



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0133109
(43) 공개일자 2022년10월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) C12Q 1/6886 (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/574 (2013.01)
C12Q 1/6886 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2022-0034295
(22) 출원일자 2022년03월18일
심사청구일자 2022년03월18일
(30) 우선권주장
1020210037912 2021년03월24일 대한민국(KR)

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(주)휴먼스케이프
서울특별시 강남구 봉은사로86길 6, 601호(삼성동, 빌딩 레베쌍트)
(72) 발명자
김종재
서울특별시 강동구 천호옛길 30, 1006호(성내동, 성내동 파라디아 아파트)
김경곤
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 113동 3401호(신천동, 파크리오)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이명진

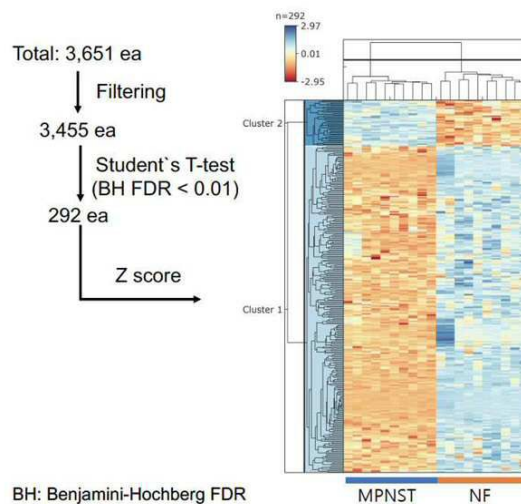
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 악성말초신경초종의 감별진단을 위한 조성물

(57) 요약

본 발명은 악성말초신경초종(Malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST)의 감별진단용 조성물, 이를 포함하는 감별진단용 키트, 이를 이용한 악성말초신경초종의 감별진단에 필요한 정보를 제공하는 방법, 악성말초신경초종의 예방, 개선 및 치료용 조성물의 스크리닝 방법 등에 관한 것이다. 본 발명의 단백질 마커를 검출할 수 있는 조성물을 이용하면, 제1형 신경섬유종증 환자에서 악성 종양의 발생 여부를 예측 및 진단할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도10a



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2333/70596 (2013.01)

G01N 2333/96486 (2013.01)

G01N 2500/00 (2013.01)

(72) 발명자

이범희

서울특별시 송파구 올림픽로 525, 104동 1605호(풍
납동, 현대아파트)

김은나

경기도 용인시 기흥구 탑실로 152, 203동 1301호
(공세동, 탑실마을 대주피오레 2단지)

장민후

서울특별시 강남구 삼성로85길 33, 702호

정황교

경기도 용인시 처인구 모현면 능곡로 10, 유성빌딩
301

도효상

서울특별시 강동구 진랑도로 25길 14, 더결블레스
903호

명세서

청구범위

청구항 1

엔도시알린(endosialin), SPARC-유사 단백질 1(SPARC-like protein 1) 및 뉴트로필 콜라게나아제(neutrophil collagenase)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 악성말초신경초종(Malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST)의 감별진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 제1형 신경섬유종증으로부터 악성말초신경초종을 구별하여 진단할 수 있는 것을 특징으로 하는, 악성말초신경초종의 감별진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체 또는 앵타머인 것을 특징으로 하는, 악성말초신경초종의 감별진단용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 악성말초신경초종의 감별진단용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 악성말초신경초종의 감별진단용 키트.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 키트는 엔도시알린(endosialin), SPARC-유사 단백질 1(SPARC-like protein 1) 및 뉴트로필 콜라게나아제(neutrophil collagenase)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현이 검출되거나 이들의 발현 수준이 양성 신경섬유종 시료의 발현 수준과 비교하여 더 높을 경우 악성말초신경초종으로 결정하는 것을 지시하는 설명서를 포함하는 것을 특징으로 하는, 악성말초신경초종의 감별진단용 키트.

청구항 7

피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 엔도시알린(endosialin), SPARC-유사 단백질 1(SPARC-like protein 1) 및 뉴트로필 콜라게나아제(neutrophil collagenase)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이

의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 악성말초신경초종의 감별진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 방법은 엔도시알린(endosialin), SPARC-유사 단백질 1(SPARC-like protein 1) 및 뉴트로필 콜라게나아제(neutrophil collagenase)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현이 검출되거나 이들의 발현 수준이 제1형 신경섬유종증 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서의 발현 수준과 비교하여 더 높을 경우 악성말초신경초종으로 진단하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 악성말초신경초종의 감별진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 피검체는 악성말초신경초종이 의심되는 환자이거나 제1형 신경섬유종증으로 진단된 환자인 것을 특징으로 하는, 악성말초신경초종의 감별진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈액, 전혈, 혈장, 소변, 조직, 세포, 기관, 골수, 미세침흡인검체, 미세침세척액, 중심부마늘생검(core needle biopsy) 검체 및 타액으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 악성말초신경초종의 감별진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 단백질 발현 수준은 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로켓 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 질량분석법(Mass spectrometry), FACS 및 단백질칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정되는 것을 특징으로 하는, 악성말초신경초종의 감별진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 mRNA 발현 수준은 PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅(northern blotting), 서던 블랏팅(southern blotting), In situ 교잡법 및 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정되는 것을 특징으로 하는, 악성말초신경초종의 감별진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 13

하기의 단계를 포함하는 악성말초신경초종의 예방, 개선 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법:

(a) 분리된 세포 또는 조직에 후보물질을 접촉시키는 단계;

(b) 상기 세포 또는 조직에서 TGF- β 신호전달계, ILK 신호전달계, 액틴-사이토스켈레톤(actin-cytoskeleton) 신

호전달계 및 RhoGDI 신호전달계로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 신호전달계 단백질의 활성 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 후보물질과 접촉된 세포 또는 조직에서 상기 단백질의 활성 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준이 후보물질 접촉 전의 수준과 비교하여 감소되는 경우, 상기 후보물질을 악성말초신경초종의 예방, 개선 또는 치료용 물질로 판정하는 단계.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 신호전달계 단백질은 키나아제(kinase)인 것을 특징으로 하는, 악성말초신경초종의 예방, 개선 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 키나아제는 CDK4, STK10, CDK5, MAP2K1, ALPK3, PNKP, PDK3, PHKG1, CFL1 및 PACSIN3로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 코딩되는 키나아제인 것을 특징으로 하는, 악성말초신경초종의 예방, 개선 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법.

청구항 16

제13항에 있어서,

상기 분리된 세포 또는 조직은 신경세포 또는 신경조직인 것을 특징으로 하는, 악성말초신경초종의 예방, 개선 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 악성말초신경초종(Malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST)의 감별진단용 조성물, 이를 포함하는 감별진단용 키트, 이를 이용한 악성말초신경초종의 감별진단에 필요한 정보를 제공하는 방법, 악성말초신경초종의 예방, 개선 및 치료용 조성물의 스크리닝 방법 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 제1형 신경섬유종증(Neurofibromatosis type I, 이하 'NF-1'이라 함)은 1882년 프리드리히 폰 레클링하우젠(Fredrich von Recklinghausen)에 의해 처음 기술되었으며, 가장 흔한 유전 질환 중 하나이다. NF-1은 상염색체 우성 유전을 통해 유전되며, 전 세계적으로 1:3,000명의 사람에게 영향을 미친다. NF-1은 피부의 다발성 밀크커피 반점과 피부의 신경섬유종을 특징으로 한다. 또한, 다양한 수준의 신경계, 골격계 발현과 신생물성 발현이 환자에게 영향을 줄 수 있다. NF-1 환자는 총상신경섬유종(Plexiform neurofibromas, PN; 27%), 시신경교종(Optic nerve glioma; 15-20%), 크롬친화세포종(pheochromocytoma; 1%), 악성말초신경초종(malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST; 8-13%)을 포함한 중추 및 말초 신경계 종양이 발생할 위험이 있다. 이는 일반인에 비해 약 1,000배 높은 비율이다.

[0004] 악성말초신경초종(이하 'MPNST'라 함)은 NF-1 환자의 생존률에 가장 큰 영향을 미치는 합병증 중 하나이다. 이는 양성 신경 수초 종양인 총상신경섬유종의 악성 변형에 의해 생기는 것으로 알려져 있으며, 심한 통증, 급격한 섬유종의 크기 증가, 신경학적 증상이 동반할 경우 의심을 해야한다.

[0005] 현재까지 18F-FDG-PET(18F-fluorodeoxyglucose positron emission computerized tomography)가 양성 종양과

MPNST를 구분하는데 활용되고 있으며, 악성이 의심되는 경우 조직학적 소견으로 MPNST를 진단하게 된다.

[0006] 대부분의 MPNST는 조직학적으로 방추상세포(spindle cell)가 다발을 이루는 양상이고, 핵분화가 진행된 세포가 관찰되며, 주변 조직을 침투하는 양상을 띤다. MPNST의 진단을 위해 S100 단백질 염색이 이용되고 있으나, MPNST의 50-90%에서 염색 양성을 보이고, 이외에 Leu-7 단백질과 수초염기성 단백질(myelin basic protein)은 MPNST의 약 50%에서 양성을 보인다. 비멘틴(vimentin) 또한 MPNST의 진단에 사용되는 병리학적 마커이나, 방추상세포에 특이적이고 MPNST의 특이적 진단에는 제한적이다. 따라서 NF-1에서 MPNST의 진행을 명확히 판단할 수 있는 병리학적 지표가 필요한 실정이다.

[0007] MPNST는 진단 후 수술적 절제를 요하는 질환이다. 수술 후에도 약 50%에는 재발의 위험이 있으며, 수술로 완전 절제가 이루어지지 않은 경우 항암 요법과 방사선 치료가 필요할 수 있다. 그럼에도 불구하고 MPNST 환자들의 5년 생존률은 20-50%에 머문다.

[0008] 현재까지 MPNST를 표적할 수 있는 치료법이 부재한 상황에서, MPNST를 혈액이나 소변에서 조기 진단할 수 있는 바이오 마커를 찾는다면 환자들의 생존률 향상에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) WO 2013142427 A1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 이에 본 발명자들은 악성말초신경초종(Malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST) 및 양성 신경섬유종 조직을 이용하여 광범위한 정량적, 정성적 단백질 분석을 수행한 결과, MPNST 조직에서 특이적으로 발현되는 단백질을 동정하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0012] 따라서, 본 발명의 목적은 악성말초신경초종(MPNST)의 감별진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은, 본 발명에 따른 조성물을 포함하는 악성말초신경초종의 감별진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은, 악성말초신경초종의 감별진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 악성말초신경초종의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 악성말초신경초종의 예방, 개선 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0017] 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

[0019] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 엔도시알린(endosialin), SPARC-유사 단백질 1(SPARC-like protein 1) 및 뉴트로필 콜라게나아제(neutrophil collagenase)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 악성말초신경초종(Malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST)의 감별진단용 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 조성물은 제1형 신경섬유종증으로부터 악성말초신경초종을 구별하여 진단할 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체 또는 앵

타머일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0022] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 상기 조성물을 포함하는 악성말초신경초종의 감별진단용 키트를 제공한다.
- [0024] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 키트는 엔도시알린(endosialin), SPARC-유사 단백질 1(SPARC-like protein 1) 및 뉴트로필 콜라게나아제(neutrophil collagenase)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현이 검출되거나 이들의 발현 수준이 양성 신경섬유종 시료의 발현 수준과 비교하여 더 높을 경우 악성말초신경초종으로 결정하는 것을 지시하는 설명서를 포함할 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 엔도시알린(endosialin), SPARC-유사 단백질 1(SPARC-like protein 1) 및 뉴트로필 콜라게나아제(neutrophil collagenase)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 악성말초신경초종의 감별진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 방법은 엔도시알린(endosialin), SPARC-유사 단백질 1(SPARC-like protein 1) 및 뉴트로필 콜라게나아제(neutrophil collagenase)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현이 검출되거나 이들의 발현 수준이 제1형 신경섬유종증 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서의 발현 수준과 비교하여 더 높을 경우 악성말초신경초종으로 진단하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 피검체는 악성말초신경초종이 의심되는 환자이거나 제1형 신경섬유종증으로 진단된 환자일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 전혈, 혈장, 소변, 조직, 세포, 기관, 골수, 미세 침흡인검체, 미세침세척액, 중심부바늘생검(core needle biopsy) 검체 및 타액으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 단백질 발현 수준은 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 질량분석법(Mass spectrometry), FACS 및 단백질칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 mRNA 발현 수준은 PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅(northern blotting), 서던 블랏팅(southern blotting), In situ 교잡법 및 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 또한, 본 발명은 TGF- β 신호전달계, ILK 신호전달계, 액틴-사이토스켈레톤(actin-cytoskeleton) 신호전달계 및 RhoGDI 신호전달계로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 신호전달계 단백질의 활성 억제제 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는, 악성말초신경초종의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0032] 더욱이, 본 발명은 TGF- β 신호전달계, ILK 신호전달계, 액틴-사이토스켈레톤(actin-cytoskeleton) 신호전달계 및 RhoGDI 신호전달계로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 신호전달계 단백질의 활성 억제제 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 악성말초신경초종의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0033] 뿐만 아니라, 본 발명은 TGF- β 신호전달계, ILK 신호전달계, 액틴-사이토스켈레톤(actin-cytoskeleton) 신호전달계 및 RhoGDI 신호전달계로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 신호전달계 단백질의 활성 억제제 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제의, 악성말초신경초종에 대한 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [0034] 또한, 본 발명은 TGF- β 신호전달계, ILK 신호전달계, 액틴-사이토스켈레톤(actin-cytoskeleton) 신호전달계 및 RhoGDI 신호전달계로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 신호전달계 단백질의 활성 억제제 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는, 악성말초신경초종의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0035] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 신호전달계 단백질은 키나아제(kinase)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니

다.

- [0036] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 키나아제는 CDK4, STK10, CDK5, MAP2K1, ALPK3, PNKP, PDK3, PHKG1, CFL1, 및 PACSIN3로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 코딩되는 키나아제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 단백질의 활성 억제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 펩타이드, 항체, 앵타머 및 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 신호전달계 단백질의 활성 억제제는 셀루메티닙(selumetinib), 알보시딕(alvociclib), 푸르발라놀(purvalanol), 팔보시클립(palbociclib), 리보시클립(ribociclib), 아베마시클립(abemaciclib), 포스타마티닙(fostamatinib), 비니메티닙(binimetinib), 라디시콜(radicalcol), AZD-8330, 다이하이드로리포산(dihydrolipoic acid), 알스터폴론(alsterpaullone), 히메니알디신(hymenialdisine), 인디루빈-3'-모노심(indirubin-3'-monoxime), 올로모우신(olomoucine), SU9516, 및 6-페닐[5H]피롤로[2,3-B]피라진으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 유전자의 발현 억제제는 상기 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 miRNA, siRNA, shRNA, 리보자임(ribozyme), DNAzyme, PNA(peptide nucleic acid) 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 또한, 본 발명은 (a) 분리된 세포 또는 조직에 후보물질을 접촉시키는 단계; (b) 상기 세포 또는 조직에서 TGF- β 신호전달계, ILK 신호전달계, 액틴-사이토스켈레톤(actin-cytoskeleton) 신호전달계 및 RhoGDI 신호전달계로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 신호전달계 단백질의 활성 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 후보물질과 접촉된 세포 또는 조직에서 상기 단백질의 활성 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준이 후보물질 접촉 전의 수준과 비교하여 감소되는 경우, 상기 후보물질을 악성말초신경초종의 예방, 개선 또는 치료용 물질로 판정하는 단계를 포함하는 악성말초신경초종의 예방, 개선 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0041] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 신호전달계 단백질은 키나아제(kinase)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 키나아제는 CDK4, STK10, CDK5, MAP2K1, ALPK3, PNKP, PDK3, PHKG1, CFL1, 및 PACSIN3로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 코딩되는 키나아제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 분리된 세포 또는 조직은 신경세포 또는 신경조직일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0045] 본 발명은 악성말초신경초종(Malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST)의 감별진단용 조성물 등에 관한 것으로, 본 발명의 단백질 마커를 검출할 수 있는 조성물을 이용하여 제1형 신경섬유종증 환자에서 악성 종양의 발생 여부를 예측 및 진단하고 치료 표적으로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0047] 도 1a 및 도 1b는 양성 신경섬유종(NF) 및 악성말초신경초종(MPNST) 조직을 이용한 정량적 단백질 분석의 시계열적 흐름도이다.
- 도 2는 단백질 데이터 분석 방법을 도식화한 도이다.
- 도 3은 양성 신경섬유종(NF) 및 악성말초신경초종(MPNST) 조직에 대한 단백질의 정량 결과를 나타낸 단백질 풍부도 분포(distribution of protein abundance) 그래프이다.
- 도 4는 벤다이어그램 분석을 이용하여 신경섬유종(NF) 및 악성말초신경초종(MPNST) 두 그룹에 대한 정성적 단백질 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 5a 및 도 5b는 양성 신경섬유종(NF) 및 악성말초신경초종(MPNST) 조직에서 10배 이상 발현 증가가 나타난 단백질 조사 결과를 나타낸 도로서, 도 5a는 세포외 엑소솜에서 발현되는 단백질을, 도 5b는 세포외기질을 분해하는 단백질을 선별한 결과이다.

도 6a 내지 도 6j는 양성 신경섬유종(NF)과 악성말초신경초종(MPNST) 조직에서 S-100 동형 단백질 및 비멘틴의 발현 양상을 조사한 결과를 나타낸 그래프로서, 도 6a는 S100-A1 단백질, 도 6b는 S100-A4 단백질, 도 6c는 S100-A6 단백질, 도 6d는 S100-A7 단백질, 도 6e는 S100-A8 단백질, 도 6f는 S100-A9 단백질, 도 6g는 S100-A10 단백질, 도 6h는 S100-A13 단백질, 도 6i는 S100-B 단백질, 도 6j는 비멘틴(vimentin)에 대한 결과를 나타낸 도이다. (F1-F10은 환자의 MPNST 부위 시료, F11-F20은 환자의 양성 NF 부위 시료를 의미한다. 구체적으로, F1, F2는 환자 1의 MPNST 부위 시료; F3, F4는 환자 2의 MPNST 부위 시료; F5, F6은 환자 3의 MPNST 부위 시료; F7, F8은 환자 4의 MPNST 부위 시료; F9, F10은 환자 5의 MPNST 부위 시료; F11, F12는 환자 1의 양성 NF 부위 시료; F13, F14는 환자 2의 양성 NF 부위 시료; F15, F16은 환자 3의 양성 NF 부위 시료; F17, F18은 환자 4의 양성 NF 부위 시료; F19, F20은 환자 5의 양성 NF 시료를 의미한다. (표 3 참조))

도 7은 양성 신경섬유종(NF)과 악성말초신경초종(MPNST) 조직에서 엔도시알린(endosialin)의 발현 양상을 조사한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 양성 신경섬유종(NF)과 악성말초신경초종(MPNST) 조직에서 SPARC-유사 단백질 1의 발현 양상을 조사한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 9는 양성 신경섬유종(NF)과 악성말초신경초종(MPNST) 조직에서 뉴트로필 콜라게나아제(neutrophil collagenase)의 발현 양상을 조사한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 10a 내지 도 10c는 양성 신경섬유종(NF)과 악성말초신경초종(MPNST) 조직에서 발현이 변화한 단백질을 계층적 군집화 분석(hierarchical cluster analysis)한 결과를 나타낸 도로서, 도 10a는 전체 결과를 시각화한 도이고, 도 10b는 MPNST에서 발현이 증가된 단백질의 클러스터를, 도 10c는 MPNST에서 발현이 감소된 단백질의 클러스터를 나타낸 도이다.

도 11은 악성말초신경초종(MPNST) 특이적 단백질에 대한 gene ontology 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 12는 악성말초신경초종(MPNST) 특이적 단백질에 대한 IPA(ingenuity pathway analysis) 결과를 나타낸 도이다.

도 13 내지 도 21은 양성 신경섬유종(NF)과 비교하여 악성말초신경초종(MPNST)에서 특이적으로 발현 또는 활성이 증가한 키나아제의 abundance를 비교 분석한 그래프로서, 도 13은 CDK4, 도 14는 MAP2K1, 도 15는 PDK3, 도 16은 STK10, 도 17은 ALPK3, 도 18은 PHKG1, 도 19는 CDK5, 도 20은 PNKP, 도 21은 PACSIN3의 abundance에 대한 결과를 나타낸 것이다.

도 22는 양성 신경섬유종(NF)과 악성말초신경초종(MPNST) 조직에서 MMP8 단백질(뉴트로필 콜라게나아제)에 대한 IHC(Immunohistochemistry) 결과를 나타낸 도이다 (A1 및 B1은 NF 조직, A2 및 B2는 MPNST 조직).

도 23은 악성말초신경초종(MPNST) 환자의 혈액을 이용하여 종양 제거 유무에 따른 MMP8 단백질(뉴트로필 콜라게나아제) 발현 차이를 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 24는 양성 신경섬유종(NF)과 비교하여 악성말초신경초종(MPNST)에서 특이적으로 발현 또는 활성이 증가한 ILK 신호전달 체계, 액틴-사이토스켈레톤(actin-cytoskeleton) 신호전달 체계, 및 키나아제에 대한 IHC(Immunohistochemistry) 결과를 나타낸 도이다 (A1 내지 J1은 NF 조직, A2 내지 J2는 MPNST 조직).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명은 제1형 신경섬유종증(Neurofibromatosis type I)에서 악성말초신경초종(Malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST)으로 이행되는 경우를 감별진단하기 위한 복수의 바이오 마커 및 MPNST 특이적으로 항진되는 신호전달 경로 또는 발현이 증가되는 키나아제(kinase)를 표적으로 하는 MPNST 치료제의 스크리닝 방법 등에 관한 것으로서, 본 발명자들은 MPNST 특이적 진단 마커 및 새로운 치료 표적을 발굴하기 위해 예의 연구한 결과 본 명세서에서 개시하는 복수의 단백질 및 신호전달 경로를 발견하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0048]

[0050] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0052] 본 발명은 하기 표 1에 기재된 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 악성말초신경초종(Malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST)의 감별진단용 조성물에 관한 것이다.

표 1

UniProt Accession	유전자	단백질	서열번호
Q9HCU0	CD248	Endosialin	1
Q14515	SPARCL1	SPARC-like protein 1	2
P22894	MMP8	Neutrophil collagenase	3

[0053]

[0054] 본 발명의 일 실시예에서는, 악성말초신경초종(MPNST) 및 양성 신경섬유종(NF) 및 조직을 이용한 단백질 분석을 통해, MPNST에 특이적인 단백질들을 동정하였고, 이들 중 혈액이나 소변에서 검출될 수 있는 3종의 단백질 - 엔도시알린, SPARC-유사 단백질 1 및 뉴트로필 콜라게나아제 - 을 선별하여 MPNST에 대한 바이오 마커로 사용될 수 있음을 보였다(실시예 2 내지 4 및 실시예 6 참조).

[0055] 상기 엔도시알린은 CD248 유전자에 의해 코딩되고, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 1번 내지 324번 아미노산이 소실된 동형 단백질을 포함한다. 상기 SPARC-유사 단백질 1은 SPARCL1 유전자에 의해 코딩되고, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 서열번호 2의 아미노산 서열에서 1번 내지 125번 아미노산이 소실된 동형 단백질을 포함한다. 또한, 상기 뉴트로필 콜라게나아제는 MMP8 유전자에 의해 코딩되고, 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0056] 본 명세서에서 사용된 용어, "단백질"은 폴리펩타이드(polypeptide) 또는 펩타이드(peptide)와 호환성 있게 사용되며, 예컨대, 자연 상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다. "mRNA"는 단백질 합성 과정에서 특정 유전자로부터 아미노산 서열을 특정하게 되는 리보솜으로 유전 정보(유전자 특이적 염기 서열)를 전달하는 RNA를 의미한다.

[0057] 본 명세서에서 사용된 용어, "발현(expression)"은 세포에서 단백질 또는 핵산이 생성되는 것을 의미한다.

[0058] 본 명세서에서 사용된 용어, "감별진단(differential diagnosis)"은 특정한 질환 또는 상태를 유사한 증상을 나타내는 다른 것으로부터 구별하는 것을 지칭한다. 감별진단 방법은 다중 대안이 가능한 상태의 존재를 확인하는데 사용되는 체계적 진단 방법이다. 이러한 방법은 본질적으로 후보 상태의 확률을 무시할만한 수준으로 축소시키는 제거 프로세스 또는 정보 수득 프로세스이다. 해당 용어는 또한 양성 신경섬유종증(neurofibromatosis)에서 악성말초신경초종으로의 이행 여부를 결정하는 것을 언급하기 위해 사용된다.

[0059] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 제1형 신경섬유종증(NF-1)으로부터 악성말초신경초종(MPNST)을 구별하여 진단할 수 있다.

[0060] 본 명세서에서 사용된 용어 "제1형 신경섬유종증(Neurofibromatosis type I)" 또는 "양성 신경섬유종"은 피부, 골격계, 신경계 등에 다양한 임상증상을 보이는 유전질환으로 1882년 프리드리히 폰 레클링하우젠(Fredrich von Recklinghausen)에 의해 처음으로 보고된 질환을 의미한다. 제1형 신경섬유종증은 피부의 밀크 커피색 반점(cafe-au-lait-spot), 겨드랑이 부위 주근깨(axillary freckling), 서혜부 부위의 주근깨(inguinal freckling), 다발성 신경섬유종(neurofibroma), 홍채에 작고 색조를 띤 과오종인 리쉬결절(Lisch nodule), 시신경교종(optic glioma), 골형성 장애의 특징적인 증상을 보인다. 이 외 저신장, 척추측만증, 학습장애가 나타날 수 있다. 제1형 신경섬유종증 환자에서 나타나는 대부분의 종양은 양성이지만, 드문 경우에는 악성으로 진행될 수 있으며 신경이 있는 신체 모든 부위에 발생할 수 있다. 연구에 의하면 67%의 경우에서 생후 1세 이전에 발견되며, 25-90%에서 특징적인 피부병변인 밀크 커피색 반점을 동반하고, 최고 16%에서 악성화 되는 것으로 보고되어 있다.

- [0061] 본 명세서에서 사용된 용어 "악성말초신경초종(Malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST)"은 "악성 말초신경초종양"과 호환성 있게 사용되며, 일반적으로 사지 및 두경부에 발생하고 복강, 골반, 비뇨생식계 등에서도 드물게 발생한다. 주로 제1형 신경섬유종증과 연관되어 있으며, 신경섬유종증 환자 중 일생 동안 악성말초신경초종이 발생될 위험성은 약 10% 내외로 알려져 있고, 예후가 매우 불량하며 악성도가 높은 난치병 중 하나이다.
- [0062] 본 발명의 조성물이 단백질의 발현 수준을 측정하기 위한 것인 경우, 단백질의 발현 수준을 측정하는 체계는 상기 단백질에 특이적인 항체 또는 앵타머일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0063] 본 명세서에서 사용된 용어, "항체"는 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 또한 항원-항체 결합성을 갖는 것이면 전체 항체의 일부도 본 발명의 항체에 포함되며, 본 발명의 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 모든 종류의 면역글로불린 항체가 포함된다. 예를 들어, 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태의 항체뿐 아니라 항체 분자의 기능적인 단편, 즉 항원 결합 기능을 갖는 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 나아가 본 발명의 항체에는 상기 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 것이라면 인간화 항체, 키메라 항체 등의 특수 항체와 재조합 항체도 포함된다.
- [0064] 본 명세서에서 사용된 용어, "앵타머(aptamer)"는 시료 내의 검출하고자 하는 분석 물질과 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.
- [0065] 상기 표 1에 기재된 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 본 발명의 조성물은 공지된 단백질을 감지하는 방법에 필요한 재제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 본 조성물을 이용하여 공지된 단백질을 감지하는 방법을 제한없이 사용하여 피검체(본 발명에서는 피검체로부터 수득한 생물학적 시료)에서 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있다.
- [0066] 또한, 본 발명의 조성물이 mRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 것인 경우, 상기 mRNA의 발현 수준을 측정하는 체계는 상기 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0067] 본 명세서에서 사용된 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다.
- [0068] 본 명세서에서 사용된 용어, "프로브"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 표지(labeling)되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고 뉴클레오타이드 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0069] 상기 "프라이머" 또는 "프로브"는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한 프라이머 또는 프로브는 mRNA와의 혼성화를 방해하지 않는 범위에서 당해 기술 분야에 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 표지물질(labeling material)의 결합 등이 있다.
- [0070] 상기 표 1에 기재된 단백질의 mRNA에 특이적인 프라이머 세트 또는 프로브를 포함하는 본 발명의 조성물은 공지된 RNA를 감지하는 방법에 필요한 재제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물을 이용하여 공지된 RNA를 감지하는 방법을 제한없이 사용함으로써 피검체에서 상기 단백질 마커들의 mRNA의 수준을 측정할 수 있다.

- [0071] 또한, 본 발명에서, 상기 단백질의 mRNA를 코딩하는 유전자는 그 핵산 서열이 유전자 은행에 등록되어 있으므로 당업자는 상기 서열을 바탕으로 이들 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머 쌍 또는 프로브를 디자인할 수 있다.
- [0072] 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 포스포라미다이트 고체지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있으며, 모든 기능적 등가물을 포함한다. 또한, 전술한 "프라이머" 또는 "프로브"에 관한 내용이 동일하게 적용될 수 있다.
- [0073] 상기 "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 등가적인 서열에서의 각 잔기 치환, 부가 및 결실의 숫자는 상응하는 기준 서열과 비교하고 실질적으로 등가적인 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 등가적인 생물학적 활성과 실질적으로 등가적인 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.
- [0075] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 본 발명에 따른 상기 조성물을 포함하는 악성말초신경초종의 감별진단용 키트를 제공할 수 있다.
- [0076] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 엔도시알린(endosialin), SPARC-유사 단백질 1(SPARC-like protein 1) 및 뉴트로필 콜라게나아제(neutrophil collagenase)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현이 검출되거나 이들의 발현 수준이 양성 신경섬유종 시료의 발현 수준과 비교하여 더 높을 경우 악성말초신경초종으로 결정하는 것을 지시하는 설명서를 포함할 수 있다.
- [0077] 상기 본 발명의 키트에는 표적 단백질을 마커로 인식하는 항체 또는 mRNA를 마커로 인식하는 프라이머 세트, 프로브뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0078] 구체적인 양태로서 상기 진단 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단용 키트일 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 세트를 포함한다. 프라이머는 각 마커 유전자의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약 7bp 내지 50bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10bp 내지 30bp의 길이이다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리메라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0079] 다른 구체적인 양태로는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기관, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기관은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0081] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 엔도시알린(endosialin), SPARC-유사 단백질 1(SPARC-like protein 1) 및 뉴트로필 콜라게나아제(neutrophil collagenase)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 악성말초신경초종의 감별진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공할 수 있다.

- [0082] 본 발명에 있어서, 상기 방법은 엔도시알린(endosialin), SPARC-유사 단백질 1(SPARC-like protein 1) 및 뉴트로필 콜라게나아제(neutrophil collagenase)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현이 검출되거나 이들의 발현 수준이 제1형 신경섬유종증 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서의 발현 수준과 비교하여 더 높을 경우 악성말초신경초종으로 진단하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0083] 본 명세서에서 사용된 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, 상기 단백질의 발현 수준을 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 실험법들이 이에 포함된다. 각 방법 별로 구체적 단백질 수준 비교 방식은 당업계에 잘 알려져 있다. 따라서 상기 목적 단백질 검출은 상기 표 1에 기재된 단백질의 존재 여부의 검출, 또는 상기 단백질 발현량의 증가(상향 조절) 또는 감소(하향 조절)를 확인하는 것을 포함하는 의미이다.
- [0084] 또한, 상기 용어 "감별진단"은 전술한 의미 외에도, 특정 질병 또는 질환에 대한 대상(subject)의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 대상이 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 대상의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)를 포함한다.
- [0085] 본 발명에 있어서, 상기 피검체는 악성말초신경초종이 의심되는 환자이거나 제1형 신경섬유종증으로 진단된 환자일 수 있다.
- [0086] 본 발명에 있어서, 상기 생물학적 시료는 악성말초신경초종의 감별진단을 실시하고자 하는 피검체에서 채취된 것이라면 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들어, 생검 등으로 얻어진 조직, 세포, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 비액, 객담, 관절액, 양수, 복수, 자궁경부 분비물, 질 분비물, 소변, 뇌척수액 등 생체 시료뿐만 아니라 미세침흡인검체 및 미세침세척액 또한 포함한다. 바람직하게는 생물학적 액체 시료, 예를 들어 혈액, 전혈, 혈장, 소변, 조직, 세포, 기관, 골수, 미세침흡인검체, 미세침세척액, 중심부바늘생검(core needle biopsy) 검체 및 타액으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에서 측정될 수 있다. 본 발명은 악성말초신경초종이 발생한 병변조직 외에도 체액시료(일례로, 소변 또는 혈액)를 통해 진단이 가능하여, 진단의 효용성, 신속성, 편의성 및 안전성 등이 증가된다는 점에서 기술적 의의가 크다.
- [0087] 상기 생물학적 시료는 검출 또는 진단에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 균질화(homogenization), 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 상기 시료는 단백질 마커의 탐지 감도를 증가시키도록 준비될 수 있는데 예를 들어 환자로부터 수득한 혈청 시료는 음이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 크기별 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 액체 크로마토그래피, 연속추출(sequential extraction) 또는 젤 전기영동 등의 방법을 이용하여 전처리될 수 있다.
- [0088] 상기 단백질 발현 수준 측정은 당업계에 공지된 단백질 발현 측정 방법에 의한 것이라면 측정 방법이 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로켓 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 질량분석법(Mass spectrometry), FACS 및 단백질칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0089] 상기 mRNA 발현 수준 측정은 당업계에 공지된 유전자 발현 측정 방법에 의한 PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅(northern blotting), 서던 블랏팅(southern blotting), In situ 교잡법 및 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0090] 본 명세서에서 사용된 용어, '분석'은 바람직하게는 '측정'을 의미하는 것일 수 있고, 상기 정성분석은 목적하는 물질의 존재 여부를 측정 및 확인하는 것을 의미하는 것일 수 있으며, 상기 정량분석은 목적하는 물질의 존재 수준(발현 수준) 또는 양의 변화를 측정 및 확인하는 것을 의미하는 것일 수 있다. 본 발명에서 분석 또는 측정은 정성적인 방법과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한없이 수행될 수 있으며, 바람직하게는 정량적인 측정이 수행되는 것일 수 있다.

- [0092] 한편, NF-1에서 MPNST의 발생 기전은 종양내 NF-1의 완전 소실, RAS-MAPT 신호의 과도한 활성화, CDKN2A 유전자의 소실, PRC2(polycomb repressive complex 2)의 구성 유전자 SUZ12와 EED의 소실, 종양억제유전자 TP53의 소실, PI3K-AKT-mTOR 신호체계의 비정상적 항진, EGFR(epidermal growth factor receptor), PDGF-R(platelet-derived growth factor receptor), VEGFR(vascular endothelial growth factor receptor) 등의 비정상적 활성화가 관여하는 것으로 알려져 왔다. 이에 기반하여 MPNST에서 다양한 임상 연구가 진행되어 왔으나, 뚜렷한 치료효과를 내는 연구는 없었다. 따라서 새로운 접근법을 이용한 새로운 치료 표적 및 후보 물질을 탐색할 필요성이 있었다.
- [0093] 본 발명은 이러한 요구에 따라 악성말초신경초종(MPNST)에서 특이적으로 항진되는 4종의 신호전달계 - ILK 신호전달 체계, 액틴-사이토스켈레톤(actin-cytoskeleton) 신호전달 체계, RhoGDI 신호전달 체계, TGF- β 신호전달 체계 - 및 MPNST에서 특이적으로 발현 또는 활성이 증가한 10종의 키나아제 - CDK4, MAP2K1, PDK3, STK10, ALPK3, PHKG1, CDK5, PNKP, CFL1, 및 PACSIN3 유전자에 의해 발현되는 키나아제 - 를 발굴하였고, 이들이 MPNST의 새로운 치료 표적으로서 활용될 수 있음을 확인하였다(실시에 5 및 실시예 7 참조).
- [0094] 따라서, 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 TGF- β 신호전달계, ILK 신호전달계, 액틴-사이토스켈레톤(actin-cytoskeleton) 신호전달계 및 RhoGDI 신호전달계로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 신호전달계 단백질의 활성 억제제 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는, 악성말초신경초종의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.
- [0096] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 TGF- β 신호전달계, ILK 신호전달계, 액틴-사이토스켈레톤(actin-cytoskeleton) 신호전달계 및 RhoGDI 신호전달계로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 신호전달계 단백질의 활성 억제제 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는, 악성말초신경초종의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공할 수 있다.
- [0097] 상기 "TGF- β 신호전달계(TGF beta signaling) 단백질"은 TGF- β 신호전달에 직간접적으로 관여하는 단백질을 모두 포함한다. 예를 들어, SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5, SMAD9, Thrombospondin-1, Rock, Cdc42/RAC, PAK, LIMK, PI3K, Ras, Raf, MEK1/2, ERK1/2, JNK, P38, Cofilin, mTOR, AKT 이 있다.
- [0098] 상기 "ILK 신호전달계(Integrin-linked kinase signaling) 단백질"은 ILK 신호전달에 직간접적으로 관여하는 단백질을 모두 포함한다. 예를 들어, mTOR, AKT, VEGF, NF- κ GSK3 β , SNAIL, AP-1, MMP9, JAK2, Cdc42/RAC, SNAI1, JNK, PI3K, AP-1, C-Jun, HIF1 α , COX2, β -Catenin 이 있다.
- [0099] 상기 "액틴-사이토스켈레톤 신호전달계(actin-cytoskeleton signaling) 단백질"은 액틴-사이토스켈레톤 신호전달에 직간접적으로 관여하는 단백질을 모두 포함한다. 예를 들어, PI3K, CaM, PKA, Rho, ROCK, Ras, Rac, Paxillin, FAK, Cofilin, Cortactin, WAVE, PIX, TIAM1, Vav, PAK1, GEF, VASP, MEKK, MEK, MLCK, MLC, LIMK, ADF, CapZ, Hsp90, Gelsolin, ADF, Filamin, Profilin, RhoGEF, Myosin, ACTN, Vinculin, ACTN, PFN, MEK1/2, ERK1/2 이 있다.
- [0100] 상기 "RhoGDI 신호전달계(Rho GDP-dissociation inhibitor signaling) 단백질"은 RhoGDI 신호전달에 직간접적으로 관여하는 단백질을 모두 포함한다. 예를 들어, MKK4/7, JNK, C-Jun, PARP, ROCK1, ROCK2, Cdc42, eNOS, Tau, MLCP, MLC, CRMP2, Adducin, LIMK, PKN, BORGs, Citron, WASP, MRCK, PI3K, PAK, PAR6, PAR3 이 있다.
- [0101] 본 발명에 있어서, 상기 신호전달계 단백질은 키나아제(kinase)일 수 있으며, 상기 키나아제는 하기 표 2에 기재된 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 키나아제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0102] 본 발명에 있어서, 하기 표 2의 키나아제는 "CDK4", "STLK10" 및 "PHKG1"은 ILK 신호전달계; "CDK5"는 액틴-사이토스켈레톤(actin-cytoskeleton) 신호전달계 및 RhoGDI 신호전달계; "MAP2K1" 및 "CFL1"은 액틴-사이토스켈레톤(actin-cytoskeleton) 신호전달계 및 TGF- β 신호전달계; "ALPK3"는 Heart development; PNKP는 DNA damage & repair; "PDK3"는 Pyruvate metabolism, citric acid(TCA) cycle; "PACSIN3"은 액틴-사이토스켈레톤(actin-cytoskeleton) 신호전달계에 속할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

표 2

UniProt Accession	유전자	단백질	서열번호
P11802	CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	4
Q94804	STK10	Serine/threonine-protein kinase 10	5
Q00535	CDK5	Cyclin-dependent-like kinase 5	6
Q02750	MAP2K1	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1	7
Q96L96	ALPK3	Alpha-protein kinase 3	8
Q96T60	PNKP	Bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase	9
Q15120	PKD3	[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 3, mitochondrial	10
Q16816	PHKG1	Phosphorylase b kinase gamma catalytic chain, skeletal muscle/heart isoform	11
Q9UKS6	PACSIN3	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 3	12
P23528	CFL1	Cofilin	13

[0103]

[0104]

본 발명에서는, 상기 표 2에 기재된 단백질들이(p-MEK 포함) MPNST에서 특이적으로 상향 조절되어 있음을 확인하였는바, 이들의 억제할 수 있는 물질, 예를 들어 상기 단백질에 대한 길항제(antagonist)가 MPNST 치료제로서 사용될 수 있다.

[0105]

본 발명에 있어서, 상기 단백질의 활성 억제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 펩타이드, 항체, 앵타머 및 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0106]

본 명세서에서 사용된 용어, "항체"와 "앵타머"의 정의는 전술한 바와 같다.

[0107]

본 발명에 있어서, 상기 신호전달계 단백질의 활성 억제제는 셀루메티닙(selumetinib), 알보시딕(alvocidib), 푸르발라놀(purvalanol), 팔보시클립(palbociclib), 리보시클립(ribociclib), 아베마시클립(abemaciclib), 포스타마티닙(fostamatinib), 비니메티닙(binimetinib), 라디시콜(radicicol), AZD-8330, 다이하이드로리포산(dihydrolipoic acid), 알스터폴론(alsterpaullone), 히메니알디신(hymenialdisine), 인디루빈-3'-모노심(indirubin-3'-monoxime), 올로모우신(olomoucine), SU9516, 및 6-페닐[5H]피롤로[2,3-B]피라진으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0108]

본 발명에 있어서, 상기 유전자의 발현 억제제는 상기 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 miRNA, siRNA, shRNA, 리보자임(ribozyme), DNAzyme, PNA(peptide nucleic acid) 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0109]

본 명세서에서 사용된 용어, "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는 타겟으로 하는 mRNA, 특히 mRNA의 씨드(seed) 서열에 대한 상보적인 서열을 가지고 있어 mRNA와 이합체(duplex)를 형성할 수 있는 핵산-기반 분자를 포괄한다. 따라서, 본 명세서에서 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는 "상보적 핵산-기반 억제제"로 기재될 수 있다.

[0110]

본 명세서에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 언급하면서 사용되는 용어 "상보적"은 소정의 혼성화 또는 어닐링(annealing) 조건, 바람직하게는 생리학적 조건 하에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 상기 mRNA 타겟에 선택적으로 혼성화 할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다.

[0111]

본 발명에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 다양한 분자를 포함한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 DNA 또는 RNA 분자이며, 보다 바람직하게는 RNA 분자이다. 선택적으로, 본 발명에서 이용되는 안티센스 올리고뉴클

레오타이드는 리보뉴클레오타이드(RNA), 디옥시리보뉴클레오타이드(DNA), 2'-O-변형 올리고뉴클레오타이드, 포스포로티오에이트-백본 디옥시리보뉴클레오타이드, PNA(peptide nucleic acid) 또는 LNA(locked nucleic acid)이다. 2'-O-변형 올리고뉴클레오타이드는, 예를 들면 2'-O-알킬 올리고뉴클레오타이드, 2'-O-C1-3 알킬 올리고뉴클레오타이드 또는 2'-O-C1-3 메틸 올리고뉴클레오타이드 동일 수 있다.

[0112] 본 명세서에서 사용된 용어, "miRNA, siRNA 및 shRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱(silencing)을 매개하기 위하여 주로 목적 유전자로부터 전사된 mRNA에 결합하여, 상기 mRNA의 해독을 저해하는 핵산 분자를 의미한다. 상기 miRNA, siRNA 및 shRNA는 표적 유전자의 발현을 해독수준에서 억제할 수 있기 때문에, 효율적인 유전자 녹다운(knockdown) 방법 또는 유전자치료 방법에 사용될 수 있다.

[0113] 본 명세서에서 사용된 용어, "리보자임"은 표적 RNA 분자 내 특정 뉴클레오타이드 서열을 인식하여 부위 특이적으로 절단시킴으로써 표적 유전자의 단백질 발현을 억제할 수 있다.

[0114] 본 명세서에서 사용된 용어, "PNA"는 핵산 모방체, 예를 들어, DNA 모방체를 의미하고, 여기에서 데옥시리보오스 포스페이트 백본은 슈도펩타이드 백본으로 치환되고 단지 원래 4개의 뉴클레오타이드가 유지된다. PNA의 중성의 백본은 낮은 이온성 강도의 조건 하에 DNA 및 RNA에 특이적인 하이브리드를 제공하는 것으로 알려져 있으며, 전사 또는 번역 억제를 유도하거나 복제를 억제하여 유전자 발현의 서열-특이적 조절에 대한 안티센스 또는 항원 제제로서 사용될 수 있다.

[0115] 한편, 본 발명의 조성물 내의 상기 신호전달계 단백질의 활성 억제제 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9 중량%, 또는 0.001 내지 50 중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.

[0116] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0117] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡슐제, 연질캡슐제, 서방갑셀제, 장용갑셀제, 환제, 틱크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.

[0118] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0119] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0120] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC) 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젖산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제셀락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 텍스트린, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무

(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 봉해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 4000, PEG 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에틸렌글리콜 지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.

[0121] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에틸렌소르비톨지방산에스테르류(트윈에스테르), 폴리옥시에틸렌모노알킬에테르류, 라놀린에테르류, 라놀린에스테르류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

[0122] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.

[0123] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.

[0124] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메틸셀룰로오스(HPMC), HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.

[0125] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9% 염화나트륨주사액, 링겔주사액, 텍스트로스주사액, 텍스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이트 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메틸아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모늄), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨(NaHSO_3) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소디움비설파이드 0.1%, 소디움포름알데히드 설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소디움비설파이드와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

[0126] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위탐솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스펀, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아덱스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 테고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16(Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈(Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입(AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈(N, Es), 웨코비(W, R, S, M, Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제(TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.

[0127] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 슈크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

[0128] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

- [0129] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0130] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0131] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 투여, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.
- [0132] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.
- [0133] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0134] 본 발명에서 "투여"란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0135] 본 발명에서 "예방"이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0136] 본 명세서에서 사용된 용어 "건강기능식품"이란, 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처가 승인한 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0138] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 (a) 분리된 세포 또는 조직에 후보물질을 접촉시키는 단계; (b) 상기 세포 또는 조직에서 TGF- β 신호전달계, ILK 신호전달계, 액틴-사이토스켈레톤(actin-cytoskeleton) 신호전달계 및 RhoGDI 신호전달계로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 신호전달계 단백질의 활성 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 후보물질과 접촉된 세포 또는 조직에서 상기 단백질의 활성 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준이 후보물질 접촉 전의 수준과 비교하여 감소되는 경우, 상기 후보물질을 악성말초신경초종의 예방, 개선 또는 치료용 물질로 판정하는 단계를 포함하는 악성말초신경초종의 예방, 개선 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.
- [0139] 본 발명에 있어서, 상기 후보 물질은 저분자량 화합물, 고분자량 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연물 추출물, 핵산, 단백질, 당, 및 지질 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않고, TGF- β 신호전달계, ILK 신호전달계, 액틴-사이토스켈레톤(actin-cytoskeleton) 신호전달계, 및 RhoGDI 신호전달계로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 신호전달계 단백질의 활성 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시킬 수 있는 물질이라면 모두 포함될 수 있다.
- [0140] 상기 핵산은 microRNA, siRNA, shRNA, 안티센스 RNA, 앵타머(aptamer), LNA(locked nucleic acid), PNA(peptide nucleic acid), 및 모폴리노(morpholino)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0141] 본 발명에 있어서, 상기 신호전달계 단백질은 키나아제(kinase)일 수 있으며, 상기 키나아제는 CDK4, STK10, CDK5, MAP2K1, ALPK3, PNKP, PDK3, PHKG1, CFL1, 및 PACSIN3로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 코딩되는 키나아제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0142] 본 발명에 있어서, 상기 분리된 세포 또는 조직은 신경세포 또는 신경조직일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0143] 본 발명에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 관례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.
- [0144] 본 발명의 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본 발명의 명세서 전체에서 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 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다.
- [0145] 본 발명의 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 "이들의 조합"의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [0147] 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.
- [0149] **[실시예]**
- [0150] **실시예 1. 시료 준비 및 단백질 분석**
- [0151] **1.1. 시료 준비**
- [0152] 제1형 신경섬유종증으로 진단된 5명의 환자로부터 악성말초신경초종(MPNST) 조직을 수득하였으며, 대조군으로는 5명의 환자로부터 수득한 양성 신경섬유종 조직을 사용하였다. MPNST 환자에 대한 정보는 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

환자	NF-1 생식세포 돌연변이	MPNST 유래	병리학적 특징
1	c.7285C>T (p.R2429*)	우측 대퇴골	방추세포육종(spindle cell sarcoma), 낮은 등급, 낮은 등급의 악성말초신경초종과 일치, 신경섬유종에서 발생, 9.2 × 9.1 × 5.2 cm, 근육 내
2	c.1316T>C (p.L439P)	우측 허벅지	신경섬유종에서 발생한 악성말초신경초종, 높은 등급, 9.7 × 7 × 6.5 cm
3	c.6791dup (p.Y2264fs)	전완	악성말초신경초종, FNCLCC 등급, 신경섬유종종의 백그라운드 내, 2 × 1.5 × 1.1 cm, 전완, 진피 및 피하
4	발견되지 않음	골반	방추세포 신생물(spindle cell neoplasm), 악성말초신경초종과 일치, 낮은 등급, 신경섬유종종의 백그라운드 내, 12 × 7 × 5 cm, 좌측 치골 영역
5	c.2990G>C (p.R997T)	골반	신경섬유종에서 발생한 악성말초신경초종, FNCLCC 등급, 파편화 됨, 24 × 17 × 5.5 cm 응집체, 골반강

[0153]

[0154]

수득한 조직 시료는 포르말린으로 고정된 후 파라핀으로 포매하였다. 단백질 분리를 위해, 도 1a 및 도 1b의 흐름도에 나타난 바와 같이, 상기 FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) 조직 슬라이드를 면도칼로 분리하여 튜브에 넣고 200 μ l의 헵테인(heptane)으로 1시간 동안 25°C에서 탈파라핀화하였다. 이어서, 시료의 파쇄, 추출 및 균질화를 위해 AFA[®] (adaptive focused acoustics[®]) 초음파 분쇄기를 사용하여 5% SDS, 50mM Triethylammonium biocarbonate buffer 100 μ l를 추가한 후 시료를 용해(lysis)하였다. 이후, Trypsin/LysC protease를 이용하여 시료를 소화(digestion)시켜 peptide를 제조 후 LC-MS를 이용하여 단백체를 분석하였다.

[0156]

1.2. 단백질 분석

[0157]

단백체 분석은 LC-MS를 이용하여 수행되었다. 질량 분석(Mass spectrometry, 이하 'MS'라 함) 장비는 Q-Exactive Plus BioPharm version (ThermoFisher, 미국)을, 액체 크로마토그래피(liquid chromatography, 이하 'LC'라 함)는 UltiMate[™] RSLCnano System (ThermoFisher, 미국)을 사용하였다. 시료는 5.0 μ l씩 자동시료 주입장치를 이용하여 주입하여 250 nl/min의 유속으로 NanoLC와 연동된 이온 트랩 질량분석기(ion trap mass spectrometer)로 분석을 수행하였다.

[0158]

LC에 사용한 컬럼은 내직경 75 μ m, 외직경 360 μ m의 용융 실리카 모세관 컬럼(fused silica capillary column) C18을 사용하였다. 시료는 200분 동안 250 nl/min의 유속으로 분석하였으며, 농도 구배는 5% 솔루션 B에서 50% 솔루션 B (80% acetonitrile, 0.1% formic acid, 5% DMSO)로 90분 동안 분리하였다.

[0159]

MS를 위한 파라미터는 MS1 해상도(resolution) 70000, MS1 최대 충전 시간(maximum fill time) 20 msec, DDA(data dependent acquisition) 방법(상위 10)을 사용하였고, MS2 해상도 17500, MS2 최대 충전 시간 100 msec, AGC(auto gain control) 1e6으로 수행하였다.

[0161]

실시예 2. 단백질 데이터 분석 및 이를 통한 악성말초신경초종(MPNST) 특이적 단백질 동정

[0162]

상기 실시예 1에서 수득한 악성말초신경초종(MPNST) 및 양성 신경섬유종(NF) 조직 시료에 대한 단백질 데이터 분석을 수행하였다.

[0164]

먼저, 도 2에 나타난 바와 같이, 각각 raw 데이터를 프로테오믹스 디스커버 2.2 소프트웨어(Thermo, 미국)를 사용하

였다. Uniprot에서 제공하는 인간 단백질 reference database를 이용하여 비표지 정량 (Label free quantitation) 알고리즘으로 단백질의 정성정보와 정량정보를 추출하였다. 정성 분석을 위해 peptide search 조건 중 fixed modification 조건은 cysteine에 carbamidomethylation을 사용하였으며 variable modification 조건으로 n-terminal acetylation과 methionine oxidation을 적용하였다. precursor 이온의 초기 질량 오차는 10 ppm으로 그리고 fragment 이온에 대한 질량 오차는 20 ppm으로 조정하였으며 peptide를 단백질로 mapping할 때 unique peptide와 razor peptide를 둘다 사용하였다. 비표지 정량을 위해서 unique peptide의 peak intensity를 이용하였다.

[0165] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 각 시료로부터 획득한 단백질 정량값 분포가 균일함을 확인하였다.

[0166] 또한, 상기 시료의 단백질 정량 정보를 이용하여 주성분 분석 (Principal component analysis, PCA)를 수행하였다. 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 MPNST와 NF 두 그룹 사이의 단백질체의 정량, 정성적인 차이를 통해 두 그룹을 구별할 수 있음을 확인하였다. 보다 구체적으로, 도 4의 우측 그래프를 참조하면, 양성 NF 조직에서는 3,483개의 단백질들이, MPNST 조직에서는 3,601개의 단백질들이 동정되었으며, 양성 NF 조직에서는 동정되지 않았으나 MPNST 조직에서만 동정된 단백질은 141개, 반대의 경우는 23개로 나타났다.

[0168] 실시예 3. 악성말초신경초종(MPNST)에서 발현이 증가한 단백질의 도출

[0169] 볼케이노 플롯(volcano plot) 분석을 이용한 단백질의 정량적 분석을 통해 도 5a에 나타난 바와 같이 양성 NF와 비교하여 MPNST에서 10배 이상 발현 증가가 나타나고, 세포외 엑소좀(extracellular exosome)에서 주로 발현되는 단백질을 조사하였다(붉은색 박스로 표시). 엑소좀으로 배출되는 단백질은 혈액이나 소변에서 검출될 수 있으므로 진단을 위한 검체 채취에 유리하기 때문이다.

[0170] 그 결과 도 5a의 우측에 나타난 바와 같이, CD248, DNAJB4, POTE, SPARCL1, TBC1D4 등 24종의 단백질이 선별되었다.

[0171] 또한, 도 5b에 나타난 바와 같이 세포외기질을 분해하는 단백질(단백성 세포외기질; proteinaceous extracellular matrix)을 조사하였다(붉은색 박스로 표시). 세포외기질에서 발현되는 단백질 또한 혈액이나 소변에서 검출될 수 있기 때문이다. 또한, 기질 분해는 암세포의 주변 조직 침투시 발생하는 현상이므로 세포의 악성화에 기반하는 단백질이다.

[0172] 그 결과, 도 5b의 우측에 나타난 바와 같이 CD248, SPARCL1, CILP2, MMP8, SPON1 단백질이 선별되었다.

[0174] 비교예 1. 악성말초신경초종(MPNST)과 양성 신경섬유종(NF)에서 S-100 단백질의 발현 양상 조사

[0175] 기존에 양성 NF와 MPNST의 구분에 중요한 병리학적 지표로 사용되어 오고 있는 S-100 단백질의 발현 양상을 조사하였다.

[0176] 총 9가지의 S-100 동형 단백질(isoform)을 조사한 결과, 도 6a 내지 6i에 나타난 바와 같이 개별 환자에 따라 양성 NF와 MPNST 사이의 발현 양상에 차이를 나타났다. 이러한 결과는 S-100 단백질의 양성 NF와 MPNST 구분을 위한 특이적 마커로서의 한계점이 뚜렷하게 드러난 것이다.

[0177] 또한, 양성 NF와 MPNST를 구분하는 또 다른 지표로서 비멘틴(vimentin)을 조사한 결과 양성 NF와 MPNST 사이의 발현 양상 차이는 나타나지 않았다.

[0178] 상기와 같은 결과를 종합하면, 기존에 사용되고 있는 마커인 S-100 및 비멘틴은 MPNST 특이적 바이오 마커로서 임상 적용하기에는 명확한 한계를 가지고 있음을 시사한다.

[0180] 실시예 4. 악성말초신경초종(MPNST)의 진단적 마커 선정

[0181] 4.1. 엔도시알린 (CD248)

[0182] CD248 유전자가 코딩하는 단백질인 엔도시알린(endosialin)은 종양의 혈관 재생에 관여하는 분자로서, 세포외기질로 분비되며 엑소좀에서도 발견된다.

[0183] 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 엔도시알린은 5명의 환자로부터 수득한 모든 MPNST 조직에서 특이적으로

발견되었다. 특히 엔도시알린은 엑소솜에서 발견되므로 혈액 및 소변 시료에서 검출할 수 있을 것으로 예상된다는 점에서 MPNST 진단적 마커로서의 활용도가 높을 것으로 기대된다.

4.2. SPARC-유사 단백질 1 (SPARCL1)

SPARCL1 유전자에 의해 코딩되는 SPARC-유사 단백질 1은 주로 세포외로 분비되며, 칼슘, 세포외기질, 콜라겐 등에 결합하는 단백질이다.

도 8에 나타난 바와 같이, SPARC-유사 단백질 1은 양성 NF에서는 검출되지 않는 반면, MPNST에서 특이적으로 발현되는 것을 확인하였다. 이 단백질도 세포외에서 발견되며 엑소솜에도 존재하므로 혈액 및 소변 시료에서 검출할 수 있을 것으로 예상되며, 따라서 MPNST 진단적 마커로서의 활용도가 높을 것으로 예상된다.

4.3. 뉴트로필 콜라게나아제 (MMP8)

MMP8 유전자에 의해 코딩되는 뉴트로필 콜라게나아제(neutrophil collagenase)는 세포외기질을 분해하는 프로테아제(protease)로서, 암 전이 및 다양한 염증 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다.

도 9에 나타난 바와 같이, 뉴트로필 콜라게나아제는 5명의 환자로부터 수득한 모든 MPNST 조직에서 특이적으로 발현됨을 확인하였다. 특히 뉴트로필 콜라게나아제는 세포외기질로 분비되므로 혈액 및 소변 시료에서 검출할 수 있을 것으로 예상된다는 점에서 MPNST 진단적 마커로서의 활용도가 높을 것으로 기대된다.

실시예 5. 악성말초신경초종(MPNST)의 새로운 치료 표적 발굴

5.1. 계층적 군집화 분석(hierarchical cluster analysis)

MPNST에서 특이적으로 발현이 증가되는 단백질을 계층적 군집화 분석을 통해 두 개의 클러스터(cluster)로 구분하였다. 보다 구체적으로, 도 10a에 나타난 바와 같이 두 그룹에서 동정된 총 3,624개 단백질 중에서 각 그룹당 80% 이상의 시료에서 동정된 단백질들 3,455개를 추출하고 두 그룹에 대해서 Student's T test를 수행하여 Benjamini-Hochberg FDR < 0.01을 만족하는 292개의 단백질들을 선별하였다. 해당 단백질들의 정량정보에 대한 Z score를 산출하고 K-means clustering 분석을 수행한 결과 두개의 클러스터가 형성되는 것을 확인하였다. 각 클러스터에 해당되는 단백질들은 g:Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/>)을 수행하여 Biological process, Cellular compartment 및 Molecular function을 조사하였다.

도 10b를 참조하면, 클러스터 1은 MPNST에서 발현이 증가된 단백질로서, 기능상 액틴(actin), 근골격계 단백질과 같이 세포외기질에 결합하여 기능하는 단백질이 발견되었다.

도 10c를 참조하면, 클러스터 2는 MPNST에서 발현이 감소되어 있는 단백질로서, 주로 세포외기질에 분비되거나 엑소솜에 존재하는 단백질들이 발견되었다.

5.2. GO 분석 및 IPA(ingenuity pathway analysis)를 통한 표적 신호전달 체계 발굴

144종의 MPNST 특이적 단백질에 대해 Gene ontology 분석 및 QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis를 수행하여 MPNST에서 특이적으로 발현이 변화하는 단백질이 관여하는 pathway를 확인하였다. 144종의 MPNST 특이적 단백질 accession number를 ShinyGO 및 IPA server에 입력하여 144종의 MPNST 특이적 단백질들이 관련된 Biological process, Cellular compartment 및 Molecular function을 조사하였다.

그 결과, 도 11 및 도 12에 나타난 바와 같이 ILK 신호전달 체계, actin-cytoskeleton 신호전달 체계 및 RhoGDI 신호전달 체계가 MPNST에서 특이적으로 항진됨을 확인하였다. 또한, 상기 신호전달 체계의 상위 신호전달을 유추해 볼 때, TGF- β 의 항진이 기저할 것으로 예측되었다.

5.3. 새로운 치료 표적으로서의 키나아제(kinase) 발굴

상기 실시예 5.2에서 발굴한 신호전달 체계와 연관되어 MPNST에서 특이적으로 발현 또는 활성이 증가한 키나아

제는 치료 표적으로서 활용될 수 있다. 이에 본 발명자들은 MPNST에서 증가되어 있는 키나아제를 발굴하였다.

[0205] 그 결과 도 13 내지 도 21에 나타난 바와 같이, CDK4, MAP2K1, PDK3, STK10, ALPK3, PHKG1, CDK5, PNKP 및 PACSIN3 등의 키나아제가 MPNST에서 증가되어 있음을 확인하였다. 따라서 이들 키나아제에 대한 억제제, 예를 들면 상기 키나아제에 대한 길항제(antagonist)가 MPNST의 치료에 사용될 수 있다.

[0206] 특히, 포스타마티닙(fostamatinib)은 CDK4, MAP2k1, STK1 및 PHKG1에 다발적인 길항작용을 나타내므로 MPNST 치료제로서 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

[0208] 실시예 6. 악성말초신경초종(MPNST)의 진단적 마커에 대한 검증

[0209] 상기 실시예 4에서 발굴한 MPNST 진단적 마커 중 MMP8 단백질 발현 검증을 위해 MPNST 환자의 조직에 IHC 염색을 실시하였다.

[0210] 그 결과, 하기 표 4 및 도 22에 나타난 바와 같이, NF 조직과 비교하여 MPNST 조직에서 MMP8 단백질(뉴트로필 콜라게나아제)이 과발현된 것을 확인할 수 있었다.

표 4

	MPNST-003* PSY (19S-105596 F5) NF1/ MPNST	MPNST-010* LSJ (20S 121739 A1) NF1/ MPNST
MMP8	1+/3+	1+/3+
✓ Expression (1+) weak, (2+) moderate, (3+) strong		

[0211]

[0212] 또한, 환자의 시료를 얻는데 용이한 혈중에서의 MMP8 단백질 발현 차이를 ELISA 분석법으로 확인하였다. 구체적으로, 정상군 (WT00), NF1 환자 (SEL00), MPNST 환자 중 수술 후(post-OP) 종양 부위를 완전히 제거한 환자(clear), 종양 제거 양상에 따라 완전히 제거되지 않아 종양이 존재할 가능성 있는 환자 (intermediate), 전혀 제거되지 않았거나 전이가 있는 환자 (involvement)의 혈장을 대상으로 ELISA 분석법으로 분석하였다.

[0213] 그 결과, 하기 표 5 및 도 23에 나타난 바와 같이, 종양이 완전히 제거되지 않거나 (intermediate), 전이 혹은 전혀 제거되지 않은 (involvement) 환자의 혈장에서 MMP8 단백질의 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다. 종양 제거 유무에 따라 MMP8 단백질 발현 차이를 확인한 상기 결과로부터, MMP8 단백질이 MPNST 진단적 마커로서 활용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

표 5

Surgical Resection Margin		MMP8 (pg/ml)
WT	WT1	15.048
	WT2	30.861
	WT3	7.559
	WT4	55.949
	WT5	71.280
	WT6	20.267
	WT7	22.179
	WT8	51.115
	WT9	15.048
	WT10	51.115
NF1	SEL22	23.743
	SEL23	40.393
	SEL44	-0.465
	SEL45	37.622
	SEL66	48.004
	SEL69	51.806
	SEL70	30.514
	SEL74	23.569
MPNST (post-OP)	Negative (clear)	MPNST-002 -1.687
		MPNST-005 11.914
	Positive (intermediate)	MPNST-003 222.625
		MPNST-004 213.218
		MPNST-010 87.241
	Positive (involvement)	MPNST-001 284.413

[0214]

[0215] 실시예 7. 악성말초신경초종(MPNST)의 치료 표적에 대한 검증

[0216] 상기 실시예 5에서 발굴한 MPNST 치료 표적인 ILK 신호전달 체계, 액틴-사이토스켈레톤(actin-cytoskeleton) 신호전달 체계, 및 다양한 키나아제의 비정상적 활성도를 제시하기 위하여 MPNST 환자 조직에서 ILK, Cofilin, MEK, p-MEK, 및 PACSIN3 단백질의 IHC 염색을 실시하였다.

[0217] 그 결과, 하기 표 6 및 도 24에 나타낸 바와 같이, MPNST 조직에서 NF 조직에 비해 ILK, Cofilin, MEK, p-MEK, 및 PACSIN3 단백질의 발현이 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

표 6

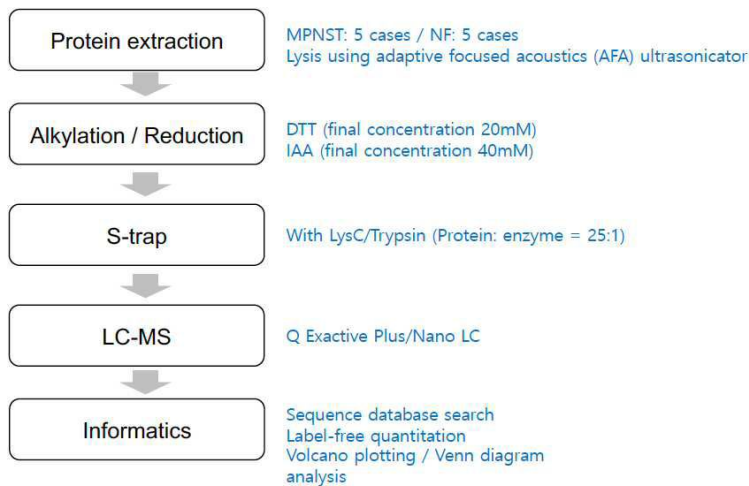
	MPNST-003* PSY (19S-105596 F5) NF1/ MPNST	MPNST-010* LSJ (20S 121739 A1) NF1/ MPNST
Cofilin	1+/3+	1+/3+
ILK	1+/2+	1+/3+
MEK1	1+/3+	1+/3+
p-MEK1	1+/1+	1+/3+
PACSIN3	1+/2+	1+/3+
✓ Expression (1+) weak, (2+) moderate, (3+) strong		

[0218]

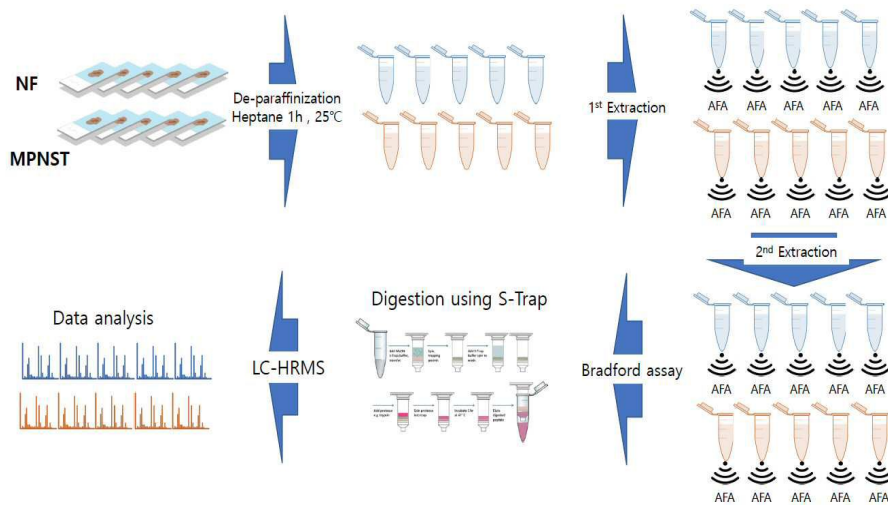
[0219] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

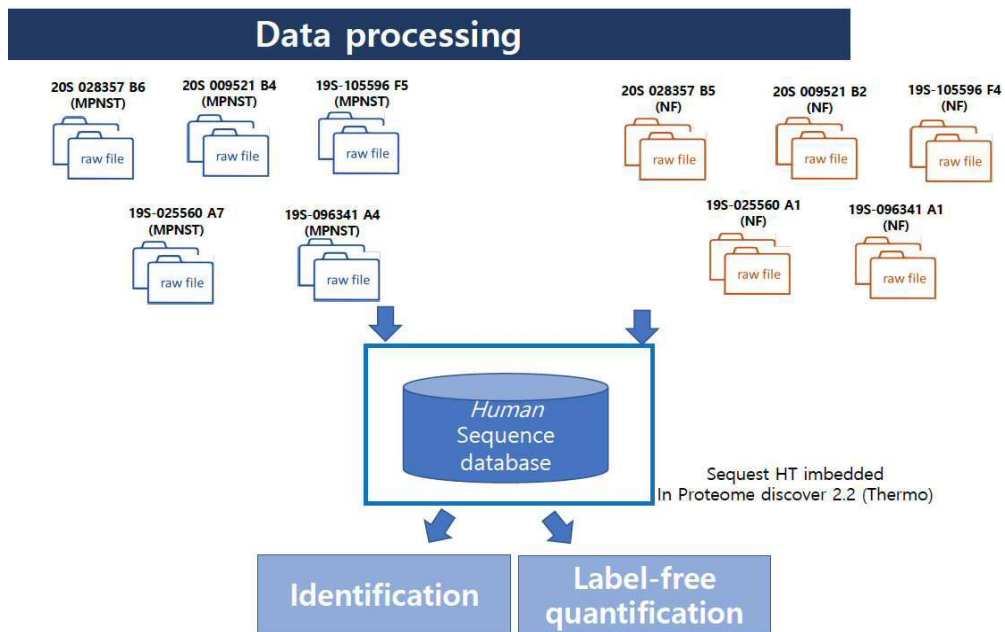
도면1a



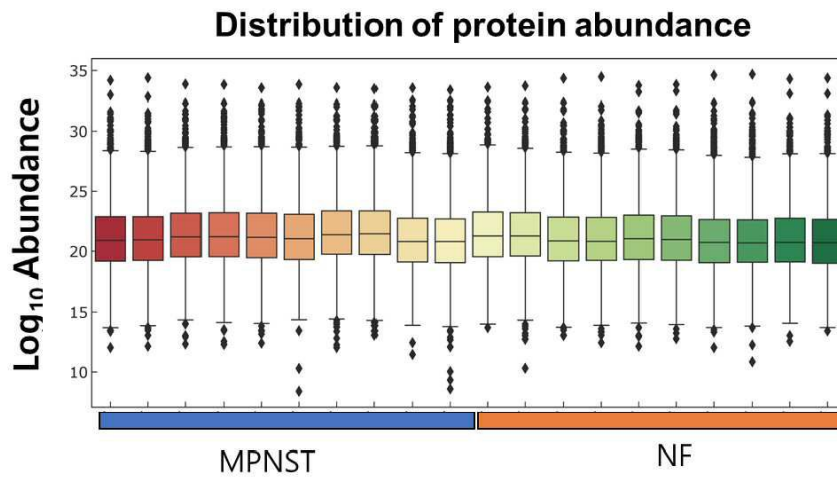
도면1b



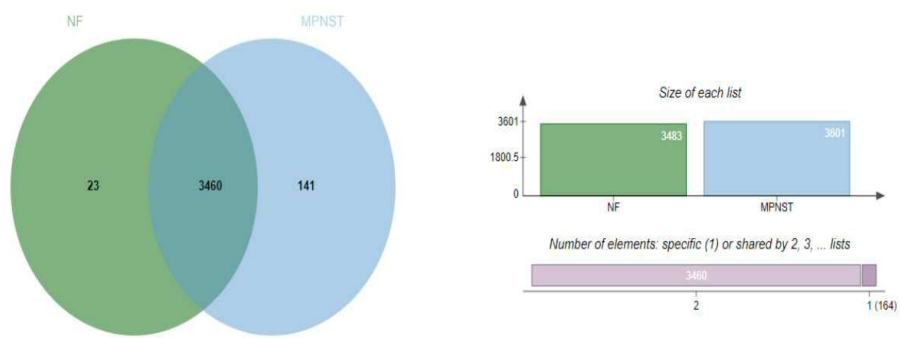
도면2



도면3



도면4



도면5a

Proteins of Ratio (MPNST/NF) > 10

Item	Ref	Gene	Count	%	P-value	Benjamini
sarcolemmal reticulum membrane	RT		5	5.9	1.7E-5	2.7E-3
myosin filament	RT		4	4.7	4.9E-5	3.9E-3
Z disc	RT		5	5.9	2.1E-3	1.9E-1
extracellular exosome	RT		24	23.2	2.9E-3	1.1E-1
I band	RT		3	3.5	4.9E-3	1.4E-1
cytosol	RT		24	23.2	2.1E-2	4.4E-1
proteinaceous extracellular matrix	RT		5	5.9	3.4E-2	5.9E-1
sarcolemmal reticulum lumen	RT		2	2.4	3.6E-2	5.2E-1
cytoskeletal density	RT		4	4.7	5.2E-2	5.1E-1
perinuclear region of cytoplasm	RT		7	8.2	6.4E-2	5.9E-1
actin cytoskeleton	RT		4	4.7	7.7E-2	6.9E-1
mitochondrion	RT		11	12.9	8.0E-2	5.7E-1

UNIPROT ACCESSION	GENE NAME
Q9HCU0	CD248 molecule (CD248)
Q9UDY4	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B4 (DNAJB4)
Q6S833	PDZ ankyrin domain family member E (PDZEE)
Q14615	SPARC like 1 (SPARCL1)
Q60343	TSG1 domain family member 4 (TSG1D4)
P51690	ar/sulfatase E (chondrocyte) (ARSE)
P20160	azurocidin 1 (AZU1)
Q8UUL8	collagen intermediate layer protein 2 (CLIP2)
Q9V696	chloride intracellular channel 4 (CLIC4)
P13829	enolase 3 (ENO3)
P21695	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (GPD1)
P49773	histidine triad nucleotide binding protein 1 (HNT1)
Q86723	homerin (HRN8)
P01880	immunoglobulin heavy constant delta (IGHD)
P12835	keratin 3 (KRT3)
P30481	major histocompatibility complex, class I, B (HLA-B)
Q02750	mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAP2K4)
Q9UK03	myosin heavy chain 13 (MYH13)
Q8U011	ras homolog family member 12 (RHOT2)
Q94804	serine/threonine kinase 10 (STRK10)
Q96HL6	sodium channel and calcium linker 1 (SCLT1)
Q15758	solute carrier family 1 member 5 (SLC1A5)
P22735	transglutaminase 1 (TGM1)
Q9H6F2	transmembrane protein 38A (TMEM38A)

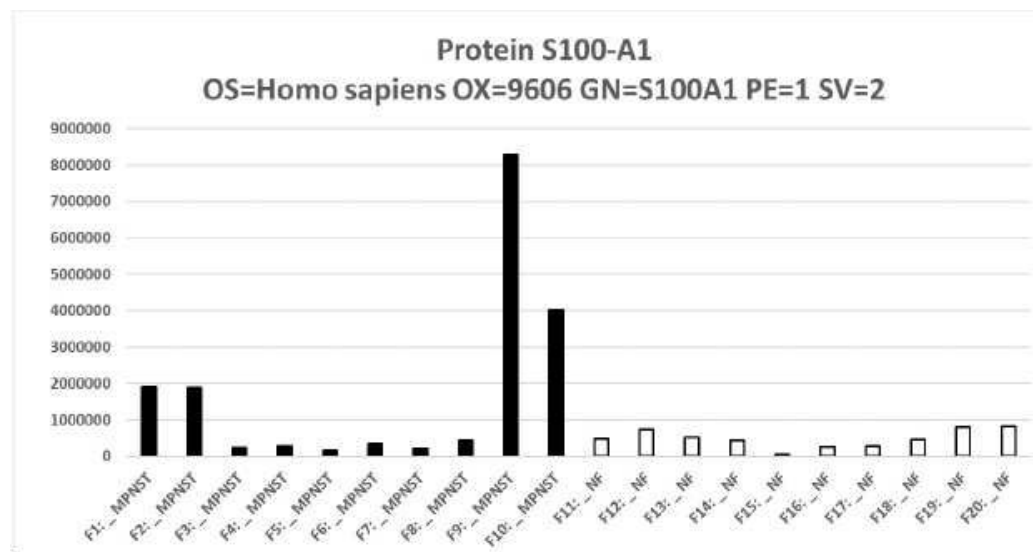
도면5b

Proteins of Ratio (MPNST/NF) > 10

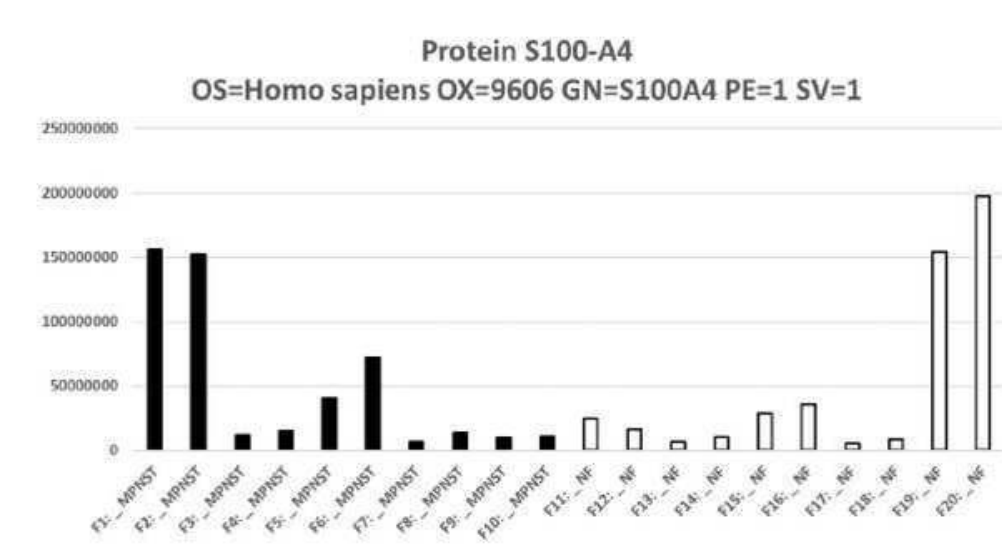
Term	RT	Genes	Count	%	P-value	Benjamini
sarcolemmal reticulum membrane	RT		5	5.9	1.7E-5	2.7E-3
myosin filament	RT		4	4.7	4.9E-5	3.9E-3
Z disc	RT		5	5.9	2.1E-3	1.0E-1
extracellular exosome	RT		24	23.2	2.9E-3	1.1E-1
I band	RT		3	3.5	4.9E-3	1.4E-1
cytosol	RT		24	23.2	2.1E-2	4.4E-1
perinuclear extracellular matrix	RT		5	5.9	2.4E-2	5.9E-1
sarcolemmal reticulum lumen	RT		2	2.4	3.6E-2	5.2E-1
vesicular density	RT		4	4.7	5.2E-2	6.1E-1
perinuclear region of cytoplasm	RT		7	8.2	6.4E-2	6.9E-1
actin cytoskeleton	RT		4	4.7	7.7E-2	6.9E-1
mitochondrion	RT		11	12.9	8.0E-2	6.7E-1

UNIPROT ACCESSION	GENE NAME
Q9HCU0	CD248 molecule (CD248)
Q14515	SPARC like 1 (SPARCL1)
Q9TUL8	cartilage intermediate layer protein 2 (CILP2)
P22094	matrix metalloproteinase 9 (MMP9)
Q9HCB6	spondin 1 (SPON1)

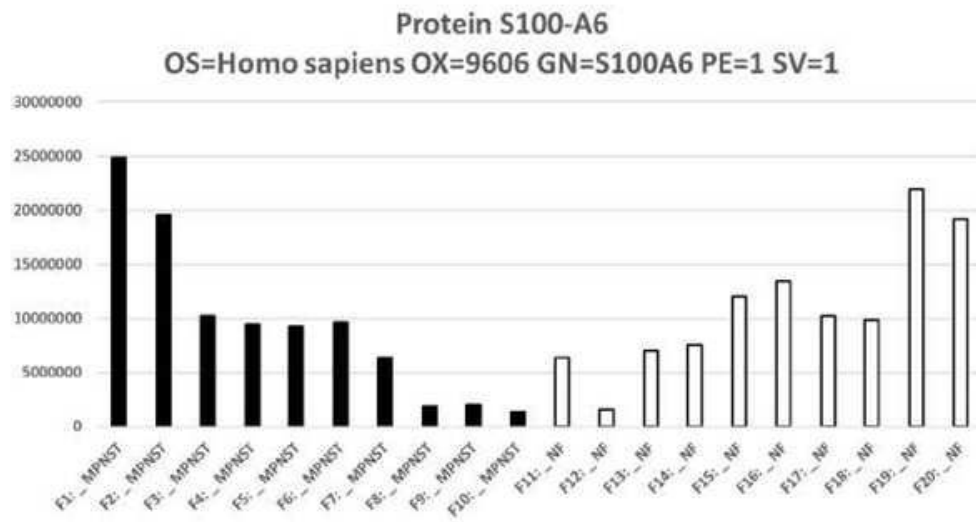
도면6a



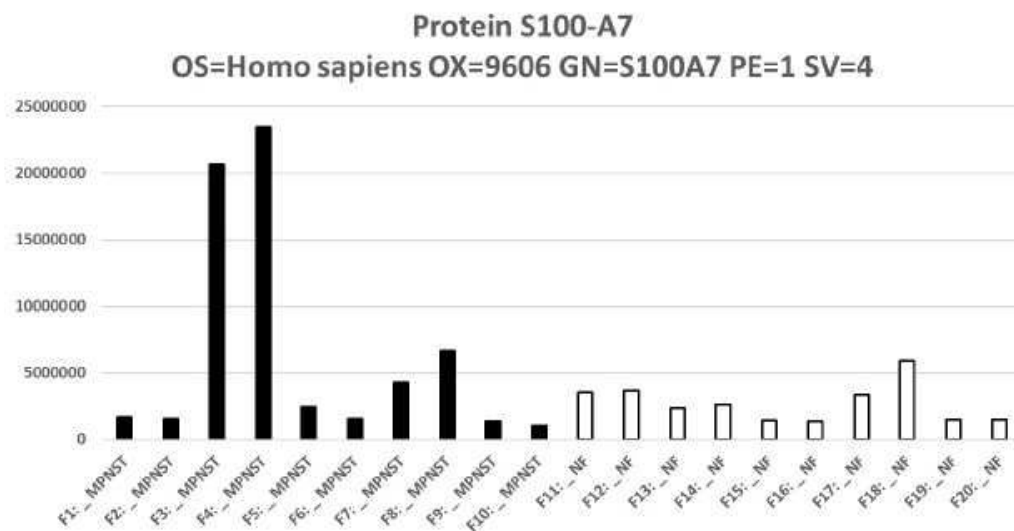
도면6b



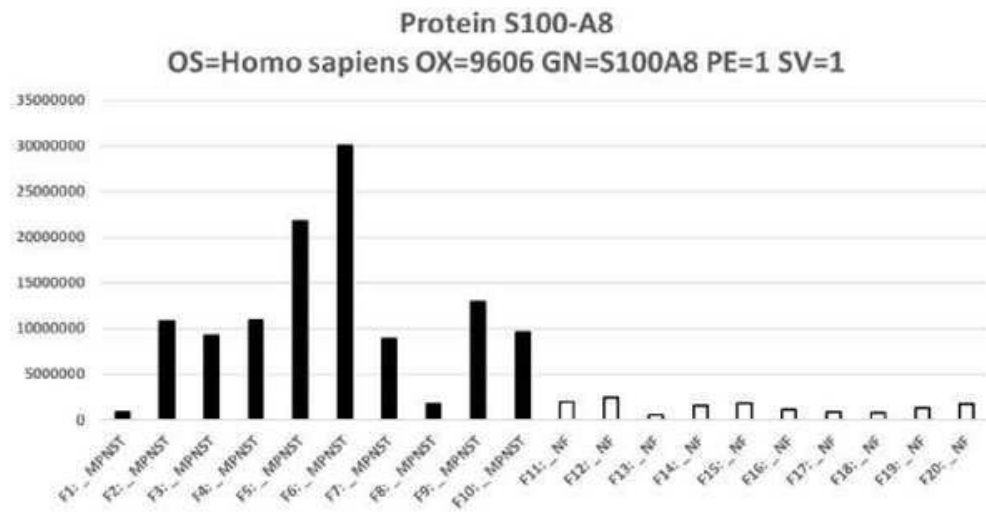
도면6c



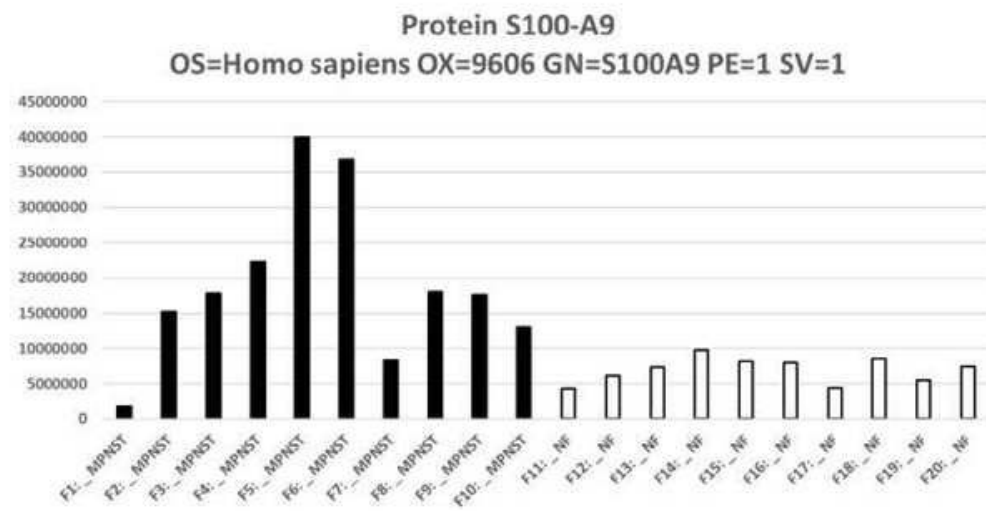
도면6d



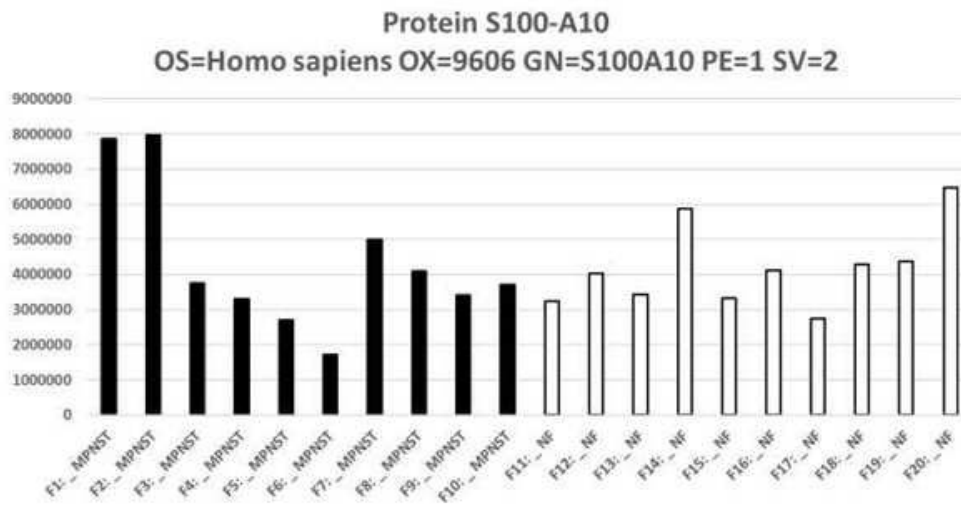
도면6e



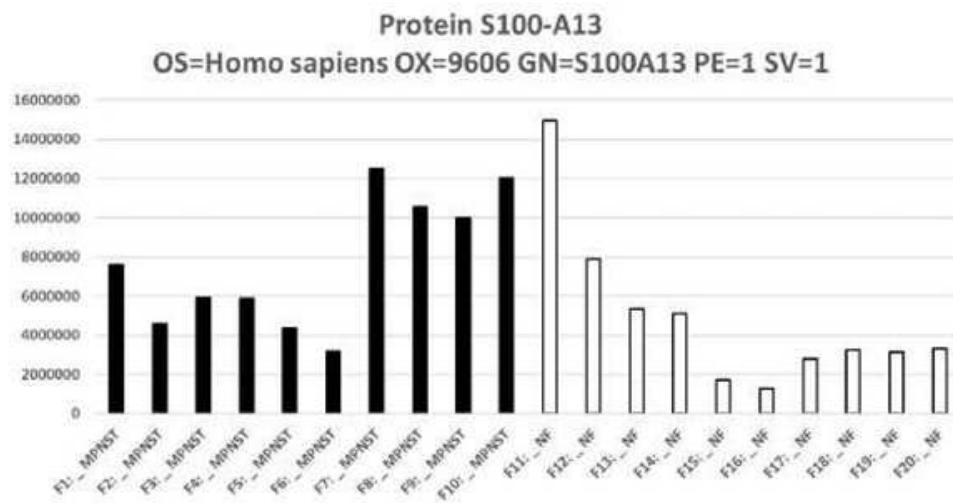
도면6f



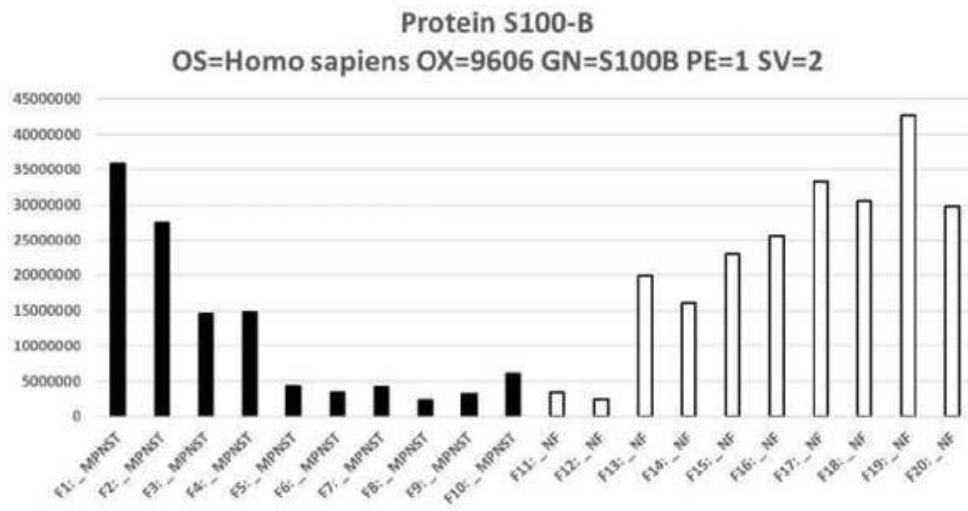
도면6g



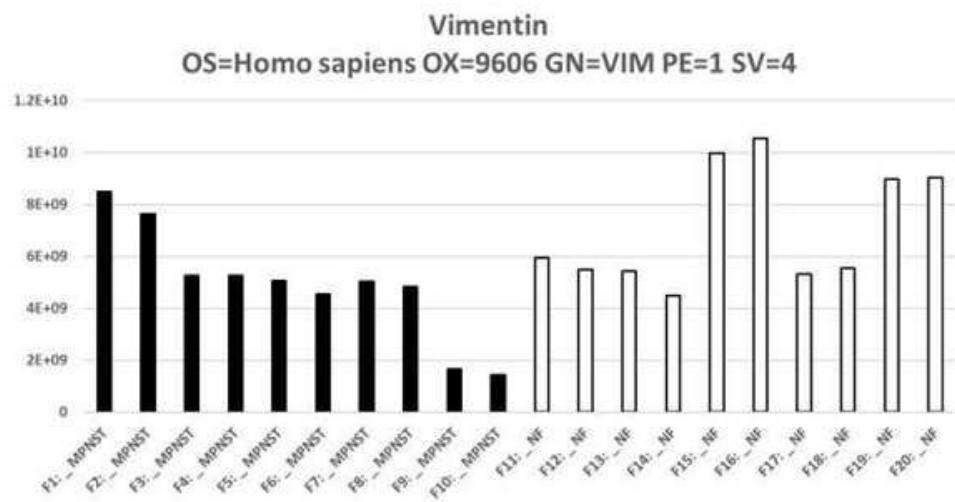
도면6h



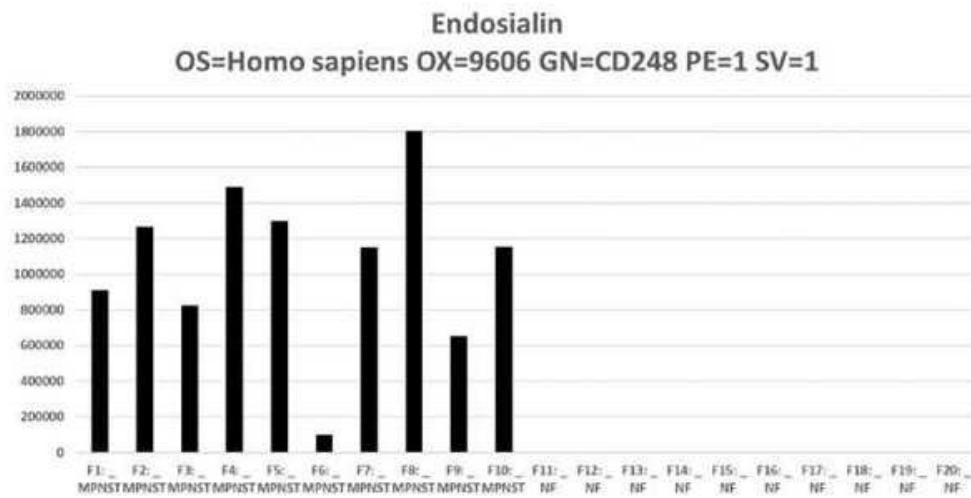
도면6i



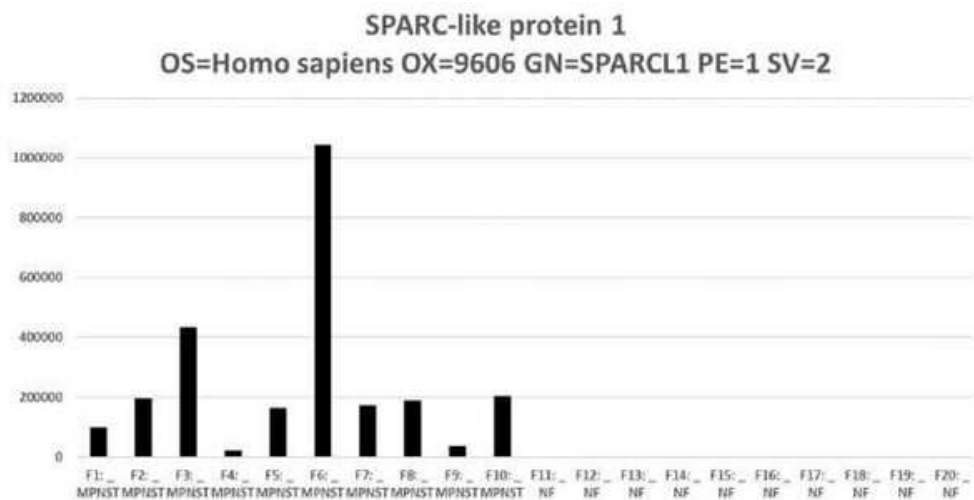
도면6j



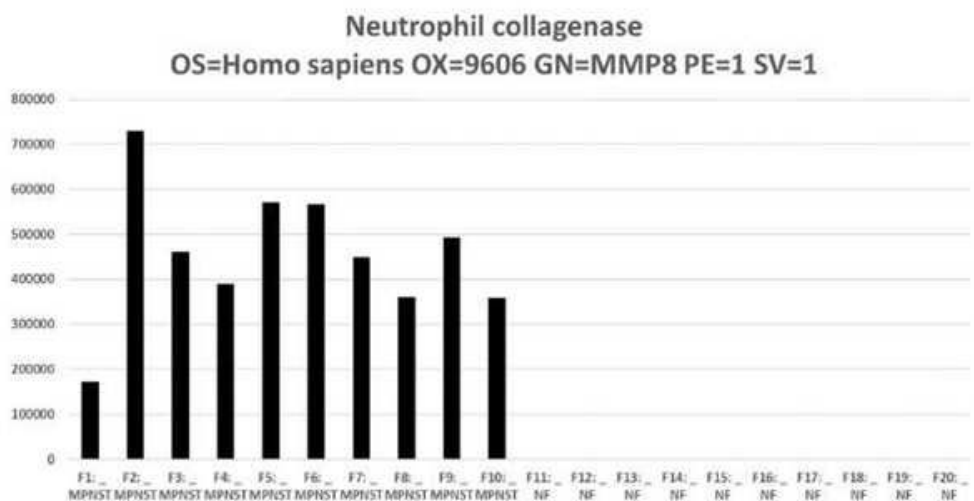
도면7



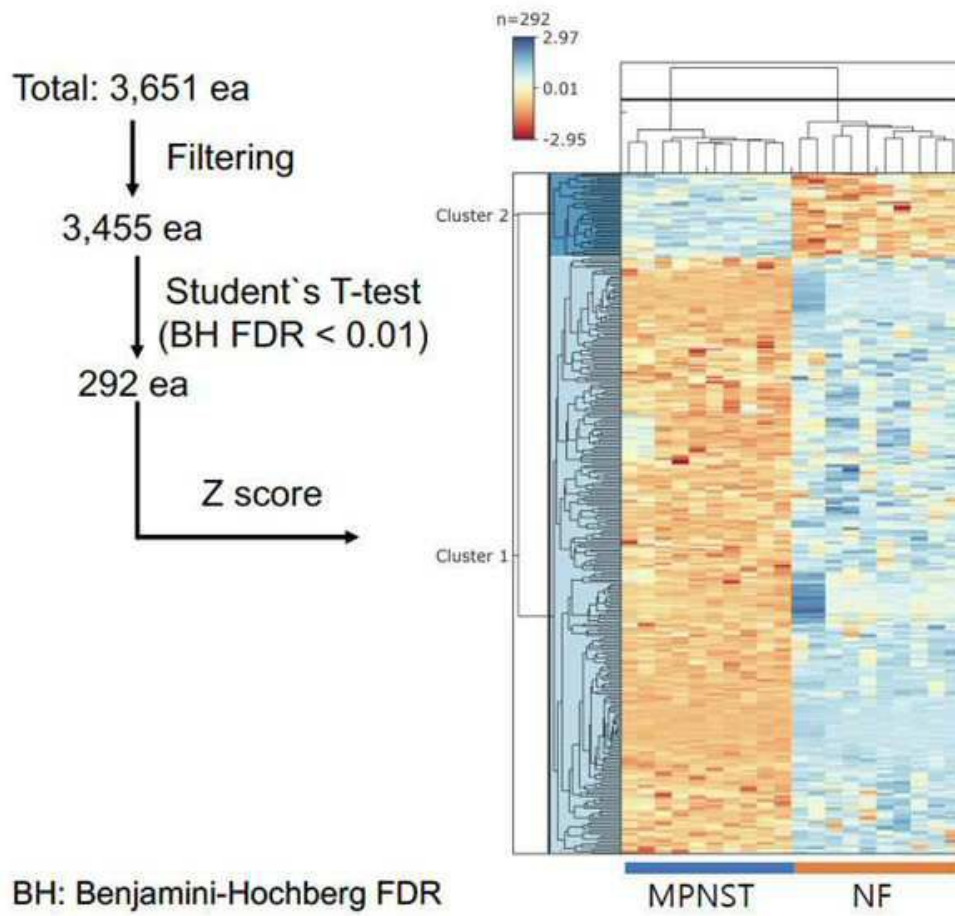
도면8



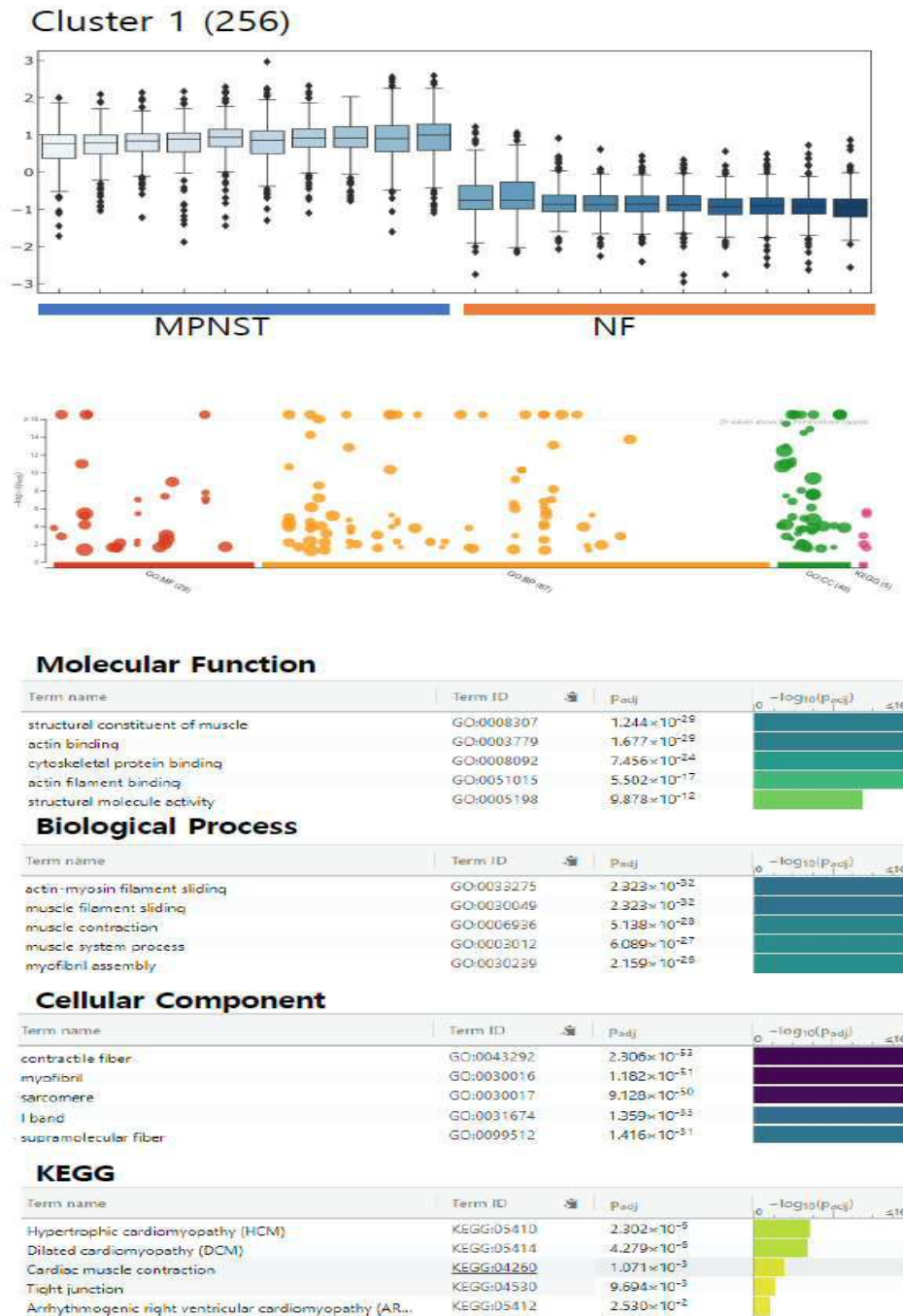
도면9



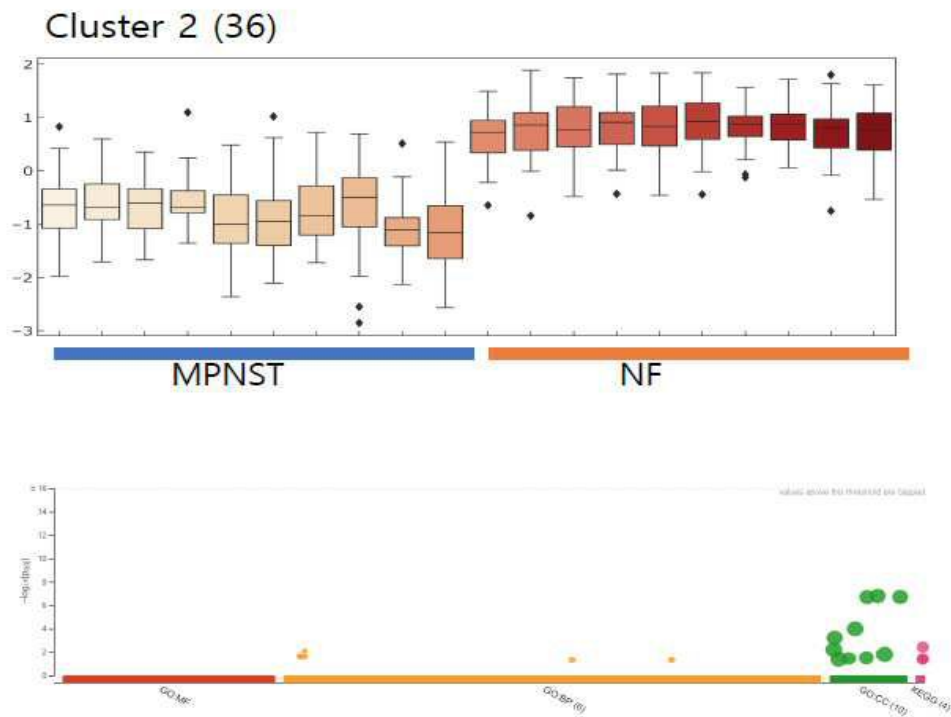
도면10a



도면10b



도면10c



Biological Process

Term name	Term ID	Padj	$-\log_{10}(p_{adj})$	q10
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	KEGG:05410	2.302×10^{-6}	5.62	0.05
Dilated cardiomyopathy (DCM)	KEGG:05414	4.279×10^{-6}	5.57	0.05
Cardiac muscle contraction	KEGG:04260	1.071×10^{-3}	3.07	0.05
Tight junction	KEGG:04530	9.694×10^{-3}	2.02	0.05
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	KEGG:05412	2.530×10^{-2}	1.60	0.05

Cellular Component

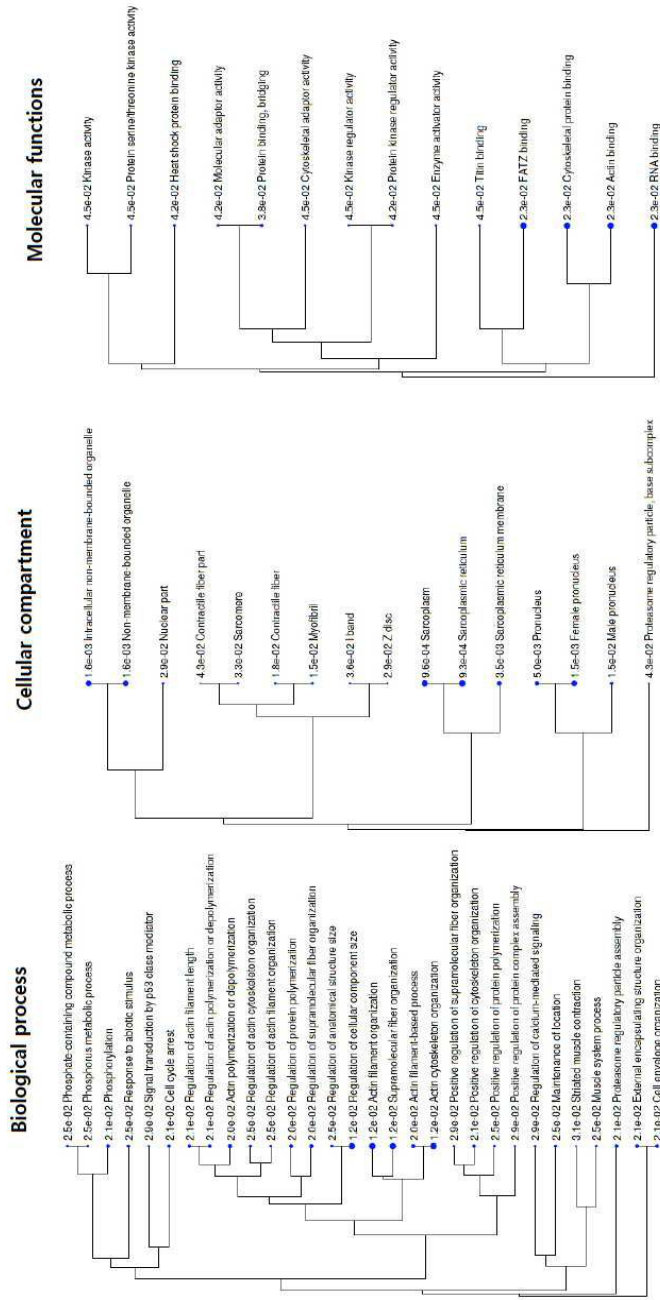
Term name	Term ID	Padj	$-\log_{10}(p_{adj})$	q10
extracellular exosome	GO:0070062	1.622×10^{-7}	6.79	0.05
extracellular vesicle	GO:0190358	1.947×10^{-7}	6.71	0.05
extracellular organelle	GO:0043230	2.025×10^{-7}	6.69	0.05
vesicle	GO:0031982	1.083×10^{-4}	3.96	0.05
extracellular space	GO:0005615	6.322×10^{-4}	3.20	0.05

KEGG

Term name	Term ID	Padj	$-\log_{10}(p_{adj})$	q10
Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	KEGG:05167	3.905×10^{-3}	2.40	0.05
Influenza A	KEGG:05164	3.680×10^{-2}	1.43	0.05
Leishmaniasis	KEGG:05140	3.953×10^{-2}	1.40	0.05
Tuberculosis	KEGG:05152	4.390×10^{-2}	1.36	0.05

도면11

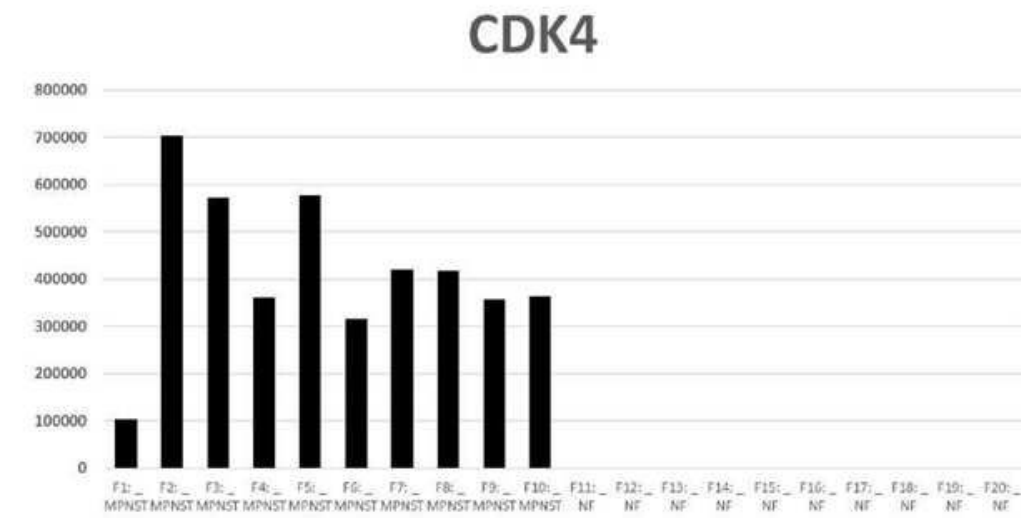
GO analysis for 144 MPNST specific proteins



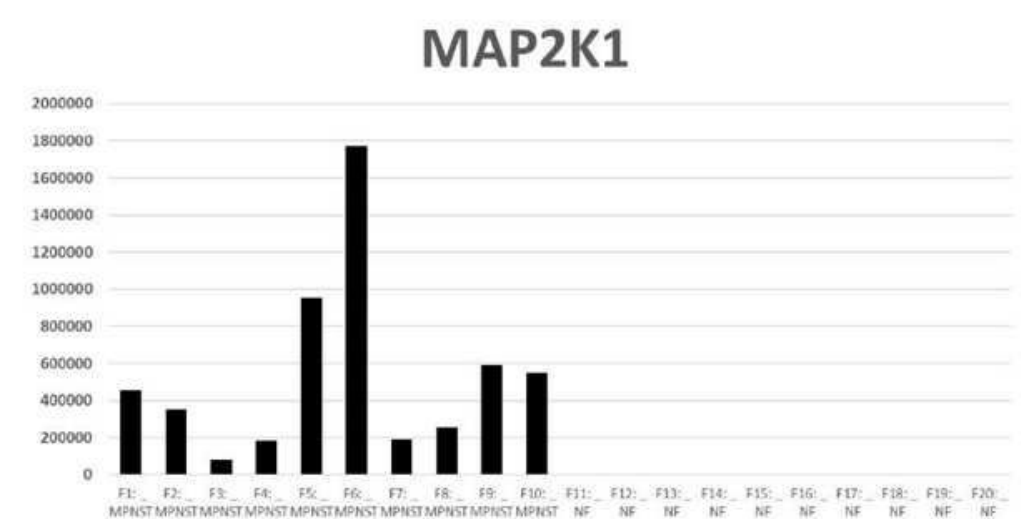
도면12

Top Canonical Pathways			
Name	p-value	Overlap	
Calcium Signaling	5.82E-19	13.6 %	277/150
ILK Signaling	2.17E-14	11.9 %	227/185
Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)	2.55E-12	13.5 %	177/126
Actin Cytoskeleton Signaling	2.58E-11	9.4 %	20/212
Epithelial Adherens Junction Signaling	4.11E-11	11.4 %	177/149
Top Upstream Regulators			
Upstream Regulators			
Name	p-value	Predicted Activation	
TGFB1	8.02E-11	Activated	
MEEC	9.14E-11	Activated	
MYOCD	1.71E-09	Activated	
miR-16-3p (and other miRNAs w/seed AGCAGCA)	1.49E-07	Inhibited	
SLMO3	1.55E-07		
Causal Network			
Name	p-value	Predicted Activation	
tributyrin	1.07E-14		
pyroxamide	1.44E-14		
nocetamol	1.44E-12		
dometamol	1.98E-12		
Htac	2.75E-12		

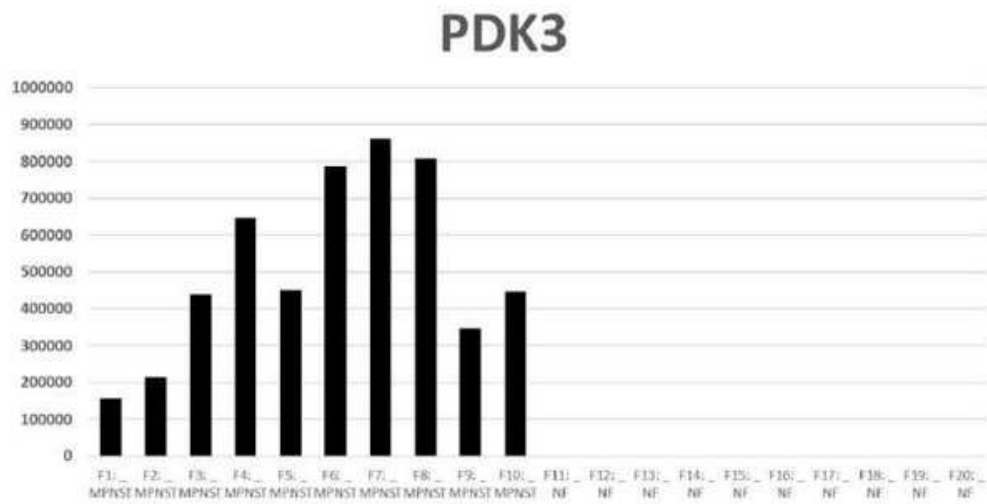
도면13



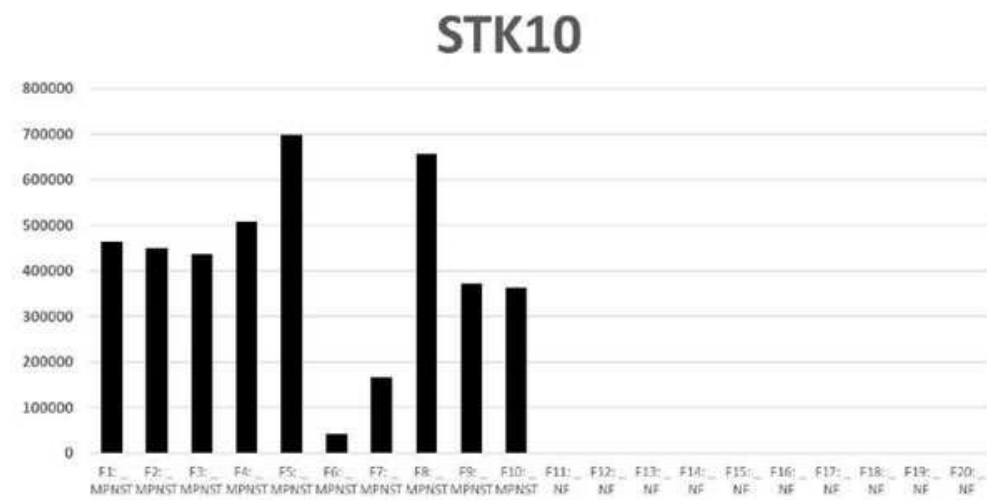
도면14



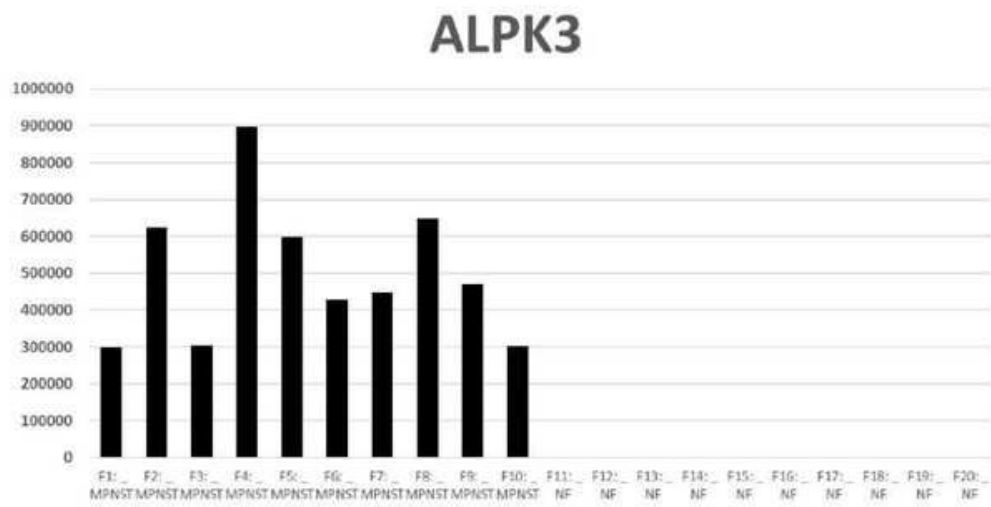
도면15



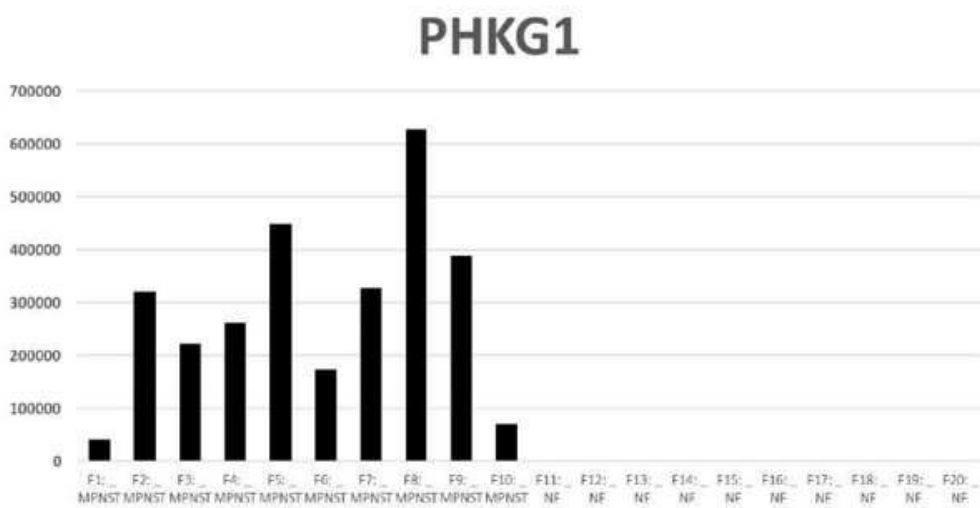
도면16



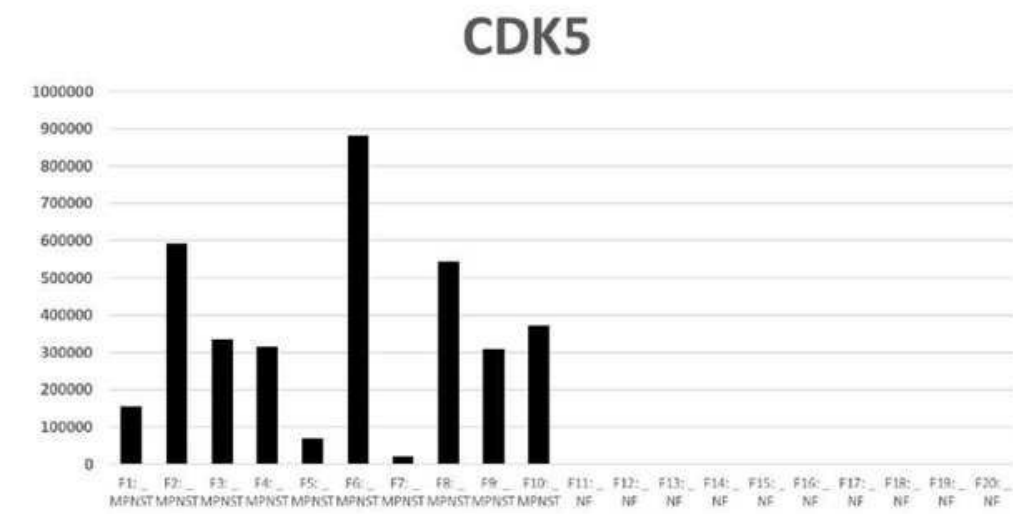
도면17



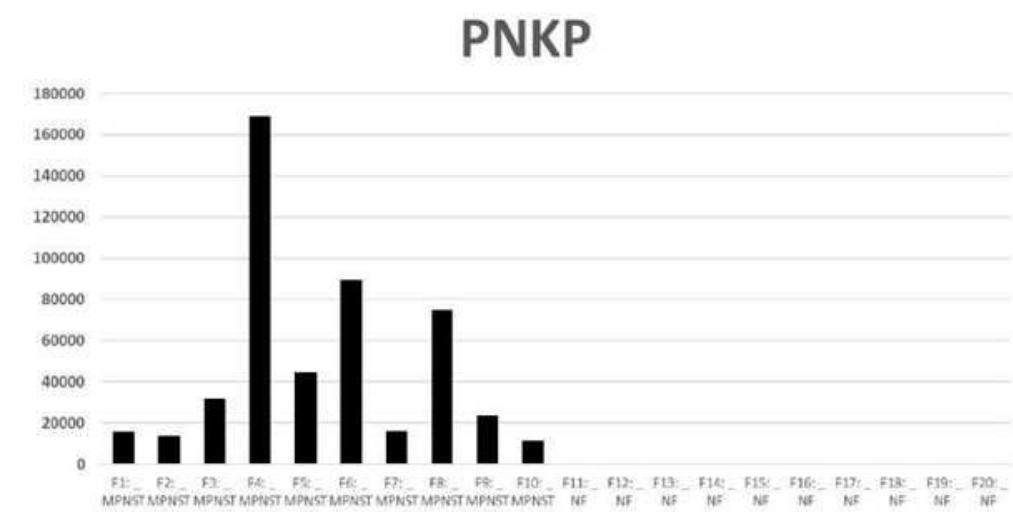
도면18



도면19



도면20



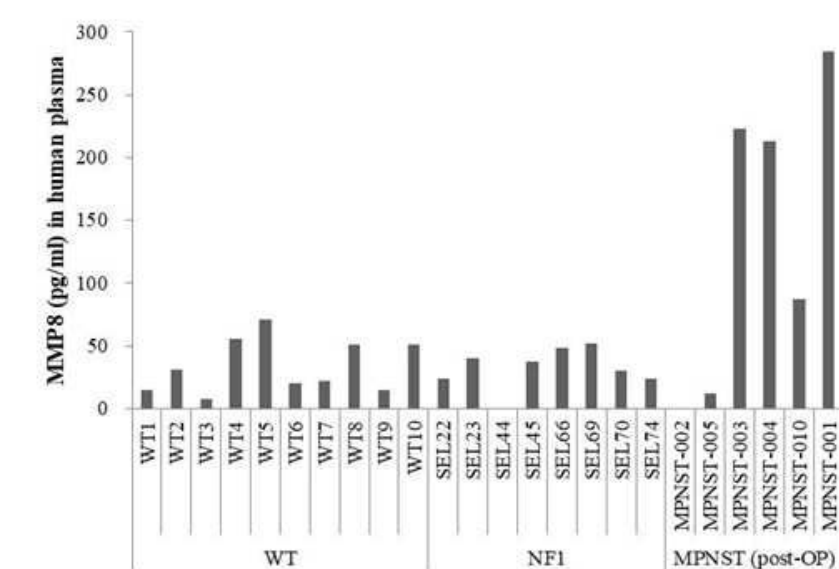
도면21



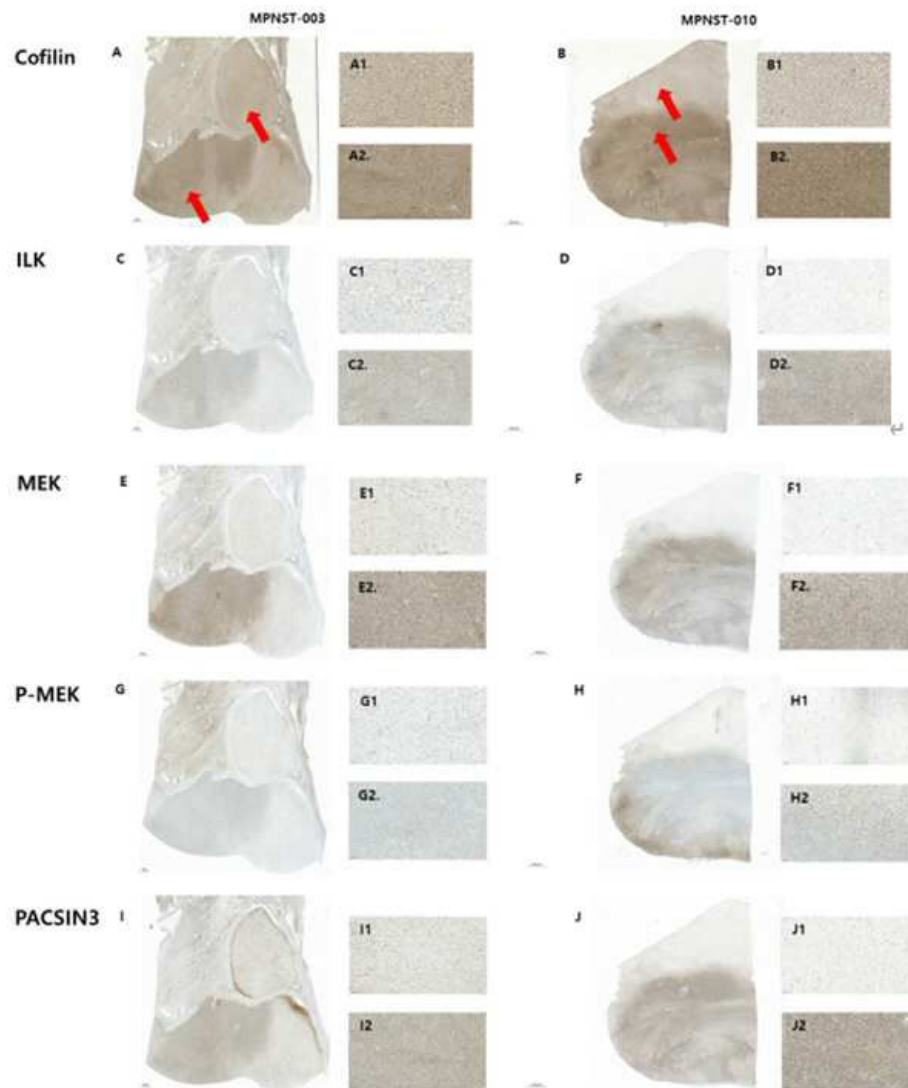
도면22



도면23



도면24



서열 목록

- <110> THE ASAN FOUNDATION
University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
Humanscape Inc.
- <120> Composition for Differential Diagnosis of Malignant Peripheral
Nerve Sheath Tumor
- <130> MP20-260P1
- <150> KR 10-2021-0037912
- <151> 2021-03-24
- <160> 13
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 757

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Leu Arg Leu Leu Leu Ala Trp Ala Ala Ala Gly Pro Thr Leu

1 5 10 15

Gly Gln Asp Pro Trp Ala Ala Glu Pro Arg Ala Ala Cys Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Cys Tyr Ala Leu Phe Pro Arg Arg Arg Thr Phe Leu Glu Ala Trp

35 40 45

Arg Ala Cys Arg Glu Leu Gly Gly Asp Leu Ala Thr Pro Arg Thr Pro

50 55 60

Glu Glu Ala Gln Arg Val Asp Ser Leu Val Gly Ala Gly Pro Ala Ser

65 70 75 80

Arg Leu Leu Trp Ile Gly Leu Gln Arg Gln Ala Arg Gln Cys Gln Leu

85 90 95

Gln Arg Pro Leu Arg Gly Phe Thr Trp Thr Thr Gly Asp Gln Asp Thr

100 105 110

Ala Phe Thr Asn Trp Ala Gln Pro Ala Ser Gly Gly Pro Cys Pro Ala

115 120 125

Gln Arg Cys Val Ala Leu Glu Ala Ser Gly Glu His Arg Trp Leu Glu

130 135 140

Gly Ser Cys Thr Leu Ala Val Asp Gly Tyr Leu Cys Gln Phe Gly Phe

145 150 155 160

Glu Gly Ala Cys Pro Ala Leu Gln Asp Glu Ala Gly Gln Ala Gly Pro

165 170 175

Ala Val Tyr Thr Thr Pro Phe His Leu Val Ser Thr Glu Phe Glu Trp

180 185 190

Leu Pro Phe Gly Ser Val Ala Ala Val Gln Cys Gln Ala Gly Arg Gly

195 200 205

Ala Ser Leu Leu Cys Val Lys Gln Pro Glu Gly Gly Val Gly Trp Ser

210 215 220

Arg Ala Gly Pro Leu Cys Leu Gly Thr Gly Cys Ser Pro Asp Asn Gly

225 230 235 240

Gly Cys Glu His Glu Cys Val Glu Glu Val Asp Gly His Val Ser Cys

245 250 255

Arg Cys Thr Glu Gly Phe Arg Leu Ala Ala Asp Gly Arg Ser Cys Glu

260 265 270

Asp Pro Cys Ala Gln Ala Pro Cys Glu Gln Gln Cys Glu Pro Gly Gly

275 280 285

Pro Gln Gly Tyr Ser Cys His Cys Arg Leu Gly Phe Arg Pro Ala Glu

290 295 300

Asp Asp Pro His Arg Cys Val Asp Thr Asp Glu Cys Gln Ile Ala Gly

305 310 315 320

Val Cys Gln Gln Met Cys Val Asn Tyr Val Gly Gly Phe Glu Cys Tyr

325 330 335

Cys Ser Glu Gly His Glu Leu Glu Ala Asp Gly Ile Ser Cys Ser Pro

340 345 350

Ala Gly Ala Met Gly Ala Gln Ala Ser Gln Asp Leu Gly Asp Glu Leu

355 360 365

Leu Asp Asp Gly Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu Ala Trp Lys Ala

370 375 380

Phe Asn Gly Gly Trp Thr Glu Met Pro Gly Ile Leu Trp Met Glu Pro

385 390 395 400

Thr Gln Pro Pro Asp Phe Ala Leu Ala Tyr Arg Pro Ser Phe Pro Glu

405 410 415

Asp Arg Glu Pro Gln Ile Pro Tyr Pro Glu Pro Thr Trp Pro Pro Pro

420 425 430

Leu Ser Ala Pro Arg Val Pro Tyr His Ser Ser Val Leu Ser Val Thr

435 440 445

Arg Pro Val Val Val Ser Ala Thr His Pro Thr Leu Pro Ser Ala His

450 455 460

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

465 470 475 480
 Gln Ile Pro Val Ile Ala Ala Asn Tyr Pro Asp Leu Pro Ser Ala Tyr
 485 490 495
 Gln Pro Gly Ile Leu Ser Val Ser His Ser Ala Gln Pro Pro Ala His
 500 505 510
 Gln Pro Pro Met Ile Ser Thr Lys Tyr Pro Glu Leu Phe Pro Ala His

 515 520 525
 Gln Ser Pro Met Phe Pro Asp Thr Arg Val Ala Gly Thr Gln Thr Thr
 530 535 540
 Thr His Leu Pro Gly Ile Pro Pro Asn His Ala Pro Leu Val Thr Thr
 545 550 555 560
 Leu Gly Ala Gln Leu Pro Pro Gln Ala Pro Asp Ala Leu Val Leu Arg
 565 570 575
 Thr Gln Ala Thr Gln Leu Pro Ile Ile Pro Thr Ala Gln Pro Ser Leu
 580 585 590

 Thr Thr Thr Ser Arg Ser Pro Val Ser Pro Ala His Gln Ile Ser Val
 595 600 605
 Pro Ala Ala Thr Gln Pro Ala Ala Leu Pro Thr Leu Leu Pro Ser Gln
 610 615 620
 Ser Pro Thr Asn Gln Thr Ser Pro Ile Ser Pro Thr His Pro His Ser
 625 630 635 640
 Lys Ala Pro Gln Ile Pro Arg Glu Asp Gly Pro Ser Pro Lys Leu Ala
 645 650 655
 Leu Trp Leu Pro Ser Pro Ala Pro Thr Ala Ala Pro Thr Ala Leu Gly

 660 665 670
 Glu Ala Gly Leu Ala Glu His Ser Gln Arg Asp Asp Arg Trp Leu Leu
 675 680 685
 Val Ala Leu Leu Val Pro Thr Cys Val Phe Leu Val Val Leu Leu Ala
 690 695 700
 Leu Gly Ile Val Tyr Cys Thr Arg Cys Gly Pro His Ala Pro Asn Lys
 705 710 715 720
 Arg Ile Thr Asp Cys Tyr Arg Trp Val Ile His Ala Gly Ser Lys Ser

725					730					735					
Pro	Thr	Glu	Pro	Met	Pro	Pro	Arg	Gly	Ser	Leu	Thr	Gly	Val	Gln	Thr
740					745					750					
Cys	Arg	Thr	Ser	Val											
755															
<210>	2														
<211>	664														
<212>	PRT														
<213>	Homo sapiens														
<400>	2														
Met	Lys	Thr	Gly	Leu	Phe	Phe	Leu	Cys	Leu	Leu	Gly	Thr	Ala	Ala	Ala
1				5					10					15	
Ile	Pro	Thr	Asn	Ala	Arg	Leu	Leu	Ser	Asp	His	Ser	Lys	Pro	Thr	Ala
			20					25					30		
Glu	Thr	Val	Ala	Pro	Asp	Asn	Thr	Ala	Ile	Pro	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu
			35					40					45		
Ala	Glu	Glu	Asn	Glu	Lys	Glu	Thr	Ala	Val	Ser	Thr	Glu	Asp	Asp	Ser
50						55					60				
His	His	Lys	Ala	Glu	Lys	Ser	Ser	Val	Leu	Lys	Ser	Lys	Glu	Glu	Ser
65					70					75					80
His	Glu	Gln	Ser	Ala	Glu	Gln	Gly	Lys	Ser	Ser	Ser	Gln	Glu	Leu	Gly
				85					90					95	
Leu	Lys	Asp	Gln	Glu	Asp	Ser	Asp	Gly	His	Leu	Ser	Val	Asn	Leu	Glu
			100					105					110		
Tyr	Ala	Pro	Thr	Glu	Gly	Thr	Leu	Asp	Ile	Lys	Glu	Asp	Met	Ser	Glu
		115					120					125			
Pro	Gln	Glu	Lys	Lys	Leu	Ser	Glu	Asn	Thr	Asp	Phe	Leu	Ala	Pro	Gly
	130					135					140				
Val	Ser	Ser	Phe	Thr	Asp	Ser	Asn	Gln	Gln	Glu	Ser	Ile	Thr	Lys	Arg
145					150					155					160
Glu	Glu	Asn	Gln	Glu	Gln	Pro	Arg	Asn	Tyr	Ser	His	His	Gln	Leu	Asn
				165					170					175	

Arg Ser Ser Lys His Ser Gln Gly Leu Arg Asp Gln Gly Asn Gln Glu

180 185 190
Gln Asp Pro Asn Ile Ser Asn Gly Glu Glu Glu Glu Glu Lys Glu Pro
195 200 205
Gly Glu Val Gly Thr His Asn Asp Asn Gln Glu Arg Lys Thr Glu Leu
210 215 220
Pro Arg Glu His Ala Asn Ser Lys Gln Glu Glu Asp Asn Thr Gln Ser
225 230 235 240
Asp Asp Ile Leu Glu Glu Ser Asp Gln Pro Thr Gln Val Ser Lys Met
245 250 255

Gln Glu Asp Glu Phe Asp Gln Gly Asn Gln Glu Gln Glu Asp Asn Ser
260 265 270
Asn Ala Glu Met Glu Glu Glu Asn Ala Ser Asn Val Asn Lys His Ile
275 280 285
Gln Glu Thr Glu Trp Gln Ser Gln Glu Gly Lys Thr Gly Leu Glu Ala
290 295 300
Ile Ser Asn His Lys Glu Thr Glu Glu Lys Thr Val Ser Glu Ala Leu
305 310 315 320
Leu Met Glu Pro Thr Asp Asp Gly Asn Thr Thr Pro Arg Asn His Gly

325 330 335
Val Asp Asp Asp Gly Asp Asp Asp Gly Asp Asp Gly Gly Thr Asp Gly
340 345 350
Pro Arg His Ser Ala Ser Asp Asp Tyr Phe Ile Pro Ser Gln Ala Phe
355 360 365
Leu Glu Ala Glu Arg Ala Gln Ser Ile Ala Tyr His Leu Lys Ile Glu
370 375 380
Glu Gln Arg Glu Lys Val His Glu Asn Glu Asn Ile Gly Thr Thr Glu
385 390 395 400

Pro Gly Glu His Gln Glu Ala Lys Lys Ala Glu Asn Ser Ser Asn Glu
405 410 415
Glu Glu Thr Ser Ser Glu Gly Asn Met Arg Val His Ala Val Asp Ser

420 425 430
 Cys Met Ser Phe Gln Cys Lys Arg Gly His Ile Cys Lys Ala Asp Gln
 435 440 445
 Gln Gly Lys Pro His Cys Val Cys Gln Asp Pro Val Thr Cys Pro Pro
 450 455 460
 Thr Lys Pro Leu Asp Gln Val Cys Gly Thr Asp Asn Gln Thr Tyr Ala

 465 470 475 480
 Ser Ser Cys His Leu Phe Ala Thr Lys Cys Arg Leu Glu Gly Thr Lys
 485 490 495
 Lys Gly His Gln Leu Gln Leu Asp Tyr Phe Gly Ala Cys Lys Ser Ile
 500 505 510
 Pro Thr Cys Thr Asp Phe Glu Val Ile Gln Phe Pro Leu Arg Met Arg
 515 520 525
 Asp Trp Leu Lys Asn Ile Leu Met Gln Leu Tyr Glu Ala Asn Ser Glu
 530 535 540

 His Ala Gly Tyr Leu Asn Glu Lys Gln Arg Asn Lys Val Lys Lys Ile
 545 550 555 560
 Tyr Leu Asp Glu Lys Arg Leu Leu Ala Gly Asp His Pro Ile Asp Leu
 565 570 575
 Leu Leu Arg Asp Phe Lys Lys Asn Tyr His Met Tyr Val Tyr Pro Val
 580 585 590
 His Trp Gln Phe Ser Glu Leu Asp Gln His Pro Met Asp Arg Val Leu
 595 600 605
 Thr His Ser Glu Leu Ala Pro Leu Arg Ala Ser Leu Val Pro Met Glu

 610 615 620
 His Cys Ile Thr Arg Phe Phe Glu Glu Cys Asp Pro Asn Lys Asp Lys
 625 630 635 640
 His Ile Thr Leu Lys Glu Trp Gly His Cys Phe Gly Ile Lys Glu Glu
 645 650 655
 Asp Ile Asp Glu Asn Leu Leu Phe
 660
 <210> 3

<211> 467

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Phe Ser Leu Lys Thr Leu Pro Phe Leu Leu Leu Leu His Val Gln

1 5 10 15
Ile Ser Lys Ala Phe Pro Val Ser Ser Lys Glu Lys Asn Thr Lys Thr
20 25 30
Val Gln Asp Tyr Leu Glu Lys Phe Tyr Gln Leu Pro Ser Asn Gln Tyr
35 40 45
Gln Ser Thr Arg Lys Asn Gly Thr Asn Val Ile Val Glu Lys Leu Lys
50 55 60
Glu Met Gln Arg Phe Phe Gly Leu Asn Val Thr Gly Lys Pro Asn Glu
65 70 75 80

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

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

210 215 220
 Leu Ala His Ser Ser Asp Pro Gly Ala Leu Met Tyr Pro Asn Tyr Ala
 225 230 235 240
 Phe Arg Glu Thr Ser Asn Tyr Ser Leu Pro Gln Asp Asp Ile Asp Gly
 245 250 255
 Ile Gln Ala Ile Tyr Gly Leu Ser Ser Asn Pro Ile Gln Pro Thr Gly
 260 265 270
 Pro Ser Thr Pro Lys Pro Cys Asp Pro Ser Leu Thr Phe Asp Ala Ile
 275 280 285
 Thr Thr Leu Arg Gly Glu Ile Leu Phe Phe Lys Asp Arg Tyr Phe Trp

 290 295 300
 Arg Arg His Pro Gln Leu Gln Arg Val Glu Met Asn Phe Ile Ser Leu
 305 310 315 320
 Phe Trp Pro Ser Leu Pro Thr Gly Ile Gln Ala Ala Tyr Glu Asp Phe
 325 330 335
 Asp Arg Asp Leu Ile Phe Leu Phe Lys Gly Asn Gln Tyr Trp Ala Leu
 340 345 350
 Ser Gly Tyr Asp Ile Leu Gln Gly Tyr Pro Lys Asp Ile Ser Asn Tyr
 355 360 365

 Gly Phe Pro Ser Ser Val Gln Ala Ile Asp Ala Ala Val Phe Tyr Arg
 370 375 380
 Ser Lys Thr Tyr Phe Phe Val Asn Asp Gln Phe Trp Arg Tyr Asp Asn
 385 390 395 400
 Gln Arg Gln Phe Met Glu Pro Gly Tyr Pro Lys Ser Ile Ser Gly Ala
 405 410 415
 Phe Pro Gly Ile Glu Ser Lys Val Asp Ala Val Phe Gln Gln Glu His
 420 425 430
 Phe Phe His Val Phe Ser Gly Pro Arg Tyr Tyr Ala Phe Asp Leu Ile

 435 440 445
 Ala Gln Arg Val Thr Arg Val Ala Arg Gly Asn Lys Trp Leu Asn Cys
 450 455 460

Arg Tyr Gly

465

<210> 4

<211> 303

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Thr Ser Arg Tyr Glu Pro Val Ala Glu Ile Gly Val Gly Ala

1 5 10 15

Tyr Gly Thr Val Tyr Lys Ala Arg Asp Pro His Ser Gly His Phe Val

20 25 30

Ala Leu Lys Ser Val Arg Val Pro Asn Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

35 40 45

Leu Pro Ile Ser Thr Val Arg Glu Val Ala Leu Leu Arg Arg Leu Glu

50 55 60

Ala Phe Glu His Pro Asn Val Val Arg Leu Met Asp Val Cys Ala Thr

65 70 75 80

Ser Arg Thr Asp Arg Glu Ile Lys Val Thr Leu Val Phe Glu His Val

85 90 95

Asp Gln Asp Leu Arg Thr Tyr Leu Asp Lys Ala Pro Pro Pro Gly Leu

100 105 110

Pro Ala Glu Thr Ile Lys Asp Leu Met Arg Gln Phe Leu Arg Gly Leu

115 120 125

Asp Phe Leu His Ala Asn Cys Ile Val His Arg Asp Leu Lys Pro Glu

130 135 140

Asn Ile Leu Val Thr Ser Gly Gly Thr Val Lys Leu Ala Asp Phe Gly

145 150 155 160

Leu Ala Arg Ile Tyr Ser Tyr Gln Met Ala Leu Thr Pro Val Val Val

165 170 175

Thr Leu Trp Tyr Arg Ala Pro Glu Val Leu Leu Gln Ser Thr Tyr Ala

180 185 190

Thr Pro Val Asp Met Trp Ser Val Gly Cys Ile Phe Ala Glu Met Phe

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

245 250 255
 Val Gln Ser Val Val Pro Glu Met Glu Glu Ser Gly Ala Gln Leu Leu
 260 265 270
 Leu Glu Met Leu Thr Phe Asn Pro His Lys Arg Ile Ser Ala Phe Arg
 275 280 285
 Ala Leu Gln His Ser Tyr Leu His Lys Asp Glu Gly Asn Pro Glu
 290 295 300

<210> 5

<211> 968

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Ala Phe Ala Asn Phe Arg Arg Ile Leu Arg Leu Ser Thr Phe Glu

1 5 10 15
 Lys Arg Lys Ser Arg Glu Tyr Glu His Val Arg Arg Asp Leu Asp Pro
 20 25 30
 Asn Glu Val Trp Glu Ile Val Gly Glu Leu Gly Asp Gly Ala Phe Gly
 35 40 45
 Lys Val Tyr Lys Ala Lys Asn Lys Glu Thr Gly Ala Leu Ala Ala Ala
 50 55 60
 Lys Val Ile Glu Thr Lys Ser Glu Glu Glu Leu Glu Asp Tyr Ile Val
 65 70 75 80

Glu Ile Glu Ile Leu Ala Thr Cys Asp His Pro Tyr Ile Val Lys Leu
 85 90 95
 Leu Gly Ala Tyr Tyr His Asp Gly Lys Leu Trp Ile Met Ile Glu Phe
 100 105 110

Cys Pro Gly Gly Ala Val Asp Ala Ile Met Leu Glu Leu Asp Arg Gly
 115 120 125
 Leu Thr Glu Pro Gln Ile Gln Val Val Cys Arg Gln Met Leu Glu Ala
 130 135 140
 Leu Asn Phe Leu His Ser Lys Arg Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Ala

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

 Ile Thr Leu Ile Glu Met Ala Gln Ile Glu Pro Pro His His Glu Leu
 225 230 235 240
 Asn Pro Met Arg Val Leu Leu Lys Ile Ala Lys Ser Asp Pro Pro Thr
 245 250 255
 Leu Leu Thr Pro Ser Lys Trp Ser Val Glu Phe Arg Asp Phe Leu Lys
 260 265 270
 Ile Ala Leu Asp Lys Asn Pro Glu Thr Arg Pro Ser Ala Ala Gln Leu
 275 280 285
 Leu Glu His Pro Phe Val Ser Ser Ile Thr Ser Asn Lys Ala Leu Arg

 290 295 300
 Glu Leu Val Ala Glu Ala Lys Ala Glu Val Met Glu Glu Ile Glu Asp
 305 310 315 320
 Gly Arg Asp Glu Gly Glu Glu Asp Ala Val Asp Ala Ala Ser Thr
 325 330 335
 Leu Glu Asn His Thr Gln Asn Ser Ser Glu Val Ser Pro Pro Ser Leu
 340 345 350
 Asn Ala Asp Lys Pro Leu Glu Glu Ser Pro Ser Thr Pro Leu Ala Pro

355 Ser Gln Ser Gln Asp Ser Val Asn Glu Pro Cys Ser Gln Pro Ser Gly
 370 375 380
 Asp Arg Ser Leu Gln Thr Thr Ser Pro Pro Val Val Ala Pro Gly Asn
 385 390 395 400
 Glu Asn Gly Leu Ala Val Pro Val Pro Leu Arg Lys Ser Arg Pro Val
 405 410 415
 Ser Met Asp Ala Arg Ile Gln Val Ala Gln Glu Lys Gln Val Ala Glu
 420 425 430
 Gln Gly Gly Asp Leu Ser Pro Ala Ala Asn Arg Ser Gln Lys Ala Ser
 435 440 445
 Gln Ser Arg Pro Asn Ser Ser Ala Leu Glu Thr Leu Gly Gly Glu Lys
 450 455 460
 Leu Ala Asn Gly Ser Leu Glu Pro Pro Ala Gln Ala Ala Pro Gly Pro
 465 470 475 480
 Ser Lys Arg Asp Ser Asp Cys Ser Ser Leu Cys Thr Ser Glu Ser Met
 485 490 495
 Asp Tyr Gly Thr Asn Leu Ser Thr Asp Leu Ser Leu Asn Lys Glu Met
 500 505 510
 Gly Ser Leu Ser Ile Lys Asp Pro Lys Leu Tyr Lys Lys Thr Leu Lys
 515 520 525
 Arg Thr Arg Lys Phe Val Val Asp Gly Val Glu Val Ser Ile Thr Thr
 530 535 540
 Ser Lys Ile Ile Ser Glu Asp Glu Lys Lys Asp Glu Glu Met Arg Phe
 545 550 555 560
 Leu Arg Arg Gln Glu Leu Arg Glu Leu Arg Leu Leu Gln Lys Glu Glu
 565 570 575
 His Arg Asn Gln Thr Gln Leu Ser Asn Lys His Glu Leu Gln Leu Glu
 580 585 590
 Gln Met His Lys Arg Phe Glu Gln Glu Ile Asn Ala Lys Lys Lys Phe
 595 600 605

Phe Asp Thr Glu Leu Glu Asn Leu Glu Arg Gln Gln Lys Gln Gln Val
 610 615 620
 Glu Lys Met Glu Gln Asp His Ala Val Arg Arg Arg Glu Glu Ala Arg
 625 630 635 640
 Arg Ile Arg Leu Glu Gln Asp Arg Asp Tyr Thr Arg Phe Gln Glu Gln
 645 650 655

 Leu Lys Leu Met Lys Lys Glu Val Lys Asn Glu Val Glu Lys Leu Pro
 660 665 670
 Arg Gln Gln Arg Lys Glu Ser Met Lys Gln Lys Met Glu Glu His Thr
 675 680 685
 Gln Lys Lys Gln Leu Leu Asp Arg Asp Phe Val Ala Lys Gln Lys Glu
 690 695 700
 Asp Leu Glu Leu Ala Met Lys Arg Leu Thr Thr Asp Asn Arg Arg Glu
 705 710 715 720
 Ile Cys Asp Lys Glu Arg Glu Cys Leu Met Lys Lys Gln Glu Leu Leu

 725 730 735
 Arg Asp Arg Glu Ala Ala Leu Trp Glu Met Glu Glu His Gln Leu Gln
 740 745 750
 Glu Arg His Gln Leu Val Lys Gln Gln Leu Lys Asp Gln Tyr Phe Leu
 755 760 765
 Gln Arg His Glu Leu Leu Arg Lys His Glu Lys Glu Arg Glu Gln Met
 770 775 780
 Gln Arg Tyr Asn Gln Arg Met Ile Glu Gln Leu Lys Val Arg Gln Gln
 785 790 795 800

 Gln Glu Lys Ala Arg Leu Pro Lys Ile Gln Arg Ser Glu Gly Lys Thr
 805 810 815
 Arg Met Ala Met Tyr Lys Lys Ser Leu His Ile Asn Gly Gly Gly Ser
 820 825 830
 Ala Ala Glu Gln Arg Glu Lys Ile Lys Gln Phe Ser Gln Gln Glu Glu
 835 840 845
 Lys Arg Gln Lys Ser Glu Arg Leu Gln Gln Gln Gln Lys His Glu Asn
 850 855 860

Gln Met Arg Asp Met Leu Ala Gln Cys Glu Ser Asn Met Ser Glu Leu

865 870 875 880

Gln Gln Leu Gln Asn Glu Lys Cys His Leu Leu Val Glu His Glu Thr

885 890 895

Gln Lys Leu Lys Ala Leu Asp Glu Ser His Asn Gln Asn Leu Lys Glu

900 905 910

Trp Arg Asp Lys Leu Arg Pro Arg Lys Lys Ala Leu Glu Glu Asp Leu

915 920 925

Asn Gln Lys Lys Arg Glu Gln Glu Met Phe Phe Lys Leu Ser Glu Glu

930 935 940

Ala Glu Cys Pro Asn Pro Ser Thr Pro Ser Lys Ala Ala Lys Phe Phe

945 950 955 960

Pro Tyr Ser Ser Ala Asp Ala Ser

965

<210> 6

<211> 292

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Gln Lys Tyr Glu Lys Leu Glu Lys Ile Gly Glu Gly Thr Tyr Gly

1 5 10 15

Thr Val Phe Lys Ala Lys Asn Arg Glu Thr His Glu Ile Val Ala Leu

20 25 30

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

35 40 45

Leu Arg Glu Ile Cys Leu Leu Lys Glu Leu Lys His Lys Asn Ile Val

50 55 60

Arg Leu His Asp Val Leu His Ser Asp Lys Lys Leu Thr Leu Val Phe

65 70 75 80

Glu Phe Cys Asp Gln Asp Leu Lys Lys Tyr Phe Asp Ser Cys Asn Gly

85 90 95

Asp Leu Asp Pro Glu Ile Val Lys Ser Phe Leu Phe Gln Leu Leu Lys

100 105 110

Gly Leu Gly Phe Cys His Ser Arg Asn Val Leu His Arg Asp Leu Lys

115 120 125

Pro Gln Asn Leu Leu Ile Asn Arg Asn Gly Glu Leu Lys Leu Ala Asp

130 135 140

Phe Gly Leu Ala Arg Ala Phe Gly Ile Pro Val Arg Cys Tyr Ser Ala

145 150 155 160

Glu Val Val Thr Leu Trp Tyr Arg Pro Pro Asp Val Leu Phe Gly Ala

165 170 175

Lys Leu Tyr Ser Thr Ser Ile Asp Met Trp Ser Ala Gly Cys Ile Phe

180 185 190

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

195 200 205

Asp Asp Gln Leu Lys Arg Ile Phe Arg Leu Leu Gly Thr Pro Thr Glu

210 215 220

Glu Gln Trp Pro Ser Met Thr Lys Leu Pro Asp Tyr Lys Pro Tyr Pro

225 230 235 240

Met Tyr Pro Ala Thr Thr Ser Leu Val Asn Val Val Pro Lys Leu Asn

245 250 255

Ala Thr Gly Arg Asp Leu Leu Gln Asn Leu Leu Lys Cys Asn Pro Val

260 265 270

Gln Arg Ile Ser Ala Glu Glu Ala Leu Gln His Pro Tyr Phe Ser Asp

275 280 285

Phe Cys Pro Pro

290

<210> 7

<211> 393

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Pro Lys Lys Lys Pro Thr Pro Ile Gln Leu Asn Pro Ala Pro Asp

1 5 10 15
 Gly Ser Ala Val Asn Gly Thr Ser Ser Ala Glu Thr Asn Leu Glu Ala
 20 25 30
 Leu Gln Lys Lys Leu Glu Glu Leu Glu Leu Asp Glu Gln Gln Arg Lys
 35 40 45
 Arg Leu Glu Ala Phe Leu Thr Gln Lys Gln Lys Val Gly Glu Leu Lys
 50 55 60
 Asp Asp Asp Phe Glu Lys Ile Ser Glu Leu Gly Ala Gly Asn Gly Gly
 65 70 75 80
 Val Val Phe Lys Val Ser His Lys Pro Ser Gly Leu Val Met Ala Arg
 85 90 95
 Lys Leu Ile His Leu Glu Ile Lys Pro Ala Ile Arg Asn Gln Ile Ile
 100 105 110
 Arg Glu Leu Gln Val Leu His Glu Cys Asn Ser Pro Tyr Ile Val Gly
 115 120 125
 Phe Tyr Gly Ala Phe Tyr Ser Asp Gly Glu Ile Ser Ile Cys Met Glu
 130 135 140
 His Met Asp Gly Gly Ser Leu Asp Gln Val Leu Lys Lys Ala Gly Arg
 145 150 155 160
 Ile Pro Glu Gln Ile Leu Gly Lys Val Ser Ile Ala Val Ile Lys Gly
 165 170 175
 Leu Thr Tyr Leu Arg Glu Lys His Lys Ile Met His Arg Asp Val Lys
 180 185 190
 Pro Ser Asn Ile Leu Val Asn Ser Arg Gly Glu Ile Lys Leu Cys Asp
 195 200 205
 Phe Gly Val Ser Gly Gln Leu Ile Asp Ser Met Ala Asn Ser Phe Val
 210 215 220
 Gly Thr Arg Ser Tyr Met Ser Pro Glu Arg Leu Gln Gly Thr His Tyr
 225 230 235 240
 Ser Val Gln Ser Asp Ile Trp Ser Met Gly Leu Ser Leu Val Glu Met
 245 250 255

Ala Val Gly Arg Tyr Pro Ile Pro Pro Pro Asp Ala Lys Glu Leu Glu
260 265 270

Leu Met Phe Gly Cys Gln Val Glu Gly Asp Ala Ala Glu Thr Pro Pro
275 280 285

Arg Pro Arg Thr Pro Gly Arg Pro Leu Ser Ser Tyr Gly Met Asp Ser
290 295 300

Arg Pro Pro Met Ala Ile Phe Glu Leu Leu Asp Tyr Ile Val Asn Glu
305 310 315 320

Pro Pro Pro Lys Leu Pro Ser Gly Val Phe Ser Leu Glu Phe Gln Asp
325 330 335

Phe Val Asn Lys Cys Leu Ile Lys Asn Pro Ala Glu Arg Ala Asp Leu
340 345 350

Lys Gln Leu Met Val His Ala Phe Ile Lys Arg Ser Asp Ala Glu Glu
355 360 365

Val Asp Phe Ala Gly Trp Leu Cys Ser Thr Ile Gly Leu Asn Gln Pro
370 375 380

Ser Thr Pro Thr His Ala Ala Gly Val
385 390

<210> 8
<211> 1907
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8

Met Glu Val Ala Trp Leu Val Tyr Val Leu Gly Gln Gln Pro Leu Ala
1 5 10 15

Arg Gln Gly Glu Gly Gln Ser Arg Leu Val Pro Gly Arg Gly Leu Val
20 25 30

Leu Trp Leu Pro Gly Leu Pro Arg Ser Ser Pro Ser Trp Pro Ala Val
35 40 45

Asp Leu Ala Pro Leu Ala Pro Ala Arg Pro Arg Gly Pro Leu Ile Cys
50 55 60

His Thr Gly His Glu Gln Ala Gly Arg Glu Pro Gly Pro Gly Ser Ser

65						70						75						80
Thr	Lys	Gly	Pro	Val	Leu	His	Asp	Gln	Asp	Thr	Arg	Cys	Ala	Phe	Leu			
					85						90						95	
Pro	Arg	Pro	Pro	Gly	Pro	Leu	Gln	Thr	Arg	Arg	Tyr	Cys	Arg	His	Gln			
					100						105						110	
Gly	Arg	Gln	Gly	Ser	Gly	Leu	Gly	Ala	Gly	Pro	Gly	Ala	Gly	Thr	Trp			
					115						120						125	
Ala	Pro	Ala	Pro	Pro	Gly	Val	Ser	Lys	Pro	Arg	Cys	Pro	Gly	Arg	Ala			
					130						135						140	
Arg	Pro	Gly	Glu	Gly	Gln	Gln	Gln	Val	Thr	Thr	Ala	Arg	Pro	Pro	Ala			
					145						150						155	
Ile	Asn	Arg	Gly	Ala	Arg	Gln	Pro	Arg	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly			
					165						170						175	
Arg	Gly	Pro	Gly	Ala	Gly	Ala	Trp	Arg	Thr	Gly	Glu	Ala	Ala	Ala	Ser			
					180						185						190	
Ala	Gly	Pro	Ala	Val	Gly	Glu	Gly	Gly	Ala	Met	Gly	Ser	Arg	Arg	Ala			
					195						200						205	
Pro	Ser	Arg	Gly	Trp	Gly	Ala	Gly	Gly	Arg	Ser	Gly	Ala	Gly	Gly	Asp			
					210						215						220	
Gly	Glu	Asp	Asp	Gly	Pro	Val	Trp	Ile	Pro	Ser	Pro	Ala	Ser	Arg	Ser			
					225						230						235	
Tyr	Leu	Leu	Ser	Val	Arg	Pro	Glu	Thr	Ser	Leu	Ser	Ser	Asn	Arg	Leu			
					245						250						255	
Ser	His	Pro	Ser	Ser	Gly	Arg	Ser	Thr	Phe	Cys	Ser	Ile	Ile	Ala	Gln			
					260						265						270	
Leu	Thr	Glu	Glu	Thr	Gln	Pro	Leu	Phe	Glu	Thr	Thr	Leu	Lys	Ser	Arg			
					275						280						285	
Ser	Val	Ser	Glu	Asp	Ser	Asp	Val	Arg	Phe	Thr	Cys	Ile	Val	Thr	Gly			
					290						295						300	
Tyr	Pro	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Trp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Thr	Glu	Leu	Asp			
					305						310						315	
					320						325						330	

Arg Tyr Cys Gly Leu Pro Lys Tyr Glu Ile Thr His Gln Gly Asn Arg

325 330 335

His Thr Leu Gln Leu Tyr Arg Cys Arg Glu Glu Asp Ala Ala Ile Tyr

340 345 350

Gln Ala Ser Ala Gln Asn Ser Lys Gly Ile Val Ser Cys Ser Gly Val

355 360 365

Leu Glu Val Gly Thr Met Thr Glu Tyr Lys Ile His Gln Arg Trp Phe

370 375 380

Ala Lys Leu Lys Arg Lys Ala Ala Ala Lys Leu Arg Glu Ile Glu Gln

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

Gln Ala Pro Gly Pro Ser Val Pro Thr Arg Glu Pro Glu Gly Gly Thr

435 440 445

Leu Ala Ala Trp Gln Glu Gly Glu Thr Glu Thr Ala Gln His Ser Gly

450 455 460

Leu Gly Leu Ile Asn Ser Phe Ala Ser Gly Glu Val Thr Thr Asn Gly

465 470 475 480

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

485 490 495

Tyr Ile Cys Asp Ala Met Glu Leu Gly Pro Gln Arg Ala Leu Lys Glu

500 505 510

Glu Ser Gly Ala Lys Lys Lys Lys Lys Asp Glu Glu Ser Lys Gln Gly

515 520 525

Leu Arg Lys Pro Glu Leu Glu Lys Ala Ala Gln Ser Arg Arg Ser Ser

530 535 540

Glu Asn Cys Ile Pro Ser Ser Asp Glu Pro Asp Ser Cys Gly Thr Gln

545 550 555 560

Gly Pro Val Gly Val Glu Gln Val Gln Thr Gln Pro Arg Gly Arg Ala

565 570 575
 Ala Arg Gly Pro Gly Ser Ser Gly Thr Asp Ser Thr Arg Lys Pro Ala
 580 585 590
 Ser Ala Val Gly Thr Pro Asp Lys Ala Gln Lys Ala Pro Gly Pro Gly
 595 600 605
 Pro Gly Gln Glu Val Tyr Phe Ser Leu Lys Asp Met Tyr Leu Glu Asn

 610 615 620
 Thr Gln Ala Val Arg Pro Leu Gly Glu Glu Gly Pro Gln Thr Leu Ser
 625 630 635 640
 Val Arg Ala Pro Gly Glu Ser Pro Lys Gly Lys Ala Pro Leu Arg Ala
 645 650 655
 Arg Ser Glu Gly Val Pro Gly Ala Pro Gly Gln Pro Thr His Ser Leu
 660 665 670
 Thr Pro Gln Pro Thr Arg Pro Phe Asn Arg Lys Arg Phe Ala Pro Pro
 675 680 685

 Lys Pro Lys Gly Glu Ala Thr Thr Asp Ser Lys Pro Ile Ser Ser Leu
 690 695 700
 Ser Gln Ala Pro Glu Cys Gly Ala Gln Ser Leu Gly Lys Ala Pro Pro
 705 710 715 720
 Gln Ala Ser Val Gln Val Pro Thr Pro Pro Ala Arg Arg Arg His Gly
 725 730 735
 Thr Arg Asp Ser Thr Leu Gln Gly Gln Ala Gly His Arg Thr Pro Gly
 740 745 750
 Glu Val Leu Glu Cys Gln Thr Thr Thr Ala Pro Thr Met Ser Ala Ser

 755 760 765
 Ser Ser Ser Asp Val Ala Ser Ile Gly Val Ser Thr Ser Gly Ser Gln
 770 775 780
 Gly Ile Ile Glu Pro Met Asp Met Glu Thr Gln Glu Asp Gly Arg Thr
 785 790 795 800
 Ser Ala Asn Gln Arg Thr Gly Ser Lys Lys Asn Val Gln Ala Asp Gly
 805 810 815
 Lys Ile Gln Val Asp Gly Arg Thr Arg Gly Asp Gly Thr Gln Thr Ala

820	825	830	
Gln Arg Thr Arg Ala Asp Arg Lys Thr Gln Val Asp Ala Gly Thr Gln			
835	840	845	
Glu Ser Lys Arg Pro Gln Ser Asp Arg Ser Ala Gln Lys Gly Met Met			
850	855	860	
Thr Gln Gly Arg Ala Glu Thr Gln Leu Glu Thr Thr Gln Ala Gly Glu			
865	870	875	880
Lys Ile Gln Glu Asp Arg Lys Ala Gln Ala Asp Lys Gly Thr Gln Glu			
885	890	895	
Asp Arg Arg Met Gln Gly Glu Lys Gly Met Gln Gly Glu Lys Gly Thr			
900	905	910	
Gln Ser Glu Gly Ser Ala Pro Thr Ala Met Glu Gly Gln Ser Glu Gln			
915	920	925	
Glu Val Ala Thr Ser Leu Gly Pro Pro Ser Arg Thr Pro Lys Leu Pro			
930	935	940	
Pro Thr Ala Gly Pro Arg Ala Pro Leu Asn Ile Glu Cys Phe Val Gln			
945	950	955	960
Thr Pro Glu Gly Ser Cys Phe Pro Lys Lys Pro Gly Cys Leu Pro Arg			
965	970	975	
Ser Glu Glu Ala Val Val Thr Ala Ser Arg Asn His Glu Gln Thr Val			
980	985	990	
Leu Gly Pro Leu Ser Gly Asn Leu Met Leu Pro Ala Gln Pro Pro His			
995	1000	1005	
Glu Gly Ser Val Glu Gln Val Gly Gly Glu Arg Cys Arg Gly Pro Gln			
1010	1015	1020	
Ser Ser Gly Pro Val Glu Ala Lys Gln Glu Asp Ser Pro Phe Gln Cys			
1025	1030	1035	1040
Pro Lys Glu Glu Arg Pro Gly Gly Val Pro Cys Met Asp Gln Gly Gly			
1045	1050	1055	
Cys Pro Leu Ala Gly Leu Ser Gln Glu Val Pro Thr Met Pro Ser Leu			
1060	1065	1070	

Pro Gly Thr Gly Leu Thr Ala Ser Pro Lys Ala Gly Pro Cys Ser Thr
1075 1080 1085

Pro Thr Ser Gln His Gly Ser Thr Ala Thr Phe Leu Pro Ser Glu Asp
1090 1095 1100

Gln Val Leu Met Ser Ser Ala Pro Thr Leu His Leu Gly Leu Gly Thr
1105 1110 1115 1120

Pro Thr Gln Ser His Pro Pro Glu Thr Met Ala Thr Ser Ser Glu Gly
1125 1130 1135

Ala Cys Ala Gln Val Pro Asp Val Glu Gly Arg Thr Pro Gly Pro Arg
1140 1145 1150

Ser Cys Asp Pro Gly Leu Ile Asp Ser Leu Lys Asn Tyr Leu Leu Leu
1155 1160 1165

Leu Leu Lys Leu Ser Ser Thr Glu Thr Ser Gly Ala Gly Gly Glu Ser
1170 1175 1180

Gln Val Gly Ala Ala Thr Gly Gly Leu Val Pro Ser Ala Thr Leu Thr
1185 1190 1195 1200

Pro Thr Val Glu Val Ala Gly Leu Ser Pro Arg Thr Ser Arg Arg Ile
1205 1210 1215

Leu Glu Arg Val Glu Asn Asn His Leu Val Gln Ser Ala Gln Thr Leu
1220 1225 1230

Leu Leu Ser Pro Cys Thr Ser Arg Arg Leu Thr Gly Leu Leu Asp Arg
1235 1240 1245

Glu Val Gln Ala Gly Arg Gln Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Ser Trp
1250 1255 1260

Gly Pro Gly Pro Ser Ser Leu Thr Val Pro Ala Ile Val Val Asp Glu
1265 1270 1275 1280

Glu Asp Pro Gly Leu Ala Ser Glu Gly Ala Ser Glu Gly Glu Gly Glu
1285 1290 1295

Val Ser Pro Glu Gly Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Gln Glu Ser Ser
1300 1305 1310

Met Ala Gly Arg Leu Gly Glu Ala Gly Gly Gln Ala Ala Pro Gly Gln
1315 1320 1325

Gly Pro Ser Ala Glu Ser Ile Ala Gln Glu Pro Ser Gln Glu Glu Lys

1330 1335 1340
Phe Pro Gly Glu Ala Leu Thr Gly Leu Pro Ala Ala Thr Pro Glu Glu
1345 1350 1355 1360
Leu Ala Leu Gly Ala Arg Arg Lys Arg Phe Leu Pro Lys Val Arg Ala
1365 1370 1375
Ala Gly Asp Gly Glu Ala Thr Thr Pro Glu Glu Arg Glu Ser Pro Thr
1380 1385 1390
Val Ser Pro Arg Gly Pro Arg Lys Ser Leu Val Pro Gly Ser Pro Gly
1395 1400 1405

Thr Pro Gly Arg Glu Arg Arg Ser Pro Thr Gln Gly Arg Lys Ala Ser
1410 1415 1420
Met Leu Glu Val Pro Arg Ala Glu Glu Glu Leu Ala Ala Gly Asp Leu
1425 1430 1435 1440
Gly Pro Ser Pro Lys Ala Gly Gly Leu Asp Thr Glu Val Ala Leu Asp
1445 1450 1455
Glu Gly Lys Gln Glu Thr Leu Ala Lys Pro Arg Lys Ala Lys Asp Leu
1460 1465 1470
Leu Lys Ala Pro Gln Val Ile Arg Lys Ile Arg Val Glu Gln Phe Pro

1475 1480 1485
Asp Ala Ser Gly Ser Leu Lys Leu Trp Cys Gln Phe Phe Asn Ile Leu
1490 1495 1500
Ser Asp Ser Val Leu Thr Trp Ala Lys Asp Gln Arg Pro Val Gly Glu
1505 1510 1515 1520
Val Gly Arg Ser Ala Gly Asp Glu Gly Pro Ala Ala Leu Ala Ile Val
1525 1530 1535
Gln Ala Ser Pro Val Asp Cys Gly Val Tyr Arg Cys Thr Ile His Asn
1540 1545 1550

Glu His Gly Ser Ala Ser Thr Asp Phe Cys Leu Ser Pro Glu Val Leu
1555 1560 1565
Ser Gly Phe Ile Ser Arg Glu Glu Gly Glu Val Gly Glu Glu Ile Glu

1570 1575 1580
 Met Thr Pro Met Val Phe Ala Lys Gly Leu Ala Asp Ser Gly Cys Trp
 1585 1590 1595 1600
 Gly Asp Lys Leu Phe Gly Arg Leu Val Ser Glu Glu Leu Arg Gly Gly
 1605 1610 1615
 Gly Tyr Gly Cys Gly Leu Arg Lys Ala Ser Gln Ala Lys Val Ile Tyr

 1620 1625 1630
 Gly Leu Glu Pro Ile Phe Glu Ser Gly Arg Thr Cys Ile Ile Lys Val
 1635 1640 1645
 Ser Ser Leu Leu Val Phe Gly Pro Ser Ser Glu Thr Ser Leu Val Gly
 1650 1655 1660
 Arg Asn Tyr Asp Val Thr Ile Gln Gly Cys Lys Ile Gln Asn Met Ser
 1665 1670 1675 1680
 Arg Glu Tyr Cys Lys Ile Phe Ala Ala Glu Ala Arg Ala Ala Pro Gly
 1685 1690 1695

 Phe Gly Glu Val Pro Glu Ile Ile Pro Leu Tyr Leu Ile Tyr Arg Pro
 1700 1705 1710
 Ala Asn Asn Ile Pro Tyr Ala Thr Leu Glu Glu Asp Leu Gly Lys Pro
 1715 1720 1725
 Leu Glu Ser Tyr Cys Ser Arg Glu Trp Gly Cys Ala Glu Ala Pro Thr
 1730 1735 1740
 Ala Ser Gly Ser Ser Glu Ala Met Gln Lys Cys Gln Thr Phe Gln His
 1745 1750 1755 1760
 Trp Leu Tyr Gln Trp Thr Asn Gly Ser Phe Leu Val Thr Asp Leu Ala

 1765 1770 1775
 Gly Val Asp Trp Lys Met Thr Asp Val Gln Ile Ala Thr Lys Leu Arg
 1780 1785 1790
 Gly Tyr Gln Gly Leu Lys Glu Ser Cys Phe Pro Ala Leu Leu Asp Arg
 1795 1800 1805
 Phe Ala Ser Ser His Gln Cys Asn Ala Tyr Cys Glu Leu Leu Gly Leu
 1810 1815 1820
 Thr Pro Leu Lys Gly Pro Glu Ala Ala His Pro Gln Ala Lys Ala Lys

1825 1830 1835 1840

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

 1845 1850 1855

Gln Pro Gln Lys Lys Gly Leu Pro Ser Pro Gln Gly Thr Arg Lys Ser

 1860 1865 1870

Ala Pro Ser Ser Lys Ala Thr Pro Gln Ala Ser Glu Pro Val Thr Thr

 1875 1880 1885

Gln Leu Leu Gly Gln Pro Pro Thr Gln Glu Glu Gly Ser Lys Ala Gln

 1890 1895 1900

Gly Met Arg

1905

<210> 9

<211> 521

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Gly Glu Val Glu Ala Pro Gly Arg Leu Trp Leu Glu Ser Pro Pro

 1 5 10 15

Gly Gly Ala Pro Pro Ile Phe Leu Pro Ser Asp Gly Gln Ala Leu Val

 20 25 30

Leu Gly Arg Gly Pro Leu Thr Gln Val Thr Asp Arg Lys Cys Ser Arg

 35 40 45

Thr Gln Val Glu Leu Val Ala Asp Pro Glu Thr Arg Thr Val Ala Val

 50 55 60

Lys Gln Leu Gly Val Asn Pro Ser Thr Thr Gly Thr Gln Glu Leu Lys

 65 70 75 80

Pro Gly Leu Glu Gly Ser Leu Gly Val Gly Asp Thr Leu Tyr Leu Val

 85 90 95

Asn Gly Leu His Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Glu Thr Arg Thr Pro

 100 105 110

Glu Ser Gln Pro Asp Thr Pro Pro Gly Thr Pro Leu Val Ser Gln Asp

115 120 125
 Glu Lys Arg Asp Ala Glu Leu Pro Lys Lys Arg Met Arg Lys Ser Asn
 130 135 140
 Pro Gly Trp Glu Asn Leu Glu Lys Leu Leu Val Phe Thr Ala Ala Gly
 145 150 155 160
 Val Lys Pro Gln Gly Lys Val Ala Gly Phe Asp Leu Asp Gly Thr Leu
 165 170 175
 Ile Thr Thr Arg Ser Gly Lys Val Phe Pro Thr Gly Pro Ser Asp Trp
 180 185 190
 Arg Ile Leu Tyr Pro Glu Ile Pro Arg Lys Leu Arg Glu Leu Glu Ala
 195 200 205
 Glu Gly Tyr Lys Leu Val Ile Phe Thr Asn Gln Met Ser Ile Gly Arg
 210 215 220
 Gly Lys Leu Pro Ala Glu Glu Phe Lys Ala Lys Val Glu Ala Val Val
 225 230 235 240
 Glu Lys Leu Gly Val Pro Phe Gln Val Leu Val Ala Thr His Ala Gly
 245 250 255
 Leu Tyr Arg Lys Pro Val Thr Gly Met Trp Asp His Leu Gln Glu Gln
 260 265 270
 Ala Asn Asp Gly Thr Pro Ile Ser Ile Gly Asp Ser Ile Phe Val Gly
 275 280 285
 Asp Ala Ala Gly Arg Pro Ala Asn Trp Ala Pro Gly Arg Lys Lys Lys
 290 295 300
 Asp Phe Ser Cys Ala Asp Arg Leu Phe Ala Leu Asn Leu Gly Leu Pro
 305 310 315 320
 Phe Ala Thr Pro Glu Glu Phe Phe Leu Lys Trp Pro Ala Ala Gly Phe
 325 330 335
 Glu Leu Pro Ala Phe Asp Pro Arg Thr Val Ser Arg Ser Gly Pro Leu
 340 345 350
 Cys Leu Pro Glu Ser Arg Ala Leu Leu Ser Ala Ser Pro Glu Val Val
 355 360 365

Val Ala Val Gly Phe Pro Gly Ala Gly Lys Ser Thr Phe Leu Lys Lys
370 375 380

His Leu Val Ser Ala Gly Tyr Val His Val Asn Arg Asp Thr Leu Gly
385 390 395 400

Ser Trp Gln Arg Cys Val Thr Thr Cys Glu Thr Ala Leu Lys Gln Gly
405 410 415

Lys Arg Val Ala Ile Asp Asn Thr Asn Pro Asp Ala Ala Ser Arg Ala
420 425 430

Arg Tyr Val Gln Cys Ala Arg Ala Ala Gly Val Pro Cys Arg Cys Phe
435 440 445

Leu Phe Thr Ala Thr Leu Glu Gln Ala Arg His Asn Asn Arg Phe Arg
450 455 460

Glu Met Thr Asp Ser Ser His Ile Pro Val Ser Asp Met Val Met Tyr
465 470 475 480

Gly Tyr Arg Lys Gln Phe Glu Ala Pro Thr Leu Ala Glu Gly Phe Ser
485 490 495

Ala Ile Leu Glu Ile Pro Phe Arg Leu Trp Val Glu Pro Arg Leu Gly
500 505 510

Arg Leu Tyr Cys Gln Phe Ser Glu Gly
515 520

<210> 10
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 10

Met Arg Leu Phe Arg Trp Leu Leu Lys Gln Pro Val Pro Lys Gln Ile
1 5 10 15

Glu Arg Tyr Ser Arg Phe Ser Pro Ser Pro Leu Ser Ile Lys Gln Phe
20 25 30

Leu Asp Phe Gly Arg Asp Asn Ala Cys Glu Lys Thr Ser Tyr Met Phe
35 40 45

Leu Arg Lys Glu Leu Pro Val Arg Leu Ala Asn Thr Met Arg Glu Val

50 55 60
 Asn Leu Leu Pro Asp Asn Leu Leu Asn Arg Pro Ser Val Gly Leu Val
 65 70 75 80
 Gln Ser Trp Tyr Met Gln Ser Phe Leu Glu Leu Leu Glu Tyr Glu Asn
 85 90 95

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

 165 170 175
 Asn Pro Val His Pro Lys His Ile Gly Ser Ile Asp Pro Thr Cys Asn
 180 185 190
 Val Ala Asp Val Val Lys Asp Ala Tyr Glu Thr Ala Lys Met Leu Cys
 195 200 205
 Glu Gln Tyr Tyr Leu Val Ala Pro Glu Leu Glu Val Glu Glu Phe Asn
 210 215 220
 Ala Lys Ala Pro Asp Lys Pro Ile Gln Val Val Tyr Val Pro Ser His
 225 230 235 240

 Leu Phe His Met Leu Phe Glu Leu Phe Lys Asn Ser Met Arg Ala Thr
 245 250 255
 Val Glu Leu Tyr Glu Asp Arg Lys Glu Gly Tyr Pro Ala Val Lys Thr
 260 265 270
 Leu Val Thr Leu Gly Lys Glu Asp Leu Ser Ile Lys Ile Ser Asp Leu
 275 280 285
 Gly Gly Gly Val Pro Leu Arg Lys Ile Asp Arg Leu Phe Asn Tyr Met
 290 295 300

Tyr Ser Thr Ala Pro Arg Pro Ser Leu Glu Pro Thr Arg Ala Ala Pro

305 310 315 320

Leu Ala Gly Phe Gly Tyr Gly Leu Pro Ile Ser Arg Leu Tyr Ala Arg

325 330 335

Tyr Phe Gln Gly Asp Leu Lys Leu Tyr Ser Met Glu Gly Val Gly Thr

340 345 350

Asp Ala Val Ile Tyr Leu Lys Ala Leu Ser Ser Glu Ser Phe Glu Arg

355 360 365

Leu Pro Val Phe Asn Lys Ser Ala Trp Arg His Tyr Lys Thr Thr Pro

370 375 380

Glu Ala Asp Asp Trp Ser Asn Pro Ser Ser Glu Pro Arg Asp Ala Ser

385 390 395 400

Lys Tyr Lys Ala Lys Gln

405

<210> 11

<211> 387

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Thr Arg Asp Glu Ala Leu Pro Asp Ser His Ser Ala Gln Asp Phe

1 5 10 15

Tyr Glu Asn Tyr Glu Pro Lys Glu Ile Leu Gly Arg Gly Val Ser Ser

20 25 30

Val Val Arg Arg Cys Ile His Lys Pro Thr Ser Gln Glu Tyr Ala Val

35 40 45

Lys Val Ile Asp Val Thr Gly Gly Gly Ser Phe Ser Pro Glu Glu Val

50 55 60

Arg Glu Leu Arg Glu Ala Thr Leu Lys Glu Val Asp Ile Leu Arg Lys

65 70 75 80

Val Ser Gly His Pro Asn Ile Ile Gln Leu Lys Asp Thr Tyr Glu Thr

85 90 95

Asn Thr Phe Phe Phe Leu Val Phe Asp Leu Met Lys Arg Gly Glu Leu

100 105 110

Phe Asp Tyr Leu Thr Glu Lys Val Thr Leu Ser Glu Lys Glu Thr Arg

115 120 125

Lys Ile Met Arg Ala Leu Leu Glu Val Ile Cys Thr Leu His Lys Leu

130 135 140

Asn Ile Val His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile Leu Leu Asp Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Gly Glu Arg Leu Arg Glu Val Cys Gly Thr Pro Ser Tyr Leu Ala

180 185 190

Pro Glu Ile Ile Glu Cys Ser Met Asn Glu Asp His Pro Gly Tyr Gly

195 200 205

Lys Glu Val Asp Met Trp Ser Thr Gly Val Ile Met Tyr Thr Leu Leu

210 215 220

Ala Gly Ser Pro Pro Phe Trp His Arg Lys Gln Met Leu Met Leu Arg

225 230 235 240

Met Ile Met Ser Gly Asn Tyr Gln Phe Gly Ser Pro Glu Trp Asp Asp

245 250 255

Tyr Ser Asp Thr Val Lys Asp Leu Val Ser Arg Phe Leu Val Val Gln

260 265 270

Pro Gln Asn Arg Tyr Thr Ala Glu Glu Ala Leu Ala His Pro Phe Phe

275 280 285

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

290 295 300

Phe Lys Val Ile Ala Leu Thr Val Leu Ala Ser Val Arg Ile Tyr Tyr

305 310 315 320

Gln Tyr Arg Arg Val Lys Pro Val Thr Arg Glu Ile Val Ile Arg Asp

325 330 335

Pro Tyr Ala Leu Arg Pro Leu Arg Arg Leu Ile Asp Ala Tyr Ala Phe

340 345 350
 Arg Ile Tyr Gly His Trp Val Lys Lys Gly Gln Gln Gln Asn Arg Ala
 355 360 365
 Ala Leu Phe Glu Asn Thr Pro Lys Ala Val Leu Leu Ser Leu Ala Glu
 370 375 380
 Glu Asp Tyr
 385

 <210> 12
 <211> 424
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 Met Ala Pro Glu Glu Asp Ala Gly Gly Glu Ala Leu Gly Gly Ser Phe
 1 5 10 15
 Trp Glu Ala Gly Asn Tyr Arg Arg Thr Val Gln Arg Val Glu Asp Gly
 20 25 30
 His Arg Leu Cys Gly Asp Leu Val Ser Cys Phe Gln Glu Arg Ala Arg
 35 40 45
 Ile Glu Lys Ala Tyr Ala Gln Gln Leu Ala Asp Trp Ala Arg Lys Trp

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

 Ser Arg Ala Ala Glu Asp Gly Phe Arg Lys Ala Gln Lys Pro Trp Leu
 130 135 140
 Lys Arg Leu Lys Glu Val Glu Ala Ser Lys Lys Ser Tyr His Ala Ala
 145 150 155 160

Arg Lys Asp Glu Lys Thr Ala Gln Thr Arg Glu Ser His Ala Lys Ala
165 170 175

Asp Ser Ala Val Ser Gln Glu Gln Leu Arg Lys Leu Gln Glu Arg Val
180 185 190

Glu Arg Cys Ala Lys Glu Ala Glu Lys Thr Lys Ala Gln Tyr Glu Gln
195 200 205

Thr Leu Ala Glu Leu His Arg Tyr Thr Pro Arg Tyr Met Glu Asp Met
210 215 220

Glu Gln Ala Phe Glu Thr Cys Gln Ala Ala Glu Arg Gln Arg Leu Leu
225 230 235 240

Phe Phe Lys Asp Met Leu Leu Thr Leu His Gln His Leu Asp Leu Ser
245 250 255

Ser Ser Glu Lys Phe His Glu Leu His Arg Asp Leu His Gln Gly Ile
260 265 270

Glu Ala Ala Ser Asp Glu Glu Asp Leu Arg Trp Trp Arg Ser Thr His
275 280 285

Gly Pro Gly Met Ala Met Asn Trp Pro Gln Phe Glu Glu Trp Ser Leu
290 295 300

Asp Thr Gln Arg Thr Ile Ser Arg Lys Glu Lys Gly Gly Arg Ser Pro
305 310 315 320

Asp Glu Val Thr Leu Thr Ser Ile Val Pro Thr Arg Asp Gly Thr Ala
325 330 335

Pro Pro Pro Gln Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Gly Gln Asp Glu Glu
340 345 350

Trp Ser Asp Glu Glu Ser Pro Arg Lys Ala Ala Thr Gly Val Arg Val
355 360 365

Arg Ala Leu Tyr Asp Tyr Ala Gly Gln Glu Ala Asp Glu Leu Ser Phe
370 375 380

Arg Ala Gly Glu Glu Leu Leu Lys Met Ser Glu Glu Asp Glu Gln Gly
385 390 395 400

Trp Cys Gln Gly Gln Leu Gln Ser Gly Arg Ile Gly Leu Tyr Pro Ala

405

410

415

Asn Tyr Val Glu Cys Val Gly Ala

420

<210> 13

<211> 166

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Asp Gly Val Ile Lys Val Phe Asn

1 5 10 15

Asp Met Lys Val Arg Lys Ser Ser Thr Pro Glu Glu Val Lys Lys Arg

20 25 30

Lys Lys Ala Val Leu Phe Cys Leu Ser Glu Asp Lys Lys Asn Ile Ile

35 40 45

Leu Glu Glu Gly Lys Glu Ile Leu Val Gly Asp Val Gly Gln Thr Val

50 55 60

Asp Asp Pro Tyr Ala Thr Phe Val Lys Met Leu Pro Asp Lys Asp Cys

65 70 75 80

Arg Tyr Ala Leu Tyr Asp Ala Thr Tyr Glu Thr Lys Glu Ser Lys Lys

85 90 95

Glu Asp Leu Val Phe Ile Phe Trp Ala Pro Glu Ser Ala Pro Leu Lys

100 105 110

Ser Lys Met Ile Tyr Ala Ser Ser Lys Asp Ala Ile Lys Lys Lys Leu

115 120 125

Thr Gly Ile Lys His Glu Leu Gln Ala Asn Cys Tyr Glu Glu Val Lys

130 135 140

Asp Arg Cys Thr Leu Ala Glu Lys Leu Gly Gly Ser Ala Val Ile Ser

145 150 155 160

Leu Glu Gly Lys Pro Leu

165