



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014013796-3 A2

(22) Data do Depósito: 06/06/2014

(43) Data da Publicação: 05/01/2016

(RPI 2348)



* B R 1 0 2 0 1 4 0 1 3 7 9 6 A

(54) Título: ANTÍGENOS DE QUINASES
DEPENDENTES DE CICLINAS OU
PEPTÍDEOS DERIVADOS PARA CONTROLE
DE DIFERENTES ESPÉCIES DE
CARRAPATOS

(51) Int. Cl.: A61K 38/17; A61K 38/45; A61P
33/14

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL, UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO,
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE
FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

(72) Inventor(es): HELGA FERNANDES
GOMES, JORGE LUIZ DA CUNHA MORAES,
ITABAJARA DA SILVA VAZ JÚNIOR, CARLOS
JORGE LOGULLO DE OLIVEIRA

(57) Resumo: ANTÍGENOS DE QUINASES
DEPENDENTES DE CICLINAS OU
PEPTÍDEOS DERIVADOS PARA CONTROLE
DE DIFERENTES ESPÉCIES DE
CARRAPATOS Antígenos de quinases
dependentes de ciclinas ou peptídeos derivados
para controle de diferentes espécies de
carrapatos, caracterizada pela produção por
síntese química ou produzida em outros
organismos por meio de técnicas de DNA
recombinante de um antígeno do carrapato
Ixodes persulcatus. Este antígeno isolado é uma
quinase dependente de ciclinas (CDK-10),
enzima com atividade sobre o ciclo celular e/ou
controle da expressão gênica, presente em
tecidos do carrapato. O uso dessa proteína, em
animais, como imunógeno, é capaz de gerar
resposta protetora contra carrapatos. Portanto, o
antígeno pode ser utilizado isoladamente ou em
conjunto com outros antígenos como vacina
para prevenir a infestação de carrapato.

ANTÍGENOS DE QUINASES DEPENDENTES DE CICLINAS OU PEPTÍDEOS DERIVADOS
PARA CONTROLE DE DIFERENTES ESPÉCIES DE CARRAPATOS

001. Refere-se o presente invento a produção e caracterização de um antígeno do carrapato *Ixodes persulcatus*. O antígeno isolado, denominado de quinase dependente de ciclinas (CDK-10), é uma enzima com atividade sobre o ciclo celular e/ou controle da expressão gênica, presente em vários tecidos do carrapato. O uso deste antígeno como imunógeno em animais é capaz de induzir uma resposta imunológica, de forma que o antígeno pode ser utilizado como vacina para prevenir a infestação, isoladamente ou em conjunto com outros antígenos já descritos ou a serem descritos.

002. O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini 1887; Acari: *Ixodidae*) é um ectoparasita hematófago originário da Ásia, cujo principal hospedeiro é o bovino. Encontra-se amplamente distribuído nos grandes rebanhos bovinos da América, África, Ásia e Oceania, entre os paralelos 32°N e 32°S, sendo um dos principais parasitas que afetam a pecuária destas áreas. Seu desenvolvimento é favorecido pelas condições climáticas, principalmente temperatura e umidade elevadas.

003. O *R. microplus* acarreta diversos danos econômicos, tornando-se o principal alvo de programas de controle e erradicação nos rebanhos da América do Sul. Um carrapato suga, em média, de 2 a 3 mL de sangue por dia do seu hospedeiro e isto se reflete em grandes perdas na produção de leite e de carne, além de danos no couro causados por reações inflamatórias nos locais de fixação do carrapato. Este carrapato também pode atuar como vetor

de doenças, como a tristeza parasitária bovina, causada por protozoários do gênero *Babesia* e pela *rickettsia* do gênero *Anaplasma*.

a. O uso de vacinas se mostra atrativo por ser seguro para o ambiente, para os consumidores e para o hospedeiro. Já foi comprovado que animais são capazes de produzir uma resposta immune em resposta a imunizações com extratos brutos de carrapatos, bem como com proteínas purificadas destes extratos.

b. Neste sentido, duas vacinas foram lançadas no mercado, utilizando como alvo o aparelho digestivo do carrapato. No Brasil também existem grupos que vêm trabalhando no sentido de melhorar os antígenos comercializados e outros que visam interferir com a proliferação de novos indivíduos, com a interferência no processo de ovogênese e/ou embriogênese.

004. Várias proteínas do carrapato já foram testadas em ensaios de imunização de animais, podendo ser citadas a glicoproteína BYC (*Boophilus* *Yolk* pro-cathepsin), a THAP (*Tick Heme-binding Aspartic proteinase*), a GST (Glutathione S-transferase), a VTDCE nativa (Vitellin Degrading Cysteine endopeptidase), a BmCL1 (cathepsin L-like endopeptidase), a CRT (calreticulina) e inibidores de tripsina (BmTIs). Essas proteínas induziram a produção de imunoglobulinas e conferiram uma imunoproteção parcial, por interferirem na reprodução do carrapato.

005. Em artrópodes existem dois tipos principais de ovários: 1) os ovários panoísticos, no qual o próprio ovócito é responsável pela síntese de vários tipos

de RNAs (rRNA, mRNA) e todos os constituintes necessários para o desenvolvimento, que são estocados para servir às necessidades futuras do embrião; 2) os ovários meroísticos, que podem ser subdivididos em politróficos e telotróficos. Neste caso, as macromoléculas são sintetizadas em células germinativas especializadas denominadas células nutrizes e posteriormente são transferidas para os ovócitos em crescimento. Este processo é muito bem caracterizado em ovários politróficos de *Drosophila melanogaster*, onde cada ovócito é abastecido por um grupo específico de células nutrizes. A função nutricional dessas células é facilitada pela presença de canais citoplasmáticos estáveis denominados “pontes intercelulares” responsáveis pela ligação dessas células ao ovócito. Desta forma, servem como rota de transporte para lipídeos, proteínas, carboidratos, mitocôndrias, retículo endoplasmático, RNAm, ribossomos que são produzidas por estas células e estocados no ovócito em crescimento. Após este processo as células nutrizes entram em apoptose. Após a ovogênese os ovócitos são fecundados e corionados para dar início a embriogênese.

006. As principais modificações morfológicas que acontecem durante a embriogênese do carrapato bovino *R. microplus* foram recentemente elucidadas. Por meio de microscopia confocal de varredura a laser, observamos no primeiro dia de desenvolvimento que inicialmente o embrião deste carrapato é um organismo unicelular. No quarto dia observa-se uma intensa proliferação nuclear acarretando na formação de uma estrutura denominada blastoderma sincicial, onde estes núcleos estão posicionados na região cortical do embrião.

Neste momento o embrião é um organismo unicelular polinucleado. Entre o quarto e o sexto dia inicia-se a proliferação das células embrionárias, que culmina na formação do blastoderma celular. No sétimo dia de desenvolvimento o embrião já se apresenta segmentado. Daí por diante inicia-se a organogênese culminando no décimo dia com a observação de estruturas mais complexas como a carapaça e patas.

007. Uma célula se reproduz por uma sequência ordenada de eventos que duplicam seus componentes e depois a divide em duas novas células-filhas. Este ciclo de duplicação e divisão é conhecido como ciclo celular. Ele representa o mecanismo essencial pelo qual todos os seres vivos se reproduzem. Este ciclo de duplicação e divisão celular é dividido em quatro estágios ou fases. Os dois eventos mais dramáticos acontecem quando o núcleo se divide, processo denominado de mitose (M), e quando a célula divide-se em duas, processo denominado citocinese. Estes dois processos compõem a fase M do ciclo celular. O período entre uma fase M e a próxima é denominado interfase, que divide as três fases remanescentes do ciclo celular: fase G1, fase S (síntese), e fase G2. Durante a fase G1 inicia-se o intervalo entre o término da fase M e o início de S. Na fase S, ocorre a replicação do DNA nuclear. Na fase G2 ocorre o término da fase S e o início de M. Lembrando-se que as fases G1 e G2 compreendem um período adicional que as células possuem para crescer e duplicar suas organelas citoplasmáticas.

008. Durante o ciclo celular existem dois mecanismos de regulação, um para produzir os novos componentes da célula em crescimento e outro para

organizar esses componentes nas células-filhas que serão formadas. Esses mecanismos são conhecidos como sistema de controle do ciclo, que através de freios moleculares param o sistema em vários pontos de checagem, assegurando assim a progressão correta. Os pontos de checagem são importantes porque permitem que o sistema possa ser regulado por meio de sinais oriundos de outras células (fatores de crescimento, ou outras moléculas sinalizadoras extracelulares) e conseqüentemente podendo inibir ou promover a proliferação celular. Um grupo específico de enzimas da família das proteínó-quinases ativadas ciclicamente desempenham papel central no controle do ciclo celular. Elas recebem essa denominação, pois são ativadas em determinados momentos do ciclo, e após efetuar seu papel, são rapidamente desativadas.

009. O grupo protéico responsável pela ativação ou desativação das proteínó-quinases são as ciclinas. As ciclinas recebem esse nome, devido a sua concentração variar de maneira cíclica durante o ciclo celular. Elas possuem atividade enzimática, quando ligadas as quinases do ciclo celular, tornando essas também enzimaticamente ativas. As proteínas quinases que só apresentam atividade na presença de ciclinas são denominadas quinases dependentes de ciclinas (Cyclin-dependent Kinases – CDKs).

010. As CDKs são subunidades catalíticas de complexos heterodiméricos que são ativadas momentaneamente em estágios específicos do ciclo celular, e sua ativação ou inativação dispara os próximos eventos do ciclo celular. Cada subunidade catalítica da CDK pode associar-se a diferentes ciclinas, e estas determinam quais serão fosforiladas pelo complexo CDK-ciclina.

011. Existem ao todo 13 tipos de CDKs codificadas no genoma humano, e essas desempenham funções essenciais no controle do ciclo celular, nos processos neuronais e transcripcionais, bem como na diferenciação e morte celular. Durante o ciclo de Divisão Celular participam a CDK1 (fase G2 e na transição G2/M), a CDK2 (G1 e no início da fase S) e a CDK4 (no início de G1), já o processo de transcrição é regulado pela Cdk7-ciclina H, Cdk8-ciclina C, Cdk9-ciclina T e Cdk11-ciclina L. As Cdk5 e 11 desempenham funções no sistema nervoso e também estão associadas ao processo de apoptose, enquanto a Cdk 1, 4 e 6 exercem função essencial na morte de células neuronais. As CDKs estão envolvidas no tráfego através da membrana do Complexo de Golgi, na exocitose de insulina pelas células β do pâncreas e na regulação da enzima fosfodiesterase retinal.

012. Os controladores negativos do ciclo celular atuam inativando as funções dos controladores positivos, o que leva a célula à parada no ciclo celular e à apoptose (morte programada). São descritos como controladores negativos os inibidores intrínsecos e extrínsecos.

013. Os inibidores intrínsecos de CDKs são proteínas que bloqueiam a atividade dos complexos de CDK-ciclina. Elas ligam-se às CDKs, ou aos dímeros CDKs-ciclina e nas duas condições as quinases são inativadas. Duas famílias de genes, a família cip/kip (CDK interacting protein/kinase inhibitory protein) e a INK4a/ARF (inhibitor of kinase/Alternative reading frame) impedem a progressão do ciclo celular. A família cip/kip inclui os genes p21, p27 e p57. Eles param o ciclo na fase G1 se ligando e inativando o complexo Ciclina-Cdk.

A família INK4a/ARF inclui p16INK4a, que se liga a CDK4 e para o ciclo na fase G1 e o p14arf, que previne a degradação de p53.

014. Um inibidor extrínseco de CDK é uma substância química que inibe a função das CDKs. Os inibidores extrínsecos são classificados em 3 categorias: inibidores amplos de CDKs, compostos visando amplo espectro de Cdk, inibidores específicos, que visam um tipo específico de Cdk e inibidores com vários alvos, são compostos que tem como alvo as CDKs, bem como outras quinases, tais como a VEGFR ou PDGFR. De uma forma geral, esses inibidores são potentes agentes anti-proliferativos, interrompendo as células em G1 ou são indutores de apoptose e nesses casos são conhecidos por ativar vias intrínsecas, como a ativação de vias de caspase ou diminuição do RNAm de genes da família Bcl-2 ou ainda por via mitocondrial.

015. Os modelos estruturais de CDKs podem providenciar informações sobre desenhos de inibidores seletivos para CDKs. Mais de 50 inibidores farmacológicos de CDKs foram descritos, alguns com atividade potencial antitumoral (câncer). Um dos inibidores mais utilizado como potente antitumoral e com alta especificidade para CDKs é a roscovitina. Ela é aplicada não só como agente quimioterápico, mas também já foi descrita como sendo um inibidor do ciclo celular, quando em baixas concentrações, podendo então ser usada nas técnicas de produção *in vitro* de embriões a fim de garantir um aumento no número de blastocistos.

016. A clonagem da região codificadora da quinase dependente de ciclinas (CDK-10) foi realizada utilizando as técnicas de PCR. Para a clonagem,

primers baseados em regiões do gene da enzima foram utilizados na reação de PCR para amplificar a sequência da região codificante do cDNA da CDK-10 de ovário de *Ixodes persulcatus*. O produto do PCR correspondeu a um fragmento de 1071 bp, referente a sequência do cDNA da CDK-10 e foi purificado a partir da banda do gel de agarose. O fragmento foi clonado no vetor pGEM-T e bactérias *E. coli* (linhagem Top 10) foram transformadas com o plasmídeo resultante. O plasmídeo recombinante foi extraído através de miniprep (preparação de DNA plasmidial através de lise alcalina com SDS) e a sequência de ácidos nucléicos foi determinada. A sequência de aminoácidos da CDK-10 de *Ixodes persulcatus* foi deduzida a partir da sequência de ácidos nucléicos.

017. A seguir foram projetados oligonucleotídeos para que a região codificadora da CDK-10 fosse clonada no vetor de expressão pCold™ TF DNA utilizando como enzimas de restrição NdeI e XhoI. A partir da construção pGEM-T contendo a região codificante da CDK-10 foi realizado um PCR com Taq polimerase que resultou na amplificação do inserto de 1071 pb. O inserto amplificado foi purificado e hidrolisado, juntamente com o vetor e com as enzimas de restrição NdeI e XhoI. Para a ligação, o inserto e o vetor foram incubados com a enzima T4 DNA Ligase. A reação foi mantida a 16°C por 18 horas originando a construção pCold-CDK10 Ip.

018. Bactérias *E. coli* linhagem AD494 foram transformadas com o DNA do plasmídeo pCold-CDK-10, pelo método de choque térmico e plaqueadas em ágar LB, contendo o antibiótico ampicilina (100 µg/ml) e kanamicina (20 µg/ml).

Uma colônia foi isolada e inoculada em 25 ml de meio LB contendo ampicilina e kanamicina, e crescida sob agitação constante a 180 rpm, 37°C por 16 horas. Após, 5 mL do cultivo foram inoculados em 500 ml de meio LB em erlenmeyer de dois litros e incubado sob agitação constante a 180 rpm, 37°C até alcançar a densidade ótica 0,6 no comprimento de onda de 600 nm. Após atingida a densidade ótica, o erlenmeyer foi transferido para shaker a 15°C, 120 rpm e após 30 minutos foi adicionado, o isopropil- β -D tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 1 mM para a indução da expressão da proteína, e então incubado sob agitação constante a 120 rpm, 37°C, por 24 horas. As células cultivadas foram centrifugadas a 10000 x g por 10 minutos a 4°C. Desprezado o sobrenadante, o sedimento foi ressuspensão em 20 ml tampão de lise Bugbuster com 2 μ L de Benzonase Nuclease HC, 3 μ L de Lisozima e 400 μ L de inibidor de protease livre de EDTA. Esse material foi incubado no shaker a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida o material foi centrifugado 10000 x g a 4°C durante 20 minutos.

019. A purificação da CDK-10 recombinante (CDK-10) foi realizada por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, sendo utilizado o íon metálico Ni^{++} para este fim. As eluições foram feitas com tampão fosfato (20 mM Fosfato de Sódio, 0,5 M NaCl, pH 7,4) contendo concentração crescente de imidazol variando de 5 em 5 de 10 mM até 50 mM e por fim uma concentração de 150 mM.

020. Amostras foram analisadas por SDS-PAGE 12%. As frações protéicas foram misturadas a 25% do volume de tampão de amostra para SDS-PAGE,

fervidas por 5 minutos e aplicadas no gel. O gel foi submetido à eletroforese em tampão de corrida com corrente de 10 mA e posteriormente corado com Coomassie Blue G-250.

021. Para testar a capacidade da CDK-10 de induzir uma resposta imunológica protetora dois hamsters foram imunizados com a CDK-10. A amostra de CDK-10 purificada foi misturada ao adjuvante oleoso e inoculado nos hamsters. Foram realizados três inóculos, contendo aproximadamente 100 µg de proteína por dose, com intervalos de 15 dias entre cada uma. Como grupo controle foram utilizados dois hamsters, inoculados somente com adjuvante e PBS. Para analisar a resposta imunológica desenvolvida pelos animais, foi coletada amostras de sangue antes da primeira imunização, antes da segunda, antes da terceira e 15 dias após a terceira imunização.

022. Os hamsters foram infestados com 20 pares de carrapatos e a proteção foi calculada a partir da quantidade de fêmeas contadas após alimentação e a eclosão dos ovos.

023. O número de fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo, e eclosão dos ovos em cada hamster estão colocados nas tabelas I e II.

Tabela I: Peso dos carrapatos alimentados em hamster vacinados e não vacinados.

	Grupo	Peso das fêmeas ingurgitadas (mg)	
		Controle	Vacinado
		260,0	80,0
		410,0	100,0

		220,0	150,0
		305,0	90,0
		330,0	40,0
		200,0	70,0
		205,0	60,0
		240,0	
		330,0	
	Média	277,80	88,00
	Desvio padrão	70,80	31,55
	Redução		55%

Tabela II: Peso das larvas oriundas dos carrapatos alimentados em hamster vacinados e não vacinados.

Grupo	Peso dos ovos(mg)	
	Controle	Vacinado
	24	0
	0	6,1
	42,2	0
	61,4	0
	16,7	9,6
	40,8	23,3
	47,0	0

		34,4	5,5
		16,8	0
		30,4	0
		0	5,4
	Média	15,68	3,04
	Desvio padrão	20,19	5,66
	Redução		80%

024. Como resultado foi possível verificar que nos hamsters imunizados, os carrapatos apresentaram uma menor capacidade de completarem o ciclo biológico, em relação aos carrapatos do animal controle. A proteção obtido pela imunização foi de 55% para redução no peso das fêmeas ingurgitada e 80% na eclosão dos ovos.

Reivindicações

1. ANTÍGENOS DE QUINASES DEPENDENTES DE CICLINAS OU PEPTÍDEOS DERIVADOS PARA CONTROLE DE DIFERENTES ESPÉCIES DE CARRAPATOS, **caracterizados por** compreender um ou mais antígenos da proteína quinase dependente de ciclinas (CDK-10) recombinante selecionados dentre aqueles que apresentam a sequência de aminoácidos SEQ ID Nº 1, tendo pesos moleculares de aproximadamente 40 kDa e um adjuvante oleoso ou metálico, em um veículo fisiologicamente aceitável.
2. ANTÍGENOS DE QUINASES DEPENDENTES DE CICLINAS OU PEPTÍDEOS DERIVADOS PARA CONTROLE DE DIFERENTES ESPÉCIES DE CARRAPATOS de acordo com a reivindicação 1, **caracterizados pelo** fato das proteínas terem pelo menos, 80% de identidade para a sequência definida pela SEQ ID Nº 1.
3. ANTÍGENOS DE QUINASES DEPENDENTES DE CICLINAS OU PEPTÍDEOS DERIVADOS PARA CONTROLE DE DIFERENTES ESPÉCIES DE CARRAPATOS de acordo com a reivindicação 1, **caracterizados pelo** fato das proteínas estarem em uma concentração de 0,01 a 6,0 mg/ml.
4. ANTÍGENOS DE QUINASES DEPENDENTES DE CICLINAS OU PEPTÍDEOS DERIVADOS PARA CONTROLE DE DIFERENTES ESPÉCIES DE CARRAPATOS de acordo com a reivindicação 1, **caracterizados por** ser a proteína obtida por síntese química ou produzida em outros organismos por meio de técnicas de DNA recombinante.
5. USO DE UMA PROTEÍNA CARACTERIZADA POR COMPREENDER DA PROTEÍNA QUINASE DEPENDENTE DE CICLINAS (CDK-10) RECOMBINANTE, **caracterizado por** ser

compreendido da sequência de aminoácidos SEQ ID Nº 1 como definida nas reivindicações 1- 4 para formulação de uma vacina.

Resumo

ANTÍGENOS DE QUINASES DEPENDENTES DE CICLINAS OU PEPTÍDEOS DERIVADOS PARA CONTROLE DE DIFERENTES ESPÉCIES DE CARRAPATOS

Antígenos de quinases dependentes de ciclinas ou peptídeos derivados para controle de diferentes espécies de carrapatos, caracterizada pela produção por síntese química ou produzida em outros organismos por meio de técnicas de DNA recombinante de um antígeno do carrapato *Ixodes persulcatus*. Este antígeno isolado é uma quinase dependente de ciclinas (CDK-10), enzima com atividade sobre o ciclo celular e/ou controle da expressão gênica, presente em tecidos do carrapato. O uso dessa proteína, em animais, como imunógeno, é capaz de gerar resposta protetora contra carrapatos. Portanto, o antígeno pode ser utilizado isoladamente ou em conjunto com outros antígenos como vacina para prevenir a infestação de carrapato.

LISTAGENS DAS SEQUÊNCIAS

1) Informações Gerais do Pedido de Patente

Dados do Requerente:

Nome: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Endereço completo: Rua Sarmento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90050-170

Título da invenção: Antígenos de quinases dependentes de ciclinas ou peptídeos derivados para controle de diferentes espécies de carrapatos

Número de seqüências constantes do pedido: 1 (uma)

2) Informações Gerais da Sequências

Número identificador: Seq. ID n°: 01

a) tamanho: 356 aminoácidos

b) Tipo: Proteína

Características da molécula sequenciada:

a) Tipo: Proteína

b) Nome: quinase dependente de ciclinas (CDK-10)

Outras informações relevantes

Fonte original da molécula: carrapato *Ixodes persulcatus*

Atividade enzimática: enzima com atividade sobre o ciclo celular e/ou controle da expressão gênica

Descrição da seqüência SEQ ID NO: 1

001 Met Glu Thr Gly Thr Asn Gln Thr Ala Pro Glu Lys Asn 013

014 Val Val Leu Ala Ser Leu Ser Thr Gly Lys Phe Phe Glu 026

027 Val Pro Asp Lys Asp Ile Pro Gly Arg Cys Arg Leu Val 039

040 Thr Glu Phe Glu Lys Leu Asn Arg Ile Gly Glu Gly Thr 052

053 Thr Gly Ile Val Tyr Arg Ala His Asp Leu Lys Ser Gly 065

066 Glu Ile Val Ala Met Lys Lys Val Arg Met Glu Gln Glu 078

079 Lys Asp Gly Ile Pro Val Ser Gly Leu Arg Glu Ile Asn 091
092 Leu Leu Leu Asn Ile Gln His Val Asn Ile Val Asn Leu 104
105 Lys Glu Val Ala Val Gly Lys Ser Leu Asp Ser Ile Phe 117
118 Leu Val Met Glu Tyr Cys Glu Gln Asp Leu Ala Ser Leu 130
131 Leu Asp Asn Met Gln Ser Pro Phe Ser Glu Gln Val Lys 143
144 Cys Ile Met Met Gln Leu Phe Lys Gly Leu Gln Tyr Leu 156
157 His Lys Asn Phe Ile Val His Arg Asp Leu Arg Val Ser 169
170 Asn Leu Leu Leu Thr Asp Lys Gly Cys Leu Lys Ile Ala 182
183 Asp Phe Gly Leu Ala Arg Lys Tyr Gly Leu Phe Val Lys 195
196 Phe Met Thr Phe Arg Val Val Thr Leu Trp Tyr Val Tyr 208
209 Arg Ala Phe Glu Leu Leu Leu Gln Ala Lys thr Gln Thr 221
222 Thr Ala Ile Asp Ile Trp Ala Ala Gly Cys Val Leu Gly 234
235 Glu Leu Leu Leu His Cys Phe Leu Leu Pro Gly Arg Gly 247
248 Glu Ile His Gln Leu Glu Leu Glu Leu Ile Ile Asp Leu 260
261 Leu Gly Thr Pro Asn Asp Met Ile Trp Pro Gly Tyr Ser 273
274 Lys Leu Pro Ala Leu Glu Asn Phe Thr Leu Lys Gln Gln 286
287 Pro Tyr Asn Asn Leu Lys His Phe Phe Pro Trp Leu Ser 299
300 Pro Ala Gly Ile Arg Leu Leu Asn Phe Leu Phe Met Tyr 312
313 Asp Pro Lys Lys Arg Ala Thr Ala Glu Glu Ser Leu Gln 325
326 Ser Ser Tyr Phe Ser Glu Pro Pro Leu Pro Cys Glu Ala 338
339 Glu Leu Met Pro Ser Phe Pro Gln His Arg Asn Leu Lys 351
352 Arg Ser Ala Met Ala Asn