



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0002151
(43) 공개일자 2022년01월06일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/175 (2016.01) A61K 31/198 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A23L 33/175 (2016.08)
A61K 31/198 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-0085599</p> <p>(22) 출원일자 2021년06월30일
심사청구일자 2021년06월30일</p> <p>(30) 우선권주장
1020200080308 2020년06월30일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)</p> <p>(72) 발명자
김현준
경상남도 진주시 평거로115번길 5, 103동 1006호
(신안동, 평거1차현대아파트)
강재순
경상남도 진주시 진주대로 501(가좌동)
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
최규환</p> |
|--|---|

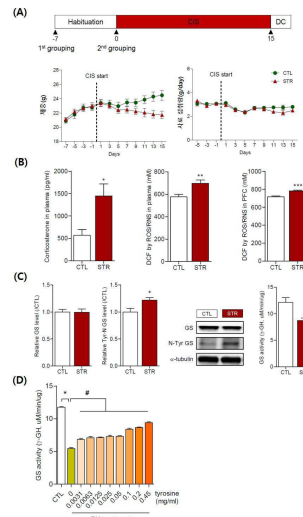
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 티로신을 유효성분으로 함유하는 단백질 내 티로신의 니트로화에 의한 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 티로신을 유효성분으로 함유하는 단백질 내 티로신의 니트로화(nitration)에 의한 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 유효성분인 티로신이 저하된 GS 활성을 증진시킬 뿐만 아니라, 뇌에서의 글루타민, 글루탐산의 함량(비율) 및 암모니아의 양을 정상적인 상태로 회복시키는 효과가 있으며, 제2형 당뇨병 모델에서 인슐린 민감도 증진, 간질발작 모델에서 흥분독성과 산화스트레스 억제 효과, 뇌졸중 모델에서 뇌 경색 저감 및 GS 활성 증진 효과, 인간 재조합 MnSOD를 이용한 티로신의 니트로화 제거 효과 급성 신부전에서 효과 및 고암모니아 혈증에 대한 효과가 있으므로, 단백질 내 티로신의 니트로화(nitration)에 의한 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물 또는 단백질 내 티로신의 니트로화(nitration)에 의한 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
A23V 2250/0652 (2013.01)

(72) 발명자

백지형

경상남도 진주시 진주대로815번길 11, 118동 1304호(주약동, 주약현대아파트)

정순용

경상남도 진주시 강남로189번길 25, 201호(칠암동)

박상원

경상남도 진주시 천수로 30, 105동 402호(주약동, 한보은빛마을아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711110767
과제번호	2019R1A2C1005020
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구
연구과제명	만성스트레스에 의한 우울 행동의 원인기전을 바탕으로 한 새로운 우울증 동물모델

개발

기 여 율	35/100
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	기초의과학분야(MRC)
연구과제명	바이오 항노화 의과학연구센터
기 여 율	35/100
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	30/100
과제수행기관명	경상국립대학교 산학협력단
연구기간	2021.06.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

티로신 또는 식품학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 단백질 내 티로신의 니트로화(nitration)에 의한 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단백질 내 티로신의 니트로화는 티로신 수산화효소(tyrosine hydroxylase), 망간 슈퍼옥사이드 디스무타아제(Mn Superoxide dismutase), Cu/Zn 슈퍼옥사이드 디스무타아제(Mn Superoxide dismutase), 인슐린 수용체 베타 서브유닛(insulin receptor β subunit), 아넥신 IV(annexin IV), 글루탐산 탈수소효소(glutamate dehydrogenase), 3- α -OH 스테로이드 탈수소효소(3- α -OH steroid dehydrogenase), 글루타티온 S-전달효소(glutathione S-transferase), 3-케토아실 CoA 티올레이즈(3-ketoacyl CoA thiolase), 카탈라아제(catalase), Tau 단백질, 미토콘드리아 복합체 1(mitochondria complex 1), 알파-시누클레인(α -synuclein), 아포지단백-A1(apolipoprotein-A1), 아밀로이드- β (amyloid- β) 및 NMDA 수용체(NMDA receptor) 중에서 선택된 어느 하나의 단백질 내 티로신의 니트로화인 것을 특징으로 하는 단백질 내 티로신의 니트로화(nitration)에 의한 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단백질 내 티로신의 니트로화(nitration)에 의한 질환은 우울증(depressive disorder), 불안장애(anxiety disorder), 뇌졸중(stroke), 뇌전증(epilepsy), 녹내장(glaucoma), 당뇨병(diabets), 당뇨병 망막병증(diabetic retinopathy), 발작(seizure), 간성뇌증(hepaticencephalopathy), 인지기능장애(cognitive impairment), 뇌발달장애(brain development impairment), 암(cancer), 알츠하이머병(Alzheimer disease), 급성 신장 손상(Acute kidney injury) 및 고암모니아혈증(Hyperammonemia) 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 단백질 내 티로신의 니트로화(nitration)에 의한 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 단백질 내 티로신의 니트로화(nitration)에 의한 질환은 뇌, 간, 근육, 지방조직, 신장조직, 췌장 또는 폐에서 발생하는 것을 특징으로 하는 단백질 내 티로신의 니트로화(nitration)에 의한 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 환, 정제(tablet), 캡슐(capsule), 산제, 분말, 과립, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 단백질 내 티로신의 니트로화(nitration)에 의한 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

티로신 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 단백질 내 티로신의 니트로화(nitration)에 의한 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 티로신 이외에 추가로 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질 내 티로신의 니트로화(nitration)에 의한 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

니트로화(nitration) 티로신을 포함하는 단백질에 티로신을 처리하여 니트로화 티로신으로부터 니트로기를 제거하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 티로신을 유효성분으로 함유하는 단백질 내 티로신의 니트로화에 의한 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생체 내에서 $\cdot\text{NO}$ 또는 $\cdot\text{NO}$ 유도 대사물이 존재하는 상태에서 반응성 산소종의 과잉 수준은 과산화질소와 같은 질산성 종의 형성을 이끈다. 따라서 단백질에 포함된 아미노산 중 티로신의 니트레이션이 발생하게 되면 단백질의 구조 및 기능적 변화를 초래할 수 있다. 따라서 티로신의 니트레이션은 다양한 질병을 초래하는 원인이 될 수 있다.

[0003] 일례로, 글루타민 합성 효소(glutamine synthetase, GS)는 생체에서 글루탐산과 암모니아를 이용하여 글루타민을 합성하는 효소로, 신체의 여러 기관에서 생성되며 기관 및 전 신체의 질소 균형에서 역할을 수행하고 있다. 만성 스트레스 등의 이유로 글루타민 합성 효소가 활성질소에 노출되면 티로신이 니트레이션 되며, 글루타민 합성 효소의 활성도를 저하시켜 다양한 질환을 일으킬 수 있다.

[0004] 최근, 골격근에서의 글루타민 합성 효소의 과발현에 기초한 유전자 요법이 급성 고암모니아혈증의 치료를 위하여 제안되었으며, 이 치료요법의 근거는 일반적으로 간 질환 환자의 근육에서 결핍되는 글루타민 합성 효소를 대체하거나 증강시켜 근육에서 글루타민 합성 효소에 의한 암모니아의 제거를 증가시키는 것을 목표로 하는 것이다.

[0005] 한편, 한국공개특허 제2020-0018488호에 고암모니아혈증을 치료하기 위한 글루타민 합성효소의 용도에 대하여 개시되어 있고, 한국공개특허 제2020-0038481호에 스트레스 관련 장애를 치료하기 위한 조성물이 개시되어 있으나, 본 발명의 티로신을 유효성분으로 함유하는 단백질 내 티로신의 니트로화에 의한 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대해 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 티로신을 유효성분으로 함유하는 단백질 내 티로신의 니트로화에 의한 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하고, 본 발명의 유효성분인 티로신이 스트레스에 의해 생성된 글루타민 합성 효소 내 N-tyr 함량을 감소시킬 뿐만 아니라, 활성이 저하된 글루타민 합성 효소의 활성을 증진시키며, 뇌에서의 글루타민, 글루탐산의 함량 및 암모니아 양을 정상적인 상태로 회복시키는 효과가 있다는 것을 확인하였고, 제2형 당뇨 모델에서 인슐린 민감도 증진, 간질발작 모델에서 흥분독성과 산화스트레스 억제 효과, 뇌졸중 모델에서 뇌경색 저감 및 GS 활성 증진 효과, 인간 재조합 MnSOD를 이용한 티로신의 니트로화 제거 효과 급성 신부전에서의 효과 및 고암모니아혈증에 대한 효과를 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 티로신 또는 식품학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 단백질 내 티로신의 니트로화(nitration)에 의한 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 티로신 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 단백질 내 티로신의 니트로화(nitration)에 의한 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 니트로화(nitration) 티로신을 포함하는 단백질에 티로신을 처리하여 니트로화 티로신으로부터 니트로기를 제거하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명은 티로신을 유효성분으로 함유하는 단백질 내 티로신의 니트로화에 의한 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 스트레스에 의해 글루타민 합성 효소의 발현량은 변화가 없으나, GS 내의 N-tyr의 함

량은 통계적으로 유의미하게 증가하였으며, 그로 인해 GS의 활성이 저하됨을 확인하였고, 세포 기반 실험에서 유리 티로신이 저하된 GS 활성을 증진시킬 뿐만 아니라, 뇌에서의 글루타민, 글루탐산의 함량(비율) 및 암모니아 양을 정상적인 상태로 회복시키는 효과가 있고, 제2형 당뇨 모델에서 인슐린 민감도 증진, 간질발작 모델에서 흥분독성과 산화스트레스 억제 효과, 뇌졸중 모델에서 뇌경색 저감 및 GS 활성 증진 효과, 인간 재조합 MnSOD를 이용한 티로신의 니트로화 제거 효과 급성 신부전에서의 효과 및 고암모니아혈증에 대한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0011]

도 1은 만성 부동자세 스트레스(CIS)에 따른 효과를 확인한 것으로, (A)는 실험 기간 중의 체중 및 음식 섭취량 변화를 확인한 결과이고, (B)는 혈장 내 코르티코스테론의 함량 변화와 혈장 및 PFC(전전두엽)에서의 ROS/RNS 함량 변화를 확인한 것이며, (C)는 GS 함량은 변화가 없으나, 스트레스군의 N-Tyr 함량은 통계적으로 유의미하게 증가하였으며, GS 활성은 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 결과이고, (D)는 PFC 조직 파쇄물에 과산화질소 및 티로신을 처리한 후, *in vitro* GS 활성을 확인한 결과이다. *, **, ***는 CTL에 대비하여 통계적으로 유의미한 차이가 있다는 것으로, *는 $p<0.05$ 이고, **는 $p<0.01$ 이며, ***는 $p<0.001$ 이다. #는 티로신을 처리하지 않은 군 대비 티로신을 처리한 군의 GS 활성이 통계적으로 유의미하게 증가했다는 것으로 $p<0.05$ 이다.

도 2는 티로신-식이(TD)한 만성 부동자세 스트레스(CIS) 유도군(STR)의 체중 및 사료 섭취량을 확인한 결과이다. (A)는 일반 식이군(ND)과 티로신-식이군(TD)의 스케줄이고, (B)는 체중변화를 확인한 결과이며, (C)는 사료 섭취량을 확인한 결과이다.

도 3은 티로신-식이(TD)한 만성 부동자세 스트레스(CIS) 유도군(STR)의 우울행동을 확인한 것으로, (A)는 열린 공간 시험(Open field test) 결과이고, (B)는 꼬리 현수 시험(tail suspension test) 및 (C)는 자당 선호도 시험(sucrose preference test) 결과이다.

도 4는 티로신-식이(TD)한 만성 부동자세 스트레스(CIS) 유도군(STR)의 혈장에서 코르티코스테론(corticosterone)의 함량(A) 및 혈장 및 PFC에서의 ROS/RNS에 변화량을 DCF(dichlorofluorescein)를 통해 TD에 의해 스트레스 호르몬과 산화적 스트레스가 감소된 것을 확인한 결과이다(B, C).

도 5는 티로신-식이(TD)한 만성 부동자세 스트레스(CIS) 유도군(STR)의 PFC에서, GS의 활성(A), GS의 발현량(B) 및 GS에 포함된 티로신의 nitration 레벨(C)을 확인한 결과이다.

도 6은 티로신-식이(TD)한 만성 부동자세 스트레스(CIS) 유도군(STR)의, PFC에서 글루탐산염, 글루타민, 티로신 및 GABA 함량을 확인한 결과이다.

도 7은 티로신-식이(TD)한 만성 부동자세 스트레스(CIS) 유도군(STR)의 PFC에서 암모니아 함량을 확인한 결과이다.

도 8은 마우스 PFC 단백질에 ONOO^- 를 처리하여 단백질의 니트로화를 유도하고, 티로신에 의한 니트로화 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 9는 본 발명에 따른 펩타이드의 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 결과이며, C는 PFC(전전두엽) 조직 내 글루타민 합성효소 단백질에 대한 웨스턴 블랏 결과이고, D는 간 조직 내 글루타민 합성효소, 인슐린 수용체 베타 및 인산화 인슐린 수용체 베타 단백질에 대한 웨스턴 블랏 결과이다.

도 10은 고지방식이에 의한 제2형 당뇨 모델 마우스에서 L-티로신의 섭취에 따른 체중변화(A), 혈당(B) 및 사료 섭취량(C)을 기간별로 확인한 결과이다. ***은 일반식이군(ND) 대비 고지방식이군(HFD)의 혈중 글루코스 함량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p<0.001$ 이고, #, ##은 고지방식이군(HFD) 대비 L-티로신 함유 식이군(HFD+L-Tyr)의 혈중 글루코스 함량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, #는 $p<0.05$ 이고, ##은 $p<0.01$ 이다.

도 11은 고지방식이에 의한 제2형 당뇨 모델 마우스에서, L-티로신 식이한 마우스의 포도당 내당능을 확인한 결과이다. (A)는 시간 경과에 따른 혈액 내 글루코스 함량을 나타낸 것이고, (B)는 (A)에서 곡선아래면적(AUC)를 나타낸 것이다. **, ***은 일반식이군(ND) 대비 고지방식이군(HFD)의 혈중 글루코스 함량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, **은 $p<0.01$ 이고, ***은 $p<0.001$ 이며, #은 고지방식이군(HFD) 대비 L-티로신 함유 식이군(HFD+L-Tyr)의 혈중 글루코스 함량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, $p<0.05$ 이다.

도 12는 고지방식이에 의한 제2형 당뇨 모델 마우스에서, L-티로신 식이한 마우스의 인슐린 저항성을 확인한 결

과이다. (A)는 시간 경과에 따른 혈액 내 글루코스 함량을 나타낸 것이고, (B)는 (A)에서 곡선아래면적(AUC)를 나타낸 것이다. *, **, ***은 일반식이군(ND) 대비 고지방식이군(HFD)의 혈중 글루코스 함량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, *은 $p<0.05$ 이며, **은 $p<0.01$ 이고, ***은 $p<0.001$ 이다. #은 고지방식이군(HFD) 대비 L-티로신 함유 식이군(HFD+L-Tyr)의 혈중 글루코스 함량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, $p<0.05$ 이다.

도 13은 조직내 지방 축적 변화(A) 및 혈장 내 ROS/RNS 함량 변화(B)를 확인한 결과이다. ***은 ND 대비 HFD 또는 HFD+Tyr의 조직 무게 및 혈장 내 ROS/RNS 함량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p<0.001$ 이고, #, ##은 HFD 대비 HFD+Tyr의 조직 무게 및 혈장 내 ROS/RNS 함량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, #은 $p<0.05$ 이고, ##은 $p<0.01$ 이다.

도 14는 티로신 식이에 따른 발작 정도의 변화(A), 체중 변화(C) 및 생존율(D)을 확인한 결과이며, (B)는 (A)에서 곡선아래면적(AUC)를 나타낸 것이다. **, ***은 ND 대비 5x L-Tyr의 발작 수준이 통계적으로 유의하게 감소하였다는 것으로, **은 $p<0.01$ 이고, ***은 $p<0.001$ 이다. #은 CTL의 발작 전 대비 발작후의 체중이 증가하였다는 것으로 $p<0.05$ 이다.

도 15는 카이닌산을 주사하여 생존한 마우스의 해마 조직에서 ROS/RNS 양적 변화(A) 및 GS 활성도를 분석한 결과이다. (A)에서 **, ***는 CTL 대비 ROS/RNS의 함량이 증가하였다는 것으로, **은 $p<0.01$ 이고, ***은 $p<0.001$ 이다. ##, ###은 KA 주사하고 일반식이한 ND군 대비 티로신 식이군의 ROS/RNS의 함량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, ##은 $p<0.01$ 이고, ###은 $p<0.001$ 이다. (B)에서 *은 KA 주사하고 일반식이한 ND군 대비 티로신 식이군의 GS 활성이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p<0.05$ 이다.

도 16은 카이닌산에 의해 해마 영역(CA1(A), CA3(B))의 신경세포 수 및 동일한 부위의 미세아교세포(microglia) 활성도를 분석한 조직면역화학염색 결과이다. *은 CTL 대비 신경세포수가 감소하였거나 염증을 유도하는 미세아교세포의 활성이 증가하였다는 것으로 $p<0.05$ 이고, #은 티로신 식이군에서 유의미하게 미세아교세포 활성이 감소하였다는 것으로 $p<0.05$ 이다.

도 17은 만성 신체구금 스트레스 모델 마우스에서 D-티로신의 인지장애 예방 효과를 확인한 결과이다.

도 18은 엔도텔린-1(Endothelin-1)을 이용한 뇌졸중(stroke) 모델 마우스에서 L-티로신의 뇌경색(brain infarct) 저감 및 GS 활성 증진 효과를 확인한 결과이다.

도 19는 인간 재조합 MnSOD를 이용한 티로신의 denitration 효과를 확인한 결과이다. ***은 과산화질소(2.1mM PN)군 대비 티로신 투여군(L-Tyr, D-Tyr)의 Mn SOD 활성이 증가하였다는 것으로, $p<0.001$ 이다.

도 20은 급성 신부전에 대한 티로신의 효과를 확인한 결과로, (A) 항산화 작용인자인 NQO-1의 유전자 발현량, (B) CuZnSOD 활성, (C) MnSOD 활성, (D) ROS/RNS 함량 및 (E) 신장 허혈 및 재관류 24시간 후 신장조직에서 nitrotyrosine 단백질 발현량을 나타낸 것이다.

도 21은 신장손상 평가지표로서 혈장 크레아티닌을 측정한 결과이다. *, **은 Sham군 대비 통계적으로 유의미하게 크레아틴(creatinine)(A), IL-1 β (B) 및 IL-6(C)의 발현량이 증가하였다는 것으로, *은 $p<0.05$ 이고, **은 $p<0.01$ 이다. #, ##은 CMC+IR 군 대비 크레아틴(creatinine), IL-1 β 및 IL-6의 발현량이 감소하였다는 것으로, #은 $p<0.05$ 이고, ##은 $p<0.01$ 이다.

도 22는 간성뇌증(고암모니아혈증)에 대한 티로신의 효과를 확인한 결과이다. (A) 혈중 암모니아 함량, (B) 혈장내 ALT 및 (C) 니트로화된 단백질 함량을 확인한 웨스턴 블랏이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 티로신 또는 식품학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 단백질 내 티로신의 니트로화(nitration)에 의한 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0013] 상기 단백질 내 티로신의 니트로화는 티로신 수산화효소(tyrosine hydroxylase), 망간 슈퍼옥시드 디스무타아제(Mn Superoxide dismutase), Cu/Zn 슈퍼옥시드 디스무타아제(Mn Superoxide dismutase), 인슐린 수용체 베타 서브유닛(insulin receptor β subunit), 아넥신 IV(annexin IV), 글루탐산 탈수소효소(glutamate dehydrogenase), 3- α -OH 스테로이드 탈수소효소(3- α -OH steroid dehydrogenase), 글루타티온 S-전달효소(glutathione S-transferase), 3-케토아실 CoA 티올레이즈(3-ketoacyl CoA thiolase), 카탈라아제(catalase), Tau 단백질, 미토콘드리아 복합체 1(mitochondria complex 1), 알파-시누클레인(α -synuclein), 아포지단백-

A1(apolipoprotein-A1), 아밀로이드- β (amyloid- β) 및 NMDA 수용체(NMDA receptor) 중에서 선택된 어느 하나의 단백질 내 티로신의 니트로화인 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다.

[0014] 상기 단백질 내 티로신의 니트로화(nitration)에 의한 질환은 우울증(depressive disorder), 불안장애(anxiety disorder), 뇌졸중(stroke), 뇌전증(epilepsy), 녹내장(glaucoma), 당뇨병(diabetes), 당뇨병망막병증(diabetic retinopathy), 발작(seizure), 간성뇌증(hepaticencephalopathy), 인지기능장애(cognitive impairment), 뇌발달장애(brain development impairment), 암(cancer), 알츠하이머병(Alzheimer disease), 급성 신장 손상(Acute kidney injury) 및 고암모니아혈증(Hyperammonemia) 중에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.

[0015] 상기 단백질 내 티로신의 니트로화(nitration)는 뇌, 간, 근육, 지방조직, 신장조직, 췌장 또는 폐에서 발생할 수 있으며, 이에 한정하는 것은 아니다.

[0016] 본 발명의 유효성분인 티로신을 투여하는 양은 하기 표 1에 개시한 양으로 투여하는 것이 바람직하지만, 이에 제한하는 것은 아니다.

표 1

[0017] 질환별 투여량 및 식이기간

질환명	티로신 투여량(마우스 기준)		식이기간
	사료	섭취량	
우울증, 인지기능	180~1,000mg/식이kg	14~140mg/kg/day	4주
뇌전증	180~1,000mg/식이kg	14~140mg/kg/day	1주
뇌졸중	800~1000mg/식이kg	80~140mg/kg/day	1주
당뇨	180 mg/식이kg	14~28 mg/kg/day	15주
급성신장손상	100 mg/몸무게kg	100mg/kg	4일
간성뇌증(고암모니아혈증)	100 mg/몸무게kg	100mg/kg	4일

[0018] 상기 건강기능식품 조성물은 환, 정제(tablet), 캡슐(capsule), 산제, 분말, 과립, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나로 제조하거나, 식품의 성분으로 첨가하여 제조될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 제조될 수 있다.

[0019] 본 발명의 유효성분을 첨가할 수 있는 식품의 일례로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 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.

[0020] 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.

[0021] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 티로신 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 단백질 내 티로신의 니트로화(nitration)에 의한 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0023] 상기 티로신 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 증진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이

러한 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, 동결건조제, 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 위텟솔(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 니트로화(nitration) 티로신을 포함하는 단백질에 티로신을 처리하여 니트로화 티로신으로부터 니트로기를 제거하는 방법에 관한 것이다.

[0028] 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.

[0029] 1. 동물 모델

[0030] 본 발명에서는 7주령 C57BL/6 수컷 마우스 28마리(한국 코아텍)를 표준 조건(온도 22~24℃, 습도 50~70% 오전 6시에 점등되는 12시간 명암주기)으로 사육하였으며, 이때 식이요법과 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 본 발명에서 사용한 동물은 국립보건원(NIH, Bethesda, MD, USA) 지침에 따르는 경상대학교 동물보호 및 사용위원회(GNU IACUC)로부터 승인 받은 프로토콜(GNU-161128-M0068)에 따라 실시하였다.

[0031] 2. 혈장 및 전전두엽(prefrontal cortex; PFC) 시료 준비

[0032] 뇌의 혈액과 PFC 시료는 각각 CO₂ 가스로 마취된 마우스로부터 샘플링하였다. 마우스 혈액은 오전 9시에서 11시 사이에 채취하여 K₃EDTA로 코팅된 진공용기에 수집하였다. 혈장은 4℃에서 500×g로 10분 동안 원심분리하여 획득하였고, PFC 시료는 무게를 잰 후, Bullet 조직파쇄기를 이용하여 조직을 파쇄하고, 4℃에서 12,000rpm으로 20분 동안 원심분리하였다. 상기 획득한 혈장과 조직 파쇄물(lysate)는 사용하기 전까지 -80℃에서 보관하였다.

[0033] 3. 코르티코스테론(corticosterone) 및 ROS/RNS(reactive oxygen species/reactive nitrogen species) 확인

[0034] 10μg의 파쇄물을 GS 어세이 완충용액(50mM의 이미다졸-HCl, pH 6.8, 50mM L-글루타민, 25mM의 히드록실아민, 25mM의 비산나트륨(sodium arsenate), 2mM의 MnCl₂ 및 0.16mM의 ADP) 50mℓ에 혼합하여 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0035] 혼합 후, 정지 완충용액(90mM의 FeCl₃, 1.8N의 HCl 및 1.45% trichloroacetic acid) 50μℓ를 첨가하여 반응을 정지시키고, GS에 의한 글루타민(glutamine) 및 히드록실아민(hydroxylamine) 반응으로부터 합성된 γ-글루타밀 히드록사메이트(γ-glutamylhydroxamate)를 마이크로플레이트 리더를 이용하여 560nm에서 측정하였다.

[0036] 웨스턴블랏 및 면역침강(IP)-WB을 이용하여 GS 및 Tyr-nitration GS의 레벨을 각각 측정하였고, Tyr-nitration GS의 면역침강 분석은 항-3-니트로티로신 항체(ab61392, Abcam, Cambridge, UK) 및 단백질A/G 플러스 아가로스(Santa Cruz, Dallas, TX, USA)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 실시하였고, GS의 웨스턴블랏

은 항-GS(1:5000, Abcam)를 이용하여 실시하였다.

- [0037] 실시예 1. 만성 부동자세 스트레스(Chronic immobilization stress; CIS)에 따른 행동 분석, 글루타민 합성 효소(GS) 활성 변화 및 GS 내의 nitration-티로신의 함량 확인
- [0038] 동물모델은 두 그룹(정상군, 스트레스군)으로 나누어, 스트레스군은 매일 2시간(오후 2~4시)동안 개별적으로 구속기에 강제동원하여 만성적 부동자세 스트레스를 15일 동안 주었으며, 격일로 체중변화와 사료 섭취량을 측정하였다.
- [0039] 이후, 동물을 희생시켜 혈장 내 코르티코스테론(corticosterone) 함량 변화를 확인하였고, 혈장 및 PFC에서의 ROS/RNS를 확인하였다. 코르티코스테론의 함량은 ELISA 키트(Cayman)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 실시하였고, ROS/RNS는 ROS/RNS 어세이 키트(Cell Biolabs, San Diego, CA, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 실시하였다.
- [0040] 그 결과 도 1에 개시한 바와 같이, 스트레스를 가하지 않은 대조군(CTL)에 비해 만성 스트레스를 가한 스트레스군(STR)의 체중은 7일에서 15일 사이 감소하는 경향을 보였으나, 사료 섭취량은 차이가 거의 없는 것으로 나타났다, 코르티코스테론 함량과 ROS/RNS도 통계적으로 유의미하게 증가하였다.
- [0041] 한편, 대조군 대비 스트레스군의 글루타민 합성효소(GS)의 발현량은 감소하지 않았으며, GS 내의 티로신이 nitration된 레벨이 통계적으로 유의미하게 증가하였을 뿐만 아니라, GS 활성이 통계적으로 유의미하게 감소한 것을 확인하였다.
- [0042] 또한, 10 μ g의 PFC(prefrontal cortex) 조직 파쇄물에 0.0031~0.45mg/ml의 티로신을 첨가하여 혼합하고 10분 동안 얼음에서 인큐베이션하고, 과산화질소(PN)를 상기 조직 파쇄물의 10배의 부피가 되도록 혼합한 후 10분동안 인큐베이션한 후 *in vitro* GS 활성을 확인한 결과, 티로신 농도의 증가에 따라 GS 활성도 증가하는 것을 확인하였다.
- [0043] 실시예 2. 티로신-식이(TD)한 만성 부동자세 스트레스(CIS) 유도군(STR)의 체중 및 사료 섭취량 변화 확인
- [0044] 동물모델은 두 그룹(정상군, 스트레스군)으로 나누어, 스트레스군은 매일 2시간(오후 2~4시)동안 개별적으로 구속기에 강제동원하여 만성적 부동자세 스트레스를 15일 동안 주었으며, 격일로 체중변화와 사료 섭취량을 측정하였다.
- [0045] 상기 정상군 및 스트레스군은 영양 균형이 맞는 일반식이군과 본 발명의 티로신(tyrosin)이 보충(181.2mg/kg)된 식이군으로 다시 분류하여 급여하였다.
- [0046] 그 결과 도 2에 개시한 바와 같이, 티로신-식이 여부에 따른 체중의 변화 또는 사료섭취량의 차이는 없는 것으로 확인되었다.
- [0047] 이후, OFT(open field test), TST(tail suspension test) 및 SPT(sucrose preference test)를 포함하는 행동분석을 실시하였다.
- [0048] OFT(열린 공간 시험)는 사각형 상자(60×60×20cm)에서 수행하였으며, 마우스를 상자의 중앙 영역(30×30cm)에 배치하고 그 동작을 5분 동안 추적하여 총 이동거리, 중앙지역에서의 지속시간, 중앙지역으로 진입시도 빈도수를 측정하였다.
- [0049] TST(꼬리 현수 시험법)는 마우스를 수평막대가 있는 상자에서 개별적으로 매달고, 움직이지 않는 지속시간을 측정하기 위하여 6분 동안 움직임을 추적하였다.
- [0050] SPT(자당 선호도 시험)는 48시간 동안 0.1M의 자당(sucrose) 및 물을 제공하여 습관을 들인 후, 24시간 동안 0.1M의 자당(sucrose) 및 물을 제공하지 않고, 이후, 6시간 동안 0.1M의 자당(sucrose) 및 물을 제공하고, 3시간동안 0.1M의 자당(sucrose) 및 물의 위치를 변경하였다.
- [0051] 이후, 자당 및 물의 소비량을 측정하고, 자당 선호도들 총 소비량 대비 제공한 자당의 비율로 계산하였다.
- [0052] 그 결과 도 3에 개시한 바와 같이, 열린 공간 시험에서, 정상군(CTL) 대비 스트레스군(STR)군이 중앙지역에 머무르는 시간, 움직이는 거리, 중심으로 이동하는 횟수가 감소하였으나, 스트레스군 중에서 일반식이(ND)군에 비해 티로신-식이군(TD)의 중앙지역에 머무르는 시간, 움직이는 거리, 중심으로 이동하는 횟수가 증가한 것을 확인하였다.
- [0053] 또한, 꼬리 현수 시험(TST)에서 스트레스군의 일반식이군(ND)은 움직이지 않는 시간이 정상군(CTL)에 비해 통

계적으로 유의미하게 증가하였으며($p<0.05$), 이에 대비하여 티로신-식이군은 움직이지 않는 시간이 통계적으로 유의미하게 감소하였다($p<0.05$).

[0054] 또한, 자당 선호도 시험에서도, 스트레스군의 자당 선호도가 정상군에 비해 통계적으로 유의미하게 감소하였으나($p<0.001$), 스트레스군의 일반식이군 대비 본 발명의 티로신 식이군의 자당 선호도는 통계적으로 유의미하게 증가하였다($p<0.01$).

[0055] 이후 동물을 희생시켜 확인한 혈장에서 코르티코스테론 함량을 확인한 결과, 도 4에 개시한 바와 같이, 스트레스에 의해 코르티코스테론 함량이 증가되었으나, 스트레스군의 일반식이군 대비 티로신 식이군에서는 코르티코스테론의 함량이 통계적으로 유의미하게 감소한 것을 확인하였고(#, $p<0.05$), 혈장과 PFC 조직에서 ROS/RNS를 확인한 결과, 스트레스군의 일반식이군 대비 티로신 식이군에서는 ROS/RNS가 통계적으로 유의미하게 감소한 것을 확인하였다(**: $p<0.01$, *: $p<0.05$).

[0056] 한편, 대조군 대비 스트레스군의 일반식이(ND) 및 티로신 식이(TD) 둘다 글루타민 합성효소(GS)의 발현량은 유사하게 나타났으나, 스트레스에 의해 GS 활성은 감소되었으나, 스트레스군에서 일반식이군에 대비하여 티로신-식이군은 GS 활성이 통계적으로 유의미하게 증가하였으며, GS 내의 N-Tyr(nitration 티로신)의 함량이 스트레스에 의해 통계적으로 유의미하게 증가하였으나, 티로신-식이군은 일반식이 스트레스군에 비해 통계적으로 유의미하게 N-Tyr의 함량이 감소하였다(도 5).

[0057] **실시예 3. 티로신-식이(TD)한 만성 부동자세 스트레스(CIS) 유도군(STR)의, PFC에서 글루탐산염, 글루타민, 티로신 및 GABA 함량 확인**

[0058] PFC에서 아미노산(글루탐산염, 글루타민, 티로신) 및 GABA의 함량을 액체 크로마토그래피 질량분석법(LC-MS/MS)으로 정량하였다.

[0059] 우선 PFC 조직을 파쇄하여 조직의 상층액을 취해 내부 표준물질(L-Glu-d5)와 이동상으로 희석하였다. 희석한 시료를 5개로 분주하여 LC-MS/MS 시스템(Agilent 6460)에 주입하였다. 칼럼은 SeQuant ZIC[®]-HILIC 칼럼($2.1\times 100\text{mm}$, $3.5\mu\text{m}$, $100\text{\AA}$)을 사용하였고, 이동상은 0.1% 포름산을 포함하는 아세토니트릴(acetonitrile)을 사용하여 농도구배를 주어 분리하였다.

[0060] 아미노산 검출은 복수 반응 감시 검출법을 이용하였다(Glu의 m/z 148→84, Gln의 m/z 147→84, GABA의 m/z 104→87 및 내부 표준물질의 m/z 153→88).

[0061] 그 결과, 도 6에 개시한 바와 같이, PFC에서 스트레스군의 일반식이군은 정상군에 대비 글루탐산염, 글루타민, 티로신 및 가바의 함량이 감소하였고, 이에 대비 티로신 식이군은 정상군 수준 이상으로 글루탐산염, 글루타민, 티로신 및 가바의 함량이 증가한 것을 확인하였다.

[0062] **실시예 4. 티로신-식이(TD)한 만성 부동자세 스트레스(CIS) 유도군(STR)의 PFC에서 암모니아 함량 변화**

[0063] 조직이 녹지 않도록 -20°C 이하에서, PFC 조직 무게 측정한 후, 1.5ml 튜브에 조직 무게 10mg당 $100\mu\text{l}$ 의 RIPA(proteinase inhibitor cocktail, PIC 포함)와 적당한 갯수의 유리 비드를 넣고 볼렛 블렌더(bullet blender)를 이용하여 30초 동안 2번 조직을 파쇄하였다. 조직 파쇄물을 스핀다운(spin down)하여 새로운 1.5ml 튜브에 옮겨 1분 동안 초음파를 이용하여 조직 분쇄하였다. 12,000rpm에서 15분 동안 원심 분리 후, 상층액을 새로운 1.5ml 튜브로 옮기고, 시험에 사용하기 전까지 -80°C 에서 보관하였다. 상기 과정에서 PFC 조직 무게 측정을 제외한 모든 과정은 4°C 에서 실시하였다. 암모니아 어세이 키트(Ammonia assay kit: Sigma-Aldrich, Cat Num. AA0100)에서 제공되는 암모니아 표준용액($10\mu\text{g}/\text{ml}=588\mu\text{M}$ 제공)을 물로 희석하여 0(blank control), 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, $1.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 제조하였고, PFC 조직 파쇄물은 PBS 완충용액으로 2배 희석하였다.

[0064] 상기 암모니아 어세이 키트에서 제공하는 암모니아 어세이 시약 $100\mu\text{l}$ 에 PBS 완충용액으로 2배 희석한 시료 $10\mu\text{l}$ (조직 $5\mu\text{g}$ 에 상응)를 넣고 상온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 동시에 암모니아 어세이 시약 $100\mu\text{l}$ 에 대하여, 표준용액 $10\mu\text{l}$ 를 넣고, 상온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. PFC 조직 파쇄물 완충용액(RIPA+PIC)에 의한 간섭 영향을 보정하기 위해 PBS 완충용액으로 2배 희석한 RIPA+PIC를 완충용액 블랭크 대조군으로 사용하였다. 5분 후에, 마이크로 리더기를 이용하여 340nm에서 흡광도를 측정하였다 (A_{initial}).

[0065] L-글루탐산 탈수소효소(glutamate dehydrogenase) 용액 $10\mu\text{l}$ 를 넣고, 상온에서 5분 동안 인큐베이션 후에 340nm에서 흡광도를 측정하였다(A_{final}).

- [0066] DA340nm($A_{\text{final}}-A_{\text{initial}}$)를 구하고 표준의 경우, 블랭크 대조군의 DA340nm를, 시료의 경우에는 완충용액 블랭크 대조군의 DA340nm를 빼서 제외하였다.
- [0067] 표준의 결과값을 이용하여 선형회귀(linear regression)을 구하고, 이를 이용하여 샘플의 암모니아 농도를 계산하였다.
- [0068] 그 결과 도 7에 스트레스군의 일반식이란 경우, 정상군에 비해 암모니아 함량이 증가하였으며, 이에 대비하여 본 발명의 티로신-식이한 군은 정상군과 유사한 수준으로 암모니아 함량이 감소한 것을 확인하였다.
- [0069] **실시예 5. *in vitro* 니트로화(nitration) 억제 효과 분석**
- [0070] 마우스 PFC 단백질에 ONOO⁻를 처리하여 단백질의 니트로화를 유도하고, 티로신에 의한 니트로화 억제 효과를 확인하였다. 그 결과 도 8에 개시한 바와 같이 티로신의 농도 의존적으로 단백질들의 니트로화가 억제되는 것을 확인하였으며, 니트로화 억제 효과는 L-티로신 및 D-티로신 둘다 유사한 수준으로 나타났다.
- [0071] 또한, 본 발명에 따른 티로신의 니트로화 억제 효과를 마우스의 뇌와 간 조직 파쇄물(lysate)을 이용하여 분석하였다. CO₂ 가스로 마취된 마우스로부터 전전두엽(prefrontal cortex, PFC) 및 간(liver) 조직을 각각 채취하여 무게를 잰 후, 조직 파쇄기를 이용하여 조직을 파쇄하고, 4℃에서 12,000rpm으로 20분 동안 원심분리한 후 상등액을 취하여 PFC 및 간 조직 파쇄물(lysate)을 얻었다. 상기 조직 파쇄물에 단백질의 니트로화를 유도하는 퍼옥시니트리트(peroxynitrite, PN)를 첨가하고, 글루타민(Q), L-티로신(L-Tyr) 및 D-티로신(D-Tyr)을 2mM의 농도로 각각 첨가한 후 5초 동안 볼텍스(vortex)하여 혼합하고 얼음에서 10분 동안 반응시켰다. 이후, 항-니트로티로신 항체(1:1,000), 항-글루타민 합성효소 항체(1:5,000), 항-인슐린 수용체 베타 항체(1:1,000) 또는 항-인산화 인슐린 수용체 베타 항체(1:1,000)를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다.
- [0072] 그 결과, PN에 의해 PFC 및 간 조직 내 티로신 니트로화가 증가된 단백질들이 증가한 것을 확인하였고, 글루타민 합성효소(GS)와 인슐린 수용체 베타 서브유닛(IRb) 이외의 여러 단백질의 니트로화가 증가된 것을 여러 밴드의 웨스턴 블랏 결과로 확인하였다. PN에 의해 티로신 니트로화가 증가된 단백질들은 티로신(Y)이 말단에 위치한 펩타이드 처리에 의해 니트로화가 감소한 것을 확인하였다(도 9A, 9B). PFC와 간 조직에서 각 처리군의 단백질 양의 차이가 없음을 GS와 IRb의 발현으로 확인하였다. 하지만, IRb는 PN에 니트로화가 되어 인산화된 형태가 감소된 것을 인산화-IRb(IRb-p)의 웨스턴 블랏으로 확인하였다(도 9C, 9D).
- [0073] **실시예 6. 고지방식이 제2형 당뇨병 모델 마우스에서 L-티로신의 인슐린 민감도 증진 효과 확인**
- [0074] **(1) 고지방식이 제2형 당뇨병 모델 확립**
- [0075] 3주령 C57BL/6 마우스 수컷 27마리를 1주일 동안 사육환경에 적응시킨 후, 3 그룹으로 나누어 각각 정상식이(ND, normal diet; 10kcal% fat, 열량 3.85 kcal/g), 고지방식이(HFD, high fat diet; 60 kcal% fat, 열량 5.24 kcal/g), L-티로신(L-Tyr) 첨가 고지방식이(HFD+L-Tyr; 181mg의 L-티로신/kg 포함)를 제공하였으며, 물과 사료는 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 3개월 동안 2일마다 체중과 먹이섭취량을 측정하였고, 1주마다 혈당을 측정하였다.
- [0076] 그 결과 도 10에 개시한 바와 같이, 체중은 점진적으로 증가하였고, 동일자 기준으로, HFD 및 HFD+L-Tyr 그룹의 체중이 ND 보다 더 나가는 것으로 확인하였고, HFD 및 HFD+L-Tyr 그룹의 체중변화는 유사한 수준으로 나타났다. 사료 섭취량에는 그룹간 차이가 거의 없고, 기간에 따른 차이도 발생하지 않았으며, 혈당은 정상식이군(ND)에 비해 HFD 군의 혈당이 통계적으로 유의미하게 증가하였으며, HFD군 대비 HFD+L-Tyr 군의 혈당이 통계적으로 유의미하게 감소하였다.
- [0077] **(2) 포도당 내당능 검사**
- [0078] 1× PBS에 D-글루코스를 용해시켜 40% D-글루코스 용액을 준비하였다. 16시간 금식한 마우스의 혈당을 측정 후, 체중 1kg 당 2g의 글루코스를 복강 주사하기 위하여, 식(1)에 따라 글루코스 용액을 복강주사하였다.
- [0079] 식(1)
- [0080] $\text{글루코스 주사량}(\mu\text{l}) = \text{체중}(\text{g}) \times 5$
- [0081] 일례로, 체중 45g인 마우스에는 40% 글루코스 용액 225 μl 를 주사하였다. 글루코스 용액을 복강주사한 후, 30, 60, 90 및 120분 시점에 혈당을 측정하였다.

- [0082] 그 결과, 도 11에 개시한 바와 같이 정상식이군(ND)에 대비하여 고지방식이군(HFD)의 혈액 내 글루코스 함량이 통계적으로 유의미하게 증가하였고, 이에 대비하여 본 발명의 L-티로신 (L-Tyr) 첨가 고지방식이군(HFD+L-Tyr)은 혈액 내 글루코스 함량이 감소하였다.
- [0083] **(3) 인슐린 저항성 시험**
- [0084] 인슐린을 생리식염수에 희석하여 0.15 U/ml 용액을 준비하였다. 6시간 금식한 마우스의 혈당을 측정 한 후, 인슐린을 복강주사하였다(0.75 U/체중(kg)). 인슐린을 복강주사한 후, 15, 30, 60 및 90분 시점에 혈당을 측정하였다.
- [0085] 식(2)
- [0086] 인슐린 주사량(μ l)=체중(g) $\times$ 5
- [0087] 그 결과, 도 12에 개시한 바와 같이 정상식이군(ND)에 대비하여 고지방식이군(HFD)의 혈액 내 글루코스 함량이 통계적으로 유의미하게 증가하였고, 이에 대비하여 본 발명의 L-티로신 (L-Tyr) 첨가 고지방식이군(HFD+L-Tyr)은 혈액 내 글루코스 함량이 감소하였다.
- [0088] **(4) 조직내 지방 축적 변화 및 혈장 내 ROS/RNS 함량 변화 확인**
- [0089] 아베르틴(Avertin)으로 마우스를 마취하고, 심장을 통해 혈액을 채취하여 진공 채혈기(vacutainer)의 EDTA와 반응시킨 후 1,500 $\times$ g, 4℃에서 15분 동안 원심분리하여 혈장을 분리하였다. PBS와 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde; PFA)를 심장을 통해 관류하여 조직을 고정하고 각 조직을 적출하여 PFA에 보관하였다.
- [0090] 혈장 내 활성산소/질소(ROS/RNS) 농도는 혈장을 PBS에 3배 희석한 후, Oxiselect ROS/RNS 어세이 키트(Cell Biolabs)를 사용하여 권장 실험방법대로 측정하였다.
- [0091] 그 결과, HFD 동물 모델에서 티로신이 전반적인 간의 지방축적을 감소시켰고, 신장 주변 지방조직의 양은 통계적인 차이가 나는 수준으로 감소시킨 것을 확인하였고, 정상식이군(ND)에 대비하여 고지방식이군(HFD)의 혈장 내 ROS/RNS 레벨이 통계적으로 유의미하게 증가하였고, 이에 대비하여 본 발명의 L-티로신(L-Tyr) 첨가 고지방식이군(HFD+L-Tyr)은 혈장 내 ROS/RNS 레벨이 통계적으로 유의미하게 감소하였다(도 13).
- [0092]
- [0093] **실시예 7. 카이닌산(Kainic acid)으로 발작을 유발시킨 간질발작 모델 마우스에서 L-티로신의 흥분독성과 산화 스트레스 억제 효과 확인**
- [0094] 카이닌산(KA)으로 발작을 유발시킨 간질 발작 동물 모델을 이용하여 티로신의 글루타메이트의 흥분독성 억제 효과를 확인하였다. 마우스를 7일 동안 티로신의 양을 다르게 섭취시킨 동물에게 동일 양의 카이닌산을 복강주사하여 발작 정도를 확인하였다.
- [0095] (1) 간질 발작
- [0096] 4주령 ICR 수컷 마우스에 1주 동안 정상식이 또는 L-티로신 함유 식이를 제공하였으며, 물과 사료는 자유롭게 섭취할 수 있게 하였다.
- [0097] 정상식이(ND): AIN-93G
- [0098] 1 $\times$ L-Tyr: 181mg/kg의 L-Tyr을 포함한 AIN-93G
- [0099] 3 $\times$ L-Tyr: 543mg/kg의 L-Tyr을 포함한 AIN-93G
- [0100] 5 $\times$ L-Tyr: 905mg/kg의 L-Tyr을 포함한 AIN-93G
- [0101] 카이닌산(Kainic acid: KA, Abcam)를 중탕으로 가열하면서 생리식염수에 용해하여 9mg/ml 카이닌산 용액을 준비하였으며, 카이닌산 용액을 복강주사하고(30mg/kg), 2시간 동안 발작 레벨과 증상을 기록하였다. 발작 레벨 판단은 하기 표 2의 기준에 따라 적용하였으며, 카이닌산 주사 전과 24시간 후의 체중을 측정하여 비교하였다.
- [0102] 또한, 카이닌산을 주사하고 24시간 후 생존한 마우스의 뇌 생조직을 적출하거나 PFA 관류로 조직고정 후 뇌를 적출하였다.

[0103] 발작 레벨에 따른 대표 증상

레벨	대표 증상
I	코너에 쭈그러 앉거나 고정자세, 응시
II	몸을 뻗고, 꼬리 곧고 뻗뻗, 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	레벨 V 지속적으로 발작
VI	몸의 간헐적인 경련, 발을 이용해 균형 유지가 길지 않음, 대개 사망함

[0104] 그 결과, 발작정도가 티로신 함량에 따라 차등적으로 경감 되는 것을 확인하였으며, 실험군 간의 체중변화는 없는 것으로 나타났다(도 14).

[0105] 또한, 티로신을 섭취하지 않은 동물의 경우, 카이닌산에 의한 강한 발작 현상으로 120분을 넘기지 못하고 죽는 개체가 발생하였으나, 티로신의 섭취량에 따라 마우스가 죽는 현상도 개선되는 것을 확인하였으며, 900mg/kg(식이무게)의 티로신이 포함된 사료를 섭취한 마우스의 경우 모두 생존하였다.

[0106] (2) ROS/RNS 측정

[0107] 뇌조직 중 해마를 조직 질량 10mg 당 RIPA buffer 100 μ l (proteinase/phosphatase inhibitor 포함)를 넣고 유리 비드 및 Bullet Blender를 이용하여 1분 동안 분쇄하였다. 12,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 원심분리 상층액을 분리하고 PBS에 10배 희석하여 ROS/RNS 측정에 사용하였다. ROS/RNS 농도는 OxiSelect ROS/RNS 어세이 키트(Cell Biolabs)를 사용하여 권장 실험방법대로 측정하였다.

[0108] 카이닌산을 주사하여 생존한 마우스의 해마 조직의 ROS/RNS 양적변화와 GS 활성도를 분석한 결과, ROS/RNS의 양이 카이닌산에 의해 증가되었지만 티로신을 섭취시킨 마우스에서는 대조군 수준으로 감소되었다(도 15).

[0109] (3) 글루타민 합성효소(GS) 활성 측정

[0110] 96웰 플레이트에 해마 용해물 2 μ l를 넣고, 50mM 이미다졸-HCl 완충용액(pH 6.8)를 추가로 넣어 50 μ l를 맞추었다. GS 활성 어세이 완충용액(50mM imidazole-HCl, pH6.8, 25mM의 L-글루타민, 12.5mM의 히드록실아민, 12.5mM의 비산나트륨(sodium arsenate), 1mM의 MnCl₂ 및 0.08mM의 ADP) 50 μ l를 넣고, 37 $^{\circ}$ C에서 30~60분 동안 반응시켰다.

[0111] 반응 종료 후, 빈 웰에 표준물질인 γ -글루타미히드록삼메이트(γ -glutamylhydroxamate)를 0.391~25.0mM의 농도가 되도록 첨가하였다. 시료와 표준물질에 100 μ l의 반응정지 용액(90mM의 FeCl₃, 1.8N의 HCl 및 1.45%(w/v) 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid)을 첨가하고, 560nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0112] 표준곡선과의 비교를 통해 각 샘플의 GS 활성을 구하였다. GS 활성은 최종 생성물인 γ -글루타미히드록삼메이트의 생성량으로 표현하고, 단위는 μ M/min/ μ g protein이다.

[0113] 그 결과 도 15에 개시한 바와 같이 GS 활성이 카이닌산에 의해 감소되었지만 티로신을 섭취시킨 마우스에서는 대조군 수준 이상으로 증가하였다.

[0114] (4) 조직면역염색(Immunohistochemistry, IHC)

[0115] PBS와 PFA를 심장을 통해 관류하고 뇌를 적출하여 PFA에 15시간 이상 후고정하였다. PBS로 10분 동안 3회 세척하고, 진동 마이크로톰(vibratome)으로 40 μ m 두께로 뇌조직 절편을 획득하였다.

[0116] 3% 소 혈청 알부민(bovine serum albumin)을 용해시킨 IHC 완충용액(0.3% Triton X-100을 포함하는 PBS)에 상기 획득한 뇌 절편을 실온에서 1시간 동안 블로킹한 후, 4 $^{\circ}$ C에서 1차 항체(anti-NeuN (Millipore, MAB377, 1:500), anti-Iba1 (Wako, 019-19741, 1:200))와 15시간 이상 반응시켰다(3% BSA를 포함하는 IHC 완충용액). IHC 완충용액으로 10분씩 3회 세척하고, 형광표지된 2차 항체(anti-Mouse IgG Alexa Fluor 488(Invitrogen, 1:1000), anti-Rabbit IgG AlexaFluor594 (Invitrogen, 1:000))와 실온에서 2시간 반응시켰다(3% BSA를 포함하는 IHC 완충용액). IHC 완충용액으로 10분씩 3회 세척하고, 실라인(silane) 코팅된 유리 슬라이드에 절편을 고정하였다. DAPI가 포함된 anti-fade 용액을 절편에 얹고 커버 유리를 덮어 말렸다. 형광현미경으로 촬영한 이미지의 신호밀도를 이미지 J 분석 프로그램을 이용하여 분석하였다.

[0117] 카이닌산에 의해 유발된 발작 모델의 뇌조직을 검사한 결과, 카이닌산에 의해 해마 영역(CA1, CA3)의 신경세포

수가 감소되었으며, 동일한 부위의 미세아교세포(microglia) 활성도가 증가되었으나, 티로신을 섭취한 경우, 신경세포의 수가 유지되고, 염증반응에 의해 미세아교세포의 활성이 감소한 것을 확인하였다(도 16).

실시예 8. 만성 신체구금 스트레스 모델 마우스에서 D-티로신의 인지장애 예방 효과 확인

(1) 만성 신체 구금 스트레스 모델 준비

C57BL/6 수컷 마우스(7주령) 28마리를 두 그룹으로 나누어 정상식이(AIN-93G) 또는 D-티로신(D-Tyr) 포함 식이(181mg D-Tyr/kg AIN-93G)를 1주일 동안 제공하였다. 물과 사료는 자유롭게 섭취할 수 있게 하였으며, 1주에 두 번 체중과 먹이섭취량을 측정하였다.

8주령부터 2주 동안 하루 2시간씩 200lux 조명 조건에서 만성 신체 구금 스트레스(chronic immobilization stress, CIS)를 가하였다. 대조군(CTL), D-Tyr 섭취 대조군(CTL+D-Tyr), 만성스트레스군(STR), D-Tyr 섭취 만성스트레스군(STR+D-Tyr)으로 분류하고, 각 그룹 당 동물은 7마리로 구성하였다.

(2) 인지기능시험

2주 동안의 CIS 종료 후, 인지기능 시험을 실시하였다. 적응기간 포함, 전 시험 기간 동안 D-Tyr 함유 섭식을 제공한 그룹과 일반 사료 섭식군의 인지기능을 비교하기 위해, 장기 기억능력을 시험하는 사물 인지기능시험(object recognition test, ORT)과 사물 위치 인지기능시험(object location recognition test, OLT)을 수행하였다.

ORT: 적응(habituation), 친화(familiarization), 시험(test)의 세 단계로 구성하였다. 시험 상자에 하루 10분씩 이를 동안 적응시키고, 3일째 친화 단계에는 두 개의 동일한 사물을 10분 동안 탐색하도록 하였다. 마우스를 시험 상자에 넣을 때는 물체가 없는 벽 쪽을 바라보게 넣었다. 4일째 시험 단계에는 두 사물 중 하나를 새로운 사물로 교체하고 10분 동안 탐색하게 하되, 초반 5분 동안의 기록을 데이터로 사용하였다. 사물인지기능 지수(DI)는 하기 식(3)으로 산출하였다.

식 (3)

DI(Discrimination Index) = [신규 사물 탐색시간-친숙한 사물 탐색시간] / [신규 사물 탐색시간+친숙한 사물 탐색시간]

OLT: ORT 수행 24시간 후에 친숙한 사물의 위치를 변경하고 5분 동안 탐색하도록 하였다. 상기 사물인지기능 지수(DI)와 동일한 방법으로, 전체 사물 탐색 시간 중, 위치가 이동된 사물을 탐색하는 시간의 비율을 계산하여 사물 위치 인지기능 지수를 산출하였다.

만성스트레스 정도 인지장애 동물 모델을 이용하여 티로신의 인지기능 보호 효능을 확인하기 위해, 마우스에 티로신이 첨가된 사료를 제공하면서 만성스트레스(14일)를 가한 결과, 체중 및 사료섭취량은 티로신의 포함여부에 따른 차이가 나타나지 않았으며, ORT에서는 통계적으로 유의미한 차이를 확인할 수 없었고, OLT에서는 스트레스에 의해 저하된 인지기능이 티로신의 섭취에 의해 대조군 수준으로 유지해 주고 있다는 것을 확인하였다(도 17).

실시예 9. 엔도텔린-1(Endothelin-1)을 이용한 뇌졸중(stroke) 모델 마우스에서 L-티로신의 뇌경색(brain infarct)과 산화스트레스 저감 효과 확인

(1) 뇌졸중 모델 마우스 준비

8주령 C57BL/6 수컷 마우스에 1주일 이상 정상식이 또는 L-티로신 함유 식이를 제공하였고, 물과 사료는 자유롭게 섭취할 수 있게 하였다.

정상식이(ND): AIN-93G

L-Tyr: 905mg/kg L-Tyr을 포함한 AIN-93G

(2) 엔도텔린-1(Endothelin-1) 준비 및 정위 수술(stereotaxic surgery)

3차 증류수에 엔도텔린-1(Endothelin-1)을 넣고($2\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 강력하게 vortex 후, 4℃에서 약 10분 동안 초음파를 이용하여 완전하게 용해시켰다.

마취제 아버틴(averitin: 마우스 무게 25g당 0.5ml)을 복강 주사하여 마우스를 마취시킨 후에, 정위 수술을 통해 $2\mu\text{g}$ 의 엔도텔린-1(Endothelin-1)을 대뇌의 운동피질 영역(bregma를 중심으로 AP 1.5mm, ML -1.5mm, DV 1.8mm)

에 주입하였다. 1분당 $0.3\mu\text{l}$ 의 속도로 주입하였으며, 주입이 완료된 후 약 5분 동안 바늘을 그대로 두어 엔도텔린-1(Endothelin-1)이 충분히 조직에 흡수될 수 있도록 하였다. 피부를 봉합 후에 원래 케이지에서 회복시켰다.

[0137] (3) 조직염색

[0138] PBS와 PFA를 심장을 통해 관류하고 뇌를 적출하여 PFA에 15시간 이상 후고정하였다. PBS로 10분 동안 3회 워싱하고, vibratome으로 $40\mu\text{m}$ 두께로 뇌조직 절편을 잘라내고 엔도텔린-1(Endothelin-1)을 주입한 지점에서 4장씩의 절편을 silane 코팅된 유리 슬라이드에 고정하였다. 건조된 절편은 0.1% cresyl violet 용액에 5분 동안 담근 후에 3차 증류수에 2번 담궈 염색액을 씻어냈다. 100% 에탄올에 2~3초 담궈 탈수시킨 후에 자일렌에 5초 동안 2번 씻어냈다. Mount 용액을 도포 후에 커버글라스로 덮고 건조시켰다. 염색된 절편시료를 광학현미경으로 관찰하고, 저장된 이미지를 대상으로 이미지 J 프로그램을 이용하여 뇌경색 부위의 면적을 산출하였다.

[0139] (4) 글루타민 합성효소(GS) 활성 측정

[0140] 96웰 플레이트에 대뇌 운동피질 lysate $2\mu\text{l}$ 를 넣고, 50 mM imidazol-HCl buffer (pH 6.8)를 추가로 넣어 50 μl 를 맞추었다. GS 활성 assay buffer (50 mM imidazole-HCl, pH 6.8, 25 mM L-glutamine, 12.5 mM hydroxylamine, 12.5 mM sodium arsenate, 1 mM MnCl_2 and 0.08 mM ADP) 50 μl 를 넣고, 37° 에서 30~60분 동안 반응시켰다.

[0141] 반응 종료 후, 빈 웰에 표준물질인 γ -glutamylhydroxamate($0.391\sim 25.0\text{mM}$)를 넣었다. 시료와 표준물질에 100 μl 의 반응정지 용액(90mM FeCl_3 , 1.8N HCl 및 1.45% 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid))을 넣고 560nm 파장에서 흡광도를 측정하였고, 표준곡선과의 비교를 통해 각 시료의 GS 활성을 구하였다. GS 활성 최종 생산물인 γ -glutamylhydroxamate의 생성량으로 표현하고, 단위는 $\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$ protein이다.

[0142] 엔도텔린-1(Endothelin-1)을 마우스 뇌의 motor cortex 에 주입하여 혈관성 뇌졸중을 유도한 실험결과, endothelin을 투여한 실험군에서는 saline을 투여한 대조군에 비해 경색 부피(infarct volume)가 급증하였고, 티로신을 900mg/kg(사료무게)의 용량으로 섭취시킨 실험군에서 infarct volume이 감소한 것을 확인하였다. 또한 조직의 GS 활성도가 대조군에 비해 엔도텔린-1(Endothelin-1)에 의해 감소되었으나, tyr 식이에 의해 GS의 활성이 유지되는 것을 확인할 수 있다(도 18).

[0143] 실시예 10. 인간 재조합 MnSOD를 이용한 티로신의 denitration 효과 확인

[0144] 1) 퍼옥시니트리트(Peroxynitrite) 정량

[0145] 퍼옥시니트리트(Peroxynitrite)를 0.3M NaOH에 40배 희석하여 302nm에서 흡광도를 측정하고, 퍼옥시니트리트(Peroxynitrite)의 몰흡광계수($\epsilon_{302} = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)를 이용하여 정량하였다.

[0146] 2) SOD 활성 측정

[0147] SOD 활성 측정은 Thermofisher사의 SOD 비색반응 활성 키트를 이용하였다. 표준 SOD에 범위 내의 인간 재조합 MnSOD, 펩타이드와 퍼옥시니트리트를 혼합하고 얼음에서 10분 동안 반응시켰다. 표준 SOD 또는 반응시킨 혼합물 10 μl 와 키트에서 제공하는 기질 용액 50 μl 를 96웰 플레이트에 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 키트에서 제공하는 잔틴산화효소 25 μl 를 넣고 상온에서 20분 동안 반응시킨 후, 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 2차 측정 흡광도에서 1차 측정 흡광도를 뺀 데이터를 이용하여 SOD 활성을 측정하였다.

[0148] 그 결과, SOD는 생체 내의 활성 질소종에 의해 SOD 활성이 저하되었다. MnSOD의 활성도는 peroxynitrite의 의해 감소되나, 첨가한 Tyr (L-, D-form)에 SOD 활성이 유지되는 것을 확인하였다(도 19).

[0149] 실시예 11. 급성 신부전에 대한 Tyr의 효과 확인

[0150] (1) 동물실험

[0151] 23~25g의 웅성 C57BL/6 마우스(코아텍)를 온도와 습도가 일정하게 유지되는 무균 사육실에서 자유롭게 물과 사료를 섭취하도록 하고, 1) 대조군(Sham), 2) 조제용매 처치 신장 허혈 및 재관류 유발군(CMC+IR), 3) L-tyrosine처치 신장 허혈 및 재관류 유발군(L-Tyr+IR) 등 3개 실험군으로 나누었다.

[0152] L-티로신(100mg/kg)은 0.5% CMC(carboxymethyl cellulose)에 현탁하였다. L-티로신 또는 조제용매 CMC를 4일 동안 하루 1회 경구로 투여하였으며, 4일째 경구투여 30분 후 신장 허혈을 유발하였다. 신장 허혈은 복부를 절개하고 Muller atraumatic vascular clamp를 이용하여 양측 신혈관경(renal pedicle)을 결자하여

유발하였으며, 25분 허혈 후 clamp를 제거하여 재관류하였다. 대조군(Sham)은 겹자를 통한 허혈 유발을 제외한 모든 수술과정을 동일하게 시행하였다. 재관류 후 24시간에 실험동물을 희생시켜 심장에서 혈액을 채취하고 조직을 적출하였다.

[0153] (2) 혈장 크레아티닌

[0154] 채취한 혈액을 3,000rpm에서 15분 동안 원심분리하여 혈장을 분리하고 Jaffe법을 이용하여 혈중 크레아티닌을 측정하였다. Jaffe법은 510nm 파장에서 혈장 시료를 피크르산과 반응하여 측정한 흡광도와 60% 아세트산으로 반응을 종료시킨 후 측정한 흡광도의 차이로 크레아티닌 양을 계산하여 mg/dl 단위로 나타내었다.

[0155] (3)정량적 실시간 중합효소반응

[0156] Trizol 방법으로 신장 조직에서 total RNA를 추출하였고 Revert Aid 역전사 시스템(Thermofisher)을 사용하여 cDNA를 합성하였다. iQ SYBR Green Super mix(Bio-Rad)를 사용하여 CFX Connect Real-Time PCR 시스템(Bio-Rad)에서 정량적 PCR을 수행하였다. 하우스키핑 유전자로 GAPDH를 사용하였다. 실험에 사용한 프라이머는 표 3에 개시하였다.

표 3

유전자	방향	프라이머 서열(5' →3')	서열번호
IL-1β	Forward	TCGCAGCAGCACATCAACAAGAG	1
	Reverse	GGTGTCTCATGTCTCATCCTGGA	2
IL-6	Forward	CCAATTCTCTTGAAATCAC	3
	Reverse	GGAATGTCCACAACTGATA	4
NQO-1	Forward	ATGACATCACAGGTGAGCTGAAGG	5
	Reverse	CTCAAACAGCCTTTCAGAATGGC	6
GAPDH	Forward	GTGGCAAAGTGGAGATTGTTG	7
	Reverse	TTGACTGTGCCGTGAATTTG	8

[0158] (4) 웨스턴 블랏

[0159] 신장 조직을 RIPA 완충용액에서 균질화하고 16,000×g, 4℃에서 15분 동안 원심분리한 후 상층액을 수집하여 BCA법으로 단백질을 정량하였다. SDS-PAGE로 전기영동한 후 PVDF 멤브레인에 이동시키고, 5% 탈지분유로 블로킹하였다. 이후 니트로-티로신 및 β-actin 1차 항체 및 상응하는 2차 항체를 반응시킨 후 ECL법으로 ChemiDoc XRS⁺ 시스템(Bio-Rad)에서 분석하였다.

[0160] ROS(Reactive oxygen species) 또는 RNS(reactive nitrogen species)에 의한 산화적 스트레스는 신장 허혈 및 재관류 손상에 의한 급성 신부전의 주요 기전이며, 항산화 인자의 증가는 신장 허혈 및 재관류 손상을 억제하는데 중요하다. 신장 허혈 및 재관류 24시간 후 신장 조직에서 항산화 작용인자인 NQO-1의 유전자 발현을 측정하고 결과 L-티로신 투여는 NQO-1의 유전자 발현을 조제용매 투여군에 비해 통계적으로 유의하게 증가시켰다(#, p<0.01). 미토콘드리아에서 ROS/RNS의 함량도 IR에 의해 약 6배 이상 증가하였으나, Tyr에 의해 억제되어 있다는 것을 확인하였다. MnSOD와 Cu/Zn SOD의 활성도가 IR에 의해 감소되었지만, Tyr에 의해 회복되는 것을 확인하였다. 신장 허혈 및 재관류 24시간 후 신장조직에서 nitrotyrosine 단백질이 sham군에 비해 증가하였으며, 이러한 증가는 L-tyrosine 투여에 의해 현저하게 감소하였다(도 20).

[0161] 또한, 도 21에 개시한 바와 같이 신장손상 평가지표로서 혈장 크레아티닌을 측정한 결과, 혈장 크레아티닌은 신장 허혈 및 재관류 24시간 후 sham군에 비해 약 5.9배 증가하였으며, 이러한 증가는 L-tyrosine 투여에 의해 통계적으로 유의하게 억제되었고, 신장 허혈 및 재관류 손상에 따른 급성신부전의 주요 발병기전으로 염증반응을 확인하기 위해 신장 조직에서 염증성 사이토카인(IL-1b 및 IL-6)의 유전자 발현을 측정 결과에서는 신장 허혈 및 재관류 24시간 후 IL-1b 및 IL-6 유전자 발현이 sham군에 비해 증가하였으며, 이러한 증가는 L-tyrosine 투여에 의해 통계적으로 유의하게 억제되었다.

[0162] 실시예 12. Azoxymethan을 이용한 간성뇌증(고암모니아혈증)에 대한 Tyr의 효능 실험

[0163] (1) 동물실험

[0164] 웅성 13주 C57BL/6 마우스(코아텍)를 온도와 습도가 일정하게 유지되는 무균 사육실에서 자유롭게 물과 사료를 섭취하도록 하고, (1) 대조군(Control), (2)Carboxymethyl cellulose+azoxymethane 처치군(CMC+AOM), (3) L-티

로신+AOM 처치군(L-Tyr+AOM) 등 3개 실험군으로 나누었다. L-티로신(100mg/kg)은 0.5% CMC(carboxymethyl cellulose)에 현탁하였다. L-티로신 또는 조제용매 CMC를 4일 동안 하루 1회 경구로 투여하였으며, 4일째 경구 투여 2시간 후 AOM(100mg/kg, 100mL)를 복강으로 주사하였다. AOM 투여 후 12시간 뒤 탈수를 예방하기 위하여 0.5% 글루코스를 포함하는 생리식염수 200mL를 복강주사하고 4시간 후 실험동물을 희생시켜 심장에서 혈액을 채취하고 간 조직을 적출하였다.

(2) 혈중 암모니아 분석

혈액 내 암모니아 양은 단일과장 반사측정법 분석용 측정기인 PocketChem BA PA-4140(Arkray, Japan)를 사용하여 측정하였다. 검사지에 혈액을 20 μ L 올려 실온에서 3분 동안 반응시키고 측정기에 삽입하여 635nm(LED) 과장에서 흡광도를 측정하여 결과를 μ g/dL 단위로 나타내었다.

(3) 혈장 ALT 분석

간세포 손상의 혈액지표인 ALT(alanine aminotransferase)은 채취한 혈액을 3,000rpm에서 15분 동안 원심분리하여 혈장을 분리하고 ChemiLab GPT 어세이 키트(IVD-LAB, Korea)를 사용하여 측정하였다. Kit의 표준측정법에 따라 분광광도계의 340nm 파장에서 흡광도를 측정하여 결과를 U/L 단위로 나타내었다.

(4) Western blot

간 조직을 RIPA 완충용액에서 균질화하고 16,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 원심분리한 후 상층액을 수집하여 BCA 법으로 단백질 양을 정량하였다. SDS-PAGE로 전기영동한 후 PVDF 멤브레인에 이동시키고, 5% 탈지분유로 블로킹하였다. 이후 니트로-티로신 및 β -actin 1차 항체 및 상응하는 2차 항체를 반응시킨 후 ECL법으로 ChemiDoc XRS⁺ 시스템(Bio-Rad)에서 분석하였다.

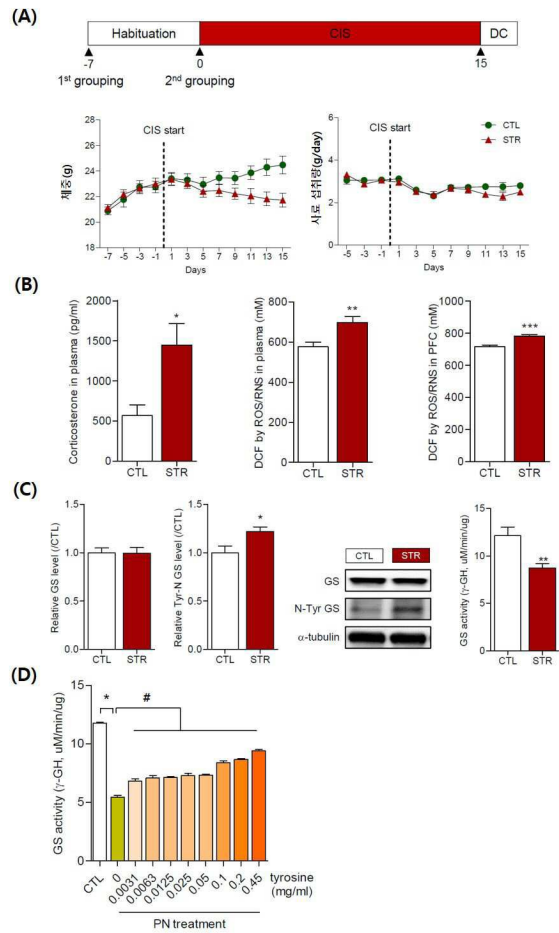
암모니아는 아미노산과 핵산의 주 대사물이며, 암모니아를 요소로 전환시키는 요소회로의 주요 효소들이 간세포에만 존재하고, 암모니아를 농도를 낮춰주는 GS와 SOD, 활성산소를 제거하는 catalase등도 간 조직에 풍부하게 존재하기 때문에 간을 지나 뇌로 올라가는 혈관의 혈중 암모니아 농도 변화는 간성뇌증에 중요한 지표가 된다. AOM에 의한 급성 간성뇌증 모델에서 혈중 암모니아를 측정한 결과 CMC+AOM 처치군은 정상대조군에 비해 혈중 암모니아 농도가 6.7배 증가하였으며, L-tyrosine 투여는 AOM에 의한 혈중 암모니아 증가를 통계적으로 유의하게 억제하였다. 간 실질세포의 손상은 세포질에 존재하는 ALT의 혈중 유리를 유발하여 그 농도가 증가하므로 이 효소의 활성을 측정하는 것은 간 손상의 정도를 알 수 있는 직접적인 지표이다. AOM에 의한 급성 간성뇌증 모델에서 혈장 내 ALT를 측정한 결과 CMC+AOM 처치군은 혈장 ALT가 대조군에 비해 약 65배 증가하였으며, L-tyrosine 투여는 AOM에 의한 혈장 ALT 증가를 통계적으로 유의하게 억제하였다. AOM 투여 16시간 후 간 조직에서 nitrotyrosine 단백질이 대조군에 비해 증가하였으며, 이러한 증가는 L-tyrosine 투여에 의해 현저하게 감소하였으며, 이 결과는 Tyr이 간에 존재하는 단백질들의 nitration을 억제하여 간으로 유입된 암모니아를 제거할 수 있도록 해준다는 증거가 되었다(도 22).

[통계 처리]

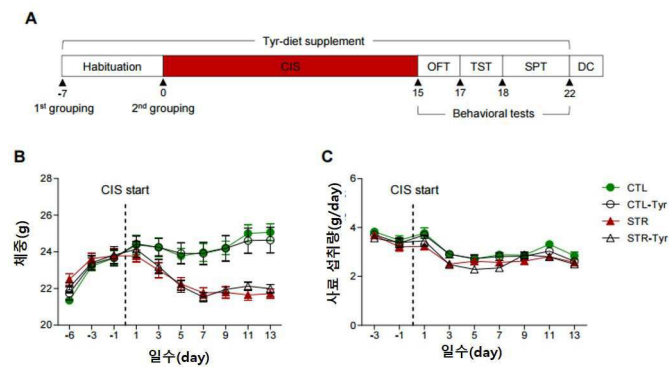
본 발명의 모든 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 나타냈으며, Dunnetts Multiple Comparison Test를 이용한 일원 분석(ANOVA) 또는 GraphPad 프리즘 5(GraphPad Software)를 이용한 스튜던트 t 검정(p<0.05)으로 통계 분석되었다.

도면

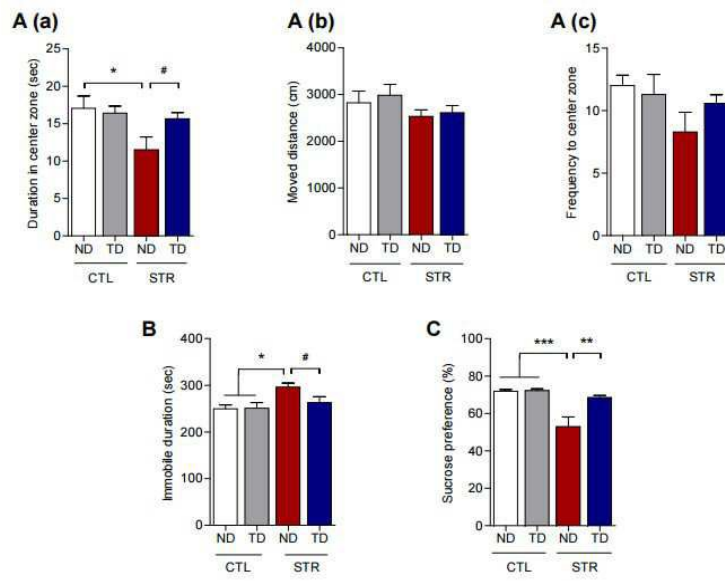
도면1



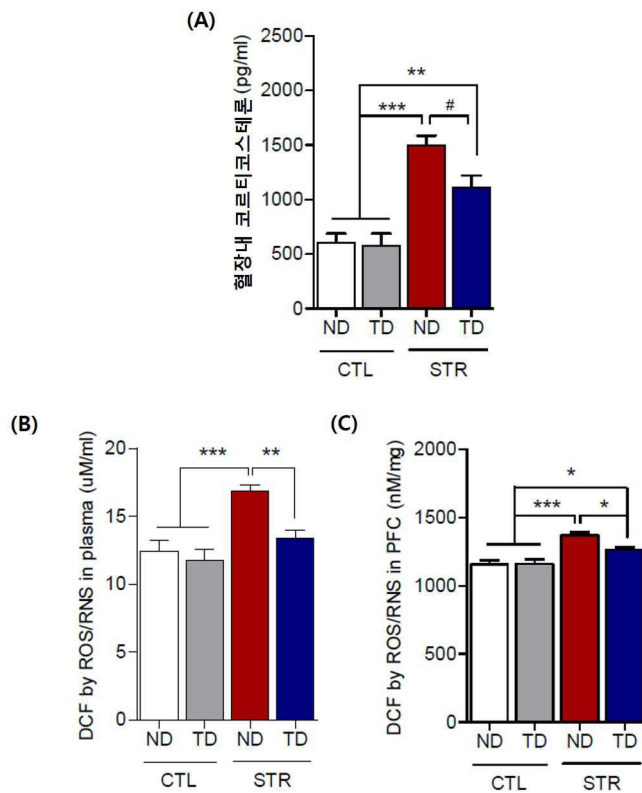
도면2



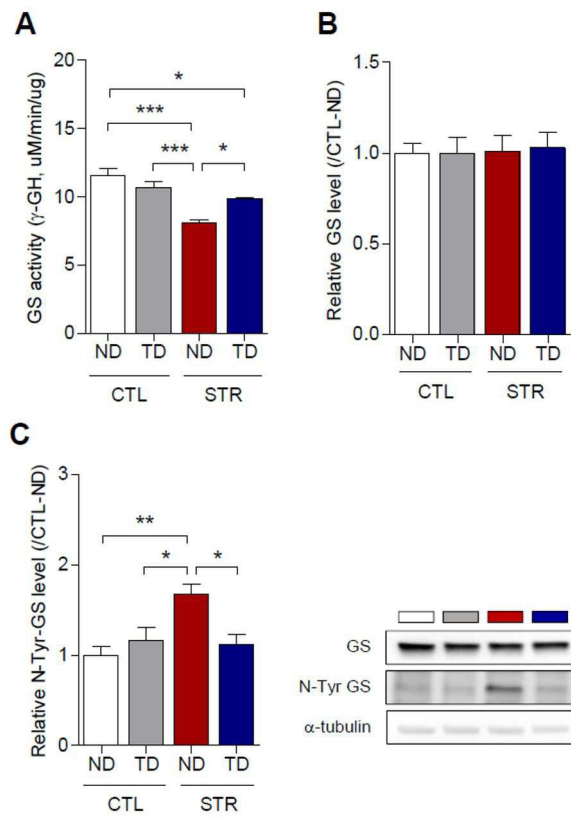
도면3



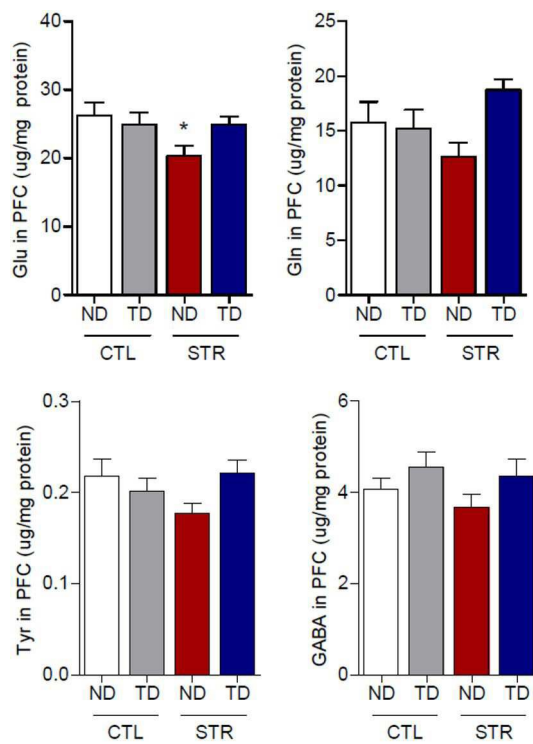
도면4



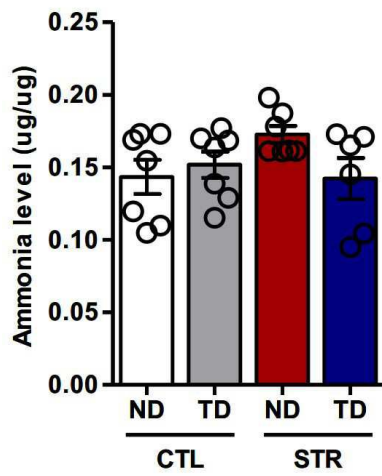
도면5



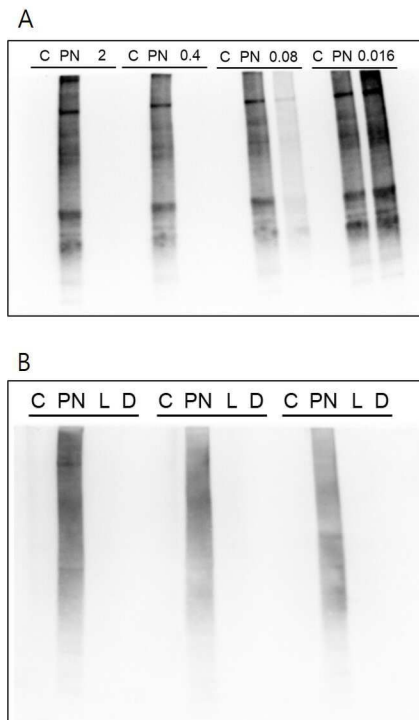
도면6



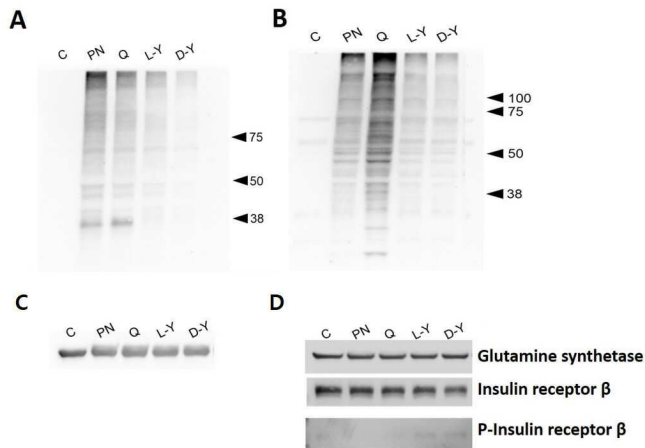
도면7



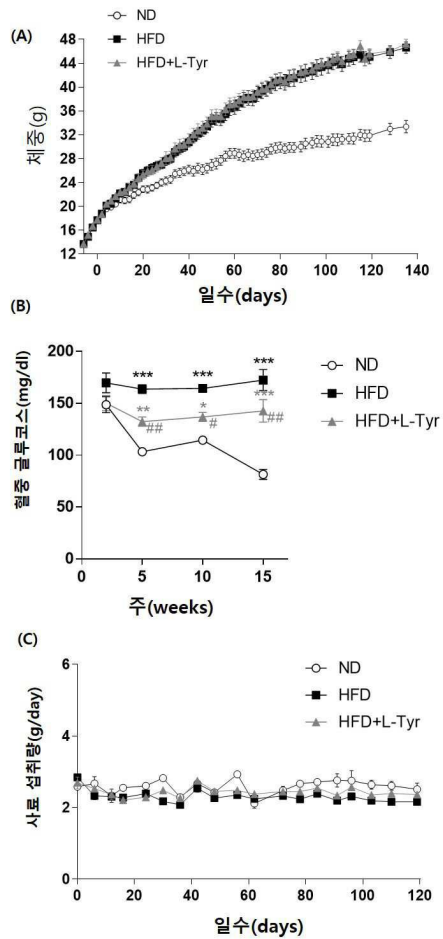
도면8



도면9

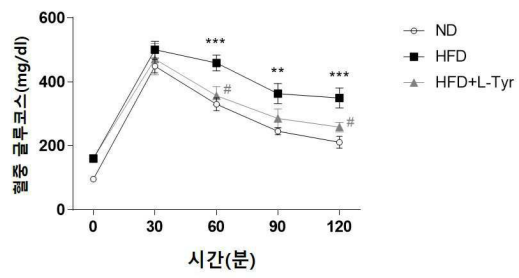


도면10

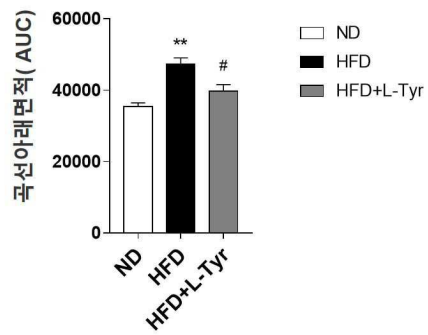


도면11

(A)

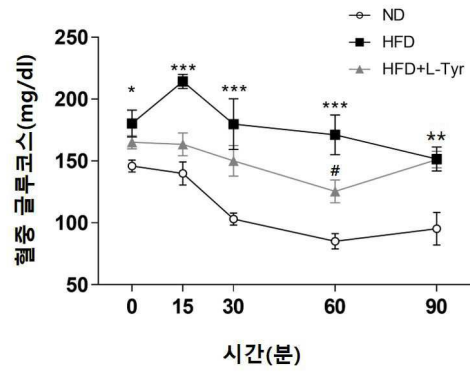


(B)

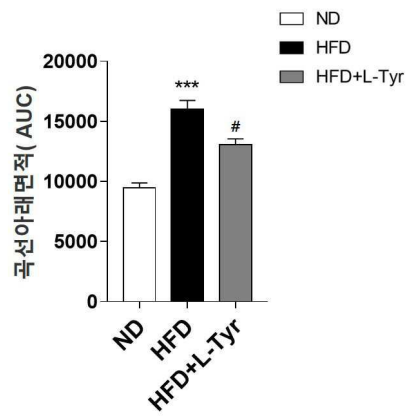


도면12

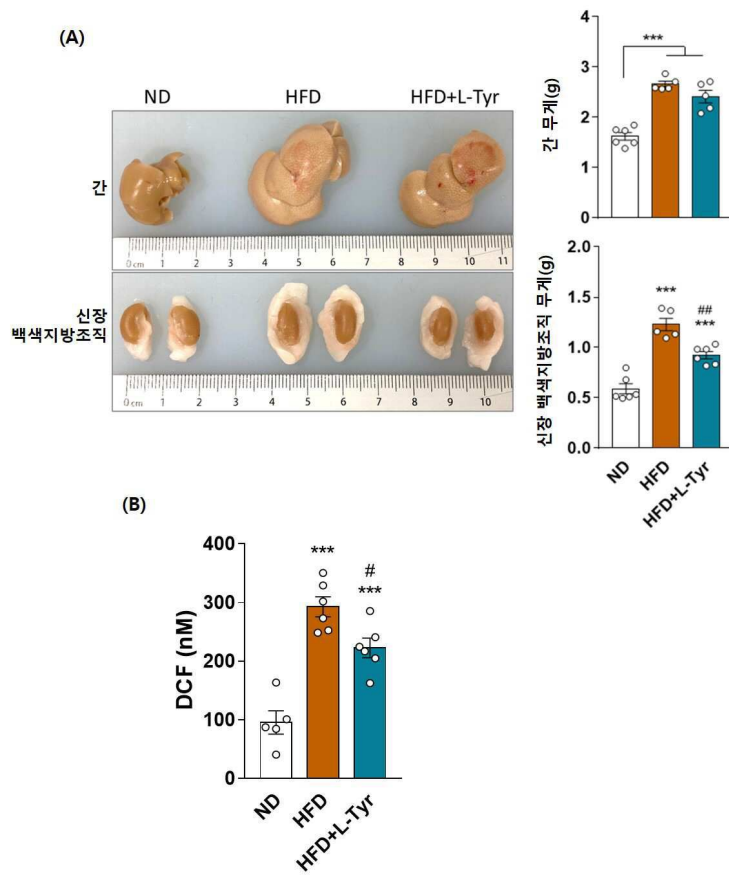
(A)



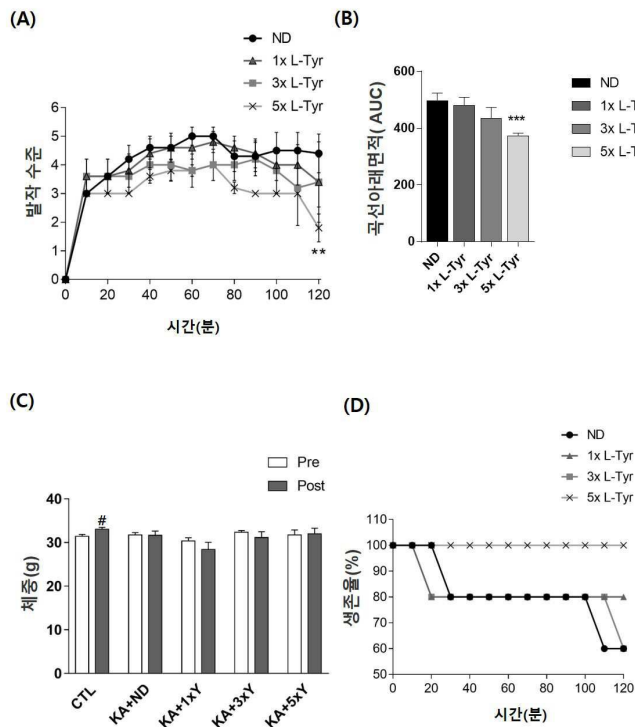
(B)



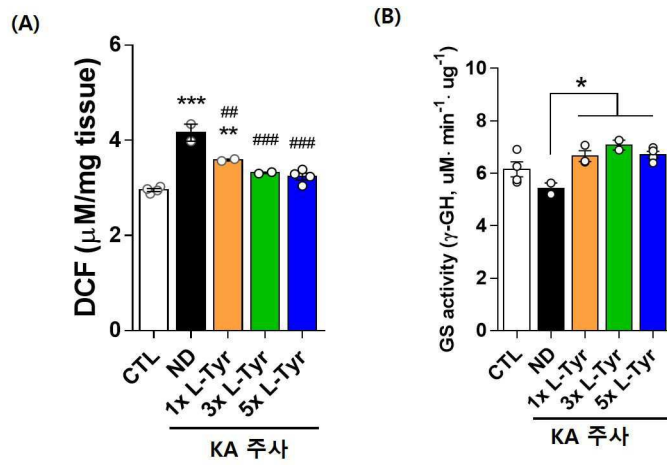
도면13



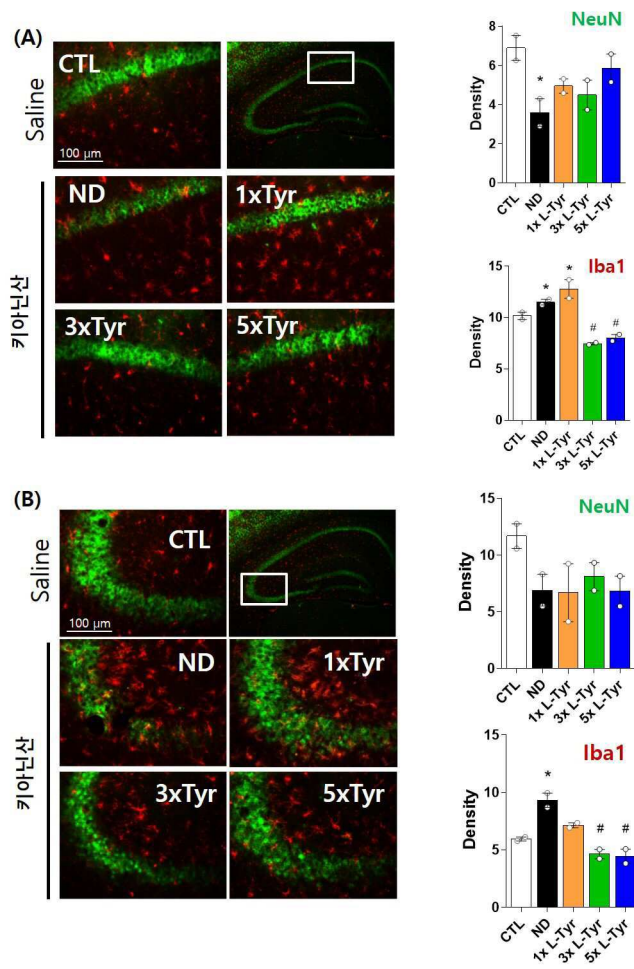
도면14



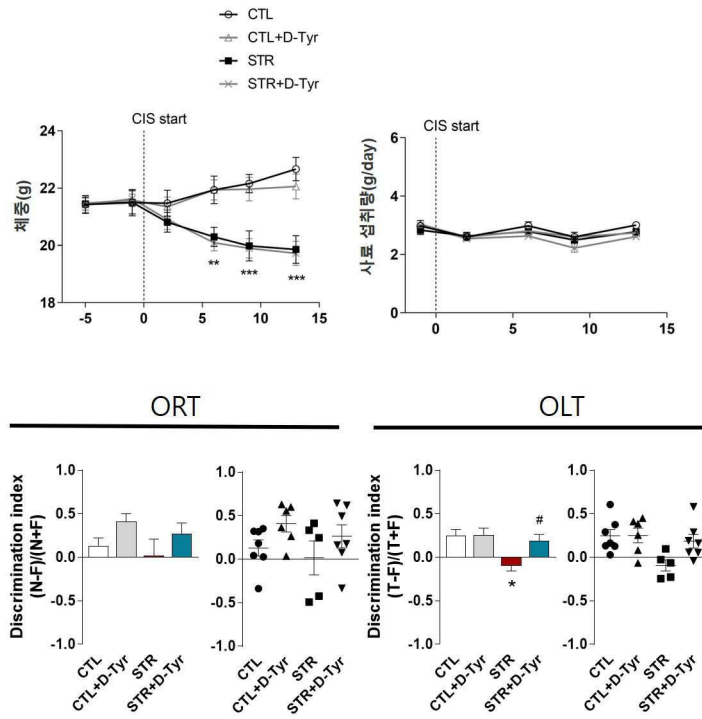
도면15



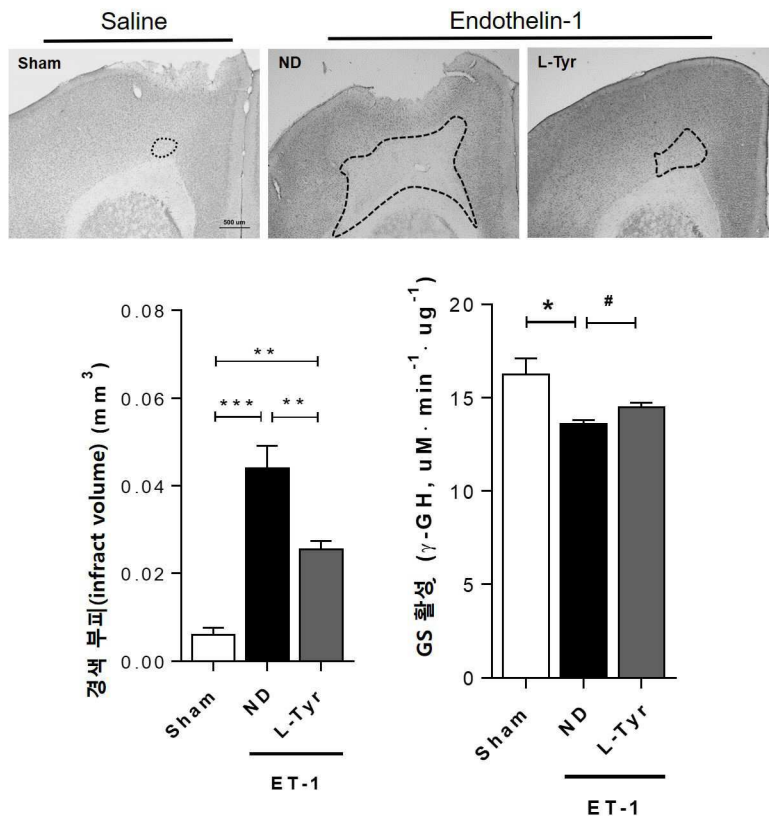
도면16



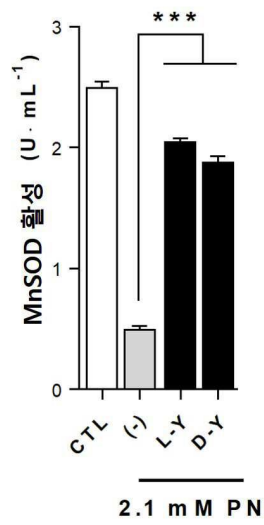
도면17



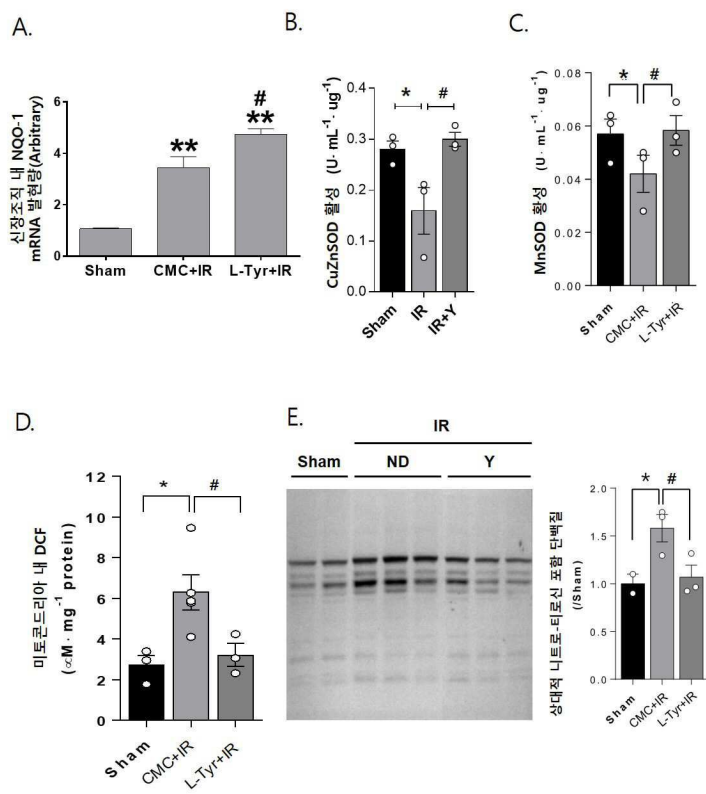
도면18



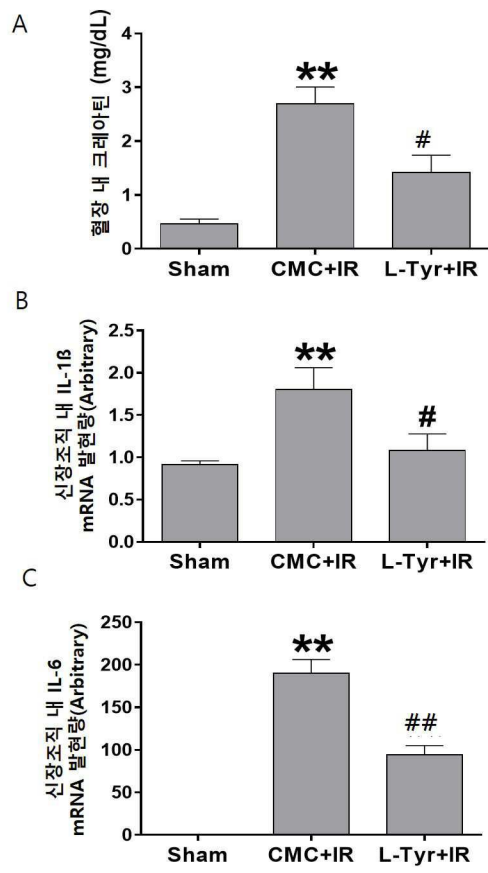
도면19



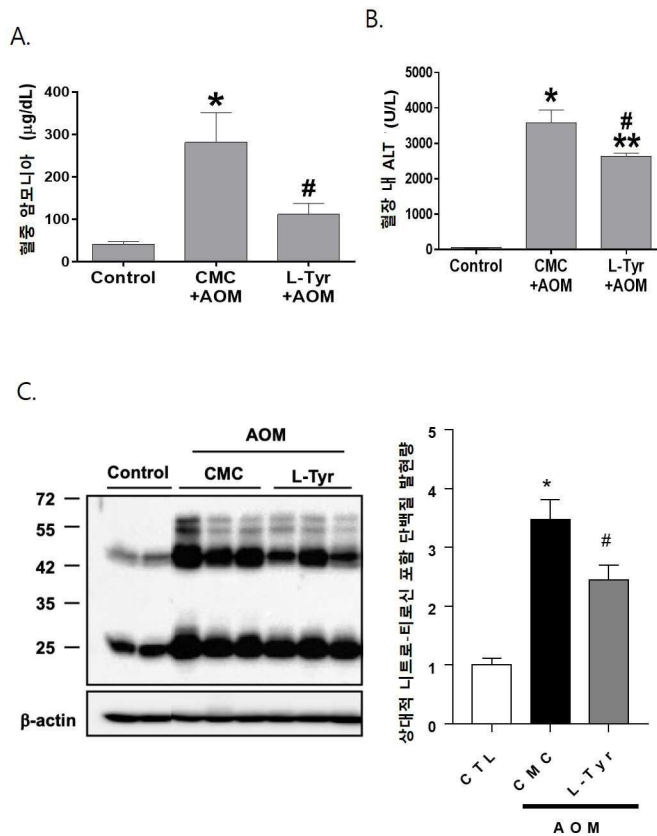
도면20



도면21



도면22



서열목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Composition for preventing, ameliorating or treating disease caused by nitration of tyrosine in protein comprising tyrosine as effective component
- <130> PN21130
- <150> KR 2020-0080308
- <151> 2020-06-30
- <160> 8
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> IL-1beta f
- <400> 1
- tcgcagcagc acatcaacaa gag

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-1beta r
 <400> 2
 ggtgctcatg tctctatcct gga 23
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-6f
 <400> 3
 ccaattcatc ttgaaatcac 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-6r
 <400> 4
 ggaatgtcca caaactgata 20

 <210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NQ0-1f
 <400> 5
 atgacatcac aggtgagctg aagg 24
 <210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NQ0-1r
 <400> 6
 ctcaaaccag cctttcagaa tggc 24

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDHf

<400> 7
 gtggcaaagt ggagattgtt g 21

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDHR

<400> 8
 ttgactgtgc cgttgaattt g 21