(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0021470
(43) 공개일자 2018년03월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/16 (2013.01)
C07K 14/47 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0106060
(22) 출원일자 2016년08월22일
심사청구일자 2016년08월22일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
강릉원주대학교산학협력단
강원도 강릉시 죽헌길 7(지변동)
(72) 발명자
최수영
강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 706호 (후평동, 동아아파트)
김대원
강원도 강릉시 교동광장로 138-12, 302동 201호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 **세포투과성 Atox1 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물**

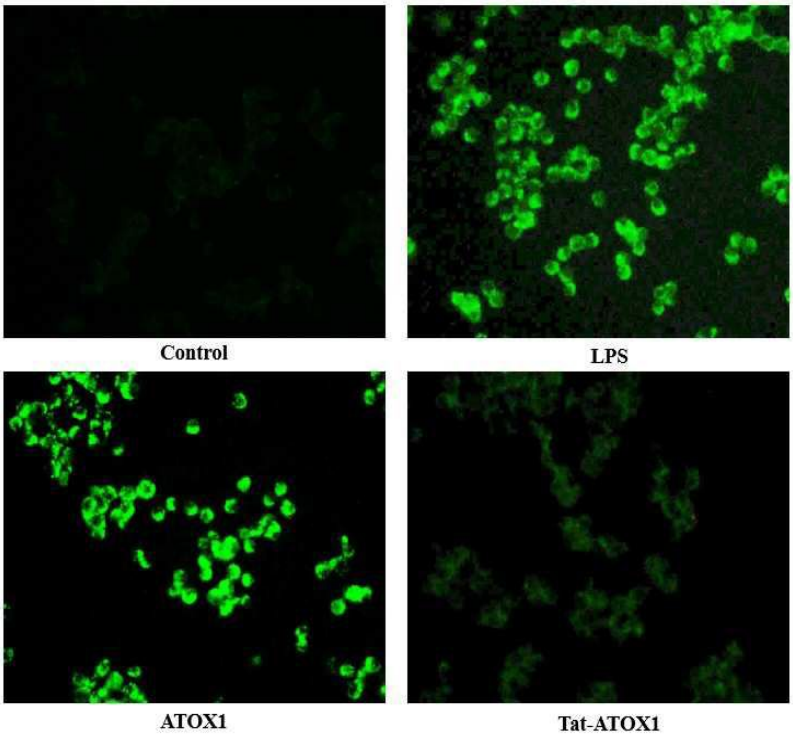
(57) 요 약

과제: 부작용이 적거나 없으며, 효과가 우수한 항염증 치료용 약제를 제공하는 것.

해결수단: 본 발명은 세포투과성 Atox1 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물에 관한 것으로서, 세포 내로 투과된 Atox1 융합단백질은 과산화수소 독성에 대해 세포생존율을 증가시키고, 활성산소종 수준을 감소시켜 세포

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도6



보호 작용을 하였다. LPS-유도된 COX2와 iNOS 단백질 발현 수준을 투여량 의존적으로 현저히 감소시켰다. 또한, Tat-Atox1 융합단백질은 고농도 LPS로 유도된 염증반응을 억제하였다. 뿐만 아니라, Tat-Atox1 융합단백질은 피부 염증에서 초기에 일어나는 단핵세포 (monocyte)와 같은 염증세포의 침윤을 현저히 저해하였고, TPA로 유도되는 동물 염증모델에서 COX-2 발현 수준과 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 생성을 현저히 감소시켰고, TPA로 유도되는 피부염증 동물모델에서 TPA로 유도되는 p38, ERK 및 JNK 인산화와 p65와 IκBα인산화를 저해하였다. 이는 투과된 Tat-Atox1 융합단백질이 세포자기사멸 경로를 저해함으로써 과산화수소로 유도되는 세포사멸로부터 세포를 보호 효과가 있으며, 염증 치료효과가 있음을 말해준다.

(52) CPC특허분류

C07K 7/06 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

(72) 발명자

음원식

강원도 춘천시 후석로 325, 포스코더샵아파트 112동 802호 (후평동)

신민재

인천광역시 남구 낙섬중로 18, 1-1201 (용현동, 대림아파트)

조효상

경기도 구리시 체육관로 163-12

김덕수

충청남도 천안시 동남구 다가6길 6, 301호 (그린빌, 다가동)

박진서

강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 1404호 (후평동, 동아아파트)

한규형

강원도 춘천시 새청말길 26, 107동 1402호 (강변코아루아파트, 우두동)

이근욱

서울특별시 동작구 동작대로39길 22, 113동 805호 (동작동, 이수힐스테이트)

조윤신

강원도 강릉시 화부산로99번길 12, 104동 802호 (강릉교동롯데캐슬아파트, 교동)

손오라

경기도 양주시 백석읍 중앙로223번길 123-21

손은정

경기도 남양주시 비룡로116번길 35, 306동 404호 (마석역신도브래뉴 3차 아파트, 묵현리)

김현아

서울특별시 강남구 남부순환로 2803, 102동 802호 (삼성래미안아파트, 도곡동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093812

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 새로운 Biomolecule Delivery System을 이용한 질환 치료제 개발 : 질환치료용 생리활성 고분자 신소재 물질 탐색 및 개발

기 여 율 1/2

주관기관 한림대학교

연구기간 2015.09.01 ~ 2016.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1D1A3A01015668

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 지역대학우수과학자

연구과제명 도파민 세포 침투성 Antioxidant 1 융합 단백질을 통한 파킨슨병 보호 기전 연구

기 여 율 1/2

주관기관 강릉원주대학교

연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

Atox1 (Antioxidant 1) 단백질의 N-말단 및 C-말단 중 한 군데 이상에 단백질 수송 도메인이 공유결합된 Atox1 융합단백질을 함유하는 염증 치료제 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 HIV Tat 펩타이드임을 특징으로 하는 Atox1 융합단백질을 함유하는 염증 치료제 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 융합단백질은 서열번호 4, 6 또는 8인 것을 특징으로 하는 Atox1 융합단백질을 함유하는 염증 치료제 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포투과성 Atox1 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 활성산소종 (ROS; Reactive Oxygen Species)은 산소와의 상호작용 및 거대분자의 손상을 포함한 다양한 세포 대사과정의 부산물로 자연스럽게 생성된다. 활성산소종의 생성과 소멸 과정의 불균형으로 세포의 구조와 기능을 바꿈으로써 세포는 손상을 받으며, 장기간 활성산소종에 노출되면 과산화 지방질 생성, DNA 손상, 세포의 염증 및 사멸, 더 나아가 암, 알츠하이머, 파킨슨, 헌팅턴 등 여러 가지 질환이 발병한다. 세포의 산화반응 조절 기능을 하는 활성산소종은 그것의 생성과 소멸이 균형을 맞추면서 면역 체계에 중요한 역할을 한다. 많은 연구자들은 활성산소종에 의해 나타나는 염증 및 노화에 초점을 맞추고 있다.

[0003] ATX1으로 알려져 있는 Atox1 (Antioxidant 1)은 68개의 아미노산으로 구성되어 있다. Atox1은 구리 섀퍼론으로 구리 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 구리는 모든 생물체에서 필수적이며 진핵 세포의 호흡 과정, 항산화 및 철 대사 등 많은 생화학적 과정에 관여하는 촉매의 공통인자로서 중요하다. Atox1은 후기골지망에서 ATPase (adenosine triphosphatase)를 세포질의 구리에 제공함으로써 구리와 결합하는 혈액 중의 산화효소인 세룰로플라스민을 활성화하며, 과산화물과 과산화수소로 유도된 독성으로부터 세포를 보호하여 항산화제로서 작용하고, 산화 스트레스로 인한 질병의 발생 과정에 영향을 미친다.

[0004] 단백질의 형질도입은 포유류의 세포에 다양한 외인성 단백질을 전달하는 단백질 수송 도메인 (protein transduction domains; PTDs)을 사용한다. 진핵 세포는 단백질 및 핵산 등 거대 분자의 전달을 제한하는 지질 이중층으로 이루어진 원형질막으로 싸여있으며, 단백질 또한 크기와 낮은 침투성 및 생화학적 특성 때문에 조직 또는 세포 내로의 투과에 제약이 따른다. 이러한 한계를 극복하기 위한 단백질 수송 도메인의 주요 아미노산 서열은 세포막에 침투할 수 있는 능력이 있기 때문에 많은 연구에서 거대 분자를 전달하는 방법으로 이용된다. 정확한 메커니즘이 밝혀지지 않았지만, 단백질 수송 도메인과 공유결합한 융합단백질은 시험관 내 (*in vitro*) 및 생체 내 (*in vivo*)에서 다양한 단백질을 세포 내부로 전달하는데 널리 사용되고 있다. Tat-펩타이드는 HIV-1 Tat 펩타이드 (RKKRRQRRR; Tat 49-57 a.a.)로부터 유래했으며, 가장 많이 사용되는 단백질 수송 도메인이다. 세

포 내에 효율적으로 형질도입될 수 있는 Tat-펩타이드는 안정성이 우수하고, 독성이 거의 없으며 혈청에 민감하지 않은 이점을 가진다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 염증 질환에 유용한 치료용 약학 조성물을 제공하려는 것을 목표로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명자들은 과산화수소에 의한 산화 스트레스로 유도된 세포사멸에서 형질도입된 Tat-Atox1 융합단백질의 기능을 조사하였다. Atox1과 Tat 펩타이드를 융합하여 Tat-Atox1 융합단백질을 제조하였고, Raw 264.7 세포 내에 효과적으로 형질도입되는 것을 확인하였다. 또한, Raw 264.7 세포에 산화 스트레스를 유도하였으며 과산화수소로 유도된 세포사멸에서 Tat-Atox1 융합단백질의 세포보호 효과를 살펴보았다. 산화 스트레스가 유도된 Raw 264.7 세포에서 항 세포사멸 단백질의 발현을 확인한 결과, Tat-Atox1 융합단백질의 농도에 비례하여 세포사멸이 억제되는 것을 알 수 있었다. 따라서, Tat-Atox1 융합단백질은 Raw 264.7 세포 내로 잘 투과하고, 산화 스트레스로 유도된 활성산소종의 생성과 세포사멸을 억제하여 세포를 보호함을 알 수 있었다. 이것은 Raw 264.7 세포에 형질도입된 Tat-Atox1 융합단백질이 세포사멸을 방지하고, 산화 스트레스로 인한 Raw 264.7 세포 염증질환의 치료제로 이용 가능함을 말해준다.

[0008] 본 발명은 Atox1 (Antioxidant 1) 단백질의 N-말단 및 C-말단 중 한 군데 이상에 단백질 수송 도메인이 공유결합된 Atox1 융합단백질을 함유하는 염증질환 치료제 조성물에 관한 것이다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송 도메인이 HIV Tat 펩타이드임을 특징으로 하는 Atox1 융합단백질을 함유하는 염증 치료제 조성물에 관한 것이다.

[0010] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 융합단백질이 서열번호 4, 6, 또는 8인 것을 특징으로 하는 Atox1 융합단백질을 함유하는 염증 치료제 조성물에 관한 것이다.

[0012] Atox1 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약학 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 경구 또는 주사 형태로 제형화할 수 있다. 경구용 조성물로는 예를 들면 정제 및 젤라틴 캡슐이 있으며, 이들은 활성 성분 이외에도 희석제(예: 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활탁제(예: 실리카, 탤크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)을 함유하고, 정제는 또한 결합제(예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸셀룰로스 및/또는 폴리비닐피롤리돈)를 함유하며, 경우에 따라서 붕해제(예: 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염) 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보조제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위함 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료상 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0013] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 경구로 투여하거나, 비경구 방식 즉, 정맥 내, 피하, 복강 내 투여 또는 국소적용할 수 있다. 용량은 일일 투여량 0.0001~100mg/kg을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0015] 본 발명에 따른 Atox1 단백질 분자의 세포 내 전달은 Atox1에 15~30개의 아미노산으로 구성되고, 5개 이상의 트립토판을 포함하는 비친수성 도메인(hydrophobic domain), 라이신을 4개 이상 다수 포함하는 친수성 도메인(hydrophilic domain) 및 상기 두 도메인을 분리시켜 주는 스페이서(spacer)로 구성된 수송 도메인이 공유결합된, Pep-1을 비롯한 세포투과성 수송도메인 또는 HIV Tat 세포투과성 도메인이 목표 단백질인 Atox1의 N-말단 및/또는 C-말단과 공유결합된 형태의 융합단백질을 구성하여 수행된다. 본 발명의 상기 수송도메인의 일례로는 Pep-1 펩타이드, HIV Tat 49~57 펩타이드를 들 수 있다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 Pep-1 펩타이

드, HIV Tat 49~57 잔기 펩타이드로만 한정되는 것은 아니고, Pep-1 또는 HIV Tat의 아미노산 서열 일부 치환이나 부가, 결여로 Pep-1 펩타이드 또는 HIV Tat 펩타이드와 유사한 기능을 하는 펩타이드를 제조하는 것이 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 당업자에게는 용이하므로, 15~30개의 아미노산으로 구성되고, 5개 이상의 트립토판을 포함하는 비친수성 도메인(hydrophobic domain), 라이신을 4개 이상 다수 포함하는 친수성 도메인(hydrophilic domain) 및 상기 두 도메인을 분리시켜 주는 스페이서(spacer)로 구성된 단백질 수송 도메인과 이로부터 아미노산 일부 치환으로 동일·유사한 단백질 수송기능을 수행하는 단백질 수송 도메인, 또는 6 내지 12개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인, 6 내지 12개의 라이신으로 구성되는 올리고라이신 수송 도메인, 6 내지 12개의 아르기닌으로 구성되는 올리고아르기닌 수송 도메인 또는 6 내지 12개의 라이신 또는 아르기닌으로 구성되는 올리고(라이신,아르기닌) 수송 도메인도 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.

[0017] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.

[0018] "Atox1 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 Atox1을 포함하며, 단백질 수송 도메인과 화물 분자(cargo molecule, 즉 본 발명에서는 Atox1을 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서와 도면에서 구체적인 일 실시예로서 "Tat-Atox1"은 Atox1 융합단백질 중 Atox1의 N-말단에 Tat 단백질 수송 도메인이 결합한 것을 말한다.

[0019] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.

[0020] 또한, "표적 세포"란 수송 도메인에 의해 화물 분자가 전달되는 세포를 의미하는 것으로서 즉, 표적 세포는 체내 세포, 다시 말하여 살아있는 동물 또는 인간의 장기 또는 조직을 구성하는 세포 또는 살아있는 동물 또는 인간에서 발견되는 미생물을 포함하는 의미이다. 또한, 표적 세포는 체외 세포, 즉 배양된 동물 세포, 인체 세포 또는 미생물을 포함하는 의미이다. 구체적으로 본 발명의 실시예에서 표적 세포는 Raw 264.7 세포를 의미한다.

[0021] 본 명세서의 "단백질 수송 도메인"은 화물 분자(목표 단백질) 펩타이드 또는 단백질과 공유결합을 이루어 별도의 수용체나 운반체, 에너지를 필요로 하지 않고 상기 펩타이드나 단백질을 세포 내로 도입할 수 있는 것을 말하며, 예를 들면 HIV-1 Tat를 말한다.

[0022] 본 명세서의 "목표 단백질"은 Tat 단백질 수송 도메인과 공유결합을 이루어 세포 내로 도입되어 활성을 나타내는 분자를 의미한다. "화물 분자"와 동일한 의미이다.

[0023] 또한, 본 명세서에서는 단백질 또는 펩타이드를 세포 내로 "도입"하는 것에 대하여 "형질도입", "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.

[0025] 본 발명에서 단백질 수송 도메인으로는 15~30개의 아미노산으로 구성되고, 5개 이상의 트립토판을 포함하는 비친수성 도메인, 라이신을 다수 포함하는 친수성 도메인 및 상기 두 도메인을 분리시켜 주는 스페이서로 구성된 단백질 수송 도메인, 6 내지 12개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인, 6 내지 12개의 라이신으로 구성되는 올리고라이신 수송 도메인, 6 내지 12개의 아르기닌으로 구성되는 올리고아르기닌 수송 도메인 또는 6 내지 12개의 라이신 또는 아르기닌으로 구성되는 올리고(라이신,아르기닌) 수송 도메인을 들 수 있다. 또한, 목표 단백질(화물 분자)은 Atox1이다. 상기 단백질 수송 도메인 및 목표 단백질은 silent change에 따라 서열 내에서 하나 이상의 아미노산이 기능적으로 동등하게 작용하는 유사한 극성의 다른 아미노산(들)로 치환될 수 있다. 서열 내 아미노산 치환은 그 아미노산이 속하는 클래스의 다른 구성원들로부터 선택될 수 있다. 예컨대, 소수성 아미노산 분류는 알라닌, 발린, 류이신, 이소류이신, 페닐알라닌, 발린, 트립토판, 프롤린 및 메티오닌을 포함한다. 극성 중성 아미노산은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함한다. 양성 염기성 아미노산은 아르기닌, 라이신 및 히스티딘을 포함한다. 음성 전하를 띤 산성 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 또한, 본 발명의 융합단백질과 아미노산 서열 간의 일정 범위의 상동성, 예컨대 85-100% 범위 내에서 동일·유사한 생물학적 활성을 갖는 절편 또는 이들의 유도체들도 본 발명의 권리범위에 포함된다.

[0026] 본 발명에서 정의되는 염증질환이란 아토피 피부염을 포함하는 피부염증질환, 신경교종세포 등 신경세포 염증질환, 척추염, 요도염, 방광염, 신염, 신우신염, 혈관염, 비염, 인후염, 편도염, 급성통증 또는 염증성 장질환 등

을 포괄적으로 이르는 표현이며, 바람직하게는 피부염증질환, 요도염, 방광염, 신염, 신우신염, 비염, 인후염, 편도염 또는 염증성 장질환이다.

발명의 효과

[0027] 본 발명의 Atox1 융합단백질은 투여량 및 처리시간 의존적으로 세포 내로 투과하였고, 투과된 Atox1 융합단백질은 세포 내에서 13시간 동안 현저한 수준을 나타내었다.

[0028] 본 발명의 Atox1 융합단백질은 LPS-유도된 COX2와 iNOS 단백질 발현 수준을 투여량 의존적으로 현저히 감소시켰다. 또한, Atox1 융합단백질은 고농도 LPS로 유도된 염증반응을 억제하였다.

[0029] 또한, 본 발명의 Atox1 융합단백질은 세포로 투과되어 LPS 또는 H_2O_2 처리한 세포에서 활성산소종 수준을 감소시킴으로써 세포 보호효과를 나타내었다.

[0030] 뿐만 아니라, 본 발명의 Atox1 융합단백질은 피부 염증에서 초기에 일어나는 단핵세포 (monocyte)와 같은 염증세포의 침윤을 현저히 저해하였고, TPA로 유도되는 동물 염증모델에서 COX2 발현 수준과 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 생성을 현저히 감소시켰고, TPA로 유도되는 피부염증 동물모델에서 p38, ERK 및 JNK 인산화와 p65와 IκBα인산화를 저해하였다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 Tat-Atox1 융합단백질 구축 및 정제에 관한 도면이다.

도 2는 Raw 264.7 세포 내로 Tat-Atox1 융합단백질의 투과를 나타낸다. 세포는 60 ㎜ 배양접시에서 배양한 후 Tat-Atox1 융합단백질 (0.01 ~ 0.3 μM)과 대조군 Atox1 단백질을 한 시간 동안 배양배지에 가하여 웨스턴 블롯으로 분석하였다.

도 3은 Raw 264.7 세포 내로 Tat-Atox1 융합단백질 (0.3 μM)과 대조군 Atox1 단백질을 15 ~ 60분간 배양배지에 가하여 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다.

도 4는 세포 투과된 Tat-Atox1 융합단백질의 세포 내 분포를 공촛점 현미경으로 관찰한 사진이다.

도 5는 Raw 264.7 세포 내로 투과된 Tat-Atox1 융합단백질의 안정성을 다양한 시간 경과 후 평가한 것이다 (1 ~ 15시간). 세포는 0.3 μM Tat-Atox1 융합단백질로 한 시간 동안 선처리하고, 웨스턴 블롯으로 분석하였다.

도 6은 Raw 264.7 세포에서 LPS로 유도한 염증반응에 대한 Tat-Atox1 융합단백질의 저해효과를 나타낸다.

도 7은 Raw 264.7 세포 내로 Atox1 융합단백질 (0.01 ~ 0.3 μM)을 1시간 동안 처리하고 LPS로 염증을 유발하여 웨스턴 블롯 분석으로 COX-2와 iNOS를 측정한 결과이다.

도 8은 Raw 264.7 세포 내로 Atox1 융합단백질 (0.01 ~ 0.3 μM)을 1시간 동안 처리하고 LPS로 염증을 유발하여 RT-PCT 분석으로 TNF-α, IL-1β, IL-6를 측정한 결과이다.

도 9는 Raw 264.7 세포 내로 Atox1 융합단백질 (0.01 ~ 0.3 μM)을 1시간 동안 처리하고 LPS로 염증을 유발하여 웨스턴 블롯 분석으로 p65, IκBα를 측정한 결과이다.

도 10은 Raw 264.7 세포 내로 Atox1 융합단백질 (0.01 ~ 0.3 μM)을 1시간 동안 처리하고 LPS로 염증을 유발하여 웨스턴 블롯 분석으로 p38, JNK, ERK를 측정한 결과이다.

도 11은 Raw 264.7 세포 내로 Atox1 융합단백질 (0.01 ~ 0.3 μM)을 1시간 동안 처리하고 LPS로 염증을 유발하여 웨스턴 블롯 분석으로 Akt를 측정한 결과이다.

도 12는 8주령 마우스 수컷 귀에 TPA로 염증을 유발하여 Tat-Atox1 융합단백질 0.3 μM을 처리하고 H&E 염색을 수행한 결과이다.

도 13은 8주령 마우스 수컷 귀에 TPA로 염증을 유발하여 Tat-Atox1 융합단백질 0.3 μM을 처리하고 COX-2와 iNOS을 웨스턴 블롯 분석 및 RT-PCT을 통해 확인한 결과이다.

도 14는 8주령 마우스 수컷 귀에 TPA로 염증을 유발하여 Tat-Atox1 융합단백질 0.3 μM을 처리하고 TNF-α, IL-1β, IL-6을 RT-PCT을 통해 확인한 결과이다.

도 15는 8주령 마우스 수컷 귀에 TPA로 염증을 유발하여 Tat-Atox1 융합단백질 0.3 μM을 처리하고 p65, IκBα

를 웨스턴블롯 분석을 통해 확인한 결과이다.

도 16은 8주령 마우스 수컷 귀에 TPA로 염증을 유발하여 Tat-Atox1 융합단백질 0.3 μM을 처리하고 p38, JNK, ERK를 웨스턴블롯 분석을 통해 확인한 결과이다.

도 17은 8주령 마우스 수컷 귀에 TPA로 염증을 유발하여 Tat-Atox1 융합단백질 0.3 μM을 처리하고 Akt를 웨스턴블롯 분석을 통해 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명 범위가 실시예의 기재에 의해 제한되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다. 특히, 아래의 실시예에서는 단백질 수송 도메인으로서 HIV Tat 펩타이드를 이용하였고, 목표 단백질인 Atox1의 N-말단에 공유결합하였으나, 본 발명의 Atox1 융합단백질이 반드시 Tat-Atox1 융합단백질에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명함을 밝힌다.

[0034] **재료**

[0035] 12-*O*-TPA (tetradecanoylphorbol-13-acetate)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Ni^{2+} 나이트릴로트리아세트산 세파로즈 수퍼플로우 (Ni^{2+}-nitrilotri-acetic acid Sepharose superflow)는 Qiagen (Valencia, CA, USA)에서 구입하였다. DMEM (Dulbecco''s modified Eagle's medium)은 Lonza (Walkersville, MD, USA)에서 구입하였고, FBS와 항생제는 Gibco BRL에서 구입하였다. 합성 Tat 펩타이드는 Peptron (Daejeon, Korea)에서 구입하였고, 기본 항체와 액틴은 각각 Cell Signaling Technology (Beverly MA, USA) 및 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 다른 화학물질 및 시약들은 입수 가능한 최상급의 제품을 이용하였다.

[0037] **Tat-Atox1 플라스미드 구축**

[0038] 세포 투과성 Tat-Atox1 융합단백질을 제조하기 위해 인간 Atox1의 cDNA 서열 및 두 개의 프라이머를 이용하였다. 센스 프라이머는 5'-CTCGAGATGCCGAAGCACG-3'으로 *Xho*I 제한부위를 포함하고, 안티센스 프라이머는 5'-GGATCCCTACTCAAGGCCAAGG-3'으로 *Bam*HI 제한부위를 포함한다. 생성된 PCR 결과물은 T4 DNA 라이게이즈 (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 TA 벡터 (Novagen, Darmstadt, Germany)에 연결하고, *Xho*I과 *Bam*HI으로 플라스미드의 특정 부위를 절단한다. 잘린 단편은 Tat 발현 벡터에 연결하여 Tat-Atox1 융합단백질을 제조하였으며, 대조군 Atox1 단백질은 Tat 펩타이드 없이 제조하였다.

[0040] **Tat-Atox1 융합단백질 발현 및 정제**

[0041] 재조합 Tat-Atox1 융합단백질 및 대조군 Atox1 단백질 플라스미드는 *E. coli* BL21 세포에서 형질전환하였다. 형질전환된 세포를 100㎍/ml 암피실린이 포함된 100ml LB 배지에서 37℃, 180 rpm의 조건으로 6시간 배양한 후, 0.5 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside)를 첨가하여 18℃, 180 rpm으로 24시간 배양하였다. 회수한 세포를 음파처리하고 원심분리하였다. 상층액만 분리하고 Ni^{2+}-나이트릴로트리아세트산 세파로즈 수퍼플로우 친화 크로마토그래피 (Qiagen, Balencia, CA, USA)와 PD-10 컬럼 크로마토그래피 (Amersham, Braunschweig, Germany)로 정제하였다. 단백질 농도는 소 혈청 알부민 (BSA; bovine serum albumin)을 표준화하여 단백질 검정 키트 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량하였다.

[0043] **Raw 264.7 세포에 Tat-Atox1 융합 단백질의 형질도입 및 과산화수소 처리**

[0044] 계대 배양한 Raw 264.7 세포를 60mm 접시에 분주하여 37℃, 95% 습도, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. Tat-Atox1 융합단백질 및 Atox1 단백질의 세포투과 능력을 확인하기 위하여 1시간 동안 단백질을 다양한 농도 (0.001~0.3 μM)로 처리하였다. 또한, 단백질 (0.3 μM)을 처리 시간을 달리하여 10~60분간 처리하였다. Raw 264.7 세포 내

에 Tat-Atox1 융합단백질이 얼마 동안 남아있는지 알아보기 위해 0.3 nM Tat-Atox1 융합단백질을 처리하고, 특정 시간 (1~15시간)이 지난 후에 세포를 회수하였다.

[0045] 또한, Raw 264.7 세포에 1시간 동안 농도별(0.01~0.3 μM)로 Tat-Atox1 융합단백질과 Atox1 단백질을 처리한 후, 1 mM 과산화수소를 첨가하여 1시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 PBS로 헹구어내고 트립신-EDTA를 처리하여 분리하였다. 분리된 세포의 단백질을 추출하기 위해 RIPA 용균완충액 (ELPIS BIOTECH, Daejeon, Korea)을 넣고 침전물을 녹인 후, 원심분리 (4℃, 12,000 rpm, 10 min)하여 상등액을 취해 단백질을 정량하였다.

[0047] **웨스턴 블롯 분석**

[0048] 30~50 ㎍의 단백질을 5X 시료 완충액과 혼합하여 2분간 끓여 단백질 시료를 준비한 다음 15% 미니젤 (Hoefer Scientific , San Francisco, CA, USA) SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 분자량에 따라 분리하였다. 전기영동이 끝난 후 나이트로셀룰로스 막으로 전기이동하고, 막은 0.1% Tween 20을 함유하는 TBS 완충액에 녹인 5% 탈지분유로 상온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 단백질의 발현을 측정하기 위해 1차 항체를 1:500으로 PBS에 희석하여 상온에서 3시간 동안 반응시킨 후 TBS-T로 세정하였다. 2차 항체로는 호스래디쉬 퍼옥시데이즈가 결합된 항-토끼 IgG 또는 항-마우스 IgG를 1:10,000으로 PBS에 희석하여 상온에서 1시간 반응시켰다. TBS-T로 세척 후에 탐지 시약을 이용하여 각 단백질의 발현량을 확인하였다.

[0050] **공촛점 형광 현미경 관찰**

[0051] 24 웰 플레이트에 커버 글라스를 각각 넣고 그 위에 세포를 분주하여 2시간 동안 배양하였다. 0.1 nM Tat-Atox1 융합단백질과 Atox1 단백질을 2시간 동안 Raw 264.7 세포에 형질도입한 후, PBS로 3번 세척하였다. 각 웰에 4% 파라포름알데하이드를 넣고 5분 동안 세포를 고정한 후, PBS를 넣어 짧게 세 번 세척하였다. 3% BSA, 0.1% Triton X-100이 함유된 PBS (PBS-BT)로 실온에서 40분간 블로킹하고, PBS-BT로 3번 세척하였다. 1차 항체 (His-probe, Santa Cruz Biotechnology)는 1:2,000 비율로 희석하고, 4℃에서 12시간 동안 배양하였다. 2차 항체 (Alexa Fluor 488)는 1:10,000 비율로 희석하고 어둡게 하여 1시간 동안 반응시키고, PBS-BT로 5분 동안 3번 세척하였다. 웰에서 커버 글라스를 분리하여 모서리 부분의 물기를 제거하고 마운팅하였다. 공촛점 형광 현미경으로 관찰하고 영상분석기를 이용하여 형광 발현을 확인하였다.

[0053] **동물모델 제조**

[0054] ICR 마우스(수컷 8주령)를 23℃, 습도 60% 그리고 고정적으로 12시간의 빛/12시간 어둠 주기로 음식물과 물을 자유롭게 섭취할 수 있는 곳에서 사육하였다. 동물 관리를 포함한 모든 실험 절차는 한림의료센터기관 동물 관리 및 사용위원회에서 국립수의과학검역원의 실험동물 관리 및 사용에 대한 가이드를 따라 실험하였다.

[0056] **통계 분석**

[0057] 모든 데이터는 실험 결과의 평균값이며, 통계학적인 차이는 student’t-test 분석법을 이용하여 비교하였고, $p<0.05$일때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

[0059] **결과 1: Tat-Atox1 융합단백질 제조**

[0060] 세포침투성 Tat-Atox1 융합단백질을 제조하기 위해 인간 Atox1 유전자를 PCR을 통해 획득하였고, 이를 pET 벡터 시스템에 클로닝하였다. 이렇게 만들어진 단백질 발현 유전자를 BL21에 형질전환하였다. 형질전환된 단백질을 과대발현하고, 정제하였다 (도 1).

[0062] **결과 2: Raw 264.7 세포로 Tat-Atox1 융합단백질의 침투성 확인**

[0063] Raw 264.7 세포로 Tat-Atox1 융합단백질의 투과 능력을 확인하였다. Raw 264.7 세포를 다양한 농도의 Atox1 융

합단백질로 처리하였고, 그 결과, 농도 의존적으로 침투됨을 확인하였다. 이를 His Ab을 이용한 웨스턴블롯 분석으로 확인하였다 (도 2).

[0064] 또한, Tat-Atox1 융합단백질 농도를 0.3 μM로 고정하여 Raw 264.7 세포에 다양한 시간 동안 처리한 결과, Atox1 융합단백질은 Raw 264.7 세포에 시간 의존적으로 침투되었다. 이를 His Ab을 이용한 웨스턴블롯 분석 (도 3) 및 형광현미경 (도 4)으로 확인하였다.

[0066] <u>결과 3: Tat-Atox1 융합단백질의 Raw 264.7 세포 내 안정성 확인</u>

[0067] 세포 침투성 Tat-Atox1 융합단백질을 0.3 μM로 고정하여 Raw 264.7 세포에 처리하고, 1시간 동안 배양하였다. 이후 침투된 Tat-Atox1 융합단백질의 안정성을 확인하였고, 처리 후 13시간까지 안정하게 유지되는 것을 확인할 수 있었다 (도 5).

[0069] <u>결과 4: Tat-Atox1 융합단백질의 Raw 264.7 세포 보호 효능</u>

[0070] 세포 침투성 Tat-Atox1 융합단백질을 0.3 μM로 고정하여 Raw 264.7 세포에 처리하고, 1시간 동안 배양하였다. 이후 LPS를 처리하여 세포에 염증을 유발하였다. 이때 Tat-Atox1 융합단백질의 효능을 DCF-DA를 이용하여 확인하였다. 그 결과, 세포 침투성 Tat-Atox1 융합단백질을 처리한 군에서 항염증 보호 효과가 있음을 확인하였다 (도 6).

[0071] 세포 침투성 Tat-Atox1 융합단백질을 0.01 μM ~ 0.3 μM로 Raw 264.7 세포에 처리하고, 1시간 동안 배양하였다. 이후 LPS를 처리하여 세포에 염증을 유발하였다. 이때 세포 침투성 Tat-Atox1 융합단백질의 효능을 COX2와 iNOS를 이용한 웨스턴블롯 분석으로 확인하였다. 또한, mRNA 수준도 RT-PCR을 통해 동시에 확인하였다. 그 결과, Tat-Atox1 융합단백질을 처리한 군에서 세포 보호 효과가 있음을 확인하였다 (도 7).

[0072] 세포 침투성 Tat-Atox1 융합단백질을 0.01 μM ~ 0.3 μM로 Raw 264.7 세포에 처리하고, 1시간 동안 배양하였다. 이후 LPS를 처리하여 세포에 염증을 유발하였다. 이때, 세포 침투성 Tat-Atox1 융합단백질의 효능을 TNF-α, IL-1β, IL-6를 이용하여 mRNA 수준에서 RT-PCR을 통해 확인하였다. 그 결과 세포 침투성 Tat-Atox1 융합단백질을 처리한 군에서 보호 효과가 있음을 확인하였다 (도 8).

[0073] 세포 침투성 Tat-Atox1 융합단백질을 0.01 μM ~ 0.3 μM로 Raw 264.7 세포에 처리하고, 1시간 동안 배양하였다. 이후 LPS를 처리하여 세포에 염증을 유발하였다. 이때, 세포 침투성 Tat-Atox1 융합단백질의 효능을 p65, IκBα를 이용한 웨스턴블롯 분석으로 확인하였다. 그 결과, 침투성 Atox1 융합단백질을 처리한 군에서 보호 효과가 있음을 확인하였다 (도 9).

[0074] 세포 침투성 Atox1 융합단백질을 0.01 μM ~ 0.3 μM로 Raw 264.7 세포에 처리하고, 1시간 동안 배양하였다. 이후 LPS를 처리하여 세포에 염증을 유발하였다. 이때, 세포 침투성 Tat-Atox1 융합단백질의 효능을 p38, JNK, ERK를 이용한 웨스턴블롯 분석으로 확인하였다. 그 결과, 세포 침투성 Tat-Atox1 융합단백질을 처리한 군에서 보호 효과가 있음을 확인하였다 (도 10).

[0075] 세포 침투성 Atox1 융합단백질을 0.01 μM ~ 0.3 μM로 Raw 264.7 세포에 처리하고, 1시간 동안 배양하였다. 이후 LPS를 처리하여 세포에 염증을 유발하였다. 이때, 세포 침투성 Tat-Atox1 융합단백질의 효능을 Akt를 이용한 웨스턴블롯 분석으로 확인하였다. 그 결과, 세포 침투성 Tat-Atox1 융합단백질을 처리한 군에서 보호 효과가 있음을 확인하였다 (도 11).

[0077] <u>결과 5: 동물실험을 통한 염증 기전 연구</u>

[0078] 8주령 ICR 마우스 수컷의 귀에 TPA를 바르고 염증을 유발하였다. 이후, TAt-Atox1 융합단백질을 0.3 μM로 처리하고 효능을 평가하였다. 조직을 잘라 H&E 염색을 수행하였다. 그 결과, 세포 침투성 Tat-Atox1 융합단백질을 처리한 군에서 보호 효과가 있음을 확인하였다 (도 12).

[0079] 또한, 8주령 ICR 마우스 수컷의 귀에 TPA를 바르고 염증을 유발하였다. 이후, TAt-Atox1 융합단백질을 0.3 μM로 처리하고 효능을 평가하였다. 조직을 절단하여 COX2와 iNOS로 웨스턴블롯 분석을 수행하였다. 또한, mRNA 수준은 RT-PCR을 통해 동시에 확인하였다. 그 결과, 세포 침투성 Tat-Atox1 융합단백질을 처리한 군에서 보호 효

과가 있음을 확인하였다 (1: 대조군, 2: TPA 처리군, 3: Atox1 단백질 처리군, 4: Tat-Atox1 융합단백질 처리군) (도 13).

[0080] 또한, 8주령 ICR 마우스 수컷의 귀에 TPA를 바르고 염증을 유발하였다. 이후, TAt-Atox1 융합단백질 0.3 μM를 처리하고 효능을 평가하였다. 조직을 절단하여 TNF-α, IL-1β, IL-6의 mRNA 수준 변화를 RT-PCR을 통해 확인하였다. 그 결과, 세포 침투성 Tat-Atox1 융합단백질을 처리한 군에서 보호 효과가 있음을 확인하였다 (1: 대조군, 2: TPA 처리군, 3: Atox1 단백질 처리군, 4: Tat-Atox1 융합단백질 처리군) (도 14).

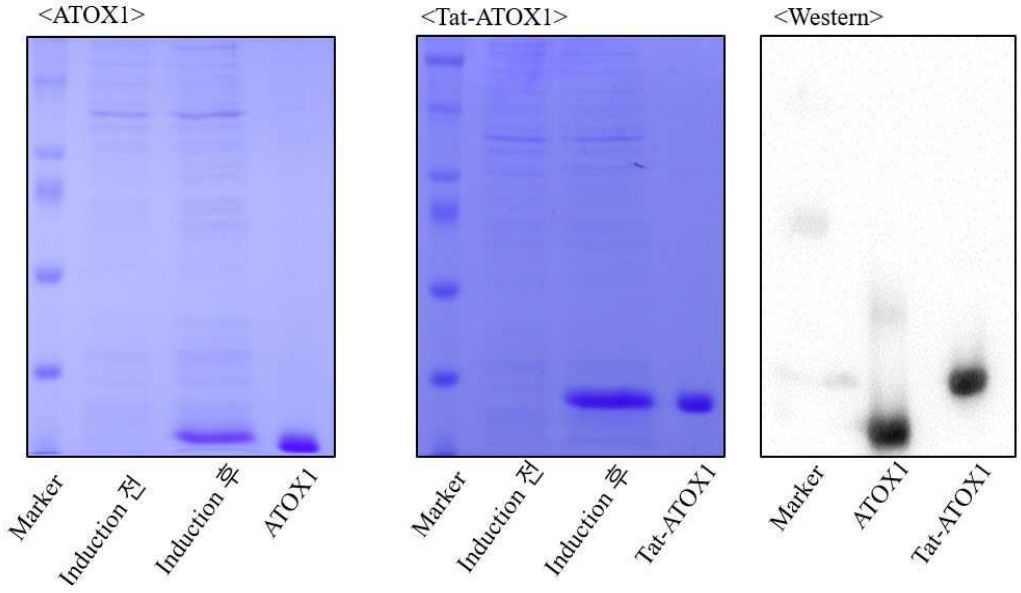
[0081] 또한, 8주령 ICR 마우스 수컷의 귀에 TPA를 바르고 염증을 유발하였다. 이후 침투성 Atox1 융합단백질 0.3 μM를 처리하고 효능을 평가하였다. 조직을 절단하여 p65, IκBα를 이용한 웨스턴블롯 분석을 수행하였다. 그 결과, 세포 침투성 Atox1 융합단백질을 처리한 군에서 보호 효과가 있음을 확인하였다 (1: 대조군, 2: TPA 처리군, 3: Atox1 단백질 처리군, 4: Tat-Atox1 융합단백질 처리군) (도 15).

[0082] 또한, 8주령 ICR 마우스 수컷의 귀에 TPA를 바르고 염증을 유발하였다. 이후 침투성 Atox1 융합단백질 0.3 μM를 처리하고 효능을 평가하였다. 조직을 갈아 p38, JNK, ERK를 이용한 웨스턴블롯 분석을 수행하였다. 그 결과, 세포 침투성 Atox1 융합단백질을 처리한 군에서 보호 효과가 있음을 확인하였다 (1: 대조군, 2: TPA 처리군, 3: Atox1 단백질 처리군, 4: Tat-Atox1 융합단백질 처리군) (도 16).

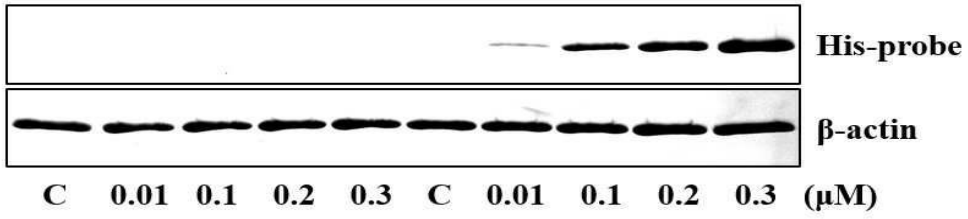
[0083] 또한, 8주령 ICR 마우스 수컷의 귀에 TPA를 바르고 염증을 유발하였다. 이후 침투성 Atox1 융합단백질 0.3 μM를 처리하고 효능을 평가하였다. 조직을 잘라 Akt를 이용한 웨스턴블롯 분석을 수행하였다. 그 결과, 침투성 Atox1 융합단백질을 처리한 군에서 보호 효과가 있음을 확인하였다 (1: 대조군, 2: TPA 처리군, 3: Atox1 단백질 처리군, 4: Tat-Atox1 융합단백질 처리군) (도 17).

도면

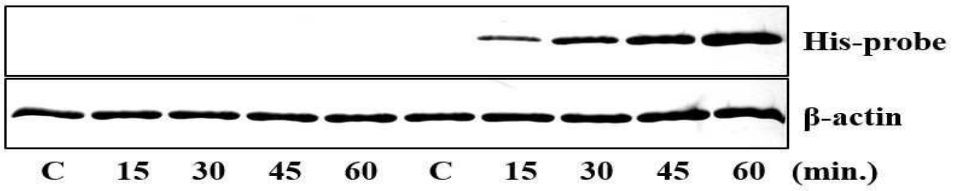
도면1



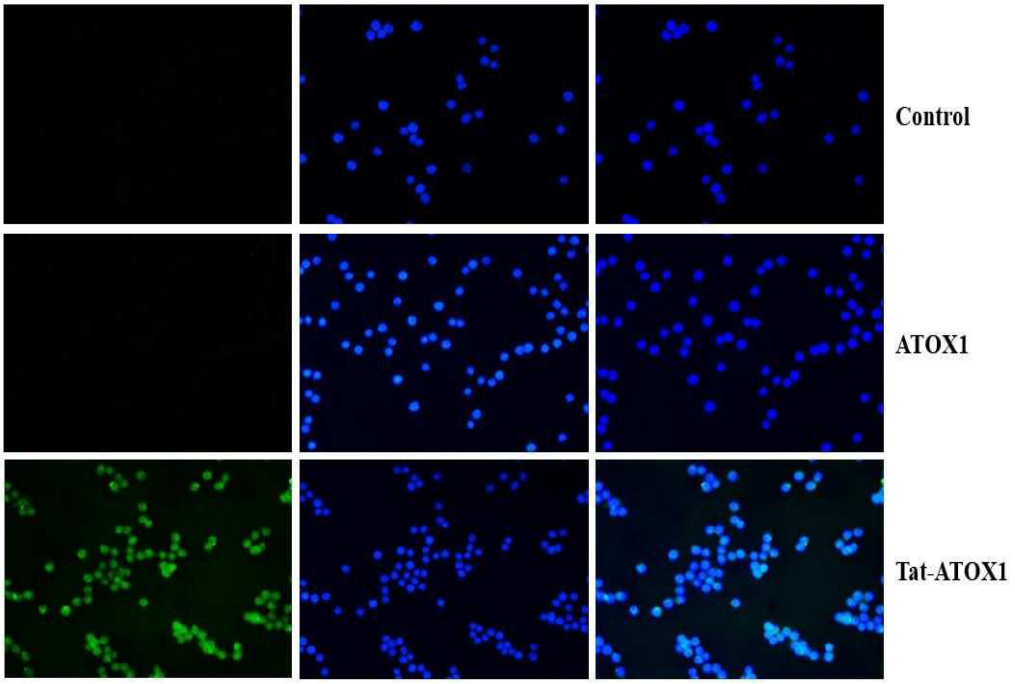
도면2



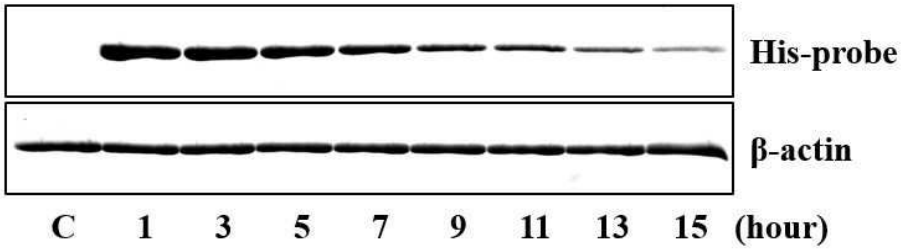
도면3


His-probe
β-actin
C 15 30 45 60 C 15 30 45 60 (min.)

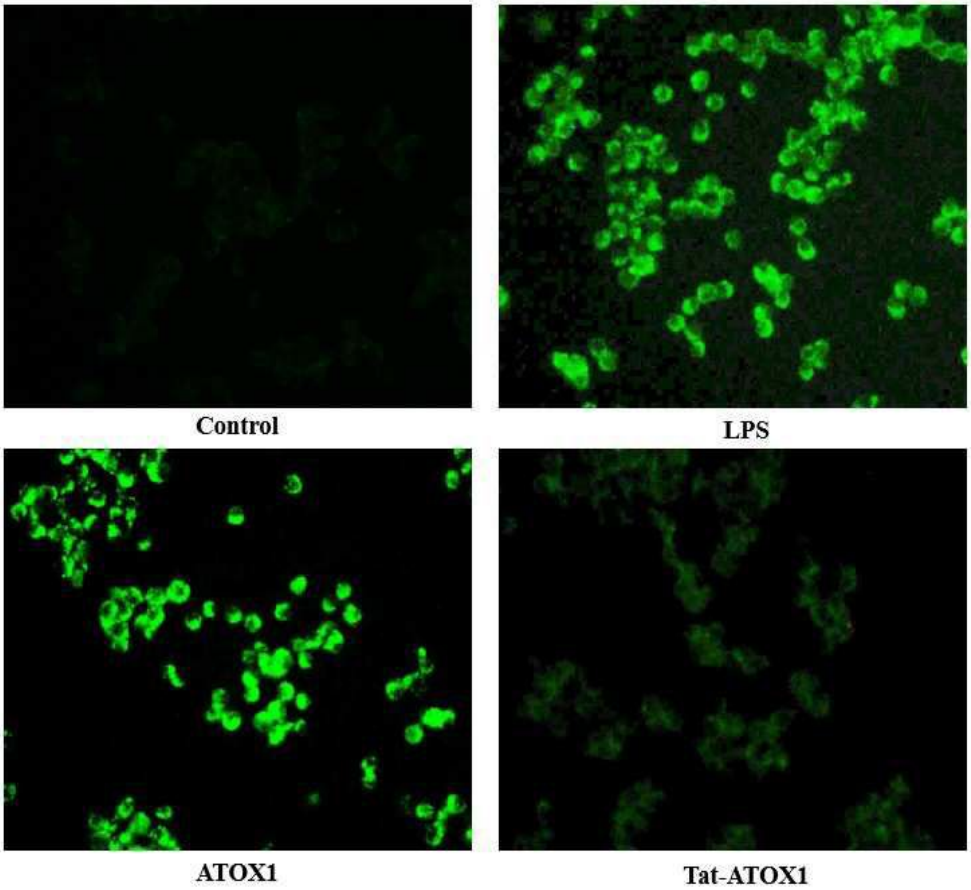
도면4


Control
ATOX1
Tat-ATOX1

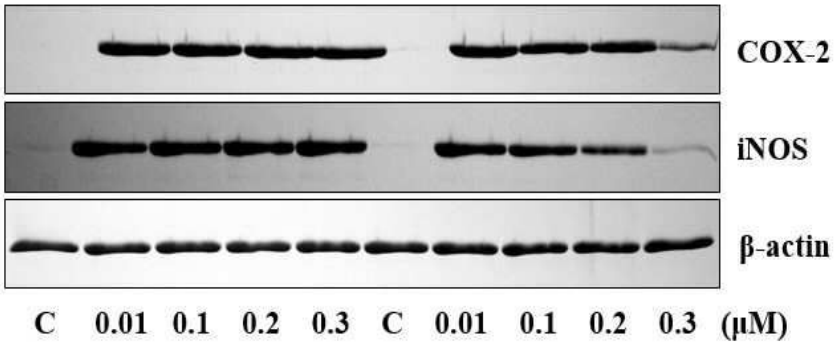
도면5

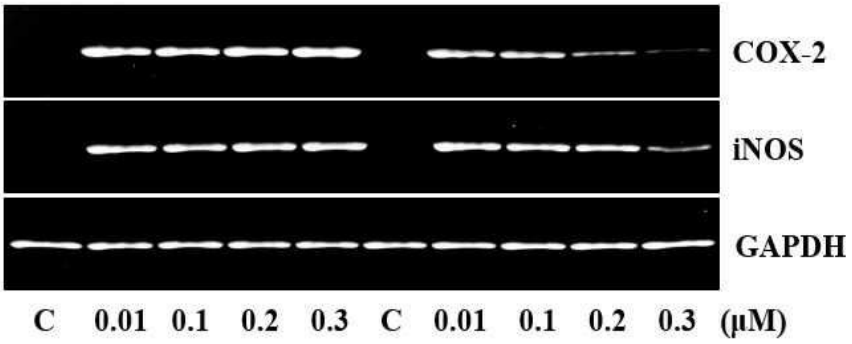

His-probe
β-actin
C 1 3 5 7 9 11 13 15 (hour)

도면6

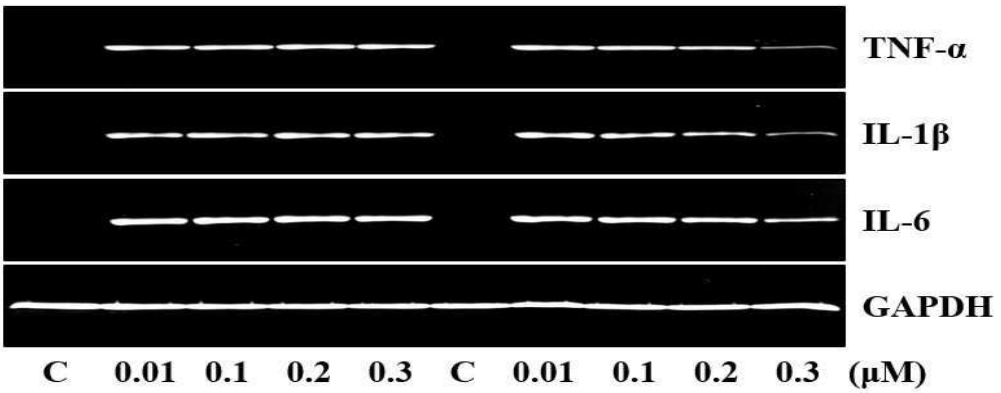


도면7

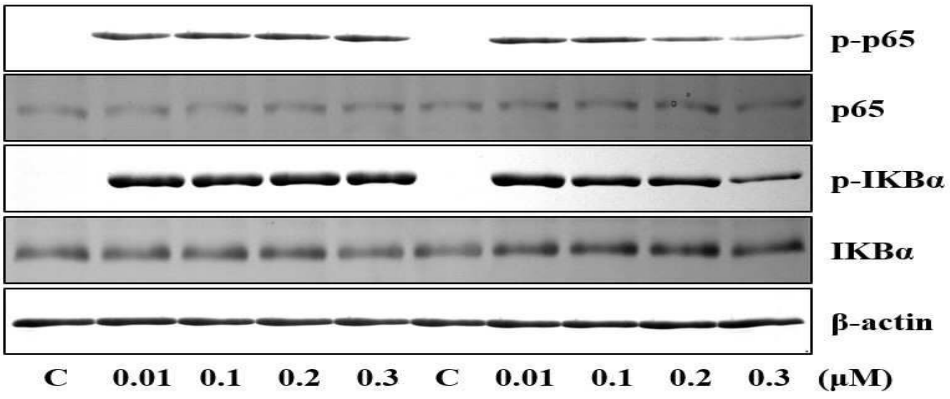

COX-2
iNOS
β-actin
C 0.01 0.1 0.2 0.3 C 0.01 0.1 0.2 0.3 (μM)


COX-2
iNOS
GAPDH
C 0.01 0.1 0.2 0.3 C 0.01 0.1 0.2 0.3 (μM)

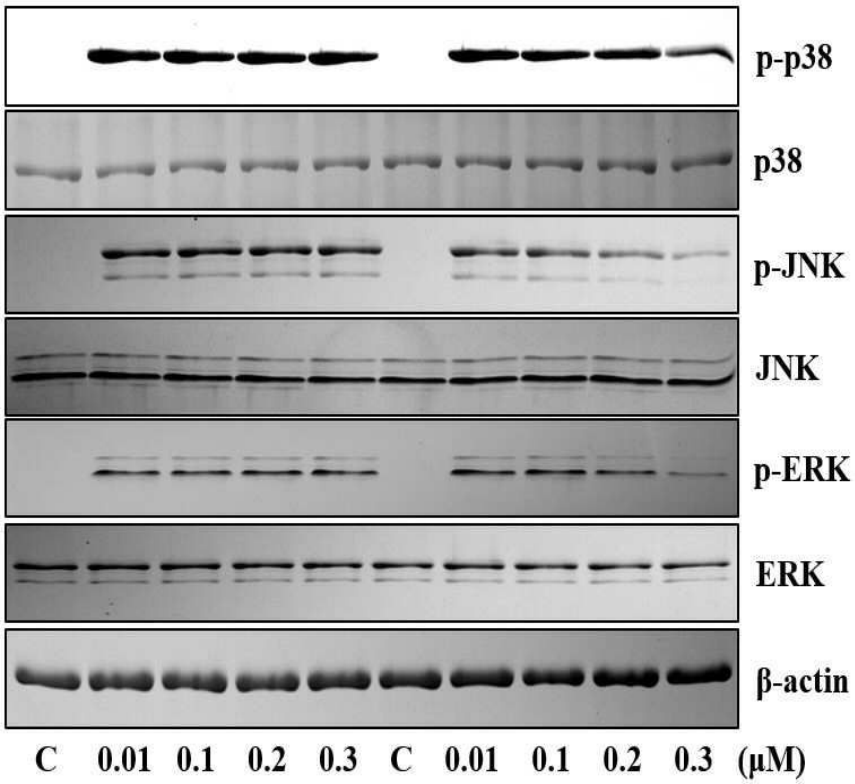
도면8


TNF-α
IL-1β
IL-6
GAPDH
C 0.01 0.1 0.2 0.3 C 0.01 0.1 0.2 0.3 (μM)

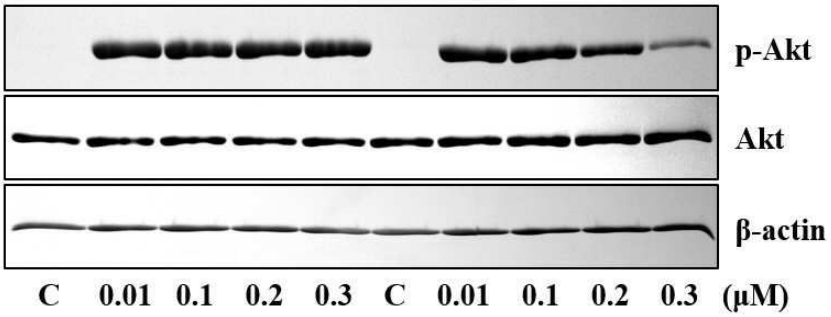
도면9


p-p65
p65
p-IKBα
IKBα
β-actin
C 0.01 0.1 0.2 0.3 C 0.01 0.1 0.2 0.3 (μM)

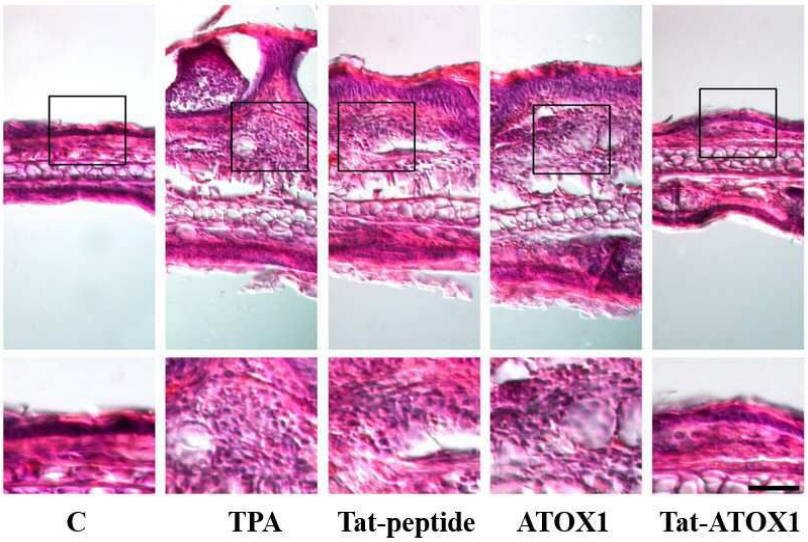
도면10


p-p38
p38
p-JNK
JNK
p-ERK
ERK
β-actin
C 0.01 0.1 0.2 0.3 C 0.01 0.1 0.2 0.3 (μM)

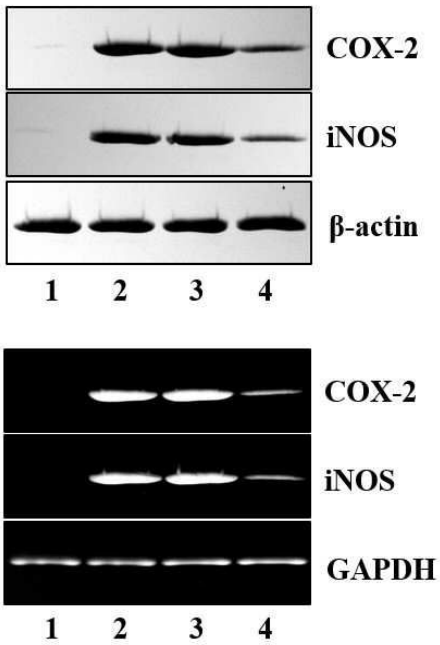
도면11


p-Akt
Akt
β-actin
C 0.01 0.1 0.2 0.3 C 0.01 0.1 0.2 0.3 (μM)

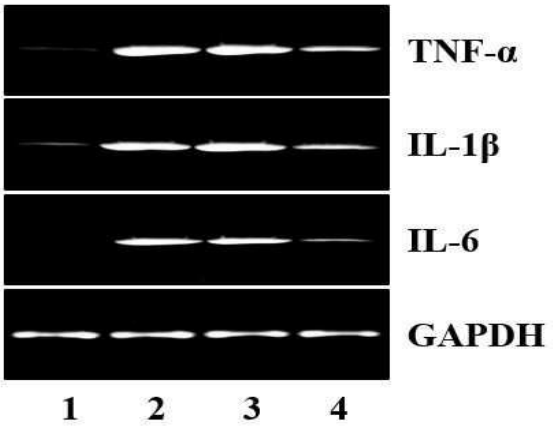
도면12


C
TPA
Tat-peptide
ATOX1
Tat-ATOX1

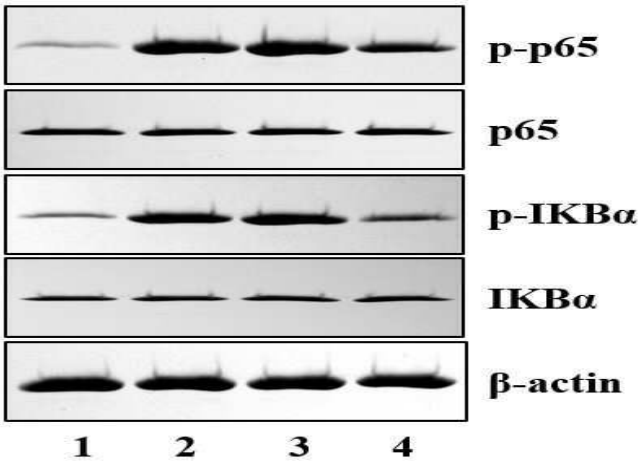
도면13


COX-2
iNOS
β-actin
1 2 3 4
COX-2
iNOS
GAPDH
1 2 3 4

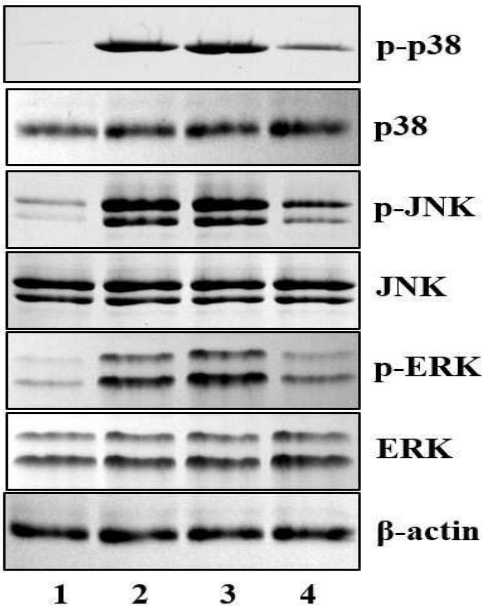
도면14



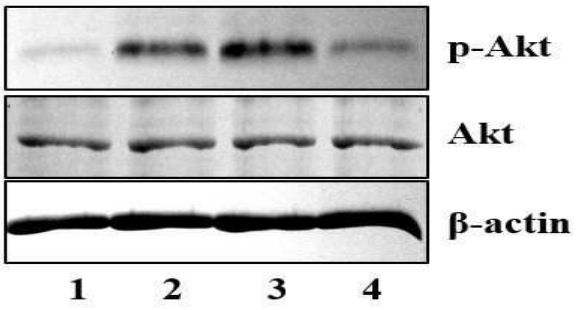
도면15



도면16



도면17



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Pharmaceutical composition for treating Parkinson's disease containing cell-transducible ATOX1 fusion protein

<130> HallymU-syCHOI-Atox1-PD

<160> 8

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

ctcgagatgc cgaagcacg 19

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

ggatccctac tcaaggccaa gg 22

<210> 3

<211> 270

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide encoding Tat-Atox1 fusion protein

<400> 3

agcagcggcc tggtgccgcg cggcagccat aggaagaagc ggagacagcg acgaagactc 60

gagatgccga agcacgagtt ctctgtggac atgacctgtg gaggctgtgc tgaagctgtc 120

tctcgggtcc tcaataagct tggaggagtt aagtatgaca ttgacctgcc caacaagaag 180

gtctgcattg aatctgagca cagcatggac actctgcttg caaccctgaa gaaaacagga 240

aagactgttt cctaccttgg ccttgagtag 270

<210> 4

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-Atox1 fusion protein

<400> 4

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Pro Lys His Glu

1 5 10 15

Phe Ser Val Asp Met Thr Cys Gly Gly Cys Ala Glu Ala Val Ser Arg

20 25 30

Val Leu Asn Lys Leu Gly Gly Val Lys Tyr Asp Ile Asp Leu Pro Asn

35 40 45

Lys Lys Val Cys Ile Glu Ser Glu His Ser Met Asp Thr Leu Leu Ala

50 55 60

Thr Leu Lys Lys Thr Gly Lys Thr Val Ser Tyr Leu Gly Leu Glu

65 70 75

<210> 5

<211> 278

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide encoding Atox1-Tat fusion protein

<400> 5

agcagcggcc tggtgccggc ggcagccact cgagatgccg aagcacgagt tctctgtgga 60

catgacctgt ggaggctgtg ctgaagctgt ctctcgggtc ctcaataagc ttggaggagt 120

taagtatgac attgacctgc ccaacaagaa ggtctgcatt gaatctgagc acagcatgga 180

cactctgctt gcaaccctga agaaaacagg aaagactgtt tcctaccttg gccttgagta 240

gggatcctag gaagaagcgg agacagcgac gaagatag 278

<210> 6

<211> 77

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Atox1-Tat fusion protein

<400> 6

Met Pro Lys His Glu Phe Ser Val Asp Met Thr Cys Gly Gly Cys Ala

1 5 10 15

Glu Ala Val Ser Arg Val Leu Asn Lys Leu Gly Gly Val Lys Tyr Asp

20 25 30

Ile Asp Leu Pro Asn Lys Lys Val Cys Ile Glu Ser Glu His Ser Met

35 40 45

Asp Thr Leu Leu Ala Thr Leu Lys Lys Thr Gly Lys Thr Val Ser Tyr

50 55 60

Leu Gly Leu Glu Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

65 70 75

<210> 7

<211> 277

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide encoding Tat-Atox1-Tat fusion protein

<400> 7

aggaagaagc ggagacagcg acgaagactc gagatgccga agcacgagtt ctctgtggac 60

atgacctgtg gaggctgtgc tgaagctgtc tctcgggtcc tcaataagct tggaggagtt 120

aagtatgaca ttgacctgcc caacaagaag gtctgcattg aatctgagca cagcatggac 180

actctgcttg caaccctgaa gaaaacagga aagactgttt cctaccttgg ccttgagtag 240

ggatcctagg aagaagcgga gacagcgacg aagatag 277

<210> 8

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-Atox1-Tat fusion protein

<400> 8

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Pro Lys His Glu

1 5 10 15

Phe Ser Val Asp Met Thr Cys Gly Gly Cys Ala Glu Ala Val Ser Arg

20 25 30

Val Leu Asn Lys Leu Gly Gly Val Lys Tyr Asp Ile Asp Leu Pro Asn

35 40 45

Lys Lys Val Cys Ile Glu Ser Glu His Ser Met Asp Thr Leu Leu Ala

50 55 60

Thr Leu Lys Lys Thr Gly Lys Thr Val Ser Tyr Leu Gly Leu Glu Gly

65 70 75 80

Ser Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

85 90