



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0116084

(43) 공개일자 2015년10월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0040451

(22) 출원일자 2014년04월04일

심사청구일자 2014년04월04일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)

(72) 발명자

류지간

인천광역시 연수구 송도동 163-6 엑스포아파트 902동 701호

서준규

서울 강남구 영동대로 230, 3동 803호 (대치동, 우성아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

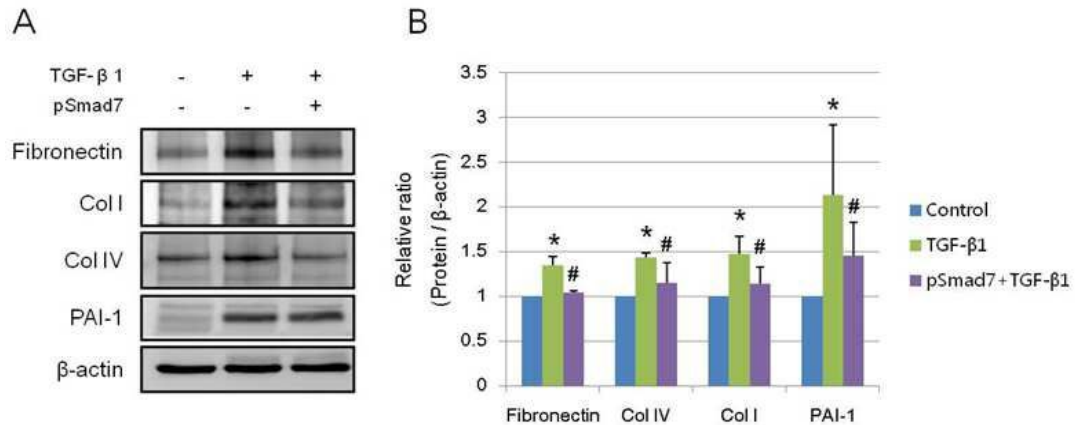
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 스매드 7을 유효성분으로 포함하는 폐이로니병의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 스매드 7(Smad 7) 유전자 또는 스매드 7(Smad 7) 단백질을 유효성분으로 포함하는 폐이로니병의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 스매드 7(Smad 7) 유전자 또는 스매드 7(Smad 7) 단백질은 음경백막의 섬유화 병변을 감소시키고, 음경 섬유모세포 내 스매드 2/3(Smad 2/3)의 인산화를 억제하여 TGF-베타 신호전달경로의 활성을 억제하여, 음경 섬유모세포의 근섬유모세포로의 분화를 억제함으로써 세포외기질의 합성을 감소시켜 조직의 항섬유화 효과가 우수하므로, 폐이로니병의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

최민지

인천 중구 서해대로 439, 101동 301호 (신흥동1가,
경남아너스빌아파트)

송강문

경기 부천시 원미구 안곡로 284, 102동 304호 (역
곡동, 한국아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0015771

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 핵심연구

연구과제명 섬유화 관련 신호전달경로를 겨냥한 음경만곡증의 병인규명

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2014.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

스매드 7(Smad 7) 유전자 또는 스매드 7(Smad 7) 단백질을 유효성분으로 포함하는 페이로니병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 스매드 7(Smad 7) 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 갖는, 페이로니병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 스매드 7(Smad 7) 유전자는 벡터에 포함된 형태인 것인, 페이로니병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 스매드 7(Smad 7) 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는, 페이로니병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 스매드 7(Smad 7) 단백질은 음경백막의 섬유화를 억제하는 것을 특징으로 하는, 페이로니병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

스매드 7(Smad 7) 유전자 또는 스매드 7(Smad 7) 단백질을 유효성분으로 포함하는 페이로니병의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 스매드 7(Smad 7) 유전자 또는 스매드 7(Smad 7) 단백질을 유효성분으로 포함하는 페이로니병의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

스매드 7(Smad 7)은 스매드(Smad) 패밀리 중 하나로, TGF-베타(transforming growth factor- β)의 하위신호전달 물질 중 하나이다. 세포내에서 TGF-베타 신호에 의해 인산화가 되어 활성을 갖게 되는 스매드 2(Smad 2)와 스매드 3(Smad 3)는 복합체를 이루어 세포의 핵 안까지 신호를 전달하게 된다. 이때 스매드 7(Smad 7)은 스매드

2(Smad 2)와 스매드 3(Smad 3)의 인산화를 억제하거나, TGF-베타 제1형 수용체의 분해를 촉진함으로써 TGF-베타 신호전달을 억제하는 것으로 알려져 있다(Nakao et al, Nature, 389, pp631-635, 1997; Kavsak et al, Mol Cell, 6:1355-1375, 2000). 스매드 7(Smad 7)은 배아발생, 면역 및 염증반응의 조절, 암화, 대사조절 등에 관련됨이 보고되었으나(Zhu L et al, Cell and Bioscience, 1:44 pp1-6, 2011), 현재까지 스매드 7(Smad 7)과 페이로니병(음경만곡증 또는 음경섬유화라고도 함)의 연관 관계에 대해서는 전혀 개시된 바 없다.

[0003] 한편, 페이로니병은 음경 발기조직을 둘러싸고 있는 음경백막에 섬유화병변이 생기고, 발기 시에 통증을 유발하고 섬유화병변이 있는 쪽으로 음경이 휘는 음경만곡을 유발해서 정상적인 성행위에 장애를 주는 질환이다. 일종의 후천성 음경기형으로서 성행위시 음경백막의 반복적인 외상 또는 전구섬유화인자의 과발현이 섬유화병변의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 그 외에도 유전적 소인 등이 페이로니병의 원인이 될 수 있다.

[0004] 현재까지 페이로니병의 치료를 위해 개발된 전문의약품은 전혀 없으며, 비타민 E 등과 같이 항산화 작용이 있는 약물이 경험적으로 사용되고 있으나, 그 효과는 미미하고, 수술적 치료가 유일하게 효과적인 치료법이다. 따라서, 음경백막의 섬유화병변을 효과적으로 치료할 수 있는 페이로니병 치료제의 필요성이 요구되고 있는 실정이다.

[0005] 이에 본 발명자들은 페이로니병 예방 또는 치료용 조성물을 개발하고자 노력한 결과, 스매드 7(Smad 7)이 페이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포에서 항섬유화 작용을 가지며, 섬유모세포에서 근섬유모세포로의 분화를 억제함으로써 세포외기질(extracellular matrix) 생성의 억제, 즉 섬유화 현상을 억제할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 스매드 7(Smad 7) 유전자 또는 스매드 7(Smad 7) 단백질을 유효성분으로 포함하는 페이로니병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 또한, 본 발명의 목적은 스매드 7(Smad 7) 유전자 또는 스매드 7(Smad 7) 단백질을 유효성분으로 포함하는 페이로니병의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 스매드 7(Smad 7)의 유전자를 유효성분으로 포함하는 페이로니병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 스매드 7(Smad 7)의 유전자를 유효성분으로 포함하는 페이로니병의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 스매드 7(Smad 7) 유전자 또는 스매드 7(Smad 7) 단백질은 음경백막의 섬유화 병변을 감소시키고, 음경 섬유모세포 내 스매드 2/3(Smad 2/3)의 인산화를 억제하여 TGF-베타 신호전달경로의 활성을 억제하여, 음경 섬유모세포의 근섬유모세포로의 분화를 억제함으로써 세포외기질의 합성을 감소시켜 조직의 항섬유화 효과가 우수하므로, 페이로니병의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 스매드 7(Smad 7)의 세포외기질 (플라스미노겐 활성인자 억제제-1, 피브로넥틴, 콜라겐 I 및 콜라겐 IV) 합성 억제 효과를 나타낸 도이다.

도 2는 스매드 7(Smad 7)의 콜라겐 생성 감소 효과를 나타낸 도이다.

도 3은 스매드 7(Smad 7)의 스매드 2(Smad 2), 스매드 3(Smad 3) 인산화 억제 효과를 나타낸 도이다.

도 4는 스매드 7(Smad 7)의 스매드 2/3(Smad 2/3)의 핵 내 이동 억제 효과를 나타낸 도이다.

도 5는 스매드 7(Smad 7)의 음경 섬유모세포의 근섬유모세포로의 분화 억제 효과를 나타낸 도이다.

도 6은 스매드 7(Smad 7)의 음경 섬유모세포의 세포사멸 유도 효과를 나타낸 도이다.

도 7은 스매드 7(Smad 7)의 PARP-1 발현 억제 효과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은 스매드 7(Smad 7) 유전자 또는 스매드 7(Smad 7) 단백질을 유효성분으로 포함하는 페이로니병의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0013] 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물을 포함한다.
- [0014] 본 발명의 스매드 7(Smad 7) 단백질은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 코딩될 수 있으며, 상기 염기서열은 GenBank ID :NM_005904의 288-1568번째 염기서열이다.
- [0015] 상기 스매드 7(Smad 7) 단백질은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다.
- [0016] 본 발명의 스매드 7(Smad 7) 단백질은 시험관에서 플라스미드 DNA를 합성하여 형질전환을 통하여 세포 안으로 도입시키는 방법, 세포 내에서 스매드 7(Smad 7) 유전자가 발현되도록 제조된 플라스미드 DNA 발현벡터 또는 PCR-유도된 플라스미드 DNA(PCR-derived plasmid DNA) 발현 카세트를 세포 내로 도입시키는 방법 및 스매드 7(Smad 7) 단백질 및 펩타이드를 직접 투여하거나 스매드 7(Smad 7)의 활성을 보이는 일부 도메인을 이용하는 방법에 의하여 발현이 증폭될 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명의 스매드 7(Smad 7) 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있으며, 상기 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 스매드 7(Smad 7)의 유전자는 벡터에 포함된 형태일 수 있으며, 바람직하게 스매드 7(Smad 7)의 플라스미드 DNA 형태로 본 발명의 조성물에 포함된다.
- [0019] 본 발명의 스매드 7(Smad 7) 유전자를 포함하는 플라스미드 벡터는 선별 마커, 바람직하게는 항생제인 앰피실린 마커가 있는 pCMV5를 이용하여 제조할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 벡터 pCMV5를 EcoRI, XbaI의 제한 효소로 절단한 후, 인서트(insert)인 스매드 7(Smad 7) 유전자를 삽입하여 본 발명의 스매드 7(Smad 7) 유전자를 포함하는 플라스미드 벡터를 제조하였다.
- [0020] 상기 스매드 7(Smad 7)의 유전자 또는 단백질은 음경 섬유모세포 내 스매드 2/3(Smad 2/3)의 인산화를 억제하여 TGF-베타의 신호전달경로의 활성화를 억제하여, 음경 섬유모세포의 근섬유모세포로의 분화를 억제함으로써 세포 외기질의 합성을 감소시키는 등 조직의 항섬유화 효과가 우수하다.
- [0021] 따라서, 본 발명의 스매드 7(Smad 7)의 유전자 또는 단백질은 페이로니병의 예방 또는 치료에 유용한 의약품 및 건강기능식품 등에 이용될 수 있다.
- [0022] 상기 페이로니병은 음경 섬유모세포에서 세포외기질의 과도한 생성으로 인한 음경백막의 섬유화에 의하여 발생하고, 이러한 음경백막의 섬유화는 성교시 손상, 유전적 소인 및 이들의 조합으로부터 선택된 것에 의하여 야기된 것일 수 있다.
- [0023] 페이로니병의 음경 조직의 섬유화 및 발기부전의 음경 리모델링에 의한 조직 섬유화는 모두 음경의 섬유화를 초래하나, 페이로니병에 의한 섬유화는 음경백막이라는 결합조직(connective tissue)에 섬유화가 생기는 것임에

반해, 발기부전의 음경 리모델링에 의한 섬유화는 음경 발기조직, 즉 망상 해면체 구조(cavernous sinusoids)로 이루어진 특수한 혈관조직에 섬유화가 생기는 것임을 의미한다. 또한 양 질환에 의한 섬유화가 야기되는 원인으로 전혀 다른데, 페이로니병에 의한 음경백막의 섬유화는 상기한 바와 같이 성교시 음경손상, 유전적 소인 등으로 인해 음경백막에 섬유화가 발생하는 반면, 발기부전에 의한 음경 발기조직의 섬유화는 당뇨, 고지질혈증, 고혈압, 흡연 등과 같은 혈과 위험인자 등으로 인해 음경동맥(cavernous artery)의 죽상경화증(atherosclerosis)이 발생하고, 이로 인해 발기조직으로의 혈액공급이 감소되어 주로 발생하는 바, 양 질환에 의한 음경 조직의 섬유화는 섬유화가 일어나는 조직과 섬유화의 원인이 전혀 다르다.

[0024] 상기 세포외기질 단백질은 플라스미노겐 활성화인자 억제제-1(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1), 피브로넥틴(fibronectin), 콜라겐 I(collagen I) 및 콜라겐 IV(collagen IV)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0025] 본 발명의 조성물은 스매드 7(Smad 7) 유전자 또는 스매드 7(Smad 7) 단백질을 유효성분으로 하는 조성물과 함께 페이로니병의 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.

[0026] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용액, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 또한, 비수성용액, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[0028] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물은 1일 0.0001mg/kg 내지 1000 mg/kg의 양으로 투여할 수 있다. 상기 조성물의 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다.

[0029] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 음경의 섬유화병변 내로의 직접투여, 그 외 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0030] 본 발명의 약학적 조성물은 페이로니병의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0031] 본 발명에서, '건강기능식품'이란 질병의 예방 및 개선, 생체방어, 면역, 병후의 회복, 노화 억제 등 생체조절 기능을 가지는 식품을 말하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해하여야 한다.

[0032] 본 발명의 유효성분은 페이로니병의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 스매드 7(Smad 7) 유전자 또는 스매드 7(Smad 7) 단백질을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 스매드 7(Smad 7) 유전자 또는 스매드 7(Smad 7) 단백질을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통

상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 유효성분은 원료에 대하여 15중량 % 이하, 바람직하게는 10 중량 % 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.

[0033] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0034] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g 이다.

[0035] 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, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0036] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예, 실험예 및 제제예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예, 실험예 및 제제예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 실험예 및 제제예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0037] **실시예 1. 스매드 7(Smad 7) 유전자를 포함하는 플라스미드 벡터의 준비**

[0038] 본 발명의 스매드 7(Smad 7) 유전자를 포함하는 플라스미드 벡터는 앰피실린 마커가 있는 pCMV5를 이용하여 제조하였다. 이를 EcoRI, XbaI의 제한 효소로 절단한 후, 인서트(insert)인 스매드 7(Smad 7) 유전자를 삽입하였다.

[0039] 또는 스매드 7(Smad 7) 유전자를 포함하는 플라스미드 벡터를 addgene 사로부터 구입하여 사용하였다.

[0040] **실험예 1. 스매드 7(Smad 7) 유전자의 세포외 기질 단백질 합성 억제 효과**

[0041] 본 발명의 스매드 7(Smad 7) 유전자의 음경 섬유모세포에서의 세포외 기질 단백질 합성 억제 효과를 확인하기 위하여, 웨스턴 블롯법을 수행하여 플라스미노젠 활성인자 억제제-1(PAI-1), 피브로넥틴(fibronectin), 콜라겐 I, 콜라겐 IV의 발현 정도를 측정하였다.

[0042] **1-1. 음경 섬유모세포 배양 및 스매드 7(Smad 7) 유전자의 플라스미드 DNA에 의한 형질전환**

[0043] 페이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리된 섬유모세포를 25℃에서 10% FBS(fetal bovine serum), 100units/ml 페니실린 및 100μg/ml 스트렙토마이신을 첨가한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle Medium)배지에서 배양하였다. 세포를 규칙적으로 계대 배양하여 대수적 성장을 유지하였다. 형질전환(transfection) 24시간 전, 약 80%의 세포 융만도(confluency)에서 트립신을 처리한 후 항생제가 포함되어 있지 않은 신선한 배지에서 배양을 유지시켰다. PEI25000/pDNA 콤플렉스(complex)로 형질전환을 수행하였다. 음경 섬유모세포가 배양되어 있는 각 웰에 1μg 농도의 스매드 7(Smad 7)의 플라스미드 DNA를 48 시간 동안 처리하였고, 그 후 TGF-베타 1을 24시간 동안 처리하였다.

[0044] **1-2. 스매드 7(Smad 7) 유전자의 세포외기질 단백질 합성 억제 효과 확인**

[0045] 섬유모세포에서 스매드 7(Smad 7)의 플라스미드 DNA가 TGF-베타 1에 의한 세포외기질 단백질 합성을 억제하는 효과를 확인하기 위하여 웨스턴블롯을 수행하였다.

[0046] 구체적으로는, 상기 1-1.에서 배양된 음경 섬유모세포를 PBS로 완전하게 세척한 다음 단백질 분해효소 저해제 혼합물(protease inhibitor cocktail)이 포함된 세포 분해 완충액(RIPA buffer)을 넣고 용해시킨 후 4℃에서 13,000rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액만 회수하였다. 이 용해물을 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)을 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 추출된 단백질들은 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 전기영동한 후 겔 속에 있던 단백질들을 니트로셀로로오스 막(nitrocellulose membrane)으로 이동시키고, 5% 탈지유(skim milk)로 차단(blocking) 하였다. 그리고 플라스미노겐 활성화인자 억제제-1(PAI-1), 피브로넥틴(fibronectin), 콜라겐 I 및 콜라겐 IV 항체를 사용하여 4℃에서 16시간 반응시켰다. 그 후 남아 있는 항체를 제거하기 위해서 세척 완충액으로 다시 3회 세척한 다음, 이차항체(HRP-labeled anti-mouse 또는 HRP-labeled anti-rabbit antibody)를 1:200 비율로 상온에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 남아있는 항체를 제거하기 위해 세척 완충액으로 다시 3회 세척한 후에 발색시켰다. 이의 결과는 도 1에 나타내었다.

[0047] 도 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 스매드 7(Smad 7) 유전자는 TGF-베타 1에 의한 세포외기질(플라스미노겐 활성화인자 억제제-1, 피브로넥틴, 콜라겐 I 및 콜라겐 IV) 합성을 현저히 감소시킴을 확인하였다.

[0048] **실시예 2. 스매드 7(Smad 7)의 유전자의 TGF-베타 1에 의한 콜라겐 합성 억제 효과 확인**

[0049] 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 음경 섬유모세포를 배양하고, 여기에 TGF-베타1과 스매드 7(Smad 7)의 플라스미드 DNA를 처리하였다. 이를 히드록시프롤린법(hydroxyproline assay)을 수행하고 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 콜라겐 활성정도를 측정하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0050] 도 2에 나타난 바와 같이, 스매드 7(Smad 7) 유전자는 TGF-베타 1에 의한 콜라겐 생성을 감소시킴을 확인하였다.

[0051] **실시예 3. 스매드 7(Smad 7)의 유전자에 의한 스매드 2/3(Smad 2/3)의 억제 효과 확인**

[0052] **3-1. 스매드 7(Smad 7)의 유전자에 의한 스매드 2/3(Smad 2/3)의 인산화 억제 효과 확인**

[0053] 스매드 7(Smad 7)의 유전자에 의한 스매드 2/3(Smad 2/3)의 인산화 억제 효과를 확인하여 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0054] 구체적으로, 상기 실시예 1-1.에서 배양된 음경 섬유모세포를 PBS로 완전하게 세척한 다음 단백질 분해효소 저해제 혼합물(protease inhibitor cocktail)이 포함된 세포 분해 완충액(RIPA buffer)을 넣고 용해시킨 후 4℃에서 13,000rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액만 회수하였다. 이 용해물을 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)을 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 추출된 단백질들은 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 전기영동한 후 겔 속에 있던 단백질들을 니트로셀로로오스 막(nitrocellulose membrane)으로 이동시키고, 5% 탈지유(skim milk)로 차단(blocking) 하였다. 그리고 포스포(phospho)-스매드 2(Smad 2), 포스포(phospho)-스매드 3(Smad 3) 및 총 스매드 2/3(Smad 2/3) 항체를 사용하여 4℃에서 16시간 반응시켰다. 그 후 남아 있는 항체를 제거하기 위해서 세척 완충액으로 다시 3회 세척한 다음, 이차항체(HRP-labeled anti-mouse 또는 HRP-labeled anti-rabbit antibody)를 1:200 비율로 상온에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 남아있는 항체를 제거하기 위해 세척 완충액으로 다시 3회 세척한 후에 발색시켰다. 이의 결과를 도 3에 나타내었다.

[0055] 도 3에 나타난 바와 같이, 스매드 7(Smad 7)의 유전자는 TGF-베타 1에 의한 스매드 2(Smad 2), 스매드 3(Smad 3) 인산화를 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0056] **3-2. 스매드 7(Smad 7)의 유전자에 의한 스매드 2/3(Smad 2/3)의 핵 내로의 이동 억제 효과 확인**

- [0057] 스매드 7(Smad 7)의 유전자에 의한 스매드 2/3(Smad 2/3)의 핵 내로의 이동 억제 효과 확인하기 위하여 공초점 현미경 분석을 수행하였다.
- [0058] 구체적으로, 상기 실시예 1-1.에서 배양된 음경 섬유모세포를 PBS로 완전하게 세척한 다음, 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정시킨 후 메탄올을 처리하여 차단하였다. 그리고 스매드 2/3(Smad 2/3) 항체를 사용하여 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 남아 있는 항체를 제거하기 위해서 세척완충액으로 다시 3회 세척한 다음, 항체를 형광으로 확인할 수 있도록 제작된 이차항체(FITC-labeled anti-mouse or TRITC-labeled anti-hamster antibody)를 1:100 비율로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 남아있는 항체를 제거하기 위하여 세척 완충액으로 다시 3회 세척한 후에 형광현미경이나 형광물질을 확인할 수 있는 공초점 현미경으로 발현 정도를 분석하였고, 이때 세포의 핵을 염색하기 위하여 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)를 사용하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0059] 도 4에 나타낸 바와 같이, 스매드 7(Smad 7)의 유전자는 TGF-베타 1에 의한 스매드 2/3(Smad 2/3)의 핵 내 이동을 성공적으로 억제할 수 있음을 확인하였다.
- [0060] **실시예 4. 스매드 7(Smad 7)의 유전자가 TGF-베타 1에 의한 섬유모세포의 근섬유모세포로의 분화 억제 효과 확인**
- [0061] 스매드 7(Smad 7)의 유전자가 TGF-베타 1에 의한 섬유모세포의 근섬유모세포로의 분화 억제 효과를 확인하기 위하여 면역형광염색과 웨스턴 블롯을 수행하였다.
- [0062] 구체적으로, 상기 실시예 1-1.에서 배양된 음경 섬유모세포를 PBS로 완전히 세척한 다음, 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정시킨 후 메탄올을 처리하여 차단하였다. 그 다음 근섬유모세포(myofibroblast) 분화 표지인자인 평활근 알파 액틴(smooth muscle alpha actin, α -SMA) 항체를 사용하여 4 내지 16시간 동안 반응시켰다. 남아 있는 항체를 제거하기 위하여 세척완충액으로 다시 3회 세척한 후, 항체를 형광으로 확인할 수 있도록 제작된 이차항체(FITC-labeled anti-mouse or TRITC-labeled anti-hamster antibody)를 1:100 비율로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 남아있는 항체를 제거하기 위하여 세척 완충액으로 다시 3회 세척한 후에 형광물질을 확인할 수 있는 공초점 현미경으로 발현 정도를 분석하였고, 이때 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)를 이용하여 세포의 핵을 염색하였다. 그 결과를 도 5A에 나타내었다.
- [0063] 또한, 상기 실시예 1-1.에서 배양된 음경 섬유모세포를 PBS로 완전하게 세척한 다음 단백질 분해효소 저해제 혼합물(protease inhibitor cocktail)이 포함된 세포 분해 완충액(RIPA buffer)을 넣고 용해시킨 후 4℃에서 13,000rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액만 회수하였다. 이 용해물을 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)을 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 추출된 단백질들은 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 전기영동한 후 겔 속에 있던 단백질을 니트로셀로오스 막(nitrocellulose membrane)으로 이동시키고, 5% 탈지유(skim milk)로 차단(blocking) 하였다. 그리고 α -SMA(smooth muscle α -actin) 항체를 사용하여 4℃에서 16시간 반응시켰다. 그 후 남아 있는 항체를 제거하기 위해서 세척 완충액으로 다시 3회 세척한 다음, 이차항체 (HRP-labeled anti-mouse 또는 HRP-labeled anti-rabbit antibody)를 1:200 비율로 상온에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 남아있는 항체를 제거하기 위해 세척 완충액으로 다시 3회 세척한 후에 발색시켰다. 그 결과를 도 5B 및 5C에 나타내었다.
- [0064] 도 5에 나타낸 바와 같이, 근섬유모세포 분화 표지인자인 α -SMA의 발현이 감소하였음을 확인함으로써, 스매드 7(Smad 7)의 유전자에 의해서 TGF-베타 1에 의한 섬유모세포에서 근섬유모세포로의 분화가 억제됨을 확인하였다.
- [0065] **실시예 5. 스매드 7(Smad 7)의 세포사멸 효과 확인**
- [0066] 스매드 7(Smad 7) 유전자에 의한 음경 섬유모세포의 세포사멸 효과를 확인하기 위하여 터널 분석법(TUNEL assay)을 수행 한 후, 공초점 현미경으로 그 결과를 분석하였다.
- [0067] 구체적으로, 상기 실시예 1-1.에서 배양된 음경 섬유모세포를 PBS로 완전히 세척한 다음, 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정시킨 후 메탄올을 처리하여 차단하였다. PBS로 완전히 세척 후, 균등 완충액을 처리하였다. TdT(terminal deoxynucleotidyl transferase)효소와 함께 37에서 1시간 반응시키고 세포사멸 시 DNA 절단이 일어났는지 여부를 파악하기 위해 잘린 DNA 조각 말단에 UTP(Uridine triphosphate)가 결합하도록 반응

시켰다. 반응정지 완충액을 이용하여 효소 반응을 멈춘 후 Digoxigenin-TRICT 항체와 반응시켜 잘린 DNA 말단에 형광물질을 표지하였다. 잔여 항체를 제거하기 위해 세척 완충액으로 4회 세척 후 공초점 현미경 분석방법을 통하여 사멸된 세포들을 파악하였다. 공초점 현미경 분석은 올림푸스사의 컨포칼 현미경(FV1000, Olympus, Tokyo, Japan)의 400배율 렌즈를 사용하여 TRITC, DAPI 형광 파장을 모두 흡수 할 수 있도록 설정하고 6개 이상의 구역을 임의적으로 정하여 DAPI 파장과 TRITC 파장이 중첩되어 염색된 세포만을 계수하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

도 6에 나타난 바와 같이, 스매드 7(Smad 7)의 유전자는 음경 섬유모세포의 세포사멸을 효과적으로 유도함을 확인하였다.

실시예 6. 스매드 7(Smad 7)의 유전자의 PARP-1의 발현 증가 효과 확인

스매드 7(Smad 7)의 유전자의 음경 섬유모세포에서 세포주기 및 TGF-베타의 신호전달 억제 역할을 하는 PARP-1의 발현 증가 효과를 확인하기 위하여 웨스턴 블롯을 수행하였다.

구체적으로, 상기 실시예 1-1.에서 배양된 음경 섬유모세포를 PBS로 완전하게 세척한 다음 단백질 분해효소 저해제 혼합물(protease inhibitor cocktail)이 포함된 세포 분해 완충액(RIPA buffer)을 넣고 용해시킨 후 4℃에서 13,000rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액만 회수하였다. 이 용해물을 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)을 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 추출된 단백질들은 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 전기영동한 후 겔 속에 있던 단백질들을 니트로셀로오스 막(nitrocellulose membrane)으로 이동시키고, 5% 탈지유(skim milk)로 차단(blocking) 하였다. 그리고 시클린(Cyclin) D1, PARP-1 항체를 사용하여 4℃에서 16시간 반응시켰다. 그 후 남아 있는 항체를 제거하기 위해서 세척 완충액으로 다시 3회 세척한 다음, 이차항체 (HRP-labeled anti-mouse 또는 HRP-labeled anti-rabbit antibody)를 1:200 비율로 상온에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 남아있는 항체를 제거하기 위해 세척 완충액으로 다시 3회 세척한 후에 발색시켰다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

도 7에 나타난 바와 같이, 스매드 7(Smad 7)의 유전자는 음경 섬유모세포에서 TGF-베타 신호전달을 억제하는 PARP-1의 발현을 현저하게 증가시킴을 확인하였다.

이하 본 발명의 상기 조성물을 포함하는 약학적 조성물 및 식품 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

제제예 1. 약학적 조성물의 제제

1-1. 산제의 제조

스매드 7(Smad 7) 유전자	20 mg
유당	100 mg
탈크	10 mg
상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.	

1-2. 정제의 제조

스매드 7(Smad 7) 유전자	10 mg
옥수수전분	100 mg
유당	100 mg
스테아린산 마그네슘	2 mg

[0085] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0086] **1-3. 캡슐제의 제조**

[0087] 스매드 7(Smad 7) 유전자 10 mg

[0088] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0089] 락토오스 14.8 mg

[0090] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0091] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0092] **1-4. 주사제의 제조**

[0093] 스매드 7(Smad 7) 유전자 10 mg

[0094] 만니톨 180 mg

[0095] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0096] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26 mg

[0097] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0098] **1-5. 액제의 제조**

[0099] 스매드 7(Smad 7) 유전자 20 mg

[0100] 이성화당 10 g

[0101] 만니톨 5 g

[0102] 정제수 적량

[0103] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0104] **제제예 2. 식품 조성물의 제제**

[0105] **2-1. 건강식품의 제조**

[0106] 스매드 7(Smad 7) 유전자 100 mg

[0107] 비타민 혼합물 적량

[0108] 비타민 A 아세테이트 70 μg

[0109] 비타민 E 1.0 mg

[0110] 비타민 B1 0.13 mg

[0111] 비타민 B2 0.15 mg

[0112] 비타민 B6 0.5 mg

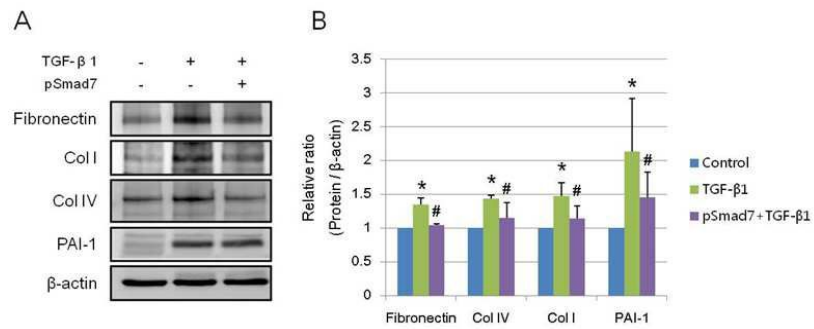
[0113] 비타민 B12 0.2 μg

[0114] 비타민 C 10 mg

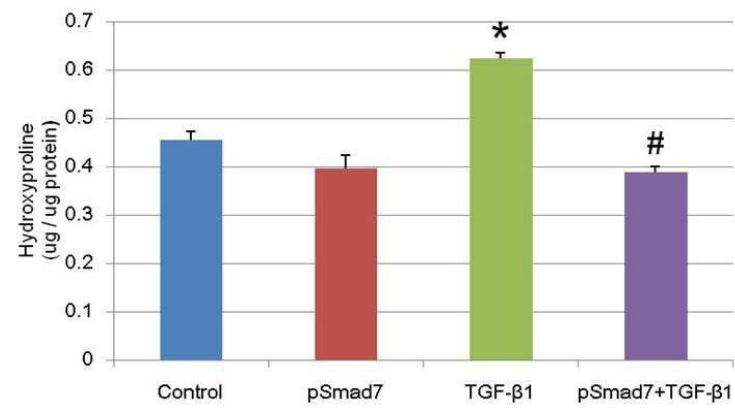
[0115]	비오틴	10 μ g
[0116]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0117]	엽산	50 μ g
[0118]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0119]	무기질 혼합물	적량
[0120]	황산제1철	1.75 mg
[0121]	산화아연	0.82 mg
[0122]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0123]	제1인산칼륨	15 mg
[0124]	제2인산칼슘	55 mg
[0125]	구연산칼륨	90 mg
[0126]	탄산칼슘	100 mg
[0127]	염화마그네슘	24.8 mg
[0128]	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.	
[0129]	2-2. 건강음료의 제조	
[0130]	스매드 7(Smad 7) 유전자	100 mg
[0131]	비타민 C	15 g
[0132]	비타민 E(분말)	100 g
[0133]	젖산철	19.75 g
[0134]	산화아연	3.5 g
[0135]	니코틴산아미드	3.5 g
[0136]	비타민 A	0.2 g
[0137]	비타민 B1	0.25 g
[0138]	비타민 B2	0.3 g
[0139]	물	정량
[0140]	통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85 ℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.	
[0141]	상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.	

도면

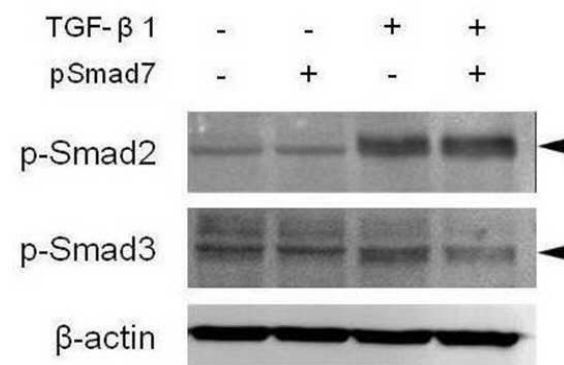
도면1



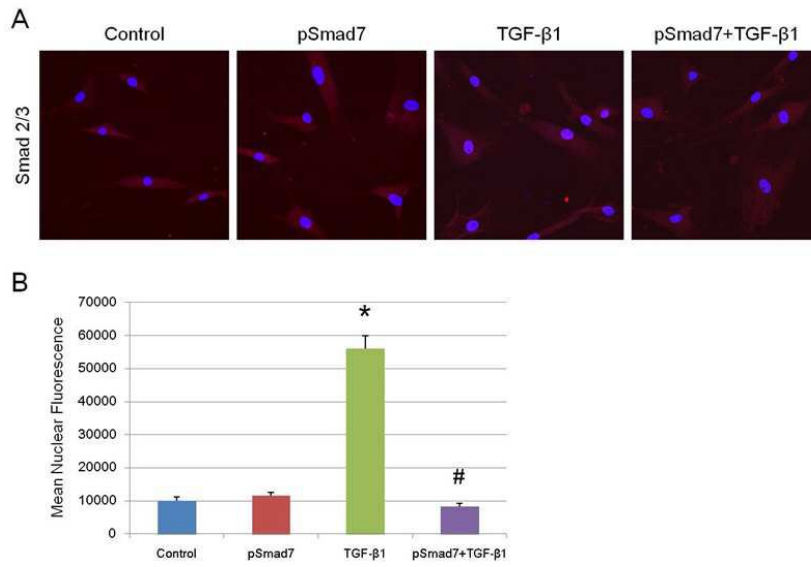
도면2



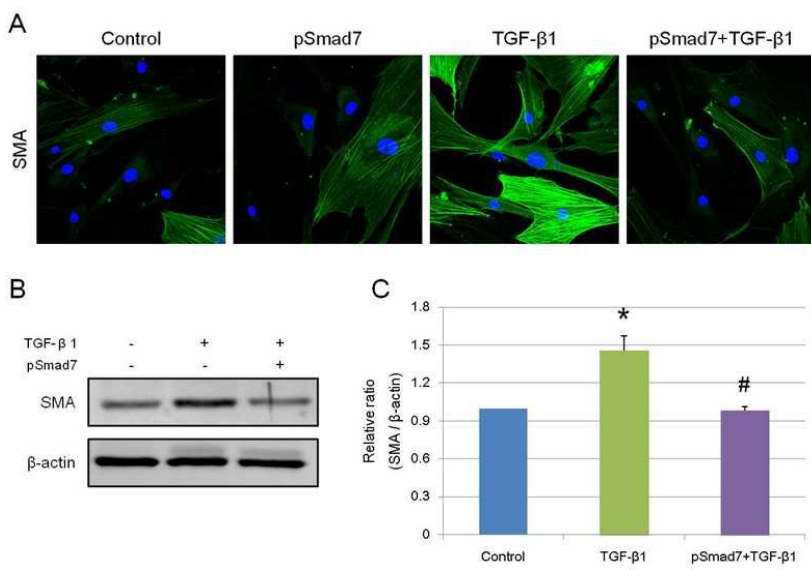
도면3



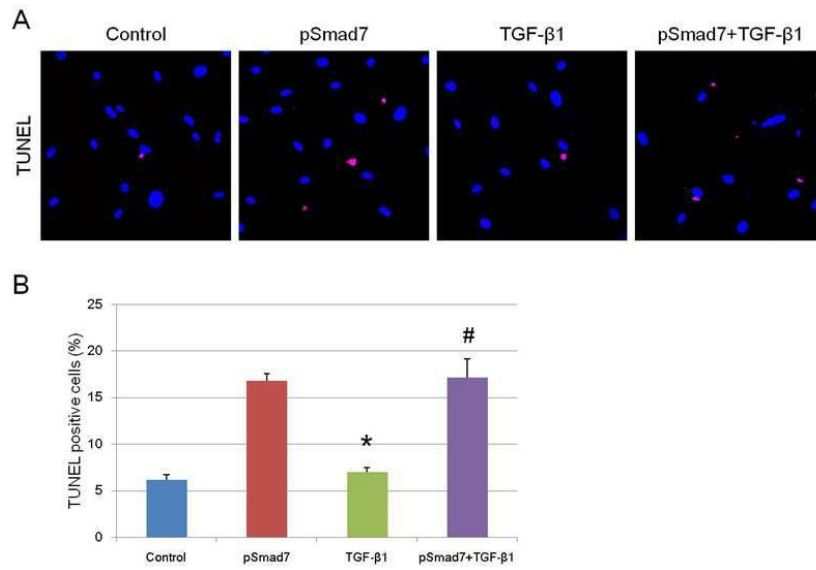
도면4



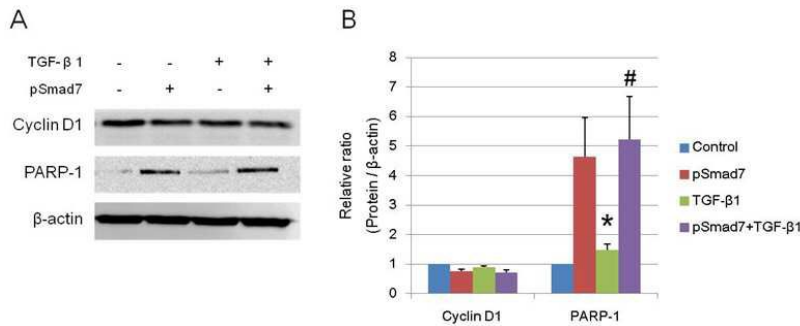
도면5



도면6



도면7



서열목록

<110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE

<120> Composition for preventing or treating Peyronie's disease
comprising Smad 7

<130> 127

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1281

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgttcagga ccaaacgac tgcgctcgtc cggcgtctct ggaggagccg tgcgcccggc

60

ggcgaggacg aggaggaggg cgcaggggga ggtggaggag gaggcgagct gcggggagaa

120

ggggcgacgg acagccgagc gcatggggcc ggtggcgcg gcccgggcag ggctggatgc 180

tgccctgggca aggcggtgcg aggtgccaaa ggtcaccacc atccccaccc gccagccgcg 240

ggcgccggcg cggccggggg cgccgaggcg gatctgaagg cgctcacgca ctcggtgctc 300

aagaaactga aggagcggca gctggagctg ctgctccagg ccgtggagtc ccgcgggggg 360

acgcgcaccg cgtgcctcct gctgcccggc cgctggact gcaggctggg cccggggggc 420

cccggcgcg cgagcctgc gcagccgcc tcgtcctact cgctccccct cctgctgtgc 480

aaagtgttca ggtggccgga tctcaggcat tctcggaag tcaagaggct gtgttgctgt 540

gaatcttacg ggaagatcaa ccccgagctg gtgtgctgca accccatca ccttagccga 600

ctctgcgaac tagagtctcc cccccctct tactccagat acccgatgga ttttctcaaa 660

ccaactgcag actgtccaga tgctgtgctt tctccgctg aaacaggggg aacgaattat 720

ctggccccctg gggggctttc agattccaa cttcttctgg agcctgggga tcggtcacac 780

tggtgctggtg tggcatactg ggaggagaag acgagagtgg ggaggctcta ctgtgtccag 840

gagccctctc tggatatctt ctatgatcta cctcagggga atggcttttg cctcgacag 900

ctcaattcgg acaacaagag tcagctggtg cagaagggtg ggagcaaaat cggctgcggc 960

atccagctga cgcgggaggt ggatggtgtg tgggtgtaca accgcagcag ttaccccatc 1020

ttcatcaagt ccgccacact ggacaaccg gactccagga cgctgttggg acacaagggtg 1080

ttccccggtt tctccatcaa ggctttcgac tacgagaagg cgtacagcct gcagcggccc 1140

aatgaccacg agtttatgca gcagccgtgg acgggcttta ccgtgcagat cagctttgtg 1200

aagggtggg gccagtgtca caccgccag ttcacagca gctgccgtg ctggctagag 1260

gtcatcttca acagccggtg g 1281

<210> 2

<211> 426

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Phe Arg Thr Lys Arg Ser Ala Leu Val Arg Arg Leu Trp Arg Ser

1 5 10 15

Arg Ala Pro Gly Gly Glu Asp Glu Glu Gly Ala Gly Gly Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Gly Glu Leu Arg Gly Glu Gly Ala Thr Asp Ser Arg Ala His

35 40 45

Gly Ala Gly Gly Gly Gly Pro Gly Arg Ala Gly Cys Cys Leu Gly Lys
50 55 60

Ala Val Arg Gly Ala Lys Gly His His His Pro His Pro Pro Ala Ala
65 70 75 80

Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Glu Ala Asp Leu Lys Ala Leu Thr
85 90 95

His Ser Val Leu Lys Lys Leu Lys Glu Arg Gln Leu Glu Leu Leu Leu
100 105 110

Gln Ala Val Glu Ser Arg Gly Gly Thr Arg Thr Ala Cys Leu Leu Leu
115 120 125

Pro Gly Arg Leu Asp Cys Arg Leu Gly Pro Gly Ala Pro Ala Gly Ala
130 135 140

Gln Pro Ala Gln Pro Pro Ser Ser Tyr Ser Leu Pro Leu Leu Leu Cys

145 150 155 160

Lys Val Phe Arg Trp Pro Asp Leu Arg His Ser Ser Glu Val Lys Arg
165 170 175

Leu Cys Cys Cys Glu Ser Tyr Gly Lys Ile Asn Pro Glu Leu Val Cys
180 185 190

Cys Asn Pro His His Leu Ser Arg Leu Cys Glu Leu Glu Ser Pro Pro
195 200 205

Pro Pro Tyr Ser Arg Tyr Pro Met Asp Phe Leu Lys Pro Thr Ala Asp
210 215 220

Cys Pro Asp Ala Val Pro Ser Ser Ala Glu Thr Gly Gly Thr Asn Tyr
225 230 235 240

Leu Ala Pro Gly Gly Leu Ser Asp Ser Gln Leu Leu Leu Glu Pro Gly
245 250 255

Asp Arg Ser His Trp Cys Val Val Ala Tyr Trp Glu Glu Lys Thr Arg
260 265 270

Val Gly Arg Leu Tyr Cys Val Gln Glu Pro Ser Leu Asp Ile Phe Tyr
275 280 285

Asp Leu Pro Gln Gly Asn Gly Phe Cys Leu Gly Gln Leu Asn Ser Asp

290	295	300	
Asn Lys Ser Gln Leu Val Gln Lys Val Arg Ser Lys Ile Gly Cys Gly			
305	310	315	320
Ile Gln Leu Thr Arg Glu Val Asp Gly Val Trp Val Tyr Asn Arg Ser			
	325	330	335
Ser Tyr Pro Ile Phe Ile Lys Ser Ala Thr Leu Asp Asn Pro Asp Ser			
	340	345	350
Arg Thr Leu Leu Val His Lys Val Phe Pro Gly Phe Ser Ile Lys Ala			
	355	360	365
Phe Asp Tyr Glu Lys Ala Tyr Ser Leu Gln Arg Pro Asn Asp His Glu			
	370	375	380
Phe Met Gln Gln Pro Trp Thr Gly Phe Thr Val Gln Ile Ser Phe Val			
385	390	395	400
Lys Gly Trp Gly Gln Cys Tyr Thr Arg Gln Phe Ile Ser Ser Cys Pro			
	405	410	415
Cys Trp Leu Glu Val Ile Phe Asn Ser Arg			
	420	425	