



등록특허 10-2355568



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년02월07일

(11) 등록번호 10-2355568

(24) 등록일자 2022년01월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/6883 (2018.01)

G01N 33/573 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6893 (2013.01)

C12Q 1/6883 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2020-0089566

(22) 출원일자 2020년07월20일

심사청구일자 2020년07월20일

(56) 선행기술조사문헌

US20170138963 A1*

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

유지환

서울특별시 서대문구 연희로32길 48

천재희

서울특별시 종로구 사직로8길 20, 101동 803호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

파도특허법인유한회사, 이재영

전체 청구항 수 : 총 11 항

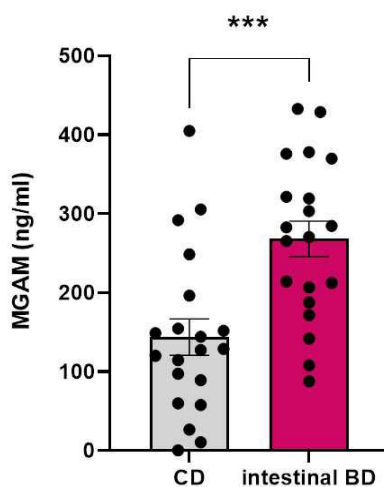
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 베체트 장염의 진단용 바이오마커

(57) 요약

본 발명의 바이오마커는 정상 대조군과 비교하여 그 질환의 발병 여부 및 가능성을 예측할 수 있을 뿐만 아니라, 증상만으로 구별하여 진단하기 힘든 크론병과 베체트 장염을 매우 효과적으로 구별하여 진단할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 33/573 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/924 (2013.01)
G01N 2800/06 (2013.01)

(72) 발명자

정연욱

서울특별시 동대문구 장안벚꽃로 107, 119-1501(장안동, 장안현대홈타운)

박지혜

서울시 종로구 사직로8길 4, 101동(사직동, 광화문푸름스페이스본)

정다운

경기도 파주시 하우안길 24-37

(56) 선행기술조사문헌

KR1020200059173 A
KR1020150062690 A
KR1020180119717 A
JP2020014446 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105337
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	유용 프로바이오틱스 발굴 시스템 개발 및 노토바이오틱 마우스기반 유효성 검증
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465027610
과제번호	HI18C0094010019
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구자 주도 질병극복연구
연구과제명	염증성 장질환 경구용 치료전달체의 효능 평가 및 신규 표적 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

말타아제-글루코아밀라제 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 베체트병 진단용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 베체트병은 베체트 장염인 것인, 진단용 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고캡타이드, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것인, 진단용 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자에 상보적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것인, 진단용 조성물.

청구항 7

제3항 내지 제6항 중 어느 한 항의 진단용 조성물을 포함하는 베체트병의 진단용 키트.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 베체트병은 베체트 장염인 것인, 진단용 키트.

청구항 9

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, 말타아제-글루코아밀라제 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 베체트병을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 방법은 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역 분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법,

2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(Liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(Liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏팅 및 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, 정보 제공 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법은 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, 정보 제공 방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 베체트병은 베체트 장염인 것인, 정보 제공 방법.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 정보 제공 방법은 말타아제-글루코아밀라제 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군과 비교하여 증가된 경우, 베체트병의 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는 것인, 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 베체트 장염의 진단용 바이오마커에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 한국, 중국, 일본, 터키 등 지중해 연안부터 극동 아시아에 이르는 지역에 그 발병 빈도가 상대적으로 서구에 비해 높은 베체트병은 전신적인 혈관염으로서, 구강이나 성기 또는 장 등의 점막 부위의 궤양, 관절염부터 혈관 및 중추 신경계 등의 중요 장기 침범 등의 증상을 특징으로 하는 원인미상의 질병이다. 즉, 혈액이 흐르는 어디든 발생할 수 있는 전신성 혈관염에 해당하며, 다양한 임상 증상 및 중증도의 증상을 보인다. 베체트병은 다양한 임상 양상을 보이며, 일부에서는 심각한 합병증과 장애를 유발할 수 있으므로, 베체트병을 조기에 진단하는 것은 매우 중요하다. 베체트병의 발병률이 높은 것으로 알려진 터키를 기준으로, 매년 환자 1인당 일반적인 베체트병의 치료에 약 3,300 달러의 경비가 소요되며, 신경학적 증상을 보이는 베체트병 환자는 약 5,000 달러의 경비가 소요되는 것으로 보고되었다. 특히, 20대에서 40대에서 가장 높은 질병의 활성도를 보이기 때문에, 젊은 연령에서 심각한 합병증의 발생으로 인한 경제적, 사회적 손실이 매우 큰 질환에 해당한다. 뿐만 아니라, 베체트병 환자의 약 42% 정도는 연중 대부분의 날 동안 일을 하지 못하기 때문에 사회적인 손실이 더욱 큰 질환에 해당한다. 우리나라에서도 베체트병은 서구에 비해 유병률이 높은 질환이기에, 베체트병으로 인한 직간접적인 의료비로 인해 지출해야 하는 경비가 매우 클 것으로 예상된다.

[0003] 한편, 현재 베체트병 환자와 건강한 사람을 구분할 수 있는 객관적인 진단용 생체표지자가 없으므로, 베체트병의 진단은 주로 임상적인 증상에 의존한다. 그러나 베체트병은 다양한 임상 증상을 보이기에, 임상적 증상에 기반한 진단은 낮은 민감도 및 특이성을 보인다. 또한, 발병 후 베체트병의 확진까지 오랜 시간이 걸리는 문제점이 있다. 특히, 베체트 장염(Intestinal Bechet's disease)과 크론병(Crohn's disease)은 유사한 증상이 나타나며 내시경 소견, 조직학적 소견 역시 유사하게 나타나 구분이 어려운 실정이다. 하지만 이와 같은 질환을 구별하기 위한 임상 병리학적인 소견, 실험 방법 또는 조직학적 진단 테스트는 아직까지 연구된 바가 없다.

[0004] 이와 같은 한계를 극복하기 위해서, 객관적인 진단적 생체표지자를 발명하는 것은 매우 중요하다. 베체트병, 특히 베체트 장염을 진단할 수 있는 객관적인 진단적 생체표지자를 발굴할 수 있으면, 이와 같은 질환을 조기에 진단함으로써, 확진에 걸리는 시간을 줄이고, 질병 수준에 적절한 맞춤형 치료를 가능하게 하여, 증상 악화 및 고가의 불필요한 치료를 피할 수 있다. 또한, 질환 관련 예후에 정확한 정보를 제공하여 더 좋은 치료 성적을

거둘 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명의 일 목적은 베체트병 진단용 바이오마커를 제공하는 것이다.
- [0006] 본 발명의 다른 목적은 베체트병 진단용 조성물; 및 이를 포함하는 키트를 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 또 다른 목적은 베체트병을 진단하기 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명의 일 구현 예에서는 베체트병 진단용 바이오마커를 제공한다.
- [0010] 본 발명의 일 구체 예에서는 베체트 장염 진단용 바이오마커를 제공한다.
- [0011] 본 발명의 상기 바이오마커는 말타아제-글루코아밀라제(maltase-glucoamylase; MGAM) 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함한다.
- [0012] 본 발명의 상기 "말타아제-글루코아밀라제(maltase-glucoamylase; MGAM)"는 장에 존재하는 소화 효소로서, 알파-글루코시다아제(alpha-glucosidase) 소화효소에 해당한다. 이와 같은 단백질은 기질 특이성이 다른 두 개의 하위 유닛으로 구성되어 있다. N-말단 측매 도메인은 말토스에 대해 높은 활성을 갖고 있으며, C-말단 도메인은 글루코스 올리고머에 더 넓은 기질 특이성 및 활성을 갖는다. 장에서 이와 같은 단백질은 효소로서, 수크라제-이소말타제 및 알파-아밀라제와 함께 식이성 녹말을 소화시키는데 시너지 효과를 발휘하도록 하는 역할을 한다.
- [0013] 본 발명의 상기 말타아제-글루코아밀라제 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 상기 "바이오마커"는 일반적으로 다양한 생물학적 시료에 존재하는 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자로서, 개체 내 발생할 수 있는 다양한 변화 또는 질환의 발병 등을 대표할 수 있는 지표를 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 바이오마커는 정상 대조군 또는 크론병 환자와 비교하여 그 발현 수준이 증가된 경우, 베체트병, 예를 들면, 베체트 장염의 발병 또는 발생 가능성을 매우 높은 정확도로 대표할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일 구체 예에서는, 상기 말타아제-글루코아밀라제(maltase-glucoamylase; MGAM) 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자가 정상 대조군 또는 크론병 환자와 비교하여 그 발현 수준이 증가된 경우에 베체트병, 예를 들면, 베체트 장염이 이미 발병되었거나 또는 발병 가능성이 높을 것으로 예상할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 상기 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 상기 진단은 베체트병, 예를 들면, 베체트 장염의 발병 여부 또는, 그 발병 가능성을 예상하는 것으로서, 본 발명의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 통해 상기 질환의 발병 여부 또는 가능성을 매우 효과적으로 예상할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 상기 "베체트병"은 전신적인 혈관염으로, 구강이나 성기 또는 장 등의 점막 부위의 궤양, 관절염부터 혈관 및 중추 신경계 등의 중요 장기 침범 등의 증상을 특징으로 하는 원인미상의 질병이다.
- [0018] 본 발명의 상기 베체트병은 베체트 장염일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 베체트 장염에 의해 발생된 궤양은 구강 궤양과는 달리 치료에 잘 반응하지 않으며, 장 출혈이나 천공이 합병되기도 한다. 따라서, 베체트 장염을 조기에, 다른 염증성 장 질환과 구분하여 진단해 내는 것은 매우 중요하다. 본 발명의 목적상 상기 바이오마커는 임상적 증상이 유사한 염증성 장질환에 해당하는 다양한 다른 질환, 특히 크론병(Crohn's disease)과 그 구분을 명확하게 하여 이를 구분하여 진단할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 다른 구현 예에서는 베체트병 진단용 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일 구체 예에서는 베체트 장염 진단용 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 상기 진단용 조성물에서, 상기 베체트병, 베체트 장염, 말타아제-글루코아밀라제 단백질 등과 관련된

내용은 상기 바이오마커에서 기재된 바와 동일하여, 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략한다.

- [0023] 본 발명의 상기 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하여 그 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제라면 제한되지 않는다. 예를 들면, 상기 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 상기 "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 가리킨다. 본 발명의 목적상, 항체는 상기 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 본 발명의 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기 항체는 당업계에서 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 다클론 항체는 상기 단백질의 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 과정을 포함하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산될 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물로부터 제조될 수 있다. 또한, 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method; Kohler 및 Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리 기술(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991 참조)을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전장의 경쇄 및 2개의 전장의 중쇄를 갖는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체의 기능적인 단편을 포함한다.
- [0025] 본 발명의 상기 항체의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0026] 본 발명에 상기 "PNA(Peptide Nucleic Acid)"는 인공적으로 합성된, DNA 또는 RNA와 비슷한 중합체를 가리키며, 1991년 덴마크 코펜하겐 대학교의 Nielsen, Egholm, Berg와 Buchardt 교수에 의해 처음으로 소개되었다. DNA는 인산-리보스당 골격을 갖는데 반해, PNA는 펩타이드 결합에 의해 연결된 반복된 N-(2-아미노에틸)-글리신 골격을 가지며, 이로 인해 DNA 또는 RNA에 대한 결합력과 안정성이 크게 증가되어 분자 생물학, 진단 분석 및 안티센스 치료법에 사용되고 있다. PNA는 문헌[Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O (December 1991). "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide". Science 254 (5037): 1497-1500]에 상세하게 개시되어 있다.
- [0027] 본 발명의 상기 "앵타머"는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 앵타머의 일반적인 내용은 문헌[Bock LC et al., Nature 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". J Mol Med. 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". Proc Natl Acad Sci USA. 95(24): 142727(1998)]에 상세하게 개시되어 있다.
- [0028] 본 발명의 상기 항체, PNA 및 앵타머는 본 발명의 상기 단백질의 아미노산 서열을 기초로 통상의 기술자가 쉽게 제작할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 상기 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 본 발명의 상기 유전자와 상보적으로 결합하여 그 발현 수준을 측정할 수 있는 것이라면 제한되지 않고 모두 포함될 수 있다. 예를 들면, 상기 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자에 상보적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 상기 "프라이머"는 표적 유전자 서열을 인지하는 단편으로서, 정방향 및 역방향의 프라이머 쌍을 포함하나, 바람직하게는, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다. 프라이머의 핵산 서열이 시료 내 존재하는 비-표적 서열과 불일치하는 서열이어서, 상보적인 프라이머 결합 부위를 함유하는 표적 유전자 서열만 증폭하고 비특이적 증폭을 유발하지 않는 프라이머일 때, 높은 특이성이 부여될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 상기 "프로브"란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 상보적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 프로브의 종류는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없으나, 바람직하게는 PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA 또는 DNA일 수 있으며, 가장 바람직하게는 PNA이다. 보다 구체적으로, 상기 프로브는 바이오 물질로서 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체 외에서 제조된 것을 포함하는 것으로, 예를 들어, 효소, 단백질, 항체, 미생물, 동식물 세포 및 기관, 신경세포,

DNA, 및 RNA일 수 있으며, DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, RNA는 게놈 RNA, mRNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

- [0032] 본 발명의 상기 "LNA(Locked nucleic acids)"란, 2'-O, 4'-C 메틸렌 브릿지를 포함하는 핵산 아날로그를 의미한다 [J Weiler, J Hunziker and J Hall Gene Therapy (2006) 13, 496.502]. LNA 뉴클레오사이드는 DNA와 RNA의 일반적 핵산 염기를 포함하며, Watson-Crick 염기 쌍 규칙에 따라 염기 쌍을 형성할 수 있다. 하지만, 메틸렌 브릿지로 인한 분자의 'locking'으로 인해, LNA는 왓슨-크릭 결합에서 이상적 형상을 형성하지 못하게 된다. LNA가 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드에 포함되면, LNA는 보다 빠르게 상보적 뉴클레오타이드 사슬과 쌍을 이루어 이중 나선의 안정성을 높일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 상기 "안티센스"는 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적서열 내에서 전형적으로 mRNA와 RNA:올리고머 헤테로이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오타이드 염기의 서열 및 서브유닛간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.
- [0034] 본 발명의 상기 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 본 발명의 상기 단백질에 대한 아미노산 서열을 토대로 그 유전자의 염기 서열을 도출할 수 있으므로, 통상의 기술자는 이를 바탕으로 상기 유전자에 상보적으로 결합하는 프라이머, 프로브 등을 쉽게 제작할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 상기 진단용 조성물에서, 상기 말타아제-글루코아밀라제 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자가 정상 대조군 또는 크론병 환자와 비교하여 그 발현 수준이 증가된 경우에 베체트병, 예를 들면 베체트 장염이 이미 발병되었거나 또는 발병 가능성이 높을 것으로 예상할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는, 베체트병의 진단용 키트를 제공한다.
- [0038] 본 발명의 일 구체 예에서는 베체트 장염의 진단용 키트를 제공한다.
- [0039] 본 발명의 상기 진단용 키트는 본 발명의 상기 베체트병의 진단용 조성물을 포함한다.
- [0040] 본 발명의 상기 진단용 키트에서, 상기 베체트병, 베체트 장염, 말타아제-글루코아밀라제 단백질, 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제 등과 관련된 내용은 상기 바이오마커 및 진단용 조성물에서 기재된 바와 동일하여, 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략한다.
- [0041] 본 발명의 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명의 상기 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 진단용 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 더 포함할 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 단백질을 코딩하는 유전자에 대해 특이적인 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 상기 유전자의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10 bp 내지 30 bp의 길이를 가질 수 있다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 상보적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 용기, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 진단용 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기관, 및 형광표지 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기관은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 진단용 키트는 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. ELISA 키트는 상기 단백질에 대해 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는, 베체트병을 진단하기 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

- [0047] 본 발명의 일 구체 예에서는, 베체트 장염을 진단하기 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0048] 본 발명의 상기 정보 제공 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, 말타아제-글루코아밀라제 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0049] 본 발명의 상기 정보 제공 방법에서, 상기 베체트병, 베체트 장염, 말타아제-글루코아밀라제 단백질 등과 관련된 내용은 상기 바이오마커 및 진단용 조성물에서 기재된 바와 동일하여, 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략한다.
- [0050] 본 발명의 상기 정보 제공 방법에서, 상기 말타아제-글루코아밀라제 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군과 비교하여 증가된 경우, 베체트병, 예를 들면, 베체트 장염의 발병 가능성이 높은 것으로 예측할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 목적상 상기 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 크론병 환자의 발현 수준과 비교하여 높은 경우 베체트병, 예를 들면, 베체트 장염이 이미 발병했거나, 또는 발병할 가능성이 높을 것으로 예측할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 상기 정보 제공 방법에서, 베체트병, 예를 들면, 베체트 장염의 발병 여부 또는 발병 가능성이 높을 것으로 예측되는 경우, 상기 목적하는 개체에 대하여 해당 질환에 대한 약제를 투여하는 등의 적절한 치료를 수행하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 상기 "목적하는 개체"란 베체트병, 예를 들면, 베체트 장염의 발병 여부가 불확실한 개체로, 질환이 발병되었거나, 또는 발병 가능성이 높은 개체를 의미한다.
- [0054] 본 발명의 상기 "생물학적 시료"는 개체로부터 얻어지거나 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 예를 들면, 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma) 및 혈청(serum)을 포함하는) 혈액, 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 골반 내 유체액(pelvic fluids), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명의 상기 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고 펩타이드, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것일 수 있다.
- [0056] 본 발명의 상기 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자에 상보적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것일 수 있다.
- [0057] 본 발명의 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 방법은 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역 분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏팅 및 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것일 수 있다.
- [0058] 본 발명의 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법은 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소 반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것일 수 있다.
- [0060] [서열목록]
- [0061] 서열번호 1: MGAM 단백질 아미노산 서열

[0062] MARKKLKFTTLEIVLSVLLLVFIISIVLIVLLAKESLKSTAPDPGTTGTPDPGTTGTP
 [0063] DPGTTGTTTHARTTGPPDPGTTGTTTPVSAECPVVNELERINCIPDQPPTKATCDQRGCCWN
 [0064] PQGAVSVPCYYSKNHSHYVEGNLVNTNAGFTARLKNLPSSPVFGSNVDNVLLTAEYQTS
 [0065] NRFHFKLTDQTNNRFEVPHHVQSFSGNAAASLTQVEISRQPFSSIKVTRRSNNRVLFDS
 [0066] SIGPLLFADQFLQLSTRLPSTNVYGLGEHVHQYRHDNMWKTWPIFNRDTPNGNGTNLY
 [0067] GAQTFFLCLEASGLSFGVFLMNSNAMEVVLQPAPAITYRTIGGILDFYVFLGNTPEQVV
 [0068] QEYLELIGRPALPSYWALGFHLTRYEGTLDNMREVVERNRAAQLPYDVQHADIDYMDER
 [0069] RDTFTYDSVDFKGFPEFVNLHNNGQLVIVIDPAISNNSSSSKPYGPDYDRGSDMKIIVVNS
 [0070] SDGVTPLIGEVWPGQTVFPDYTNPCAVWWTKFELFHNQVEFDGIWIDMNEVSFVDS
 [0071] VSGCSTNNLNNPPTPRILDGYLFCKTLCMDAVQHWGKQYDIHNLYGYSMATAEAAKT
 [0072] VFPNKRSEILTRSTFAGSGKFAAHWLGDNATATWDDLRSIPGVLEFNLFGIPMVGPDICG
 [0073] FALDTPEELCRRWMLGAFYPFSRNHNGQGYKDQDPASFGADSLNLSRHYLNIRYTLL
 [0074] PYLYTLFFRAHSRGDTVAPRLLEFYEDNSTWDVHQFLWGPGLLITPVLDEGAEKVMAY
 [0075] VPDVWYDYETGSQVRWRKQKQVEMELPGDKIGLHLRGYIFPTQPNTTTLASRKNPLGL
 [0076] IIALDENKEAKGELFWDNGETKDTVANKVYLLCEFVTQNRLEVNISQSTYKDPNNLAFN
 [0077] EIKILGTEEPSNVTVKHNGVPSQTSPTVTYDSNLKVAIITDIDLLLGEAYTVEWSIKIRD
 [0078] EEKIDCYPDENGASAENCTARGCIWEASNSSGVPFCYFVNDLYSVSDVQYNHSGATADIS
 [0079] LKSSVYANAFSTPVNPLRLDVTYHKNEMLQFKIYDPKNRYEVPVPLNIPSMPSSTPEG
 [0080] QLYDVLIKKNPFGIEIRRKSTGTIIWDSQLLGFTFSDMFIRISTRLPISKYLYGFGETEHR
 [0081] SYRRDLEWHTWGMFSRDQPPGYKKNYGVHPYMGLEEDGSAHGVLLNNSNAMDVTFQPL
 [0082] PALTYRTTGGVLDFYVFLGPTPELVTQQYTELIGRPVMVPYWSLGFQLCRYGYQNDSEIA
 [0083] SLYDEMVAQIPYDVQYSDIDYMERQLDFTLSPKFAGFPALINRMKADGMRVILILDPAI
 [0084] SGNETQPPYAFTRGVEDDVFIKYPNDGDIWVGKVPDFPDVVVNGSLDWDSSQVELYRAYV
 [0085] AFPDFFRNSTAKWWKREIEELYNPNQNPERSLKFDGMWIDMNEPSSFVNGAVSPGCRDAS
 [0086] LNHPYPMPHLESRRGLSSKTLCMESQILPDGSLVQHYNVHNLYGWSQTRPTYEAVQEV
 [0087] TGQRGVVITRSTFPSSGRWAGHWLGDNTAAWDQLKKSIIIGMMEFSLFGISYTGADICGFF
 [0088] QDAEYEMCVRWMLGAFYPFSRNHNTIGTRRQDPVSWDAFVNI SRTLQTRYTLLPYLY
 [0089] TLMHKAHTEGVTVVRPLLHEFVSDQVTWIDISQFLLGPAFLVSPVLERNARNVTAYFPRA
 [0090] RWYDYDTGVDINARGEWKTLAPLDHINLHVGGYILPWQEPALNTHLSRQKFMGFKIAL
 [0091] DDEGTAGGWLFWDGQSIDTYGKGLYLASFSASQNTMQSHIIFNNYITGTNPLKGLYIE
 [0092] IWGVGSVPVTSVSI SVSGMVI TFSFNDPTTQVLSIDVTDRNISLHNFTSLTWISTL

발명의 효과

[0093] 본 발명의 바이오마커는 정상 대조군과 비교하여 그 질환의 발병 여부 및 가능성을 예측할 수 있을 뿐만 아니라, 증상만으로 구별하여 진단하기 힘든 크론병과 베체트병, 예를 들면, 베체트 장염을 매우 효과적으로 구별하여 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0094] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 장 점막 조직에서 본 발명에 따른 바이오마커의 발현 수준을 면역염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 2 및 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈청에서 본 발명에 따른 바이오마커의 발현 수준을 ELISA를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0095] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0097] 실시예

[0099] [실시예 1] 장 점막 조직에서의 바이오마커 발현 수준 확인

[0100] 연세대학교 세브란스병원(서울, 신촌)의 염증성 장 질환 클리닉에서 치료받고 있는 베체트 장염(intestinal Bechet's disease) 환자 7명 또는 크론병(Crohn's disease; CD) 환자 7명을 대상으로, 대장 내시경 유도 생체 검사를 통해 대장 점막 조직을 채취하였다.

[0101] 상기 베체트병 또는 크론병 환자로부터 얻은 조직을 10% 포르말린으로 고정시키고, 파라핀에 포매하여 7 μ m 두께의 절편을 슬라이드에 부착하였다. 그런 다음, 자일렌을 이용하여 상기 절편을 탈파라핀화 한 뒤에 고농도에서 저농도 순으로 에탄올을 처리하였다. 이후, 말타아제-글루코아밀라제에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 면역염색을 수행하고, 현미경을 이용하여 그 단백질들의 발현 수준을 측정 한 뒤에 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0102] 도 1에서 보는 바와 같이, 염증성 장 질환에 해당하는 크론병과 베체트 장염을 비교하였을 때, 크론병 환자의 장 점막 조직(CD)에 비하여 베체트 장염 환자의 장 점막 조직(BD)에서 말타아제-글루코아밀라제(MGAM)의 발현 수준이 현저하게 증가된 것을 확인하였다.

[0103] 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 바이오마커를 사용하는 경우, 증상만으로 구별하여 진단하기 힘든 크론병과 베체트병, 특히 베체트 장염을 매우 효과적으로 구별하여 진단할 수 있음을 알 수 있다.

[0105] [실시예 2] 혈청에서의 바이오마커 발현 수준 확인

[0106] 상기 실시예 1과 같이, 연세대학교 세브란스병원의 염증성 장 질환 클리닉에서 치료받고 있는 베체트 장염 환자 7명, 크론병 환자 7명 또는 정상 대조군으로부터 혈청을 수득하였다. 이렇게 수득된 혈청은 통상의 방법에 의해 말타아제-글루코아밀라제에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 ELISA 분석을 수행하여, 그 결과를 도 2 및 3에 나타내었다.

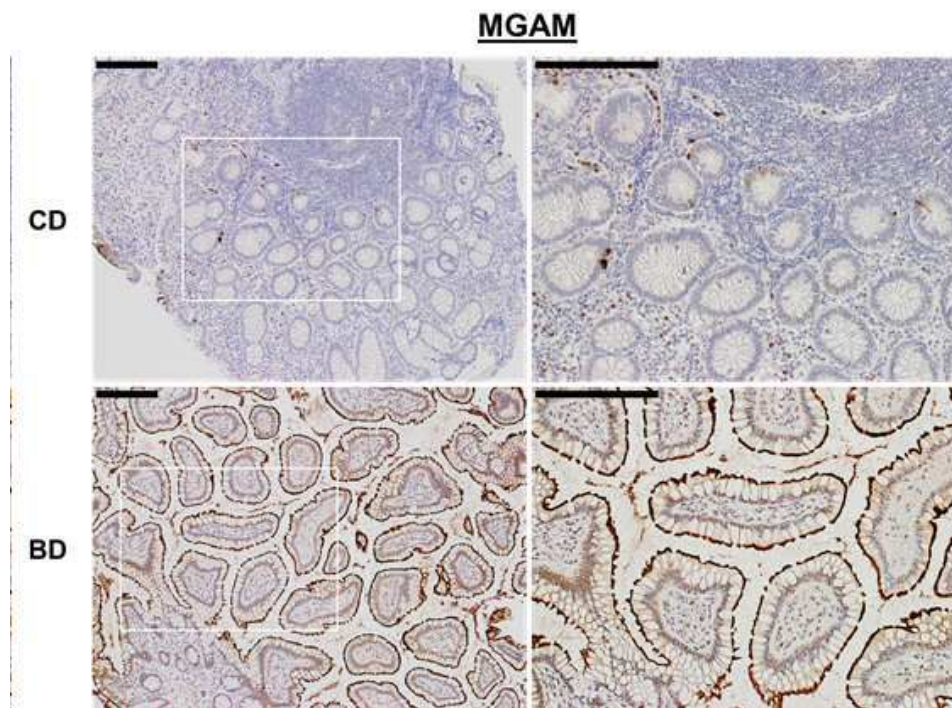
[0107] 도 2 및 3에서 보는 바와 같이, 말타아제-글루코아밀라제 단백질의 발현 수준은 정상 대조군(HC) 및 크론병 환자(CD)에 비하여 베체트 장염 환자(intestinal BD)에서 현저하게 높은 것을 확인하였다.

[0108] 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 말타아제-글루코아밀라제는 정상 대조군과 비교하여 그 질환의 발병 여부 및 가능성을 예측할 수 있을 뿐만 아니라, 증상만으로 구별하여 진단하기 힘든 크론병과 같은 다른 염증성 장 질환과 베체트병, 특히 베체트 장염을 매우 효과적으로 구별하여 진단할 수 있음을 알 수 있다.

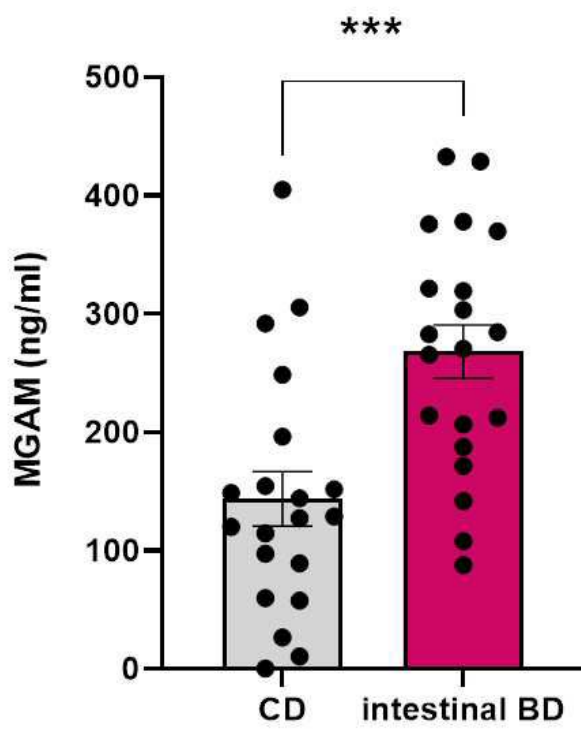
[0110] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

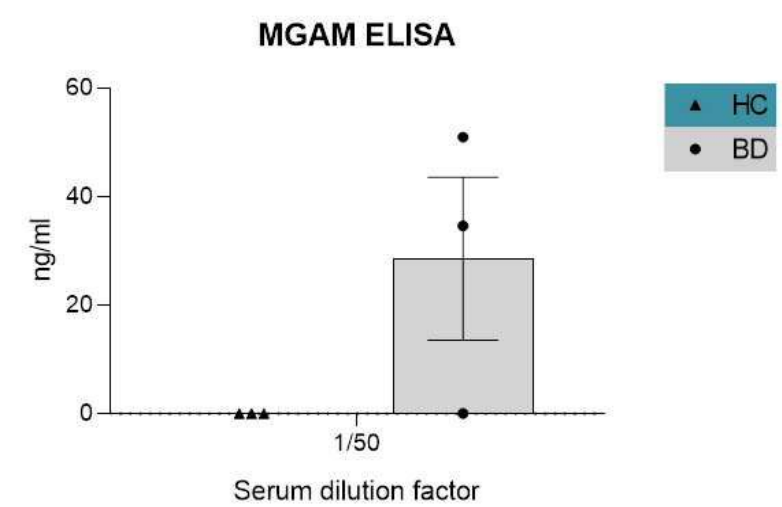
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> A Biomarker for diagnosing Intestinal Bechet's disease
- <130> PDPB204102
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1857
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Ala Arg Lys Lys Leu Lys Lys Phe Thr Thr Leu Glu Ile Val Leu
1 5 10 15
Ser Val Leu Leu Leu Val Leu Phe Ile Ile Ser Ile Val Leu Ile Val
20 25 30

Leu Leu Ala Lys Glu Ser Leu Lys Ser Thr Ala Pro Asp Pro Gly Thr
35 40 45
Thr Gly Thr Pro Asp Pro Gly Thr Thr Gly Thr Pro Asp Pro Gly Thr
50 55 60
Thr Gly Thr Thr His Ala Arg Thr Thr Gly Pro Pro Asp Pro Gly Thr
65 70 75 80
Thr Gly Thr Thr Pro Val Ser Ala Glu Cys Pro Val Val Asn Glu Leu

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

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

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

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

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

Ala Thr Ala Glu Ala Ala Lys Thr Val Phe Pro Asn Lys Arg Ser Phe
595 600 605

Ile Leu Thr Arg Ser Thr Phe Ala Gly Ser Gly Lys Phe Ala Ala His
610 615 620

Trp Leu Gly Asp Asn Thr Ala Thr Trp Asp Asp Leu Arg Trp Ser Ile
625 630 635 640

Pro Gly Val Leu Glu Phe Asn Leu Phe Gly Ile Pro Met Val Gly Pro
645 650 655

Asp Ile Cys Gly Phe Ala Leu Asp Thr Pro Glu Glu Leu Cys Arg Arg
660 665 670

Trp Met Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Ser Arg Asn His Asn Gly
675 680 685

Gln Gly Tyr Lys Asp Gln Asp Pro Ala Ser Phe Gly Ala Asp Ser Leu
690 695 700

Leu Leu Asn Ser Ser Arg His Tyr Leu Asn Ile Arg Tyr Thr Leu Leu
705 710 715 720

Pro Tyr Leu Tyr Thr Leu Phe Phe Arg Ala His Ser Arg Gly Asp Thr
725 730 735

Val Ala Arg Pro Leu Leu His Glu Phe Tyr Glu Asp Asn Ser Thr Trp
740 745 750

Asp Val His Gln Gln Phe Leu Trp Gly Pro Gly Leu Leu Ile Thr Pro
755 760 765

Val Leu Asp Glu Gly Ala Glu Lys Val Met Ala Tyr Val Pro Asp Ala
770 775 780

Val Trp Tyr Asp Tyr Glu Thr Gly Ser Gln Val Arg Trp Arg Lys Gln
785 790 795 800

Lys Val Glu Met Glu Leu Pro Gly Asp Lys Ile Gly Leu His Leu Arg
805 810 815

Gly Gly Tyr Ile Phe Pro Thr Gln Gln Pro Asn Thr Thr Thr Leu Ala
820 825 830

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

835 840 845
 Glu Ala Lys Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asn Gly Glu Thr Lys Asp Thr
 850 855 860
 Val Ala Asn Lys Val Tyr Leu Leu Cys Glu Phe Ser Val Thr Gln Asn
 865 870 875 880
 Arg Leu Glu Val Asn Ile Ser Gln Ser Thr Tyr Lys Asp Pro Asn Asn
 885 890 895

 Leu Ala Phe Asn Glu Ile Lys Ile Leu Gly Thr Glu Glu Pro Ser Asn
 900 905 910
 Val Thr Val Lys His Asn Gly Val Pro Ser Gln Thr Ser Pro Thr Val
 915 920 925
 Thr Tyr Asp Ser Asn Leu Lys Val Ala Ile Ile Thr Asp Ile Asp Leu
 930 935 940
 Leu Leu Gly Glu Ala Tyr Thr Val Glu Trp Ser Ile Lys Ile Arg Asp
 945 950 955 960
 Glu Glu Lys Ile Asp Cys Tyr Pro Asp Glu Asn Gly Ala Ser Ala Glu

 965 970 975
 Asn Cys Thr Ala Arg Gly Cys Ile Trp Glu Ala Ser Asn Ser Ser Gly
 980 985 990
 Val Pro Phe Cys Tyr Phe Val Asn Asp Leu Tyr Ser Val Ser Asp Val
 995 1000 1005
 Gln Tyr Asn Ser His Gly Ala Thr Ala Asp Ile Ser Leu Lys Ser Ser
 1010 1015 1020
 Val Tyr Ala Asn Ala Phe Pro Ser Thr Pro Val Asn Pro Leu Arg Leu
 1025 1030 1035 1040

 Asp Val Thr Tyr His Lys Asn Glu Met Leu Gln Phe Lys Ile Tyr Asp
 1045 1050 1055
 Pro Asn Lys Asn Arg Tyr Glu Val Pro Val Pro Leu Asn Ile Pro Ser
 1060 1065 1070
 Met Pro Ser Ser Thr Pro Glu Gly Gln Leu Tyr Asp Val Leu Ile Lys
 1075 1080 1085
 Lys Asn Pro Phe Gly Ile Glu Ile Arg Arg Lys Ser Thr Gly Thr Ile

1090 1095 1100
 Ile Trp Asp Ser Gln Leu Leu Gly Phe Thr Phe Ser Asp Met Phe Ile

 1105 1110 1115 1120
 Arg Ile Ser Thr Arg Leu Pro Ser Lys Tyr Leu Tyr Gly Phe Gly Glu

 1125 1130 1135
 Thr Glu His Arg Ser Tyr Arg Arg Asp Leu Glu Trp His Thr Trp Gly

 1140 1145 1150
 Met Phe Ser Arg Asp Gln Pro Pro Gly Tyr Lys Lys Asn Ser Tyr Gly

 1155 1160 1165
 Val His Pro Tyr Tyr Met Gly Leu Glu Glu Asp Gly Ser Ala His Gly

 1170 1175 1180

 Val Leu Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val Thr Phe Gln Pro Leu
 1185 1190 1195 1200
 Pro Ala Leu Thr Tyr Arg Thr Thr Gly Gly Val Leu Asp Phe Tyr Val

 1205 1210 1215
 Phe Leu Gly Pro Thr Pro Glu Leu Val Thr Gln Gln Tyr Thr Glu Leu

 1220 1225 1230
 Ile Gly Arg Pro Val Met Val Pro Tyr Trp Ser Leu Gly Phe Gln Leu

 1235 1240 1245
 Cys Arg Tyr Gly Tyr Gln Asn Asp Ser Glu Ile Ala Ser Leu Tyr Asp

 1250 1255 1260
 Glu Met Val Ala Ala Gln Ile Pro Tyr Asp Val Gln Tyr Ser Asp Ile
 1265 1270 1275 1280
 Asp Tyr Met Glu Arg Gln Leu Asp Phe Thr Leu Ser Pro Lys Phe Ala

 1285 1290 1295
 Gly Phe Pro Ala Leu Ile Asn Arg Met Lys Ala Asp Gly Met Arg Val

 1300 1305 1310
 Ile Leu Ile Leu Asp Pro Ala Ile Ser Gly Asn Glu Thr Gln Pro Tyr

 1315 1320 1325

 Pro Ala Phe Thr Arg Gly Val Glu Asp Asp Val Phe Ile Lys Tyr Pro
 1330 1335 1340

Asn Asp Gly Asp Ile Val Trp Gly Lys Val Trp Pro Asp Phe Pro Asp
 1345 1350 1355 1360
 Val Val Val Asn Gly Ser Leu Asp Trp Asp Ser Gln Val Glu Leu Tyr
 1365 1370 1375
 Arg Ala Tyr Val Ala Phe Pro Asp Phe Phe Arg Asn Ser Thr Ala Lys
 1380 1385 1390
 Trp Trp Lys Arg Glu Ile Glu Glu Leu Tyr Asn Asn Pro Gln Asn Pro

 1395 1400 1405
 Glu Arg Ser Leu Lys Phe Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro
 1410 1415 1420
 Ser Ser Phe Val Asn Gly Ala Val Ser Pro Gly Cys Arg Asp Ala Ser
 1425 1430 1435 1440
 Leu Asn His Pro Pro Tyr Met Pro His Leu Glu Ser Arg Asp Arg Gly
 1445 1450 1455
 Leu Ser Ser Lys Thr Leu Cys Met Glu Ser Gln Gln Ile Leu Pro Asp
 1460 1465 1470

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

 1540 1545 1550
 Gly Ala Asp Ile Cys Gly Phe Phe Gln Asp Ala Glu Tyr Glu Met Cys
 1555 1560 1565
 Val Arg Trp Met Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Ser Arg Asn His
 1570 1575 1580
 Asn Thr Ile Gly Thr Arg Arg Gln Asp Pro Val Ser Trp Asp Val Ala
 1585 1590 1595 1600

Phe Val Asn Ile Ser Arg Thr Val Leu Gln Thr Arg Tyr Thr Leu Leu
1605 1610 1615

Pro Tyr Leu Tyr Thr Leu Met His Lys Ala His Thr Glu Gly Val Thr
1620 1625 1630

Val Val Arg Pro Leu Leu His Glu Phe Val Ser Asp Gln Val Thr Trp
1635 1640 1645

Asp Ile Asp Ser Gln Phe Leu Leu Gly Pro Ala Phe Leu Val Ser Pro
1650 1655 1660

Val Leu Glu Arg Asn Ala Arg Asn Val Thr Ala Tyr Phe Pro Arg Ala
1665 1670 1675 1680

Arg Trp Tyr Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Asp Ile Asn Ala Arg Gly Glu
1685 1690 1695

Trp Lys Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp His Ile Asn Leu His Val Arg
1700 1705 1710

Gly Gly Tyr Ile Leu Pro Trp Gln Glu Pro Ala Leu Asn Thr His Leu
1715 1720 1725

Ser Arg Gln Lys Phe Met Gly Phe Lys Ile Ala Leu Asp Asp Glu Gly
1730 1735 1740

Thr Ala Gly Gly Trp Leu Phe Trp Asp Asp Gly Gln Ser Ile Asp Thr
1745 1750 1755 1760

Tyr Gly Lys Gly Leu Tyr Tyr Leu Ala Ser Phe Ser Ala Ser Gln Asn
1765 1770 1775

Thr Met Gln Ser His Ile Ile Phe Asn Asn Tyr Ile Thr Gly Thr Asn
1780 1785 1790

Pro Leu Lys Leu Gly Tyr Ile Glu Ile Trp Gly Val Gly Ser Val Pro
1795 1800 1805

Val Thr Ser Val Ser Ile Ser Val Ser Gly Met Val Ile Thr Pro Ser
1810 1815 1820

Phe Asn Asn Asp Pro Thr Thr Gln Val Leu Ser Ile Asp Val Thr Asp
1825 1830 1835 1840

Arg Asn Ile Ser Leu His Asn Phe Thr Ser Leu Thr Trp Ile Ser Thr

	1845	1850	1855
Leu			