(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.
C07K 5/09 (2006.01)
C07K 5/08 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0026899
(43) 공개일자 2007년03월09일

(21) 출원번호 10-2005-0060052
(22) 출원일자 2005년07월05일
심사청구일자 2005년07월05일

(71) 출원인 충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교

(72) 발명자 석대은
대전 유성구 신성동 대림두레아파트 101-201
정태숙
대전 서구 둔산동 파랑새 아파트 101-1101

(74) 대리인 김원준

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 히스티딘-프롤린 잔기를 함유하는 광범위 항산화성 펩타이드

(57) 요약

본 발명은 LDL 및 HDL의 산화에 대한 우수한 항산화능을 표시함으로서 동맥경화증의 예방·치료제로 활용될 수 있는 히스티딘 잔기를 함유하는 광범위 항산화 펩타이드에 관한 것으로서, His-Pro 잔기가 C-말단에 존재하는 것을 특징으로 하는 광범위 항산화 펩타이드에 관한 것이다.

상기의 항산화 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 2

특허청구의 범위

청구항 1.

LDL에 대해 항산화성을 갖는 펩타이드로서,

His-Pro 잔기가 C-말단에 존재하는 것을 특징으로 하는 항산화성 펩타이드.

청구항 2.

제 1 항에 있어서,

상기 항산화성 펩타이드를 구성하는 아미노산의 개수가 3~7개인 것을 특징으로 하는 항산화성 펩타이드.

청구항 3.

제 1 항 내지 제 2 항에 있어서,

무전하 극성 아미노산을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 항산화성 펩타이드.

청구항 4.

제 3 항에 있어서,

상기 무전하 극성 아미노산은 시스테인 또는 글루타민 중에서 선택되어지는 하나 이상의 아미노산인 것을 특징으로 하는 항산화성 펩타이드.

청구항 5.

제 1 항 내지 제 4 항에 있어서,

펩타이드를 구성하는 아미노산 중 1개 이상이 D-form의 아미노산인 것을 특징으로 하는 항산화성 펩타이드.

청구항 6.

제 1항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 의한 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 심혈관 장애질환의 예방·치료용 항산화제.

청구항 7.

제 1 항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 의한 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 대사성 질환의 예방·치료용 항산화제.

청구항 8.

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 의한 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 노화 및 노인성 질환의 예방·치료용 항산화제.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 동맥경화증 등 저밀도 지단백질의 산화로 인해 야기되는 심혈관성 질환의 예방 또는 치료용으로 활용될 수 있는 광범위 항산화성 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 십만명 당 순환기계 질환에 의한 사망자수는 127.8명으로 호흡기계 질환의 34.5명, 소화기계 질환의 29.4명에 비해 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 단핵구의 혈관벽 내로의 이동 및 대식세포로의 변형, 지질과 손상된 세포 및 조직의 침착, 평활근세포의 증식 및 섬유화, 혈소판의 흡착 및 응집반응이라는 일련의 병리학적 변화를 동반하며, 이로 인한 혈관의 비후, 수축 및 협착을 거쳐 동맥벽이 경화되는 메카니즘은 두 이론에서 동일하다.

동맥경화성 병변의 유발 및 촉진요인으로는 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 진행되어왔다.

최근의 연구 결과로 정상적인 LDL은 세포내에서 cholesterol 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 섭취로 부터 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 점착해 MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)과 M-CSF(macrophage colony-stimulation factor)의 분비를 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 monocyte-macrophage의 scavenger receptor에 포착되어 세포내의 콜레스테롤 함량을 조절하지 못하게 된다. 결국에는 대식세포 내에 콜레스테롤의 축적에 따른 foam cell의 형성으로 이어지며 다량의 ROSs 를 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 탐색연구에서 천연물로부터 도래되는 여러 가지 항산화제의 보호효과가 보고되었는데 대개가 polyphenol 류의 항산화에 관해 주로 보고되어 왔으나 이러한 polyphenol 류의 prooxidant 효과가 보고되면서 항산화제로서의 한계가 파악되었다. 게다가 이러한 LDL 산화는 주로 Cu^{2+}에 의한 LDL산화에 관한 것이 주로 되어 온 반면에, Fe^{2+}, alkylperoxyl radicals 이나 HOCl에 의한 LDL 산화에 대한 항산화 보호 연구는 부진하다. 또한 α-tocopherol, β-carotene, 또는 ascorbic acid와 같은 천연 항산화제에 의해 LDL 산화를 방지하는 방안이 시도되어 왔으나, 이러한 지용성 항산화제의 효과는 LDL 산화의 지연에 국한되고, 근본적으로 LDL 산화물 생성을 감소시키지 못했다.

오히려 LDL 내 vitamin E의 함량 증가는 prooxidant 작용과 관련된 atherogenicity를 증대시킬 수 있다는 문제점이 제기되었다. 한편 probucol이나 BHT와 같은 항산화제는 현저한 항산화 역할에도 불구하고 부작용이 많아 사용이 제한되고 있다.

LDL 산화는 여러가지 요인(ROS, peroxynitrite, HOCl, lipoxygenase 등)에 의해서 유발되며, 일단 산화가 개시되면 쉽게 LDL peroxidation이 진행되므로 산화를 초기에 방지하는 것이 중요하다. LDL의 산화는 HDL의 존재하에 크게 감소하므로, HDL은 LDL 산화를 방지하는 기능을 지닌 것으로 파악되었고, 이는 HDL에 결합된 단백질의 항산화 활성이 oxLDL의 생성을 감소시키기 때문으로 설명되고 있다(Jerlich et al., *Biochim. Biophys. Acta,* 2000; 1481, 109; Harats et al., *Arteriol. Thrombo. Vascul. Biol.*, 2000; 20, 2100; Ahmed et al., *J. Biol. Chem.* 2001; 276, 24473; Ahmed et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 2002; 290, 391.).

Antiatherogenicity와 관련된 HDL에 함유된 단백질 중에서 특히 PON 1은 산화물생성방지 및 분해 활성을 통해 LDL 산화물의 생성방지에 중요한 것으로 보고되어 왔으며, knock-out mice 실험에서 PON1의 항산화 역할이 확인되었다. 이외에 HDL에 존재하는 혈소판 활성인자 분해효소(PAF-AH)는 lipid 산화물을 제거하거나, PON1의 항산화 기능을 강화하며(Durrington et al., *Arteriosl. Thrombo. Vascul. 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; Kontush et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003), apolipoprtoein A1은 PON1 활성을 안정화하거나 보강하는 것으로 알려져 있어, 이러한 HDL 에 결합된 단백질들과 PON1 간의 synergy 효과가 기대된다. 이러한 차원에서 PON1은 항산화 단백질로서, HDL 산화를 방지하는 효과를 표시하는 것으로 알려져 있다.

PON1은 ROS에 의한 산화적 구조변형에 취약한 것으로 보고 되었으며 특히 Cu^{2+}-bound hydroxyl ion, HOCl이나 lipid peroxidation 생성물인 aldehydes에 의해 불활성화되는 것으로 보고되었다. 최근의 연구에서 PON1의 구조적 특징이 항산화에 관계되는 것으로 보고되면서 PON1 구조 내에서 항산화 기능에 관여하는 부위의 펩타이드 구조의 특징에 대해 관심이 증대되었다. 별도로 최근에 항산화 단백질로 알려진 알부민(albumin)에 함유된 N-말단 서열 펩타이드인 Asp-Ala-His-Lys(서열번호 1) 등 펩타이드 류에 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 구조활성 관계에서, 펩타이드 구조내 히스티딘 잔기의 위치가 N-말단에서 2번째 또는 3번째에 존재하는 펩타이드류가 Cu^{2+} 산화에 대한 방지효과가 큰 것으로 밝혀졌다. 그럼에도 불구하고 이러한 펩타이드 류는 Cu^{2+}에 의한 산화에 대한 보호효과는 뚜렷한 반면에 alkyperoxyl radicals, HOCl등 다른 산화제에 대한 보호효과는 미흡하여 생체내에서 생성되는 여러 가지 산화계를 효과적으로 차단하는 데에는 한계가 있다. 아울러 고혈압 치료제 peptide로서 thiol기를 함유한 proline 유도체인 Zofenopril ([1(S),4(S)]-1(3-mercapto-2-methyl-1-oxopropyl)4-phenylthiol-L-proline-S-benzothioester)의 경우 항산화 효과가 보고되어 있으나 여러 가지 산화제에 대한 보호효과는 알려져 있지 않다(Scribner AW, 등, 2003, Eur J Pharmacol. 482, 1).

동맥경화증의 직접적 원인이 되는 LDL 산화에 관련된 주요 산화계로서는 Cu^{2+} 또는 Fe^{2+}에 의해 생성되는 hydroxyl radicals 과 alkylperoxyl radicals 그리고 HOCl/HOONO에 의한 산화가 있으나 이러한 산화계에 대해 공통적으로 보호작용을 나타내는 효과적인 항산화 펩타이드의 개발은 보고된 바가 없다.

따라서, 여러 산화계에 대해 보호 효과를 보이는 항산화 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 PON1의 구조로부터 도출된, 생체내에서 진행되는 여러 가지 산화계에 대해 광범위 항산화 활성을 갖는 펩타이드류를 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 목적을 달성하기 위한 본 발명은, LDL 및 HDL의 산화에 대한 우수한 항산화능을 표시함으로서 동맥경화증의 예방·치료제로 활용될 수 있는 히스티딘 잔기를 함유하는 광범위 항산화성 펩타이드에 관한 것으로서, His-Lys 잔기가 N-말단에서 둘째 또는 셋째 위치에 존재하고 Tyr 잔기를 추가하는 것을 특징으로 하는 광범위 항산화성 펩타이드에 관한 것이다.

이하 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

동맥경화증 질환의 직접적 원인이 되는 LDL 산화를 방지하는 항산화 펩타이드 구조를 도출하기 위해, in vivo system에서 항산화 작용이 알려진 단백질 PON1의 서열(도 1, 서열번호 2)을 검토한 결과 히스티딘 잔기가 비교적 많이 단백질 구조 한쪽으로 몰려서 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 일반적으로 히스티딘은 항산화 아미노산으로 알려져 있으며 Cu^{2+} 이온에 의해 야기된 산화 시 Cu^{2+} 이온을 직접 chelation하여 항산화 효과를 나타내고, 히드록실 라디칼 제거능도 우수한 아미노산으로 보고되어 있다. 또한, 본 발명자는 PON1 효소의 Cu^{2+} 이온 산화과정에서(Su and Sok, Free Radical Res. 2004; 45, 2211) 효소 단백질 내 히스티딘 잔기가 소실되는 것을 관찰하여(Su and Sok, Free Radical Res. 2004; 37, 1319), PON1의 항산화성에 구조내 히스티딘 잔기가 중요한 역할을 하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 PON1 염기서열 중 히스티딘 잔기를 지닌 서열을 중심으로 한 펩타이드들이 항산화성이 있을 것으로 예상할 수 있었으며, 항산화 기능을 가질 것으로 예상되는 펩타이드와 비교 실험을 위해 일부 서열을 변경한 펩타이드 총 21가지의 구조를 도출하고 종래에 알려진 고상 합성법에 의하여 합성하였다.

상기 펩타이드의 아미노산 서열은 표 1에 기재하였으며 PON1의 서열 위치에 따라 분류하여 기호로 표기하였다.

[표 1]

표시기호	서열	서열번호
I-1	Leu-Ala-His-Lys-Ile-His-Val-Tyr-Glu-Lys-His-Ala	서열번호 3
I-2	Val-Tyr-Glu-Lys-His-Ala	서열번호 4
II-1	Leu-Trp-Val-Gly-Cys-His-Pro-Phe-Gly-Met-Lys-Ile-Phe-Tyr-Asp	서열번호 5
II-2	Leu-Trp-Val-Gly-Cys-His-Pro	서열번호 6
II-3	Leu-Trp-Val-Gly-Ala-His-Pro	서열번호 7
II-4	Phe-Gly-Met-Lys-Ile-Phe-Tyr-Asp	서열번호 8
II-5	Gly-Cys-His-Pro	서열번호 9
II-6	Gly-Ala-His-Pro	서열번호 10
III-1	Thr-Val-Phe-His-Lys-Ala-Leu-Tyr	서열번호 11
III-2	Thr-Val-Phe-His-Lys-Ala-Leu	서열번호 12
III-3	Val-Phe-His-Lys-Ala-Leu-Tyr	서열번호 13
III-4	Phe-His-Lys-Ala-Leu-Tyr	서열번호 14
III-5	Phe-His-Lys-Ala	서열번호 15
III-6	Phe-His-Lys	
III-7	Phe-His-Lys-Tyr	서열번호 16
IV-1	Val-Asn-His-Pro	서열번호 17
IV-2	Asn-Pro-His-Gly	서열번호 18
IV-3	Val-His-Pro	
IV-4	Asn-His-Pro	
V	Asp-Pro-Tyr-Leu-Arg-Ser-Trp-Glu-Met-Tyr-Leu-Gly	서열번호 19
VI	Arg-Asn-His-Gln-Ser-Ser-Tyr-Gln-Thr-Arg-Phe	서열번호 20

상기의 합성된 펩타이드에 대해 항산화 활성을 갖는 펩타이드를 선별하고 검증하기 위하여 실시예 2 내지 실시예 10에 보여주듯이 다양한 산화계, 즉 Cu^{2+}, Fe^{2+}, alkylperoxyl 라디칼 또는 HOCl에 대해 유도되는 LDL의 산화에 대한 항산화 활성을 측정하였다.

본 발명의 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 5μM copper 이온 존재 시 LDL의 산화에 대한 상기 펩타이드의 항산화성을 측정한 결과, II-2, II-5, III-3, III-4, III-7, IV-1 및 IV-4의 항산화 활성이 85% 이상으로 뛰어남을 알 수 있었고, 이들의 항산화 활성은 종래 기술에 의한 Asp-Ala-His-Lys의 항산화 활성 84.2%보다도 우수함을 알 수 있었다(표 2). 상기 펩타이드 중 일부에 대하여 5μM copper 이온 존재 시 HDL의 산화에 대한 항산화성을 측정한 결과, LDL에 대해 높은 항산화성을 보인 펩타이드는 HDL에 대해서도 마찬가지로 높은 항산화 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(표 3).

또한, 산화적 구조변형에 취약한 것으로 알려진 PON1의 ascorbate/copper ion에 의해 유도된 불활성화에 대해서도 역시 LDL의 산화에 대한 항산화 활성을 표시한 펩타이드들이 유사한 보호효과를 표시하였으며, 구체적으로는 펩타이드 II-2, II-5, III-4, III-5, III-7, IV-1 및 IV-4의 표시효과가 70% 이상을 나타내었다. 또한 이들은 68.6%의 보호효과를 나타낸 Asp-Ala-His-Lys에 비해서도 현저한 효과를 나타내었다(표 4). 아울러 이들 중 II-2, III-3 및 III-4에 대하여 peptide/Cu^{2+} complex의 superoxide dismutase activity의 평가 시 0.5μM의 낮은 complex 농도에서 뚜렷한 superoxide dismutase 활성을 표시하였다(표 5).

합성된 펩타이드를 무작위로 선택하여 ascorbate/Fe^{2+} 에 의해 유도된 PON1의 불활성화에 대한 보호효과를 시험해 본 결과, ascorbate/Cu^{2+}에 의해 유도된 PON1의 불활성화에 대해서 보호효과를 갖는 펩타이드들이 역시 보호효과를 나타내는 것으로 확인되었다(표 6).

LDL의 또 다른 산화요인인 alkylperoxyl radical에 대한 본 발명의 펩타이드들의 항산화효과를 알아보기 위하여, alkylperoxyl radical generator인 AAPH(2,2'-azobis(2-aminopropane) dihydrochloride)에 의해 유도되는 LDL산화에 대한 항산화 활성을 측정하였다. 그 결과 I-1, II-1, II-2, III-1, III-3, III-4, III-7, V 및 VI이 LDL의 AAPH 산화에 대한 항산화 활성(28-43% 보호)이 특히 뛰어남을 알 수 있었다(표 7). 이는 종래기술에 의한 Asp-Ala-His-Lys이 Cu^{2+}에 대해서는 높은 항산화성을 나타내었지만, alkylperoxyl radical에 대해서는 항산화성이 낮은(13.3%) 것과는 대조되는 결과이다. 아울러 AAPH 에 의한 PON1의 불활성화에 대해서 역시 합성된 대부분의 펩타이드가 우수한 보호효과를 표시하였다(표 8).

주요 산화계의 일종인 HOCl에 의한 acetylcholinesterase의 불활성화에 대해 I-1, II-1, II-2, II-3, II-4, III-4 및 V가 HOCl을 제거함에서 뚜렷한 항산화 보호효과를 보인 반면에 기존 보고된 Asp-Ala-His-Lys의 보호효과는 미약하였다(표 9).

상기의 결과에서 항산화성이 우수한 펩타이드의 공통적인 특징으로는 (1) His-Lys 잔기가 N-말단에서 둘째 또는 셋째 위치에 존재하며 추가로 Tyr 잔기를 포함하거나(I-1, III-3, III-4 및 III-7), (2) His-Pro 잔기가 C-말단에 존재하는 것(II-2, II-3, II-5, II-6, IV-1, IV-3, IV-4)을 특징으로 한다. 이 중 His-Lys 잔기가 N-말단에서 둘째 또는 셋째 위치에 존재하며 추가로 Tyr 잔기를 포함하는 첫 번째 부류의 펩타이드에 관해서는 별개의 특허로 출원한다. 상기 펩타이드들은 펩타이드를 구성하는 아미노산의 개수가 3~10개인 것이 바람직하며 3~7개인 것이 더욱 바람직하다.

His-Pro 잔기가 C-말단에 존재하는 경우에는 Cu2+ 와 그 이외의 산화계에 대해 광범위한 항산화 효과를 나타내었다. 그러나, His-Pro 잔기가 펩타이드의 중간에 존재하는 펩타이드 II는 다른 산화계에 대해서는 현저한 항산화 효과를 나타내었으나 Cu2+ 에 의한 항산화 효과는 극히 미약하여 His-Pro 잔기의 위치가 Cu2+ 산화에 대한 항산화 효과를 비롯한 광범위 항산화 효과에 중요함을 알 수 있다.

상기의 His-Pro 잔기가 C-말단에 존재하는 펩타이드는 무전하 극성 아미노산(Ser, Thy, Tyr, Cys, Asn, Cln 또는 Gly)를 추가로 함유하는 것이 더욱 바람직하다. 실시예에서 볼 수 있듯이 무전하 극성 아미노산인 Cys 또는 Gln 잔기를 추가로 함유하는 펩타이드(II-2, II-6, IV-1 및 IV-4)는 그렇지 않은 펩타이드에 비해 항산화성이 현저하게 증가하였으며, Cys 잔기를 함유하는 경우 그 효과가 더욱 현저하였다.

실시예에서는 상기 펩타이드들을 자연계에 존재하는 L-form의 아미노산을 사용하여 제조하였으나, 펩타이드를 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 의하여 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 항산화효과를 갖는 예방·치료제로 사용할 수 있다.

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

또한 본 발명의 항산화 펩타이드는 광범위한 산화계에 대한 항산화성으로 인하여 항산화 화장품 재료로도 사용할 수 있다. 본 펩타이드에 의한 항산화 화장품은 로션이나, 크림, 에센스, 팩 등의 형태로 화장품 분야에서의 공지의 방법으로 제조할 수 있다.

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

실시예

실시예 1 : 항산화 펩타이드 류의 도출

펩타이드 시료는 표 1에 기재된 21가지를 보고된 고상 합성법에 의해 N-말단 보호기에 의해 Fmoc-/ Boc-법에 의해 탈수축합에 의한 산아미드 결합과 선택적인 탈보호반응을 극대화시키는 최적 합성 방법을 사용하여 합성하였다(Molly A. Bower 등 *Letters in Peptide Science*, 2003, *10*, 463; Holger Wenschuh 등, *Biopolymers*(Peptide Science), 2000, *55*, 188). 합성된 시료는 LC/MS 에 의해 분자량과 구조를 확인하였다(데이타 생략). 펩타이드를 증류수 또는 중수소탄산완충액(pH 10.5)에 용해한 후에 필요한 농도에 맞추어 첨가하여 다음의 실시예에서 사용하였다.

실시예 2 : 펩타이드 농도에 따른 LDL 산화에 대한 항산화 효과 분석

사람의 혈액으로부터 기존 방법(Aviram M et al., Free Radic. Biol. Med., 1999, 26, 892)에 의해 분리한 LDL(50mg protein 함량)을 0.5mM ascorbate와 1mM H_2O_2를 함유한 PBS(phosphate buffered saline) 완충액 50mL에 넣고서 $CuCl_2$의 농도가 20μM이 되도록 첨가하여 반응용액(reaction solution)을 제조하였다. 상기 반응 용액 각 1 mL에 실시예 1 에서 제조한 펩타이드 II-2, III-3, III-4 또는 Asp-Ala-His-Lys(이하 실시예에서 사용한 Asp-Ala-His-Lys은 Bachem 회사에서 구매하여 사용하였다)의 농도가 5, 10, 20, 40μM이 되도록 추가하여 각각의 펩타이드 용액을 제조한 후에 3시간 동안 38℃에서 교반하여 산화시킨 후에 상기 혼합액에 8.1% SDS 1mL, 20% 아세트산 2mL 및 0.75% 티오바비튜릭산(TBA, thiobarbituric acid) 1mL를 첨가하였다. 상기 혼합물을 15분간 가열하여 끓인뒤 30분 동안 얼음에 놓아둔 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 15 분 동안 끓인 후 얼음에 5분 동안 놓아두고 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 원심분리로 얻어진 상층액의 533 nm에서의 흡광도를 UV/VIS 스펙트로메터를 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(malondialdehyde)를 이용해 Gutteridge, J.M.C.의 방법(*Analytical Biochemistry*, 1975, 69, 518-526)에 따라 보정(calibration)하였다.

지질 과산화의 억제 정도는 펩타이드 수 가지 농도로 처리했을때의 지질 과산화 억제 정도를 나타낸 곡선으로부터 % 저해 효과를 나타내었다. 항산화 활성은 하기 수학식 1에 나타난 바와 같이 대조군(펩타이드를 첨가하지 않은 것)에 대한 TBA 반응성 기질(TBARS, thiobarbituric acid reactive substrate)의 퍼센트 감소 정도로 나타내어 도 2의 그래프로 나타내었다.

<수학식 1>

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

상기에서 $A_{\text{샘플군}}$: LDL/펩타이드/ascorbate/H_2O_2/Cu^{2+} 혼합액에 의한 흡광도,

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

$A_{\text{비교군2}}$: LDL 및 ascorbate/H_2O_2/Cu^{2+} 혼합액에 의한 흡광도,

$A_{\text{대조군}}$: LDL 자체에 의한 흡광도.

도 2(○, Asp-Als-His-Lys; ▲, II-2; △, III-3; ■, III-4)에 표기한 바와 같이, 각 펩타이드들은 모두 뚜렷한 항산화 효과를 보여주었으며, 대체로 활성이 큰 펩타이드의 유효 농도값은 대개 10 μM 이하로 나타났으며 이와 같은 결과는 일단 $CuCl_2$가 결합시 각 펩타이드에 단단히 결합됨을 의미한다.

실시예 3 : Cu^{2+}에 의한 LDL 산화에 대한 펩타이드의 항산화 효과 분석

본 발명의 펩타이드가 항산화 활성을 가지는지 알아보기 위해 상기 실시예 1에 기술된 각 펩타이드의 Cu^{2+}에 의한 LDL의 산화에 대한 항산화 평가 실험(*in vitro*)을 수행하였다(표 2).

PBS 완충액이 ascorbate와 H_2O_2를 함유하지 않고, Cu^{2+}의 농도가 5μM, 펩타이드의 농도가 5μM인 것을 제외하고는 실시예 2의 방법과 동일한 방법에 의하여 펩타이드 존재하에서 LDL을 산화시키고, 샘플을 제조하여 533nm에서의 흡광도를 측정하였다. <수학식 1>의 $A_{\text{비교군2}}$에 LDL 및 $CuCl_2$ 혼합액의 533nm에서의 흡광도 값을 대입하여 항산화활성을 계산하여 표 2에 나타내었다.

표 2의 결과에서 볼 수 있듯이, His 잔기를 함유하는 대부분의 펩타이드가 높은 항산화활성을 나타내었으며, 특히 II-2, II-5, III-3, III-4, III-7, IV-1 및 IV-4의 항산화 활성이 85% 이상으로 뛰어남을 알 수있었다. 이들 대부분의 항산화 활성은 종래 기술에 의한 Asp-Ala-His-Lys의 항산화 활성 84.2%보다도 우수함을 알 수 있었다.

[표 2]

Cu^{2+}에 의해 유도되는 LDL 산화에 대한 항산화 펩타이드 의 보호효과

Treatment	Conc. (μM)	Inhibition, (%)
Cu^{2+} + None	5	0
+ Asp-Ala-His-Lys	5	84.2 ±0.7
+ I-1	5	53.6 ±4.1
+ I-2	5	21.9 ±2.5
+ II-1	5	6.9 ±1.1
+ II-2	5	87.9 ±1.8
+ II-3	5	58.8 ±3.6
+ II-4	5	4.4 ±0.2
+ II-5	5	85.6 ±3.1
+ II-6	5	81.7 ±2.8
+ III-1	5	3.8 ±0.3
+ III-2	5	2.6 ±0.2
+ III-3	5	88.4 ±0.4
+ III-4	5	89.2 ±2.4
+ III-5	5	75.3 ±2.9
+ III-6	5	21.1 ±1.4
+ III-7	5	89.9 ±3.5
+ IV-1	5	96.9 ±5.2
+ IV-2	5	10.4 ±1.4
+ IV-3	5	76.4 ±2.6
+ IV-4	5	88.8 ±2.6
+ V	5	0.4 ±1.3
+ VI	5	77.7 ±3.6

실시예 4 : Copper ion 에 의한 HDL에 대한 항산화 활성 분석

본 발명의 펩타이드가 항산화 활성을 가지는지 알아보기 위해 각 펩타이드의 HDL 산화에 대한 항산화 평가 실험(in vitro)을 수행하였다.

LDL 대신 HDL을 사용한 것을 제외하고는 실시예 3과 동일한 방법으로 펩타이드 존재 하에서 HDL을 산화시키고, 샘플을 제조하여 533nm에서의 흡광도를 측정하였다. <수학식 1>에서도 LDL 대신 HDL을 사용한 혼합액의 533 nm에서의 흡광도 값을 대입하여 항산화활성을 계산하여 표 3에 나타내었다.

[표 3]

Cu^{2+}에 의해 유도되는 HDL 산화에 대해 항산화 펩타이드가 나타내는 항산화 보호효과

Treatment	Conc. (μM)	Inhibition, (%)
Cu^{2+} + None	5	0
+ Asp-Ala-His-Lys	5	35.3 ±1.7
+ I-1	5	17.7 ±4.3
+ I-2	5	19.2 ±3.5
+ II-1	5	6.6 ±1.8
+ II-2	5	38.0 ±3.8
+ II-3	5	58.8 ±3.5
+ II-4	5	6.4 ±2.5
+ III-3	5	35.3 ±2.4
+ III-4	5	42.4 ±3.4

실시예 5 : Cu^{2+}에 의한 PON1의 불활성화에 대한 항산화 활성 분석

본 발명의 펩타이드가 항산화 활성을 가지는지 알아보기 위해 각 펩타이드의 PON1의 산화적 불활성화에 대한 항산화 평가 실험(in vitro)을 수행하였다. Glutathione은 Sigma에서 구매하여 사용하였다.

PON1(5units/mL)를 50μM의 $CaCl_2$가 함유된 50mM N-2- hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) 완충액(pH 7.4)에 넣고서 ascorbate(0.5 mM)와 $CuCl_2$(1μM)을 첨가한 후에 각 펩타이드의 존재하에 38도에서 10분간 동안 산화시킨 후에 일정량을 취하여 270nm에서의 흡광도를 측정함으로써 PON1의 잔류 활성도를 측정하였다. 대조군과 비교하여 하기의 <수학식 2>에 의하여 보호활성(%)을 산출하여 표 4에 나타내었다.

<수학식 2>

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

상기에서

$A_{\text{대조군}}$: PON1만의 활성도,

$A_{\text{비교군1}}$: 상기 sample 용액의 270nm에서의 흡광도,

$A_{\text{비교군2}}$: ascorbate 및 Cu^{2+}의 처리후 270nm에서의 흡광도,

PON1의 활성도는 PON1(5units/mL)을 phenyl acetate(1 mM)와 1mM $CaCl_2$를 함유한 0.05 mM Tris buffer(pH 8.0)에 PON1을 넣은 직후와 2 분후 상온에서 270nm에서의 흡광도의 변화(△A)로 측정하였다.

[표 4]

ascorbate/Cu^{2+}에 의한 PON1의 불활성화에 대한 펩타이드의 보호효과

Treatment	Conc.(μM)	Protection, (%)
Ascobate/Cu^{2+}+ none	500/1	0
+ Asp-Ala-His-Lys	5	68.6 ±5.8
+ I-1	5	67.0 ±3.2
+ I-2	5	18.1 ±2.5
+ II-1	5	15.5 ±0.9
+ II-2	5	78.0 ±7.8
+ II-3	5	63.5 ±2.9
+ II-4	5	-8.1 ±1.7
+ II-5	5	88.9 ±4.5
+ II-6	5	50.5 ±3.1
+ III-1	5	17.4 ±3.6
+ III-2	5	11.1 ±2.9
+ III-3	5	43.2 ±2.9
+ III-4	5	100.3 ±5.2
+ III-5	5	79.8 ±4.9
+ III-6	5	67.8 ±4.6
+ III-7	5	81.9 ±5.6
+ IV-1	5	76.3 ±0.9
+ IV-2	5	14.5 ±5.4
+ IV-3	5	43.2 ±1.9
+ IV-4	5	75.5 ±1.5
+ VI	5	0.3 ±2.8
+ Glutathione	5	29.8 ±5.4

실시예 6 : 펩타이드/Cu^{2+} complex의 superoxide dismutase 활성 분석

Beauchamp and Fridovich 방법(*Anal. Biochem.* 44: 276-287; 1971)에 의거하여, 0.1 mM xantihnine, 25 mM nitroblue tetrazolium(NBT) 및 xanthine oxidase (20 nM)를 함유한 0.5mL의 50mM 탄산 완충액(pH 10.2)에 펩타이드/Cu^{2+} complex를 넣은 후에 560 nm 에서의 흡광도 증가를 5분간 측정하였다. 상기 펩타이드/Cu^{2+} complex는 1 mM 펩타이드와 $CuCl_2$(1 mM)를 100μl의 HEPES buffer(pH 7.4)에 가하여 상온에서 30 분간 반응시켜 제조한 후, 하기 표 5에 기재된 농도가 되도록 취하여 사용하였다. 이때 xanthine oxidase만에 의한 NBT 산화에 따른 흡광도 증가를 100%로 간주하고 각 peptide complex의 존재하에 감소시킨 %를 활성도로 표시하여, 세 번 반복 실험에 의한 평균값과 표준편차를 표 5에 나타내었다.

[표 5]

펩타이드/Cu^{2+} complex에 의한 superoxide dismutase 활성

Treatment	Conc of Peptide:Cu^{2+} 1:1 complex (μM)	Activity, (%)
Cu^{2+}-(Asp-Ala-His-Lys) complex	0.5	0.1 ± 4.9
	1.0	22.1 ± 1.0
Cu^{2+}-(II-2) complex	0.5	29.1 ± 2.4
	1.0	50.6 ± 4.6
Cu^{2+}-(III-3) complex	0.5	21.2 ± 5.1
	1.0	39.2 ± 3.7
Cu^{2+}-(III-4) complex	0.5	28.6 ± 5.8
	1.0	54.4 ± 1.4

실시예 7 : Fe^{2+}에 의한 PON1의 불활성화에 대한 항산화 활성 분석

본 발명의 펩타이드가 ascorbate/Fe^{2+} 산화에 대해 항산화 활성을 가지는지 알아보기 위해 각 펩타이드의 PON1의 산화적 불활성화에 대한 항산화 평가 실험(in vitro)을 수행하였다.

구체적으로는, Cu^{2+} 대신 Fe^{2+}($FeSO_4$)를 4uM의 농도로 사용한 것을 제외하고는 실시예 5와 동일한 방법에 의하여 보호활성(%)을 산출하여 표 6에 나타내었다. 보호활성은 <수학식 2>에서 $A_{비교군2}$에 ascorbate 및 Fe^{2+}의 처리후에 270nm에서의 흡광도를 대입하여 계산하였다.

[표 6]

ascorbate/Fe^{2+}에 의한 PON1의 불활성화에 대한 항산화 펩타이드의 보호효과

Treatment	Conc(μM)	Protection, (%)
+ Asp-Ala-His-Lys	5	35.24 ±5.1
+ I-1	5	41.44 ±1.2
+ I-2	5	10.21 ±1.2
+ II-1	5	48.64 ±4.6
+ II-2	5	46.41 ±4.3
+ III-3	5	35.89 ±2.5
+ III-4	5	53.27 ±7.4

실시예 8 : AAPH에 의한 LDL 산화에 대한 펩타이드의 항산화 효과

PBS 완충액이 ascorbase와 H_2O_2를 함유하지 않고, Cu^{2+} 대신 AAPH의 농도가 5mM, 펩타이드의 농도가 50μM인 것을 제외하고는 실시예 1에서 제조한 모든 펩타이드에 대해 실시예 2의 방법과 동일한 방법에 의하여 펩타이드 존재하에서 LDL을 산화시키고, 샘플을 제조하여 533nm에서의 흡광도를 측정하였다. <수학식 1>의 $A_{비교군2}$를 LDL 및 AAPH 혼합액의 반응후 533 nm에서의 흡광도 값을 대입하여 항산화활성을 계산하여 표 7에 나타내었다.

[표 7]

Alkylperoxyl 라디칼 생성물질(AAPH)에 의한 LDL 산화에 대한 펩타이드의 항산화 효과

Treatment	Conc.(μM)	Protection, (%)
AAPH + None	5	0
+ Asp-Ala-His-Lys	5	13.3 ± 2.3
+ I-1	5	28.7 ± 3.5
+ I-2	5	5.6 ± 2.1
+ II-1	5	42.6 ± 3.1
+ II-2	5	37.7 ± 2.6
+ II-3	5	22.9 ± 3.4
+ II-4	5	4.4 ± 1.0
+ II-5	5	26.1 ± 0.4
+ II-6	5	16.0 ± 2.1
+ III-1	5	38.6 ± 3.7
+ III-2	5	11.0 ± 1.2
+ III-3	5	36.8 ± 1.1
+ III-4	5	39.3 ± 3.1
+ III-5	5	9.1 ± 1.2
+ III-6	5	4.7 ± 0.5
+ III-7	5	40.3 ± 4.3
+ IV-1	5	14.2 ± 2.5
+ IV-2	5	8.1 ± 1.6
+ IV-3	5	3.4 ± 0.2
+ IV-4	5	9.1 ± 2.5
+ V	5	28.4 ± 3.5
+ VI	5	30.0 ± 3.9

아울러 도 3(○, Asp-Als-His-Lys; ▲, II-2; △, III-3; □, II-1; ■, III-4)에 표기한 바와 같이, 각 펩타이드들은 모두 경시별로 뚜렷한 항산화 효과를 보여주었으며, 대체로 활성이 큰 펩타이드 (II-1, II-2, III-3, III-4)는 경시별 항산화능의 감소가 완만한 반면에 Asp-Als-His-Lys는 비교적 빠른 감소가 나타내었다.

실시예 9 : AAPH 에 의한 PON1의 불활성화에 대한 항산화 활성 분석

ascorbate와 Cu염 대신 AAPH을 5mM의 농도로 사용하고, 각 펩타이드를 50μM 또는 100μM을 투입하여 38℃에서 3시간 산화한 것을 제외하고는 실시예 5와 동일한 방법에 의하여 보호활성(%)을 산출하여 표 8에 나타내었다. 보호활성을 산출한 <수학식 2>에서 $A_{비교군2}$는 AAPH의 270nm에서의 흡광도를 의미한다.

[표 8]

Alkylperoxyl 라디칼 생성물질(AAPH)에 의한 PON1의 불활성화에 대한 항산화 펩타이드의 보호효과

Treatment	Conc.(μM)	Protection. (%)
AAPH + None	5000	0
+ Asp-Ala-His-Lys	100	32.6 ±3.6
+ I-1	100	51.3 ±6.9
+ I-2	100	2.3 ±4.7
+ II-1	100	52.8 ±3.4
+ II-2	50	64.2 ±5.2
	100	83.0 ±9.4
+ II-3	100	56.3 ±2.9
+ II-4	100	-7.3 ±2.1
+ II-5	100	52.2 ±4.3
+ II-6	100	38.8 ±0.9
+ III-1	100	35.7 ±3.2
+ III-2	100	3.3 ±2.5
+ III-3	100	38.4 ±5.6
+ III-4	100	39.1 ±6.2
+ III-5	100	10.8 ±3.1
+ III-6	100	6.2 ±2.1
+ III-7	100	44.9 ±2.6
+ IV-1	100	42.3 ±5.0
+ IV-2	100	14.7 ±3.9
+ IV-3	100	39.6 ±4.2
+ IV-4	100	39.1 ±3.7
+ V	100	4.6 ±1.1
+ Histidine	100	26.2 ±4.4
+ Cysteine	100	38.3 ±2.4

실시예 10 : HOCl 에 의한 acetylcholinesterase의 불활성화에 대한 항산화 활성 분석

본 발명의 펩타이드가 항산화 활성을 가지는지 알아보기 위해 펩타이드의 acetylcholinesterease의 HOCl에 의한 산화적 불활성화에 대한 항산화 평가 실험(in vitro)을 수행하였다.

구체적으로, acetylcholine esterease(0.025 unit/ml)를 0.1mL PBS 완충액(pH 7.4)에 넣고서 HOCl(0.01 mM)을 첨가한 후에 각 펩타이드를 10μM 농도로 첨가하여 37도에서 15분간 산화시킨 후 20uL를 취하여 acetylcholine esterase의 잔류 활성도를 측정하였다. Acetylcoline esterase의 활성도는 0.1 M 인산 완충액(pH 7.4)에 acetylthiocholine(1 mM)과 DTNB 시약을 넣은후에 412nm 에서의 흡광도 증가로 측정하였다(표 8).

<수학식 3>

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

상기에서

$A_{\text{대조군}}$: acetylcholinesterase의 활성도,

$A_{\text{비교군1}}$: HOCl과 펩타이드 존재하의 acetylcholine esterase의 활성도,

$A_{비교군2}$: HOCl 존재하의 acetylcholine esterase의 활성도,

[표 9]

[HOCl에 의한 acetylcholine esterease의 불활성화에 대한 항산화 펩타이드의 보호효과

Treatment	Conc.(μM)	Protection, (%)
HOCl/PON 1	50/0.1	133.2 ±0.2
HOCl + none	10	0
+ Asp-Ala-His-Lys	10	27.8 ±3.7
+ I-1	10	99.5 ±11.1
+ I-2	10	36.3 ±4.7
+ II-1	10	94.3 ±2.8
+ II-2	10	72.5 ±6.9
+ II-3	10	56.5 ±5.6
+ II-4	10	64.7 ±6.7
+ II-5	10	33.4 ±10.4
+ II-6	10	6.7 ±5.0
+ III-1	10	54.6 ±4.9
+ III-2	10	30.7 ±4.1
+ III-3	10	48.3 ±3.7
+ III-4	10	104.1 ±3.1
+ III-5	10	12.9 ±7.8
+ III-6	10	2.2 ±3.9
+ III-7	10	31.8 ±13.0
+ IV-3	10	16.0 ±3.6
+ V	10	107.6 ±6.6
+ VI	10	20.9 ±8.38

이하, 본 발명의 펩타이드류 를 이용하여 예방 또는 치료할 수 있는 구체적인 질환에 대해 설명한다.

적용예 1 : 동맥경화증(Atherosclerosis)

동맥경화증은 혈중 cholesterol 의 증가가 특징이나 그 주요원인은 LDL 산화로 알려져 있다. 이와 관련하여 혈관내 플라그 형성은 과도한 양의 활성산소에 의해 LDL 지질 과산화(lipid peroxidation), HDL 단백질의 HOCL 산화 등 동맥경화증에서 증가해 있다고 알려져 있다(V1995, Trends. Neurosci., 18, 172-176; Smith et al., 1996, Mol. Chem. neuropathol., 28, 41-48, Smith et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 94, 9866-9868; Montine et al., 1996, J. Neuropathol. Exp. Neurol., 55, 202-201). 따라서, 지단백질의 과산화 억제 활성 및 HDL 항산화 관련 단백질의 산화적 손상에 대해 보호활성이 우수한 본 발명의 펩타이드 류는 심혈관 질환의 예방·치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

적용예 2 : 대사성 질환(Metabolic diseases)

대사성 질환은 당뇨병, 고지질 증 등의 다양한 증상들을 나타내는 퇴행성 질환이다. 이러한 대사성 질환의 주요 원인으로 산화적 독성이 제시되고 있는데 주로 지질 과산화, DNA 산화, 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 세포내 산화와 관련된 대사성 질환의 예방·치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

적용예 3 : 기타 산화성 스트레스 관련 질환 (노화 등)

본 펩타이드 는 다양한 산화계에 대해 광범위하게 항산화효과를 표시함으로 산화성 스트레스에 의해 발생되는 노화나 기타 노인성 질환에 대해 항산화성 억제력을 표시함으로 다양한 산화성 질환에 대해 대사성 질환을 예방·치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 효과

이상과 같은 본 발명의 펩타이드들은 LDL 산화에 대한 항산화효과 뿐 아니라 다른 산화계에 대해서도 보호효과를 나타내어 생체내 산화성 스트레스에 대해 전반적으로 보호효과를 나타내는 광범위 항산화성을 나타낸다.

상기의 항산화 펩타이드들은 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 노화등의 산화성 스트레스에 관련된 질환의 예방·치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 PON1(paraoxonase1)의 아미노산 서열을 보여주는 모식도이다.

도 2는 Cu^{2+}/ascorabte/H_2O_2에 의해 유도되는 LDL 산화에 대한 본 발명에 의한 펩타이드의 항산화 효과를 보여주는 그래프이다.

도 3은 AAPH에 의해 유도되는 LDL 산화에 대한 본 발명에 의한 펩타이드의 항산화 효과를 보여주는 그래프이다.

도면

도면1

```
        10         20         30         40         50         60
AKLIALTLLG MGLALFRNHQ SSYQTRLNAL REVQPVELPN CNLVKGIETG SEDMEILPNG

        70         80         90        100        110        120
LAFISSGLKY PGIKSFNPNS PGKILLMDLN EEDPTVLELG ITGSKFDVSS FNPHGISTFT

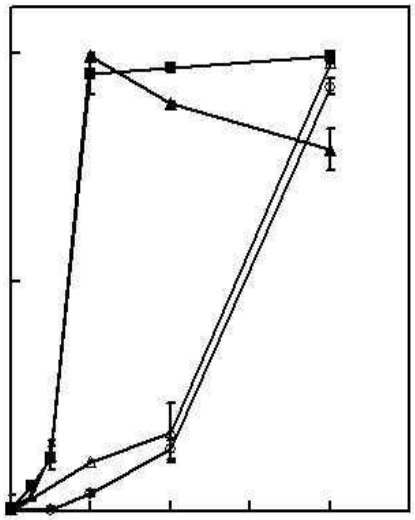
       130        140        150        160        170        180
DEDNAMYLLV VNHPDAKSTV ELFKFQEEEK SLLHLKTIRH KLLPNLNDIV AVGPEHFYGT

       190        200        210        220        230        240
NDHYFLDPYL QSWEMYLGLA WSYVVYYSPS EVRVVAEGFD FANGINISPD GKYVYIAELL

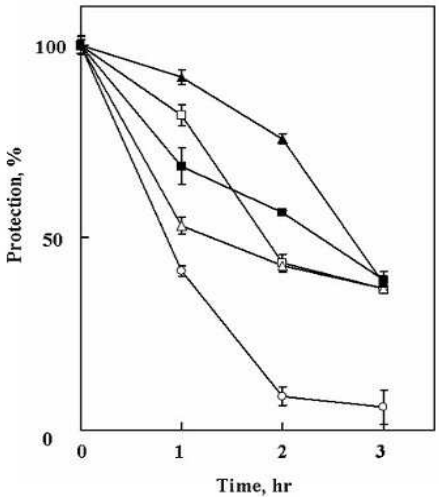
       250        260        270        280        290        300
AHKIHVYEKH ANWTLTPLKS LDFNTLVDNI SVDPETGDLW VGCHPNGMKI FFYDSENPPA

               310        320        330        340        350
SEVLRIQNIL TEEPKVTQVY AENGTVLQGS TVASVYKGKL LIGTVFHKAL YCEL
```

도면2



도면3



서열목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University

<120> Broad spectrum antioxidant peptides containing Histidine-Lysine and Tyrosine residue

<160> 20

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antioxidant peptides

<400> 1
Ala Ser Pro Ala Leu Ala His Ile Ser Leu Tyr Ser
1 5 10

<210> 2
<211> 354
<212> PRT
<213> human plasma

<400> 2
Ala Lys Leu Ile Ala Leu Thr Leu Leu Gly Met Gly Leu Ala Leu Phe
1 5 10 15

Arg Asn His Gln Ser Ser Tyr Gln Thr Arg Leu Asn Ala Leu Arg Glu
20 25 30

Val Gln Pro Val Glu Leu Pro Asn Cys Asn Leu Val Lys Gly Ile Glu
35 40 45

Thr Gly Ser Glu Asp Met Glu Ile Leu Pro Asn Gly Leu Ala Phe Ile
50 55 60

Ser Ser Gly Leu Lys Tyr Pro Gly Ile Lys Ser Phe Asn Pro Asn Ser
65 70 75 80

Pro Gly Lys Ile Leu Leu Met Asp Leu Asn Glu Glu Asp Pro Thr Val
85 90 95

Leu Glu Leu Gly Ile Thr Gly Ser Lys Phe Asp Val Ser Ser Phe Asn
100 105 110

Pro His Gly Ile Ser Thr Phe Thr Asp Glu Asp Asn Ala Met Tyr Leu
115 120 125

Leu Val Val Asn His Pro Asp Ala Lys Ser Thr Val Glu Leu Phe Lys
130 135 140

Phe Gln Glu Glu Glu Lys Ser Leu Leu His Leu Lys Thr Ile Arg His
145 150 155 160

Lys Leu Leu Pro Asn Leu Asn Asp Ile Val Ala Val Gly Pro Glu His
165 170 175

Phe Tyr Gly Thr Asn Asp His Tyr Phe Leu Asp Pro Tyr Leu Gln Ser
180 185 190

Trp Glu Met Tyr Leu Gly Leu Ala Trp Ser Tyr Val Val Tyr Tyr Ser
195 200 205

Pro Ser Glu Val Arg Val Val Ala Glu Gly Phe Asp Phe Ala Asn Gly

```
    210                 215                 220

Ile Asn Ile Ser Pro Asp Gly Lys Tyr Val Tyr Ile Ala Glu Leu Leu
225                 230                 235                 240

Ala His Lys Ile His Val Tyr Glu Lys His Ala Asn Trp Thr Leu Thr
                245                 250                 255

Pro Leu Lys Ser Leu Asp Phe Asn Thr Leu Val Asp Asn Ile Ser Val
            260                 265                 270

Asp Pro Glu Thr Gly Asp Leu Trp Val Gly Cys His Pro Asn Gly Met
        275                 280                 285

Lys Ile Phe Phe Tyr Asp Ser Glu Asn Pro Pro Ala Ser Glu Val Leu
    290                 295                 300

Arg Ile Gln Asn Ile Leu Thr Glu Glu Pro Lys Val Thr Gln Val Tyr
305                 310                 315                 320

Ala Glu Asn Gly Thr Val Leu Gln Gly Ser Thr Val Ala Ser Val Tyr
                325                 330                 335

Lys Gly Lys Leu Leu Ile Gly Thr Val Phe His Lys Ala Leu Tyr Gly
            340                 345                 350

Glu Leu
```

<210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antioxidant peptides

<400> 3

```
Leu Ala His Lys Ile His Val Tyr Glu Lys His Ala
  1               5                  10
```

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antioxidant peptides

<400> 4
Val Tyr Glu Lys His Ala
1 5

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antioxidant peptides

<400> 5
Leu Trp Val Gly Cys His Pro Phe Gly Met Lys Ile Phe Tyr Asp
1 5 10 15

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antioxidant peptides

<400> 6
Leu Trp Val Gly Cys His Pro
1 5

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antioxidant peptides

<400> 7
Leu Trp Val Gly Ala His Pro
1 5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antioxidant peptides

<400> 8
Phe Gly Met Lys Ile Phe Tyr Asp
1 5

<210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antioxidant peptides

<400> 9
Gly Cys His Pro
1

<210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antioxidant peptides

<400> 10
Gly Ala His Pro
1

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antioxidant peptides

<400> 11
Thr Val Phe His Lys Ala Leu Tyr
1 5

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antioxidant peptides

<400> 12
Thr Val Phe His Lys Ala Leu
1 5

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antioxidant peptides

<400> 13
Val Phe His Lys Ala Leu Tyr
1 5

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antioxidant peptides

<400> 14
Phe His Lys Ala Leu Tyr
1 5

<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antioxidant peptides

<400> 15
Phe His Lys Ala
1

<210> 16
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antioxidant peptides

<400> 16
Phe His Lys Tyr
1

<210> 17
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antioxidant peptides

<400> 17
Phe His Lys Tyr
1

<210> 18
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antioxidant peptides

<400> 18
Asn Pro His Gly
1

<210> 19
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antioxidant peptides

<400> 19
Asp Pro Tyr Leu Arg Ser Trp Glu Met Tyr Leu Gly
1 5 10

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antioxidant peptides

<400> 20
Arg Asn His Gln Ser Ser Tyr Gln Thr Arg Phe
1 5 10