(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0009451
(43) 공개일자 2011년01월28일

(51) Int. Cl.
C07K 14/435 (2006.01) *C07K 14/585* (2006.01)
A61K 38/23 (2006.01) *A61P 21/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0066854
(22) 출원일자 2009년07월22일
심사청구일자 2009년07월22일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내
(72) 발명자
박남규
부산광역시 남구 대연 3동 599-1번지
고혜진
부산광역시 영도구 남항동 2가 224번지
김은정
부산광역시 부산진구 가야 2동 514-5번지
(74) 대리인
이처영

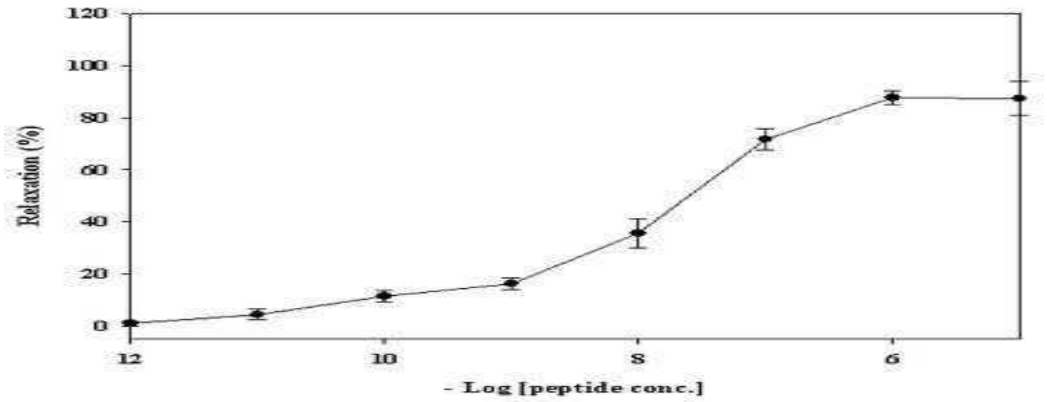
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 평활근 이완활성을 지닌 칼시토닌 관련 펩타이드

(57) 요 약

본 발명은 극피동물인 별불가사리(*Asterina pectinifera*)로부터 분리한 이완활성을 가지는 신규 펩타이드에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 DRM(dorsal retractor muscle)에 대하여 이완활성을 나타내는, 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 신규 칼시토닌 관련 펩타이드(SF-CT, SF-Calcitonin)에 관한 것이다.

대 표 도 - 도8



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2009-05001-0034-0
부처명 환경부
연구관리전문기관
연구사업명 차세대핵심환경기술개발사업
연구과제명 해양생태계의 해적생물인 불가사리로부터 유용성 물질 회수 및 해양생태계 복원
기여율
주관기관 부경대학교
연구기간 2008년 04월 ~ 2011년 02월

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 평활근 이완활성을 지닌 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 별불가사리(*Asterina pectinifera*) 유래인 것을 특징으로 하는 펩타이드.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 극피동물로부터 분리한 이완활성을 가지는 신규 펩타이드에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 평활근 이완활성을 나타내는 신규 칼시토닌(calcitonin) 관련 펩타이드에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 칼시토닌(Calcitonin)은 척추동물의 내분비계에서 혈액 속의 칼슘량을 조절하는 갑상선 호르몬으로 갑상선 C세포에서 분비되는 32개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩타이드로써, 아미노산 서열 1번과 7번의 시스테인(Cys)인 이황화물 결합(disulfied bond)에 의해 서로 연결되어 있으며, C-말단의 프롤린(Pro)이 아마이드화(-NH_2)되어 있다. 칼시토닌은 혈액 속의 칼슘의 농도가 정상치보다 높을 때, 그 양을 저하시키는 작용을 하는 호르몬으로, 혈액의 칼슘을 상승시키는 부갑상선 호르몬과는 반대되는 작용을 하지만 이들은 모두 칼슘대사를 조절하는 호르몬이다.

[0003] 칼시토닌은 다양한 종류의 척추동물로부터 발견되었으며 종에 따라 그 생리활성 정도와 아미노산 서열에 있어서 차이가 있는데, 인간 및 쥐를 대상으로 칼슘의 농도를 저하시키는 정도를 실험하였을 때, 연어, 뱀장어 및 닭의 칼시토닌이 효능이 높은 것으로 확인되었다. 특히, 연어의 칼시토닌은 인체에 대해 강한 활성을 나타내기 때문에 현재 골다공증 치료제 및 의약용으로 인간 칼시토닌(human calcitonin)보다 널리 사용되고 있다. 연어 칼시토닌은 인간 칼시토닌보다 칼슘농도를 저하시키는 활성이 20 - 30배 강하지만 투여시 생체에 대한 항원성 및 그로 인한 중화 효과로 투여량이 계속 증가되어야 치료 효과를 나타내는 부작용을 가지고 있다. 또한 소화기관에 악영향을 끼쳐 구토, 메스꺼움 등의 현상을 일으켜 환자의 체중 감소 및 치료 기피를 유도한다. 반면, 인간 칼시토닌은 항원성도 없고, 소화기관에 대한 악영향도 연어 칼시토닌에 비해 매우 적으나 낮은 활성 때문에 치료에 사용하기에 부적합하다. 상기와 같은 연어 및 사람 칼시토닌의 제약점들을 보완하기 위해 현재는 이들을 혼합하여 의약품으로 이용하고 있는 중이다.

[0004] 한편, 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.

[0005] 이에, 본 발명자들은 해양생물인 별불가사리를 대상으로 평활근 이완활성을 가지는 새로운 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 평활근 이완활성을 지니는 신

규한 칼시토닌 관련 펩타이드를 분리하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 본 발명의 주된 목적은 평활근 이완활성을 가지는 신규 칼시토닌 관련 펩타이드를 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 평활근 이완활성을 지닌 펩타이드를 제공한다.

효 과

[0008] 본 발명은 평활근 이완활성을 가지는 신규 칼시토닌 관련 펩타이드를 제공하는 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0009] 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 평활근 이완활성을 지닌 펩타이드에 관한 것이다.

[0010] 본 발명에 있어서, 상기 펩타이드는 별불가사리(*Asterina pectinifera*) 유래인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0011] 본 발명의 칼시토닌과 근육이완활성의 연관성에 대한 연구결과를 살펴보면, 연어 칼시토닌이 골격근의 metabolism과 연관되어 있음을 확인한 연구(Kenney MA *et al., Biochem Biophys Res Commun.*, 30;197(1):8-14, 1993, Nov)가 알려진 바 있고, 칼시토닌이 인간의 담낭에 강한 이완효과를 나타냄을 확인한 연구(Jonderko K,J *et al., Gastroenterol Hepatol.*, 4(6):505-11, 1989, Nov-Dec)가 알려진 바 있다.

[0012] 본 발명에 있어서, 서열번호 1에 기재된 펩타이드는 극피동물인 별불가사리(*Asterina pectinifera*)로부터 메탄올-산 추출물을 얻고, 상기의 추출물을 CM 52 양이온 교환 수지 컬럼 크로마토그래피로 조정제한 후, HPLC 시스템을 거침으로써 분리하였다. 상기 분리된 펩타이드는 이완활성을 갖는 새로운 칼시토닌 관련 펩타이드로 상기의 HPLC 시스템을 거친 후, 'MALDI-TOF mass spectrometer(Voyager-DE™ STR spectrometer, Perseptive Biosystems, U.S.A)' 및 'automated protein sequencer PPSQ-21A(Shimadzu, Ltd., Japan)'를 통해 아미노산 서열을 결정하였다 (서열번호 1).또한, 활성을 측정하기 위해 별불가사리의 DRM(dorsal retractor muscle)을 사용하였다. 서열번호 1의 펩타이드의 일차구조를 GenBankTM/EMBL Data Bank를 사용하여 이전에 밝혀져 있는 단백질 서열과의 상동성을 조사한 결과, 생체 내에서 칼슘조절 역할을 하는 물질인 칼시토닌(calcitonin)과 상동성을 지닌다는 것을 확인하였다.

실 시 예

[0013] 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.

[0014] **실시예 1. 별불가사리로부터 이완활성 펩타이드 분획의 추출**

[0015] 본 실시예에서는 사용한 불가사리는 별불가사리(*Asterina pectinifera*)로서, 경북 포항 호미곶에서 채집하였으며, 체장 8~15cm 크기 불가사리 450마리를 채집한 후, 즉시 추출에 사용하였다.

[0016] 상기 살아있는 불가사리 450마리를 70% 메탄올 용액에 넣어 65℃ 에서 5분간 중탕하였다. 이후 5% 초산

을 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 한 번 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.

[0017] 상기 상층액은 부분적으로 물질을 분리하기 위해 Sep-Pak C_{18} cartridge (20 mL, Waters)에 주입하여 0.1% TFA가 포함된 H_2O (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.

[0018] **실시예 2. 별불가사리 분획의 별불가사리 DRM에 대한 이완활성 측정**

[0019] 실시예 1에서 추출된 RM10, RM60, RM 100 분획의 이완활성을 별불가사리 (*Asterina pectinifera*)의 DRM(dorsal retractor muscle)를 이용하여 측정하였다.

[0020] 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 활성화 시켰고, 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).

[0021] **실시예 3. RM60 분획으로부터 이완활성 펩타이드의 분리 및 정제**

[0022] 실시예 2에서 활성이 확인된 별불가사리 추출물 RM60 분획을 서로 다른 칼럼을 사용하는 연속적인 6단계의 HPLC를 통하여 분리하였다. 각각의 HPLC 정제를 통해 얻어진 분획들은 실시예 2와 동일한 방법으로 불가사리 DRM에 대해 이완활성을 측정하였으며, 활성을 나타낸 분획들을 농축하여 다음 단계의 HPLC 정제를 위하여 사용하였다.

[0023] ① CM52 칼럼: CM52(2.5 × 30 cm) 칼럼을 이용하여 농도구배, 20 mM → 1.5 M 암모늄 아세테이트 (ammonium acetate) (pH 5.0, 6시간); 유속, 2.75 mL/min의 조건으로 분리하였다. 이완활성은 머무름 시간 40~45분 근처의 분획에서 확인되었다 (도 2).

[0024] ② C_{18} 칼럼: 상기 농축된 활성 분액을 역상 HPLC 컬럼 (Vydac protein & peptide C_{18}, 9.2 × 250 mm)에 적용하여 A 용매로 0.1% TFA 수용액 (pH 2.2)과 B 용매로서 0.1% TFA를 포함한 100% 아세토나이트릴 (actonitrile) (pH 2.2)을 사용하여 0 → 100 %의 B 용매 (200 min)로 농도경사를 주고, 유속은 3.0 mL/min으로 40℃에서 분리하였다. 이완활성은 머무름 시간 70분 근처의 분획에서 확인되었다 (도 3).

[0025] ③ 음이온 교환 칼럼: TSK-gel DEAE-5PW (7.5 × 75 mm) 칼럼을 사용하여 정제하였으며, A 용매, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.8); B 용매, 1.0 M NaCl을 포함하는 10 mM의 Tris-HCl buffer (pH 8.8); 농도구배, 0 → 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 5분 근처의 분획에서 확인되었다 (도 4).

[0026] ④ C_{18} 칼럼: 전 단계의 역상 칼럼과 성질이 다른 Hypersil-BDS C_{18} (2 × 125 mm)을 이용하였다. 이때, B 용매의 농도구배, 20 → 40%로 60분 동안 0.5 mL/min의 유속으로 40℃에서 분리하였으며, 26% 아세토나이트릴 (acetonitrile)에 해당되는 부분에서 활성을 보였다 (도 5).

[0027] ⑤ 양이온 교환 칼럼: TSK-gel SP-5PW (7.5 × 75 mm) 칼럼을 사용하여 정제하였으며, A 용매, 10 mM phosphate buffer solution (pH 6.0); B 용매, 1.0 M NaCl을 포함하는 10 mM의 phosphate buffer solution (pH 6.0); 농도구배, 0 → 0.5 M B 용매 (100 min), 유속; 0.5 mL/min; 온도; 40 ℃; 분획 량(fraction volume), 1.0 mL의 조건으로 수행하였다. 이완활성은 머무름 시간 20~25분 근처의 분획에서 확인되었다 (도 6).

[0028] ⑥ Hypersil-BDS C_{18} 칼럼: 여섯 번째 과정으로 Hypersil-BDS C_{18} (2 × 125 mm)을 이용하였다. 이때, B 용매의 농도구배, 25 → 30 %로 50분 동안 0.5 mL/min의 유속으로 40℃에서 분리하였으며(Data not shown), 최종적으로 25% 아세토나이트릴의 아이소크래틱(isocratic) 조건에서 Hypersil-BDS C_{18} (2 × 125 mm) 컬럼을 이용하여 정제하였다. 그 결과, 22.93분의 머무름 시간을 갖는 하나의 순수한 물질을 최종 정제하였다 (도 7a).

[0029] **실시예 4. 천연 펩타이드의 분자량 측정 및 아미노산 서열 결정**

[0030] 불가사리로부터 최종적으로 정제되어 DRM에 이완활성을 지닌 펩타이드의 분자량은 MALDI-TOF mass spectrometer (Voyager-DETM STR spectrometer, Perseptive Biosystems, U.S.A)를 사용하여 측정하였다. 아미노산 서열의 결정은 Automated protein sequencer PPSQ-21A (Shimadzu, Ltd., Japan)를 사용하여 Edman 분해법으로 분석하였다.

[0031] 최종 정제한 펩타이드의 분자량은 3655 Da이었고(도 7b), 이 물질의 일차구조를 알아보기 위해 Edman 분해법을 이용하여 일차서열을 분석한 결과, 2개의 Met과 방향족 아미노산인 2개의 Phe과 (+) charge를 지닌 1개의 Lys과 1개의 Arg 및 (-) charge를 지닌 2개의 Asp와 1개의 Glu을 포함한 20개의 아미노산으로 구성된 펩타이드로 확인되었다. 특히, 이 물질은 N-말단과 C-말단 부분에 각각 salt bridge를 형성할 수 있는 Lys-Asp과 Arg-Glu를 지닌 것이 특징으로, 이 물질의 일차서열은 다음과 같았다; Ser-Gly-Thr-Gly-Cys-Thr-Gln-Phe-Ser-Gly-Cys-Ala-Gln-Leu-Lys-Val-Gly-Gln-Asp-Ala-Leu-Ser-Arg-Val-Leu-Ala-Asp-Ser-Asn-Ser-Arg-Phe-Gly-Ser-Gly-Gly-Pro (서열번호 3).

[0032] 한편, Edman 분해법에 따르면 N-말단 쪽의 5번째 잔기와 11번째 잔기가 검출되지 않았지만 아미노산 서열 분석과 분자량 값을 기초로 하여 계산해 보면 2개의 Cys이 S-S 결합을 하고 있는 형태의 분자량과 일치한다는 것을 알 수 있었다. 즉, 정제한 물질의 분자량은 3655 Da이지만 검출되지 않은 2개의 Xaa를 제외한 아미노산 분자량의 합은 3453.70 Da이기 때문에 이들 간의 분자량 차이는 201.3 Da임을 알 수 있었다. 여기서 1개의 Cys 아미노산 잔기량이 103.1 Da이므로 2개의 Cys는 206.2 Da이 되고, 이들 간에 S-S 결합을 형성하므로 2개의 수소가 빠져 나가면 204.2 Da이 되므로 최종적으로 3453.70 Da에 검출되지 않은 아미노산의 분자량에 해당하는 204.2 Da을 추가하면 3657.90 Da에 해당하게 된다. 따라서, 검출되지 않은 2개의 Xaa인 5번째와 11번째 잔기가 Cys임을 추정할 수 있었다.

[0033] 또한, 이 펩타이드의 일차구조를 GenBankTM/EMBL Data Bank를 사용하여 이전에 밝혀져 있는 단백질 서열과의 상동성을 조사한 결과, 생체 내에서 칼슘조절 역할을 하는 물질인 칼시토닌(calcitonin)과 상동성을 지닌다는 것을 확인하였다. 이들 칼시토닌은 분자 내에서 공통영역, 즉 1번째와 7번째 잔기가 Cys으로 S-S 결합 그리고 마지막 잔기가 Pro-NH_2로 되어 있는데 본 발명의 펩타이드 역시 동일한 아미노산으로 구성되어 있음을 알 수 있다. 또한, 본 발명의 펩타이드는 지금까지 밝혀진 다른 칼시토닌보다 N-말단 부위에 4개의 아미노산을 더 가지고 있다는 점이 특징으로(표 1, 사람: 서열번호 1, 연어: 서열번호 2, 불가사리 칼시토닌: 서열번호 3의 일차구조 비교), 편의상 SF-CT(SF-Calcitonin)이라 명명하였다.

표 1

[0034]

Human					C	G	N	L	S	T	C	M	L	G	T	Y	T	Q	D	-	F	N	K	F	H	T	F	P	Q	T	A	I	G	V	G	A	P	NH_2
Salmon					C	S	N	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	-	L	H	K	L	Q	T	Y	P	R	T	N	T	G	S	G	T	P	NH_2

Star fish	S	G	T	G	C	T	Q	F	S	G	C	A	Q	L	K	V	G	Q	D	A	L	S	R	V	L	A	D	S	N	S	R	F	G	S	G	G	P	NH_2

[0035] **실시예 5. SF-CT의 별불가사리 DRM에 대한 이완활성 측정**

[0036] 별불가사리로부터 정제된 SF-CT의 이완활성을 실시예 2의 방법과 동일한 방법으로 별불가사리의 DRM을 이용하여 측정하였고, SF-CT는 10^{-12} M에서 10^{-5} M까지 누적 투여하였으며, 이완활성은 10^{-6} M 아세틸콜린의 최대 수축에 대한 상대적 이완 %로서 나타냈다. 한편, 반응의 크기는 ED_{50} (최고 이완의 50 %를 나타낼 때의 농도) 및 E_{max} (10^{-5} M에서의 이완 %)로서 비교하였다. ED_{50}값은 least square method로 계산하였으며, 통계적 처리는 student's t-test로서 했다. 모든 반응 값은 means ±s.e.로 표시하였다.

[0037] 그 결과, 도 8에서 나타내듯이 SF-CT은 10^{-11} M에서 4.5 %의 역치값을 가졌고, 10^{-5} M에서 87.4 ± 6.4 %의 이완활성을 나타내었다.

[0038] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 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.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 Sep-Pak C_{18} 칼럼을 사용하여 별불가사리로부터 분리된 4가지 분획의 불가사리 DRM(dorsal retractor muscle)에 대한 이완활성 측정 실험결과를 나타낸 것이다.

[0040] 도 2는 CM52 양이온 교환수지 크로마토그램과 불가사리 DRM에 대한 이완활성을 나타낸 것이다 (■는 활성분획을 나타냄).

[0041] 도 3은 도 2의 활성분획의 역상 HPLC 크로마토그램과 불가사리 DRM에 대한 이완활성을 나타낸 것이다 (■는 활성분획을 나타냄).

[0042] 도 4는 도 3의 활성분획의 음이온 교환수지 크로마토그램과 불가사리 DRM에 대한 이완활성을 나타낸 것이다 (■는 활성분획을 나타냄).

[0043] 도 5는 도 4의 활성분획의 역상 HPLC 크로마토그램과 불가사리 DRM에 대한 이완활성을 나타낸 것이다 (■는 활성분획을 나타냄).

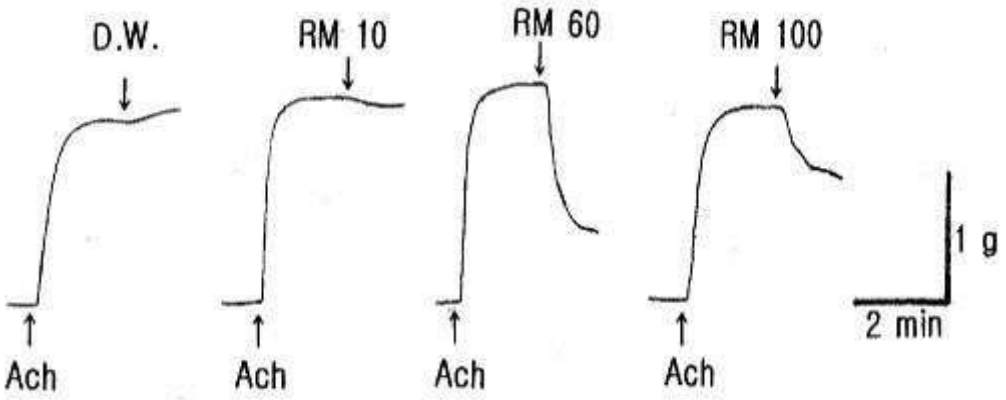
[0044] 도 6은 도 5의 활성분획의 역상 HPLC 크로마토그램과 불가사리 DRM에 대한 이완활성을 나타낸 것이다 (■는 활성분획을 나타냄).

[0045] 도 7a는 도 6의 활성분획의 마지막 정제단계의 불가사리 DRM에 대한 이완활성을 나타낸 것이고, 도 7b는 활성피크의 MALDI-TOF Mass 결과를 나타낸 것이다.

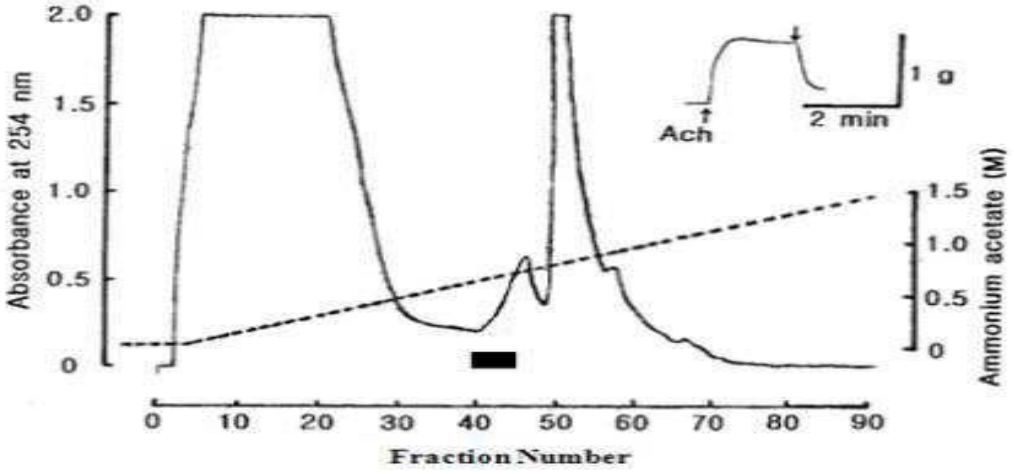
[0046] 도 8은 SF-CT (●) human-calcitonin (H-CT), salmon-calcitonin (S-CT)의 불가사리 DRM에 대한 농도-의존적 이완활성 측정결과를 나타내는 그래프이다.

도면

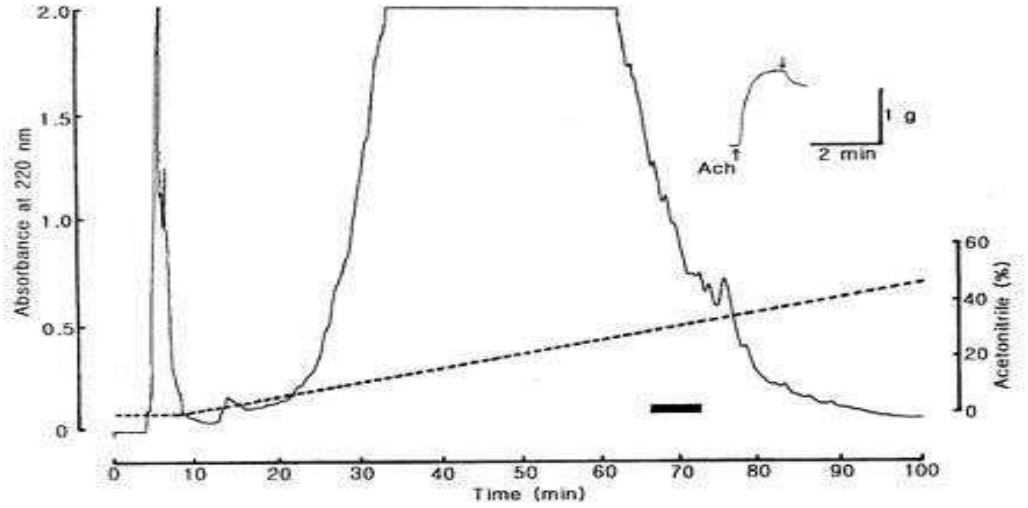
도면1


D.W.
RM 10
RM 60
RM 100
Ach
Ach
Ach
Ach
1 g
2 min

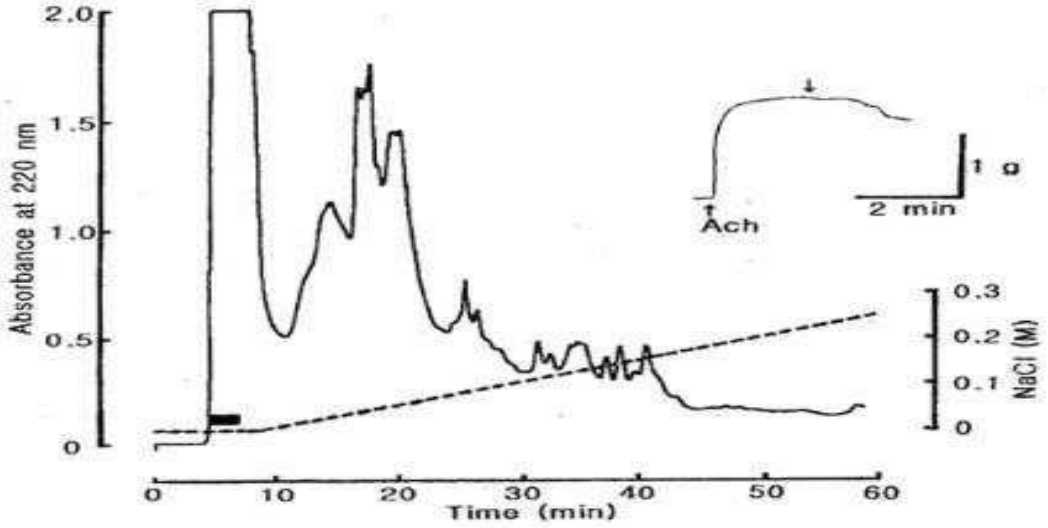
도면2


Absorbance at 254 nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
Fraction Number
Ach
1 g
2 min
Ammonium acetate (M)
1.5
1.0
0.5
0

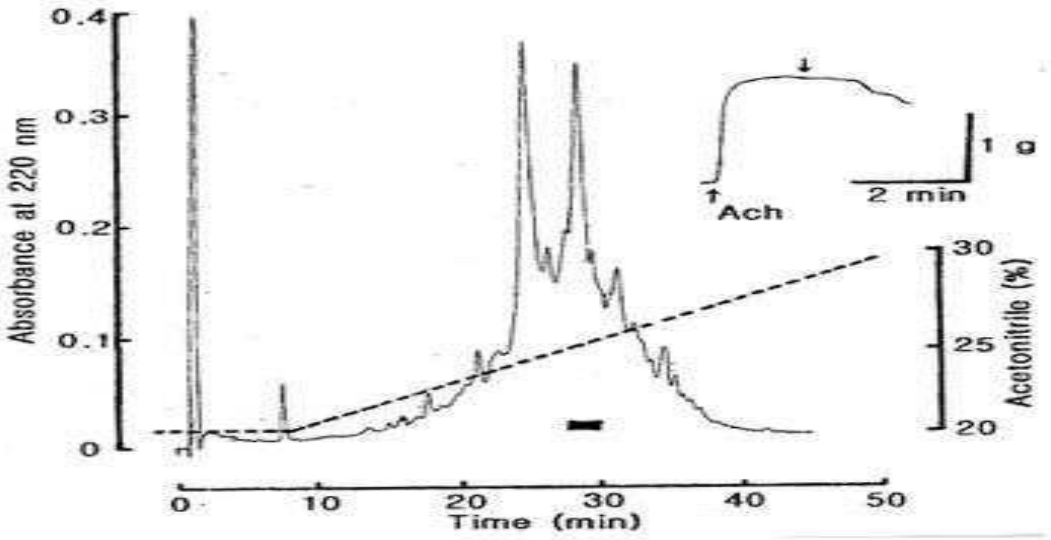
도면3


Absorbance at 220 nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0
Ach
1 g
2 min
60
40
20
0
Acetonitrile (%)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Time (min)

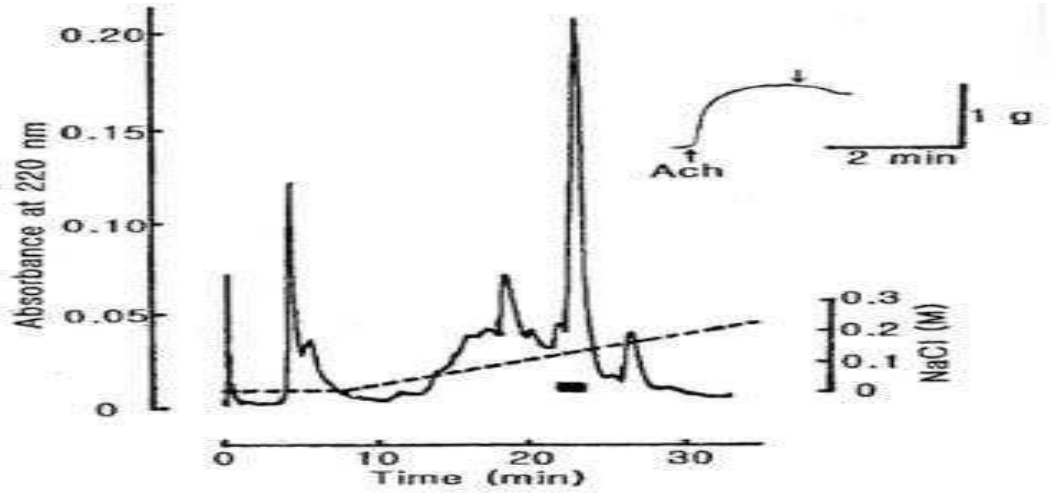
도면4


Absorbance at 220 nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0
Ach
1 g
2 min
0.3
0.2
0.1
0
NaCl (M)
0
10
20
30
40
50
60
Time (min)

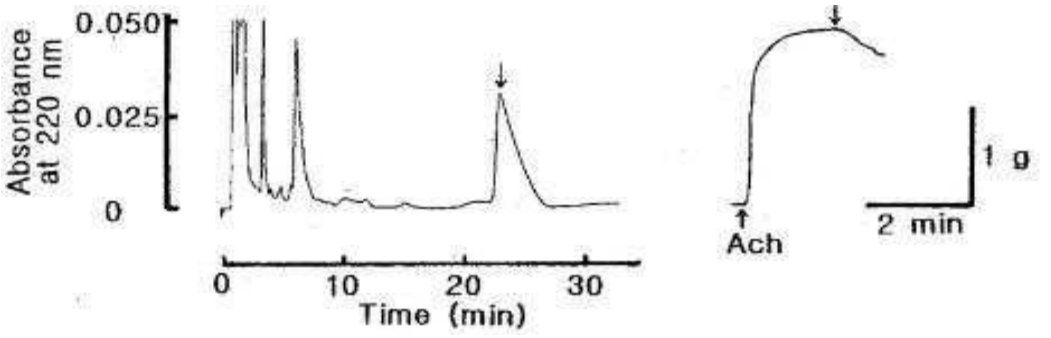
도면5


Absorbance at 220 nm
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
10
20
30
40
50
Time (min)
Ach
1 g
2 min
30
25
20
Acetonitrile (%)

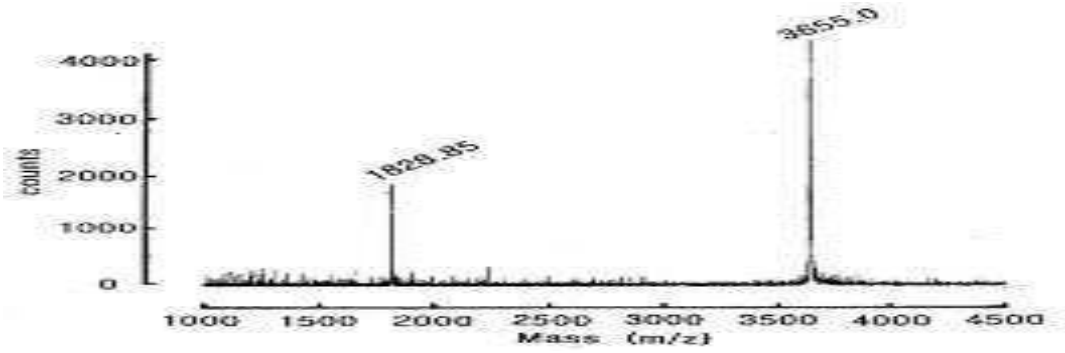
도면6


Absorbance at 220 nm
0.20
0.15
0.10
0.05
0
0
10
20
30
Time (min)
Ach
1 g
2 min
0.3
0.2
0.1
0
NaCl (M)

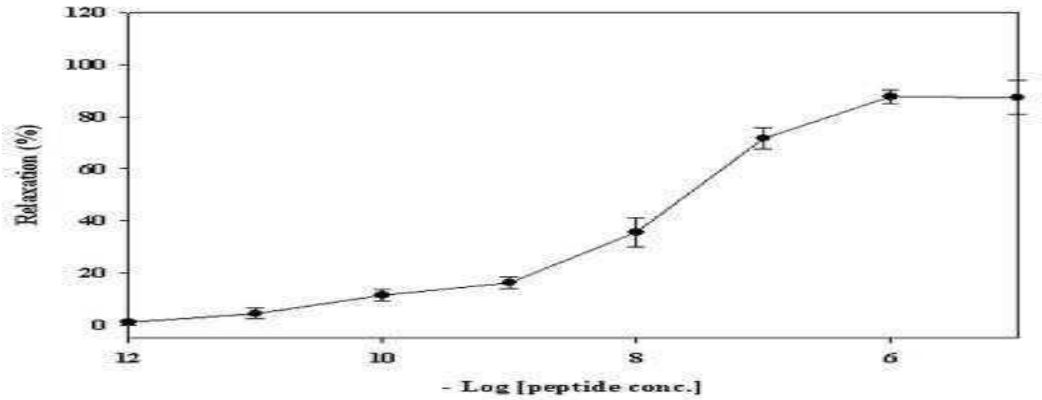
도면7a


Absorbance at 220 nm
0.050
0.025
0
0
10
20
30
Time (min)
Ach
1 g
2 min

도면7b



도면8



서 열 목 록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
<120> Calcitonin-like Peptide Having Relaxing Activity of Smooth Muscle

<130> P09-B113

<160> 3

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 32
<212> PRT
<213> Human

<400> 1

```
Cys Gly Asn Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe
  1               5                  10                  15

Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro
             20                  25                  30
```

<210> 2
<211> 32
<212> PRT
<213> Salmon

<400> 2

```
Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu
  1               5                  10                  15

His Lys Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asn Thr Gly Ser Gly Thr Pro
             20                  25                  30
```

<210> 3
<211> 37
<212> PRT
<213> Starfish

<400> 3

```
Ser Gly Thr Gly Cys Thr Gln Phe Ser Gly Cys Ala Gln Leu Lys Val
  1               5                  10                  15

Gly Gln Asp Ala Leu Ser Arg Val Leu Ala Asp Ser Asn Ser Arg Phe
             20                  25                  30

Gly Ser Gly Gly Pro
         35
```