



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년06월07일
(11) 등록번호 10-2404659
(24) 등록일자 2022년05월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/747 (2014.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61P 25/24 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 35/747 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2020-0123016
- (22) 출원일자 2020년09월23일
심사청구일자 2020년09월23일
- (65) 공개번호 10-2022-0040149
- (43) 공개일자 2022년03월30일
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020110057550 A*
US20170312232 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
주식회사 에치와이
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)
- (72) 발명자
라계현
경기도 시흥시 은계중앙로 325
정운희
경기도 화성시 병점2로 78
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 피씨알

전체 청구항 수 : 총 6 항

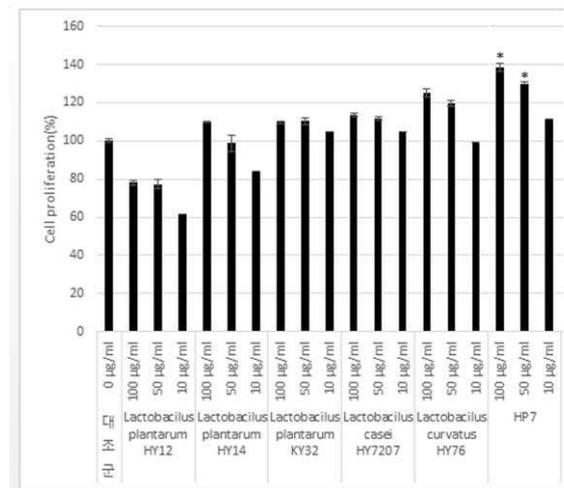
심사관 : 양웅철

(54) 발명의 명칭 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주를 함유하는 인지기능장애 및 우울증 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 인지기능장애 및 우울증 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 조성물에 유효성분으로 포함되는 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주는 뇌신경세포 증식 효과 및 스트레스호르몬에 의한 뇌신경세포 사멸 억제 효과를 나타내므로, 인지기능장애 및 우울증의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

- A61P 25/24 (2018.01)
- A61P 25/28 (2018.01)
- A23V 2002/00 (2013.01)
- A23V 2200/322 (2013.01)
- A23Y 2220/63 (2013.01)

(72) 발명자

최일동

경기도 용인시 기흥구 금화로82번길 14, 금화마을
대우현대1단지아파트 112동 704호

허건

경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 85

이정열

서울특별시 서초구 반포대로 310-6

심재현

경기도 화성시 동탄대로 181, 104동 1101호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545019135
과제번호	318027042HD040
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	고부가가치식품기술개발(R&D)
연구과제명	프로바이오틱스 및 인지기능 개선 소재 함유 유제품 생산 및 산업화
기여율	1/1
과제수행기관명	(주)한국야쿠르트
연구기간	2019.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 파라카제이 HP7 균주를 유효성분으로 포함하는 치매 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서;

상기 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주는 락토바실러스 파라카제이 HP7 생균체 또는 락토바실러스 파라카제이 HP7 사균체인 것인 치매 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 치매는 노인성 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 루이체 치매, 전측두엽 치매, 파킨슨 병 치매, 헌팅턴병 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매, 두부 외상으로 인한 치매, 및 물질로 유발된 치매로 이루어진 균으로부터 선택되는 질환인 것인 치매 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

락토바실러스 파라카제이 HP7 균주를 유효성분으로 포함하는 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서 상기 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주는 락토바실러스 파라카제이 HP7 생균체 또는 락토바실러스 파라카제이 HP7 사균체인 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

락토바실러스 파라카제이 HP7 균주를 유효성분으로 포함하는 치매 예방 또는 개선용 식품 조성물로서;

상기 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주는 락토바실러스 파라카제이 HP7 생균체 또는 락토바실러스 파라카제이 HP7 사균체인 것인 치매 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 치매는 노인성 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 루이체 치매, 전측두엽 치매, 파킨슨 병 치매, 헌팅턴병 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매, 두부 외상으로 인한 치매, 및 물질로 유발된 치매로 이루어진 균으로부터 선택되는 질환인 것인 치매 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

락토바실러스 파라카제이 HP7 균주를 유효성분으로 포함하는 우울증 예방 또는 개선용 식품 조성물로서;

상기 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주는 락토바실러스 파라카제이 HP7 생균체 또는 락토바실러스 파라카제이 HP7 사균체인 것인 우울증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주를 유효성분으로 포함하는 인지기능장애 및 우울증 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 고령화 사회로 빠르게 진행되고 있는 현대 사회에서 노화 과정을 지연시키는 것은 중요한 보건 과제 중 하나이다. 우리나라의 경우 2010년에 65세 이상의 인구가 11.3%를 차지하였으며, 2050년에는 37.3%로 급증할 것으로 예상되고 있다. 이와 같은 고령화 사회에서는 질병 이환율의 상승 및 막대한 의료비 지출이 예상되며 치매 등의 노인성 질환의 급증이 사회적으로 문제가 될 것으로 예상된다. 노화가 진행되는 과정은 유전, 환경, 그리고 생활 방식의 복합적인 작용에 의해 영향을 받으며, 다양한 형태적, 생화학적 변화가 수반되는데, 특히, 산화스트레스의 증가와 염증 반응의 증가는 노화 촉진에 관여하는 주요 원인으로 여겨지고 있다.

[0004] 감정적 또는 물리적 위협이나 위험 등 외부의 압력과 같은 스트레스 요인에 의해서 긴장, 흥분, 각성 또는 불안과 같은 생리적 반응이 일어나게 되는데 이러한 반응으로부터 원상태로 돌아가려는 반작용을 스트레스라고 한다. 스트레스 반응 초기에는 교감신경계와 부신수질로부터 에피네프린과 노르에피네프린이 분비 증가가 일어난다. 이후, 시상하부 뇌하수체 부신수질 축 시스템으로 뇌의 시상하부에서 부신피질호르몬 유리 호르몬이 분비되고, 뇌하수체를 자극하면 뇌하수체에서 부신피질 자극 호르몬이 분비되며, 부신피질 자극 호르몬이 부신에서 에피네프린과 코르티코이드의 분비를 유도한다.

[0005] 면역세포에서 분비되는 펩타이드이며 면역세포 간의 정보를 매개하는 역할을 하는 사이토카인은 단핵 혹은 대식세포와 림프구에서 주로 분비되며, 신경원 내피세포 정상세포 혹은 소교세포등의 뇌세포에서도 분비된다. 사이토카인에 대한 수용체들은 면역계뿐만 아니라 말초신경계와 중추신경계를 포함한 다양한 조직에 위치하고 있는데, 사이토카인은 부신피질자극호르몬을 자극하여 시상하부 뇌하수체 부신수질축을 활성화시켜 코르티솔 분비를 촉진하여 우울증을 유발한다. 또한, 염증성 사이토카인은 신경영양성 인자와 모노아민 신경전달인자를 감소시켜 신경세포 자멸사와 신경교 손상을 유발한다.

[0006] 치매에는 알츠하이머형 치매(Alzheimer's disease), 혈관성 치매, 및 기타 혼합형이 있으며, 우리나라 65세 이상의 노인 치매 환자중 50~60%가 알츠하이머형 치매이고 15~30%가 혈관성 치매이며 나머지 10~15%가 이 두 가지 질환의 혼합형이다. 뇌속 노폐물인 베타아밀로이드(AB)가 알츠하이머형 치매의 주요 발병 원인으로 알려져 있으며, 알츠하이머형 치매의 치료를 위해 많은 약물들이 치료제로 시도되었으나 아직까지 뚜렷한 효과가 입증된 약물은 알려져 있지 않다. 알츠하이머형 치매 환자들에게 부족한 뇌속 중요 신경전달물질 중 하나인 아세틸콜린(acetylcholine)에 작용하는 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase) 제해제가 치료제로서 유일하게 사용되고 있으나, 이 약물은 부분적으로 인지기능의 호전은 보이지만 알츠하이머병의 진행에는 전혀 작용을 하지 못하는 것으로 알려져 있으며, 효과적인 치매 예방 또는 치료제의 개발이 요구되고 있다.

[0007] 알츠하이머병은 전뇌의 콜린성 뉴런이 퇴화하여 신경 전달 물질인 아세틸콜린의 방출이 감소함으로써 인식 능력의 저하를 일으킨다(Murer MG et al., 2001). 파킨슨병은 흑질 도파민성(substantia nigral dopaminergic) 신경세포의 수가 감소되게 되고 이는 선조체의 도파민(striatal dopamine)의 고갈을 초래하여 운동 기능 장애와 같은 징후를 초래하게 된다. 스트레스는 신경 쇠약과 해마를 포함한 다양한 뇌 지역의 부피를 감소시킬 뿐만 아니라(Duman, R.S. and Monteggia, L.M.2006) 해마의 BDNF mRNA 발현을 감소시켜 우울증을 유발하는 것으로 알려져 있으며(Duman, R.S. and Monteggia, L.M. 2006 Smith, M.A. et al., 1995), 스트레스에 의하여 해마나 전전뇌 피질의 감소된 BDNF의 발현을 다시 증가시킴으로써 신경쇠약과 세포수 감소를 회복시킴으로써 우울증과 같은 정신질환의 치료가 가능한 것으로 보고되었다(Duman, R.S. and Monteggia, L.M. 2006).

[0008] 신경영양성 인자(Neurotrophic factor)는 발생 과정 동안 신경 세포의 생존과 분화를 조절하며(Davies, 1994), 개체의 일생 동안 신경 구조의 유지 및 이온 채널의 활성화, 신경 전달 물질 방출, 그리고 액손 경로 탐색 (axon path-finding) 등의 기능에 영향을 끼친다(Schnell et al., 1994; Song and Poo, 1999; Schinder and Poo, 2000). 신경 영양성 인자 중 BDNF는 중추신경계(Central Nervous System, CNS)에서 학습 및 기억, 고등 사고 능력을 담당하는 해마, 피질 그리고 전뇌 기저부에 많이 발현되고 있다. 시냅스 전달 및 시냅스 가소성의 중요한 조절자인 BDNF는 퇴행성 뇌질환인 알츠하이머 병(Alzheimer's disease, AD), 파킨슨병 (Parkinson's disease, PD), 스트레스에 의한 우울증(Depression), 뇌졸중, 헌팅턴무도병, 대뇌허혈성질환, 신경퇴화질환 또는 당뇨병성 신경병증 등 다양한 질병과 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. 다만, BDNF 그 자체는 14kDa의 거대분자 단백질로써 혈뇌장벽(Blood-brain barrier, BBB)을 통과하지 못할 뿐만 아니라, 직접적인 투여가 어렵다는 문제점이 있다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 스트레스 및 우울증, 인지장애 및 치매에 유익한 효과를 갖는 유산균을 발굴하기 위한 연구를 수행하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개 제10-2014-0023241호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 하나의 목적은 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주를 유효성분으로 포함하는 인지기능장애 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주를 유효성분으로 포함하는 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주를 유효성분으로 포함하는 인지기능장애 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주를 유효성분으로 포함하는 우울증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 일 양상은 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주를 유효성분으로 포함하는 인지기능장애 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명의 다른 양상은 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주를 유효성분으로 포함하는 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 약제의 제조에 통상적으로 이용되는 것으로써, 락토오스, 텍스트로스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 진분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로오스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유효제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington: the science and practice of pharmacy* 22nd edition (2013)에 상세히 기재되어 있다.

[0020] 본 발명의 일 구체예에 따른 약학적 조성물은 하나 이상의 인지기능장애 및/또는 우울증의 치료에 활성을 나타내는 물질과 함께 투여될 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명의 일 구체예에 따른 약학적 조성물은 인지기능장애 및/또는 우울증의 치료를 위하여 단독으로,

또는 시술, 호르몬 치료, 약물치료 및/또는 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용될 수 있다.

- [0022] 본 발명의 약학적 조성물은 그 제형의 제제화에 필요하고 적절한 각종 기재 및/또는 첨가물을 포함할 수 있으며, 그 효과를 떨어뜨리지 않는 범위 내에서 비이온 계면활성제, 실리콘 폴리머, 체질안료, 향료, 산화 안정화제, 유기 용매, 이온성 또는 비이온성 증점제, 유연화제, 산화방지제, 자유 라디칼 파괴제, 불투명화제, 안정화제, 에몰리언트(emollient), 실리콘, α-히드록시산, 소포제, 보습제, 비타민, 곤충 기피제, 향료, 보존제, 계면활성제, 소염제, 물질 P 길항제, 충진제, 중합체, 추진제, 염기성화 또는 산성화제, 또는 착색제 등 공지의 화합물을 더 포함하여 제조될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 성인 기준으로 0.001~1000mg/kg일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 투여할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 투여 시 다양한 제형으로 투여될 수 있는데, 환제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 등의 고형제제 형태로 투여될 수 있으며, 여러 가지 부형제, 예를 들어, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 더 포함할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 조성물을 분말, 과립, 정제 또는 캡슐 형태로 제형화할 경우, 이의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 예를 들어, 락토오스, 텍스트로스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알기네이트, 젤라틴, 인산칼슘, 규산칼슘, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및/또는 광물유가 사용될 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 또한, 제제화에 일반적으로 사용되는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 포함하여 조제될 수 있으며, 상기 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 또는 탈크 같은 윤활제를 더 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 인지기능장애는 노인성 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 루이체 치매, 전측두엽 치매, 파킨슨병 치매, 헌팅턴병 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매, 두부 외상으로 인한 치매, 및 물질로 유발된 치매로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환일 수 있다.
- [0027] 우울증 및 치매 등 인지기능장애 환자에서는 BDNF의 발현의 감소에 따른 신경세포의 감소가 나타난다. 본 발명의 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주를 유효성분으로 포함하는 조성물은 뇌신경세포 활성 유전자인 BDNF 및 세포 생존관련 유전자인 RELA의 발현을 증가시키고, 세포 사멸 유전자인 CASPASE3 발현을 감소시켜 뇌신경세포 증식 효과 및 스트레스호르몬에 의한 뇌신경세포 사멸 억제 효과를 나타내므로, 우울증 및 치매 등 인지기능장애의 개선에 유용하게 활용될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주는 락토바실러스 파라카제이 HP7 생균체, 락토바실러스 파라카제이 HP7 사균체, 이의 파쇄물, 이의 배양액, 상기 균주의 추출물, 상기 파쇄물의 추출물 또는 상기 배양액의 추출물일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 양상은 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주를 유효성분으로 포함하는 인지기능장애 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 양상은 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주를 유효성분으로 포함하는 우울증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0031] 전술한 내용과 중복되는 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0032] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로써 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주 외에, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함할 수 있다. 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 향미제로서 천연 향미제[타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍

미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

[0034] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 식품 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명의 식품 조성물은 식품, 식품첨가제, 음료, 음료첨가제, 발효유, 건강기능식품 등으로 사용될 수 있다. 식품, 식품첨가제, 음료, 음료첨가제, 또는 건강기능식품으로 사용되는 경우, 각종 식품류, 발효유, 육류, 음료수, 초콜릿, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올 음료, 비타민 복합제, 주류 또는 그 밖의 건강기능식품 제형으로 제공될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 인지기능장애는 노인성 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 루이체 치매, 전측두엽 치매, 파킨슨병 치매, 헌팅턴병 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매, 두부 외상으로 인한 치매, 및 물질로 유발된 치매로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환일 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주는 락토바실러스 파라카제이 HP7 생균체, 락토바실러스 파라카제이 HP7 사균체, 이의 파쇄물, 이의 배양액, 상기 균주의 추출물, 상기 파쇄물의 추출물 또는 상기 배양액의 추출물일 수 있다.

발명의 효과

[0039] 인지기능장애 및 우울증 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 따르면, 본 발명의 조성물에 유효성분으로 포함되는 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주는 뇌신경세포 증식 효과 및 스트레스호르몬에 의한 뇌신경세포 사멸 억제 효과를 나타내므로, 인지기능장애 및 우울증의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 신경세포에서 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주에 의한 신경세포의 증식율을 나타낸 그래프이다.

도 2는 스트레스호르몬인 부신피질호르몬(corticosterone) 및/또는 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주에 의한 신경세포의 생존율을 나타낸 그래프이다.

도 3는 스트레스호르몬인 부신피질호르몬 및/또는 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주에 의한 신경세포의 세포사멸관련 유전자인 BDNF의 발현량 변화를 나타낸 그래프이다.

도 4은 스트레스호르몬인 부신피질호르몬 및/또는 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주에 의한 신경세포의 세포사멸관련 유전자인 RELA의 발현량 변화를 나타낸 그래프이다.

도 5은 스트레스호르몬인 부신피질호르몬 및/또는 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주에 의한 신경세포의 세포사멸관련 유전자인 Caspase3의 발현량 변화를 나타낸 그래프이다.

도 6은 비 유발군 (sham), 유발군 (scopolamine), 유발군에 HP7을 처리한 군 (HP7) 및 유발군에 donepezil을 처리한 군 (donepezil, 양성대조군)의 신규물체 인식 시험 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7은 비 유발군 (sham), 유발군 (scopolamine), 유발군에 HP7을 처리한 군 (HP7) 및 유발군에 donepezil을 처리한 군 (donepezil, 양성대조군)의 수동회피 시험 결과를 나타내는 그래프이다.

도 8은 비 유발군 (sham), 유발군 (scopolamine), 유발군에 HP7을 처리한 군 (HP7) 및 유발군에 donepezil을 처리한 군 (donepezil, 양성대조군)의 β -amyloid 42 측정 결과를 나타내는 그래프이다.

도 9는 비 유발군 (sham), 유발군 (scopolamine), 유발군에 HP7을 처리한 군 (HP7) 및 유발군에 donepezil을 처리한 군 (donepezil, 양성대조군)의 BDNF 측정 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하 본 발명을 하나 이상의 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 실시예 1. 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주의 분리 및 동정

[0045] 1-1. 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주의 분리

[0046] 균주의 1차 분리

[0047] 한국 배추김치 및 백김치를 수집한 후 분쇄하여 호기희석액 5ml에 희석하여 김치 분쇄액을 제조하였다. 상기 김치 분쇄액을 0.1% CaCO₃를 함유하는 MRS 고체배지에 도말한 후 AnaeroGen™ gas pack(Oxoid Inc.) 을 사용하여 혐기적인 조건에서 37℃에서 48시간 배양한 후 젖산 생성에 의해 투명환을 형성한 콜로니를 백금이(loop)로 취하여 BCP 고체배지에 접종하고 24시간 후 노란색 환을 형성한 콜로니를 유산균으로 1차로 순수 분리하였다.

[0049] 헬리코박터 파이로리 억제 활성 평가

[0050] 상기 1차 분리된 균주들에서 헬리코박터 파이로리 억제 활성을 평가하였다.

[0051] 상기 1차 분리된 유산균주들을 MRS 배지에 접종하여 24시간 배양 후 배양액을 중성으로 조정하여 희석 배양액을 헬리코박터 파이로리 SS1(H. pylori SS1)을 lawn으로 한 한천 배지에 도말하였다. 이때, 헬리코박터 파이로리를 저해하는 halo를 형성하는 균주 31종을 2차로 분리하였다.

[0052] 헬리코박터 파이로리 응집(coaggregation)활성이 강한 균주를 선별하기 위하여 위에서 분리된 31종의 균주를 사용하여 헬리코박터 파이로리 응집활성 시험을 진행하였다. 상기 31종의 균주는 MRS 배지에 접종하여 24시간 배양 후 원심분리를 통해 균체를 회수하여 인산완충용액(PBS, pH 7.0)으로 세척 후 0.D600값이 4가 되도록 PBS에 현탁하고 헬리코박터 파이로리 SS1(H. pylori SS1)은 10% calf serum이 첨가된 브루셀라 한천배지에 접종하여 10% CO₂, 37℃ 및 microaerobic 조건에서 3일간 배양한 후 균체를 회수하여 인공위액(0.3% pepsin, 0.5% NaCl, pH 4)에 0.D600 값이 2가 되도록 현탁하였다. 이렇게 제조된 유산균과 헬리코박터 파이로리 현탁액을 1:1 중량 비율이 되도록 섞은 후 15분 간 방치하여 응집체 형성이 우수한 균주를 최종적으로 선별하였다.

[0054] 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주의 특성 확인

[0055] 락토바실러스 파라카제이 HP7의 균학적 특성은 표 1과 같다.

표 1

[0056]

구분		특성	비고
균의 형태	세포의 형태	구균	MRS 한천평판배지에서 37℃, 2일간 배양했을 때 균의 특성
	운동성	없음	
	포자형성능	없음	
	그람(Gram) 염색	양성	
균락의 형태	형상	원형	
	융기	볼록	
	표면	매끄러움(Smooth)	
생리적 성질	생육온도	생장가능 생육온도: 20~45℃ 최적온도: 37℃	-
	생육 pH	생장가능 생육 pH: 4.5~10 최적 pH: 5.0~6.0	
	산소에 대한 영향	통성혐기성	
	카탈라제	-	
	가스형성여부	-	
	15℃에서 생육	-	
	45℃에서 생육	+	
	인돌생산	-	
	젖산생산	+	

[0058] 또한, 락토바실러스 파라카제이 HP7의 당 분해 이용성을 확인하기 위해 Biomerieux 사의 API 50 CH kit를 이용하여 당 발효 실험을 하였고, 그 결과를 하기의 표 2에 나타내었다.

표 2

당 0-24	사용 여부	당 25-49	사용 여부
0 Control	-	25 에스콜린	-
1 글리세롤	-	26 살리신	+
2 Erythritol	-	27 셀로비오스	+
3 D 아라비노스	-	28 말토스	+
4 L 아라비노스	-	29 유당	+
5 리보스	+	30 멜리비오스	-
6 D 크실로스	-	31 자당	+
7 L 크실로스	-	32 트레할로스	+
8 아도니톨	+	33 이눌린	+
9 β-메틸-D-크실로시드	-	34 멜레지토스	+
10 갈락토스	+	35 라피노스	-
11 포도당	+	36 전분	-
12 과당	+	37 글리코젠	-
13 만노스	+	38 크실리톨	-
14 소르보스	+	39 겐티오비오스	+
15 랍노스	-	40 D 투라노스	+
16 들시톨	-	41 D 라이소스	-
17 이노시톨	-	42 D 타가토스	+
18 만니톨	+	43 D 푸코스	+
19 소르비톨	+	44 L 푸코스	-
20 α-메틸-D-만노시드	-	45 D 아라비톨	-
21 α-메틸-D-글루코시드	-	46 L 아라비톨	-
22 N-아세틸-글루코사민	+	47 글루코나테	+
23 아미그달린	+	48 2-케토-글루코나테	-
24 아르부틴	+	49 5-케토-글루코나테	-

[0060]

[0062] 1-2. 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주의 동정

[0063] 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주의 동정을 위하여, 16S rDNA 유전자 분석과 Biomerieux 사의 API 50 CHL kit 동정을 수행하였다.

[0064] 그 결과, 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주의 16S rRNA 유전자는 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*)의 16S rDNA 유전자와 99% 일치하는 것으로 나타났으며, 각종 당 분해능을 API 아이덴티피케이션 소프트웨어 프로그램(API identification software program)으로 분석한 결과도 락토바실러스 파라카제이 서브스페이즈 파라카제이(*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*)와 99.1%의 유사성을 가진 것으로 나타났다.

[0065] 상기 균주는 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7으로 명명하고, 2016년 10월 31일 생물자원센터(기탁번호: KCTC 13143BP)에 기탁하였다.

[0066] 이후 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주는 한국생명공학연구원에서 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7 균주(KCTC 13143BP)를 분양받아 사용하였다.

[0068] 실시예 2. 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주의 뇌신경세포 증식 효과 및 스트레스호르몬에 의한 뇌신경세포 사멸 억제 효과 확인

[0069] 2-1. 세포 배양 및 유산균 처리

[0070] 사람의 신경모세포종 SK-N-SH를 10% 비활성화 우태아 혈청(fetal bovine serum)과 1% 페니실린-스트렙토마이신 용액(penicillin/streptomycin)을 넣은 EMEM 배양액으로 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 37°C 조건으로 배양하였다. 충분한 세포를 얻기 위해 배양용 플라스크(T75cm²)에서 세포를 배양하고, 2 내지 3일에 한 번씩 배지를 80% 교체하여 배양하였다. 세포가 충분히 자랐을 때 trypsin-EDTA(ethylene diamine tetraacetic acid) 용액(1x)을 사용하여 부착된 세포를 떼어낸 후, 우태아 혈청과 항생제를 첨가하지 않은 성장배지에 2X10⁴ cells/well 내지 3X10⁴ cells/well로 조정하여 96-웰 플레이트에 접종하였다. 그 후, 실시예 1에서 분리한 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주 및 비교 균주로써, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY12, 락토바실러스 플란타룸 HY14, 락토바실러스 플란타룸 KY32, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207 및 락토바실러스 커

바투스(*Lactobacillus curvatus*) HY76을 각각 5, 10, 50 또는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리하고, 24시간 동안 배양하여 MTT assay와 세포 내 유전자 발현량을 검출하기 위하여 사용하였다.

2-2. 세포 증식율 또는 생존율 측정

유산균의 뇌신경세포의 증식효과를 확인하기 위하여, 세포 증식율 또는 생존율을 측정하였다.

구체적으로, 실시예 2-1에서 균주가 처리된 SK-N-SH 세포의 증식율 또는 생존율은 Chung 등이 사용한 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylterazolium bromid] 환원 방법을 이용하여 측정하였다. 각 웰에 MTT 용액(5mg/ml)을 성장배지의 1/10 부피비로 첨가하고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4시간 배양한 다음, MTT를 환원시켜 생성된 formazon이 배지에 따라 나가지 않도록 배지를 조심스럽게 제거하였다. 남아있는 배지를 완전히 제거하기 위해 실온에서 30분간 방치한 후, DMSO를 이용하여 용해시킨 시료를 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 측정 시 대조군은 DMSO로 하였고, 세포의 증식율 또는 생존율은 하기의 식을 사용하여 계산하였다.

세포 증식율 또는 생존율(%)=[시료 처리군의 흡광도/대조군의 흡광도] X 100

그 결과, 50 또는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주를 단독 처리하였을 때, 유의적으로 세포 증식 효과가 나타난 것으로 확인되었으며, 각각의 평균 증식율은 표 3과 같다 (도 1).

표 3

구분	처리량	평균 증식율(%)
대조군	0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	100
HY12	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	78
	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	77
	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	62
HY14	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	110
	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	99
	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	84
KY32	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	110
	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	110
	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	105
HY7207	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	114
	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	112
	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	105
HY76	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	125
	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	120
	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	99
HP7	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	138
	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	130
	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	111

또한, 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주를 250 μM 스트레스호르몬(corticosterone)과 같이 처리한 결과, 250 μM 스트레스호르몬(corticosterone) 단독처리인 양성 대조군과 비교하여 뇌신경세포 SK-N-SH는 생존율이 15 내지 21% 증가한 것으로 확인되었으며, 각각의 평균 생존율은 표 4와 같다 (도 2).

표 4

구분	처리량	평균 생존율
Corticosterone	0 μM	1.424335
	250 μM	1
HP7	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.02045
	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.112474
	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.213701
	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.175869

2-3. 유전자 발현 분석

- [0087] 스트레스호르몬에 의한 뇌신경세포 사멸 억제 효과를 평가하기 위하여 유전자 발현 분석을 수행하였다.
- [0088] 구체적으로, 실시예 2-2에서 균주가 처리된 SK-N-SH 세포에서 유전자 발현을 분석하기 위하여, Total RNA Extraction Kit(IntronBio)를 이용하여 RNA를 추출하였다. Total RNA 정량 후, 분리한 RNA로부터 Quantitect reverse transcription kit(Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 유전자의 발현량은 Taqman probe 및 Real-time PCR(applied biosystems, QuantStudio™ 6 real time PCR)을 이용하여 수행하였다. Real-time PCR을 통해 얻어진 결과는 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)의 발현수준과 비교하여 보정하였고, comparative cycle threshold method를 이용하여 분석하였다. 또한, 각각의 PCR reaction의 melting curve를 통해 증폭된 유전자의 순도를 확인하였다. Cycle threshold 상대적인 정량 값으로 표현하였다.
- [0089] 그 결과, 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 250 μM 스트레스호르몬 (corticosterone)과 같이 처리했을 때 250 μM 스트레스호르몬(corticosterone) 단독처리인 양성 대조군 (corticosterone)과 비교하여 뇌신경세포 활성 유전자인 BDNF 발현율이 약 7% 증가하고 (도 3), 세포 생존관련 유전자인 RELA 발현율도 약 7% 증가하였으며 (도 4), 세포 사멸 유전자인 CASPASE-3 발현율을 약 22% 감소시켰다 (도 5).
- [0090] 이와 같은 결과를 통하여, 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주는 뇌신경세포 증식 효과 및 스트레스호르몬에 의한 뇌신경세포 사멸 억제 효과를 나타냈다는 점에서, 인지기능장애 및/또는 우울증의 예방, 개선 또는 치료에 락토바실러스 파라카제이 HP7 균주가 효과적으로 활용될 수 있음을 확인하였다.
- [0092] **실시예 3. 동물모델에서의 유효성 평가**
- [0093] 3-1. 투여물질의 준비
- [0094] 음성 대조물질 (vehicle)로 PBS를 사용하였고, 양성 대조물질 (Positive control)로 Donepezil을 사용하였고, 최종 용량 5 mg/10 ml/kg에 맞게 칭량하여 조제하여 사용하였다. 급성 인지능 저하를 유도하는 물질로서 scopolamine을 사용하였다.
- [0096] 3-2. 실험동물의 준비 및 투여물질의 투여
- [0097] 6주령 수컷 ICR mouse를 준비하였고, 비 유발군 (sham), 유발군 (scopolamine), 유발군에 HP7을 처리한 군 (HP7) 및 유발군에 donepezil을 처리한 군 (donepezil, 양성대조군)으로 구별하여 실험하였다.
- [0099] 3-3. 신규물체 인식 시험
- [0100] 본 발명의 균주를 통해 기억력 개선 효과를 확인하기 위해 신규물체 시험을 수행하였다.
- [0101] 시험 방법은 구체적으로, 40 cm x 40 cm의 아크릴 케이지에 상이한 2개의 물체를 이용하여 기억력을 평가하였다. 아크릴 케이지 내를 익숙하게 한 후, 2개의 물체를 일정한 위치에 위치하여 자유롭게 인지하게 한 후, 각 물체를 탐색한 시간을 측정하였다. 24시간의 지연시간을 개체별로 주고 다시 동일한 위치에 한 가지 물체만 다른 물체로 변경하였다. 이 때 변경한 물체를 신규물체로 인식하여 탐색 시간이 길수록 기억력이 좋은 것으로 판단할 수 있다. 24시간 전의 물체를 기억하지 못한다면 신규 물체와 기존 물체를 구분하지 못하고 양쪽 물체 모두 균일하게 탐색할 가능성이 있다. 총 10분간 자유롭게 탐색하도록 하며, 결과는 preference index (PI, 신규물체 탐색 시간/총 탐색 시간)로 나타내었다. 낮은 PI 값은 새로운 물체를 인식하는 능력이 손상되었음을 의미한다. 분석은 SMART VIDEO TRACKING Software (Panlab, USA)을 이용하여 실시하였다.
- [0102] 신규 물체의 탐색에 선호도를 보임을 비교함으로써 인지능과 관련한 유효성을 검증하였다. 이 실험은 기본적으로 마우스의 단기 기억력을 확인하는 시험이기 때문에 정상적인 탐색 기능을 가지지 않은 개체는 결과 해석에 배제하였다. 그 기준은 총 탐색 시간이 15초 이하인 개체는 결과에서 제외하였다.
- [0103] Sham(미유발군)은 신규물체에 대한 preference index (PI) 값이 0.60 ± 0.11 을 나타내었고, Scopolamin(유발군)과 비교하여 유의적인 차이를 보여주었다. HP-7(실험군)은 0.42 ± 0.13 의 PI 값을 보여주었다. Donepezil(양성대조군)은 0.59 ± 0.13 의 PI로 Scopolamin(유발군)과 비교하여 차이를 보여주었다 (도 6).
- [0105] 3-4. 수동회피 시험
- [0106] 본 발명의 균주를 통해 기억력 개선 효과를 확인하기 위해 수동회피 시험을 수행하였다.
- [0107] 시험 방법은 구체적으로, 수동회피 실험은 어두운 곳을 선호하는 설치류의 습성을 이용한 행동실험으로, 동일한 크기의 2개의 케이지(검은색 아크릴과 화이트 아크릴)를 맞대어 제작되었다. 어두운 cage에는 foot shock이 발생하는 철망구조로 되어 밝은 곳에서 어두운 곳으로 개체가 진입하였을 때, 0.5 mA의 전류를 3초동안 주어 전기

자극을 주어 강제 기억을 유발하였다. 24시간 후 다시 밝은 곳에 개체를 두어 어두운 방으로 들어가는 시간을 측정하여 기억력 능력을 평가하였다. 결과치는 300초를 최대값으로 하며 Step through latency (sec)로 나타내었다. Acquisition time이 200초 이상 나오는 개체는 정상적 탐색 능력을 보인 개체가 아니라고 판단하여 최종 결과에서 제외하였다.

[0108] 전기 자극에 대한 기억으로 인해 어두운 곳으로 가려는 습성을 억제하는 정도를 관찰하여 기억력에 대한 시험군 간의 비교로 유효성을 검증하는 시험방법으로 알려져 있다. 어두운 방에 들어가지 않는 시간을 비교함으로써 인지능과 관련한 유효성을 검증하였다. 이 실험은 기본적으로 마우스의 단기 기억력을 확인하는 시험이기 때문에 어두운 방을 잘 찾아가지 않는 개체, 기억을 통해 어두운 방을 들어가지 않는 것이 아니라 Freezing에 의해 아예 움직임이 없는 개체는 결과 해석 시 배제하였다. 이번 시험계에서 해당하는 개체는 없는 것으로 판단하였다.

[0109] Sham(미유발군)은 어두운 방으로 이동하는 평균 시간(sec)이 171.13 ± 113.78 을 나타내었고, Scopolamin(유발군)과 비교하여 차이를 보여주었다. HP-7(실험군)은 105.88 ± 92.99 의 어두운 방으로 이동하는 평균 시간을 나타내었다 (도 7).

[0111] 3-5. β -amyloid 42 측정

[0112] 본 발명의 균주를 통한 인지능 개선 효과를 확인하기 위해 β -amyloid 42 측정하였다.

[0113] 구체적으로, β -amyloid 42, 40측정은 마우스 혈액에서 Elisa kit(Abcam, USA)를 이용하여 측정하였다.

[0114] 그 결과, Sham(미유발군)은 β -amyloid 42 혈액농도(pg/ml)가 52.55 ± 3.75 을 나타내었고, Scopolamin(유발군) 66.06 ± 2.74 와 비교하여 차이를 보여주었다. HP-7(실험군)은 54.84 ± 1.46 농도를 나타내었다 (도 8).

[0116] 3-6. BDNF 측정

[0117] 본 발명의 균주를 통한 인지능 개선 효과를 확인하기 위해 BDNF 측정하였다.

[0118] 그 결과, Sham(미유발군)은 BDNF 혈액농도(pg/ml)가 2.74 ± 0.31 을 나타내었고, Scopolamin(유발군) 1.58 ± 0.17 에서 Sham(미유발군)과 비교하여 감소하는 차이를 보여주었다. HP-7(실험군)은 2.08 ± 0.34 농도를 나타내었다 (도 8).

[0119] 상기한 동물모델 실험 결과 본 발명의 HP7 균주는 인지능 개선의 효과를 가짐을 알 수 있다.

[0121] 이제까지 본 발명에 대하여 그 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

수탁번호

[0124]

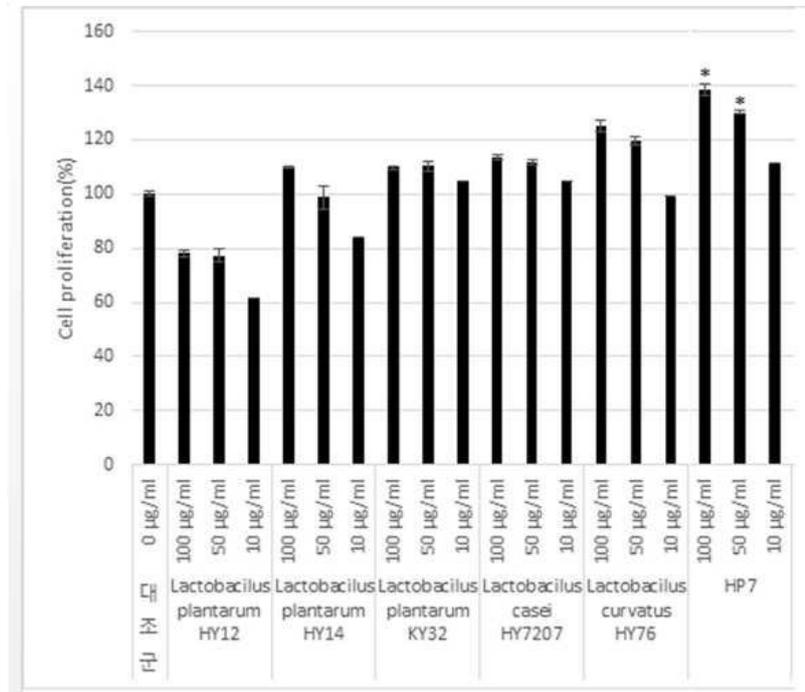
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13143BP

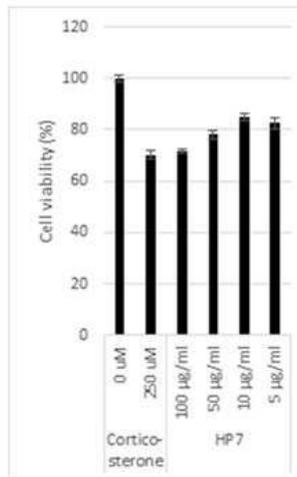
수탁일자 : 20161031

도면

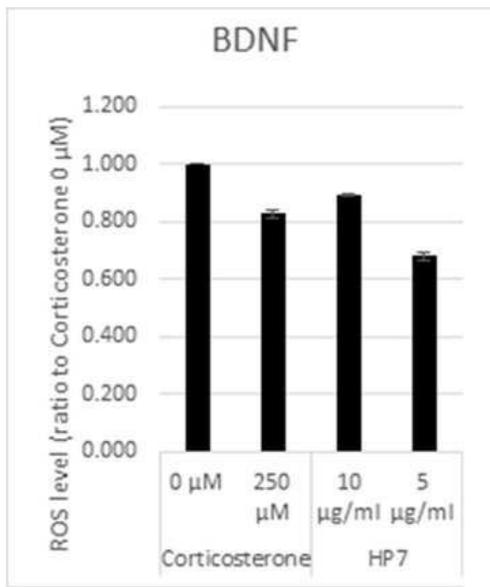
도면1



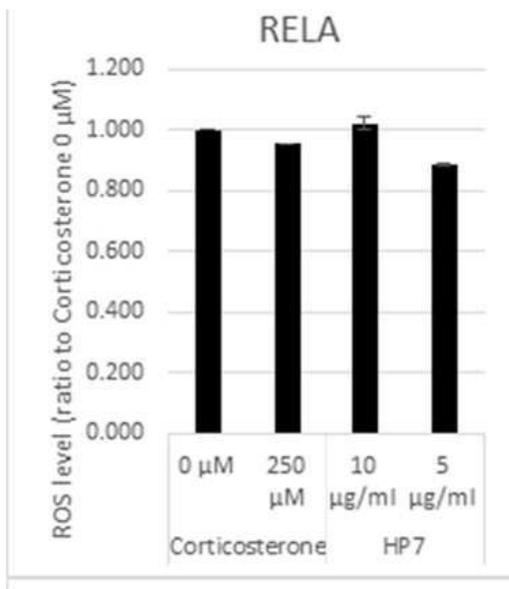
도면2



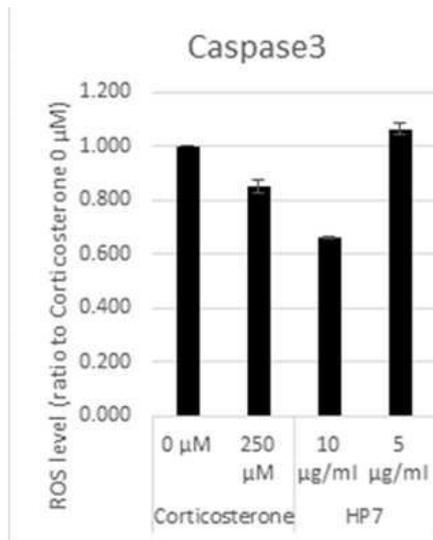
도면3



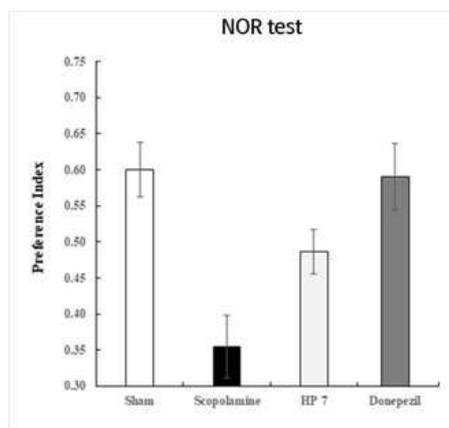
도면4



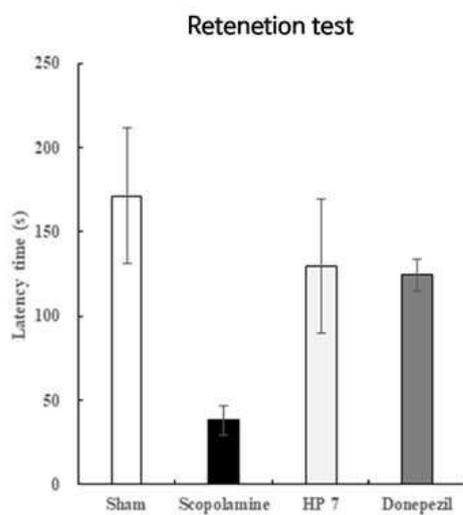
도면5



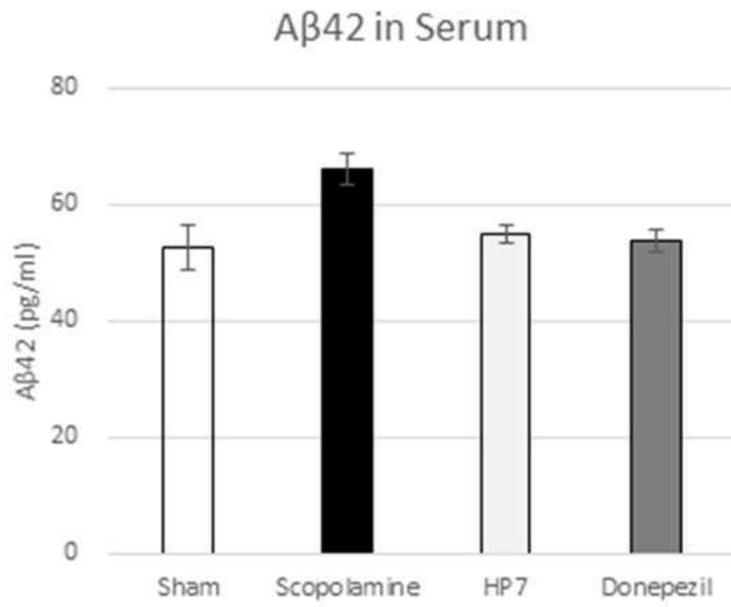
도면6



도면7



도면8



도면9

