



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0096204
(43) 공개일자 2011년08월30일

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0015522

(22) 출원일자 2010년02월22일

심사청구일자 2010년02월22일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전 유성구 궁동 220 충남대학교

(72) 발명자

허강민

대전광역시 서구 둔산동 목련아파트 203-801

원민호

충청남도 연기군 전의면 신방리 354

(74) 대리인

김원준

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) A20에 특이결합하는 펩타이드 및 이를 함유하는 암 치료-예방 조성물

(57) 요약

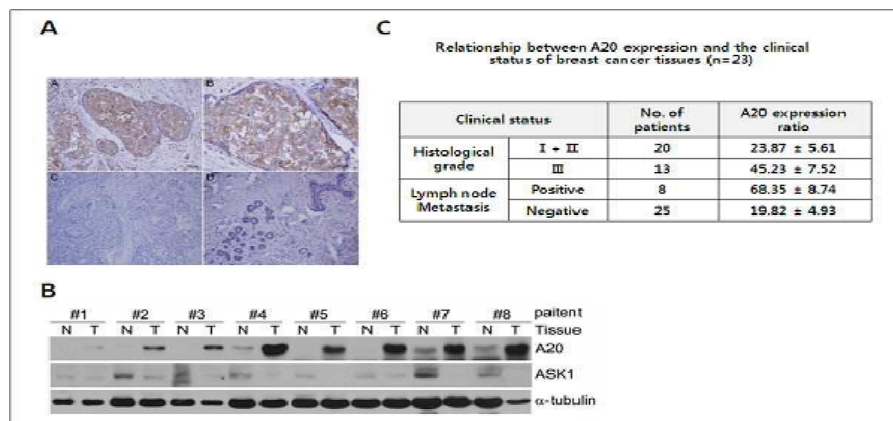
본 발명은 암조직에서 특이적으로 발현하는 항-세포사멸 단백질에 특이적으로 결합하여 그 활성을 저해하는 펩타이드 및 상기 펩타이드를 함유하는 암 치료-예방 조성물에 관한 것이다.

이상과 같이 본 발명에 의하면 암 환자의 조직에서 과발현되는 A20의 함량을 측정함으로써 유방암 진단법 및 예후 예측에 활용할 수 있게 된다.

또한 본 발명에 의하면, 암 조직에서 활성화되고 암의 전이과정에 관여하는 것으로 확인된 A20의 활성을 억제하는 펩타이드를 제공함으로써 암의 예방과 치료제로 활용할 수 있게 된다.

현재 유방암의 치료는 항-에스트로젠 제제를 이용한 호르몬 요법이 주류를 이루고 있다. 그러나 에스트로젠 수용체가 없거나 미미한 환자의 경우 치료에 어려움이 있다. 본 발명에 의하면, 호르몬 요법이 아닌 새로운 펩타이드를 처방할 수 있으므로, 특히 유방암 치료에 많은 도움이 될 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	0720560
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	충남대학교병원
연구사업명	암정복추진연구개발사업
연구과제명	암 등록 사업과 연계한 암 바이오 마커 개발 사업
기여율	3/10
주관기관	충남대학교산학협력단
연구기간	2009.05.25 ~ 2010.05.24이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	R13-2007-020-01002-0
부처명	한국과학재단
연구관리전문기관	충남대학교산학협력단
연구사업명	선도연구센터육성(MRC)지원사업
연구과제명	감염신호 조절을 담당하는 새로운 신호전달 네트워크 구축
기여율	4/10
주관기관	충남대학교산학협력단
연구기간	2009.03.01 ~ 2011.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	FG06-2-17
부처명	한국과학재단
연구관리전문기관	충남대학교산학협력단
연구사업명	특정연구개발사업
연구과제명	세포사면 조절 단백질기능을 이용한 중앙세포 타겟발굴 및 항암제 내성 극복 기술개발
기여율	3/10
주관기관	충남대학교산학협력단
연구기간	2009.04.01 ~ 2010.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

생체로부터 분리된 조직내의 A20 발현량을 분석하여 암발생 여부 및 암 진행정도를 진단하는 방법.

청구항 2

A20의 아미노 말단 또는 ASK1의 아미노 말단과 결합하는 펩타이드.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

서열번호 1의 아미노산 서열의 일부 또는 이를 포함하는 서열, 또는 이들과 유사한 서열의 펩타이드.

청구항 4

제 2 항에 있어서,

A20 zinc finger motif domain의 일부 또는 이를 포함하는 서열, 또는 이들과 유사한 서열의 펩타이드.

청구항 5

제 2 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 펩타이드를 유효성분으로 하는 암 예방-치료용 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 암은 유방암 또는 간암인 것을 특징으로 하는 암 예방-치료용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 암조직에서 특이적으로 발현하는 항-세포사멸 단백질에 특이적으로 결합하여 그 활성을 저해하는 펩타이드 및 상기 펩타이드를 함유하는 암 치료-예방 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 여러 염증 매개인자 또는 암 촉진인자(tumor promoter)에 의해 활성화되는 NF- κ B는 항-세포사멸 단백질의 발현을 증가시킴으로써 암세포성장을 조절하는 것으로 알려져 있다. 임상적으로 다양한 악성종양(leukemia, lymphoma, melanoma, 췌장암, 유방암, 두경부암 등)에서 NF- κ B의 활성이 관찰되는데, 암세포에서 활성화된 NF- κ B는 암전이와 관련된 여러 인자들의 발현을 조절하는 기능을 함으로써 세포의 암화과정에서의 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다.

[0003] 또한 현재 암환자들에게 임상적으로 사용되고 있는 여러 항암 화학요법(taxol, doxorubicin, daunorucin, etoposide, vincristine, comptothecin 등) 또는 방사능 요법을 처치하는 과정에서 불가피하게 NF- κ B가 활성화되어 암세포들로 하여금 이들 항암요법에 대한 저항성을 갖게 함으로서 암치료의 효과를 저해하고 있는 것으

로 확인되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 본 발명은 암환자의 조직으로부터 NF- κ B에 의해 활성이 조절되는 항-세포사멸 단백질을 추적함으로써 암을 진단할 수 있는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0005] 또한 본 발명은 NF- κ B에 의해 활성이 조절되는 항-세포사멸 단백질을 분석하고 그 기작을 규명하여 궁극적으로는 암의 예방 및 치료에 적합한 물질을 개발하고 활용하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0006] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은, 생체로부터 분리된 조직내의 A20 발현량을 분석하여 암발생 여부 및 암 진행정도를 진단하는 방법에 관한 것이다.
- [0007] 또한 본 발명은, A20의 아미노 말단 또는 ASK1의 아미노 말단과 결합하는 펩타이드에 관한 것이다. A20의 아미노 말단 또는 ASK1의 아미노 말단과 결합하는 펩타이드는 A20와 ASK1의 결합을 경쟁적으로 방해함으로써 결과적으로 A20과의 결합에 의한 ASK1의 분해(활성상실)가 방지되는 효과를 보이게 된다.
- [0008] 이때 상기 펩타이드는, 서열번호 1 즉, ASK1의 아미노 말단 domain (아미노산 서열 1 - 668번)의 일부 또는 이를 포함하는 서열, 또는 이들과 유사한 서열의 펩타이드일 수 있다.
- [0009] 또한 상기 펩타이드는 A20 zinc finger motif domain의 일부 또는 이를 포함하는 서열, 또는 이들과 유사한 서열의 펩타이드일 수 있다.
- [0010] 또한 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 하는 암 예방-치료용 조성물에 관한 것이다. 이때 상기 암은 유방암 또는 간암일 수 있다.

발명의 효과

- [0011] 이상과 같이 본 발명에 의하면 암 환자의 조직에서 과발현되는 A20의 함량을 측정함으로써 유방암 진단법 및 예후 예측에 활용할 수 있게 된다.
- [0012] 또한 본 발명에 의하면, 암 조직에서 활성화되고 암의 전이과정에 관여하는 것으로 확인된 A20의 활성을 억제하는 펩타이드를 제공함으로써 암의 예방과 치료제로 활용할 수 있게 된다.
- [0013] 현재 유방암의 치료는 항-에스트로젠 제제를 이용한 호르몬 요법이 주류를 이루고 있다. 그러나 에스트로젠 수용체가 없거나 미미한 환자의 경우 치료에 어려움이 있다. 본 발명에 의하면, 호르몬 요법이 아닌 새로운 펩타이드를 처방할 수 있으므로, 특히 유방암 치료에 많은 도움이 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 각종 암 조직에서의 NF- κ B 의존적 항-세포사멸 단백질 발현을 보여주는 블롯팅 사진(A-D) 및 A20의 mRNA 발현을 보여주는 블롯팅 사진(E)이다.
- 도 2는 유방암 환자의 암조직염색 사진(A) 및 Western blotting 사진(B)이다.
- 도 3은 여러 유방암 세포주(도 3A)에서 A20 및 MMP (암 전이의 마커) 발현을 비교한 도면이다.

도 4는 유방암세포에 A20를 인위적으로 과발현시키면 암세포 전이능력이 향상되고, 암세포 전이에 필요한 여러 단백질 (MMP를 비롯한 protease)의 발현이 증가됨을 보여주는 도면이다.

도 5는 A20 과발현에 의하여 JNK의 활성화가 지속적으로 억제되며, TNF에 의한 세포사멸도 억제됨을 보여주는 도면이다.

도 6은 A20과 JNK upstream kinase의 결합관계를 보여주는 도면이다.

도 7는 A20 과발현에 의한 ASK1의 발현 감소현상 및 그 기작을 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하 첨부된 도면과 사전실험 및 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 또한 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

<사전실험>

1. 고형암조직으로부터 항세포사멸 단백질들의 발현 분석

세포사멸을 조절하는 NF- κ B 의존적 항세포사멸 단백질들의 발현과 암의 직접적인 연관성을 확인하기 위하여, 충남대학교 병원에서 외과적 수술을 받은 간암, 유방암, 위장암 및 대장암환자의 조직으로부터 단백질을 추출하여 항-세포사멸 단백질들의 발현량을 비교하였다(도 1에서 A~D). 도에서 N은 정상인 유래의 조직이고 C는 암환자 유래의 조직이다.

분석 결과, 특히 간암 및 유방암에서 항-세포사멸 단백질의 일종인 A20의 발현이 특이적으로 활성화되어 있고, 다른 항-세포사멸 단백질 종류인 IAP family 단백질 (XIAP, CIAP2)의 발현은 유의적인 차이 없음을 확인하였다.

각각의 암조직으로부터 mRNA를 분리하여 그 발현을 비교하였을 때도 간암 및 유방암에서 A20이 특이적으로 증가되었다(도 1에서 E).

2. 유방암 조직에서의 A20 발현 분석

유방암환자의 증례를 확대하여, 유방암환자의 임상적 예후 및 암전이와의 관계를 알아보기 위하여 23명의 유방암환자를 대상으로 A20 발현정도와 임상적 수치를 비교분석하였다.

예상과 같이 모든 유방암 환자의 암조직염색(도 2에서 A) 및 Western blotting(도 2에서 B)에서 모두 A20의 발현이 현저히 증가되었다. 유방암 3기의 환자에서 발현이 더욱 증가되었다. 특히 유방암 전이에 영향을 미치는 림프구 전이 조직에서 상대적으로 A20의 발현이 증가(도 2에서 C)되는 것으로 보아 A20 유방암의 전이와 연관이 있을 것으로 추측할 수 있다.

3. A20의 암 전이능력 확인

유방암 세포를 이용하여 A20와 유방암 전이와의 상관관계를 추적하였다.

(1) 이를 위해 먼저, 유방암의 예후 및 전이능이 다르다고 알려진 여러 유방암 세포주(도 3A)에서 A20 및 MMP (암 전이의 마커) 발현을 비교하였다. 그 결과, 전이능이 가장 약한 세포주인 MCF-7 세포에 비하여 MMP-2 및 MMP-9의 발현이 높은 MDA-MB231/435 세포에서 A20의 발현 역시 현저히 증가(도 3B, 3C)됨을 확인하였다.

(2) A20의 발현이 가장 적은 MCF-7세포에 A20을 과발현시킨 세포주(A20-MCF-7)를 제작/확립하고(도 4A), 이들 세포주를 이용하여 세포의 이동능력을 matrigel을 이용하여 측정하였다.

그 결과 A20을 과발현시킨 세포주(A20-MCF-7)의 암 전이능력이 증가되어 있으며, 특히 PKC activator인 PMA로

자극을 주었을 경우 현저한 전이능의 증가를 보였다(도 4B).

[0029] 또한 A20 과발현에 의한 유방암세포 전이능의 원인을 추궁하기위하여 이들 세포주에서 발현하는 유전자의 차이를 micro array기법으로 확인하였으며, A20을 과발현시킨 세포주(A20-MCF-7)에서 세포전이와 관련된 단백질분해 효소들이 과발현되어 있음을 RT-PCR로 검증하였다(도 3C). 이들 세포주에서 MMP-9의 활성도를 zymography상에서 확인하였다(도 3D).

[0030] 이들 결과로부터, A20이 특히 유방암 전이를 초래한다는 것을 확인하였다.

[0031] 4. A20의 항-세포사멸 작용의 기작 분석

[0032] 유방암조직에서 과발현된 A20가 어떻게 세포사멸을 억제하는지에 대한 그 정확한 기전을 다양한 방법으로 분석하였다.

[0033] (1) 먼저 A20가 TNF에 의하여 유도되는 항-세포사멸인자이므로 TNF에 의해 활성화되는 NF- κ B에 의한 항-세포사멸효과에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하였다. 이를 위하여 A20-adenoviral vector를 제조한 후 TNF에 의한 JNK 신호전달계 및 세포사멸 (apoptosis)에 미치는 영향을 분석하였다.

[0034] 그 결과, TNF에 의하여 A20의 발현이 유도되며, JNK의 활성화는 transient하게 유도됨을 확인하였다. 또한 NF- κ B에 의해 유도되는 단백질합성을 억제하기위하여 TNF와 cycloheximide를 동시에 투여하면 JNK의 활성화가 지속적으로 이루어짐을 알 수 있었다. 이때 A20 과발현에 의하여 JNK의 활성화가 지속적으로 억제되며(도 5A, 5B), TNF에 의한 세포사멸 (casapase-dependent apoptosis)도 억제되었다(도 5C, 5D).

[0035] 이상의 결과는 TNF에 의하여 발현이 유도되는 A20는 JNK의 활성을 지속적으로 억제함으로써 항-세포사멸효과를 나타내는 것임을 보여준다.

[0036] (2) A20 과발현에 의한 JNK활성 억제의 분자적 기전을 보다 상세히 분석하였다. 이를 위해 JNK upstream kinase인 MAP3K (GCK, MEKK3, ASK1), MAP2K (MKK4, MKK7) 와 MAPK (JNK1, JNK2)와 단백질-단백질 간의 결합을 co-immunoprecipitation 및 내인성 단백질간의 결합을 조사하였다.

[0037] 그 결과, A20이 MAP3K인 ASK1과의 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다(도 6A~6F). 이러한 A20와 ASK1과의 결합은 종래 보고된바 없었다.

[0038] 이들 결합부위를 mapping하기위하여 여러 deletion mutant들 제조한 후 다시 co-immunoprecipitation을 시행하였다.

[0039] 그 결과, A20 과 ASK1의 결합은 A20의 아미노 말단 부위의 OTU domain과 ASK1의 아미노 말단 domain을 통하여 이루어짐을 확인하였다(도 6G~6K).

[0040] 이상의 결과는 유방암 또는 간암에서, 발현이 증가된 A20가 ASK1과 결합함으로써 ASK1의 기능을 억제하고 궁극적으로 JNK의 활성을 억제함으로써 항-세포사멸 작용을 완성함을 보여주는 것이다.

[0041] (3) A20이 ASK1의 활성화에 미치는 영향을 분석하기 위하여 in-vitro kinase assay 및 ASK1의 modification 연구를 수행하였다.

[0042] 그 결과, A20 과발현 후 ASK1의 발현이 현저히 감소되며(도 7A), 이러한 ASK1의 발현감소는 A20 과발현에 의하여 ASK1에 대한 ubiquitination 과정을 통하여 이루어지는 것을 확인하였다(도 7B~7C).

[0043] 또한 zinc finger motif domain이 변이(C624A, C627A)된 A20이 ASK1의 발현감소를 유도하지 못함을 확인하였다(도 7D).

[0044] 이상으로부터, 유방암에서 증가된 A20는 ASK1과 결합하고, 이어 이를 분해함으로써 결과적으로 세포사멸을 유도

하는 JNK의 활성화를 억제하는 기작을 통해 항-세포사멸효과를 나타낸다는 사실을 확인할 수 있다.

[0045] <가상 실시예>

[0046] 1. A20의 발현농도 분석을 통한 암 발생 및 진행정도 분석

[0047] 전술한 바와 같은 사전실험 결과, 특히 간암 및 유방암에서 항-세포사멸 단백질의 일종인 A20의 발현이 특이적으로 활성화되며, A20의 mRNA도 그 발현이 증가됨을 확인하였다.

[0048] 따라서 인체로부터 분리된 간 또는 유방 조직으로부터 A20의 발현 정도를 분석함으로써 암발생 여부 및 암 진행 정도를 진단할 수 있다.

[0049] A20의 발현농도와 암 발생여부(진행정도)와의 구체적인 상관관계(비율관계)는, 본 발명의 기술적 사상에 근거하여, 당업자가 통상적인 노력을 통해 결정할 수 있음은 당연할 것이다.

[0050] 2. A20와 결합하는 펩타이드 및 A20의 돌연변이를 제조

[0051] 전술한 바와 같은 사전실험 결과, A20의 아미노 말단 부위의 OTU domain과 ASK1의 아미노 말단 domain이 결합되는 것을 확인하였다.

[0052] 따라서 당업자의 통상적인 노력을 통해 상기 A20의 아미노 말단 부위의 OTU domain과 결합될 수 있는 펩타이드를 설계하여 제조할 수 있을 것이다.

[0053] A20과 결합하는 펩타이드의 한 예로서, ASK1의 kinase domain 서열(서열번호 1)의 전부 또는 일부로 이루어지거나, 이 서열을 포함하는 서열로 이루어진 펩타이드를 제조할 수 있을 것이다.

[0054] 또한 ASK1의 kinase domain 서열(서열번호 1)과 동일하지는 않더라도 A20의 아미노 말단과 결합가능한 펩타이드가 가능할 수 있음은 당업자에게 있어 당연할 것이다.

[0055] 또한 A20의 zinc finger motif (cystein 624번, 627번) 서열이 돌연변이된 펩타이드를 제조하여, A20의 기능을 저해함으로써 ASK1의 발현을 유지시킬 수 있을 것이다.

[0056] 3. 상기 펩타이드를 유효성분으로 하는 암 예방-치료용 조성물의 제조

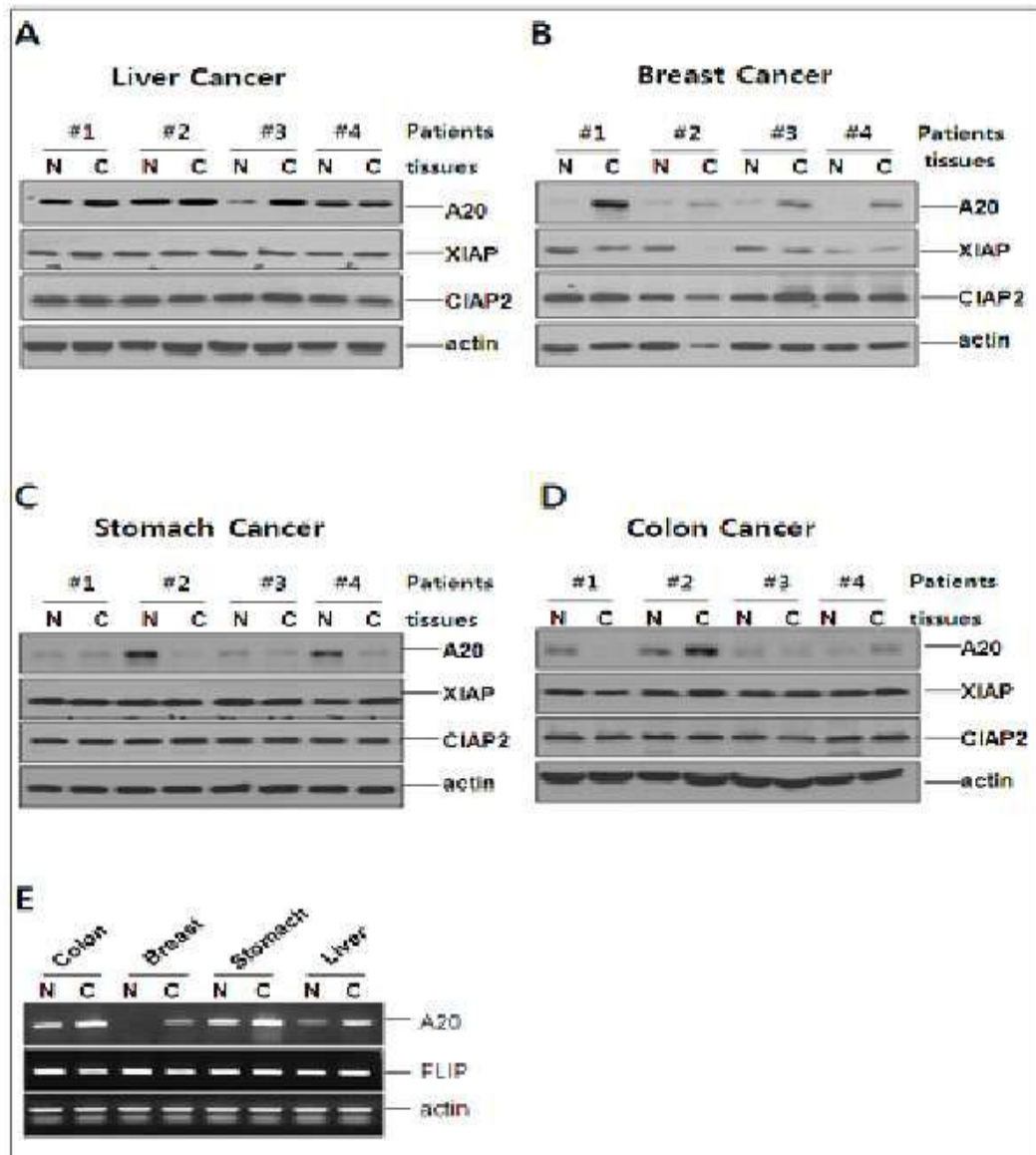
[0057] 전술한 바와 같은 사전실험 결과, A20는 ASK1과 결합하고, 이어 이를 분해함으로써 결과적으로 세포사멸을 유도하는 JNK의 활성화를 억제하는 기작을 통해 항-세포사멸효과를 나타냈다.

[0058] 따라서 A20가 ASK1와 결합하는 것을 방지할 수 있다면 세포사멸을 유도하는 JNK의 활성화가 유지되어 암세포 사멸효과를 얻을 수 있음은 논리적으로 명백하다.

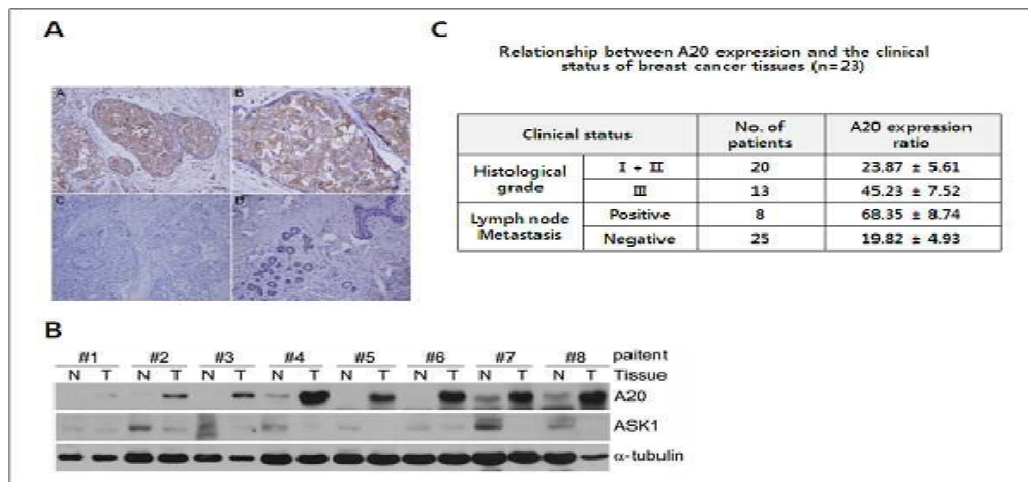
[0059] A20과 결합하는 펩타이드를 유효성분으로 하는 약제학적 조성물을 제조하는 것은 당업자에게 용이한 일일 것이며, 이를 적절한 투여조건에 맞추어 인체에 투여하는 경우 암 특히 유방암과 간암을 예방하고 치료할 수 있을 것이다.

도면

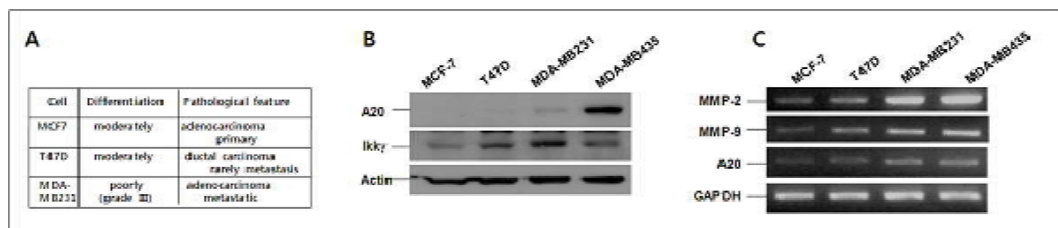
도면1



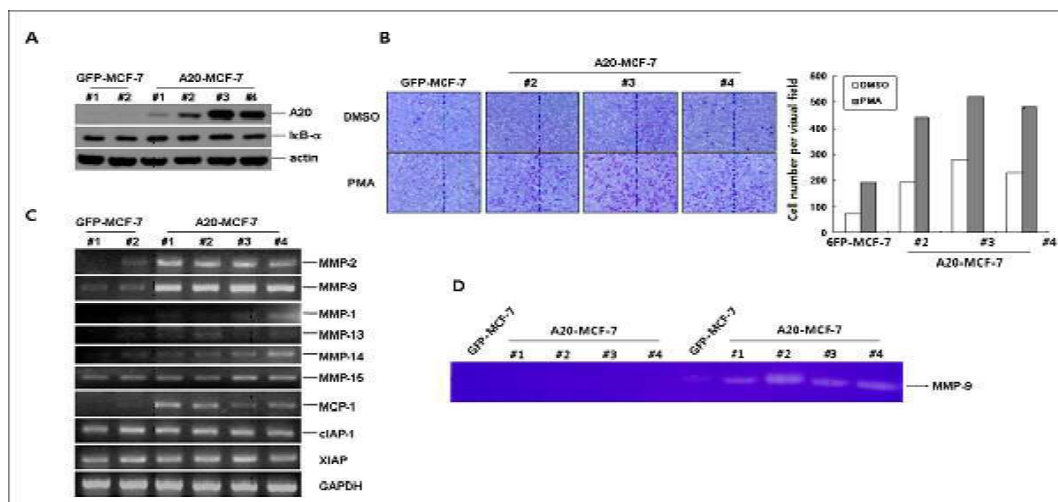
도면2



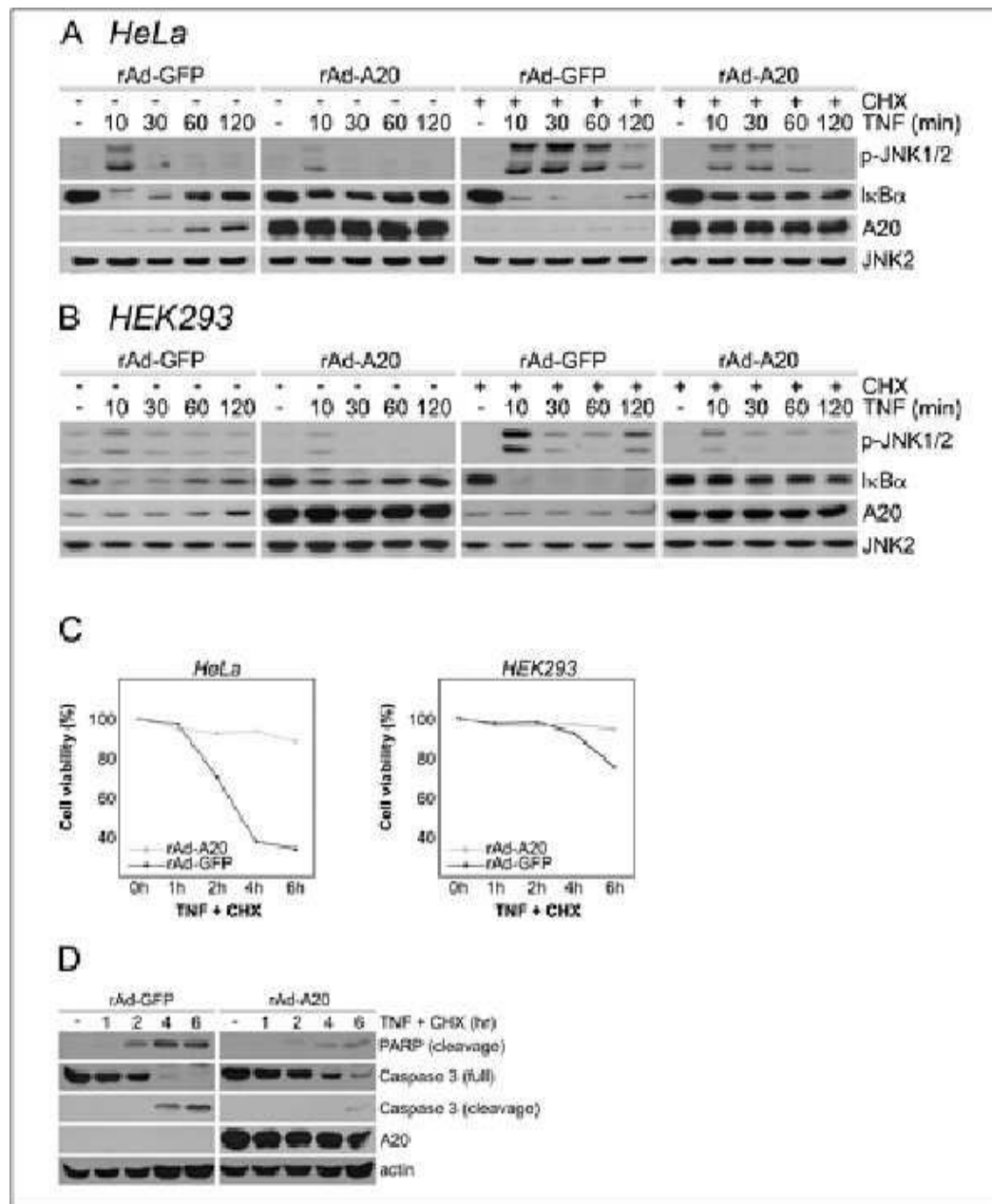
도면3



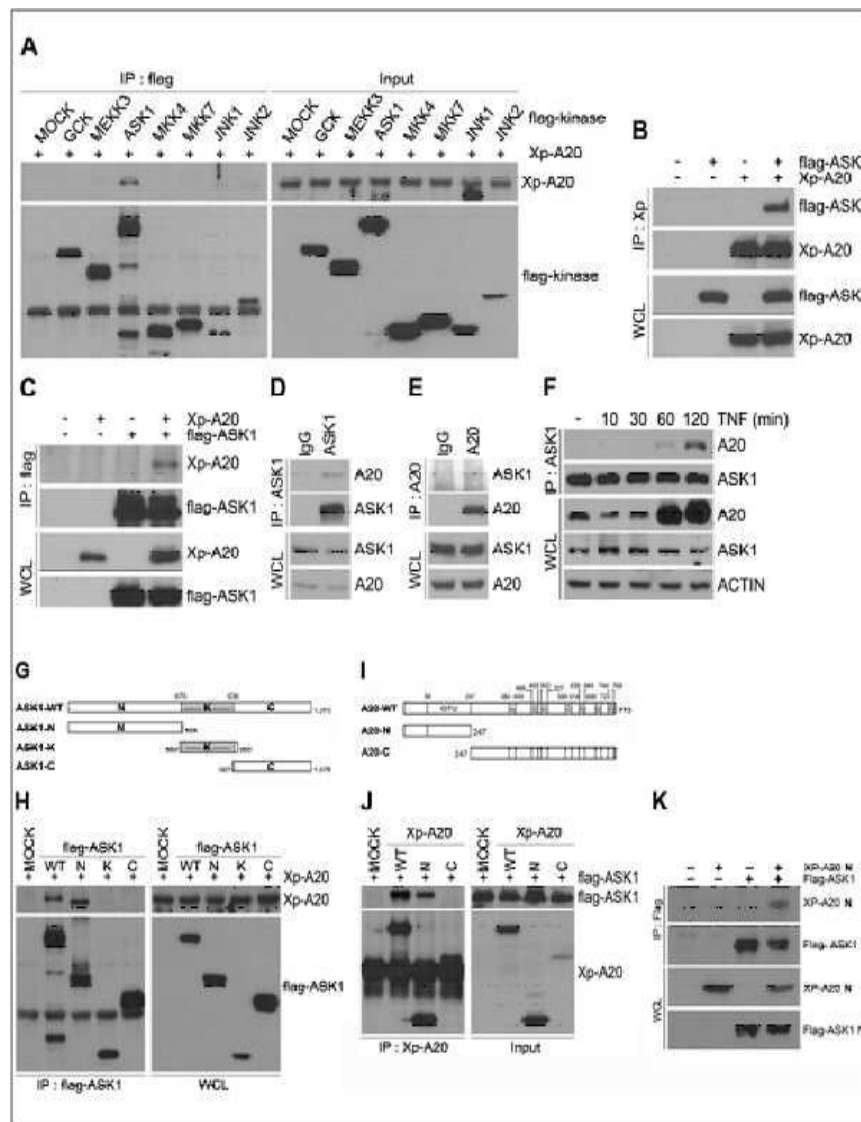
도면4



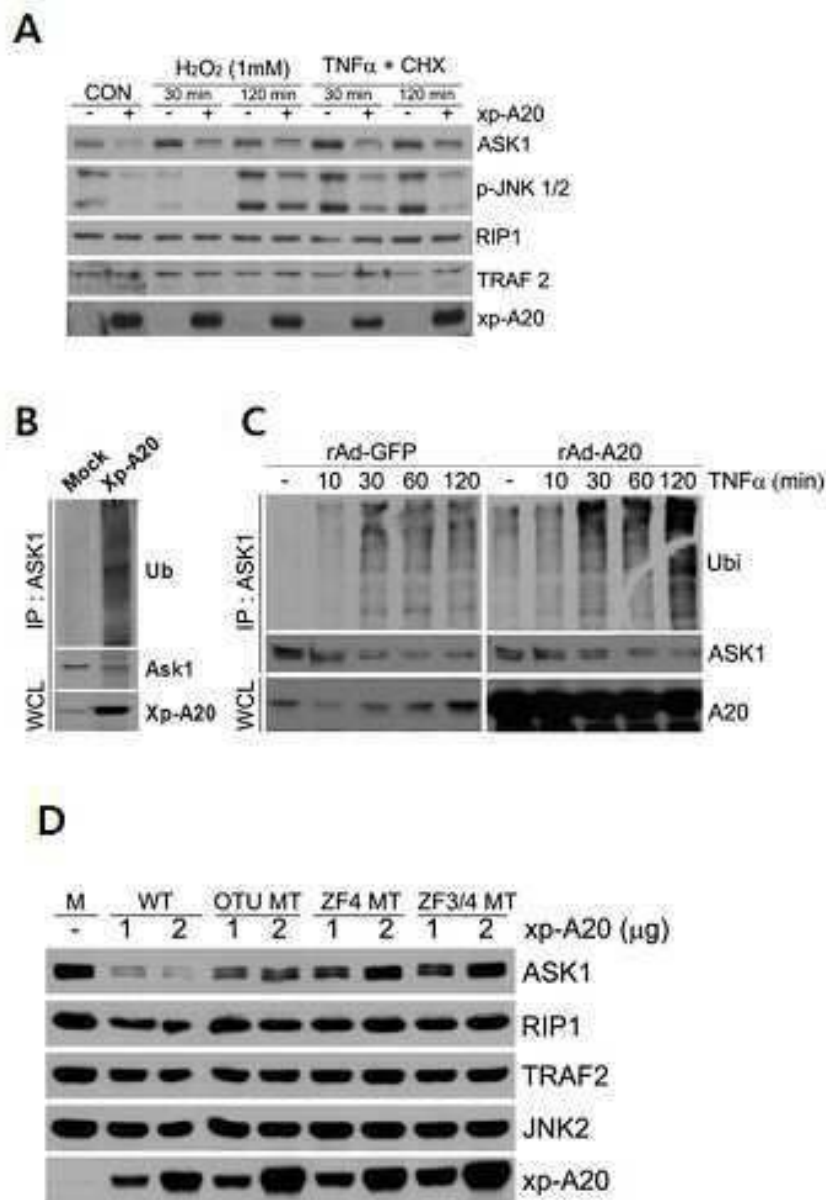
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> A20-interacting peptide, and composition for cancer therapeutic
and prevention using the peptide
- <160> 1
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 508
- <212> PRT
- <213> amino-terminal domain of ASK1
- <400> 1

Met Ser Thr Glu Ala Asp Glu Gly Ile Thr Phe Ser Val Pro Pro Phe
1 5 10 15
Ala Pro Ser Gly Phe Cys Thr Ile Pro Glu Gly Gly Ile Cys Arg Arg
20 25 30
Gly Gly Ala Ala Ala Val Gly Glu Gly Glu Glu His Gln Leu Pro Pro
35 40 45
Pro Pro Pro Gly Ser Phe Trp Asn Val Glu Ser Ala Ala Ala Pro Gly
50 55 60
Ile Gly Cys Pro Ala Ala Thr Ser Ser Ser Ser Ala Thr Arg Gly Arg
65 70 75 80
Gly Ser Ser Val Gly Gly Gly Ser Arg Arg Thr Thr Val Ala Tyr Val
85 90 95
Ile Asn Glu Ala Ser Gln Gly Gln Leu Val Val Ala Glu Ser Glu Ala
100 105 110
Leu Gln Ser Leu Arg Glu Ala Cys Glu Thr Val Gly Ala Thr Leu Glu
115 120 125
Thr Leu His Phe Gly Lys Leu Asp Phe Gly Glu Thr Thr Val Leu Asp
130 135 140
Arg Phe Tyr Asn Ala Asp Ile Ala Val Val Glu Met Ser Asp Ala Phe
145 150 155 160
Arg Gln Pro Ser Leu Phe Tyr His Leu Gly Val Arg Glu Ser Phe Ser
165 170 175
Met Ala Asn Asn Ile Ile Leu Tyr Cys Asp Thr Asn Ser Asp Ser Leu
180 185 190
Gln Ser Leu Lys Glu Ile Ile Cys Gln Lys Asn Thr Met Cys Thr Gly
195 200 205
Asn Tyr Thr Phe Val Pro Tyr Met Ile Thr Pro His Asn Lys Val Tyr
210 215 220
Cys Cys Asp Ser Ser Phe Met Lys Gly Leu Thr Glu Leu Met Gln Pro
225 230 235 240
Asn Phe Glu Leu Leu Leu Gly Pro Ile Cys Leu Pro Leu Val Asp Arg

245 250 255
 Phe Ile Gln Leu Leu Lys Val Ala Gln Ala Ser Ser Ser Gln Tyr Phe
 260 265 270
 Arg Glu Ser Ile Leu Asn Asp Ile Arg Lys Ala Arg Asn Leu Tyr Thr
 275 280 285
 Gly Lys Glu Leu Ala Ala Glu Leu Ala Arg Ile Arg Gln Arg Val Asp
 290 295 300
 Asn Ile Glu Val Leu Thr Ala Asp Ile Val Ile Asn Leu Leu Leu Ser

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

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

 450 455 460
 Lys Lys Gly Asn Leu Glu Lys Leu Gln Ser Tyr Trp Glu Val Gly Phe
 465 470 475 480
 Phe Leu Gly Ala Ser Val Leu Ala Asn Asp His Met Arg Val Ile Gln
 485 490 495
 Ala Ser Glu Lys Leu Phe Lys Leu Lys Thr Pro Ala

500

505