(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년10월22일
(11) 등록번호 10-2010225
(24) 등록일자 2019년08월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 27/447* (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01) *G01N 30/88* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6848 (2013.01)
G01N 27/447 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7002579
(22) 출원일자(국제) 2015년07월13일
심사청구일자 2017년04월26일
(85) 번역문제출일자 2017년01월26일
(65) 공개번호 10-2017-0029532
(43) 공개일자 2017년03월15일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/040202
(87) 국제공개번호 WO 2016/007959
국제공개일자 2016년01월14일
(30) 우선권주장
62/023,615 2014년07월11일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2011087865 A1*
WO2014037977 A1*
Roslyn Dillon et al., 'Discovery of a Novel B-Raf Fusion Protein Related to c-Met Drug Resistance', J. Proteome Res., 2011, Vol. 10, pp 5084-5094. 1부.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
익스프레션 패톨로지, 인크.
미국 메릴랜드주 20850 록빌 스위트 300 메디컬 센터 드라이브 9600
(72) 발명자
크리츠먼 데이비드 비.
미국 매릴랜드주 20882 게이더스버그 웰시 로드 24305
헴브러프 토드
미국 매릴랜드주 20882 게이더스버그 뉴베리 로드 24336
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 19 항 심사관 : 차명훈

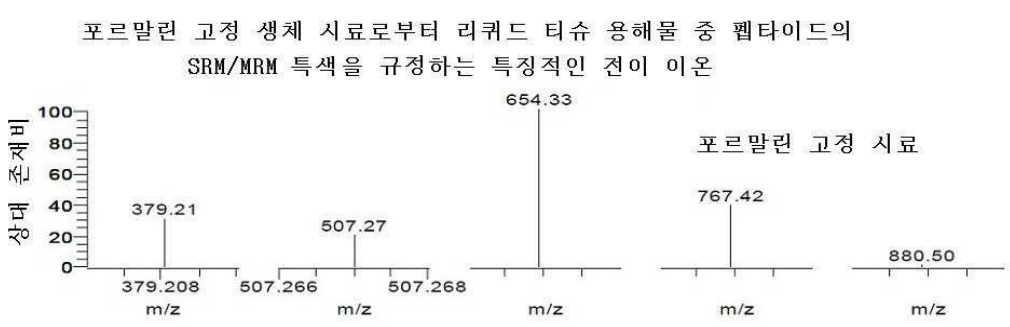
(54) 발명의 명칭 **세린/트레오닌-단백질 키나제 수용체 B-raf(BRAF)에 대한 SRM/MRM 검정**

(57) 요 약

현재 개시 내용은 선택 반응 모니터링(SRM) 질량 분광법, 또는 다중 반응 모니터링(MRM) 질량 분광법으로 또한 지칭될 수 있는 방법에 의해 포르말린 중에 고정된 생체 시료에서 직접적으로 BRAF 단백질을 정량화하는 데 특히 유리한 세린/트레오닌-단백질 키나제 B-raf(BRAF)로부터, 특정 펩타이드, 및 상기 펩타이드의 유래된 이온화 특

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1c



징을 제공한다. 이러한 생체 시료는 화학적으로 보존되고 고정되되, 여기서 상기 생체 시료는, 포르말린-고정 조직/세포, 포르말린-고정/파라핀 포매(FFPE) 조직/세포, FFPE 조직 블록 및 상기 블록 유래의 세포, 및 포르말린으로 고정 및/또는 파라핀으로 포매된 조직 배양 세포를 비롯하여 제제/정착제를 함유하는 포름알데하이드로 처리된 조직 및 세포로부터 선택된다.

(52) CPC특허분류
G01N 30/72 (2013.01)
G01N 33/57496 (2013.01)
G01N 33/6851 (2013.01)
G01N 2030/8831 (2013.01)
G01N 2333/912 (2013.01)
G01N 2560/00 (2013.01)

(72) 발명자
타이파람빌 시노
미국 매릴랜드주 21704 프레데릭 싱글톤 테라스 3730

랴오허 웨이-리
미국 버지니아주 20170 헌든 섀넌 플레이스 1112

명 세 서

청구범위

청구항 1

포르말린-고정된 조직의 인간 생체 시료에서 BRAF 티로신 키나제 수용체 단백질(BRAF)의 수준을 측정하는 방법으로서,

질량 분광법을 사용하여 상기 생체 시료로부터 제조된 단백질 분해물(digest) 중 BRAF 단편 펩타이드의 양을 검출 및 정량화하는 단계; 및 상기 시료 중 BRAF 단백질의 수준을 산출하는 단계를 포함하되;

상기 BRAF 단편 펩타이드는 서열번호 4의 펩타이드이고; 상기 수준은 상대적 수준 또는 절대적 수준인, BRAF 티로신 키나제 수용체 단백질(BRAF)의 수준을 측정하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 BRAF 단편 펩타이드의 양을 검출 및 정량화하는 단계 전에 상기 단백질 분해물을 분별(fractionating)하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 분별하는 단계는 액체 크로마토그래피, 나노-역상 액체 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피, 또는 역상 고성능 액체 크로마토그래피로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질 분해물은 프로테아제 분해물을 포함하는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 단백질 분해물은 트립신 분해물을 포함하는, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질량 분광법은 탠덤 질량 분광법, 이온 트랩 질량 분광법, 삼중 사극자 질량 분광법, MALDI-TOF 질량 분광법, MALDI 질량 분광법, 및 비행시간 질량 분광법으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 사용되는 질량 분광법의 방식은 선택 반응 모니터링(Selected Reaction Monitoring: SRM), 다중 반응 모니터링(Multiple Reaction Monitoring: MRM), 및 다중 선택 반응 모니터링(multiple Selected Reaction Monitoring: mSRM)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 방식인, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조직은 파라핀 포매(embedded) 조직인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조직은 종양으로부터 얻어진 것인, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 BRAF 단편 펩타이드를 정량화하는 단계는 하나의 생체 시료에서 상기 BRAF 단편 펩타이드의 양을, 상이한 그리고 별개의 생체 시료 중 동일한 BRAF 단편 펩타이드의 양과 비교하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 BRAF 단편 펩타이드를 정량화하는 단계는 기지의 양의 첨가된 내부 표준 펩타이드와 비교함으로써 생체 시료 중 상기 BRAF 단편 펩타이드의 양을 결정하는 단계를 포함하되, 상기 생체 시료 중 상기 BRAF 단편 펩타이드는 동일한 아미노산 서열을 가지는 내부 표준 펩타이드와 비교되는, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 내부 표준 펩타이드는 동위원소로 표지된 펩타이드인, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 동위원소 표지된 내부 표준 펩타이드는 ^{18}O, ^{17}O, ^{34}S, ^{15}N, ^{13}C, ^{2}H 및 이들의 조합으로부터 선택되는 하나 이상의 안정적인 중동위원소(heavy stable isotope)를 포함하는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질 분해물 중 상기 BRAF 단편 펩타이드의 양을 검출 및 정량화하는 단계는 상기 생체 시료가 수득된 대상체에서 BRAF 단백질의 존재 및 암과의 연관성을 나타내는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 BRAF 단편 펩타이드의 양 또는 상기 BRAF 단백질의 수준을 검출 및 정량화한 결과를 상기 암의 진단 병기/등급/상태와 상관시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 BRAF 단편 펩타이드의 양 또는 상기 BRAF 단백질의 수준을 검출 및 정량화한 결과를 상기 암의 진단 병기/등급/상태에 상관시키는 단계는, 복합 포맷(multiplex format)에서 다른 단백질 또는 다른 단백질로부터의 펩타이드의 양을 검출 및 정량화하는 것과 조합되어 상기 암의 진단 병기/등급/상태에 관한 추가적인 정보를 제공하는, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생체 시료가 수득된 대상체에 대하여 상기 BRAF 단편 펩타이드의 존재, 부재 또는 양, 또는 BRAF 단백질의 수준에 기반하여 치료제를 선택하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 치료제는 상기 BRAF 단백질에 결합하거나 상기 BRAF 단백질의 생물학적 활성을 저해하는, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 치료제는 베무라페닙(Vemurafenib) 또는 소라페닙(Sorafenib)인, 방법.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 미국 가출원 제62/023,615호(출원일: 2014년 7월 11일)에 대한 우선권을 주장하며, 이 기초 출원의 내용은 그의 전문이 본 명세서에 편입된다.

배 경 기 술

[0002] 세린/트레오닌-단백질 키나제 B-raf(또한 원발암유전자(Proto-Oncogene) B-Raf, p94, v-Raf 쥣과 육종 바이러스성 발암유전자 동족체 B1, 및 BRAF라고도 지칭되고, 여기서는 "BRAF"라고 지칭됨)의 서열로부터 유래된 특정 펩타이드가 제공된다. 각각의 펩타이드에 대한 펩타이드 서열 및 단편화/전이 이온은, 다중 반응 모니터링(Multiple Reaction Monitoring: MRM) 검정이라고도 지칭될 수 있는, 질량 분광법-기반 선택 반응 모니터링(Selected Reaction Monitoring: SRM) 검정(본 명세서에서 SRM/MRM이라 지칭됨)에서 특히 유용하다. BRAF 단백질의 SRM/MRM 정량 분석을 위한 펩타이드의 사용이 기재되어 있다.

[0003] 이 SRM/MRM 검정은 BRAF 단백질로부터 특이적 펩타이드 중 하나 이상의 *상대적* 또는 *절대적* 정량 수준을 측정하는 데 사용될 수 있고, 따라서 생체 시료로부터 얻어진 주어진 단백질 제조물 중 BRAF 단백질의 양을 질량 분광법에 의해 측정하는 방법을 제공한다.

[0004] 보다 구체적으로, SRM/MRM 검정은 환자 조직 시료, 예컨대 포르말린 고정 암 환자 조직으로부터 입수된 세포로부터 제조된 복합 단백질 용해물 시료 중에서 직접적으로 이들 펩타이드를 측정할 수 있다. 포르말린-고정 조직으로부터 단백질 시료을 제조하는 방법은 미국 특허 제7,473,532호에 기재되어 있으며, 이 문헌의 내용은 그의 전문이 본 명세서에 참고로 편입된다. 미국 특허 제7,473,532호에 기재된 방법은 익스프레션 패톨로지 인코포레이티드(Expression Pathology Inc.)(미국 메릴랜드주 록빌 소재)로부터 입수가능한 리퀴드 티슈(Liquid Tissue)(등록상표) 시약 및 프로토콜을 사용하여 편리하게 수행될 수 있다.

[0005] 암 환자 조직으로부터 가장 널리 그리고 유리하게 입수가능한 형태의 조직은 포르말린으로 고정하고, 파라핀으로 포매된 조직이다. 수술로 제거된 조직의 포름알데하이드/포르말린 고정은 단연 전세계적으로 암 조직 시료을 보존하는 가장 일반적인 방법이며, 표준 병리학 실무에 대하여 허용되는 관습이다. 포름알데하이드의 수용액은 포르말린으로 지칭된다. "100%" 포르말린은, 산화 및 중합도를 제한하는 소량의 안정화제, 보통 메탄올과 함께, 수 중 포름알데하이드의 포화 수용액(약 40부피% 또는 37질량%)으로 이루어진다. 조직이 보존되는 가장 일반적

인 방법은 수성 포름알데하이드(일반적으로 10%의 중성 완충 포르말린이라 칭하여짐) 중에서 장시간(8시간 내지 48시간) 동안 전체 조직을 침지한 다음, 실온에서 장기간의 저장 동안 파라핀 왁스에 고정된 전체 조직을 포매시키는 것이다. 따라서, 포르말린 고정 암 조직을 분석하는 분자 분석 방법은 암 환자 조직의 분석을 위해 가장 많이 허용되고 아주 많이 이용되는 방법일 것이다.

[0006] SRM/MRM 검정으로부터의 결과는 조직(생체 시료)이 수집되고 보존된 환자 또는 대상체의 특정 조직 시료(예컨대, 암 조직 시료) 내 BRAF 단백질의 정확하고 정밀한 정량 수준의 상관관계를 보여주는 데 사용될 수 있다. 이는 암에 대한 진단 및 예후 정보를 제공할 뿐만 아니라, 의사 또는 다른 의료 전문가가 환자에 대한 적절한 치료법을 더욱 정확하게 결정하는 것도 가능하게 한다. 이환된 조직 또는 다른 환자 시료에서 단백질 발현의 수준에 대한 진단상, 예후상 및 치료상 중요한 정보를 제공하는 이와 같은 검정은 *동반 진단*(*companion diagnostic*) 검정이라 불린다. 예를 들어, 이와 같은 검정은 암의 병기 또는 정도를 진단하고 환자가 가장 많이 반응할 가능성이 있는 치료제를 결정하도록 설계될 수 있다.

발명의 내용

[0007] 본 명세서에 기재된 검정은 BRAF 단백질로부터 특정 비변형 펩타이드의 *상대적* 또는 *절대적* 수준을 측정하고, 또한 BRAF 단백질로부터 특정 변형 펩타이드의 절대적 또는 상대적 수준을 측정할 수 있다. 변형의 예는 펩타이드에 존재할 수 있는 인산화 아미노산 잔기 및 글리코실화 아미노산 잔기를 포함한다.

[0008] BRAF 단백질의 *상대적* 정량 수준은 SRM/MRM 방법에 의해, 예를 들어 상이한 시료에서 개별적인 BRAF 펩타이드의 SRM/MRM 특색 피크 면적(signature peak area)(예컨대, 특색 피크 면적 또는 통합된 단편 이온 강도)을 비교함으로써 결정된다. 대안적으로, 각각의 펩타이드가 자체의 특이적인 SRM/MRM 특색 피크를 가지는, 다수의 BRAF 특징 펩타이드에 대한 다수의 SRM/MRM 특색 피크 면적을 비교하여, 하나의 생체 시료 중 상대적 BRAF 단백질 함량을 결정하고 이를 하나 이상의 추가적 또는 상이한 생체 시료에서 BRAF 단백질 함량과 비교하는 것이 가능하다. 이와 같이 해서, BRAF 단백질 유래의 특정 펩타이드 또는 펩타이드들의 양, 및 따라서 BRAF 단백질의 양이 동일한 실험 조건 하에서 2개 이상의 생체 시료에 걸쳐서 동일한 BRAF 펩타이드, 또는 펩타이드들에 대하여 결정된다. 또한, 상대적인 정량은 SRM/MRM 방법에 의해 펩타이드에 대한 특색 피크 면적을, 생체 시료 유래의 동일한 단백질 제조물 내 상이한 단백질, 또는 단백질들 유래의 또 다른 및 상이한 펩타이드, 또는 펩타이드들에 대한 특색 피크 면적과 비교함으로써 단일 시료 내 BRAF 단백질 유래의 주어진 펩타이드, 또는 펩타이드들에 대하여 결정될 수 있다. 동일한 방법으로, BRAF 단백질 유래의 특정 펩타이드의 양, 및 따라서 BRAF 단백질의 양은 동일한 시료 내에서 서로에 대해 결정된다. 이러한 접근법은 시료들 간 그리고 시료들 내에서 또 다른 펩타이드 또는 펩타이드들의 양에 대하여 BRAF 단백질 유래의 개별적인 펩타이드 또는 펩타이드들을 정량화시키되, 여기서 특색 피크 면적에 의해 결정된 바와 같은 양은, 생체 시료 유래의 단백질 제조물 중 BRAF 펩타이드의 양을 가중하는 부피 또는 중량에 대한 절대 중량에 관계없이, 서로에 대해 상대적이다. 상이한 시료 간의 개별적인 특색 피크 면적에 대한 상대적인 정량 데이터는 시료 당 분석되는 단백질의 양에 대하여 정규화될 수 있다. 상대적인 정량은, 다른 펩타이드들/단백질들에 관하여 하나의 펩타이드/단백질의 상대적인 단백질량에 대한 통찰력을 확보하기 위하여 단일 시료에서 그리고/또는 많은 시료에 걸쳐서 동시에 다수의 단백질 및 BRAF 단백질 유래의 많은 펩타이드에 걸쳐서 실행될 수 있다.

[0009] BRAF 단백질의 *절대적* 정량 수준은, 예를 들어, 하나의 생체 시료에서 BRAF 단백질 유래의 개별적인 펩타이드의 SRM/MRM 특색 피크 면적을 고정된 내부 표준의 SRM/MRM 특색 피크 면적과 비교하는 SRM/MRM 방법에 의하여 결정된다. 일 실시형태에서, 내부 표준은 하나 이상의 중동위원소로 표지화된 하나 이상의 아미노산 잔기를 함유하는 동일한 정확한 BRAF 펩타이드의 합성 형태이다. 질량 분광법에 의해 분석될 경우, 천연 BRAF 펩타이드 특색 피크와는 상이하고 당해 피크로부터 구별되며, 따라서 비교 피크로서 사용될 수 있는, 예측가능하고 일관성 있는 SRM/MRM 특색 피크를 생성하도록, 이러한 동위원소 표지된 내부 표준이 합성된다. 따라서, 내부 표준이 기지의 양의 생체 시료 유래의 단백질 제조물에 가해지고 질량 분광법에 의해 분석될 때, 천연 펩타이드의 SRM/MRM 특색 피크 면적은 내부 표준 펩타이드의 SRM/MRM 특색 피크 면적과 비교되고, 이러한 수치 비교는 생체 시료 유래 원래의 단백질 제조물에 존재하는 천연 펩타이드의 절대 몰농도 및/또는 절대 중량을 나타낸다. 단편 펩타이드에 대한 절대적 정량 데이터는 시료 당 분석되는 단백질의 양에 따라서 표시된다. 절대적 정량은, 단일 시료 중 그리고/또는 많은 시료에 걸쳐서 많은 펩타이드, 따라서 단백질에 걸쳐서 동시에 실행되어, 개별적인 생체 시료 중 그리고 개별적인 시료의 전체 코호트 중 절대적 단백질 양에 대한 통찰력을 확보할 수 있다.

[0010] SRM/MRM 검정 방법은, 예를 들어, 환자-유래 조직, 예컨대, 포르말린 고정 조직에서 직접적으로, 암의 병기 및/또는 환자 예후의 진단을 돕기 위하여, 그리고 치료제가 환자를 치료함에 있어서 사용하기에 가장 유리할 것인

지 여부를 결정하는데 도움을 주기 위하여 사용될 수 있다. 예컨대 부분 또는 전체 종양의 치료적 제거를 위한 수술을 통하여 또는 의심되는 질환의 존재 또는 부재를 결정하는 데 수행되는 생검 절차를 통하여 환자로부터 제거되는 암 조직은, 특정 단백질 또는 단백질들, 및 어떠한 형태의 단백질들이 그 환자 조직에 존재하는지 여부를 결정하기 위해 분석된다. 게다가, 단백질, 또는 다수 단백질의 발현 수준이 결정되어 건강한 조직에서 발견되는 "정상" 또는 참조 수준과 비교될 수 있다. 건강한 조직에서 발견되는 단백질의 정상 또는 참조 수준은, 예를 들어, 암을 가지지 않는 하나 이상의 개체의 관련 조직으로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, 정상 또는 참조 수준은 암에 의해 영향을 받지 않은 관련 조직의 분석에 의해 암을 지니는 개체에 대하여 얻어질 수 있다.

[0011] 단백질 수준(예컨대, BRAF 수준)의 검정은 또한 BRAF 수준을 이용함으로써 암으로 진단된 환자 또는 대상체에 대한 암의 병기를 진단하고 그리고 예후 정보를 제공하는 데 사용될 수 있다. 개별적인 BRAF 펩타이드의 수준은 분석되는 단백질 용해물의 전체 양 당 SRM/MRM 검정에 의해 결정되는 펩타이드의 몰량으로 정의된다. 따라서 BRAF에 관한 정보는 BRAF 단백질(또는 BRAF 단백질의 단편 펩타이드)의 수준을 정상 조직에서 관찰된 수준과 상관시킴으로써 암의 병기 또는 등급 및/또는 환자 예후를 결정하는 데 있어서 도움을 주는 데 사용될 수 있다. 일단 암의 병기 및/또는 등급, 및/또는 BRAF 단백질 발현 특성이 결정되면, 그 정보는, 예를 들어, 검정된 단백질 또는 단백질(들)(예를 들어, BRAF)의 비정상적인 발현을 특징으로 하는 암 조직을 특이적으로 치료하도록 개발된 치료제(화학적 및 생물학적)의 목록과 일치될 수 있다. 치료제인 베무라페닙(Vemurafenib) 및 소라페닙(Sorafenib)은 BRAF-발현 암 세포를 표적화하는데 특히 유용하다. 기타 BRAF 저해제는 GDC-0879, PLX-4720, 다브라페닙(dabrafenib) 및 LGX818을 포함한다. BRAF 단백질 검정으로부터의 정보를, 예를 들어, BRAF 단백질 또는 상기 단백질을 발현하는 세포/조직을 특이적으로 표적화하는 치료제의 목록에 일치시키는 것은, 질환의 치료에 대한 *개인화된 의학* 접근법으로 지칭된 것을 정의한다. 본 명세서에 기재된 검정 방법은 진단 및 치료 결정을 위한 공급원으로서 환자 자신의 조직으로부터의 단백질의 분석을 사용함으로써 *개인화된 의학* 접근법의 기반을 형성한다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1a 내지 도 1c는 삼중 사극자 질량 분광계(triplequadrupole mass spectrometer) 상에서 수행된 BRAF 펩타이드의 정량화를 이용하여 포르말린 고정 생체 시료로부터의 리퀴드 티슈 용해물에 대하여 실행된 BRAF 단백질로부터의 단일 펩타이드의 SRM/MRM 검정의 일례를 도시한다. 포르말린에 고정된 생체 시료 중 이러한 펩타이드를 측정하는 방법에 대한 특이적인 특징이 도시되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 원칙적으로, 예를 들어 공지된 특이성의 프로테아제(예를 들어, 트립신)로 소화(digesting)시킴으로써 제조된, BRAF 단백질로부터 유래된 임의의 예측된 펩타이드가, 질량 분광법-기반 SRM/MRM 검정을 사용하여 시료 중 BRAF 단백질의 존재비를 결정하기 위하여 대용 리포터로 사용될 수 있다. 유사하게, BRAF 단백질에서 잠재적으로 변형된 것으로 알려진 부위에서 아미노산 잔기를 함유하는 임의의 예측된 펩타이드 서열은 또한 잠재적으로 시료 중 BRAF 단백질의 변형 정도를 검정하는 데 사용될 수 있었다.

[0014] BRAF 단편 펩타이드는 미국 특허 제7,473,532호에 제공된 리퀴드 티슈 프로토콜의 사용에 의한 것을 포함하는 다양한 방법에 의해 생성될 수 있다. 리퀴드 티슈 프로토콜 및 시약은 조직/생체 시료 중 단백질의 단백질 가수분해에 의한 소화에 의해 포르말린으로 고정되고 파라핀으로 포매된 조직으로부터 질량 분광 분석에 적합한 펩타이드 시료을 생성할 수 있다. 리퀴드 티슈 프로토콜에서, 조직/생체 시료는, 단백질 가교를 반전시키거나 해제시키기 위하여 완충액 중에서 장기간 동안(예를 들어, 약 10분 내지 약 4시간의 기간 동안 약 80℃ 내지 약 100℃로) 가열된다. 이용되는 완충액은 중성 완충액(예를 들어, 트리스-기반 완충액, 또는 세제를 함유하는 완충액)이다. 열 처리 후, 조직/생체 시료는, 상기 생체 시료의 조직 및 세포 구조를 파괴시키고 상기 시료를 액화시키는 데 충분한 시간(예컨대, 37℃ 내지 65℃의 온도에서 30분 내지 24시간의 기간) 동안 트립신, 키모트립신, 펩신, 및 엔도프로테이나제 Lys-C를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 1종 이상의 프로테아제로 처리된다. 가열 및 단백질 분해의 결과는 액체인 가용성의 희석가능한 생체분자 용해물이다.

[0015] 놀랍게도, BRAF 단백질로부터의 많은 잠재적인 펩타이드 서열이 즉시 분명하지 않다는 이유로 질량 분광-기반 SRM/MRM 검정에 사용하는 데 적합하지 않거나 효과적이지 않다고 여겼다. 이것은 포르말린 고정 조직으로부터 유래된 펩타이드에 대해서 특히 그러하다. MRM/SRM 검정에 가장 적합한 펩타이드인 것으로 예측하는 것이 가능하지 않았으므로, BRAF 단백질을 위하여 믿을 수 있고 정확한 SRM/MRM 검정을 개발하기 위해 실제 리퀴드 티슈 용해물에서 변형 및 비변형 펩타이드를 실험적으로 식별하는 것이 필요하였다. 어떠한 이론에 의해서도 구속되

길 원치 않지만, 일부 펩타이드는, 예를 들어, 다른 단백질과 구별되지 않는 단편을 잘 이온화하거나 생성하지 않기 때문에 질량 분광에 의해 검출하는 것이 어려울 수 있었던 것으로 여겨진다. 펩타이드는 또한 분리(예를 들어, 액체 크로마토그래피)에서 잘 분리되지 않을 수 있거나, 또는 유리 또는 플라스틱 제품에 부착할 수 있다.

[0016] 본 개시 내용의 다양한 실시형태에서 발견된 BRAF 펩타이드(예를 들어, 표 1 및 표 2)는 포르말린 고정 암 조직으로부터 생성된 세포로부터 제조된 복합 리퀴드 티슈 용해물 내에서 모든 단백질의 프로테아제 소화에 의해 BRAF 단백질로부터 유래되었다. 달리 언급되지 않는 한, 각각의 예에서 프로테아제는 트립신이었다. 그 다음 리퀴드 티슈 용해물은 질량 분광법에 의해 분석되어 질량 분광법에 의해 검출되고 분석되는 BRAF 단백질로부터 유래된 펩타이드를 결정하였다. 질량-분광 분석에 대한 펩타이드의 특이적인 바람직한 하위세트의 식별은, 1) 리퀴드 티슈 용해물의 질량 분광 분석에서 단백질 유래의 펩타이드 또는 펩타이드들이 이온화되는 실험 결정, 및 2) 리퀴드 티슈 용해물을 제조함에 있어서 사용된 프로토콜 및 실험 조건을 견디는 펩타이드의 능력을 기반으로 한다. 이러한 후자의 특성은 펩타이드의 아미노산 서열로뿐만 아니라, 시료 제조 동안 변형된 형태로 견디는 펩타이드 내 변형된 아미노산 잔기의 능력으로도 확대된다.

[0017] 포르말린(포름알데하이드) 고정 조직으로부터 직접적으로 입수된 세포로부터의 단백질 용해물은, 조직 현미해부를 통하여 시료 튜브에 세포를 수집한 다음, 장시간 동안 리퀴드 티슈 완충액에서 세포를 가열하는 것을 수반하는 리퀴드 티슈 시약 및 프로토콜을 사용하여 제조되었다. 일단 포르말린-유도 가교가 부정적으로 영향을 받으면, 그 후 조직/세포는, 예를 들어, (다른 프로테아제가 사용될 수 있지만) 트립신 등과 같은 프로테아제를 사용하여 예측가능한 방식으로 완전히 소화된다. 각각의 단백질 용해물은 프로테아제를 이용한 본래 폴리펩타이드의 소화에 의해 펩타이드의 수집물로 된다. 각각의 리퀴드 티슈 용해물을 (예를 들어, 이온 트랩 질량 분광법에 의해) 분석하여, 데이터가 각각의 단백질 용해물에 존재하는 모든 세포 단백질로부터 질량 분광법에 의해 식별될 수 있는 만큼 많은 펩타이드의 식별로서 제시된, 펩타이드의 다수의 전체 프로테오믹 조사를 수행하였다. 단일 복합 단백질/펩타이드 용해물로부터 가능한 한 많은 펩타이드의 식별을 위하여 전체 프로파일링을 수행할 수 있는 이온 트랩 질량 분광계 또는 질량 분광계의 다른 형태가 이용된다. 그러나, 이온 트랩 질량 분광계는 펩타이드의 전체 프로파일링을 수행하기 위하여 유리하게 이용될 수 있다. SRM/MRM 검정은 MALDI, 이온 트랩, 또는 삼중 사극자를 비롯한 질량 분광계의 임의의 유형 상에서 전개되고 수행될 수 있지만, 유리하게는 삼중 사극자 기기 플랫폼이 SRM/MRM 검정에 이용된다. 이런 유형의 질량 분광계는 세포 내에 함유된 모든 단백질로부터 수십만 내지 수백만개의 개별의 펩타이드로 구성될 수 있는 매우 복잡한 단백질 용해물 내에서 단일의 단리된 표적 펩타이드를 분석하기 위한 적합한 기기이다.

[0018] 일단 이용되는 조건 하에서 가능한 한 많은 펩타이드가 단일 용해물의 단일 MS 분석으로 식별되었다면, 펩타이드의 그 목록이 수집되어 그 용해물에서 검출된 단백질을 결정하는 데 사용되었다. 다수의 리퀴드 티슈 용해물에 대하여 이 공정을 반복하여, 펩타이드의 매우 큰 목록이 단일 데이터세트로 수집되었다. 데이터세트의 유형은 (프로테아제 소화 후) 분석된 생체 시료의 유형에서, 그리고 구체적으로 생체 시료의 리퀴드 티슈 용해물에서 검출될 수 있는 펩타이드를 나타내는 것으로 고려될 수 있으며, 따라서 예를 들어 BRAF 단백질과 같은 특정 단백질에 대한 펩타이드를 포함한다.

[0019] 일 실시형태에서, BRAF 단백질의 절대적 또는 상대적 양의 결정에 유용한 것으로 확인된 BRAF 트립신 펩타이드는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10 및 서열번호 11의 펩타이드 중 하나 이상, 둘 이상, 셋 이상, 또는 넷 이상을 포함하며, 이의 각각은 표 1에 열거되어 있다. 이들 펩타이드의 각각은 포르말린으로 고정되고, 파라핀으로 포매된 조직으로부터 제조된 리퀴드 티슈 용해물에서 질량 분광법에 의해 검출되었다. 따라서, 각각의 펩타이드는, 직접적으로 포르말린 고정 환자 조직에서를 비롯하여 인간 생체 시료에서 BRAF 단백질에 대한 정량적 SRM/MRM 검정을 전개하는 데 사용하기 위한 후보이다.

표 1

[0020]

서열	펩타이드 서열
서열번호 1	LTQEHIEALLDK
서열번호 2	TVVPAR
서열번호 3	IQDGEK
서열번호 4	LLFQGFR
서열번호 5	NQFGQR
서열번호 6	NEVGVLR
서열번호 7	SNNIFLHEDLTVK
서열번호 8	SASEPSLNR
서열번호 9	FGGEHNPPSIYLEAYEEYTSK
서열번호 10	SSSSSEDR
서열번호 11	TPIQAGGYGAFPVH

[0021] 표 1에 열거된 BRAF 트립신 펩타이드는, 전립선, 결장 및 유방을 비롯한 상이한 인간 기관의 다수의 상이한 포르말린 고정 조직의 다수의 리퀴드 티슈 용해물로부터 검출되었다. 이들 펩타이드의 각각은 포르말린 고정 조직 중의 BRAF 단백질의 정량적 SRM/MRM 검정에 유용한 것으로 고려된다. 이들 실험의 추가의 데이터 분석은 임의의 특정 기관 부위로부터 임의의 특정 펩타이드에 대한 선호도를 나타내지 않았다. 따라서, 이들 펩타이드는 임의의 생체 시료로부터 또는 신체 내 임의의 기관 부위로부터 유래된 임의의 포르말린 고정 조직으로부터 리퀴드 티슈 용해물에 대하여 BRAF 단백질의 SRM/MRM 검정을 수행하는 데 이용될 수 있다.

[0022] BRAF 단백질로부터 유래된 각각의 펩타이드에 대한 SRM/MRM 검정을 가장 효율적으로 구현하기 위하여, 분석에서 펩타이드 서열에 부가해서 정보를 이용하는 것이 바람직하다. 추가적인 정보는 특이적인 표적화된 펩타이드(들)의 올바르고 집중된 분석을 수행하기 위하여 질량 분광계(예를 들어, 삼중 가극자 질량 분광계)를 안내하고 지시함에 있어서 사용될 수 있으므로, 검정은 효과적으로 수행될 수 있다.

[0023] 일반적으로 표적 펩타이드에 대한 그리고 특이적인 BRAF 펩타이드에 대한 추가적인 정보는 펩타이드의 단일 동위원소 질량, 그의 전구체 하전 상태, 전구체 m/z 값, m/z 전이 이온, 및 각각의 전이 이온의 이온 유형 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 표 2는 표 1의 목록으로부터 두 가지(2)의 BRAF 펩타이드에 대한 SRM/MRM 검정을 전개하는 데 사용될 수 있는 추가적인 펩타이드 정보를 나타낸다. 표 2에 예에 의해 나타낸 두 가지(2) BRAF 펩타이드에 대하여 기재된 유사한 추가적인 정보가 제작될 수 있고, 얻어질 수 있으며, 그리고 표 1에 포함된 다른 펩타이드의 분석에 적용될 수 있다.

표 2

[0024]

서열	펩타이드 서열	단일 동위원소 질량	전구체 하전 상태	전구체 m/z	전이 m/z	이온 유형
서열번호 1	LTQEHIEALLDK	1408.7562	2	705.385	688.387	y6
			2	705.385	801.471	y7
			2	705.385	938.53	y8
			2	705.385	1067.573	y9
			2	705.385	1195.631	y10
서열번호 4	LLFQGFR	879.4966	2	440.756	379.208	y3
			2	440.756	507.267	y4
			2	440.756	654.335	y5
			2	440.756	767.419	y6
			2	440.756	880.503	y7

[0025] 하기 기재된 방법은, 1) BRAF 단백질에 대한 질량 분광법-기반 SRM/MRM 검정에 사용될 수 있는 BRAF 단백질로부터 후보 펩타이드를 식별하고, 2) 상관관계를 보여주기 위하여 BRAF 단백질로부터 표적 펩타이드에 대하여 개별

적인 SRM/MRM 검정, 또는 검정들을 전개하며, 3) 최적 치료법의 암 진단 및/또는 선택에 정량적인 검정을 적용하는 데 사용되었다.

[0026] **검정 방법**

[0027] 1. BRAF 단백질에 대한 SRM/MRM 후보 단편 펩타이드의 식별

[0028] a. 단백질을 소화시키기 위한 프로테아제 또는 프로테아제들(트립신을 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있음)을 사용하여 포르말린 고정 생체 시료로부터 리퀴드 티슈 단백질 용해물을 제조

[0029] b. 이온 트랩 탠덤 질량 분광계 상에서 리퀴드 티슈 용해물 내 모든 단백질 단편을 분석하고, BRAF 단백질로부터 모든 단편 펩타이드를 식별(여기서, 개별적인 단편 펩타이드는 인산화 또는 글리코실화와 같은 임의의 펩타이드 변형을 포함하지 않음)

[0030] c. 이온 트랩 탠덤 질량 분광계 상에서 리퀴드 티슈 용해물 내 모든 단백질 단편을 분석하고, 예를 들어 인산화 또는 글리코실화 잔기와 같은 펩타이드 변형을 보유하는 BRAF 단백질로부터 모든 단편 펩타이드를 식별

[0031] d. 잠재적으로 전체의 전장 BRAF 단백질로부터 특이적인 소화 방법에 의해 생성되는 모든 펩타이드가 측정될 수 있지만, SRM/MRM 검정의 전개에 사용되는 바람직한 펩타이드는 포르말린 고정 생체 시료로부터 제조된 복합 리퀴드 티슈 단백질 용해물에서 직접 질량 분광에 의해 식별되는 것임

[0032] e. 포르말린 고정 생체 시료로부터 리퀴드 티슈 용해물을 분석할 때 환자 조직에서 특이적으로 변형(인산화, 글리코실화 등)되고 이온화되며, 따라서 질량 분광계에서 검출되는 펩타이드가 BRAF 단백질의 펩타이드 변형을 검정하기 위한 후보 펩타이드로서 식별됨

[0033] 2. BRAF 단백질로부터 단편 펩타이드에 대한 질량 분광 검정

[0034] a. 리퀴드 티슈 용해물에서 식별된 개별적인 단편 펩타이드에 대한 삼중 사극자 질량 분광계 상에서의 SRM/MRM 검정이 BRAF 단백질 유래 펩타이드에 적용됨

[0035] i. 겔 전기영동, 액체 크로마토그래피, 모세관 전기영동, 나노-역상 액체 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피, 또는 역상 고성능 액체 크로마토그래피를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아닌 최적의 크로마토그래피 조건을 위한 단편 펩타이드에 대한 최적의 체류 시간을 결정

[0036] ii. 각각의 펩타이드에 대한 SRM/MRM 검정을 전개시키기 위하여, 펩타이드의 단일 동위원소 질량, 각각의 펩타이드에 대한 전구체 하전 상태, 각각의 펩타이드에 대한 전구체 m/z 값, 각각의 펩타이드에 대한 m/z 전이 이온, 및 각각의 단편 펩타이드에 대한 각각의 전이 이온의 이온 유형을 결정

[0037] iii. SRM/MRM 검정은 이어서 삼중 사극자 질량 분광계 상에서 (i) 및 (ii)로부터의 정보를 사용하여 수행될 수 있음(여기서 각각의 펩타이드는 삼중 사극자 질량 분광계 상에서 수행된 바와 같은 독특한 SRM/MRM 검정을 정확하게 규정하는 특징적이고 독특한 SRM/MRM 특색 피크를 가짐)

[0038] b. SRM/MRM 질량 분광계 분석으로부터 독특한 SRM/MRM 특색 피크 면적의 함수로서, 검출되는 BRAF 단백질의 단편 펩타이드의 양이 특정 단백질 용해물 중 단백질의 상대적 및 절대적 양 둘 다를 나타낼 수 있도록 SRM/MRM 분석을 수행

[0039] i. 다음에 의해 달성될 수 있는 상대적 정량화:

[0040] 1. 하나의 포르말린 고정 생체 시료로부터 리퀴드 티슈 용해물에서 검출되는 주어진 BRAF 펩타이드로부터의 SRM/MRM 특색 피크 면적을, 적어도 제2, 제3, 제4 또는 그 이상의 포르말린 고정 생체 시료로부터의 적어도 제2, 제3, 제4 또는 그 이상의 리퀴드 티슈 용해물에서 동일한 BRAF 단편 펩타이드의 동일한 SRM/MRM 특색 피크 면적과 비교함으로써 BRAF 단백질의 증가 또는 감소된 존재를 결정

[0041] 2. 하나의 포르말린 고정 생체 시료로부터 리퀴드 티슈 용해물에서 검출되는 주어진 BRAF 펩타이드로부터의 SRM/MRM 특색 피크 면적을, 상이한 그리고 별개의 생물학적 공급원으로부터 유래된 다른 시료에서 다른 단백질로부터의 단편 펩타이드로부터 전개된 SRM/MRM 특색 피크 면적과 비교함으로써 BRAF 단백질의 증가 또는 감소된 존재를 결정(여기서, 펩타이드 단편에 대한 2개의 시료 사이의 SRM/MRM 특색 피크 면적 비교는 각각의 시료에서 분석된 단백질의 양에 대하여 정규화됨).

[0042] 3. 다양한 세포 조건 하에서 BRAF 단백질의 변경 수준을 발현 수준을 변경시키지

않는 다른 단백질의 수준에 대하여 정규화하도록 주어진 BRAF 펩타이드에 대한 SRM/MRM 특색 피크 면적을, 포르말린 고정 생체 시료로부터의 동일한 리퀴드 티슈 용해물 내 상이한 단백질로부터 유래된 다른 단편 펩타이드로부터의 SRM/MRM 특색 피크 면적과 비교함으로써 BRAF 단백질의 증가 또는 감소된 존재를 결정.

[0043] 4. 이러한 검정은 BRAF 단백질의 비변형 단편 펩타이드 및 변형 단편 펩타이드 둘 다에 적용할 수 있음(여기서, 변형은 인산화 및/또는 글리코실화를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니며, 그리고 변형 펩타이드의 상대적 수준은 비변형 펩타이드의 상대적 양을 결정하는 것과 동일한 방식으로 결정됨).

[0044] ii. 주어진 펩타이드의 절대적 정량화는 개별적인 생체 시료 중의 BRAF 단백질로부터 주어진 단편 펩타이드에 대한 SRM/MRM 특색 피크 면적을, 생체 시료로부터 단백질 용해물에 가해진 내부 단편 펩타이드 표준의 SRM/MRM 특색 피크 면적과 비교함으로써 달성될 수 있음

[0045] 1. 내부 표준은 조사 중인 BRAF 단백질로부터 단편 펩타이드의 표지화된 합성 형태임. 이러한 표준은 기지의 양의 시료에 가해지고, SRM/MRM 특색 피크 면적은 내부 단편 펩타이드 표준 및 생체 시료 중의 천연 단편 펩타이드 둘 다에 대하여 개별적으로 결정된 다음, 두 피크 면적을 비교할 수 있음.

[0046] 2. 이는 비변형 단편 펩타이드 및 변형 단편 펩타이드에 적용될 수 있음(여기서, 변형은 인산화 및/또는 글리코실화를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니며, 그리고 변형 펩타이드의 절대 수준은 비변형 펩타이드의 절대 수준을 결정하는 것과 동일한 방식으로 결정될 수 있음).

[0047] 3. 암 진단 및 치료에 단편 펩타이드 정량화의 적용

[0048] a. BRAF 단백질의 단편 펩타이드 수준의 상대적 및/또는 절대적 정량화를 수행하고, 암 분야에서 잘 이해되는 바와 같이, 환자 종양 조직에서 암의 병기/등급/상태에 대한 BRAF 단백질 발현의 앞서 결정된 연관성이 확인되는 것을 입증

[0049] b. BRAF 단백질의 단편 펩타이드 수준의 상대적 및/또는 절대적 정량화를 수행하고 상이한 처리 전략으로부터의 임상 결과와의 상관관계를 입증하되, 이러한 상관관계는 이미 업계에서 입증되었거나 환자의 코호트 및 환자로부터의 조직에 걸쳐 상관관계 연구를 통해 장래에 입증될 수 있음. 일단 앞서 확립된 상관관계 또는 장래에 유도될 상관관계가 이러한 검정에 의해 확인된다면, 검정 방법은 최적의 치료 전략을 결정하는 데 사용될 수 있음

[0050] 도 1은 포르말린 고정 생체 시료로부터의 리퀴드 티슈 용해물에 대해 수행된 단일의 SRM/MRM 검정의 일례를 나타낸다. SRM/MRM 검정은 삼중 사극자 질량 분광계 상에서 BRAF 단백질의 정량화를 위하여 단일 펩타이드에 대해서 전개되었다. 이 BRAF 펩타이드(서열 LLFQGFR)에 대한 특이적 및 독특한 특징은 이온 트랩 및 삼중 사극자 질량 분광계 둘 다에서 모든 BRAF 펩타이드의 분석에 의해 전개되었고 도 1a에 도시되어 있다. 그 정보는 펩타이드의 단일 동위원소 질량, 그의 전구체 하전 상태, 전구체 m/z 값, 전구체의 전이 m/z 값, 및 식별된 전이의 각각의 이온 유형을 포함한다. 정보는 각각 및 모든 후보 SRM/MRM 펩타이드에 대하여 포르말린 고정 시료/조직으로부터 리퀴드 티슈 용해물에서 직접적으로 실험으로 결정되어야 하는데; 이는 흥미롭게도 BRAF 단백질 유래의 모든 펩타이드가 본 명세서에 기재된 바와 같은 SRM/MRM을 사용하여 이와 같은 용해물에서 검출될 수 없기 때문이며, 이는 검출되지 않은 BRAF 펩타이드가 포르말린 고정 시료/조직으로부터 리퀴드 티슈 용해물에서 직접적으로 펩타이드/단백질을 정량화하는 데 사용하기 위하여 SRM/MRM 검정을 전개하기 위하여 후보 펩타이드로 고려될 수 없음을 나타낸다.

[0051] 도 1b에 도시된 바와 같이, 이 특정 SRM/MRM 검정은 삼중 사극자 질량 분광계 상에서 실행되었다. 이 실험에서의 실험 시료는, 조직 대용물로서 작용하도록 포르말린으로 고정되고 파라핀으로 포매된 세포주로부터 제작된 리퀴드 티슈 단백질 용해물이었다. 이 검정으로부터의 데이터는, 포르말린 고정 시료에서 이러한 BRAF 펩타이드에 대한 독특한 SRM/MRM 특색 피크의 존재를 나타낸다.

[0052] 도 1c는 포르말린 고정 생체 시료에서 전술한 펩타이드를 정량적으로 측정하는 데 사용된 이 펩타이드에 대한 특이적 전이 이온 특징을 나타낸다. 이들 데이터는 분석된 단백질 용해물의 마이크로그램 당 펩타이드의 몰량의 함수로서 이러한 BRAF 펩타이드의 절대적 양을 나타낸다. 포르말린 고정 환자-유래 조직의 분석에 기초한 조직 내 BRAF 단백질 수준의 평가는 각각의 특정 환자에 대한 진단, 예후, 및 치료-관련 정보를 제공할 수 있다. 일 실시형태에서, 이러한 개시 내용은, 질량 분광법을 사용하여 생체 시료로부터 제작된 단백질 소화물(digest) 중 하나 이상의 변형 또는 비변형 BRAF 단편 펩타이드의 양을 검출 및/또는 정량화하는 단계; 및 상기 시료 중 변형 또는 비변형 BRAF 단백질의 수준을 산출하는 단계를 포함하는, 생체 시료에서 세린/트레오닌-단백질 키나제

B-raf(BRAF) 단백질의 수준을 측정하는 방법을 기재하되; 여기서 상기 수준은 상대적 수준 또는 절대적 수준이다. 관련 실시형태에서, 하나 이상의 BRAF 단편 펩타이드를 정량화하는 것은, 기지의 양의 첨가된 내부 표준 펩타이드와의 비교에 의해 생체 시료 중 BRAF 단편 펩타이드의 각각의 양을 결정하는 것을 포함하되, 여기서 생체 시료 중 BRAF 단편 펩타이드의 각각은 동일한 아미노산 서열을 가지는 내부 표준 펩타이드와 비교된다. 일부 실시형태에서, 동위원소로 표지된 내부 표준 펩타이드인 내부 표준은 ^{18}O, ^{17}O, ^{34}S, ^{15}N, ^{13}C, ^{2}H 또는 이의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 안정적인 중동위원소를 포함한다.

[0053] 본 명세서에 기재된 생체 시료 중 BRAF 단백질(또는 이의 대용물로서의 단편 펩타이드)의 수준을 측정하는 방법은 환자 또는 대상체에서 암의 진단 및/또는 예후지표로서 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, BRAF 단백질의 수준의 측정으로부터의 결과는 조직에서 발견되는 BRAF 단백질의 수준을, 정상 및/또는 암 또는 전암 조직에서 발견되는 단백질의 수준과의 상관관계를 보여줌으로써(예컨대, 비교함으로써) 암의 진단 병기/등급/상태 및/또는 예후 상태를 결정하는 데 이용될 수 있다.

[0054] 핵산 및 단백질 둘 다 동일한 리퀴드 티슈(상표명) 생체분자 제조물로부터 분석될 수 있으므로, 단백질이 분석될 때 동일한 시료 중의 핵산으로부터 질환 진단 및 약물 치료 결정에 대한 추가적인 정보를 생성하는 것이 가능하다. 예를 들어, BRAF 단백질이 특정 세포에 의해 증가된 수준에서 발현된다면, SRM에 의해 검정될 때, 데이터는 세포의 상태 및 비제어 성장에 대한 세포 잠재력에 대한 정보를 제공할 수 있고, 암의 잠재적인 약물 저항성 및 개발이 얻어질 수 있다. 동시에, BRAF 유전자의 상태 및/또는 유전자가 암호화하는 핵산 및 단백질에 대한 정보(예컨대, mRNA 분자 및 이들의 발현 수준 또는 스플라이스 변화)는 동일한 리퀴드 티슈(상표명) 생체분자 제조물에 존재하는 핵산으로부터 얻어질 수 있고, BRAF 단백질의 SRM 검정에 대하여 동시에 평가될 수 있다. BRAF 및 동일한 생체분자 제조물에 존재하는 것으로부터의 유래가 아닌 임의의 유전자 및/또는 핵산은 BRAF 단백질의 SRM 분석에 대하여 동시에 평가될 수 있다. 일 실시형태에서, BRAF 단백질 및/또는 하나, 둘, 셋, 넷 또는 그 이상의 추가적인 단백질에 대한 정보가 이들 단백질을 암호화하는 핵산을 조사함으로써 평가될 수 있다. 이러한 핵산은, 예를 들어, 서열결정 방법, 중합효소 연쇄 반응 방법, 제한 단편 다형성 분석, 결실, 삽입의 식별 및/또는, 단일 염기쌍 다형성, 전이, 전환, 또는 이들의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아닌 돌연변이의 존재의 결정 중 하나 이상, 둘 이상, 또는 셋 또는 그 이상에 의해 조사될 수 있다.

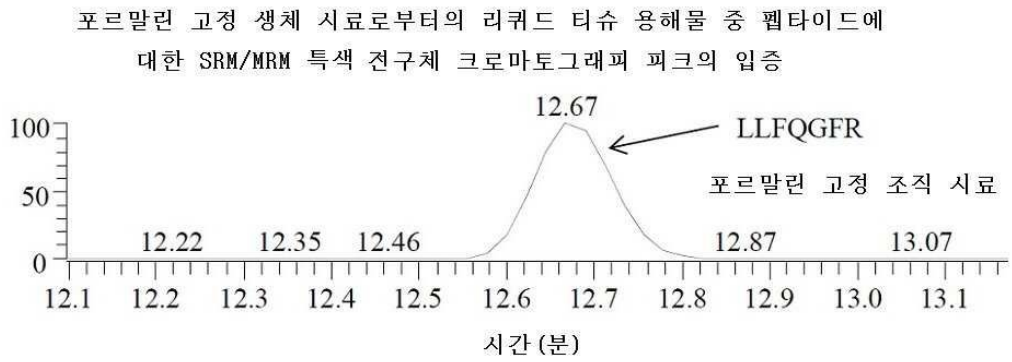
도면

도면1a

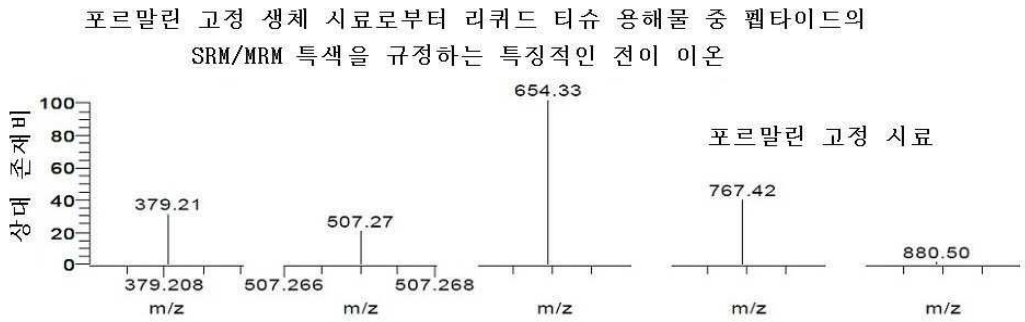
포르말린 고정 생체 시료로부터 리퀴드 티슈 용해물 중 펩타이드의 SRM/MRM 특색 크로마토그래피 피크를 규정하는 특징

펩타이드 서열	단일 동위원소 질량	전구체 하전 상태	전구체 m/z	전이 m/z	이온 유형
LLFQGFR	879.4966	2	440.756	379.208	y3
		2	440.756	507.267	y4
		2	440.756	654.335	y5
		2	440.756	767.419	y6
		2	440.756	880.503	y7

도면1b



도면1c



서 열 목 록

<110> AB Enzymes Oy

<120> A novel fungal protease and use thereof

<130> A9273PC

<150> FI 20095497

<151> 2009-04-30

<160> 15

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Fusarium equiseti

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Sequence of an aminoterminal peptide #3792 from Fusarium equiseti RF6318 protease.

<220><221> VARIANT

<222> (18)..(18)

<223> /replace= "Ser"

<220><221> VARIANT

<222> (18)..(18)

<223> /replace= "Thr"

<220><221> VARIANT

<222> (18)..(18)

<223> /replace= "Arg"

<400> 1

Ala Leu Thr Thr Gln Ser Asn Ala Pro Trp Gly Leu Ala Ala Ile Ser

1 5 10 15

Arg Cys Thr Pro

20

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Fusarium equiseti

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Sequence of a tryptic peptide 1246.673 from Fusarium equiseti RF6318 protease.

<400> 2

Thr Val Ala Ala Ala Asp Ser Ser Trp Arg

1 5 10

<210

> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Fusarium equiseti

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Sequence of a tryptic peptide 3341.633 from Fusarium equiseti RF6318 protease.

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 3

Xaa Thr Tyr Gly Val Ala Lys

1 5

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Fusarium equiseti

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Sequence of a tryptic peptide 1503.799 from Fusarium equiseti

RF6318 protease

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace= "Ile"

<400> 4

Glu Ala Leu Thr Val Gly Ala Thr Thr Ser Ala Asp Ala Lys

1 5 10

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> The sequence of the oligonucleotide primer PRO87 derived from the aminoterminal peptide SEQ ID NO:1.

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> r is a or g

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> y is t or c

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 5

cartcnaayg cnccntgggg 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> The sequence of the oligonucleotide primer PRO88 derived from the aminoterminal peptide SEQ ID NO:1.

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> r is a or g

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> y is t or c

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> y is t or c

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 6

caragyaayg cnccntgggg 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> The sequence of the oligonucleotide primer PRO89 derived from

peptide SEQ ID NO:4.

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> r is a or g

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 7

gcrtcngcng angtngtngc 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> The sequence of the oligonucleotide primer PRO90 derived from

peptide SEQ ID NO:4.

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> r is a or g

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> r is a or g

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 8

gcrtcngcrc tngtngtngc 20

<210> 9

<211> 866

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> The sequence of the PCR fragment obtained using the primers PRO88 (SEQ ID NO:6) and PRO89 (SEQ ID NO:7) and Fusarium equiseti RF6318 genomic DNA as a template.

<400> 9

aaagcaacgc accgtggggt cttgctgcca tctcccgccg aacccccggt ggcagcacct 60

acacctacga caccactgcc ggtgccggta cttacggtta cgtcgttgac tctggtatca 120

acaccgccca cactgacttt ggcggccgtg cttctctcgg ttacaacgct gctggtggcg 180

cccacactga taccttggc cacggtaccc acgttgctgg taccattgcc tccaacacct 240

acggtgttgc caagcgtgta agtacaatca taccccacat gagctacaac atgatctgaa 300

ctttatactt actattatta ggccaacgtc atctctgtca aggttttcgt cggtaaccaa 360

gcttctacct ctgttatcct tgctggtttc aactgggctg tcaacgacat cacctccaga 420

accgtgctag cccgctctgt catcaacatg tctctcggtg gtccctcttc tcagacctgg 480

gctactgcca tcaacgctgc ctacagccaa ggtgtcctct ccgttgttgc tgccggtaac 540

ggtgattcca acggtcgtcc tctccccgcc tctggccagt ctcctgccaa cgttcccaac 600

gctatcaccg ttgctgccgc cgactccagc tggcgaactg cctctttcac caactacggt 660

cctgaggtcg atgtcttcgg tcctggtgtc aacatccagt ccacctggta cacctccaac 720

agcgctacca acaccatcag cggtacctcc atggcttgcc ctcacgttgc tggtcttgct 780

ctctacctcc aggctctcga gaacctcaat acccctgctg ccgtcaccaa ccgcatcaag 840

tctcttgcaa ctacctccgc tgacgc 866

<210> 10

<211> 1303

<212> DNA

<213> Fusarium equiseti

<220><221> misc_feature

<223> The nucleotide sequence of the full-length Fusarium equiseti RF6318 protease gene (Fe prtS8A) .

<400> 10

atgactagct tccgccgtat cgctcttggc cttgcagctc tgctgcccgc agtcctcgcc 60

gctcccaccg agaagcgaca ggagctcact gccgcgcctg acaagtacat catcaccctc 120

aagcccgagg ctgctgaggc caaggtcgag gctcacatgg cctgggttac cgacgtccac 180

cgccgcagcc tcggcaagcg tgacacttcc ggtgttgaga agaagttcaa catcagcagc 240

tggaacgcct actctggcga gttcgacgat gctaccattg ctgagatcaa gaagagcccc 300

gaggttgcct tcgtcgagcc cgactacatt gtcaccctcg actacaaggt tgagcctctc 360

tctgaccgtg ctctgaccac tcagagcaac gctccttggg gtcttgctgc catctcccgc 420

cgaaccccg gtggcagcac ctacacctac gacaccactg ccggtgccgg tacttacggt 480

tacgtcgttg actctggtat caacaccgcc cacactgact ttggcggccg tgcttctctc 540

ggttacaacg ctgctggtgg cgcccacact gataccctg gccacggtac ccacgttgct 600

ggtaccattg cctccaacac ctacggtgtt gccaagcgtg taagtacaat catccccac 660

atgagctaca acatgatctg aactttatac ttactattat taggccaacg tcatctctgt 720

caaggttttc gtcggtaacc aagcttctac ctctgttatc cttgctggtt tcaactgggc 780

tgtcaacgac atcacctcca agaaccgtgc tagccgctct gtcatcaaca tgtctctcgg 840

tggtccctct tctcagacct gggctactgc catcaacgct gcctacagcc aaggtgtcct 900

ctccgttgtt gctgccggta acggtgattc caacggtcgt cctctccccg cctctggcca 960

gtctcctgcc aacgttccca acgctatcac cgttgctgcc gccgactcca gctggcgaac 1020

tgcctctttc accaactacg gtcctgaggt cgatgtcttc ggtcctggtg tcaacatcca 1080

gtccacctgg tacacctcca acagcgctac caacaccatc agcggtacct ccatggcttg 1140

ccctcacgtt gctggtcttg ctctctacct ccaggctctc gagaacctca ataccctgc 1200

tgccgtcacc aaccgcatca agtctcttgc cactaccggc cgcatcactg gcagcctcag 1260

cggcagcccc aacgccatgg ctttcaacgg cgctactgct taa 1303

<210> 11

<211> 412

<212> PRT

<213> Fusarium equiseti

<220><221> MISC_FEATURE

<223> The deduced amino acid sequence of the full-length Fusarium equiseti RF6318 protease (Fe_RF6318) including amino acids from Met1 to Ala412.

<400> 11

Met Thr Ser Phe Arg Arg Ile Ala Leu Gly Leu Ala Ala Leu Leu Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Asp Lys Tyr Ile Ile Thr Leu Lys Pro Glu Ala Ala Glu Ala Lys

35 40 45

Val Glu Ala His Met Ala Trp Val Thr Asp Val His Arg Arg Ser Leu

50 55 60

Gly Lys Arg Asp Thr Ser Gly Val Glu Lys Lys Phe Asn Ile Ser Ser

65 70 75 80

Trp Asn Ala Tyr Ser Gly Glu Phe Asp Asp Ala Thr Ile Ala Glu Ile

85 90 95

Lys Lys Ser Pro Glu Val Ala Phe Val Glu Pro Asp Tyr Ile Val Thr

100 105 110

Leu Asp Tyr Lys Val Glu Pro Leu Ser Asp Arg Ala Leu Thr Thr Gln

115 120 125

Ser Asn Ala Pro Trp Gly Leu Ala Ala Ile Ser Arg Arg Thr Pro Gly

130 135 140

Gly Ser Thr Tyr Thr Tyr Asp Thr Thr Ala Gly Ala Gly Thr Tyr Gly
145 150 155 160
Tyr Val Val Asp Ser Gly Ile Asn Thr Ala His Thr Asp Phe Gly Gly
165 170 175
Arg Ala Ser Leu Gly Tyr Asn Ala Ala Gly Gly Ala His Thr Asp Thr
180 185 190
Leu Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ser Asn Thr Tyr

195 200 205
Gly Val Ala Lys Arg Ala Asn Val Ile Ser Val Lys Val Phe Val Gly
210 215 220
Asn Gln Ala Ser Thr Ser Val Ile Leu Ala Gly Phe Asn Trp Ala Val
225 230 235 240
Asn Asp Ile Thr Ser Lys Asn Arg Ala Ser Arg Ser Val Ile Asn Met
245 250 255
Ser Leu Gly Gly Pro Ser Ser Gln Thr Trp Ala Thr Ala Ile Asn Ala

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

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

385 390 395 400

Ser Pro Asn Ala Met Ala Phe Asn Gly Ala Thr Ala

405 410

<210> 12

<211> 1243

<212> DNA

<213> Fusarium equiseti

<220><221> misc_feature

<223> The nucleotide sequence encoding the amino acid sequence of the proenzyme form of Fusarium equiseti RF6318 protease.

<400> 12

gctcccaccg agaagcgaca ggagctcact gccgcgcctg acaagtacat catcaccctc 60

aagcccgagg ctgctgaggc caaggtcgag gctcacatgg cctgggttac cgacgtccac 120

cgccgcagcc tcggcaagcg tgacacttcc ggtgttgaga agaagttcaa catcagcagc 180

tggaacgcct actctggcga gttcgacgat gctaccattg ctgagatcaa gaagagcccc 240

gaggttgcct tcgtcgagcc cgactacatt gtcaccctcg actacaaggt tgagcctctc 300

tctgaccgtg ctctgaccac tcagagcaac gctccttggg gtcttgctgc catctcccgc 360

cgaaccccg gtggcagcac ctacacctac gacaccactg ccggtgccgg tacttacggt 420

tacgtcgttg actctggtat caacaccgcc cacactgact ttggcggccg tgcttctctc 480

ggttacaacg ctgctggtgg cgcccacact gataccctg gccacggtac ccacgttgct 540

ggtaccattg cctccaacac ctacggtgtt gccaagcgtg taagtacaat cataccccac 600

atgagctaca acatgatctg aactttatac ttactattat taggccaacg tcatctctgt 660

caaggttttc gtcggtaacc aagcttctac ctctgttatc cttgctggtt tcaactgggc 720

tgtcaacgac atcacctcca agaaccgtgc tagccgctct gtcatcaaca tgtctctcgg 780

tggtccctct tctcagacct gggctactgc catcaacgct gcctacagcc aaggtgtcct 840

ctccgttgtt gctgccggta acggtgattc caacggtcgt cctctccccg cctctggcca 900

gtctcctgcc aacgttccca acgctatcac cgttgctgcc gccgactcca gctggcgaac 960

tgcctctttc accaactacg gtcctgaggt cgatgtcttc ggtcctggtg tcaacatcca 1020

gtccacctgg tacacctcca acagcgctac caacaccatc agcggtacct ccatggcttg 1080

ccctcacgtt gctggtcttg ctctctacct ccaggctctc gagaacctca ataccctgc 1140

tgccgtcacc aaccgcatca agtctcttgc cactaccggc cgcatcactg gcagcctcag 1200

cggcagcccc aacgccatgg ctttcaacgg cgctactgct taa 1243

<210> 13

<211> 392

<212> PRT

<213> Fusarium equiseti

<220><221> MISC_FEATURE

<223> The amino acid sequence of the proenzyme form of Fusarium

equiseti RF6318 protease including amino acids Ala21 to Ala 412

of the full length protease.

<400> 13

Ala Pro Thr Glu Lys Arg Gln Glu Leu Thr Ala Ala Pro Asp Lys Tyr
1 5 10 15

Ile Ile Thr Leu Lys Pro Glu Ala Ala Glu Ala Lys Val Glu Ala His
20 25 30

Met Ala Trp Val Thr Asp Val His Arg Arg Ser Leu Gly Lys Arg Asp
35 40 45

Thr Ser Gly Val Glu Lys Lys Phe Asn Ile Ser Ser Trp Asn Ala Tyr
50 55 60

Ser Gly Glu Phe Asp Asp Ala Thr Ile Ala Glu Ile Lys Lys Ser Pro
65 70 75 80

Glu Val Ala Phe Val Glu Pro Asp Tyr Ile Val Thr Leu Asp Tyr Lys
85 90 95

Val Glu Pro Leu Ser Asp Arg Ala Leu Thr Thr Gln Ser Asn Ala Pro
100 105 110

Trp Gly Leu Ala Ala Ile Ser Arg Arg Thr Pro Gly Gly Ser Thr Tyr
115 120 125

Thr Tyr Asp Thr Thr Ala Gly Ala Gly Thr Tyr Gly Tyr Val Val Asp
130 135 140

Ser Gly Ile Asn Thr Ala His Thr Asp Phe Gly Gly Arg Ala Ser Leu
145 150 155 160

Gly Tyr Asn Ala Ala Gly Gly Ala His Thr Asp Thr Leu Gly His Gly
165 170 175

Thr His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ser Asn Thr Tyr Gly Val Ala Lys
180 185 190

Arg Ala Asn Val Ile Ser Val Lys Val Phe Val Gly Asn Gln Ala Ser
195 200 205

Thr Ser Val Ile Leu Ala Gly Phe Asn Trp Ala Val Asn Asp Ile Thr
210 215 220

Ser Lys Asn Arg Ala Ser Arg Ser Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Ser Gln Thr Trp Ala Thr Ala Ile Asn Ala Ala Tyr Ser Gln
245 250 255

Gly Val Leu Ser Val Val Ala Ala Gly Asn Gly Asp Ser Asn Gly Arg
260 265 270

Pro Leu Pro Ala Ser Gly Gln Ser Pro Ala Asn Val Pro Asn Ala Ile
275 280 285

Thr Val Ala Ala Ala Asp Ser Ser Trp Arg Thr Ala Ser Phe Thr Asn
290 295 300

Tyr Gly Pro Glu Val Asp Val Phe Gly Pro Gly Val Asn Ile Gln Ser
305 310 315 320

Thr Trp Tyr Thr Ser Asn Ser Ala Thr Asn Thr Ile Ser Gly Thr Ser
325 330 335

Met Ala Cys Pro His Val Ala Gly Leu Ala Leu Tyr Leu Gln Ala Leu
340 345 350

Glu Asn Leu Asn Thr Pro Ala Ala Val Thr Asn Arg Ile Lys Ser Leu
355 360 365

Ala Thr Thr Gly Arg Ile Thr Gly Ser Leu Ser Gly Ser Pro Asn Ala
370 375 380

Met Ala Phe Asn Gly Ala Thr Ala
385 390

<210> 14

<211> 934

<212> DNA

<213> Fusarium equiseti

<220><221> misc_feature

<223> The nucleotide sequence encoding the amino acid sequence of the mature form of Fusarium equiseti RF6318 protease.

<400> 14

gctctgacca ctcagagcaa cgctccttgg ggtcttgctg ccatctcccg ccgaaccccc 60

ggtggcagca cctacaccta cgacaccact gccggtgccg gtacttacgg ttacgtcgtt 120

gactctggta tcaacaccgc ccacactgac tttggcggcc gtgcttctct cggttacaac 180

gctgctggtg gcgcccacac tgataccctt ggccacggta cccacgttgc tggtaccatt 240

gcctccaaca cctacggtgt tgccaagcgt gtaagtacaa tcatacccca catgagctac 300

aacatgatct gaactttata cttactatta ttaggccaac gtcatctctg tcaaggtttt 360

cgtcggtaac caagcttcta cctctgttat ccttgctggt ttcaactggg ctgtcaacga 420

catcacctcc aagaaccgtg ctagccgctc tgtcatcaac atgtctctcg gtggtccctc 480

ttctcagacc tgggctactg ccatcaacgc tgcctacagc caaggtgtcc tctccgttgt 540

tgctgccggt aacggtgatt ccaacggtcg tcctctcccc gcctctggcc agtctcctgc 600

caacgttccc aacgctatca ccgttgctgc cgccgactcc agctggcgaa ctgcctcttt 660

caccaactac ggtcctgagg tcgatgtctt cggtcctggt gtcaacatcc agtccacctg 720

gtacacctcc aacagcgcta ccaacaccat cagcggtacc tccatggctt gccctcacgt 780

tgctggtctt gctctctacc tccaggctct cgagaacctc aataccccctg ctgccgtcac 840

caaccgcatc aagtctcttg ccactaccgg ccgcatcact ggcagcctca gcggcagccc 900

caacgccatg gctttcaacg gcgctactgc ttaa 934

<210> 15

<211> 289

<212> PRT

<213> Fusarium equiseti

<220><221> MISC_FEATURE

<223> The amino acid sequence of the mature form of Fusarium equiseti RF6318 protease including amino acids Ala124 to Ala412 of the full legth enzyme.

<400> 15

Ala Leu Thr Thr Gln Ser Asn Ala Pro Trp Gly Leu Ala Ala Ile Ser
1 5 10 15

Arg Arg Thr Pro Gly Gly Ser Thr Tyr Thr Tyr Asp Thr Thr Ala Gly

20 25 30

Ala Gly Thr Tyr Gly Tyr Val Val Asp Ser Gly Ile Asn Thr Ala His

35 40 45

Thr Asp Phe Gly Gly Arg Ala Ser Leu Gly Tyr Asn Ala Ala Gly Gly

50 55 60

Ala His Thr Asp Thr Leu Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile

65 70 75 80

Ala Ser Asn Thr Tyr Gly Val Ala Lys Arg Ala Asn Val Ile Ser Val

85 90 95

Lys Val Phe Val Gly Asn Gln Ala Ser Thr Ser Val Ile Leu Ala Gly

100 105 110

Phe Asn Trp Ala Val Asn Asp Ile Thr Ser Lys Asn Arg Ala Ser Arg

115 120 125

Ser Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Ser Gln Thr Trp Ala

130 135 140

Thr Ala Ile Asn Ala Ala Tyr Ser Gln Gly Val Leu Ser Val Val Ala

145 150 155 160

Ala Gly Asn Gly Asp Ser Asn Gly Arg Pro Leu Pro Ala Ser Gly Gln

165 170 175

Ser Pro Ala Asn Val Pro Asn Ala Ile Thr Val Ala Ala Ala Asp Ser

180 185 190

Ser Trp Arg Thr Ala Ser Phe Thr Asn Tyr Gly Pro Glu Val Asp Val

195 200 205

Phe Gly Pro Gly Val Asn Ile Gln Ser Thr Trp Tyr Thr Ser Asn Ser

210 215 220

Ala Thr Asn Thr Ile Ser Gly Thr Ser Met Ala Cys Pro His Val Ala

225 230 235 240

Gly Leu Ala Leu Tyr Leu Gln Ala Leu Glu Asn Leu Asn Thr Pro Ala

245 250 255

Ala Val Thr Asn Arg Ile Lys Ser Leu Ala Thr Thr Gly Arg Ile Thr

260 265 270

Gly Ser Leu Ser Gly Ser Pro Asn Ala Met Ala Phe Asn Gly Ala Thr

275 280 285

Ala

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 15

【변경전】

제11항에 있어서,

【변경후】

제14항에 있어서,