(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0047874
(43) 공개일자 2013년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/56 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0112676
(22) 출원일자 2011년11월01일
심사청구일자 2012년05월31일
기술이전 희망 : **기술양도**, **실시권허여**, **기술지도**

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산 남구 무거2동 산29
(72) 발명자
최혜선
울산광역시 남구 대학로1번길 18-16, 일와그린빌라 401호 (무거동)
김운기
경상남도 양산시 일동4길 5 (중부동)
케케
울산광역시 남구 대학로 93, 청운학사 602호 (무거동, 울산대학교)
(74) 대리인
특허법인 충정

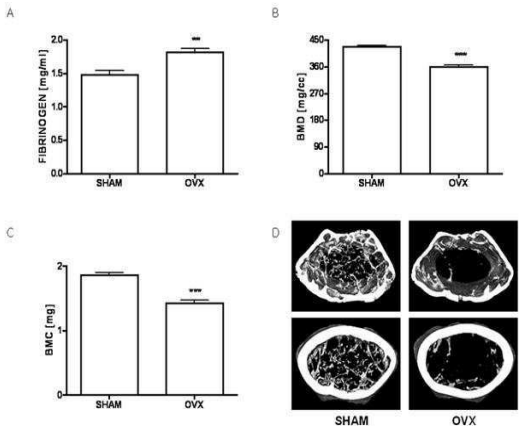
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **골 손실 진단 마커로서의 피브리노겐의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 골 손실 진단 마커로서의 피브리노겐의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 피브리노겐 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 피브리노겐 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 포함하는 골 손실 진단용 조성물, 피검체로부터 분리된 혈액 내의 피브리노겐 함량을 정상인 혈액 내의 피브리노겐 함량과 비교하는 단계를 포함하는 골 손실 여부를 예측하기 위해 정보를 제공하는 방법 및 피브리노겐의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 골 손실 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 골 손실 진단용 신규 바이오마커인 피브리노겐은 골 손실이 유발되는 경우 혈장 내에 그 함량이 증가되는 것으로 나타남에 따라 환자들로부터 혈액을 채취하여 혈장 내 함유된 피브리노겐의 함량을 측정하는 방법으로 통해 골손실 여부 및 골손실로 인해 유발되는 질환의 발병 가능성을 손쉽고 간단하게 진단할 수 있는 효과가 있으며, 나아가 피브리노겐의 발현 억제제 또는 활성 억제제의 경우 골손실 관련 질환의 예방 또는 치료할 수 있어 골 손실 관련 질환의 새로운 치료제를 제공할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 A090080
부처명 보건복지부
연구사업명 보건의료기술진흥사업
연구과제명 TLR4자극에 의한 골대사 연구
주관기관 울산대학교
연구기간 2009.05.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

피브리노겐(fibrinogen) 유전자 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 피브리노겐 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 포함하는 골 손실 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 피브리노겐 유전자는 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3인 것을 특징으로 하는 골 손실 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 물질은 피브리노겐 단백질에 특이적으로 결합 가능한 항체이거나 피브리노겐 유전자에 특이적으로 결합 가능한 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 골 손실 진단용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 피브리노겐은 폐경기로 인해 골 손실이 유발될 경우 혈액 내에서 함량이 증가되어 있는 것을 특징으로 하는 골 손실 진단용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 피브리노겐은 파골세포의 형성 촉진, 액틴 링(actin ring) 형성 촉진 또는 골 흡수 촉진 작용을 갖는 것을 특징으로 하는 골 손실 진단용 조성물.

청구항 6

피검체로부터 분리된 혈액 내의 피브리노겐 함량을 정상인 혈액 내의 피브리노겐 함량과 비교하는 단계를 포함하는 골 손실 여부를 예측하기 위해 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 혈액 내의 피브리노겐 함량은 피브리노겐 유전자에 특이적으로 결합 가능한 프라이머 또는 프로브를 사용하거나, 피브리노겐 단백질에 특이적으로 결합 가능한 항체를 사용하여 측정하는 것을 특징으로 하는 골 손실 여부를 예측하기 위해 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 측정은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블럿, 노던 블럿, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay) 및 면역조직화학적 분석(immunohistochemical analysis)으로 이루어진 군중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 골 손실 여부를 예측하기 위해 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

피브리노겐의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 골 손실 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 골 손실 관련 질환은 골다공증, 골감소증 또는 장기염증에 수반된 골파괴증 인 것을 특징으로 하는 골 손실 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 폐경기 후 나타나는 골 손실 및 이로 인한 골 질환의 발병 여부를 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 새로운 진단 마커로서 피브리노겐의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 뼈(bone)는 인체의 연조직과 체중을 지탱해주고 내부기관을 둘러싸서 내부 장기를 외부의 충격으로부터 보호한다. 또한 근육이나 장기를 구조적으로 지탱할 뿐만 아니라 체내의 칼슘이나 다른 필수 무기질 즉 인이나 마그네슘과 같은 물질을 저장하는 인체의 중요한 부분 중 하나이다. 따라서 성장이 끝난 성인의 뼈는 멈추지 않고 죽는 날까지 오래된 뼈는 제거하고 새로운 뼈로 대체하는 생성과 흡수과정을 매우 역동적, 지속적으로 반복 재생하면서 균형을 유지하게 된다. 이를 뼈의 재형성(bone remodeling)이라고 한다. 이러한 뼈의 재형성은 성장과 스트레스에 의해서 일어나는 뼈의 미세한 손상을 회복시키고 적절히 뼈의 기능을 유지하는데 필수적이다.

[0003] 뼈의 재형성에는 크게 두 종류의 세포가 관여하는 것으로 알려져 있다. 두 세포 중 하나는 뼈를 생성하는 조골세포(osteoblast)이고, 다른 하나는 뼈를 파괴하는 파골세포(osteoclast)이다. 조골세포는 RANKL(receptor activator of NF-κB ligand: 이하 간략하게 'RANKL'이라 함)과 이것의 유도 수용체(decoy receptor)인 OPG(osteoprotegerin)를 생성한다. RANKL이 파골 전구세포(osteoclast progenitor cells) 표면에 있는 수용체인 RANK(receptor activator of NF-κB: 이하 간략하게 'RANK'라 함)에 결합하면 파골 전구세포가 파골세포로 분화되어 골 흡수(resorption)가 일어난다. 자세하게는 RANKL 자극에 의한 세포내 칼슘 신호 전달로 파골 전구세포에서 파골세포의 분화를 조절하는 핵심 전사인자로 알려져 있는 NFAT(nuclear factor of activated T cells: 이하 간단하게 'NFAT'라 함)의 발현이 유도되고, 그 후 세포외 신호조절인산화효소(extracellular signal-regulated kinase: 이하 간단하게 'ERK'라 함), NF-κB, p38 MAP kinase 등의 활성화가 NFAT의 자가증폭(autoamplification)을 유발하여 활성이 지속되는 것이다.

[0004] 따라서 오래된 뼈의 흡수 또는 파괴는 이와 같은 기작을 통해 파골세포에 의해 이루어지며, 이는 뼈에 구멍을 내어 적은 양의 칼슘이 혈류로 방출되어 신체기능을 유지하는데 사용된다(William J. et al., NATURE., 423, pp.337342, 2033). 또한, 파골세포는 실제적인 뼈의 흡수작용을 할 때는 다핵세포로 융합된 후 그 구조가 변하여 주름진 테두리를 형성하며, 골 기질 표면에 흡착하여 산성화 환경에서 카텝신(cathepsin) K 나 H+-ATPase 등 많은 효소의 작용으로 뼈를 흡수한다. 이에 반해, 조골세포는 교원질로 구멍을 채우고 칼슘과 인의 침적물(hydroxyapatite)을 덮어서 단단한 새로운 뼈를 만들어 골격을 재건하게 된다.

[0005] 성인의 경우 매년 골격의 약 10-30%가 이런 과정을 통하여 재형성되며, 파골속도와 조골 속도가 동일해야만 전과 같은 골밀도를 유지할 수 있다. 정상 성인에서는 골흡수 양과 골형성 양 사이에는 항상 균형이 유지되고 있다. 이와 같이 중요한 뼈에 균형이 깨질 경우 많은 질병이 야기될 수 있는데, 이러한 질환을 골대사 질환이라 한다.

[0006] 골대사 질환 중 고령사회에서 큰 문제로 대두되고 있는 골다공증은 골의 화학적 조성에는 큰 변화 없이 단위 용적내의 골량(bone mass)이 감소하여 경미한 충격에도 쉽게 골절을 일으킬 수 있는 질환이다. 특히 폐경 후 여성들의 경우 에스트로겐의 분비부족으로 인하여 그 발생빈도가 비교적 높게 나타난다고 알려져 있다.

[0007] 일반적으로 여성이 폐경기에 접어들면 에스트로겐을 생성하지 못하게 되는데, 에스트로겐의 분비 감소는 여성의 비뇨생식계통 뿐만 아니라 신체전반에 걸쳐 큰 영향을 미치게 되며, 배란이 중단되어 월경이 사라지는 것을 폐경이라 한다. 또한, 40세 이전에 발생하는 미숙 폐경은 원인 미확인의 난소 부전으로 통칭되며, 이는 다량의 장기간에 걸친 흡연이나, 고해발 고도에서의 거주, 영양 불량 등과 관련이 있는 것으로 믿어지고 있다, 한편, 인위적 폐경은 난소절제술, 화학요법, 골반에 대한 방사선 조사, 또는 난소에 대한 혈액 공급을 저하시키는 임의

의 과정으로부터 초래될 수 있다. 이렇게 폐경이 일어나게 되면, 여러 가지 폐경기 증상이 나타나게 되는데 그 중에 하나가 골 손실에 의한 골다공증인 것이다.

[0008] 또한, 폐경에 의한 에스트로겐 농도의 급속한 감소는, B-임파구(B-lymphocyte)가 다량 생성되어 골수(bone marrow)에 B 세포 전구체(pre-B cell)가 축적을 야기하고, 이로 인해 IL-6의 양이 증가하여 파골세포의 활성을 증가시키므로 결국 골량이 감소하게 되어 골다공증이 나타나게 된다.

[0009] 한편, 이러한 폐경기 증후군의 치료를 위해 가장 널리 사용되고 있는 방법으로 에스트로겐 대체 요법(estrogen replacement therapy)이 사용되고 있으나, 에스트로겐 요법의 경우 유방암과 같은 특정 암의 발생률이 증가되는 부작용이 있고, 또한 특정 자궁암 발생과도 관련이 있다는 내용이 보고되고 있다. 따라서 이러한 부작용을 감소시키기 위해 프로제스틴(progestin)을 이용하는 치료가 사용되고 있으나, 에스트로겐-프로게스틴 투약과 같은 치료를 받은 폐경 후 여성들은 자주 불쾌한 자궁내의 출혈을 경험하고 있어 부작용 없이 효과적으로 폐경기 증상을 치료할 수 있는 새로운 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

[0010] 이와 더불어 최근에는 식생활의 서구화와 여성들의 사회진출로 인해 폐경기에 이르는 나이가 아닌데도 불구하고 골 손실로 유발되는 질환이 젊은 여성층에서도 많이 발생하고 있다.

[0011] 따라서 골 손실의 가능성을 보다 신속하고 정확하게 예측할 수 있다면 골 손실로 인해 유발되는 질환을 미리 예방할 수 있으므로, 골 손실 질환을 예측할 수 있는 방법의 개발이 필요하다.

[0012] 한편, 종래에는 대부분의 골 질환과 관련되어 치료제 개발에만 연구가 집중되었을 뿐 골 질환의 발병 여부를 진단할 수 있는 바이오마커에 대한 연구는 미비한 실정이다. 그나마 선행 기술로는 대한민국등록특허 제0934286호와 같이 인터루킨(IL)-15 유전자 내의 다형성 및 일배체형을 확인함으로서 골다공증의 위험성을 예측, 진단할 수 있는 골다공증 예측용 다형성 마커에 대한 기술 등이 전부였다.

[0013] 이에 본 발명자들은 혈액에 존재하는 피브리노겐의 함량을 측정을 통해 골 손실의 발병 여부를 신속하게 진단 또는 예측할 수 있다는 사실을 확인함으로써 피브리노겐을 골 손실 진단을 위한 바이오마커로 사용할 수 있음을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 따라서 본 발명의 목적은 골 손실 여부를 진단할 수 있는 새로운 바이오마커인 피브리노겐의 용도, 즉, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 피브리노겐 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 피브리노겐 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 포함하는 골 손실 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 또한, 본 발명의 다른 목적은 피검체로부터 분리된 혈액 내의 피브리노겐 함량을 정상인 혈액 내의 피브리노겐 함량과 비교하는 단계를 포함하는 골 손실 여부를 예측하기 위해 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 또한, 본 발명의 다른 목적은 피브리노겐의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 골 손실 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 피브리노겐 유전자 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 피브리노겐 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 포함하는 골 손실 진단용 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 피브리노겐 유전자는 서열번호 1, 2 또는 3 일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 물질은 피브리노겐 유전자에 특이적으로 결합 가능한 프라이머 또는 프로브이거나, 피브리노겐 단백질에 특이적으로 결합 가능한 항체일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 피브리노겐은 폐경기로 인해 골 손실이 유발될 경우, 혈액 내에서 함량이 증가할 수 있다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 피브리노겐은 파골세포의 형성 촉진, 액틴 링(actin ring) 형성 촉진 또는 골 흡수 촉진 작용을 갖는 것일 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 피검체로부터 분리된 혈액 내의 피브리노겐 함량을 정상인 혈액 내의 피브리노겐 함량과 비교

하는 단계를 포함하는 골 손실 여부를 예측하기 위해 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 혈액 내의 피브리노겐 함량은 피브리노겐 유전자에 특이적으로 결합 가능한 프라이머 또는 프로브를 사용하거나, 피브리노겐 단백질에 특이적으로 결합 가능한 항체를 사용하여 측정할 수 있다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 측정은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블럿, 노던 블럿, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay) 및 면역조직화학적 분석(immunohistochemical analysis)으로 이루어진 군중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0025] 나아가 본 발명은 피브리노겐의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 골 손실 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 골 손실 관련 질환은 골다공증, 골감소증, 장기염증에 수반된 골파괴증일 수 있다.

발명의 효과

[0027] 본 발명에 따른 골 손실 진단용 신규 바이오마커인 피브리노겐은 골 손실이 유발되는 경우 혈장 내에 그 함량이 증가되는 것으로 나타남에 따라 환자들로부터 혈액을 채취하여 혈장 내 함유된 피브리노겐의 함량을 측정하는 방법으로 통해 골손실 여부 및 골손실로 인해 유발되는 질환의 발병 가능성을 손쉽고 간단하게 진단할 수 있는 효과가 있으며, 나아가 피브리노겐의 활성 억제제의 경우 골손실 관련 질환의 예방 또는 치료할 수 있어 골 손실 관련 질환의 새로운 치료제를 제공할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 본 발명의 일실시예에서 난소 적출된 마우스와 난소 적출하지 않은 대조군 마우스를 대상으로 혈장 내 피브리노겐의 함량분석(도 1a)및 골밀도 분석(도 1b 및 1c)결과를 나타낸 것이고, CT 촬영을 통해 대퇴골의 성장정도를 분석한 결과(도 1d)를 나타낸 것이다.

도 2는 피브리노겐의 파골세포 분화 및 파골세포의 아폽토시스 억제 정도를 나타낸 결과로서, 2a는 피브리노겐 처리 시간에 따른 TRAP 양성 세포의 수를 측정한 결과를 나타낸 것이고, 2b는 피브리노겐 처리 시간에 따른 분화된 세포의 수를 측정한 결과를 나타낸 것이며, 2c는 처리한 피브리노겐의 농도에 따른 TRAP 양성 세포의 수를 측정한 결과를 나타낸 것이고, 2d는 피브리노겐의 농도에 따른 파골세포의 아팝토시스 정도를 분석한 결과를 나타낸 것이다(도 2에서 0-4D, 0-2D, 2-4D, 3-4D는 피브리노겐이 첨가된 기간을 나타낸 것임).

도 3은 피브리노겐의 액틴 링 구조 형성에 미치는 영향을 조사한 결과로서, 위의 그래프는 피브리노겐 처리 농도에 따른 액틴 링 구조 형성 정도를 분석한 결과를 나타낸 것이고, 아래 사진은 형성된 액틴 링을 현미경을 통해 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본 발명은 골 손실의 발병 가능성을 신속하고 정확하게 예측 또는 진단할 수 있는 바이오마커로서 피브리노겐(fibrinogen)의 신규 용도를 제공함에 그 특징이 있다.

[0030] 보다 구체적으로 본 발명은 피브리노겐 유전자 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 피브리노겐 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 포함하는 골 손실 진단용 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.

[0031] 일반적으로 피브리노겐(fibrinogen)은 소위 응고 캐스케이드의 최종 단계에 존재하는 매우 중요한 응고인자로서, 손상 후 응고계 활성화에 있어서 트롬빈에 의해 그 가용성 형태로부터 지혈 및 창상 치유에 중요한 기여를 하는 불용성의 피브린으로 변환시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 그 구조는 알파 체인(alpha chain), 베타 체인(beta chain), 감마 체인(gamma chain)의 3가지 펩타이드 형태가 3차원적 구조를 이루며 합해져 있는 단백질 구조를 지니고 있다.

[0032] 그러나 이러한 피브리노겐에 대해서는 지혈 및 창상 치유에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있을 뿐, 골 질환, 즉 골 손실과의 관련성에 대한 연구에 대해서는 전혀 보고된 바가 없다.

[0033] 이에 본 발명에서는 피브리노겐을 골 손실 진단을 위한 바이오마커로 사용할 수 있음을 최초로 규명하였다.

[0034] 이러한 규명은 본 발명의 일실시예를 통해 입증하였는데, 즉, 난소를 적출한 마우스 동물모델과 난소를 적출하지 않은 대조군 마우스 동물모델을 대상으로 혈액(혈액 내 혈장에 함유된)내의 피브리노겐의 함량을 측정한 결과, 난소 적출 마우스가 정상 마우스에 비해 혈액 내 피브리노겐의 함량이 증가한 것으로 나타났다(도 1a 참조).

[0035] 또한 대조군 마우스와 난소 적출 마우스를 대상으로 해면 골밀도(BMD:bone mineral density)와 골질량(BMC:bone mineral content)을 비교 측정한 결과, 대조군의 경우 난소적출 마우스에 비해 골밀도와 골질량이 모두 감소한 것으로 나타났다(도 1b 및 도 1c 참조).

[0036] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 피브리노겐을 골 손실의 진단 또는 예측을 위한 바이오 마커로 사용할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

[0037] 나아가 본 발명자들은 폐경기로 인해 골 손실이 증가되는 경우 혈액 내에서 증가되는 피브리노겐의 역할을 확인하는 실험을 수행하였는데, 즉 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 마우스 동물모델로부터 골수 세포를 분리한 후, RANKL로 자극시킨 다음, 피브리노겐의 처리 시간을 달리한 상태에서 파골세포의 분화 및 생존 정도를 비교 분석하였고, 이때 파골세포 분화 정도를 분석하기 위해 TRAP 양성 세포들을 분석하였는데, 이는 파골세포의 분화가 있을 경우 다핵세포의 개수가 늘어날 것이므로 TRAP에 양성을 보이는 세포의 수가 증가하기 때문이다.

[0038] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이 피브리노겐을 처리한 경우, 처리 농도가 증가할수록 파골세포의 세포 분화 및 생존력이 증가하는 것으로 나타났다.

[0039] 따라서 상기 결과를 통해 본 발명자들은 피브리노겐이 파골세포의 세포 분화 및 생존을 향상시키는 작용을 갖는다는 사실을 알 수 있었다.

[0040] 또한, 본 발명자들은 마우스로부터 분리한 골수 세포를 대상으로 파골세포의 분화 조건(RANKL로 자극시)시 피브리노겐의 처리 농도에 따른 파골세포의 세포사멸 정도를 분석한 결과, 처리한 피브리노겐의 농도가 증가할 수 있도록 파골세포의 세 포 분화는 점차 증가하는 것으로 나타난 반면, 파골세포의 아폽토시스(세포사멸)는 피브리노겐 처리 농도와 비례하게 세포사멸이 억제되는 것으로 나타났다(도 3 참조).

[0041] 즉, 이러한 결과는 피브리노겐이 파골세포의 세포 분화 촉진과 함께 파골세포의 아팝토시스를 억제하는 역할을 한다는 사실을 알 수 있었다.

[0042] 나아가 본 발명자들은 피브리노겐이 액틴 링을 형성할 수 있는지 확인하기 위해, 마우TM로부터 분리된 골수 세포를 RANKL로 자극시켜 파골세포 분화를 유도한 다음, 농도별 피브리노겐을 처리하고, 링 형성 여부를 rhodamine-phalloidin, hoechest로 염색하여 분석한 결과, 피브리노겐의 처리 농도에 비례하여 액틴 링의 형성이 증가하는 것으로 나타났다(도 4 참조).

[0043] 따라서 이와 같은 결과를 통해 본 발명자들은 피브리노겐이 액틴 링 구조의 형성을 촉진시키는 작용을 갖는다는 사실을 알 수 있었다. 본 발명에서 관찰한 상기 액틴 링 구조는 액틴 필라멘트로 구성된 일종의 띠(ring) 구조물로 파골세포가 뼈를 파괴하는 활성을 가지는데 중요한 역할을 하고 있다고 알려진 바 있다.

[0044] 궁극적으로 본 발명자들은 이와 같은 실험들을 토대로, 피브리노겐을 폐경기 시 유발되는 골 손실을 미리 진단 및 예측하는 바이오마커로 사용할 수 있음을 알 수 있었으며, 특히 혈장 내 피브리노겐의 함량이 정상인에 비해 많이 증가된 양으로 존재하고 있는 경우, 골 손실이 발병될 가능성이 높다고 판단할 수 있다.

[0045] 또한, 본 발명에 따른 상기 피브리노겐은 골 손실 유발 질환을 예측 및 진단할 수 있는 바이오 마커로서 사용 가능하며, 특히 폐경기로 인한 골 손실의 유발 여부를 예측 또는 진단할 수 있다.

[0046] 일반적으로 폐경기는 여성에게 있어 월경출혈의 최종 현상으로서 정의된다. 그러나 이 용어는 생식기까지와 월경출혈의 최종 현상을 경과 하는 사이의 이행기간을 포함하여 여성 갱년기의 시기로 언급되는데 통상 사용된다. 또한 이 시기는 폐경기 근처 또는 갱년기로서도 언급되기도 한다. 이러한 시기 동안에는 각종 내분비, 체세포 및 생리적 변화 및 난소 기능의 손실이 점차적으로 진행된다.

[0047] 또한, 폐경기 근처에서 쇠퇴하는 에스트로겐 수준과 관련된 증상으로는 전신열감 및 발한, 위축질염, 두통, 현기증, 관절통, 불면증, 무감정, 권태, 근육약화, 심계항진 및 분위기 변화, 울병, 기억 및 집중력 저하, 이상감응 및 성적 기능과 관련된 문제와 같은 심리적 증상이 포함되며, 특히 에스트로겐 농도의 급속한 감소는 파골세포의 활성을 증가시켜 골 흡수(골 손실)가 증가하게 되며, 종국에는 골다공증과 같은 골 대사 질환을 초래하게

된다.

[0048] 그러므로 본 발명은 피브리노겐 유전자 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 피브리노겐 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 포함하는 골 손실 진단용 조성물을 제공할 수 있으며, 바람직하게 상기 피브리노겐 유전자는 서열목록의 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것일 수 있고, 가장 바람직하게는 서열번호 1,2 및 3의 염기서열을 모두 포함한 것일 수 있다. 상기 서열번호1은 피브리노겐의 서브유닛 중 하나인 알파 체인의 cDNA 염기서열이며, 서열번호 2는 베타 체인의 cDNA 염기서열, 서열번호 3은 감마 체인의 cDNA 염기서열을 나타낸 것이다.

[0049] 또한, 상기 피브리노겐 단백질은 서열목록의 서열번호 4, 서열번호 5 또는 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있고, 가장 바람직하게는 서열번호 4,5 및 6의 아미노산 서열을 모두 포함한 것일 수 있다. 상기 서열번호 4는 피브리노겐 서브유닛 중 하나인 알파 체인의 아미노산 서열, 서열번호 5는 피브리노겐 서브유닛 중 하나인 베타 체인의 아미노산 서열, 서열번호 6은 피브리노겐 서브유닛 중 하나인 감마 체인의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

[0050] 본 발명에서, 상기 "진단"이라는 용어는 병리 상태를 확인하는 것을 의미하는 것으로서, 본 발명의 목적상 상기 진단은 골 손실 진단 마커의 발현 유무를 확인하여 골 손실의 여부를 확인하는 것을 의미하며, 또한, 본 발명에서의 진단은 골 손실 진단 마커의 발현 유무 및 발현 정도를 확인하여 골 손실의 발병여부, 발전 및 경감 등을 판단하는 것도 포함할 수 있다.

[0051] 또한, 상기 "진단용 마커(diagnosis marker)"란 골 손실이 발생한 경우를 정상의 경우와 구분하여 진단할 수 있는 물질을 의미하며, 정상에 비하여 골 손실이 발생한 경우 혈액 내에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예컨대, mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다. 본 발명에서 제공하는 골 손실 진단용 마커는 정상에 비해 혈액, 보다 바람직하게는 혈장에서 발현양이 증가하는 피브리노겐 유전자 또는 단백질일 수 있다.

[0052] 또한, 본 발명에서 상기 피브리노겐 유전자 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 피브리노겐 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 물질은 피브리노겐 유전자에 특이적인 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있다. 본 발명에서 상기 피브리노겐 유전자에 특이적인 프라이머 또는 프로브는 서열번호 1로 나타내는 피브리노겐 유전자 전체 또는 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 프로브일 수 있으며, 상기 프라이머 또는 프로브는 당업계에 알려진 방법을 통해 디자인할 수 있다.

[0053] 본 발명에서 상기 "프라이머"란 용어는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있을 수 있다. 또한, 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 피브리노겐 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 또한, 본 발명에 따른 프라이머는 유전자 증폭 반응에 이용될 수 있는 것이 바람직하다.

[0054] 상기 "증폭 반응"은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 말하며, 이러한 유전자의 증폭 반응들에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있고, 예컨대, 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 리가아제 연쇄반응(LCR), 전자 중재 증폭(TMA), 핵산 염기서열 기판 증폭(NASBA) 등이 포함될 수 있다.

[0055] 본 발명에서, 상기 "프로브"라는 용어는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타켓 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것을 말한다. 본 발명에 따른 프로브는 단일쇄일 수 있으며, 바람직하게는 올리고디옥시리보뉴클레오티드일 수 있다. 본 발명의 프로브는 자연 dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 프로브는 골격 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대, 펩타이드 핵산 (PNA) (M. Egholm et al., Nature, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA,

2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 헥소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로헥시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에티틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.

[0056] 또한, 본 발명에서 상기 피브리노겐 단백질의 수준을 측정할 수 있는 물질로는 피브리노겐 단백질에 대해 특이적으로 결합할 수 있는 다클론 항체, 단일클론 항체 및 재조합 항체 등의 "항체"를 포함할 수 있다.

[0057] 뿐만 아니라 본 발명은 피브리노겐 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 골 손실 진단용 조성물을 포함하는 골 손실 진단용 키트를 제공할 수 있다.

[0058] 본 발명의 진단용 키트에 포함되는 골 손실 진단용 조성물은 피브리노겐 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 항체를 포함할 수 있으며, 이들의 정의는 앞서 기술된 바와 같다.

[0059] 본 발명의 골 손실 진단용 키트가 만일 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, Thermus aquaticus (Taq), Thermus thermophilus (Tth), Thermus filiformis, Thermis flavus, Thermococcus literalis 또는 Pyrococcus furiosus(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있으며, 본 발명의 위암 진단용 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다.

[0060] 나아가, 본 발명에 따른 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[0061] 또한, 본 발명은 피브리노겐 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 골 손실 진단용 조성물을 포함하는 골 손실 진단용 마이크로어레이를 제공한다.

[0062] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 피브리노겐 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 항체는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기질(substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기질은 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함할 수 있다. 상기 혼성화 어레이 요소는 상기 기질 상에 배열되고 고정화되며, 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기질에 결합될 수 있다.

[0063] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료가 핵산일 경우에는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화 될 수 있다. 혼성화 조건은 다양할 수 있으며, 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.

[0064] 또한, 본 발명은 피브리노겐 유전자의 발현수준 또는 피브리노겐 단백질 수준을 측정하여 골 손실을 예측 및 진단하는 방법을 제공할 수 있는데, 상기 방법은 피검체로부터 분리된 혈액 내의 피브리노겐 함량을 정상인 혈액 내의 피브리노겐 함량과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0065] 상기에서 혈액 내의 피브리노겐 함량을 비교하는 단계는 피브리노겐 유전자의 발현수준 또는 피브리노겐 단백질 수준을 정상인의 시료를 대조군으로 하여 비교 측정할 수 있다.

[0066] 상기 피브리노겐 유전자의 발현 수준 측정은 바람직하게는 mRNA의 수준을 측정하는 것이며, mRNA의 수준을 측정하는 방법으로는 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소연쇄반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏 및 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0067] 상기 피브리노겐 단백질 수준의 측정은 항체를 이용할 수 있는데, 이러한 경우, 혈액 내의 피브리노겐 마커 단백질과 이에 특이적인 항체는 결합물, 즉, 항원-항체 복합체를 형성하며, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정할 수 있다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수

있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0068] 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는, 이에 제한되지는 않으나, 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있다.

[0069] 따라서 본 발명은 상기와 같은 검출 방법들을 통하여, 대조군의 피브리노겐 mRNA 발현양 또는 단백질의 양과 골 손실 의심 환자에서의 피브리노겐 mRNA 발현양 또는 단백질의 양을 확인할 수 있고, 상기 발현양의 정도를 대조군과 비교함으로써 골 손실의 발병여부, 진행단계 또는 예후 등을 예측 및 진단할 수 있다.

[0070] 나아가 본 발명은 골 손실이 발생되는 경우, 혈액 내(보다 바람직하게는 혈장 내)에서 피브리노겐의 함량이 증가한다는 사실 및 함량이 증가된 피브리노겐은 파골세포의 세포 분화 및 생존, 액틴 링 구조 형성의 촉진 작용을 통해 파골세포의 활성을 촉진시킨다는 사실을 규명하였다.

[0071] 한편, 이러한 사실을 토대로 본 발명자들은 본 발명의 피브리노겐 유전자의 발현 또는 피브리노겐 단백질의 활성을 억제할 경우 골 손실을 예방 또는 치료할 수 있음을 예측할 수 있었고, 따라서 피브리노겐의 발현 또는 활성 억제제의 경우 골 손실을 치료할 수 있는 치료제로 사용가능함을 알 수 있었다.

[0072] 그러므로 본 발명은 피브리노겐 유전자의 발현 억제제 또는 피브리노겐 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 골 손실 예방 또는 치료용 조성물을 제공할 수 있다.

[0073] 본 발명에 따른 골 손실의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에는 피브리노겐의 발현을 억제할 수 있는 물질이라면 모두 포함할 수 있고, 바람직하게는 화학물질, 뉴클레오티드, 안티센스, siRNA 올리고뉴클레오타이드 또는 천연물 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 본 발명의 피브리노겐 유전자의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열을 가지는 안티센스 또는 siRNA(small interference RNA) 올리고뉴클레오티드를 유효성분으로 포함할 수 있으며, 더욱더 바람직하게는 서열번호 1에 대한 siRNA 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0074] 본 발명에서 상기 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"란 용어는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 피브리노겐의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 본 발명의 안티센스 서열은 피브리노겐 mRNA에 상보적이고 피브리노겐 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하며, 피브리노겐 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다.

[0075] 또한, 상기 안티센스 핵산은 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., *Curr Opin Struct Biol*., 5, 3, 343-55, 1995). 핵산 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 핵산은 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-메틸피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6(6-아미노헥실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다. 또한, 본 발명의 안티센스 핵산은 상기 안티센스 핵산의 활성 및 세포 흡착성을 향상시키는 하나 이상의 모이어티(moiety) 또는 컨쥬게이트(conjugate)와 화학적으로 결합될 수 있다. 콜레스테롤 모이어티, 콜레스테릴 모이어티, 콜릭산, 티오에테르, 티오콜레스테롤, 지방성 사슬, 인지질, 폴리아민, 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 아다맨탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 옥타데실아민, 헥실아미노-카르보닐-옥시콜에스테롤 모이어티 등의 지용성 모이어티 등이 있고 이에 제한되지는 않는다. 지용성 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오티드와 제조 방법은 본 발명의 기술 분야에서 이미 잘 알려져 있다(미국특허 제5,138,045호, 제5,218,105호 및 제5,459,255호). 상기 변형된 핵산은 뉴클레아제에 대한 안정성을 증가시키고 안티센스 핵산과 표적 mRNA와의 결합 친화력을 증가시킬 수 있다.

[0076] 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 일예는 RNA 중합효소 I를 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한 가지 예는 인식부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 이런 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.

[0077] 본 발명에서 "siRNA" 용어는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다(국제공개 특허번호 00/44895, 01/36646, 99/32619, 01/29058, 99/07409 및 00/44914 참조). siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 넉다운(knock-down) 방법으로서 또는 유전자치료 방법으로 제공된다.

[0078] 본 발명의 siRNA 분자는, 센스 가닥(피브리노겐 mRNA 서열에 상응하는 서열)과 안티센스 가닥(피브리노겐 mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중쇄를 이루는 구조를 가질 수 있으며, 또한, 본 발명의 siRNA 분자는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다. 나아가 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 또한, siRNA 말단 구조는 피브리노겐 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하고, 점착 말단 구조는 3'-말단 돌출 구조와 5'-말단 돌출 구조 모두 가능하다.

[0079] 또한, 본 발명의 siRNA 분자는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오티드 서열이 삽입된 형태를 가질 수 있으며, 이 경우 뉴클레오타이드 서열의 발현에 의해 형성된 siRNA 분자는 분자내 혼성화에 의하여 헤어핀 구조를 형성하게 되며, 전체적으로는 스템-앤드-루프 구조를 형성하게 된다. 이 스템-앤드-루프 구조는 인 비트로 또는 인 비보에서 프로세싱되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다.

[0080] siRNA를 제조하는 방법은 시험관에서 siRNA를 직접 합성한 뒤, 형질전환 과정을 거쳐 세포 안으로 도입시키는 방법과 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-유래의 siRNA 발현 카세트 등을 세포 안으로 형질전환 또는 감염(infection)시키는 방법이 있다.

[0081] 또한, 유전자 특이적인 siRNA를 포함하는 본 발명의 조성물은 siRNA의 세포내 유입을 촉진시키는 제제를 포함할 수 있다. siRNA의 세포내 유입을 촉진시키는 제제에는 일반적으로 핵산 유입을 촉진하는 제제를 사용할 수 있으며, 이러한 예로는, 리포좀을 이용하거나 콜레스테롤, 콜레이트 및 데옥시콜산을 비롯한 다수의 스테롤류 중 1종의 친유성 담체와 함께 배합할 수 있다. 또한 폴리-L-라이신(poly-L-lysine), 스퍼민(spermine), 폴리실아잔(polysilazane), 폴리에틸레민(PEI: polyethylenimine), 폴리디하이드로이미다졸레늄(polydihydroimidazolenium), 폴리알리라민(polyallylamine), 키토산(chitosan) 등의 양이온성 고분자(cationic polymer)를 이용할 수도 있고, 숙실화된 PLL(succinylated PLL), 숙실화된 PEI(succinylated PEI), 폴리글루타믹산(polyglutamic acid), 폴리아스파틱산(polyaspartic acid), 폴리아크릴산(polyacrylic acid), 폴리메타아크릴산(polymethacylic acid), 덱스트란 설페이트(dextran sulfate), 헤파린(heparin), 히아루릭산(hyaluronic acid) 등의 음이온성 고분자(anionic polymer)를 이용할 수 있다.

[0082] 또한, 상기 피브리노겐 단백질의 발현 및 활성을 감소시키는 물질로서 피브리노겐단백질에 특이적인 항체를 사용할 경우, 상기 항체는 기존의 치료제와 직접 또는 링커 등을 통하여 간접적으로 커플링(예를 들어, 공유결합)시킬 수 있다. 항체와 결합될 수 있는 치료제로는 이에 제한되지는 않으나, 131I, 90Y, 105Rh, 47Sc, 67Cu, 212Bi, 211At, 67Ga, 125I, 186Re, 188Re, 177Lu, 153Sm, 123I, 111In 등과 같은 방사성핵종(radionuclide); 메토트렉세이트(methotrexate), 아드리아마이신(adriamycin), 및 인터페론과 같은 림포카인(lympokine) 등의 생물학적 반응 변형체 또는 약물; 리신, 아브린, 디프테리아 등과 같은 독소; 이형기능성 항체(heterofunctional antibodies), 즉 다른 항체와 결합되어서 그 복합체가 암 세포와 효능 세포(예를 들면, T 세포와 같은 K 세포(killer cell) 모두에 결합하는 항체; 및 자연적인, 즉, 비-연관 또는 비-복합된 항체와 결합될 수 있다.

[0083] 또한, 본 발명에서 상기 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등과 같은 경구 투여용 담체 및 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르 브산과 같은 항산화제가있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

[0084] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 적합한 형태로 제형화 될 수 있다. 즉, 본 발명의 약학적 조성물은 공지의 방법에 따라 다양한 비경구 또는 경구 투여용 형태로 제조될 수 있으며, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것으로는 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 주사용 제형은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜 주사용으로 제형화 될 수 있다. 또한, 경구 투여용 제형으로는, 이에 한정되지는 않으나, 분말, 과립, 정제, 환약 및 캡슐 등이 있다.

[0085] 상기와 같은 방법으로 제형화된 약학적 조성물은 유효량으로 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있는데, 상기 "투여"란 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며 물질의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0086] 또한, 상기에서 "유효량" 이란 환자에게 투여하였을 때, 예방 또는 치료 효과를 나타내는 양을 말한다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 환자의 질환 종류 및 중증도, 연령, 성별, 체중, 약물에 대한 민감도, 현재 치료법의 종류, 투여방법, 표적 세포 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 종래의 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 바람직하게는 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 1~10000㎍/체중kg/day, 더욱더 바람직하게는 10~1000㎎/체중kg /day의 유효용량으로 하루에 수회 반복 투여될 수 있다.

[0087] 이하, 실시예를 들어 본 발명에 대해서 더욱 상세하게 설명할 것이나, 하기의 실시예는 본 발명의 바람직한 실시예일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0088] **<실시예 1>**

[0089] **난소 적출 시 혈액 내 피브리노겐의 함량 및 골밀도 변화 분석**

[0090] 본 발명자들은 동물모델을 통해 골 손실의 진단을 혈청 내 피브리노겐의 수치 측정을 통해 측정할 수 있는지를 확인하기 위해 먼저 다음과 같이 마우스 모델을 준비하였다. 잭슨 실험실(Jackson laboratory)로부터 6주령의 C57BL/6J 마우스를 입수한 다음, 울산대학교의 면역조절 연구 센타에서 난소절제술(7마리 대상)을 시행하였고 이때 대조군으로 가짜(sharm)수술(6마리 대상)을 시행하였으며, 수술 동안 케타민(ketamine; 60mg/kg, ip)으로 마취시켰다. 수술 후 모든 마우스들은 병원균이 없는 면역조절 연구 센타에서 동물 보호 기관의 추천 조건으로 사육하였다.

[0091] 위와 같이 난소 적출 시술이 완료된 후 8주가 경과한 다음, 각 마우스들로부터 혈액을 채취한 후, 혈장(plasma)내에 존재하는 피브리노겐의 함량을 피브리노겐 ELISA 키트를 사용하여 측정하였다.

[0092] 또한, 피브리노겐 측정과 함께 본 발명자들은 난소가 적출된 마우스들을 대상으로 골밀도를 측정하였고 CT 영상 촬영을 통해 이미지 분석을 수행하였다.

[0093] 골밀도 측정은 난소 적출 시술 후 8주가 경과한 다음 각 마우스들을 대상으로 골밀도를 측정하였는데, 골밀도 측정을 위한 마이크로 CT(uCT) 스캐닝은 GE eXplore Locus SP System(Locus SP; GE heathecare company)을 사용하여 수행하였으며, 3D 조직형태계측학(histomorphometry) 및 골 구조의 가시화 측정은 마우스의 대퇴골을 효과적인 검출기의 픽셀 크기인 0.008nm에서 고해상도 uCT 이미징 시스템을 사용하여 스캐닝하였다. 3D 마이크로 구조 분석을 위한 소프트웨어는 eXplore MicroView 버전 2.2를 사용하였다.

[0094] 그 결과, 도 1a에 나타낸 바와 같이, 난소가 적출된 마우스 군의 경우 난소가 적출되지 않은 마우스 군에 비해 혈장 내 피브리노겐의 함량이 유의적으로 증가한 것으로 나타났으며, 골밀도와 골질량은 난소가 적출된 마우스 군의 경우 대조군에 비해 유의적으로 감소한 것으로 나타났으며(도 1b 및 1c 참조), 이러한 결과는 CT 이미지 분석 결과에서도 동일하게 나타났다(도 1d 참조).

[0095] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 난소 적출로 폐경기를 유도한 마우스군을 대상으로 한 실험결과로 폐

경기로 인한 골밀도 및 골질량은 감소된다는 것을 알 수 있었고, 골밀도와 골질량 감소시 혈장 내 피브리노겐의 함량은 증가한다는 사실을 알 수 있었으며, 따라서 혈장 내 피브리노겐의 함량 측정을 통해 골 손실여부를 예측 및 진단할 수 있음을 알 수 있었다.

[0096] **<실시예 2>**

[0097] **골 손실로 인해 증가된 피브리노겐의 파골세포 분화에 미치는 영향 분석**

[0098] 상기 실시예 1을 통해 골손실이 유발될 경우, 혈액, 보다 구체적으로는 혈장(plasma) 내 피브리노겐의 함량이 증가한다는 사실을 확인하였고, 이에 증가된 피브리노겐이 골 손실을 유도하는 파골세포의 분화에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0099] 먼저, 5 주령의 C57BL/6J 마우스로부터 골수세포를 분리하였고, 대퇴골과 경골은 무균상에서 인접한 연조직(soft tissue)이 없도록 절단하였다. 뼈 양끝을 조금 잘라 한 쪽 끝에 21-gauge 주사바늘을 꽂고 α-MEM을 흘려보내 골수세포를 시험관에 모았다. 수득한 골수세포 현탁액은 세척한 후, 대식세포증식자극인자인 M-CSF(20ng/ml; R&D 시스템)이 포함된 플레이트에 첨가한 후 16시간 동안 배양시켰다. 이후 비부착된 세포들을 수확한 후 M-CSF로 2일 간 다시 배양하였고, 배양하는 동안 플레이트의 바닥에 단핵수/마크로파지 같은 세포가 부착된 큰 세포집단인 골수유래 대식세포(BMM; Bone marrow-derived macrophage)가 형성되었다. 소수의 비부착 세포들은 PBS로 플레이트를 세척하면서 제거시켰고, 부착된 BMM을 수득한 후, 플레이트에 분주하였다. 이후 M-CSF 및 파골세포 분화인자인 RANKL(40ng/ml; R&D 시스템)가 함유된 배지를 첨가한 후 3일째 상기 배지를 교체하였다.

[0100] 이후 응집체 형성을 방지하기 위해 피브리노겐을 50ug/ml까지의 농도가 되도록 헤파린(300ng/ml) 존재 하에 첨가하였다. 일정 시간 배양 후, 세포들을 10% 포르말린으로 10분 동안 고정시킨 후, TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase)로 염색하였고, TRAP 양성의 다핵 세포(MNC;multinucleated cells)들을 계산하였다. 이때 상기 TRAP은 파골세포의 분화 정도를 측정하는 지표로 사용한 것으로서, 파골세포의 분화가 있을 경우 다핵세포의 개수가 증가할 것이므로 TRAP 양성세포의 수가 증가하는 것을 확인함으로써 파골세포의 분화 여부를 측정할 수 있다. 이때 본 발명에서는 TRAP 양성세포의 수와 분화된 세포들의 수를 함께 측정하였다.

[0101] 그 결과, 파골세포 분화 초기 단계에 피브리노겐이 첨가된 경우는 오히려 피브리노겐이 파골세포의 형성을 다소 억제하는 것으로 나타났으나, 파골세포의 분화 후기 단계에 피브리노겐이 첨가된 경우에는 TRAP 양성세포 및 분화된 세포들의 수가 증가하는 것으로 나타났으며(도 2a 및 2b 참조), 이러한 결과는 도 2c에 나타낸 현미경 관찰을 통한 TRAP 양성세포들의 확인을 통해서도 알 수 있었다.

[0102] **<실시예 3>**

[0103] **피브리노겐의 파골세포 생존에 미치는 영향 분석**

[0104] 상기 실시예 3을 통해 본 발명자들은 골손실이 일어나는 경우, 혈장 내 증가된 피브리노겐이 파골세포의 분화 과정에서 분화 초기 단계가 아닌 분화 후기 단계에서 파골세포의 분화를 더 촉진시키는 작용을 한다는 사실을 알 수 있었다. 이에 본 발명자들은 피브리노겐이 분화가 완료되어 성숙된 파골세포의 생존에도 영향을 미치는지 조사하였는데, 일반적으로 파골세포 분화 인자이며 파골세포의 생존 인자들인 M-CSF 및 RANK가 세포 배양 배지에서 제거되는 경우 성숙한 파골세포들은 아폽토시스가 유발되는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 발명자들은 배양배지에서 M-CSF 및 RANK 인자들을 제거한 후, 이들 인자가 제거된 배지에 피브리노겐을 첨가하였을 경우, 성숙한 파골세포의 아팝토시스가 억제되어 파골세포의 생존을 향상시킬 수 있는지를 분석하였다.

[0105] 이를 위해 상기 실시예를 통해 수득한 BMM 세포를 RANKL로 4일 동안 자극시킨 다음, 세포를 세척하고 M-CSF 및 RANKL와 피브리노겐을 각 농도별(0, 10, 20, 50ug/ml)로 첨가된 배지에서 18시간 배양한 다음, 아팝토시스를 아넥신 V로 염색하여 측정하였다. 파골세포의 아팝토시스(apoptosis)는 아넥신 V 염색을 통해 측정하였다. BMM 유래의 파골세포는 RANKL로 4일 동안 자극시켰고, 이후 세척한 다음 M-SCF 및 RANKL로 18일 동안 재자극을 주었다. 아넥신 V 염색을 위해 세포들을 수확하고 FACS 튜브로 옮긴 다음, 세척하고 아넥신 V FITC(BD Bioscience)가 함유된 결합 버퍼(10mM HEPES/NaOH, pH7.4, 140mM NaCl, 2.5 mM $CaCl_2$)로 15분 동안 반응시킨 후 , FACS Calibur로 분석하였다.

[0106] 그 결과, 도 2c 및 2d에 나타낸 바와 같이, TRAP 양성세포는 피브리노겐의 첨가량에 비례하여 증가하는 것으로 나타났으며, 성숙한 파골세포는 피브리노겐의 첨가량에 비례하여 아팝토시스가 감소되는 것으로 나타났다.

[0107] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 피브리노겐이 성숙한 파골세포의 아팝토시스를 억제하여 파골세포의 생존력을 증가시키는 작용을 한다는 것을 알 수 있었다.

[0108] **<실시예 4>**

[0109] **피브리노겐의 액틴 형성과 골흡수 촉진 작용 분석**

[0110] 본 발명자들은 골손실 시 혈액내 함량이 증가되는 피브리노겐이 액틴 형성과 골흡수에 미치는 영향을 조사하였는데, 이를 위해 분화된 파골세포의 배지에 피브리노겐을 각 농도별 처리하여 배양한 후, 상아질 슬라이스 상에 형성되는 구멍의 정도측정으로 조사하였다. 즉, M-CSF 및 RANKL로 배양하여 분화된 파골세포는 이후 트립신/EDTA를 처리하여 세포들을 수득하였고, 수득한 세포들(2000개의 세포)을 상아질 슬라이스에 분주시킨 후, 상아질 슬라이스 상에서 M-CSF 및 RANKL로 1일 동안 배양시켰고, 배양된 슬라이스는 이후 1M NH_4OH로 초음파 처리하여 부착된 세포들을 제거시킨 후, Mayer's hematoxylin(시그마 사)으로 염색한 다음, 상기 시약의 사용 방법에 따라 구멍에 재흡수된 정도를 가시화하였다.

[0111] 또한, 파골세포 내에서 F-액틴의 분포정도를 측정하기 위해, 세포들을 글래스 커버슬립 상에 놓고 포름알데히드로 고정시킨 후, 0.1% triton-X 100을 함유한 PBS 용액으로 처리한 다음, 액틴의 검출을 위해 rhodamine phalloidin(Molecular Probe)로 반응시켰고, 핵의 검출을 위해 hoechst(CalBiochem)을 사용하여 반응시켰다. 핵과 F-액틴의 분포 정도는 형광현미경(Carl Zeiss)을 사용하여 확인하였다.

[0112] 또한, 본 실험에서 얻은 모든 수치는 평균± SEM으로 표시하였고, 스튜던트-테스트는 대조군과 실험군 간의 차이를 측정하는데 사용하였으며, p value 값이 0.05 미만인 경우를 유의치로 하였다.

[0113] 그 결과, 파골세포의 작용을 위한 사이토스켈레톤의 형성에 피브리노겐이 미치는 영향을 조사하기 위해 액틴 링 구조의 형성 정도를 분석한 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이 분화된 파골세포에 피브리노겐을 첨가한 경우, 첨가된 농도에 비례하여 액틴 링 구조의 형성이 증가하는 것으로 나타났고, 골의 흡수도 증가하는 것으로 나타났다.

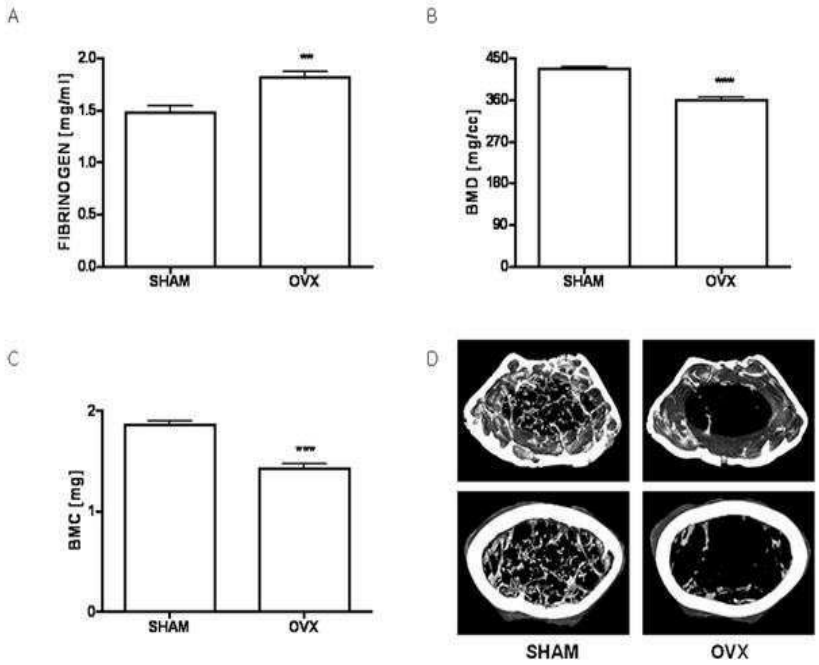
[0114] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 피브리노겐의 경우, 골손실이 유발되면 혈액 내 피브리노겐의 함량이 증가된다는 사실을 규명함으로써 피브리노겐을 골손실 여부를 진단할 수 있는 마커로 사용할 수 있음을 알 수 있었고, 나아가 골손실 시 혈액 내 증가되는 피브리노겐의 역할을 규명한 결과, 파골세포의 분화 촉진과, 파골세포 작용에 중요한 액틴 링 구조의 형성 및 골 재흡수를 촉진시키는 작용을 한다는 사실을 알 수 있었다.

[0115] 이러한 결과를 토대로 본 발명자들은 파골세포의 분화 및 작용을 촉진시키는 피브리노겐의 역할 규명을 통해 피브리노겐의 작용 또는 활성을 억제할 수 있는 억제제의 경우, 골손실 질환의 발병 또는 증상을 개선 또는 치료할 수 있는 치료제로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

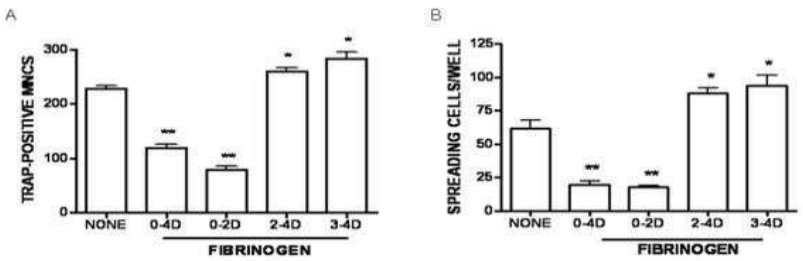
[0116] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

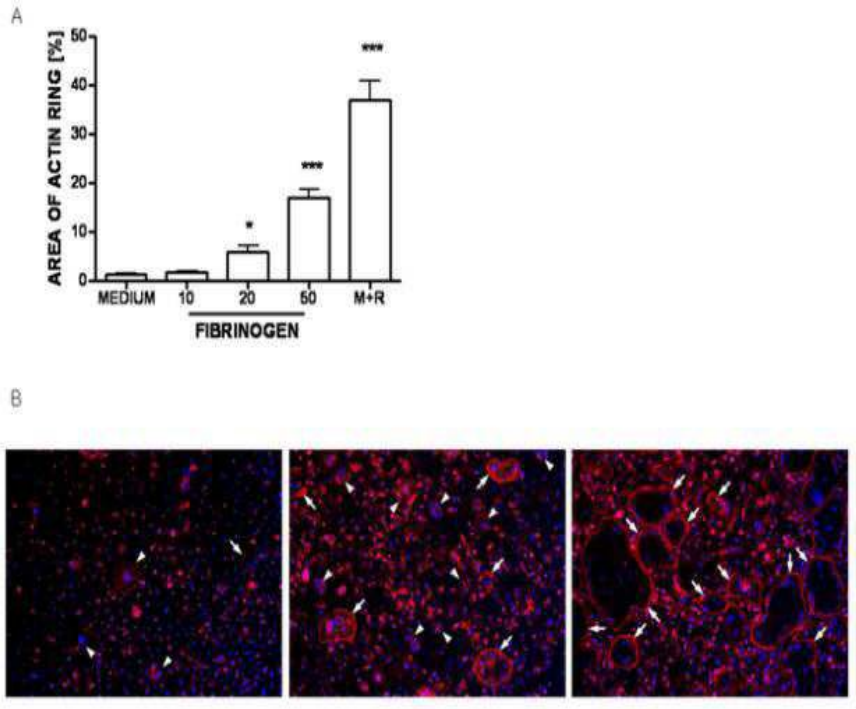
도면1


A
FIBRINOGEN [mg/ml]
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
SHAM
OVX
B
BMD [mg/cc]
450
360
270
180
90
0
****
SHAM
OVX
C
BMC [mg]
2
1
0
***
SHAM
OVX
D
SHAM
OVX

도면2


A
TRAP-POSITIVE MNCS
300
200
100
0
***
***
*
*
NONE
0-4D
0-2D
2-4D
3-4D
FIBRINOGEN
B
SPREADING CELLS/WELL
125
100
75
50
25
0
**
**
*
*
NONE
0-4D
0-2D
2-4D
3-4D
FIBRINOGEN

도면3



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation of Ulsan university

<120> Use of fibrinogen as a bone loss diagnostic marker

<130> np11-1124

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 7576

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fibrinogen alpha chain gene

<400> 1

gtctaggagc cagccccacc cttagaaaag atgttttcca tgaggatcgt ctgcctagtt 60

ctaagtgtgg tgggcacagc atgggtatgg ccctttttcat ttttttcttct tgctttctct 120

ctggtgttta ttccacaaag agcctggagg tcagagtcta cctgctctat gtcctgacac 180

actcttagct ttatgacccc aggcctggga ggaaatttcc tgggtgggct tgacacctca 240

agaatacagg gtaatatgac accaagagga agatcttaga tggatgagag tgtacaacta 300

caagggaaac tttagcatct gtcattcagt cttaccacat tttgttttgt tttgttttaa 360

aaagggcaag aattatttgc catccttgta cctataaagc cttggtgcat tataatgcta 420

gttaatggaa taaaacattt tatggtaaga tttgttttct ttagttatta atttcttgct 480

acttgtccat aataagcaga acttttagtg ttagtacagt tttgctgaaa ggttattgtt 540

gtgtttgtca agacagaaga aaaagcaaac gaattatctt tggaaatatc tttgcagtat 600

cagaagagat tagttagtaa ggcaatacgc ttttccgcag taatggtatt cttttaaatt 660

atgaatccat ctctaaaggt tacatagaaa cttgaaggag agaggaacat tcagttaaga 720

tagtctaggt ttttctactg aagcagcaat tacaggagaa agagctctac agtagttttc 780

aactttctgt ctgcagtcat tagtaaaaat gaaaaggtaa aatttaactg attttataga 840

ttcaaataat tttcctttta ggatggattc tttaaaactc ctaatattta tcaaatgctt 900

atttaagtgt cacacacagt taagaaattt gtacaccttg tctcctttaa ttctcataac 960

aactccataa aatgggtcct aggatttcca tttgaagata agaaacctga agcttgccga 1020

agccctgtgt ctgctctcct taatctctgt gagagtgcca tctcttcctg gggacttgta 1080

ggcatgccac tgtctcctct tctggctaac attgctgttg ctctcttttg tgtatgtgaa 1140

tgaatcttta aagactgcag atagtggtga aggtgacttt ctagctgaag gaggaggcgt 1200

gcgtggccca agggttgtgg aaagacatca atctgcctgc aaagattcag actggccctt 1260

ctgctctgat gaagactggg taagcagtca gcgggggaag caggagattc cttccctctg 1320

atgctagagg ggctcacagg ctgacctgat tggtcccaga aacttttta aatagaaaat 1380

aattgaatag ttacctacat agcaaataaa gaaaaggaac ctactcccaa gagcactgtt 1440

tatttacctc cccaactctg gatcattagt gggtgaacag acaggatttc agttgcatgc 1500

tcaggcaaaa ccaggctcct gagtattgtg gcctcaattt cctggcacct atttatggct 1560

aagtggaccc tcattccaga gtttctctgc gacctctaac tagtcctctt acctacttt 1620

aagccaactt atctggaaga gaaagggtag gaagaaatgg gggctgcatg gaaacatgca 1680

aaattattct gaatctgaga gatagatcct tactgtaatt ttctcccttc actttcagaa 1740

ctacaaatgc ccttctggct gcaggatgaa agggttgatt gatgaagtca atcaagattt 1800

tacaaacaga ataaataagc tcaaaaattc actatttgaa tatcagaaga acaataagga 1860

ttctcattcg ttgaccacta atataatgga aattttgaga ggcgattttt cctcagccaa 1920

tagtaagtat tacatattta cttctttgac tttataacag aaacaacaaa aatcctaaat 1980

aaatatgata tccgcttata tctatgacaa tttcatccca aagtacttag tgtagaaaca 2040

cataccttca taatatccct gaaaatttta agagggagct tttgttttcg ttatttttc 2100

aaagtaaaag atgttaactg agattgttta aggtcacaaa ataagtcaga attttggatt 2160

aaaacaagaa tttaaatgtg ttcttttcaa cagtatatac tgaaagtagg atgggtcaga 2220

ctctttgagt tgatattttt gtttctgctt tgtaaaggtg aaaactgaga ggtcaaggaa 2280

cttgttcaaa gacacagagc tgggaattca actcccagac tccactgagc tgattaggta 2340

gatttttaaa tttaaaatat agggtcaagc tacgtcattc tcacagtcta ctcattaggg 2400

ttaggaaaca ttgcattcac tctgggcatg gacagcgagt ctagggagtc ctcagtttct 2460

caagttttgc tttgcctttt tacaccttca caaacacttg acatttaaaa tcagtgatgc 2520

caacactagc tggcaagtga gtgatcctgt tgacccaaaa cagcttagga accatttcaa 2580

atctatagag ttaaaaagaa aagctcatca gtaagaaaat ccaatatgtt caagtccctt 2640

gattaaggat gttataaaat aattgaaatg caatcaaacc aactatttta actccaaatt 2700

acacctttaa aattccaaag aaagttcttc ttctatattt ctttgggatt actaattgct 2760

attaggacat cttaactggc attcatggaa ggctgcaggg cataacatta tccaaaagtc 2820

aaatgcccca taggttttga actcacagat taaactgtaa ccaaaataaa attaggcata 2880

tttacaagct agtttctttc tttctttttt ctctttcttt ctttctttct ttctttcttt 2940

ctttctttct ttctttcttt ctttctcctt ccttcctttc ttcctttctt ttttgctggc 3000

aattacagac aaatcactca gcagctactt caataaccat attttcgatt tcagaccgtg 3060

ataataccta caaccgagtg tcagaggatc tgagaagcag aattgaagtc ctgaagcgca 3120

aagtcataga aaaagtacag catatccagc ttctgcagaa aaatgttaga gctcagttgg 3180

ttgatatgaa acgactggag gtaagtatgt ggctgtggtc ccgagtgtcc ttgtttttga 3240

gtagagggaa aaggaaggcg atagttatgc actgagtgtc tactatatgc agagaaaagt 3300

gttatatcca tcatctacct aaaagtaggt attattttcc tcactccaca gttgaagaaa 3360

aaaaaattca gagatattaa gtaaattttc caacgtacat agatagtaat tcaaagcaat 3420

gttcagtccc tgtctattcc aagccattac atcaccacac ctctgagccc tcagcctgag 3480

ttcaccaagg atcatttaat tagcgtttcc tttgagaggg aatagcacct tactcttgat 3540

ccattctgag gctaagatga attaaacagc atccattgct tatcctggct agccctgcaa 3600

tacccaacat ctcttccact gagggtgctc gataggcaga aaacagagaa tattaagtgg 3660

taggtctccg agtcaaaaaa aatgaaacca gtttccagaa ggaaaattaa ctaccaggaa 3720

ctcaatagac gtagtttatg tatttgtatc tacattttct ctttattttt ctcccctctc 3780

tctaggtgga cattgatatt aagatccgat cttgtcgagg gtcatgcagt agggctttag 3840

ctcgtgaagt agatctgaag gactatgaag atcagcagaa gcaacttgaa caggtcattg 3900

ccaaagactt acttccctct agagataggc aacacttacc actgataaaa atgaaaccag 3960

ttccagactt ggttcccgga aattttaaga gccagcttca gaaggtaccc ccagagtgga 4020

aggcattaac agacatgccg cagatgagaa tggagttaga gagacctggt ggaaatgaga 4080

ttactcgagg aggctccacc tcttatggaa ccggatcaga gacggaaagc cccaggaacc 4140

ctagcagtgc tggaagctgg aactctggga gctctggacc tggaagtact ggaaaccgaa 4200

accctgggag ctctgggact ggagggactg caacctggaa acctgggagc tctggacctg 4260

gaagtactgg aagctggaac tctgggagct ctggaactgg aagtactgga aaccaaaacc 4320

ctgggagccc tagacctggt agtaccggaa cctggaatcc tggcagctct gaacgcggaa 4380

gtgctgggca ctggacctct gagagctctg tatctggtag tactggacaa tggcactctg 4440

aatctggaag ttttaggcca gatagcccag gctctgggaa cgcgaggcct aacaacccag 4500

actggggcac atttgaagag gtgtcaggaa atgtaagtcc agggacaagg agagagtacc 4560

acacagaaaa actggtcact tctaaaggag ataaagagct caggactggt aaagagaagg 4620

tcacctctgg tagcacaacc accacgcgtc gttcatgctc taaaaccgtt actaagactg 4680

ttattggtcc tgatggtcac aaagaagtta ccaaagaagt ggtgacctcc gaagatggtt 4740

ctgactgtcc cgaggcaatg gatttaggca cattgtctgg cataggtact ctggatgggt 4800

tccgccatag gcaccctgat gaagctgcct tcttcgacac tgcctcaact ggaaaaacat 4860

tcccaggttt cttctcacct atgttaggag agtttgtcag tgagactgag tctaggggct 4920

cagaatctgg catcttcaca aatacaaagg aatccagttc tcatcaccct gggatagctg 4980

aattcccttc ccgtggtaaa tcttcaagtt acagcaaaca atttactagt agcacgagtt 5040

acaacagagg agactccaca tttgaaagca agagctataa aatggcagat gaggccggaa 5100

gtgaagccga tcatgaagga acacatagca ccaagagagg ccatgctaaa tctcgccctg 5160

tcagaggtat ccacacttct cctttgggga agccttccct gtccccctag actaagttaa 5220

atatttctgc acagtgttcc catggcccct tgcatttcct tcttaactct ctgttacacg 5280

tcattgaaac tacacttttt tggtctgttt ttgtgctaga ctgtaagttc cttgggggca 5340

gggcctttgt ctgtctcatc tctgtattcc caaatgccta acagtacaga gccatgactc 5400

aataaataca tgttaaatgg atgaatgaat tcctctgaaa ctctatttga gcttatttag 5460

tcaaattctt tcactattca aagtgtgtgc tattagaatt gtcacccaac tgattaatca 5520

catttttagt atgtgtctca gttgacattt aggtcaggct aaatacaagt tgtgttagta 5580

ttaagtgatg cttagctacc tgtactggtt acttgctatt agtttgtgca agtaaaattc 5640

caaatacatt tgaggaaaat ccccttttgca atttgtaggt ataaataacc gcttatttgc 5700

ataagttcta tcccactgta agtgcatcct ttccctatgg agggaaggaa aggaggaaga 5760

aagaaaggaa gggaaagaaa cagtatttgc cttatttaat ctgagccgtg cctatctttg 5820

taaagttaaa tgagaataac ttcttccaac cagcttaatt ttttttttag actgtgatga 5880

tgtcctccaa acacatcctt caggtaccca aagtggcatt ttcaatatca agctaccggg 5940

atccagtaag atttttctg tttattgcga tcaagagacc agtttgggag gatggctttt 6000

gatccagcaa agaatggatg gatcactgaa ttttaaccgg acctggcaag actacaagag 6060

aggtttcggc agcctgaatg acgaggggga aggagaattc tggctaggca atgactacct 6120

ccacttacta acccaaaggg gctctgttct tagggttgaa ttagaggact gggctgggaa 6180

tgaagcttat gcagaatatc acttccgggt aggctctgag gctgaaggct atgccctcca 6240

agtctcctcc tatgaaggca ctgcgggtga tgctctgatt gagggttccg tagaggaagg 6300

ggcagagtac acctctcaca acaacatgca gttcagcacc tttgacaggg atgcagacca 6360

gtgggaagag aactgtgcag aagtctatgg gggaggctgg tggtataata actgccaagc 6420

agccaatctc aatggaatct actaccctgg gggctcctat gacccaagga ataacagtcc 6480

ttatgagatt gagaatggag tggtctgggt ttcctttaga ggggcagatt attccctcag 6540

ggctgttcgc atgaaaatta ggccccttgt gacccaatag gctgaagaag tgggaatggg 6600

agcactctgt cttctttgct agagaagtgg agagaaaata caaaaggtaa agcagttgag 6660

attctctaca acctaaaaaa ttcctaggtg ctattttctt atcctttgta ctgtagctaa 6720

atgtacctga gacatattag tctttgaaaa ataaagttat gtaaggtttt ttttatcttt 6780

aaatagctct gtgggtttta acatttttgt aaagatatac caagggccat tcagtacatc 6840

aggaaagtgg cagacagaag cttctctctg caaccttgaa gactattggt ttgagaactt 6900

ctcttcccat accacccaaa atcataatgc cattggaaag caaaaagttg ttttatccat 6960

ttgatttgaa ttgttttaag ccaatatttt aaggtaaaac tcactgaatc taaccatagc 7020

tgacctttgt agtagaattt acaacttata attacaatgc acaatttata attacaatat 7080

gtatttatgt cttttgctat ggagcaaatc caggaaggca agagaaacat tctttcctaa 7140

atataaatga aaatctatcc tttaaactct tccactagac gttgtaatgc acacttattt 7200

ttttcccaag gagtaaccaa tttctttcta aaacacattt aaaattttaa aactatttat 7260

gaatattaaa aaaagacata attcacacat taataaacaa tctcccaagt attgatttaa 7320

cttcattttt ctaataatca taaactatat tctgtgacat gctaattatt attaaatgta 7380

agtcgttagt tcgaaagcct ctcactaagt atgatctatg ctatattcaa aattcaaccc 7440

atttactttg gtcaatattt gatctaagtt gcatctttaa tcctggtggt cttgccttct 7500

gatttttaat ttgtatcctt ttctattaag atatatttgt cattttctct tgaatatgta 7560

ttaaaatatc ccaagc 7576

<210> 2

<211> 8878

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fibrinogen beta chain gene

<400> 2

gaattcatgc ccctttgaa atagacttat gtcattgtca gaaaacataa gcatttatgg 60

tatatcatta atgagtcacg attttagtgg ttgccttgtg agtaggtcaa atttactaag 120

cttagatttg ttttctcaca tattctttcg gagcttgtgt agtttccaca ttaatttacc 180

agaaacaaga tacacactct ctttgaggag tgccctaact tcccatcatt ttgtccaatt 240

aaatgaattg aagaaattta atgtttctaa actagaccaa caaagaataa tagttgtatg 300

acaagtaaat aagctttgct gggaagatgt tgcttaaatg ataaaatggt tcagccaaca 360

agtgaaccaa aaattaaata ttaactaagg aaaggtaacc atttctgaag tcattcctag 420

cagaggactc agatatatat aggattgaag atctctcagt taagtctaca tgaaaaggat 480

ggtttcttgg agcttccaca aacttaaaac catgaaacat ctattattgc tactattgtg 540

tgtttttcta gttaagtccc aaggtgtcaa cgacaatgag gaggtgaatt ttttaaagca 600

ttattatatt attagtagta ttattaatat aagatgtaac ataatcatat tatgtgctta 660

ttttaatgaa attagcattg cttatagtta tgaaatggaa ttgttaacct ctgacttatt 720

gtatttaaag aatgtttcat agtatttctt atataaaaac aaagtaattt cttgttttct 780

agtttatcac ctttgttttc ttaagatgag gatggcttag ctaatgtaag atgtgttttt 840

ctcacttgct attctgagta ctgtgatttt catttacttc tagcaataca ggattacaat 900

taagaggaca agatctgaaa atctcacaaa ctataaaata ataaaagagc agaattttaa 960

gataaaagaa actggtggta ggtagattgt tctttggtga aggaaggtaa tatatattgt 1020

tactgagatt actatttata aaaattataa ctaagcctaa aagcaaaata catcaagtgt 1080

aatgatagaa aatgaaatat tgctttttc agatgaaaag ttcaaattag agttagtgtg 1140

tattgttatt attaatagtt atgaaacacg gttcagtcta atttatttat ttgtagaaca 1200

gtttgtcctc aactattatt tttgctgact tattgctgtt aatttgcagt tactaaaaat 1260

acagaaatgc atttaggaca atggatattt aagaaattta aattttatca tcaaacgtat 1320

catggccaaa tttcttacat atagcatagt atcattaaac tagaaataag aatacacaat 1380

aatatttaaa tgaagtgatt catttcggat cattattgag tttcaaggga acttgagtgt 1440

tgtacttatc agactctaca tgtaagaaca tatagttaat ctggttgtgt gtgtaaaaac 1500

atatggttaa tctggttaag tctggttaat catattaggt aagaaaaatg taaagaatgt 1560

gtaagacgaa atttttgtaa agtactctgc aaagcacttt cacatttctg cttatcaact 1620

aaacctcaca gagatagttt aatagtttag gctttaaaat ggattttgat tattcaacaa 1680

gtggccttca taatttcttt aagtgttttt ctttaagtat atactttctt taaatatttt 1740

ttaaaatttc cttttctcta gtaaagccag accatccatg ctacctctct agtggcactc 1800

tgaaataaaa agaaaatagt tttctctgtt ataattgtat ttgtaataag cagatgaatc 1860

acatttctta aaatttgttt tagagagggt aagctctgac taggaccatg acttcaatgt 1920

gaaatatgta tatatcctcc gaatctttac atattaagaa tgtatatagt caactggtta 1980

aacaggaaaa tctggaacag cctggctggg ttttaatctt agcaccatcc tactaaatgt 2040

taaataatat tataatctaa tgaataaatg acaatgcaat tccaaataga gttcatctga 2100

tgacttctag actcacaaaa ttgcaagaga gctcagttgt tgctcagttg ttccaaatca 2160

tgtcgtttgt taatttgtaa ttaagctcca aaggatgtat agctactgac aaaaaaaaaa 2220

atgagaatgt agttaatcca aatcaaaact ttcctattgc aatgcgtatt ttctgcttca 2280

ttatccttta atataatatt ttaagttagc aagtaatttt aattacaatg cacaagcctt 2340

gagaattatt ttaaatataa gaaaatcata atgtttgata aagaaatcat gtaagaaatt 2400

tcaagataat ggtttaacaa ataattttgt tgatagaaga taagactaaa agtgaaattc 2460

gaagtggaga ggacacttaa actgtagtac ttgttatgtg tgattccagt aaaaatagta 2520

atgagcactt attattgcca agtactgttc tgagggtacc atatgcaata agttatttaa 2580

tccttacaat aatcttgtaa ggcagattca aactatcatt acacttattt tacagatgag 2640

aaaactgggg cacagataaa gcaacttgcc caaggtctca tagctgtaag tcaaccctac 2700

ggtcaagacc tacaagtagc cgagctccag agtacattat gagggtcaaa gattgtctta 2760

ttacaaataa attccaagta gaatcaacct ttaataagtc tttaatgtct cttaaatatg 2820

tttatatagg agtctaatca ccaattcaca aaaatgaaag tagggaaatg attaacaata 2880

atcataggaa tctaacaatc caagtggctt gagaatattc attcttcttg acagtataga 2940

ttctttacaa tttcgtaagt tccaatgtat gttttaggaa tatgaggtca ttactattca 3000

taatctgata cagctttatc ctaaggcctc tctttaaaaa ctacactgca tcatagcttt 3060

tttgtgcagt tggtctttct actgttactg aacagtaagc aacctacaga ttcactatca 3120

ccaaccagcc agttgatgga tcttaagcaa attatcaagc ttgtgataac ctaaattata 3180

aaatgagggt gttggaatag ttacattcca aatcttctat aacactctgt attatatttc 3240

tgcctcattc cttgtagggt ttcttcagtg cccgtggtca tcgacccctt gacaagaaga 3300

gagaagaggc tcccagcctg aggcctgccc caccgcccat cagtggaggt ggctatcggg 3360

ctcgtccagc caaagcagct gccactcaaa agaaagtaga aagaaaagcc cctgatgctg 3420

gaggctgtct tcacgctgac ccagacctgg tgggtgcact gatgtttctt gcagtggtgg 3480

ctctctcatg cagagaaagc ctgtagtcat ggcagtctgc taatgtttca ctgacccaca 3540

ttaccatcac tgttattttg tttgtttatt ttggaaataa aattcaaaac ataaacatat 3600

tgggcctttg gtttaggctt tctttcttgt tttctttggt ctgggcccaa aatttcaaat 3660

taggatatgt gggtgccacc tttccatttg tattttgcca ctgcctttgt ttagttggta 3720

aaattttcat agcccaatta tatttttct ggggtaagta atattttaaa tctctatgag 3780

agtatgatga tgactttcga atttctggtc ttacagaaaa ccaaataata aatttttatg 3840

ttggctaatc gtatcgctga attttcctat gtgctatttt aacaaatgtc catgacccaa 3900

atccttcatc taatgcctgc tattttcttt gtttttaggg ggtgttgtgt cctacaggat 3960

gtcagttgca agaggctttg ctacaacagg aaaggccaat cagaaatagt gttgatgagt 4020

taaataacaa tgtggaagct gtttcccaga cctcctcttc ttcctttcag tacatgtatt 4080

tgctgaaaga cctgtggcaa aagaggcaga agcaagtaaa aggtagatat ccttgtgctt 4140

tccattcgat tttcagctat aaaattggaa ccgttagact gccacgagaa tgcatggttg 4200

tgagaagatt aacatttctg ggttagtgaa tagcattcat acgcttttgg gcaccttccc 4260

ctgcaacttg ccagataagc actattcagc tcttattccc agtctgacat cagcaagtgt 4320

gattttctat gaaaaattct actatgactc cttattttaa gtatacaaga aacttgtgac 4380

tcagaagata atatttacag agtggaaaaa aacccctagc atttatagtt ttaacatttg 4440

aggttttgaa tgagagagtt atccataata tattcaattg tgttgtggat aatgacacct 4500

aacctgtgaa tcttgaggtc agaatgttga gtgctgttga cttggtggtc aggaaacagc 4560

tagtgcgtga gcctggcaca ggcatctcag tgagtagcat acccacagtt ggaaatttt 4620

caaagaaatc aaaggaatca tgacatctta taaatttcaa ggttctgcta tacttatgtg 4680

aaatggataa ataaatcaag catatccact ctgtaagatt gaacttctca gatggaagac 4740

cccaatactg ctttctcctc ttttccctca ccaaagaaat aaacaaccta tttcatttat 4800

tactggacac aatctttagc gtatacctat ggtaaattac tagtatggtg gttaggattt 4860

atgttaattt gtatatgtca tgcgccaaat catttccact aaatatgact atatatcata 4920

actgcttggt gatagctcag tgtttaatag tttattctca gaaaatcaaa attgtatagt 4980

taaatacatt agttttatga ggcaaaaatg ctaactattt ctacataatt tcatttttcc 5040

agataatgaa aatgtagtca atgagtactc ctcagaactg gaaaagcacc aattatatat 5100

agatgagact gtgaatagca atatcccaac taaccttcgt gtgcttcgtt caatcctgga 5160

aaacctgaga agcaaaatac aaaagttaga atctgatgtc tcagctcaaa tggaatattg 5220

tcgcacccca tgcactgtca gttgcaatat tcctgtggtg tctggcaaag gtaactgatt 5280

cataaacata tttttagaga gttccagaag aactcacaca ccaaaaataa gagaacaaca 5340

acaacaacaa aaatgctaag tggattttcc caacagatca taatgacatt acagtacatc 5400

ataaaaatat ccttagccag ttgtgttttg gactggcctg gtgcatttgc tggttttgat 5460

gagcaggatg gggcacaggt agtcccaggg gtggctgatg tgtgcatctg cgtactggct 5520

tgaacagatg gcagaaccac agatagatgt agaagtttct ccattttgtg tgttctggga 5580

gctcatggat attccaggac acaaaaggtg gagaagagct ttgttcatcc tcttagcaga 5640

taaacgtcct caaaactggg ttggacttac taaagtaaaa tgaaaatcta atatttgtta 5700

tattattttc aaaggtctat aataacacac tccttagtaa cttatgtaat gttattttaa 5760

agaattggtg actaaataca aagtaattat gtcataaacc cctgaacata atgttgtctt 5820

acatttgcag aatgtgagga aattatcagg aaaggaggtg aaacatctga aatgtatctc 5880

attcaacctg acagttctgt caaaccgtat agagtatact gtgacatgaa tacagaaaat 5940

ggaggtaagc tttcgacagt tgttgacctg ttgatctgta attatttgga taccgtaaaa 6000

tgccaggaaa caaggccagg tgtggtggct catacctgta attccagcac cttgggaggc 6060

caaagtgggc tgatagcttg agcctaggag tttgaaacta gcctgggcaa cataatgaga 6120

ccctaactct acaaaaaaaa aaaaaatacc aaaaaaaaaa aaaaaatcag ctgtgttggt 6180

agtatgtgcc tgtagtccca gctatccagg aggctgagat gggagatcac ctgagcccac 6240

aacctggagt cttgatcatg ctactgaact gtagcctggg caacagagga tagtgagatc 6300

ctgtctcaaa aaaaaaaatt aattaaaaag ccaggaaaca agacttagct ctaacatcta 6360

acatagctga caaaggagta atttgatgtg gaattcaacc tgatatttaa aagttataaa 6420

atatctataa ttcacaattt ggggtaagat aaagcacttg cagtttccaa agattttaca 6480

agtttacctc tcatatttat ttccttattg tgtctatttt agagcaccaa atatatacta 6540

aatggaatgg acaggggatt cagatattat tttcaaagtg acattatttg ctgttggtta 6600

atatatgctc tttttgtttc tgtcaaccaa aggatggaca gtgattcaga accgtcaaga 6660

cggtagtgtt gactttggca ggaaatggga tccatataaa cagggatttg gaaatgttgc 6720

aaccaacaca gatgggaaga attactgtgg cctaccaggt aacgaacagg catgcaaaat 6780

aaaatcattc tatttgaaat gggatttttt ttaattaaaa aacattcatt gttggaagcc 6840

tgttttaggc agttaagagg agtttcctga caaaaatgtg gaagctaaag ataagggaag 6900

aaaggcagtt tttagtttcc caaaatttta tttttggtga gagattttat tttgtttttc 6960

ttttaggtga atattggctt ggaaatgata aaattagcca gcttaccagg atgggaccca 7020

cagaactttt gatagaaatg gaggactgga aaggagacaa agtaaaggct cactatggag 7080

gattcactgt acagaatgaa gccaacaaat accagatctc agtgaacaaa tacagaggaa 7140

cagccggtaa tgccctcatg gatggagcat ctcagctgat gggagaaaac aggaccatga 7200

ccattcacaa cggcatgttc ttcagcacgt atgacagaga caatgacggc tggtatgtgt 7260

ggcactcttt gctcctgctt taaaaatcac actaatatca ttactcagaa tcattaacaa 7320

tatttttaat agctaccact tcctgggcac ttactgtcag ccactgtcct aagctcttta 7380

tgcatcactc gaaagcattt caactataag gtagacattc ttattctcat tttacagatg 7440

agatttagag agattacgtg atttgtccaa tgtcacacaa ctacccagag ataaaactag 7500

aatttgagca cagttacttt ctgaataatg agcatttaga taaataccta tatctctata 7560

ttctaaagtg tgtgtgaaaa ctttcatttt catttccagg gttctctgat actaagggtt 7620

gtaaaagcta ttattccagt ataaagtaac aaacacagtc cctagatgga ttgccacaaa 7680

ggcccagtta tctctctttc ttgctatagg gcacaggagg tctttggtgt attagtgtga 7740

ctctatgtat agcacccaaa ggaaagacta ctgtgcacac gagtgtagca gtcttttatg 7800

ggtaatctgc aaaacgtaac ttgaccaccg tagttctgtt tctaataacg ccaaacacat 7860

tttctttcag gttaacatca gatcccagaa aacagtgttc taaagaagac ggtggtggat 7920

ggtggtataa tagatgtcat gcagccaatc caaacggcag atactactgg ggtggacagt 7980

acacctggga catggcaaag catggcacag atgatggtgt agtatggatg aattggaagg 8040

ggtcatggta ctcaatgagg aagatgagta tgaagatcag gcccttcttc ccacagcaat 8100

agtccccaat acgtagattt ttgctcttct gtatgtgaca acatttttgt acattatgtt 8160

attggaattt tctttcatac attatattcc tctaaaactc tcaagcagac gtgagtgtga 8220

ctttttgaaa aaagtatagg ataaattaca ttaaaatagc acatgatttt cttttgtttt 8280

cttcatttct cttgctcacc caagaagtaa caaaagtata gttttgacag agttggtgtt 8340

cataatttca gttctagttg attgcgagaa ttttcaaata aggaagaggg gtcttttatc 8400

cttgtcgtag gaaaaccatg acggaaagga aaaactgatg tttaaaagtc cacttttaaa 8460

actatattta tttatgtagg atctgtcaaa gaaaacttcc aaaaagattt attaattaaa 8520

ccagactctg ttgcaataag ttaatgtttt cttgttttgt aatccacaca ttcaatgagt 8580

taggctttgc acttgtaagg aaggagaagc gttcacaacc tcaaatagct aataaaccgg 8640

tcttgaatat ttgaagattt aaaatctgac tctaggacgg gcacggtggc tcacgactat 8700

aatcccaaca ctttgggagg ctgaggcggg cggtcacaag gtcaggagtt caagaccagc 8760

ctgaccaata tggtgaaacc ccatctctac taaaaataca aaaattagcc aggcgtggtg 8820

gcaggtgcct gtaggtccca gctagcctgt gaggtggaga ttgcattgag ccaagatc 8878

<210> 3

<211> 1589

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fibrinogen gamma chain gene

<400> 3

ggggagtgct gacactacaa ggctcggagc tccgggcact cagacatcat gagttggtcc 60

ttgcaccccc ggaatttaat tctctacttc tatgctcttt tatttctctc ttcaacatgt 120

gtagcatatg ttgctaccag agacaactgc tgcatcttag atgaaagatt cggtagttat 180

tgtccaacta cctgtggcat tgcagatttc ctgtctactt atcaaaccaa agtagacaag 240

gatctacagt ctttggaaga catcttacat caagttgaaa acaaaacatc agaagtcaaa 300

cagctgataa aagcaatcca actcacttat aatcctgatg aatcatcaaa accaaatatg 360

atagacgctg ctactttgaa gtccaggaaa atgttagaag aaattatgaa atatgaagca 420

tcgattttaa cacatgactc aagtattcga tatttgcagg aaatatataa ttcaaataat 480

caaaagattg ttaacctgaa agagaaggta gcccagcttg aagcacagtg ccaggaacct 540

tgcaaagaca cggtgcaaat ccatgatatc actgggaaag attgtcaaga cattgccaat 600

aagggagcta aacagagcgg gctttacttt attaaacctc tgaaagctaa ccagcaattc 660

ttagtctact gtgaaatcga tgggtctgga aatggatgga ctgtgtttca gaagagactt 720

gatggcagtg tagatttcaa gaaaaactgg attcaatata aagaaggatt tggacatctg 780

tctcctactg gcacaacaga attttggctg ggaaatgaga agattcattt gataagcaca 840

cagtctgcca tcccatatgc attaagagtg gaactggaag actggaatgg cagaaccagt 900

actgcagact atgccatgtt caaggtggga cctgaagctg acaagtaccg cctaacatat 960

gcctacttcg ctggtgggga tgctggagat gcctttgatg gctttgattt tggcgatgat 1020

cctagtgaca agtttttcac atcccataat ggcatgcagt tcagtacctg ggacaatgac 1080

aatgataagt ttgaaggcaa ctgtgctgaa caggatggat ctggttggtg gatgaacaag 1140

tgtcacgctg gccatctcaa tggagtttat taccaaggtg gcacttactc aaaagcatct 1200

actcctaatg gttatgataa tggcattatt tgggccactt ggaaaacccg gtggtattcc 1260

atgaagaaaa ccactatgaa gataatccca ttcaacagac tcacaattgg agaaggacag 1320

caacaccacc tgggggggagc caaacaggct ggagacgttt aaaagaccgt ttcaaaagag 1380

atttactttt ttaaaggact ttatctgaac agagagatat aatatttttc ctattggaca 1440

atggacttgc aaagcttcac ttcattttaa gagcaaaaga ccccatgttg aaaactccat 1500

aacagtttta tgctgatgat aatttatcta catgcatttc aataaacctt ttgtttcctc 1560

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 1589

<210> 4

<211> 644

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fibrinogen alpha chain protein

<400> 4

Met Phe Ser Met Arg Ile Val Cys Leu Val Leu Ser Val Val Gly Thr
1 5 10 15

Ala Trp Thr Ala Asp Ser Gly Glu Gly Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly
20 25 30

Gly Val Arg Gly Pro Arg Val Val Glu Arg His Gln Ser Ala Cys Lys
35 40 45

Asp Ser Asp Trp Pro Phe Cys Ser Asp Glu Asp Trp Asn Tyr Lys Cys
50 55 60

Pro Ser Gly Cys Arg Met Lys Gly Leu Ile Asp Glu Val Asn Gln Asp
65 70 75 80

Phe Thr Asn Arg Ile Asn Lys Leu Lys Asn Ser Leu Phe Glu Tyr Gln
85 90 95

Lys Asn Asn Lys Asp Ser His Ser Leu Thr Thr Asn Ile Met Glu Ile

100 105 110

Leu Arg Gly Asp Phe Ser Ser Ala Asn Asn Arg Asp Asn Thr Tyr Asn
115 120 125

Arg Val Ser Glu Asp Leu Arg Ser Arg Ile Glu Val Leu Lys Arg Lys
130 135 140

Val Ile Glu Lys Val Gln His Ile Gln Leu Leu Gln Lys Asn Val Arg
145 150 155 160

Ala Gln Leu Val Asp Met Lys Arg Leu Glu Val Asp Ile Asp Ile Lys

165 170 175

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

245 250 255
Met Arg Met Glu Leu Glu Arg Pro Gly Gly Asn Glu Ile Thr Arg Gly
260 265 270
Gly Ser Thr Ser Tyr Gly Thr Gly Ser Glu Thr Glu Ser Pro Arg Asn
275 280 285
Pro Ser Ser Ala Gly Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ser Gly Pro Gly Ser
290 295 300
Thr Gly Asn Arg Asn Pro Gly Ser Ser Gly Thr Gly Gly Thr Ala Thr
305 310 315 320

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

385 390 395 400
Gly Asn Ala Arg Pro Asn Asn Pro Asp Trp Gly Thr Phe Glu Glu Val
405 410 415

Ser Gly Asn Val Ser Pro Gly Thr Arg Arg Glu Tyr His Thr Glu Lys
420 425 430
Leu Val Thr Ser Lys Gly Asp Lys Glu Leu Arg Thr Gly Lys Glu Lys
435 440 445
Val Thr Ser Gly Ser Thr Thr Thr Thr Arg Arg Ser Cys Ser Lys Thr
450 455 460

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

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

Ser Glu Ala Asp His Glu Gly Thr His Ser Thr Lys Arg Gly His Ala
610 615 620
Lys Ser Arg Pro Val Arg Gly Ile His Thr Ser Pro Leu Gly Lys Pro
625 630 635 640
Ser Leu Ser Pro

<210> 5
<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fibrinogen beta chain protein

<400> 5

Met Lys Arg Met Val Ser Trp Ser Phe His Lys Leu Lys Thr Met Lys
1 5 10 15

His Leu Leu Leu Leu Leu Leu Cys Val Phe Leu Val Lys Ser Gln Gly
20 25 30

Val Asn Asp Asn Glu Glu Gly Phe Phe Ser Ala Arg Gly His Arg Pro
35 40 45

Leu Asp Lys Lys Arg Glu Glu Ala Pro Ser Leu Arg Pro Ala Pro Pro
50 55 60

Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Arg Ala Arg Pro Ala Lys Ala Ala Ala
65 70 75 80

Thr Gln Lys Lys Val Glu Arg Lys Ala Pro Asp Ala Gly Gly Cys Leu
85 90 95

His Ala Asp Pro Asp Leu Gly Val Leu Cys Pro Thr Gly Cys Gln Leu
100 105 110

Gln Glu Ala Leu Leu Gln Gln Glu Arg Pro Ile Arg Asn Ser Val Asp
115 120 125

Glu Leu Asn Asn Asn Val Glu Ala Val Ser Gln Thr Ser Ser Ser Ser
130 135 140

Phe Gln Tyr Met Tyr Leu Leu Lys Asp Leu Trp Gln Lys Arg Gln Lys
145 150 155 160

Gln Val Lys Asp Asn Glu Asn Val Val Asn Glu Tyr Ser Ser Glu Leu
165 170 175

Glu Lys His Gln Leu Tyr Ile Asp Glu Thr Val Asn Ser Asn Ile Pro
180 185 190

Thr Asn Leu Arg Val Leu Arg Ser Ile Leu Glu Asn Leu Arg Ser Lys
195 200 205

Ile Gln Lys Leu Glu Ser Asp Val Ser Ala Gln Met Glu Tyr Cys Arg
210 215 220

Thr Pro Cys Thr Val Ser Cys Asn Ile Pro Val Val Ser Gly Lys Glu

225 230 235 240

Cys Glu Glu Ile Ile Arg Lys Gly Gly Glu Thr Ser Glu Met Tyr Leu

245 250 255

Ile Gln Pro Asp Ser Ser Val Lys Pro Tyr Arg Val Tyr Cys Asp Met

260 265 270

Asn Thr Glu Asn Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln Asn Arg Gln Asp Gly

275 280 285

Ser Val Asp Phe Gly Arg Lys Trp Asp Pro Tyr Lys Gln Gly Phe Gly

290 295 300

Asn Val Ala Thr Asn Thr Asp Gly Lys Asn Tyr Cys Gly Leu Pro Gly

305 310 315 320

Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Asp Lys Ile Ser Gln Leu Thr Arg Met Gly

325 330 335

Pro Thr Glu Leu Leu Ile Glu Met Glu Asp Trp Lys Gly Asp Lys Val

340 345 350

Lys Ala His Tyr Gly Gly Phe Thr Val Gln Asn Glu Ala Asn Lys Tyr

355 360 365

Gln Ile Ser Val Asn Lys Tyr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Ala Leu Met

370 375 380

Asp Gly Ala Ser Gln Leu Met Gly Glu Asn Arg Thr Met Thr Ile His

385 390 395 400

Asn Gly Met Phe Phe Ser Thr Tyr Asp Arg Asp Asn Asp Gly Trp Leu

405 410 415

Thr Ser Asp Pro Arg Lys Gln Cys Ser Lys Glu Asp Gly Gly Gly Trp

420 425 430

Trp Tyr Asn Arg Cys His Ala Ala Asn Pro Asn Gly Arg Tyr Tyr Trp

435 440 445

Gly Gly Gln Tyr Thr Trp Asp Met Ala Lys His Gly Thr Asp Asp Gly

450 455 460

Val Val Trp Met Asn Trp Lys Gly Ser Trp Tyr Ser Met Arg Lys Met

465 470 475 480

Ser Met Lys Ile Arg Pro Phe Phe Pro Gln Gln

485 490

<210> 6

<211> 437

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fibrinogen gamma chain protein

<400> 6

Met Ser Trp Ser Leu His Pro Arg Asn Leu Ile Leu Tyr Phe Tyr Ala

1 5 10 15

Leu Leu Phe Leu Ser Ser Thr Cys Val Ala Tyr Val Ala Thr Arg Asp

20 25 30

Asn Cys Cys Ile Leu Asp Glu Arg Phe Gly Ser Tyr Cys Pro Thr Thr

35 40 45

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

50 55 60

Asp Leu Gln Ser Leu Glu Asp Ile Leu His Gln Val Glu Asn Lys Thr

65 70 75 80

Ser Glu Val Lys Gln Leu Ile Lys Ala Ile Gln Leu Thr Tyr Asn Pro

85 90 95

Asp Glu Ser Ser Lys Pro Asn Met Ile Asp Ala Ala Thr Leu Lys Ser

100 105 110

Arg Lys Met Leu Glu Glu Ile Met Lys Tyr Glu Ala Ser Ile Leu Thr

115 120 125

His Asp Ser Ser Ile Arg Tyr Leu Gln Glu Ile Tyr Asn Ser Asn Asn

130 135 140

Gln Lys Ile Val Asn Leu Lys Glu Lys Val Ala Gln Leu Glu Ala Gln

145 150 155 160

Cys Gln Glu Pro Cys Lys Asp Thr Val Gln Ile His Asp Ile Thr Gly

165 170 175

Lys Asp Cys Gln Asp Ile Ala Asn Lys Gly Ala Lys Gln Ser Gly Leu

180 185 190

Tyr Phe Ile Lys Pro Leu Lys Ala Asn Gln Gln Phe Leu Val Tyr Cys

195 200 205

Glu Ile Asp Gly Ser Gly Asn Gly Trp Thr Val Phe Gln Lys Arg Leu

210 215 220

Asp Gly Ser Val Asp Phe Lys Lys Asn Trp Ile Gln Tyr Lys Glu Gly

225 230 235 240

Phe Gly His Leu Ser Pro Thr Gly Thr Thr Glu Phe Trp Leu Gly Asn

245 250 255

Glu Lys Ile His Leu Ile Ser Thr Gln Ser Ala Ile Pro Tyr Ala Leu

260 265 270

Arg Val Glu Leu Glu Asp Trp Asn Gly Arg Thr Ser Thr Ala Asp Tyr

275 280 285

Ala Met Phe Lys Val Gly Pro Glu Ala Asp Lys Tyr Arg Leu Thr Tyr

290 295 300

Ala Tyr Phe Ala Gly Gly Asp Ala Gly Asp Ala Phe Asp Gly Phe Asp

305 310 315 320

Phe Gly Asp Asp Pro Ser Asp Lys Phe Phe Thr Ser His Asn Gly Met

325 330 335

Gln Phe Ser Thr Trp Asp Asn Asp Asn Asp Lys Phe Glu Gly Asn Cys

340 345 350

Ala Glu Gln Asp Gly Ser Gly Trp Trp Met Asn Lys Cys His Ala Gly

355 360 365

His Leu Asn Gly Val Tyr Tyr Gln Gly Gly Thr Tyr Ser Lys Ala Ser

370 375 380

Thr Pro Asn Gly Tyr Asp Asn Gly Ile Ile Trp Ala Thr Trp Lys Thr

385 390 395 400

Arg Trp Tyr Ser Met Lys Lys Thr Thr Met Lys Ile Ile Pro Phe Asn

405 410 415

Arg Leu Thr Ile Gly Glu Gly Gln Gln His His Leu Gly Gly Ala Lys

420 425 430

Gln Ala Gly Asp Val

435