



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년04월04일
(11) 등록번호 10-1723306
(24) 등록일자 2017년03월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/475 (2006.01) C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/245 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C12N 9/90 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/475 (2013.01)
C07K 14/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0147368
(22) 출원일자 2015년10월22일
심사청구일자 2015년10월22일
(56) 선행기술조사문헌
Min Han 등. Biotechnol Lett. Vol. 31, No. 11,
페이지 1677-1684 (2009.)*
GenBank Accession Number EU680844
(2008.05.16.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
최한석
서울특별시 송파구 올림픽로 203, 501동 706호 (잠실동)
송정아
서울특별시 송파구 문정로 83, 103동 1103호 (문정동, 문정래미안아파트)
웬민탄
베트남 호치민시 10지구 9번구 수반한로 442/22
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 6 항

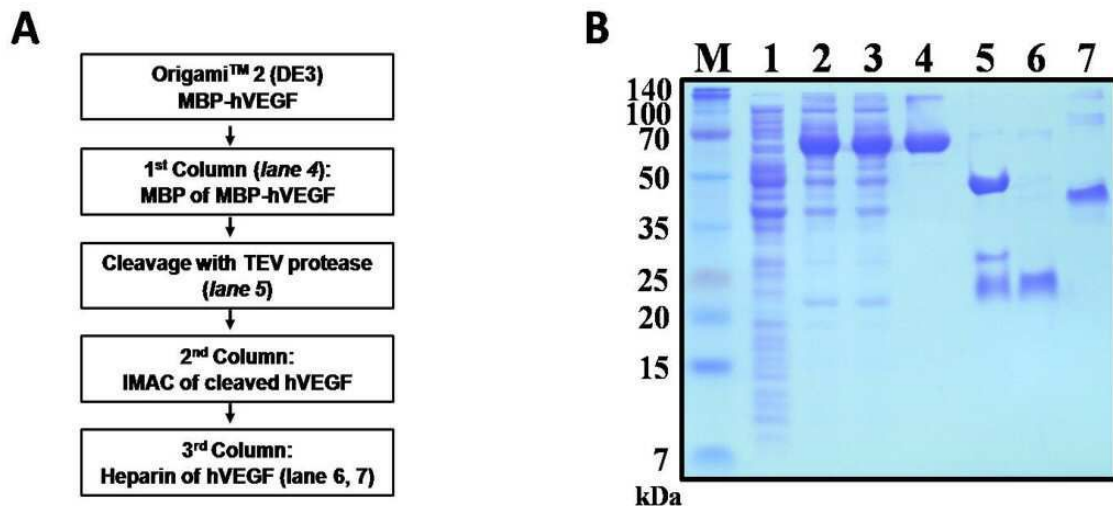
심사관 : 박정웅

(54) 발명의 명칭 생물학적 활성을 가진 인간 혈관내피성장인자 재조합 단백질의 수용성 과발현 및 정제방법

(57) 요약

본 발명은 생물학적 활성을 가진 인간 혈관내피성장인자(human vascular endothelial growth factor; hVEGF)의 수용성 과발현 및 정제방법에 관한 것으로서, 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag) 및 hVEGF 유전자를 포함하는 재조합 발현백터를 제공한다. 또한 상기 재조합 발현백터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공하며, 상기 hVEGF 재조합 단백질의 생산방법을 제공한다. 본 발명에 따라 정제된 hVEGF 단백질은 혈관신생과 관련된 질병에 광범위한 치료제로서 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C07K 14/245 (2013.01)

C12N 15/63 (2013.01)

C12N 9/90 (2013.01)

C12Y 503/04001 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711019162

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터(ACE)육성사업기초의약학분야(MRC)

연구과제명 세포기능장애 연구센터(2)

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA), 단백질 이황화물 이성질화효소(protein disulfide isomerase; PDI) 및 단백질 이황화물 이성질화효소 b'a' 도메인(protein disulfide isomerase b'a' domain; PDIB'a')으로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나의 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag) 및 서열번호 1로 표시되는 인간 혈관내피성장인자(human vascular endothelial growth factor; hVEGF) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 NusA 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 핵산서열이고, 상기 PDI 유전자는 서열번호 4로 표시되는 핵산서열이고, 상기 PDIB'a' 유전자는 서열번호 5로 표시되는 핵산서열인 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 5

제1항에 따른 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 7

N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA), 단백질 이황화물 이성질화효소(protein disulfide isomerase; PDI) 및 단백질 이황화물 이성질화효소 b'a' 도메인(protein disulfide isomerase b'a' domain; PDIB'a')으로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나의 수용성 향상 태그 및 서열번호 1로 표시되는 hVEGF 유전자가 포함된 유전자 구조체(gene construct)가 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 있는 재조합 미생물.

청구항 8

삭제

청구항 9

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항 따른 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA), 단백질 이황화물 이성질화효소(protein disulfide isomerase; PDI) 및 단백질 이황화물 이성질화효소 b'a' 도메인(protein disulfide isomerase b'a' domain; PDIB'a')으로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나의 수용성 향상 태그-서열번호 1로 표시되는 hVEGF 재조합 단백질을 발현시키는 단계;

상기 발현된 수용성 향상 태그-서열번호 1로 표시되는 hVEGF 재조합 단백질에서 수용성 향상 태그를 제거하는 단계; 및

상기 수용성 향상 태그가 제거된 서열번호 1로 표시되는 hVEGF 재조합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 hVEGF 재조합 단백질 생산방법.

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 N-말단 태그를 이용한 생물학적 활성을 가진 인간 혈관내피성장인자(human vascular endothelial growth factor; hVEGF) 재조합 단백질의 수용성 과발현 및 정제방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 혈관내피성장인자(human vascular endothelial growth factor; VEGF)는 혈관 침투성 인자(vascular permeability factor; VPF)로서 최초로 알려졌으며, 생체 내에서(in vivo) 새로운 혈관을 형성하는 과정인 혈관 신생(neovascularization)에 있어 중요한 생리학적 역할을 하고 있다. 태아 맥관구조(embryonic vasculature)의 초기 형성과 관련되어 있는 혈관형성(Vasculogenesis)은 VEGF에 의해 강력하게 조절된다. 마우스에서 하나 또는 둘의 VEGF 대립유전자(alleles)가 결핍되면 심혈관계 발달에 있어 혈관 형성이 손상되거나, 임신 중간 단계에서 사망하는 결과를 나타낸다. 추가적으로, 저산소 조건에서 새로운 혈관 형성에 관여하는 VEGF 생산을 촉발시키는 것으로 밝혀졌다. 정상적인 생리학적 조건에 있어서는, 상처 치료 및 여성 생식 주기에서 강력한 조절을 통해 VEGF가 높게 발현된다. 몇몇 케이스에 있어서, VEGF의 상향 조절에 의한 과도한 혈관신생(angiogenesis)은 류마티스 관절염, 죽상동맥경화반(atherosclerotic plaque) 생성, 당뇨 망막병증에서 실명 및 중앙 혈관신생과 같은 질병을 야기하기도 한다. VEGFs는 1980년대에 분리되었다. 생리학적으로, VEGFs는 내피세포, 섬유아세포, 대식세포(macrophages), T 세포, 호중구(neutrophils), 혈소판, 케라틴 생성 세포, 신장 혈관간세포(renal mesangial cells) 및 많은 중앙 세포를 포함하는 여러 형태의 세포에서 합성되고, 분비되었다. 라니비주맙(ranibizumab), 베바시주맙(bevacizumab), 아플리버셉트(aflibercept), 소라페닙(sorafenib), 액시티닙(axitinib) 및 파조파닙(pazopanib)과 같은 여러 약물이 VEGF 관련 질병에 적용되었고, 상기 약물 중 몇몇은 대성공을 거두었다.

[0003] VEGF 유사체인 VEGFA, VEGFB, VEGFC 및 VEGFD가 인간 유전체에서 밝혀졌다. VEGF121, VEGF121b, VEGF145, VEGF165, VEGF165b, VEGF189 및 VEGF206과 같은 VEGF-A 단백질의 다양한 이성질체는 보고되어 있다. 가장 많고 주된 활성화 VEGF 이성질체는 2개의 단량체(165-아미노산)로 구성되고, 각 단량체는 접힘(folding) 동역학 VEGF 신호를 조절하는 단일 글리코실화 사이트 및 시스테인 매듭(cysteine knot) 모티프를 포함한다.

[0004] VEGFs는 동형이합체(homodimer)로서 활성 형태인데, 여러 연구에서 생물학적 활성을 가진 재조합 VEGF 동형이합체를 얻어냈다. 효모, 곤충, 쌀, 누에 및 동물세포와 같은 다양한 진핵생물 발현 숙주 시스템에서 VEGF를 발현시키고 생산하기 위해 여러 가지 전략이 사용되어 왔다. 하지만, 상기 시스템에서의 VEGF 생산은 손상된 과-글리코실화가 야기될 수 있으며, 시간이 소요되는 까다로운 배양 조건 및 특정한 장비가 필요하고, 바이오 약품의 제조에 있어 비용이 많이 발생할 수 있다.

[0005] 대장균(*E. coli*)은 단백질 발현에 있어서 많이 사용된다. 하지만, VEGF를 대장균에서 발현시키면, 잘못 접힘(misfolded)이 생기고, 봉입체(inclusion body)를 형성하여 스스로 응집되기도 하는데, 이는 낮은 VEGF 활성을 가지게 되어 추후 정제 과정에서 방해가 된다. 본 발명자들은 Trx, GST, MBP, NusA, PDI 및 PDIb'a'와 같은 여러 태그들의 효과를 연구해 왔는데, 대장균에서 재조합 단백질의 수용성 발현을 향상시킬 수 있었다. 하지만, 지금까지 VEGF의 수용성 발현을 위해 여러 융합 태그들을 사용하여, 태그에 따른 용해도 및 발현 수준을 비교한 연구는 없었다. 또한, 많은 단백질들이 태그의 절단 후에 용해도 또는 활성을 잃어버리게 되는 부분을 보다 중요하게 고려해야 하는데, 태그의 절단 후 VEGF의 생물학적 활성에 대한 보고는 지금까지 없었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2015-0034885호(2015.04.06 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag) 및 인간 혈관내피성장인자(human vascular endothelial growth factor; hVEGF) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공하는데 있다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 hVEGF 재조합 단백질의 생산방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 대장균 세포질에서 수용성 형태로 단백질을 과발현시키기 위해서, 재조합 hVEGF165 (hVEGF)를 다양한 태그-융합 형태로 제작하였다. 이 중에서, 융합 파트너의 적절한 접합을 돕기 위해 일반적인 분자 샤페론(chaperone)으로 작동하는 MBP 태그가 높은 수율로 생물학적 활성을 가진 수용성 hVEGF 생산하기에 가장 적절한 것으로 나타났다. 또한, TEV 단백질 분해효소(protease)를 태그 제거에 사용하였으며, 관심 표적 단백질은 여러 크로마토그래피를 조합하여 분리하고 본 발명을 완성하였다.
- [0011] 본 발명은 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag) 및 인간 혈관내피성장인자(human vascular endothelial growth factor; hVEGF) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.
- [0012] 본 발명에 있어서, 상기 수용성 향상 태그는 hVEGF 재조합 단백질을 수용성 형태로 발현시킬 수 있는 것이면 어느 것이든 제한 없이 이용가능하다. 예를 들어, 상기 수용성 향상 태그는 헥사히스티딘(hexahistidine; His6), 티오레독신(thioredoxin; Trx), 글루타치온 S-트랜스퍼라제(glutathione S-transferase; GST), 말토스 결합 단백질(Maltose Binding Protein, MBP), N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA), 단백질 이황화물 이성질화효소(protein disulfide isomerase; PDI) 및 PDI의 b'a' 도메인(b'a' domain of PDI; PDIB'a') 중 어느 하나일 수 있다.
- [0013] 상세하게는, 상기 hVEGF 유전자는 hVEGF165로서, 서열번호 1로 표시되는 핵산서열인 것을 특징으로 하고, 상기 Trx 유전자는 서열번호 2로 표시되는 핵산서열이고, 상기 NusA 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 핵산서열이고, 상기 PDI 유전자는 서열번호 4로 표시되는 핵산서열이고, 상기 PDIB'a' 유전자는 서열번호 5로 표시되는 핵산서열이고, 상기 MBP 유전자는 서열번호 6으로 표시되는 핵산서열인 것을 특징으로 한다. 한편, 상기 PDIB'a' 유전자는 PDI 유전자의 일부가 제거된 것이다. 또한, hVEGF 아미노산 서열은 서열번호 7로 표시하였다.
- [0014] 본 발명에 있어서, “벡터”는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.
- [0015] 본 발명에서 있어서, “발현 벡터”는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질 전환된 세포를 비 형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 암피실린(ampicilin), 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol) 과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.
- [0016] 본 발명에서 사용한 Gateway Vector system은 엔트리벡터와 목적벡터로 구성되며, 상기 엔트리벡터는 목적유전자의 양말단에 attL1, attL2를 갖는 벡터이며, 목적벡터는 attR1, attR2를 포함하는 벡터이다. 상기 엔트리벡터와 상기 목적벡터는 목적벡터의 attR1 및 attR2가 엔트리벡터의 attL1 및 attL2와 재조합효소에 의해 LR반응을 일으키며, 이 과정에서 엔트리벡터에 포함되어 있던 목적유전자가 목적벡터로 전달되게 되고, attR1과 attR2는 attB1과 attB2 서열로 치환되어진다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다. 바람직하게는 상기 미생물은 대장균일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 또한, 본 발명은 수용성 향상 태그 및 hVEGF 유전자가 포함된 유전자 구조체(gene construct)가 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 있는 재조합 미생물을 제공한다. 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 있어 상기 유전

자를 숙주세포의 게놈 염색체에 삽입하여서도 상기와 같이 재조합 벡터를 숙주세포에 도입한 경우와 동일한 효과를 가질 것은 자명하다 할 것이다.

[0019] 본 발명에서 상기 유전자를 숙주세포의 염색체상에 삽입하는 방법으로는 통상적으로 알려진 유전자조작방법을 사용할 수 있으며, 일 예로는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, 포스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 비바이러스성 벡터를 이용하는 방법들을 들 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 수용성 향상 태그-hVEGF 재조합 단백질을 발현시키는 단계; 상기 발현된 수용성 향상 태그-hVEGF 재조합 단백질에서 수용성 향상 태그를 제거하는 단계; 및 상기 수용성 향상 태그가 제거된 hVEGF 재조합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 hVEGF 재조합 단백질 생산방법을 제공한다.

[0021] 한편, 본 발명의 실시예에서는 담배 식각 바이러스(Tobacco Etch Virus; TEV) 단백질 분해효소(protease)를 사용했지만, 상기 단백질 분해효소(protease)는 당업계에서 통상적으로 사용될 수 있는 Factor Xa 단백질 분해효소, 트롬빈(Thrombin), 엔테로키나제(Enterokinase), 유비퀴틴-특이적 단백질 분해효소(Ubiquitin-specific protease), 푸린(Furin), 유전자 분해효소 I(Genease I) 또는 단백질 분해효소 K(Proteinase K)등을 적용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명에서 사용한 유전공학 기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.(2001)) 및 프레드릭 등의 문헌(Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1,2,3, John Wiley & Sons, Inc.(1994)) 등을 참조할 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명은 본 발명은 N-말단 태그를 이용한 생물학적 활성을 가진 인간 혈관내피성장인자(human vascular endothelial growth factor; hVEGF) 재조합 단백질의 수용성 발현 및 정제방법에 관한 것으로서, N-말단에 말토스 결합 단백질(Maltose Binding Protein, MBP)과 같은 수용성 향상 태그를 융합하여 대장균 내에서 용해도 및 안정도가 증가된 hVEGF 단백질을 분리, 정제하는 방법에 대한 것이다. 이렇게 얻어진 hVEGF 단백질은 혈관신생과 관련된 질병에 광범위한 치료제로서 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 도메인 구조의 모식도 및 MBP-hVEGF 구조체의 제작 과정을 나타낸다. (A) 게이트웨이 클로닝 방법을 사용하여 제작한 pHMW-hVEGF 벡터 맵. *E. coli*에서의 융합 단백질 발현은 IPTG-유도성 T7 프로모터에 의해 조절되고, 선별 마커는 암피실린(ampicillin)이다. (B) 7개의 융합 단백질들(His6-, Trx-, GST-, MBP-, NusA-, PDIb'a'- 및 PDI-hVEGF)의 구조 모식도를 나타낸다. 화살표는 TEV 단백질 분해효소 절단 사이트를 나타낸다.

도 2는 SDS-PAGE를 통해 *E. coli* Origami™ 2 (DE3)에서 태그된 hVEGF의 발현 분석 결과이다. hVEGF 단백질 발현은 (A) 37℃ 및 (B) 18℃에서 0.5 mM IPTG로 유도되었다. His6, 헥사(폴리)히스티딘(hexa(poly)histidine); Trx, 티오레독신(thioredoxin); GST, 글루타치온-S-트랜스퍼라아제(glutathione-S-transferase); PDIb'a', 인간 PDI의 b'a' 도메인; MBP, 말토스-결합 단백질(maltose-binding protein); NusA, N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance protein A); PDI, 인간 PDI; M, 분자량 마커; C, 음성 대조군으로서 IPTG 유도 전의 총 세포 단백질; I, IPTG 유도 후의 총 세포 단백질; P, 세포 초음파 처리 후 펠렛 분획; S, 세포 초음파 처리 후 수용성 상층액.

도 3은 *E. coli*에서의 hVEGF 정제에 대한 SDS-PAGE 분석 결과이다. (A) hVEGF 정제에 대한 모식도. (B) 크로마토그래피에 의해 *E. coli*로부터 정제된 His6-MBP-hVEGF. lane 5는 MBP 태그가 거의 완전히 절단되었다는 것을 나타낸다. M, 분자량 마커; lane 1, 음성 대조군으로서 IPTG 유도 전 총 세포; lane 2, IPTG 유도 후 총 세포; lane 3, 세포 초음파 처리 후 수용성 상층액; lane 4, MBP 컬럼을 사용하여 정제한 His6-MBP-hVEGF 융합 단백질(62.9 kDa); lane 5, TEV 단백질 분해효소로 절단된 His6-MBP 태그: His6-MBP (43.9 kDa) 및 hVEGF (19 kDa); lane 6 및 7, 헤파린 컬럼을 사용하여 정제한 hVEGF (19 kDa), 환원 및 비환원 조건에서의 각각 hVEGF 최종 산물의 순도.

도 4는 Flk1⁺ MPCs를 CD31⁺/CD144⁺ ECs로의 분화에 있어, 정제된 hVEGF의 in vitro 생물학적 활성 결과이다. *E.*

coli 및 동물세포로부터 정제된 hVEGF를 다양한 농도로 첨가하여 48시간 동안 배양한 Flk1⁺ MPCs의 FACS 분석 결과이다. (A) 밀도 플롯은 Flk1⁺ MPCs로부터 분화된 CD31⁺/CD144⁺ 발현 ECs의 백분율을 나타낸다. (B) 밀도 플롯은 CD144⁺ 및 CD140b⁺ 발현 세포 개체군을 나타낸다. hVEGF 처리는 CD144⁺ 발현 세포의 수를 현저하게 증가시킨 반면, CD140b⁺ 발현 세포는 감소시켰다. (C) 및 (D)는 다른 농도의 hVEGF로 48시간 배양 후, CD31⁺/CD144⁺ 발현 ECs의 세포 생존능을 나타낸다. 스케일 바, 500 μ m. (E) CD31⁺/CD144⁺ 발현 ECs 개체군의 백분율을 나타낸다. 각 샘플은 적어도 3번 이상 독립적으로 반복 실험을 수행하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0026] <실험예>

[0027] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0028] 1. 발현 벡터의 플라스미드 제작

[0029] hVEGF-발현 벡터를 제작하기 위해서, BP 및 LR 재조합 반응을 적용하였다. 간단히 설명하면, 성숙 hVEGF의 165개 아미노산을 코딩하는 *E. coli* 코돈 최적화된 올리고뉴클레오타이드(NCBI Reference Sequence: BAA78418.1)를 합성하였다(GenScript, Piscataway, NJ). 담배 식각 바이러스 인식 사이트(Tobacco etch virus recognition site; TEVrs)인 ENLYFQ/G는 hVEGF 올리고뉴클레오타이드의 N-말단에 삽입하였다. 그 후, pENTR-hVEGF로 명명한 엔트리 클론을 얻기 위해서, 전체 합성된 DNA 서열은 BP 재조합 반응에 의해 pDONOR207로 옮겨졌다. 다음으로, pENTR-hVEGF와, 7개의 최종 벡터인 pDEST-HGWA, pDEST-HXGWA, pDEST-HGGWA, pDEST-HMGWA, pDEST-HNGWA, pDEST-PDI 및 pDEST-PDIB'a' 사이에 LR 재조합 반응을 수행하였다. 모든 발현 클론들의 서열은 서열분석을 통해 확인하였다(Macrogen, Daejeon, Korea).

[0030] 2. 박테리아에서의 발현 벡터 발현

[0031] 7개의 발현 플라스미드들을 포함하는 *E. coli* Origami™ 2 (DE3) 세포(Novagen, Madison, WI)를 LB 배지에서 37℃, 200rpm로 배양하였다. 플레이팅된 형질전환체의 단일 콜로니를 50 μ g/mL 암피실린이 포함된 5 mL의 LB 배지에 접종하고, 37℃에서 밤새도록 배양한 후, 1:200 비율의 암피실린이 포함된 LB 배지로 옮겼다. 그 후, 진탕 배양기에서 37℃, 200rpm로 배양되었다. 단백질 발현을 유도하기 위해서, OD₆₀₀이 0.7에 이르렀을 때, 0.5 mM 이소프로필- β -D-티오갈락토시드(isopropyl- β -D-thiogalactoside; IPTG)를 배양액에 첨가하였고, 37℃에서 4시간 동안 유지하거나, 18℃에서 18시간 동안 유지하였다. 단백질 발현 수준을 측정하기 위해서, 세포를 수확하였고, 10% 트리신 젤(tricine gel)을 사용하여 SDS-PAGE에 의해 분석하였다.

[0032] 3. 재조합 hVEGF의 정제

[0033] 배양된 세포들은 500 mL 배양을 통해 3,800 $\times$ g에서 30분 동안 원심분리하여 수확하였다. 세포 펠렛(pellet)은 50 mL 완충액 A (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 250 mM NaCl, 5% glycerol (v/v))에 재현탁하였고, 용해물(lysate)이 완전히 균질화 될 때까지 ultrasonic cell disruptor JY99-IIDN (Ningbo Scientz Biotechnology, Guangdong, China)로 파괴하였다. 23,000 $\times$ g에서 30분 동안 원심분리하여 용해물로부터 상층액을 수집하였고, 이는 추후 정제를 위해 사용되었다.

[0034] 미정제 샘플로부터 MBP-hVEGF 단백질은 MBP 크로마토그래피에 의해 먼저 정제되었다. 여과된 상등액은 완충액 A로 미리-평형화된 2 $\times$ 5 mL MBP Trap HP column (GE Healthcare, Piscataway, NJ)에 로딩하였다. 잔여 비-특이적인 결합 불순물을 제거하기 위해서 컬럼은 10-15 CV의 완충액 A로 씻어냈고, 단백질 샘플은 5 CV의 100% 완충액 B (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 250 mM NaCl, 5 % glycerol (v/v), 50 mM maltose)에 완전히 용출시켰다.

[0035] 단백질 절단을 위하여, 전체 20 mL의 일부 분리된 MBP-hVEGF 단백질을 1:10 (w/w) 비율의 TEV 단백질 분해효소(protease)로 처리하였다. TEV 활성은 고농도의 염에 의해 억제될 수 있으므로, 절단 전에 단백질 샘플은 완충액 C (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5% glycerol (v/v))로 투석하였다. 그 후, 샘플은 최종 부피 150 mL로 완충액 C에 희석하였고, 반응은 18℃에서 밤새도록 수행하였다. 절단된 샘플은 NaCl 최종농도가 1 M이 되도록 4 M NaCl

가 함유된 50 mL의 완충액 C로 혼합되었다. 1 h 동안 반응시킨 후, 샘플은 $23,000 \times g$ 로 20분 동안 원심분리시켰고, 일부 응집물을 제거하기 위해서, 0.2 μ m Acrodisc Syringe Filters, Supor Membrane (Pall Corporation, Ann Arbor, MI)가 사용되었다. 정제된 샘플은 완충액 A로 미리-평형화된 2×5 mL HisTrap HP column (GE Healthcare)에 즉시 적용하였다. 이 단계에서, 10% 완충액 D (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 250 mM NaCl, 5% glycerol (v/v), 1 M imidazole)로 컬럼을 씻어낼 때, hVEGF는 일부 MBP 태그와 함께 용출된 반면, 잔여 MBP 태그 및 TEV 단백질 분해효소는 100% 완충액 D가 포함된 컬럼에서 씻겨 내려갔다. 전체 30 mL의 hVEGF 및 MBP 혼합 분획은 완충액 C (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5% glycerol (v/v))로 투석하여, 염분을 제거하였다. 그 후, 남아있는 MBP 태그를 완전히 제거하기 위해서, HiTrap Heparin HP column (GE Healthcare)을 이용하여 추가적으로 정제하였다. 샘플을 컬럼에 로딩하기 전에, 효율적인 분리를 위하여 5 mL 컬럼을 완충액 C로 미리-평형화시켰다. MBP 태그는 유량 통과 단계(flow-through step)에서 제거되지만, hVEGF는 이후 100% 완충액 E (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5% glycerol (v/v), 1 M NaCl)에 용출되었다. 완충액을 1X PBS, pH 7.4로 변경한 최종 정제된 hVEGF는 동결건조시켰고, 추후 실험을 위해 -80°C 에서 보관하였다.

[0036] 4. 전기영동 및 실버 염색

[0037] 10% tricine SDS-PAGE gel에 로딩하기 전에, 단백질 분획은 $5 \times$ 샘플 완충액 (312.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 50% glycerol, 5% SDS, 0.05% bromophenol blue, 100 mM DTT)에 혼합하여 준비하였다. 그 후, 단백질 밴드는 Coomassie brilliant blue R-250 (Amresco, Solon, OH) 염색을 통하여 가시화되었다. 용합 단백질의 상대적 발현 및 용해도 수준을 확인하기 위해서, ImageJ image analyzer (<http://imagej.nih.gov/ij>)가 사용되었는데, 이는 전체 *E. coli* 발현 단백질에 대한 용합 단백질의 상관관계 및 전체 발현 용합 단백질에 대한 수용성 단백질의 상관관계를 정량하기 위한 것이다.

[0038] 5. 엔도톡신(endotoxin) 분석

[0039] 정제된 hVEGF 샘플의 엔도톡신 수준을 측정하기 위해서, QCL-1000™ Endpoint Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate Assay kit (Lonza, Basel, Switzerland)을 사용하였다. 우선 50 μ L의 hVEGF, 표준액 및 엔도톡신-프리 워터를 37°C 에서 전-평형화된 96 웰-플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 그 후, 50 μ L의 LAL을 첨가하였고, 각 샘플을 혼합한 후, 37°C 에서 10분 동안 반응시켰다. 계속하여, 37°C 에서 미리 예열된 100 μ L 기질 용액을 샘플에 첨가한 후, 지속적으로 파이펫팅하였다. 16분 동안 반응시킨 후, 반응을 중단시키기 위해서 100 μ L의 중단 시약 (25% v/v glacial acetic acid in water)을 첨가하였고, 405-410 nm에서 각 샘플의 흡광도를 분광광도계로 측정하였다.

[0040] 6. 활성 분석

[0041] E14tg2a 배아 줄기 세포주는 Dr. Jun K. Yamashita (Kyoto University)로부터 제공받았다. ESCs는 배지 (Glasgow's MEM supplemented with 10% KnockOut Serum Replacement, 5% fetal bovine serum (FBS), 1% non-essential amino acids, 1% sodium pyruvate solution, 1% Penicillin-Streptomycin, 0.1 mM 2-Mercaptoethanol 및 2000 U/ml leukemia inhibitory factor (Merck Millipore, Darmstadt, Germany))에서 유지시켰다. ESCs는 0.1% 젤라틴 코팅된 플라스크에서 분화배지(α -MEM supplemented with 10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin 및 0.1 mM 2-Mercaptoethanol)에 96-108 시간 동안, $1000 - 2000 \text{ cells/cm}^2$ 밀도로 배양되었다. 세포는 Accutase (Merck Millipore)를 이용하여 수확되었고, Flk-1 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)로 표지되었다. Flk1⁺ mesodermal precursor cells (MPCs)는 magnetic-activated cell sorting (AutoMACS Pro Separator, Miltenyi Biotec)에 의해 분리되었다.

[0042] 그 후, Flk1⁺ MPCs를 collagen type IV (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)-코팅된 접시에 5000 cells/cm^2 밀도로 접종하였고, 여러 농도의 정제된 *E. coli*-유래 또는 CHO-유래 hVEGF가 첨가된 분화 배지에 배양하였다. 48시간 후, 세포는 0.05% trypsin-EDTA로 수확하였고, DPBS에 녹인 100 μ L의 0.5% BSA 당 1×10^6 세포로 재현탁하였다. 세포는 30분 동안 다음의 항체로 반응시켰다: Phycoerythrin-conjugated anti-mouse CD144 (clone eBioBV13, eBioscience, San Diego, CA), PerCP/eFluor710-conjugated anti-mouse CD31 (clone 390, eBioscience), Allophycocyanin-conjugated anti-mouse CD140b (clone APB5, eBioscience). 분석은 FACSria II (BD Biosciences)를 통해 수행하였다. 상-전이 이미지(Phase-contrast images)는 Axiovert 200M (Zeiss, Jena, Germany)을 통해 얻었다.

[0043] <실시예 1> hVEGF-발현 플라스미드의 제작 및 수용성 발현 평가

[0044] 도 1A에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 있어서 BP 및 LR 반응은 성공적으로 수행되었다. 결과적으로, hVEGF의 코돈 최적화된 DNA 서열은 서브클로닝되었고, 여러 융합 태그 유전자들과 재조합되었다. 그 결과, hVEGF N-말단에 His6, Trx, GST, MBP, NusA, PDI 및 PDIB'a'가 융합된 7개의 구조체를 얻을 수 있었다(도 1B). 또한, 다운스트림(downstream) 정제 및 태그 절단을 위해, His6 또는 His8와 TEVrs를 재조합 융합 단백질에 포함시켰다(도 1B). hVEGF를 융합 형태로 과발현시키기 위해서 Origami™ 2 (DE3) *E. coli* 균주가 박테리아 숙주로서 사용되었다.

[0045] IPTG-유도성 T7 프로모터의 조절 하에서 Origami 2 (DE3)에서 발현되도록, hVEGF 발현 벡터를 디자인하였다. 발현 수준 및 용해도는 태그들 및 온도에 따라 달라졌다. 37°C에서는, 다른 태그들과 비교시 Trx-hVEGF, MBP-hVEGF 및 His6-hVEGF가 70% 이상으로 가장 높은 발현 수준을 나타냈다(도 2A 및 표 1). 18°C의 낮은 발현 온도는 모든 구조체의 발현 수준을 크게 증가시키지는 않았으나, NusA-hVEGF, PDI-hVEGF 및 PDIB' a' -hVEGF의 용해도를 상당히 개선시켰다(도 2B 및 표 1). 특히, MBP-hVEGF는 2가지 온도 조건에서 가장 높은 발현 수준 및 용해도를 나타냈고, MBP는 상대적으로 정제가 쉽기 때문에 후속 연구를 위해 선택되었다. 아래 표 1은 7개의 다양한 태그를 가진 hVEGF의 발현 및 용해도 수준을 나타낸다.

표 1

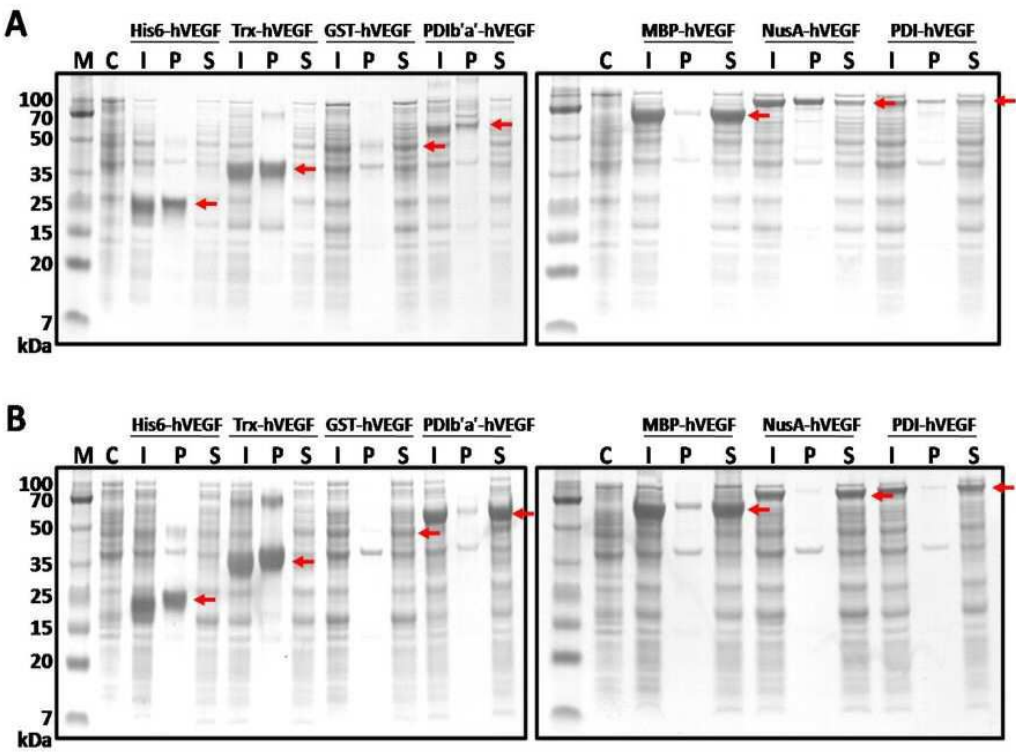
	Tag	Tag size (kDa)	Fusion protein size (kDa)	Expression level (%)		Solubility (%)	
				37°C	18°C	37°C	18°C
hVEGF (19 kDa)	His6	0.8	22.6	69.1	74.3	0.1	0.1
	Trx	11.7	34.4	77.4	79.3	2.5	3.9
	GST	25.6	48.3	20.2	22.6	83.1	97
	PDIB'a'	30.6	53.6	48.9	68.4	3.1	91.5
	MBP	40.2	62.9	76.4	78.7	95.6	98.7
	NusA	54.7	77.5	74.0	73.2	38.5	98.2
	PDI	54.8	77.8	31.2	32.5	48.6	96.8

[0046]

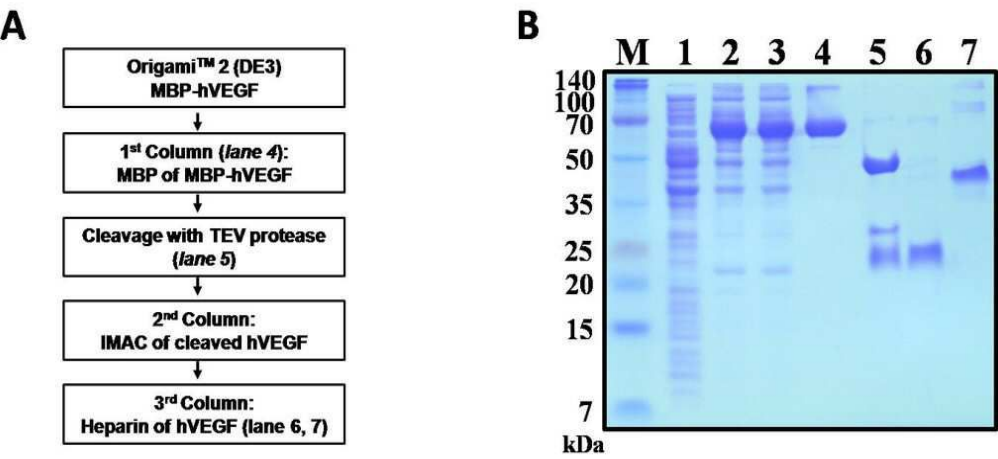
[0047] <실시예 2> MBP-hVEGF 구조체로부터 hVEGF의 정제

[0048] 500 mL 배양으로부터 제조한 정제된 상등액을 정제 초기 단계로서 MBP Trap HP 컬럼 상에 로딩하였다. MBP 태그는 컬럼 레진의 텍스트린 리간드와 높은 친화도를 갖기 때문에, 비-특이적으로 결합하는 단백질을 제거하기 쉬운 반면, MBP-hVEGF가 컬럼 상에 여전히 단단히 결합되어 있다. 도 3의 lane 4에서 나타낸 바와 같이, MBP-hVEGF와 연관된 ~44 kDa의 확실한 단백질 밴드는 용출 분획에서 검출되었다. 그 후, 일부 정제된 MBP-hVEGF의 절단 반응을 수행하기 위해서, TEV 단백질 분해효소를 사용하였다. MBP 태그 및 hVEGF를 효율적으로 분리시키기 위한 TEV 단백질 분해효소의 활성은 거의 100%였다(도 3, lane 5). MBP 태그 및 TEV 단백질 분해효소는 모두 6개의 히스티딘 태그를 구조체 내에 포함하고 있기 때문에, hVEGF의 분리를 촉진시키기 위해서 HisTrap HP 컬럼을 정제 과정에 추가하였다. 이 과정에서, TEV 단백질 분해효소는 컬럼에 단단히 결합되어 있고, 고농도의 이미다졸(imidazole)에 의해 용출되지만, 일부 MBP 태그 및 hVEGF는 더 빨리 함께 용출되었다. 이론적으로, hVEGF는 헤파린 리간드에 높은 결합 친화도를 갖는 헤파린-결합 도메인을 포함하므로, HiTrap Heparin HP 컬럼은 단백질 혼합물을 정제하기 위해서 사용되었다. MBP 태그는 컬럼에 결합하는 어떤 헤파린-결합 도메인을 갖고 있지 않아, 유량 통과 단계(flow-through step)에서 씻겨 나가게 된다. SDS-PAGE 결과, hVEGF는 컬럼에 결합하였고, 1 M NaCl가 함유된 완충액에 효과적으로 용출되었다. 따라서, 환원 조건에서 hVEGF의 순도는 약 98%였다(도 3, lane 6). 또한, 비-환원 조건에서는 정제된 샘플이 hVEGF의 이량체 형태 및 단량체 형태를 모두 포함하는 것으로 나타났다(도 3, lane 7). 500 mL의 세포 배양을 통해 약 0.78 mg의 순수한 hVEGF를 얻어냈다(표 2). 아래 표 2는 18°C로 *E. coli*에서 발현된 MBP-hVEGF로부터 정제된 hVEGF 수율을 나타낸다.

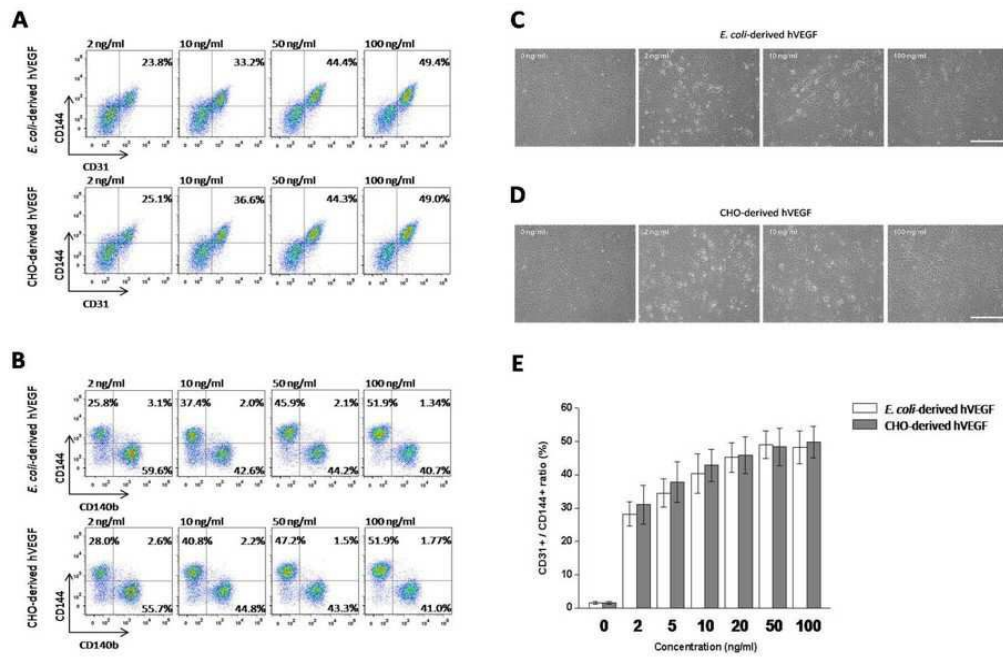
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- <120> Soluble overexpression and purification method of active recombinant human vascular endothelial growth factor
- <130> ADP-2015-0386
- <160> 7
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 495
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

```

gccccgatgg ccgagggggg tggccagaat caccatgaag ttgttaaatt catggatgtg      60
tatcaacgct cgtattgccca cccaatcgaa acctggtcgc acatttttca ggaatatccc      120
gatgaaatcg aatacatittt caaacctagt tgtgtacett taatgagatg tggaggctgt      180

tgcaacgatg agggctctgga atgtgtccca actgaggagt caaatataac aatgcagatt      240
atgcggatta agccgcatac gggccaacac attggtgaaa tgtcattttct gcaacataat      300
aatgcgaat gccgacctaa aaaagacaga gcacgccagg aaaatccctg tgggccgtgc      360
tccgaacgtc gtaagcatct ttctgtgcaa gatccgcaga cctgtaaatg ttcttgtaaa      420
aacacggatt ctctgttcaa agcgcgtcag ttggaactga atgagcgcac atgccggtgt      480

```

gacaaaccac gcagg 495

<210> 2

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

agcgataaaa ttattcacct gactgacgac agttttgaca cggatgtact caaagcggac 60

ggggcgatcc tcgtcgattt ctgggcagag tgggtcggtc cgtgcaaaat gatcgccccg 120

attctggatg aaatcgctga cgaatatcag ggcaaaactga ccgttgcaaa actgaacatc 180

gatcaaaacc ctggcactgc gccgaatat ggcatccgtg gtatcccgac tctgctgctg 240

ttcaaaaacg gtgaagtggc ggcaacaaaa gtgggtgcac tgtctaaagg tcagttgaaa 300

gagttcctcg acgctaacct ggcc 324

<210

> 3

<211> 1482

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

aacaaagaaa ttttggctgt agttgaagcc gtatccaatg aaaaggcgct acctcgcgag 60

aagattttcg aagcattgga aagcgcgtg gcgacagcaa caaagaaaaa atatgaacaa 120

gagatcgacg tccgcgtaca gatcgatcgc aaaagcggtg attttgacac ttccgctcgc 180

tggtagttg ttgatgaagt caccagccg accaaggaaa tcacccttga agccgcacgt 240

tatgaagatg aaagcctgaa cctgggcgat tacgttgaag atcagattga gtctgttacc 300

tttgaccgta tcaactacca gacggcaaaa caggttatcg tgcagaaagt gcgtgaagcc 360

gaacgtgcga tggtagttga tcagttccgt gaacacgaag gtgaaatcat caccggcgtg 420

gtgaaaaaag taaaccgcga caacatctct ctggatctgg gcaacaacgc tgaagccgtg 480

atcctgcgcg aagatatgct gccgcgtgaa aacttccgcc ctggcgaccg cgttcgtggc 540

gtgctctatt ccgttcgcc ggaagcgcgt ggcgcgcaac tgttcgtcac tcgttccaag 600

ccggaatgc tgatcgaact gttccgtatt gaagtgccag aaatcggcga agaagtgatt 660

gaaattaaag cagcggctcg cgatccgggt tctcgtgcga aaatcgcggt gaaaaccaac 720

gataaacgta tcgatccggt aggtgcttgc gtaggtatgc gtggcgcgcg tgttcaggcg 780

gtgtctactg aactgggtgg cgagcgtatc gatatcgtcc tgtgggatga taaccggcg 840

cagttcgtga ttaacgcaat ggcaccggca gacgttgctt ctatcgtggt ggatgaagat 900
aaacacacca tggacatcgc cgttgaagcc ggtaatctgg cgcaggcgat tggccgtaac 960
ggtcagaacg tgcgtctggc ttccgaactg agcggttggg aactcaacgt gatgaccgtt 1020
gacgacctgc aagctaagca tcaggcggaa gcgcacgcag cgatcgacac cttcaccaaa 1080
tatctcgaca tcgacgaaga cttcgcgact gttctggttag aagaaggctt ctcgacgctg 1140
gaagaattgg cctatgtgcc gatgaaagag ctgttggaat tcgaaggcct tgatgagccg 1200

accgttgaag cactgcgcga gcgtgctaaa aatgcactgg ccaccattgc acaggcccag 1260
gaagaaagcc tcggtgataa caaacccgct gacgatctgc tgaaccttga aggggtagat 1320
cgtgatttgg cattcaaaact ggccgcccgt ggcggttggta cgctggaaga tctcgccgaa 1380
cagggcattg atgatctggc tgatatcgaa gggttgaccg acgaaaaagc cggagcactg 1440
attatggctg cccgtaatat ttgctgggtc ggtgacgaag cg 1482

<210> 4
<211> 1461
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 4
gacgcaccgg aagaagagga tcatgtcctg gttctgcgca aaagcaactt cgcggaagca 60

ctggccgcac ataaatatct gctggtggaa ttttatgctc cttggtgcgg tcattgcaaa 120
gccctggccc cggagtacgc caaagccgca ggtaaactga aagctgaagg tagcgaaatc 180
cgcttgccaa aggttgatgc tacggaagag agtgacctgg cgcagcagta tgggtgccgc 240
ggctatccta caattaaatt cttccgtaac ggtgataccg catctccaaa agaataatcc 300
gctggtcgcg aggcggacga tattgttaac tggctgaaga aacgcactgg ccctgccgca 360
accacctgc ctgatggcgc tgctgccgaa agcctggctg aaagtagcga agttgccgtc 420
attggtttct ttaaggatgt agaatctgac agtgccaaac agtttctgca agcggcagag 480

gctatcgatg acatcccgtt cggcatcacc tctaacagtg acgtattcag taaataccaa 540
ctggataaag acggcgttgt gctgttcaag aaatttgatg aaggctgcaa caactttgag 600
ggtgaggatg ccaaggagaa cctgtcggat ttatttaagc acaaccaact gccgctggtt 660
attgaattta cagaacaaac ggcgccgaaa attttcggcg gtgagattaa aacacatatac 720
ctgctgtttc tgccgaagag cgtttctgat tacgatggta aactgagtaa ttttaaacc 780
gccgcagaat ctttcaaagg taagattctg ttcattttca ttgatagcga ccacacggac 840
aatcagcgta tcctggagtt ctttggctctg aagaaagagg aatgcccggc tgtgcgtctg 900

attacgctgg aagaggaaat gacaaagtac aagccggaga gcgaggaact gactgcagaa 960
cgtatcacccg aattttgtca tcgtttcctg gaggggaaga ttaagccgca tctgatgagc 1020
caggaactgc cggaggattg ggacaaacag ccagtgaag ttctggtggg gaagaatttt 1080
gaagatgtgg ctttcgatga gaagaagaat gtgtttgtgg agttctacgc cccgtggtgt 1140
gggcactgta aacagctggc gccgatctgg gacaaactgg gcgaaacgta taaagatcac 1200
gaaaatattg tgatcgcgaa aatggattct accgcgaatg aagtagaagc ggtaaaagta 1260
cactcttttc cgacgtgaa attctttcca gcgagcgagg atcgtactgt cattgattat 1320

aatggcgaac gtactctgga cggctttaag aaatttctgg aaagcggcgg ccaggatggc 1380
gcgggcgatg atgatgacct ggaagacctg gaagaagcgg aggaaccaga catggaggag 1440
gatgacgacc agaaagcggc c 1461

<210> 5
<211> 801
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 5

attgaattta cagaacaaac ggcgccgaaa attttcggcg gtgagattaa aacacatc 60
ctgctgtttc tgccgaagag cgtttctgat tacgatggta aactgagtaa ttttaaaacc 120
gccgcagaat ctttcaaagg taagattctg ttcattttca ttgatagcga ccacacggac 180

aatcagcgta tcctggagtt ctttggcttg aagaaagagg aatccccggc tgtgcgtctg 240
attacgctgg aagaggaaat gacaaagtac aagccggaga gcgaggaact gactgcagaa 300
cgtatcacccg aattttgtca tcgtttcctg gaggggaaga ttaagccgca tctgatgagc 360
caggaactgc cggaggattg ggacaaacag ccagtgaag ttctggtggg gaagaatttt 420
gaagatgtgg ctttcgatga gaagaagaat gtgtttgtgg agttctacgc cccgtggtgt 480
gggcactgta aacagctggc gccgatctgg gacaaactgg gcgaaacgta taaagatcac 540
gaaaatattg tgatcgcgaa aatggattct accgcgaatg aagtagaagc ggtaaaagta 600

cactcttttc cgacgtgaa attctttcca gcgagcgagg atcgtactgt cattgattat 660
aatggcgaac gtactctgga cggctttaag aaatttctgg aaagcggcgg ccaggatggc 720
gcgggcgatg atgatgacct ggaagacctg gaagaagcgg aggaaccaga catggaggag 780
gatgacgacc agaaagcggc c 801

<210> 6
<211> 1098
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

aaaactgaag aaggtaaact ggtaatctgg attaacggcg ataaaggcta taacggtctc 60
gctgaagtcg gtaagaaatt cgagaaagat accggaatta aagtcaccgt tgagcatccg 120

gataaactgg aagagaaatt cccacaggtt gcggcaactg gcgatggccc tgacattatc 180
ttctgggcac acgaccgctt tgggtggctac gctcaatctg gcctgttggc tgaaatcacc 240
ccggacaaag cgttccagga caagctgtat ccgtttacct gggatgccgt acgttacaac 300
ggcaagctga ttgcttaccg gatcgctgtt gaagcgttat cgctgattta taacaaagat 360
ctgctgccga acccgccaaa aacctgggaa gagatcccgg cgctggataa agaactgaaa 420
gcgaaaggta agagcgcgct gatgttcaac ctgcaagaac cgtacttcac ctggccgctg 480
attgctgctg acgggggtta tgcgttcaag tatgaaaacg gcaagtacga cattaaagac 540

gtgggcgtgg ataacgctgg cgcgaaagcg ggtctgacct tcctggttga cctgattaaa 600
aacaacaca tgaatgcaga caccgattac tccatcgcag aagctgcctt taataaaggc 660
gaaacagcga tgaccatcaa cggcccgctgg gcatgggtcca acatcgacac cagcaaagtg 720
aattatgggtg taacggtact gccgaccttc aagggtcaac catccaaacc gttcgttggc 780
gtgctgagcg caggtattaa cgccgccagt ccgaacaaag agctggcaaa agagttcctc 840
gaaaactatc tgctgactga tgaaggtctg gaagcgggtta ataaagacaa accgctgggt 900
gccgtagcgc tgaagtctta cgaggaagag ttggcgaaag atccacgtat tgccgccacc 960

atggaaaacg ccagaaaagg tgaaatcatg ccgaacatcc cgcagatgtc cgctttcttg 1020
tatgccgtgc gtactgcggt gatcaacgcc gccagcggtc gtcagactgt cgatgaagcc 1080
ctgaaagacg cgcagact 1098

<210> 7

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys

1 5 10 15

Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu

20 25 30

Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys

35	40	45	
Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu			
50	55	60	
Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile			
65	70	75	80
Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe			
85	90	95	
Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg			
100	105	110	
Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe			
115	120	125	
Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser			
130	135	140	
Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys			
145	150	155	160
Asp Lys Pro Arg Arg			
165			