(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0063830
(43) 공개일자 2019년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 38/19* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/1709 (2013.01)
A61K 38/191 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0162891
(22) 출원일자 2017년11월30일
심사청구일자 2017년11월30일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이대희
경기도 용인시 처인구 고진로27번길 28-5(고림동)
오상철
서울특별시 강남구 선릉로 120, 7동 602호(대치동, 개포1,2차 우성아파트)
김보람
서울특별시 구로구 구로중앙로 137, 502호(구로동)
(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 8 항

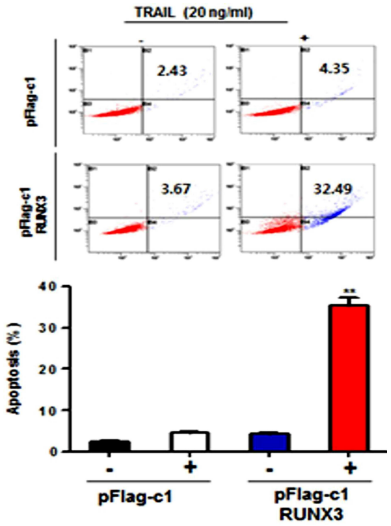
(54) 발명의 명칭 **RUNX3 단백질 또는 이를 코딩하는 RUNX3 유전자를 포함하는 TRAIL의 항암 효과 증진용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 RUNX3 단백질 또는 이를 코딩하는 RUNX3 유전자, 및 TRAIL을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 암 예방 또는 치료용 약학 조성물, TRAIL의 항암 효과 증진용 약학 조성물 및 암세포 사멸 증진 방법은 TRAIL 내성을 극복할 수 있는 RUNX3 단백질 또는 이를 코딩하는 RUNX3 유전자를 이용함으로써 TRAIL에 대한 내성을 보이는 암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2017R1A2B2011684
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자사업
연구과제명 혜지호그 억제제 신약 개발 및 내성극복 후보물질 Genipin 병용 연구
기 여 율 1/3
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2015R1D1A1A01058303
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공학개인기초연구지원사업
연구과제명 TRAIL 저항성 암줄기세포를 위한 타겟 치료의 적용과 개발
기 여 율 1/3
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI15C1665
부처명 한국보건산업진흥원
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 연구역량 강화지원
연구과제명 바이오메디컬 중개연구 인재 양성 프로그램 개발
기 여 율 1/3
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

RUNX3 단백질 또는 이를 코딩하는 RUNX3 유전자, 및 TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 RUNX3 단백질은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 암은 대장암, 결장암, 췌장암, 간암, 자궁경부암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 폐암, 자궁암, 방광암 및 혈액암으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

RUNX3 유전자를 포함하는 벡터 또는 상기 벡터로 형질전환된 RUNX3 과발현 세포, 및 TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 벡터는 플라스미드 DNA 또는 재조합 바이러스성 벡터로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 세포는 조혈 줄기세포, 수지상 세포, 자가이식 종양세포(autologous tumor cells) 및 정착 종양세포(established tumor cells)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

RUNX3 단백질 또는 이를 코딩하는 RUNX3 유전자를 유효성분으로 포함하며, TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)의 내성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 TRAIL의 항암 효과 증진용 약학 조성물.

청구항 8

RUNX3 단백질 또는 이를 코딩하는 RUNX3 유전자, 및 TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; Trail)을 인간을 제외한 포유동물의 암세포에 병용 투여하는 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 RUNX3 단백질 또는 이를 코딩하는 RUNX3 유전자, 및 TRAIL을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 인류의 건강을 위협하는 최대의 질병 중의 하나로서, 세포주가 일련의 돌연변이 과정을 거쳐, 무제한적이고 비조절적인 방식으로 불사화 되어 발생하는 질병이다. 암 발생의 원인으로는 화학물질, 바이러스, 세균, 전리방사선 등의 환경적 또는 외적 요인과 선천성 유전자 변이 등의 내적 요인을 들 수 있다(Klaunig & Kamendulis, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 44:239-267, 2004).

[0003] 초기에 발견된 암일 경우 수술, 방사선 치료, 화학적 요법 등의 치료법이 있으나 그 부작용 또한 큰 문제로 대두되고 있으며, 말기 암이나 전이된 암의 경우 특별한 치료법 없이 시한부 인생으로 삶을 마감하는 상황이다. 또한, 암과 관련된 다양한 생화학적 기전이 규명되고 그에 따른 치료제가 개발되어 오고 있으나, 아직까지 암에 대한 근본적인 치료방법은 제시되지 않고 있다.

[0004] TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand)은 종양괴사인자(Tumor necrosis factor, TNF)의 일종으로 종양세포의 자가 세포사멸을 유도하는 리간드로 알려져 있다. TRAIL은 4개의 수용체를 갖고 있으며, 상기 수용체 중 사멸 수용체(death receptor, DR4, DR5)는 암 세포주에서, 디코이 수용체(Decoy receptor, DcR1, DcR2)는 정상 세포주에서 과발현된다. 상기 TRAIL은 종양세포의 표면에 있는 DR4 및 DR5와 같은 사멸 수용체에 결합하여 종양세포의 사멸을 유도할 수 있다. 상기 디코이 수용체의 경우는 c-터미널 말단에 사멸 도메인을 가지고 있지 않아 세포사멸 신호전달이 세포 내로 전해지지 않는다. 따라서, TRAIL을 기반으로 하는 치료는 정상세포에 대해서는 무해하면서 다양한 암 세포주에 대해서만 독성을 유도한다는 특징을 가지고 있어 매우 효과적인 차세대 항암 치료제이다.

[0005] 그러나, TRAIL을 암세포주에 지속적으로 처리하면 TRAIL에 감수성을 보이던 암세포주도 점차 TRAIL에 대해 내성을 가지게 되는 것이 밝혀지게 되었다. 구체적으로, 많은 암세포는 사멸 수용체의 감소와 세포의 FLICE 유사 억제 단백질(cellular FLICE-like inhibitory protein, c-FLIP(L)), B-세포 림포마-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2), B-세포 림포마 엑스트라 라지(B-cell lymphoma-extra large, Bcl-xL) 또는 골수성 백혈병 세포-1(myeloid cell leukemia-1, Mcl-1)와 같은 항-세포사멸 단백질을 증가시키는 등 다양한 매커니즘을 통하여 TRAIL에 의해 유도된 세포사멸에 저항성을 나타내고 있다.

[0006] 따라서, 암세포에 대해 선택적으로 세포사멸을 유도할 수 있는 TRAIL의 내성을 극복하여 암세포 증식을 막고 세포사멸을 촉진시킬 수 있는 방법에 대한 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) KR 10-0475649 B

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 정상세포에는 영향을 주지 않고 선택적으로 암세포의 세포사멸을 유도하는 TRAIL의 내성을 극복하여 효과적으로 암세포의 세포사멸을 유도함으로써 항암 효과를 증진시킬 수 있는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기한 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 RUNX3 단백질 또는 이를 코딩하는 RUNX3 유전자, 및 TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 RUNX3 유전자를 포함하는 벡터, 또는 상기 벡터로 형질전환된 RUNX3 과발현 세포 또는 이의 배양액, 및 TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 RUNX3 단백질 또는 이를 코딩하는 RUNX3 유전자를 유효성분으로 포함하며, TRAIL(Tumor

necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)의 내성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 TRAIL의 항암 효과 증진용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 아울러, 본 발명은 RUNX3 단백질 또는 이를 코딩하는 RUNX3 유전자, 및 TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; Trail)을 인간을 제외한 포유동물의 암세포에 병용 투여하는 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 암 예방 또는 치료용 약학 조성물, TRAIL의 항암 효과 증진용 약학 조성물 및 암세포 사멸 증진 방법은 TRAIL 내성을 극복할 수 있는 RUNX3 단백질 또는 이를 코딩하는 RUNX3 유전자를 포함함으로써 TRAIL에 대한 내성을 보이는 암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 TRAIL에 의한 세포사멸 경로를 나타내는 모식도이다.

도 2는 대장암 세포(HCT116, DLD-1, Colo205, SNU283, HT29)에서 TRAIL에 의한 세포성장(cell viability)을 나타내는 그래프이다.

도 3는 RUNX3의 과발현이 대장암의 세포성장에 영향을 미치는 정도를 나타내는 세포성장(cell viability) 그래프이다.

도 4는 대장암 세포주(HT29, Colo205, DLD-1)에서 RUNX3 과발현이 TRAIL의 민감성에 끼치는 영향을 나타내기 위한 그래프이다.

도 5는 위암 세포주(AGS, MKN45) 또는 유방암 세포주(MCF-7, MDA-MB 231)에서 RUNX3 과발현이 TRAIL의 민감성에 끼치는 영향을 나타내기 위한 그래프이다.

도 6은 HT29 세포주에서 RUNX3 과발현시키고 TRAIL을 병용처리하는 경우 Apoptosis 인자들의 발현이 증가되는 것을 웨스턴 블랏 실험을 통해 단백질 수준에서 확인한 결과이다.

도 7은 RUNX3 과발현 대장암 세포주에서 TRAIL에 의한 apoptosis가 현저히 증가하는 것을 나타내는 그래프이다.

도 8은 HT29 세포주에서 RUNX3 과발현시키고 TRAIL과 함께 caspase 저해제를 처리하는 경우 RUNX3에 의해 증가되었던 TRAIL의 민감도가 없어진 것을 나타내는 것이다.

도 9은 RUNX3 과발현시 TRAIL 민감성에 중요하다고 알려진 DR5(Death receptor5)가 증가되는 것을 나타내는 웨스턴 블랏 실험 결과이다.

도 10은 RUNX3의 과발현에 의해 DR5가 증가되는 것을 형광면역염색을 통해서 나타내는 결과이다.

도 11은 HT29 세포주에서 RUNX3 과발현시키고 TRAIL과 함께 DR5 siRNA를 처리하는 경우 RUNX3에 의해 증가되었던 TRAIL의 민감도가 없어지는 것을 western blot을 통해 나타내는 것이다.

도 12는 HT29 세포주에서 RUNX3 과발현시키고 TRAIL과 함께 DR5 siRNA를 처리하는 경우 RUNX3에 의해 증가되었던 TRAIL의 민감도가 없어지는 것을 FACS를 통해 나타내는 것이다.

도 13은 RUNX3 과발현에 의해 ER Stress 관련 인자가 증가하는지를 확인하는 웨스턴 블랏 실험 결과이다.

도 14는 RUNX3가 ROS를 통해 ER stress를 증가시키는지 확인하기 위해 발생된 ROS를 측정한 결과를 나타내는 것이다.

도 15는 RUNX3 과발현에서 의해 ROS가 증가되어져 있음을 면역형광염색으로 나타낸 것이다.

도 16은 ROS 억제제인 NAC을 처리하여 확인한 결과, RUNX3에 의해 증가되었던 TRAIL 민감성이 NAC에 의해 차단되는 것을 나타내는 결과이다.

도 17은 RUNX3 과발현시 암 세포의 세포사멸을 억제하는 SOD3의 발현이 저해되는 것을 확인한 것이다.

도 18의 A는 xenograft를 통해 RUNX3의 유무에 따른 종양의 크기를 비교한 결과를 나타내는 사진이고, 도 18의 B는 5주령 누드마우스에 대장암 세포주 HT29와 RUNX3 과발현 세포주를 피하에 주사한 후 종양의 크기를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 도면을 참조하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0016] 본 발명의 발명자들은 암세포에 선택적으로 세포사멸을 유도할 수 있는 TRAIL의 내성을 극복할 수 있는 방법에 대하여 연구하던 중, RUNX3 단백질 또는 이를 코딩하는 RUNX3 유전자와 TRAIL을 암 세포에 병용 투여하는 경우, RUNX3의 과발현으로 인해 세포사멸 수용체인 DR5의 발현이 증대되며, 이로 인해 TRAIL에 의한 암 세포의 세포사멸이 증대되는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0017] 본 발명의 일 측면은 RUNX3 단백질 또는 이를 코딩하는 RUNX3 유전자, 및 TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0018] 본 발명에서, 상기 TRAIL은 일부 염기서열이 변이되거나 조작(engineered)된 TRAIL을 포함한다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 암 세포에 상기 RUNX3 단백질 또는 이를 코딩하는 RUNX3 유전자, 및 TRAIL을 병용처리한 경우 세포사멸이 증가하는 것을 확인할 수 있다. 구체적으로는, RUNX3의 과발현은 TRAIL의 세포사멸 수용체의 일종인 DR5의 발현을 증가시키고, 발현이 증가된 DR5가 TRAIL에 의해 유도되는 세포 사멸의 민감성을 증진시키는 것이 확인되었다. 따라서, RUNX3 단백질 또는 이를 코딩하는 RUNX3 유전자는 TRAIL과 함께 암 예방 또는 치료용 약학 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0020] 상기 약학 조성물은 RUNX3 단백질 또는 이를 코딩하는 RUNX3 유전자 1 내지 50 중량% 및 TRAIL 50 내지 99 중량%를 포함할 수 있다.

[0021] 상기 RUNX3 단백질은 하기 1) 내지 3)의 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0022] 1) 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열;

[0023] 2) 서열번호 1의 일부분으로 나타내는 아미노산 서열; 및

[0024] 3) 서열번호 1과 80% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열.

[0025] 상기 RUNX3 유전자는 RUNX3 cDNAM 또는 RUNX3 RNA인 것이 바람직하다.

[0026] 상기 RUNX3 단백질은 TRAIL 센서타이저(sensitizer)인 것이 바람직하다.

[0027] 본 발명에서 RUNX3 유전자는 상기 RUNX3 단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하며, 상기 염기서열에는 DNA, cDNA 및 RNA 서열이 모두 포함된다.

[0028] 본 발명에서 RUNX3 단백질은 DNA 재조합 기술을 사용하여 제조될 수 있으며 이를 위하여 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 구체적으로 RUNX3 단백질은 상기 RUNX3 유전자를 사용하여 세균, 효모, 식물 세포주 및 동물 세포주 내에서 재조합 방식으로 주입하는 유전공학 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0029] 상기 RUNX3 단백질 또는 이를 코딩하는 RUNX3 유전자는 TRAIL을 이용하여 암을 치료할 때 함께 사용되는 것이 바람직하다.

[0030] 상기 암은 대장암, 결장암, 췌장암, 간암, 자궁경부암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 폐암, 자궁암, 방광암 및 혈액암으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나인 것이 바람직하다.

[0031] 상기 조성물은 RUNX3 단백질 또는 이를 코딩하는 RUNX3 유전자에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상을 함유할 수 있다.

[0032] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명에 사용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조

에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등을 들 수 있다.

[0034] 상기 조성물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여 시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

[0035] 상기 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0036] 상기 조성물의 일일 투여량은 약 0.0001 내지 100 ㎎/㎏이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 ㎎/㎏이며, 하루 1회 내지 수회 나누어 투여하는 것이 바람직하나 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[0037] 상기 RUNX3 cDNA의 유효용량은 0.002 내지 1 ㎎/㎏이고, 바람직하게는 0.02 내지 0.2 ㎎/㎏이며, RUNX3 RNA의 유효용량은 0.001 내지 0.5 ㎎/㎏이고, 바람직하게는 0.01 내지 0.1 ㎎/㎏이며, 상기 RUNX3 단백질의 유효용량은 0.04 내지 4㎎/㎏이고, 바람직하게는 0.4 내지 1 ㎎/㎏이다.

[0038] 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 조성물은 사람 또는 동물용으로 투여될 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명은 RUNX3 유전자를 포함하는 벡터, 또는 상기 벡터로 형질전환된 RUNX3 과발현 세포 또는 이의 배양액, 및 TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0041] 상기 RUNX3 유전자는 RUNX3 cDNA 또는 RUNX3 RNA인 것이 바람직하고, 플라스미드 DNA 및 재조합 바이러스성 벡터로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 발현 벡터 내로 공지의 방법에 의해 도입될 수 있다.

[0042] 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 벡터는 상기 RUNX3 유전자가 삽입된 벡터를 말하며, 상기 벡터는 당업계에 공지된 플라스미드 DNA 및 재조합 바이러스성 벡터로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하다.

[0043] 상기 재조합 바이러스는 레트로 바이러스, 아데노 바이러스, 아데노 부속 바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 렌티바이러스로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0044] 본 발명에 따른 벡터는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 표적 세포 내에 도입할 수 있다. 예를 들어, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란=매개된 형질감염(DEAE Dextran-medeated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기침공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 및 세포 내로 핵산을 유입시키기 위한 다른 공지의 방법에 의해 세포 내로 도입할 수 있다.

[0045] 상기 세포는 조혈 줄기세포, 수지상 세포, 자가이식 종양세포(autologous tumor cells) 및 정착 종양세포(established tumor cells)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하다.

[0046] 본 발명에 따른 상기 벡터에 의하여 생산된 RUNX3 단백질은 TRAIL의 세포사멸 수용체인 DR5의 발현을 증대시키고, 이로 인해 TRAIL에 의한 세포사멸 민감성을 증대시킬 수 있다. 따라서, 상기 RUNX3 유전자를 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 RUNX3 과발현 세포 또는 이의 배양액은 TRAIL과 함께 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있다.

[0047] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적

용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명에 따른 조성물의 일일 투여량은 0.0001 ~ 10 ㎎/㎖이며, 바람직하게는 0.0001 ~ 5 ㎎/㎖이며, 하루 일 회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

[0048] 또한, 본 발명의 조성물은 벡터로 형질전환된 RUNX3 과발현 세포의 경우, 10^3 내지 10^8 개를 함유하는 것이 바람직하고, 10^4 내지 10^7개를 함유하는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0049] 상기 RUNX3 유전자를 포함하는 벡터 또는 세포를 유효성분으로 함유하는 조성물의 유효 용량은 체중 1 ㎏당 벡터의 경우에는 0.05 내지 12.5 ㎎/㎏, 재조합 바이러스의 경우에는 10^7 내지 10^{11} 바이러스 입자(10^5 내지 10^9 IU)/㎏, 세포의 경우에는 10^3 내지 10^6 세포/㎏이고, 바람직하게는 벡터의 경우에는 0.1 내지 10 ㎎/㎏, 재조합 바이러스의 경우에는 10^8 내지 10^{10} 입자(10^6 내지 10^8 IU)/㎏, 세포의 경우에는 10^2 내지 10^5 세포/㎏이며, 하루 2 내지 3회 투여될 수 있다. 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 신경 질환의 발병 정도에 따라 변할 수 있다.

[0050] 또한, 본 발명은 RUNX3 단백질 또는 이를 코딩하는 RUNX3 유전자를 유효성분으로 포함하며, TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)의 내성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 TRAIL의 항암 효과 증진용 약학 조성물을 제공한다.

[0051] 상기 RUNX3 단백질은 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0052] 상기 RUNX3 단백질은 TRAIL 센서타이저(sensitizer)인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0053] 상기 암은 대장암, 결장암, 췌장암, 간암, 자궁경부암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 폐암, 자궁암, 방광암 및 혈액암으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하고, 위암, 유방암 또는 대장암인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않으며, TRAIL에 대한 내성을 가진 암은 모두 포함되는 것이 바람직하다.

[0054] 또한, 본 발명은 RUNX3 단백질 또는 이를 코딩하는 RUNX3 유전자, 및 TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; Trail)을 인간을 제외한 포유동물의 암세포에 병용 투여하는 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법을 제공한다.

[0055] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0056] **실시예**

[0057] **실험예 1. 대장암 세포에서 TRAIL과 RUNX3가 세포 성장에 미치는 영향**

[0058] 대장암에서 Runx3의 발현량 증가 확인 - western blotting

[0059] pFlag-c1 또는 pFlag-c1 RUNX3를 대장암 세포(HCT116, DLD-1, Colo205, SNU283, HT29)에 transfection하여 RUNX3가 과발현되는 stable 세포주를 구축하였고, 과발현되어 있는지를 western blotting으로 확인하였다. 그리고, RUNX3가 과발현된 stable 세포주를 이용하여 Cell proliferation 측정하였다. 24시간 후 MTS solution을 넣어 4시간 반응 후 550nm에서 흡광도를 측정하여 cell viability를 확인하고 이를 도 2 및 도 3에 나타내었다.

[0060] 도 2는 대장암 세포(HCT116, DLD-1, Colo205, SNU283, HT29)에서 TRAIL에 의한 세포성장(cell viability)을 나타내는 그래프이고, 도 3은 RUNX3의 과발현이 대장암의 세포성장에 영향을 미치는 정도를 나타내는 세포성장(cell viability) 그래프이다.

[0061] 도 3을 살펴보면, 대장암 세포(HCT116, DLD-1, Colo205, SNU283, HT29) 중에서 HCT116이 TRAIL에 대한 sensitivity가 가장 높은 것을 알 수 있었다. 또한, 도 3을 살펴보면 RUNX3의 과발현에 의한 세포 성장의 변화는 큰 영향이 없는 것을 확인할 수 있었다.

[0062] **실험예 2. RUNX3의 과발현과 TRAIL의 병용효과**

[0063] RUNX3 과발현 세포주에서 TRAIL에 대해 민감성이 증가함을 확인 - Flow cytometry

[0064] 대장암 세포주(HT29, Colo205, DLD-1)에서 RUNX3 과발현이 TRAIL의 민감성에 영향을 끼치는지 알아보고자 하였다.

[0065] 이를 위하여 먼저, 대장암 세포주(HT29, Colo205, DLD-1)와 RUNX3 과발현 세포주를 seeding하였다. 그리고, 24시간 후 TRAIL(20 ng/ml)을 처리하고, 6시간 후 cell을 harvest하였다. Annexin V-FITC, PI(propidium iodide)로 염색하고 Flow cytometry 측정 기계를 이용하여 살아있는 세포 수를 측정하여 도 4에 나타내었다.

[0066] 도 4를 살펴보면, RUNX3 과발현된 세포에서 TRAIL에 의한 민감성이 더욱 높은 것을 확인할 수 있다.

[0067] 또한, 위암 세포주(AGS, MKN45) 및 유방암 세포주(MCF-7, MDA-MB 231)에서 RUNX3 과발현이 TRAIL의 민감성에 영향을 끼치는지 알아보고자 하였다.

[0068] 이를 위하여, 위암 세포주(AGS, MKN45) 및 유방암 세포주(MCF-7, MDA-MB 231)와 RUNX3 과발현 세포주를 각각 seeding하였다. 그리고, 24시간 후 TRAIL(20 ng/ml)을 처리하고, 6시간 후 cell을 harvest하였다. Annexin V-FITC, PI(propidium iodide)로 염색하고 Flow cytometry 측정 기계를 이용하여 살아있는 세포 수를 측정하여 도 5에 나타내었다.

[0069] 도 5를 살펴보면, RUNX3 과발현된 위암 세포 및 유방암 세포에서 TRAIL에 의한 민감성이 더욱 높은 것을 확인할 수 있다.

[0070] RUNX3 과발현 세포주에서 TRAIL에 대해 민감성이 증가함을 단백질 수준에서 확인 - Western blot

[0071] 대장암 세포주(HT29)와 RUNX3 과발현 세포주를 seeding하고, 24시간 후 TRAIL(20 ng/ml)을 처리하였다. 그리고, 6시간 후 harvest하여 lysis를 통하여 단백질을 모아 western blotting을 실시하였다. 그리고, 세포사멸에 관련된 marker를 사용하여 발현의 변화를 확인하였다.

[0072] 도 6은 HT29 세포주에서 RUNX3를 과발현시키고 TRAIL을 병용처리하는 경우 Apoptosis 인자들의 발현이 증가되는 것을 웨스턴 블랏 실험을 통해 단백질 수준에서 확인한 결과이다. 도 6을 살펴보면, HT29 세포주에서 RUNX3을 과발현시키고, TRAIL을 병용처리함으로써 Apoptosis 인자인 PARP, Caspase-3, Caspase-9, Caspase-8 등이 증가되는 것을 확인하였다.

[0073] 도 7은 RUNX3 과발현 대장암 세포주에서 TRAIL에 의한 apoptosis가 현저히 증가하는 것을 나타내는 그래프이다. 도 7을 살펴보면, HT29 Control 세포주에서는 TRAIL에 의한 apoptosis가 2%정도 증가하였는데 RUNX3 과발현 세포주에서는 TRAIL에 의한 apoptosis가 29% 증가됨을 FACS analysis를 통해서 확인하였다.

[0074] 이러한 apoptosis가 caspase에 의존적인 것인지 확인하기 위해 동일한 조건에서 caspase 저해제를 처리하는 실험을 하였다.

[0075] 도 8은 HT29 세포주에서 RUNX3 과발현시키고 TRAIL과 함께 caspase 저해제를 처리하는 경우 RUNX3에 의해 증가되었던 TRAIL의 민감도가 없어진 것을 나타내는 것이다.

[0076] 이러한 결과는 RUNX3에 의한 TRAIL 민감도 증가가 caspase를 통해서 일어난다는 것을 의미하는 것이다.

[0077] **실험예 3. 대장암 세포에서 RUNX3 과발현시 DR5 발현 증가**

[0078] RUNX3 과발현 시 Death receptor 단백질 발현 확인

[0079] RUNX3 과발현 됐을 때 pro-apoptotic, anti-apoptotic 단백질의 발현을 확인하고자 하였다.

[0080] 이를 위하여, 대장암 세포주(HT29)와 RUNX3 과발현 세포주를 seeding하였다. 그리고, 24시간 후 harvest하여 lysis를 통하여 단백질을 모아 western blotting을 실시하고, 이를 도 9에 나타내었다.

[0081] 도 9를 통해, RUNX3 과발현시 TRAIL 민감성에 중요하다고 알려진 DR5(Death receptor5)가 현저히 증가됨을 확인할 수 있었다.

[0082] RUNX3 과발현 시 DR5 발현 변화 확인- Immunofluorescence

[0083] 대장암 세포주(HT29)와 RUNX3 과발현 세포주를 seeding하였다. 그리고, 24시간 후 3.7% formaldehyde를 넣어서 고정화시키고, triton x100으로 항체의 투과율을 높여준 후 1차 항체, 2차 항체를 붙였다. DAPI 염색을 통하여 핵을 염색한 뒤 슬라이드에 마운팅 하여 confocal microscopy를 통하여 DR5 발현을 확인하였다.

[0084] 도 10은 RUNX3의 과발현에 의해 DR5가 증가되는 것을 형광면역염색을 통해서 나타내는 결과이다.

[0085] RUNX3의 과발현에 의한 DR5의 증가가 TRAIL 민감도에 미치는 영향

[0086] RUNX3의 과발현에 의한 DR5의 증가가 TRAIL 민감도에 영향을 끼치는지 확인하고자 하였다.

[0087] 이를 위하여 DR5 siRNA를 이용하여 DR5의 발현을 억제하였다.

[0088] 도 11은 HT29 세포주에서 RUNX3 과발현시키고 TRAIL과 함께 DR5 siRNA를 처리하는 경우 RUNX3에 의해 증가되었던 TRAIL의 민감도가 없어지는 것을 western blot을 통해 나타내는 것이다. 도 11의 경우, PARP의 과발현으로 인해 세포사멸이 유도됨을 확인할 수 있다.

[0089] 또한, 도 12는 HT29 세포주에서 RUNX3 과발현시키고 TRAIL과 함께 DR5 siRNA를 처리하는 경우 RUNX3에 의해 증가되었던 TRAIL의 민감도가 없어지는 것을 FACS를 통해 나타내는 것이다.

[0090] 이러한 결과들은 RUNX3 과발현에 의한 DR5 증가가 TRAIL에 의한 세포사멸 민감성을 증대시킨다는 것을 증명한다.

[0091] **실험예 4. 대장암 세포에서 RUNX3 과발현시 ROS의 증가**

[0092] DR5는 ROS-ER stress에 의해 증가된다고 알려져 있다. RUNX3에 의한 DR5의 증가가 ROS-ER Stress에 의한 것인지 확인하고자 하였다.

[0093] 이를 위하여 대장암 세포에서 RUNX3 과발현에 따른 ROS의 발생을 2,7-dicholorofluorescein diacetate(DCFH-DA) 염색을 통하여 Flow cytometry로 확인하고자 하였다.

[0094] 먼저, 대장암 세포주(HT29)와 RUNX3 과발현 세포주를 seeding하였다. 그리고 형광 probe인 DCFH-DA로 염색한 후 염색한 세포를 Flow cytometry를 통하여 10,000 여개의 cell을 찍어 ROS 발생을 관찰하였다.

[0095] 도 13은 RUNX3 과발현에 의해 ER Stress 관련 인자가 증가하는지를 확인하는 웨스턴 블랏 실험 결과이다.

[0096] 상기 도 13을 통해 RUNX3 과발현에 의해 ER Stress 관련 인자인 p-IRE1α, p-JNK, XBP1S 등이 증가됨으로써 RUNX3는 IRE1α를 통해서 ER stress가 유도되는 것을 알 수 있었다. 그리고, 상기 ER stress에 의해 DR5가 증가되는 것을 알 수 있었다.

[0097] 도 14는 RUNX3가 ROS를 통해 ER stress를 증가시키는지 확인하기 위해 발생된 ROS를 측정한 결과를 나타내는 것이다. 상기 도 14를 통해, RUNX3 과발현에 의해 ROS가 두 배 이상 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

[0098] 도 15는 RUNX3 과발현에서 의해 ROS가 증가되어져 있음을 면역형광염색으로 나타낸 것이다.

[0099] 도 16은 ROS 억제제인 NAC을 처리하여 확인한 결과, RUNX3에 의해 증가되었던 TRAIL 민감성이 NAC에 의해 차단되는 것을 나타내는 결과이다. 즉, PARP의 과발현되어 세포사멸이 유도됨을 확인할 수 있다. 도 16을 통해

RUNX3에 의한 TRAIL 민감성이 ROS 의존적인 것을 알 수 있다.

[0100] 이러한 결과들은 RUNX3가 ROS 유도를 통해 DR5를 증가시킬 뿐만 아니라 TRAIL 민감성을 증가시킨다는 것을 의미한다.

[0101] **실험예 5. 대장암 세포에서 RUNX3 과발현시 세포사멸 증가 확인**

[0102] RUNX3 과발현시 SOD3의 발현 변화 확인 - Western blot, Immunofluorescence

[0103] RUNX3의 과발현시에 세포사멸에 관련한 인자들의 발현의 변화를 단백질 수준에서 살펴보기 위한 실험을 실시하였다.

[0104] 이를 위하여 먼저, 대장암 세포주(HT29)와 RUNX3 과발현 세포주를 seeding하였다. 24시간 후 TRAIL(5 ng/ml)을 처리하고, 6시간 후 harvest하여 lysis를 통하여 단백질을 모아 western blotting을 실시하였다. 또한, RUNX3의 과발현시에 ROD3의 발현을 Immunofluorescence로 확인하였다.

[0105] 도 17은 RUNX3 과발현시 암 세포의 세포사멸을 억제하는 SOD3의 발현이 저해되는 것을 확인한 것이다.

[0106] 이와 같이 SOD3의 발현이 저해되는 경우 ROS가 증가하게 되고, 이로 인해 RUNX3에 의한 TRAIL 민감성이 증대된다.

[0107] RUNX3 과발현시 TRAIL에 의해 유도된 세포 사멸의 민감성이 증가함 - 종양크기 측정, xenograft

[0108] 이전의 결과들을 바탕으로 RUNX3의 과발현이 TRAIL에 의해 유도되는 세포 사멸의 민감성을 증진시키는 것을 동물실험을 통해 확인하고자 하였다.

[0109] 먼저, 5주령 Balb/c-nude mouse의 피하에 대장암 세포주(HT29)와 RUNX3 과발현 세포주를 주입하고 종양이 자라날 때까지 키웠다. 종양의 크기를 2-3일에 한번 측정하고, 일정한 크기(100 mm^3)가 되면 TRAIL을 복강에 주사하였다. 3일 간격으로 5번 TRAIL을 복강에 주사하고, xenograft를 통해 종양 크기의 차이를 확인하였다. 도 18의 A는 xenograft를 통해 RUNX3의 유무에 따른 종양의 크기를 비교한 결과를 나타내는 사진이고, 도 18의 B는 5주령 누드마우스에 대장암 세포주 HT29와 RUNX3 과발현 세포주를 피하에 주사한 후 종양의 크기를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

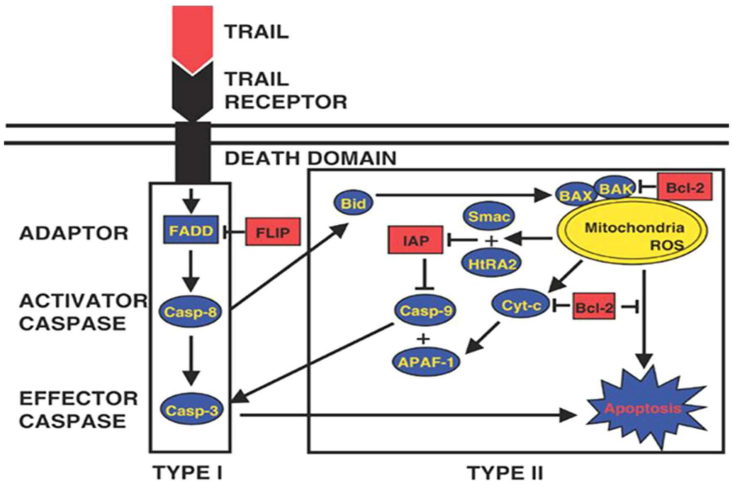
[0110] 5주령 누드마우스에 대장암 세포주 HCT116과 RUNX3 과발현 세포주를 피하에 주사한 후 종양의 크기를 측정한 결과 RUNX3이 과발현되었을 때 종양이 덜 형성되고, RUNX3 과발현 세포주에 TRAIL을 처리한 것이 종양이 자라는 속도가 늦는 것을 확인하였다(도 18B).

[0111] 그리고, xenograft를 통해 온전한 종양의 크기를 비교한 결과 마찬가지로 RUNX3이 과발현된 조건에서 TRAIL을 처리한 것의 종양의 크기가 가장 작았다(도 18A).

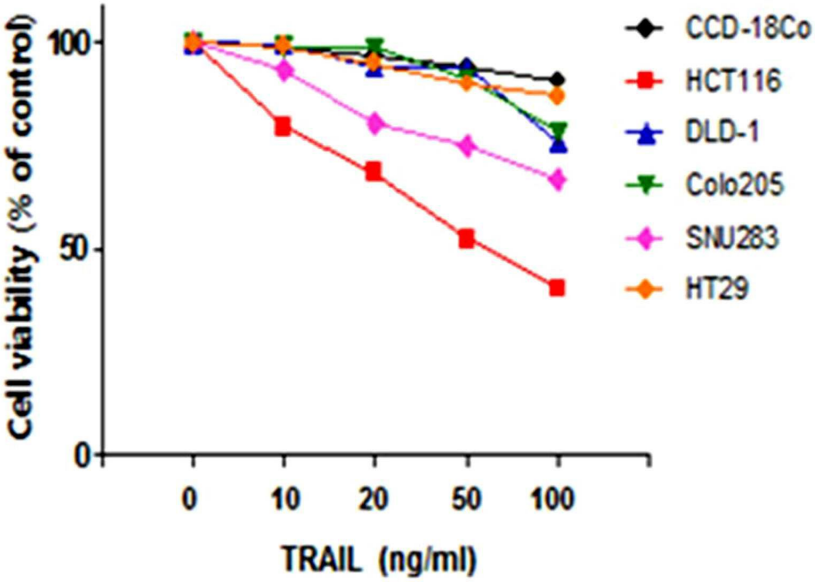
[0113] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

도면

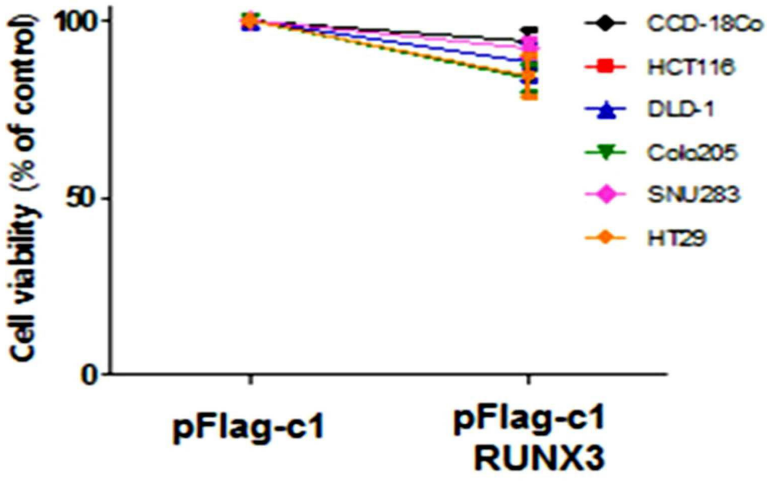
도면1


TRAIL
TRAIL RECEPTOR
DEATH DOMAIN
ADAPTOR
FADD
FLIP
ACTIVATOR CASPASE
Casp-8
EFFECTOR CASPASE
Casp-3
TYPE I
Bid
BAX
BAK
Bcl-2
Smac
IAP
HtRA2
Mitochondria ROS
Casp-9
APAF-1
Cyt-c
Bcl-2
Apoptosis
TYPE II

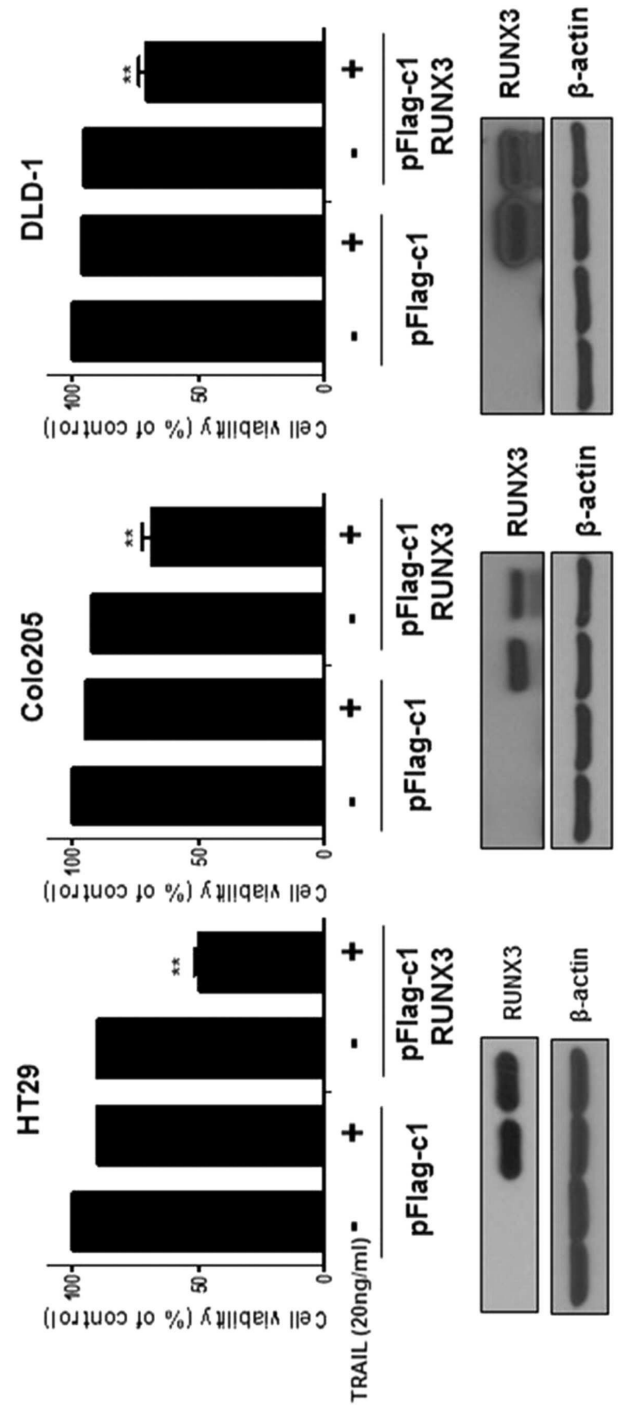
도면2


Cell viability (% of control)
100
50
0
0
10
20
50
100
TRAIL (ng/ml)
CCD-18Co
HCT116
DLD-1
Colo205
SNU283
HT29

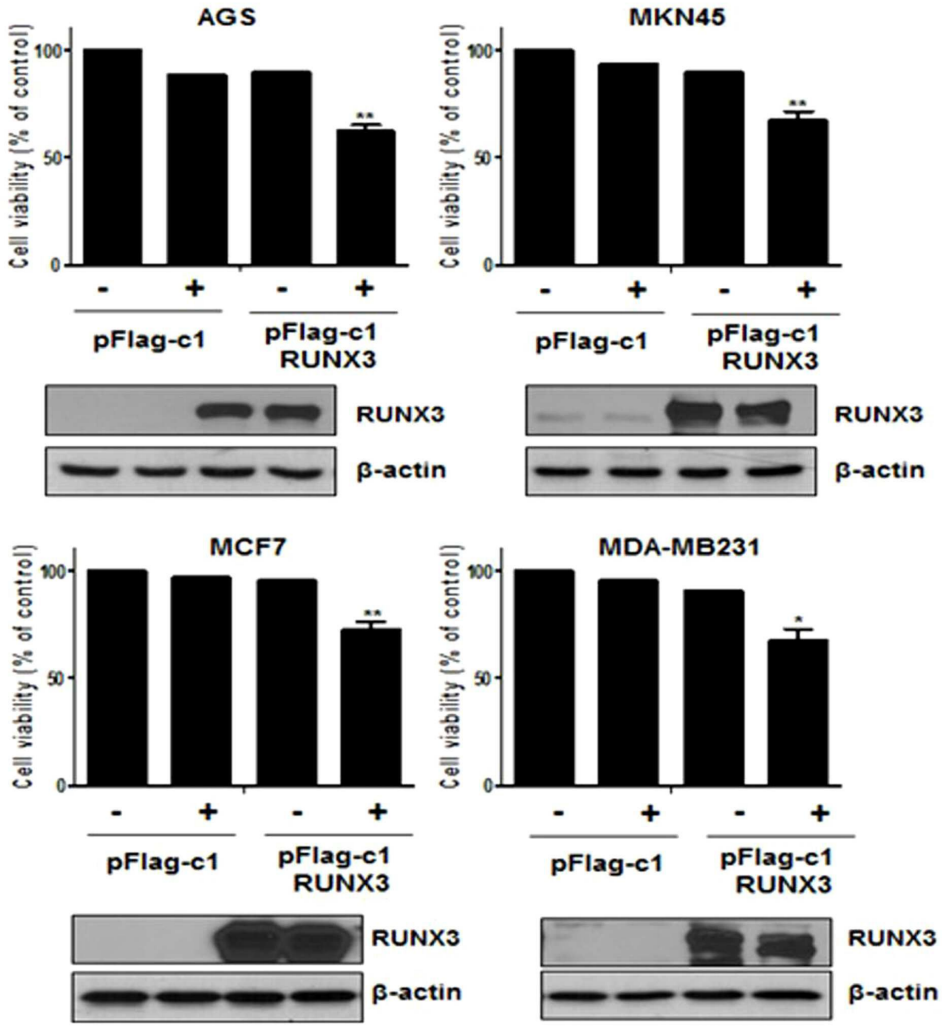
도면3


Cell viability (% of control)
100
50
0
pFlag-c1
pFlag-c1
RUNX3
CCD-18Co
HCT116
DLD-1
Colo205
SNU283
HT29

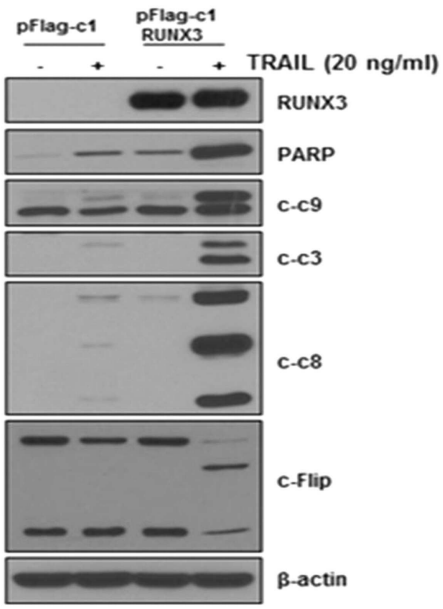
도면4


HT29
Colo205
DLD-1
Cell viability (% of control)
100
50
0
TRAIL (20ng/ml)
-
+
-
+
pFlag-c1
pFlag-c1 RUNX3
**
RUNX3
β-actin

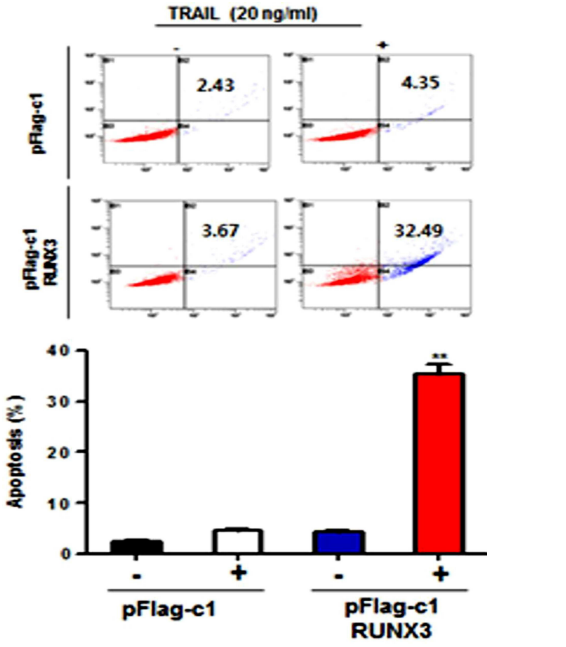
도면5


AGS
MKN45
MCF7
MDA-MB231
Cell viability (% of control)
100
50
0
**
*
-
+
pFlag-c1
pFlag-c1
RUNX3
RUNX3
β-actin

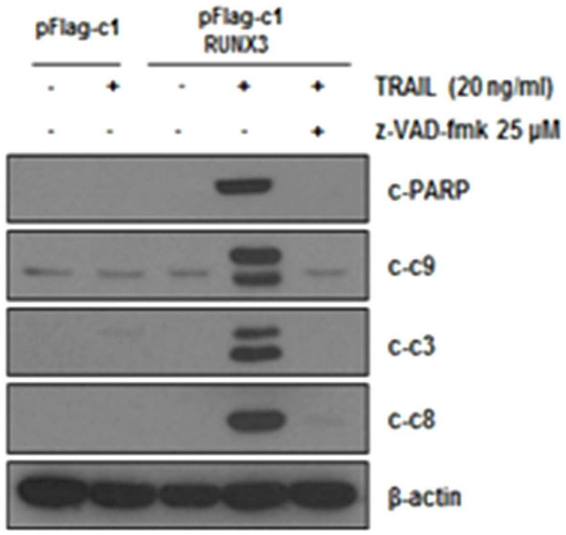
도면6


pFlag-c1
pFlag-c1
RUNX3
-
+
-
+
TRAIL (20 ng/ml)
RUNX3
PARP
c-c9
c-c3
c-c8
c-Flip
β-actin

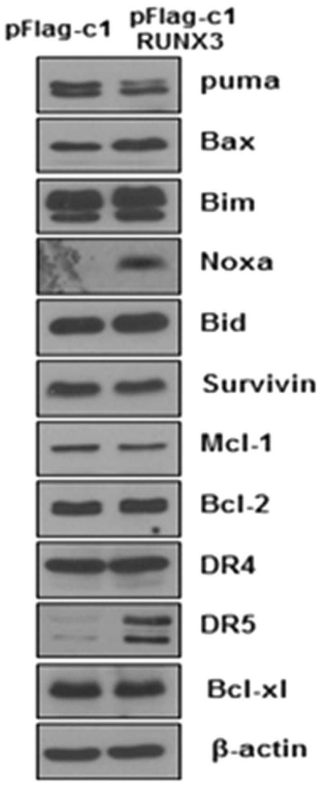
도면7


TRAIL (20 ng/ml)
pFlag-c1
pFlag-c1 RUNX3
2.43
4.35
3.67
32.49
Apoptosis (%)
40
30
20
10
0
**
-
+
-
+
pFlag-c1
pFlag-c1 RUNX3

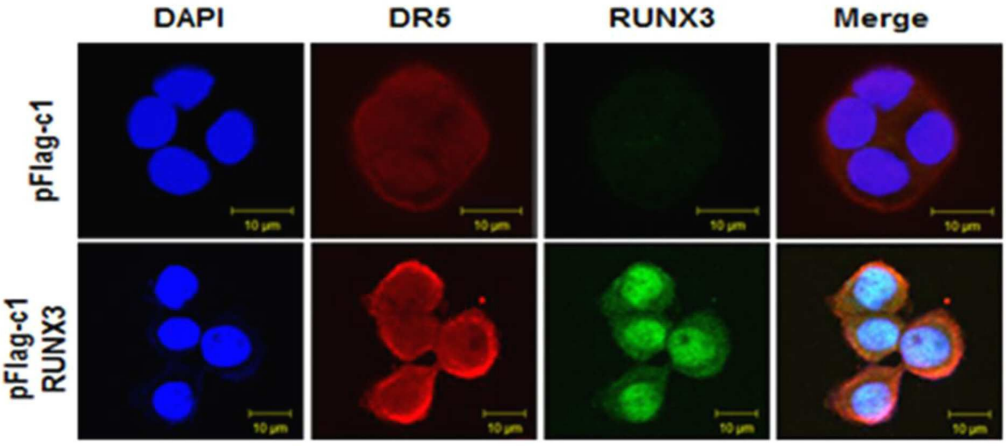
도면8


pFlag-c1
pFlag-c1 RUNX3
TRAIL (20 ng/ml)
z-VAD-fmk 25 μM
c-PARP
c-c9
c-c3
c-c8
β-actin

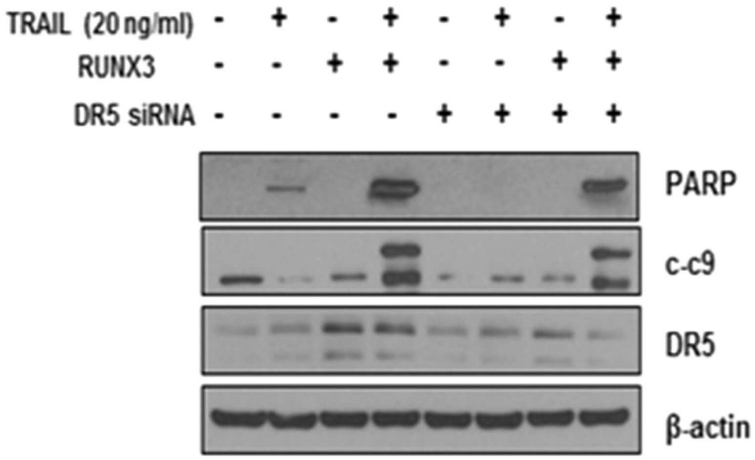
도면9


pFlag-c1
pFlag-c1
RUNX3
puma
Bax
Bim
Noxa
Bid
Survivin
Mcl-1
Bcl-2
DR4
DR5
Bcl-xl
β-actin

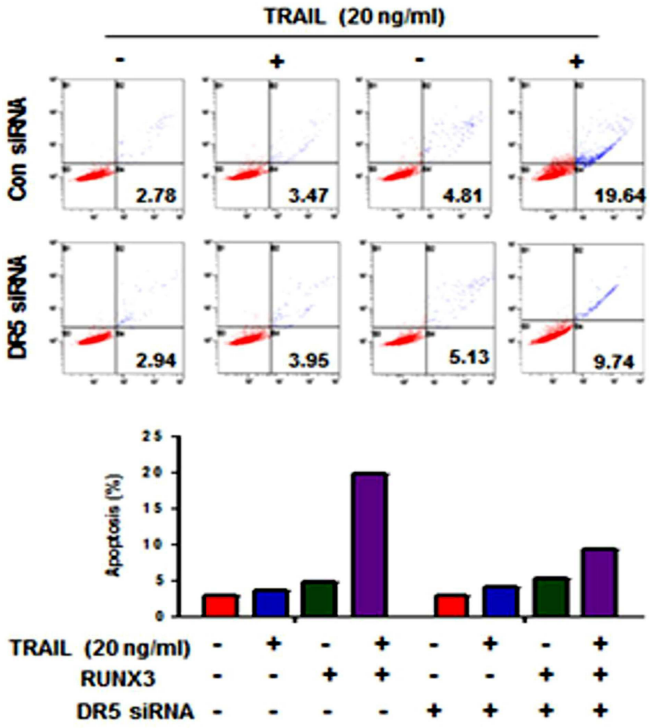
도면10


DAPI
DR5
RUNX3
Merge
pFlag-c1
pFlag-c1
RUNX3

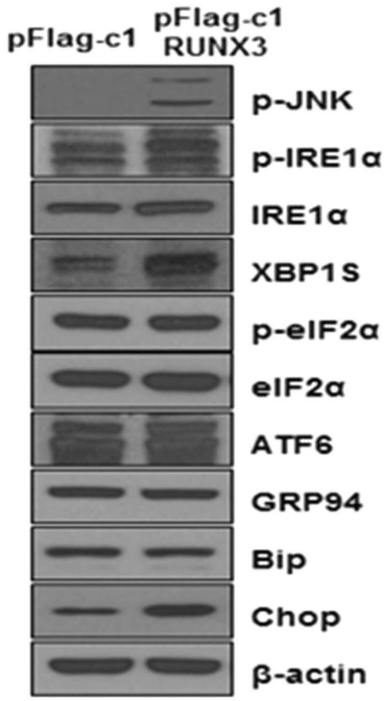
도면11


TRAIL (20 ng/ml) - + - + - + - +
RUNX3 - - + + - - + +
DR5 siRNA - - - - + + + +
PARP
c-c9
DR5
β-actin

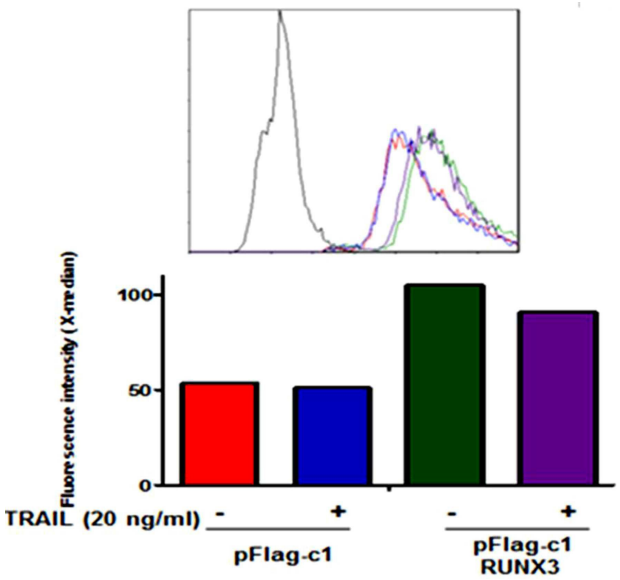
도면12


TRAIL (20 ng/ml)
- + - +
Con siRNA
2.78
3.47
4.81
19.64
DR5 siRNA
2.94
3.95
5.13
9.74
Apoptosis (%)
25
20
15
10
5
0
TRAIL (20 ng/ml) - + - + - + - +
RUNX3 - - + + - - + +
DR5 siRNA - - - - + + + +

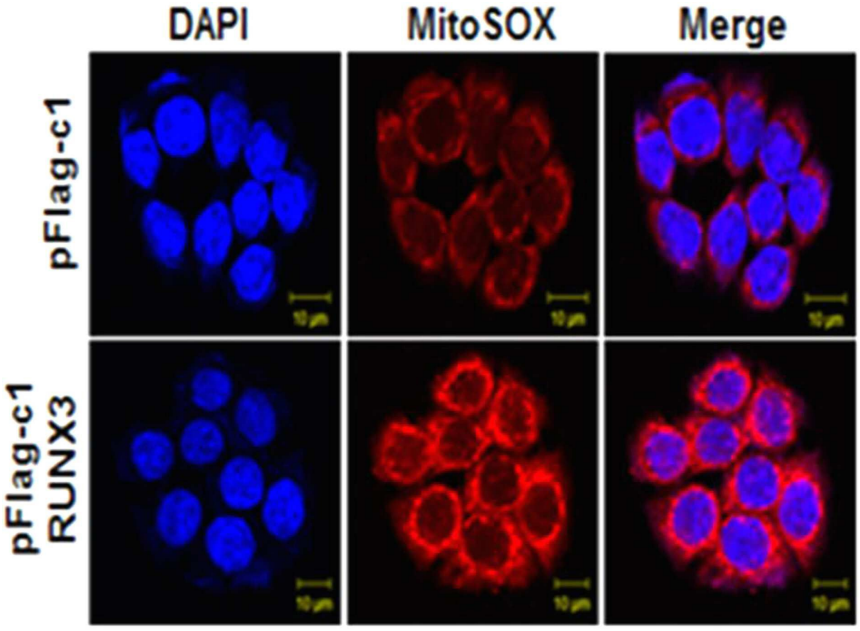
도면13


pFlag-c1
pFlag-c1
RUNX3
p-JNK
p-IRE1α
IRE1α
XBP1S
p-eIF2α
eIF2α
ATF6
GRP94
Bip
Chop
β-actin

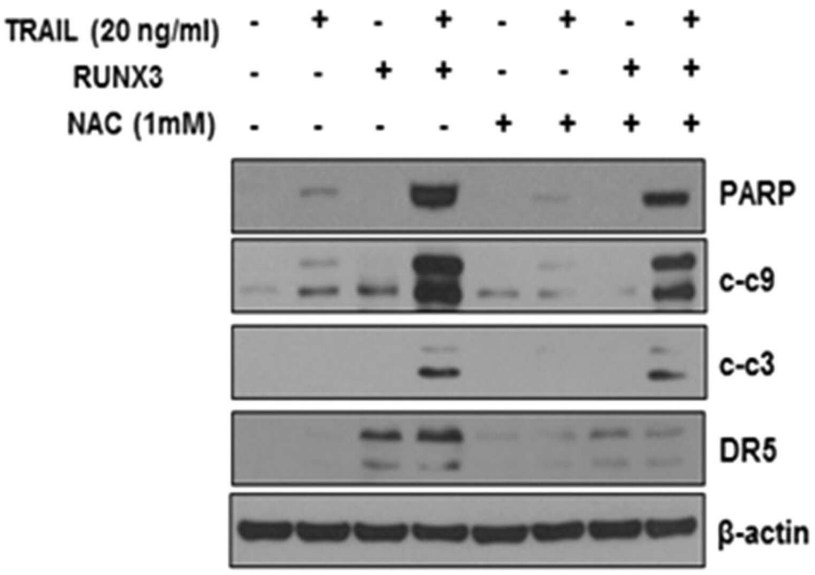
도면14


Fluorescence intensity (X-median)
100
50
0
TRAIL (20 ng/ml)
-
+
-
+
pFlag-c1
pFlag-c1
RUNX3

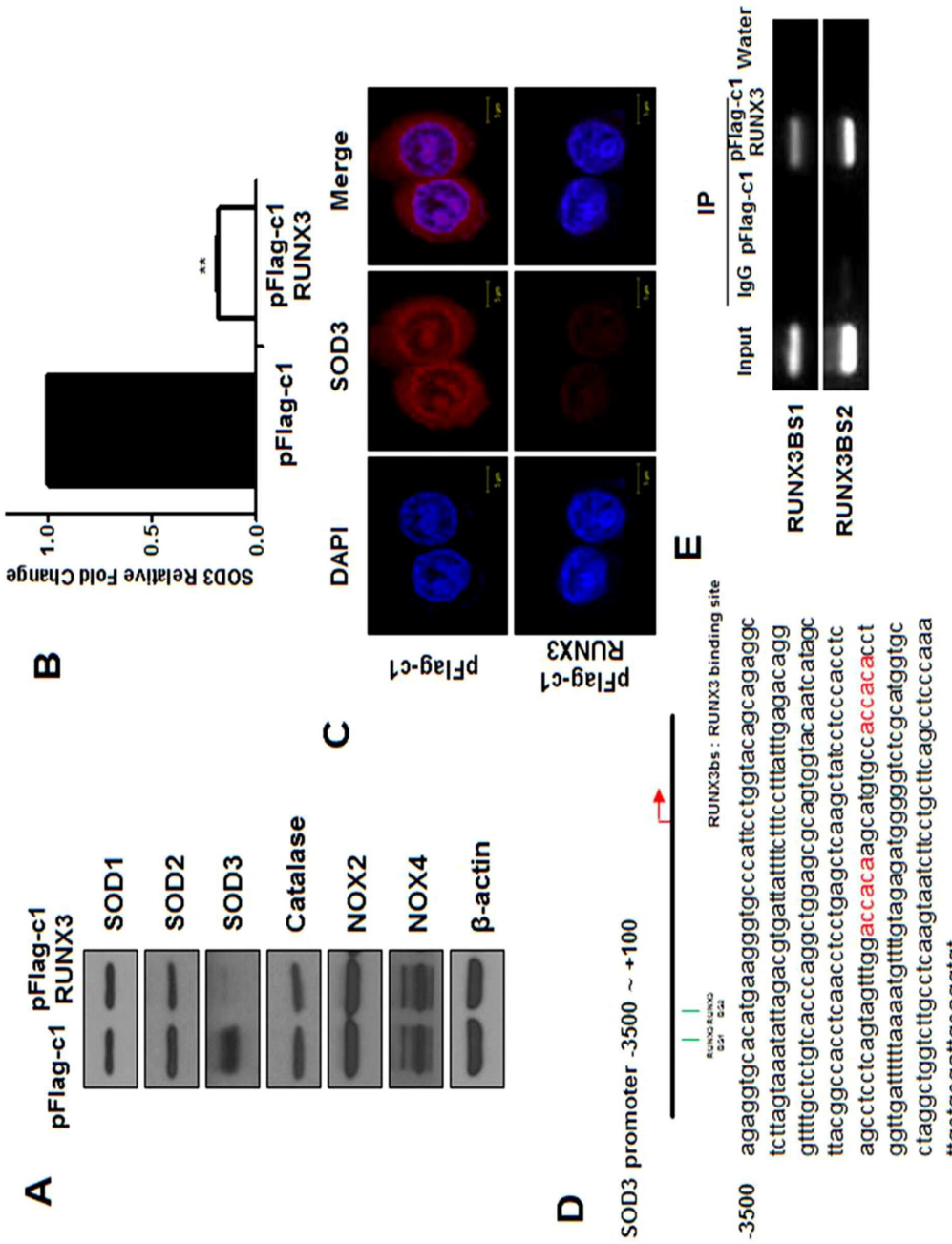
도면15


DAPI
MitoSOX
Merge
pFlag-c1
pFlag-c1
RUNX3

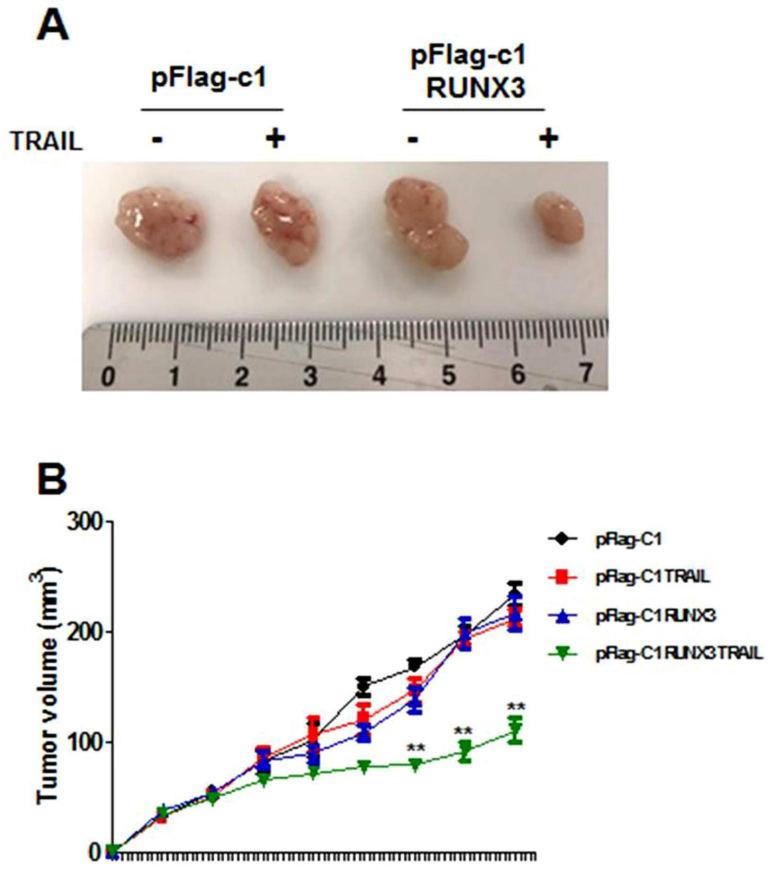
도면16


TRAIL (20 ng/ml) - + - + - + - +
RUNX3 - - + + - - + +
NAC (1mM) - - - - + + + +
PARP
c-c9
c-c3
DR5
β-actin

도면17


A
pFlag-c1
pFlag-c1 RUNX3
SOD1
SOD2
SOD3
Catalase
NOX2
NOX4
β-actin
B
SOD3 Relative Fold Change
1.0
0.5
0.0
**
pFlag-c1
pFlag-c1 RUNX3
C
DAPI
SOD3
Merge
pFlag-c1
pFlag-c1 RUNX3
D
SOD3 promoter -3500 ~ +100
RUNX3bs : RUNX3 binding site
-3500
agaggtgcacatgaagggtgcccattcctggtacagcagaggc
tcttagtaaatattagacgtgattatttctttccttattgagacagg
gttttgctctgtcacccaggctggagcgcagtggtacaatcatagc
ttacggccacctcaacctcctgagctcaagctatcctcccacctc
agcctcctcagtagttggaccacaagcatgtgccaccacacct
ggttgatttttaaaatgttttgtagagatggggtctcgcatggtgc
ctaggctggtcttgcctcaagtaatcttcctgcttcagcctcccaaa
ttgctgcgattgcaggtgt
E
IP
Input
IgG
pFlag-c1
pFlag-c1 RUNX3
Water
RUNX3BS1
RUNX3BS2

도면18



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Pharmacological composition containing a RUNX3 protein or RUNX3 gene for the prevention and treatment of cancer

<130> HPC-7677

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 415

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human RUNX3

<400> 1

Met Arg Ile Pro Val Asp Pro Ser Thr Ser Arg Arg Phe Thr Pro Pro
1 5 10 15

Ser Pro Ala Phe Pro Cys Gly Gly Gly Gly Gly Lys Met Gly Glu Asn

20 25 30

Ser Gly Ala Leu Ser Ala Gln Ala Ala Val Gly Pro Gly Gly Arg Ala

35 40 45

Arg Pro Glu Val Arg Ser Met Val Asp Val Leu Ala Asp His Ala Gly

50 55 60

Glu Leu Val Arg Thr Asp Ser Pro Asn Phe Leu Cys Ser Val Leu Pro

65 70 75 80

Ser His Trp Arg Cys Asn Lys Thr Leu Pro Val Ala Phe Lys Val Val

85 90 95

Ala Leu Gly Asp Val Pro Asp Gly Thr Val Val Thr Val Met Ala Gly

100 105 110

Asn Asp Glu Asn Tyr Ser Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Ala Val Met

115 120 125

Lys Asn Gln Val Ala Arg Phe Asn Asp Leu Arg Phe Val Gly Arg Ser

130 135 140

Gly Arg Gly Lys Ser Phe Thr Leu Thr Ile Thr Val Phe Thr Asn Pro

145 150 155 160

Thr Gln Val Ala Thr Tyr His Arg Ala Ile Lys Val Thr Val Asp Gly

165 170 175

Pro Arg Glu Pro Arg Arg His Arg Gln Lys Leu Glu Asp Gln Thr Lys

180 185 190

Pro Phe Pro Asp Arg Phe Gly Asp Leu Glu Arg Leu Arg Met Arg Val

195 200 205

Thr Pro Ser Thr Pro Ser Pro Arg Gly Ser Leu Ser Thr Thr Ser His

210 215 220

Phe Ser Ser Gln Pro Gln Thr Pro Ile Gln Gly Thr Ser Glu Leu Asn

225 230 235 240

Pro Phe Ser Asp Pro Arg Gln Phe Asp Arg Ser Phe Pro Thr Leu Pro

245 250 255

Thr Leu Thr Glu Ser Arg Phe Pro Asp Pro Arg Met His Tyr Pro Gly

260 265 270

Ala Met Ser Ala Ala Phe Pro Tyr Ser Ala Thr Pro Ser Gly Thr Ser

```
        275                 280                 285
Ile Ser Ser Leu Ser Val Ala Gly Met Pro Ala Thr Ser Arg Phe His
    290                 295                 300
His Thr Tyr Leu Pro Pro Pro Tyr Pro Gly Ala Pro Gln Asn Gln Ser

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

Ser Asp Gly Val Glu Ala Asp Gly Ser His Ser Asn Ser Pro Thr Ala
385                 390                 395                 400
Leu Ser Thr Pro Gly Arg Met Asp Glu Ala Val Trp Arg Pro Tyr
                405                 410                 415
```