



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0121391
(43) 공개일자 2012년11월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7017249
(22) 출원일자(국제) 2010년12월03일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2012년07월02일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2010/068836
(87) 국제공개번호 WO 2011/067377
국제공개일자 2011년06월09일
(30) 우선권주장
MI2009A002154 2009년12월04일 이탈리아(IT)

(71) 출원인
비오유니베르사 에스.알.엘.
이탈리아 아이-84084 피스치아노 디파르티멘토 디
스치엔체 파르마체유티케 유니베르시타 데글리 스
투디 디 살레르노 비아 폰테 돈 메틸로
(72) 발명자
투르코 마리아 카테리나
이탈리아 아이-83100 아벨리노 비아 브리가타 아
벨리노 33
(74) 대리인
리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 생화학 혈청 마커

(57) 요약

본 발명은 미지의 생물 시료에서 가용성 BAG3 단백질의 존재 및/또는 농도를 검출하는 방법에 관한 것이고 분석은 바람직하게는 항체로, 바람직하게는 단일클론항체로 ELISA에 의해 수행된다. 가용성 형태의 상기 단백질의 존재는 심장병과 또는 체장 종양의 존재와 연관되어 있다.

대표도 - 도1

a)

100 kDa



b)

시작 - 끝	관찰값	Mr(실험)	Mr(계산)	ppm	미스 시열 (Miss sequence)
32 - 47	1915.8500	1914.8427	1914.9013	-31	K.IDPQTGWPFVDHNSR.T
48 - 55	990.3800	989.3727	989.4567	-85	R.TTTWNDPR.V
63 - 73	1062.4700	1061.4627	1061.4738	-10	K.DTASSANGPSR.N
78 - 82	611.4200	610.4127	610.4166	-6	R.LLPIRE
109 - 123	1764.8800	1763.8727	1763.8866	-7	R.QPHLFHAYSQPGVQR.F
200 - 209	1081.5600	1080.5527	1080.5676	-14	R.SSLGSHQLPR.G
256 - 267	1481.7300	1480.7227	1480.7423	-13	K.IQGDDWEPRPLRA

특허청구의 범위

청구항 1

하기의:

- a. 혈청 (serum) 또는 혈장 (plasma)으로 구성되는, 생물 시료를 얻는 단계,
- b. 상기 생물 시료에서 가용성 BAG3의 존재 또는 농도 값을 결정하는 단계,
- c. 상기 시료로부터 얻어진 값을, 참조 값 (reference value) 또는 생물 참조 시료 (biological reference sample)로부터 얻어진 값과 비교하는 단계,
- d. 선택적으로, 추가적인 유사 값의 그룹화 (grouping) 또는 통계적으로 다른 평균 값을 가지는 그룹으로의 분할을 결정하는 단계,
- e. 가용성 BAG3의 존재 및/또는 수준을 바람직하게는 하기의 병리 (pathology): 심장병 또는 췌장암으로 구성되는 군으로부터 선택되는 병리적 상태와 연관시키는 단계를 포함하는, 미지의 생물 시료에서 가용성 BAG3 단백질의 존재 및/또는 농도를 검출하기 위한 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 결정 단계 b)는 가용성 BAG3에 대한 특이적 리간드와 함께 수행되는 것인 방법.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 생물 시료는 사람 기원인 것인 방법.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 항응고제 물질이 상기 생물 시료에 첨가되는 것인 방법.

청구항 5

청구항 2 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 특이적 리간드는 항체인 것인 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 결정 단계 b)는 단일클론성 (monoclonal), 다클론성 (polyclonal) 또는 재조합 항-BAG3 항체 또는 그의 조각 (fragment)(*scFv*, *디아바디* (*diabody*), *미니바디* (*minibody*))으로 수행되는 것인 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 항체는 단일클론성이고 하기 아미노산 서열: BAG3의 1차 서열의 18 내지 33, 385 내지 399 또는 533 내지 547로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 BAG3 에피토프 (epitope)를 인식하거나 인간화되거나 그렇지 않으면 재조합에 의해 변형된, 그의 재조합 유도체인 것인 방법.

청구항 8

청구항 2 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 리간드는 형광물질 (fluorophore), 발색단 (chromophore) 또는 기질을 발색단으로 전환시킬 수 있는 효소로 표지되는 것인 방법.

청구항 9

청구항 2 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결정 단계 b)는 BAG3 포획 리간드 및 검출 리간드와 함께 샌드위치 ELISA (sandwich ELISA)를 사용하여 수행되고, 1차 및 2차 모두는 단일클론 항체이고 상기 2차 항체는 사용되는 포획 항체에 의해 인식되는 에피토프와 다른 에피토프를 인식하거나, 몇몇의 단일클론항체의 혼합물인 것인 방법.

청구항 10

청구항 5 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 병리적 상태는 심장병인 것인 방법.

청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 상기 심장병 (단계 (e))은: 협심증, 경색전 협심증, 심근경색증, 심부전, 급성 관상질환, 급성 심부전, 만성 심부전 또는 의인 심장병으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 12

산화적 스트레스와 연관되는 병리적 상태의 혈청 마커로서 사람 가용성 BAG3 단백질의 용도.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 병리적 상태는 심장병 또는 췌장암인 것인 용도.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 심장병은: 협심증, 경색전 협심증, 심근경색증, 심부전, 급성 관상질환, 급성 심부전, 만성 심부전 및 의인 심장병으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 용도.

청구항 15

혈청으로 구성되는 생물 시료에서 가용성 BAG3를 검출하고 투여하기 위한, 및 암 또는 심장병 환자 (cancer or heart patient)에서 병리적 상태를 확인하기 위한 키트로서, 생물 시료를 투여하기 (dosing) 위한, 하기 아미노산 서열: 18 내지 33, 385 내지 399 또는 533 내지 547 (BAG3의 1차 서열의 관점에서)로 구성되는 군으로부터 선택되는 BAG-3 에피토프를 인식하는 하나 이상의 항체 또는 인간화되거나 그렇지 않으면 재조합에 의해 변형된 그의 재조합 유도체, 및 바람직하게는 재조합 단백질을 포함하는 표준 BAG3 단백질을 포함하는 키트.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 진단 혈청 마커의 기술 분야와 관련된 것이다.

배경 기술

[0002] BAG3 (참조서열: NP_004272; Gene ID 9531)는 특히 조면소포체에 집중되어 있는 74 kDa 세포질 단백질이다. 최근 40 kDa 세포질 형태는 시냅소솜 (synaptosome)과 연관되어 있다는 것이 기술되었다 (Brown 등, 2008). 게다가, 재조합 형태 및 몇 가지 결손 돌연변이가 E.coli에서 발현되었다 (Rose 등, 2007 (a)).

[0003] 사람에서 bag3 유전자 발현은 근육세포에서, 몇 가지 다른 정상 세포 유형에서뿐 아니라 어떤 암에서도 (백혈병 및 림프종, 골수종, 췌장 및 갑상선 암, 흑색종, 골육종, 등) 지속적이고 (Romano 등, 2003; Homma 등, 2006; Chiappetta 등, 2007, Rosati 등, 2007) 서로 다른 스트레스 인자 (stressor)에 반응하는 다양한 세포 유형에서 유도된다: 고온에 노출된 췌장암 계통 (Liao 등, 2001), 중금속과 함께 배양되거나 고온에 노출된 HeLa 세포 (Pagliuca 등, 2003), 디에틸말레이트 (diethylmaleate), 산화적 스트레스 유도제로 처리된 백혈구 (Bonelli 등, 2004), 빛에 의해 손상된 생쥐 망막 세포 (Chen 등, 2004), 저장도 초음파로 처리된 Molt-4 세포 (사람 백혈병 T 세포) (Tabuchi 등, 2006), HIV-1 바이러스에 노출된 사람 미세아교세포 (Rosati 등, 2007 a). 이러한 발견은, BAG3 발현의 조절이 스트레스에 대한 세포 반응에서 중요한 요소이고 bag3 유전자의 프로모터에서, 다양한 형태의 세포 스트레스에서 활성화되는, 전사인자 HSF (열 충격 인자) 1에 반응하는 요소의 존재와 일치한다는 것을 나타낸다. HSF1 활성의 조절은 BAG3 단백질의 세포 수준의 유의성 있는 감소를 초래하여, 이 조절자가 bag3의 발현에서 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다 (Franceschelli 등, 2008). EGR1은 bag3 발현의 조절에 관여되는 또 다른 전사인자이다 (Gentilella 등, 2008).

[0004] BAG3가 B-세포 만성 림프구성 백혈병 (B-CLL)을 갖는 24명의 환자 및 급성 림프구성 백혈병 (ALL)을 갖는 11명

의 어린이로부터 유래된 1차 백혈병 세포 (primary leukemic cell)에 대한 연구로부터 얻어진 1차 암세포 (primary cancer cell)의 생존에 영향을 미친다는 첫 번째 증거: 특이적 안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드의 사용에 의해 감소하는 BAG3 수준은 EP 1465927 A1 및 U.S. 7,537,760 B2에 또한 기술된 바와 같이 아포토틱 바디 (apoptotic body)의 100% 이상 증가를 가져왔다 ($p < 0.001$). 그러므로 이들 세포에서 아포토시스 (apoptosis)의 퍼센트 비율은 동일한 화학요법 약물(chemotherapy drug)로 처리된 세포 및 미처리된 세포 모두와 비교하여 유의성 있게 증가하였다 (Leone and Turco, 2001, Romano 등, 2003a, 2003b). 정상 백혈구에서, 상기 유전자의 과발현은 아포토틱 반응을 유의성 있게 감소시키는 것으로 입증되었다 (Bonelli 등, 2004).

[0005] 그 후, 사람 갑상선 조직의 분석은, 정상 조직 및 시험된 갑상선종 (goiter) 시료가 BAG3 발현에 대해 음성 (negative)인 반면, 시험된 암 시료는 명확하게 양성 (positive)이고, 더 높은 BAG3 발현이 악성 종양에서 관찰되었다는 것을 보여주었다.

[0006] 골육종 및 흑색종 세포와 같은 다른 종양에서, bag3 특이적 siRNA은 기저 세포의 감소된 생존을 유발하여, 화학요법제로 현저한 상승 효과를 나타낸다; 쥐에 이식된 사람 흑색종 세포에서 BAG3 억다운 (knockdown)은, 동물의 개선된 생존과 함께, 종양의 성장을 유의성 있게 감소시켰다 (Ammirante 등, in press). 다른 한편으로, bag3의 과발현은 화학요법 약물로 처리된 또는 다른 프로-아포토틱 (pro-apoptotic) 자극에 노출된 암세포의 감소된 아포토시스를 초래한다 (Rose 등, 2007 (b)).

[0007] 세포질 BAG-3의 존재가 서로 다른 세포 시스템에서 검출되었고 예를 들면, 백혈병 또는 갑상선 암과 같은 종양 뿐 아니라, 보다 일반적으로 세포 생존과도 연관된 것으로 밝혀졌음에도 불구하고, 지금까지 BAG3의 가용성 형태는 기술된 적이 없었고, 혈청에서 그의 존재는 심장 곤란 (cardiac distress) 상태와 연관된 적이 없었다.

[0008] 그러므로, 본 발명은, 놀랍게도 특이적 및 민감한 방식으로 특정 질병 상태와 연관된, BAG-3 단백질의 신규한 분비되는 가용성 형태의 확인 문제 및 사람과 다른 포유동물에서 그의 생산 문제를 해결한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 하기의:
- [0010] a. 혈청 (serum) 또는 혈장 (plasma)으로 구성되는, 생물 시료를 얻는 단계,
- [0011] b. 상기 생물 시료에서 가용성 BAG3의 존재 또는 농도 값을 결정하는 단계,
- [0012] c. 상기 시료로부터 얻어진 값을, 참조 값 (reference value) 또는 생물 참조 시료 (biological reference sample)로부터 얻어진 값과 비교하는 단계,
- [0013] d. 선택적으로, 추가적인 유사 값의 그룹 (및 아마도 그의 통계적으로 다른 평균 값을 갖는 그룹으로의 추가적인 분할)을 결정하는 단계,
- [0014] e. 가용성 BAG3의 존재 및/또는 수준을 심장병 또는 체장암인 병리적 상태와 연관시키는 단계를 포함하는, 미지의 생물 시료에서 가용성 BAG3 단백질의 존재 및/또는 농도를 검출하기 위한 방법에 관한 것이다.
- [0015] 바람직하게는 상기 투여 단계 (b)는 항체, 바람직하게는 단일클론항체로 ELISA에 의해 수행된다. 대안적으로, 상기 가용성 단백질은 환자의 혈청으로부터 분리될 수 있다.
- [0016] 제안된 분석 (assay) 방법은 건강한 사람의 군으로부터, 바람직하게는 비교가능한 연령의 군에서 심장병 환자군의 통계적으로 유의성 있는 분리를 허용한다. 그것은 또한 증가된 위험 (심부전, HF)에서 환자의 하위군 (subgroup) 내 심장병을 갖는 환자를 계층화할 수 있다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본 발명은 세포 내 형태에 관해 이전에 기술된 기능 (세포주기 및 아포토시스의 조절)과 비교하여 예기치 못한 생물학적 활성을 갖는 BAG3 단백질의 가용성 형태의 발견을 기반으로 하고 있다: 예를 들면 그러한 형태는 세포에 의해 능동적으로 분비되어 단핵구/대식세포를 활성화시킬 수 있다.
- [0018] 상기 가용성 형태는 또한 특정 병리적 상태, 특히 심장병 및 체장암에 매우 특이적인 혈청 생화학 마커라는 것이 밝혀졌다. 그러므로 본 발명의 목적은, 상기 언급된 병리적 상태의 존재를 결정하기 위한, BAG3 단백질의 가

용성 형태 및 혈청으로 구성되는 생물 시료에서 그의 수준을 확인하기 위한 방법이다.

- [0019] 가용성 BAG3에 의해, 나타난 바와 같이 세포에 의해, 예를 들면, 췌장암 세포 (Panc-1)에서 엑소솜과 그의 관련성에 의해 및 Hep G2 세포 (사람 간세포암종), C6 세포 (쥐 교모세포종), ASPC-1 세포 (사람 췌장샘암종), ARO 세포 (역형성 갑상선 암), HT-29 세포 (대장샘암종) 및 똑같은 Panc-1 세포와 같은 생종양세포주 (viable tumor cell line)의 상등액에서 그의 존재에 의해 (Trypan Blue exclusion 분석에 의해), 능동적으로 분비되는 BAG3의 형태를 의미하고, 그러므로 가용성 BAG3는 세포 사멸 후 배양 배지에서 세포 내용물의 방출에 의해 유래된 것이 아님을 나타낸다.
- [0020] 게다가, 가용성 BAG3는 심근세포에서 산화적 스트레스의 유도 후 방출 (또는 분비)되고 약 75kD의 분자량을 갖는 형태로서, 예를 들면 SDS-PAGE에 의해, 심장병 환자의 혈청으로부터 정량적으로 정제될 수 있다.
- [0021] 그러므로, 생물 시료에서, 가용성 BAG3는, 그의 존재가 세포의 존재와 무관하기 때문에 세포질 형태와 구별될 수 있다. 실제로, 예를 들면, BAG3 단백질은 정상 조직에서보다 갑상선 종양 생체 검사 (biopsy)에서 더 높은 것으로 밝혀지지만, 면역 조직학 염색은 세포질에서만 상기 단백질을 검출한다.
- [0022] 병리적 상태에 대한 혈청 마커로서 가용성 BAG3의 용도와 부합되게, 본 발명은 바람직한 포획 및/또는 검출 제제로서 단일클론성 또는 다클론성 항체를 사용함으로써 그러한 형태의 존재 및 양을 검출하기 위한 방법에 관한 것이다.
- [0023] 단일클론성 및 다클론성 항-BAG3 항체는 EP 1465927 A1 및 U.S. 7,537,760 B2에 기술되어 있다.
- [0024] 바람직한 실현 (realization)에 따르면 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0025] a. 혈청 또는 혈장으로 구성되는 생물 시료를 얻는 단계,
- [0026] b. 그러한 생물 시료 내의 가용성 BAG3의 농도를 결정하는 단계,
- [0027] c. 상기 시료로부터 얻어진 결과를 참조값 또는 참조 혈청 시료로부터 얻어진 값과 비교하는 단계,
- [0028] d. 선택적으로, 통계적으로 다르지 않은 가용성 혈청 BAG-3 평균값을 갖는 환자의 하위군을 결정하는 단계 (예를 들면, 21 내지 43세 환자군 및 44 내지 65세 환자군),
- [0029] e. 가용성 BAG3의 수준 또는 존재를 심장병 또는 췌장암 중에서 선택된 병리적 상태와 연관시키는 단계.
- [0030] 정의 "심장병"은 협심증, 불안정협심증, 심근경색증, 심부전, 급성 관상질환, 급성 심부전, 만성 심부전, 및 의인 심장병을 의미한다.
- [0031] 바람직한 실현에 따르면 생물 시료는 혈청 또는 혈장이고 사람 기원이다. 그것은 또한, 선택적으로, 예를 들면 항-응고 활성을 갖는 물질로 보충된 전혈로부터 얻어질 수 있다.
- [0032] 생물 시료 내 BAG3의 존재는 바람직하게는 면역학적 방법에 의해 및 보다 더 바람직하게는 항-BAG3 단일클론성, 다클론성 또는 재조합 항체 (예를 들면 ScFv 조각, 디아바디, 등)에 의해 결정된다.
- [0033] 바람직한 실현에 따르면 상기 항체는 단일클론성이고 조각 18 내지 33, 385 내지 399 또는 533 내지 547을 포함하는 BAG3 서열 (참조서열: NP_004272; Gene ID 9531)에서 에피토프를 인식한다. 여기에 기술된 상기 항체는 보다 더 바람직하게는 U.S. 7,537,760 또는 Advanced Biotechnology Center of Genoa에 2002년 12월 17일 기탁된 모체 하이브리도마 번호. PD02009의 서브클론에서 확인된 항체이다; 대안적으로, 그것은 재조합 및/또는 인간화된 형태와 같은, 그러한 항체의 유도체일 수 있다.
- [0034] 추가의 실현에 따르면, 바람직하게는 단일클론성이라면, 상업적인 항-BAG3 항체가 또한 사용될 수 있다 (예를 들면: Goat 항-Bag3 다클론성 항체, Abcam; Rabbit 항-Bag3 다클론성 항체, Abcam; Mouse 항-Bag3 단일클론성 항체, Abcam; Rabbit 항-Human Bag3 다클론성 항체, Abcam; Mouse 항-Human Bag3 단일클론성 항체, Clone 5A8, Abgent; 항-Bag3 다클론성 항체, Abnova Corporation; Goat 항-Bag3 다클론성 항체, Abnova Corporation; Mouse 항-Bag3 다클론성 항체, Abnova Corporation; Rabbit 항-Human Bag3 다클론성 항체, Atlas Antibodies; Goat 항-Bag3/BIS/CAIR1 다클론성 항체, Everest Biotech; Goat 항-Bag3 다클론성 항체, GeneTex; Rabbit 항-Human Bag3 다클론성 항체, GeneTex; Goat 항-Human Bcl-2-bindin Protein BIS (BAG3) 다클론성 항체, LifeSpan BioSciences; Rabbit 항-Human Bcl-2-bindin Protein BIS (BAG3) 다클론성 항체, LifeSpan BioSciences; Goat 항-Bag3 다클론성 항체, Novus Biologicals; Mouse 항-Human Bag3 다클론성 항체, Novus Biologicals; Rabbit 항-Bag3 다클론성 항체, Novus Biologicals; Rabbit 항-Human Bag3 다클론성 항체, Novus

Biologicals; Goat 항-Human BAG3/BIS/CAIR1 다클론성 항체, Raybiotech, Inc.; Rabbit 항-Human Bag3 다클론성 항체, Proteintech Group, Inc.; Rabbit 항-Human BAG3 Prestige Antibodies Powered by Atlas Antibodies Antibody, Sigma-Aldrich; 등).

- [0035] 면역학적 분석은 바람직하게는 ELISA로서, 1차 포획 리간드는 항체이고, 보다 더 바람직하게는 아미노산 18 내지 33, 385 내지 399 또는 533 내지 547에 해당하는 BAG3의 서열 내 에피토프를 인식하는 단일클론성 항체로부터 선택된다; 포획 항체에 의해 인식되는 것과 다른 에피토프를 인식하는, 검출을 위한 2차 항체는 단일클론성, 적어도 두 개의 단일클론성 항체의 혼합물 또는 다클론성 항체일 수 있다.
- [0036] 상기 분석의 바람직한 실험이 항-BAG3 항체의 사용을 포함할지라도, 동일한 결과가 항체 이외의 BAG3 결합 분자, 예를 들면 가용성 수용체 또는 천연 또는 합성 리간드에 의해 달성될 수 있다.
- [0037] 검출에 사용되는 상기 리간드는 결국 항체, 예를 들면 형광물질 (fluorophore), 발색단 (chromophore) 또는 기질을 발색단으로 전환시킬 수 있는 효소로 표시되는 항체에 의해 인식될 수 있으므로, 생물 시료에서 BAG3의 존재를 시각화하는데 유용하다; 대안적으로 그것은 그러한 발색기 (chromophore group)에 직접 연결될 수 있다.
- [0038] 서로 다른 반응 스킴이 가용성 BAG3의 수준을 검출 및/또는 측정하는데 동일하게 유효한 것으로 확인될 수 있다. 예를 들면 포획을 위해, 1차 항체, 예를 들면 바람직하게는 모체 클론 PD2009에 의해 생산된 단일클론성 항체로부터 선택되는 항-BAG3 단일클론성 항체를 사용하는 것이 가능하다 (BAG3 서열의 단일 에피토프, 및 특히 각각 아미노산 18 내지 33, 385 내지 399 또는 533 내지 547로부터 유래한 아미노산 서열을 인식하는 AC-1, AC-2 또는 AC-3). 검출을 위해, 단일클론성 또는 다클론성 항체 (만일 다클론성이라면, 상기 항체는 바람직하게는 Rosati 등, 2007 (a)에 의해 기술된 바와 같이 TOS-2로 명명되고, 면역원으로서 사용되는 전체 재조합 단백질에 대해 생성된다) 또는 모체 클론 PD2009로부터 얻어진 단일클론항체일 수 있으나, 포획을 위해 사용되는, 예를 들면, AC-2 또는 AC-3, 또는 그 둘의 혼합물과 같은, AC-1에 의해 인식되는 에피토프와 다른 에피토프를 인식하는 항체와는 다른 2차 항체를 사용하는 것이 가능하다 (각각, BAG3 단백질의 아미노산 서열 385 내지 399 및 533 내지 547에 해당하는).
- [0039] 그러나 통상의 기술자는 상기 분석의 바람직한 실험에 대해 기술된 것과는 다른 단일클론성 또는 다클론성 항체가 사용될지라도, 본 발명에 포함되는 상기 BAG3 포획 및/또는 검출 스킴의 변형을 결정할 수 있다. 예를 들면, 상기 방법은 재조합 형태로 발현되는 (예를 들면, ScFv 조각, 미니바디, 디아바디 등과 같은) 또는 예를 들면, 인간화, 등에 의해 변형된 항체와 같은 상기 기술된 단일클론항체로부터 유래된 항체의 사용을 포함한다.
- [0040] 일반적으로, 가용성 BAG3의 검출은 혈청 내 가용성 단백질이 고체상에 고정된 첫 번째 분자 (포획 단계에서, BAG3 리간드) 및 그 후 포획 리간드에 이미 결합된 가용성 BAG3 단백질을 다른 부위의 수준에서 결합시킴으로써 직접 또는 간접의 측색 또는 형광측정 검출을 가능하게 하는 두 번째 분자와 상호작용하는 샌드위치 스킴에 따라 수행된다. 두 번째 리간드는 검출 리간드로 명명된다.
- [0041] 상기 방법은 또한 첫 번째 포획 제제 또는 두 번째 검출 제제가 매트릭스 (또한 고체상으로 불리는), 예를 들면 미세적 정판 (microtiter plate) 또는 구슬 또는 튜브의 벽에 흡수되거나, 부착되거나 또는 공유적으로 결합되는 분석의 실험을 포함한다.
- [0042] 대안적으로 가용성 BAG3는 또한, 분자의 분리 (예를 들면 SDS-PAGE에 의해) 및 그 후 항체 인식 후에, 예를 들면 웨스턴-블롯, 또는 분자량에 기초하여 분리된 단백질의 시퀀싱에 의해 혈청에서 검출될 수 있다.
- [0043] 제안되는 분석 방법은 바람직하게는 비교가능한 연령군에서, 건강한 환자군으로부터 심장 환자군의 분리를 가능하게 한다. 게다가, 그것은 보다 불리한 예후를 갖는 더 높은 위험 (심부전)에서 환자의 하위집단을 확인함으로써 동일한 심장 환자를 계층화한다.
- [0044] 심장병에 대해 심장의 선택된 병리는, 예를 들면: 협심증, 불안정협심증, 심근경색증, 심부전, 급성 관상질환, 급성 심부전, 만성 심부전, 약으로부터 심장의 손상 (heart damage from drugs), 등으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것으로 의도된다.
- [0045] 정상 또는 병리적 상태의 혈청 BAG3 특징적 값은 상기 분석에 대해 사용된 스킴에 따라 변할 수 있기 때문에 하기는 단지 예로서 보고된다. 가용성 BAG3의 농도는 평균적으로 $2.38 \text{ ng/ml} \pm 0.32$ 이지만, 21세 내지 43세 연령군에서 BAG3의 평균 혈청 농도는 $3.13 \text{ ng/ml} (\pm 0.50)$ 인 반면, 44세 내지 65세의 공여자에서는 $1.80 \text{ ng/ml} (\pm 0.40)$ 이다.
- [0046] (다양한 유형 및 등급의) 심장병의 임상적인 진단을 받은 환자의 혈청에서 49세 내지 81세를 포함하는 연령 범

위에서 (평균 연령: 68.04 ± 6.9) 가용성 BAG3 단백질의 존재, 검출된 BAG3의 농도는 평균적으로 $8.30 \text{ ng/ml} \pm 0.58$ 이다.

[0047] 췌장샘암종에 의해 영향받는 환자에서, 가용성 BAG-3의 농도는 일반적으로 10 ng/ml 보다 높고 평균적으로 $130.8 \text{ ng/ml} (\pm 59.4)$ 이다.

[0048] 추가의 특면에 따라, 본 발명은 병리적 상태의 마커로서 가용성 사람 BAG3 단백질의 용도에 관한 것이다. 특히, 상기 병리적 상태는 심장병이고 하기: 협심증, 불안정협심증, 심근경색증, 심부전, 급성 관상질환, 급성 심부전, 만성 심부전, 및 심장 의인 손상 (cardiac iatrogenic damage), 등 또는 췌장 종양 (pancreatic tumor), 바람직하게는 샘암종으로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0049] 어느 특정한 이론에 구속되지 않으면서, 췌장 세포 및 심근세포에 의한 BAG3의 분비는 심장의 경우, 병원성 손상으로부터 및, 췌장샘암종의 경우, 산소 및/또는 다른 영양소의 부족으로부터 유발되는 스트레스에 대한 "생리적" 세포 반응을 나타낼 수 있었다.

[0050] 게다가, 본 발명은 BAG3가 잘 보존된 단백질이기 때문에 면역계의 표적 세포, 바람직하게는 포유동물의 대식세포를 활성화시키는 가용성 사람 BAG3 단백질의 용도에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0051] 도 1. 정상 심장조직에서 및 쥐에서 경색 유도 후 BAG3 단백질의 발현을 나타내는 면역조직화학적 절편.
- 도 2. 심근세포에서 유래한 용해물 및 상등액에서 수행된 항-BAG3 항체를 이용한 웨스턴 블롯.
- 도 3. 만성 허혈성 심질환을 갖는 환자의 혈청으로부터 정제된 가용성 단백질의, 항-BAG3 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석.
- 도 4. BAG3의 검출을 위한 ELISA의 보정 곡선 (calibration curve).
- 도 5. 건강한 공여자에서 및 연령 군에 따른 BAG3 혈청 농도의 그래프 표현.
- 도 6. 연령 군으로 분할된 건강한 공여자에서 및 환자에서 BAG3 혈청 농도의 그래프 표현.
- 도 7. 심부전을 갖는 환자에서 BAG3 단백질의 검출을 위한 ELISA 분석의 ROC 곡선.
- 도 8. 대상부전되지 않은 (non-decompensated) 심장병을 갖는 환자와 비교하여 심부전 진단을 받은 환자에서 BAG3 혈청 농도의 그래프 표현.
- 도 9a. LPS의 존재 또는 부재시 가용성 재조합 BAG-3의 증가하는 투여량에 의해 자극된 쥐 대식세포 (J774)에서 iNOS (유도성 산화질소 합성효소, inducible nitric oxide synthase) 단백질 및 비교를 위한 대조군 단백질 (GAPDH)의 생산, 도 9b. 동일한 세포 유형에서 Griess 시약으로 아질산염의 결정.
- 도 10. J774 세포의 표면에 결합된 rBAG3 단백질의 공초점 현미경 분석.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0052] 실시예 1. 모체 하이브리도마로부터 AC-1, AC-2, AC-3 클론의 분리
- [0053] 단일클론항체 AC-1, 2 및 3을 Advanced Biotechnology Center of Genoa에 2002년 12월 17일 번호 PD02009로 기탁되었고, U.S. 7,537,760에 기술되는 모체 하이브리도마로부터 서브클로닝에 의해 분리하였고, 배양 배지 상에서 ELISA 분석에 의해 선별하였다.
- [0054] 실시예 2. 가용성 BAG3 단백질이 심장병을 갖는 환자의 혈청에서 정제된다.
- [0055] 만성 허혈성 심장병에 의해 영향받은 환자의 혈청을 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. 75 kD에 해당하는 밴드를 젤-추출하고 (gel-eluted) (도 1a를 보라) 트립신 소화에 의해 얻어진 절편을 질량분석법 (MALDI/MS)으로 분석하고 "MASCOT" 소프트웨어를 통해 확인하였다. 일부 펩티드 서열의 분석에서 (도 1b) 그 단백질은 BAG3-유사 단백질로 확인되었다.
- [0056] 실시예 3. 쥐에서 심근스트레스의 모델 개발.
- [0057] 220 내지 250 그램 정도 무게의 Sprague-Dawley 수컷 쥐 (Charles River Laboratories, Italy)를 경구적으로 펜토바르비탈 (pentobarbital)의 복강내주사 (60 mg/kg)로 마취시킨 후 판을 삽입하였다. 전측 가슴절개술

(anterior thoracotomy) 후, 심장을 몸 밖에 노출시키고 (exteriorize) 하행지 (descending coronary artery)의 근부 전측로 (proximal anterior tract)의 봉합을 받았다. 대조군 동물은 동맥 묶음을 제외하고 동일한 과정을 겪었다. 그 과정 다음날, 모든 생존 개체는 적어도 35%의 좌심실을 포함하는 큰 경색의 존재에 대한 가슴경유심장초음파검사 (transthoracic echocardiography)로써 선별되었다 (IM 군). 쥐는 그 후 표준 과정에 의해 희생되었고 좌심실은 면역조직화학적 과정을 위해 포르말린으로 처리되었다. 도면은 대조군 및 IM 군을 대표하는 BAG3 단백질 발현 데이터를 나타낸다.

[0058] 도 2는 실시예 1에서 기술된 BAG3-특이적 단일클론항체로 얻어진 면역조직화학 결과를 나타낸다: BAG3 단백질 수준의 유의성 있는 증가가 대동맥의 일시적 폐색에 의한 경색의 유도 후 쥐로부터 심장 조직에서 관찰된다.

[0059] 그 후 웨스턴 블롯 분석은, BAG3 단백질이 PEITC (페닐이소티오시아네이트, phenylisothiocyanate)에 의해 유도된 산화적 스트레스에 노출된 심근세포의 상등액에서 방출된다는 것을 드러내었다 (도 3).

[0060] 이 실험에서, 80%의 합류 (confluence)에서 플레이트드 (plated) 되고 37°C, 5% CO₂ 대기에서 혈청을 결여한 배지에서 배양된 쥐의 심근세포를 도면에 나타낸 시간 동안 10 μM PEITC로 처리하였다.

[0061] 실험의 종결에서, 세포를 수확하고 가공하였다. 세포내 BAG3의 발현 수준을 평가하기 위해 단백질 용해물을 항-BAG3 항체 (TOS-2 및 AC-1) 및 로딩 (loading) 대조군으로서 사용되는 항-GAPDH 항체로 웨스턴-블롯에 의해 분석하였다 (도 3A); 도 3B에서, 상등액을 수집하였고, 아세톤 (1:9 부피)으로 침전시키고 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다.

[0062] BAG3의 존재가 Hep G2 (사람 간세포암종), C6 (쥐 교모세포종), Panc-1 (사람 췌장샘암종), ARO (역형성 갑상샘암종) 및 HT-29 (결장직장암종) 세포주의 상등액에서 또한 검출되었다. BAG3는 시험된 다양한 종양세포주에 의해 방출되나 HUVEC (사람 제대 내피세포, human umbilical cord endothelial cell)와 같은 정상적인 1차 세포의 배양 배지에서는 방출되지 않는다.

[0063] **실시예 4. 혈청 내 BAG-3 측정을 위한 ELISA 분석의 개발.**

[0064] 심장병을 갖는 환자의 혈액에서 BAG3 단백질이 검출가능한지를 시험하기 위해, 교정기 (calibrator)로서 하기 기술된 바와 같이 제조된 BAG3 재조합 단백질을 사용하여 ELISA 분석을 개발하였다.

[0065] 시험된 BAG3-특이적 항체의 서로 다른 조합은:

[0066] a):

[0067] - BAG3 단백질의 아미노산 18 내지 33의 서열을 인식하도록 설계된 (DRDPLPPGYEIKIDPQ), 1차 단일클론항체 클론 AC-1;

[0068] - TOS-2로 명명되는, 면역원으로서 전체 재조합 단백질 (참조서열: NP_004272)을 사용함으로써 개발된 2차 다클론항체를 AC-1 항체에 의해 포획되는 BAG3 단백질의 검출자로서 대신 사용하였다;

[0069] b):

[0070] - 1차 단일클론항체 클론 AC-1;

[0071] - BAG3 단백질의 아미노산 385 내지 399의 서열을 인식하도록 설계되고 (SSPKSVATEERAAPS) 검출자로서 사용되는, AC-2로 명명되는 2차 단일클론항체;

[0072] c):

[0073] - 1차 단일클론항체 클론 AC-1;

[0074] - BAG3 단백질의 아미노산 533 내지 547의 서열을 인식하도록 설계되고 (DKGKKNAGNAEDPHT) 검출자로서 사용되는, AC-3으로 명명되는 2차 단일클론항체;

[0075] d):

[0076] - 1차 단일클론항체 클론 AC-1;

[0077] - 검출자로서 사용되는 AC-2 및 AC-3 항체의 혼합물;

[0078] e):

- [0079] - 1차 단일클론항체 클론 AC-2;
- [0080] - 검출자로서: AC-1, 또는 AC-3, 또는 AC-1 및 AC-3 항체의 혼합물;
- [0081] f):
- [0082] - 1차 단일클론항체 클론 AC-3;
- [0083] - 검출자로서: AC-1, 또는 AC-2, 또는 AC-1 및 AC-2 항체의 혼합물.
- [0084] 시험된 모든 조합은, 정량적 방식으로, ELISA 분석에 의해 환자의 혈청 내 가용성 BAG-3의 존재를 확인할 수 있다. 도 4의 예시적인 구체예는 3% 소혈청알부민 (BSA)이 첨가된 살린 용액 내에서 재구성된 재조합 BAG3 단백질의 스칼라 농도를 갖는 교정 곡선의 개발을 나타낸다.
- [0085] 상기 재조합 단백질은 NCBI PubMed 서열의 염기 1 내지 2608에 해당하는 BAG3 단백질을 암호화하는 cDNA로부터 생산되었다: 유방암 세포주 MCF-7으로부터 얻어진 전체 RNA로부터 PCR에 의해 증폭된 후 제한효소 NcoI/XhoI를 사용하여 발현 벡터 pET 30a (+) (Novagen) 내에 클로닝 된 NM_004281.3 사람.
- [0086] 여섯 개의 히스티딘 잔기에 융합된, 결과로 얻어진 재조합 단백질은 E.coli에서 발현되었고 HisTrap HP 컬럼 (GE Healthcare)으로 친화성 크로마토그래피에 의해 정제되었다.
- [0087] 96-well microplate는 그 후 AC-1 항체를 포함하는 용액의 첨가에 의해 기능을 발휘하게 되었고 그 후 비특이적 상호작용을 방지하기 위해 블로킹 (blocking) 용액으로 처리되었다. 상기 재조합 단백질은 그 후 도면에 나타낸 농도에서 첨가되었고, 다클론항체 TOS-2에 의해 겉으로 드러났다. 신호는 히드로퍼옥시다제 (HRP)에 결합된 항-토끼 2차 항체의 사용 및 그 후 TMB 시약 (eBioscience, UK)의 첨가에 의해 얻어졌다.
- [0088] 상기 분석은 심부전을 갖는 환자의 혈청 내에서 가용성 BAG3 단백질의 존재를 분석하는데 유용한 것으로 입증되었다.
- [0089] **실시예 5. 심장병 및 체장암을 갖는 환자의 혈청에서 ELISA 분석의 확인.**
- [0090] 혈청은 어떤 종류의 현성 질병 (overt disease)도 겪지 않는 개체에서 BAG3의 혈청 농도를 조사하기 위해 건강한 공여자로부터 수집되었다. 공여자의 연령은 21세 내지 65세였다. 검출된 BAG3의 농도는 평균적으로 $2.38 \text{ ng/ml} \pm 0.32$ 였다.
- [0091] 약간의, 연령에 관계된 농도의 차이가 있었다. 특히, 21 내지 43세 군에서, BAG3의 평균 혈청 농도는 $3.13 \text{ ng/ml} (\pm 0.50)$ 인 반면, 44 내지 65세 연령의 공여자에서는 $1.80 \text{ ng/ml} (\pm 0.40)$ 이다 (도 5).
- [0092] 그 후 (다양한 유형 및 등급의) 심장병의 임상적 진단을 받은 38명의 환자로부터 얻어진 혈청이 가용성 BAG3 단백질의 존재를 분석하기 위해 수집되었다. 검사된 환자의 연령 범위는 49세 내지 81세를 포함했다 (평균 연령: 68.04 ± 6.9). 검출된 BAG3의 농도는 평균적으로 $8.30 \text{ ng/ml} \pm 0.58$ 이다.
- [0093] 심장병을 갖는 환자와 건강한 공여자 간의 차이는, 환자의 전체 및 동일 연령범위 모두에서 매우 유의성 있다 (도 6).
- [0094] 추가로, 심장병을 갖는 환자 중에서 심부전을 갖거나 갖지 않는 개체로 구성되고, 서로 다른 BAG3의 혈청 수준을 특징으로 하는 두 집단이, 대상부전되지 않은 심장병을 갖는 환자와 비교하여 심부전 진단을 받은 환자에서 BAG3 혈청 농도를 그래프적으로 나타내는 도 8에 기술된 바와 같이 인식되었다.
- [0095] 게다가, 가용성 BAG-3의 혈청 수준이 체장암, 결장암 또는 폐암을 갖는 일부 환자에서 또한 측정되었다. 70 ng/ml 초과 혈청 수준은, 하기 표 1에 나타낸 바와 같이 체장암을 갖는 환자에서만 측정되었다.

표 1

[0096]

암 환자의 혈청에서 가용성 BAG-3의 수준

채장샘암종	BAG-3의 혈청 농도 (ng/ml)
환자 1 채장	222.5
환자 2 채장	157.6
환자 3 채장	102.7
환자 4 채장	77.4
환자 5 채장	94
결장암	
환자 1 결장	0
환자 2 결장	0
환자 3 결장	0
폐암	
환자 1 폐	0
환자 2 폐	0

[0097]

실시예 6. ELISA 분석의 민감도 및 특이도 결정

[0098]

얻어진 데이터는 그 후 심부전을 갖는 환자에서 BAG3 단백질의 검출을 위한 ELISA 분석의 민감도 및 특이도 값을 결정하기 위해 통계 분석 프로그램을 통해 분석되었다.

[0099]

2.76 ng/ml를 컷-오프 값으로 사용하여, 민감도 및 특이도 값은 각각 83.3% 및 77.08%인 반면, 양의 및 음의 예측치는 각각 75% 및 88.1%이다. 도 7은 나타난 컷-오프로 얻어진 ROC 곡선을 보여준다.

[0100]

실시예 7. 가용성 BAG3 단백질의 기능적 활성도의 특성화.

[0101]

혈청 내 방출된 단백질의 혈구 세포에 대한 가능한 역할을 결정하기 위해, 재조합 BAG3 단백질을 대식세포 활성화 분석 (macrophage activation assay)을 위해 사용하였다. 이러한 목적을 위해, 쥐의 단핵구 J774 세포주를, 양의 대조군으로서 리포폴리사카라이드 (LPS)와 같은 염증 유발 제제를 사용하여 재조합 BAG3 단백질의 서로 다른 농도로 처리하였다. J774 세포는 60% 함유에서 플레이트되었고 단독 또는 10 ng/ml 농도에서 LPS와의 조합으로, 250, 500 ng/ml 및 1 mg/ml의 농도에서 재조합 BAG3 단백질과 함께 24시간 동안 배양되었다.

[0102]

실험의 종결에서, 세포를 수확하고 가공하였다. 효소의 발현 수준을 평가하기 위해, 상기 단백질 용해물을 항-iNOS 항체 (iNOS: 유도성 산화질소 합성효소, inducible nitric oxide synthase)로, 및 로딩 대조군으로 사용되는 GAPDH에 대한 항체로 웨스턴-블롯에 의해 분석하였다. 데이터는 도 9a에서 나타난다.

[0103]

게다가 배양 배지에서 단핵구 활성화와 연관된 아질산염의 생산은 Griess 시약 (1% 설퍼닐아미드, 0.1% 나프틸 에틸렌디아민, 5% 인산)으로 확인하였고 Beckman DU-62 분광광도계로 550 nm에서 측정하였다 (도 9b).

[0104]

도 9b)는, 재조합 단백질이, 500 ng/ml의 농도에서, 대조군 (미처리 세포로 구성된)에 비교하여 아질산염 생산을 3배 증가시켰다 ($p < 0.001$); 추가로 그의 활성도는 투여량 의존적이다 (도 9a 및 9b).

[0105]

그 후 FluoroTag FITC Conjugation 키트 (Sigma)를 사용하여 BAG3 재조합 단백질을 FITC에 결합시켰다. 동일한 양의 BSA-FITC (음의 대조군) 및 rBAG3-FITC를 1시간 동안 배양 배지에 첨가하였다. 그 후 3.7% 포름알데히드 용액으로 세포를 고정하였고 Zeiss LSM 공초점 현미경으로 분석하였다.

[0106]

BAG3 단백질의 J774 세포의 표면에서의 결합은 형광물질과 결합된 재조합 단백질의 사용에 의해 확인되었다 (도 10). BAG3 결합은 다른 단백질, 예를 들면 BSA가 BAG3 대신 사용될 때 관찰되지 않기 때문에 특이적이다.

[0107]

참조문헌

[0108]

1. Bonelli, P., Petrella A., Rosati, A., Romano, M.F., Lerose, R., Pagliuca, M.G., Amelio, T., Festa, M., Martire, G., Venuta, S., Turco, M.C., and Leone, A. (2004). BAG3 protein regulates stress-induced apoptosis in normal and neoplastic leukocytes. *Leukemia* 18, 358-360.

[0109]

2. Bruno, A.P., Festa, M., Dal Piaz, F., Rosati, A., Turco, M.C., Giuditta, A., Marzullo, L. (2008). Identification of a synaptosome-associated form of BAG3 protein. *Cell Cycle* 7(19), 3104-3105.

- [0110] 3. Carra, S., Seguin, S.J., Landry, J. (2008a). HspB8 and Bag3: a new chaperone complex targeting misfolded proteins to macroautophagy. *Autophagy* 4(2), 237-239.
- [0111] 4. Carra, S., Seguin, S.J., Lambert, H., Landry, J. (2008b). HspB8 chaperone activity toward poly(Q)-containing proteins depends on its association with Bag3, a stimulator of macroautophagy. *J Biol Chem* 18, 283(3), 1437-1444.
- [0112] 5. Chen, L., Wu, W., Dentchev, T., Zeng, Y., Wang, J., Tsui, I., Tobias, J.W., Bennett, J., Baldwin, D., Dunaief, J.L. (2004). Light damage induced changes in mouse retinal gene expression. *Exp Eye Res* 79(2), 239-247.
- [0113] 6. Chiappetta, G., Ammirante, M., Basile, A., Rosati, A., Festa, M., Monaco, M., Vuttariello, E., Pasquinelli, R., Arra, C., Zerilli, M., Todaro, M., Stassi, G., Pezzullo, L., Gentilella, A., Tosco, A., Pascale, M., Marzullo, L., Belisario, M.A., Turco, M.C. and Leone, A. (2007). The antiapoptotic protein BAG3 is expressed in thyroid carcinomas and modulates apoptosis mediated by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Clin Endocrinol Metab* 92(3), 1159-1163.
- [0114] 7. Franceschelli, S., Rosati, A., Le Rose, R., Turco, M.C., Pascale, M. (2008). Bag3 gene expression is regulated by heat shock factor 1. *J Cell Physiol* 19, 215(3), 575-577.
- [0115] 8. Gentilella, A., Passiatore, G., Deshmane, S., Turco, M.C., Khalili, K. (2008). Activation of BAG3 by Egr-1 in response to FGF-2 in neuroblastoma cells. *Oncogene* 28, 27(37), 5011-5018.
- [0116] 9. Homma, S., Iwasaki, M., Shelton, G.D., Engvall, E., Reed, J.C., Takayama, S. (2006). BAG3 deficiency results in fulminant myopathy and early lethality. *Am J Pathol* 169(3), 761-773.
- [0117] 10. Iwasaki, M., Homma, S., Hishiya, A., Dolezal, S.J., Reed, J.C., Takayama, S. (2007). BAG3 regulates motility and adhesion of epithelial cancer cells. *Cancer Res* 67(21), 10252-10259.
- [0118] 11. Kassis, J.N., Guancial, E.A., Doong, H., Virador, V., Kohn, E.C. (2006). CAIR-1/BAG-3 modulates cell adhesion and migration by downregulating activity of focal adhesion proteins. *Exp Cell Res* 10, 312(15), 2962-2971.
- [0119] 12. Liao, Q., Ozawa, F., Friess, H., Zimmermann, A., Takayama, S., Reed, J.C., Kleeff, J., Buchler, M.W. (2001). The anti-apoptotic protein BAG-3 is overexpressed in pancreatic cancer and induced by heat stress in pancreatic cancer lines. *FEBS Lett* 503, 151-157.
- [0120] 13. Pagliuca, M.G., Lerose, R., Cigliano, S. and Leone, A. (2003). Regulation by heavy metals and temperature of the human BAG-3 gene, a modulator of Hsp70 activity. *FEBS Lett* 541, 11-15.
- [0121] 14. Romano, M.F., Festa, M., Putrella, A., Rosati, A., Pascale, M., Bisogni, R., Poggi, L., Kohn, E.C., Venuta, S., Turco, M.C. and Leone, A. (2003b). BAG3 protein regulates cell survival in childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Biol Ther* 2, 508-510.
- [0122] 15. Romano, M.F., Festa, M., Pagliuca, G., Lerose, R., Bisogni, R., Chiurazzi, F., Storti, G., Volpe, S., Venuta, S., Turco, M.C. and Leone, A. (2003a). BAG3 protein controls B-chronic lymphocytic leukaemia cell apoptosis. *Cell Death Differ* 10, 383-385.
- [0123] 16. Rosati, A., Leone, A., Del Valle, L., Amini, S., Khalili, K. and Turco, M.C. (2007a). Evidence for BAG3 modulation of HIV-1 gene transcription. *J Cell Physiol* 210(3), 676-683.
- [0124] 17. Rosati, A., Ammirante, M., Gentilella, A., Basile, A., Festa, M., Pascale, M., Marzullo, L., Belisario, M.A., Tosco, A., Franceschelli, S., Molledo, O., Pagliuca, G., Lerose, R. and Turco, M.C. (2007b). Apoptosis inhibition in cancer cells: a novel molecular pathway that involves BAG3 protein. *IJBCB* 39 7-8, 1337-1342.
- [0125] 18. Tabuchi, S., Asaeda, M., Kamitan, H., Watanabe, T. (2006). Surgical treatment of arteriovenous malformation in a patient with human immunodeficiency virus infection and hemophilia a: case report. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 15(2), 66-8.

수탁번호

[0126]

기탁기관명 : Advanced Biotechnology Center

수탁번호 : ABC02009

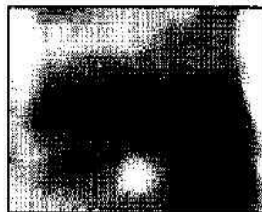
수탁일자 : 20021217

도면

도면1

a)

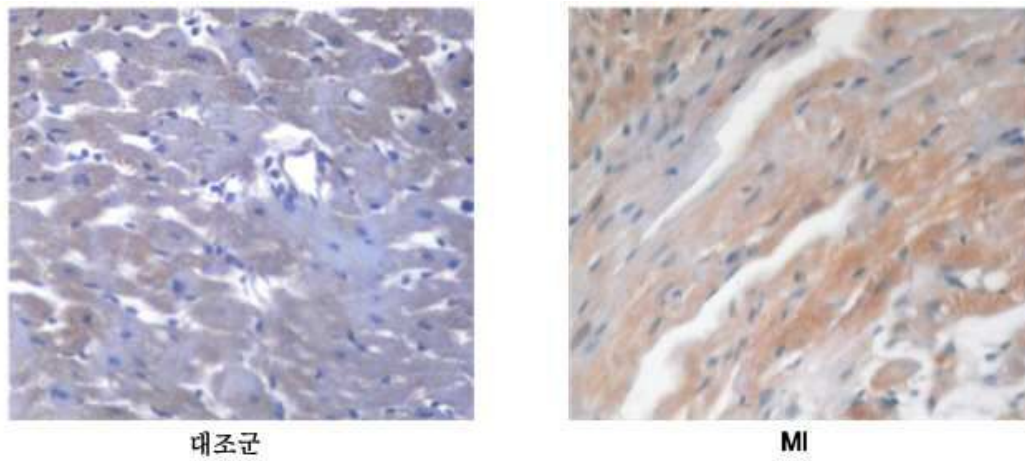
100 kDa



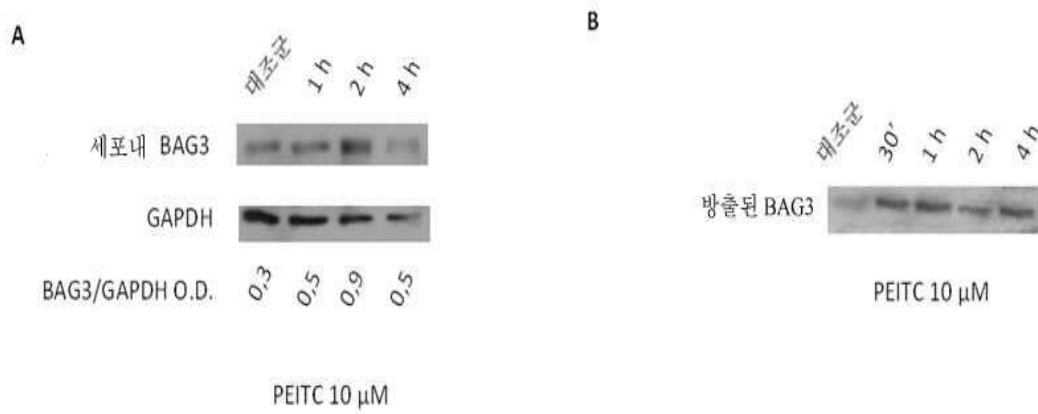
b)

시작 - 끝	관찰값	Mr(실험)	Mr(계산)	ppm	미스 서열 (Miss sequence)
32 - 47	1915.8500	1914.8427 1914.9013	-31	K.IDPQTGWPFVDHNSR.T	
48 - 55	990.3800	989.3727 989.4567	-85	R.TTTWNDPR.V	
63 - 73	1062.4700	1061.4627 1061.4738	-10	K.DTASSANGPSR.N	
78 - 82	611.4200	610.4127 610.4166	-6	R.LLPIR.E	
109 - 123	1764.8800	1763.8727 1763.8856	-7	R.QPHLFHAYSQPGVQR.F	
200 - 209	1081.5600	1080.5527 1080.5676	-14	R.SSLGSHQLPR.G	
256 - 267	1481.7300	1480.7227 1480.7423	-13	K.IQGDDWEPRPLR.A	

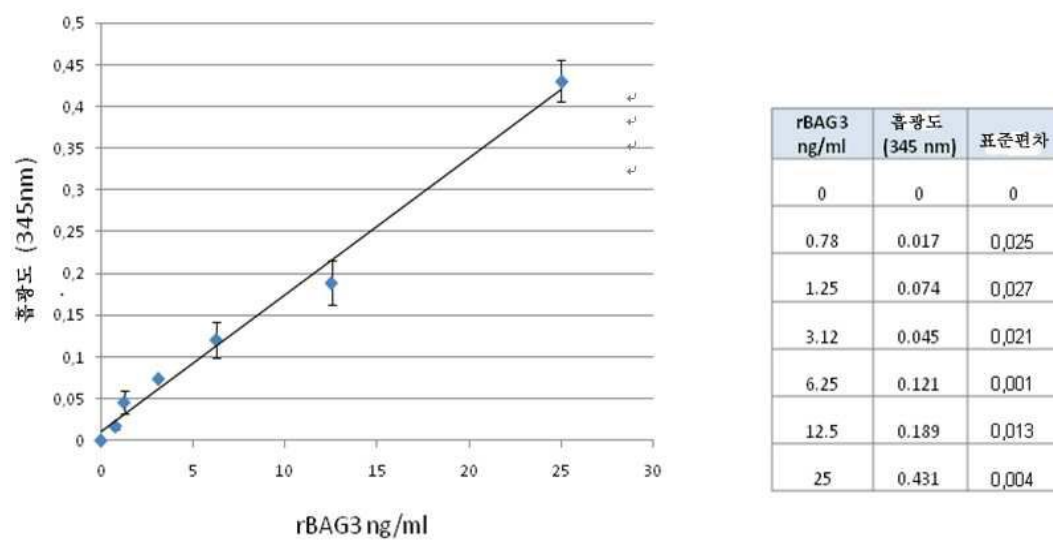
도면2



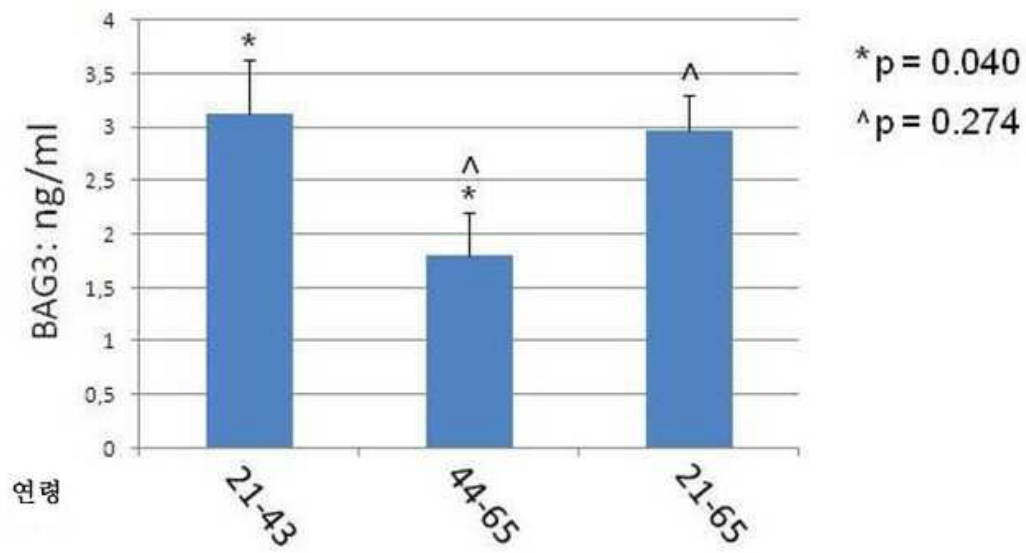
도면3



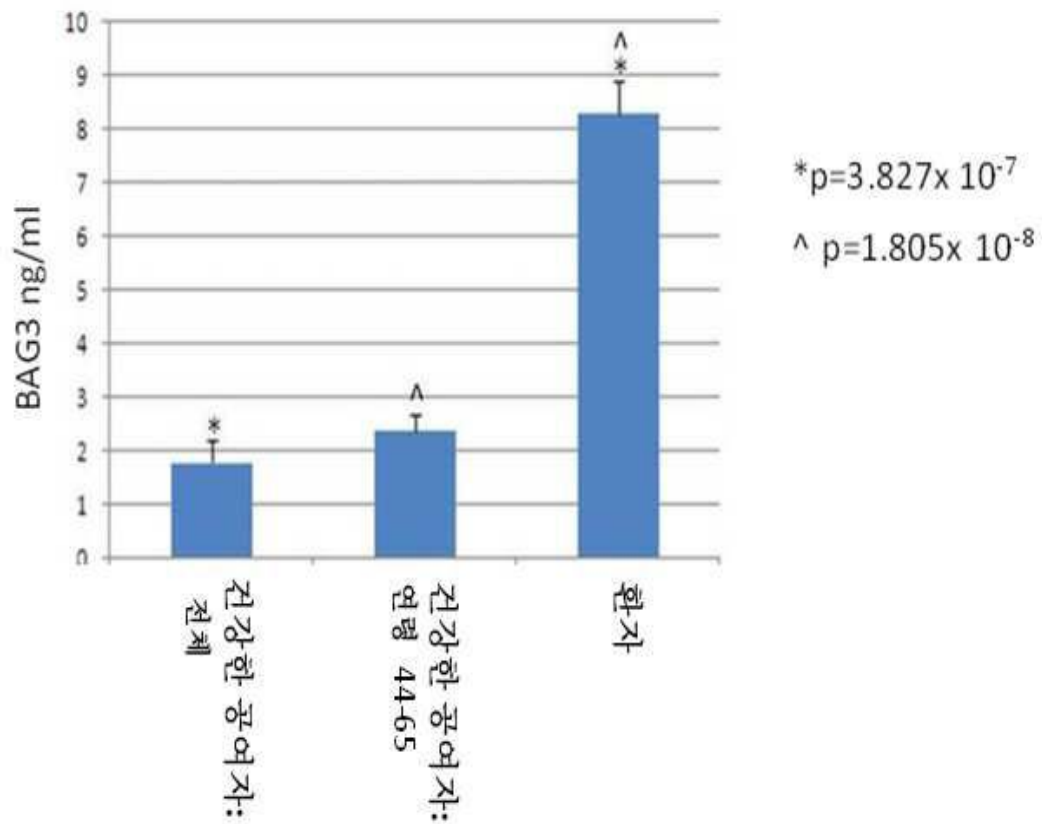
도면4



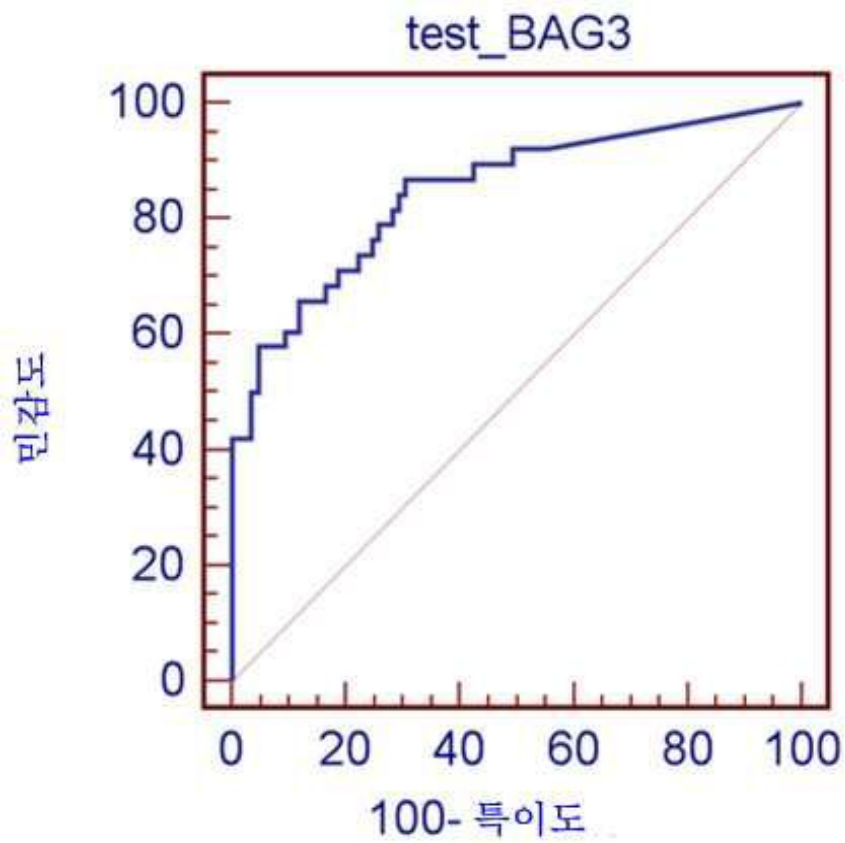
도면5



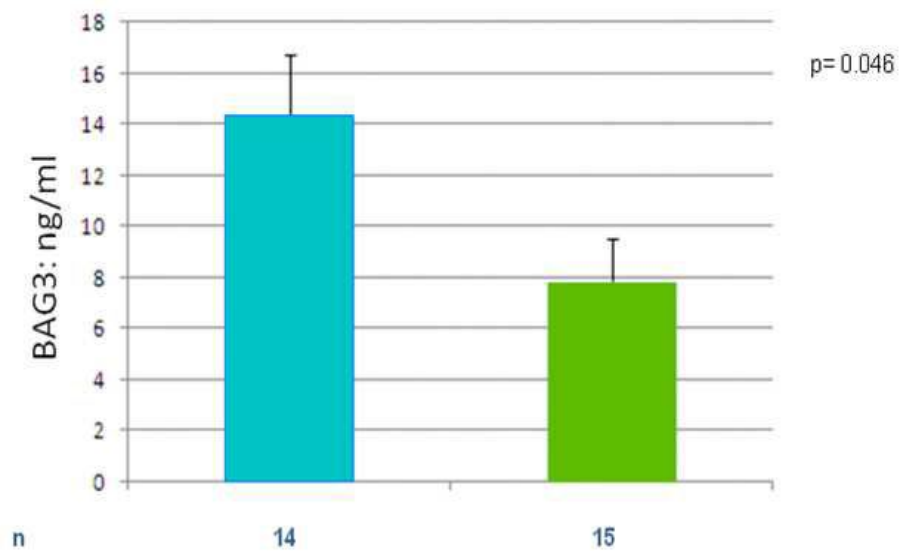
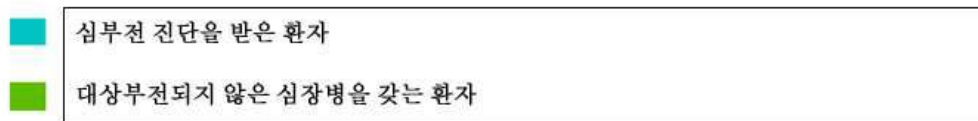
도면6



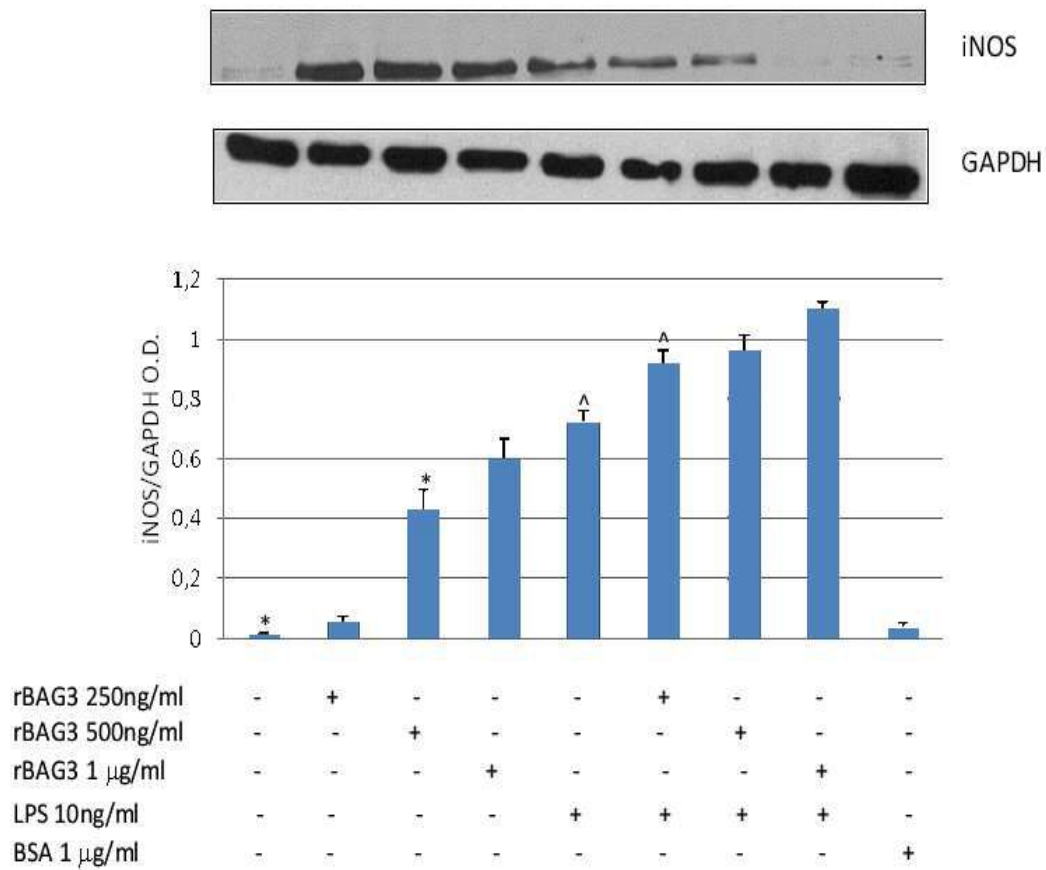
도면7



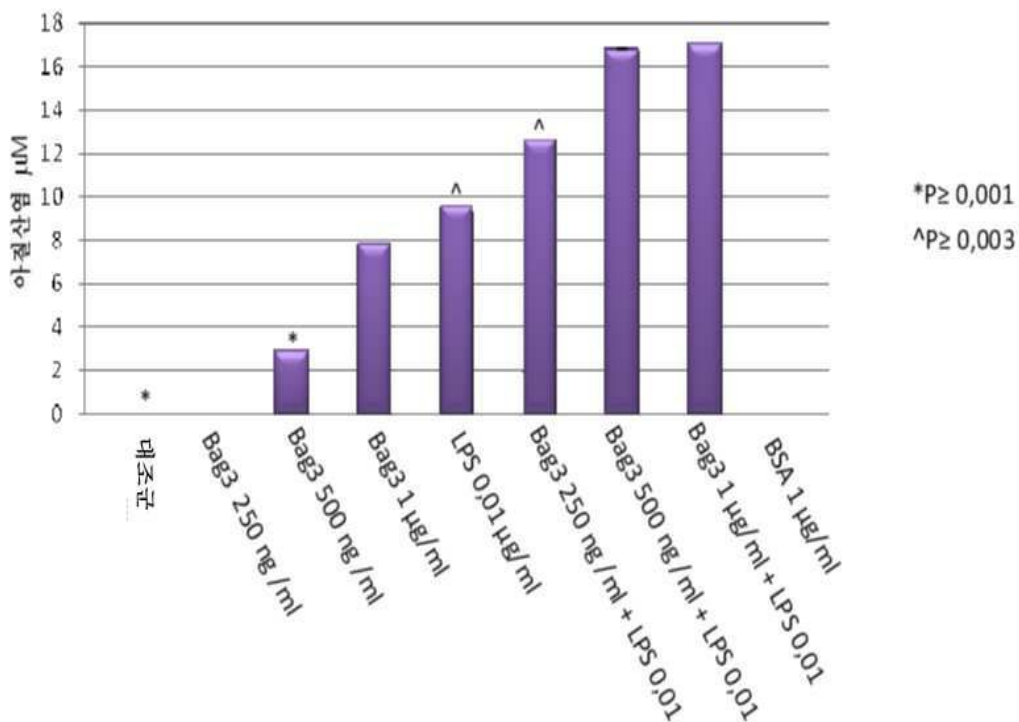
도면8



도면9a



도면9b



서열 목록

<110> BIOUNIVERSA S.R.L.
 <120> BIOCHEMICAL SERUM MARKER
 <130> PM028949
 <150> IT MI2009A002154
 <151> 2009-12-04
 <150> EP PCT/EP2010/068836
 <151> 2010-12-03
 <160> 3
 <170> Kopatent In 2.0
 <210> 1
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Asp Arg Asp Pro Leu Pro Pro Gly Tyr Glu Ile Lys Ile Asp Pro Gln

1 5 10 15

<210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

Ser Ser Pro Lys Ser Val Ala Thr Glu Glu Arg Ala Ala Pro Ser

1 5 10 15

<210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

Asp Lys Gly Lys Lys Asn Ala Gly Asn Ala Glu Asp Pro His Thr

1 5 10 15