



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0125963
(43) 공개일자 2013년11월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/46 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0049636
(22) 출원일자 2012년05월10일
심사청구일자 2012년05월10일
기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
(72) 발명자
에스. 더블유. 에이 히마야
부산시 남구 대연3동 599-1번지 부경대학교 대연
캠퍼스 해양바이오프로세스연구단
김세권
부산광역시 동래구 사직로 80, 125동 1402호(사직
동, 쌍용예가아파트)
(74) 대리인
위병갑

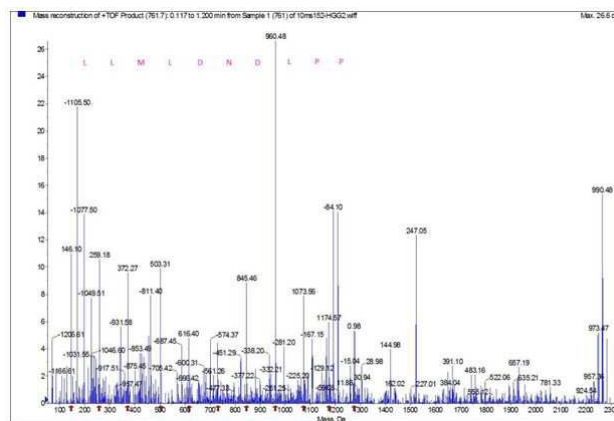
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 신규한 바이오기능성 펩티드 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 항고혈압 및 항산화 바이오기능성 펩티드에 관한 것이다. 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드는 ACE 저해 활성이 뛰어난 뿐만 아니라, 산화적 스트레스로부터 세포 보호 효과, 세포 내 활성산소종 소거 활성 및 항산화 효소(또는 물질) 발현을 상향 조절할 수 있는 효과가 우수하다. 따라서 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드는 항고혈압 및 항산화 바이오기능성 펩티드 물질로서 약리학적 조성물과 같은 의약품은 물론이고, 건강기능식품 등으로 활용할 수 있어 식품산업 및 의약산업에 응용될 경우 그 가치가 매우 높을 것으로 기대된다. 특히 본 발명의 바이오기능성 펩티드는 항고혈압 효과와 더불어 항산화 활성을 가지므로 고혈압, 산화적 스트레스로 인한 질환 및 이들과 연계된 심혈관 치료에도 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 M2010-01

부처명 국토해양부 (마린바이오프로세스연구단)

연구사업명 해양생명공학사업

연구과제명 해양생물 유래 생리활성물질의 임상평가를 통한 제품화 및 산업화

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교

연구기간 2010.01.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 항고혈압 및 항산화 바이오풀능성 펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 바이오풀능성 펩티드는 대구(*gadus macrocephalus*) 껍질의 젤라틴으로부터 유래된 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 바이오풀능성 펩티드는 안지오텐신 변환 효소(angiotensin converting enzyme: ACE) 억제 활성을 통해 고혈압을 예방 및 치료하는 효과를 가지는 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 바이오풀능성 펩티드는 세포 내 활성산소종 소거 활성, 항산화 관련 효소 발현의 상향 조절 및 항산화 관련 물질 발현의 상향 조절을 통하여 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 효과를 가지는 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 항산화 효소는 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase: SOD) 또는 카탈라제(catalase)인 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 항산화 물질은 글루타치온(glutathione)인 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 7

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 바이오풀능성 펩티드를 유효성분으로 포함하는 고혈압 또는 산화적 스트레스 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 산화 스트레스 관련 질환은 암, 자가면역 질환, 간질환, 신경퇴행성 질환, 관상동맥 질환(coronary artery disease, CAD) 또는 심혈관 질환(cardiovascular disease, CVD)인 것을 특징으로 하는 고혈압 또는 산화적 스트레스 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 관상동맥질환은 심근경색, 협심증, 다른 만성 관상동맥질환, 아테롬성동맥경화증, 급성 관상동맥 증후군(예컨대, 불안정협심증, NSTEMI(non-ST-elevation myocardial infarction) 또는 STEMI(ST-elevation myocardial infarction), PAOD(peripheral arterial occlusive disease) 또는 뇌혈관 발작인 것을 특징으로 하

는 고혈압 또는 산화적 스트레스 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 바이오기능성 펩티드는 조성물 내에 10 내지 100 μ M의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 고혈압 또는 산화적 스트레스 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 11

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 바이오기능성 펩티드를 유효성분으로 포함하는 고혈압 또는 산화적 스트레스 관련 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신규한 바이오기능성 펩티드 및 이의 용도에 관한 것으로, 항고혈압 및 항산화 효과를 가지는 펩티드; 이를 유효성분으로 포함하는 고혈압 또는 산화적 스트레스 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물; 및 이를 유효성분으로 포함하는 고혈압 또는 산화적 스트레스 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 고혈압은 전 세계적으로 성인의 15~20%가 겪고 있는 질환으로 동맥경화, 뇌졸중, 심근경색 및 당뇨병 등 심각한 만성 질환을 야기시켜 사회적으로나 경제적으로 막대한 손실을 일으키고 있다. 이는 정상적인 혈압을 유지하는 기구들이 천천히 붕괴되는 질환으로 순환기계 질환의 원인이 되는 동시에 앞서 언급한 질환과 함께 합병증으로 나타날 경우 치사율이 매우 높은 만성 퇴행성 질환으로 발전하게 된다.

[0003] 고혈압의 원인은 대부분 밝혀져 있지 않지만 혈압을 상승시킬 수 있는 여러 가지 요인들 가운데 레닌-안지오텐신-알도스테론(Renin-Angiotensin-Aldosterone) 고리는 생체 내에서 혈압과 체액량을 조절하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 생체 중에 존재하고 있는 불활성화 데카펩티드(decapeptide)인 안지오텐신 I(angiotensin I)은 안지오텐신 I 전환 효소(angiotensin I converting enzyme, ACE)에 의하여 C-말단의 His-Leu이 떨어져 나감으로써 혈관벽 수축 작용이 있는 옥타펩티드(octapeptide)인 안지오텐신 II(angiotensin II)로 전환되며, 이렇게 생성된 안지오텐신 II는 직접적으로 혈관을 수축하고, 신장에서 알도스테론의 분비를 증가시켜 체액량을 증가시키므로써 혈압을 상승시키는 작용을 한다. 이러한 ACE의 활성을 억제시킴으로써 혈압상승의 원인이 되는 안지오텐신 II의 생성을 저하시켜 혈압의 상승을 억제할 수 있게 된다. 따라서 레닌-안지오텐신-알도스테론 고리의 작용을 효과적으로 조절하는 약물의 발견은 고혈압 치료제 연구에 있어서 중요한 것이라 할 수 있다.

[0004] 대표적인 ACE 억제제로서 화학합성제인 에넬라프릴(enalapril)이나 캡토프릴(captopril) 등이 개발되어 고혈압 개선제로서 이용되고 있지만, 마른기침, 두통, 안면홍조, 식욕부진, 미각이상, 발진, 백혈구 감소 등의 부작용이 많아 최근에는 부작용이 없는 천연물에서의 ACE 억제제의 개발이 중요시되고 있다.

[0005] 또한 이러한 고혈압과 관련하여 몇몇 연구에서는 고혈압과 산화적 스트레스의 상호관련성을 보여준다. 즉, 안지오텐신 II가 인간 동맥에서 초과산화물 생산을 촉진시킬 수 있다는 연구와 혈관벽에서 발생하는 활성산소종이 고혈압에 영향을 미칠 수 있음이 보고된 바 있다(Berry, Brosnan, Fennell, Hamilton, & Dominiczak, 2001; Bhuyan & Mugesh, 2011).

[0006] 따라서 고혈압과 산화적 스트레스 사이에 상호관련성으로 인해, ACE 억제 활성과 더불어 항산화적 특성을 갖는

치료학적 물질이 항산화 특성을 갖지 않은 다른 고혈압 치료제에 비해 이점을 가질 수 있으며, 이러한 특성을 갖는 물질을 개발하는 경우 고혈압, 산화적 스트레스로 인한 질환 및 이들과 연계된 심혈관 치료에도 모두 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

[0007] 항산화(antioxidation)란 체내에서 일어나는 여러 산화작용을 방지하는 것을 말하며, 생체막이나 지단백질로서 존재하는 지질은 체내에서 발생하는 자유 라디칼(free radical)의 공격을 받아 여러 종류의 과산화물을 형성하는데, 과산화물들과 분해산물 등은 반응성이 높아 주변의 생체분자들의 구조와 기능을 변환시켜 증가하면 노화 현상 및 여러 가지 만성질환을 초래한다. 생체 내에는 이러한 자유 라디칼(free radical)을 중화시키고 몸을 보호할 수 있는 여러 항산화 방어기구가 있다.

[0008] 인간의 질병 및 노화는 체내 대사과정 중 발생하는 O_2^- (superoxide), NO(nitric oxide), NO_2 (nitrogen dioxide), OH(hydroxyl), ROO(proxy), RO(alkoxy), H_2O_2 (hydroperoxyl) 라디칼(radical) 등의 산화반응에 기인하며 생체 내에서는 이런 유해한 라디칼인 유리기로부터 생체를 방어하기 위한 수단으로써 이중 간과 적혈구에 있는 항산화 효소인 슈퍼옥시드 디스무타제(SOD, superoxide dismutase)는 슈퍼옥시드 라디칼(superoxide radical)을 환원시켜 H_2O_2 로 전환시키며 이때 생성된 H_2O_2 등은 카탈라제(CAT; catalase), 글루타치온 퍼옥시다제(GSH-px; glutathione-peroxidase) 등의 항산화 효소나 비타민 E, 글루타치온 등의 항산화 물질이 존재하여 유리기를 제거함으로써 생체를 산화적 손상으로부터 보호한다. 그러나 이러한 항산화 방어계가 유리기 생성을 조절할 수 없을 정도로 저하될 때 조직의 산화적 스트레스와 손상이 촉진되며 체내에서 생성된 과잉의 유리기와 지질 과산화물은 단백질의 산화, DNA 손상과 같은 산화적 스트레스에 의한 상해를 증가시킨다.

[0009] 이러한 산화적 스트레스의 감소를 위해 많은 합성 또는 천연 항산화 물질이 개발되어 왔으나 합성 항산화제의 경우 안전성에 취약하다는 문제점이 발생하여, 비타민 A, C, E와 더불어 최근에는 각종 생약과 식용식물 추출물 등에 존재하는 항산화제 물질인 카로티노이드류, 플라보노이드류, 폴리페놀물질들을 이용하여, 보다 안전하며 항산화 효과가 뛰어난 천연 항산화제를 개발하기 위한 노력을 하고 있다.

[0010] 한편, 생리활성을 가지는 기능성 천연물질로 최근에는 펩티드성 물질에 대한 연구가 급증하고 있으며, 이러한 펩티드성 물질 분리를 위해 많은 천연물을 대상으로 하는 연구들이 진행되고 있다. 일례로, 펩티드성 ACE 제해 물질은 뱀독으로부터 처음 분리되어 보고되었고, 다랑어, 고등어, 새우 등의 어패류의 효소 가수분해물, 동물의 혈장 등에서 분리한 펩티드 등도 보고되었다. 많은 천연물(동식물 포함) 중 특히 어류의 경우, 대부분 어류 가공 시 어류 가공부산물이 어체 중의 약 75% 정도로 발생하게 되고, 그 중 어류 뼈나 껍질이 약 30% 정도를 차지하고 있어, 어류 가공 시 발생되는 가공부산물을 이용하여 젤라틴이나 콜라겐과 같은 새로운 유용한 성분들을 분리하는 기술 개발이 많이 진행되고 있다. 참고로 이전 연구에서 Kim et al.(1993)은 틸라피아로부터 유용한 젤라틴을 추출하여 산업화에 성공하였으며, 틸라피아의 비늘로부터 콜라겐을 추출하여 식품 및 의약품용으로 일부 생산 판매하고 있다. 또한, 단백질 가수분해효소를 이용한 식품 단백질로부터 펩티드의 제조는 어류 껍질 젤라틴 가수분해물 제조 등에 응용되어 생리활성을 가지는 유용 성분으로 전환시키는 것으로 알려져 있다.

[0011] 따라서 대부분 버려지고 있는 어류 가공부산물을 의약 및 식품산업에 유용한 소재로 사용할 경우, 다양한 산업적 유용 효과를 얻을 수 있다.

[0012] 이에 본 발명자들은 어류의 가공부산물을 이용한 기능성 약제학적 또는 식품학적 소재를 연구하던 중, 대구(*gadus macrocephalus*) 껍질 젤라틴으로부터 유래된 펩티드가 ACE 억제 활성을 가져 혈압을 강하시킬 수 있을 뿐만 아니라, 강력한 항산화 활성을 가짐을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 따라서 본 발명의 목적은 항고혈압 및 항산화 바이오키능성 펩티드를 제공하는 것이다.

[0014] 또한 본 발명의 다른 목적은 상기 바이오키능성 펩티드를 유효성분으로 포함하는 고혈압 또는 산화적 스트레스 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 바이오키능성 펩티드를 유효성분으로 포함하는 고혈압 또는 산화적 스트레스 관련 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 항고혈압 및 항산화 바이오키네틱 펩티드를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 바이오키네틱 펩티드는 대구(*gadus macrocephalus*) 껍질의 젤라틴으로부터 유래될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 바이오키네틱 펩티드는 안지오텐신 변환 효소(angiotensin converting enzyme: ACE) 억제 활성을 통해 고혈압을 예방 및 치료하는 효과를 가질 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 바이오키네틱 펩티드는 세포 내 활성산소종 소거 활성, 항산화 관련 효소 발현의 상향 조절 및 항산화 관련 물질 발현의 상향 조절을 통하여 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 효과를 가질 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항산화 효소는 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase: SOD) 또는 카탈라제(catalase)일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항산화 물질은 글루타치온(glutathione)일 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 바이오키네틱 펩티드를 유효성분으로 포함하는 고혈압 또는 산화적 스트레스 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 산화 스트레스 관련 질환은 암, 자가면역 질환, 간질환, 신경퇴행성 질환, 관상동맥 질환(coronary artery disease, CAD) 또는 심혈관 질환(cardiovascular disease, CVD)일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 관상동맥질환은 심근경색, 협심증, 다른 만성 관상동맥질환, 아테롬성동맥 경화증, 급성 관상동맥 증후군 또는 뇌혈관 발작일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 바이오키네틱 펩티드는 조성물 내에 10 내지 100 μ M의 농도로 포함될 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 바이오키네틱 펩티드를 유효성분으로 포함하는 고혈압 또는 산화적 스트레스 관련 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

발명의 효과

- [0028] 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드는 ACE 저해 활성이 뛰어날 뿐만 아니라, 산화적 스트레스로부터 세포 보호 효과, 세포 내 활성산소종 소거 활성 및 항산화 효소(또는 물질) 발현을 상향 조절할 수 있는 효과가 우수하다. 따라서 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드는 항고혈압 및 항산화 바이오키네틱 펩티드 물질로서 약리학적 조성물과 같은 의약품은 물론이고, 건강기능식품 등으로 활용할 수 있어 식품산업 및 의약산업에 응용될 경우 그 가치가 매우 높을 것으로 기대된다. 특히 본 발명의 바이오키네틱 펩티드는 항고혈압 효과와 더불어 항산화 활성을 가지므로 고혈압, 산화적 스트레스로 인한 질환 및 이들과 연계된 심혈관 치료에도 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 대구(*gadus macrocephalus*) 껍질 젤라틴의 위장 효소 가수분해산물의 FPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다.
- 도 2는 상기 FPLC를 통해 정제된 분획 중 가장 높은 항산화 활성을 보이는 분획을 다시 RT-HPLC를 수행하여 얻은 크로마토그램을 나타낸 것이다.
- 도 3은 RT-HPLC의 활성 분획(H-Fr2)을 추가 정제하기 위하여 다시 RT-HPLC를 수행하여 얻은 크로마토그램을 나타낸 것이다.
- 도 4는 Lineweaver-Burk plot을 이용한 본 발명의 바이오키네틱 펩티드의 ACE 억제(저해) 패턴을 그래프로 나타

낸 것이다.

도 5는 Q-TOF ESI mass spectroscopy를 이용하여 분석한 정제된 본 발명의 바이오기능성 펩티드의 아미노산 서열 및 분자량을 나타낸 것이다.

도 6은 MRC-5 및 RAW264.7 세포에 본 발명의 바이오기능성 펩티드의 농도별 처리에 따른 세포 생존율을 나타낸 것이다(blank: 무처리군).

도 7은 RAW264.7 세포에 본 발명의 바이오기능성 펩티드의 농도별 처리에 따른 DPPP oxide 형광강도를 나타낸 것이다(blank: 무처리군, control: 대조군(펩티드 대신 히드록실기 처리)).

도 8은 RAW264.7 세포에 본 발명의 바이오기능성 펩티드의 농도별 처리에 따른 카보닐 그룹의 증가 수준을 측정하여 나타낸 그래프이다(control: 대조군(펩티드 대신 히드록실기 처리)).

도 9는 RAW264.7 세포에 본 발명의 바이오기능성 펩티드의 농도별 처리에 따른 세포 내 DNA 손상 정도를 나타낸 전기영동 사진이다(blank: 무처리군, control: 대조군(펩티드 대신 히드록실기 처리)).

도 10은 RAW264.7 세포에 본 발명의 바이오기능성 펩티드의 농도별 처리에 따른 DCF-형광강도를 나타낸 것이다(blank: 무처리군, control: 대조군(펩티드 대신 히드록실기 처리)).

도 11은 RAW264.7 세포에 본 발명의 바이오기능성 펩티드의 농도별 처리에 따른 SOD-1, catalase 및 glutathione의 발현량 측정을 위해 역전사-중합효소연쇄반응법(RT-PCR)을 수행한 결과이다(blank: 무처리군, control: 대조군(펩티드 대신 히드록실기 처리)).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 항고혈압 및 항산화 활성을 갖는 신규 바이오기능성 펩티드를 제공함에 그 특징이 있다.
- [0031] 본 발명의 펩티드는 어류인 대구 껍질의 젤라틴으로부터 일련의 과정을 통해 수득하거나 또는 당업계에 공지된 화학적 합성 방법을 통해 제조될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 펩티드를 천연물질로부터 수득하고자 하는 경우, 대구(*gadus macrocephalus*) 껍질에서 젤라틴을 추출한 후, 이 젤라틴에 펩신, 트립신 및 알파-키모트립신을 처리한 후, 크로마토그래피를 통한 정제과정을 거쳐 제조할 수 있다.
- [0033] 상기와 같은 방법을 통해 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 항고혈압 또는 항산화 바이오기능성 펩티드를 제조하는 경우, 천연물질을 사용한다는 점에서 장기적 사용에도 안전할 뿐만 아니라, 버려지는 어류 가공부산물을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다는 점에서 환경적, 경제적 이점을 가질 수 있다.
- [0034] 본 발명자들은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드가 안지오텐신 변환 효소(angiotensin converting enzyme: ACE) 억제 활성을 통해 고혈압을 예방 및 치료할 수 있을 뿐만 아니라, 세포 내 활성산소종 소거 활성, 항산화 관련 효소 발현의 상향 조절 및 항산화 관련 물질 발현의 상향 조절을 통하여 산화적 스트레스로부터 세포를 보호할 수 있는 효과가 우수함을 확인함으로써, 항고혈압 및 항산화 기능을 동시에 가진다는 사실을 최초로 규명하였다.
- [0035] 보다 구체적으로, 하기 실험예 2에서는 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 바이오기능성 펩티드의 ACE 억제 활성을 측정한 결과 IC₅₀값이 35.72 μ M로 측정되어 강력한 ACE 억제 활성을 나타내는 확인하였으며, 이를 통해 본 발명의 바이오기능성 펩티드가 ACE 억제를 통해 혈압상승의 원인이 되는 안지오텐신 II의 생성을 저하시켜 혈압의 상승을 억제할 수 있음을 유추할 수 있었다.
- [0036] 또한, 하기 실험예 3에서는 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 바이오기능성 펩티드가 산화적 스트레스로부터 세포를 보호할 수 있는지를 평가한 결과, 본 발명의 펩티드가 세포막 지질 과산화 억제, 세포막 단백질 산화 억제 및 산화에 의한 세포 내 DNA 손상을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0037] 또한, 하기 실험예 3에서는 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 바이오기능성 펩티드의 세포 내 활성산소종 소거 활성을 측정한 결과, 본 발명의 펩티드가 농도 및 시간 의존적으로 강력한 세포내 라디칼 소거 효과를 보이는 것을 확인할 수 있었다.
- [0038] 뿐만 아니라, 하기 실험예 4에서는 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 바이오기능성 펩티드가

항산화 관련 효소(또는 물질)의 발현 수준을 조절할 수 있지를 평가하였으며, 그 결과 본 발명의 펩티드가 항산화 효소로 널리 알려진 슈퍼옥사이드 디스무타제(superoxide dismutase: SOD), 카탈라제(catalase) 및 항산화 물질인 글루타치온(glutathione)의 발현을 효과적으로 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

- [0039] 따라서 상기와 같은 특징을 갖는 본 발명의 펩티드는 항고혈압 및 항산화 바이오키능성 펩티드 물질로서 약리학적 조성물과 같은 의약품은 물론이고, 건강기능식품에 유용하게 사용될 수 있음을 입증하였다.
- [0040] 본 발명은 또한, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 바이오키능성 펩티드를 유효성분으로 포함하는 고혈압 또는 산화적 스트레스 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 조성물은 고혈압뿐만 아니라 산화적 스트레스로 인한 다양한 질환에 적용될 수 있는데, 이러한 산화적 스트레스 관련 질환의 종류로는 암, 자가면역 질환, 간질환, 신경퇴행성 질환, 관상동맥 질환(coronary artery disease, CAD) 또는 심혈관 질환(cardiovascular disease, CVD)에 적용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 의해 예방 또는 치료되는 상기 관상동맥질환은 심근경색, 협심증, 다른 만성 관상동맥질환, 아테롬성동맥경화증, 급성 관상동맥 증후군(예컨대, 불안정협심증, NSTEMI(non-ST-elevation myocardial infarction) 또는 STEMI(ST-elevation myocardial infarction), PAOD(peripheral arterial occlusive disease) 또는 뇌혈관 발작일 수 있다.
- [0042] 상기 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물이나 식품 조성물일 수 있다.
- [0043] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0044] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0045] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 서열번호 1로 이루어진 바이오키능성 펩티드는 조성물에 10 내지 100 μ M 농도로 포함될 수 있으며, 조성물 총 중량에 대하여 0.1 ~ 95 중량%로 포함될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 조성물은 또한 식품 조성물일 수 있는데, 이러한 식품 조성물은 유효성분인 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 바이오키능성 펩티드를 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0048] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각 종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛,

식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강 보조식품류 등이 있다.

- [0050] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 바이오기능성 펩티드 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 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. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0051] 본 발명은 또한 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 바이오기능성 펩티드를 유효성분으로 포함하는 고혈압 또는 산화적 스트레스 관련 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0052] 본 발명의 건강기능식품은 고혈압 또는 산화적 스트레스 관련 질환의 예방 및 개선을 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 “건강기능식품” 이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0054] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0055] 상기 “식품첨가물 공전” 에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.
- [0056] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 바이오기능성 펩티드를 부형제, 결합제, 봉해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.
- [0057] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분인 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 바이오기능성 펩티드를 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 백운폴 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0058] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 바이오기능성 펩티드와 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기준에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.
- [0059] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 바이오기능성 펩티드와 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기준에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.
- [0060] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.
- [0061] 또한 본 발명은 고혈압 또는 산화적 스트레스 관련 질환의 예방 및 치료용 의약 또는 식품의 제조를 위한 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 바이오기능성 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 상기한 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 바이오기능성 펩티드를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 고혈압 또는 산화적 스트레스 관련 질환의 예방 및 치료용 의약 또는 식품의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.
- [0062] 또한 본 발명은 포유동물에게 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 바이오기능성 펩티드를 투여하는 것을 포함하는 고혈압 또는 산화적 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0063] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을

말한다.

[0064] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 의사, 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약제학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 치료방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 바이오기능성 펩티드를 1일 1회 내지 수회 투여시, 1mg/kg~100mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0065] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 바이오기능성 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 복강내, 국소, 피내, 흡입 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0066] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0067] <실시예 >

[0068] 시약

[0069] 신선한 대구(*gadus macrocephalus*) 껍질 샘플들은 대한민국 부산 자갈치 어시장으로부터 얻었다. 펩신, 트립신, 알파-키모트립신, ACE(from rabbit lung), hippuryl-histidyl-leucine(HHL), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 및 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide(DMPO)는 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA) 및 diphenyl-1-pyrenylphosphine(DPPP)와 같은 형광 프로브는 Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA)로부터 구입하였다. 마우스 대식세포 세포주(RAW264.7)는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)로부터 얻었다. Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS) 및 다른 세포 배양 물질들은 Gibco BRL, Life Technologies(USA)로부터 구입하였다. RNA는 Trizol reagent (Invitrogen Co., CA, USA)를 이용하여 분리하였으며 RT-PCR을 위한 특이 프라이머 세트는 Bioneer Inc.(Alameda, CA, USA)로부터 얻었다. 또한 실험에 사용된 모든 다른 화합물들은 상업적으로 사용가능한 최고 분석용 등급을 사용하였다.

[0070] <실시예 1>

[0071] 대구 껍질로부터 젤라틴 추출 및 위장의 엔도펩티다아제를 이용한 가수분해

[0072] 대구(*gadus macrocephalus*) 껍질은 표면 점액물질을 제거하기 위하여 세척한 다음 1×2cm 크기의 작은 조각으로 분절하였다. 이렇게 분절한 대구 껍질은 껍질/용액의 비가 1:4(w/v)가 되도록 1% 수산화칼슘 용액에 침지시켰으며, 상기 용액은 비 콜라겐 단백질을 제거를 위하여 24시간마다 3번 교체하였다. 상기와 같이 알칼리성으로 처리된 껍질은 물로 깨끗이 세척한 다음, 껍질로부터 젤라틴을 추출하기 위하여 pH6, 60℃ 조건에서 껍질/물의 비가 1:4(w/v)가 되도록 증류수에 담근 후 연속적으로 교반하였다. 상기 혼합물은 3000rpm에서 10분간 원심분리시킨 후, 상등액을 수집하여 동결건조하였다. 이렇게 수득한 건조물은 젤라틴 파우더로 사용하였다.

[0073] 상기 과정을 통해 추출한 젤라틴은 위장의 엔도펩티다아제를 이용하여 가수분해하기 위하여 37℃에서 펩신, 트립신 및 알파-키모트립신을 적용하여 연속적인 가수분해를 실시하였다. 먼저 젤라틴을 글리신 버퍼(0.01M, pH 2)에 녹인 후 펩신(E/S of 1/100)으로 4시간 동안 교반하면서 가수분해시켰다. pH는 1M 수산화나트륨을 이용하여 6.5로 조절하였으며, 또한 이러한 펩티드 가수분해물은 트립신과 알파-키모트립신(E/S of 1/100 for each enzyme)을 이용하여 4시간 동안 교반하면서 추가적인 가수분해를 실시하였다. 상기 혼합물은 끓는 수중배양기(water bath)에서 10분 동안 가열함으로써 반응을 중지시켰다. 감압 하에 동결 건조된 가수분해산물은 -80℃에

서 저장한 후, 하기 실험에서 시료로 사용하였다.

[0074] <실시예 2>

[0075] 바이오횡능성 펩티드의 분리 및 동정

[0076] 본 발명자들은 상기 실시예 1을 통해 얻은 대구 껍질 젤라틴 유래 가수분해산물에서 바이오횡능성 펩티드를 동정하기 위하여, 먼저 FPLC(Fast protein liquid chromatography) 및 HPLC(High performance liquid chromatography)를 이용하여 바이오 기능을 갖는 펩티드를 정제한 후 아미노산 서열을 분석하였다.

[0077] <2-1> Fast protein liquid chromatography

[0078] 실시예 1을 통해 얻은 대구 껍질 젤라틴 유래 가수분해산물을 HiPrep 16/10 diethylaminoethyl fast flow(DEAE FF) 이온 교환 컬럼 상에서 FPLC(AKTA, Amersham Bioscience Co., Uppsala, Sweden)를 이용하여 정제하였다. 먼저 20mM 소듐 아세테이트 버퍼(pH 4.0)로 HiPrep 16/10 DEAE FF 이온 교환 컬럼을 평형화시킨 후 대구 껍질 젤라틴 유래 가수분해산물을 상기 컬럼 상에 로딩한 다음, 2ml/min 속도로 같은 버퍼 내에서 염화나트륨(0-2M)을 선형적으로 증가시키며 용출시켰다. 각각의 분획(4ml)은 280nm에서 확인하였으며, 피크와 일치하는 분획들을 수집하였다. 이렇게 수집된 분획(도 1 참조)들은 감압 하에 동결건조시킨 후, ACE 억제 활성을 분석하였다. 이때 가장 높은 ACE 억제 활성을 가진 분획에서 순수한 펩티드를 얻기 위하여 하기 실험에서 고속 액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography)를 이용하여 추가 정제하였다.

[0079] <2-2> High performance liquid chromatography

[0080] 상기 실시예<2-1>에서 FPLC를 통해 정제된 가장 높은 항산화 활성을 보이는 분획은 1.5ml/min의 유속(flow rate)에서 0.1% 트리플루오로아세트산 에시드(trifluoroacetic acid: TFA)를 포함하는 아세트오니트릴 용매를 선형적으로 증가(0-40% in 40 min)시키면서 Primesphere 10 C18(20 mm×250 mm, Phenomenex, Cheshire, England) 컬럼 상에서 역상 고속액체크로마토그래피(RP-HPLC, Dionex Korea Ltd., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 더 정제하였다. 용출 피크는 215nm에서 검출되었으며, 그 결과 4개의 분획을 얻을 수 있었다(도 2 참조). 4개의 분획 중 가장 높은 ACE 억제 활성을 보이는 분획 2(H-Fr2)를 선별한 후 수집된 용출물은 회전증발기를 이용하여 농축시켰다. 농축된 분획 2(H-Fr2)는 1ml/min 유속에서 이동상으로서 0.1% TFA를 포함하는 20% 아세트오니트릴 용매를 사용하여 YMC-Pack Pro C18 (20 mm×250 mm) 컬럼에서 추가 정제하였다(도 3 참조). 정제된 펩티드는 아미노산 서열을 분석하였다.

[0081] <2-3> 아미노산 서열 분석

[0082] 정제된 펩티드의 정확한 분자량 및 아미노산 서열은 ESI(electrospray ionization) 소스(source)와 Q-TOF 질량 분석계(Micromass, Altrincham, UK)가 함께 장착된 기기(Q-TOF ESI mass spectroscopy)를 이용하여 분석하였다. 상기 실시예<2-2>를 통해 정제된 펩티드는 메탄올/물(1:1, v/v)에서 녹인 후 ESI 소스로 도입하여 각각을 인퓨즈시킨 후, 분자량은 질량스펙트럼에서 2개의 전하($M+2H$)⁴²를 띤 상태로써 분석되었다. 분자량 측정 후 자동적으로 선택된 펩티드 절편들은 tandem mass spectrometry 분석에 의해 서열정보를 얻을 수 있었다(도 4 참조). 그 결과 아미노산 서열은 Leu-Leu-Met-Leu-Asp-Asn-Asp-Leu-Pro-Pro로 동정되었으며, 본 발명에서는 이를 서열번호 1로 표시하였다. 또한 상기 펩티드의 분자량은 실제로 1301 KDa로 나타나 아미노산의 계산된 분자량과 일치하는 것을 확인할 수 있었다.

[0083] 상기 실시예에서 살펴본 바와 같이, 본 발명자들은 대구 껍질로부터 젤라틴을 추출한 후 위장의 엔도펩티다아제(펩신, 트립신 및 알파-키토트립신)를 이용하여 가수분해하였으며, 이러한 가수분해 과정을 통해 수득한 가수분해산물을 일련의 정제과정을 거쳐 높은 ACE 억제 활성 및 항산화 활성을 갖는 바이오횡능성 펩티드를 수득하였다(서열번호 1). 하기 실험예에서는 상기 수득한 본 발명의 펩티드의 바이오횡능성을 평가하기 위하여 ACE 억제 활성, 세포 독성평가, 산화적 스트레스로부터 세포의 거대분자의 손상을 방지하는 효과, 세포 내 활성산소종 소

거활성 및 항산화 관련 효소의 발현에 미치는 영향을 자세히 살펴보았다.

<실험예 1>

본 발명의 바이오기능성 펩티드의 ACE 억제 활성 측정 및 억제 패턴 분석

<1-1> ACE 억제 활성 측정

안지오텐신 변환 효소(angiotensin converting enzyme: ACE) 억제 활성 측정은 Cheung and Cushman(1971) 방법을 조금 변형하여 수행하였다. 반응 혼합물(50mM 인산나트륨 버퍼(pH 8.3)에 5mM HHL(Hip-His-Leu), 0.3M NaCl 및 ACE 5 μ l 함유) 50 μ l에 본 발명의 바이오기능성 펩티드 50 μ l를 첨가하였으며, 0.5M NaCl을 포함하는 8.3mM HHL 기질 150 μ l와 함께 혼합하였다. 37℃에서 30분간 반응시키고 0.1M HCl 250 μ l 첨가로 반응을 중지시켰다. 다시 여기에 에틸아세테이트 1ml를 가하여 3000rpm에서 10분간의 원심분리시킨 후, 상층액 0.2ml를 튜브로 옮겨 60℃에서 30분 동안 건조시켰다. 마노산(hippuric acid)은 증류수 1ml에서 다시녹인 후 형광 마이크로-플레이트 리더기(Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austria)를 이용하여 228nm에서 흡광도를 측정하였다. IC₅₀ 값은 ACE 활성의 50% 억제하는데 요구되는 농도로써 정의되었다.

그 결과 본 발명의 바이오기능성 펩티드는 IC₅₀ 값이 35.72 μ M로 측정되어 강력한 ACE 억제 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

<1-2> ACE 억제 패턴 분석

ACE 억제 패턴의 분석은 Bush, Henry 및 Slusarchyk(1984)에 의해 공개된 방법에 따라 수행되었다. 본 발명의 바이오기능성 펩티드 각각을 농도별로 반응 혼합물에 첨가하였으며, 기질의 다른 농도에서 효소 활성을 측정하였다. 본 발명의 바이오기능성 펩티드의 효소 억제 패턴은 Lineweaver-Burk plots으로 측정되었다.

그 결과는 도 5에서 나타내었으며, 이를 통해 본 발명의 바이오기능성 펩티드는 ACE를 비-경쟁적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

<실험예 2>

본 발명의 바이오기능성 펩티드의 세포 독성 평가

본 발명의 바이오기능성 펩티드가 세포에 독성을 나타내지 않은 안전한 물질임을 확인하기 위하여 MRC-5(인간 폐 섬유아세포) 및 RAW264.7(마우스 단핵구세포)의 MTT(3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 에세이를 통해 세포 생존율을 측정하였다(ACE는 대부분 폐의 혈관내피세포에서 막 결합 체외효소로써 발견되어지므로, 폐 섬유아세포에서 독성이 없는 것은 ACE 억제제의 중요한 요건이다).

MRC-5 및 RAW264.7은 100 μ g/ml 페니실린스트렙토마이신 및 10% 소태아혈청을 포함하는 DMEM 배지에서 5% CO₂ 습기 있는 환경 하에 37℃가 유지되는 조건에서 배양되었다. 세포들은 5×10^3 cells/well 밀도로 분주하여 96-웰 플레이트에서 24시간 배양한 후 새로운 배지로 세척하고, 본 발명의 바이오기능성 펩티드를 농도별로 첨가한 후 24시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후 PBS로 상기 배양된 세포들을 세척하고, 100 μ l MMT 용액(1mg/ml)을 각각의 웰에 첨가한 뒤 세포들을 4시간 동안 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 각각의 웰에 첨가된 MMT 용액을 제거하고, 100 μ l 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide)를 첨가하여 formazan crystal을 녹인 후, 광학 밀도는 UV 마이크로 플레이트 리더(Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austria)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 무처리군과 비교하여 상대적으로 계산되었다. 데이터는 적어도 3번의 독립적 실험의 평균값으로써 나타내었다.

그 결과 도 6에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 바이오기능성 펩티드는 10, 22, 50 μ M의 어떤 농도에서도 세포 독성이 나타나지 않았다. 이를 통해 본 발명의 바이오기능성 펩티드가 독성을 나타내지 않는 안전한 물질임을 확인할 수 있었다.

[0097] <실험예 3>

[0098] 본 발명의 바이오기능성 펩티드의 산화적 스트레스로부터 세포 보호 효과

[0099] 본 발명의 바이오기능성 펩티드가 산화적 스트레스로부터 세포를 보호할 수 있는 효과를 가지는지를 평가하기 위하여, 본 발명의 바이오기능성 펩티드의 처리에 따른 세포막 지질 과산화 억제정도, 세포막 단백질 산화 억제정도 및 세포 내 DNA 산화 억제정도를 실험하였다.

[0100] <3-1> 세포막 지질 과산화에 미치는 영향

[0101] 세포 내 과산화지질 수준은 이전(Rajapakse, Kim, Mendis & Kim, 2007)에 설명된 형광 프로브, diphenyl-1-pyrenylphosphine(DPPH)로써 측정되었다. 즉 세포막에서 불포화지방산은 자유 라디칼에 의해 산화되기 쉬운데, 본 실험에서는 RAW264.7 세포를 강한 알킬 라디칼 생성자인 2,2'-amidino-propane dihydrochloride(AAPH)에 노출시킨 후, 지질 히드로퍼옥사이드 민감성 형광 프로브인 DPPH를 이용하여 세포 막 지질의 과산화 정도를 측정하였다(DPPH 분자들은 세포막에 쉽게 침투되며, 지질 산화로부터 생성된 히드로퍼옥사이드와 반응하여 형광 DPPH oxide를 생성하는 것으로 알려져 있음).

[0102] RAW264.7 세포들을 culture dishes에서 배양한 다음 PBS로 3번 세척하여, 37℃의 어두운 조건 하에 30분간 13 μ M DPPH(dissolved in DMSO)로 라벨링하였다. 이렇게 라벨링 된 세포들은 PBS로 3번 세척 후 시립 프리 배지에 1×10^8 밀도로 형광 마이크로티터 96-웰 플레이트에 분주하였다. 세포들이 완전히 부착된 다음, 본 발명의 바이오기능성 펩티드를 농도별로 처리하여 1시간 동안 반응시켰다. 이 후 3mM APPH를 PBS 에 첨가하였으며, DPPH-oxide 형광강도는 GENios uorescence microplate reader (Tecan Austria GmbH, Austria)를 이용하여 8시간 후에 361nm의 여기 파장 및 380nm의 방출 파장에서 측정되었다.

[0103] 그 결과 도 7에서 나타난 바와 같이, 대조군은 무처리군(blank)과 비교하여 APPH 처리 후 8시간이 경과하였을 때 형광강도가 약 3.5배 증가한 것으로 나타났다. 그에 반해, 본 발명의 바이오기능성 펩티드를 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 형광강도가 감소되었으며, 처리농도가 가장 높은(50 μ M) 실험군에서는 대조군에 비해 84% 억제가 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0104] <3-2> 세포막 단백질 산화에 미치는 영향

[0105] 세포막 단백질 산화 정도는 세포막 단백질에서 카보닐 그룹의 양(Rajapakse, Kim, Mendis & Kim, 2007) 측정을 통해 평가하였다. 산화적 스트레스에 따른 막 단백질의 산화는 알데하이드 및 케톤과 같은 카보닐 그룹을 생산하므로, 카보닐 그룹은 단백질 산화의 수준을 확인하는 마커로 사용된다. 본 실험에서 세포막 단백질 산화는 히드록시라디칼로 자극된 백혈구를 이용하여 분석하였다.

[0106] RAW264.7 세포들을 culture dishes에서 배양한 다음 PBS로 3번 세척하여, 환원제(25 mM TrisHCl, pH 7.8, 2 mM EDTA, 180 mM NaCl and 1% Triton X-100)가 없는 용해버퍼로 용해하였다. 상기 세포 용해액을 분주하고, 여기에 본 발명의 바이오기능성 펩티드를 농도별로 처리한 후 37℃에서 30분 동안 반응시켰다. 상기 혼합물에 0.1M FeSO₄ 및 2mM H₂O₂를 첨가하여 단백질 산화를 개시한 후, 1시간 동안 반응시켰다. 트리클로로아세트산(400 μ l from 20% solution)을 각각의 반응 혼합물에 첨가하고, 3000rpm에서 원심분리하여 용해된 단백질을 침전시켰다. 침전된 단백질은 0.2% 2,4-dinitrophenyl hydrazine(in 2mM HCl)에서 재부유시킨 후 실온에서 40분 동안 반응시켰다. 이 단백질은 20% 트리클로로아세트산으로 다시 침전시킨 후 형성된 펠렛(pellet)은 에탄올:에틸아세테이트(1:1 v/v) 용액으로 3번 세척하였다. 그 후 6M, 500 μ l의 구아니딘 하이드로클로라이드(guanidini hydrochloride)를 이용하여 상기 펠렛을 녹이고, 37℃에서 15분 동안 인큐베이션시켰다. 1500rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취하고, UVvis micro-plate reader (Tecan Austria GmbH, Austria)를 이용 370nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0107] 그 결과 도 8에서 나타난 바와 같이, 자극 후 카보닐 그룹의 증가 수준은 본 발명의 바이오기능성 펩티드 농도에 의존하여 두드러지게 억제되는 것을 알 수 있었으며, 특히 10 μ M에서 63%, 25 μ M에서 47% 및 50 μ M 농도에서 28%로 나타났다.

- [0108] <3-3> 세포 내 DNA 산화에 미치는 영향
- [0109] 세포 DNA는 활성산소종 또는 자유 라디칼에 산화에 민감하다. 활성산소종 또는 자유 라디칼은 DNA 사슬을 절단하거나, DNA-단백질 가교를 통해 DNA에 손상을 유도한다. 본 실험에서는 본 발명의 바이오기능성 펩티드가 세포 내 DNA 산화를 효과적으로 억제할 수 있는지 알아보기 위하여, RAW264.7 세포로부터 분리된 genomic DNA를 이용 펜톤 반응을 통해 형성된 히드록실 라디칼에 의해 유도된 DNA 손상 정도를 분석하였다.
- [0110] genomic DNA 분리는 표준 phenol/proteinase K 과정을 약간 변경하여 수행되었다(Sambrook & Russell, 2001). 간략하게는, RAW264.7 세포를 PBS로 2번 세척하고, 10mM EDTA를 포함하는 PBS를 이용하여 분주하였다. 상기 세포들을 원심분리를 통해 얻은 후, RNase(0.03mg/ml), NaOAC(0.175M), proteinase K(0.25mg/ml) 및 SDS(0.6%)에서 녹였다. 이 혼합물은 37℃에서 30분간 반응시키고, 55℃에서 1시간 더 반응시켰다. 그리고 phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1) 혼합용매를 상기 혼합물에 1:1의 비율로 첨가한 후, 혼합물을 4℃, 6000rpm에서 5분간 원심분리시켰다. 원심분리 후 상등액과 100% ice cold 에탄올을 1:1.5 비율로 혼합하고, -20℃에서 15분간 유지하였다. 이 후 4℃, 12,000rpm에서 5분 동안 다시 원심분리하여 수득된 펠렛은 TE 버퍼로 녹이고 260/280nm에서 분광광도법적으로 정제된 DNA를 측정하였다.
- [0111] H₂O₂ 매개된 DNA 산화는 Milne, Nicotera, Orrenius 및 Burkitt(1993) 방법으로써 측정하였다. 간략하게, 100 μl DNA 반응 혼합물은 농도별 본 바이오기능성 펩티드 시료(또는 대조군으로써 증류수의 동일한 부피), 200 μM 최종 농도의 FeSO₄, 2mM 최종 농도의 H₂O₂ 및 50 μg/ml 최종 농도의 genomic DNA를 첨가하여 준비되었다. 그 후 혼합물은 상온에서 30분 동안 반응시켰으며, 10mM 최종 농도의 EDTA를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 1 μg의 DNA를 포함하는 반응 혼합물(20 μl)은 1% 아가로스 젤 상에서 100V, 30분 동안 전기영동되었다. 1mg/ml EtBr(Ethidium Bromide)을 이용 젤을 염색한 후, AlphaEasegel image analysis software (Alpha Innotech, CA, USA)를 이용 가시화하였다.
- [0112] 그 결과 도 9에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 바이오기능성 펩티드를 처리한 실험군에서 농도에 의존적으로 DNA 산화가 억제되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0113] <실험예 4>
- [0114] 본 발명의 바이오기능성 펩티드의 세포 내 활성산소종 소거 효과
- [0115] 본 발명의 바이오기능성 펩티드가 세포에 손상을 미치는 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)을 실제로 소거할 수 있는지 확인하였다.
- [0116] 활성산소종의 세포 내 형성은 형광기질로써 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)를 이용한 종래 공개된 방법(Rajapakse, Kim, Mendis & Kim, 2007)으로 분석되었다. DCFH-DA는 세포막 투과성이 좋아 세포로의 전달이 용이하고 일단 세포 내로 들어가면 에스테라제(esterase)에 의해 DCFH로 가수분해되고 이 가수분해 생성물은 전하를 띄게 되어 세포 밖으로 잘 유출되지 않으므로 세포 내에 남아있게 된다. 기질인 DCFH는 형광물질이 아니지만 산화된 생성물인 DCF는 형광이 강하므로 쉽게 감지할 수 있다. DCFH가 DCF로 산화되는 것은 superoxide anion, H₂O₂, peroxy radical, peroxynitrite, nitric oxide 등 세포의 산화스트레스 하에서 생성될 수 있는 여러 가지의 유리 라디칼들의 작용에 의해 일어나므로, 이를 이용한 DCF 형광도의 측정에 의해 세포의 총체적인 산화성 스트레스를 정량하는 것이 가능하다.
- [0117] 먼저 형광 마이크로타이터 96-웰 플레이트에서 배양한 RAW264.7 세포를 암중에서 30 분 동안 HBSS (Hanks balanced salt solution) 중의 DCFH-DA 20 μM로 표지하였다. 이어서, 세포에 본 발명의 바이오기능성 펩티드를 농도별로 처리하고, 추가로 1시간 동안 배양하였다. 이 후 세포에서 비 침투 형광 프로브를 제거하기 위하여 PBS로 3번 세척한 후, 활성산소종 생성을 촉진시키기 위하여 HBSS에 녹인 500 μM H₂O₂를 가하였다. 세포 ROS에 의한 DCFH의 산화에 기인하여 2', 7'-디클로로플루오레스신(DCF)에서 방출된 형광 신호의 강도를 uorescence micro-plate reader (Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austria)를 이용하여 시간 의존적(λ 여기 = 485 nm, λ 방출 = 528 nm)으로 검출하였다. 투여량 및 시간에 의존적인 처리 효과를 플로팅하고 대조군과 블랭크 군의 형광 강도와 비교하였다.
- [0118] 그 결과 도 10에서 나타낸 바와 같이, 대조군에서는 라디칼-매개 산화가 배양 시간에 따라 증가하였음이 나타났

다. 이에 반해 본 발명의 바이오기능성 펩티드를 처리한 실험군의 경우 DCF의 형광 강도가 농도 및 시간 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히, 가장 낮은 농도를 처리한 실험군에서 조차 대조군과 비교하여 DCF 형광 강도가 월등히 감소하는 것으로 나타났다. 이는 본 발명의 바이오기능성 펩티드가 농도 및 시간 의존적으로 강력한 세포내 직접 라디칼 소거 효과를 가져 우수한 항산화 효과를 나타냄을 의미한다.

[0119] <실험예 5>

[0120] 본 발명의 바이오기능성 펩티드가 항산화 관련 효소(또는 물질)의 발현에 미치는 영향

[0121] 상기 실험예 3 및 4를 통해 본 발명의 바이오기능성 펩티드가 우수한 항산화 활성을 갖는 것을 확인할 수 있었다. 이에 본 실험에서는 이러한 항산화 활성이 항산화 효소의 발현 조절을 통해 이루어지는 것인지 확인하기 위하여, 세포 전체 RNA를 분리한 후 RT-PCR을 통해 항산화 효소로 널리 알려진 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(SOD), 클루타치온(GSH) 및 카탈라제의 발현 정도를 측정하였다. 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(SOD), 클루타치온(GSH) 및 카탈라제 발현은 H_2O_2 유도된 백혈구에서 실험되었다.

[0122] 참고로 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase: SOD)는 인체 내에서 대표적인 활성산소라고 할 수 있는 과산화물음이온(superoxide anion: $O_2^{\cdot-}$)을 과산화수소(H_2O_2)로 변화시키는 항산화효소이다. 또한 카탈라제(catalase)는 과산화수소를 물로 변화시키는 효소로서 지질과산화를 일차적으로 방호하며 라디칼 생성을 억제하는 항산화효소이다. 글루타치온(glutathione)은 산화적 손상으로부터 세포를 보호하는 주요한 역할을 한다고 알려져 있는 항산화 물질이다.

[0123] 세포 전체 RNA는 Trizol reagent를 이용하여 처리된 H_2O_2 유도된 RAW264.7 세포로부터 추출되었다. 항산화 효소 발현의 지속적인 상태 농도의 변화는 RT-PCR로 평가되었다. 간략하게, 전체 RNA(2 μ g)를 Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 단일 가락 cDNA로 변환하였으며, 목적 cDNA는 하기 표 1에서 나타낸 프라이머세트를 이용하여 증폭시켰다. 증폭 사이클은 95℃에서 45초, 60℃에서 1분 및 72℃에서 45초로 수행되었다. 35회 사이클 후, PCR 생성물은 1.5% 아가로스 겔에서 100V, 15분 동안 전기영동을 통해 분리되었다. 1mg/ml EtBr(ethidium bromide)을 이용해 겔을 염색하고, AlphaEasegel image analysis software (Alpha Innotech, CA, USA)를 이용 UV light를 가시화하였다.

표 1

유전자	프라이머명	프라이머 서열	서열번호
SOD-1	포워드	5' -AGG-GCA-TCA-TCA-ATT-TCG-AG-3'	2
	리버스	5' -TGC-CTC-TCT-TCA-TCC-TTT-GG-3'	3
catalase	포워드	5' -TCT-GGA-GAA-GTG-CGG-AGA-TT-3'	4
	리버스	5' -AGT-CAG-GGT-GGA-CCT-CAG-TG-3'	5
glutathione	포워드	5' -AGC-CCA-ACT-TCA-TGC-TCT-TC-3'	6
	리버스	5' -CCC-ACC-AGG-AAC-TTC-TCA-AA-3'	7
β -actin	포워드	5' -GCC-ACC-CAG-AAG-ACT-GTG-GAT-3'	8
	리버스	5' -TGG-TCC-AGG-GTT-TCT-TAC-TCC-3'	9

[0125] 그 결과 도 11에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 바이오기능성 펩티드 처리한 경우 농도 의존적으로 SOD-1, catalase 및 glutathione의 발현이 증가되는 것으로 나타났다. 따라서 본 발명의 바이오기능성 펩티드가 항산화에 직접적인 영향을 미치는 항산화 효소의 발현을 효과적으로 상향 조절할 수 있음을 확인할 수 있었다.

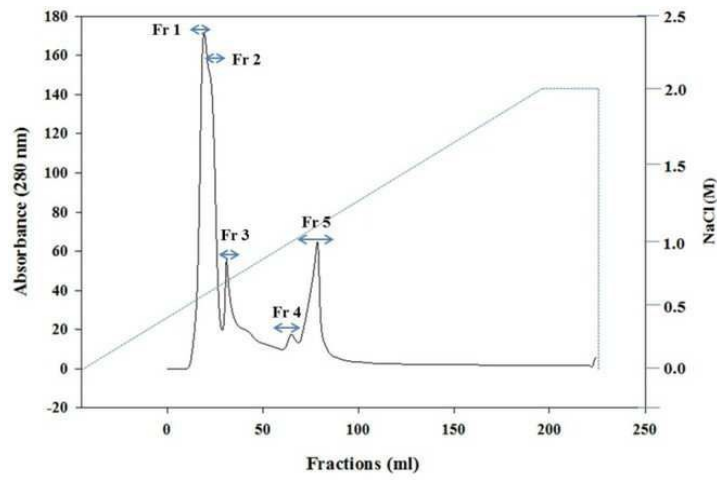
[0126] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

부호의 설명

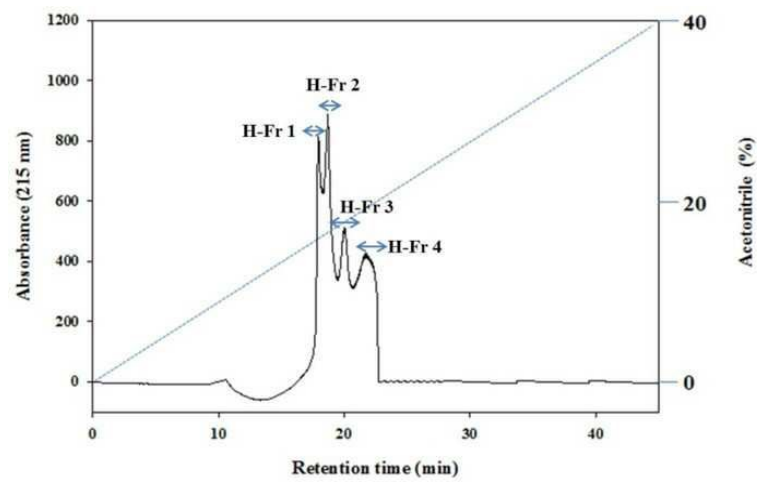
[0127] PCP: 본 발명의 서열번호 1로 이루어진 바이오기능성 펩티드

도면

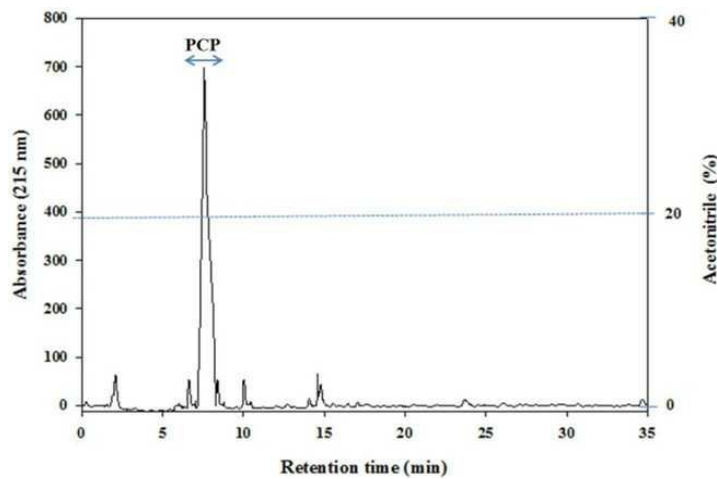
도면1



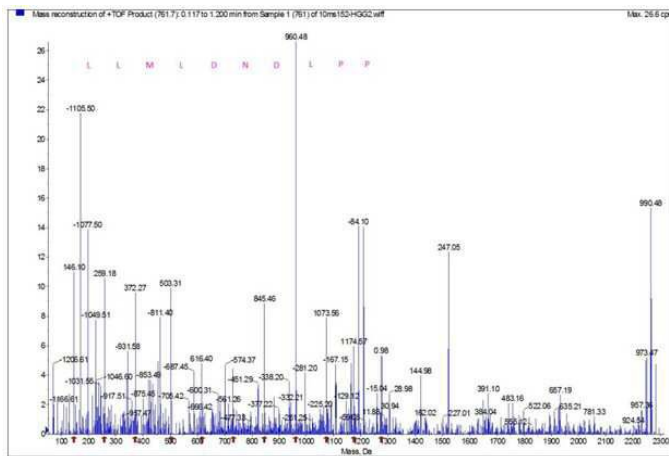
도면2



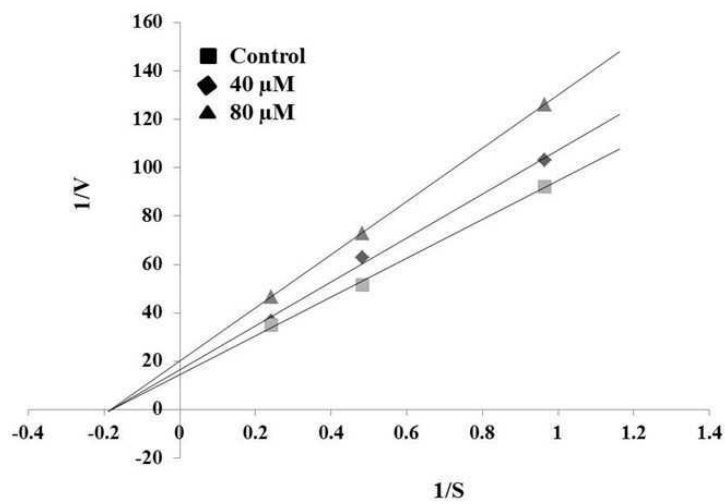
도면3



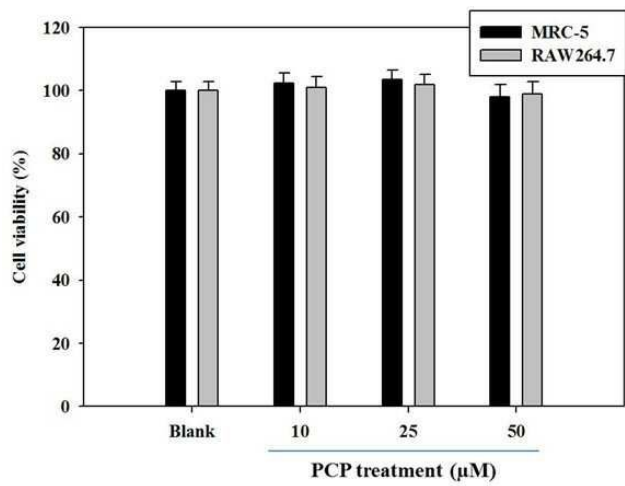
도면4



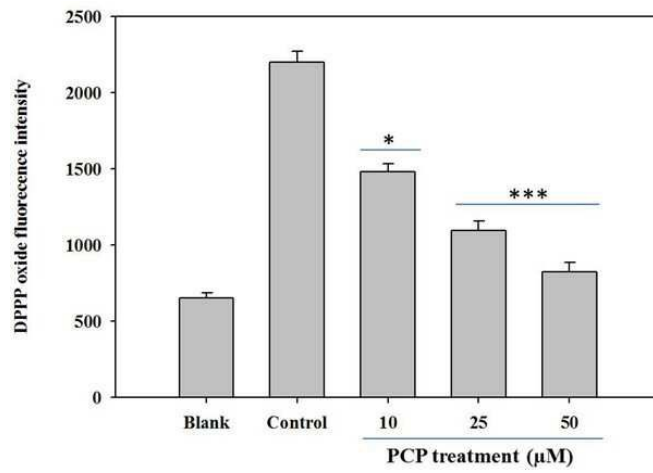
도면5



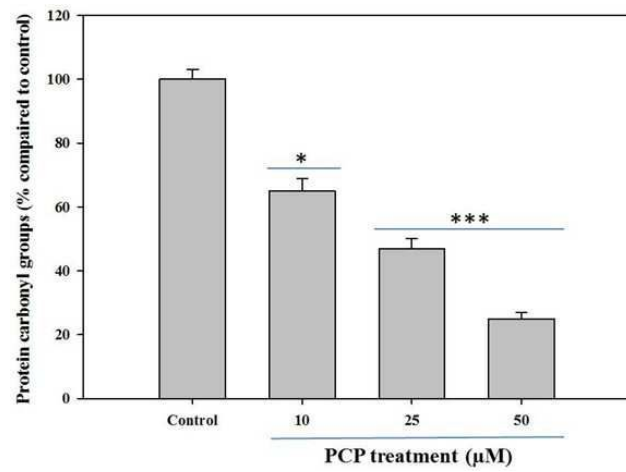
도면6



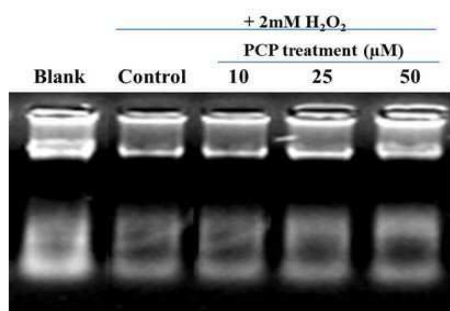
도면7



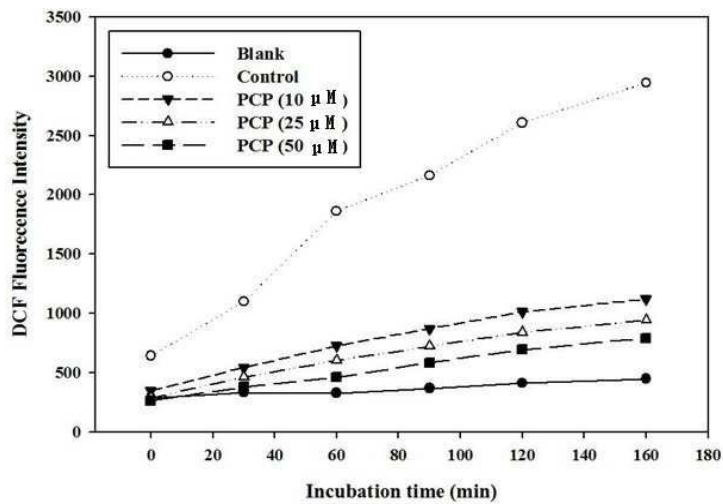
도면8



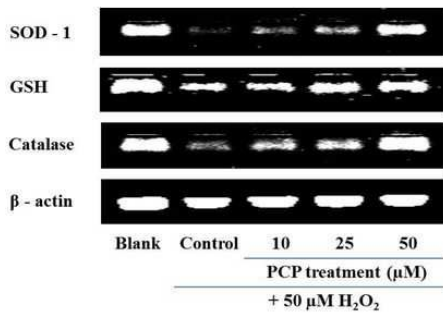
도면9



도면10



도면11



서열 목록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> Antihypertensive and Antioxidative Bioactive Peptide

<130> PN1202-015

<160> 9

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antihypertensive and Antioxidative Bioactive Peptide

<400> 1

Leu Leu Met Leu Asp Asn Asp Leu Pro Pro

1 5 10

<210> 2

<211> 20

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SOD-1 forward primer	
<400>	2	
	agggcatcat caatttcgag	20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SOD-1 reverse primer	
<400>	3	
	tgcctctctt catccttgg	20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	catalase forward primer	
<400>	4	
	tctggagaag tgcggagatt	20
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	catalase reverse primer	
<400>	5	
	agtcagggtg gacctcagt	20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	glutathione forward primer	
<400>	6	
	agcccaactt catgctcttc	20

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glutathione reverse primer

<400> 7
 cccaccagga acttctcaaa 20

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> beta-actin forward primer

<400> 8
 gccacccaga agactgtgga t 21

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> beta-actin reverse primer

<400> 9
 tgggccaggg tttcttactc c 21