스 상태에서 변화에 대한 순응성 후성적 반응은 다양한 질환, 특히 일반적으로 GI 관의 염증, 및 보다 특히 IBD 및

크론병과 같이 항산화 항상성 간섭으로 추적될 수 있는 질환에서 중요한 역할을 담당할 것이다.

[0049] 실시예 7은 BCM-7이 BCM-7 보다 큰 모르핀의 효능 순서, 및 뉴런 세포에서 0.16 및 1.31 nM 및 GI 상피 세포에서 각각 6.38 및 15.95 nM의 IC50 값을 지니며 농도-의존적인 방식으로 시스테인의 흡수를 억제할 수 있음을 나타낸다 (도 5). 시스테인 흡수의 억제는 30분에 완전히 발생하였고 48시간의 모르핀 또는 BCM-7 노출 동안 지속되었는데 (도 6), 이는 BCM-7로의 단일 노출 후 시스테인 흡수에 대한 장기적인 만성 효과를 나타낸다. 이러한 효과는 델타 아편유사 수용체가 아닌 선택적인 μ -길항체의 존재 하에, 지시된 대로, 차단에 매개된 μ -아편유사 수용체였다.

[0050] 실시예 8은 BCM-7 및 모르핀이 시스테인 및 GSH 수준에서 시간-의존적인 감소를 발생시켰음을 나타낸다. 뉴런 세포에서 시스테인의 세포내 수준, 글루타치온 (GSH) 대 이의 산화된 형태인 글루타치온 디설파이드 (GSSG)의 GSH/GSSG 비에 의해 반영되는 세포의 레독스 상태가 또한 감소하였는데 (도 7), 이는 잠재적으로 산화 스트레스 상태를 나타낸다. 추가로, SAM/SAH의 비 (메틸화 능력)도 상이한 시점에서의 BCM-7 처리에 의해 영향을 받았다 (도 7). 따라서, BCM-7은 주요 세포내 항산화 수준, 특히 GSH 수준에서의 감소를 유도하고, 산화-스트레스 신호전달 경로를 통해 염증 변화를 발생시킬 가능성을 갖는다. 추가로, SAM 수준에서 매개된 변화는 염증 경로의 원인이 되는 유전자에서의 후성적 변화를 유도할 수 있었다.

[0051] 실시예 9는 원형 아편유사 모르핀을 이용한 처리가 7,592개의 차별적 발현되는 전사체 (DET)를 발생시키는 한편, BCM-7 처리가 1,467개의 DET를 생성하였음을 예시한다. 501개 DET는 모르핀 및 BCM-7 둘 모두에 의해 공유되었다. 추가로, 이러한 결과는 전체적 DNA 메틸화에서 관찰된 변화와 현저하게 관련이 있는 것으로 발견된 질환 및 장애를 나타낸다. BCM-7 차별적 메틸화된 프로모터 전사체 (DMT)는 염증 질환과 관련되었다 (표 5). 따라서, GSH 항산화 수준 및 산화 스트레스에 대한 BCM-7의 긍성 효과는 본질적으로 만성 순응성 유전자 발현 변화로 해석된다. BCM-7의 영향 하에 후성적으로 변경된 유전자는 세포 기능 뿐만 아니라 염증 질환 경로를 조절하는데 직접 관여하며, 전사적으로 조절된 유전자는 또한 세포 기능 및 레독스 항상성에 관여한다 (표 5).

[0052] 실시예 10은 BCM-7의 영향 하에 염증성 반응을 매개하는데 기여하는 유전자에서의 DNA 메틸화 변화를 도시한다. NFkappaB와 같은 사이토카인 및 IL1과 같은 인터루킨 (도 8)은 BCM-7 노출 후에 그 후성적 상태가 변경된다. 따라서, 레독스 상태의 변화는 사이토카인의 후성적 상태에서의 장기적 변화를 매개하였다. 이는 잠재적으로 IBD와 같은 질환에서 장기적인 만성 변화 및 염증성 반응에 기여하는, 문자 손상의 메모리로서 작용할 것이다. 추가로, 변경된 후성적 상태는 실시예 10으로부터 분명하다. 따라서, BCM-7은 베타-카세인 A1 공급 연구로부터 명백한 바와 같이 MPO 활성을 변경시킬 뿐만 아니라, MPO 유전자의 후성적 상태도 변경시킨다 (도 9).

[0053] 이러한 연구는 베타-카세인 A1 소비 및 창자의 염증 간의 관련성의 첫 번째 뚜렷한 과학적 증거를 나타낸다. 종래에, BCM-7 (베타-카세인 A1 자체라기보다)에 관한 결정적이지 않은 상충된 입증되지 않은 보고서 및 연구는 당업자에게 혼동을 일으켜, 다수는 그러한 관련성이 없다고 여겼다. 본 출원인의 발견을 통해, 수년 동안 전세계적으로 많은 사람들이 고통받았던 다양한 염증성 창자 질환에 의해 야기된 문제에 대한 대안적인 가능한 해결책이 여기에 제공되며, 이는 즉, 식이에서 베타-카세인 A1의 회피이다. 이는 창자의 염증과 관련된 질환 또는 증상을 치료, 회피 또는 위험성을 감소시킬 목적으로 이용가능한, 주로 베타-카세인 A2 (그리고 베타-카세인 A1 부재)를 함유하는 베타-카세인 내용물을 갖는 밀크를 생성하고 그러한 밀크 및 밀크로부터 유래된 제품을 제조함에 의해 달성될 수 있다. 우유는 베타-카세인 A1 및 베타-카세인 A2의 상대적인 비율에 대해 시험될 수 있다. 대안적으로, 젖소는 베타-카세인 A1 또는 베타-카세인 A2 또는 둘 모두의 조합물을 함유하는 밀크를 생성하는 그 능력에 대해 유전적으로 시험될 수 있다. 이러한 기법은 널리 알려져 있다.

[0054] 본 발명은 염증성 창자 질환을 치료하거나 예방하기 위한 기법 또는 방법에 비해 뚜렷한 장점을 갖는다. 대부분의 기존 기법 또는 방법은 약제, 스트레스 관리 또는 식이 조절을 통한 의학적 개입에 의존적인데, 그 중 다수는 종종 성공이 제한적이거나 실제 성공한 적이 없다. 본 발명은 관리가 비교적 쉬운 해결책, 즉 식이의 "보통" (베타-카세인 A1 함유) 밀크를 베타-카세인 A2가 높다고 알려진 밀크, 바람직하게는 모든 존재하는 베타-카세인이 베타-카세인 A2인 밀크로 교체함에 의해 비-베타-카세인 A1 식이로 전환시키는 해결책을 제공한다. 본 발명은 약학적 개입보다 상당히 저렴하고, 또한 유제품 또는 다른 일반 식품의 회피와 같은 대규모 식이 변화에 대한 어떤 요구도 없다.

[0055] 본 명세서에서 종래 문서에 대한 임의의 언급은 그러한 종래 기술이 널리 알려져 있거나 당 분야에서 평범한 일반적인 지식의 부분을 형성함을 인정하는 것으로 간주되어선 안 된다.

[0056] 본 명세서에서 사용되는 용어 "포함하다", "포함하는" 및 유사한 용어는 배타적 또는 철저한 의미로 해석되어선

안 된다. 다시 말해, 이들은 "비제한적으로 포함하는" 것을 의미하기 위한 것이다.

[0057] 본 발명은 하기 실시예를 참조하여 추가로 기재된다. 청구된 발명은 어떤 방식으로든 이러한 실시예에 의해 제한되지 않음이 이해될 것이다.

[0058] 실시예

[0059] 실시예 1: 급식 방법

[0060] 72마리의 젖을 뱀 (4주령) 수컷 Wistar 래트를 이용하였다. 대조 식이에 대한 7일의 순응 기간 후에, 다음 3개의 식이 중 하나를 12 또는 60시간 동안 래트에 공급하였다: 100% A1 식이, 100% A2 식이, 대조 식이 (처리 당 n=6). 식이의 단백질 구성요소는 탈지유 (A1 및 A2 식이의 경우) 및 달걀 흰자 (비-유단백질 대조 식이의 경우)로부터 유래되었고, 에너지 및 다량영양소 조성에 대해 균형을 맞추었다 (표 1 참조). 상기 기간이 끝나기 15분 전에, 래트는 복강내 주입을 통해 날록순 또는 염수 (대조군)를 수용하였고, 그 후 비-소화가능한 트레이서, 이산화티탄을 경구로 강제 급식시켰다. 대변 및 소변 샘플을 다음 24시간 동안 7개 시점에 수집하고, 분석될 때까지 -20°C (대변) 또는 -80°C (소변)에서 저장하였다.

[0061] 표 1: 식이의 조성

성분	A1 밀크 식이		A2 밀크 식이		달걀 흰자 식이	
	gm	kcal	gm	kcal	gm	kcal
카세인	0	0	0	0	0	0
A1 분유	475	1691	0	0	0	0
A2 분유	0	0	468	1687	0	0
DL-메티오닌	3	12	3	12	0	0
달걀 흰자 (건조됨)	0	0	0	0	200	800
옥수수 전분	150	600	150	600	153	612
수크로스	288	1152	294	1176	500	2000
셀룰로스, BW200	50	0	50	0	50	0
옥수수유	45.2	406.8	43	387	50	450
미네랄 믹스 S10001	35	0	35	0	35	0
바이오틴, 1%	0	0	0	0	0.4	0
비타민 믹스 V10001	10	40	10	40	10	40
콜린	2	0	2	0	2	0
바이타르트레이트						
합계	1058.2	3902	1055	3902	1000.4	3902

[0062]

[0063] 실시예 2: 결장 MPO 활성

[0064] 실시예 1에 따라 사육된 래트로부터의 결장 조직을 확립된 방법에 기반하여 미엘로퍼옥시다제 (MPO) 활성에 대해 정량하였다 (Grisham, M.B., et al., *Methods Enzymol.*, 1990, 186:729-742). 결장 조직 (50 mg)을 균질화시키고, 원심분리를 통해 분배하고, 초음파 프로브에 의해 파괴시키고, 동결-해동 사이클로 처리하였다. 내인성 MPO는 562 nm에서 비색에 의해 측정되는 3,3',5,5'-테트라메틸-벤지딘테트라메틸-벤지딘 기질의 H₂O₂-의존성 산화를 촉매화한다. 동일한 균질액에 대해 바이신코닌산(bicinchoninic acid)(BCA) (Smith, P.K., et al., *Anal. Biochem.*, 1985, 150(1):76-85) 단백질 측정에 의해 활성을 표준화하였다. 결과를 도 1에 도시한다.

[0065] 실시예 3: 공장 MPO 활성

[0066] 이러한 실시예에서, 공장에서 취해진 조직 샘플을 분석하였다. 이용된 방법은 실시예 2에서와 동일하였다. 결과를 표 2 및 도 2에 도시한다.

[0067] 표 2: 결장 및 공장 조직에서 MPO 활성

식이	공장	SD
100% A1	0.458	0.164
75% A1:25% A2	0.497	0.107
50% A1:50% A2	0.476	0.112
25% A1:75% A2	0.557	0.119
100% A2	0.532	0.254

[0068] [0069] 실시예 4: 혈청 아밀로이드 A 수준

[0070] SAA 수준은 실시예 1에 따라 사육된 래트로부터 취해진 혈장에서 측정되었다. 측정은 시판되는 ELISA 키트를 이용하여 이루어졌다 (Tridelta Development Limited, Maynooth, Ireland). 결과를 표 3 및 도 3에 도시한다.

[0071] 표 3: 혈장 중 SAA 수준

	SAA	SD
A1 12	0.0304	0.021
A1 60	0.0129	0.012
A1 12 N	0.0223	0.018
A1 60 N	0.0106	0.008
A2 12	0.0349	0.011
A2 60	0.0085	0.006
A2 12 N	0.0391	0.005
A2 60 N	0.0103	0.007

[0072] [0073] 실시예 5: 장 조직학

[0074] 래트의 위장관에서 형태의 변화를 측정하기 위해 이용된 절차는 광학 현미경 하에 혈마톡실린 및 애오신 염색된 조직 색션의 조직학적 평가에 기반한다 (Knoch, B. et al., *J. Nutrigenet. Nutrigenomics*, 2009, 2(1):9-28 and Barnett, M.P., *BMC Immunol.*, 2010, 11:39). 상기 방법은 장 염증에 대한 베타-카세인 변이체의 효과를 확인하기 위해 100% A1 또는 100% A2 식이가 공급된 래트의 결장 조직으로부터 유래된 색션에 적용되었다. 결과는 도 4에 도시된다. 데이터 (평균 ± SEM)는 60시간 날록손 그룹에서 베타-카세인 A1-공급된 래트 및 베타-카세인 A2-공급된 래트 간에 유의한 ($P < 0.05$) 차이가 있었음을 나타내었고, 베타-카세인 A2-공급된 래트가 현저하게 더 높은 점수를 가졌다. 그러나, 이러한 조직학적 점수의 크기는 염증을 표시하는 것이 아니며, 전체 분석은 조직학 점수에 대한 식이, 시간, 또는 날록손 치료 효과의 증거를 나타내지 않는다.

[0075] 실시예 6: 위장 증상

[0076] 이러한 8주의 랜덤화된 교차 연구에서, 참가자 ($n=41$)는 2주의 낙농 세척 후에 두 그룹 중 하나로 랜덤화되었다: 1) A1 밀크 ($n=21$); 또는 2) A2 밀크 ($n=20$). 참가자는 두 번째 2주의 낙농 세척을 받은 후 대안적인 개입 밀크 아암으로 교차되서, 8주 연구의 끝에, 모든 참가자 ($n=37$)는 둘 모두의 밀크 개입을 완료하였다. 19세 내지 68세의 남성 (12) 및 29명의 여성 (29)이 동원되었다. 제외 기준은 (1) 우유 알레르기; 2) 의학적으로 진단된 락토스 불내성; 3) 임신 및 수유; 4) 지난 6개월간의 심혈관 사건; 5) 아편유사 소비; 6) 이전 8주 이내의 항생제 치료; 및 7) 스크리닝하기 4주 전 면역억제 약물 또는 항-염증 약물이었다. 참가자는 A1 밀크 또는 A2 밀크에 대해 2주로 랜덤화되기 전에 14일 낙농 세척 기간을 시작하였다 (낙농유가 공급된 라이스 밀크로 대체됨). 연구의 제 1 아암이 완료된 후에, 참가자는 다른 밀크 개입으로 교차되기 전에 두 번째 2주의 세척을 완료하였다.

[0077] 세척 라이스 밀크 - 참가자는 14일 세척 기간 동안 모든 낙농유를 공급된 라이스 밀크로 교체하고 연구의 지속 기간 동안 모든 다른 낙농 제품을 피하도록 지시받았다. 이들에게 비스킷 및 초콜렛과 같은 숨겨진 유제품 공급원에 관한 정보를 제공하고, 유제품 비함유 대안의 목록을 제공하였다. 참가자에게는 또한 각각의 14일 세척 기간 동안, 일 당 750mL의 라이스 밀크를 소비하도록 충분한 라이스 밀크 (So Natural Rice Milk, Freedom Foods, Australia)를 공급하였다. 라이스 밀크는 1리터의 초-고온 (UHT) 패키지로 공급되었고 100mL 당 하기의 영양 프로파일을 지녔다: 에너지 212kJ, 총 단백질 0.3g, 총 지방 1.0g 및 탄수화물 10.4g.

[0078] A1 밀크 - 참가자는 모든 낙농유를 공급된 A1 밀크로 교체하고 모든 다른 낙농 제품 및 유제품의 숨겨진 공급원을 피하도록 지시받았다. 2주 A1 밀크 개입 동안, 참자가에게 하루 동안에 걸쳐 750mL/일 (약 7.5g의 베타-카

세인 A1)의 A1 밀크를 소비하도록 지시하였다. A1 밀크의 Nano-LC ESI MS 분석 (APAF, Sydney)은 총 베타-카세인 중 A1 비율이 A1 밀크에서 >99%임을 발견하였다.

[0079] A2 밀크 - 참가자는 모든 낙농유를 공급된 A2 밀크로 교체하고 모든 다른 낙농 제품 및 유제품의 숨겨진 공급원을 피하도록 지시받았다. 2주 A2 밀크 개입 동안, 참자가에게 하루 동안에 걸쳐 750mL/일 (약 7.5g의 베타-카세인 A2)의 A2 밀크를 소비하도록 지시하였다. A2 밀크의 Nano-LC ESI MS 분석 (APAF, Sydney)은 총 베타-카세인 중 A1 비율이 0.1-0.5%였음을 발견하였다.

[0080] A1 밀크 및 A2 밀크 둘 모두를 1 리터 UHT 패키지로 참가자에게 공급하였고 이는 100mL 당 하기의 영양 프로파일을 지녔다: 에너지 189kJ, 총 단백질 3.1g, 총 지방 2.5g 및 탄수화물 (락토스 포함) 5.2g. 참가자는 순응도 달력 상에 매일 소비된 밀크의 부피를 기록하였다. 순응도는 소비된 밀크 부피를 예상되는 매일 밀크 소비 부피로 나누고 100을 곱한 비율로서 계산되었다. A1 밀크 및 A2 밀크는 동일한 일반 포장에 제공되므로 참가자는 이들이 수용한 밀크 개입을 알지 못한다.

[0081] Bristol 대변 등급 (Lewis S.J. and Heaton K.W., *Scand. J. Gastroenterol.* 1997, 32(9):920-4)을 결장 통과 시간의 대용치로서 이용하였다. 결과를 표 4에 도시한다.

표 4: 대변 농도의 Bristol 대변 등급 분석

	모든 참가자 (n=36)		여성만(n=25)		남성만(n=11)		밀크 불내성으로 스스로-기제 (n=8)		밀크-내성으로 스스로-기제(n=28)	
A1에 대한 평균 (±SE)	3.87 (0.11)		3.94 (0.15)		3.72 (0.15)		4.02 (0.28)		3.82 (0.12)	
A2에 대한 평균 (±SE)	3.56 (0.15)		3.50 (0.16)		3.70 (0.31)		3.86 (0.33)		3.47 (0.16)	
차이	0.31 (0.14)		0.44 (0.16)		0.02 (0.28)		0.16 (0.29)		0.35 (0.17)	
A1-A2 (±SE)										
페어드 t-시험에 대한 P 값	0.038		0.013		0.156		0.592		0.044	
중앙값 (A1, A2)	4.0	3.8	4.0	3.8	3.7	3.8	.0	4.0	3.95	3.7
25 백분위수 A1	3.35	3.02	3.25	2.9	3.5	3.1	3.67	2.9	3.22	3.02
75 백분위수	4.2	4.07	4.3	4.0	4.2	4.3	4.6	4.7	4.2	4.0
Wilcoxon 부호 순위 시험에 대한 P 값	0.085		0.028		0.824		0.598		0.115	

[0083]

실시예 7: 시스테인의 흡수에 대한 BCM-7의 효과

[0085] 방사선표지된 [³⁵S]-시스테인 흡수 검정을 Caco-2-GI 상피 세포 및 뉴런 세포에서, A1 밀크로부터 방출된 BCM-7의 존재 하에 수행하고, 비처리된 대조군 뿐만 아니라 모르핀; 원형 아편유사 수용체 효능제에 대해 비교하였다. 세포의 전처리는 앞서 기재된 대로 30분, 4, 24 및 48시간 동안 상이한 시점에 수행되었다 (Trivedi M., et al.; *Mol. Pharm.*, 2014). 간단히 말해, SH-SY5Y 인간 뉴런 세포 및 Caco-2 창자 상피 세포를 6웰 플레이트에 플레이팅하고 약물로 전처리하고 흡수를 측정하기 전에 다양한 시간 동안 인큐베이션시켰다. 배지를 흡입시키고 세포를 600 μL의 HBSS로 37°C에서 세척하였다. 비-방사성 HBSS를 흡입시키고, [³⁵S]-시스테인, (1 μCi/1 mL), 10 μM 표지되지 않은 시스테인 및 100 μM DTT를 함유하는 600 μL의 37°C HBSS로 대체하고, 세포를 5분 동안 인큐베이션시켰다. [³⁵S]-시스테인/HBSS 혼합물을 흡입시키고, 빙냉 HBSS를 이용한 2회 세척에 의해 처리를 종료하였다. 그 후 세포를 600 μL의 dH₂O로 용해시키고, 긁어 내어, 1.5 mL의 미세원심분리튜브에 수집하고, 10초 동안 음파처리하였다. 100 μL의 각 샘플을 단백질 검정을 위해 분취시켰다. 200 μL의 각 샘플 (3중으로)을 4 mL의 섬광 유체를 지닌 섬광 바이알로 분취시키고, 볼텍싱하고, 단백질 함량에 대해 표준화된 방사성에 대해 계수하였다. 추가로, 모르핀 및 BCM-7의 시스테인 흡수 효과 또한 선택적인 μ-길항체인 D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr (CTAP), 및 엘타 길항체 날트린돌 (NTI)의 존재 하에 특성화되었다. 결과를 도 5 및 6에 도시한다. 이러한 도면에서 각각의 * 표시는 비처리된 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이를 나타내고 (p<0.05), 각각의 # 표시는 비처리된 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다 (p<0.005).

[0086]

실시예 8: GSH 수준에 대한 BCM-7의 효과

[0087] 본 실시예에서는 실시예 7에서 관찰된 대로 시스테인 흡수에서의 감소가 잠재적으로 GSH 변화로 해석될 수 있고

항산화 수준에 영향을 미칠 수 있는지를 조사하였다. GSH의 세포내 수준은 상이한 시점 (30분, 4시간, 및 24시간)에 BCM-7 뿐만 아니라 모르핀을 이용하여 HPLC 및 종래에 이용된 전기화학적 구배 검출 방법을 이용하여 측정되었다 (Hodgson *et al.*, *J. Alzh. Dis.* 2013, Trivedi M., *et al.*, *Mol. Pharm.* 2014). 간단히 말해, SH-SY5Y 뉴런 세포를 α-MEM에서 컨플루언스까지 성장시켰다. 배지를 흡입시키고 세포를 1 mL의 빙냉 HBSS로 2회 세척하였다. HBSS를 흡입시키고 0.6 mL의 빙냉 dH₂O를 세포에 첨가하였다. 세포를 플라스크/디시에서 긁어내어 dH₂O에 혼탁시켰다. 세포 혼탁액을 15초 동안 열음에서 음파처리하고 100 μL의 혼탁액을 이용하여 단백질 함량을 측정하였다. 남아 있는 용해물을 미세원심분리튜브에 첨가하고 같은 부피의 0.4 N 과염소산을 첨가한 다음, 열음 위에서 5분 동안 인큐베이션시켰다. 샘플을 5,000 × g에서 원심분리하고 상청액을 새로운 미세원심분리튜브로 옮겼다. 100 μL의 샘플을 원뿔형 미세-오토샘플러 바이알에 첨가하고 오토샘플러 냉각 트레이에서 4°C로 유지시켰다. 10 μL의 이러한 샘플을 HPLC 시스템에 주입하였다.

[0088] 레독스 및 메틸화 경로 대사산물의 분리를 Agilent Eclipse XDB-C8 분석 컬럼 (3 × 150 mm; 3.5 μm) 및 Agilent Eclipse XDB-C8 (4.6 × 12.5 mm; 5 μm) 가드 컬럼을 이용하여 수행하였다. 2개의 이동상을 이용하였다: 이동상 A는 인산에 의해 pH 2.65로 조정된 0% 아세토니트릴, 25 mM 소듐 포스페이트, 1.4 mM 1-옥탄설폰산이었다. 이동상 B는 50% 아세토니트릴이었다. 유량은 초기에 0.6mL/분으로 설정되었고, 단계식 구배가 이용되었다: 0-9분 0% B, 9-19분 50% B, 19-30분 50% B. 그 후 컬럼을 다음 진행 이전에 5% B로 12분 동안 평형화시켰다. 온도는 27°C로 유지되었다. 전기화학 검출기는 BDD Analytical 세포 Model 5040을 구비한 ESA CoulArray였고 작동 전위는 1500 mV로 설정되었다. 표준 교정 곡선 및 ESA-공급된 HPLC 소프트웨어를 이용하여 대사산물의 피크 면적으로부터 샘플 농도를 결정하였다. 샘플 농도를 단백질 함량에 대해 표준화하였다. 일부 경우에 샘플은 필요에 따라 이동상에서 회석되거나, 티울 수준이 표준 곡선의 범위 내에 있음을 확실히 하기 위해 최대 50 μl의 샘플을 주입시켰다. 결과를 도 7에 도시한다.

실시예 9: DNA 메틸화 및 유전자 발현 수준에 대한 BCM-7의 효과

[0089] SAM/SAH에서의 변화는 다양한 기능에 관여하는 유전자에 영향을 주는, 전체적 DNA 메틸화에 잠재적으로 영향을 미칠 수 있었다. BCM-7에 의해 유도된 전체적 DNA 메틸화 수준은 앞서 기재된 대로 메틸-CpG 결합 도메인 (MBD) 단백질-풍부화된 유전체 서열화 (MBD-seq)를 이용하여 조사된 반면 (Trivedi M., *et al.*, *Mol. Pharm.* 2014), mRNA 번역 마이크로어레이 데이터는 비처리된 대조군 SH-SY5Y 세포 및 1 μM BCM-7로 4시간 동안 처리된 세포로부터, Agilent V3 마이크로어레이 칩을 이용하여 수득되었다.

[0090] 간단히 말해, 유전체 DNA를 세포주에 적절한 프로토콜을 이용하여 Easy DNA 키트 (Invitrogen K1800-01)에 의해 샘플로부터 추출하였다. 다음 설정을 이용하여 Covaris S2 상에서 단편화를 수행하였다: 동작 비율 10%, 강도 5, 200초 동안 베스트 당 200회 사이클. 평균 길이가 200 bp인 단편이 수득되었다. 파워 모드는 주파수 스위핑, 온도 6-8o C, 수위 12였다. 최대 5 μg을 AFA 증강제를 갖는 미세튜브에서 130 μl의 Tris- EDTA에 부하시켰다. DNA가 덜 투입된 샘플의 경우 (500 ng 아래) DNA를 TrisEDTA에서 1:5로 회석하였다. 5-3 μg으로 투입된 DNA를 DNA 1000 칩을 이용하여 Agilent 2100에서 분석하였다. 3 μg 미만으로 투입된 DNA를 회전 증발기에서 25 μl로 농축시키고 단편 분포를 고 민감도 DNA 칩 상에서 조사하였다. 메틸화된 DNA를 MethylCap 키트 (Diagenode, Belgium)를 이용하여 포획하였다. 수율은 전형적으로 총 포획된 DNA의 0.5 내지 8 ng였다. 후속하여 Illumina Genome Analyzer II를 이용하여 단편을 서열화하였다. 단편화되고 포획된 DNA의 농도를 480/520nm에서 Fluostar Optima 플레이트 리더 상에서 Quant-iT PicoGreen dsDNA 검정 키트에 의해 결정하였다 (Invitrogen P7589).

[0091] DNA 라이브러리를 제조하기 위해, DNA 샘플 Prep Master Mix 세트 1 (NEB E6040)을 Multiplexing Sample Preparation Oligo 키트 (96개 샘플, Illumina PE-400-1001)와 함께 이용하였다. 전체 단편화된 DNA를 활용하였고, Multiplexing Sample Preparation Oligo 키트에 제공된 멀티플렉싱 서열화 어댑터를 이용하여, NEB 프로토콜에 따랐다. 라이브러리의 크기 선택을 2% 아가로스 젤 (Low Range Ultra Agarose Biorad 161-3107) 상에서 수행하였다. 1Kb Plus 사다리 (Invitrogen 10787-018)를 이용하였고 젤을 120 V에서 2시간 동안 진행시켰다. 300 bps +/- 50bps의 단편을 잘라내어 Qiagen Gel Extraction Kit 컬럼 (Qiagen 28704) 상에 용리시켜 23 μl의 EB에서 용리시켰다.

[0092] 일부미나 라이브러리 증폭 인덱스 프로토콜을 다음과 같이 변경하여 이용하였다: 22 μl의 DNA를 이용하여 21회 사이클 진행을 수행하였다. 샘플을 Qiaquick PCR 정제 컬럼 (Qiagen 28101) 상에서 정제시키고 50 μl의 EB에서 용리시키고, 1:5 회석하고, 회전 증발기에서 10 μl로 농축시켰다. 1 μl를 Agilent 2100 HS DNA 칩에 적용하고 농도를 Agilent 2100 상에서 도말표본 분석에 의해 측정하였다. 샘플을 10 nM로 회석시켰다. NaOH로 변

성시킨 후 샘플을 16 pM으로 희석시켰다. 페어드-엔드(Paired-End) 유세포를 Cluster Station User 가이드에 따라 제조하였다. 페어드 엔드 진행 동안 2 x 51 사이클에 의해, 서열화를 HiSeq user 가이드 (Multiplexed PE Run을 수행함)에 따라 수행하였다.

[0094] 전체 유전체 마이크로어레이 하이브리드화를 위해, 각 샘플로부터의 500 ng의 총 RNA를 Low RNA Input Linear Amplification Labelling 키트 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 형광 염료 (Cy3; Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ)로 표지시켰다. 형광 표지된 cRNA의 양 및 품질은 NanoDrop ND-1000 분광광도계 및 Agilent Bioanalyzer를 이용하여 평가되었다. 제조사의 사양에 따라, 1.6 mg의 Cy3-표지된 cRNA를 세척 및 스캐닝 전에 17시간 동안 Agilent Human Whole Genome Oligo Microarray (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA)에 하이브리드화시켰다. 스캐닝된 이미지로부터 Feature Extraction 소프트웨어 (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA)를 이용하여 데이터를 추출하였다.

[0095] 전체 유전체 DNA MBD-seq는 오류 발견율 (FDR) <0.1 및 mRNA 마이크로어레이 데이터에 의해 정의되는 차별적으로 메틸화된 프로모터 전사체 (DMT)를 나타내었고 FDR<0.1에 의해 정의된 차별적으로 발현된 전사체 (DET)를 나타내었다. 전사체는 차별적으로 메틸화/전사된 유전자 및 비코딩 RNA 둘 모두를 포함하였다. 특수한 생물학적 또는 기능적으로 관련된 경로에서 BCM-7에 의해 유도된 후성적 변화 뿐만 아니라 전사 변화가 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 도구를 이용하여 평가되었고 가장 높은 영향력을 나타낸 경로가 확인되었다. 결과를 표 5에 도시한다.

표 5: 염증 질환 및 BCM-7 차별적으로 발현된 전사체

질환 또는 장애	DMT에 대한 P-값
염증 질환	3.96×10^{-3} to 4.51×10^{-2}
질환 또는 장애	DET에 대한 P-값
세포 항상성	1.27×10^{-4} to 3.28×10^{-2}
번역 후 변형	2.41×10^{-6} to 1.84×10^{-2}

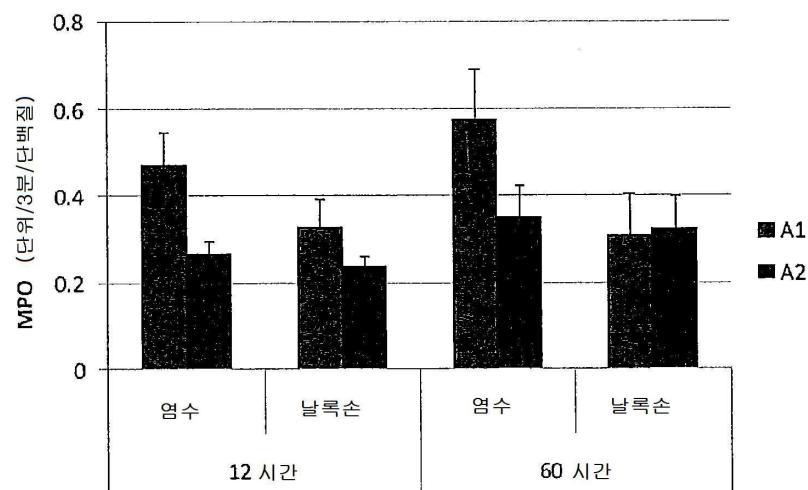
[0097] [0098] 실시예 10: 사이토카인의 후성적 상태에 대한 BCM-7의 효과

[0099] 여러 개별적인 사이토카인이 IBD 및 크론병과 같은 질환에서 염증성 반응을 매개하는데 관여하는 것이 보고된다. NFKappaB가 일례이다. 유사하게, IL1, IL10 IL33 등과 같은 인터루킨도 IBD에서 염증성 반응을 매개하는데 관여하는 것이 보고된다. 인터루킨 및 NFKappaB에 대한 BCM-7의 후성적 효과를 실시예 9에 상기 기재된 방법을 이용하여 조사하였다. 도 8 및 9는 이러한 유전자, 즉 MPO, IL1R, IL10 및 NFKappaB-활성화 단백질의 유전자내 또는 프로모터 영역 근처에서 DNA 메틸화 변화에 대한 BCM-7의 효과를 도시한다. "CpG"는 특정 유전자좌에 명시된 CpG 섬 (높은 빈도의 시토신-구아닌 부위)의 정상 수준을 표시한다. "Control"은 비처리된 대조군을 나타낸다.

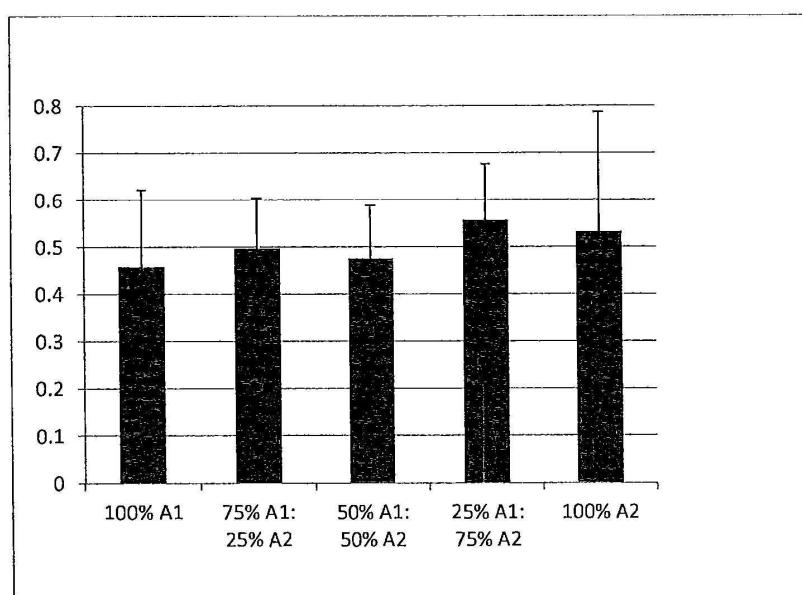
[0100] 비록 본 발명이 예로서 기재되었으나, 청구항에 정의된 본 발명의 범위를 벗어나지 않으며 변경 및 변형이 이루어질 수 있음이 이해되어야 한다. 더욱이, 공지된 등가물이 특정 기능에 존재하는 경우, 그러한 등가물은 본 명세서에서 구체적으로 언급된 바와 같이 포함된다.

도면

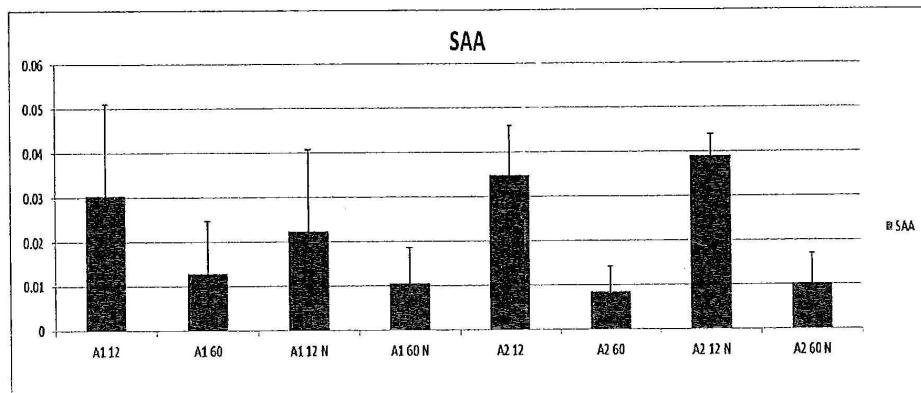
도면1



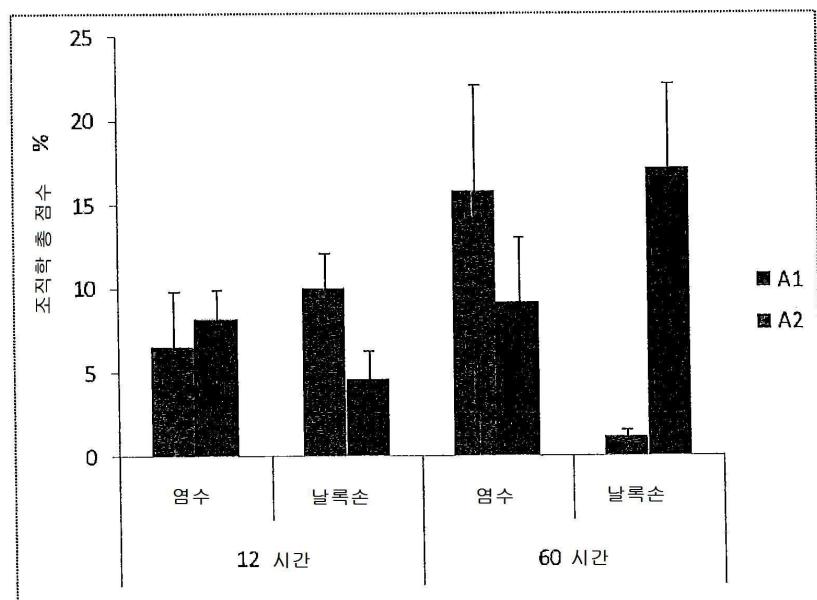
도면2



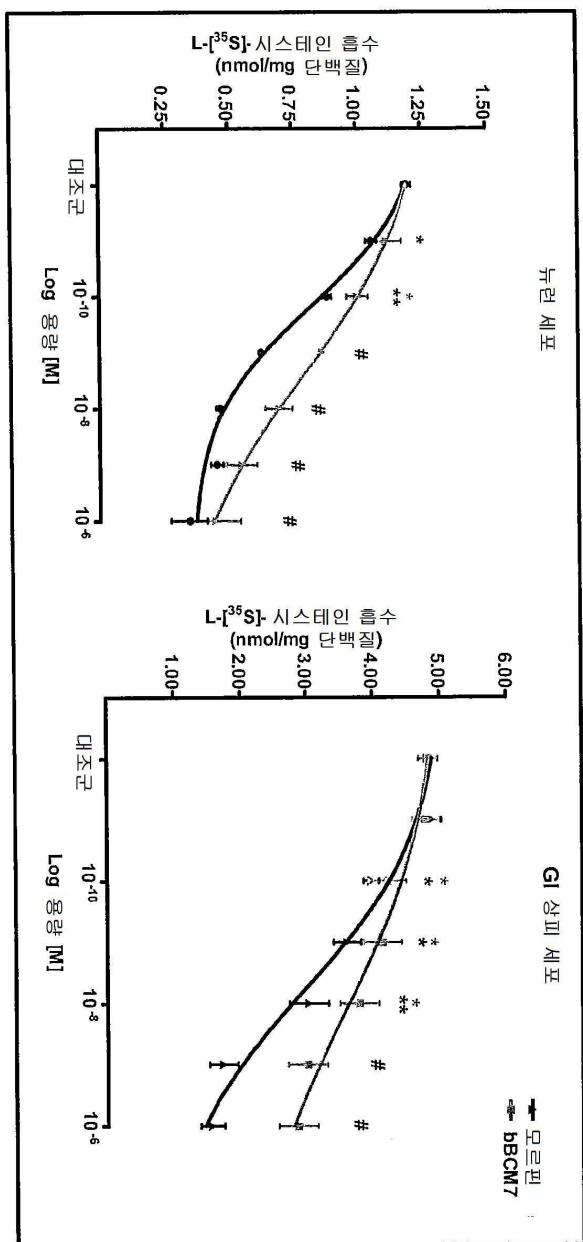
도면3



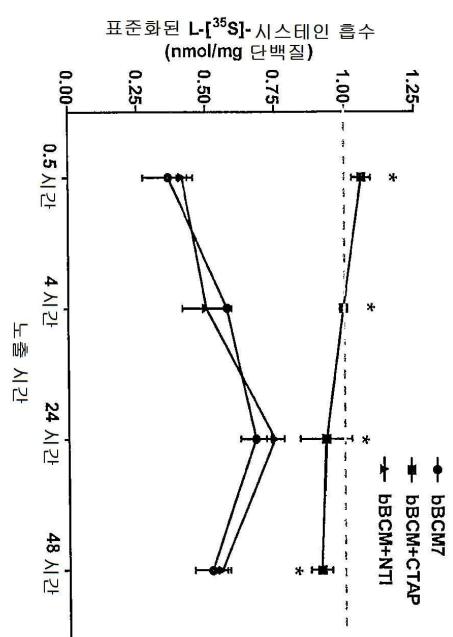
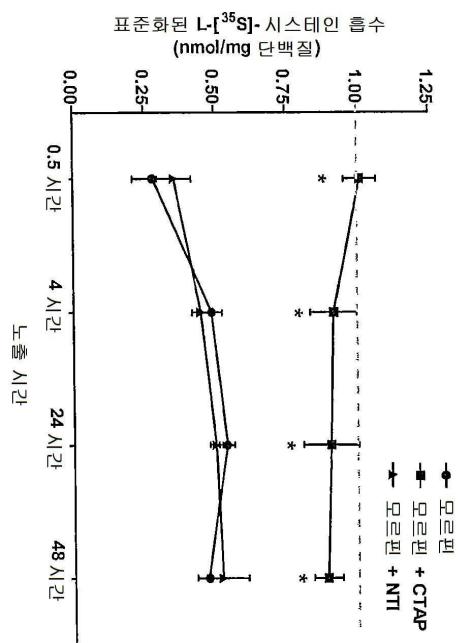
도면4



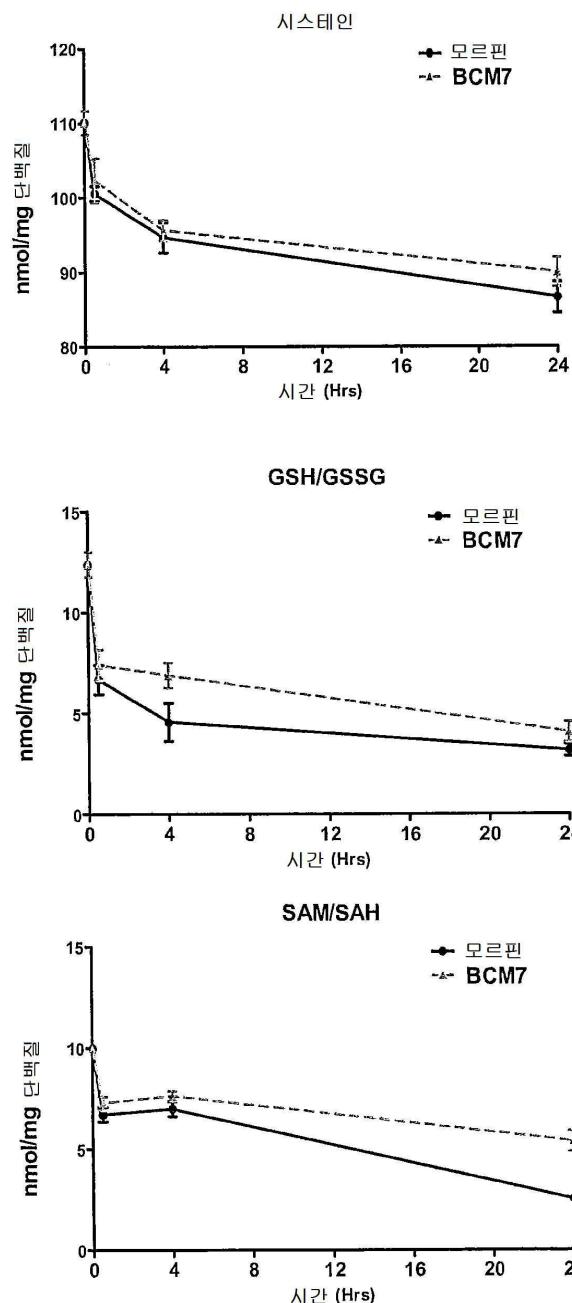
도면5



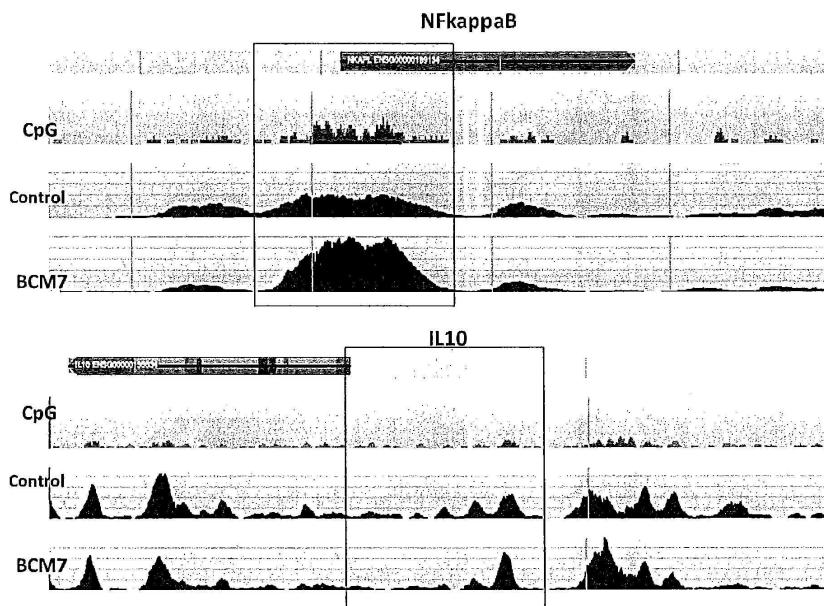
도면6



도면7



도면8



도면9

