



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2017-0112973  
 (43) 공개일자 2017년10월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 38/16* (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)  
*C07K 19/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 38/16* (2013.01)  
*A61K 9/0019* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-0165648
- (22) 출원일자 2016년12월07일  
 심사청구일자 2016년12월07일
- (30) 우선권주장  
 1020160036346 2016년03월25일 대한민국(KR)

- (71) 출원인  
**연세대학교 산학협력단**  
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자  
**구본녀**  
 서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원건물  
**이상규**  
 서울특별시 강남구 압구정로29길 71, 10동 1004호(압구정동, 현대아파트)
- (74) 대리인  
**특허법인인벤투스**

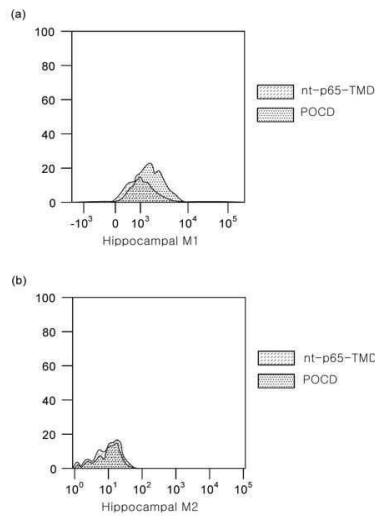
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 약학 조성물**

**(57) 요약**

본 발명은 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 본 발명은 선천 면역계의 활성화 및 전염증성 싸이토카인의 생성 및 분비를 조절함으로써 수술 후 인지 기능장애를 예방하거나 치료할 수 있고, 더 나아가 염증 반응을 억제할 수 있는 조성물을 제공한다.

**대표도** - 도1c



(52) CPC특허분류

*A61K 9/0021* (2013.01)

*A61K 9/0043* (2013.01)

*C07K 19/00* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

NF- $\kappa$ B의 전사 조절 도메인 및 단백질 운반 도메인을 포함하는 융합 단백질을 포함하는, 수술 후 염증 반응 억제용 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 NF- $\kappa$ B의 전사 조절 도메인은 RelA(p65), c-Rel, Rel-B, NF- $\kappa$ B1(p50) 및 NF- $\kappa$ B2(p52)중 적어도 하나, 상기 단백질 운반 도메인은 Hph-1, Mph-1, Sim-2, Tat, VP22, Antp(antennapedia), Pep-1(peptide-1), PTD-5(protein transduction domain-5), 11R, 7R 및 CTP(cytoplasmic transduction peptide) 중 적어도 하나인, 수술 후 염증 반응 억제용 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서

상기 융합 단백질은 경쟁적 억제에 의하여 NF- $\kappa$ B 전사를 억제함으로써, 비장 내의 염증 반응을 억제시키는, 수술 후 염증 반응 억제용 조성물.

#### 청구항 4

NF- $\kappa$ B의 전사 조절 도메인 및 단백질 운반 도메인을 포함하는 융합 단백질을 포함하는, 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 융합 단백질은 경쟁적 억제에 의하여 NF- $\kappa$ B 전사를 억제함으로써, 뇌 염증(neuroinflammation)을 억제시키는, 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 6

제4항에 있어서,

상기 NF- $\kappa$ B의 전사 조절 도메인은 RelA(p65), c-Rel, Rel-B, NF- $\kappa$ B1(p50) 및 NF- $\kappa$ B2(p52)중 적어도 하나, 상기 단백질 운반 도메인은 Hph-1, Mph-1, Sim-2, Tat, VP22, Antp(antennapedia), Pep-1(peptide-1), PTD-5(protein transduction domain-5), 11R, 7R 및 CTP(cytoplasmic transduction peptide) 중 적어도 하나인, 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 7

제4항에 있어서,

상기 약학 조성물은 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 중량% 내지 10 중량%의 상기 융합 단백질을 포함하는, 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 8

제4항에 있어서,

상기 NF- $\kappa$ B의 전사 조절 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖고, 상기 단백질 운반 도메인은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는, 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 9**

제4항에 있어서,

상기 조성물은 뇌로 전달되는 것인, 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 10**

제4항에 있어서,

상기 조성물은 복강내 투여, 비강내 투여, 정맥내 투여, 피하 주사, 뇌척수강내 주사, 흡입투여, 또는 경구 투여용 제형인, 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 11**

제9항에 있어서,

상기 조성물은 복강 내 투여용 또는 비강내 투여용 제형인, 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 12**

제4항에 있어서,

상기 용합 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는, 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 약학 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 수술 후 유도되는 염증 반응을 억제할 수 있는 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 염증은 생체 조직이 손상을 입었을 때에 체내에서 일어나는 방어적 반응으로, 예를 들어 외상이나 화상, 세균 침입 따위에 대하여 몸의 일부에 충혈, 부종, 발열, 통증을 일으키는 증상이다. 염증 신호는 크게 사이클로옥시게나제(COX, cyclooxygenase) 경로와 리폭시게나제(LOX, lipoxxygenase) 경로를 통하여 만들어지며, 그 결과 프로스타글란딘, 류코트리엔, 트롬복산 등이 생성된다. 염증신호가 전달되면, 생체 내에서는 여러 가지 변화가 일어나는데, 염증이 필요한 부위의 혈관이 확장되어 혈액공급이 왕성하게 되도록 하여 세균을 잡아먹는 호중성 백혈구 등 염증 반응에 필요한 혈액세포를 공급한다.

[0003] 특히, 수술 후 동반되는 염증 반응은 병의 경과가 악화되는 것과 연관될 수 있다. 예를 들어, 고령, 대사증후군, 퇴행성 신경계 질환을 갖고 있는 환자에게서, 수술 후 나타나는 뇌 염증은 수술 후 인지 기능장애(postoperative cognitive dysfunction, POCD)의 경과를 더욱 악화시킬 수 있다. 이때, 수술과 관련되어 나타나는 인지 기능 저하인 POCD는 일시적 또는 수주에서 수개월 동안 지속될 수 있는데, 뇌 염증에 의해 재원기간 연장될 뿐만 아니라, 사망률 증가, 생업에서의 조기 퇴출, 영구 치매 등을 초래할 수 있다. 이에 따라, POCD를 효과적으로 예방하거나 치료할 수 있고, 수술 후 동반되는 염증 반응을 억제할 수 있는 방법들의 개발이 요구되고 있다.

[0004] 발명의 배경이 되는 기술은 본 발명에 대한 이해를 보다 용이하게 하기 위해 작성되었다. 발명의 배경이 되는 기술에 기재된 사항들이 선행기술로 존재한다고 인정하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0005] 염증 반응은 병원체에 대한 대식세포(macrophage)의 반응에 의해 개시될 수 있다. 병원체에 의해 활성화된 대

식세포가 생성하는 반응성 활성산소종 및 활성질소종(예를 들어 NO), 프로스타글란딘, 루코트리엔 등과 같은 염증매개체, 그리고 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 및 IL-8 등과 같은 전염증성 사이토카인은 염증 반응에 관여할 수 있다.

- [0006] 이에 따라, 본 발명의 발명자들은 염증매개체들의 생성과 관련된 유전자들의 전사인자로 알려져 있는 NF- $\kappa$ B의 활성이 대식세포의 염증관련 작용에 중요할 수 있음을 인식하였다.
- [0007] 또한, 본 발명의 발명자들은 수술 후 동반되는 염증 반응이 병의 경과를 악화시킬 수 있음을 인식하여, 이를 효과적으로 억제하는 방법을 탐색하였다.
- [0008] 이에, 본 발명의 발명자들은 NF- $\kappa$ B의 전사를 억제함으로써, 수술 후의 나타날 수 있는 염증 반응이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 더 나아가, 본 발명의 발명자들은 수술 후 뇌의 염증 반응을 억제함으로써, 수술 후 인지 장애를 개선하는 효과를 확인할 수 있었다.
- [0009] 이에 따라, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 NF- $\kappa$ B의 전사를 억제함으로써 전염증성 사이토카인의 발현 수준, 더 나아가 단백질의 수준을 조절할 수 있는, 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 한편, 본 발명의 발명자들은 수술 후 염증 반응, 특히 뇌의 염증 반응과 연관될 수 있는 POCD에 효과적인 약물로 알려진, IL-1ra가 혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier, BBB)이라는 뇌조직의 특수성으로 인해 임상 용량의 100배 가까운 용량을 사용하거나 뇌실로 직접 투여해야 된다는 제한점에 대하여 인식하였다.
- [0011] 더 나아가, 본 발명의 발명자들은 뇌 염증을 억제하는 기존의 약물들이 뇌조직 침투가 미미함에 따라 위해할 정도의 과량 사용하거나 뇌내에 직접 투여하는 침습적 방법의 위험성을 인식하였다.
- [0012] 이에, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 투여량이나 투여 방법이 실제 임상적용이 가능한, 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 과제들은 이상에서 언급한 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0014] 본 발명의 일 실시예에 따르면, NF- $\kappa$ B의 전사 조절 도메인 및 단백질 운반 도메인을 포함하는 융합 단백질을 포함하는 수술 후 염증 반응 억제용 조성물이 제공된다.
- [0015] 본 명세서에서 사용되는 용어, "염증 반응"은 수술 후 동반되는 염증 반응을 의미할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 염증 반응은 자가면역반응에 의한 조직 손상으로 유도되는 염증 반응일 수 있다.
- [0016] 염증 반응은 정상적인 개체에서 발병 요인을 중화시키거나 제거하고 상한 조직을 재생시켜서 정상적인 구조와 기능을 회복시키는데 기여할 수 있지만, 그렇지 못한 경우에는 만성 염증과 같은 질병의 원인이 될 수 있다. 특히, 감염, 수술과 같은 전신 면역계가 자극된 상황에서 immune-to-brain communication을 통해 유발된 뇌의 염증 반응은 POCD와 같은 질병과 연관될 수 있다.
- [0017] 구체적으로, 수술에 의한 조직 손상으로 유발되는 일련의 선천 면역 반응 및 이에 따른 염증 반응은 다음과 같은 절차로 진행된다. 먼저, high-mobility group box 1(HMGB1)으로 대표되는 damage-associated molecular patterns(DAMPs)가 분비된다. 그 다음, DAMPs나 PAMP(Pathogen-associated molecular pattern)는 TLRs로 대표되는 패턴형 인식 수용체(pattern recognition receptors, PRRs)에 결합된다. 이는 nuclear factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)를 활성화하며, 이에 따른 전염증성(pro-inflammatory) 사이토카인의 합성 및 분비가 촉진된다. 이 결과로, 대식세포는 더욱 활성화 되고, 손상 조직 내의 IL-1나 TNF- $\alpha$  같은 전염증성 사이토카인이 증가되어 염증 반응이 일어나게 된다.
- [0018] 특히, IL-1 $\beta$ 는 다양한 염증신호를 활성화 시킬 뿐만 아니라 중추신경계의 기능에 영향을 미치고 다양한 질병에서 발현되기 때문에 사이토카인의 원형으로 여겨질 수 있다. 이에, IL-1 $\beta$ 는 수술 후 동반될 수 있는 염증 반응과 연관된 사이토카인의 주요 조절자일 수 있다. 예를 들어, IL-1 $\beta$ 를 투여하거나, 감염이나 수술로 인해 내부의 IL-1 $\beta$  수치가 증가할 경우, 조직 내의 염증 반응이 발생 될 수 있다.
- [0019] 더 나아가, IL-1은 TNF receptor-associated factor 6(TRAF6), MyD88, IRAK를 통해 I $\kappa$ B $\alpha$ 을 인산화시켜, NF- $\kappa$ B의 DNA-바인딩 활성을 증가시킬 수 있다. 이렇게 활성화된 NF- $\kappa$ B은 염증성 효소들과 사이토카인을 전사하

여 IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  등을 증폭시킨다. 이에 따라, NF- $\kappa$ B는 수술 후 동반되는 염증 반응, 더 나아가 염증 반응으로 유도되는 질환과도 밀접하게 연관될 수 있다. 예를 들어, NF- $\kappa$ B의 활성화 또는 발현의 증가는 뇌의 염증 반응으로 유도되는 알츠하이머병을 포함하는 퇴행성 뇌 질환으로 이어질 수 있다. 더 나아가, NF- $\kappa$ B의 활성화 또는 발현의 증가는 면역세포의 기능을 돕는데 중요한 역할을 하는 비장의 손상을 야기할 수 있다. 구체적으로 비장의 기능은 면역 세포의 기능을 돕는 옥소닌과 결합된 세균이나 항체로 둘러싸인 세포들과 같은 입자(particles)들을 혈류로부터 제거한다. 이에 따라, 비장의 이상은 면역능력 저하와 감염대항능력을 떨어뜨려 전신성 염증(systemic inflammation), 패혈증의 발병으로 이어질 수 있다.

[0020] 이에, 본 발명의 발명자들은 NF- $\kappa$ B의 억제가 염증 반응을 줄일 수 있다는 점을 인지하였고, 수술 후 일어날 수 있는 다양한 면역 반응과 연관된 염증성 사이토카인의 핵심조절인자가 NF- $\kappa$ B인 것을 발견하였다.

[0021] 더 나아가, 본 발명의 발명자는 경쟁적 억제에 의하여 NF- $\kappa$ B 전사를 억제함으로써 전염증성 사이토카인의 발현 수준, 또는 단백질의 수준을 조절할 수 있고, 이의 결과로 수술 후 동반되는 염증 반응을 억제할 수 있는 조성물을 발명하는데 이르렀다.

[0022] 이에 따라, 본 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물에 사용되는 융합 단백질은 NF- $\kappa$ B의 전사 조절 도메인 및 단백질 운반 도메인을 포함할 수 있다. 즉, 본 발명에서 제공되는 융합 단백질은 수술 후 동반되는 염증 반응을 억제할 수 있다.

[0023] 본 명세서에서 사용되는 용어, "전사 조절 도메인"은 전사 인자를 구성하는 도메인으로 트랜스 액티베이션 도메인이 없이 DNA 결합 부위만으로 구성된 도메인을 의미한다. 본 발명에 융합 단백질은 트랜스 액티베이션 도메인은 없으나 DNA 결합 부위를 가지고 있기 때문에 목적하는 프로모터에 결합할 수는 있으나 전사를 촉진할 수 없다. 따라서 본 발명의 융합 단백질은 NF- $\kappa$ B 유전자에 대한 우선음성돌연변이체(dominant negative mutant)이기 때문에 세포 내의 야행성 NF- $\kappa$ B에 대한 경쟁적 억제제로 작용하여 NF- $\kappa$ B의 전사 및 활성을 억제할 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에 따르면, NF- $\kappa$ B는 RelA(p65), c-Rel, Rel-B, NF- $\kappa$ B1(p50) 및 NF- $\kappa$ B2(p52)중 적어도 하나일 수 있으며, 다양한 실시예에서 NF- $\kappa$ B는 RelA(p65)일 수 있다.

[0025] 본 명세서에서 사용되는 용어 "단백질 운반 도메인"은 7-50개의 아미노산으로 이루어져 있는 소수성이 강한 짧은 펩타이드로, 120 kDa 이상의 분자량을 단백질뿐만 아니라, DNA 또는 RNA를 세포 내로 전달할 수 있는 도메인을 의미한다. 본 발명의 단백질 운반 도메인이 부착되지 않은 단백질(즉, 전사 조절 도메인만으로 구성된 p65-TMD)의 경우 본 발명의 융합 단백질과는 달리 NF- $\kappa$ B 및 IL-2의 전사 억제, LPS에 의한 전염증성 사이토카인의 분비 억제 효과가 없다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 단백질 운반 도메인은 Hph-1, Mph-1, Sim-2, Tat, VP22, Antp (antennapedia), Pep-1 (peptide-1), PTD-5 (protein transduction domain-5), 11R, 7R 및 CTP (cytoplasmic transduction peptide)중 적어도 하나일 수 있다. 여기서, "11R" 및 "7R"은 알기닌이 각각 11개 및 7개로 구성된 펩타이드를 의미한다. 다양한 실시예에서 단백질 운반 도메인은 Hph-1일 수 있다.

[0027] 본 발명의 발명자들은 수술 후 일어날 수 있는 다양한 염증 반응 중, 뇌의 염증 반응은 POCD의 기전이 될 수 있음을 인지하였다. 이에, 본 발명의 발명자들은, 말초 수술 직후부터 뇌척수액에서 전염증성 사이토카인이 증가하는 뇌 염증 양상을 확인 하였고, 더 나아가, POCD 발생이 IL-6나, 뇌세포 손상과 유의한 연관관계를 보인다는 점을 확인하였다.

[0028] 결과적으로, 본 발명의 발명자들은 경쟁적 억제에 의하여 NF- $\kappa$ B 전사를 억제함으로써 전염증성 사이토카인의 발현 수준, 또는 단백질의 수준을 조절할 수 있고, 이의 결과로 뇌 염증을 억제할 수 있는 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 약학 조성물을 발명하는데 이르렀다.

[0029] 이에, 본 발명의 일 실시예에 따르면, NF- $\kappa$ B의 전사 조절 도메인 및 단백질 운반 도메인을 포함하는 융합 단백질을 포함하는 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물이 제공된다.

[0030] 본 명세서에서 사용되는 용어, "예방"은 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 예방 또는 치료용 약학 조성물을 개체에 투여하여 수술 후 인지 기능장애를 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0031] 본 명세서에서 사용되는 용어, "치료"는 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 예방 또는 치료용 약학 조성물을 개체에 투여하여 수술 후 인지 기능장애 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.

- [0032] 본 명세서에서 사용되는 용어, "수술 후 인지 기능장애"는 POCD와 동일 할 수 있다. 수술 후 인지 기능장애는, 수술 후 인지 기능 저하의 형태로 나타나는 모든 증상을 포함하며, 예를 들어 수술과 관련되어 나타나는 일시적 인지 기능의 저하부터, 수술에서 수개월 동안 인지기능 저하가 지속되거나, 치매를 야기하는 인지 장애뿐 아니라 저하되거나 섬망에 이를 가능성이 있거나 이를 예방할 필요가 있는 모든 상태를 의미할 수 있다.
- [0033] 특히, 감염, 수술과 같은 전신 면역계가 자극된 상황에서 immune-to-brain communication을 통해 유발된 뇌 염증은 POCD와 같은 질병과 연관될 수 있다. 여기서 immune-to-brain communication은 혈중 싸이토카인이 확산을 통해 뇌에 도달하거나, 싸이토카인과 뇌 내의 혈관 내피 세포 간의 상호작용을 통해 싸이토카인이 뇌로 전달되거나, 미주신경(vagus nerve)과 교감신경계의 카테콜라민 회로를 통해 말초에 있던 싸이토카인이 직접적으로 신경계를 활성화시키는 것을 의미한다.
- [0034] 또한, Immune-to-brain communication은 뇌 염증을 유발하고, 단기간의 뇌 염증은 발열, 식욕 저하, 졸림, 인지 장애 등과 같은 중추신경 매개 병적 행동을 유발한다. 이는 손상 당한 개체가 자가 치유할 수 있도록 하는 호스트의 자기 방어 기제라고 고려된다. 치유가 이루어진 후에는 염증이 악화되며, 인지 기능장애를 포함한 병적 행동도 점차 소멸되는 것으로 알려진다.
- [0035] 그러나, 고령의 실험동물 경우, 병적 행동의 기간, 정도가 조직 손상의 정도보다 훨씬 심한 경향을 보인다. 정상생활로의 복귀가 지연되거나 실질적으로 불가능하게 되기도 한다. 고령화, 스트레스, 대사증후군, 퇴행성 신경 질환과 같이 면역반응을 변화시키는 환경에서는 부적응적인 병적 행동이 초래되어, 행동과 인지 기능의 병적인 상태가 초래될 수 있다. 또한, 질환이 없는 비교적 정상인의 뇌에서도 증가되어 있는 염증성 프로파일을 보이는 경우도 다수 있다.
- [0036] 구체적으로, 수술에 의한 뇌 조직의 손상은 NF- $\kappa$ B의 활성화를 유도하고, 이에 따라 뇌 내의 전염증성 싸이토카인의 합성 및 분비가 촉진된다. 특히, TNF- $\alpha$ 는 혈액-뇌 장벽을 손상시키며, 골수에서 유래된 활성화된 대식세포는 손상된 혈액-뇌 장벽을 통해 뇌실질로 침투할 수 있다. 이 결과로, 중추신경계 내에서 지속적으로 대식세포와 미세아교세포(microglia)가 활성화된다. 이후, 해마내의 IL-1 $\beta$ 나 TNF- $\alpha$  같은 전염증성 싸이토카인이 증가되며, 전염증성 싸이토카인의 증가는 뇌 염증을 일으켜 시냅스 전달 장애, 인지 기능 이상을 초래할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물에서 제공 되는 융합 단백질은 경쟁적 억제에 의하여 NF- $\kappa$ B 전사를 억제함으로써, 뇌 염증(neuroinflammation)을 억제시킬 수 있다.
- [0038] 예를 들어, 상기 융합 단백질은 세포간 부착 분자(intracellular adhesion molecule, ICAM), 혈관세포 부착 분자(vascular cell adhesion molecule, VCAM), E-셀렉틴(E-selectin), P-셀렉틴(P-selectin) 및 호중성 백혈구의 전사를 억제함으로써, 뇌 염증을 억제시킬 수 있다. 이때, 세포간 부착 분자, 혈관세포 부착 분자, E-셀렉틴 및 P-셀렉틴은 부착 분자일 수 있다. 부착 분자는 백혈구들이 뇌실질에 침윤하는 것에 연관될 수 있다. 더 나아가, 호중성 백혈구(neutrophil)와 같은 혈액-유래성 백혈구들은 알츠하이머병과 연관된 기억력감퇴와 신경 병리학적 변화(neuropathological change)를 유도할 수 있다. 더 나아가, 염증 반응 동안 유도된 호중성 백혈구는 미세아교세포를 활성화시키고, 조직을 붕괴할 수 있다. 이에 따라, 세포간 부착 분자, 혈관세포 부착 분자, E-셀렉틴 및 P-셀렉틴, 호중성 백혈구의 발현 수준의 감소는 뇌 염증을 억제할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물에서 NF- $\kappa$ B의 전사 조절 도메인은 RelA(p65), c-Rel, Rel-B, NF- $\kappa$ B1(p50) 및 NF- $\kappa$ B2(p52)중 적어도 하나, 상기 단백질 운반 도메인은 Hph-1, Mph-1, Sim-2, Tat, VP22, Antp(antennapedia), Pep-1(peptide-1), PTD-5(protein transduction domain-5), 11R, 7R 및 CTP(cytoplasmic transduction peptide) 중 적어도 하나일 수 있다.
- [0040] 본 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물은 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 중량% 내지 10 중량%의 상기 융합 단백질을 포함할 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않고 다양한 함량으로 포함될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물의 NF- $\kappa$ B의 전사 조절 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 단백질 운반 도메인은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0042] 더 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물의 융합 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는다.

- [0043] 본 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물의 융합 단백질은 포함된 도메인이 기능을 하는 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의한 단백질의 변이체를 포함한다. 열거된 아미노산 서열의 치환, 삽입, 결실 변이체도 본 발명이 제공하는 다양한 실시예에서의 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물에 이용될 수 있다.
- [0044] 이때, 단백질의 변이체란 열거된 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 삽입은 통상적으로 약 1개 내지 20개 아미노산의 연속 서열로 이루어지나, 보다 큰 삽입도 가능할 수 있다. 결실은 통상적으로 약 1개 내지 30개의 잔기로 이루어지나, 일부의 경우에는 도메인 중 하나가 결실될 수 있는 것과 같이 보다 큰 결실 또한 가능할 수 있다. 이런 변이체는 당해 분야에 공지된 화학적 펩티드 합성방법 또는 DNA 서열을 기본으로 하는 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다 (Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 2d Ed., 1989). 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다 (H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 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.
- [0045] 또한, 본 발명의 다양한 실시예에서의 융합 단백질은 경우에 따라서는 인산화 (phosphorylation), 황화 (sulfation), 아크릴화 (acrylation), 당화 (glycosylation), 메틸화 (methylation), 파네실화 (farnesylation) 등으로 수식 (modification) 될 수도 있다.
- [0046] 상기 변이체 또는 수식체는 융합 단백질과 동일한 생물학적 활성을 나타내는 기능적 등가물이나, 필요에 따라서는 이의 단백질의 특성을 변형시킨 변이체 또는 수식체일 수 있다. 바람직하게는 아미노산 서열상의 변이와 수식에 의해서 단백질의 열, pH등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 단백질 활성이 증가한 단백질일 수 있다.
- [0047] 본 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 그 방식에 있어 특별히 제한되지 아니하며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학적 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 이때, 목적 부위는 수술 후 염증 반응을 수반할 수 있는 모든 부위 또는, 수술 후 염증 반응에 의해 질병이 나타난 모든 부위가 될 수 있다. 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물은 경구 투여, 비경구 투여, 비강내 투여로 투여할 수 있으며, 비강내 투여 방식으로도 투여할 수 있다.
- [0048] 특히, 수술 후 인지 기능장애 예방을 위해, 본원의 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물은 적절한 경로를 통해 중추신경 또는 말초신경으로 도입하는 것이 바람직하다. 여기서, 적절한 투여 경로는 비강내 투여일 수 있다. 보다 구체적으로, 투여 경로는 비강내 투여를 통한 뇌실내 (intraventricular) 또는 수막내 (intrathecal) 투여를 포함한다. 이때, 비강내 투여는 혈액-뇌 장벽을 거치지 않고 전신적 노출을 감소시키면서도 펩타이드나 단백질을 뇌실질로 투여할 수 있는 비침습적이고 효율적인 방법일 수 있다.
- [0049] 예를 들어, 본 발명의 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물을 비강내 투여하면 상기 조성물이 후각신경(olfactory nerve)과 삼차신경(trigeminal nerve)이 분포하는 비점막(nasal mucosa)에 접촉하게 된다. 그 다음, 후각 상피 영역에 도달한 본 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물은 후각 수용 신경세포(olfactory receptor neuron, ORN) 주변의 코 상피 장벽(epithelium barrier)이 열려 있는 틈을 통해 ORN 축삭의 주변을 따라서 이동하고, 후각 피복(sheathing) 세포들에 의한 채널들을 통해 빠르게 중추신경계로 들어갈 수 있다. 이때, 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물의 일부는 ORN 말단에서 세포내섭취(endocytosis)를 통해 ORN 내부로 들어와 후구(olfactory bulb)까지 이동할 수 있다. 후각 상피 영역에 도달하지 못한 상기 조성물도 삼차 신경 말단에서 삼차 신경에 의해 세포내 섭취되어 뇌의 보다 미골 영역(caudal region)으로 직접 이동할 수 있다. 또한, 신경 주변을 경유하지 않더라도 고유관까지 흡수된 본 발명의 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물은 고유관에 위치하는 혈관을 따라 중추신경계(central nervous system, CNS)로 들어가게 된다. 어느 경로로든 CNS로 들어간 상기 조성물은 간질액(interstitial fluid)이나 뇌척수액을 매개로 뇌 전반으로 확산될 수 있다. 그러나 전술한 바와 같이 본 발명의 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물은 뇌로 전달되

는 것에 제한되지 않고, 수술 후 염증 반응이 일어난 목적 부위로 전달 될 수 있다. 더 나아가 본 발명의 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물의 효과적인 투여를 위한 투여 경로는 당업자에 의해 용이하게 선택될 수 있다.

[0050] 본원의 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물의 비강내 투여를 위해 비강용으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있는데, 이때 담체는 포유동물, 바람직하게는 인간의 비강 상피의 어느 부분에 투여하기에 적당한 한 종 이상의 적절한 고상 또는 필러 희석제 또는 캡슐화 물질을 말한다. 대표적으로, 상기 담체는 액체, 용액, 현탁액, 겔, 연고, 로션, 또는 이들의 조합일 수 있다. 바람직하게, 상기 담체는 약학적으로 허용가능한 수성 담체이다. 본 발명의 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물은 여러 가지 단위 투여 형태로 제조될 수 있다. 이러한 형태로는 점비액(nasal drop), 비강용 스프레이, 비강용 겔, 비강용 연고, 및 비강용 분말이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0051] 또한 상기 담체에는 전달 강화제를 포함할 수 있는데, 비강내 전달 강화제에는, 응집 저해제, 투여량 변경제, pH 제어제, 분해 효소 저해제, 점액질 용해 또는 점액 제거제, 섬모안정 시약들, 막투과 촉진제(예를 들면, 계면 활성제, 담즙산염, 인지질 또는 지방산 첨가제, 혼합 미셀(micelle), 리포솜, 또는 담체, 알콜, 에나민(enamine), 산화질소 공여체 혼합물, 긴 사슬(long-chain) 양친매성 분자, 소형 소수성 침투 강화제, 나트륨 또는 살리실산 유도체, 아세토아세트산의 글리세롤 에스테르, 시클로덱스트린 또는 베타-시클로덱스트린 유도체, 중간 사슬 지방산, 킬레이트 시약, 아미노산 또는 그의 염, N-아세틸아미노산 또는 그의 염, 선택된 막 성분에 대한 분해 효소, 지방산 합성 저해제, 콜레스테롤 합성 저해제 또는 산화질소 자극 물질, 키토산, 그리고 키토산 유도체와 같은 상피 접합 생리학의 조절 약제, 혈관 확장제, 선택적 운반 촉진제 그리고 비내 점막 전달을 강화하기 위해, 본원의 조성물이 효과적으로 조합되고, 결합되고, 보관되고, 캡슐화 되거나 활성 약제를 안정시킬 수 있게 해주는, 안정적 운송체, 담체, 지지 물질 또는 착물 생성종(complex-forming species) 등이 포함될 수 있다.

[0052] 본 명세서에서 "개체"는 쥐, 가축, 인간 등을 포함하는 포유 동물을 비롯한 모든 동물을 의미한다.

[0053] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 다만, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것에 불과하므로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것으로 해석되어서는 아니된다.

**발명의 효과**

[0054] 본 발명은 선천 면역계의 활성화 및 전염증성 사이토카인의 생성 및 이의 분비를 조절하여 수술 후에 나타나는 염증 반응을 억제할 수 있는 효과를 나타낸다.

[0055] 또한, 본 발명은 투여량이나 투여 방법이 실제 임상적용이 가능한 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있다.

[0056] 나아가, 본 발명을 통해 IL-1β, NF-κB를 중심으로 한 뇌 염증과의 인과 관계를 확립하며, IL-1β, NF-κB 기전을 차단하여 POCD를 방지할 수 있는 임상적 적용의 가능성이 제공된다.

[0057] 본 발명에 따른 효과는 이상에서 예시된 내용에 의해 제한되지 않으며, 더욱 다양한 효과들이 본 명세서 내에 포함되어 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0058] 도 1a 및 1b는 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물을 처리한 후 해마(hippocampus)에서 IL-1β와 IL-6의 발현 수준을 나타낸다.

도 1c는 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물을 처리한 후 해마에서의 M1 표현형 사이토카인 및 M2 표현형 사이토카인의 수준을 나타낸다.

도 1d는 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물을 처리한 후 혈뇌 장벽의 무결성의 변화를 나타낸다.

도 1e는 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물을 처리한 후 뇌에서의 미세아교세포 활성화 변화를 나타낸다.

도 1f는 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물을 처리한 후 해마에서의 부착 분자의

발현 수준을 나타낸다.

도 1g는 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물을 처리한 후 뇌에서의 호중성 백혈구의 발현 수준을 나타낸다.

도 2a는 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물을 처리한 후 비장에서의 싸이토 카인의 발현 수준을 나타낸다.

도 2b는 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물을 처리한 후 비장에서의 M1 표현형 싸이토카인 및 M2 표현형 싸이토카인의 수준을 나타낸다.

도 2c는 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물을 처리한 후 LPS 처리된 비장에서의 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF  $\alpha$  및 MCP-1의 단백질 수준을 나타낸다.

도 2d는 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물을 처리한 후 LPS 처리된 비장에서의 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF  $\alpha$  및 IL-17A의 상대적 발현 수준을 나타낸다.

도 3a는 복강수술 유사 모델에 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 약학 조성물을 처리한 후 수동 회피 테스트를 통해 학습과 기억력을 평가한 실험 결과를 나타낸다.

도 3b는 복강수술 유사 모델에 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 약학 조성물을 처리한 후 EPM(Elevated plus maze)를 통해 작업 기억을 평가한 실험 결과를 나타낸다.

도 3c는 복강수술 유사 모델에 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 약학 조성물을 처리한 후 새로운 물체에 대한 인지 테스트를 통해 인지 기억을 평가한 실험 결과를 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0059] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0060] 이하에서는, 본 발명의 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물의 효과는 뇌 또는 비장에 대한 검증을 예시적으로 설명하나, 이에 제한되지 않고, 본 발명의 다양한 실시예에서의 조성물은 수술 후 염증 반응이 일어날 수 있는 부위 더 나아가, 수술 후 염증 반응에 의한 병의 발생부위에 제공될 수 있다.

[0061] 이하에서는, 설명의 간명함을 위해 본 발명의 수술 후 염증 반응 억제용 조성물 및 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물은 본원 발명의 조성물(nt-p65-TMD 융합단백질) 또는 본 발명의 조성물로 나타낸다. 또한, 본 발명의 수술 후 염증 반응 억제용 조성물은 뇌 염증을 억제함으로써, POCD를 예방하거나 치료하는 효과를 나타내어, 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물로 제공될 수 있다. 더 나아가, 본 발명의 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 조성물은 수술 후 염증 반응 억제용 조성물로서 제공될 수 있다.

**[0063] 실시예 1: 뇌 염증 반응 테스트**

**[0065] 뇌의 염증 반응 분석**

[0066] 수술에 의한 조직 손상에 따른 전신 염증(systemic inflammation)은 뇌 속, 특히 해마에 대한 대식 세포 침윤 및 신경계 면역세포인 미세아교세포 활성화를 유발하고, 이에 따라 NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ 나 TNF- $\alpha$  같은 전염증성 싸이토카인의 수준을 높게 유지시킬 수 있다. 또한, 아르지네이스-1 (arginase-1), IL-10과 같은 항 전염증성 싸이토카인의 수준이 낮아질 수 있다. 높은 수준의 전염증성 싸이토카인은 인지 기능장애를 유발한다. 따라서 수술로 야기된 조직 손상에 의해 선천 면역 시스템이 활성화되어, 뇌 염증으로 이어질 수 있다.

[0067] 따라서, 본원 발명의 새로운 융합단백질은 뇌 염증을 억제하는 것에 효과가 있음이 확인되었다.

[0068] 도 1a 및 1b는 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물을 처리한 후 해마에서 사이토카인의 발현 수준을 나타낸다. 도 1a는 수술 후 2일째 해마를 적출하여 ELISA 검사한 결과를 나타내며, 본원 발명의 조성물(nt-p65-TMD 융합단백질) 투여 시 수술 후 해마에서 IL-1 $\beta$ , IL-6가 효과적으로 감소되는 것을 확인할 수 있다. 도 1b는 수술 후 2일째 해마를 적출하여 RT-PCR 검사한 결과를 나타내며, 본원 발명의 조성물(nt-p65-TMD 융합단백질) 투여 시 수술 후 해마에서 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 가 효과적으로 감소되는 것을 확인할 수 있다. 더 나아가, 본원 발명의 조성물(nt-p65-TMD 융합단백질)이 처리된 nt-p65-TMD(5mg/kg)군은 아르지네이스-1와 IL-10과 같은 항 염증성 사이토카인의 발현 수준이 미세하게 증가한 것을 확인할 수 있다. 이때, 전염증성 사이토카인의 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 는 M1 표현형일 수 있고, 항 전염증성 사이토카인의 아르지네이스-1와 IL-10는 M2 표현형일 수 있다. 이에 따라, 본 발명의 조성물(nt-p65-TMD 융합단백질)은 M1 표현형의 사이토카인에 대하여 보다 효과적일 수 있다.

[0069] 도 1c는 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물을 처리한 후 해마에서의 M1 표현형 사이토카인 및 M2 표현형 사이토카인의 수준을 나타낸다. 구체적으로, 해마내의 사이토카인의 수준은 수술 후 2일째의 해마를 적출한 후, M1 표현형의 마커인 CD86+ 세포와 M2 표현형의 마커인 CD206+ 세포를 염색한 후 유세포 검사를 함으로써 측정하였다. 도1c의 (a)는 해마내의 M1 표현형 사이토카인의 수준을 나타낸다. 그 결과, 본 발명의 조성물이 처리된 nt-p65-TMD(10mg/kg)군은 POCD군과 대조적으로 CD86+ 세포의 수가 감소된 결과로, M1 표현형 사이토카인의 수준이 감소된 것을 확인할 수 있다. 더 나아가, 도1c의 (b)는 해마내의 M2 표현형 사이토카인의 수준을 나타낸다. 본 발명의 조성물이 처리된 nt-p65-TMD(10mg/kg)군은 POCD군과 CD206+ 세포의 수가 유사한 것을 알 수 있다.

[0071] **혈뇌 장벽의 무결성의 변화**

[0072] 외과적 수술은 말초 세포들에 의해 생성 분비되는 전염증성 사이토카인의 증가로 이어질 수 있다. 이러한 전신 염증은 혈액-뇌-장벽의 기능장애 및 무결성에 영향을 미쳐, 혈액에 존재하는 백혈구와 중성구 등이 뇌조직으로 침투하게 된다.

[0073] 따라서, 본원 발명의 새로운 융합단백질은 혈액-뇌-장벽의 순환 혈액양을 조절할 수 있음이 확인되었다.

[0074] 도 1d는 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물을 처리한 후 혈뇌 장벽의 무결성의 변화를 나타낸다. 도 1d의 (a) 및 (b)는 수술 후 2일째 새줄무늬체 (striatum), 피질(cortex) 및 해마에서의 무결성을 관찰하기 위해 에반스 청 혈관외유출 방법(Evans blue extravasation method)을 이용하여 검사한 결과이다. 이때, 무결성의 관찰은 수술 후 2일째의 쥐의 목정맥에 0.5 %의 에반스 청을 투여한 후, 새줄무늬체와 피질 및 해마를 관찰함으로써 수행되었다. 결과에 따르면, POCD군은 새줄무늬체와 피질 및 해마에서의 에반스 청의 유입된양이 유의적으로 증가한 것을 알 수 있다. 본원 발명의 조성물(nt-p65-TMD 융합단백질) 투여군은 POCD군과 대조적으로 에반스 청의 유양이 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있다. 특히, 본 발명의 조성물이 처리된 nt-p65-TMD(10mg/kg)군은 정상적 control군의 결과와 차이가 없는 것을 알 수 있다.

[0075] 도 1e는 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물을 처리한 후 뇌에서의 미세아교세포 활성화 변화를 나타낸다. 도 1e의 (a)는 수술 후 2일째 해마 내의 미세아교세포 표지자의 단백질 수준을 웨스턴 블랏 (western blot) 분석을 이용하여 검사한 결과이다. 1e의 (b)는 도 1e의 (a)의 결과에 대한 상대적 광학밀도를 나타내는 결과이다. 결과에 따르면, 수술만 시행한 POCD군은 control군과 대조적으로, 미세아교세포 표지자의 단백질의 수준이 유의하게 증가한 것을 알 수 있다. 본원 발명의 조성물(nt-p65-TMD 융합단백질) 투여군은 POCD군과 대조적으로 control군과 비슷한 수준으로 미세아교세포 표지자의 단백질 수준이 감소한 것을 확인할 수 있다. 더 나아가, 도 1e의 (c)는 수술 후 2일째 해마에서의 미세아교세포의 발현 수준을 면역형광염색법을 이용하여 검사한 결과이다. 결과에 따르면, 본원 발명의 조성물(nt-p65-TMD 융합단백질) 투여군은 POCD군과 대조적으로 control군과 비슷한 수준으로 미세아교세포의 발현 수준이 감소한 것을 확인할 수 있다. 미세아교세포는 활성화 됨에 따라 전염증성 사이토카인을 생성할 수 있는데, 이상의 결과로, 본원 발명의 조성물은 미세아교세포의 발현 수준 또는 이의 표지자의 단백질 수준을 감소시키는 효과를 나타냄으로써 전염증성 사이토카인의 수준을 조절할 수 있는 효과가 있다.

[0077] **혈관 내피세포에서의 부착 분자(adhesion molecule) 의 발현 수준 감소**

[0078] 혈관 염증 반응과 이로 인한 혈액-뇌-장벽의 기능장애는 알츠하이머병을 포함하여 여러 퇴행성 뇌 질환에 중요한 발병원인이 될 수 있다. 더 나아가, 혈관 염증 반응은 알츠하이머병 동물모델뿐만 아니라 수술 후 인지장애 동물모델에서 임파세포, 단핵백혈구, 호중성 백혈구 등과 같은 혈액-유래성 백혈구들이 뇌실질에 침윤되는 것을 매개할 수 있다.

[0079] 이때, 혈액-유래성 백혈구들이 뇌실질에 침윤하는 것에 있어서 혈관내피세포에서의 부착 분자의 발현이 연관될 수 있다. 이에 따라, 본 발명의 새로운 융합단백질은 부착 분자의 발현을 조절할 수 있음이 확인되었다.

[0080] 도 1f는 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물을 처리한 후 해마에서의 부착 분자의 발현 수준을 나타낸다. 도 1f는 수술 후 2일째 해마 내의 세포간 부착 분자(ICAM, intracellular adhesion molecule), 혈관세포 부착 분자(VCAM, vascular cell adhesion molecule), E-셀렉틴(E-selectin) 및 P-셀렉틴(P-selectin)의 mRNA 수준을 검사한 결과이다. 결과에 따르면, 본원 발명의 조성물(nt-p65-TMD 융합단백질) 투여군은 POCD군과 대조적으로 control군과 비슷한 수준으로 세포간 부착 분자, 혈관세포 부착 분자, E-셀렉틴 및 P-셀렉틴의 전사가 효과적으로 감소한 것을 확인할 수 있다.

[0082] **혈관 내피세포에서의 호중성 백혈구(neutrophil)의 발현 수준 감소**

[0083] 림프구(lymphocyte), 단핵 백혈구(monocytes)와 호중성 백혈구(neutrophil)와 같은 혈액-유래성 백혈구들은 알츠하이머병과 연관된 기억력감퇴와 신경병리학적 변화(neuropathological change)를 유도할 수 있다. 더 나아가, 염증 반응 동안 유도된 호중성 백혈구는 미세아교세포를 활성화시키고, 조직을 붕괴할 수 있다.

[0084] 이에 따라, 본 발명의 새로운 융합단백질은 호중성 백혈구의 발현 수준을 감소시킬 수 있음이 확인되었다.

[0085] 도 1g는 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물을 처리한 후 뇌에서의 호중성 백혈구의 발현 수준을 나타낸다. 도 1g의 (a)는 수술 후 2일째 해마 내의 호중성 백혈구 엘라스테이스(elastase)의 단백질 수준을 웨스턴 블랏(western blot) 분석을 이용하여 검사한 결과이다. 1g의 (b)는 도 1g의 (a)의 결과에 대한 상대적 광학밀도를 나타내는 결과이다. 결과에 따르면, 수술만 시행한 POCD군은 control군과 대조적으로, 호중성 백혈구 엘라스테이스의 단백질의 수준이 유의하게 증가한 것을 알 수 있다. 본원 발명의 조성물(nt-p65-TMD 융합단백질) 투여군은 POCD군과 대조적으로 control군과 비슷한 수준으로 호중성 백혈구 엘라스테이스의 단백질 수준이 감소한 것을 확인할 수 있다. 특히, 본 발명의 조성물이 처리된 nt-p65-TMD(10mg/kg)군은 정상 control군 보다 호중성 백혈구 엘라스테이스의 단백질 수준이 감소한 것을 알 수 있다. 더 나아가, 도 1g의 (b)는 수술 후 2일째 해마에서의 호중성 백혈구 엘라스테이스의 발현 수준을 면역형광염색법을 이용하여 검사한 결과이다. 결과에 따르면, 본원 발명의 조성물(nt-p65-TMD 융합단백질) 투여군은 POCD군과 대조적으로 control군과 비슷한 수준으로 호중성 백혈구 엘라스테이스의 발현이 감소한 것을 확인할 수 있다. 염증 반응으로 유도된 호중성 백혈구활성의 증가는, 전염증성 사이토카인을 생성하는 미세아교세포를 활성화시킬 수 있다. 이상의 결과로, 본원 발명의 조성물은 호중성 백혈구 엘라스테이스의 발현 수준 또는 호중성 백혈구 엘라스테이스 단백질 수준을 감소시키는 효과를 나타냄으로써 전염증성 사이토카인의 수준을 조절할 수 있는 효과가 있다.

[0087] **실시예 2: 비장의 염증 반응 테스트**

[0088] 수술에 의한 비장의 손상은 NF-kB, IL-1β나 TNF-α 같은 전염증성 사이토카인의 수준을 높일 수 있다. 이의 결과로, 염증 반응은 전신으로 이어질 수 있다.

[0089] 따라서, 본원 발명의 새로운 융합단백질은 비장 내의 염증 반응을 억제 할 수 있음이 확인되었다.

[0091] **비장의 염증 반응 분석 (수술 시행 염증 반응 모델)**

[0092] 도 2a는 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물을 처리한 후 비장에서의 사이토카인의 발현 수준을 나타낸다. 도 2a는 수술 후 2일째 해마를 적출하여 RT-PCR 검사한 결과를 나타내며, 본원 발명의 조성물(nt-p65-TMD 융합단백질) 투여 시 수술 후 해마에서 IL-1β, IL-6 및 TNF-α가 효과적으로 감소되는 것을 확인할 수 있다. 더 나아가, 본 발명의 조성물이 처리된 nt-p65-TMD(5mg/kg)군은 아르지네이스-1와 IL-10과 같은 항 염증성 사이토카인의 발현 수준이 증가한 것을 확인할 수 있다. 특히, 본 발명의 조성물이 처리된 nt-p65-

TMD(5mg/kg)군의 IL-10의 상대적 발현 수준은 control군과 유사한 결과를 나타내어, IL-10의 발현 수준의 조절에 본 발명의 조성물이 효과적인 것을 알 수 있다. 이에 따라, 본 발명의 조성물(nt-p65-TMD 융합단백질)은 M1 표현형의 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 와 M2 표현형인 IL-10의 발현 수준을 다른 사이토카인 보다 효과적으로 조절할 수 있다.

[0093] 도 2b는 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물을 처리한 후 비장에서의 M1 표현형 사이토카인 및 M2 표현형 사이토카인의 수준을 나타낸다. 구체적으로, 비장내의 사이토카인의 수준은 수술 후 2일째의 비장을 적출한 후, M1 표현형의 마커인인 CD86+ 세포와 M2 표현형의 마커인 CD206+ 세포를 염색한 후 유세포검사를 함으로써 측정하였다. 도2의 (a)는 비장내의 M1 표현형 사이토카인의 수준을 나타낸다. 그 결과, 본 발명의 조성물이 처리된 nt-p65-TMD(10mg/kg)군은 POCD군과 대조적으로 CD86+ 세포의 수가 감소된 것을 알 수 있다. 더 나아가, nt-p65-TMD(10mg/kg)군에서 M1 표현형 사이토카인의 수준은 control군과 유사한 수준으로 감소된 것을 확인할 수 있다. 도 2b의 (b)는 비장 내의 M2 표현형 사이토카인의 수준을 나타낸다. 본 발명의 조성물이 처리된 nt-p65-TMD(10mg/kg)군은 POCD군과 대조적으로 CD206+ 세포의 수가 control군과 유사한 것을 알 수 있다. 이상의 도 2b의 결과는 도 2a에서 염증성 사이토카인의 M1 표현형의 발현 수준이 control군의 수준과 유사하게 감소하고, 항 염증성 사이토카인의 M2 표현형의 발현 수준이 control군의 수준과 유사하게 증가한 결과와도 연결된다.

[0095] **비장의 염증 반응 분석 (LPS에 의한 염증 반응 모델)**

[0096] 본원 발명의 새로운 융합단백질은 수술로 유도된 염증 반응뿐만 아니라, LPS로 유도된 염증 반응에도 효과적임을 확인하였다. 이하에서는, LPS처리된 비장에 대한 본 발명의 새로운 융합단백질의 효과를 예시적으로 설명하지만, 이의 효과는 비장에 제한되는 것은 아니다.

[0097] 이때, 염증 반응 모델은 LPS(20 mg/kg)가 복강내 1회 투여된 BALB/c 쥐(6 내지 8 주)를 이용하였다.

[0098] 도 2c는 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물을 처리한 후 LPS 처리된 비장에서의 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF  $\alpha$  및 MCP-1의 단백질 수준을 나타낸다. 도 2c는 LPS 투여 후 2일째 비장을 적출하여 ELISA 검사한 결과를 나타낸다. 구체적으로, LPS 처리군에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF  $\alpha$  및 MCP-1과 같은 염증성 사이토카인의 수준이 증가되었고, 본원 발명의 조성물(nt-p65-TMD 융합단백질) 투여한 군의 경우, LPS 처리군과 비교하였을 때, 염증성 사이토카인의 단백질 수준이 감소되었다. 더 나아가, 정상의 control군과 비교하였을 때, 본원 발명의 조성물(nt-p65-TMD 융합단백질)을 투여한 군과 염증성 사이토카인의 단백질 수준에 유의적인 차이가 없었다.

[0099] 도 2d는 본원 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물을 처리한 후 LPS 처리된 비장에서의 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF  $\alpha$  및 IL-17A의 상대적 발현 수준을 나타낸다. 도 2d는 LPS 투여 후 2일째 비장을 적출하여 RT-PCR 검사한 결과를 나타낸다. 구체적으로, LPS 처리군에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF  $\alpha$  및 IL-17A과 같은 염증성 사이토카인의 수준이 증가되었고, 본 발명의 조성물(nt-p65-TMD 융합단백질) 투여한 군의 경우, LPS 처리군과 비교하였을 때, 염증성 사이토카인의 발현 수준이 효과적으로 감소되는 것을 확인할 수 있다. 이 결과로, 본원 발명의 조성물(nt-p65-TMD 융합단백질)은 염증성 사이토카인의 M1 표현형의 발현 수준을 억제할 수 있는 효과가 있다.

[0101] **실시예 3: 신경 행동 검사를 통한 인지 기능 평가**

[0102] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물의 수술 후 인지 기능장애에 대한 효능을 평가하기 위해, 복강수술 유사 모델을 사용하였다. male BALB/c 마우스(6 to 8-week-old)를 사용하여 흡입마취제로 마취후 개복하여 위장막 동맥을 결찰하고 장관을 손가락으로 문지름으로써 인체 복강 대수술 유사 모델을 구축하였다. 본 발명의 조성물을 수술 후 회복기에 투여하고, 아래의 테스트들을 실시하였다.

[0104] **수동 회피 테스트 - 학습과 기억력 평가**

[0105] 수동회피테스트에서는 동일한 구조의 조명이 있는 방과 조명이 없는 어두운 방으로 나누어져 있고(가로 25 cm, 세로 20 cm, 높이 20 cm), 두 방 사이에 작은 연결문이 장치되어 있다. 본 테스트는 마우스의 작업 메모리 능

력을 측정하는 방법으로 학습 및 기억력 측정을 위하여 널리 이용된다.

- [0106] (i) 트레이닝 : 왕복상자의 좌측 방에 불을 켜고 마우스의 머리가 연결 문의 반대쪽으로 향하게 내려놓는다. 마우스를 10초간 탐색시킨 후 연결 문을 열어 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 한다. 마우스는 방을 탐색하다가 본능적으로 어두운 우측 방으로 이동하게 되는데, 이때 연결 문이 열린 후 120초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 마우스는 실험에서 제외시킨다. 일단 마우스가 어두운 쪽으로 들어가면 연결 문이 닫힌다. 그 후 0.5 mA의 전기 충격이 3초 동안 격자모양 바닥을 통해 흐르게 되고 마우스는 이를 기억하게 된다. 연결 문이 열린 후 마우스가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정하여 기록한다.
- [0107] (ii) 테스트 : 테스트는 트레이닝이 끝난 후, 48시간 후에 수술 및 마취가 기억에 미치는 효과를 확인하고자 실시한다. 마우스를 왕복상자에 넣고 10초 동안 탐색시간 후 연결문이 열리고, 어두운 쪽으로 마우스 네 발이 전부 들어가는데 걸리는 시간(latency time; 머무름 시간)을 300초까지 측정한다. 어두운 쪽으로 가는데 걸리는 시간이 길수록 수동 회피의 학습과 기억이 좋은 것으로 판단한다.
- [0108] 도 3a을 참조하면, 수술 후 2일째 수동회피 테스트를 한 결과, 수술만 시행한 군(POCD)은 머무름 시간이 유의하게 감소하나, 수술 후 본 발명의 조성물을 10 mg/kg 투여한 치료군은 모두 정상 군(control)과 같은 수준의 인지기능 개선 효과를 보였다.

[0110] **EPM(Elevated plus maze test) -작업 기억 평가**

- [0111] Elevated plus maze(EPM)는 두 개의 개방형 평형대와 두 개의 폐쇄형 평형대 그리고 중앙의 중앙 강단으로 구성되어 있다. 본 평가에서는 5분간 마우스가 개방형 평형대에서 머무는 시간을 측정하였다. 4개의 통로 가운데 마주보는 2개(길이 30 cm, 폭5 cm)는 개방되어 있고, 크기가 동일한 다른 2개의 통로는 높이20 cm의 벽으로 구성되어 있다. 중앙 강단은 가로 5 cm 및 세로 5 cm로 하였고, 미로의 중앙부 천장에 비디오카메라를 설치하여 동물의 행동을 기록하였다.
- [0112] 테스트를 시작할 때 마우스는 미로의 개방형 평형대에 머리를 밖으로 향하게 놓은 다음미로를 자유롭게 탐색하도록 하였다. 행동은 5분 간 관찰하였다. 마우스가 개방형 평형대와 폐쇄형 평형대에 머문 시간, 총 이동거리 등을 SMART Video Tracking System을 사용하고, SMART v2.5.21 프로그램으로 각각 분석하여 기억 능력을 측정하였다.
- [0113] 각 마우스의 첫째 날과 둘째 날에서 양쪽의 폐쇄형 평형대 중 어떤 것이든지 상관없이 평행대에 진입까지 소요된 시간(Transfer latency)를 측정하였다. 여기서 학습된 것은 첫째 날과 비교하였을 때, 둘째 날 때 줄어든 소요된 시간을 보였을 때라고 정의한다. 정량적인 분석을 위해서 학습 지수(learning index)는 첫째 날과 둘째 날에서의 소요된 시간의 상대적인 차이를 바탕으로 계산하였다. 높은 학습 지수는 뇌내 해마(hippocampus) 기능이 우수함을 의미한다.
- [0114] 도 3b에서 (a)는 수술 전날 소요된 시간, (b)는 수술 후 둘째 날 소요된 시간, (c)는 학습 지수를 나타낸다. POCD군은 낮은 학습지수를 보인 반면, 본 발명의 조성물이 처리된 nt-p65-TMD(10mg/kg)군은 control군의 학습지수와 차이가 없다. 즉 본 발명의 조성물의 치료 효과로 인해 학습 능력이 개선 되었음을 알 수 있다.

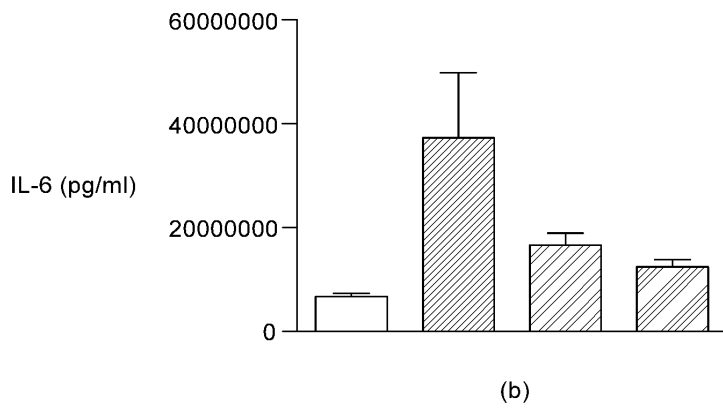
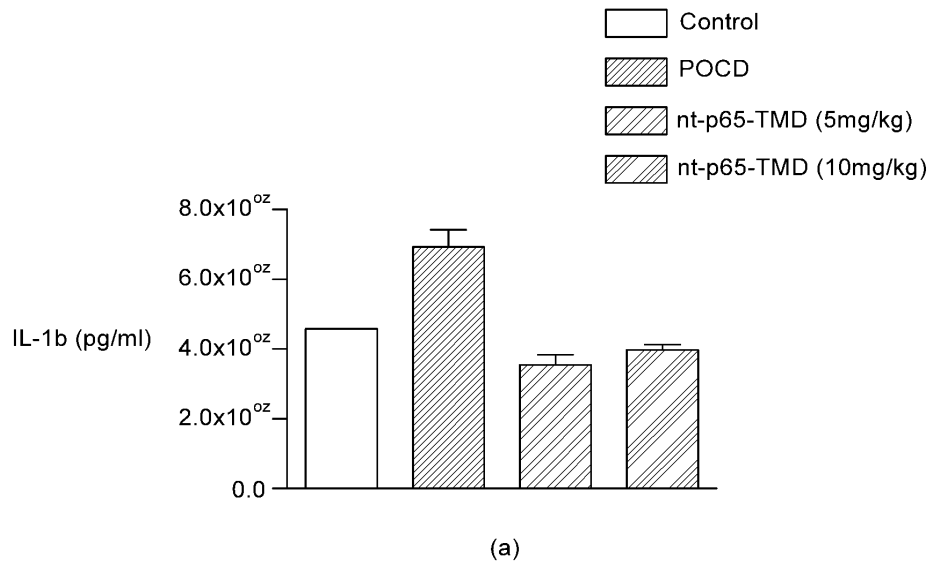
[0116] **새로운 물체에 대한 인지 테스트 - 인지 기억 평가**

- [0117] 아크릴 상자(40 cm x 40 cm x 40cm)의 내부 중앙 부분에 동일한 두 물체를 18cm정도 간격으로 놓고 10분 간 탐색을 허용하고, 48시간 후 둘 중 하나는 색깔과 형태가 다른 새로운 물체로 바꾸어 3분간 관찰하도록 하고 마우스가 새로운 물체에 머문 시간을 측정하였다.
- [0118] 주의 집중력 평가를 위하여 수행하며, 마우스에게 동일한 두 물체를 제시하면, 자연스럽게 호기심이 유발되어 마우스가 두 물체를 탐지하게 되는데 이때 통상적으로 두 물체를 탐지하는 시간이 비슷하다. 그러나, 48시간 후 두 물체 중 하나를 새로운 물체로 대체시키면 일반적으로 마우스는 새로운 물체에 대해 더 많은 호기심을 가지는 습성 때문에 새로운 물체를 탐지하는 시간이 더 증가하게 된다. 본 실시예에서는 아크릴(40×40×40)cm의 상자에 수술 전 마우스를 넣고 5분간 상자 속 환경에 적응시켰다. 5분 후 상자에 두 개의 물체를 놓고 각각의 물체에 대한 반응시간을 3분 동안 관찰하여 기록하였다. 수술 48시간 후, 두 개의 물체 중 한 개의 물체를 색깔과 형태가 다른 새로운 물체로 바꾼 후 3분 동안 관찰하여 새로운 물체에 대한 반응시간을 기록하였다.

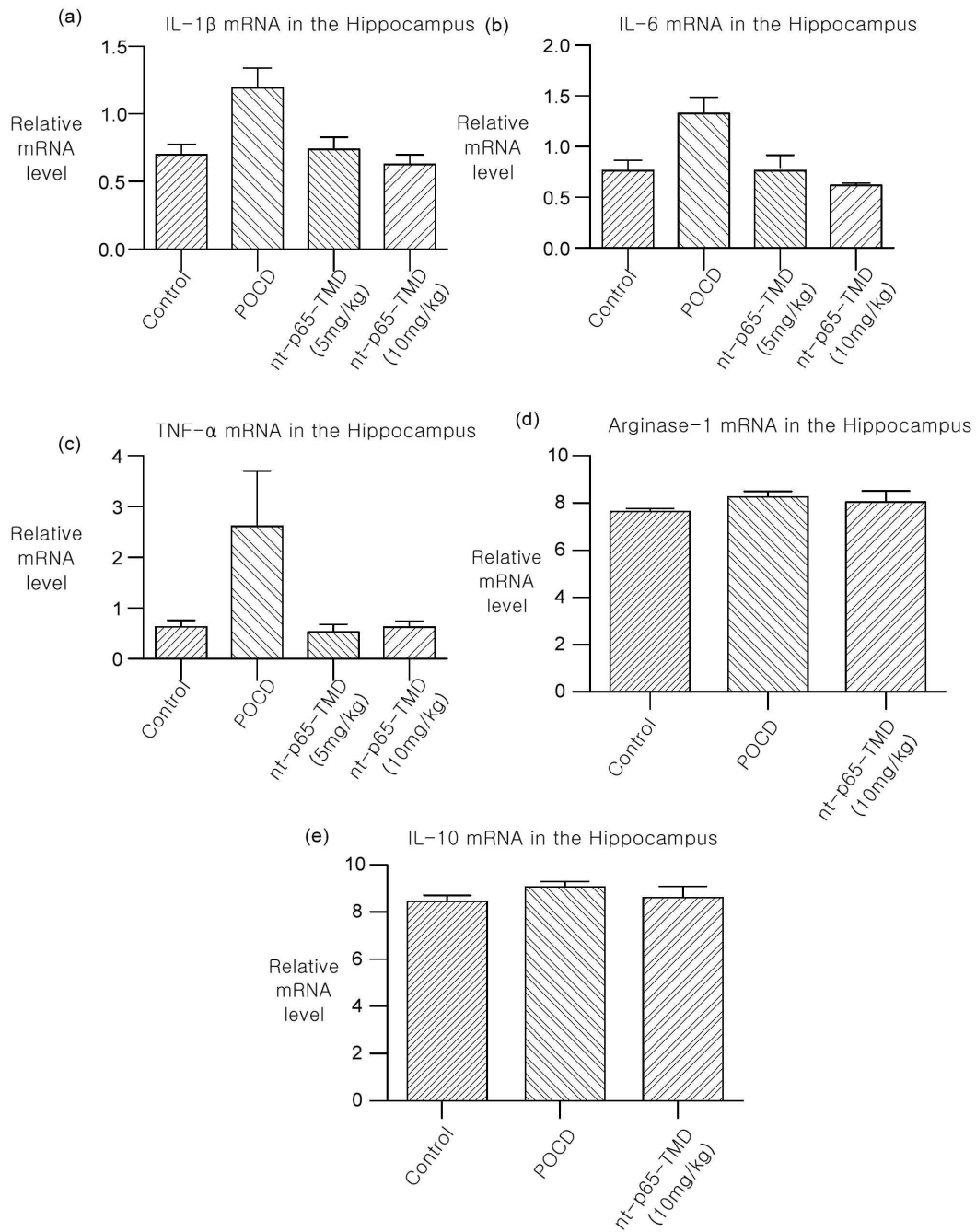
- [0119] 도 3c를 참조하면, 수술 전 동일한 두 물체에 대한 탐색 기간에는 군들 사이에 차이가 없었으나, 수술 후 2일째 새로운 물체에 대한 탐색 시간은 control군과 nt-p65-TMD(10mg/kg)군은 새로운 물체에 대한 탐색 기간이 증가한 반면, POCD 군의 경우 새로운 물체와 이전 물체에 대한 탐색 기간 사이에 차이가 없었다. 이는 수술 후 인지 기능의 저하를 의미하며, 본원 발명의 조성물을 수술 후 투여했을 때 치료 효과로 인지 기억 능력이 향상되는 것을 나타낸다.
- [0121] 이상의 실시예의 결과로 본 발명의 조성물(nt-p65-TMD 융합단백질)은 염증 반응에 유도되는 전염증성 싸이토카인의 발현 수준 또는 단백질의 농도를 효과적으로 낮출뿐만 아니라, 항 전염증성 싸이토카인의 발현 수준 또는 단백질의 수준을 높여, 수술 후 일어날 수 있는 염증 반응을 개선하는 효과가 있을 수 있다. 더 나아가, 본원 발명의 조성물(nt-p65-TMD 융합단백질)은 학습능력, 기억력을 개선하는 효과가 있을 수 있다. 이에 따라, 본원 발명의 조성물(nt-p65-TMD 융합단백질)은 수술 후 인지 기능장애를 예방하거나 치료할 수 있는 효과가 있다. 이때, 뇌에서의 염증 반응의 개선 또는 억제 는 인지 기능의 향상으로 이어질 수 있다. 이에 따라, 본 발명의 일 실시예에 따른 수술 후 염증 반응 억제용 조성물은 본 발명의 다른 실시예의 수술 후 인지 기능장애 예방용 또는 치료용 약학 조성물로서 제공될 수 있다.
- [0122] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 더욱 상세하게 설명하였으나, 본 발명은 반드시 이러한 실시예로 국한되는 것은 아니고, 본 발명의 기술사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양하게 변형 실시될 수 있다. 따라서, 본 발명에 개시된 실시예들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 그러므로, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 보호 범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

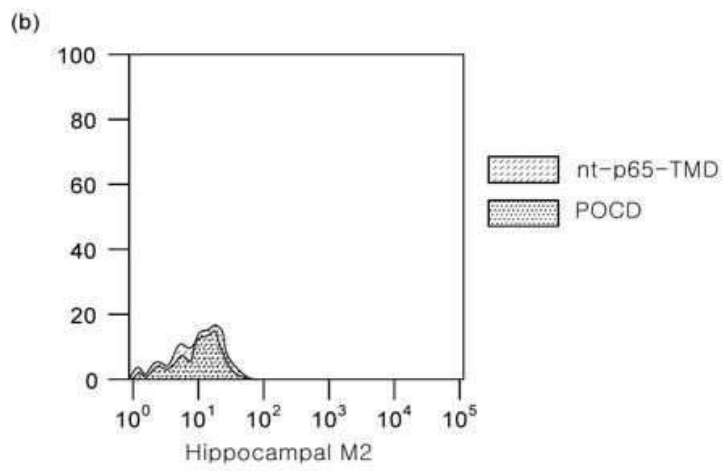
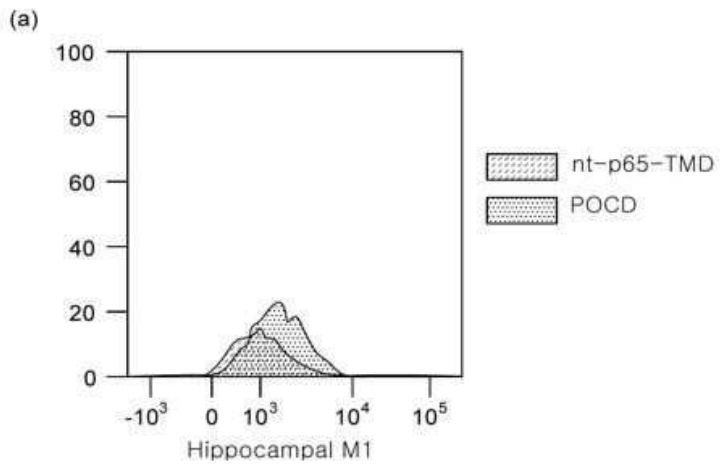
도면1a



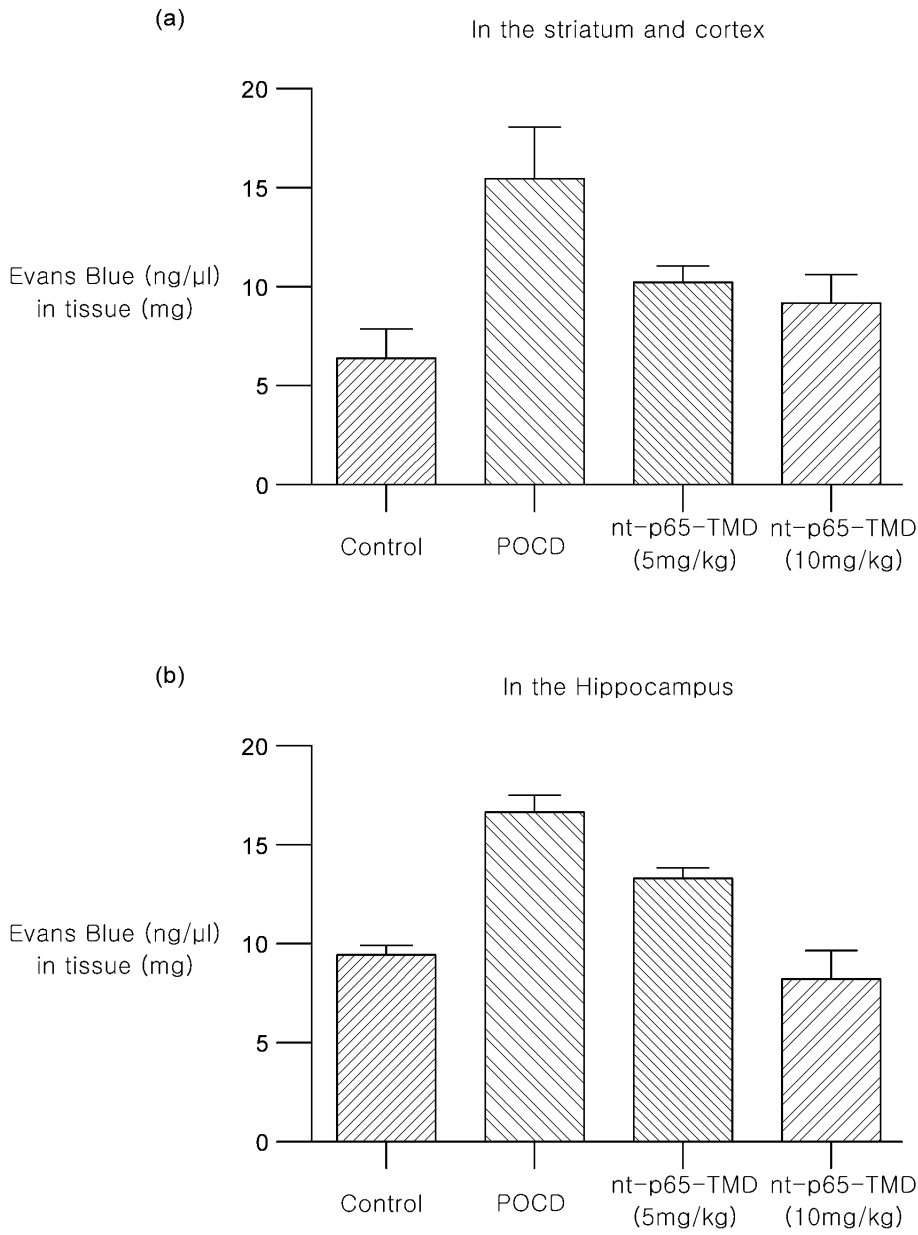
도면1b



도면1c

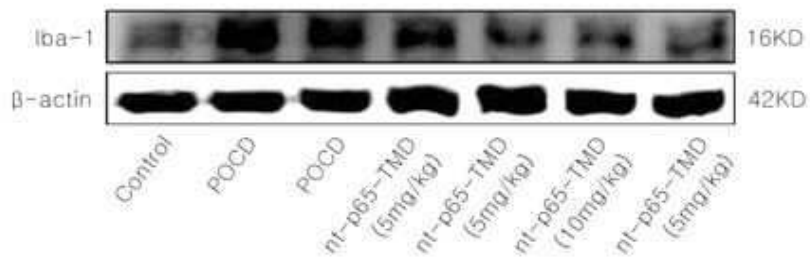


도면1d

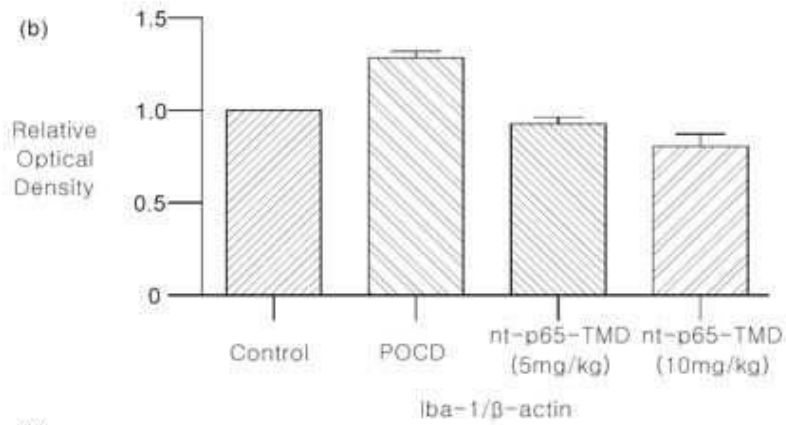


도면1e

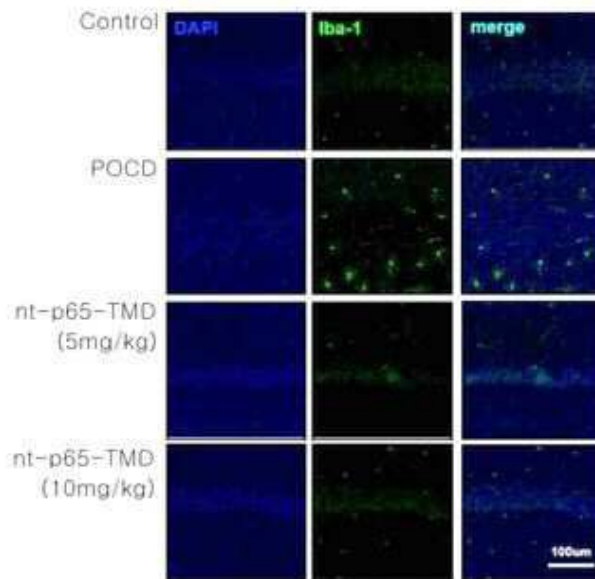
(a)



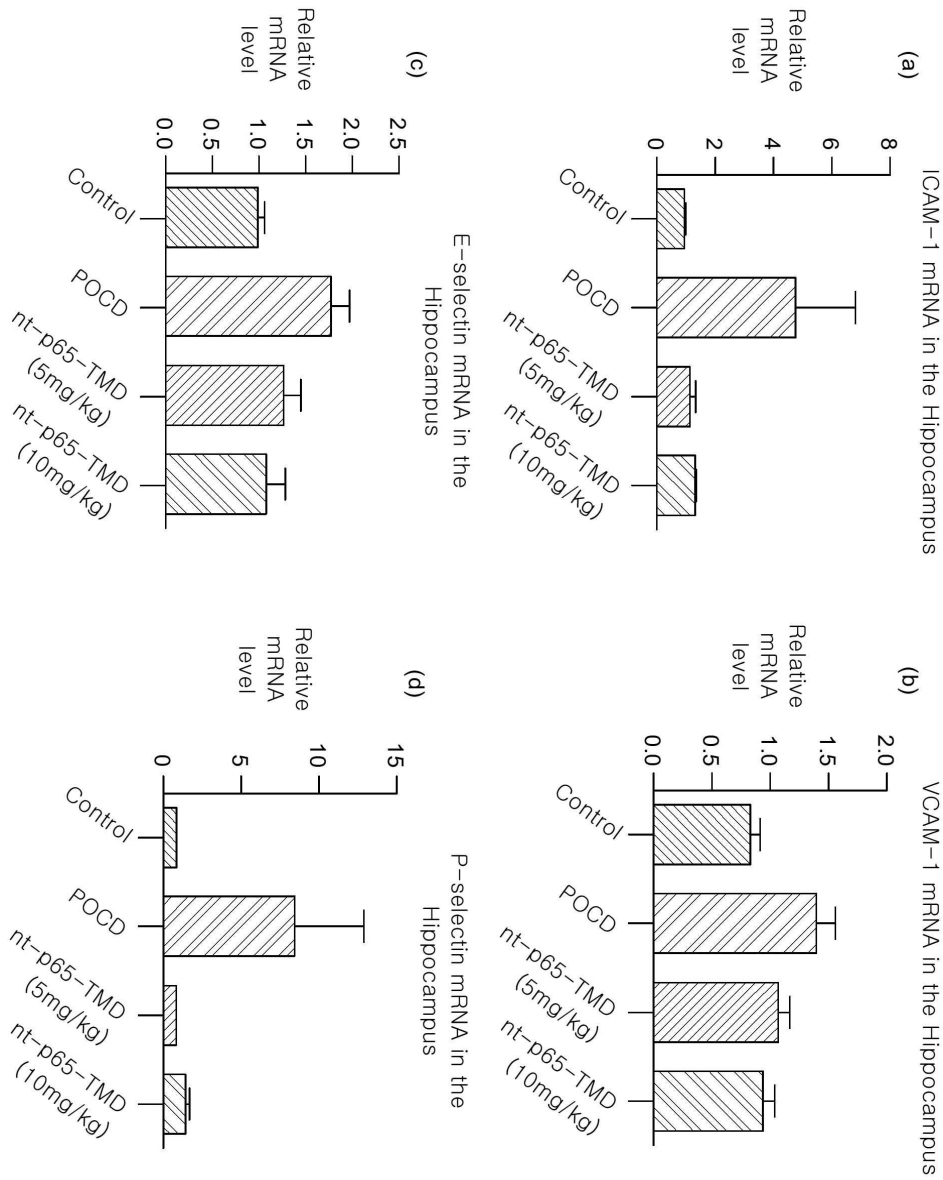
(b)



(c)

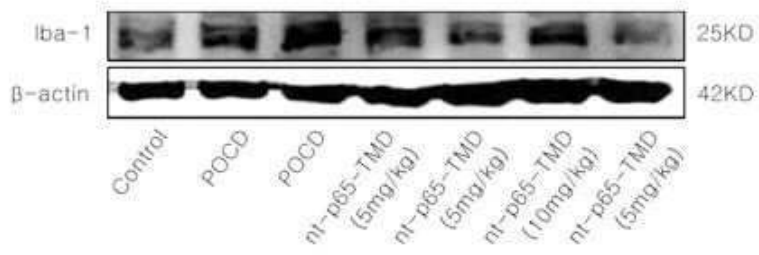


도면1f

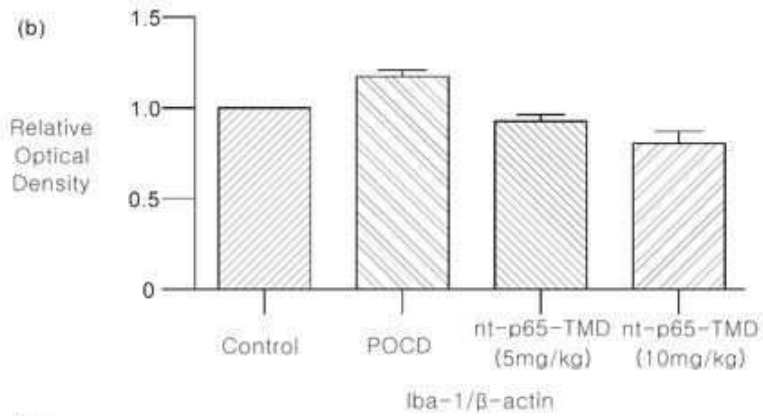


도면1g

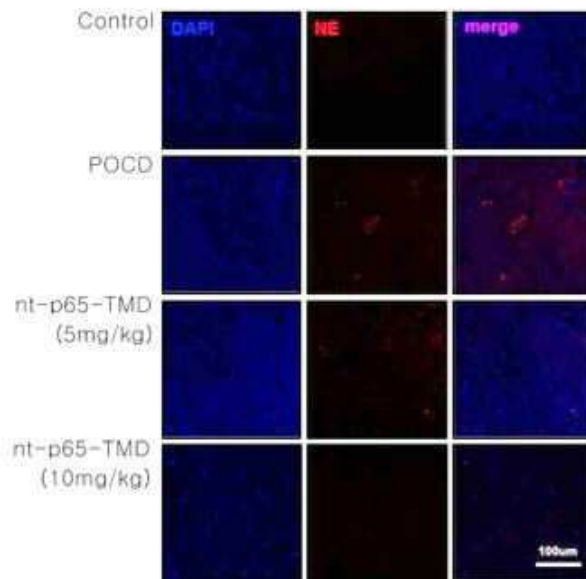
(a)



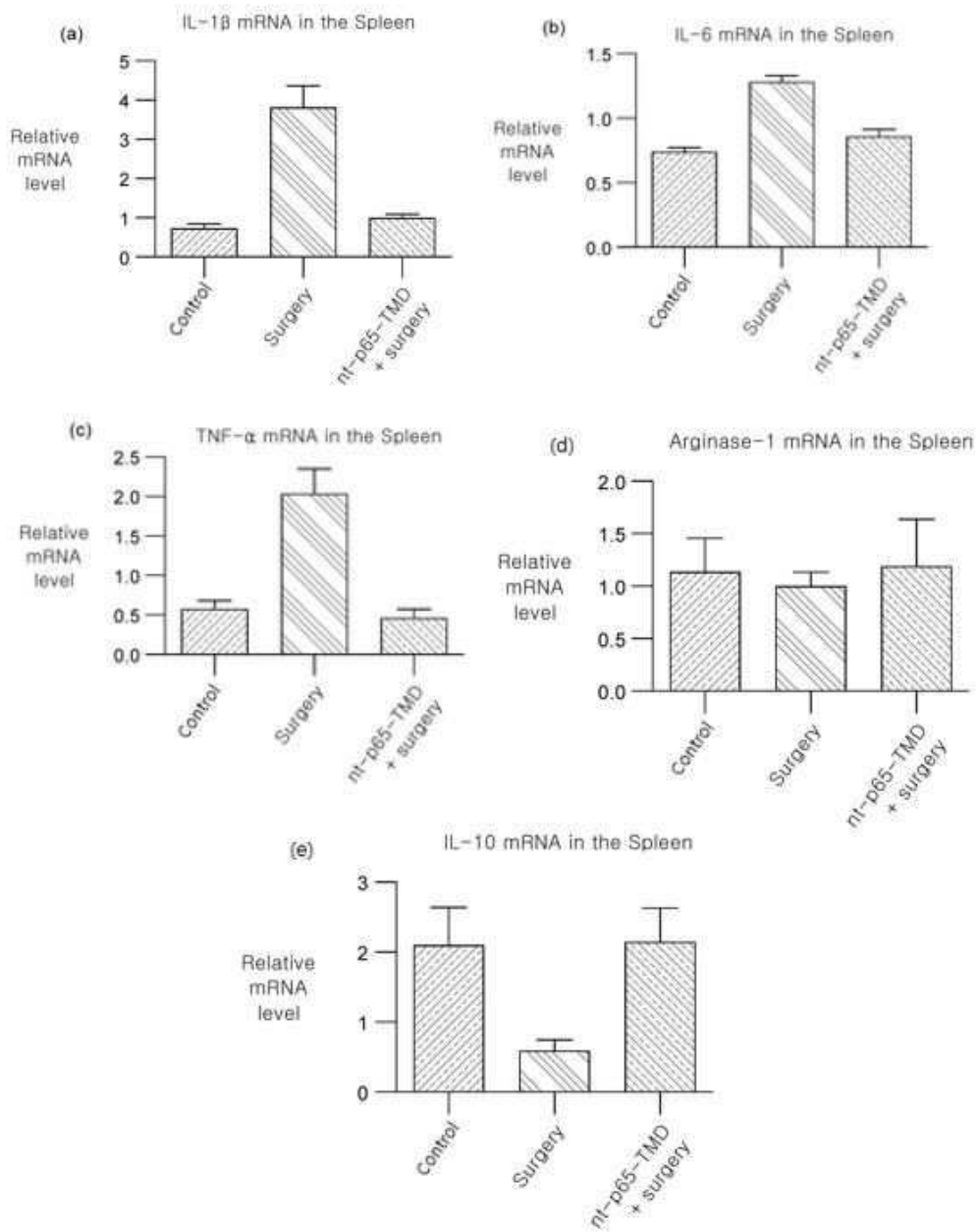
(b)



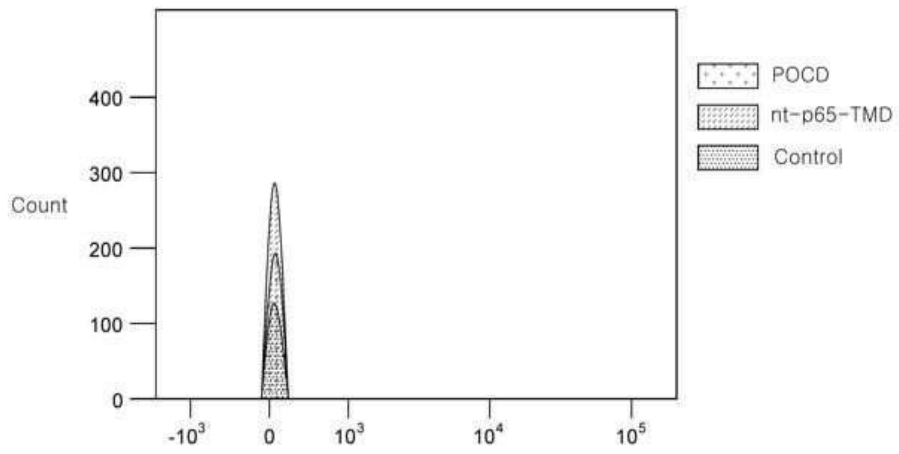
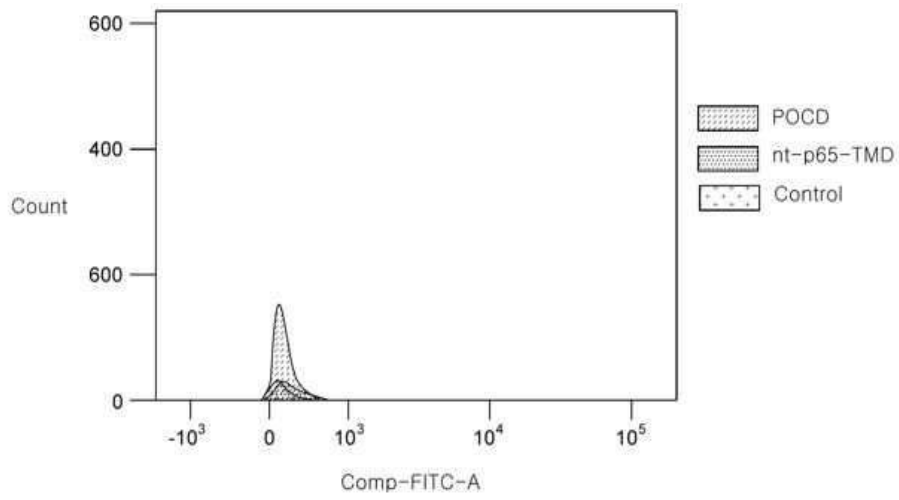
(c)



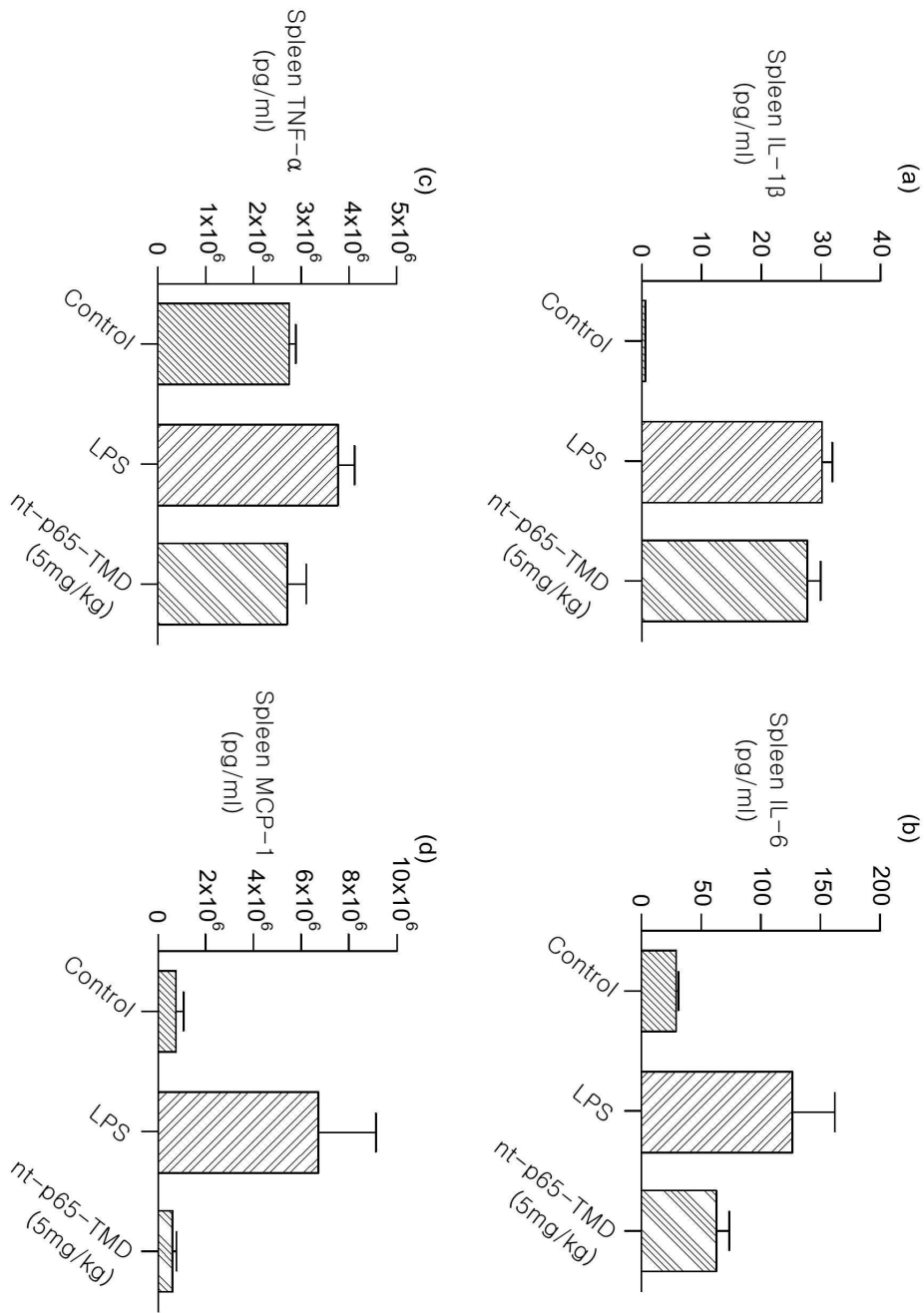
도면2a



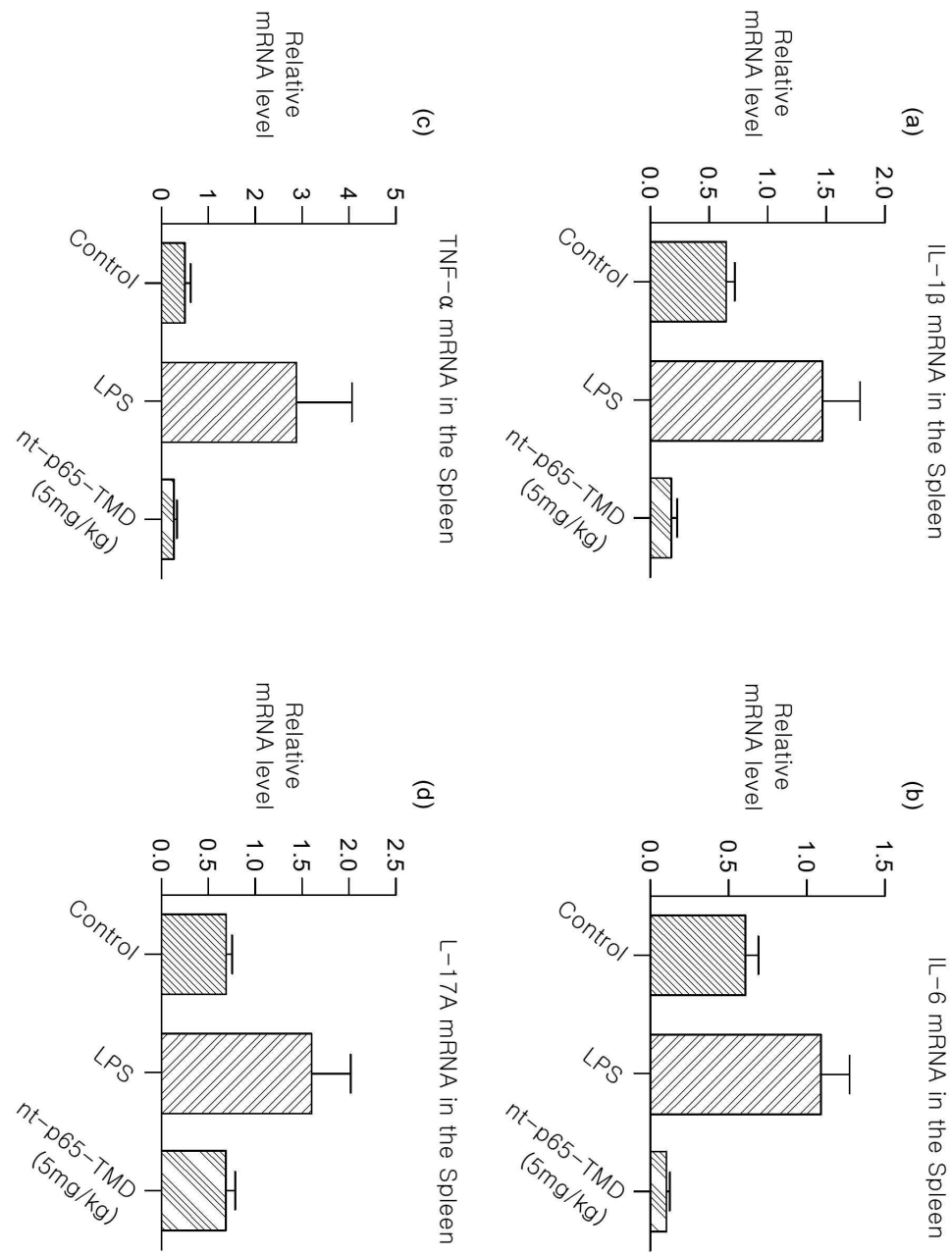
도면2b



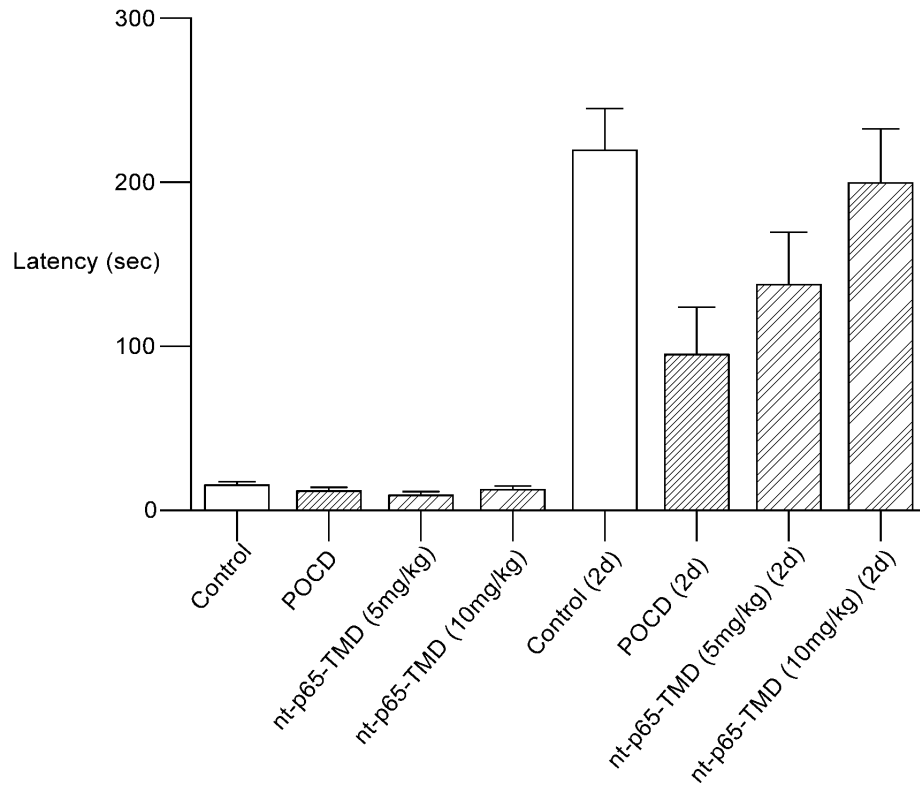
도면2c



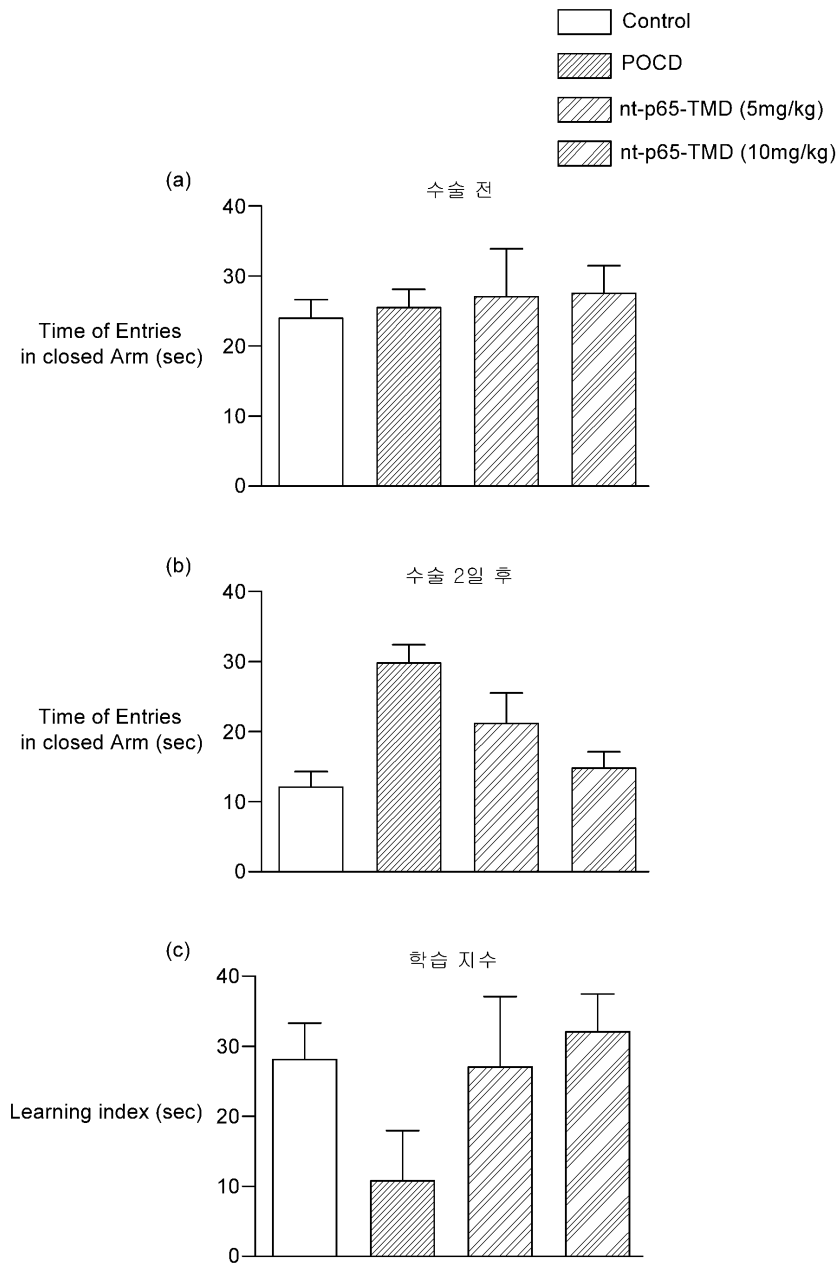
도면2d



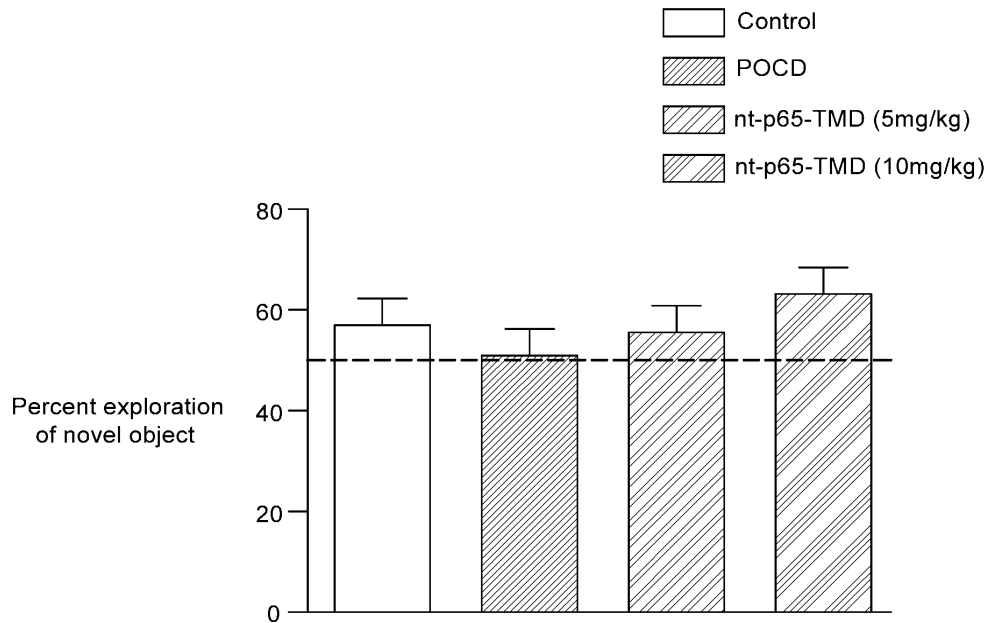
도면3a



도면3b



도면3c



서열목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY
- <120> COMPOSITION FOR INHIBITING POSTOPERATIVE INFLAMMATORY RESPONSE AND COMPOSITION FOR TREATING OR PREVENTING POSTOPERATIVE COGNITIVE DYSFUNCTION
- <130> 16PD5948KR
- <160> 3
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 187
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Amino acid sequence of p65 transcription modulation domain
- <400> 1

Met Asp Asp Leu Phe Pro Leu Ile Phe Pro Ser Glu Pro Ala Gln Ala

1                    5                    10                    15  
 Ser Gly Pro Tyr Val Glu Ile Ile Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Met

20                    25                    30

Arg Phe Arg Tyr Lys Cys Glu Gly Arg Ser Ala Gly Ser Ile Pro Gly

35                    40                    45

Glu Arg Ser Thr Asp Thr Thr Lys Thr His Pro Thr Ile Lys Ile Asn



1                    5                    10                    15  
 Arg Gly Ser His Met Ala Ser Gly Tyr Ala Arg Val Arg Arg Arg Gly  
                          20                    25                    30  
 Pro Arg Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Glu Phe  
                          35                    40                    45  
 Met Asp Asp Leu Phe Pro Leu Ile Phe Pro Ser Glu Pro Ala Gln Ala  
  
                          50                    55                    60  
 Ser Gly Pro Tyr Val Glu Ile Ile Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Met  
 65                    70                    75                    80  
 Arg Phe Arg Tyr Lys Cys Glu Gly Arg Ser Ala Gly Ser Ile Pro Gly  
                          85                    90                    95  
 Glu Arg Ser Thr Asp Thr Thr Lys Thr His Pro Thr Ile Lys Ile Asn  
                          100                    105                    110  
 Gly Tyr Thr Gly Pro Gly Thr Val Arg Ile Ser Leu Val Thr Lys Asp  
                          115                    120                    125  
  
 Pro Pro His Arg Pro His Pro His Glu Leu Val Gly Lys Asp Cys Arg  
                          130                    135                    140  
 Asp Gly Tyr Tyr Glu Ala Asp Leu Cys Pro Asp Arg Ser Ile His Ser  
 145                    150                    155                    160  
 Phe Gln Asn Leu Gly Ile Gln Cys Val Lys Lys Arg Asp Leu Glu Gln  
                          165                    170                    175  
 Ala Ile Ser Gln Arg Ile Gln Thr Asn Asn Asn Pro Phe His Val Pro  
                          180                    185                    190  
 Ile Glu Glu Gln Arg Gly Asp Tyr Asp Leu Asn Ala Val Arg Leu Cys  
  
                          195                    200                    205  
 Phe Gln Val Thr Val Arg Asp Pro Ala Gly Arg Pro Leu Leu Leu Thr  
                          210                    215                    220  
 Pro Val Leu Ser His Pro Ile Phe Asp Asn Arg  
 225                    230                    235