

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0057954 (43) 공개일자 2014년05월14일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) G01N 33/50 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)	
(21) 출원번호 10-2012-0124361	(72) 발명자 황선욱 서울특별시 서초구 효령로33길 50 방배 서리폴 e-편한세상 102동 102호	
(22) 출원일자 2012년11월05일 심사청구일자 2012년11월05일	방상수 서울 성북구 안암로 145, (안암동5가, 고려대학교) 유성재 서울 성북구 안암로 145, (안암동5가, 고려대학교)	
	(74) 대리인 이처영	

전체 청구항 수 : 총 6 항

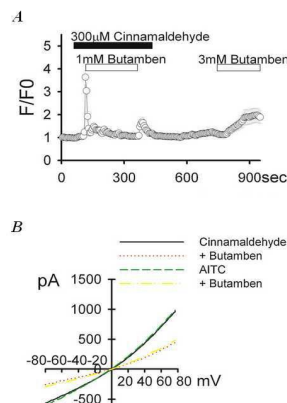
(54) 발명의 명칭 부탐벤을 이용한 TRPA1 억제제의 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 부탐벤을 이용하여 TRPA1 활성을 억제하는 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 TRPA1 활성을 억제하는 부탐벤을 이용하여, TRPA1 활성을 억제하는 통증억제물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 저온 자극, 염증성 자극 및 기계적 자극 등 다양한 자극의 감지를 담당하는 TRPA1의 활성을 억제하는 물질을 선택적으로 스크리닝할 수 있어, 효과적인 통증억제제를 개발하는데 유용하다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A11137311010000100

부처명 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 [1차년도] 신종 통각유전자 PNT ion channel의 진동타겟 검증 및 제어기술 기반 연구

주관기관 고려대학교 산학협력

연구기간 2011.11.01 ~ 2012.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 통증억제물질의 스크리닝 방법:

- (a) TRPA1을 발현하는 세포에 TRPA1 특이적 활성화제 및 상기 활성화 억제제 후보물질을 처리하거나 상기 채널 특이적 활성화제 및 부탐벤(Butamben) 또는 p-아미노 벤조익산(p-amino benzoic acid) 유도체를 처리하는 단계; 및
- (b) 상기 TRPA1 특이적 활성화제 및 상기 활성화 억제제 후보물질을 처리한 군과 상기 채널 특이적 활성화제 및 Butamben 또는 이의 유사체를 처리한 군의 이온채널 활성을 측정하여, 부탐벤 처리군과 비교하여 이온채널 활성이 유사하거나 낮은 물질을 선별하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포는 TRPA1을 코딩하는 유전자로 형질전환된 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 세포는 3차감각신경세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 TRPA1 특이적 활성화제는 신남알데하이드, Allyl isothiocyanate(머스타드오일), 아세트알데하이드 및 포르말린으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 부탐벤 또는 p-아미노 벤조익산(p-amino benzoic acid) 유도체는 30 내지 300 μ M 농도로 처리하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 이온 채널 활성의 측정은 전세포 전압 클램프 기술 또는 칼슘 이미징화에 의해 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 부탐벤을 이용하여 TRPA1 활성을 억제하는 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 TRPA1 활성을 억제하는 부탐벤을 이용하여, TRPA1 활성을 억제하는 통증억제물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인체 생리학 및 약리학 분야의 연구를 통해 2003년에 말초감각신경섬유에 존재하는 TRPA1(Transient receptor

potential cation channel, subfamily A, member 1)이 발견되었다. 상기 TRPA1은 저온 자극, 염증성 자극 및 기계적 자극 등 다양한 자극을 감지하여 활성화되며, 상기 활성화에 의해 인체가 통증을 느끼게 된다. 특히 상기 TRPA1은 온도 및 통증유발 유해자극을 감지하는 통각수용체 군인 thermoTRP 군(temperature-sensitive transient receptor potential ion channels)에 속해 있다. 연구자들은 통각수용체 TRPA1의 기능을 명확히 규명함으로써 인체의 통각 기전을 밝히고, 아울러 TRPA1의 조절약물의 개발을 통해 통증 경감의 목표를 달성할 수 있으리라 예측하고 있다. 또한 TRPA1은 만성 통증과 기계적 통각이상에 관여하는 것으로 알려졌으며 TRPA1을 타겟으로 하는 약물은 이러한 통증에 매우 효과적인 것으로 간주되고 있다 (Story GM *et al.*, *Cell*, 112(6):819, 2003, Bandell M *et al.*, *Neuron*, 41(6):849, 2004, Corey DP *et al.*, *Nature*, 432(7018):723, 2004, Bang S *et al.*, *Eur J Neurosci.*, 26(9):2516, 2007, Petrus M *et al.*, *Mol. Pain*, 3:40, 2007, Eid SR *et al.*, *Mol. Pain*, 4:48, 2008, Bang S *et al.*, *J. Gen. Physiol.*, 133:257, 2009, Kwan KY *et al.*, *J. Neurosci.*, 29:4808, 2009, Chung MK *et al.*, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 704:615, 2011).

[0003] 상기 TRPA1의 활성화 억제를 기전으로하는 통증억제제 개발에 쓰이는 기반 기술을 이해하기 위한 TRPA1의 특성은 다음과 같다. TRPA1은 이온채널이며, 이의 활성화를 통하여 양이온이 감각신경세포 내부로 이동하고, 이에 의해 세포막 전류가 변화한다. 상기 세포막 전류의 변화에 의해 활동전압이 발생하고 이 전압신호가 궁극적으로 뇌로 전달되어 통증을 감지하는 것이다. 상기 TRPA1 활성화를 측정하는 기술로는 첫 번째, 세포막 전류를 증폭하여 그 변화를 측정할 수 있는 패치클램프 전기생리학 기술과 두 번째, TRPA1이 칼슘 이온 등의 양이온을 이동시키는 데에서 착안한 세포내 칼슘 농도 변화 측정 기술이 있다. 첫 번째 기술의 경우 측정의 정밀도에 있어 두 번째 기술보다 우위에 있으며, 두 번째 기술의 경우, 첫 번째 기술 보다 고속 측정이 가능하다는 장점이 있어 서로 보완적이다. 또한 상기 TRPA1 활성화 측정 기술들은 동물의 감각신경세포 배양기술, 세포주 배양기술, TRPA1 DNA 관리 및 형질감염 기술이 뒷받침되어야 구현할 수 있다. 즉, 각종 TRPA1 특이적 억제제 후보물질들 및 표준 활성제를 TRPA1 과발현 세포에 각각 투여하고 TRPA1 활성화 억제 효과를 측정 및 비교함으로써, 억제제 여부 및 그 강력성을 측정할 수 있다 (Bandell M *et al.*, *Neuron*, 41(6):849, 2004, Petrus M *et al.*, *Mol Pain*, 3:40, 2007, Bang S *et al.*, *Eur J Neurosci.*, 26(9):2516, 2007, Bang S *et al.*, *Br J Pharmacol*, 161(3):707, 2010, Bang S *et al.*, *Pain*, 152(5):1156, 2011).

[0004] 이에, 본 발명자들은 TRPA1을 발현하는 세포주를 제작하고, 부탐벤을 처리한 상기 세포주에 TRPA1 활성제인 신남알데히드를 처리하는 경우, TRPA1 활성이 억제되고, 따라서 상기 부탐벤을 이용하면, TRPA1의 활성을 억제하는 물질을 효율적으로 스크리닝할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 TRPA1의 활성을 억제하는 물질을 효율적으로 스크리닝하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) TRPA1을 발현하는 세포에 TRPA1 특이적 활성제 및 상기 활성 억제제 후보물질을 처리하거나 상기 채널 특이적 활성제 및 부탐벤(Butamben) 또는 p-아미노 벤조익산(p-amino benzoic acid) 유도체를 처리하는 단계; 및 (b) 상기 TRPA1 특이적 활성제 및 상기 활성 억제제 후보물질을 처리한 군과 상기 채널 특이적 활성제 및 Butamben 또는 이의 유사체를 처리한 군의 이온채널 활성을 측정하여, 부탐벤 처리군과 비교하여 이온채널 활성이 유사하거나 낮은 물질을 선별하는 단계를 포함하는 통증억제물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0007] 본 발명에 따르면, 저온 자극, 염증성 자극 및 기계적 자극 등 다양한 자극의 감지를 담당하는 TRPA1의 활성을 억제하는 물질을 선택적으로 스크리닝할 수 있어, 효과적인 통증억제제를 개발하는데 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0008] 도 1은 세포주에서 발현된 mTRPA1이 부탐벤에 의해 억제되는 것을 전기 생리화적인 이온 채널의 열람을 억제하는 효과의 측정과, 칼슘의 세포내 유입을 억제하는 효과의 측정을 통해 억제효과가 있음을 나타낸 것으로, A: 1 mM 부탐벤이 cinammaldehyde에 의해 활성화된 TRPA1 반응을 억제하는 것을 칼슘 이미지 방법으로 확인할 것이고, B는 1mM 부탐벤이 전기 생리화적인 실험에서도 유용하게 억제되는 것을 I/V curve 로 나타낸 것이다.
- 도 2는 농도에 따른 TRPA1의 활성화에 의한 칼슘 유입량을 나타낸 농도-반응 곡선으로서 각각의 활성을 Hill-plot 방법으로 도표화 했고 이때 IC50는 69 μ M 이고 N 값은 0.9 이었다
- 도 3은 6주된 성체 생쥐에서 삼차 감각신경절(TG) 감각신경세포를 추출하여 배양한 후 상기 칼슘 이미지 기법을 이용하여 감각신경세포에서도 Butamben이 TRPA1를 효과적으로 억제함을 보여주는 도이다..
- 도 4는 부탐벤을 발바닥에 투여한 쥐에 10 mM 신남알데히드를 투여하고, 매 분마다 급성 얇기 튀기기 반응을 측정된 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0009] 본 발명은 (a) TRPA1을 발현하는 세포에 TRPA1 특이적 활성화제 및 상기 활성화 억제제 후보물질을 처리하거나 상기 채널 특이적 활성화제 및 부탐벤(Butamben) 또는 p-아미노 벤조익산(p-amino benzoic acid) 유도체를 처리하는 단계; 및 (b) 상기 TRPA1 특이적 활성화제 및 상기 활성화 억제제 후보물질을 처리한 군과 상기 채널 특이적 활성화제 및 Butamben 또는 이의 유사체를 처리한 군의 이온채널 활성을 측정하여, 부탐벤 처리군과 비교하여 이온채널 활성이 유사하거나 낮은 물질을 선별하는 단계를 포함하는 통증억제물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0010] 본 발명에 있어서, 세포는 TRPA1을 코딩하는 유전자로 형질전환된 세포인 것을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 3차감각신경세포를 사용할 수 있으며, 본 발명의 일 양태로는 감각신경세포로 척수후근신경절의 세포를 사용할 수 있다.
- [0011] 본 발명에서, 상기 TRPA1 특이적 활성화제는 신남알데하이드, Allyl isothiocyanate(머스타드오일), 아세트알데하이드, 및 포르말린으로 구성된 군에서 선택하여 사용할 수 있으며, 부탐벤 또는 p-아미노 벤조익산(p-amino benzoic acid) 유도체는 30 μ M 내지 300 μ M 농도로 처리할 수 있다.
- [0012] 본 발명에 있어서, 상기 이온 채널 활성의 측정은 전세포 전압 클램프 기술 또는 칼슘 이미지화에 의해 수행할 수 있다.
- [0013] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 TRPA1 특이적 활성화제로 알려진 cinammaldehyde에 의해 증가된 TRPA1의 활성을 부탐벤이 억제하는 것을 확인하였다 (도 1~3). 본 발명의 부탐벤은 농도 의존적으로 TRPA1를 억제하는 효과를 보이며 그 적정 농도는 30 μ M에서 1mM 이었다(도 2). 또한, 부탐벤(Butamben)이 동물모델에서 TRPA1 활성을 기반으로 하는 cinammaldehyde에 의한 급성 통증 행동이 감소되는 것을 확인하였다 (도 4).
- [0014] 이에 상기 부탐벤이 TRPA1의 활성화 억제제로서 역할을 함과 동시에, TRPA1의 활성화 억제제를 스크리닝하는데 있어서, 양성대조군으로 유용하게 사용될 수 있다는 것을 확인하였다.
- [0015] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 TRPA1이 특이적인 cinammaldehyde에 의해 증가된 활성을 상기 Butamben이 억제하는 것을 감각 신경세포에서 확인하였다 (도 3).
- [0016] 본 발명의 구체적인 실시예는 TRPA1 억제제 Butameben이 마이크로몰라 농도의 범위에서 TRPA1 활성화에 억제 효과를 나타내는 것을 시사한다 (도 2).
- [0017] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0018] 실시예 1: TRPA1 형질전환 세포주 및 DRF 감각신경세포 준비

[0019] (1) TRPA1 형질전환 세포주 제조

- [0020] HEK293 세포주(ATCC CRL-11268)를 mTRPA1(서열번호 1)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드 DNA를 이용하여 일시적(transiently) 형질전환하였다.
- [0021] 구체적으로, HEK293T 세포주를 각각 24 well plate 당 0.8 μ g의 mTRPA1의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 pcDNA5/FRT 벡터(Department of Cell Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037 USA) 및 0.2 μ g/웰의 pcDNA3(Invitrogen Corp., USA; 녹색 형광 단백질 cDNA 포함)로 Fugene HD(Roche Diagnostics, 미국)를 이용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 형질전환하였다. 상기 형질전환된 세포를 24시간 동안 CO₂ 인큐베이터에서 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM 배지에서 배양하고, 폴리-L-오르트린 코팅된 유리 커버 슬립에 도달한 후, 10 내지 24 시간 동안 추가 배양하였다.
- [0022] **(2) 척수후근신경절 (dorsal root ganglia: DRG) 감각신경세포 준비**
- [0023] 차가운 PBS에서 성체 ICR계 생쥐 (한림실험동물연구소, 한국)의 DRG를 분리하여 세절한 후, 3mg/mL의 콜라게나아제 타입2 (collagenase type 2; Invitrogen, USA)를 37°C에서 40분 동안 처리한 후 기계적인 방법으로 완전히 소화시켰다. 상기 방법으로 제조한 TG 감각신경세포를 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 10 ng/ 2.5S NGF(calbiochem, USA)를 포함하는 DMEM/F12 배지에서 폴리-L-오르트린 코팅된 유리 커버 슬립에 도달한 후, 48 내지 72시간 동안 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.
- [0024] 실시예의 실험 결과는 양측 꼬리(two-tailed), 쌍을 이루지 않은(unpaired) 스튜던트 t-검정(Student's t-test)을 이용하여 통계적으로 분석하였고, 평균 $\pm$ S.E.M.의 형태로 나타내었다. 또한, **P < 0.01 및 *P < 0.05이었다.
- [0025] **실시예 2: TRPA1 억제제에 의한 TRPA1의 활성화 변화 조사**
- [0026] 실시예 1에서 제조한 mTRPA1 형질전환 세포주에 300 μ M의 cinamaldehyde(MP bio, USA)를 처리한 후, 상기 약물 처리기간 중 일부 기간 동안, 10 μ M 또는 300 μ M Butamben (Sigma, USA) 을 함께 처리하였다. 상기 화학물질들의 저장 용액은 물 또는 DMSO 을 이용하여 제조하였고, 사용하기 직전에 검사용액으로 희석하여 사용하였다.
- [0027] (1) 칼슘이미지화를 이용한 세포내 칼슘수준변화 측정
- [0028] 상기 방법으로 처리된 형질전환 세포에 칼슘 이미지화를 수행하였다.
- [0029] 구체적으로, 0.02% 플루로닉산(pluronic acid; Invitrogen, USA)을 포함하는 배스 용액(bath solution, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES를 포함하고 NaOH를 이용하여 pH 7.4로 적정)에서 상기 화학물질이 처리된 형질전환 세포에 Fura2-AM(5 μ M; invitorgen, USA)을 37°C에서 1시간 동안 주입하였다. 이후, fura2 calcium image system olympus 형광 현미경(Olympus, 일본)을 이용하여 칼슘 이미지화(Calcium imaging)를 수행하였고, Meta flow(Morecular device, 미국)를 이용하여 촬영이미지(time-lapse image; 340nm /380nm)를 매 3초마다 측정하여 그 비율로 나타내었다.
- [0030] 그 결과, 도 1 및 도 2에서 나타난 바와 같이 Butamben은 TRPA1 활성화를 억제함을 확인하였다.
- [0031] 또한, 도 3에서 나타난 바와 같이 Butamben은 TG 감각신경세포에서도 TRPA1 활성화를 효과적으로 억제함을 확인하였다.
- [0032] (2) 전기 생리화학적 방법으로 세포 내 채널의 활성 측정
- [0033] 상기 화학물질이 처리된 형질전환 세포에 전기 생리화학적 측정을 수행하였다.
- [0034] 구체적으로, 배스 용액(bath solution, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES를 포함하고 NaOH를 이용하여 pH 7.4로 적정)하고 유리 피펫에는 피펫 용액(pipet solution, 140mM CsCl 10mM EGTA, 10mM HEPES 를 포함하여 pH 7.4로 적정) 상기 신남알데하이드와 부탐벤이 처리된 형질전환 세포를 사용하였다. 이후, patch clamp set 을 이용하여 whole cell patch clamp 를 실시하였고 이중 전압 전류 상관 곡선

을 이용하여 이온 채널 특이적인 반응인 것을 확인하였고, 동시에 Butamben에 의해 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다.

[0035] patch clamp set 은 multiclamp 700B(molecular device, 미국) 을 이용하여 미세한 신호를 증폭하고, digidata1332a(Molecular device, 미국) 를 이용하여 아날로그 신호를 디지털화하였다. pClamp 10 (Molecular device, 미국) 을 이용하여 데이터를 수집 및 기계를 조작했고 clomp X-10 (Molecular device, 미국) 을 이용하여 데이터를 편집했다.

[0036] 그 결과, 도 1에서 나타난 바와 같이 부탐벤은 TRPA1 활성을 억제함을 확인하였다.

[0037] 실시예 3: 급성 침해성 행동 (발 플린치 (Flinch) 행동) 분석

[0038] 실시예 1에서 제조한 형질전환 세포를 이용하여, 실험군의 급성 발 행동(hindpaw licking-flicking behavior) 한 시간을 10분 동안 측정하였다.

[0039] 대조군 : 무처리

[0040] 실험군 1. 3mM 의 Butamben;

[0041] 실험군 2. 10mM cinammaldehyde;

[0042] 실험군 3. 3mM Butamben + 10mM cinammaldehyde;

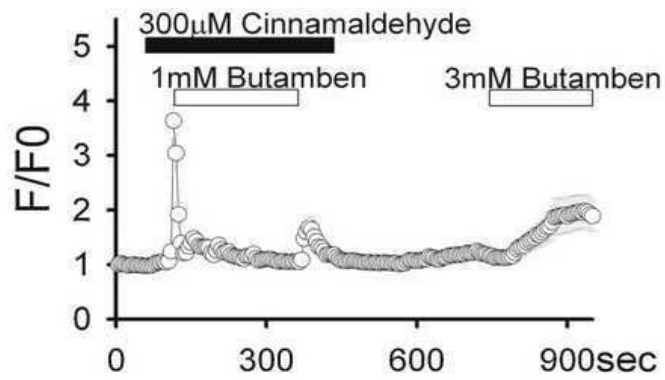
[0043] 그 결과, 도 4에서 나타난 바와 같이 cinammaldehyde의 경우 쥐가 발을 털거나 핥는 시간이 증가한데 반해 Butamben을 미리 투여한 실험군의 경우, 투여한 쥐의 통증 행동이 현저히 줄어들었음을 확인하였다.

[0044] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

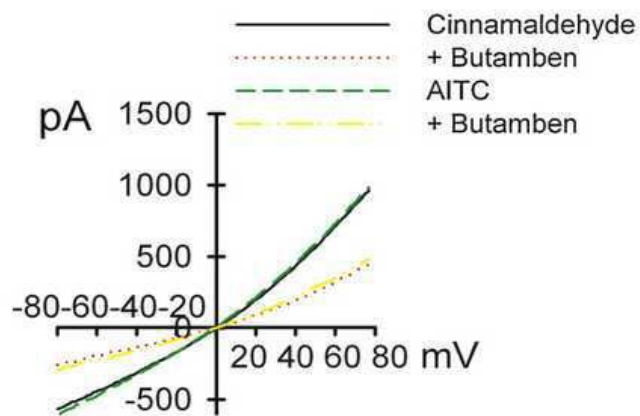
도면

도면1

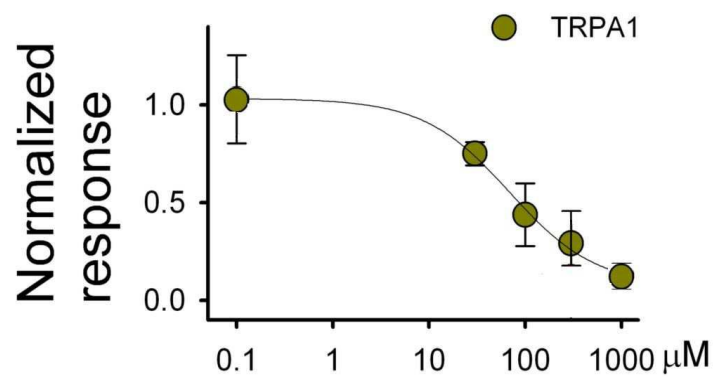
A



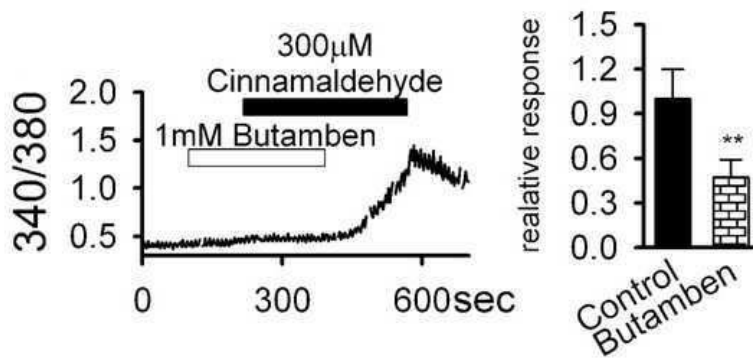
B



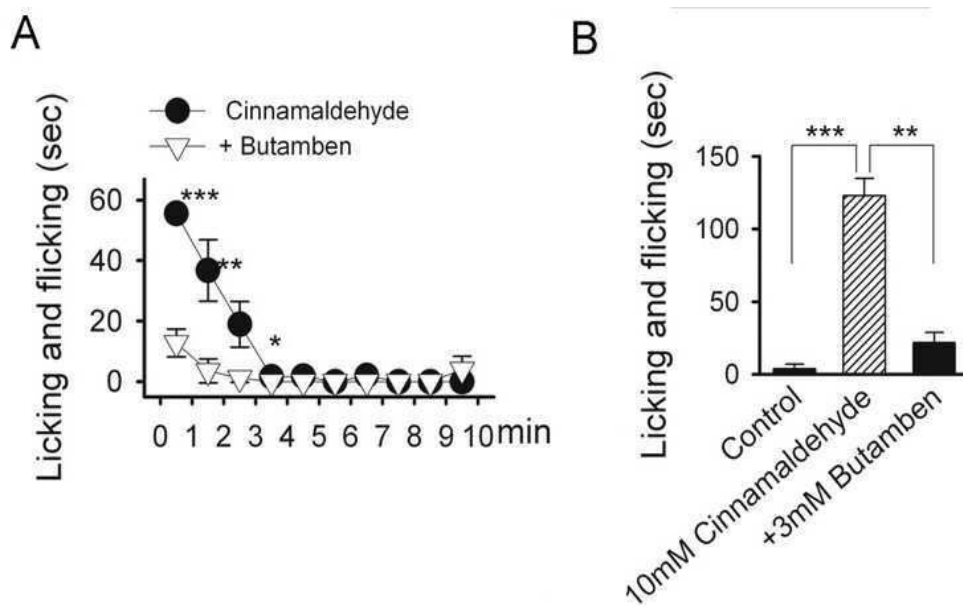
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Method for Screening TRPA1 Inhibitor Using Butamben
- <130> P12-B121
- <160> 1
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1125
- <212> PRT
- <213> Homo sapience
- <400> 1

Met Lys Arg Gly Leu Arg Arg Ile Leu Leu Pro Glu Glu Arg Lys Glu

1 5 10 15

Val Gln Gly Val Val Tyr Arg Gly Val Gly Glu Asp Met Asp Cys Ser
20 25 30

Lys Glu Ser Phe Lys Val Asp Ile Glu Gly Asp Met Cys Arg Leu Glu
35 40 45

Asp Phe Ile Lys Asn Arg Arg Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Asp Glu Asn
50 55 60

Leu Cys Pro Leu His His Ala Ala Ala Glu Gly Gln Val Glu Leu Met
65 70 75 80

Glu Leu Ile Ile Asn Gly Ser Ser Cys Glu Val Leu Asn Ile Met Asp
85 90 95

Gly Tyr Gly Asn Thr Pro Leu His Cys Ala Ala Glu Lys Asn Gln Val
100 105 110

Glu Ser Val Lys Phe Leu Leu Ser Gln Gly Ala Asn Pro Asn Leu Arg
115 120 125

Asn Arg Asn Met Met Ser Pro Leu His Ile Ala Val His Gly Met Tyr
130 135 140

Asn Glu Val Ile Lys Val Leu Thr Glu His Lys Ala Thr Asn Ile Asn
145 150 155 160

Leu Glu Gly Glu Asn Gly Asn Thr Ala Leu Met Ser Thr Cys Ala Lys
165 170 175

Asp Asn Ser Glu Ala Leu Gln Ile Leu Leu Glu Lys Gly Ala Lys Leu
180 185 190

Cys Lys Ser Asn Lys Trp Gly Asp Tyr Pro Val His Gln Ala Ala Phe
195 200 205

Ser Gly Ala Lys Lys Cys Met Glu Leu Ile Leu Ala Tyr Gly Glu Lys
210 215 220

Asn Gly Tyr Ser Arg Glu Thr His Ile Asn Phe Val Asn His Lys Lys
225 230 235 240

Ala Ser Pro Leu His Leu Ala Val Gln Ser Gly Asp Leu Asp Met Ile
245 250 255

Lys Met Cys Leu Asp Asn Gly Ala His Ile Asp Met Met Glu Asn Ala

260 265 270
 Lys Cys Met Ala Leu His Phe Ala Ala Thr Gln Gly Ala Thr Asp Ile
 275 280 285
 Val Lys Leu Met Ile Ser Ser Tyr Thr Gly Ser Ser Asp Ile Val Asn
 290 295 300
 Ala Val Asp Gly Asn Gln Glu Thr Leu Leu His Arg Ala Ser Leu Phe
 305 310 315 320

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

 385 390 395 400
 Gln His Ile Lys Glu Leu Val Met Asp Glu Asp Asn Asp Gly Cys Thr
 405 410 415
 Pro Leu His Tyr Ala Cys Arg Gln Gly Val Pro Val Ser Val Asn Asn
 420 425 430
 Leu Leu Gly Phe Asn Val Ser Ile His Ser Lys Ser Lys Asp Lys Lys
 435 440 445
 Ser Pro Leu His Phe Ala Ala Ser Tyr Gly Arg Ile Asn Thr Cys Gln
 450 455 460

 Arg Leu Leu Gln Asp Ile Ser Asp Thr Arg Leu Leu Asn Glu Gly Asp
 465 470 475 480
 Leu His Gly Met Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Lys Asn Gly His Asp
 485 490 495
 Lys Val Val Gln Leu Leu Leu Lys Lys Gly Ala Leu Phe Leu Ser Asp
 500 505 510
 His Asn Gly Trp Thr Ala Leu His His Ala Ser Met Gly Gly Tyr Thr

515 520 525
 Gln Thr Met Lys Val Ile Leu Asp Thr Asn Leu Lys Cys Thr Asp Arg

 530 535 540
 Leu Asp Glu Glu Gly Asn Thr Ala Leu His Phe Ala Ala Arg Glu Gly
 545 550 555 560
 His Ala Lys Ala Val Ala Met Leu Leu Ser Tyr Asn Ala Asp Ile Leu

 565 570 575
 Leu Asn Lys Lys Gln Ala Ser Phe Leu His Ile Ala Leu His Asn Lys
 580 585 590
 Arg Lys Glu Val Val Leu Thr Thr Ile Arg Asn Lys Arg Trp Asp Glu
 595 600 605

 Cys Leu Gln Val Phe Thr His Asn Ser Pro Ser Asn Arg Cys Pro Ile
 610 615 620
 Met Glu Met Val Glu Tyr Leu Pro Glu Cys Met Lys Val Leu Leu Asp
 625 630 635 640
 Phe Cys Met Ile Pro Ser Thr Glu Asp Lys Ser Cys Gln Asp Tyr His
 645 650 655
 Ile Glu Tyr Asn Phe Lys Tyr Leu Gln Cys Pro Leu Ser Met Thr Lys
 660 665 670
 Lys Val Ala Pro Thr Gln Asp Val Val Tyr Glu Pro Leu Thr Ile Leu

 675 680 685
 Asn Val Met Val Gln His Asn Arg Ile Glu Leu Leu Asn His Pro Val
 690 695 700
 Cys Arg Glu Tyr Leu Leu Met Lys Trp Cys Ala Tyr Gly Phe Arg Ala
 705 710 715 720
 His Met Met Asn Leu Gly Ser Tyr Cys Leu Gly Leu Ile Pro Met Thr
 725 730 735
 Leu Leu Val Val Lys Ile Gln Pro Gly Met Ala Phe Asn Ser Thr Gly
 740 745 750

 Ile Ile Asn Gly Thr Ser Ser Thr His Glu Glu Arg Ile Asp Thr Leu
 755 760 765

Asn Ser Phe Pro Ile Lys Ile Cys Met Ile Leu Val Phe Leu Ser Ser
 770 775 780
 Ile Phe Gly Tyr Cys Lys Glu Val Ile Gln Ile Phe Gln Gln Lys Arg
 785 790 795 800
 Asn Tyr Phe Leu Asp Tyr Asn Asn Ala Leu Glu Trp Val Ile Tyr Thr
 805 810 815
 Thr Ser Ile Ile Phe Val Leu Pro Leu Phe Leu Asn Ile Pro Ala Tyr
 820 825 830
 Met Gln Trp Gln Cys Gly Ala Ile Ala Ile Phe Phe Tyr Trp Met Asn
 835 840 845
 Phe Leu Leu Tyr Leu Gln Arg Phe Glu Asn Cys Gly Ile Phe Ile Val
 850 855 860
 Met Leu Glu Val Ile Phe Lys Thr Leu Leu Arg Ser Thr Gly Val Phe
 865 870 875 880
 Ile Phe Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Ser Phe Tyr Val Leu Leu Asn
 885 890 895
 Phe Gln Asp Ala Phe Ser Thr Pro Leu Leu Ser Leu Ile Gln Thr Phe
 900 905 910
 Ser Met Met Leu Gly Asp Ile Asn Tyr Arg Asp Ala Phe Leu Glu Pro
 915 920 925
 Leu Phe Arg Asn Glu Leu Ala Tyr Pro Val Leu Thr Phe Gly Gln Leu
 930 935 940
 Ile Ala Phe Thr Met Phe Val Pro Ile Val Leu Met Asn Leu Leu Ile
 945 950 955 960
 Gly Leu Ala Val Gly Asp Ile Ala Glu Val Gln Lys His Ala Ser Leu
 965 970 975
 Lys Arg Ile Ala Met Gln Val Glu Leu His Thr Asn Leu Glu Lys Lys
 980 985 990
 Leu Pro Leu Trp Tyr Leu Arg Lys Val Asp Gln Arg Ser Thr Ile Val
 995 1000 1005
 Tyr Pro Asn Arg Pro Arg His Gly Arg Met Leu Arg Phe Phe His Tyr
 1010 1015 1020

Phe Leu Asn Met Gln Glu Thr Arg Gln Glu Val Pro Asn Ile Asp Thr

1025 1030 1035 1040

Cys Leu Glu Met Glu Ile Leu Lys Gln Lys Tyr Arg Leu Lys Asp Leu

1045 1050 1055

Thr Ser Leu Leu Glu Lys Gln His Glu Leu Ile Lys Leu Ile Ile Gln

1060 1065 1070

Lys Met Glu Ile Ile Ser Glu Thr Glu Asp Glu Asp Asn His Cys Ser

1075 1080 1085

Phe Gln Asp Arg Phe Lys Lys Glu Arg Leu Glu Gln Met His Ser Lys

1090 1095 1100

Trp Asn Phe Val Leu Asn Ala Val Lys Thr Lys Thr His Cys Ser Ile

1105 1110 1115 1120

Ser His Pro Asp Phe

1125