(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년06월17일
(11) 등록번호 10-1630691
(24) 등록일자 2016년06월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/435 (2006.01) *A61K 38/10* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) *C07K 7/08* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/43504 (2013.01)
A61K 38/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0044856
(22) 출원일자 2015년03월31일
심사청구일자 2015년03월31일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020060115052 A
박남규 등. 해양생태계의 해적생물인 불가사리로부터 유용성 물질 회수 및 해양생태계 복원에 관한 연구. 연구보고서, 부경대학교 산학협력단. (2011.02.24.)

(73) 특허권자
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
박남규
부산광역시 수영구 광안해변로 100 (남천동, 삼익비치아파트) 212동 606호
김군도
부산 남구 분포로 113, 225동 704호 (용호동, 엘지메트로시티아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
한윤호

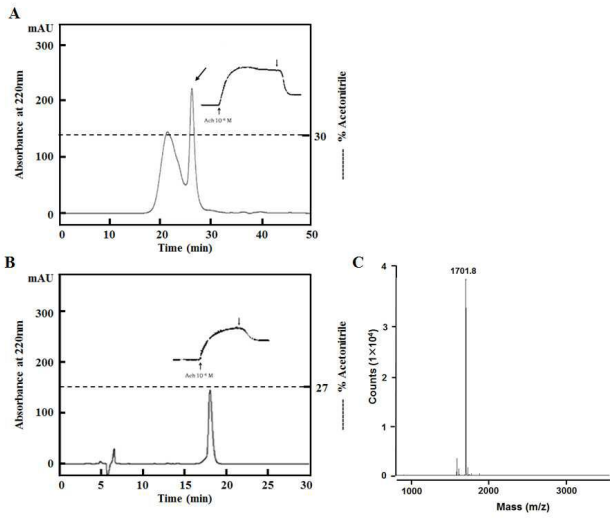
전체 청구항 수 : 총 3 항 심사관 : 이영기

(54) 발명의 명칭 **아무르불가사리 유래의 새로운 신경성 펩타이드 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 평활근 이완활성을 나타내고, 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 신경성 펩타이드를 제공한다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
A61K 38/1767 (2013.01)
C07K 7/08 (2013.01)
(72) 발명자
조미정
부산 북구 상학산복길 201 남문하이빌 B동 302호
고혜진
부산광역시 영도구 남항동 2가 224번지
김찬희
부산 동래구 명륜로75번길 31, 가동 502호 (수안동, 새동래아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013000130002
부처명 환경부
연구관리전문기관 한국환경산업기술원
연구사업명 환경기술개발사업
연구과제명 연안생태계 균형유지를 위한 무척추동물 고부가가치 물질 활용기술개발
기 여 율 1/1
주관기관 부경대학교 산학협력단
연구기간 2013.05.01 ~ 2016.03.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

평활근 이완활성을 나타내고, 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 신경성 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서,

C-말단이 카르복실화 또는 아마이드화된 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 근육 이완제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신경성 펩타이드에 관한 것으로서, 더 상세하게는 아무르불가사리 유래의 새로운 신경성 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 신경성 펩타이드의 기능에 있어 평활근(smooth muscle) 수축 및 이완운동 조절은 미오신(myosina)과 액틴(actin)의 결합에 의해 조절된다. 미오신 경사슬 인산화효소(myosin light-chain kinase)가 미오신 조절 경사슬(myosin regulatory light chain)을 인산화(phosphorylation)시켜 미오신이 액틴과 결합되도록 하여 수축작용을 나타내는 반면, 미오신과 액틴의 결합이 방해를 받게 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 유지 등의 기능에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 이유에서 포유동물뿐만 아니라 연체동물을 이용한 신경성 펩타이드의 평활근 조절에 관한 다양한 연구결과가 진행되고 있다. 특히 해양 무척추 극피동물 중 해삼(*Holothuria glaberrima*) 또는 별 불가사리(*Asterina pectinifera*)에서 평활근 이완활성(smooth muscle relaxing activities)을 나타내는 펩타이드 분리에 관한 연구가 보고되었다. 이중 불가사리는 극피동물에 속하는 해양 저서생물로 섭식능력과 번식력 및 재생력이 강하여 양식장 및 연안 생태계에 위협적인 대상으로 주목 받고 있고 대부분이 폐기처분되어 생리활성물질에 대한 활성효과의 검증이나 분리, 정제 및 구조활성과의 연관성 연구는 극히 제한되어 있다.

[0003] 대한민국 등록특허 제0664998호는 별불가사리(*Asterina pectinifera*)로부터 분리한 이완활성을 가진 신경성 펩타이드를 개시하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 그러나, 상기 선행기술의 경우, 근육 이완성 펩타이드의 이완활성이 낮아 산업이용성의 한계가 존재한다.

[0005] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 이완활성을 지닌 신경성 펩타이드를 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 일 관점에 따르면, 평활근 이완활성을 나타내고, 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는

신경성 펩타이드가 제공된다.

[0007] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 근육 이완제가 제공된다.

발명의 효과

[0008] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 불가사리로부터 분리 및 정제한 이완활성을 지닌 신경성 펩타이드 생산효과를 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 Sep-Pak C_{18} 카트리지에 의하여 분리된 4가지 불가사리 분획물에 대한 이완활성을 분석한 결과를 나타내는 근전도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 아무르 불가사리 유문맹낭 추출 활성분획(RM60)에 대한 역상 HPLC 크로마토그램과 상기 HPLC에 의해 분리된 활성분획(■)의 근육 이완활성을 측정한 근전도(상기 크로마토그램 내의 우측)이다.

도 3은 도 2의 활성분획에 대한 양이온 교환수지 HPLC 크로마토그램과 상기 HPLC에 의해 분리된 활성분획(■)의 근육 이완활성을 측정한 근전도이다.

도 4는 도 3의 활성분획의 역상 HPLC 크로마토그램과 불가사리 DRM에 대한 이완활성(■;활성분획)을 측정한 그래프이다.

도 5는 도 4의 활성 분획의 음이온 교환수지 크로마토그램과 불가사리 DRM에 대한 이완활성(화살표;활성분획)을 측정한 그래프이다.

도 6은 도 5의 활성 분획의 역상 HPLC 크로마토그램과 별 불가사리 DRM에 대한 이완활성(■;활성분획)을 측정한 그래프이다.

도 7은 도 6의 활성 분획의 분자량 HPLC 크로마토그램과 별 불가사리 DRM에 대한 이완활성(화살표;활성분획)(A)과 활성 분획의 마지막 정제단계 및 이완활성 (B) 및 MALDI-TOF Mass 결과(C)를 나타낸 그래프이다.

도 8은 AML-OH(●) 및 AML-NH_2(▽)의 불가사리 DRM에 대한 농도-의존적 이완활성을 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] **용어의 정의:**

[0011] 본 문서에서 사용되는 용어 "아무르 불가사리(*Asterias amurensis*)"는 극피동물 차극목 불가사리과의 불가사리로 지름은 30cm 정도이고 팔의 길이는 9cm 내외이며 흰색에서 남빛 자주색까지 개체의 색 변화가 심하다. 제주도 남부를 제외한 우리나라 전 연안에 분포하며 고등류, 게류 및 따개비류를 포함해 먹을 수 있는 먹이는 모두 먹어치우는 강력한 포식활동으로 패류양식장 등에 심각한 피해를 준다.

[0012] 본 문서에서 사용되는 용어 "AML"은 아무르 불가사리(*Asterias amurensis*)의 유문맹낭(pyloric cecum)으로부터 추출된 추출물로부터 정제된 펩타이드로 분자량은 1701.78 Da이고 기존에 알려진 극피동물유래의 신경성 펩타이드와 다른 새로운 신경성 펩타이드를 말한다.

[0013] 본 문서에서 사용되는 용어 "유문맹낭(pyloric cecum)"은 불가사리류의 각 팔의 내강에 쌍을 이루어 포도송이처럼 넓어지는 눈에 띄게 큰 가늘고 긴 기관으로 주름이 많은 맹낭 모양이고 현장막에 의해 팔의 배벽에 걸리고 그 기부는 유문 위에 열린다. 기능은 주로 소화액의 분비이지만 일부 영양저장도 한다.

[0014] 본 문서에서 사용되는 용어 "별불가사리(*Asterina pectinifera*)"는 극피동물 유극목 별불가사리과의 불가사리로 우리나라 전 연안의 조간대에서부터 조하대 수심 약 20 m 전후까지에서 매우 흔하게 발견되는 중형의 불가사리류이다. 팔의 수는 보통 5개이며, 길이는 5~7 cm 전후이고 섭식능력과 번식력이 뛰어나 굴, 전복 및 조개 등의 양식장에 큰 피해를 준다.

[0015] **발명의 상세한 설명:**

[0016] 본 발명의 일 관점에 따르면, 평활근 이완활성을 나타내고, 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는

신경성 펩타이드가 제공된다.

[0017] 상기 펩타이드는 C-말단이 카르복실화 또는 아마이드화된 것 일 수 있다.

[0018] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 근육 이완제가 제공된다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드를 포함하는 근육 이완제는 통상의 방법에 따른 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제는 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 또는 광물유 일 수 있다. 또한, 상기 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있고 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제등이 포함되며, 상기 부형제는 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose) 및 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드를 포함하는 근육 이완제는 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 0.01 내지 500mg/kg의 양, 바람직하게는 0.1 내지 100mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있고 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중 및 나이 등에 따라서 증감될 수 있으나 이에 한정된 것은 아니다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드를 포함하는 근육 이완제는 랫트, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있고 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여 시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드를 포함하는 근육 이완제는 랫트에 경구 투여, 복강 내 투여 및 피하 주사 시의 독성 실험을 수행한 결과, 복강 내 투여 독성시험에 의한 50% 치사량(LD_{50})은 적어도 근육 이완제 500 mg/kg 이상인 안전한 물질로 판명되었다.

[0023] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0024] **실시예 1: 시료 준비**

[0025] 본 발명의 일 실시예에 따라 아무르 불가사리(*Asterias amurensis*)의 유문맹낭(pyloric cecum)으로부터 새로운 이완활성 펩타이드를 분리하기 위하여 시료를 준비하였다.

[0026] 먼저, 실험에 사용한 아무르 불가사리(*Asterias amurensis*, 50마리, 체장 15 ~ 20 cm)는 2013년 8월에 부산광역시 기장군에서 채집하였으며, 살아있는 상태에서 해부하여 유문맹낭(pyloric cecum)을 분리하고 실험에 사용할 때까지 액체질소로 동결시켜 보관하였다.

[0027] **실시예 2: 근육 이완성 물질의 추출**

[0028] 본 발명의 일 실시예에 따라 분리한 아무르 불가사리의 유문맹낭으로부터 근육 이완성 물질을 추출하였다.

[0029] 구체적으로, 상기 적출한 유문맹낭을 1% 초산 용액을 첨가하여 100℃ 에서 5분간 끓인 뒤 조직을 파쇄하고 원심분리(4℃, 40분, 10,000 ×g)를 수행하였다. 그 후, 상등액에서 부분적으로 물질을 분리하기 위해 Sep-Pak C_{18} 카트리지(20 mL 수용액)에 주입하여 0.1% TFA(trifluoroacetic acid)가 포함된 H_2O(D.W.), 10% 메탄올(RM10), 60% 메탄올(RM60) 및 100% 메탄올(RM100)로 물질들을 각각 용출시켜 별불가사리(*Asterina pectinifera*)의 후견인근(dorsal retractor muscle, DRM)에 대한 이완활성(relaxing activities) 측정에 사용하였다. 구체적으로, Sep-Pak C_{18} 카트리지에 의하여 분리된 DW 분획, RM10 분획, RM 60 분획 및 RM 100 분획을 수득하였고 상기 4가지 분획의 불가사리 DRM에 대한 이완활성은 분획 투여 후 발생되는 이완의 정도를 변환기(transducer)를 통해 전달되어지는 장력의 차이로 측정함으로써 분석하였다. 그 결과, 도 1에 도시된 바와 같이, RM60의 경우에서 가장 큰 근육 이완활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0030] **실시예 3: 근육 이완성 펩타이드의 분리 및 정제**

[0031] 본 발명의 일 실시예에 따라 분리한 아무르 불가사리의 유문맹낭 추출물로부터 근육 이완성 펩타이드를 분리 및 정제하였다.

[0032] 구체적으로, 아무르불가사리 유문맹낭 추출물의 RM60을 역상 HPLC 컬럼 (Shiseido CapCell-PAK C_{18}, 4.6×250 mm)을 이용하여 하기와 같은 조건으로 분리를 수행하였다. A 용매는 0.1% TFA를 포함하는 H_2O(pH 2.2), B 용매는 0.1% TFA를 포함하는 100% 아세토나이트릴(CH_3CN)(pH 2.2)을 이용하여 조건; 5% B → 5% B(10 분) → 65% B(60 분), 파장; 220 nm, 유속; 1.0 ml/분 및 온도; 40℃로 수행하였고 상기 HPLC에 의해 용출된 분획들은 불가사리 DRM에 대해 이완활성 측정에 사용되었다.

[0033] 그 결과, 근육 이완활성은 42-45 분의 머무름시간(retention time, RT)에서 용출된 분획에서 이완활성이 확인되었다(도 2).

[0034] **실시예 4: 양이온 교환 HPLC 컬럼을 이용한 분리**

[0035] 본 발명의 일 실시예에 따라 실시예 3의 HPLC에 의해 수득된 활성분획을 양이온 교환 HPLC로 분리하였고, 상기 양이온 교환 HPLC에 의해 분리된 분획들에 대하여 별 불가사리 DRM에 대한 근육 이완활성을 측정하였다.

[0036] 구체적으로 상기 양이온 교환 HPLC는 TSK-gel SP-5PW(7.5×75 mm) 컬럼을 사용하였고, 분리조건은 하기와 같다: A 용매; 10 mM PB(pH 7.0), B 용매; 1.0 M NaCl을 포함하는 10 mM PB(pH 6.0), 조건; 0 → 0(20 분) → 1.0 M B(100 분), 파장; 220 nm, 유속; 1.0 ml/분 및 온도; 실온조건으로 수행하였다.

[0037] 그 결과, 근육 이완활성은 B 용매의 농도가 0 M NaCl을 포함하는 10 mM PB(pH 6.0)로 용출되어지는 0-10 분 사이의 머무름시간(RT)의 분획에서 확인되었다(도 3).

[0038] **실시예 5: C_{18} HPLC 컬럼을 이용한 분리**

[0039] 본 발명의 일 실시예에 따라 실시예 4의 양이온 교환 HPLC에 의해 수득된 활성분획을 역상 HPLC로 분리하였고, 상기 역상 HPLC에 의해 분리된 분획들에 대하여 별 불가사리 DRM에 대한 근육 이완활성을 측정하였다.

[0040] 구체적으로 CapCell-PAK C_{18}(4.6×250 mm) 컬럼을 적용하여 A 용매로 0.1% TFA 수용액(pH 2.2)과 B 용매로 0.1% TFA를 포함한 100% 아세토나이트릴(actonitrile)(pH 2.2)을 사용하여 B 용매의 농도를 23 %에서 43% 까지 40 분 동안 농도경사를 주었고, 유속은 1.0 mL/분으로 40℃에서 분리하였다.

[0041] 그 결과, 근육 이완활성은 머무름시간(RT) 14-16 분까지의 머무름시간에서 용출된 분획에서 확인되었다(도 4).

[0042] **실시예 6: 음이온 교환 HPLC 컬럼을 이용한 분리**

[0043] 본 발명의 일 실시예에 따라 실시예 5의 역상 HPLC에 의해 수득된 활성분획을 음이온 교환 HPLC로 분리하였고, 상기 음이온 교환 HPLC에 의해 분리된 분획들에 대하여 별 불가사리 DRM에 대한 근육 이완활성을 측정하였다.

[0044] 구체적으로 Mono-Q HR 5/5(7.5 × 75 mm) 컬럼을 사용하여 정제하였으며, 분리조건은 하기와 같다. A 용매; 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), B 용매; 1.0 M NaCl을 포함하는 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 조건; 0 → 0(10 분) → 1.0 M B(50 분), 파장; 220 nm, 유속; 0.5 ml/분 및 온도; 실온조건으로 수행하였다.

[0045] 그 결과, 이완활성은 약 0.1 M 의 NaCl 을 포함하는 Tris-HCl(pH 8.0) 용매의 농도로 용출되어지는 18-22 분사이의 머무름시간(RT)에서 확인되었다(도 5).

[0046] **실시예 7: C_{18} HPLC 컬럼을 이용한 분리**

[0047] 본 발명의 일 실시예에 따라 실시예 6의 음이온 교환 HPLC에 의해 수득된 활성분획을 역상 HPLC로 분리하였고, 상기 역상 HPLC에 의해 분리된 분획들에 대하여 별 불가사리 DRM에 대한 근육 이완활성을 측정하였다.

[0048] 구체적으로 CapCell-PAK C_{18}(4.6×250 mm) 컬럼을 적용하여 A 용매로 0.1% TFA 수용액(pH 2.2)과 B 용매로 0.1% TFA를 포함한 100% 아세토나이트릴(actonitrile)(pH 2.2)을 사용하여 B 용매의 농도를 23 %에서 40% 까지 50 분 동안 농도경사를 주었고, 유속은 0.5 mL/분으로 40℃에서 분리하였다.

[0049] 그 결과, 근육 이완활성은 머무름시간(RT) 32-34 분까지의 머무름시간에서 용출된 분획에서 확인되었다(도 6).

[0050] **실시예 8: 겔 여과 HPLC 컬럼을 이용한 분리**

[0051] 본 발명의 일 실시예에 따라 실시예 7의 역상 HPLC에 의해 수득된 활성분획을 겔 여과 HPLC로 분리하였고, 상기 겔 여과 HPLC에 의해 분리된 분획들에 대하여 별 불가사리 DRM에 대한 근육 이완활성을 측정하였다.

[0052] 구체적으로 분자량 크기에 따른 분리를 수행하기 위하여 30% 아세토나이트릴(acetonitrile) 조건에서 Superdex Peptide HR 10/300 GL(10×300 mm) 컬럼을 이용하여 HPLC를 수행하였다.

[0053] 그 결과, 이완활성은 머무름시간(RT) 32 분 근처의 분획에서 확인되었다(도 7A).

[0054] **실시예 9: 이완 활성 펩타이드의 최종정제**

[0055] 본 발명의 일 실시예에 따라 실시예 8의 겔 여과 HPLC에 의해 수득된 활성분획을 역상 HPLC로 최종 정제하였고 별 불가사리 DRM에 대한 근육 이완활성을 측정하였다.

[0056] 최종적으로 27% 아세토나이트릴의 아이소크래틱(isocratic) 조건에서 CapCell- PAK C_{18}(4.6 × 250 mm) 컬럼을 이용하여 정제하였다. 그 결과, 이완활성은 보유시간(RT) 28분 근처의 분획에서 확인되었고 상기 활성분획의 마지막 정제는 16.1분의 머무름시간(RT)을 갖는 하나의 순수한 물질을 최종 정제하였으며, 이 물질은 아무르 불가사리(*Asterias amurensis*) 추출물로부터 정제되었으므로 'AML'이라 명명하였다(도 7B).

[0057] **실시예 10: 펩타이드의 분자량 측정 및 아미노산 서열 결정**

[0058] 본 발명의 일 실시예에 따라 최종 정제한 펩타이드의 분자량을 측정하고 아미노산 서열을 결정하였다.

[0059] 구체적으로, 아무르 불가사리로부터 정제된 불가사리 DRM에 대하여 이완활성을 가지는 펩타이드의 분자량은 ABI484 단백질 시퀀서(Applied Biosystems, U.S.A)를 사용하여 측정하였고 아미노산 서열은 자동 단백질 서열분석기 PPSQ-33A(Shimadzu, Ltd., Japan)를 이용하여 Edman 분해법으로 분석하였다.

[0060] 그 결과, 최종 정제한 펩타이드의 분자량은 1701.78 Da이었고, 아미노산 서열은 Phe-Gly-Gly-Ser-Gly-Ala-Phe-Asp-Pro-Leu-Ser-Ala-Gly-Phe-Thr-Asp-Arg(서열번호 1)로 구성된 헵타데카 펩타이드(heptadecapeptide)로 확인되었다(도 7C). 상기 펩타이드에 대해 질량측정기를 이용한 질량조사 결과를 하기 표 1에 표시하였다.

표 1

[0061]

사이클 수	페닐티오히단 지방산	수율(pmol)	m/z
1	Phe	95.29	1701.78
2	Gly	82.56	
3	Gly	61.84	
4	Ser	58.33	
5	Gly	54.54	
6	Ala	69.17	
7	Phe	64.22	
8	Asp	18.44	
9	Pro	34.09	
10	Leu	40.47	
11	Ser	15.22	
12	Ala	29.69	
13	Gly	20.13	
14	Phe	25.00	
15	Tyr	14.11	
16	Asp	11.21	
17	Arg	8.57	

[0062] **실시예 11: 천연물의 C 말단 구조 확인**

[0063] 본 발명의 일 실시예에 따라 정제한 천연물의 C 말단구조를 밝히기 위해, 분자량 측정과 역상(reverse-phase) HPLC 칼럼을 이용한 머무름시간(RT)의 비교로 확인하였다.

[0064] 구체적으로 정제한 천연물과 C-말단 아미노산이 free한 -OH 형태인 AML-OH와 C-말단 아미노산이 아마이드화

(amidation) 형태인 AML-NH_2를 27% 아세토나이트릴(acetonitrile)의 등용매(isocratic) 조건에서 CapCell-PAK C_{18}(4.6×250 mm) 컬럼을 이용하여 용출시간을 비교한 결과, 천연물 펩타이드와 합성 펩타이드인 AML-OH는 같은 시간에 용출되었으며, 상기 결과로부터 두 펩티드가 같은 화학적 성분을 가진다는 것을 확인하였다. 따라서 정제된 천연물의 일차구조는 C-말단이 -OH기인(서열번호 1)인 것을 확인하였고 상기 헵타데카펩타이드와 알려진 극피동물유래의 신경성 펩타이드와 유사성을 비교한 결과 AML은 기존에 알려진 펩타이드와는 다른 새로운 신경성 펩타이드임을 확인하였다. 상기 정제된 신경성 펩타이드의 유사성 비교결과를 하기 표 2에 표시하였다.

표 2

[0065]

펩타이드 명칭 (종)	아미노산 서열	참고 문헌
S1 (Asteroidae)	Gly-Phe-Asn-Ser-Ala-Leu-Met-Phe-amide(서열번호 2)	(Elphick MR *et al.*, *Proc Biol Sci.* 1991 243, 121-127)
S2 (Asteroidae)	Ser-Gly-Pro-Tyr-Ser-Phe-Asn-Ser-Gly-Leu-Tyr-Phe-amide(서열번호 3)	
GFSKLYFa (Holothuroidea)	Gly-Phe-Ser-Lys-Leu-Tyr-Phe-amide(서열번호 4)	(Diaz Miranda *et al.*, Biol Bull 182: 241 - 247. 1992)
SGTSVLYFa (Holothuroidea)	Ser-Gly-Tyr-Ser-Val-Leu-Tyr-Phe-amide(서열번호 5)	
GYSPFMFa (Holothuroidea)	Ser-Gly-Tyr-Ser-Pro-Phe-Met-Phe-amide(서열번호 6)	(Ohtani M et al., 1999, *J Biosci Bioeng*.88(1):12-9
FKSPFMFa (Holothuroidea)	Phe-Lys-Ser-Pro-Phe-Met-Phe-amide(서열번호 7)	

[0066] **실시예 12: 아무르 불가사리 DRM에 대한 근육 이완활성 측정**

[0067] 본 발명의 일 실시예에 따라 아무르불가사리로부터 정제된 AML의 이완활성을 측정하기 위하여 별불가사리(*Asterina pectinifera*)의 DRM을 이용하였다.

[0068] 구체적으로 아무르 불가사리 DRM의 표본을 만들기 위해 아무르 불가사리의 안점(eye spot)을 제거한 후 5개 팔을 따라 중앙을 가로지르는 DRM을 메스로 분리한 후, 5 mm정도의 단편으로 만들었다. 상기 준비된 각 단편들은 반응조 내의 지지대에 고정시키고, 위쪽은 등용매성 트랜스듀서(isometric transducer)에 연결하였다. 상기 연결된 조직에 1 g의 장력을 준 뒤, 실온에서 15분 간격으로 인공해수(55 mM Mg^{2+})를 교체하며 평형화시켰다. 그 후, 5 × 10^{-6} M 아세틸콜린을 투여하여 활성화 시켰고, 15분 경과 후 5 × 10^{-6} M의 아세틸콜린을 투여하여 근육을 수축시킨 후, 각 HPLC 정제단계에서 얻은 분획들 및 합성 펩타이드를 투여하였다. 상기 모든 과정은 (mM) NaCl 445, KCl 10, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 10, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 55, Glucose 10 및 pH 7.8 Tris-HCl 10의 조성을 가진 인공해수(artificial sea water)를 사용하였다.

[0069] 이 후 아무르 불가사리로부터 정제된 AML과 C 말단이 아마이드화된 AML-NH_2의 별불가사리 DRM에 대한 근육 이완활성을 측정하였다. 상기 이완활성은 5 × 10^{-6} M 아세틸콜린의 최대수축에 대한 상대적 이완율(%)로서 나타냈다. 한편, 반응의 크기는 ED_{50}(최고 이완의 50%를 나타낼 때의 농도) 및 E_{max} (10^{-5} M에서의 이완%)로서 비교하였으며, 그 결과로부터 두 물질의 상대적 효과를 계산하였고 상기 ED_{50}값은 최소자승법(least square method)으로 계산하였다.

[0070] 그 결과, 카르복실화(caboxylation) 및 아마이드화(amidation)된 AML은 10^{-11} M에서 각각 9.17%와 12.45%의 역치값을 가졌고, EC_{50}은 각각 1.4×10^{-8} M과 1.6×10^{-8} M를 나타내었다. 또한, 카르복실화 및 아마이드화된 AML은 10^{-5} M에서 각각 107.82 ± 3.83%와 101.17 ± 1.65%의 최대 이완활성을 나타내었다(도 8).

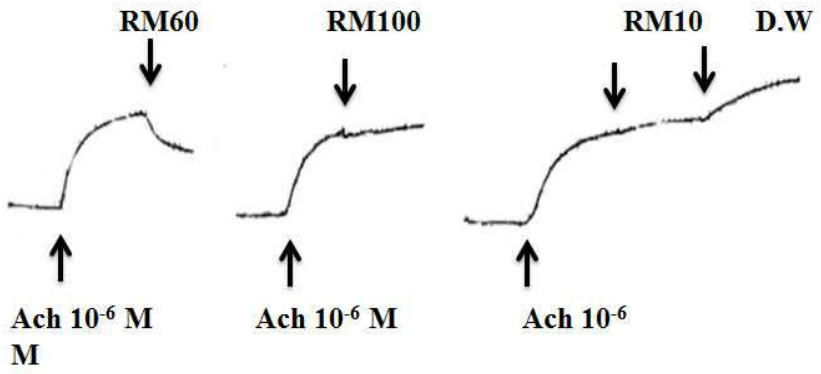
[0071] 상기 결과들로부터 본 발명의 일 실시예에 따른 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 구성되는 아무르불가사리 유래의 신경 펩타이드는 C-말단의 형태와 무관하게 근육 이완작용이 매우 뛰어남을 알 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 신경 펩타이드는 근육 이완제로서 근육통, 근위축성 축삭경화증 등의 질병의 치료 및

증상의 완화에 효율적으로 사용될 수 있다.

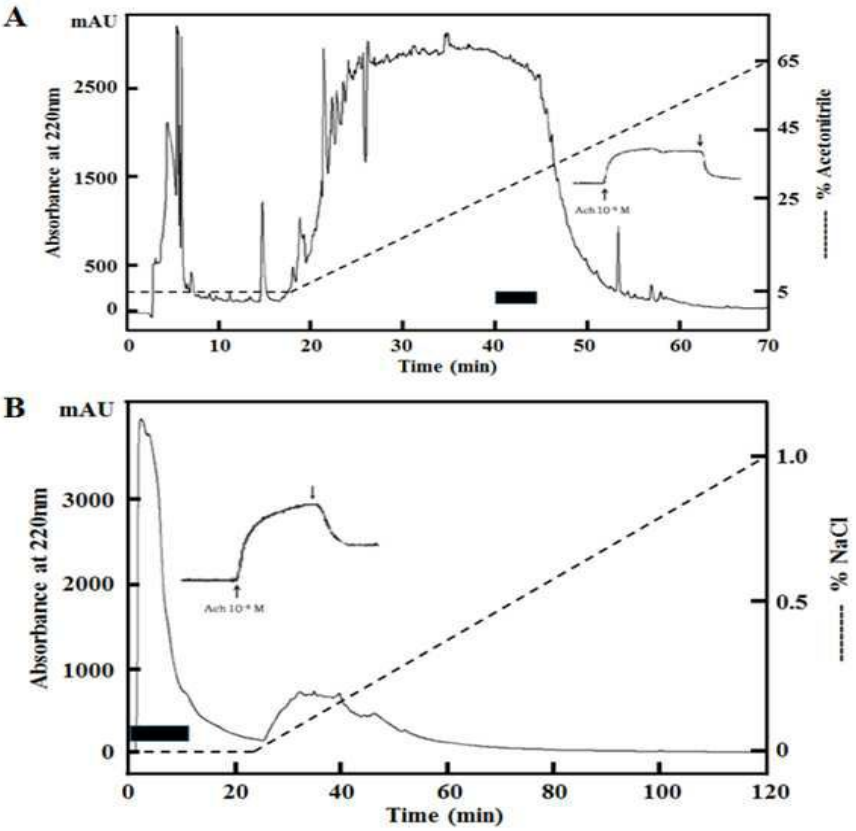
[0072] 본 발명은 상술한 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

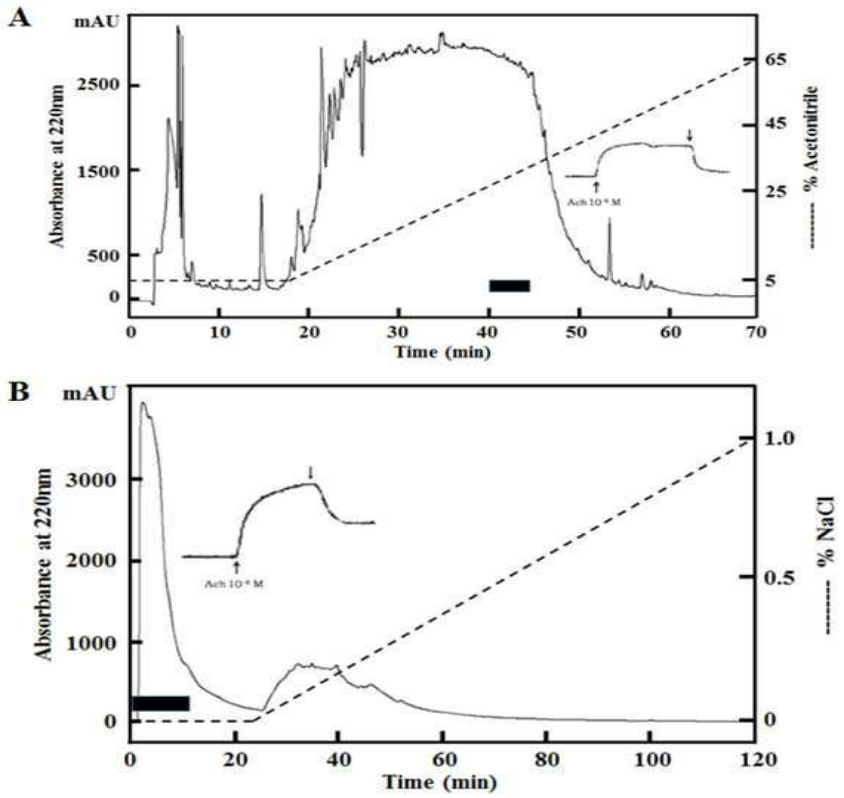
도면1



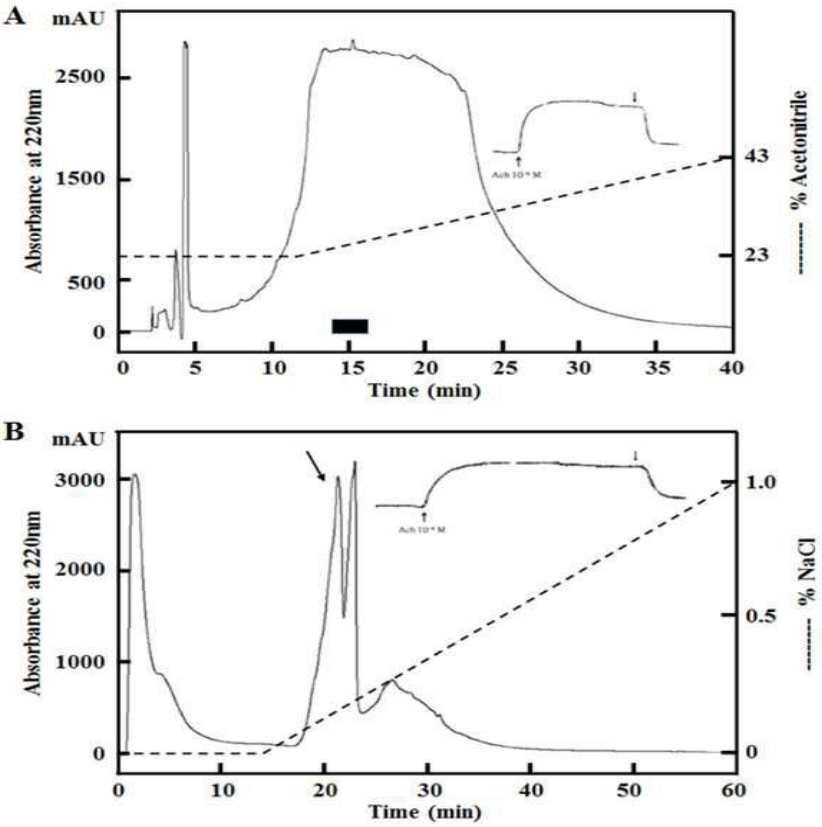
도면2



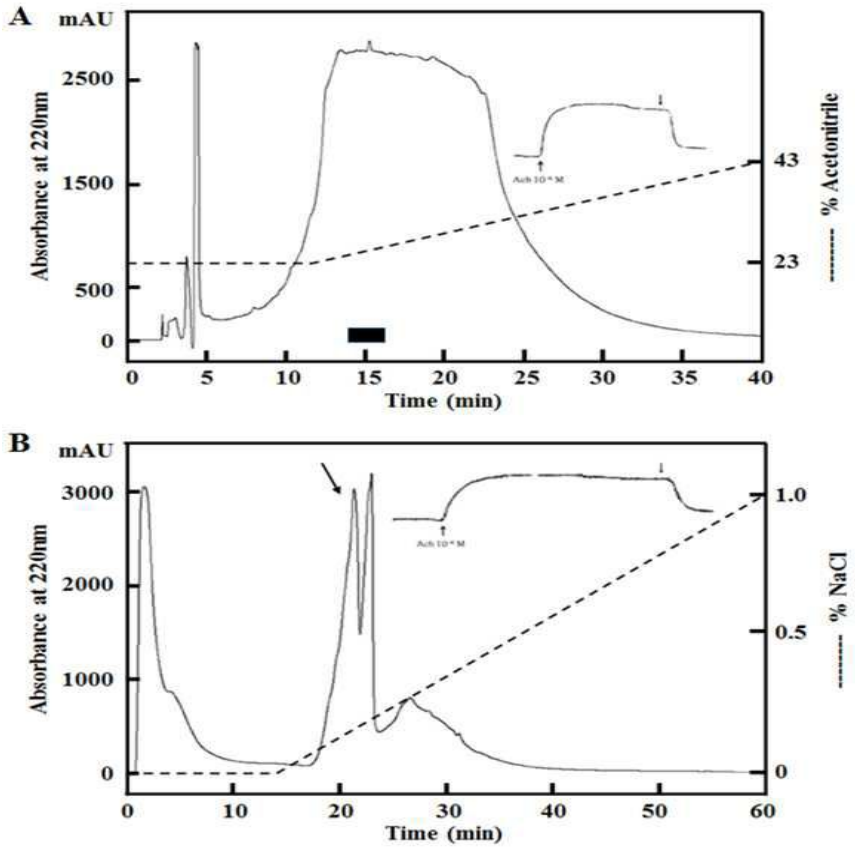
도면3


A
mAU
Absorbance at 220nm
2500
1500
500
0
65
45
25
5
% Acetonitrile
Ach 10⁻³ M
0
10
20
30
40
50
60
70
Time (min)
B
mAU
Absorbance at 220nm
3000
2000
1000
0
1.0
0.5
0
% NaCl
Ach 10⁻³ M
0
20
40
60
80
100
120
Time (min)

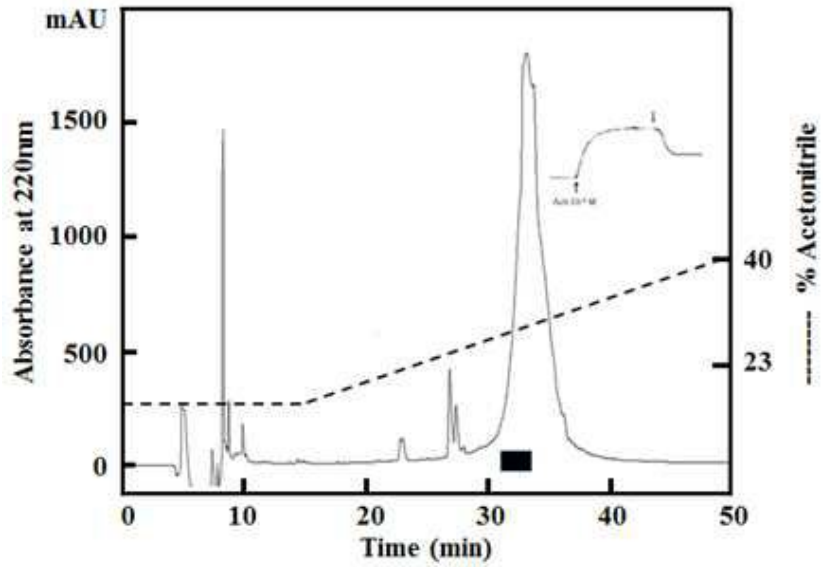
도면4


A
mAU
Absorbance at 220nm
2500
1500
500
0
43
23
% Acetonitrile
Ach 10⁻³ M
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Time (min)
B
mAU
Absorbance at 220nm
3000
2000
1000
0
1.0
0.5
0
% NaCl
Ach 10⁻³ M
0
10
20
30
40
50
60
Time (min)

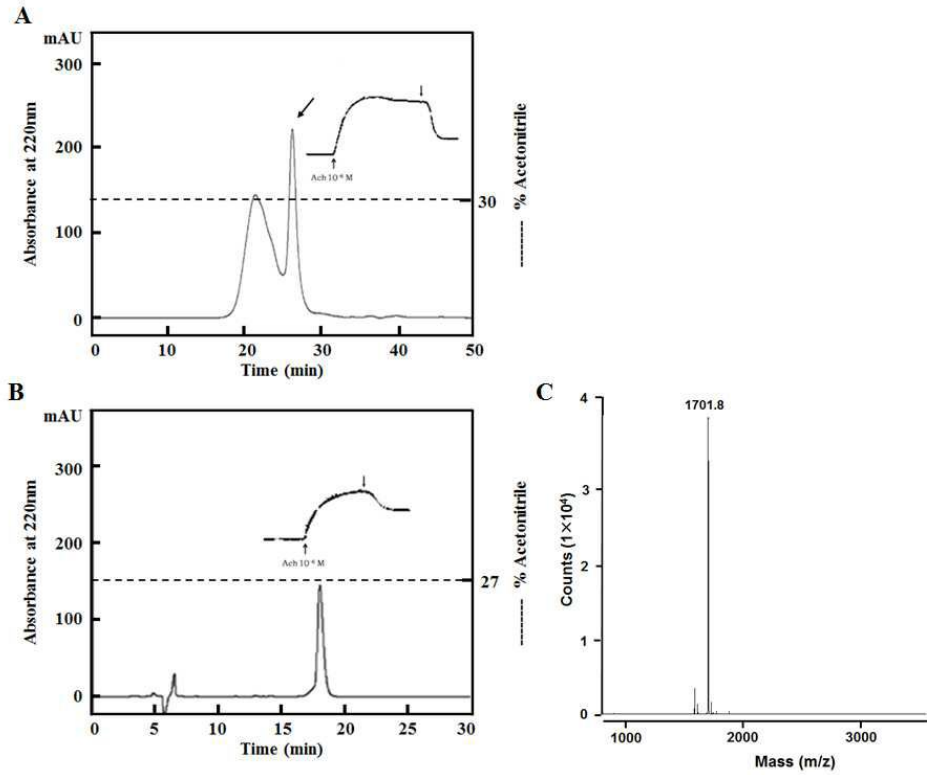
도면5


A
mAU
2500
1500
500
0
Absorbance at 220nm
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Time (min)
43
23
------ % Acetonitrile
B
mAU
3000
2000
1000
0
Absorbance at 220nm
0
10
20
30
40
50
60
Time (min)
1.0
0.5
0
------ % NaCl

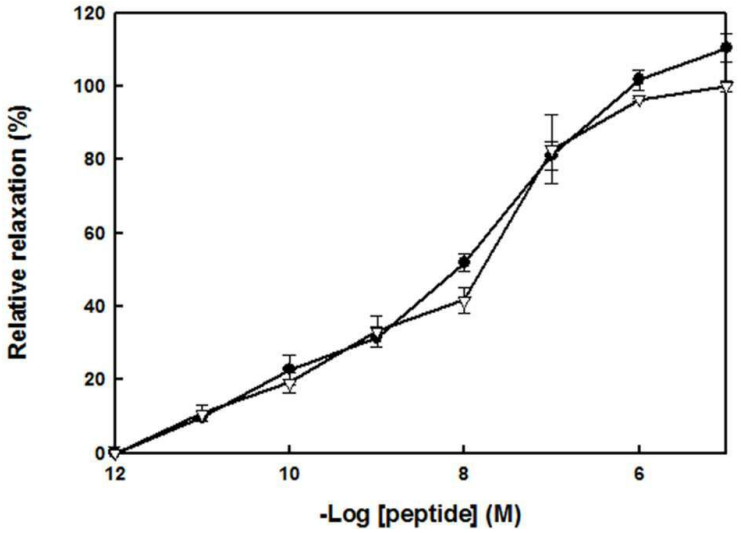
도면6


mAU
1500
1000
500
0
Absorbance at 220nm
0
10
20
30
40
50
Time (min)
40
23
------ % Acetonitrile

도면7



도면8



서 열 목 록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> A Novel neurogenic peptide from the North Pacific seastar, Asterias amurensis, and uses thereof

<130> PD15-5201

<160> 7

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Asterias amurensis

<400> 1

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

Arg

<210> 2

<211> 8

<212
> PRT

<213> Asteroidae S1

<400> 2

Gly Phe Asn Ser Ala Leu Met Phe
1 5

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Asteroidae S2

<400> 3

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

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Holothuroidea GFSKLYFa

<400> 4

Gly Phe Ser Lys Leu Tyr Phe
1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Holothuroidea SGTSVLYFa

<400> 5

Ser Gly Tyr Ser Val Leu Tyr Phe

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Holothuroidea GYSPFMFa

<400> 6

Ser Gly Tyr Ser Pro Phe Met Phe

1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Holothuroidea FKSPFMFa

<400> 7

Phe Lys Ser Pro Phe Met Phe

1 5