



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0041912
(43) 공개일자 2024년04월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/20 (2019.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 33/20 (2021.08)
- (21) 출원번호 10-2024-7001857
- (22) 출원일자(국제) 2022년06월28일
심사청구일자 2024년01월17일
- (85) 번역문제출일자 2024년01월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2022/067808
- (87) 국제공개번호 WO 2023/275099
국제공개일자 2023년01월05일
- (30) 우선권주장
10 2021 206 749.2 2021년06월29일 독일(DE)
10 2021 209 147.4 2021년08월19일 독일(DE)

- (71) 출원인
베리솔 게엠베하
독일 10965 베를린 요크스트라세 71
- (72) 발명자
숨버그 루츠
독일 10965 베를린 요크스트라세 71
- (74) 대리인
최광호

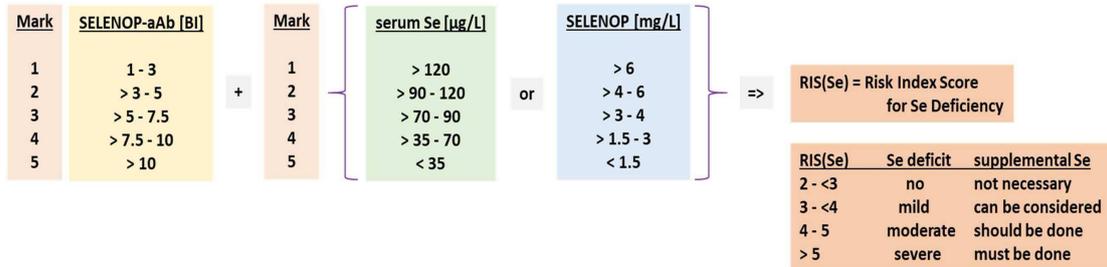
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **체액내 셀레늄 결핍을 식별하기 위한 복합 바이오마커**

(57) 요약

본 발명은 셀레늄 또는 셀레노단백질 P의 양과 셀레노단백질 P에 대한 항체의 양을 모두 결정하고, 상기 셀레늄 결핍에 대한 위험지수 점수를 추정 또는 계산함으로써 대상의 셀레늄(Se) 결핍 위험을 평가하는 방법과, 셀레늄 결핍과 관련된 질병을 앓고 있는 대상에서 Se 보충 모니터링에 있어서 본 발명의 방법이나 본 발명에 따라 구한 위험지수 점수의 용도에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류
G01N 33/6848 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

대상의 셀레늄(Se) 결핍의 건강 위험을 평가하는 방법에 있어서:

- a) a1) 셀레늄(Se) 및/또는 a2) 셀레노단백질 P(SELENOP)로부터 선택된 측정된 생물학적 값을 상기 대상의 샘플에서 결정하는 단계; 및
- b) SELENOP에 대한 항체(SELENOP-Ab)의 측정된 생물학적 값을 상기 대상의 샘플에서 결정하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

- c) 2개 이상의 생물학적 변수들을 상관관계로 설정하되, 상기 생물학적 변수들을 상기 단계 a) 및 b)의 상기 측정된 생물학적 값들로 표시하는 단계; 및
- d) i) 상기 단계 a) 및 b) 또는 ii) 상기 단계 c)에서 구할 수 있는 값들을 이용해 상기 대상의 Se 결핍에 대한 위험지수 점수를 계산하는 단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 측정된 생물학적 값들이 상기 대상의 셀레늄 결핍과 관련된 위험과 상관관계가 있으며, 상기 대상은 폐혈증, 염증, SIRS, 염증성 장 질환, 감염, 심혈관 질환(CVD; cardio-vascular diseases), 죽상경화증, 심혈관 사건, 뇌졸중, 심근경색, 심근병증, 압, 유방암, 전립선암, 대장암, 폐암, 간암, (다발성)외상, 갑상선 기능장애, I형 및/또는 II형 당뇨병, 중환자실(ICU; intensive care unit)에서 치료되는 중증 질환, 중증화상이나 화상부상, 중독, 신경퇴행성 질환, 간질, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 진행성이나 만성 다발성 경화증(MS; multiple sclerosis), 근위축성 측삭 경화증(ALS; amyotrophic lateral sclerosis), 불임 또는 고혈압을 겪고있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 a2) 및/또는 b)가 면역분석으로서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 질량 분광법, 형광 분광법, X선 형광 분광법 및 흡수 분광법으로부터 선택된 분광법을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

대상의 Se 보충을 모니터링하기 위한 동반 진단 방법으로서, 제1항 내지 제5항 중 하나에 따른 방법 또는 제2항 내지 제5항 중 하나에 따라 구할 수 있는 위험지수 점수의 용도.

청구항 7

대상의 치료나 예방적 Se 보충 동안 개인의 Se 요구량과 투여량 요법의 정량화에 있어서 제1항 내지 제5항 중 하나에 따른 방법 또는 제2항 내지 제5항 중 하나에 따라 구할 수 있는 위험지수 점수의 용도.

청구항 8

SELENOP에 대한 항체의 약학적 유효량 투여에 의한 Se 중독의 분석과 모니터링 또는 Se 중독을 겪는 대상의 치료에 있어서 제1항 내지 제5항 중 하나에 따른 방법 또는 제2항 내지 제5항 중 하나에 따라 구할 수 있는 위험

지수 점수의 용도.

청구항 9

패혈증, 감염, (다발성)외상 또는 SIRS에서 선택된 질병을 겪는 대상의 치료에 있어서 제1항 내지 제5항 중 하나에 따른 방법 또는 제2항 내지 제5항 중 하나에 따라 구할 수 있는 위험지수 점수의 용도.

청구항 10

인플루엔자 A와 COVID-19를 포함한 바이러스 감염으로부터 선택된 질병을 앓고 있는 대상의 치료에 있어서, 제1항 내지 제5항 중 하나에 따른 방법 또는 제2항 내지 제5항 중 하나에 따라 구할 수 있는 위험지수 점수의 용도.

청구항 11

제1항에 따른 방법을 수행하기 위한 키트에 있어서:

- a) SELENOP에 대한 항체(SELENOP-Ab) 측정을 위한 특정 시약,
- b) 사용자 진단지;
- c) 선택적으로 완충액, 교정 표준물질, 음성 대조군, 양성 대조군으로부터 선택된 하나 이상의 시약이나 화학물질; 및
- d) 선택적으로 SELENOP 측정을 위한 특정 시약;을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 셀레늄(Se)이나 셀레노단백질 P의 양과 셀레노단백질 P에 대한 항체의 양 2개의 양을 결정하고, 때로는 이렇게 구한 값들을 이용해 대상의 Se 결핍에 대한 위험지수 점수를 계산해 상기 대상의 셀레늄(Se) 결핍 위험을 평가하는 방법에 관한 것이며, 또한 특별히 Se 결핍과 관련된 질병을 앓고 있는 대상에서 Se 보충을 모니터링하는데 있어 본 발명의 방법 또는 본 발명에 따라 얻은 위험지수 점수의 용도에 관한 것이기도 하다.

배경 기술

[0002] 셀레노단백질 P(약어 Sepp1, SeP, SELP, SePP, SELENOP, 이하 "SELENOP")는 혈장 셀레노단백질로서, 셀레늄(Se) 상태 및 결핍의 마커 역할을 하는 것으로 알려져 있다([1] 참조). SELENOP 혈청이나 혈장 농도는 충분히 높은, 즉 풍부하고 건강을 지원하는 Se 섭취량의 지표로 사용되는 포화 수준에 도달한다([2,3] 참조). 따라서 SELENOP의 결정(판단)은 영양학적 Se 요구량을 평가하는 중요한 도구이다[4-6].

[0003] 구조적으로 인간 SELENOP은 381개의 아미노산 잔기를 포함하는 단백질로, 그 중 10개가 59, 300, 318, 330, 345, 352, 367, 369, 376 및 378 위치의 셀레노시스테인(Sec) 잔기일 것으로 예측된다. 그러나 SELENOP당 Sec의 정확한 수는 가변적이며 일부 예측된 Sec 위치에서 다른 잔기가 발견되어, 평균적으로 예상(평균±SD: 5.4±0.5)보다 SELENOP 분자당 Se 함량이 상당히 낮아진다[7]. (신호 서열 절단 후) 분비된 형태는 362개의 아미노산 잔기를 포함하고 번역 후 변형(post-translational modification)을 포함할 수 있으며, 이는 인산화 및 여러 글리코실화 부위를 포함할 수 있다[8, 9]. 또, SELENOP의 N-이나 C-말단 부분을 포함하는 단편을 포함하는 여러 변이체가 기술되었다[8,10,11].

[0004] SELENOP의 순환 농도는 포화 가능한 것으로 보였는데, 즉, SELENOP는 정상적인 조건에서 최대 순환 농도가 5-7 mg/l에 달하는 것으로 추정된다[2,12]. 따라서 SELENOP은 Se 결핍과 Se 요구 결정을 위한 바이오마커로 사용된다. Se 보충 연구에 따르면 SELENOP 혈청이나 혈장 농도는 인간의 Se 영양상태에 대한 용이한 접근이 가능한 마커인 반면, 혈액내 Se의 미량 원소 농도를 정량화하려면 물리 화학적/분광학 기술(예: 원자 흡수 분광법, X선 형광 또는 질량 분석법) 요건으로 인해 더 많은 노력이 필요하다[2,5,13-17].

[0005] 차선의 발현 수준과 5 mg/l 미만의 SELENOP의 순환 농도를 갖는 집단과 대상들은 Se 결핍, 즉 Se 보충 투여가 필요한 것으로 간주 및 분류된다. 일단 Se 혈청 농도가 높아 120~130 µg Se/l 이상이면, 순환하는 SELENOP는 포화되고 Se를 더 보충해도 SELENOP 농도는 5~7 mg/l 이상으로 증가하지 않는 것으로 보고되었다[2,5,15]. 5-7

mg/ℓ의 SELENOP를 투여받은 각 대상은 Se-충만으로 간주된다. Se를 더 많이 섭취해도 순환 SELENOP 농도에 더 이상 영향을 미치지 않으며, SELENOP 농도가 5-7 mg/ℓ를 넘으면 특정 유전자형, 질병 또는 기타 개별적인 이유로 인해 희귀상태를 나타낼 수 있다고 보였지만, 이들이 높은 Se 섭취만으로는 발생하지 않는다. 매우 높은 SELENOP 농도가 비만[18] 또는 폐동맥 고혈압[19]과 관련하여 설명되었지만, Se 함유 물질 보충에 대한 반응은 아니다. 2형 당뇨병과 당뇨병 전단계 환자에서 순환 SELENOP 수치의 상승이 보고되었으며 죽상동맥경화증과 관련이 있는 것으로 나타났다[20]. 대조적으로, 폐혈증에서는 SELENOP 농도가 감소하는데, 이는 Se 농도 감소의 원인[21], 또는 간에 의한 미량원소 방출 감소로 추정된다[22]. 대사증후군과 관련된 순환 SELENOP 농도의 현저한 감소가 심혈관 질환이 있는 환자에서도 발견되었다[23].

[0006] 미세원소 Se의 불충분한 공급은 체액내 Se 및 셀레노단백질(특히 SELENOP) 농도 감소와 관련된 Se 결핍을 일으키고, 이는 여러 질병과 관련 합병증의 위험 요소가 된다. 낮은 Se 상태를 초래하는 Se 결핍은 질병 위험(예: 하시모토 갑상선염 및 그레이브스병)과 관련이 있다. 반면, Se 중독 사례들이 분석되었고 기준치 이상의 혈청 Se 농도가(예: 파라다이스 너트 패러독스) 탈모는 물론 손톱과 발톱 약화 및 손실을 일으킨다고 보고되었다[24,25].

[0007] 현재 개인의 Se 상태를 결정하는 몇가지 접근법이 있다. 이는 개인의 체액내 Se 또는 단백질 바이오마커 SELENOP의 농도나 양을 측정하여 결정할 수 있다[2,26].

[0008] SELENOP 농도는 SELENOP를 Se 상태의 적합한 바이오마커로 인정하는 광범위한 농도 범위에 걸쳐 체액(예: 혈액, 혈청, 혈장, 모유, 뇌척수액)의 Se 농도와 상관관계가 있는 것으로 보인다. Se 보충 연구[2,27,28]는 SELENOP 혈청 또는 혈장 수준이 인간의 Se 상태에 대한 선호되는 바이오마커임을 시사한다. 이들 임상 연구에서 혈청 Se와 SELENOP 수치 사이에 매우 유의미한 상관관계가 발견되었다[2,27,28]. 마찬가지로, SELENOP는 Se 결핍 바이오마커 역할을 하는데, 이는 Se 결핍 상태의 등급이 증가함에 따라 SELENOP 혈장 수준이 감소하는 것으로 나타났다기 때문이다[29-31].

[0009] 현재, Se 대사, 특히 많은 병리학적 상태의 발달 및 치료에서 Se 결핍의 역할에 대한 이해가 급속도로 성장하고 있다. 셀레노단백질을 통해 매개되는 Se의 유익한 건강 효과로 인해, 충분한 양의 Se를 공급하고 Se가 셀레노단백질 합성의 제한 요소가 되는 것을 방지함으로써 Se 상태를 개선하고 건강 위험을 줄이는 것이 제안되었다. Se 상태의 개선은 Se 보충제를 투여하여 Se 함량이 높은 음식으로 식이 패턴을 변경함으로써 달성될 수 있다[32].

[0010] 또한 Se 결핍은 폐암, 유방암, 전립선암, 간암, 간암, 암, 대장암 또는 대장암, 심혈관 질환(고혈압, 심근경색, 뇌졸중, 재관류 손상), 불임, 세균 감염, 폐혈증, (다발성)외상, 전신 염증반응 증후군(SIRS), 바이러스 감염(특히 A형 인플루엔자), B형 간염, C형 간염, COVID-19) 및 초기 신경 퇴행 및 발작(예: 알츠하이머병, 파킨슨병, 간질 발작)을 포함한 신경학적 기능장애 등을 포함한 많은 질병, 특히 질병 관련 합병증의 발생이나 개선에 중요한 (위험) 요인이 될 수 있는 것으로 보고되었다. 예를 들어, SELENOP의 검출은 건강한 대상에서 첫번째 심혈관 사건이 발생할 위험, 심혈관 사망 위험 평가(WO2019081504A1) 또는 대상이 심혈관 질환이나 심부전 사건(WO2020128073A1)에 걸릴 위험을 평가하는데 사용될 수 있는 것으로 나타났다.

[0011] 다수의 임상 시험에서 특정 의학적 측면(예: 질병 위험 감소, 질병 증상 완화 또는 치료 보조제로 제공될 때 치료에 기여)에 대한 보충 Se 섭취가 건강에 미치는 영향을 연구했다. 유사한 대상 그룹을 대상으로 한 다양한 실험의 결과는 종종 논란의 여지가 있다. Se 보충 실험의 일부 주요 분야가 그 예가 될 수 있다. 미국의 NPC(Nutritional Prevention of Cancer) 실험에서는 하루 평균 200μg의 Se 보충을 섭취하는 대상에게서 전립선암 발병률이 4.5년에 걸쳐 거의 2배 감소했다고 보고했다. 대조적으로 셀레늄과 비타민 E 암 예방 연구(SELECT)는 전립선암 발생에 대한 하루 200μg의 Se 보충의 긍정적인 효과를 보고하지 않았지만 매우 유사한 개입 시험을 수행했다. 마찬가지로, 자가면역 갑상선염에 대한 비교 가능한 Se 보충 연구에서도 상충되는 결과가 보고되었다[33]. 정기적으로 매우 뚜렷한 셀레늄 결핍증이 발생하는 중증 질환을 앓고있는 중환자실 환자의 사망률에 미치는 영향에도 동일하게 적용된다. Se 보충을 사용한 유사한 개입 연구에서는 상충되는 결과, 즉 매우 강력한 사망 위험 감소와 유의미한 효과가 없는 것으로 보고되었다. 불행히도, 현재까지 건강 위험을 줄이거나 치료 성공을 향상시키기 위해 Se를 보충한 연구 결과가 항상 일관되지는 않았다.

[0012] Se 결핍의 예방 및 치료 동안 Se 보충 효과는 대상의 생물학적 샘플에서 Se 또는 SELENOP 농도 측정을 통해 모니터링할 수 있다. SELENOP 농도는 안정기에 도달한다고 보고되어 있지만 일단 Se 공급에 의해 충분히 높은 Se 상태가 달성되면, DE102020002289 A1은 SELENOP 농도가 안정 수준을 초과할 수 있으므로 Se 중독에 대한 바이오마커로도 적합할 수 있다고 소개한다.

- [0013] SELENOP에 대한 aAb(autoantibodies)의 검출 방법이 기술되었고 자가면역 갑상선 환자에서 항-SELENOP-aAb의 존재가 보고되었지만[34], 항-SELENOP-aAb (및 항-SELENOP-Ab)의 중요한 역할은 일반적으로 Se 상태 평가에서는 인정되지 않았다.
- [0014] 방사면역분석법[26,35,36], 효소결합 면역흡착 분석법(ELISA)[37], 화학발광 면역분석법[21] 및 샌드위치 SELENOP-ELISA[38]와 같은 여러 SELENOP 정량 방법이 알려져 있다. 단일클론 항체를 우선적으로 사용하는 항체 기반 샌드위치 ELISA는 가장 신뢰할 수 있고 광범위하며 자주 사용되는 기술일 수 있다[7,21,26,39,40].
- [0015] 또, WO2020128073A1은 전장 SELENOP 형태(신호 서열, 분비 또는 처리된 형태 포함) 이외의 특정 SELENOP 단편이 개인의 체액내 SELENOP의 양을 결정하는데 특히 적합하다고 교시하고 있다(WO2020128073A1의 서열 ID 번호 1 내지 15 참조).
- [0016] SELENOP의 검출을 위해 시판되는 ELISA 키트가 이용 가능하며, 예를 들어 인간 셀레노단백질 P(SELENOP) ELISA 키트, 제품 코드: STE(selenOmed GmbH, Berlin, Germany); 치킨 셀레노프로테인 P(SELENOP1) ELISA 키트, Cat. 중국 우한시 소재 우한 아베바이오사이언스 컴퍼니(Wuhan Abebioscience Co., Ltd.) 제품 번호 AE56582CH ; 또 키 셀레노단백질 P(SELENOP1) ELISA 키트, Cat. No. AE56581RB(무한 Abebioscience Co., Ltd.)이 있다.
- [0017] 따라서, SELENOP는 특히 Se 결핍 대상의 Se 대사, 즉 대상의 Se 섭취 후 Se 상태가 충분한 Se 상태로 진행되는 동적 진행 및 그 이후의 감소를 모니터링하기에 적합한 마커로 알려져 있다.
- [0018] 따라서, 대상의 Se 상태에 대한 저렴하고 빠르며 신뢰할 수 있는 결정을 제공하고, 대상의 보충 요법 동안 투여해야 할 Se의 필요량을 적절하게 제어하고 모니터링하는 것이 본 발명의 근본적인 문제 중 하나이다. 특히 Se 상태의 결핍을 평가하는 것이 필요하다. Se 상태의 이런 개선된 식별은 특히 Se 결핍과 관련된 장애나 기능장애를 피하거나 치료하기 위해 대상에게 적절한 예방적 및/또는 치료적 Se 보충 요법을 추가로 허용할 것이다. 대상의 건강 상태 악화와 잠재적인 Se 중독을 피하기 위해 Se 보충 요법 중에 대상의 Se 필요성을 올바르게 식별해야 한다는 것은 명백하다.
- [0019] Se 보충, 특히 치료나 영양 보충을 모니터링하기 위해 Se 상태 마커의 진단적 사용을 허용하는 것이 본 발명의 또 다른 근본적인 문제이다. 이는 놀랍게도 개인의 체액내 SELENOP, 즉 동물의 SELENOP 또는 이의 동족체의 Se 농도 및/또는 단백질/펩타이드 농도를 항-SELENOP 항체, 특히 SELENOP 자가항체나 치료용 항-SELENOP 항체의 상대적인 양과 상관시킴으로써 달성된다.
- [0020] 놀랍게도, 개인의 Se 상태를 결정하려면 관찰된 SELENOP의 절대적 또는 상대적 양을 식별할 뿐만 아니라 항-SELENOP 항체, 특히 항-SELENOP 항체의 절대적 또는 상대적 양을 식별해 개인의 Se 상태를 정확하게 평가하는 것이 필요하다는 것이 밝혀졌다. 더 큰 노력 없이 항-SELENOP 자가항체의 절대량을 확인하는 것이 불가능하더라도, 수행하기 쉽고 대상의 Se 보충 요법에 대한 필요성을 빠르고 신뢰할 수 있게 평가할 수 있는 평가 방법이 발견되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0021] 본 발명은 항-SELENOP 항체의 양의 측정값이 대상의 Se 보충 필요성을 평가하는데 매우 관련성이 높은 추가 요소를 유도해 대상의 체액에서 측정되는 Se나 SELENOP 양의 정상 값이 대상의 Se 보충 필요성에 대한 관련 정보를 제공하기에 충분할 것이라는 기술적 편견을 극복한다. 본 발명에서 교시된 바와 같이, 표준 기술로 측정된 Se나 SELENOP의 양이나 수준이 정상적이거나 충분한 Se 상태의 수준을 시사하는 경우에도 항-SELENOP 항체가 존재할 때는 Se 결핍이 있을 수 있다.

과제의 해결 수단

- [0022] 따라서, 본 발명의 방법은 Se 결핍증을 겪거나 Se 결핍증으로 분류된 대상의 예방 및 치료시의 진단법으로 적합하다.
- [0023] 또, 본 발명은 우선 a) 대상의 샘플에서 a1) 셀레늄(Se) 및/또는 a2) 셀레노단백질 P(SELENOP); 및 b) 상기 대상의 샘플에서 항-SELENOP-항체, 바람직하게는 aAb(SELENOP)의 측정된 생물학적 값을 평가하는 방법을 제공한다.
- [0024] 또, 셀레늄(Se) 결핍과 관련된 건강 위험을 평가하거나 대상의 셀레늄(Se) 결핍 위험을 평가하기 위한 본 발명

방법은 c) 2개 이상의 생물학적 변수들을 상관관계로 설정하되, 상기 생물학적 변수들을 상기 단계 a) 및 b)의 상기 측정된 생물학적 값들로 표시하는 단계; 및 d) i) 상기 단계 a) 및 b) 또는 ii) 상기 단계 c)에서 구할 수 있는 값들을 이용해 상기 대상의 Se 결핍에 대한 위험지수 점수를 계산하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

- [0025] 또, 단계 a1, a2 및/또는 b)의 수행을 위한 상기 대상의 샘플은 동일하거나 상이하지만, 바람직하게는 동일하다.
- [0026] 대상의 셀레늄(Se) 결핍 위험을 평가하기 위한 본 발명 방법의 또 다른 구현예에서, 상기 대상의 Se 결핍에 대한 위험지수 점수는 바람직하게는 표 1A 및 1B에 요약된 바와 같이 하나 이상의 임계값과 상관관계가 있다.
- [0027] 본 발명은 아래 단계들을 포함하는 대상의 셀레늄(Se) 결핍의 건강 위험을 평가하는 방법을 제공하는바:
- [0028] a) a1) 셀레늄(Se) 및/또는 a2) 셀레노단백질 P(SELENOP)로부터 선택된 측정된 생물학적 값을 대상의 샘플에서 결정하는 단계;
- [0029] b) 상기 대상의 샘플에서 SELENOP에 대한 항체(SELENOP-Ab)의 측정된 생물학적 값을 결정하는 단계; 및
- [0030] c) 단계 a 및 b에서 정의된 대로 얻을 수 있는 값을 기반으로 Se 결핍 위험을 평가하는 단계.
- [0031] 본 발명은 아래 단계들을 포함하는 대상의 셀레늄(Se) 결핍의 건강 위험을 평가하는 방법도 제공하는바:
- [0032] a) a1) 셀레늄(Se) 및/또는 a2) 셀레노단백질 P(SELENOP)로부터 선택된 측정된 생물학적 값을 대상의 샘플에서 결정하는 단계;
- [0033] b) 상기 대상의 샘플에서 SELENOP에 대한 항체(SELENOP-Ab)의 측정된 생물학적 값을 결정하는 단계;
- [0034] c) 수학적 연산자, 바람직하게는 덧셈, 곱셈 및/또는 강화를 사용하여 2개 이상의 생물학적 매개변수를 상관관계로 설정하는 단계(여기서, 상기 생물학적 매개변수는 단계 a) 및 b)에서 정의된 바와 같이 얻을 수 있는 상기 측정된 생물학적 값으로 표시됨);
- [0035] d) 단계 a)의 i)과 b) 또는 단계 c)의 값들을 사용하여 상기 대상의 Se 결핍에 대한 위험지수 점수를 계산해 Se 결핍의 위험을 평가하는 단계.
- [0036] 본 발명은 아래 단계들을 포함하는 대상의 셀레늄(Se) 결핍을 진단하는 시험관내 방법도 제공하는바:
- [0037] a) a1) 셀레늄(Se) 및/또는 a2) 셀레노단백질 P(SELENOP)로부터 선택된 측정된 생물학적 값을 대상의 샘플에서 결정하는 단계;
- [0038] b) 상기 대상의 샘플에서 SELENOP에 대한 항체(SELENOP-Ab)의 측정된 생물학적 값을 결정하는 단계;
- [0039] c) 수학적 연산자, 바람직하게는 덧셈, 곱셈 및/또는 강화를 사용하여 2개 이상의 생물학적 매개변수를 상관관계로 설정하는 단계(여기서, 상기 생물학적 매개변수는 단계 a) 및 b)에서 정의된 바와 같이 얻을 수 있는 상기 측정된 생물학적 값으로 표시됨);
- [0040] d) a)와 b) 단계의 i) 또는 c) 단계의 ii)에서 정의된 값들을 사용하여 상기 대상의 Se 결핍에 대한 위험지수 점수를 계산해 Se 결핍 등급을 평가하는 단계.
- [0041] 용어 "대상"은 살아있는 인간 또는 인간이 아닌 유기체, 바람직하게는 척추동물, 특히 포유동물, 더욱 바람직하게는 인간을 의미한다. 가장 바람직하게는, 대상은 셀레늄 결핍과 관련된 질병을 앓거나 앓는다고 의심된다. "대상"은 포유동물, 새 및/또는 물고기와 같은 동물, 바람직하게는 반려 동물, 특히 닭, 오리, 거위, 돼지, 소, 염소, 양, 사냥감, 말, 낙타, 고양이, 개, 토끼, 송어, 연어이다.
- [0042] 여기서, "셀레늄 결핍과 관련된 질병"(이하 "DRSD(disease related to a selenium deficit))은 바람직하게는 패혈증; 및/또는 염증; 및/또는 SIRS(전신 염증 반응 증후군); 및/또는 염증성 장 질환, 특히 모르부스 크론(Morbus Crohn) 및/또는 궤양성 대장염; 및/또는 박테리아 감염; 및/또는 바이러스 감염, 특히 A형 인플루엔자, B형 간염, C형 간염 또는 COVID-19를 유발하는 감염; 및/또는 죽상동맥 경화증 및 심혈관 사건, 특히 뇌졸중, 심근경색, 심근병증 및/또는 급성 심부전을 포함하는 심혈관 질환(CVD); 및/또는 암, 특히 유방암 및/또는 전립선암 및/또는 대장암 및/또는 폐암 및/또는 간암, 특히 유방암; 및/또는 (다중)외상; 및/또는 갑상선 기능장애, 특히 하시모토 갑상선염, 그레이브스 눈병증; 및/또는 1형 및/또는 2형 당뇨병; 및/또는 중환자실(ICU)에서 치료되는 심각한 질병; 및/또는 심각한 화상 또는 화상 부상; 및/또는 중독 및/또는 신경퇴행성 질환, 특히 간질 발작 및/또는 알츠하이머병 및/또는 파킨슨병 및/또는 헌팅턴병 및/또는 진행성 또는 만성 다

발성 경화증(MS) 및/또는 근위축성 측삭 경화증(ALS) 및/또는 또는 불임 및/또는 고혈압 중에서 선택된 하나 이상의 질병, 장애 또는 기능장애이고, 이런 질병, 장애 또는 기능장애는 임상 증상을 나타내기도 한다.

[0043] 따라서, 본 발명의 방법은 DRSD, 특히 i) 폐혈증, ii) 염증, iii) SIRS, iv) 염증성 장 질환, v) 바이러스 감염, 특히 A형 인플루엔자, B형 감염, C형 감염 또는 COVID-19, vi) 심혈관 질환(CVD), vii) 죽상경화증, viii) 심혈관 질환, ix) 뇌졸중, x) 심근경색, xi) 심근병증, xii) 암, xiii) 유방암, xiv) 전립선암, xv) 대장암, xvi) 폐암, xvii) 간암, xviii)(다발성)외상, xix) 갑상선 기능장애, 특히 하시모토 갑상선염 및 그레이브스 눈병증, xx) I형이나 II형 당뇨병 xxi) 중환자실(ICU)에서 치료되는 심각한 질병, xxii) 심각한 화상 또는 화상, xxiii) 특히 카뮈프, 수은 또는 납과 같은 독성 금속 중독, xxiv) 신경변성 질환, xxv) 간질성 발작, xxvi) 알츠하이머병, xxvii) 파킨슨병, xxviii) 헌팅턴병, xxix) 진행성 또는 만성 다발성 경화증(MS), xxx) 근위축성 측삭 경화증(ALS), xxxi) 불임 또는 xxxii) 고혈압, 특정 실시양태에서는 하시모토병, 그레이브스 안 병증, A형 인플루엔자, B형 감염, C형 감염 또는 COVID-19 중 하나 이상을 앓고 있는 대상에서 셀레늄(Se) 결핍의 위험을 평가한다.

[0044] 용어 "샘플"은 상기 대상을 지칭하며, 바람직하게는 상기 대상의 체액, 보다 바람직하게는 전혈, 혈청, 혈장, 소변, 뇌척수액(CSF) 및 타액으로 이루어진 군으로부터 선택된 체액을 의미한다. 전술한 "샘플"은 전혈, 혈장 및 혈청으로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

[0045] 본 발명에 따른 용어 "측정된 생물학적 값"은 바람직하게는 적절한 검출 방법에 따라 조사 대상의 샘플 내 관심 생물학적 분석물 또는 그에 대한 각각의 바이오마커의 상대적 또는 절대적인 양 또는 농도를 나타내는 임의의 검출 가능한 신호를 의미한다. 본 발명에 따르면, "측정된 생물학적 값"은 특히 Se 상태의 결정을 위한 관련 생물학적 표지를 포함하며, 이는 다음을 포함한다:

[0046] a1) 미량원소 셀레늄(Se); 및/또는

[0047] a2) 셀레노단백질 P(SELENOP); 그리고

[0048] b) SELENOP(Ab(SELENOP)), 바람직하게는 aAb(SELENOP)에 대한 항체, 바람직하게는 상기 대상의 하나의 동일한 샘플로부터 유래된 항체.

[0049] 본 발명의 각 목적의 바람직한 실시양태에서, SELENOP(Ab(SELENOP))에 대한 항체는 자가항체 유형(aAb(SELENOP))이다.

[0050] 본 발명의 추가 구현예에서, 용어 "항-SELENOP-항체"는 특히 항-SELENOP-자가항체(aAb(SELENOP)) 및/또는 치료 Ab(SELENOP)를 의미한다.

[0051] 본 발명에서, 항체인 생물학적 분석물의 측정된 생물학적 값은 이런 항체의 결합 지수로 표시된다. 또는, SELENOP에 대한 항체, 바람직하게는 자가항체인 생물학적 분석물의 측정된 생물학적 값은 여전히 배경보다 통계적으로 유의한 양성 신호를 생성하는 이런 항체의 유희율을 나타내는 n번째 백분위수로 표시된다. 또는, 항체, 특히 자가항체인 생물학적 분석물의 측정된 생물학적 값이 항체, 바람직하게는 SELENOP에 대한 자가항체를 포함하는 상기 대상의 샘플의 n번째 연속 회색으로 표시될 수 있으며, 이는 여전히 배경보다 통계적으로 유의한 양성을 산출하는바, 즉 음성 샘플의 평균+3 표준 편차(음성 샘플의 평균+3*SD)를 초과하므로, 기술적 잡음이 양성 자가항체 신호의 원인이 될 가능성이 거의 없다. 대안적으로, 양성 샘플은 사분위수 범위(P75+1.5* IQR)의 이상치 기준 P75+1.5배를 사용하여 식별되며, 이는 기술적 잡음이 양성 자가항체 신호에 대한 거의 발생하지 않는 이유가 된다. 양성 자가항체 신호를 정의하기 위한 이런 임계값의 예가 문헌에 제공되어 있으며, 여기서 평균+3*SD와 P75+1.5* IQR을 모두 비교한다[41,42]

[0052] 본 발명에서, 용어 "SELENOP"는 예를 들어 SwissProt 데이터베이스 번호 P49908에 따라 GenBank 데이터베이스 항목 CAA77836.2로 각각 인코딩된 인간 SELENOP(SELENOP)을 의미한다.

[0053] 또는, "SELENOP"이 조사중인 대상의 각 종과 일치하는 SELENOP의 오솔로그를 의미한다[43]. 또는, SELENOP의 측정된 생물학적 값의 측정과 관련하여, "SELENOP"가 인간 SELENOP의 특정 단편, 및 당업계에 SELENOP의 정량화에 적합한 항원으로 알려진 임의의 이종상동체를 포함한다. 이런 적합한 단편은 SELENOP의 정량화를 위해 특이적이어야 하며, 예를 들어 W02019081504A1에 소개되고 특히 W02019081504A1에 개시된 서열번호 3 내지 15에 따른 펩티드 서열이 알려져 있다.

- [0054] SELENOP 또는 이의 단편을 검출하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 질량 분광법 및 면역분석법이 바람직하고, 면역분석법이 가장 바람직하다. 특정 SELENOP 단편은 SELENOP의 정량화에 적합한 지표 분자로서 해당 분야에 알려져 있다.
- [0055] 본 발명의 한 실시양태에서 SELENOP는 SELENOP 및/또는 그의 단편에 결합하는 포획분자를 사용하는 면역분석에 의해 측정된다. 일반적으로 포획분자는 표적 분자 또는 항원에 대한 항체 또는 항체 단편이다. 그러나, 면역분석 기술에 익숙한 당업자에게 공지된 포획분자에 대한 수많은 대안이 있다.
- [0056] SELENOP의 결정에는 일반적으로 전술한 분자내 영역에 대한 면역반응성이 포함된다. 이는 특정 단편을 선택적으로 측정할 필요가 없음을 의미한다. 셀레노단백질 P(SELENOP) 및/또는 이의 단편의 수준을 결정하는데 사용되는 포획분자는 상기 포획분자의 결합 영역을 포함하는 임의의 단편에 결합하는 것으로 이해된다. 상기 포획분자는 항체 또는 항체 단편 또는 비-IgG Scaffold(스캐폴드)일 수 있다. 기존의 다양한 면역분석법이 본 발명의 분석법 및 방법에 사용될 수 있으며, 여기에는 방사면역분석법("RIA"), 균질 효소 증식 면역분석법("EMIT"), 효소 결합 면역흡착 분석법("ELISA"), 아포효소 재활성화 면역분석("ARIS"), 화학발광 및 형광 면역분석, Lumindex 기반 비드 어레이, 단백질 마이크로어레이 분석 및 신속한 테스트 형식(예: 면역크로마토그래피 스트립 테스트("딥스틱 면역분석") 및 면역 크로마토그래피 분석)이 포함된다.
- [0057] 본 발명의 한 실시양태에서 이런 분석은 효소 표지, 화학발광 표지, 전기화학발광 표지, 바람직하게는 완전 자동화 분석을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의 종류의 검출 기술을 사용하는 샌드위치 면역분석이다. 본 발명의 한 실시양태에서 이런 분석은 효소 표지된 샌드위치 분석이다. 자동화된 또는 완전 자동화된 분석의 예에는 아래 시스템 중 하나에 사용될 수 있는 분석이 포함된다: Roche Elecsys®, Abbott Architect®, Siemens Centauer®, Brahms Kryptor®, Biomerieux Vidas®, 면역진단 시스템 IDS- iSYS®, Alere Triage®.
- [0058] 본 발명의 방법의 또 다른 구체예에는 완전 자동화된 분석 시스템이 필요 없이 약 1시간 이내에 테스트를 수행할 수 있는 테스트 기술인 소위 POC(point-of-care) 테스트(현장 진료)가 포함된다. 이 기술은 측면 유동 기술, 면역크로마토그래피, 생물발광이나 형광 공명 에너지 전달, 표면 플라즈몬 공명, 바이오센서 또는 전기화학적 테스트를 기반으로 할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 한 실시양태에서, 상기 2개의 포획분자 중 적어도 하나는 검출가능하도록 표지화된다. 바람직한 실시양태에서, 상기 표지는 화학발광 표지, 효소 표지, 형광 표지, 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 표지를 포함하는 군으로부터 선택된다. 본 발명의 각각의 목적의 가장 바람직한 실시양태는 방사성 표지가 없으며, 특히 본 발명의 검출 방법 및 이에 따라 사용되는 경우 또는 본 발명의 키트에서 방사성 표지가 존재하거나 사용되지 않는다.
- [0060] 분석 구조와 관련하여, 본 발명의 분석은 동질적이거나 이질적일 수 있으며, 또한 본 발명의 분석은 경쟁적이거나 비경쟁적으로 설계될 수 있다는 점에 유의해야 한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 분석은 비경쟁적 면역분석인 샌드위치 분석의 형태로 이루어지며, 여기서 검출 및/또는 정량화될 분자는 제1 항체 및 제2 항체에 결합되어 있다. 제1 항체는 고체상, 예를 들어 비드, 웰의 표면 또는 다른 용기, 칩 또는 스트립에 결합될 수 있으며, 이에 따라 제2 항체는 예를 들어 염료, 방사성 동위원소, 태그 서열 또는 반응성 또는 촉매 활성 부분으로 표지된 항체이다. 그런 다음 분석물에 결합된 표지된 항체의 양을 적절한 방법으로 측정한다. "샌드위치 분석"과 관련된 일반적인 구성 및 절차는 잘 확립되어 있으며 당업자에게 알려져 있다[44-46]. 본 발명의 대안적 실시양태에서, 분석은 경쟁적 면역분석인 샌드위치 분석의 형태로 이루어지며, 여기서 검출 및/또는 정량화될 분자는 제1 항체 및 제2 항체에 결합되고, 여기서 이런 결합은 바람직하게는 본 발명의 테스트 키트의 요소이고 분자의 절대적 또는 상대적 결정이 검출될 수 있도록 충분히 특성화되는 또 다른 결합 분자와 추가로 경쟁한다. 따라서 본 발명에 적합한 다른 결합 분자는 예를 들어 표지되거나 검출 가능한 단백질 단편, 펩티드, 항체, 압타머 또는 기타 특이적으로 결합하는 분자일 수 있다. 본 발명의 이해를 위해, 용어 '결합'과 '포획'(또는 '결합 분자' 및 '포획분자')은 동의어로 사용된다.
- [0061] 본 발명의 다른 구현예에서 분석물의 검출은 2개의 포획분자, 바람직하게는 항체들을 포함할 수 있으며, 둘 다 액체 반응 혼합물에 분산액으로 존재하며, 여기서 제1 표지 성분은 제1 포획분자에 부착되며, 이런 제1 표지 성분은 형광- 또는 화학발광-소광 또는 증폭에 기초한 표지 시스템의 일부이고, 상기 마킹 시스템의 제2 표지 성분은 제2 포획분자에 부착되어, 두 포획분자들이 분석물에 결합할 때 샘플을 구성하는 용액에서 형성된 샌드위치 복합체를 검출할 수 있는 측정 가능한 신호가 생성된다. 상기 표지 시스템은 형광 염료 또는 화학발광 염료, 특히 시아닌 유형의 염료와 조합된 희토류 크립테이트 또는 희토류 킬레이트를 추가로 포함할 수 있다.

- [0062] 본 발명에서, 형광 기반 분석은 예를 들어 FAM(5- 또는 6-카르복시플루오레세인), VIC, NED, 플루오레세인, 플루오레세인이소티오시아네이트(FITC), IRD-700/800, CY3, CY5, CY3.5, CY5.5, Cy7, xanthen, 6-Carboxy-2',4',7',4,7-헥사클로로플루오레세인(HEX), TET, 6-카르복시-4',5'-디클로로-2',7'-디메소디플루오레세인(JOE), N,N,N',N'-테트라메틸-6-카르복시로다민(TAMRA), 6-카르복시-X-로다민(ROX)), 5-카르복시로다민-6G(RG5), 6-카르복시-로다민-6G(RG6), 로다민, 로다민 그린, 로다민 레드, 로다민 110과 같은 시아닌 염료, BODIPY TMR 등의 BODIPY 염료, 오레곤 그린, 움벨리페론 등의 쿠마린, 벤즈이 미드, Hoechst 33258과 같은; Texas Red, Yakima Yellow, Alexa Fluor, PET, ethidiumbromide, 아크리디늄 염료, 카르바졸 염료, 페녹사진 염료, 포르피린 염료, 폴리메틴 염료 등과 같은 페난트리딘을 포함하는 그룹으로부터 선택될 수 있는 염료의 사용을 포함한다. 화학발광 기반 분석은 당업자에게 공지된 바와 같이 화학발광 물질에 대해 기술된 물리적 원리에 기초한 염료의 사용을 포함한다(49). 화학발광 라벨은 아크리디늄 에스테르 라벨, 이소 루미놀 라벨을 포함하는 스테로이드 라벨이다. 바람직한 화학발광 염료는 아크리디늄에스테르이다.
- [0063] 적합한 효소 표지로 락테이트 탈수소효소(LDH), 크레아틴 키나제(CPK), 알칼리성 포스파타제(AP), 분비된 알칼리성 포스파타제(SEAP), 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST), 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT), 산성 포스파타제, 글루코스-6- 인산염 탈수소효소, 루시피라제(LUC), 녹색 형광 단백질(GFP)이 있다.
- [0064] 본 발명의 한 실시양태에서, 샘플에서 SELENOP를 결정하기 위한 분석은 <math><0.100 \text{ mg/}\ell</math>, 바람직하게는 <math><0.05 \text{ mg/}\ell</math>, 더욱 바람직하게는 <math><0.01 \text{ mg/}\ell</math>의 분석 민감도를 나타낸다.
- [0065] 본 발명에서, "분석"이나 "진단 분석"은 진단 분야에 적용되는 임의의 유형일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 분석은 시험관 내에서 수행된다. 이런 분석은 특정 친화력을 갖는 하나 이상의 포획 프로브에 대한 검출할 분석물의 결합을 기반으로 할 수 있다. 포획분자와 표적 분자 또는 관심 분자 사이의 상호작용과 관련하여, 친화도 상수는 10^7 M^{-1} 초과, 바람직하게는 10^8 M^{-1} 초과, 더욱 바람직하게는 10^9 M^{-1} 초과, 가장 바람직하게는 10^{10} M^{-1} 초과이다. 결합 친화성 매개변수는 예를 들어 독일 카셀 소재의 Biaffin(<http://www.biaffin.com/de/>)에서 서비스로 제공되는 Biacore 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 결합 친화도는 당업자에 의해 정의된 적합한 표준 테스트 조건 하에서 결정될 수 있다.
- [0066] 본 발명에서, "포획분자"란 표적 분자나 관심 분자, 즉 샘플로부터 분석물(즉, 본 발명에서 셀레노단백질 P 및 이의 단편)을 결합하는데 사용될 수 있는 분자를 의미한다. 따라서 "포획분자"는 관심 표적 분자들에 특이적으로 결합하기 위해 표면전하, 소수성, 친수성, 루이스 공여체 및/또는 수용체의 존재나 부재와 같은 표면 특징 측면에서는 물론 공간적으로도 적절하게 형성되어야 한다. 이로써, 결합은 예를 들어 이온성, 반데르발스, 파이-파이, 시그마-파이, 소수성 또는 수소 결합 상호작용 또는 포획분자들과 관심 표적분자들 사이의 전술한 상호작용들 중 둘 이상의 조합으로 매개될 수 있다. 관심의, "포획분자"는 핵산 분자, 탄수화물 분자, PNA 분자, 단백질, 항체, 펩티드 또는 당단백질을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, "포획분자"는 표적분자나 관심 분자에 대해 충분한 친화도를 갖는(즉, 분석에 맞게 표적분자의 정량화를 위해) 항체 단편을 포함한 항체이고, 재조합 항체나 재조합 항체 단편 뿐만 아니라 상기 항체의 화학적으로 및/또는 생화학적으로 변형된 유도체 또는 적어도 12개의 아미노산 길이를 갖는 변이체 사슬로부터 유래된 단편을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 상기 2개의 포획분자들 중 적어도 하나는 자성 입자로서 고체상에 결합되거나 종이나 폴리스티렌 표면에 운반된다.
- [0067] "Se"는 다른 언급이 없는 한 원자번호 34의 화학 원소로 자연적으로 발생하는 모든 Se 동위원소를 포함한다.
- [0068] Se 검출법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 일반적으로 Se의 측정과 정량화는 원자흡수 분광법, 질량 분석법(예: 유도결합 플라즈마 질량분석법) 또는 전반사 X선 형광법을 사용하고, 예를 들어, 혈청 Se에 대해 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 이하의 검출 한계를 보이는 최소한의 샘플 준비를 요하는 Se 검출법이 있다.
- [0069] "항체"란 당업자에게 공지된 임의의 항체, 항체 유사체 또는 유도체를 의미하며, IgG, 전형적인 전장 면역글로불린, 효소유래 항체 단편(예; Fab', F(ab')₂, Fc) 및 유전조작된 항체 단편(예, scFv, (scFv)₂, 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디) 등이 있다. 이런 항체 단편은 적어도 중쇄 및/또는 경쇄의 F-가변 도메인, 예를 들어 에피토프 태그(예: Fab-V5Sx2)로 이량체화된 Fab 미니바디, 단일 사슬 Fab 항체, 1가 Fab 항체를 포함하는 Fab-단편을 포함한 화학적으로 결합된 항체(단편 항원 결합); C3/4 도메인으로 이량체화된 2가 Fab(미니 항체); dHLX 도메인의 이량체화와 같은 이중 도메인을 사용한 다량체화로 생긴 2가 Fab나 다가 Fab, 예컨대 Fab-dHLX-FSx2; F(ab')₂-단편, scFv- 단편, 다중화된 다가 또는/및 다중특이적 scFv-단편, 2가 및/또는 이중특이적 디아바디, BITE®(이중특이적 T-세포 참여자), 삼작용성 항체, 다가 항체(예: IgG와 다른 부류의 항체);

단일 도메인 항체, 예를 들어 낙타류나 어류 면역글로불린에서 유래된 나노바디가 있다.

- [0070] "항체"는 항체 단편, 앵타머, 비-Ig 스캐폴드를 포함한다.
- [0071] 또, "항체"는 항체와 같은 결합 친화성을 갖는 항원 분자를 복합체화하는 것으로 당업자에게 알려진, 즉 SELENOP에 대한 본 발명에 따른 생체고분자 스캐폴드를 포함할 수 있으며, 고도의 항원(SELENOP) 특이적 생체고분자의 생성에 사용된다. 생체고분자 지지체(스캐폴드)의 예로는 앵타머, 스피에겔머, 안티칼린 및 코노톡신이 있다. 비-Ig(비 면역글로불린) 스캐폴드는 단백질 스캐폴드일 수 있으며 리간드 또는 표적 분자에 특이적으로 결합하는 능력이 있는 항체 모방체로서 적합할 수 있다. 비-Ig 스캐폴드는 테트라넥틴 기반 비-Ig 스캐폴드(예: US20100028995A1), 피브로넥틴 스캐폴드(예: EP1266025A1), 리포칼린 기반 스캐폴드(예: WO2011154420A1), 유비퀴틴 스캐폴드(예: WO2011073214A1), 트랜스퍼링 스캐폴드(예: US20040023334A1), 단백질 A 스캐폴드(예: EP2231860A1), 안키린 반복 기반 스캐폴드(예: WO2010060748A1), 미세단백질 바람직하게는 시스틴 매듭을 형성하는 미세단백질 스캐폴드(예: EP2314308A1), Fyn S3/4 도메인 기반 스캐폴드(예: WO2011023685A1), EGFR-A 도메인 기반 스캐폴드(예: WO2005040229A1) 및 Kunitz 도메인 기반 스캐폴드(예: EP1941867A1))를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0072] "항체"는 바람직하게는 하나 이상의 자가항체, 특히 상기 정의된 바와 같은 셀레늄 결핍과 관련된 임의의 질병 또는 장애가 있는 대상에서 상호작용하는 자가항체를 의미한다.
- [0073] 또, "항체"는 바람직하게는 셀레늄 결핍과 관련된 임의의 질병 또는 장애를 앓고 있는 대상의 치료에 특히 적합한 하나 이상의 치료용 항체도 의미한다.
- [0074] SELENOP에 대한 항체("Ab(SELENOP)")를 검출하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다(34).
- [0075] 본 발명은 아래를 포함하고 본 발명의 방법을 수행하기 위한 테스트 키트도 제공한다:
- [0076] a) SELENOP에 대한 항체(SELENOP-Ab), 바람직하게는 SELENOP-aAb의 측정을 위한 특정 시약;
- [0077] b) 사용자 진단지;
- [0078] c) 선택적으로 완충액, 교정 표준물질, 음성 대조군, 양성 대조군으로부터 선택된 하나 이상의 시약 또는 화학물질; 및
- [0079] d) 선택적으로 SELENOP 측정을 위한 특정 시약.
- [0080] 본 발명에 따른 테스트 키트는 저장 안정성이 있다. 즉, 키트에 제공된 모든 시약의 안정성은 최소 6개월, 바람직하게는 최소 1년이다. 또는, 본 발명의 테스트 키트의 시약 및/또는 화학물질 중 하나 이상이 동결 건조 형태로 제공될 수도 있다.
- [0081] "Ab(SELENOP)의 결합 지수"(이하 "Ab(SELENOP)-BI")란 Ab(SELENOP)의 양이나 농도의 절대적 측정을 할 수 없는 경우 관련 관련 상대 매개변수로, 자가항체 검출의 대부분의 경우이다.
- [0082] "대상의 셀레늄 결핍 위험 평가"란 라는 표현은 바람직하게는 본 발명에 의해 교시된 매개변수, 즉 Se 및/또는 SELENOP를 Ab(SELENOP)와 함께 사용하여 대상의 셀레늄 상태를 확인하는 것을 의미하고, 선택적으로 예방(예: 독성 물질, 바이러스 또는 박테리아에 대한 노출이 증가한 상태), 방지(예: 암, 심혈관 또는 자가면역 질환) 또는 치료 목적(예: 감염, 난임, 암, 자가면역 또는 심혈관 질환 치료 중 보조 요법)을 위한 Se 보충의 필요 또는 요구 사항과 대상의 확인된 셀레늄 상태를 연관시킬 수도 있다.
- [0083] "Se 보충"은 예방적, 방지적, 치료적 또는 영양학적(즉, 보조제 또는 단독으로 사용됨) 맥락으로 사용되든, 바람직하게는 대상이 약학적으로 허용되는 양으로 Se를 섭취하는 것을 의미한다. Se는 생리학적으로 허용되는 셀레나이트, 셀레네이트, 셀레노메티오닌(L- 셀레노메티오닌) 또는 셀레늄이 풍부한 식품(예: 브라질 너트, 야채, 효모, 과일)의 형태로 적용될 수 있다. 본 발명의 방법의 바람직한 실시형태에서, Se 보충이나 Se 요법은 셀레나이트, 셀레네이트 또는 셀레노메티오닌(L- 셀레노메티오닌)으로부터 선택되는 Se를 필요에 따라 항산화제, 특히 보조효소 Q10, 글루타티온, 비타민 C 또는 E, 아연 또는 기타 미량 영양소와 조합하여 필요로 하는 대상에게 투여함으로써 수행된다.
- [0084] 상당한 Se 결핍이 검출된 경우, 대상의 Se 상태를 모니터링하고 있으면 Se 보충이 당업자가 현재 알고있는 허용 가능한 섭취 상한치(UL(Se))를 넘을 수 있다. 또는, Se 보충을 비타민 제품이나 비타민(예: 비타민 E, 비타민 C, 비타민 A) 및/또는 미네랄 영양소(예: 요오드, 불소, 아연, 구리, 철) 및/또는 보조제(예: 코엔자임 Q10)와

함께 할 수도 있다. Se 보충을 위한 용량 제제는 예를 들어 경구 사용을 위한 또는 이를 필요로 하는 대상에 대한 정맥내 투여를 위한 수용성 분말, 액체 또는 유체의 정제, 캡슐, 과립, 분말, 향 주머니로 할 수 있다.

- [0085] 본 발명은 Se 보충 요법 동안 필요한 개별 Se 양 및 투여량 요법의 정량화에 있어서 동반 진단이나 모니터링을 위해 대상의 셀레늄(Se) 결핍 위험을 평가하기 위한 본 발명의 방법의 용도도 제공한다.
- [0086] "Se 결핍에 대한 위험지수 점수"(이하 "RIS(Se)")란 개인의 Se 상태에 대한 개선된 정의 및 분류를 위한 매개변수를 의미한다. RIS(Se)는 하기 화학식 I에 따라 계산된다:
- [0087] $RIS(Se) = \text{마크}(Se \text{ 등가}) + \text{마크}(Ab(SELENOP)-BI)$ (식 I)
- [0088] 따라서, RIS(Se) 채점은 본 발명의 방법에 따라 대상의 샘플에서 결정된 마크 값을 추가해 생기고, 이에 따라 본 발명의 바람직한 일 실시예에서 이 계산을 위한 모든 측정된 생물학적 값들은 상기 대상의 하나의 샘플에서 생긴다.
- [0089] [표 1A]
- [0090] Se 등가량(Se 또는 SELENOP, *혈청 또는 혈장 수준)의 측정된 생물학적 값의 결정된 마크에 대한 마크 분포의 사전-채점
- [0091] 마크 Se* 양 resp. SELENOP* 양
- [0092] 1 >120 μ g/L >6mg/L
- [0093] 2 >90~120 μ g/L >4~6mg/L
- [0094] 3 >70~90 μ g/L >3~4mg/L
- [0095] 4 \geq 35~70 μ g/L \geq 1.5~3 mg/L
- [0096] 5 <35 μ g/L <1.5mg/L
- [0097] [표 1B]
- [0098] SELENOP에 대한 항체의 결합지수 Ab(SELENOP)-BI의 측정된 생물학적 값들의 결정된 마크에 대한 마크 분포의 사전-채점
- [0099] 마크 결합지수 Ab(SELENOP)
- [0100] 1 1 ~ 3
- [0101] 2 >3~5
- [0102] 3 >5~7.5
- [0103] 4 >7.5~10
- [0104] 5 >10
- [0105] [표 2]
- [0106] 식 I을 사용한 RIS(Se) 채점, 셀레늄 상태 분류 및 Se 보충 요건
- [0107] 점수 Se 보충에 관한 결론
- [0108] 1~<3 Se 무결핍, Se 보충이 불필요
- [0109] 3~<4 가벼운 Se 결핍, 가벼운 Se 보충 고려
- [0110] 4~5 중간 정도의 Se 결핍, 중간 정도의 Se 보충 필요
- [0111] >5 심각한 Se 결핍, 높은 Se 보충 필요
- [0112] 샘플의 생물학적 매개변수(Se 및 SELENOP)가 모두 결정되었으면, 평균값이나 가중 평균값(예: 통계 오차 막대에 해당)이 생겨 식 I에 사용될 수 있다.
- [0113] 당업자라면 알 수 있듯이, 사용된 매개변수마다 다른 마크 값을 할당하고, 계산의 즉각적인 결과로 서로 다른 점수 등급을 매길 수 있다. 명명된 매개변수를 계산하기 위해 식 I에서 하나 이상의 다른 수학적 연산자를 사용

한 결과 계산의 즉각적인 결과로서 동일하거나 다른 점수 등급을 낼 수도 있다. 사용된 매개변수에 대한 서로 다른 마크 값과 명명된 매개변수를 계산하기 위한 하나 이상의 다른 수학적 연산자를 모두 사용한 결과 계산의 즉각적 결과로 동일하거나 다른 점수 등급을 얻을 수도 있다. 본 발명에 따른 RIS 채점에 적합한 수학적 연산자로는 숫자로 나타난 측정값(즉, 마크 또는 원데이터 값)의 곱셈, 나눗셈, 덧셈, 뺄셈, 강화 등이다. 이는 대체 공식 T가 예를 들어 다음과 같이 읽을 수 있음을 의미한다.

- [0114] $RIS(Se) = \text{마크}(Se \text{ 양})^x [\text{연산자}] \text{마크}(SELENOP)^y [\text{연산자}]$
- [0115] $\text{마크}(Ab(SELENOP)-BI)^z$, 여기서 x, y, z는 실수
- [0116] RIS(Se)의 계산을 위한 다른 방식도 유효하고, Ab(SELENOP)의 증가량이 일반적으로 Se 결핍의 위험 증가, Se 보충 권고와 관련이 있도록 Ab(SELENOP)의 측정값을 이런 계산에 유도하는 것도 본 발명의 범위에 속한다.
- [0117] 본 발명은 본 발명에 따른 대상, 특히 식 I에서 3 이상의 점수를 갖는 RIS(Se) 결핍 위험을 평가하는 방법을 사용하여 고위험으로 확인된 대상에 Se를 보충하는 것도 포함한 방법도 제공한다.
- [0118] 본 발명은 하나 이상의 DRSD를 앓고 있는 대상을 Se 보충으로 치료하는 방법도 제공하는데, 본 발명에 따른 셀레늄(Se) 결핍의 위험을 평가하는 어떤 방법도 동반 진단으로서 수행되고 사용되는데, "동반 진단"이란 Se 상태의 모니터링을 의미하며, 바람직하게는 본 발명에 의해 정의된 RLS(Se)의 계산이 사용되며, 더욱 바람직하게는 대상이 하나 이상의 DRSD, 특히 i) 패혈증, ii) 염증, iii) SIRS, iv) 염증성 장 질환, v) 감염, vi) 심혈관 질환(CVD), vii) 죽상경화증, viii) 심혈관 사건, ix) 뇌졸중, x) 심근경색, xi) 심근병증, xii) 암, xiii) 유방암, xiv) 전립선암, xv) 대장암, xvi) 폐암, xvii) 간암, xviii)(다중)외상, xix) 갑상선 기능장애, xx) 제1형 당뇨병 및/또는 II, xxi) 중환자실(ICU)에서 치료되는 중증 질환, xxii) 중증 화상 또는 화상, xxiii) 중독, xxiv) 신경퇴행성 질환, xxv) 간질 발작, xxvi) 알츠하이머병, xxvii) 파킨슨병, xxviii) 헌팅턴병, xxix) 진행성 또는 만성 다발성 경화증(MS), xxx) 근위축성 측삭 경화증(ALS), xxxi) 불임, 또는 xxxii) 고혈압, 및 특정 실시양태에서는 하시모토병, 그레이브스 안병증, 인플루엔자 A, B형 감염, C형 감염, 또는 COVID-19을 앓고 있다.
- [0119] 본 발명은 셀레늄 결핍과 관련된 질병을 앓고 있는 대상을 Se 보충으로 치료하는 방법도 제공하고, 이때 본 발명에 따른 셀레늄(Se) 결핍의 위험을 평가하는 어떤 방법도 치료에 사용된다. 바람직하게는 본 발명에 의해 정의된 바와 같은 RIS(Se)의 계산이 사용되고, 더욱 바람직하게는 대상이 하나 이상의 DRSD, 특히 i) 패혈증, ii) 염증, iii) SIRS, iv) 염증성 질환을 앓고 있는 경우 장 질환, v) 감염, vi) 심혈관 질환(CVD), vii) 죽상경화증, viii) 심혈관 사건, ix) 뇌졸중, x) 심근경색, xi) 심근병증, xii) 암, xiii) 유방암, xiv) 전립선암, xv) 대장암, xvi) 폐암, xvii) 간암, xviii)(폴리)외상, xix) 갑상선 기능장애, xx) 제1형 및/또는 II형 당뇨병, xxi) 집중 치료에서 치료되는 중증 질환 병동(ICU), xxii) 심각한 화상 또는 화상, xxiii) 중독, xxiv) 신경퇴행성 질환, xxv) 간질 발작, xxvi) 알츠하이머병, xxvii) 파킨슨병, xxviii) 헌팅턴병, xxix) 진행성 또는 만성 다발성 경화증(MS), xxx) 근위축성 측삭 경화증(ALS), xxxi) 불임, 또는 xxxii) 고혈압, 및 특정 실시양태에서는 하시모토병, 그레이브스 안 병증, A형 인플루엔자, B형 감염, C형 감염 또는 COVID-19을 앓고 있다.
- [0120] 본 발명은 Se 보충으로 셀레늄 결핍과 관련된 질병을 앓고 있는 대상을 치료하는 방법도 제공하는데, 이때 본 발명에 따른 셀레늄(Se) 결핍의 위험을 평가하는 어떤 방법도 적어도 2회 수행될 수 있고, 바람직하게는 본 발명에 의해 정의된 RIS(Se)의 계산이 사용되며, 더욱 바람직하게는 대상이 하나 이상의 DRSD, 특히 i) 패혈증, ii) 염증, iii) SIRS, iv) 염증성 장을 앓고 있는 경우 질환, v) 감염, vi) 심혈관 질환(CVD), vii) 죽상동맥경화증, viii) 심혈관 질환, ix) 뇌졸중, x) 심근경색, xi) 심근병증, xii) 암, xiii) 유방암, xiv) 전립선암, xv) 대장암, xvi) 폐암, xvii) 간암, xviii)(폴리)외상, xix) 갑상선 기능장애, xx) 제1형 및/또는 II형 당뇨병, xxi) 집중 치료에서 치료되는 중증 질환 유닛(ICU), xxii) 중증 화상 또는 화상 부상, xxiii) 중독, xxiv) 신경퇴행성 질환, xxv) 간질 발작, xxvi) 알츠하이머병, xxvii) 파킨슨병, xxviii) 헌팅턴병, xxix) 진행성 또는 만성 다발성 경화증(MS), xxx) 근위축성 측삭 경화증(ALS), xxxi) 불임, 또는 xxxii) 고혈압, 및 특정 실시양태에서는 하시모토병, 그레이브스 눈 병증, A형 인플루엔자, B형 감염, C형 감염 또는 COVID-19을 앓고 있을 수 있다.
- [0121] 본 발명은 본 발명에 따른 Se 결핍의 건강위험을 평가하는 방법 또는 위험지수 점수를 사용하여 대상의 치료 또는 예방을 위한 Se 보충 중 개인의 Se 요구량 및 투여량 요법을 정량화하는 방법도 제공한다.
- [0122] 본 발명은 본 발명에 따른 셀레늄 결핍의 건강 위험도 평가 방법 또는 본 발명에 따라 얻을 수 있는 위험지수

점수를 이용하여 동반진단으로서 대상의 셀레늄 보충을 모니터링하는 방법도 제공한다. 본 발명은 본 발명에 따른 Se 결핍증의 건강 위험도나 본 발명에 따라 얻을 수 있는 위험지수 점수의 평가 방법을 사용하여 동반 진단으로서 약학적 유효량의 SELENOP에 대한 항체를 투여하여 셀레노스증을 앓고 있는 대상의 치료를 모니터링하는 방법도 제공한다.

[0123] 본 발명은 본 발명에 따른 셀레늄 결핍의 건강 위험도 평가 방법 또는 본 발명에 따라 얻을 수 있는 위험지수 점수를 이용하여 셀레늄 중독을 분석 및 모니터링하는 방법도 제공한다.

[0124] 본 발명은 본 발명에 따른 Se 결핍의 건강 위험이나 본 발명에 따라 얻을 수 있는 위험지수 점수를 평가하는 방법을 이용해 폐혈증, 감염, (다발성)트라이무 또는 SIRS 중에서 선택된 질병을 앓고있는 대상의 치료를 모니터링하는 방법도 제공한다.

[0125] 본 발명은 본 발명에 따른 셀레늄 결핍의 건강 위험도 평가 방법 또는 본 발명에 따라 얻을 수 있는 위험지수 점수를 이용하여 A형 인플루엔자 및 COVID-19 중에서 선택된 바이러스 감염을 앓고 있는 대상의 치료 상태를 모니터링하는 방법도 제공한다.

[0126] 본 발명은 a) 셀레노스증을 앓고 있는 대상의 치료에서 SELENOP에 대한 약학적 유효량의 항체의 용도; b) 약학적 유효량의 SELENOP에 대한 항체 및 선택적으로 추가 보조 성분을 포함하는 셀레늄증을 앓고 있는 대상의 치료를 위한 약학 조성물의 제조; 및 c) 약학적 유효량의 SELENOP에 대한 항체를 포함하는 셀레늄증을 앓고 있는 대상의 치료를 위한 약학 조성물에 관한 것이기도 하다. SELENOP에 대한 이런 항체는 해당 분야에 알려져 있다 [50]. SELENOP에 대한 약학적 유효량의 항체를 사용하여 대상을 치료하는 것은 바람직하게는 본 개시내용에 따른 셀레늄(Se) 결핍 위험을 평가하는 방법을 사용하여 SE 상태를 모니터링하는 것을 동반한다.

도면의 간단한 설명

[0127] 도 1은 적용가능한 임계값에 따라 Se 결핍에 대한 위험지수 점수를 적용하는 방식을 보여주는 도면.

서열:

SEQ ID No 1: 프라이머 P1

SEQ ID No 2: 프라이머 P2

SEQ ID No 3: 재조합 SEAP의 cDNA

SEQ ID No 4: 프라이머 P3

SEQ ID No 5: 프라이머 P4

SEQ ID No 6: 인간 재조합 SELENOP의 cDNA

SEQ ID No 7: 융합 단백질 SELENOP-SEAP의 cDNA

SEQ ID No 8: 융합 단백질 SELENOP-SEAP의 아미노산 서열

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0128] 실시예

[0129] 재료:

[0130] DNA 프라이머는 Life Technologies(Carlsbad, CA, USA)에서, 벡터는 Promega GmbH(Mannheim, Germany)에서, pIRESneo 벡터는 Clontech(Palo Alto, CA, USA)에서 구입했다. 달리 명시하지 않는 한, 다른 화학물질과 시약들은 Sigma-Aldrich Chemie GmbH(독일 뮌헨)나 Merck KGaA(독일 다름슈타트)에서, 효소는 Promega(미국 버지니아주 매디슨)나 New England Biolabs(미국 매사추세츠주 입스위치)에서 구입했다. 세포배양 배지와 첨가제는 Fisher Scientific Co. LLC(Hanover Park, IL, USA)에서 구입했다. 액체에 대한 백분율 값은(v/v)로 표시되고, 그렇지 않으면(w/w)로 주어진다. 실온(RT; room temperature)은 20°C +/- 5°C를 의미한다.

[0131] 실시예 1: 혈청 샘플내 셀레노단백질 P 측정

[0132] selenOtest™ ELISA는 발색 효소-결합 면역흡착 분석으로, 혈청 샘플내 인간 SELENOP의 정량적 측정을 위한 것이다. 설명한 바와 같이[7], 기본적으로 항원포획 단계와 검출 단계에 2가지 SELENOP 특이 단일클론 항체들을

사용한다. IgG 분리물이나 혈청 샘플들내 SELENOP 농도가 2개의 단일클론 항체들(mAb1, mAb2)로 검증된 상용 SELENOP 특이 ELISA를 사용해 샌드위치 ELISA로 측정되었다. 분석군(calibrators)과 대조군(cIntrols)의 SELENOP 농도가 NIST SRM 1950 표준 참고 자료(미국 메릴랜드주 게이더스버그 국립 표준기술 연구소)의 연속 회석에 대해 검증되었다. SELENOP 농도 11.6 $\mu\text{g/L}$ 에서 정량 하한(LLOQ), 538.4 $\mu\text{g/L}$ 에서 정량 상한(UL(Se)OQ)을 결정해, 11.6-538.4 $\mu\text{g/L}$ 의 SELENOP에서 회석된 혈청 샘플의 작동범위를 정의했다. 20% CV의 교차점은 검출 한계(LOD)를 정의하고 SELENOP 농도 6.7 $\mu\text{g/L}$, 즉 잘 공급된 인간 대상들의 평균 혈청 SELENOP 농도보다 500배 정도 낮은 수준에 도달했다. 신호는 분석 작업 범위 내에서 회석시 선형이었고 SELENOP는 실온에서 24시간 동안 혈청에서 안정적이었다. 분석 매개변수에 대한 자세한 내용은 공개되었고[7], 이 분석은 다른 경쟁 제품과 비교하여 가장 신뢰할 수 있는 제품으로 입증되었다[47]

[0133] 요컨대, 에탄올 침전이 없는 양성과 음성 IgG 분리물 각각 100 μl 를 사전코팅 96-웰 플레이트에 도포했다. 혈청 샘플(5 μl)을 1:33으로 회석하고 사전코팅 96-웰 플레이트에 도포했다. 표준물질과 교정물질(양성 및 음성 대조군)이 각 분석 실행에 포함되었다.

[0134] 실시예 2: 혈청 샘플내 셀레늄 측정

[0135] IgG-분리물이나 혈청 샘플들내 셀레늄 농도를 벤치탑 TXRF 분석기(picofox S2, Bruker Nano GmbH, Berlin, Germany)를 사용하여 전반사 X선 형광(TXRF; total reflection X-ray fluorescence)으로 분석했다([48] 참조). 이를 위해, SELENOP-aAb 양성 및 SELNOP-aAb 음성 IgG 분리물들로부터의 단백질들을 9배 부피의 100% 아이스콜드 에탄올을 사용하여 1배 부피의 IgG 분리물에 침전시키고 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 배양했다. 15000*g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 동안 원심분리한 후, 상등액을 버리고 펠릿을 Ga-표준 농도 1mg/ ℓ 로 100 μl 61% HNO₃에서 80 $^{\circ}\text{C}$ 로 2시간 동안 배양했다. 이런 혈청 샘플들을 Ga-표준 농도 1 mg/ ℓ 로 직접 1:2 회석했다. TXRF에 의한 Se-검출을 위해, 각 용액 8 μl 를 연마된 석영 유리 슬라이드에 도포하고 밤새 건조했다.

[0136] 실시예 3: 혈청 샘플내 SELENOP에 대한 항체 측정

[0137] 3.1 재조합 SEAP-SELENOP 리포터 단백질의 생성

[0138] pIRESneo-SEAP 플라스미드의 구축

[0139] 아미노산 1-513(SEQ ID No.3)을 코딩하는 분비된 알칼리성 포스파타제(SEAP)(pSEAP2-Basic, Clontech)의 cDNA 서열을 프라이머 P1(5'-3': atagatatcatgctgctgctgctgctgctg, SEQ ID No.1) 및 EcoRV와 NotI 제한 부위를 함유하는 프라이머 P2(5'-3': atagcgccgcccccactctagagtaaccgg, SEQ ID No.2)를 사용해 PCR로 증폭했다. pIRESneo 플라스미드(Clontech, Palo Alto, California)를 EcoRV 및 NotI 제한 엔도뉴클레아제(NEB Biolabs)로 분해하고, 단편들을 제거하고 pIRESneo-SEAP 플라스미드를 생성하는 PCR 서열로 교체했다.

[0140] 인간 재조합 SELENOP(SEQ ID No.6)의 cDNA를 프라이머 P1(5'-3': atagcgccgctgagagccaggaccaaagctcctta)(SEQ ID No.4) 및 P2(5'-3': atagaattcttagttgaagggcattcgcactt)(SEQ ID No.5)(BioTeZ, 독일 베를린)을 사용해 PCR로 증폭했다. 두 서열 모두 확장되어 적합한 제한 부위를 제공했다. 제한, 소화 및 아가로스 겔 전기영동을 통한 분리 후, 제한된 SELENOP cDNA를 코딩하는 분리된 DNA를 벡터 pIRESneo-SEAP에 결합시킨 후 E.coli로 형질전환했다. SEAP-SELENOP 코딩 서열(SEQ ID No.7)의 양성 클론을 확인하고 발현 플라스미드를 서열분석으로 확인했다. 융합 단백질 SEAP-SELENOP(SEQ ID No.8)의 단백질 생산을 위해, 인간 배아 신장 세포(HEK 293 cells)를 10% 소 태아로 보충된 DMEM/F12에서 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂에서 배양하고 FuGENE® 시약(Promega)을 사용해 pIRESneo-SEAP-SELENOP 으로 형질감염시켰다. 형질감염 48시간 후, 10%(v/v) FBS 및 0.5-0.8 mg/ml G418이 포함된 DMEM/F12에서 배양하여 성공적으로 형질감염된 세포들을 선택했다. 높은 수준의 재조합 단백질(SEAP-SELENOP)을 발현하는 안정한 클론들을 증식하고 세포 상층액을 수집했다.

[0141] 3.2 SELENOP에 대한 aAb 검출을 위한 면역발광측정 분석

[0142] SELENOP("SELENOP-aAb")에 대한 자가항체("aAb") 검출을 위한 면역발광측정 분석을 확립하고 혈청 샘플을 분석하는데 사용했다. 면역발광측정 분석은 리포터 SEAP에 융합된 재조합 SELENOP에 aAb를 결합한 후, 단백질 A에 의한 항체-항원-리포터 복합체의 침전을 기반으로 한다. 이를 위해, 1:100 회석된 항원-리포터 상층액 40 μl 각각을 10 μl 의 1:2 회석된 혈청 샘플로 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 배양했다. 둘째날에는 40 μl 의 단백질 A 슬러리(20%)를 첨가하고, 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 배양, 세척하고(50mM Tris-HCl, pH 7.5, 100mM NaCl, 0.5% Triton X-100) 500*g(4 $^{\circ}\text{C}$, 5분)에서 원심분리했다. 6회의 세척 단계 후, 상대 발광 신호(RLU)로 리포터 활성을 검출했는데, 이는 샘플내 SELENOP-aAb의 양에 비례한다.

[0143] 4. 통계분석

[0144] 결과들은 평균 \pm SD 또는 개별 값들의 분포로 표시된다. SELENOP-aAb 분석의 데이터를 분석 플레이트마다 평가했다. 동일한 플레이트에서 50% 가장 작은 신호 강도의 평균값을 1 상대단위(rel 단위, RU, resp., 상대 발광 단위, RLU)로 설정했다. 샘플내 상대 SELENOP aAb 역가는 SELENOP-aAb가 인구의 50% 이상에 존재하지 않는다는 가정에 기초하여 동일한 플레이트에서 개별 신호 강도와 50% 가장 작은 신호 강도의 평균값의 몫으로 계산되었다. 계산된 신호 몫이 음성(대조군) 샘플들의 평균 배경 신호보다 5배나 10배보다 높아 컷오프=5 또는 컷오프=10이 되는 경우 혈청 샘플을 SELENOP-aAb 양성으로 정의했다. 분석간 및 분석내 CV는 20% 미만으로 결정되었다.

[0145] 참고자료

[0146] 1. 버크, RF 및 KE 힐. Annu Rev Nutr, 2015. 35: p.109-34.

[0147] 2. 허스트, R' 외. Am J Clin Nutr, 2010. 91(4): p.923-31.

[0148] 3. Combs, GF, Jr. 외. Br J Nutr, 2012. 107(10): p.1514-25.

[0149] 4. Ashton, K. 외. American J of Clinical Nutrition, 2009. 89(6): p.2025s-2039s.

[0150] 5. Xia, YM, 외. American J of Clinical Nutrition, 2010. 92(3): p.525-31.

[0151] 6. Kipp, AP 외. J Trace Elem Med Biol, 2015. 32: p.195-9.

[0152] 7. Hybsier, S. 외. Redox Biology, 2017. 11 : p.403-14.

[0153] 8. 버크, RF, KE 힐. Annu Rev Nutr, 2005. 25: p.215-35.

[0154] 9. Saito, Y. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 2020. 66(1): p.1-7.

[0155] 10. Saito, Y.외. 생화학저널, 2004. 381: p.841-6.

[0156] 11. Ballihaut, G.외. 금속공학, 2012. 4(6): p.533-8.

[0157] 12. 힐, KE, 외. 영양학회지, 1996. 126(1): p.138-45.

[0158] 13. Persson-Moschos, M.외. Eur J Clin Nutr, 1998. 52(5): p.363-7.

[0159] 14. Xia, YM, 외. American J of Clinical Nutrition, 2005. 81(4): p.829-34.

[0160] 15. Burk, RF 등. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. 15(4): p.804-10.

[0161] 16. Rayman, MP, 외. Br J Nutr, 2014. 112(1) : p.99-111.

[0162] 17. Kahaly, GJ외. J Clin Endocrinol Metab, 2017. 102(11) : p.4333-41.

[0163] 18. Chen, MX 외. 비만 연구 및 임상 실습, 2017. 11(2): p.227-32.

[0164] 19. Kikuchi, N' 외. 순환, 2018. 138(6): p.600-23.

[0165] 20. Yang, S.J. 외. J Clin Endocrinol Metab, 2011. 96(8): p.E1325-9.

[0166] 21. Hollenbach, B. 외. J Trace Elem Med Biol, 2008. 22(1) : p.24-32.

[0167] 22. Renko, K. 외. FASEB J, 2009. 23(6): p.1758-65.

[0168] 23. Gharipour, M. 외. J Gene Med, 2017. 19(3) p.e2945.

[0169] 24. Senthilkumaran, S.외. Int J Trichology, 2012. 4(4): p.283-4.

[0170] 25. Morris, J.S. 및 S.B. Crane. Nutrients, 2013. 5(4): p.1024-57.

[0171] 26. 힐, KE, 외. J Nutr, 1996. 126(1) : p.138-45.

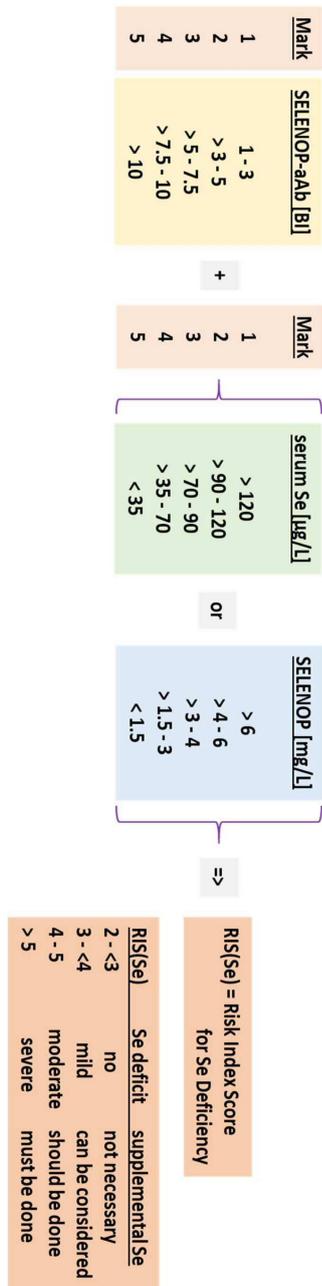
[0172] 27. Xia, Y.외. American J Clin Nutr, 2010. 92(3): p.525-31.

[0173] 28. Eskes, SA외. Clinical Endocrinology, 2014. 80(3): p.444-51.

- [0174] 29. Yang, JG외. J Nutr, 1989. 119(7): p.1010-2.
- [0175] 30. Renko, K., 외. Biochem J, 2008. 409(3): p.741-9.
- [0176] 31. Moghaddam, A.외. Nutrients, 2020. 12(7):2098.
- [0177] 32. Schomburg, L. Hormones(Athens), 2020. 19(1):p. 15-24.
- [0178] 33. Schomburg, L. Nat Rev Endocrinol, 2011. 8(3):p. 160-71.
- [0179] 34. Sun, Q.외., Autoimmunity to Selenoprotein P in Thyroid Patients. 62. Kongress fur Endokrinologie, 괴팅겐, 독일, 2019.
- [0180] 35. Persson-Moschos, M.외. Analyst, 1995. 120(3): p.833-6.
- [0181] 36. Huang, W., 외. British Journal of Nutritio, 1995. 73(3): p.455-61.
- [0182] 37. Andoh, A.외. Nutrition, 2005. 21(5): p.574-9.
- [0183] 38. Hybsier, S외. Redox Biol, 2017. 11 : p.403-14.
- [0184] 39. Perssonmoschos, M.외. Analyst, 1995. 120(3): p.833-36.
- [0185] 40. Tanaka, M.외. J Clin Lab Anal, 2016. 30(2): p.114-22.
- [0186] 41. Kerman, R., 외. Clin Transpl, 2013: p.357-60.
- [0187] 42. Schwiebert, C 외. Int J Mol Sci, 2020. 21(2):463
- [0188] 43. Penglase, S.외. PeerJ, 2015. 3: p.e1244.
- [0189] 44. Poschenrieder, A.외. Anal Bioanal Chem, 2019. 411(29): p.7607-21.
- [0190] 45. Justino, CI 등. Adv Clin Chem, 2016. 73: p.65-108.
- [0191] 46. Del Campo, M., 외. Front Neurol, 2015. 6: p.202.
- [0192] 47. Saito, Y.외. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2018. 41(5): p.828-33.
- [0193] 48. Hoeflich, J. 등,(2010) Br J Nutr 104(11): 1601-1604.
- [0194] 49. Kirk-Othmer, Encyclopedia of chemical technology, 4판, 편집장, JI Kroschwitz; 편집자, M Howe-Grant, John Wiley & Sons(1993) Vol.15, pp. 518-562.
- [0195] 50. Mita, Y., 외.,(2017). Nat. Commun. 8: p.1658

도면

도면1



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> BERYSOL GmbH

<120> Composite Biomarker for the Identification of Selenium Deficiency in a Bodily Fluid

<130> BY022429-P-WO

<150> DE102021209147.4

<151> 2021-08-19

<150> DE102021206749.2

<151> 2021-06-29

<160> 8

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer P1

<400> 1

atagatatca tgctgctgct gctgctgctg 30

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer P2

<400> 2

atagcggccg ccccgactct agagtaacc gg 32

<210> 3

<211> 4677

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Expression vector containing cDNA of SEAP

<400> 3

ggtaccgagc tcttacgct gctagcccgg gctcgagatc tgcgatctaa gtaagcttcg 60

aatcgcgaat tgccccacca tgctgctgct gctgctgctg ctgggcctga ggctacagct 120

ctccctgggc atcatcccag ttgaggagga gaacccggac tcttggaaacc gcgaggcagc 180

cgaggccctg ggtgccgcca agaagctgca gcctgcacag acagccgcca agaacctcat 240

catcttcttg ggcgatggga tgggggtgic tacggtgaca gctgccagga tcctaaaagg 300

gcagaagaag gacaaactgg ggcctgagat acccctggcc atggaccgct tcccatatgt 360

ggctctgtcc aagacatata atgtagacaa acatgtgcca gacagtggag ccacagccac 420

ggctacctg tgcgggtca agggcaactt ccagaccatt ggcttgagtg cagccgcccg 480
 ctttaaccag tgcaacacga cacgcggcaa cgaggtcac tccgtgatga atcgggccaa 540
 gaaagcaggg aagtcagtgg gagtggtaac caccacacga gtgcagcacg cctcgcacg 600
 cggcacctac gccacacgg tgaaccgcaa ctggtactcg gacgccgacg tgcctgcctc 660

 ggccccccag gaggggtgcc aggacatcgc tacgcagctc atctccaaca tggacattga 720
 cgtgatccta ggtggaggcc gaaagtacat gtttcgcatg ggaaccccag accctgagta 780
 cccagatgac tacagccaag gtgggaccag gctggacggg aagaatctgg tgcaggaatg 840
 gctggcgaag cgcagggtg cccggtatgt gtggaaccgc actgagctca tgcaggcttc 900
 cctggacccg tctgtgacc atctcatggg tctctttgag cctggagaca tgaatacga 960
 gatccaccga gactccacac tggacccctc cctgatggag atgacagagg ctgccctgcg 1020
 cctgctgagc aggaacccc gcggttctt cctcttcgtg gaggtgtgtc gcatcgacca 1080

 tggatcatcat gaaagcaggg cttaccgggc actgactgag acgatcatgt tgcacgacgc 1140
 cattgagagg gcgggccagc tcaccagcga ggaggacacg ctgagcctcg tcaactgccga 1200
 ccaactccac gtcttctct teggaggeta cccctgcga gggagctcca tcttcgggct 1260
 ggccccctggc aagggccggg acaggaaggc ctacacggtc ctctatacg gaaacggctc 1320
 aggctatgtg ctcaaggacg gcgcccggcc ggatgttacc gagagcgaga gcgggagccc 1380
 cgagtatcgg cagcagtcag cagtgcacct ggacgaagag acccagcag gcgaggacgt 1440
 ggcggtgttc gcgcgggcc cgcaggcgca cctggttcac ggctgcagg agcagacctt 1500

 catagcgcac gtcattggct tgcgcgctg cctggagccc tacaccgctt gcgacctggc 1560
 gccccccgc ggcaccaccg acgccgcgca cccgggttac tctagagtcg gggcggccgg 1620
 ccgcttcgag cagacatgat aagatacatt gatgagttg gacaaaccac aactagaatg 1680
 cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tghtaacatt 1740
 ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc atttatggt tcaggttcag 1800
 ggggaggtgt gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg taaaatcgat 1860
 aaggatccgt cgaccgatgc ccttgagagc cttcaacca gtcagctcct tccggtgggc 1920

 gcggggcatg actatcgtcg ccgcaattat gactgtcttc tttatcatgc aactcgtagg 1980
 acaggtgccg gcagcgtct tccgttctt cgtcactga ctcgctgcgc tggctgctt 2040
 ggctgcggcg agcggatatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag 2100
 gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa 2160
 aggcccggtt gctggcgttt ttccatagc tccgcccc tgacgagcat cacaaaaatc 2220
 gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc 2280

ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg 2340

cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt 2400

cggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga acccccctt cagcccgacc 2460

gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaacc ggtaagacac gacttatcgc 2520

cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag 2580

agttcttgaa gtggtggcct aactacgctt aactagaag aacagtattt ggtatctgcg 2640

ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaa gagttgtag ctcttgatcc ggcaaaaaa 2700

ccaccgtgg tagcgtggt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag 2760

gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact 2820

cacgttaagg gattttgctc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa 2880

atataaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt 2940

accaatgctt aatcagttag gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag 3000

ttgcctgact ccccgctgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca 3060

gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct caccgctcc agatttatca gcaataaacc 3120

agccagccgg aaggcccgag cgcagaagtg gtcttcaac tttatccgcc tccatccagt 3180

ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg 3240

ttgttgccat tgctacaggc atcgtggtgt cagctcgtc gtttggtag gcttcattca 3300

gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg 3360

ttagctcctt cggctctccg atcgttgtca gaagtaagt ggccgcagtg ttatcactca 3420

tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg 3480

tgactggtga gtactcaacc aagtattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct 3540

cttgccccgc gtcaatacgg gataataacc cgccacatag cagaacttta aaagtctca 3600

tcattgaaa acgttcttgc gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca 3660

gttcgatgta acccactcgt gcaaccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg 3720

tttctgggtg agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac 3780

ggaaatgttg aatactcata ctcttcttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt 3840

attgtctcat gagcggatc atatttgaat gtatttagaa aaataaaca atagggttc 3900

cgcgacatt tccccaaaa gtgccacctg acgcgcctg tagcggcgca ttaagcggg 3960

cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttc cagcgccta gcgccgctc 4020

ctttcgcttt cticccttcc tttctcgcca cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa 4080
 atcgggggct ccctttaggg ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac cccaaaaaac 4140
 ttgattaggg tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt tttcgccctt 4200
 tgacgttggg gtccacgttc tttaatagtg gactcttggt ccaactgga acaaacactca 4260
 accctatctc ggtctattct tttgatttat aagggatatt gccgatttcg gcctattggt 4320
 taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcaattt taacaaaata ttaacgctta 4380
 caatttgcca ttcgccattc aggctgcgca actggtggga agggcgatcg gtgcgggcct 4440

cttcgctatt acgccagccc aagctacat gataagtaag taatattaag gtacgggagg 4500
 tacttggagc ggccgcaata aaatatcttt attttcatta catctgtgtg ttggtttttt 4560
 gtgtgaatcg atagtactaa catacgtctt ccatcaaac aaaacgaaac aaaacaaact 4620
 agcaaaatag gctgtcccca gtgcaagtgc aggtgccaga acatttctct atcgata 4677

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer P3

<400> 4

atagcggccg ctgagagcca ggaccaaage tcctta 36

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer P4

<400> 5

atagaattct tagtttgaag ggcattcgca ctt 33

<210> 6

<211> 1089

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> cDNA SELENOP

<400> 6

gagagccagg accaaagctc cttatgtaag caacccccag cctggagcat aagagatcaa 60
gatccaatgc taaactccaa tggttcagtg actgtggttg ctcttcttca agccagctgc 120
tacctgtgca tactgcaggc atctaaatta gaagacctgc gagtaaaact gaagaaagaa 180
ggatattcta atatttctta tattgttgtt aatcatcaag gaatctcttc tcgattaaaa 240

tacacacatc ttaagaataa ggtttcagag catattctctg tttatcaaca agaagaaaac 300
caaacagatg tctggactct tttaaatgga agcaaagatg acttctcat atatgataga 360
tgtggccgtc ttgtatatca tcttggtttg cctttttctt tectaacttt cccatatgta 420
gaagaagcca ttaagattgc ttactgtgaa aagaaatgtg gaaactgctc tctcacgact 480
ctcaaagatg aagacttttg taaactgtta tctttggcta ctgtggataa aacagttgaa 540
actccatcgc ctattacca tcatgagcat catcacaatc atggacatca gcacctggc 600
agcagtgagc ttcagagaa tcagcaacca ggagcaccaa atgctcctac tcatcctgct 660

cctccaggcc ttcatacca ccataagcac aagggtcagc ataggcaggg tcaccagag 720
aaccgagata tgccagcaag tgaagattta caagatttac aaaagaagct ctgtcgaaag 780
agatgtataa atcaattact ctgtaaattg cccacagatt cagagttggc tcttaggagc 840
tgctgctgcc attgtcgaca tctgatattt gaaaaaacag ggtctgcaat cacctgccag 900
tgtaaagaaa acctccatc tttatgtagc tgccagggac ttcgggcaga ggagaacata 960
actgaatctt gtcagtgccg tttgcctcca gctgcctgcc aaataagtca gcagcttata 1020
cccacagaag ccagtgccag ttgccgctgc aagaatcagg caaaaaagtg cgaatgcct 1080

tcaaactaa 1089

<210> 7

<211> 2631

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cDNA of fusion protein SEAP-SELENOP

<400> 7

atgctgctgc tgetgctgct gctgggcctg aggctacagc tctcctggg catcatccca 60
gttgaggagg agaaccggga cttctggaac cgcgaggcag ccgaggccct ggtgcccgc 120
aagaagctgc agcctgcaca gacagccgcc aagaacctca tcatcttctt gggcgatggg 180
atgggggtgt ctacggtgac agctgccagg atcctaaaag ggcagaagaa ggacaaactg 240

gggcctgaga taccctggc catggaccgc ttcccatatg tggctctgtc caagacatac 300

 aatgtagaca aacatgtgcc agacagtgga gccacagcca cggcctacct gtgcggggtc 360
 aagggcaact tccagacat tggcttgagt gcagccgccc gctttaacca gtgcaacacg 420
 acacgcgga acgaggtcat ctccgtgatg aatcgggcca agaaagcagg gaagtcatg 480
 ggagtggtaa ccaccacag agtgcagcac gcctcgccag ccggcaccta cgcaccacag 540
 gtgaaccgca actggtactc ggacccgac gtgcctgcct cggcccgcca ggaggggtgc 600
 caggacatcg ctacgcagct catctccaac atggacattg acgtgatcct aggtggaggc 660
 cgaaagtaca tgtttcgcat gggaaccca gaccctgagt acccagatga ctacagccaa 720

 ggtgggacca ggctggacgg gaagaatctg gtgcaggaat ggctggcgaa gcgccagggt 780
 gcccgtatg tgtggaaccg cactgagctc atgcaggctt ccctggacc gtctgtgacc 840
 catctcatgg gtctcttga gcctggagac atgaaatag agatccacc agactccaca 900
 ctggaccctt ccctgatgga gatgacagag gctgccctgc gcctgctgag caggaacccc 960
 cgcggcttct tctcttctgt ggaggggtgt cgcacgacc atggtcatca taaaagcagg 1020
 gcttaccggg cactgactga gacgatcatg ttgcagcagc ccattgagag ggccggccag 1080
 ctaccagcg aggaggacac gctgagcctc gtcactgccg accactccca cgtcttctcc 1140

 ttccggaggt accccctgag agggagctcc atcttcgggc tggcccctgg caaggcccgg 1200
 gacaggaagg cctacacggt cctctatac ggaacggtc caggctatgt gctcaaggac 1260
 ggccccggc cggatgtac cgagagcgag agcgggagcc ccgagtatcg gcagcagtca 1320
 gcagtcccc tggacgaaga gaccacgca ggcgaggacg tggcgggtgt cgcgcgcggc 1380
 ccgcaggcgc acctggttca cggcgtgcag gacgagacct tcatagcga cgtcatggcc 1440
 ttccgcccct gcctggagcc ctacaccgcc tgcgacctgg cccccccgc cggcaccacc 1500
 gacgcccgc acccgggtta ctctagagtc ggggcccggc ctgagagcca ggaccaaagc 1560

 tccttatgta agcaaccccc agcctggagc ataagagatc aagatccaat gctaaactcc 1620
 aatggttcag tgactgtggt tgctcttctt caagccagct gctacctgtg catactgcag 1680
 gcatctaaat tagaagacct gcgagtaaaa ctgaagaaag aaggatattc taatatttct 1740
 tatattgttg ttaatcatca aggaatctct tctcgattaa aatacacaca tcttaagaat 1800
 aaggttccag agcatattcc tgtttatcaa caagaagaaa accaaacaga tgtctggact 1860
 cttttaaag gaagcaagaa tgacttctc atatatgata gatgtggccg tcttgtatat 1920
 catcttgggt tgcccttttc ctctctaact ttcccatatg tagaagaagc cattaagatt 1980

gcttactgtg aaaagaaatg tggaaactgc tctctcacga ctctcaaaga tgaagacttt 2040
 tgtaaactgtg tatctttggc tactgtggat aaaacagttg aaactccatc gcctcattac 2100
 catcatgagc atcatcacia tcatggacat cagcaccttg gcagcagtga gctttcagag 2160
 aatcagcaac caggagcacc aaatgctcct actcatcctg ctctccagg ccttcatcac 2220
 caccataagc acaagggtca gcataggcag ggtcacccag agaaccgaga tatgccagca 2280
 agtgaagatt tacaagatit acaaaaagaag ctctgtcgaa agagatgtat aaatcaatta 2340
 ctctgtaaat tgcccacaga ttcagagttg gctcctagga gctgctgctg ccattgtcga 2400

catctgatat ttgaaaaaac agggctcga atcacctgcc agtgtaaaga aaacctcca 2460
 tctttatgta gctgccaggg acttcgggca gaggagaaca taactgaatc ttgtcagtgc 2520
 cgtttgctc cagctgcctg ccaataagt cagcagctta taccacaga agccagtgcc 2580
 agttgccgct gcaagaatca ggcaaaaaag tgcgaatgcc cttcaacta a 2631

<210> 8

<211> 876

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fusion Protein SEAP-SELENOP

<400> 8

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn Arg Glu
 20 25 30

Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala Gln Thr
 35 40 45

Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser
 50 55 60

Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Lys Lys Asp Lys Leu
 65 70 75 80

Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Val Ala Leu
 85 90 95

Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His Val Pro Asp Ser Gly Ala Thr
 100 105 110

Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Phe Gln Thr Ile Gly
 115 120 125

Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn
 130 135 140

Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ser Val
 145 150 155 160

Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Thr
 165 170 175

Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Val Pro
 180 185 190

Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln Leu Ile
 195 200 205

Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met
 210 215 220

Phe Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr Ser Gln
 225 230 235 240

Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp Leu Ala
 245 250 255

Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu Met Gln
 260 265 270

Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro
 275 280 285

Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp Pro Ser
 290 295 300

Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu Leu Ser Arg Asn Pro
 305 310 315 320

Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His
 325 330 335

His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Thr Ile Met Phe Asp
 340 345 350

Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp Thr Leu

Tyr Gln Gln Glu Glu Asn Gln Thr Asp Val Trp Thr Leu Leu Asn Gly
 610 615 620
 Ser Lys Asp Asp Phe Leu Ile Tyr Asp Arg Cys Gly Arg Leu Val Tyr
 625 630 635 640
 His Leu Gly Leu Pro Phe Ser Phe Leu Thr Phe Pro Tyr Val Glu Glu
 645 650 655

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

 Asn Gln Gln Pro Gly Ala Pro Asn Ala Pro Thr His Pro Ala Pro Pro
 725 730 735
 Gly Leu His His His His Lys His Lys Gly Gln His Arg Gln Gly His
 740 745 750
 Pro Glu Asn Arg Asp Met Pro Ala Ser Glu Asp Leu Gln Asp Leu Gln
 755 760 765
 Lys Lys Leu Cys Arg Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu
 770 775 780

 Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala Pro Arg Ser Cys Cys Cys His Cys Arg
 785 790 795 800
 His Leu Ile Phe Glu Lys Thr Gly Ser Ala Ile Thr Cys Gln Cys Lys
 805 810 815
 Glu Asn Leu Pro Ser Leu Cys Ser Cys Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu
 820 825 830
 Asn Ile Thr Glu Ser Cys Gln Cys Arg Leu Pro Pro Ala Ala Cys Gln
 835 840 845

 Ile Ser Gln Gln Leu Ile Pro Thr Glu Ala Ser Ala Ser Cys Arg Cys

850 855 860
Lys Asn Gln Ala Lys Lys Cys Glu Cys Pro Ser Asn
865 870 875