



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0068986
(43) 공개일자 2021년06월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4439 (2006.01) A61K 38/39 (2019.01)
A61P 15/02 (2006.01) C12Q 1/6876 (2018.01)
G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/4439 (2013.01)
A61K 38/39 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-0151765
(22) 출원일자 2020년11월13일
심사청구일자 2020년11월13일
- (30) 우선권주장
1020190158578 2019년12월02일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- (72) 발명자
안기훈
서울특별시 강남구 삼성로 417, 대치포스코더샵아파트 103동 1801호
- 왕은진
서울특별시 성북구 종암로14길 26-19, 303호
- (74) 대리인
특허법인 피씨알

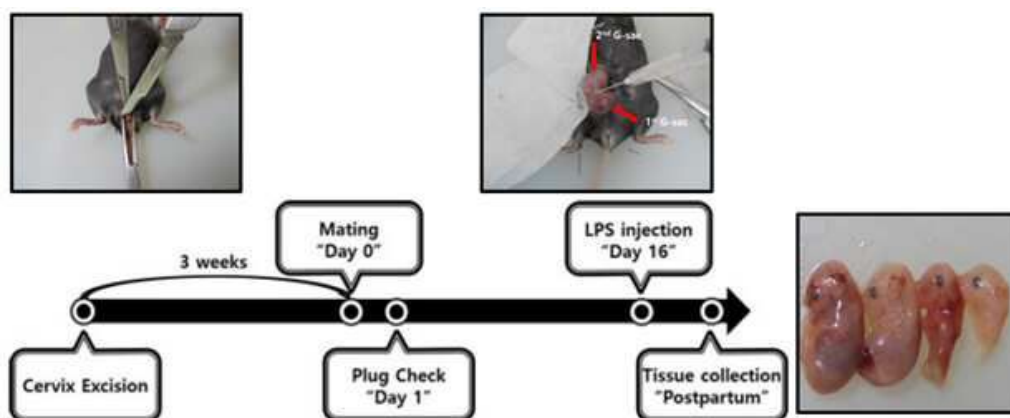
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 조산의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물

(57) 요약

자궁경부의 섬유아세포가 근섬유모세포로 분화하는 것을 억제하는 제제를 유효성분으로 포함하는 조산 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 개시된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 15/02 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.05)
G01N 33/689 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2500/04 (2013.01)
G01N 2800/368 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345316512
과제번호	2018R1D1A1B07046332
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	고려대학교
연구사업명	2018년도 이공학개인기초연구 신규 신청과제
연구과제명	독창적 자궁경부손상 조산마우스모델을 이용한 자궁경부의 근섬유모세포분화 조절을
통한 새로운 조산예방법 개발	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2018.06.01 ~ 2021.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

자궁경부의 섬유아세포가 근섬유모세포로 분화하는 것을 억제하는 제제를 유효성분으로 포함하는,
조산 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 제제는 TGF- β 1(Transforming Growth Factor beta1) 억제제 및 혈장 피브로넥틴(Plasma Fibronectin) 중 적어도 하나를 포함하는 것인,

조산 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

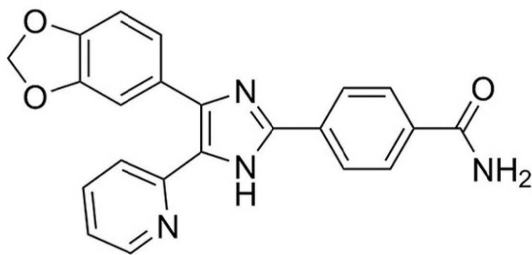
청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 TGF- β 1 억제제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인,

조산 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



청구항 4

제 2 항에 있어서,

상기 혈장 피브로넥틴은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 폴리펩타이드인 것인,

조산 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은 임신 전에 투여하기 위한 것인,

조산 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은 자궁경부 손상 직후에 투여하기 위한 것인,

조산 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

자궁경부로부터 분리한 섬유아세포에 TGF- β 1 및 시험물질을 접촉시키는 단계;

상기 세포의 α -SMA의 발현 정도를 측정하는 단계;

상기 시험물질이 α -SMA의 발현을 억제하는 경우 조산 예방 또는 치료용 후보 물질로 결정하는 단계를 포함하는 조산 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 자궁경부는 근위부인,

조산 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 조산 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 자궁경부 근위부의 근육-콜라겐 비율의 증가를 억제함으로써 조산을 예방할 수 있는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 조산은 임신의 10%에서 발생하며 조산율은 해마다 증가하는 추세이다. 또한 조산은 저출산 및 인구감소에 영향을 미치는 신생아 사망의 가장 중요한 원인이다.

[0004] 조산의 위험인자로는 조산의 과거력, 짧은 자궁경부 길이, 다태 임신, 고령임신, 감염질환, 만성질환 등이 알려져 있으며, 조산의 조기 예측 검사로는 초음파를 이용한 자궁경부 길이 측정이 이용되고 있다.

[0005] 조산 예방 및 치료제로서 프로게스테론, 니페디핀(Nifedipine), 프로메트리움(Prometrium), 마케나(Makena, hydroxyprogesterone caproate) 등이 사용되고 있다. 이 중 가장 널리 사용되는 프로게스테론은 자궁 수축 및 조기 진통을 방지하여 조산을 예방하며, 자궁경부의 길이가 짧거나 조기 진통의 과거력이 있는 산모에는 예방적 효과가 있으나, 그 외 다른 원인에 의한 조산에는 효과가 입증되지 않았으며 유방암 과거력, 간기능 이상, 정맥혈전증이 있는 경우에는 사용할 수 없다. 또한 기존의 조산 치료제는 모두 임신 후에 조산 위험성이 높다고 진단되는 경우 복용하는 것으로서, 임신 전에 복용하여 선제적으로 조산 위험성을 낮출 수 있는 치료법 및 약물은 알려지지 않았다.

[0006] 따라서 종래 조산 치료제와는 다른 약리기전으로 작용하고, 임신 전에 복용하여 조산 위험성을 미리 낮출 수 있는 치료제가 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개공보 제10-2017-0125708호(2017.11.15)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 일 구체예에 따른 약학적 조성물은 조산 위험성을 낮출 수 있다.

[0010] 일 구체예에 따른 약학적 조성물은 자궁경부 수술 후 투여하여 자궁경부 손상 후 회복에 의해 증가하는 조산 위험성을 낮출 수 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 일 양상은, 자궁경부의 섬유아세포(fibroblast)가 근섬유모세포(myofibroblast)로 분화하는 것을 억제하는 제제를 유효성분으로 포함하는 조산 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

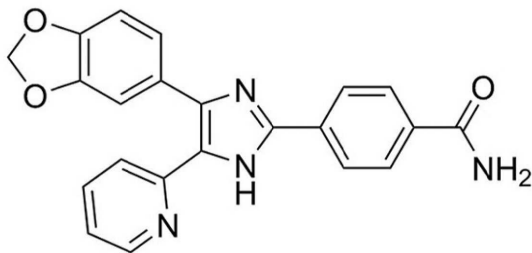
[0012] 본 발명자는 자궁경부에서 상처 등의 손상이 발생한 후 재생과정에서 근위부(Proximal site)의 근섬유아세포 분화가 증가하여 근육-콜라겐의 비율이 증가하면 조산의 위험성이 증가할 수 있음을 발견하고, 이를 억제할 수 있는 약물을 조산 치료제로 이용할 수 있음을 확인하였다. 자궁경부 근위부의 근육-콜라겐 비율이 증가하면 임신 중 자궁경관 개대(열림)가 일어나기 쉬워지고 조산의 원인이 될 수 있다. 따라서 자궁경부의 섬유아세포가 근섬유모세포로 분화하는 것을 방지함으로써 자궁경부의 근육-콜라겐 비율 증가를 억제하여 조산의 발생 가능성을 낮출 수 있다.

[0013] 일 구체예에서, 상기 제제는 TGF- β 1(Transforming Growth Factor beta1) 억제제 및 혈장 피브로넥틴 중 적어도 하나를 포함하는 것일 수 있다.

[0014] 본 발명자는 상처 치료 용도로서 사용될 수 있는 것으로 알려진 다양한 후보물질들을 투여하여 효과를 확인한 결과, TGF- β 1 억제제 또는 혈장 피브로넥틴이 조산의 원인 지표인 자궁경부 근위부의 근육량/콜라겐 비율의 증가를 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0015] 일 구체예에서, 상기 TGF- β 1 억제제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0016] [화학식 1]



[0017]

[0018] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 SB-431542로도 알려져 있으며, IPUAC 명칭은 4-(5-Benzol[1,3]dioxol-5-yl-4-pyridin-2-yl-1H-imidazol-2-yl)-benzamide이고, Cas 번호는 301836-41-9이다. 상기 SB-431542는 ALK4, ALK5, 및 ALK7를 억제하며, Activin/BMP/TGF- β 경로를 억제하는 것으로 알려져 있다.

[0019] 본 발명자는 조산동물모델의 자궁경부로부터 섬유아세포를 1차 배양하고, 상기 SB-431542를 p2단계에서 처리한 결과 α -SMA의 발현량이 감소함을 확인하였다.

[0020] 상기 혈장 피브로넥틴은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 폴리펩타이드일 수 있다. 피브로넥틴(Fibronectin)은 ECM 당단백질로서 조직 복구에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있으며 혈장 피브로넥틴(plasma fibronectin)과 세포성 피브로넥틴(cellular fibronectin)으로 구별된다. 혈장 피브로넥틴과 세포성 피브로넥틴은 서로 서열이 다르며 조산 예방에 있어서 다른 효과를 가질 수 있다. 세포성 피브로넥틴은 근섬유세포로의 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있으나, 본 발명자는 이와 달리 혈장 피브로넥틴은 근섬유아세포로의 분화를 억제할 수 있음을 확인하였다. 상기 혈장 피브로넥틴의 기원은 특별히 한정되는 것은 아니며, 예를 들면 소의 혈장(bovine plasma)에서 추출하여 멸균된 것을 사용할 수 있고, 시판되는 것을 구입하여 사용할 수 있다.

[0021] 일 구체예에서, 상기 조성물은 임신 전에 투여하기 위한 것일 수 있다. 상기 약학적 조성물은 임신기간 중에 투여할 수도 있으나, 임신 전에 투여하여 조산의 원인이 되는 자궁경부 근위부의 근육-콜라겐 비율의 증가를 임신 전에 미리 억제함으로써 조산을 예방할 수 있다.

[0022] 일 구체예에서, 상기 조성물은 자궁경부 손상 직후에 투여하기 위한 것일 수 있다. 상기 자궁경부 손상은 임신 중절 등 수술에 의한 손상뿐만 아니라 성생활 등 일상생활 중에도 발생할 수 있는 손상, 질염, 골반염, 바이러스 감염에 의한 손상을 포함한다. 자궁경부 근위부의 근육-콜라겐 비율 증가는 일상생활 중에도 발생할 수 있으며, 예를 들면 특별한 치료가 없는 자궁경부의 미세한 손상 또는 염증에 의해서도 증가할 수 있다. 따라서 본

발명의 약학적 조성물을 임신 전, 또는 자궁경부 손상 직후에 투여하면 자궁경부의 근육 비율 증가를 사전에 차단함으로써 조산을 효과적으로 예방할 수 있다.

[0023] 상기 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제, 패치제, 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 상기 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.

[0024] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0025] 일 구체예에서, 상기 조성물은 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하, 자궁경부, 질내, 자궁내 또는 직장내 투여하기 위한 것일 수 있다.

[0026] 일 구체예에서, 상기 조성물은 전신적 투여(systemic administration) 경로로 투여하기 위한 것일 수 있다. 상기 전신적 투여는 약물이 순환기를 통해 전신에 영향을 주는 투여 경로로써, 예를 들면 경구 또는 주사 투여일 수 있다. 상기 전신적 투여는 국소 투여(local administration)와 구별된다. 일 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물은 국소 투여인 질내 투여보다 전신적 투여인 경구 또는 복강내 투여하였을 때 더 우수한 효과를 나타내었다.

[0027] 일 구체예에서, 상기 조성물은 질내 투여를 제외한 투여 경로로 투여하기 위한 것일 수 있다.

[0028] 일 구체예에 따르면, 상기 조성물은 경구 투여 또는 주사 투여하기 위한 것일 수 있고, 상기 주사 투여는 복강내 투여일 수 있다. 일 실시예에 따르면, 투여 경로에 따라 효과 차이가 있으며, 경구 투여 또는 복강내 투여하는 경우 질내 투여보다 근육/콜라겐 비율을 낮추는 효과가 우수함을 확인하였다.

[0029] 본 발명에서, "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내, 질내, 자궁내, 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.

[0030] 본 발명의 화합물의 국소 또는 경피 투여용 복용 형태는 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 분말, 용액, 스프레이, 흡입제 또는 패치를 포함할 수 있다. 활성 성분은 멸균 조건 하에서 약제학적으로 허용 가능한 담체 및 임의의 필요한 보존제 또는 버퍼와 혼합될 수 있다. 안과 제형, 예를 들면 귀물약 및 안약은 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있다. 추가로, 본 발명은 화합물은 경피 패치 형태로 사용될 수 있다. 패치는 화합물을 적절한 매질에서 용해 또는 분산시켜 만들어질 수 있다. 피부를 통해 화합물의 유동을 증가시키기 위해 흡수 촉진제가 사용될 수 있다. 흡수 속도는 속도 조절막 또는 폴리머 매트릭스 또는 겔에서 화합물을 분산시켜 제어될 수 있다.

[0031] 상기 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 적용할 수 있다. 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 감염 등 염증, 바이러스 감염, 또는 물리적 손상 등 자궁경부와 관련된 손상을 가진 환자에게 치료제, 항비아러스제, 또는 항생제와 동시에 또는 순차적으로 처방될 수 있으며, 상기 손상에 의한 자궁경부의 근육/콜라겐 비율 증가를 억제함으로써 조산 위험 증가를 예방할 수 있다.

- [0033] 다른 양상은 자궁경부로부터 분리한 섬유아세포에 TGF- β 1 및 시험물질을 접촉시키는 단계; 상기 세포의 α -SMA의 발현 정도를 측정하는 단계; 상기 시험물질이 α -SMA의 발현을 억제하는 경우 조산 예방 또는 치료용 후보물질로 결정하는 단계를 포함하는 조산 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0034] 상기 자궁경부는 포유동물, 인간, 또는 비인간 동물의 것일 수 있으며, 비인간 동물은 구체적으로는 비인간 영장류, 설치류, 돼지, 마우스, 랫트, 개, 고양이, 소, 염소, 또는 조산동물모델일 수 있다.
- [0035] 상기 섬유아세포는 자궁경부로부터 얻은 조직을 1차 배양한 세포일 수 있고, 또는 1차 배양 세포로부터 섬유아세포를 분리 및 파종하여 2차 배양한 세포일 수 있다.
- [0036] 상기 시험물질 접촉은 2차 배양 후 12 내지 36시간, 18 내지 30시간, 22시간 내지 26시간, 또는 24시간이 경과한 후에 실시되는 것일 수 있다.
- [0037] 상기 α -SMA(alpha smooth muscle actin)는 근섬유모세포의 마커로서 α -SMA의 발현량을 측정하면 시험물질이 섬유아세포의 근섬유세포로의 분화를 억제할 수 있는지 확인할 수 있다.
- [0038] α -SMA의 발현수준은 당업계에서 알려진 방법을 이용하여 전사 산물 수준에서 측정될 수 있다. 예를 들면 α -SMA의 mRNA는 혼성화 방법에 의한 프로브를 사용한 측정, 또는 증폭 기반의 검출방법에 의해 정량될 수 있다. 또는 α -SMA의 발현수준은 번역 산물인 단백질 수준에서 측정될 수 있다. 상기 단백질의 측정방법은 α -SMA 단백질을 특이적으로 인식하는 항체를 사용하는 면역침전, 웨스턴 블롯, 면역조직화학 분석 등 당업계에서 알려진 면역 분석 방법을 포함할 수 있다. 상기 항체는 단일 클론 또는 다중 클론 항체일 수 있으며, 표적 단백질에 대한 결합 능력을 보유하는 항체의 임의의 단편 또는 변형이 사용될 수도 있다.
- [0039] 일 구체예에서, 상기 자궁경부는 근위부일 수 있다. 자궁경부는 근위부(proximal), 중간부(middle), 및 원위부(distal)로 구분될 수 있으며, 근위부의 근육/콜라겐 비율이 조산 위험과 가장 관련이 높다. 따라서 근위부로부터 얻은 섬유아세포의 근섬유 분화 정도를 측정하면 후보물질의 조산 억제 효과를 보다 정확하게 확인할 수 있다.

발명의 효과

- [0041] 일 구체예에 따른 조산 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 이용하면, 임신 전 또는 임신 중에 투여함으로써 조산의 원인이 되는 자궁경부의 근육-콜라겐 비율의 증가를 억제함으로써 조산을 효과적으로 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0043] 도 1은 일 실시예에 따른 조산동물모델을 제작하는 과정을 나타낸 것이다.
- 도 2는 일 실시예에 따른 조산동물모델의 자궁경부 위치별로 매슨 트리크롬 조직화학 염색을 통해 콜라겐 함량 변화를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 일 실시예에 따른 평활근 마커인 α -SMA(alpha-smooth muscle actin) 발현량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 일 실시예에 따른 조산동물모델의 근육-콜라겐 비율 변화를 확인한 결과이다.
- 도 5는 일 실시예에 따른 마우스의 자궁경부 세포로부터 분리한 섬유아세포에 TGF- β 1 및 이의 억제제인 SB-431542를 처리하는 실험과정을 나타낸 것이다.
- 도 6은 상기 도 5의 실험 후 웨스턴 블로팅하여 α -SMA의 단백질 발현량을 확인한 결과이다.
- 도 7은 일 실시예에 따른 마우스의 자궁경부 세포로부터 분리한 섬유아세포에 TGF- β 1 및 이의 억제제인 SB-431542를 처리하고 α -SMA의 mRNA 발현량 및 단백질 발현량을 확인한 결과이다.
- 도 8은 일 실시예에 따른 마우스의 자궁경부 세포로부터 분리한 섬유아세포에 TGF- β 1 및 이의 억제제인 SB-431542를 처리하고 α -SMA 단백질에 대해 면역형광염색한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 일 실시예에 따른 마우스의 자궁경부 세포로부터 분리한 섬유아세포에 TGF- β 1 및 이의 억제제인 SB-431542를 처리하고 콜라겐 1의 발현 변화를 관찰한 것이다.

도 10은 일 실시예에 따른 마우스의 자궁경부 세포로부터 분리한 섬유아세포에 TGF- β 1 및 혈장 피브로넥틴을 각각 처리하고 α -SMA의 발현량, I형 콜라겐의 발현량, 및 α -SMA/콜라겐 비율의 변화를 관찰한 결과이다.

도 11은 일 실시예에 따른 마우스의 자궁경부 세포로부터 분리한 섬유아세포에 TGF- β 1 및 콘드로이틴 설페이트(CS), 테나신-C(TN-C), TGF- β 3를 각각 처리하고 α -SMA 발현량 변화를 확인한 것이다.

도 12은 SB-431542 또는 피브로넥틴의 질내 투여, 경구 투여, 및 복강내 투여 후 수득한 자궁경부조직의 근위부와 원위부를 나타낸 것이다.

도 13은 피브로넥틴을 질내 투여하고 α -SMA(A), I형 콜라겐(B), 및 이들의 비율(M/C ratio) (C)을 나타낸 결과이다.

도 14는 SB-431542를 질내 투여하고 α -SMA(A), I형 콜라겐(B), 및 이들의 비율(M/C ratio) (C)을 나타낸 결과이다.

도 15는 SB-431542를 복강내 투여 또는 경구 투여하고 α -SMA(A), I형 콜라겐(B), 및 이들의 비율(M/C ratio) (C)을 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 실시예 1: 조산 동물 모델 제작

[0047] 도 1을 참조하여 조산동물모델의 제작과정을 설명한다. 성적으로 성숙한 암컷 C57BL/6 마우스를 실험에 사용하였다. 실험실은 12시간의 주간/야간 주기로 일정한 온도(22 내지 24℃)로 유지하였다.

[0048] 마우스는 무작위로 4개의 그룹 중 하나에 할당되었으며, 하나의 그룹은 10마리로 구성되었다. 4개의 그룹은 A(대조군, sham), B(자궁경부 부분절제), C(LPS 주입), D(자궁경부 부분절제 및 LPS 주입)으로 나뉘었다.

[0049] 부분적인 자궁경부조직 절제(tissue excision)는 5 주령에 수행되었다. 구체적으로 마우스를 2 내지 4%의 이소플루란 흡입으로 마취시킨 후, 겹자를 이용하여 자궁경부를 파악하고 메스를 사용하여 1 mm 깊이로 절개하였다. 절개 후 출혈을 최소화하기 위해 압박하여 지혈하였다. 자궁경부의 길이는 2.5 mm이고, 자궁경부의 약 40%가 절제되었으며 절개된 자궁경부조직의 평균 중량은 7 mg이었다. 자궁경부조직 절제로부터 3주 후에 교미하여 임신 유도하였으며 임신 확률은 약 50%였다. 점액 플러그(mucus plug)가 질 내에 있는 날을 임신 1일로 설정하였다.

[0050] 임신 16 일째 우측 자궁의 첫 번째와 두 번째 태낭 사이에 리포폴리사카라이드(LPS, lipopolysaccharide from Escherichia coli 055:B5, Sigma-Aldrich) 100 ug / NS 100uL를 주입하여 조산을 유도하였다. 분만 후 12시간 후에 마우스를 희생시키고 자궁을 적출하였다.

[0051] 평균임신기간은 자궁경부 절제 및 LPS 주입을 모두 실시한 그룹 D가 대조군인 그룹 A보다 유의하게 낮았다. LPS 주사 후 24시간 이내 또는 18일 이전에 분만을 조산으로 정의했을 때, 조산의 비율은 A 그룹 0%, B그룹 30%, C 그룹 60%, D그룹 100%였다.

[0053] 실시예 2: 자궁경부의 근육-콜라겐 비율 증가 확인

[0054] 자궁경부의 교차점 바로 위를 절단하여 자궁경부 샘플을 수득하였다. 자궁 경부 조직을 4% 중성 완충 포르말린에 overnight 처리하여 고정시키고 가공하여 파라핀 블록에 위치시켰다. 조직 섹션(4 μ m)를 블록으로부터 절단하고, 슬라이드에 장착하고, 자일렌으로 탈파라핀화하고, 에탄올로 재수화시켰다. 각 섹션은 헤마톡실린 및 에오신을 사용하여 염색하고 자궁경부의 길이를 측정하였다.

[0055] 근육(평활근, smooth muscle)-콜라겐 비율을 확인하기 위해 매슨 트릭롬 키트(Masson's trichrome staining

kit, NovaUltra)를 이용하여 조직화학염색을 실시하였다. 각 절편당 근위부(Proximal cervix), 중간부(middle cervix), 및 원위부(distal cervix) 영역에 대한 200 배율의 이미지에 대해 Image J 소프트웨어(NIH, Bethesda, MD)를 이용하여 콜라겐 및 평활근의 평균 백분율을 분석하였다.

[0056] 도 2는 매슨 트릭롬 염색에 의해 콜라겐을 가시화한 것으로, 조산동물모델의 자궁경부 근위부(Proximal cervix) 및 중간부에서 콜라겐의 비중이 감소하였음을 확인할 수 있었다.

[0057] α -SMA의 발현을 확인하기 위한 실험 방법은 다음과 같다. 4% paraformaldehyde에 하루 동안 조직을 넣어 고정하였다. 비특이적 결합을 막기 위해 blocking buffer에 담근 후 실온에서 5시간 동안 반응시켰다. 1차 항체는 5% bovine serum albumin (BSA, Sigma, USA) blocking buffer에 혼합하여 처리한 후 실온에서 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 후 1X PBS 로 씻어내고, 5 % BSA blocking buffer에 2차 항체(Alexa 488 dye)를 혼합하여 처리 하였다. 2차 항체 처리 후 3회에 걸쳐 1X PBS로 세척하였다. 2차 antibody는 빛에 민감하기 때문에 반응 시간 동안 암실에서 수행하였다. 모든 조직 sample은 형광현미경을 통해 관찰하였다.

[0058] 도 3은 평활근 세포의 마커 중 하나인 α -SMA의 발현을 확인한 것으로, 자궁경부 절제 및 LPS 감염이 발생하였을 때 α -SMA의 발현이 크게 증가하였다.

[0059] 도 4는 자궁경부의 근위부가 중간부 및 원위부보다 근육의 비율이 높다는 것을 확인한 결과이다.

[0060] 하기 표 1에 따르면, 자궁경부조직 절제 및 LPS에 의한 염증반응 유도를 모두 실시한 D 그룹은 자궁경부 근위부의 근육-콜라겐 비율이 다른 그룹들보다 증가하였으며, 최대 65%까지 증가하는 것이 확인되었다.

표 1

	A	B	C	D	p-Value
	Sham	Cervical tissue excision	LPS	Cervical tissue excision + LPS	
Proximal cervix	0.9 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.6	0.6 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.6	0.037*
Middle cervix	0.9 $\pm$ 0.7	0.7 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.2	1 $\pm$ 0.7	0.229
Distal cervix	0.8 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.6	0.269

[0061]

[0062] 자궁경부의 근위부 근육 비율이 증가하면 임신 중 자궁경관 개대(열림)가 일어나 조산의 원인이 될 수 있음을 알 수 있었다.

[0064] 실시예 2: SB431542 투여시 자궁경부의 근육/콜라겐 비율 감소 효과 확인

[0065] 도 5를 참조하여 실험과정을 설명한다. 4 내지 6 주령 C57BL/6 마우스의 자궁경부로부터 세포를 분리하여 60mm 디쉬에서 1차 배양(primary cell culture)하였다(p0 단계). 12 내지 15일을 배양하여 p1 단계를 거친 후 섬유아세포(fibroblast)의 수를 측정하고 6 well 디쉬에 약 0.3×10^6 개/디쉬 밀도로 섬유아세포를 파종하여 2차 배양하였다(p2 단계). 2차 배양으로부터 1일 후 Serum 이 없는 배지 상태에서 두시간 처리 후 TGF- β 1을 디쉬당 10ng/ml 처리하여 근섬유아세포로 분화를 유도하고, 실험군에는 TGF- β 1 억제제인 SB-431542를 0, 2, 8, 16 μ M의 농도로 처리하였다. 약물 처리 이틀 후 10X Phosphate Buffered Saline (PBS; Affymetrix)로 세포를 세척하고 RIPA buffer를 이용하여 단백질을 추출하였다. 근섬유세포의 마커인 α -SMA 와 콜라겐의 마커인 COL I의 발현양을 조사하기 위해 Western blot을 시행하였다. 일차 항체인 α -smooth muscle actin (1:1000) 과 I형 콜라겐 (1:500) antibody 는 4°C Overnight으로 반응시키고 이차 항체인 anti-mouse IgG (CellNest, USA)를 첨가하여 실온에서 1시간 반응 후 detection 하였다.

[0067] 도 6의 A 및 B를 참조하면, 디쉬당 SB-431542를 8 μ M 처리하였을 때 α -SMA 단백질의 발현이 감소하여 근섬유아세포로의 분화를 억제함을 확인할 수 있었다. 이후 진행되는 실험에서는 0.3×10^6 개의 세포가 파종된 디쉬를 기준으로 8 μ M/디쉬의 농도로 SB-431542를 처리하여 실험을 진행하였다.

[0068] 도 7은 섬유아세포에 SB-431542를 처리하고 α -SMA의 mRNA 발현량 및 단백질 발현량을 측정한 결과를 나타낸 것이다. 도 7의 A에 따르면 α -SMA의 mRNA 발현량은 큰 변화가 없었으나, 도 7의 B에 따르면 α -SMA의 단백질 발

현량이 현저히 감소하였음을 확인하였다. 따라서 SB-431542 처리시 α -SMA의 단백질 발현을 억제하여 자궁경부 근위부의 근육량/콜라겐 비율 감소를 유도할 수 있음을 알 수 있었다.

[0069] 도 8은 면역형광법으로 α -SMA의 단백질 발현량을 측정함으로써 근섬유아세포로의 분화되는 정도를 확인한 결과로서, TGF- β 1 및 SB-431542를 동시에 처리하는 경우 α -SMA의 형광 검출이 감소하므로 SB-431542에 의해 섬유아세포에서 근섬유아세포로의 분화가 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[0070] 도 9는 TGF- β 1 및 이의 억제제 SB-431542는 콜라겐 1의 발현에는 영향이 없음을 확인한 결과이다.

[0071] 상기 실험결과를 종합할 때, TGF- β 1 억제제인 SB-431542는 자궁경부에 투여시 근육 분화를 억제하고 콜라겐의 발현에는 영향을 미치지 않는다. 따라서 SB-431542는 자궁경부 손상시 발생할 수 있는 근위부의 근육-콜라겐 비율의 증가를 억제함으로써 조산 예방을 기대할 수 있다.

[0073] 실시예 3: 혈장 피브로넥틴의 자궁경부의 근육/콜라겐 비율 감소 효과 비교

[0074] 자궁경부 근위부의 근육-콜라겐 비율 증가를 억제할 수 있는 후보약물로서 혈장 피브로넥틴(Fibronectin, FN)을 투여하고 α -SMA 및 1형 콜라겐의 발현량 변화를 분석하였다. 실험방법은 투여약물을 제외하고는 상기 실시예 2 및 도 5에 기재된 방법과 동일한 방법으로 실험하였다. 혈장 피브로넥틴은 Sigma-aldrich에서 구입한 fibronectin bovine plasma 제품을 사용하였으며, 투여량은 well당 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 하였다.

[0075] 도 10의 A를 참조하면, 근육세포 분화의 지표인 α -SMA의 발현량은 TGF- β 1 투여에 의해 증가하였으나, 혈장 피브로넥틴을 함께 투여한 경우는 TGF- β 1을 투여하지 않은 대조군만큼 발현량이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한 도 10의 B를 참조하면 TGF- β 1과 혈장 피브로넥틴을 함께 처리한 군에서 콜라겐의 발현 감소도 다소 확인되었으나, α -SMA와 콜라겐 1의 비율을 측정한 결과인 도 10의 C를 참조하면 혈장 피브로넥틴은 TGF- β 1에 의해 증가하는 α -SMA/콜라겐 1의 비율을 감소시킴으로서 자궁경부 손상시 발생할 수 있는 근위부의 근육-콜라겐 비율의 증가를 억제함으로써 조산 예방을 기대할 수 있음을 알 수 있었다.

[0077] 실시예 4: 기타 상처 치료용 약물의 자궁경부의 근육/콜라겐 비율 감소 효과 비교

[0078] 상처 치료용도로 사용되는 약물인 콘드로이틴 설페이트(Chondroitin Sulfate, CS), 테나신 C(Tenascin C, TN-C), 또는 TGF- β 3를 투여하고, 근육-콜라겐 비율의 증가 억제 효과를 확인하였다. 실험방법은 투여약물을 제외하고는 상기 실시예 2 및 도 5에 기재된 방법과 동일한 방법으로 실험하였다.

[0079] 콘드로이틴 설페이트는 Sigma-aldrich로부터 구입하였으며, 처리용량은 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리하였다. 테나신-C는 EMD-Millipore로부터 구입하였으며, $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리하였다. TGF- β 3는 Sigma-aldrich로부터 구입하였으며, $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리하였다.

[0080] 도 11에 따르면, 콘드로이틴 설페이트(CS, 도 11A), 테나신-C(TN-C, 도 11B), 및 TGF- β 3(도 11C)는 TGF- β 1에 의한 α -SMA 발현 증가를 미약하게 억제시켰으나 SB-431542에 의한 α -SMA 발현 억제 효과와는 현저한 차이가 있었다(도 7 참조). 따라서 CS, TN-C, 및 TGF- β 3는 α -SMA의 발현을 억제하는 효과 및 자궁경부 근위부의 근육-콜라겐 비율의 증가 억제 효과를 기대하기 어렵다고 판단되었다.

[0081] 따라서 기존 상처 회복에 사용되는 약물 중 SB-431542 및 혈장 피브로넥틴을 사용하는 경우 자궁경부의 섬유아세포가 근섬유모세포로 분화하는 것을 억제함으로써 조산 예방 효과를 가질 수 있음을 확인하였다.

[0083] 실시예 5: 약물 투여 경로(Drug administration route)에 따른 효과 차이

[0084] 5-1. 약물의 질내투여 (Intravaginal administration), 경구투여(Oral administration, PO), 및 복강내 투여 (Intraperitoneal administration, IP) 방법

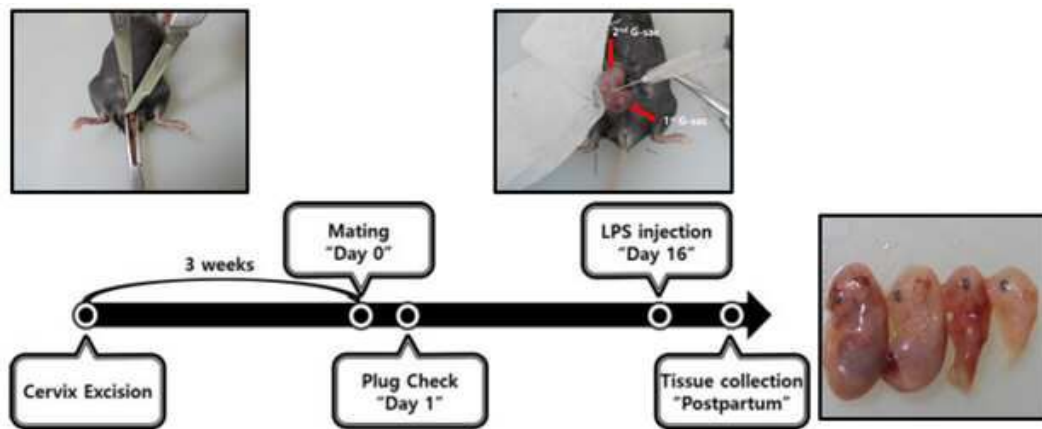
[0085] 성적으로 성숙한 암컷 C57BL/6 마우스를 in vivo 실험에 사용하였다. 실험실은 12시간의 주간/야간 주기로 일정한 온도($22 \pm 24^\circ\text{C}$)로 유지하였다. 부분적인 자궁경부조직 절제(tissue excision)는 5 주령에 수행되었다. 구체적으로 마우스를 2 내지 4%의 이소플루란 흡입으로 마취시킨 후, 겸자를 이용하여 자궁경부를 파악하고 메스를 사용하여 1 mm 깊이로 절개하였다. 절개 후 출혈을 최소화하기 위해 압박하여 지혈하였다. 자궁경부의 길

이는 2.5 mm이고, 자궁경부의 약 40%가 절제되었으며 절개된 자궁경부조직의 평균 중량은 7 mg이었다.

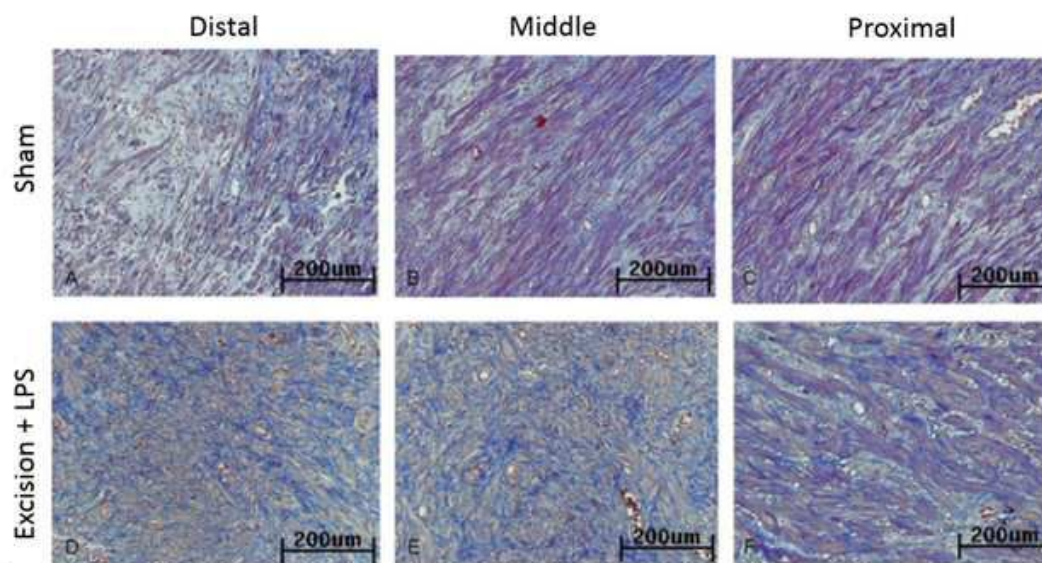
- [0086] 자궁경부조직 절제와 동시에 존데(feeding needle)를 이용하여 질을 통해 자궁경부에 액상형 Fibronectin 과 DMSO에 녹인 SB-431542를 주입하였다.
- [0087] 액상형 Fibronectin 은 20mg 과 0.2mg(20mg을 10배 희석, FN(X10)으로 표기)의 용량을 3주간 매일 질을 통해 자궁경부로 주입하였다. SB-431542은 5%의 DMSO에 녹여 20mg 과 0.2mg(20mg을 10배 희석, SB-431542 (X10)으로 표기)의 용량을 3주간 매일 질을 통해 자궁경부 주입하였다. 3주간 약물 처리 후, 자궁경부조직 내의 근위부(Proximal cervix) 와 원위부(distal cervix) 영역을 나누어 샘플을 수득하였다. (도 13 참고)
- [0088] α -SMA와 I형 콜라겐(Collagen I)의 발현을 확인하기 위한 단백질 추출 방법은 다음과 같다. RIPA buffer(RIPA lysis buffer, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% SD, 0.1% SDS, 50mM Tris-13 HCl, 2mM EDTA) 와 protease inhibitor cocktail (GenDEPOT, P3100-005)를 섞은 후 100ul를 각 영역이 분리된 자궁경부조직에 넣고 호모게나이저를 이용하여 분쇄하였다. 아이스에 40분간 방치 후 원심분리기(13000rpm, 4도)를 이용하여 15분간 원심분리를 하였다. 상층액만 새로운 튜브에 보관 후에 사용하였다. 단백질 정량은 Bradford method (Protein assay dye reagent concentrate buffer, BioRad)에 의해 진행하였다.
- [0089] α -SMA와 I형 콜라겐의 발현을 확인하기 위한 웨스턴 블롯 방법은 다음과 같다. 추출한 단백질은 5 ug씩 10% SDS PAGE gel 에 로딩하고 nitrocellulose membrane에 옮겼다(transfer). 5% skim milk로 블락킹 후에 일차 항체인 α -smooth muscle actin antibody (1:1000, NSJ Bioreagents, V2001) 및 I형 콜라겐 antibody (1:500, Abcam, ab88147), GAPDH (1:1000, Santa Cruz, sc376559) 을 4 °C, Overnight으로 반응시키고 이차 항체인 anti-mouse IgG (CellNest, USA)를 첨가하여 실온에서 1시간 반응 후 ECL kit (SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Thermo scientific)를 이용하여 디벨롭하고 검출(detection)하였다.
- [0090] 경구 투여(PO)는 자궁경부조직 절제와 동시에 존데를 이용하여 입을 통해 식도로 약물을 투여하였다. SB-431542는 5%의 DMSO에 녹여 10mg/kg 의 양으로 100ul씩 3주간 주입하였다.
- [0091] 복강내 주입(IP)은 자궁경부조직 절제와 동시에 인슐린 주사기를 이용하여 복강 내로 약물을 투여하였다. SB-431542는 5%의 DMSO에 녹여 10mg/kg 의 양으로 100ul씩 3주간 주입하였다.
- [0092] SB-431542의 투여량은 nature medicine 논문에 Dario 저자가 쓴 Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors 논문을 참고하였다.
- [0093] 5-2. 실험결과
- [0094] 도 14는 액상형 Fibronectin 을 20mg 과 0.2mg(20mg을 10배 희석, FN(X10)으로 표기)의 용량으로 3주간 매일 질을 통해 자궁경부로 주입 후의 결과이다. A는 α -SMA, B는 I형 콜라겐 그리고 C는 M/C ratio 이다. 도 14의 C에서 Fibronectin을 20, 0.2mg으로 처리하였을 때, 자궁경부절제 그룹보다 M/C ratio가 감소하였다. 이는 자궁경부절제를 안한 대조군과 유의한 수준이다.
- [0095] 도 15는 SB-431542 를 20mg 과 0.2mg(20mg을 10배 희석, SB-431542 (X10)으로 표기)의 용량으로 3주간 매일 질을 통해 자궁경부로 주입 후의 결과이다. A는 α -SMA, B는 I형 콜라겐 그리고 C는 M/C ratio 이다. 도 15C에서 자궁경부절제군은 대조군보다 M/C ratio 가 증가하였으나 SB-431542를 20, 0.2mg으로 처리한 그룹에서는 유의미한 변화가 없었다.
- [0096] 도 16은 SB-431542 를 10mg/kg 의 용량으로 3주간 매일 경구투여 혹은 복강내 주입을 통해 약물 주입 후의 결과이다. A는 α -SMA, B는 I형 콜라겐 그리고 C는 M/C ratio 이다. 도 16C에서 자궁경부절제군은 대조군보다 M/C ratio 가 증가하였고 경구투여를 통해 DMSO를 주입한 그룹은 대조군과 비슷한 M/C ratio 수치를 보였다. 반면 경구투여, 복강내 주입을 통해 SB-431542를 투여한 그룹에서는 자궁경부절제 그룹보다 낮은 M/C ratio를 보였다.

도면

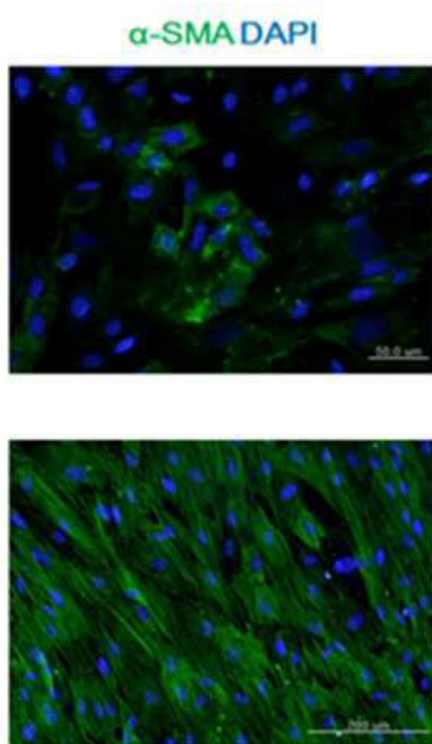
도면1



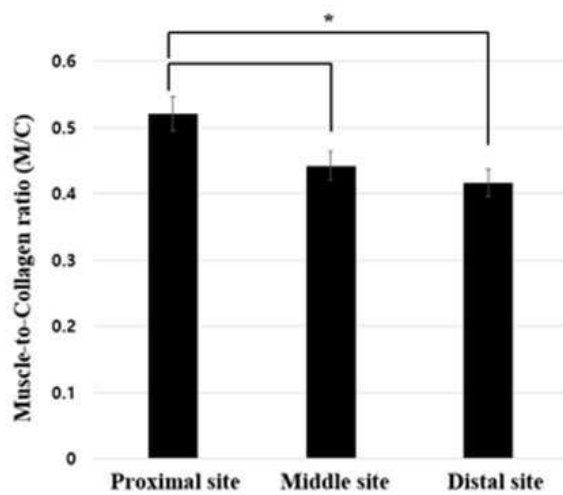
도면2



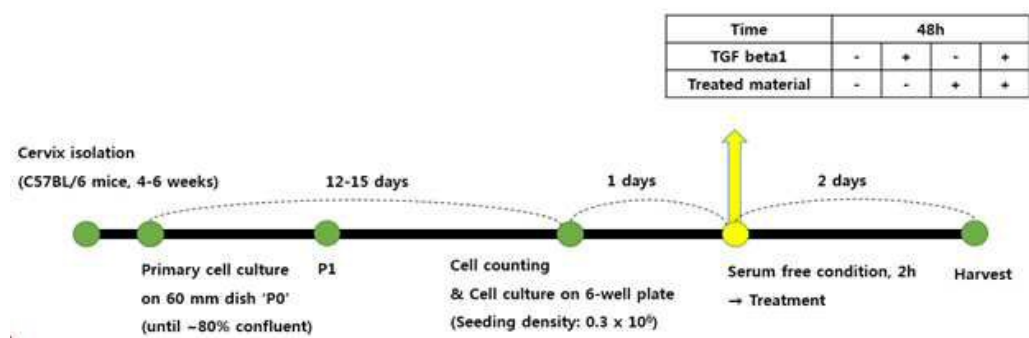
도면3



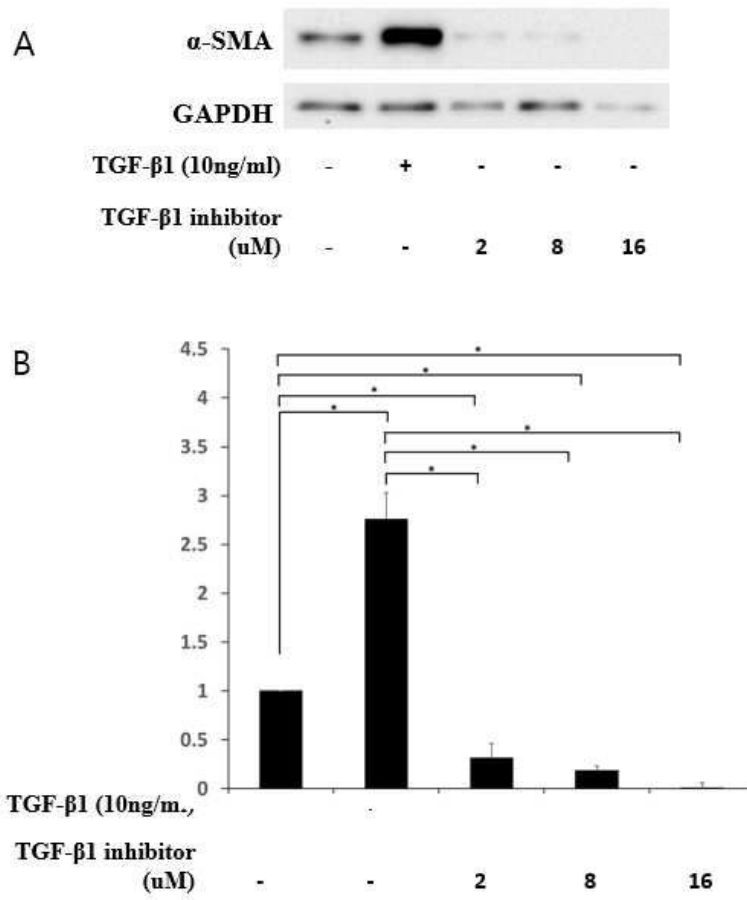
도면4



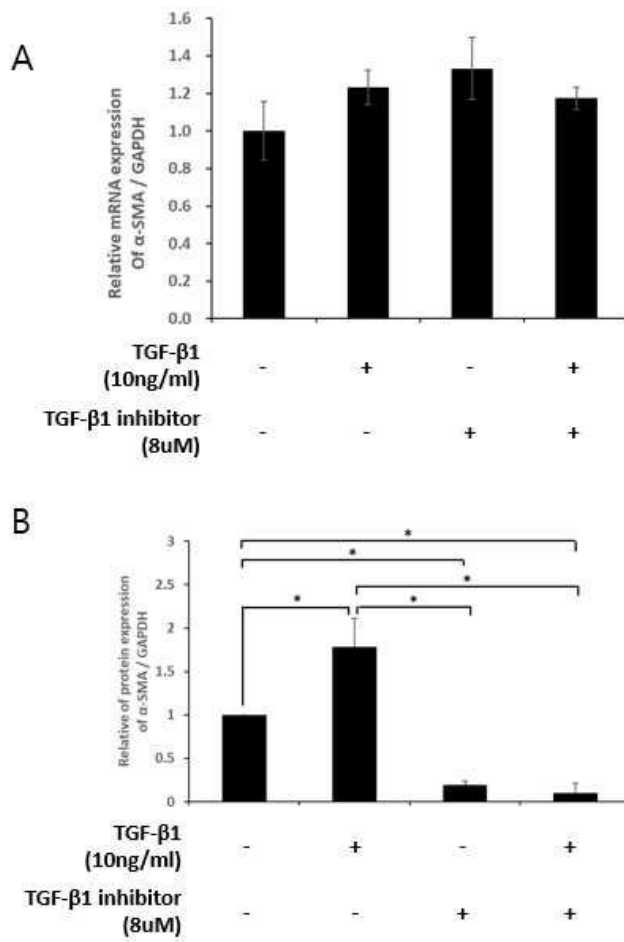
도면5



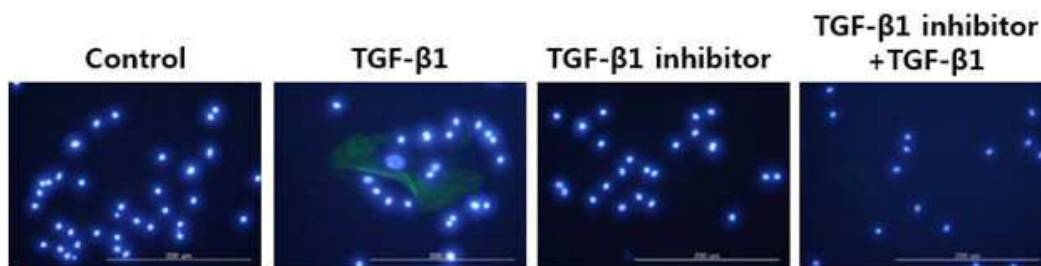
도면6



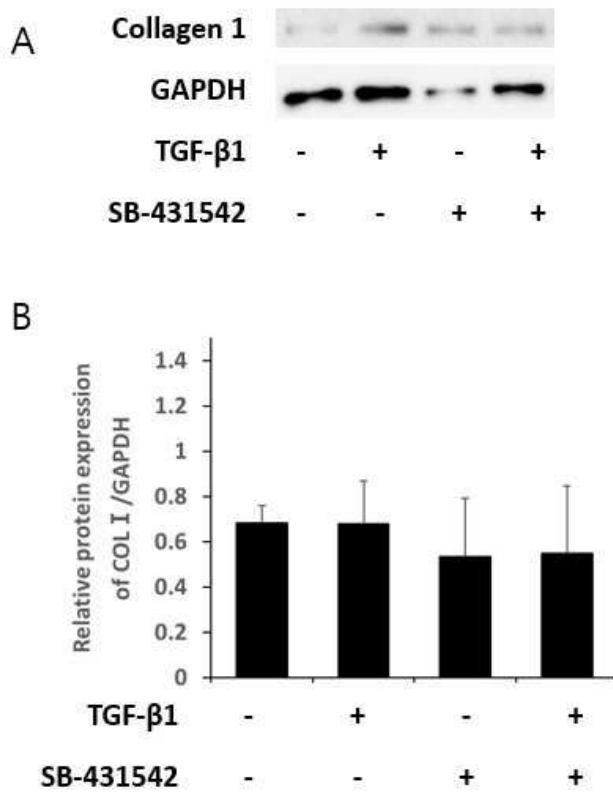
도면7



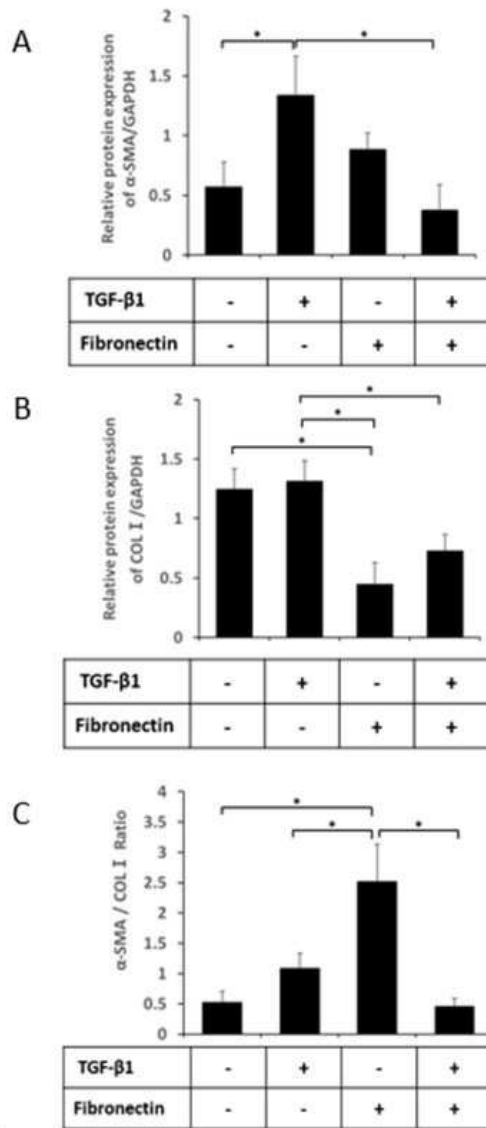
도면8



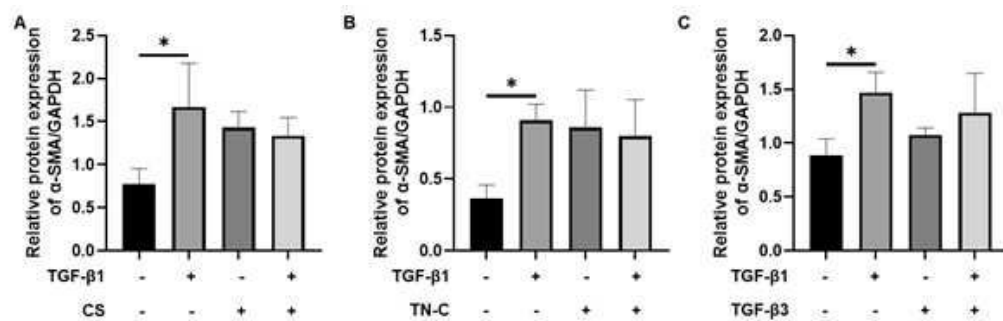
도면9



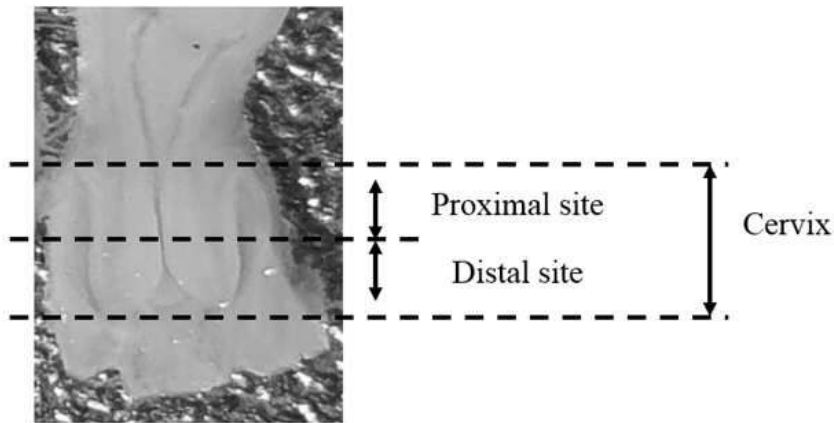
도면10



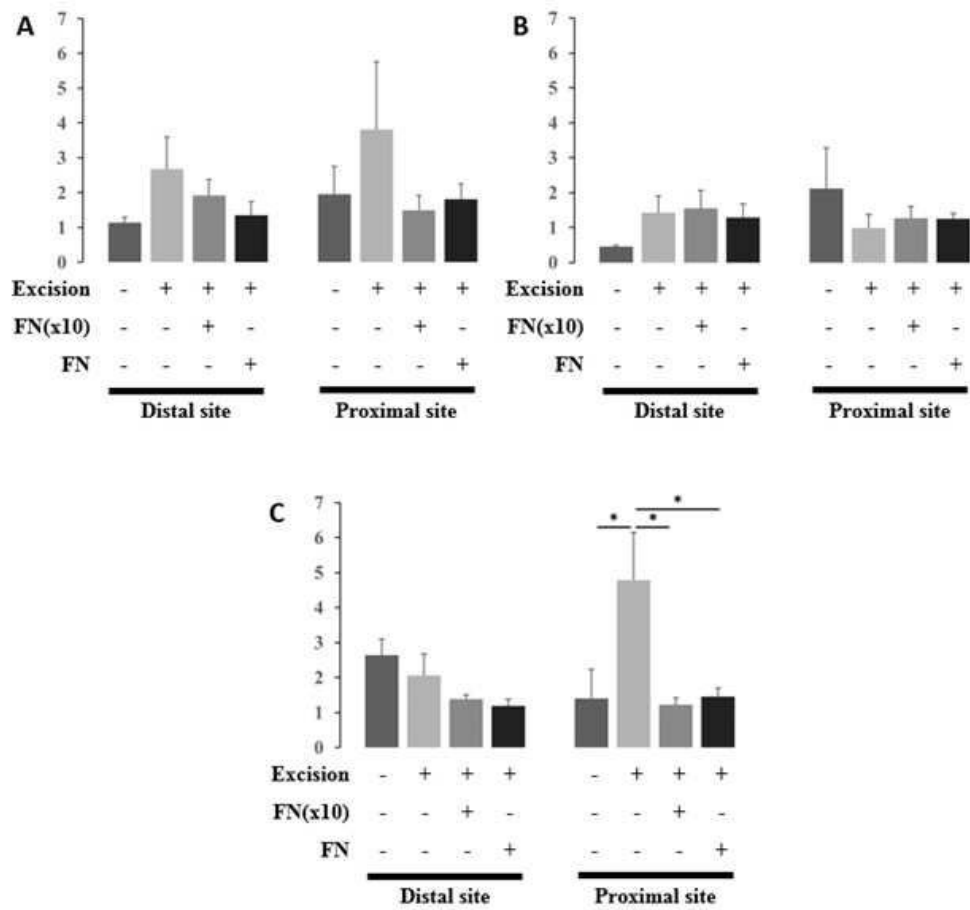
도면11



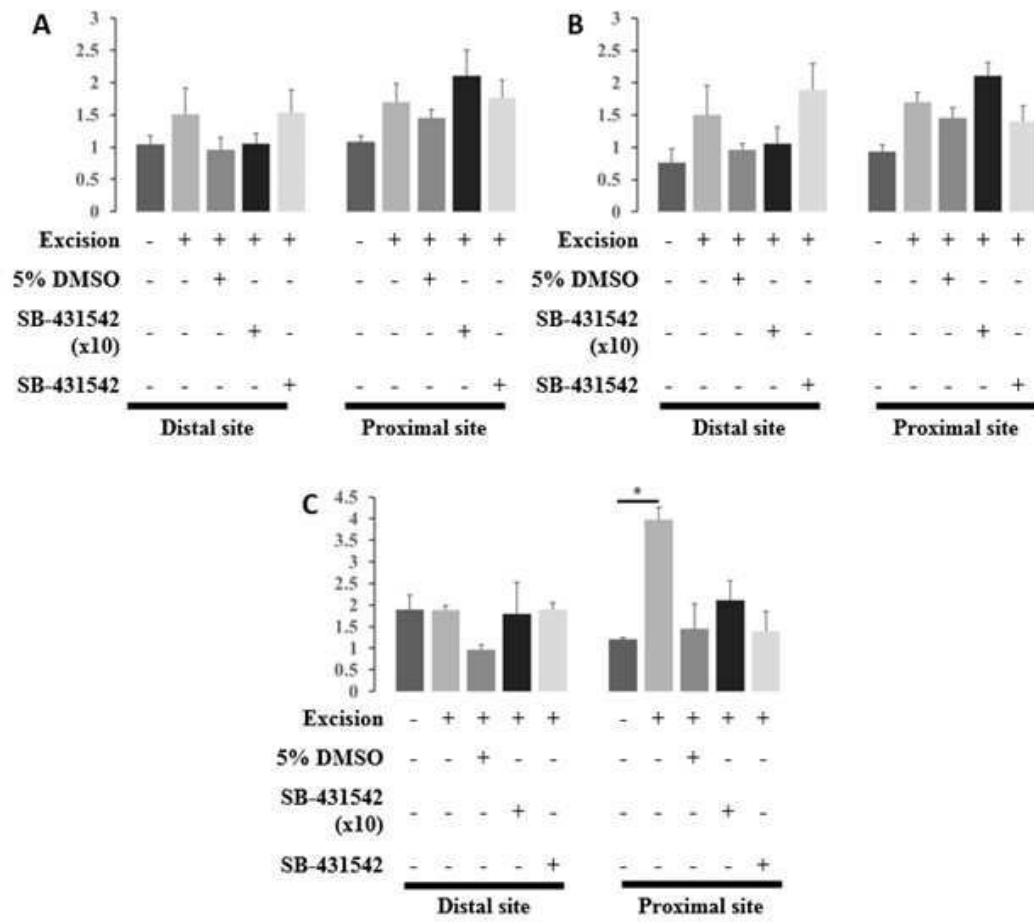
도면12



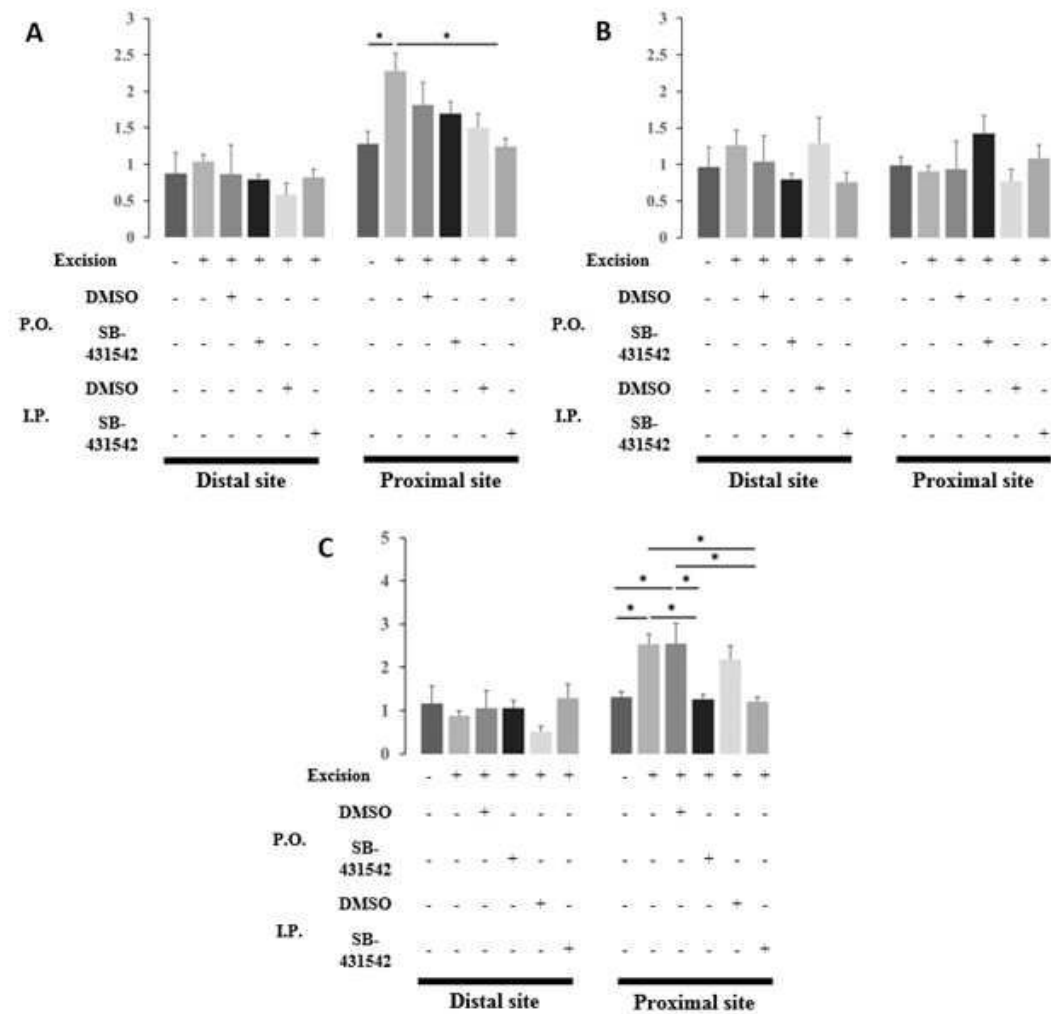
도면13



도면14



도면15



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
 - <120> Pharmaceutical compositions for the prevention or treatment of premature birth
 - <130> PN190317-P1
 - <160> 1
 - <170> KoPatentIn 3.0
 - <210> 1
 - <211> 2387
 - <212> PRT
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> Plasma Fibronectin NP_001157250
 - <400> 1
- Met Leu Gly Gly Pro Gly Pro Gly Leu Leu Leu Leu Leu Ala Val Leu

1 5 10 15
 Ser Leu Gly Thr Ala Val Pro Ser Ala Gly Ala Ser Lys Ser Arg Arg

 20 25 30
 Gln Ala Gln Gln Ile Val Gln Pro Gln Ser Pro Leu Thr Val Ser Gln
 35 40 45
 Ser Lys Pro Gly Cys Tyr Asp Asn Gly Lys His Tyr Gln Ile Asn Gln
 50 55 60
 Gln Trp Glu Arg Thr Tyr Leu Gly Ser Ala Leu Val Cys Thr Cys Tyr
 65 70 75 80
 Gly Gly Ser Arg Gly Phe Asn Cys Glu Ser Lys Pro Glu Pro Glu Glu
 85 90 95

 Thr Cys Phe Asp Lys Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Arg Val Gly Asp Thr
 100 105 110
 Tyr Glu Arg Pro Lys Asp Ser Met Ile Trp Asp Cys Thr Cys Ile Gly
 115 120 125
 Ala Gly Arg Gly Arg Ile Ser Cys Thr Ile Ala Asn Arg Cys His Glu
 130 135 140
 Gly Gly Gln Ser Tyr Lys Ile Gly Asp Thr Trp Arg Arg Pro His Glu
 145 150 155 160
 Thr Gly Gly Tyr Met Leu Glu Cys Val Cys Leu Gly Asn Gly Lys Gly

 165 170 175
 Glu Trp Thr Cys Lys Pro Ile Ala Glu Lys Cys Phe Asp Gln Ala Ala
 180 185 190
 Gly Thr Ser Tyr Val Val Gly Glu Thr Trp Glu Lys Pro Tyr Gln Gly
 195 200 205
 Trp Met Met Val Asp Cys Thr Cys Leu Gly Glu Gly Ser Gly Arg Ile
 210 215 220
 Thr Cys Thr Ser Arg Asn Arg Cys Asn Asp Gln Asp Thr Arg Thr Ser
 225 230 235 240

 Tyr Arg Ile Gly Asp Thr Trp Ser Lys Lys Asp Asn Arg Gly Asn Leu
 245 250 255

Leu Gln Cys Ile Cys Thr Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Lys Cys Glu
 260 265 270
 Arg His Thr Ser Leu Gln Thr Thr Ser Ala Gly Ser Gly Ser Phe Thr
 275 280 285
 Asp Val Arg Thr Ala Ile Tyr Gln Pro Gln Pro His Pro Gln Pro Pro
 290 295 300
 Pro Tyr Gly His Cys Val Thr Asp Ser Gly Val Val Tyr Ser Val Gly

 305 310 315 320
 Met Gln Trp Leu Lys Thr Gln Gly Asn Lys Gln Met Leu Cys Thr Cys
 325 330 335
 Leu Gly Asn Gly Val Ser Cys Gln Glu Thr Ala Val Thr Gln Thr Tyr
 340 345 350
 Gly Gly Asn Ser Asn Gly Glu Pro Cys Val Leu Pro Phe Thr Tyr Asn
 355 360 365
 Gly Lys Thr Phe Tyr Ser Cys Thr Thr Glu Gly Arg Gln Asp Gly His
 370 375 380

 Leu Trp Cys Ser Thr Thr Ser Asn Tyr Glu Gln Asp Gln Lys Tyr Ser
 385 390 395 400
 Phe Cys Thr Asp His Thr Val Leu Val Gln Thr Arg Gly Gly Asn Ser
 405 410 415
 Asn Gly Ala Leu Cys His Phe Pro Phe Leu Tyr Asn Asn His Asn Tyr
 420 425 430
 Thr Asp Cys Thr Ser Glu Gly Arg Arg Asp Asn Met Lys Trp Cys Gly
 435 440 445
 Thr Thr Gln Asn Tyr Asp Ala Asp Gln Lys Phe Gly Phe Cys Pro Met

 450 455 460
 Ala Ala His Glu Glu Ile Cys Thr Thr Asn Glu Gly Val Met Tyr Arg
 465 470 475 480
 Ile Gly Asp Gln Trp Asp Lys Gln His Asp Met Gly His Met Met Arg
 485 490 495
 Cys Thr Cys Val Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Thr Cys Val Ala Tyr
 500 505 510

Ser Gln Leu Arg Asp Gln Cys Ile Val Asp Gly Ile Thr Tyr Asn Val
515 520 525

Asn Asp Thr Phe His Lys Arg His Glu Glu Gly His Met Leu Asn Cys
530 535 540

Thr Cys Phe Gly Gln Gly Arg Gly Arg Trp Lys Cys Asp Pro Val Asp
545 550 555 560

Gln Cys Gln Asp Ser Glu Thr Arg Thr Phe Tyr Gln Ile Gly Asp Ser
565 570 575

Trp Glu Lys Tyr Leu Gln Gly Val Arg Tyr Gln Cys Tyr Cys Tyr Gly
580 585 590

Arg Gly Ile Gly Glu Trp Ala Cys Gln Pro Leu Gln Thr Tyr Pro Asp
595 600 605

Thr Ser Gly Pro Val Gln Val Ile Ile Thr Glu Thr Pro Ser Gln Pro
610 615 620

Asn Ser His Pro Ile Gln Trp Ser Ala Pro Glu Ser Ser His Ile Ser
625 630 635 640

Lys Tyr Ile Leu Arg Trp Lys Pro Lys Asn Ser Pro Asn Arg Trp Lys
645 650 655

Glu Ala Thr Ile Pro Gly His Leu Asn Ser Tyr Thr Ile Lys Gly Leu
660 665 670

Arg Pro Gly Val Val Tyr Glu Gly Gln Leu Ile Ser Val Gln His Tyr
675 680 685

Gly Gln Arg Glu Val Thr Arg Phe Asp Phe Thr Thr Thr Ser Thr Ser
690 695 700

Pro Ala Val Thr Ser Asn Thr Val Thr Gly Glu Thr Thr Pro Leu Ser
705 710 715 720

Pro Val Val Ala Thr Ser Glu Ser Val Thr Glu Ile Thr Ala Ser Ser
725 730 735

Phe Val Val Ser Trp Val Ser Ala Ser Asp Thr Val Ser Gly Phe Arg
740 745 750

Val Glu Tyr Glu Leu Ser Glu Glu Gly Asp Glu Pro Gln Tyr Leu Asp

755 760 765
 Leu Pro Ser Thr Ala Thr Ser Val Asn Ile Pro Asp Leu Leu Pro Gly
 770 775 780
 Arg Lys Tyr Thr Val Asn Val Tyr Glu Ile Ser Glu Glu Gly Glu Gln
 785 790 795 800
 Asn Leu Ile Leu Ser Thr Ser Gln Thr Thr Ala Pro Asp Ala Pro Pro
 805 810 815

 Asp Pro Thr Val Asp Gln Val Asp Asp Thr Ser Ile Val Val Arg Trp
 820 825 830
 Ser Arg Pro Arg Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Val Tyr Ser Pro
 835 840 845
 Ser Val Glu Gly Ser Ser Thr Glu Leu Asn Leu Pro Glu Thr Ala Asn
 850 855 860
 Ser Val Thr Leu Ser Asp Leu Gln Pro Gly Val Gln Tyr Asn Ile Thr
 865 870 875 880
 Ile Tyr Ala Val Glu Glu Asn Gln Glu Ser Thr Pro Val Phe Ile Gln

 885 890 895
 Gln Glu Thr Thr Gly Val Pro Arg Ser Asp Lys Val Pro Pro Pro Arg
 900 905 910
 Asp Leu Gln Phe Val Glu Val Thr Asp Val Lys Ile Thr Ile Met Trp
 915 920 925
 Thr Pro Pro Glu Ser Pro Val Thr Gly Tyr Arg Val Asp Val Ile Pro
 930 935 940
 Val Asn Leu Pro Gly Glu His Gly Gln Arg Leu Pro Val Ser Arg Asn
 945 950 955 960

 Thr Phe Ala Glu Val Thr Gly Leu Ser Pro Gly Val Thr Tyr His Phe
 965 970 975
 Lys Val Phe Ala Val Asn Gln Gly Arg Glu Ser Lys Pro Leu Thr Ala
 980 985 990
 Gln Gln Ala Thr Lys Leu Asp Ala Pro Thr Asn Leu Gln Phe Ile Asn
 995 1000 1005
 Glu Thr Asp Thr Thr Val Ile Val Thr Trp Thr Pro Pro Arg Ala Arg

1010 1015 1020
 Ile Val Gly Tyr Arg Leu Thr Val Gly Leu Thr Arg Gly Gly Gln Pro

 1025 1030 1035 1040
 Lys Gln Tyr Asn Val Gly Pro Ala Ala Ser Gln Tyr Pro Leu Arg Asn

 1045 1050 1055
 Leu Gln Pro Gly Ser Glu Tyr Ala Val Ser Leu Val Ala Val Lys Gly

 1060 1065 1070
 Asn Gln Gln Ser Pro Arg Val Thr Gly Val Phe Thr Thr Leu Gln Pro

 1075 1080 1085
 Leu Gly Ser Ile Pro His Tyr Asn Thr Glu Val Thr Glu Thr Thr Ile

 1090 1095 1100

 Val Ile Thr Trp Thr Pro Ala Pro Arg Ile Gly Phe Lys Leu Gly Val
 1105 1110 1115 1120
 Arg Pro Ser Gln Gly Gly Glu Ala Pro Arg Glu Val Thr Ser Glu Ser

 1125 1130 1135
 Gly Ser Ile Val Val Ser Gly Leu Thr Pro Gly Val Glu Tyr Val Tyr

 1140 1145 1150
 Thr Ile Ser Val Leu Arg Asp Gly Gln Glu Arg Asp Ala Pro Ile Val

 1155 1160 1165
 Lys Lys Val Val Thr Pro Leu Ser Pro Pro Thr Asn Leu His Leu Glu

 1170 1175 1180
 Ala Asn Pro Asp Thr Gly Val Leu Thr Val Ser Trp Glu Arg Ser Thr
 1185 1190 1195 1200
 Thr Pro Asp Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Thr Thr Thr Pro Thr Asn Gly

 1205 1210 1215
 Gln Gln Gly Tyr Ser Leu Glu Glu Val Val His Ala Asp Gln Ser Ser

 1220 1225 1230
 Cys Thr Phe Glu Asn Leu Ser Pro Gly Leu Glu Tyr Asn Val Ser Val

 1235 1240 1245

 Tyr Thr Val Lys Asp Asp Lys Glu Ser Val Pro Ile Ser Asp Thr Ile

 1250 1255 1260

Ile Pro Ala Val Pro Pro Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Val Gly
1265 1270 1275 1280
Pro Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro Pro Ser Ser Ile Glu Leu
1285 1290 1295
Thr Asn Leu Leu Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val
1300 1305 1310
Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn
1315 1320 1325
Leu Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Leu Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu
1330 1335 1340
Gln His Glu Ser Ile Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Ala Leu Asp
1345 1350 1355 1360
Ser Pro Ser Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr
1365 1370 1375
Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg
1380 1385 1390
His His Pro Glu Asn Met Gly Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro
1395 1400 1405
Pro Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Asn Pro Gly Thr Glu
1410 1415 1420
Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Ser Lys Glu Glu Ser Leu Pro
1425 1430 1435 1440
Leu Val Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu
1445 1450 1455
Val Ile Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro
1460 1465 1470
Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly
1475 1480 1485
Ser Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala
1490 1495 1500
Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr
1505 1510 1515 1520

Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Val Ser
1525 1530 1535

Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Met Gln Val Thr
1540 1545 1550

Asp Val Gln Asp Asn Ser Ile Ser Val Arg Trp Leu Pro Ser Ser Ser
1555 1560 1565

Pro Val Thr Gly Tyr Arg Val Thr Thr Ala Pro Lys Asn Gly Pro Gly
1570 1575 1580

Pro Ser Lys Thr Lys Thr Val Gly Pro Asp Gln Thr Glu Met Thr Ile
1585 1590 1595 1600

Glu Gly Leu Gln Pro Thr Val Glu Tyr Val Val Ser Val Tyr Ala Gln

1605 1610 1615

Asn Gln Asn Gly Glu Ser Gln Pro Leu Val Gln Thr Ala Val Thr Asn
1620 1625 1630

Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp Ser
1635 1640 1645

Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr Arg
1650 1655 1660

Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile His Glu Leu Phe Pro Ala
1665 1670 1675 1680

Pro Asp Gly Glu Glu Glu Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro Gly
1685 1690 1695

Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met Glu Ser
1700 1705 1710

Gln Pro Leu Ile Gly Thr Gln Ser Thr Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asn
1715 1720 1725

Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Thr Ala Gln Trp Thr
1730 1735 1740

Ala Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys

1745 1750 1755 1760

Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser

1765 1770 1775
 Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser
 1780 1785 1790
 Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val
 1795 1800 1805
 Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr
 1810 1815 1820

 Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu
 1825 1830 1835 1840
 Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Ile Pro Ala Asn Gly Gln Thr
 1845 1850 1855
 Pro Ile Gln Arg Thr Ile Arg Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr
 1860 1865 1870
 Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile His Leu Tyr Thr Leu Asn
 1875 1880 1885
 Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile

 1890 1895 1900
 Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu
 1905 1910 1915 1920
 Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile
 1925 1930 1935
 Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro
 1940 1945 1950
 Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr
 1955 1960 1965

 Glu Tyr Thr Ile Gln Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu
 1970 1975 1980
 Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr
 1985 1990 1995 2000
 Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser
 2005 2010 2015
 Thr Val Gln Lys Thr Pro Phe Ile Thr Asn Pro Gly Tyr Asp Thr Gly

2020 2025 2030
Asn Gly Ile Gln Leu Pro Gly Thr Ser Gly Gln Gln Pro Ser Leu Gly

2035 2040 2045
Gln Gln Met Ile Phe Glu Glu His Gly Phe Arg Arg Thr Thr Pro Pro

2050 2055 2060
Thr Thr Ala Thr Pro Val Arg His Arg Pro Arg Pro Tyr Pro Pro Asn

2065 2070 2075 2080
Val Asn Glu Glu Ile Gln Ile Gly His Val Pro Arg Gly Asp Val Asp

2085 2090 2095
His His Leu Tyr Pro His Val Val Gly Leu Asn Pro Asn Ala Ser Thr

2100 2105 2110
Gly Gln Glu Ala Leu Ser Gln Thr Thr Ile Ser Trp Thr Pro Phe Gln

2115 2120 2125
Glu Ser Ser Glu Tyr Ile Ile Ser Cys His Pro Val Gly Ile Asp Glu

2130 2135 2140
Glu Pro Leu Gln Phe Arg Val Pro Gly Thr Ser Ala Ser Ala Thr Leu

2145 2150 2155 2160
Thr Gly Leu Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Asn Ile Ile Val Glu Ala Val

2165 2170 2175
Lys Asp Gln Gln Arg Gln Lys Val Arg Glu Glu Val Val Thr Val Gly

2180 2185 2190
Asn Ser Val Asp Gln Gly Leu Ser Gln Pro Thr Asp Asp Ser Cys Phe

2195 2200 2205
Asp Pro Tyr Thr Val Ser His Tyr Ala Ile Gly Glu Glu Trp Glu Arg

2210 2215 2220
Leu Ser Asp Ser Gly Phe Lys Leu Ser Cys Gln Cys Leu Gly Phe Gly

2225 2230 2235 2240
Ser Gly His Phe Arg Cys Asp Ser Ser Lys Trp Cys His Asp Asn Gly

2245 2250 2255
Val Asn Tyr Lys Ile Gly Glu Lys Trp Asp Arg Gln Gly Glu Asn Gly

2260 2265 2270
Val Asn Tyr Lys Ile Gly Glu Lys Trp Asp Arg Gln Gly Glu Asn Gly

Gln Met Met Ser Cys Thr Cys Leu Gly Asn Gly Lys Gly Glu Phe Lys
2275 2280 2285

Cys Asp Pro His Glu Ala Thr Cys Tyr Asp Asp Gly Lys Thr Tyr His
2290 2295 2300

Val Gly Glu Gln Trp Gln Lys Glu Tyr Leu Gly Ala Ile Cys Ser Cys
2305 2310 2315 2320

Thr Cys Phe Gly Gly Gln Arg Gly Trp Arg Cys Asp Asn Cys Arg Arg
2325 2330 2335

Pro Gly Ala Glu Pro Gly Asn Glu Gly Ser Thr Ala His Ser Tyr Asn
2340 2345 2350

Gln Tyr Ser Gln Arg Tyr His Gln Arg Thr Asn Thr Asn Val Asn Cys
2355 2360 2365

Pro Ile Glu Cys Phe Met Pro Leu Asp Val Gln Ala Asp Arg Glu Asp
2370 2375 2380

Ser Arg Glu
2385