



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0016672
(43) 공개일자 2020년02월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
G01N 33/68 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0092042
(22) 출원일자 2018년08월07일
심사청구일자 2018년08월07일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
이상욱
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
김경곤
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 108동 2302호(신천동, 파크리오)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리엔목특허법인

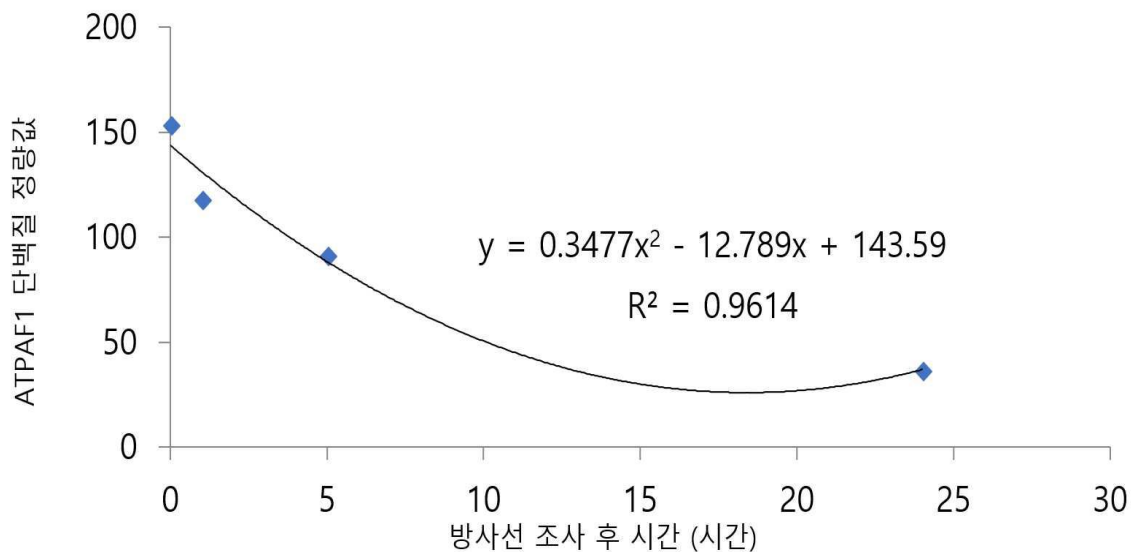
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 방사선 피폭 진단용 바이오마커 및 이를 이용한 방법

(57) 요약

방사선 피폭 진단용 바이오마커 및 이를 이용한 방법에 관한 것이다. 일 양상에 따른 방사선 피폭 진단용 조성물, 키트, 및 이를 이용한 방사선 피폭 진단 방법에 따르면, 방사선 피폭 시간이나 피폭 선량을 간편하게 진단할 수 있고, 방사선 치료 효과를 예측할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/142 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2333/46 (2013.01)

G01N 2800/40 (2013.01)

(72) 발명자

하창훈

서울특별시 강동구 고덕로 131, 105동 1503호(암사동, 강동 롯데캐슬퍼스트아파트)

염정훈

서울특별시 강동구 천중로16길 37, 105동 301호(천호동)

유재원

서울특별시 송파구 풍성로22길 20, 201호(풍납동)

김유나

경기도 화성시 동탄대로12길 71, 1841동 1005호(오산동, 화성동탄2 센트럴힐즈 동탄 아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M2A2A7A02020204

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 울산대학교

연구사업명 방사선 기술개발사업

연구과제명 방사선 치료 반응 예측 및 생체 피폭 모니터링 개발사업

기 여 율 1/1

주관기관 서울아산병원

연구기간 2017.05.02 ~ 2020.01.31

명세서

청구범위

청구항 1

ATPAF1(ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor) 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 방사선 피폭 진단용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 ATPAF1 단백질은 서열번호 1 내지 132 중 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방사선 피폭 진단용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 제제는 ATPAF1 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 것인 방사선 피폭 진단용 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 항체는 폴리클론 항체 또는 모노클론 항체인 것인 방사선 피폭 진단용 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 제제는 ATPAF1 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드인 것인 방사선 피폭 진단용 조성물.

청구항 6

ATPAF1 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 방사선 피폭 진단용 키트.

청구항 7

개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 ATPAF1 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준 또는 ATPAF1 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

상기 측정된 발현 수준을 정상 대조군의 단백질 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는 방사선 피폭을 진단하는 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈소판, 혈청, 복수액, 골수액, 림프액, 타액, 누액, 점막액, 양수, 또는 이들의 조합인 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 방사선 피폭 진단용 바이오마커 및 이를 이용한 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 방사선 피폭은 심장질환이나 암 발생의 위험을 증가시킨다. 방사선 피폭에 의한 인체 손상 정도를 측정하기 위해 세포학적, 유전학적인 측정법들이 지난 수십 년간 사용되어 왔다. 하지만 이러한 측정법들은 방사선에 대한 인체의 유전자 또는 세포의 손상 여부를 확인해 줄 수 있을 뿐, 방사선에 대한 인체 반응의 분자적 기작에 대한 정보는 제공하지는 않는다. 따라서, 방사선 피폭을 편리하고 정확하게 진단할 수 있도록 하는 마커를 찾기 위해 지금도 많은 노력이 경주되고 있다.

- [0003] 지난 수십 년간 방사선 피폭 마커에 대한 연구는 주로 암에 집중되어 왔지만 최근 들어 방사선에 노출된 정상 조직이나 시료에서 발견될 수 있는 피폭 마커를 찾는 연구로 더욱 확대되었다. 지금까지 방사선 피폭 마커로 연구되어 온 단백질 마커들이 일부 존재하나, 방사선 피폭 정도를 정량적으로 예측하기는 어려웠다.
- [0004] 일반적으로, 방사선 종사자들이 작업 시 사용하는 TLD 배지(badge)로 선량계의 방사선 노출 정도를 계산하는 방법과 피폭 상황을 재구성하여 방사선 선량을 수학적으로 계산하는 방법이 사용되지만, 배지 패용에 대한 간접 측정 또는 이론적 측정으로 인해 개별 인체에 미치는 선량도 측정의 신뢰도가 떨어지는 한계가 있다. 또한, 소핵 형성도 측정, 적혈구의 glycophorin A의 돌연변이 측정, DNA절단 정도, 및 치아의 에나멜(enamel)을 이용한 EST(Electron Spin Resonance)등의 방법들이 시도되었지만 개인차에 따라 지표들의 오차 범위가 매우 커서 방사선 선량측정이 거의 불가능하였다. 방사선 피폭 개체의 피폭 선량을 측정하기 위해, 염색체 이상측정법(conventional chromosome aberration)으로 피폭환자의 말초혈액을 채취하여 림프구를 배양하고 림프구내에 형성된 염색체 이상인 이동원체(dicentrics)와 환(ring)의 발생빈도를 광학현미경 및 미세구조 관찰장비를 통해 판별할 수 있는 gold standard 방법이 연구되었으나, 많은 시간 및 비용이 들며, 소수 전문가들만이 진단할 수 있는 한계로 거의 활용되지 못하고 있는 실정이다.
- [0005] 따라서, 채취가 간편한 액체 시료에서 방사선 피폭 선량에 정량적으로 반응하여 방사선 피폭을 정확하고 빠르게 진단할 수 있는 바이오마커에 대한 연구가 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 방사선에 노출시 발현이 정량적으로 변화하므로, 방사선 피폭 선량을 예측할 수 있고, 방사선 치료 효과를 진단할 수 있는 바이오마커 구성물에 관한 것으로, ATPAF1(ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1) 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 방사선 피폭 진단용 구성물, 키트 및 상기 단백질을 이용한 방사선 피폭을 진단하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명은 방사선 피폭에 대한 단백질 마커를 발견하기 위해 예의 연구한 결과, 방사선에 피폭 시 특정 단백질, 즉 ATPAF1 및 그 mRNA 발현량이 혈액 세포에서 특이적으로 감소한다는 것을 발견하고 ATPAF1의 방사선 피폭 마커로서의 용도를 발명하였다.
- [0008] 일 양상은 ATPAF1(ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1) 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 방사선 피폭 진단용 구성물을 제공한다.
- [0009] 본 명세서에서 용어 "진단"은 병태 생리의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미하는 것이다. 본 발명에서의 진단은 방사선 피폭 여부 및/또는 그 정도를 확인하는 것이다.
- [0010] 방사선 피폭시, 체세포가 손상되어 조혈조직 손상, 소화기계통 손상, 중추신경계 손상, 또는 피부 손상과 같은 급성 부작용이나 백내장, 종양, 생식력 저하와 같은 만성 부작용이 나타날 수 있다. 또한, 염색체 이상으로 발생하는 생식 세포 손상의 원인이 되기도 한다. 따라서, 방사선 피폭을 정량적으로 진단할 수 있는 마커가 필요하다.
- [0011] 또한, 방사선 치료는 항암 치료에 있어 매우 중요한 역할을 하지만, 방사선 치료시 방사선 피폭에 의해 불가항력적으로 종양 주변의 정상 조직에 손상이 발생한다. 이러한 종양 주변 정상 조직의 손상은 방사선 치료를 향상시키는 데 걸림돌이 된다. 또한, 방사선 치료로 인해 정상 장기에 한계선량 이상의 방사선이 조사되면 장기 고유의 기능을 부분적으로 상실하거나 영구적으로 기능 손상이 유발되어 만성적 부작용을 초래하기도 한다. 따라서, 방사선 노출에 반응하는 정상 조직 및 암 조직의 손상을 모니터링할 수 있는 마커가 필요하고, 이러한 마커를 통해 환자 맞춤형 치료가 가능하다.
- [0012] 본 명세서에서 용어 "마커(marker)"란 정상군 개체와 방사선 피폭된 개체를 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상군 개체에 비해 방사선에 피폭된 군에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산, 유전자, 지질, 당지질, 당단백질 또는 당 등과 같은 유기 생체 분자들을 포함한다. 본 발명에서의 방사선 피폭을 진단하기 위한 마커는 정상 대조군의 시료에 비하여, 방사선 피폭군의 시료에서 특이적으로 낮은 수준의 발현을 보이는 ATPAF1 유전자 및 이에 의해 코딩되는 단백질이다.

- [0013] 상기 ATPAF1(ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1) 단백질은 미토콘드리아 내 ATP생산효소인 ATPase의 합성단계에서 F1 서브유닛의 결합을 조절하는 샤페론 단백질이다. ATPAF1 단백질은 주요 혈액 세포에서 발현되나, 방사선 피폭과의 연관성 또는 방사선 피폭에 의한 영향에 대해서는 전혀 알려져 있지 않다. ATPAF1 단백질은 주로 핵, 미토콘드리아, 및 세포 외부(extracellular)에서 발현하므로 ATPAF1의 발현이나 기능 모니터링을 위해 세포 내 기관의 분리나 분해 과정이 필요 없다는 장점이 있다.
- [0014] 상기 ATPAF1 단백질은 ATP11, 또는 ATP11p로도 표시될 수 있으며, 인간에서 GenBank Accession No. NM_001256418.1, NM_001243728.1, NM_001042546.2, 또는 NM_022745.4의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산으로부터 암호화된 단백질일 수 있다. 상기 ATPAF1 단백질은 인간에서 GenBank Accession No. NP_001243347.1, NP_001230657.1, NP_001036011.2, NP_073582.3, UniprotKB Accession No. Q5TC12, A8MRA7, I3L448, HOYCA6, HOYD21, HOYEW4, HOYDD6, B7Z3U4 또는 E9PPX6의 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있다.
- [0015] 상기 ATPAF1 단백질은 서열번호 1 내지 123 중 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있다. 상기 ATPAF1 단백질은 ATPAF1 동형 단백질이나 이들의 전구체일 수 있다. 용어 "동형(isoform)"은 동일한 단백질의 다른 형태를 말한다.
- [0016] 상기 ATPAF1 단백질의 단편은 면역원성 단편일 수 있다. 상기 ATPAF1 단백질에 대한 항체에 의해 인식될 수 있는 하나 이상의 에피토프(epitope)를 가지고 있는 단편일 수 있다.
- [0017] 상기 ATPAF1 단백질의 발현 수준 측정은 ATPAF1 단백질의 발현 수준 또는 ATPAF1 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 mRNA 발현 수준을 측정함으로써 수행할 수 있다.
- [0018] 본 명세서에서 용어 "발현 수준 측정"이란 방사선 피폭을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서의 방사선 피폭 진단 유전자에서 발현된 단백질의 발현량을 확인하는 과정으로, 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편을 이용하여 단백질을 확인할 수 있다. 이를 위한 분석방법으로는 웨스턴블랏팅, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선 면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사선 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 본 명세서에서 용어 "항체"란 당해 기술분야에 공지된 용어로서 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역글로불린을 의미한다. 본 발명에서의 항체는 본 발명의 방사선 피폭 마커인 ATPAF1에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, ATPAF1 유전자를 발현벡터에 클로닝하여 ATPAF1 유전자에 의해 코딩되는 ATPAF1 단백질을 얻고, 얻어진 ATPAF1 단백질로부터 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 항체를 제조할 수 있다. 상기 항체의 형태는 폴리클론 항체 또는 모노클론 항체를 포함하며, 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2 개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태를 의미한다. 또한, 상기 항체는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.
- [0020] 상기 ATPAF1 단백질을 암호화하는 mRNA 발현량을 측정하는 체계는 일 구현예에 따르면 유전자의 mRNA에 대해 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브, 또는 안티센스 뉴클레오타이드이며, ATPAF1 유전자의 핵산 서열이 알려져 있으므로, 당업자는 상기 서열을 바탕으로 이들 유전자의 mRNA에 대해 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 디자인할 수 있다.
- [0021] 본 명세서에서 용어 "mRNA 발현 수준 측정"이란 방사선 피폭을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 방사선 피폭 마커 유전자의 mRNA 발현정도를 확인하는 과정으로, 본 발명의 일 구현예에 따르면 mRNA에 대한 프라이머 또는 프로브를 이용하여 측정할 수 있다. 이를 위한 분석방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RTPCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA: RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), 또는 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 명세서에서 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3'-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머레이트 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면 ATPAF1 유전자의 mRNA의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성량의 측정을 통해 방사선 피폭을 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

- [0023] 본 명세서에서 용어 "프로브"란 mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현량을 확인할 수 있다.
- [0024] 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면 ATPAF1 폴리뉴클레오타이드의 mRNA와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 정도를 통해 mRNA의 발현량을 측정함으로써 방사선 피폭 여부 및 정도를 측정할 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체 지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 기술분야에 공지된 다양한 방법을 통해 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)로의 변형이 있다.
- [0026] 상기 ATPAF1 단백질 및 그 유전자의 mRNA 발현 수준은 방사선 피폭시 혈액 세포 특이적으로 감소하므로, 상기 본 발명에 따른 방사선 피폭을 진단하기 위한 마커 검출용 조성물은 방사선 피폭이 의심되는 개체 중에서 특히 얻기 쉬운 혈액세포나 혈액으로부터 얻어진 시료에서의 단백질 발현 수준을 측정하는데 이용될 수 있다.
- [0027] 상기 조성물은 방사선 피폭 진단에 필요한 시료를 더 포함할 수 있다.
- [0029] 다른 양상은 ATPAF1 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 방사선 피폭 진단용 키트를 제공한다.
- [0030] ATPAF1 단백질, ATPAF1 단백질의 단편, 발현 수준, 및 발현 수준의 측정은 전술한 바와 같다.
- [0031] 상기 키트는 방사선 피폭 진단에 필요한 시료를 더 포함할 수 있다. 상기 키트는 항체, 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적합한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 또는 발색 기질을 포함할 수 있다.
- [0032] 다른 구체예에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있다.
- [0034] 다른 양상은 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 ATPAF1 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 발현 수준을 정상 대조군의 단백질 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는 방사선 피폭을 진단하는 방법을 제공한다.
- [0035] ATPAF1 단백질, ATPAF1 단백질의 단편, 발현 수준, 및 발현 수준의 측정은 전술한 바와 같다.
- [0036] 상기 방법은 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 ATPAF1 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0037] 상기 개체는 방사선 피폭이 의심되는 개체일 수 있고, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.
- [0038] 용어 "생물학적 시료"는 생물로부터 수득된 시료를 말한다. 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈소판, 혈청, 복수액, 골수액, 림프액, 타액, 누액, 점막액, 양수, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 생물학적 시료가 혈액 또는 혈장일 경우, 채취가 용이한 혈액, 혈장을 검체로 사용하기 때문에 개체의 장기 조직을 적출하지 않기 때문에 개체에게 부담을 주지 않으면서도 간편하게 분석할 수 있다. 또한, 혈액은 인체를 빠른 속도로 순환하기 때문에 방사선 노출에 의해 민감하게 반응할 수 있으므로 진단의 정확도 및 민감도가 높아 방사선 피폭 진단에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0039] 상기 생물학적 시료는 온전한(intact) 단백질을 포함할 수 있다. 온전한 단백질은 별도의 단백질의 변형 없이 생물학적 시료로부터 분리된 단백질일 수 있다. 온전한 단백질은, 예를 들어 단백질 분해 효소에 의한 단백질

분해 없이, 생물학적 시료로부터 분리된 단백질일 수 있다.

- [0040] 상기 측정하는 단계는 생물학적 시료와, ATPAF1 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 인큐베이션시키는 단계를 포함할 수 있다. 인큐베이션은 인 비트로(in vitro)에서 수행될 수 있다. 측정 방법은 예를 들어, 웨스턴블랏팅, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선 면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip) 등을 포함할 수 있다.
- [0043] 상기 측정하는 단계는 상기 생물학적 시료를 질량분석하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 생물학적 시료를 질량 분석하는 단계는 해당 단백질에서 유래한 펩타이드를 측정하는 것일 수 있다.
- [0044] 상기 방법은 상기 측정된 발현 수준을 정상 대조군의 ATPAF1 단백질 발현 수준과 비교하는 단계를 포함한다.
- [0045] 상기 정상 대조군은 방사선에 노출되지 않은 개체, 또는 방사선에 노출되기 전에 동일 개체로부터 분리된 생물학적 시료일 수 있다.
- [0046] 상기 측정된 단백질의 발현 수준은 방사선에 노출된 시간 및/또는 선량에 비례하여 정상 대조군에 비해 감소하기 때문에, ATPAF1 단백질의 발현 수준을 정상 대조군의 ATPAF1 단백질 발현 수준과 비교함으로써, ATPAF1 단백질의 발현 수준이 감소하는 정도에 따라 방사선 피폭 여부 및/또는 그 정도, 예를 들어, 방사선 피폭 선량을 예측하거나, 방사선 치료에 대한 효과를 예측하거나, 방사선 치료시 방사선 조사에 의한 치료 대상 이외의 정상 장기의 손상 정도를 진단, 예측할 수 있다.
- [0047] 상기 방법은 방사선 피폭 진단을 위해 정보를 제공하는 방법을 포함한다.

발명의 효과

- [0048] 일 양상에 따른 방사선 피폭 진단용 조성물, 키트, 및 이를 이용한 방사선 피폭 진단 방법에 따르면, 방사선 피폭 시간이나 피폭 선량을 간편하게 진단할 수 있고, 방사선 치료 효과를 예측할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0049] 도 1은 방사선 조사시 혈액 세포에서 단백질 발현 패턴 변화를 비표지 에 따라 글로벌 프로파일링(Global profiling) 정량법으로 단백질을 정량하고, 정량값에 따라 단백질들을 분류한 결과이다.
- 도 2는 혈액세포주 GM0834 및 GM10860에 x선을 2Gy 조사하고 0, 4, 9, 24시간 후의 ATPAF1 mRNA 발현을 RT-PCR로 확인한 결과이다.
- 도 3은 혈액세포주 GM0834 및 GM10860에 x선을 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8Gy 선량으로 조사하고 9시간 후의 ATPAF1 mRNA 발현을 RT-PCR로 확인한 결과이다.
- 도 4는 방사선 조사 시간에 따른 ATPAF1 단백질 발현 정량값의 변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0050] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 실시예 1. 방사선 피폭 바이오마커의 선별

- [0053] 혈액 세포에 방사선을 조사한 후, 각 시료를 질량분석기술 기반의 프로테옴 프로파일링 방법과 비표지 정량법으로 바이오마커 후보를 선별하였다. 글로벌 프로파일링 방법으로 펩타이드들의 스펙트럼 강도를 통계적으로 분석하는 비표지 정량법 (label free quantitation: LFQ)을 통해 방사선 조사에 의해 발현량이 변화한 단백질을 선별하여 바이오마커를 스크리닝하였다.

- [0054] 구체적으로, 혈액세포주에 2Gy의 방사선을 조사하고, 0, 1, 5, 24시간 후 단백질 발현 패턴의 변화에 비표지 정량법을 통해서 단백질을 정량하고, 시료 간의 패턴 변화에 따라 따라 단백질들의 그룹을 6개의 클러스터(cluster)로 분류하였다. 분류 결과를 도 1에 나타내었다. 6개의 클러스터 중 시간이 지남에 따라 발현량이 일

관적으로 감소하는 클러스터 4를 선택하였다.

[0055] 클러스터 4에 속하는 123개의 단백질 중 방사선 피폭 후 24시간이 지난 후에도 발현량이 지속적으로 감소하는 단백질인 ATPAF1을 바이오마커로 선택하였다.

[0057] 실시예 2. 방사선 피폭에 따른 ATPAF1 mRNA의 발현 변화 평가

[0058] 실시예 1에서 선택한 ATPAF1이 방사선 피폭의 바이오마커로 기능하는지 여부를 평가하기 위해서, 혈액세포주에 방사선을 조사한 후 ATPAF1 mRNA의 발현 변화를 RT-PCR을 통해 확인하였다.

[0059] 구체적으로, 혈액세포주(lymphoblastoid cell line)는 GM0834 및 GM10860 세포주를 Coriell Cell Repositories (NJ, USA)에서 분양 받았다. 분양 받은 세포주를 2mM L-글루타민과 15% 열처리되지 않은 FBS(fetal bovine serum)이 함유된 RPMI 1640 배지에서 부유시켜 T75 플라스크에서 부유된 상태로 배양하였다.

[0060] 상기 혈액세포주에 X-RAD 320 Biological X-Ray Irradiator (Precision X-Ray, Inc., CT, USA)로 2Gy선량으로 x선을 조사한 후 1, 5, 24시간 후에 샘플링을 하였다. 또한, 혈액세포주에 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8Gy 선량으로 x선을 조사하고 9시간 후에 샘플링을 하였다. 상기 샘플링한 세포주에 대하여, 0.01% Triton X-100, 완전 프로테아제 저해제 각테일 용액(complete protease inhibitor cocktail solution)과 1% PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)가 포함된 PBS 버퍼를 사용하여 세포 용해물에 5초 3회 20% 프로브 타입 음파처리(probe type sonication) 과정을 통해 단백질을 분해를 위한 단백질 균질액을 얻었다.

[0061] 상기 단백질 균질액에서 당업계에서 사용되는 공지된 방법을 통해 총 RNA를 추출하였다. 추출된 총 RNA는 260/280 nm에서 1.95이상, 260/230nm에서 1.2이상의 순도로 정제하였다. 정제한 mRNA 1μg으로부터 cDNA를 합성하기 위해, 정제한 mRNA 1μg으로부터 High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, USA)에 기술된 방법을 이용하여 20μl의 cDNA를 합성하였다. 키트 사용법은 10μl의 2X RT 버퍼, 1μl의 20X Enzyme mix, 1μg total RNA를 9 μl까지 혼합하여 반응물 조성을 구성하고 최종 부피가 20μl가 되도록 nuclease-free H₂O로 맞추었다. 37℃에서 60분간 효소반응 후 95℃에서 5분간 반응정지와 동시에 4℃에서 합성된 cDNA합성을 종료하였다. 각 유전자 발현을 위해 PCR을 수행하기 전까지 완성된 cDNA는 -15 내지 -25℃구간의 냉동고에 저장하여 사용하였다.

[0062] cDNA 합성 후, ATPAF1(NM_022745.4)의 프라이머 쌍(정방향: 5'-acagaagacagatgccttgg-3', 역방향: 5'-cgtaggtctctttccgatca-3'; 497bp)을 사용하여 94℃ 4분 1 사이클, 94℃ 30초 와 57℃ 50초 와 72℃ 1분 27사이클, 72℃ 10분 1사이클로 PCR을 수행하였다. PCR을 통해 얻어진 PCR 산물을 2% 아가로스 젤에서 전기영동하여 mRNA의 발현을 확인하였다.

[0063] 도 2는 혈액세포주 GM0834 및 GM10860에 x선을 2Gy 조사하고 0, 4, 9, 24시간 후의 ATPAF1 mRNA 발현을 RT-PCR로 확인한 결과이다.

[0064] 도 2에 나타난 바와 같이, 두 종류의 혈액 세포에서 x선 조사 후 시간이 지남에 따라 ATPAF1 mRNA의 발현량이 정량적으로 감소하였고, 24시간이 지난 후에도 계속하여 감소하는 것을 확인하였다.

[0065] 도 3은 혈액세포주 GM0834 및 GM10860에 x선을 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8Gy 선량으로 조사하고 9시간 후의 ATPAF1 mRNA 발현을 RT-PCR로 확인한 결과이다.

[0066] 도 3에 나타난 바와 같이, 두 종류의 혈액 세포에서 x선을 조사한 선량에 비례하여 ATPAF1 mRNA의 발현량이 정량적으로 감소하는 것을 확인하였다.

[0067] 따라서, ATPAF1 mRNA는 방사선 조사 선량 및 조사 시간에 비례하여 발현량이 정량적으로 감소하는 것을 알 수 있다.

[0069] 실시예 3. 방사선 피폭에 따른 ATPAF1 단백질의 발현 변화 평가

[0070] ATPAF1 단백질의 방사선 피폭에 따른 변화를 평가하기 위해서, 고분해능 질량분석기를 이용하여 펩타이드들의 스펙트럼 강도를 통계적으로 분석하는 비표지 정량법 (Label free quantitation: LFQ)을 통해 정량을 수행하였다. 구체적으로는, 프로테아제/포르파타제 저해제 각테일이 추가된 8M 우레아 100μl를 이용하여 1x10⁶의 세포

를 용해시킨 후 50mM 디티오프레이톨(dithiothreitol)로 37℃에서 이황화 결합을 환원시켰다. 이후 55mM 요오드 아세트아미드(iodoacetamide)로 빛이 없는 조건에서 알킬레이션을 수행한 후 55mM 디티오프레이톨로 담금질(quenching)을 수행하였다. 50mM 탄산수소 암모늄(ammonium bicarbonate)을 800 ml까지 추가하여 단백질:프로테아제 = 25:1의 비율로 처리하고 37℃에서 O/N으로 분해를 수행하였다. 분해된 후 10% 포름산을 이용하여 반응을 중지시키고 C18 역상 탈염 카트리지(reverse phase desalting cartridge)를 이용하여 탈염을 수행하였다. 탈염된 펩타이드는 진공 건조기(Speed Vac)를 이용하여 건조한 후 0.1% 포름산으로 녹여LC-MS 분석을 수행하였다. MS장비는 Q-Exactive Plus BioPharm version (Thermo, USA)을, LC는 UltiMate™ 3000 RSLCnano System (Thermo, USA)를 사용하였으며 펩타이드 시료는 4 µl씩 주입하여 300 µl/min의 유속으로 NanoLC와 연동된 이온 트랩 질량 분석기(Ion trap mass spectrometer)로 분석을 수행하였다. LC는 Solution A (5% 아세토니트릴, 0.1% 포름산)와 solution B (95% 아세토니트릴, 0.1% 포름산)의 농도 구배 120분을 포함하여 총 150분 동안 분리하며 사용하는 분석 컬럼은 AQUA C18 (5 µm, 125A)을 충전한 내직경 75 µm, 외직경 360 µm, 길이 50cm fused silica capillary column를 사용하여 펩타이드 혼합체를 분리하였다. 분리된 펩타이드는 2000V의 Electrospray ionization voltage을 이용하여 이온 분사하며 이온 방출기는 내직경 20 µm 트랩 이온 스프레이 방출기(tapered ion spray emitter)를 통해 질량분석기로 주입하여 스펙트럼 데이터를 획득하였다. 오비트랩(Orbitrap) MS 분석은 400~2000 m/z 범위에 대해 이온 트랩 MS로 1번의 서베이 스캔(survey scan) (resolution 30,000)후에 Higher energy collision dissociation (HCD, 25% energy level) 방식을 이용하여 오비트랩 MS를 이용, 8번의 MS/MS (resolution 60,000) 분석을 수행하였다. 5분의 dynamic exclusion option을 통해 중복된 펩타이드 이온 검출을 최소화하였다. 이온 트랩의 Auto gain control target setting은 Full MS에 대해서는 3E04를, FT MS/MS에 대해서는 2E5을 사용하였다. 획득한 RAW 파일을 Sequest 알고리즘 기반의 데이터 베이스 분석 소프트웨어인 Proteome Discoverer (Thermo, USA, version 2.2)를 이용하여 정성 분석 및 비표지 정량 분석을 수행하였다. 시스템인에는 cystein carbamidomethylation, 메티오닌(methionine)에 oxidation을 variable modification으로 수행. Trypsin miss cleavage는 “1” 값을 이용하며 sequence database는 최신 swissprot sequence DB를 사용하며 비표지 정량을 위해서 펩타이드 이온 강도를 이용한 정량분석을 수행하였다. 동정된 단백질들을 Uniprot accession number를 query로 사용하여 Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>)을 이용, gene ontology (GO)를 세포 성분(cellular component), 분자 기능 및 생물학적 공정의 세 분야를 대상으로 분석하였으며 Perseus(<http://www.perseus-framework.org>)를 이용하여 히트 맵(heat map) 및 클러스터링 분석과 Volcano plot 분석을 수행하였다.

[0071] 실험 결과, 하기 표 1에 방사선 피폭 후 시간 경과에 따른 ATPAF1의 단백질 발현 정량값을 나타내었다. ATPAF1 발현 정량값은 3회 분석하여 얻은 값의 평균이다.

표 1

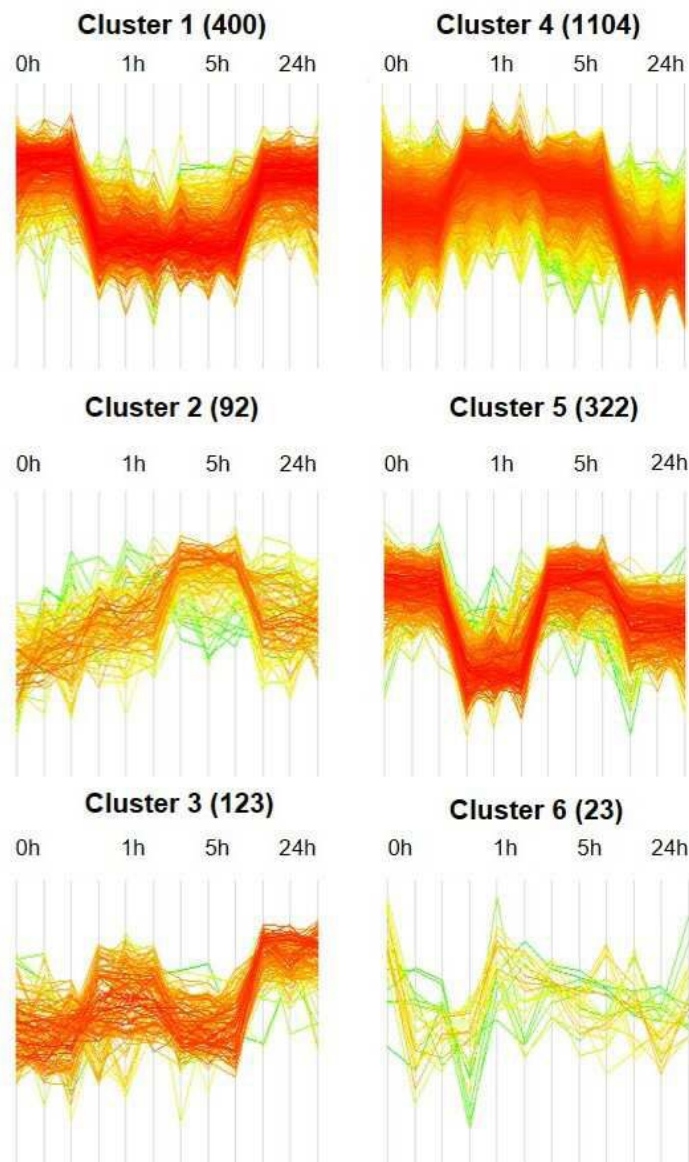
2Gy후 시간	0시간	1시간	5시간	24시간
ATPAF1 단백질 발현 정량값	153.6	118.1	91.5	36.8

[0073] 표 1에 나타난 바와 같이, 방사선 피폭 후 ATPAF1 단백질의 발현량이 시간에 비례하여 감소하는 것을 확인하였다. 도 4는 방사선 조사 시간에 따른 ATPAF1 단백질 발현 정량값의 변화를 나타낸 그래프이다.

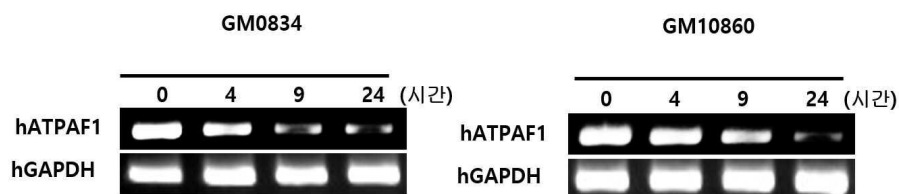
[0074] 도 4에 나타난 바와 같이, x축을 시간으로, y축을 ATPAF1 단백질의 발현 정량값으로 하여 그래프를 그린 결과, 그래프가 선형을 나타내어 ATPAF1 단백질이 방사선 조사 후 시간에 비례하여 발현이 감소하는 것을 확인하였다.

도면

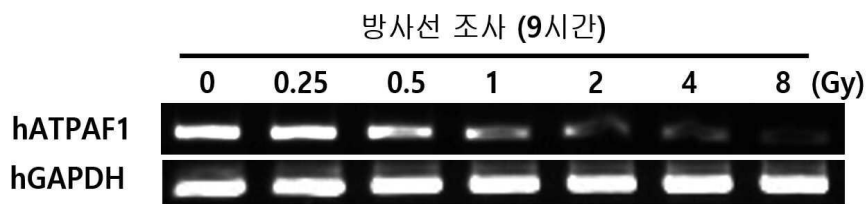
도면1



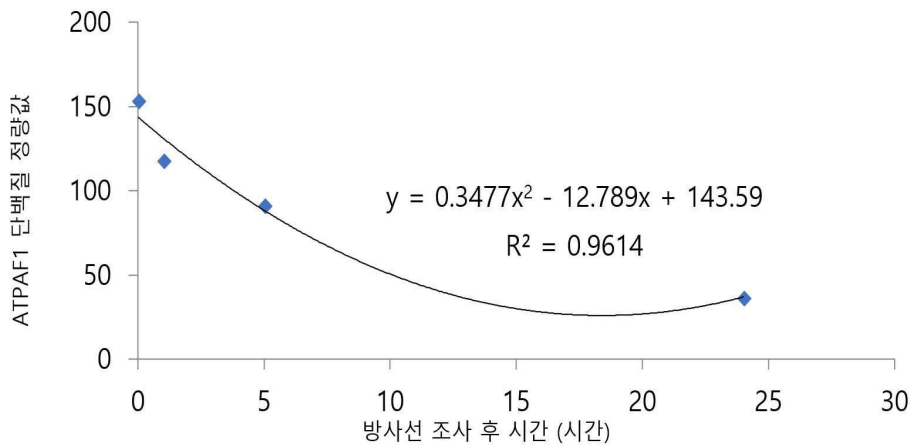
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
 THE ASAN FOUNDATION
- <120> Biomarker for diagnosing radiation exposure and method using
 thereof
- <130> PN122083
- <160> 13
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 177
- <212> PRT
- <213> homo sapiens
- <400> 1
- Met Val Lys Glu Lys Thr Ala Glu Glu Ile Lys Gln Ile Trp Gln Gln
 1 5 10 15
- Tyr Phe Ala Ala Lys Asp Thr Val Tyr Ala Val Ile Pro Ala Glu Lys
 20 25 30

Phe Asp Leu Ile Trp Asn Arg Ala Gln Ser Cys Pro Thr Phe Leu Cys
 35 40 45
 Ala Leu Pro Arg Arg Glu Gly Tyr Glu Phe Phe Val Gly Gln Trp Thr
 50 55 60
 Gly Thr Glu Leu His Phe Thr Ala Leu Ile Asn Ile Gln Thr Arg Gly
 65 70 75 80
 Glu Ala Ala Ala Ser Gln Leu Ile Leu Tyr His Tyr Pro Glu Leu Lys
 85 90 95

 Glu Glu Lys Gly Ile Val Leu Met Thr Ala Glu Met Asp Ser Thr Phe
 100 105 110
 Leu Asn Val Ala Glu Ala Gln Cys Ile Ala Asn Gln Val Gln Leu Phe
 115 120 125
 Tyr Ala Thr Asp Arg Lys Glu Thr Tyr Gly Leu Val Glu Thr Phe Asn
 130 135 140
 Leu Arg Pro Asn Glu Phe Lys Tyr Met Ser Val Ile Ala Glu Leu Glu
 145 150 155 160
 Gln Ser Gly Leu Gly Ala Glu Leu Lys Cys Ala Gln Asn Gln Asn Lys
 165 170 175

Thr

<210> 2

<211> 240

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Met Ser Asp Pro Ala Ala Phe Glu Ser Arg Leu Glu Lys Arg Ser Glu
 1 5 10 15
 Phe Arg Lys Gln Pro Val Gly His Ser Arg Gln Gly Asp Phe Ile Lys
 20 25 30
 Cys Val Glu Gln Lys Thr Asp Ala Leu Gly Lys Gln Ser Val Asn Arg
 35 40 45

Gly Phe Thr Lys Asp Lys Thr Leu Ser Ser Ile Phe Asn Ile Glu Met

50 55 60
Val Lys Glu Lys Thr Ala Glu Glu Ile Lys Gln Ile Trp Gln Gln Tyr
65 70 75 80
Phe Ala Ala Lys Asp Thr Val Tyr Ala Val Ile Pro Ala Glu Lys Phe
85 90 95
Asp Leu Ile Trp Asn Arg Ala Gln Ser Cys Pro Thr Phe Leu Cys Ala
100 105 110
Leu Pro Arg Arg Glu Gly Tyr Glu Phe Phe Val Gly Gln Trp Thr Gly

115 120 125
Thr Glu Leu His Phe Thr Ala Leu Ile Asn Ile Gln Thr Arg Gly Glu
130 135 140
Ala Ala Ala Ser Gln Leu Ile Leu Tyr His Tyr Pro Glu Leu Lys Glu
145 150 155 160
Glu Lys Gly Ile Val Leu Met Thr Ala Glu Met Asp Ser Thr Phe Leu
165 170 175
Asn Val Ala Glu Ala Gln Cys Ile Ala Asn Gln Val Gln Leu Phe Tyr
180 185 190

Ala Thr Asp Arg Lys Glu Thr Tyr Gly Leu Val Glu Thr Phe Asn Leu
195 200 205
Arg Pro Asn Glu Phe Lys Tyr Met Ser Val Ile Ala Glu Leu Glu Gln
210 215 220
Ser Gly Leu Gly Ala Glu Leu Lys Cys Ala Gln Asn Gln Asn Lys Thr
225 230 235 240

<210> 3

<211> 283

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 3

Met Glu Arg Ala Arg Gly Pro Arg Ala Glu Ala Asp Ala Pro Glu Glu

1 5 10 15
Glu Glu Glu Ala Gly Ala Ala Met Ala Ala Val Val Val Ala Ala Ala
20 25 30

Gly Gly Ala Gly Pro Ala Val Leu Gln Val Ala Gly Leu Tyr Arg Gly
 35 40 45
 Leu Cys Ala Val Arg Ser Arg Ala Leu Gly Leu Gly Leu Val Ser Pro
 50 55 60
 Ala Gln Leu Arg Val Phe Pro Val Arg Pro Gly Ser Gly Arg Pro Glu
 65 70 75 80

 Gly Gly Ala Asp Ser Ser Gly Val Gly Ala Glu Ala Glu Leu Gln Ala
 85 90 95
 Asn Pro Phe Tyr Asp Arg Tyr Arg Asp Lys Ile Gln Leu Leu Arg Arg
 100 105 110
 Ser Asp Pro Ala Ala Phe Glu Ser Arg Leu Glu Lys Arg Ser Glu Phe
 115 120 125
 Arg Lys Gln Pro Val Gly His Ser Arg Gln Gly Asp Phe Ile Lys Cys
 130 135 140
 Val Glu Gln Lys Thr Asp Ala Leu Gly Lys Gln Ser Val Asn Arg Gly

 145 150 155 160
 Phe Thr Lys Asp Lys Thr Leu Ser Ser Ile Phe Asn Ile Glu Met Val
 165 170 175
 Lys Glu Lys Thr Ala Glu Glu Ile Lys Gln Ile Trp Gln Gln Tyr Phe
 180 185 190
 Ala Ala Lys Asp Thr Val Tyr Ala Val Ile Pro Ala Glu Lys Phe Asp
 195 200 205
 Leu Ile Trp Asn Arg Ala Gln Ser Cys Pro Thr Asn Val Ala Glu Ala
 210 215 220

 Gln Cys Ile Ala Asn Gln Val Gln Leu Phe Tyr Ala Thr Asp Arg Lys
 225 230 235 240
 Glu Thr Tyr Gly Leu Val Glu Thr Phe Asn Leu Arg Pro Asn Glu Phe
 245 250 255
 Lys Tyr Met Ser Val Ile Ala Glu Leu Glu Gln Ser Gly Leu Gly Ala
 260 265 270
 Glu Leu Lys Cys Ala Gln Asn Gln Asn Lys Thr
 275 280

<210> 4
<211> 351
<212> PRT

<213> homo sapiens
<400> 4

Met Glu Arg Ala Arg Gly Pro Arg Ala Glu Ala Asp Ala Pro Glu Glu
1 5 10 15
Glu Glu Glu Ala Gly Ala Ala Met Ala Ala Val Val Val Ala Ala Ala
20 25 30
Gly Gly Ala Gly Pro Ala Val Leu Gln Val Ala Gly Leu Tyr Arg Gly
35 40 45
Leu Cys Ala Val Arg Ser Arg Ala Leu Gly Leu Gly Leu Val Ser Pro
50 55 60

Ala Gln Leu Arg Val Phe Pro Val Arg Pro Gly Ser Gly Arg Pro Glu
65 70 75 80
Gly Gly Ala Asp Ser Ser Gly Val Gly Ala Glu Ala Glu Leu Gln Ala
85 90 95
Asn Pro Phe Tyr Asp Arg Tyr Arg Asp Lys Ile Gln Leu Leu Arg Arg
100 105 110
Ser Asp Pro Ala Ala Phe Glu Ser Arg Leu Glu Lys Arg Ser Glu Phe
115 120 125
Arg Lys Gln Pro Val Gly His Ser Arg Gln Gly Asp Phe Ile Lys Cys

130 135 140
Val Glu Gln Lys Thr Asp Ala Leu Gly Lys Gln Ser Val Asn Arg Gly
145 150 155 160
Phe Thr Lys Asp Lys Thr Leu Ser Ser Ile Phe Asn Ile Glu Met Val
165 170 175
Lys Glu Lys Thr Ala Glu Glu Ile Lys Gln Ile Trp Gln Gln Tyr Phe
180 185 190
Ala Ala Lys Asp Thr Val Tyr Ala Val Ile Pro Ala Glu Lys Phe Asp
195 200 205

Leu Ile Trp Asn Arg Ala Gln Ser Cys Pro Thr Phe Leu Cys Ala Leu
 210 215 220
 Pro Arg Arg Glu Gly Tyr Glu Phe Phe Val Gly Gln Trp Thr Gly Thr
 225 230 235 240
 Glu Leu His Phe Thr Ala Leu Ile Asn Ile Gln Thr Arg Gly Glu Ala
 245 250 255
 Ala Ala Ser Gln Leu Ile Leu Tyr His Tyr Pro Glu Leu Lys Glu Glu
 260 265 270
 Lys Gly Ile Val Leu Met Thr Ala Glu Met Asp Ser Thr Phe Leu Asn
 275 280 285
 Val Ala Glu Ala Gln Cys Ile Ala Asn Gln Val Gln Leu Phe Tyr Ala
 290 295 300
 Thr Asp Arg Lys Glu Thr Tyr Gly Leu Val Glu Thr Phe Asn Leu Arg
 305 310 315 320
 Pro Asn Glu Phe Lys Tyr Met Ser Val Ile Ala Glu Leu Glu Gln Ser
 325 330 335
 Gly Leu Gly Ala Glu Leu Lys Cys Ala Gln Asn Gln Asn Lys Thr
 340 345 350

<210> 5
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 5

Met Ala Ala Val Val Val Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Pro Ala Val
 1 5 10 15
 Leu Gln Val Ala Gly Leu Tyr Arg Gly Leu Cys Ala Val Arg Ser Arg
 20 25 30
 Ala Leu Gly Leu Gly Leu Val Ser Pro Ala Gln Leu Arg Val Phe Pro
 35 40 45
 Val Arg Pro Gly Ser Gly Arg Pro Glu Gly Gly Ala Asp Ser Ser Gly
 50 55 60
 Val Gly Ala Glu Ala Glu Leu Gln Ala Asn Pro Phe Tyr Asp Arg Tyr

65	70							75							80			
Arg	Asp	Lys	Ile	Gln	Leu	Leu	Arg	Arg	Ser	Asp	Pro	Ala	Ala	Phe	Glu			
				85							90						95	
Ser	Arg	Leu	Glu	Lys	Arg	Ser	Glu	Phe	Arg	Lys	Gln	Pro	Val	Gly	His			
				100							105						110	
Ser	Arg	Gln	Gly	Asp	Phe	Ile	Lys	Cys	Val	Glu	Gln	Lys	Thr	Asp	Ala			
				115							120						125	
Leu	Gly	Lys	Gln	Ser	Val	Asn	Arg	Gly	Phe	Thr	Lys	Asp	Lys	Thr	Leu			
				130							135						140	
Ser	Ser	Ile	Phe	Asn	Ile	Glu	Met	Val	Lys	Glu	Lys	Thr	Ala	Glu	Glu			
145				150							155						160	
Ile	Lys	Gln	Ile	Trp	Gln	Gln	Tyr	Phe	Ala	Ala	Lys	Asp	Thr	Val	Tyr			
				165							170						175	
Ala	Val	Ile	Pro	Ala	Glu	Lys	Phe	Asp	Leu	Ile	Trp	Asn	Arg	Ala	Gln			
				180							185						190	
Ser	Cys	Pro	Thr	Phe	Leu	Cys	Ala	Leu	Pro	Arg	Arg	Glu	Gly	Tyr	Glu			
				195							200						205	
Phe	Phe	Val	Gly	Gln	Trp	Thr	Gly	Thr	Glu	Leu	His	Phe	Thr	Ala	Leu			
210				215							220							
Ile	Asn	Ile	Gln	Thr	Arg	Gly	Glu	Ala	Ala	Ala	Ser	Gln	Leu	Ile	Leu			
225				230							235						240	
Tyr	His	Tyr	Pro	Glu	Leu	Lys	Glu	Glu	Lys	Gly	Ile	Val	Leu	Met	Thr			
				245							250						255	
Ala	Glu	Met	Asp	Ser	Thr	Phe	Leu	Asn	Val	Ala	Glu	Ala	Gln	Cys	Ile			
				260							265						270	
Ala	Asn	Gln	Val	Gln	Leu	Phe	Tyr	Ala	Thr	Asp	Arg	Lys	Glu	Thr	Tyr			
				275							280						285	
Gly	Leu	Val	Glu	Thr	Phe	Asn	Leu	Arg	Pro	Asn	Glu	Phe	Lys	Tyr	Met			
290				295							300							
Ser	Val	Ile	Ala	Glu	Leu	Glu	Gln	Ser	Gly	Leu	Gly	Ala	Glu	Leu	Lys			
305				310							315						320	
Cys	Ala	Gln	Asn	Gln	Asn	Lys	Thr											

325

<210> 6
 <211> 283
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 6

Met Glu Arg Ala Arg Gly Pro Arg Ala Glu Ala Asp Ala Pro Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Glu Glu Ala Gly Ala Ala Met Ala Ala Val Val Val Ala Ala Ala
 20 25 30
 Gly Gly Ala Gly Pro Ala Val Leu Gln Val Ala Gly Leu Tyr Arg Gly
 35 40 45
 Leu Cys Ala Val Arg Ser Arg Ala Leu Gly Leu Gly Leu Val Ser Pro
 50 55 60
 Ala Gln Leu Arg Val Phe Pro Val Arg Pro Gly Ser Gly Arg Pro Glu
 65 70 75 80
 Gly Gly Ala Asp Ser Ser Gly Val Gly Ala Glu Ala Glu Leu Gln Ala
 85 90 95
 Asn Pro Phe Tyr Asp Arg Tyr Arg Asp Lys Ile Gln Leu Leu Arg Arg
 100 105 110
 Ser Asp Pro Ala Ala Phe Glu Ser Arg Leu Glu Lys Arg Ser Glu Phe
 115 120 125
 Arg Lys Gln Pro Val Gly His Ser Arg Gln Gly Asp Phe Ile Lys Cys
 130 135 140
 Val Glu Gln Lys Thr Asp Ala Leu Gly Lys Gln Ser Val Asn Arg Gly
 145 150 155 160
 Phe Thr Lys Asp Lys Thr Leu Ser Ser Ile Phe Asn Ile Glu Met Val
 165 170 175
 Lys Glu Lys Thr Ala Glu Glu Ile Lys Gln Ile Trp Gln Gln Tyr Phe
 180 185 190
 Ala Ala Lys Asp Thr Val Tyr Ala Val Ile Pro Ala Glu Lys Phe Asp
 195 200 205

Leu Ile Trp Asn Arg Ala Gln Ser Cys Pro Thr Asn Val Ala Glu Ala

210 215 220
Gln Cys Ile Ala Asn Gln Val Gln Leu Phe Tyr Ala Thr Asp Arg Lys
225 230 235 240
Glu Thr Tyr Gly Leu Val Glu Thr Phe Asn Leu Arg Pro Asn Glu Phe
245 250 255
Lys Tyr Met Ser Val Ile Ala Glu Leu Glu Gln Ser Gly Leu Gly Ala
260 265 270
Glu Leu Lys Cys Ala Gln Asn Gln Asn Lys Thr
275 280

<210> 7
<211> 351
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 7

Met Glu Arg Ala Arg Gly Pro Arg Ala Glu Ala Asp Ala Pro Glu Glu
1 5 10 15
Glu Glu Glu Ala Gly Ala Ala Met Ala Ala Val Val Val Ala Ala Ala
20 25 30
Gly Gly Ala Gly Pro Ala Val Leu Gln Val Ala Gly Leu Tyr Arg Gly
35 40 45
Leu Cys Ala Val Arg Ser Arg Ala Leu Gly Leu Gly Leu Val Ser Pro

50 55 60
Ala Gln Leu Arg Val Phe Pro Val Arg Pro Gly Ser Gly Arg Pro Glu
65 70 75 80
Gly Gly Ala Asp Ser Ser Gly Val Gly Ala Glu Ala Glu Leu Gln Ala
85 90 95
Asn Pro Phe Tyr Asp Arg Tyr Arg Asp Lys Ile Gln Leu Leu Arg Arg
100 105 110
Ser Asp Pro Ala Ala Phe Glu Ser Arg Leu Glu Lys Arg Ser Glu Phe
115 120 125

Arg Lys Gln Pro Val Gly His Ser Arg Gln Gly Asp Phe Ile Lys Cys
130 135 140
Val Glu Gln Lys Thr Asp Ala Leu Gly Lys Gln Ser Val Asn Arg Gly
145 150 155 160
Phe Thr Lys Asp Lys Thr Leu Ser Ser Ile Phe Asn Ile Glu Met Val
165 170 175
Lys Glu Lys Thr Ala Glu Glu Ile Lys Gln Ile Trp Gln Gln Tyr Phe
180 185 190
Ala Ala Lys Asp Thr Val Tyr Ala Val Ile Pro Ala Glu Lys Phe Asp
195 200 205
Leu Ile Trp Asn Arg Ala Gln Ser Cys Pro Thr Phe Leu Cys Ala Leu
210 215 220
Pro Arg Arg Glu Gly Tyr Glu Phe Phe Val Gly Gln Trp Thr Gly Thr
225 230 235 240
Glu Leu His Phe Thr Ala Leu Ile Asn Ile Gln Thr Arg Gly Glu Ala
245 250 255
Ala Ala Ser Gln Leu Ile Leu Tyr His Tyr Pro Glu Leu Lys Glu Glu
260 265 270
Lys Gly Ile Val Leu Met Thr Ala Glu Met Asp Ser Thr Phe Leu Asn
275 280 285
Val Ala Glu Ala Gln Cys Ile Ala Asn Gln Val Gln Leu Phe Tyr Ala
290 295 300
Thr Asp Arg Lys Glu Thr Tyr Gly Leu Val Glu Thr Phe Asn Leu Arg
305 310 315 320
Pro Asn Glu Phe Lys Tyr Met Ser Val Ile Ala Glu Leu Glu Gln Ser
325 330 335
Gly Leu Gly Ala Glu Leu Lys Cys Ala Gln Asn Gln Asn Lys Thr
340 345 350

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 8

Phe Leu Cys Ala Leu Pro Arg Arg Glu Gly Tyr Glu Phe Phe Val Gly

1 5 10 15

Gln Trp Thr Gly Thr Glu Leu His Phe Thr Ala Leu Ile Asn Ile Gln

20 25 30

Thr Arg Gly Glu Ala Ala Ala Ser Gln Leu Ile Leu Tyr His Tyr Pro

35 40 45

Glu Leu Lys Glu Glu Lys Gly Ile Val Leu Met Thr Ala Glu Met Asp

50 55 60

Ser Thr Phe Leu Asn Val Ala Glu Ala Gln Cys Ile Ala Asn Gln Val

65 70 75 80

Gln Leu Phe Tyr Ala Thr Asp Arg Lys Glu Thr Tyr Gly Trp Ala Gln

85 90 95

Leu Leu Ala Ile His Ser Thr Leu Ile His Leu His Gln Arg Val Arg

100 105 110

Lys

<210> 9

<211> 183

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 9

Xaa Gly Lys Gln Ser Val Asn Arg Gly Phe Thr Lys Asp Lys Thr Leu

1 5 10 15

Ser Ser Ile Phe Asn Ile Glu Met Val Lys Glu Lys Thr Ala Glu Glu

20 25 30

Ile Lys Gln Ala Glu Lys Phe Asp Leu Ile Trp Asn Arg Ala Gln Ser

35 40 45

Cys Pro Thr Phe Leu Cys Ala Leu Pro Arg Arg Glu Gly Tyr Glu Phe

50 55 60

Phe Val Gly Gln Trp Thr Gly Thr Glu Leu His Phe Thr Ala Leu Ile

65 70 75 80

Asn Ile Gln Thr Arg Gly Glu Ala Ala Ala Ser Gln Leu Ile Leu Tyr
85 90 95
His Tyr Pro Glu Leu Lys Glu Glu Lys Gly Ile Val Leu Met Thr Ala
100 105 110
Glu Met Asp Ser Thr Phe Leu Asn Val Ala Glu Ala Gln Cys Ile Ala
115 120 125
Asn Gln Val Gln Leu Phe Tyr Ala Thr Asp Arg Lys Glu Thr Tyr Gly
130 135 140

Leu Val Glu Thr Phe Asn Leu Arg Pro Asn Glu Phe Lys Tyr Met Ser
145 150 155 160
Val Ile Ala Glu Leu Glu Gln Ser Gly Leu Gly Ala Glu Leu Lys Cys
165 170 175
Ala Gln Asn Gln Asn Lys Thr
180

<210> 10
<211> 174
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 10

Leu Ile Arg Ser Asp Pro Ala Ala Phe Glu Ser Arg Leu Glu Lys Arg
1 5 10 15

Ser Glu Phe Arg Lys Gln Pro Val Gly His Ser Arg Gln Gly Asp Phe
20 25 30
Ile Lys Cys Val Glu Gln Lys Thr Asp Ala Leu Gly Lys Gln Ser Val
35 40 45
Asn Arg Gly Phe Thr Lys Asp Lys Thr Leu Ser Ser Ile Phe Asn Ile
50 55 60
Glu Met Val Lys Glu Lys Thr Ala Glu Glu Ile Lys Gln Ile Trp Gln
65 70 75 80
Gln Tyr Phe Ala Ala Lys Asp Thr Val Tyr Ala Val Ile Pro Ala Glu
85 90 95

Lys Phe Asp Leu Ile Trp Asn Arg Ala Gln Ser Cys Pro Thr Asn Val

100 105 110
Ala Glu Ala Gln Cys Ile Ala Asn Gln Val Gln Leu Phe Tyr Ala Thr
115 120 125
Asp Arg Lys Glu Thr Tyr Gly Leu Val Glu Thr Phe Asn Leu Arg Pro
130 135 140
Asn Glu Phe Lys Tyr Met Ser Val Ile Ala Glu Leu Glu Gln Ser Gly
145 150 155 160

Leu Gly Ala Glu Leu Lys Cys Ala Gln Asn Gln Asn Lys Thr

165 170

<210> 11

<211> 86

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 11

Xaa Val Arg Pro Gly Ser Gly Arg Pro Glu Gly Gly Ala Asp Ser Ser

1 5 10 15

Gly Val Gly Ala Glu Ala Glu Leu Gln Ala Asn Pro Phe Tyr Asp Arg

20 25 30

Tyr Arg Asp Lys Ile Gln Leu Leu Arg Arg Ser Asp Pro Ala Ala Phe

35 40 45

Glu Ser Arg Leu Glu Lys Arg Ser Glu Phe Arg Lys Gln Pro Val Gly

50 55 60

His Ser Arg Gln Gly Asp Phe Ile Lys Cys Val Glu Gln Lys Asp Gly

65 70 75 80

Ala Gln Asn Lys Leu Val

85

<210> 12

<211> 45

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 12

Met Ser Asp Pro Ala Ala Phe Glu Ser Arg Leu Glu Lys Arg Ser Glu

1 5 10 15

 Phe Arg Lys Gln Pro Val Gly His Ser Arg Gln Gly Asp Phe Ile Lys
 20 25 30
 Cys Val Glu Gln Lys Asp Gly Ala Gln Asn Lys Leu Val
 35 40 45
 <210> 13
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 13

 Met Ile Trp Tyr Thr Glu Lys Gly His Leu Thr Lys Thr Arg Asp Phe
 1 5 10 15
 Lys Lys Leu Arg Lys Leu Ser Gly Ser Gly Asp Ser Trp Ala Arg Ala
 20 25 30

 Pro Thr His His Thr Ile Gln Thr Arg Ala Leu Trp Pro Cys Ala Arg
 35 40 45
 Lys Asp Leu Ile Ile Leu Phe Thr Leu Gln Asn Val Ala Glu Ala Gln
 50 55 60
 Cys Ile Ala Asn Gln Val Gln Leu Phe Tyr Ala Thr Asp Arg Lys Glu
 65 70 75 80
 Thr Tyr Gly Leu Val Glu Thr Phe Asn Leu Arg Pro Asn Glu Phe Lys
 85 90 95
 Tyr Met Ser Val Ile Ala Glu Leu Glu Gln Ser Gly Leu Gly Ala Glu

 100 105 110
 Leu Lys Cys Ala Gln Asn Gln Asn Lys Thr
 115 120