

## 명세서

### 발명의 명칭: CPNE7 단백질 또는 CPNE7단백질 유래 펩타이드를 포함하는 세포 내 활성산소 제거용 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 활성산소 제거용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 CPNE7 단백질 또는 CPNE7단백질 유래 펩타이드를 포함하는 세포 내 활성산소 제거용 조성물에 대한 것이다.

[2]

### 배경기술

- [3] 의학 기술의 발전은 질병의 예방 및 치료를 통해 인간의 평균수명을 연장하고 있다. 최근 고령인구 집단의 성장과 함께 다양한 노인성 질환에 대한 예방과 그 치료에 관한 관심이 증가하고 있다. 그러나 아직까지 노화를 야기하는 정확한 기전은 규명되지 못했으며, 수많은 노인성 질환의 발생 원인 및 치료에 관한 기술은 개발 초기 단계에 머물고 있다. 통계청의 '2021 고령자 통계'에 따르면 65세 이상 인구는 전체의 16.5%를 차지하며 해마다 비중이 증가할 것으로 예측되고 있다. UN이 정의하는 고령화 사회란, 65세 이상 인구가 총 인구의 7% 이상을 차지하는 사회이며 이를 기초로 할 때 우리나라는 이미 고령화 사회로 진입한 상태이며, 평균수명의 지속적인 증가에 따라 노인인구 비중은 더욱 증가할 것으로 예상된다.
- [4] 노인인구가 증가함에 따라 노인성 질환의 예방과 치료를 가능하게 하는 항노화 기술의 개발의 중요성이 점점 더 커지고 있다. 항노화 기술과 관련하여 개체 수준에서의 노화를 이해하기 위해서는 먼저 세포-분자생물학적 관점에서 노화 현상을 규명하는 것이 선행되어야 할 것이다. 노화의 원인에 관한 연구 중 가장 유력한 학설로서 받아들여지는 활성산소 이론(Free radical theory, Hartman et al., 1986)에 따르면 강력한 반응성을 가진 활성산소(Reactive Oxygen Species, ROS)는 체세포 돌연변이(somatic mutation)를 야기해 단백질을 손상시키며 이를 노화의 원인으로 보고 있다. 활성산소는 구조적으로 매우 불안정하여 세포 내 DNA와 결합해 강한 산화작용을 야기할 수 있다. 독성이 강한 산소분자 라디칼(radical)은 세포막의 불포화지방산(PUFA)와 결합해 세포막의 변화를 초래하고 결과적으로 세포 노화를 촉진하게 된다. 허혈/재관류에 의한 조직 손상, 대사증후군, 파킨슨병, 알츠하이머와 같은 퇴행성 신경 질환, 조로증, 암, 심혈관 질환과 같은 수많은 질병들이 활성산소와 관련될 뿐만 아니라, 활성산소는 피부의 진피층에 주로 존재하는 콜라겐(collagen)과 엘라스틴(elastin)의 형태를 변형시킴으로써 피부의 노화를 촉진시킨다.
- [5] 인체 내에서 자연적으로 생성되는 내인성 항산화 효소 (SOD, Catalase, Glutathione peroxidase 등)는 활성산소의 구조를 안정적으로 바꿔 활성산소를 중

화하는 기능을 한다. 하지만, 이는 30세를 넘어가면서 감소하는 것으로 보고되어 있고, 40세에는 25세에 비해 약 50% 가량 줄어들고, 60대에 이르러서는 90%까지 감소하는 것으로 알려져 있다. 따라서 노화가 진행될수록 활성산소의 생성율이 증가된다. 비효소적 외인성 항산화 물질 (비타민 C, E, A, 셀레늄 등)인 이차적 항산화제는 섭취 후 빠르게 흡수되므로 내인성 항산화 효소의 감소를 충분히 보상할 수 없다.

- [6] Copine-7(CPNE7)단백질 결손 생쥐에서는 상아질을 형성하는 상아모세포의 노화가 가속되어 병적인 상아질이 형성됨을 실험적으로 확인하였다. CPNE7은 치아 구조의 약 70% 이상을 구성하는 상아질 재생을 유도하는 단백질이다. 본 연구진은 CPNE7 단백질이 상아모세포 내 항상성 유지에 필수적인 요소인 점에 착안하여 CPNE7의 결손이 상아모세포 내 내인성 항산화 효소의 감소에 따른 활성산소 과잉 형성을 야기함으로써 DNA 손상으로 이어질 것으로 보아 본 발명에 이르게 되었다.

[7]

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [8] 본 발명은 CPNE7 단백질 또는 CPNE7단백질 유래 펩타이드를 포함하는 세포 내 활성산소 제거용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 포함하는 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 포함하는 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 포함하는 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [14]
- [15] 본 발명의 목적은 이상에서 언급한 것으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 목적들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[16]

### 과제 해결 수단

- [17] 본 발명자들은 상기 기술적 과제를 해결하기 위하여, 다양한 연구를 수행한 결과, 세포 내 활성산소를 제거하는 CPNE7 단백질 또는 CPNE7단백질 유래 펩타이드를 포함하는 세포 내 활성산소 제거용 조성물을 개발하였다.
- [18] 또한, CPNE7 단백질 유래 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환을 치료할 수 있는 제제를 위한 10개의 아미노산으로 구성된 신규한 펩타이드를 개발하였다.
- [19] 상술한 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는, 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환을 치료용 펩타이드를 제공한다.
- [20] K-Y-R1-R2-R3-R4-R5-R6-R7-R8 (일반식 1)
- [21] 상기 일반식 1에서,
- [22] R1은 아르기닌(R), 리신(K) 또는 글루타민(Q)이고;
- [23] R2는 아르기닌(R) 또는 글루타민(Q)이며;
- [24] R3, R4 및 R5는 각각 아르기닌(R) 또는 리신(K)이고;
- [25] R6는 아스파라긴(N) 또는 세린(S)이며; 및
- [26] R7 및 R8은 리신(K) 또는 타이로신(Y)이다.
- [27]
- [28] 본 발명에서 제공하는 펩타이드는 세포독성을 나타내지 않으면서도, 상아모세포 분화마커 유전자인 Dspp, Dmp1 및 Nestin 유전자의 발현수준을 증가시킬 수 있으며, 치수조직 세포와 함께 생체내에 이식할 경우, 상기 치수조직 세포가 상아질/치수조직-유사 조직을 형성하는 특징을 나타낼 수 있다.
- [29] 본 발명에서 제공하는 펩타이드는, 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환을 치료효과를 나타낼 수 있는 한, 이를 구성하는 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 변이체 펩타이드도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 범주에 포함된다.
- [30] 일반적으로, 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 폴리펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다. 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 또한, 아미노산 서열상의 변이 또는 수식에 의해서 펩타이드의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 세포 내 활성산소 제거능이 증가한 펩타이드를 포함할 수 있다.
- [31] 예를 들어, 본 발명에서 제공하는 서열번호 1의 펩타이드의 3번에 위치한 산성 아미노산인 글루타민은 염기성 아미노산인 리신 또는 아르기닌으로 치환되어도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있고; 서열번호 1의 펩타이드의 4번 또는 5번에 위치한 염기성 아미노산인 아르기닌은 산성 아미노산인 글루타민 또는 염기성 아미노산인 리신으로 치환되어도 본 발명에서 제공

하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있으며; 서열번호 1의 펩타이드의 6번, 7번 또는 9번에 위치한 염기성 아미노산인 리신은 염기성 아미노산인 아르기닌 또는 방향족 아미노산인 타이로신으로 치환되어도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있고; 서열번호 1의 펩타이드의 8번에 위치한 산성 아미노산인 아스파라긴은 중성 아미노산인 세린으로 치환되어도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있으며; 서열번호 1의 펩타이드의 10번에 위치한 방향족 아미노산인 타이로신은 염기성 아미노산인 리신으로 치환되어도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있다.

- [32] 이처럼, 본원발명의 펩타이드를 구성하는 산성 아미노산, 염기성 아미노산 또는 방향족 아미노산은 각각 이와 다른 산성 아미노산, 염기성 아미노산, 중성 아미노산 또는 방향족 아미노산으로 치환되어도, 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있으므로, 본 발명의 펩타이드를 구성하는 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 변이체 펩타이드도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 범주에 포함됨은 자명하다.
- [33] 또한, 본 발명의 펩타이드는 그의 N-말단 또는 C-말단에 임의의 아미노산이 부가된 형태를 갖더라도, 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있으므로, 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 범주에 포함된다. 일 예로서, 상기 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 1 내지 300개의 아미노산이 부가된 형태가 될 수 있고, 다른 예로서, 상기 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 1 내지 100개의 아미노산이 부가된 형태가 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 상기 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 1 내지 24개의 아미노산이 부가된 형태가 될 수 있다.
- [34] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [35] 상기 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있다. 뉴클레오티드 서열을 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당업계에서 널리 공지된 합성법, 예를 들어 문헌(Engels and Uhlmann, *Angew Chem IntEd Engl.*, 37:73-127, 1988)에 기술된 방법을 이용할 수 있으며, 트리에스테르, 포스파이트, 포스포르아미다이트 및 H-포스페이트 방법, PCR 및 기타 오토 프라이머 방법, 고체 지지체상의 올리고뉴클레오타이드 합성법 등을 이용하여 합성할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [36] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 상기 발현벡터를 포함하는 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용하여 상기 펩타이드를 제조하는 방법을 제공한다.
- [37] 본 발명의 용어 "발현벡터"란, 목적하는 숙주세포에서 목적 펩타이드를 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 의미한다. 상기 발현벡터는 개시

코돈, 종결코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현조절 요소들을 포함하는데, 상기 개시코돈 및 종결코돈은 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 일부로 간주되고, 유전자 제작물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내어야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.

- [38] 본 발명의 용어 "작동가능하게 연결(operably linked)"이란, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 상태를 의미한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 발현 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.
- [39] 또한, 상기 발현벡터는 세포 배양액으로부터 펩타이드의 분리를 촉진하기 위하여 상기 펩타이드의 배출을 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 특이적인 개시 시그널은 또한 삽입된 핵산 서열의 효율적인 번역에 필요할 수도 있다. 이들 시그널은 ATG 개시코돈 및 인접한 서열들을 포함한다. 어떤 경우에는, ATG 개시코돈을 포함할 수 있는 외인성 번역 조절 시그널이 제공되어야 한다. 이들 외인성 번역 조절 시그널 및 개시코돈은 다양한 천연 및 합성 공급원일 수 있다. 발현 효율은 적당한 전사 또는 번역 강화 인자의 도입에 의하여 증가될 수 있다.
- [40] 아울러, 상기 발현벡터는 상기 펩타이드의 검출이 용이하도록 하기 위하여, 임의로 엔도펩티다아제를 사용하여 제거할 수 있는 단백질 태그를 추가로 포함할 수 있다.
- [41] 본 발명의 용어 "태그(tag)"란, 정량가능한 활성 또는 특성을 나타내는 분자를 의미하며, 플루오레세인과 같은 화학적 형광물질(fluoracer), 형광 단백질(GFP) 또는 관련 단백질과 같은 폴리펩타이드 형광물질을 포함한 형광분자일 수도 있고; Myc 태그, 플래그(Flag) 태그, 히스티딘 태그, 루신 태그, IgG 태그, 스트렙타비딘 태그 등의 에피토프 태그일 수도 있다. 특히, 에피토프 태그를 사용할 경우, 바람직하게는 6개 이상의 아미노산 잔기로 구성되고, 보다 바람직하게는 8개 내지 50개의 아미노산 잔기로 구성된 펩타이드 태그를 사용할 수 있다.
- [42] 본 발명의 용어 "관상동맥질환 (CAD)"은 심장의 주요 혈관인 관상동맥이 좁아지거나 막히는 질병을 의미한다. 이로 인해 심장근육에 산소와 영양분이 부족해지면서 발생할 수 있으며, 이런 현상은 주로 동맥경화로 인해 일어나게 된다. 동맥경화는 콜레스테롤, 지방, 칼슘 등이 혈관벽에 쌓이면서 발생하는데, 이 과정에서 산화스트레스가 큰 역할을 한다. 산화 스트레스는 혈관 손상을 악화시키고 염증을 유발하여 동맥경화를 가속화시키는 심근세포의 산화스트레스를 원인으로 하는 질병이다.

- [43] 본 발명의 용어 “심근경색증(MI)”은 관상동맥의 혈액 공급이 급격하게 차단되어 심장근육이 정지하는 상황을 의미할 수 있다. 산화 스트레스는 심근세포의 손상을 악화시키고 염증 반응을 촉진하여 심장 기능의 저하를 유발할 수 있다.
- [44] 본 발명의 용어 “심부전(Heart Failure)”은 심장이 몸에 충분한 피를 공급하지 못하는 상태를 의미하며, 이런 상황은 심근세포의 산화 스트레스는 심부전의 주요 원인 중 하나로, 세포의 손상과 염증을 악화시키며 심장의 기능을 저하시킬 수 있다.
- [45] 본 발명의 용어 “심방세동”이란 심장의 심방에서 비정상적인 전기적 신호가 발생하여 심장의 리듬이 빠르고 불규칙하게 된 상태를 의미할 수 있으며, 이로 인해 심장이 효율적으로 혈액을 몸에 공급하지 못하게 된다. 심근세포의 산화 스트레스는 세포 내에서 불균형한 상태로 산소 반응성 화합물(자유 라디칼)이 증가하게 되며, 이러한 산화 화합물들이 세포와 생체 분자에 손상을 주게 되므로 심장의 전기적 불균형을 악화시키고, 심방세동의 발생 가능성을 높일 수 있다.
- [46] 심근세포의 산화 스트레스는 심장의 손상과 염증을 악화시킬 수 있으며, 이는 심장의 전기적 안정성을 해치고 심장질환을 유발할 수 있으므로 심근세포의 산화 스트레스의 저하를 통해 심장질환의 치료가 가능할 수 있다.
- [47] 본 발명의 용어 “광피부염(Photodermatitis)”은 자외선 또는 특정 물질과 햇빛이 결합하여 피부에 염증 반응을 일으키는 상태를 의미할 수 있으며 자외선 노출로 인한 피부 손상의 주요 원인 중 하나는 산화 스트레스이다. 산화 스트레스는 진피 섬유아세포에 영향을 미칠 수 있으며, 이로 인해 콜라겐 분해와 염증 반응이 촉진될 수 있다. 이러한 과정은 피부의 특성을 변화시키고, 광피부염의 증상을 악화시킬 수 있다.
- [48] 본 발명의 용어 “아토피 피부염(Atopic dermatitis)”은 만성적인 피부염으로, 피부가 건조하고 가려움 증상이 동반되며, 염증이 반복적으로 발생하는 것이 특징으로, 유전적 요인, 환경 요인, 면역계 이상 등이 관련되어 있다고 알려져 있으며, 진피 섬유아세포의 스트레스는 아토피 피부염의 발병 및 진행과 연관될 수 있다. 산화 스트레스는 세포에 손상을 주는 자유 라디칼을 생성하며, 이는 염증 반응과 세포의 기능 저하를 일으킨다. 진피 섬유아세포는 피부의 진피층에 위치하며, 피부의 구조와 기능을 유지하는데 중요한 역할을 하므로 산화 스트레스로 인해 진피 섬유아세포의 기능이 저하되면, 피부의 보호 기능이 약화될 수 있다. 이로 인해 피부는 외부 자극에 더 취약해지며, 아토피 피부염의 증상이 악화될 수 있다. 이로 인한 산화 스트레스는 염증 반응을 촉진할 수 있다. 이러한 염증 반응은 아토피 피부염의 주요 증상 중 하나로, 진피 섬유아세포가 올바르게 기능하지 못하는 원인이 된다. 아울러, 산화 스트레스로 인한 세포 손상은 피부 장벽의 손상을 악화시킬 수 있다. 피부 장벽이 손상되면, 알레르기 반응을 일으키는 물질이 피부에 더 쉽게 침투할 수 있으며, 이는 아토피 피부염의 증상을 더욱 악화시킬 수 있다.

- [49] 본 발명에 있어서, 상기 발현백터는 CPNE7 단백질 또는 서열번호 1로 이루어진 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있는데, 이때 사용되는 백터는 상기 펩타이드를 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 플라스미드 DNA, 파아지 DNA 등이 될 수 있고, 보다 바람직하게는 상업적으로 개발된 플라스미드(pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP 등), 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118, pUC119 등), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110, pTP5 등), 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24, YCp50 등), 파아지 DNA(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11, λZAP 등), 동물바이러스 백터(레트로 바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 백신시아 바이러스(vaccinia virus) 등), 곤충 바이러스 백터(배큘로바이러스(baculovirus) 등)가 될 수 있다. 상기 발현백터는 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용함이 바람직하다.
- [50] 본 발명에서 제공하는 형질전환체는 상기 본 발명에서 제공하는 발현백터를 숙주에 도입하여 형질전환시킴으로써 제작될 수 있고, 상기 발현백터에 포함된 폴리뉴클레오티드를 발현시켜서, 상기 펩타이드를 생산하는데 사용될 수 있다. 상기 형질전환은 다양한 방법에 의하여 수행될 수 있는데, 상기 펩타이드를 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, CaCl<sub>2</sub> 침전법, CaCl<sub>2</sub> 침전법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 사용될 수 있다. 또한, 상기 형질전환체의 제작에 사용되는 숙주 역시 상기 펩타이드를 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 대장균, 스트렙토마이세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 사카로마이세스 셰레비지에, 스킴조사카로마이세스 폼베 등의 효모 세포; 피치아 파스토리스 등의 균류 세포; 드로소필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO, COS, NSO, 293, 보우멜라노마 세포 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있다.
- [51] 상기 형질전환체는 또한 본 발명의 서열번호 1로 이루어진 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 생산하는 방법에 사용될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 서열번호 1로 이루어진 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 생산하는 방법은 (a) 상기 형질전환체를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및 (b) 상기 배양물로부터 본 발명의 펩타이드를 회수하는 단계를 포함할 수 있다.
- [52] 본 발명의 용어 "배양"이란, 미생물을 적당히 인공적으로 조절된 환경조건에서 생육시키는 방법을 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 형질전환체를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 본 발명의 서열번호 1로 이루어진 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 발현시켜서 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치 공정 또는

주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다.

- [53] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈 및 자일로즈의 혼합당을 주 탄소원으로 사용하며 이외에 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 및 질산 암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기 화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다.
- [54] 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.
- [55] 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 27°C 내지 37°C, 바람직하게는 30°C 내지 35°C이다. 배양은 상기 펩타이드의 생성량이 최대로 얻어질 때까지 계속한다. 이러한 목적으로 보통 10 내지 100 시간에서 달성된다.
- [56] 아울러, 배양물로부터 상기 펩타이드를 회수하는 단계는 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 상기 회수 방법은 생산된 상기 펩타이드의 회수에 사용될 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법을 사용할 수 있다.

- [57] 본 발명의 약학 조성물은, 상기 펩타이드에 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체(자연적 또는 비자연적 담체), 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환 치료용 약학 조성물의 형태로 제조될 수 있다. 구체적으로, 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 심장질환 또는 피부질환이 유발된 부위에 투여할 수 있는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명에서, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 콜라겐 등을 들 수 있다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 특히, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제, 연고제(예를 들어, 치수이장제 등) 등이 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [58] 본 발명의 약학 조성물에 포함된 상기 펩타이드의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 최종 조성물 총 중량을 기준으로 0.0001 내지 50 중량%, 보다 바람직하게는 0.01 내지 20 중량%의 함량으로 포함될 수 있다.
- [59] 상기 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 본 발명의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 단독으로 투여하거나 공지된 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 치료용 약학 조성물과 병용하여 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.
- [60] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중증도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물은 성인 1인당 약 0.1 ng 내지 약 100 mg/kg, 바람직하게는 1 ng 내지 약 10 mg/kg로 투여할 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또

는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [61] 본 발명은 다른 하나의 양태로서 상기 약학 조성물을 약제학적으로 유효한 양으로 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 이 발병된 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 치료방법을 제공한다.
- [62] 본 발명의 용어 "개체"란 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 의 치료가 요구되는 쥐, 가축 등을 포함하는 포유동물 등을 제한 없이 포함할 수 있으나, 상기 질환이 발병된 개체 중에서 인간을 제외한다.
- [63] 본 발명의 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 치료용 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여도 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 목적하는 바에 따라 경구 투여, 피부투여, 근육 주사, 정맥 주사, 피하 주사, 호흡기 투여, 직장 투여, 환부 투여 등의 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [64] '경구 투여(구강내 투여)'는 약물을 입을 통해 섭취하는 방식으로, 일반적으로 알약, 캡슐, 액체 형태의 약물이 사용될 수 있다. '피부 투여'는 약물을 피부에 바르거나 부착하는 방식으로, 크림, 겔, 패치 등의 형태로 사용될 수 있다. '근육 주사'는 약물을 직접 근육 조직에 주사하는 방식으로, 주로 주사기와 바늘을 사용할 수 있다. '정맥 주사'는 약물을 직접 혈관에 주입하는 방법으로, 주사기와 바늘, 혹은 정맥 캐놀라를 사용할 수 있다. '피하 주사'는 약물을 피부 아래 지방 조직에 주입하는 방식으로, 인슐린과 같은 약물 투여에 사용될 수 있다. '호흡기 투여'는 약물을 입 혹은 코를 통해 호흡기에 도달하게 하는 방식으로, 흡입기, 가스, 증기 등의 형태로 사용될 수 있다. '직장 투여'는 약물을 직장 내에 주입하는 방식으로, 직장약, 직장적립제 등의 형태로 사용될 수 있다. '환부 투여'는 약물을 직접 치료가 필요한 부위에 적용하는 방식으로, 질환 특성에 따라 크림, 겔, 패치 등의 형태로 사용될 수 있다.
- [65] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 펩타이드를 포함하는 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공한다.
- [66] 본 발명의 용어, "개선"이란, 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [67] 본 발명에 있어서, 상기 개선은 본 발명의 펩타이드를 유효 성분으로 포함하는 약학 조성물을 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 의 치료가 요구되는 개체에 투여하여 심근세포 또는 진피 섬유아세포 내의 활성산소의 제거를 촉진함으로써, 심근세포

의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 증상이 호전되거나 또는 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미하는 것으로 해석될 수 있다.

- [68] 본 발명의 용어 "의약외품"이란, 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 개선, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물품들 중 의약품보다 작용이 경미한 물품들을 의미하는 것으로, 예를 들어 약사법에 따르면 의약외품이란 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람·동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 섬유·고무 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않으며, 기구 또는 기계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염병을 막기 위한 살균·살충제 등이 이에 포함된다.
- [69] 본 발명에 있어서, 상기 펩타이드를 포함하는 의약외품 조성물의 종류나 제형은 특별히 제한되지 않으나, 일 예로서, 연고제, 패치제, 파우더제, 겔화제, 스프레이제, 정제 또는 스프레이제 등일 수 있다.
- [70] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 펩타이드를 포함하는 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [71] 본 발명의 용어, "식품"은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강 기능 식품 및 건강 식품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.
- [72] 상기 건강 기능(성) 식품(functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 식품은 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 예방 또는 개선의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.
- [73] 상기 건강 식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)은 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강 기능 식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용될 수 있다.

- [74] 구체적으로, 상기 건강 기능 식품은 본 발명의 펩타이드를 음료, 차류, 향신료, 껌류, 과자류 등의 식품 소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없는 장점이 있다.
- [75] 본 발명의 식품 조성물은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 예방 또는 개선에 대하여 높은 효과를 기대할 수 있으므로, 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [76] 상기 식품 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.
- [77] 또한, 상기 식품 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크롬(Cr) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [78] 또한, 상기 식품 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.
- [79] 본 발명의 펩타이드는 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 식품 조성물은 식품 또는 음료에 대하여 50 중량부 이하, 구체적으로 20 중량부 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 함량을 포함할 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [80] 본 발명의 식품 조성물의 일 예로 건강음료 조성물로 사용될 수 있으며, 이 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이

드; 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강음료 조성물 100 mL 당 일반적으로 약 0.01 내지 0.04 g, 구체적으로 약 0.02 내지 0.03 g이 될 수 있다.

- [81] 상기 외에 건강음료 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강음료 조성물 100 중량부당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [82] 본 발명의 식품 조성물은 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 예방 또는 개선 효과를 나타낼 수 있다면 다양한 중량%로 포함할 수 있으나, 구체적으로 본 발명의 펩타이드를 식품 조성물의 총 중량 대비 0.00001 내지 100 중량% 또는 0.01 내지 80 중량%로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[83]

### 발명의 효과

- [84] 본 발명은 CPNE7 단백질 또는 CPNE7단백질 유래 펩타이드를 포함하는 세포 내 활성산소 제거용 조성물을 제공할 수 있다.
- [85] 본 발명의 다른 목적은 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공할 수 있다.
- [86] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공할 수 있다.
- [87] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 포함하는 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있다.
- [88] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 포함하는 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공할 수 있다.
- [89] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 포함하는 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공할 수 있다.
- [90]

[91] 본 발명의 효과는 이상에서 언급한 것으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[92]

### 도면의 간단한 설명

[93] 도 1은 Cell permeant reagent 2',7' -dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, also known as H2DCFDA, DCFH-DA, and DCFH)를 이용한 활성산소 수준 비교한 그 래프로써, ShCpne7 형질전환을 통해 Cpne7이 감소되었을 때, 활성산소 수준은 대조군에 비해 약 2배이상 증가된 것을 결과를 보여준다.

[94] 도 2는 Cell permeant reagent 2',7' -dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, also known as H2DCFDA, DCFH-DA, and DCFH)를 이용한 활성산소 수준 비교결과 및 Cell permeant reagent 2',7' -dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, also known as H2DCFDA, DCFH-DA, and DCFH)를 이용한 활성산소 수준 비교결과이다.

[95] 도 3은 WST-8(High Sensitive Water Soluble Tetrazolium Salt)을 이용한 살아있는 세포의 양 측정결과이다.

[96] 도 4는 Cpne7 Knockout 생쥐의 증가된 활성산소가 상아모세포에 미치는 영향 평가(DNA 손상) 결과 및 DNA 손상마커 단백질인  $\gamma$ -H2A.X의 면역형광염색법을 통한 DNA 손상정도 비교확인 결과이다.

[97] 도 5는 Cpne7 Knockout 생쥐의 증가된 활성산소가 상아모세포에 미치는 영향 (세포 노화)을 평가한 결과로써, 세포 노화 마커 효소인 Beta-Galactosidase (B-gal) 염색을 통한 세포노화 정도를 비교한 결과이다.

[98] 도 6은 Cpne7 Knockout 생쥐의 증가된 활성산소가 상아모세포에 미치는 영향 (조직형태학적)을 평가한 결과이다.

[99] 도 7은 CPNE7제조합 단백질(rCPNE7)의 활성산소 제거능 확인결과이다.

[100] 도 8은 Cell permeant reagent 2',7' -dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, also known as H2DCFDA, DCFH-DA, and DCFH)를 이용한 활성산소 수준 비교를 통한 CPNE7제조합 단백질(rCPNE7)의 활성산소 제거능 확인결과이다.

[101] 도 9는 DNA 손상마커 단백질인  $\gamma$ -H2A.X의 면역형광염색법을 통한 DNA 손상 정도 비교확인을 통한 CPNE7제조합 단백질(rCPNE7)의 활성산소 제거능 확인결과이다.

[102] 도 10은 세포 노화 마커 효소인 Beta-Galactosidase (B-gal) 염색을 통한 세포노화 정도 비교를 통한 CPNE7제조합 단백질(rCPNE7)의 활성산소 제거능 확인결과이다.

[103] 도 11은 WST-8(High Sensitive Water Soluble Tetrazolium Salt)을 이용한 살아있는 세포의 양 측정결과로써, 다른 활성산소의 농도 별 hDPCs의 세포 생존율 확인 결과이다.

- [104] 도 12는 CPNE7 단백질 유래 기능성 펩타이드(Selcopintide) 농도별 활성산소 제거능 확인결과이다.
- [105] 도 13은 Cell permeant reagent 2',7' -dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, also known as H2DCFDA, DCFH-DA, and DCFH)를 이용한 활성산소 수준 비교에 따른 CPNE7 단백질 유래 기능성 펩타이드(Selcopintide) 농도별 활성산소 제거능 확인결과이다.
- [106] 도 14는 RT-PCR을 통해 hDPCs 세포에서 Selcopintide의 내인성 항산화 효소들의 mRNA 수준을 통한 활성산소 수준 비교에 따른 CPNE7 단백질 유래 기능성 펩타이드(Selcopintide) 농도별 활성산소 제거능 확인결과이다.
- [107] 도 15는 DNA 손상마커 단백질인  $\gamma$ -H2A.X의 면역형광염색법을 통한 DNA 손상정도 비교확인을 통한 Selcopintide의 활성산소 제거능 확인결과이다.
- [108] 도 16은 WST-8(High Sensitive Water Soluble Tetrazolium Salt)을 이용한 살아있는 세포의 양 측정 결과이다.
- [109] 도 17은 세포 내 활성산소를 유도하는 H2O2를 처리하고 Selcopintide를 처리한 후 광학현미경 상에서 세포 확인 및 WST-8(High Sensitive Water Soluble Tetrazolium Salt)을 이용한 살아있는 세포의 양 측정을 통한 심근세포에서 Selcopintide의 활성산소 제거능 확인결과이다.
- [110] 도 18은 세포 노화 마커 효소인 Beta-Galactosidase (B-gal) 염색을 통한 세포노화정도 비교를 통한 심근세포에서 Selcopintide의 활성산소 제거능 확인결과이다.
- [111] 도 19는 WST-8(High Sensitive Water Soluble Tetrazolium Salt)을 이용한 살아있는 세포의 양 측정을 통한 진피 섬유아세포에서 Selcopintide의 활성산소 제거능 확인결과이다.
- [112] 도 20은 진피 섬유아세포에서 Selcopintide의 활성산소 제거능을 확인한 결과이다.
- [113] 도 21은 세포 노화 마커 효소인 Beta-Galactosidase (B-gal) 염색을 통한 세포노화정도 비교를 통한 진피 섬유아세포에서 Selcopintide의 활성산소 제거능 확인결과이다.

[114]

#### 발명의 실시를 위한 형태

- [115] 본 발명의 목적 및 효과, 그리고 그것들을 달성하기 위한 기술적 구성들은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 본 발명을 설명함에 있어서 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 것이다. 그리고 후술되는 용어들은 본 발명에서의 기증을 고려하여 정의된 용어들로서 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 관례 등에 따라 달라질 수 있다.
- [116] 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있다. 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전

하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다. 그러므로 그 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다.

- [117] 이하에서는 본 발명의 실시예에 대하여 구체적으로 설명하기로 한다.
- [118] 실시예 1. **Cell permeant reagent 2',7' -dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, also known as H2DCFDA, DCFH-DA, and DCFH)**를 이용한 활성산소 수준 비교
- [119]
- [120] 인간 치수 세포인 human dental pulp cells(hDPCs)를 10% FBS를 포함하는  $\alpha$ -MEM 배지에서, 5%의 CO<sub>2</sub> 및 37°C 조건으로 배양하였다.
- [121]
- [122] 다음으로, 상기 배양된 hDPCs 세포를 60mm 배양접시에 각 접시당  $4 \times 10^5$  세포수로 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음, 리포펙타민 Plus™ 시약을 이용하여 상기 배양된 세포에, Shcon 벡터와 ShCpne7 벡터를 도입하여 형질전환시켰다.
- [123]
- [124] 상기 형질전환된 hDPCs 세포를 다시 96웰 플레이트에 각 웰당  $3 \times 10^3$  세포수로 분주하고 24시간 동안 배양한 다음, 상기 DCFDA 물질을 각각 처리하고 40분 후에 마이크로 플레이트 리더기로 Ex/Em = 485/535 nm에서 활성산소 수준을 측정하였다. 이때, 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 Control 그룹과 Shcon 벡터를 사용하였다.
- [125]
- [126] 도 1을 참고하면, ShCpne7 형질전환을 통해 Cpne7이 감소되었을 때, 활성산소 수준이 대조군에 비해 약 2배이상 증가된 것을 확인할 수 있다. 이를 통해 Cpne7은 hDPCs 세포에서 활성산소 수준을 정상수준으로 유지하는데 효과가 있음을 알 수 있다.
- [127] 실시예 2. **Cell permeant reagent 2',7' -dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, also known as H2DCFDA, DCFH-DA, and DCFH)**를 이용한 활성산소 수준 비교
- [128]
- [129] Cpne7 유전자를 제거한(knockout)한 6개월령 생쥐의 하악 어금니 조직 절편에 상기 DCFDA 물질을 각각 처리하고 40분 후에 공초점 현미경을 통해 활성산소 수준을 각각 측정하였다. 이때, 대조군으로는 6개월령 BL6 생쥐의 하악 어금니를 이용하였다.
- [130]
- [131] Cpne7 유전자가 제거되었을 때, *In vitro* 결과와 유사하게 생체 내 상아모세포에서의 활성산소 수준이 대조군에 비해 증가된 것을 확인하였다(도 2).
- [132]

- [133] 상기 결과로부터 Cpne7이 상아모세포를 포함하는 생체내에서 활성산소 수준을 정상수준으로 유지하는 요소임을 확인하였다.
- [134]
- [135] 실시예 3. 상아모세포를 이용한 Cpne7 knockdown시의 산화스트레스 취약성 검증
- [136]
- [137] 배양된 hDPCs 세포를 96웰 플레이트에 각 웰당  $3 \times 10^3$  세포수로 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음, 과산화수소( $H_2O_2$ )를 50uM과 100uM씩 24시간 동안 처리하였다. 상기 WST-8 용액을 각 웰에 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 후, 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정 비교하였다.
- [138]
- [139] 측정결과 Cpne7 유전자를 knockdown한 군(ShCpne7)에서  $H_2O_2$  100uM의 농도에서 대조군에 비해 세포 생존율이 유의미하게 감소하였다(도 3). 따라서, Cpne7은 hDPCs 세포에서 활성산소 수준을 정상수준으로 유지하는데 관련이 있음을 확인할 수 있었다.
- [140]
- [141] 실시예 4. DNA 손상마커 단백질인  $\gamma$ -H2A.X의 면역형광염색법을 통한 DNA 손상정도 비교확인
- [142]
- [143] 상기 실시 도 1 및 도 2의 결과로부터, Cpne7이 활성산소 정상 수준 유지에 관여하고, 특히 Cpne7이 Knockout될시 활성산소가 증가됨을 확인하였다. 이에 따라, 활성산소의 증가가 상아모세포의 DNA 손상을 증가시킬 수 있는지 확인하였다.
- [144]
- [145] 6개월령 Cpne7 Knockout 생쥐의 하악 어금니 조직 절편에  $\gamma$ -H2A.X 항체를 이용한 면역형광염색법을 수행하여, 강도를 비교하였다. 이때, 대조군으로는 6개월령 BL6 생쥐의 하악 어금니 조직 절편을 사용하였다.
- [146]
- [147] 도 4에서 확인할 수 있듯이, 활성산소가 증가된 Cpne7 Knockout 생쥐의 상아모세포에서 DNA 손상이 축적되어 있음을 확인하였다.
- [148]
- [149] 이를 통해, Cpne7 Knockout에 따른 활성산소의 증가는 DNA 손상을 유도하는 것으로 분석되었다.
- [150]
- [151] 실시예 5. 세포 노화 마커 효소인 Beta-Galactosidase (B-gal) 염색을 통한 세포 노화 정도 비교
- [152]

- [153] 상기 실시 도 1, 도 2 및 도 4 결과로부터, Cpne7이 Knockout될시 증가된 활성산소가 DNA 손상을 유도하는 것이 확인되어, 유도된 DNA 손상이 세포 노화를 촉진할 수 있는지 확인하였다.
- [154]
- [155] 형질전환이 완료된 hDPCs를 35mm 배양접시에  $1 \times 10^5$  세포수가 되도록 분주하고 24시간동안 배양한 다음, 5% FBS, 50ug/ml ascorbic acid, 그리고 10mM  $\beta$ -glycerophosphate 가 함유된  $\alpha$ -MEM 배지를 2일에 한 번씩 교체해주며 21일까지 세포분화를 하였다. 0,4,7,14, 그리고 21일의 분화된 상아모세포를 4% 파라포름 알데히드에 고정하고, CO<sub>2</sub>가 없는 37°C 인큐베이터에서 24시간 동안 B-gal 염색을 수행하였다.
- [156]
- [157] 또한, 활성산소와 DNA 손상이 확인된 6개월령 Cpne7 knockout 생쥐의 하악 어금니 조직 절편에서 24시간 동안 B-gal 염색을 수행하였다. 도 5에서 보듯이, Cpne7 유전자가 knockdown 되거나 knockout된 상아모세포에서 B-gal positive 세포가 대조군에 비해 더 많은 것을 확인하였다.
- [158]
- [159] 따라서, Cpne7 knockout에 따른 활성산소의 증가는 DNA 손상을 유도하고 세포 노화를 촉진시키는 것을 확인하였다.
- [160]
- [161] 실시예 6. 6개월령과 12개월령 Cpne7 knockout 생쥐의 하악 어금니의 조직형태학적 비교
- [162]
- [163] 6개월령과 12개월령 Cpne7 knockout 생쥐 하악 어금니의 조직절편을 Hematoxylin and Eosin (H&E) 염색법을 수행하였다.
- [164]
- [165] 상기 도 1, 도 2, 도 3 및 도 4로부터 Cpne7 knockout 상아모세포는 활성산소의 증가를 통해 DNA 손상 유도와 세포노화가 촉진되는 것을 확인하였다.
- [166]
- [167] 6개월령과 12개월령 Cpne7 knockout 생쥐의 하악 어금니의 조직형태학적 비교한 결과 6개월령 Cpne7 knockout 하악 어금니의 상아모세포가 불규칙적인 배열을 보일 뿐 아니라 세포핵이 비정상적인 형태를 띠는 것을 확인하였고, 또한 치수조직 내 병적인 뼈 유사 경조직이 형성된 것이 확인하였다.
- [168]
- [169] 12개월령 Cpne7 knockout 치아 조직에서는 상기 치수조직 내 병적인 뼈 유사 경조직이 더 많이 형성되었으며, 상아모세포가 대부분 죽고 남아있는 상아모세포의 상태가 대조군과 비교해 건강하지 못한 것이 확인되었다.
- [170]

- [171] 따라서, Cpne7 knockout에 의한 활성산소의 증가는 상아모세포에서 DNA 손상과 세포 노화를 유도하여 병적인 상황을 야기하는 것으로 확인되었다.
- [172]
- [173] 실시예 7. 세포 내 활성산소를 유도하는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하고 CPNE7 재조합 단백질을 처리한 후 광학현미경 상에서 세포 확인
- [174]
- [175] hDPCs를 35mm 배양 접시에 1x10<sup>5</sup> 세포수가 되도록 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 각각 5uM, 100uM, 1mM, 또는, 2mM 농도로 처리하고, 다시 100ng/ml의 재조합 CPNE7 단백질을 처리한 후, 24시간동안 배양하였다. 상기 배양이 종료된 후, 배양된 세포를 PBS로 세척하고 광학현미경을 통해 관찰하였다. 이때, 대조군으로는 상기 재조합 CPNE7 단백질(rCPNE7)을 처리하지 않고 배양한 hDPCs를 사용하였다.
- [176]
- [177] 도 7에서 확인할 수 있듯이, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100uM 이하의 농도에서는 어떠한 변화도 확인되지 않았으며, 1mM 이상의 농도에서 산화적 스트레스에 의한 세포사멸이 관찰되었다. 반면, 재조합 CPNE7 단백질을 처리군에서는 대조군에 비해 세포 생존율이 높게 관찰되었다. 이를 통해 CPNE7 단백질이 활성산소 제거 효능을 가지는 것으로 분석되었다.
- [178]
- [179] 실시예 8. Cell permeant reagent 2',7' -dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, also known as H<sub>2</sub>DCFDA, DCFH-DA, and DCFH)를 이용한 활성산소 수준 비교
- [180]
- [181] 배양된 hDPCs를 35mm 공초점 현미경용 배양 접시에 1x10<sup>5</sup> 세포수가 되도록 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM을 처리하고 rCPNE7 100ng/ml을 처리하여 공초점 현미경으로 약 1시간동안 촬영하였다.
- [182]
- [183] 도 8을 참고하면, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM 처리 후, 약 30분째 활성산소량이 최대수치를 보였으며, 그 후 감소하여 약 1시간째 유의성이 확인되었다. 이를 통해 CPNE7 단백질의 활성산소 제거 가능성을 확인하였다.
- [184]
- [185] 실시예 9. DNA 손상마커 단백질인  $\gamma$ -H2A.X의 면역형광염색법을 통한 DNA 손상정도 비교
- [186]
- [187] 상기 도 8에서 CPNE7 재조합 단백질이 hDPCs에서 과량의 활성산소를 제거함을 확인하였고, 이에 따라 DNA 손상 정도를 확인하고자 하였다.
- [188]

- [189] 배양된 hDPCs를 35mm 공초점 현미경용 배양 접시에  $1 \times 10^5$  세포수가 되도록 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음,  $H_2O_2$  1mM을 처리하고 rCPNE7 100ng/ml을 처리하여 24시간 후 4% 파라포름알데하이드로 세포 고정을 진행하였다.
- [190]
- [191] 고정된 세포에  $\gamma$ -H2A.X 항체를 이용한 면역형광염색법을 수행하여, 강도를 비교하였다.
- [192] 도 9를 참고하면, 비교결과  $H_2O_2$  1mM을 처리하여 산화적 스트레스를 부여한 군에서는 상당량의 DNA 손상이 유도된 반면, CPNE7 재조합 단백질 100ng/ml 처리군에서는 DNA 손상의 축적이 현저히 감소한 것을 확인하였다. 이를 통해 CPNE7 단백질이 과량의 활성산소를 제거함으로써 DNA 손상을 예방 또는 수선하는 것을 확인할 수 있었다.
- [193]
- [194] 실시예 10. 세포 노화 마커 효소인 **Beta-Galactosidase (B-gal)** 염색을 통한 세포 노화 정도 비교
- [195]
- [196] 상기 도 8 및 도 9에서 CPNE7 재조합 단백질이 hDPCs에서 과량의 활성산소 제거에 따라 DNA 손상을 예방 또는 수선하는 것이 확인되었으며, 이것이 세포노화에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.
- [197]
- [198] 이를 위하여 배양된 hDPCs를 6웰 플레이트에  $1 \times 10^5$  세포수가 되도록 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음,  $H_2O_2$  1mM을 처리하고 rCPNE7 100ng/ml을 처리하여 12시간 또는 24시간 후, 각각 4% 파라포름알데하이드로 세포 고정을 진행하였다.
- [199]
- [200] 다음으로, 고정된 세포에 24시간 동안 B-gal 염색을 수행하여, 세포노화 정도를 비교하였다.
- [201]
- [202] 도 10을 참고하면,  $H_2O_2$  1mM 처리 12시간 후, B-gal positive한 hDPCs 세포들이 확인되었으며, 24시간 후에 더 많이 확인되었다. 반면, CPNE7 재조합 단백질 처리군에서는 B-gal positive한 hDPCs 세포들이  $H_2O_2$  단독 처리군에 비해 현저히 감소함을 확인하였다. 이를 통하여, CPNE7 단백질의 활성산소 제거능이 DNA 손상을 예방 또는 수선함으로써 세포 노화를 억제할 수 있음을 확인하였다.
- [203]
- [204] 실시예 11. **WST-8(High Sensitive Water Soluble Tetrazolium Salt)**을 이용한 살아있는 세포의 양 측정
- [205]

- [206] 배양된 hDPCs 세포를 96웰 플레이트에 각 웰당  $3 \times 10^3$  세포수로 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음, 과산화수소( $H_2O_2$ )를 0uM(Control), 50uM, 100uM, 200uM, 500uM, 1mM, 그리고 2mM씩 24시간 동안 처리했다. 상기 WST-8 용액을 각 웰에 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 후, 마이크로 플레이트 리더기를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정 비교하였다.
- [207]
- [208] 도 11에서 확인되듯이  $H_2O_2$  농도의 증가에 따라 세포 생존율이 감소함을 확인했으며,  $H_2O_2$  500uM 이상의 농도에서는 유사한 세포 생존율이 확인되었다. 이후,  $H_2O_2$  1mM의 농도를 산화적 스트레스 부여 농도로 선택하였다.
- [209]
- [210] 실시예 12. 세포 내 활성산소 제거용 펩타이드의 합성
- [211]
- [212] 본 발명자들은 세포 내 활성산소 제거 효과를 나타내는 펩타이드(서열번호 1)를 9-플루오르닐메틸옥시카보닐(9-fluorenylmethyloxycarbonyl, Fmoc) 방법으로 합성하고, 상기 합성된 펩타이드의 아미노산을 치환하여 각 그룹의 펩타이드를 합성하였다(표 1 내지 12).
- [213] N-KYQRRKKNKY-C(서열번호 1)
- [214] 먼저, 그룹 1의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드 또는 상기 서열번호 1의 펩타이드의 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하여 합성하였다(표 1).
- [215] [표1]  
그룹 1의 펩타이드

| 서열번호 | 아미노산 서열(N-C) |
|------|--------------|
| 1    | KYQRRKKNKY   |
| 2    | KYQRRKRKNKY  |
| 3    | KYQRRRKKNKY  |
| 4    | KYQRRRRKNKY  |
| 5    | KYQRKKKNKY   |
| 6    | KYQRKRKNKY   |
| 7    | KYQRKKRNKY   |
| 8    | KYQRKRRKNKY  |

- [216]
- [217] 다음으로, 그룹 2의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하여 합성하였다(표 2).
- [218] [표2]  
그룹 2의 펩타이드

| 서열번호 | 아미노산 서열(N-C) |
|------|--------------|
| 9    | KYQRRKKSKY   |
| 10   | KYQRRKRISKY  |
| 11   | KYQRRRKISKY  |
| 12   | KYQRRRRISKY  |
| 13   | KYQRKKKISKY  |
| 14   | KYQRKRKISKY  |
| 15   | KYQRKKRISKY  |
| 16   | KYQRKRRISKY  |

[219]

[220] 다음으로, 그룹 3의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하여 합성하였다(표 3).

[221]

[표3]

그룹 3의 펩타이드

| 서열번호 | 아미노산 서열(N-C) |
|------|--------------|
| 17   | KYQRRKKNIYK  |
| 18   | KYQRRKRNIYK  |
| 19   | KYQRRRKNIYK  |
| 20   | KYQRRRRNIYK  |
| 21   | KYQRKKKNIYK  |
| 22   | KYQRKRKNIYK  |
| 23   | KYQRKKRNIYK  |
| 24   | KYQRKRRNIYK  |

[222]

[223] 다음으로, 그룹 4의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하며, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하고, 10번 아미노산을 리신으로 치환하여 합성하였다(표 4).

[224]

[225]

[표4]

그룹 4의 펩타이드

| 서열번호 | 아미노산 서열(N-C) |
|------|--------------|
| 25   | KYQRRKKSIYK  |
| 26   | KYQRRKRSIYK  |
| 27   | KYQRRRKSIYK  |

|    |            |
|----|------------|
| 28 | KYQRRRRSYK |
| 29 | KYQRKKKSYK |
| 30 | KYQRKRKSYK |
| 31 | KYQRKKRSYK |
| 32 | KYQRKRRSYK |

[226]

[227] 다음으로, 그룹 5의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 아르기닌으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하여 합성하였다(표 5).

[228]

[표5]

그룹 5의 펩타이드

| 서열번호 | 아미노산 서열(N-C) |
|------|--------------|
| 33   | KYRQRKKNKY   |
| 34   | KYRQRKRNKY   |
| 35   | KYRQRRKNKY   |
| 36   | KYRQRRRNKY   |
| 37   | KYRQKKKNKY   |
| 38   | KYRQKRKNKY   |
| 39   | KYRQKKRNKY   |
| 40   | KYRQKRRNKY   |

[229]

[230] 다음으로, 그룹 6의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 아르기닌으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하여 합성하였다(표 6).

[231]

[표6]

그룹 6의 펩타이드

| 서열번호 | 아미노산 서열(N-C) |
|------|--------------|
| 41   | KYRQRKKSKY   |
| 42   | KYRQRKRSKY   |
| 43   | KYRQRRKSKY   |
| 44   | KYRQRRRSKY   |
| 45   | KYRQKKKSKY   |
| 46   | KYRQKRKSKY   |
| 47   | KYRQKKRSKY   |
| 48   | KYRQKRRSKY   |

[232]

[233] 다음으로, 그룹 7의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 아르기닌으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하며, 10번 아미노산을 리신으로 치환하여 합성하였다(표 7).

[234]

[표7]

그룹 7의 펩타이드

| 서열번호 | 아미노산 서열(N-C) |
|------|--------------|
| 49   | KYRQRKKNYK   |
| 50   | KYRQRKRNYK   |
| 51   | KYRQRRKNYK   |
| 52   | KYRQRRRNYK   |
| 53   | KYRQKKKNYK   |
| 54   | KYRQKRKNYK   |
| 55   | KYRQKKRNYK   |
| 56   | KYRQKRRNYK   |

[235]

[236] 다음으로, 그룹 8의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 아르기닌으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하며, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하고, 10번 아미노산을 리신으로 치환하여 합성하였다(표 8).

[237]

[표8]

그룹 8의 펩타이드

| 서열번호 | 아미노산 서열(N-C) |
|------|--------------|
| 57   | KYRQRKKSYK   |
| 58   | KYRQRKRSYK   |
| 59   | KYRQRRKSYK   |
| 60   | KYRQRRRSYK   |
| 61   | KYRQKKKSYK   |
| 62   | KYRQKRKSYK   |
| 63   | KYRQKKRSYK   |
| 64   | KYRQKRRSYK   |

[238]

[239] 다음으로, 그룹 9의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 리신으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하여 합성하였다(표 9).

[240] [표9]  
그룹 9의 펩타이드

| 서열번호 | 아미노산 서열(N-C) |
|------|--------------|
| 65   | KYKQRKKNKY   |
| 66   | KYKQRKRNKY   |
| 67   | KYKQRRKNKY   |
| 68   | KYKQRRRNKY   |
| 69   | KYKQKKKNKY   |
| 70   | KYKQKRKNKY   |
| 71   | KYKQKKRNKY   |
| 72   | KYKQKRRNKY   |

[241]

[242] 다음으로, 그룹 10의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 리신으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하여 합성하였다(표 10).

[243] [표10]  
그룹 10의 펩타이드

| 서열번호 | 아미노산 서열(N-C) |
|------|--------------|
| 73   | KYKQRKKSKY   |
| 74   | KYKQRKRSKY   |
| 75   | KYKQRRKSKY   |
| 76   | KYKQRRRSKY   |
| 77   | KYKQKKKSKY   |
| 78   | KYKQKRKSKY   |
| 79   | KYKQKKRSKY   |
| 80   | KYKQKRRSKY   |

[244]

[245] 다음으로, 그룹 11의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 리신으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하며, 10번 아미노산을 리신으로 치환하여 합성하였다(표 11).

[246] [표11]

그룹 11의 펩타이드

| 서열번호 | 아미노산 서열(N-C) |
|------|--------------|
| 81   | KYKQRKKNYK   |
| 82   | KYKQRKRNYK   |
| 83   | KYKQRRKNYK   |
| 84   | KYKQRRRNYK   |
| 85   | KYKQKKKNYK   |
| 86   | KYKQKRKNYK   |
| 87   | KYKQKKRNYK   |
| 88   | KYKQKRRNYK   |

[247]

[248]     끝으로, 그룹 12의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 리신으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하며, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하고, 10번 아미노산을 리신으로 치환하여 합성하였다(표 12).

[249]

[표12]

그룹 12의 펩타이드

| 서열번호 | 아미노산 서열(N-C) |
|------|--------------|
| 89   | KYKQRKKSYK   |
| 90   | KYKQRKRSYK   |
| 91   | KYKQRRKSYK   |
| 92   | KYKQRRRSYK   |
| 93   | KYKQKKKSYK   |
| 94   | KYKQKRKSYK   |
| 95   | KYKQKKRSYK   |
| 96   | KYKQKRRSYK   |

[250]

[251]     실시예 13. CPNE7 단백질 유래 기능성 펩타이드(Selcopintide) 농도별 활성산소 제거능 확인

[252]

[253]     도 12는 세포 내 활성산소를 유도하는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하고 Selcopintide(서열번호 96)를 처리한 후 광학현미경 상에서 세포 확인 및 WST-8(High Sensitive Water Soluble Tetrazolium Salt)을 이용한 살아있는 세포의 양 측정한 결과이다.

[254]

- [255] 배양된 hDPCs 세포를 6웰 플레이트에 각 웰당  $1 \times 10^5$  세포수로 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음, 과산화수소( $H_2O_2$ )를 1mM 처리 후, Selcopintide를 1ug/ml, 10ug/ml, 100ug/ml, 500ug/ml의 농도로 24시간 동안 처리했다. 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 hDPCs를 사용하였다.
- [256]  $H_2O_2$  1mM 처리 군에서는 대조군에 비해 상아모세포의 상당한 세포사멸이 확인되었다. 반면, Selcopintide 처리 군들에서는  $H_2O_2$  단독 처리군에 비해 세포 생존율이 더 높은 것이 확인되었으며, 특히 1ug/ml과 10ug/ml 처리군에서 세포 생존율이 높은 것이 확인되었다(도 12).
- [257]
- [258] 배양된 hDPCs 세포를 96웰 플레이트에 각 웰당  $3 \times 10^3$  세포수로 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음, 과산화수소( $H_2O_2$ )를 1mM 처리 후, Selcopintide를 1ug/ml, 10ug/ml, 100ug/ml, 500ug/ml의 농도로 24시간 동안 처리했다. 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 hDPCs를 사용하였다.
- [259]
- [260] 상기 WST-8 용액을 각 웰에 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 후, 마이크로 플레이트 리더기를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정 비교하였다. 대조군에 비해  $H_2O_2$  처리군들에서 세포 생존율이 유의미하게 감소한 것이 확인되었으나,  $H_2O_2$  단독 처리 군에 비해 Selcopintide 1ug/ml과 10ug/ml 처리 군에서 유의미하게 세포 생존율이 더 높은 것이 확인되었다(도 12).
- [261]
- [262] 이를 통하여, CPNE7 단백질 유래 기능성 펩타이드(Selcopintide)의 활성산소 제거능을 확인하였다.
- [263]
- [264] **실시예 14. Cell permeant reagent 2',7' -dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, also known as H2DCFDA, DCFH-DA, and DCFH)를 이용한 활성산소 수준 비교에 따른 CPNE7 단백질 유래 기능성 펩타이드(Selcopintide) 농도별 활성산소 제거능 확인**
- [265]
- [266] 배양된 hDPCs를 35mm 공초점 현미경용 배양 접시에  $1 \times 10^5$  세포수가 되도록 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음,  $H_2O_2$  1mM을 처리하고 Selcopintide 10ug/ml를 처리하여 공초점 현미경으로 약 1시간동안 촬영하였다.
- [267]
- [268] 도 13을 참고하면,  $H_2O_2$  1mM 처리 후, 약 30분째 활성산소량이 최대수치를 보였으며, 그 후 감소하여 약 1시간째 유의성이 확인되었다. 이를 통하여, Selcopintide 활성산소 제거 가능성을 확인하였다.
- [269]
- [270]

- [271] 실시예 15. RT-PCR을 통해 hDPCs 세포에서 Selcopintide의 내인성 항산화 효소들의 mRNA 수준 확인
- [272]
- [273] 배양된 hDPCs를 60mm 배양 접시에  $4 \times 10^5$  세포수가 되도록 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음,  $H_2O_2$  1mM을 처리하고 CPNE7 재조합 단백질(100ng/ml), Selcopintide(10ug/ml)를 처리한 후, 30분 그리고 1시간 후에 Sod1, 2, 3, Catalase, Gpx7, Hmox1, 그리고 Txrmd1의 mRNA 수준을 확인하였다.
- [274] 도 14를 참고하면, CPNE7 재조합 단백질 그리고 Selcopintide 처리 30분 후, 내인성 항산화 효소 Sod1, 2, Catalase가  $H_2O_2$  단독 처리군에 비해 유의미하게 증가한 것을 확인할 수 있으며, CPNE7 재조합 단백질 그리고 Selcopintide 처리 1시간 후 내인성 항산화 효소 Sod1, Gpx7과, OH free radical의 형성을 저해하는 Hmox1과 Txrmd1이 유의미하게 증가한 것을 확인할 수 있다.
- [275] 이를 통해 Selcopintide가 CPNE7 단백질과 유사하게 내인성 항산화 효소를 조절함으로써 활성산소를 제거할 수 있음을 확인하였다.
- [276]
- [277] 실시예 16. DNA 손상마커 단백질인  $\gamma$ -H2A.X의 면역형광염색법을 통한 DNA 손상정도 비교확인
- [278]
- [279] 앞서 살펴본 바와 같이 CPNE7 재조합 단백질이 hDPCs에서 과량의 활성산소를 제거함에 따라 DNA 손상 예방 또는 수선을 통해 세포노화를 억제하는 것을 확인하였다.
- [280]
- [281] 배양된 hDPCs를 35mm 공초점 현미경용 배양 접시에  $1 \times 10^5$  세포수가 되도록 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음,  $H_2O_2$  1mM을 처리하고 Selcopintide 10ug/ml을 처리하여 24시간 후 4% 파라포름알데하이드로 세포 고정을 진행하였다.
- [282]
- [283] 고정된 세포에  $\gamma$ -H2A.X 항체를 이용한 면역형광염색법을 수행하여, 강도를 비교하였다.
- [284]
- [285] 도 15를 참고하면,  $H_2O_2$  1mM을 처리하여 산화적 스트레스를 부여한 군에서는 상당량의 DNA 손상이 유도된 반면, Selcopintide 10ug/ml 처리군에서는 DNA 손상의 축적이 현저히 감소한 것을 확인하였다.
- [286]
- [287] 이를 통해, Selcopintide가 CPNE7 단백질과 유사하게 과량의 활성산소를 제거함으로써 DNA 손상을 예방 또는 수선하는 것으로 확인되었다.
- [288]

- [289] 실시예 17. **WST-8(High Sensitive Water Soluble Tetrazolium Salt)**을 이용한 살아있는 세포의 양 측정
- [290]
- [291] 앞서 살펴본 상아모세포 연구에서 CPNE7 단백질과 Selcopintide가 활성 산소 제거능이 있음을 확인하였다. 다음으로는 상아모세포와 마찬가지로 MSC(Mesenchymal stem cell)에서 분화하는 것으로 알려져 있는 심근세포에서도 상기 펩타이드의 활성산소 제거능을 확인하였다.
- [292]
- [293] 배양된 심근세포(H9C2 cell line) 세포를 96웰 플레이트에 각 웰당  $3 \times 10^3$  세포수로 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음, 과산화수소( $H_2O_2$ )를 0uM(Control), 50uM, 100uM, 200uM, 500uM, 1mM, 그리고 2mM씩 24시간 동안 처리했다. 상기 WST-8 용액을 각 웰에 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 후, 마이크로 플레이트 리더기를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정 비교하였다.
- [294]
- [295] 도 16에서 보듯이  $H_2O_2$  농도의 증가에 따라 세포 생존율이 감소함을 확인했으며,  $H_2O_2$  500uM 이상의 농도에서는 유사한 세포 생존율이 확인되었다.
- [296]
- [297] 이후,  $H_2O_2$  1mM의 농도를 H9C2 세포에서 산화적 스트레스 부여 농도로 선택하였다.
- [298]
- [299] 실시예 17. 세포 내 활성산소를 유도하는  $H_2O_2$ 를 처리하고 Selcopintide를 처리한 후 광학현미경 상에서 세포 확인 및 **WST-8(High Sensitive Water Soluble Tetrazolium Salt)**을 이용한 살아있는 세포의 양 측정
- [300]
- [301] 배양된 H9C2 세포를 6웰 플레이트에 각 웰당  $1 \times 10^5$  세포수로 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음, 과산화수소( $H_2O_2$ )를 1mM 처리 후, Selcopintide를 1ug/ml, 10ug/ml, 100ug/ml, 500ug/ml의 농도로 24시간 동안 처리했다. 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 H9C2 세포를 사용하였다.
- [302]  $H_2O_2$  1mM 처리 군에서는 대조군에 비해 심근세포의 상당한 세포사멸이 확인되었다. 반면, Selcopintide 처리 군들에서는  $H_2O_2$  단독 처리군에 비해 세포 생존율이 더 높은 것이 확인되었다(도 17).
- [303]
- [304] 배양된 H9C2 세포를 96웰 플레이트에 각 웰당  $3 \times 10^3$  세포수로 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음, 과산화수소( $H_2O_2$ )를 1mM 처리 후, Selcopintide를 1ug/ml, 10ug/ml, 100ug/ml, 500ug/ml의 농도로 24시간 동안 처리했다. 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 H9C2 세포를 사용하였다.
- [305]

- [306] 상기 WST-8 용액을 각 웰에 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 후, 마이크로 플레이트 리더기를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정 비교하였다.
- [307]
- [308] 대조군에 비해  $H_2O_2$  처리군들에서 세포 생존율이 유의미하게 감소한 것이 확인되었으나,  $H_2O_2$  단독 처리 군에 비해 Selcopintide 1ug/ml, 10ug/ml, 100ug/ml, 그리고 500ug/ml 처리 군에서 유의미하게 세포 생존율이 더 높은 것이 확인되었다(도 17).
- [309]
- [310] 이를 통해, CPNE7 단백질 유래 기능성 펩타이드(Selcopintide)가 심근세포에서도 활성산소 제거능이 있음을 확인하였다.
- [311]
- [312] 실시예 18. 세포 노화 마커 효소인 **Beta-Galactosidase (B-gal)** 염색을 통한 세포 노화 정도 비교
- [313]
- [314] 상기 도 17에서 Selcopintide가 H9C2 세포에서 과량의 활성산소 제거에 효능이 있는 것이 확인되었으며, 이것이 세포노화에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.
- [315]
- [316] 배양된 H9C2를 6웰 플레이트에  $1 \times 10^5$  세포수가 되도록 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음,  $H_2O_2$  1mM을 처리하고 Selcopintide 1ug/ml, 10ug/ml, 100ug/ml, 그리고 500ug/ml을 처리하고 24시간 후, 각각 4% 파라포름알데하이드로 세포 고정을 진행하였다.
- [317]
- [318] 다음으로, 고정된 세포에 24시간 동안 B-gal 염색을 수행하여, 세포노화 정도를 비교하였다.
- [319]
- [320]  $H_2O_2$  1mM 처리 24시간 후, B-gal positive한 다수의 H9C2 세포들이 확인되었다. 반면, Selcopintide 처리군들에서는 B-gal positive한 H9C2 세포들이  $H_2O_2$  단독 처리군에 비해 현저히 감소함을 확인하였다.
- [321]
- [322] 이를 통하여, Selcopintide의 활성산소 제거능이 심근세포 노화를 억제할 수 있음을 나타내는 것으로 분석되었다.
- [323]
- [324] 실시예 19. WST-8(High Sensitive Water Soluble Tetrazolium Salt)을 이용한 살아있는 세포의 양 측정
- [325]
- [326] 앞선 상아모세포와 심근세포 연구에서 Selcopintide가 활성산소 제거능이 있음을 확인하였다. 다음으로는 상아모세포, 심근세포와 마찬가지로

MSC(Mesenchymal stem cell)에서 분화하는 것으로 알려져 있는 진피 섬유아세포에서도 상기 펩타이드의 활성산소 제거능이 있는지 확인해보고자 하였다.

[327]

[328] 배양된 진피 섬유아세포(CCD986SK) 세포를 96웰 플레이트에 각 웰당  $3 \times 10^3$  세포수로 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음, 과산화수소( $H_2O_2$ )를 0uM(Control), 50uM, 100uM, 200uM, 500uM, 1mM, 그리고 2mM씩 24시간 동안 처리했다. 상기 WST-8 용액을 각 웰에 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 후, 마이크로 플레이트 리더기를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정 비교하였다.

[329]

[330] 도 19에서 보듯이  $H_2O_2$ 농도의 증가에 따라 세포 생존율이 감소함을 확인했으며,  $H_2O_2$  500uM 이상의 농도에서는 유사한 세포 생존율이 확인되었다.

[331]

[332] 이후,  $H_2O_2$  1mM의 농도를 CCD986SK 세포에서 산화적 스트레스 부여 농도로 선택하였다.

[333]

[334] 실시예 20. 세포 내 활성산소를 유도하는  $H_2O_2$ 를 처리하고 Selcopintide를 처리한 후 광학현미경 상에서 세포 확인 및 WST-8(High Sensitive Water Soluble Tetrazolium Salt)을 이용한 살아있는 세포의 양 측정

[335]

[336] 배양된 CCD986SK 세포를 6웰 플레이트에 각 웰당  $1 \times 10^5$  세포수로 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음, 과산화수소( $H_2O_2$ )를 1mM 처리 후, Selcopintide를 1ug/ml, 10ug/ml, 100ug/ml, 500ug/ml의 농도로 24시간 동안 처리했다. 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 CCD986SK 세포를 사용하였다.

[337]

[338]  $H_2O_2$  1mM 처리 군에서는 대조군에 비해 진피 섬유아세포의 상당한 세포사멸이 확인되었다. 반면, Selcopintide 처리 군들에서는  $H_2O_2$  단독 처리군에 비해 세포 생존율이 더 높은 것이 확인되었으며, 특히 Selcopintide 1ug/ml과 10ug/ml에서 유의성이 가장 높았다(도 20).

[339]

[340] 배양된 CCD986SK 세포를 96웰 플레이트에 각 웰당  $3 \times 10^3$  세포수로 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음, 과산화수소( $H_2O_2$ )를 1mM 처리 후, Selcopintide를 1ug/ml, 10ug/ml, 100ug/ml, 500ug/ml의 농도로 24시간 동안 처리했다. 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 CCD986SK 세포를 사용하였다.

[341]

상기 WST-8 용액을 각 웰에 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 후, 마이크로 플레이트 리더기를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정 비교하였다.

[342]

대조군에 비해  $H_2O_2$  처리군들에서 세포 생존율이 유의미하게 감소한 것이 확인되었으나,  $H_2O_2$  단독 처리 군에 비해 Selcopintide 1ug/ml, 10ug/ml, 100ug/ml, 그리

고 500ug/ml 처리 군에서 유의미하게 세포 생존율이 더 높은 것이 확인되었다(도 20).

[343] 따라서, CPNE7 단백질 유래 기능성 펩타이드(Selcopintide)가 진피 섬유아세포에서도 활성산소 제거능이 있음을 확인하였다.

[344]

[345] 실시예 21. 세포 노화 마커 효소인 **Beta-Galactosidase (B-gal)** 염색을 통한 세포 노화 정도 비교

[346]

[347] 상기 도 20에서 확인한 바와 같이 Selcopintide가 CCD986SK 세포에서 과량의 활성산소 제거에 효능이 있는 것이 확인되었으며, 이것이 세포노화에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

[348]

[349] 배양된 CCD986SK 세포를 6웰 플레이트에  $1 \times 10^5$  세포수가 되도록 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음,  $H_2O_2$  1mM을 처리하고 Selcopintide 1ug/ml, 10ug/ml, 100ug/ml, 그리고 500ug/ml을 처리하고 24시간 후, 각각 4% 파라포름알데하이드로 세포 고정을 진행하였다.

[350]

[351] 고정된 세포에 24시간 동안 B-gal 염색을 수행하여, 세포노화 정도를 비교하였다.

[352]

[353]  $H_2O_2$  1mM 처리 24시간 후, B-gal positive한 다수의 CCD986SK 세포들이 확인되었다. 반면, Selcopintide 처리군들에서는 B-gal positive한 CCD986SK 세포들이  $H_2O_2$  단독 처리군에 비해 현저히 감소함을 확인하였다.

[354]

[355] 이를 통하여 Selcopintide의 활성산소 제거능이 진피 섬유아세포의 노화를 억제할 수 있음을 나타내는 것으로 분석되었다.

[356]

[357] 앞서 살펴본 실시예를 통하여 CPNE7 단백질 및 CPNE7 단백질 유래 기능성 펩타이드(Selcopintide)가 과량의 활성산소( $H_2O_2$ )로 인하여 발생하는 치수질환, 심근경색, 피부염증 등을 예방 또는 치료하며, 이를 통하여 개체의 노화를 방지하는데 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[358]

[359] 본 명세서와 도면에는 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 개시하였으며, 비록 특정 용어들이 사용되었으나, 이는 단지 본 발명의 기술 내용을 쉽게 설명하고 발명의 이해를 돕기 위한 일반적인 의미에서 사용된 것이지, 본 발명의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다. 여기에 개시된 실시예 외에도 본 발명의 기술

적 사상에 바탕을 둔 다른 변형예들이 실시 가능하다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 것이다.

## 청구범위

- [청구항 1] CPNE7 단백질 또는 서열번호 1 내지 96 중 어느 하나의 서열의 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 포함하는 세포 내 활성산소 제거용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,  
상기 세포는 치수세포, 심근세포 또는 진피 섬유아세포인 것을 특징으로 하는 세포 내 활성산소 제거용 조성물.
- [청구항 3] 서열번호 1 내지 96 중 어느 하나의 서열의 아미노산으로 이루어진 세포 내 활성산소 제거를 위한 펩타이드.
- [청구항 4] 제3항의 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드.
- [청구항 5] 제4항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터.
- [청구항 6] 제3항의 펩타이드를 포함하는 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,  
상기 약학 조성물은 상기 펩타이드가 반복되어 연결된 폴리펩타이드를 포함하는 것인, 조성물.
- [청구항 8] 제6항에 있어서,  
상기 약학 조성물은 상기 펩타이드에 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 예방 또는 치료효과를 나타내는 약물이 결합된 복합체를 포함하는 것인, 조성물.
- [청구항 9] 제6항에 있어서,  
상기 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것인, 조성물.
- [청구항 10] 제6항에 있어서,  
상기 심장질환은 관상동맥질환(Coronary artery disease, CAD), 심근경색증(Myocardial infarction, MI), 심부전(Heart failure) 또는 심방세동(Atrial fibrillation, AF)인 것인, 조성물.
- [청구항 11] 제6항에 있어서,  
상기 피부질환은 광피부염(Photodermatitis) 또는 아토피 피부염(Atopic dermatitis)인 것인, 조성물.
- [청구항 12] 제3항의 펩타이드를 포함하는 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 예방 또는 개선용 의약품 조성물.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,  
상기 의약품 조성물은 연고제, 패치제, 파우더제, 겔화제, 스프레이제, 정제 또는 스프레이제로 제공되는 것인, 조성물.

- [청구항 14] 제3항의 펩타이드를 포함하는 심근세포의 산화스트레스로 인한 심장질환 또는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품 조성물.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,  
상기 건강기능성 식품 조성물은 음료, 차류, 향신료, 껌류 또는 과자류의 제조에 사용되는 것인, 조성물.