



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년03월13일

(11) 등록번호 10-2508681

(24) 등록일자 2023년03월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/17 (2006.01) A61P 27/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/1709 (2020.05)

A61P 27/16 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2020-0067111

(22) 출원일자 2020년06월03일

심사청구일자 2020년06월03일

(65) 공개번호 10-2020-0140202

(43) 공개일자 2020년12월15일

(30) 우선권주장

1020190066581 2019년06월05일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

JP4711512 B2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

지현영

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 예비승의생명 연구센터 225호

이민구

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 신관304호(신촌동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

파도특허법인유한회사, 특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 13 항

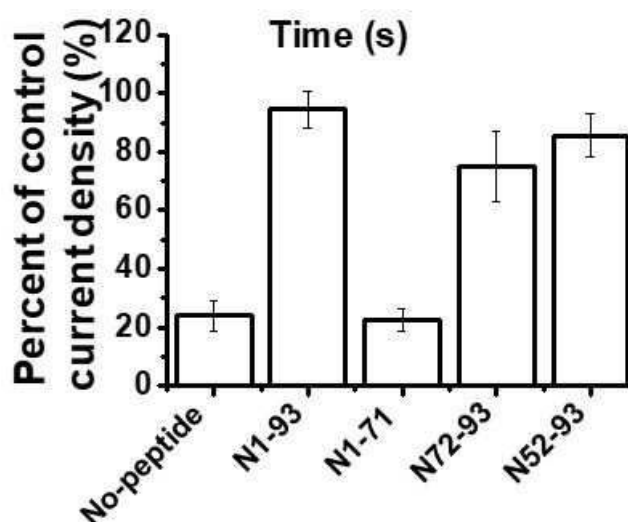
심사관 : 이에리

(54) 발명의 명칭 칼륨 채널병증의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 칼륨 채널병증(potassium channelopathy)의 예방 또는 치료용 조성물 및 대상체 또는 생물학적 시료 내 KCNQ4의 칼륨이온 통로 기능을 활성화하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 칼륨 채널의 기능이상으로 인한 칼륨 채널병증(potassium channelopathy), 구체적으로는 비증후군성 진행형 난청 질환에 있어 칼륨 채널의 이온 통로 기능을 효과적으로 회복시킨다. 이에, 본 발명은 칼륨 채널병증에 대한 대중적인 치료에서 벗어나 병인을 제거하는 근원적인 치료방법으로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도2e



(72) 발명자

최재영

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 안이병원 401-1

정진세

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 안이병원이비인
후과학교실

신동훈

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 에비슨의생명연
구센터 217호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711108917
과제번호	2018R1A5A2025079
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업
연구과제명	만성난치질환 시스템의학 연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

서열목록 제1서열의 C 말단으로부터 N 말단 방향으로 22개의 연속되는 아미노산 잔기의 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 KCNQ4(Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 4) 단백질의 기능 이상 관련 칼륨 채널병증(potassium channelopathy)의 예방 또는 치료용 조성물로서,

상기 KCNQ4(Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 4) 단백질의 기능 이상 관련 칼륨 채널병증(potassium channelopathy)은 비증후군성 진행형 난청(nonsyndromic progressive deafness)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열목록 제1서열의 C 말단으로부터 N 말단 방향으로 42개의 연속되는 아미노산 잔기의 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 KCNQ4 단백질의 기능 이상은 *KCNQ4* 유전자의 돌연변이에 의해 발생하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 비증후군성 진행형 난청은 상염색체 우성 비증후군성 난청 2(deafness nonsyndromic autosomal dominant 2, DFNA2)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

서열목록 제1서열의 C 말단으로부터 N 말단 방향으로 22개의 연속되는 아미노산 잔기의 서열을 갖는 펩타이드를 코딩하는 핵산 분자를 유효성분으로 포함하는 KCNQ4(Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 4) 단백질의 기능 이상 관련 칼륨 채널병증(potassium channelopathy)의 예방 또는 치료용 조성물로서,

상기 KCNQ4(Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 4) 단백질의 기능 이상 관련 칼륨 채널병증(potassium channelopathy)은 비증후군성 진행형 난청(nonsyndromic progressive deafness)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열목록 제1서열의 C 말단으로부터 N 말단 방향으로 42개의 연속되는 아미노산 잔기의 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

제 8 항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 핵산 분자는 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제 8 항에 있어서, 상기 비증후군성 진행형 난청은 상염색체 우성 비증후군성 난청 2(deafness nonsyndromic autosomal dominant 2, DFNA2)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

서열목록 제1서열의 C 말단으로부터 N 말단 방향으로 22개의 연속되는 아미노산 잔기의 서열을 갖는 펩타이드를 인간을 제외한 대상체 또는 KCNQ4를 포함하는 생물학적 시료에 접촉시키는 단계를 포함하는 인간을 제외한 대상체 또는 생물학적 시료 내 KCNQ4의 칼륨이온 통로 기능을 활성화하는 방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열목록 제1서열의 C 말단으로부터 N 말단 방향으로 42개의 연속되는 아미노산 잔기의 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

삭제

청구항 17

제 14 항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 KCNQ4 단백질의 N-말단 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 칼륨 채널병증, 구체적으로는 비증후군성 진행형 난청의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 약 15-20%의 유병률을 보이는 비교적 흔한 질환인 난청(hearing loss)은 외이 및 중이와 같은 소리 신호의 전달 기관이 염증 등에 의해 손상되었을 경우 발생하는 전음성 난청(conductive hearing loss), 달팽이관과 청신경 등 소리 자극을 감지하거나 이를 전기적 에너지로 변환하여 전달하는 기관에 기능 이상이 생겨 발생하는 감각신경성 난청(sensorineural hearing loss)로 나뉜다. 감각신경성 난청은 미로염이나 뇌수막염 등의 염증성 질환, 소음, 이독성 약물, 측두골 골절 등의 외상, 갑상선 기능저하 등의 대사이상, 다발성 경화증 등의 신경학적 이상, 이온 채널 단백질의 기능 이상 등에 의해 발생할 수 있다
- [0004] 소리를 듣는 과정에서 중요한 역할을 하는 전압 개폐 칼륨 채널(voltage-gated K^+ channel)인 KCNQ4는 주로 내이(inner ear) 달팽이관의 유모세포(hair cell)에서 발현하며, 달팽이관 내 K^+ 이온의 항상성 유지에 핵심적인 역할을 한다. KCNQ4 유전자에 돌연변이가 발생할 경우 비증후군성 진행형 난청(non-syndromic progressive deafness)인 상염색체 우성 비증후군성 난청 2(deafness nonsyndromic autosomal dominant 2, DFNA2)이 발생하는데, 이러한 난청은 진행성이며, 중등도의 난청소견을 보인다. 난청의 예방 및 치료를 위해 시도된 많은 연구들에도 불구하고, 난청의 명확한 분자기전 및 예방과 치료 방안이 아직까지 제시되고 못하면서 여전히 기존의 항생제 또는 항염증제에 의한 대증적 치료가 주를 이루고 있다. 이에, 이온채널 단백질의 소실된 기능을 회복 시킴으로써 감각신경성 난청을 근본적으로 치료할 수 있는 효율적인 치료제 개발이 요구된다.
- [0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 미국특허출원 제16/060841호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 칼륨 채널의 기능이상 및 이로 인한 칼륨 이온의 항상성 유지 실패를 원인으로 하는 다양한 칼륨 채널병증(potassium channelopathy)에 대해, 대증적인 치료에서 벗어나 병인을 제거하는 근원적인 치료방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 칼륨 채널 단백질의 가장 N-말단 쪽의 막통화 도메인(transmembrane domain)과 연결된 세포 내 N-말단 펩타이드, 상기 펩타이드와 일정 수준 이상의 아미노산 서열 상동성을 가지는 펩타이드 또는 이의 C-말단의 일부 절편으로 이루어진 펩타이드를 투여할 경우, 칼륨 채널의 이온 통로 기능이 회복되는 것을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0010] 따라서 본 발명의 목적은 칼륨 채널병증(potassium channelopathy)의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0011] 발명의 다른 목적은 대상체 또는 생물학적 시료 내 KCNQ4의 칼륨이온 통로 기능을 활성화하는 방법을 제공하는 데 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열의 C 말단으로부터 N 말단 방향으로 22개 이상의 연속되는 아미노산 잔기를 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 칼륨 채널병증(potassium channelopathy)의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명자들은 칼륨 채널의 기능이상 및 이로 인한 칼륨 이온의 항상성 유지 실패를 원인으로 하는 다양한 칼륨 채널병증(potassium channelopathy)에 대해, 대증적인 치료에서 벗어나 병인을 제거하는 근원적인 치료방법을

개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 칼륨 채널 단백질의 가장 N-말단 쪽의 막통화 도메인(transmembrane domain)과 연결된 세포 내 N-말단 펩타이드, 상기 펩타이드와 일정 수준 이상의 아미노산 서열 상동성을 가지는 펩타이드 또는 이의 C-말단의 일부 절편으로 이루어진 펩타이드를 투여할 경우, 칼륨 채널의 이온 통로 기능이 회복되는 것을 발견하였다.

- [0018] 본 명세서에서 용어 "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다. 본 발명에 따르면, 서열목록 제1서열의 아미노산 서열은 전압 개폐 칼륨 채널(voltage gated potassium channel), 구체적으로는 KCNQ4 단백질의 N-말단 펩타이드의 아미노산 서열(N1-93)이다.
- [0019] 본 발명의 펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성 방법, 예를 들어 고상 합성 기술(solid-phase synthesis techniques)에 따라 제작될 수도 있고(Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.:Rockford, 111(1984)), 적합한 숙주세포를 이용하여 재조합적으로 수득할 수도 있다(Sambrook, J. et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)). 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 유전자를 안정적, 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포로는 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용될 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 슈린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주, CHO(Chinese hamster ovary) 세포, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명의 펩타이드는 자연계의(natural occurring) 펩타이드 혹은 그 서열 유사체로서 그 자체로서 안정성이 우수하지만, 아미노산의 변형에 의해 안정성이 더욱 향상될 수 있다. 구체적으로는, 예를 들어 본 발명 펩타이드의 C-말단은 히드록시기(-OH) 또는 아미노기(-NH₂)로 변형될 수 있으며, N-말단은 아세틸기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐기, 포르밀기, 팔미토일기, 미리스틸기, 스테아릴기 및 폴리에틸렌글리콜(PEG)로 구성된 군으로부터 선택되는 보호기가 결합될 수 있다. 이러한 예시적인 아미노산의 변형은 본 발명의 펩타이드의 안정성을 크게 개선시킨다. 본 명세서에서 용어 "안정성"은 인 vivo 안정성 뿐만 아니라, 저장 안정성도 포함한다. 상술한 보호기는 생체 내의 단백질 절단효소로부터 본 발명의 펩타이드를 보호하는 작용을 한다.
- [0021] 본 발명의 펩타이드는 서열목록 제1서열의 아미노산 서열에 대하여 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 아미노산 서열도 포함한다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 아미노산 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 70%의 상동성, 구체적으로는 최소 80%의 상동성, 보다 구체적으로는 최소 90%의 상동성, 가장 구체적으로는 최소 95%의 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 의미한다.
- [0022] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 펩타이드는 서열목록 제1서열의 C 말단으로부터 N 말단 방향으로 42개 이상의 연속되는 아미노산 잔기를 포함하며, 보다 구체적으로는 서열목록 제1서열의 아미노산 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 가지며, 가장 구체적으로는 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 가진다.
- [0023] 후술하는 실시예에서 보는 바와 같이, 본 발명자들은 N1-93 펩타이드와 유사한 효능을 보이는 이의 절편을 탐색한 결과, N1-93 펩타이드의 C-말단으로부터 연속된 22개 잔기로 구성된 N72-93 펩타이드 및 C-말단으로부터 연속된 44개 잔기로 구성된 N52-93 펩타이드가 전장 N1-93 펩타이드에 필적하는 칼륨채널 기능 회복 활성을 보인다는 사실을 확인하였다.
- [0025] 또한, 본 발명에서 이용되는 펩타이드는 이의 천연형 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 뿐만 아니라 이의 아미노산 서열 변이체도 또한 포함된다. 아미노산 서열 변이체란 본 발명의 펩타이드의 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu 및 Asp/Gly 간의 교환이다.
- [0026] 경우에 따라서는 본 발명의 펩타이드는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation) 또는 파네실화(farnesylation) 등으로 수식(modification)될 수도

있다.

- [0028] 본 명세서에서 용어 “예방”은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [0029] 본 명세서에서 용어 “치료”는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물이 대상체에 투여되면 유전적 변이를 비롯한 다양한 원인에 의해 기능을 상실한 칼륨이온 채널 단백질의 기능이 상당부분 회복되면서 이온 항상성의 붕괴에 따른 증상의 발전을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 이들 질환 치료의 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 상기 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 “치료” 또는 “치료제”는 “치료 보조” 또는 “치료 보조제”의 의미를 포함한다.
- [0030] 본 명세서에서 용어 “투여” 또는 “투여하다”는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.
- [0031] 본 발명에서 용어 “치료적 유효량”은 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하고자 하는 개체에게 조성물 내의 약리성분(즉, 본 발명의 펩타이드)이 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 정도로 함유된 조성물의 함량을 의미하며, 이에 “예방적 유효량”을 포함하는 의미이다.
- [0032] 본 명세서에서 용어 “대상체”는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.
- [0034] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료되는 칼륨 채널병증(potassium channelopathy)은 KCNQ4(Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 4) 단백질의 기능 이상을 원인으로 하는 채널병증이다. 본 명세서에서 용어 “기능 이상”은 단백질이 가지는 생체 내에서의 정상적인 생물학적 활성이 감소되거나 소멸된 것을 의미한다. 따라서, 기능 이상은 기능 상실(Loss-of-function)과 동일한 의미이다. 기능 이상 또는 기능 상실은 유전자 전사활성의 저하, 번역(translation)의 저하, RNA 프로세싱의 이상, 단백질의 안정성 및 3차원 구조의 이상, 이동 및 활성의 이상 또는 이들의 조합에 기인할 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 KCNQ4 단백질의 기능 이상은 *KCNQ4* 유전자의 돌연변이에 의해 발생한다.
- [0035] 전압 개폐 칼륨 채널(voltage gated potassium channel)인 KCNQ4 단백질에 기능 이상이 발생할 경우 활동전압에 따른 칼륨 이온의 통과가 원활하지 못하며, 자극에 의해 유입된 칼륨 이온이 세포 밖으로 유출되지 못하면서 칼륨 이온의 항상성이 붕괴된다. 따라서, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료될 수 있는 칼륨 채널병증은 KCNQ4 단백질의 기능 이상으로 인해 칼륨 이온의 항상성이 유지되지 못하는 모든 질환을 포함하며, 예를 들어 신경근긴장증(neuromyotonia), 간헐성 운동실조(Episodic Ataxia), 저칼륨혈증 주기성마비(hypokalaemic periodic paralysis), 간질(epilepsy) 및 상염색체 우성 비증후군성 난청 2(deafness nonsyndromic autosomal dominant 2, DFNA2)를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로는, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료될 수 있는 칼륨 채널병증은 상염색체 우성 비증후군성 난청 2(DFNA2)이다.
- [0037] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 이에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 구산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유효제, 현탁제, 보존제 등을 추가로포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0038] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 구체적으로는 비경구 방식으로 투여될 수 있고, 보다 구체적으로는 피하, 경피, 정맥 또는 고실 내 투여(intratympanic administration)될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 mg/kg 범위 내이다.
- [0040] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로

제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

- [0041] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 핵산 분자를 유효성분으로 포함하는 칼륨 채널병증(potassium channelopathy)의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0042] 본 발명에서 치료하고자 하는 칼륨 채널병증 및 본 발명에서 이용하는 펩타이드에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재 생략한다.
- [0043] 본 명세서에서 용어 “핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)). 본 발명의 핵산 분자는 적합한 유전자 전달체를 통해 대상체에서 발현시킬 수 있다.
- [0044] 본 명세서에서 용어 “발현시키다”는 대상체가 외래(exogenous) 유전자를 발현하게 하거나 또는 내인성(endogenous) 유전자의 자연적 발현량을 증가시키기 위해 유전자 전달체를 이용하여 인위적으로 이를 도입함으로써 유전자가 대상체 세포 내에서 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 따라서, 용어 “발현”은 “형질전환(transformation)”, “형질감염(transfection)” 또는 “형질도입(transduction)”과 동일한 의미이다.
- [0045] 본 명세서에서, 용어 “유전자 전달체(gene carrier)”는 유전자를 세포 내로 운반하는 모든 수단을 의미하며, 유전자 전달은 유전자의 세포내 침투(transduction)와 동일한 의미를 가진다. 조직 수준에서, 상기 용어 유전자 전달은 유전자의 확산(spread)과 동일한 의미를 가진다. 따라서, 본 발명의 유전자 전달 시스템은 유전자 침투 시스템 및 유전자 확산 시스템으로 기재될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 유전자 전달체는 도입하고자 하는 유전자를 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 구조체인 발현카세트의 형태로 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 유전자에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터, 전사종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역종결신호를 포함한다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다.
- [0047] 본 발명에서 이용되는 유전자 전달체는 통상적인 유전자 삽입에 이용되는 모든 유전자 전달 시스템이 적용될 수 있으며, 예를 들어 플라스미드, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated viruses: AAV), 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 배시니아 바이러스, 리포솜 및 니오솜을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0048] 본 발명의 유전자 전달체를 대상체의 숙주 세포 내로 운반하는 방법은 예를 들어 미세 주입법(Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.* 101:1094-1099 (1985)), 칼슘포스페이트 침전법(Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.* 7:2745-2752 (1987)), 전기천공법(Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718(1986)), 리포솜-매개 형질감염법(Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176(1987)), DEAE-텍스트란 처리법(Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990))가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명에 따르면, 본 발명의 서열목록 제1서열의 펩타이드를 코딩하는 핵산 분자는 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [0050] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 첨부한 서열목록에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 한정되지 않는다는 것은 당업자에게 명확하다. 뉴클레오타이드에서의 변이는 단백질에서 변화를 가져오지 않는 것도 있는데, 이러한 핵산은 기능적으로 균등한 코돈, 코돈의 축퇴성에 의해 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈, 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 가지는 핵산분자를 모두 포괄한다.
- [0051] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명에서 이용되는 핵산 분자는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 70%의 상동성, 구체적으로는 80%의 상동성, 보다 구체적으로는 90%의 상동성, 가장 구체적으로는 95%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서

열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)(Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI(National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다.

[0053] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 펩타이드를 대상체 또는 KCNQ4를 포함하는 생물학적 시료에 접촉시키는 단계를 포함하는 대상체 또는 생물학적 시료 내 KCNQ4의 칼륨이온 통로 기능을 활성화하는 방법을 제공한다.

[0054] 본 발명에서 이용되는 펩타이드에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0055] 본 발명에서 용어 “생물학적 시료”는 동물로부터 얻어지는, KCNQ4 또는 이를 발현하는 세포를 포함하고 있는 모든 시료로서, 조직, 기관, 세포 또는 세포 배양액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 동물은 인간을 제외한 동물이다.

[0056] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 상술한 본 발명의 펩타이드 또는 이를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 칼륨 채널병증(potassium channelopathy)의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0058] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0059] (a) 본 발명은 칼륨 채널병증(potassium channelopathy)의 예방 또는 치료용 조성물 및 대상체 또는 생물학적 시료 내 KCNQ4의 칼륨이온 통로 기능을 활성화하는 방법을 제공한다.

[0060] (b) 본 발명은 칼륨 채널의 기능이상으로 인한 칼륨 채널병증(potassium channelopathy), 구체적으로는 비증후군성 진행형 난청 질환에 있어 칼륨 채널의 이온 통로 기능을 효과적으로 회복시킨다.

[0061] (c) 본 발명은 칼륨 채널병증에 대한 대중적인 치료에서 벗어나 병인을 제거하는 근원적인 치료방법으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도 1은 KCNQ4 단백질의 모식도 및 1-93 아미노산에 해당하는 KCNQ4의 N-말단 펩타이드 (N1-93)의 아미노산 서열을 나타낸 그림이다.

도 2는 KCNQ4 N-말단 펩타이드(N1-93)에 의해 KCNQ4 채널의 rundown이 조절됨을 보여주는 그림이다. KCNQ4로 일시적으로 형질전환된 CHO 세포에서 전체세포 전류를 기록하였다. -70 mV의 고정전압에서, 탈분극 전압 보폭 0 mV으로 전류를 유도하였다. 도 2a는 KCNQ4에서 대조군 펩타이드에 비해 시간 의존적으로 전류가 감소함을 보여준다. 도 2b는 N1-93 펩타이드에 의해 시간 의존적인 rundown이 억제되고 채널 전류가 증가됨을 보여준다. 도 2c는 0 mV에서 측정된 N1-93 펩타이드에 의한 전류 밀도로, 대조군 대비 전류 변화율을 보여준다. 숫자는 시험된 세포 수를 나타내며, 데이터는 평균±표준오차로 나타났다. 도 2d는 N1-93 펩타이드의 C-말단 절편 중의 하나인 N72-93 펩타이드 또한 KCNQ4 채널의 rundown을 유의하게 억제하면서 채널 전류를 증가시킴을 보여주는 그림이다. 도 2e는 N1-93 펩타이드의 다양한 절편들에 의한 전류 밀도를 보여주는 그림으로, N1-93 펩타이드의 C-말단쪽 절편인 N72-93와 N52-93 역시 N1-93 펩타이드의 약 80-90%에 달하는 전류 밀도를 보임을 알 수 있다.

도 3은 KCNQ4 관련 난청동물모델을 이용하여 본 발명의 펩타이드의 청력보존 효과를 검증한 결과를 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는

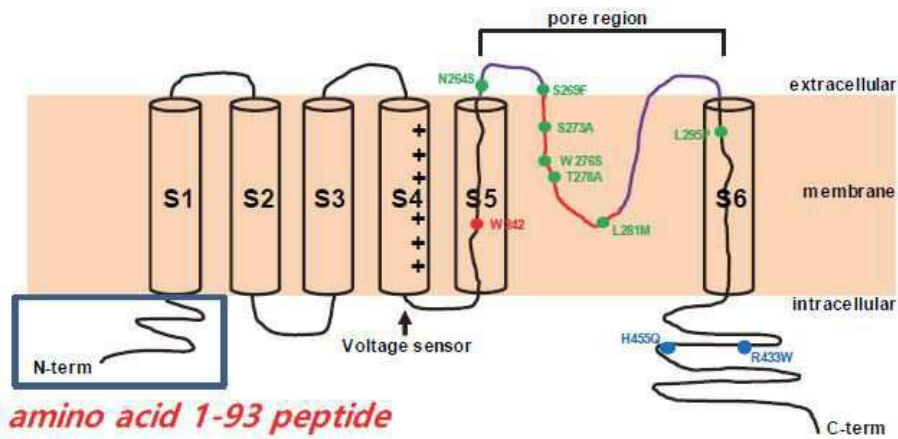
것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

- [0066] **실시예**
- [0067] **실험방법**
- [0068] 세포배양 및 형질전환
- [0069] CHO(Chinese hamster ovary) 세포를 10% FBS(fetal bovine serum) 및 페니실린(50IU/ml)/스트렙토마이신(50 μ g/ml)(Invitrogen)이 보충된 DMEM (Dulbecco's modified essential medium) 및 RPMI 1640 배지에서 각각 배양하였다. 이후 리포팩타민과 PLUS 시약, 또는 리포팩타민 2000(Invitrogen)을 이용하여 제조자의 지시에 따라 세포에 *KCNQ4* 플라스미드를 형질전환하였다.
- [0071] *KCNQ4* 펩타이드
- [0072] KCNQ4 단백질의 1-93 아미노산에 해당하는 KCNQ4의 N-말단 펩타이드 (N1-93), 1-71 아미노산에 해당하는 N1-71, 72-93 아미노산에 해당하는 N72-93 및 52-93 아미노산에 해당하는 N52-93을 각각 Pepmic Co., Ltd에서 합성하고 HPLC 및 질량 스펙트럼 분석으로 >75% 순도를 확인하였다. 모든 화합물은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.
- [0074] 전기생리학 분석
- [0075] 전체세포 패치 클램핑(whole-cell patch clamp)를 이용하여 CHO 세포에서 칼륨 채널 활성을 측정하였다. 요약하면, 세포를 역상 현미경(Ti2; Nikon, Tokyo, Japan)에 마운팅된 배스에 위치시켰다. 기가 실(gigaseal) 형성 후 패치막을 파열시킴으로써 일반적인 전체세포 클램프를 획득하였다.
- [0076] 배스 용액은 5 mL/min에서 관류시켰으며, 전압 및 전류는 상온(22°C-25°C)에서 기록하였다. 약 2-5 M Ω 의 free-tip 저항을 가지는 패치 피펫을 패치-클램프 증폭기(Axopatch-200B; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)의 헤드 스테이지에 연결하였다. 데이터를 획득하고 명령 펄스를 부과하기 위해 pCLAMP 소프트웨어 v.10.2 및 Digidata-1550B (Molecular Devices)를 사용하였다. 전압 및 전류 레직은 Clampfit v. 10.2 및 Origin v. 8.0(OriginLab Corp., Northampton, MA, USA)을 이용하여 저장 및 분석하였다. 전류는 5 kHz에서 샘플링하였다. 모든 데이터 1 kHz에서 저주파 통과 여과(low pass-filter)를 하고, 전체 세포 정전 용량을 측정하였다.
- [0077] 전체세포 패치 클램프를 위한 배스 용액에는 150mM NaCl, 5mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 10mM 글루코스, 10mM 수크로스 및 10mM HEPES(NaOH로 pH7.4까지 적정)가 포함되었다. 피펫 용액에는 150mM KCl, 5mM NaCl, 1mM CaCl₂, 3mMg ATP, 10mM HEPES 및 5m 메틸렌글리콜테트라아세트산(EGTA)(KOH로 pH7.2까지 적정)이 포함되었다. 전류-전압(I-V) 관계를 결정하기 위해, 1단계 펄스 0mV(펄스 지속시간 2초; 펄스간 지속시간 20초; 고정전압 -80mV)을 가하여 전압 클램프 모드 및 I-V 곡선을 획득하였다. 모든 데이터는 전체세포 정전용량(pA/pF)에 대해 정규화하였다. 펩타이드를 DW(1mM)에 용해시키고 피펫 용액(최종농도 1mM)에 넣었다. 모든 데이터는 전체세포 정전용량(pA/pF)에 대해 정규화하였다. 대조군 대비 전류밀도 변화를 막대 그래프(평균 \pm 표준오차)로 나타내었다.
- [0079] 동물실험
- [0080] p.W276S 마우스의 제작
- [0081] CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 Kcnq4 c.830G>C (p.W276S) 녹-인(knock-in) 마우스를 제작하였다. CCAGAGCGAGTCGGCATAGGAGG (gRNA1) 및 ATGCCGACTCGCTCTGGTGGGGG (gRNA1)의 2개의 가이드 RNA를 사용하였다. 상동 인도 복구(homology-directed repair)를 위한 ssDNA 공여자 서열은 다음과 같다:
- [0082] TCTACCTGGCTGAGAAGGATGCCAACTCTGACTTCTCTCTCATATGCCGACTCGCTCTGGTCGGGACGGTGGTGGAGCATCTGTGCAGGGCTGCCCTTACC. 볼드체로 표시된 염기는 녹-인 대립유전자가 gRNA에 의해 다시 절단되는 것을 막기 위해 도입되었다. 밑줄친 서열 부분은 녹-인 마우스의 지노타이핑에 사용될 NdeI 제한효소 부위를 나타낸다. 동물실험 과정은 연세대학교 의과대학 동물실험윤리위원회의 승인 하에 수행하였으며, 모든 마우스에 대해 실험동물 관리사용 가이드라인을 준수하였다. 마우스를 무균 조건 하에서 7:00 AM에서 7:00 PM까지 빛을 공급하고 자유롭게 물과 조사(irradiated) 설치류 먹이를 섭취할 수 있도록 하였다. 마우스를 C57BL/6의 유전적 배경을 가진 마우스와 교배하였다. 모든 연구에서 암, 수 마우스의 비율은 대략 같았으며, 무작위 선발은 이루어지지 않았다.
- [0084] 청성 뇌간반응(auditory brainstem response, ABR)

- [0085] Tucker-Davis Technologies(TDT) RZ6ABR 디지털 신호 프로세싱 하드웨어 및 BioSigRZ 소프트웨어(Alachua, FL, USA)를 이용하여 방음 챔버에서 ABR 역치를 측정하였다. 피하바늘(전극)을 마취된 마우스의 좌우 귀의 두정위 및 복외측에 위치시켰다. SigGenRZ 소프트웨어 및 RZ6 디지털 신호 프로세서를 이용하여 계속된 클릭 자극(10 μ s 지속) 또는 톤 버스트 자극(tone burst stimuli)(5 ms 지속)을 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 30 및 42 kHz에서 생성한 뒤 multi-field 1(MF1) 자기 스피커(TDT)를 이용하여 외이도로 전달하였다 가해주었다. 자극 강도는 10에서 95 dB SPL까지 5 dB씩 증가시켰다. ABR 신호를 저-임피던스 Medusa Biological Amplifier System (RA4LI, TDT)에 입력하고, 이후 신호는 RZ6 디지털 신호 프로세싱 하드웨어에 전달되었다. 기록된 신호를 0.5-1 kHz band-pass 필터를 이용하여 필터링하고 512개의 톤 버스트로 인한 ABR 파형의 평균을 내었다. BioSigRZ 소프트웨어를 이용하여 각 주파수에 대한 ABR 역치를 결정하였다. 자극을 점차 증가시키면서(20-90 dB SPL) 입력/출력(I/O) 함수로서 클릭으로 유발된 ABR의 파형 신호를 통해 피크 진폭(mV)과 피크 잠복기(ms)를 계산하였다.
- [0087] 정원창막(Round window membrane, RWM) 주입
- [0088] 증류수에 용해된 0.8 μ l-1.0 μ l의 펩타이드를 신생아 마우스 P0-P1에 주입하였다. P0-P1 마우스를 저체온 노출을 통해 마취시킨 뒤, 귀후방을 절개하여 이강(otic bulla)을 노출시키고 달팽이관이 보이도록 하였다. 주입은 미세조절기로 조절되는 글래스 마이크로피펫을 이용하여 RWM을 통해 수행되었다. 주입물의 용적은 10분간 ~0.02 μ l/min로 조절하였다.
- [0090] **실험결과**
- [0091] 전기생리학 분석
- [0092] 본 발명자들은 4개의 독립적인 가계에서 *KCNQ4* 유전자 내에 공-분리(cosegregating) 이형접합 미스센스 돌연변이인 c.140T>C (p.Leu47Pro)를 동정하였으며, 이로 인한 변이 KCNQ4는 야생형 KCNQ4에 비해 채널 전류가 감소함을 발견하였다(Shin DH et al., *Human mutation*.2019;40(3):335-46). 이에, 본 발명자들은 KCNQ4 채널 N-말단의 세포내 부위의 역할을 조사하고자 하였으며, 이를 위해 KCNQ4의 N-말단 펩타이드(N1-93 a.a)를 합성한 뒤 이의 효과를 시험하였다. KCNQ4로 형질전환된 세포는 0 mV 탈분극 전압 보폭을 가하자 외부로의 칼륨 흐름을 증가시켰다. 대조군 펩타이드에서, KCNQ4 채널 전류는 시간 의존적인 rundown을 보였다(도 2a). N1-93 펩타이드는 KCNQ4 채널의 rundown을 막고 전류를 증가시켰다(도 2b). 대조군 전류 밀도의 백분율을 계산하였다. 대조군 펩타이드는 채널 전류가 50% 감소된 반면 N1-93 펩타이드는 35%의 전류 증가를 유발하였다(도 2c).
- [0093] 아울러, N1-93 펩타이드와 유사한 효율로 칼륨 채널 기능을 회복시킬 수 있는 절편을 탐색한 결과, N1-93 펩타이드의 N-말단이 제거(truncation)된 절편인 N72-93 펩타이드 및 N52-93 펩타이드가 각각 N1-93 펩타이드의 약 80-90%에 달하는 전류 밀도를 보임으로써 N1-93 펩타이드의 C-말단 일부 절편인 이들 펩타이드도 칼륨 채널병증(potassium channelopathy)의 치료를 위한 유의한 유효성분임을 알 수 있었다(도 2e).
- [0095] 동물실험
- [0096] *KCNQ4* 관련 난청 동물모델인 Kcnq4 p.W276S 녹-인 마우스를 제작하여 마우스의 한쪽 귀에 N1-93 펩타이드를 주사하고, 반대 쪽 귀에는 모크(mock) 펩타이드를 주사한 결과, 도 3에서 보는 바와 같이 N1-93 펩타이드를 주사한 쪽(파란색선)이 반대쪽(빨간색선)에 비해 현저하게 청력이 보존된다는 사실을 관찰하였다.
- [0098] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1

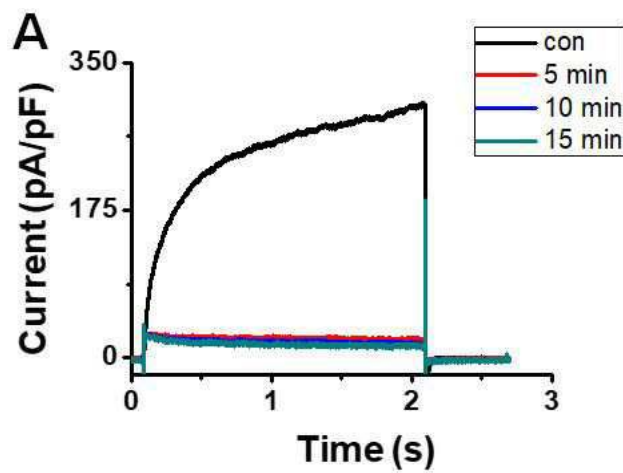


amino acid 1-93 peptide

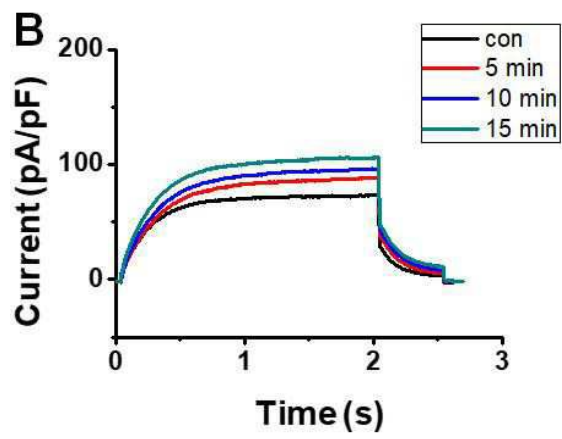
Peptide의 서열 (KCNQ4의 N-terminus 1-93에 해당) :

MAEAPRRRLG LGPPPGDAPR AELVALTAVQ SEQGEAGGGG SPRLGLLGS
PLPPGAPLPG PGSGSGSACG QRSSAAHKRY RRLQNWVYNV LER

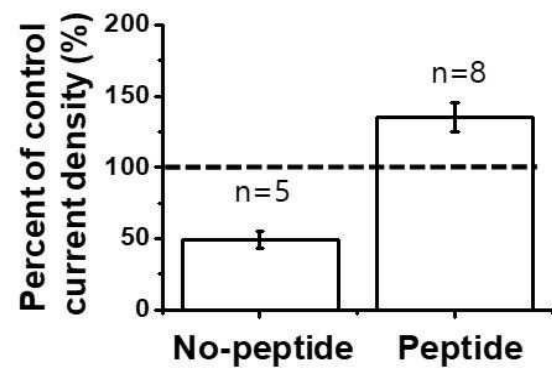
도면2a



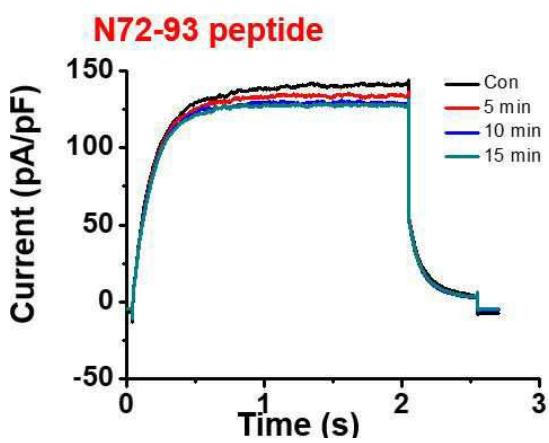
도면2b



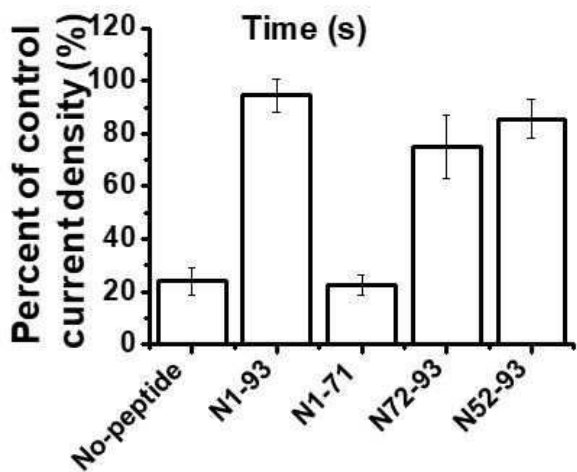
도면2c



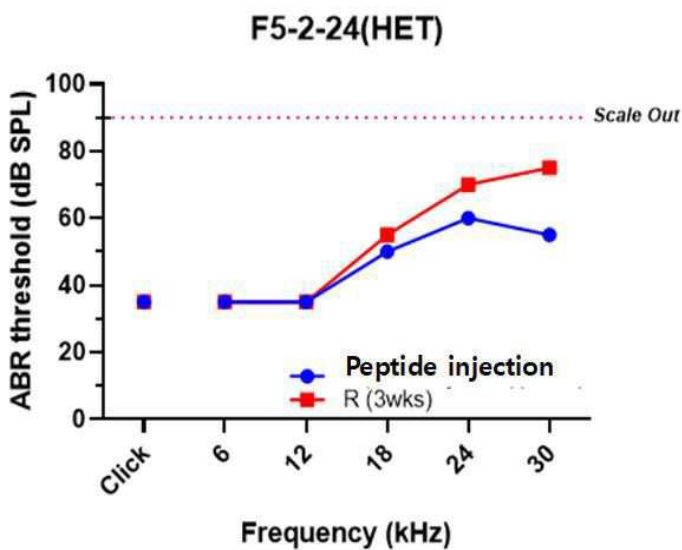
도면2d



도면2e



도면3



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation Yonsei University
- <120> A Composition for Preventing or Treating Potassium Channelopathies
- <130> HPC8733
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 93
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220><223> N1-93 amino acids

<400> 1

Met Ala Glu Ala Pro Pro Arg Arg Leu Gly Leu Gly Pro Pro Pro Gly

1 5 10 15

Asp Ala Pro Arg Ala Glu Leu Val Ala Leu Thr Ala Val Gln Ser Glu

20 25 30

Gln Gly Glu Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro Arg Arg Leu Gly Leu Leu

35 40 45

Gly Ser Pro Leu Pro Pro Gly Ala Pro Leu Pro Gly Pro Gly Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Ala Cys Gly Gln Arg Ser Ser Ala Ala His Lys Arg Tyr

65 70 75 80

Arg Arg Leu Gln Asn Trp Val Tyr Asn Val Leu Glu Arg

85 90

<210> 2

<211> 279

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N1-93 coding nucleotides

<400> 2

atggccgagg cccccccgcg ccgcctcggc ctgggtcccc cgcccgggga cgccccccgc 60

gcggagctag tggcgctcac ggccgtgcag agcgaacagg gcgaggcggg cgggggcggc 120

tccccgcgcc gcctcggcct cctgggcagc ccctgcgcgc cgggcgcgcc cctccctggg 180

ccgggctccg gctcgggctc cgctgcggc cagcgctcct cggccgcgca caagcgtac 240

cgccgcctgc agaactgggt ctacaacgtg ctggagcgg 279

<210> 3

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N52-93

<400> 3

Leu Pro Pro Gly Ala Pro Leu Pro Gly Pro Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10 15
Ala Cys Gly Gln Arg Ser Ser Ala Ala His Lys Arg Tyr Arg Arg Leu

20 25 30
Gln Asn Trp Val Tyr Asn Val Leu Glu Arg

35 40

<210> 4

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N72-93

<400> 4

Arg Ser Ser Ala Ala His Lys Arg Tyr Arg Arg Leu Gln Asn Trp Val

1 5 10 15

Tyr Asn Val Leu Glu Arg

20