



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. C07K 14/775 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2007년06월07일 10-0725642 2007년05월30일
--	-------------------------------------	--

(21) 출원번호 (22) 출원일자 심사청구일자	10-2006-0006066 2006년01월20일 2006년01월20일	(65) 공개번호 (43) 공개일자
----------------------------------	---	------------------------

(73) 특허권자 충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교

(72) 발명자 석대은
대전 유성구 신성동 대림두레아파트 101-20

정태숙
대전 서구 둔산동 파랑새아파트 101-1101

(74) 대리인 김원준

(56) 선행기술조사문헌
BLASTP 2.2.9 KR1019990021828 A
KR1020050122729 A

심사관 : 신원혜

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 저밀도 지단백질에 대해 항산화성을 갖는 펩타이드

(57) 요약

본 발명은 LDL 및 HDL의 산화에 대한 우수한 항산화능을 표시함으로써 동맥경화증의 예방·치료제로 활용될 수 있는 히스티딘(His) 잔기를 함유하는 Apo AI-유사 펩타이드에 관한 것으로서, 히스티딘(His) 잔기가 N-말단에서 2번째 또는 3번째 위치에 존재하고 10번 또는 11번 위치에 시스테인(Cys) 잔기와 타이로신(Tyr) 잔기를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 Apo AI-유사 펩타이드에 관한 것이다.

상기의 Apo AI-유사 펩타이드는 다양한 산화적 스트레스에 의한 지단백질(LDL/HDL)의 산화에 대한 항산화 활성이 뛰어나므로 산화적 스트레스에 의해 유발되는 동맥경화증과 같은 심혈관계 질환, 대사성 질환 및 기타 노화 등의 산화성 스트레스에 관련된 질환의 예방·치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

저밀도 지단백질(low-density lipoprotein, LDL)에 대해 항산화성을 갖는 펩타이드로서,

서열번호 3, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 10, 서열번호 11 또는 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 항산화성 펩타이드.

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 항산화성 펩타이드에 관한 것으로 더욱 자세하게는 동맥경화증 등 저밀도 지단백질의 산화로 인해 야기되는 심혈관성 질환의 예방 또는 치료용으로 활용될 수 있는 항산화성 Apo AI-유사 펩타이드에 관한 것이다.

고혈압 및 동맥경화증과 같은 순환기계 질환과 아울러 관련 합병증으로 불리는 대사증후군(metabolic syndrome)은 육류 소비가 많은 미국이나 유럽의 여러 나라에서는 물론 식생활이 급속히 서구화되어가고 있는 우리나라에서도 주된 사망원인으로 대두되고 있다. 2002년 통계청 사망원인 통계에 의하면 인구 십만 명 당 순환기계 질환에 의한 사망자수는 127.8명으로 호흡기계 질환의 34.5명, 소화기계 질환의 29.4명에 비해 그 수가 월등히 높다.

순환기계 질환의 주요 병인인 동맥경화의 발병 기전은 충분히 규명되고 정립되진 않았으나, 현재 가장 유력한 학설로는 "손상 반응설(response-to-injury hypothesis)"과 "체세포 돌연변이설(somatic mutation hypothesis)"을 들 수 있다. 손상 반응설에서는 혈관내피세포의 손상에 따른 혈소판과 염증세포의 침윤으로 평활근세포의 유주 및 증식을, 체세포 돌연변이설에서는 손상으로 변이가 일어난 평활근세포의 팽창을 동맥경화 유발의 주된 원인으로 제시하고 있다. 초기 유발원인의 차이는 있으나, 내피세포의 손상 및 증식, 혈중 단백질의 혈관벽 내로의 이동 및 대식세포로의 변형, 지질과 손상된 세포 및 조직의 침착, 평활근세포의 증식 및 섬유화, 혈소판의 침착 및 응집반응이라는 일련의 병리학적 변화를 동반하며, 이로 인한 혈관의 비후, 수축 및 협착을 거쳐 동맥벽이 경화되는 메카니즘은 두 이론에서 동일하다.

동맥경화성 병변의 유발 및 촉진요인으로서는 흡연, 고혈압, 비만, 당뇨, 스트레스, 노화 등이 있으며, 특히 혈중 저밀도 지단백질(LDLs, low-density lipoproteins) 농도의 증가가 가장 중요한 발병요인으로 알려져 있다. 따라서 동맥경화의 방지 방안으로서 종전부터 콜레스테롤 흡수의 억제와 생합성의 저해를 통한 혈장 LDL량을 감소시키려는 시도가 진행되어왔으며, 아울러 생성된 LDL 또는 HDL내에 존재하는 lipid peroxide를 제거하려는 시도가 진행되고 있다.

최근의 연구 결과로 정상적인 LDL은 세포 내에서 콜레스테롤 생성을 조절하는 역할을 하지만 LDL이 일단 산화 변형되어 LDL 산화물(oxLDL)로 되면서 동맥경화 발병의 원인이 되고 동맥경화를 더욱 악화시키는 것으로 알려지고 있다. 고지방이나 고콜레스테롤의 섭취로부터 유래된 콜레스테롤은 LDLs로 전환되어 혈관세포에서 발생하는 활성산소종(ROSs, reactive oxygen species)에 의해 산화된다. 특히 초기에 LDL이 산화되는 동안 최소한으로 변형된 LDL(MM-LDL)은 내피에 침착해 MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1)과 M-CSF(macrophage colony-stimulation factor)의 분

비를 유도한다. 이어서 M-CSF가 조직 대식세포의 증식을 촉진시키고 대식세포는 MM-LDL을 더욱 산화시켜 oxLDL은 더 이상 LDL 수용체(receptor)에 의해 인식되지 않고, 그 대신 단구-대식세포(monocyte-macrophage)의 스캐빈저 수용체(scavenger receptor)에 포착되어 세포내의 콜레스테롤 함량을 조절하지 못하게 된다. 결국에는 대식세포 내에 콜레스테롤의 축적에 따른 거품세포(foam cell)의 형성으로 이어지며 다량의 ROSs를 생산, 배출함으로써 내피세포를 손상시키고 추가적인 대식세포와 T 임파구(lymphocytes)의 침윤을 초래한다. 한편 oxLDL은 단구에 대한 효과적인 화학 친화물질이며 대식세포의 이동을 강하게 억제시켜 동맥벽에 대식세포가 오래 머물도록 한다. oxLDL은 세포독성을 나타내어 내피의 기능 이상을 촉진하고 내피세포와 대식세포로부터 분비되는 성장조절물질(growth modulators)에 의해 평활근세포 증식이 일어나고, 세포외 기질 단백질(extracellular matrix proteins)의 분비로 지방반(fatty streak)과 죽상판(atheromatous plaques)이 형성되어 동맥경화를 촉진시킨다.

최근, 이러한 관점에서 동맥경화의 예방 및 치료를 위해 oxLDLs 생성요인의 제거에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Steinberg et al., *N. Engl. J. Med.*, 1989; 320, 915; Berliner et al., *Circulation*, 1995; 91, 2488; Wagner and Heinecke. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1997; 17, 3338; Kawashiri et al, *Curr. Atheroscler. Res.*, 2000; 2, 363).

LDL의 산화를 방지하기 위한 항산화제의 탐색 연구에서 천연물로부터 도래되는 여러 가지 항산화제의 보호 효과가 보고되었는데 대개는 폴리페놀 류의 항산화에 관해 주로 보고되어 왔으나 이러한 폴리페놀류의 산화촉진(prooxidant) 효과가 보고되면서 항산화제로서의 한계가 파악되었다. 게다가 이러한 LDL 산화는 주로 Cu^{2+} , Fe^{2+} , 알킬퍼옥사이드(alkylperoxide) 이나 HOCl에 의한 것으로 다양한 산화계에 의해 이루어지고 있다. 이를 위해 α -tocopherol, β -카로틴, ascorbic acid 및 여러 가지 천연 항산화제에 의한 LDL 산화의 방지 방안이 시도되어 왔으나. in vitro 실험에서 항산화제에 효과가 인정되나. 근본적으로 LDL 산화물의 생성을 감소시키지 못했다. 오히려 LDL 내 vitamin E의 함량 증가는 산화촉진(prooxidant) 작용과 관련된 아테롬발생성(atherogenicity)를 증대시킬 수 있다는 문제점이 제기되었다.

LDL 산화는 여러 가지 요인(ROS, peroxyntirite, HOCl, lipoxygenase 등)에 의해서 유발되며, 일단 산화가 개시되면 쉽게 LDL peroxidation이 진행되므로 산화를 초기에 방지하는 것이 중요하며 아울러 LDL 내에 이미 생성된 lipid peroxide의 제거 역시 중요하다. 별도로 LDL의 산화는 HDL의 존재 하에 크게 감소하므로 HDL 자체가 항산화능을 지닌 것으로 알려져 있으며, 따라서 HDL의 항산화능이 원활하게 유지되도록 HDL 내에 존재하는 lipid peroxide의 신속한 제거가 역시 중요하다 (Jerlich et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 2000; 1481, 109; Harats et al., *Arteriol. Thrombo. Vasc. Biol.*, 2000; 20, 2100; Ahmed et al., *J. Biol. Chem.* 2001; 276, 24473; Ahmed et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 290, 391.).

최근 연구 결과에 의하면 HDL의 항산화 기능은 HDL의 antiatherogenicity와 관계되는 것으로 보고되어 있으며 이러한 항산화 기능 유지에 apolipoprotein AI가 중요한 것으로 알려져 있다(Gaber et al., *J. Lipid Res.* 2001; 42, 545; Navab et al., *Circulation*. 2002; 105, 290). 최근에 일부 Apo AI-유사 펩타이드의 유사한 기능이 입증됨에 따라서 Apo AI-유사 펩타이드의 항동맥경화 예방용으로 활용이 대두되고 있으나 이들 peptide의 직접적인 항산화 기능은 미흡한 편이다 (Van Lenten et al., *Circulation*. 2004; 110, 3252; Navab et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25, 1325).

Antiatherogenicity와 관련된 HDL에 함유된 단백질로는 paraoxonase 1, lecithin cholesterol acyltransferase 및 platelet activating factor hydrolase 등이 알려져 있으며 이들은 lipid 산화물을 제거하는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(Durrington et al., *Arterioscl. Thrombo. Vasc. Biol.*, 2001; 21, 473; Jaouad et al., *Free Rad. Res.*, 2003; 37, 77; Marathe et al., *J. Biol. Chem.*, 2003; 278, 3937; Bargota et al., *Bio Med. Chem. Lett.*, 2003; 13, 1623; Koutush et al., *Arterioscler Thromb Vasc Bio.*, 2003), apolipoprotein AI은 phospholipid나 cholesterylester 등을 함께 용해시켜 HDL 기능강화에 매우 중요한 역할을 한다(Van Lenten et al., *Circulation*. 2004; 110, 3252; Navab et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Bio.* 2005; 25, 1325). 이러한 차원에서 apolipoprotein AI와 유사한 기능을 나타내는 peptide의 개발은 매우 중요한 것으로 이러한 peptide가 항산화 기능을 갖추게 되면, HDL 기능을 상승시킬 것으로 기대되나 이러한 연구가 시도된 바 없다.

최근에 항산화 단백질로 알려진 알부민(albumin)에 함유된 N-말단 서열 펩타이드인 Asp-Ala-His-Lys(서열번호 1) 등 펩타이드류에 의한 LDL 산화 방지에 대한 보고가 있었는데 (Bar-Or et al., *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 2001; 284, 856), 이러한 펩타이드류는 부작용이 적다는 장점이 있으며, Cu^{2+} 에 의한 LDL 산화의 보호에 관련한 구조 활성 관계에서, 펩타이드 구조 내 히스티딘 잔기의 위치가 N-말단에서 2번째 또는 3번째에 존재하는 펩타이드류가 Cu^{2+} 산화에 대한 방지효과가 큰 것으로 밝혀졌다. 그럼에도 불구하고 이러한 펩타이드류는 Cu^{2+} 에 의한 산화에 대한 보호효과는 뚜렷한 반면

에 alkylhydroperoxide, HOCl 등 다른 산화제에 대한 보호효과는 미흡하여 생체 내에서 생성되는 여러 가지 산화계를 효과적으로 차단하는 데에는 한계가 있다. 동맥경화증의 직접적 원인이 되는 LDL 산화에 관련된 주요 산화계로서는 Cu^{2+} 또는 Fe^{2+} 에 의해 생성되는 hydroxyl radicals 과 alkylperoxides 류 그리고 HOCl/HOONO에 의한 산화가 있으나 LDL 지질 내로 침투해서 여러 가지 산화계에 대해 공통적으로 보호작용을 나타내는 효과적인 지질 침투성 항산화 펩타이드의 개발은 보고된 바가 없다.

따라서 여러 산화계에 대해 보호 효과를 보이는 항산화성 Apo AI-유사 펩타이드는 독성이 적고 효능이 우수한 순환기계 질환 및 대사성 질환의 예방 및 치료제로 효과가 있을 것으로 기대되며 개발이 요구되어 진다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 전술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로 apolipoprotein AI의 구조로부터 도출된 기존 Apo AI-유사 펩타이드 구조에 생체 내에서 lipoprotein의 산화에 관련된 여러 가지 산화계에 대해 광범위 항산화 활성을 갖는 펩타이드 류를 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한 본 발명은 상기의 펩타이드류를 주요한 유효성분으로 함유하는 지단백질의 산화와 관련된 동맥경화 등 심혈관 장애 질환의 예방·치료제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성

전술한 바와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명은 His 잔기가 N-말단에서 2번 또는 3번 위치에 존재하고 Cys 잔기를 펩타이드의 중간 위치에 함유하는 것을 특징으로 하는 Apo AI-유사 펩타이드이다. 또한 본 발명은 N-말단의 7번째 또는 8번째에 Tyr 잔기를 함유하는 것을 특징으로 하는 Apo AI-유사 펩타이드이다.

이하 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

동맥경화증 질환의 직접적 원인이 되는 LDL 산화를 방지하는 항산화 펩타이드 구조를 도출하기 위해 기존 Apo AI-유사 펩타이드에 항산화 아미노산 잔기를 도입시켰다(표 1). 일반적으로 히스티딘은 항산화 아미노산으로 알려져 있으며 Cu^{2+} 이온에 의한 산화과정에서 Cu^{2+} 이온을 직접 chelation하여 항산화 효과를 나타내고, 아올러 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical) 제거능도 우수한 아미노산으로 보고되어 있다. 또한, 본 발명자는 paraoxonase 1 효소의 Cu^{2+} 이온 산화과정에서 (Su and Suk, *Free Radical Res.*, 2004; 45, 2211) 효소 단백질 내 히스티딘 잔기가 소실되는 것을 관찰하여(Su and Suk, *Free Radical Res.*, 2004; 37, 1319), 펩타이드의 구조 내에 있는 히스티딘(His) 잔기가 paraoxonase 1의 항산화성에 중요한 역할을 하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 시스테인(Cys) 잔기는 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical) 외에도 HOCl 이나 hydroperoxide 등 산화제의 제거에 관여하는 것으로 알려져 있다(Hawkins et al., *Amino acids* 2003; 25, 259; Pruts et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1996; 332, 110).

따라서 히스티딘(His) 잔기나 시스테인(Cys) 잔기를 Apo AI-유사 펩타이드에 도입시키면 항산화성이 우수하고, 아올러 인지질 침투형 펩타이드의 개발을 예상할 수 있었다. 이에 기존 Apo AI-유사 펩타이드와 비교 실험을 위해 일부 잔기를 변경한 Apo AI-유사 펩타이드 총 10가지의 구조를 도출하고 종래에 알려진 고상 합성법에 의하여 합성하였다.

상기 펩타이드의 아미노산 서열은 표 1에 기재하였으며 항산화 아미노산인 히스티딘(His) 잔기와 시스테인(Cys) 잔기의 서열 위치에 따라 분류하여 기호로 표기하였다. 이하 상세한 설명 및 실시예에서 언급되는 펩타이드명(A~L)은 표 1의 서열 및 특성을 가진다.

[표 1]

펩타이드	서열	분자량	서열번호
A	DWFKAFYDKVAEKFKKEAF	2269.6	서열번호 2
B	DHWFKAFYDKVAEKFKKEAF	2406.7	서열번호 3
C	DWFKAFYDKVCEKFKKEAF	2301.4	서열번호 4
D	DWFKAFYDKVAEKFKKEACHP	2535.6	서열번호 5
E	DWFKAFYDKVAEKFKKEAHKAL	2512.4	서열번호 6
F	DFHKAFYDKVAEKFKKEAF	2220.5	서열번호 7
G	DHFKAIFYDKVAEKFKKEAF	2220.5	서열번호 8
H	YFGKAFYDKVAEKFKKEAF	2286.6	서열번호 9
I	DHWFKAFYDKVCEKFKKEF	2439.2	서열번호 10
J	DHWFKAFYDKVCEKFKKEAF	2367.7	서열번호 11
K	DWHFKAFYDKVCEKFKKEF	2367.7	서열번호 12
L	DWFKFYDKVAEKFKKEAFCKAL	2685.1	서열번호 13

상기의 합성된 펩타이드에 대해 항산화 활성과 아울러 인지질 용해능을 갖는 펩타이드를 선별하고 검증하기 위해 실시예 2 내지 9에서와 같이 인지질 용해도 및 친화도 정도를 측정하였고 아울러 다양한 산화제(Cu^{2+} 이온, HOCl 및 hydroperoxide)에 대한 항산화 활성을 측정하였다.

우선 본 발명의 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, phosphatidylcholine의 용해능과 기존 Apo AI-유사 펩타이드(펩타이드 A)의 용해능을 측정 비교하였을 때(도 1), 펩타이드 C(11번 위치에 Cys 잔기 존재)와 펩타이드 B(2번 위치에 His 잔기 존재)은 dimyristoylphosphatidylcholine에 대한 신속한 용해능을 나타냈으며 기존 Apo AI-유사 펩타이드(펩타이드 A)보다 약간 나은 것으로 사료되었다. 또한 Cys 잔기와 His 잔기를 동시에 지닌 펩타이드 I, 펩타이드 J 및 펩타이드 K는 펩타이드 A에 비해 약간 약하나 최대 인지질 용해능은 유사한 것으로 관찰되어 유사성능으로 판단되었다. 반면에 펩타이드의 C-말단을 연장시킨 펩타이드 E 및 펩타이드 L의 경우는 인지질 용해능이 미약하였고 아울러 N-말단의 구조변형이나 Trp 잔기의 결손은 인지질 용해능의 감소를 초래하였다. 이와 같이 최대 지질 용해능을 비교 시 펩타이드 B, 펩타이드 C, 펩타이드 I, 펩타이드 J 및 펩타이드 K는 기존 Apo AI-유사 펩타이드(펩타이드 A)에 비해 거의 유사한 것으로 사료되었다.

이어서 상기의 합성된 펩타이드 구조 내 트립토판(Trp) 잔기의 형광 스펙트럼 변화에 대해 phosphatidylcholine liposome이 미치는 영향을 분석하였다(도 2 및 표 2). Trp 함유 amphipathic 펩타이드는 지질(lipid) 내로 삽입 시 Trp 형광이 증대되는 것으로 알려져 있다. 펩타이드 A($5\ \mu\text{M}$)는 phatidylcholine의 농도 증가 [번호 3($25\ \mu\text{M}$), 번호 4($50\ \mu\text{M}$), 번호 5($100\ \mu\text{M}$)]에 따른 Trp 형광의 증대를 보여 주었다.

한편 콜레스테롤($100\ \mu\text{M}$)의 존재 하에서는 이러한 현상이 방해되었다. 콜레스테롤 $50\ \mu\text{M}$ 과 DMPC(dimyristoyl phosphatidylcholine) $50\ \mu\text{M}$ 이 1:1로 함유된 번호 2는 DMPC $50\ \mu\text{M}$ 이 함유된 번호 4, DMPC $100\ \mu\text{M}$ 이 함유된 번호 5와 비교하여 Trp 형광이 현저하게 감소된 것을 알 수 있었다.

마찬가지로 N-말단의 2번째 위치에 His 잔기가 함유된 펩타이드 I도 펩타이드 A(Apo AI-유사 펩타이드)와 유사한 현상이 관찰되었다. 이와 같이 펩타이드 I는 phosphatidylcholine liposome에 선택적으로 삽입되는 것으로 사료되었다. 이러한 결과를 기초로 다른 펩타이드의 실험결과를 분석 시 표 2에서와 같이 펩타이드 A, B, C, I, J 및 K는 phosphatidylcholine 존재 하에 방사 파장이 크게 감소하였고 아울러 형광강도가 크게 증가되었으며 이러한 형광은 펩타이드 A와 마찬가지로 콜레스테롤 존재 하에 감소하였다. 이러한 결과는 이들 펩타이드의 인지질 용해능 결과(도 1)와 일치하였다. 한편 인지질 용해능이 낮은 펩타이드 E는 형광스펙트럼 분석결과 인지질과의 친화성이 약한 것으로 사료되었고 펩타이드 D는 콜레스테롤의 영향에 둔감하였다(표 2).

이어서 상기의 합성된 펩타이드에 대해 항산화 활성을 갖는 펩타이드를 선별하고 검증하기 위하여 실시예 5 내지 실시예 8에 보여주듯이 다양한 산화제, 즉 Cu^{2+} , hydroperoxide 또는 HOCl 에 대한 항산화 활성을 측정하였다.

펩타이드를 무작위로 선택하여 구리(copper) 이온 ($5\ \mu\text{M}$)에 의해 유도된 LDL의 산화에 대한 상기 펩타이드의 항산화성을 측정한 결과, 펩타이드 B, F, D, H, I, J 및 K는 구리(copper) 이온과 1:1의 비율로 결합 시 90% 이상의 항산화 효과를

표시하였다(도 3). 그러한 His 잔기가 C-말단 가까이 있는 경우 항산화 효과는 미약하였다. 그리고 His 잔기가 함유되지 않은 펩타이드(F, G, H)는 Cu^{2+} 산화에 대해 항산화 활성을 거의 나타내지 않았다. 이로써 His 잔기가 펩타이드의 항산화성, 특히 Cu^{2+} 산화에 대한 항산화성에 중요한 역할을 함을 알 수 있다. 한편 펩타이드 C(Cys 잔기 함유)의 경우 His 함유 펩타이드보다 항산화성이 약하였으나 펩타이드 A 보다 더 효과적이었다. 더욱이 His 잔기와 Cys 잔기를 동시에 함유 시에 항산화 효과는 더 우수함을 알 수 있었다.

이와 관련 간 펩타이드의 구리(copper) 이온 결합력을 실시예 6에서와 같이 평가한 결과, N-말단 2번 또는 3번 위치에 His 잔기만을 함유한 펩타이드 F, G 및 H는 1:0.5 와 1:1의 몰 농도 비율 (copper 이온:펩타이드)에서 13 % 와 100 % 의 구리(copper) 이온 결합력을 표시한 반면에, Cys 잔기와 His 잔기를 동시에 함유한 펩타이드 I, J 및 K는 1:0.5 와 1:1의 몰 농도 비율에서 35%와 100% 의 구리(copper) 이온 결합력을 표시함으로써 항산화에서 Cys 잔기의 보조역할을 파악할 수 있었다(도 4).

이어서 주요 산화제의 일종인 HOCl에 의한 acetylcholinesterase의 불활성화에 대해 각 펩타이드가 HOCl을 제거함에서 나타내는 보호효과를 분석하였을 때 각 펩타이드는 1:1(펩타이드:HOCl)의 몰 농도 비율에서 뚜렷한 항산화 보호효과(>46%)를 보였다. 특히 Cys 잔기를 함유한 펩타이드 C, D 및 L은 80% 이상 또는 유사한 보호효과를 표시하였으나, Cys 잔기를 말단에 지닌 펩타이드 D 및 L은 비교적 미흡하였다. 또한 Cys 잔기와 His 잔기를 동시에 지닌 펩타이드 I, J 및 K는 우수한 항산화 효과(>90%)를 나타냈다. 이러한 결과는 신규 펩타이드들이 기존 보고된 펩타이드 A보다 우수함을 나타내는 것이다(표 3).

아울러 지단백질(lipoprotein)의 산화에 관련된 lipid peroxide에 대한 항산화를 평가하기 위해 각 펩타이드의 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid에 대한 제거능을 평가하였을 때(표 4), 각 펩타이드는 부분적인 peroxide 제거능을 보여주었는데 특히 Cys 잔기함유 펩타이드인 펩타이드 C, I, J, K 및 L은 뚜렷한 항산화 보호효과(20~24%)를 보였으나 다른 펩타이드의 peroxide 제거능은 미미하였다. 이 결과 역시 Cys 잔기를 지닌 펩타이드가 기존 펩타이드 A 보다 더 우수함을 보여주는 것이다(표 4).

끝으로 phosphatidylserine 에 의해 저해된 paraoxonase 1 활성의 펩타이드에 의한 회복능을 평가하였을 때(표 5), 펩타이드 A는 89%의 회복능을 보여 줌으로서 phosphatidylserine의 용해 제거능이 우수함을 알 수 있었으며, 펩타이드 B나 펩타이드 C도 역시 유사한 회복능을 보여주었다. 아울러 His 잔기와 Cys 잔기를 동시에 지닌 펩타이드 I, J 및 K도 유사한 기능을 발휘함으로써 이들 펩타이드 회복능은 phosphatidylcholine의 용해능과 유사한 것으로 파악되는바 본 연구에서 소개된 펩타이드 B, C, I, J 및 K는 기존 Apo AI-유사 펩타이드인 펩타이드 A와 비교 시 phosphatidylserine 저해성을 회복시키는 능력이 동등함을 알 수 있었다(표 5).

상기의 결과에서 1) 구리 이온 산화에 대해 항산화성이 우수한 펩타이드는 His 잔기가 N-말단에서 2번째 또는 3번째 위치에 존재하는 경우 (펩타이드 B, I, J, K); 2) HOCl이나 peroxide에 대해 항산화성이 우수한 경우는 구조 중간에 Cys 잔기를 함유한 펩타이드 (펩타이드 C, I, J, K); 3) 광범위하게 항산화성이 우수한 펩타이드의 공통적인 특징으로는 His 잔기가 N-말단에서 2번째 또는 3번째 위치에 존재하여 Cys 잔기를 구조 중간에 지닌 펩타이드 (펩타이드 I, J, K)임을 알 수 있었다. 상기 항산화성 Apo AI-유사 펩타이드들은 펩타이드를 구성하는 아미노산의 개수가 18개 이상인 것이 바람직하다.

실시예에서는 상기 펩타이드들을 자연계에 존재하는 L-form의 아미노산을 사용하여 제조하였으나, 펩타이드들 구성하는 아미노산의 일부가 D-form이어도 무방하며, L-form에 한정되는 것은 아니다.

상기의 펩타이드는 동맥경화와 같은 심혈관계 질환, 대사성 질환, 노화 등의 산화 스트레스에 의한 질환의 예방·치료에 이용될 수 있다. 본 발명의 펩타이드가 치료용 약제 및 식품으로 이용되기 위해서는 약제학적 및 식품학적 분야에서 공지의 방법에 의해 제조될 수 있으며, 그 자체 또는 약학적 또는 식품학적으로 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 또한, 이들을 경구 또는 비경구로 투여용 제제와 같은 단위투여형 또는 수회투여형 제제로 제형화하여 항산화 효과를 갖는 예방·치료제로 사용할 수 있다.

이때 적용량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 물활성화율 및 배설속도, 환자의 연령, 제충, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증정도 등에 따라 적절히 조절하여 사용할 수 있음은 당업자에게는 당연한 것이다.

이하 실시예를 통하여 본 발명을 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 예시적인 목적일 뿐 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1 : 항산화 펩타이드의 제조

보고된 고상 합성법에 의해 N-말단 보호기에 의해 Fmoc-/Boc- 법에 의해 탈수축합에 의한 산아미드 결합과 선택적인 탈 보호반응을 극대화시키는 최적 합성방법을 사용하여 표 1에 기재된 10종의 펩타이드 시료를 합성하였다(Molly A. Bower 등 *Letters In Peptide Science*, 2003, 10, 463; Holger Wenschuh 등, *Biopolymers*(Peptide Science), 2000, 55, 188). 합성된 시료는 LC/MS에 의해 분자량과 구조를 확인하였다(데이터 생략). 펩타이드를 증류수 또는 중수소탄산 완충액(pH 10.5)에 용해한 후 필요한 농도에 맞추어 첨가하여 다음의 실시예에서 사용하였다.

실시예 2 : 펩타이드의 phosphatidylcholine liposome에 대한 용해능 분석

본 발명의 펩타이드의 phosphatidylcholine liposome에 대한 용해능을 경시별로 알아보기 위해 상기 펩타이드에 의한 phosphatidylcholine liposome의 현탁도(turbidity)의 감소효과를 용해능으로 환산 평가하였다(Datta 등, *J. Lipid Res.*, 2001, 42, 1096-1104). 구체적으로, phosphatidylcholine liposome을 클로로포름(chloroform)에 녹이고 감압건조 시킨 후 이어서 완충액(0.1 M 인산완충액(PBS buffer), pH 7.0 + 1 mM Ca^{2+})을 첨가한 후 격렬한 초음파 (sonication) 하에 미세 리포솜(liposome)을 제조한다. 이어서 초음파 법으로 제조된 DMPC liposome(200 μM)을 0.5 mL의 10 mM PBS 완충액(pH 7.4)에 넣은 후 각 펩타이드 (최종농도, 50 μM)를 넣고서 325 nm에서 흡광도를 20분 동안 경시적으로 측정하여 도 1에 나타내었다.

도 1에서 펩타이드 A, B, C, I, J 및 K는 시간 경과에 따라 파장이 크게 감소하여 이들 펩타이드들은 인지질 용해능이 우수한 반면, 펩타이드 H, F는 인지질 용해능이 매우 낮은 것으로 나타났다.

실시예 3 : phosphatidylcholine의 존재하에 펩타이드 A 및 펩타이드 I의 Trp 형광 스펙트럼의 변화분석

이어서 상기의 합성된 펩타이드 구조 내 Trp 잔기의 형광 스펙트럼 변화에 대한 phosphatidylchoine liposome의 영향을 분석하기 위해 10 mM PBS 완충액에서 각 펩타이드를 용해시키고 이어서 DMPC liposome을 여러 가지 농도(최종 농도, 25~100 μM)로 넣은 후에 Trp 형광 곡선의 변화를 Perkin-Elmer 550-55 장비(5 nm excitation & 2.5 nm emission slit width)를 사용 분석하였다. 이때에 excitation 파장은 280 nm에서 그리고 emission 파장은 300~400 nm로 변화시켰다 (Epand R. M. 등 *Biochemistry*, 2004, 43, 5073~5083).

아울러 phosphatidylchoine:콜레스테롤(1:1) 혼합물과 반응 시 각 펩타이드의 Trp 형광에 미치는 영향을 분석하였다(도 2).

실시예 4 : 리포솜(liposome)과 반응한 펩타이드 내 Trp 잔기의 형광스펙트럼 분석

상기에서와 같이(실시예 3) 펩타이드 구조 내 Trp 잔기의 형광 스펙트럼 변화에 대한 phosphatidylcholine liposome의 영향을 분석하였으며 이때에 DMPC liposome의 영향을 구체적으로 분석하기 위해 DMPC liposome 존재 하에 방출(emission) 파장의 변화를 관찰 분석하여 각 펩타이드의 최대형광 방출(emission) 파장(λ_{max}), 형광강도(I_{max}), 형광상승 %로 각각 표시하였다. 아울러 콜레스테롤을 첨가 DMPC:cholesterol(1:1)의 조건에서 파장 변화 및 형광강도의 증가를 분석하였다(표 2).

[표 2]

Dimyristoylphosphatidylcholine(DMPC) 또는 DMPC:Cholesterol (Ch)혼합물의 존재 하에 각 펩타이드의 Trp 형광 스펙트럼의 변화

펩타이드	최대흡수파장(λ_{max})			최대형광강도(I_{max})			* I_{max} 증가율 (%)
	PBS완충액	+DMPC	+DMPC:Ch	PBS완충액	+DMPC	+DMPC:Ch	
A	360	351	359	105.8	161.0	110.4	52.1
B	358	349	357	101.3	167.5	122.9	65.7
C	359	350	357	102.1	171.9	115.1	68.3
D	357	352	353	70.1	114.1	79.79	62.7
E	356	355	357	85.2	93.9	91.83	10.2
I	359	347	358	106.2	174.5	107.9	61.0
J	359	350	357	84.2	136.8	87.6	61.5
K	359	348	358	108.6	173.4	112.5	59.7

* I_{max} 증가율(%)는 PBS 완충액에서의 I_{max} 값에 비해 DMPC 추가 시 증가율로 표시함

실시예 5 : Cu^{2+} 에 의한 LDL의 산화에 대한 Apo AI-유사 항산화 펩타이드의 항산화 효과

사람의 혈액으로부터 기준방법(Aviram M et al., *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 26, 892)에 의해 분리한 LDL (50 mg protein 함량)을 0.5 mM ascorbate와 1 mM H_2O_2 를 함유한 PBS (phosphate buffered saline) 완충액 50 mL에 넣고서 $CuCl_2$ 의 농도가 20 μM 이 되도록 첨가하여 반응용액(reaction solution)을 제조하였다. 상기 반응 용액 각 1 mL에 실시예 1에서 제조한 펩타이드의 농도가 5, 10, 20, 40 μM 이 되도록 추가하여 각각의 펩타이드 용액을 제조한 후에 3시간 동안 38°C에서 산화시킨 후에 상기 혼합액에 8.1% SDS 1 mL, 20% 아세트산 2 mL 및 0.75% 티오바비투릭산(TBA, thiobarbituric acid) 1 mL를 첨가하였다. 상기 혼합물을 15분간 가열하여 끓인 뒤 30분 동안 얼음에 놓아 둔 후 14,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상기 상층액에 상기 혼합액과 동일 부피의 15% 트리클로로아세트산(TCA, trichloroacetic acid) 및 0.75% TBA를 첨가하였다.

상기 반응 혼합액을 15분 동안 끓인 후 얼음에 5분 동안 놓아두고 3,000rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 원심분리로 얻어진 상층액의 533nm에서의 흡광도를 UV/VIS 스펙트로미터를 이용하여 측정하였다(Bidlack, W. T., and Tappel, A. L., *Lipids*, 1973, 8, 177-182). 1,1,3,3-테트라에톡시프로판(1,1,3,3-tetraethoxypropane)의 가수분해에 의해 생성되는 말론디알데히드(malonedialdehyde)를 이용해 Gutteridge, J.M.C.의 방법(*Analytical Biochemistry*, 1975, 69, 518-526)에 따라 보정하였다.

지질 과산화의 억제 정도는 펩타이드 수 가지 농도로 처리했을 때의 지질 과산화 억제 정도를 나타낸 곡선으로부터 % 저해 효과를 나타내었다. 항산화 활성은 하기 수학적 1에 나타난 바와 같이 대조군(펩타이드를 첨가하지 않은 것)에 대한 TBA 반응성 기질(TBARS, thiobarbituric acid reactive substrate)의 % 감소 정도로 나타내서 도 3에 나타내었다.

<수학적 1>

$$\text{항산화활성(\%)} = \left[1 - \frac{A_{\text{샘플군}} - A_{\text{비교군1}}}{A_{\text{비교군2}} - A_{\text{대조군}}} \right] \times 100$$

상기에서 $A_{\text{샘플군}}$: LDL/펩타이드/ Cu^{2+} 혼합액에 의한 흡광도,

$A_{\text{비교군1}}$: LDL 및 펩타이드 혼합액에 의한 흡광도,

$A_{\text{비교군2}}$: LDL 및 Cu^{2+} 혼합액에 의한 흡광도,

A 대조군 : LDL 자체에 의한 흡광도.

도 3에 표기한 바와 같이, 각 펩타이드(B, F, G, H, I, J 및 K)들은 모두 뚜렷한 항산화 효과를 보여주었으며, 대체로 활성이 큰 펩타이드의 유효 농도값은 대개 10 μM 이하로 나타났으며 이와 같은 결과는 일단 CuCl_2 가 결합 시 각 펩타이드에 단단히 결합됨을 의미한다.

실시예 6 : diphenylhydrazide Cu^{2+} 착물 분석에 의거 Apo AI-유사 항산화 펩타이드의 Cu^{2+} 에 대한 결합능력 분석

본 발명의 펩타이드의 항산화 활성이 Cu^{2+} 결합력과 상관되는지를 알아보기 위해 상기 실시예 1에 기술된 각 펩타이드가 Cu^{2+} 와 diphenylhydrazide 간의 결합에 대해 나타내는 효과를 분석, Cu^{2+} 결합력으로 표시하였다 (도 4).

즉, 2 μM Cu^{2+} 를 함유하는 10 mM PBS 완충액(pH 7.4)에 여러 가지 농도 (최종농도, 2~16 μM)로 펩타이드를 가하고 10 분간 반응시켰다. 이어서 반응액에 0.5 mM의 diphenylhydrazide (DPCH)를 가한 후에 DPCH- Cu^{2+} 착물에 의한 495 nm에서의 흡광도를 측정하였고 아울러 각 펩타이드(최종농도, 0.4~8 μM)의 존재 하에서의 흡광도를 측정하여 도 4에 펩타이드의 항산화 활성으로 표시하였다.

실시예 7 : HOCl에 의한 acetylcholinesterase의 불활성화에 대한 각 펩타이드

본 발명의 펩타이드가 항산화 활성을 가지는지 알아보기 위해 펩타이드의 etylcholinesterase의 HOCl에 의한 산화적 불활성화에 대한 항산화평가 실험(in vitro)을 수행하였다(표 3).

구체적으로, etylcholinesterase(0.025 unit/mL)를 0.1mL PBS 완충액(pH 7.4)에 넣고서 HOCl (최종농도, 0.01 mM)을 첨가한 후에 표 1에 기재된 각 펩타이드를 10 μM 농도로 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 산화시킨 후 20 μL 를 취하여 etylcholinesterase의 잔류 활성도를 측정하였다.

etylcholinesterase의 활성도는 0.1M 인산 완충액 (pH7.4)에 acetylthiocholine (1 mM)과 DTNB (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) 시약 (최종 0.1 mM)을 넣은 후에 412 nm에서의 흡광도 증가로 측정하였고 보호 활성을 수학식 2에 의거 산출 후 표 3에 나타냈다.

<수학식 2>

$$\text{보호활성(\%)} = \frac{A_{\text{대조군}} - A_{\text{비교군1}}}{A_{\text{대조군}} - A_{\text{비교군2}}} \times 100$$

상기에서

A 대조군 : etylcholinesterase의 활성도,

A 비교군1 : HOCl과 펩타이드 존재하의 etylcholinesterase의 활성도,

A 비교군2 : HOCl 존재 하의 etylcholinesterase의 활성도.

[표 3]

HOCI에 의한 아세틸콜린에스터라제의 불활성화에 대한 항산화 펩타이드의 보호효과

펩타이드	보호활성(%)	펩타이드	보호활성(%)
A	50.9±3.7	G	78.7±6.4
B	46.2±4.8	H	91.6±5.2
C	88.7±3.0	I	97.4±2.7
D	79.6±7.5	J	94.2±6.3
E	87.5±2.4	K	96.9±8.4
F	77.6±1.8	L	80.1±1.9

실시예 8 : 각 펩타이드의 13-hydroperoxyoctadienoic acid에 대한 제거능 분석

상기 실시예 2에 따라서 펩타이드를 13-hydroperoxyoctadienoic acid 리폭소와 반응시킨 후에 펩타이드 (최종 농도, 250 μM)에 의한 13-hydroperoxyoctadienoic acid의 양적 감소를 평가하였다(in vitro).

먼저, 50 μM 13-hydroperoxyoctadienoic acid (linoleic acid를 콩 리폭시게나아제(soybean lipoxygenase)로 처리하여 얻을 수 있다) 함유 0.1 mM PBS 완충액 0.1 mL에 각 펩타이드 (최종 농도 250 μM)를 가하고 30℃에서 1.5시간 방치한 다음 FOX II 분석(Simon, P. W. Methods Enzymol. 1994, 233, 183-189)에 의거 감소된 퍼옥사이드의 양을 측정하고 감소량 %로 표시하였다(표 4).

[표 4]

13-hydroperoxyoctadienoic acid 에 대한 각 Apo AI-유사 펩타이드의 환원 효과

펩타이드	보호활성(%)	펩타이드	보호활성(%)
A	5.1±2.1	G	< 5
B	12.7±2.3	H	< 5
C	23.8±2.8	I	22.3±3.4
D	*	J	21.4±4.1
E	*	K	23.6±3.2
F	< 5	L	23.5±3.5

* not tested

실시예 9 : DPPS-매개 paraoxonase 1의 불활성화에 대한 각 펩타이드의 보호작용

0.1mL의 PBS 완충액(pH 7.0)내에서 paraoxonase 1(5 units/mL)을 DPPS 200μM과 함께 각 펩타이드의 존재 하에 30 분간 반응시킨 후에 일부 (20μL)를 취하여 잔존 arylesterase 활성을 측정하고 각 펩타이드의 재활성능을 수학적 3에 의거 평가하였다. 각 실험은 3회 반복하였고 그 결과를 평균 S.E.M으로 표 5에 나타냈다.

<수학적 3>

$$\text{보호활성(\%)} = \frac{A_{\text{대조군}} - A_{\text{비교군1}}}{A_{\text{대조군}} - A_{\text{비교군2}}} \times 100$$

상기에서

- A 대조군 : paraoxonase 1의 활성도,
- A 비교군1 : DPPS와 펩타이드 존재 하의 paraoxonase 1의 활성도,
- A 비교군2 : DPPS 존재 하의 paraoxonase 1의 활성도.

【표 5】
phosphatidylserine에 의한 paraoxonase 1 활성 저해에 대한 각 펩타이드의
보호효과

펩타이드	보호활성(%)	펩타이드	보호활성(%)
A	89.5±5.2	G	< 5
B	86.3±2.3	H	6.2±4.4
C	93.2±4.5	I	91.9±4.3
D	44.3±4.0	J	91.7±5.9
E	11.4±3.8	K	86.8±1.7
F	< 5	L	23.3±3.6

이와 같이, 본 발명의 펩타이드 항산화제는 항산화 효과가 있음을 알 수 있었다.

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 펩타이드류(펩타이드 I, J, K)는 인지질(phospholipid)의 침투능과 용해능을 동시에 갖고 있으며, 아올러 구리 이온, 퍼옥사이드 및 HOCl에 대한 항산화 활성이 우수하여, 지단백질(lipoprotein)의 산화에 대한 억제능이 뛰어나 산화적 스트레스에 의해 유도되는 심혈관질환을 예방 또는 치료하는데 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

이하 본 발명의 펩타이드를 이용하여 예방 또는 치료할 수 있는 구체적인 질환에 대해 설명한다.

<적용예 1> 동맥경화증(Atherosclerosis)

동맥경화증은 혈중 cholesterol의 증가가 특징이나 그 주요원인은 LDL 산화로 알려져 있다. 이와 관련하여 혈관 내 플라그 형성은 과도한 양의 활성산소에 의한 LDL 지질 과산화(lipid peroxidation), HDL 단백질의 HOCl 산화 등에 따라 증가한다고 알려져 있다(Smith et al., *Trends. Neurosci.*, 1995, 18, 172-176; Smith et al., *Mol. Chem., Neuropathol.*, 1996, 28, 41-48; Smith et al., *Proc. Matl Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, 94, 9866-9868; Montie et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1996, 55, 201-202). 따라서, lipoprotein 지질 과산화 억제 활성 및 HDL 항산화 관련 단백질의 산화적 손상에 대해 보호활성이 우수한 본 발명의 펩타이드는 심혈관 질환을 예방 및 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

<적용예 2> 대사성 질환(Metabolic Diseases)

대사성 질환은 당뇨병, 고지질증 등의 다양한 증상들을 나타내는 퇴행성 질환이다. 이러한 대사성 질환의 주요 원인으로 산화적 독성이 제시되어 있는데 주로 지질 과산화, DNA산화, 단백질 카보닐(protein carbonyl) 및 나이트로타이로신(nitrotyrosine)의 증가가 흑질에서 발견된다(Bowling, A.C and Beal, M.F., *Life Sci.*, 1995, 56(14), 1151-1171). 따라서, 지질 과산화 억제 활성 등 항산화 관련 활성이 우수한 본 발명의 펩타이드는 대사성 질환을 예방 및 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 효과

이상과 같이 본 발명에 의해 LDL 산화에 대한 항산화효과가 뛰어나 산화적 스트레스에 의해 유발되는 심혈관계 질환, 대사성 질환 및 기타 노화 등을 예방 및 치료하는데 유용하게 사용될 수 있는 Apo AI-유사 펩타이드의 제공이 가능하게 된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 의한 펩타이드의 인지질 용해능을 분석한 그래프이다.

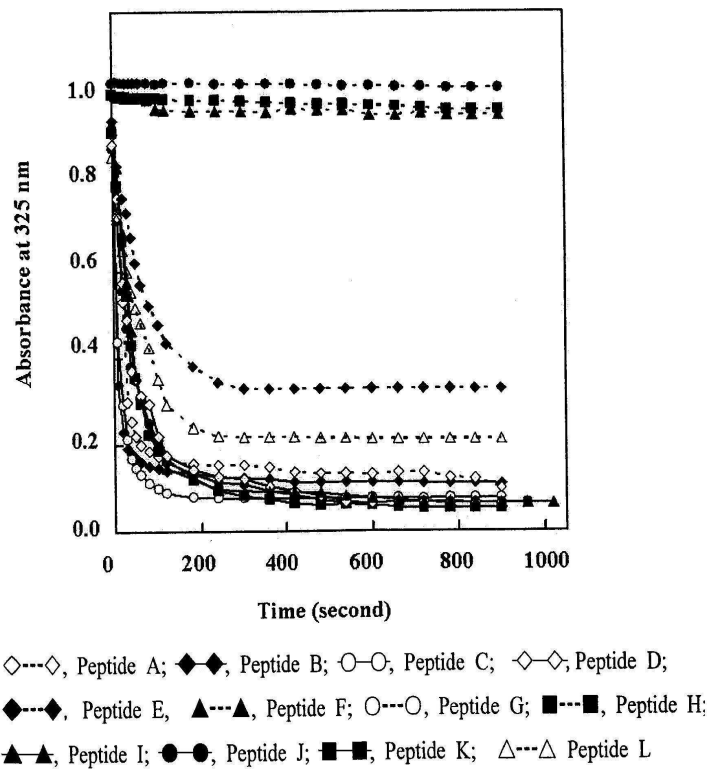
도 2는 펩타이드의 phosphatidylcholine 농도변화에 따른 Trp 형광 변화를 나타낸 그래프이다.

도 3은 Cu^{2+} 에 의해 유도되는 LDL 산화에 대한 본 발명에 의한 펩타이드의 보호효과를 나타낸 그래프이다.

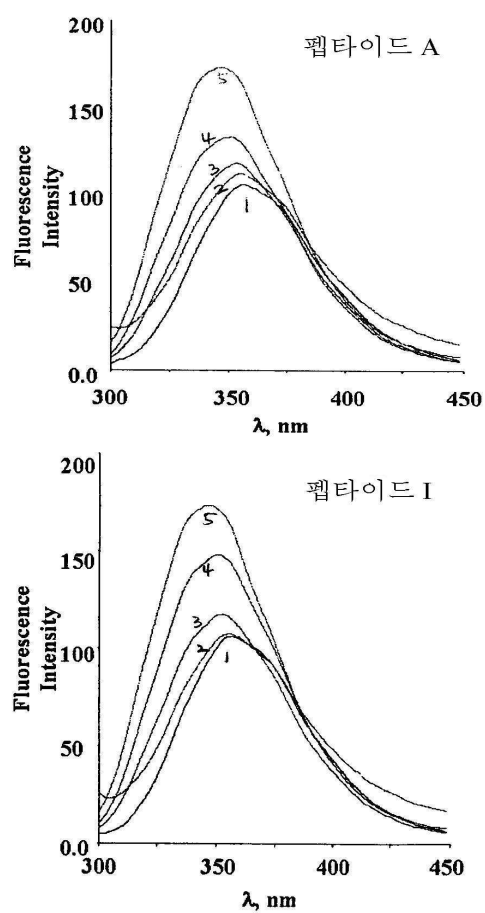
도 4는 diphenylhydrazide: Cu^{2+} 착물 분석에 의해 본 발명에 의한 펩타이드의 Cu^{2+} 에 대한 결합력을 나타낸 그래프이다.

도면

도면1

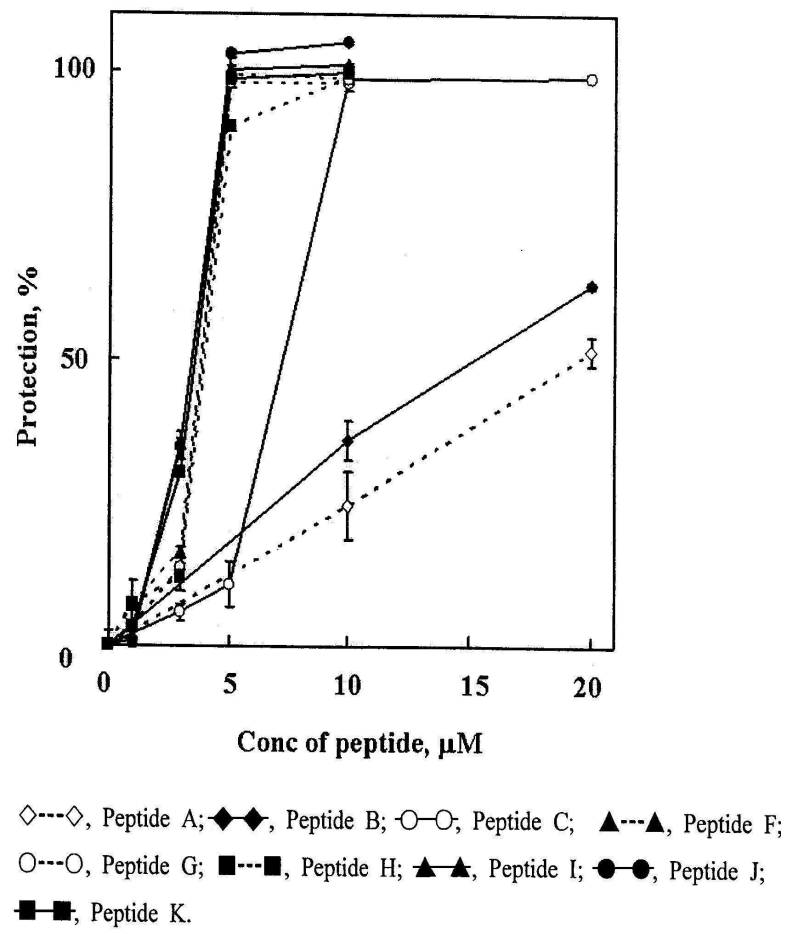


도면2

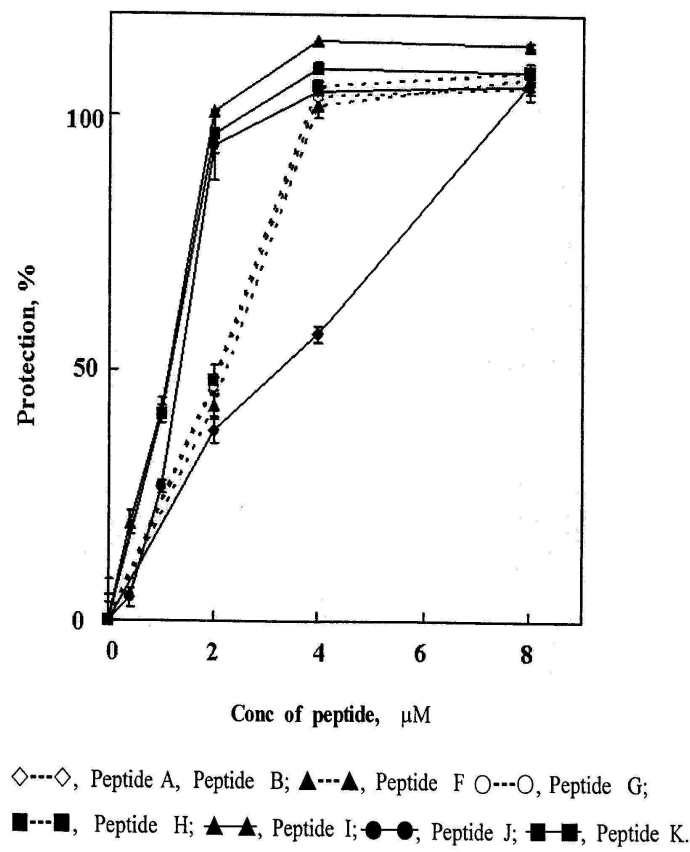


- 1, peptide (5 μ M) only;
- 2, peptide (5 μ M) + 1:1 DMPC: Cholesterol (100 μ M)
- 3, peptide (5 μ M) + DMPC (25 μ M)
- 4, peptide (5 μ M)+ DMPC (50 μ M)
- 5, peptide (5 μ M) + DMPC (100 μ M)

도면3



도면4



서열목록

서열목록 전자파일 첨부