



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0052483
(43) 공개일자 2009년05월26일

(51) Int. Cl.

C07K 14/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0119003

(22) 출원일자 2007년11월21일

심사청구일자 2007년11월21일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

김찬화

서울 용산구 이촌1동 코오롱아파트 103-402

유현석

서울 강서구 등촌동 642 코오롱아파트 101동 404호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이문섭, 윤여강

전체 청구항 수 : 총 6 항

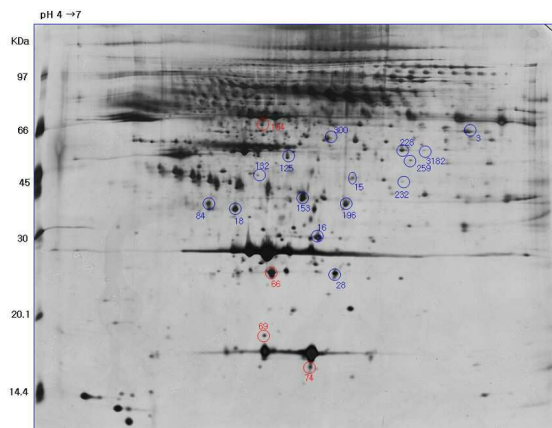
(54) 심혈관 질환 진단용 바이오마커

(57) 요약

본 발명은 혈액을 이용한 심혈관 질환의 진단용 마커로 사용 될 수 있는 단백질에 관한 것으로, 구체적으로는 정상인 혈액 보다 심혈관 질환 환자의 혈액에서 그 발현양이 감소 또는 증가되는 바이오마커 단백질과 이를 이용한 심혈관 질환의 진단 키트에 관한 것이다. 또한 그 발현양이 증가 또는 감소되는 단백질은 심혈관 질환의 치료제로서도 그 가치가 인정되는 바이다.

본 발명에 따르면, 사람의 혈액으로부터 심혈관 질환을 진단하여 그 증상의 정도를 파악할 수도 있다. 또한 본 발명의 바이오마커 단백질을 기초로 제조된 단일클론항체는 immunoassay 키트(ELISA, antibody coated tube test, lateral-flow test, potable biosensor)에 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 심혈관 질환의 진단 및 진행정도를 판단하고, 치료용 목적으로는 신약 개발에 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김현정

서울 노원구 월계3동 미성아파트 15-1110

김미령

경기 고양시 일산동구 장항2동 호수마을아파트
504-1003

김판겸

서울 성북구 정릉1동 태영아파트 101동 208호

특허청구의 범위

청구항 1

정상인의 혈액 보다 심혈관 질환 환자의 혈액에서 발현이 상대적으로 감소하는 하기 군에서 선택된 단백질을 포함하는 심혈관 질환 진단용 바이오마커:

서열번호 1의 아미노산 서열을 가지고 51-53 KD의 분자량 및 5.6-7.6의 pI를 갖는 헤모펙신 전구체(Hemopexin precursor);

서열번호 2의 아미노산 서열을 가지고 38-40 KD의 분자량 및 5.6-7.6의 pI를 갖는 헵토글로빈(Haptoglobin);

서열번호 3의 아미노산 서열을 가지고 39-41 KD의 분자량 및 4.9-6.9의 pI를 갖는 알파-1-마이크로글로빈(Alpha-1-microglobulin);

서열번호 4의 아미노산 서열을 가지고 22-24 KD의 분자량 및 4.2-6.2의 pI를 갖는 씨-타입 렉틴 도메인 패밀리 3(C-type lectin domain family 3);

서열번호 5의 아미노산 서열을 가지고 20-22 KD의 분자량 및 4.8-6.8의 pI를 갖는 콤플렉스-형성-당단백질 에이치 씨(Complex-forming glycoprotein HC);

서열번호 6의 아미노산 서열을 가지고 45-47 KD의 분자량 및 5.4-7.4의 pI를 갖는 헵토글로빈 전구체(Haptoglobin precursor);

서열번호 7의 아미노산 서열을 가지고 22-24 KD의 분자량 및 4.2-6.2의 pI를 갖는 보체 요소 아이 라이트 체인(Complement factor I light chain);

서열번호 8의 아미노산 서열을 가지고 102-104 KD의 분자량 및 5.5-7.5의 pI를 갖는 인터-알파-트립신 저해제 패밀리 헤비 체인-관련된 단백질(Inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy chain-related protein (IHRP));

서열번호 9의 아미노산 서열을 가지고 24-26 KD의 분자량 및 5.1-7.1의 pI를 갖는 프리-세럼 아밀로이드 피 컴포넌트(Pre-serum amyloid P component);

서열번호 10의 아미노산 서열을 가지고 15-17 KD의 분자량 및 4.5-6.5의 pI를 갖는 프리알부민(Prealbumin);

서열번호 11의 아미노산 서열을 가지고 38-40 KD의 분자량 및 6.8-8.8의 pI를 갖는 보체 요소 에이치 관련된 1(Complement factor H-related 1);

서열번호 12의 아미노산 서열을 가지고 38-40 KD의 분자량 및 5.4-7.4의 pI를 갖는 헵토글로빈-관련된 단백질 전구체(Haptoglobin-related protein precursor);

서열번호 13의 아미노산 서열을 가지고 47-49 KD의 분자량 및 4.8-6.8의 pI를 갖는 보체요소 씨4비3(Complement component C4B3); 및

서열번호 14의 아미노산 서열을 가지고 45-47 KD의 분자량 및 4.8-6.8의 pI를 갖는 피그먼트 상피의 차이나는 요인(Pigment epithelial-differentiating factor).

청구항 2

정상인의 혈액 보다 심혈관 질환 환자의 혈액에서 상대적으로 발현이 증가하는 하기 군에서 선택된 단백질을 포함하는 심혈관 질환 진단용 바이오마커:

서열번호 15의 아미노산 서열을 가지고 22-24 KD의 분자량 및 4.8-6.8의 pI를 갖는 레티놀 부착 단백질 4(Retinol Binding Protein 4);

서열번호 16의 아미노산 서열을 가지고 28-30 KD의 분자량 및 4.5-6.5의 pI를 갖는 프로아포-에이-아이 단백질(Proapo-A-I protein);

서열번호 17의 아미노산 서열을 가지고 15-17 KD의 분자량 및 4.5-6.5의 pI를 갖는 트랜스티레틴(Transferritin); 및

서열번호 18의 아미노산 서열을 가지고 97-99 KD의 분자량 및 4.3-6.3의 pI를 갖는 셀룰로플라즈민(Ceruloplasmin).

청구항 3

제 1항 또는 제 2항의 단백질 또는 그 면역원성 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환 진단제.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 항체는 모노클로날 항체인 것을 특징으로 하는 심혈관 질환 진단제.

청구항 5

제 1항 또는 제 2항의 단백질 또는 그 면역원성 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환 진단키트.

청구항 6

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 정상인 혈액보다 심혈관 질환 환자의 혈액에서 감소하는 하기 군에서 선택된 단백질을 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환 치료 및 예방용 조성물:

서열번호 1의 아미노산 서열을 가지고 51-53 KD의 분자량 및 5.6-7.6의 pI를 갖는 헤모펙신 전구체(Hemopexin precursor);

서열번호 2의 아미노산 서열을 가지고 38-40 KD의 분자량 및 5.6-7.6의 pI를 갖는 헵토글로빈(Haptoglobin);

서열번호 3의 아미노산 서열을 가지고 39-41 KD의 분자량 및 4.9-6.9의 pI를 갖는 알파-1-마이크로글로빈(Alpha-1-microglobulin);

서열번호 4의 아미노산 서열을 가지고 22-24 KD의 분자량 및 4.2-6.2의 pI를 갖는 씨-타입 렉틴 도메인 패밀리 3(C-type lectin domain family 3);

서열번호 5의 아미노산 서열을 가지고 20-22 KD의 분자량 및 4.8-6.8의 pI를 갖는 콤플렉스-형성-당단백질 에이치 씨(Complex-forming glycoprotein HC);

서열번호 6의 아미노산 서열을 가지고 45-47 KD의 분자량 및 5.4-7.4의 pI를 갖는 헵토글로빈 전구체(Haptoglobin precursor);

서열번호 7의 아미노산 서열을 가지고 22-24 KD의 분자량 및 4.2-6.2의 pI를 갖는 보체 요소 아이 라이트 체인(Complement factor I light chain);

서열번호 8의 아미노산 서열을 가지고 102-104 KD의 분자량 및 5.5-7.5의 pI를 갖는 인터-알파-트립신 저해제 패밀리 헤비 체인-관련된 단백질(Inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy chain-related protein (IHRP));

서열번호 9의 아미노산 서열을 가지고 24-26 KD의 분자량 및 5.1-7.1의 pI를 갖는 프리-세럼 아밀로이드 피 컴포넌트(Pre-serum amyloid P component);

서열번호 10의 아미노산 서열을 가지고 15-17 KD의 분자량 및 4.5-6.5의 pI를 갖는 프리알부민(Prealbumin);

서열번호 11의 아미노산 서열을 가지고 38-40 KD의 분자량 및 6.8-8.8의 pI를 갖는 보체 요소 에이치 관련된 1(Complement factor H-related 1);

서열번호 12의 아미노산 서열을 가지고 38-40 KD의 분자량 및 5.4-7.4의 pI를 갖는 헵토글로빈-관련된 단백질 전구체(Haptoglobin-related protein precursor);

서열번호 13의 아미노산 서열을 가지고 47-49 KD의 분자량 및 4.8-6.8의 pI를 갖는 보체요소 씨4비3(Complement component C4B3); 및

서열번호 14의 아미노산 서열을 가지고 45-47 KD의 분자량 및 4.8-6.8의 pI를 갖는 피그먼트 상피의 차이나는 요인(Pigment epithelial-differentiating factor).

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 심혈관 질환 환자가 병이 진행됨에 따라 나타나는 단백질에 관한 것으로서, 상세하게는 심혈관 질환 환자의 혈액에서 더 많이 혹은 적게 발현되는 바이오마커 단백질과 이를 이용한 심혈관 질환의 조기진단을 위한 진단키트에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 심혈관 질환은 심장질환과 혈관질환을 포함한다. 구체적인 병명으로는 심부전, 고혈압성 심장질환, 부정맥, 판막질환, 선천성 심장질환, 심근증, 심낭질환 등이 중요한 심장질환이며, 혈관질환에는 뇌졸중, 말초혈관질환, 동맥류 등이 있다. 심장질환 중에 중요한 부분을 차지하는 관상동맥 질환은 대개 동맥경화에 의해서 심장에 혈액을 공급하는 관상동맥이 막히거나, 좁아져서 발생한다. 심근경색증이나 협심증이 이에 해당한다. 관상동맥질환은 우리나라에서 지난 30여 년 동안에 급격히 증가하여왔다.
- <3> 일반적으로는 심근경색, 뇌졸중, 협심증, 고혈압, 심부전등을 말할 수 있고, 심근경색증은 심장근육에 혈액을 공급하는 혈관이 막혀서 심장 근육조직이 죽게 되는 질병을 말한다. 심근경색이라는 말은 심장의 근육이 산소 부족으로 죽어간다는 의미가 된다. 이러한 산소부족은 심장에 산소를 공급하는 혈관(관상동맥)이 동맥경화로 좁아지거나 혈전이 생성되어 발생하는 경우가 많으며 심근경색증이 일어나면 환자는 심한 가슴의 통증, 호흡곤란 등을 느끼게 된다.
- <4> 뇌졸중은 뇌에 혈액을 공급하는 동맥에 장애가 생겨 정상적인 혈액공급이 이루어지지 못해 뇌 기능이 갑작스럽게 손실되는 것으로 흔히 '중풍'이라고도 한다. 뇌의 일시적 혹은 지속적인 혈액공급 부족이나 출혈로 인하여 발생하며 뇌가 손상됨에 따라 언어장애, 운동장애 등 뇌의 손상된 부위에 의해 조절되는 신체 기능에 이상이 생긴다. 뇌졸중은 크게 뇌의 혈관이 막혀서 특정부위에 혈액순환이 안 되어 나타나는 허혈성 뇌졸중(뇌경색)과 뇌혈관이 터져 발생하는 출혈성 뇌졸중으로 분류할 수 있다.
- <5> 협심증은 심장 근육이 일시적으로 충분한 혈액을 공급받지 못하여 흉부압박감 또는 흉통을 느끼는 것으로 심장에 혈액을 공급하는 관상동맥이 부분적으로 좁아져 발생하는 관상동맥질환의 하나이다. 안정협심증, 불안정협심증, 이형 협심증(프린즈메탈 협심증) 등으로 나눈다. 심장의 혈관이 막혀서 심장 근육이 죽게 되는 심근경색과는 달리 협심증의 통증은 휴식을 취하거나 협심증 약을 복용하면 수분 내에 감소된다. 협심증은 심장 근육에 충분한 양의 혈액이 공급되지 못하여 발생하는 것으로 가장 흔한 원인은 동맥경화증이다.
- <6> 고혈압은 혈압이 올라가서 내려가지 않고 높은 상태가 계속되는 것이다. 혈압은 여러 가지 요인에 따라서 상당히 변동이 있을 수 있지만 고혈압이라고 하면 항상 높은 상태가 유지될 때를 말한다. 고혈압을 치료해야하는 이유는 고혈압을 치료 안해두면 고혈압에 의한 여러 가지 합병증 즉 뇌졸중, 심부전, 협심증, 급성심근경색증 등의 관상동맥질환, 신부전등이 올 수 있기 때문이다.
- <7> 심장의 펌프작용이 저하되어 필요한 양의 혈액을 신체의 다른 기관에 내보내지 못하게 된 상태를 심부전 이라 한다. 많은 심장질환들이 심장의 수축능력과 이완능력에 장애를 일으켜 심부전의 원인이 될 수 있다.
- <8> 심혈관 질환은 분류에 따라 진단하는 법이 다르지만, 일반적으로 심장의 전기적인 리듬을 기록하는 심전도검사, 전산화단층촬영(CT), 핵자기공명촬영(MRI), 소량의 방사능 동위원소를 주입하여 혈액의 흐름, 심장 또는 뇌의 대사에 대한 정밀한 3차원 사진을 얻을 수 있는 양전자방출단층촬영(PET), 초음파를 이용한 혈관이 좁아진 정도를 파악하는 혈류검사, 길고 가늘고 유연한 튜브(카테터)를 오금부위 또는 팔에 있는 동맥을 통하여 삽입하여 심장의 관상동맥으로 이동시킨 후 조영제나 염료를 주입하여 X선 촬영함으로써 관상동맥의 좁아진 부위를 알아내는 관상동맥혈관 조영술과 혈액검사 방법이 있다. 혈액검사는 심근경색이나 심혈관 질환이 일어나 심장근육의 괴사가 나타나면 죽은 세포에서 효소가 혈액 중으로 흘러나오게 된다. 혈액의 이러한 효소의 양을 측정하는 것으로 크레아티키나아제(CK-MB), AST, LDH가 심혈관 질환이 일어날 경우 상승된다. 이러한 효소치의 상승은 다른 질환에서도 나타날 수 있으므로 다른 질병 표지자와의 연관성이 높아 직접적인 심혈관 질환의 진행정도를 판정하기가 어려운 상태이다.
- <9> 현재 심혈관 질환의 진행정도를 판단하는 혈액에서의 바이오마커들은 한정적이다. 따라서 임상적으로 특이성과

민감도가 높은 신규 진단마커와 아울러 이를 검출할 수 있는 단일클론항체를 개발할 경우, 심혈관 질환의 조기 진단 및 진행정도를 미리 예측 할 수 있는 형태의 키트 개발을 도모할 수 있다.

- <10> 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 2차원 전기영동 기술을 이용하여 정상인의 혈액에서 보다 심혈관 질환 환자의 혈액에서 감소 및 증가하는 바이오마커 단백질을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <11> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 심혈관 질환의 조기진단을 위한 새로운 바이오마커 또는 그 면역원성 단편을 제공하는 데 있다.
- <12> 본 발명의 다른 목적은 상기 바이오마커 단백질에 대한 항체 및 이를 이용한 진단키트를 제공하는데 있다.

과제 해결수단

- <13> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 정상인의 혈액 보다 심혈관 질환 환자의 혈액에서 발현이 상대적으로 감소하는 하기 군에서 선택된 단백질을 포함하는 심혈관 질환 진단용 바이오마커를 제공한다:
- <14> 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지고 51-53 KD의 분자량 및 5.6-7.6의 pI를 갖는 헤모펙신 전구체(Hemopexin precursor);
- <15> 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지고 38-40 KD의 분자량 및 5.6-7.6의 pI를 갖는 헵토글로빈(Haptoglobin);
- <16> 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지고 39-41 KD의 분자량 및 4.9-6.9의 pI를 갖는 알파-1-마이크로글로빈(Alpha-1-microglobulin);
- <17> 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지고 22-24 KD의 분자량 및 4.2-6.2의 pI를 갖는 씨-타입 렉틴 도메인 패밀리 3(C-type lectin domain family 3);
- <18> 서열번호 5의 아미노산 서열을 가지고 20-22 KD의 분자량 및 4.8-6.8의 pI를 갖는 콤플렉스-형성-당단백질 에이치 씨(Complex-forming glycoprotein HC);
- <19> 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지고 45-47 KD의 분자량 및 5.4-7.4의 pI를 갖는 헵토글로빈 전구체(Haptoglobin precursor);
- <20> 서열번호 7의 아미노산 서열을 가지고 22-24 KD의 분자량 및 4.2-6.2의 pI를 갖는 보체 요소 아이 라이트 체인(Complement factor I light chain);
- <21> 서열번호 8의 아미노산 서열을 가지고 102-104 KD의 분자량 및 5.5-7.5의 pI를 갖는 인터-알파-트립신 저해제 패밀리 헤비 체인-관련된 단백질(Inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy chain-related protein (IHRP));
- <22> 서열번호 9의 아미노산 서열을 가지고 24-26 KD의 분자량 및 5.1-7.1의 pI를 갖는 프리-세럼 아밀로이드 피 컴포넌트(Pre-serum amyloid P component);
- <23> 서열번호 10의 아미노산 서열을 가지고 15-17 KD의 분자량 및 4.5-6.5의 pI를 갖는 프리알부민(Prealbumin);
- <24> 서열번호 11의 아미노산 서열을 가지고 38-40 KD의 분자량 및 6.8-8.8의 pI를 갖는 보체 요소 에이치 관련된 1(Complement factor H-related 1);
- <25> 서열번호 12의 아미노산 서열을 가지고 38-40 KD의 분자량 및 5.4-7.4의 pI를 갖는 헵토글로빈-관련된 단백질 전구체(Haptoglobin-related protein precursor);
- <26> 서열번호 13의 아미노산 서열을 가지고 47-49 KD의 분자량 및 4.8-6.8의 pI를 갖는 보체요소 씨4비3(Complement component C4B3); 및
- <27> 서열번호 14의 아미노산 서열을 가지고 45-47 KD의 분자량 및 4.8-6.8의 pI를 갖는 피그먼트 상피의 차이나는 요인(Pigment epithelial-differentiating factor).

- <28> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 정상인의 혈액 보다 심혈관 질환 환자의 혈액에서 상대적으로 발현이 증가하는 하기 군에서 선택된 단백질을 포함하는 심혈관 질환 진단용 바이오마커를 제공한다:
- <29> 서열번호 15의 아미노산 서열을 가지고 22-24 KD의 분자량 및 4.8-6.8의 pI를 갖는 레티놀 부착 단백질 4(Retinol Binding Protein 4);
- <30> 서열번호 16의 아미노산 서열을 가지고 28-30 KD의 분자량 및 4.5-6.5의 pI를 갖는 프로아포-에이-아이 단백질 (Proapo-A-I protein);
- <31> 서열번호 17의 아미노산 서열을 가지고 15-17 KD의 분자량 및 4.5-6.5의 pI를 갖는 트랜스티레틴 (Transthyretin); 및
- <32> 서열번호 18의 아미노산 서열을 가지고 97-99 KD의 분자량 및 4.3-6.3의 pI를 갖는 셀룰로플라즈민 (Ceruloplasmin).
- <33> 본 발명에서, 상기 바이오마커는 상기 분자량 및 pI를 가지는 한 상기 서열번호를 가지는 전장 단백질의 일부일 수 있으며, 이 경우 도 3a 내지 3r의 MS/MS 결과에서 빨간색으로 표시된 트립신 분해된 펩타이드 서열들을 가진다. 상기 트립신 분해된 펩타이드란 MALDI-TOF 또는 MS/MS 분석을 위해 트립신(trypsin)으로 분해된 단백질의 펩타이드를 의미한다. 또한 상기 분자량과 pI는 2차원 전기영동(Two-dimentional electrophoresis) 상에서 확인된 값으로서 일반적으로 허용되는 실험상의 오차범위를 포함한다.
- <34> 본 발명에서, 심혈관 질환(Cardiovascular Disease, CVD)은 심장질환과 혈관질환을 의미하는데, 구체적인 예로 심부전, 고혈압성 심장질환, 부정맥, 판막질환, 선천성 심장질환, 심근증, 심낭질환 등의 심장질환과 뇌졸중, 말초혈관질환, 동맥류 등의 혈관질환을 포함한다.
- <35> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 단백질 또는 그 면역원성 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환 진단제를 제공한다.
- <36> 본 발명에서, 상기 면역원성 단편이란 본 발명의 바이오 마커 단백질에 대한 항체에 의해 인식될 수 있는 하나 이상의 에피토프(epitope)를 가지고 있는 바이오 마커 단백질의 단편을 의미한다.
- <37> 본 발명의 심혈관 질환 진단제에서, 상기 항체는 폴리클로날 항체일 수도 있으나, 모노클로날 항체인 것이 바람직하다.
- <38> 본 발명의 폴리클로날 항체는 당업자에 알려진 종래방법에 따라 면역원인 바이오 마커 단백질 또는 그 단편을 외부 숙주에 주사함으로써 제조될 수 있다. 외부 숙주는 마우스, 래트, 양, 토끼와 같은 포유동물을 포함한다. 면역원은 근내, 복강내 또는 피하 주사방법으로 주사되면, 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 보조제(adjuvant)와 함께 투여된다. 외부숙주로부터 정기적으로 혈액을 채취하여 향상된 역가 및 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하거나 이로부터 항체를 분리·정제한다.
- <39> 상기 모노클로날 항체는 당업자에 알려진 융합에 의한 불멸화된 세포주 생성기술(Koeher and Milstein (1975) Nature, 256:495))에 의해 제조될 수 있다. 그 제조방법을 간단히 설명하면 다음과 같다. 먼저 순수한 단백질을 20 μ g을 얻어서 Balb/C 쥐에 면역화를 시키거나 펩타이드를 합성하여 소혈청 알부민과 결합시켜 쥐에 면역화시킨다. 그 후에 쥐에서 분리된 항원-생산 임파구를 인간 또는 마우스의 미엘로마와 융합하여 불멸화된 하이브리도마를 생성하며, 엘라이저(ELISA)방법을 사용하여 원하는 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마 세포만을 선택하여 증식한 후 배양물로부터 모노클로날 항체를 분리 정제한다.
- <40> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 단백질 또는 그 면역원성 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환 진단키트를 제공한다.
- <41> 본 발명의 진단키트는 당업자에 알려진 종래의 제조방법에 의해 제조되며, 전형적으로 동결건조형태의 항체와 버퍼, 안정화제, 불활성 단백질 등을 포함한다. 상기 항체는 방사종(radionuclides), 형광원(fluorescors), 효소(enzymes) 등에 의해 표지화될 수 있다.
- <42> 본 발명의 단일클론항체는 immunoassay 키트(ELISA, antibody coated tube test, lateral-flow test, potable biosensor)에 다양하게 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 보다 높은 특이도와 민감도를 나타내는 항체의 개발을 통한 다양한 심혈관 질환 검출 스펙트럼을 갖는 단백질 칩 개발에도 이용될 수 있다.
- <43> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 정상인 혈액보다 심혈관 질환 환자의 혈액에서 감소하는 하기 군에서

선택된 단백질을 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환 치료 및 예방용 조성물을 제공한다:

- <44> 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지고 51-53 KD의 분자량 및 5.6-7.6의 pI를 갖는 헤모펙신 전구체(Hemopexin precursor);
- <45> 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지고 38-40 KD의 분자량 및 5.6-7.6의 pI를 갖는 헵토글로빈(Haptoglobin);
- <46> 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지고 39-41 KD의 분자량 및 4.9-6.9의 pI를 갖는 알파-1-마이크로글로빈(Alpha-1-microglobulin);
- <47> 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지고 22-24 KD의 분자량 및 4.2-6.2의 pI를 갖는 씨-타입 렉틴 도메인 패밀리 3(C-type lectin domain family 3);
- <48> 서열번호 5의 아미노산 서열을 가지고 20-22 KD의 분자량 및 4.8-6.8의 pI를 갖는 콤플렉스-형성-당단백질 에이치 씨(Complex-forming glycoprotein HC);
- <49> 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지고 45-47 KD의 분자량 및 5.4-7.4의 pI를 갖는 헵토글로빈 전구체(Haptoglobin precursor);
- <50> 서열번호 7의 아미노산 서열을 가지고 22-24 KD의 분자량 및 4.2-6.2의 pI를 갖는 보체 요소 아이 라이트 체인(Complement factor I light chain);
- <51> 서열번호 8의 아미노산 서열을 가지고 102-104 KD의 분자량 및 5.5-7.5의 pI를 갖는 인터-알파-트립신 저해제 패밀리 헤비 체인-관련된 단백질(Inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy chain-related protein (IHRP));
- <52> 서열번호 9의 아미노산 서열을 가지고 24-26 KD의 분자량 및 5.1-7.1의 pI를 갖는 프리-세럼 아밀로이드 피 컴포넌트(Pre-serum amyloid P component);
- <53> 서열번호 10의 아미노산 서열을 가지고 15-17 KD의 분자량 및 4.5-6.5의 pI를 갖는 프리알부민(Prealbumin);
- <54> 서열번호 11의 아미노산 서열을 가지고 38-40 KD의 분자량 및 6.8-8.8의 pI를 갖는 보체 요소 에이치 관련된 1(Complement factor H-related 1);
- <55> 서열번호 12의 아미노산 서열을 가지고 38-40 KD의 분자량 및 5.4-7.4의 pI를 갖는 헵토글로빈-관련된 단백질 전구체(Haptoglobin-related protein precursor);
- <56> 서열번호 13의 아미노산 서열을 가지고 47-49 KD의 분자량 및 4.8-6.8의 pI를 갖는 보체요소 씨4비3(Complement component C4B3); 및
- <57> 서열번호 14의 아미노산 서열을 가지고 45-47 KD의 분자량 및 4.8-6.8의 pI를 갖는 피그먼트 상피의 차이나는 요인(Pigment epithelial-differentiating factor).
- <58> 본 발명의 바이오마커 단백질들은 심혈관 질환 환자의 혈액에서 부족한 성분들이므로 이를 환자의 혈액에 보충하여 주면 심혈관 질환의 치료 및 예방에 효과를 발휘할 수 있을 것이다.
- <59> 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의해 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 주사제 등의 제형으로 제조되어 정맥주사 등으로 투여될 수 있다.
- <60> 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 환자의 연령, 성별, 상태, 질병의 증상에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준으로 1일 0.01-1mg의 단백질을 투여할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <61> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.
- <62> **실시예 1: 시료준비 (Sample preparation)**
- <63> 고려대학교 구로병원에서 심혈관 질환의 공복 시 혈당 수치와 혈관의 협착 정도를 기준으로 나누어서 실험을 하였다. 심혈관 질환 환자의 수는 19명, 비교를 위한 정상군은 30명으로 하였다.
- <64> 병원에서 얻은 혈청은 혈액 중에 가장 많이 차지하고 있는 단백질로 알려진 알부민 및 6가지 풍부한 양으로 존

제하는 단백질 예컨대, albumin, transferrin, IgG, IgA, haptoglobin, antitrysin 등을 제거하는 칼럼(Agilent Multiple Affinity Removal Column; Agilent Technologies, Wilmington, DE, 미국)을 사용하였다. 각각의 시료는 완충액 A(완충액A[5185-5987], 조성: phosphates and 0.02% sodium azide, pH 7.4 in water, Agilent Technologies사)로 5배 희석하여 0.22 μ m의 spin 필터에 넣고 원심분리기(Union-55R centrifuge, 한일과학, 한국)로 4℃, 16,000× g에서 1시간 동안 돌려, 칼럼 상층부에는 부산물들이 남게 하고 하층부에는 부산물들이 제거된 용액만이 남게 하였다. 하층부의 용액을 4.6× 100 mm 면역친화성 칼럼에 주입하여 분당 0.5 ml의 유속으로 실시하여 흘러나온 flow-through 분획을 얻었다. 이 때 적게 존재하는 단백질들은 약 3분경에 흘러나오는 분획에서 얻었고, 약 13분경에 6종의 거대 단백질들은 면역친화성 칼럼에 결합하였다. 이와 같은 방법으로 모든 시료를 처리하여, 각각의 시료는 분자량 3 kDa 이하를 제거하는 칼럼(Molecular cut-off column; Amicon, Millipore Corp., 미국)을 사용하여 HPLC 분획물에 존재하는 염과 지질을 제거하였다. 이렇게 농축된 시료에 5배의 차가운 아세톤을 넣고 -20℃에서 하루 보관하였다. -20℃에서 침전된 단백질은 원심분리기(Union-55R centrifuge, 한일과학, 한국)로 4℃, 13,000 rpm에서 10분 동안 돌려, 여분의 지질이 제거하였고 단백질만이 남았다. 이러한 침전물을 공기 중에서 말리고 시료 완충액을 넣어 단백질 정량을 하여 -70℃ 냉동고에 보관하였다. 시료 완충액의 조성은 다음과 같다: 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 40 mM Tris-Cl(pH 8.5), 65 mM DTT, 1 mM EDTA, 1% IPG buffer.

<65> 실시예 2: 이차원 전기영동(Two-Dimensional Electrophoresis)

<66> 가. 일차원 전기영동(Isoelectrofocusing, IEF)

<67> 시료 완충액으로 처리된 시료의 단백질 양을 60 μ g으로 하여 일차원 전기영동을 실시하였다. 시료의 총 부피가 450 μ l가 되게 rehydration 완충액(8 M urea, 2% CHAPS, 13mM DTT, 1 % IPG buffer)을 섞어 일차원 전기영동을 할 수 있는 24 cm strip holder에 넣은 뒤, pH 4-7 범위의 Drystrip(Amerahsm Pharmacia Biotech, Uppsala, 스웨덴)을 strip holder에 장착하였다. 20℃에서 5시간가량 strip을 rehydration 완충액으로 불려준 뒤, 다음과 같은 조건으로 일차원 전기영동을 수행하였다: 80V 5시간, 200V 30분, 500V 1분, 8000V 45분, 8000V 142000 Vhrs, 17시간 45분, 총 146 KVhr. 일차원 전기영동은 IPGphor(Amerahsm Pharmacia Biotech, Uppsala, 스웨덴)로 수행하였다.

<68> 나. 이차원 전기영동

<69> (Sodoum Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)

<70> 일차원 전기영동이 끝난 strip을 이차원 전기영동을 하기 위해, 일차원 전기영동이 끝난 strip을 cap tube에 넣고 일차 평형화 용액(6 M urea, 50 mM Tris-cl(pH 8.8), 30% glycerol, 2% SDS, 1% DTT) 10 ml에 15분간 반응시킨 후 버리고, 다시 이차 평형화 용액(6 M urea, 50 mM Tris-cl(pH 8.8), 30% glycerol, 2% SDS, 1.5% IAA) 10 ml을 넣고 10분간 재반응 시켰다. 11~16%로 만들어진 Polyacrylamide 젤(25× 30cm) 위에 반응이 끝난 strip을 장착하고, 0.5% 아가로스로 sealing하였다. 이차원 전기영동은 Ettan Dalt(Amerahsm Pharmacia Biotech, Uppsala, 스웨덴)에 전기영동 완충액(24 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS)을 넣고 전기영동을 실시하였다. 전기영동 조건은 다음과 같다: 70 V 1시간, 180 V 2시간, 360 V 2시간, 430 V 3시간 30분.

<71> 다. 염색(scanning)

<72> 이차원 전기영동이 끝난 뒤 젤을 가시화시키기 위해 은(silver) 염색을 수행하였다. silver 염색과정은 다음과 같다. 50% methanol, 12% acetic acid로 이루어진 용액에 3시간가량 반응시켜 고정화(Fixation)한 후, 50% ethanol로 20분간 3회 세척(Washing)하였다. 이를 다시 0.2% Sodium thiosulfate 용액으로 1분간 반응시켜 민감화(Sensitizing)한 후, 증류수(Distilled Water, DW)로 세척하였다. 여기에 0.1% Silver nitrate, 0.075% formaldehyde(37%) 용액으로 20분간 반응시켜 반응화(Improving)한 후, 증류수로 다시 세척하였다. 이를 다시, 미리 차게 해둔 6% Sodium carbonate, 0.075% formaldehyde(37%) 용액으로 약 7분간 반응시켜 가시화(Developing)하였고, 50% methanol 및 12% acetic acid 용액으로 처리하여 반응을 정지시켰다.

<73> 라. 이미지 분석(Image Analysis)

<74> 실험한 젤들을 분석하기 위해, 먼저 ImageScanner(Amersham Pharmacia Bio-tech, Uppsala, 스웨덴)로 스캔하였다. 단백질 발현이 차이나는 점들을 분석하기 위해 이차원 전기영동 분석 전용 프로그램인 ImageMaster(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, 스웨덴)로 분석을 수행하였다.

<75> 실시예 3: 질량분석기를 이용한 단백질 동정(ESI-Q-TOF/MS/MS Analysis)

- <76> 이미지 분석프로그램으로 찾아낸 점들을 동정하기 위해, 이차원 전기영동이 끝난 젤로부터 점(spot)들을 오려냈다. 먼저 silver를 없애기 위해 30 mM Potassium Ferricyanide와 100 mM Sodium Thiosulfate 용액이 1:1로 섞인 탈염색 용액 100 μ l을 젤 조각에 5분간 처리하였다. 이후 400 μ l의 물로 3번 세척하였다. 다시 200 mM ammonium bicarbonate로 반응시킨 뒤 물로 세척하였다. Acetonitrile을 넣어 젤이 하얗게 변할 때까지 탈수시킨 후, 이 젤을 진공 원심분리기(Speed vacuum centrifuge)에 넣어서 젤로부터 용액을 완전히 없앴다. 건조된 젤 조각은 0.2 μ g의 트립신(trypsin; Promega)이 들어있는 50 mM의 ammonium bicarbonate 20 μ l로 얼음 상에서 45분간 흡수시켰다. 반응용액을 제거한 후, 50 mM의 ammonium bicarbonate 30 μ l를 넣은 후 37°C로 밤새 반응시켰다. 그 펩타이드 용액은 C18 nano column(home made)를 이용하여 염분을 제거하였다.
- <77> Custom-made chromatographic columns은 질량분석 이전에 펩타이드 염분제거와 농축용으로 사용되었다. Poros reverse R2 material(20-30 μ m bead size, PerSeptive Biosystems)의 100-300 nL로 구성된 칼럼을 단단히 조여진 GELoader tip(Eppendorf, hamburg, 독일)에 팩킹하였다. 10 mL syringe는 공기압으로 칼럼을 통해 물질을 통과시켰다. 펩타이드 용액 30 μ l는 5% formic acid 용액 내에서 희석되어 칼럼 안으로 이동되었다. 그리고 30 μ l는 5% formic acid 용액으로 세척하였다. MS/MS분석을 위해 펩타이드는 borosilicate nanoelectrospray needle(Micromass, Manchester, UK)에 50% methanol/49% H₂O/1% formic acid와 섞여 용출시켰다.
- <78> MS/MS는 Q-TOF2 mass spectrometer(Micromass, Manchester, 영국)상에서 nano-ESI로 수행하였다. 그 소스(source)온도는 80°C였다. 안정된 flow rate(10-30 nL/min)를 생성하기 위해 0-5 psi의 nitrogen back-pressure와 혼합한 이온 소스(ion source)에서 borosilicate nanoelectrospray needles(EconoTip™, New Objective, 미국)에 1 kV의 전압을 적용하였다. 그 원뿔(cone) 전류는 40 V이다. Quadrupole analyser는 hexapole collision cell에서 분절화를 하기 위해 전구 이온(precursor ion)을 선택하는데 사용되었다. 충돌가스(collision gas)는 6-7 x 10⁻⁵ mbar의 아르곤(Ar)이며 충돌 에너지(collision energy)는 20-30 V이다. 생성 이온은 반사기(reflector)와 작은 통로판 검사기(micro channel plate detector), 그리고 time-to-digital 변환기에 맞추어지는 TOF 분석기를 이용하여 분석되었다. 그 자료는 Mass Lynx Widows NT PC system을 이용하여 분석되었다.
- <79> 단백질을 동정하기 위해 모든 MS/MS 스펙트럼은 MASCOT search program (www.matrixscience.com)을 이용하여 NCBI nr 데이터베이스에서 단백질 서열을 조사하였다.
- <80> 상기와 같이 심혈관 질환의 진행시 다르게 발현되는 단백질의 아미노산 서열을 ESI-Q-TOF/MS/MS를 이용하여 확인하였으며, 도 3a 내지 3r에 나타내었다.
- <81> **실시예 4: Western blotting**
- <82> 가. SDS-PAGE 전기영동
- <83> 심혈관 질환 환자의 혈청 단백질 40 μ g을 10% SDS-PAGE 전기영동을 실시하였다. 혈청시료 5-8 μ l(단백질 40 μ g)에 SDS-PAGE loading 완충액 (60 mM Tris-Cl, 2% SDS, 25% Glycerol, 14.4 mM 2-Mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol Blue, pH 6.8) 5 μ l를 섞어 mini gel (6× 8cm)에서 분자량별(separating gel상에서 100 V로 로딩)로 분리하였다. 이 때 사용한 running 완충액의 조성은 0.025 M Tris-Cl, 0.192 M Glycine, 1% SDS(pH 8.3)이다.
- <84> 나. Blotting
- <85> SDS-PAGE가 끝난 뒤 gel의 단백질을 Semi-dry 형태의 transfer kit(GE Healthcare)을 이용하여 NitroCellulose 막으로 옮겨(transfer), 45 mA에서 1시간 30분 동안 실시하였다.
- <86> 다. 항체반응
- <87> Retinol binding protein 4(RBP4)를 대상으로 하여 실시하였다. Membrane을 5% w/v nonfat dry milk로 실온에서 1시간 30분 동안 블로킹(blocking)시켰다. 일차 항체로는 Retinol binding protein 4를 사용하였고, 이 때 Retinol binding protein 4는 다클론항체(polyclonal antibody)이다. Retinol binding protein 4의 antibody를 4°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 일차항체의 희석농도는 1/2000으로 하였다. T-TBS(0.1%, Tris-buffered saline-tween 20)로 세척한 후에 이차 항체로 실온에서 1시간 반응시켰다. 이차항체는 anti-rabbit을 사용하였고, 희석농도는 anti-rabbit은 1/10,000 이었다. 이차항체 반응 후에 T-TBS로 세척하고 난 뒤, ECL (Pierce Biotechnology, Inc., 미국)로 가시화 시켰다.

<88> **실시예 5: ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 시험법**

<89> 정상인 및 심혈관 질환 환자, 총 66명의 혈청샘플 및 Retino binding protein 4 표준물질 100 μ l를 각 웰(well)에 넣는다. 이 때 기준물질의 단백질 농도는 300, 150, 75, 37.5, 18.75, 9.4, 4.7 ng/ml로 하여 연속 희석하였다. 뚜껑을 덮고 실온에서 1시간 동안 반응시켜 다클론 항체가 붙어있는 플레이트(plate)에 항원을 붙였다. 1시간 후 플레이트를 비운 뒤 세정완충용액으로 세 번 세척하고, 희석된 이차 항체 anti-Retino binding protein 4 용액 100 μ l을 각 웰에 넣었다. 그 다음 뚜껑을 잘 덮어 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 후 플레이트를 비운 뒤 세정완충용액으로 다섯 번 세척하고, Streptavidin-PAL 용액 100 μ l을 각 웰에 넣었다. 그 다음 뚜껑을 잘 덮어 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 20분 동안 섞은 뒤 플레이트를 비우고 세정완충용액으로 다섯 번 세척하였다. 기질반응용액 pNPP 100 μ l을 각 웰에 넣은 다음 뚜껑을 잘 덮어 37℃에서 표준물질농도가 300 ng/ml인 흡광도가 1.5-2.0 units에 이를 정도(약 20분)로 반응시켜 색깔 변화를 유도하였고, 여기에 50 μ l의 반응 정지용액을 각각의 웰에 넣고 ELISA reader를 이용하여 450nm에서 광흡수도를 측정하였다. 표준물질의 농도로 구해진 표준곡선을 이용하여 각 혈청샘플에 존재하는 Retino binding protein 4의 양을 구하였다.

<90> 상기 이차원 전기영동실험을 수행한 결과, 심혈관 질환 환자의 혈청에서 새롭게 발견되거나 발현양이 감소 또는 증가하는 단백질들이 동정되었다.

<91> **1. 심혈관 질환 환자의 혈청에서 발견되는 단백질**

<92> 심혈관 질환 환자군을 대상으로 전기영동을 수행한 결과 15개의 발현이 감소한 단백질(# 3, # 15, # 18, # 28, # 84, # 125, # 132, # 153, # 162, # 196, # 228, # 232, # 259, # 300, # 3182)과 4개의 증가하는 단백질(# 66, # 69, # 74, # 104)을 찾을 수 있었다(도 1a). 발현이 감소한 단백질은 비교를 위한 정상군의 단백질보다 유의확률 0.05를 만족하는 수준에서 약 45% 이상 감소하였으며, 증가한 단백질은 유의확률 0.05를 만족하는 수준에서 약 100% 이상 증가하였다. 또한, ESI-Q-TOF를 수행하여 심혈관 질환이 진행시 발현이 감소 또는 증가하는 단백질을 하기 표 1에서와 같이 동정하였다.

<93> [표 1]. 심혈관 질환 환자의 혈청에서 발견되는 단백질

스팟	분자량(kDa)/pI	단백질명	Vol.증감
# 3	52.2/6.6	Hemopexin precursor	-59%
# 15	38.7/6.6	Haptoglobin	-65%
# 18	39.8/5.9	Alpha-1-microglobulin	-56%
# 28	22.9/5.2	C-type lectin domain family 3	-45%
# 84	20.5/5.8	Complex-forming glycoprotein HC	-45%
# 125	45.8/6.4	Haptoglobin precursor	-62%
# 132	22.8/5.2	Complement factor I light chain	-46%
# 153	103.5/6.5	Inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy chain-related protein (IHRP)	-62%
# 162	25.4/6.1	Pre-serum amyloid P component	-55%
# 196	16/5.5	Prealbumin	-45%
# 228	38.8/7.8	Complement factor H-related 1	-51%
# 232	39.3/6.4	Haptoglobin-related protein precursor	-79%
# 259	47.9/5.8	Complement component C4B3	-54%
# 300	46.4/5.8	Pigment epithelial-differentiating factor	-54%
# 3182	38.7/7.8	Complement factor H-related protein 1 precursor (FHR-1)	-88%
# 66	23.2/5.8	Retino Binding Protein 4	+102%
# 69	28.9/5.5	Proapo-A-I protein	+807%
# 74	15.9/5.5	Transthyretin	+133%
# 104	98.3/5.3	Ceruloplasmin	+128%

<94> **2. 단백질의 아미노산 서열의 결정**

<95> 상기와 같이 심혈관 질환의 진행시 다르게 발견되는 단백질의 아미노산 서열을 ESI-Q-TOF/MS/MS를 이용하여 동정하여 도 3a 내지 3r의 결과를 얻었다. 도면에서 빨간색은 매치된 트립신 분해된 펩타이드 서열을 나타낸다. 이들 단백질의 아미노산 서열은 NCBI 데이터베이스(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 서치하여 헤모펙신 전구체(Hemopexin precursor)(서열번호 1), 헵토글로빈(Haptoglobin)(서열번호 2), 알파-1-마이크로글로빈(Alpha-1-microglobulin)(서열번호 3), 씨-타입 렉틴 도메인 패밀리 3(C-type lectin domain family 3)(서열번호 4), 콤플렉스-형성-당단백질 에이치 씨(Complex-forming glycoprotein HC)(서열번호 5), 헵토글로빈 전구체

(Haptoglobin precursor)(서열번호 6), 보체 요소 아이 라이트 체인(Complement factor I light chain)(서열번호 7), 인터-알파-트립신 저해제 패밀리 헤비 체인-관련된 단백질(Inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy chain-related protein (IHRP)(서열번호 8), 프리-세럼 아밀로이드 피 컴포넌트(Pre-serum amyloid P component)(서열번호 9), 프리알부민(Prealbumin)(서열번호 10), 보체 요소 에이치 관련된 1(Complement factor H-related 1)(서열번호 11), 헵토글로빈-관련된 단백질 전구체(Haptoglobin-related protein precursor)(서열번호 12), 보체요소 씨4비3(Complement component C4B3)(서열번호 13), 피그먼트 상피의 차이나는 요인(Pigment epithelial-differentiating factor)(서열번호 14), 레티놀 부착 단백질 4(Retinol Binding Protein 4)(서열번호 15), 프로아포-에이-아이 단백질(Proapo-A-I protein)(서열번호 16), 트랜스티레틴(Transthyretin)(서열번호 17), 및 셀룰로플라즈민(Ceruloplasmin)(서열번호 18) 서열을 가짐을 확인하였다.

<97> 하기 표 2 및 표 3은 심혈관 질환 환자에서 다르게 발현하는 단백질들의 트립신 분해된 펩타이드 서열을 나타낸다.

<98> [표 2]. 발현이 감소한 단백질의 트립신 분해된 펩타이드 서열

스팟	단백질명	트립신 분해된 펩타이드 서열	Accession no.
# 3	Hemopexin precursor	LLQDEFFGIPSPDAAVECHR YYCFQGNQFLR DYFMPCPGR GGYTLVSGY PK EVGPHGIILDSDAAFCPGSSR	gi386789
# 15	Haptoglobin	YVMLPVADQDQCIR	gi176784
# 18	Alpha-1-microglobulin	WYNLAIG STCPWLK ETLLQDFRVVAQ GVGIPEDSIF TMADRGECVPGEQEPEPIIPR	gi4502067
# 28	C-type lectin domain family 3	LDTLAGEVALLK CFLAFTQTK	gi44507557
# 84	Complex-forming glycoprotein HC	GECVPGEQEPEPIIPR	gi223373
# 125	Haptoglobin precursor	DIAPT LTLVVGK YVMLPVADQDQCIR YQEDTCYGDAGSAFA VHDLEEDTWYATGILSFDK	gi306882
# 132	Complement factor I light chain	VFSLQWGEVK	gi224798
# 153	IHRP	QGPWNLLSDPEQGVETGQYER	gi1483187
# 162	Pre-serum amyloid P component	AYSLSYNTQGR VGEYSLYIGR QGYFVEAQPKIVLGGEQDSYG GK GYVIKPLVWV	gi337758
# 196	Prealbumin	AADDTWEPFASGK	gi219978
# 228	Complement factor H-related 1	ITCTEEGWSPT PK EIMENYNIALR	gi11321587
# 232	Haptoglobin-related protein precursor	VGYVSGWQSDNFK YVMLPVADQYDCIT HYEGSTCPK	gi1495458
# 259	Complement component C4B3	EPFLSCCQFAESLR ALEILQEEDLIQEDDIPVRSFFPEN WLWR GLCVATPVQLR GSFEFPVGDVASK VTASDPLDTLGSEGALSPGGVASLLR	gi40737343
# 300	Pigment epithelial - differentiating factor	LAAAVSNFGYDLYR ELLDTVTAPQK TSLEDFYLDEER TVQAVLTPVK LQSLFDSPDFSK DTDTGALLFIGK	gi189770

<99>

[표 3]. 발현이 증가한 단백질의 트립신 분해된 펩타이드 서열

스팟	단백질명	트립신 분해된 펩타이드 서열	Accession no.
# 66	Retinol Binding Protein 4	LLNNWDVCDMV GTFTDTEPAKFK WGVASFLOKGNDD HWVDTDYDTYAVQ YSCRLN LDGTCADSYSFVFSR	gi55663330
# 69	Proapo-A-I protein	LLDNWDSVTSTFSK	gi178775
# 74	Transferrin	RYTIAALLSPYSYSTTAWTNPKE	gi37483
# 104	Ceruloplasmin	EVGPTNADPVCLAK	gi180249

3. Western blotting 및 ELISA 시험결과

상기 발현이 변화된 단백질 등 중 심혈관 질환 환자의 혈액에서 동정된 단백질인 Retinol binding protein 4(RBP4)를 western blot을 한 실험 결과를 도 4a에 나타내고, 그 상대적인 강도를 도 4b에 나타내었다. 또한, 심혈관 질환 환자의 혈액에서 동정된 단백질인 Ceruloplasmin을 Western blot을 한 실험 결과를 도 6a에 나타내고, 그 상대적인 강도를 도 6b에 나타내었다. 결과에서 보는 바와 같이, 정상인 보다 심혈관 질환 환자에서 RBP4 및 Ceruloplasmin의 양이 증가하였다. 이러한 결과는 2차 전기영동의 결과와 같은 결과를 나타내었다. 도 5는 정상인 및 심혈관 질환 환자, 총 66명의 혈액으로 RBP4를 ELISA한 실험 결과이며, 2차 전기영동의 결과 및 western blot을 한 결과와 마찬가지로 심혈관 질환 환자에서 증가하였다. 이것으로 보아 RBP4 및 Ceruloplasmin은 심혈관 질환의 진단에 매우 유용할 것으로 생각되며, 또한 심혈관 질환 치료 및 예방용 조성물로서의 가능성을 나타내는 것이다.

산업이용 가능성

이상 설명한 바와 같이, 본 발명의 결과로 얻어진 심혈관 질환에서 발현이 감소한 단백질 15개와 발현이 증가한 단백질 4개는 심혈관 질환의 조기진단을 위한 바이오마커로 사용될 수 있다. 본 발명의 바이오마커 단백질은 심혈관 질환 환자의 혈액에서 측정할 수 있다. 또한, 본 발명의 바이오마커 단백질을 기초로 제조된 단일클론항체는 심혈관 질환의 조기진단을 위한 immunoassay 키트에 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 보다 높은 특이도와 민감도를 나타내는 항체의 개발을 통한 다양한 심혈관 질환 조기진단을 위한 검출 스펙트럼을 갖는 단백질 칩 개발에 이용될 수도 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 정상인 혈액에서 보다 심혈관 질환 환자의 혈액에서 감소 및 증가한 단백질을 나타내는 2-D 전기영동 이미지이다.

도 2는 도 1에서 나타난 단백질들을 상세하게 보여주는 확대 이미지이다. 여기서, Healthy는 정상인, CVD는 심혈관 질환(Cardiovascular Disease) 환자를 나타낸다.

도 3a 내지 3r은 각각 헤모백신 전구체, 헵토글로빈, 알파-1-마이크로글로빈, 씨-타입 렉틴 도메인 패밀리 3, 콤플렉스-형성-당단백질 에이치 씨, 헵토글로빈 전구체, 보체 요소 아이 라이트 체인, 인터-알파-트립신 저해제 패밀리 헤비 체인-관련된 단백질, 프리-세럼 아밀로이드 피 컴포넌트, 프리알부민, 보체 요소 에이치 관련된 1, 헵토글로빈-관련된 단백질 전구체, 보체요소 씨4비3, 피그먼트 상피의 차이나는 요인, 레티놀 부착 단백질 4, 프로아포-에이-아이 단백질, 트랜스페린, 및 셀룰로플라즈민의 ESI-Q-TOF/MS/MS 결과이다.

도 4a는 정상인과 심혈관 질환 환자의 혈액에서 동정된 단백질인 Retinol binding protein 4를 Western blot 결과이다.

도 4b는 도 4a의 상대적인 강도를 나타낸 결과이다.

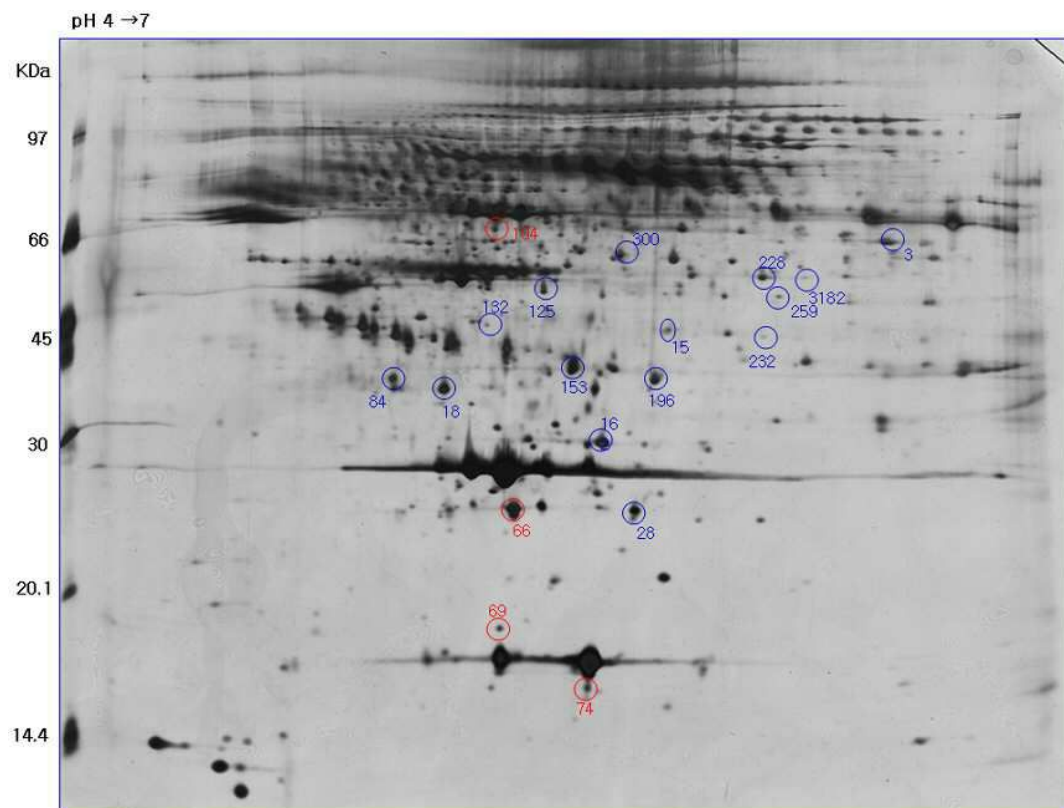
도 5는 정상인 47명 및 심혈관 질환 환자 19명의 혈액으로 Retinol binding protein 4 를 ELISA를 한 실험 결과이다.

도 6a는 정상인과 심혈관 질환 환자의 혈액에서 동정된 단백질인 Ceruloplasmin을 Western blot 결과이다.

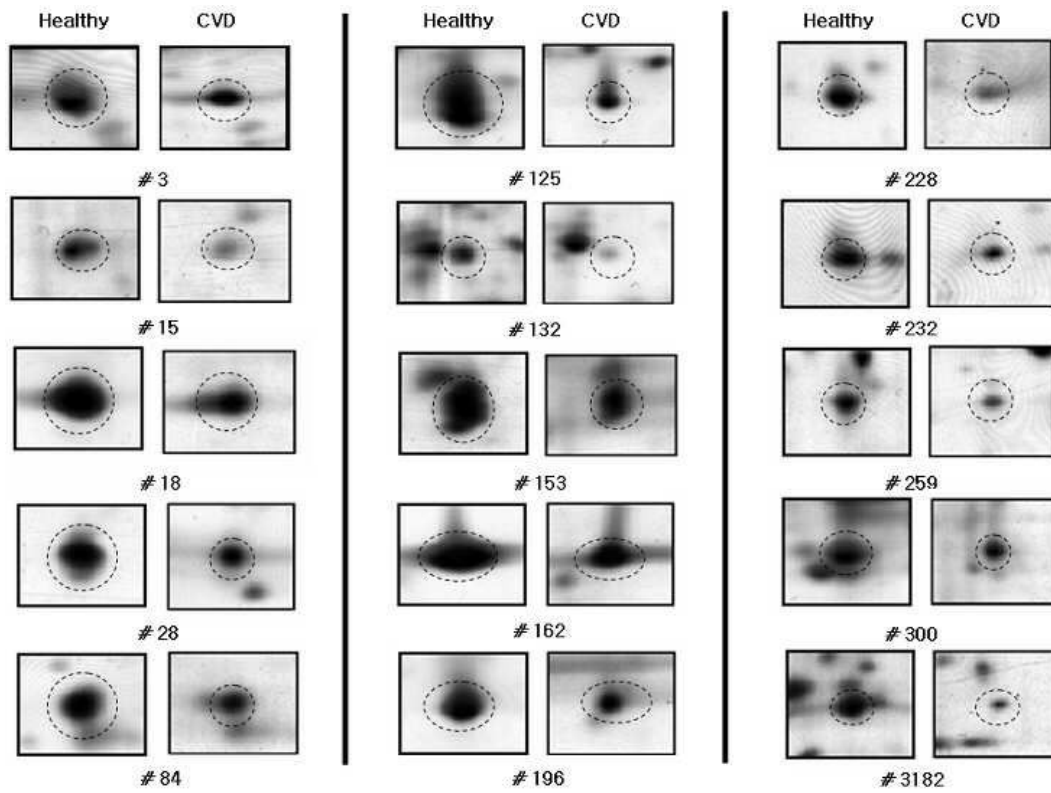
도 6b는 도 6a의 상대적인 강도를 나타낸 결과이다.

도면

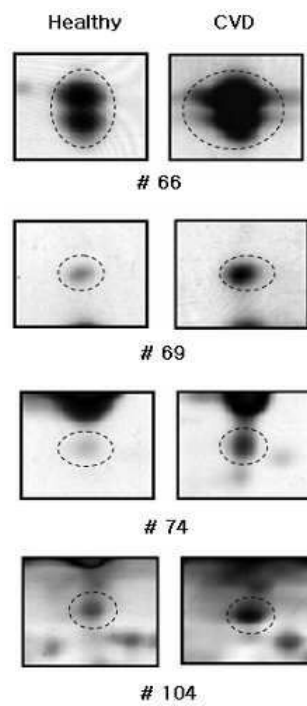
도면1



도면2a



도면2b



도면3a

[gi|366789](#) Mass: 52254 Score: 167 Queries matched: 7
hemopexin precursor

```

1 ARVLGAPVAL GLWSLCUSLA IATPLPPTSA HGNVAEGETK PDPDVTERCS
51 DGWSFDATTL DDNGTMLFFK GEFVWKSHKW DRELISERUK NFPSPVDAAF
101 RQGHNSVFLI KGDKVWVYPP EKKEKGYPKL LQDEFFGIPS PLDAAVECHR
151 GECQAEGLVF FQGDREWFUD LATGTMKERS WPAVGNCSSA LRWLGRYYCF
201 QGNQELRFDP VRGEVPPRYP RDVRDYEMPC PGRGHGHRNG TGHGNSHHG
251 PEYMRCSPHL VLSALTSDNH GATYAFSGTH YWRLDTSRDG WHSWPIAHQW
301 PQGPSAVDAA FSWEKLYLV QGTQVYVFLT KGGYTLVSGY PKRLEKEVGT
351 PHGIILDSVD AAFICPGSSR LHIMAGRRLW WLDLKSGAQA TWTLPWPHE
401 KVDGALCMK SLGPNSSCSAN GPGLYLIHGP NLYCYSDEK LNAAKALPQP
451 QNVTSLLGCT H

```

도면3b

[gi|176784](#) Mass: 38710 Score: 72 Queries matched: 1
haptoglobin

```

1 ALGAVIALLL WGQLFAVDSG NDVTDIADDG CPKPPEIAHG YVEHSVRYQC
51 KNYVKLRTEG DGVYTLNDKK QWINKAVGDK LPECEAVCGK PKNPANPVQR
101 ILGGHLDAIG SFPWQAKMVS RHNLTGATL INEQULLTTA KNLFLNHSN
151 ATAKDIAPTL TLYVGKKQLV EIEKVVLHPN YSQVDIGLIK LKQKVSNER
201 VMPICLPSKD YAEVGRLGYV SGUGRNANFK FTDHLKYVHL PVADQDQCIR
251 HYEGETVPEK KTPKSPVGVO PILNKHTFCA GMSKYQEDTC YGDAGSAFAV
301 HDLEEDTWYA AGILSFDKSC AVAEYGVYVK VTSIQDWVQK TIAEN

```

도면3c

[gi|4502067](#) Mass: 39886 Score: 208 Queries matched: 8
alpha-1-microglobulin/bikunin precursor [Homo sapiens]

```

1 MRSLGALLLL LSACLAVSAG PVPTPPDNIQ VQENFNISRI YGKWYNLAIG
51 STCPWLKKIM DRMTVSTLVL GEGATEAEIS MTSTRWRKGV CEETSGAYEK
101 TDTDGKFLYH KSKWNITMES YVHTNYDEY AIFLTKKFSR HHGPTITAKL
151 YGRAPQLRET LLQDFRVVAQ GVGIPEDSIF TMADRGECPV GEQEPEPILI
201 PRVRRRAVLPQ EEESGGGQL VTEVTKKEDS CQLGYSAGPC MGMTSRYFYN
251 GTSMACETFO YGGCMGNGNN FVTEKECLQT CRTVAACNLP IVRGPCRAFI
301 QLWAFDAVRG KCVLFPYGGC QGNGNKFYSE KECREYCGVP GDGDEELLRF
351 SN

```

도면3d

[gi|4507557](#) Mass: 22951 Score: 68 Queries matched: 4
C-type lectin domain family 3, member B [Homo sapiens]

```

1 MELWGAYLLL CLFSLLTQVT TEPPTQKPKK IVNAXKDVVN TKMFEEELKSR
51 LDTLAQEVAL LKEQQALQTV CLKGTKVHMK CFLAFTQTKT FHEASEDCIS
101 RGGTLSTPQT GSENDALYFY LRQSVGNEAE IWLGLNDMAA EGTUVDNTGA
151 RIAYKNUETE ITAQPDGGKT ENCAVLSGAA NGKWFDKRCR DQLPYICQFG
201 IV

```

도면3e

[gi|223373](#) Mass: 20592 Score: 52 Queries matched: 1
complex-forming glycoprotein HC

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 GPVPTPPDNI QVQENFBISR IYGKWNLA I GSTCPLKIMD RMTVSTLVLG
51 EGATEAEISM TSTRWRKGVC EETSGAYEKT DTDGKFLYHK SKWBITMESY
101 VVHTNYDEYA IFLTCKFSRH HGPTITAKLY GRAPQLRETL LQDFRVVAQG
151 VGIPEDSIFT MADR**GECVPG EQEPEPILIP R**

도면3f

[gi|306882](#) Mass: 45860 Score: 154 Queries matched: 4
haptoglobin precursor

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MSALGAVIAL LLWGQLFAVD SGNDVTDIAD DGCPKPPEIA HGYVEHSVRY
51 QCKNYYKLRT EGDGVYTLNN KKQWINKAVG DKLPECEADD GCPKPPEIAH
101 GYVEHSVRYQ CKNYYKL RTE GDGVYTLNNE KQWINKAVGD KLPECEAVCG
151 KPKNPANPVQ RILGGHLD AK GSFPWQAKMV SHHNLTTGAT LINEQWLLTT
201 AKNLFLNHSE NATAK**DIAPT LTLVVGKKQL** VEIEKVVLHP NYSQVDIGLI
251 KLKQKVSUNE RVMPICLPSK DYAEVGRVGY VSGWGRNANF KFTDHLK**KVM**
301 **LPVADQDQCI RHYEGSTVPE** KKTPKSPVGV QPILNEHTFC AGMSKY**QEDT**
351 **CYGDAGSAFA VHDLEEDTWY ATGILSFDKS** CAVA EYGVYV KVTSIQDWVQ
401 KTIAEN

도면3g

[gi|224798](#) Mass: 22845 Score: 37 Queries matched: 1
complement factor I light chain

1 IVGGKRAQLG DLPWQVAIKD ASGITCGGIY IGIIFHENYN AGETYQNDIA
51 LIMKKDGNKK DCELP RSIPA CVPUSPYLPQ PNDTCIVSGU GREKDNER**VF**
101 **SLQWGEVKLI** SNCSKFYGNR FYEKEMECAG TYDGSIDACK GDSGGPLVCM
151 DANNVTYVUG VVSUGENCCK PEFPGVYTKV ANYFDWISYH VGRPFISQYN
201

도면3h

[gi|1483187](#) Mass: 103549 Score: 51 Queries matched: 1
inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy chain-related protein (IHRP)
Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MKPPRPVRTC SKVLVLLSLL AIHQTTTAEK NGIDIYSLTV DSRVSSRFAM
51 TVVTSRVVNR ANTVQEATFQ MELPKKAFIT NFSMNIDGMT YPGIIEKAE
101 AQAQYSAAVA KGKNAGLVKA TGRNMEQFQV SVSVAPNAKI TFEVVEELL
151 KRRLGVYELL LKVRPQQLVK HLQMDIHIFE PQGISFLETE STFMTNQLVD
201 ALTTWQNKTK AHIRFKPTLS QQQKSPEQQE TVLDGNLIIR YDVEDRAISGG
251 SIQIENGYFV HYFAPEGLTT MPKNVVFVID KSGSMSGRKI QQTREALIKI
301 LDDLSPRDQF NLIVFSTEAT QWRPSLVPAS AENVNKARSF AAGIQALGGT
351 NINDAMLMAY QLLDSSNQEE RLPEGSVSLI ILLTDGDPTV GETNPRSIQN
401 NVREAVSGRY SLFCLGFGFD VSYAFLEKLA LDNGGLARRI HEDSDSALQL
451 QDFYQEVANP LLTAVTFEYP SNAVEEVTQN NFRLLFKGSE MUVAGKLQDR
501 GPDVLTATVS GKLPTQNTF QTESSVAEQE AEFQSPKYIF HNFMERLWAY
551 LTIQQLLEQT VSASDADQQA LRNQALNLSL AYSFVTPLTS MUVTKPDDQE
601 QSQVAEKPMH GESRNRNVHS GSTFFKYLLQ GAKIPKPEAS FSPRRGWNRO
651 AGAAGSRMNF RPYVLSSRQL GLPGPPDVPD HAAYHPFRRL AILPASAPPA
701 TSNPDPAVSR VMNMKIEETT MTTQTPAPIQ APSAILPLPG QSVRLCVDP
751 RHRQGPVHLL SDPEQGEVET GQYEREKAGF SWIEVTFKNP LVVWHASPEH
801 VVVTNRNRSS AYKUKETLFS VMPGLKMTMD KTGLLLSDP DKVTIGLLFW
851 DGRGEGRLRL LRDTDRFSSH VGGLGQFYQ EVLWGSPAAS DDGRRTLVRQ
901 GNDHSATREH RLDYQEGPPG VEISCWSVEL

```

도면3i

[gi|337758](#) Mass: 25495 Score: 261 Queries matched: 5
pre-serum amyloid P component
Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MNKPLLWISV LTSLLAEFAH TDLGKVFVF PRESVTDHVN LITPLEKPLQ
51 NFTLCFRAYS DLSRAYSLEFS YNTQGRDNEL LVIKERVGEY SLYIGRHKVT
101 PKVIEKFPAP VHICVSWESS SGIAEFWING TPLVKKGLRQ GYFVEAQPKI
151 VLGQEQDSYG GKFDRSQSFV GEIGDLYMWD SVLPPENILS AYQGTPLPAN
201 ILDWQALNVE IRGYVIKPL VVV

```

도면3j

[gi|219978](#) Mass: 16023 Score: 63 Queries matched: 2
prealbumin [Homo sapiens]
Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MASHRLLLLC LAGLVFVSEA GPTGTGESKC PLNVKVLDAV RGSPAINVAN
51 HVFRKAADDI WEPFASGKTS ESGELHGLTT EEEFVEGIYK VEIDTKSYWK
101 ALGISPFHEH AEVVFTANDS GPRRYTIAAL LSPYSYSTTA VVTNPKE

```

도면3k

[gi|11321567](#) Mass: 38777 Score: 96 Queries matched: 2
complement factor H-related 1 [Homo sapiens]

1	MULLVSVILI	SRISSVGGEA	TFCDFPKINH	GILYDEEKYK	PFSQVPTGEV
51	FYYSCEYNFV	SPSKSFWTRI	TCTEEGWSPT	PKCLRLCFFP	FVENGHSESS
101	GQTHLEGDTV	QIICNTGYRL	QNNENNISCV	ERGWTTPPKC	RSTDTSVCNP
151	PTVQNAYIVS	RQMSKYPSGE	RVRYQCRSPY	EMFGDEEVMC	LNGNWTPEPPQ
201	CKDSTGKCGP	PPIDNGDIT	SFPLSVYAPA	SSVEYQCQNL	YQLEGNKRIT
251	CRNGQWSEPP	KCLHPCVISR	EIMENYNIAL	RWTAKQKLYL	RTGESAEFVC
301	KRGYRLSSRS	HTLRITTCWDG	KLEYPTCAKR		

도면3l

[gi|1495458](#) Mass: 44076 Score: 111 Queries matched: 2
haptoglobin-related protein [Homo sapiens]

1	MHVCVCVCVC	VYMPVCVDAC	MCCEAGRPAF	RSFLFSLCSD	LGAVISLLLLU
51	GRQLFALYSG	NDVTDISDDR	FPKPPEIANG	YVEHLFRYQC	KNYYRLRTEG
101	DGVYTLNDKK	QWINKAVGDK	LPECEAVCGK	PKNPANPVQR	ILGGHLDARG
151	SFPWQAKMVS	HHNLTGTATL	INEQWLLTTA	KNLFLNHSEN	ATAKDIAPTL
201	TLYVGKKQLV	EIEKVVLHPN	YHQVDIGLIK	LKQKVLVNER	VMPICLPSKN
251	YAEVGRVGYV	SGWGQSDNFK	LTDHLKYVHL	FVADQYDCIT	HXEGSTCPKW
301	KAPKSPVGVQ	PILNEHTFCV	GMSKYQEDTC	YGDAGSAFAV	HDLEEDTWYA
351	AGILSFDKSC	AVAEYGVYVK	VTSIQHWVQK	TIAEN	

도면3m

[gi|40737343](#) Mass: 47937 Score: 278 Queries matched: 7
C4B3 [Homo sapiens]
Matched peptides shown in **Bold Red**

1	GQYASPTAKR	CCQDGVTRLF	MMSSCEQRAA	RVQQPDCREP	FLSCQQAES
51	LRKKS RDKGQ	AGLQ RALEIL	QEEDLIDEDD	IPVRSFFPEN	WLWRVETVDR
101	FQILTLWLPD	SLTTWEIHGL	SLSKTK GLCV	ATPVQLRVFR	EFHLHLRLPM
151	SVRRFEQLEL	RPVLYNYLDK	NLTVSVHVSP	VEGLCLAGGG	GLAQQVLVPA
201	GSARPVAFSV	VPTAAAVSL	KVVARG SFEF	PVGDAVSKVL	QIEKEGAIHR
251	EELVVELNPL	DHRGRTLEIP	GNSDPNMIPD	GDFNSYVR VT	ASDPLDTLGS
301	EGALSPGGVA	SLLRLPRGCG	EQTMIIYLAPT	LAASRYLDKT	EQUSTLPPET
351	KDHAVDLIQK	GYMRIQQFRK	ADGSYAAWLS	RGSTWLTAF	VLKVLSLAQE
401	QVGGSPKQLQ	ETSNWLLSQQ	QADGSFQD		

도면3n

[gi|189778](#) Mass: 46471 Score: 312 Queries matched: 8
pigment epithelial-differentiating factor
Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MQALVLLLCI GALLGHSSCQ NPASPPEEGS PDPDSTGALV EEDDPFFKVP
51 VNK**LAAAVSN FGYDL**YRVRS SMSPTTNVLL SPLSVATALS ALSLGADERT
101 ESIIHRALYY DLISSPDIHG TYK**ELLDTVT APQ**KNLKSAS RIVFEKKLRI
151 KSSFVAPLEK SYGTRPRVLT GNPRLDLQEI NNWVQAQMKG KLARSTKEIP
201 DEISILLGCV AHFKGQWVTK FDSRK**TSLED FYL**DEERTVR VPMMSDPKAV
251 LRYGLDSDL CKIAQLPLTG SMSIIFFLPL KVTQNLTLIE ESLTSEFIHD
301 IDRELK**TVQA VLTVP**KLKLS YEGEVTKSLQ EMK**LQSLFDS PDF**SKITGKP
351 IKLTQVEHRA GFEWNEDGAG TTPSPGLQPA HLTFFPLDYHL NQPFIFVLRD
401 **TDTGALLFIG KILD**PRGP

도면3o

[gi|543981](#) Mass: 38777 Score: 105 Queries matched: 3
Complement factor H-related protein 1 precursor (FHR-1)
Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MWLLVSVILI SRISSVGGEA TFCDFPKINH GILYDEEKYK PFSQVPTGEV
51 FYYSCEYNFV SPSKSFWTRI **TCTEEGWSPT PK**CLRLCFFP FVENGHSESS
101 GQTHLEGDTV QIICNTGYRL QNNENNISCV ERGWSTPPKC RSTDTSCVNP
151 PTVQNAVIVS RQMSKYPAGE RVRYQCRSPY EMFGDEEVMC LNGNWTEPPQ
201 CKDSTGKCGP PPPIDNGDIT SFPLSVYAPA SSVEYQCQNL YQLEGNKRIT
251 CRNGQWSEPP KCLHPCVISR **EIMENYNIAL RWTAKQKLYL** RTGESAEFVC
301 KRGYRLSSRS HTLRTTCWDG KLEYPTCAKR

도면3p

[gi|178775](#) Mass: 28944 Score: 47 Queries matched: 1
proapolipoprotein

1 RHFQQQDEPP QSPWDRVKDL ATVYVDVLKD SGRDYWSQFE GSALGKQLNL
51 **KLLDNWDSVT STPSK**LREQL GPVTQEFWDN LEKETEGLRQ EMSKDLEEVK
101 AKVQPYLDDF QKKWQEEMEL YRQKVEPLRA ELQEGARQKL HELQEKLSPL
151 GEEMDRARA HVDALRTHLA PYSDELRLQRL AARLEALKEN GGARLAEYHA
201 KATEHLSTLS EKAKPALEDL RQGLLPVLES FKVSFLSALE EYTKKLNTQ

도면3q

[gi|37483](#) Mass: 15991 Score: 15 Queries matched: 1
transthyretin [Homo sapiens]

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MASHRLLLLC LAGLVFVSEA GPTGTGESKC PLMKVLDVAV RGSPAINVAV
51 HVFRKAADDV WEPFASGKTS ESGELHGLTT EEEFVEGIYK VEIDTKSYWK
101 ALGISPFHEH AEVVFTANDS GPR**RYTIAAL LSPYSYSTIA VVINPKE**

도면3r

[gi|180249](#) Mass: 98321 Score: 70 Queries matched: 1
ceruloplasmin

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

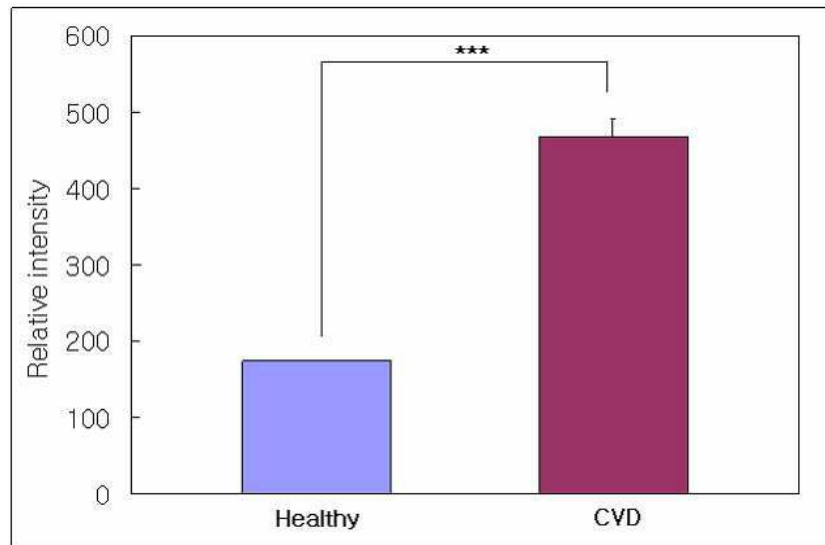
1 VVMFSVVDEN FSWYLEDNK TYCSEPEKVD KDNEDFQESN RMYSVNGYTF
51 GSLPGLSMCA EDRVKUYLFG MGNEVDVHAA FFHQALTNK NYRIDTINLF
101 PATLFDAYMV AQNPGEWMLS CQNLNHLKAG LQAFFQVQEC NKSSSKDNIR
151 GKHVRHYVIA AEEIIUNYAP SGIDIFTKEN LTAPGSDSAV FFEQGTTRIG
201 GSYKKLVYRE YTDASFTNRK ERGPEEEHLG ILGPVIAEV GDTIRVTFHN
251 KGAYPLSIEP IGVRFNKNNE GTYVSPNYPN QSRVPPSAS HVAPTETFTY
301 EWTVPKEVGP THADPVCLAK MYSAVDPTK DIFTGLIGPM KICKKGSLSHA
351 NGRQKDVDE FYLFPTVFDE NESLLEDNI RMFTTAPDQV DKEDEDFQES
401 NKMHSMMNGFM YGNQPLTMC KGDSVWVWLF SAGNEADVHG IYFSGNTYLV
451 RGERRDTANL FPQTSLLTHM WPDTEGTFNV ECLTTDHYTG GMKQKYTVNQ
501 CRRQSEDSTF YLGERTYYIA AVEVEWDYSP QREWEKELHH LQEQNVSNF
551 LDKGEFYIGS KYKKVVYRQY TDSTFRVPVE RKAEEHHLGI LGPOLHADVG
601 DKVKIIFKNM ATRPYSIAH GVQTESSTVT PTLPGETLTY VWKIPERSGA
651 GTEDSACIPW AYYSTVDQVK DLYSGLIGPL IVCRRPYLKV FNPRRKLEFA
701 LLFLVFDENE SWYLDNINIKT YSDHPEKVNK DDEEFIESNK MHAINGRMFG
751 NLQGLTMHVG DEVNWYLMGM GNEIDLHTVH FHGHSFQYKH RGVYSSDVFD
801 IFPGTYQTLE MFPRTPGIWL LHCHVTDHIH AGMETTYTVL QNEGEYPTK
851 SG

```

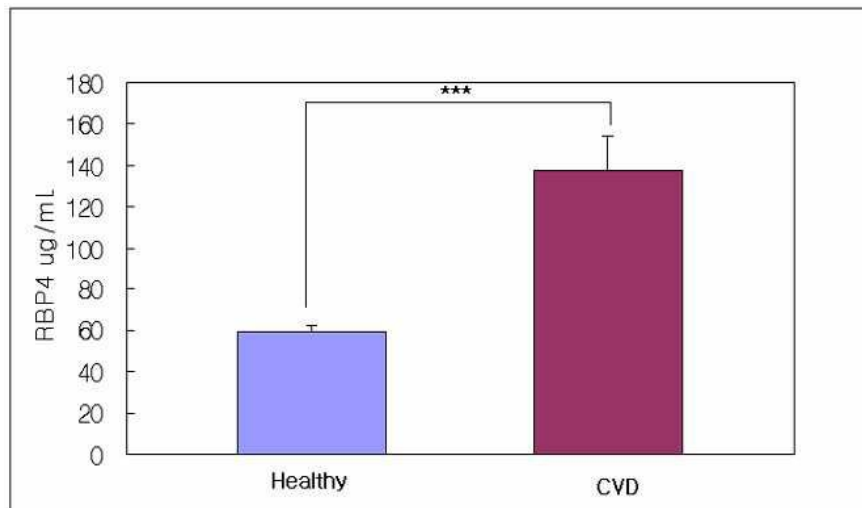
도면4a



도면4b



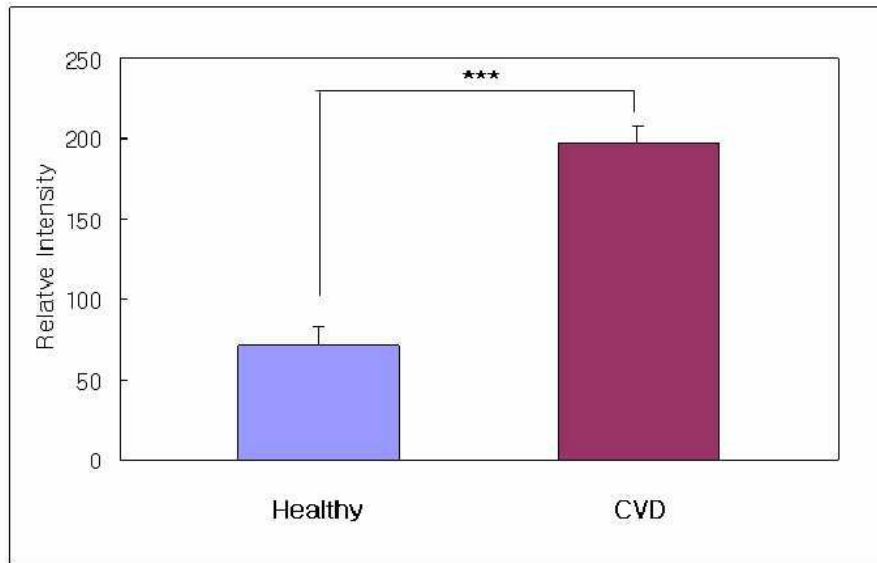
도면5



도면6a



도면6b



서열 목록

<110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation
 <120> Bio-marker for diagnosing Cardiovascular disease

<160> 18

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 Ala Arg Val Leu Gly Ala Pro Val Ala Leu Gly Leu Trp Ser Leu Cys
 1 5 10 15

Trp Ser Leu Ala Ile Ala Thr Pro Leu Pro Pro Thr Ser Ala His Gly
 20 25 30

Asn Val Ala Glu Gly Glu Thr Lys Pro Asp Pro Asp Val Thr Glu Arg
 35 40 45

Cys Ser Asp Gly Trp Ser Phe Asp Ala Thr Thr Leu Asp Asp Asn Gly
 50 55 60

Thr Met Leu Phe Phe Lys Gly Glu Phe Val Trp Lys Ser His Lys Trp

65	70	75	80
Asp Arg Glu Leu Ile Ser Glu Arg Trp Lys Asn Phe Pro Ser Pro Val	85	90	95
Asp Ala Ala Phe Arg Gln Gly His Asn Ser Val Phe Leu Ile Lys Gly	100	105	110
Asp Lys Val Trp Val Tyr Pro Pro Glu Lys Lys Glu Lys Gly Tyr Pro	115	120	125
Lys Leu Leu Gln Asp Glu Phe Pro Gly Ile Pro Ser Pro Leu Asp Ala	130	135	140
Ala Val Glu Cys His Arg Gly Glu Cys Gln Ala Glu Gly Val Leu Phe	145	150	155
Phe Gln Gly Asp Arg Glu Trp Phe Trp Asp Leu Ala Thr Gly Thr Met	165	170	175
Lys Glu Arg Ser Trp Pro Ala Val Gly Asn Cys Ser Ser Ala Leu Arg	180	185	190
Trp Leu Gly Arg Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Asn Gln Phe Leu Arg Phe	195	200	205
Asp Pro Val Arg Gly Glu Val Pro Pro Arg Tyr Pro Arg Asp Val Arg	210	215	220
Asp Tyr Phe Met Pro Cys Pro Gly Arg Gly His Gly His Arg Asn Gly	225	230	235
Thr Gly His Gly Asn Ser Thr His His Gly Pro Glu Tyr Met Arg Cys	245	250	255
Ser Pro His Leu Val Leu Ser Ala Leu Thr Ser Asp Asn His Gly Ala	260	265	270
Thr Tyr Ala Phe Ser Gly Thr His Tyr Trp Arg Leu Asp Thr Ser Arg	275	280	285
Asp Gly Trp His Ser Trp Pro Ile Ala His Gln Trp Pro Gln Gly Pro	290	295	300

Ser Ala Val Asp Ala Ala Phe Ser Trp Glu Glu Lys Leu Tyr Leu Val
305 310 315 320

Gln Gly Thr Gln Val Tyr Val Phe Leu Thr Lys Gly Gly Tyr Thr Leu
325 330 335

Val Ser Gly Tyr Pro Lys Arg Leu Glu Lys Glu Val Gly Thr Pro His
340 345 350

Gly Ile Ile Leu Asp Ser Val Asp Ala Ala Phe Ile Cys Pro Gly Ser
355 360 365

Ser Arg Leu His Ile Met Ala Gly Arg Arg Leu Trp Trp Leu Asp Leu
370 375 380

Lys Ser Gly Ala Gln Ala Thr Trp Thr Glu Leu Pro Trp Pro His Glu
385 390 395 400

Lys Val Asp Gly Ala Leu Cys Met Glu Lys Ser Leu Gly Pro Asn Ser
405 410 415

Cys Ser Ala Asn Gly Pro Gly Leu Tyr Leu Ile His Gly Pro Asn Leu
420 425 430

Tyr Cys Tyr Ser Asp Val Glu Lys Leu Asn Ala Ala Lys Ala Leu Pro
435 440 445

Gln Pro Gln Asn Val Thr Ser Leu Leu Gly Cys Thr His
450 455 460

<210> 2
<211> 345
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Ala Leu Gly Ala Val Ile Ala Leu Leu Leu Trp Gly Gln Leu Phe Ala
1 5 10 15

Val Asp Ser Gly Asn Asp Val Thr Asp Ile Ala Asp Asp Gly Cys Pro
20 25 30

Lys Pro Pro Glu Ile Ala His Gly Tyr Val Glu His Ser Val Arg Tyr
35 40 45

Gln Cys Lys Asn Tyr Tyr Lys Leu Arg Thr Glu Gly Asp Gly Val Tyr
50 55 60

Thr Leu Asn Asp Lys Lys Gln Trp Ile Asn Lys Ala Val Gly Asp Lys
65 70 75 80

Leu Pro Glu Cys Glu Ala Val Cys Gly Lys Pro Lys Asn Pro Ala Asn
85 90 95

Pro Val Gln Arg Ile Leu Gly Gly His Leu Asp Ala Ile Gly Ser Phe
100 105 110

Pro Trp Gln Ala Lys Met Val Ser Arg His Asn Leu Thr Thr Gly Ala
115 120 125

Thr Leu Ile Asn Glu Gln Trp Leu Leu Thr Thr Ala Lys Asn Leu Phe
130 135 140

Leu Asn His Ser Glu Asn Ala Thr Ala Lys Asp Ile Ala Pro Thr Leu
145 150 155 160

Thr Leu Tyr Val Gly Lys Lys Gln Leu Val Glu Ile Glu Lys Val Val
165 170 175

Leu His Pro Asn Tyr Ser Gln Val Asp Ile Gly Leu Ile Lys Leu Lys
180 185 190

Gln Lys Val Ser Val Asn Glu Arg Val Met Pro Ile Cys Leu Pro Ser
195 200 205

Lys Asp Tyr Ala Glu Val Gly Arg Leu Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly
210 215 220

Arg Asn Ala Asn Phe Lys Phe Thr Asp His Leu Lys Tyr Val Met Leu
225 230 235 240

Pro Val Ala Asp Gln Asp Gln Cys Ile Arg His Tyr Glu Gly Ser Thr
245 250 255

Val Pro Glu Lys Lys Thr Pro Lys Ser Pro Val Gly Val Gln Pro Ile
260 265 270

Leu Asn Lys His Thr Phe Cys Ala Gly Met Ser Lys Tyr Gln Glu Asp
275 280 285

Thr Cys Tyr Gly Asp Ala Gly Ser Ala Phe Ala Val His Asp Leu Glu
290 295 300

Glu Asp Thr Trp Tyr Ala Ala Gly Ile Leu Ser Phe Asp Lys Ser Cys
305 310 315 320

Ala Val Ala Glu Tyr Gly Val Tyr Val Lys Val Thr Ser Ile Gln Asp
325 330 335

Trp Val Gln Lys Thr Ile Ala Glu Asn
340 345

<210> 3
<211> 352
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Met Arg Ser Leu Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ala Cys Leu Ala
1 5 10 15

Val Ser Ala Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln
20 25 30

Glu Asn Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala
35 40 45

Ile Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr
50 55 60

Val Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser
65 70 75 80

Met Thr Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly
85 90 95

Ala Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser
100 105 110

Lys Trp Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp
115 120 125

Glu Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro
130 135 140

Thr Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr
145 150 155 160

Leu Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu
165 170 175

Asp Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu
180 185 190

Gln Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg Val Arg Arg Ala Val Leu
195 200 205

Pro Gln Glu Glu Glu Gly Ser Gly Gly Gly Gln Leu Val Thr Glu Val
210 215 220

Thr Lys Lys Glu Asp Ser Cys Gln Leu Gly Tyr Ser Ala Gly Pro Cys
225 230 235 240

Met Gly Met Thr Ser Arg Tyr Phe Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Cys
245 250 255

Glu Thr Phe Gln Tyr Gly Gly Cys Met Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val
260 265 270

Thr Glu Lys Glu Cys Leu Gln Thr Cys Arg Thr Val Ala Ala Cys Asn
275 280 285

Leu Pro Ile Val Arg Gly Pro Cys Arg Ala Phe Ile Gln Leu Trp Ala
290 295 300

Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Val Leu Phe Pro Tyr Gly Gly Cys
305 310 315 320

Gln Gly Asn Gly Asn Lys Phe Tyr Ser Glu Lys Glu Cys Arg Glu Tyr
325 330 335

Cys Gly Val Pro Gly Asp Gly Asp Glu Glu Leu Leu Arg Phe Ser Asn
340 345 350

<210> 4
 <211> 202
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Glu Leu Trp Gly Ala Tyr Leu Leu Leu Cys Leu Phe Ser Leu Leu
 1 5 10 15

Thr Gln Val Thr Thr Glu Pro Pro Thr Gln Lys Pro Lys Lys Ile Val
 20 25 30

Asn Ala Lys Lys Asp Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu Leu Lys
 35 40 45

Ser Arg Leu Asp Thr Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys Glu Gln
 50 55 60

Gln Ala Leu Gln Thr Val Cys Leu Lys Gly Thr Lys Val His Met Lys
 65 70 75 80

Cys Phe Leu Ala Phe Thr Gln Thr Lys Thr Phe His Glu Ala Ser Glu
 85 90 95

Asp Cys Ile Ser Arg Gly Gly Thr Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Ser
 100 105 110

Glu Asn Asp Ala Leu Tyr Glu Tyr Leu Arg Gln Ser Val Gly Asn Glu
 115 120 125

Ala Glu Ile Trp Leu Gly Leu Asn Asp Met Ala Ala Glu Gly Thr Trp
 130 135 140

Val Asp Met Thr Gly Ala Arg Ile Ala Tyr Lys Asn Trp Glu Thr Glu
 145 150 155 160

Ile Thr Ala Gln Pro Asp Gly Gly Lys Thr Glu Asn Cys Ala Val Leu
 165 170 175

Ser Gly Ala Ala Asn Gly Lys Trp Phe Asp Lys Arg Cys Arg Asp Gln

180 185 190
 Leu Pro Tyr Ile Cys Gln Phe Gly Ile Val
 195 200

 <210> 5
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 5
 Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe
 1 5 10 15

 Asx Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser
 20 25 30

 Thr Cys Pro Leu Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val Ser Thr Leu Val
 35 40 45

 Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr Arg
 50 55 60

 Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr
 65 70 75 80

 Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asx Ile Thr
 85 90 95

 Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala Ile Phe
 100 105 110

 Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr Ala Lys
 115 120 125

 Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln Asp Phe
 130 135 140

 Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile Phe Thr
 145 150 155 160

 Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro Glu Pro
 165 170 175

Ile Leu Ile Pro Arg
180

<210> 6
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Met Ser Ala Leu Gly Ala Val Ile Ala Leu Leu Leu Trp Gly Gln Leu
1 5 10 15

Phe Ala Val Asp Ser Gly Asn Asp Val Thr Asp Ile Ala Asp Asp Gly
20 25 30

Cys Pro Lys Pro Pro Glu Ile Ala His Gly Tyr Val Glu His Ser Val
35 40 45

Arg Tyr Gln Cys Lys Asn Tyr Tyr Lys Leu Arg Thr Glu Gly Asp Gly
50 55 60

Val Tyr Thr Leu Asn Asn Lys Lys Gln Trp Ile Asn Lys Ala Val Gly
65 70 75 80

Asp Lys Leu Pro Glu Cys Glu Ala Asp Asp Gly Cys Pro Lys Pro Pro
85 90 95

Glu Ile Ala His Gly Tyr Val Glu His Ser Val Arg Tyr Gln Cys Lys
100 105 110

Asn Tyr Tyr Lys Leu Arg Thr Glu Gly Asp Gly Val Tyr Thr Leu Asn
115 120 125

Asn Glu Lys Gln Trp Ile Asn Lys Ala Val Gly Asp Lys Leu Pro Glu
130 135 140

Cys Glu Ala Val Cys Gly Lys Pro Lys Asn Pro Ala Asn Pro Val Gln
145 150 155 160

Arg Ile Leu Gly Gly His Leu Asp Ala Lys Gly Ser Phe Pro Trp Gln
165 170 175

Ala Lys Met Val Ser His His Asn Leu Thr Thr Gly Ala Thr Leu Ile
180 185 190

Asn Glu Gln Trp Leu Leu Thr Thr Ala Lys Asn Leu Phe Leu Asn His
195 200 205

Ser Glu Asn Ala Thr Ala Lys Asp Ile Ala Pro Thr Leu Thr Leu Tyr
210 215 220

Val Gly Lys Lys Gln Leu Val Glu Ile Glu Lys Val Val Leu His Pro
225 230 235 240

Asn Tyr Ser Gln Val Asp Ile Gly Leu Ile Lys Leu Lys Gln Lys Val
245 250 255

Ser Val Asn Glu Arg Val Met Pro Ile Cys Leu Pro Ser Lys Asp Tyr
260 265 270

Ala Glu Val Gly Arg Val Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Asn Ala
275 280 285

Asn Phe Lys Phe Thr Asp His Leu Lys Tyr Val Met Leu Pro Val Ala
290 295 300

Asp Gln Asp Gln Cys Ile Arg His Tyr Glu Gly Ser Thr Val Pro Glu
305 310 315 320

Lys Lys Thr Pro Lys Ser Pro Val Gly Val Gln Pro Ile Leu Asn Glu
325 330 335

His Thr Phe Cys Ala Gly Met Ser Lys Tyr Gln Glu Asp Thr Cys Tyr
340 345 350

Gly Asp Ala Gly Ser Ala Phe Ala Val His Asp Leu Glu Glu Asp Thr
355 360 365

Trp Tyr Ala Thr Gly Ile Leu Ser Phe Asp Lys Ser Cys Ala Val Ala
370 375 380

Glu Tyr Gly Val Tyr Val Lys Val Thr Ser Ile Gln Asp Trp Val Gln
385 390 395 400

Lys Thr Ile Ala Glu Asn
405

<210> 7
 <211> 200
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Ile Val Gly Gly Lys Arg Ala Gln Leu Gly Asp Leu Pro Trp Gln Val
 1 5 10 15

Ala Ile Lys Asp Ala Ser Gly Ile Thr Cys Gly Gly Ile Tyr Ile Gly
 20 25 30

Ile Ile Phe His Glu Asn Tyr Asn Ala Gly Glu Thr Tyr Gln Asn Asp
 35 40 45

Ile Ala Leu Ile Met Lys Lys Asp Gly Asn Lys Lys Asp Cys Glu Leu
 50 55 60

Pro Arg Ser Ile Pro Ala Cys Val Pro Trp Ser Pro Tyr Leu Phe Gln
 65 70 75 80

Pro Asn Asp Thr Cys Ile Val Ser Gly Trp Gly Arg Glu Lys Asp Asn
 85 90 95

Glu Arg Val Phe Ser Leu Gln Trp Gly Glu Val Lys Leu Ile Ser Asn
 100 105 110

Cys Ser Lys Phe Tyr Gly Asn Arg Phe Tyr Glu Lys Glu Met Glu Cys
 115 120 125

Ala Gly Thr Tyr Asp Gly Ser Ile Asp Ala Cys Lys Gly Asp Ser Gly
 130 135 140

Gly Pro Leu Val Cys Met Asp Ala Asn Asn Val Thr Tyr Val Trp Gly
 145 150 155 160

Val Val Ser Trp Gly Glu Asn Cys Gly Lys Pro Glu Phe Pro Gly Val
 165 170 175

Tyr Thr Lys Val Ala Asn Tyr Phe Asp Trp Ile Ser Tyr His Val Gly
 180 185 190

Arg Pro Phe Ile Ser Gln Tyr Asn
195 200

<210> 8
<211> 930
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Met Lys Pro Pro Arg Pro Val Arg Thr Cys Ser Lys Val Leu Val Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Leu Ala Ile His Gln Thr Thr Thr Ala Glu Lys Asn Gly
20 25 30

Ile Asp Ile Tyr Ser Leu Thr Val Asp Ser Arg Val Ser Ser Arg Phe
35 40 45

Ala His Thr Val Val Thr Ser Arg Val Val Asn Arg Ala Asn Thr Val
50 55 60

Gln Glu Ala Thr Phe Gln Met Glu Leu Pro Lys Lys Ala Phe Ile Thr
65 70 75 80

Asn Phe Ser Met Asn Ile Asp Gly Met Thr Tyr Pro Gly Ile Ile Lys
85 90 95

Glu Lys Ala Glu Ala Gln Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Val Ala Lys Gly
100 105 110

Lys Asn Ala Gly Leu Val Lys Ala Thr Gly Arg Asn Met Glu Gln Phe
115 120 125

Gln Val Ser Val Ser Val Ala Pro Asn Ala Lys Ile Thr Phe Glu Leu
130 135 140

Val Tyr Glu Glu Leu Leu Lys Arg Arg Leu Gly Val Tyr Glu Leu Leu
145 150 155 160

Leu Lys Val Arg Pro Gln Gln Leu Val Lys His Leu Gln Met Asp Ile
165 170 175

His Ile Phe Glu Pro Gln Gly Ile Ser Phe Leu Glu Thr Glu Ser Thr

180	185	190
Phe Met Thr Asn Gln Leu Val Asp Ala Leu Thr Thr Trp Gln Asn Lys		
195	200	205
Thr Lys Ala His Ile Arg Phe Lys Pro Thr Leu Ser Gln Gln Gln Lys		
210	215	220
Ser Pro Glu Gln Gln Glu Thr Val Leu Asp Gly Asn Leu Ile Ile Arg		
225	230	235 240
Tyr Asp Val Asp Arg Ala Ile Ser Gly Gly Ser Ile Gln Ile Glu Asn		
245	250	255
Gly Tyr Phe Val His Tyr Phe Ala Pro Glu Gly Leu Thr Thr Met Pro		
260	265	270
Lys Asn Val Val Phe Val Ile Asp Lys Ser Gly Ser Met Ser Gly Arg		
275	280	285
Lys Ile Gln Gln Thr Arg Glu Ala Leu Ile Lys Ile Leu Asp Asp Leu		
290	295	300
Ser Pro Arg Asp Gln Phe Asn Leu Ile Val Phe Ser Thr Glu Ala Thr		
305	310	315 320
Gln Trp Arg Pro Ser Leu Val Pro Ala Ser Ala Glu Asn Val Asn Lys		
325	330	335
Ala Arg Ser Phe Ala Ala Gly Ile Gln Ala Leu Gly Gly Thr Asn Ile		
340	345	350
Asn Asp Ala Met Leu Met Ala Val Gln Leu Leu Asp Ser Ser Asn Gln		
355	360	365
Glu Glu Arg Leu Pro Glu Gly Ser Val Ser Leu Ile Ile Leu Leu Thr		
370	375	380
Asp Gly Asp Pro Thr Val Gly Glu Thr Asn Pro Arg Ser Ile Gln Asn		
385	390	395 400
Asn Val Arg Glu Ala Val Ser Gly Arg Tyr Ser Leu Phe Cys Leu Gly		
405	410	415

Phe Gly Phe Asp Val Ser Tyr Ala Phe Leu Glu Lys Leu Ala Leu Asp
420 425 430

Asn Gly Gly Leu Ala Arg Arg Ile His Glu Asp Ser Asp Ser Ala Leu
435 440 445

Gln Leu Gln Asp Phe Tyr Gln Glu Val Ala Asn Pro Leu Leu Thr Ala
450 455 460

Val Thr Phe Glu Tyr Pro Ser Asn Ala Val Glu Glu Val Thr Gln Asn
465 470 475 480

Asn Phe Arg Leu Leu Phe Lys Gly Ser Glu Met Val Val Ala Gly Lys
485 490 495

Leu Gln Asp Arg Gly Pro Asp Val Leu Thr Ala Thr Val Ser Gly Lys
500 505 510

Leu Pro Thr Gln Asn Ile Thr Phe Gln Thr Glu Ser Ser Val Ala Glu
515 520 525

Gln Glu Ala Glu Phe Gln Ser Pro Lys Tyr Ile Phe His Asn Phe Met
530 535 540

Glu Arg Leu Trp Ala Tyr Leu Thr Ile Gln Gln Leu Leu Glu Gln Thr
545 550 555 560

Val Ser Ala Ser Asp Ala Asp Gln Gln Ala Leu Arg Asn Gln Ala Leu
565 570 575

Asn Leu Ser Leu Ala Tyr Ser Phe Val Thr Pro Leu Thr Ser Met Val
580 585 590

Val Thr Lys Pro Asp Asp Gln Glu Gln Ser Gln Val Ala Glu Lys Pro
595 600 605

Met Glu Gly Glu Ser Arg Asn Arg Asn Val His Ser Gly Ser Thr Phe
610 615 620

Phe Lys Tyr Tyr Leu Gln Gly Ala Lys Ile Pro Lys Pro Glu Ala Ser
625 630 635 640

Phe Ser Pro Arg Arg Gly Trp Asn Arg Gln Ala Gly Ala Ala Gly Ser
645 650 655

Arg Met Asn Phe Arg Pro Gly Val Leu Ser Ser Arg Gln Leu Gly Leu
660 665 670

Pro Gly Pro Pro Asp Val Pro Asp His Ala Ala Tyr His Pro Phe Arg
675 680 685

Arg Leu Ala Ile Leu Pro Ala Ser Ala Pro Pro Ala Thr Ser Asn Pro
690 695 700

Asp Pro Ala Val Ser Arg Val Met Asn Met Lys Ile Glu Glu Thr Thr
705 710 715 720

Met Thr Thr Gln Thr Pro Ala Pro Ile Gln Ala Pro Ser Ala Ile Leu
725 730 735

Pro Leu Pro Gly Gln Ser Val Glu Arg Leu Cys Val Asp Pro Arg His
740 745 750

Arg Gln Gly Pro Val Asn Leu Leu Ser Asp Pro Glu Gln Gly Val Glu
755 760 765

Val Thr Gly Gln Tyr Glu Arg Glu Lys Ala Gly Phe Ser Trp Ile Glu
770 775 780

Val Thr Phe Lys Asn Pro Leu Val Trp Val His Ala Ser Pro Glu His
785 790 795 800

Val Val Val Thr Arg Asn Arg Arg Ser Ser Ala Tyr Lys Trp Lys Glu
805 810 815

Thr Leu Phe Ser Val Met Pro Gly Leu Lys Met Thr Met Asp Lys Thr
820 825 830

Gly Leu Leu Leu Leu Ser Asp Pro Asp Lys Val Thr Ile Gly Leu Leu
835 840 845

Phe Trp Asp Gly Arg Gly Glu Gly Leu Arg Leu Leu Leu Arg Asp Thr
850 855 860

Asp Arg Phe Ser Ser His Val Gly Gly Thr Leu Gly Gln Phe Tyr Gln
865 870 875 880

Glu Val Leu Trp Gly Ser Pro Ala Ala Ser Asp Asp Gly Arg Arg Thr

885

890

895

Leu Arg Val Gln Gly Asn Asp His Ser Ala Thr Arg Glu Arg Arg Leu
900 905 910

Asp Tyr Gln Glu Gly Pro Pro Gly Val Glu Ile Ser Cys Trp Ser Val
915 920 925

Glu Leu
930

<210> 9
<211> 223
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Met Asn Lys Pro Leu Leu Trp Ile Ser Val Leu Thr Ser Leu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Phe Ala His Thr Asp Leu Ser Gly Lys Val Phe Val Phe Pro Arg
20 25 30

Glu Ser Val Thr Asp His Val Asn Leu Ile Thr Pro Leu Glu Lys Pro
35 40 45

Leu Gln Asn Phe Thr Leu Cys Phe Arg Ala Tyr Ser Asp Leu Ser Arg
50 55 60

Ala Tyr Ser Leu Phe Ser Tyr Asn Thr Gln Gly Arg Asp Asn Glu Leu
65 70 75 80

Leu Val Tyr Lys Glu Arg Val Gly Glu Tyr Ser Leu Tyr Ile Gly Arg
85 90 95

His Lys Val Thr Pro Lys Val Ile Glu Lys Phe Pro Ala Pro Val His
100 105 110

Ile Cys Val Ser Trp Glu Ser Ser Ser Gly Ile Ala Glu Phe Trp Ile
115 120 125

Asn Gly Thr Pro Leu Val Lys Lys Gly Leu Arg Gln Gly Tyr Phe Val
130 135 140

Glu Ala Gln Pro Lys Ile Val Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ser Tyr Gly
145 150 155 160

Gly Lys Phe Asp Arg Ser Gln Ser Phe Val Gly Glu Ile Gly Asp Leu
165 170 175

Tyr Met Trp Asp Ser Val Leu Pro Pro Glu Asn Ile Leu Ser Ala Tyr
180 185 190

Gln Gly Thr Pro Leu Pro Ala Asn Ile Leu Asp Trp Gln Ala Leu Asn
195 200 205

Tyr Glu Ile Arg Gly Tyr Val Ile Ile Lys Pro Leu Val Trp Val
210 215 220

<210> 10
<211> 147
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Met Ala Ser His Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Ala Gly Leu Val Phe
1 5 10 15

Val Ser Glu Ala Gly Pro Thr Gly Thr Gly Glu Ser Lys Cys Pro Leu
20 25 30

Met Val Lys Val Leu Asp Ala Val Arg Gly Ser Pro Ala Ile Asn Val
35 40 45

Ala Met His Val Phe Arg Lys Ala Ala Asp Asp Thr Trp Glu Pro Phe
50 55 60

Ala Ser Gly Lys Thr Ser Glu Ser Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr
65 70 75 80

Glu Glu Glu Phe Val Glu Gly Ile Tyr Lys Val Glu Ile Asp Thr Lys
85 90 95

Ser Tyr Trp Lys Ala Leu Gly Ile Ser Pro Phe His Glu His Ala Glu

100 105 110

Val Val Phe Thr Ala Asn Asp Ser Gly Pro Arg Arg Tyr Thr Ile Ala
115 120 125

Ala Leu Leu Ser Pro Tyr Ser Tyr Ser Thr Thr Ala Val Val Thr Asn
130 135 140

Pro Lys Glu
145

<210> 11
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11
Met Trp Leu Leu Val Ser Val Ile Leu Ile Ser Arg Ile Ser Ser Val
1 5 10 15

Gly Gly Glu Ala Thr Phe Cys Asp Phe Pro Lys Ile Asn His Gly Ile
20 25 30

Leu Tyr Asp Glu Glu Lys Tyr Lys Pro Phe Ser Gln Val Pro Thr Gly
35 40 45

Glu Val Phe Tyr Tyr Ser Cys Glu Tyr Asn Phe Val Ser Pro Ser Lys
50 55 60

Ser Phe Trp Thr Arg Ile Thr Cys Thr Glu Glu Gly Trp Ser Pro Thr
65 70 75 80

Pro Lys Cys Leu Arg Leu Cys Phe Phe Pro Phe Val Glu Asn Gly His
85 90 95

Ser Glu Ser Ser Gly Gln Thr His Leu Glu Gly Asp Thr Val Gln Ile
100 105 110

Ile Cys Asn Thr Gly Tyr Arg Leu Gln Asn Asn Glu Asn Asn Ile Ser
115 120 125

Cys Val Glu Arg Gly Trp Ser Thr Pro Pro Lys Cys Arg Ser Thr Asp
130 135 140

Thr Ser Cys Val Asn Pro Pro Thr Val Gln Asn Ala Tyr Ile Val Ser
145 150 155 160

Arg Gln Met Ser Lys Tyr Pro Ser Gly Glu Arg Val Arg Tyr Gln Cys
165 170 175

Arg Ser Pro Tyr Glu Met Phe Gly Asp Glu Glu Val Met Cys Leu Asn
180 185 190

Gly Asn Trp Thr Glu Pro Pro Gln Cys Lys Asp Ser Thr Gly Lys Cys
195 200 205

Gly Pro Pro Pro Pro Ile Asp Asn Gly Asp Ile Thr Ser Phe Pro Leu
210 215 220

Ser Val Tyr Ala Pro Ala Ser Ser Val Glu Tyr Gln Cys Gln Asn Leu
225 230 235 240

Tyr Gln Leu Glu Gly Asn Lys Arg Ile Thr Cys Arg Asn Gly Gln Trp
245 250 255

Ser Glu Pro Pro Lys Cys Leu His Pro Cys Val Ile Ser Arg Glu Ile
260 265 270

Met Glu Asn Tyr Asn Ile Ala Leu Arg Trp Thr Ala Lys Gln Lys Leu
275 280 285

Tyr Leu Arg Thr Gly Glu Ser Ala Glu Phe Val Cys Lys Arg Gly Tyr
290 295 300

Arg Leu Ser Ser Arg Ser His Thr Leu Arg Thr Thr Cys Trp Asp Gly
305 310 315 320

Lys Leu Glu Tyr Pro Thr Cys Ala Lys Arg
325 330

<210> 12
<211> 385
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Met His Val Cys Val Cys Val Cys Val Cys Val Tyr Met Pro Val Cys
1 5 10 15

Val Asp Ala Cys Met Cys Cys Glu Ala Gly Arg Pro Ala Phe Arg Ser
20 25 30

Phe Leu Phe Ser Leu Cys Ser Asp Leu Gly Ala Val Ile Ser Leu Leu
35 40 45

Leu Trp Gly Arg Gln Leu Phe Ala Leu Tyr Ser Gly Asn Asp Val Thr
50 55 60

Asp Ile Ser Asp Asp Arg Phe Pro Lys Pro Pro Glu Ile Ala Asn Gly
65 70 75 80

Tyr Val Glu His Leu Phe Arg Tyr Gln Cys Lys Asn Tyr Tyr Arg Leu
85 90 95

Arg Thr Glu Gly Asp Gly Val Tyr Thr Leu Asn Asp Lys Lys Gln Trp
100 105 110

Ile Asn Lys Ala Val Gly Asp Lys Leu Pro Glu Cys Glu Ala Val Cys
115 120 125

Gly Lys Pro Lys Asn Pro Ala Asn Pro Val Gln Arg Ile Leu Gly Gly
130 135 140

His Leu Asp Ala Lys Gly Ser Phe Pro Trp Gln Ala Lys Met Val Ser
145 150 155 160

His His Asn Leu Thr Thr Gly Ala Thr Leu Ile Asn Glu Gln Trp Leu
165 170 175

Leu Thr Thr Ala Lys Asn Leu Phe Leu Asn His Ser Glu Asn Ala Thr
180 185 190

Ala Lys Asp Ile Ala Pro Thr Leu Thr Leu Tyr Val Gly Lys Lys Gln
195 200 205

Leu Val Glu Ile Glu Lys Val Val Leu His Pro Asn Tyr His Gln Val
210 215 220

Asp Ile Gly Leu Ile Lys Leu Lys Gln Lys Val Leu Val Asn Glu Arg
225 230 235 240

Val Met Pro Ile Cys Leu Pro Ser Lys Asn Tyr Ala Glu Val Gly Arg
245 250 255

Val Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Gln Ser Asp Asn Phe Lys Leu Thr
260 265 270

Asp His Leu Lys Tyr Val Met Leu Pro Val Ala Asp Gln Tyr Asp Cys
275 280 285

Ile Thr His Tyr Glu Gly Ser Thr Cys Pro Lys Trp Lys Ala Pro Lys
290 295 300

Ser Pro Val Gly Val Gln Pro Ile Leu Asn Glu His Thr Phe Cys Val
305 310 315 320

Gly Met Ser Lys Tyr Gln Glu Asp Thr Cys Tyr Gly Asp Ala Gly Ser
325 330 335

Ala Phe Ala Val His Asp Leu Glu Glu Asp Thr Trp Tyr Ala Ala Gly
340 345 350

Ile Leu Ser Phe Asp Lys Ser Cys Ala Val Ala Glu Tyr Gly Val Tyr
355 360 365

Val Lys Val Thr Ser Ile Gln His Trp Val Gln Lys Thr Ile Ala Glu
370 375 380

Asn
385

<210> 13
<211> 428
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Gly Gln Tyr Ala Ser Pro Thr Ala Lys Arg Cys Cys Gln Asp Gly Val
1 5 10 15

Thr Arg Leu Pro Met Met Ser Ser Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Val
20 25 30

Gln Gln Pro Asp Cys Arg Glu Pro Phe Leu Ser Cys Cys Gln Phe Ala
35 40 45

Glu Ser Leu Arg Lys Lys Ser Arg Asp Lys Gly Gln Ala Gly Leu Gln
50 55 60

Arg Ala Leu Glu Ile Leu Gln Glu Glu Asp Leu Ile Asp Glu Asp Asp
65 70 75 80

Ile Pro Val Arg Ser Phe Phe Pro Glu Asn Trp Leu Trp Arg Val Glu
85 90 95

Thr Val Asp Arg Phe Gln Ile Leu Thr Leu Trp Leu Pro Asp Ser Leu
100 105 110

Thr Thr Trp Glu Ile His Gly Leu Ser Leu Ser Lys Thr Lys Gly Leu
115 120 125

Cys Val Ala Thr Pro Val Gln Leu Arg Val Phe Arg Glu Phe His Leu
130 135 140

His Leu Arg Leu Pro Met Ser Val Arg Arg Phe Glu Gln Leu Glu Leu
145 150 155 160

Arg Pro Val Leu Tyr Asn Tyr Leu Asp Lys Asn Leu Thr Val Ser Val
165 170 175

His Val Ser Pro Val Glu Gly Leu Cys Leu Ala Gly Gly Gly Gly Leu
180 185 190

Ala Gln Gln Val Leu Val Pro Ala Gly Ser Ala Arg Pro Val Ala Phe
195 200 205

Ser Val Val Pro Thr Ala Ala Ala Ala Val Ser Leu Lys Val Val Ala
210 215 220

Arg Gly Ser Phe Glu Phe Pro Val Gly Asp Ala Val Ser Lys Val Leu
225 230 235 240

Gln Ile Glu Lys Glu Gly Ala Ile His Arg Glu Glu Leu Val Tyr Glu
245 250 255

Leu Asn Pro Leu Asp His Arg Gly Arg Thr Leu Glu Ile Pro Gly Asn
260 265 270

Ser Asp Pro Asn Met Ile Pro Asp Gly Asp Phe Asn Ser Tyr Val Arg
275 280 285

Val Thr Ala Ser Asp Pro Leu Asp Thr Leu Gly Ser Glu Gly Ala Leu
290 295 300

Ser Pro Gly Gly Val Ala Ser Leu Leu Arg Leu Pro Arg Gly Cys Gly
305 310 315 320

Glu Gln Thr Met Ile Tyr Leu Ala Pro Thr Leu Ala Ala Ser Arg Tyr
325 330 335

Leu Asp Lys Thr Glu Gln Trp Ser Thr Leu Pro Pro Glu Thr Lys Asp
340 345 350

His Ala Val Asp Leu Ile Gln Lys Gly Tyr Met Arg Ile Gln Gln Phe
355 360 365

Arg Lys Ala Asp Gly Ser Tyr Ala Ala Trp Leu Ser Arg Gly Ser Ser
370 375 380

Thr Trp Leu Thr Ala Phe Val Leu Lys Val Leu Ser Leu Ala Gln Glu
385 390 395 400

Gln Val Gly Gly Ser Pro Glu Lys Leu Gln Glu Thr Ser Asn Trp Leu
405 410 415

Leu Ser Gln Gln Gln Ala Asp Gly Ser Phe Gln Asp
420 425

<210> 14
<211> 418
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Met Gln Ala Leu Val Leu Leu Leu Cys Ile Gly Ala Leu Leu Gly His
1 5 10 15

Ser Ser Cys Gln Asn Pro Ala Ser Pro Pro Glu Glu Gly Ser Pro Asp
20 25 30

Pro Asp Ser Thr Gly Ala Leu Val Glu Glu Glu Asp Pro Phe Phe Lys
35 40 45

Val Pro Val Asn Lys Leu Ala Ala Ala Val Ser Asn Phe Gly Tyr Asp
50 55 60

Leu Tyr Arg Val Arg Ser Ser Met Ser Pro Thr Thr Asn Val Leu Leu
65 70 75 80

Ser Pro Leu Ser Val Ala Thr Ala Leu Ser Ala Leu Ser Leu Gly Ala
85 90 95

Asp Glu Arg Thr Glu Ser Ile Ile His Arg Ala Leu Tyr Tyr Asp Leu
100 105 110

Ile Ser Ser Pro Asp Ile His Gly Thr Tyr Lys Glu Leu Leu Asp Thr
115 120 125

Val Thr Ala Pro Gln Lys Asn Leu Lys Ser Ala Ser Arg Ile Val Phe
130 135 140

Glu Lys Lys Leu Arg Ile Lys Ser Ser Phe Val Ala Pro Leu Glu Lys
145 150 155 160

Ser Tyr Gly Thr Arg Pro Arg Val Leu Thr Gly Asn Pro Arg Leu Asp
165 170 175

Leu Gln Glu Ile Asn Asn Trp Val Gln Ala Gln Met Lys Gly Lys Leu
180 185 190

Ala Arg Ser Thr Lys Glu Ile Pro Asp Glu Ile Ser Ile Leu Leu Leu
195 200 205

Gly Val Ala His Phe Lys Gly Gln Trp Val Thr Lys Phe Asp Ser Arg
210 215 220

Lys Thr Ser Leu Glu Asp Phe Tyr Leu Asp Glu Glu Arg Thr Val Arg
225 230 235 240

Val Pro Met Met Ser Asp Pro Lys Ala Val Leu Arg Tyr Gly Leu Asp
245 250 255

Ser Asp Leu Ser Cys Lys Ile Ala Gln Leu Pro Leu Thr Gly Ser Met
260 265 270

Ser Ile Ile Phe Phe Leu Pro Leu Lys Val Thr Gln Asn Leu Thr Leu
275 280 285

Ile Glu Glu Ser Leu Thr Ser Glu Phe Ile His Asp Ile Asp Arg Glu
290 295 300

Leu Lys Thr Val Gln Ala Val Leu Thr Val Pro Lys Leu Lys Leu Ser
305 310 315 320

Tyr Glu Gly Glu Val Thr Lys Ser Leu Gln Glu Met Lys Leu Gln Ser
325 330 335

Leu Phe Asp Ser Pro Asp Phe Ser Lys Ile Thr Gly Lys Pro Ile Lys
340 345 350

Leu Thr Gln Val Glu His Arg Ala Gly Phe Glu Trp Asn Glu Asp Gly
355 360 365

Ala Gly Thr Thr Pro Ser Pro Gly Leu Gln Pro Ala His Leu Thr Phe
370 375 380

Pro Leu Asp Tyr His Leu Asn Gln Pro Phe Ile Phe Val Leu Arg Asp
385 390 395 400

Thr Asp Thr Gly Ala Leu Leu Phe Ile Gly Lys Ile Leu Asp Pro Arg
405 410 415

Gly Pro

<210> 15
<211> 199
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15
Met Asn Tyr Ser Lys Ile Pro Ala Gln Val Asp Leu Arg Arg Gln Ala
1 5 10 15

Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp
20 25 30

Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys Asp Pro
35 40 45

Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser Val Asp
50 55 60

Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg Leu Leu
65 70 75 80

Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr Asp Thr
85 90 95

Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala Ser Phe
100 105 110

Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp Tyr Asp
115 120 125

Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp Gly Thr
130 135 140

Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn Gly Leu
145 150 155 160

Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu Leu Cys
165 170 175

Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly
180 185 190

Arg Ser Glu Arg Asn Leu Leu
195

<210> 16
<211> 249
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp Asp Arg
1 5 10 15

Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp Ser Gly

20	25	30
Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys Gln Leu		
35	40	45
Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser		
50	55	60
Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn		
65	70	75 80
Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu		
	85 90	95
Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys		
100	105	110
Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu		
115	120	125
Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln		
130	135	140
Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala		
145	150	155 160
His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu		
	165	170 175
Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly		
	180	185 190
Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr		
195	200	205
Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu		
210	215	220
Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu		
225	230	235 240
Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln		
245		

<210> 17
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 Met Ala Ser His Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Ala Gly Leu Val Phe
 1 5 10 15

Val Ser Glu Ala Gly Pro Thr Gly Thr Gly Glu Ser Lys Cys Pro Leu
 20 25 30

Met Val Lys Val Leu Asp Ala Val Arg Gly Ser Pro Ala Ile Asn Val
 35 40 45

Ala Val His Val Phe Arg Lys Ala Ala Asp Asp Thr Trp Glu Pro Phe
 50 55 60

Ala Ser Gly Lys Thr Ser Glu Ser Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr
 65 70 75 80

Glu Glu Glu Phe Val Glu Gly Ile Tyr Lys Val Glu Ile Asp Thr Lys
 85 90 95

Ser Tyr Trp Lys Ala Leu Gly Ile Ser Pro Phe His Glu His Ala Glu
 100 105 110

Val Val Phe Thr Ala Asn Asp Ser Gly Pro Arg Arg Tyr Thr Ile Ala
 115 120 125

Ala Leu Leu Ser Pro Tyr Ser Tyr Ser Thr Thr Ala Val Val Thr Asn
 130 135 140

Pro Lys Glu
 145

<210> 18
 <211> 852
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Val Val Met Phe Ser Val Val Asp Glu Asn Phe Ser Trp Tyr Leu Glu
1 5 10 15

Asp Asn Ile Lys Thr Tyr Cys Ser Glu Pro Glu Lys Val Asp Lys Asp
20 25 30

Asn Glu Asp Phe Gln Glu Ser Asn Arg Met Tyr Ser Val Asn Gly Tyr
35 40 45

Thr Phe Gly Ser Leu Pro Gly Leu Ser Met Cys Ala Glu Asp Arg Val
50 55 60

Lys Trp Tyr Leu Phe Gly Met Gly Asn Glu Val Asp Val His Ala Ala
65 70 75 80

Phe Phe His Gly Gln Ala Leu Thr Asn Lys Asn Tyr Arg Ile Asp Thr
85 90 95

Ile Asn Leu Phe Pro Ala Thr Leu Phe Asp Ala Tyr Met Val Ala Gln
100 105 110

Asn Pro Gly Glu Trp Met Leu Ser Cys Gln Asn Leu Asn His Leu Lys
115 120 125

Ala Gly Leu Gln Ala Phe Phe Gln Val Gln Glu Cys Asn Lys Ser Ser
130 135 140

Ser Lys Asp Asn Ile Arg Gly Lys His Val Arg His Tyr Tyr Ile Ala
145 150 155 160

Ala Glu Glu Ile Ile Trp Asn Tyr Ala Pro Ser Gly Ile Asp Ile Phe
165 170 175

Thr Lys Glu Asn Leu Thr Ala Pro Gly Ser Asp Ser Ala Val Phe Phe
180 185 190

Glu Gln Gly Thr Thr Arg Ile Gly Gly Ser Tyr Lys Lys Leu Val Tyr
195 200 205

Arg Glu Tyr Thr Asp Ala Ser Phe Thr Asn Arg Lys Glu Arg Gly Pro
210 215 220

Glu Glu Glu His Leu Gly Ile Leu Gly Pro Val Ile Trp Ala Glu Val
225 230 235 240

Gly Asp Thr Ile Arg Val Thr Phe His Asn Lys Gly Ala Tyr Pro Leu
245 250 255

Ser Ile Glu Pro Ile Gly Val Arg Phe Asn Lys Asn Asn Glu Gly Thr
260 265 270

Tyr Tyr Ser Pro Asn Tyr Asn Pro Gln Ser Arg Ser Val Pro Pro Ser
275 280 285

Ala Ser His Val Ala Pro Thr Glu Thr Phe Thr Tyr Glu Trp Thr Val
290 295 300

Pro Lys Glu Val Gly Pro Thr Asn Ala Asp Pro Val Cys Leu Ala Lys
305 310 315 320

Met Tyr Tyr Ser Ala Val Asp Pro Thr Lys Asp Ile Phe Thr Gly Leu
325 330 335

Ile Gly Pro Met Lys Ile Cys Lys Lys Gly Ser Leu His Ala Asn Gly
340 345 350

Arg Gln Lys Asp Val Asp Lys Glu Phe Tyr Leu Phe Pro Thr Val Phe
355 360 365

Asp Glu Asn Glu Ser Leu Leu Glu Asp Asn Ile Arg Met Phe Thr
370 375 380

Thr Ala Pro Asp Gln Val Asp Lys Glu Asp Glu Asp Phe Gln Glu Ser
385 390 395 400

Asn Lys Met His Ser Met Asn Gly Phe Met Tyr Gly Asn Gln Pro Gly
405 410 415

Leu Thr Met Cys Lys Gly Asp Ser Val Val Trp Tyr Leu Phe Ser Ala
420 425 430

Gly Asn Glu Ala Asp Val His Gly Ile Tyr Phe Ser Gly Asn Thr Tyr
435 440 445

Leu Trp Arg Gly Glu Arg Arg Asp Thr Ala Asn Leu Phe Pro Gln Thr
450 455 460

Ser Leu Thr Leu His Met Trp Pro Asp Thr Glu Gly Thr Phe Asn Val

465											470											475											480
Glu	Cys	Leu	Thr	Thr	Asp	His	Tyr	Thr	Gly	Gly	Met	Lys	Gln	Lys	Tyr																		
				485								490								495													
Thr	Val	Asn	Gln	Cys	Arg	Arg	Gln	Ser	Glu	Asp	Ser	Thr	Phe	Tyr	Leu																		
				500								505								510													
Gly	Glu	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Val	Glu	Trp	Asp	Tyr																		
				515								520								525													
Ser	Pro	Gln	Arg	Glu	Trp	Glu	Lys	Glu	Leu	His	His	Leu	Gln	Glu	Gln																		
				530								535								540													
Asn	Val	Ser	Asn	Ala	Phe	Leu	Asp	Lys	Gly	Glu	Phe	Tyr	Ile	Gly	Ser																		
				545								550								555								560					
Lys	Tyr	Lys	Lys	Val	Val	Tyr	Arg	Gln	Tyr	Thr	Asp	Ser	Thr	Phe	Arg																		
				565								570								575													
Val	Pro	Val	Glu	Arg	Lys	Ala	Glu	Glu	Glu	His	Leu	Gly	Ile	Leu	Gly																		
				580								585								590													
Pro	Gln	Leu	His	Ala	Asp	Val	Gly	Asp	Lys	Val	Lys	Ile	Ile	Phe	Lys																		
				595								600								605													
Asn	Met	Ala	Thr	Arg	Pro	Tyr	Ser	Ile	His	Ala	His	Gly	Val	Gln	Thr																		
				610								615								620													
Glu	Ser	Ser	Thr	Val	Thr	Pro	Thr	Leu	Pro	Gly	Glu	Thr	Leu	Thr	Tyr																		
				625								630								635								640					
Val	Trp	Lys	Ile	Pro	Glu	Arg	Ser	Gly	Ala	Gly	Thr	Glu	Asp	Ser	Ala																		
				645								650								655													
Cys	Ile	Pro	Trp	Ala	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Val	Asp	Gln	Val	Lys	Asp	Leu																		
				660								665								670													
Tyr	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Ile	Val	Cys	Arg	Arg	Pro	Tyr	Leu																		
				675								680								685													
Lys	Val	Phe	Asn	Pro	Arg	Arg	Lys	Leu	Glu	Phe	Ala	Leu	Leu	Phe	Leu																		
				690								695								700													

Val Phe Asp Glu Asn Glu Ser Trp Tyr Leu Asp Asp Asn Ile Lys Thr
705 710 715 720

Tyr Ser Asp His Pro Glu Lys Val Asn Lys Asp Asp Glu Glu Phe Ile
725 730 735

Glu Ser Asn Lys Met His Ala Ile Asn Gly Arg Met Phe Gly Asn Leu
740 745 750

Gln Gly Leu Thr Met His Val Gly Asp Glu Val Asn Trp Tyr Leu Met
755 760 765

Gly Met Gly Asn Glu Ile Asp Leu His Thr Val His Phe His Gly His
770 775 780

Ser Phe Gln Tyr Lys His Arg Gly Val Tyr Ser Ser Asp Val Phe Asp
785 790 795 800

Ile Phe Pro Gly Thr Tyr Gln Thr Leu Glu Met Phe Pro Arg Thr Pro
805 810 815

Gly Ile Trp Leu Leu His Cys His Val Thr Asp His Ile His Ala Gly
820 825 830

Met Glu Thr Thr Tyr Thr Val Leu Gln Asn Glu Gly Glu Tyr Pro Asp
835 840 845

Thr Lys Ser Gly
850