



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년09월27일
(11) 등록번호 10-1988120
(24) 등록일자 2019년06월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57446 (2019.01)
G01N 33/57488 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0105210
(22) 출원일자 2017년08월21일
심사청구일자 2017년08월21일
(65) 공개번호 10-2019-0020364
(43) 공개일자 2019년03월04일
(56) 선행기술조사문헌
WO2014099400 A2
(뒷면에 계속) 기술이전 희망 : 기술양도

(73) 특허권자
가톨릭대학교 산학협력단
서울특별시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교
성의교정내 (반포동)
(72) 발명자
박원상
서울특별시 서초구 신반포로19길 10, 26동 1002
호(반포동, 신반포3지구아파트)
윤정환
서울특별시 서초구 서래로5길 107, 302호(반포
동, 호린하우스)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 7 항

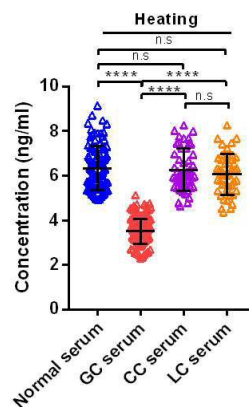
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 혈액 내 gastrokine 1 단백을 이용하는 위암 진단

(57) 요약

본 발명은 엑소좀의 GKN1 단백질(Exosomal Gastrokine-1 Protein) 수준을 측정하는 제제를 포함하는 위암 진단용 조성물 또는 상기 조성물을 포함하는 위암 진단용 키트에 관한 것이며, 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 GKN1 단백질 수준을 측정하는 단계 및 상기 GKN1 단백질 수준을 대조군 시료로부터 얻은 기준치와 비교하는 단계를 포함하는 위암의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도4e



(52) CPC특허분류

G01N 33/6893 (2013.01)
 G01N 2800/50 (2013.01)
 G01N 2800/52 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

US20130130354 A1
 CN101921335 A
 Amer A Hasan et al, International Scholarly and Scientific Research & Innovation, (2015), vol. 9, no. 6, pp. 532-535.
 Valentina Villano et al, Journal of Negative Results in Biomedicine, (2016), 15:14, pp. 1-7.
 박인수 저, 카톨릭대학교 대학원 의학석사 학위논문 (2011), pp. 1-30.
 G Nardone et al, Digestive and Liver Disease (2007), vol. 39, pp. 122-129.
 Maria Irene Scarano et al, Cutting Edge Therapies for Cancer in the 21st Century (2014), eISBN : 978-1-60805-880-8, pp 253-270.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2015R1A2A2A01002531
부처명	과학기술정보통신
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	Gastrokine 1 역할 규명을 통한 위암의 분자생물학적 발암 기전 연구
기 여 율	1/1
주관기관	가톨릭대학교
연구기간	2015.05.01 ~ 2018.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

혈장 또는 혈청의 엑소솜 내에 존재하는 GKN1 단백질(Gastrokine-1 Protein) 수준을 측정하는 제제를 포함하는 위암의 진단용 조성물로서,

상기 혈장 또는 혈청은 70℃에서 10분 동안 열처리된 것을 특징으로 하는 위암의 진단용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 GKN1 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질 특이적으로 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 따른 조성물을 포함하는 위암 진단용 키트.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 키트는 ELISA 키트 또는 단백 칩 키트인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 6

(a) 환자로부터 분리된 혈장 또는 혈청을 70℃에서 10분 동안 열처리한 후, 혈장 또는 혈청의 엑소솜 내에 존재하는 GKN1 단백질 수준을 효소면역분석법(ELISA)을 이용하여 측정하는 단계; 및

(b) 상기 GKN1 단백질 수준을 대조군 시료로부터 얻은 기준치와 비교하는 단계를 포함하는 위암의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

제 6 항에 있어서,

상기 GKN1 단백질 수준이 기준치에 비하여 낮은 경우에 위암인 것으로 판단하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 6 항에 있어서,

상기 GKN1 단백질 수준이 기준치에 비하여 낮은 경우에 위암의 발병가능성이 높거나 예후가 좋지 않을 가능성이 높은 것으로 판단하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 GKN1 단백질(Gastrokine-1 Protein) 수준을 측정하는 제제를 포함하는 위암의 진단용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 위암은 전 세계적으로 한국, 중국, 일본 등에서 많이 발생하는 암으로써 미국, 유럽 등의 서구에서는 발생률이 낮으나, 한국의 경우 암 발생률 1위가 위암이고, 사망률은 폐암에 이어 2위를 차지하고 있다. 위암의 분류를 살펴보면 전체의 95%가 위벽 점막의 샘 세포에서 생기는 선암이며, 그 외 림프계에서 발생하는 림프종, 간질조직에서 발생하는 위장관 간질성종양이 있다.

[0003] 현재 암을 치료하는 방법 중 3가지 주요 치료법으로는 외과적 치료법, 약물 요법, 방사선 요법이 있는데, 약물 요법은 치료에 동반되는 고통이 적고, 외과적 치료나 방사선 치료에 비해 치료 후에도 암의 재발이 상대적으로 적으므로 이에 대해 기대가 모아지고 있다. 따라서 이에 부응할 만한 수많은 항암제가 개발되어 사용되고 있는데, 이들 대부분의 항암제는 암의 이상증식을 염두에 두고 활발하게 분열하는 세포를 선택적으로 죽게 함으로써 항암 효과를 나타내는 것이다. 이러한 항암제는 일반적으로 인체 내에서 활발하게 분열하는 세포인 면역세포, 모근세포와 같은 정상세포도 함께 죽이게 되는 심각한 부작용을 동반하므로 장기간 사용이 불가능한 문제점을 안고 있다. 또한, 위암치료를 위한 방법으로는 림프절 절제술, 내시경적 점막절제술, 복강경적 위절제술 등의 방법이 사용되고 있는데, 내시경적 점막절제술은 점막 내 조기위암에 대해 암 병변이 있는 위 점막 주위에 생리 식염수를 주입하여 병변부위를 볼록하게 부풀린 다음 병변이 있는 점막을 절제하는 방법으로, 간단한 내시경 시술로 위 절제수술의 고통을 피할 수 있다는 장점이 있지만, 점막에 국한된 조기위암 중 림프절 전이가능성이 낮은 경우에 한해 사용할 수 있다는 한계가 있다.

[0004] 최근 들어, 전 세계적으로 암의 생성 및 치료와 관련된 유전자의 기능 연구를 통해 치료용 표적을 발굴하고 이들을 진단 및 치료제 개발에 이용하기 위한 연구를 진행하고 있다. 게놈 연구의 활성화와 함께 인간 유전자 DNA 칩 또는 프로테옴 분석 연구가 활발하게 이루어지고 암과 관련된 유전자가 대량 발굴됨에 따라 많은 유전자들의 목록과 관련 데이터베이스는 구축되어 있으나 대부분 이들 유전자들에 대한 세포 내에서의 구체적 생물학적 기능 및 암 관련성은 아직 연구되지 않았거나 불확실하여 실제 암 관련성 또는 진단 및 표적 유전자로서의 활용과 함께 나아가 암을 효과적으로 치료할 수 있는 유전자의 발굴에 상당한 어려움이 있다. 따라서 지금까지 밝혀진 암 관련 유전자 이외에도 새로운 유전자들의 발굴이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1215069호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 GKN1 단백질(Gastrokine-1 Protein) 수준을 측정하는 제제를 포함하는 위암의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 위암의 진단용 조성물을 포함하는 위암 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 GKN1 단백질 수준을 측정하는 단계; 및 (b) GKN1 단백질 수준을 대조군 시료로부터 얻은 기준치와 비교하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 위암

의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 GKN1 단백질(Gastrokine-1 Protein) 수준을 측정하는 제제를 포함하는 위암의 진단용 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명의 일실시에 있어서, 상기 GKN1 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 것일 수 있다.
- [0011] 본 발명의 일실시에 있어서, 상기 GKN1 단백질은 혈액, 혈장 또는 혈청에 엑소솜 내에 존재하는 것 일 수 있다.
- [0012] 또한, 본 발명은 위암의 진단용 조성물을 포함하는 위암 진단용 키트를 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일실시에 있어서, 상기 키트는 ELISA 키트 또는 단백질 칩 키트인 것일 수 있다.
- [0014] 또한, 본 발명은 (a) 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 GKN1 단백질 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 GKN1 단백질 수준을 대조군 시료로부터 얻은 기준치와 비교하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 위암의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일실시에 있어서, 상기 GKN1 단백질은 60 내지 80℃에서 5 내지 15분 동안 열처리하는 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 75 내지 85℃에서 8 내지 12분 동안 열처리하는 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 70℃에서 10분 동안 열처리하는 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일실시에 있어서, 상기 GKN1 단백질 수준이 기준치에 비하여 낮은 경우에 위암인 것으로 판단되는 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일실시에 있어서, 상기 GKN1 단백질 수준이 기준치에 비하여 낮은 경우에 위암의 발병가능성이 높거나 예후가 좋지 않을 가능성이 높은 것으로 판단하는 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일실시에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장 또는 혈청인 것일 수 있고, 바람직하게는 혈청인 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일실시에 있어서, 상기 측정은 효소면역분석법(ELISA), 방사능면역분석법(radioimmunoassay, RIA), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 웨스턴 블롯팅, 면역침강법, 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 유체 세포 측정법 (flow cytometry), 형광활성화 세포분류법(FACS), 효소기질발색법 및 항원-항체 응집법으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 방법을 이용하여 수행되는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명에 따른 GKN1 단백질(Gastrokine-1 Protein)은 위암의 예측 또는 진단에 유용한 바이오마커로서, 상기 엑소솜의 GKN1 단백질을 포함하여 시료 내 총 GKN1 단백질 수준이 정상인에 비해 낮은 경우 위암인 것으로 빠르고 편리하게 위암의 진단 또는 예후 예측이 가능할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1a는 GKN1 결합 단백을 동정한 결과로서, 단백질 마이크로어레이에서 재조합 GKN1 단백질에 결합을 보이는 엑소솜 단백질의 리스트를 나타낸 것이다.
 도 1b는 GKN1이 COMT 및 YWHAZ 단백질에 대한 결합력을 면역침전법 및 웨스턴블롯팅으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.
 도 2a는 HFE-145 세포, 재조합 GKN1(rGKN1) 단백을 처리/비처리한 AGS 및 MKN1 세포에서 분리된 엑소솜 (Exosome), 엑소솜이 제거된 배지(soluble) 및 전체 세포 용해물(WCL)에서의 GKN1, TSG-1 및 CD81에 대한 웨스턴블롯팅의 결과를 나타낸 것이다.
 도 2b는 HFE-145 세포 유래의 엑소솜에 트립신 및 Triton X-100 의 처리/비-처리에 의한 효소 분해 어세이 (Trypsin digestion assay)를 한 결과를 나타낸 것이다.
 도 3a는 siClathrin을 처리한 AGS 및 MKN1 세포에서 Clathrin 단백질의 발현이 억제됨을 웨스턴블롯팅으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3b는 제조함 GKN1 단백질을 AGS 세포에 처리한 후 분리된 엑소좀을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3c는 siClathrin이 처리된 AGS 및 MKN1 세포에서 GKN1 단백질을 포함하는 엑소좀의 위치화(localization)된 결과를 나타낸 것이다.

도 3d는 siClathrin이 처리된 AGS 및 MKN1 세포에서 GKN1 및 CD81의 발현량을 웨스턴블롯팅으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4a는 HFE-145 세포에서 열처리를 하지 않거나(Non-heating) 열처리를 한 경우(Heating)의 전체 배지(Media), 엑소좀(Exosome) 및 엑소좀이 제거된 배지(exosome depleted media)에서의 GKN1 단백질의 농도를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4b는 10명의 건강한 피험자(Normal serum) 및 10명의 위암 환자(cancer serum)의 혈청에서 열처리를 하지 않거나(Non-heating) 열처리를 한 경우(Heating)의 전체 혈청(Whole Serum), 엑소좀(Exosome) 및 엑소좀이 제거된 혈청(W/O Exosome)에서의 GKN1 단백질의 농도를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4c는 100명의 건강한 피험자들로부터 혈청 GKN1 단백질 농도에 따른 나이 및 성별의 관련도를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4d는 건강한 피험자, 위축성 위염(atrophic gastritis: Atrophy)이 있는 자, 장상피화생(intestinal metaplasia: IM)이 동반된 위축성 위염이 있는 자 및 위암 환자에서의 GKN1 단백질의 농도를 분석한 결과를 나타낸 것이다(P<0.0001).

도 4e는 100명의 건강한 피험자(Normal serum), 150명의 위암 환자(GC serum), 45명의 간암 환자(LC serum) 및 50명의 대장암 환자(CC serum)에서 혈청 GKN1 농도를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4f는 정상 위 점막(normal)을 가진 자, 위축성 위염(atrophic gastritis: Atrophy)이 있는 자 및 장상피화생(intestinal metaplasia)이 동반된 위축성 위염이 있는 자에 대한 위암 환자에서의 혈청 GKN1 수준에 의한 ROC 곡선 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 4g는 혈청 GKN1 농도로 위암 환자를 간암 및 대장암 환자와 구분할 수 있는 지에 대한 ROC 곡선 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 4h는 건강한 피험자, 위축성 위염(atrophic gastritis: Atrophy)이 있는 자, 장상피화생(intestinal metaplasia: IM)이 동반된 위축성 위염이 있는 자 및 위암 환자 중 조기위암과 진행성 위암 환자에서의 GKN1 단백질의 농도를 분석한 결과를 나타낸 것이다(P<0.0001).

도 4i는 건강한 피험자, 위축성 위염(atrophic gastritis: Atrophy)이 있는 자, 장상피화생(intestinal metaplasia: IM)이 동반된 위축성 위염이 있는 자 및 위암 환자 중 조기 위암 환자에서의 GKN1 수준에 대한 ROC 곡선 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 5a는 HFE-145 세포 유래의 엑소좀이 Jurkat T 세포, THP-1 단백질, U937 대식세포의 세포막에 붙었는지 여부를 확인하기 위한 면역형광 어세이 결과를 나타낸 것이다.

도 5b는 HFE-145 세포 유래의 엑소좀 GKN1 및 CD81 단백질이 Jurkat T 세포, THP-1 단백질, U937 대식세포의 세포막 또는 세포질이나 핵에 존재하는지 여부를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명에서의 용어, "진단"은 병리 상태를 확인하는 것을 의미하는 것으로서, 본 발명의 목적상 상기 진단은 엑소좀의 GKN1 단백질 발현 수준을 확인하여 위암의 진행 여부를 확인하는 것을 의미한다

[0023] 본 발명에서의 용어, "항체"란 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커인 GKN1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함되며, 본 발명의 부분 펩티드로는 최소한 7개의 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 더욱 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다. 이러한 본 발명의 GKN1 단백질질에 대한 항체는 당업계의 공지된 방법으로

제조될 수 있는 모든 항체를 포함한다.

- [0024] 본 발명의 위암 진단 키트는 엑소좀의 GKN1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함할 수 있고, 단백 수준을 측정하는 키트는 "단백질 발현 수준 측정"을 위해 사용되는 ELISA 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있다.
- [0025] 상기 항체를 이용한 단백질 발현 여부 측정은 GKN1 단백질 및 그의 항체 간의 항원-항체 복합체를 형성함으로써 측정되며, 다양한 방법에 의해 상기 복합체의 형성량을 측정함으로써 정량적으로 검출할 수 있게 된다.
- [0026] 상기 항원-항체 복합체에 의한 측정은 효소면역분석법(ELISA), 방사능면역분석법(radioimmunoassay, RIA), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 웨스턴 블롯팅, 면역침강법, 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 유체 세포 측정법 (flow cytometry), 형광활성화 세포분류법(FACS), 효소기질발색법 및 항원-항체 응집법으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 방법을 이용하여 수행되는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명에서의 용어, "생물학적 시료"란 구체적으로 엑소좀 내 GKN1 단백질을 포함하여 총 GKN1 단백질 발현 수준을 검출할 수 있는 시료를 의미하며, 예로써 혈액, 혈장 또는 혈청 등을 포함하나, 바람직하게는 혈청을 의미한다.
- [0028] 본 발명은 환자로부터 분리된 생물학적 시료를 획득한 후, 60 내지 80℃에서 5 내지 15분 동안 열처리하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 열처리 후 총 시료내 혹은 엑소좀내 GKN1 단백질의 발현 수준을 측정하여 대조군 시료로부터 얻은 기준치와 비교하여 엑소좀의 GKN1 단백질 수준이 기준치에 비하여 낮은 경우에 위암인 것으로 판단함으로써 위암의 예측 또는 진단이 가능하다.
- [0029] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0031] **실시예 1. 실험 방법**

[0032] **1.1. GKN1 이 도입된 재조합 벡터 제조**

[0033] 재조합 GKN1 단백질을 제조하기 위해 다음과 같이 재조합 벡터를 제조하였다. 먼저 인체 GKN1 cDNA를 PCR 방법을 이용해 증폭시키고, pCMV6-AN-FC(Origene ID PS100055) 벡터에 제한효소 사이트를 이용하여 pCMV6-AN-FC-hGKN1 재조합 벡터를 제조하였다. 보다 구체적으로, pCMV6-AN-FC 벡터와 GKN1 cDNA를 SgfI과 MluI의 제한효소로 처리한 후, pCMV6-AN-FC와 hGKN1 cDNA를 연결시켜 상기 벡터에 GKN1 유전자를 도입시켰다. 이후 대장균에 형질전환하여 아가 플레이트 상에서 생긴 콜로니를 취한 후, 이를 배양하여 DNA를 추출한 후, 시퀀싱을 수행하여 GKN1 유전자가 올바르게 도입된 것인지 확인하였다. 그 후 protein A affinity 크로마토그래피를 이용하여 재조합 GKN1 단백질을 정제한 후 이를 웨스턴 블롯법을 이용하여 GKN1 재조합 단백을 확인하였다. 이 후, 상기 GKN1 유전자의 서열을 서열번호 1로, 이로 코딩된 GKN1 단백질의 아미노산 서열을 2로 나타내었다.

[0036] **1.2. 세포배양**

[0037] GKN1(Gastrokine-1) 단백을 발현하지 않는 AGS 및 MKN1 위암세포주(gastric cancer cell lines)와 GKN1을 발현하는 HFE-145 불멸화 위상피세포주(immortalized gastric epithelial cells)는 10% 열-불활성화된 FBS(fetal bovine serum)을 포함하는 RPMI-1640 배지에서 37℃, 5% CO₂에서 배양되었다. 또한, Jurkat T 세포, THP-1 단핵구 및 U937 대식세포도 상기와 같은 조건에서 배양되었다.

[0039] **1.3. HuProt™ 마이크로어레이(microarray)를 통한 GKN1 결합단백의 동정**

[0040] GKN1 결합단백을 동정하기 위하여, 19,000 개 이상의 전-길이 재조합 인간 단백을 포함하는 Human Proteome Microarray(CDI Labs, USA)가 사용되었다. 간단하게, 단백질 마이크로어레이는 2시간 동안 Blocking Buffer (5% BSA in PBS with 0.05% tween-20)가 처리된 후, 1 µg의 biotinylated GKN1과 4℃에서 8시간 동안 처리되었다. 이후, 마이크로어레이에 1 µg의 streptavidin-fluorescence (Alexa-Fluor 635 nm)가 처리되었다. 결과는 GenePix 4100A Microarray Laser Scanner (Molecular Devices, USA)로 확인하였다.

[0042] **1.4. 엑소좀 분리(Exosome Isolation)**

[0043] GKN1 단백질이 엑소좀에 존재하는지 조사하기 위하여, AGS 및 MKN1 세포는 재조합 GKN1 단백질(rGKN1, ANRT, Daejeon, Korea)으로 처리되었다. 엑소좀은 HFE-145, AGS 및 MKN1 세포의 상층액으로부터 분리되었다. 간단하게, passage 3 내지 8의 세포가 serum-free 배지에서 배양되었고, 배지를 모으기 전 48시간 동안 10% FBS

와 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂에서 배양되었다. 조건화된 배지는 세포 잔해(cell debris)를 제거하기 위해 4°C에서 10분 동안 2000g에서 원심분리되었고, 이후 0.22 μm 필터를 통과시켰다. 필터된 상층액은 새로운 glass tube에 옮겨서 얼음에 놓아두었다. 이후, 새로운 glass tube에 2 ml의 상층액을 0.75ml의 A/B/C solution (101Bio company, CA, USA)과 혼합시키고, 30초 동안 강하게 볼텍싱하였고, 4°C에서 30분 동안 놔두었다. 혼합물은 2개의 층으로 분리되어 위층은 제거되고, 아래층은 microcentrifuge tube에 옮겨 3분 동안 5000g에서 원심분리되었고, 다시 중간층은 새로운 microcentrifuge tube에 옮겨 3분 동안 5000g에서 원심분리된 후, 뚜껑을 열어 상온에서 10분 동안 에어 드라이되었다. 총 4배 부피의 1X PBS를 tube에 가하고 강하게 파이켓팅되었다. Tube는 horizontal shaker에서 고속으로 15분 동안 처리한 후, 5분 동안 5000g에서 원심 분리되었다. 상층액은 PureExo Column (101Bio company, CA, USA)으로 조심히 옮겨진 후, 5분 동안 1000g에서 원심분리되었다. 통과액은 PBS에 부유된 분리된 엑소좀 분획을 포함하고 있다.

[0045] 1.5. 엑소좀 표지(Exosome Labeling)

[0046] 엑소좀은 제조사의 프로토콜(약간 변형)에 따라 PKH26(Sigma, St. Louis, USA)로 표지되었다. 간단하게, 엑소좀 펠릿은 1ml의 Diluent C로 부유되었고, 따로 1ml의 Diluent C는 4 μl의 PKH26으로 혼합시켜 Stain Solution을 만들었다. 엑소좀 현탁액은 상기 stain solution을 혼합하여 4분 동안 반응시켰고, 표지 반응은 동량의 1% BSA(bovine serum albumin)가 더해지면서 멈추었다. 표지된 엑소좀은 Total Exosome Isolation Kit(Invitrogen)을 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 분리되었다. 간단하게, 0.5 volume의 Isolation Reagent가 표지된 엑소좀에 더해지고 혼합되었다. 표지된 엑소좀은 밤새 4°C에 놔두었고, 순차적으로 4°C에서 1시간 동안 10,000g에서 원심분리되었다. 이후, 상층액은 버리고, 각 펠릿은 100 μl의 PBS로 부유되었다.

[0048] 1.6. 엑소좀에서 GKN1 단백질의 발현

[0049] HFE-145, AGS 및 MKN1 세포의 세포 용해물(cell lysate) 및 엑소좀에서의 GKN1 발현은 웨스턴블롯팅으로 분석되었다. 동량의 세포 용해물 및 엑소좀은 12.5% SDS-PAGE로 분리되었고, Hybond-PVDF(polyvinylidene difluoride) transfer membranes (Amersham)으로 옮겨졌다. 0.5% skim milk로 블러킹한 후, 멤브레인은 anti-GKN1 (Abcam, MA, USA), anti-TSG101 및 anti-CD81 antibodies (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA)인 1차 항체로 반응시켰고, HRP(horseradish peroxidase)-conjugated secondary antibodies로 반응시켰다. 단백 밴드는 Westernsure ECL substrate (LI-COR Biosciences, NE, USA)로 검출되었고, 밴드는 LAS 4000 (Fuji Film, Japan)으로 가시화되었다.

[0051] 1.7. 공동-면역침전(co-immunoprecipitation)

[0052] 제조함 GKN1(rGKN1)으로 처리된 AGS 및 MKN1 세포 유래의 엑소좀은 PBS로 세척되었고, 기존에 기재한 바와 같이 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 10 mM NaF, 1.0 mM NaVO₄ 및 1% protease inhibitor cocktail (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 포함하는 PBS(pH 7.2)로 4°C에서 용해되었다(J. Biol. Chem. 2010; 285: 20547-57). 기존에 기재한 바와 같이, 동량의 단백 알리퀴트(1.0mg)는 2.0 μg의 GKN1(Abcam, Cambridge, UK), COMT 및 YWHAZ (Genetex, CA, USA)에 대한 항체가 결합된 Protein A/G-agarose(Santa Cruz Biotechnology)에서 면역침전되었다(EBioMedicine. 2016; 9: 97-109).

[0054] 1.8. Trypsin digestion assay

[0055] GKN 단백질의 엑소좀 내 존재 부위를 찾기 위해, 기존에 기재한 바와 같이 HFE-145 세포(7 μl의 PBS에 35 μg의 단백질)로부터 분리된 엑소좀은 4°C에서 30분 동안 1% Triton X-100에 의하여 지질막이 분해되었다(Blood. 2009; 113: 1957-66). 엑소좀은 Triton X-100이 없는 동일 조건 하에서 배양되었다. 엑소좀 현탁액은 2가지 효소 농도 (15 및 0.01 μg/mL)로 37°C 에서 트립신으로 분해되었다. Triton X-100 처리는 트립신 활성화에 거의 영향을 주지 않았다 (data not shown). 트립신 처리 후, 샘플은 동량의 Laemmli buffer로 즉시 혼합되었고, 3분 동안 끓인 후 젤 로딩이 이루어졌다.

[0057] 1.9. 면역형광 연구

[0058] Mouse anti-GKN1 (abcam), anti-clathrin 및 anti-alexa-488 conjugated goat anti-mouse IgG (invitrogen) secondary antibody가 면역반응을 가시화하기 위해 사용되었다. 반응의 특이성은 Non-immune Mouse Serum (invitrogen)으로 테스트되었다.

[0060] 1.10. 혈청 샘플

[0061] 위절제술을 할 예정인 위암환자 150명과 건강한 지원자 100명으로 구성된 집단에서 연구가 이루어졌다. 또한,

45명의 간암(hepatocellular carcinoma) 환자와 50명의 대장암(colorectal cancer) 환자가 각각 대조군으로서 사용되었다. 수술 전 암환자 245명과, 100명의 건강한 지원자로부터 전혈이 채취되었고, 샘플링한 후 혈청을 분리하여 즉시 -80℃에 보관하였다. 동결된 혈청은 얼음에서 녹인 다음, 인산 완충용액 (PBS)으로 혈청 내 총 단백질 농도를 15ug/ml로 희석하여 사용하였다. GKN1 단백질이 HFE-145 세포의 배양액 및 인간의 혈청에 있는 엑소솜 단백질로서 존재하는지 조사하기 위하여, 샘플은 70℃에서 처리되거나 처리되지 않았다. 전체 배양액, 전혈청, 엑소솜이 제거된 샘플 및 엑소솜 분획에 있는 GKN1 단백질의 농도는 제조사의 지시에 따라 ELISA kit (USCN, Wuhan, China)을 사용하여 계산되었다. 고지된 동의서가 헬싱키 선언에 따라 제공되었고, 모든 피험자로부터 서면 동의서를 받았다. 본 발명은 Institutional Review Board of The Catholic University of Korea, College of Medicine (MC16SISI0132)에 의해 승인되었다. 암 환자 누구에게서도 유전성 암의 증거는 없었다.

[0063] **1.11. 통계 분석**

[0064] 0.05 미만의 P 값을 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 이진분류법에 근거한 마커의 진단학적 유용성을 평가하기 위하여, ROC(receiver operating characteristic) 곡선 분석이 사용되었다. ROC 곡선은 모든 가능한 한 계값에 평가되는 true-positive fraction 대 false-positive fraction의 플롯(plot)이다.

[0066] **실시예 2. GKN1 결합 단백질의 동정**

[0067] 본 발명자들은 GKN1에 결합하는 단백질을 동정하기 위하여, 단백질 마이크로어레이 어레이를 수행하였다. 그 결과, 재조합 GKN1(rGKN1)에 보통 내지 강한 결합력을 가진 27개의 엑소솜 단백질이 발견되었다(도 1a). 엑소솜 단백질에 대한 GKN1의 결합력을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 HFE-145 세포와 재조합 GKN1(rGKN1)을 처리한 AGS 및 MKN1 세포에서 엑소솜 단백질을 추출하였고, 공동-면역침전 분석에 의하여 엑소솜 단백질 중 GKN1 과 COMT 사이의 상호작용 및 GKN1과 YWHAZ 사이의 상호작용을 증명하였다(도 1b).

[0069] **실시예 3. 위 세포주 유래 엑소솜에서 GKN1 단백질의 검출**

[0070] 상기 재조합 GKN1(rGKN1) 단백질이 엑소솜 단백질에 대한 결합력이 있다는 사실로부터, 본 발명자들은 GKN1이 엑소솜 단백질으로 자연적으로 분비되고 세포 내로 내재화되는지 조사하기 위하여, HFE-145, AGS 및 MKN1 세포의 배양 상층액으로부터 엑소솜을 분리하여 GKN1의 존재 여부를 확인하는 실험을 수행하였다. 그 결과, HFE-145 세포 유래의 엑소솜에서는 GKN1 단백질이 포함되어 있었으나, AGS 및 MKN1 위암세포주 유래의 엑소솜에서는 GKN1 단백질이 발견되지 않음을 확인하였다(도 2a). AGS 및 MKN1 세포에 재조합 GKN1 단백질을 처리할 때, GKN1 단백질의 발현은 주로 엑소솜에 존재하였고, 엑소솜이 없는 배지 및 엑소솜이 없는 전체 세포 용해물(WCL)에는 발현이 거의 없었다(도 2a). 2개의 엑소솜 단백질 마커 중에서, TSG101은 분리된 엑소솜 및 세포 용해물에서 확인되었으나, CD81은 단지 엑소솜에서만 존재함을 확인하여 CD81을 추후 실험에서 엑소솜 마커로서 사용하였다(도 2a).

[0071] 다음으로, 엑소솜 내 GKN1 단백질의 존재 부위를 확인하기 위하여, 트립신 및 Triton X-100 의 처리/비-처리에 의한 Trypsin Digestion Assay가 수행되었고, 이후 웨스턴블롯팅이 수행되었다(Blood. 2009; 113: 1957-66). 엑소솜에 Triton X-100 이 비-처리되고 트립신만 처리된 경우 GKN1은 트립신-의존의 효소 분해가 일어나지 않았다. 그러나, Triton X-100 및 트립신이 모두 처리된 경우 GKN1은 완전히 분해되었다(도 2b). 상기 결과로부터 GKN1 단백질이 엑소솜 내부에 존재한다는 것을 확인하였다.

[0073] **실시예 4. GKN1 단백질을 포함하는 엑소솜의 Clathrin-의존적 내재화**

[0074] 본 발명자들은 엑소솜의 GKN1 단백질의 내재화에 Clathrin이 관련되었는지 여부를 확인하는 실험을 수행하였다. Clathrin을 녹다운시키기 위하여 siRNA인 siClathrin을 사용하였으며, siClathrin이 유입된 AGS 및 MKN1 세포에서는 clathrin 발현이 확연히 감소됨을 확인하였다(도 3a). GKN1 단백질을 포함한 PKH26-양성 엑소솜(도 3b)을 AGS 및 MKN1 세포에 처리한 경우, 상기 엑소솜들은 AGS 및 MKN1의 세포질에서 명확히 내재화되어 있었다(도 3c). 그러나, AGS 및 MKN1 세포에서 clathrin 이 녹다운된 경우에는 세포막과 세포질에서의 PKH26-양성 엑소솜의 존재가 확연히 억제되었다(도 3c). 상기 세포에서, 세포막에 있는 GKN1 및 CD81 단백질의 발현은 현저히 감소되었고, 세포질에서는 확인되지 않았다(도 3d).

[0075] 따라서, Clathrin-매개의 내포작용(endocytosis)은 GKN1 단백질을 포함하는 엑소솜을 위세포에 부착시키고 내재화시키는데 중요한 역할을 하고 있음을 확인하였다.

[0077] **실시예 5. 혈청 GKN1 단백질 농도에 의한 위암의 진단**

[0078] GKN1 단백질이 엑소솜 단백질로서 배지 및 인간 혈청에 존재하는지 확인하기 위하여, GKN1 단백질의 농도는 HFE-145 세포의 배양액 및 인간 혈청을 70℃에서 10분 동안 처리한 후 ELISA assay로 측정하였다. 그 결과,

HFE-145 세포에서 열처리되지 않은 경우(Non-heating) GKN1 단백질이 전체 배지, 엑소솜 및 엑소솜이 제거된 배지에서 확인되지 않았고, 반면 70°C에서 10분 동안 열처리한 경우(heating)에는 전체 배지, 엑소솜 및 엑소솜이 제거된 배지(soluble)에서 GKN1 단백질의 농도가 각각 1.13 ± 0.06 , 1.08 ± 0.1 및 0.05 ± 0.04 ng/ml로 확인되었다(도 4a). 이와 일치하여, GKN1 단백질은 열처리되지 않은 전체 혈청, 엑소솜 및 엑소솜이 제거된 혈청에서 확인되지 않았다(도 4b). 10명의 건강한 피험자 중에서, 열처리된 전체 혈청 및 엑소솜에서의 GKN1 단백질 발현 농도는 각각 6.53 ± 0.58 ng/ml 및 6.24 ± 0.55 ng/ml 이었다(도 4b). 또한, 10명의 위암 환자에서, 전체 혈청 및 엑소솜에서의 GKN1 단백질 발현 농도는 각각 3.58 ± 0.54 ng/ml 및 3.28 ± 0.82 ng/ml 이었고(도 4b), 이는 혈청 GKN1 단백질의 대부분이 엑소솜 내에 존재함을 의미한다. 상기 결과에 따라, 본 발명자들은 100명의 건강한 피험자 및 245명의 위암, 대장암 및 간암 환자에서의 전체 혈청을 얻은 후 70°C에서 10분 동안 열처리한 후 GKN1 농도를 분석하였다.

[0079] 도 4c에서 보는 바와 같이, 정상 건강인에서 혈청 GKN1 단백질의 수준은 나이와 관련이 있는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다($P=0.338$). 또한, 혈청 GKN1 수준에 있어 남녀간 차이는 보이지 않았다($P=0.074$). 흥미롭게도, 위축성 위염이 있는 자들과 장상피화생(intestinal metaplasia, IM)이 동반된 위축성 위염이 있는 자들은 위염이 없는 피험자보다 낮은 혈청 GKN1 농도를 보였으나, 위암을 가진 환자보다는 현저히 높았다(도 4d).

[0080] 100명의 건강한 피험자 및 150명의 위암 환자의 전체 혈청에 있는 GKN1 농도는 각각 6.35 ± 0.82 ng/ml 및 3.50 ± 0.57 ng/ml 이었고(도 4e), 이로써 위암 환자에서의 혈청 GKN1 단백질 수준이 건강한 피험자의 수준에서 비해 현저히 낮았음을 확인하였다($P<0.0001$). 더욱이, 간암 및 대장암 환자에서의 혈청 GKN1 농도는 각각 6.07 ± 0.92 및 6.26 ± 0.95 ng/ml 이었고, 이는 건강한 피험자의 수준과 유사하며, 위암 환자에 비해 현저히 높은 수준이었다(도 4e). 특히, ROC 곡선의 area 값이 각각 1.0, 1.0 및 0.9964로 확인됨으로써, 혈청 GKN1 단백질의 농도에 의하여 건강한 피험자, 위축성 위염이 있는 자, 장상피화생(intestinal metaplasia, IM)이 동반된 위축성 위염이 있는 자들과 위암 환자를 구별할 수 있음을 확인하였다(도 4f). 또한, 본 발명자들이 혈청 GKN1 수준에 의하여 위암환자와 간암 및 대장암 환자를 구별할 수 있음을 확인하기 위하여, ROC 곡선 값을 측정하였고, ROC 곡선에서 area는 각각 0.9938 및 0.9987로서, 전체 혈청에서의 GKN1 단백질 농도에 의해 위암의 위험을 예측 및 진단할 수 있음을 확인하였다(도 4g).

[0081] 위암은 암세포의 위벽 침윤 정도에 따라 조기 위암과 진행성 위암으로 구분된다. 본 연구에서 조기 위암 환자 혈청에서의 GKN1 농도는 3.75 ± 0.47 ng/ml 으로 진행성 위암 환자의 혈청 GKN1 농도인 3.38 ± 0.58 ng/ml 보다 높았으나($P<0.001$)(도 4h), 장상피화생(intestinal metaplasia, IM)이 동반된 위축성 위염이 있는 자들의 혈청 GKN1 농도보다는 낮았다($P<0.001$)(도 4h). ROC 곡선의 area 값이 모두 1.0 으로 확인됨으로써, 혈청 GKN1 단백질의 농도에 의하여 건강한 피험자, 위축성 위염이 있는 자, 장상피화생(intestinal metaplasia, IM)이 동반된 위축성 위염이 있는 자들과 조기 위암 환자를 구별할 수 있음을 확인하였다(도 4i).

[0082] 상기 결과로부터, 본 발명자들은 인간 혈청에 있는 엑소솜 GKN1 단백질이 위암의 진단을 위한 유용한 바이오마커로서 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0084] **실시예 6. 엑소솜의 GKN1 단백질의 혈액으로의 전달**

[0085] 위상피에서 생산되는 GKN1 단백질이 혈청에서 확인되었다는 증거에 근거하여, 본 발명자들은 위점막에 있는 림프구, 단핵구 및 대식세포가 위상피세포에서 혈액으로 GKN1 단백질을 포함한 엑소솜에 대한 전달자로서 기능할 수 있는지 여부를 실험하였다. 흥미롭게도, 면역형광 어세이 결과에서 HFE-145 세포 유래의 엑소솜은 THP-1 단핵구 및 U937 대식세포의 세포막에 붙었으나 Jurkat T 세포에는 붙지 않았고(도 5a), GKN1 단백질은 THP-1 단핵구 및 U937 대식세포의 세포막 부분에 존재하였음을 확인하였다(도 5b). 따라서, 본 발명자들은 GKN1 단백질을 포함한 엑소솜을 혈액으로 전달하는 것은 단핵구 및 대식세포임을 확인하였다.

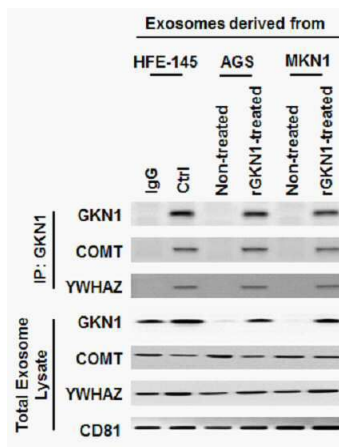
도면

도면1a

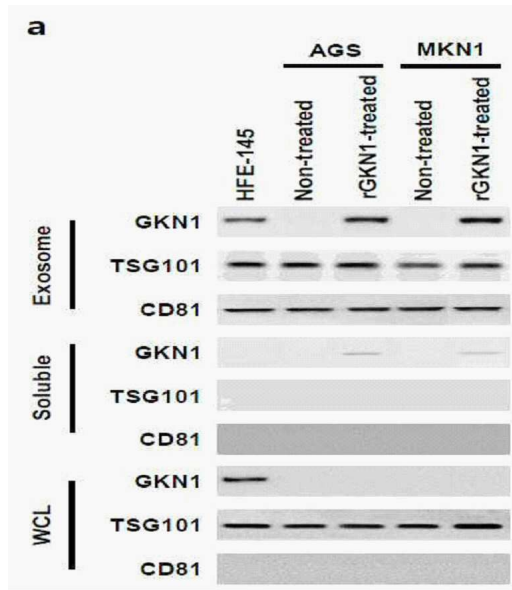
a

Number	Gene symbol	Description	Entrez ID	Chromosome	Map location
1	ACSL4	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	2182	X	Xq22.3-q23
2	AHNAK	AHNAK nucleoprotein	79026	11	11q12.2
3	ALDH1L1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1	10840	3	3q21.3
4	ALDH9A1	aldehyde dehydrogenase 9 family, member A1	223	1	1q23.1
5	ASNA1	arsA arsenite transporter, ATP-binding, homolog 1 (bacterial)	439	19	19q13.3
6	CKB	creatine kinase, brain	1152	14	14q32
7	CLIC1	chloride intracellular channel 1	1192	6	6p21.3
8	COMT	catechol-O-methyltransferase	1312	22	22q11.21
9	CTNS	cystinosis, lysosomal cystine transporter	1497	17	17p13
10	G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase	2539	X	Xq28
11	GALM	galactose mutarotase (aldose 1-epimerase)	130589	2	2p22.1
12	GARS	glycyl-tRNA synthetase	2617	7	7p15
13	GLUL	glutamate-ammonia ligase	2752	1	1q31
14	GPD1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	2819	12	12q13.12
15	GSN	gelsolin	2934	9	9q33
16	GSTM3	glutathione S-transferase mu 3 (brain)	2947	1	1p13.3
17	HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	3265	11	11p15.5
18	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	3557	2	2q14.2
19	PGD	phosphogluconate dehydrogenase	5226	1	1p36.22
20	PKLR	pyruvate kinase, liver and RBC	5313	1	1q21
21	PSAT1	phosphoserine aminotransferase 1	29968	9	9q21.2
22	PSMB6	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 6	5694	17	17p13
23	RNH1	ribonuclease/angiogenin inhibitor 1	6050	11	11p15.5
24	SECT3	SECT3 homolog (S. cerevisiae)	6396	3	3p25-p24
25	SPRR3	small proline-rich protein 3	6707	1	1q21-q22
26	TGM1	transglutaminase 1	7051	14	14q11.2
27	YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta	7534	8	8q23.1

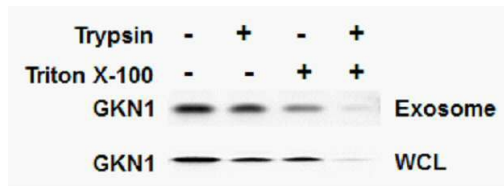
도면1b



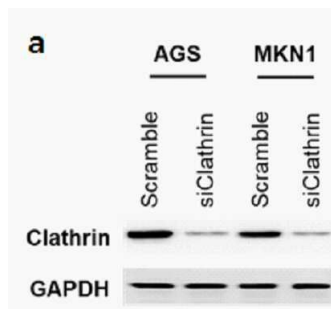
도면2a



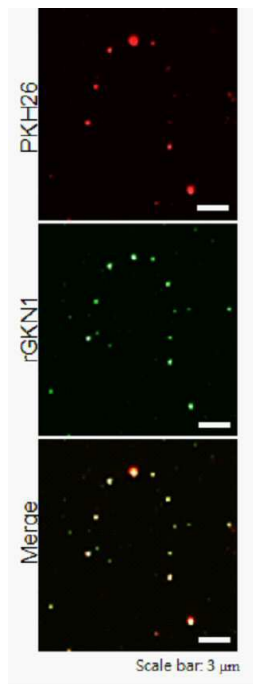
도면2b



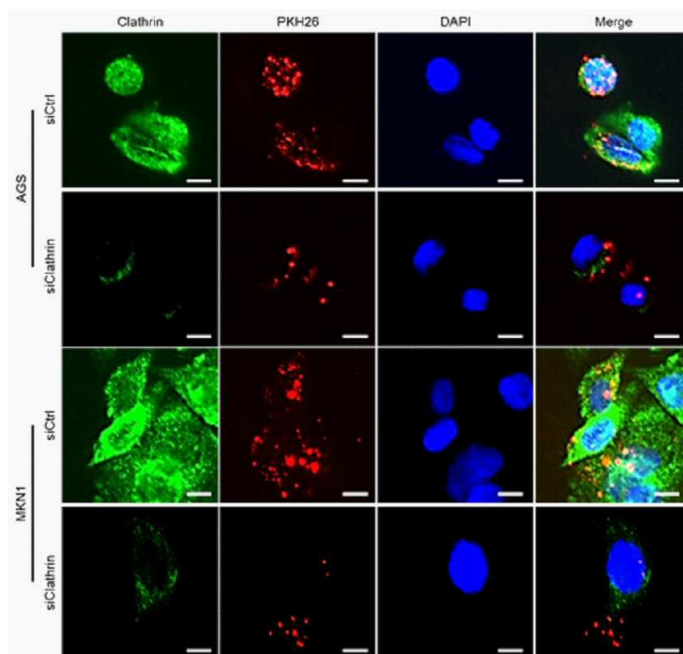
도면3a



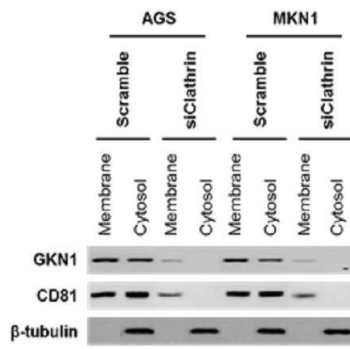
도면3b



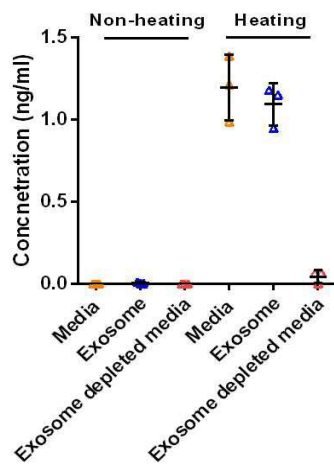
도면3c



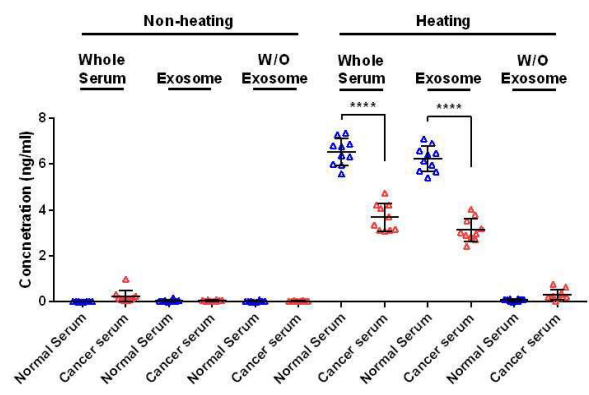
도면3d



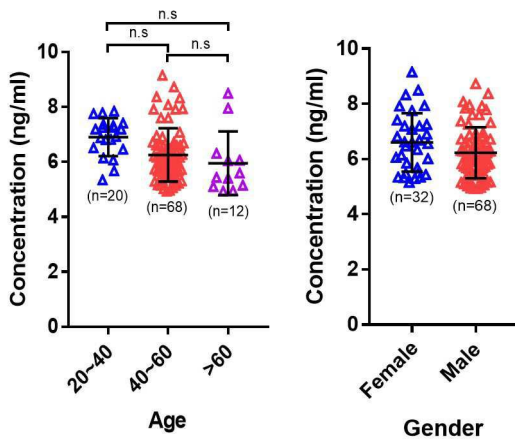
도면4a



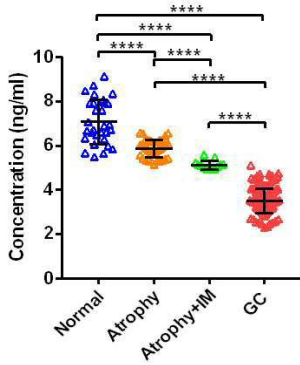
도면4b



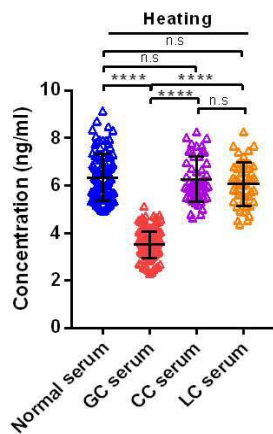
도면4c



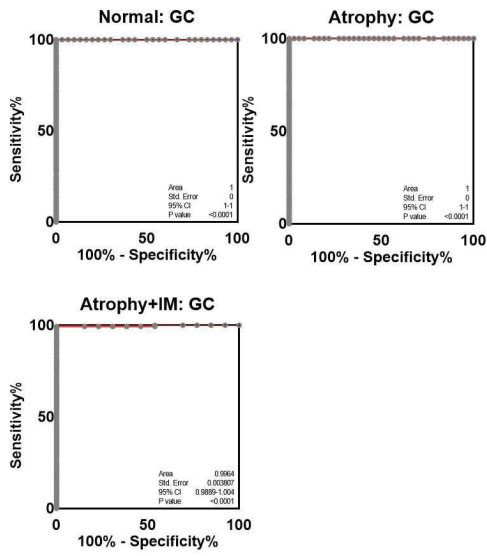
도면4d



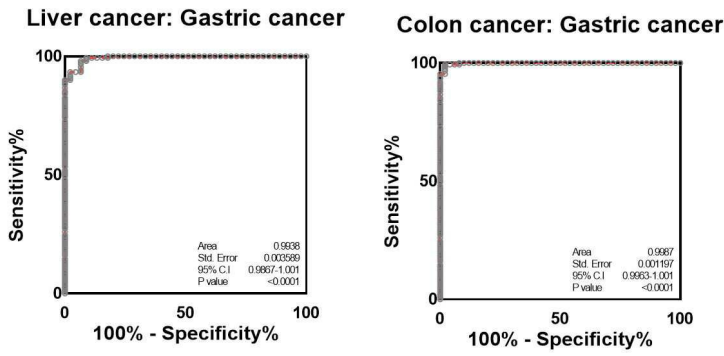
도면4e



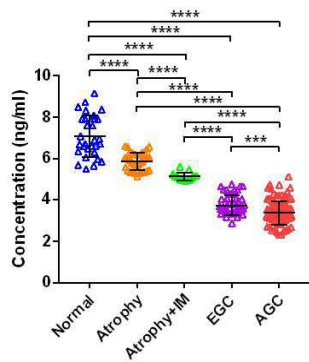
도면4f



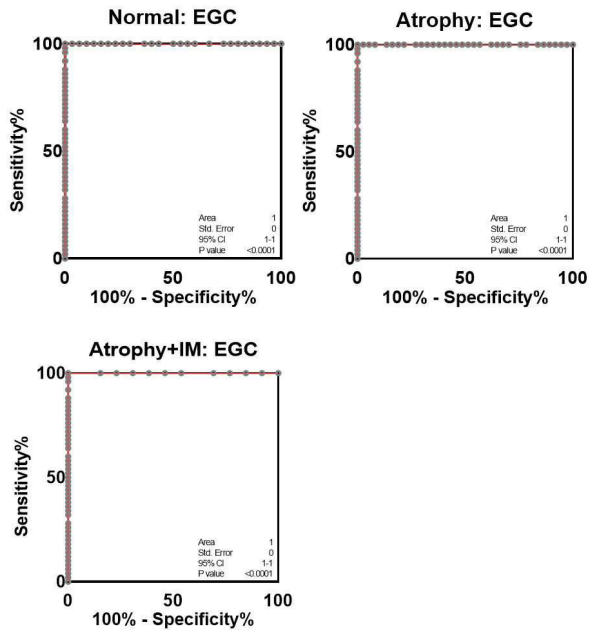
도면4g



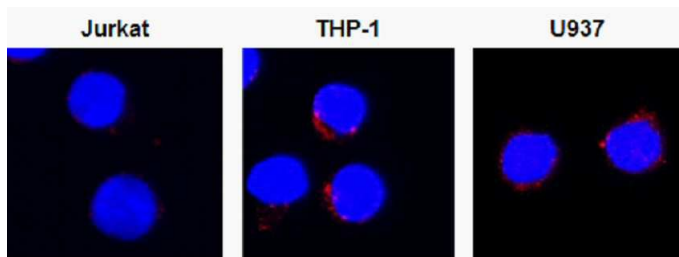
도면4h



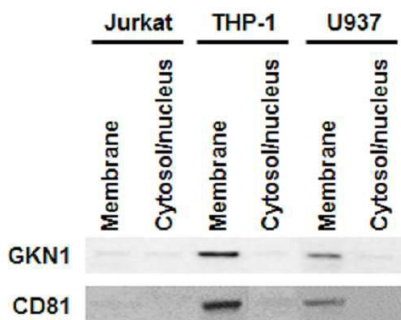
도면4i



도면5a



도면5b



서열 목록

- <110> THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION
- <120> Diagnosis of gastric cancer using gastrokeine 1 protein within blood

<130> PN1706-210
 <160> 2
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 600
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cDNA sequence of GKN1
 <400> 1
 atgcttgctt actcctctgt ccaactgcttt cgtgaagaca agatgaagtt cacaattgtc 60
 tttgctggac ttcttggagt ctttctagct cctgccttag ctaactataa tatcaacgtc 120

 aatgatgaca acaacaatgc tggaagtggg cagcagtcag tgagtgtcaa caatgaacac 180
 aatgtggcca atgttgacaa taacaacgga tgggactcct ggaattccat ctgggattat 240
 ggaaatggct ttgctgcaac cagactcttt caaaagaaga catgcattgt gcacaaaatg 300
 aacaaggaag tcatgccctc cattcaatcc cttgatgcac tggccaagga aaagaagctt 360
 cagggttaagg gaccaggagg accacctccc aaggcctga tgtactcagt caacccaac 420
 aaagtcgatg acctgagcaa gttcggaaaa aacattgcaa acatgtgtcg tgggattcca 480
 acatacatgg ctgaggagat gcaagaggca agcctgtttt tttactcagg aacgtgctac 540

 acgaccagtg tactatggat tgtggacatt tccttctgtg gagacacggt ggagaactaa 600
 600

<210> 2
 <211> 199
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> amino acid sequence of GKN1
 <400> 2
 Met Leu Ala Tyr Ser Ser Val His Cys Phe Arg Glu Asp Lys Met Lys
 1 5 10 15
 Phe Thr Ile Val Phe Ala Gly Leu Leu Gly Val Phe Leu Ala Pro Ala
 20 25 30

 Leu Ala Asn Tyr Asn Ile Asn Val Asn Asp Asp Asn Asn Asn Ala Gly
 35 40 45

Ser Gly Gln Gln Ser Val Ser Val Asn Asn Glu His Asn Val Ala Asn
 50 55 60
 Val Asp Asn Asn Asn Gly Trp Asp Ser Trp Asn Ser Ile Trp Asp Tyr
 65 70 75 80
 Gly Asn Gly Phe Ala Ala Thr Arg Leu Phe Gln Lys Lys Thr Cys Ile
 85 90 95
 Val His Lys Met Asn Lys Glu Val Met Pro Ser Ile Gln Ser Leu Asp
 100 105 110
 Ala Leu Val Lys Glu Lys Lys Leu Gln Gly Lys Gly Pro Gly Gly Pro
 115 120 125
 Pro Pro Lys Gly Leu Met Tyr Ser Val Asn Pro Asn Lys Val Asp Asp
 130 135 140
 Leu Ser Lys Phe Gly Lys Asn Ile Ala Asn Met Cys Arg Gly Ile Pro
 145 150 155 160
 Thr Tyr Met Ala Glu Glu Met Gln Glu Ala Ser Leu Phe Phe Tyr Ser
 165 170 175
 Gly Thr Cys Tyr Thr Thr Ser Val Leu Trp Ile Val Asp Ile Ser Phe
 180 185 190
 Cys Gly Asp Thr Val Glu Asn
 195

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 문서전체

【보정세부항목】 문서전체

【변경전】

gastrokine 1 단백

GKN1 단백

【변경후】

gastrokine 1 단백질

GKN1 단백질