(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0094636
(43) 공개일자 2025년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/18 (2016.01) *A61K 31/198* (2024.01)
A61K 38/00 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/18 (2016.08)
A61K 31/198 (2024.01)
(21) 출원번호 10-2025-0076610(분할)
(22) 출원일자 2025년06월11일
심사청구일자 2025년06월11일
(62) 원출원 특허 10-2022-0023574
원출원일자 2022년02월23일
심사청구일자 2022년02월23일
(30) 우선권주장
1020210024072 2021년02월23일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김현준
경상남도 진주시 평거로115번길 5, 103동 1006호 (신안동, 평거1차현대아파트)
김영범
인천광역시 남동구 석산로 35, 108동 2003호(간석동, 간석마을 풍림아이원아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인정진

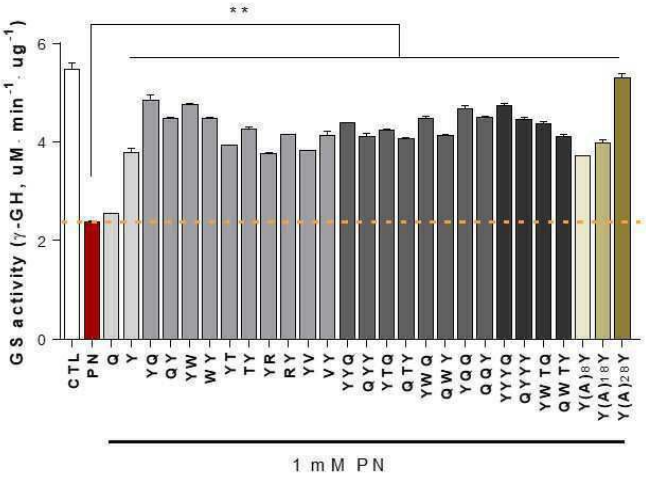
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 **티로신이 말단에 위치하는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 단백질의 니트로화에 의해 발생하는 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명의 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드는 단백질의 니트로화를 억제하는 효과가 우수하고, 만성신체구금 스트레스 우울증/인지기능장애 유도 모델, 알츠하이머 치매 모델, 뇌전증 발작 모델, 뇌졸중 모델, 제2형 당뇨병 모델, 급성신부전 모델 또는 고암모니아혈증 모델에서 질환의 증상을 예방, 개선 또는 치료하는 효과가 우수하다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61K 38/00 (2013.01)
A61P 21/00 (2018.01)
A61P 3/04 (2018.01)
A61P 3/10 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/316 (2013.01)
A23V 2200/3262 (2013.01)
A23V 2200/328 (2013.01)
A23V 2200/332 (2013.01)

(72) 발명자
강재순
경상남도 진주시 진주대로815번길 11, 118동 1304호(주약동, 주약현대아파트)
정순웅
경상남도 진주시 강남로189번길 25, 201호(칠암동)
송미영
경상남도 진주시 신안들말길 47, 209동 802호(신안동, 주공2차아파트)
백지형
경상남도 진주시 진주대로815번길 11, 118동 1304호(주약동, 주약현대아파트)
박상원
경상남도 진주시 천수로 30, 105동 402호(주약동, 한보은빛마을아파트)
김화진
경상남도 진주시 천수로 30, 105동 402호(주약동, 한보은빛마을아파트)
유대영
경상남도 진주시 새평거로 30, 105동 2101호(평거동, 엠코타운더프라하)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711110767
과제번호 2019R1A2C100502012
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 만성스트레스에의한 우울 행동의 원인기전을 바탕으로한 새로운 우울증 동물모델 개발
기 여 율 3/10
과제수행기관명 경상대학교 산학협력단
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711112483
과제번호 2015R1A5A2008833
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원(R&D)
연구과제명 바이오항노화 의과학연구센터
기 여 율 3/10
과제수행기관명 경상대학교 산학협력단
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711137640
과제번호 2021R1A5A8029490
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원(R&D)
연구과제명 항노화 바이오소재 세포공장 지역혁신연구센터
기 여 율 4/10
과제수행기관명 경상국립대학교
연구기간 2021.06.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

티로신이 말단에 위치하는 펩타이드인 티로신-글루타민(YQ) 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 포함하는 제2형 당뇨병(type 2 diabetes), 당뇨신증, 근감소증, 이상지질혈증(dyslipidemia), 비만 및 비알코올성 지방간 질환 중에서 선택된 어느 하나인, 단백질의 니트로화에 의해 발생하는 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 2

티로신이 말단에 위치하는 펩타이드인 티로신-글루타민(YQ) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 제2형 당뇨병(type 2 diabetes), 당뇨신증, 근감소증, 이상지질혈증(dyslipidemia), 비만 및 비알코올성 지방간 질환 중에서 선택된 어느 하나인, 단백질의 니트로화에 의해 발생하는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 단백질의 니트로화에 의해 발생하는 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 산화 스트레스(oxidative stress)는 신진대사 과정에서 생성된 산소가 자유라디칼(free radical)로 작용하여 세포에 손상을 입히고 여러 가지 질병을 유발한다고 알려져 있다. 특히, 세포 내 존재하는 활성산소종(ROS) 또는 활성질소종(RNS)에 의해 단백질이 니트로화(nitraion)된다. 이러한 단백질의 니트로화 현상은 산화 과정에 동반되는 부수적인 현상으로 알려져 있으며, 특정 단백질이 니트로화되면 구조적 변이로 인해 기능이 저하되고, 이로 인해 여러 가지 질병이 발생한다. 단백질의 니트로화는 세포 내 신호 전달, 염증 반응에 의한 질병, 퇴행성 신경질환, 노화 등에 밀접한 관련이 있는 것으로 보고된 바 있으며, 최근에는 천식, 당뇨, 암, 만성 스트레스 우울증, 제2형 당뇨병 또는 급성 신장 질환 등에도 영향을 주는 것으로 보고되고 있다. 따라서, 단백질의 니트로화에 대한 연구는 생물학적, 임상학적으로 매우 중요한 역할을 수행할 수 있으며, 단백질의 니트로화를 억제하는 물질 개발에 대한 연구가 필요한 실정이다.

[0003] 한편, 한국등록특허 제1897400호에는 '티로신 디카복실레이즈의 활성 억제용 조성물 및 이를 이용한 발효식품의 제조방법'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2018-0021746호에는 '니트로화 공정으로부터 니트로화된 방향족 화합물을 정제하는 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 '티로신이 말단에 위치하는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 단백질의 니트로화에 의해 발생하는 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 단백질의 니트로화에 의해 발생하는 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하고, 본 발명의 유효성분인 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드가 단백질의 니트로화를 억제하고, 만성신체구금 스트레스 우울증/인지기능장애 유도 모델, 알츠하이머 치매 모델, 뇌전증 발작 모델, 뇌졸중 모델, 제2형 당뇨병 모델, 급성신부전 모델 또는 고암모니아혈증 모델에서 질병 증상을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0005] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드 또는 식품학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 단백질의 니트로화에 의해 발생하는 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0006] 또한, 본 발명은 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 단백질의 니트로화에 의해 발생하는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 단백질 내 티로신의 니트로화 억제용 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 니트로화 티로신을 포함하는 단백질에 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드를 처리하여 니트로화 티로신으로부터 니트로기를 제거하는 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드 또는 식품학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 활성산소종/활성질소종 증가에 의해 발생하는 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드 또는 식품학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 활성산소종/활성질소종 증가에 의해 발생하는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드는 단백질의 니트로화를 억제하는 효과가 우수하고, 스트레스에 의해 증가된 글루타민 합성효소 내 티로신의 니트로화 레벨을 감소시키고, 스트레스에 의해 감소된 글루타민 합성효소의 활성을 증가시키며, 만성신체구금 스트레스 우울증/인지기능장애 유도 모델, 알츠하이머 치매 모델, 뇌전증 발작 모델, 뇌졸중 모델, 제2형 당뇨병 모델, 급성신부전 모델 또는 고암모니아혈증 모델에서 질병 증상을 예방, 개선 또는 치료 효과가 우수하다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명의 펩타이드 식이에 따른 동물의 장기 기억능력을 분석하기 위하여 실시한 사물인지기능검사(object recognition test, ORT) 및 사물위치인지기능검사(object location recognition test, OLT) 과정을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 펩타이드의 단백질 니트로화 억제 효과를 확인한 것으로, A는 PFC(전전두엽) 조직 내 니트로티로신 단백질에 대한 웨스턴 블랏 결과이고, B는 간 조직 내 니트로티로신 단백질에 대한 웨스턴 블랏 결과이다.

도 3은 본 발명에 따른 펩타이드의 단백질 발현양 조절 효과를 확인하기 위한, 간 조직 내 인슐린 수용체 베타 및 인산화 인슐린 수용체 베타 단백질에 대한 웨스턴 블랏 결과이다.

도 4는 티로신이 말단에 위치한 펩타이드에 의한 Cu/ZnSOD(A) 및 MnSOD(B)의 니트로화 억제 효과를 확인한 결과이다. PN은 단백질의 니트로화를 유도하는 퍼옥시니트리트(peroxynitrite)이다. *, ***은 PN 단독 처리군 대비 펩타이드 처리군의 Cu/ZnSOD 또는 MnSOD의 활성이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, *은 $p<0.05$, ***은 $p<0.001$이다.

도 5는 티로신이 말단에 위치한 펩타이드에 의한 글루타민 합성효소의 니트로화 억제 효과를 확인한 결과이다. PN은 단백질의 니트로화를 유도하는 퍼옥시니트리트(peroxynitrite)이다. **은 PN 단독 처리군 대비 펩타이드 처리군의 글루타민 합성효소의 활성이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, $p<0.01$이다.

도 6은 티로신이 말단에 위치한 펩타이드에 의한 카탈라아제의 니트로화 억제 효과를 확인한 웨스턴 블랏 결과이다.

도 7은 티로신이 말단에 위치한 펩타이드에 의한 HSP60(Heat shock protein60)의 재접힘(refolding) 활성 측정을 통한 니트로화 억제 효과를 확인한 결과이다. RLU는 Time 0과 Time 60에서 측정된 흡광도 차이값(relative light unit)을 의미한다.

도 8은 만성신체구금 스트레스 유도군(STR)에서의 티로신-글루타민 펩타이드 식이(PD)에 따른 GS 활성(A), GS 발현양(B) 및 GS에 포함된 티로신의 니트로화 레벨(C 및 D)을 확인한 결과이다.

도 9는 만성신체구금 스트레스 유도군(STR)에서의 글루타민-티로신 펩타이드 식이(PD)에 따른 GS 활성(A), GS 발현양(B) 및 GS에 포함된 티로신의 니트로화 레벨(C 및 D)을 확인한 결과이다.

도 10은 만성신체구금 스트레스 유도군(STR)에서의 티로신-글루타민 펩타이드 식이(PD)에 따른 혈장 내 코르티코스테론 농도(A), 자당 선호도(B), 혈장 내 ROS/RNS 농도(C) 및 PFC 조직 내 ROS/RNS 농도(D)를 확인한 결과이다.

도 11은 만성신체구금 스트레스 유도군(STR)에서의 글루타민-티로신 펩타이드 식이(PD)에 따른 혈장 내 코르티코스테론 농도(A), 자당 선호도(B), 혈장 내 ROS/RNS 농도(C) 및 PFC 조직 내 ROS/RNS 농도(D)를 확인한 결과이다.

도 12는 만성신체구금 스트레스 동물모델에서의 티로신-글루타민(YQ) 또는 티로신-트립토판(YW) 펩타이드 식이에 따른 기억능력분석 결과를 나타낸 변별력 지수로, A는 1xYQ 펩타이드 식이에 따른 사물인지기능검사(object recognition test, ORT) 결과이고, B는 2xYQ 펩타이드 식이에 따른 사물인지기능검사(ORT) 결과이며, C는 1xYQ 또는 1xYW 펩타이드 식이에 따른 사물위치인지기능검사(object location recognition test, OLT) 결과이다. *, **은 대조군(CTL) 대비 스트레스 처리군(STR)의 사물인지기능지수 또는 사물위치인지기능지수가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, *은 $p<0.05$, **은 $p<0.01$이다. #은 스트레스 처리군에서 일반식이군(ND) 대비 펩타이드 식이군(1xYQ 또는 2xYQ)의 사물인지기능지수가 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, $p<0.05$이다.

도 13은 알츠하이머성 치매 동물모델에서의 티로신-글루타민(YQ) 펩타이드 식이에 따른 사물인지기능검사(object recognition test, ORT) 결과로, A는 2개월령의 동물에 실험한 결과이고, B는 8개월령의 동물에 실험한 결과이고, C는 2개월령 및 8개월령의 동물에 실험한 결과이며, D는 6개월간의 인지기능 감소폭에 대한 결과이다. *, **은 정상군(WT) 대비 치매 동물모델(3xTG)의 사물인지기능지수가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, *은 $p<0.05$, **은 $p<0.01$이다. #은 2개월령 대비 8개월령의 사물인지기능지수가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, $p<0.05$이다.

도 14는 알츠하이머성 치매 동물모델에서의 티로신-글루타민(YQ) 펩타이드 식이에 따른 ROS/RNS 농도를 나타낸 것이다. *은 정상군(WT) 대비 치매 동물모델(3xTG)의 ROS/RNS 농도가 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, $p<0.05$이고, #은 치매 동물모델에서 일반식이군(ND) 대비 펩타이드 식이군(YQ)의 ROS/RNS 농도가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, $p<0.05$이다. DCF는 2',7'-디클로로플루오레신(2',7'-Dichlorofluorescin)이다.

도 15는 글루타메이트성 뉴런 형광표지 알츠하이머성 치매 동물모델에 관한 것으로, A는 글루타메이트성 뉴런을 붉은색으로 표지할 수 있는 동물모델임을 확인한 결과이고, B는 티로신-글루타민(YQ) 펩타이드 식이에 따른 글루타메이트성 뉴런의 활성도를 나타낸 것이다. *은 정상군(WT) 대비 글루타메이트성 뉴런 형광표지 알츠하이머성 치매 동물모델(3xTG-vGluT2-Cre::tdTomato)의 글루타메이트성 뉴런의 활성도가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, $p<0.05$이고, #은 글루타메이트성 뉴런 형광표지 알츠하이머성 치매 동물모델에서 일반식이군(ND) 대비 펩타이드 식이군(YQ)의 글루타메이트성 뉴런의 활성도가 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, $p<0.05$이다.

도 16은 간질 발작 동물모델에서의 티로신-글루타민(YQ) 또는 티로신-트립토판(YW) 펩타이드 처리에 따른 발작 레벨(A, B) 및 A, B의 곡선아래면적(C, D)을 나타낸 것이다. *, **, ***은 일반식이군(ND) 대비 펩타이드 처리군(5xL-Tyr, 3xYQ, YQ i.p, 1xYW 또는 3xYQ)의 발작 레벨이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, *은 $p<0.05$, **은 $p<0.01$, ***은 $p<0.001$이다.

도 17은 간질 발작 동물모델에서의 티로신-글루타민(YQ) 또는 티로신-트립토판(YW) 펩타이드 처리에 따른 ROS/RNS 농도를 나타낸 것이다. *은 대조군(CTL) 대비 카이닌산 처리군의 ROS/RNS 농도가 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, $p<0.05$이고, #은 카이닌산 처리군에서 일반식이군(ND) 대비 펩타이드 식이군(3xYW 또는 3xYQ)의 ROS/RNS 농도가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, $p<0.05$이다.

도 18은 간질 발작 동물모델에서의 티로신-글루타민(YQ) 또는 티로신-트립토판(YW) 펩타이드 처리에 따른 글루타민 합성효소의 활성을 나타낸 것이다. ***은 대조군(CTL) 대비 카이닌산 처리군의 글루타민 합성효소의 활성이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, $p<0.001$이다. #, ##은 카이닌산 처리군에서 일반식이군(ND) 대비 펩타이드 처리군(3xYQ, YQ i.p, 1xYW, 3xYW 또는 3xYQ)의 글루타민 합성 효소의 활성이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, #은 $p<0.05$, ##은 $p<0.01$이다.

도 19는 허혈성 뇌졸중 동물모델에서의 티로신-글루타민(YQ) 펩타이드 처리에 따른 신경세포의 수(A), SOD 활성(B) 및 카탈라아제 활성(C)을 나타낸 것이다. sham은 허위시술군이고, vehicle은 0.9% 살린(saline) 주입군이다. *, ***은 허위시술군(sham) 대비 허혈성 뇌졸중 동물모델(ischemia)의 신경세포의 수, SOD 활성 또는 카탈라아제 활성이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, *은 $p<0.05$, ***은 $p<0.001$이다. #은 허혈성 뇌졸중 동물모델에서 0.9% 살린 주입군(vehicle) 대비 펩타이드 처리군(YQ)의 신경세포의 수, SOD 활성 또는 카탈라아제 활성이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, $p<0.05$이다.

도 20은 허혈성 뇌졸중 동물모델에서의 티로신-글루타민(YQ) 펩타이드 처리에 따른 신경세포 사멸을 확인하기 위한 면역조직화학염색 결과를 나타낸 것이다. sham은 허위시술군이고, vehicle은 0.9% 살린 주입군이며, ischemia는 허혈성 뇌졸중 동물모델이다. NeuN은 추상신경세포를 염색한 것이고, Iba-1은 별모양아교세포를 염색한 것이며, GFAP는 미세아교세포를 염색한 것이다.

도 21은 고지방식이 제2형 당뇨 동물모델에서 티로신-글루타민(YQ) 펩타이드 처리에 따른 체중변화(A) 및 사료섭취량(B)을 기간별로 확인한 결과이다. ND는 정상식이군이고, HFD는 고지방식이군이다.

도 22는 고지방식이 제2형 당뇨 동물모델에서 티로신-글루타민(YQ) 펩타이드 처리에 따른 혈당을 기간별로 확인한 결과이다. ND는 정상식이군이고, HFD는 고지방식이군이다. ***,****은 정상식이군(ND) 대비 고지방식이군(HFD)의 혈당이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, ***은 $p<0.001$, ****은 $p<0.0001$이다. ##, ###은 고지방식이군(HFD) 대비 YQ 펩타이드 첨가 고지방식이군(HFD+1xYQ 또는 HFD+3xYQ)의 혈당이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, ##은 $p<0.01$, ###은 $p<0.001$이다.

도 23은 고지방식이 제2형 당뇨 동물모델에서 티로신-글루타민(YQ) 펩타이드 처리에 따른 내당능(glucose tolerance test, GTT)을 확인한 결과이다. A는 시간 경과에 따른 혈액 내 글루코스 함량을 나타낸 것이고, B는 A에서 곡선아래면적(AUC)을 나타낸 것이다. ***은 정상식이군(ND) 대비 고지방식이군(HFD)의 글루코스 함량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, ***은 $p<0.001$이다. ##은 고지방식이군(HFD) 대비 YQ 펩타이드 첨가 고지방식이군(HFD+3xYQ)의 글루코스 함량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, $p<0.01$이다.

도 24는 고지방식이 제2형 당뇨 동물모델에서 티로신-글루타민(YQ) 펩타이드 처리에 따른 인슐린 감수성(insulin tolerance test, ITT)을 확인한 결과이다. A는 시간 경과에 따른 혈액 내 글루코스 함량을 나타낸 것이고, B는 A에서 곡선아래면적(AUC)을 나타낸 것이다. ***은 정상식이군(ND) 대비 고지방식이군(HFD)의 글루코스 함량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, $p<0.001$이다. ####은 고지방식이군(HFD) 대비 YQ 펩타이드 첨가 고지방식이군(HFD+3xYQ)의 글루코스 함량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, $p<0.0001$이다.

도 25는 고지방식이 제2형 당뇨 동물모델에서 티로신-글루타민(YQ) 펩타이드 처리에 따른 소변 배출량(A) 및 지방량(B)을 확인한 결과이다. *은 정상식이군(ND) 대비 고지방식이군(HFD)의 소변 배출량 또는 지방량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, $p<0.05$이다. ##, ####은 고지방식이군(HFD) 대비 YQ 펩타이드 첨가 고지방식이군(HFD+3xYQ)의 소변 배출량 또는 지방량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, ##은 $p<0.01$, ####은 $p<0.0001$이다.

도 26은 고지방식이 제2형 당뇨 동물모델에서 티로신-글루타민(YQ) 펩타이드 처리에 따른 혈장 내 인슐린(A), ALT(B) 및 ROS/RNS(C)의 농도를 확인한 결과이다. **,***,****은 정상식이군(ND) 대비 고지방식이군(HFD)의 혈장 내 인슐린, ALT 또는 ROS/RNS의 농도가 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, **은 $p<0.01$, ***은 $p<0.001$, ****은 $p<0.0001$이다. ##은 고지방식이군(HFD) 대비 YQ 펩타이드 첨가 고지방식이군(HFD+3xYQ)의 혈장 내 인슐린, ALT 또는 ROS/RNS의 농도가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, $p<0.01$이다.

도 27은 고지방식이 제2형 당뇨 동물모델에서 티로신-글루타민(YQ) 펩타이드 처리에 따른 간조직의 변화를 확인하기 위한 H&E 염색 결과이다. ND는 정상식이군이고, HFD는 고지방식이군이다.

도 28은 고지방식이 제2형 당뇨 동물모델에서 티로신-글루타민(YQ) 펩타이드 처리에 따른 인슐린 수용체 베타(IRβ)의 발현양을 확인한 결과이다. *은 정상식이군(ND) 대비 고지방식이군(HFD)의 인슐린 수용체 베타(IRβ)의 발현양이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, $p<0.05$이다. ##은 고지방식이군(HFD) 대비 YQ 펩타이드 첨가 고지방식이군(HFD+3xYQ)의 인슐린 수용체 베타(IRβ)의 발현양이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, $p<0.01$이다.

도 29는 고지방식이 제2형 당뇨 동물모델에서 티로신-글루타민(YQ) 펩타이드 처리에 따른 소변 내 알부민/크레아틴 비율(A), 간 조직 내 중성지방의 양(B) 및 혈장 내 중성지방의 양(C)을 확인한 결과이다. *, **은 정상식이군(ND) 대비 고지방식이군(HFD)의 소변 내 알부민/크레아틴 비율, 간 조직 내 중성지방의 양 또는 혈장 내 중성지방의 양이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, *은 $p<0.05$, **은 $p<0.01$이다. #, ##은 고지방식이군(HFD) 대비 YQ 펩타이드 첨가 고지방식이군(HFD+1xYQ 또는 HFD+3xYQ)의 소변 내 알부민/크레아틴 비율, 간 조직 내 중성지방의 양 또는 혈장 내 중성지방의 양이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, #은 $p<0.05$, ##은 $p<0.01$이다.

도 30은 급성 신부전 동물모델에서 티로신-글루타민(YQ) 펩타이드 처리에 따른 신장손상을 평가하기 위한 혈장 내 크레아티닌 농도(A), 신장 조직 내 염증반응 확인을 위한 IL-1β(B), IL-6(C) 및 MCP-1(D)의 발현양을 확인한 결과이다. sham은 허위시술군이고, renal IR은 급성 신부전 유도군이며, veh는 물 투여군이다. **은 허위시술군(sham) 대비 물 투여한 급성 신부전 유도군(veh+renal IR)의 크레아티닌 농도, IL-1β, IL-6, 또는 MCP-1의 발현양이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, $p<0.01$이다. #, ##은 물 투여한 급성 신부전 유도군(veh+renal IR) 대비 YQ 펩타이드 투여한 급성 신부전 유도군(YQ+renal IR)의 크레아티닌 농도, IL-1β, IL-6, 또는 MCP-1의 발현양이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, #은 $p<0.05$, ##은 $p<0.01$이다.

도 31은 급성 신부전 동물모델에서 티로신-글루타민(YQ) 펩타이드 처리에 따른 신장 조직에서의 니트로티로신(nitrotyrosine) 및 지질과산화 산물(4-HNE)의 발현양을 확인한 결과이다. *은 허위시술군(sham) 대비 물 투여한 급성 신부전 유도군(veh+renal IR)의 니트로티로신(nitrotyrosine) 및 지질과산화 산물(4-HNE)의 발현양이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, $p<0.05$이다. #은 물 투여한 급성 신부전 유도군(veh+renal IR) 대비 YQ 펩타이드 투여한 급성 신부전 유도군(YQ+renal IR)의 니트로티로신(nitrotyrosine) 및 지질과산화 산물(4-HNE)의 발현양이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, $p<0.05$이다.

도 32는 고암모니아혈증 동물모델에서 티로신-글루타민(YQ) 펩타이드 처리에 따른 혈중 암모니아 농도(A) 및 간 조직에서의 니트로티로신(nitrotyrosine) 발현양을 확인한 결과이다. Control은 정상대조군이고, AOM은 아족시메탄(Azoxymethane)에 의한 고암모니아혈증 유도군이다. *, **은 정상대조군(Control) 대비 물 투여한 고암모니아혈증(veh+AOM)의 혈중 암모니아 농도 및 간 조직에서의 니트로티로신(nitrotyrosine) 발현양이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, *은 $p<0.05$, **은 $p<0.01$이다. #은 물 투여한 고암모니아혈증(veh+AOM) 대비 YQ 펩타이드 투여한 고암모니아혈증 유도군(YQ200+AOM)의 혈중 암모니아 농도 및 간 조직에서의 니트로티로신(nitrotyrosine) 발현양이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, $p<0.05$이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드 또는 식품학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 단백질의 니트로화에 의해 발생하는 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0014] 상기 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드는 티로신이 양쪽 말단 또는 한쪽 말단에 위치할 수 있고, 티로신과 연결된 아미노산은 극성/친수성(예, 티로신, 글루타민, 트레오닌), 비극성/소수성(예, 트립토판, 발린), 전하성(예, 아르기닌)일 수 있으며, 연결된 아미노산의 개수는 1~29개일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0015] 본 발명의 단백질의 니트로화에 의해 발생하는 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 단백질은 글루타민 합성효소(glutamine synthetase),인슐린 수용체 베타 서브유닛(insulin receptor β subunit), 망간 슈퍼옥시드 디스무타아제(Mn Superoxide dismutase), 열충격단백질 60(heat shock protein 60), Cu/Zn 슈퍼옥시드 디스무타아제(Cu/Zn Superoxide dismutase) 및 카탈라아제(catalase) 중에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.

[0016] 또한, 상기 단백질의 니트로화에 의해 발생하는 질환은 우울증(depressive disorder), 불안장애(anxiety disorder), 뇌졸중(stroke), 뇌전증(epilepsy), 발작(seizure), 인지기능장애(cognitive impairment), 알츠하이머병(Alzheimer disease), 치매(dementia), 제2형 당뇨병(type 2 diabetes), 당뇨신증, 근감소증, 이상지질혈증(dyslipidemia), 비만, 비알코올성 지방간 질환, 급성 신장 손상(Acute kidney injury), 고암모니아혈증(Hyperammonemia) 및 간성뇌증 중에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.

[0017] 상기 단백질의 니트로화에 의해 발생하는 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 환, 정제(tablet), 캡슐(capsule), 산제, 분말, 과립, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나로 제조하거나, 식품의 성분으

로 첨가하여 제조될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 제조될 수 있다.

[0018] 본 발명의 유효성분을 첨가할 수 있는 식품의 일례로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 중에서 선택된 어느 하나의 형태일 수 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0019] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 및 천연 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0020] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 단백질의 니트로화에 의해 발생하는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 단백질의 니트로화에 의해 발생하는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 있어서, 상기 단백질 및 단백질의 니트로화에 의해 발생하는 질환은 전술한 바와 같다.

[0023] 상기 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드 이외에 추가로 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여 시 피부 외용 또는 복강 내, 직장, 정맥, 근육 또는 피하주사 방식을 선택하는 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 약학 조성물은 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제 및 현탁 용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0025] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 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. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0026] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하게 사용할 수 있다

[0027] 또한, 본 발명은 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 단백질 내 티로신의 니트로화 억제용 조성물을 제공한다.

[0028] 본 발명의 단백질 내 티로신의 니트로화 억제용 조성물에 있어서, 상기 단백질은 전술한 바와 같다.

[0029] 또한, 본 발명은 니트로화 티로신을 포함하는 단백질에 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드를 처리하여 니트로화 티로신으로부터 니트로기를 제거하는 방법을 제공한다.

[0030] 또한, 본 발명은 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드 또는 식품학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 활성산소종/활성질소종 증가에 의해 발생하는 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0031] 또한, 본 발명은 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드 또는 식품학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 활성산소종/활성질소종 증가에 의해 발생하는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0032] 본 발명의 활성산소종/활성질소종 증가에 의해 발생하는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 있어서, 상기 활성산소종/활성질소종 증가에 의해 발생하는 질환은 우울증(depressive disorder), 불안장애(anxiety disorder), 뇌졸중(stroke), 뇌전증(epilepsy), 발작(seizure), 인지기능장애(cognitive impairment), 알츠하이머병(Alzheimer disease), 치매(dementia), 제2형 당뇨병(type 2 diabetes), 당뇨신증, 근감소증, 이상지질혈증(dyslipidemia), 비만, 비알코올성 지방간 질환, 급성 신장 손상(Acute kidney injury), 고암모니아혈증(Hyperammonemia) 및 간성뇌증 중에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.

[0034] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0036] **재료 및 방법**

[0037] **1. 펩타이드 합성**

[0038] 본 발명에 따른 펩타이드의 효과를 분석하기 위하여 단독 아미노산으로는 글루타민(Q), $_{L}$-티로신($_{L}$-Y) 또는 $_{D}$-티로신($_{D}$-Y)을 이용하였고, 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드로는 티로신-글루타민(YQ), 글루타민-티로신(QY), 티로신-트립토판(YW), 트립토판-티로신(WY), 티로신-트레오닌(YT), 트레오닌-티로신(TY), 티로신-아르기닌(YR), 아르기닌-티로신(RY), 티로신-발린(YV), 발린-티로신(VY), 티로신-티로신-글루타민(YYQ), 글루타민-티로신-티로신(QYY), 티로신-트레오닌-글루타민(YTQ), 글루타민-트레오닌-티로신(QTY), 티로신-트립토판-글루타민(YWQ), 글루타민-트립토판-티로신(QWY), 티로신-글루타민-글루타민(YQQ), 글루타민-글루타민-티로신(QQY), 티로신-티로신-티로신-글루타민(YYYQ), 글루타민-티로신-티로신-티로신(QYYY), 티로신-트립토판-트레오닌-글루타민(YWTQ), 글루타민-트립토판-트레오닌-티로신(QWTY), 티로신-랜덤아미노산 8개-티로신($Y(A)_{8}Y$), 티로신-랜덤아미노산 18개-티로신($Y(A)_{18}Y$) 또는 티로신-랜덤아미노산 28개-티로신($Y(A)_{28}Y$)을 이용하였다. 글루타민은 뉴트리코스트(Nutricost) 사의 순도 100% 제품을 사용하였고, L-티로신은 시그마(Sigma-Aldrich, #93829, >99.0% BioUltra) 제품을, D-티로신은 시그마(Sigma-Aldrich, #855456, >99.0% BioUltra) 제품을 사용하였고, *in vitro* 실험에 사용한 펩타이드는 펩트론(peptron, 순도 98% 이상)에 의뢰하여 합성하여 사용하였으며, *in vivo* 실험에 사용한 펩타이드는 GL 바이오켐(GL Biochem, 순도 95% 이상)에 의뢰하여 합성하여 실험에 사용하였다.

[0040] **2. 동물 실험**

[0041] 본 발명에서는 7주령 C57BL/6 수컷 마우스, 알츠하이머성 치매 모델인 3xTG-AD 마우스, 4주령 ICR 수컷 마우스 또는 몽골리안 저빌(65~75g)을 온도 22~24℃, 습도 50~70%, 12시간 명암주기로 사육하였으며, 이때 식이요법과 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 본 발명에서 사용한 동물은 국립보건원(NIH, Bechesda, MD, USA) 지침에 따르는 경상대학교 동물보호 및 사용위원회(GNU IACUC)로부터 승인 받은 프로토콜(GNU-161128-M0068)에 따라 실시하였다.

[0043] **3. 마우스의 뇌와 간 조직 시료 준비**

[0044] CO_2 가스로 마취된 마우스로부터 전전두엽(prefrontal cortex, PFC) 및 간(liver) 조직을 각각 채취하여 무게를

잰 후, 조직 파쇄기를 이용하여 조직을 파쇄하고, 4℃에서 12,000 rpm으로 20분 동안 원심분리한 후 상등액을 취하여 PFC 및 간 조직 파쇄물(lysate)을 얻었다.

[0046] **4. 티로신 함유 펩타이드가 첨가된 사료 준비**

[0047] 본 발명의 펩타이드 식이에 따른 동물실험을 수행하기 위하여 티로신 함유 펩타이드가 첨가된 마우스용 사료를 제조하였다. 티로신 함유 펩타이드는 티로신-글루타민(YQ), 글루타민-티로신(QY) 또는 티로신-트립토판(YW)을 사용하였고, 분자량은 각각 309.32g/mol 또는 367.40g/mol이며, 일반사료(AIN-93G)에 첨가하여 제조하였다(표 1).

표 1

[0048]

사료명	조성
1xYQ 또는 1xQY	309.32mg YQ 또는 QY + 일반사료 1kg
2xYQ	618.64mg YQ + 일반사료 1kg
3xYQ	927.96mg YQ + 일반사료 1kg
1xYW	367.40mg YW + 일반사료 1kg
3xYW	1120.2mg YW + 일반사료 1kg

[0049] **5. 인지기능검사**

[0050] 본 발명의 펩타이드 식이에 따른 동물의 장기 기억능력을 분석하기 위하여 사물인지기능검사(object recognition test, ORT)와 사물위치인지기능검사(object location recognition test, OLT)를 실시하였다(도 1). 적응(habituation), 친화(familiarization) 및 검사(test)의 세 단계로 구성되었고, 시험 상자에 하루 10분씩 2일 동안 적응시키고, 3일째 친화 단계에는 두 개의 동일한 사물을 10분 동안 탐색하도록 하였다. 이후, 4일째 시험 단계에는 두 사물 중 하나를 새로운 사물로 교체하고 10분 동안 탐색하게 하되, 초반 5분 동안의 기록을 데이터로 사용하였다. 사물인지기능(ORT) 지수는 하기와 같은 수식으로 산출하였다.

[0051] Discrimination index = (N-F)/(N+F)

[0052] N: 신규 사물 탐색시간

[0053] F: 친숙한 사물 탐색시간

[0054] ORT 수행 24시간 후에 친숙한 사물의 위치를 변경하고 5분간 탐색하도록 하고, 전체 사물 탐색 시간 중, 위치가 이동된 사물을 탐색하는 시간의 비율을 계산하여 사물위치인지기능(OLT) 지수를 산출하였다.

[0056] **실시예 1. 단백질의 니트로화(nitration) 억제 효과 분석**

[0057] **1-1. 마우스의 뇌와 간 조직내 단백질의 니트로화 억제 효과 분석**

[0058] 본 발명에 따른 펩타이드에 의한 단백질의 니트로화 억제 효과를 분석하기 위하여 마우스의 뇌와 간 조직 파쇄물(lysate)을 이용하였다. 상기 조직 파쇄물에 단백질의 니트로화를 유도하는 퍼옥시니트리트(peroxynitrite, PN)를 첨가하고, 본 발명에 따른 펩타이드를 2mM의 농도로 각각 첨가한 후 5초 동안 볼텍스(vortex)하여 혼합하고 얼음에서 10분 동안 반응시켰다. 이후, 항-니트로티로신 항체(1:1,000), 항-인슐린 수용체 베타 항체(1:1,000) 또는 항-인산화 인슐린 수용체 베타 항체(1:1,000)를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다.

[0059] 그 결과, PN에 의해 PFC 및 간 조직 내 티로신 니트로화가 증가된 단백질들이 증가한 것을 확인하였고, 글루타민 합성효소(GS)와 인슐린 수용체 베타 서브유닛외(IRb)이외의 여러 단백질의 니트로화가 증가된 것을 여러 밴드의 웨스턴 블랏 결과로 확인하였으며, PN에 의해 티로신 니트로화가 증가된 단백질들은 티로신(Y)이 말단에 위치한 펩타이드 처리에 의해 니트로화가 감소한 것을 확인하였다(도 2). 또한, 간 조직에서 IRb 단백질은 PN 또는 티로신(Y)이 말단에 위치한 펩타이드 처리에 의해 발현 차이가 없는 반면, 인산화-IRb 단백질은 PN에 의해 니트로화가 되어 발현이 감소하였고 티로신(Y)이 말단에 위치한 펩타이드 처리에 의해 발현이 증가하는 것을 확인하였다(도 3).

[0061] **1-2. Cu/ZnSOD 및 MnSOD의 니트로화 억제 효과 분석**

[0062] 본 발명에 따른 펩타이드에 의한 Cu/Zn 슈퍼옥시드 디스무타아제(Cu/Zn Superoxide dismutase, SOD-1) 및 망간 슈퍼옥시드 디스무타아제(Mn Superoxide dismutase, SOD-2)의 니트로화 억제 효과를 분석하기 위하여 SOD 비색 반응 활성 키트(Thermo Scientific, #EIASODC)를 이용하였다. PCR용 튜브에 표준 범위 내의 인간 재조합 Cu/ZnSOD 또는 MnSOD을 넣고, 본 발명에 따른 펩타이드를 1mM의 농도로 각각 넣고, 1mM의 퍼옥시니트리트(peroxynitrite, PN)를 첨가하고 혼합한 후 얼음에서 10분 동안 반응시켰다. 이후, 키트에서 제공하는 잔틴산화효소 25㎕를 넣고 상온에서 20분 동안 반응시킨 후, 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 2차 측정 흡광도에서 1차 측정 흡광도를 뺀 데이터를 이용하여 Cu/ZnSOD 또는 MnSOD의 활성을 측정하였다.

[0063] 그 결과, PN 처리에 의해 Cu/ZnSOD 또는 MnSOD의 활성은 급격히 저하되나, 티로신이 말단에 위치한 펩타이드에 의해 Cu/ZnSOD 또는 MnSOD의 활성이 회복되는 것을 확인하였다(도 4).

[0065] **1-3. 글루타민 합성효소(glutamine synthetase)의 니트로화 억제 효과 분석**

[0066] 본 발명에 따른 펩타이드에 의한 글루타민 합성효소(glutamine synthetase)의 니트로화 억제 효과를 분석하기 위하여 마우스의 뇌 조직 파쇄물(lysate)을 이용하였다. PCR용 튜브에 상기 PFC 조직 파쇄물을 넣고, 본 발명에 따른 펩타이드를 1mM의 농도로 각각 넣고, 1mM의 퍼옥시니트리트(peroxynitrite, PN)를 첨가하고 혼합한 후 얼음에서 10분 동안 반응시켰다. 이후, 반응시킨 샘플 50㎕를 96웰 플레이트에 넣고 글루타민 합성효소 어세이 버퍼(50mM 이미다졸-HCl, pH 6.8, 25mM L-글루타민, 12.5mM 하이드록실아민, 12.5mM 비산나트륨, 1mM $MnCl_2$, 0.08mM ADP) 50㎕를 넣은 후, 37℃에서 약40분 동안 반응시킨 후, 560nm에서 흡광도를 측정하였다. ɣ-글루타밀히드록사메이트(ɣ-glutamylhydroxamate)를 이용하여 작성된 표준 곡선으로부터 글루타민 합성효소의 활성을 계산하였다.

[0067] 그 결과, PN 처리에 의해 글루타민 합성효소의 활성은 급격히 저하되나, 티로신이 말단에 위치한 펩타이드에 의해 글루타민 합성효소의 활성이 회복되는 것을 확인하였다. 특히, 30개의 아미노산으로 이루어진 길이가 긴 펩타이드에 의해서도 PN 처리에 의해 니트로화 되어 활성이 저하된 글루타민 합성효소의 활성을 회복시키는 효과가 있음을 확인하였다(도 5).

[0069] **1-4. 카탈라아제(catalase)의 니트로화 억제 효과 분석**

[0070] 본 발명에 따른 펩타이드에 의한 카탈라아제의 니트로화 억제 효과를 분석하기 위하여 인간 재조합 카탈라아제를 이용한 웨스턴 블랏을 수행하였다. PCR용 튜브에 0.2㎍의 인간 재조합 카탈라아제를 넣고, 본 발명에 따른 펩타이드를 2mM의 농도로 각각 넣고, 1mM의 퍼옥시니트리트(peroxynitrite, PN)를 첨가하고 혼합한 후 얼음에서 10분 동안 반응시켰다. 이후, SDS 샘플 버퍼를 넣고 5분간 끓이고, SDS-PAGE 겔에 전기영동한 후, PVDF 멤브레인에 트랜스퍼하고 항-니트로티로신 항체(1:1000)를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다.

[0071] 그 결과, PN 처리에 의해 니트로화된 카탈라아제의 발현은 증가한 반면, 티로신이 말단에 위치한 펩타이드에 의해 니트로화된 카탈라아제의 발현이 감소하는 것을 확인하였다(도 6).

[0073] **1-5. HSP60(Heat shock protein60)의 재접힘(refolding) 활성 측정을 통한 니트로화 억제 효과 분석**

[0074] 샤페론 단백질의 일종인 HSP60의 활성도는 단백질 니트로화에 의해 저해되는 것으로 알려져 있으며, 이와 관련된 여러 질병들이 알려져 있다. 이에, 본 발명에 따른 펩타이드에 의한 HSP60의 니트로화 억제 효과를 분석하기 위하여 HSP60/HSP10 Glow-Fold 단백질 재접힘 키트(R&D Systems, #K-300)를 이용하였다. PCR용 튜브에 키트에서 제공하는 HSP60 용액을 넣고, 본 발명에 따른 펩타이드를 1mM의 농도로 각각 넣고, 1mM의 퍼옥시니트리트(peroxynitrite, PN)를 첨가하고 혼합한 후 얼음에서 10분 동안 반응시켰다. 이후, 키트에서 제공하는 HSP10 용액, Mg^{2+}-ATP 용액 및 Glow-Fold 기질 단백질을 넣고 상온에서 15~30분 동안 반응시키고, 반응시킨 샘플을 45℃에서 7분 동안 열을 가한 후, 즉시 얼음에 넣었다. 96 웰 플레이트에 루시페린 용액 50㎕와 샘플 4㎕를 섞고 1~2분 이내에 마이크로플레이트리더기를 이용하여 발광을 측정하였다(Time 0). 남은 샘플을 30℃에서 60분 동안 반응시킨 후, 96 웰 플레이트에 루시페린 용액 50㎕와 샘플 4㎕를 섞고 1~2분 이내에 마이크로플레이트리더기를 이용하여 발광을 측정하였다(Time 60). Time 0과 Time 60에서 측정된 흡광도 차이값(RLU, relative light

unit)을 이용하여 각 샘플의 HSP60 재접힘 활성을 분석하였다.

[0075] 그 결과, PN 처리에 의해 HSP60의 재접힘 활성도는 급격히 저하되나, 티로신이 말단에 위치한 펩타이드에 의해 HSP60의 재접힘 활성도가 회복되는 것을 확인하였다(도 7). 상기 결과를 바탕으로, 티로신이 말단에 위치한 펩타이드를 이용하여 HSP60의 활성 저하로 유도되는 질병을 예방 또는 개선시킬 수 있을 것으로 판단되었다.

[0077] *

[0078] **실시예 2. 만성신체구금 스트레스 동물모델에서의 GS 니트로화 억제 효과 및 항우울 효과 분석**

[0079] 7주령 C57BL/6 수컷 마우스 28마리를 두 그룹(정상군, 스트레스군)으로 나누어, 스트레스군은 15일 동안 매일 2시간(오후 2~4시)동안 개별적으로 구속기에 강제동원하여 만성신체구금 스트레스를 주었다. 상기 정상군(CTL) 및 스트레스군(STR)은 영양 균형이 맞는 일반식이군(ND)과 YQ 또는 QY 펩타이드가 보충(330㎎/㎏)된 식이군(PD)으로 다시 분류하여 급여하였다. 15일 동안의 만성신체구금 스트레스가 완료된 마우스는 자당 선호도 시험(sucrose perference test, SPT)을 수행하였고, 혈액 및 PFC 조직을 채취하여 이후 실험을 수행하였다.

[0081] **(1) GS 니트로화 억제 효과 분석**

[0082] 만성신체구금 스트레스가 완료된 마우스 PFC 파쇄물을 이용하여 전술한 바와 같은 방법으로 GS 활성 및 GS 발현양을 측정하였다.

[0083] 그 결과, GS 발현양은 유사하게 나타났으나, 스트레스에 의해 GS 활성이 감소한 것을 확인하였고, 스트레스 군에서 일반식이군 대비, YQ 또는 QY 펩타이드 식이군의 GS 활성이 통계적으로 유의미하게 증가한 것을 확인하였다(도 8A, 8B, 9A, 9B).

[0084] 또한, 면역침강(IP)-WB을 이용하여 GS내의 티로신이 니트로화된 레벨을 측정하였다. Tyr-nitriation GS의 면역침강 분석은 항-니트로티로신 항체(ab61392, Abcam) 및 단백질A/G 플러스 아가로스(Santa Cruz)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 실시하였다.

[0085] 그 결과, 스트레스에 의해 GS 내의 티로신이 니트로화된 레벨이 통계적으로 유의미하게 증가하였으며, 스트레스군에서 일반식이군 대비, YQ 또는 QY 펩타이드 식이군의 GS 내의 티로신이 니트로화된 레벨이 통계적으로 유의미하게 감소한 것을 확인하였다(도 8C, 8D, 9C, 9D).

[0087] **(2) 항우울 효과 분석**

[0088] 만성신체구금 스트레스가 완료된 마우스에서 혈액 및 PFC 조직을 채취하여 항우울 효과를 분석하였다. 마우스로부터 채취한 혈액을 4℃에서 1,000×g로 10분 동안 원심분리한 후 상등액을 취하여 혈장(plasma)을 분리하고 PBS로 1/20 희석하여 준비하였다. 코르티코스테론 EIA 키트(Cayman)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 혈장 내 코르티코스테론(corticosterone) 농도를 측정하였다.

[0089] 그 결과, 스트레스에 의해 혈장 내 코르티코스테론의 농도가 통계적으로 유의미하게 증가하였으며, 스트레스 군에서 일반식이군 대비, YQ 또는 QY 펩타이드 식이군의 혈장 내 코르티코스테론의 농도가 감소한 것을 확인하였다(도 10A, 11A).

[0090] 또한, PBS로 1/3 희석한 혈장 및 50㎍의 PFC 조직 파쇄물을 준비하였다. ROS/RNS 어세이 키트(Cell Biolabs)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 혈장 및 PFC 조직 내 ROS/RNS(reactive oxygen species/reactive nitrogen species) 농도를 측정하였다.

[0091] 그 결과, 스트레스에 의해 혈장 및 PFC 조직 내 ROS/RNS의 농도가 통계적으로 유의미하게 증가하였으며, 스트레스 군에서 일반식이군 대비, YQ 또는 QY 펩타이드 식이군의 혈장 및 PFC 조직 내 ROS/RNS의 농도가 감소한 것을 확인하였다(도 10C, 10D, 11C, 11D).

[0092] 또한, 15일 동안의 만성신체구금 스트레스가 완료된 마우스의 자당(sucrose)에 대한 선호도 측정을 통해 우울증을 평가하였다. 자당 선호도 시험은 총 4일에 걸쳐 진행하였고, 동일한 크기와 모양의 음수통에 동일한 양의 0.1M의 자당 및 물을 공급하였다. 1일차에 0.1M의 자당 및 물을 24시간 동안 제공하였고, 2일차에 자당 및 물의

위치를 교환하여 24시간 동안 제공하였고, 3일차에는 0.1M의 자당 및 물을 제공하지 않았으며, 4일차에 다시 동일한 양의 0.1M의 자당 및 물을 3시간 동안 제공한 후, 위치를 교환하고 3시간 동안 다시 제공하였다. 4일차 6시간 동안 음용한 자당 및 물의 양을 측정하고 하기식에 따라 자당 선호도(%)를 계산하였다.

[0093] 자당 선호도(%)=자당 음용량/(물 음용량+자당 음용량)×100

[0094] 그 결과, 스트레스에 의해 자당 선호도가 감소하였으며, 스트레스 군에서 일반식이군 대비, YQ 또는 QY 펩타이드 식이군의 자당 선호도가 증가한 것을 확인하였다(도 10B, 11B).

[0096] **실시예 3. 만성신체구금 스트레스 동물모델에서의 인지기능 향상 분석**

[0097] 7주령 C57BL/6 수컷 마우스 28마리를 두 그룹(정상군, 스트레스군)으로 나누어, 티로신 함유 펩타이드(1xYQ, 2xYQ 또는 1xYW)가 첨가된 사료를 1주일 동안 섭식하게 하였고, 스트레스군에 2주 동안 매일 2시간(오후 2~4시)씩 개별적으로 구속기에 강제동원하여 만성신체구금 스트레스를 주었다. 이후, 사물인지기능검사(object recognition test, ORT)를 수행하였다.

[0098] 그 결과, 스트레스에 의해 사물인지 기능이 감소하였으며, 스트레스 군에서 일반식이군 대비 YQ 또는 YW 펩타이드 식이군의 사물인지기능이 증가한 것을 확인하였다(도 12).

[0100] **실시예 4. 알츠하이머성 치매 동물모델에서의 인지기능 향상 분석**

[0101] **4-1. 알츠하이머성 치매 유전자 변형 마우스 모델**

[0102] 알츠하이머성 치매 유전자 변형 마우스 모델인 3xTG-AD 2개월령 및 정상 마우스 C57BL/6 2개월령의 인지기능을 검사한 후, 각 두 그룹으로 나누어 일반사료(ND) 또는 티로신 함유 펩타이드(1xYQ)가 첨가된 사료를 섭식하게 하였다. 또한, 3xTG-AD 마우스에서 경도인지장애가 나타나는 것으로 알려진 8개월령에 인지기능을 다시 시험하여 티로신 펩타이드의 인지기능 보호 효능을 검사하였다.

[0103] 그 결과, 정상 마우스 대비 치매 동물모델의 사물인지기능이 감소하였으며, 2개월령때보다 8개월령때의 사물인지기능 감소폭이 더 큰 것을 확인하였다. 또한, 정상 마우스군에서는 펩타이드 식이에 따른 차이가 없는 반면, 치매 동물모델에서는 YQ 펩타이드 식이에 의해 사물인지기능이 다소 증가하는 것을 확인하였다(도 13).

[0104] 또한, 뇌조직 중 해마를 조직 질량 10mg 당 RIPA 완충용액 100㎕ (단백질가수분해효소/인산가수분해효소 저해제 포함)를 넣고 유리 비드 및 블렌더를 이용하여 1분 동안 분쇄하였다. 12,000×g, 4℃에서 15분 동안 원심분리하여 상층액을 분리하였고, PBS에 10배 희석하여 활성산소종/활성질소종(ROS/RNS) 측정에 사용하였다. ROS/RNS 농도는 OxiSelect ROS/RNS 어세이 키트(Cell Biolabs)를 사용하여 권장 실험방법대로 측정하였다.

[0105] 그 결과, 치매 동물모델의 해마 조직의 ROS/RNS 농도는 정상군 대비 증가하였지만 YQ 펩타이드에 의해 감소하는 것을 확인하였다(도 14).

[0107] **4-2. 글루타메이트성 뉴런 형광표지 알츠하이머성 치매 모델**

[0108] 글루타메이트성 뉴런에 형광표지된 vGluT2-IRES-Cre::tdTomato 마우스와 알츠하이머성 치매 유전자 변형 마우스 모델인 3xTG-AD 마우스를 교잡하여, 글루타메이트성 뉴런에 형광표지된 치매 모델인 3xTG-vGluT2-Cre::tdTomato를 구축하여, 글루타메이트성 뉴런을 붉은색으로 표지할 수 있는 동물모델임을 확인하였다(도 15A).

[0109] 3xTG-vGluT2-Cre::tdTomato 마우스 2개월령에 티로신 함유 펩타이드(1xYQ)가 첨가된 사료를 섭식하게 하였고, 6~8개월령에 자발적 흥분성 시냅스후 전류(spontaneous excitatory postsynaptic current, sEPSC)를 측정하여 글루타메이스성 뉴런의 활성도를 측정하였다. 막 전류를 기록하기 위해 200㎛ 두께의 횡단면 뇌절편을 1.5~2㎖/분의 인공 뇌척수액이 주입된 기록 챔버에 넣고, -70mV의 유지 전위에서 내측 전전두엽피질(mPFC)의 시각화된 글루타메이트성 뉴런에서 전세포 전압 클램프 기록을 얻었다. 글루타메이트성 전류는 피크로톡신(100㎛M)의 첨가로 분리되었다. 모든 기록은 30±2℃에서 이루어졌으며, 피펫 용액은 130mM KCl, 5mM $CaCl_2$, 10mM EGTA, 10mM HEPES, 2mM MgATP, 0.5mM Na_2GTP 및 5mM 포스포크레아틴으로 이루어진 물질을 이용하였다.

[0110] 그 결과, 치매 동물모델의 글루타메이스성 뉴런의 활성은 정상군 대비 감소하였지만 YQ 펩타이드에 의해 증가하

는 것을 확인하였다(도 15B).

[0112] **실시예 5. 간질 발작 동물모델에서의 흥분독성 및 산화 스트레스 억제 효과 분석**

[0113] 4주령 ICR 수컷 마우스에 1주일 동안 정상식이, 티로신(L-Tyr) 또는 티로신 함유 펩타이드(3xYQ, 1xYW 또는 3xYW)가 첨가된 사료를 섭식하게 하였고, 200mg/kg YQ를 복강주사(YQ i.p)하였다. 카이닌산(Kainic acid, KA)을 중탕으로 가열하면서 생리식염수에 용해하여 4.5mg/㎖ 카이닌산 용액을 준비하였으며, 카이닌산 용액을 복강주사하고(36mg/kg), 2시간 동안 발작 레벨과 증상을 기록하였다. 카이닌산을 주사하고 16시간 또는 5일 후 생존한 마우스의 뇌 조직(전전두엽 피질, 해마)을 적출하였다.

[0115] **5-1. 발작 레벨 판단**

[0116] 발작 레벨 판단은 하기 표 2의 기준에 따라 적용하여 기록하였다.

표 2

[0117] 발작 레벨에 따른 대표 증상

레벨	대표 증상
Ⅰ	코너에 쭈그려 앉거나 고정자세, 응시
Ⅱ	몸을 뻗고, 꼬리 곧고 뻣뻣, 귀가 뒤로 누움, 눈이 튀어나오고 붉음
Ⅲ	반복적인 머리 까딱, 배에 앞발을 얹고 앉음
Ⅳ	간헐적인 경련으로 달리고 점프, 고요하게 있으며 강직간대 발작으로 앉고 누움
Ⅴ	지속적으로 발작
Ⅵ	몸의 간헐적인 경련, 발을 이용해 균형 유지가 길지 않음, 대개 사망함

[0118] 그 결과, 일반식이군 대비 펩타이드 식이군의 발작 레벨이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다(도 16).

[0119] **5-2. 활성산소종/활성질소종(ROS/RNS) 측정**

[0120] 뇌조직 중 해마를 조직 질량 10mg 당 RIPA 완충용액 100㎕ (단백질가수분해효소/인산가수분해효소 저해제 포함)를 넣고 유리 비드 및 블렌더를 이용하여 1분 동안 분쇄하였다. 12,000×g, 4℃에서 15분 동안 원심분리하여 상층액을 분리하고 PBS에 10배 희석하여 ROS/RNS 측정에 사용하였다. ROS/RNS 농도는 OxiSelect ROS/RNS 어세이 키트(Cell Biolabs)를 사용하여 권장 실험방법대로 측정하였다.

[0121] 그 결과, 카이닌산을 주사하여 생존한 마우스의 해마 조직의 ROS/RNS 농도는 카이닌산에 의해 증가하였지만 3xYQ 또는 3xYW 펩타이드에 의해 감소하는 것을 확인하였다(도 17).

[0123] **5-3. 글루타민 합성효소(GS) 활성 측정**

[0124] 96웰 플레이트에 해마 용해물 2㎕를 넣고, 50mM 이미다졸-HCl 완충용액(pH 6.8)를 추가로 넣어 50㎕를 맞추었다. GS 활성 어세이 완충용액(50mM 이미다졸-HCl, pH6.8, 25mM의 L-글루타민, 12.5mM의 히드록실아민, 12.5mM의 비산나트륨(sodium arsenate), 1mM의 $MnCl_2$ 및 0.08mM의 ADP) 50㎕를 넣고, 37℃에서 약 40분 동안 반응시켰다. 반응 종료 후, 빈 웰에 표준물질인 γ-글루타밀히드록삼메이트(γ-glutamylhydroxamate)를 0.391~25.0mM의 농도가 되도록 첨가하였다. 시료와 표준물질에 100㎕의 반응정지 용액(90mM의 $FeCl_3$, 1.8N의 HCl 및 1.45%(w/v) 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid)을 첨가하고, 560nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선과의 비교를 통해 각 샘플의 GS 활성을 구하였다. GS 활성은 최종 생산물인 γ-글루타밀히드록삼메이트의 생성량으로 표현하였고, 단위는 μM/min/㎍ 단백질이다.

[0125] 그 결과, 카이닌산을 주사하여 생존한 마우스의 해마 조직의 글루타민 합성효소의 활성은 카이닌산에 의해 감소하였지만, 3xYQ, 1xYW, 3xYW 또는 3xYQ 펩타이드에 의해 증가하는 것을 확인하였다(도 18).

[0127] *

[0128] **실시예 6. 허혈성 뇌졸중 동물모델에서의 신경세포사멸 억제 및 항산화 효과 분석**

[0129] 3개월령 수컷 몽골리안 저빌을 3% 이소플루레인(isoflurane)으로 전신마취를 유도한 후, 2.5%의 이소플루레인 가스로 마취를 유지하였다. 목 부분을 소독한 후 절개하여 양쪽 온목동맥(common carotid artery)을 노출시키고, 소형혈관클립(micro vessel clip)을 이용하여 5분 동안 혈류를 폐쇄하여 허혈을 유발하여 뇌졸중을 유도하였다. 혈관클립 적용 시 체온은 37.0±0.5℃로 유지하였고, 허위시술(sham operation)을 수행한 동물을 대조군으로 이용하였다.

[0131] **6-1. 신경세포사멸 억제 효과 분석**

[0132] 허혈을 유발한 후, 재관류시키면서 YQ 펩타이드를 200mg/kg의 양으로 24시간마다 3회 복강 투여하였고, 4일째에 동물을 희생시켜 뇌 조직을 적출하여 사멸된 신경세포의 수를 측정하였다.

[0133] 그 결과, 허혈성 뇌졸중 동물모델의 신경세포의 수는 허위시술군 대비 감소하였지만, YQ 펩타이드에 의해 증가하는 것을 확인하였다(도 19A).

[0135] **6-2. SOD 및 CAT 활성 측정**

[0136] 허혈을 유도한 후, 재관류시키면서 YQ 펩타이드를 200mg/kg의 양으로 1회 복강 투여하였고, 재관류하고 2시간 또는 24시간 후에 아베르틴(avertin)을 이용하여 전신마취시킨 후 두개강을 열고 신속히 뇌를 꺼낸 후, 해마조직을 적출하여 액체질소에 급냉시켜 초저온 냉동고에 보관하였다. 이후, SOD 비색반응 활성 키트 및 카탈라아제 비색반응 활성 키트를 이용하여 SOD와 CAT 활성을 측정하였다.

[0137] 그 결과, 허혈성 뇌졸중 동물모델의 재관류 24시간 후, SOD와 CAT 활성은 허위시술군 대비 감소하였지만, YQ 펩타이드에 의해 증가하는 것을 확인하였다(도 19B, C).

[0139] **6-3. 신경세포사멸 확인을 위한 면역조직화학염색**

[0140] 허혈성 뇌손상 동물모델의 해마에서 신경세포와 아교세포의 변화 및 관련인자의 변화를 확인하기 위해 면역조직화학염색을 실시하였다. 허혈을 유발한 후, 재관류시키면서 YQ 펩타이드를 200mg/kg의 양으로 24시간마다 3회 복강 투여하였다. 펩타이드 대신 vehicle(0.9% 살린)을 투여하여 대조군으로 이용하였다. 4일째에 동물을 희생시켜 뇌 조직을 적출하여 4% 파라포름알데하이드를 이용하여 4℃에서 고정하였다. 이후 10, 20, 30% 수크로스 용액에 침적시킨 다음 액체질소를 이용하여 조직을 얼린 뒤 30㎛ 두께의 연속절편으로 제작하였고, 냉동보존용액에 넣어 -20℃에서 보관하였다. 뇌조직절편을 0.01M PBS를 사용하여 10분씩 3회 세척하였고, 조직내에 존재하는 내인성 과산화효소를 없애기 위해 0.3% H_2O_2에 30분 동안 반응시켰다. 비특이적인 면역반응을 방지하기 위해 절편을 각각의 항체에 맞는 5% 정상 혈청으로 30분간 반응시킨 후 항-추상신경세포 관련 항체(NeuN), 항-별모양 아교세포 관련 항체(Iba-1) 및 항-미세아교세포 관련 항체(GFAP)를 각각의 희석배수로 희석하여 상온에서 밤새 반응시킨 후 반응이 끝난 조직은 비오틴이 결합되어있는 2차항체로 2시간 반응시킨 후 ABC용액에 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 조직은 3, 3'-DAB 키트를 이용하여 발색을 실시한 후 슬라이드 글라스에 도말한 후 실온에서 12시간 동안 말리고, 통상적인 탈수 투명화 과정을 거쳐 DPX 마운팅 용액을 이용하여 봉입한 후 현미경(Olympus BX53)을 이용하여 관찰하였다.

[0141] 그 결과, 대조군(0.9% 살린 투여군)에서는 해마 CA1 영역에 신경세포가 거의 관찰되지 않았으나 YQ 펩타이드 투여군에서는 허위시술군(sham)과 비교해 약 60.7%의 세포가 살아남아 있음을 확인하였다. 또한, 허혈성 뇌졸중 동물모델에서 대조군(0.9% 살린 투여군)에서는 확장된 세포질과 확장된 세포돌기를 가진 아교세포들이 관찰되었으나, YQ 펩타이드 투여군에서는 아교세포들의 형태학적인 변화가 크지 않았으며, 허위시술군(sham)과 거의 유사한 형태를 나타내는 것을 확인하였다(도 20).

[0142] 상기 결과를 바탕으로, 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드가 허혈에 의한 뇌조직의 산화적 손상 및 면역 반응을 억제시켜 신경세포의 사멸을 방어하는 것을 알 수 있었다.

[0144] **실시예 7. 고지방식이 제2형 당뇨 동물모델에서 인슐린 민감도 증진 효과 분석**

[0145] 3주령 C57BL/6 수컷 마우스를 코아텍에서 구입하여 동물사육실에서 항온(22±2℃), 항습(50±5%), 12시간 간격의 광주기로 유지하고 케이지당 2마리씩 분리 사육하였다. 1주간 적응시킨 뒤, 4그룹으로 나누어 정상식이(normal diet, ND), 고지방식이(high fat diet, HFD, 60% kcal fat), YQ 펩타이드 첨가 고지방식이군(HFD+1xYQ 또는 HFD+3xYQ)으로 17주간 사육하였다.

[0147] **7-1. 몸무게, 사료 섭취량 및 공복혈당 측정**

[0148] 일주일 간격으로 각 동물의 몸무게와 사료섭취량을 측정하였으며, 사육 시작 후 1, 5 또는 8주에는 12시간 절식 후 혈당측정검사기(Accu-Check)를 이용하여 공복혈당을 측정하였다.

[0149] 그 결과, 모든 실험군의 체중은 점진적으로 증가하였고, 동일자 기준으로, ND군 대비 HFD군의 체중이 더 높은 것으로 확인하였으며, HFD군 대비 HFD+3xYQ군의 체중이 더 낮은 것으로 확인하였다(도 21A). 사료 섭취량은 동일자 기준으로, ND군 대비 HFD군, HFD+1xYQ군 또는 HFD+3xYQ군이 낮은 것으로 확인하였고, HFD군, HFD+1xYQ군 또는 HFD+3xYQ군의 그룹간 차이는 거의 없는 것을 확인하였다(도 21B).

[0150] 또한, HFD군의 혈당이 ND군에 비해 증가하였으며, HFD+1xYQ군 또는 HFD+3xYQ군의 혈당이 HFD군에 비해 시간이 지날수록 감소하는 것을 확인하였다(도 22).

[0152] **7-2. 내당능(glucose tolerance test, GTT) 및 인슐린 감수성(insulin tolerance test, ITT) 검사**

[0153] 사육 시작 후 15주에 GTT 검사를, 16주에 ITT 검사를 수행하였다. GTT는 12시간 절식 후 포도당 용액 2g/kg을 복강주사한 후, 0, 20, 60, 90 및 120분에 정맥에서 채혈하여 혈당을 측정하였다. ITT는 6시간 절식 후 인슐린 0.75U/kg을 복강주사한 후, 0, 15, 30, 60 및 120분에 정맥에서 채혈하여 혈당을 측정하였다.

[0154] 내당능 및 인슐린 감수성 검사 결과에서, ND군에 대비하여 HFD군의 혈액 내 글루코스 함량이 증가하였고, HFD군에 대비하여 HFD+3xYQ군의 혈액 내 글루코스 함량이 감소하는 것을 확인하였다(도 23, 24).

[0156] **7-3. 소변 배출량 및 지방량 측정**

[0157] 소변 배출량(urine volume)은 16시간 동안 대사 케이지에서 수집한 소변의 양(㎖)을 측정하였고, 지방량(fat mass)은 EchoMRI™ 기계를 사용하여 각 마우스에서 측정하여 몸무게의 %로 나타내었다.

[0158] 그 결과, ND군에 대비하여 HFD군의 소변 배출량 및 지방량이 증가하였고, HFD군에 대비하여 HFD+3xYQ군의 소변 배출량 및 지방량이 감소하는 것을 확인하였다(도 25).

[0160] **7-4. 혈장 생화학적 분석**

[0161] 마취 후 하대동맥에서 혈액을 채취하고, 3,000rpm에서 15분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 인슐린의 농도는 ELISA 키트(Crystal Chem, Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA Kit)를 사용하여 측정하였고, 알라닌 아미노전이효소의 농도는 (ahlanine aminotransferase, ALT)는 어세이 키트(IVD Lab Co., ChemiLab GPT(ALT) assay kit)를 사용하여 측정하였으며, ROS/RNS의 농도는 어세이 키트(Cell Biolabs, Inc., OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay Kit)를 사용하여 측정하였다.

[0162] 그 결과, ND군에 대비하여 HFD군의 혈장 내 인슐린, ALT 및 ROS/RNS의 농도가 증가하였고, HFD군에 대비하여 HFD+3xYQ군의 혈장 내 인슐린, ALT 및 ROS/RNS의 농도가 감소하는 것을 확인하였다(도 26).

[0163] 상기 결과를 바탕으로, 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드가 비알코올성 간질환 및 활성산소/활성질소종에 의한 만성 대사 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0164]

[0165] **7-5. 조직학적 분석**

[0166] 마취 후 간 조직을 적출하여 액체질소에 급속 냉동하고 일부는 10% 포르말린에 고정한 후, 파라핀 블럭(paraffin block)에서 5um 두께의 조직 슬라이드를 제작하였다. 이후, 조직을 H&E(hematoxilyn & eosin)로 염색하였고, 현미경(Olympus, CKX41)으로 관찰하여 이미지화하였다.

[0167] 그 결과, HFD군의 간은 간세포 속 지방 방울의 흔적과 조직의 섬유화가 관찰된 반면, HFD+3xYQ군은 ND군과 유사한 간 조직의 모습을 유지하는 것을 확인하였다(도 27).

[0169] **7-6. 인슐린 수용체(insulin receptor) 발현양 측정**

[0170] 대사질환에서 근육의 인슐린 수용체의 감소는 인슐린 신호 민감도를 감소시켜 근육에서의 글루코스를 사용하는 능력을 제한시키게 되어 근감소증의 원인이 된다고 알려져 있다. 간 조직을 RIPA 버퍼에서 균질화하고 BCA법으로 단백질을 정량하여 항-인슐린 수용체 베타(insulin receptor-β,IRβ) 항체를 이용하여 웨스턴 블랏을 실시하였다.

[0171] 그 결과, ND군에 대비하여 HFD군의 인슐린 수용체 베타의 발현양이 감소하였고, HFD군에 대비하여 HFD+3xYQ군의 인슐린 수용체 베타의 발현양이 증가하는 것을 확인하였다(도 28).

[0172] 상기 결과를 바탕으로, 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드가 인슐린 수용체 베타의 발현양을 증가시킴으로써, 대사 질환에 따른 근감소증 예방 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0174] **7-7. 알부민/크레아틴 함량 및 중성지방 함량 측정**

[0175] 신장의 기능이 저하되면 소변 내 알부민(albumin)의 함량이 증가하고 크레아틴(creatinne)의 함량이 감소한다고 알려져 있다. 이에, 마우스 알부민 ELISA 키트(Abcam) 및 크레아틴 어세이 키트(Abcam)를 이용하여 각 실험동물의 소변에서 알부민 및 크레아틴의 함량을 측정하였고, 알부민/크레아틴 비율을 계산하였다. 또한, 혈장 10㎕ 또는 균질화한 간 조직 40mg을 10,000 g에서 10분간 원심분리한 후, 상층액을 분리하여 중성지방(Triglyceride, TG) 측정 키트(Cayman)를 이용하여 혈장 또는 간에 존재하는 중성지방의 양을 측정하였다.

[0176] 그 결과, ND군에 대비하여 HFD군의 알부민/크레아틴 비율 및 중성지방의 양이 증가하였고, HFD군에 대비하여 HFD+1xYQ 또는 HFD+3xYQ군의 알부민/크레아틴 비율 및 중성지방의 양이 감소하는 것을 확인하였다(도 29).

[0177] 상기 결과를 바탕으로, 티로신이 말단에 위치하는 펩타이드가 당뇨에 의한 신장기능의 저하를 억제하여 당뇨 합병증의 하나인 당뇨신증 예방에 효과가 있음을 알 수 있었고, 혈중 중성지방의 이상 증가 현상인 이상지질혈증에 대한 예방 또는 치료 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0179] **실시예 8. 신장 허혈 재관류에 의한 급성신부전 동물모델에서의 단백질의 니트로화 억제 효과 분석**

[0180] 23~25g의 수컷 C57BL/6 마우스를 온도와 습도가 일정하게 유지되는 무균 사육실에서 자유롭게 물과 사료를 섭취하도록 하고, 1)대조군(Sham), 2)물 투여한 신장 허혈 재관류 유발군(Veh+renal IR), 3)YQ 펩타이드 투여한 신장 허혈 재관류 유발군(YQ+renal IR)으로 나누었다. YQ(100 mg/kg)는 4일간 하루 1회 경구로 투여하였으며, 4일째 경구투여 30분 후 신장 허혈을 유발하였다. 신장 허혈은 복부를 절개하고 미세혈관 겸자(Muller atraumatic vascular clamp)를 이용하여 양측 신혈관경(renal pedicle)을 겸자하여 유발하였으며, 25분 허혈 후 겸자를 제거하여 재관류하였다. 대조군(sham)은 겸자를 통한 허혈 유발을 제외한 모든 수술과정을 동일하게 시행하였다. 재관류 후 24시간에 실험동물을 희생시켜 심장에서 혈액을 채취하고 신장조직을 적출하였다.

[0182] **8-1. 혈중 크레아티닌 농도 측정**

[0183] 채취한 혈액을 3,000rpm에서 15분 동안 원심분리하여 혈장을 분리하고 Jaffe법을 이용하여 신장 손상에 대한 평가 지표인 혈중 크레아티닌의 농도를 측정하였다. Jaffe법은 510nm 파장에서 혈장 시료를 피크르산과 반응하여 측정한 흡광도와 60% 아세트산으로 반응을 종료시킨 후 측정한 흡광도의 차이로 크레아티닌의 농도를 계산하여 mg/dℓ 단위로 나타내었다.

[0184] 그 결과, 혈장 크레아티닌은 신장 허혈 및 재관류 24시간 후 대조군(sham)에 비해 현저하게 증가하였으며, 이러한 증가는 YQ 펩타이드 투여에 의해 통계적으로 유의하게 억제되는 것을 확인하였다(도 30A).

[0186] **8-2. 실시간 qPCR 분석**

[0187] Trizol법으로 신장 조직에서 총 RNA를 추출하였고 RevertAid 역전사 시스템(Thermofisher)을 사용하여 cDNA를 합성하였다. iQ SYBR Green Supermix(Bio-Rad)를 사용하여 CFX Connect Real-Time PCR 시스템(Bio-Rad)에서 염증성 사이토카인(IL-1β, IL-6 및 MCP-1)에 대한 정량적 PCR(quantitative PCR, qPCR)을 수행하였다. GAPDH로 보정된 타겟 mRNA의 상대적인 양은 $2^{-\triangle Ct}$법을 사용하여 분석하였다. 실험에 사용한 프라이머는 하기 표 3과 같다.

표 3

[0188] qPCR 분석에 사용한 프라이머 정보

유전자	프라이머 서열(5'-3')	서열번호
IL-1β	F: TCGCAGCAGCACATCAACAAGAG	1
	R: GGTGCTCATGTCCTCATCCTGGA	2
IL-6	F: CCAATTCATCTTGAAATCAC	3
	R: GGAATGTCCACAAACTGATA	4
MCP-1	F: ACCTTTGAATGTGAAGTTGA	5
	R: CTACAGAAGTGCTTGAGGTG	6
GAPDH	F: GTGGCAAAGTGGAGATTGTTG	7
	R: TTGACTGTGCCGTTGAATTTG	8

[0189] 그 결과, 급성 신부전의 주요 발병기전인 염증반응의 지표인 IL-1β, IL-6 및 MCP-1의 발현양은 신장 허혈 및 재관류 24시간 후 대조군(sham)에 비해 현저하게 증가하였으며, 이러한 증가는 YQ 펩타이드 투여에 의해 통계적으로 유의하게 억제되는 것을 확인하였다(도 30B, C, D).

[0190] **8-3. 신장 조직에서의 니트로화 단백질 및 지질과산화 산물 발현양 측정**

[0191] 신장 조직을 RIPA 버퍼에서 균질화하고 BCA법으로 단백질을 정량한 후, 니트로티로신(nitrotyrosine) 및 지질과산화의 산물인 4-hydroxynonenal(4-HNE)에 대한 항체를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다.

[0192] 그 결과, 신장 허혈 및 재관류 24시간 후 신장조직에서 티로신이 니트로화된 단백질의 양이 대조군(sham)에 비해 증가하였으며, 이러한 증가는 YQ 펩타이드 투여에 의해 현저하게 감소하는 것을 확인하였다(도 31).

[0194] **실시예 9. 고암모니아혈증 동물 모델에서의 혈중 암모니아 억제 효과 분석**

[0195] 13주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 온도와 습도가 일정하게 유지되는 무균 사육실에서 자유롭게 물과 사료를 섭취하도록 하고, (1)대조군(Control), (2)물 투여한 고암모니아혈증군(Veh+AOM), (3)100mg/kg YQ 펩타이드 투여한 고암모니아혈증군(YQ100+AOM) 및 (4)200mg/kg YQ 펩타이드 투여한 고암모니아혈증군(YQ200+AOM)으로 나누었다. YQ 펩타이드를 4일간 하루 1회 경구로 투여하였으며, 4일째 경구투여 2시간 후 아족시메탄(Azoxymethane, AOM, 100mg/kg)을 복강으로 주사하여 고암모니아혈증을 유도하였다. AOM 투여 후 12시간 뒤 탈수를 예방하기 위하여 0.5% 글루코스를 포함하는 생리식염수 200㎕를 복강주사하고 4시간 후 실험동물을 희생시켜 심장에서 혈액을 채취하고 간 조직을 적출하였다.

[0197] **9-1. 혈중 암모니아 분석**

[0198] 암모니아는 아미노산과 핵산의 주 대사물이며, 암모니아를 요소로 전환시키는 요소회로의 주요 효소들이 간세포에만 존재하고, 암모니아를 농도를 낮춰주는 GS와 SOD, 활성산소를 제거하는 카탈라아제등도 간 조직에 풍부하게 존재하기 때문에 간을 지나 뇌로 올라가는 혈관의 혈중 암모니아 농도 변화는 간성뇌증에 중요한 지표가 된다. 이에, 혈중 암모니아 양을 측정하기 위하여 단일파장 반사측정법 분석용 측정기인 PocketChem BA PA-

4140(Arkray, Japan)를 사용였다. 검사지에 혈액 20㎕를 실온에서 3분간 반응시키고 측정기에 삽입하여 635nm(LED) 파장에서 흡광도를 측정하여 결과를 ㎍/dL 단위로 나타내었다.

[0199] 그 결과, 물 투여한 고암모니아혈증군(Veh+AOM)은 대조군(control)에 비해 혈중 암모니아 농도가 약 3.6배 증가하였으며, YQ 펩타이드의 투여는 AOM에 의한 혈중 암모니아 증가를 통계적으로 유의하게 억제하는 것을 확인하였다(도 32A).

[0201] **9-2. 간 조직에서의 니트로화 단백질 발현양 측정**

[0202] 간 조직을 RIPA 버퍼에서 균질화하고 BCA법으로 단백질을 정량한 후, 니트로티로신(nitrotyrosine)에 대한 항체를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다.

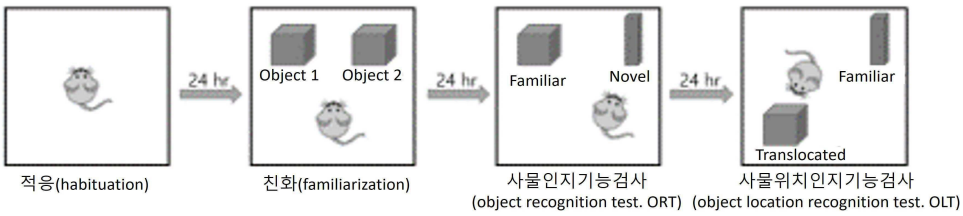
[0203] 그 결과, AOM 투여 후 간 조직에서 니트로티로신 단백질이 대조군에 비해 증가하였으며, 이러한 증가는 YQ 펩타이드의 투여에 의해 현저하게 감소하였으며, 이 결과는 YQ 펩타이드가 간에 존재하는 단백질들의 니트로화를 억제하여 간으로 유입된 암모니아를 제거할 수 있도록 해준다는 것을 알 수 있었다(도 32).

[0205] [통계 처리]

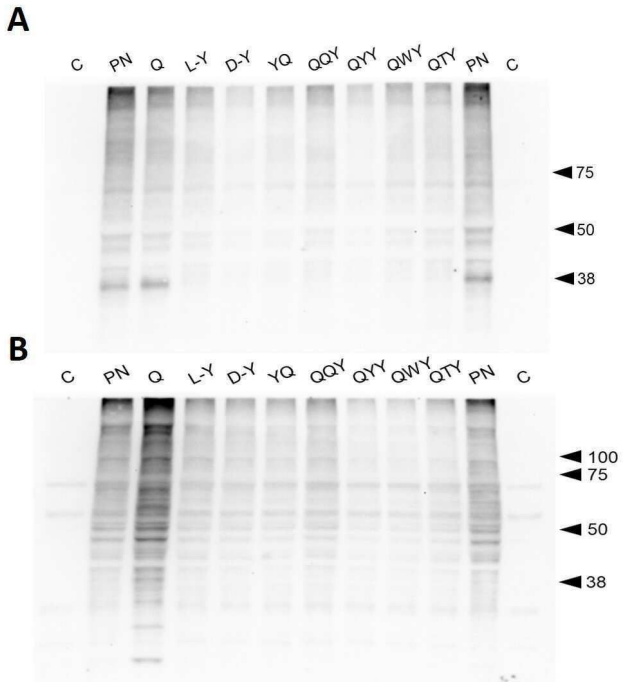
[0206] 본 발명의 모든 데이터는 평균±표준편차로 나타냈으며, Dunnetts Multiple Comparison Test를 이용한 일원 분산 분석(ANOVA) 또는 GraphPad 프리즘 5(GraphPad Software)를 이용한 스튜던트 t 검정으로 통계 분석되었다.

도면

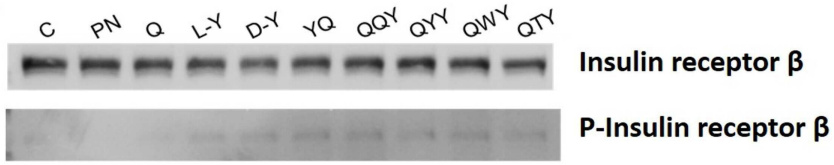
도면1



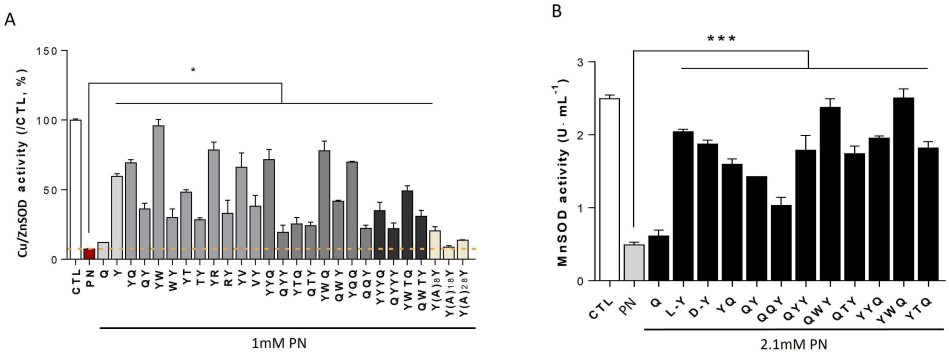
도면2


A
C
PN
Q
L-Y
D-Y
YQ
QQY
QYY
QWY
QTY
PN
C
75
50
38
B
C
PN
Q
L-Y
D-Y
YQ
QQY
QYY
QWY
QTY
PN
C
100
75
50
38

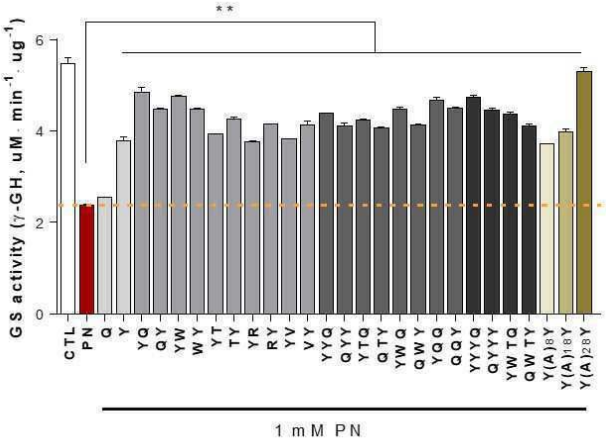
도면3


C
PN
Q
L-Y
D-Y
YQ
QQY
QYY
QWY
QTY
Insulin receptor β
P-Insulin receptor β

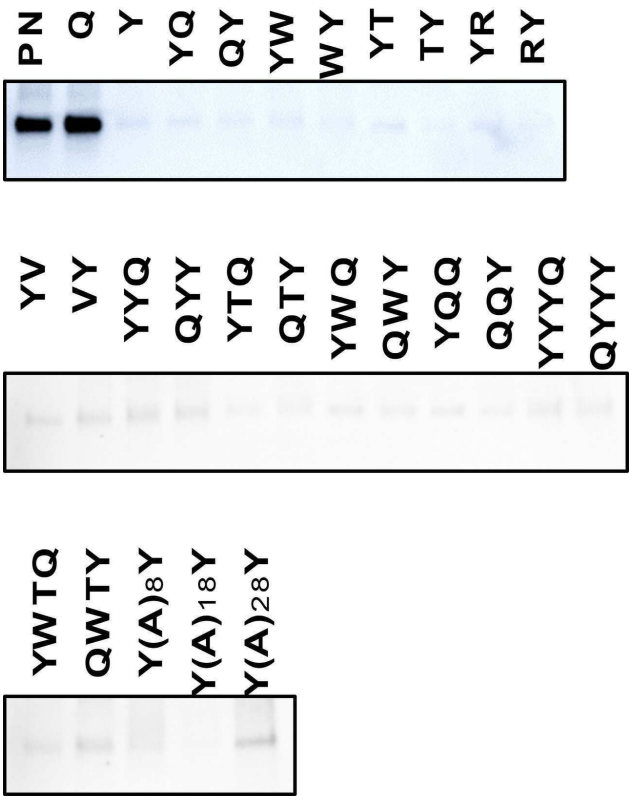
도면4


A
Cu/ZnSOD activity (/CTL, %)
150
100
50
0
*
CTL
PN
1mM PN
B
MnSOD activity (U mL-1)
3
2
1
0
***
CTL
PN
2.1mM PN

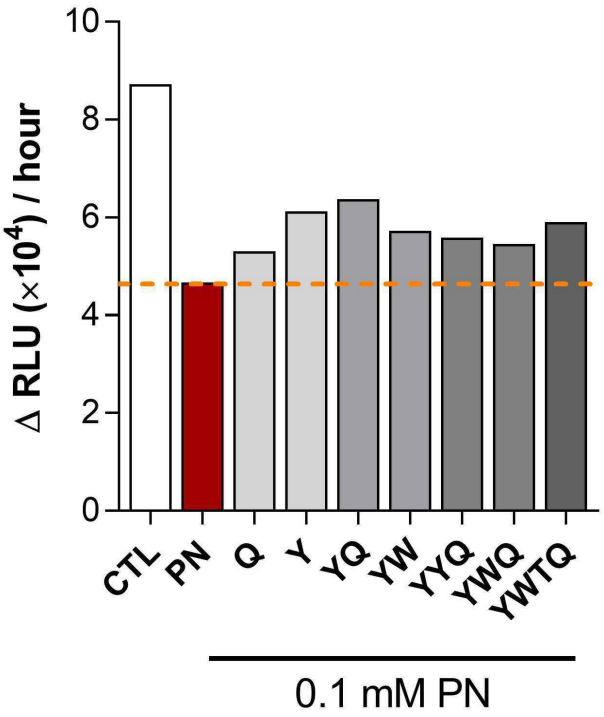
도면5


**
GS activity (γ-GH, uM· min-1· ug-1)
0
2
4
6
CTL
PN
Q
Y
YQ
QY
YW
WY
YT
TY
YR
RY
YV
VY
YYQ
QYY
YTQ
QTY
YWQ
QWY
YQQ
QQY
YYYQ
QYYY
YWTQ
QWTY
Y(A)8Y
Y(A)18Y
Y(A)28Y
1 mM PN

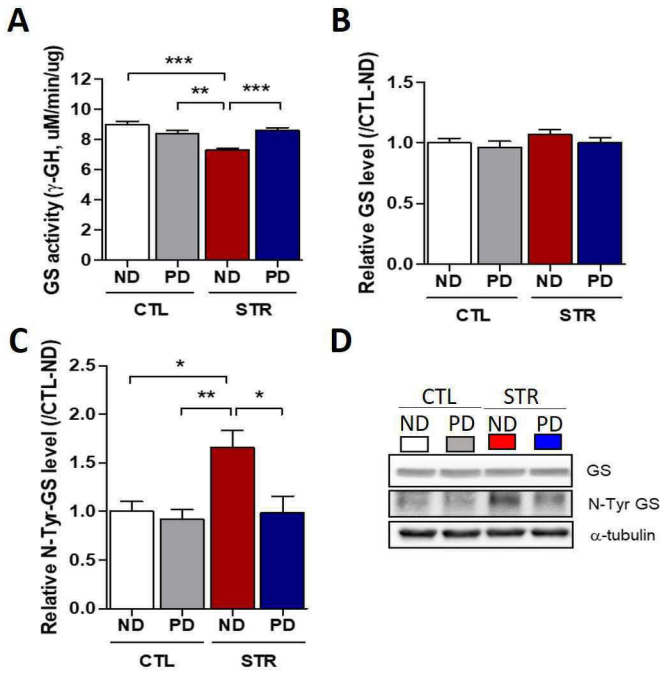
도면6


PN
Q
Y
YQ
QY
YW
WY
YT
TY
YR
RY
YV
VY
YYQ
QYY
YTQ
QTY
YWQ
QWY
YQQ
QQY
YYYQ
QYYY
YWTQ
QWTY
Y(A)8Y
Y(A)18Y
Y(A)28Y

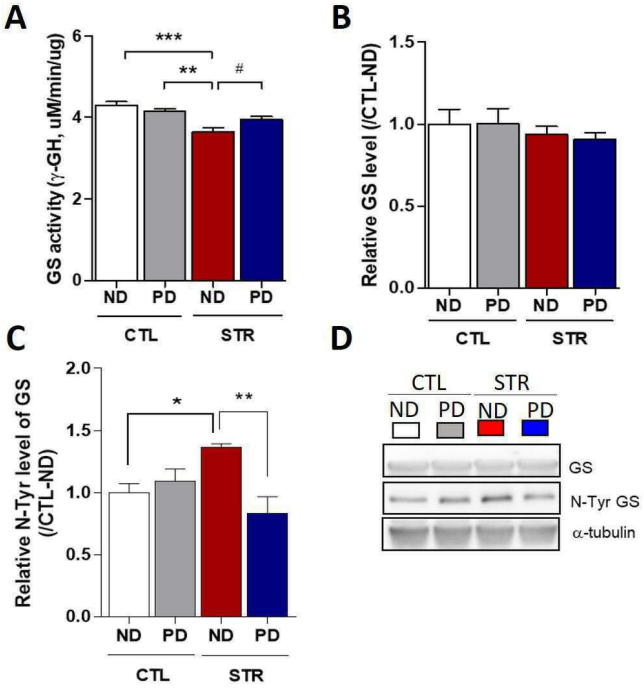
도면7


Δ RLU (×10^4) / hour
10
8
6
4
2
0
CTL
PN
Q
Y
YQ
YW
YYQ
YWQ
YWTQ
0.1 mM PN

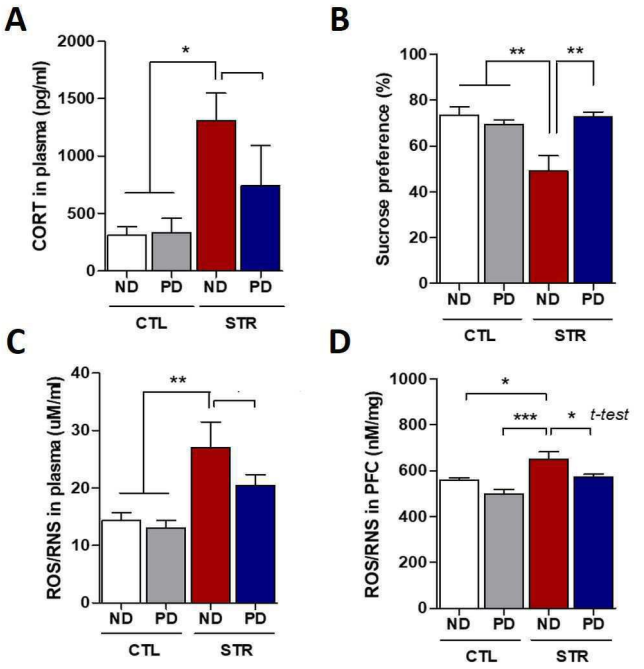
도면8


A
GS activity (γ-GH, uM/min/ug)
***
**
***
ND
PD
ND
PD
CTL
STR
B
Relative GS level (/CTL-ND)
C
Relative N-Tyr-GS level (/CTL-ND)
*
**
*
D
CTL
STR
GS
N-Tyr GS
α-tubulin

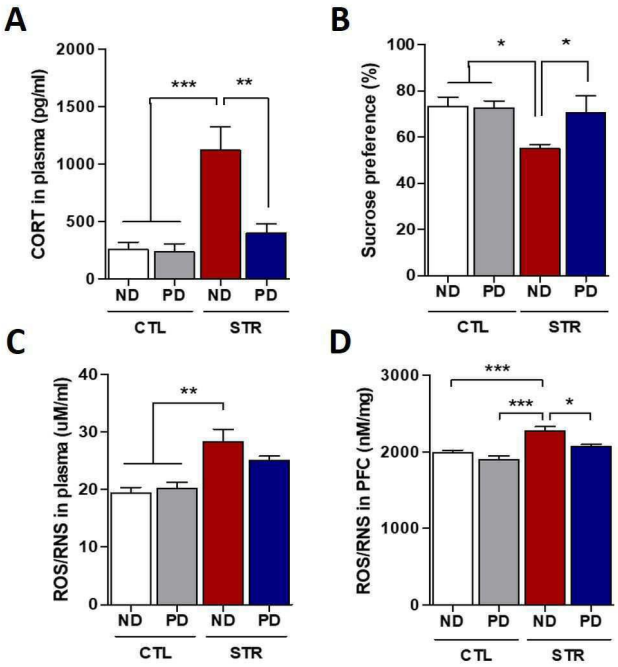
도면9


A
GS activity (γ-GH, uM/min/ug)
***
**
#
ND PD ND PD
CTL STR
B
Relative GS level (/CTL-ND)
ND PD ND PD
CTL STR
C
Relative N-Tyr level of GS (/CTL-ND)
*
**
ND PD ND PD
CTL STR
D
CTL STR
ND PD ND PD
GS
N-Tyr GS
α-tubulin

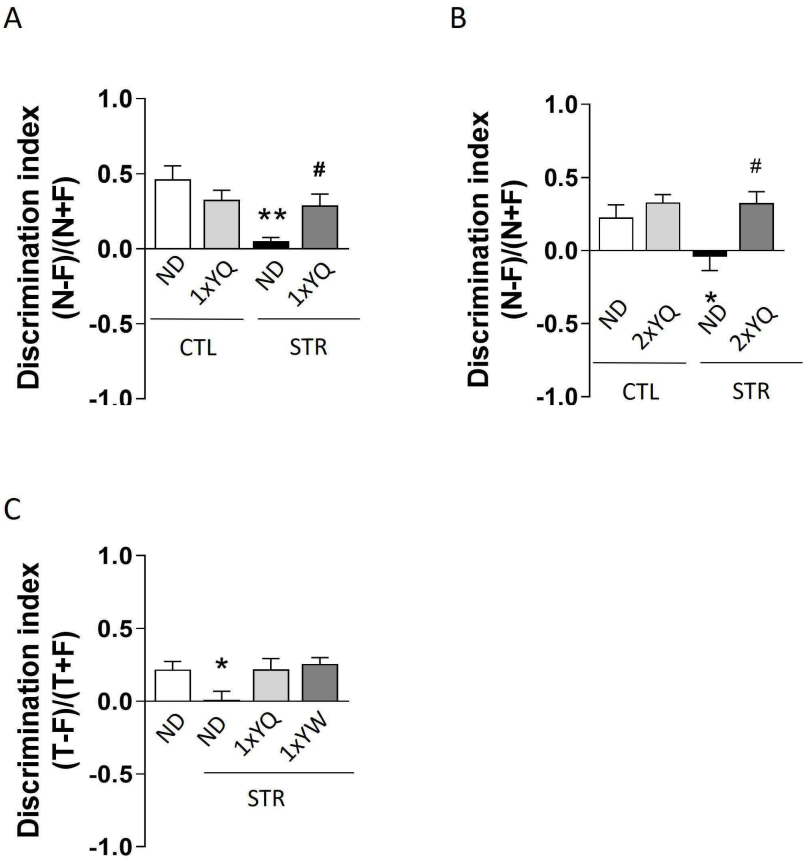
도면10


A
CORT in plasma (pg/ml)
*
ND PD ND PD
CTL STR
B
Sucrose preference (%)
**
**
ND PD ND PD
CTL STR
C
ROS/RNS in plasma (uM/ml)
**
ND PD ND PD
CTL STR
D
ROS/RNS in PFC (nM/mg)
*
***
* t-test
ND PD ND PD
CTL STR

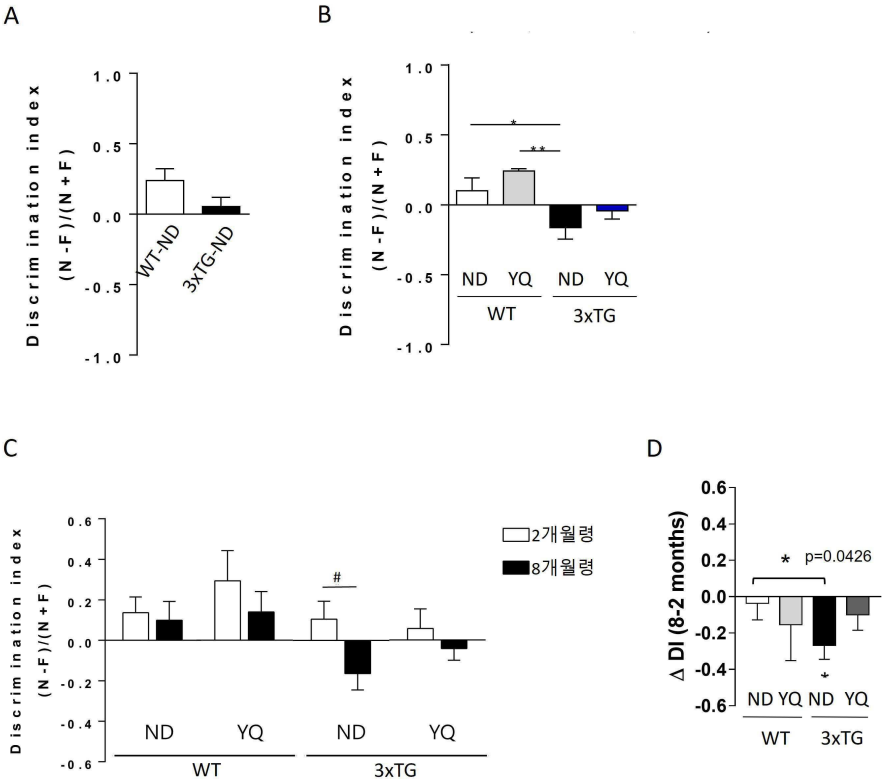
도면11


A
CORT in plasma (pg/ml)
2000
1500
1000
500
0
***
**
ND
PD
ND
PD
CTL
STR
B
Sucrose preference (%)
100
80
60
40
20
0
*
*
ND
PD
ND
PD
CTL
STR
C
ROS/RNS in plasma (uM/ml)
40
30
20
10
0
**
ND
PD
ND
PD
CTL
STR
D
ROS/RNS in PFC (nM/mg)
3000
2000
1000
0
***
***
*
ND
PD
ND
PD
CTL
STR

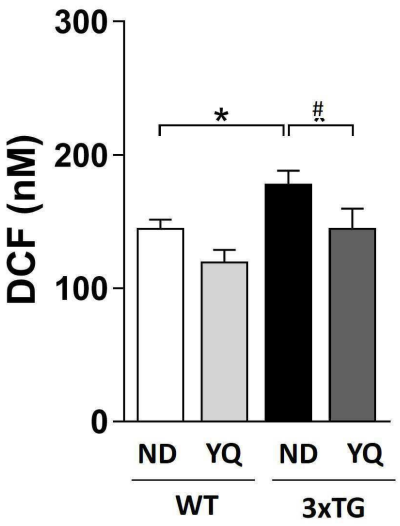
도면12


A
Discrimination index
(N-F)/(N+F)
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
**
#
ND
1xYQ
ND
1xYQ
CTL
STR
B
Discrimination index
(N-F)/(N+F)
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
#
*
ND
2xYQ
ND
2xYQ
CTL
STR
C
Discrimination index
(T-F)/(T+F)
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
*
ND
ND
1xYQ
1xYW
STR

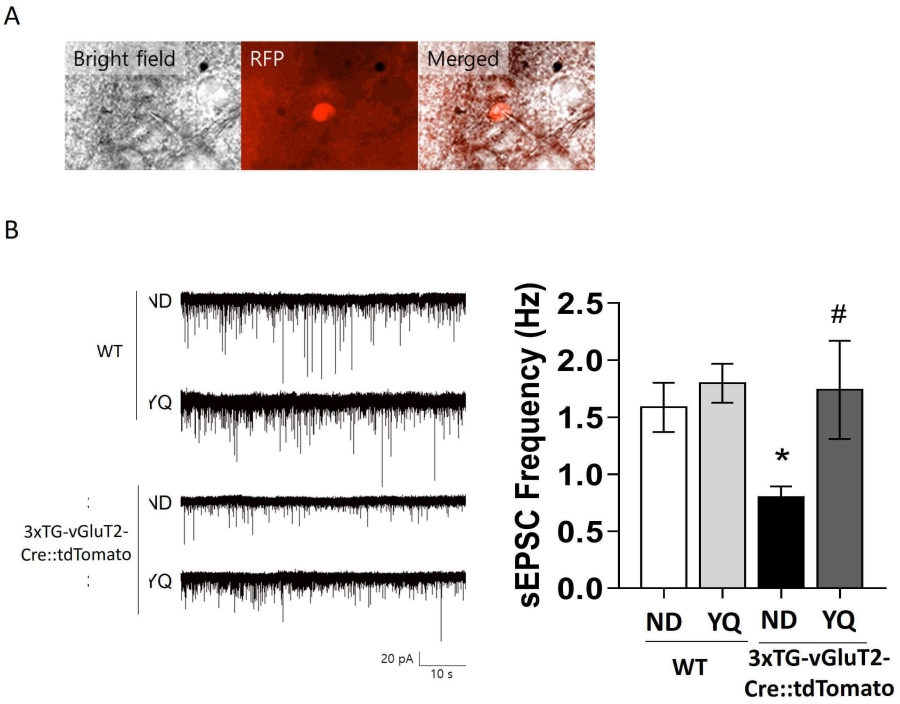
도면13


A
B
C
D
Discrimination index (N-F)/(N+F)
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
WT-ND
3xTG-ND
*
**
ND
YQ
WT
3xTG
0.6
0.4
0.2
-0.2
-0.4
-0.6
#
2개월령
8개월령
Δ DI (8-2 months)
p=0.0426

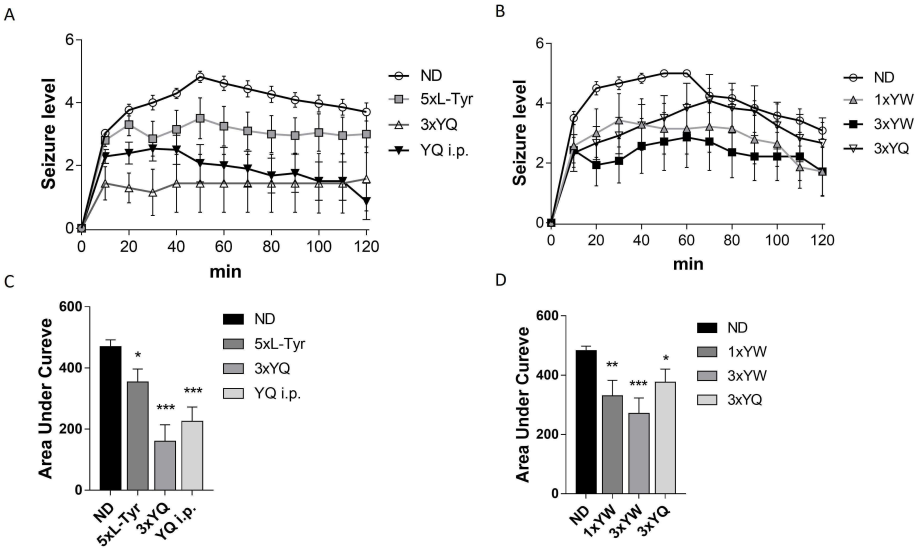
도면14


DCF (nM)
300
200
100
0
*
#
ND
YQ
WT
3xTG

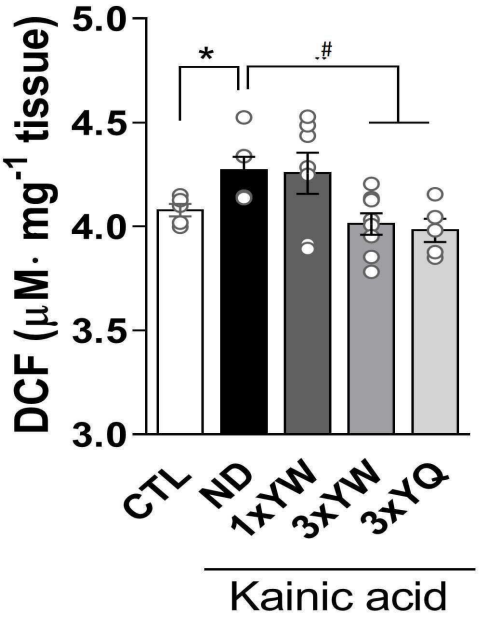
도면15


A
Bright field
RFP
Merged
B
WT
ND
YQ
3xTG-vGluT2-Cre::tdTomato
ND
YQ
20 pA
10 s
sEPSC Frequency (Hz)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
#
ND
YQ
ND
YQ
WT
3xTG-vGluT2-Cre::tdTomato

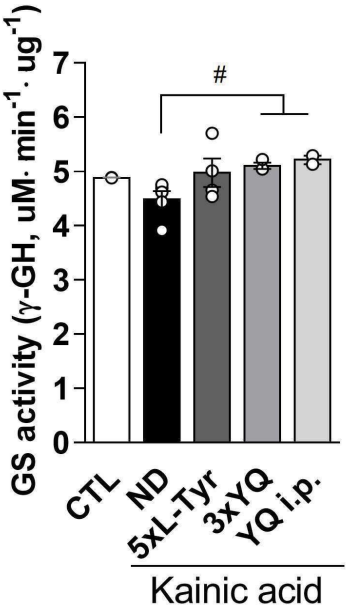
도면16

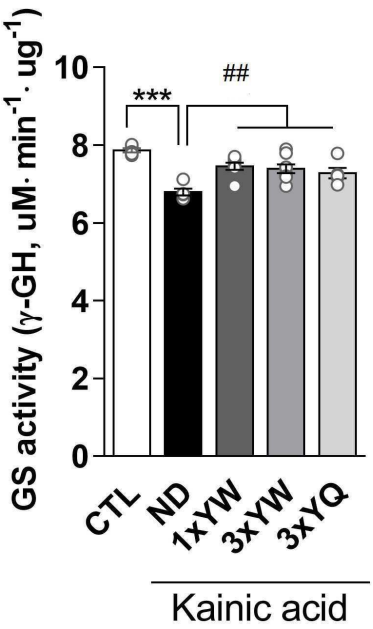

A
Seizure level
min
ND
5xL-Tyr
3xYQ
YQ i.p.
B
Seizure level
min
ND
1xYW
3xYW
3xYQ
C
Area Under Cureve
ND
5xL-Tyr
3xYQ
YQ i.p.
D
Area Under Cureve
ND
1xYW
3xYW
3xYQ

도면17

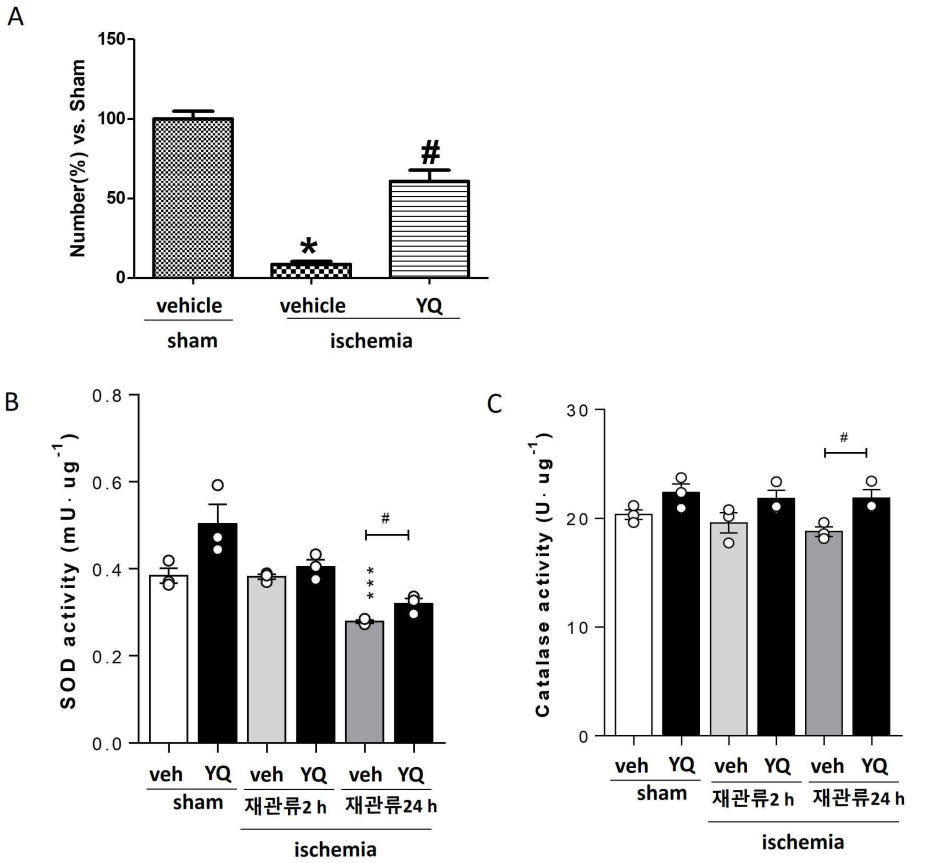

DCF (μM· mg-1 tissue)
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
*
#
CTL
ND
1xYW
3xYW
3xYQ
Kainic acid

도면18

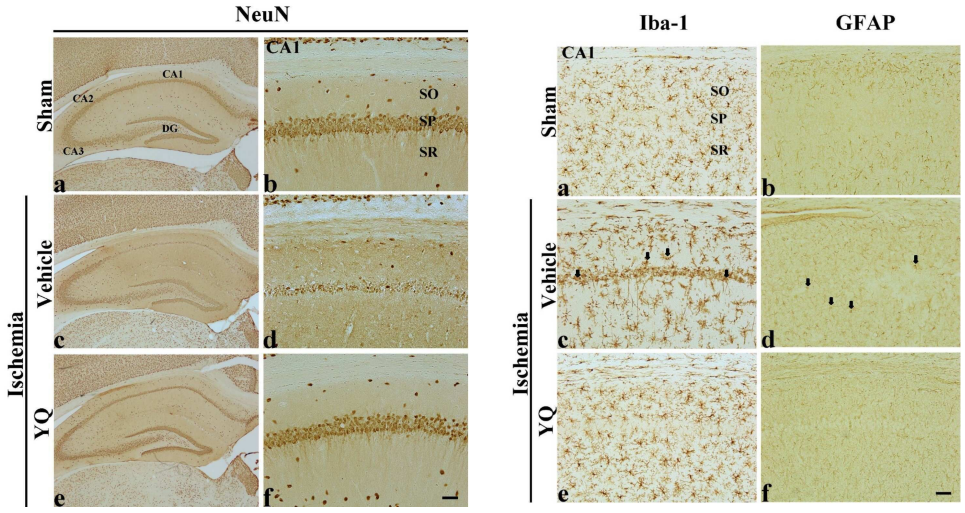

GS activity (γ-GH, uM· min-1· ug-1)
7
6
5
4
3
2
1
0
#
CTL
ND
5xL-Tyr
3xYQ
YQ i.p.
Kainic acid


GS activity (γ-GH, uM· min-1· ug-1)
10
8
6
4
2
0
***
##
CTL
ND
1xYW
3xYW
3xYQ
Kainic acid

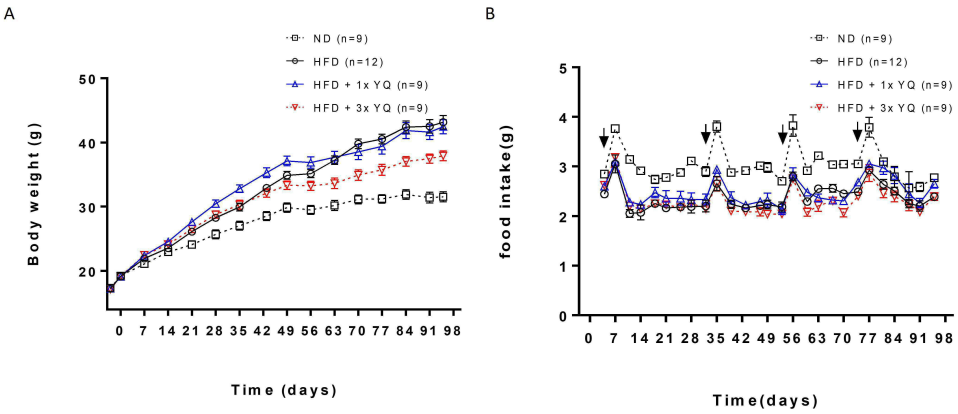
도면19


A
Number(%) vs. Sham
150
100
50
0
*
#
vehicle
vehicle
YQ
sham
ischemia
B
SOD activity (mU · ug-1)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
***
#
veh
YQ
veh
YQ
veh
YQ
sham
재관류2 h
재관류24 h
ischemia
C
Catalase activity (U · ug-1)
30
20
10
0
#
veh
YQ
veh
YQ
veh
YQ
sham
재관류2 h
재관류24 h
ischemia

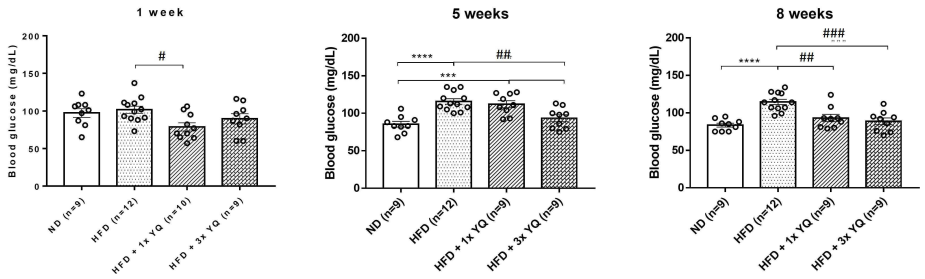
도면20


NeuN
Iba-1
GFAP
Sham
Vehicle
Ischemia
YQ
CA1
CA2
CA3
DG
SO
SP
SR
a
b
c
d
e
f

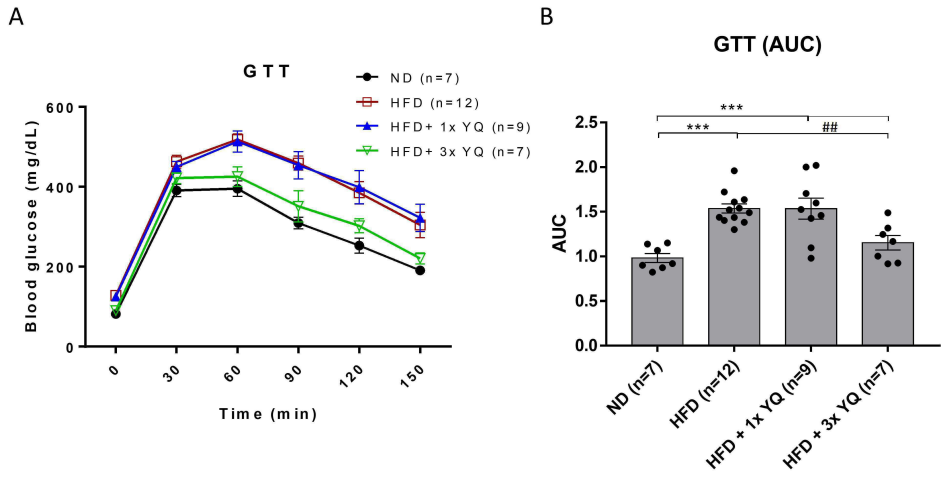
도면21



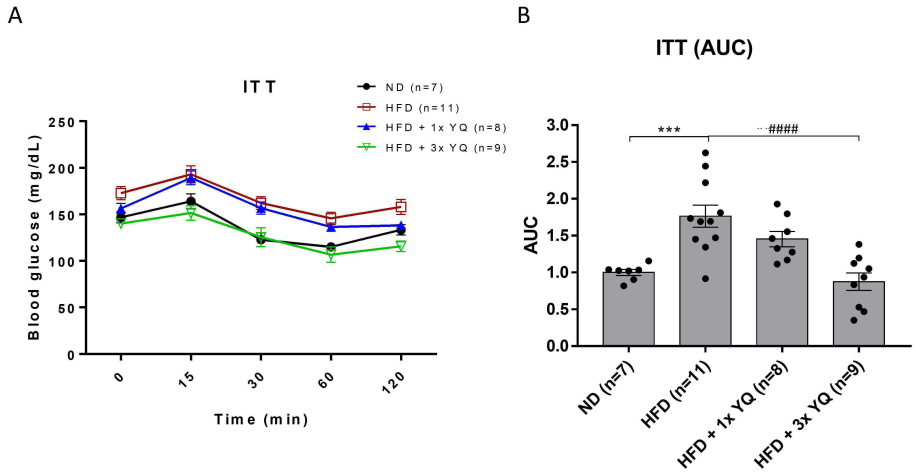
도면22



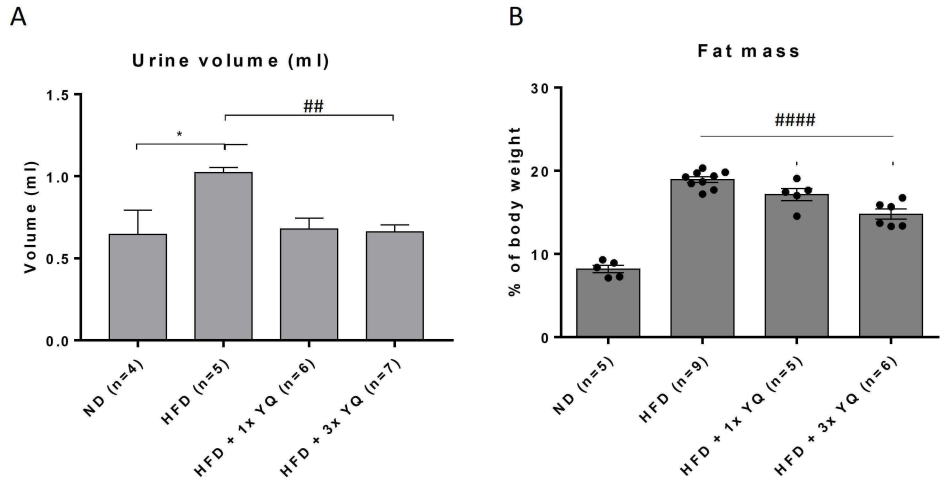
도면23



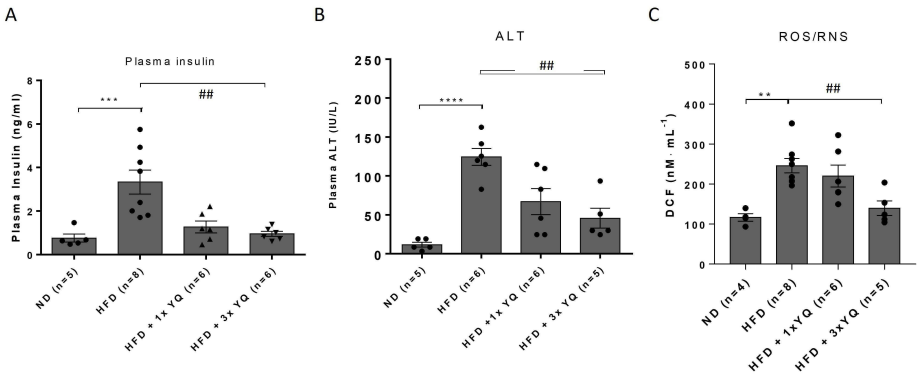
도면24



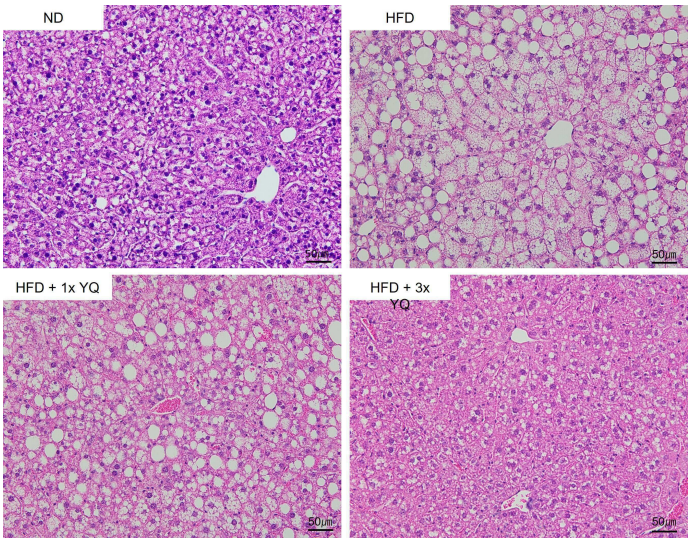
도면25



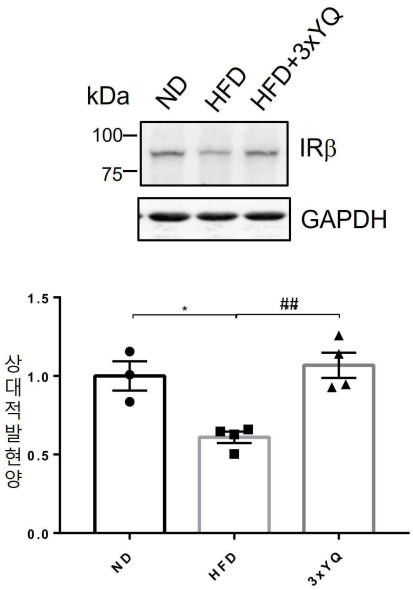
도면26



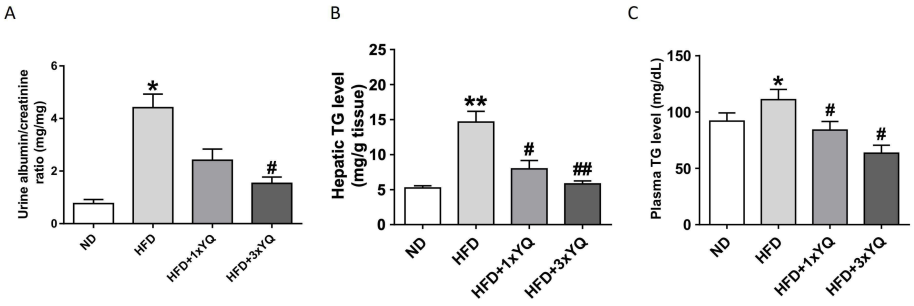
도면27



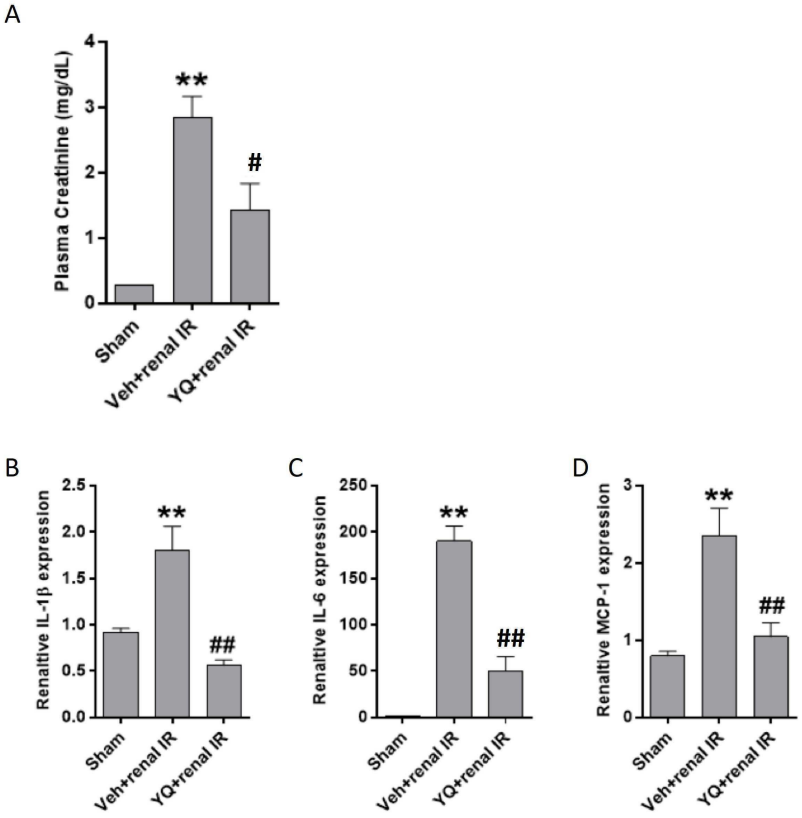
도면28



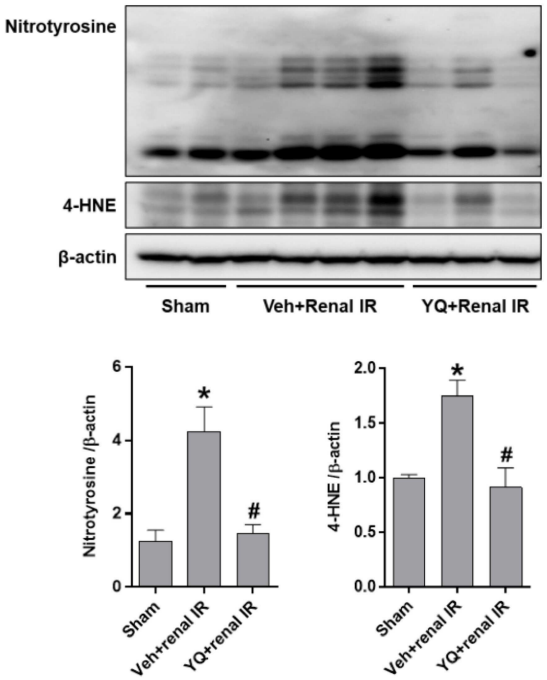
도면29



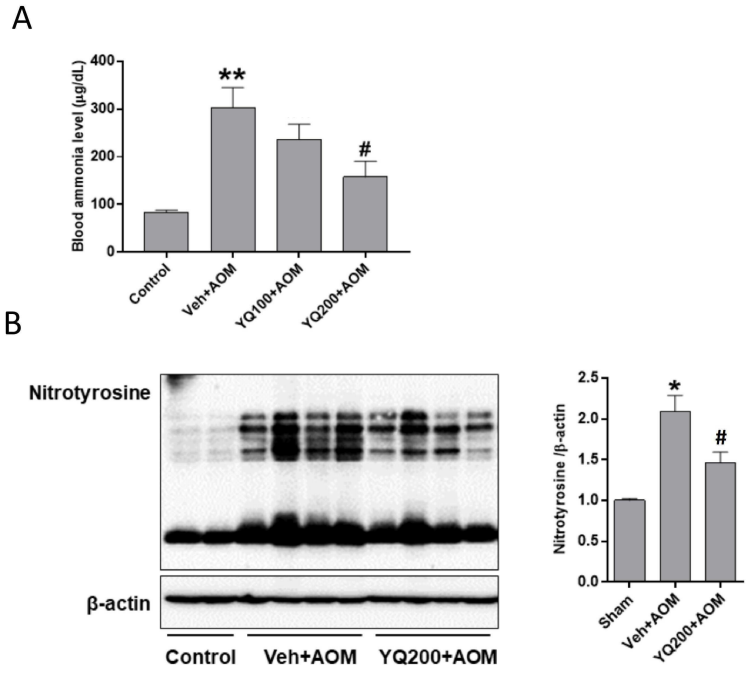
도면30


A
Plasma Creatinine (mg/dL)
**
#
Sham
Veh+renal IR
YQ+renal IR
B
Renaltive IL-1β expression
**
##
C
Renaltive IL-6 expression
**
##
D
Renaltive MCP-1 expression
**
##

도면31


Nitrotyrosine
4-HNE
β-actin
Sham
Veh+Renal IR
YQ+Renal IR
Nitrotyrosine /β-actin
*
#
4-HNE /β-actin
*
#

도면32



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Composition for preventing, ameliorating or treating disease caused by nitration of protein comprising peptide with tyrosine at the terminal as effective component

<130> PN22055

<160> 8

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

tcgcagcagc acatcaacaa gag 23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

ggtgctcatg tcctcatcct gga 23

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

ccaattcatc ttgaaatcac 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

ggaatgtcca caaactgata 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

acctttgaat gtgaagttga 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

ctacagaagt gcttgaggtg 20

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

gtggcaaagt ggagattgtt g 21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

ttgactgtgc cgttgaattt g 21