

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

(19) BG

(11) 105294 A
7(51) C 07 K 16/00
C 07 K 16/30
C 12 N 15/13
C 12 N 15/63

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 105294
(22) Заявено на 26.02.2001
(24) Начало на действие
на патента от:

Приоритетни данни

(31) 9818915 (32) 28.08.98 (33) GB

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 12 на 29.12.2001
(45) Отпечатано на
(46) Публикувано в бюлетин №
на
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):
KS BIOMEDIX LTD., SURREY (GB)

(72) Изобретател(и):
Peter John Harrison, Surrey (GB)

(74) Представител по индустриална
собственост:
Фани Владимирова Божинова, 1000
София, п.к. 728

(86) № и дата на PCT заявка:
PCT/GB99/02729, 20.08.99

(87) № и дата на PCT публикация:
WO00/12556, 09.03.2000

(54) ВИСОКОАФИНИТЕТНИ АНТИТЕЛА

(57) Изобретението се отнася до високоафинитетни моноклонални антитела, чийто афинитет се характеризира, като се инкубират първа и втора проба от анти тялото в покрити с антиген кладенчета на микротитърна паничка в концентрация, избрана в рамките на линейната част от стандартна крива при pH 7,2 за 1 h и при температура 37°C. Отстранява се несвързаното анти тяло от двете проби. Инкубира се първата проба с PBS при pH 7,2 при 37°C и pH се редуцира на втората проба до pH 3 или по-ниско и пробата се инкубира за 1 h при 37°C. Несвързаното анти тяло се отстранява от двете проби, които се инкубират с антиантитяло алкално-фосфатазен конюгат за 1 h при 37°C. Несвързаният конюгат се отстранява от двете проби и се добавя PNPP субстрат към тях. Измерва се абсорбцията на пробите при 405 nm и се определя количеството на анти тялото, свързано към антигена, като количеството, свързано във втората проба, е > 50% в сравнение с това на първата проба.

10 претенции, 1 фигура

BG 105294 A

ВИСОКО АФИНИТЕТНИ АНТИТЕЛА

Област на изобретението

Настоящото изобретение се отнася до антитела и тяхното приложение като терапевтици.

Ниво на изобретението

Антителата отнавна са отнасяни като потенциални силни средства за лечение на рак и други заболявания. Обаче, макар да има известни забележими отклонения, този потенциал все още не е напълно реализиран.

Тази относителна липса на успех може би се дължи, поне отчасти, на използването на моноклонални антитела, получени от гризачи, които рядко имат афинитет по- висок от 10^{-9} M. Антитела, притежаващи това ниво на афинитет са с ограничена терапевтична приложимост, доколкото е доказано трудно да се достави достатъчно антитяло до целта, за да се предизвика полезна биологична активност. Свързването на едно антитяло се към даден антиген е обратимо, и в концентрациите на антитялото по-специално за *in vivo* приложение, дисоциацията ще преобладава над асоциацията. По принцип, възможно е изброяването на дисоциацията на антигена чрез повишаване концентрацията на антитялото. Обаче, това може да доведе до неприемливи клинични странични ефекти и би повишило също стойността на терапията.

Общо за изобретението

Настоящото изобретение се основава на това, че могат да бъдат продуцирани антитела или техни фрагменти, които са "киселинно-устойчиви" и това свойство се свързва с високия афинитет на свързване на дадено антитяло с неговия антиген.

Съгласно настоящето изобретение, високо-афинитетно антитяло има афинитет, характеризиращ се с:

- (i) инкубиране на първа и втора проби от антитялото в покрити с антиген кладенчета на микротитърна паничка в концентрация, избрана в рамките на линейната част от стандартна крива при рН 7.2 за 1 час при 37°C;
- (ii) отстраняване на несвързаното антитяло от двете проби;
- (iii) инкубиране на първата проба с PBS при рН 7.2 при 37°C° и редуциране на рН на втората проба до рН 3 или по-ниско и инкубиране за 1 час при 37°C;
- (iv) отстраняване на несвързаното антитяло от двете проби;
- (v) инкубиране на двете проби с анти-антитяло алкално-фосфатазен конюгат за 1 час при 37°C;
- (vi) отстраняване на несвързаният конюгат от двете проби;
и
- (vii) добавяне на PNPP субстрат към пробите, измерване на абсорбцията на пробите при 405 nm, и определяне на количеството на антитялото свързано към антигена, където количеството свързано във втората проба е > 50% от това на първата проба.

За предпочитане, максималното рН в етап (iii) е 2.5, по-специално 2.0.

Антитела или антитяло фрагменти с "киселинно- устойчиви" свойства се очаква да подпомагат асоциацията вместо дисоциацията и поради това имат по- дълго време на локализация в целените сайтове, което води до по- висока концентрация на антитела, локализиращи в тези места.

По- специално, изобретението се отнася до получаването на високо- афинитетен фрагмент на едноверижно Fv антитяло. Този ScFv притежава определени преимущества с факта, че позволява по- добро насочване към даден сайт *in vivo*.

Описание на Чертежа

Фигура 1 илюстрира резултатите, постигнати за киселинна устойчивост на овчи и миши моноклонални антитела и едноверижни Fvs с афинитет към карциноембрионален антиген при различни стойности на pH.

Описание на изобретението

Киселинно- устойчивите моноклонални антитела съгласно настоящето изобретение могат да бъдат получени с помощта на различни техники. Например, може да бъде приложена класическа хибридомна техника, която включва сливането на В-лимфоцити от имунизирани животни, секретирани високо- афинитетни антитела с подходящ фузионен партньор. Алтернативен метод е пречистването на mРНК от избрани лимфоцити и използването им в PCR техника за амплифициране на необходимите гени за антитела. Фаговата и други техники за демонстрирането на антитяло фрагменти може също да бъде използвана за получаване на антитяло гените от естествени или имунизирани библиотеки след подходящи селекционни процедури.

Антитяло генът може да бъде също така ко- експресиран със или по друг начин присъединен към токсини, радиоизотопи или

ензими или каквито и да са други желани молекули за осигуряване на фузионен протеин със строго определени характеристики на свързване. В друга алтернатива, антителата може да бъдат продуцирани чрез трансгенни животни както е описано в US-A-5770429.

Антитялото може да бъде цяло антитяло, включващо тежки и леки вериги, и постоянни и вариабилни участъци. Обратно, антитялото е антитяло фрагмент, нар. $F(ab')_2$, Fab, Fv или едноверижни Fv фрагменти, осигуряващ присъствието на най-малко част от вариабилния участък, който осигурява свойството "киселинна устойчивост". Антитялото може да бъде също животинско, химерно или хуманизирано антитяло. Подходящ метод за продуциране на хуманизирани антитела е описан в WO-A-92/15699.

В предпочитан вариант на изпълнение на изобретението, антитялото е едноверижен Fv фрагмент. Едноверижния Fv фрагмент включва едновременно и тежко вериги и леко верижни вариабилни участъци, свързани с подходящ пептид.

Антителата от настоящето изобретение може да бъдат определени чрез техните киселинно устойчиви свойства, които могат да бъдат охарактеризирани чрез промита с киселина ензимно- свързана имуносорбентна проба (EIA), както е описано по- горе. Обикновено стойността на A_{450} , получена чрез EIA, ще представлява антитяло свързването на $>50\%$ за проба при pH 3 или по- ниско, сравнено със стойността за пробата при pH 7.2. За предпочитане, стойността A_{450} на проба при pH 2 ще представлява антитяло свързването на $>60\%$ и особено 70% от тази, получена при pH 7.2.

Животното, подложено на имунизация не е гризач, но е избрано така, че да даде по- високо афинитетни антитела. Всеки

голям бозайник може да бъде използван и подходящите животни включват зайци, кози, крави и овце.

Антитяло от изобретението може да бъде използвано за лечение и може да бъде включено в който и да е подходящ състав с физиологично-подходящ ексципиент, разтворител или носител.

Изобретението се илюстрира със следните примери:

Пример 1.

Имунизира се овца с карциноембрионен антиген (CEA) в пълен аджувант на Фройнд, след което се реимунизира трикратно с антиген в непълен аджувант на Фройнд. Животните се умъртвяват след финалната имунизация и лимфните жлези се отстраняват.

Клетките от лимфните жлези след това се промиват и се сливат с овчи хетеромиеломен фузионен партньор SFP3.2. Слятите клетки се посяват при обща плътност от приблизително 10^6 за ml в среда, съдържаща HAT (*Life Technologies*). Тези проби след това се скринират за хибридоми, секретирани високо афинитетни антитела спрямо специфичният антиген с помощта както на нормална EIA, така и на промита с киселина EIA.

Стандартните EIA изследвания се осъществяват както следва:

Изследователски панички *Maxisorb* (NUNC) се покриват с CEA ($0.4 \mu\text{g/ml}$ във фосфатно буферен разтвор при pH 7.2), $100 \mu\text{l}$ за кладенче и се оставят за една нощ при 4°C . Паничките след това се промиват трикратно с 0.01% детергент Tween 20. Всички останали реактивни сайтове върху паничките се блокират чрез добавяне на $200 \mu\text{l}$ за кладенче от 0.2% свободен на мазнина млечен протеин в PBS при pH 7.2 при 37°C за $\frac{1}{2}$ часа. Паничките след това се промиват в PBS както е описано по-горе и $45 \mu\text{l}$ от

антицяло пробите се добавят към кладенчетата на паничките. Пробите се инкубират за един час при 37°C и след това се промиват както е описано по-рано. Свързаното антицяло след това се открива с помощта на конюгат на алкална фосфатаза с магарешко анти-овче антицяло (Sigma D5187, разрежено с 1/5000 в PBS при pH 7.2 с 1% PBS). Паничките след това се промиват и се добавят 100 µl за кладенче от разтвор на PNPP (Sigma N2770). Абсорбцията се измерва с помощта на спектрофотометър при 405 nm с фосфатно буферен разтвор като контрола.

Промити с киселина EIA изследвания се провеждат както следва:

Покриването и свързването на антицяло пробите се провежда както е описано за стандартната EIA по-горе. Обаче, след инкубация с антицяло пробите, паничките се промиват и се добавят 200 µl за кладенче HCl (10 mM разтвор на Stock) при pH 2 за един час при 37°C. След три промивания, антицялото останало свързано към антигена се установява чрез конюгат на алкална фосфатаза с магарешко анти-овче антицяло и PNPP, както е описано по-горе. За осигуряване на това, че е направено действително сравнение между антителата при различни концентрации, всяка проба се избира такава, че да дава стойност на A_{405} от приблизително 1.0 в нормалната EIA (т.е. в линейната част на EIA кривата на отговора).

Три хибридоми (1D2, 6G11 и 6H9) секретират антитела, които дават по-вече от 50% ретенция на свързване в промитата с киселина EIA, в сравнение със свързването в не-киселинно промитата EIA.

Пример 2.

Едноверижен Fv фрагмент се продуцира от хибридомата 6H9 по-горе, както следва:

мРНК се пречиства от култивираните хибридомни клетки с помощта на олиго- dT целулоза. Едноверижна ДНК, комплементарна на мРНК (сДНК) се синтезира чрез обратна транскрипция. Универсални праймери, създадени от константните участъци на гени на овчи тежко и леко верижни антитела, се използват в отделни обратно транскрипционни реакции за синтезиране на сДНК за антицяло вариабилните участъци.

сДНК след това се амплифицира чрез полимеразната верижна реакция за получаване на двойно- верижна ДНК с помощта на праймери, създадени от тежко и леко верижните вариабилни рамкови последователности. Отделни полимеразни верижни реакции са използвани за амплифициране на тежко и леко верижните участъци. Продуктите след това се анализират чрез агарозна гел електрофореза и ДНК ивиците, еквивалентни на леко и тежко верижните гени се изрязват от гела и се пречистват.

Еквимоларни количества от вариабилни тежко и леко верижни ДНК се смесват заедно с олигонуклеотидна линкерна ДНК. Линкерната ДНК кодира аминокиселинната последователност $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ с допълнителни нуклеотиди, комплементарни на 3' края от тежко верижния вариабилен участък и 5' края на леко верижния вариабилен участък. Трите ДНК молекули се денатурират, деспирализират и разширяват в първия етап (без праймери) от двустадийната PCR реакция, така че фрагментите се съединяват, като по този начин се оформя едноверижното Fv.

Едноверижната Fv ДНК се амплифицира във втория етап от PCR с помощта на двойка праймери, получени от края на тежко и леко верижния вариабилен участък с добавянето на местата за

разпознаване от рестрикционните ензими *Alw441* и *NotI*. Едноверижният Fv генен продукт се анализира чрез гел електрофореза и се пречиства. Едноверижният Fv след това се разгражда с рестрикционните ензими *Alw441* и *NotI* и се клонира във вектор на експресия. Векторът след това се използва за трансформиране на *E. coli* HB 2151, и се оставя експресията на протеина да протече. Векторът е конструиран така, че да включва хекса- хистидинова опашка в COOH края на SFv. Едноверижният Fv се пречиства с помощта на никел- хелатна афинитетна хроматография и се анализира чрез SDS- PAGE. Аmino киселинната последователност за тежко верижният вариабилен участък и леко верижният вариабилен участък са описани в SEQ ID NOs: 2 и 4, съответно. Провежда се също киселинно- промита EIA за определяне на свойството устойчивост на киселина за едноверижния Fv.

Киселинно промитата EIA се провежда както следва:

Покрити с карциноембрионален антиген (CEA) микротитърни пластинки се изготвят както е описано по- рано. Едноверижни Fv проби (6H9) се разреждат до обхват на концентрацията от 1 ng/ml до 100 ng/ml в PBS при pH 7.2, съдържащ 1% телешки серумен албумин (BSA). Добавят се 100 µl от пробата към кладенчетата на микротитърната пластинка и се инкубира за 1 час при 37°C. Паничките след това се промиват, добавят се 200 µl цитрат за кладенче и паничките се инкубират за 1 час при 37°C. В този случай, киселите препарати се получават с помощта на щок разтвор от 100 mM цитрат, разреден до pH стойности 4.0, 3.5, 3.0, 2.5 и 2.0 в реакционната смес. PBS при pH 7.2 се използва като контрола. Паничките след това се промиват и се добавят 100 µl за кладенче от миши анти- тетра- хистидиново антитяло (*Qiagen*) (100 ng/ml, разреден в PBS при pH 7.2 с 1% BSA) и се инкубират за 1 час при 37°C. След промиването на паничките, пробите се инкубират

за 1 час при 37°C със 100 μ l за кладенче конюгат на козя анти-миша алкална фосфатаза. (*Sigma A3688*, разреден 1/1000 в PBS с BSA при pH 7.2). Паничките след това се промиват, обработват се с PNPP както е описано по-рано и абсорбцията се измерва с помощта на спектрометър при 405 nm.

Като контрола за киселинна устойчивост, sFv проби се инкубират с PBS при pH 7.2 за генериране на EIA кривата на отговора за sFv пробите. В линейния участък концентрация от 10-20 ng/ml от sFv дава абсорбция (A_{405}) от 1.0- 1.5 и поради това се използва за определяне количеството на анти тялото, свързано в киселинно промитите проби като процент от количеството, свързано в референтната проба.

Свойствата устойчивост на киселина на 6H9 пълното анти тяло и 6H9 едноверижното Fv се сравнява с това за полученото от мишия анти- карциномембрионен антиген пълно анти тяло, A5B7 и едноверижното Fv MFE. Резултатите са показани на Фигура 1, със свързването с антиген на получените от мишка анти телата, които са съществено редуцирани при pH 3.5 и по-малко от 5% при pH 2.5. В противовест на това, 6H9 анти телата обладават >70% антиген при pH 3.5, >60% при pH 2.5 и > 50% при pH 2.0.

ПРЕТЕНЦИИ

1. Високо афинитетно моноклонално антитяло, където афинитета се характеризира с:

(i) инкубиране на първа и втора проби от антитялото в покрити с антиген кладенчета на микротитърна паничка в концентрация, избрана в рамките на линейната част от стандартна крива при рН 7.2 за 1 час при 37°C;

(ii) отстраняване на несвързаното антитяло от двете проби;

(iii) инкубиране на първата проба с PBS при рН 7.2 за един час при 37°C и редуциране на рН на втората проба до рН 3 или по-ниско и инкубиране за 1 час при 37°C;

(iv) отстраняване на несвързаното антитяло от двете проби;

(v) инкубиране на двете проби с анти-антитяло алкално-фосфатазен конюгат за 1 час при 37°C;

(vi) отстраняване на несвързаният конюгат от двете проби; и

(vii) добавяне на PNPP субстрат към пробите, измерване на абсорбцията на пробите при 405 nm, и определяне на количеството на антитялото свързано към антигена, където количеството свързано във втората проба е > 50% от това на първата проба.

2. Антитяло съгласно претенция 1, където количеството на антитялото, свързано във втората проба е >60% от това, свързано към първата проба.

3. Антитяло съгласно претенция 1 или претенция 2, където рН в етап (iii) е редуцирано до рН 2.5 – рН 2.0.

4. Антитяло съгласно която и да е от предходните претенции, което не произходжа от гризач.

5. Антитяло съгласно която и да е от предходните претенции, което притежава афинитет към асоцииран с тумор антиген.

6. Антитяло съгласно претенция 5, където антигенът е карциноембрионен антиген.

7. Антитяло съгласно която и да е от предходните претенции, което е едноверижно Fv, F(ab')₂, Fv или fab.

8. Антитяло съгласно претенция 7, притежаващо тежко верижен вариабилен участък, включващ аминокиселинната последователност, дефинирана в SEQ ID No. 2 и леко верижен вариабилен участък, включващ аминокиселинната последователност, дефинирана в SEQ ID No. 4, или техни варианти.

9. Полинуклеотидна молекула, кодираща антитяло съгласно претенция 8, където полинуклеотида включва нуклеотидната последователност, дефинирана в SEQ ID Nos. 1 и 3 или техни варианти.

10. Среда за клониране, включваща полинуклеотидната молекула съгласно претенция 9.

СЕКВЕНЦИОНЕН ЛИСТИНГ

<110> KS Biomedix Ltd

<120> Антитела

<130> rep05827wo

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 363

<212> ДНК

<213> Изкуствено създадена последователност

<220>

<223> Описание на изкуствено създадената
последователност: Антитяло фрагмент

<400> 1

cag	gtg	cag	ctg	cag	gag	tcg	gga	ccc	agc	ctg	gtg	aag	ccc	tca	cag	48
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Ser	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln	
1				5				10					15			

acc	ctc	tcc	ctc	acc	tgc	acg	gtc	tct	gga	ttc	tca	tta	acc	aag	tat	96
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Lys	Tyr	
				20				25					30			

ggt	gtt	agt	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	gga	aag	gcg	ctt	gag	tgg	cta	144
Gly	Val	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu	Trp	Leu	
			35				40					45				

ggt	ggt	gtg	tcc	agt	ggt	gca	cta	aca	gcc	tat	aac	aca	gcc	cta	cag	192
Gly	Gly	Val	Ser	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ala	Tyr	Asn	Thr	Ala	Leu	Gln	
			50				55				60					

tcc	cga	ctc	agc	gtc	acc	agg	gac	acc	tcc	aag	agc	caa	ttc	tcc	ctg	240
Ser	Arg	Leu	Ser	Val	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Gln	Phe	Ser	Leu	
							70				75				80	

tca ctg agc agc gtg act act gag gac acg gcc att tac tac tgt gcg 288
 Ser Leu Ser Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

aaa tct gtc aat ggt gac agt gtt cct tat ggt ttg gac tac tgg agc 336
 Lys Ser Val Asn Gly Asp Ser Val Pro Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Ser
 100 105 110

cca gga ctc cta ctc acc gtc tcc tca 363
 Pro Gly Leu Leu Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Изкуствено създадена последователност

<220>

<223> Описание на изкуствено създадената
 последователност: Антитяло фрагмент

<400> 2

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Lys Tyr
 20 25 30

Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Gly Val Ser Ser Gly Ala Leu Thr Ala Tyr Asn Thr Ala Leu Gln
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Val Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Ser Leu Ser Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Lys Ser Val Asn Gly Asp Ser Val Pro Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Ser
 100 105 110

Pro Gly Leu Leu Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3
 <211> 333
 <212> ДНК
 <213> Изкуствено създадена последователност

<220>
 <223> Описание на изкуствено създадената
 последователност: Антитяло фрагмент

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (333)

<400> 3

cag gat gtg ctg act cag ccg tcc tcc gtg tct ggg tcc ctg ggc cag	48
Gln Asp Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ser Leu Gly Gln	
1 5 10 15	
agg gtc tcc atc acc tgc tct gga agc agc agc aac att gga ggt aat	96
Arg Val Ser Ile Thr Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn	
20 25 30	
gct tat gtg ggc tgg tac caa cag gtc cca gga tca gcc ccc aga ctc	144
Ala Tyr Val Gly Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Ser Ala Pro Arg Leu	
35 40 45	
ctc atc agt gct aca acc gat cga gcc tcg ggg atc ccc gac cga ttc	192
Leu Ile Ser Ala Thr Thr Asp Arg Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe	
50 55 60	
tcc ggc tcc agg tct ggg aac aca gcc acc ctg acc atc agc tcg ctc	240
Ser Gly Ser Arg Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu	
65 70 75 80	
cag gct gag gac gag gcc gat tat tac tgt gca tcg tat caa agt act	288
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Gln Ser Thr	
85 90 95	
tac agt ggt gtt ttc ggc agc ggg acc agg ctg acc gtc ctg ggt	333
Tyr Ser Gly Val Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly	
100 105 110	

<210> 4
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Изкуствено създадена последователност

<223> Описание на изкуствено създадената
 последователност: Антитяло фрагмент

<400> 4

Gln	Asp	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Leu	Gly	Gln	1	5	10	15
Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Gly	Asn	20	25	30	
Ala	Tyr	Val	Gly	Trp	Tyr	Gln	Gln	Val	Pro	Gly	Ser	Ala	Pro	Arg	Leu	35	40	45	
Leu	Ile	Ser	Ala	Thr	Thr	Asp	Arg	Ala	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Arg	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	65	70	75	80
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Tyr	Gln	Ser	Thr	85	90	95	
Tyr	Ser	Gly	Val	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	100	105	110		