



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0106500
(43) 공개일자 2022년07월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0009482
(22) 출원일자 2021년01월22일
심사청구일자 2021년01월22일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
오연목
서울특별시 용산구 이촌로 181, 104동 1101호(이
촌동, 한강대우아파트)
박진수
서울특별시 송파구 올림픽로45길 12, 5동 202호(
풍납동, 극동아파트)
김수한
부산광역시 서구 구덕로 196, 1303호(부민동1가,
허브센티움)
(74) 대리인
이명진

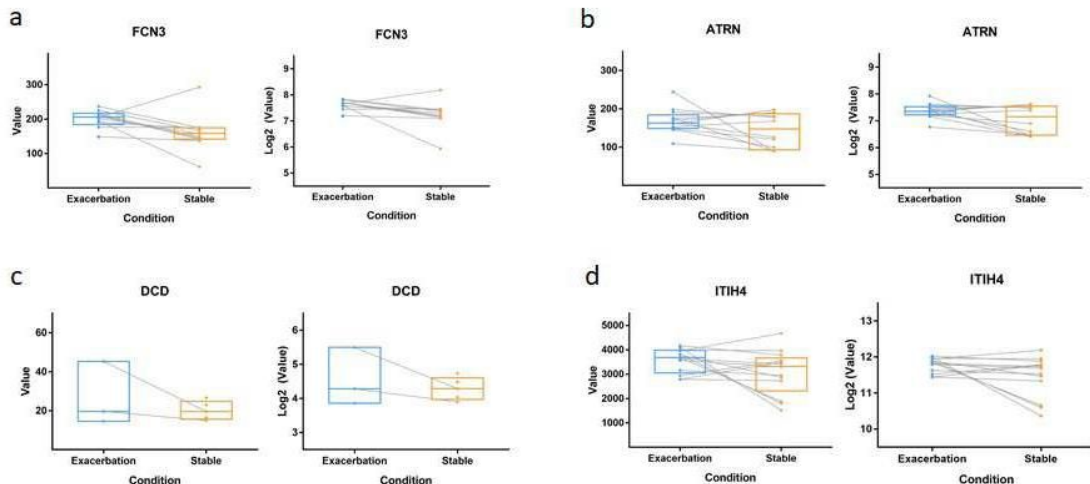
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 만성폐쇄성폐질환 악화 진단용 바이오마커 조성물 4종

(57) 요약

본 발명은 만성폐쇄성폐질환 악화 진단용 바이오마커 조성물 4종 등에 관한 것으로, 보다 구체적으로 FCN3(Ficolin 3), ATRN(Attractin), DCD(Dermcidin), 및 ITIH4(Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA를 유효성분으로 포함하는 만성폐쇄성폐질환(COPD) 악화 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/112 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2800/122 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711116582
과제번호	2015K1A4A3046807
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	해외우수기관유치(R&D)
연구과제명	아산-미네소타 이식 이노베이션 센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

FCN3(Ficolin 3), ATRN(Attractin), DCD(Dermcidin), 및 ITIH4(Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA를 유효성분으로 포함하는 만성폐쇄성폐질환(COPD) 악화 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 악화는 급성 악화된 것을 특징으로 하는, 만성폐쇄성폐질환(COPD) 악화 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 조성물은 만성폐쇄성폐질환의 급성 악화 및 안정 상태의 만성폐쇄성폐질환을 구별하는 것을 특징으로 하는, 만성폐쇄성폐질환(COPD) 악화 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 비액, 객담, 관절낭액, 양수, 복수, 자궁경부 또는 질 분비물, 소변 및 뇌척수액으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 시료로 하는 것을 특징으로 하는, 만성폐쇄성폐질환(COPD) 악화 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 5

FCN3(Ficolin 3), ATRN(Attractin), DCD(Dermcidin), 및 ITIH4(Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 체제를 유효성분으로 포함하는 급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD) 진단용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 단백질 발현 수준은 단백질에 특이적인 항체 또는 앵타머로 측정하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 mRNA 발현 수준은 mRNA에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 프라이머로 측정하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 조성물은 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 비액, 객담, 관절낭액, 양수, 복수, 자궁경부 또는 질 분비물, 소변 및 뇌척수액으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 시료로 하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 9

제5항의 조성물을 포함하는 급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD) 진단용 키트.

청구항 10

급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD) 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여,

(a) 피검체의 시료를 제공하는 단계;

(b) FCN3(Ficolin 3), ATRN(Attractin), DCD(Dermcidin), 및 ITIH4(Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 대조군과 비교하고 대조군에 비해 발현 수준이 증가한 피검체를 급성 악화 만성폐쇄성폐질환에 걸린 것으로 판정하는 단계;를 포함하는 급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD)의 마커를 검출하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 비액, 객담, 관절낭액, 양수, 복수, 자궁경부 또는 질 분비물, 소변 및 뇌척수액으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD)의 마커를 검출하는 방법.

청구항 12

급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD)과 안정 상태의 만성폐쇄성폐질환 구별에 필요한 정보를 제공하기 위하여,

(a) 피검체의 시료를 제공하는 단계;

(b) FCN3(Ficolin 3), ATRN(Attractin), DCD(Dermcidin), 및 ITIH4(Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 대조군과 비교하고 대조군에 비해 발현 수준이 증가한 경우 급성 악화 만성폐쇄성폐질환인 것으로 판정하는 단계;를 포함하는 급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD)의 마커를 검출하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 만성폐쇄성폐질환 악화 진단용 바이오마커 조성물 4종 등에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0003] 만성폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)은 폐의 만성적, 진행성 하기도 감염질환이다. WHO의 2004년도 추정에 따르면, 현재 6400만이 COPD를 앓고 있으며, 3 백만 여명이 COPD로 사망했으며, 이는 그 해의 세계 사망률의 5%에 해당한다. COPD는 이제 주요 질병의 원인이며, 미국에서 3번째 사망원인이다. 전체 COPD 사망자는 이후 10여 년 이상까지 점차 증가할 것이며, 특별히 담배 연기의 노출 등의 위험 요인을 없애는 등의 제한이 없는 한, 2030년까지 전세계적으로 사망원인 3위로 예측된다.
- [0004] 한편, COPD의 급성 악화(AECOPD)는 COPD 환자의 주된 사망 원인으로, 증상이 안정적으로 유지되던 COPD 환자가 평소와 달리 치료약제의 변경이 필요할 정도로 증상의 변화(숨참, 기침, 가래 등)가 발생하는 경우를 말한다. AECOPD는 COPD 환자에 대한 치료방침에 변화가 필요할 가능성이 높은 상태로서 COPD를 가진 환자의 장기간 생존율을 감소시킬 수 있다. 또한, AECOPD는 기관지의 감염, 대기오염과 같은 원인에 의해 발생하기도 하며, 1/3 정도는 원인불명으로 발생한다. 따라서, 환자들의 생존을 연장시키기 위해서는 급성 악화 시에 기도와 폐 실질의 비정상적인 반응에 대한 이해가 필요하며, 급성 악화의 예방과 초기 상태를 치료하기 위해 AECOPD 환자를 특이적으로 선별할 수 있는 바이오마커를 탐색할 필요가 있다.
- [0005] 기존 COPD에서 국부적인 폐 반응, CRP, IL-6 및 TNF-알파가 말초 혈액에서 증가하는 것이 보고된 바 있고 이 혈액 마커는 COPD의 생존과 매우 관련되어 있음이 알려져 있었다. 또한, 혈청SP-D와 같은 몇몇 마커들은 AECOPD를 가지는 환자에서 발견되지만 이들은 AECOPD를 예측할 수 있을 정도의 유의미한 마커는 아니었다.
- [0006] 따라서, COPD의 급성 악화를 진단/구별하기 위한 유의한 바이오마커의 개발이 요구되어지고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) 만성폐쇄성폐질환의 병인과 병태생리, 대한내과학회지: 제 77 권 제 4 호 2009

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 이에 본 발명자들은 상기한 문제점을 해결하기 위해 만성폐쇄성폐질환(COPD)의 급성 악화 환자의 시료에서 특이적으로 상향 조절되는 지표 단백질을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [0011] 따라서, 본 발명의 목적은 FCN3(Ficolin 3), ATRN(Attractin), DCD(Dermcidin), 및 ITIH4(Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA를 유효성분으로 포함하는 만성폐쇄성폐질환(COPD) 악화 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 FCN3(Ficolin 3), ATRN(Attractin), DCD(Dermcidin), 및 ITIH4(Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD) 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD) 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD) 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여,
- [0015] (a) 피검체의 시료를 제공하는 단계;
- [0016] (b) FCN3(Ficolin 3), ATRN(Attractin), DCD(Dermcidin), 및 ITIH4(Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0017] (c) 상기 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 대조군과 비교하고 대조군에 비해 발현 수준이 증가한 피검체를

급성 악화 만성폐쇄성폐질환에 걸린 것으로 판정하는 단계;를 포함하는 급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD)의 마커를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

[0019] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0021] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 FCN3(Ficolin 3), ATRN(Attractin), DCD(Dermcidin), 및 ITIH4(Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA를 유효성분으로 포함하는 만성폐쇄성폐질환(COPD) 악화 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 FCN3(Ficolin 3), ATRN(Attractin), DCD(Dermcidin), 및 ITIH4(Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD) 진단용 조성물을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD) 진단용 키트를 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD) 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여,

[0025] (a) 피검체의 시료를 제공하는 단계;

[0026] (b) FCN3(Ficolin 3), ATRN(Attractin), DCD(Dermcidin), 및 ITIH4(Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0027] (c) 상기 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 대조군과 비교하고 대조군에 비해 발현 수준이 증가한 피검체를 급성 악화 만성폐쇄성폐질환에 걸린 것으로 판정하는 단계;를 포함하는 급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD)의 마커를 검출하는 방법을 제공한다.

[0028] 또한, 본 발명은 급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD)과 안정 상태의 만성폐쇄성질환 구별에 필요한 정보를 제공하기 위하여,

[0029] (a) 피검체의 시료를 제공하는 단계;

[0030] (b) FCN3(Ficolin 3), ATRN(Attractin), DCD(Dermcidin), 및 ITIH4(Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0031] (c) 상기 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 대조군과 비교하고 대조군에 비해 발현 수준이 증가한 경우 급성 악화 만성폐쇄성폐질환인 것으로 판정하는 단계;를 포함하는 급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD)의 마커를 검출하는 방법을 제공한다.

[0032] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 악화는 급성 악화를 의미한다.

[0033] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 조성물은 만성폐쇄성폐질환의 급성 악화 및 안정 상태의 만성폐쇄성폐질환을 구별하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 단백질 발현 수준은 단백질에 특이적인 항체 또는 앵타머로 측정하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 mRNA 발현 수준은 mRNA에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 프라이머로 측정하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 조성물은 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 비액, 객담, 관절낭액, 양수, 복수, 자궁경부 또는 질 분비물, 소변 및 뇌척수액으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 시료로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 또한, 본 발명은 FCN3(Ficolin 3), ATRN(Attractin), DCD(Dermcidin), 및 ITIH4(Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측

정하는 제제의 급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD) 진단 용도를 제공한다.

- [0038] 또한, 본 발명은 (a) 피검체의 시료를 제공하는 단계;
- [0039] (b) FCN3(Ficolin 3), ATRN(Attractin), DCD(Dermcidin), 및 ITIH4(Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0040] (c) 상기 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 대조군과 비교하고 대조군에 비해 발현 수준이 증가한 피검체를 급성 악화 만성폐쇄성폐질환에 걸린 것으로 판정하는 단계;를 포함하는 급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD) 진단 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0042] 본 발명은 AECOPD 환자의 시료에서 안정된 COPD 상태와 비교하여 FCN3(Ficolin 3), ATRN(Attractin), DCD(Dermcidin), 및 ITIH4(Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4)가 상향조절됨을 확인하였는 바, 본 발명의 단백질을 이용하여 AECOPD를 안정상태의 COPD와 효과적으로 구별하여 진단할 수 있으며, 오진의 위험도를 감소시키고 AECOPD의 정확한 치료 방법을 확립하는 데 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 프로테오믹스 분석의 플로우 차트를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오마커의 혈장 샘플에서의 프로테오믹스 분석 결과를 나타낸 것으로, a는 FCN3, b는 ATRN, c는 DCD, d는 ITIH4가 AECOPD 환자의 샘플에서 상향조절됨을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0045] 본 발명은 FCN3(Ficolin 3), ATRN(Attractin), DCD(Dermcidin), 및 ITIH4(Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA를 유효성분으로 포함하는 급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD) 진단용 바이오마커 조성물 등을 제공한다.
- [0047] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0049] “FCN3” 단백질은 포유류에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서의 FCN3 단백질은 서열번호 1로 표시되는 인간 FCN3(NP_003656) 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 상기 “FCN3” mRNA는 바람직하게는 서열번호 2로 표시되는 FCN3 mRNA(NM_173452) 염기서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다(괄호 안은 NCBI Genebankaccession number). 상기한 FCN3 mRNA transcript variant들의 coding region(exon) 등의 특징 사항은 괄호 안에 기재된 Genebank accession number로 NCBI 데이터베이스를 검색하여 나오는 서열정보에서 확인된다.
- [0051] “ATRN” 단백질은 포유류에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서의 ATRN 단백질은 서열번호 3으로 표시되는 인간 ATRN(NP_647537) 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다(괄호 안은 NCBI Genebank accession number).
- [0052] 상기 “ATRN” mRNA는 바람직하게는 서열번호 4로 표시되는 ATRN mRNA(NM_139321) 염기서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다(괄호 안은 NCBI Genebankaccession number). 상기한 ATRN mRNA transcript variant들의 coding region(exon) 등의 특징 사항은 괄호 안에 기재된 Genebank accession number로 NCBI 데이터베이스를 검색하여 나오는 서열정보에서 확인된다.
- [0053] “DCD” 단백질은 포유류에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서의 DCD 단백질은 서열번호 5로 표시되는 인간 DCD(NP_444513) 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아

니다(괄호 안은 NCBI Genebank accession number).

- [0054] 상기 “DCD” mRNA는 바람직하게는 서열번호 6으로 표시되는 DCD mRNA(NM_053283) 염기서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다(괄호 안은 NCBI Genebank accession number). 상기한 DCD mRNA transcript variant들의 coding region(exon) 등의 특징 사항은 괄호 안에 기재된 Genebank accession number로 NCBI 데이터베이스를 검색하여 나오는 서열정보에서 확인된다.
- [0055] “ITIH4” 단백질은 포유류에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서의 ITIH4 단백질은 서열번호 7로 표시되는 인간 ITIH4(NP_002209) 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다(괄호 안은 NCBI Genebank accession number).
- [0056] 상기 “ITIH4” mRNA는 바람직하게는 서열번호 8으로 표시되는 ITIH4 mRNA(NM_002218) 염기서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다(괄호 안은 NCBI Genebank accession number). 상기한 ITIH4 mRNA transcript variant들의 coding region(exon) 등의 특징 사항은 괄호 안에 기재된 Genebank accession number로 NCBI 데이터베이스를 검색하여 나오는 서열정보에서 확인된다.
- [0057] “단백질”은 ‘폴리펩타이드(poly peptide)’ 또는 ‘펩타이드(peptide)’와 호환성 있게 사용되며, 예컨대, 자연 상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다.
- [0058] “폴리뉴클레오티드(polynucleotide)” 또는 “핵산”은 단일 또는 이중 가닥의 형태로 된 데옥시리보핵산(deoxyribonucleic acid, DNA) 또는 리보핵산(ribonucleic acid, RNA)를 말한다. 다른 제한이 없는한, 자연적으로 생성되는 뉴클레오티드와 비슷한 방법으로 핵산에 혼성화되는 자연적 뉴클레오티드의 공지된 아날로그도 포함된다. 일반적으로 DNA는 아데닌(adenine, A), 구아닌(guanine, G), 시토신(cytosine, C), 티민(thymine, T) 등 네 가지 염기로 구성되어 있으며, RNA는 티민 대신 우라실(Uracil, U)을 가지고 있다. 핵산 이중 가닥에서 A는 T 또는 U, C는 G 염기와 수소결합을 이루는데, 이러한 염기의 관계를 ‘상보적(complementary)’이라고 한다.
- [0059] “mRNA(messenger RNA 또는 전령 RNA)”는 단백질 합성 과정에서 특정 유전자의 염기서열의 유전 정보를 리보솜(ribosome)으로 전달하여 폴리펩타이드 합성(단백질 번역, translation)의 청사진 역할을 하는 RNA이다. 유전자를 주형(template)으로 하여 단일 가닥의 mRNA가 전사(transcription) 과정을 통하여 합성된다.
- [0060] “상보적(complementary)”은 소정의 혼성화 또는 어닐링 조건, 구체적으로는 생리학적 조건 하(세포 내)에서 핵산 분자 내 타겟팅 모이어티가 타겟(예컨대, 본 발명의 바이오마커 유전자)에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하는 것으로 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기서열을 가질 수 있으며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 보다 구체적으로는 완전히 상보적인 것을 의미한다.
- [0061] 단백질의 ‘발현 증가(또는 고발현)’라는 의미는 발현되지 않던 것이 발현된 것(즉, 검출되지 않던 것이 검출된 것) 또는 정상적인 수준보다 상대적으로 과발현된 것(즉, 검출량이 많아지는 것)을 의미한다. 이의 반대적 용어의 의미는 당업자라면 상기 정의에 준하여, 반대의미를 가지는 것으로 이해 가능하다.
- [0062] 상기 ‘프라이머(primer)’는 DNA 합성의 개시점(starting point)으로 작용하는 짧은 단일가닥 올리고뉴클레오티드(single strand oligonucleotide)이다. 프라이머는 적합한 완충액(buffer)와 온도 조건에서 주형(template)인 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하고, DNA 중합효소가 프라이머에 주형 DNA에 상보적인 염기를 갖는 뉴클레오타이드 트리포스페이트를 추가하여 연결함으로써 DNA가 합성된다. 프라이머는 일반적으로 15 내지 30개의 염기서열로 이루어져 있으며, 염기 구성과 길이에 따라 주형 가닥에 결합하는 온도(melting temperature, T_m)가 달라진다. 프라이머의 서열은 주형의 일부 염기 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서 상기 mRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 프라이머는 각 유전자 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, DNA 합성을 통해 mRNA 또는 cDNA의 특정 구간을 증폭하여 mRNA의 양을 측정하려는 목적에 맞는 길이와 상보성을 갖는 것이면 충분하다. 상기 증폭 반응을 위한 프라이머는 증폭하고자 하는 mRNA의 특정 구간의 양쪽 끝부분의 주형(또는 센스, sense)과 반대편(안티센스, antisense)에 각각 상보적으로 결합하는 한 세트(쌍)으로 구성된다. 프라이머는 당업자라면 상기 단백질 또는 이의 mRNA 또는 cDNA 염기서열을 참조하여 용이하게 디자인할 수 있다.
- [0063] 상기 ‘프로브(probe)’는 특정 유전자의 mRNA나 cDNA(complementary DNA)에 특이적으로 결합할 수 있는 짧은 수개 내지 길게는 수백 개의 염기(base pair) 길이의 RNA 또는 DNA 등 폴리뉴클레오티드의 단편을 의미하며, 표

지(labeling)되어 있어서 결합하는 대상 mRNA나 cDNA의 존재 유무, 발현양 등을 확인할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해서는 본 발명의 mRNA에 상보적인 프로브를 피검체의 시료와 혼성화 반응(hybridization)을 수행하여 본 발명의 mRNA의 발현양을 측정함으로써 색소관련 피부 상태의 진단 또는 멜라닌 과다생성 검출에 이용할 수 있다. 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 기술에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 본 발명에서 상기 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한 프라이머 또는 프로브는 본 발명의 mRNA와의 혼성화를 방해하지 않는 범위에서 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 다양하게 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등), 그리고 형광 또는 효소를 이용한 표지 물질(labeling material)의 결합 등이 있다.

[0064] 상기 항체란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명에 사용되는 항체는 단클론 또는 다클론 항체, 면역학적으로 활성인 단편(예를 들어, Fab 또는 (Fab)₂ 단편), 항체 중쇄, 인간화 항체, 항체 경쇄, 유전자 조작된 단일쇄 Fv 분자, 키메릭 항체 등일 수 있다.

[0065] 상기 앵타머란 시료 내의 검출하고자 하는 분석물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질로 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지는 단일 가닥 핵산(DNA, RNA, 또는 변형 핵산)을 의미하는 것으로, 특이적으로 시료 내의 표적 단백질의 존재를 확인할 수 있다. 앵타머의 제조는 일반적인 앵타머의 제조 방법에 따라, 확인하고자 하는 표적 단백질에 대해 선택적이고 높은 결합력을 가지는 올리고뉴클레오타이드의 서열을 결정하여 합성한 후, 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단이나 3' 말단을 앵타머 칩의 관능기에 결합할 수 있도록, -SH, -COOH, -OH 또는 NH₂로 변형을 시킴으로써 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0066] 본 발명의 바이오마커 단백질은 공지된 단백질이므로 본 발명에 사용되는 항체는 단백질을 항원으로 하여 면역학 분야에서 널리 알려져 있는 통상의 방법으로 제조할 수 있다. 본 발명에 따른 항체의 항원으로서 사용되는 본 발명의 바이오마커 단백질은 천연에서 추출하거나 합성될 수 있으며 DNA 서열을 기초로 하여 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다. 유전자 재조합 기술을 이용할 경우 본 발명의 바이오마커 단백질을 코딩하는 핵산을 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 재조합 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체에서 본 발명의 바이오마커 단백질이 발현되도록 숙주 세포를 배양한 후 형질전환체로부터 본 발명의 바이오마커 단백질을 회수함으로써 수득될 수 있다.

[0067] 예를 들어, 다클론 항체는 본 발명의 바이오마커 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 항체는 말, 소, 염소, 양, 개, 닭, 칠면조, 토끼, 마우스 또는 래트와 같은 여러 온혈 동물을 이용하여 제조할 수 있다.

[0068] 단클론 항체도 공지된 융합방법(fusion method)(Kohler and Milstein, European J. Immunol. 6:511-519, 1976), 재조합 DNA 방법(미국특허 제4816567호) 및 과지 항체 라이브러리(Clackson et al., Nature, 352, 624-628, 1991; Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 58:1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조할 수 있다.

[0069] "기능적 등가물"이라는 용어는 예를 들어, 기준(reference) 서열로부터 하나 또는 그 이상의 치환, 결실 또는 부가, 기준(reference) 서열과 실험(subject) 서열 사이의 다양한 기능적 비유사성을 낳지 않는 실제 효과(net effect) 등 변화된 돌연변이 서열의 뉴클레오타이드와 핵산서열 모두를 의미한다. 통상적으로, 그런 실질적 등가물인 서열은 단지 약 35%(즉, 실질적으로 증가적인 서열에서의 각 잔기 치환, 부가 및 결실의 숫자는 상응하는 기준 서열과 비교하고 실질적으로 증가적인 서열에서의 나머지 전체 숫자로 나누었을 때 약 0.35 또는 그 이하이다) 정도로 본 명세서에 나열된 것에서부터 다양하다. 그런 서열은 나열된 서열과 65%의 서열 동일성을 갖는다. 본 발명에 따른 실질적 등가물인, 예를 들어 돌연변이, 아미노산 서열은 나열된 아미노산 서열과 바람직하게는 최소한 80%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 최소한 90%의 서열 동일성을 갖는다. 실질적 등가물인 본 발명의 뉴클레오타이드 서열은 예를 들어, 유전자 암호의 중복(redundancy) 또는 축퇴(degeneracy)를 고려할 때, 더 낮은 백분율의 서열 동일성을 가질 수 있다. 바람직하게는, 뉴클레오타이드 서열은 최소한 약 65%의 동일성, 보다 바람직하게는 최소한 약 75%의 동일성, 가장 바람직하게는 약 95%의 동일성을 가져야 한다. 본 발명의 목적을 위해서는, 실질적으로 증가적인 생물학적 활성과 실질적으로 증가적인 합성 특징을 가지는 서열들은 실질적 등가물로 취급된다. 등가물을 결정하기 위해, 성숙 서열(예를 들어, 위(spurious) 종결코돈(stop codon)을 제조하는 돌연변이를 통한)의 절단(truncation)은 무시되어야 한다.

[0070] 본 명세서에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본 발명의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대

적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다.

- [0071] 본 발명에서 용어, "급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD)"이란 호흡기증상이 매일-매일의 변동 범위를 넘어서 치료약제의 변경이 필요할 정도로 급격히 악화된 상태로 정의되며, 호흡곤란의 악화, 기침의 증가, 가래양의 증가 또는 가래색의 변화 등이 특징이다. 급성 악화는 여러 원인에 의해 발생할 수 있으나 가장 흔한 원인은 기도 감염으로 알려져 있다. 급성 악화의 약물치료는 기관지확장제, 스테로이드, 항생제가 사용되며 악화로 인한 증상을 호전시키고 악화기간과 향후 재발을 줄일 수 있다. 급성 악화 예방을 위하여 호흡재활치료, 금연, 예방접종과 규칙적인 약제 투약이 권장된다. 경한 급성 악화는 명확한 지침을 적용하여 환자를 교육하였을 경우 집에서 치료할 수 있다.
- [0072] 이와 같이, COPD의 급성 악화로 인한 증상을 호전시키고, 조속하고 정확한 치료를 위하여 안정 상태의 COPD와 AECOPD를 구별하는 바이오마커가 필요한 실정이었으며, 본 발명자들은 AECOPD와 안정 상태의 COPD 각각에서 시료를 분리한 후 단백질 발현을 분석한 결과, 본 발명의 단백질 바이오마커인 FCN3, ATRN, DCD, 및 ITIH4가 상향 조절됨을 확인함으로써, AECOPD를 진단할 수 있음을 확인하였다 (본 발명의 실시예 참고).
- [0073] 또한, 본 발명에서, 상기 급성 악화는 하기 경증, 중등증, 및 중증 악화로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다 :
- [0074] · 경증 악화: 속효성기관지확장제 치료만 필요한 경우
- [0075] · 중등증 악화: 속효성기관지확장제와 항생제 또는 경구스테로이드 치료가 필요한 경우
- [0076] · 중증 악화: 응급실 방문이나 입원이 필요한 악화로 급성 호흡부전을 동반
- [0077] 본 명세서에서, 용어 “안정 상태의 만성폐쇄성폐질환”이란 급성 악화 상태가 아닌 상태를 의미하며, 경증, 중등증, 중증, 고도중증으로 중증도 분류될 수 있다. 상기 안정 상태의 COPD는 중증도에 관계없이 급성 악화될 수 있다. 또한, 안정 상태의 만성폐쇄성폐질환은 ‘일반적으로 유해한 입자 또는 가스에 상당한 노출로 인해 발생하는 기도 및/또는 폐포의 이상으로 인한 지속적인 호흡기 증상 및 기류 제한’으로 정의될 수 있다.
- [0078] 본 명세서에서, 용어 '검출'은 목적하는 물질(본 발명에서의 마커 단백질)의 존재(발현) 여부를 측정 및 확인하는 것, 또는 목적하는 물질의 존재 수준(발현 수준)의 변화를 측정 및 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 같은 맥락에서, 본 발명에서 상기 단백질의 발현수준을 측정하는 것은 발현 여부를 측정하는 것(즉, 발현 유무를 측정하는 것), 또는 상기 단백질의 질적, 양적 변화 수준을 측정하는 것을 의미한다. 상기 측정은 정성적인 방법(분석)과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있다. 단백질 수준의 측정에 있어서 정성적 방법과 정량적 방법의 종류는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 기술한 실험방법들이 이에 포함된다. 각 방법 별로 구체적 단백질 수준 비교 방식은 당업계에 잘 알려져 있다. 따라서 상기 목적 단백질 검출은 본 발명의 바이오마커 단백질의 존재 여부 검출, 또는 상기 단백질 발현량의 증가(상향 조절) 또는 감소(하향 조절)를 확인하는 것을 포함하는 의미이다.
- [0079] 본 명세서에서, 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)를 모두 포함하는 개념이다. 바람직하게 본 발명에서의 진단은 본 발명의 바이오마커 단백질 또는 이의 mRNA 발현 수준을 측정하여 AECOPD를 진단하거나, 안정 상태의 COPD와 AECOPD를 구별하는 것일 수 있다.
- [0081] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD) 진단용 키트를 제공한다.
- [0082] 본 발명의 키트는 본 발명의 바이오마커 단백질 또는 이의 mRNA 수준을 측정하는 체제 이외에 면역학적 분석에 사용되는 당 업계에 공지된 도구 및/또는 시약을 추가로 포함할 수 있다.
- [0083] 상기에서 면역학적 분석은 항원과 항체의 결합을 측정할 수 있는 있는 방법이라면 모두 포함될 수 있다. 이러한 방법들은 당 분야에 공지되어 있으며 예를 들어, 면역세포화학 및 면역조직화학, 방사선 면역 분석법(radioimmunoassays), 효소결합면역법(ELISA: Enzyme Linked Immunoabsorbent assay), 면역 블롯(immunoblotting), 파아르 분석법(Farr assay), 면역침강, 라텍스 응집, 적혈구 응집, 비탁계법, 면역확산법, 카운터-전류 전기영동법, 단일 라디칼 면역확산법, 단백질 칩 및 면역형광법이 있다.

- [0084] 면역학적 분석에 사용되는 도구 및/또는 시약으로는 적합한 담체 또는 지지체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제가 포함된다. 또한, 표지물질이 효소인 경우에는 효소활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다.
- [0085] 본 발명의 키트에 포함되는 항원은 바람직하게는 적합한 담체 또는 지지체에 문헌에 개시된 바와 같은 다양한 방법을 이용하여 고정될 수 있으며(Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow & Lane; Cold Spring Harbor, 1988), 적합한 담체 또는 지지체의 예로는 아가로스, 셀룰로즈, 니트로셀룰로즈, 텍스트란, 세파텍스, 세파로즈, 리포솜, 카복시메틸 셀룰로즈, 폴리아크릴아미드, 폴리스테린, 반려암, 여과지, 이온교환수지, 플라스틱 필름, 플라스틱 튜브, 유리, 폴리아민-메틸 비닐-에테르-말레산 공중합체, 아미노산 공중합체, 에틸렌-말레산 공중합체, 나일론, 컵, 플랫 팩(flat packs) 등이 포함된다. 그 외의 다른 고체 기질로는 세포 배양 플레이트, ELISA 플레이트, 튜브 및 폴리머성 막이 있다. 상기 지지체는 임의의 가능한 형태, 예를 들어 구형(비드), 원통형(시험관 또는 웰 내면), 평면형(시트, 시험 스트립)을 가질 수 있다.
- [0086] 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지는 항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정가능하게 하며, 이의 예로는 효소, 형광물질, 리간드, 발광물질, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사성 동위원소 등을 사용할 수 있다. 효소로는 β -글루쿠로니다제, β -D-글루코시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라아제, 글리코즈 옥시다아제, 핵소키나제, 말레이트 디하이드로게나아제, 글루코스-6-인산디하이드로게나아제, 인버타아제 등을 사용할 수 있다. 형광물질로는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리트린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, 플루오르신이소티오시아네이트 등을 사용할 수 있다. 리간드로는 바이오틴 유도체 등이 있으며, 발광물질로는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있다. 미소입자로는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있고 레독스 분자로는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논 등이 있다. 그러나 상기 예시된 것들 외에 면역학적 분석법에 사용할 수 있는 것이라면 어느 것이라도 사용할 수 있다.
- [0088] 또한, 본 발명은 급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD) 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여,
- [0089] (a) 피검체의 시료를 제공하는 단계;
- [0090] (b) FCN3(Ficolin 3), ATRN(Attractin), DCD(Dermcidin), 및 ITIH4(Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0091] (c) 상기 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 대조군과 비교하고 대조군에 비해 발현 수준이 증가한 피검체를 급성 악화 만성폐쇄성폐질환에 걸린 것으로 판정하는 단계;를 포함하는 급성 악화 만성폐쇄성폐질환(AECOPD)의 마커를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0092] 본 발명에서, 상기 대조군은 정상인 또는 안정 상태의 COPD 환자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0093] 본 발명의 mRNA의 발현량 측정은 RT-PCR, 정량적 또는 반정량적 RT-PCR(Quantitative or semi-Quantitative RT-PCR), 정량적 또는 반정량적 리얼 타임 RT-PCR(Quantitative or semi-Quantitative real-time RT-PCR), 노던 블롯(northern blot) 및 DNA 또는 RNA 칩(chip)으로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상의 방법을 이용하여 측정되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0094] 본 발명의 단백질 발현량 측정은 웨스턴 블롯, ELISA, 방사선면역분석법, 방사면역확산법, 오우크레로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석, 보체고정분석, FACS 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 방법을 이용하여 측정되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0095] 본 명세서에서, 피검체는 AECOPD를 진단하고자 하는 모든 동물, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간 또는 설치류일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0096] 본 명세서에서, 시료는 이에 제한되는 것은 아니나, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 비액, 객담, 관절낭액, 양수, 복수, 자궁경부 또는 질 분비물, 소변 및 뇌척수액으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 것일 수 있으며, 바람직하게는 혈액, 혈장, 또는 혈청일 수 있다.
- [0097] 본 명세서에서, 상기 "포유류"는 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원 동물, 사냥 동물, 또는 애완 동물, 가령 개, 말, 고양이, 소, 랫트, 마우스, 비-인간 영장류(가령, 원숭이, 유인원) 등을 포함하여, 포유류로 분류된 임

의의 동물을 나타낸다.

[0098] 본 명세서에서, 상기 "설치류"는 계통발생적 순서 설치목(Rodentia)의 모든 구성원을 나타내며 그것으로부터 유래되는 향후의 모든 세대의 임의의 및 모든 자손을 포함한다.

[0100] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0102] **[실시예]**

[0103] **실험준비**

[0104] **1. 연구 모집단 및 연구 디자인**

[0105] AECOPD로 인해 외래 또는 응급실을 통해 대한민국 서울아산병원에 온 COPD 환자를 등록하고 2015년부터 2017년까지 안정된 상태의 외래 진료소에 치료 후 추적 하였다. 혈액 샘플은 각 환자에서 치료 경험에 없는 AECOPD 상태 및 안정적인 COPD 상태 모두에서 수득되었다. 모든 AECOPD 환자의 방문은 발병 후 14일 이내에 이루어졌으며, 퇴원 후 최소 6주 후에 샘플링을 통한 후속 방문을 수행하였다. 모든 환자에게 서면 동의를 받았다.

[0106] COPD의 진단은 GOLD(Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) 기준을 기반으로 수행하였다 (호환 가능한 병력 [예 : 40 세 이상, 흡연], 및 폐활량 측정 [기관지 확장제 후 FEV1/강제 폐활량 70 %, 이하, 및 FEV1 및 강제 폐활량 70% 이하]). AECOPD는 다음과 같은 주요 증상(호흡 곤란 증가, 가래 고름 증가, 가래 부피 증가) 중 최소 2 개 또는 1개의 주요 및 1개의 경미한 증상(코 분비물 / 충혈, 천명, 인후통, 기침)을 동반한 급성 악화로 정의되며, 적어도 2일 동안으로 치료법의 변경이 필요한 것을 말한다. 안정한 COPD는 미국 흉부 학회/유럽 호흡기 협회의 합의 기준에 따라 악화와 관련된 증상이 없고 6 주 동안 기관지 확장제를 제외하고, 추가적인 치료가 필요하지 않은 것으로 정의되었다.

[0107] 포함 기준은 다음과 같다 : 1) GOLD 기준에 의한 COPD 진단 환자; 2) AECOPD 증상 발병 후 2 주 이내에 치료를 위해 외래 또는 EM 방문이 필요한 환자; 3) 치료 전의 AECOPD 및 안정된 COPD 상태의 혈액 샘플을 모두 가진 COPD 환자.

[0108] 제외 기준은 다음과 같다 : 1) 연령 40세 미만; 2) 흉부 X레이에서 폐렴 징후; 3) 기타 폐 질환 동반(예 : 기관지 확장증, 폐결핵 파괴, 활동성 폐결핵, 폐암, 간질 성 폐 질환, 폐동맥 고혈압, 유육종증); 4) 임신 중이거나 수유중인 경우; 5) 사망 또는 장애를 유발할 수 있는 기타 질환 동반(예 : 암, 심부전, 관상 동맥 질환, 뇌 혈관 질환, 만성 신장 질환, 주요 합병증이 있는 당뇨병, 조절되지 않는 고혈압).

[0110] **2. 임상 변수**

[0111] 다음 매개 변수에 대한 기본 정보를 후향적으로 검토하였다 :

[0112] 전체 병력(연령, 성별, 체질량 지수, 병력, 흡입기 및 스테로이드를 포함한 약물, 흡연력, 악화 이력), 실험실 혈액 검사, 가래 검사, 심전도, 산소 포화도(SpO2), 혈액 가스 분석(BGA), 흉부 방사선 사진, 흉부 컴퓨터 단층 촬영(CT), PFT, 삶의 질 설문지(예 : CAT). 또한, 치료 이력, AECOPD 회복 기간, 사망 날짜 또는 등록 후 마지막 추적 조사 결과도 검토하였다.

[0114] **3. 샘플 수집**

[0115] 12mL의 전혈 샘플(혈장의 경우 8mL, 혈청의 경우 4mL)을 AECOPD 및 안정적인 COPD 상태의 환자로부터 EDTA 코팅 튜브에 수집하였다. 적혈구 분획을 4℃에서 15 분 동안 2500 x g에서 원심 분리하여 분리하고 투명한 혈장 상층액을 -80℃에서 동결된 분취액에 보관하였다. 분리된 혈청 샘플을 멸균 마이크로 원심 분리 튜브(각 바이알 500 μL)에 분취한 다음 -80℃에서 보관하였다.

[0117] **4. 단백질 분해 및 샘플 준비**

[0118] 프로테오믹 분석(도 1)을 위해, 두 쌍의 혈장 풀(AECOPD, 안정 COPD)의 3 개 사본을 준비하였다. 혈장은 먼저 다중 친화성 제거 시스템-14(MARS-14, Agilent™) 컬럼으로 더 낮은 풍부도의 단백질의 검출을 강화하기 위해 기본적으로 풍부한 단백질을 제거하였다. 다음 14 개의 단백질을 최대 94%까지 제거하였다: 알부민, IgG, 항 트립신, IgA, 트랜스페린, 합토클로빈, 피브리노젠, 알파 2-마크로글로불린, 알파 1-산 당단백질, IgM, 아포지 단백질 AI, 아포지 단백질 AII, 보체 C3 및 트랜스티레틴.

[0119] 혈장 샘플을 4배까지 희석한 다음 원심 분리하고 160 µL를 MARS-14 컬럼에 저유량(0.125mL/min)으로 18분 동안 로딩하고 추가로 2분 동안 1mL/min의 유속으로 로딩하였다. 제거된 혈장을 나타내는 비흡착(flow-through) 분획을 회수하여 -20℃에서 보관하였다. 결합된 단백질을 용출 완충액으로 1.0 mL/min에서 7분 동안 방출한 다음 로딩/세척 완충액으로 11분 동안 1 mL/min의 유속으로 세척하였다. 비흡착 분획 및 풍부한 혈장 단백질(결합된 분획)을 모두 회수하여 추가 분석까지 -20℃에서 보관하였다.

[0120] 단백질은 이황화물의 환원 및 알킬화를 위해 100 µl SDS 버퍼(4% SDS, 0.1M 디티오프레이톨 [DTT, Sigma])에 추가로 현탁되었고, 용해되지 않은 물질을 제거하기 위해 13,000 x g에서 8-15 분 동안 원심 분리를 실시하였다. 다음으로, 12% 인산 및 S-trap 결합 버퍼(90% MeOH, 100mM 최종 TEAB, pH 7.1)를 SDS 용해물에 첨가하였다. 그런 다음 산성화된 SDS 용해물/MeOH S-Trap 완충액 혼합물을 마이크로 컬럼에 첨가하고 모든 SDS 용해물/S-Trap 완충액이 S-trap 컬럼을 통과할 때까지 마이크로 컬럼을 4000 g에서 원심분리하였다. 그 후, 포획된 단백질은 원심 분리와 함께 S-trap 완충액을 첨가하여 3 회 세척하였다. 스핀컬럼의 매트릭스 내에 갇힌 단백질은 분해를 위해 샘플 튜브를 청소하기 위해 이동되었다. 이어서 프로테오믹 등급 트립신(1 : 10 - 1 : 25 wt : wt)을 첨가하고 47℃에서 1 시간 동안 배양하였다. 소화 후, 펩타이드는 용액(TEAB, 포름산)으로 용리되고 4000g에서 원심 분리하였다.

[0122] **5. 지질 크로마토그래피-질량 분석법/질량 분석법(LC-MS/MS) 데이터 수집**

[0123] 분해된 샘플은 TOF(triple time of-flight) 5600+ 질량 분석기(호주 AB SCIEX)와 함께 Nano-LC 425 고압 LC(HPLC) 시스템을 사용하여 분석하였다. 준비된 샘플은 먼저 3-5 µl ChromXp C18(120 Å)로 포장된 트랩 컬럼(300 µm X 10 mm) 및 분석 컬럼(300 µm X 15 cm)이 있는 cHiPLC® 시스템이 포함된 nano-LC 425에 주입하였다. 역상 HPLC의 경우, 물 중 0.1% FA 및 아세토니트릴(ACN) 중 0.1% FA가 각각 용매 A와 B로 사용되었다. 펩타이드를 용출하기 위해 5 µl/min의 유속에서 이동상 B의 백분율이 증가하는 55분의 구배 용리를 사용하였다. 그런 다음 컬럼에서 나온 용출액을 Triple TOF 5600 +(Sciex, USA) MS에서 추가로 분석하였다. 간단히 말해, 각 샘플의 펩타이드를 ChromXP C18(AB SCIEX) 트랩 컬럼에 로딩하고, 3-25 %의 버퍼 B(98% ACN, 0.1% FA)의 선형 구배로 300 µm x 15cm 길이의 분석 컬럼에서 55분간 5 µl/분의 유속으로 분리하였다. 마지막으로 총 78 개의 파일(2세트가 있는 13명의 환자, 각각 3개 샘플의 수행)이 3중 LC-MS/MS 실행으로 분석되었다.

[0125] **6. SWATH(Sequential window acquisition of all theoretical fragmentation spectra) MS 데이터 수집**

[0126] SWATH 데이터 분석을 위해, MS로 처음에 단백질 식별을 결정하고 펩타이드 전구체, 생성물 이온 m/z 값 및 크로마토그래피 머무름 시간을 얻기 위해 데이터 종속 모드에서 사용하였다. 전체 프로파일 MS(MS1) 스캔은 양이온 모드에서 m/z 400-1250의 질량 범위에서 획득하였다. 전하 상태가 2+에서 5+ 인 상위 20 개 이온이 단편화를 위해 선택되었으며, MS/MS 스캔(MS2)은 34개 창(25m/z, 1m/z 겹침)을 사용하여 m/z 100-1500의 질량 범위에서 수집하였다. MS1 스캔의 최대 충전 시간은 250ms이고 MS2 스캔은 100ms로, 3.3초의 주기로 반복수행하였다.

[0127] SWATH-MS는 하이브리드 전체 스캔 기기(바람직하게는 Q-TOF 및 Q-Orbitrap)에서 수행되는 데이터 독립적 수집의 특정 변형을 말한다. SWATH-MS 데이터 수집에서는 사전 정의된 일련의 전구체 m/z 값 범위가 분리되고 공동조각화되었다. SWATH-MS 데이터의 펩타이드 중심 점수화는 스펙트럼 라이브러리의 형태와 같은 사전 지식을 사용하여 수행하였다.

[0129] **7. 데이터 처리 및 분석**

[0130] 획득한 SWATH 데이터는 Spectronaut 11 소프트웨어를 사용하여 범 인간 스펙트럼 라이브러리인 SWATHatlas(www.

Swasthatlas.org)와 비교하여 분석하였다. 기본 분석 설정 및 단백질 식별의 FDR(false discovery rate)이 5 %로 설정되고 최대 6 개의 전구체가 정량화에 사용되는 등 사소한 변경을 포함하였다. 또한, 펩타이드 정량화를 위해 조각 이온의 피크 면적을 사용하였다. 단백질을 정량화하기 위해 펩타이드 양의 평균값을 측정하였다. 단백질 정량화의 결과는 Perseus에서 추가로 처리하고 통계적으로 분석하였다(ver. 1.5.6.0). 모든 데이터는 log2 변환하였고 단백질 수준의 차이는 Welch의 t-검정과 Benjamini-Hochberg p-값(q-값) 보정을 통해 비교하였다. 결과 q-값 0.1을 컷오프로 설정하였다. 데이터 세트는 유클리드 거리에 따라 Z-정규화하고 계층적으로 클러스터링하였다. 또한, 발현된 단백질은 다음 기준에 따라 확인하였다: (1) 폴드 변화가 > 1.1이고 (2) 통계적 유의성이 $q < 0.05$ 에서 허용됨.

8. 통계적 분석

환자 정보 데이터는 SPSS 소프트웨어(버전 24.0; SPSS Inc.; Chicago, IL)를 사용하여 분석하였다. 연속 측정에 있어 데이터가 정규 분포를 따르는 경우 평균 $\pm$ SD로 표시되고 그룹 내 비교를 위해 일원 분산 분석을 사용하였다. 연속 데이터가 정규 분포를 따르지 않은 경우 중앙값으로 표시되고 비모수 검정(Mann-Whitney U 검정)이 분석에 적용되었다.

차별적으로 발현된 단백질은 다음 단계에 따라 분석되었다: 먼저, AEOPD vs. 안정 COPD 그룹의 개별 정규화 풍부도 값에 대해 t-test가 수행되었으며 0.05를 임계값으로 설정하였다. FDR 보정 p-값은 원시 p-값의 Benjamini-Hochberg 보정에 의해 계산되었다. 다음으로, 이들 FDR 보정 p-값이 유의한 단백질을 추가로 선택하여 AEOPD 및 안정한 COPD 그룹 간에 ≥ 1.3 이상의 배수 변화로 그룹 간에 차이가 있는 상향 조절된 단백질을 포함하였다. 상기 조건을 만족하는 단백질들을 유의한 것으로 판단하였다. 부분 최소 제곱 차별(PLS-DA) 분석은 본 연구에서 정량화된 모든 단백질에 대해 수행하였으며 예측에 대한 가변 영향(VIP) 값이 1 이상인 것으로 간주되었으며, 이는 유의미하게 차별적으로 발현되는 단백질을 선택할 때도 고려되었다.

실시예 1. 연구 모집단의 기준 특성

COPD로 진단된 총 13명의 환자가 모집되었으며, 악화 및 안정 상태의 혈액 샘플을 사용할 수 있었다. 연령, 성별, BMI, 흡연 상태, 폐 기능 검사를 포함한 모든 환자의 임상 표현형은 표 1에 나타내었다. 연구 집단의 중앙 연령은 68세(63, 73 세)였으며 남성이 더 많았다($n = 12$, 92.3 %). BMI 중앙값은 23.8(21.95, 27.71), FEV1은 1.42L(1.09, 1.90), 및 47 %(41, 63.5)로 나타났다.

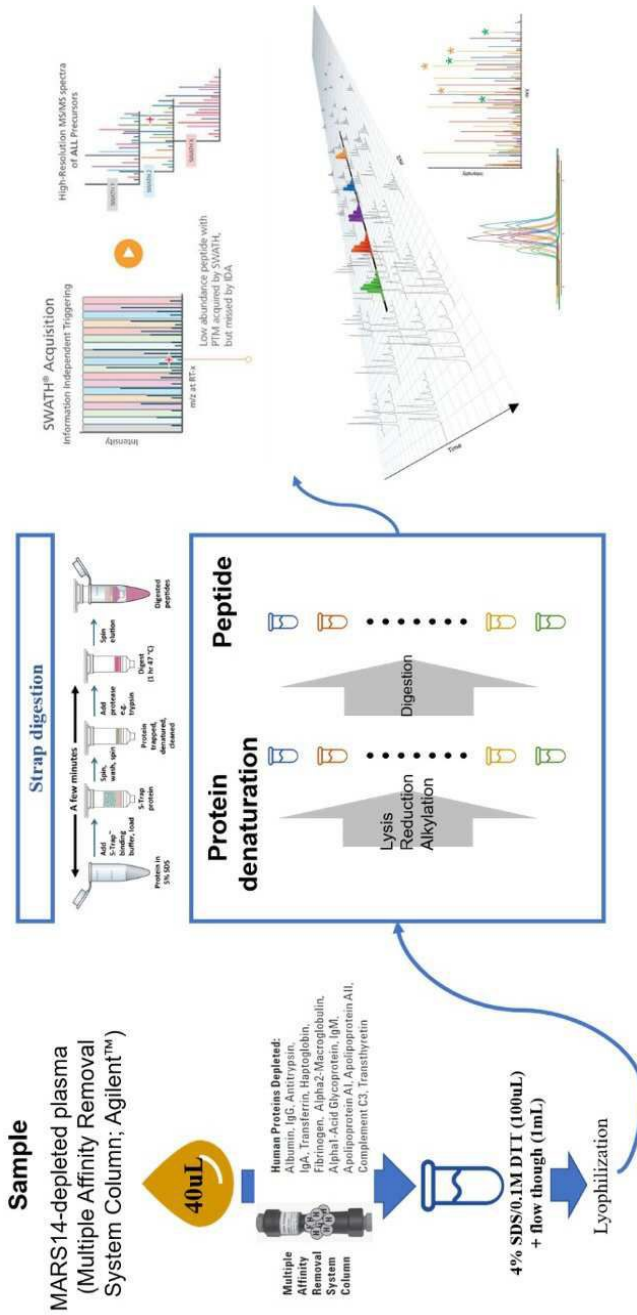
표 1

Pt. Number	Age	Gender	BMI	FEV1/FVC	FEV1(L)	FEV1(%)	FVC(L)	FVC(%)
Patient 1	71	Male	29.23	0.58	1.88	63	3.22	71
Patient 2	71	Male	23.80	0.44	1.33	47	3.01	73
Patient 3	64	Male	26.18	0.37	1.58	49	4.31	99
Patient 4	84	Male	24.10	0.36	1.15	47	3.2	80
Patient 5	62	Female	20.27	0.4	1.02	47	2.57	93
Patient 6	68	Male	22.39	0.32	1.42	42	4.41	94
Patient 7	54	Male	22.41	0.44	2.19	68	4.98	112
Patient 8	76	Male	21.39	0.46	1.91	67	4.14	98
Patient 9	75	Male	29.37	0.32	0.76	26	2.41	54
Patient 10	69	Male	24.70	0.29	1.03	34	3.55	82
Patient 11	64	Male	23.02	0.66	1.56	64	2.37	72
Patient 12	58	Male	21.51	0.36	1.35	40	3.73	86
Patient 13	65	Male	32.72	0.51	2.1	59	4.12	81

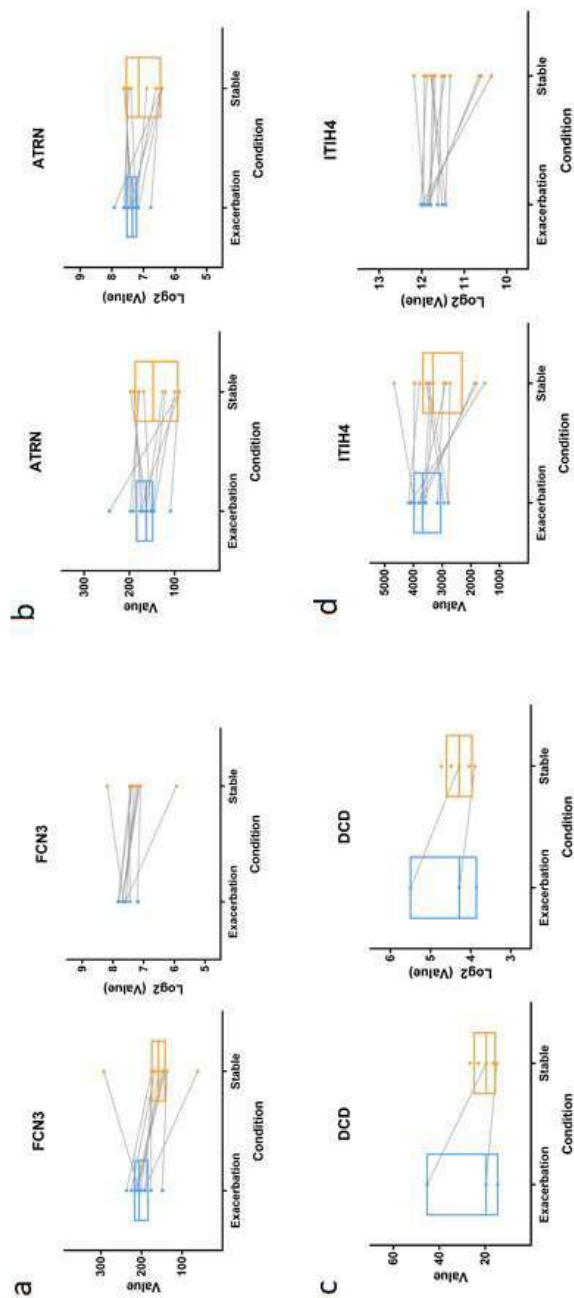
- [0141] 실시예 2. AECOPD 선별용 바이오마커의 선택 및 검증
- [0142] 본 발명자들은 프로테오믹스 분석을 통해, AECOPD와 안정 상태의 COPD 사이에서 차등 발현되는 다양한 단백질을 확인함으로써, 그 중에서도 유의미한 단백질을 4 가지를 선별하였다.
- [0143] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, FCN3, ATRN, DCD, 및 ITIH4 단백질은 AECOPD 환자의 혈장 샘플에서 안정 상태의 COPD 샘플과 비교하여 유의미한 상향조절 결과를 나타내었다.
- [0145] 상기 실시예에 따라, FCN3, ATRN, DCD, 및 ITIH4 단백질은 AECOPD에서 임상적 유의성 있는 마커로 선별되었는 바, 본 발명의 단백질은 AECOPD의 조기 진단 및 발명 예측에 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.
- [0147] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

도면1



도면2



서열 목록

- <110> THE ASAN FOUNDATION
University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- <120> 4 types of biomarker compositions for diagnosis of exacerbation
of chronic obstructive pulmonary disease
- <130> MP20-251
- <160> 8
- <170> KoPatent In 3.0

<210> 1
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FCN3(Ficolin 3), NP_003656
 <400> 1
 Met Asp Leu Leu Trp Ile Leu Pro Ser Leu Trp Leu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ala Cys Leu Lys Thr Gln Glu His Pro Ser Cys Pro Gly Pro
 20 25 30
 Arg Glu Leu Glu Ala Ser Lys Val Val Leu Leu Pro Ser Cys Pro Gly
 35 40 45
 Ala Pro Gly Ser Pro Gly Glu Lys Gly Ala Pro Gly Pro Gln Gly Pro
 50 55 60
 Pro Gly Pro Pro Gly Lys Met Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Asp Pro
 65 70 75 80
 Val Asn Leu Leu Arg Cys Gln Glu Gly Pro Arg Asn Cys Arg Glu Leu
 85 90 95
 Leu Ser Gln Gly Ala Thr Leu Ser Gly Trp Tyr His Leu Cys Leu Pro
 100 105 110
 Glu Gly Arg Ala Leu Pro Val Phe Cys Asp Met Asp Thr Glu Gly Gly
 115 120 125
 Gly Trp Leu Val Phe Gln Arg Arg Gln Asp Gly Ser Val Asp Phe Phe
 130 135 140
 Arg Ser Trp Ser Ser Tyr Arg Ala Gly Phe Gly Asn Gln Glu Ser Glu
 145 150 155 160
 Phe Trp Leu Gly Asn Glu Asn Leu His Gln Leu Thr Leu Gln Gly Asn
 165 170 175
 Trp Glu Leu Arg Val Glu Leu Glu Asp Phe Asn Gly Asn Arg Thr Phe
 180 185 190
 Ala His Tyr Ala Thr Phe Arg Leu Leu Gly Glu Val Asp His Tyr Gln
 195 200 205

Leu Ala Leu Gly Lys Phe Ser Glu Gly Thr Ala Gly Asp Ser Leu Ser

210 215 220

Leu His Ser Gly Arg Pro Phe Thr Thr Tyr Asp Ala Asp His Asp Ser

225 230 235 240

Ser Asn Ser Asn Cys Ala Val Ile Val His Gly Ala Trp Trp Tyr Ala

245 250 255

Ser Cys Tyr Arg Ser Asn Leu Asn Gly Arg Tyr Ala Val Ser Glu Ala

260 265 270

Ala Ala His Lys Tyr Gly Ile Asp Trp Ala Ser Gly Arg Gly Val Gly

275 280 285

His Pro Tyr Arg Arg Val Arg Met Met Leu Arg

290 295

<210> 2

<211> 1046

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FCN3(Ficolin 3), NM_173452

<400> 2

aatctggcat ctttccctg gtgggccag caagatggat ctactgtgga tctgcctc 60

cctgtggctt ctctgcttg gggggcctgc ctgcctgaag acccaggaac acccagctg 120

cccaggacc aggaactgg aagccagcaa agttgtctc ctgcccagtt gtcccgagc 180

tccaggaagt cctggggaga agggagcccc aggtcctcaa gggccacctg gaccaccagg 240

caagatgggc cccaagggtg agccaggccc cagaaactgc cgggagctgt tgagccaggg 300

cgccaccttg agcggtggt accatctgtg cctacctgag ggcagggcc tccagtctt 360

ttgtgacatg gacaccagg ggggcggctg gctggtgtt cagaggcgcc aggatggtt 420

tgtggatttc ttccgtctt ggtcctccta cagagcaggt tttgggaacc aagagtctga 480

attctggctg ggaatgaga atttcacca gttactctc cagggttaact gggagctgcg 540

ggtagagctg gaagacttta atggtaacg tactttcgcc cactatgcga cttccgcct 600

cctcggtgag gtagaccact accagctggc actgggcaag ttctcagagg gactgcagg 660

ggattccctg agcctccaca gtgggaggcc ctttaccacc tatgacgtg accacgattc 720

aagcaacagc aactgtgcag tgattgtcca cgggtgcctgg tggtatgcat cctgttaccg 780

atcaaatctc aatggctcgt atgcagtgtc tgaggctgcc gccacaaat atggcattga 840
ctgggcctca ggccgtgggtg tgggccaccc ctaccgcagg gttcggatga tgcttcgata 900
gggcactctg gcagccagtg cccattatctc tcctgtacag cttccggatc gtcagccacc 960
ttgcctttgc caaccacctc tgcttgccctg tccacattta aaaataaaat cattttagcc 1020
ctttcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1046

<210> 3

<211> 1429

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ATRN(Attractin), NP_647537

<400> 3

Met Val Ala Ala Ala Ala Ala Thr Glu Ala Arg Leu Arg Arg Arg Thr

1 5 10 15

Ala Ala Thr Ala Ala Leu Ala Gly Arg Ser Gly Gly Pro His Trp Asp

20 25 30

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

35 40 45

Leu Pro Arg Leu Leu Ser Pro Pro Leu Arg Pro Arg Leu Leu Leu Leu

50 55 60

Leu Leu Leu Leu Ser Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Cys Glu

65 70 75 80

Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Val Ser Gly Ser Ala Ala Ala

85 90 95

Glu Ala Lys Glu Cys Asp Arg Pro Cys Val Asn Gly Gly Arg Cys Asn

100 105 110

Pro Gly Thr Gly Gln Cys Val Cys Pro Ala Gly Trp Val Gly Glu Gln

115 120 125

Cys Gln His Cys Gly Gly Arg Phe Arg Leu Thr Gly Ser Ser Gly Phe

130 135 140

Val Thr Asp Gly Pro Gly Asn Tyr Lys Tyr Lys Thr Lys Cys Thr Trp

145 150 155 160

Leu Ile Glu Gly Gln Pro Asn Arg Ile Met Arg Leu Arg Phe Asn His

165 170 175
 Phe Ala Thr Glu Cys Ser Trp Asp His Leu Tyr Val Tyr Asp Gly Asp
 180 185 190
 Ser Ile Tyr Ala Pro Leu Val Ala Ala Phe Ser Gly Leu Ile Val Pro

 195 200 205
 Glu Arg Asp Gly Asn Glu Thr Val Pro Glu Val Val Ala Thr Ser Gly
 210 215 220
 Tyr Ala Leu Leu His Phe Phe Ser Asp Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Gly
 225 230 235 240
 Phe Asn Ile Thr Tyr Ser Phe Asp Met Cys Pro Asn Asn Cys Ser Gly
 245 250 255
 Arg Gly Glu Cys Lys Ile Ser Asn Ser Ser Asp Thr Val Glu Cys Glu
 260 265 270

 Cys Ser Glu Asn Trp Lys Gly Glu Ala Cys Asp Ile Pro His Cys Thr
 275 280 285
 Asp Asn Cys Gly Phe Pro His Arg Gly Ile Cys Asn Ser Ser Asp Val
 290 295 300
 Arg Gly Cys Ser Cys Phe Ser Asp Trp Gln Gly Pro Gly Cys Ser Val
 305 310 315 320
 Pro Val Pro Ala Asn Gln Ser Phe Trp Thr Arg Glu Glu Tyr Ser Asn
 325 330 335
 Leu Lys Leu Pro Arg Ala Ser His Lys Ala Val Val Asn Gly Asn Ile

 340 345 350
 Met Trp Val Val Gly Gly Tyr Met Phe Asn His Ser Asp Tyr Asn Met
 355 360 365
 Val Leu Ala Tyr Asp Leu Ala Ser Arg Glu Trp Leu Pro Leu Asn Arg
 370 375 380
 Ser Val Asn Asn Val Val Val Arg Tyr Gly His Ser Leu Ala Leu Tyr
 385 390 395 400
 Lys Asp Lys Ile Tyr Met Tyr Gly Gly Lys Ile Asp Ser Thr Gly Asn
 405 410 415

Val Thr Asn Glu Leu Arg Val Phe His Ile His Asn Glu Ser Trp Val
420 425 430

Leu Leu Thr Pro Lys Ala Lys Glu Gln Tyr Ala Val Val Gly His Ser
435 440 445

Ala His Ile Val Thr Leu Lys Asn Gly Arg Val Val Met Leu Val Ile
450 455 460

Phe Gly His Cys Pro Leu Tyr Gly Tyr Ile Ser Asn Val Gln Glu Tyr
465 470 475 480

Asp Leu Asp Lys Asn Thr Trp Ser Ile Leu His Thr Gln Gly Ala Leu
485 490 495

Val Gln Gly Gly Tyr Gly His Ser Ser Val Tyr Asp His Arg Thr Arg
500 505 510

Ala Leu Tyr Val His Gly Gly Tyr Lys Ala Phe Ser Ala Asn Lys Tyr
515 520 525

Arg Leu Ala Asp Asp Leu Tyr Arg Tyr Asp Val Asp Thr Gln Met Trp
530 535 540

Thr Ile Leu Lys Asp Ser Arg Phe Phe Arg Tyr Leu His Thr Ala Val
545 550 555 560

Ile Val Ser Gly Thr Met Leu Val Phe Gly Gly Asn Thr His Asn Asp
565 570 575

Thr Ser Met Ser His Gly Ala Lys Cys Phe Ser Ser Asp Phe Met Ala
580 585 590

Tyr Asp Ile Ala Cys Asp Arg Trp Ser Val Leu Pro Arg Pro Asp Leu
595 600 605

His His Asp Val Asn Arg Phe Gly His Ser Ala Val Leu His Asn Ser
610 615 620

Thr Met Tyr Val Phe Gly Gly Phe Asn Ser Leu Leu Leu Ser Asp Ile
625 630 635 640

Leu Val Phe Thr Ser Glu Gln Cys Asp Ala His Arg Ser Glu Ala Ala
645 650 655

Cys Leu Ala Ala Gly Pro Gly Ile Arg Cys Val Trp Asn Thr Gly Ser
660 665 670

Ser Gln Cys Ile Ser Trp Ala Leu Ala Thr Asp Glu Gln Glu Glu Lys
675 680 685

Leu Lys Ser Glu Cys Phe Ser Lys Arg Thr Leu Asp His Asp Arg Cys
690 695 700

Asp Gln His Thr Asp Cys Tyr Ser Cys Thr Ala Asn Thr Asn Asp Cys
705 710 715 720

His Trp Cys Asn Asp His Cys Val Pro Arg Asn His Ser Cys Ser Glu
725 730 735

Gly Gln Ile Ser Ile Phe Arg Tyr Glu Asn Cys Pro Lys Asp Asn Pro
740 745 750

Met Tyr Tyr Cys Asn Lys Lys Thr Ser Cys Arg Ser Cys Ala Leu Asp
755 760 765

Gln Asn Cys Gln Trp Glu Pro Arg Asn Gln Glu Cys Ile Ala Leu Pro
770 775 780

Glu Asn Ile Cys Gly Ile Gly Trp His Leu Val Gly Asn Ser Cys Leu
785 790 795 800

Lys Ile Thr Thr Ala Lys Glu Asn Tyr Asp Asn Ala Lys Leu Phe Cys
805 810 815

Arg Asn His Asn Ala Leu Leu Ala Ser Leu Thr Thr Gln Lys Lys Val
820 825 830

Glu Phe Val Leu Lys Gln Leu Arg Ile Met Gln Ser Ser Gln Ser Met
835 840 845

Ser Lys Leu Thr Leu Thr Pro Trp Val Gly Leu Arg Lys Ile Asn Val
850 855 860

Ser Tyr Trp Cys Trp Glu Asp Met Ser Pro Phe Thr Asn Ser Leu Leu
865 870 875 880

Gln Trp Met Pro Ser Glu Pro Ser Asp Ala Gly Phe Cys Gly Ile Leu
885 890 895

Ser Glu Pro Ser Thr Arg Gly Leu Lys Ala Ala Thr Cys Ile Asn Pro
900 905 910

Leu Asn Gly Ser Val Cys Glu Arg Pro Ala Asn His Ser Ala Lys Gln

915 920 925
 Cys Arg Thr Pro Cys Ala Leu Arg Thr Ala Cys Gly Asp Cys Thr Ser
 930 935 940
 Gly Ser Ser Glu Cys Met Trp Cys Ser Asn Met Lys Gln Cys Val Asp
 945 950 955 960
 Ser Asn Ala Tyr Val Ala Ser Phe Pro Phe Gly Gln Cys Met Glu Trp
 965 970 975
 Tyr Thr Met Ser Thr Cys Pro Pro Glu Asn Cys Ser Gly Tyr Cys Thr
 980 985 990

 Cys Ser His Cys Leu Glu Gln Pro Gly Cys Gly Trp Cys Thr Asp Pro
 995 1000 1005
 Ser Asn Thr Gly Lys Gly Lys Cys Ile Glu Gly Ser Tyr Lys Gly Pro
 1010 1015 1020
 Val Lys Met Pro Ser Gln Ala Pro Thr Gly Asn Phe Tyr Pro Gln Pro
 1025 1030 1035 1040
 Leu Leu Asn Ser Ser Met Cys Leu Glu Asp Ser Arg Tyr Asn Trp Ser
 1045 1050 1055
 Phe Ile His Cys Pro Ala Cys Gln Cys Asn Gly His Ser Lys Cys Ile

 1060 1065 1070
 Asn Gln Ser Ile Cys Glu Lys Cys Glu Asn Leu Thr Thr Gly Lys His
 1075 1080 1085
 Cys Glu Thr Cys Ile Ser Gly Phe Tyr Gly Asp Pro Thr Asn Gly Gly
 1090 1095 1100
 Lys Cys Gln Pro Cys Lys Cys Asn Gly His Ala Ser Leu Cys Asn Thr
 1105 1110 1115 1120
 Asn Thr Gly Lys Cys Phe Cys Thr Thr Lys Gly Val Lys Gly Asp Glu
 1125 1130 1135

 Cys Gln Leu Cys Glu Val Glu Asn Arg Tyr Gln Gly Asn Pro Leu Arg
 1140 1145 1150
 Gly Thr Cys Tyr Tyr Thr Leu Leu Ile Asp Tyr Gln Phe Thr Phe Ser
 1155 1160 1165
 Leu Ser Gln Glu Asp Asp Arg Tyr Tyr Thr Ala Ile Asn Phe Val Ala

1170 1175 1180
 Thr Pro Asp Glu Gln Asn Arg Asp Leu Asp Met Phe Ile Asn Ala Ser
 1185 1190 1195 1200
 Lys Asn Phe Asn Leu Asn Ile Thr Trp Ala Ala Ser Phe Ser Ala Gly

 1205 1210 1215
 Thr Gln Ala Gly Glu Glu Met Pro Val Val Ser Lys Thr Asn Ile Lys
 1220 1225 1230
 Glu Tyr Lys Asp Ser Phe Ser Asn Glu Lys Phe Asp Phe Arg Asn His
 1235 1240 1245
 Pro Asn Ile Thr Phe Phe Val Tyr Val Ser Asn Phe Thr Trp Pro Ile
 1250 1255 1260
 Lys Ile Gln Ile Ala Phe Ser Gln His Ser Asn Phe Met Asp Leu Val
 1265 1270 1275 1280

 Gln Phe Phe Val Thr Phe Phe Ser Cys Phe Leu Ser Leu Leu Leu Val
 1285 1290 1295
 Ala Ala Val Val Trp Lys Ile Lys Gln Ser Cys Trp Ala Ser Arg Arg
 1300 1305 1310
 Arg Glu Gln Leu Leu Arg Glu Met Gln Gln Met Ala Ser Arg Pro Phe
 1315 1320 1325
 Ala Ser Val Asn Val Ala Leu Glu Thr Asp Glu Glu Pro Pro Asp Leu
 1330 1335 1340
 Ile Gly Gly Ser Ile Lys Thr Val Pro Lys Pro Ile Ala Leu Glu Pro

 1345 1350 1355 1360
 Cys Phe Gly Asn Lys Ala Ala Val Leu Ser Val Phe Val Arg Leu Pro
 1365 1370 1375
 Arg Gly Leu Gly Gly Ile Pro Pro Pro Gly Gln Ser Gly Leu Ala Val
 1380 1385 1390
 Ala Ser Ala Leu Val Asp Ile Ser Gln Gln Met Pro Ile Val Tyr Lys
 1395 1400 1405
 Glu Lys Ser Gly Ala Val Arg Asn Arg Lys Gln Gln Pro Pro Ala Gln
 1410 1415 1420

Pro Gly Thr Cys Ile

1425

<210> 4

<211> 8651

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ATRN(Attractin), NM_139321

<400> 4

acagccccgc cccgcacggc caggcgaagc ggagccggcc gtgcggtgtg tgtgtatgtg	60
ttcgcggggc gccgtctcag ccccggaag atggtggctg cagcggcggc aactgaggca	120
aggctgagga ggaggacggc ggcgacggca gcgctcggg gcaggagcgg cgggccgcac	180
tgggactggg acgtgaccag ggctgggagg cggggctgg gggccgggct ggcctccccg	240
cggctgctgt ctccaccgt gcggccacgg ctgctgtgc tgcgttgtt gctctgccg	300
ccgtgctgc tgcgtgctt gccctgtgag gccgagggcg cggcggcggc ggccggcggg	360
tcgggctcag ccgcagccga ggccaaggaa tgtgaccggc cctgtgtcaa cggcggctgc	420
tgcaaccctg gcaccggcca gtgcgtctgc cccgccggct gggtgggcca gcaatgccag	480
cactgcgggg gccgcttcag actaactgga tcttctgggt ttgtgacaga tggacctgga	540
aattataaat acaaaacgaa gtgcacgtgg ctattgaag gacagccaaa tagaataatg	600
agacttcgtt tcaatcattt tgctacagag ttagttggg accatttata tgtttatgat	660
ggggactcaa tttatgcacc gctagtgtt gcatttagtg gcctcattgt tcctgagaga	720
gatggcaatg agactgtccc tgagtttgtt gccacatcag gttatgcctt gctgcatttt	780
tttagtgatg ctgcttataa ttgactgga ttaataatta cttacagttt tgatatgtgt	840
ccaaataact gtcaggccg aggagagtgt aagatcagta atagcagcga tactgttgaa	900
tgtgaatgtt ctgaaaactg gaaagtgaa gcatgtgaca ttcctcactg tacagacaac	960
tgtggttttc ctcatcgagg catctgcaat tcaagtgatg tcagaggatg ctctgcttc	1020
tcagactggc agggctcctgg atgttcagtt cctgtaccag ctaaccagtc attttgact	1080
cgagaggaat attctaactt aaagtcctcc agagcatctc ataaagctgt ggtcaatgga	1140
aacattatgt gggttgttgg aggatataatg ttcaaccact cagattataa catggttcta	1200
gcgtatgacc ttgcttctag ggagtggcct ccactaaacc gttctgtgaa caatgtggtt	1260
gttagatatg gtcattcttt ggcatatatac aaggataaaa ttacatgta tggaggaaaa	1320
attgattcaa ctgggaatgt gaccaatgag ttgagagttt ttacattca taatgagtca	1380
tgggtgttgt tgaccctaa ggcaaaggag cagtatgcag tgggtgggca ctctgcacac	1440

attgttacac tgaagaatgg ccgagtggc atgctggta tctttgtca ctgccctctc	1500
tatggatata taagcaatgt gcaggaatat gatttggata agaacacatg gagtatatta	1560
cacacccagg gtgcccttgt gcaagggggt tacggccata gcagtgttta cgaccatagg	1620
accagggccc tatacgttca tgggtggctac aaggctttca gtgccaataa gtaccggctt	1680
gcagatgac tctaccgata tgatgtggat acccagatgt ggaccattct taaggacagc	1740
cgatttttcc gttacttgca cacagctgtg atagtgagtg gaaccatgct ggtgtttgga	1800
ggaaacacac acaatgacac atctatgagc catggcgcca aatgcttctc ttcagatttc	1860
atggcctatg acattgcctg tgaccgctgg tcagtgttcc ccagacctga tctccaccat	1920
gatgtcaaca gatttggcca ttcagcagtc ttacacaaca gcaccatgta tgtgttcggt	1980
ggtttcaata gtctctctct cagcgacatc ctggtattca cctcggaaca gtgtgatgcg	2040
catcggagtg aagccgttgt tttagcagca ggacctggta ttcggtgtgt gtggaacaca	2100
gggtcgtctc agtgtatctc gtggcgctg gcaactgatg aacaagaaga aaagttaaaa	2160
tcagaatgtt tttccaaaag aactcttgac catgacagat gtgaccagca cacagattgt	2220
tacagctgca cagccaacac caatgactgc cactgggtgca atgaccattg tgtccccagg	2280
aaccacagct gtcagaagg ccagatctcc atttttaggt atgagaattg cccaaggat	2340
aaccccatgt actactgtaa caagaagacc agctgcagga gctgtgccct ggaccagaac	2400
tgccagtggg agccccggaa tcaggagtgc attgccctgc ccgaaaatat ctgtggcatt	2460
ggctggcatt tggttggaaa ctcatgtttg aaaattacta ctgccaagga gaattatgac	2520
aatgctaaat tgttctgtag gaaccacaat gcccttttgg cttctcttac aaccagaag	2580
aaggtagaat ttgtccttaa gcagctgcga ataatgcagt catctcagag catgtccaag	2640
ctcaccttaa ccccatgggt cggccttcgg aagatcaatg tgtcctactg gtgctgggaa	2700
gatatgtccc catttacaaa tagtttacta cagtggatgc cgtctgagcc cagtgatgct	2760
ggattctgtg gaattttatc agaaccagc actcggggac tgaaggctgc aacctgcatc	2820
aaccactca atggtagtgt ctgtgaaagg cctgcaaacc acagtgctaa gcagtgccgg	2880
acaccatgtg ccttgaggac agcatgtgga gattgcacca gcggcagctc tgagtgcattg	2940
tgggtgcagca acatgaagca gtgtgtggac tccaatgcct acgtggcctc cttccctttt	3000
ggccagtgtg tggaatggta tacgatgagc acctgcccc ctgaaaattg ttcaggtac	3060
tgtacctgta gtcattgctt ggagcaacca ggctgtggct ggtgtactga tcccagcaat	3120
actggcaaag ggaaatgcat agagggttcc tataaaggac cagtgaagat gccttcgcaa	3180

gcccctacag gaaatttcta tccacagccc ctgctcaatt ccagcatgtg tctagaggac	3240
agcagataca actggtcttt cattcactgt ccagcttgcc aatgcaacgg ccacagtaaa	3300
tgcatcaatc agagcatctg tgagaagtgt gagaacctga ccacaggcaa gcactgagag	3360
acctgcatac ctggcttcta cggatgatccc accaatggag ggaaatgtca gccatgcaag	3420
tgcaatgggc acgcgtctct gtgcaacacc aacacgggca agtgcttctg caccaccaag	3480
ggcgtcaagg gggacgagtg ccagctatgt gaggtagaaa atcgatacca aggaaacct	3540
ctcagaggaa catgttatta tactcttctt attgactatc agttcacctt tagtctatcc	3600
caggaagatg atcgctatta cacagctatc aattttgtgg ctactctga cgaacaaaac	3660
agggatttgg acatgttcat caatgcctcc aagaatttca accicaacat cacctgggct	3720
gccagtttct cagctggaac ccaggctgga gaagagatgc ctgttgttcc aaaaaccaac	3780
attaaggagt acaaagatag tttctctaata gagaagtgtg attttcgcaa ccacccaaat	3840
atcactttct ttgtttatgt cagtaatttc acctggccca tcaaaattca gattgccttc	3900
tctcagcaca gcaattttat ggacctggta cagtctctcg tgactttctt cagttgttcc	3960
ctctctttgc tctggtggc tgctgtggtt tggaagatca aacaaagtg ttgggcctcc	4020
agacgtagag agcaacttct tcgagagatg caacagatgg ccagccgtcc ctttgcctct	4080
gtaaatgtcg ccttggaac agatgaggag cctctgac ttattggggg gagtataaag	4140
actgttccca aaccattgc actggagccg tgttttgca acaaagccgc tgtcctctct	4200
gtgtttgtga ggctccctcg aggcctgggt ggcatccctc ctctgggca gtcaggtctt	4260
gctgtggcca gcgccctggt ggacatttct cagcagatgc cgatagtgt caaggagaag	4320
tcaggagccg tgagaaaccg gaagcagcag cccctgcac agcctgggac ctgcatctga	4380
tgctggggcc agggactctc ccacgcacga gctagttagt ggacaccag agccatctgc	4440
agggaagggc gtggcgggga aatggctgtg cgggtcggga cggaagactg gaaaccctca	4500
aagcatctga ctacctgca tgatcacaag ctttcttga cggtttctcc catccgtgtt	4560
ccagcatcta accttttact tttgcatagg aaatacttga ttttaattaca ggtccaggga	4620
tgagctgatg gttgctggag gaggccagt tagagccagt gagagaacta ggaatgacac	4680
tcaggttcac tgtgaaaac tgttcttggg actgtctcaa ctgtgcaaaa aacaaaagat	4740
ggagtgttta caagtagaca ttctcatca gttgttcttg aacatggtct tttaaaaact	4800
agtcagatga atgttttca tctgaagcct gctatctttt ttaaaagatg tgctatttat	4860
tcttgacga tttaggcaat tatctctctt ccaggagta ctttttttc tagttgagaa	4920

ttaataatgg tccatctctt ttgatcatat caagctagga tagaaggggg gctattttaa	4980
atgtcaagg t cagcagtgtt actttgaatg taaactggta taataggtag ttttctatag	5040
taacttgatt aatttagtct taatccattt gaaactctct cttcctttct ctctgcctgt	5100
ccctctctt ctccatctca ccctccctct ctcacacata cacacacaaa cacatacaca	5160
caacactaag tgcctagact ttaaatagat cttagcaattg gaaagttagt aagcctaagt	5220
ttttacataa ttgcattcct acattcttgt aaaatttaaa tagctacat tggcaatctg	5280
cttttttct aaaatctgat ttgcagccag gaaagaattt tctcaccaa ggaacatttg	5340
atctagcagc agggatgaga ggaaagcaga aatgaatgaa ctgtgaaagc tctgttttt	5400
attatcaaaa aggacactgt caagaaggcg cccctgccc ccacccctgt gtcaccctag	5460
gcctgataag cgatcagagg aaaggactca ttcatgtcac gcttccttga gcagaaaaga	5520
gcactgagag cacttgggac ccctggatca gagagcatct gtgtgtctg cagcctctc	5580
tgaacttgtg gticattctc aggcctgggt ggactcagat gccaggaaag ggacagcctc	5640
ccattgtcag gcagaagctg cccaaagcct ggagaaggac ttgtttgcc tctttcccc	5700
aggaggggct cgaccaccc accctccctc tcagaccaag gtggtggctg tgaggagggc	5760
agcaaatgct gacaaggatg aaaagcacat ggaaaaaat ggatgaggag ggaaaactct	5820
gccaaatgga aaatgaccaa atttaagagg gtgggacagt cccctgctcc tctccagag	5880
ggcactgctt ggaaattgtg ttttcccat ttatggtgct ctgtattctg gcattatgca	5940
gcagcctccc agaagctctc ttctgcttca aaacctggga tctctggcat taccctattg	6000
ggatggaccg ctggacagca atgctcgagt ttgtgaattt ggagagatac tcaaaagagc	6060
taaaactgca gcattttacc tttaaatgca gtgcctagag agagagtatt gtctcttccc	6120
caacactaac ccactccca tgaagaattg cctggaaaga tgttttcaag gaatttgaac	6180
cataaaacac tatctgatgc acagaacacc tctactttga gactcacctc tcataaagct	6240
tctttttcac attactgtta aagaccagac gtcttagaaa agaccctcc tctcatgagc	6300
tccccatcc ctgctacaga acacagcacc catggcgctt gcagtggact ggcccttaa	6360
ttccacaggg cccccagc aaggccaaag ggaggccctt gggtattgtc ctctacaag	6420
gaagatctc tttgtttgtt caaaggacca gtttctctag gccaaagaag tctcttccc	6480
atgttagtcc tatgccttga aatatcatgc accatgaccc acagccatct ggttatgtct	6540
tattttttc ctaaaagata atgtttattt ttaaaaagga aggaaggagc aagtgaagtt	6600
tcattctgct ccagcgggtg ggaagccgt gaatccacct gcttctctt tgcaaccgac	6660
agcaaacagc tttctccggc ctcagggcag aaaaaggga tggcaggag taagaggcgc	6720
tgggctcgga gcctgtttcc aagaaggaat tggttgtcat ctggcagtgt tgcgcgtcac	6780

aagagagcct gtatataaat taaaatagtc aagacaacac tgaccttgca cttgtacata	6840
actatacagt agtgtccaga atgttcagac attcggagtg tacataaaac agaaaaaatc	6900
ttcatgtatt ttattataat ataacaatgt ctgagtttca cctaagatgt ttttgtcca	6960
tatgctggat atccaggttc tcgccaggcc ccgatacatg aataacaaac ccaagaaacg	7020
catccccatt gtgtgatgtg ttcagatgca tctggcacca attaggtatt tcttaaaaca	7080
ggactcatct gtcagagtgc acatgaaaaa tcaggcaggg aatcgaaacg acagtctgg	7140
aggagactca ggaagcagag gcgtccctgc cgctgccctt ggccctgcaa gcacatcatg	7200
accctttctg gcagcctctt ggtgctctgg gtagtgaggg atgaccagtc ttgtcctgag	7260
aaatgtttct cttagtcttt aagticaaag actaacctgt agcaatcaga ctttccaaaa	7320
gggggttctc catTTTTTgt agttttgtct aaatttttaa tgaccatttc ctggaatcag	7380
tttattatac tgaaaactgg ggggtgggagt agggagctag tttgttgata aatagttccc	7440
atttcccat ggagaatttg acataccctg gactcctgtg tgcctcctgc catccctgca	7500
cacagcctgg ggagaagcct gtgcctcccc gtgtggagag aaggcaacce cagatccct	7560
gagctaacce ggaggaagg cagtctgga cagaagactg tcagcagaag gaaagtactg	7620
gactaccctg gggtaagtc tgccattcaa gactggagac acctgggaaa taaaaagagc	7680
agggcactgc tgggtgggaag aggcatttta cttccagtg caaatcctgc tcctttgatt	7740
taatggggtg tactggggcc aggggctgat tcacttcctt gggagatggt ggtgttttca	7800
tgaacatctt tgatccttcc atttcattta ttcattcctc cattcaacaa gtatttgcta	7860
aacactaact taagctaagt ctaggtagt gactgagatg taaaaataga ttttagaatt	7920
aaaacaaaat ccaagtctc acaccctgt catcccagga gatctttcct tgtggtggtt	7980
tctgtgagaa ttggccatcc tgaggacaca gccaggacgg cagaggcctc ctggcctcag	8040
ggcatgccct gctaccttc tgaaatgttt acccattga ccaaacttgg ctccagccat	8100
tcggttggtt tctagatagc caggcccacc aagagatatt gcccttgat gagagtcaaa	8160
caccctgcct acaaggagat gttttgaaat ggagaggaaa attggcacct catcttttaa	8220
aggcagtaat ggaattgatt ttcagtaact gaatttgtgc aaaaaacatt ctaaacta	8280
gigaagcctg tttcgttgaa ctaattctgg ctctggaaat gttttgttt tatagtatt	8340
tacgatttcg tttgtttgga ttcaagctta gtttgttaat atgtataatt tagcatctat	8400
tacactcatg taaatatgga gtaagtattg taaactatct catcgcgggg attgtgggtg	8460
ttatacatc atttaggact gcaatttttt ggtatttttt gtattgtaaa ataacagcta	8520
atttaagcag gaacaagaga actaaggag gtcgtgcat tttaaacaca aatgtgaaga	8580
acttgtatat aaacaaaagt aaatactata atacaaactt ccttctgaaa taaaagtaga	8640

tctggtaaaa a

8651

<210> 5

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DCD(Dermcidin), NP_444513

<400> 5

Met Arg Phe Met Thr Leu Leu Phe Leu Thr Ala Leu Ala Gly Ala Leu

1 5 10 15

Val Cys Ala Tyr Asp Pro Glu Ala Ala Ser Ala Pro Gly Ser Gly Asn

20 25 30

Pro Cys His Glu Ala Ser Ala Ala Gln Lys Glu Asn Ala Gly Glu Asp

35 40 45

Pro Gly Leu Ala Arg Gln Ala Pro Lys Pro Arg Lys Gln Arg Ser Ser

50 55 60

Leu Leu Glu Lys Gly Leu Asp Gly Ala Lys Lys Ala Val Gly Gly Leu

65 70 75 80

Gly Lys Leu Gly Lys Asp Ala Val Glu Asp Leu Glu Ser Val Gly Lys

85 90 95

Gly Ala Val His Asp Val Lys Asp Val Leu Asp Ser Val Leu

100 105 110

<210> 6

<211> 519

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DCD(Dermcidin), NM_053283

<400> 6

gacaccctag atccaagat ctccaaggat ttggtggcat acccactcca gcacacagaa 60

gcatgagggt catgactctc ctcttctga cagctctggc aggagccctg gtctgtgcct 120

atgatccaga ggccgcctct gcccaggat cggggaaccc ttgccatgaa gcatcagcag 180

ctcaaaagga aaatgcaggt gaagaccag ggttagccag acaggcacca aagccaagga 240

agcagagatc cagccttctg gaaaaaggcc tagacggagc aaaaaagct gtggggggac 300

tcggaact aggaaaagat gcagtcgaag atctagaaag cgtgggtaaa ggagccgtcc 360
atgacgttaa agacgtcctt gactcagtac tatagctgta aggagaagct gagaaatgat 420

accaggagc agcaggettt acgtcttcag cctaaaacct aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 480
aaatttaaaa cagctattaa actgaaagca tctgtaata 519

<210> 7

<211> 930

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ITIH4(Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4), NP_002209

<400> 7

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 Ile 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 Ser 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> 8

<211> 3282

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ITIH4(Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4), NM_002218

<400> 8

agaagcctcc tggcagacac tggagccacg atgaagcccc caaggcctgt ccgtacctgc 60

agcaaagttc tcgtcctgct ttcactgctg gccatccacc agactactac tgccgaaaag 120

aatggcatcg acatctacag cctcaccgtg gactccaggg tctcatcccg atttgcccac 180

acggtcgtca ccagccgagt ggtcaatagg gccaatctg tgcaggaggc caccttccag 240

atggagctgc ccaagaaagc cttcatcacc aacttctcca tgatcatcga tggcatgacc 300

taccagggga tcatcaagga gaaggctgaa gcccaggcac agtacagcgc agcagtggcc 360

aagggaaaga gcgtcggcct cgtcaaggcc accgggagaa acatggagca gttccaggtg 420

tcggtcagtg tggctccaa tgccaagatc acctttgagc tggcttatga ggagctgctc 480

aagcggcggtt tgggggtgta cgagctgctg ctgaaagtgc ggccccagca gctggtcaag 540

cacctgcaga tggacattca catcttcgag cccagggca tcagctttct ggagacagag 600

agcaccttca tgaccaacca gctggttagac gccctacca cctggcagaa taagaccaag 660

gtcacatcc gggtcaagcc aacactttcc cagcagcaaa agtccccaga gcagcaagaa 720

acagtcctgg acggcaacct cattatccgc tatgatgtgg accggggcat ctccgggggc 780

tccattcaga tcgagaacgg ctactttgta cactactttg cccccgaggg cctaaccaca 840

atgccaaga atgtggtctt tgtcattgac aagagcggct ccatgagtgg caggaaaatc 900

cagcagaccc gggaagccct aatcaagatc ctggatgacc tcagccccag agaccagttc 960

aacctcatcg tcttcagtac agaagcaact cagtggaggc catcactggt gccagcctca 1020

gccgagaacg tgaacaaggc caggagcttt gctgcgggca tccaggccct gggagggacc 1080

aacatcaatg atgcaatgct gatggtctg cagttgtctg acagcagcaa ccaggaggag 1140

cggctgcccc aaggagtggt ctactcatc atcctgtca ccgatggcga cccactgtg 1200

ggggagacta accccaggag catccagaat aacgtgcggg aagctgtaag tggccggtac 1260

agcctcttct gcctgggctt cggtttcgac gtcagctatg ccttcctgga gaagctggca 1320

ctggacaatg gcggcctggc ccggcgcatc catgaggact cagactctgc cctgcagctc 1380

caggacttct accaggaagt ggccaaccca ctgctgacag cagtgcctt cgagtacca	1440
agcaatgccg tggaggaggt cactcagaac aacttcggc tcctcttcaa gggctcagag	1500
atggtggtgg ctgggaagct ccaggaccgg gggcctgatg tgctcacagc cacagtcagt	1560
gggaagctgc ctacacagaa catcactttc caaacggagt ccagtgtggc agagcaggag	1620
gcggagtcc agagcccaaa gtatatcttc cacaacttca tggagaggct ctgggcatac	1680
ctgactatcc agcagctgct ggagcaaaact gtctccgcat ccgatgctga tcagcaggcc	1740
ctccggaacc aagcgtgaa tttatcactt gcctacagct ttgtcacgcc tctcacatct	1800
atggtagtca ccaaaccga tgaccaagag cagtctcaag ttgctgagaa gcccatggaa	1860
ggcgaaagta gaaacaggaa tgtccactca ggttccactt tcttcaaata ttatctccag	1920
ggagcaaaaa taccaaaacc agaggcttcc ttttctcaa gaagaggatg gaatagacaa	1980
gctggagctg ctggctccc gatgaatttc agacctggg ttctcagctc caggcaactt	2040
ggactcccag gacctctga tgttctgac catgctgctt accaccctt ccgccgtctg	2100
gccatcttgc ctgcttcagc accaccagcc acctcaaatc ctgatccagc tgtgtctcgt	2160
gtcatgaata tgaatatga agaaacaacc atgacaaccc aaaccccagc ccccatacag	2220
gctccctctg ccatcctgcc actgcctggg cagagtgtgg agcggctctg tgtggacccc	2280
agacaccgcc aggggccagt gaacctgctc tcagaccctg agcaaggggt tgaggtgact	2340
ggccagtatg agaggagaa ggctgggttc tcatggatcg aagtgcctt caagaacccc	2400
ctggtatggg ttcacgcac ccctgaacac gtggtgtgga ctcggaaccg aagaagctct	2460
gcgtacaagt ggaaggagac gctattctca gtgatcccc gcctgaagat gaccatggac	2520
aagacgggtc tctgctgct cagtgacca gacaaagtga ccatggcct gttgttctgg	2580
gatggccgtg gggaggggct ccggtctctt ctgcgtgaca ctgaccgtt ctccagccac	2640
gttggaggga ccttggcca gttttaccag gaggtgctct ggggatctcc agcagcatca	2700
gatgacggca gacgcacgt gaggttcag ggcaatgacc actctgccac cagagagcgc	2760
aggctggatt accaggagg gccccggga gtggagattt cctgctggtc tgtggagctg	2820
tagttctgat ggaaggagct gtgccaccc tgtacattg gcttccccct gcaactgcag	2880
ggccgcttct ggggcctgga ccacatggg gaggaagagt ccactcatt acaaataaag	2940
aaagtggtg tgagcctggg aagtgggtgt ctccagttcc atgtggcaa atcctagggc	3000
ctcaacctcg catcctgaac cttagcatcg tggaacacag aagcttcac tgtcagctct	3060
caagagccca tggccaggaa ggcccatgct gagctttcag tccagcccct tcattttaca	3120
aacaaggaaa ctgagctga accaccatt tgagatgtca ctgtggcccc cagctagagg	3180
cccagggtg ggagcattct ccaggagcag aggttcagtc tgcttcatgg tctcttggac	3240

cagttttgac tacaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaatagagtg aa

3282