



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0030974

(43) 공개일자 2016년03월21일

- |  |   |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>A61K 35/20 (2015.01) A61K 38/17 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/>A61K 35/20 (2013.01)<br/>A61K 38/1709 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-7003267</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2014년07월10일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2016년02월04일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/NZ2014/000141</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2015/005804<br/>국제공개일자 2015년01월15일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>61/845,480 2013년07월12일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>디 에이2 밀크 컴퍼니 리미티드<br/>뉴질랜드 오클랜드 쇼트랜드 스트리트 88 레벨 27<br/>씨/- 심슨 그리어슨</p> <p>(72) 발명자<br/>클라크, 앤드류 존<br/>뉴질랜드 1052 오클랜드 파벨 클리블랜드 로드 14</p> <p>(74) 대리인<br/>특허법인 남앤드남</p> |
|--|---|

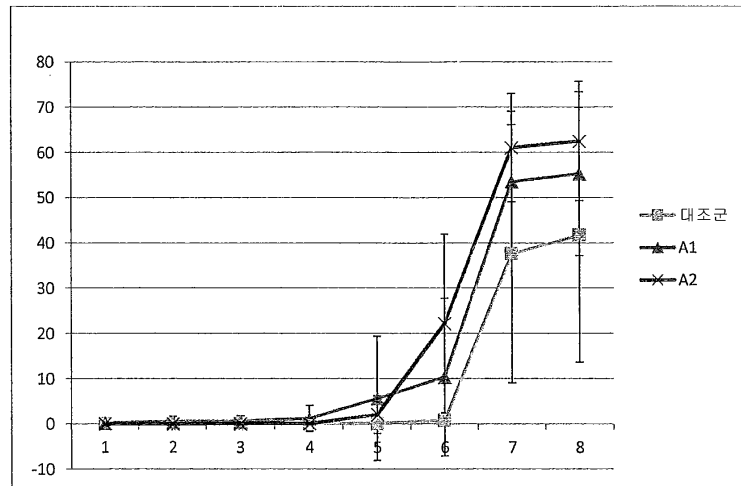
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 락토스 불내증의 증상을 감소시키거나 예방하는 베타-카세인 A2

(57) 요약

본 발명은 베타-카세인을 함유하는 조성물의 동물에 의한 소비를 포함하거나, 상기 조성물을 소비를 위해 동물에 제공하는, 동물에서의 락토스 불내증의 증상을 예방하거나 감소시키는 것에 관한 것으로, 베타-카세인은 적어도 75 중량%의 베타-카세인 A2를 포함한다. 효과를 급성(조성물에 대한 노출후) 및 진행성(락토스에 대한 이후의 노출) 둘 모두이다.

대표도 - 도1



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

동물에서 락토스 불내증(lactose intolerance)의 증상을 예방하거나 감소시키기 위한 조성물의 용도로서, 조성물이 베타-카세인을 함유하고, 베타-카세인이 적어도 75 중량%의 베타-카세인 A2를 포함하는, 용도.

#### 청구항 2

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

#### 청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 베타-카세인이 100%의 베타-카세인 A2를 포함하는 용도.

#### 청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 밀크 또는 유제품인 용도.

#### 청구항 5

제 4항에 있어서, 밀크가 신선한 밀크, 분유, 분말에서 재구성된 액상유, 탈지유, 균질화 밀크, 연유, 무가당 밀크, 저온살균 밀크 또는 비-저온살균 밀크인 용도.

#### 청구항 6

제 4항에 있어서, 유제품이 크림, 요구르트, 퀴크(quark), 치즈, 버터, 또는 아이스크림인 용도.

#### 청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 락토스 불내증의 증상이 복부 팽창 및 경련, 고창(flatulence), 설사, 구역, 소리는는 위(rumbling stomach), 및 구토 중 하나 이상을 포함하는 용도.

#### 청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, 락토스 불내증 증상의 예방 또는 감소가 동물에 의한 조성물 소비에 대한 급성 반응인 용도.

#### 청구항 9

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 동물로 하여금 락토스에 대한 이후의 노출시 락토스 불내증의 증상을 예방하거나 감소시키는 경향을 갖도록 하는 용도.

#### 청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 동물이 인간, 개, 또는 고양이인 용도.

#### 청구항 11

동물에서 락토스 불내증의 증상을 예방하거나 감소시키기 위한 조성물로서, 조성물이 베타-카세인을 함유하고, 베타-카세인이 적어도 75 중량%의 베타-카세인 A2를 포함하는, 조성물.

#### 청구항 12

동물에서 락토스 불내증의 증상을 예방하거나 감소시키기 위한 조성물의 제조에서의 밀크의 용도로서, 밀크가 베타-카세인을 함유하고, 베타-카세인이 적어도 75 중량%의 베타-카세인 A2를 포함하는, 용도.

#### 청구항 13

동물에서 락토스 불내증의 증상을 예방하거나 감소시키기 위한 조성물의 제조에서의 베타-카세인 A2의 용도로서, 조성물이 적어도 75 중량%의 베타-카세인 A2를 포함하는, 용도.

**청구항 14**

제 13항에 있어서, 베타-카세인 A2가 밀크의 성분인 용도.

**청구항 15**

베타-카세인을 함유하는 조성물의 동물에 의한 소비를 포함하거나, 상기 조성물을 소비를 위해 동물에게 제공하는, 동물에서 락토스 불내증의 증상을 예방하거나 감소시키는 방법으로서, 베타-카세인이 적어도 75 중량%의 베타-카세인 A2를 포함하는, 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001]

**기술 분야**

[0002]

본 발명은 락토스 불내증(lactose intolerance)의 증상을 감소시키거나 예방하기 위한 밀크 단백질 베타-카세인 A2의 용도에 관한 것이다. 상세하게는, 본 발명은 밀크 및 밀크 유래 식품에 관한 것이다. 본 출원인은 높은 수준의 단백질 베타-카세인 A2를 함유하는 밀크 및 유제품의 소비 및 베타-카세인 A1을 함유하는 밀크 및 유제품의 회피가 락토스 불내증의 증상을 감소시키거나 예방하는데 이로운 것을 발견하였다. 특히, 이로운 효과는 즉시적(급성)이며, 락토스에 대한 이후의 노출시 락토스 불내증의 증상을 예방하거나 감소시키는 진행성(베타-카세인 A1에 대한 노출 후) 소인을 추가로 유도한다.

**배경 기술**

[0003]

**발명의 배경**

[0004]

락토스 불내증은 일반적으로 손상된 락토스를 소화하는 능력을 나타낸다. 락토스는 갈락토스 및 글루코스 단당류를 포함하는 이당류 탄수화물이다. 락토스는 밀크 및 밀크-유래 낙농 제품에서 발견된다. 인간 밀크는 약 9% 락토스를 포함하는 반면, 가공되지 않은 우유는 약 4.7%의 락토스를 포함한다. 염소, 버팔로 및 양으로부터의 밀크는 또한 4.5-5.0% 범위의 락토스를 함유한다. 락토스의 소화는 락타제 효소에 의한 락토스의 갈락토스 및 글루코스로의 가수분해(또는 분리)이다.

[0005]

락토스 불내성인 사람은 이들의 소화계에서 충분한 수준의 락타제가 결핍되어 있다. 락토스는 소장벽을 통해 혈류로 흡수될 수 없고, 따라서 락타제에 의해 분해되지 않는 경우, 온전하게 결장으로 통과한다. 결장에서의 락토스의 박테리아 발효는 대량의 가스를 발생시킨다. 추가로, 흡수되지 않은 탄수화물 및 발효 생성물은 결장의 삼투압을 상승시키고, 이는 장으로의 물의 증가된 유동을 야기시킨다. 따라서, 락토스 불내증은 복부 팽창 및 경련, 고창(flatus), 설사, 구역, 소리나는 위(rumbling stomach), 또는 심지어 구토를 포함하는 다양한 증상을 야기시킬 수 있다. 이들 증상은 일반적으로 락토스의 소비 약 30분 내지 2시간 후에 발생한다.

[0006]

조기 유아 포유동물은 락타제를 생성시키나, 이러한 생성은 일반적으로 이유(weaning) 후에 중지된다. 그러나, 일부 인간 집단은 락타제 생성이 성인기까지 지속되는 락타제 지속성(lactase persistence)이 발달하였다. 다양한 집단에서의 락타제 지속성의 단계는 낙농 제품이 식품원으로서 이용가능한 문화를 선호하는 집단의 자연 선택의 결과인 것으로 생각된다.

[0007]

락토스 불내증은 용인될 수 있는 락토스의 양이 사람마다 다양하다는 점에서 절대적이지 않다. 일반적으로, 락토스 불내성인 사람은 시행착오에 의해 얼마나 많은 락토스를 이들이 용인할 수 있는지 결정되어야 한다. 이는 보통 식이 락토스의 수준을 조절하거나, 식이 락토스를 전부 회피함으로써 수행된다. 일부 경우에서, 효소적 락타제 보충이 이용될 수 있다. 식물-기반 밀크 또는 밀크 유도체, 예를 들어, 두유, 현미유, 아몬드 밀크, 코코넛 밀크, 오토 밀크(oat milk), 헴프 밀크(hemp milk) 및 땅콩 밀크가 사용될 수 있는데, 이는 이들이 본질적으로 락토스를 비함유하기 때문이다. 또한, 이용가능한 많은 락토스 비함유 또는 락토스 감소된 식품이 존재한다. 상기 식품의 이용가능성에도 불구하고, 식이에서의 밀크 또는 낙농 제품의 회피는 종종 어렵다.

[0008]

밀크(및 다른 낙농 제품)의 소비와 락토스 불내증의 증상 사이의 연관성은 널리 공지되어 있다. 그러나, 락토스 불내증에 특이적인 의학적 진단의 부재하에서, 많은 사람은 자신이 락토스 불내성인 것으로 잘못

생각하는데, 이는 이들이 경험한 증상과 밀크 또는 다른 낙농 제품의 소비를 연관시키기 때문이다. 상기 증상은 사실 달리 무시할 만하거나 눈에 띄지 않을 효과를 악화시키는 다른 밀크 성분으로 인한 것일 수 있다. 단백질은 상기 증상을 야기시키거나 악화시킬 수 있는 성분의 한 예이다.

[0009] 전세계 집단에서 소비되는 밀크, 주로 우유는 인간 식이에서 단백질의 주요 공급원이다. 우유는 통상적으로 리터 당 약 30 그램의 단백질을 포함한다. 카세인은 단백질의 가장 큰 구성요소를 차지하고(80%), 베타-카세인은 카세인의 약 37%를 차지한다. 지난 20년간, 많은 건강 장애는 카세인 단백질, 특히 베타-카세인과 관련이 있다는 증거의 실체가 점점 커져 왔다.

[0010] 베타-카세인은 베타-카세인 A1 및 베타-카세인 A2로 분류될 수 있다. 이러한 2개의 단백질은 대부분의 인간 집단에서 소비되는 밀크 중의 우세한 베타-카세인이다. 베타-카세인 A1은 단일 아미노산이 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 장에서 베타-카세인들의 효소적 소화에 매우 중요하다. 위치 67에서의 히스티딘의 존재는 베타-카소모르핀-7(BCM-7)로 공지된, 7개의 아미노산을 포함하는 단백질 단편이 효소적 소화시에 생성되는 것을 허용한다. 따라서, BCM-7은 베타-카세인 A1의 소화 생성물이다. 베타-카세인 A2의 경우에, 위치 67은 그 위치에서 아미노산 결합의 절단을 방해하는 프롤린이 차지하고 있다. 따라서, BCM-7은 베타-카세인 A2의 소화 생성물이 아니다.

[0011] 베타-카세인 B 및 베타-카세인 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 우유에서, 매우 낮은 수준으로만 발견되거나, 전혀 발견되지 않는다. 따라서, 본 발명의 상황에서, 용어 베타-카세인 A1은 위치 67에 히스티딘을 갖는 임의의 베타-카세인을 나타내고, 용어 베타-카세인 A2는 위치 67에 프롤린을 갖는 임의의 베타-카세인을 나타낸다.

[0012] BCM-7은 아편유사제 펩티드이고, 신체 전체에 걸쳐 아편유사제 수용체를 강력하게 활성화시킬 수 있다. BCM-7은 위장 벽을 건너 순환으로 진입하는 능력을 지녀서 아편유사제 수용체를 통해 진신 및 세포 활성화에 영향을 미칠 수 있다. 본 출원인 등은 밀크 및 유제품 중의 베타-카세인 A1의 소비와 타입 I 당뇨병(WO 1996/014577), 관상동맥 심질환(WO 1996/036239) 및 신경 질환(WO 2002/019832)을 포함하는 특정한 건강 질환의 발병률 사이의 연관성을 이전에 확인하였다.

[0013] 또한 BCM-7이 소화 기능에 영향을 줄 수 있다는 의견이 있었다. 아편유사제 수용체는 위장 운동, 점액 생산 및 호르몬 생산을 조절하는 것을 포함하여, 위장 기능 조절에서 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 아편유사제 수용체 매개 효과에 기여함을 나타낸다(Charlin V. *et al.*, *Rev. Med. Chil.*, 1992, 120(6):666-9). 그러나, 카소모르핀 및 장에서의 통과 시간 사이의 연관성에 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 소비와 변비 사이의 관계를 입증하는데 실패하였다(Crowley, E.T., *Nutrients*, 2013, 5, 253-266). 또한, BCM-7은 mu-오피에이트 수용체 매개 경로를 통해 점액의 생산을 자극하고(Zoghbi, S., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2006, 290(6):G1105-13), 면역계와 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). 더욱 최근에, 베타-카세인 A1은 위장관 내의 조직의 염증을 야기시키는 것으로 보고되었다(Ul Haq, M.R., *et al.*, *Eur. J. Nutr.*, 2013; Barnett, M.P.G., *et al.*, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2014). 베타-카세인 A1 유래 BCM-7에 의해 유도된 염증은 병에 걸린 조직의 후생유전학적 DNA 변형 및 이후의 유전자 발현에 대한 하류 효과를 갖는 것이 입증되었다(Trivedi, M.S., *et al.*, *J. Nut. Bio.*, 2014).

[0014] 상기 보고는 카세인 및 카소모르핀(BCM-7 포함)과 위장 기능 사이의 연관성을 나타낸다. 이러한 보고는 일반적으로 유단백질 또는 카세인을 이용한 연구 또는 BCM-7 자체를 이용한 연구에 기반한다. 그러나, 지금까지, 베타-카세인 A1의 소비를 위장 기능 및 상세하게는 락토스 불내증의 증상과 직접 연관시킨 보고는 없었다. 또한, 베타-카세인 A2가 높은 밀크(및 거꾸로 베타-카세인 A1은 낮은)를 마신 후 위장 기능에서의 개선으로 언급되는 공지되지 않거나 확인되지 않은 상태를 갖는 소비자로부터의 입증되지 않은 보고(온라인 및 매체)가 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, 운동의 연속 소화 효과 및 변의 굳기에 걸친 보고를 포함한다는 점에서 상충된다. 상세하게는 잠재적으로 결과에 영향을 줄 수 있는 변수의 수가 매우 많은 식품 및 생리학적 기능의 경우에, 입증되지 않은 보고를 신뢰하여 결론을 내릴 수 없다.

[0015] 본 출원인은 이제 베타-카세인 A1의 소비와 락토스 불내증의 증상 사이의 직접적인 연관성에 대한 확실한 과학적 증거를 발견하였다. 장 건강에 영향을 미칠 수 있고, 밀크 및 유제품이 매우 다양한 단백질 성분 및 다른 성분을 함유하는 인간 식이에서의 많은 요인을 고려해 볼 때, 본 출원인의 베타-카세인 A1 소비와 락토스 불내증의 증상 사이의 명백한 직접적 관련성의 발견은 놀라운 일이다. 중요하게는, 본 출원인은 베타-카세인 A1의 소비에 대한 급성 및 요망되지 않은 반응뿐만 아니라 베타-카세인 A1의 소비 및 결과로서 발생하는 BCM-7의 생성에서의 진행성(베타-카세인 A1 또는 BCM-7에 대한 노출 후) 반응이 동물에서 유전적 변화를 유도할 수 있고, 이는 낮은 수준의 락타제 및 결과로서 락토스에 대한 이후의 노출시의 락토스 불내증의 증상을 야기시킬 가능성의 증가를 초래할 수 있다는 증거를 발견하였다.

[0016] 따라서, 락토스 불내증의 증상을 감소시키거나 예방하기 위한 방법을 제공하거나, 적어도 현존하는 방법에 유용한 대안을 제공하는 것이 본 발명의 목적이다.

**발명의 내용**

[0017] **발명의 개요**

[0018] 본 발명의 첫번째 양태에서, 동물에서 락토스 불내증의 증상을 예방하거나 감소시키기 위한 조성물의 용도가 제공되며, 조성물은 베타-카세인을 함유하고, 베타-카세인은 적어도 75 중량%의 베타-카세인 A2를 포함한다.

[0019] 본 발명의 두번째 양태에서, 동물에서 락토스 불내증의 증상을 예방하거나 감소시키기 위한 조성물이 제공되며, 조성물은 베타-카세인을 함유하고, 베타-카세인은 적어도 75 중량%의 베타-카세인 A2를 포함한다.

[0020] 본 발명의 또 다른 양태에서, 동물에서 락토스 불내증의 증상을 예방하거나 감소시키기 위한 조성물의 제조에서 밀크의 용도가 제공되며, 밀크는 베타-카세인을 함유하고, 베타-카세인은 적어도 75 중량%의 베타-카세인 A2를 포함한다.

[0021] 또 다른 양태에서, 동물에서 락토스 불내증이 증상을 예방하거나 감소시키기 위한 조성물의 제조에서 베타-카세인 A2의 용도가 제공되며, 조성물은 적어도 75 중량%의 베타-카세인 A2를 포함한다. 베타-카세인 A2는 바람직하게는 밀크의 성분이다. 밀크는 바람직하게는 우유이다.

[0022] 본 발명의 추가 양태에서, 베타-카세인을 함유하는 조성물의 동물에 의한 소비를 포함하거나, 상기 조성물을 소비를 위해 동물에게 제공하는, 동물에서 락토스 불내증의 증상을 예방하거나 감소시키는 방법이 제공되며, 베타-카세인은 적어도 75 중량%의 베타-카세인 A2를 포함한다.

[0023] 베타-카세인 A2의 양은 75 중량% 내지 100 중량%의 베타-카세인, 예를 들어, 적어도 90 중량% 또는 심지어 100 중량%의 베타-카세인의 범위의 임의의 양일 수 있다.

[0024] 본 발명의 특정 구체예에서, 조성물은 밀크 또는 유제품이다. 밀크는 분유 또는 액상유일 수 있다. 유제품은 크림, 요구르트, 퀴크(quark), 치즈, 버터, 아이스크림, 또는 임의의 다른 유제품일 수 있다.

[0025] 락토스 불내증의 증상은 복부 팽창 및 경련, 고창, 설사, 구역, 소리나는 위(rumbling stomach), 및 구토일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0026] 동물에 의한 조성물의 소비에 대한 반응은 급성 반응일 수 있고, 또한 동물에서 락토스에 대한 이후의 노출시 락토스 불내증의 증상을 예방하거나 감소시키는 소인을 유도할 수 있다.

[0027] 본 발명의 대부분의 구체예에서, 동물은 인간이다. 그러나, 다른 구체예에서, 동물은 개, 고양이, 또는 사료에 밀크가 보충되는 임의의 다른 애완 동물일 수 있다.

[0028] **도면의 간단한 설명**

[0029] 도 1은 실시예 1의 식이를 먹인 래트에서의 위장 통과 시간을 제시한다.

[0030] 도 2는 실시예 1의 식이를 먹인 래트에서의 십이지장 락타제 활성을 제시한다.

[0031] 도 3은 실시예 1의 식이를 먹인 래트에서의 결장 골수세포형과산화효소 활성을 제시한다.



- [0032] 도 4는 뉴런 세포 및 GI 상피 세포에서의 시스테인의 모르핀 및 BCM-7 농도 의존성 흡수를 제시한다.
- [0033] 도 5는 뉴런 세포 및 GI 상피 세포에서의 시스테인의 시간-의존성 흡수를 제시한다.
- [0034] 도 6은 시스테인 흡수에 대한 BCM-7 및 모르핀의 효과를 매개하는데 있어서의  $\mu$ -아편유사제 수용체의 관련성을 제시한다.
- [0035] 도 7은 시간 경과에 따른 시스테인 수준, GSH/GSSG 및 SAM/SAH에 대한 BCM-7 및 모르핀의 효과를 제시한다.
- [0036] 도 8 및 9는 락토스 대사 및 락토스 합성과 관련된 유전자에서의 CpG 메틸화에 대한 BCM-7의 영향을 제시한다.
- [0037] 도 10은 10 및 20주 동안 베타-카세인 A1 또는 베타-카세인 A2 식이를 먹인 NOD 마우스의 소장에서의 락타제를 인코딩하는 LCT 유전자의 수준을 제시한다.
- [0038] **상세한 설명**
- [0039] 본 발명은 락토스 불내증의 증상을 감소시키거나 예방하기 위한 단백질 베타-카세인을 함유하는 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다. 중요하게는, 베타-카세인은 베타-카세인의 A2 변이체이거나, 조성물에 존재하는 전체 베타-카세인 변이체의 적어도 75 중량%를 차지한다. 조성물에서의 A2 변이체의 우세의 중요성은 출원인이 A1 변이체와 인간에서의 락토스 불내증의 증상 사이의 직접적인 연관성이 존재한다는 것을 밝혀낸 사실에 기인한다. 본 출원인은 또한 십이지장에서 높은 수준의 A2 변이체를 함유하는 밀크 단백질의 존재가 락타제 활성을 유리하게 자극한다는 것을 밝혀내었다. 따라서, A1 변이체의 소비가 회피되고, A2 변이체가 대신 소비되는 경우 장 건강에서의 개선이 예상될 수 있다.
- [0040] 본 명세서에서 사용되는 용어 "락토스 불내증의 증상"은 복부 팽창 및 경련, 고창, 설사, 구역, 소리나는 위 (rumbling stomach), 및 구토를 포함하는 다양한 증상 중 어느 하나 이상을 의미하는 것으로 의도되며, 상기 증상은 급성, 일시적 또는 만성일 수 있다.
- [0041] 본 명세서에서 사용되는 용어 "급성"은 달리 나타내지 않는 한, 베타-카세인 A1의 소비로부터 장으로부터의 베타-카세인 A1 또는 BCM-7의 배출의 기간(통상적으로, 소비 후 8-20시간)을 의미하는 것으로 의도된다.
- [0042] 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. 이후, 베타-카세인의 유일한 식이 공급원이 A2 변이체를 함유하고 다른 변이체를 함유하지 않는 경우, A1 변이체의 식이 섭취는 제거되고, 따라서 베타-카세인 A1 소비로부터 발생하는 락토스 불내증의 해로운 증상이 또한 제거될 것으로 예상될 수 있다.
- [0043] 따라서, 본 출원의 발명은 식이에서의 베타-카세인 A1의 감소 또는 제거, 및 베타-카세인 A2의 축진을 기초로 하며, 이는 베타-카세인 함유 식품 조성물, 특히 밀크 및 유제품에서의 베타-카세인이 주로 베타-카세인 A2이거나 심지어 오로지 베타-카세인 A2인 것을 보장함으로써 달성된다.
- [0044] 이상적으로는, 조성물 내의 베타-카세인은 100% 베타-카세인 A2이다. 따라서, 베타-카세인 A1의 완전한 제거는 락토스 불내증의 증상을 감소시키거나 전부 제거함으로써 관련된 건강 이점을 최대화시킨다. 그러나, 증상은 베타-카세인이 주로 베타-카세인 A2이고, 예를 들어, 80 중량%, 90 중량%, 95 중량%, 98 중량% 및 99 중량%를 포함하나 이에 제한되지는 않는 75 중량% 내지 100 중량% 사이의 임의의 양의 베타-카세인 A2인 임의의 조성물에서 감소될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 조성물은 통상적으로 밀크이지만, 크림, 요구르트, 쿼크, 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 케이크의 형태일 수 있다.
- [0046] 밀크는 인간, 염소, 돼지 및 버팔로를 포함하는 임의의 포유동물로부터 수득될 수 있고, 본 발명의 바람직한 구체예에서 밀크는 우유이다.
- [0047] 밀크는 신선한 밀크, 분유, 분말에서 재구성된 액상유, 탈지유, 균질화 밀크, 연유, 무가당 밀크, 저온살균 밀크 또는 비-저온살균 밀크의 형태, 또는 임의의 다른 형태의 밀크일 수 있다.
- [0048] 본 발명의 조성물은 주로 인간에 의한 소비에 이용가능하지만, 건강상의 이점은 고양이, 개 및 다른 애완 동물

과 같은 일부 다른 동물에도 적절함이 인지되어야 한다.

[0049] 본 발명에 대한 지지는 실시예에 기재된 실험에서 발견된다.

[0050] 실시예 1은 실시예 2 내지 4의 래트 연구를 위한 급식 방법을 설명한다. 식이는 표 1에 제시되어 있다. A1 밀크 식이는 식이 내의 베타-카세인 모두가 베타-카세인 A1인 제형을 기초로 한다. A2 밀크 식이는 식이 내의 베타-카세인 모두가 베타-카세인 A2인 제형을 기초로 한다. 대조군 식이는 단백질 함유물이 달걀 흰자인 제형을 기초로 한다.

[0051] 실시예 2에는 실시예 1의 다양한 식이를 먹인 래트에서의 위장 통과 시간(GITT)에 대한 연구가 기재되어 있다. 추적자로서 사용되는 티타늄 디옥사이드(TiO<sub>2</sub>)는 급식 12시간 후에 동물에 경구 투여되었다. TiO<sub>2</sub>의 회수는 도 1에 시간(시)에 비한 회수 %로 제시된다. A1 식이를 먹인 래트는 A2 식이를 먹인 래트에 비해 지연된 통과를 나타내었고, 둘 모두의 그룹은 대조군 식이를 먹인 래트에 비해 지연을 나타내었다. 이는 BCM-7의 방출로 인해 베타-카세인 A2보다 높은 전체 아편유사제 활성을 갖는 베타-카세인 A1과 일치한다. 락토스 불내증의 증상에서의 락토스의 박테리아 발효와 연관된다. 발효 동안의 박테리아 수는 GITT와 함께 지속적으로 증가한다. 따라서, 운동성이 2배 감소되는 경우, 발효 속도에서의 4배 증가 및 이에 따라 락토스 불내증 증상의 소견이 존재할 것이다. 따라서, 실시예 2는 베타-카세인 A2를 함유하는 식이에 비해 베타-카세인 A1을 함유하는 식이가 GITT에서의 지연에 기여하고, 락토스 불내증의 증상을 발생시킬 가능성이 더 높다는 증거이다.

[0052] 실시예 3은 급성 급식 후(12시간 후)의 십이지장에서의 락타제 활성이 100% A2 식이를 먹인 래트에 대해 만성 급식(60시간 후)에 비해 크게 상승되나, 100% A1 식이는 그렇지 않은 것을 제시한다. 이는 식이에서 건강한 위장 기능 및 락토스의 소화를 촉진하거나, 밀크 및 낙농 제품이 소비되는 경우에 경험하는 락토스 불내증의 증상을 경감시키거나 배제시키기 위해 베타-카세인 A2, 및 베타-카세인 A2를 함유하는 밀크 또는 유제품이 이용될 수 있음을 의미한다. 베타-카세인 A2를 함유하는 식이가 락타제의 분비 또는 활성을 자극하나, 베타-카세인 A1을 함유하는 식이는 그렇지 않은 것으로 생각된다. 이는 베타-카세인 A1 및 베타-카세인 A2의 소화 생성물이 소장으로 진입하는 밀크 단백질의 불루스에 의한 효소 분비의 자극 후에 조직 염증 및 기능에 효과를 갖는 다양한 효과로 인한 가능성이 높다.

[0053] 실시예 4는 래트의 결장에서의 골수세포형과산화효소(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 및 Dommels, Y.E.M., *et al.*, *Genes Nutr.*, 2007, 2(2):209-223). 결장 MPO 활성이 베타-카세인 A2를 먹인 래트에 비해 베타-카세인 A1을 먹인 래트에서 증가된 것으로 밝혀졌고, 이는 차례로 염증 반응의 지표인 베타-카세인 A1을 먹인 래트에서의 호중구 세포의 증가된 수준을 나타내었다. 상기 효과는 날록산(공지된 아편유사제 수용체 길항제)으로 처리된 래트에서 관찰되지 않았으며, 이는 상기 효과가 BCM-7과  $\mu$ -아편제 수용체의 상호작용을 통해 매개되는 것을 입증한다. 결장의 염증은 락토스 불내증의 증상에 대한 증가된 감수성 또는 민감성을 야기시킨다.

[0054] 실시예 5는 BCM-7이 농도-의존성 방식으로 시스테인의 흡수를 억제할 수 있음을 나타낸다. 모르핀은 BCM-7보다 더 큰 효능을 나타내었고, IC50 값은 뉴런 세포에서 0.16 및 1.31 nM(각각) 및 GI 상피 세포에서 6.38 및 15.95 nM(각각)이다(도 4). 시스테인 흡수의 억제가 30분 후에 완전히 발생되었고, 모르핀 또는 BCM-7 노출 48 시간까지 지속되었다(도 5). 이는 BCM-7에 대한 단일 노출 후의 시스테인 흡수에 대한 장기간 만성 효과를 나타낸다. 델타 아편유사제 수용체가 아닌 선택적  $\mu$ -길항제의 존재하에서의 차단은 이들 효과가  $\mu$ -아편유사제 수용체 매개된 것임을 나타내었다.

[0055] 음식-유래 펩티드는 세포에서 S-아데노실메티오닌(SAM)의 수준을 조절할 수 있는 글루타티온의 수준을 포함하는 산화환원 대사를 변경시키는 것으로 보고되어 있다. SAM은 DNA 메틸화 변화를 매개하기 위한 보편적 메틸 공여체이다. 이들 변화는 후생유전학적 조절 기억의 일부이며, 항상성을 유지시키기 위해 유전자 발현의 수준을 조절할 수 있다. 중요하게는, 이들 변화는 고도로 안정적일 수 있고, 유전자 발현/억제를 간섭하고 이에 의해 유전자 수준을 영구적으로 변경시킬 잠재성을 갖는다. 따라서, 글루타티온의 수준은 유전자가 중요한 역할을 하는 경로, 예를 들어, 락토스 합성 및 대사 경로에 영향을 미칠 수 있다. 그러므로, 산화환원 기반 신호전달 경로를 통한 BCM-7에 의해 유도된 후생유전학적 변화는 락토스 합성 및 대사를 담당하는 조절 유전자에 영향을 미칠 수 있고, 이에 따라 신체에서의 락토스 수준에 영향을 미칠 수 있다. 신체는 특정한 전체 수준의 락토스를 흡수하거나, 대사시키거나, 청소시키거나, 저장하도록 운운된다. BCM-7의 영향하에서 수준이 변경되는 경우, 락토스 수준을 조절하는 신체의 능력은 포화될 수 있고, 이에 의해 하류 병태생리학적 준입상 또는 임상 효과를

유도할 수 있다.

[0056] 실시예 6은 BCM-7 및 모르핀이 시스테인 및 글루타티온(GSH) 수준 둘 모두에서 시간-의존적 감소를 야기시키는 것을 제시한다. 뉴런 세포에서의 시스테인의 세포내 수준 및 세포의 산화환원 상태(GSH 대 이의 산화된 형태 글루타티온 디설파이드(GSSG)의 비에 의해 반영됨)가 또한 감소되었으며(도 6), 이는 산화 스트레스 조건의 가능성을 나타낸다. 추가로, 메틸화 능력(SAM/SAH 비에 의해 나타남)이 또한 다양한 시점에서 BCM-7 처리에 의해 영향을 받았다(도 7). 그러므로, BCM-7은 주요 세포내 항산화제 수준, 특히 GSH 수준에서의 감소를 유도한다. 감소된 GSH 수준은 SAM 수준을 조절함으로써 산화-스트레스 신호전달 경로를 통해 염색질 변형을 유도하는 것으로 공지되어 있다.

[0057] 실시예 7은 BCM-7에 의해 유도된 DNA 메틸화 수준을 조사한다. 도 8은 BCM-7에 의해 영향을 받는 염증 반응을 매개하는 것을 담당하는 유전자 중 하나인 MPO에서의 DNA 메틸화 변화를 제시한다. 산화환원 상태에서의 변화는 염증 유전자의 후생유전학적 상태에서 장기간 변화를 야기시키는 것으로 밝혀졌다. 이는 락토스 불내증에 대한 장기간 만성 변화 및 염증 반응에 잠재적으로 기여하는 분자 손상의 기억과 동등하다. 따라서, BCM-7은 베타-카세인 A1 급식 연구로부터 명백한 바와 같이 MPO 활성을 변경시킬뿐만 아니라, MPO 유전자의 후생유전학적 상태를 변경시키며, 따라서 락토스 합성 및 대사에 대한 진행성이고 장기간의 영향을 미친다. 변경된 락토스 수준의 하류 효과는 위 기능이상 및 소화 문제를 포함할 수 있다. 도 9에 나타낸 바와 같이, BCM-7은 락토스 대사 및 분해와 관련된 락타제와 같은 효소의 후생유전학적 상태를 변경시킨다. 이는 누적된 락토스 수준을 초래할 수 있고, 사람에게 따라 용인될 수 있거나 용인될 수 없는 락토스의 조절된 농도를 초래할 수 있다. 용인될 수 없는 경우, 소화 기능에서의 변화 및 장 염증이 예상될 수 있다.

[0058] BCM-7은 또한 표 4에 제시된 바와 같이 소화 기능과 관련된 효소에 영향을 미친다. B4GALT2, LGALS12 및 B4GALT1은 갈락토스 대사와 관련된 효소를 코딩하는 유전자이다. 갈락토스는 락토스의 합성에서 중요한 중간체이다. 유사하게, GKN1, GALK2, GALR2, GALT, 및 GALR1은 갈락토스의 수준을 조절하는 것과 관련되고, 이에 따라 락토스의 수준을 간접적으로 조절하는 효소를 코딩한다. 이들 효소의 활성에서의 변화는 락토스의 수준에서 변화를 간접적으로 초래할 수 있다. BCM-7은 이들 유전자의 후생유전학적 상태를 조절함으로써 이들 효소의 효소 활성을 변경시킨다. 이는 산화환원 상태의 기계적 조절에 의해 매개된다. 이들 변화는 궁극적으로 급성 단계에서 락토스 수준을 왜곡시킬 뿐만 아니라, 심지어 다음 세대까지 이어질 수 있는 후생유전학적 변화로 인해 장기간 효과를 가질 수 있다.

[0059] BCM-7은 락토스 합성 및 대사에서 변화를 매개할 뿐만 아니라, 소화 과정 및 장 기능과 관련된 효소의 활성 및 수준을 조절할 수도 있다. 콜레시스토키닌, 모틸린, 세크레타제, 및 옥시토신과 같은 효소에 대한 유전자기 BCM-7에 의해 영향을 받는 변경된 후생유전학적 상태를 갖는 것으로 밝혀졌다. 이는 개인의 위장 기능 및 소화 능력에 직접 영향을 미칠 수 있다. 따라서, BCM-7은 변경된 장 운동성, 소화 이상, 고창 및 설사의 증상에 기여하며, 상기 증상 모두는 락토스 불내증의 증상이다.

[0060] 락타제 효소 수준에 대한 후생유전학적 변화의 하류 효과는 qPCR에서 mRNA 수준에 대한 연구에서 추가로 입증되었다(실시예 8). NOD 마우스는 이유(weaning) 후 베타-카세인 A1 또는 베타-카세인 A2 풍부 식이가 공급되었다. 안락사 후, 장 샘플이 절제되고 수거되었다. RNA는 이들 샘플로부터 분리되었고, PCR은 소장에서의 락타제 효소 수준에 특이적인 프라이머를 이용하여 수행되었다. 도 10에 나타낸 바와 같이, 락타제 효소의 mRNA 수준은 동일 기간에 걸쳐 베타-카세인 A1 식이를 먹인 마우스의 소장에서의 락타제 mRNA의 수준에 비해 10 및 20주 동안 베타-카세인 A2 식이를 먹인 마우스의 소장에서 더 높았다. 높은 수준의 락타제 효소를 갖는 경우, 베타-카세인 A2를 먹인 마우스는 소화계로부터 락토스를 청소시킬 것이며, 오직 특정 수준의 락토스가 이용 가능하게 될 것이다. 따라서, 락토스 불내증과 관련된 증상이 회피된다. 대조적으로, 소장에서 낮은 수준의 락타제 mRNA를 갖는 경우, 베타-카세인 A1 식이를 먹인 마우스는 높은 수준의 락토스가 생성되는 것을 가능케 할 수 있고, 따라서 락토스 불내증의 증상을 야기시킬 수 있다.

[0061] 이들 연구는 베타-카세인 A1 소비와 락토스 불내증의 증상 사이의 연관성의 첫번째의 명백한 과학적 증거를 제시하며, 추가로 베타-카세인 A2 소비(베타-카세인 A1 소비에 비함)가 락토스에 대한 이후의 노출시의 락토스 불내증의 증상의 예방 또는 감소에 이로운 소인을 유도하는 것을 제시한다. 이전에, BCM-7(베타-카세인 A1 자체가 아님)과 관련한 결론에 이르지 못하고 상충적인 증례서술적 보고 및 연구가 당업자 사이에서 혼란을 야기시켰고, 많은 사람이 상기 연관성이 존재하지 않는다고 믿었다. 본 출원인의 발견을 통해, 자신이 락토스 불내성인 것으로 생각하는 많은 사람들이 겪었던 문제에 대해 대안적인 잠재적 해법, 즉, 식이에서의 베타-카세인 A1의 회피가 제공된다. 이는 주로 베타-카세인 A2인 베타-카세인 함유물을 갖는 밀크를 수득하고, 상기 밀크로부터



터 유래된 제품을 생성시키고, 상기 밀크 및 제품을 락토스 불내증의 증상을 감소시키거나 예방하는 목적에 이용가능하게 만듦으로써 달성될 수 있다.

[0062] 우유는 베타-카세인 A1 및 베타-카세인 A2의 상대 비율에 대해 시험될 수 있다. 대안적으로, 소는 베타-카세인 A1 또는 베타-카세인 A2 또는 둘 모두의 조합을 함유하는 우유를 생산하는 이의 능력에 대해 유전학적으로 시험될 수 있다. 이들 기술은 널리 공지되어 있다.

[0063] 본 발명은 락토스 불내증의 증상 회피에 대해 현존하는 방법에 비해 명백한 장점을 갖는다. 대부분의 현존하는 방법은 식이 변화에 의존하며, 이중 많은 방법은 종종 제한적이거나 실제 성공을 거두지 못하였다. 본 발명은 비교적 다루기 쉬운 해법, 즉, 베타-카세인 A1을 함유하는 밀크 또는 유제품의 회피 및 식이 내의 밀크 및 유제품이 주로 베타-카세인 A2, 바람직하게는 100% 베타-카세인 A2인 베타-카세인을 함유하는 것의 보장을 제공한다. 본 발명은 대규모의 식이 변화, 예를 들어, 낙농 제품 또는 다른 일반적인 식품의 회피에 대한 어떠한 필요성도 피한다.

[0064] 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.

[0065] 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.

[0066] 본 발명은 하기 실시예를 참조하여 추가로 기재된다. 청구된 발명은 어떤 방식으로든 이러한 실시예에 의해 제한되지 않음이 인지될 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0067] **실시예**

[0068] **실시예 1: 급식 방법**

[0069] 72마리의 이유된(4주령) 수컷 Wistar 래트를 이용하였다. 대조군 식이에 대한 7일의 순응 기간 후에, 다음 3개의 식이 중 하나를 12 또는 60시간 동안 래트에 공급하였다: 100% A1 식이, 100% A2 식이, 대조군 식이 (처리당 n=6). 식이의 단백질 구성요소는 탈지유(A1 및 A2 식이의 경우) 및 달걀 흰자(비-유단백질 대조군 식이의 경우)로부터 유래되었고, 에너지 및 다량영양소 구성에 대해 균형을 맞추었다(표 1 참조). 상기 기간이 끝나기 15분 전에, 래트는 복강내 주입을 통해 날룩손 또는 염수(대조군)를 수용하였고, 그 후, 소화 가능하지 않은 추적자, 티타늄 디옥사이드를 경구로 강제 급식시켰다. 대변 및 소변 샘플을 다음 24시간 동안 7개 시점에 수집하고, 이들을 분석될 때까지 -20℃(대변) 또는 -80℃(소변)에서 저장하였다.

[0070] **표 1: 식이의 조성**

생성물	A1 밀크 식이		A2 밀크 식이		대조군 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
비오틴, 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

[0071]

[0072] **실시예 2: 위장 통과 시간**

[0073] 위장 통과 시간(GITT)을 실시예 1에 따라 급식된 래트에서 측정하였다. 100% A1 식이, 100% A2 식이, 또는 대조군 식이를 먹인 지 12시간 후의 동물에 경구 투여되는 티타늄 디옥사이드(TiO<sub>2</sub>)를 추적자로 이용하였다. 결과는 표 2 및 도 1에 제시되어 있다. 회수 데이터는 시간(시)에 비한 TiO<sub>2</sub> 회수 %로 표현된다. A1 식이를 먹인 래트는 A2 식이를 먹인 래트에 비해 지연된 통과를 나타내었고, 둘 모두의 그룹은 대조군 식이를 먹인 래트에 비해 지연을 나타내었다.

[0074] **표 2: GI 통과 시간**

시간	대조군	SD	A1	SD	A2	SD
1	0.001	0.002	0.171	0.406	0.001	0.002
2	0.006	0.011	0.514	1.218	0.011	0.024
3	0.028	0.047	0.522	1.221	0.033	0.043
4	0.029	0.046	1.189	2.854	0.056	0.036
5	0.064	0.071	5.624	13.713	2.048	4.162
6	0.758	1.196	10.343	17.419	22.188	19.698
7	37.605	28.549	53.530	15.513	61.024	11.983
8	41.716	28.082	55.296	18.084	62.482	13.170

[0075]

[0076] **실시예 3: 락타제 활성**

[0077] 동결된 분말화된 십이지장 조직 샘플을 얼음-냉각된 탈이온수(1:5 wt/vol)에서 균질화시킨 후, 4에서 30분 동안 2,200g에서 원심분리시켰다. 상층액을 수거하고, 탈이온수로 추가로 희석(1:25)시켰다. 샘플을 락토스와 함께 인큐베이션하고, 유리된 글루코스를 글루코스-산화효소 키트(Sigma)를 이용하여 결정하고, 마이크로플레이트 판독기로 측정하였다. 표 3 및 도 2는 래트의 급성(12시간) 및 만성(60시간) 급식 그룹 둘 모두에 대한 십이지장 락타제에 대한 결과를 제시한다. 십이지장 락타제 활성은 만성 급식 A2 그룹 및 급성 및 만성 급식 A1 그룹 둘 모두에 비해 급성 급식 A2 그룹에서 상승되었다.

[0078] **표 3: 급성 및 만성 급식 그룹에 대한 락타제 활성**

십이지장 락타제 (f 카탈/ug 단백질) 표준 편차		
A1 12	8.94	3.87
A1 60	7.35	2.19
A1 12 N	8.99	3.86
A1 60 N	8.42	2.59
A2 12	35.97	32.23
A2 60	8.45	1.92
A2 12 N	6.55	2.76
A2 60 N	데이터 없음	데이터 없음

[0079]

[0080] **실시예 4: MPO 활성**

[0081] 실시예 1에 따라 급식된 래트로부터의 결장 조직을 확립된 방법을 기초로 하여 골수세포형과산화효소(MPO) 활성에 대해 정량하였다(Grisham, M.B., et al., *Methods Enzymol.*, 1990, 186:729-742). 결장 조직(50 mg)을 균질화시키고, 원심분리를 통해 분배시키고, 초음파 프로브에 의해 파열시키고, 동결-해동 사이클에 적용시켰다. 내인성 MPO는 562 nm에서 비색 측정된 3,3',5,5'-테트라메틸-벤지딘 기질의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-의존성 산화를 측정한다. 활성을 동일 균질화물에 대한 비신코닌산(bicinchoninic acid)(BCA)(Smith, P.K., et al., *Anal. Biochem.*, 1985, 150(1):76-85) 단백질 결정에 의해 표준화시켰다. 결과는 도 3에 제시된다. A1 급식된 동물에 비해, A2 동물은 급성 급식 후에 유의하게 낮은 수준의 MPO 활성을 나타내었다. 이는 지속적이었고, 만성 급식으로 추가로 증가되었으며, 날록손의 경구 투여에 의해 완전히 가역적이었다.

[0082]

**실시예 5: 시스테인의 흡수에 대한 BCM-7의 효과**

[0083]

방사선표지된 [<sup>35</sup>S]-시스테인 흡수 검정을 Caco-2-GI 상피 세포 및 뉴런 세포에서, 베타-카세인 A1으로부터 방출된 BCM-7의 존재하에 수행하고, 비처리된 대조군 뿐만 아니라 모르핀(원형 아편유사제 수용체 효능제)에 대해 비교하였다. 세포의 전처리는 앞서 기재된 대로 30분, 4, 24 및 48시간 동안 상이한 시점에 수행되었다(Trivedi M., *et al.*; *Mol. Pharm.*, 2014). SH-SY5Y 인간 뉴런 세포 및 Caco-2 장 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, [<sup>35</sup>S]-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. [<sup>35</sup>S]-시스테인/HBSS 혼합물을 흡입시키고, 얼음 냉각된 HBSS를 이용한 2회 세척에 의해 처리를 종료하였다. 그 후, 세포를 600 μL의 dH<sub>2</sub>O로 용해시키고, 끓여 내어, 1.5 mL의 미세원심분리 튜브에 수집하고, 10초 동안 음과처리하였다. 100 μL의 각 샘플을 단백질 검정을 위해 분취시켰다. 200 μL의 각 샘플(3중으로)을 4 mL의 심광 유체를 지닌 심광 바이알로 분취시키고, 불택싱하고, 방사성(단백질 함량에 대해 표준화됨)에 대해 계수하였다. 추가로, 모르핀 및 BCM-7의 시스테인 흡수 효과 또한 선택적인 μ-길항제인 D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr(CTAP), 및 델타 길항제 날트린돌(NTI)의 존재하에서 특성 규명되었다. 결과를 도 4, 5 및 6에 도시한다. 이러한 도면에서 사용된 기호 \*는 비처리된 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이를 나타내고(p<0.05), 기호 #은 비처리된 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다(p<0.005).

[0084]

**실시예 6: GSH 및 SAM 수준에 대한 BCM-7의 효과**

[0085]

본 실시예에서는 실시예 5에서 관찰된 대로 시스테인 흡수에서의 감소가 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 전기화학적 구배 검출 방법을 이용하여 측정되었다(Hodgson *et al.*, *J. Alzh. Dis.* 2013, Trivedi M., *et al.*, *Mol. Pharm.* 2014). SH-SY5Y 뉴런 세포를 α-MEM에서 컨플루언스까지 성장시켰다. 배지를 흡입시키고, 세포를 1 mL의 얼음 냉각된 HBSS로 2회 세척하였다. HBSS를 흡입시키고, 0.6 mL의 얼음 냉각된 dH<sub>2</sub>O를 세포에 첨가하였다. 세포를 플라스크/디시에서 끓여 내어 dH<sub>2</sub>O에 현탁시켰다. 세포 현탁액을 15초 동안 얼음에서 음과처리하고, 100 μL의 현탁액을 이용하여 단백질 함량을 측정하였다. 남아 있는 용해물을 미세원심분리 튜브에 첨가하고, 같은 부피의 0.4 N 과염소산을 첨가한 다음, 얼음 위에서 5분 동안 인큐베이션시켰다. 샘플을 5,000 × g에서 원심분리하고, 상층액을 새로운 미세원심분리 튜브로 옮겼다. 100 μL의 각각의 샘플을 원뿔형 미세-오토샘플러 바이알에 첨가하고, 오토샘플러 냉각 트레이에서 4°C로 유지시켰다. 10 μL의 이러한 샘플 각각을 HPLC 시스템에 주입하였다.

[0086]

산화환원 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 A: 인산에 의해 pH 2.65로 조정된 0% 아세토니트릴, 25 mM 소듐 포스페이트, 1.4 mM 1-옥탄설폰산. 이동상 B: 50% 아세토니트릴. 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. 사용된 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 희석되거나, 티올 수준이 표준 곡선의 범위 내에 있음을 확실하게 하기 위해 최대 50 μl의 샘플을 주입시켰다. 결과를 도 7에 도시한다.

[0087]

**실시예 7: DNA 메틸화 수준에 대한 BCM-7의 효과**

[0088]

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 획득되었다.

[0089]

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 동

안 버스트 당 200회 사이클. 평균 길이가 200 bp인 단편이 수득되었다. 파워 모드는 주파수 스위핑, 온도 6-8 °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 희석하였다. 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. 이후, Illumina Genome Analyzer II를 이용하여 단편을 서열 분석하였다. 단편화되고 포획된 DNA의 농도를 480/520nm에서 Fluostar Optima 플레이트 판독기 상에서 Quant-iT PicoGreen dsDNA 검정 키트(Invitrogen P7589)에 의해 결정하였다.

[0090]

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 겔(Low Range Ultra Agarose Biorad 161-3107) 상에서 수행하였다. 1Kb Plus 래더(Invitrogen 10787-018)를 이용하였고, 겔을 120 V에서 2시간 동안 진행시켰다. 300 bps +/- 50bps의 단편을 잘라내어, Qiagen Gel Extraction Kit 컬럼(Qiagen 28704) 상에 용리시키고, 23 µl의 EB에서 용리시켰다.

[0091]

일루미나 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 희석하고, 회전 증발기에서 10 µl로 농축시켰다. 1 µl를 Agilent 2100 HS DNA 칩에 적용하고, 농도를 Agilent 2100 상에서 도말표본 분석에 의해 측정하였다. 샘플을 10 nM로 희석시켰다. NaOH로 변성시킨 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, 서열분석을 HiSeq user 가이드(Multiplexed PE Run을 수행함)에 따라 수행하였다.

[0092]

전체 유전체 DNA MBD-seq는 오류발견율(false discovery rate)(FDR) <0.1 및 ANOVA 후 사후 스튜던츠 t-검정(post-hoc student's t-test)(p<0.05)에 의해 규정된 바에 따라 차별적으로 메틸화된 전사물(DMT)을 나타내었다. 전사물은 유전자 및 차별적으로 메틸화/전사된 비-코딩 RNA 둘 모두를 포함하였다. 특정한 생물학적 또는 기능적으로 관련된 경로에서 BCM-7에 의해 유도된 후생유전학적 변화뿐만 아니라 전사 변화를 인제뉴리티 경로 분석(Ingenuity Pathway Analysis)(IPA) 도구를 이용하여 평가하고, 가장 높은 영향을 나타내는 경로를 확인하였다. 결과는 표 4에 제시된다. 락토스 대사 및 락토스 합성을 담당하는 유전자의 후생유전학적 상태에서의 변화가 또한 도 8 및 9에 제시된 바와 같이 BCM7 하에서 변경되는 것으로 보고되어 있다.

[0093]

**표 4: BCM-7의 영향하에서 차별적으로 메틸화된 전사물의 목록**

	기능적 온톨로지(ontology) / 유전자 온톨로지				
	소화	락토스 대사	락토스 생합성 경로	위산 분비	갈락토스 대사
1	AKR1C1	LCT	B4GALT2	PGC	GKN1
2	AKR1C2		LGALS12	SCTR	GALK2
3	CCKBR		B4GALT1	OXTR	GALR2
4	HTR3A			VIPR1	GALT
5	MLNR			SST	GALR1
6	SLC15A1			PPARGC1A	CHST1
7	CTRB2				NPY
8	CTRB1				PYY
9	MEP1B				
10	SULT2A1				
11	CELA3A				
12	AMY1C				
13	CTSE				
14	CCKAR				
15	CAPN9				

[0094]

[0095]

**실시예 8: 소장에서의 락타제 수준에 대한 BCM-7의 효과**

[0096] NOD 마우스(수컷 및 암컷)를 이유로부터 베타-카세인 A1 또는 A2 밀크 단백질이 풍부한 식이를 개시시켰다. 이들 식이는 적절한 조성 및 영양을 보장하도록 Specialty Feeds Pty. Ltd.(Australia)사에 의해 제조되었다. 각각의 성별 및 식이로부터의 마우스의 코호트(n=10)를 10주 또는 20주에서 안락사시켰다. 해부시, 조직 샘플을 수거하고, RNAlater™ 중에 -80℃에서 저장하였다. 40마리의 NOD 마우스로 본 연구를 수행하였다: 그룹 당 10마리(수컷/암컷: A1/A2).

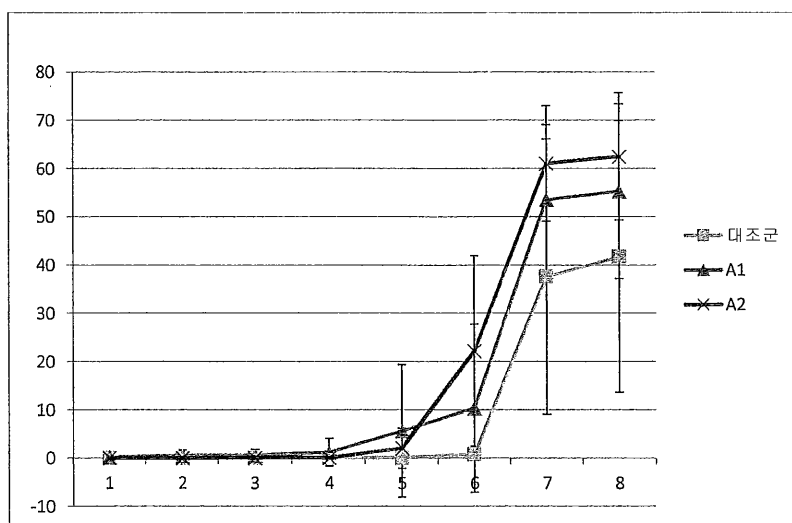
[0097] RNA 전사의 분석을 위한 세포 배양물로부터의 RNA를 Ambion(Austin, TX)사의 RNAqueous®-4PCR 키트를 이용하여 분리시켰다. 상기 절차는 제조업체의 프로토콜에 의해 기재된 것과 동일하였다. 분리된 RNA에 DNase를 처리하여 RNA를 정제한 후, ND-1000 NanoDrop 분광광도계를 이용하여 RNA 정량하였다. Roche(Indianapolis, IN)사로부터의 퍼스트-스트랜드 cDNA 합성(first-strand cDNA synthesis)을 이용하여 이전에 기재된 바와 같이 cDNA를 합성하였다. RNA(1 mg), dNTP 믹스(1 mM), 무작위 핵사머 프라이머(60 mM)와 함께 충분한 분자생물학 등급의 H<sub>2</sub>O를 첨가하여, 13 ml의 최종 샘플 부피를 달성하였다. 각각의 샘플을 5분 동안 65℃에서 변성시킨 후, 얼음 상에 두었다. 트랜스크립터(Transcriptor) RT(20 단위/ml)(Roche), 프로텍터(Protector) RNase 억제제(40 U/ml)(Roche), 5 트랜스크립터 역전사효소 반응 완충액(Roche), 및 분자생물학 등급의 H<sub>2</sub>O를 첨가하고, 최종 부피를 20 ml로 조정하였다. 이후, 10분 동안 25℃ 및 30분 동안 55℃에서 PTC 써모사이클러(Thermocycler)(MJ Research, St. Bruno, QC, Canada)에서 인큐베이션하였다. 마지막으로, 역전사효소 효소를 5분 동안 85℃에서의 인큐베이션에 의해 억제하였다.

[0098] qRT-PCR 검정을 Roche(Trivedi *et al.*, Mol. Pharmacol., 2014)사로부터의 LightCycler 480 qRT-PCR 기계를 이용하여 삼중 샘플에서 수행하였다. qRT-PCR을 5 ml의 cDNA 주형, 10 mM 센스 및 안티센스 프라이머, Roche사로부터의 10 ml SYBR Green I Master, 뿐만 아니라 20 ml의 최종 부피의 dH<sub>2</sub>O를 이용하여 수행하였다. 상기 목적에 사용된 프라이머는 정방향 5'-GGAGTGTCACCCACAGACAG-3' 및 역방향 5'-GAACACAAGCTACACGGGA-3'이었다. 샘플을 하기 프로토콜로 처리하였다: 95℃에서 5분 동안의 인큐베이션, 및 이후 10초 동안 95℃, 20초 동안 60℃, 및 30초 동안 72℃의 45 사이클 후, 5초 동안 95℃, 65℃에서 1분, 및 용해 곡선에 대해 97℃의 1회 사이클, 후 90초 동안 40℃에서의 냉각. 플레이트 상에서 주형이 없는 대조군(NTC)를 수행하였고, 해리 곡선을 생성시켜 비특이적 생성물을 결정하였고, 이를 임의의 비-특이적 증폭을 피하기 위해 표준화시켰다. 데이터를 Roche 정량 방법 D(DCt)를 이용하여 분석하고, 베타-액틴 수준에 대해 표준화시켰다. 결과는 도 10에 제시된다.

[0099] 비록 본 발명이 실시예에 의해 기재되었으나, 청구항에 정의된 본 발명의 범위를 벗어나지 않으며 변경 및 변형이 이루어질 수 있음이 인지되어야 한다. 더욱이, 공지된 등가물이 특정 기능에 존재하는 경우, 그러한 등가물은 본 명세서에서 구체적으로 언급된 바와 같이 포함된다.

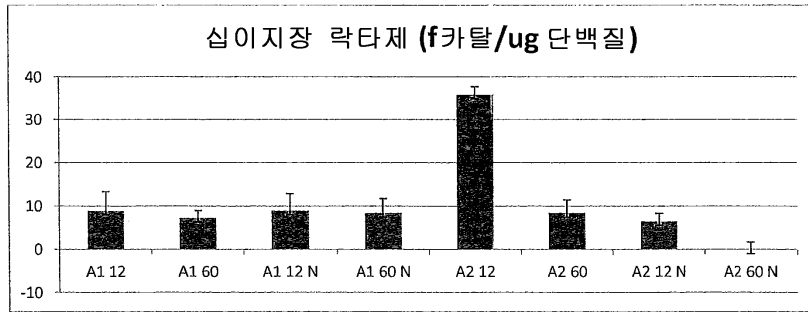
**도면**

**도면1**

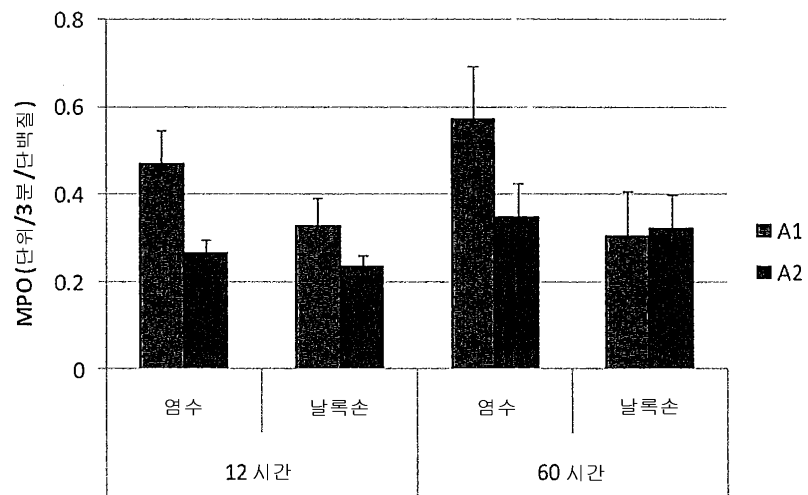




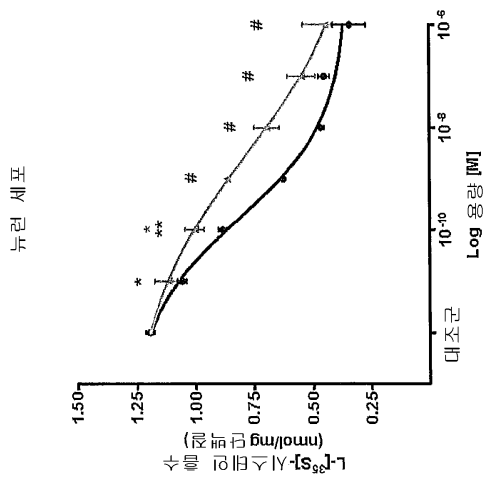
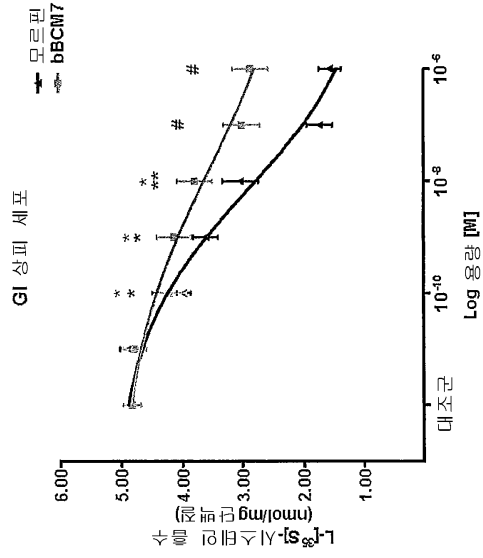
도면2



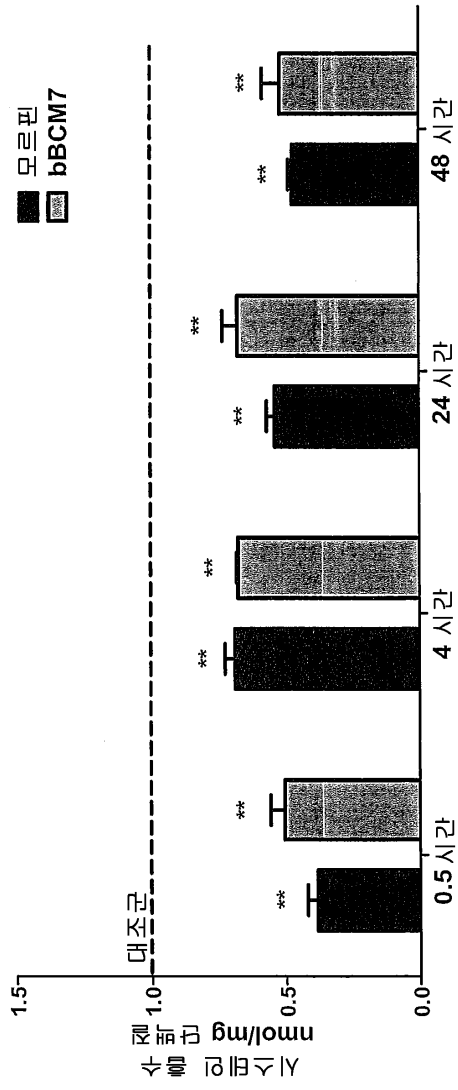
도면3



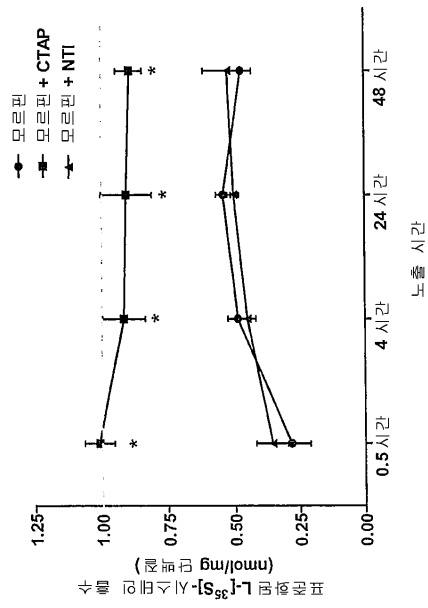
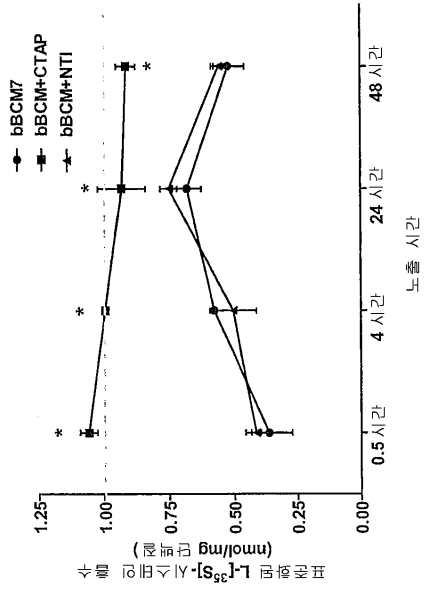
도면4



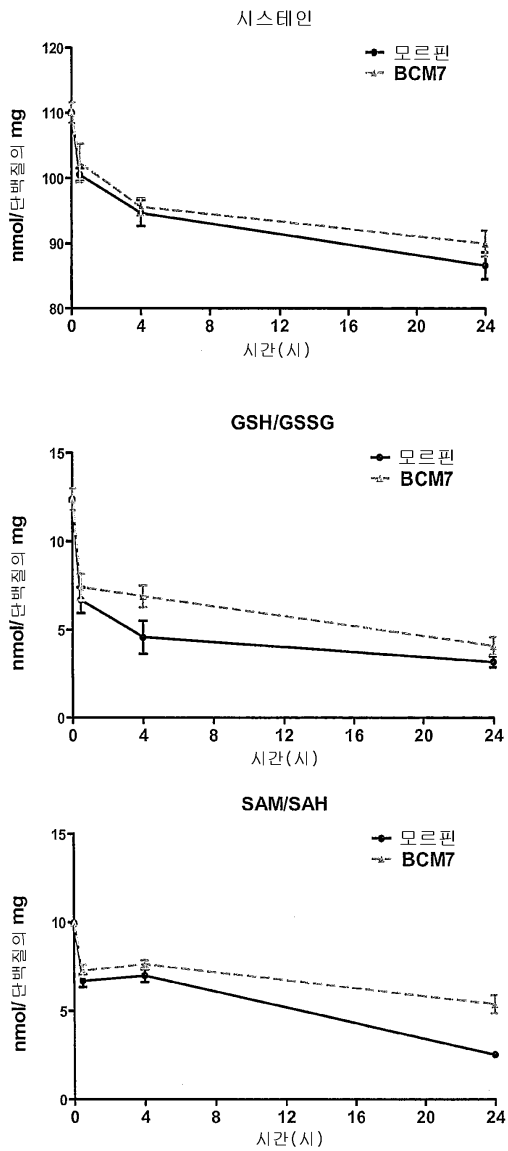
도면5



도면6

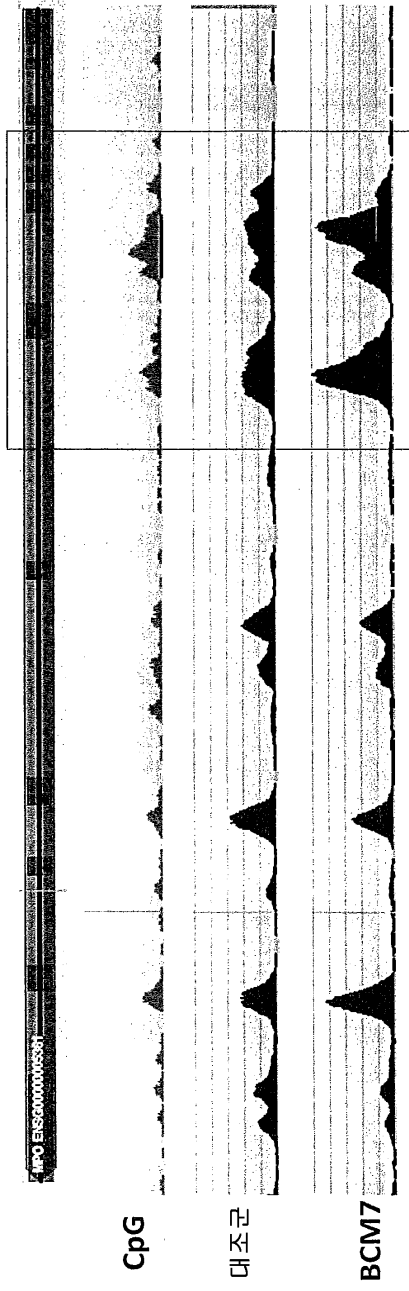


도면7

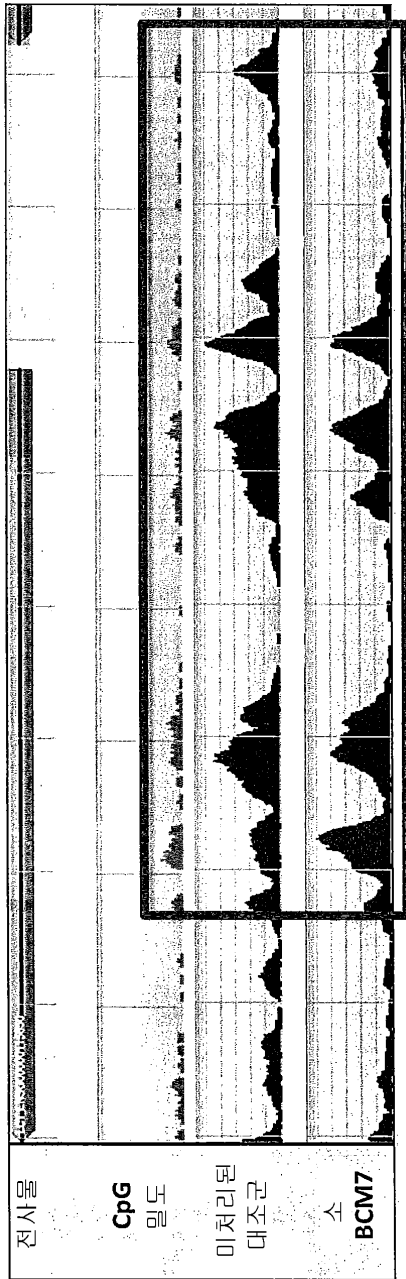




도면8



도면9



도면10

