

(19)대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

(11) 공개번호

10-2006-0115052

(43) 공개일자

2006년11월08일

(21) 출원번호 10-2005-0037342

(22) 출원일자 2005년05월04일

(71) 출원인 부경대학교 산학협력단
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자 박남규
부산광역시 남구 대연3동 599-1번지
김은정
부산광역시 부산진구 가야 2동 514-5번지
김찬희
부산광역시 부산진구 가야 2동 514-5번지
고혜진
부산광역시 영도구 남항동 2가 224번지
김인혜
부산광역시 해운대구 반송 3동 250-2774번지
홍용기
부산광역시 남구 대연 3동 599-1번지
윤호동
경남 통영시 미수2동 231번지 정원파크 507호
박희연
부산시 해운대구 송정동 태림그린빌 702호
장영채
경북 경산시 하양읍 금락 1리 330번지

(74) 대리인 이처영

심사청구 : 있음

(54) 평활근 이완활성을 지닌 신경성 펩타이드

요약

본 발명은 극피동물로부터 분리한 이완활성을 가진 새로운 신경성 펩타이드에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 평활근 이완활성을 나타내는 새로운 신경성 펩타이드에 관한 것이다.

본 발명의 펩타이드는 기존에 알려진 이완활성 펩타이드인 S1 및 S2보다 강한 이완활성을 나타내면서도, 적은 수의 아미노산으로 구성되어 대량생산이 용이하여 근육이완제로 유용할 것으로 기대된다.

대표도

도 7

색인어

극피동물, 불가사리 (*Asterina pectinifera*), 신경성펩타이드, 이완활성

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 Sep-Pak C18 칼럼을 사용하여 별불가사리로부터 분리된 4가지 분획의 불가사리 DRM (dorsal retractor muscle)에 대한 이완활성 측정 실험결과를 나타낸 것이다.

도 2는 CM52 양이온 교환수지 크로마토그램과 불가사리 DRM에 대한 이완활성을 나타낸 것이다 (■는 활성분획을 나타냄).

도 3은 도 2의 활성분획의 역상 HPLC 크로마토그램과 불가사리 DRM에 대한 이완활성을 나타낸 것이다 (■는 활성분획을 나타냄).

도 4는 도 3의 활성분획의 음이온 교환수지 크로마토그램과 불가사리 DRM에 대한 이완활성을 나타낸 것이다 (■는 활성분획을 나타냄).

도 5는 도 4의 활성 분획의 역상 HPLC 크로마토그램과 불가사리 DRM에 대한 이완활성을 나타낸 것이다 (■는 활성분획을 나타냄).

도 6은 도 5의 활성 분획의 역상 HPLC 크로마토그램과 불가사리 DRM에 대한 이완활성을 나타낸 것이다 (■는 활성분획을 나타냄).

도 7은 도 6의 활성 분획의 마지막 정제단계 (A), 불가사리 DRM에 대한 이완활성(B) 및 활성 피크의 MALDI-TOF Mass 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 Asteripectin (●), S1 (○), S2 (▼), FLRF(▽) 및 FMRFa (□)의 불가사리 DRM에 대한 농도-의존적 이완활성 측정결과를 나타낸 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 극피동물로부터 분리한 이완활성을 가진 새로운 신경성 펩타이드에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 평활근 이완활성을 나타내는 새로운 신경성 펩타이드에 관한 것이다.

신경성 펩타이드의 기능에 있어 평활근 수축 및 이완운동 조절은 미오신(myosin)과 액틴(actin)의 결합에 의해 조절된다. Myosin light-chain kinase가 myosin regulatory light chain을 인산화시켜 미오신이 액틴과 결합되도록 하여 수축작용을 나타내는 반면, myosin과 actin의 결합이 방해받게 되면 이완작용이 나타나게 된다. 구조적으로 가로무늬를 가지고 있지 않는 포유류 평활근은 내장의 여러 장기 및 순환기 계통의 관벽을 구성하며, 내용물의 수송, 분해, 배출 및 보존과 유지등의 기능에 관여하는 것으로 알려져 있다.

이러한 평활근은 포유동물에서 뿐만 아니라 진화상 하등한 연체동물에서도 횡문이 없고 filaments와 dense body를 포함하고 있는 catch muscle fiber로서 존재함이 보고된 바 있다. 이러한 이유에서 포유동물뿐만 아니라 연체동물을 이용한 신경성 펩타이드의 평활근 조절에 관한 다양한 연구결과가 진행되고 있으며, 주로 연체동물의 catch relaxing peptide를 중

심으로 이루어지고 있다. 대표적으로 진주담치의 pedal ganglia로부터 아세틸콜린 자극에 의한 anterior byssus retractor muscle의 catch tension에 대하여 이완활성을 가진 FMRFamide의 분리가 보고되었고, ABRM으로부터 전기자극에 의한 ABRM의 수축력을 증가시키는 small cardioactive peptide 및 *Mytilus* inhibitory peptide가 정제되었다.

그러나, 연체동물보다 척추동물과 진화상 더 밀접한 종으로 인식되고 있는 극피동물의 근육생리는 연체동물의 근육계보다 척추동물의 근육계와 유사할 것으로 생각되어지지만, 이들을 이용한 연구는 미비한 실정이다. 최근 극피동물의 추출물을 사용하여 *in vitro*상에서 이완을 유발하는 물질들이 확인되었으나, 극피동물에 있어 신경전달물질에 관한 연구는 아세틸콜린, 카테콜아민(catecholamine)과 가바(GABA)와 같은 기본적인 신경전달물질들의 활성 연구에 제한되어 있다. 뿐만 아니라, 본 발명에서 실험동물로 사용한 별불가사리는 대부분이 폐기처분되고 있으며, 생리활성물질에 대한 활성효과의 검증이나 분리, 정제 및 구조 활성과의 연관성 연구는 극히 제한되어 있었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에, 본 발명자들은 해양생물인 별불가사리를 대상으로 이완활성을 지니는 새로운 신경성 펩타이드를 분리하고자 예의 노력한 결과, 극피동물인 별불가사리(*Asterina pectinifera*)로부터 메탄올-산 추출물을 얻고, 상기의 추출물을 CM-셀룰로오스 컬럼 크로마토그래피로 조정제한 후, HPLC 시스템을 거쳐 이완활성을 갖는 새로운 신경성 펩타이드를 분리하고 본 발명을 완성하게 되었다.

결국, 본 발명의 주된 목적은 평활근 이완활성을 지니는 새로운 신경성 펩타이드를 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 신경성 펩타이드를 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함하는 핵산을 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 평활근 이완활성을 지닌 신경성 펩타이드를 제공한다.

본 발명에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있고, C-말단이 카르복실화 또는 아마이드화되거나, N-말단의 아민기가 알킬 또는 아세틸기로 치환된 것임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 아미노산 서열은 L-타입 또는 D-타입인 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명은 또한, 서열번호 2의 펩타이드를 코딩하는 DNA 또는 RNA를 포함하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터를 박테리아, 효모 또는 곰팡이에 도입하여 수득되는 형질전환 미생물을 제공한다.

본 발명은 또한, 상기 형질전환 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 평활근 이완활성을 지닌 신경성 펩타이드의 제조방법을 제공한다.

본 발명은 또한, 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 기관지 천식, 고혈압, 이뇨 및 발기부전으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 증상 개선용 의약조성물을 제공한다.

본 발명에 있어서, 서열번호 1에 기재된 신경성 펩타이드는 극피동물인 별불가사리(*Asterina pectinifera*)로부터 메탄올-산 추출물을 얻고, 상기의 추출물을 CM 52 양이온 교환 수지 컬럼 크로마토 그래피로 조정제한 후, HPLC 시스템을 거쳐 침으로써 분리하였다.

상기 분리된 펩타이드는 이완활성을 갖는 새로운 신경성 펩타이드로 상기의 HPLC 시스템을 거친 후, 'MALDI-TOF mass spectrometer (Voyager-DETM STR spectrometer, Perseptive Biosystems, U.S.A)' 및 'automated protein sequencer PPSQ-21A (Shimadzu, Ltd., Japan)'를 통해 아미노산 서열을 결정하였다 (서열번호 1).

서열번호 1의 펩타이드를 가지고 별불가사리의 DRM에 대한 이완활성을 측정한 결과, 기존에 알려진 S1보다 약 10^3 배, S2보다 약 10^4 배 높은 활성을 나타내었다.

본 발명의 신경성 펩타이드는 C-말단이 카르복실화 또는 아민화된 것이 바람직하며, N-말단의 아민기가 아세틸기 또는 알킬기로 치환된 것이 바람직하다.

본 발명의 펩타이드를 구성하는 아미노산은 L-타입의 아미노산 및/또는 D-타입의 아미노산 어느 것이든 무방하게 사용할 수 있다.

본 발명의 펩타이드가 가진 평활근 이완활성은 근육의 수축과 이완에 관련되는 기관지 천식, 고혈압, 이뇨 및 발기부전 등의 증상 완화에 사용될 수 있다.

본 발명의 신경성 펩타이드들은 별불가사리로부터 분리 및 정제하여 얻을 수 있을 뿐만 아니라 펩타이드 합성을 이용하여 화학적 방법에 의하여 제조될 수도 있으며, 펩타이드를 코딩하는 DNA 또는 RNA를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 미생물을 배양하여 제조될 수도 있다.

본 발명에서, "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.

라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환되어야 한다. 본 발명에 있어서, 선호되는 숙주세포는 원핵세포이다. 적합한 원핵 숙주세포는 *E. coli* DH5a, *E. coli* JM101, *E. coli* K12, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* XL-1Blue (Stratagene), *E. coli* B, *E. coli* B21 등을 포함한다. 그러나 FMB101, NM522, NM538 및 NM539와 같은 *E. coli* 균주 및 다른 원핵생물의 종(species) 및 속(genera)등이 또한 사용될 수 있다. 전술한 *E. coli*에 덧붙여, 아그로박테리움 A4와 같은 아그로박테리움 속 균주, 바실루스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실리(*bacilli*), 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 세라티아 마르게센스(*Serratia marcescens*)와 같은 또 다른 장내세균 및 다양한 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 균주가 숙주세포로서 이용될 수 있다.

원핵세포의 형질전환은 Sambrook et al., supra의 1.82 섹션에 기술된 칼슘 클로라이드 방법을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다. 선택적으로, 전기천공법(electroporation)(Neumann et al., EMBO J., 1:841, 1982) 또한 이러한 세포들의 형질전환에 사용될 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 구체적으로 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 오로지 본 발명을 구체적으로 설명하는 것으로 이들 실시예에 의해 본 발명을 한정하는 것은 아니다.

실시예 1: 불가사리로부터 이완활성 펩타이드 분획의 추출

본 실시예에서는 사용한 불가사리는 별불가사리(*Asterina pectinifera*)로서, 2002년 8월에 경북 포항 호미곶에서 채집하였으며, 체장 8~15cm 크기 불가사리 450마리를 채집한 후, 즉시 추출에 사용하였다.

상기 살아있는 불가사리 450마리를 70% 메탄올 용액에 넣어 65℃ 에서 5분간 증탕하였다. 이후 5% 초산을 넣어 조직을 파쇄한 후, 원심분리(4℃, 40분, 10,000 x g)하여 상층액을 농축시킨 다음, 시료:에탄올의 비율이 2:9 (v/v)가 되도록 에탄올을 첨가하여 -20℃에서 냉동보관한 후 원심분리(4℃, 40분, 10,000 x g)하여 침전물을 제거하였다. 분리된 상층액은 다시 농축하여 시료:에탄올의 비율이 1:10 (v/v)이 되도록 에탄올을 첨가한 후, 원심분리(4℃, 40분, 10,000 x g)하여 한번 더 침전물을 제거하였다. 이 단계를 거친 상층액에 에탄올 및 NaCl을 시료(1 L):에탄올(8 L):NaCl(11 g)의 비율로 첨가한 후, 원심분리(4℃, 40분, 10,000 x g)하여 얻어진 상층액을 농축한 후, 총 농도가 0.1 N HCl이 되도록 1 N HCl을 첨가한 후 원심분리(4℃, 50분, 20,000 x g)를 하였다.

상기 상층액은 부분적으로 물질을 분리하기 위해 Sep-Pak C₁₈ cartridge (20 mL, Waters)에 주입하여 0.1% TFA가 포함된 H₂O (D.W.), 10% methanol (retained materials; RM10) 및 60% methanol (RM60)과 100% methanol (RM100)로 물질들을 각각 용출시켜 각각 DW 분획, RM10 분획, RM 60 분획, RM 100 분획을 얻었다.

실시에 2. 별불가사리 분획의 별불가사리 DRM에 대한 이완활성 측정

실시에 1에서 추출된 RM10, RM60, RM 100 분획의 이완활성은 별불가사리 (*Asterina pectinifera*)의 DRM(dorsal retractor muscle)을 이용하였다.

별불가사리 DRM의 표본을 만들기 위해 별불가사리의 eye spot을 제거한 후 5개 팔을 따라 중앙을 가로지르는 DRM을 메스로 분리한 후, 20 mm정도의 단편으로 절단하였다. 준비된 각 단편들은 반응조 내의 지지대에 고정시키고, 위쪽은 아이소메트릭 트랜스듀서(isometric transducer)에 연결하였다. 연결된 조직에 1 g의 장력을 준 뒤, 실온에서 15분 간격으로 인공해수(55 mM Mg^{2+} artificial sea water)를 교체하며 평형화시켰다. 이후, 10^{-6} M 아세틸콜린을 투여하여 활성화시켰고, 15분후 10^{-6} M의 아세틸콜린을 투여하여 근육을 수축시킨 후, 각 HPLC 정제단계에서 얻은 상기 분획들을 투여하였다. 모든 과정은 인공 해수(NaCl 445mM, KCl 10mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 10mM, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 55mM, Glucose 10mM 및 Tris-HCl(pH 7.8) 20mM) 하에서 수행하였다. 그 결과, RM60 분액에서 평활근 이완활성을 확인할 수 있었다 (도 1).

실시에 3. RM60 분획으로부터 신경성 펩타이드의 분리 및 정제

실시에 2에서 활성이 확인된 별불가사리 추출물 RM60 분획을 서로 다른 칼럼을 사용하는 연속적인 7단계의 HPLC를 통하여 분리하였다. 각각의 HPLC 정제를 통해 얻어진 분획들은 실시에 2와 동일한 방법으로 불가사리 DRM에 대해 이완활성을 측정하였으며, 활성을 나타낸 분획들을 농축하여 다음단계의 HPLC 정제를 위하여 사용하였다.

① CM52 칼럼: CM52(2.5×30 cm) 칼럼을 이용하여 농도구배, 20 mM $\rightarrow$ 1.5 M 암모늄 아세테이트(ammonium acetate) (pH 5.0, 6시간); 유속, 2.75 mL/min의 조건으로 분리하였다. 이완활성은 머무름 시간 50분 근처의 분획에서 확인되었다 (도 2).

② C₁₈ 칼럼: 상기 농축된 활성 분액을 역상 HPLC 컬럼(Vydac protein & peptide C₁₈, 9.2×250 mm)에 적용하여 A용매로 0.1% TFA 수용액(pH 2.2)과 B용매로서 0.1% TFA를 포함한 100% 아세토나이트릴(actonitrile) (pH 2.2)을 사용하여 0 $\rightarrow$ 100 %의 B 용매로 농도경사를 주고, 유속은 3.0 mL/min으로 40℃에서 분리하였다. 이완활성은 머무름 시간 50분 근처의 분획에서 확인되었다 (도 3).

③ 음이온 교환 칼럼: TSK-gel DEAE-5PW (7.5×75 mm) 컬럼을 사용하여 정제하였으며, A 용매, 10 mM Tris-HCl buffer(pH 9.2); B 용매, 1.0 M NaCl을 포함하는 10 mM의 Tris-HCl buffer(pH 9.2); 농도구배, 0 $\rightarrow$ 0.5 M B용매 (100 min), 유속; 0.5 mL/min, 온도; 40 ℃; 분획 량(fraction volume), 1.0 mL의 조건으로 수행하였다. 이완활성은 머무름 시간 25분 근처의 분획에서 확인되었다 (도 4).

④ C₁₈ 칼럼: Capcellpak C₁₈ (4.6×250 mm) 컬럼을 이용하여 분리하였으며, HPLC는 농도구배, 15 $\rightarrow$ 30 % B (60분); 유속, 1.0 mL/min; 온도, 40 ℃의 조건으로 수행하였다. 이완활성은 머무름 시간 35분 근처의 분획에서 확인되었다 (도 5).

⑤ C₁₈ 칼럼: 전 단계의 역상 컬럼과 성질이 다른 Hypersil-BDS C₁₈ (2×125 mm)을 이용하였다. 이때, B용매의 농도구배, 15 $\rightarrow$ 30%로 60분 동안 0.5 mL/min의 유속으로 40℃에서 분리하였으며, 20% 아세토나이트릴(acetonitrile)에 해당되는 부분에서 활성을 보였다 (도 6).

⑥ Size exclusion column: 분자량 크기에 따른 분리를 행하기 위하여 30% 아세토나이트릴 조건에서 Superdex Peptide HR 10/30 (10×300 mm) 컬럼을 이용하여 HPLC를 행하였다. 이때, 유속은 0.5 mL/min으로 실온에서 분리하였으며, 24.034분의 머무름 시간을 가졌다. 이 결과로 분자량이 약 1000~3000 Da 사이임을 알 수 있었다.

⑦ Hypersil-BDS C₁₈ 컬럼: 최종적으로 20% 아세토나이트릴의 아이소크래틱(isocratic) 조건에서 Hypersil-BDS C₁₈ (2×125 mm) 컬럼을 이용하여 정제하였다. 그 결과, 16.1분의 머무름시간을 갖는 하나의 순수한 물질을 최종 정제하였으며, 이 물질은 불가사리(*Asterina pectinifera*) 추출물로부터 정제되었으므로 Asteripectin이라 명명하였다 (도 7).

실시에 4: 천연 펩타이드의 분자량 측정 및 아미노산 서열 결정

실시에 3에서 최종적으로 정제된 불가사리 DRM에 대하여 이완활성을 가지는 펩타이드 Asteripectin의 분자량을 MALDI-TOF mass spectrometer (Voyager-DETM STR spectrometer, Perseptive Biosystems, U.S.A)를 사용하여 측정하였다. Asteripectin의 아미노산 서열을 결정하기 위해서 automated protein sequencer PPSQ-21A (Shimadzu, Ltd., Japan)를 사용하여 Edman 분해법으로 분석하였다.

최종 정제한 펩타이드의 분자량은 1601.7 Da이었고 (도 7), 아미노산 서열은 Phe-Gly-Lys-Gly-Gly-Ala-Tyr-Asp-Pro-Leu-Ser-Ala-Gly-Phe-Thr-Asp로 구성된 헥사데카 펩타이드(hexadecapeptide)로 확인되었다 (표 1).

【표 1】
Asteripectin의 아미노산 서열 및 Asteripectin의 질량조사

사이클수	Phenylthiohydantion amino acid	수율 (pmol)	m/z
1	Phe	452	1601.72
2	Gly	298	
3	Lys	363	
4	Gly	258	
5	Gly	241	
6	Ala	268	
7	Tyr	235	
8	Asp	143	
9	Pro	152	
10	Leu	147	
11	Ser	26	
12	Ala	80	
13	Gly	64	
14	Phe	80	
15	Tyr	23	
16	Asp	9	

상기 Asteripectin의 아미노산 서열의 유사성을 조사한 결과, 상기 펩타이드 서열은 기존에 알려진 신경성 펩타이드와 유사성을 갖지 않는 새로운 신경성 펩타이드로 확인되었다.

【표 2】
극피동물로부터 정제된 신경성 펩타이드

Peptide name (species)	Sequence	References
S1 (Asteroidae)	1 5 Gly-Phe-Asn-Ser-Ala-Leu-Met-Phe-amide(서열번호 3)	Elphick <i>et al.</i> , 1991b,c
S2 (Asteroidae)	1 5 10 Ser-Gly-Pro-Tyr-Ser-Phe-Asn-Ser-Gly-Leu-Tyr-Phe-amide(서열번호 4)	Elphick <i>et al.</i> , 1991b,c
GFSKLYFa (Holothuroidea)	1 5 Gly-Phe-Ser-Lys-Leu-Tyr-Phe-amide(서열번호 5)	Diaz Miranda <i>et al.</i> , 1992
SGTSVLYFa (Holothuroidea)	1 5 Ser-Gly-Tyr-Ser-Val-Leu-Tyr-Phe-amide(서열번호 6)	Diaz Miranda <i>et al.</i> , 1992
GYSPFMFa (Holothuroidea)	1 5 Ser-Gly-Tyr-Ser-Pro-Phe-Met-Phe-amide(서열번호 7)	Ohtani <i>et al.</i> , 1999
FKSPFMFa (Holothuroidea)	1 5 Phe-Lys-Ser-Pro-Phe-Met-Phe-amide(서열번호 8)	Ohtani <i>et al.</i> , 1999

상기 Asteripectin의 펩타이드 서열과 알려진 극피동물유래의 신경성 펩타이드와 유사성을 비교한 결과 Asteripectin은 기존에 알려진 펩타이드와는 전혀 다른 새로운 신경성 펩타이드로 확인되었다.

실시예 5: 펩타이드의 합성 및 정제

Asteripectin의 펩타이드 서열과 동일한 펩타이드 서열을 가지는 펩타이드를 합성하여 동일한 이완활성을 가지는지를 확인하였다.

펩타이드의 합성

아미노산 서열분석과 분자량 분석결과에 따라 정제한 펩타이드를 Fmoc-법을 이용한 고상법으로 합성하였다 (Park, N.G. *et al.*, *I. Bull. Korean Chem. Soc.* 18:50, 1997.). SF- I 은 Fmoc-Asp (OBut)-resin (0.67 mmole/g)을 0.05 mmole 스케일(scale)로 사용하여 DMF로 팽윤(swelling) 시킨 후, 20% piperidine/DMF를 이용하여 수지로부터 Fmoc-보호기를 절단하였다. DIPCI/HOBT법을 이용하여 결합시키고자 하는 아미노산의 카르복실기를 에스테르 형태로 활성화시켜, 수지에 도입을 하여 반응이 완료된 수지는 DMF로 세정하고, 다시 20 % piperidine/DMF로 첫 번째로 도입된 아미노산의 Fmoc-기를 절단하였다. 반응 후, DMF로 세정하고 두 번째 아미노산을 DIPCI/HOBT법으로 결합을 시켰다. 이와 같은 과정을 순차적으로 반복하여, 완전한 펩타이드 사슬을 수지에 성장시켰다.

펩타이드-수지의 절단과 탈보호

합성 펩타이드에 연결되어 있는 수지와 측쇄(side chain)의 보호기를 제거하기 위해서 절단시약[TFA (4 mL) : *m*-cresol (0.4 mL) : thioanisole (0.8 mL) : EDT (0.5 mL)]을 사용하여 실온에서 90분간 반응을 시켰다. 반응이 완료된 수지를 여과한 다음 펩타이드 용액을 진공농축하였다. 계속해서 농축액에 차가운 에테르를 첨가하여 펩타이드를 결정화 및 절단시약을 제거 시킨 후, 5 % 초산 용액으로 녹여 농축 후 동결건조 시켰다.

합성 펩타이드의 정제

수지로부터 미정제(crude) 펩타이드들은 Vydac 218TP510 Protein & peptide C₁₈ (9.2 × 250 mm)을 사용하여 0.1% TFA가 포함된 아세트나이트릴을 18~25%로 농도 구배를 주어 15분동안 유속 3.0 mL/min의 조건으로 분리하였다. 순수한 합성 펩타이드는 동일한 컬럼에서 22% 아세트나이트릴의 아이소크래틱한 용출방법으로 얻었다.

천연물과 합성물의 비교

정제한 천연물과 합성물의 동일성은 분자량 측정과 역상(reverse-phase) HPLC 컬럼을 이용한 머무름시간(retention time, RT)을 비교함으로써 확인하였다. 정제한 합성 펩타이드는 Vydac protein & peptide C₁₈ (4.6 × 250 mm) 컬럼을 사용하여 22% 아세트나이트릴의 아이소크래틱 조건으로 비교하였다. 그 결과 천연물 펩타이드와 합성 펩타이드는 같은 시간에 용출되었다. 따라서, 두 펩타이드가 같은 화학적 성분을 가진다고 할 수 있었다.

실시예 5: Asteripectin의 별불가사리 DRM에 대한 이완활성 측정

별불가사리로부터 정제된 Asteripectin의 이완활성을 실시예 2의 방법과 동일한 방법으로 별불가사리의 DRM을 이용하여 측정하였으며, 비교 물질로는 기존에 알려져 있는 극피동물유래의 S1과 S2 및 연체동물 유래의 FMRFamide와 FLMFamide를 사용하였다. 이완활성은 10⁻⁶ M 아세틸콜린의 최대수축에 대한 상대적 이완 %로서 나타냈다. 한편, 반응의 크기는 ED₅₀ (최고 이완의 50 %를 나타낼 때의 농도) 및 E_{max} (10⁻⁵ M에서의 이완 %)로서 비교하였다. ED₅₀ 값은 least square method로 계산하였으며, 통계적 처리는 student's t-test로서 했다. 모든 반응 값은 means ± s.e.로 표시하였다.

그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, Asteripectin은 10⁻¹⁰ M에서 0.59%의 역치값을 가지고 있었으며, 10⁻⁵ M에서 120.0 ± 7.0%의 최대 이완활성을 나타내었다. 또한, S1의 경우 10⁻¹⁰ M에서 2.4%의 역치값을 나타냈으나, 10⁻⁵ M에서 45.2 ±

2.4%의 이완활성을 나타내었다. 또한, S2는 10^{-7} M에서 2.6%의 역치값을 나타내었으며, 10^{-5} M에서 15%정도의 이완활성을 보여 S1보다도 낮은 활성을 가졌다. 또한, FLRFamide와 FMRFamide는 거의 활성을 나타내지 못했다. 이들 신경성 펩타이드의 활성의 크기는 Asteripectin》S1>S2>FLRFa>FMRFa순이었다.

실시예 6: 펩타이드의 활성부위의 확인

Asteripectin을 구성하는 16개의 아미노산 중 이완활성을 나타내는 가장 작은 단위를 알아보기 위하여, 실시예 5와 같은 방법으로 Asteripectin의 N 말단 또는 C 말단이 절단된 펩타이드를 합성하였다.

상기 합성된 펩타이드의 이완활성을 실시예 2와 동일한 방법으로 별불가사리의 DRM을 이용하여 측정하여 이완활성을 나타내는 최단 아미노산 서열을 확인하였다.

【표 3】
Asteripectin (AP)의 N-말단 및 C-말단 유도체

Peptide	Sequence
N-terminal analogs	
AP (2-16)	G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D (서열번호 9)
AP (3-16)	K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D (서열번호 10)
AP (4-16)	G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D (서열번호 11)
AP (5-16)	G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D (서열번호 12)
AP (6-16)	A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D (서열번호 13)
AP (7-16)	Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D (서열번호 14)
C-terminal analogs	
AP (1-15)	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T (서열번호 15)
AP (1-14)	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F (서열번호 16)
AP (1-13)	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G (서열번호 17)
AP (1-12)	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A (서열번호 18)
AP (5-14)	G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F (서열번호 2)

상기 합성된 펩타이드의 이완활성을 측정한 결과 N-말단 유도체인 AP (2-16), AP (3-16) 및 AP (4-16)와 C-말단 유도체인 AP (1-15) 및 AP (1-14)에서 Asteripectin과 비교하여 현저한 이완활성의 변화를 보이지 않았으므로, 다섯 번째 잔기부터 열네 번째 잔기 (AP (5-14))를 활성을 나타내는 최소 잔기로 규정하였다 (서열번호 2).

이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

발명의 효과

본 발명은 평활근 이완활성을 지니는 새로운 신경성 펩타이드를 제공하는 효과가 있으며, 상기 신경성 펩타이드를 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함하는 핵산을 제공하는 효과가 있다.

본 발명의 펩타이드는 기존에 알려진 이완활성 펩타이드인 S1과 S2보다 강한 이완활성을 나타내면서도, 적은 수의 아미노산으로 구성되어 대량생산이 용이하여 근육이완제로 사용하기에 유용할 것으로 기대된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 평활근 이완활성을 지닌 신경성 펩타이드.

청구항 2.

제1항에 있어서, 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 3.

제1항에 있어서, C-말단이 카르복실화 또는 아마이드화된 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 4.

제1항에 있어서, N-말단의 아민기가 알킬 또는 아세틸기로 치환된 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 5.

제1항에 있어서, 상기 아미노산 서열은 L-타입 및/또는 D-타입인 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 6.

서열번호 2의 펩타이드를 코딩하는 DNA 또는 RNA를 포함하는 핵산.

청구항 7.

제6항의 핵산을 포함하는 재조합 벡터.

청구항 8.

제7항의 재조합 벡터를 박테리아, 효모 또는 곰팡이에 도입하여 수득되는 형질전환 미생물.

청구항 9.

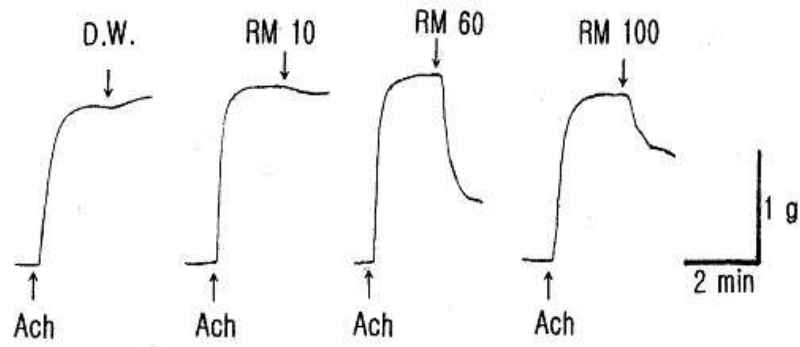
제8항의 형질전환 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 평활근 이완활성을 지닌 신경성 펩타이드의 제조방법.

청구항 10.

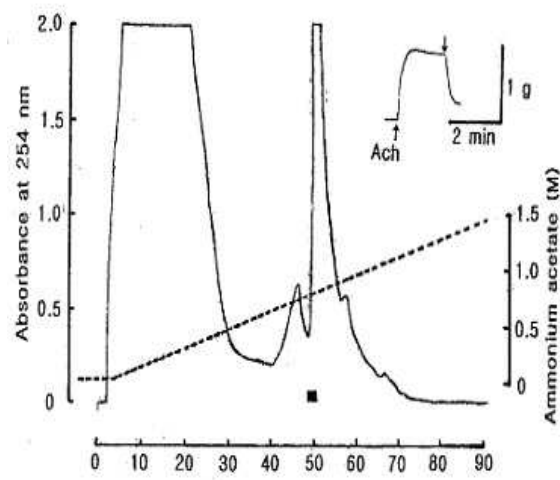
제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 기관지 천식, 고혈압, 이뇨 및 발기부전으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 증상 개선용 의약조성물.

도면

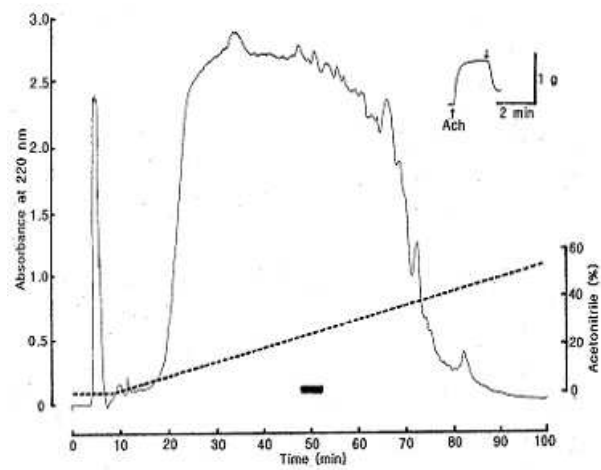
도면1



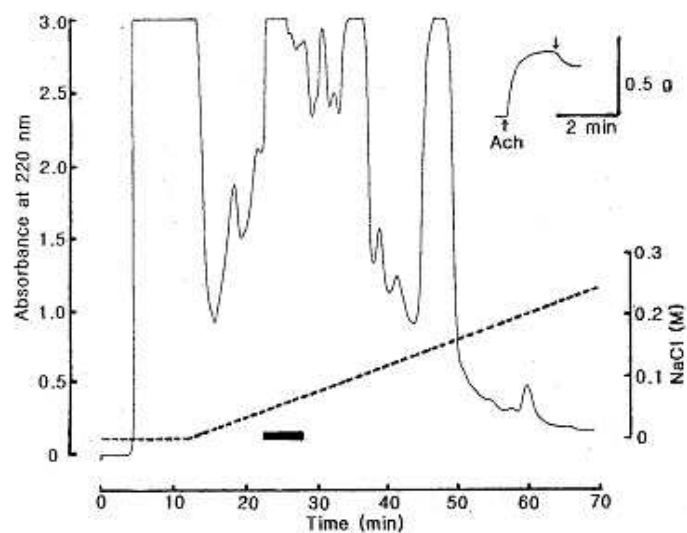
도면2



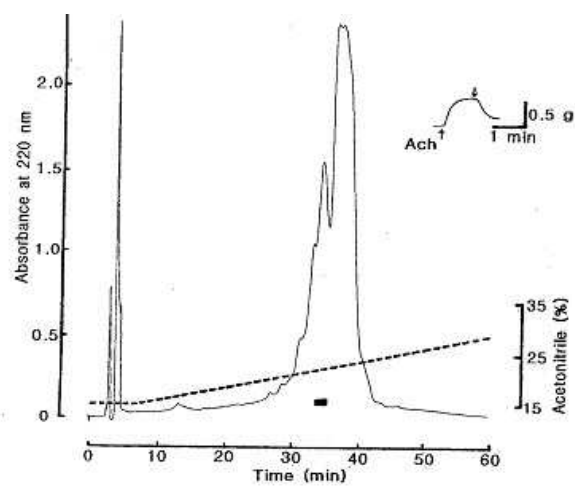
도면3



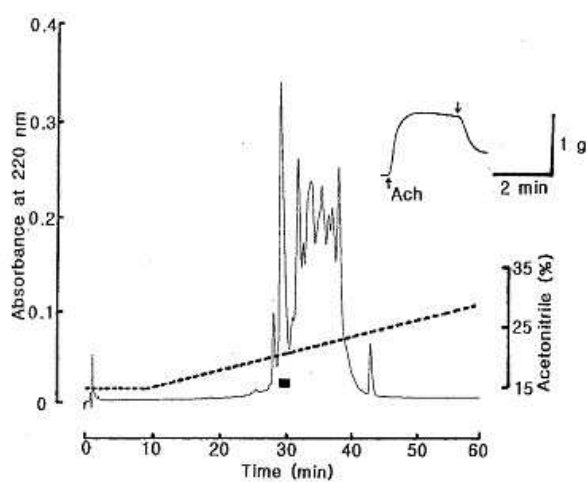
도면4



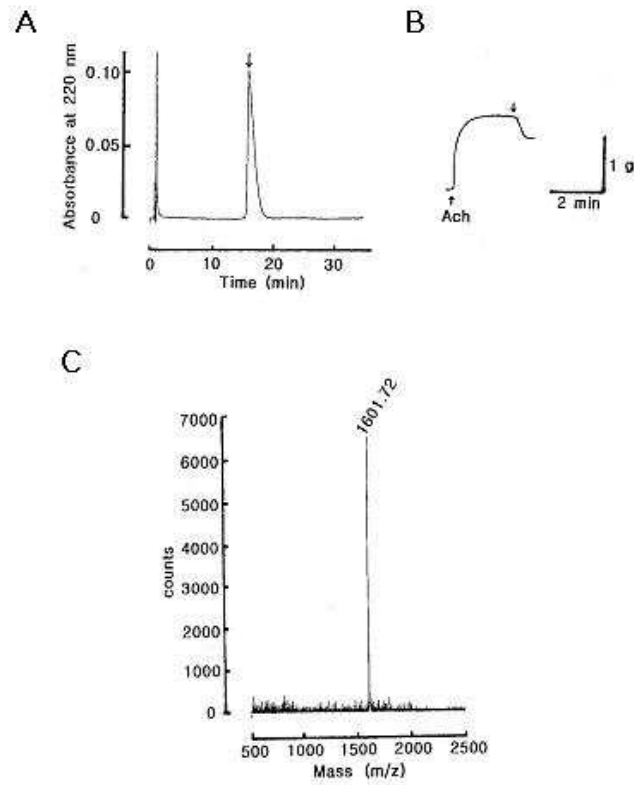
도면5



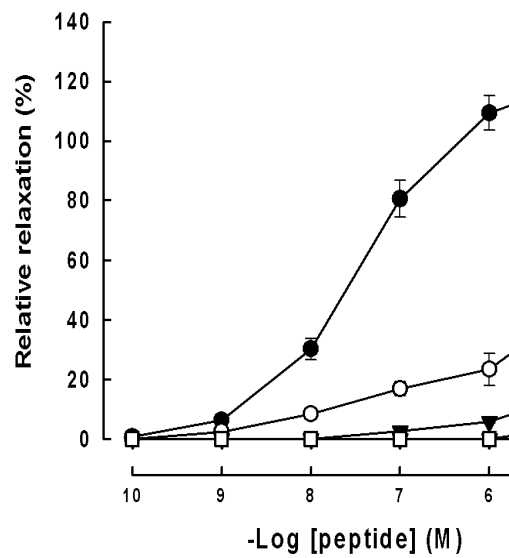
도면6



도면7



도면8



서열목록

<110> Pukyong National University Industrial Foundation

<120> Neuropeptide Having Relaxing Activity of Smooth Muscle

<130> P05-B095

<160> 18

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Asterina pectinifera

<400> 1

Phe Gly Lys Gly Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Ser Ala Gly Phe Thr Asp
1 5 10 15

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> neuropeptide

<400> 2

Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Ser Ala Gly Phe
1 5 10

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Asteroidae

<400> 3

Gly Phe Asn Ser Ala Leu Met Phe
1 5

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Asteroidae

<400> 4

Ser Gly Pro Tyr Ser Phe Asn Ser Gly Leu Tyr Phe
1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Holothuroidea

<400> 5
 Gly Phe Ser Lys Leu Tyr Phe
 1 5

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Holothuroidea

<400> 6
 Ser Gly Tyr Ser Val Leu Tyr Phe
 1 5

<210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Holothuroidea

<400> 7
 Ser Gly Tyr Ser Pro Phe Met Phe
 1 5

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Holothuroidea

<400> 8
 Phe Lys Ser Pro Phe Met Phe
 1 5

<210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> asteripectin derivative

<400> 9
 Gly Lys Gly Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Ser Ala Gly Phe Thr Asp
 1 5 10 15

<210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> asteripectin derivative

<400> 10
 Lys Gly Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Ser Ala Gly Phe Thr Asp
 1 5 10

<210> 11
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> aseripectin derivative

<400> 11
 Gly Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Ser Ala Gly Phe Thr Asp
 1 5 10

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

<220>
 <223> asteripectin derivative

<400> 12
 Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Ser Ala Gly Phe Thr Asp
 1 5 10

<210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> asteripectin derivative

<400> 13

Ala Tyr Asp Pro Leu Ser Ala Gly Phe Thr Asp
1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> asteripectin derivative

<400> 14

Tyr Asp Pro Leu Ser Ala Gly Phe Thr Asp
1 5 10

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> asteripectin derivative

<400> 15

Phe Gly Lys Gly Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Ser Ala Gly Phe Thr
1 5 10 15

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> asteripectin derivative

<400> 16

Phe Gly Lys Gly Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Ser Ala Gly Phe
1 5 10

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> asteripectin derivative

<400> 17

Phe Gly Lys Gly Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Ser Ala Gly
1 5 10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> asteripectin derivative

<400> 18

Phe Gly Lys Gly Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Ser Ala
1 5 10