



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0077920
(43) 공개일자 2013년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/10 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01) A61P 33/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0144400

(22) 출원일자 2011년12월28일

심사청구일자 2011년12월28일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자

박남규

부산광역시 수영구 남천동 삼익비치 APT 212-606
호

서정길

부산광역시 남구 대연동 599-1번지 부경대학교
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김남식, 양기혁, 한윤호, 이인행

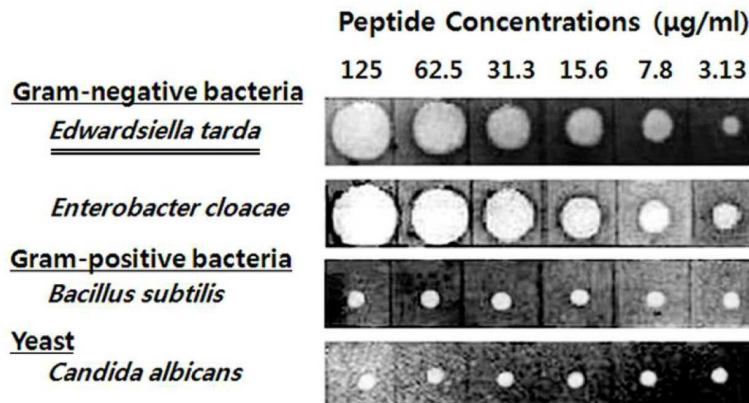
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 에드워드병의 원인세균에 대한 아피대신의 항균작용

(57) 요약

본 발명은 어류 에드워드병 치료 및 예방을 위하여, 아피대신(apidaecin)을 유효성분으로 함유하는 어류 에드워드병 치료 및 예방용 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 조성물은 양식 어류의 에드워드병을 유발하는 *Edwardsiella species*에 대하여 막 선택성이 없는 정균기작을 통해서 특이적이고 효율적인 항 세균활성을 나타낼 뿐만 아니라, 인체 및 어류의 적혈구에 대한 용적활성은 거의 없기 때문에, 양식어류에 대한 사료첨가제로 사용되거나, 에드워드병 발병시 치료제로 사용되더라도 어류 및 인체의 건강에 대한 위협요소를 제공하지 않는다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

고혜진

부산광역시 남구 대연동 599-1번지 부경대학교

김혜림

부산광역시 남구 대연동 599-1번지 부경대학교

우경은

부산광역시 남구 대연동 599-1번지 부경대학교

이민정

부산광역시 남구 대연동 599-1번지 부경대학교

박태현

부산광역시 남구 대연3동 599-1번지 부경대학교

특허청구의 범위

청구항 1

아피대신(apidaecin)을 유효성분으로 함유하는 어류 에드워드병 치료 및 예방용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 아피대신은 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 아피대신 Ib(apidaecin Ib)인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

사료첨가제의 형태로 제공되는, 조성물.

청구항 4

아피대신을 어류에 투여하는 단계를 포함하는 어류의 에드워드병 치료 및 예방방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 아피대신은 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 아피대신 Ib(apidaecin Ib)인, 방법.

명 세 서

기술분야

[0001] 본 발명은 어류 질병 치료 및 예방용 조성물에 관한 것으로서, 더 상세하게는 에드워드병 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 항생제는 인간 질병을 조절하기 위해 사용되거나 식량으로 제공되는 동물의 사료첨가제로 사용되고 있다. 항생제의 사용은 병원성 세균의 감염을 회피하는데 도움을 줄 수 있지만, 세심한 주의와 조절을 필요로 한다. 이는 항생제의 사용이 항생제 내성 세균을 유도할 수 있고 특정 균주의 독성을 증가시킬 수 있으며, 이를 통해 결국 병리학적 환경을 급격하게 바꿀 수 있기 때문이다(Ervik *et al.*, *Disease of Aquatic Organisms*, 18: 45-51, 1994). 덧붙여, 시중에 유통되는 육류에 잔류하는 항생제의 존재는 소비자의 건강에 악영향을 미칠 수 있다(Chinabut and Puttinaowarat, *Dev. Biol. (Basel)*, 373(121): 255??261, 2005).

[0003] 특히, 수중양식에서 첨가제로 사용되는 항생제는 항생제의 축적, 항생제 내성 세균 및 수중 환경의 불균형을 유도할 수 있기 때문에 이러한 효과는 인류의 보건에 직접적으로 관련되어 있다. 이러한 이유로 수중 생물, 소비자 및 환경에 덜 해롭고 또한 세균에 저항성을 부여하지 않는 대체제의 개발이 지속가능한 수중양식을 위해 절실한 실정이다.

[0004] 최근, 항미생물성 펩타이드가 통상의 항생제와 다른 세균 막에 대한 작동기전에 기인하여 새로운 유형의 대체제로서 고려되고 있고, 항생제보다 환경 및 소비자에게 덜 해롭고 저항성 세균을 유발하지 않는 것으로 보고되어 왔다(Hancock and Chapple, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 1317-1323, 1999; Zasloff, *Nature*, 415: 389-395, 2002).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 그러나, 아직 양식어업에서 빈번히 발생하는 에드워드병을 특이적으로 치료 및 예방할 수 있는 항미생물성 펩타이드에 대하여는 보고된 바는 없는 실정이다.

[0006] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 에드워드병의 치료 및 예방용 조성물 및 이를 이용한 에드워드병의 치료 및 예방방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 일 관점에 따르면, 아피대신(apidaecin)을 유효성분으로 함유하는 어류 에드워드병 치료 및 예방용 조성물이 제공된다.

[0008] 상기 어류는 양식 어류일 수 있다.

[0009] 아피대신은 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 아피대신 Ib(apidaecin Ib)일 수 있다. 선택적으로, 상기 아피대신은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 아피대신 Ia 또는 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 아피대신 II일 수 있다.

[0010] 상기 조성물은 어류용 의약 또는 어류용 사료첨가제의 형태로 제공될 수 있다.

[0011] 본 발명의 다른 관점에 따르면, 아피대신을 어류에 투여하는 단계를 포함하는 양식 어류의 에드워드병 치료 및 예방방법이 제공된다.

[0012] 이 때, 상기 어류는 양식 어류일 수 있다.

[0013] 이 때, 상기 아피대신은 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 아피대신 Ib일 수 있고, 상기 아피대신은 사료에 첨가되어 양식 어류에 투여될 수 있다. 선택적으로, 상기 아피대신은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 아피대신 Ia 또는 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 아피대신 II일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 실시예에서 아피대신의 유효 투여량은 0.1 μ g/kg 내지 100 mg/kg일 수 있고, 1 μ g/kg 내지 10 mg/kg일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에서 아피대신의 투여경로는 경구 또는 비경구 어떤 것도 가능하나, 경구 투여인 것이 바람직하고, 어류가 양식되고 있는 수조의 물에 직접 살포하는 것도 가능하다.

발명의 효과

[0016] 상기한 바와 같이 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물은 양식 어류의 에드워드병을 유발하는 *Edwardshiella* 속 세균에 대하여 특이적이고 효율적인 항세균활성을 나타낼 뿐만 아니라, 인체 및 어류의 적혈구에 대한 용적활성은 거의 없기 때문에, 양식어류에 대한 사료첨가제로 사용되거나, 에드워드병 발병시 치료제로 사용되더라도 어류 및 인체의 건강에 대한 위협요소를 제공하지 않는다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 아피대신 Ia, Ib 및 II의 아미노산 서열을 나타내는 그림이다.

도 2는 본 발명의 아피대신 Ib의 항균활성을 보여주는 사진이다.

도 3은 본 발명의 아피대신 Ib의 살균활성을 보여주는 그래프이다.

도 4는 본 발명의 아피대신 Ib의 형광 유출활성을 보여주는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다. 또한 설명의 편의를 위하여 도면에서는 구성 요소들이 그 크기가 과장 또는 축소될 수 있다.

[0019] **실시예: 펩타이드의 합성**

[0020] 펩타이드는 펩타이드 합성기(Millipore Model 9050, PerSeptive Biosystem, USA)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 합성하였다. 상온에서 절단시키고 90분간 탈보호제(TFA:thioanisole:m-Cresol:1,2-ethanedithiol=5:1.7:0.6:0.9, v/v)를 이용하여 측쇄에 대한 탈보호화 이후에 조 펩타이드를 5% 아세트산에 용해시킨 후 5% 아세트산으로 Sephadex G-25 칼럼(fine, 2.6 x 110 cm)에 의해 정제하였다. 그런다음, 상기 펩타이드를 μ Bondapak C18 HPLC 칼럼(7.8 x 300 mm, 10 μ m, 100 Å)과 Waters 600 HPLC 시스템을 연결하여 추가적으로 정제하였다. 원하는 순도의 분획을 모아 실험을 위해 동결건조하였다. 천연 펩타이드와 합성 펩타이드의 균일성을 확인하기 위해, 합성 펩타이드의 분자량과 아미노산 조성을 MALDI-TOF 질량분석기(Voyager DETM STR, Pharmacia, Sweden)과 아미노산 분석기로 결정하였다. 합성 펩타이드의 분자량은 하기와 같았다: 아피대신 Ib; 기본 피크, 2109.4, calcd. 화학식, C₉₅H₁₅₀N₃₂O₂₃).

[0021] 아피대신 Ib는 18개의 아미노산 잔기로 구성되어 있고(서열번호 2), 6개의 프롤린 잔기(30%)와 3개의 아르기닌 잔기(17%)를 함유하고 있다(도 1). 한편, 아피대신 Ia 및 아피대신 II는 각각 서열번호 1 및 3의 아미노산 서열을 갖는데, 유사한 항균활성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다(도 1).

[0022] **실험예 1: 극민감 방사상 확산 분석(ultrasensitive radial diffusion assay)**

[0023] 상기 합성 펩타이드의 항박테리아 활성은 *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* 및 *Streptococcus iniae*를 포함한 그람양성균과 *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Shigella flexneri*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardshiella tarda* 및 *Vbrio parahemolyticus*를 포함하는 그람음성균 및 진균의 한 종인 *Candida albicans*에 대한 극민감 방사상 확산 분석을 종래에 보고된 바에 따라 수행하였다(Seo *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 338: 1998??2004, 2005).

[0024] 모든 균들은 TSB(trypticase soy broth)와 SDB(sabouraud dextrose broth)에서 18시간 동안 적절한 온도(*A. hydrophila*, *E. tarda*, *S. iniae*와 *V. parahemolyticus*와 같은 어류 병원성 세균은 25℃, 기타 다른 세균은 37℃)로 배양하였다. 밤새 배양 후, 상기 세균과 *C. albicans* 현탁액을 각각 10⁸ CFU/ml 및 10⁶ CFU/ml에 상응하도록 McFarland 탁도 표준 0.5(Vitek Colorimeter #52-1210, Hach, Loveland, Colorado)로 희석하였다. 0.5 ml의 희석된 세균 현탁액을 9.5 ml의 깔개 겔(underlay gel, 10 mM 인산 완충액(pH 6.57), 0.03% TSB 또는 0.03% SDB 및 1% I형 한천(low EEO))에 혼합하여 세균의 경우 5 x 10⁶ CFU/ml로 만들어주고, *C. albicans*의 경우 5 x 10⁴ CFU/ml로 조정된 후 평판 접시에 도포하였다. 상기 합성 펩타이드를 산성화된 물(0.01% 초산) 3 μ l에 2배씩 순차적으로 희석한 후 1 mm 두께의 깔개 겔 내에 형성된 직경 2.5 mm의 웰에 각 희석액을 첨가한 후, 25℃ 또는 37℃에서 3시간 동안 배양하였다. 배양 후 세균 또는 *C. albicans* 현탁액 위에 10 mM 인산완충용액(pH 6.57)에 6% TSB 또는 6% SDB 및 1% 한천을 포함하는 강도 두 배의 덮개 겔 10 ml를 덮었다. 평판 접시를 추가적으로 18-24시간 동안 배양한 후 투명지역의 직경을 측정하였다. 웰의 직경을 제한 후 투명 지역의 직경을 유니트(U)로 표현하였는데 0.1 mm를 1U로 환산하였고 합성 펩타이드의 MEC(최소 효과 농도, μ g/ml)는 펩타이드 농도의 로그값에 대한 유니트의 곡선의 X-intercept로 계산하였다(Zhao *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 2695-2702, 2001). 양성 대조군으로는 교잡종 줄무늬 베스(hybrid striped bass, *Morone saxatilis* x *M. chrysops*)로부터 분리된 α -나선형의 항균 펩타이드인 피시딘 1이 사용되었다(Silphaduang and Noga, *Nature*, 414: 268-269, 2001.).

[0025] 분석 결과, 아피대신 Ib는 *E. coli*, *E. cloacae* 및 *S. flexneri*(MECs: 3.13-6.25 μ g/ml)를 포함하는 몇몇 그람음성균에 대하여 강한 항미생물 활성을 나타낸 반면, *B. subtilis*, *M. luteus* 및 *S. aureus*를 포함한 모든 그람양성균과 효모인 *C. albicans*(MECs: >125 μ g/ml)에 대하여는 효과가 거의 없었다(표 1 및 도 2).

표 1

[0026] 아피대신 Ib 및 피시딘 1의 항균 활성

미생물	그람	최소효과농도 (μ g/ml)	
		아피대신 Ib	피시딘 1
<i>B. subtilis</i> PM125	+	> 125	4.5
<i>B. subtilis</i> KCTC1021	+	> 125	7.5
<i>M. luteus</i> ATCC9341	+	> 125	8

<i>S. aureus</i> RM4220	+	> 125	4.4
<i>E. coli</i> D31	-	> 125	3.8
<i>E. coli</i> KCTC1116	-	1	7
<i>Enterobact</i> <i>cloacae</i> KCTC1685	-	0.3	6
<i>Shigella flexneri</i> KCTC2517	-	1.5	8
어류 병원성 세균			
<i>A. hydrophila</i> KCTC2358	-	>125	10
<i>E. tarda</i> H-4	-	3.2	>62.5
<i>S. iniae</i> FP5229	+	>125	6.5
<i>V. parahemolyticus</i> HUF91	-	>125	10
<i>V. parahemolyticus</i> KCCM41664	-	>125	3
효모			
<i>C. albicans</i> KCTC7965		>125	>62.5

[0027] 홍미롭게도, 아피대신 Ib는 *A. hydrophila*, *E. tarda*, *S. iniae* 및 *V. parahemolyticus*와 같은 어류 병원균 중에서는 오직 *E. tarda*(MEC: 3.2 µg/ml)에 대하여만 항미생물 활성을 나타내었다. 표준 항미생물 펩타이드로 사용된 피시딘 1은 조사된 모든 세균에게서 폭넓은 항미생물 활성을 보인 반면, *E. tarda*와 효모인 *C. albicans*에 대하여는 유의한 활성을 보이지 않았다(MEC: > 62.5 µg/ml).

[0028] **실험예 2: *Edwardshiella* 속 세균에 대한 특이적 활성 확인**

[0029] Apidaecin Ib의 *Edwardshiella* 속 세균에 대한 특이적 항균활성을 측정하기 위해서 4종류의 *E. tarda*와 1종류의 *E. ictaluri*에 대해서 상기와 동일한 방법으로 항균활성을 측정하였다(표 2).

[0030] 분석 결과, 아피대신 Ib는 활성 측정에 사용된 5종류의 *Edwardshiella* 속 세균에 대해서 강한 활성을 나타내었다(MECs: 0.8-3.2 µg/ml). 그러나 표준 항균 펩타이드인 피시딘 1은 유의한 활성을 보이지 않았다(MECs: >125 µg/ml).

표 2

[0031] 아피대신 Ib 및 피시딘 1의 *Edwardshiella* 속 세균에 대한 항균활성

세균	최소 효과 농도 (µg/ml)	
	아피대신 Ib	피시딘 1
<i>E. tarda</i> H-4	3.2	> 125
<i>E. tarda</i> RE1	1.0	> 125
<i>E. tarda</i> RE2	0.6	> 125
<i>E. tarda</i> RED2	1.8	> 125
<i>E. ictaluri</i> KCTC12264	0.8	> 125

[0032] **실험예 3: 살균 분석**

[0033] 아피대신 Ib의 작동 기전을 확인하기 위해, MEC(3.2 µg/ml) 및 MEC 10배의 농도(32 µg/ml)의 아피대신 Ib에 *E. tarda*를 노출시킬 경우 생존율을 조사하였다. 구체적으로 10⁶ CFU/ml의 *E. tarda*를 포함하는 배양액 1 ml를 특정 최종농도(1X MEC 및 10X MEC)로 첨가된 상기 펩타이드에 정해진 시간 간격동안(0, 10, 20, 40 및 60분) 노출시킨 후 동일 양(20 µl)을 배양액에서 취하여 적절한 평판 배지(TSA) 상에 도말하였다. 밤새 배양된 평판 배지에서의 콜로니의 수를 계수하였다. 음성대조군으로는 펩타이드를 전혀 첨가하지 않고 배양한 세균을 사용하였다.

[0034] 그 결과, 도 3에서 나타난 바와 같이, 비록 MEC 10배의 농도에서의 콜로니 형성 단위는 MEC에서 보다 훨씬 작았지만 MEC에서는 물론 MEC 10배의 농도에서 아피대신 Ib는 *E. tarda*를 완벽하게 죽이지 못했다. 이는 *E. tarda*에 대한 저해 기전이 살균작용보다는 정균작용에 의한 것임을 시사하는 것이다.

[0035] **실험예 4: 적혈구 용적활성 분석**

[0036] 아피대신 Ib가 세균에만 특이적으로 작용하고, 생체 내에서 적혈구 용적작용과 같은 부작용이 나타나는지 확인하기 위해서, 인간 및 어류의 적혈구를 이용하여 아피대신 Ib 및 피시딘 1의 적혈구 용적활성(hematocrit)을 분

석하였다(표 3). 구체적으로, 적혈구는 헤파린-처리 혈액으로부터 4000 x g의 속도로 5분간 원심분리하여 수집하였고 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.4/ 150 mM NaCl)으로 세 차례 세척하여 혈장과 버피코트를 제거한 후, 완충액에 현탁하여 3%의 적혈구 용적율(hematocrit)로 조절하였다(2×10^8 cells/ml). 90 μ l의 3% 적혈구 용적율을 갖는 현탁액에 10 μ l의 펩타이드를 첨가하여 최종 농도를 3.13 내지 100 μ g/ml로 조절한 후 60분간 37℃에서 배양하였다. 배양 후, 8000 x g의 속도로 10분간 원심분리하여 얻은 상등액(70 μ l)을 마이크로타이터 플레이트에 놓고 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 적혈구 용적율 0 및 100%는 각각 완충액 및 0.1% Triton X-100 처리 후에 얻은 용액의 흡광도로 결정되었다. 펩타이드에 의한 적혈구 용적율은 하기식에 의해 계산되었다:

[0037] 적혈구 용적율 = (펩타이드 용액의 405nm에서의 흡광도 ?? 완충액의 405nm에서의 흡광도) / (0.1% 트리톤 X-100의 405 nm에서의 흡광도 ?? 완충액의 405nm에서의 흡광도) x 100

표 3

[0038] 아피대신 Ib 및 피시딘 1의 적혈구 용적활성

농도 (μ g/ml)	용적율 (%)			
	아피대신 Ib		피시딘 1	
	인간 적혈구	어류 적혈구	인간 적혈구	어류 적혈구
3.13	0.3	0.1	1.5	1.3
6.25	0.4	0.2	3.6	4.7
12.5	1	0.3	18.9	15.8
25	1	1.2	51.6	48.5
50	1.3	2.4	83.7	80.3
100	4.3	2.6	100	100

[0039] 그 결과, 표 3에서 나타난 바와 같이, 아피대신 Ib는 100 μ g/ml의 농도까지는 적혈구 용적활성을 나타내지 않은 반면, 피시딘 1은 12.5 μ g/ml의 농도에서조차 적혈구 용적활성을 보였다. 이러한 결과는 아피대신 Ib가 유의한 적혈구 용적활성 없이 *E. tarda* 특이적인 항세균 활성을 가짐을 시사하는 것이다.

[0040] 실험예 5: 형광유출 분석

[0041] 아피대신 Ib의 특이적 막 선택성을 확인하기 위하여, 아피대신 Ib 존재시 중성막인 DPPC(dipalmitoylphosphatidylcholine) 및 EYPC(egg yolk phosphatidylcholine)와 산성막인 DPPC:DPPG(dipalmitoylphosphatidylglycerol) = 3:1 및 EYPC:EYPG(egg yolk phosphatidylglycerol) = 3:1으로부터 형광물질들의 유출 정도를 측정하였다(도 4). 측정 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 아피대신 Ib는 측정에 사용된 모든 막으로부터 형광 물질의 유출을 거의 유도하지 않았다. 그러나 피시딘 1은 측정에 사용된 모든 막으로부터 강한 형광 물질의 유출을 유도하였다. 이러한 결과는 아피대신 Ib는 막과의 특이적 상호작용 및 막 선택성이 없음을 시사하는 것이다.

[0042] 본 발명은 도면에 도시된 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

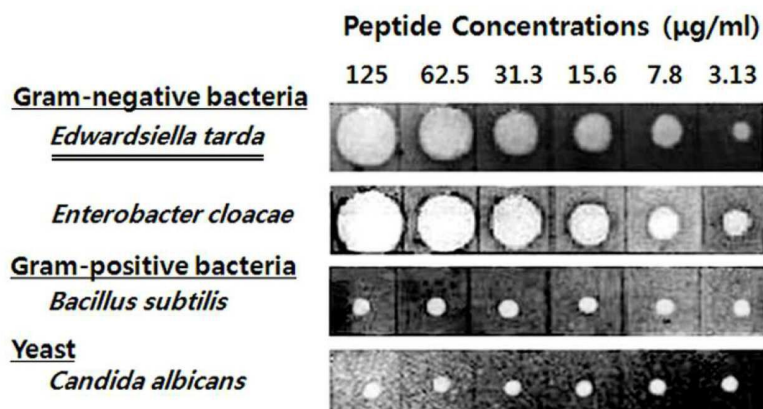
도면1

서열번호 1 **Apidaecin Ia:** GNNRPVYIPQPRPPHPRI

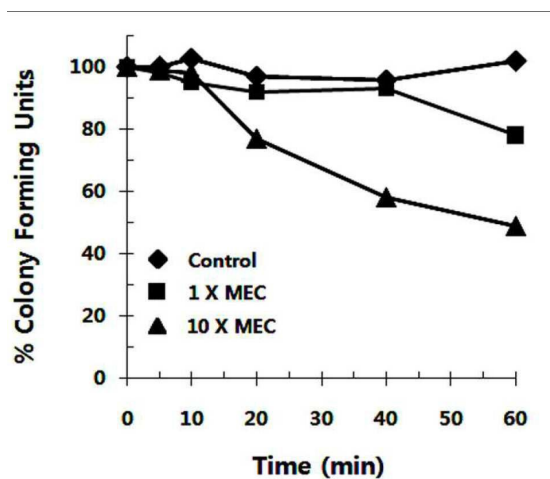
서열번호 2 **Apidaecin Ib:** GNNRPVYIPQPRPPHPRL

서열번호 3 **Apidaecin II:** GNNRPIYIPQPRPPHPRL

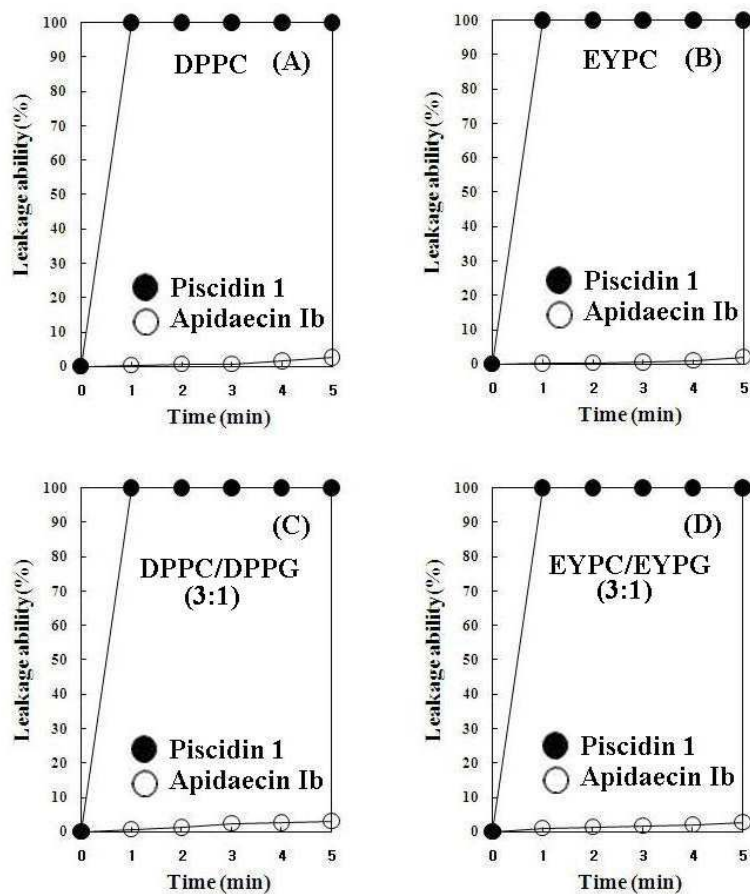
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> Antimicrobial activity of Apidaecine against the causative bacteria of Edwardsiellosis

<130> PD11-0078

<160> 3

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> apidaecin Ia

<400> 1

Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro

1

5

10

15

Arg Ile

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> apidaecin Ib

<400> 2

Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro

1 5 10 15

Arg Leu

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> apidaecin II

<400> 3

Gly Asn Asn Arg Pro Ile Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro

1 5 10 15

Arg Leu