



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0110754
(43) 공개일자 2017년10월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/70 (2006.01) *C07K 14/56* (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01) *C12P 21/02* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/70 (2013.01)

C07K 14/56 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0034582

(22) 출원일자 2016년03월23일

심사청구일자 2016년03월23일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

(72) 발명자

최한석

서울특별시 송파구 올림픽로 203, 501동 706호 (잠실동)

부티투창

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 울산의대 생리학교실 (풍납동, 서울아산병원)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

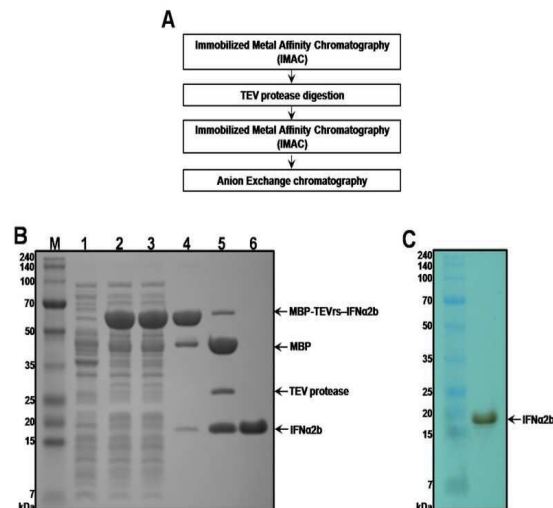
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 생물학적 활성을 가진 인간 인터페론 알파 2b 재조합 단백질의 수용성 과발현 및 정제방법

(57) 요약

본 발명은 생물학적 활성을 가진 인간 인터페론 알파 2b(interferon alpha 2b; IFN α -2b)의 수용성 과발현 및 정제방법에 관한 것으로서, 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag) 및 IFN α -2b 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다. 또한 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공하며, 상기 IFN α -2b 재조합 단백질의 생산방법을 제공한다. 본 발명에 따라 정제된 IFN α -2b 단백질은 바이러스성 질병에 광범위한 치료제로서 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12N 15/62 (2013.01)

C12P 21/02 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

(72) 발명자

주철현

서울특별시 강남구 도곡로78길 22 108동 1904호 (대치동, 삼성아파트)

마틴 크루파

서울특별시 강남구 논현로159길 39, 하얏트빌 401호 (신사동)

송정아

서울특별시 송파구 문정로 83, 103동 1103호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015047980

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터(ACE)육성사업기초의약학분야(MRC)

연구과제명 세포기능장애 연구센터(3)

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2015.09.01 ~ 2016.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

수용성 향상 태그(solubility enhancing tag) 및 인간 인터페론 알파 2b(interferon alpha 2b; IFN α -2b) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 수용성 향상 태그는 티오레독신(Thioredoxin, Trx), N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA), 단백질 이황화물 이성질화효소(protein disulfide isomerase; PDI), 단백질 이황화물 이성질화효소 b'a' 도메인(protein disulfide isomerase b'a' domain; PDIB'a') 및 말토스 결합 단백질(Maltose Binding Protein, MBP)로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 IFN α -2b 유전자는 서열번호 1로 표시되는 핵산서열인 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 4

제2항에 있어서, 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 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

수용성 향상 태그 및 IFN α -2b 유전자가 포함된 유전자 구조체(gene construct)가 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 있는 재조합 미생물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 수용성 향상 태그는 티오레독신(Thioredoxin, Trx), N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA), 단백질 이황화물 이성질화효소(protein disulfide isomerase; PDI), 단백질 이황화물 이성질화효소 b'a' 도메인(protein disulfide isomerase b'a' domain; PDIB'a') 및 말토스 결합 단백질(Maltose Binding Protein, MBP)로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 9

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항 따른 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 수용성 향상 태그-IFN α -2b 재조합 단백질을 발현시키는 단계;

상기 발현된 수용성 향상 태그-IFN α -2b 재조합 단백질에서 수용성 향상 태그를 제거하는 단계; 및

상기 수용성 향상 태그가 제거된 IFN α -2b 재조합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 IFN α -2b 재조합 단백질

생산방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 수용성 향상 태그는 티오레독신(Thioredoxin, Trx), N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA), 단백질 이황화물 이성질화효소(protein disulfide isomerase; PDI), 단백질 이황화물 이성질화효소 b'a' 도메인(protein disulfide isomerase b'a' domain; PDIB'a') 및 말토스 결합 단백질(Maltose Binding Protein, MBP)로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 IFN α -2b 재조합 단백질 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 N-말단 태그를 이용한 생물학적 활성을 가진 인간 인터페론 알파 2b(interferon alpha 2b; IFN α -2b) 재조합 단백질의 수용성 과발현 및 정제방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인터페론(Interferons; IFNs)은 항바이러스성, 항증식성 및 면역조절 활성을 가진 사이토카인 패밀리에 속한다. IFNs은 항바이러스성 분자로 1957년에 처음 소개되었으나, 악성 및 바이러스성 질환에 대한 진정한 치료 잠재성은 1986년 재조합 인간 IFN α 2a (Roferon-A) 및 이후 IFN α 2b (Intron-A)의 개발로 확인되었다. IFN α 는 JAK-STAT 신호 전달 기작을 통하여 그 효과를 나타낸다. JAK-STAT 기작은 MAPK 기작과 관련되어 있는데, 이는 모든 진핵세포에서 발견되고, 증식, 분화, 생존 및 세포사멸과 같은 다양한 세포 공정을 조절한다.

[0003] IFN α 2b는 166개의 아미노산으로 구성된 당단백질로서, 106번 위치에 당화된 트레오닌(threonine)을 가지고 있다. 2개의 이황화물결합은 29번 및 138번 뿐만 아니라 1번 및 98번 위치에서 시스테인(cysteines)에 의해 형성되었으나, 1번 및 98번 위치 사이에서 형성된 결합은 생물학적 활성에 영향을 미치지 않는다. IFN α 2b의 결정 구조는 루프에 의해 연결된 5개의 α -헬릭스(α -helices)로 이루어진 각각의 단량체를 가진 아연 이량체(zinc dimer)가 존재하는 것으로 나타난다.

[0004] 대부분의 재조합 IFN α 단백질은 대장균(*Escherichia coli*; *E. coli*)을 이용하여 생산되어 왔다. IFN α 의 생산 및 정제를 위해, *E. coli* 재조합 단백질 발현 시스템에 여러 인자들이 적용되어 왔다. IFN α 유전자는 인트론을 갖고 있지 않으며, 많은 단백질 생산물이 O-당화(glycosylation) 없이도 활성을 가진다. 또한, *E. coli*는 빨리 자라고, 높은 세포 밀도를 갖으므로, 대규모 단백질 생산에 효율적인 시스템이다.

[0005] 1980년대에 IFN α 가 처음으로 클로닝되고 발현된 이래로, 높은 세포 내 발현 수준을 얻기 위한 여러 프로모터 시스템이 연구되었다. 하지만, *E. coli*에서 재조합 단백질의 과발현은 봉입체(inclusion body)를 형성하는데, 이는 불용성이고 잘못 접힌(misfolded) 단백질 응집체이며, 대부분 생물학적으로 불활성화된다. 즉, *E. coli*에서 IFN α 를 효과적으로 과발현시키기 위한 노력은 세포 내 봉입체(inclusion body)의 형성으로 인해 방해받고 있다.

[0006] 봉입체로부터 재조합 IFN α 의 재접힘(Refolding)은 가능하다. 하지만, 많은 경우 봉입체로부터 얻은 생물학적 활성을 가진 단백질의 전체적인 수율이 낮다. 또한, 단백질 재접힘 조건에 대한 광범위한 최적화가 필요하여 재접힘 공정을 다루기가 쉽지 않다. *E. coli*에서 IFN α 의 용해도를 향상시키기 위해서, 세포질 분비(periplasmic secretion), 저온 처리 및 저농도 이소프로필- β -D-티오갈락토시드(isopropyl- β -D-thiogalactoside; IPTG) 처리를 포함하는 여러 전략들이 시도되었다. 또한, 스트렙토마이세스 리비단스(*Streptomyces lividans*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 및 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)를 포함하는, *E. coli*를 제외한 발현 시스템에서도 시험되었다. 불운하게도, 상기 시스템 중 어떤 것도 *E. coli*에서 발현된 봉입체와 비교될 만한 수율을 나타내지 않았다. 아마도, 용해도를 증가시키기 위한 가장 성공적인 전략은 융합 단백질 구조체를 사용하는 것이라고 판단된다. 친화도 태그들은 단백질 수율을 개선시키고, 단백질 분해(proteolysis)를 방지하며, 단백질 용해도를 개선시키는 것으로 보고되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2013-0018743호(2013.02.25 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag) 및 인간 인터페론 알파 2b(interferon alpha 2b; IFN α -2b) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 IFN α -2b 재조합 단백질의 생산방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 *E. coli*에서 IFN α -2b의 발현 수준 및 용해도를 비교하기 위해서, 7개의 태그들, 티오레독신(Thioredoxin, Trx), 헥사히스티딘(hexahistidine; His6), 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), 글루타치온 S-트랜스퍼라제(glutathione S-transferase; GST) 및 PDI b'a' 도메인(PDIb'a')을 37℃ 및 18℃의 다른 발현 온도에서 실험하였다. 본 발명자들은 4개의 태그들, PDI, PDIb'a', MBP 및 NusA가 재조합 IFN α 의 수용성 발현을 30% 이상 증가시킨다는 것을 확인하였다. 또한, 18℃의 낮은 온도에서도 GST를 제외한 모든 태그 단백질의 용해도가 71% 이상 증가한 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0012] 본 발명은 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag) 및 인간 인터페론 알파 2b(interferon alpha 2b; IFN α -2b) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.

[0013] 본 발명에 있어서, 상기 수용성 향상 태그는 IFN α -2b 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.

[0014] 상세하게는, 상기 IFN α -2b 유전자는 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, IFN α -2b 아미노산 서열은 서열번호 7로 표시하였다.

[0015] 본 발명에 있어서, “벡터”는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.

[0016] 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 앰피실린(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.

[0017] 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.

- [0018] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다. 바람직하게는 상기 미생물은 대장균일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 또한, 본 발명은 수용성 향상 태그 및 IFN α -2b 유전자가 포함된 유전자 구조체(gene construct)가 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 있는 재조합 미생물을 제공한다. 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 있어 상기 유전자를 숙주세포의 게놈 염색체에 삽입하여서도 상기와 같이 재조합 벡터를 숙주세포에 도입한 경우와 동일한 효과를 가질 것은 자명하다 할 것이다.
- [0020] 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, 폭스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 비바이러스성 벡터를 이용하는 방법을 들 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 수용성 향상 태그-IFN α -2b 재조합 단백질을 발현시키는 단계; 상기 발현된 수용성 향상 태그-IFN α -2b 재조합 단백질에서 수용성 향상을 제거하는 단계; 및 상기 수용성 향상 태그가 제거된 IFN α -2b 재조합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 IFN α -2b 재조합 단백질 생산방법을 제공한다.
- [0022] 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.
- [0023] 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

- [0024] 본 발명은 본 발명은 N-말단 태그를 이용한 생물학적 활성을 가진 인간 인터페론 알파 2b(interferon alpha 2b; IFN α -2b) 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 IFN α -2b 단백질을 분리, 정제하는 방법에 대한 것이다. 이렇게 얻어진 IFN α -2b 단백질은 바이러스성 질병에 광범위한 치료제로서 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 Tag-TEVrs-IFN α 2b 발현 벡터 구축 및 IFN α 2b 융합 단백질 도메인 구조 모식도를 나타낸다. (A) 발현 벡터 클로닝 과정을 나타낸다. (B) 7개의 융합 단백질 구조체의 구조 모식도를 나타낸다. 화살표는 His6 태그 및 TEV 단백질 분해효소 절단 사이트를 나타낸다.
- 도 2는 *E. coli*에서 7개의 서로 다른 수용성 태그가 융합된 IFN α 2b의 SDS-PAGE 발현 분석 결과이다. 단백질 발현은 (A) 37°C 및 (B) 18°C에서 1 mM IPTG로 유도되었다. 화살표는 각 태그를 가진 융합된 IFN α 2b를 나타낸다. M, 분자량 사이즈 마커; C, 유도 전의 총 단백질; I, 유도 후의 총 단백질; P, 불용성 세포 펠렛; S, 세포 파괴 후 수용성 상층액.
- 도 3은 *E. coli*에서의 IFN α 2b 정제 결과이다. (A) 정제 단계에 대한 모식도. (B) *E. coli*로부터 정제된 IFN α 2b는 SDS-PAGE를 이용하여 분석하였다. M, 분자량 사이즈 마커; lane 1, 유도 전 총 단백질; lane 2, 유도 후 총 세포; lane 3, 수용성 세포 용해액; lane 4, IMAC를 사용하여 정제한 MBP-TEVrs-IFN α 2b 융합 단백질(59.5 kDa); lane 5, TEV 단백질 분해효소(29 kDa)를 이용하여 절단한 MBP 태그(40.2 kDa); lane 6, 최종 정제된 IFN α 2b(19.3 kDa). (C) IFN α 2b의 순도를 측정하기 위해 사용된 실버-염색된 SDS-PAGE 젤을 나타낸다.
- 도 4는 ISRE 프로모터를 가진 HEK293 상에서의 정제된 IFN α 2b 효과를 나타낸다. HEK293 세포는 대조군인 Renilla 루시페라아제 플라스미드 pRL-CMV 뿐만 아니라 ISRE 프로모터에 의해 조절되는 pGL3-기반 반딧불이 루

시퍼라아제 리포터 구조체로 형질감염되었다. 형질감염 24시간 후, 인터페론을 세포에 처리하였고, 처리 12시간 후, 루시퍼라아제 활성을 측정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 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.

[0027] <실험예>

[0028] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0029] 1. 플라스미드 제작

[0030] BP 재조합 반응에 의한 도입 벡터를 제작하기 위하여, IFN α 2b의 165개 아미노산을 코딩하는 DNA 서열은 코돈 최적화되었고, 합성되었다(Genscript, Piscataway, NJ). LR 재조합 반응에 의한 발현 벡터를 구축하기 위하여, 7개의 태그들(His6, Trx, GST, hPDIb'a', MBP, hPDI 및 NusA)은 IFN α 2b의 N-말단에 융합되었다. 태그된 단백질의 제거를 위한 담배 식각 바이러스 인식 사이트(Tobacco etch virus recognition site; TEVrs; ENLYFQ↓G)는 각 구조체의 상기 태그 및 IFN α 2b 사이에 위치시켰다.

[0031] 2. 박테리아에서의 발현 및 융합 단백질의 용해도 분석

[0032] 발현 및 용해도를 시험하기 위해서, 발현 벡터들은 *E. coli* BL21 (DE3) 세포로 형질전환시켰다. 형질전환된 세포들은 50 μ g/mL 앰피실린이 함유된 3 mL Luria-Bertani 배지에 37°C에서 접종하였다. A₆₀₀이 0.5에 이르렀을때, 발현 유도를 위해 1mM 이소프로필- β -D-티오갈락토시드(isopropyl- β -D-thiogalactoside; IPTG)를 배양액에 첨가하여, 37°C에서 5시간 동안 유지하거나, 18°C에서 12시간 동안 유지하였다. 유도된 세포는 Tris 완충액에서 초음파처리에 의해 파괴시켰고, 그 후 수용성 및 불용성 부분을 분리하기 위해서, 용해된 세포들을 4°C, 17,000 x g 에서 10분 동안 원심분리시켰다. 각 융합 단백질의 발현 수준 및 용해도를 평가하기 위해서, SDS-PAGE 및 10% 트리신 젤(tricine gel)을 사용하였다. 발현 및 용해도 수준은 ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij>)에 의해 측정하였고, 다음 식을 이용하여 계산하였다:

[0033] 발현 수준 = S' / I'

[0034] 용해도 = S'' / (S'' + P')

[0035] 상기 S'는 융합 단백질의 양; I'는 IPTG 유도에 따른 전체 세포 내 단백질의 양; S''는 상등액 부분(S)에 있는 융합 단백질의 양; 및 P'은 펠렛 부분(P)에 있는 융합 단백질의 양.

[0036] 3. 정제

[0037] MBP-TEVrs-IFN α 2b의 발현 벡터를 가진 *E. coli* BL21 (DE3)는 18°C에서 12시간 동안 배양한 후, 4°C, 3500 x g 에서 25분 동안 원심분리하였다. 유도된 세포는 완충액 A (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5% glycerol, 5 mM β -mercaptoethanol, 2 mM PMSF; pH 8.0)에 재현탁하였다. 세포를 깨기 위해서, 혼합물은 초음파 파쇄기 (ultrasonic homogenizer)로 20번 이상 초음파처리하였다. 원심분리를 통해 얻은 여과된 상등액은 완충액 A로 평형화된 5 mL HisTrap FF affinity column (GE Healthcare, Piscataway, NJ)에 로딩하였다. 비특이적 결합을 제거하기 위한 세척 단계는 20 컬럼 부피(column volumes; CV)의 완충액 B(50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5% glycerol, 5 mM β -mercaptoethanol, 50 mM imidazole, 2 mM PMSF; pH 8.0)로 수행하였다. 용출 단계는 완충액 C(50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5% glycerol, 5 mM β -mercaptoethanol, 2 mM PMSF, 1 M imidazole; pH 8.0)로 수행하였다. 융합 단백질을 절단하기 위해 새로 만든 TEV를 사용하였고, 1:15 (TEV: 융합단백질 [w/w])의 비율로, 절단 완충액 D(50 mM Tris-HCl, 5% glycerol, 2.5% sucrose; pH 8.4)로 18°C에서 24시간 동안 처리하였다. 절단된 IFN α 2b를 분리하기 위해서, 프로테아제 절단 후에 완충액 E(50 mM Tris-HCl, 5% glycerol, 2.5% sucrose, 5 mM β -mercaptoethanol, 2 mM PMSF; pH 8.4)로 평형화된 HisTrap FF affinity column에 2차적으로 적용하였다. 잔여 MBP 태그를 제거하기 위해서 2차 HisTrap을 통과한 분획물은 MBP 컬럼에 적용할 수도 있고, 동일한 결합 완충액[완충액 F (50 mM Tris-HCl, 5% glycerol, 2.5% sucrose, 2 mM PMSF, 2 mM EDTA, pH 8.4)]를 사용한 최종 HiTrap Q HP (GE healthcare, Piscataway, NJ)에 직접 적용할 수도 있다. NaCl 구배(0-300mM)는 절단된 IFN α 2b를 용출하기 위해 사용하였다. 분리된 IFN α 2b를 함유하는 Q eluent는 농축되었고, 투석을 통해 PBS 완충액과 교환되었다. 모든 정제 과정은 10% 트리신 젤(tricine gel)을 이용한 SDS-PAGE를 통해

확인하였다. 단백질 농도는 Bradford 분석을 통해 측정하였다.

[0038] 4. 전기영동 및 실버 염색

[0039] 각 정제 단계 후 단백질들은 10% tricine SDS-PAGE gel을 통해 확인되었다. 단백질 변성을 위해, 100 mM DTT가 포함된 샘플 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS [w/v] 0.04% Coomassie Brilliant Blue 및 5% glycerol)을 첨가하여 200℃에서 15분 동안 반응시켰다. 단백질 밴드들은 Coomassie Brilliant Blue로 염색하였다. 최종 IFN α 2b의 순도는 Silver Stain Plus kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)을 통해 측정하였다. 단백질 밴드가 젤 상에 명확하게 나타나면, 반응을 종결시키기 위해 5% 아세트산(v/v)을 첨가하였다. 젤은 5% 글리세롤(v/v) 및 0.02% 소듐 아지드(sodium azide)(w/v)가 포함된 용액에서 보존되었다.

[0040] 5. 엔도톡신(endotoxin) 분석

[0041] 최종 정제된 IFN α 2b가 나타내는 지질다당류(lipopolysaccharide; LPS)의 양은 quantitative Endpoint Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test (Lonza, Basel, Switzerland)를 통해 측정하였다. 50 μ L의 1 μ g/mL 최종 IFN α 2b 또는 엔도톡신 표준액(0.1, 0.25, 0.5, or 1.0 EU/mL)을 미리-예열된(37℃) 마이크로플레이트에 우선 첨가하였다. 다음으로, 50 μ L LAL 시약을 각 웰에 분주하였다. 37℃에서 10분 동안 반응시킨 후, 100 μ L 발색 기질을 첨가하였고, 37℃에서 6분동안 더 반응시켰다. 최종적으로, 100 μ L의 반응 중단 시약(25% acetic acid [v/v])을 첨가하였고, 405nm에서 흡광도를 분광광도계로 측정하였다. 엔도톡신 단위는 표준액으로부터 얻어진 표준 곡선을 기준으로 측정하였다.

[0042] 6. 루시페라아제(Luciferase) 분석

[0043] Transfectin (Bio-Rad)을 이용한 형질감염 24시간 전에, HEK293 세포를 10^5 세포/웰의 밀도로 24-웰 플레이트에 분주하였다. 세포는 ISRE promoter(100 ng)가 클로닝 된 pGL3-기반 반딧불이 루시페라아제 리포터 구조체 및 대조군 Renilla 루시페라아제 플라스미드 pRL-CMV(10 ng)로 형질감염되었다. 형질감염 24시간 후, 세포들은 연속적으로 10배씩 희석된 IFN α 2b로 처리되었다. 루시페라아제 활성은 dual-luciferase assay kit (Promega)을 사용하여 처리 12시간 후, luminometer (Victor X4; PerkinElmer, Waltham, MA)로 측정하였다. 반딧불이 루시페라아제 수치는 Renilla 루시페라아제 수치로 표준화되었고, 상대 루시페라아제 단위(relative luciferase unit; RLU) 수치는 표준화된 수치를 음성 대조군 샘플 수치로 나누어 계산되었다.

[0044] 상기 결과는 다음의 식 및 Microsoft Excel software를 이용하여 적용하였다.

$$[0045] Re = B_l + (Max - B_l) / (1 + (EC_{50} / conc)^{H_s}) - (Max - B_h) / (1 + (IC_{50} / conc)^{H_i})$$

[0046] 상기 Re는 세포의 반응, B_l는 저농도에서의 베이스라인, Max는 최고 반응, conc는 단백질의 농도, H_s는 자극에 대한 힐 계수(Hill coefficient), B_h는 고농도에서의 베이스라인 및 H_i는 억제에 대한 힐 계수(Hill coefficient).

[0047] 7. 통계

[0048] 실험은 3번 반복하여 수행하였고, 평균±표준 편차(mean±standard error; SE)로 나타냈다. 그룹 간 평균은 Student's t-test 또는 one-way analysis of variance (ANOVA)를 이용하여 비교하였다. P < 0.05는 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

[0049] <실시예 1> IFN 플라스미드의 구축 및 용해도 실험

[0050] *E. coli*에서의 IFN α 2b 발현 수준 및 용해도에 있어, 여러 태그들에 대한 효과를 시험하기 위해서, 본 발명자들은 N-말단에 His6, Trx, GST, MBP, NusA, PDI 또는 PDIb'a' 태그를 가진 IFN을 발현하는 7개의 플라스미드를 구축하였다(도 1).

[0051] 정제 과정 중 효과적인 분리를 위해서, TEV 단백질 분해효소 인식 사이트(TEV protease recognition site; TEVrs)는 태그 및 IFN 사이에 삽입되었다. 분리를 촉진하기 위해서, His6을 Trx, GST, MBP 및 NusA의 N-말단에 연결하였고, His8은 PDI 및 PDIb'a'의 N-말단에 연결하였다. IFN 및 TEVrs의 서열은 *E. coli* 발현을 위해 코돈-최적화되었고, 서열 확인 후 발현 플라스미드들은 *E. coli* BL21(DE3) 세포 내로 형질전환되었다. IFN α 2b의 발현은 T7 프로모터에 의해 조절되고, 최대 발현을 위해, 37℃ 및 18℃의 두 온도에서 단백질 발현을 유도하고, IPTG의 최적 농도는 1mM로 선택하였다(도 2 및 표 1).

[0053]

표 1

[0054]

태그	태그 크기 (kDa)	융합 크기 (kDa)	발현 수준 (%)		용해도 (%)	
			37℃	18℃	37℃	18℃
His6	0.8	20.1	6	30	0	9
Trx	11.7	31.0	27	38	1	78
GST	25.6	44.9	33	17	4	31
PD1b'a'	30.6	49.9	25	46	2	71
MBP	40.2	59.5	23	45	7	80
PDI	54.8	74.1	16	39	15	92
NusA	54.7	74.0	19	53	8	88

[0055]

태그 및 온도에 따른 발현 수준 및 용해도는 차이를 나타냈다. GST를 제외한 모든 구조체에서 37℃에 비해 18℃에서 더 많이 발현되었다. GST-태그된 IFN α 2b는 18℃에서 17% 발현된 것에 비해 37℃에서는 약 33% 발현되었다(도 2, 표 1). 하지만, 불용성 세포 펠렛 분획에 대부분의 단백질이 남아 있어, 모든 구조체는 37℃에서 낮은 용해도를 나타냈다. 37℃에 비해 18℃에서, His6, Trx, PD1b'a', MBP, PDI 및 NusA-태그된 구조체에서 IFN α 2b 발현은 현저하게 향상되었는데, 30% 이상 발현 수준이 향상된 것으로 나타났다. 발현 수준, 용해도, 작은 태그 크기 및 정제를 위한 크로마토그래피 용이성에 기초하여, 7개의 태그 중에서 추가적인 정제를 위한 IFN의 융합 파트너로 MBP를 선택하였다.

[0056]

<실시예 2> 재조합 IFN α 2b의 정제

[0057]

MBP 융합 구조체는 높은 IFN α 2b 발현 수준 및 용해도를 나타냈다. 또한, 상기 융합 단백질은 작은 태그 크기와 같은 용이한 정제 특성을 갖고 있다. MBP-TEVrs-IFN α 2b 융합 단백질은 고정 금속 친화도 크로마토그래피(Immobilized Metal Affinity Chromatography)에 의해 우선 분리된 후(도 3B, lane 4), MBP 태그를 제거하기 위해서 TEV 단백질 분해효소 절단에 적용되었다(도 3A). TEV 단백질 분해효소에 의해 약 89%의 융합단백질이 효과적으로 절단되었다(도 3B, lane 5). 그 후, 잔여 융합단백질, 절단된 MBP 태그 및 TEV 단백질 분해효소를 제거하기 위해서, 절단 산물을 2차 IMAC 정제 과정에 적용하였고, 다음으로 엔도톡신 수준을 감소시키는데 도움이 되는 음이온 교환 크로마토그래피에 적용하였다. 500mL 배양액으로부터 상기 공정을 통해 얻은 순수한 IFN α 2b는 7.2mg이었다(도 3B, lane 6 및 표 2). 실버 염색으로 단일 밴드를 확인하였는데, 이는 정제된 IFN α 2b 단백질이 고순도라는 것을 나타낸다(도 3C). 최종 단백질 산물의 엔도톡신 수준은 0.46 EU/ μ g이었다.

표 2

[0058]

정제단계	부피 (mL)	농도 (mg/mL)	총 단백질 (mg)	순도 (%)	IFN α 2b (mg)	수율 (%)
Supernatant	75	5.3	397.5	53.3	68.7	100
1st IMAC	45	2.0	90.0	75.5	22.0	32.0
2nd IMAC	84	0.4	33.6	55.4	18.6	27.1
3rd Q	36	0.2	7.2	99.8	7.2	10.5

[0059]

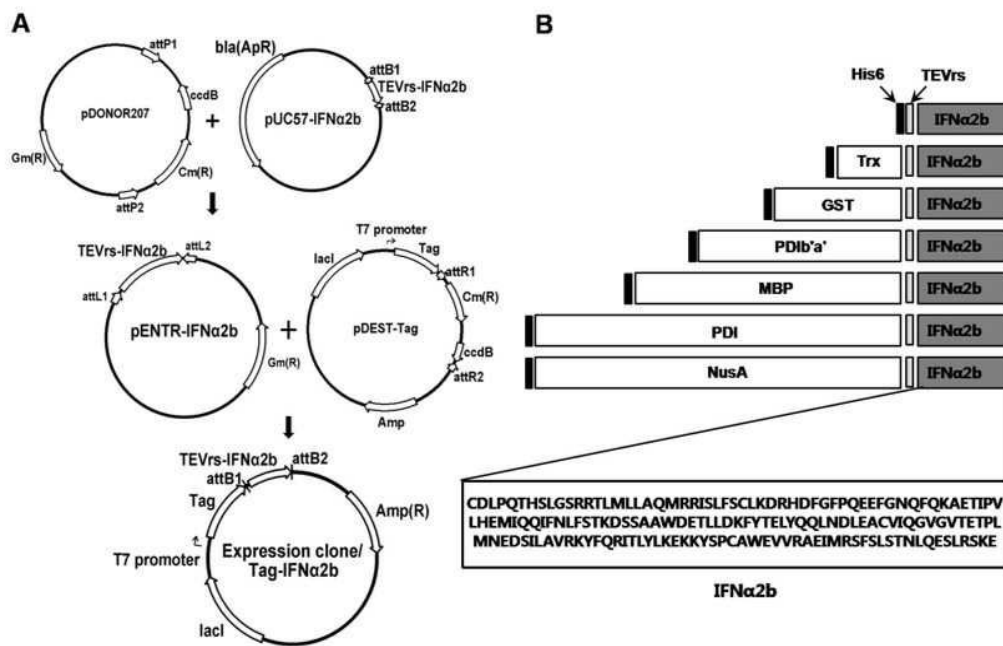
<실시예 3> 생물학적 활성 측정

[0060]

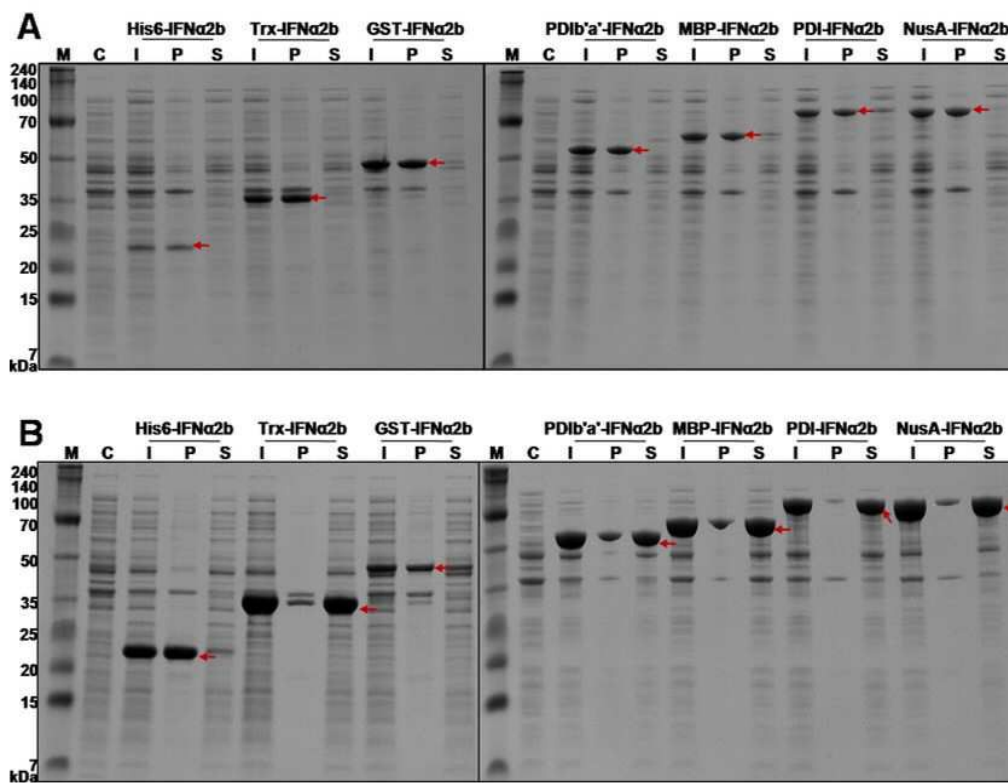
정제된 IFN α 2b의 생물학적 활성을 확인하기 위해서, 반딧불이 루시페라아제 분석을 사용하였다. 간단히 설명하면, HEK293 세포는 IFN-유도성 프로모터 서열(ISRE)이 클로닝된 pGL3-기반 반딧불이 루시페라아제 리포터 구조체로 형질감염되었다. 형질감염 24시간 후, 세포는 연속적으로 10배씩 희석된 정제 IFN α 2b로 처리되었고, 처리 12시간 후, 루시페라아제 활성을 측정하였다(도 4). 수치는 대조군 Renilla 루시페라아제 수치로 표준화되었다. 분석 결과, 정제된 IFN α 2b는 이상성(biphasic) 농도 의존적 방법으로 루시페라아제 활성을 증가시켰고 계산된 EC₅₀은 3.6 $\pm$ 3.5 nM이었다.

도면

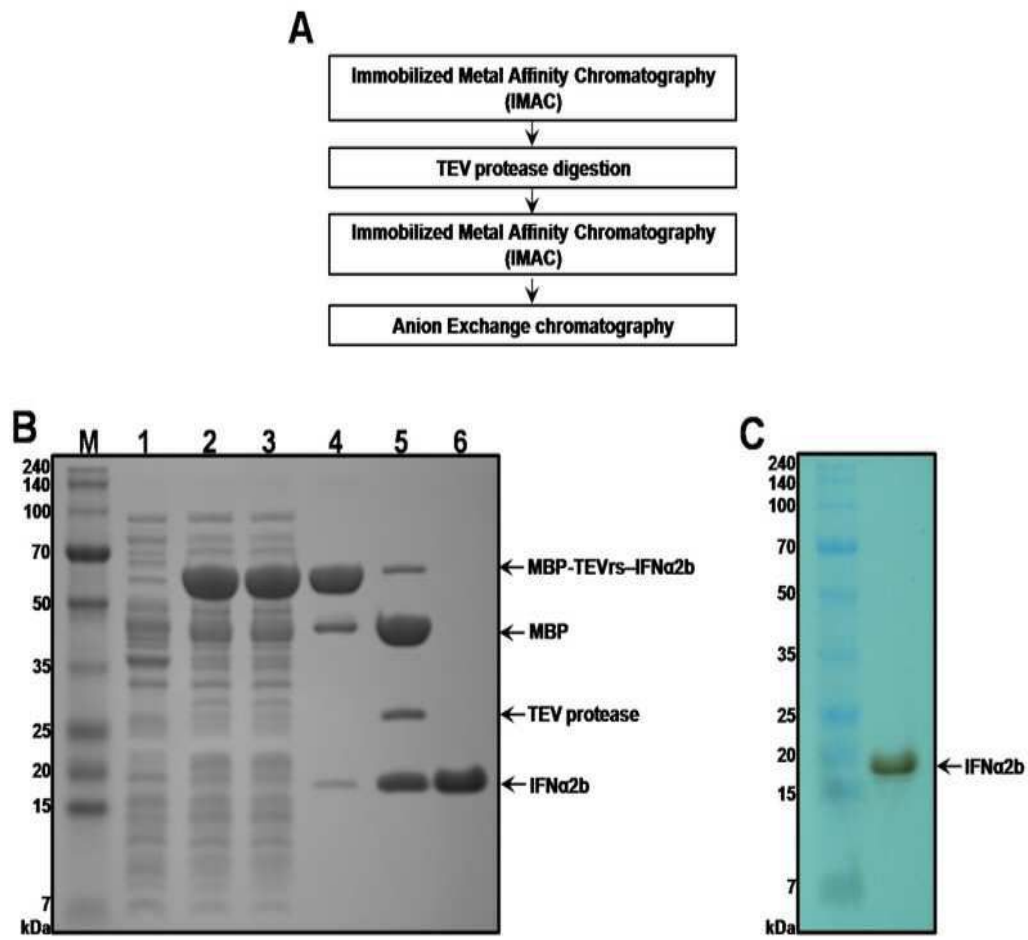
도면1



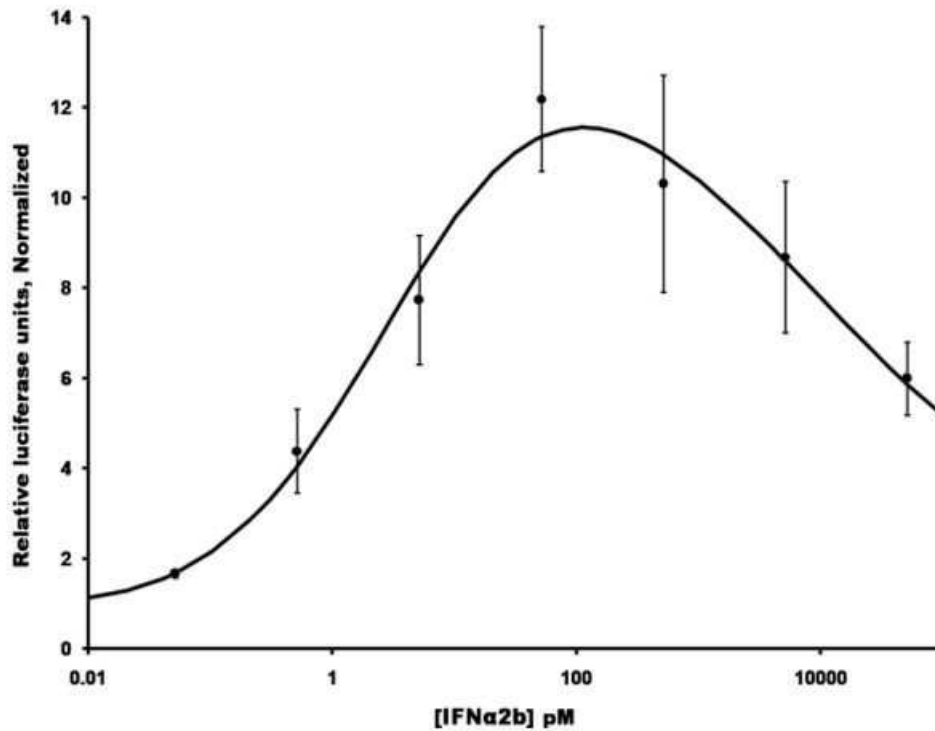
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation, THE ASAN FOUNDATION

<120> Soluble overexpression and purification method of bioactive
recombinant human interferon alpha 2b

<130> ADP-2016-0035

<160> 7

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 498

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

ggctgtgac tgccgcaaac gcactcgctg ggttctcgcc gcacgctgat gctgctggca      60
cagatgcgtc gcatttcgct gtttagctgc ctgaaagatc gtcatgactt tggtttcccg      120
caagaagaat ttggtaacca gttccaaaag gccgaaacca tcccgggtgct gcacgaaatg      180

atccagcaaa tcttcaacct gtttagcacg aaagatagct ctgcggcctg ggatgaaacc      240
ctgctggaca agttctatac ggaactgtac cagcaactga acgatctgga agcgtgcgtt      300
attcagggcg tcggtgtgac cgaaacgccg ctgatgaatg aagactcaat tctggccgctc      360
cgtaaataatt ttcagcgcac caccctgtat ctgaaggaaa agaaatacag cccgtgtgca      420
    
```

tggaagtgg ttcgtgctga aatcatgcgc agtttctccc tgtcaacgaa cctgcaggaa	480
tctctgcgca gtaaagaa	498
<210> 2	
<211> 324	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 2	
agcgataaaa ttattcacct gactgacgac agttttgaca cggatgtact caaagcggac	60
ggggcgatcc tctctgattt ctgggcagag tgggtcggtc cgtgcaaaat gatcgccccg	120
attctggatg aaatcgctga cgaatatcag ggcaaaactga ccgttgcaaa actgaacatc	180
gatcaaaacc ctggcactgc gccgaaatat 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 aaaaggcgt acctcgcgag	60
aagattttcg aagcattgga aagcgcgtg gcgacagcaa caaagaaaaa atatgaacaa	120
gagatcgacg tccgcgtaca gatcgatcgc aaaagcgtg attttgacac tttccgtcgc	180
tggttagttg ttgatgaagt caccagccg accaaggaaa tcacccttga agccgcacgt	240
tatgaagatg aaagcctgaa cctgggcgat tacgttgaag atcagattga gtctgttacc	300
tttgaccgta tctactacca gacggcaaaa caggttatcg tgcagaaagt gcgtgaagcc	360
gaacgtgcga tgggtggtga tcagttccgt gaacacgaag gtgaaatcat caccggcgtg	420
gtgaaaaaag taaaccgcga caacatctct ctggatctgg gcaacaacgc tgaagccgtg	480
atcctgcgcg aagatatgct gccgcgtgaa aacttccgcc ctggcgaccg cgttcgtggc	540
gtgctctatt ccgttcgccc ggaagcgcgt ggcgcgcaac tgttcgtcac tcgttccaag	600
ccggaatgc tgatcgaact gttccgtatt gaagtccag 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 ttgcgaactg agcggttggg aactcaacgt gatgaccgtt	1020
gacgacctgc aagctaagca tcaggcggaa ggcacgcag cgatcgacac cttcaccaaa	1080
tatctcgaca tcgacgaaga cttcgcgact gttctggtag aagaaggctt ctcgacgtg	1140
gaagaattgg cctatgtgcc gatgaaagag ctgttggaag tcgaaggcct tgatgagccg	1200
accgttgaag cactgcgcga gcgtgctaaa aatgcactgg ccaccattgc acaggcccag	1260
gaagaaagcc tcggtgataa caaacggct gacgatctgc tgaaccttga aggggtagat	1320
cgtgatttgg cattcaact ggccgcccgt ggcttttga cgctggaaga tctcgccgaa	1380
cagggcattg atgatctggc tgatatcgaa gggttgaccg acgaaaaagc cggagcactg	1440
attatggctg cccgtaatat ttgctggttc 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
cgcttgcaa aggttgatgc tacggaagag agtgacctgg cgcagcagta tgggtgccgc	240
ggctatccta caattaaatt cttccgtaac ggtgataccg catctccaaa agaataatcc	300
gctggctcgc aggcggacga tattgttaac tggctgaaga aacgcactgg ccctgccgca	360
accacctgc ctgatggcgc tgctgccgaa agcctggctg aaagtagcga agttgccgtc	420
attggtttct ttaaggatgt agaattctgac agtgccaaac agtttctgca agcggcagag	480
gctatcgatg acatccgtt cggcatcacc tctaacagtg acgtattcag taaataccaa	540
ctggataaag acggcgttgt gctgttcaag aaatttgatg aaggtcgaa caactttgag	600
ggtgaggatga ccaaggagaa cctgctggat ttatttaagc acaaccaact gccgctggtt	660
attgaattta cagaacaaac ggccgcaaaa attttcggcg gtgagattaa aacacatc	720
ctgctgtttc tgccgaagag cgtttctgat tacgatgta aactgagtaa ttttaaaacc	780
gccgcagaat ctttcaaagg taagattctg ttcattttca ttgatagcga ccacacggac	840

aatcagcgta tcctggagtt ctttggctctg aagaaagagg aatgcccggc tgtgcgtctg	900
attacgctgg aagaggaaat gacaaagtac aagccggaga gcgaggaact gactgcagaa	960
cgtatcaccg aattttgtca tcgtttcctg gaggggaaga ttaagccgca tctgatgagc	1020
caggaactgc cggaggattg ggacaaacag ccagtgaag tttcgggtggg gaagaatfff	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
gcgggcatg atgatgacct ggaagacctg gaagaagcgg aggaaccaga catggaggag	1440
gatgacgacc agaaagcggc c	1461
<210> 5	
<211> 801	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 5	
attgaattta cagaacaac ggcccgaaa attttcggcg gtgagattaa aacacatatt	60
ctgctgtttc tgccgaagag cgtttctgat tacgatggtg aactgagtaa ttttaaacc	120
gccgcagaat ctttcaaagg taagattctg ttcattttca ttgatagcga ccacacggac	180
aatcagcgta tcctggagtt ctttggctctg aagaaagagg aatgcccggc tgtgcgtctg	240
attacgctgg aagaggaaat gacaaagtac aagccggaga gcgaggaact gactgcagaa	300
cgtatcaccg aattttgtca tcgtttcctg gaggggaaga ttaagccgca tctgatgagc	360
caggaactgc cggaggattg ggacaaacag ccagtgaag tttcgggtggg gaagaatfff	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
gcgggcatg 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 tgaatcacc 240

ccggacaaag cgttccagga caagctgtat ccgtttacct gggatgccgt acgttacaac 300

ggcaagctga ttgcttacc gatcgtctgt gaagcgttat cgctgattta taacaaagat 360

ctgctgccga acccgccaaa aacctgggaa gagatcccgg cgctggataa agaactgaaa 420

gcgaaaggta agagcgcgct gatgttcaac ctgcaagaac cgtacttcac ctggccgctg 480

attgctgctg acgggggtta tgcgttcaag tatgaaaacg gcaagtacga cattaagac 540

gtgggcgtgg ataacgctgg cgcgaaagcg ggtctgacct tcttggttga cctgattaaa 600

aacaaacaca tgaatgcaga caccgattac tccatcgag aagctgcctt taataaaggc 660

gaaacagcga tgaccatcaa cggcccgctgg gcatggcca acatcgacac cagcaaagtg 720

aattatgggtg taacggtact gccgacctt aagggtcaac catccaaacc gttcgttggc 780

gtgctgagcg caggtattaa gcgcgccagt ccgaacaaag agctggcaaa agagttcctc 840

gaaaactatc tgctgactga tgaaggcttg gaagcggtta ataaagacaa accgctgggt 900

gccgtagcgc tgaagtctta cgaggaagag ttggcgaaag atccacgtat tgccgccacc 960

atggaaaacg cccagaaagg tgaaatcatg ccgaacatcc cgcagatgac cgctttcttg 1020

tatgccgtgc gtactgcggt gatcaacgcc gccagcggtc gtcagactgt cgatgaagcc 1080

ctgaaagacg cgcagact 1098

<210> 7

<211> 166

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu

1 5 10 15

Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys

					20					25					30				
Asp	Arg	His	Asp	Phe	Gly	Phe	Pro	Gln	Glu	Glu	Phe	Gly	Asn	Gln	Phe				
35					40					45									
Gln	Lys	Ala	Glu	Thr	Ile	Pro	Val	Leu	His	Glu	Met	Ile	Gln	Gln	Ile				
50					55					60									
Phe	Asn	Leu	Phe	Ser	Thr	Lys	Asp	Ser	Ser	Ala	Ala	Trp	Asp	Glu	Thr				
65					70					75					80				
Leu	Leu	Asp	Lys	Phe	Tyr	Thr	Glu	Leu	Tyr	Gln	Gln	Leu	Asn	Asp	Leu				
85					90					95									
Glu	Ala	Cys	Val	Ile	Gln	Gly	Val	Gly	Val	Thr	Glu	Thr	Pro	Leu	Met				
100					105					110									
Asn	Glu	Asp	Ser	Ile	Leu	Ala	Val	Arg	Lys	Tyr	Phe	Gln	Arg	Ile	Thr				
115					120					125									
Leu	Tyr	Leu	Lys	Glu	Lys	Lys	Tyr	Ser	Pro	Cys	Ala	Trp	Glu	Val	Val				
130					135					140									
Arg	Ala	Glu	Ile	Met	Arg	Ser	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Asn	Leu	Gln	Glu				
145					150					155					160				
Ser	Leu	Arg	Ser	Lys	Glu														
165																			