



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0051604
(43) 공개일자 2011년05월18일

(51) Int. Cl.

A61K 38/07 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

A61K 35/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0108254

(22) 출원일자 2009년11월10일

심사청구일자 2009년11월10일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자

변희국

강원도 강릉시 견소동 신도브래뉴아파트 106동 1003호

전중균

강원도 강릉시 송정동 1061 경포신도브래뉴 301-803호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

전중학

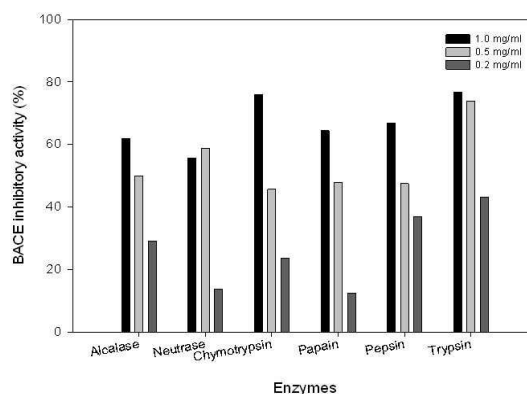
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 동물 플랑크톤 유래의 알츠하이머 질병의 억제 또는 예방을 위한 조성물 및 그 제조 방법

(57) 요약

본 발명에서는 해양 동물 플랑크톤인 로티퍼(rotifer) 유래의 단백질 가수분해 산물을 유효 성분으로 함유하는, 알츠하이머 질환과 같은 퇴행성 뇌질환에 관여하는 베타-세크레타제의 활성을 억제할 수 있는 추출물 및 이를 유효 성분으로 함유하는 약리학적, 식품공학적 조성물 및 이들을 제조하는 방법을 제안한다. 본 발명에 따라 얻어지는 로티퍼 유래의 펩타이드 추출물은 베타-세크레타제의 활성을 크게 억제할 수 있고, 대량 배양이 가능한 동물 플랑크톤으로부터 상술한 약리학적 기능을 갖는 조성물을 의약품 또는 건강 보조 식품으로 응용할 수 있으므로, 경제성을 확보할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

김세권

부산광역시 동래구 사직동 1017 사직쌍용예가아파트 125-1402호

박흠기

강원도 강릉시 포남동 대인4차아파트 1004호

이민수

부산광역시 연제구 연산1동 327-9 부림맨션 2동 101호

이정권

강원도 강릉시 교동 1832-7호 201호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 B10400109A280000110

부처명 국토해양부

연구관리전문기관

연구사업명 마린바이오21사업

연구과제명 미이용 수산자원의 고도활용기술개발 및 산업화

기여율

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2009년 01월 01일 ~ 2009년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

동물 플랑크톤인 로티퍼의 체성분을 이루는 단백질을 가수분해하여 얻어지는 펩타이드를 유효 성분으로 함유하는 알츠하이머 질병(Alzheimer's disease)의 억제 또는 예방 효과를 갖는 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 펩타이드는 상기 로티퍼의 체성분을 이루는 단백질을 트립신으로 처리한 가수분해 산물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 조성물은 베타-세크레타제(β -secretase) 억제 활성을 갖는 조성물.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 로티퍼는 브라키오누스속(*Brachionus*)에 속하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 로티퍼는 브라키오누스 로툰디포미스(*Brachionus rotundiformis*), 브라키오누스 플리카틸리스(*Brachionus plicatilis*), 브라키오누스 칼리시플로루스(*Brachionus calyciflorus*) 또는 브라키오누스 루벤스(*Brachionus rubens*)에서 선택되는 조성물.

청구항 6

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 로티퍼에서 유래된 펩타이드를 함유하는 유효 성분은 0.01 ~ 10.0 mg/ml의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 펩타이드는 상기 로티퍼를 트립신으로 처리하고, 상기 트립신 처리에 의하여 얻어진 가수분해산물을 칼럼 크로마토그래피에 의하여 분리하여 분획 성분(1차 분획 성분) 중에서 1번째 분획 성분인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 펩타이드는, 상기 1차 분획 성분 중 1번째 분획 성분을 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)로 분리하여 얻어진 분획 성분(2차 분획 성분) 중에서 3번째 분획 성분인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 로티퍼에서 유래된 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

분말화된 동물 플랑크톤인 로티퍼를 단백질 분해효소로 처리하여 분말화된 로티퍼의 체성분 중에 함유되어 있는 단백질로부터 가수분해된 펩타이드를 얻는 것을 특징으로 하는 로티퍼 유래의 알츠하이머 질병의 억제 또는 예방 효과를 갖는 유효 성분을 제조하는 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 얻어진 펩타이드를 크로마토그래피를 사용하여 분리하는 단계를 더욱 포함하는 방법.

청구항 12

제 10항 또는 제 11항에 있어서,

상기 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 퇴행성 뇌질환을 치료 또는 예방할 수 있는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 알츠하이머 질병의 치료, 예방 및/또는 억제 효과를 갖는 동물 플랑크톤 유래의 펩타이드 추출물을 유효 성분으로 함유하는 약리학적, 식품공학적 조성물 및 이들 추출물을 제조하기 위한 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 파킨슨병, 알츠하이머 질병, 헌팅톤병, 근위축성 측색 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 등과 같은 퇴행성 뇌질환은 현대 의학에서도 해결하고 있지 못하는 난치병들이다. 그 중에서도 알츠하이머 질병(Alzheimer's disease)은 노인성 치매(senile dementia)의 주요 원인으로, 주로 65세 이상의 노인들에게 발병하지만, 드물게는 그보다 훨씬 이른 연령에서도 조발성 알츠하이머 질병(early-onset Alzheimer) 역시 보고되고 있다. 한 연구 결과에 따르면 2050년경에는 인구 85명당 1명꼴로 알츠하이머 질병 환자가 생겨날 것이라고 보고되는 등(Ron Brookmeyer et al. "Forecasting the global burden of Alzheimer's disease", Johns Hopkins University, Dept. of Biostatistics Working Papers 130, 2007), 2050년경에는 세계적으로 1억 1천만 명 정도의 알츠하이머 질병 환자가 생길 것으로 보고되고 있다. 특히, 급속한 노령화가 진행되고 있는 국내의 추세를 고려해 볼 때, 노인성 치매의 주원인인 알츠하이머 질병을 비롯한 퇴행성 뇌질환을 효율적으로 예방, 치

료할 수 있는 제제를 신속하게 개발할 필요성이 제기된다.

- [0003] 알츠하이머 질병을 앓고 있는 환자의 경우, 초기에는 단기간의 기억 상실에서부터 감정의 기복, 언어 능력의 상실 및 장기간 기억 손상을 거쳐 최종적으로는 사망에 이르게 된다. 현재까지 알츠하이머 질병을 치료하기 위한 효율적인 방법은 알려져 있지 않으며, 운동이나 균형 있는 식습관 등을 통하여 알츠하이머 질병을 어느 정도 예방할 수 있는 정도이다.
- [0004] 알츠하이머 질병의 원인과 관련해서는 크게 i) 신경전달물질인 아세틸콜린(acetylcholine)의 합성이 저하되기 때에 야기된다는 가설(아세틸콜린 가설, cholinergic hypothesis), ii) 뇌에서 아밀로이드 펩타이드가 축적되는 것이 원인이라는 가설(아밀로이드 가설, amyloid hypothesis), iii) 과도하게 인산화된 타우 단백질(tau protein)의 이상으로 알츠하이머 질병이 개시된다는 가설(tau hypothesis)이 제기되고 있고, 그 중에서도 아밀로이드 가설이 폭넓게 지지를 받고 있다.
- [0005] 아밀로이드 가설에 따르면, 40~42개의 아미노산으로 구성되는 베타-아밀로이드(amyloid β peptide, A β)가 뇌 세포에 축적되어 알츠하이머 질병의 가장 중요한 원인으로, 베타-아밀로이드는 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein, APP)의 단백질 분해에 의하여 생성된다. 아밀로이드 전구체 단백질의 분해와 관련해서 3개의 단백질 분해효소(proteolytic enzyme), 즉 알파-세크레타제(α -secretase), 베타-세크레타제(β -secretase) 및 감마-세크레타제(γ -secretase)가 관여한다.
- [0006] 이를 보다 구체적으로 설명하면, 아밀로이드 전구체 단백질은 단일한 막관통 단백질(transmembrane protein)로서, 590~680개의 아미노산으로 이루어진 세포의 아미노말단 도메인(extracellular N-terminal domain)과 세포 내 신호 전달 서열(intracellular signal transduction sequence)을 포함하는 약 55개의 아미노산으로 구성된 세포질 테일(cytoplasmic tail)로 구성된다. 이와 같은 아밀로이드 전구체 단백질 유전자의 전사 RNA(mRNA)는 선택적 스플라이싱(alternative splicing)을 통하여 8개의 동소체(isoform)를 형성하며, 그 중에서 3개의 동소체가 뇌에 주로 존재한다.
- [0007] 아밀로이드 전구체 단백질은 크게 2개의 경로를 거쳐 단백질 분해 프로세싱(processing)을 거친다. 우선 알파-세크레타제는 아밀로이드 전구체 단백질의 베타-아밀로이드 도메인의 17번째 아미노산을 절단하여 큰 수용성 N-말단 단편(APPs α)과 대략 10 KDa의 비-아밀로이드형 C-말단 단편(C83)을 형성하고, 이들 단편이 감마-세크레타제에 의하여 추가적으로 분해되어 비-아밀로이드형 펩타이드(P3)를 생성한다. 이에 반하여, 베타-세크레타제에 아밀로이드 전구체 단백질의 베타-아밀로이드 도메인 내에서 이 전구체 단백질을 절단하여, 대략 100-KDa의 짧은 수용성 N-말단 단편(APPs β)과 아밀로이드 생성형의 대략 12-KDa의 C-말단 단편(C99)을 생성하고, 감마-세크레타제에 의하여 C99 단편을 추가로 절단함으로써 베타-아밀로이드가 생성되는데, 감마-세크레타제에 의하여 절단되는 부위에 따라 40개의 아미노산으로 구성되는 베타-아밀로이드(A β_{40})와 42개의 아미노산으로 구성되는 베타-아밀로이드(A β_{42})가 생성된다.
- [0008] 이러한 점을 고려할 때, 대표적인 퇴행성 뇌질환인 알츠하이머 질병을 야기하는 것으로 알려진 베타-아밀로이드(A β)의 뇌세포 내에서의 축적을 방지하기 위해서는 아밀로이드 전구체 단백질(APP)이 아밀로이드 생성형의 C-단편(C99)로 절단되도록 유도하는 베타-세크레타제의 활성을 억제할 필요가 있다.
- [0009] 베타-세크레타제는 또한 BACE1(β -site APP-cleaving enzyme 1) 또는 메맵신 2(memapsin 2)로도 불린다. 현재까지의 일부 연구에 따르면, 막관통 아스파르트산 단백질 분해효소인 BACE의 과-발현에 의하여 베타-세크레타제의 활성이 증가하며, BACE의 과-발현에 의하여 APP가 베타-세크레타제의 절단 부위에서 정확하게 절단되며, BACE antisense 올리고뉴클레오타이드에 의하여 베타-세크레타제의 활성이 억제되며, 정제된 BACE가 APP를 정확하게 절단하여 베타-세크레타제의 특성을 보인다는 연구(Robert Vassar et al., β -Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE, *Science*, 286, 735-741 (1999))와 막-결합 단백질인 아스파르트산 단백질 분해효소 역시 베타-세크레타제가 베타-아밀로이드의 생성을 억제하기 위한 표적 물질이라는 연구(Riqiang Yan et al, Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β -secretase activity, *Nature*, 402, 533-537 (1999))가 보고되고 있다.
- [0010] 특히, 베타-세크레타제는 베타-아밀로이드 생성을 개시하는 효소로서 베타-세크레타제의 활성을 억제함으로써 베타-아밀로이드의 감소는 물론이고 그 이후의 해로운 모든 단계를 또한 방지할 수 있다는 점, 베타-세크레타제

를 코딩하는 유전자를 변형시키더라도 심각한 문제가 없으므로 임상적으로도 안전하다는 점에서 알츠하이머 질병의 치료를 위한 표적으로서 많은 이점을 가지고 있다. 이에 따라 베타-세크레타제의 활성을 저해시키기 위한 많은 억제제가 보고되고 있다.

[0011] 예를 들어 “Glu-Val-Asn-Leu-Ala-Ala-Glu-Phe”의 8개의 아미노산을 기본 구성으로 하되, Lue-Ala 사이의 펩티드 결합이 하이드록시에틸렌기(hydroxyethylene group)로 변형된 1세대 베타-세크레타제 억제제인 “OM99-2” 외에도, 시클로아미드 우레탄 마크로사이클릭 고리(cycloamide urethane macrocyclic ring)을 가지는 유도체, 하이드록시에틸아민 유도체, 페닐노르스타틴-기반의 유도체, 3차 카빈아민(tertiary carbineamine) 등이 베타-세크레타제의 억제제로서 보고되었다(Varghese John et al., Human β -Secretase (BACE) and BACE Inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 4625-4630 (2003); Arun K. Ghosh et al., β -Secretase as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease, *Neurotherapeutics*, 5, 399-408 (2008)).

[0012] 이와 함께 식물에서 유래한 페놀 화합물로서 1,2,3-trigalloyl glucopyranoside, acetonyl geraniin, euphorscopin, furosine, helioscopinin A, helioscopinin B, jolinin, rogosin E가 BACE1의 활성을 억제한다는 연구 결과도 있다 (Mira Jun et al., Plant Phenolics as β -Secretase(BACE1) Inhibitors, *Food Science and Biotechnology*, 15(4), 617-624 (2006)). 아울러, 대한민국 등록특허 제610562호에서는 과일, 야채, 시앗 등에 들어있는 천연 유래 다가 페놀 화합물인 플라보노이드 유도체인 아멘토플라본, 히노키플라본, 오크나플라본 등의 플라보노이드 유도체를 유효 성분으로 포함하고, 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 뇌졸중 또는 치매의 예방 또는 치료를 위한 조성물을 제안하고 있다.

[0013] 하지만, 대표적인 퇴행성 뇌질환인 알츠하이머 질병의 중요한 원인인 베타-아밀로이드의 생성을 개시하는 베타-세크레타제의 활성 억제제를 산업적으로 응용하기 위해서는 이들 억제제를 대량으로 생산할 수 있는 방법이 모색될 필요가 있다.

[0014] 한편, 종래 화학 합성 방법 등을 통하여 제조되었던 항생제 등에 대한 내성이 증가하는 등의 문제가 발생됨에 따라, 최근 미국, 일본 및 유럽을 비롯한 세계 각국에서는 천연 물질로부터 약리학적 활성을 갖는 물질을 얻기 위한 노력이 지속되고 있다. 이에, 각국에서는 항생물질(antibiotics), 항암제(anticancer drugs)와 같이 인체에 유용한 의약품은 물론이고, 살균제, 살충제, 제초제와 같은 농약, 건강보조식품, 효소와 같은 식품 소재 등 다양한 용도에 활용될 수 있는 새로운 물질을 탐색하기 위해서 자연 상태의 생물, 특히 그 번식 및 배양이 용이한 미생물에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

[0015] 특히, 해양 동물 플랑크톤 및 담수 동물 플랑크톤의 경우에는 그 종류에 따라 다양한 체성분을 다량 함유하고 있기 때문에, 이들 체성분들로부터 고부가가치를 갖는 소재로의 전환을 통하여 건강 기능성 제품 소재로 이용될 수 있을 것으로 기대되고 있다.

[0016] 그 중에서도 동물 플랑크톤(zooplankton)은 대량 생산이 용이할 뿐만 아니라 부가가치가 매우 높기 때문에 생물 소재 산업에 있어서 중요한 위치를 차지하고 있다. 과거에는 주로 동물 플랑크톤을 대량으로 배양하거나 육성하기 위한 방법이 주로 연구되었으나 이와 같은 동물 플랑크톤을 활용하고자 하는 연구 내지는 특허가 진행되고 있다.

[0017] 일례로, 대한민국 등록특허 제349426호에서는 해수에서 서식하는 갑각류의 유생인 아르테미아 살리나(*Artemia salina*) 추출물을 화장료 조성물 총 중량에 대해서 0.01 ~ 50 중량% 함유하는 주름방지용 화장료 조성물에 대해서 기술하고 있으며, 대한민국 공개특허 제10-2009-0067854호에서는 해양 동물 플랑크톤에서 유래한 펩타이드 조성물이 항산화 및 항고혈압 효과가 있다고 개시하고 있다.

[0018] 그렇지만, 손쉽게 배양 가능하고 다양한 체성분을 함유하고 있는 동물 플랑크톤이 가지고 있는 잠재력을 고려해 볼 때, 이와 같은 동물 플랑크톤으로부터 약품 또는 건강 보조식품과 같이 인체의 건강을 증진시킬 수 있는 조성물을 얻기 위한 연구는 지속적으로 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0019] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결할 수 있도록 제안된 것으로, 본 발명의 목적은 동물 플랑크톤의 체성분의 상당 부분을 차지하는 단백질의 가수분해 산물인 펩타이드를 주성분으로 하여, 대표적인 퇴행성 뇌질환의 하나인 알츠하이머 질병의 원인이 되는 아밀로이드-베타의 생성을 유도하는 베타-세크레타제의 활성을 억제하는 조성물을 제공하고자 하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 다른 목적은 동물 플랑크톤의 체성분의 주요 성분인 단백질을 다양한 분해효소로 가수분해하는 방법을 통하여 상술한 베타-세크레타제의 활성을 억제하는 추출물을 얻는 방법을 제공하는데 있다.
- [0021] 본 발명의 다른 이점 및 목적은 후술하는 발명의 상세한 설명 및 첨부하는 도면을 통해서 더욱 분명해질 것이다.

과제 해결수단

- [0022] 상기와 같은 목적을 갖는 본 발명의 일 관점에 따르면, 동물 플랑크톤인 로티퍼의 체성분을 이루는 단백질을 가수분해하여 얻어지는 펩타이드를 유효 성분으로 함유하는 알츠하이머 질병의 억제 및/또는 예방을 위한 조성물을 제공한다.
- [0023] 이때, 상기 펩타이드는 상기 로티퍼의 체성분을 이루는 단백질의 트립신에 의한 가수분해 산물이다.
- [0024] 본 발명에 따르면, 로티퍼 유래의 펩타이드를 유효 성분으로 함유하는 상기 조성물은 베타-세크레타제(β -secretase) 억제 활성을 가지고 있어서 대표적인 퇴행성 뇌질환인 알츠하이머 질병의 치료 또는 예방 효과를 갖는다.
- [0025] 바람직하게는 로티퍼는 브라키오누스속(*Brachionus*)에 속하는 로티퍼로서, 예를 들면 *브라키오누스 로툰디포미스*(*Brachionus rotundiformis*), *브라키오누스 플리카틸리스*(*Brachionus plicatilis*), *브라키오누스 칼리시플로루스*(*Brachionus calyciflorus*) 또는 *브라키오누스 루벤스*(*Brachionus rubens*)에서 선택될 수 있다.
- [0026] 바람직하게는 상기 로티퍼에서 유래된 펩타이드를 함유하는 유효 성분은 0.01 ~ 10.0 mg/ml의 농도, 바람직하게는 0.05 ~ 5.0 mg/ml, 더욱 바람직하게는 0.05 ~ 3.0 mg/ml의 농도로 사용될 수 있다.
- [0027] 정제 과정을 거친다면, 상기 펩타이드는 상기 로티퍼를 트립신으로 처리하고, 상기 트립신 처리에 의하여 얻어진 가수분해산물을 칼럼 크로마토그래피에 의하여 분리하여 분획 성분(1차 분획 성분) 중에서 1번째 분획 성분이다.
- [0028] 이때, 상기 펩타이드는, 상기 1차 분획 성분 중 1번째 분획 성분을 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)로 분리하여 얻어진 분획 성분(2차 분획 성분) 중에서 3번째 분획 성분인 것을 특징으로 하며, 정제된 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0029] 본 발명의 다른 관점에 따르면, 분말화된 동물 플랑크톤인 로티퍼를 단백질 분해효소로 처리하여 분말화된 로티퍼의 체성분 중에 함유되어 있는 단백질로부터 가수분해된 펩타이드를 얻는 것을 특징으로 하는 로티퍼 유래의 알츠하이머 질병의 억제 및/또는 예방 효과를 갖는 유효 성분을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0030] 이때, 바람직한 실시예에 따르면 전술한 단백질 가수분해 산물인 펩타이드를 크로마토그래피와 같은 분리 수단을 사용하여 분리, 정제하는 단계를 더욱 포함할 수 있다.

효 과

- [0031] 본 발명에서는 손쉽게 대량으로 배양할 수 있는 동물 플랑크톤인 로티퍼의 체성분 중에서 가장 많은 함량을 갖는 단백질의 가수분해 산물인 펩타이드가 대표적인 퇴행성 뇌질환인 알츠하이머 질병과 밀접하게 관련된 베타-세크레타제의 활성을 크게 억제할 수 있다는 것을 확인하였다.
- [0032] 이에 따라, 동물 플랑크톤으로부터 추출된 베타-세크레타제의 활성을 억제하는 활성 성분인 펩타이드를 유효성

분으로 사용하는 경우, 해당 활성 물질의 순도에 따라 약리학적 조성물과 같은 의약품은 물론이고, 건강 보조 식품 등으로 활용할 수 있어서, 건강 기능성 식품을 포함한 식품 산업 및 의약 산업에 응용될 경우 그 가치가 매우 높을 것으로 기대된다.

[0033] 특히, 본 발명에 따라 동물 플랑크톤인 로티퍼로부터 추출한 펩타이드 성분은 대량 배양 및 고밀도 배양 및 증식이 가능한 동물 플랑크톤으로부터 추출되었으므로, 경제성을 확보할 수 있으며, 생체에서 유래한 성분으로서 인체에 대해서도 부작용이 없이 활용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0034] 본 발명자들은 동물 플랑크톤을 활용하여 약리학적 조성물 또는 식품 중의 생리 활성 유효 성분으로의 활용을 연구하여 본 발명을 완성하였는바, 이하에서 첨부하는 도면을 참조하여 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0035] 1. 해양 동물 플랑크톤에서 항-알츠하이머 질병 활성 물질의 제조

[0036] 해양 동물 플랑크톤(marine zooplankton)은 대량 배양기술이 확립되어 있기 때문에 생물원료로서의 산업적 수급 조절이 용이할 뿐만 아니라 지속적인 공급도 가능하다. 특히, 해양 동물 플랑크톤인 로티퍼(rotifer)는 치어의 먹이 생물로 널리 이용되어 왔으며 대량생산이 용이하기 때문에 고부화가치화에 의한 소재 개발을 통한 경제성을 확보할 수 있다면 산업적 응용이 가능하다. 이에 본 발명에서는 동물 플랑크톤 중에서 대량배양이 용이하고 구입이 쉬운 로티퍼로부터 항-알츠하이머 질병 활성 효과를 갖는 물질을 추출하였는바, 이하에서 본 발명을 첨부하는 도면을 참조해서 상세하게 설명한다.

[0037] 우선, 본 발명에 따라 대표적인 퇴행성 뇌질환인 알츠하이머 질병의 진행과 밀접하게 관련되어 있는 베타-세크레타제 억제 효과를 갖는 성분을 추출하기 위해서 소스(source)로 사용된 해양 동물 플랑크톤 중에서 대량 배양이 용이하고 구입하기 쉬운 로티퍼를 선택한다. 로티퍼(rotifer)는 윤충이라고도 불리는 동물 플랑크톤으로서, 광온, 광염분과 같이 열악한 조건에서도 배양 가능하며, 번식력이 대단히 높아 대량배양은 물론이고 높은 밀도 배양(10,000 개체 이상/ml)이 가능하며, 한 부유성의 매우 작은(150~350 μ m)의 동물 플랑크톤의 일종이다. 본 발명에 따라 선택 가능한 로티퍼의 예로는 예를 들어 해수에 서식하거나 또는 담수에 거주하는 로티퍼로서, 바람직하게는 브라키우누스속(*Brachionus*)에 속하는 로티퍼를 들 수 있다. 이러한 로티퍼로는 예를 들어 아열대 지역에 주로 서식하는 브라키우누스 로툰디포미스(*Brachionus rotundiformis*, S형, SS형), 온대 지역에 주로 서식하는 브라키오누스 플리카틸리스(*Brachionus plicatilis*, L형)는 물론이고, 브라키오누스 칼리시폴로루스(*Brachionus calyciflorus*) 또는 브라키오누스 루벤스(*Brachionus rubens*)와 같은 로티퍼가 바람직하고, 특히 바람직하게는 브라키오누스 로툰디포미스 또는 브라키오누스 플리카틸리스이다. 선택되는 로티퍼의 종류에 따라 이를 배양할 수 있도록 이미 공지되어 있는 로티퍼 배양액 및 배양 방법이 사용될 수 있음은 물론이다.

[0038] 로티퍼에 대한 종래의 분석에 따르면 로티퍼의 체성분 중에는 단백질의 함량이 가장 높으며, 특히 글루탐산(glutamic acid), 아스파르트산(aspartic acid), 류신(leucine) 및 글리신(glycine)이 비교적 높은 조성을 가지고 있다. 이에 본 발명에서는 로티퍼의 조성 중에서 가장 높은 함량을 가지고 있는 단백질을 가수분해하기 위해서 다양한 단백질 분해효소(proteolytic enzyme)를 사용하여 로티퍼 체성분 중의 단백질을 분해하여 펩타이드(peptide) 상태의 가수분해산물을 얻었다. 일반적으로 생명체의 체성분 중에서 단백질을 분리하는 방법으로 황산암모늄을 이용한 단백질 침전법이 알려져 있으나, 이 경우에 단백질 침지 반응 시간 및 탈염을 위한 추가적인 과정이 추가되어 비효율적일 수 있다. 이에 따라, 본 발명에서는 로티퍼로부터 활성 물질을 추출하는 방법으로 효소적 가수분해 방법을 이용하였다. 본 발명의 실시예에 따라 사용되는 단백질 분해효소로는 알카라제(Alcalase), α -키모트립신(α -Chymotrypsin)과 같은 키모트립신, 뉴트라제(Neutrase), 파파인(papain), 펩신(pepsin), 트립신(trypsin)을 사용하였으나, 그 외의 다른 단백질 가수분해효소, 예를 들어, 프로타막스(Protomax), 플라보자임(flavourzyme)과 같이 다른 저렴한 단백질 가수분해효소가 사용될 수 있음은 물론이다.

[0039] 이때, 사용되는 단백질 가수분해의 활성을 위해서 각 효소의 최대 활성 pH, 활성 온도 등을 조절할 필요가 있는데, 각각의 단백질 분해효소의 체내에서의 최적 반응 조건과 동일한 조건을 적용할 수 있다. 이러한 가수분해효소에 대한 최대 활성 pH 등의 조건은 잘 알려져 있으므로 상세한 설명은 생략한다. 이때, 사용된 기질인 로티퍼의 체성분에 대해서 해당 단백질 분해효소는 5:1 ~ 20:1 정도의 비율로 혼합될 수 있다. 본 발명의 실시예에 따

르면, 특히 α -키모트립신, 뉴트라제, 트립신의 가수분해 효율이 양호한 것으로 확인되었다(도 1 참조)

[0040] 2. 동물 플랑크톤 추출물의 베타-세크레타제 활성 억제 분석

[0041] 상술한 과정을 통해서 동물 플랑크톤인 로티퍼의 주요 체성분인 단백질의 가수분해 산물인 펩타이드를 대상으로 대표적인 퇴행성 뇌질환인 알츠하이머 질병의 주요한 원인인 베타-아밀로이드의 합성을 개시하는 베타-세크레타제 활성 억제 정도를 분석하였다.

[0042] 전술한 것처럼, 알츠하이머 질병의 원인과 관련해서 가장 폭넓게 지지되고 있는 ‘아밀로이드 가설’에 따르면 아밀로이드 전구체 단백질(Amyloid precursor protein, APP)이 베타-세크레타제에 의하여 특정 위치에서 절단된 뒤, 감마-세크레타제에 의하여 다른 위치에서 절단되어 생성된 베타-아밀로이드가 뇌세포 또는 신경세포 등에 축적됨으로써 알츠하이머 질병이 야기된다. 이에, 본 발명에서는 로티퍼 유래의 단백질 가수분해 산물이 알츠하이머 질병의 치료, 예방 등의 효과를 알아보기 위해서 각각의 단백질 분해효소에 의한 가수분해 산물이 베타-세크레타제의 활성을 억제하는 정도를 우선 분석하였다.

[0043] 본 발명의 실시예에 따르면, 동물 플랑크톤인 로티퍼의 체성분의 대부분을 차지하는 단백질에 다양한 단백질 분해효소를 처리한 뒤에 베타-세크레타제의 활성 억제 정도를 측정한 결과 특히 트립신 가수분해 산물의 활성이 가장 양호하였다(도 2 및 도 3, 표 4 참조). 본 발명과 관련해서 베타-세크레타제의 활성을 억제하기 위해서, 로티퍼 유래의 단백질 가수분해산물은 0.01 ~ 10.0 mg/ml, 바람직하게는 0.05 ~ 5.0 mg/ml, 더욱 바람직하게는 0.05 ~ 3.0 mg/ml의 농도로 사용될 수 있다.

[0044] 아울러, 로티퍼 유래의 가수분해 산물을 대상으로 해당 펩타이드를 분자량별로 분획할 수 있는 지지체로서, 극성 유기용매 또는 수용매 혼합액 중의 지질(lipids), 호르몬(hormones), 비타민(vitamin), 다른 작은 생체분자와 같은 화합물의 분리와 추출에 효율적인 칼럼 충전제인 ‘Sephadex G-25’를 사용한 칼럼 크로마토그래피 분석을 통해서 크게 6개의 분자량으로 구분되는 분획 성분으로 나누어진다는 점을 확인하였으며(도 4a), 이들 분획 성분에서 1번째 분획 성분이 베타-세크레타제 억제 효과가 가장 뛰어나다는 점을 확인하였다(도 4b).

[0045] 한편, 칼럼 크로마토그래피 분석을 통해서 베타-세크레타제 억제 효과가 뛰어난 분획 성분을 고성능 액체 크로마토그래피(High performance liquid chromatography, HPLC)로 분석하면 총 3개의 분획 성분으로 구분되는데(도 5a), 베타-세크레타제 활성 억제 효과와 관련해서는 3번째 분획 성분이 가장 우수하였다(도 5b).

[0046] 계속해서, HPLC 분석을 통하여 가장 양호한 베타-세크레타제 억제 효과를 갖는 분획 성분을 MS/MS 기기를 사용하여 분석한 결과 분자량은 483 Da이고, “Gly-Arg-Gln-Lys(서열번호 1)”의 4개의 아미노산 잔기를 보유하고 있다(도 6).

[0047] 3. 동물 플랑크톤 유래의 펩타이드 추출물의 산업적 응용

[0048] 알츠하이머 질병을 예방 또는 치료하기 위한 방법으로서 베타-아밀로이드 생성 과정에서 초기 단계를 담당하는 베타-세크레타제의 활성을 억제하는 것이 효율적이지만, 현재까지 보고된 대부분의 베타-세크레타제 활성 억제제는 단순히 화학적으로 합성된 것이어서 안정성의 문제라든가 부작용의 문제를 완전히 해소하였다고 보기 어렵다. 하지만, 본 발명에서는 생명체인 동물 플랑크톤에서 얻어진 단백질 가수분해 산물인 일정 크기의 펩타이드를 사용하였으므로 이러한 문제점을 해소할 수 있다. 아울러, 손쉽게 배양 가능한 동물 플랑크톤에서 유래하므로, 산업적인 규모로 이들 동물 플랑크톤을 배양한 뒤에 비교적 손쉽게 이들 성분을 추출할 수 있으므로 경제성에서도 훨씬 양호하다.

[0049] 특히, 아밀로이드 전구체 단백질(APP)과 베타-세크레타제는 모두 세포 표면에 존재하는 단백질이지만, 이들 단백질이 소포체(endoplasmic reticulum)이나 골지체와 같은 세포내 소기관으로 흡입(endocytose)된 다음에, 베타-세크레타제에 의한 APP의 절단 반응이 일어난다. 따라서 베타-세크레타제를 표적으로 하는, 즉 베타-세크레타제 억제제(inhibitory drug)은 이들 세포 소기관의 막을 손쉽게 통과할 수 있어야 한다. 뿐만 아니라, 인체 내에서 대부분의 베타-아밀로이드는 뇌에서 생성되기 때문에, 약품으로서의 베타-세크레타제 억제제는 혈액장벽(blood-brain barrier)을 관통할 수 있어야 하며 충분히 크기가 작을 필요가 있는데, 본 발명에서 최종적으로 확인된 펩타이드 성분은 이런 점에서 유리하다고 생각된다.

- [0050] 한편, 본 발명에 따라 담수한 동물 플랑크톤의 일종인 로티퍼 유래의 단백질 가수분해산물을 유효 성분으로 함유하는 조성물은 알츠하이머 질병의 진행과 밀접한 관련이 있는 베타-세크레타제의 활성을 억제하는 효과를 가지고 있으므로, 정제 정도에 따라 알츠하이머 질병의 치료를 위한 약리학적 조성물이나 알츠하이머 질병의 예방을 위한 건강보조식품 조성물로 사용될 수 있다.
- [0051] 구체적으로, 본 발명의 로티퍼 유래의 가수분해산물을 유효 성분으로 함유하는 약리학적 조성물은 경구, 비경구(근육내 또는 정맥내), 장용, 직장 또는 국소(국부)로 투여할 수 있으며, 다른 일반적인 약리학적 조성물과 마찬가지로 용액, 산제, 정제, 캡슐제, 연고(크림 또는 젤), 좌제 형태로 투여될 수 있다. 이때, 만약 본 발명의 로티퍼 유래의 가수분해산물을 약리학적 조성물로 사용하는 경우에는 액체 또는 고체 담체(carrier)를 함께 사용하는 방법으로 인체 투여에 적합한 형태로 제조될 수 있음은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 사실이다.
- [0052] 이러한 제형에 적합한 부형제로는 약제에 통상적으로 사용되는 액체 또는 고체의 충전제, 증량제, 용매, 에멀션, 윤활제, 향미제, 착색제 및/또는 완충제를 포함한다. 본 발명의 로티퍼 유래의 가수분해 산물을 유효 성분으로 포함하는 약리학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제, 희석제 및 윤활제로는 시럽, 아라비아고무, 아카시아 고무, 젤라틴, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 락토오스, 수크로오스, 당분, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 인산칼슘, 글리신, 스테아린산마그네슘, 폴리에틸렌글리콜, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조산 에스테르, 실리카, 황산라우릴나트륨과 같은 통상적인 부형제와 일반적인 향미제 또는 착색제를 들 수 있다. 아울러, 다른 보조 물질로는 탄산마그네슘, 이산화티타늄, 만니톨 및 다른 당 또는 당 알코올, 유단백질, 젤라틴, 전분, 셀룰로오스 및 이들 유도체, 동물성 및 식물성 오일(예컨대 생선 간유, 해바라기유, 땅콩유, 폴리에틸렌글리콜) 및 용매(메탄올, 글리세롤과 같은 모노 또는 다가 알코올)를 포함한다.
- [0053] 특히, 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되는데, 이러한 고형제제는 하나 이상의 부형제로서 전분, 탄산칼슘, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 제조될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로서 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 외에도 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등의 다양한 부형제가 혼합될 수 있다.
- [0054] 한편, 본 발명의 로티퍼 유래의 단백질 가수분해 산물을 식품 조성물에 사용되는 경우에 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등에 사용될 수 있다.
- [0055] 이하, 예시적인 실시예를 통해서 본 발명을 보다 상세하게 설명하지만, 본 발명이 하기 실시예에 의하여 한정되는 것은 결코 아니다.
- [0056] 실시예 1: 해양 동물 플랑크톤 유래의 단백질 가수분해 산물의 제조
- [0057] 본 실시예에서는 해양 동물 플랑크톤인 로티퍼를 선정하여 선정된 로티퍼를 대상으로 다양한 단백질 가수분해 효소를 사용하여 가수분해 산물을 제조하였다.
- [0058] 해양 동물플랑크톤은 종에 따라 체성분의 함량의 차이가 크다. 그 중에 현재 대량배양이 용이하고 구입이 쉬운 로티퍼(rotifer)종을 대상으로 실험을 실시하였다. 원료는 로티퍼종 중에서 S-유형의 브라키오누스 로툰디포미스(*Brachionus rotundiformis*)를 경상남도 통영에서 아쿠아넷(Aquanet)을 통해서 구입하였다. 구입한 로티퍼는 수분을 완전히 제거하기 위해 동결건조를 실시한 후 분말 형태로 -80℃에 보관하였다.
- [0059] 로티퍼의 일반 조성 중 가장 높은 함량을 나타내는 단백질을 이용하기 위하여 단백질 가수분해 효소를 이용하여 가수분해를 실시하여, 로티퍼의 가수분해물의 수득을 측정하였다. 단백질 가수분해 효소는 알카라제(Alcalase), α -키모트립신(chymotrypsin), 뉴트라제(Neutrase), 파파인(papain), 펩신(pepsin) 및 트립신(trypsin)을 사용하였다. 로티퍼 1 g을 100 ml의 완충용액에 넣고 pH와 온도를 각 단백질 가수분해 효소의 최적 조건(표 1 참조)에 조건에 맞추어 1시간 반응시킨 후 효소 대 기질을 1:10 비율로 효소를 넣어 준 후, 12시간 반응시켰다. 반응시간 종료 후 각 효소에서 얻어진 가수분해물의 가수분해도를 측정한 결과, 가수분해 산물의 수득율은 α -

키모트립신 50%, 뉴트라제 47%, 트립신 46% 순으로 높게 나타났다(도 1 참조)

표 1. 로티퍼 가수분해를 위한 효소의 최적 조건

효소	완충액	최적 조건	
		pH	온도(℃)
알카라제	50 mM S.P [*]	7.0	50
α-키모트립신	“	“	“
뉴트라제	“	“	37
파파인	“	“	“
펩신	20 mM G.P ^{**}	2.0	“
트립신	50 mM S.P [*]	7.0	“

^{*}: sodium phosphate buffer

^{**}: glycine-HCl buffer

실시예 2: 해양 동물 플랑크톤 유래 펩타이드 활성 및 정제 분석

본 실시예에서는 실시예 1을 통하여 얻어진 로티퍼 유래의 단백질 가수분해 산물의 퇴행성 뇌질환의 예방, 치료 정도를 확인하기 위하여, 이들 단백질 가수분해 산물이 알츠하이머 질병 진행의 주요 기작에 관여하는 베타-세크레타제의 억제 활성 정도를 β-secretase inhibitory activity assay를 통하여 분석하였다.

우선, 이 분석 기법을 이용하여 각각의 단백질 가수분해 산물 중에서 베타-세크레타제 억제 활성이 높은 펩타이드가 다량 함유되어 있는 효소 가수분해 산물을 선정하였다. 베타-세크레타제 억제 활성은 베타-세크레타제 분석 키트(β-secretase assay kit)에서 제시한 방법을 변형하여 측정하였다.

buffer (50 mM sodium acetate, pH 4.5) 70 μl, 베타-세크레타제 (1.0 Unit/ml) 10 μl, 기질 (10 mM MCA-[ASN670, LEU671]-AMYLOID BETA/A4 PRECURSOR PROTEIN 77, 50 mM sodium acetate buffer, pH 4.5) 10 μl를 시료액 (실시예 1에서 얻은 각각의 효소 분해 산물을 50 mM sodium acetate buffer로 희석한 것으로, 본 실시예에서는 시료액의 최종 농도를 각각 1.0 mg/ml, 0.5 mg/ml, 2.0 mg/ml로 희석하였음) 10 μl와 혼합한 후 25℃에서 60분간 암조건에서 반응시켰다. 형광 reader(Bio-Rad)는 excitation 360nm로 하고, emission 405nm로 하여 측정하였다. 베타-세크레타제에 대한 저해율(inhibition ratio)은 다음과 같은 공식에 따라 계산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - \{(S - S_0) / (C - C_0)\}] \times 100$$

C : 시료액을 첨가하지 않은 실험군(Enzyme + buffer + substrate)의 반응 시작 후 20분 후의 형광도값

C₀: 시료액을 첨가하지 않은 실험군(Enzyme+buffer+substrate)의 반응 직전(zero time)의 형광도값

S : 시료액이 첨가된 실험군(Enzyme + sample + substrate)의 반응 20분 후의 형광도값

S₀: 시료액이 첨가된 실험군(Enzyme+sample+substrate)의 반응 직전(zero time)의 형광도값

로티퍼 단백질을 가수분해효소로 분해한 후, 각각의 가수분해물의 β-세크레타제의 저해 활성을 측정한 결과, 최대 반응 시간은 20분으로 제한하였으며, 도 2에 도시된 것과 같이, 반응 후 20분 이후부터는 상대적인 형광도값(Relative Fluorescent Units, RFU)은 증가하지 않았다. 도 2에서 형광도값이 큰 샘플은 베타-세크레타제에 억제 활성이 떨어지는 것이고, 형광도값이 작을수록 베타-세크레타제 억제 활성이 높은 물질이다. 즉, 샘플을 처리하지 않은 대조군인 control의 형광도값이 가장 높으며 각각의 샘플의 활성에 따라 형광도값이 측정되는데,

특히 트립신으로 처리한 가수분해 산물의 형광도값이 control에 비하여 가장 차이가 많다는 점에서 이 가수분해 산물의 베타-세크레타제 억제 효과가 가장 양호하다는 것을 확인하였다.

[0074] 한편, 본 실시예에 따라 반응시킨 후 각각의 가수분해 산물의 베타-세크레타제 저해 활성을 측정한 결과가 하기 표 2와 도 3에 표시되어 있다. 각각의 가수분해 산물의 베타-세크레타제의 활성 억제 정도를 농도별로 측정한 결과, 트립신 가수분해물의 활성이 가장 우수하였으며, IC₅₀값(베타-세크레타제 활성을 50% 억제할 때의 농도)은 트립신 가수분해 산물의 경우 0.212 mg/ml이었다.

[0075] 표 2. 로티퍼 가수분해산물의 베타-세크레타제 억제 활성

가수분해 효소	IC ₅₀ (mg/ml)
알카라제	0.656
α-키모트립신	0.614
뉴트라제	0.696
파파인	0.714
펩신	0.571
트립신	0.212

[0077] 실시예 3: 베타-세크레타제 억제 활성 펩타이드의 분리 및 정제

[0078] 가. 칼럼 크로마토그래피 분석

[0079] 로티퍼 가수분해 산물 중에서 베타-세크레타제 억제 활성 효과가 가장 우수한 것으로 분석된 트립신 가수분해 산물로부터 베타-세크레타제 억제 활성 펩타이드를 분리, 정제하였다. 트립신 가수분해산물로부터 ‘세파덱스(Sephadex) G-25’를 충전시킨 칼럼에 의한 크로마토그래피를 이용하여 로티퍼 유래의 트립신 가수분해산물을 분리하였으며, 각각의 획분은 분광광도계로 파장 215 nm에서 형광도를 측정하였다. 펩타이드 성분의 분리는 1.5 ml/min 동안 수행되었으며, 7.5 ml의 획분 부피로 수집되었다. 분획물의 형광도를 측정한 결과, 6개 (F1 ~ F6)의 획분으로 분리되었다(도 4a). 이어서 각각의 얻어진 획분을 동결건조한 후 일정량을 취하여 베타-세크레타제 저해 활성을 측정하였다(도 4b). 도 4b에 도시된 것처럼, 본 실시예에 따라 로티퍼 유래의 트립신 가수분해 산물 중에서 1번째 획분(F1)의 0.1 mg/ml 용액의 베타-세크레타제 저해 활성이 70.09%로 가장 높게 나타났다.

[0080] 나. HPLC 분석

[0081] 베타-세크레타제 저해 활성이 가장 높은 획분(F1)을 ODS column을 사용하여 고성능 액상 크로마토그래피(High performance liquid chromatography, HPLC, agilent 1100)에서 분리 정제하였다. 1.0 ml/min의 유속으로 아세토니트릴(acetonitrile)을 0%에서 50%까지 선형 기울기(linear gradient)로 50분간 흘려준 뒤 Grom-sil ODS-5 ST column (5 μm, 10 × 250 mm)를 사용하였다. elution은 280 nm에서 점검되었다. 그 결과 도 5a에서와 같이 3개의 획분(F1 ~ F3)으로 분리되었다. 분리된 각각의 획분에 대해서 베타-세크레타제 저해 활성을 측정하였다(도 5b). 도시된 것처럼, 3번째 획분(F3)의 베타-세크레타제 억제 활성이 가장 우수하였으며, IC₅₀ 값으로 나타내었을 때 3번째 획분은 0.0875 mg/ml로 측정되었다. 이는 분리 정제 이전의 트립신 가수분해 산물의 IC₅₀ 값(0.212 mg/ml)에 비하여 2.42배 증가한 것이다.

[0082] 실시예 4: 정제된 분획 성분의 분자량 및 조성 분석

[0083] 실시예 3의 HPLC 및 베타-세크레타제 활성 억제 분석을 통하여 가장 우수한 효과를 갖는 것으로 확인된 분리, 정제된 분획(F3)의 활성 펩타이드의 아미노산 서열과 분자량을 MS/MS 분석기(nano-ESI source가 구비된 Q-TOF tandem mass spectrometer)를 사용하여 분석하였다. 본 실시예에 따른 측정 결과가 도 6에 표시되어 있다. 분석 결과 분자량은 483 Da 이었으며, “Gly-Arg-Gln-Lys” (서열번호 1)의 4개의 아미노산 잔기를 가지고 있었다. 최종적으로 분리 정제된 본 실시예의 활성 펩타이드의 베타-세크레타제의 억제 활성 농도인 IC₅₀ 값은 183 μM 이

었다.

[0084] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 기초하여 본 발명을 상세하게 기술하였으나, 본 발명이 이에 한정되는 것은 결코 아니다. 오히려 본 발명이 속하는 기술분야의 평균적 기술자라면 상술한 실시예에 기초하여 다양한 변형과 변경을 용이하게 추고할 수 있다 할 것이다. 그러나 그러한 변형과 변경은 본 발명의 권리범위에 속한다는 점은 첨부하는 청구의 범위를 통하여 더욱 분명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0085] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 동물 플랑크톤인 로티퍼에 다양한 단백질 가수분해 효소를 처리하여 얻어진 각각의 가수분해 산물의 수율(Yield)을 측정한 그래프이다.

[0086] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 동물 플랑크톤인 로티퍼의 체성분 중에서 가장 많은 함량을 갖는 단백질에 다양한 단백질 분해효소로 처리하여 얻어진 각각의 가수분해산물의 베타-세크레타제의 저해 활성을 형광도 값으로 측정한 그래프로서, 반응 시간에 따른 형광도값의 증가를 측정한 것이다.

[0087] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 동물 플랑크톤인 로티퍼의 체성분 중에서 가장 많은 함량을 갖는 단백질에 다양한 단백질 분해효소로 처리하여 얻어진 각각의 가수분해산물의 베타-세크레타제의 저해 활성을 측정한 그래프이다.

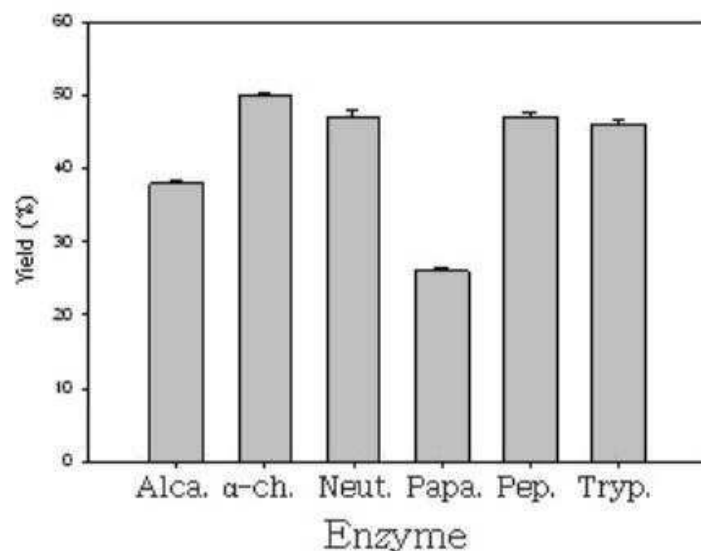
[0088] 도 4는 본 발명의 다른 실시예에 따라 로티퍼 유래의 단백질의 트립신에 의한 가수분해산물을 칼럼 크로마토그래피로 분리한 것으로, 도 4a는 형광도 값에 기초한 6개의 분획성분을 보여주는 그래프이고, 도 4b는 칼럼 크로마토그래피에 의하여 분리된 각 분획성분의 베타-세크레타제의 저해 활성을 측정한 그래프이다.

[0089] 도 5는 본 발명의 다른 실시예에 따라 로티퍼 유래의 단백질의 트립신에 의한 가수분해 산물 중, 칼럼 크로마토그래피 분리를 통하여 베타-세크레타제의 저해 활성이 가장 뛰어난 분획성분을 다시 HPLC로 분리한 것으로, 도 5a는 HPLC에 의하여 3개의 분획성분으로 분리된다는 것을 보여주는 그래프이고, 도 5b는 HPLC에 의하여 분리된 각 분획성분의 베타-세크레타제의 저해 활성을 측정한 그래프이다.

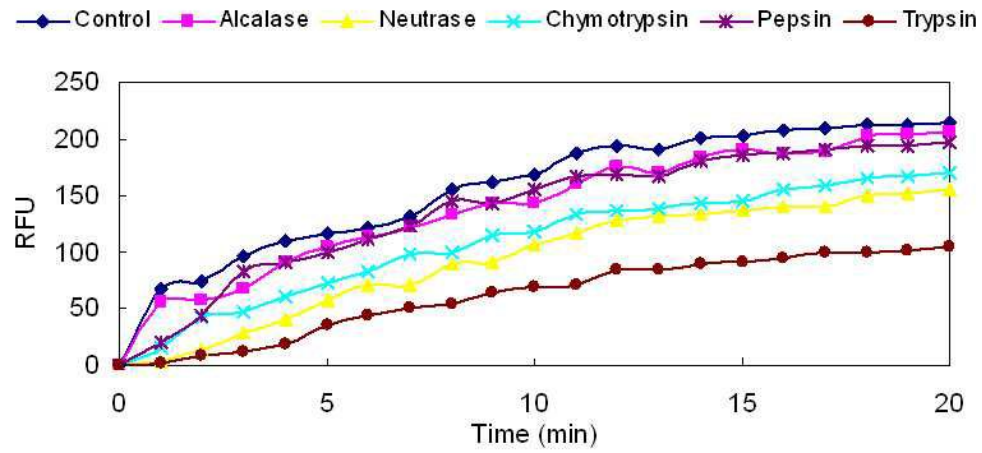
[0090] 도 6은 HPLC 분석에서 가장 우수한 베타-세크레타제 저해 활성을 보인 분획성분을 대상으로 MS/MS 분석 결과를 도시한 그래프이다.

도면

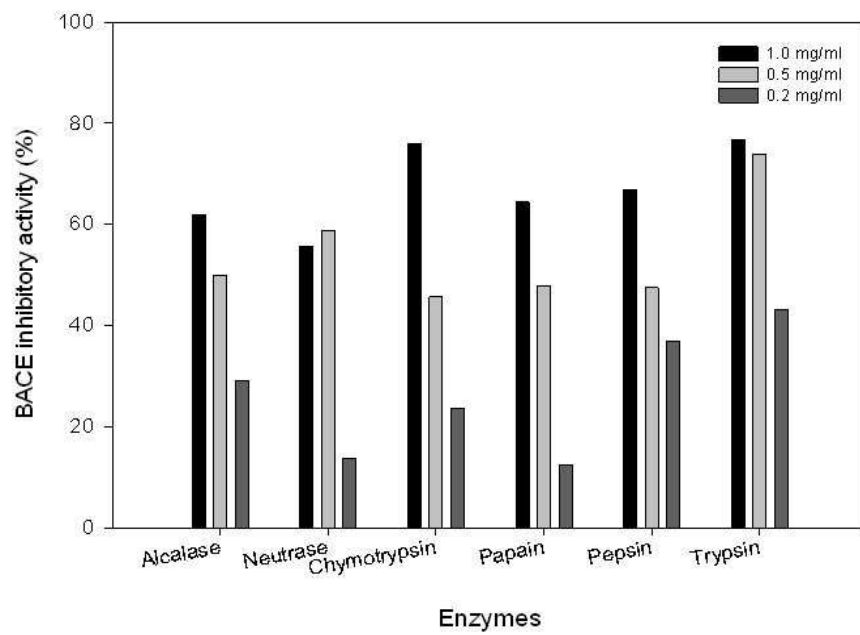
도면1



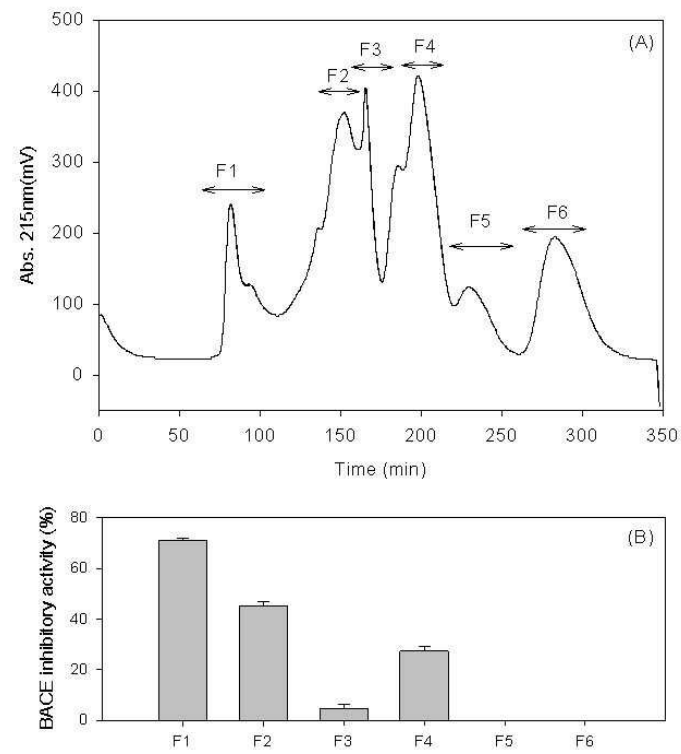
도면2



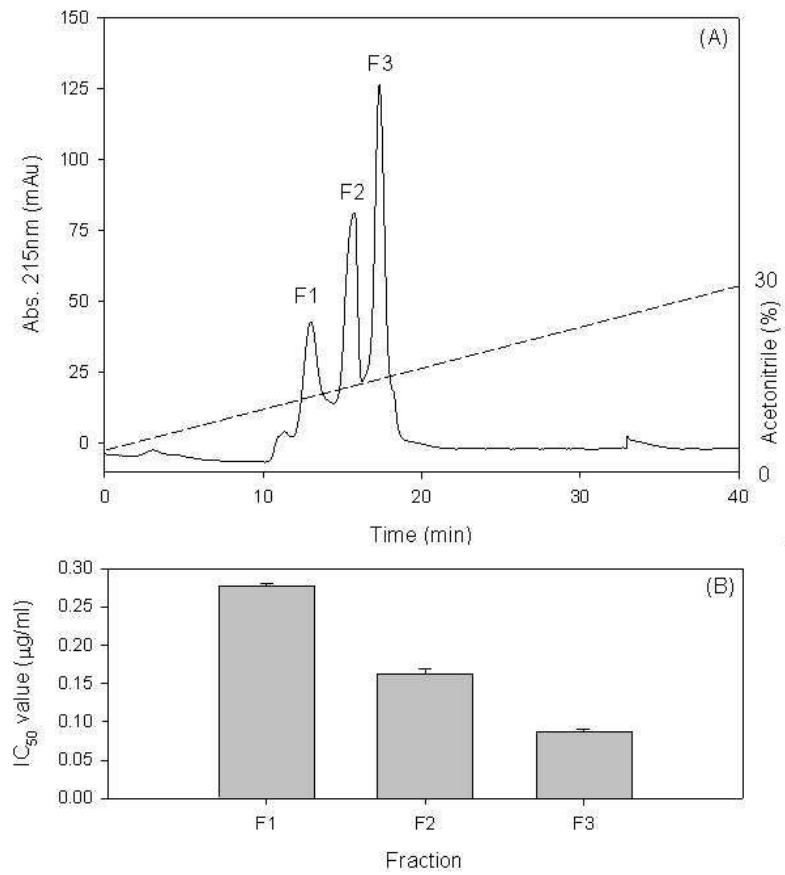
도면3



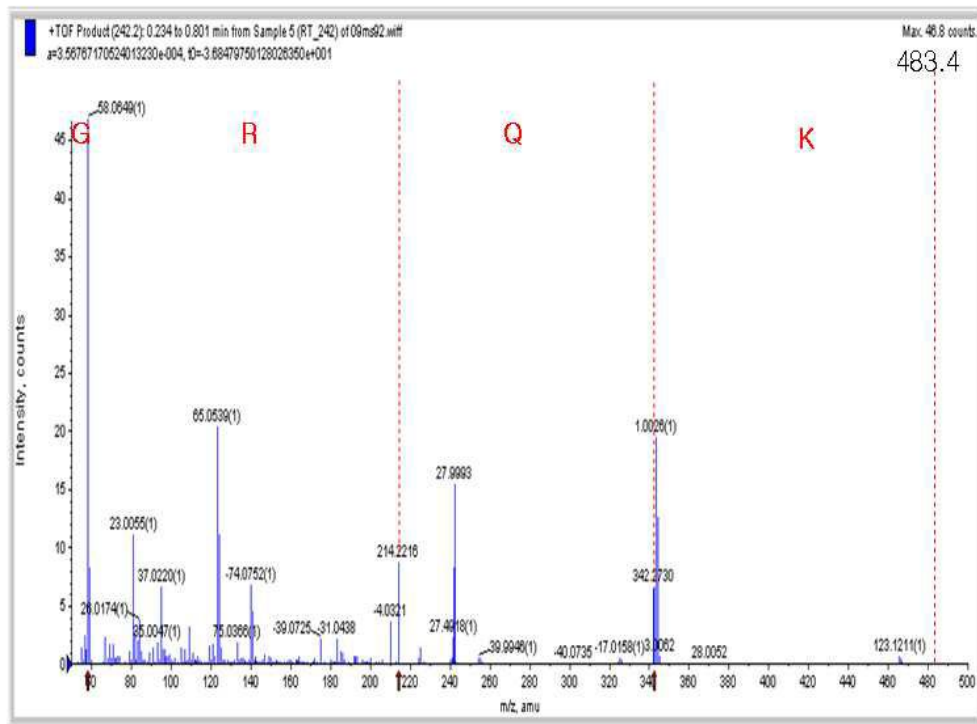
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> Bukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
 <120> Composition Extracted from Zooplankton for Inhibiting or Preventing Alzheimer's Disease and Process Thereof

<160> 1

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Brachionus rotundiformis

<400> 1

Gly Arg Gln Lys

1