(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0035701
(43) 공개일자 2025년03월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/1767 (2013.01)
A61P 9/10 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-0118031
(22) 출원일자 2023년09월06일
심사청구일자 2023년09월06일

(71) 출원인
국립부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)
(72) 발명자
제재영
부산광역시 남구 신선로 566, 304동 401호
(74) 대리인
김성현

전체 청구항 수 : 총 7 항

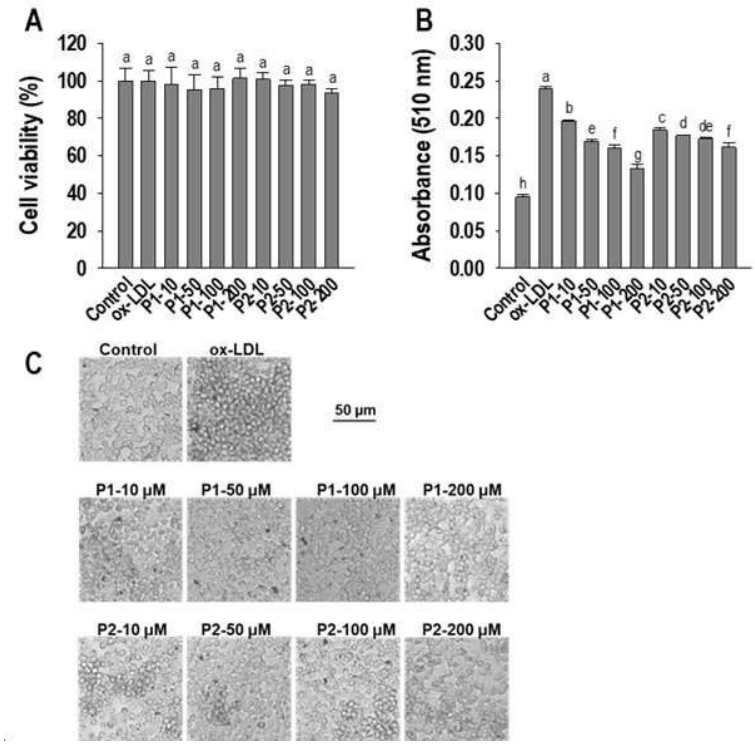
(54) 발명의 명칭 **거품세포 형성 억제 및 항염증 활성 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 죽상동맥경화증 억제용 조성물 및 억제방법**

(57) 요 약

본 발명은 서열번호 1(PIISVYWK) 또는 서열번호 2(FSVVPSPK)의 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 하여 죽상동맥경화증의 발달단계 중 거품세포의 형성을 감소시키고, 거품세포로 유입되는 콜레스테롤를 억제 및 외부 유출을 촉진하여 세포 내 콜레스테롤 수치를 개선하며 콜레스테롤 유입 및 유출에 관여하는 단백질의 발현을 조

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



절할 뿐만 아니라 염증 반응을 억제함으로써 죽상동맥경화증의 개선 및 예방할 수 있는 조성물을 제공한다.

본 발명은 홍합 단백질로부터 확인된 항비만 펩타이드인 서열번호 1(PIISVYWK) 또는 서열번호 2(FSVVPSPK)가 산화된 저밀도지단백질(oxidized LDL, oxLDL) 처리된 RAW264.7 대식세포의 거품세포 형성 억제 효과를 나타낸다. 서열번호 1(PIISVYWK) 또는 서열번호 2(FSVVPSPK) 펩타이드는 거품세포 형성을 억제하고 콜레스테롤 대사를 조절하여 세포 내 콜레스테롤 수치를 개선 시킨다. 또한 서열번호 1(PIISVYWK) 또는 서열번호 2(FSVVPSPK) 펩타이드는 콜레스테롤 유입 억제 및 유출 촉진에 관여하는 단백질 발현을 조절하여 죽상동맥경화증 개선 및 예방 효능을 나타낼 수 있으며 제약 및 식품 관련 산업에서 사용될 수 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345365259
과제번호	2021R1I1A3047702
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	수산생물 기능성 펩타이드의 oxLDL에 의한 동맥경화 발생 억제 효능 및 펩타이드 전달체 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부경대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

콜레스테롤 대사에서 서열번호 1(PIISVYWK) 또는 서열번호 2(FSVVPSPK)의 펩타이드 서열을 유효성분으로 포함하는 죽상동맥경화증 예방 및 개선용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 펩타이드 서열은 PPAR-γ 신호 전달 경로를 활성화하는 것을 특징으로 하는 죽상동맥경화증 예방 및 개선용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 펩타이드 서열은 NF-κB 신호 전달 경로를 억제하여 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokines) 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 죽상동맥경화증 예방 및 개선용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 PPAR-γ 신호전달의 활성은 대식세포에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 죽상동맥경화증 예방 및 개선용 약학적 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 활성화된 PPAR-γ는 ABCA-1 또는 ABGC-1을 발현시키는 것을 특징으로 하는 죽상동맥경화증 예방 및 개선용 약학적 조성물.

청구항 6

대식세포의 거품세포 형성과정에서 홍합 단백질 유래 서열번호 1(LLRLTDL) 또는 서열번호 2(GYALPCDCL)의 펩타이드 서열을 처리하여 PPAR-γ 신호 전달 경로를 활성화하고,

상기 PPAR-γ신호 전달 경로는 콜레스테롤의 유입을 감소시키거나 콜레스테롤의 유출을 증가시키는 것을 특징으로 하는 죽상동맥경화증 억제법.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 콜레스테롤 유출 단백질은 ABCA-1 또는 ABCG-1인 것을 특징으로 하는 죽상동맥경화증 억제법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 거품세포 형성 억제 및 항염증 활성 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 죽상동맥경화증 억제용 조성물 및 억제방법에 관한 것으로서, 상세하게는 서열번호 1(PIISVYWK) 또는 서열번호 2(FSVVPSPK)의 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 하여 죽상동맥경화증의 발달단계 중 거품세포의 형성을 감소시키고, 거품세포로 유입되는 콜레스테롤을 억제 및 외부 유출을 촉진하여 세포 내 콜레스테롤 수치를 개선하며 콜레스테롤 유입 및 유출에 관여하는 단백질의 발현을 조절할 뿐만 아니라 거품세포 형성 과정에서 발생하는 염증 반응을 억제하여 죽상동맥경화증을 개선 및 예방할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 죽상동맥경화증은 만성 염증성 질환으로 혈관벽에 지질이 축적되어 점차 혈관을 막아 동맥경화증을 일으키는 증상으로, 지질(콜레스테롤)이 혈관벽에 축적되어 죽종을 형성하면서 시작된다. 죽상동맥경화증은 심혈관질환의 주요한 원인으로 세계적으로 가장 흔한 사망 원인이며, 국내에서도 사망 원인 2~3위를 차지할 정도로 위험한 질환이다.

[0003] 세포 차원에서 죽상동맥경화증을 발생시키는 세포의 종류는 다양하다. 그 중, 대식세포는 죽상동맥경화증을 유도하는 산화된 저밀도지단백질(ox-LDL)의 포식작용을 담당하는 세포이다. ox-LDL이 대식세포에 포식되면, 지질(콜레스테롤 포함)이 대식세포 내 축적되어 거품세포를 형성하면서 죽상동맥경화증을 일으킨다. 따라서, 죽상동맥경화증의 일차적 예방 차원으로써, 거품세포 내 축적된 지질(콜레스테롤 포함)을 제거하거나 거품세포 형성을 억제하는 것이 매우 중요하다.

[0004] 한편, 죽상동맥경화증을 유발하는 LDL(low density lipoprotein)은 산화되면서 세포독성을 유도하는 다양한 옥시스테롤(oxysterol)을 형성한다. 따라서, 거품세포 형성의 억제는 죽상동맥경화증의 개선 또는 치료를 위한 중요한 요소이다.

[0005] 내피하 공간에서 대식세포에 의한 ox-LDL의 축적은 죽상경화증의 시작 단계로 간주된다. ox-LDL 내재화는 내막 대식세포에서 세포 지질 및 콜레스테롤 에스테르 축적 및 거품세포 형성에 원인이 되며 죽상동맥경화증 플라크가 발달하게 된다. 따라서, ox-LDL에 의해 유도된 대식세포 거품세포 형성의 억제는 죽상동맥경화증의 치료 및 예방에 중요하다.

[0006] 콜레스테롤 대사의 조절 장애는 죽상동맥경화증 발병의 또 다른 중요한 측면입니다. 이러한 콜레스테롤 유입 및 유출 과정의 불균형은 세포 지질 및 콜레스테롤 에스테르 축적 및 최종적으로 거품세포 형성을 유발할 수 있다. 스캐빈저 수용체 SR-A1 및 CD-36은 ox-LDL을 세포 내로 유입시키는 중추적인 역할을 하며 ox-LDL의 75% 내지 90%가 이들에 의해 내재화된다. 이러한 수용체에 의해 산화된 저밀도지단백질(ox-LDL)이 흡수된 후 다양한 과정을 거쳐 세포 내 지방구(lipid droplets)가 증가하여 대식세포가 거품세포로 변화하게 된다. In vivo 연구에서 CD36-/- 및 SR-A-/- 결실 마우스에서 죽상동맥경화 발병이 감소한 것으로 밝혀졌다.

[0007] 반대로 저장된 콜레스테롤 에스테르는 콜레스테롤 에스테르 가수분해효소에 의해 유리 콜레스테롤로 가수분해되고 ABCA-1 및 ABCG-1과 같은 ABC 수송체들에 의해 세포 내 콜레스테롤을 ApoA-1 및 HDL를 통해 세포 외로 유출될 수 있도록 매개한다. ABCA-1 및 ABCG-1은 생체 내 연구에서 콜레스테롤 유출을 촉진하는 것으로 나타났다. 또한, ABCG-1 유전자의 부재는 고지방 및 고콜레스테롤 식이 쥐에서 콜레스테롤 축적을 초래한다. 따라서 콜레스테롤 유입과 유출의 균형을 유지하는 것이 죽상동맥경화증 예방에 가장 중요하다.

[0008] 뿐만 아니라 죽상동맥경화증이 염증성 질환이라는 증거 또한 확실하다. 죽상경화증에서 면역 활성화의 중요성은 여러 동물 모델에서 입증되었으며, 염증 매개체 또는 면역 세포를 제거하면 죽종 발생이 광범위하게 감소하는 것으로 나타났다. 특히 대식세포는 죽종 발생의 모든 과정에 관여하고 있으며 동맥경화증에 있어 가장 중요한 면역 세포이다. 대식세포가 oxLDL을 흡수하면 세포 내 전사인자인 NF-κB 신호전달 체계가 활성화되고 이에 따라 염증 단백질 및 염증 매개체가 과다 형성되어 염증 반응이 일어난다. 이러한 염증 반응은 혈관의 손상을 유발하고 동맥경화증의 발병을 과속화 시킨다. 실제로, 임상 연구에서는 염증 조절이 죽상동맥경화증의 임상적 합병증을 예방할 수 있다는 사실이 입증되었다. 따라서 oxLDL에 의한 대식세포의 염증 반응을 제어하는 것은 죽상

동맥경화증 예방하고 치료할 수 있는 주요 표적이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2022-0085167호

(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-1957581호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 또는 2의 서열을 유효성분으로 하여 콜레스테롤의 유입과 유출의 균형을 유지하며 거품세포 형성 과정에서 발생하는 염증 반응을 억제하여 죽상동맥경화증 예방 및 개선 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 또한 상기 서열번호 1 또는 2의 서열을 유효성분으로 하는 죽상동맥경화증 예방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 대식세포의 거품세포 형성 과정에서 서열번호 1(PIISVYWK) 또는 서열번호 2(FSVVPSPK)의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 죽상동맥경화증 예방 및 개선용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 상기 펩타이드 서열은 PPAR-γ 신호 전달 경로를 활성화하는 것이 바람직하다.

[0014] 상기 PPAR-γ 신호전달의 활성은 대식세포에서 이루어지는 것이 바람직하다.

[0015] 서열번호 1 또는 서열번호 2의 펩타이드로 활성화된 PPAR-γ는 ABCA-1 또는 ABGC-1을 발현시키는 것이 바람직하다.

[0016] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 대식세포의 거품세포 형성과정에서 홍합 단백질 유래 서열번호 1(PIISVYWK) 또는 서열번호 2(FSVVPSPK)의 펩타이드 서열을 처리하여 PPAR-γ 신호 전달 경로를 활성화하고,

[0017] 상기 PPAR-γ신호 전달 경로는 콜레스테롤의 유입을 감소시키거나 콜레스테롤의 유출을 증가시키는 것을 특징으로 하는 죽상동맥경화증 억제법을 제공한다.

[0018] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 대식세포의 거품세포 형성 과정에서 발생하는 염증 반응을 홍합 단백질 유래 서열번호 1(PIISVYWK) 또는 서열번호 2(FSVVPSPK)의 펩타이드 서열을 처리하여 NF-κB 신호전달 경로를 억제하고,

[0019] 상기 NF-κB 신호전달 경로의 억제는 염증 매개체 생성 억제 및 관련 단백질 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 죽상동맥경화증 예방 및 개선법을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에서는 홍합 단백질에서 분리한 서열번호 1(PIISVYWK) 또는 서열번호 2(FSVVPSPK)를 유효성분으로 포함하는 죽상동맥경화증 예방 또는 개선용 조성물에 관한 것이다. 종래기술에서 서열번호 1 및 2는 항비만 효능을 나타낸다고 보고하였는데, 본 발명은 서열번호 1(PIISVYWK) 또는 서열번호 2(FSVVPSPK)가 거품세포 형성 억제, 세포 내 콜레스테롤 수치 개선 및 콜레스테롤 유입 억제 및 유출 촉진 단백질 발현을 조절하여 거품세포 형성 과정에서 발생하는 염증 반응을 억제하여 죽상동맥경화증을 예방 또는 개선하는 효과를 얻을 수 있다.

[0021] 본 발명은 홍합 단백질로부터 확인된 항비만 펩타이드인 서열번호 1(PIISVYWK) 또는 서열번호 2(FSVVPSPK)가 산화된 저밀도지단백질(oxidized LDL, oxLDL) 처리된 RAW264.7 대식세포의 거품세포 형성 억제 효과를 나타낸다. 서열번호 1(PIISVYWK) 또는 서열번호 2(FSVVPSPK) 펩타이드는 거품세포 형성을 억제하고 콜레스테롤 대사를 조절하여 세포 내 콜레스테롤 수치를 개선시킬 수 있다. 서열번호 1 또는 2 펩타이드는 염증성 사이토카인의 생성

을 억제하므로 항염증 활성에도 효과가 있다. 또한 서열번호 1(PIISVYWK) 또는 서열번호 2(FSVVPSPK) 펩타이드는 콜레스테롤 유입 억제 및 유출 촉진에 관여하는 단백질 발현을 조절하여 죽상동맥경화증 개선 및 예방 효능을 나타낼 수 있으며 제약 및 식품 관련 산업에서 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 (A) ox-LDL 처리된 RAW264.7 세포에서 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드의 정량적 세포 생존율, (B) 거품 세포 형성 억제 효과 및 (C) 정성적 거품 세포 형성 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 (A) ox-LDL 처리된 RAW264.7 세포에서 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드가 (A) 총 콜레스테롤, (B) 유리 콜레스테롤 및 (C) 콜레스테릴 에스테르 함량에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 ox-LDL 처리된 RAW264.7 세포에서 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드가 (A) 콜레스테롤 유입(B) 콜레스테롤 유출(C) ABCA1, ABCG1, SR-A1 및 CD-36 단백질 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 ox-LDL 처리된 RAW264.7 세포에서 PPPAR-γ 및 LXR-α 단백질 발현에 대한 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드의 효과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 ox-LDL 처리된 RAW264 세포에서 염증성 사이토카인 (A) TNF-α,(B) IL-6 및 (C) IL-1β 및(D) PGE2 생산에 대한 PIISVYWK (P1) 및 FSVVPSPK (P2) 펩타이드의 억제효과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드가 (A) NO 생성(B) iNOS 및 COX-2 단백질 발현 및 (C) ox-LDL 처리된 RAW264.7 세포에서 NF-κB 핵 전좌에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[0025] 이에 앞서, 후술하는 용어들은 본 발명에서의 기능을 고려하여 정의된 것으로서, 이는 본 발명의 기술적 사상에 부합되는 개념과 당해 기술분야에서 통용 또는 통상적으로 인식되는 의미로 해석하여야 함을 명시한다.

[0026] 또한, 본 발명과 관련된 공지기능 혹은 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0028] 본 발명의 신규 펩타이드는 이들의 아미노산 서열 변이체를 포함할 수 있다. 여기서 변이체란 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질(펩타이드)을 의미한다. 이러한 변이체는 야생형과 실질적으로 동등한 활성을 갖는 기능적 상동체 또는 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키는 변형을 가지는 펩타이드를 포함한다. 바람직하게는 펩타이드의 물리 화학적 성질이 변형된 변이체이다. 예를 들어, 온도, 수분, pH, 전해질, 환원당, 가압, 건조, 동결, 계면장력, 광선, 동결과 해동의 반복, 고농도 조건 등의 물리적 요인과 산, 알카리, 중성염, 유기용매, 금속이온, 산화환원제, 프로티아제 등의 화학적 요인의 외부 환경에 대한 구조적 안정성이 증대된 변이체이다.

[0029] 또한 아미노산 서열상의 변이로 효소 활성이 증대된 변이체일 수 있다.

[0030] 본 발명의 신규한 펩타이드는 홍합 단백질로부터 직접 분리하여 제조할 수 있으며, 이의 분리 및 정제는 많은 공지 방법에 의해 실시할 수 있다.

[0031] 또한 본 발명의 펩타이드는 화학적으로 합성할 수 있다. 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당 분야에 널리 공지된 펩타이드 합성법을 이용하여 얻을 수 있다. 펩타이드는 통상의 단계적인 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법을 이용하여 제조할 수 있다. 특히, 바람직한 펩타이드의 제조방법은 고체상 합성방법(solid phase syntheses)을 이용하는 것이다.

[0032] 본 발명의 신규한 펩타이드는 보호된 아미노산 간의 응축반응(condensation reaction)에 의한 통상의 고체상 방법으로, C-말단으로부터 시작하여 그 서열에 따라 순차적으로 진행하면서 합성할 수 있다. 응축 반응 후 보호기 및 C-말단 아미노산이 연결된 담체를 산분해(acid decomposition) 또는 아미놀리시스(aminolysis)와 같은 공지의 방법에 의해 제거할 수 있다. 상기 언급된 펩타이드 합성법은 관련 서적에 상세히 기술되어 있다.

[0034] 본 발명에서는 대식세포에 산화된 저밀도지단백질(ox-LDL)로 처리하여 거품세포 형성을 촉진했으며, 가장 중요한 분석으로 지질 방울을 시각화하여 펩타이드 처리로 세포 지질 축적을 확인할 수 있다.

[0035] 본 발명의 일측면에 따르면, 대식세포의 거품세포 형성과정에서 서열번호 1(PIISVYWK) 또는 서열번호 2(FSVVPSPK)의 펩타이드 서열을 유효성분으로 포함하는 죽상동맥경화증 예방 및 개선용 약학적 조성물을 제공한다.

[0036] 펩타이드 서열은 PPAR-γ 신호 전달 경로를 활성화하고, PPAR-γ 신호전달의 활성은 대식세포에서 이루어지는 것이 바람직하다.

[0037] 서열번호 1 또는 서열번호 2의 펩타이드로 활성화된 PPAR-γ는 ABCA-1 및/또는 ABGC-1을 발현시키는 것이 바람직하다.

[0038] 바람직하게는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 펩타이드가 PPPAR-γ 및 LXR-α의 발현을 활성화할 수 있다. 서열번호 1 또는 서열번호 2의 펩타이드는 유도성 산화질소 합성효소(iNOS) 단백질 발현과 관련된 NO 생성과 고리형 산화효소 (cyclooxygenase-2, COX-2) 단백질 발현과 관련된 PGE2 생성에 있어서, iNOS 및 COX-2 발현을 억제하므로 서열번호 1 또는 서열번호 2의 펩타이드에 의해 NO 생성 및 PGE2 생성이 억제될 수 있다.

[0039] 서열번호 1 또는 서열번호 2의 펩타이드는 항염증 역할도 하는데, NF-κB의 활성화를 억제하여 염증성 사이토카인의 생성을 억제하여 죽상 동맥 경화증 예방 및 개선 효과가 있다.

[0041] 본 발명의 다른 일측면에 따르면, 대식세포의 거품세포 형성 과정에서 서열번호 1(LLRLTDL) 또는 서열번호 2(GYALPCDCL)의 펩타이드를 처리하여 PPAR-γ 신호 전달 경로를 활성화하는 단계를 포함하고, PPAR-γ 신호 전달 경로는 콜레스테롤의 유출을 증가시키는 것을 특징으로 하는 죽상동맥경화증 억제법을 제공한다.

[0042] PPAR-γ 활성화는 SR-A1의 발현을 억제하는 것이 바람직하다.

[0043] PPAR-γ 신호 전달 경로의 활성은 ABCA-1 및/또는 ABGC-1을 발현을 유도하는 것이 바람직하다.

[0045] 본 발명에서는 ox-LDL 처리 RAW264.7 대식세포에서 홍합 단백질 유래 두 항비만 펩타이드 서열번호 1(PIISVYWK)과 서열번호 2(FSVVPSPK)가 거품세포 형성 억제 및 관련 콜레스테롤 대사에 미치는 영향에 대하여 제공한다.

[0046] 서열번호 1(PIISVYWK)과 서열번호 2(FSVVPSPK)는 ox-LDL이 처리된 대식세포에서 지질 축적 억제, 총 콜레스테롤 함량, 유리 콜레스테롤 함량 및 콜레스테롤 에스테르 함량을 개선하여 거품세포 형성 억제 활성을 확인할 수 있다.

[0047] 또한, 서열번호 1(PIISVYWK)과 서열번호 2(FSVVPSPK)의 처리는 콜레스테롤 유입률을 억제하고 콜레스테롤 유출률을 증가시킬 수 있다. 서열번호 1(PIISVYWK)과 서열번호 2(FSVVPSPK)의 처리는 콜레스테롤 유입에 관여하는 스캐빈저 수용체들인 SR-A1 및 CD-36의 단백질 발현을 억제(콜레스테롤 유입을 억제)하며 반대로 콜레스테롤 유출을 촉진하는 ATP-결합 카세트(ABC) 수송체 ABCA-1 및 ABCG-1의 단백질 발현을 증가시킬 수 있다.

[0048] 본 발명에서 서열번호 1(PIISVYWK)과 서열번호 2(FSVVPSPK) 펩타이드는 PPAR-γ 신호 전달 경로를 활성화하고, PPAR-γ 의 하위 신호전달 분자인 LXR-α 발현이 일어나며, PPAR-γ 및 LXR-α 발현에 의하여 ABCA-1 및 ABCG-1의 단백질 발현을 증가시킬 수 있다. 본 발명에서 PPAR-γ의 발현은 하위 신호전달 분자인 LXR-α 발현도 포함한다.

[0049] 핵수용체 간 X수용체(LXR)와 PPAR-γ(peroxisome proliferator-activated receptor gamma)가 콜레스테롤 대사의 주요 조절자로 알려져 있다. 콜레스테롤 대사에 서열번호 1(PIISVYWK)과 서열번호 2(FSVVPSPK) 펩타이드 처리는 ox-LDL 처리된 RAW264.7 대식세포에서 LXR-α 및 PPAR-γ 발현의 상당한 증가를 나타낸다. 콜레스테롤 대

사 과정에서 LXR은 레티노이드 X 수용체(RXR)에 결합하여 ABCA-1 및 ABCG-1 발현을 긍정적으로 조절할 수 있다. 또한, PPAR-γ 활성화는 ABCA-1, ABCG-1 및 LXR 발현의 트랜스활성화를 유도할 수 있다.

[0050] 보다 바람직하게는 본 발명의 서열번호 1(PIISVYWK)과 서열번호 2(FSVVPSPK)는 PPAR-γ 발현을 활성화한 다음 LXR-α 발현에 이어 ABCA-1 및 ABCG-1 발현을 활성화시킬 수 있다. PPAR-γ 활성화는 SR-A1 및 CD-36 조절에 반대 효과를 나타내는데, SR-A1 발현에 억제 효과가 있으며 ox-LDL 내재화를 하향 조절한다. 반면 PPAR-γ는 CD-36 발현을 증가시켜 반대 효과를 나타낸다. 그러나, PPAR-γ 리간드의 다중 효과를 고려하면, PPAR-γ 활성화의 순 효과는 거품세포 형성에서 항동맥경화로 알려져 있으며 대부분 콜레스테롤 유출 과정과 관련이 있다.

[0051] 본 발명의 서열번호 1(PIISVYWK)과 서열번호 2(FSVVPSPK)는 ABCA-1 및 ABCG-1 발현의 조절을 통해 콜레스테롤 유출을 촉진하고 PPAR-γ/LXR-α 경로를 활성화함으로써 거품세포 형성을 억제하고 콜레스테롤 대사를 연관시킨다고 할 수 있다. 따라서 서열번호 1(LLRLTDL)과 서열번호 2(GYALPCDCL)의 처리는 PPAR-γ/LXR-α 신호 전달 경로가 거품세포 형성 억제에 관여함으로써 PPAR-γ 및 LXR-α의 발현을 증가시킬 수 있다. 또한 서열번호 1(PIISVYWK)과 서열번호 2(FSVVPSPK) 펩타이드에 의한 PPAR-γ의 활성화는 SR-A1 발현을 억제할 수 있다(CD-36의 억제 효과는 PPAR-γ 리간드 활성화와 연관되지 않을 수 있다).

[0052] 본 발명은 서열번호 1(PIISVYWK)과 서열번호 2(FSVVPSPK) 펩타이드가 산화된 저밀도지단백질(ox-LDL)이 처리된 대식세포에서 NF-κB 신호 전달 경로를 억제하여 염증성 사이토카인의 생성 억제 및 관련 단백질인 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제시킬 수 있다.

[0053] 따라서, 본 발명의 서열번호 1(PIISVYWK)과 서열번호 2(FSVVPSPK)는 PPAR-γ/LXR-α 신호 전달 경로 활성화를 통해 거품세포 형성을 약화시키고 관련 콜레스테롤 대사를 조절함으로써 죽상동맥경화증 억제 효과를 나타낼 수 있다.

[0055] 본 발명의 서열번호 1(PIISVYWK)과 서열번호 2(FSVVPSPK)가 항염증 활성을 하고, 거품세포 형성 억제, 세포 내 콜레스테롤 수치 개선 및 콜레스테롤 유입 억제 및 유출 촉진 단백질 발현을 조절하여 죽상동맥경화증을 예방, 개선 또는 치료를 위한 다양한 형태의 약학 조성물로 활용이 가능하다.

[0057] 본 발명에서 약학 조성물이라 함은 치료적 유효량 또는 약학으로 유효한 양으로 투여한다. 용어 "치료적 유효량 또는 약학으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0058] 본 발명에서 약학 조성물은 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 상기 약학 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0059] 본 발명의 약학 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[0061] 본 명세서에 있어서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 그리고 본 명세서에

서 사용된 용어는 실시예들을 설명하기 위한 것이며, 본 발명을 제한하고자 하는 것이 아니다. 본 명세서에서 단수형은 문구에서 특별히 언급하지 않는한 복수형도 포함한다.

[0063] 본 문서에서, "A 또는 B," "A 또는/및 B 중 적어도 하나," 또는 "A 또는/및 B 중 하나 또는 그 이상"등의 표현은 함께 나열된 항목들의 모든 가능한 조합을 포함할 수 있다. 예를 들면, "A 또는 B," "A 및 B 중 적어도 하나," 또는 "A 또는 B 중 적어도 하나"는, (1) 적어도 하나의 A를 포함, (2) 적어도 하나의 B를 포함, 또는 (3) 적어도 하나의 A 및 적어도 하나의 B 모두를 포함하는 경우를 모두 지칭할 수 있다.

[0065] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0067] **<실시예>**

[0068] **재료**

[0069] PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드는 Peptron Inc.(대전, 한국)에서 공급받았다. 인간 혈장 LDL은 LEE BioSolutions(360-10, Lee BioSolution, Maryland Heights, MO, USA)에서 구입하였다. 모든 세포 배양 시약은 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)에서 제공받았다. 1차 및 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA, USA), NovusBio®, USA 및 Abcam(Dawinbio Inc.)에서 구입하였다. 본 연구에 사용된 다른 모든 시약은 Sigma-Aldrich(미국 미주리주 세인트루이스)에서 구입하였다.

[0071] **실시예 1 - LDL 산화 및 티오바르비투르산 반응성 물질(TBARS) 측정**

[0072] LDL(1 mg/mL)을 CuSO4(10 μM)로 4시간 동안 37 ℃에서 산화시켰으며 산화 수준은 TBARS 분석을 수행하여 측정하였다. 형성된 ox-LDL을 TCA(25% w/v) 와 TBA (1% w/v in 0.3% NaOH)의 1:1 비율 혼합물과 반응시킨 후 어두운 환경에서 92 ℃에서 40분 동안 끓였다. 흡광도는 마이크로플레이트 리더(Multiskan™ GO, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 532nm 파장에서 측정하였다. LDL 산화 정도는 말론디알데히드(MDA) 표준 곡선을 사용하여 LDL 단백질 밀리그램당 MDA 나노몰로 표현하였다. 165-200 nM/MDA 사이의 TBARS 값이 모든 실험에 사용하였다.

[0074] **실시예 2 - 세포 배양 및 치료**

[0075] RAW264.7 세포(American Type Culture Collection, USA)를 표준 조건 하에서 DMEM 배양 배지에서 배양하였다. 1×105 또는 1×106 세포/mL의 세포 밀도를 각각 96웰 플레이트 또는 6cm 배양 접시에 사용하였다. 세포를 PIISVYWK(P1) 또는 FSVVPSPK(P2) 펩타이드로 1시간 동안 처리한 후 24시간 동안 ox-LDL 노출을 처리하였다.

[0077] **실시예 3 - MTT 분석**

[0078] RAW264.7 세포에서 PIISVYWK(P1)과 FSVVPSPK(P2)의 세포 독성은 MTT 분석을 사용하여 평가하였다. PIISVYWK(P1) 또는 FSVVPSPK(P2)(10-200 μM)로 24시간 동안 세포를 처리한 후, 세포를 MTT 작업 시약과 함께 4시간 더 배양하였다. 포르마잔 결정이 형성된 후 DMSO를 첨가하여 용해시킨 후 마이크로플레이트 리더(Multiskan™ GO, Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0080] **실시예 4 - Oil Red O 염색 분석**

[0081] RAW264.7 세포를 P1 또는 P2 펩티드(10-200 μM)로 1시간 동안 처리한 후 24시간 동안 ox-LDL을 처리하고 오일 레드 O 염색 분석을 수행하여 세포내 지질 축적 효과를 확인하였다. 처리 후, 세포를 4% 파라포름알데히드로 고

정시킨 후, 60% 이소프로판올로 세척하였다. 그런 다음, 새로 준비한 Oil Red O 용액을 사용하여 1시간 동안 세포 염색을 하고 증류수로 세척한 후 도립현미경(DMI6000, Leica, Wetzlar, Germany)을 사용하여 이미지를 촬영하였다. Oil Red O 염색의 정량분석은 마이크로플레이트 리더(Multiskan™ GO, Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA)를 사용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하여 수행하였다.

[0083] **실시예 5 - 총 콜레스테롤(TC), 유리 콜레스테롤(FC) 및 콜레스테롤 에스테르(CE) 함량 측정**

[0084] RAW264.7 세포를 12웰 플레이트에 24시간 동안 시딩하고 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 샘플로 처리한 다음 ox-LDL(50 μM)을 24시간 동안 처리하였다. 처리된 세포의 단백질 농도는 BCA 분석으로 실험하였다. 콜레스테롤 에스테르 양은 TC에서 FC를 빼서 계산하였다. 총 콜레스테롤(TC)과 유리 콜레스테롤(FC)은 제조업체의 지침에 따라 BioVision 총 콜레스테롤 및 콜레스테롤 에스테르 비색 분석 키트 II를 사용하여 실험하였다. 세포를 12웰 플레이트에 24시간 동안 시딩하고 P1 및 P2 샘플로 처리한 후 ox-LDL(50 μM)을 24시간 동안 처리하였다. 처리된 세포의 단백질 농도는 BCA 분석에 결과로 결정하였다. 콜레스테롤 에스테르 양은 TC에서 FC를 빼서 계산하였다.

[0086] **실시예 6 - 콜레스테롤 유입 및 유출 분석**

[0087] RAW264.7 세포를 PIISVYWK(P1) 또는 FSVVPSPK(P2) 펩타이드(10-200 μM)로 1시간 동안 처리한 후 96-블랙 웰 플레이트에서 ox-LDL을 24시간 처리하고 콜레스테롤 유입 및 유출 효과를 25-NBD-콜레스테롤을 사용하여 실험하였다. 콜레스테롤 유입 실험은 펩타이드 처리 후 6시간 동안 무혈청 DMEM에 25-NBD 콜레스테롤(5 μg/mL)을 표지하여 수행하였다. 대식세포의 콜레스테롤 양은 GENios 마이크로플레이트 판독기(GENios, TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 사용하여 485nm의 여기 파장과 535nm의 방출 파장에서 결정되었다. 콜레스테롤 유출 측정을 위해 먼저 무혈청 DMEM에서 1 μg/mL의 25-NBD 콜레스테롤로 세포를 6시간 동안 표지하였다. 그 후, 25-NBD 콜레스테롤 배양된 세포를 PBS로 세척한 후 무혈청 DMEM과 함께 6시간 동안 배양하였다. 콜레스테롤 유입을 결정하는 데 사용된 위의 파장에 표시된 대로 세포와 배지의 형광 강도를 측정하였다. 콜레스테롤 유출량은 전체 형광(세포의 형광 강도 + 배지의 형광 강도)에 대한 배지의 형광 강도의 백분율로 표시하였다.

[0089] **실시예7 - TNF-α, IL-1β, IL-6 수준의 결정**

[0090] 세포를 P1 또는 P2(10-200 μM)로 1시간 동안 처리한 후 24시간 동안 ox-LDL을 처리하고 전염증성 사이토카인(TNF-α, IL-1β, and IL-6)의 수준을 제조사의 지시에 따라 BioTrak™ ELISA 키트(GE Healthcare)를 사용하여 정량화하였다.

[0092] **실시예 8 - NO 측정을 위한 Griess 시약 분석**

[0093] Griess 시약 분석을 수행하여 배양 배지의 NO 수준을 측정하였다. 세포를 상기 기재된 바와 같이 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드로 처리하였다. Griess 시약(5% 인산 및 0.1% 나프틸에틸렌디아민 디히드로클로라이드에 1% 설파닐아미드)을 세포 배양 배지와 1:1 비율로 혼합하고 20분간 배양한 후 마이크로플레이트 리더(Multiskan™ GO)를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 농도를 실험하기 위해 아질산나트륨 표준 곡선을 사용하였다.

[0095] **실시예 9 - 웨스턴 블롯 분석**

[0096] 표준 프로토콜에 따라 웨스턴 블롯 분석을 수행하였고, 화학발광 ECL 분석 키트(Life Technologies, 서울, 한국)를 사용하여 밴드를 시각화하고 Davinch-Chemi Imager™(CAS400SM, Core Bio, 서울, 한국)에서 이미지하였다. 핵 추출 키트(NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, Thermo Fisher Scientific, Inc. Rockford, IL, USA)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 핵 및 세포질 분획을 추출하였다.

[0098] **실시예 10 - 통계분석**

[0099] Sigma Plot 12.0(Systat Software Inc., San Jose, CA, USA)을 사용하여 데이터에 대한 일원 분산 분석을 수행했으며 이는 평균 SD(n=3)로 표시하였다. P<0.05인 값은 통계적으로 유의한 것으로 본다.

[0101] **결과 및 평가**

[0102] **PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드가 세포 생존력 및 ox-LDL 유발 거품 세포 형성에 미치는 영향**

[0103] 다른 분석을 수행하기 전에 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드를 사용하여 RAW264.7 세포에서 세포독성을 확인하였다.

[0104] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 (A) ox-LDL 처리된 RAW264.7 세포에서 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드의 정량적 세포 생존율, (B) 거품 세포 형성 억제 효과 및 (C) 정성적 거품 세포 형성 억제 효과를 나타낸 그래프이다. 세포를 P1 또는 P2로 1시간 동안 처리하고 MTT 분석을 수행하여 세포 생존력을 측정하고 세포를 ox-LDL로 24시간 더 처리하여 Oil Red O 염색을 수행하였다. 실험은 ± SD의 세 가지 독립적인 결정(n=3)으로 수행되었으며, P 값은 $P < 0.05$이다. 도 1을 참고하여 설명하면, 테스트된 농도에서는 세포독성 효과가 나타나지 않았다(10~200μM). 가장 먼저 분석한 결과, Oil Red O 염색을 통해 P1 및 P2 펩타이드의 거품 세포 형성 억제 활성을 확인하였다. PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드 모두 Oil Red O 염색에 대해 용량 의존적 억제 효과를 나타냈지만, PIISVYWK(P1) 펩타이드는 FSVVPSPK(P2) 펩타이드보다 더 높은 억제량을 나타냈다. 200μM의 펩타이드 농도에서 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드는 세포내 지질 축적을 각각 74.0% 및 54.2% 억제하였다(도 1의 B). 질적 이미지를 얻는 것도 이러한 억제 활동을 추가로 검증하였다(도 1의 C).

[0106] **PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드가 총 콜레스테롤(TC), 유리 콜레스테롤(FC) 및 콜레스테롤 에스테르(CE) 수준에 미치는 영향**

[0107] TC, FC 및 CE 수준에 대한 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩티드의 효과를 ox-LDL 처리된 RAW264.7 세포에서 분석하였다.

[0108] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 (A) ox-LDL 처리된 RAW264.7 세포에서 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드가 (A) 총 콜레스테롤, (B) 유리 콜레스테롤 및 (C) 콜레스테릴 에스테르 함량에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 세포를 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드로 1시간 동안 처리한 후 ox-LDL을 24시간 동안 처리하였다. 실험은 ± SD의 세 가지 독립적인 결정(n=3)으로 수행되었으며, P 값은 $P < 0.05$이다. 도 2를 참고하여 설명하면, PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 처리는 용량 의존 방식으로 TC, FC 및 CE 수준을 억제시켰다. 그러나 200 μM의 펩타이드 농도에서는 FSVVPSPK(P2)가 콜레스테롤 수치를 완전히 억제하여 PIISVYWK(P1) 처리보다 더 높은 TC 및 FC 억제 효과를 나타냈다. PIISVYWK(P1) 처리는 TC와 FC를 각각 70.7%와 58.3% 감쇠시켰다. 또한, PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 처리 모두 테스트된 모든 농도에서 CE 수준을 완전히 억제하였다.

[0110] **PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드가 콜레스테롤 대사에 미치는 영향**

[0111] 콜레스테롤 대사에서 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드의 역할을 밝히기 위해 콜레스테롤 유입, 콜레스테롤 유출 수준, 관련 단백질 발현 및 관련 전사 인자 발현을 측정하였다.

[0112] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 ox-LDL 처리된 RAW264.7 세포에서 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드가 (A) 콜레스테롤 유입(B) 콜레스테롤 유출(C) ABCA1, ABCG1, SR-A1 및 CD-36 단백질 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 세포를 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드로 1시간 동안 처리한 후 ox-LDL을 24시간 동안 처리하였다. 실험은 ± SD의 세 가지 독립적인 결정(n=3)으로 수행되었으며, P 값은 $P < 0.05$이다. 도 3을 참고하여 설명하면, Ox-LDL 치료군은 무치료군에 비해 콜레스테롤 유입량을 95.6% 증가시켰다. 그러나 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드는 용량 의존적으로 이 ox-LDL 증가된 콜레스테롤 유입 수준을 억제했으며 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드의 200μM 농도에서 각각 40.3% 및 41.7%의 억제로 거의 유사한 억제 수준이 관찰되었다(도 3의 A). 반대로, PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드는 용량 의존적으로 콜레스테롤 유출 수준을 증가시키는 것으로 나타났다. 200μM의 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드에서는 콜레스테롤 유출 속도가 극적으로 증가한 것으로 나타났다. 그러나 ox-LDL 처리는 콜레스테롤 유출 수준을 증가시키지

못했다(도 3의 B).

[0113] 콜레스테롤 대사에서 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드의 역할을 추가로 검증하기 위해 콜레스테롤 유입 및 유출 관련 단백질 발현을 실험하였다. 도 3의 C에 나타난 바와 같이, ABCA-1 및 ABCG-1 단백질 발현은 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 처리에 의해 증가하였다. 반대로 SR-A1 및 CD-36 수준은 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 처리에 의해 용량 의존적으로 억제되었다.

[0115] 더욱이, 우리는 콜레스테롤 대사 관련 전사 인자 발현에 대한 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드의 효과를 확인하였다. 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 ox-LDL 처리된 RAW264.7 세포에서 PPPAR-ɣ 및 LXR-α 단백질 발현에 대한 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드의 효과를 나타낸 그래프이다. 세포를 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드로 1시간 동안 처리한 후 ox-LDL을 24시간 동안 처리하였다. 실험은 ± SD의 세 가지 독립적인 결정(n=3)으로 수행되었으며, P 값은 P < 0.05이다. 도 4를 참고하여 설명하면, PPAR-ɣ 및 LXR-α 단백질 발현은 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 처리로 나타난 결과이다. 200μM 농도에서 PIISVYWK(P1) 처리는 PPAR-ɣ 및 LXR-α 발현을 각각 52.9% 및 50.8% 향상시켰다. FSVVPSPK(P2) 처리는 또한 이러한 전사 인자 발현을 증가시켰으며, 200μM 농도에서 PPAR-ɣ 및 LXR-α 발현이 각각 48.5% 및 36.4% 증가한 것으로 나타났다(도 4).

[0117] **항염증 활성에 대한 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드의 효과**

[0118] 죽상경화증은 염증 반응과 연관되어 있으므로 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드의 항염증 효과를 실험하였다. 이를 위해 종양 괴사 인자-α(TNF-α), 인터루킨-6(IL-6) 및 -1β(IL-1β)를 포함한 전 염증성 사이토카인 수준을 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드 처리로 실험하였다.

[0119] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 ox-LDL 처리된 RAW264 세포에서 전염증성 사이토카인 생산(A) TNF-α,(B) IL-6 및(C) IL-1β 및(D) PGE2 생산에 대한 PIISVYWK (P1) 및 FSVVPSPK (P2) 펩타이드의 효과를 나타낸 그래프이다. 세포를 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드로 1시간 동안 처리한 후 ox-LDL을 24시간 동안 처리하였다. 실험은 ± SD의 세 가지 독립적인 결정(n=3)으로 수행되었으며, P 값은 P < 0.05이다. 도 5를 참고하여 설명하면, ox-LDL 치료는 이들 세 가지 전염증성(Pro-inflammatory) 사이토카인의 더 높은 생산을 가져왔고, PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 치료는 용량 의존적으로 이러한 수준을 억제하였다(도 5의 A-C). 또한 PIISVYWK(P1)과 FSVVPSPK(P2) 수준은 프로스타글란딘 E2(PGE2) 수준을 각각 29.8%와 36.4% 감소시켰다(도 5의 D).

[0121] 또한 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드 처리를 통해 배양 배지 내 산화질소(NO) 수준을 측정하였다.

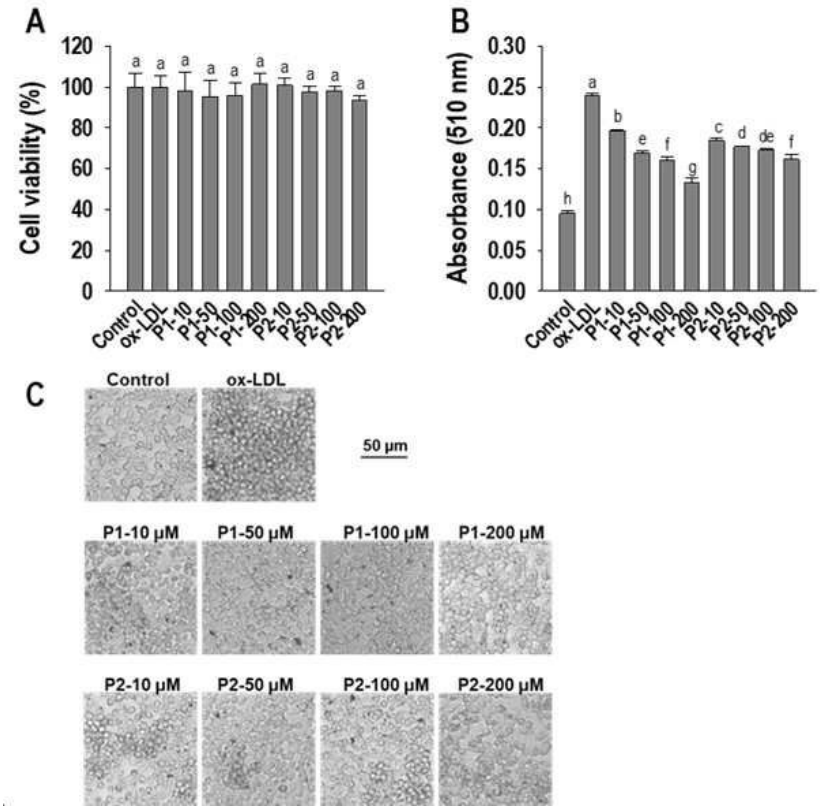
[0122] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드가 (A) NO 생성(B) iNOS 및 COX-2 단백질 발현 및 (C) ox-LDL 처리된 RAW264.7 세포에서 NF-κB 핵 전좌에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 세포를 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드로 1시간 동안 처리한 후 NO 및 iNOS 및 COX-2 측정을 위해 24시간 동안 ox-LDL 처리하고 NF-κB 측정을 위해 세포를 P1 및 P2 펩티드로 1시간 동안 처리하였다. 실험은 ± SD의 세 가지 독립적인 결정(n=3)으로 수행되었으며, P 값은 P < 0.05이다. 도 6을 참고하여 설명하면, PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 처리는 용량 의존적으로 ox-LDL 유도된 NO 수준을 억제했으며, 200μM 농도에서 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드는 NO 수준을 각각 55.5% 및 64.5% 억제하였다(도 6의 A). 유도성 산화질소 합성효소(iNOS) 단백질 발현과 관련된 NO 생성과 고리형 산화효소(cyclooxygenase-2, COX-2) 단백질 발현과 관련된 PGE2 생성 때문에, 본 발명에서는 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 처리에 따른 iNOS 및 COX-2 발현 수준을 확인하였다. 도 6의 B에 나타난 바와 같이, 두 펩타이드 모두 용량 의존적으로 iNOS 및 COX-2 발현 억제 효과를 나타내었다. 죽상 동맥 경화증 관련 항염증 활성에 대한 PIISVYWK(P1) 및 FSVVPSPK(P2) 펩타이드의 효과를 추가로 검증하기 위해 NF-κB 활성화를 실험하였다. 도 6의 C에 도시된 바와 같이, 두 펩타이드 모두 NF-κB 핵 전좌를 억제하였다.

[0124] 전술한 내용은 후술할 발명의 청구범위를 더욱 잘 이해할 수 있도록 본 발명의 특징과 기술적 장점을 다소 폭넓게 상술하였다. 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적인

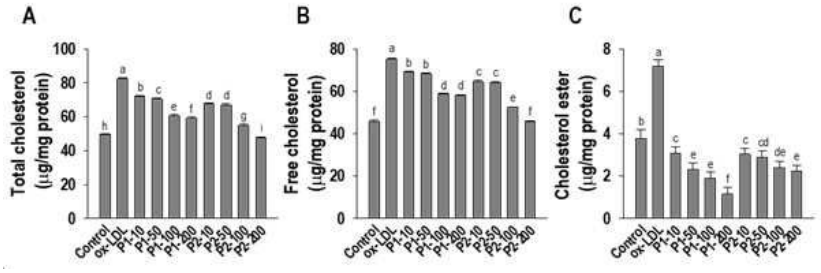
특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

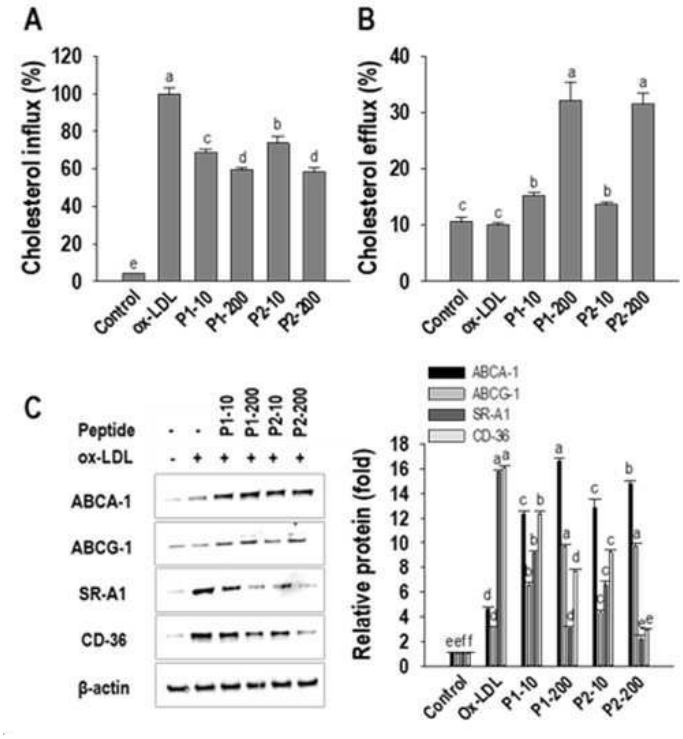
도면1



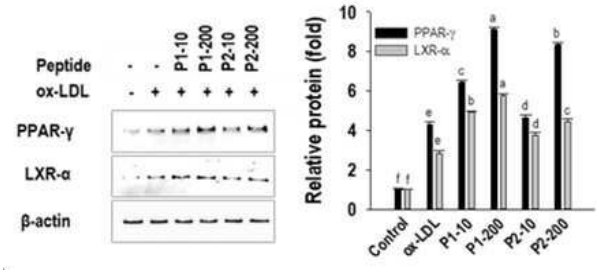
도면2



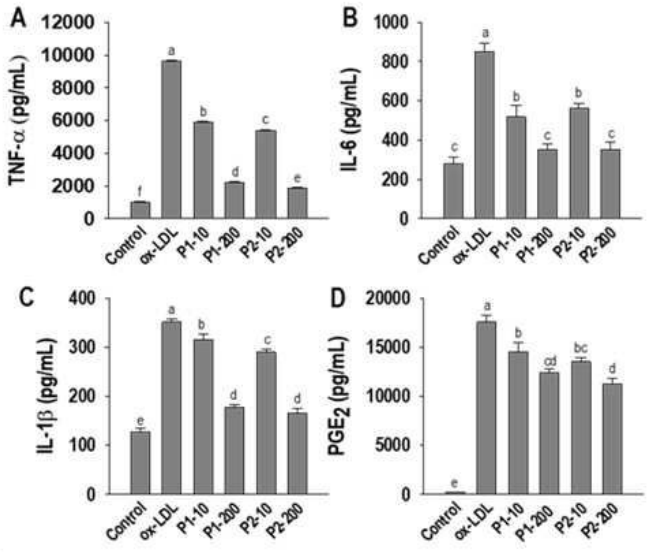
도면3


A
Cholesterol influx (%)
Control
ox-LDL
P1-10
P1-200
P2-10
P2-200
B
Cholesterol efflux (%)
C
Peptide
ox-LDL
ABCA-1
ABCG-1
SR-A1
CD-36
β-actin
Relative protein (fold)

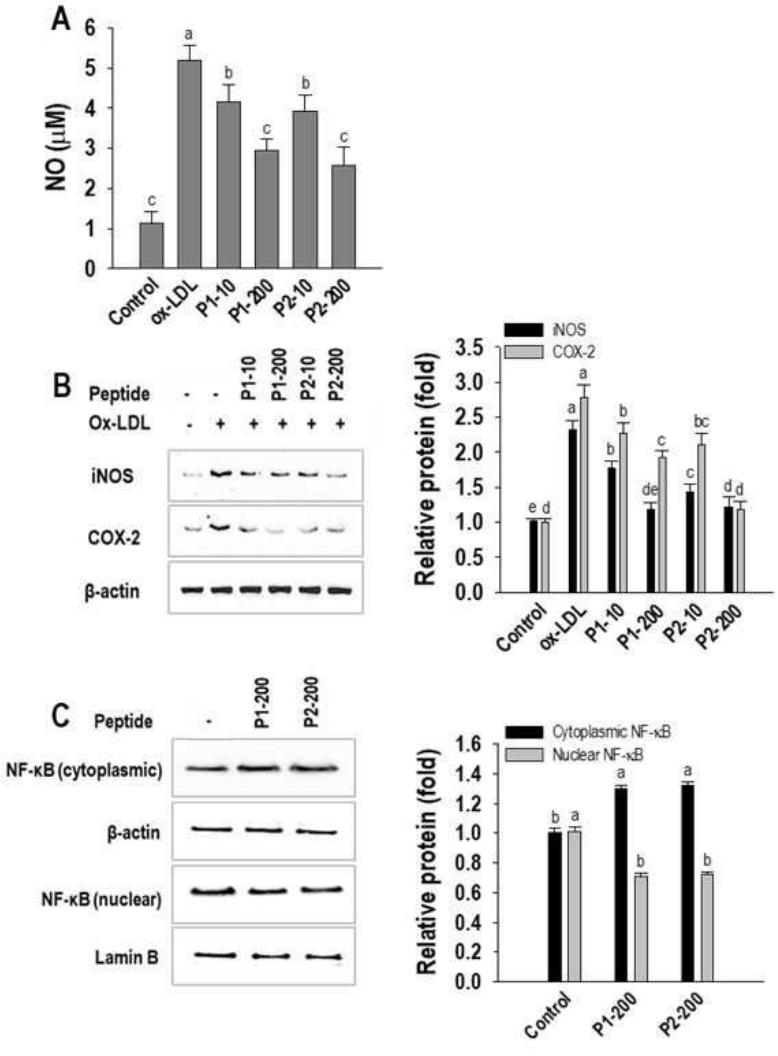
도면4


Peptide
ox-LDL
PPAR-γ
LXR-α
β-actin
Relative protein (fold)
Control
ox-LDL
P1-10
P1-200
P2-10
P2-200

도면5


A
TNF-α (pg/mL)
B
IL-6 (pg/mL)
C
IL-1β (pg/mL)
D
PGE2 (pg/mL)
Control
ox-LDL
P1-10
P1-200
P2-10
P2-200

도면6


A
NO (μM)
Control
ox-LDL
P1-10
P1-200
P2-10
P2-200
B
Peptide
Ox-LDL
iNOS
COX-2
β-actin
Relative protein (fold)
C
NF-κB (cytoplasmic)
β-actin
NF-κB (nuclear)
Lamin B
Cytoplasmic NF-κB
Nuclear NF-κB