(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0028116
(43) 공개일자 2021년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/10 (2017.01) *C40B 40/08* (2006.01)
C40B 50/06 (2017.01) *G01N 30/72* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/1065 (2013.01)
C12N 15/1093 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0108930
(22) 출원일자 2020년08월28일
심사청구일자 2020년08월28일
(30) 우선권주장
1020190108722 2019년09월03일 대한민국(KR)

(71) 출원인
재단법인 오송첨단의료산업진흥재단
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명로 123
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
최소영
세종특별자치시 누리로 27, 614동 1001호(한솔동, 첫마을6단지)
박지훈
세종특별자치시 달빛1로 206, 906동 901호(아름동, 범지기마을9단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충현

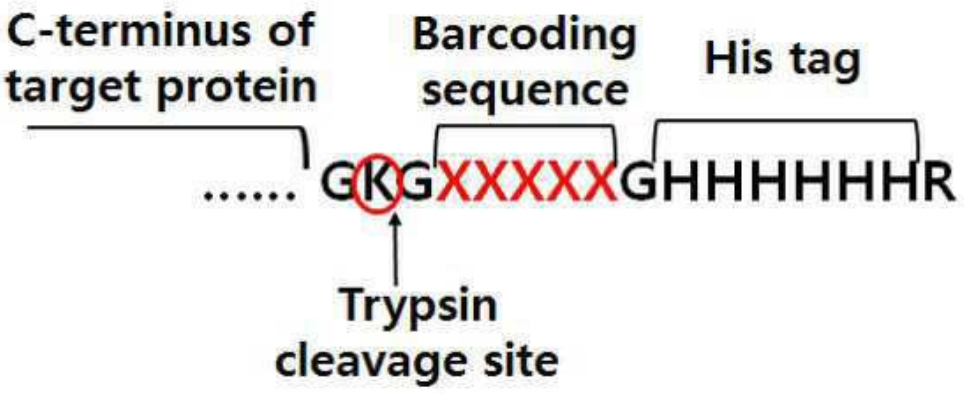
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **단백질 생산성 향상을 위한 개별 바코딩 시스템 도입한 시그널 펩타이드 초고속 선별방법**

(57) 요 약

본 발명은 다양한 시그널 펩타이드 중에서 목적 단백질을 세포 밖으로 효율적으로 분비하는 최적의 시그널 펩타이드를 선별하기 위한 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 숙주세포 내에서 목적 단백질을 발현하여 숙주세포 외부로 목적 단백질을 효율적으로 분비하는 특정 시그널 펩타이드의 선별방법에 관한 것이다. 본 발명의 조성물 및/또는 선별방법을 이용하면, 상기 시그널 펩타이드 별로 만들어진 바코딩 서열을 통해 목적 단백질에 최적인 시그널 펩타이드를 초고속으로 선별할 수 있어 재조합 단백질의 생산 수율을 극대화 할 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C40B 40/08 (2013.01)
C40B 50/06 (2013.01)
G01N 30/7233 (2013.01)
G01N 33/6848 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C07K 2319/21 (2013.01)
C07K 2319/50 (2013.01)

(72) 발명자
진종화
서울특별시 용산구 백범로90다길 12, 202동 1803호(문배동, 용산씨제이나인파크)
김성섭
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 307동 1404호(전민동, 엑스포아파트)
장명희
세종특별자치시 남세종로 503, 112동 1402호(보람동, 호려울마을1단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711081692
과제번호	2016M3A9D9945473
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	신약개발지원센터 R&D 지원사업
연구과제명	단백질 생산 효율 증대를 위한 단백질 분비 시스템 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교 산학협력단
연구기간	2016.09.01 ~ 2019.03.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

다양한 시그널 펩타이드 (signal peptide) 중에서 목적 단백질 (target peptide)을 숙주세포 밖으로 효율적으로 분비하는 특정 시그널 펩타이드 (signal peptide)를 선별하기 위한 조성물로서,

상기 조성물은 시그널 펩타이드 태그 (Signal peptide tag, SP-tag)를 포함하는 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 핵산분자를 포함하고;

상기 시그널 펩타이드 태그는 각각의 시그널 펩타이드 별로 다르게 바코딩 되어 있는 3개 이상의 아미노산으로 이루어져 있는 바코딩 서열 (Barcoding sequence site)을 포함하며;

상기 3개 이상의 아미노산은 L(Leucine), P(Proline), A(Alanine), W(Tryptophan), Y(Tyrosine), T(Threonine), S(Serine), E(Glutamate) 및 D(Aspartate)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 시그널 펩타이드 태그는 단백질 분해성 절단 부위(proteolytic cleavage site)를 상기 바코딩 서열의 N 말단에 추가적으로 포함하여, 단백질에 의해 바코딩 서열이 절단될 수 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 단백질 분해성 절단 부위는 트립신 절단 부위(trypsin cleavage site), 트롬빈 절단 부위(thrombin cleavage site), 엔터로키나아제 절단 부위 (enterokinase cleavage site), 인자 Xa 절단 부위 (Factor Xa cleavage site), 콜라게나아제 절단 부위 (collagenase cleavage site) 및 TEV 프로테아제 절단부위 (TEV protease cleavage site)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 단백질 분해성 절단 부위는 트립신 절단 부위인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 트립신 절단 부위는 K(Lysine) 및 R(Arginine)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 3 항에 있어서, 상기 단백질 분해성 절단 부위는 바코딩 서열과 링커로 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 링커는 1개 이상의 G(Glycine)를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 시그널 펩타이드 태그를 포함하는 폴리펩타이드는 숙주세포 배양액에서 바코딩 서열을 분리 및 정제하기 위한 친화-태그 (Affinity tag)를 상기 바코딩 서열의 C 말단에 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 친화 태그는 His-tag (Histidine tag), myc-tag, FLAG-tag, SUMO-tag (small ubiquitin-like modifier tag), CYD-tag (covalent yet dissociable NorpD peptide tag), HPC-tag (heavy chain of protein C tag), CBP-tag (calmodulin binding peptide tag) 및 HA-tag (hemagglutinin-tag)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 친화 태그는 2 내지 15개의 히스티딘으로 구성된 His-tag인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 상기 시그널 펩타이드 태그는 하기의 식 1로 표시되는 것을 특징으로 하는 조성물:

<식 1>

트립신 절단 부위 - 링커 - 바코딩 서열 - 링커 - 친화 태그 - 트립신 절단 부위.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 시그널 펩타이드 태그는 하기의 식 2로 표시되는 것을 특징으로 하는 조성물:

<식 2>

K(Lysine) 또는 R(Arginine) - G(Glycine) - 바코딩 서열 - G(Glycine) - 친화 태그 - K(Lysine) 또는 R(Arginine).

청구항 13

제 1 항에 있어서, 상기 시그널 펩타이드 태그를 포함하는 폴리펩타이드는 시그널 펩타이드 태그의 N 말단에 목적 단백질이 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 시그널 펩타이드 태그를 포함하는 폴리펩타이드는 상기 목적 단백질의 N 말단에 시그널 펩타이드가 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15

제 1 항 또는 제 14 항의 시그널 펩타이드 태그를 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터.

청구항 16

하기의 단계를 포함하는, 숙주세포 내에서 목적 단백질을 발현하여 숙주세포 외부로 상기 목적 단백질을 분비하는 특정 시그널 펩타이드의 선별방법:

1) 다양한 시그널 펩타이드에 대한 제 15 항의 벡터를 제작하여 라이브러리를 구축하는 단계;

2) 상기 벡터를 이용하여 숙주세포를 형질전환시키는 단계;

3) 상기 형질전환된 숙주세포로부터 시그널 펩타이드 태그를 포함하는 폴리펩타이드를 발현시키는 단계; 및

4) 상기 형질전환된 숙주세포 외부로 분비된 시그널 펩타이드 태그를 포함하는 폴리펩타이드, 시그널 펩타이드 태그 또는 시그널 펩타이드 태그에 포함된 바코딩 서열을 정량하는 단계.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 숙주세포는 CHO 세포, HeLa 세포, HEK293 세포, BHK 세포, COS7 세포, COP5 세포, A549 세포, NIH3T3 세포, MDCK 세포 및 WI38 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 세포인 것을 특징으로 하는 선별방법.

청구항 18

제 16 항에 있어서, 상기 단계 3)은 시그널 펩타이드 태그를 포함하는 폴리펩타이드를 발현시킨 후, 친화 태그를 이용하여 분리 및 정제하는 단계 (단계 3-1))를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 선별방법.

청구항 19

제 16 항에 있어서, 상기 단계 3)은 상기 시그널 펩타이드 태그를 포함하는 폴리펩타이드에 트립신을 처리하는 단계 (단계 3-2))를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 선별방법.

청구항 20

제 16 항에 있어서, 상기 단계 4)는 LC-MS/MS를 이용하여 정량하는 것을 특징으로 하는 선별방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 다양한 시그널 펩타이드 중에서 목적 단백질을 숙주 세포 밖으로 효율적으로 분비하는 특정 시그널 펩타이드를 선별하기 위한, 바코딩 서열을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 전 세계적으로 생명공학기술의 발달에 따라 단백질의 구조와 기능에 대한 연구가 활발히 진행되어왔으며, 질병 타깃에 특이적이고 부작용이 낮은 치료용 항체를 포함한 재조합 의약품 시장의 폭발적인 성장을 통해 기존의 저분자 의약품이 주도권을 가지고 있던 세계 제약시장의 판권이 뒤집히고 있다.

[0004] 재조합 단백질 의약품은 유전자 재조합 기술을 이용하여 생체에서 얻기 힘든 치료용 단백질 성분을 미생물이나 동물세포시스템을 통해 대량생산한 의약품을 말한다. 재조합 단백질은 세포 내에 발현시키거나 세포 외로 분비되도록 조절할 수 있다. 세포 내 발현 시 단백질의 과발현으로 인하여 세포 내에 비활성화 상태의 불용성 덩어리로 축적되는 경우가 많으며, 그렇지 않다 하더라도 세포를 파쇄하는 번거로움과 세포 내에 존재하는 수많은 단백질들과 분리하기 위한 정제공정의 어려움 등 생산성을 저하시키는 많은 요인들을 제공한다. 반면에 생성된 단백질을 세포 외로 분비시킬 경우 전자의 경우에 따르는 어려움을 쉽게 회피할 수 있다. 또한 단백질의 세포외 분비는 전사 후 단백질의 접힘 및 수식이 정확하게 이루어졌을 때만 가능하므로 치료용 단백질의 생산 시 활성화된 형태의 정확한 3차 구조를 가진 가용성 단백질을 얻을 수 있는 장점이 있다. 따라서 재조합 단백질을 세포 외로 분비될 수 있도록 생산하는 것은 단백질의 생산수율 측면뿐만 아니라 단백질의 품질관리(quality control) 측면에서도 유리하다. 그러므로 재조합 단백질 의약품을 제조하는 데에 있어, 재조합 단백질을 효율적으로 세포 밖으로 분비시킬 수 있는 최적화 단계가 중요하다.

[0005] 시그널 펩타이드는 분비 단백질이나 막단백질의 N 말단에 위치하여 분비성 단백질 또는 막 단백질의 표적화(targeting) 신호로 기능하는 아미노산 서열로, 현재까지 알려진 진핵생물의 시그널 펩타이드의 종류만 4~ 5천여 가지로 매우 다양하다. 목적 단백질을 생산함에 있어서, 어떠한 시그널 펩타이드를 적용하느냐에 따라 목적 단백질의 세포외 분비율이 달라질 수 있으며, 이와 관련하여 목적 단백질에 맞는 시그널 펩타이드를 선정하여 목적 단백질 세포외 분비를 최적화하는 연구가 보고된 바 있다 (*Acta Biochim Biophys Sin* (Shanghai) (2011) 43 (2): 96-102, Signal peptide replacements enhance expression and secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jan 1;391(1):931-5, Signal peptide design for improving recombinant protein secretion in the baculovirus expression vector system.).

[0006] 따라서, 단백질 의약품 개발시 상기 4천개 이상의 시그널 펩타이드 중 목적 단백질 발현에 가장 적합한 시그널 펩타이드를 초고속으로 스크리닝하여 목적 단백질에 도입한다면 인위적으로 재조합 단백질 의약품 생산량의 극대화를 유도할 수 있다.

[0007]

[0008] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 목적 단백질을 세포 외로 고효율로 분비시킬 수 있는, 목적단백질의 분비에 가장 적합한 시그널 펩타이드를 초고속으로 탐색하는 방법을 찾고자 예의 노력을 하였다. 그 결과, 특정한 종류의 아미노산을 조합하여 상기 시그널 펩타이드 별로 바코딩 서열을 만들어 이를 라이브러리화 한 후 숙주세포에서 발현시키고 숙주세포의 배양액을 이용하여 목적 단백질을 정량하면, 목적 단백질을 외부로 효율적으로 분비시킬 수 있는 최적의 시그널 펩타이드를 선별할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 다양한 시그널 펩타이드 (signal peptide) 중에서 목적 단백질 (target peptide)을 숙주세포 밖으로 효율적으로 분비하는 특정 시그널 펩타이드 (signal peptide)를 선별하기 위한 조성물을 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 숙주세포 내에서 목적 단백질을 발현하여 숙주세포 외부로 상기 목적 단백질을 분비하는 특정 시그널 펩타이드의 선별방법을 제공하는데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다양한 시그널 펩타이드 (signal peptide) 중에서 목적 단백질 (target

peptide)을 숙주세포 밖으로 효율적으로 분비하는 특정 시그널 펩타이드 (signal peptide)를 선별하기 위한 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명자들은 목적 단백질을 세포 외로 고효율로 분비시킬 수 있는, 목적단백질의 분비에 가장 적합한 시그널 펩타이드를 초고속으로 탐색하는 방법을 찾고자 노력한 결과, 특정한 종류의 아미노산을 조합하여 상기 시그널 펩타이드 별로 바코딩 서열을 만들어 이를 목적 단백질에 적용할 경우, 목적 단백질을 외부로 효율적으로 분비시킬 수 있는 최적의 시그널 펩타이드를 선별할 수 있음을 발견하였다.

[0020] 본 명세서에서 용어 "시그널 펩타이드" 또는 "signal peptide"는 세포 외부로 분비되는 분비성 단백질의 N 말단(전단)에 결합되어 세포막을 통과시키는 펩타이드를 의미한다. 상기 시그널 펩타이드는 보통 10 내지 30개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 막통과에 있어 특이적인 protease에 의해 절단되어 제거되며, 세포 외부로는 상기 분비성 단백질만이 분비되게 된다. 현재까지 알려진 바로는 진핵세포 내에 존재하는 시그널 펩타이드만도 총 4137개가 알려져 있다 (Uniprot, 2017.06.)

[0021] 세포 외부로 분비되는 분비성 단백질마다 고유의 시그널 펩타이드를 가지고 있는데, 이는 발현하는 세포의 종류, 발현된 단백질의 역할, 또는 적정량의 단백질의 발현을 위해서 각각의 다른 시그널 펩타이드를 가지고 있는 것으로 예상되고 있다.

[0023] 본 명세서에서 용어 "목적 단백질" 또는 "target protein"은 적당한 숙주세포를 이용하여 이를 고효율로 생산하고자 하는 단백질을 의미하며, 바이오 의약품의 개발시 목적 단백질에 대한 최적의 시그널 펩타이드를 재조합 단백질에 도입한다면 인위적으로 상기 목적 단백질 생산량의 극대화를 유도할 수 있다.

[0024] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 조성물은 시그널 펩타이드 태그(Signal peptide tag, SP-tag)를 포함하는 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 핵산분자를 포함한다.

[0025] 본 명세서에서 용어 "시그널 펩타이드 태그", "Signal peptide tag" 또는 "SP-tag"는 각각의 시그널 펩타이드 별로 다르게 바코딩 되어 있는 3개 이상의 아미노산으로 이루어져 있는 바코딩 서열 (Barcoding sequence site)을 포함하는 태그로서, 직접 또는 링커를 활용하여 목적 단백질의 C 말단 (후단)에 결합될 수 있는 펩타이드 태그를 의미한다.

[0026] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 3개 이상의 아미노산은 L(Leucine), P(Proline), A(Alanine), W(Tryptophan), Y(Tyrosine), T(Threonine), S(Serine), E(Glutamate) 및 D(Aspartate)로 구성된 군으로부터 선택되는 것이다.

[0027] 상기 9가지 아미노산 중 3개를 조합하여 코돈을 만들 경우, 총 729가지(9x9x9)의 시그널 펩타이드를 바코딩 할 수 있으며, 4개를 조합하여 코돈을 만들 경우 6,561가지(9x9x9x9), 5개를 조합하여 코돈을 만들 경우 59,049가지(9x9x9x9x9)의 시그널 펩타이드를 바코딩 할 수 있다. 현재까지 밝혀진 진핵생물의 시그널 펩타이드 종류가 4,137개인 점을 고려하면 상기 바코딩 서열은 바람직하게는 3 내지 8개, 보다 바람직하게는 3 내지 5개가 적합하다.

[0028] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 바코딩 서열은 상기 9가지 아미노산 중 동일한 3개의 아미노산을 이용하여 구성할 수 있다.

[0029] 예를 들어, LLL, PPP, AAA, WWW, YYY, TTT, SSS, EEE 및 DDD로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0030] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 바코딩 서열은 상기 9가지 아미노산 중 2개는 동일한 아미노산을, 다른 1개는 다른 아미노산을 이용하여 구성할 수 있다.

[0031] 예를 들어, LLP, PPA, AAW, WWY, YYT, TTS, SSE, EED 및 DDL과 같이 동일한 아미노산이 연속해서 반복되는 형태로 서열을 구성하거나, LDL, PEP, ASA, WTW, YLY, TPT, SAS, EWE 및 DYD 등과 같이 동일한 아미노산 사이에 다른 아미노산이 삽입된 형태로 구성할 수도 있다.

[0032] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 바코딩 서열은 상기 9가지 아미노산 중 3가지 모두 다른 아미노산을 이용하여 구성할 수 있다.

[0033] 예를 들어, LPA, PAW, AWY, WYT, YTS, TSE, SED, EDL 및 DLP 등과 같이 서로 다른 아미노산이 나열된 형태로 서열을 구성할 수 있다.

[0034] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 바코딩 서열은 상기 9가지 아미노산 중 동일한 4개의 아미노산을 이용하여 구성할 수 있다.

[0035] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 바코딩 서열은 상기 9가지 아미노산 중 일부는 동일한 아미노산을, 일부는 다른 아미노산을 서로 조합하여 4개의 아미노산으로 구성할 수 있다.

[0036] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 바코딩 서열은 상기 9가지 아미노산 중 동일한 5개의 아미노산을 이용하여 구성할 수 있다.

[0037] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 바코딩 서열은 상기 9가지 아미노산 중 일부는 동일한 아미노산을, 일부는 다른 아미노산을 서로 조합하여 5개의 아미노산으로 구성할 수 있다.

[0038] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 바코딩 서열은 하기의 서열목록 제1서열을 포함하거나, 서열목록 제1서열로 구성되는 것이다.

[0039] $[L]_1[L]_2[L]_3$ (서열목록 제1서열)

[0040] 상기 서열목록 제1서열에 있어서 $[L]_1$, $[L]_2$ 또는 $[L]_3$는 P, A, W, Y, T, S, E 및 D로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산으로 치환될 수 있다.

[0041] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 바코딩 서열은 하기의 서열목록 제2서열을 포함하거나, 서열목록 제2서열로 구성되는 것이다.

[0042] $[L]_1[L]_2[L]_3[L]_4$ (서열목록 제2서열)

[0043] 상기 서열목록 제2서열에 있어서 $[L]_1$, $[L]_2$, $[L]_3$ 또는 $[L]_4$는 P, A, W, Y, T, S, E 및 D로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산으로 치환될 수 있다.

[0044] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 바코딩 서열은 하기의 서열목록 제3서열을 포함하거나, 서열목록 제3서열로 구성되는 것이다.

[0045] $[L]_1[L]_2[L]_3[L]_4[L]_5$ (서열목록 제3서열)

[0046] 상기 서열목록 제3서열에 있어서 $[L]_1$, $[L]_2$, $[L]_3$, $[L]_4$ 또는 $[L]_5$는 P, A, W, Y, T, S, E 및 D로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산으로 치환될 수 있다.

[0047] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 9가지의 아미노산을 바코딩 서열로 선정한 이유는 다음과 같다:

[0048] ① 먼저 20 종의 아미노산에서 후술하는 트립신 절단 부위인 K 및 R을 제외하여 18종의 아미노산을 선정하였다.

[0049] ② 이후, 아래와 같은 실험을 통해 상기 18종의 아미노산 중 소수성 지표(hydropathy index)가 높거나 낮은 V, F, G, C, H 및 N의 6종을 제외하여 12종의 아미노산을 선정하였다: 먼저 아미노산을 1개씩 다르게 하여 LC-MS 분석을 통해 발현량이 동일한지 확인을 하였다. 상기 아미노산들 중 LC-MS 분석 시 V, F, G, C, H 및 N의 경우 상대적으로 높거나 낮은 값이 확인이 되어 이를 제외하였다 (또한, 상기 H는 His tag에 영향을 줄 가능성 및 전하 변경의 우려도 존재함).

[0050] ③ 추가적으로, 상기 12종의 아미노산 중 M은 단백질 digestion시 oxidation modification이 발생할 수 있어서 배제하여 총 11종의 아미노산을 선정하였다.

[0051] ④ 마지막으로, 이들 중 유사한 질량 (Similar Mass)을 갖는 I, Q, N, L, E 및 D 중에서는 I 및 Q를 배제 (N은 단계 ②에서 배제)하고 L, E 및 D 만 사용하여 최종적으로 L, P, A, W, Y, T, S, E 및 D의 9종을 바코팅 시퀀스로 디자인하였다.

[0052] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 시그널 펩타이드 태그는 단백질 분해성 절단 부위 (proteolytic cleavage site)를 상기 바코딩 서열의 N 말단 (전단)에 추가적으로 포함하여, 상기 단백질에 의해 바코딩 서열이 절단될 수 있는 것이다.

[0053] 본 명세서에서 용어 "단백질 분해성 절단 부위" 또는 "proteolytic cleavage site"는 절단하고자 하는 단백질

또는 펩타이드 내에 포함된 부위로서, 특정 단백질이 상기 부위를 인식하여 절단하고자 하는 단백질 또는 펩타이드를 절단할 수 있는 부위를 의미한다.

[0054] 당업계에는 다양한 단백질 분해성 절단 부위가 알려져 있으며, 바람직하게는 트립신 절단 부위 (trypsin cleavage site), 트롬빈 절단 부위 (thrombin cleavage site), 엔터로키나아제 절단 부위 (enterokinase cleavage site), 인자 Xa 절단 부위 (Factor Xa cleavage site), 콜라게나아제 절단 부위 (collagenase cleavage site) 및 TEV 프로테아제 절단부위 (TEV protease cleavage site)을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단백질 분해성 절단 부위는 트립신에 의해 절단되는 트립신 절단 부위인 것이다.

[0056] 트립신은 K(Lysine) 또는 R(Arginine) 옆을 절단하는 단백질 분해성 효소로서, 상기 단백질 분해성 절단 부위는 K 및 R로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0057] 상기 단백질 분해성 절단 부위는 바코딩 서열과 직접 연결되거나 링커로 연결될 수 있으며, 당업계에 공지된 다양한 링커로 연결될 수 있으나, 바람직하게는 G(Glycine)을 이용할 수 있다.

[0058] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 링커로서 G를 선정하였는데, 이는 K 옆에 P가 있으면 트립신 절단이 완벽히 이루어지지 않으며, 산성 잔기 (Acidic residue)인 D 및 E의 경우 가수 분해 속도를 저해하여 절단 오류 (miss cleavage)가 발생될 수 있기 때문에 P, D 및 E는 부적합하며, 바코딩 서열로 사용한 L, P, A, W, Y, T, S, E 및 D를 제외하여 안정적 절단을 고려한 것이다.

[0059] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 링커는 1개 이상의 G를 포함하는 것이다.

[0060] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 시그널 펩타이드 태그를 포함하는 폴리펩타이드는 숙주세포 배양액에서 바코딩 서열을 분리 및 정제하기 위한 친화-태그 (Affinity tag)를 상기 바코딩 서열 말단에 추가적으로 포함하는 것이다.

[0061] 본 명세서에서 용어 "친화-태그" 또는 "Affinity tag"는 관심 분자(molecule of interest)에 결합되어, 친화 태그 수용체 (affinity tag receptor)를 이용한 관심 분자 (예를 들어, 바코딩 서열)를 분리 및 정제하기 위한 태그를 의미하며, 당업계에 공지된 다양한 친화-태그를 본 발명의 구현에 이용할 수 있다.

[0062] 상기 친화-태그는 His-tag (Histidine tag), myc-tag, FLAG-tag, SUMO-tag (small ubiquitin-like modifier tag), CYD-tag (covalent yet dissociable NorpD peptide tag), HPC-tag (heavy chain of protein C tag), CBP-tag (calmodulin binding peptide tag) 및 HA-tag (hemagglutinin-tag)으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 2 내지 15개의 히스티딘으로 구성된 His-tag인 것이다.

[0063] 또한, 본 발명의 시그널 펩타이드 태그는 하기의 식 1로 표시될 수 있다:

[0064] <식 1>

[0065] 트립신 절단 부위 - 링커 - 바코딩 서열 - 링커 - 친화 태그 - 트립신 절단 부위.

[0066] 또한, 본 발명의 시그널 펩타이드 태그는 하기의 식 2로 표시될 수 있다:

[0067] <식 2>

[0068] K(Lysine) 또는 R(Arginine) - G(Glycine) - 바코딩 서열 - G(Glycine) - 친화 태그 - K(Lysine) 또는 R(Arginine).

[0069] 보다 바람직하게는 본 발명의 시그널 펩타이드 태그는 하기의 식 3으로 표시될 수 있다:

[0070] <식 3>

[0071] K(Lysine) - G(Glycine) - 바코딩 서열 - G(Glycine) - 친화 태그 - R(Arginine).

[0072] 펩타이드의 C 말단에 트립신 절단부위인 R(아르기닌)을 삽입할 경우 펩타이드 이온화 안정성을 확보할 수 있다.

[0073] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 친화-태그인 His tag의 경우, 말단 H는 전하 변경의 우려가 있어, C 말단에 이온화 안정성 확보를 위해 R(아르기닌)을 추가 하였다. 이외에도, 정량성 확보를 위해 internal standard로 isotope labeled peptide를 합성하여 진행시에도 R (아르기닌)을 사용하였다(참고: ^{15}N, ^{13}C 표지된 아르기닌 잔

기를 합성).

[0074] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 시그널 펩타이드 태그를 포함하는 폴리펩타이드는 시그널 펩타이드 태그의 N 말단(전단)에 목적 단백질이 결합되어 있는 것이다.

[0075] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 시그널 펩타이드 태그를 포함하는 폴리펩타이드는 상기 목적 단백질의 N 말단(전단)에 시그널 펩타이드가 결합되어 있는 것이다.

[0077] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 시그널 펩타이드 태그를 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0079] 본 발명의 핵산분자는 단리된 것이거나 재조합된 것일 수 있으며, 단일쇄 및 이중쇄 형태의 DNA 및 RNA뿐만 아니라 대응하는 상보성 서열이 포함된다. "단리된 핵산"은 천연 생성 원천에서 단리된 핵산의 경우, 핵산이 단리된 개체의 게놈에 존재하는 주변 유전 서열로부터 분리된 핵산이다. 주형으로부터 효소적으로 또는 화학적으로 합성된 핵산, 예컨대 PCR 산물, cDNA 분자, 또는 올리고뉴클레오타이드의 경우, 이러한 절차로부터 생성된 핵산이 단리된 핵산분자로 이해될 수 있다. 단리된 핵산분자는 별도 단편의 형태 또는 더 큰 핵산 구축물의 성분으로서의 핵산 분자를 나타낸다. 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결"된다. 예를 들면, 전서열 또는 분비 리더 (leader)의 DNA는 폴리펩타이드가 분비되기 전의 형태인 전단백질 (preprotein)로서 발현되는 경우 폴리펩타이드의 DNA에 작동가능하게 연결되고, 프로모터 또는 인핸서는 폴리펩타이드 서열의 전사에 영향을 주는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되며, 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하도록 배치될 때 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로 "작동가능하게 연결된"은 연결될 DNA 서열들이 인접하여 위치함을 의미하며, 분비 리더의 경우 인접하여 동일한 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나 인핸서는 인접하여 위치할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 통상적인 방법에 따라 사용한다.

[0080] 본 명세서에서 용어 "벡터"는 핵산 서열을 복제할 수 있는 세포로의 도입을 위해서 핵산 서열을 삽입할 수 있는 전달체를 의미한다. 핵산 서열은 외생 (exogenous) 또는 이종 (heterologous)일 수 있다. 벡터로서는 플라스미드, 코스미드 및 바이러스(예를 들면 박테리오파지)를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 당업자는 표준적인 재조합 기술에 의해 벡터를 구축할 수 있다 (Maniatis, et al., *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; 및 Ausubel et al., In: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994 등).

[0081] 본 명세서에서 용어 "발현 벡터"는 전사되는 유전자 산물 중 적어도 일부분을 코딩하는 핵산 서열을 포함한 벡터를 의미한다. 일부의 경우에는 그 후 RNA 분자가 단백질, 폴리펩타이드, 또는 펩타이드로 번역된다. 발현 벡터에는 다양한 조절서열을 포함할 수 있다. 전사 및 번역을 조절하는 조절서열과 함께 벡터 및 발현 벡터에는 또 다른 기능도 제공하는 핵산 서열도 포함될 수 있다.

[0082] 상기와 같이 시그널 펩타이드 별로 특정한 아미노산 암호로 바코딩된 바코딩 서열을 포함하는 시그널 펩타이드 태그를 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산서열을 "시그널 펩타이드-목적 단백질-시그널 펩타이드 태그" 형태로 제작하여 벡터에 삽입한 후 이를 적당한 숙주세포에서 발현 시킬 수 있다. 이 경우, 상기 시그널 펩타이드가 "목적 단백질-시그널 펩타이드 태그"를 숙주세포의 세포막으로 효율적으로 분비할 경우, 시그널 펩타이드 태그 내의 바코딩 서열을 확인함으로써 상기 목적단백질을 효율적으로 분비한 시그널 펩타이드의 종류를 손쉽게 확인할 수 있다.

[0084] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 숙주세포 내에서 목적 단백질을 발현하여 숙주세포 외부로 상기 목적 단백질을 분비하는 특정 시그널 펩타이드의 선별방법을 제공한다:

[0085] 1) 다양한 시그널 펩타이드에 대한 벡터를 제작하여 라이브러리를 구축하는 단계;

[0086] 2) 상기 벡터를 이용하여 숙주세포를 형질전환 시키는 단계;

[0087] 3) 상기 형질전환된 숙주세포로부터 시그널 펩타이드 태그를 포함하는 폴리펩타이드를 발현시키는 단계; 및

[0088] 4) 상기 형질전환된 숙주세포 외부로 분비된 시그널 펩타이드 태그를 포함하는 폴리펩타이드, 시그널 펩타이드 태그 또는 시그널 펩타이드 태그에 포함된 바코딩 서열을 정량하는 단계.

[0089] 본 명세서에서 용어 "숙주세포"는 진핵생물 및 원핵생물을 포함하며, 상기 벡터를 복제할 수 있거나 벡터에 의해 코딩되는 유전자를 발현할 수 있는 임의의 형질 전환 가능한 생물을 의미한다.

[0090] 본 명세서에서 용어 "형질전환"은 형질감염 (transfection), 형질도입 (transduction) 또는 형질전환 (transformation)을 포함하는 의미로 사용된다. 숙주세포는 상기 벡터에 의해 형질감염 (transfected), 형질도입 (transduced) 또는 형질전환 (transformed) 될 수 있으며, 이는 외생의 핵산분자가 숙주세포 내에 전달되거나 도입되는 과정을 의미한다.

[0091] 본 발명의 숙주세포는 바람직하게는 세균 (bacteria)세포, 이스트 (yeast), 동물 (CHO 세포 등) 또는 인간 세포 (HeLa 세포, HEK293 세포, BHK 세포, COS7 세포, COP5 세포, A549 세포, NIH3T3 세포, MDCK 세포, WI38 세포 등)을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0092] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 본 발명의 단계 3) (상기 형질전환된 숙주세포로부터 시그널 펩타이드 태그를 포함하는 폴리펩타이드를 발현시키는 단계) 이후에, 친화 태그를 이용하여 분리 및 정제하는 단계(단계 3-1))를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0093] 또한, 상기 단계 3) 이후에, 상기 시그널 펩타이드 태그를 포함하는 폴리펩타이드에 트립신을 처리하는 단계(단계 3-2))를 추가적으로 포함하여, 트립신 절단에 의해 목적 단백질과 바코딩 서열을 효율적으로 분리할 수 있다.

[0094] 상기 단계 3-1) 및 3-2)은 상기 단계 3) 이후, 개별로 실시하거나 순서대로 또는 역순으로 실시할 수 있다.

[0095] 상기 단계 4)의 시그널 펩타이드 태그를 포함하는 폴리펩타이드, 시그널 펩타이드 태그 또는 시그널 펩타이드 태그에 포함된 바코딩 서열의 정량은 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF (Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-TOF (Sulface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선면역분석 (radioimmunoassay, RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 면역조직화학 (immunohistochemistry) 분석, 면역세포화학 (immunocytochemistry) 분석, 면역침강법 (immunoprecipitation), 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석 (liquid chromatography-Mass Spectrometry, LCMS), LC-MS/MS (liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블롯 (western blot), 및 ELISA (enzyme linked immunosorbentassay) 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0096] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 시그널 펩타이드 태그를 포함하는 폴리펩타이드, 시그널 펩타이드 태그 또는 시그널 펩타이드 태그에 포함된 바코딩 서열의 정량을 각각 웨스턴 블롯으로 정량한 경우와 LC-MS/MS를 이용한 초고속으로 정량한 경우를 비교하여 보았다. 이 경우 상기 바코딩 서열을 이용하여 LC-MS/MS로 초고속으로 정량한 경우에도 가장 발현량이 높은 3가지의 시그널 펩타이드가 웨스턴 블롯의 경우와 일치하여, LC-MS/MS를 이용한 초고속으로 정량의 효용성을 검증하였다.

[0097] 초고속 펩타이드 정량을 위해 LC-MS/MS를 이용하는 경우, 최대 20개 아미노산까지 포함하는 경우 정량성 확보에 용이한 점을 고려하여, 상기 시그널 펩타이드 태그의 길이는 총 20개 아미노산 이내인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 하기 식 1에서 링커는 1-3개의 아미노산, 바코딩 서열은 3-5개의 아미노산, 친화 태그는 2 내지 10개의 아미노산으로 구성하여 전체 길이를 20개 아미노산 이내로 구성하는 것이 LC-MS/MS를 이용한 정량에 적합하다.

발명의 효과

[0099] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0100] (ⅰ) 본 발명은 다양한 시그널 펩타이드 중에서 목적 단백질을 세포 밖으로 효율적으로 분비하는 최적의 시그널 펩타이드를 선별하기 위한 조성물을 제공한다.

[0101] (ii) 또한, 본 발명은 숙주세포 내에서 목적 단백질을 발현하여 숙주세포 외부로 목적 단백질을 효율적으로 분비하는 특정 시그널 펩타이드의 선별방법을 제공한다.

[0102] (iii) 본 발명의 조성물 및/또는 선별방법을 이용하면, 상기 시그널 펩타이드 별로 만들어진 바코딩 서열을 통해 목적 단백질에 최적인 시그널 펩타이드를 초고속으로 선별할 수 있어 재조합 단백질의 생산 수율을 극대화 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0104] 도 1은 Signal peptide tag (SP-tag)을 이용하여 해당 signal peptide를 식별하는 원리에 대한 모식도이다.

도 2는 SP-tag을 이용하여 단백질 생산량을 증가시키는 signal peptide 선별 방법 모식도를 나타낸다.

도 3은 signal peptide-표적 단백질-SP-tag을 발현하는 벡터의 구축 예시를 나타낸다.

도 4는 1200종의 Signal peptide와 SP-tag으로 이루어진 라이브러리 구축한예시를 나타낸다.

도 5는 SP-tag를 디자인하는 방법을 나타낸다.

도 6은 아미노산 18종을 각각 가지고 있는 18종 SP-tagging 단백질 발현 정제 결과를 나타낸다.

도 7은 18종의 아미노산을 하나씩 포함한 SP-tag의 상대정량 결과를 나타낸다.

도 8은 10종류의 signal peptide 벡터들을 이용한 라이브러리 제작 방법 검증 결과를 나타낸다.

도 9는 LC-MS/MS를 이용한 optimal signal peptide 스크리닝 방법 검증 실험 모식도를 나타낸다.

도 10은 LC-MS/MS와 western blot 실험 결과 비교 분석 결과를 나타낸다.

도 11은 LC-MS/MS와 western blot 결과를 통한 signal peptide 랭킹화 결과를 나타낸다.

도 12는 9종의 SP-tag 발현량에 따른 LC-MS/MS peak 그래프를 나타낸다.

도 13은 SP-tag과 LC-MS/MS를 이용한 signal peptide 스크리닝 결과를 나타낸다.

도 14는 Peak area와 intensity에 따른 상대 정량 peak 종류를 나타낸다.

도 15는 선별된 10종의 signal peptide를 나타내는 표이다.

도 16은 시료에 존재하지 않는 isotope labeled peptide 기반의 글로벌 스탠다드 펩타이드 (EQVTNVGGAVVTGVTAVAQK)로 16개 그룹의 MRM 분석결과를 보정하기 위한 수치를 나타낸다.

도 17은 Aflibercept 발현에 적합한 signal peptide 스크리닝 결과를 나타낸다.

도 18은 LC-MS/MS 분석 결과에서 도출된 결과중 상위 24종과 하위 24종의 individual 발현을 western blot과 OCTET으로 정량하여 비교한 결과를 나타낸다.

도 19는 western blot과 OCTET으로 분석하여 얻은 2차 hit에 대한 signal peptide를 나타내는 표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0105] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0107] **실시예**

[0108] *실험재료 및 실험방법*

[0109] **1. Barcoding sequence 에 사용될 아미노산 선정**

[0110] LC-MS/MS에서 효율적이고 동등한 이온화 및 검출을 위해 barcoding sequence로 사용할 아미노산을 선정하였다. 총 20종의 아미노산 중 trypsin에 절단되는 K(라이신)와 R(아르기닌)을 제외한 18종의 아미노산이 각각 하나씩 포함된 tag을 한 종의 표적단백질 c-terminal에 fusion된 형태의 18종의 clone들을 제작하였다.

[0111] Overlapping PCR (SET15-R500, Solgent)을 이용해 표적유전자를 만들고 vector와 유전자에 제한 효소 AscI

(R0558S, New England Biolabs) / XhoI (R0146S, New England Biolabs)을 처리하였다. Vector와 PCR product를 DNA ligation mixture (6023, Takara)와 섞은 후 상온에서 10분간 ligation 시킨 후 DH5α (CP010, Enzynomics)에 transformation하여 클로닝 하였다. 18종의 plasmid를 FreeStyle 293-F 세포 (R79007, ThermoFisher Scientific)에 발현시켰고 3일 후 세포배양액을 수거하였다. 세포배양액에 있는 표적단백질을 Ni-NTA resin (05893801001, Roche)을 이용해 His affinity chromatography로 분리 정제하였다. 18종의 단백질 1 ug 씩 전처리 후 LC-Ms/Ms로 정량하여 peak area 값을 구하고 비교하였다.

[0113] **2. Signal peptide와 SP-tag vector 구축**

[0114] 1200종의 SP-tag에 대한 primer를 합성하였고 (Cosmogenetech, Republic of Korea) Overlapping PCR (SET15-R500, Solgent)을 이용해 SP-tag 유전자를 제작하였다. Vector와 PCR product에 제한효소 AscI (R0558S, New England Biolabs) / XhoI (R0146S, New England Biolabs)을 처리하고 DNA ligation (6023, Takara)을 하였다. Ligation mixture를 DH5α (CP010, Enzynomics) 에 transformation하여 클로닝 하였다.

[0116] **3. 표적 단백질 라이브러리 제작 protocol 검증**

[0117] 10종의 signal peptide가 있는 10종 vector들과 1종 표적단백질 유전자를 제한효소 AscI (R0558S, New England Biolabs) / XhoI (R0146S, New England Biolabs)을 각각 처리하고 10종의 vector와 insert를 DNA ligation (6023, Takara) 하였다. 다음 ligation mixture를 DH5α (CP010, Enzynomics)에 transformation하여 mini-library를 제작하였다. Mini-library의 다양성을 확인하기 위해 re-transfromation하여 100개의 colony를 picking 하여 sequencing (Solgent, Republic of Korea) 진행하였다.

[0119] **4. Signal peptide screening 검증**

[0120] 9종의 SP-tag이 있는 vector들과 1종 표적단백질 유전자를 각각 클로닝하여 9종의 clones을 제작하였다. 9종을 섞어서 혹은 독립적으로 FreeStyle 293-F 세포 (R79007, ThermoFisher Scientific)에 발현시키고 3일 후 세포 배양액을 확보하였다. 세포 배양액에 있는 표적단백질을 검출하기 위해 anti-6 x his antibody (ab18184, Abcam)를 이용해 western blot을 진행하였다. 또한 세포 배양액을 Ni-NTA resin (05893801001, Roche)을 이용해 His affinity chromatograpy를 진행하여 전처리 후 LC-Ms/Ms를 실시하여 peak area 값을 얻었다. Western blot 결과와 LC-MS/MS결과를 비교 분석하였다.

[0122] **5. 다중반응 모니터링 (MRM : Multiple reaction monitoring)을 이용한 정량**

[0123] MRM은 나노전자분무 인터페이스를 갖춘 하이브리드 트리플 쿼드러플/이온 트랩 질량 분석기 (6500QTRAP, AB SCIEX, USA)에 연결된 나노 LC 시스템(nanoACQUITY UPLC System Nano-LC, Waters)에서 수행하였다. 상기 질량분석기를 양성 이온 MRM 모드에서 작동하였으며, Q1 and Q3는 상이한 전구체/산물 이온쌍을 전달하도록 세팅하였다.

[0124] LC 버퍼 시스템은 하기와 같다: 이동상 A, 2% 아세토니트릴/0.1% 포름산 (Fisher Scientific, Cat# LS118-4) 및 이동상 B, 98% 아세토니트릴/0.1% 포름산 (Fisher Scientific, Cat# LS120-212). 펩타이드를 분리하여 유속 300 nl/min로 45분 내에 5% 내지 95% B로 선형 농도 구배의 이동상 B에서 용출하였다. 총 LC 분석 시간은 60분이었으며, 트랩 (100Å, 5 μm, 180 μm x 20 mm, 2G, V/M, Cat# 186006527)과 분석 (130Å, 1.7 μm, 100 μm X 100, Cat# 186003546)용 컬럼을 각각 사용하였다.

[0125] 전형적인 장비 세팅은 다음과 같다: 이온스프레이(IS) 볼트 2.3 kV, 인터페이스 히터의 온도 300℃, GS1 (nebulizer gas) 셋팅 15, 및 커튼 가스 셋팅 20. 디클러스터링 전위 (DP) 및 충돌 에너지 (CE) MS 계수는 각 펩타이드의 적정화된 수치를 선형 회귀분석 및 매뉴얼 튜닝 하여 결정하였다. MRM 실험은 Q1 and Q3에 대하여 각각 0.2/0.7 Da (FWHM)의 해상도를 이용하여 20 ms의 스캐닝 시간 0.002 m/z의 스캐닝 폭으로 수행되었다. MRM 수행 시 스캐닝 시간은 각 트랜지션에서 20 ms이었고, 트랜지션 스캐닝 간의 퍼즈는 1 ms로 맞추었다. MRM 트랜지션은 최고 강도의 단편 이온을 모니터링 하기 위해 선별되었다.

[0127] **6. 시료전처리 (In solution digestion)**

[0128] MRM 분석을 위해 단백질을 다음과 같이 처리하였다. 시료 단백질은 비씨코닌산 (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo ScientificTM, 23225) 분석법으로 정량하였다. 100 μg의 단백질 시료를 6 M urea (GE Healthcare, PN 17-1319-01), 50 mM Tris, pH 8.0 (Invitrogen, AM9855G), 및 30 mM dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich, PN D0632-10G)를 이용하여 37℃에서 60분간 변성한 후 50 mM iodoacetamide (IAA, Sigma-Aldrich, PN I1149-25G)로 실온의 암실에서 30분간 알킬화 하였다. 우레아를 50 mM Tris, pH 8.0를 이용하여 15배 희석한 후 트립신/라이스씨(Promega, PN V0571)을 1:50 (w/w)의 효소 대 단백질 농도의 비로 첨가하여 37℃에서 Overnight 배양하였다.

[0129] 트립신 분해는 최종농도 1%의 포름산 (SIGMA Aldrich, F0507) 을 첨가하여 중지하였으며, OASIS cartridges (Waters, PN WAT094225)에서 염을 제거하였다. 상기 카트리지는 사용 전에 0.1% 포름산을 포함하는 3 ml의 물 및 3 ml의 메탄올로 평형화하였다. 사용 후 3 ml 0.1% 포름산으로 세척한 후 1 ml의 60% ACN, 0.1 % 포름산으로 용출하였다. 용출된 시료를 스피드 진공에서 건조 후 동결하였다. MRM 분석 전에 시료는 0.1% 포름산에 0.2 μg/μl 농도로 용해하여 사용하였다.

[0131] **7. SP-tag design**

[0132] SP-tag은 cleavage site, barcoding sequence, his tag으로 구성된다. SP-tag에 사용되는 아미노산은 최소 14-20까지 가능하며 (LC-MS 분석 시 최대 20개 amino acid까지가 정량성 확보가 가능), 본 발명자들은 아래와 같은 방식으로 14개의 아미노산을 활용하였다. 14개의 아미노산의 펩타이드 길이를 유지 하면서 1200종의 peptide mass 값이 차이나는 펩타이드를 디자인 하기 위해, SP-Tag 역할을 하는 펩타이드는 정량적으로 차이를 보이지 않게 디자인하였다.

[0134] **(1) 바코딩 시퀀스 선정**

[0135] ① MRM 분석을 위해 단백질 펩타이드 최대 길이는 20, 최소 길이는 8개 아미노산으로, Trypsin cleavage site인 R 또는 K은 포함시키지 않았다. 즉, 먼저 20 종의 아미노산에서 K 및 R을 제외하여 18종의 아미노산을 선정하였다.

[0136] ② 이후, 아래와 같은 실험을 통해 상기 18종의 아미노산 중 소수성 지표(hydropathy index)가 높거나 낮은 V, F, G, C, H 및 N의 6종을 제외하여 12종의 아미노산을 선정하였다: 먼저 아미노산을 1개씩 다르게 하여 LC-MS 분석을 통해 발현량이 동일한지 확인을 하였다. 상기 아미노산들 중 LC-MS 분석 시 V, F, G, C, H 및 N의 경우 상대적으로 높거나 낮은 값이 확인이 되어 이를 제외하였다 (또한, 상기 H는 His tag에 영향을 줄 가능성 및 전하 변경의 우려도 존재함).

[0137] ③ 추가적으로, 상기 12종의 아미노산 중 M은 단백질 digestion시 oxidation modification이 발생할 수 있어서 배제하여 총 11종의 아미노산을 선정하였다.

[0138] ④ 마지막으로, 이들 중 유사한 질량 (Similar Mass)을 갖는 I, Q, N, L, E 및 D 중에서는 I 및 Q를 배제 (N은 단계 ②에서 배제)하고 L, E 및 D 만 사용하여 최종적으로 L, P, A, W, Y, T, S, E 및 D의 9종을 이용하여 5자리 바코팅 시퀀스를 design 하였다.

[0140] **(2) Cleavage site 및 his tag design**

[0141] Cleavage site design으로서, Trypsin cleavage를 위해 앞쪽에 Lysine (K)을 삽입 하였으며, 펩타이드 이온화 안정성과 정량성 확보를 위해 Arginine (R)을 맨 뒤쪽에 삽입하였다.

[0142] 또한 KP, KD, KE 연속 sequence 발생 방지를 위해 K 뒤에 G를 삽입하였는데, K 옆에 P가 있으면 Trypsin cleavage가 완벽히 이루어지지 않으며, Acidic residue인 D 및 E의 경우 가수 분해 속도를 저해하여 miss cleavage의 발생 원인이기 때문이다. 또한, G를 선정한 이유는 ① 먼저 P, D, E를 제외하고, ② 바코딩 sequence로 사용한 L, P, A, W, Y, T, S, E 및 D를 제외하였으며, ③ 안정적 cleavage site를 고려하여 G를 선

정하였다.

[0143] His tag은 표적 단백질만을 분리 정제하기 위한 6 x Histidine tag을 붙였다.

[0145] *실험결과*

[0146] **1. Signal peptide tag (SP-tag)을 이용하여 해당 signal peptide를 찾은 방법 고안**

[0147] 세포 내에서 translation되는 단백질의 N-terminus에 있는 Signal peptide는 단백질 분비에 매우 중요한 역할을 한다. 재조합 단백질의 생산시 다양한 signal peptide를 접목시킴으로써 세포 밖 분비를 촉진시켜 생산량을 증가 시킬 수 있다. 본 발명은 단백질 생산에 최적의 signal peptide를 찾기 위한 초고속 탐색 방법을 고안하였다. 단백질 N-terminus에 있는 signal peptide는 세포 내에서 cleavage 되므로 분비된 단백질에는 signal peptide가 존재하지 않는다. 그 대신 단백질 C-terminus에 signal peptide tag (SP-tag)를 붙이고 이를 동정함으로써 그에 해당하는 signal peptide를 식별하는 방법을 고안하였다 (도 1).

[0148] 단백질 생산량을 증가시키는 signal peptide 스크리닝 방법에 대한 모식도는 도 2와 같다:

[0149] 1) 표적 단백질 라이브러리 제작: 다양한 signal peptide와 이에 해당하는 서로 다른 분자량을 가진 SP-tag들을 가지고 있는 벡터에 표적 단백질을 클로닝하여 표적 단백질 라이브러리를 제작한다.

[0150] 2) 표적 단백질 라이브러리 발현: 표적 단백질 라이브러리를 동물세포에 transfection 시킨 후, 수일 뒤 세포 밖으로 분비된 단백질을 포함하고 있는 세포 배양액을 모은다. 이때 signal peptide 종류에 따라 분비된 단백질의 양이 다르며 이는 각 signal peptide에 해당하는 SP-tag에 따라 구분될 수 있다.

[0151] 3) 단백질 생산량을 증가 시키는 signal peptide 선별: 생산된 단백질을 포함한 세포배양액에서 LC-MS/MS를 이용해 다양한 SP-tag을 동정하고 상대정량을 실시한다. 상대정량 값을 이용해 동정된 SP-tag들을 ranking화하고 해당 되는 signal peptide를 식별함으로써 단백질 생산량을 증가시키는 최적의 signal peptide를 찾을 수 있다.

[0153] **2. Signal peptide 및 SP-tag을 가지고 있는 라이브러리 구축**

[0154] Signal peptide와 SP-tag 사이에 표적 단백질을 제한 효소 ASC I - Xba I/Nhe I을 이용하여 클로닝 해서 [signal peptide - 표적 단백질 - SP-tag] 형태를 포함하는 벡터를 제작하였다(도 3).

[0155] 또한, 도 4와 같이 1200종의 signal peptide를 가지고 있는 벡터에 각 signal peptide에 해당하는 1200종의 SP-tag을 클로닝하여 라이브러리를 구축하였다. 라이브러리 구축에 사용된 1200종의 signal peptide는 이미 알려져 있는 인간 분비 단백질의 signal peptide를 사용하였다(표 1).

표 1

[0157] **라이브러리를 구성하는 1200종의 인간 signal peptides**

No.	Name of Signal peptides	Amino acid sequence
1	Afamin	MKLLKLTGFIFFLFFLTESLT
2	Alkaline phosphatase	MQGPWVLLLLGLRLQLSLG
3	Alpha-1-antitrypsin	MPSSVSWGILLLAGLCCLVPVSLA
4	Alpha-2-macroglobulin	MGKNKLLHPSLVLLLVLLPTDA
5	Angiogenin	MVMGLGVLLLVFVLGLGLTPPTLA
6	Apolipoprotein E	MKVLWAALLVTFLAGCQA
7	Appetite-regulating hormone	MPSPGTVCSLLLLGMLWLDLAMA
8	Arylsulfatase A	MGAPRSLLLALAAGLAVA
9	Azurocidin	MTRLTVLALLAGLLASSRAGSSPLLD
10	Cadherin-2	MCRIAGALRTLLPLLAALLQASVEA
11	Calcitonin	MGFQKFSPFLALSILVLLQAGSLHA
12	Carboxypeptidase A1	MRGLLVLSVLLGAVFG
13	Cathepsin B	MWQLWASLCCLLVLANA

14	Chromogranin-A	MRSAAVLALLLCAGQVTA
15	Cortistatin	MPLSPGLLLLLLSGATAT
16	Elastin	MAGLTAAAPRPGVLLLLLSILHPSRP
17	Fibroblast growth factor 4	MSGPGTAAVALLPAVLLALLAPWAGRGGAA
18	Fibronectin	MLRGPGPGLLLLAVQCLGTAVPSTGASKSKR
19	Fibulin-1	MERAAPSRRVPLPLLLLGGLALLAAGVDA
20	Gastric triacylglycerol lipase	MWLLLTMASLISVLGTTHG
21	Gastrin	MQRLCVYVLIFALALAAFSEA
22	Glucosylceramidase	MAGSLTGLLLLQAVSWASG
23	High IgG Fc receptor I	MWFLTTLLLWVPVDG
24	Histatin-3	MKFFVFALILALMLSMTGA
25	Human Serum Albumin	MKWVTFISLLFLFSSAYS
26	Insulin	MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAA
27	Insulin-like growth factor 1	MGKISSLPTQLFKCCFCDFLK
28	Interferon alpha-17	MALSFSLLMAVLVLSYKSICSLG
29	Interleukin-2	MQLLSCIALILALV
30	Lactotransferrin	MKLVFLVLLFLGALGLCLA
31	Nephronectin	MDFLLALVLVSSLYLQAAA
32	Neuropeptide B	MARSATLAAAALALCLLLAPPGLA
33	Neurotrophin 4	MLPLPSCSLPILLLFLLPSVPIES
34	Neutrophil defensin 1	MRTLAILAAILLVALQAQA
35	Oxytocin	MAGSSLACCLLGLLALTSA
36	Pancreatic alpha amylase	MKFFLLLFTIGFCWA
37	Pancreatic prohormone	MAAARLCLSLLLLSTCVALLLQPLLGAQG
38	Pepsin A4	MKWLLLLGLVALSEC
39	Proenkephalin-A	MARFLTLCTWLLLLGPGLLATVRA
40	Resistin	MKALCLLLLPVLGLLVSS
41	slit3	MAPGWAGVGAAVRARLALALALASVLSGPPAVA
42	SOD3	MLALLCSCLLLAAGASDA
43	Statherin	MKFLVFAFILALMVSMIGA
44	Thromopoietin	MELTELLLVVMLLLTARLTLS
45	Tissue-type plasminogen activator	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP
46	Trypsinogen-2	MNLLLILTFVAAAVA
47	Tyrosinase	MLLAVLYCLLWSFQTSAG
48	Uteroglobin	MKLAVTLTLVTLALCCSSASA
49	Vascular endothelial growth factor A	MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQA
50	Wnt-1	MGLWALLPGWVSATLLLALAALPAALA
51	Acidic mammalian chitinase	MTKLILLTGLVLILNLQLGSA
52	Acrosin	MVEMLPTAILLVLAVSVVA
53	Acrosomal protein SP-10	MNRFLLLMSLYLLGSARGTSS
54	Acyloxyacyl hydrolase	MQSPWKILTVAPLFLLLSLQSSA
55	ADAM DEC1	MLRGISQLPAVATMSWVLLPVLWLIVQTQA
56	ADAMTS-like protein 1	MECCRRATPGTLLLFLAFLLLSSRTARS
57	Adipolin	MRRWAWAAVVVLLGPQLVLL
58	Adiponectin	MLLLGAVLLLLALPGHDQ
59	Adrenomedullin	MKLVSVALMYLGSLAFLGADT
60	Agouti-related protein	MLTAAVLSCALLLALPATRG
61	Agouti-signaling protein	MDVTRLLLATLLVFLCFFTANS
62	Agrin	MAGRSHPGPLRPLLPLLVVAACVLPGAGG
63	Alpha-1B-glycoprotein	MSMLVVFLLLWGVTWGPVTEA
64	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1	MWAQLLLGMLALSPAIA
65	Alpha-fetoprotein	MKWVESIFLIFLLNFTES
66	Alpha-lactalbumin	MRFFVPLFLVGILFPAILA
67	Ameloblastin	MSASKIPLFKMKDLILILCLLEMSFA
68	Amelogenin	MGTWILFACLLGAAFA
69	Amelotin	MRSTILLFCLLGSTRS
70	Amiloride-sensitive amine oxidase	MGRGTLALGWAGAALLLLQMLAAA
71	Amphiregulin	MRAPLLPPAPVVLSLLILG

72	Amyloid beta A4 protein	MLPGLALLLLAAWTARA
73	Angiotensinogen	MRKRAPQSEMAPAGVSLRATILCLLAWAGLAAG
74	Anosmin-1	MVPGVPGAVLTLCLWLAASSGCLA
75	Antileukoproteinase	MKSSGLFPFLVLLALGTLAPWAVEG
76	Apelin	MNLRLCVQALLLLWLSLTAVCG
77	Apolipoprotein A-I	MKAAVLTLAVLFLTGSQA
78	Apolipoprotein B-100	MDPPRPALLALLALPALLLLLLAGARA
79	Aspartylglucosaminidase	MARKSNLPVLLVPFLLCQALVRC
80	Asporin	MKEYVLLLFLALCS
81	Augurin	MAASPARPAVLALTGLALLLLLCWGPGGISG
82	Basigin	MAAALFVLLGFALLGTHGASG
83	Beta-2-glycoprotein 1	MISPVLILFSSFLCHVAIA
84	Beta-2-microglobulin	MSRSVALAVLALLSLSGLEA
85	Beta-hexosaminidase subunit alpha	MTSSRLWFSLLLAAAFAGRATA
86	Beta-microseminoprotein	MNVLLGSVVIFATFVTLCNA
87	Beta-secretase 2	MGALARALLLPLLAQWLLRA
88	Biglycan	MWPLWRLVSLLALSQA
89	Bone marrow proteoglycan	MKLPLLLALLFGAVSA
90	Brevican core protein	MAQLFLPLLAALVLAQAPAALA
91	Calreticulin	MLLSVPLLLGLLGLAVA
92	Calsequestrin-2	MKRTHLFIVGIYFLSSCRA
93	Carboxylesterase 1	MWLRAFILATLSASAAW
94	Cartilage intermediate layer protein 1	MVGTKAWVFSFLVLEVTSVLG
95	Cerebellin-1	MLGVLELLLLGAAWLAGPARG
96	Ceruloplasmin	MKILILGIFLFLCSTPAWA
97	Cholecystokinin	MNSGVCLCVLMAVLAAGALT
98	Cholinesterase	MHSKVTIICIRFLFWFLLLCMLIGKSHT
99	Chondroadherin-like protein	MEGPRSSTHVPLVLPLLVLLLLAPARQAAA
100	Chordin	MPSLPAPPAPLLLLGLLLLGSRPARG
101	Choriogonadotropin subunit beta 3	MEMFQGLLLLLLLSMGGTWA
102	Chorionic somatomammotropin hormone 2 isoform 2	MAAGSRTSLLLAFALLCLPWLQEAGA
103	Chymase	MLLLPLPLLLFLLCSRAEA
104	Clusterin	MMKTLLLFVGLLLTWESGQVLG
105	Coagulation factor V	MFPGCPRLWVLVVLGTSWVGWGSQGTEA
106	Colipase	MEKILILLLVALSVAYA
107	Collagen alpha-1(I) chain	MFSFVDLRLLLLLAATALLTHG
108	Complement C3	MGPTSGPSLLLLLLTHLPLALG
109	Contactin-1	MKMWLLVSHLVIISITTCLA
110	Corneodesmosin	MGSSRAPWMGRVGGHGMMALLLAGLLLPGTLA
111	Corticoliberin	MRLPLLVSAGVLLVALLPCPPCRA
112	Corticosteroid-binding globulin	MPLLLYTCLLWLPTSGLWTVQA
113	Corticotropin-releasing factor-binding protein	MSPNFKLQCHFILIFLTALRGESR
114	C-reactive protein	MEKLLCFLVLTSLSHAFG
115	Cubilin	MMNMSLPFLWSLLTLLIFAEVNG
116	Cystatin-C	MAGPLRAPLLLLAILAVALAVSPAAG
117	Deoxyribonuclease-1	MRGMKLLGALLALAALLQGAVS
118	Dermatopontin	MDLSLLWVLLPLVTMAWG
119	Dermcidin	MRFMTLLFLTALAGALVCA
120	Dickkopf-related protein 1	MMALGAAGATRVFVAMVAAALGGHPLLGVSA
121	Dystroglycan	MRMSVGLSLLLPLSGRTFLLLLSVVMAQS
122	EGF-like domain-containing protein 1	MGAAAVRWHLCVLLALGTRGRLA
123	Enamelin	MLVLRCRLGTSFPKLDNLVPKGKMKILLVFLGLLGNSVA
124	Endothelin-1	MDYLLMIFSLLFVACQG
125	Endothelin-2	MVSVPTTWCSVALALLVALHEGKG
126	Ephrin-A2	MAPAQRPLLPLLLLLLPLPPPPFA
127	Epiphycan	MKTLAGLVLGLVIFDAAVT
128	Eppin	MGSSGLLSLLVLFVLLANVQG

129	Erythroferrone	MAPARRPAGARLLLVYAGLLAAAAAGLG
130	Erythropoietin	MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLG
131	E-selectin	MIASQFLSALTLVLLIKESGA
132	Fibromodulin	MQWTSLLLLAGLFSLSQA
133	Follicular dendritic cell secreted peptide	MKKVLLLITAILAVAVG
134	Follistatin	MVRARHQPGGLCLLLLLCQFMEDRSAQA
135	Furin	MELRPWLLWVVAATGTLVLLAADA
136	Galanin peptides	MARGSALLLASLLLAAALS
137	Galanin-like peptide	MAPPSVPLVLLLVLLLSLAETPAS
138	Gastrokine-1	MLAYSSVHCFREDKMKFTIVFAGLLGVFLAPALA
139	Glucagon	MKSIYFVAGLFVMLVQGSWQ
140	Glycophorin-A	MYGKIIFVLLLSEIVSISA
141	Glypican-1	MELRARGWWLLCAAAALVACARG
142	GPHB5 protein	MKLAFLFLGPMALLLLAGYGCVLG
143	Granulysin	MATWALLLLAAMLLGNPGLVFS
144	Granzyme B	MQPILLLLAFLLLPRADA
145	Growth hormone variant	MAAGSRTSLLLAFGLLCLSWLQEGSA
146	Guanylin	MNAFLLSALCLLGAWAALAGG
147	Haptoglobin	MSALGAVIALLLWGQLFA
148	Heparanase	MLLRSKPALPPPLMLLLLGPLGPLSPGALPRPAQA
149	Hepatocyte growth factor	MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLLPIAIPYAEG
150	Hepcidin	MALSSQIWAACLLLLLLASLTSG
151	Ig heavy chain V-III region 23	MEFGLSWLFLVAILKGVQC
152	Ig kappa chain V-III region HIC	METPAQLLFLLLLWLPDTTG
153	Insulin-like peptide INSL6	MPRLLRLSLLWLGLLLVRFS
154	Integrin alpha-2	MGPERTGAAPLPLLLVLALSQGILNCCLA
155	Intelectin-1	MNQLSFLLFLIATTRGWS
156	Interferon alpha-inducible protein 27-like protein 2	MMKRAAAAAVGGALAVGAVPVVLS
157	Interleukin-2	MYRMQLLSCIALSLALVTNS
158	Interleukin-6	MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAP
159	Kallikrein-1	MWFLVLCLALSLGGTGAA
160	Kallikrein-6	MKKLMVVLSLIAAAWA
161	Keratocan	MAGTICFIMWVLFITDTVWS
162	Kininogen-1	MKLITILFLCSRLLLSLT
163	Klotho	MPASAPPRRPRPPPPSLSLLLVLLGLGGRRLRA
164	Lactoperoxidase	MRVLLHLPALLASLILLQAAASTTRA
165	Legumain	MVWKVAVFLSVALGIGA
166	Leptin	MHWGTLCGFLWLWPYLFYVQA
167	Lumican	MSLSAFTLFLALIGGTSG
168	Lymphotactin	MRLLILALLGICSLTAYIVEG
169	Lysyl oxidase homolog 2	MERPLCSHLCSCLAMLALLSPLSLA
170	Mammalian ependymin-related protein 1	MPGRAPLRTVPGALGAWLLGGLWAWTLCGLCSLGAVG
171	Mannose-binding protein C	MSLFPSLPLLLLSMVAASYS
172	Matrilin-2	MEKMLAGCFLLILGQIVLLPAEA
173	Metalloproteinase inhibitor 2 (TIMP2)	MGAAARTLRLALGLLLLATLLRPADA
174	Methyltransferase-like protein 7B	MDILVPLLQLLVLLLTLPLHLMA
175	Midkine	MQHRGFLLLTLLALLALTSA
176	Mucin-5AC	MSVGRRKLALLWALALALACTRHTGHA
177	Muellerian-inhibiting factor	MRDLPLTSLALVLSALGA
178	Multimerin-1	MKGARLFVLLSSLWSGGIG
179	Myostatin	MQKLQLCVYIYLFMLIVA
180	Napsin-A	MSPPPLLQPLLLLLPLLNVEPSGAT
181	Natriuretic peptides A	MSSFSTTTVSFLLLLAFQLLGQTRA
182	Natriuretic peptides B	MDPQTAPSRALLLLLFLHLAFLGGRS
183	Netrin-4	MGSCARLLLLWGCTVVAA
184	Neural cell adhesion molecule 1	MLQTKDLIWTLFFLGTAVS
185	Neurexophilin-2	MRLRPLPLVVVPGLLQLLFCDS

186	Neurocan core protein	MGAPFVWALGLLMLQMLLFVAG
187	Neuroendocrine convertase 1	MERRAWSLQCTAFVLFCAWCALNSAKA
188	Neuroendocrine convertase 2	MKGGCVSQWKAAAGFLFCVMVFASA
189	Neuromedin-B	MARRAGGARMFGSLLLFALLAAGV
190	Neurosecretory protein VGF	MKALRLSASALFCLLLINGLGA
191	Niemann-Pick C1 protein	MTARGLALGLLLLLLCPAQVFS
192	Noggin	MERCPSLGVTLYALVVVLGLRATPAGG
193	Norrin	MRKHVLAASFSMLSLLVIMGDTDS
194	Nyctalopin	MKGRGMLVLLLHAVVLGLPSAWA
195	Olfactomedin-4	MRPGLSFLLALLFFLGQAAG
196	Osteoglycin	MKTLQSTLLLLLLVPLIKP
197	Otospiralin	MQACMVPGLALCLLLGPLAGA
198	Ovochymase-2	MLISRNKLILLLGIVFFERGKS
199	Palmitoyl-protein thioesterase 1	MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHL
200	Pancreatic lipase-related protein 3	MLGIWIVAFLFFGTSRG
201	Parathyroid hormone	MIPAKDMAKVMIVMLAICFLTKSDG
202	Peptide YY	MVFVRRPWPALTTVLLALLVCLGALVDA
203	Persephin	MAVGKFLLGSLLLLSLQLGQG
204	Pikachurin	MDLIRGVLLRLLLLASSLGPGAVS
205	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide	MTMCSGARLALLVYGIIMHSSVYS
206	Placenta-specific protein 1	MKVFKFIGLMILLTSAFSAGSG
207	Plasma serine protease inhibitor	MQLFLLLCLVLLSPQGASL
208	Platelet-derived growth factor receptor beta	MRLPGAMPALALKGELLLLSLLLLLEPQISQG
209	Prenylcysteine oxidase 1	MGRVVAELVSSLLGLWLLLCSCGCPEG
210	Prepronociceptin	MKVLLCDLLLLSLFSSVFS
211	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	MTSSGPGPRFLLLLPLLLPPAASA
212	Proenkephalin-B	MAWQGLVLAACLLMFPSTTA
213	Pro-epidermal growth factor	MLLTLIILLPVVSKFSFVSLSA
214	Proepiregulin	MTAGRRMEMLCAGRVPALLLCLGFHLLQA
215	Progonadoliberin-1	MKPIQKLLAGLILLTWCVEGCSS
216	Prokineticin-1	MRGATRVSIMLLLVTVSDC
217	Prokineticin-2	MRSLCCAPLLLLLLLPPLLLTPRAGDA
218	Prolactin releasing hormone	MKVLRAWLLCLLMLGLALRGAAS
219	Prolactin-inducible protein	MRLLQLLFRASPATLLLVLCLQLGANKA
220	Prolyl 3-hydroxylase 2	MRERIWAPPLLLLLPLLLPPPLWG
221	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	MIWYILIIGILLPQSLA
222	Promotilin	MVSRKAVAALLVVHVAAMLASQTEA
223	Pro-neuropeptide Y	MLGNKRLGLSGLTLALSLLVCLGALAEA
224	Pro-opiomelanocortin	MPRSCCSRSGALLLALLLQASMEVRG
225	Prorelaxin H2	MPRLFFFHLLGVCLLLNQFSRAVA
226	ProSAAS	MAGSPLLWGPRAGGVGLLVLLLLGLFRPPPALC
227	Prosalusin	MAAATRGCRPWGSLLGLLGLVSAAAA
228	Prostaglandin-H2 D-isomerase	MATHHTLWMGLALLGVLGDLQA
229	Prostate and testis expressed protein 2	MLVLFLLGTVFLLCPYWGELHDPIKA
230	Protachykinin-1	MKILVALAVFFLVSTQLFA
231	Protein disulfide-isomerase	MLRRALLCLAVAALVRA
232	Protein O-glucosyltransferase 1	MEWWASSPLRLWLLLFLLPSAQG
233	Prothrombin	MAHVRGLQLPGCLALAALCSLVHS
234	Pro-thyrotropin-releasing hormone	MPGPWLLLALALTLNLTGVPGGRA
235	Pulmonary surfactant-associated protein D	MLLFLLSALVLLTQPLGYLE
236	Relaxin-3	MARYMLLLLLAVWVLTGELWPGAEA
237	Renalase	MAQVLIVGAGMTGSLCA
238	Renin	MDGWRRMPRWGLLLLLWGSCTFG
239	Reticulocalbin-2	MRLGPRTAALGLLLLCAAAAGA
240	Sarcalumenin	MRALVLLGCLLASLLFSGQA
241	Sclerostin	MQLPLALCLVCLLVHTAFRVVEG

242	Secretin	MAPRPLLLLLLLLGGSAA
243	Secretoglobin family 1D member 1	MRLSVCLLLLTLALCCYRANA
244	Secretogranin-1	MQPTLLLSLLGAVGLAAVNS
245	Selenoprotein M	MSLLLPPLALLLLLAALVAPATA
246	Semenogelin-1	MKPNIIFVLSLLLILEKQAAVMG
247	Serglycin	MMQKLLKCSRLVLALALILVLESSVQG
248	Serotransferrin	MRLAVGALLVCAVLGLCLA
249	Serum amyloid A-1 protein	MKLLTGLVFCSLVLGVSS
250	Serum amyloid P-component	MNKPLLWISVLTSLLEAFA
251	Somatomedin-B and thrombospondin type-1 domain-containingprotein	MRTLWMALCALSRLWPGAQA
252	Somatotropin	MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA
253	Sperm acrosome-associated protein 5	MKAWGTVVVTLATLMVVTVDA
254	Spexin	MKGLRSLAATTLALFLVFVFLGNSSC
255	Spondin-1	MRLSPAPLKLSRTPALLALALPLAAALA
256	Stanniocalcin-1	MLQNSAVLLVLVISASA
257	Stereocilin	MALSLWPLLLLLLLLLLLSFAV
258	Steryl-sulfatase	MPLRKMKIPFLLLFFLWEAES
259	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3A	MKSLTWILGLWALAACFTPGES
260	Sulfatase 1	MKYSCCALVLAVLGTELLGSLC
261	Syncollin	MSPLRPLLLALALASVPCAQG
262	Tachykinin-3	MRIMLLFTAILAFSLA
263	Tenascin	MGAMTQLLAGVFLAFLALATEG
264	Thyroglobulin	MALVLEIFTLLASICWVSA
265	Thyroid peroxidase	MRALAVLSVTLVMACTEA
266	Transcobalamin-1	MRQSHQLPLVGLLLFSFIPSQLC
267	Transforming growth factor beta-1	MPPSGLRLLLLLLPLLWLLVLTPGRPAAG
268	Transthyretin	MASHRLLLLCLAGLVFVSEA
269	Trehalase	MPGRTWELCLLLLLGLGLGSQEA
270	TSHR protein	MRPADLLQLVLLLDLPRDLGG
271	Tsukushin	MPWPLLLLLAVSGAQT
272	Urocortin	MRQAGRAALLAALLLLVQLCPGSSQ
273	Urotensin-2B	MNKILSSTVCFGLLTLLSVLSFLQSVHG
274	Versican core protein	MFINIKSILWMCSTLIVTHA
275	Vitrin	MRTVVLTMKASVIEMFLVLLVTGVHS
276	Vitronectin	MAPLRPLLILALLAWVALA
277	WAP four-disulfide core domain protein 2	MPACRLGPLAAALLLSLLLFGFTLVSGTGA
278	Zymogen granule membrane protein 16	MLTVALLALLCASASG
279	Cystatin-S	MARPLCTLLL LMATLAGALA
280	A disintegrin and metalloproteinase…1	MQRAVPEGFGRRKLGSDMGNAE RAPGSRSFGPVPTLLLLAAALLAVSDA
281	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	MSSWSRQRPKSPGGIQPHVSRTLFLLLLLAASAWG
282	Bone morphogenetic protein 2	MVAGTRCLLALLLPQVLLGGAAG
283	Bone morphogenetic protein 7	MHVRSLRAAAPHSFVALWAPLFLLRSALA
284	Complement C1q tumor necrosis factor-relatedprotein8	MAAPALLLLALLLPVGA
285	Carboxypeptidase E	MAGRGGSALLALCGALAACGWLLGA
286	Cholesteryl ester transfer protein	MLAATVLTLALLGNAHA
287	Complement factor I	MKLLHVFLLFLCFHLRFC
288	Collagen alpha-3(VI) chain	MRKHRHLPLVAVFCLFLSGFPTTHA
289	Cysteine-rich motor neuron 1 protein	MYLVAGDRGLAGCGHLLVSLLGLLLLLARSGTRA
290	UPF0672 protein CXorf36	MEPQLGPEAAALRPGWLALLLWVSALSCSFS
291	Cystatin-D	MMWPMHTPLLLLTALMVAVA
292	Beta-defensin 109	MRLHLLLLILLLFSILLSPVRG
293	Dickkopf-related protein 2	MAALMRSKDSSCCLLLLAAVLMVESSQIGSSRA
294	EMILIN-1	MAPRTLWSCYLCCLLTAAAGA
295	Fibulin-2	MVLLWEPAGAWLALGLALALGPSVAAA

296	FRAS1-related extracellular matrix protein 3	MAGASRHPTGTPRQLLVALACLLLSRPALQ
297	Gelsolin	MAPHRPAPALLCALSLALCALSLPVRA
298	Beta-galactosidase-1-like protein	MAPKKLSCLRSLLLPLSLTLLLPQADT
299	Plasma protease C1 inhibitor	MASRLTLLTLLLLLLAGDRASS
300	Interleukin-10	MHSSALLCCLVLLTGVRA
301	Interleukin-12 subunit alpha	MCPARSLLLVATLVLLDHLSLA
302	Interleukin-31	MASHSGPSTSVLFLFCCLGGWLA
303	Interleukin-1 receptor-like 1	MGFWILAILTILMYSTAA
304	Early placenta insulin-like peptide	MASLFRSYLPAIWLLLSQLLRESLA
305	Kallikrein-14	MSLRVLGSGTWPSAPKMF
306	Extracellular glycoprotein lacritin	MKFTTLLFLAAVAGALVYA
307	Left-right determination factor 1	MQPLWLCWALWVLPLASPGAA
308	Lysyl oxidase homolog 3	MRPVSVWQWSPWGLLLCLLCSSCLG
309	1-O-acylceramide synthase	MGLHLRPYRVGLLPDGLLFLLLLLMLLADPALP
310	Matrilin-4	MRGLLCWPVLLLLLQPWE
311	Matrix metalloproteinase-26	MQLVILRVTIFLPWCFA
312	Neutrophil collagenase	MFSLKTLPFLLLLHVQISKA
313	Netrin-2-like protein	MPGWPWGLLLTAGTLFAALSPGPPAPA
314	Neuropeptide S	MISSVKLNLILVLSLSTMHVFWC
315	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	MGWGSRCCCPGRLDLLCVLALLGGCLLPVCRT
316	Parathyroid hormone-related protein	MQRRLVQQWSVAVFLLSYAVPSCG
317	Peroxidasin-like protein	MEPRLFCWTTLFLLAGWCLPGLP
318	Sulfhydryl oxidase 2	MAAAGAAVARSPGIGAGPALR
319	Proactivator polypeptide	MYALFLLASLLGAALA
320	Pulmonary surfactant-associated protein A1	MWLCPLALNLILMAASGAVC
321	Tectonic-1	MRPRGLPPLLVVLLGCWASVSA
322	Protein TMEM155	MASDLIRTILAVALISKLGTAVDA
323	Twisted gastrulation protein homolog 1	MKLHYVAVLTLAILMFLTWLPESLS
324	Urokinase plasminogen activator surface receptor	MGHPPLLPLLLLLHTCVPASWG
325	VIP peptides	MDTRNKAQLLVLLTLLSVLF
326	Von Willebrand factor D and EGF domain-containingprotein	MPGGACVLVIALMFLAWGEA
327	WAP four-disulfide core domain protein 6	MGLSGLLPILVPFILLGDIQEPGHA
328	Protein Wnt-8a	MGNLFMLWAALGICCAAFS
329	Putative uncharacterized protein FLJ46089	MRCVTRTRNWWRRAARMPRAGSSAWWVAVCKQVCT
330	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-16alphachain	MRVMAPRTLILLLSGALALTETWA
331	Acrosin-binding protein	MRKPAAGFLPSLLKVLLLPLAPAAA
332	Angiopoietin-related protein 1	MKTFTWTLGVLFFLLVDTGHCRG
333	Apolipoprotein L1	MEGAALLRVSVLCIWMSALFLGVGVRA
334	Brain-specific serine protease 4	MVVSGAPPALGGGCLGTFTSLLLLASTAILNA
335	Cocaine- and amphetamine-regulated transcript protein	MESSRVRLLPLLGAALLLMLPLLGTRA
336	C-C motif chemokine 14	MKISVAAIPFFLLITIALG
337	C-C motif chemokine 4	MKLCVTVLSLLMLVAAFCSPALS
338	Complement component C6	MARRSVLYFILLNALINKGQA
339	Cytokine-like protein 1	MRTPGPLPVLLLLLAGAPAARP
340	Dickkopf-like protein 1	MGEASPPAPARRHLLVLLLLLSTLVIPSAA
341	Deoxyribonuclease gamma	MSRELAPLLLLLLSIHSALA
342	Dentin sialophosphoprotein	MKIITYFCIWAVAWA
343	EGF-like domain-containing protein 7	MRGSQEVLLMWLLVLAVGGTEHA
344	Endonuclease domain-containing 1 protein	MGTARWLALGSLFALAGLLEG
345	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase familymember2	MARRSSFQSCQIISLFTFAVGVNICLG

346	Abhydrolase domain-containing protein FAM108B1	MNNLSFSELCCLFCCPPCPG
347	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2	MLPCASCLPGSLLLWALLLLLLGSA
348	Complement factor H-related protein 5	MLLLFSVILISWVSTVGG
349	Glypican-4	MARFGLPALLCTLAVLSA
350	Ig heavy chain V-I region V35	MDWTWRILFLVAAATGAHS
351	Interferon alpha-7	MARSFSLLMVVLVLSYKSICSLG
352	Plasma kallikrein-like protein 4	MVSAAGLSGDGKMRGVLLVLLGLLYSSTSC
353	Laminin subunit beta-2	MELTSRERGRGQPLPWELRLGLLLSVLAATLA
354	Laminin subunit gamma-3	MAAAALLLGLALLAPRAAG
355	Lipase member I	MRVYIFLCLMCWVRS
356	Lactadherin	MPRPRLLAALCGALLCAPSLLVA
357	Mannose receptor-like protein 1	MLHPETSPGRGHLLAVLLALLGTTWA
358	Mucin-4	MKGARWRRVPWVSLSCLCLCLLPHVVPG
359	NKG2D ligand 2	MAAAAATKILLCLPLLLLLSGWSRA
360	Noelin-3	MSPPLLKLGAVLSTMAMISNWMS
361	Epididymal secretory protein E1	MRFLAATFLLLALSTAAQA
362	Otogelin	MGVLASALCWLLCVWLPWGEQA
363	PATE-like protein B	MRKMNTLLLVSLSFLYLKE
364	Perforin-1	MAARLLLLGILLLLLPLPVPA
365	Peptidoglycan recognition protein I-alpha	MGTLPWLLAFFILGLQA
366	Prostatic acid phosphatase	MRAAPLLLARAASLSLGFLFLLFFWLDRSVLA
367	Basic salivary proline-rich protein 4	MLLILLSVALLALSSA
368	Prolactin receptor	MKENVASATVFTLLLFLNTCLLNG
369	Serum amyloid A-4 protein	MRLFTGIVFCSLVMGVTS
370	Stromal cell-derived factor 2	MAVVPLLLLGGLWSAVGA
371	Serpin E3	MPPFLITLFLFHSCCLRANG
372	Tenascin-N	MSLQEMFRFPMGLLLGSVLLVASAPATL
373	Thioredoxin domain-containing protein 16	MFSGFNVFRVGISFVIMCIFYMPTVNS
374	Vascular endothelial growth factor receptor 2	MQSKVLLAVALWLCVETRA
375	von Willebrand factor A domain-containing protein 5B1	MPGLLNWITGAALPLTAS
376	WAP four-disulfide core domain protein 1	MPLTGVGPGSCRRQIIRALCLLLLLLHAGSA
377	Putative uncharacterized protein UNQ5830/PRO19650/PRO19816	MAILMLSLQLILLLIPSIS
378	Putative uncharacterized protein ENSP00000380674	MRPLLCALAGLALLCAVGALA
379	Putative uncharacterized protein LOC116349	MPAVFMLASSSALQCGRG
380	Anterior gradient protein 2 homolog	MEKIPVSAFLLLVALSYTLA
381	Insulin-like growth factor-binding protein complexacidlabilechain	MALRKGGLALALLLLSWVALGPRSLEG
382	Apolipoprotein C-III	MQPRVLLVVALLALLASARA
383	A disintegrin and metalloproteinase withthrombospondinmotifs16	MKPRARGWRGLAALWMLLAQVAEQ
384	A disintegrin and metalloproteinase withthrombospondinmotifs8	MLPAPAAPRWPPLLLLLLLLLPLARGA
385	Bone morphogenetic protein 1	MPGVARLPLLLGLLLLPRPGRP
386	Bactericidal/permeability-increasing protein-like 1	MAWASRLGLLLALLLPVVGA
387	Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M160	MMLPQNSWHIDFGRCCCHQNLFSAVVTCILLLNSCFLISS
388	Cathepsin D	MQPSSLLPLALCLLAAPA
389	Putative cat eye syndrome critical region protein 9	MQSHLAPLACAAAAGRAGGSCQA
390	UPF0670 protein C8orf55	MLGLLVALLALGLAVFA
391	C-C motif chemokine 3-like 1	MQVSTAALAVLLCTMALCNQVLS

392	Collagen alpha-2(VIII) chain	MLGTLTPLSSLLLLLLVLVLGCGPRASS
393	Uncharacterized protein C18orf20	MINLHRLCIIHVVATLLSTLLSLISVAIS
394	C-X-C motif chemokine 14	MSLLPRRAPPVSMRLLAAALLL
395	Beta-defensin 106	MRTFLFLFAVLFFLTPAKNA
396	Coagulation factor X	MGRPLHLVLLSASLAGLLLLGESLFIRREQA
397	INT-2 proto-oncogene protein	MGLIWLLLLSLLEPGWP
398	Leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT2	MGLQTTKWPSHGAFFLKSWLIISLGLYSQVSKLLA
399	Interleukin-18-binding protein	MTMRHNWTPDLSPLWVLLLCAHVVTLLV
400	Insulin-like growth factor-binding protein 7	MERPSLRALLLGAAGLLLLLLPLSSS
401	Serine protease inhibitor Kazal-type 7	MKITGGLLLLCTVVYFCSS
402	Isthmin	MVRLAAELLLLLGLLLLTLHITVLRGSGA
403	Laminin subunit beta-4	MQFQLTLFLHLGWLSYSKA
404	Endothelial lipase	MSNSVPLLCFWSLCYCFAAG
405	Secretoglobin-like protein LOC284402	MRVTSATCALLLALICSVQLGDA
406	Lymphocyte antigen 86	MKGFTATLFLWTLIFPSCSG
407	Netrin-1-like protein	MPVTFALLLLLGQATA
408	NHL repeat-containing protein 3	MARFWVCVAGAGFFLAFLVLHSRFC
409	Protocadherin-15	MFRQFYLWTCLASGIILGSLFEICLG
410	Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 5	MGPLSAPPCTQHITWKGLLLTASLLNFWNLPITA
411	Putative peptide YY-2	MATVLLALLVYLGALVDA
412	Ribonuclease K6	MVLCFPLLLLLLVLWGPVCPLHA
413	Ribonuclease-like protein 12	MIIMVIIFLVLLFWENEVND
414	Signal peptide, CUB and EGF-like domain-containingprotein2	MGVAGRNRPGAAWAVLLLLLLPPLLLAGA
415	Serpin A9	MASYLYGVLFAVGLCAPIYCVSP
416	Kunitz-type protease inhibitor 4	MKSAKLGFLLRFFIFCSLNTLLLG
417	Stanniocalcin-2	MCAERLGQFMTLALVLATFDPARG
418	Thrombospondin type-1 domain-containing protein 4	MVSHFMGSLSVLCFLLLLGFQFVCP
419	Uromodulin	MGQPSLTWMLMVVVASWFITTAAT
420	Protein Wnt-4	MSPRSCLRSLRLLVFAVFSAAA
421	Protein Wnt-7b	MHRNFRKWIFYVFLCFGVLYVKLGALSSVVA
422	Peptidase S1 domain-containing protein LOC136242	MKYVFYLGVLAGTFFFADS
423	Complement C1q subcomponent subunit C	MDVGPSSLPHLGLKLLLLLLLLPLRGQA
424	Uncharacterized protein C2orf66	MIIDSSRIPSFTQLHSTMTRAPLLLLCVALVLLGHVNG
425	Cerebellin-4	MGSGRRALSAVPAVLLVLTLPGLPVWA
426	Coiled-coil domain-containing protein 3	MLRQLLLAALCLAGPPAPARA
427	Eotaxin	MKVSAALLWLLLIAAAFSPQGLA
428	C-C motif chemokine 23	MKVSVAALSCLMLVTALGSQA
429	C-C motif chemokine 3	MQVSTAALAVLLCTMALCNQFSA
430	Colipase-like protein C6orf127	MMLPQWLLLLFLLFFFLFLLTRG
431	Retinoic acid early transcript 1G protein	MAAAASPAFLLRLPLLLLLSSWCRT
432	C-type lectin domain family 11 member A	MQAAWLLGALVVPQLLGFGHG
433	Collagen alpha-4(IV) chain	MWSLHIVLMRCSFRLTKSLATGPWSLILILFSVQYVYG
434	C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containingprotein8	MSGALLWPLLPLLLLLLSARDGVRA
435	Cysteine-rich secretory protein 2	MALLPVLFLVTVLLPSLPAEG
436	Chymotrypsinogen B	MASLWLLSCFSLVGAAFG
437	Cystatin-SA	MAWPLCTLLLLLATQAVALA
438	Coagulation factor VII	MVSQALRLLCLLLGLQGCLA
439	Fibroblast growth factor-binding protein 1	MKICSLTLLSFLLLAAQVLLVEG
440	Growth/differentiation factor 5	MRLPKLLTFLLWYLAWLDLEFICTVLG
441	Glypican-2	MSALRPLLLLLLPLCPGPGPGPG
442	Hemicentin-1	MISWEVVHTVFLFALLYSSLA

443	Hyaluronan and proteoglycan link protein 4	MVCARAALGPGALWAAAWGVLLLTAPAGA
444	Interferon beta	MTNKCLLQIALLLCFSTTALS
445	Gastric intrinsic factor	MAWFALYLLSLLWATAGT
446	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1	MRPGTGQGGLEAPGEPGPNLRQRWPLLLLGLAVVTHG
447	Interleukin-21	MERIVICLMVIFLGTLVHKSSS
448	Interleukin-29	MAAAWTVVLVTLVLGLAVA
449	Interleukin-4 receptor alpha chain	MGWLCSGLLFPVSCLVLLQVASSGN
450	Kin of IRRE-like protein 3	MKPFQLDLLFVCFFLFSQELG
451	Kallikrein-13	MWPLALVIASLTLALS
452	Kallikrein-9	MKLGLLCALLSLLAG
453	Leukemia inhibitory factor	MKVLAAGVVPLLLVLHWKHGAG
454	Long palate, lung and nasal epithelium carcinoma-associatedprotein4	MWMAWCVAALSVVAVCGT
455	Stromelysin-3	MAPAAWLRSAAARALLPPMLLLLLQPPPLLA
456	Matrix metalloproteinase-19	MNCQQLWLGFLLPMTVSG
457	Endomucin	MELLQVTILFLLPSICSS
458	Nucleobindin-2	MRWRTILLQYCFLLITCLLTALEA
459	Polymeric immunoglobulin receptor	MLLFVLTCLLAVFPAIST
460	Serine protease 27	MRRPAAVPLLLLLCFGSQRAKA
461	Stromal cell-derived factor 1	MNAKVVVVLVLVLTALCLSDG
462	Signal-regulatory protein delta	MPIPASPLHPPLPSLLLYLLLELAGVTHV
463	Slit homolog 1 protein	MALTPGWGSSAGPVRPELWLLLWAAAWRLGASA
464	Sortilin-related receptor	MATRSSRRESRLPFLFTLVALLPPGALC
465	Short palate, lung and nasal epithelium carcinoma-associatedprotein3	MMCPLWRLLIFLGLLALPLAP
466	Tryptase beta-2	MLNLLLLALPVLASRAYA
467	Protein Wnt-11	MRARPQVCEALLFALALQTGVCYG
468	Fractalkine	MAPISLSWLLRLATFCHLTVLLAG
469	Ig-like domain-containing protein ENSP00000270642	MPPPAPGARLRLLAAAALAGLAVISRGLLS
470	Apolipoprotein M	MFHQIWAALLYFYGIILNSIYQ
471	Artemin	MELGLGGLSTLSHCPWPRQQPALWPTLAALALLSSVAEA
472	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a	MALVRALVCCLLTAWHCRSGLG
473	Complement C1q tumornecrosisfactor-relatedprotein1	MGSRGQGLLLAYCLLLAFASGLVLS
474	C-C motif chemokine 28	MQQRGLAIVALAVCAALHA
475	T-cell surface glycoprotein CD8 alpha chain	MALPVTALLLPLALLLHAARP
476	Cat eye syndrome critical region protein 1	MLVDGPSERPALCFLLLAVAMSFFGSALS
477	Collagen alpha-1(II) chain	MIRLGAPQTLVLLTLLVAAVLRCQG
478	Collagen alpha-3(IX) chain	MAGPRACAPLLLLLLLGELLAAAGA
479	Collagen alpha-1(XX) chain	MSSGDPAHLGLCLWLWLGATLG
480	Peptidase inhibitor R3HDML	MPLLPSTVGLAGLLFWAGQAVNAL
481	Crumbs homolog 1	MALKNINYLLIFYLSFSLLIYIKNS
482	Beta-defensin 116	MSVMKPCLMTIAILMILAQKTPG
483	Beta-defensin 125	MNILMLTFIICGLLTRVTKG
484	Protein FAM55D	MKISMINYKSLLALLFILASWIIFTVF
485	Fibronectin type III domain-containing protein 7	MAGGRETCLPLIGFILICLKMVASAK
486	Insulin growth factor-like family member 4	MVPRISAAIFIFELLGSNS
487	Immunoglobulin superfamily member 21	MRTAPSLRRCVCLLLAAILDLARG
488	Interleukin-17A	MTPGKTSLVSLLLLLSLEAIVKA
489	Inhibin beta B chain	MDGLPGRALGAACLLLLAAGWLGPEAWG
490	Intelectin-2	MLSMLRTMTRLCFLLFFSVATSGCSA

491	Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containingprotein3	MAAAGLVAVAAAAEYSGTVASG
492	Neurotrypsin	MTLARFVLALMLGALPEVVG
493	Neurturin	MQRWKAAALASVLCSSVLS
494	Protease-associated domain-containing proteinof21kDa	MVPGAAGWCCLVLWLPACVAA
495	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLGPAGARA
496	Pigment epithelium-derived factor	MQALVLLLCIGALLGHSSC
497	Peptidase inhibitor 15	MIAISAVSSALLFSLLCEA
498	Plasminogen-related protein A	MEHKEVVLLLLLFLKSGQG
499	Podocan	MAQSRVLLLLLLLPPQLHL
500	Putative testis-specific prion protein	MQHSLVFFFAVILHLSHL
501	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2	MLLILLSVALLAFSSA
502	PC3-secreted microprotein	MALRMLWAGQAKGILGGWGIICLVMSLLLQHPGVY
503	Secretogranin-2	MAEAKTHWLGAALSLIPLIFLISGAEA
504	Secreted and transmembrane protein 1	MQTCPLAFPGHVSQALGTLLFLAASLSA
505	Semaphorin-3D	MNANKDERLKARSQDFHLFPALMMLSMTMLFLPVTG
506	Secretoglobin family 3A member 2	MKLVTIFLLVTISLCSYSATA
507	Sialate O-acetylesterase	MVAPGLVLGLVLPLILWADRSAG
508	Sialic acid-binding Ig-like lectin 6	MQGAQEASASEMLPLLLPLLWAGALA
509	SPARC	MRAWIFFLLCLAGRALA
510	Hepatocellular carcinoma-associated protein TD26	MPVPALCLLWALAMVTRPASA
511	Trypsin-X3	MKFILLWALLNLTVALA
512	Urocortin-2	MTRCALLLLMVLMLGRVLV
513	Proto-oncogene protein Wnt-3	MEPHLLGLLLGLLLGGTRVLA
514	Uncharacterized protein FLJ37543	MLAPLFLCCLRNLFRKLIS
515	Putative uncharacterized protein ENSP00000381830	MSFEYRHYKREAKICTCRGGWAHVLLCIGVSQGAC
516	Alpha-2-antiplasmin	MALLWGLLVLSWSCLQGPCSVFSPVSA
517	Angiotensin-converting enzyme	MGAASGRRGPGLLLPLPLLLLLPPQPALA
518	Angiopoietin-1	MTVFLSFAFLAAILT
519	Apolipoprotein C-IV	MSLLRNRLQALPALCLCVLVLACIGA
520	Brain-derived neurotrophic factor	MTILFLTMVISYFGCMKA
521	Uncharacterized protein C1orf54	MDVLFVAIFAVPLILG
522	Cerebellin-3	MLGAKPHWLPGPLHSPGLPLVLVLLALGAGWA
523	Carboxypeptidase B2	MKLCSLAVLVPIVLFCEQHVFA
524	C-C motif chemokine 22	MDRLQTALLVVLVLLAVALQATEA
525	Colipase-like protein C6orf126	MAAALALVAGVLSGAVLPLWS
526	Uncharacterized protein C7orf34	MPPLAPQLCRAVFLVPILLLLQVKPLNG
527	Protein canopy homolog 4	MGPVRLGILLFLFLAVHEAWA
528	Collagen alpha-2(VI) chain	MLQGTCSVLLLWGILGAIQA
529	Tenascin-X	MMPAQYALTSSLVLLVLLSTARA
530	Endothelin-3	MEPGLWLLFGLTVTSA
531	Endothelial cell-specific molecule 1	MKSVLLLTTLLVPAHLVAA
532	Protein eyes shut homolog	MTDKSIVILSLMVFHSSFING
533	Coagulation factor XI	MIFLYQVVHFILFTSVSG
534	Immunoglobulin alpha Fc receptor	MDPKQTTLLCLVLCLGQRIQA
535	Low affinity immunoglobulin gamma FcregionreceptorIII-B	MWQLLLPTALLLLVSA
536	Granzyme A	MRNSYRFLASSLSVVVSLLLIPEDVC
537	Hyaluronan and proteoglycan link protein 3	MGLLLLVPLLLLPGSYG
538	Interleukin-28B	MTGDCMPVLVLMAAVLTVTGAVPVA
539	Pancreatic secretory trypsin inhibitor	MKVTGIFLLSALALLSLSGNTGA
540	Kallistatin	MHLIDYLLLLLVGLLALSHG
541	Kallikrein-12	MGLSIFLLLCVLGLSQA

542	Keratinocyte differentiation-associated protein	MKIPVLPAVVLLSLLVLHSAQG
543	Putative lipocalin 1-like protein 1	MKPLLLAISLSLIAALQA
544	Lysozyme C	MKALIVLGLVLLSVTVQG
545	MAM domain-containing protein 2	MLLRGVLLALQALQLAGA
546	Matrilysin	MRLTVLCAVCLLPGSLA
547	Oxytocin-neurophysin 1	MAGPSLACCLLGLLALTSA
548	NPIP-like protein LOC440350	MRLRFWLLIWLLLGFISH
549	Phospholipase A2, membrane associated	MKTLLLLAVIMIFGLLQAHG
550	Group XIIB secretory phospholipase A2-like protein	MKLASGFLVLWLSLGGGLA
551	Basement membrane-specific heparansulfateproteoglycancoreprotein	MGWRAAGALLLALLLHGRLLA
552	Plasma glutamate carboxypeptidase	MKFLIFAFFGGVHLLSLCSG
553	Melanocyte protein Pmel 17	MDLVLKRCLLHLAVIGALLAVGAT
554	Vitamin K-dependent protein Z	MAGCVPLLQGLVLVLALHRVEPS
555	Sulfhydryl oxidase 1	MRRCNSGSGPPPSLLLLLLWLLAVPGANA
556	Regenerating islet-derived protein 3 gamma	MLPPMALPSVSWMLLSCLILLCQVQG
557	Secretoglobin family 1C member 1	MKGSRALLLVALTLFCICRMATG
558	Sex hormone-binding globulin	MESRGPLATSRLLLLLLLLLLRHTRQGWA
559	Tomoregulin-2	MVLWESPRQCSSWTLCEGFCWLLLLPVMLLIVARPVKLAA
560	Trefoil factor 2	MGRRDAQLLAALLVLGLCALAGS
561	Tachykinin-4	MLPCLALLLLMELSVCTVA
562	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A	MGLSTVPDLLLPLVLLELLVG
563	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHP
564	Usherin	MNCPVLSLGSGFLFQVIEMLIFAYFASISLT
565	Urotensin-2	MYKLASCCLLFIGFLNPLLS
566	V-set and transmembrane domain-containing protein 2A	MMGIFLVYVGFVFFSVLYVQQGL
567	Protein Wnt-6	MLPPLPSRLGLLLLLLLCPAHVGG
568	Putative uncharacterized protein FP248	MGTGGSLLCGCSLVLSCLCPSAS
569	Putative serine protease LOC138652	MGYCQGVSQVAVVLLMFPKEKEA
570	Zona pellucida sperm-binding protein 3	MELSYRLFICLLLWGSTELCYP
571	Signal peptide, CUB and EGF-like domain-containingprotein3	MGSGRVPGLCLLVLLVHARA
572	C-type natriuretic peptide	MHLSQLLACALLLTLLSLRPSEA
573	Antithrombin-III	MYSNVIGTVTSGKRKVYLLSLLLIGFWDCVTC
574	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b	MRLLAWLIFLANWGGARA
575	A disintegrin and metalloproteinase withthrombospondinmotifs13	MHQRHPRARCPPLCVAGILACGFLLGCWG
576	B melanoma antigen 1	MAARAVFLALSAQLLQA
577	Complement C1q subcomponent subunit A	MEGPRGWLVLCVLAISLASMVT
578	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 2	MIPWVLLACALPCAA
579	Uncharacterized protein C1orf187	MAGPAIHTAPMLFLVLLLPLELSLA
580	Carbonic anhydrase-related protein 11	MGAAARLSAPRALVLWAALGAAA
581	C-C motif chemokine 19	MALLLALSLLVLWTSPAPTLS
582	Monocyte differentiation antigen CD14	MERASCLLLLLLPLVHVSA
583	CUB domain-containing protein 1	MAGLNCGVSIALLGVLLLGAARLPRGAEA
584	UPF0669 protein C6orf120	MAAPRGRAAPWTTALLLLLASQVLSPGSCA
585	Chitinase-3-like protein 1	MGVKASQTGFVVLVLLQCCSA
586	Uncharacterized protein C18orf54	MAKSKTKHRLCSQESSVSALLASCTLSGSNS
587	Cystatin-8	MPRCRWLSLILLTIPLALVAR
588	Secreted frizzled-related protein 3	MVCGSPGGMLLLRAGLLALAALCLLRVPGARA
589	Beta-defensin 118	MKLLLLALPMLVLLPQVIP

590	Beta-defensin 133	MKIHVFLFVLFFFLVPIATRVKC
591	Beta-defensin 1	MRTSYLLLFTLCLLLSEMASG
592	Dermokine	MKFQGPLACLLLALCLGSGEA
593	Protein FAM24A	MAKMFDLRTKIMIGIGSSLLVAAMVLLSVVFC
594	Fibrinogen-like protein 1	MAKVFSFILVTTALTMGREISA
595	Folate receptor gamma	MAWQMMQLLLLALVTAAGSAQPR
596	Growth/differentiation factor 11	MVLAAPLLLGFLLLALELRPRGEA
597	Granzyme K	MTKFSSFSLFFLIVGAYMTHVCFN
598	Major histocompatibility complexclassI-relatedgeneprotein	MGELMAFLLPLIIVLMVKHSDS
599	Immunoglobulin superfamily member 1	MTLDRPGEGATMLKTFT
600	Interleukin-1 receptor antagonist protein	MEICRGLRSHLITLLLFLFHSETIC
601	Serine protease inhibitor Kazal-type 5	MKIATVSVLLPLALCLIQDAAS
602	Immunoglobulin superfamily containing leucine-richrepeatprotein	MQELHLLWWALLLGLAQA
603	Putative killer cell immunoglobulin-like receptorlikeproteinKIR3DP1	MSLMVISMACVGFFLLQGAWT
604	Laminin subunit alpha-4	MALSSAWRSVLPLWLLWSAACSRA
605	Leucine zipper protein 2	MKFSPAHYLLPLLPALVLS
606	Sushi, nidogen and EGF-like domain-containing protein 1	MRHGVAWALLVAAALGLGARGVRG
607	Protein-lysine 6-oxidase	MRFAWTVLLLGPLQLCALVHC
608	Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1	MMLRVLVGAVLPAML
609	Neurotensin/neuromedin N	MMAGMKIQLVCMLLLAFSSWSLC
610	Group 3 secretory phospholipase A2	MGVQAGLFGMLGFLGVALG
611	Placenta growth factor	MPVMRLFPCFLQLLAGLA
612	Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 11	MGPLSAPPCTEHIKWKGLLLTALLLNFWNLPTTA
613	Ribonuclease T2	MRPAALRGALLGCLCLALLCLGGA
614	R-spondin-1	MRLGLCVVALVLSWTHLTIS
615	Semaphorin-3E	MASAGHIITLLLWGYLLELWTGGHT
616	Kunitz-type protease inhibitor 1	MAPARTMARARLAPAGIPAVALWLLCTLGLQGTQA
617	Transmembrane protein 25	MALPPGPAALRHTLLLLPALLSSGWG
618	WAP four-disulfide core domain protein 10A	MAPQTLLPVLVLCVLLLQAQG
619	WAP four-disulfide core domain protein 3	MMLSCLFLLKALLALGSLESWITA
620	Protein Wnt-10a	MGSAHPRPWLRLRPQPQPRPALWVLLFFLLLLAAA
621	Abhydrolase domain-containing protein 9	MPELVVTALLAPSRLSLKLLRAFMWSLVFSVALVA
622	ADAM 12	MAARPLPVSPARALLLALAGALLAPCEA
623	A disintegrin and metalloproteinase withthrombospondinmotifs2	MDPPAGAARRLLCPALLLLLLLLPPPLLP
624	Bone morphogenetic protein 3b	MAHVPARTSPGPGPQLLLLLLPLFLLLLRDVAG
625	Complement C1q-like protein 4	MVLLLLVAIPLLVHS
626	Complement C1r subcomponent-like protein	MPGPRVWGKYLWRSPHSKGCPGAMWWLLLWGVLQA
627	Uncharacterized protein C1orf56	MVPAAGALLWVLLLNLGPRAAGA
628	Cathelicidin antimicrobial peptide	MKTQRDGHSLGRWSLVLLLLGLVMPLAIIA
629	Carboxypeptidase A2	MAMRLILFFGALFGHI
630	C-C motif chemokine 4-like	MKLCVTVLSLLVLVAAFCSLALS
631	C-C motif chemokine 13	MKVSAVLLCLLLMTAA
632	Neural cell adhesion molecule L1-like protein	MEPLLLGRGLIVYLMFLLLKFSKA
633	Complement C4-B	MRLLWGLIWASSFFTLSLQ
634	Collagen alpha-1(IX) chain	MKTCWKIPVFFFVCSFLEPWASA
635	Cartilage oligomeric matrix protein	MVPDTACVLLLTLAALGASG
636	Cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 1	MKCTAREWLRVTTVLFMARAIPA
637	UPF0556 protein C19orf10	MAAPSGGWNGVGASLWAALLLGAVALRPAEA
638	Uncharacterized protein C19orf36	MALLLCLVCLTAALA

639	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factorreceptorsubunitalpha	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP
640	Beta-defensin 103	MRIHYLLFALLFLFLVPVPGHG
641	Beta-defensin 123	MKLLLLTLTVLLLLSQLTPG
642	Beta-defensin 130	MKLHSLISVLLLFVTLIPKGKT
643	Beta-defensin 2	MRVLYLLFSFLFIFLMPLPGVFG
644	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5	MATSWGTVFFMLVVSCVCSA
645	Protein FAM55A	MSSNTMLQKTLLILISFSVVT
646	Protein FAM3B	MRPLAGGLLKVVFVVFASLCAWYSGYLLA
647	Complement factor H-related protein 4	MLLLINVILTLWVSCANGQ
648	Glucose-fructose oxidoreductase domain-containingprotein1	MLPGVGVFGTSLTARVIIPLL
649	Hemopexin	MARVLGAPVALGLWSLCWSLAIA
650	Ig heavy chain V-I region HG3	MDWTWRVFCLLAVAPGAHS
651	Insulin-like growth factor-binding protein 4	MLPLCLVAALLLAAGPGPSLG
652	Interleukin-17B	MDWPHNLLFLLTISIFLGLG
653	Interleukin-1 receptor type I	MKVLLRLICFIALLISS
654	Interleukin-5	MRMLLHLSLLALGAAYVYA
655	Inhibin beta A chain	MPLLWLRGFLLASCWIIVRS
656	Epididymal-specific lipocalin-12	MRLLCGLWLWLSLLKVLQA
657	Ly-6/neurotoxin-like protein 1	MTPLLTLILVVLMGLPLAQA
658	72 kDa type IV collagenase	MEALMARGALTGPLRALCLLGCLLSHAAA
659	Serine protease MPN2	MAAPASVMGPLGPSALGLLLLLLVVAPPRVAA
660	Neuronal pentraxin-like protein C16orf38	MGCSWRKTLSFFLVFVPIYLHGASS
661	Neurexophilin-1	MQAACWYVLFLLQPTVYLVTC
662	Group IIE secretory phospholipase A2	MKSPHVLVFLCLLVALVTG
663	Platelet-derived growth factor D	MHRLIFVYTLICANFCSC
664	Platelet factor 4	MSSAAGFCASRPGLLFLGLLLLPLVVAFASA
665	Periostin	MIPFLPMFSLLLLLIVNPINA
666	Basic salivary proline-rich protein 3	MLLILLSVALLALSSA
667	Prostasin	MAQKGVLGPGQLGAVAILLYLGLLRSGTG
668	Poliovirus receptor	MARAMAAAWPLLLVALLVLS
669	Retinol-binding protein 3	MMREWVLLMSVLLCGLA
670	WAP, kazal, immunoglobulin, kunitz and NTRdomain-containingprotein1	MPALRPLLPLLLLLRLTSG
671	Protein Wnt-5a	MKKSIGILSPGVALGMAGSAMSSKFFLVALAIFFS
672	Uncharacterized lipocalin UNQ2541/PRO6093	MMSFLLGAILTLLWAPTAQA
673	Zona pellucida sperm-binding protein 4	MWLLRCVLLCVSLSLAVS
674	Alpha-amylase 1	MKLFWLLFTIGFCWA
675	Complement C1q-like protein 2	MALGLLIAVPLLLQAAPRGAA
676	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 9	MRIWWLLLAIEICTGNINS
677	C-C motif chemokine 24	MAGLMTIVTSLLFLGVCAHHIIPTGS
678	Uncharacterized protein C4orf26	MARRHCFSYWLLVCWLVVTVAEG
679	CD166 antigen	MESKGASSCRLLFCLLISATVFRPGLG
680	Uncharacterized protein C14orf93	MSFSATILFSPPSGSEA
681	Collagen alpha-5(VI) chain	MKILLIIFVLIIWTETLA
682	Complement component C8 gamma chain	MLPPGTATLLTLLLAAGSLG
683	Collagen alpha-1(X) chain	MLPQIPFLLLVSLNLVHG
684	Putative uncharacterized protein C17orf69	MHPWLGSALGFPKCRG
685	Cysteine-rich motor neuron 2 protein	MAGVGAAALSLLLHLGALALAAGAEG
686	Cysteine-rich secretory protein 3	MTLFPVLLFLVAGLLPSFPA
687	Macrophage colony-stimulating factor 1	MTAPGAAGRCPPTTWLGSLLLVCLLASRSIT
688	Beta-defensin 108B	MRIAVLLFAIFFFMSQVLPARG
689	Complement decay-accelerating factor	MTVARPSVPAALPLLGELPRLLLLVLLCLPAVWG
690	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 11	MKFLLDILLLLPLLIVCSL
691	EMILIN-2	MWQPRRPWPRVPWRWALALLALVGAGLCHA

692	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	MLKALFLTMLTLALVKS
693	Fibroblast growth factor 5	MSLSFLLLLFFSHLILS
694	Fibroblast growth factor receptor 4	MRLLLALLGVLLSVPGPPVLS
695	Glia-derived nexin	MNWHLPLFLLASVTLPSIC
696	Gamma-glutamyl hydrolase	MASPGCLLCVLGLLLCGAASLELS
697	Glutathione peroxidase 3	MARLLQASCLLSLLLAGFVS
698	Histatin-1	MKFFVFALVLALMISMISA
699	Insulin-like growth factor II	MGIPMGKSMLVLLTFLAFASCCIA
700	Interleukin-19	MKLQCVSLWLLGTILILCSVDNHG
701	Interleukin-32	MCFPKVLSDDMKKLKARMVMLLPTSAQGLG
702	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H5-like protein	MSGWRYLICVSFLLTILLELTYQ
703	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	MKPPRPVRTCSKVLVLLSLLAIHQTTTA
704	Uncharacterized protein KIAA0495	MCLLSSSAASDLAATSLTA
705	Plasma kallikrein	MILFKQATYFISLFATVSC
706	Ig kappa chain V-I region HK101	MDMRVLAQLLGLLLCFPGARC
707	Laminin subunit gamma-1	MRGSHRAAPALRPRGRLWPVLAVLAAAAAAGCA
708	Left-right determination factor 2	MWPLWLCWALWVLPLAGPGAA
709	Lipase member H	MLRFYLFISLLCLSRSDA
710	Noelin	MSVPLLKIGVVLSTMA
711	Protocadherin alpha-10	MVSRCSCLGVQCLLLSLLLLAAWEVGSG
712	Plexin-B1	MPALGPALLQALWAGWVLT
713	Prolactin	MNIKGSPWKGSLLLLVSNLLLCQSVAP
714	Poliovirus receptor-related protein 4	MPLSLGAEMWGPEAWLLLLLLLASFTGRCPA
715	Secretoglobin family 1D member 4	MRLSVCLLMVSLALCCYQAHA
716	Slit homolog 2 protein	MRGVGWQMLSLSLGLVLAILNKVAPQACPA
717	Trefoil factor 1	MATMENKVICALVLVSMLALGTLA
718	Scavenger receptor cysteine-rich domain-containingproteinLOC284297	MRVLACLLAALVGIQA
719	Trefoil factor 3	MAARALCMLGLVLALLSSSSA
720	Metalloproteinase inhibitor 1	MAPFEPLASGILLLLWLIAPSRA
721	Vascular endothelial growth factor receptor 1	MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSG
722	WNT1-inducible-signaling pathway protein 1	MRWFLPWTLAAVTAAAASTVLA
723	Uncharacterized protein ENSP00000244321	MRLSRRPETFLLAFVLLCTLLGLGCP
724	Anthrax toxin receptor 2	MVAERSPARSPGSWLFPGLWLLVLSGPGGLLRA
725	Apolipoprotein C-I	MRLFLSLPVLVVVLSIVLEGPAPAQG
726	Lymphotoxin-alpha	MTPPERLFLPRVCGTTLHLLLLGLLLVLLPGAQG
727	ADAMTS-like protein 2	MDGRWQCSCWAWFLLVLAVVAG
728	ADAMTS-like protein 4	MENWTGRPWLYLLLLLSLPQLCLD
729	Complement C1q-like protein 3	MVLLLVILIPVLVSSAGTSA
730	Collagen alpha-6(IV) chain	MLINKLWLLLVTLCLTEELAAA
731	Collagen alpha-6(VI) chain	MMLLILFLVIICSHISVNQ
732	EGF-like domain-containing protein 6	MPLPWSLALPLLLSWVAGGFG
733	EMILIN-3	MGRRRLLVWLCAVAALLSGAQA
734	Ephrin type-A receptor 10	METCAGPHPLRLFLCRMQLCLALLLGPWRPGTA
735	Fibroblast growth factor-binding protein 3	MTPPKLRASLSPSLLLLLSGCLLAAA
736	Complement factor H-related protein 2	MWLLVSVILISRISSVGG
737	Fibrinogen beta chain	MKRMVSWSFHKLKTMKHLLLLLLCVFLVKS
738	Fibronectin type III domain-containing protein 1	MAPEAGATLRAPRRLSWAALLLLAALLPVASS
739	Growth/differentiation factor 6	MDTPRVLLSAVFLISFLWDLPG
740	Hyaluronidase-1	MAAHLLPICALFLTLLDMAQG
741	Interferon epsilon-1	MIIKHFFGTVLVLLASTTIFS
742	Interleukin-1 receptor accessory protein	MTLLWCVVSLYFYGILQSDA

743	Ig kappa chain V-I region HK102	MDMRVPAQLLGLLLLWLPGAKC
744	Ig kappa chain V-II region RPMI 6410	MRLPAQLLGLLMLWVPGSSG
745	Epididymal-specific lipocalin-10	MRQGLLVLALVLVLVLVLA
746	Leucine-rich repeat LGI family member 3	MAGLRARGGPGPGLLALSALGFCLMLQVSA
747	Lysozyme-like protein 6	MTKALLIYLVSSFLALNQA
748	Mucin-like protein 1	MKFLAVLVLLGVSIFLVSAQ
749	Group IID secretory phospholipase A2	MELALLCGLVVMAGVIPIQG
750	Procollagen C-endopeptidase enhancer 2	MRGANAWAPLCLLLAAATQLSRQ
751	Basic salivary proline-rich protein 1	MLLILLSVALLALSSA
752	Peroxidasin homolog	MAKRSRGPGRRCLLALVLFCAWGTLA
753	Ribonuclease 8	MAPARAGCCPLLLLLLGLWVAEVLVRA
754	Semaphorin-3B	MGRAGAAAVIPGLALLWAVGLGSA
755	Secreted Ly-6/uPAR-related protein 1	MASRWAVQLLLVAAWSMGCGE
756	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6B	MRALEGPGLSLLCLVLALPALLPVPAVRG
757	Triggering receptor expressed on myeloid cells 1	MRKTRLWGLLWMLFVSELRA
758	von Willebrand factor	MIPARFAGVLLALALILPGTLC
759	Protein Wnt-16	MDRAALLGLARLCALWAALLVLFPYGAQG
760	Putative uncharacterized protein FLJ21075	MGFHFCIWIIFLLPPPCKKC
761	Arylsulfatase F	MRPRRPLVFMSLVCALLNTCQA
762	ADAMTS-like protein 5	MGKLRPGRVEWLASGHTERPHLFQNLLLFLWA
763	A disintegrin and metalloproteinase withthrombospondinmotifs17	MCDGALLPPLVLPVLLLLVWGLDPGTA
764	A disintegrin and metalloproteinase withthrombospondinmotifs9	MQFVSWATLLTLLVRDLA
765	Bactericidal/permeability-increasing protein-like 2	MCTKTIPVLWGCFLLWNLYVSSS
766	Putative uncharacterized protein C1orf191	MWGFLVLKARWLVTPVRT
767	Carboxypeptidase B	MLALLVLVTVALASA
768	Uncharacterized protein C10orf25	MVPGPPESVVRFFLWFCFLLPPTRKASC
769	UPF0454 protein C12orf49	MVNLAAMVWRRLLRKRWVLALVFGLSLVYFLSS
770	Putative uncharacterized protein C14orf144	MCRETAGYGWLLASTELLSLLEPLSP
771	Beta-Ala-His dipeptidase	MDPKLGRMAASLLAVLLLLLERGMFS
772	Collagen alpha-2(IV) chain	MGRDQRAVAGPALRRWLLLGTVTVG
773	Complement component C8 alpha chain	MFAVVFFILSLMTCQPGVTA
774	Collagen alpha-2(XI) chain	MERCSRCHRLLLLLPLVLGLSA
775	Complement component receptor 1-like protein	MAPPVRLERPFPSRRFPGLLLAALVLLLSSFS
776	Platelet basic protein	MSLRLDTTPSCNSARPLHALQVLLLLSLLLTALA
777	Follistatin-related protein 4	MKPGGFWLHLTLLGASLPAALG
778	Protein G7c	MLPTEVPQSHPGPSALLLLQLLLPPTSA
779	Gastric inhibitory polypeptide	MVATKTFALLLLSLFLAVGLG
780	Gastrokine-1	MLAYSSVHCFREDKMKFTIV
781	Glycosyltransferase 1 domain-containing protein 1	MRLLFLAVLRPHTGNA
782	Interleukin-20	MKASSLAFSLLSAAFYLLWTPSTG
783	Interleukin-27 subunit beta	MTPQLLLALVLWASCPPCSG
784	Kazal-type serine protease inhibitor domain-containingprotein1	MLPPPRPAAALALPVLLLLLVVLTPPPTGA
785	Kallikrein-10	MRAPHLHLSAASGARALAKLLPLLMAQLWA
786	Kallikrein-7	MARSLLLPLQILLLSLALETAG
787	Ig kappa chain V region EV15	MGSQVHLLSFLLLWISDTRA
788	Long palate, lung and nasal epithelium carcinoma-associatedprotein1	MAGPWTFTLLCGLLAATLIQA
789	Low-density lipoprotein receptor-related protein 8	MGLPEPGPLRLLALLLLLLLLLLLQLQHLAAA
790	Cartilage matrix protein	MRVLSGTSLMLCSLLLLQALC

791	Melanoma-derived growth regulatory protein	MARSLVCLGVIILLSAFSGPGVRG
792	Matrix metalloproteinase-16	MILLTFSTGRRLDFVHHSGVFFLQTLLWILC
793	Multimerin-2	MILSLLFSLGGPLGWGLLGAWA
794	Protein NOV homolog	MQSVQSTSFCLRKQCLCLTFLLLHLLGQVAA
795	Oocyte-secreted protein 1 homolog	MKTILGFKGLFYLHSLIWTCAGDWSA
796	Secretory phospholipase A2 receptor	MLLSPSLLLLLLLGAPRGCA
797	Proline-rich protein 1	MKLTFFLGLLALISCFTPSES
798	Putative pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 7	MGPLSAPPCTQHITWKGLLLTASLLNFWNPPTTA
799	Poliovirus receptor-related protein 1	MARMGLAGAAGRWWGLALGLTAFFLPGVHS
800	Glutaminyl-peptide cyclotransferase	MAGGRHRRVVGTLHLLLLVAALPWASRG
801	Trypsin-1	MNPLLILTFVAAALA
802	Thyrotropin subunit beta	MTALFLMSMLFGLTCGQAMS
803	Putative testis serine protease 2	MSSGGGSRGLLAWLLLLQPWPGQNWA
804	von Willebrand factor C domain-containing protein 2-like	MALHIHEACILLLVIPGLVTS
805	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3	MKRSVAVWLLVGLSLG
806	ADAM 28	MLQGLLPVSLLLSVAVSA
807	B melanoma antigen 5	MAAGAVFLALSAQLLQA
808	Probetacellulin	MDRAARCSGASSLPLLLALALGLVILHCVVA
809	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 4	MLPLLLGLLGPAACWA
810	Carboxypeptidase N catalytic chain	MSDLLSVFLHLLLLFKLVAP
811	Coiled-coil domain-containing protein 80	MTWRMGPRFTMLLAMWLVCGS
812	Protein CEI	MVAPAARVFLRAVRAALTSTVPDLLCLLARGSPRG
813	Bile salt-activated lipase	MGRLQLVVLGLTCCWAVASA
814	Putative cystatin-9-like 2	MWSLPPSRALSCAPLLLLFSFQFLVTYA
815	Protein CYR61	MSSRIARALALVVTLLHLTRLALS
816	Beta-defensin 135	MATRSVLLALVVLNLLFYVPPGRS
817	Epidermal growth factor receptor	MRPSGTAGAALLALLAALCPASRA
818	Elastase-2A	MIRTLLLSTLVAGALS
819	Inactive carboxylesterase 4	MWLPALVLATLAASAAWA
820	Fibrillin-2	MGRRRRLCLQLYFLWLGCVVLWAQGTAG
821	Fibroleukin	MKLANWYWLSSAVLATYGFLVVA
822	Leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT1	MDLRDWLFLCYGLIAFLTEV
823	Follistatin-related protein 3	MRPGAPGPLWPLPWGALAWAVGFVSS
824	Beta-galactosidase-1-like protein 2	MTTWSLRRRPARTLGLLLLVVLGFLVLRRLDW
825	Gremlin-1	MSRTAYTVGALLLLLGTLLPAAEG
826	Interferon alpha-1/13	MASPFALLMVLVVLSCKSSCSLG
827	Indian hedgehog protein	MSPARLRPRLHFCLVLLLLLVVPAAWG
828	Interleukin-12 subunit beta	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVA
829	Interleukin-27 subunit alpha	MGQTAGDLGWRLSLLLLPLLLVQAGVWG
830	Interleukin-3	MSRLPVLLLLQLLVRPGLQ
831	Inhibin beta E chain	MRLPDVQLWLVLLWALVRA
832	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	MKRLTCFFICFFLSEVSG
833	Kallikrein-5	MATARPPWMWVLCALITALLLG
834	Ig kappa chain V-III region VG	MEAPAQLLFLLLLWLPDTTG
835	Apolipoprotein(a)-like protein 2	MEHKEVVLLLLLFLKSAPTET
836	Complement-activating component of Ra-reactive factor	MRWLLLYYALCFSLSKASA
837	Microfibrillar-associated protein 5	MSLLGPKVLLFLAAFIITSDW
838	Opticin	MRLLAFLSLLALVLQETGT
839	Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 4	MGPLSAPPCTQRITWKGVLLTASLLNFWNPPTTA
840	Secretogranin-3	MGFLGTGTWILVLVLPIQA
841	Semaphorin-3G	MAPSAWAICWLLGGLLLHGGSS
842	Surfactant-associated protein G	MGSGLPLVLLLTLLGSSHG

843	SPARC-related modular calcium-binding protein 2	MLLPQLCWLPLLAGLLPPVPA
844	Kunitz-type protease inhibitor 3	MQLQASLSFLLILTLCLELRSELA
845	Protein TSPEAR	MSALLSLCFVLPLAAPGHG
846	Protein WFDC11	MVSLMKLWIPMLMTFFCTVLLSVLG
847	Protein Wnt-10b	MLEEPRPRPPPSGLAGLLFLALCSRALS
848	Angiopoietin-related protein 4	MSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQG
849	Apolipoprotein C-II	MGTRLLPALFLVLLVLGFEVQG
850	Protein ARMET	MRRMWATQGLAVALALSVLPG
851	A disintegrin and metalloproteinase withthrombospondinmotifs12	MPCAQRSWLANLSVVAQLLNFGALC
852	Bone morphogenetic protein 10	MGSLVLTLCALFCLAAYLVSG
853	Carboxypeptidase A5	MQGTPGGGTRPGPSPVDRRTLLVFSFILAAALG
854	Carboxypeptidase Z	MPPPLPLLLLTVLVVAAA
855	C-C motif chemokine 18	MKGLAAALLVLVCTMALCSC
856	Fibronectin type-III domain-containing protein C4orf31	MVLLHWCLLWLLFPLSSRT
857	Uncharacterized protein C6orf15	MQGRVAGSCAPLGLLLVCLHLPGLFA
858	Complement factor B	MGSNLSPQLCLMPFILGLLSGGVTT
859	Calcium-activated chloride channel regulator family member 3	MVFSLKVILFLSLLLSPVLK
860	Putative uncharacterized protein C13orf28	MAVSQGDGTLCFVLLLCCWQETEL
861	Complement component C7	MKVISLFILVGFIGEFQSFSSA
862	Cochlin	MSAAWIPALGLGVCLLLLPGPAGS
863	Chordin-like protein 1	MGGMKYIFSLLFFLLLEGGKT
864	UPF0510 protein C19orf63	MAAASAGATRLLLLLLMAVAAPSRARG
865	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	MWLQSLLLLGTVACSIS
866	Cystatin-like 1	MGIGCWRNPLLLLIALVLS
867	C-X-C motif chemokine 3	MAHATLSAAPSNPRLLRVALLLLLLVAASRRAAG
868	17-beta hydroxysteroid dehydrogenase 13	MNIILEILLLLITIIYSYL
869	Elastase-1	MLVLYGHS
870	EGF-like module-containing mucin-like hormonereceptor-like3	MQGPLLLPGLCFLLSLFGAVT
871	Ephrin type-A receptor 3	MDCQLSILLLLSCSVLDSFG
872	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3	MRANDALQVLGLLFSLARG
873	Fibulin-7	MVPSSPRALFLLLLILACPEPRAS
874	Folate receptor beta	MVWKWMPLLLLLVCVA
875	Follistatin-related protein 1	MWKRWLALALALVAVAWVRA
876	Growth hormone receptor	MDLWQLLLTLALAGSSDA
877	Glutathione peroxidase 7	MVAATVAAAWLLLWAAACA
878	Hepatocyte growth factor-like protein	MGWLPLLLLLTQCLGVPG
879	Hyaluronidase-3	MTTQLGPALVLGVALCLGCG
880	Interferon alpha-17	MALSFSLLMAVLVLSYKSICSLG
881	Interferon omega-1	MALLFPLLAALVMTSYSPVGS
882	Interleukin-4	MGLTSQLLPPLFFLLACAGNFVHG
883	Interleukin-9	MLLAMVLTSALLLCSVAG
884	Serine protease inhibitor Kazal-type 5-like 3	MAAFPHKIIFFLVCSTLTHVAFS
885	Laminin subunit alpha-3	MAAAARPRGRALGPVLPPTPLLLLVLRVLPACGAT
886	Hepatic triacylglycerol lipase	MDTSPLCFSILLVLCIFIQSSA
887	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2	MRPRTKARSPGRALRNPWRGFLPLTLALFVGAGHA
888	Matrix metalloproteinase-20	MKVLPASGLAVFLIMALKFSTA
889	Mucin-7	MKTLPLFVCICALSACFSFSEG
890	Matrix-remodeling-associated protein 5	MPKRAHWGALSVVLILLWGHPRVALA
891	Ecto-ADP-ribosyltransferase 5	MALAALMIALGSLGLHTWQAQA
892	Vasopressin-neurophysin 2-copeptin	MPDTMLPACFLGLLAFSSA
893	Nidogen-1	MLASSSRIRAAWTRALLLPLLLAGPVGC

894	Neurexophilin-3	MQLTRCCFVFLVQGSLYLVICG
895	Osteoclast associated immunoglobulin-like receptor	MALVLILQLLTLWPLCHT
896	Peptidoglycan recognition protein	MSRRSMLLAWALPSLLRLGAA
897	Plasminogen-related protein B	MEHKEVVLLLLLFLKSGQG
898	Protein Plunc	MFQTGGLIVFYGLLAQTMA
899	Podocan-like protein 1	MAESGLAMWPSLLLLLLLPGPPPVAG
900	Placental protein 11	MRACISLVLAVLCGLAWA
901	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	MRILKRFLACIQLLCVCRLDWANG
902	Prorelaxin H2	MPRLFFFHLLGVCLLLNQFSRAVA
903	Ribonuclease pancreatic	MALEKSLVRLLLLVLILLVLGWVQPSLG
904	Ribonuclease-like protein 9	MMRTLITTHPLPLLLLPQQLLQLVQF
905	Ribonuclease-like protein 10	MKLNLVQIFFMLLMLLLGLGMGLGLG
906	Secreted frizzled-related protein 1	MGIGRSEGGRRGAALGVLLALGAALLAVGSA
907	Pulmonary surfactant-associated protein D	MLLFLLSALVLLTQPLGYLE
908	Spermatogenesis-associated protein 6	MPKVKALQCALALEISSVTC
909	Tissue factor pathway inhibitor 2	MDPARPLGLSILLLFLTEAALG
910	Thrombospondin-4	MLAPRGAAVLLLHLVLQRWLAAGAQA
911	Protein Wnt-9b	MRPPPALALAGLCLLALPAAAA
912	Dickkopf-related protein 3	MQRLGATLLCLLLAAAVPTAP
913	Alpha-1-acid glycoprotein 2	MALSWVLTVLSLLPLLEA
914	Amiloride-sensitive amine oxidase [copper-containing]	MPALGWAVAAILMLQTAMA
915	ADM2	MARIPTAALGCISLLCLQLPGSLS
916	Amelogenin, Y isoform	MGTWILFACLVGAAFA
917	Angiopoietin-related protein 5	MMSPSQASLLFLNVCIFICGEAVQG
918	Apolipoprotein A-IV	MFLKAVVLTLALVAVAGARA
919	ADAMTS-like protein 3	MASWTSPWWVLIGMVFMHSPLPQTTA
920	A disintegrin and metalloproteinase withthrombospondinmotifs14	MAPLRALLSYLLPLHCALCAAA
921	A disintegrin and metalloproteinase withthrombospondinmotifs7	MPGGPSPRSPAPLLRPLLLLLCALAPG
922	B melanoma antigen 3	MAAGVVFLALSAQLLQA
923	Bone morphogenetic protein 15	MVLLSILRILFLCELVLF
924	Bone morphogenetic protein 4	MIPGNRMLMVVLLCQVLLG
925	Mus musculus Ig H-chain V-regiongene,exonandpartialcds	MGWSYIILFLVAT
926	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3	MLWRQLIYWQLLALFFLPFCLC
927	Carbonic anhydrase 6	MRALVLLLSLFLLGGQA
928	C-C motif chemokine 1	MQIITTALVCLLLAGMWPEDVDS
929	C-C motif chemokine 5	MKVSAAALAVILIATALCAPASA
930	CUB domain-containing protein 2	MLAEWGACLLLAVALLGPGLQA
931	Uncharacterized protein C11orf44	MVLLCLFLASLAATPRA
932	Collagen alpha-1(IV) chain	MGPRLSVWLLLLPAALLLHEEHSRAAA
933	Collagen alpha-1(VIII) chain	MAVLPGPLQLLGVLLTISLSSIRLIQA
934	Collagen alpha-1(XIV) chain	MKIFQRKMRYWLLPPFLAIVYFCTIVQG
935	Collagen triple helix repeat-containing protein 1	MRPQGPAASPQRLRGLLLLLLLQLPAPSSA
936	Beta-defensin 134	MKPLLVVFVFLFLWDPVLA
937	Defensin-6	MRTLTILTAVLLVALQAKA
938	Dentin matrix protein 4	MKMMLVRRFRVLILMVFLVAC
939	Epididymal sperm-binding protein 1	MTRWSSYLLGWTTFLLYSYESSGG
940	Coagulation factor VIII	MQIELSTCFFLCLLRFCFS
941	Fibroblast growth factor 8	MGSPRSALSCLLLHLLVLCLQA
942	Growth arrest-specific protein 6	MAPSLSPGPAALRRAPQLLLLLLAAECALA
943	Growth/differentiation factor 9	MARPNKFLLWFCCFAWLCFPISLG
944	Histidine-rich glycoprotein	MKALIAALLLITLQYSCA

945	Interleukin-17 receptor E	MGSSRLAALLLPLLLIVIDLSDS
946	Insulin-like growth factor-binding protein 6	MTPHRLLPPLLLLLALLLAASPGGALA
947	Interleukin-11	MNCVCRLVLVVLSLWPDTAVA
948	Interleukin-25	MRERPRLGEDSSLISLFLQVVAFLAMVMGTHT
949	Serine protease inhibitor Kazal-type 6	MKLSGMFLLLSLALFCFLTGVFS
950	Uncharacterized protein KIAA0564	MQSRLLLLGAPGGHG
951	Putative killer cell immunoglobulin-like receptor-likeproteinKIR3DX1	MAPKLITVLCLGFCLN
952	Laminin subunit alpha-5	MAKRLCAGSALCVRGPRGPAPLLLVGLALLGAARA
953	Laminin subunit beta-3	MRPFFLLCFALPGLLHA
954	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamilyAmember2	MTPILTVLICLGLSLGPRTHVQA
955	Matrix metalloproteinase-21	MLAASIFRPTLLLCWLAAPWPTQP
956	Neurexophilin-4	MRLLPEWFLLLFGPWLLRKAVSA
957	Polyserase-3	MKWCWGPVLLIAGATVLMEGLQA
958	Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 2	MGPLSAPPCTEHIKWKGLLVTASLLNFWNLPTTA
959	R-spondin-2	MQFRLFSFALIILNCMDYSHC
960	Semaphorin-3F	MLVAGLLLWASLLTGAWP
961	Sperm-associated antigen 11B	MRQRLLPSVTSLLLVALLFPGSSQ
962	SPARC-related modular calcium-binding protein 1	MLPARCARLLTPHLLLVLVQLSPARG
963	Thrombospondin type-1 domain-containing protein 1	MKPMLKDFSNLLLVVLCDYVLGEA
964	V-set and transmembrane domain-containing protein 1	MTAEFLSLLCLGLCLG
965	von Willebrand factor A domain-containing protein 3A	MKKYRKISIGCFAMATQTSHVFHG
966	Wnt inhibitory factor 1	MARRSAFPAAALWLWSILLCLLALRAEA
967	Protein Z-dependent protease inhibitor	MKVVPSLLLSVLLAQVWLVPG
968	A disintegrin and metalloproteinase withthrombospondinmotifs19	MRLTHICCCCLLYQLGFLSNG
969	Bone morphogenetic protein 6	MPGLGRRAQWLCWWWGLLCS
970	Complement C1q subcomponent subunit B	MMMKIPWGSIPVLMLLLLLGLIDIS
971	C-C motif chemokine 7	MKASAALLCLLLTAAAFSPQGLA
972	Putative uncharacterized protein C10orf31	MFCLLHLCFYLANFASSIKRTHA
973	Uncharacterized protein C12orf73	MPAGVPMSTYLKMFAASLLAMCAGA
974	Collagen alpha-3(IV) chain	MSARTAPRPQVLLLPLLLVLLAAAPAAS
975	Complement component C8 beta chain	MKNSRTWAWRAPVELFLLCAALGCLSLPGSRG
976	Collectin-11	MRGNLALVGVLISLAFLSLLPSGHP
977	Uncharacterized protein C16orf89	MASLGLLLLLLLTALPPLWS
978	Uncharacterized protein C17orf67	MASFKLADSVWEDSLSKR
979	Protein CREG2	MSVRRGRRPARPGTRLSWLLCCSALLSPAAG
980	C-X-C motif chemokine 9	MKKSGVLFLLGIILLVLIGVQG
981	Beta-defensin 107	MPGAMKIFVFILAALILLAQIF
982	Beta-defensin 128	MKLFLVLIILLFEVLTDG
983	Ephrin-A4	MRLLPLLRTVLWAAFLGSPLRGGSS
984	EMI domain-containing protein 1	MGGPRAWALLCLGLLLPGGGAA
985	Protein FAM131A	MFLATLSFLLPFAHPFGTVSC
986	UPF0528 protein FAM172A	MSISLSSLILLPIWINMA
987	Fas apoptotic inhibitory molecule 3	MDFWLWPLYFLPVSGAL
988	Low affinity immunoglobulin gamma FcregionreceptorIII-A	MWQLLLPTALLLLVSA
989	Fibroblast growth factor receptor 3	MGAPACALALCVAVAIVAGASS
990	Growth/differentiation factor 3	MLRFLPDLAFSFLLILALGQAVQF
991	Gastrokine-2	MKILVAFLVVLTIFGIQSHG
992	Gastrin-releasing peptide	MRGRELPLVLLALVLCLAPRGRA
993	Inducible T-cell costimulator	MKSGLWYFFLFCLRIKVLTG
994	Interphotoreceptor matrix proteoglycan 1	MYLETRRAIFVFWIFLQVQG

995	Serine protease inhibitor Kazal-type 9	MRATAIVLLLALTLATMFS
996	Kallikrein-8	MGRPRPRAAKTWMFLLLLGGAWAGHSRA
997	Leucine-rich glioma-inactivated protein 1	MESERSKRMGNACIPLKRIAYFLCLLSALLLTEG
998	Lipase member N	MMWLLLTTTCLICGTLNA
999	Long palate, lung and nasal epithelium carcinoma-associatedprotein3	MQPVMLALWSLLLLWGLATP
1000	Lysozyme-like protein 2	MKAAGILTLIGCLVTGAES
1001	Stromelysin-2	MMHLAFLVLLCLPVCSA
1002	Matrix metalloproteinase-17	MRRRAARGPGPPPPGPGLSRLPLPLLLLLALGTRGGCA
1003	Nodal homolog	MHAHCLPFLLHAWWALLQAGAATVAT
1004	Neuronal cell adhesion molecule	MQLKIMPKKKRLSAGRVPLILFLC
1005	Glycodelin	MLCLLLTLGVALVCGVPA
1006	Plasminogen activator inhibitor 1	MQMSPALTCLVLGLALVFGEGSA
1007	Platelet-derived growth factor subunit B	MNRCWALFLSLCCYLRLVSA
1008	Paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha	MGRPLLLPLLPLLLPPAFL
1009	Proline-rich acidic protein 1	MRRLLLVTSLVVVLLWEAGA
1010	R-spondin-4	MRAPLCLLLLVAHAVDMLA
1011	Syndecan-4	MAPARLFALLLFFVGGVA
1012	Secreted frizzled-related protein 4	MFLSILVALCLWLHLALG
1013	Vitelline membrane outer layer protein 1 homolog	MERGAGAKLLPLLLLLRATGFTCA
1014	Brorin	MPSSTAMAVGALSSSLLVTCCLMVALC
1015	WAP four-disulfide core domain protein 12	MGSSSFLVLMVSLVLVTLVAVEG
1016	Zinc-alpha-2-glycoprotein	MVRMVPVLLSLLLLLGP
1017	Angiopoietin-related protein 7	MLKKPLSAVTWLCIFIVAFVSHPAWL
1018	Neutrophil defensin 1	MRTLAILAAILLVALQAQA
1019	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	MALFVRLLALALALALGPAATLA
1020	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 5	MRPLLVLLLLGLAAG
1021	Beta-casein	MKVLILACLVALALA
1022	Coiled-coil domain-containing protein 134	MDLLQFLAFLFVLLLSGMGATG
1023	C-C motif chemokine 20	MCCTKSLLLAALMSVLLLHLCGESEA
1024	Tryptase beta-1	MLNLLLLALPVLASRAYA
1025	Cerberus	MHLLLFQLLVLLPLGKT
1026	Complement factor D	MHSWERLAVLVLLGAAACAA
1027	Chitinase-3-like protein 2	MGATTMDQKSLWAGVVVLLLLQGGSA
1028	Contactin-associated protein-like 3	MASVAWAVLKVLLLLPTQTWSPVGA
1029	Complement C2	MGPLMVLFCLLFLYPGLADS
1030	Collagen alpha-1(XVI) chain	MWVSWAPGLWLLGLWATFGHG
1031	Probable carboxypeptidase X1	MWGLLLALAAFAPAVGPALG
1032	Cystatin-9	MSSPQRRKAMPWALSLLLMGFQLLVTYA
1033	C-X-C motif chemokine 6	MSLPSSRAARVPGPSGSLCALLALLLLTPPGPLASA
1034	Beta-defensin 136	MNLCLSALLFFLVILLPSGKG
1035	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase familymember5	MTSKFLLVSFILAALSLSTTFSLQ
1036	Ephrin type-B receptor 6	MATEGAAQLGNRVAGMVCSLWVLLLVSSVLA
1037	Fibrillin-3	MTLEGLYLARGPLARLLLAWSALLCMAGGQG
1038	Leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT3	MISAAWSIFLIGTKIGLFLQVAPLSVMA
1039	Embryonic growth/differentiation factor 1	MPPPQQGPCGHHLLLLLALLLPSLPLTRA
1040	Ig heavy chain V-II region ARH-77	MDLLHKNMKHLWFFLLLVA
1041	Interferon kappa	MSTKPDMIQKCLWLEILMGIFIAGTLS
1042	IgA-inducing protein homolog	MCSYYHMKKRSVSGCNITIFAVMFSHLSAG
1043	Interleukin-7	MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASS
1044	Inhibin alpha chain	MVLHLLLFLLLTPQGGHS
1045	Lipase member M	MLETLSRQWIVSHRMEMWLLILVAYMFQRNVNS

1046	Ig lambda chain V region 4A	MAWTPLFLFLLTCCPGSNSQ
1047	Mannan-binding lectin serine protease 2	MRLLTLLGLLCGSVA
1048	Stromelysin-1	MKSLPILLLLCVAVCSA
1049	Mesothelin	MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRT
1050	Mucin-1	MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTG
1051	Protein kinase C-binding protein NELL2	MESRVLLRTFCLIFGLGAVWG
1052	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	MPLGLLWLGLALLGALHAQA
1053	Orexigenic neuropeptide QRFP	MVRPYPLIYFLFLPLGAC
1054	Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 6	MGPLSAPPCTQHITWKGLLLTASLLNFWNLPTTA
1055	Putative peptide YY-3	MVSVCRPWPAVAIALLALLVCLG
1056	Regenerating islet-derived protein 3 alpha	MLPPMALPSVSWMLLSCLMLLSQVQG
1057	Serpin A11	MGPAWLWLLGTGILASVHC
1058	Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxindomain-containingprotein1	MWPRLAFCCWGLALVSG
1059	TGF-beta receptor type III	MTSHYVIAIFALMSSCLATA
1060	Thyroxine-binding globulin	MSPFLYLVLLVLGLHATIHC
1061	Tubulointerstitial nephritis antigen-like	MWRCPLGLLLLLPLAGHLALG
1062	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 18	MAQHGAMGAFRALCGLALLCALSLG
1063	WAP four-disulfide core domain protein 5	MRTQSLLLLGALLAVGSQLPAVFG
1064	Apolipoprotein A-V	MASMAAVLTWALALLSAFSATQA
1065	Apolipoprotein O	MFKVIQRSVGPASLSLLTFKVYAAP
1066	Chymotrypsinogen B2	MAFLWLLSCWALLGTTFG
1067	Bone morphogenetic protein 5	MHLTVFLLKGIVGFLWSCWVLVGYAKGGLG
1068	Biotinidase	MAHAHIQGGRRAKSRFVVCIM
1069	Calumenin	MDLRQFLMCLSLCTAFALS
1070	Collagen alpha-1(VI) chain	MRAARALLPLLLQACWTAA
1071	Carboxypeptidase-like protein X2	MSRPGTATPALALVLLAVTLAGVGA
1072	Protein CREG1	MAGLSRGSARALLAALLASTLLALLVSPARG
1073	Granulocyte colony-stimulating factor	MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQE
1074	C-X-C motif chemokine 16	MGRDLRPGSRVLLLLLLLLLVYLTQPGNG
1075	Beta-defensin 127	MGLFMIIAILLFQKPTVTEQ
1076	Dehydrogenase/reductase SDR family member 4-like 2	MARLLGLCAWARKSVRLASS
1077	Extracellular matrix protein 1	MGTTARAALVLTYLAVASA
1078	Eosinophil cationic protein	MVPKLFTSQICLLLLGLMGVEGSLHA
1079	Elastase-2B	MIRTLLLSTLVAGALS
1080	Protein FAM150A	MRPLKPGAPLPALFLLALALSPHGAHG
1081	Protein FAM5B	MRWQCGTRFRGLRPAVAPWTALLALGLPGWVLA
1082	Growth/differentiation factor 2	MCPGALWVALPLLSLLAGSLQG
1083	Glycoprotein hormones alpha chain	MDYYRKYAAIFLVTLSVFLHVLHS
1084	Progonadoliberin-2	MASSRRGLLLLLLLTAHLGPSEA
1085	Glypican-6	MPSWIGAVILPLLGLLLSLPAGA
1086	Proheparin-binding EGF-like growth factor	MKLLPSVVLKLFLAAVLSA
1087	Protein HEG homolog 1	MASPRASRWPPPLLLLLLPLLLLPPAAPG
1088	Hyaluronan and proteoglycan link protein 2	MPGWLTLPTLCRFLLWAFTIFHKAQG
1089	Insulin-like growth factor-binding protein 2	MLPRVGCPALPLPPPPLLPLLLLLLGASGGGGGARAEVL
1090	Insulin-like 3	MDPRLPAWALVLLGPALVFA
1091	Serine protease inhibitor Kazal-type 8	MKGICSDAILVLATSMWMAFA
1092	Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase	MGPPGSPWQWVTLLLGLLLPPAAP
1093	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamilyBmember1	MTPILTVLICLGLSLGPRTHVQA
1094	Lysozyme-like protein 1	MKAAGILTLIGCLVTGAES

1095	Netrin-1	MMRAVWEALAALAAVACLVGAVRG
1096	Neuropilin-2	MDMFPLTWVFLALYFSRHQV
1097	Neurotrophin-3	MSILFYVIFLAYLRGIQG
1098	Otoraplin	MARILLLFLPGLVAVCA
1099	Protocadherin alpha-6	MVFTPEDRLGKQCLLLPLLLLAAWKVGSG
1100	Gastricsin	MKWMVVVLVCLQLLEA
1101	Platelet factor 4 variant	MSSAARSRLTRATRQEMLFLALLLLPVVVA
1102	Proline-rich protein 4	MLLVLLSVVLLALSSA
1103	Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 8	MGLLSAPPCTQRITWKGLLLTASLLNFWNPPTTA
1104	Pulmonary surfactant-associated protein B	MAESHLLQWLLLLLPTLCGPGTAA
1105	Inactive serine protease RAMP	MELGCWTQLGLTFLQLLLISS
1106	Ribonuclease-like protein 13	MAPAVTRLLFLQLVLGPTLV
1107	R-spondin-3	MHLRLISWLFIILNFMEYIGS
1108	Suprabasin	MHLARLVGSCSLLLLLGALSGWAAS
1109	Metalloproteinase inhibitor 3	MTPWLGLIVLLGSWSLGDWGAEA
1110	Thymic stromal lymphopoietin	MFPFALLYVLSVSFRKIFILQLVGLVLT
1111	Testis-expressed sequence 264 protein	MSDLLLLGLIGGLTLLLLLTLLAFAGYSGLLA
1112	Retinoschisin	MSRKIEGFLLLLLFGYEATLGLS
1113	C-type lectin domain-containing protein UNQ5810/PRO19627	MQRWTLWAAAFLTLHSAQA
1114	Uncharacterized aarF domain-containing protein kinase 1	MARKALKLASWTSMALA
1115	Attractin	MVAAAAATEARLRRR
1116	A disintegrin and metalloproteinase withthrombospondinmotifs6	MEILWKTLTWILSLIMASSEF
1117	BMP-binding endothelial regulator protein	MLWFSGVGALAERYCRRSPGITCCVLLLLNCSGVPMSLA
1118	Complement C1q tumor necrosis factor-relatedprotein9-like	MRIWWLLLAIEICTGNINS
1119	Carboxypeptidase A6	MKCLGKRRGQAAAFLPLCWLFLKILQPGHS
1120	Collagen alpha-3(V) chain	MGNRRDLGQPRAGLCLLLAALQLLPGTQA
1121	Complement component C9	MSACRSFAVAICILEISILTA
1122	B melanoma antigen 2	MAAGVVFLALSAQLLQA
1123	Chordin-like protein 2	MVPEVRVLSSLLGLALLWFPLDSHA
1124	C-X-C motif chemokine 5	MSLLSSRAARVPGPSSSLCALLVLLLLTQPGPIAS
1125	C-X-C motif chemokine 11	MSVKGMAIALAVILCATVVQG
1126	Desert hedgehog protein	MALLTNLLPLCCLALLALPAQS
1127	Protein FAM180A	MHWKMLLLLLLYYNAEA
1128	Protein FAM19A4	MRSPRMRVCAKSVLLSHWLFLAYVLMVCCKLMSAS
1129	Fibrillin-1	MRRGRLLEIALGFTVLLASYTSHGADA
1130	Fibroblast growth factor 10	MWKWILTHCASAFPHLPGCCCCCFLLLFLVSSVPVTC
1131	Glypican-5	MDAQTWPVGFRCLLLLALVGSARS
1132	Hyaluronan-binding protein 2	MFARMSDLHVLLLMALVGKTACG
1133	Probable serine protease HTRA4	MIRPQLRTAGLGRCLLPGLLLLLVPVLWAGA
1134	Islet amyloid polypeptide	MGILKLQVFLIVLSVALNHLKA
1135	Interleukin-15	MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEA
1136	Interferon-alpha/beta receptor beta chain	MLLSQNAFIFRSLNLVLMVYISLVFG
1137	Inhibin beta C chain	MTSSLLLAFLLLAPTTVA
1138	Ig kappa chain V-IV region	MVLQTQVFISLLLWISGAYG
1139	Epididymal-specific lipocalin-8	MPGAAEALPTVTVTLVAGAVPPASG
1140	Leucine-rich repeat-containing protein 17	MRVVTIVILLCFCKAAEL
1141	Collagen alpha-5(IV) chain	MKLRGVSLAAGLFLLALSLWGQPAEA
1142	Lysozyme g-like protein 1	MSALWLLLGLLALMDLSES
1143	Multiple epidermal growth factor-like domains 6	MSFLEEARAAGRAVVLALVLLLLPAV
1144	Microfibril-associated glycoprotein 4	MKALLALPLLLLLSTPPCAPQ
1145	Protein kinase C-binding protein NELL1	MPMDLILVVWFCVCTA
1146	Nidogen-2	MEGDRVAGRPVLSSLPVLLLLPLLMLRAAA
1147	Platelet-activating factor acetylhydrolase	MVPPKLHVLFCLCGCLAVVYP

1148	Peptidase inhibitor 16	MHGSCSFLMLLLPLLLLLVATTGPVGA
1149	Phospholipase A1 member A	MPPGPWESCFWVGGLILWLSVGSSG
1150	Vitamin K-dependent protein C	MWQLTSLLLFVATWGISGTPAPLDSVFSSSER
1151	Properdin	MITEGAQAPRLLLPPLLLLLTLPATGS
1152	Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 1	MGTLSAPPCTQRIKWKGLLLTASLLNFWNLPTTA
1153	Pregnancy zone protein	MRKDRLLHLCLVLLLILLSASDSNS
1154	Regulated endocrine-specific protein 18	MQHPLWPGSSEGLQLLVCFLLLNSCPGGCS
1155	FMRFamide-related peptides	MEIISSKLFILLTLATSSLLTSNIFC
1156	Sperm-associated antigen 11A	MRQRLLPSVTSLLLVALLFPGSSQA
1157	Thrombospondin and AMOP domain-containingisthmin-likeprotein1	MRALRDRAGLLLCVLLLAALLEAALG
1158	Collagen alpha-2(I) chain	MLSFVDTRTLLLLAVTLCLATCQS
1159	Testican-2	MRAPGCGRLVLPLLLLAAAALA
1160	T-cell immunomodulatory protein	MAAAGRLPSSWALFSPLLAGLALLGVGPVPARA
1161	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B	MNNLLCCALVFLDISIKWTTQ
1162	Putative trypsin-6	MNPLLILAFVGAAVA
1163	Urocortin-3	MLMPVHFLLLLLLLLGGPRTG
1164	Vasorin	MCSRVPLLLPLLLLLALGPGVQG
1165	Protein WFDC10B	MAPQTLLLVLVLCVLLLQAQG
1166	Protein Wnt-5b	MPSLLLLFTAALLSSWA
1167	Angiopoietin-related protein 6	MGKPWLRALQLLLLLGASWA
1168	A disintegrin and metalloproteinase withthrombospondinmotifs15	MLLLGILTLAFAGRTAG
1169	B melanoma antigen 4	MAAGAVFLALSAQLLQA
1170	UPF0672 protein C3orf58	MWRLVPPKLGRLSRSLKLAALGSLLVLMVLHSPSL
1171	C-C motif chemokine 2	MKVSAALLCLLLIAATFIPQGLA
1172	T-cell surface glycoprotein CD8 beta chain	MRPRLWLLLAAQLTVLHGNSV
1173	Putative uncharacterized protein C11orf45	MLTRLVLSAHLSSTTSPPWTHA
1174	Complement C5	MGLLGILCFLIFLGKTWG
1175	Collagen alpha-1(XI) chain	MEPWSSRWKTKRWLWDFTVTTLALTFLFQAREVRGA
1176	Collectin-10	MNGFASLLRRNQFILLVLFLLQIQSLG
1177	Uncharacterized protein C17orf99	MGLPGLFCLAVLAASSFSKA
1178	Cartilage-associated protein	MEPGRRGAAALLALLCVACALRAGRA
1179	Granulocyte colony-stimulating factor receptor	MARLGNCSLTWAALIILLLPGSLE
1180	Cystatin-9-like	MLGLPWKGGLSWALLLLLLGSQILLIYA
1181	C-X-C motif chemokine 13	MKFISTSLLLMLLVSSLSPVQG
1182	Beta-defensin 126	MKSLLFTLAVFMLLAQLVSG
1183	Protein FAM24B	MPVIAGGILAALLLLIVVVLC
1184	Fibroblast growth factor receptor 2	MVSWGRFICLVVVTMATLSLA
1185	Fibrinogen alpha chain	MFSMRIVCLVLSVVGTAWT
1186	Growth/differentiation factor 15	MPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGGA
1187	Pancreatic secretory granule membrane majorglycoproteinGP2	MPHLMERMVGSGLLWLALVSCILTQASA
1188	Insulin-like growth factor-binding protein-like 1	MPRLSLLLPLLLLLLLPLLPPLSPS
1189	Interleukin-26	MLVNFILRCGLLLVTLSLAIA
1190	Interleukin-6 receptor subunit beta	MLTLQTWLVQALFIFLTTESTG
1191	Interleukin-7 receptor subunit alpha	MTILGTTFGMVFSLLQVVSG
1192	Kallikrein-4	MATAGNPWGWFLGYLILGVAGSLVSG
1193	Ig kappa chain V-I region Daudi	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC
1194	Latherin	MLNVSGLFVLLCGLLVSSSA
1195	Epididymal-specific lipocalin-9	MALLLLSLGLSLIAA
1196	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamilyAmember3	MTPILTVLICLGLSLDPRTHVQA
1197	Lutropin subunit beta	MEMLQGLLLLLLLSMGGAWA

1198	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 4	MPRPGTSGRRPLLLVLLLPLFAAATSA
1199	Lysozyme g-like protein 2	MLSSVVFWGLIALIGTSRG
1200	Meteorin	MGFPAAALLCALCCGLLAPAARA

[0159] **3. 1200종의 signal peptides를 구분할 수 있는 SP-tag 디자인**

[0160] SP-tag은 크게 1200종 이상의 다양성을 만들어 내는 barcoding sequence와 Histidine tag으로 이루어지게 디자인하였다(도 5). 1200종의 signal peptides에 각각 하나씩 대응하기 위해 아미노산 5자리로 이루어진 barcoding sequences를 고안하였다. 그리고 그 뒤에 실험의 정확도를 위해 세포배양액에서 표적 단백질만을 분리 정제하기 위한 6 x Histidine tag을 붙였다. LC-MS/MS 수행 시 효과적인 Trypsin cleavage를 위해 양 끝에 Lysine (K)과 Arginine (R)을 삽입하였다. 단백질-barcoding sequence-his tag사이에는 linker 아미노산으로 glycine을 삽입하여 디자인하였다.

[0161] Barcoding sequence에 사용할 아미노산을 선정하기 위해 Trypsin cleavage site인 K와 R을 제외한 총 18종의 아미노산을 확인하였다. 18종의 아미노산을 하나씩 포함한 18종의 SP-tag이 달린 단백질을 발현 정제하였다(도 6).

[0162] 18종의 단백질 동량을 LC-MS/MS로 식별하여 상대 정량에 적합한 아미노산을 선별하였다(도 7). 동량의 단백질을 이용한 상대 정량 결과 18종의 아미노산 중 6종(V, F, G, C, H 및 N)의 값은 상대적으로 너무 높거나 낮아서 정량하는데 있어서 부적합하였다. 12종의 아미노산(I, L, P, A, W, Y, P, T, S, E, Q 및 D)은 서로 peak area 값이 비슷하여 정량하는데 영향을 주지 않았다. 즉, 아미노산 종류에 상관없이 그 양으로만 peak area 값이 정해짐으로 상대 정량을 하기에 적합하다고 판단되었다. 결과적으로 Barcoding sequence 디자인을 위해 1차적으로 12종의 아미노산을 선별하였다.

[0164] **4. 5자리 Barcoding sequences를 디자인하여 서로 다른 분자량을 가진 1200종의 SP-tag 라이브러리 구축**

[0165] LC-MS/MS 상에서 효과적인 식별을 위해 1200종의 SP-tag은 서로 다른 분자량을 가져야 한다. 그렇기 때문에 Barcoding sequences 디자인 시 모든 sequences간의 분자량이 2이상 차이가 나게 하였다. 선별된 12종의 아미노산 중 I와 L, E 및 Q, D와 N은 분자량이 같거나 약 1정도의 차이를 보이기 때문에 I, Q 및 N을 배제하고 L, E 및 D 만 사용하였다. 총 9종의 아미노산(L, P, A, W, Y, T, S, E 및 D)을 이용하여 5자리의 Barcoding sequences 를 디자인하여 라이브러리를 구축하였다(표 2).

표 2

[0166] **아미노산 5자리로 이루어진 Barcoding sequence**

Number	Sequence	Number	Sequence	Number	Sequence	Number	Sequence
SP-tag #1	SADAA	SP-tag #301	WLELW	SP-tag #601	EWPWP	SP-tag #901	SLSYP
SP-tag #2	TADAA	SP-tag #302	EWELW	SP-tag #602	YYPWP	SP-tag #902	PLSYP
SP-tag #3	ALDAA	SP-tag #303	SAELY	SP-tag #603	WYPWP	SP-tag #903	PYSYP
SP-tag #4	EADAA	SP-tag #304	ALELY	SP-tag #604	WWPWP	SP-tag #904	EYSYP
SP-tag #5	TLDAA	SP-tag #305	DLELY	SP-tag #605	AAPWT	SP-tag #905	WLSYP
SP-tag #6	LLDAA	SP-tag #306	ELELY	SP-tag #606	SAPWT	SP-tag #906	YYSYP
SP-tag #7	SYDAA	SP-tag #307	WAELY	SP-tag #607	TAPWT	SP-tag #907	WYSYP
SP-tag #8	WADAA	SP-tag #308	EYELY	SP-tag #608	EAPWT	SP-tag #908	WWSYP
SP-tag #9	SWDAA	SP-tag #309	DWELY	SP-tag #609	LLPWT	SP-tag #909	AASYS
SP-tag #10	EYDAA	SP-tag #310	YYELY	SP-tag #610	ELPWT	SP-tag #910	SASYS
SP-tag #11	WLDAA	SP-tag #311	AAEWA	SP-tag #611	SYPWT	SP-tag #911	PASYS
SP-tag #12	EWDAA	SP-tag #312	SAEWA	SP-tag #612	WLPWT	SP-tag #912	DASYS
SP-tag #13	YYDAA	SP-tag #313	PAEWA	SP-tag #613	WYPWT	SP-tag #913	EASYS
SP-tag #14	WYDAA	SP-tag #314	EAEWA	SP-tag #614	AAPWW	SP-tag #914	PLSYS
SP-tag #15	WWDAA	SP-tag #315	TLEWA	SP-tag #615	SAPWW	SP-tag #915	LLSYS
SP-tag #16	SADAD	SP-tag #316	YAEWA	SP-tag #616	TAPWW	SP-tag #916	YASYS
SP-tag #17	DADAD	SP-tag #317	SYEWA	SP-tag #617	DAPWW	SP-tag #917	ELSYS

SP-tag #18	DLDAD	SP-tag #318	WAEWA	SP-tag #618	EAPWW	SP-tag #918	SYSYS
SP-tag #19	TYDAD	SP-tag #319	SWEWA	SP-tag #619	TLPWW	SP-tag #919	WASYS
SP-tag #20	TWDAD	SP-tag #320	PWEWA	SP-tag #620	LLPWW	SP-tag #920	SWSYS
SP-tag #21	WWDAD	SP-tag #321	EYEWA	SP-tag #621	YAPWW	SP-tag #921	EYSYS
SP-tag #22	TADAE	SP-tag #322	WLEWA	SP-tag #622	ELPWW	SP-tag #922	WLSYS
SP-tag #23	PLDAE	SP-tag #323	EWEWA	SP-tag #623	SYPWW	SP-tag #923	EWSYS
SP-tag #24	YADAE	SP-tag #324	YYEWA	SP-tag #624	PYPWW	SP-tag #924	YYSYS
SP-tag #25	SADAL	SP-tag #325	WWEWA	SP-tag #625	YLPWW	SP-tag #925	WYSYS
SP-tag #26	TADAL	SP-tag #326	PAEWD	SP-tag #626	PWPWW	SP-tag #926	WWSYS
SP-tag #27	WADAL	SP-tag #327	DAEWD	SP-tag #627	EYPWW	SP-tag #927	TASYT
SP-tag #28	TYDAL	SP-tag #328	EAEWD	SP-tag #628	WLPWW	SP-tag #928	SLSYT
SP-tag #29	EYDAL	SP-tag #329	SYEWD	SP-tag #629	EWPWW	SP-tag #929	LLSYT
SP-tag #30	DWDAL	SP-tag #330	TYEWD	SP-tag #630	AAPWY	SP-tag #930	ELSYT
SP-tag #31	WYDAL	SP-tag #331	EYEWD	SP-tag #631	ELPWY	SP-tag #931	SYSYT
SP-tag #32	SADAP	SP-tag #332	DWEWD	SP-tag #632	WAPWY	SP-tag #932	WASYT
SP-tag #33	DADAP	SP-tag #333	AAEWE	SP-tag #633	EYPWY	SP-tag #933	TYSYT
SP-tag #34	EADAP	SP-tag #334	SAEWE	SP-tag #634	EWPWY	SP-tag #934	SWSYT
SP-tag #35	WADAP	SP-tag #335	PAEWE	SP-tag #635	WWPYA	SP-tag #935	EYSYT
SP-tag #36	PWDAP	SP-tag #336	ALEWE	SP-tag #636	EAPYD	SP-tag #936	EWSYT
SP-tag #37	EYDAP	SP-tag #337	EAEWE	SP-tag #637	TLPYD	SP-tag #937	YYSYT
SP-tag #38	EWDAP	SP-tag #338	TLEWE	SP-tag #638	DYPYD	SP-tag #938	WYSYT
SP-tag #39	YYDAP	SP-tag #339	LLEWE	SP-tag #639	EYPYD	SP-tag #939	WWSYT
SP-tag #40	WYDAP	SP-tag #340	YAEWE	SP-tag #640	EWPYD	SP-tag #940	AASYW
SP-tag #41	WWDAP	SP-tag #341	ELEWE	SP-tag #641	SAPYS	SP-tag #941	SASYW
SP-tag #42	ELDAS	SP-tag #342	SYEWE	SP-tag #642	TAPYS	SP-tag #942	TASYW
SP-tag #43	SYDAT	SP-tag #343	WAEWE	SP-tag #643	LLPYS	SP-tag #943	SYSYW
SP-tag #44	AADAY	SP-tag #344	TYEWE	SP-tag #644	YAPYS	SP-tag #944	WASYW
SP-tag #45	SADAY	SP-tag #345	SWEWE	SP-tag #645	ELPYS	SP-tag #945	TYSYW
SP-tag #46	PADAY	SP-tag #346	TWEWE	SP-tag #646	SYPYS	SP-tag #946	PWSYW
SP-tag #47	DADAY	SP-tag #347	WLEWE	SP-tag #647	DYPYS	SP-tag #947	YYSYW
SP-tag #48	PLDAY	SP-tag #348	EWEWE	SP-tag #648	EWPYS	SP-tag #948	ALTAA
SP-tag #49	DLDAY	SP-tag #349	YYEWE	SP-tag #649	EAPYT	SP-tag #949	DLTAA
SP-tag #50	SYDAY	SP-tag #350	WYEWE	SP-tag #650	YAPYT	SP-tag #950	SYTAA
SP-tag #51	EYDAY	SP-tag #351	TAEWL	SP-tag #651	SAPYW	SP-tag #951	WATAA
SP-tag #52	YYDAY	SP-tag #352	EAEWL	SP-tag #652	TAPYW	SP-tag #952	TYTAA
SP-tag #53	WYDAY	SP-tag #353	TLEWL	SP-tag #653	EAPYW	SP-tag #953	TWTAA
SP-tag #54	WWDAY	SP-tag #354	YAEWL	SP-tag #654	PLPYW	SP-tag #954	DLTAD
SP-tag #55	ALDLA	SP-tag #355	SYEWL	SP-tag #655	LLPYW	SP-tag #955	ELTAE
SP-tag #56	EADLA	SP-tag #356	WAEWL	SP-tag #656	YAPYW	SP-tag #956	YLTAE
SP-tag #57	TLDLA	SP-tag #357	EYEWL	SP-tag #657	SYPYW	SP-tag #957	EWTAE
SP-tag #58	DLDLA	SP-tag #358	YYEWL	SP-tag #658	SWPYW	SP-tag #958	WATAL
SP-tag #59	ELDLA	SP-tag #359	WYEWL	SP-tag #659	PWPYW	SP-tag #959	EWTAL
SP-tag #60	SYDLA	SP-tag #360	AAEWP	SP-tag #660	WLPYW	SP-tag #960	SATAP
SP-tag #61	SWDLA	SP-tag #361	DAEWP	SP-tag #661	YYPYW	SP-tag #961	TATAP
SP-tag #62	EWDLA	SP-tag #362	SYEWP	SP-tag #662	AAPYY	SP-tag #962	DLTAP
SP-tag #63	YYDLA	SP-tag #363	DYEWP	SP-tag #663	SAPYY	SP-tag #963	ELTAP
SP-tag #64	WWDLA	SP-tag #364	WLEWP	SP-tag #664	TAPYY	SP-tag #964	SYTAP
SP-tag #65	SADLL	SP-tag #365	WYEWP	SP-tag #665	ALPYY	SP-tag #965	WATAP
SP-tag #66	PADLL	SP-tag #366	SAEWS	SP-tag #666	EAPYY	SP-tag #966	TYTAP
SP-tag #67	SLDLL	SP-tag #367	TAEWS	SP-tag #667	PLPYY	SP-tag #967	DYTAP
SP-tag #68	TLDLL	SP-tag #368	EAEWS	SP-tag #668	YAPYY	SP-tag #968	EYTAP
SP-tag #69	LLDLL	SP-tag #369	SYEWS	SP-tag #669	ELPYY	SP-tag #969	WLTAP
SP-tag #70	ELDLL	SP-tag #370	DWEWS	SP-tag #670	WAPYY	SP-tag #970	EWTAP
SP-tag #71	SYDLL	SP-tag #371	LLEWT	SP-tag #671	TYPYY	SP-tag #971	YYTAP
SP-tag #72	WADLL	SP-tag #372	YAEWT	SP-tag #672	YLPYY	SP-tag #972	WYTAP
SP-tag #73	TYDLL	SP-tag #373	WAEWT	SP-tag #673	EYPYY	SP-tag #973	WWTAP
SP-tag #74	SWDLL	SP-tag #374	DYEWT	SP-tag #674	DWPYY	SP-tag #974	DATAS
SP-tag #75	PWDLL	SP-tag #375	EYEWT	SP-tag #675	EWPYY	SP-tag #975	LLTAS

SP-tag #76	EYDLL	SP-tag #376	WLEWT	SP-tag #676	YYPYY	SP-tag #976	SYTAS
SP-tag #77	DWDLL	SP-tag #377	WYEWT	SP-tag #677	WYPYY	SP-tag #977	TYTAS
SP-tag #78	EWDLL	SP-tag #378	AAEWW	SP-tag #678	ALSAA	SP-tag #978	SWTAS
SP-tag #79	YYDLL	SP-tag #379	SAEWW	SP-tag #679	EASAA	SP-tag #979	TWTAS
SP-tag #80	WWDLL	SP-tag #380	TAEWW	SP-tag #680	PLSAA	SP-tag #980	EWTAS
SP-tag #81	SADLP	SP-tag #381	ALEWW	SP-tag #681	DLSAA	SP-tag #981	AATAT
SP-tag #82	TADLP	SP-tag #382	EAEWW	SP-tag #682	ELSAA	SP-tag #982	SATAT
SP-tag #83	DADLP	SP-tag #383	TLEWW	SP-tag #683	PYSAA	SP-tag #983	DATAT
SP-tag #84	EADLP	SP-tag #384	YAEWW	SP-tag #684	SWSAA	SP-tag #984	SLTAT
SP-tag #85	TLDLP	SP-tag #385	ELEWW	SP-tag #685	PWSAA	SP-tag #985	TLTAT
SP-tag #86	DLDLP	SP-tag #386	SYEWW	SP-tag #686	EYSAA	SP-tag #986	YATAT
SP-tag #87	ELDLP	SP-tag #387	PYEWW	SP-tag #687	WLSAA	SP-tag #987	SYTAT
SP-tag #88	SYDLP	SP-tag #388	YLEWW	SP-tag #688	EWSAA	SP-tag #988	SWTAT
SP-tag #89	PYDLP	SP-tag #389	PWEWW	SP-tag #689	YYSAA	SP-tag #989	EYTAT
SP-tag #90	SWDLP	SP-tag #390	EYEWW	SP-tag #690	WYSAA	SP-tag #990	EWTAT
SP-tag #91	EYDLP	SP-tag #391	DWEWW	SP-tag #691	WWSAA	SP-tag #991	YYTAT
SP-tag #92	WLDLP	SP-tag #392	SAEWY	SP-tag #692	TASAD	SP-tag #992	WYTAT
SP-tag #93	EWDLP	SP-tag #393	TAEWY	SP-tag #693	DLSAD	SP-tag #993	WWTAT
SP-tag #94	WWDLP	SP-tag #394	DAEWY	SP-tag #694	WASAD	SP-tag #994	SATAW
SP-tag #95	DWDLS	SP-tag #395	SAEYA	SP-tag #695	TYSAD	SP-tag #995	TATAW
SP-tag #96	DADLT	SP-tag #396	PAEYA	SP-tag #696	TWSAD	SP-tag #996	ALTAW
SP-tag #97	SYDLT	SP-tag #397	EAEYA	SP-tag #697	WLSAD	SP-tag #997	YATAW
SP-tag #98	DYDLT	SP-tag #398	PLEYA	SP-tag #698	TYSAE	SP-tag #998	SYTAW
SP-tag #99	SADLW	SP-tag #399	YAEYA	SP-tag #699	DYSAE	SP-tag #999	WATAW
SP-tag #100	LLDLW	SP-tag #400	ELEYA	SP-tag #700	TWSAE	SP-tag #1000	SWTAW
SP-tag #101	ELDLW	SP-tag #401	PYEYA	SP-tag #701	DWSAE	SP-tag #1001	EYTAW
SP-tag #102	TWDLW	SP-tag #402	EYEYA	SP-tag #702	WWSAE	SP-tag #1002	YYTAW
SP-tag #103	EWDLW	SP-tag #403	EWEYA	SP-tag #703	SWSAL	SP-tag #1003	TATAY
SP-tag #104	SADLY	SP-tag #404	WWEYA	SP-tag #704	WYSAL	SP-tag #1004	DATAY
SP-tag #105	TADLY	SP-tag #405	SYEYD	SP-tag #705	EASAP	SP-tag #1005	TLTAY
SP-tag #106	EADLY	SP-tag #406	DYEYD	SP-tag #706	YASAP	SP-tag #1006	YATAY
SP-tag #107	PLDLY	SP-tag #407	DWEYD	SP-tag #707	ELSAP	SP-tag #1007	ELTAY
SP-tag #108	ELDLY	SP-tag #408	AAEYE	SP-tag #708	WASAP	SP-tag #1008	SYTAY
SP-tag #109	WADLY	SP-tag #409	SAEYE	SP-tag #709	YLSAP	SP-tag #1009	TYTAY
SP-tag #110	PWDLY	SP-tag #410	TAEYE	SP-tag #710	EYSAP	SP-tag #1010	YYTAY
SP-tag #111	DWDLY	SP-tag #411	DAEYE	SP-tag #711	WLSAP	SP-tag #1011	WYTAY
SP-tag #112	WWDLY	SP-tag #412	EAEYE	SP-tag #712	EWSAP	SP-tag #1012	AATLA
SP-tag #113	AADWD	SP-tag #413	PLEYE	SP-tag #713	YYSAP	SP-tag #1013	SATLA
SP-tag #114	TADWD	SP-tag #414	DLEYE	SP-tag #714	WYSAP	SP-tag #1014	TATLA
SP-tag #115	DADWD	SP-tag #415	ELEYE	SP-tag #715	TASAS	SP-tag #1015	EATLA
SP-tag #116	EADWD	SP-tag #416	SYEYE	SP-tag #716	DASAS	SP-tag #1016	TLTLA
SP-tag #117	TLDWD	SP-tag #417	WAEYE	SP-tag #717	SLSAS	SP-tag #1017	YATLA

SP-tag #118	ELDWD	SP-tag #418	TYEYE	SP-tag #718	TLSAS	SP-tag #1018	ELTLA
SP-tag #119	SYDWD	SP-tag #419	SWEYE	SP-tag #719	YASAS	SP-tag #1019	SYTLA
SP-tag #120	YYDWD	SP-tag #420	EYEYE	SP-tag #720	ELSAS	SP-tag #1020	TYTLA
SP-tag #121	AADWE	SP-tag #421	DWEYE	SP-tag #721	PYSAS	SP-tag #1021	DYTLA
SP-tag #122	SADWE	SP-tag #422	EWEYE	SP-tag #722	SWSAS	SP-tag #1022	EYTLA
SP-tag #123	DLDWE	SP-tag #423	YYEYE	SP-tag #723	PWSAS	SP-tag #1023	DWTLA
SP-tag #124	ELDWE	SP-tag #424	WYEYE	SP-tag #724	EYSAS	SP-tag #1024	YYTLA
SP-tag #125	WADWE	SP-tag #425	WWEYE	SP-tag #725	WLSAS	SP-tag #1025	WYTLA
SP-tag #126	DYDWE	SP-tag #426	AAEYL	SP-tag #726	EWSAS	SP-tag #1026	WWTLA
SP-tag #127	EWDWE	SP-tag #427	TAEYL	SP-tag #727	YYSAS	SP-tag #1027	EWTLD
SP-tag #128	AADWL	SP-tag #428	EAEYL	SP-tag #728	WYSAS	SP-tag #1028	AATLL
SP-tag #129	TADWL	SP-tag #429	TLEYL	SP-tag #729	WWSAS	SP-tag #1029	SATLL
SP-tag #130	DADWL	SP-tag #430	SYEYL	SP-tag #730	SASAT	SP-tag #1030	TATLL
SP-tag #131	EADWL	SP-tag #431	SWEYL	SP-tag #731	EASAT	SP-tag #1031	DATLL
SP-tag #132	PLDWL	SP-tag #432	EWEYL	SP-tag #732	TLSAT	SP-tag #1032	EATLL
SP-tag #133	YADWL	SP-tag #433	YAEYT	SP-tag #733	YASAT	SP-tag #1033	PLTLL
SP-tag #134	SYDWL	SP-tag #434	YLEYT	SP-tag #734	ELSAT	SP-tag #1034	DLTLL
SP-tag #135	PYDWL	SP-tag #435	AAEYW	SP-tag #735	WASAT	SP-tag #1035	ELTLL
SP-tag #136	SWDWL	SP-tag #436	EAEYW	SP-tag #736	WLSAT	SP-tag #1036	SYTLL
SP-tag #137	AADWP	SP-tag #437	PLEYW	SP-tag #737	YYSAT	SP-tag #1037	PYTLL
SP-tag #138	TADWP	SP-tag #438	YAEYW	SP-tag #738	WYSAT	SP-tag #1038	SWTLL
SP-tag #139	YADWP	SP-tag #439	ELEYW	SP-tag #739	WWSAT	SP-tag #1039	PWTLL
SP-tag #140	SWDWP	SP-tag #440	SYEYW	SP-tag #740	AASAW	SP-tag #1040	EYTLL
SP-tag #141	PWDWP	SP-tag #441	WAEYW	SP-tag #741	SASAW	SP-tag #1041	WLTLL
SP-tag #142	DWDWP	SP-tag #442	SWEYW	SP-tag #742	PASAW	SP-tag #1042	EWTLL
SP-tag #143	EWDWP	SP-tag #443	EYEYW	SP-tag #743	ALSAW	SP-tag #1043	YYTLL
SP-tag #144	WYDWP	SP-tag #444	DWEYW	SP-tag #744	EASAW	SP-tag #1044	WYTLL
SP-tag #145	TYDWS	SP-tag #445	EWEYW	SP-tag #745	TLSAW	SP-tag #1045	WWTLL
SP-tag #146	DYDWS	SP-tag #446	YYEYW	SP-tag #746	YASAW	SP-tag #1046	AATLP
SP-tag #147	DADWT	SP-tag #447	AAEYY	SP-tag #747	WASAW	SP-tag #1047	PATLP
SP-tag #148	DLDWT	SP-tag #448	SAEYY	SP-tag #748	TYSAW	SP-tag #1048	ALTLP
SP-tag #149	AADWW	SP-tag #449	PAEYY	SP-tag #749	YLSAW	SP-tag #1049	EATLP

SP-tag #150	SADWW	SP-tag #450	DAEYY	SP-tag #750	EWSAW	SP-tag #1050	TLTLP
SP-tag #151	TADWW	SP-tag #451	SLEYY	SP-tag #751	WWSAW	SP-tag #1051	ELTLP
SP-tag #152	DADWW	SP-tag #452	PLEYY	SP-tag #752	AASAY	SP-tag #1052	SYTLP
SP-tag #153	EADWW	SP-tag #453	DLEYY	SP-tag #753	SASAY	SP-tag #1053	PYTLP
SP-tag #154	PLDWW	SP-tag #454	ELEYY	SP-tag #754	ALSAY	SP-tag #1054	DYTLP
SP-tag #155	YADWW	SP-tag #455	SYEYY	SP-tag #755	SLSAY	SP-tag #1055	WLTLP
SP-tag #156	ELDWW	SP-tag #456	WAEYY	SP-tag #756	PLSAY	SP-tag #1056	YYTLP
SP-tag #157	SYDWW	SP-tag #457	YLEYY	SP-tag #757	YASAY	SP-tag #1057	WYTLP
SP-tag #158	PYDWW	SP-tag #458	TWEYY	SP-tag #758	SYSAY	SP-tag #1058	WWTLP
SP-tag #159	SWDWW	SP-tag #459	WLEYY	SP-tag #759	TYSAY	SP-tag #1059	EATLS
SP-tag #160	PWDWW	SP-tag #460	EWEYY	SP-tag #760	EYSAY	SP-tag #1060	SYTLS
SP-tag #161	EYDWW	SP-tag #461	WYEYY	SP-tag #761	EWSAY	SP-tag #1061	SWTLS
SP-tag #162	DWDWW	SP-tag #462	TAPAA	SP-tag #762	YYSAY	SP-tag #1062	DWTLS
SP-tag #163	EWDWW	SP-tag #463	ALPAA	SP-tag #763	WYSAY	SP-tag #1063	AATLT
SP-tag #164	AADWY	SP-tag #464	SLPAA	SP-tag #764	WWSAY	SP-tag #1064	SATLT
SP-tag #165	EADWY	SP-tag #465	TLPAA	SP-tag #765	AASLA	SP-tag #1065	EATLT
SP-tag #166	TYDWY	SP-tag #466	DLPAA	SP-tag #766	SASLA	SP-tag #1066	TLTLT
SP-tag #167	ELDYA	SP-tag #467	ELPAA	SP-tag #767	PASLA	SP-tag #1067	ELTLT
SP-tag #168	WADYA	SP-tag #468	SYPAA	SP-tag #768	ALSLA	SP-tag #1068	SYTLT
SP-tag #169	SWDYA	SP-tag #469	WAPAA	SP-tag #769	PLSLA	SP-tag #1069	TYTLT
SP-tag #170	EWDYA	SP-tag #470	SWPAA	SP-tag #770	DLSLA	SP-tag #1070	SWTLT
SP-tag #171	AADYD	SP-tag #471	PWPAA	SP-tag #771	ELSLA	SP-tag #1071	TWTLT
SP-tag #172	SADYD	SP-tag #472	EYPAA	SP-tag #772	SYSLA	SP-tag #1072	YYTLT
SP-tag #173	PADYD	SP-tag #473	WLPAA	SP-tag #773	WASLA	SP-tag #1073	WYTLT
SP-tag #174	DADYD	SP-tag #474	EWPAA	SP-tag #774	TWSLA	SP-tag #1074	WWTLT
SP-tag #175	EADYD	SP-tag #475	YYPAA	SP-tag #775	WLSLA	SP-tag #1075	TLTLW
SP-tag #176	ELDYD	SP-tag #476	WYPAA	SP-tag #776	EWSLA	SP-tag #1076	ELTLW
SP-tag #177	SYDYD	SP-tag #477	WWPAA	SP-tag #777	YYSLA	SP-tag #1077	DWTLW
SP-tag #178	WADYD	SP-tag #478	TAPAD	SP-tag #778	WWSLA	SP-tag #1078	EWTLW
SP-tag #179	TYDYD	SP-tag #479	TLPAD	SP-tag #779	DASLD	SP-tag #1079	WWTLW
SP-tag #180	PWDYD	SP-tag #480	SYPAD	SP-tag #780	DLSLD	SP-tag #1080	EATLY
SP-tag #181	EYDYD	SP-tag #481	TYPAD	SP-tag #781	WASLD	SP-tag #1081	TLTLY

SP-tag #182	EWDYD	SP-tag #482	SWPAD	SP-tag #782	EWSLD	SP-tag #1082	ELTLY
SP-tag #183	YYDYD	SP-tag #483	DWPAD	SP-tag #783	TASLE	SP-tag #1083	WATLY
SP-tag #184	AADYE	SP-tag #484	AAPAE	SP-tag #784	TLSLE	SP-tag #1084	TYTLY
SP-tag #185	SADYE	SP-tag #485	PAPAE	SP-tag #785	DLSLE	SP-tag #1085	EYTLY
SP-tag #186	TADYE	SP-tag #486	ALPAE	SP-tag #786	ELSLE	SP-tag #1086	EWTLY
SP-tag #187	DADYE	SP-tag #487	LLPAE	SP-tag #787	WASLE	SP-tag #1087	YYTLY
SP-tag #188	SLDYE	SP-tag #488	ELPAE	SP-tag #788	TYSLE	SP-tag #1088	WYTLY
SP-tag #189	TLDYE	SP-tag #489	WAPAE	SP-tag #789	EYSLE	SP-tag #1089	EATWA
SP-tag #190	DLDYE	SP-tag #490	EWPAE	SP-tag #790	YYSLE	SP-tag #1090	TLTWA
SP-tag #191	ELDYE	SP-tag #491	YYPAE	SP-tag #791	WYSLE	SP-tag #1091	ELTWA
SP-tag #192	WADYE	SP-tag #492	AAPAL	SP-tag #792	WWSLE	SP-tag #1092	EWTWA
SP-tag #193	EYDYE	SP-tag #493	TAPAL	SP-tag #793	TASLL	SP-tag #1093	WYTWA
SP-tag #194	EWDYE	SP-tag #494	ALPAL	SP-tag #794	SLSLL	SP-tag #1094	EYTWD
SP-tag #195	WYDYE	SP-tag #495	EAPAL	SP-tag #795	TLSLL	SP-tag #1095	YYTWD
SP-tag #196	WWDYE	SP-tag #496	PLPAL	SP-tag #796	LLSLL	SP-tag #1096	SATWE
SP-tag #197	DADYL	SP-tag #497	LLPAL	SP-tag #797	TYSLL	SP-tag #1097	TYTWE
SP-tag #198	YADYL	SP-tag #498	YAPAL	SP-tag #798	EYSLL	SP-tag #1098	EWTWE
SP-tag #199	TYDYL	SP-tag #499	ELPAL	SP-tag #799	EWSLL	SP-tag #1099	WWTWE
SP-tag #200	SWDYL	SP-tag #500	SYPAL	SP-tag #800	SASLP	SP-tag #1100	AATWL
SP-tag #201	SADYP	SP-tag #501	PYPAL	SP-tag #801	TLSLP	SP-tag #1101	SATWL
SP-tag #202	TADYP	SP-tag #502	SWPAL	SP-tag #802	YASLP	SP-tag #1102	TATWL
SP-tag #203	DLDYP	SP-tag #503	PWPAL	SP-tag #803	SYSLP	SP-tag #1103	ALTWL
SP-tag #204	ELDYP	SP-tag #504	EYPAL	SP-tag #804	TYSLP	SP-tag #1104	EATWL
SP-tag #205	SYDYP	SP-tag #505	DWPAL	SP-tag #805	SWSLP	SP-tag #1105	YATWL
SP-tag #206	PYDYP	SP-tag #506	EWPAL	SP-tag #806	PWSLP	SP-tag #1106	SYTWL
SP-tag #207	DWDYP	SP-tag #507	YYPAL	SP-tag #807	EYSLP	SP-tag #1107	WATWL
SP-tag #208	YYDYP	SP-tag #508	WYPAL	SP-tag #808	DWSLP	SP-tag #1108	DYTWL
SP-tag #209	WWDYP	SP-tag #509	WWPAL	SP-tag #809	WYSLP	SP-tag #1109	EYTWL
SP-tag #210	ELDYS	SP-tag #510	AAPAP	SP-tag #810	WWSLP	SP-tag #1110	DATWP
SP-tag #211	DWDYS	SP-tag #511	SAPAP	SP-tag #811	AASLS	SP-tag #1111	TLTWP
SP-tag #212	SADYW	SP-tag #512	TAPAP	SP-tag #812	TASLS	SP-tag #1112	YATWP
SP-tag #213	PADYW	SP-tag #513	DAPAP	SP-tag #813	ALSLS	SP-tag #1113	TYTWP

SP-tag #214	DADYW	SP-tag #514	EAPAP	SP-tag #814	TLSLS	SP-tag #1114	TWTWP
SP-tag #215	PLDYW	SP-tag #515	PLPAP	SP-tag #815	YASLS	SP-tag #1115	EWTWP
SP-tag #216	DLDYW	SP-tag #516	LLPAP	SP-tag #816	ELSLS	SP-tag #1116	AATWT
SP-tag #217	ELDYW	SP-tag #517	YAPAP	SP-tag #817	SWSLS	SP-tag #1117	TATWT
SP-tag #218	SYDYW	SP-tag #518	ELPAP	SP-tag #818	PWSLS	SP-tag #1118	DATWT
SP-tag #219	WADYW	SP-tag #519	SYPAP	SP-tag #819	EWSLS	SP-tag #1119	LLTWT
SP-tag #220	DYDYW	SP-tag #520	WAPAP	SP-tag #820	YYSLS	SP-tag #1120	YATWT
SP-tag #221	TWDYW	SP-tag #521	TYPAP	SP-tag #821	WYSLS	SP-tag #1121	ELTWT
SP-tag #222	WLDYW	SP-tag #522	YLPAP	SP-tag #822	AASLT	SP-tag #1122	SYTWT
SP-tag #223	YYDYW	SP-tag #523	TWPAP	SP-tag #823	TASLT	SP-tag #1123	WATWT
SP-tag #224	AADYY	SP-tag #524	WLPAP	SP-tag #824	TLSLT	SP-tag #1124	EYTWT
SP-tag #225	SADYY	SP-tag #525	EWPAP	SP-tag #825	YASLT	SP-tag #1125	YYTWT
SP-tag #226	TADYY	SP-tag #526	YYPAP	SP-tag #826	WASLT	SP-tag #1126	WWTWT
SP-tag #227	DADYY	SP-tag #527	WYPAP	SP-tag #827	EYSLT	SP-tag #1127	AATWW
SP-tag #228	EADYY	SP-tag #528	WWPAP	SP-tag #828	YYSLT	SP-tag #1128	SATWW
SP-tag #229	PLDYY	SP-tag #529	PAPAS	SP-tag #829	WYSLT	SP-tag #1129	TATWW
SP-tag #230	YADYY	SP-tag #530	SYPAS	SP-tag #830	PLSLW	SP-tag #1130	DATWW
SP-tag #231	ELDYY	SP-tag #531	PWPAS	SP-tag #831	LLSLW	SP-tag #1131	EATWW
SP-tag #232	SYDYY	SP-tag #532	EAPAT	SP-tag #832	ELSLW	SP-tag #1132	TLTWW
SP-tag #233	WADYY	SP-tag #533	TLPAT	SP-tag #833	TYSLW	SP-tag #1133	DLTWW
SP-tag #234	TYDYY	SP-tag #534	ELPAW	SP-tag #834	DYSLW	SP-tag #1134	ELTWW
SP-tag #235	SWDYY	SP-tag #535	PWPAW	SP-tag #835	DWSLW	SP-tag #1135	SYTWW
SP-tag #236	PWDYY	SP-tag #536	YYPAW	SP-tag #836	DLSLY	SP-tag #1136	WATWW
SP-tag #237	EYDYY	SP-tag #537	WWPAW	SP-tag #837	SYSLY	SP-tag #1137	TYTWW
SP-tag #238	WLDYY	SP-tag #538	AAPAY	SP-tag #838	SWSLY	SP-tag #1138	SWTWW
SP-tag #239	EWDYY	SP-tag #539	SAPAY	SP-tag #839	PWSLY	SP-tag #1139	EYTWW
SP-tag #240	SAELA	SP-tag #540	TAPAY	SP-tag #840	YYSLY	SP-tag #1140	WLTWW
SP-tag #241	ELELA	SP-tag #541	DAPAY	SP-tag #841	ELSWA	SP-tag #1141	EWTWW
SP-tag #242	SYELA	SP-tag #542	EAPAY	SP-tag #842	SYSWA	SP-tag #1142	SLTWY
SP-tag #243	WAELA	SP-tag #543	TLPAY	SP-tag #843	PWSWA	SP-tag #1143	DLTWY
SP-tag #244	SWELA	SP-tag #544	LLPAY	SP-tag #844	EYSWA	SP-tag #1144	SYTWY
SP-tag #245	TWELA	SP-tag #545	YAPAY	SP-tag #845	WYSWA	SP-tag #1145	EWTWY

SP-tag #246	DWELA	SP-tag #546	ELPAY	SP-tag #846	SASWD	SP-tag #1146	WATYA
SP-tag #247	WWELA	SP-tag #547	SYPAY	SP-tag #847	SLSWD	SP-tag #1147	SWTYA
SP-tag #248	AAELE	SP-tag #548	YLPAY	SP-tag #848	TLSWD	SP-tag #1148	TWTYA
SP-tag #249	SAELE	SP-tag #549	TWPAY	SP-tag #849	DWSWD	SP-tag #1149	WLTYA
SP-tag #250	TAELE	SP-tag #550	DWPAY	SP-tag #850	EWSWD	SP-tag #1150	EWTYA
SP-tag #251	ALELE	SP-tag #551	EWPAY	SP-tag #851	WYSWD	SP-tag #1151	WWTYA
SP-tag #252	EAELE	SP-tag #552	YYPAY	SP-tag #852	AASWE	SP-tag #1152	TLTYE
SP-tag #253	TLELE	SP-tag #553	WYPAY	SP-tag #853	TLSWE	SP-tag #1153	WYTYE
SP-tag #254	YAELE	SP-tag #554	TLPWA	SP-tag #854	ELSWE	SP-tag #1154	WWTYE
SP-tag #255	ELELE	SP-tag #555	EYPWA	SP-tag #855	WASWE	SP-tag #1155	AATYL
SP-tag #256	SYELE	SP-tag #556	WYPWA	SP-tag #856	EWSWE	SP-tag #1156	SATYL
SP-tag #257	WAELE	SP-tag #557	SAPWD	SP-tag #857	WYSWE	SP-tag #1157	TATYL
SP-tag #258	TYELE	SP-tag #558	EAPWD	SP-tag #858	WWSWE	SP-tag #1158	ALTYL
SP-tag #259	YLELE	SP-tag #559	PLPWD	SP-tag #859	DASWL	SP-tag #1159	YATYL
SP-tag #260	PWELE	SP-tag #560	ELPWD	SP-tag #860	WYSWL	SP-tag #1160	SYTYL
SP-tag #261	DWELE	SP-tag #561	SYPWD	SP-tag #861	AASWW	SP-tag #1161	SWTYL
SP-tag #262	SAELL	SP-tag #562	WAPWD	SP-tag #862	SASWW	SP-tag #1162	DWTYL
SP-tag #263	PAELL	SP-tag #563	EYPWD	SP-tag #863	TASWW	SP-tag #1163	SATYP
SP-tag #264	DAELL	SP-tag #564	SAPWE	SP-tag #864	DASWW	SP-tag #1164	TLTYP
SP-tag #265	EAELL	SP-tag #565	TAPWE	SP-tag #865	EASWW	SP-tag #1165	LLTYP
SP-tag #266	PLELL	SP-tag #566	PLPWE	SP-tag #866	PLSWW	SP-tag #1166	SYTYP
SP-tag #267	LLELL	SP-tag #567	YAPWE	SP-tag #867	YASWW	SP-tag #1167	WATYP
SP-tag #268	YAELL	SP-tag #568	ELPWE	SP-tag #868	ELSWW	SP-tag #1168	TYTYP
SP-tag #269	SYELL	SP-tag #569	AAPWL	SP-tag #869	SYSWW	SP-tag #1169	SWTYP
SP-tag #270	PYELL	SP-tag #570	SAPWL	SP-tag #870	PYSWW	SP-tag #1170	TWTYP
SP-tag #271	SWELL	SP-tag #571	TAPWL	SP-tag #871	SWSWW	SP-tag #1171	DWTYP
SP-tag #272	TWELL	SP-tag #572	DAPWL	SP-tag #872	PWSWW	SP-tag #1172	SATYS
SP-tag #273	DWELL	SP-tag #573	EAPWL	SP-tag #873	EYSWW	SP-tag #1173	ALTYS
SP-tag #274	EWELL	SP-tag #574	PLPWL	SP-tag #874	DWSWW	SP-tag #1174	TLTYS
SP-tag #275	AAELP	SP-tag #575	YAPWL	SP-tag #875	EWSWW	SP-tag #1175	YATYS
SP-tag #276	SAELP	SP-tag #576	ELPWL	SP-tag #876	YYSWW	SP-tag #1176	DWTYS
SP-tag #277	DAELP	SP-tag #577	SYPWL	SP-tag #877	DASWY	SP-tag #1177	AATYT

SP-tag #278	EAELP	SP-tag #578	WAPWL	SP-tag #878	EASWY	SP-tag #1178	SATYT
SP-tag #279	TLELP	SP-tag #579	TYPWL	SP-tag #879	PLSWY	SP-tag #1179	TATYT
SP-tag #280	DLELP	SP-tag #580	SWPWL	SP-tag #880	DLSWY	SP-tag #1180	ALTYT
SP-tag #281	ELELP	SP-tag #581	TWPWL	SP-tag #881	ELSWY	SP-tag #1181	EATYT
SP-tag #282	SYELP	SP-tag #582	WLPWL	SP-tag #882	EYSWY	SP-tag #1182	TLTYT
SP-tag #283	PYELP	SP-tag #583	EWPWL	SP-tag #883	WLSWY	SP-tag #1183	YATYT
SP-tag #284	YLELP	SP-tag #584	YYPWL	SP-tag #884	EWSWY	SP-tag #1184	SYTYT
SP-tag #285	PWELP	SP-tag #585	WYPWL	SP-tag #885	PASYA	SP-tag #1185	WATYT
SP-tag #286	EYELP	SP-tag #586	WWPWL	SP-tag #886	LLSYA	SP-tag #1186	TYTYT
SP-tag #287	WLELP	SP-tag #587	AAPWP	SP-tag #887	ELSYA	SP-tag #1187	SWTYT
SP-tag #288	EWELP	SP-tag #588	SAPWP	SP-tag #888	WASYA	SP-tag #1188	YYTYT
SP-tag #289	YYELP	SP-tag #589	TAPWP	SP-tag #889	SWSYA	SP-tag #1189	WYTYT
SP-tag #290	WYELP	SP-tag #590	DAPWP	SP-tag #890	PWSYA	SP-tag #1190	AATYW
SP-tag #291	WWELP	SP-tag #591	EAPWP	SP-tag #891	WLSYA	SP-tag #1191	SATYW
SP-tag #292	SAELS	SP-tag #592	TLPWP	SP-tag #892	PASYD	SP-tag #1192	TATYW
SP-tag #293	SLELS	SP-tag #593	LLPWP	SP-tag #893	DYSYD	SP-tag #1193	DATYW
SP-tag #294	DWELS	SP-tag #594	YAPWP	SP-tag #894	EYSYD	SP-tag #1194	TLTYW
SP-tag #295	AAELW	SP-tag #595	ELPWP	SP-tag #895	EWSYD	SP-tag #1195	ELTYW
SP-tag #296	SAELW	SP-tag #596	SYPWP	SP-tag #896	WWSYD	SP-tag #1196	WATYW
SP-tag #297	ALELW	SP-tag #597	WAPWP	SP-tag #897	DASYL	SP-tag #1197	TYTYW
SP-tag #298	ELELW	SP-tag #598	SWPWP	SP-tag #898	DWSYL	SP-tag #1198	DYTYW
SP-tag #299	SWELW	SP-tag #599	PWPWP	SP-tag #899	WYSYL	SP-tag #1199	EYTYW
SP-tag #300	PWELW	SP-tag #600	EYPWP	SP-tag #900	ALSYP	SP-tag #1200	YYTYW

[0168] **5. 효과적인 표적 라이브러리 구축 방법 확인**

[0169] 1200종의 벡터로 이루어진 라이브러리를 하나씩 클로닝 할 수 없으므로 효과적으로 표적 라이브러리 구축 방법을 테스트하였다. 10종의 signal peptides를 가지고 있는 벡터에 1종류의 표적 단백질 유전자를 클로닝 하였다(표 3). 동량의 10종 벡터를 mixture상태로 만들어서 ligation-transformation-plasmid prep을 진행하였다. plasmid 내에 signal peptide의 분포를 확인하기 위해 100개의 colonies에서 각각 plasmid를 prep하여 해당 signal peptide에 대한 sequencing을 진행하였다 (표 4).

표 3

[0171] 라이브러리 제작 테스트에 사용된 10종류의 signal peptide

No	Signal peptides	Sequence
1	Nephronectin	MDFLLALVLVSSLYLQA
2	Neuropeptide B	MARSATLAAAALALCLL
3	Neurotrophin-4	MLPLPSCSLPILLLFLL
4	Neutrophil defensin 1	MRTLAILAAILLVALQA
5	Oxytocin	MAGSSLACCLLGLLALT
6	Pancreatic alpha amylase	MKFFLLLFTIGFCWAGR
7	PPY	MAAARLCLSLLLLSTCV
8	Pepsin	MKWLLLLGLVALSECGR
9	PENK-A	MARFLTLCTWLLLLGPG
10	Resistin	MKALCLLLLPVLGLLVS

표 4

[0172] 100개의 colonies에서 prep한 plasmid sequencing 결과

Signal peptide -1	Signal peptide -2	Signal peptide -3	Signal peptide -4	Signal peptide -5	Signal peptide -6	Signal peptide -7	Signal peptide -8	Signal peptide -9	Signal peptide -10	N.D.
해당되는 colony번호	해당되는 colony번호	해당되는 colony번호	해당되는 colony번호	해당되는 colony번호	해당되는 colony번호	해당되는 colony번호	해당되는 colony번호	해당되는 colony번호	해당되는 colony번호	해당되는 colony 번호
18	1	2	8	7	4	12	16	21	5	3
23	6	13	9	28	24	14	17	26	19	62
34	10	22	11	32	31	40	39	29	20	74
35	25	33	15	44	49	45	70	46	38	
50	27	42	30	64	60	53	71	56	48	
52	37	43	36	66	77	76	80	61	55	
54	51	47	41	75	83	85	87	78	57	
63	59	68	69	82	94	91		79	58	
84	65	90	72		100	95			96	
86	67	97	81			98			99	
88	73		89							
93	92									
총12개	총12 개	총10 개	총11 개	총8 개	총9 개	총10 개	총7 개	총8 개	총10 개	총3 개

[0174] 97개의 plasmid가 sequencing되었으며 10종의 SP-tag이 모두 확인되었고 그 분포가 7~12%로 골고루 이루어져 있음을 확인하였다(도 8). 효율적인 라이브러리 구축을 위해 동량의 벡터를 혼합하여 라이브러리를 제작하여도 SP-tag 종류에 상관없이 다양성을 유지하는 라이브러리가 구축된다는 것을 확인하였다.

[0176] 6. 재조합 단백질 생산량을 증가시키는 signal peptide 스크리닝 방법 검증

[0177] 라이브러리로 발현하여 LC-MS/MS를 이용하여 정량하는 방법의 효용성을 검증하기 위해 독립적으로 발현하여 western blot으로 정량하는 방법을 비교하였다 (도 9). 표적 단백질을 삽입한 9종의 Signal peptide/SP-tag 클론들을 섞어서 동물세포에 transfection한 뒤 수일 후 세포 배양액으로 분비된 SP-tagging 단백질을 LC-MS/MS를 이용해 상대 정량하여 랭킹화 하였다. 이와 동시에 9종의 SP-tag 벡터를 각각 9개의 다른 플라스크에 독립적으로 transfection 시킨 뒤 수일 후 세포 배양액으로 분비된 SP-tagging 단백질들을 western blot을 이용해 발현을 확인하여 발현량을 상대 비교하였다 (도 10).

[0178] 라이브러리 발현 방식을 이용한 LC-MS/MS 결과 peak 그래프에서 보면 8번, 1번 및 5번이 가장 높은 발현량을 보

였고, 3번 및 6번이 각각 그 뒤를 이었다 (도 10 내지 12). 2번, 4번, 7번 및 9번은 발현량이 현저히 낮아 랭킹화 할 수 없었다. 그리고 독립적으로 발현하여 western blot을 진행한 결과에서 보면 1번, 8번 및 5번이 발현량 top 3로 확인되었고, 7번, 6번, 9번, 4번, 3번 및 2번 순서대로 측정되었다 (도 10 및 11). 본 발명은 단백질 생산량을 가장 증가시키는 signal peptide를 선별하는 것이 목적이었던 바, 두 가지 실험의 top 3가 일치하는 결과로 비추어 볼 때 SP-tag 라이브러리를 이용한 signal peptide 선별 방법의 효용이 검증되었음을 확인하였다.

[0180] **7. SP-tag을 이용한 optimal signal peptide 선별 테스트**

[0181] Signal peptide/SP-tag을 포함하고 있는 라이브러리에 표적 단백질 human vascular endothelial growth factor (hVEGF)를 클로닝 하여 표적 단백질 라이브러리를 구축하였다. 라이브러리를 HEK 293 세포에서 발현시키고 3일 뒤 세포 배양액을 모아서 his tag을 이용해 발현된 단백질을 분리 정제하였다. 단백질 샘플을 trypsin을 처리한 후 LC-MS/MS를 이용해 Peak area 값을 구하여 SP-tag에 대해서 상대 정량을 실시하였다 (도 13).

[0182] LC-MS/MS 결과 peak 그래프를 보면 발현의 높낮이에 따라 peak의 높이 와 sharpness, noise 강도 등에서 확연한 차이를 보여주는 것을 확인 할 수 있었다 (도 14). 발현량이 높은 SP-tag은 single peak로 확연히 구분되는 반면 발현량이 낮은 SP-tag은 noise signal과 구분되지 않았다. 도 13에서 발현이 높게 확인된 10종의 SP-tag에 해당되는 signal peptide를 선별할 수 있었다 (도 15).

[0184] **8. SP-tag 정량을 위한 표준 펩타이드 합성**

[0185] 1,200 시그널 펩타이드 스크리닝을 위한 MRM 분석법 개발을 위해 internal standard로 1,200 바코딩 시퀀스 기반의 isotope labeled peptide (^{15}N, ^{13}C 표지된 아르기닌 잔기를 합성)를 합성 (JPT Peptide Technologies, Berlin, Germany) 하여 사용하였다. 1,200 표준용 펩타이드 (internal standard)는 MRM 분석 전에 100 fmol/㎕농도로 단백질 발현 혼합물에 추가하여 사용하였으며, MRM 분석 시 RT (retention time)을 통해 non-specific peak과 target peak을 정확히 구별해 내는 데 사용하였다. 또한 각 그룹 간의 분석 시 발생 되는 오차를 최소화하기 위한 isotope labeled peptide (^{15}N, ^{13}C 표지된 라이신 잔기를 합성) 기반의 글로벌 스탠다드 펩타이드 (EQVTNVGGAVVTGVTAVAQK)를 합성하였다. 글로벌 스탠다드 펩타이드는 시료에 존재하지 않는 펩타이드 시퀀스를 사용하였으며, MRM 분석 전에 50 fmol/㎕ 농도로 단백질 발현 혼합물에 추가하여 사용하였다.

표 5

[0187] **화학적으로 합성한 SP tag 펩타이드 리스트**

Number	서열	Number	서열	Number	서열	Number	서열
Peptide_001	GAAPAPGHHHHHHR	Peptide_301	GSYTLSGHHHHHHR	Peptide_601	GWWPAAGHHHHHHR	Peptide_901	GEYPWPGHHHHHHR
Peptide_002	GTAPAAGHHHHHHR	Peptide_302	GSLSYTGHHHHHHR	Peptide_602	GAAPWWGHHHHHHR	Peptide_902	GLLPYWGHHHHHHR
Peptide_003	GALSAAGHHHHHHR	Peptide_303	GTWPAPGHHHHHHR	Peptide_603	GSYTYPGHHHHHHR	Peptide_903	GWWDADGHHHHHHR
Peptide_004	GAASLAGHHHHHHR	Peptide_304	GTAPWPGHHHHHHR	Peptide_604	GYYTLAGHHHHHHR	Peptide_904	GEWTWAGHHHHHHR
Peptide_005	GSADAAGHHHHHHR	Peptide_305	GELTLPGHHHHHHR	Peptide_605	GYATYLGHHHHHHR	Peptide_905	GWAEWTGHHHHHHR
Peptide_006	GAATATGHHHHHHR	Peptide_306	GDLDLPGHHHHHHR	Peptide_606	GEWPAEGHHHHHHR	Peptide_906	GEATWWGHHHHHHR
Peptide_007	GTASASGHHHHHHR	Peptide_307	GTLELPGHHHHHHR	Peptide_607	GPAEWEGHHHHHHR	Peptide_907	GDADWWGHHHHHHR
Peptide_008	GSASATGHHHHHHR	Peptide_308	GEWPAAGHHHHHHR	Peptide_608	GALELWGHHHHHHR	Peptide_908	GTAEWWGHHHHHHR
Peptide_009	GPAPASGHHHHHHR	Peptide_309	GWAPAEGHHHHHHR	Peptide_609	GLLSLWGHHHHHHR	Peptide_909	GYYSYPGHHHHHHR

Peptide_010	GSAPAPGHHHHHHR	Peptide_310	GPAEWAGHHHHHHR	Peptide_610	GEYSAYGHHHHHHR	Peptide_910	GPWDLYGHHHHHHR
Peptide_011	GALPAAGHHHHHHR	Peptide_311	GAAEWPGHHHHHHR	Peptide_611	GSAEYYGHHHHHHR	Peptide_911	GPYDWLGHHHHHHR
Peptide_012	GAAPALGHHHHHHR	Peptide_312	GWLSAPGHHHHHHR	Peptide_612	GTADYYGHHHHHHR	Peptide_912	GPLDYWGHHHHHHR
Peptide_013	GSATAPGHHHHHHR	Peptide_313	GSWPALGHHHHHHR	Peptide_613	GELELEGHHHHHHR	Peptide_913	GYYDAYGHHHHHHR
Peptide_014	GALTAAGHHHHHHR	Peptide_314	GSAPWLGHHHHHHR	Peptide_614	GYYSLSGHHHHHHR	Peptide_914	GYADYYGHHHHHHR
Peptide_015	GAATLAGHHHHHHR	Peptide_315	GYYSAAGHHHHHHR	Peptide_615	GSYSLYGHHHHHHR	Peptide_915	GDWDYPGHHHHHHR
Peptide_016	GEASAAGHHHHHHR	Peptide_316	GYASAYGHHHHHHR	Peptide_616	GEWDLAGHHHHHHR	Peptide_916	GPWDYDGHHHHHHR
Peptide_017	GTADAAGHHHHHHR	Peptide_317	GELELAGHHHHHHR	Peptide_617	GDWELAGHHHHHHR	Peptide_917	GWYTLLGHHHHHHR
Peptide_018	GSASLAGHHHHHHR	Peptide_318	GEAELLGHHHHHHR	Peptide_618	GEADWLGHHHHHHR	Peptide_918	GYYSYTGHHHHHHR
Peptide_019	GAASLSGHHHHHHR	Peptide_319	GALELEGHHHHHHR	Peptide_619	GWYPAPGHHHHHHR	Peptide_919	GEWEYAGHHHHHHR
Peptide_020	GDASASGHHHHHHR	Peptide_320	GDLTLLGHHHHHHR	Peptide_620	GYAPWPGHHHHHHR	Peptide_920	GEYEWAGHHHHHHR
Peptide_021	GSATATGHHHHHHR	Peptide_321	GTLDLLGHHHHHHR	Peptide_621	GSWDLLGHHHHHHR	Peptide_921	GWAEYEGHHHHHHR
Peptide_022	GTAPAPGHHHHHHR	Peptide_322	GSWPADGHHHHHHR	Peptide_622	GLLTWTGHHHHHHR	Peptide_922	GYAEWEGHHHHHHR
Peptide_023	GAAPAEGHHHHHHR	Peptide_323	GSAPWDGHHHHHHR	Peptide_623	GTLTLWGHHHHHHR	Peptide_923	GEAEYWGHHHHHHR
Peptide_024	GPLSAAGHHHHHHR	Peptide_324	GTAPWTGHHHHHHR	Peptide_624	GWATAWGHHHHHHR	Peptide_924	GWYSLEGHHHHHHR
Peptide_025	GSLPAAGHHHHHHR	Peptide_325	GWLDAAGHHHHHHR	Peptide_625	GAATWWGHHHHHHR	Peptide_925	GSWEYLGHHHHHHR
Peptide_026	GPASLAGHHHHHHR	Peptide_326	GWADALGHHHHHHR	Peptide_626	GTYSYTGHHHHHHR	Peptide_926	GSYEWLGHHHHHHR
Peptide_027	GSADAPGHHHHHHR	Peptide_327	GAADWLGHHHHHHR	Peptide_627	GSYTYTGHHHHHHR	Peptide_927	GELSWYGHHHHHHR
Peptide_028	GTATAPGHHHHHHR	Peptide_328	GDLSLEGHHHHHHR	Peptide_628	GYLELPGHHHHHHR	Peptide_928	GDWTYLGHHHHHHR
Peptide_029	GALDAAGHHHHHHR	Peptide_329	GELTLTGHHHHHHR	Peptide_629	GPYELLGHHHHHHR	Peptide_929	GDYTWLGHHHHHHR
Peptide_030	GSATLAGHHHHHHR	Peptide_330	GPLSYPGHHHHHHR	Peptide_630	GEWTAEGHHHHHHR	Peptide_930	GDLTWYGHHHHHHR
Peptide_031	GAASLTGHHHHHHR	Peptide_331	GLLPAYGHHHHHHR	Peptide_631	GEADWDGHHHHHHR	Peptide_931	GEWSYDGHHHHHHR
Peptide_032	GDATASGHHHHHHR	Peptide_332	GEATWAGHHHHHHR	Peptide_632	GDAEWDGHHHHHHR	Peptide_932	GSYEWDGHHHHHHR
Peptide_033	GTASADGHHHHHHR	Peptide_333	GAADWDGHHHHHHR	Peptide_633	GDWDLSGHHHHHHR	Peptide_933	GEYTWTGHHHHHHR
Peptide_034	GSLSASGHHHHHHR	Peptide_334	GWLSATGHHHHHHR	Peptide_634	GTLSWEGHHHHHHR	Peptide_934	GTYTWEGHHHHHHR
Peptide_035	GDAPAPGHHHHHHR	Peptide_335	GTWSLAGHHHHHHR	Peptide_635	GWWSASGHHHHHHR	Peptide_935	GWYPAYGHHHHHHR
Peptide_036	GTLPAAGHHHHHHR	Peptide_336	GWASLTGHHHHHHR	Peptide_636	GSASWWGHHHHHHR	Peptide_936	GYYPAWGHHHHHHR
Peptide_037	GTAPALGHHHHHHR	Peptide_337	GTLSAWGHHHHHHR	Peptide_637	GEYDLPGHHHHHHR	Peptide_937	GWAPYYGHHHHHHR
Peptide_038	GAATLPGHHHHHHR	Peptide_338	GSATWLGHHHHHHR	Peptide_638	GELDYPGHHHHHHR	Peptide_938	GYAPYWGHHHHHHR
Peptide_039	GEASAPGHHHHHHR	Peptide_339	GPLDAYGHHHHHHR	Peptide_639	GWYTAPGHHHHHHR	Peptide_939	GPWDWPGHHHHHHR
Peptide_040	GTAPADGHHHHHHR	Peptide_340	GEWSASGHHHHHHR	Peptide_640	GTWPAYGHHHHHHR	Peptide_940	GELDYYGHHHHHHR
Peptide_041	GSASLPGHHHHHHR	Peptide_341	GSAEWSGHHHHHHR	Peptide_641	GWATYPGHHHHHHR	Peptide_941	GDLEYYGHHHHHHR

Peptide_042	GALSLAGHHHHHHR	Peptide_342	GTWSADGHHHHHHR	Peptide_642	GYATWPGHHHHHHR	Peptide_942	GWWTLPGHHHHHHR
Peptide_043	GEADAAGHHHHHHR	Peptide_343	GTATWTGHHHHHHR	Peptide_643	GTAPYWGHHHHHHR	Peptide_943	GWLPWTGHHHHHHR
Peptide_044	GDLSAAGHHHHHHR	Peptide_344	GSWSLSGHHHHHHR	Peptide_644	GEYTLLGHHHHHHR	Peptide_944	GTWPWLGHHHHHHR
Peptide_045	GSADALGHHHHHHR	Peptide_345	GPADYDGHHHHHHR	Peptide_645	GELTLYGHHHHHHR	Peptide_945	GTLPWWGHHHHHHR
Peptide_046	GTATLAGHHHHHHR	Peptide_346	GEYTAPGHHHHHHR	Peptide_646	GTLEYLGHHHHHHR	Peptide_946	GWYTAYGHHHHHHR
Peptide_047	GAATLTGHHHHHHR	Peptide_347	GEAPYTGHHHHHHR	Peptide_647	GYAEWAGHHHHHHR	Peptide_947	GYYTAWGHHHHHHR
Peptide_048	GEASATGHHHHHHR	Peptide_348	GTYSLPGHHHHHHR	Peptide_648	GAAEYWGHHHHHHR	Peptide_948	GEYDYDGHHHHHHR
Peptide_049	GSADADGHHHHHHR	Peptide_349	GSYTLPGHHHHHHR	Peptide_649	GWYSALGHHHHHHR	Peptide_949	GDYEYDGHHHHHHR
Peptide_050	GDATATGHHHHHHR	Peptide_350	GALTYLGHHHHHHR	Peptide_650	GWLSYAGHHHHHHR	Peptide_950	GTYEYEGHHHHHHR
Peptide_051	GTLSASGHHHHHHR	Peptide_351	GEAEYAGHHHHHHR	Peptide_651	GYLSAWGHHHHHHR	Peptide_951	GWWELAGHHHHHHR
Peptide_052	GTASLSGHHHHHHR	Peptide_352	GAAEYEGHHHHHHR	Peptide_652	GEAEYEGHHHHHHR	Peptide_952	GWLEWAGHHHHHHR
Peptide_053	GAASAYGHHHHHHR	Peptide_353	GSYELAGHHHHHHR	Peptide_653	GEYSLEGHHHHHHR	Peptide_953	GWAEWLGHHHHHHR
Peptide_054	GEAPAPGHHHHHHR	Peptide_354	GELSYAGHHHHHHR	Peptide_654	GSYELEGHHHHHHR	Peptide_954	GALEWWGHHHHHHR
Peptide_055	GPAPAEGHHHHHHR	Peptide_355	GSAELYGHHHHHHR	Peptide_655	GTLDYEGHHHHHHR	Peptide_955	GELEWEGHHHHHHR
Peptide_056	GALPALGHHHHHHR	Peptide_356	GDYTLAGHHHHHHR	Peptide_656	GSWDYAGHHHHHHR	Peptide_956	GWYSYSGHHHHHHR
Peptide_057	GDLPAAGHHHHHHR	Peptide_357	GTYDALGHHHHHHR	Peptide_657	GDASWYGHHHHHHR	Peptide_957	GSYSYWGHHHHHHR
Peptide_058	GEAPATGHHHHHHR	Peptide_358	GTADLYGHHHHHHR	Peptide_658	GSADYWGHHHHHHR	Peptide_958	GWADWEGHHHHHHR
Peptide_059	GDADAPGHHHHHHR	Peptide_359	GLLSYSGHHHHHHR	Peptide_659	GWYTATGHHHHHHR	Peptide_959	GEADWWGHHHHHHR
Peptide_060	GAATLLGHHHHHHR	Peptide_360	GWLPAPGHHHHHHR	Peptide_660	GTWTYAGHHHHHHR	Peptide_960	GDWSLWGHHHHHHR
Peptide_061	GELSAAGHHHHHHR	Peptide_361	GPWPALGHHHHHHR	Peptide_661	GWATYTGHHHHHHR	Peptide_961	GSWDWLGHHHHHHR
Peptide_062	GSAELAGHHHHHHR	Peptide_362	GDYSAEGHHHHHHR	Peptide_662	GYATWTGHHHHHHR	Peptide_962	GWWTLTGHHHHHHR
Peptide_063	GDLTAAGHHHHHHR	Peptide_363	GSADYEGHHHHHHR	Peptide_663	GTATYWGHHHHHHR	Peptide_963	GTLTWWGHHHHHHR
Peptide_064	GTLDAAGHHHHHHR	Peptide_364	GEYTATGHHHHHHR	Peptide_664	GPWELPGHHHHHHR	Peptide_964	GTYPYYGHHHHHHR
Peptide_065	GTADALGHHHHHHR	Peptide_365	GTYDADGHHHHHHR	Peptide_665	GELPWPGHHHHHHR	Peptide_965	GWYELPGHHHHHHR
Peptide_066	GALSLSGHHHHHHR	Peptide_366	GEATYTGHHHHHHR	Peptide_666	GPLPWEGHHHHHHR	Peptide_966	GELPWYGHHHHHHR
Peptide_067	GTLSATGHHHHHHR	Peptide_367	GYYPAAGHHHHHHR	Peptide_667	GYYPAEGHHHHHHR	Peptide_967	GPLEYWGHHHHHHR
Peptide_068	GSLTATGHHHHHHR	Peptide_368	GSYTLTGHHHHHHR	Peptide_668	GPYEYAGHHHHHHR	Peptide_968	GDWSWDGHHHHHHR
Peptide_069	GTASLTGHHHHHHR	Peptide_369	GYAPAYGHHHHHHR	Peptide_669	GEAPYYGHHHHHHR	Peptide_969	GYYSLYGHHHHHHR
Peptide_070	GSATLTGHHHHHHR	Peptide_370	GTLTYSGHHHHHHR	Peptide_670	GPAEYYGHHHHHHR	Peptide_970	GEWPYDGHHHHHHR
Peptide_071	GAAPAYGHHHHHHR	Peptide_371	GAAPYYGHHHHHHR	Peptide_671	GSWSYTGHHHHHHR	Peptide_971	GEYPWDGHHHHHHR
Peptide_072	GPLPAPGHHHHHHR	Peptide_372	GPLELLGHHHHHHR	Peptide_672	GWLDLPGHHHHHHR	Peptide_972	GDYEWPGHHHHHHR
Peptide_073	GYASASGHHHHHHR	Peptide_373	GPWDAPGHHHHHHR	Peptide_673	GPWDLLGHHHHHHR	Peptide_973	GSYDYYGHHHHHHR

Peptide_074	GSASAYGHHHHHHR	Peptide_374	GDAPWPGHHHHHHR	Peptide_674	GPLDWLGHHHHHHR	Peptide_974	GYYTYTGHHHHHHR
Peptide_075	GAASYSGHHHHHHR	Peptide_375	GELDLPGHHHHHHR	Peptide_675	GDYPYSGHHHHHHR	Peptide_975	GEWTLYGHHHHHHR
Peptide_076	GPATLPGHHHHHHR	Peptide_376	GDLELPGHHHHHHR	Peptide_676	GSYDYPGHHHHHHR	Peptide_976	GDWDLYGHHHHHHR
Peptide_077	GELPAAGHHHHHHR	Peptide_377	GLLDLLGHHHHHHR	Peptide_677	GTYTYPGHHHHHHR	Peptide_977	GEYTWLGHHHHHHR
Peptide_078	GEAPALGHHHHHHR	Peptide_378	GWLTAPGHHHHHHR	Peptide_678	GYYDLAGHHHHHHR	Peptide_978	GELTYWGHHHHHHR
Peptide_079	GALPAEGHHHHHHR	Peptide_379	GTLPWAGHHHHHHR	Peptide_679	GYADYLGHHHHHHR	Peptide_979	GDLDYWGHHHHHHR
Peptide_080	GAAELPGHHHHHHR	Peptide_380	GTAPWLGHHHHHHR	Peptide_680	GELPWTGHHHHHHR	Peptide_980	GWWSAYGHHHHHHR
Peptide_081	GPLSLAGHHHHHHR	Peptide_381	GYATAYGHHHHHHR	Peptide_681	GWLTLLGHHHHHHR	Peptide_981	GWYSWAGHHHHHHR
Peptide_082	GEADAPGHHHHHHR	Peptide_382	GELTLLGHHHHHHR	Peptide_682	GPWSWAGHHHHHHR	Peptide_982	GWASYWGHHHHHHR
Peptide_083	GSADLPGHHHHHHR	Peptide_383	GEWSAPGHHHHHHR	Peptide_683	GYAEYTGHHHHHHR	Peptide_983	GYASWWGHHHHHHR
Peptide_084	GTLPATGHHHHHHR	Peptide_384	GSAPWEGHHHHHHR	Peptide_684	GDADYYGHHHHHHR	Peptide_984	GSWEYEGHHHHHHR
Peptide_085	GLLDAAGHHHHHHR	Peptide_385	GDATWPGHHHHHHR	Peptide_685	GSAPWWGHHHHHHR	Peptide_985	GSYEWEGHHHHHHR
Peptide_086	GALDLAGHHHHHHR	Peptide_386	GTADWPGHHHHHHR	Peptide_686	GYYSLTGHHHHHHR	Peptide_986	GEYTWDGHHHHHHR
Peptide_087	GEATLAGHHHHHHR	Peptide_387	GWAELAGHHHHHHR	Peptide_687	GSYTYLGHHHHHHR	Peptide_987	GDYEWTGHHHHHHR
Peptide_088	GLLTASGHHHHHHR	Peptide_388	GAAELWGHHHHHHR	Peptide_688	GWAELEGHHHHHHR	Peptide_988	GTYEWDGHHHHHHR
Peptide_089	GTASLLGHHHHHHR	Peptide_389	GPWSLSGHHHHHHR	Peptide_689	GEAEWLGHHHHHHR	Peptide_989	GEWPWPGHHHHHHR
Peptide_090	GSATLLGHHHHHHR	Peptide_390	GSWSLPGHHHHHHR	Peptide_690	GALEWEGHHHHHHR	Peptide_990	GWLPWLGHHHHHHR
Peptide_091	GAASAWGHHHHHHR	Peptide_391	GWLSLAGHHHHHHR	Peptide_691	GEWSLLGHHHHHHR	Peptide_991	GLLPWWGHHHHHHR
Peptide_092	GDADADGHHHHHHR	Peptide_392	GEAELEGHHHHHHR	Peptide_692	GSWELLGHHHHHHR	Peptide_992	GWYSYPGHHHHHHR
Peptide_093	GTADAEGHHHHHHR	Peptide_393	GYYSASGHHHHHHR	Peptide_693	GELSLWGHHHHHHR	Peptide_993	GSYPYWGHHHHHHR
Peptide_094	GELSASGHHHHHHR	Peptide_394	GSYSAYGHHHHHHR	Peptide_694	GWWDAAGHHHHHHR	Peptide_994	GEYELYGHHHHHHR
Peptide_095	GSAELSGHHHHHHR	Peptide_395	GYASYSGHHHHHHR	Peptide_695	GEYSYSGHHHHHHR	Peptide_995	GELEYYGHHHHHHR
Peptide_096	GTLTATGHHHHHHR	Peptide_396	GELSLEGHHHHHHR	Peptide_696	GAADWWGHHHHHHR	Peptide_996	GWWDLPGHHHHHHR
Peptide_097	GPYSAAGHHHHHHR	Peptide_397	GPYTLPGHHHHHHR	Peptide_697	GTYTYTGHHHHHHR	Peptide_997	GPLDWWGHHHHHHR
Peptide_098	GSYPAAGHHHHHHR	Peptide_398	GEWDAAGHHHHHHR	Peptide_698	GEAEWDGHHHHHHR	Peptide_998	GWYDAYGHHHHHHR
Peptide_099	GYASAPGHHHHHHR	Peptide_399	GAADWEGHHHHHHR	Peptide_699	GEWSLDGHHHHHHR	Peptide_999	GWADYYGHHHHHHR
Peptide_100	GPASYAGHHHHHHR	Peptide_400	GWLSADGHHHHHHR	Peptide_700	GDWELSGHHHHHHR	Peptide_1000	GEYDYEGHHHHHHR
Peptide_101	GSAPAYGHHHHHHR	Peptide_401	GSWDLAGHHHHHHR	Peptide_701	GELTWTGHHHHHHR	Peptide_1001	GEWTWPGHHHHHHR
Peptide_102	GAADAYGHHHHHHR	Peptide_402	GWASLDGHHHHHHR	Peptide_702	GDLDWTGHHHHHHR	Peptide_1002	GDWDWPGHHHHHHR
Peptide_103	GLLPAPGHHHHHHR	Peptide_403	GDASWLGHHHHHHR	Peptide_703	GTLDWDGHHHHHHR	Peptide_1003	GWWTLLGHHHHHHR
Peptide_104	GPLPALGHHHHHHR	Peptide_404	GSADLWGHHHHHHR	Peptide_704	GSYPWPGHHHHHHR	Peptide_1004	GYLPYYGHHHHHHR
Peptide_105	GSYTAAGHHHHHHR	Peptide_405	GTLTWAGHHHHHHR	Peptide_705	GWYPALGHHHHHHR	Peptide_1005	GWYSYTGHHHHHHR

Peptide_106	GYASATGHHHHHHR	Peptide_406	GTATWLGHHHHHHR	Peptide_706	GYAPWLGHHHHHHR	Peptide_1006	GTYSYWGHHHHHHR
Peptide_107	GSASYSGHHHHHHR	Peptide_407	GEYPALGHHHHHHR	Peptide_707	GWWSATGHHHHHHR	Peptide_1007	GSYTWYGHHHHHHR
Peptide_108	GALTLPGHHHHHHR	Peptide_408	GELPAYGHHHHHHR	Peptide_708	GSWTAWGHHHHHHR	Peptide_1008	GEWEWAGHHHHHHR
Peptide_109	GWAPAAGHHHHHHR	Peptide_409	GPLEYAGHHHHHHR	Peptide_709	GTASWWGHHHHHHR	Peptide_1009	GWAEWEGHHHHHHR
Peptide_110	GELSAPGHHHHHHR	Peptide_410	GLLPYSGHHHHHHR	Peptide_710	GSATWWGHHHHHHR	Peptide_1010	GEAEWWGHHHHHHR
Peptide_111	GSAELPGHHHHHHR	Peptide_411	GEWTASGHHHHHHR	Peptide_711	GEYELPGHHHHHHR	Peptide_1011	GWWSLEGHHHHHHR
Peptide_112	GDLTAPGHHHHHHR	Peptide_412	GTWSAEGHHHHHHR	Peptide_712	GPLEYEGHHHHHHR	Peptide_1012	GSWELWGHHHHHHR
Peptide_113	GTLPADGHHHHHHR	Peptide_413	GTAEWSGHHHHHHR	Peptide_713	GWYDAPGHHHHHHR	Peptide_1013	GELSWWGHHHHHHR
Peptide_114	GTADLPGHHHHHHR	Peptide_414	GSATWEGHHHHHHR	Peptide_714	GDWPAYGHHHHHHR	Peptide_1014	GDWTLWGHHHHHHR
Peptide_115	GEADLAGHHHHHHR	Peptide_415	GDATWTGHHHHHHR	Peptide_715	GYADWPGHHHHHHR	Peptide_1015	GTWDLWGHHHHHHR
Peptide_116	GYAPAPGHHHHHHR	Peptide_416	GSWTLSGHHHHHHR	Peptide_716	GPADYWGHHHHHHR	Peptide_1016	GDLTWWGHHHHHHR
Peptide_117	GDLSLAGHHHHHHR	Peptide_417	GEYDAPGHHHHHHR	Peptide_717	GEYDLLGHHHHHHR	Peptide_1017	GYYDYPGHHHHHHR
Peptide_118	GSADLLGHHHHHHR	Peptide_418	GEAPYDGHHHHHHR	Peptide_718	GELDLYGHHHHHHR	Peptide_1018	GEWSWDGHHHHHHR
Peptide_119	GTLTLAGHHHHHHR	Peptide_419	GSYDLPGHHHHHHR	Peptide_719	GDLELYGHHHHHHR	Peptide_1019	GDWEWSGHHHHHHR
Peptide_120	GTATLLGHHHHHHR	Peptide_420	GTLTYPGHHHHHHR	Peptide_720	GPLPYYGHHHHHHR	Peptide_1020	GWWPYAGHHHHHHR
Peptide_121	GWATAAGHHHHHHR	Peptide_421	GEYTLAGHHHHHHR	Peptide_721	GSWTYPGHHHHHHR	Peptide_1021	GWYPWAGHHHHHHR
Peptide_122	GELSATGHHHHHHR	Peptide_422	GYLTAEGHHHHHHR	Peptide_722	GSYPWTGHHHHHHR	Peptide_1022	GWAPWYGHHHHHHR
Peptide_123	GEATLSGHHHHHHR	Peptide_423	GELTAYGHHHHHHR	Peptide_723	GWYTLAGHHHHHHR	Peptide_1023	GYAPWWGHHHHHHR
Peptide_124	GTASLEGHHHHHHR	Peptide_424	GDLDAYGHHHHHHR	Peptide_724	GWLTYAGHHHHHHR	Peptide_1024	GYYTLYGHHHHHHR
Peptide_125	GDLSADGHHHHHHR	Peptide_425	GEATLYGHHHHHHR	Peptide_725	GWATLYGHHHHHHR	Peptide_1025	GSYEYYGHHHHHHR
Peptide_126	GDASLDGHHHHHHR	Peptide_426	GDADYLGHHHHHHR	Peptide_726	GYATWLGHHHHHHR	Peptide_1026	GTYDYYGHHHHHHR
Peptide_127	GTLSLSGHHHHHHR	Peptide_427	GTAEYLGHHHHHHR	Peptide_727	GTYELEGHHHHHHR	Peptide_1027	GDWELYGHHHHHHR
Peptide_128	GSWSAAGHHHHHHR	Peptide_428	GTYSLLGHHHHHHR	Peptide_728	GELDYDGHHHHHHR	Peptide_1028	GELDYWGHHHHHHR
Peptide_129	GSASAWGHHHHHHR	Peptide_429	GSYTLLGHHHHHHR	Peptide_729	GDLDYEGHHHHHHR	Peptide_1029	GYYPWPGHHHHHHR
Peptide_130	GTAPAYGHHHHHHR	Peptide_430	GLLSYTGHHHHHHR	Peptide_730	GPYDYPGHHHHHHR	Peptide_1030	GWWTYAGHHHHHHR
Peptide_131	GPYSASGHHHHHHR	Peptide_431	GWYSAAGHHHHHHR	Peptide_731	GEWSAYGHHHHHHR	Peptide_1031	GWYTWAGHHHHHHR
Peptide_132	GSYPASGHHHHHHR	Peptide_432	GWASYAGHHHHHHR	Peptide_732	GEYSWAGHHHHHHR	Peptide_1032	GWATYWGHHHHHHR
Peptide_133	GPASYSGHHHHHHR	Peptide_433	GYASAWGHHHHHHR	Peptide_733	GSYEWAGHHHHHHR	Peptide_1033	GEWDYDGHHHHHHR
Peptide_134	GSAPYSGHHHHHHR	Peptide_434	GAASYWGHHHHHHR	Peptide_734	GEASWYGHHHHHHR	Peptide_1034	GDWEYDGHHHHHHR
Peptide_135	GALSAYGHHHHHHR	Peptide_435	GSAEYEGHHHHHHR	Peptide_735	GSAEWYGHHHHHHR	Peptide_1035	GEYEWTGHHHHHHR
Peptide_136	GSYDAAGHHHHHHR	Peptide_436	GDADYDGHHHHHHR	Peptide_736	GDATYWGHHHHHHR	Peptide_1036	GDYDWEGHHHHHHR
Peptide_137	GSADAYGHHHHHHR	Peptide_437	GTADYEGHHHHHHR	Peptide_737	GWYSLSGHHHHHHR	Peptide_1037	GTYEWEGHHHHHHR

Peptide_138	GTYTAAGHHHHHHR	Peptide_438	GELSYSGHHHHHHR	Peptide_738	GWLSYSGHHHHHHR	Peptide_1038	GWWSYSGHHHHHHR
Peptide_139	GYATATGHHHHHHR	Peptide_439	GSYDLTGHHHHHHR	Peptide_739	GSWSLYGHHHHHHR	Peptide_1039	GSYSWWGHHHHHHR
Peptide_140	GTATAYGHHHHHHR	Peptide_440	GTYTLTGHHHHHHR	Peptide_740	GWWPAPGHHHHHHR	Peptide_1040	GWWELPGHHHHHHR
Peptide_141	GAATYTGHHHHHHR	Peptide_441	GTLTYTGHHHHHHR	Peptide_741	GPWPAWGHHHHHHR	Peptide_1041	GEWPWLGHHHHHHR
Peptide_142	GELPAPGHHHHHHR	Peptide_442	GEWPAPGHHHHHHR	Peptide_742	GWAPWPGHHHHHHR	Peptide_1042	GWLEWPGHHHHHHR
Peptide_143	GLLPALGHHHHHHR	Peptide_443	GEAPWPGHHHHHHR	Peptide_743	GYYTLPGHHHHHHR	Peptide_1043	GPWELWGHHHHHHR
Peptide_144	GSYTASGHHHHHHR	Peptide_444	GPWSLPGHHHHHHR	Peptide_744	GSWTYTGHHHHHHR	Peptide_1044	GELPWWGHHHHHHR
Peptide_145	GSATYSGHHHHHHR	Peptide_445	GYYSAPGHHHHHHR	Peptide_745	GSYTWTGHHHHHHR	Peptide_1045	GYYEWAGHHHHHHR
Peptide_146	GPADLLGHHHHHHR	Peptide_446	GSYPAYGHHHHHHR	Peptide_746	GWLELPGHHHHHHR	Peptide_1046	GWAEYYGHHHHHHR
Peptide_147	GDADLPGHHHHHHR	Peptide_447	GYAPYSGHHHHHHR	Peptide_747	GELPWLGHHHHHHR	Peptide_1047	GYAEYWGHHHHHHR
Peptide_148	GELTAPGHHHHHHR	Peptide_448	GSAPYYGHHHHHHR	Peptide_748	GEYSYPGHHHHHHR	Peptide_1048	GWYSYLGHHHHHHR
Peptide_149	GEATLPGHHHHHHR	Peptide_449	GELELPGHHHHHHR	Peptide_749	GEWDLPGHHHHHHR	Peptide_1049	GEYEYEGHHHHHHR
Peptide_150	GTLSLPGHHHHHHR	Peptide_450	GLLELLGHHHHHHR	Peptide_750	GELPWDGHHHHHHR	Peptide_1050	GEWDWPGHHHHHHR
Peptide_151	GPWSAAGHHHHHHR	Peptide_451	GDWPALGHHHHHHR	Peptide_751	GLLDLWGHHHHHHR	Peptide_1051	GWWDLLGHHHHHHR
Peptide_152	GSWPAAGHHHHHHR	Peptide_452	GDAPWLGHHHHHHR	Peptide_752	GEYDAYGHHHHHHR	Peptide_1052	GSWDYYGHHHHHHR
Peptide_153	GWASAPGHHHHHHR	Peptide_453	GYYDAAGHHHHHHR	Peptide_753	GEADYYGHHHHHHR	Peptide_1053	GSYDYWGHHHHHHR
Peptide_154	GPASAWGHHHHHHR	Peptide_454	GAADYYGHHHHHHR	Peptide_754	GDAEYYGHHHHHHR	Peptide_1054	GWYTYTGHHHHHHR
Peptide_155	GAAELEGHHHHHHR	Peptide_455	GELDLLGHHHHHHR	Peptide_755	GWWTAPGHHHHHHR	Peptide_1055	GYYTWTGHHHHHHR
Peptide_156	GELSLAGHHHHHHR	Peptide_456	GEWTAPGHHHHHHR	Peptide_756	GTAPWWGHHHHHHR	Peptide_1056	GTYTYWGHHHHHHR
Peptide_157	GSAELLGHHHHHHR	Peptide_457	GDWPADGHHHHHHR	Peptide_757	GYYTLTGHHHHHHR	Peptide_1057	GEWTLWGHHHHHHR
Peptide_158	GTLDLAGHHHHHHR	Peptide_458	GEAPWTGHHHHHHR	Peptide_758	GTYTLYGHHHHHHR	Peptide_1058	GWLEWTGHHHHHHR
Peptide_159	GDATLLGHHHHHHR	Peptide_459	GTAPWEGHHHHHHR	Peptide_759	GEWTLLGHHHHHHR	Peptide_1059	GELTWWGHHHHHHR
Peptide_160	GSLSLLGHHHHHHR	Peptide_460	GALTWLGHHHHHHR	Peptide_760	GDWDLLGHHHHHHR	Peptide_1060	GTLEWWGHHHHHHR
Peptide_161	GWADAAGHHHHHHR	Peptide_461	GYYSATGHHHHHHR	Peptide_761	GTWELLGHHHHHHR	Peptide_1061	GEYPYYGHHHHHHR
Peptide_162	GELDASGHHHHHHR	Peptide_462	GTYSAYGHHHHHHR	Peptide_762	GELTLWGHHHHHHR	Peptide_1062	GWWSAWGHHHHHHR
Peptide_163	GDLTADGHHHHHHR	Peptide_463	GSYTAYGHHHHHHR	Peptide_763	GLLEWTGHHHHHHR	Peptide_1063	GEWSWEGHHHHHHR
Peptide_164	GDADLTGHHHHHHR	Peptide_464	GYATYSGHHHHHHR	Peptide_764	GTLEWLGHHHHHHR	Peptide_1064	GSWEWEGHHHHHHR
Peptide_165	GEATLTGHHHHHHR	Peptide_465	GTLELEGHHHHHHR	Peptide_765	GWAEWAGHHHHHHR	Peptide_1065	GWWSYPGHHHHHHR
Peptide_166	GSYPAPGHHHHHHR	Peptide_466	GPYDLPGHHHHHHR	Peptide_766	GAAEWWGHHHHHHR	Peptide_1066	GYYDYDGHHHHHHR
Peptide_167	GYAPALGHHHHHHR	Peptide_467	GEAEWAGHHHHHHR	Peptide_767	GDYSYDGHHHHHHR	Peptide_1067	GPWSYWGHHHHHHR
Peptide_168	GTLSLTGHHHHHHR	Peptide_468	GAAEWEGHHHHHHR	Peptide_768	GSYDYDGHHHHHHR	Peptide_1068	GSWPYWGHHHHHHR
Peptide_169	GWASATGHHHHHHR	Peptide_469	GEWSLAGHHHHHHR	Peptide_769	GEYSYTGHHHHHHR	Peptide_1069	GPYSWWGHHHHHHR

Peptide_170	GSATAWGHHHHHHR	Peptide_470	GSWELAGHHHHHHR	Peptide_770	GWWSLAGHHHHHHR	Peptide_1070	GSYPWWGHHHHHHR
Peptide_171	GDAPAYGHHHHHHR	Peptide_471	GWASLEGHHHHHHR	Peptide_771	GEAEWEGHHHHHHR	Peptide_1071	GEWEYLGHHHHHHR
Peptide_172	GPADAYGHHHHHHR	Peptide_472	GELSWAGHHHHHHR	Peptide_772	GELSWEGHHHHHHR	Peptide_1072	GEYEWLGHHHHHHR
Peptide_173	GSWSASGHHHHHHR	Peptide_473	GSAELWGHHHHHHR	Peptide_773	GEWTLDGHHHHHHR	Peptide_1073	GELEYWGHHHHHHR
Peptide_174	GSYTAPGHHHHHHR	Peptide_474	GDWTLAGHHHHHHR	Peptide_774	GDASWWGHHHHHHR	Peptide_1074	GWWDAYGHHHHHHR
Peptide_175	GTAPYSGHHHHHHR	Peptide_475	GTADWLGHHHHHHR	Peptide_775	GSADWWGHHHHHHR	Peptide_1075	GWADYWGHHHHHHR
Peptide_176	GSATYPGHHHHHHR	Peptide_476	GSYSYSGHHHHHHR	Peptide_776	GWWTATGHHHHHHR	Peptide_1076	GYADWWGHHHHHHR
Peptide_177	GYATLAGHHHHHHR	Peptide_477	GPYTLLGHHHHHHR	Peptide_777	GWATWTGHHHHHHR	Peptide_1077	GEWDYEGHHHHHHR
Peptide_178	GAATYLGHHHHHHR	Peptide_478	GLLTYPGHHHHHHR	Peptide_778	GTATWWGHHHHHHR	Peptide_1078	GDWEYEGHHHHHHR
Peptide_179	GEYSAAGHHHHHHR	Peptide_479	GDWSAEGHHHHHHR	Peptide_779	GEWPAYGHHHHHHR	Peptide_1079	GEYEWDGHHHHHHR
Peptide_180	GSAEYAGHHHHHHR	Peptide_480	GSADWEGHHHHHHR	Peptide_780	GEYPWAGHHHHHHR	Peptide_1080	GYYPWLGHHHHHHR
Peptide_181	GDATAYGHHHHHHR	Peptide_481	GEWTATGHHHHHHR	Peptide_781	GYAPWEGHHHHHHR	Peptide_1081	GWWSYTGHHHHHHR
Peptide_182	GSYSLAGHHHHHHR	Peptide_482	GTWDADGHHHHHHR	Peptide_782	GEAPYWGHHHHHHR	Peptide_1082	GSYTWWGHHHHHHR
Peptide_183	GYASLSGHHHHHHR	Peptide_483	GDADWTGHHHHHHR	Peptide_783	GWYSLPGHHHHHHR	Peptide_1083	GDWPYYGHHHHHHR
Peptide_184	GSLSAYGHHHHHHR	Peptide_484	GTADWDGHHHHHHR	Peptide_784	GWLSYPGHHHHHHR	Peptide_1084	GPWDYYGHHHHHHR
Peptide_185	GPWPAAGHHHHHHR	Peptide_485	GSLSWDGHHHHHHR	Peptide_785	GPWSLYGHHHHHHR	Peptide_1085	GWWPAWGHHHHHHR
Peptide_186	GWAPAPGHHHHHHR	Peptide_486	GSWTLTGHHHHHHR	Peptide_786	GSYPWLGHHHHHHR	Peptide_1086	GWYTLYGHHHHHHR
Peptide_187	GAAPWPGHHHHHHR	Peptide_487	GWYPAAGHHHHHHR	Peptide_787	GPLSWYGHHHHHHR	Peptide_1087	GWLELWGHHHHHHR
Peptide_188	GDASYSGHHHHHHR	Peptide_488	GAAPWYGHHHHHHR	Peptide_788	GYYSAYGHHHHHHR	Peptide_1088	GEYSWYGHHHHHHR
Peptide_189	GTYTASGHHHHHHR	Peptide_489	GEYSLPGHHHHHHR	Peptide_789	GYLELEGHHHHHHR	Peptide_1089	GSYEYWGHHHHHHR
Peptide_190	GSYTATGHHHHHHR	Peptide_490	GSYELPGHHHHHHR	Peptide_790	GELELYGHHHHHHR	Peptide_1090	GYYTWDGHHHHHHR
Peptide_191	GTASYTGHHHHHHR	Peptide_491	GELPYSGHHHHHHR	Peptide_791	GSYPWDGHHHHHHR	Peptide_1091	GDYTYWGHHHHHHR
Peptide_192	GSATYTGHHHHHHR	Peptide_492	GDYTLPGHHHHHHR	Peptide_792	GTWTYPGHHHHHHR	Peptide_1092	GTYDWYGHHHHHHR
Peptide_193	GELPALGHHHHHHR	Peptide_493	GTLPYDGHHHHHHR	Peptide_793	GTYTWPGHHHHHHR	Peptide_1093	GEWDLWGHHHHHHR
Peptide_194	GLLPAEGHHHHHHR	Peptide_494	GYAELLGHHHHHHR	Peptide_794	GWYDALGHHHHHHR	Peptide_1094	GELDWWGHHHHHHR
Peptide_195	GPAELLGHHHHHHR	Peptide_495	GALELYGHHHHHHR	Peptide_795	GWADLYGHHHHHHR	Peptide_1095	GWYPWPGHHHHHHR
Peptide_196	GPLDAEGHHHHHHR	Peptide_496	GEYDALGHHHHHHR	Peptide_796	GYADWLGHHHHHHR	Peptide_1096	GPWPYWGHHHHHHR
Peptide_197	GEADLPGHHHHHHR	Peptide_497	GELDYAGHHHHHHR	Peptide_797	GELDYEGHHHHHHR	Peptide_1097	GPYPWWGHHHHHHR
Peptide_198	GDAELPGHHHHHHR	Peptide_498	GEADLYGHHHHHHR	Peptide_798	GDLEYEGHHHHHHR	Peptide_1098	GWATWWGHHHHHHR
Peptide_199	GTLTLPGHHHHHHR	Peptide_499	GYYPAPGHHHHHHR	Peptide_799	GWADYDGHHHHHHR	Peptide_1099	GEWTWEGHHHHHHR
Peptide_200	GWATAPGHHHHHHR	Peptide_500	GSYDLLGHHHHHHR	Peptide_800	GDADYWGHHHHHHR	Peptide_1100	GDWEWDGHHHHHHR
Peptide_201	GAAPWTGHHHHHHR	Peptide_501	GDLSLYGHHHHHHR	Peptide_801	GEWTYAGHHHHHHR	Peptide_1101	GTWEWEGHHHHHHR

Peptide_202	GELTLAGHHHHHHR	Peptide_502	GTLTLYGHHHHHHR	Peptide_802	GEYTAWGHHHHHHR	Peptide_1102	GYYELYGHHHHHHR
Peptide_203	GDLDLAGHHHHHHR	Peptide_503	GWATYAGHHHHHHR	Peptide_803	GYAEWTGHHHHHHR	Peptide_1103	GYLEYYGHHHHHHR
Peptide_204	GEATLLGHHHHHHR	Peptide_504	GYATAWGHHHHHHR	Peptide_804	GTAEWYGHHHHHHR	Peptide_1104	GSWSWWGHHHHHHR
Peptide_205	GTLSLLGHHHHHHR	Peptide_505	GAATYWGHHHHHHR	Peptide_805	GWYSLTGHHHHHHR	Peptide_1105	GEYDYYGHHHHHHR
Peptide_206	GAAEWAGHHHHHHR	Peptide_506	GEADYDGHHHHHHR	Peptide_806	GSWTYLGHHHHHHR	Peptide_1106	GWYPWTGHHHHHHR
Peptide_207	GPWSASGHHHHHHR	Peptide_507	GDADYEGHHHHHHR	Peptide_807	GTYSLWGHHHHHHR	Peptide_1107	GWWEYAGHHHHHHR
Peptide_208	GWLSAAGHHHHHHR	Peptide_508	GTAEYEGHHHHHHR	Peptide_808	GSYTWLGHHHHHHR	Peptide_1108	GWAEYWGHHHHHHR
Peptide_209	GWASLAGHHHHHHR	Peptide_509	GEYSLTGHHHHHHR	Peptide_809	GSLTWYGHHHHHHR	Peptide_1109	GYAEWWGHHHHHHR
Peptide_210	GALSAWGHHHHHHR	Peptide_510	GTYSLEGHHHHHHR	Peptide_810	GPLDYYGHHHHHHR	Peptide_1110	GWYSWLGHHHHHHR
Peptide_211	GSAELEGHHHHHHR	Peptide_511	GELSYTGHHHHHHR	Peptide_811	GEWSYSGHHHHHHR	Peptide_1111	GWLSWYGHHHHHHR
Peptide_212	GDLDADGHHHHHHR	Peptide_512	GWYSASGHHHHHHR	Peptide_812	GSYEWSGHHHHHHR	Peptide_1112	GEWEYEGHHHHHHR
Peptide_213	GTYPAPGHHHHHHR	Peptide_513	GSWSYAGHHHHHHR	Peptide_813	GDWTYSGHHHHHHR	Peptide_1113	GWWSYDGHHHHHHR
Peptide_214	GELSLSGHHHHHHR	Peptide_514	GWASYSGHHHHHHR	Peptide_814	GTYDWSGHHHHHHR	Peptide_1114	GWYSWDGHHHHHHR
Peptide_215	GSLELSGHHHHHHR	Peptide_515	GSYSWAGHHHHHHR	Peptide_815	GDYPYDGHHHHHHR	Peptide_1115	GSYDWWGHHHHHHR
Peptide_216	GTLTLTGHHHHHHR	Peptide_516	GSASYWGHHHHHHR	Peptide_816	GSWPWPGHHHHHHR	Peptide_1116	GTYTWWGHHHHHHR
Peptide_217	GSWDAAGHHHHHHR	Peptide_517	GTLPWPGHHHHHHR	Peptide_817	GWWPALGHHHHHHR	Peptide_1117	GEWPYYGHHHHHHR
Peptide_218	GWASADGHHHHHHR	Peptide_518	GYYTAPGHHHHHHR	Peptide_818	GWAPWLGHHHHHHR	Peptide_1118	GEYPWYGHHHHHHR
Peptide_219	GTWTAAGHHHHHHR	Peptide_519	GYAPYTGHHHHHHR	Peptide_819	GYYTLLGHHHHHHR	Peptide_1119	GWLDYYGHHHHHHR
Peptide_220	GTATAWGHHHHHHR	Peptide_520	GTAPYYGHHHHHHR	Peptide_820	GEWELPGHHHHHHR	Peptide_1120	GWYTYEGHHHHHHR
Peptide_221	GAATWTGHHHHHHR	Peptide_521	GEWPALGHHHHHHR	Peptide_821	GPWELEGHHHHHHR	Peptide_1121	GYYDWDGHHHHHHR
Peptide_222	GEYPAAGHHHHHHR	Peptide_522	GELPAWGHHHHHHR	Peptide_822	GELPWEGHHHHHHR	Peptide_1122	GEYTYWGHHHHHHR
Peptide_223	GEAPAYGHHHHHHR	Peptide_523	GEAPWLGHHHHHHR	Peptide_823	GEYEYAGHHHHHHR	Peptide_1123	GTWEYYGHHHHHHR
Peptide_224	GPAEYAGHHHHHHR	Peptide_524	GPLSLWGHHHHHHR	Peptide_824	GWWDAPGHHHHHHR	Peptide_1124	GPWSWWGHHHHHHR
Peptide_225	GYLSAPGHHHHHHR	Peptide_525	GYAEYAGHHHHHHR	Peptide_825	GWAPWDGHHHHHHR	Peptide_1125	GDYDYWGHHHHHHR
Peptide_226	GSYPALGHHHHHHR	Peptide_526	GAAEYYGHHHHHHR	Peptide_826	GDAPWWGHHHHHHR	Peptide_1126	GEWELWGHHHHHHR
Peptide_227	GYASLPGHHHHHHR	Peptide_527	GSYPYSGHHHHHHR	Peptide_827	GYYSLEGHHHHHHR	Peptide_1127	GWLEWEGHHHHHHR
Peptide_228	GPLSAYGHHHHHHR	Peptide_528	GYYSLAGHHHHHHR	Peptide_828	GSYEYLGHHHHHHR	Peptide_1128	GELEWWGHHHHHHR
Peptide_229	GALSYPGHHHHHHR	Peptide_529	GEWDAPGHHHHHHR	Peptide_829	GSLEYYGHHHHHHR	Peptide_1129	GEWDWEGHHHHHHR
Peptide_230	GSWTASGHHHHHHR	Peptide_530	GEAPWDGHHHHHHR	Peptide_830	GTYDYLGHHHHHHR	Peptide_1130	GWYPWLGHHHHHHR
Peptide_231	GSYPADGHHHHHHR	Peptide_531	GDAEWPGHHHHHHR	Peptide_831	GEWDLLGHHHHHHR	Peptide_1131	GWLPYWGHHHHHHR
Peptide_232	GPASYDGHHHHHHR	Peptide_532	GPAEWDGHHHHHHR	Peptide_832	GDWELLGHHHHHHR	Peptide_1132	GYLPWWGHHHHHHR
Peptide_233	GSADYPGHHHHHHR	Peptide_533	GDWSLPGHHHHHHR	Peptide_833	GELDLWGHHHHHHR	Peptide_1133	GSWTWWGHHHHHHR

Peptide_234	GTYTAPGHHHHHHR	Peptide_534	GSWDLPGHHHHHHR	Peptide_834	GPLPYWGHHHHHHR	Peptide_1134	GYYEYEGHHHHHHR
Peptide_235	GDADAYGHHHHHHR	Peptide_535	GTLTWPGHHHHHHR	Peptide_835	GEYSYDGHHHHHHR	Peptide_1135	GWWDYPGHHHHHHR
Peptide_236	GAADYDGHHHHHHR	Peptide_536	GWADLLGHHHHHHR	Peptide_836	GSYEYDGHHHHHHR	Peptide_1136	GWYDWPGHHHHHHR
Peptide_237	GSYTLAGHHHHHHR	Peptide_537	GSYDAYGHHHHHHR	Peptide_837	GTYDYDGHHHHHHR	Peptide_1137	GPYDWWGHHHHHHR
Peptide_238	GYASLTGHHHHHHR	Peptide_538	GSADYYGHHHHHHR	Peptide_838	GWWTLAGHHHHHHR	Peptide_1138	GYYPYYGHHHHHHR
Peptide_239	GALTYSGHHHHHHR	Peptide_539	GYYTATGHHHHHHR	Peptide_839	GWATWLGHHHHHHR	Peptide_1139	GWYSWEGHHHHHHR
Peptide_240	GSATYLGHHHHHHR	Peptide_540	GTYTAYGHHHHHHR	Peptide_840	GYYPAYGHHHHHHR	Peptide_1140	GEWSWYGHHHHHHR
Peptide_241	GEYSASGHHHHHHR	Peptide_541	GYATYTGHHHHHHR	Peptide_841	GYAPYYGHHHHHHR	Peptide_1141	GEYSWWGHHHHHHR
Peptide_242	GEASYSGHHHHHHR	Peptide_542	GPYELPGHHHHHHR	Peptide_842	GELDWDGHHHHHHR	Peptide_1142	GSWEYWGHHHHHHR
Peptide_243	GTYSADGHHHHHHR	Peptide_543	GEWTALGHHHHHHR	Peptide_843	GDLDWEGHHHHHHR	Peptide_1143	GSYEWWGHHHHHHR
Peptide_244	GSYDATGHHHHHHR	Peptide_544	GDWDALGHHHHHHR	Peptide_844	GTLEWEGHHHHHHR	Peptide_1144	GTWDYWGHHHHHHR
Peptide_245	GTATYTGHHHHHHR	Peptide_545	GTWELAGHHHHHHR	Peptide_845	GWWSAEGHHHHHHR	Peptide_1145	GWWPWPGHHHHHHR
Peptide_246	GPLTLLGHHHHHHR	Peptide_546	GELTWAGHHHHHHR	Peptide_846	GEWSAWGHHHHHHR	Peptide_1146	GPWPWWGHHHHHHR
Peptide_247	GPWPASGHHHHHHR	Peptide_547	GTLEWAGHHHHHHR	Peptide_847	GSWEWAGHHHHHHR	Peptide_1147	GYYEWLGHHHHHHR
Peptide_248	GSAPWPGHHHHHHR	Peptide_548	GEATWLGHHHHHHR	Peptide_848	GWASWEGHHHHHHR	Peptide_1148	GWLEYYGHHHHHHR
Peptide_249	GWLPAAGHHHHHHR	Peptide_549	GDADWLGHHHHHHR	Peptide_849	GEASWWGHHHHHHR	Peptide_1149	GWYDYEGHHHHHHR
Peptide_250	GAAPWLGHHHHHHR	Peptide_550	GTAEWLGHHHHHHR	Peptide_850	GSAEWWGHHHHHHR	Peptide_1150	GEWDYYGHHHHHHR
Peptide_251	GELPAEGHHHHHHR	Peptide_551	GSWTLLGHHHHHHR	Peptide_851	GDATWWGHHHHHHR	Peptide_1151	GWWEWAGHHHHHHR
Peptide_252	GEAELPGHHHHHHR	Peptide_552	GWWSAAGHHHHHHR	Peptide_852	GTADWWGHHHHHHR	Peptide_1152	GEWEWEGHHHHHHR
Peptide_253	GTLDLPGHHHHHHR	Peptide_553	GWASAWGHHHHHHR	Peptide_853	GWYTLPGHHHHHHR	Peptide_1153	GDWSWWGHHHHHHR
Peptide_254	GLLSLLGHHHHHHR	Peptide_554	GAASWWGHHHHHHR	Peptide_854	GTYPWLGHHHHHHR	Peptide_1154	GSWDWWGHHHHHHR
Peptide_255	GWADAPGHHHHHHR	Peptide_555	GSYSYTGHHHHHHR	Peptide_855	GYYTAYGHHHHHHR	Peptide_1155	GWWTWTGHHHHHHR
Peptide_256	GAADWPGHHHHHHR	Peptide_556	GPLDLYGHHHHHHR	Peptide_856	GEWPYSGHHHHHHR	Peptide_1156	GWYEWPGHHHHHHR
Peptide_257	GELDLAGHHHHHHR	Peptide_557	GEAEWSGHHHHHHR	Peptide_857	GSYEWPGHHHHHHR	Peptide_1157	GEWPWYGHHHHHHR
Peptide_258	GDAELLGHHHHHHR	Peptide_558	GSAEWEGHHHHHHR	Peptide_858	GDWTYPGHHHHHHR	Peptide_1158	GEYPWWGHHHHHHR
Peptide_259	GYLPAPGHHHHHHR	Peptide_559	GDADWDGHHHHHHR	Peptide_859	GWAELYGHHHHHHR	Peptide_1159	GPYEWWGHHHHHHR
Peptide_260	GPYPALGHHHHHHR	Peptide_560	GEWSLSGHHHHHHR	Peptide_860	GYAEWLGHHHHHHR	Peptide_1160	GYYSYWGHHHHHHR
Peptide_261	GSLDLLGHHHHHHR	Peptide_561	GDWTLSGHHHHHHR	Peptide_861	GELEYEGHHHHHHR	Peptide_1161	GWWDLYGHHHHHHR
Peptide_262	GSAPWTGHHHHHHR	Peptide_562	GTLSWDGHHHHHHR	Peptide_862	GYYSYSGHHHHHHR	Peptide_1162	GWLDYWGHHHHHHR
Peptide_263	GWATALGHHHHHHR	Peptide_563	GTWTLTGHHHHHHR	Peptide_863	GPWPWPGHHHHHHR	Peptide_1163	GWWTYEGHHHHHHR
Peptide_264	GALTAWGHHHHHHR	Peptide_564	GDLDYPGHHHHHHR	Peptide_864	GEWDYAGHHHHHHR	Peptide_1164	GWYEWTGHHHHHHR
Peptide_265	GAATWLGHHHHHHR	Peptide_565	GWYSAPGHHHHHHR	Peptide_865	GWADYEGHHHHHHR	Peptide_1165	GEWTWYGHHHHHHR

Peptide_266	GELTAEGHHHHHHR	Peptide_566	GPWSYAGHHHHHHR	Peptide_866	GEADWYGHHHHHHR	Peptide_1166	GEYTWWGHHHHHHR
Peptide_267	GTAELEGHHHHHHR	Peptide_567	GSAPYWGHHHHHHR	Peptide_867	GDAEWYGHHHHHHR	Peptide_1167	GWWPWLGHHHHHHR
Peptide_268	GTLSLEGHHHHHHR	Peptide_568	GELEYAGHHHHHHR	Peptide_868	GDWSYLGHHHHHHR	Peptide_1168	GWLPWWGHHHHHHR
Peptide_269	GDLSLDGHHHHHHR	Peptide_569	GYAELEGHHHHHHR	Peptide_869	GDYSLWGHHHHHHR	Peptide_1169	GWYEYEGHHHHHHR
Peptide_270	GEWSAAGHHHHHHR	Peptide_570	GEAEYLGHHHHHHR	Peptide_870	GSWDYLGHHHHHHR	Peptide_1170	GYYEWEGHHHHHHR
Peptide_271	GEASAWGHHHHHHR	Peptide_571	GEYSLLGHHHHHHR	Peptide_871	GSYDWLGHHHHHHR	Peptide_1171	GEWEYYGHHHHHHR
Peptide_272	GSAEWAGHHHHHHR	Peptide_572	GSYELLGHHHHHHR	Peptide_872	GDLSWYGHHHHHHR	Peptide_1172	GEYEYWGHHHHHHR
Peptide_273	GAASWEGHHHHHHR	Peptide_573	GTYDLLGHHHHHHR	Peptide_873	GWYTLTGHHHHHHR	Peptide_1173	GPWDWWGHHHHHHR
Peptide_274	GWLSASGHHHHHHR	Peptide_574	GWYDAAGHHHHHHR	Peptide_874	GTLTYWGHHHHHHR	Peptide_1174	GWWTLWGHHHHHHR
Peptide_275	GSWSALGHHHHHHR	Peptide_575	GWADYAGHHHHHHR	Peptide_875	GYYELPGHHHHHHR	Peptide_1175	GWLTWWGHHHHHHR
Peptide_276	GTLPAYGHHHHHHR	Peptide_576	GAADWYGHHHHHHR	Peptide_876	GELPYYGHHHHHHR	Peptide_1176	GWYPYYGHHHHHHR
Peptide_277	GSASWDGHHHHHHR	Peptide_577	GLLPWPGHHHHHHR	Peptide_877	GPLEYYGHHHHHHR	Peptide_1177	GYYPYWGHHHHHHR
Peptide_278	GTWTASGHHHHHHR	Peptide_578	GPLPWLGHHHHHHR	Peptide_878	GEWSYTGHHHHHHR	Peptide_1178	GWWSWEGHHHHHHR
Peptide_279	GSWTATGHHHHHHR	Peptide_579	GDAEYEGHHHHHHR	Peptide_879	GDWDYSGHHHHHHR	Peptide_1179	GEWSWWGHHHHHHR
Peptide_280	GEYSAPGHHHHHHR	Peptide_580	GELDYSGHHHHHHR	Peptide_880	GDYDWSGHHHHHHR	Peptide_1180	GYYTYWGHHHHHHR
Peptide_281	GDYTAPGHHHHHHR	Peptide_581	GSLDYEGHHHHHHR	Peptide_881	GSYDWDGHHHHHHR	Peptide_1181	GWYEWLGHHHHHHR
Peptide_282	GTYPADGHHHHHHR	Peptide_582	GTLTYEGHHHHHHR	Peptide_882	GEYPYDGHHHHHHR	Peptide_1182	GYLEWWGHHHHHHR
Peptide_283	GTADYPGHHHHHHR	Peptide_583	GDYDLTGHHHHHHR	Peptide_883	GYYDLLGHHHHHHR	Peptide_1183	GWWDYEGHHHHHHR
Peptide_284	GAAEYLGHHHHHHR	Peptide_584	GPYSYPGHHHHHHR	Peptide_884	GPWEWAGHHHHHHR	Peptide_1184	GDWEYWGHHHHHHR
Peptide_285	GSYSLPGHHHHHHR	Peptide_585	GYYPALGHHHHHHR	Peptide_885	GEAPWWGHHHHHHR	Peptide_1185	GEYDWWGHHHHHHR
Peptide_286	GPLSYSGHHHHHHR	Peptide_586	GYLPAYGHHHHHHR	Peptide_886	GWWSLPGHHHHHHR	Peptide_1186	GEWPWWGHHHHHHR
Peptide_287	GSLSYPGHHHHHHR	Peptide_587	GALPYYGHHHHHHR	Peptide_887	GEYTLYGHHHHHHR	Peptide_1187	GPWEWWGHHHHHHR
Peptide_288	GLLSYAGHHHHHHR	Peptide_588	GWYSATGHHHHHHR	Peptide_888	GYLEYTGHHHHHHR	Peptide_1188	GYYSWWGHHHHHHR
Peptide_289	GEYDAAGHHHHHHR	Peptide_589	GSWTYAGHHHHHHR	Peptide_889	GSWPWLGHHHHHHR	Peptide_1189	GWWTWEGHHHHHHR
Peptide_290	GYADAEGHHHHHHR	Peptide_590	GTYSAWGHHHHHHR	Peptide_890	GPLSWWGHHHHHHR	Peptide_1190	GEWTWWGHHHHHHR
Peptide_291	GAADYEGHHHHHHR	Peptide_591	GWASYTGHHHHHHR	Peptide_891	GWYSAYGHHHHHHR	Peptide_1191	GDWDWWGHHHHHHR
Peptide_292	GSYDLAGHHHHHHR	Peptide_592	GSYTAWGHHHHHHR	Peptide_892	GEWELLGHHHHHHR	Peptide_1192	GYYDYWGHHHHHHR
Peptide_293	GDASYLGHHHHHHR	Peptide_593	GTASYWGHHHHHHR	Peptide_893	GELELWGHHHHHHR	Peptide_1193	GWWEYEGHHHHHHR
Peptide_294	GSADLYGHHHHHHR	Peptide_594	GSATYWGHHHHHHR	Peptide_894	GLLEWEGHHHHHHR	Peptide_1194	GWYEWEGHHHHHHR
Peptide_295	GTYTLAGHHHHHHR	Peptide_595	GPLPWDGHHHHHHR	Peptide_895	GSYEYEGHHHHHHR	Peptide_1195	GEWEYWGHHHHHHR
Peptide_296	GTLTAYGHHHHHHR	Peptide_596	GYYDAPGHHHHHHR	Peptide_896	GSWDWPGHHHHHHR	Peptide_1196	GEYEWWGHHHHHHR
Peptide_297	GALTYTGHHHHHHR	Peptide_597	GSWSYSGHHHHHHR	Peptide_897	GTWTWPGHHHHHHR	Peptide_1197	GEWDWWGHHHHHHR

Peptide_298	GTATYLGHHHHHHR	Peptide_598	GWLTLPGHHHHHHR	Peptide_898	GWWDLAGHHHHHHR	Peptide_1198	GDWEWWGHHHHHHR
Peptide_299	GTYSAEGHHHHHHR	Peptide_599	GPWTLLGHHHHHHR	Peptide_899	GDWELEGHHHHHHR	Peptide_1199	GWYEYYGHHHHHHR
Peptide_300	GSADYDGHHHHHHR	Peptide_600	GLLPWTGHHHHHHR	Peptide_900	GELDWEGHHHHHHR	Peptide_1200	GYYEYWGHHHHHHR

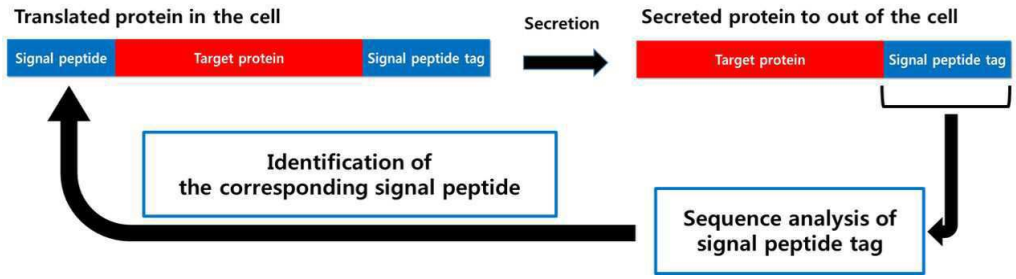
[0188] **10. Aflibercept 표적 라이브러리를 이용하여 생산량을 증가시키는 signal peptide 스크리닝**

[0189] Signal peptide/SP-tag을 포함하고 있는 라이브러리에 모델 표적 단백질로 Aflibercept를 클로닝 하여 표적 단백질 라이브러리를 구축하였다. 라이브러리를 HEK 293 세포에서 발현시키고 3일 뒤 세포 배양액을 모아서 his tag을 이용해 발현된 단백질을 분리 정제하였다. 단백질 샘플을 trypsin을 처리한 후 LC-MS/MS를 이용해 Peak area 값을 구하여 SP-tag에 대해서 상대 정량을 실시하였다. 시그널 펩타이드 스크리닝을 위해 디자인된 1,200 바코딩 펩타이드와 합성된 표준 펩타이드 1,200 (총 2,400 펩타이드)개를 효과적으로 분석하기 위해 총 16 그룹 (각 150개 타깃 펩타이드)으로 나누어 MRM 분석을 진행하였다. 각 그룹 (150개 타깃 펩타이드)에는 75개의 바코딩 펩타이드와 75개의 표준 펩타이드로 구성하였다. 또한 16개 그룹 간의 차이를 최소화 하기 위해 글로벌 스탠다드 펩타이드를 함께 분석하여 각 그룹 간 차이를 줄이기 위한 normalization을 수행하였다 (도 16). 16개 그룹에 대한 시스템 안정성을 확인해 본 결과 변동계수 (coefficient of variation, CV)는 17.26 %로 안정적으로 나타났다 (도 16). 16개 그룹 (바코딩&표준 펩타이드: 2,400개)에 대한 각각 LC-MS/MS로 분석하고 글로벌 스탠다드로 보정한 peak area 값을 그래프로 나타내었고 높은 값을 가지는 것이 1차 hit로 선정되었다 (도 17). 스크리닝 시스템을 검증하고 2차 hit를 선별하기 위해 상위 24 종과 하위 24 종에 해당하는 plasmid를 각각 individual expression 시키고 그 발현량을 western blot으로 비교 하였다 (도 18). 정량 분석을 위해 individual expression 시킨 sample을 OCTET 장비를 이용해 정량 하여 이중으로 비교하였다 (도 18). 이를 바탕으로 발현이 높게 확인된 SP-tag 14종에 각각 매칭되는 signal peptide 14종을 선별하였다 (도 19).

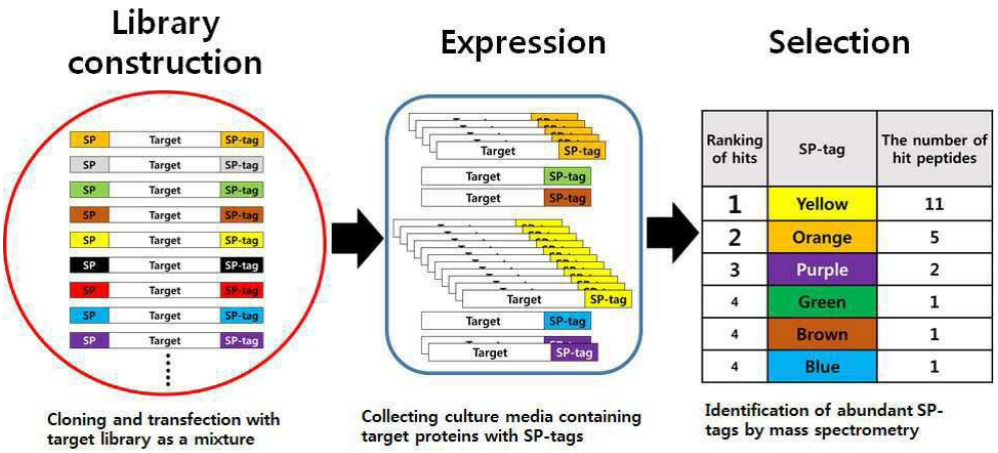
[0193] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등기물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

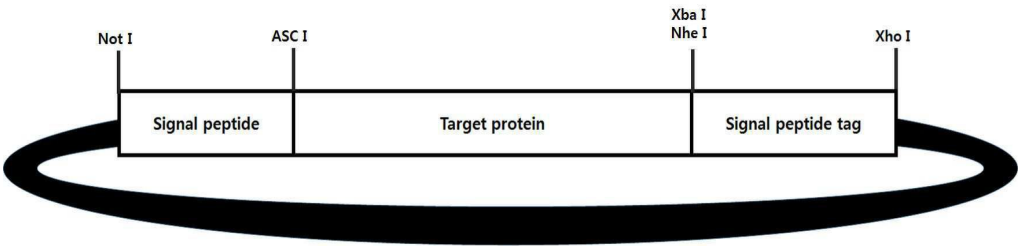
도면1



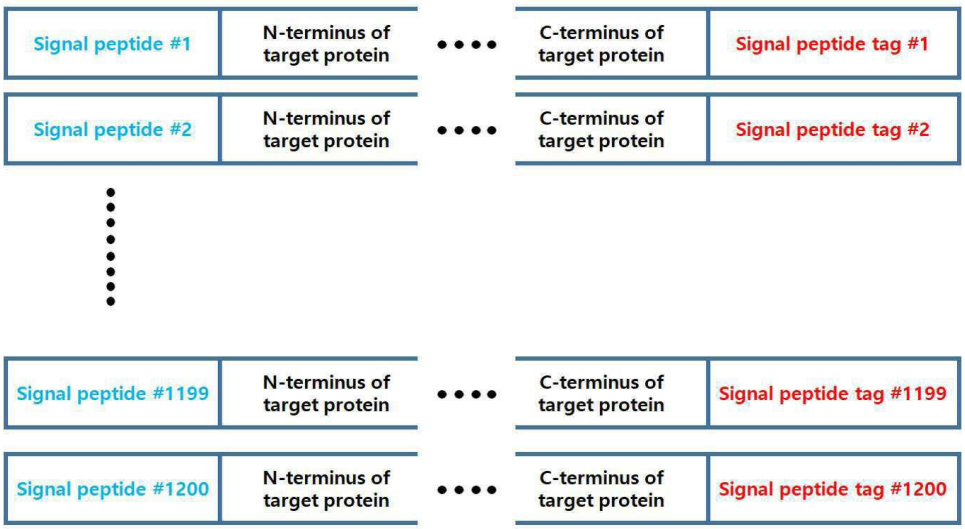
도면2



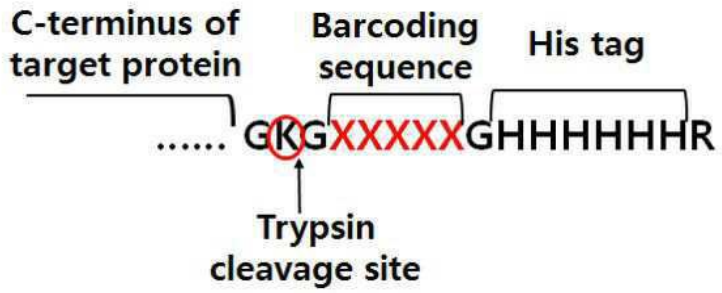
도면3



도면4

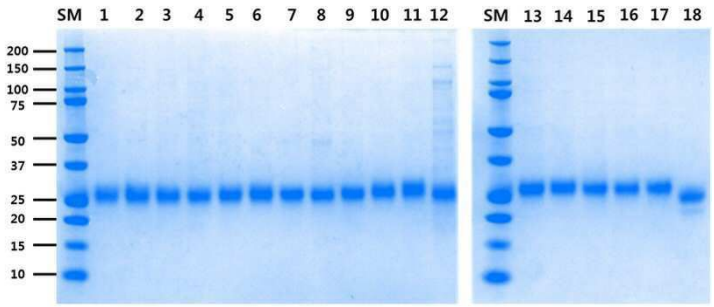


도면5

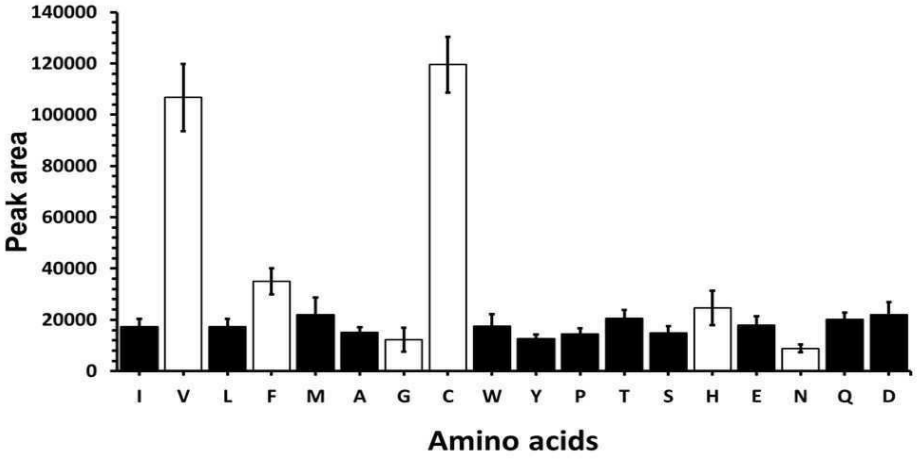


도면6

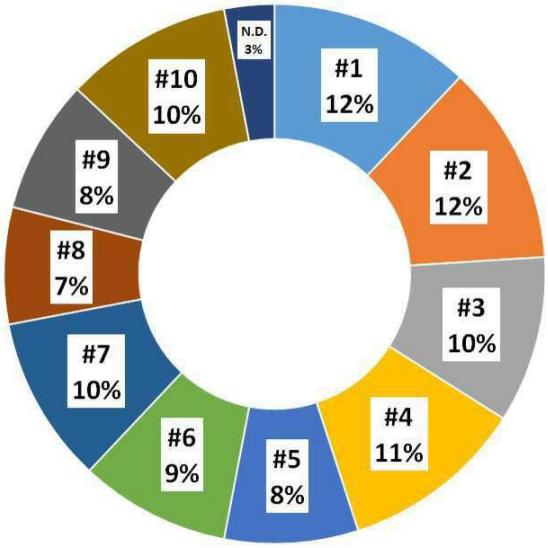
1	Isoleucine	K GFSGIFED I VSSIQTLR
2	Valine	K GFSGIFED V VSSIQTLR
3	Leucine	K GFSGIFED L VSSIQTLR
4	Phenyalanine	K GFSGIFED F VSSIQTLR
5	Methionine	K GFSGIFED M VSSIQTLR
6	Alanine	K GFSGIFED A VSSIQTLR
7	Glycine	K GFSGIFED G VSSIQTLR
8	Cysteine	K GFSGIFED C VSSIQTLR
9	Tyrosine	K GFSGIFED Y VSSIQTLR
10	Proline	K GFSGIFED P VSSIQTLR
11	Threonine	K GFSGIFED T VSSIQTLR
12	Tryptophan	K GFSGIFED W VSSIQTLR
13	Serine	K GFSGIFED S VSSIQTLR
14	Glutamic acid	K GFSGIFED E VSSIQTLR
15	Asparagine	K GFSGIFED N VSSIQTLR
16	Glutamine	K GFSGIFED Q VSSIQTLR
17	Aspartic acid	K GFSGIFED D VSSIQTLR
18	Histidine	K GFSGIFED H VSSIQTLR



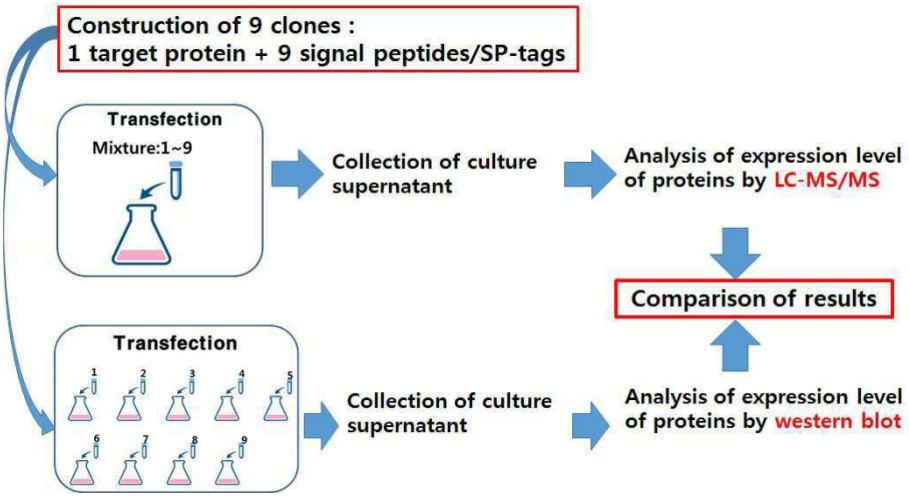
도면7


140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
Peak area
I V L F M A G C W Y P T S H E N Q D
Amino acids

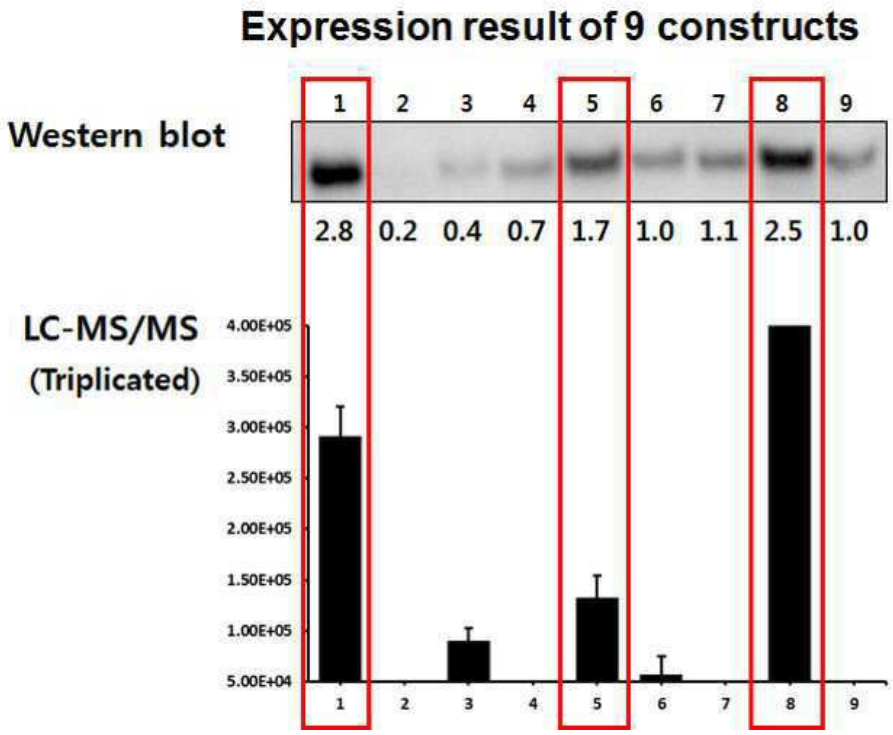
도면8


N.D. 3%
#1 12%
#2 12%
#3 10%
#4 11%
#5 8%
#6 9%
#7 10%
#8 7%
#9 8%
#10 10%

도면9


Construction of 9 clones :
1 target protein + 9 signal peptides/SP-tags
Transfection
Mixture:1~9
Collection of culture supernatant
Analysis of expression level of proteins by LC-MS/MS
Comparison of results
Transfection
Collection of culture supernatant
Analysis of expression level of proteins by western blot

도면10



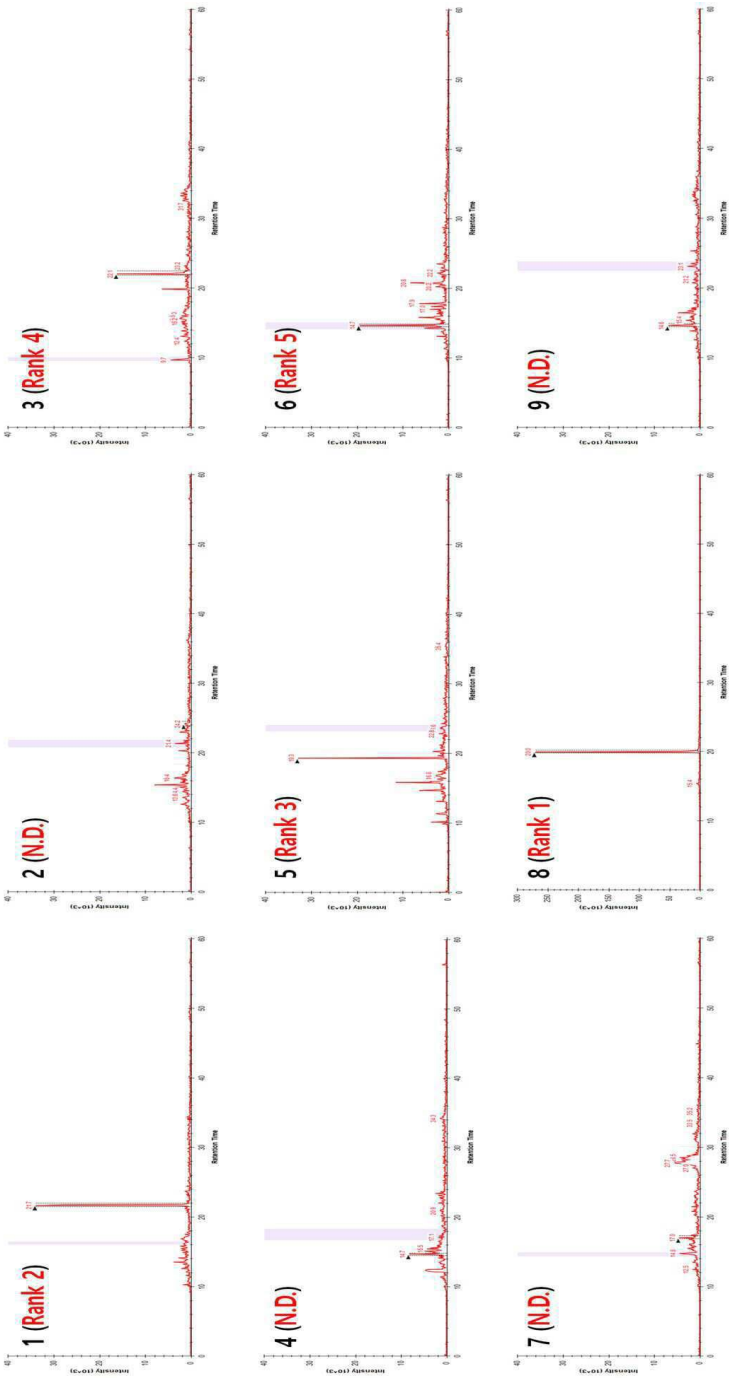
도면11

Expression ranking of 9 constructs

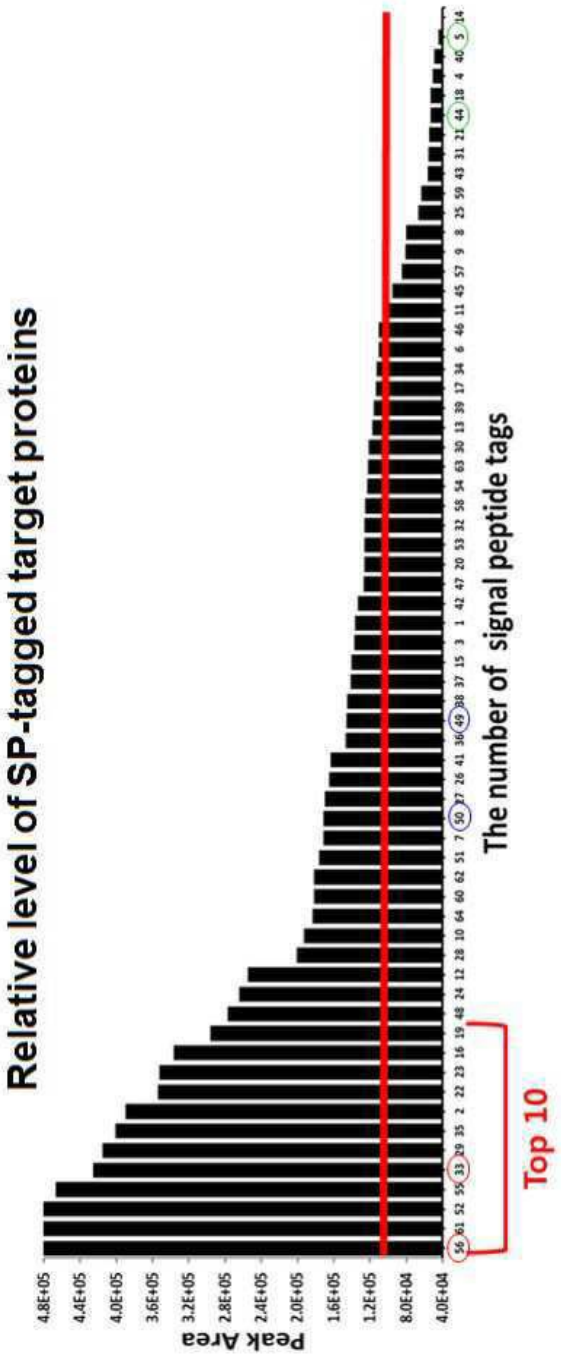
Ranking	Western blot	LC-MS/MS
1	1	8
2	8	1
3	5	5
4	7	3
5	6	6
6	9	ND (2, 4, 7, 9)
7	4	
8	3	
9	2	

ND stands for Not Determined

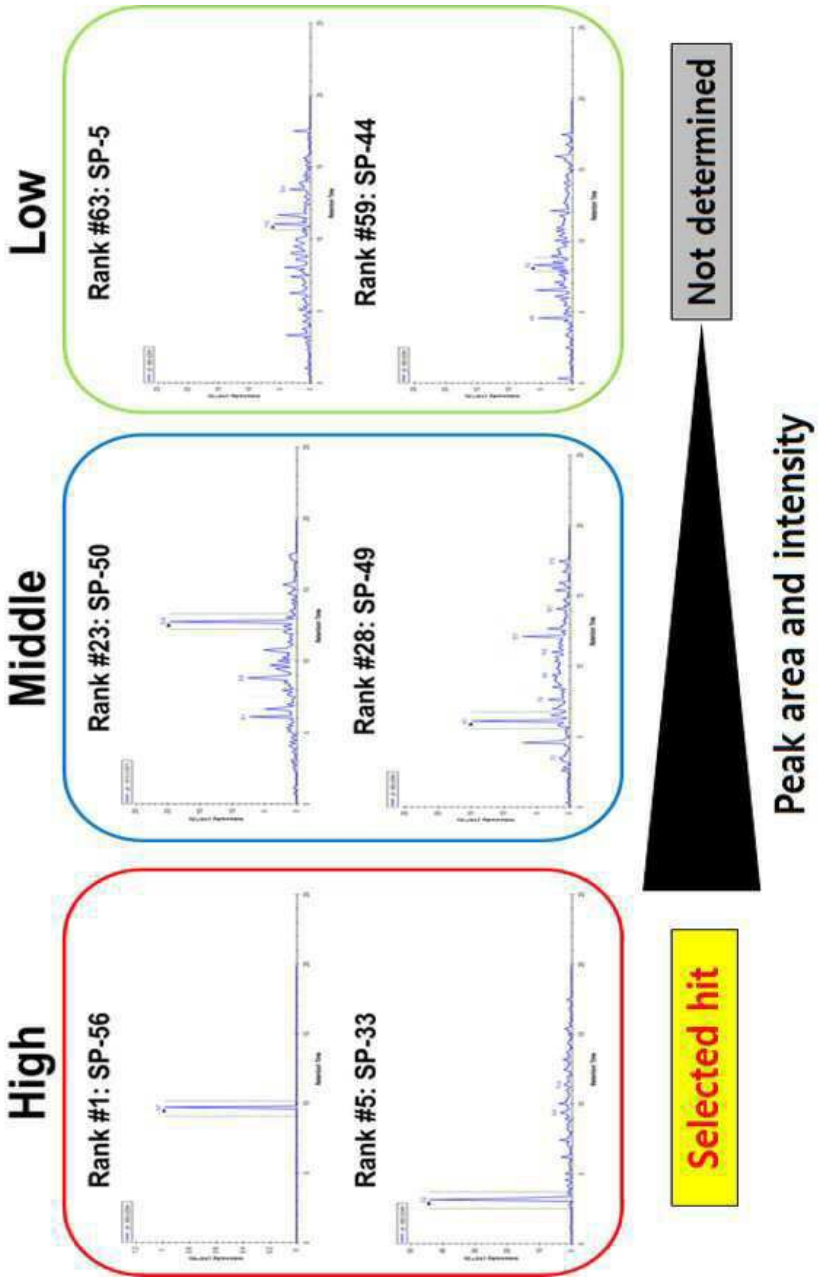
도면12



도면13


Relative level of SP-tagged target proteins
Peak Area
4.8E+05
4.4E+05
4.0E+05
3.6E+05
3.2E+05
2.8E+05
2.4E+05
2.0E+05
1.6E+05
1.2E+05
8.0E+04
4.0E+04
The number of signal peptide tags
Top 10

도면14

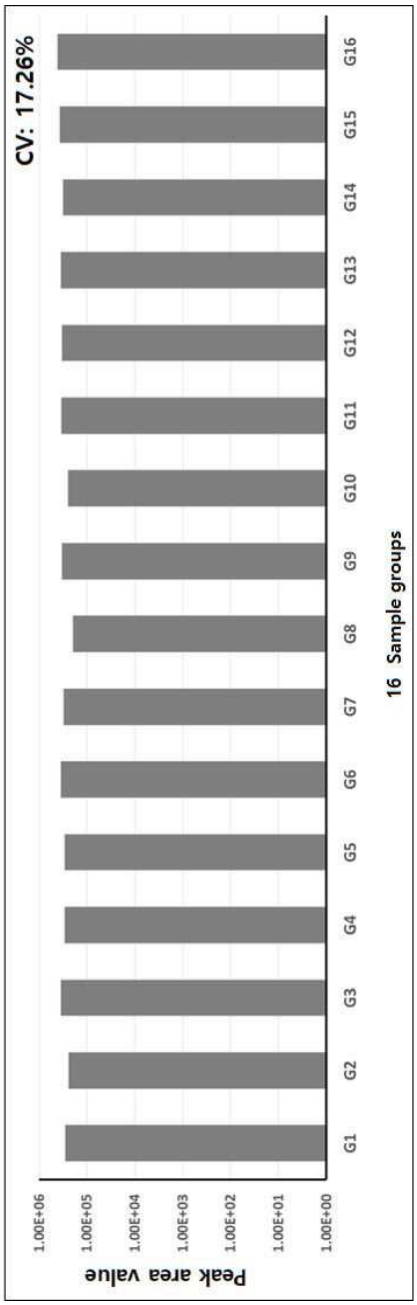

High
Rank #1: SP-56
Rank #5: SP-33
Middle
Rank #23: SP-50
Rank #28: SP-49
Low
Rank #63: SP-5
Rank #59: SP-44
Selected hit
Not determined
Peak area and intensity

도면15

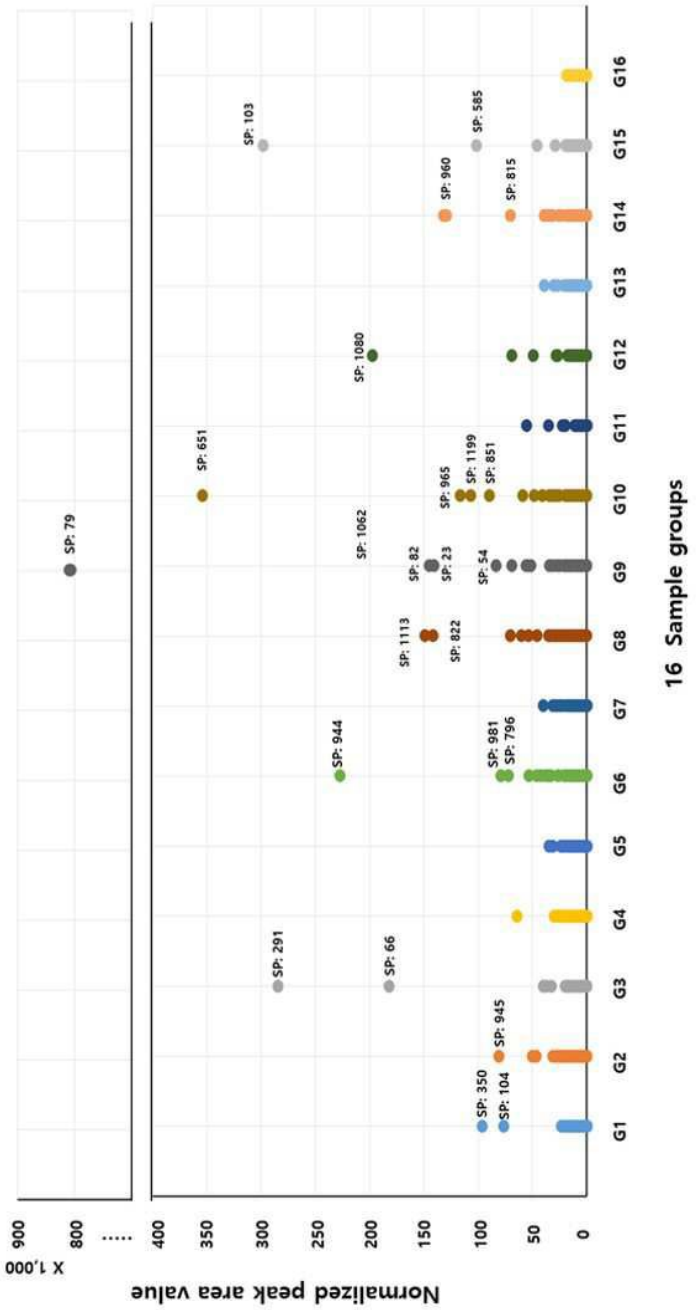
Ranking	# Signal peptide	Peak area value	Corresponding gene	Sequence
1	56	6518624	Glypican-6	MPSWIGAVILPLLGLLLSLPAGA
2	61	991527	Serine protease inhibitor Kazal-type 8	MKGICSDAILVLATSMMVMAFA
3	52	495054	C-X-C motif chemokine 16	MGRDLRPGSRVLLLLLLLLLVYLTQPGNG
4	55	467136	Progonadoliberin-2	MASSRRGLLLLLLLTAHLGPSEA
5	33	425505	Stromelysin-1	MKSLPLLLLCVAVCSA
6	29	415055	IgA-inducing protein homolog	MCSYYHMKKRSVSGCNITFAVMFSHLSAG
7	35	401353	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	MPLGLLWLGLALLGALHAQA
8	2	390198	Matrix metalloproteinase-17	MRRRAARGPGPPPPGPGLSRLPLPLLLLLALGTRGGCA
9	22	354084	Chitinase-3-like protein 2	MGATTMDQKSLWAGVVVLLLQGGSA
10	23	352607	Contactin-associated protein-like 3	MASVAWAVLKVLLLPTQTWSPVGA

도면16

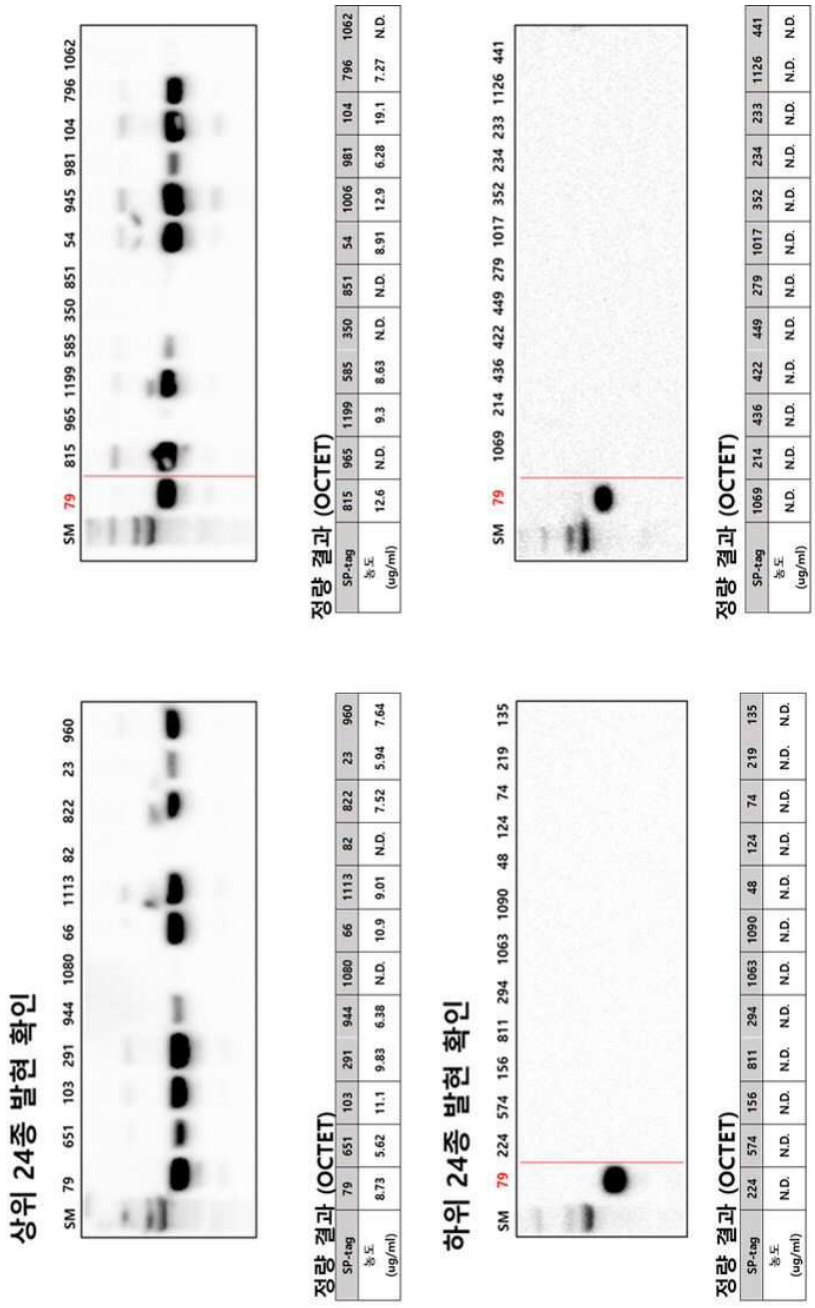
Global Standard	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16
Peak Area	2.82E+05	2.42E+05	3.48E+05	2.91E+05	2.93E+05	3.50E+05	3.09E+05	1.95E+05	3.32E+05	2.50E+05	3.43E+05	3.34E+05	3.47E+05	3.12E+05	3.69E+05	4.16E+05



도면17


Normalized peak area value
X 1,000
900
800
.....
400
350
300
250
200
150
100
50
0
16 Sample groups
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7
G8
G9
G10
G11
G12
G13
G14
G15
G16
SP: 79
SP: 651
SP: 103
SP: 1080
SP: 960
SP: 585
SP: 815
SP: 1199
SP: 851
SP: 965
SP: 1062
SP: 82
SP: 23
SP: 54
SP: 1113
SP: 822
SP: 944
SP: 981
SP: 796
SP: 291
SP: 66
SP: 945
SP: 350
SP: 104

도면18


상위 24종 발현 확인
SM 79 651 103 291 944 1080 66 1113 82 822 23 960
정량 결과 (OCTET)
SP-tag 79 651 103 291 944 1080 66 1113 82 822 23 960
농 도 (ug/ml) 8.73 5.62 11.1 9.83 6.38 N.D. 10.9 9.01 N.D. 7.52 5.94 7.64
하위 24종 발현 확인
SM 79 224 574 156 811 294 1063 1090 48 124 74 219 135
정량 결과 (OCTET)
SP-tag 224 574 156 811 294 1063 1090 48 124 74 219 135
농 도 (ug/ml) N.D. N.D. N.D. N.D. N.D. N.D. N.D. N.D. N.D. N.D. N.D. N.D.
SM 79 815 965 1199 585 350 851 54 945 981 104 796 1062
정량 결과 (OCTET)
SP-tag 815 965 1199 585 350 851 54 1006 981 104 796 1062
농 도 (ug/ml) 12.6 N.D. 9.3 8.63 N.D. N.D. 8.91 12.9 6.28 19.1 7.27 N.D.
SM 79 1069 214 436 422 449 279 1017 352 234 233 1126 441
정량 결과 (OCTET)
SP-tag 1069 214 436 422 449 279 1017 352 234 233 1126 441
농 도 (ug/ml) N.D. N.D. N.D. N.D. N.D. N.D. N.D. N.D. N.D. N.D. N.D. N.D.

도면19

Peptide number	Hit signal sequence	Amino acid sequence
Peptide_079	Insulin growth factor-like family member 4	MVPRISAAIFIFELLGSNS
Peptide_651	Group IID secretory phospholipase A2	MELALLCGLVVMAGVIPIQG
Peptide_103	Alpha-2-antiplasmin	MALLWGLLVLSWSCLQGPCSVFSPVSA
Peptide_291	Neural cell adhesion molecule 1	MLQTKDLIWTLFFLGTAVS
Peptide_066	Bile salt-activated lipase	MGRLQLVVLGLTCCWAVASA
Peptide_1113	Peptidoglycan recognition protein	MSRRSMLLAWALPSLLRLGAA
Peptide_822	Putative uncharacterized protein FP248	MGTGGSLLCGCSLVLSCLCPSAS
Peptide_960	Apolipoprotein(a)-like protein 2	MEHKEVVLLLLLFLKSAPTET
Peptide_815	Uncharacterized protein C19orf36	MALLLCLVCLTAALA
Peptide_1199	Stromal cell-derived factor 1	MNAKVVVVLVLVLTALCLSDG
Peptide_054	Uncharacterized protein FLJ37543	MLAPLFLCCLRNLFRKLIS
Peptide_1006	Interleukin-17 receptor E	MGSSRLAALLLPLLLIVIDLSDS
Peptide_104	Pigment epithelium-derived factor	MQALVLLLCIGALLGHSSC
Peptide_796	Follicular dendritic cell secreted peptide	MKKVLLLITAILAVAVG

서 열 목 록

<110> Osong Hi-Tech Medical Industry Promotion Foundation

The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University

<120> High-Throughput Screening Method using Individual Barcoding System for Identifying Optimal Signal Peptides to Enhance the Productivity of Protein

<130> HP9504

<150> KR 10-2019-0108722

<151> 2019-09-03

<160> 3

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Barcoding Sequence 3

<220><221> VARIANT

<222> (1)

<223> 1st Leu may be substituted with Pro, Ala, Trp, Tyr, Thr, Ser, Glu

or Asp

<220><221> VARIANT

<222> (2)

<223> 2nd Leu may be substituted with Pro, Ala, Trp, Tyr, Thr, Ser, Glu or Asp

<220><221> VARIANT

<222> (3)

<223> 3rd Leu may be substituted with Pro, Ala, Trp, Tyr, Thr, Ser, Glu or Asp

<400> 1

Leu Leu Leu

1

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Barcoding Sequence 4

<220><221> VARIANT

<222> (1)

<223> 1st Leu may be substituted with Pro, Ala, Trp, Tyr, Thr, Ser, Glu or Asp

<220><221> VARIANT

<222> (2)

<223> 2nd Leu may be substituted with Pro, Ala, Trp, Tyr, Thr, Ser, Glu or Asp

<220><221> VARIANT

<222> (3)

<223> 3rd Leu may be substituted with Pro, Ala, Trp, Tyr, Thr, Ser, Glu or Asp

<220><221> VARIANT

<222> (4)

<223> 4th Leu may be substituted with Pro, Ala, Trp, Tyr, Thr, Ser, Glu or Asp

<400> 2

Leu Leu Leu Leu

1

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Barcoding Sequence 5

<220><221> VARIANT

<222> (1)

<223> 1st Leu may be substituted with Pro, Ala, Trp, Tyr, Thr, Ser, Glu or Asp

<220><221> VARIANT

<222> (2)

<223> 2nd Leu may be substituted with Pro, Ala, Trp, Tyr, Thr, Ser, Glu or Asp

<220><221> VARIANT

<222> (3)

<223> 3rd Leu may be substituted with Pro, Ala, Trp, Tyr, Thr, Ser, Glu or Asp

<220><221> VARIANT

<222> (4)

<223> 4th Leu may be substituted with Pro, Ala, Trp, Tyr, Thr, Ser, Glu or Asp

<220><221> VARIANT

<222> (5)

<223> 5th Leu may be substituted with Pro, Ala, Trp, Tyr, Thr, Ser, Glu or Asp

<400> 3

Leu Leu Leu Leu Leu

1 5