

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0101617 (43) 공개일자 2012년09월14일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C07K 19/00 (2006.01) C07K 14/76 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01) A61K 38/38 (2006.01)		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1
(21) 출원번호 10-2012-0020100		(72) 발명자 오준서 서울특별시 강남구 대치2동 511번지 한보미도맨션 205동 1405호
(22) 출원일자 2012년02월28일 심사청구일자 2012년02월28일		
(30) 우선권주장 1020110018074 2011년02월28일 대한민국(KR)		(74) 대리인 특허법인다나

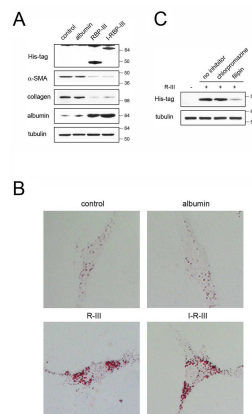
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 알부민과 레티놀 결합 단백질의 융합 단백질

(57) 요약

본 발명은 섬유질환을 예방 또는 치료하기 위해 사용할 수 있는 알부민과 레티놀 결합 단백질의 융합 단백질에 관한 것이다. 본 발명에 따른 알부민과 레티놀 결합 단백질(RBP)이 결합되어 있는 융합 단백질은 정상세포 내의 세포질성 지방 방울의 형성을 유도하고 활성화된 정상세포의 형태를 활성화 이전 상태로 전환시키므로, 간, 췌장, 폐 등에 발생한 섬유질환을 예방 또는 치료하기 위해 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100016169

부처명 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 조직 섬유화과정의 분자기전 이해 및 항섬유질환제의 타겟 개발

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.05.01 ~ 2011.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

알부민과 레티놀 결합 단백질(Retinol Binding Protein, RBP)이 결합되어 있는 융합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 알부민은 알부민 I 도메인 및 알부민 III 도메인 중 하나 이상인 융합 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 융합 단백질은 알부민 I 도메인-RBP-알부민 III, 알부민 III-RBP-알부민 I, RBP-알부민 III, 알부민 III-RBP, 알부민-RBP 또는 RBP-알부민인 융합 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 융합 단백질은 서열번호 8 내지 13 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 것인 융합 단백질.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 융합 단백질에 포함되는 알부민 또는 알부민 III 도메인은 Arg410, Tyr411, Lys525가 Ala으로 치환된 것인 융합 단백질.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 14 내지 19 중 어느 하나의 핵산 서열을 갖는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 융합 단백질에 포함되는 알부민 또는 알부민 III 도메인은 Arg410, Tyr411, Lys525가 Ala으로 치환된 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 9

제6항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 10

제8항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합벡터.

청구항 11

제9항의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체.

청구항 12

제10항의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체.

청구항 13

제11항의 형질전환체로부터 알부민과 레티놀 결합 단백질(RBP)이 결합되어 있는 융합 단백질을 발현시키는 것을 포함하는

알부민과 레티놀 결합 단백질(RBP)이 결합되어 있는 융합 단백질의 생산 방법.

청구항 14

제12항의 형질전환체로부터 알부민과 레티놀 결합 단백질(RBP)이 결합되어 있는 융합 단백질을 발현시키는 것을 포함하는

알부민과 레티놀 결합 단백질(RBP)이 결합되어 있는 융합 단백질의 생산 방법.

청구항 15

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 섬유질환의 예방 또는 치료용 의약 조성물.

청구항 16

제5항의 융합 단백질을 포함하는 섬유질환의 예방 또는 치료용 의약 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서,

상기 섬유질환은 간, 췌장, 폐, 신장 또는 장에 발생한 것인 섬유질환의 예방 또는 치료용 의약 조성물.

청구항 18

제16항에 있어서,

상기 섬유질환은 간, 췌장, 폐, 신장 또는 장에 발생한 것인 섬유질환의 예방 또는 치료용 의약 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 간, 췌장, 폐 등에 발생하는 섬유질환을 예방 또는 치료하기 위해 사용할 수 있는 알부민과 레티놀 결합 단백질의 융합 단백질에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 조직의 섬유화는 조직의 기능 상실을 초래하는 치명적인 결과를 낳는다. 예를 들어, 간의 섬유화는 간 기능 상실에 이어, 간경화, 간암으로 진행되며, 췌장의 경우에도 섬유화가 만성 췌장염 또는 췌장암에서 공통적으로 관찰된다. 그럼에도 불구하고, 현재까지 이러한 섬유질환의 치료제는 전무하며, 조직 이식만이 치료 가능성이 높은 유일한 방법이다. 섬유질환의 치료제가 전무한 이유는 조직섬유화의 분자 기전이 잘 규명되지 않았기 때문이다.

[0003] 최근 들어, 조직의 섬유화는 조직을 구성하는 세포 중 하나인 정상세포(stellate cells)가 활성화되고 이로 인해 콜라겐과 같은 세포외기질이 과도하게 발현되고, 축적됨으로써 일어난다고 밝혀졌다. 이러한 정상세포는 간 뿐만 아니라 췌장, 폐, 신장, 그리고 장 등에도 분포되어 있음이 보고되어 있다.

[0004] 정상세포는 전신에서의 레티노이드 항상성의 조절에 중심적인 역할을 한다. 식품으로부터 얻어진 비타민 A(레티놀)는 혈류에서 레티놀 결합 단백질(Retinol Binding Protein, RBP)과 결합하여 순환하다가 RBP 수용체인 STRA6를 통해 정상세포로 이동되어, 세포질 내 지방 방울 내에 레티닐 에스테르의 형태로 저장된다. 본 발명자는 정상세포 내에서 알부민이 발현되며, 온전한 지방산 결합 부위를 갖는 알부민은 비타민 A 함유 지방 방울의 형성에 관여하고, 정상세포의 활성화를 억제하며, 이미 활성화된 정상세포 내에서 알부민의 발현은 활성화 이전 상태로 전환시킴을 밝힌 바 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: Kim N, Yoo W, Lee J, Kim H, Lee H, Kim Y, Kim D, Oh J.* (2009) Formation of vitamin A lipid droplets in pancreatic stellate cells requires albumin. Gut 58(10), 1382-90.

(비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: Kim N, Choi S, Lim C, Lee H, Oh J. (2010) Albumin mediates PPAR-g and C/EBP-a -induced phenotypic changes in pancreatic stellate cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 391(1), 640-44.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 정상세포 내의 알부민 레벨을 증가시켜 정상세포의 활성화를 억제하거나 활성화된 정상세포를 활성화 이전 상태로 되돌리거나 정상세포의 노화를 유도함으로써 섬유질환을 치료하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 이를 위해, 본 발명은 알부민과 레티놀 결합 단백질(Retinol Binding Protein, RBP)이 결합되어 있는 융합 단백질을 제공한다.

[0008] 알부민은 간 세포에 의해 일차적으로 합성되는 다기능성 혈장 단백질이다. 알부민은 3개의 도메인을 가지며, 각각은 두 개의 작은 서브도메인 A 및 B로 구성된다. 알부민은 지방산을 포함한 소수성 물질을 감싸 혈액 내에서 운반시켜 주는 분자 이동의 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 결정학 분석에 따르면, 5개의 강력한 지방산 결합 부위가 알부민 내에 비대칭적으로 분포한다(서브도메인 IB에 하나, IA 과 IIA 사이에 하나, IIIA에 둘, 그

리고 IIIB에 하나).

- [0009] 본 발명자는 정상세포 내에서 발현된 알부민이 레티닐 에스테르의 저장을 안정화시켜 줌으로서 세포 내 지방 방울 형성을 촉진할 것이라고 가정하였다. 한편, 정상세포에서 RBP 수용체에 결합한 후의 레티놀-RBP 복합체는 엔도사이토시스에 의해 세포 내로 내재화될 수 있다는 점에 착안하였다. 이러한 점을 바탕으로, 정상세포 내의 알부민 레벨을 증가시키고자, 알부민과 레티놀 결합 단백질(Retinol Binding Protein, RBP)이 결합되어 있는 융합 단백질을 코딩하는 발현 벡터를 제조하여, 이러한 융합 단백질의 발현에 따른 효과를 시험하였다. 그 결과, 야생형 알부민에서 볼 수 있는 바와 같이, 재조합 융합 단백질의 발현은 정상세포 내의 지방 방울의 형성을 유도하였으며, 활성화된 정상세포의 휴지기 세포로의 표현형 역전을 유도하였다. 그리고 정상세포 활성화 마커인 α -SMA 레벨을 감소시켰다. 또한, 융합 단백질 발현 벡터로 트랜스펙션된 293 세포의 배양액을 활성화된 정상세포에 처리한 결과, 야생형 알부민의 경우와는 달리, 융합 단백질들은 성공적으로 정상세포 내로 삽입되었으며, 지방 방울의 형성을 유도하였고, α -SMA 레벨을 감소시킴을 확인할 수 있었다. 또한, 알부민의 서열 변이를 통해 정상세포의 노화를 추가적으로 유도한 결과, 돌연변이 융합 단백질의 발현으로 인해 정상세포의 노화가 유도되었음을 확인할 수 있었다.
- [0010] 본 발명에 있어서, 상기 융합 단백질의 형성에 사용되는 알부민은 임의의 종으로부터 유래한 것일 수 있으나, 면역원성의 위험성을 피하기 위해서는 인간 유래인 것이 바람직하다. 이에 제한되는 것은 아니나, 알부민은 서열번호 1의 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다.
- [0011] 이에 제한되는 것은 아니나, 알부민의 고친화성 지방산 결합 부위는 알부민 I 도메인 및 알부민 III 도메인에 존재하므로 이들을 융합 파트너로 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 한 구체예에서, 상기 융합 단백질의 형성에 사용되는 알부민은 알부민 I 도메인 및 알부민 III 도메인 중 하나 이상일 수 있다.
- [0012] 이에 제한되는 것은 아니나, 알부민 I 도메인은 서열번호 2의 핵산 서열(알부민을 코딩하는 핵산 중 1-666번째 핵산)에 의해 코딩될 수 있다.
- [0013] 또한, 알부민 III 도메인은 이에 제한되는 것은 아니나, 서열번호 3의 핵산 서열(알부민을 코딩하는 핵산 중 1216-1827번째 핵산)을 가질 수 있다.
- [0014] 한 구체예에서, 알부민 III가 융합단백질의 N 말단 쪽에 위치하게 되는 경우에는 알부민 III 도메인 앞에 분비 서열을 포함하는 알부민 N-말단을 추가시킬 수 있다. 이러한 알부민 N-말단은 이에 제한되는 것은 아니나 서열번호 4의 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다.
- [0015] 한편, 상기 알부민과 결합되는 RBP는 또한 그의 전체 서열이나 그의 일부 서열을 사용할 수 있으며, 결합되는 알부민의 서열 또는 알부민과의 결합 순서에 따라 적당하게 선택될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, RBP는 서열번호 5의 핵산 서열(RBP를 코딩하는 핵산 중 1-585번째 핵산), 서열번호 6의 핵산 서열(RBP를 코딩하는 핵산 중 55-585번째 핵산) 또는 서열번호 7의 핵산 서열(RBP를 코딩하는 핵산 중 55-603번째 핵산)에 의해 코딩될 수 있다. 예를 들어, RBP가 알부민의 C 말단에 결합되는 경우 분비서열이 필요하지 않을 수 있으므로, 서열번호 6 또는 서열번호 7의 핵산 서열에 의해 코딩되는 RBP 펩타이드를 사용할 수 있다. 또한, RBP의 C 말단에 다시 알부민 도메인이 결합되는 경우에는 RBP의 전체 서열을 이용하기 보다는 서열번호 7의 핵산 서열에 의해 코딩되는 RBP의 부분 펩타이드를 사용하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0016] 바람직한 구체예에서, 상기 융합 단백질은 알부민 I 도메인-RBP-알부민 III, 알부민 III-RBP-알부민 I, RBP-알부민 III, 알부민 III-RBP, 알부민-RBP 또는 RBP-알부민일 수 있다. 알부민 I 도메인-RBP-알부민 III는 알부민 I 도메인의 C 말단에 RBP의 N 말단이 결합되어 있고, 다시 RBP의 C 말단에 알부민 III 도메인이 결합되어 있는 형태를 의미한다. RBP-알부민 III, 알부민 III-RBP, 알부민-RBP 또는 RBP-알부민 또한 같은 방식으로 해석된다. 본 발명자는 서열 분석을 통해 상기와 같은 형태의 융합 단백질이 알부민 본연의 입체 구조를 저해하지 않아 지방산 결합 부위에 영향을 주지 않을 뿐만 아니라 RBP 수용체를 통한 RBP의 결합에도 영향을 미치지 않을 것이라는 점을 확인하였다. 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 융합 단백질은 서열번호 8 내지 13 중 어느 하나의 아미노산 서열의 서열을 가질 수 있다. 구체적으로, 알부민 I 도메인-RBP-알부민 III, 알부민 III-RBP-알부민 I, RBP-알부민 III, 알부민 III-RBP, 알부민-RBP 또는 RBP-알부민은 각각 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 또는 서열번호 13의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 이들 서열 내에는 융합되는 단백질들에 대한 아미노산뿐만 아니라, 제한효소 사이트를 코딩하는 핵산에 대한 아미노산, 정제를 위한 His tag 등을 포함할 수 있다.
- [0017] 다른 구체예에서, 알부민의 변이에 의한 정상세포의 노화 유도를 위해 야생형 알부민 또는 이의 도메인의 아미

노산 서열 중 일부 서열을 치환한 것을 이용할 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 한 구체예에서, 상기 융합 단백질에 포함되는 알부민 또는 알부민 III 도메인은 Arg410, Tyr411, Lys525가 Ala으로 치환된 것일 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 앞서 설명한 알부민과 레티놀 결합 단백질(Retinol Binding Protein, RBP)이 결합되어 있는 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 이에 제한되는 것은 아니나 서열번호 14 내지 19의 핵산 서열을 가질 수 있다. 구체적으로, 알부민 I 도메인-RBP-알부민 III, 알부민 III-RBP-알부민 I, RBP-알부민 III, 알부민 III-RBP, 알부민-RBP 또는 RBP-알부민은 이에 제한되는 것은 아니나, 각각 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 또는 서열번호 19의 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다. 이들 서열 내에는 융합되는 단백질을 코딩하는 핵산뿐만 아니라, 단백질의 융합을 위해 사용된 제한효소 사이트를 코딩하는 핵산, 정제를 위한 His tag, 종결 코돈 등을 포함할 수 있다.

[0020] 다른 구체예에서, 알부민의 변이에 의한 정상세포의 노화 유도를 위해, 야생형 알부민 또는 이의 도메인의 아미노산 서열 중 일부 서열을 치환된 것을 이용할 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 한 구체예에서, 상기 융합 단백질에 포함되는 알부민 또는 알부민 III 도메인은 Arg410, Tyr411, Lys525가 Ala으로 치환된 것일 수 있다.

[0021] 한편, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터는 융합 단백질의 제조에 사용될 수 있는 공지의 발현 벡터에 상기 폴리뉴클레오티드가 삽입되어 제조된 것이다. 본 발명에서, "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.

[0022] 한편, 이러한 재조합 벡터에는 단백질의 효과적인 분리, 정제를 위해 융합 단백질의 말단에 His 태그가 발현되도록 하는 발현 벡터를 사용할 수 있다.

[0023] 알부민과 레티놀 결합 단백질(Retinol Binding Protein, RBP)이 결합되어 있는 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 숙주세포를 형질전환시킬 수 있다. 본 발명에 따른 융합 단백질의 발현을 위해 사용되는 숙주세포로는 암세포를 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명은 또한 상기 형질전환체로부터 알부민과 레티놀 결합 단백질(RBP)이 결합되어 있는 융합 단백질을 발현시키는 것을 포함하는 알부민과 레티놀 결합 단백질(RBP)이 결합되어 있는 융합 단백질의 생산 방법을 제공한다. 형질전환체로부터의 상기 융합 단백질의 발현은 일반적으로 숙주세포의 배양을 통해 유도할 수 있다. 본 발명에 따른 알부민과 레티놀 결합 단백질(RBP)이 결합되어 있는 융합 단백질은 알부민과 RBP 자체에 분비 신호가 있어 세포 외로 분비되어 나오므로 배양 배지로부터 상기 융합 단백질을 공지의 단백질 정제 방법을 통해 분리해 낼 수 있다.

[0025] 본 발명에서 유전공학 기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)) 및 프레드릭 등의 문헌(Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1, 2, 3, John Wiley & Sons, Inc. (1994))에 개시되어 있는 내용에 의해 보다 명확하게 된다.

[0026] 본 발명은 또한 알부민과 레티놀 결합 단백질(RBP)이 결합되어 있는 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 섬유질환의 예방 또는 치료용 의약 조성물, 섬유질환의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 알부민과 레티놀 결합 단백질(RBP)이 결합되어 있는 융합 단백질의 용도, 및 치료상 유효량의 알부민과 레티놀 결합 단백질(RBP)이 결합되어 있는 융합 단백질을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 섬유질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

- [0027] 한 구체예에서, 상기 섬유질환은 이에 제한되는 것은 아니나, 간, 췌장, 폐, 신장 또는 장에 발생한 것일 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 융합 단백질에 의해 예방 또는 치료할 수 있는 섬유질환은 간 섬유증(liver fibrosis), 만성간염 (chronic hepatitis), 간경화(cirrhosis), 간암(hepatic cancer), 화학요법-연관 지방간염(chemotherapy-associated steatohepatitis, CASH), 폐 섬유증(lung fibrosis), 신장 섬유증(renal fibrosis), 신부전(renal failure), 췌장 섬유증(pancreatic fibrosis), 만성 췌장염(chronic pancreatitis) 및 췌장암(pancreatic cancer)을 포함한다.
- [0028] 본 발명의 의약 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 의약 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 바람직하게는 주사를 위한 액상 용액이 적합하다.
- [0029] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형으로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 의약 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내 등의 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 의약 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예컨대, 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여시, 본 발명의 융합 단백질은 10ng/kg~10g/kg의 용량으로 투여할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, '대상체'는 인간, 오랑우탄, 침팬지, 마우스, 랫트, 개, 소, 닭, 돼지, 염소, 양 등을 포함하나, 바람직하게는 인간이다.

발명의 효과

- [0033] 본 발명에 따른 알부민과 레티놀 결합 단백질(RBP)이 결합되어 있는 융합 단백질은 정상세포 내의 지방 방울의 형성을 유도하여 활성화된 정상세포의 형태를 활성화 이전 상태로 전환시키거나 혹은 정상세포의 노화를 유도함으로써, 간, 췌장, 폐 등에 발생한 섬유질환을 예방 또는 치료하기 위해 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1A는 RBP-알부민^{406-608a.a.(domain III)} (R-III) 및 알부민^{1-222(domain I)}-RBP-알부민⁴⁰⁶⁻⁶⁰⁸ (I-R-III)의 융합단백질 제조를 나타내는 모식도이고, 도 1B는 활성화된 정상세포에서 융합단백질 발현이 미치는 분자생물학적 영향을 western blot법으로 분석한 결과를 보여준다.
- 도 2A-2D는 활성화된 정상세포에서 알부민 또는 융합 단백질 발현이 미치는 세포형태학적 영향을 phase contrast image(좌상패널)와 autofluorescence image(우상패널), 그리고 면역형광법(우하패널)과 오일 레드 O 염색(좌하패널)으로 분석한 결과를 보여준다.
- 도 3은 점 돌연변이(R410A/Y411A/K525A)가 유도된 알부민/알부민 III 도메인을 포함하는 돌연변이 융합단백질 발현이 미치는 세포형태학적 영향을 보여준다.
- 도 4A는 본 발명에 따른 융합단백질이 정상세포로 유입되어 분자생물학적 변화를 유도함을 보여주는 웨스턴블롯 결과이고, 도 4B는 상기 융합단백질의 유입으로 인한 세포의 형태 변화를 보여주는 오일 레드 O 염색 결과를 나타내며, 도 4C는 상기 융합단백질이 caveolae-매개된 엔도사이토시스를 통해 세포로 유입됨을 보여주는 웨스턴블롯팅 분석 결과를 나타낸다.
- 도 5A는 본 발명에 따른 알부민-RBP 융합단백질을 암모늄 설페이트 침전(lane 1), His Trap 친화성 컬럼(lane

2), Resource Q 컬럼(lane 3)에 의한 정제과정을 보여주며, 도 5B는 상기 융합단백질을 1주일간 정맥주사한 후 간조직 용해물을 웨스턴블롯팅 분석한 결과이고, 도 5C는 조직 분포를 보여주는 인 비보 실험 결과이다.

도 6는 본 발명에 따른 융합단백질이 간 섬유화를 완화시킴을 보여주는 현미경 사진, Sirius red 염색 및 면역조직화학 분석 결과를 보여준다.

도 7은 본 발명에 따른 융합단백질이 간 섬유화를 예방함을 보여주는 Sirius red 염색, 면역조직화학적 염색 및 웨스턴 블롯팅 분석 결과를 보여준다.

도 8은 본 발명에 따른 융합단백질이 신장 섬유화를 감소시킴을 보여주는 MT(Masson's trichrome) 염색 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0036] [실시예]

[0037] <실험 방법>

[0038] 췌장 성상세포(Pancreatic stellate cells, PSCs)의 분리 및 배양

[0039] 랫트 췌장 성상세포를 Apte, M.V. et al., Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. Gut 43 (1), 128-133 (1998)에 기술된 방법에 따라 분리하였다. 요약하면, 췌장을 잘게 저며, 0.05% 콜라게나아제, 0.02% 프로나아제 및 0.1% DNase를 함유하는 한스 완충액에 넣고, 37°C에서 20분 동안 셰이킹하였다. 150 mm 메쉬에 거른 후, 세포를 13.2% Nycodenz 구배 상에서 1400 g 에서 20분 동안 원심분리하였다. 췌장 성상세포를 Nycodenz 용액과 수성층의 경계면 상에 있는 밴드로부터 모아, 10% 우태아 혈청이 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) (Carlsbad, CA)에 넣고, 비코팅된 플라 스틱 디쉬 상에 플레이팅하였다. 1차 배양에서 킨플루언스에 도달하면, 1:3 스플릿으로 계대 배양하였다.

[0040] 알부민-RBP 융합 단백질에 대한 발현 벡터의 구성

[0041] 랫트 간 조직으로부터 RNA를 RNeasy 키트 (Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 추출하고, GeneAmp RNA PCR (Applied Biosystems, Foster city, CA)을 이용하여 cDNA로 역전사시켰다. 알부민 또는 RBP의 전체 오픈리딩 프레임 (ORF)을 설계한 프라이머로 PCR에 의해 증폭시키고, pBluescript 벡터 내로 삽입시켰다.

[0042] 알부민 I-RBP-알부민 III(이하, 1R3 또는 I-RBP-III로도 표시)를 코딩하는 발현 벡터는 다음과 같이 제조되었다. 알부민 (도메인 I: 1-666)(서열번호 2) 또는 RBP (55-585)(서열번호 6)를 코딩하는 DNA 절편은 하 기 프라이머로 각각 PCR 하여 pBluescript-알부민 또는 pBluescript-RBP로부터 각각 증폭시켰다:

[0043] 알부민 (도메인 I: 1-666)(서열번호 2)

[0044] 센스 프라이머: 5' GGGGTACCCC ACCATGAAGT GGGTAACCTT TC 3'(서열번호 20)

[0045] 안티센스 프라이머: 5' CCCCAATTGC ATCCTCTGAC GGACAGC 3'(서열번호 21)

[0046] RBP (55-585)(서열번호 6)

[0047] 센스 프라이머: 5' GGGCAATTGG AGCGCGACTG CAGGGTG 3'(서열번호 22)

[0048] 안티센스 프라이머: 5' CCCCTCGAGT CTGCTTTGAC AGTAACC 3'(서열번호 23).

[0049] PCR 산물을 KpnI/MfeI 또는 MfeI/XhoI로 각각 이중 소화시키고, 아가로스 겔 전기영동에 의해 정제된 DNA 단편 을 함께 라이게이션시켜, KpnI/XhoI-cut pBluescript 벡터로 클로닝하여 pBluescript-1R을 수득하였다.

- [0050] 알부민(도메인 III: 1216-1827)(서열번호 3)을 코딩하는 DNA 단편은 하기 프라이머로 증폭시켰다:
- [0051] 센스 프라이머: 5' GGGCTCGAGGAAGAACCTAAGAAGCTTG 3' (서열번호 24)
- [0052] 안티센스 프라이머: 5' GGCTCTAGAT TAATGATGAT GATGATGATG GGCTAAGGCT TCTTTGCT 3' (서열번호 25).
- [0053] His-태그 서열이 안티센스 프라이머 내에 포함되어 있었다. PCR 산물을 XhoI/XbaI로 이중소화시키고, 상기 제조된 1R의 DNA 절편과 라이게이션시켰다. 생성된 DNA 절편 1R3을 발현 벡터 pcDNA3.1+의 KpnI 및 XbaI 위치에 삽입하여 pcDNA3.1-1R3을 획득하였다.
- [0054] RBP-알부민III(이하, R3 또는 RBP-III로도 표시)를 코딩하는 발현 벡터는 다음과 같이 제조하였다. RBP (1-585)(서열번호 5)를 코딩하는 DNA 절편을 하기 프라이머로 증폭시켰다.
- [0055] 센스 프라이머: 5' GCGGAATTCC ACCATGGAGT GGGTGTGGGC 3' (서열번호 26)
- [0056] 안티센스 프라이머: 5' CCCCTCGAGT CTGCTTTGAC AGTAACC 3' (서열번호 27)
- [0057] PCR 산물을 EcoRI/XhoI로 이중 소화시키고, 알부민(도메인III: 1216-1827)(서열번호 3)을 코딩하는 DNA 절편과 라이게이션시켜, pcDNA3.1+ 벡터의 EcoRI 및 XbaI 부위로 삽입하여 pcDNA3.1-R3를 획득하였다. pcDNA3.1-1R3 또는 pcDNA3.1-R3에서, 알부민/RBP 코딩영역은 동일 리딩 프레임 내 6-히스티딘 태그 코딩 서열과 종결 코돈의 바로 윗쪽에 위치한다.
- [0058] 한편, 알부민의 아미노산 잔기 Arg410, Tyr411, Lys525가 Ala으로 치환된 돌연변이 알부민의 발현은 정상세포의 노화를 유도하는 것으로 보고된 바 있다(Kim N, Yoo W, Lee J, Kim H, Lee H, Kim Y, Kim D, Oh J. * (2009) Formation of vitamin A lipid droplets in pancreatic stellate cells requires albumin. *Gut* 58(10), 1382-90.). 이는 지방산과의 직접적인 상호작용이 정상세포에서 알부민이 기능하는데 중요한 기전임을 의미한다. 따라서, 본 발명에서는 정상세포의 노화 유도를 위한 융합단백질의 제조를 위해, Muta-direct™ Site-Directed Mutagenesis Kit (iNtRON, Korea)를 이용한 PCR 기반의 방법을 이용하여 점 돌연변이(R410A/Y411A/K525A)가 유도된 알부민/알부민 III 도메인을 포함하는 돌연변이 융합단백질 발현벡터를 구축하고, 이를 활성화된 정상세포에 트랜스펙션시키고 표현형 변화를 조사하였다.
- [0059] 모든 제조물을 자동 서열기를 이용하여 시퀀싱하여 알부민/RBP 코딩 영역을 확인하였다.
- [0060] His6 태그 제조용 융합 단백질의 정제
- [0061] 마우스 R3을 코딩하는 발현 벡터를 랫트 융합 단백질에서와 동일한 방식으로 제조하였다. PCR을 위해 사용된 프라이머는 다음과 같았다.
- [0062] **알부민 (도메인 III: 1216-1827) (서열번호 3)**
- [0063] 센스 프라이머: 5' GGGCTCGAGG AAGAGCCTAA GAACTTG 3' (서열번호 28)
- [0064] 안티센스 프라이머: 5' GGCTCTAGAT TAATGATGAT GATGATGATG GGCTAAGGTG TCTTTGCA 3' (서열번호 29)
- [0065] **RBP (1-585)(서열번호 5)**
- [0066] 센스 프라이머: 5' GCGGAATTCC ACCATGGAGT GGGTGTGGGC 3' (서열번호 30)
- [0067] 안티센스 프라이머: 5' CCCCTCGAGC CTGCTTTGAC AGTAACC 3' (서열번호 31)
- [0068] 293 세포를 R3을 코딩하는 발현 벡터로 스테이블 트랜스펙션시키고, 항-His tag 항체를 이용한 웨스턴 블롯팅법으로 분리된 제조용 융합 단백질의 레벨을 평가함으로써 높은 발현율을 갖는 클로날 세포주를 선택하였다. 선택된 293 세포가 4일간 자란 무혈청 배지로부터 컨디션드 배지를 제조하고, 암모늄 설페이트(55%)로 분획한 다음, His Trap 친화성 컬럼을 통과시켰다. 샘플을 Resource Q에 의해 추가로 정제하였다. 정제된 단백질을 탈이온수로 투석하고, 동결건조시키고, 식염수 중에 용해시켰다. SDS-PAGE 및 단백질 염색에 의해 측정한 결과 R-III의 순도는 95% 를 넘었다.

- [0069] 트랜스펙션
- [0070] 활성화된 췌장 성상세포(2세대 이후)를 리포펙타민 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 트랜스펙션시켰고, 24시간 후 분석하였다.
- [0071] 웨스턴블롯 분석
- [0072] 세포들을 빙냉 인산 완충액(PBS) 중에서 2회 행구고, 용해 완충액에서 스크래핑하여 수확하였다. 균등한 양의 단백질을 SDS-PAGE에 의해 분리한 후, 1차 항체를 이용하여 이뮤노블롯 탐지를 수행하였다. 일차 항체는 다음과 같았다: 알부민(Santa Cruz, Santa Cruz, CA), α -SMA (Sigma, St. Louis, MO), α -튜블린(Cell signaling, Beverly, MA) 및 타입 I 콜라겐(Calbiochem, San Diego, CA), His-tag (AB Frontier, Seoul, Korea).
- [0073] 면역형광 분석
- [0074] 췌장 성상세포를 젤라틴으로 코팅된 원형의 커버 슬립 위에 플레이팅하였다. 샘플을 파라포름알데하이드로 고정하고 알부민 항체(Santa Cruz #sc-58698)와 함께 습윤 챔버 내에서 4°C에서 밤새 인큐베이션한 후, Alexa Fluor 568가 결합된 이차 항체와 반응시켰다. 세포들을 PBS로 세척하고 슬라이드 상에 마운팅하였다. 염색된 세포들을 Zeiss AXIO Imager M1 현미경으로 가시화하였다.
- [0075] 오일 레드 O 염색
- [0076] Koopman (Koopman, R., Schaart, G., & Hesselink, M.K., Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. *Histochem Cell Biol* 116 (1), 63-68 (2001))에 기술된 방법으로 췌장 성상세포를 오일 레드 O로 염색하여 지방 방울을 가시화하였다. 오일 레드 O는 이소프로판올 대신 트리에틸 포스페이트로 희석하여 사용하였다.
- [0077] 간 섬유화 모델의 제조
- [0078] 미네랄 오일 중에 1:1로 용해시킨 CCl_4 를 1 mL/kg BALB/c 마우스 복강 내로 주 당 3회 7주 동안 주사하여 간 손상을 유도한 간 섬유화 마우스 모델을 제조하였다. 동일한 양의 미네랄 오일 단독을 투여한 군을 대조군으로 사용하였다. 최종 CCl_4 주사 72시간 후 마우스를 희생시켰다. 간 조직을 절편화하고, 조직학적 분석을 위해 10% 완충 포르말린으로 고정하고, 남은 부분을 Rnase-free 튜브에 넣고, 액화 질소 중에서 급속동결시켰다.
- [0079] 신장 섬유화 모델의 제조
- [0080] BALB/c 마우스를 사용하여 UUO(*unilateral ureteral obstruction*) 모델을 수행하였다. 요약하면, 정중절개(midline incision)를 통해 복강을 열고, 좌측 수뇨관을 분리하여 묶었다. 유사한 방식으로 수술한 동물들은(Sham-operated animals) 동일한 외과 수술을 받되 수뇨관의 결찰은 하지 않았다. 신장 섬유화의 진전에 대한 알부민-RBP 융합 단백질 R-III의 효과를 시험하기 위해, 차단 후 6일째부터 시작하여 정맥 주사로 7일 동안 매일 R-III를 투여하였다. 실험 종료 후, 마우스를 희생시키고, 신장을 제거하였다. 신장의 반쪽은 조직학적 연구를 위해 10% 완충 포르말린으로 고정시켰다. 나머지는 액체 질소 중에서 동결(snap-frozen)시키고, 단백질 및 RNA 추출을 위해 -80°C에서 보관하였다.
- [0081] 면역조직화학 분석
- [0082] 포르말린으로 고정되고 파라핀으로 포매된 간 조직의 절편(5 μ m 두께)을 준비하고, 조직학적 분석을 위해 H&E 염색을 그리고 콜라겐 침착 분석을 위해 Sirius red 또는 Masson's trichrome 염색을 수행하였다. 조직 절편을 또한 타입 I 콜라겐(Abcam, Cambridge, UK) 항체로 면역조직화학적으로 염색하였다. Sirius red 염색을 정량하

기 위해, Image J software (NIH)를 사용하였다.

[0083] 통계학적 분석

[0084] 결과들은 평균±표준 편차 (SD)로 표현하였다. 통계학적 분석은 t-tests를 이용하여 수행하였다. 비교는 $P < 0.05$ 에서 유의도를 검정하였으며, P 수치는 양측검정을 수행하였다.

[0085] **<실험 결과>**

[0086] 알부민-RBP 융합 단백질의 췌장 정상세포에서의 지방 방울 형성 촉진

[0087] 앞서 설명한 바와 같이 제작된, RBP-알부민^{406-608a.a.(domain III)} (R-III) 및 알부민^{1-222(domain I)}-RBP-알부민⁴⁰⁶⁻⁶⁰⁸ (I-R-III) (도 1A)에서, 각각의 단백질 부분은 제한효소 인식부위 링커를 통해 연결되었으며, 폴리히스티딘 태그는 융합 단백질의 C-말단에 위치하였다. 췌장 정상세포를 계대배양(2세대 이후)하여 활성화시킨 후, 야생형 알부민, R-III 또는 I-R-III에 대한 발현벡터로 트랜스펙션시키고 표현형 변화를 조사하였다. 웨스턴 블롯 분석 결과, 예상된 크기의 융합 단백질이 발현되었다. (R-III ~45kDa 및 I-R-III ~68kDa (도 1B)).

[0088] 도 2A-2D는 활성화된 정상세포에서 알부민 또는 융합 단백질 발현이 미치는 세포형태학적 영향을 phase contrast image(좌상패널)와 autofluorescence image(우상패널), 그리고 면역형광법(우하패널)과 오일 레드 O 염색(좌하패널)으로 분석한 결과를 보여준다. 정상적인 배양 조건에서 활성화된 췌장 정상세포는 fibroblastoid의 형태를 보여주지만(도 2A), 야생형 알부민, R-III 또는 I-R-III의 발현은 autofluorescent 지질 방울의 형성을 유도하며 다각형 모양으로 세포형태를 변환시킨다(도 2B-D). 이러한 세포형태의 변화는 정상세포의 활성화 마커인 α -SMA와 타입 I 콜라겐의 발현레벨의 감소가 수반되었다(도 1B). 이는 알부민과 마찬가지로 융합 단백질의 발현이 활성화된 정상세포를 불활성화시킴을 보여준다.

[0089] 한편, 위와 같은 방법으로 수행된 점 돌연변이(R410A/Y411A/K525A)가 유도된 알부민/알부민 III 도메인을 포함하는 돌연변이 융합단백질에 대한 실험 결과, 돌연변이 융합단백질의 발현으로 인해 약간의 기름방울형성과 노화된 정상세포의 형태가 관찰되었다(도 3).

[0090] 알부민-RBP 융합 단백질의 정상세포로의 내재화

[0091] RBP 부위가 융합 단백질의 정상세포 진입을 촉진할 수 있는지 조사하기 위해, 우리는 알부민, R-III 또는 I-R-III가 안정적으로 트랜스펙션된 293 세포를 24시간 동안 배양하여 컨디션드 배지를 얻은 후, 이를 활성화된 췌장 정상세포에 조사하였다. 항-His 태그 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅법으로 분석한 결과, 야생형 알부민과는 달리 융합단백질만이 정상세포에 유입되었음이 관찰되었다(도 4A). 또한, 융합 단백질의 유입은 세포내 기름 방울 형성을 포함하여 세포의 형태를 변화시켰으며(도 4B), α -SMA와 타입 I 콜라겐의 레벨을 감소시켰다(도 4A). 우리는 추가로 clathrin-매개된 엔도사이토시스의 저해제(chlorpromazine)와 caveolae-매개된 엔도사이토시스의 저해제(filipin)를 이용하여 R-III 내재화의 메커니즘을 조사하였다. 웨스턴 블롯팅 분석 결과, 정제된 R-III의 정상세포내 유입은 filipin 선처리에 의해 크게 저해되었다(도 4C). 이러한 결과는 RBP가 caveolae-매개된 엔도사이토시스를 통해 세포로 유입된다는 이전의 보고와 일치한다. 따라서, 우리의 데이터는 융합단백질을 구성하는 각각의 단백질 파트가 모두 기능적임을 보여준다. 즉, 융합단백질에서 RBP는 정상세포-특이적 타겟팅을, 알부민 도메인은 정상세포의 불활성화라는 역할을 수행한다.

[0092] 주사된 알부민-RBP 융합단백질의 간으로의 흡수

[0093] 그런 다음 우리는 알부민-RBP 융합 단백질의 조직 분포를 인비보에서 조사하였다. I-R-III와 비교하여, R-III가 트랜스펙션된 293 세포로부터 더 많이 발현, 분비되므로 (데이터 미제시), 우리는 R-III를 선택하였고 그것을 FPLC에 의해 정제하여 >95%의 순도로 얻었다 (도 5A). BALB/c 마우스에 0.1ml의 식염수 중에 용해시킨 R-III (3 또는 10 μ g)를 매일 꼬리 정맥을 통해 7일 동안 주사하였고, 간 용해물을 항-His 태그 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅에 의해 분석하였다. 주사된 마우스에서 뚜렷한 R-III 단백질 밴드가 관찰되었으며, 그 신호는 용량의존적으로 증가하였다(도 5B). 상이한 조직으로부터 얻은 전체 세포 용해물을 균등한 양으로 웨스턴 블롯팅에

의해 분석하였을 때, 간에서 강한 R-III 신호가 보였으며, 또한 뇌, 폐, 지라, 췌장, 신장, 및 장 에서도 약한 신호가 탐지되었다(도 5C). 이러한 R-III의 조직 분포는 RBP의 경우와 유사하였다.

[0094] R-III에 의한 간 섬유화의 완화

[0095] 우리는 사염화탄소(CCl₄)-유도된 간 섬유화 모델을 이용하여 R-III의 치료 및 예방적 가능성을 평가 하였다. CCl₄ 를 BALB/c 마우스 복강내로 주 3회 7주 동안 주사하고, R-III (10 μ g; n=25), 알부민(10 μ g; n=7), RBP(5 μ g; n=5), 또는 식염수 단독 (n=23)을 CCl₄ 처리 마지막 2주 동안 매일 정맥으로 투여하였다(도 6A). 미네랄 오일/식염수 대조군 마우스는 정상적인 간 구조를 보여준다 (도 6C). 반면, CCl₄ 처리된 마우스에서는 심각한 간 섬유화가 관찰되었다 즉, 간 표면에 다수의 결절이 현미경 상에서 관찰되었고 (도 6B), 간 조직 구조의 파괴, 섬유의 확장 및 큰 섬유성 격막 형성(large fibrous septa formation)이 관찰되었다 (도 6C). 또한 Sirius red 염색과 면역조직화학 분석은 CCl₄ 처리군의 간 조직에서의 과도한 콜라겐 침착을 보여주었다 (도 6C). 그러나, R-III의 투여는 CCl₄ 처리군에서 보였던 결절 형성, 조직의 변형 및 콜라겐 침착을 현저히 감소시켰다(도 6B 및 도 6C). Image J Software (NIH) 에 의한 Sirius red 염색의 정량 분석 결과 콜라겐 함량이 R-III 처리에 의해 ~35%까지 감소되었음을 나타낸다(도 6D). 반면, 알부민 또는 RBP의 투여는 CCl₄ 처리에 의한 섬유화 진행에 별다른 영향을 끼치지 못했다 (데이터 미제시). 이러한 발견은 R-III의 투여가 CCl₄-유도된 간 섬유화 마우스 모델의 간섬유화에 치료 효능이 있음을 증명한다.

[0096] 간 섬유화 발생에 대한 R-III의 억제

[0097] R-III가 CCl₄-유도된 간 섬유화에 대한 예방 효과가 있는지 조사하기 위해, 마우스(n=22)를 CCl₄ 과 R-III (10 μ g)로 7주 동안 주 3회 처리하였다. CCl₄ 과 R-III는 서로 다른 날에 투여되었다(도 7A). 간 절편의 H&E 및 Sirius red 염색은 R-III 투여가 CCl₄ 처리에 의해 발생된 간 조직의 변형과 섬유화를 현저히 감소시킴을 보여준다 (도 7B). Sirius red 염색의 정량 분석 결과는 콜라겐 함량이 ~38%까지 감소되었음을 보여준다(도 7C). 이러한 발견은 추가로 면역조직화학적 염색과 웨스턴 블롯팅에 의해서도 뒷받침된다 (도 7B, D). 따라서, 우리의 데이터는 알부민-RBP 융합 단백질이 간 섬유화에 대한 치료 및 예방적 효능을 갖고 있음을 보여준다.

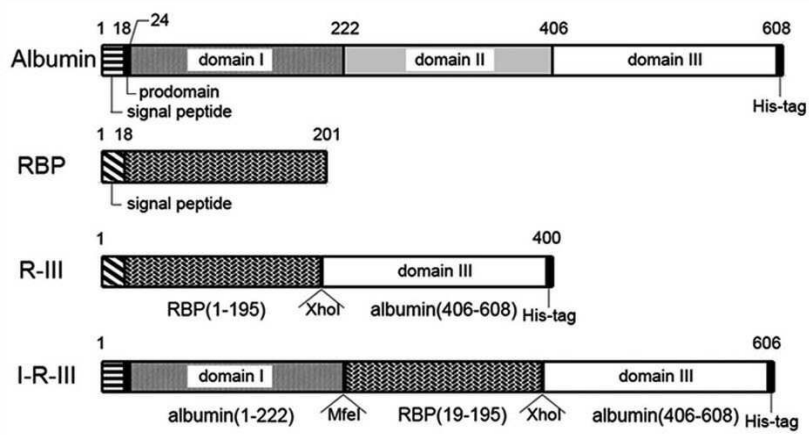
[0098] R-III에 의한 신장 섬유화의 감소

[0099] 그런 다음 우리는 UUO (unilateral ureteral obstruction)-유도된 신장 섬유화 모델을 이용하여 R-III의 치료적 잠재력을 평가하였다. 마우스를 UUO를 겪게 하고, 정맥으로 R-III (10 μ g; n=10) 또는 식염수(n=10)를 7일 동안 매일 투여하였다(도 8A). 신장 조직절편을 MT(Masson's trichrome) 염색으로 조사한 결과, UUO 그룹의 신장 조직에서 강한 콜라겐 침착이 관찰되었으며 R-III 투여가 콜라겐 침착을 현저히 감소시킴을 보여주었다(도 8B). 그러므로, 이러한 발견은 R-III 투여가 마우스에서의 UUO-유도된 신장 섬유화를 개선함을 나타낸다.

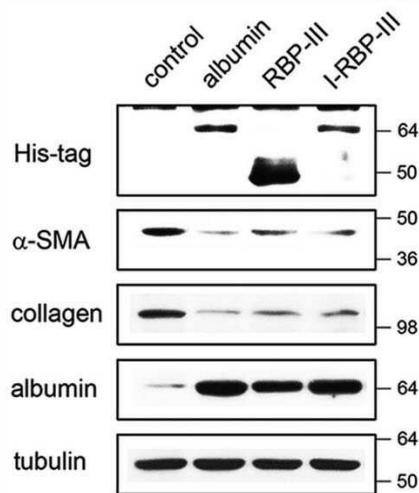
도면

도면1

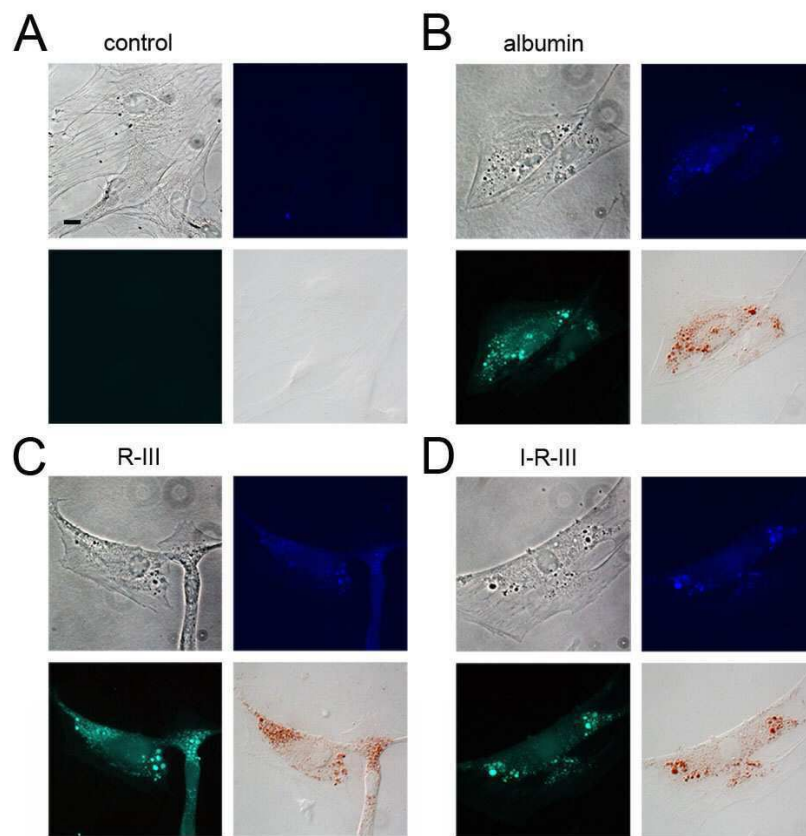
A



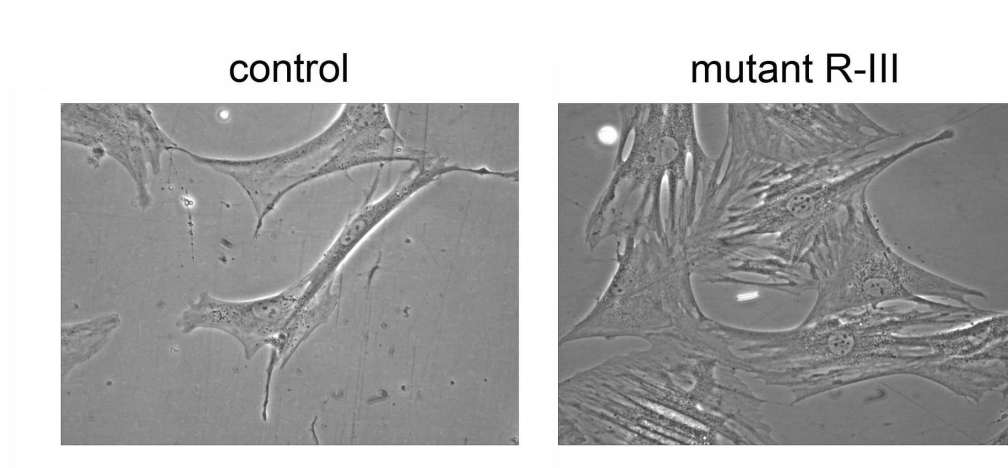
B



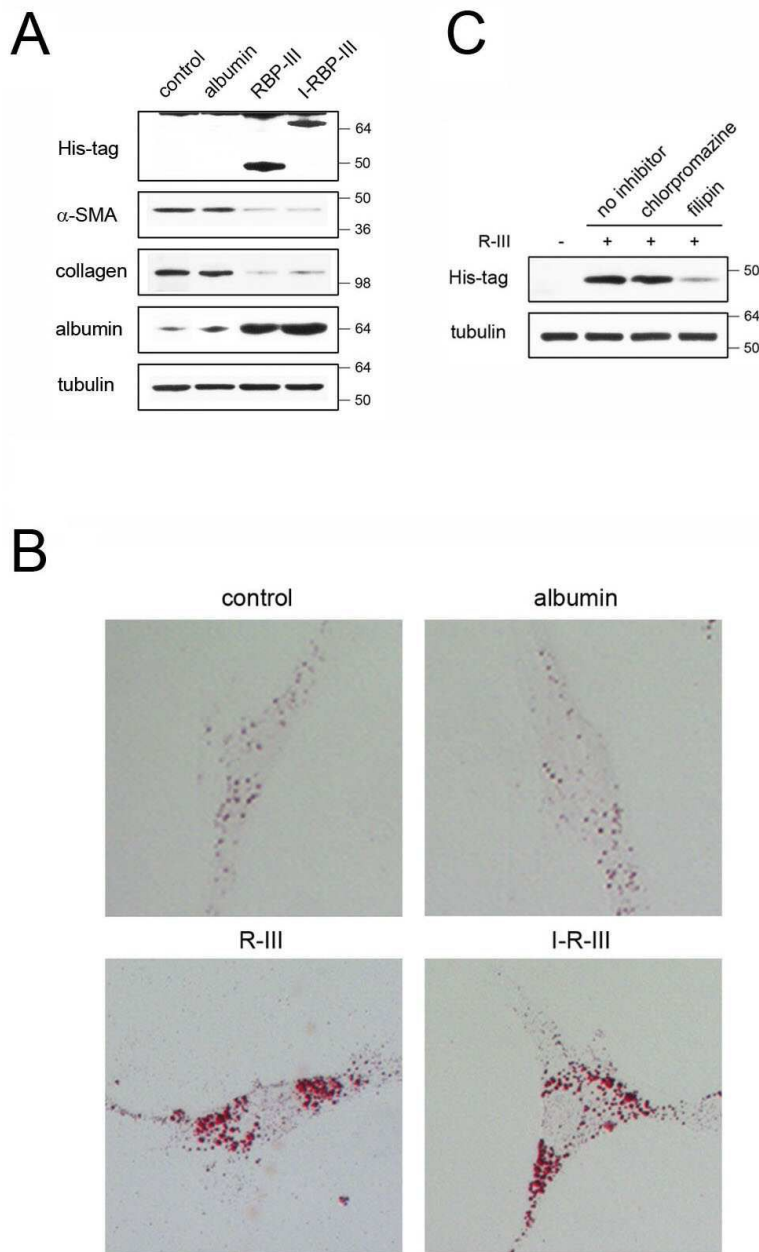
도면2



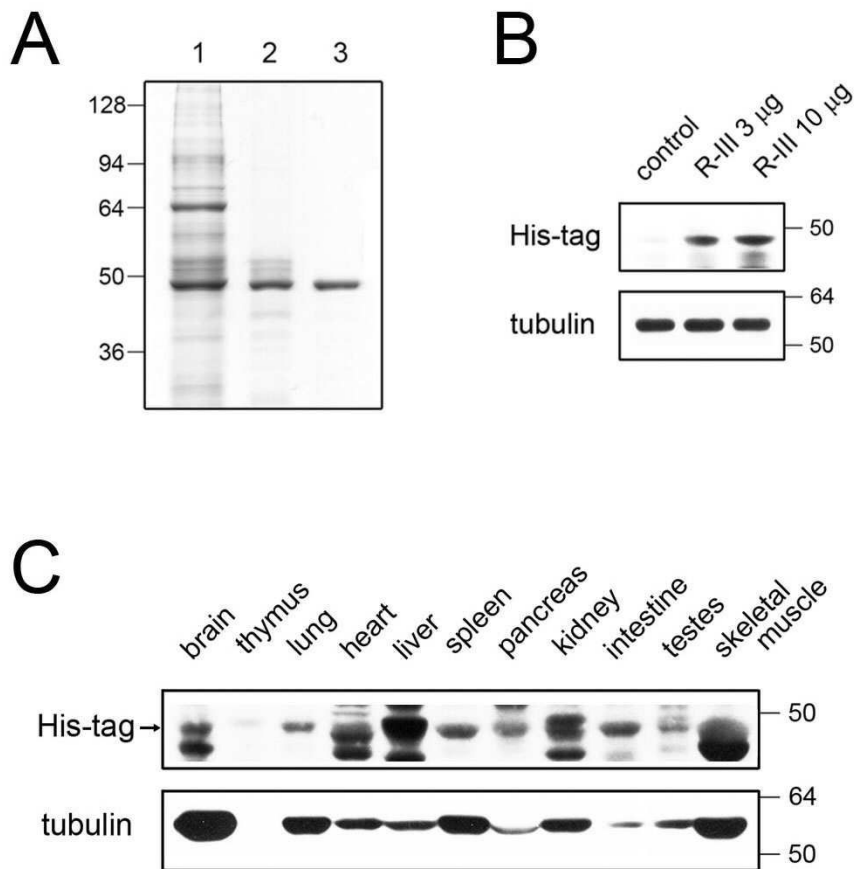
도면3



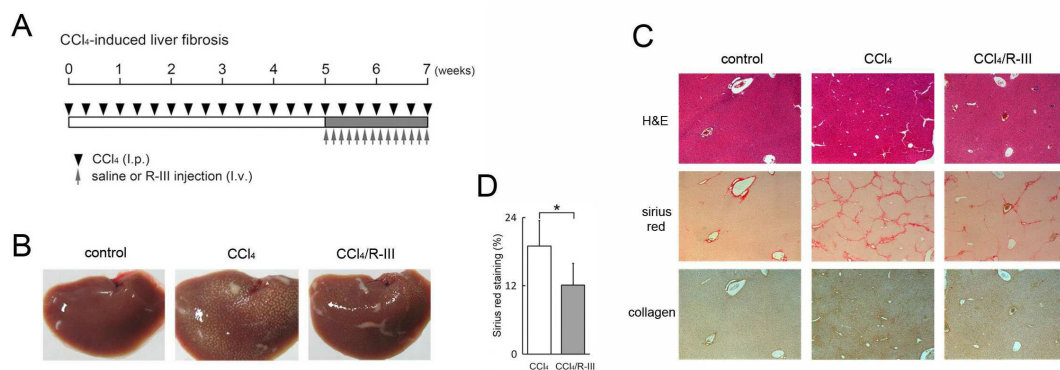
도면4



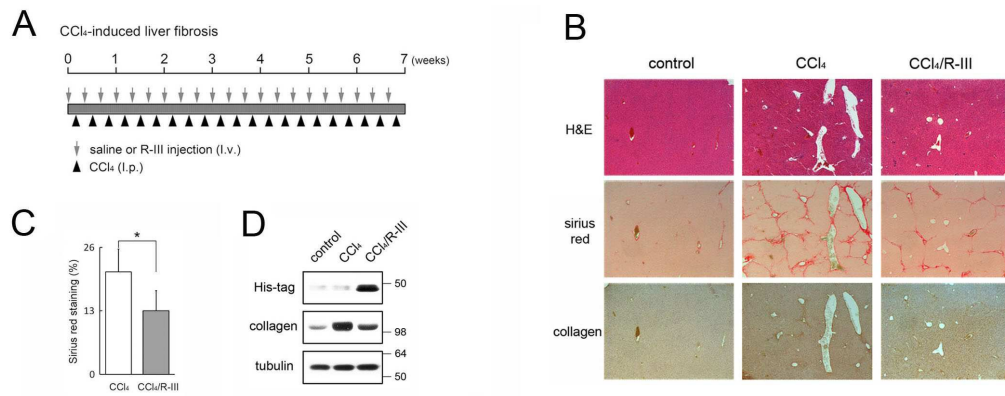
도면5



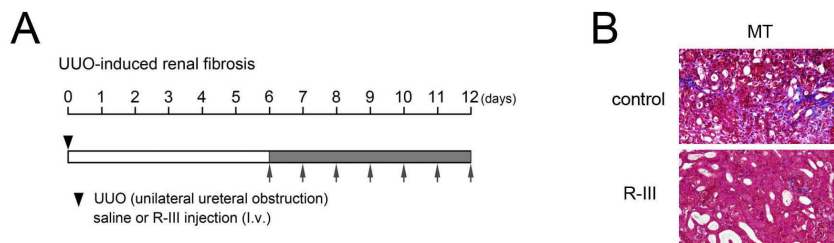
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> Fusion protein of albumin and retinol binding protein

<130> X110142

<150> KR10-2011-0018074

<151> 2011-02-28

<160> 31

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 1827

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgaagtggg taacctttat ttcccttctt ttctcttta gctcggtta ttccaggggt 60

gtgtttcgtc gagatgcaca caagagtgcg gttgctcatc ggtttaaaga ttggggagaa 120

gaaaatttca aagccttggg gttgattgcc ttgctcagt atcttcagca gtgtccattt 180

gaagatcatg taaaattagt gaatgaagta actgaatttg caaaaacatg tgttctgat 240

gagtcagctg aaaattgtga caaatcactt cataccttt ttggagacaa attatgcaca 300

gttgcaactc ttcgtgaaac ctatggtgaa atggctgact gctgtgcaaa acaagaacct 360
gagagaaatg aatgcttctt gcaacacaaa gatgacaacc caaacctccc ccgattggtg 420
agaccagagg ttgatgtgat gtgcaactgct tttcatgaca atgaagagac atttttgaaa 480
aaatacttat atgaaattgc cagaagacat ccttactttt atgccccgga actccttttc 540
tttgctaaaa ggtataaagc tgctttttaca gaatgttgcc aagctgctga taaagctgcc 600

tgctgtttgc caaagctcga tgaacttcgg gatgaaggga aggcttcgtc tgccaaacag 660
agactcaagt gtgccagctc caaaaattt ggagaaagag ctttcaaagc atgggcagta 720
gctcgcctga gccagagatt tcccaaagct gagtttgcag aagtttccaa gttagtgaca 780
gatcttacca aagtccacac ggaatgctgc catggagatc tgcttgaatg tgctgatgac 840
agggcggacc ttgccaagta tatctgtgaa aatcaagatt cgatctccag taaactgaag 900
gaatgctgtg aaaaacctct gttggaaaaa tcccactgca ttgccgaagt ggaaaatgat 960
gagatgcctg ctgacttgcc ttcattagct gctgattttg ttgaaagtaa ggatgtttgc 1020

aaaaactatg ctgaggcaaa ggatgtcttc ctgggcatgt ttttgtatga atatgcaaga 1080
aggcatcctg attactctgt cgtgctgctg ctgagacttg ccaagacata tgaaaccact 1140
ctagagaagt gctgtgccgc tgcagatcct catgaatgct atgccaaagt gttcgatgaa 1200
tttaaacctc ttgtggaaga gcctcagaat ttaatcaaac aaaattgtga gctttttgag 1260
cagcttggag agtacaattt ccagaatgcg ctattagttc gttacaccaa gaaagtaccc 1320
caagtgtcaa ctccaactct tgtagaggtc tcaagaaacc taggaaaagt gggcagcaaa 1380
tgttgtaaac atcctgaagc aaaaagaatg ccctgtgcag aagactatct atccgtggtc 1440

ctgaaccagt tatgtgtgtt gcatgagaaa acgccagtaa gtgacagagt caccaaatgc 1500
tgcacagaat ccttggtgaa caggcgacca tgcttttcag ctctggaagt cgatgaaaca 1560
tacgttccca aagagtttaa tgctgaaaca ttcaccttcc atgcagatat atgcacactt 1620
tctgagaagg agagacaaat caagaaacaa actgcacttg ttgagctcgt gaaacacaag 1680
cccaaggcaa caaaagagca actgaaagct gttatggatg atttcgcagc tttttagtag 1740
aagtgtgca aggtgacga taaggagacc tgctttgccg aggagggtaa aaaacttgtt 1800
gctgcaagtc aagctgcctt aggcctta 1827

<210> 2

<211> 666

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgaagtggg taacctttat ttcccttctt ttctcttita gctcggctta ttccaggggt 60
gtgtttcgtc gagatgcaca caagagtgag gttgctcatc ggtttaaaga ttgggagaa 120
gaaaatttca aagccttggg gttgattgcc ttgctcagt atcttcagca gtgtccattt 180
gaagatcatg taaaattagt gaatgaagta actgaatttg caaaaacatg tgttgctgat 240
gagtcagctg aaaattgtga caaatcactt catacccttt ttggagacaa attatgcaca 300
gttgcaactc ttctgtaaac ctatggtgaa atggctgact gctgtgcaa acaagaacct 360

gagagaaatg aatgcttctt gcaacacaaa gatgacaacc caaacctccc ccgattgggtg 420
agaccagagg ttgatgtgat gtgcactgct ttcatgaca atgaagagac atttttgaaa 480
aaatacttat atgaaattgc cagaagacat ccttactttt atgccccgga actccttttc 540
tttgctaaaa ggtataaagc tgcttttaca gaatgttgc aagctgctga taaagctgcc 600
tgcttgttc caaagctcga tgaacttcgg gatgaaggga aggcttcgtc tgccaaacag 660
agactc 666

<210> 3

<211> 612

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gaagagcctc agaatttaat caaacaaaat tgtgagcttt ttgagcagct tggagagtac 60
aaattccaga atgcgctatt agttcgttac accaagaaag taccccaagt gtcaactcca 120
actctttag aggtctcaag aaacctagga aaagtgggca gcaaatgttg taaacatcct 180
gaagcaaaaa gaatgccctg tgcagaagac tatctatccg tggctcctgaa ccagttagt 240
gtgttgcatg agaaaacgcc agtaagtac agagtcacca aatgctgcac agaatccttg 300
gtgaacaggc gaccatgctt ttgagctctg gaagtcgatg aaacatacgt tcccaagag 360
tttaatgctg aaacattcac cttccatgca gatatatgca cactttctga gaaggagaga 420

caaatcaaga acaaaactgc acttggtgag ctctgtaaac acaagcccaa ggcaacaaaa 480
gagcaactga aagctgttat ggatgatttc gcagcttttg tagagaagtg ctgcaaggct 540
gacgataagg agacctgctt tgccgaggag ggtaaaaaac ttgttgctgc aagtcaagct 600
gccttaggct ta 612

<210> 4

<211> 84

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4
 atgaagtggg taacctttat ttcccttctt ttctcttta gctcggctta ttccaggggt 60
 gtgtttcgtc gagatgcaca caag 84

<210> 5
 <211> 585
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 atgaagtggg tgtgggcgct cttgctgttg gcggcgctgg gcagcggcgg cgcgagagcg 60
 gactgccgag tgagcagctt ccgagtcaag gagaacttcg acaaggctcg cttctctggg 120
 acctggtacg ccatggccaa gaaggacccc gagggcctct ttctgcagga caacatcgtc 180
 gcggagtctt ccgtggacga gaccggccag atgagcgcca cagccaaggg ccgagtcctt 240
 cttttgaata actgggacgt gtgcgcagac atggtgggca ccttcacaga caccgaggac 300
 cctgccaaagt tcaagatgaa gtactggggc gtagcctcct ttctccagaa aggaaatgat 360
 gaccactgga tcgtcgacac agactacgac acgtatgccg tgcagtactc ctgccgcctc 420
 ctgaacctcg atggcacctg tgctgacagc tactccttcg tgttttcccg ggacccaac 480
 ggctgcccc cagaagcgca gaagattgta aggcagcggc aggaggagct gtgcctggcc 540
 aggcagtaca ggctgatcgt ccacaacggt tactgcgatg gcaga 585

<210> 6
 <211> 531
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 gagcgcgact gccgagtgag cagcttccga gtcaaggaga acttcgacaa ggctcgttc 60
 tctgggacct ggtacgcat ggccaagaag gaccccgagg gcctctttct gcaggacaac 120
 atcgtcgcgg agttctccgt ggacgagacc ggccagatga gcgccacagc caagggccga 180
 gtccgtcttt tgaataactg ggacgtgtgc gcagacatgg tgggcacctt cacagacacc 240
 gaggacctg ccaagttcaa gatgaagtac tggggcgtag cctcctttct ccagaaagga 300
 aatgatgacc actggatcgt cgacacagac tacgacacgt atgccgtgca gtactcctgc 360
 cgctcctga acctcgatgg cacctgtgct gacagctact ccttcgtgtt ttcccgggac 420
 cccaacggcc tgccccaga agcgcagaag attgtaaggc agcggcagga ggagctgtgc 480

ctggccaggc agtacaggct gatcgtccac aacggttact gcgatggcag a 531

<210> 7

<211> 549

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gagcgcgact gccgagtgag cagcttccga gtcaaggaga acttcgacaa ggctcgttc 60

tctgggacct ggtacgccat ggccaagaag gaccccagg gcctctttct gcaggacaac 120

atcgtcggg agttctccgt ggacgagacc ggccagatga gcgccacagc caagggccga 180

gtccgtcttt tgaataactg ggacgtgtgc gcagacatgg tgggcacctt cacagacacc 240

gaggacctg ccaagttaa gatgaagtac tggggcgtag cctcctttct ccagaaagga 300

aatgatgacc actggatcgt cgacacagac tacgacacgt atgccgtgca gtactcctgc 360

cgctcctga acctcgatgg cacctgtgct gacagctact ccttcgtgtt ttcccgggac 420

cccaacggcc tgccccaga agcgcagaag attgtaagc agcggcagga ggagctgtgc 480

ctggccaggc agtacaggct gatcgtccac aacggttact gcgatggcag atcagaaaga 540

aaccttttg 549

<210> 8

<211> 613

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala

20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu

35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val

50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp

65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp

85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala

100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln

115 120 125

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

130 135 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys

145 150 155 160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro

165 170 175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys

180 185 190

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu

195 200 205

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Gln Leu

210 215 220

Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp

225 230 235 240

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

245 250 255

Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser Val Asp

260 265 270

Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg Leu Leu

275 280 285

Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr Asp Thr

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335
 Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp Gly Thr
 340 345 350
 Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn Gly Leu
 355 360 365
 Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu Leu Cys

 370 375 380
 Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly
 385 390 395 400
 Arg Leu Glu Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu
 405 410 415
 Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg
 420 425 430
 Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val
 435 440 445

 Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu
 450 455 460
 Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn
 465 470 475 480
 Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr
 485 490 495
 Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala
 500 505 510
 Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr

 515 520 525
 Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln
 530 535 540
 Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
 545 550 555 560
 Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe
 565 570 575
 Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu

580 585 590

Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu His
595 600 605

His His His His His
610

<210> 9
<211> 619
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 9

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Gln Leu Glu Glu
20 25 30
Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly
35 40 45
Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val
50 55 60
Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly
65 70 75 80
Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro
85 90 95
Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu
100 105 110

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

Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln

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

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

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

Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly Arg Ser Arg Asp
 405 410 415
 Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu

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

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

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

610 615
 <210> 10
 <211> 407
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 Met Lys Trp Val Trp Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Leu Gly Ser Gly
 1 5 10 15

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

260 265 270
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 275 280 285
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 290 295 300
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 305 310 315 320
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 325 330 335
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 340 345 350
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 355 360 365
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 370 375 380
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 385 390 395 400
 Leu His His His His His His
 405
 <210> 11
 <211> 425
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Gln Leu Glu Glu
 20 25 30
 Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly
 35 40 45
 Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val

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

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

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

 275 280 285
 Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg Leu Leu Asn Asn Trp Asp
 290 295 300

Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr Asp Thr Glu Asp Pro Ala
 305 310 315 320
 Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala Ser Phe Leu Gln Lys Gly
 325 330 335
 Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp Tyr Asp Thr Tyr Ala Val
 340 345 350
 Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp Gly Thr Cys Ala Asp Ser
 355 360 365
 Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn Gly Leu Pro Pro Glu Ala
 370 375 380
 Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu Leu Cys Leu Ala Arg Gln
 385 390 395 400
 Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly Arg Ser Glu Arg
 405 410 415
 Asn Leu Leu His His His His His His
 420 425
 <210> 12
 <211> 800
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 20 25 30
 His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 35 40 45
 Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
 50 55 60
 Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 65 70 75 80
 Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp

85	90	95	
Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala			
100	105	110	
Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln			
115	120	125	
His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val			
130	135	140	
Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys			
145	150	155	160
Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro			
165	170	175	
Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys			
180	185	190	
Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu			
195	200	205	
Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys			
210	215	220	
Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val			
225	230	235	240
Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser			
245	250	255	
Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly			
260	265	270	
Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile			
275	280	285	
Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu			
290	295	300	
Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp			
305	310	315	320
Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser			
325	330	335	

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly

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

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
420 425 430
Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445
Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
450 455 460
Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480
Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg

485 490 495
Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510
Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525
Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
530 535 540
Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575
Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe

580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Leu Glu Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu
 610 615 620
 Asn Phe Asp Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys

 625 630 635 640
 Lys Asp Pro Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe
 645 650 655
 Ser Val Asp Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val
 660 665 670
 Arg Leu Leu Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe
 675 680 685
 Thr Asp Thr Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val
 690 695 700

 Ala Ser Phe Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr
 705 710 715 720
 Asp Tyr Asp Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu
 725 730 735
 Asp Gly Thr Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro
 740 745 750
 Asn Gly Leu Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu
 755 760 765
 Glu Leu Cys Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr

 770 775 780
 Cys Asp Gly Arg Ser Glu Arg Asn Leu Leu His His His His His His
 785 790 795 800

 <210> 13
 <211> 788
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

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

245 250 255
 Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys
 260 265 270
 Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys
 275 280 285
 Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp
 290 295 300
 Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met
 305 310 315 320

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

 385 390 395 400
 Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu
 405 410 415
 Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val
 420 425 430
 Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu
 435 440 445
 Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn
 450 455 460

 Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu
 465 470 475 480
 Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro
 485 490 495
 Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val

500 505 510
 Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu
 515 520 525
 Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu

 530 535 540
 Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala
 545 550 555 560
 Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro
 565 570 575
 Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe
 580 585 590
 Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr
 595 600 605

 Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser
 610 615 620
 Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala
 625 630 635 640
 Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln
 645 650 655
 Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys
 660 665 670
 Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu

 675 680 685
 Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe
 690 695 700
 Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile
 705 710 715 720
 Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
 725 730 735
 Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val
 740 745 750

Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu

755

760

765

Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu His His

770

775

780

His His His His

785

<210> 14

<211> 1842

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

atgaagtggg taacctttat ttcccttctt tttctcttta gctcggctta ttccaggggt 60

gtgtttcgtc gagatgcaca caagagttag gtgtctcatc ggtttaaaga ttggggagaa 120

gaaaatttca aagccttggg gtgtattgcc ttgtctcagt atcttcagca gtgtccattt 180

gaagatcatg taaaattagt gaatgaagta actgaatttg caaaaacatg tgttgctgat 240

gagtcagctg aaaattgtga caaatcactt catacccttt ttggagacaa attatgcaca 300

gttgcaactc ttcgtgaaac ctatggtgaa atggctgact gctgtgcaaa acaagaacct 360

gagagaaatg aatgcttctt gcaacacaaa gatgacaacc caaacctccc ccgattgggtg 420

agaccagagg ttgatgtgat gtgcactgct ttcatgaca atgaagagac atttttgaaa 480

aaatacttat atgaaattgc cagaagacat ccttactttt atgccccgga actccttttc 540

tttgctaaaa ggtataaagc tgcttttaca gaatgttggc aagctgctga taaagctgcc 600

tgctgttgc caaagctcga tgaacttcgg gatgaaggga aggcttcgtc tgccaaacag 660

agactccaat tggagcgcga ctgccgagtg agcagcttcc gagtcaagga gaacttcgac 720

aaggctcgtc tctctgggac ctggtagccc atggccaaga aggaccccga gggcctcttt 780

ctgcaggaca acatcgtcgc ggagtctctc gtggacgaga ccggccagat gagcgccaca 840

gccaaaggcc gagtccgtct tttgaataac tgggacgtgt gcgcagacat ggtgggcacc 900

ttcacagaca ccgaggaccc tgccaagtgc aagatgaagt actggggcgt agcctccttt 960

ctccagaaag gaaatgatga ccactggatc gtcgacacag actacgacac gtagccgtg 1020

cagtactcct gccgcctcct gaacctcgat ggcacctgtg ctgacagcta ctcttcgtg 1080

ttttccgggg accccaacgg cctgccccca gaagcgcaga agattgtaag gcagcggcag 1140

gaggagctgt gcctggccag gcagtacagg ctgatctgcc acaacggtta ctgcgatggc 1200

agactcgagg aagagcctca gaatttaatc aaacaaaatt gtgagctttt tgagcagctt 1260

ggagagtaca aattccagaa tgcgtattta gttcgttaca ccaagaaagt accccaagt	1320
tcaactccaa ctcttgtaga ggtctcaaga aacctaggaa aagtgggcag caaatgttgt	1380
aaacatcctg aagcaaaaag aatgccctgt gcagaagact atctatccgt ggtcctgaac	1440
cagttatgtg tgttgcatga gaaaacgcca gtaagtgaca gagtcaccaa atgctgcaca	1500
gaatccttgg tgaacaggcg accatgcttt tcagctctgg aagtcgatga aacatacgtt	1560
cccaaagagt ttaatgctga aacattcacc ttccatgcag atatatgcac actttctgag	1620
aaggagagac aaatcaagaa acaaactgca cttgttgagc tcgtgaaaca caagcccaag	1680
gcaacaaaag agcaactgaa agctgttatg gatgatttcg cagcttttgt agagaagtgc	1740
tgcaaggctg acgataagga gacctgcttt gccgaggagg gtaaaaaact tgttgctgca	1800
agtcaagctg ccttaggctt acatcatcat catcatcatt aa	1842
<210> 15	
<211> 1860	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 15	
atgaagtggg taacctttat ttcccttctt ttctcttta gctcggtta ttccaggggt	60
gtgtttcgtc gagatgcaca caagcaattg gaagagcctc agaatttaat caaacaaaat	120
tgtgagcttt ttgagcagct tggagagtac aaattccaga atgcgctatt agttcgttac	180
accaagaaaag taccccaagt gtcaactcca actctttag aggtctcaag aaacctagga	240
aaagtgggca gcaaatgttg taaacatcct gaagcaaaaa gaatgccctg tgcagaagac	300
tatctatccg tggctctgaa ccagttatgt gtgttgcatg agaaaacgcc agtaagtgc	360
agagtcacca aatgctgcac agaatccttg gtgaacaggc gaccatgctt ttcagctctg	420
gaagtcgatg aaacatacgt tcccaaagag tttaatgctg aaacattcac cttccatgca	480
gatatatgca cactttctga gaaggagaga caaatcaaga aacaaactgc acttgttgag	540
ctcgtgaaac acaagcccaa ggcaacaaaa gagcaactga aagctgttat ggatgatttc	600
gcagcttttg tagagaagtg ctgcaaggct gacgataagg agacctgctt tgccgaggag	660
ggtaaaaaac ttgttgctgc aagtcaagct gccttaggct tactcgagga gcgcgactgc	720
cgagtgagca gcttccgagt caaggagaac ttcgacaagg ctcgcttctc tgggacctgg	780
tacgccatgg ccaagaagga ccccaggggc ctctttctgc aggacaacat cgtcgcggag	840
ttctccgtgg acgagaccgg ccagatgagc gccacagcca agggccgagt ccgtcttttg	900
aataactggg acgtgtgcgc agacatggtg ggcaccttca cagacaccga ggacctgcc	960

aagttcaaga tgaagtactg gggcgtagcc tcctttctcc agaaaggaaa tgatgaccac	1020
tggatcgctg acacagacta cgacacgtat gccgtgcagt actcctgccg cctcctgaac	1080
ctcgatggca cctgtgctga cagctactcc ttcgtgtttt cccgggaccc caacggcctg	1140
ccccagaag cgcagaagat tgtaaggcag cggcaggagg agctgtgcct ggccaggcag	1200
tacaggctga tcgtccacaa cggttactgc gatggcagat ctagagatgc acacaagagt	1260
gaggttgctc atcggtttaa agatttggga gaagaaaatt tcaaagcctt ggtgttgatt	1320
gcctttgctc agtatcttca gcagtgtcca tttgaagatc atgtaaaatt agtgaatgaa	1380
gtaactgaat ttgcaaaaac atgtgttgct gatgagtcag ctgaaaattg tgacaaatca	1440
cttcataccc tttttggaga caaattatgc acagttgcaa ctcttcgtga aacctatggt	1500
gaaatggctg actgctgtgc aaaacaagaa cctgagagaa atgaatgctt cttgcaacac	1560
aaagatgaca acccaaacct ccccgattg gtgagaccag aggttgatgt gatgtgcact	1620
gcttttcatg acaatgaaga gacatTTTTTg aaaaaatact tatatgaaat tgccagaaga	1680
catccttact tttatgcccc ggaactcctt ttccttgcta aaaggtataa agctgctttt	1740
acagaatgtt gccaaagtcg tgataaagct gcctgcctgt tgccaaagct cgatgaactt	1800
cgggatgaag ggaaggcttc gtctgccaaa cagagactcc atcatcatca tcatcattaa	1860
<210> 16	
<211> 1224	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 16	
atgaagtggg tgtgggcgct cttgtctgtt gcggcgttgg gcagcggcgg cgcggagcgc	60
gactgccgag tgagcagctt ccgagtcaag gagaacttcg acaaggctcg cttctctggg	120
acctggtacg ccatggccaa gaaggacccc gagggcctct ttctgcagga caacatcgtc	180
gcggagtctt ccgtggacga gaccggccag atgagcgcca cagccaaggg ccgagtcctt	240
cttttgaata actgggacgt gtgcgcagac atggtgggca ccttcacaga caccgaggac	300
cctgccaaat tcaagatgaa gtactggggc gtagecctct ttctccagaa aggaaatgat	360
gaccactgga tcgtcgacac agactacgac acgtatgccg tgcagtactc ctgccgcctc	420
ctgaacctcg atggcacctg tgctgacagc tactccttcg tgttttcccg ggaccccaac	480
ggcctgcccc cagaagcgca gaagattgta aggagcgggc aggaggagct gtgcctggcc	540
aggcagtaca ggctgatcgt ccacaacggt tactgcatg gcagactcga ggaagagcct	600

cagaatttaa tcaaacaaaa ttgtgagctt tttagagcagc ttggagagta caaatccag 660
aatgcgctat tagttcgta caccaagaaa gtacccaag tgtcaactcc aactcttga 720
gaggtctcaa gaaacctagg aaaagtgggc agcaaatgtt gtaaacatcc tgaagcaaaa 780
agaatgccct gtgcagaaga ctatctatcc gtggctctga accagttatg tgtgttgc 840

gagaaaacgc cagtaagtga cagagtcacc aaatgctgca cagaatcctt ggtgaacagg 900
cgacatgct tttcagctct ggaagtcgat gaaacatacg tteccaaaga gtttaatgct 960
gaaacattca ccttccatgc agatatatgc acactttctg agaaggagag acaaatcaag 1020
aaacaaactg cacttgttga gtcgtgaaa cacaagccca aggcaacaaa agagcaactg 1080
aaagctgtta tggatgattt cgcagctttt gtagagaagt gctgcaaggc tgacgataag 1140
gagacctgct ttgccgagga gggtaaaaaa cttgttgcctg caagtcaagc tgccttaggc 1200
ttacatcatc atcatcatca ttaa 1224

<210> 17

<211> 1278

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

atgaagtggg taacctttat ttcccttctt ttctcttta gctcggtta ttccaggggt 60
gtgttctgc gagatgcaca caagcaattg gaagagcctc agaatttaaat caaacaaaat 120
tgtgagcttt ttgagcagct tggagagtac aaattccaga atgcgctatt agttcgttac 180
accaagaaag tacccaagt gtcaactcca actctttag aggtctcaag aaacctagga 240
aaagtgggca gcaaatgtt taaacatcct gaagcaaaaa gaatgccctg tgcagaagac 300
tatctatccg tggctctgaa ccagttatgt gtgttgcatg agaaaacgcc agtaagtgc 360

agagtcacca aatgctgcac agaatccttg gtgaacaggc gaccatgctt ttcagctctg 420
gaagtcgatg aaacatacgt tccaaagag tttaatgctg aaacattcac cttccatgca 480
gatatatgca cactttctga gaaggagaga caaatcaaga aacaaactgc acttgttgag 540
ctcgtgaaac acaagcccaa ggcaacaaaa gagcaactga aagctgttat ggatgatttc 600
gcagcttttg tagagaagtg ctgcaaggct gacgataagg agacctgctt tgccgaggag 660
ggtaaaaaac ttgttgcgc aagtcaagct gccttaggct tactcgagga gcgcgactgc 720
cgagtgcga gcttccgagt caaggagaac ttcgacaagg ctcgcttctc tgggacctgg 780

tacgccatgg ccaagaagga ccccgagggc ctctttctgc aggacaacat cgtcgcggag 840
ttctccgtgg acgagaccgg ccagatgagc gccacagcca agggccgagt ccgtcttttg 900

aataactggg acgtgtgcgc agacatggtg ggcaccttca cagacaccga ggaccctgcc	960
aagttcaaga tgaagtactg gggcgtagcc tcctttctcc agaaaggaaa tgatgaccac	1020
tggatcgtcg acacagacta cgacacgtat gccgtgcagt actcctgccg cctcctgaac	1080
ctcgaatggca ccigtgtga cagctactcc ttcgtgtttt cccgggaccc caacggcctg	1140
ccccagaag cgcagaagat tgtaaggcag cggcaggagg agctgtgcct ggccaggcag	1200
tacaggctga tcgtccacaa cggttactgc gatggcagat cagaaagaaa ccttttgcac	1260
catcatcatc atcattag	1278
<210> 18	
<211> 2403	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 18	
atgaagtggg taacctttat ttcccttctt ttctcttta gctcggctta ttccaggggt	60
gtgtttcgtc gagatgcaca caagagttag gttgctcatc ggtttaagaa ttggggagaa	120
gaaaatttca aagccttggg gttgattgcc tttgctcagt atcttcagca gtgtccattt	180
gaagatcatg taaaattagt gaatgaagta actgaatttg caaaaacatg tgttgctgat	240
gagtcagctg aaaattgtga caaatcactt catacccttt ttggagacaa attatgcaca	300
gttgcaactc ttcgtgaac ctatggtgaa atggctgact gctgtgcaaa acaagaacct	360
gagagaaatg aatgcttctt gcaacacaaa gatgacaacc caaacctccc ccgattgggtg	420
agaccagagg ttgatgtgat gtgcactgct ttcatgaca atgaagagac atttttgaaa	480
aaatacttat atgaaattgc cagaagacat ccttactttt atgccccgga actccttttc	540
tttgctaaaa ggtataaagc tgcttttaca gaatgttgcc aagctgctga taaagctgcc	600
tgctgtttgc caaagctcga tgaacttcgg gatgaaggga aggcttcgtc tgccaacacg	660
agactcaagt gtgccagtct ccaaaaattt ggagaaagag ctttcaaagc atgggcagta	720
gctcgcctga gccagagatt tcccaaagct gagtttgagc aagtttccaa gttagtgcac	780
gatcttacca aagtccacac ggaatgctgc catggagatc tgcttgaatg tgctgatgac	840
agggcggacc ttgccaagta tatctgtgaa aatcaagatt cgatctccag taaactgaag	900
gaatgctgtg aaaaacctct gttggaaaaa tccactgca ttgccgaagt ggaaaatgat	960
gagatgcctg ctgacttgcc ttcattagct gctgattttg ttgaaagtaa ggatgtttgc	1020
aaaaactatg ctgaggcaaa ggatgtcttc ctgggcatgt tttgtatga atatgcaaga	1080
aggcatcctg attactctgt cgtgtgtgtg ctgagacttg ccaagacata tgaaaccact	1140

ctagagaagt gctgtgccgc tgcagatcct catgaatgct atgccaaagt gttcgaatgaa	1200
tttaaacctc ttgtggaaga gcctcagaat ttaatcaaac aaaattgtga gctttttgag	1260
cagcttggag agtacaaatt ccagaatgcg ctattagtgc gttacaccaa gaaagtaccc	1320
caagtgtcaa ctccaactct tgtagaggct tcaagaaacc taggaaaagt gggcagcaaa	1380
tgttgtaaac atcctgaagc aaaaagaatg ccctgtgcag aagactatct atccgtggtc	1440
ctgaaccagt tatgtgtgtt gcatgagaaa acgccagtaa gtgacagagt caccaaatgc	1500
tgcacagaat ccttgggtgaa caggcgacca tgcttttcag ctctggaagt cgatgaaaca	1560
tacgttccca aagagtttaa tgcgtgaaaca ttcaccttcc atgcagatat atgcacactt	1620
tctgagaagg agagacaaat caagaacaaa actgcacttg ttgagctcgt gaaacacaag	1680
cccaaggcaa caaaagagca actgaaagct gttatggatg atttcgcagc tttttagag	1740
aagtgtctga aggtcgacga taaggagacc tgctttgccg aggagggtaa aaaacttgtt	1800
gctgcaagtc aagctgcctt aggcttactic gaggagcgcg actgccgagt gagcagcttc	1860
cgagtcaagg agaacttcga caaggctcgc ttctctggga cctggtagcg catggccaag	1920
aaggaccccg agggcctctt tctgcaggac aacatcgctc cggagtcttc cgtggacgag	1980
accggccaga tgagcgccac agccaagggc cgagtcctgc ttttgaataa ctgggacgtg	2040
tgcgagaca tgggtggcac cttcacagac accgaggacc ctgccaagtt caagatgaag	2100
tactggggcg tagcctctt tctccagaaa ggaaatgatg accactggat cgtcgacaca	2160
gactacgaca cgtatgccgt gcagtactcc tgccgcctcc tgaacctcga tggcacctgt	2220
gctgacagct actccttctg gttttcccg gacccaacg gcctgcccc agaagcgag	2280
aagattgtaa ggcagcgga ggaggagctg tgcttgcca ggcagtagag gctgacgtc	2340
cacaacggtt actgcgatgg cagatcagaa agaaaccttt tgcacatca tcatcatcat	2400
tag	2403
<210> 19	
<211> 2367	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 19	
atgaagtggg tgtgggcgct cttgctgttg gcggcgctgg gcagcggccg cgcgagcgcg	60
gactgccgag tgagcagctt ccgagtcaag gagaacttcg acaaggctcg cttctctggg	120
acctggtacg ccatggccaa gaaggacccc gagggcctct ttctgcagga caacatcgtc	180
gcggagttct ccgtggacga gaccggccag atgagcgcca cagccaaggg ccgagtcggt	240

cttttgaata actgggacgt gtgcgcagac atggtgggca ccttcacaga caccgaggac	300
cctgccaaagt tcaagatgaa gtactggggc gtacgtcctt tttccagaa aggaaatgat	360
gaccactgga tcgtcgacac agactacgac acgtatgccg tgcagtactc ctgccgcctc	420
ctgaacctcg atggcacctg tgctgacagc tactccttcg tgttttcccg ggacccaac	480
ggcctgcccc cagaagcgca gaagattgta aggcagcggc aggaggagct gtgcctggcc	540
aggcagtaca ggctgatcgt ccacaacggt tactgcatg gcagactcga ggatgcacac	600
aagagtgagg ttgctcatcg gtttaaagat ttgggagaag aaaatttcaa agccttggtg	660
ttgattgcct ttgctcagta tcttcagcag tgtccatttg aagatcatgt aaaattagt	720
aatgaagtaa ctgaatttgc aaaaacatgt gttgctgatg agtcagctga aaattgtgac	780
aaatcacttc ataccctttt tggagacaaa ttatgcacag ttgcaactct tcgtgaaacc	840
tatggtgaaa tggtgactg ctgtgcaaaa caagaacctg agagaaatga atgcttcttg	900
caacacaaag atgacaaccc aaacctcccc cgattggtga gaccagaggt tgatgtgatg	960
tgcactgctt ttcatgacaa tgaagagaca tttttgaaaa aatacttata tgaaattgcc	1020
agaagacatc cttactttta tgccccggaa ctccctttct ttgctaaaag gtataaagct	1080
gcttttacag aatgttgcca agctgctgat aaagctgcct gcctgttgcc aaagctcgat	1140
gaacttcggg atgaaggga ggcttcgtct gccaaacaga gactcaagtg tgccagtctc	1200
caaaaatttg gagaaagagc tttcaaagca tgggcagtag ctgcctgag ccagagattt	1260
cccaaagctg agtttgaga agtttccaag ttagtgacag atcttaccac agtccacacg	1320
gaatgctgcc atggagatct gcttgaatgt gctgatgaca gggcggacct tgccaagtat	1380
atctgtgaaa atcaagattc gatctccagt aaactgaagg aatgctgtga aaaacctctg	1440
ttggaaaaat cccactgcat tgccgaagtg gaaaatgatg agatgcctgc tgacttgct	1500
tcattagctg ctgattttgt tgaaagtaag gatgtttgca aaaactatgc tgaggcaaag	1560
gatgtcttcc tgggcatgtt tttgtatgaa tatgcaagaa ggcatcctga ttactctgtc	1620
gtgtgctgc tgagacttgc caagacatat gaaaccactc tagagaagtg ctgtgccgt	1680
gcagatcctc atgaatgcta tgccaaagtg ttcgatgaat ttaaacctct tgtggaagag	1740
cctcagaatt taatcaaaaa aaattgtgag ctttttgagc agcttgaga gtacaaattc	1800
cagaatgcgc tattagtctg ttacaccaag aaagtacccc aagtgtcaac tccaactctt	1860
gtagaggtct caagaaacct agggaaagtg ggcagcaaat gttgtaaaca tctgaagca	1920
aaaagaatgc cctgtgcaga agactatcta tccgtgtgcc tgaaccagtt atgtgtgtg	1980
catgagaaaa cgccagtaag tgacagagtc accaaatgct gcacagaatc cttggtgaac	2040
aggcgacat gcttttcagc tctggaagtc gatgaaacat acgttccca agagttaaat	2100

gctgaaacat tcaccttcca tgcagatata tgcacacttt ctgagaagga gagacaaatc 2160

aagaacaaaa ctgcacttgt tgagctcgtg aaacacaagc ccaaggcaac aaaagagcaa 2220

ctgaaagctg ttatggatga tttcgcagct tttgtagaga agtgctgcaa ggctgacgat 2280

aaggagacct gctttgccga ggagggtaaa aaacttggtg ctgcaagtca agctgcctta 2340

ggcttacatc atcatcatca tcattaa 2367

<210> 20

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer for albumin domain I in rat

<400> 20

ggggtacccc accatgaagt gggtaacctt tc 32

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer for albumin domain I in rat

<400> 21

ccccaattgc atcctctgac ggacagc 27

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer for RBP(55-585) in rat

<400> 22

gggcaattgg agcgcgactg cagggtg 27

<210> 23

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer for RBP(55-585) in rat

<400> 23

cccctcgagt ctgctttgac agtaacc 27

<210> 24
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer for albumin domain III in rat

<400> 24
 gggctcgagg aagaacctaa gaacttg 27

<210> 25
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer for albumin domain III in rat

<400> 25
 ggctctagat taatgatgat gatgatgatg ggctaaggct tctttgct 48

<210> 26
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer for RBP(1-585) in rat

<400> 26
 gcggaattcc accatggagt gggtgtgggc 30

<210> 27
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer for RBP(1-585) in rat

<400> 27
 cccctcgagt ctgctttgac agtaacc 27

<210> 28
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer for albumin domain III in mouse

<400> 28
 gggctcgagg aagagcctaa gaacttg 27

<210> 29
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antisense primer for albumin domain III in mouse
 <400> 29
 ggctctagat taatgatgat gatgatgatg ggctaagggtg tctttgca 48
 <210> 30
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sense primer for RBP(1-585) in mouse
 <400> 30
 gcggaattcc accatggagt ggggtgtgggc 30
 <210> 31
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer for RBP(1-585) in mouse
 <400> 31
 cccctcgagc ctgctttgac agtaacc 27