



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0049938
(43) 공개일자 2014년04월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/485 (2006.01) C07K 1/14 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01) C12N 15/81 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0123617
(22) 출원일자 2013년10월16일
심사청구일자 2013년10월16일
(30) 우선권주장
1020120115731 2012년10월18일 대한민국(KR)
기술이전 회망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김정윤
대전광역시 유성구 왕가봉로 23, 1109동 502호(노은동, 열매아파트)
강우규
대전광역시 서구 청사로 5, 101동 604호(월평동, 하나로아파트)
이민형
대전광역시 대덕구 중리로43번길 14-10, 3층(중리동)
(74) 대리인
위병갑

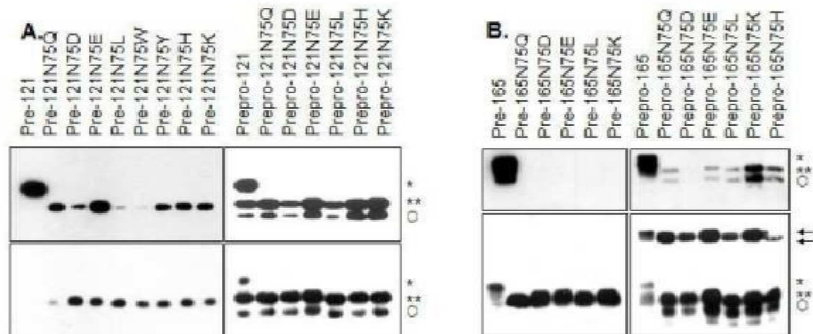
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 효모를 이용한 인간 비당화 혈관내피세포성장인자 생산방법

(57) 요약

본 발명은 효모를 이용한 인간 비당화 혈관내피세포성장인자 생산방법에 관한 것으로, 상세하게는 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF) 유전자를 비당화된 형태로 변형시키는 방법과 이를 효모에서 작용하는 조절 서열에 작동 가능하도록 연결시켜 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계, 상기 재조합 발현 벡터로 효모 숙주세포를 형질 전환하는 단계, 상기 형질 전환된 효모 숙주세포를 배양하는 단계, 상기 배양물로부터 목적 단백질을 분리 정제하는 단계로 구성되는 단백질 생산방법에 있어서, 상기 벡터는 서열번호 1을 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 인간 비당화 혈관내피세포성장인자(VEGF) 생산방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

인간 혈관내피세포성장인자(VEGF) 유전자 및 서열번호 1로 표시되는 pre 신호서열 펩티드를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계;

재조합 발현 벡터로 숙주세포인 효모를 형질 전환하는 단계;

형질 전환된 효모를 배양하는 단계; 및

배양물로부터 발현된 인간 비당화 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 정제하는 단계를 포함하는, 인간 비당화 혈관내피세포성장인자(VEGF)의 생산방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF)는 VEGF₁₂₁이며,

상기 VEGF₁₂₁의 75번 아미노산인 아르파라긴이 글루타민 또는 글루탐산으로 치환된 것을 특징으로 하는 인간 비당화 혈관내피세포성장인자(VEGF) 생산방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 서열번호 1로 표시되는 pre 신호서열 펩티드를 암호화하는 유전자는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 인간 비당화 혈관내피세포성장인자(VEGF) 생산방법.

청구항 4

인간 혈관내피세포성장인자(VEGF) 유전자 및 서열번호 2로 표시되는 prepro 신호서열 펩티드를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계;

재조합 발현 벡터로 숙주세포인 효모를 형질 전환하는 단계;

형질 전환된 효모를 배양하는 단계; 및

배양물로부터 발현된 인간 비당화 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 정제하는 단계를 포함하는, 인간 비당화 혈관내피세포성장인자(VEGF)의 생산방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF)는 VEGF₁₂₁이며,

상기 VEGF₁₂₁의 75번 아미노산인 아르파라긴이 글루타민, 글루탐산, 히스티딘 또는 라이신으로 치환된 것을 특징으로 하는 인간 비당화 혈관내피세포성장인자(VEGF) 생산방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF)는 VEGF₁₆₅이며,

상기 VEGF₁₆₅의 75번 아미노산인 아르파라긴이 글루탐산 또는 라이신으로 치환된 것을 특징으로 하는 인간 비당화 혈관내피세포성장인자(VEGF) 생산방법.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 서열번호 2로 표시되는 prepro 신호서열 펩티드를 암호화하는 유전자는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 인간 비당화 혈관내피세포성장인자(VEGF) 생산방법.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 서열번호 2는 23번, 57번, 67번 아미노산 중 어느 하나 이상이 N-당화 되는 것을 특징으로 하는 인간 비당화 혈관내피세포성장인자(VEGF) 생산방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 형질 전환된 효모 숙주세포를 배양하는 단계는 BYPDG(pH5.5) 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 인간 비당화 혈관내피세포성장인자(VEGF) 생산방법.

청구항 10

제3항 또는 제7항에 따른 방법으로 생산된 인간 비당화 혈관내피세포성장인자(VEGF).

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 효모를 이용하여 인간 비당화 혈관내피세포성장인자를 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 혈관내피세포성장인자(VEGF)는 내피세포 특이적 분열촉진물질로써, 혈관을 생성할 수 있는 신호를 전달하거나 혈관 투과성을 조절한다. 이는 배아발생에서 혈관계의 발달을 조절하는 것뿐만 아니라 성체에서의 혈관 생성에도 필수적이며, 따라서 혈관생성, 상처 치유, 골 회복, 협심증 및 조직 허혈증에 있어서 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 치료목적으로 활용하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다.

[0003] 인간의 혈관내피세포성장인자(VEGF)는 선택적 스플라이싱(alternative splicing)에 의해 하나의 유전자에서 VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆의 최소 7개의 이성체(isoform)가 만들어진다. 이 중에서 오직 VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅만이 분비되고, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆은 세포외기질에 격리되어 있다. 다만, VEGF₁₆₅는 VEGF₁₂₁과 달리 헤파린 결합 부위를 가지고 있어서 상당비율이 세포외기질에도 존재하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 이러한 혈관내피세포성장인자(VEGF)는 단일이합체의 당단백질(homodimeric glycoprotein)의 형태를 가진다. 두 개의 단일체가 공유결합으로 이루어진 이합체 형태는 수용체와의 결합과 생물학적 활성에 필수적이고, 75번째 아미노산에 이루어지는 N-당화는 비록 혈관내피세포성장인자(VEGF)의 생물학적 활성에는 영향을 미치지 않지만, 포유류의 세포에서 분비효율에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

[0005] 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 대장균, 효모, 곤충세포, CHO(Chinese Hamster Ovary)세포 등의 다양한 세포에서 발현하는 실험이 꾸준히 진행되어 왔으나 아직도 몇 가지 한계점을 가지고 있다. 대장균에서 생산된 비당화된 재조합 혈관내피세포성장인자(VEGF)는 세포 내에서 단량체의 형태로 응집체를 형성하기 때문에, 그 기능을 발휘하기 위해서는 재접힘(refolding) 및 이합체화(dimerization) 과정이 추가로 요구된다. 효모와 곤충 세포에서 인간의 당단백질을 생산하는 것 또한 적합하지 않은데, 이는 인간 당단백질에서 발견되는 글리칸 형태(glycan pattern)와 상기 세포에서 발견되는 당단백질의 글리칸 형태가 일치하지 않기 때문이다. CHO 세포 역시 재조합 당단백질을 발현시키는 것이 경제적으로 지나치게 고가라는 문제점이 있다.

[0006] 따라서 비당화된 형태의 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 보다 효율적으로 제조 및 생산할 수 있는 새로운 방법의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 1. Peretz D., Gitay Goren H., Safran M., Kimmel N., Gospodarowicz D., and Neufeld G., "Glycosylation of vascular endothelial growth factor is not required for its mitogenic activity", Biophys Res Commun 182, 1340-1347.

(비특허문헌 0002) 2. Leung D.W., Cachianes G., Kuang W.J., Goeddel D.V., and Ferrara N. "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen.", Science 246, 1306-1309.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 혈관생성, 상처 치유, 골 회복, 협심증 치료 및 조직 허혈증 등 혈관내피세포성장인자(VEGF)와 관련 있다고 알려진 다양한 질병에 적용할 수 있는 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 효모를 이용하여 생산함으로써 그 생산비용을 절감시키고, 시간과 노력을 감소시킬 수 있으며, 비당화된 형태의 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 제공함으로써 인간에게 적용하더라도 면역반응을 유도하지 않는 안전한 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기한 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF) 유전자 및 서열번호 1로 표시되는 pre 신호서열 펩티드를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계; 재조합 발현 벡터로 숙주세포인 효모를 형질 전환하는 단계; 형질 전환된 효모를 배양하는 단계; 및 배양물로부터 발현된 인간 비당화 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 정제하는 단계를 포함하는, 인간 비당화 혈관내피세포성장인자(VEGF)의 생산방법을 제공한다.

[0010] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF)는 VEGF₁₂₁이며, 상기 VEGF₁₂₁의 75번 아미노산인 아르파라긴이 글루타민 또는 글루탐산으로 치환된 것일 수 있다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 서열번호 1로 표시되는 pre 신호서열 펩티드를 암호화하는 유전자는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명은 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF) 유전자 및 서열번호 2로 표시되는 prepro 신호서열 펩티드를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계; 재조합 발현 벡터로 숙주세포인 효모를 형질 전환하는 단계; 형질 전환된 효모를 배양하는 단계; 및 배양물로부터 발현된 인간 비당화 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 정제하는 단계를 포함하는, 인간 비당화 혈관내피세포성장인자(VEGF)의 생산방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF)는 VEGF₁₂₁이며, 상기 VEGF₁₂₁의 75번 아미노산인 아르파라긴이 글루타민, 글루탐산, 히스티딘 또는 라이신으로 치환된 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF)는 VEGF₁₆₅이며, 상기 VEGF₁₆₅의 75번 아미노산인 아르파라긴이 글루탐산 또는 라이신으로 치환된 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 서열번호 2로 표시되는 prepro 신호서열 펩티드를 암호화하는 유전자는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 서열번호 2는 23번, 57번, 67번 아미노산 중 어느 하나 이상이 N-당화 되는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 형질 전환된 효모 숙주세포를 배양하는 단계는 BYPDG(pH5.5) 배지에서 배양

하는 것일 수 있다.

[0018] 나아가 본 발명은 상기 본 발명에 따른 방법으로 생산된 인간 비당화 혈관내피세포성장인자(VEGF)을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명은 대장균에서 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 생산하는 경우 요구되는 재접힘(refolding) 및 이합체화(dimerization) 과정이 별도로 요구되지 않아 그 생산공정이 간소화되고, 효모와 곤충 세포에서 생산된 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 인간에게 적용 시 야기되는 면역 반응을 완화시키며, CHO 세포에서 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 생산하는 경우 발생하는 과도한 비용을 절감시켜, 효율적인 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF) 생산방법을 제공하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1A는 본 발명의 일실시예로, 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 효모에서 발현시키기 위한 재조합 벡터를 표현한 모식도이다.

도 1B는 본 발명의 일실시예로 *S. cerevisiae*에서 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 발현시키는데 있어서 배지의 pH가 미치는 영향을 나타내는 실험 결과이다. 좌측 패널은 SDS-PAGE, 우측 패널은 웨스턴 블라팅 결과를 나타낸다.

도 1C는 본 발명의 일실시예로, 분비된 VEGF₁₂₁이 EndoH 처리에 의해 비당화되는 효과를 보여주는 웨스턴 블라팅 결과이다.

도 1D는 본 발명의 일실시예로, 분비된 VEGF₁₂₁을 2-머캅토에탄올 처리 전 후를 보여주는 결과이다. 좌측 패널은 SDS-PAGE, 우측 패널은 웨스턴 블라팅 결과를 나타낸다.

도 2A는 본 발명의 일실시예로, pre 신호서열(서열번호 1)과 prepro 신호서열(서열번호 2)하에서 VEGF₁₂₁의 분비 정도를 보여주는 SDS-PAGE 결과이다.

도 2B는 본 발명의 일실시예로, pre 신호서열(서열번호 1)과 prepro 신호서열(서열번호 2)하에서 VEGF₁₂₁의 분비 정도를 배양 시간에 따라 보여주는 웨스턴 블라팅 결과이다.

도 3A는 본 발명의 일실시예로 야생형 VEGF₁₂₁과 N-당화 돌연변이형 VEGF₁₂₁(N75Q)가 pre 신호서열(서열번호 1) 또는 prepro 신호서열(서열번호 2) 하에서 분비되는 정도를 보여주는 실험 결과이다. 좌측 패널은 SDS-PAGE, 우측 패널은 웨스턴 블라팅 결과를 나타낸다.

도 3B는 본 발명의 일실시예로, N-당화 돌연변이형 VEGF₁₂₁(N75Q)가 pre 신호서열(서열번호 1) 또는 prepro 신호서열(서열번호 2) 하에서 분비되는 정도를 배양 시간에 따라 보여주는 웨스턴 블라팅 결과이다. 상단 패널은 상청액을, 하단 패널은 세포 추출물을 나타낸다.

도 3C는 본 발명의 일실시예로, 야생형 VEGF₁₆₅ 및 N-당화 돌연변이형 VEGF₁₆₅(N75Q)가 pre(서열번호 1) 또는 prepro 신호서열(서열번호 2) 하에서 분비되는 정도를 보여주는 결과이다. 좌측 상단 패널은 상청액을 SDS-PAGE로, 우측 상단 패널은 상청액을 웨스턴 블라팅으로, 우측 하단 패널은 세포 추출물을 웨스턴 블라팅으로 분석한 결과이다.

도 4A는 본 발명의 일실시예로, VEGF와 pre(서열번호 1) 또는 prepro 신호서열(서열번호 2)을 결합시킨 야생형 및 pro 펩타이드의 다양한 돌연변이형을 보여주는 모식도이다.

도 4B는 본 발명의 일실시예로, pro 펩타이드의 다양한 돌연변이형이 야생형 VEGF₁₆₅ 및 N-당화 돌연변이형 VEGF₁₆₅(N75Q)에 미치는 영향을 보여주는 웨스턴 블라팅 결과이다. 좌측 상단 패널은 야생형 VEGF₁₆₅의 상청액, 좌측 하단 패널은 야생형 VEGF₁₆₅의 세포 추출물, 우측 상단 패널은 N-당화 돌연변이형 VEGF₁₆₅(N75Q)의 상청액, 우측 하단 패널은 N-당화 돌연변이형 VEGF₁₆₅(N75Q)의 세포 추출물을 나타낸다.

도 4C는 본 발명의 일실시예로, pro 펩타이드의 다양한 돌연변이형이 야생형 VEGF₁₂₁ 및 N-당화 돌연변이형 VEGF₁₂₁(N75Q)에 미치는 영향을 보여주는 웨스턴 블라팅 결과이다. 좌측 상단 패널은 야생형 VEGF₁₂₁의 상청액,

좌측 하단 패널은 야생형 VEGF₁₂₁의 세포 추출물, 우측 상단 패널은 N-당화 돌연변이형 VEGF₁₂₁(N75Q)의 상청액, 좌측 하단 패널은 N-당화 돌연변이형 VEGF₁₂₁(N75Q)의 세포 추출물을 나타낸다.

도 5A는 다양한 N-당화 돌연변이형 VEGF₁₂₁이 pre(서열번호 1) 또는 prepro 신호서열(서열번호 2) 하에서 분비되는 정도를 보여주는 웨스턴 블라팅 결과이다. 우측 상단 패널은 pre 신호서열(서열번호 1) 하에서 상청액을, 우측 하단 패널은 pre 신호서열(서열번호 1) 하에서 세포 추출물을, 좌측 상단 패널은 prepro 신호서열(서열번호 2) 하에서 상청액을, 좌측 하단 패널은 prepro 신호서열(서열번호 2) 하에서 세포추출물을 나타낸다.

도 5B는 다양한 N-당화 돌연변이형 VEGF₁₆₅가 pre 또는 prepro 신호서열(서열번호 2) 하에서 분비되는 정도를 보여주는 웨스턴 블라팅 결과이다. 우측 상단 패널은 pre 신호서열(서열번호 1) 하에서 상청액을, 우측 하단 패널은 pre 신호서열(서열번호 1) 하에서 세포 추출물을, 좌측 상단 패널은 prepro 신호서열(서열번호 2) 하에서 상청액을, 좌측 하단 패널은 prepro 신호서열(서열번호 2) 하에서 세포추출물을 나타낸다.

도 6은 *S.cerevisiae*에 Pep4, Prb1을 형질전환한 경우 VEGF의 분비에 미치는 효과를 보여주는 웨스턴 블라팅 결과이다. 상단 패널은 상청액을, 하단 패널을 세포 추출물을 나타낸다.

도 7은 야생형과 돌연변이형 VEGF 단백질의 효모에서의 분비량을 도시한 그래프이다.

도 8은 효모에서 생산된 야생형과 돌연변이형 VEGF 단백질이 VEGF의 생물학적 활성을 유지하는지 관찰한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명은 효모를 이용한 인간 비당화 혈관내피세포성장인자(VEGF) 생산방법에 관한 것으로, 상세하게는 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF) 유전자를 효모에서 작용하는 조절 서열에 작동가능하도록 연결시켜 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계, 상기 재조합 발현 벡터로 효모 숙주세포를 형질 전환하는 단계, 상기 형질 전환된 효모 숙주세포를 배양하는 단계, 상기 배양물로부터 목적 단백질을 분리 정제하는 단계로 구성되는 단백질 제조방법에 있어서, 상기 벡터는 효모 접합인자(MF- α) 신호 서열을 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 인간 비당화 혈관내피세포성장인자(VEGF) 생산방법에 관한 것이다.

[0022] 효모접합인자(MF- α)의 분비신호 서열은 pre 부분(19 아미노산)과 pro 부분(64개 아미노산)으로 구성되어 있고, 이 중 pro 부분은 3개의 N-연관된 당화 부위를 가지고 있다. 효모접합인자(MF- α)의 분비신호 서열은 효모에서 재조합 단백질의 분비 신호로 널리 사용되어 왔으며, *S.cerevisiae*에서 인간 재조합 VEGF₁₂₁의 분비에 있어서 인간 VEGF 자체 신호 서열에 비하여 10배 이상 더 효과적인 것으로 보고된 바 있다(Kondo et al., 1995).

[0023] 본 발명자들은 *S.cerevisiae*에서 인간 VEGF를 발현시키기 위하여 VEGF₁₂₁과 VEGF₁₆₅ 유전자를 효모접합인자(MF- α) pre 신호서열(서열번호 1) 또는 prepro 신호서열(서열번호 2)과 함께, 2 μ -베이스 벡터(2 μ -basted vectro)의 GAL 프로모터 10의 하부에 위치하도록 재조합하였고(도 1A 참조), 상기 재조합 벡터를 액포 프로테아제 유전자인 *PEP4*와 *PRB1*이 돌연변이된 *S.cerevisiae* 2805로 형질전환하였다.

표 1

Name	Sequence
VEGF ₁₂₁ DNA	5 ' ATG AAC TTT CTG CTG TCT TGG GTG CAT TGG AGC CTT GCC TTG CTG CTC TAC CTC CAC CAT GCC AAG TGG TCC CAG GCT GCA CCC ATG GCA GAA GGA GGA GGG CAG AAT CAT CAC GAA GTG GTG AAG TTC ATG GAT GTC TAT CAG CGC AGC TAC TGC CAT CCA ATC GAG ACC CTG GTG GAC ATC TTC CAG GAG TAC CCT GAT GAG ATC GAG TAC ATC TTC AAG CCA TCC TGT GTG CCC CTG ATG CGA TGC GGG GGC TGC TGC AAT GAC GAG GGC CTG GAG TGT GTG CCC ACT GAG GAG TCC AAC ATC ACC ATG CAG ATT ATG CGG ATC AAA CCT CAC CAA GGC CAG CAC ATA GGA GAG ATG AGC TTC CTA CAG CAC AAC AAA TGT GAA TGC AGA CCA AAG AAA GAT AGA GCA AGA CAA GAA AAA TGT GAC AAG CCG AGG CGG TGA 3'
VEGF ₁₂₁ PEPTIDE	(MNFLLSVVHWSLALLYLHHAKWSQA)APMAEGGGQNHHEVVVKFMDVYQSYCHPIETLVDFIQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHI GEMSFLQHNCCECRPKKDRARQEKCCKPRR

VEGF ₁₆₅ DNA	5 ' ATG AAC TTT CTG CTG TCT TGG GTG CAT TGG AGC CTT GCC TTG CTG CTC TAC CTC CAC CAT GCC AAG TGG TCC CAG GCT GCA CCC ATG GCA GAA GGA GGA GGG CAG AAT CAT CAC GAA GTG GTG AAG TTC ATG GAT GTC TAT CAG CGC AGC TAC TGC CAT CCA ATC GAG ACC CTG GTG GAC ATC TTC CAG GAG TAC CCT GAT GAG ATC GAG TAC ATC TTC AAG CCA TCC TGT GTG CCC CTG ATG CGA TGC GGG GGC TGC TGC AAT GAC GAG GGC CTG GAG TGT GTG CCC ACT GAG GAG TCC AAC ATC ACC ATG CAG ATT ATG CGG ATC AAA CCT CAC CAA GGC CAG CAC ATA GGA GAG ATG AGC TTC CTA CAG CAG AAC AAA TGT GAA TGC AGA CCA AAG AAA GAT AGA GCA AGA CAA GAA AAT CCC TGT GGG CCT TGC TCA CAG CGG AGA AAG CAT TTG TTT GTA CAA GAT CCG CAG ACG TGT AAA TGT TCC TGC AAA AAC ACA GAC TCG CGT TGC AAG GCG AGG CAG CTT GAG TTA AAC GAA CGT ACT TGC AGA TGT GAC AAG CCG AGG CGG TGA 3'
VEGF ₁₆₅ PEPTIDE	(MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQA)APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDE GLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHI GEMSFLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKSCSKNTDSRCKARQLELNER TCRCDKPRR

- [0025] 본 발명자들이 *S. cerevisiae*에서 발현된 재조합 VEGF₁₂₁의 크기를 측정한 결과 약 19kDa으로 나타났는데(도 1A), 이는 대장균에서 발현된 VEGF₁₂₁(16 kDa)보다 더 큰 분자량이다. 19 kDa 단백질 외에도, 본 발명자들은 배지 상청액(supernatant)에서 더 작은 분자량의 단백질(약 17kDa)도 발견하였으며, 이는 VEGF₁₂₁의 분해된 형태로 예상된다.
- [0026] *S. cerevisiae*에서 분비된 재조합 단백질은 세포에 결합되어 있거나 세포 외부에 존재하는 프로테아제에 의해 pH 의존적으로 분해된다는 보고가 있다. 또한, 상기 프로테아제들은 배양 배지의 산도에 의해 활성이 증가된다고 알려져 있다. 따라서 본 발명자들은 VEGF 역시 분비 과정 내지는 분비 후 pH 의존적으로 프로테아제에 의하여 분해되는지 조사하였다. VEGF₁₂₁ 발현 세포를 YPDG에서 배양하였을 때, 작은 분자량의 VEGF₁₂₁(약 17kDa, Truncated form)과 온전한 VEGF₁₂₁(약 19kDa, Intact form)이 동일한 정도로 관찰되었으나, pH 5.5인 BYPDG 배지에서 배양하였을 때 작은 분자량의 VEGF₁₂₁은 거의 관찰되지 않았다. 비록 VEGF의 N-말단 부위를 인식하는 단일클론 항체로 확인되지는 않았으나, 본 발명자들은 작은 분자량의 단백질은 VEGF 항체와 반응할 수 있는 에피토프(epitope)가 결여된 VEGF₁₂₁의 분해된 형태일 것으로 판단하였다. 본 발명자들은 *S. cerevisiae* 배양시 인산염 칼륨 버퍼(potassium phosphate buffer)가 포함된 pH 5.5의 BYPDG 배지를 사용함으로써, VEGF의 단백질 분해를 방지할 수 있었다.
- [0027] 본 발명자들은 발현된 VEGF₁₂₁을 당단백질이라고 판단하여, 엔도글리코시다아제 H(Endo H)로 처리해 본 결과, 약 3 kDa 정도 크기가 감소됨을 관찰할 수 있었다(도 1C). 이는 효소에서 분비된 VEGF₁₂₁은 75번째 아미노산 위치에 코어(core) 형태의 N-당화 올리고당이 결합된다는 것을 의미한다.
- [0028] 또한, 본 발명자들은 VEGF₁₂₁이 높은 수용체 결합 친화도와 생물학적 활성을 갖는 이량체로 존재한다는 점에 근거하여, *S. cerevisiae*에서 분비된 VEGF₁₂₁도 이량체로 존재하는지 실험해 본 결과, 2-머캅토에탄올(2-mercaptoethanol) 처리 유무에 따라 분자량이 약 2배 차이가 남을 확인할 수 있었고, 이로써 *S. cerevisiae*에서 분비된 VEGF₁₂₁도 이량체로 존재함을 확인할 수 있었다(도 1D 참조).
- [0029] *S. cerevisiae*에서 재조합 단백질의 분비를 유도하기 위하여 일반적으로 단백질 자체의 분비 신호 서열을 이용하거나 효모접합인자(MF- α)의 prepro 부위를 이용한다. 이 경우 효모접합인자(MF- α)의 prepro 부위가 VEGF 자체 신호서열보다 *S. cerevisiae*에서 VEGF의 분비에 더 나은 효과를 발휘한다는 사실은 이미 잘 알려져 있다. 그러나, 본 발명자들은 VEGF 분비에 있어서 더 효과적인 신호서열이 있을 수 있다고 판단하고, 효모접합인자(MF- α) 분비신호서열의 pre 부위와 prepro 부위가 인간 VEGF의 분비에 미치는 영향을 비교해 보기로 하였다. 그 결과 본 발명자들은 pre 부위가 prepro 부위에 비하여 VEGF의 분비에 훨씬 효과적임을 확인할 수 있었다(도 2A 및 도 3C 참조). 이 경우 배양 배지 내 VEGF₁₂₁의 양은 약 40mg/L에 달하였다. 한편, prepro 신호서열(서열번호 2)은 N-당화된 VEGF₁₂₁과 비당화된 VEGF₁₂₁의 분비를 모두 유도하는 것으로 관찰되었다(도 2B 참조).
- [0030] 이들 결과들을 통하여 본 발명자들은 pro 펩타이드가 소포체 내에서 N-연관된 올리고당이 VEGF₁₂₁에 결합하는 것을 저해함으로써 VEGF₁₂₁의 분비량을 감소시키는 것으로 해석하였다.
- [0031] 나아가 본 발명자들은 pre와 prepro 부위가 VEGF₁₂₁의 분비 효율에 미치는 영향을 좀 더 명확히 판단하기 위하여, 세포내 및 세포외의 VEGF₁₂₁ 양을 측정하였다. 그 결과, 본 발명자들은 VEGF₁₂₁ 분비가 pre 신호서열(서

열번호 1)에 의해 유도되었을 때 VEGF₁₂₁은 세포 내에 거의 축적되지 않았으며, 세포외의 VEGF₁₂₁ 양은 배양 시간에 따라 점진적으로 증가함을 확인하였다(도 2B 우측 패널). 그러나 이와 대조적으로, VEGF₁₂₁ 분비가 prepro 신호서열(서열번호 2)에 의해 유도되었을 때에는, 상당량이 비당화 또는 절단된 형태의 VEGF₁₂₁로 세포내에 존재하는 것을 확인할 수 있었다(도 2B 좌측 패널).

[0032] 한편, 본 발명자들은 절단된 형태의 VEGF₁₂₁은 비당화된 VEGF₁₂₁에서 유래된다고 판단하였는데, 이는 야생형 VEGF₁₂₁과 비당화되도록 유도된 돌연변이형 VEGF₁₂₁ 모두 절단된 단백질의 크기가 동일하기 때문이었다(도 2B 및 도 3B 참조). 또한, pro-VEGF는 VEGF 자체의 분자량에 비하여 약 14kDa 더 큰 분자량을 가진다는 점을 고려할 때, 세포내에 갇혀진 비당화된 VEGF₁₂₁와 절단된 형태의 VEGF₁₂₁ 모두 pro 펩타이드는 포함하고 있지 않은 것으로 판단하였다(도 2B 및 도 3C 참조).

[0033] 상기 결과를 근거로 본 발명자들은 야생형 VEGF는 prepro 신호서열(서열번호 2)에 의해 골지체로 이동하여 Kex2 프로테아제에 의해 pro 펩타이드가 정상적으로 제거되는 것으로 해석할 수 있었고, 따라서 축적된 형태의 VEGF 단백질들은 분비 과정에서 후-골지(post-golgi compartment)에 잔존하는 것으로 예상하였다. 따라서 본 발명자들은 pro 펩타이드가 VEGF₁₂₁의 N-당화를 방해하고, 그 결과 비당화된 VEGF₁₂₁이 세포내에 축적됨으로써 VEGF₁₂₁의 분비효율의 감소와 후-골지(post-golgi compartment)에서의 단백질 분해를 야기하는 것으로 해석하였다.

[0034] 일반적으로 효모에서 생산된 당단백질은 과도하게 만노오스화(hyper-mannosylated) 되어 있기 때문에 인간에게 다양한 면역반응을 초래하고, 따라서 효모에서 생산된 당단백질을 인간에게 투여하는 것이 적절하지 않은 것으로 알려져 있다. 한편, 인간 VEGF는 75번 아미노산이 N-당화된 당단백질이지만, 대장균에서 발현된 비당화된 VEGF는 당화된 형태와 흡사한 내피세포 분열촉진물질로써의 활성을 가지고 있다.

[0035] 상기 결과에 기초하여 본 발명자들은 효모에서 비당화된 VEGF를 생산한다면 인간에게 면역반응을 일으키지 않고 여러 질병의 치료 등 다양한 목적으로 활용될 수 있다는 생각에 기인하여, VEGF의 당화 부위인 아스파라긴을 글루타민으로 치환(N75Q)하여 N-당화 부위를 제거한 후, 효모접합인자(MF-α) pre 신호서열(서열번호 1) 또는 prepro 신호서열(서열번호 2)을 이용하여 분비하였다. 그 결과, 당화 부위의 돌연변이(N75Q)는 VEGF의 분비를 완전히 차단하거나 상당한 수준으로 감소시켰는데(도 3 참조), 이를 통하여 본 발명자들은 N-당화가 효모에서 인간의 재조합 VEGF의 분비에 중요한 역할을 행하고 있음을 다시 한 번 확인할 수 있었다.

[0036] 또한, 본 발명자들은 비당화 돌연변이형인 VEGF₁₆₅(N75Q)는 pre 신호서열(서열번호 1)에 의하여 전혀 분비되지 않았으나, prepro 신호서열(서열번호 2)에 의해서는 일부 분비됨을 확인할 수 있었다(도 3C 참조). 이러한 결과에 대해 본 발명자들은 비록 VEGF₁₆₅ 일부는 pro-VEGF₁₆₅(N75Q)의 형태로 세포 내부에 잔존하고 있으나(도 3C 하 살표), pro 펩타이드가 비당화된 VEGF₁₆₅(N75Q)의 분비에 긍정적인 효과를 발휘하는 것으로 해석하였다. 이와 같은 결과를 근거로 본 발명자들은 N-당화가 VEGF₁₆₅의 올바른 접힘(folding)과 분비에 중요하고(도 5B 참조), 세 개의 N-당화 사이트를 갖는 pro 펩타이드는 소포체에서 VEGF₁₆₅(N75Q)의 올바른 접힘에 보다 적합한 구조를 제공함으로써 비당화 VEGF₁₆₅(N75Q)의 골지체로의 이동을 가능케 하는 것으로 판단하였다.

[0037] 이에 본 발명자들은 효모접합인자(MF α)의 pro 펩타이드 상에 3개의 N-당화가 비당화된 VEGF의 분비에 긍정적인 영향을 미칠 것이라고 판단하고, 이를 직접적으로 확인하기 위하여, pro 펩타이드 상의 3개의 N-당화 부위중 어느 하나가 결여된 돌연변이형을 제작하였다. 즉, pro 펩타이드는 23번 아미노산, 57번 아미노산, 67번 아미노산에 각각 N-당화 가능한 아스파라긴을 가지고 있는데, 이를 각각 글루타민으로 변형한 돌연변이형 N1, N2, N3를 제작하였다. 또한, 3개의 N-당화 부위가 모두 결여된 돌연변이형 N123도 제작하였다(도 4A 참조). 도 4B에서 볼 수 있는 바와 같이, N1, N2, N3 돌연변이형은 비록 VEGF₁₆₅가 당화되었는지 여부에 따라 그 분비를 저해하는 정도에서는 다소 차이를 보였으나, 비당화된 경우는 물론 당화된 경우까지 모두 VEGF₁₆₅의 분비량을 감소시켰다. 한편, N123 돌연변이형은 VEGF₁₆₅의 분비를 완벽하게 억제함으로써, pro-VEGF가 세포내에 축적되도록 하였다. 상기 결과와 같은 결과는 pro 펩타이드 상에 존재하는 세 개의 N-당화가 VEGF₁₆₅의 당화 여부와는 관계없이 prepro 신호서열(서열번호 2)에 의해 VEGF₁₆₅가 분비되는 것에 매우 중요하다는 것을 보여준다.

[0038] 다음으로 본 발명자들은 VEGF₁₂₁의 분비에 있어서 pro 펩타이드의 N-당화 돌연변이형이 미치는 영향에 대해 관찰

하였다. VEGF₁₂₁은 prepro 신호서열(서열번호 2)에서보다 pre 신호서열(서열번호 1)에서 더 많은 분비 효율을 나타내는바, 본 발명자들은 VEGF₁₂₁의 분비에 있어 pro 펩타이드의 N-당화 돌연변이가 미치는 영향은 거의 없거나 혹은 증가시키는 것으로 예상하였다. 그러나 예상과 달리 N1, N2, N3 돌연변이형은 모두 야생형 VEGF₁₂₁ 및 N-당화 돌연변이형 VEGF₁₂₁(N75Q)의 분비를 감소시켰고, 이 중에서도 N1 돌연변이형은 VEGF₁₂₁의 분비를 N2, N3에 비하여 더욱 효과적으로 감소시켰으며, N123은 VEGF₁₂₁의 분비를 완벽히 차단하였다(도 4C 참조). 상기와 같은 결과는 pro 펩타이드의 N-당화가 VEGF₁₂₁의 분비에서도 중요한 역할을 하고, 특히 아미노산 23번의 N-당화가 중요하다는 것을 시사한다. N123 돌연변이형은 pro-VEGF₁₂₁의 세포내 축적을 유도하는데, 이는 VEGF₁₂₁이 소포체에서 골지체로 전달되는 과정이 적절히 일어나지 않았음을 나타낸다. 한편, 비록 pro-VEGF₁₂₁이 세포 내에서 관찰되지는 않았으나, N1, N2, N3 돌연변이형도 각각 VEGF₁₂₁의 분비를 감소시키는 것으로 나타났다.

[0039] 상기한 결과들을 통하여 본 발명자들은 pro 펩타이드의 N-당화는 pro-VEGF가 효모에서 분비되는 과정에서 접합, 안정성, 효율적인 이송 과정에 중요한 역할을 수행한다고 판단하였고, 또한, 효모접합인자(MF α)의 pro 펩타이드는 재조합 단백질의 분비에 있어 표적 단백질의 구조적 특징에 따라 긍정적인 방식 또는 부정적인 방식으로 모두 기여할 수 있다고 결론지었다.

[0040] N-연관된 올리고당이 당단백질의 접합, 형태, 안정성 및 기능과 연관되어 있음은 이미 잘 알려진 바이다. 따라서 비당화된 VEGF(N75Q)의 분비량이 낮은 이유가 N-연관된 글리칸의 부재로 인하여 VEGF의 접합 속도가 느려지거나 불안정한 형태로부터 기인한 것일 수 있다. 이를 근거로 본 발명자들은, VEGF의 N-당화 부위에 위치하는 아미노산의 화학적 물리적 특성을 변화시키면, 비당화 VEGF의 결함을 억제하고 비당화 VEGF의 분비를 증가시킬 수 있다고 생각하였다. 이러한 가능성을 실험하기 위하여 본 발명자들은 VEGF의 N-당화 부위를 글루타민 이외의 아미노산으로 치환하여 비당화 VEGF의 분비효율이 증가하는지 여부를 확인하였다. 그 결과 본 발명자들은 pre 신호서열(서열번호 1) 하에서는 글루타민, 글루탐산이, prepro 신호서열(서열번호 2) 하에서는 글루타민, 글루탐산, 히스티딘, 라이신이 각각 VEGF₁₂₁의 분비에 긍정적인 효과를 발휘함을 확인하였다(도 5A 참조). 또한 라이신은 prepro 신호서열(서열번호 2)에 의한 VEGF₁₆₅의 분비를 증가시켰다(도 5B 참조). 본 발명자들은 상기 결과가 아마도 N-연관된 글리칸의 부재로 야기되는 결함을 상기 치환된 아미노산이 가진 특성들이 보상함으로써 비당화된 VEGF의 분비 효율을 증가시키는 것으로 해석하였다.

[0041] 마지막으로, 본 발명자들은 대부분의 비당화된 VEGF가 세포 내부에 축적되는 장소에 대해 의문이 들었다. 이는 분비 과정 중 비당화된 VEGF의 위치를 파악한다면 효모에서 비당화된 VEGF의 양을 증가할 수 있는 방안을 강구할 수 있기 때문이다.

[0042] 세포 내에 존재하는 비당화 또는 절단된 VEGF₁₂₁은 pro 부분을 포함하고 있지 않다는 점에 착안하여, 본 발명자들은 VEGF 단백질은 골지체에서 Kex2에 의해 pro 펩타이드가 절단된 후, 액포(vacuole)와 같은 후-골지(post golgi organelle)에 갇혀 있을 것으로 예상하였다. VEGF가 이러한 액포(vacuole)에 위치하는지 조사하기 위하여 본 발명자들은 *PEP4* 및 *PRB1* 유전자를 액포(vacuole)에 위치하는 프로테아제인 Pep4와 Prb1이 결여된 효모 숙주세포(*S. cerevisiae* 2805)에 도입하였다.

[0043] 상기 프로테아제들은 액포(vacuole) 내에서 액포 가수분해효소의 성숙과 활성화, 대부분의 액포 프로테아제의 활성화 및 세포 내부에 축적된 단백질의 분해에 필요한 것으로 알려져 있다. 그러므로, 축적된 VEGF 단백질들이 Pep4와 Prb1이 발현된 숙주세포 내에서 사라진다면, 이는 VEGF 단백질이 액포로 이동하고 그곳에서 액포 프로테아제에 의해 분해된다는 것을 암시한다.

[0044] 도 6에 도시된 바와 같이, 대부분의 세포 내에 존재하는 VEGF₁₂₁은 Pep4+Prb1+ 숙주세포에서 사라졌으며, VEGF₁₂₁의 분비 또한 상당히 감소되었다. 따라서, 본 발명자들은 효모에서 발현된 재조합 VEGF₁₂₁ 단백질은 (특히 효모접합인자(MF- α)) prepro 신호서열을 이용하여 분비할 때) 분비과정에서 상당부분 액포에 축적되는 것으로 예상할 수 있었다.

[0045] <실시예 1>

[0046] 효모에서 발현 가능한 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF)을 포함하는 재조합 발현 벡터 제조

[0047] 본 발명자들은 효모에서 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 생산하기 위하여, 인간 혈관내피세포성장인자

(VEGF) 유전자를 효모에서 발현할 수 있도록 발현 벡터에 도입시켜 재조합 발현벡터를 제조하였다. 도 1A에 도시된 바와 같이, 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF) 본래의 26개의 아미노산 신호서열은 효모 접합인자(MF- α) 신호 서열로 대체하였고, 변형된 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF)유전자는 2u-베이스 플라스미드(2u-based plasmid) 상에 GAL10 프로모터로 통제 가능하도록 재조합하였다.

[0048] 즉, 효모 접합 인자(MF- α)의 pre 신호서열(서열번호 1)과 prepro 신호서열(서열번호 2)이 인간 VEGF₁₂₁과 VEGF₁₆₅의 분비 효율에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 본 발명자들은 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF) 자체의 신호 서열(26개 아미노산)이 제거된 각각의 VEGF 유전자를 중합연쇄반응(PCR)을 통하여 증폭하였다. 이 경우, pET-VEGF₁₂₁과 pET-VEGF₁₆₅로부터 pre 신호서열(서열번호 1)과 조합시키기 위한 프라이머로 VEGF-PF와 VEGF-C를 사용하고, prepro 신호서열(서열번호 2)와 조합시키기 위한 프라이머로 VEGF-N과 VEGF-C를 사용하였다. VEGF 유전자는 pYGLP-TxR(*GAL10p-MF a prepro-GAL7t-URA3*) 벡터로부터 증폭된 pre 신호서열(서열번호 1)과 프라이머 Pre-F(E)와 VEGF-C를 이용한 중합연쇄반응(PCR)에 의하여 연결시켰다. 상기 중합연쇄반응 결과물은 pYGLP-TxR을 제한효소 EcoR I /Sal I 으로 절단한 후 삽입함으로써, pre-VEGF₁₂₁과 pre-VEGF₁₆₅를 발현할 수 있는 재조합 발현 벡터인 pYEV121과 pYEV165를 각각 제조하였다. 한편, prepro 신호서열(서열번호 2)과 조합된 VEGF(prepro-VEGF₁₂₁, prepro-VEGF₁₆₅)를 발현시키기 위해 상기 유전자를 pYGLP-TxR의 Xba I /Sal I 에 의해 삽입시켜 pYEOV121과 pYEOV165도 제조하였다. 클로닝(clonning)을 위해 사용되는 *E. coli* 균주는 DH5a로, DH5a 는 암피실린(Ampicillin, 100ug/ml)이 첨가된 LB(1% 펩톤, 0.5% 이스트 추출물, 0.5% 염화나트륨)배지를 사용하여 37℃에서 배양하였다.

[0049] <실시예 2>

[0050] 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF)의 효모에서의 발현 및 배지 산도에 따른 분해 정도 분석

[0051] 본 발명자들은 상기 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF) 재조합 발현 벡터를 효모에서 발현시키기 위하여 상기 재조합 발현 벡터를 효모 숙주세포로 형질 전환하여 배양하였다. 사용된 효모 숙주세포는 액포 프로테아제(vacuolar protease) 유전자인 *PEP4*와 *PRB1*이 돌연변이된 *S. cerevisiae* 2805 (*MATa pep4::HIS3 prb-Δ1.6R can1 his3-20 ura3-52*)를 사용하였다. 각각의 효모 세포들은 YEPD [1% 이스트 추출물(yeast extract), 2% 박토 펩톤(Bacto0pepton), 2% 포도당(glucose)] 또는 SC-URA[0.67% 아미노산 비함유 이스트 나이트로젠 베이스(Difco, USA), 2% 포도당(glucose), 우라실 결여된 드랍 아웃 아미노산 혼합물(drop-out amino acid mixture lacking uracil)]에서 배양하였고, GAL 프로모터로부터 VEGF를 발현할 때에는 YPDG[1% 이스트 추출물, 2% 펩톤, 2% 텍스트로스, 2% 갈락토오스] 배지에서 배양하였다. 또한, 배양 중 배지 내 산도의 영향을 억제시키기 위하여 칼륨 인산염 버퍼(Potassium phosphate buffer)를 포함하는 BYPDG 배지를 사용하였다.

[0052] 본 발명자들은 배양 배지로 분비된 VEGF를 분석하기 위하여 배지 부유액을 15% SDS-PAGE로 분석하였다. 또한, 세포 추출물로부터 VEGF를 분석하기 위하여, 세포를 원심분리기로 수집하고 이를 20% TCA로 풀어준 후 글래스 비드(glass bead)를 이용하여 용해하였다. 단백질을 침전물은 원심분리 후 100% 에탄올에 씻어주고, 2X SDS-PAGE 로딩 버퍼로 풀어준 후 95℃에서 5분간 가열하였다. 원심분리 후 상청액을 15% SDS-PAGE로 전기영동 시키고, 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie Brilliant Blue) R-250을 이용하여 염색하였다. 웨스턴 블라팅은 상기 전기영동한 젤(gel)을 PVDF 멤브레인(Millipore)으로 소형 전기영동 이전 키트(mini electrophoretic transfer kit, Bio-rad)를 이용하여 이전시킨 후, 마우스 항-VEGF 단일항체(Ab-3, Oncogene research products)를 1차 항체로 사용하고, HRP 결합된 항-마우스 Ig-G 항체를 2차 항체로 사용하여 확인하였다.

[0053] 배지의 pH에 따른 분비된 VEGF₁₂₁의 분해 정도를 관찰하기 위하여 YPDG와 BYPDG 배지(pH 5.5)에서 효모를 배양한 후, 상청액을 SDS-PAGE와 웨스턴 블라팅으로 확인한 결과(도 1B 참조), 본 발명자들은 인산 칼륨 버퍼를 포함하는 pH 5.5의 BYPDG 배지에서 VEGF₁₂₁의 분해가 현저히 억제됨을 확인할 수 있었다.

[0054] 나아가 본 발명자들은 인간 VEGF가 효모에서 발현되어 이합체로 존재하는 것을 확인하였으며, 이는 VEGF₁₂₁에 환원제(2-Mercaptoethanol)를 처리함에 따라 단량체가 되는 것을 상기 기재된 것과 같은 방식으로 SDS-PAGE와 웨스턴 블라팅을 이용하여 보여주었다(도 1D 참조).

[0055] 또한, 본 발명자들은 당화된 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 비당화시키고자 2 ug의 엔도글리코시다아제H(Endo H)를 이용하여 100mM 초산 나트륨(sodium acetate, pH 4.9), 150 mM 염화나트륨(NaCl), 10mM 디티오프레itol(dithiothreitol), 1% Triton X-100, 저해제 혼합액(1 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드, 1mg/ml 캡스타틴,

1mg/ml 루페틴, 1mg/ml 아프로티닌)과 함께 50ug의 단백질을 37℃에서 16시간 동안 배양하였다. 이 후 상기 기재된 바와 같은 웨스턴 블라팅을 이용하여 확인해 본 결과, 본 발명자들은 분비된 VEGF₁₂₁의 비당화된 형태를 확인할 수 있었다(도 1C 참조).

[0056] <실시예 3>

[0057] 효모에서 인간 VEGF₁₂₁ 분비에 효모접합인자(MF-α) 신호 서열이 미치는 영향 분석

[0058] 본 발명자들은 pre-VEGF₁₂₁ 또는 prepro-VEGF₁₂₁을 발현하는 효모 균주를 BYPDG 배지에서 24시간 배양한 후에 2% 갈락토오스를 첨가하여 배양하였다. 3일 배양 후, 배양 상청액(30ul)을 SDS-PAGE로 전기영동한 결과 pre-VEGF₁₂₁의 경우 당화된 VEGF의 분비량은 pre 신호서열(서열번호 1)에서 prepro 신호서열(서열번호 2)보다 더 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다(도 2A, 도 3C 참조). 이 경우 pre 신호서열(서열번호 1)에서 분비된 VEGF₁₂₁은 약 40mg/L에 달하였으며, prepro 신호서열(서열번호 2)에서 분비된 VEGF는 당화된 VEGF₁₂₁ 뿐만 아니라 비당화된 VEGF₁₂₁도 포함하고 있었다(도 2B 참조).

[0059] 본 발명자들은 pre 신호서열(서열번호 1)과 prepro 신호서열(서열번호 2)이 VEGF₁₂₁의 분비율에 이와 같은 차이를 나타내는 원인을 파악하고자, 세포내 및 세포외의 VEGF₁₂₁ 양 배양 시간에 따라 조사하였다(도 2B 참조). 그 결과, VEGF₁₂₁는 pre 신호서열(서열번호 1)에 의할 때 세포 내에 거의 축적되지 않으며 배양 시간에 따라 세포 외의 VEGF₁₂₁이 점진적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 이와 대조적으로, VEGF₁₂₁은 prepro 신호서열(서열번호 2)에 의할 때, 비당화 또는 절단된 상태로 세포 내에 축적되는 것을 확인할 수 있었다.

[0060] <실시예 4>

[0061] 부위 특이적 돌연변이 유도

[0062] 본 발명자들은 다양한 비당화 혈관내피세포성장인자(VEGF) 돌연변이를 PCR을 기반한 부위 특이적 돌연변이 유도에 의해 제조하였다. 돌연변이 부위는 인간 VEGF 단백질의 분비신호서열인 26개의 아미노산이 절단된 후의 75번째 아미노산 서열인 아스파라긴으로 하였는데, 이를 위하여 우선 VEGF 유전자를 75번째 아스파라긴을 코딩하는 염기서열 부분을 경계로 하여 양쪽의 두 부분으로 나누어 증폭하였다. 이를 위해서 Pfu. DNA polymerase를 이용하여 95도에서 20초, 50도에서 10초, 72도에서 30초를 30회 반복 수행하였다. 증폭된 두 개의 PCR 산물들은 서로 상보적인 서열을 가지도록 하였으며, 이 부분은 아스파라긴을 코딩하는 서열이 각각의 다른 아미노산을 코딩하는 서열로 바뀐 부분을 포함하고 있다. 최종적으로 두 개의 PCR 산물들을 서로 상보적인 서열을 바탕으로 융합된 형태로 증폭하였으며, 이를 위해서 Taq. DNA polymerase를 이용하여 95도에서 20초, 50도에서 10초, 68도에서 1분을 30회 반복 수행하였다. 점 돌연변이 제조에 사용된 프라이머는 표 1에 도시되어 있다. 각각의 점 돌연변이 유전자는 pYGLP-TxR에 EcoR I /Sal I 으로 잘라 결합시키거나, Xba I /Sal I 으로 잘라 접합시켰다. 제조된 점 돌연변이 유전자는 DNA 염기서열 결정법(sequencing)으로 확인하였다

[0063] 또한, 본 발명자들은 효모 접합 인자(MF-α) prepro 신호서열(서열번호 2)의 pro 펩타이드 중 N-당화 부위로 알려진 아미노산 23번, 57번, 67번 아스파라긴을 표 1에 도시된 프라이머를 이용하여 상기한 부위 특이적 돌연변이 방법에 의해 글루타민으로 치환함으로써, 효모 접합 인자(MF-α) prepro 신호서열(서열번호 2)의 pro 펩타이드 N-당화를 제거하였다. 이 후 pYEOV121 및 pYEOV165 플라스미드 상의 prepro 신호서열(서열번호 2)을 Pst I/NcoI으로 잘라 상기 치환된 서열로 대체하였다.

[0064] <실시예 5>

[0065] 효모에서 VEGF의 효과적인 분비에 있어서 N-당화의 중요성

[0066] 본 발명자들은 효모에서 VEGF₁₂₁의 효율적인 분비를 위해 N-당화가 미치는 영향을 확인하기 위하여, 야생형 VEGF₁₂₁과 N-당화 돌연변이형인 VEGF₁₂₁(N75Q)가 효모접합인자(MF-α) pre 신호서열(서열번호 1)과 prepro 신호서열(서열번호 2) 하에서 분비되는 정도를 확인하였다. 효모 숙주세포는 BYPDG 배지에서 24시간 배양 후에 2% 갈락토오스를 첨가하여 배양하였다. 3일 후 상청액(30ul)을 SDS-PAGE(좌측 패널) 또는 웨스턴 블라팅(우측 패널)을 통해 확인하였다(도 3 A 참조). 그 결과 본 발명자들은 야생형 VEGF가 N-당화 돌연변이형인 VEGF₁₂₁(N75Q)에 비하여 그 분비량이 상당히 많다는 것을 확인할 수 있었다.

[0067] 나아가 본 발명자들은 N-당화 돌연변이형인 VEGF₁₂₁(N75Q)의 분비가 효모접합인자(MF α) pre 신호서열(서열번호 1) 또는 prepro 신호서열(서열번호 2)에 의해 유도되는 경향을 시간별로 확인하였다(도 3B 참조). 상청액(상단 패널)과 세포 추출물(하단 패널)을 웨스턴 블라팅으로 분석해 본 결과, pre 신호서열(서열번호 1)에 의한 경우, VEGF₁₂₁(N75Q)는 배양 시간에 따라 세포내 축적량은 증가하지 않았으나, 세포외 축적량은 점진적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 이와 대조적으로, prepro 신호서열(서열번호 2)에 의한 경우, 시간이 지남에 따라 비당화 또는 절단된 VEGF₁₂₁(N75Q)가 세포 내 축적됨을 확인할 수 있었다.

[0068] 또한, 본 발명자들은 야생형 VEGF₁₆₅와 N-당화 돌연변이형인 VEGF₁₆₅(N75Q)의 분비가 효모접합인자(MF α) pre 신호서열(서열번호 1) 또는 prepro 신호서열(서열번호 2)에 의해 유도되는 경향을 확인하였다(도 3C 참조). 상청액(상단패널)과 세포 추출물(하단 패널)을 SDS-PAGE(좌측 패널) 및 웨스턴 블라팅(우측 패널)으로 확인해 본 결과, pre 신호서열(서열번호 1)과 prepro 신호서열(서열번호 2) 모두에서 야생형 VEGF₁₆₅가 N-당화 돌연변이형인 VEGF₁₆₅(N75Q)에 비하여 그 분비량이 상당히 많다는 것을 확인하였다. 또한 본 발명자들은 비당화 돌연변이형인 VEGF₁₆₅(N75Q)는 pre 신호서열(서열번호 1)에 의하여 전혀 분비되지 않았으나, prepro 신호서열(서열번호 2)에 의해서는 일부 분비됨을 확인할 수 있었다(도 3C 참조).

[0069] <실시예 6>

[0070] 효모에서 야생형 및 N-당화 돌연변이형 VEGF(N75Q)의 분비와 pro 펩타이드 N-당화와의 관계

[0071] 본 발명자들은 VEGF와 결합된 prepro 신호서열(서열번호 2)의 N-당화가 VEGF의 분비에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 다양한 재조합 유전자를 제조하였다(도 4A 참조). 검정색 삼각형은 pro 펩타이드 상의 N-당화 부위로, pro 펩타이드에는 3개의 N-당화 부위가 있으며, N123은 3개의 N-당화 부위를 모두 N-당화가 일어나지 않도록 돌연변이시킨 것이고, N1은 1번 N-당화 부위, N2는 2번 N-당화 부위, N3은 3번 N-당화 부위를 돌연변이시킨 것이다.

[0072] 본 발명자들은 야생형 VEGF₁₆₅와 N-당화 돌연변이화 된 VEGF₁₆₅ 및 야생형 VEGF₁₂₁과 N-당화 돌연변이화 된 VEGF₁₂₁이 상기 다양하게 제조된 pro 펩타이드의 N-당화 돌연변이 신호서열에 의해 분비되는 정도를 관찰하였다. 즉, 상청액(상단 패널)과 세포 추출물(하단 패널)을 웨스턴 블라팅으로 분석해 본 결과, 본 발명자들은 pro 펩타이드의 N-당화가 VEGF₁₆₅ 및 VEGF₁₂₁의 분비에 매우 중요하다는 것을 확인할 수 있었다.

[0073] <실시예 7>

[0074] 효모에서 75번 아미노산의 부위 특이적 돌연변이가 비당화 VEGF의 분비에 미치는 영향

[0075] 본 발명자들은 효모에서 인간 VEGF의 75번 아미노산의 부위 특이적 돌연변이가 비당화 VEGF의 분비에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 효모 접합인자(MF-α)의 pre 신호서열(서열번호 1) 또는 prepro 신호서열(서열번호 2)에 의해 다양한 N-당화 돌연변이형 VEGF₁₂₁과 VEGF₁₆₅가 분비되는 정도를 확인하였다. 배지 상청액(상단 패널)과 세포 추출물(하단 패널)을 웨스턴 블라팅을 이용하여 분석하였다.

[0076] 본 발명자들은 VEGF₁₂₁의 경우 pre 신호서열(서열번호 1)과 관련하여 75번 아미노산을 글루탐산(pre-121N75E)으로 치환한 경우 비당화된 VEGF₁₂₁의 분비율이 증가하고, prepro 신호서열(서열번호 2)과 관련하여 75번 아미노산을 글루탐산, 히스티딘, 라이신으로 치환한 경우 비당화된 VEGF₁₂₁의 분비량이 증가함을 확인할 수 있었다(도 5A 참조).

[0077] 한편, VEGF₁₆₅의 경우에는 prepro 신호서열(서열번호 2)과 관련하여 75번 아미노산을 라이신(prepro-165N75K)으로 치환한 경우 비당화된 VEGF₁₆₅의 분비량이 증가함을 확인할 수 있었다(도 7 참조).

[0078] <실시예 8>

[0079] 효모에서 VEGF 분비에 미치는 액포 프로테아제의 영향

[0080] 본 발명자들은 효모에서 VEGF 분비에 액포 프로테아제가 미치는 영향을 확인하기 위하여, *S. cerevisiae* 2805(Pep4-prb1-) 숙주세포에 VEGF 발현 벡터와 Pep4/Prb1 발현 벡터(자체 프로모터와 터미네이터에 의해 조절

되는 *PEP4* 와 *PRB1* 유전자를 갖는 CEN 플라스미드)를 형질전환 시켰다. 상기 형질전환된 효모를 BYPDG 배지에서 24시간 배양 후 2% 갈라토오스와 첨가하여 3일 동안 배양하였다. 그 후 그 상청액(상단 패널)과 세포 추출물(하단 패널)을 웨스턴 블라팅에 의해 분석하였다.

[0081] 그 결과 본 발명자들은 Pep4와 Prb1이 발현된 효모에서 세포 내의 대부분의 VEGF₁₂₁이 사라지고, VEGF₁₂₁의 분비 또한 현저히 감소됨을 확인할 수 있었다.

[0082] 본 발명에 사용된 프라이머 서열은 하기와 같다.

표 2

[0083]

Primers	Sequence
VEGF-N	5' TCT AGA GCA CCC ATG GCA GAA GGA 3'
VEGF-C	5' ATG TCG ACT CAC CGC CTC GGC TTG TC 3'
Pre-F(E)	5' GAATTCATGAGATTTCCTTCAATT 3'
Pre-R	5' AGC TAA TGC GGA GGA TGC 3'
VEGF-PF	5' GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCA CCC ATG GCA GAA GGA 3'
VEGF-75Q-F	5' 'GTG CCC ACT GAG GAG TCC CAG ATC ACC ATG CAG ATTATG 3'
VEGF-75Q-R	5' CTG GGA CTC CTC AGT GGG CAC 3'
Pro-1N-R	5' CTGGACTGGAGCAGCTAA 3'
Pro-1N-F	5' GCTGCTCCAGTCCAGACTACAACAGAAGATGAAAC 3'
Pro-2N-R	5' CTGGGAAAATGGCAAAACAGC 3'
Pro-2N-F	5' GTTTTGCCATTTTCCCAGAGCACAAATAACGGG 3'
Pro-3N-R	5' CTGTATAAACAATAACCCGTT 3'
Pro-3N-F	5' GGGTTATTGTTTATACAGACTACTATTGCCAGC 3'
VEGF-75E-R	5' GGTGATTTTCGACTCCTCAGTGGGCACA 3'
VEGF-75E-F	5' GAGGAGTCCGAAATCACCATGCAGATTATGCGG 3'
VEGF-75K-R	5' GGTGATTTTGACTCCTCAGTGGGCACA 3'
VEGF-75K-F	5' GAGGAGTCCAAAATCACCATGCAGATTATGCGG 3'
VEGF-75H-R	5' GGTGATATGGGACTCCTCAGTGGGCACA 3'
VEGF-75H-F	5' GAGGAGTCCCATATCACCATGCAGATTATGCGG 3'
VEGF-75D-R	5' GGTGATATCGGACTCCTCAGTGGGCACA 3'
VEGF-75D-F	5' GAGGAGTCCGATATCACCATGCAGATTATGCGG 3'
VEGF-75L-R	5' GGTGATTAGGGACTCCTCAGTGGGCACA 3'
VEGF-75L-F	5' GAGGAGTCCCTAATCACCATGCAGATTATGCGG 3'
VEGF-75W-R	5' GGTGATCCAGGACTCCTCAGTGGGCACA 3'
VEGF-75W-F	5' GAGGAGTCTGGATCACCATGCAGATTATGCGG 3'
VEGF-75R-R	5' GGTGATACGGGACTCCTCAGTGGGCACA 3'
VEGF-75R-F	5' GAGGAGTCCCGTATCACCATGCAGATTATGCGG 3'
VEGF-75Y-R	5' GGTGATATAGGACTCCTCAGTGGGCACA 3'
VEGF-75Y-F	5' GAGGAGTCCTATATCACCATGCAGATTATGCGG 3'

[0084] 본 발명의 서열목록에 기재된 VEGF₁₂₁과 VEGF₁₆₅ 펩티드 서열(서열번호 5, 서열번호 6)은 분비신호서열(26개 아미노산)이 포함된 것으로, 본 발명에서는 인간 VEGF의 분비신호서열을 제거하고 MF- α 분비서열을 재조합한 것으로, 상기 본 발명에 대한 설명에서 기재된 75번 N-당화 부위는 서열번호 5(VEGF₁₂₁ 펩티드 서열)와 서열번호 6(VEGF₁₆₅ 펩티드 서열)에서는 101번째 아스파라긴을 의미한다. 한편, 서열번호 7과 서열번호 8은 각각 상기 서열번호 5와 서열번호 6의 VEGF₁₂₁과 VEGF₁₆₅ 펩티드를 인코딩하는 염기서열이다.

[0085] <실시예 9>

[0086] 효모에서 생산된 야생형 및 돌연변이형 VEGF의 생물학적 활성에 미치는 영향 분석

[0087] 본 발명자들은 본 발명에 의해 효모에서 생산된 야생형 및 돌연변이형 VEGF 단백질이 세포 내 성장인자로서의

생물학적 활성을 가지고 있는지 확인해 보고자 하였다.

[0088] 이를 위하여 본 발명에서 사용된 야생형 및 돌연변이형 VEGF를 니켈 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 55% 황산 암모늄을 함유한 무세포 배양 배지를 이용하여 침전시킨 단백질은 300mM NaCl을 포함하는 50mM 인산 나트륨 버퍼(pH 7.8)을 이용하여 4℃에서 투석한 후, HisTrap FF Ni-친화성 컬럼(GE Healthcare)를 이용하여 정제하였다. 이미다졸을 이용하여 단계 기울기에 따라 용리한 후, 정제된 단백질을 이미다졸을 제거하기 위하여 4℃에서 투석하였다.

[0089] 생물학적 활성은 세포 증식 실험을 통하여 분석하였다. 이를 위하여 MCF-7 세포를 96-웰 플레이트에 100 μ l의 배양배지(DMEM + 10% FBS, Invitrogen)에 2×10^4 의 농도로 희석하여 분배한 후, 다양한 농도의 정제된 야생형 및 돌연변이형 VEGF 또는 시판중인 인간 VEGF₁₂₁ 단백질(Biovision)을 처리하고 37℃에서 36h 동안 배양하였다. 세포 증식은 WST-1 세포 증식 분석 시스템(Takara)를 이용하여 3번 반복 측정하였다.

[0090] 그 결과, 도 8에서 볼 수 있듯이, 본 발명에서 사용한 야생형 및 돌연변이형 VEGF가 모두 농도 의존적으로 MCF-7 세포를 증식시키는 것으로 확인되었다. 특히, VEGF₁₆₅의 75번 아미노산을 글루탐산 또는 라이신으로 치환한 경우 VEGF의 생물학적 활성에 아무런 영향없이 효과적으로 비당화 VEGF가 분비량이 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

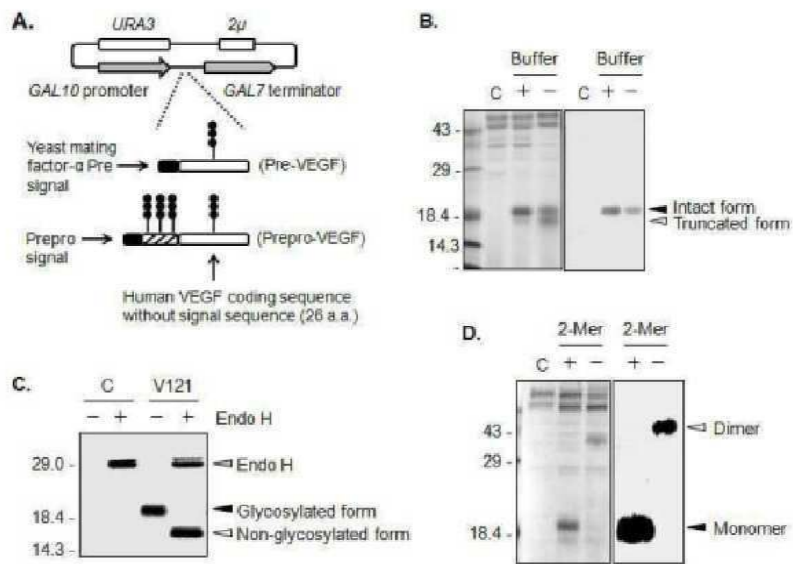
[0091] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

부호의 설명

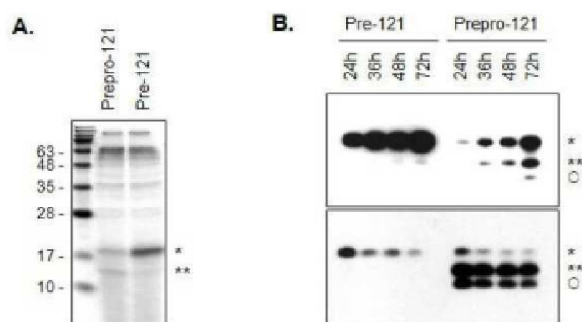
[0092] * : 당화된 VEGF
 **: 비당화된 VEGF
 ○: 절단된 VEGF
 ←: pro 펩타이드 결합된 VEGF
 VEGF₁₂₁ : VEGF의 N-말단의 26개의 분비서열이 절단되고, C-말단이 절단되어 121개의 아미노산으로 구성된 VEGF splice variant
 VEGF₁₆₅ : VEGF의 N-말단의 26개의 분비서열이 절단되고, C-말단이 절단되어 165개의 아미노산으로 구성된 VEGF splice variant

도면

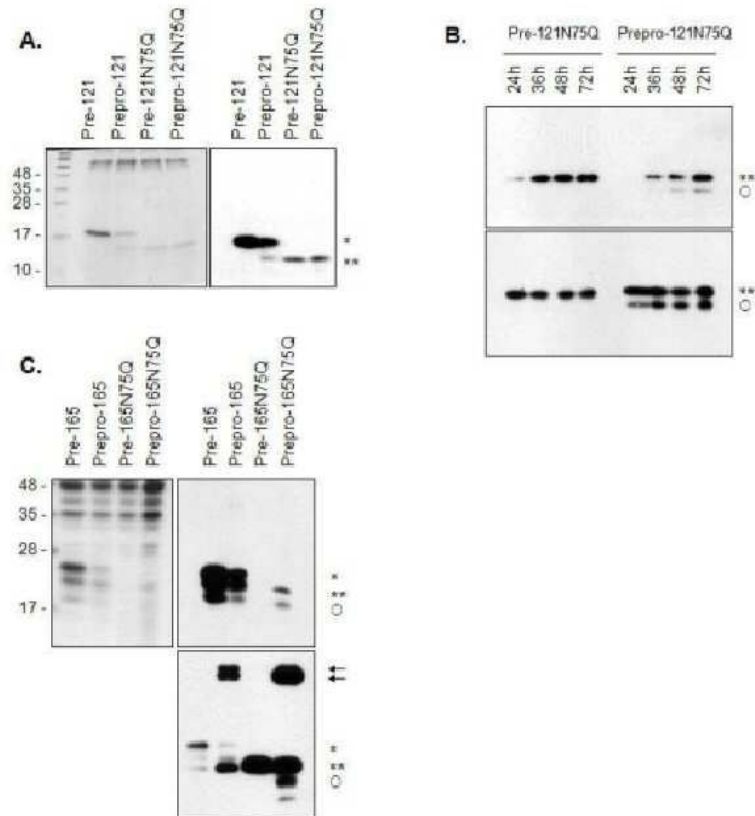
도면1



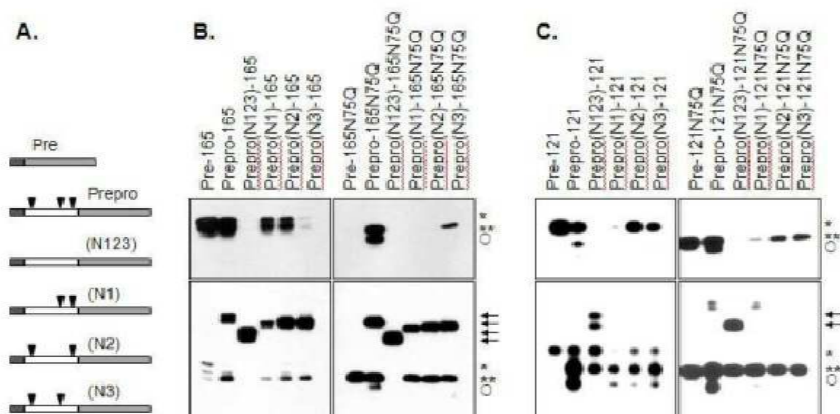
도면2



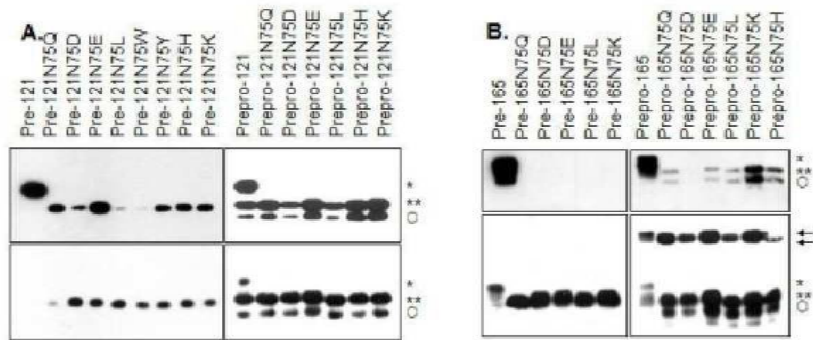
도면3



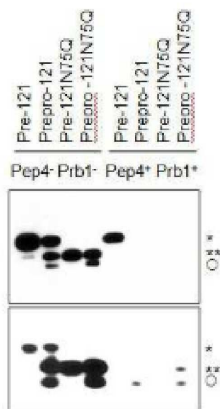
도면4



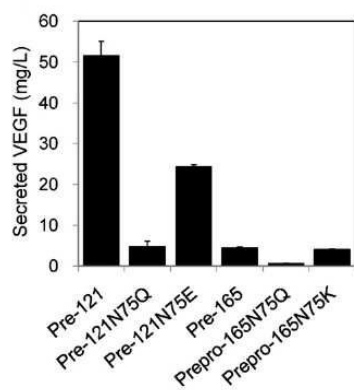
도면5



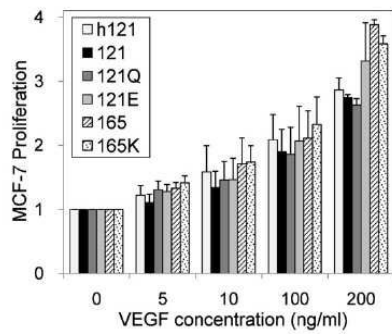
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Method for producing human non-glycosylated VEGF using
Saccharomyces cerevisiae

<130> PN1207-406

<160> 8

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 1

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser

1 5 10 15

Ala Leu Ala

<210> 2

<211>

85

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 2

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser

1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln

20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80

Ser Leu Asp Lys Arg
85

<210> 3

<211> 57

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 3

atgagatttc cttcaatttt tactgcagtt ttattcgcag catcctccgc attagct 57

<210> 4

<211> 255

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 4

atgagatttc cttcaatttt tactgcagtt ttattcgcag catcctccgc attagctgct 60

ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt 120

tacttagatt tagaagggga tticgatgtt gctgttttgc cattttccaa cagcacaaat 180

aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta 240

tctttggata aaagg 255

<210> 5

<211> 147

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly

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

85 90 95
 Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
 100 105 110
 Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
 115 120 125
 Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Cys Asp Lys
 130 135 140
 Pro Arg Arg

145

<210> 6

<211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
 85 90 95
 Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
 100 105 110
 Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
 115 120 125
 Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly
 130 135 140

Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr
 145 150 155 160
 Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln
 165 170 175
 Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 180 185 190

<210> 7

<211> 444

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

atgaactttc tgetgtcttg ggtgcattgg agccttgccct tgetgtcteta cctccaccat 60

gccaaagtggc cccaggctgc acccatggca gaaggaggag ggcagaatca tcacgaagtg 120

gtgaagttca tggatgtcta tcagcgcagc tactgccatc caatcgagac cctggtggac 180

atcttccagg agtaccctga tgagatcgag tacatcttca agccatcctg tgtgccctg 240

atgcgatcgc ggggctgctg caatgacgag ggcctggagt gtgtgccac tgaggagtcc 300

aacatcacca tgcagattat gcggatcaaa cctcaccaag gccagcacat aggagagatg 360

agcttcttac agcacaacaa atgtgaatgc agaccaaaga aagatagagc aagacaagaa 420

aaatgtgaca agccgaggcg gtga 444

<210> 8

<211> 576

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

atgaactttc tgctgtcttg ggtgcattgg agccttgcct tgctgctcta cctccacat	60
gccaagtgtt cccaggctgc acccatggca gaaggaggag ggcagaatca tcacgaagtg	120
gtgaagtcca tggatgtcta tcagcgcagc tactgccatc caatcgagac cctggtggac	180
atcttcagg agtaccctga tgagatcgag tacatcttca agccatcctg tgtgccctg	240
atgcgatgcg ggggctgctg caatgacgag ggcttgaggt gtgtgccac tgaggagtcc	300
aacatcacca tgcagattat gcggatcaaa cctcaccaag gccagcacat aggagagatg	360
agcttcctac agcacaacaa atgtgaatgc agaccaaaga aagatagagc aagacaagaa	420
aatccctgtg ggccttgctc agagcggaga aagcatttgt ttgtacaaga tccgcagacg	480
tgtaaatgtt cctgcaaaaa cacagactcg cgttgcaagg cgaggcagct tgagttaaac	540
gaacgtactt gcagatgtga caagccgagg cggatga	576