



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0038408
(43) 공개일자 2020년04월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) A23L 33/17 (2016.01)
A61K 38/43 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/1709 (2013.01)
A23L 33/17 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0110742
(22) 출원일자 2019년09월06일
심사청구일자 2019년09월06일
(30) 우선권주장
1020180117692 2018년10월02일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
차의과학대학교 산학협력단
경기도 포천시 해룡로 120, 차의과학대학교내 (동교동)
(72) 발명자
신민정
서울특별시 강남구 영동대로 230, 3동 101호 (대치동, 우성1차아파트)
김현수
서울특별시 노원구 중계4동 131번지
정지형
서울특별시 강남구 영동대로 230, 3동 101호 (대치동, 우성1차아파트)
(74) 대리인
이처영, 장제환

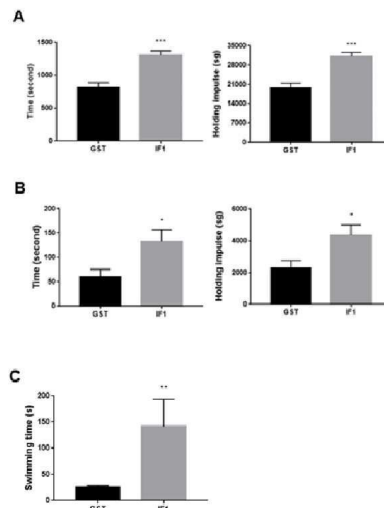
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 근감소증의 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 함유하는 근감소증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 근육량 증가 및 근생성 효과를 가지는 IF1을 유효성분으로 함유하는 근감소증의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 식품에 관한 것이다. 본 발명에 따른 IF1 (ATPase inhibitory factor 1)은 비만이 유발된 마우스 또는 노화 마우스에서 부작용 없이 근육량 증가, 근육 단백질 증가 및 근생성 효과를 나타내므로, 근감소증 등의 근육 감소 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료제로 매우 유용하다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 38/43 (2013.01)

A61P 21/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/316 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 근감소증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 근육량을 증가시키거나, 근육손실을 방지하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 근감소증은 노화 또는 비만에 의한 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 근감소증은 근위축증 (muscular atrophy), 무용성 근위축(disuse atrophy), 척수성 근위축(spinal muscular amyotrophy), 근이영양증 (dystrophy), 근경직증, 근긴장저하 (muscular hypotonia), 근력 약화, 근육퇴행위축 (muscular dystrophy), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 척수구근 근위축(sphingobulbar muscular atrophy) 및 중증근무력증 (myasthenia gravis)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 근감소증의 예방 또는 개선용 식품.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 식품은 근육량을 증가시키거나, 근육손실을 방지하는 것을 특징으로 하는 식품.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 근감소증은 노화 또는 비만에 의한 것을 특징으로 하는 식품.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 근감소증은 근위축증 (muscular atrophy), 무용성 근위축(disuse atrophy), 척수성 근위축(spinal muscular amyotrophy), 근이영양증 (dystrophy), 근경직증, 근긴장저하 (muscular hypotonia), 근력 약화, 근육퇴행위축 (muscular dystrophy), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 척수구근

근위축(sphingobulbar muscular atrophy) 및 중증근무력증 (myasthenia gravis)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 식품.

청구항 10

제6항에 있어서, 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 식품.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 함유하는 근감소증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 근육량 증가 및 근생성 효과를 가지는 IF1을 유효성분으로 함유하는 근감소증의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 식품에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 골격근은 인체에서 가장 큰 부분을 차지하는 기관으로 총 몸무게의 40-50%를 차지하며 에너지 항상성 및 열생성 등을 비롯한 체내 여러 대사 기능에도 중요한 역할을 한다. 사람의 근육은 40세 이후부터 매년 1% 이상씩 감소하며, 80세가 되면 최대 근육량의 50% 수준이 감소되며, 노년의 근육 감소는 전반적인 신체기능을 떨어뜨리는 가장 중요한 요소로 인식되고 있다. 노화가 진행되는 동안 근육량(skeletal muscle mass) 감소에 따른 근력의 저하를 근감소증 (sarcopenia)이라 일컫는다.
- [0004] 근감소증은 다양한 요인에 의해 유발되나, 각각의 요인들에 대한 연구는 아직 미진하다. 성장 호르몬의 감소 또는 신경학적 변화 (neurological change), 생리활성(physical activity)의 변화, 대사의 변화, 성호르몬의 양 또는 지방이나 카타볼릭 싸이토카인(catabolic cytokines)의 증가와 단백질의 합성과 분화의 균형 변화에 의해 유도된다 (Roubenoff R and Hughes VA, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55: M716-M724, 2000).
- [0005] 또한, 근위축 (muscular atrophy)은 근육의 사용 감소와 같은 기계적 자극의 부재에 의한 근육 조직의 손상, 직접적인 상해나 물리적 요인에 의한 근육의 파괴, 노화에 의한 근육 세포의 회복력 장애, 그리고 근육의 작용을 조절하는 신경의 손상으로 인한 근육 사용의 장애와 같은 요인에 의해 발생한다 (Booth FW *et al.*, *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 1982). 일반적인 경우 장애나 사고에 의해 장기간 해당 부위와 주변부의 근육을 사용하지 않아 근육 강도의 소실로 인해 점차 근위축으로 진행되는 무용성근위축 (disuse atrophy)이 나타나며, 근육 자체의 질병으로 인한 중증 근무력증 (myasthenia gravis), 근이영양증 (dystrophy), 근육 자체에 발생하는 염증, 근육을 지배하는 신경의 손상으로 인한 근위축인 척수성 근위축 (spinal muscular amyotrophy), 근위축성 측삭경화증 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 척수구근 근위축 (sphingobulbar muscular atrophy) 등의 형태로도 발병된다.
- [0006] 이러한 근감소증을 효율적으로 제어하는 방법에 대해 다양한 연구가 수행되고 있으며, 근감소증의 진행을 둔화시키는 방법으로는 주로 근감소증의 일종인 근육세포의 퇴행 또는 진행성 변이에 의해 유발되는 근위축증을 억제하는 방법이 사용되고 있다. 예를 들어, WO 2007/088123에는 니트록시 유도체를 유효성분으로 포함하는 근위축증 치료제가 개시되어 있고, WO 2006/081997에는 아트라릭산 또는 그의 유도체를 유효성분으로 포함하는 근위축증 치료제가 개시되어 있다. 그러나, 화합물을 유효성분으로 포함하는 이들 치료제는 근위축증이 발병된 골격근 뿐만 아니라, 근위축증과 관련되지 않은 내장근 또는 심근에도 작용하기 때문에, 크고 작은 다양한 부작용이 유발될 수 있어, 실질적인 치료에 사용되지 못하고 있다. 또한, 성장 호르몬 (GH)에 의한 치료가 근육 질량을 증가시킬 수 있는 것으로 나타났지만, 이러한 치료는 매우 고가라는 단점이 있다.
- [0007] 따라서, 고령 환자 또는 병상에 누워있는 환자에서도 부작용 없이 근감소증의 진행을 지연시킬 수 있는 효율적인 근감소증 치료 약물 및 기술개발이 절실한 상황이다.
- [0008] 한편, ATPase inhibitory factor 1 (IF1)은 미토콘드리아 내에서 ATP synthesis 합성 및 분해에 관여하는 F1Fo ATP synthase (multi-subunit, membrane-bound assembly)에 결합, 즉 IF1이 세포막에서 β -F1-ATPase에 결합함

으로써 PI3K-Akt 경로 등의 세포내 신호체계를 유발하고 이를 통해 생체반응을 유발한다. 또한, 본 발명자들은 L6 myoblast에 IF1을 처리하면 배지에서의 ATP 농도가 유의하게 증가하고, 이때 촉발되는 세포신호전달체계에 의해 근육세포 내 Akt의 인산화가 증가하는 것을 확인한 바 있다. 최근의 연구들은 근육세포내 Akt 인산화와 후속적인 mTORC 경로 활성화는 단백질의 분해를 지연시키고 단백질 합성을 촉진시킨다고 보고하고 있다 (Bodine *et al.*, *Nat Cell Biol.* 3(11):1014-9, 2001). 또한 근육 성장에 대한 음성 조절자로 알려져 있는 마이오스타틴의 발현도 증가는 근원성 (myogenic) 마커 유전자들의 발현도를 조절함으로써 근위축과 근감소를 유발하는 것으로 알려져 있다 (Rodriguez *et al.*, *Cell Mol Life Sci.* 71(22):4361-71, 2014). 따라서, IF1은 근육세포막의 F1-ATPase subunit과의 상호작용을 통해 세포외액 ATP 농도증가를 초래함을 알 수 있는데, 이것은 후속적인 생체대사 신호전달을 통해 근육 생성을 촉진하고 근위축 및 감소를 저해할 수 있다고 판단할 수 있는 근거가 된다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 부작용이 없고 효과가 우수한 근감소증 치료제를 개발하고자 예의 노력한 결과, IF1 재조합 단백질 투여에 의해 마우스의 근육량 및 근육 단백질 양이 증가하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 근육량 증가 및 근생성 효과를 나타내는 IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 근감소증의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 식품을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 근감소증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 근감소증의 예방 또는 개선용 식품을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 IF1 (ATPase inhibitory factor 1)은 비만이 유발된 마우스 또는 노화 마우스에서 부작용 없이 근육량 증가, 근육 단백질 증가 및 근생성 효과를 나타내므로, 근감소증 등의 근육 감소 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료제로 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 IF1 처리에 의한 마우스의 근육량 및 근섬유 밀도의 증가를 보여주는 것으로, (A) 대퇴사두근 (quadriceps), (B) 비복근 (gastrocnemius), (C) 대퇴사두근과 비복근 무게의 합, (D) 대퇴사두근의 조직면역 염색 결과를 나타낸 것이다. 각각의 데이터는 그룹별 평균 $\pm$ SE 값을 의미함. * $P < 0.05$ compared with HF-GST group

도 2는 IF1 처리에 의한 마우스의 비복근 단백질량 증가를 보여주는 것으로, 비만 마우스에서 감소한 비복근 단백질 양이 IF1 투여에 의해 증가한 것을 나타낸다. 각각의 데이터는 그룹별 평균 (relative to control, %) $\pm$ SE 값을 의미함. * $P < 0.05$ compared with HF-GST group

도 3은 IF1 처리에 의한 마우스의 근육 관련 유전자의 발현 변화를 보여주는 것으로, 근육 성장에 대한 음성 조절자로 알려져 있는 마이오스타틴 유전자의 발현 감소 및 근육생성에 관여하는 유전자인 마이오게닌의 발현 증가를 나타낸다. 각각의 데이터는 그룹별 평균 (relative to control, %) $\pm$ SE 값을 의미함. * $P < 0.05$ compared with HF-GST group

도 4는 IF1 처리에 의한 마우스의 근육기능 강화 및 회복을 보여주는 것으로, hanging test의 시행으로 (A) 비만모델, (B) 노화모델에서 매달린 시간과 이를 무게로 보정한 것 (impulse)을 포함하며 (C) 개량된 FST (Forced swimming test)를 통한 비만모델 마우스의 수영시간 ($\log_2$)을 나타낸다. 각각의 데이터는 그룹별 평균 (relative to control, %) $\pm$ SE 값을 의미함. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with HF-GST group

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0021] ATPase inhibitory factor 1 (이하 IF1)은 84개 아미노산으로 이루어진 9.6-kDa basic 단백질이고, *ATP5IF1* 유전자에 의해 암호화된다. ATPase는 F0, F1 domain과 central, peripheral stalk로 구성되며 여러 subunit으로 세분화된다. IF1은 ATPase의 기능을 방해하는 주요한 단백질로서 인체 내에서 자연적으로 생성되어 미토콘드리아에 의한 ATP 생성 및 분해를 조절하는 타겟으로서 많은 연구가 이루어져 있다 (Campanella *et al.*, *Cell Metab*, 8:13-25, 2008). IF1의 inhibition 작용은 ATPase의 α subunit, β subunit 부위에 결합함으로써 회전 운동을 방해하여 시작된다. IF1이 세포막 (plasma membrane)에 위치하는 F1-ATPase subunit과 결합하고, 이때 F1-ATPase 활성 조절로 ATP 가수분해가 억제됨으로 인해 세포외액의 ATP (extracellular ATP, exATP) 증가를 유발하며, exATP 는 세포막의 퓨린성 수용체와 반응한 후 퓨린성 신호전달을 통해 여러 가지 유용한 세포내 반응을 유발하게 된다.
- [0022] 하지만, IF1의 근육량, 근육 단백질 증가 또는 근생성 관련 기작은 전혀 알려진 바가 없다.
- [0023] 이에, 본 발명에서는 마우스 IF1 전체 mRNA 서열 (NCBI No. NM_007512.3)을 바탕으로 GST-tag를 포함한 IF1의 DNA data를 클로닝을 통하여 재조합 단백질 (서열번호 1)을 생산하고, 재조합 IF1을 비만 마우스 및 노화 마우스 모델에 투여하여 IF1에 의한 근육량, 근육 단백질 및 근생성 증가 등의 효과를 확인하였다. 즉, ATPase inhibitory factor 1 (IF1)의 근감소증 예방 및 치료 효과를 입증하였다.
- [0025] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 근감소증의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 근육량을 증가시키거나, 근육손실을 방지하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 근감소증은 노화 또는 비만에 의한 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 용어 "노화에 의한 근감소"는 노화에 따른 점진적인 골격 근육량의 감소 또는 근육의 밀도와 기능이 점차적으로 약화되는 것을 의미하는 것으로서, 직접적으로 근력의 저하를 유발하며 그 결과 각종 신체기능의 감소 및 장애를 일으킬 수 있는 상태를 의미한다.
- [0029] 상기 근육 노화 관련 질환은, 노화성 근감소증(age related sarcopenia), 동작 뉴런 질병, 대사성 근육 질병, 염증성 근병증, 신경근 접합부 질병, 내분비성 근병증일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 근감소증은 근위축증 (muscular atrophy), 무용성 근위축(disuse atrophy), 척수성 근위축(spinal muscular amyotrophy), 근이영양증 (dystrophy), 근경직증, 근긴장저하 (muscular hypotonia), 근력약화, 근육퇴행위축 (muscular dystrophy), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 척수근 근위축(sphingobulbar muscular atrophy) 및 중증근무력증 (myasthenia gravis)으로 구성된 군에서 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 용어 "근감소증"이란 근육량이 감소되는 질환으로서, 근육의 파괴 및 근력이 점진적으로 쇠퇴하는 질환을 의미한다. 특히 사지의 근육이 거의 좌우대칭적으로 점점 위축되어 가는 질환의 통칭을 의미하는데, 암, 노화, 신장 질환, 유전성 질환, 다양한 만성질환의 유발시에 수반될 수 있으며, 근위축성 측삭경화증(루게릭 병), 척수성 진행성근위축증 등으로 대표되고 근육이 위축되는 근위축증을 포함한다.
- [0032] 본 발명의 용어 "근위축"은 근육을 사용하지 않음으로써 발생하는 근육조직의 손실로 인한 근위축, 근육 자체의

병으로 인한 근위축 또는 근육을 지배하는 신경의 손상으로 인한 근위축인 것이 바람직하다. 상기 근육을 사용하지 않음으로써 발생하는 근육 조직의 손실로 인한 근위축은 무용성 근위축(disuse atrophy), 상기 근육 자체의 병으로 인한 근위축은 중증근무력증(myasthenia gravis) 또는 근이영양증(dystrophy): 진행성 근이영양증, 근긴장성 근이영양증, 듀센형, 베커형, 지대형, 안면건갑상완형, 근육 자체에 발생하는 염증, 근육을 지배하는 신경의 손상으로 인한 근위축은 척수성 근위축(spinal muscular amyotrophy): 베라드니히-호프만형, 쿠젤베르그, 벨란더병, 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis): 루게릭병, 또는 척수구근 근위축(sphino bulbular muscular atrophy): 케네디병인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0033] 노화성 근감소증을 비롯한 근육 노화 관련 질환은 근이영양증(muscle dystrophy)이나 근위축증 (muscle atrophy)과는 구별된다.

[0034] 구체적으로, 근이영양증 환자는 근육 조직 검사에서 근육의 피사를 보이며, 근섬유의 크기가 고르지 않고 다양하며 근섬유가 피사된 자리에 지방 및 섬유화 조직으로 대체되는 증상을 보이며, 상기 근이영양증으로는 베커 근이영양증, 뒤센 근이영양증, 선천성 근이영양증(Congenital muscular dystrophy), 에머리 드라이푸스 근이영양증(Emery-Dreifuss muscular dystrophy) 등이 대표적인 것으로 알려져 있다 (Alan E H Emery, *Lancet* 23;359(9307):687-95, 2002).

[0035] 또한, 근위축증은 사지의 근육이 위축되는 것을 의미하며, 근위축성 측삭경화증과 척수성 진행성 근위축증이 대표적이며, 이는 척수에 있는 운동신경섬유 및 세포의 진행성 변성에 의한 질환으로 알려져 있다.

[0036] 구체적으로, 상기 척수성 근위축증은 척수의 운동신경 세포의 변성에 의한 유전적 장애로서, 영유아 및 소아에게 나타나는 신경 근육 질환으로 알려져 있다. 또한, 근위축성 측삭경화증은 대뇌와 척수의 상위 운동신경세포와 하위 운동신경 세포의 사멸에 의한 난치성, 비가역 신경퇴행성 변화가 특징이며, 신경성장인자의 부족 및 신경염증이 주원인인 것으로 알려져 있다.

[0037] 현재, 노화에 따른 근감소증의 치료 방법으로는 유로코르틴 II(urocortin II)를 이용하는 방법, 호르몬 대체 치료법(hormone replacement therapy) 등이 있으나, 몇 가지 부작용이 보고되어 있어 근육 노화 관련 질환에 대한 근본적인 치료로서는 부족한 측면이 있다.

[0038] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 본 발명의 IF1을 마우스에 투여한 경우, 근육 무게가 증가 및 근육 단백질의 양이 증가하는 것을 확인하였으며, 근육 생성 및 분해 관련 유전자의 발현에도 영향을 미치는 것을 확인하였다. 이로써, IF1가 근육량을 증가시키고, 근육 손실을 방지함으로써, 효과적으로 근육 기능을 회복, 개선하는 것을 확인할 수 있었다.

[0039] IF1의 치료 효과는 압, 노화 등의 다양한 원인에 의하여 발병되는 근감소증 뿐만 아니라 근위축증에도 동등하게 적용될 수 있다.

[0040] 본 발명의 용어 "예방"이란, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여로 근감소증 또는 근육 소모 관련 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0041] 본 발명의 용어 "치료"란, 본 발명의 약학 조성물을 투여함으로써, 근감소증 또는 근육 소모 관련 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.

[0042] 상기 근감소증 치료는 근감소증 또는 근육 소모 관련 질환이 발생할 수 있는 임의의 포유 동물에 적용이 가능하며, 그 예로 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등 가축을 제한없이 포함하나, 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0043] 본 발명에서 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물들의 투여 경로는 약물이 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비강내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 등이 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0044] 상기 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 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 발명의 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.

- [0045] 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.
- [0046] 본 발명의 약학조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중독도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물을 사람을 포함하는 포유동물에 하루 동안 10 내지 100 mg/kg, 보다 바람직하게는 10 내지 30 mg/kg으로 투여할 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 내지 3회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 약학적 조성물은, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 근감소증 치료 또는 예방용 약학 조성물의 형태로 제조될 수 있는데, 상기 담체는 비자연적 담체 (non-naturally occurring carrier)를 포함할 수 있다.
- [0048] 구체적으로, 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0049] 본 발명에서, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 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 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0050] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.
- [0051] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0052] 의약 조성물은 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액으로서 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예, 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형될 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매중의 멸균 주사용액 또는 현탁액(예, 1,3-부탄디올중의 용액)일 수 있다. 허용적으로 사용될 수 있는 비히클 및 용매로는 만니톨, 물, 링겔 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 불휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해, 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 어떠한 불휘발성 오일도 사용할 수 있다. 올레산 및 이의 글리세라이드 유도체와 같은 지방산이 약제학적으로 허용되는 천연오일(예, 올리브유 또는 피마자유), 특히 이들의 폴리옥시에틸화된 것과 마찬가지로 주사 제제에 유용하다.
- [0053] 본 발명의 의약 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다. 이들 조성물은 본 발명의 화합물을 실온에서 고형이지만 직장 온도에서는 액상인 적합한 비자극성 부형제와 혼합하여 제조할 수 있다. 이러한 물질로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 코코아 버터, 밀랍 및 폴리에틸렌 글리콜이 포함된다.
- [0054] 본 발명에 따른 의약 조성물의 비경구 투여는 목적하는 치료가 국소 적용으로 접근이 용이한 부위 또는 기관과 관련이 있을 때 특히 유용하다. 피부에 국소적으로 적용하는 경우, 의약 조성물은 담체에 현탁 또는 용해된 활성성분을 함유한 적합한 연고로 제형되어야 한다. 본 발명의 화합물을 국소 투여하기 위한 담체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 광유, 유동 파라핀, 백색 와셀린, 프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌, 폴리옥시프로필렌 화합물, 유화 왁스 및 물이 포함된다. 다른 방도로서, 의약 조성물은 담체에 현탁 또는 용해된 활성 화합물을 함유한 적합한 로션 또는 크림으로 제형될 수 있다. 적합한 담체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 광유, 솔비탄 모노스테아레이트, 폴리솔베이트 60, 세틸 에스테르 왁스, 세테아릴 알코올, 2-옥틸도데카놀, 벤질 알코올

및 물이 포함된다. 본 발명의 의약 조성물은 또한 직장 좌제에 의해 또한 적합한 관장제로 하부 장관으로 국소 적용할 수 있다. 국소 적용된 경피 패치가 또한 본 발명에 포함된다.

- [0055] 본 발명의 의약 조성물은 비내 에어로졸 또는 흡입에 의해 투여할 수 있다. 이러한 조성물은 약제의 분야에 잘 알려진 기술에 따라 제조하며 벤질 알코올 또는 다른 적합한 보존제, 생체이용율을 증강시키기 위한 흡수 촉진제, 플루오로카본 및/또는 기타 본 분야에 알려진 가용화제 또는 분산제를 사용하여 염수중의 용액으로서 제조할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 약학 조성물에 포함된 상기 제제의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 최종 조성물 총중량을 기준으로 0.0001 내지 50 중량%, 보다 바람직하게는 0.01 내지 10 중량%의 함량으로 포함할 수 있다.
- [0058] 본 발명은 다른 관점에서, IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 근감소증의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.
- [0059] 본 발명은 또 다른 관점에서, IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 약학 조성물을 근감소증의 예방 또는 치료에 사용하는 용도에 관한 것이다.
- [0060] 본 발명은 또 다른 관점에서, 근감소증의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 약학 조성물의 용도에 관한 것이다.
- [0061] 본 발명의 용어 "개체"란 근감소증이 이미 발병하였거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 조성물을 개체에게 투여함으로써, 상기 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.
- [0063] 본 발명은 또 다른 관점에서, IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 근감소증의 예방 또는 개선용 식품에 관한 것이다.
- [0064] 본 발명의 용어 "개선"이란 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0065] 본 발명에 있어서, 상기 식품은 근육량을 증가시키거나, 근육손실을 방지하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0066] 본 발명에 있어서, 상기 근감소증은 노화 또는 비만에 의한 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0067] 본 발명에 있어서, 상기 근감소증은 근위축증 (muscular atrophy), 무용성 근위축(disuse atrophy), 척수성 근위축(spinal muscular amyotrophy), 근이영양증 (dystrophy), 근경직증, 근긴장저하 (muscular hypotonia), 근력약화, 근육퇴행위축 (muscular dystrophy), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 척수구 근위축(sphingobulbar muscular atrophy) 및 중증근무력증 (myasthenia gravis)으로 구성된 군에서 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0068] 본 발명의 식품 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15중량% 이하, 바람직하게는 10중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0069] 본 발명의 식품은, 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태로 제조할 수 있다. 예를 들면, 건강식품으로는 본 발명의 조성물을 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 하거나, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 기능성 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지, 콘비프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 조성물을 첨가하여 제조할 수 있다.
- [0070] 상기 건강 기능식품 또한, 식품조성물로서 기능성 식품, 영양보조제, 건강식품, 식품 첨가제 등의 다양한 형태

를 포함하는 것이며, 당업계에서 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태, 예컨대, 앞서 언급한 본 발명의 조성물을 차, 주스, 드링크의 형태로 제조하거나, 과립화, 캡슐화, 분말화 하거나, 이러한 화합물 또는 추출물을 음료, 과일 및 가공식품, 어유, 육류 및 그 가공식품, 빵류, 면류, 조미료 등 각종 식품에 첨가하여 제조함으로써 제공될 수 있다.

[0071] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

[0072] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.

[0074] [실시예]

[0075] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0077] 실시예 1: 마우스 준비

[0078] 1-1: 비만 동물 모델

[0079] 비만 마우스 모델로는 C57BL/6J 수컷을 사용하였으며, JOONGAH BIO에서 5주령의 마우스를 분양받아 1주간 보통 식이를 제공하며 적응기간을 거쳤다. 사육환경으로는 18~24℃, 50~60%의 습도를 항상 유지하였으며, 적응기간 및 실험기간 모두 자유급식을 이행하였다.

[0080] 1주일 적응기간이 끝난 후, 3가지 그룹으로 나뉘어 각각 다음 같은 조건으로 6주간 사육하였다.

[0081] 그룹 1: 정상식이(ND) 대조군 (n=10)

[0082] 그룹 2: 고지방식이(HFD) 대조군 (n=15)

[0083] 그룹 3: 고지방식이(HFD) 실험군 (n=15)

표 1

[0084] 정상 (ND; Normal Diet) 및 고지방식이 (HFD; 40% High Fat Diet) 조성표

Ingredients	ND (g)	HFD (g)
corn starch	15	15
Casein	20	20
Sucrose	50	34
corn oil	5	3
Mineral mix	3.5	3.5
Vitamin mix	1	1
Cellulose	5	5
DL-methionine	0.3	0.3
choline bitartrate	0.2	0.2
Lard		17
Cholesterol		1
BHT	0.001	0.001
Total	100 (g)	100 (g)

- [0085] 1주일 적응기간이 끝난 마우스들은 고지방식이로 6주 동안 비만을 유도한 다음, IF1을 투여하였다.
- [0087] 1-2: 노화 동물 모델
- [0088] 노화동물모델로는 성인기에 접어든 평균 8개월령 C57BL/6J 암컷을 사용하고, 이후 2개월간 시간의 흐름에 따른 노화과정을 진행시키며 정상식이 및 각 GST, IF1 (5mg/kg BW, 1주에 1회)처치를 시행하였다. 동물은 4개월간 휴식기간을 가진 후, randomization 과정을 통해 아래의 두 그룹으로 나뉘어 고지방식이와 함께 각 GST, IF1(5mg/kg BW, 매일 1회)을 처치하였다. 사육환경으로는 18~24℃, 50~60%의 습도를 항상 유지하였다.
- [0089] 그룹 1: 고지방식이(HFD) 대조군 + GST 복강주사 (n=4)
- [0090] 그룹 2: 고지방식이(HFD) 실험군 + IF1 복강주사 (n=4) (5mg/kg BW)
- [0092] **실시예 2: IF1 투여에 따른 근육량 증가**
- [0093] 적응기간 1주 이후 6주 동안 지속적인 비만을 유도한 마우스에 IF1 (5mg/kg BW)을 이후 4주 동안 주당 4회 복강주사 하였다. IF1은 GST-tag를 포함한 IF1의 DNA data를 클로닝을 통하여 분리, 정제하여 재조합 단백질을 생산하였다.
- [0094] 실시예 1의 마우스 3가지 그룹에 IF1을 투여하는 조건은 다음과 같다.
- [0095] 그룹 1: 정상식이(ND) 대조군 + GST 복강주사 (n=10)
- [0096] 그룹 2: 고지방식이(HFD) 대조군 + GST 복강주사 (n=15)
- [0097] 그룹 3: 고지방식이(HFD) 실험군 + IF1 복강주사 (n=15) (5mg/kg BW)
- [0098] IF1 투여 4주까지 모든 실험 및 사육기간이 모두 종료된 마우스는 해부를 위해 16시간 절식시키고, 다음날 우레탄 (urethane) 1.5g/ml을 복강주사 하여 완전히 마취시켰다. 마취 여부는 다리부분의 반사작용을 통해 검증하였으며, 마취가 이루어지면 인슐린 시린지 (syringe)를 통해 채혈하였다. 채혈로 얻어진 혈액은 즉시 2500rpm으로 30분간 4℃에서 원심분리하여 혈청을 분리하고, 채혈이 완료된 마우스는 해부하여 근육을 분리하여 빠르게 PBS에 담가 표면에 묻은 이물질을 제거하였다. 대퇴사두근 (Quadriceps) 및 비복근 (gastrocnemius)의 무게를 각각 측정하였다.
- [0099] 그 결과, 정상식이 및 고지방식이 대조군에 비해 IF1 투여군에서 대퇴사두근 (quadriceps) 및 비복근 (gastrocnemius)의 무게가 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다 (도 1A 내지 1C). 즉, IF1이 근육량 증가에 효과가 있음을 보여주는 것이다.
- [0100] 추가적으로, 근육세포의 변화를 관찰하기 위해 상기 근육검체 대퇴사두근 및 비복근은 헤마톡실린 (hematoxylin)과 에오신 (eosin) 용액을 사용해 면역염색 (Immunohistochemistry)을 진행하였다. 그 결과, IF1을 투여한 고지방식이군 마우스의 근육조직의 근섬유 밀도는 정상식이 섭취군 마우스의 것과 유사한 수준을 보여주었다 (도 1D).
- [0102] **실시예 3: IF1 투여에 따른 근육 단백질의 증가**
- [0103] 실시예 2에서 분리한 대퇴사두근 (quadriceps) 및 비복근 (gastrocnemius)에서 총 세포 단백질 (cellular protein) 양을 측정하였다.
- [0104] 구체적으로 비복근 조직 0.05g에 단백질분해 효소 억제제 (protease inhibitor)를 포함한 RIPA Lysis 버퍼를 넣어 용해시킨 후 4℃, 13000rpm에서 20분간 원심분리 한 상층액을 BCA 정량을 통해 단백질 양을 계산하였다.
- [0105] 그 결과, 고지방식이에 의해 비만이 유도된 마우스에서는 비복근의 단백질 양이 감소하였으나, IF1 투여에 의해 비복근의 단백질 양이 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다 (도 2). 즉, IF1이 근육내 단백질 증가에 효과가 있음을 보여주는 것이다.

[0107] **실시예 4: IF1 투여에 따른 근육 관련 유전자 발현 변화**

[0108] 실시예 2에서 분리한 대퇴사두근 (quadriceps) 및 비복근 (gastrocnemius)에서 근육 생성과 분해에 관여하는 유전자들의 발현 수준을 qPCR (quantitative polymerase chain reaction) 분석을 통해 비교하였다.

[0109] 구체적으로 비복근 조직의 RNA를 QIAzol Lysis reagent RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, 미국)을 이용하여 추출하고, 1 µg RNA를 올리고-dT(oligo-dT)와 superscript II 역전사효소 (Invitrogen, 미국)로 cDNA 합성하였다. 합성된 1000ng cDNA의 유전자 발현을 실시간 정량 PCR 증폭 (quantitative real-time PCR amplification)을 통해 비교하였다. 데이터는 비교-사이클 역치법(comparative-cycle threshold method)을 이용하여 확보하여 배수변화 (fold change)로 나타냈으며, 베타-액틴은 비교 CT법 (Comparative CT method)에서 대조군으로 사용하였다.

[0110] 그 결과, 고지방식이 대조군에 비해 IF1 투여군의 경우, 근육생성을 저해하는 것으로 알려져 있는 마이오스타틴 (myostatin) 유전자의 발현 수준이 현저히 감소한 것을 알 수 있었다. 또한, 근육생성에 관여하는 것으로 알려져 있는 미오게닌 (myogenin) 유전자의 발현 수준 및 IGF-1과 MYF5 유전자의 발현도 증가한 것을 알 수 있었다 (도 3). 즉, 이러한 결과는 세포외액 ATP가 퓨린성 신호전달을 만들게 되고 이는 후속적으로 촉발된 세포신호전달체계에 의해 단백질 합성의 증가, 단백질 분해 억제 등으로 이어짐을 시사한다.

[0112] **실시예 5: IF1 투여에 따른 동물의 근력증가**

[0113] 상기 실시예 1의 비만모델 마우스와 노화모델 마우스를 대상으로 근력을 측정하여, 근육의 기능회복 및 강화를 확인하였다 (도 4). 이때, 근력의 측정은 hanging test (도 4A 및 4B)와 FST (Forced swimming test) (도 4C 및 4D)를 개량하여 진행하였다.

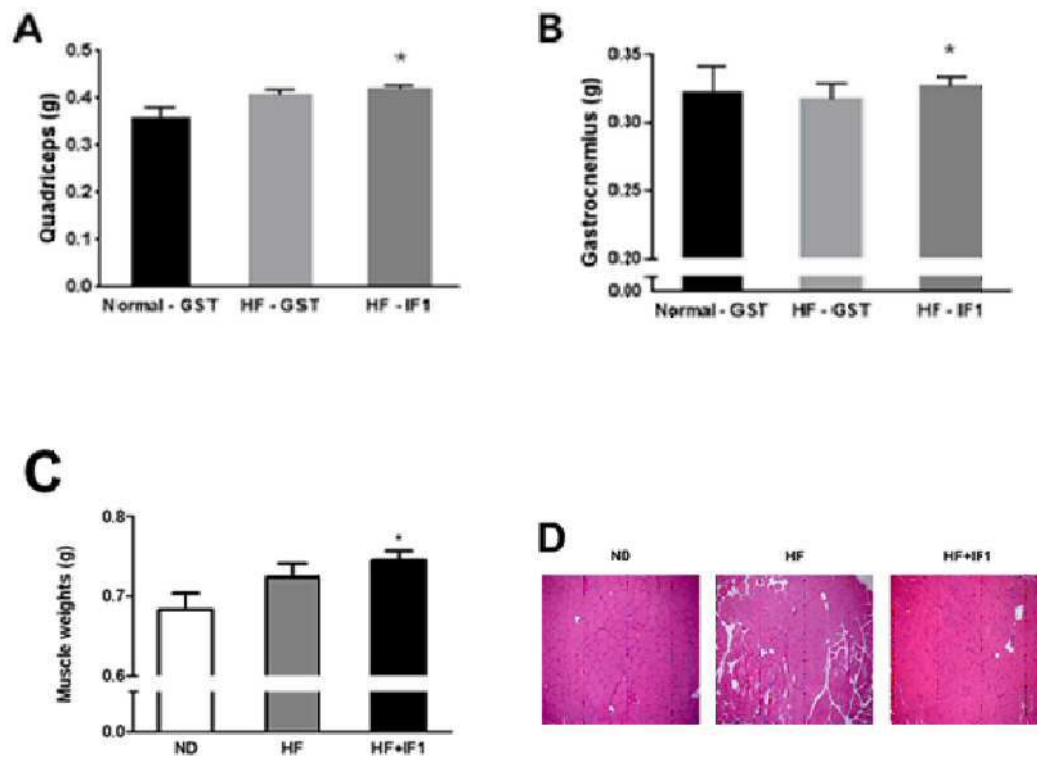
[0114] Hanging test는 1x1cm 마우스가 철장에 거꾸로 매달린 후, 바닥에 떨어지기 까지의 시간을 측정하였으며, impulse는 무게를 곱하여 보정한 지표이다. 비만모델 (도 4A)과 노화모델 (도 4B) 모두 대조군 대비 유의한 차이의 증가를 나타내며, 이는 무게보정 전후 관계없이 같은 경향을 보여주었다.

[0115] FST (forced swimming test)는 각 비만모델 마우스를 수온 34℃, 유속 2L/min에서 훈련시켜 실험에 모든 개체가 적응한 이후, 5L/min으로 변경하여 실험 진행하였다. 각 lane에는 한 마리의 마우스만 실험하였으며, 물속에서 7초이상 나오지 않을 시 실험을 중단하였다. IF1 처리시, log₋₂값을 취한 결과 대조군 대비 유의하게 증가된 수영시간을 나타내었다 (도 4C). 이는 도 4A 및 4B의 hanging test와 같은 의미를 나타내어 IF1 처리그룹의 근력증가를 나타낸다.

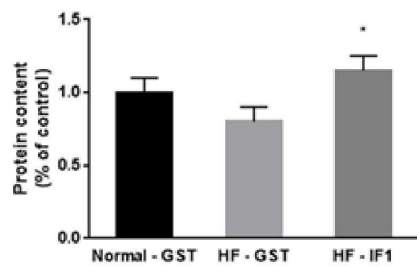
[0117] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

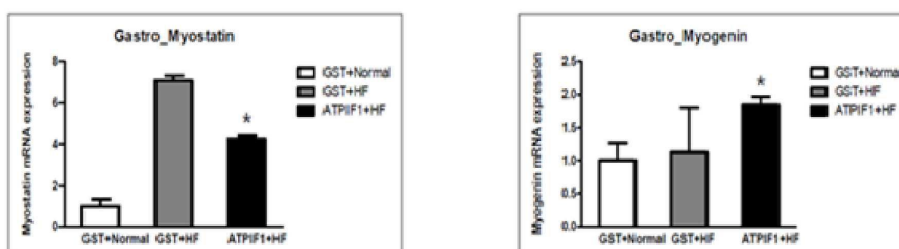
도면1



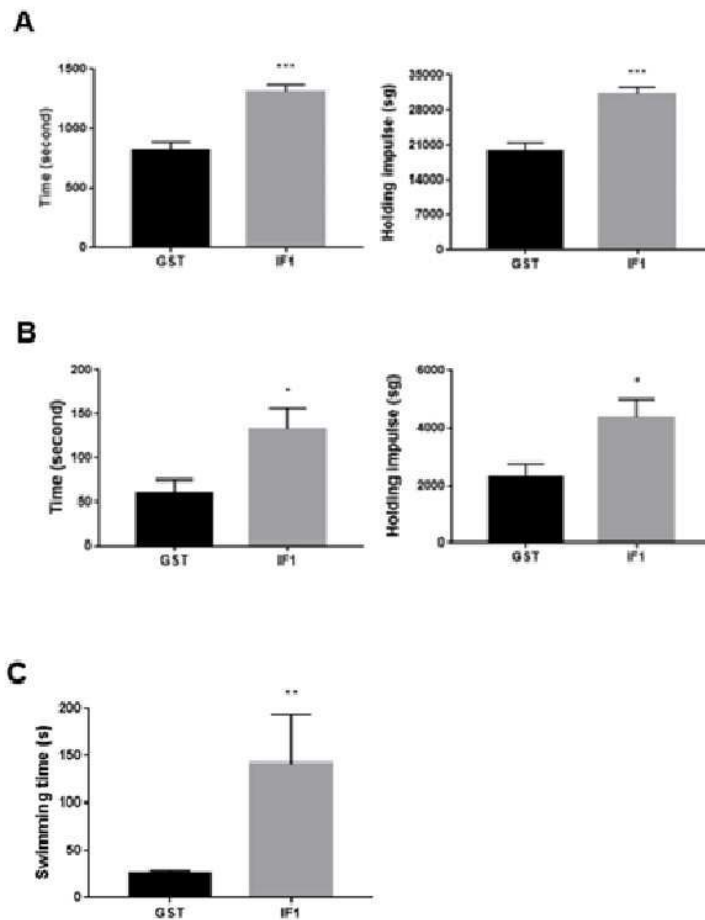
도면2



도면3



도면4



서열목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Composition for Preventing or Treating Sarcopenia Comprising IF1
- <130> P19-B198
- <150> KR 10-2018-0117692
- <151> 2018-10-02
- <160> 1
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 81
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Recombinant IF1
- <400> 1

Val Ser Asp Ser Ser Asp Ser Met Asp Thr Gly Ala Gly Ser Ile Arg
1 5 10 15
Glu Ala Gly Gly Ala Phe Gly Lys Arg Glu Lys Ala Glu Glu Asp Arg
20 25 30
Tyr Phe Arg Glu Lys Thr Lys Glu Gln Leu Ala Ala Leu Arg Lys His
35 40 45
His Glu Asp Glu Ile Asp His His Ser Lys Glu Ile Glu Arg Leu Gln
50 55 60
Lys Gln Ile Glu Arg His Lys Lys Lys Ile Gln Gln Leu Lys Asn Asn
65 70 75 80
His