

명세서

발명의 명칭: 락토바실러스 사케이 **PROBIO-65**를 포함하는 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 락토바실러스 사케이 Probio-65를 포함하는 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 부작용이 없고, 장내 미생물의 프로파일과 장내 대사체 조성물의 변화를 통해 알츠하이머병을 완화시킬 수 있는 락토바실러스 사케이 Probio-65를 포함하는 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 락토바실러스 사케이 Probio-65(Lactobacillus sakei Probio-65)는 한국인들이 수백년간 섭취하여 안전성이 전통적으로 확보된 발효먹이인 김치에서 분리된 균주로, 내산성, 내담즙성, 항생제 저항성을 나타내고, 동물체의 체내 및 장내에서 유해한 병원성 미생물의 생육을 억제하고, 면역증진 활성을 나타내며, 특히 아토피성 피부염 병변의 질병악화인자로 알려진 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)의 생육을 억제하여 아토피성 피부염의 치료 또는 예방에 효과적이고, 알레르기 관련 질환의 치료 또는 예방에도 효과적이며, 장내 유해 미생물의 이상 증식을 억제하여 장내 미생물 균총을 안정화시키는 효능을 가진다. 본 발명자는 대한민국 등록특허 제10-0479719호의 발명자로 상기 락토바실러스 사케이 Probio-65 및 그 조성물을 제안한 바 있다.
- [3] 본 발명자는 락토바실러스 사케이 Probio-65의 기타 효능과 관련하여 연구를 진행하던 중 락토바실러스 사케이 Probio-65가 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 조성물로 사용 가능하다는 것을 발견하였다.
- [4] 알츠하이머병(Alzheimer's disease)은 전세계적으로 가장 널리 퍼져 있는 치매로 전세계 4700만 명에 영향을 미치고 있으며 2018년 현재 총 6,040억 달러의 비용이 발생한다(알츠하이머 협회, 2018). 알츠하이머병은 신경섬유질의 엉킴과 대뇌피질과 해마에서 주로 뉴런의 손실과 같은 다른 신경퇴행성 질환과 많은 병리학적 측면을 공유하지만, 이 질병의 특징은 아밀로이드 베타($A\beta$)로 알려진 아밀로이드성 펩티드의 퇴적을 통해 야기되는 아밀로이드 플라크의 존재다. 형성된 모든 $A\beta$ 종 중에서 $A\beta_{42}$ 는 신경 퇴화를 일으키는 가장 독성이 강한 형태이자 공격적인 종류이다. 염증은 알츠하이머병에서 염증 반응의 항상성이 파괴되어 만성 염증을 유발하고, 초기 $A\beta$ 병리학을 유발하는 중심 메커니즘이다.
- [5] 구체적으로, 현재 알츠하이머병의 가장 유력한 원인으로 알려진 $A\beta$ 는 베타(β)와 감마 세크레타제(γ -secretase) 효소가 APP(Amyloid Precursor Protein)를 비정상적으로 가수분해시켜 생성되는 것이다. $A\beta$ 는 독성을 함유하여

신경전달물질인 아세틸콜린을 만드는 대뇌 부분과 대뇌 피질의 신경세포를 파괴하여 아세틸콜린의 활성상태를 감소시키고, 활성산소종(Reactive Oxygen Species; ROS)을 생성하여 산화적 손상으로 유한하는 것에 의하여 신경세포사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다.

- [6] 현재 사용되고 있는 알츠하이머병 치료제는 Ach 분해효소 억제제가 대부분이나, 간 독성의 부작용이 크고, 각종 부작용을 일으킨다는 문제점이 있었다.
- [7] 이러한 종래의 알츠하이머병 치료제의 문제점을 해결하기 위해 본 발명자는 체내에 부작용이 없고, 장내 미생물의 프로파일과 장내 대사체 조성물의 변화를 통해 알츠하이머병을 완화시킬 수 있는 락토바실러스 사케이 Probio-65를 포함하는 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 조성물을 개발하기에 이르렀다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는, 체내에 부작용이 없고, 장내 미생물의 프로파일과 장내 대사체 조성물의 변화를 통해 알츠하이머병을 완화시킬 수 있고, 미생물 또는 이의 배양액을 기초로 의약 조성물, 식품 조성물, 화장품 및 사료 조성물로 사용될 수 있는 락토바실러스 사케이 Probio-65를 포함하는 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하기 위한 것이다.
- [9] 본 발명의 상기 및 기타 목적들은 하기 설명되는 본 발명에 의하여 모두 달성될 수 있다.

과제 해결 수단

- [10] 본 발명의 일실시예에 따른 락토바실러스 사케이 Probio-65를 포함하는 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 조성물은 락토바실러스 사케이 Probio-65를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [11] 여기서, 상기 락토바실러스 사케이 Probio-65는 락토바실러스 사케이 Probio-65 균주를 액체 배양한 락토바실러스 사케이 Probio-65 배양액인 것을 특징으로 한다.
- [12] 또한, 본 발명의 일실시예에 따른 락토바실러스 사케이 Probio-65를 포함하는 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 조성물은 락토바실러스 사케이 Probio-65 또는 이의 배양액을 포함하는 식품 조성물로 사용될 수 있다.
- [13] 본 발명의 일실시예에 따른 락토바실러스 사케이 Probio-65를 포함하는 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 조성물은 락토바실러스 사케이 Probio-65 또는 이의 배양액을 포함하는 화장품으로 사용될 수 있다.
- [14] 본 발명의 일실시예에 따른 락토바실러스 사케이 Probio-65를 포함하는 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 조성물은 락토바실러스 사케이 Probio-65 또는 이의 배양액을 포함하는 사료 조성물로 사용될 수 있다.

발명의 효과

- [15] 본 발명은 체내에 부작용이 없고, 장내 미생물의 프로파일과 장내 대사체 조성물의 변화를 통해 알츠하이머병을 완화시킬 수 있는 락토바실러스 사케이 Probio-65를 포함하는 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 발명의 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

- [16] 도 1은 정상먹이가 공급된 GMR-OreR의 눈 형태를 800배의 배율로 촬영한 사진이다.
- [17] 도 2는 정상먹이가 공급된 형질전환 초파리(GMR-A β 42)의 눈 형태를 800배의 배율로 촬영한 사진이다.
- [18] 도 3은 락토바실러스 사케이 Probio-65 배양액이 함유된 정상먹이가 공급된 형질전환 초파리(GMR-A β 42)의 눈 형태를 800배의 배율로 촬영한 사진이다.
- [19] 도 4는 Bray-Curtis distance matrix를 기반으로 한 미생물 군집의 주요 좌표 분석(PcoA)을 나타낸 그래프이다.
- [20] 도 5는 다른 처리군에서 관찰된 속내 상대적 존재량을 나타내는 초파리의 장내 미생물학적 특성을 나타내는 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [21] 본 발명의 상술한 목적, 특징 및 장점들은 본 발명의 바람직한 실시예 및 비교예를 상세히 설명함으로써 더욱 명백해질 것이다. 후술하는 상세한 설명은 한정적인 의미로 기술되는 것은 아니고, 본 발명의 범위는 그 청구항들이 주장하는 것과 균등한 모든 범위와 더불어 첨부된 청구항에 의해서만 한정된다.
- [22] 이하, 첨부된 도면 및 실시예를 참조하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[23]

[24] 실시예

[25] 실시예 1: 락토바실러스 사케이 Probio-65의 배양액 제조

- [26] 한국의 전통발효먹이인 김치에서 분리한 락토바실러스 사케이 Probio-65는 장기 보존된 균주의 생리활성도를 향상시키고 건강한 균주를 선별하기 위해 MRS broth(Difco laboratories, USA)배지에서 15시간동안 37°C의 배양기에 넣어 2~3회 계대배양한 후 획득한 우량종을 MRS broth 배지를 사용하여 37°C의 배양기에서 항온을 유지하며 15시간동안 배양한 균체를 스타터로 사용하였다. 그 후, 글루코즈 1중량%, 효모 추출물 1중량%, 소이렙톤 0.25중량%, 폴리옥시에틸렌 소비탄 모노-올리레이트(Polyoxyethelene sorbitan mono-oleate) 0.1중량%, 황산암모늄((NH₄)₂SO₄) 0.1중량%, 황산마그네슘(MgSO₄) 0.01 중량%, 인산이수소칼륨(KH₂PO₄) 0.1중량% 및 물 90~99중량%를 포함하는 액체배양 배지를 121°C에서 15분간 멸균한 후, 이 배지를 이용하여 2L의 플라스크에서 상기 락토바실러스 사케이 Probio65를 37°C에서 24시간 동안 액체 배양함으로써 락토바실러스 사케이 Probio-65 배양액을 제조하였다.

[27]

- [28] 실시예 2: 형질전환 초파리(GMR-A β 42)를 이용한 락토바실러스 사케이 Probio-65의 알츠하이머병 예방 또는 치료 효과 실험
- [29] 실시예 2-1 실험 초파리군 사육
- [30] 본 실험을 위한 초파리군(*Drosophila melanogaster*)은 Oregon-R 야생종; Glass Multiple Reporter(GMR)-GAL4; 및 UAS-A β 42를 사용하였다. Oregon-R을 GMR-GAL4와 교배시켜 GMR-OreR을 생산하고, UAS-A β 42를 GMR-GAL4와 교배시켜 형질전환 초파리(GMR-A β 42)를 생산하였다. 모든 초파리군은 25°C의 환경에서 생육하였고, 교배 조건은 30°C로 유지하였다.
- [31]
- [32] 실시예 2-2 실험 초파리군에 대한 먹이 공급
- [33] 형질전환처리 전, 모든 실험을 위한 초파리군은 18°C의 환경에서 생육하였고, 일반 먹이를 공급하였다. 상기 일반 먹이는 끓인 옥수수 전분(Corn starch) 4%(w/v), 폴렌타(Polenta) 5%(w/v), 황설탕(Brown sugar) 10%(w/v), 한천(Agar) 0.7%(w/v), 열처리된 사효모(heat-killed yeast) 5%(w/v), 니파긴(Nipagin) 3%(w/v) 및 피로피온산(Propionic acid) 0.7%(v/v)을 혼합하여 무균 플라스틱 바이얼에 옮겨 담은 후 냉각 및 고체화시켜 제조하였다. 형질전환 과정에서, 동일한 먹이는 니파긴 및 프로피온산 없이 제조되었고, 먹이의 냉각 과정에서 고체화 직전에 락토바실러스 사케이 Probio-65(1×10^{11} CFU/ml)를 첨가하였다. 각각의 먹이는 공급전 신선한 상태로 준비하였다. 정상종 및 형질전환 초파리(GMR-A β 42)는 일반 먹이로 생육되었다. 반면에 락토바실러스 사케이 Probio-65가 공급된 형질전환 초파리(GMR-A β 42)는 젖산 박테리아를 포함하는 먹이로 생육되었다. 자손 초파리들은 분석을 위해 각각의 그룹으로부터 10일 이후에 수집되었다.
- [34]
- [35] 실시예 2-3 실험 결과
- [36] 초파리가 포유류와 유사하지만 단순한 중추신경계를 공유함에 따라 신경 연구에서 초파리 중 *Drosophila melanogaster*의 사용은 이 분야에서 중요한 돌파구가 되었다. 따라서, 본 실험에서는 초파리군으로 *Drosophila melanogaster*(*D.melanogaster*)를 사용하였다. 또한, 본 발명에 따른 락토바실러스 사케이 Probio-65를 포함하는 배양액 조성물은 pan-retinal GMR-GAL4 드라이버를 사용하여 복합 눈에서 인간 A β 42를 이소성으로 발현하는 *D.melanogaster*를 대상으로 실험하였다.
- [37]
- [38] 도 1은 정상먹이가 공급된 GMR-OreR의 눈 형태를 800배의 배율로 촬영한 사진이고, 도 2는 정상먹이가 공급된 형질전환 초파리(GMR-A β 42)의 눈 형태를 800배의 배율로 촬영한 사진이며, 도 3은 락토바실러스 사케이 Probio-65 배양액이 함유된 정상먹이가 공급된 형질전환 초파리(GMR-A β 42)의 눈 형태를 800배의 배율로 촬영한 사진이다.

[39]

[40] 도 1 내지 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 정상먹이를 공급한 GMR-OreR(대조군)의 눈 형태는 작은 육각형 모양이 규칙적으로 배열되고 상기 육각형 모양의 사이에 강모가 형성되어 있다. 그러나, 정상먹이를 공급한 형질전환 초파리(GMR-A β 42)(음성대조군)에서는 거친 눈 표현형(REP)이 특징인 강한 신경 퇴행 표현형이 나타났다. 음성대조군에 비하여 락토바실러스 사케이 Probio-65(1×10^{11} CFU/ml)를 포함하는 정상먹이를 공급한 형질전환 초파리(GMR-A β 42)는 각각의 단위가 작은 육각형 모양을 가지면서 가시적인 모공이 덜 보이는 날눈(Omatidia)이 관찰되었고, 강모의 수가 크게 증가하였으며 강모의 각도가 정류된 것을 보여주었다.

[41]

[42] [표1]

거친 눈 표현형에 대한 구조 효과 정도

군주	구조 효과 정도		
	육각형 모양 겹눈	강모 수	구멍의 유무
GMR-A β 42 without treatment	-	-	-
GMR-A β 42 treated with <i>L. sakei</i> ProBio65	++	+	++
Control	+++	+++	+++

[43]

[44] 상기 표 1은 도 1 내지 도 3과 관련하여 거친 눈 표현형에 대한 구조 효과 정도를 나타낸 표이다. 표 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 락토바실러스 사케이 Probio-65의 공급으로 A β 42가 감소함에 따라 신경독 효과가 저감되는 것을 보여주었다. 상기 저감 효과의 단계는 육각형 모양 겹눈 및 날눈(Omatidia)의 구멍에서 매우 현저하게 나타났다.

[45]

[46] 도 4는 Bray-Curtis distance matrix를 기반으로 한 미생물 군집의 주요 좌표 분석(PcoA)을 나타낸 그래프이고, 도 5는 다른 처리군에서 관찰된 속내 상대적 존재량을 나타내는 초파리의 장내 미생물학적 특성을 나타내는 그래프이다. 도 4 및 도 5에서, Nf는 정상먹이를 공급한 형질전환 초파리(GMR-A β 42)(음성대조군)이고, Probio65는 락토바실러스 사케이 Probio-65(1×10^{11} CFU/ml)를 포함하는 정상먹이를 공급한 형질전환 초파리(GMR-A β 42)(Probio65 처리군)이며, Control은 정상먹이를 공급한 GMR-OreR(대조군)을 나타낸다.

[47]

[48] 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 장내 미생물군의 분석 결과 Probio65 처리군은 음성대조군보다 대조군에 더 유사한 것으로 나타났다. 또한, 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 형질전환 초파리에 락토바실러스 사케이 Probio-65를 처리한 후 Probio65 처리군에서 기생균의 일종인 볼바키아(Wolbachia)의 상대적 풍부도는 37.9% 감소한 반면, 코리네박테리움(Corynebacterium_1)은 Probio65 처리군에서만 높은 수치를 보여주었다. 볼바키아는 D.melanogaster에서 알츠하이머병의 시초가 되거나 병인에 지배적인 균이므로 알츠하이머병에 잠재적인 바이오 마커로 보고되고 있다. 게다가 볼바키아는 신경퇴행성 질환, 특히 파킨슨병, 헌팅턴병, 알츠하이머병과 대부분 관련성을 가진다. 코리네박테리움은 글루타메이트(Glutamate)의 생성과 관련이 있다. 알츠하이머병을 가지는 환자들에 대한 사전 준비조사에 기초할 때, 알츠하이머 환자들을 낮은 플라즈마 D-글루타메이트(Plasma D-glutamate) 레벨을 가지는 것으로 보고되었다. 또한, 뇌에서의 감소된 D-글루타메이트 레벨은 알츠하이머병에서 인지장애와 연관된다. 이러한 데이터는 알츠하이머병을 가지는 환자들의 정신 건강에 있어서 D-글루타메이트의 중요성을 부각시킨다. 그리고, 락토바실러스 사케이 Probio-65는 형질전환 초파리의 내장에 존재하는 코리네박테리움의 증식을 향상시켜 잠재적으로 글루타메이트의 생성을 촉진시킨다. 따라서, 상기 형질전환 초파리들은 중요한 알츠하이머병 완화 효과를 보여주었다. 위 실험결과로부터 락토바실러스 사케이 Probio-65는 장내 미생물의 프로파일과 장내 대사체 조성물의 변화를 통해 초파리의 눈의 결함에서 발현되는 신경퇴행현상을 개선하는 효과를 가진다는 것을 확인할 수 있었다.

[49]

[50] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 설명하였으나, 본 발명은 상술한 특정 실시예에 한정되지 아니한다. 즉, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자라면 첨부된 특허청구범위의 사상 및 범주를 일탈함이 없이 본 발명에 대한 다수의 변경 및 수정이 가능하며, 그러한 모든 적절한 변경 및 수정은 균등물들도 본 발명의 범위에 속하는 것으로 간주되어야 할 것이다.

산업상 이용가능성

[51] 본 발명의 락토바실러스 사케이 Probio-65를 포함하는 조성물은 알츠하이머병을 완화시키기 위한 용도를 가지고, 미생물 또는 이의 배양액의 형태로 각종 의약 조성물, 식품 조성물, 화장품 및 사료 조성물에 사용될 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 락토바실러스 사케이 Probio-65를 유효성분으로 포함하는 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 락토바실러스 사케이 Probio-65는 락토바실러스 사케이 Probio-65 균주를 액체 배양한 락토바실러스 사케이 Probio-65 배양액인 것을 특징으로 하는 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 3] 락토바실러스 사케이 Probio-65 또는 이의 배양액을 포함하는 식품 조성물.
- [청구항 4] 락토바실러스 사케이 Probio-65 또는 이의 배양액을 포함하는 화장품.
- [청구항 5] 락토바실러스 사케이 Probio-65 또는 이의 배양액을 포함하는 사료 조성물.