(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월13일
(11) 등록번호 10-2728491
(24) 등록일자 2024년11월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *C07K 14/81* (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01) *G01N 30/88* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C07K 14/8139 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7020049
(22) 출원일자(국제) 2016년12월15일
심사청구일자 2021년12월14일
(85) 번역문제출일자 2018년07월12일
(65) 공개번호 10-2018-0134838
(43) 공개일자 2018년12월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/066936
(87) 국제공개번호 WO 2017/106504
국제공개일자 2017년06월22일
(30) 우선권주장
62/267,734 2015년12월15일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020150106006 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
다케다 파머수티컬 컴패니 리미티드
일본 오사카시 쥬오구 도쇼마찌 4 쪼메 1-1
(72) 발명자
우 지앙
미국 매사추세츠주 01803 벌링턴 55 넷워크 드라이브
장 궈동
미국 매사추세츠주 01803 벌링턴 55 넷워크 드라이브
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 박보현

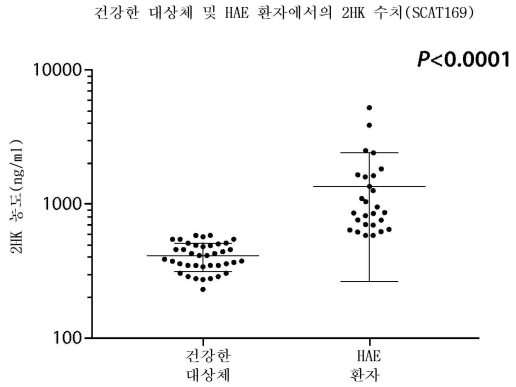
전체 청구항 수 : 총 31 항 심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 **전장 고분자량 키니노겐(HMWK) 및 절단된 HMWK를 구별하기 위한 펩타이드 정량화 검정법**

(57) 요 약

샘플에서 전장 고분자량 키니노겐(HMWK) 및 절단된 HMWK를 구별하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 이러한 방법은 생물학적 샘플을 프로테이나제에 의해 처리하여 복수의 분해된 펩타이드를 생성하는 단계 및 절단된 HMWK 및/또는 전장 HMWK를 나타내는 하나 이상의 서명 펩타이드를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
G01N 30/7233 (2013.01)
G01N 33/6848 (2013.01)
G01N 2030/8831 (2013.01)
G01N 2560/00 (2013.01)
G01N 2800/224 (2013.01)
(72) 발명자
섹스톤 다니엘 제이.
미국 매사추세츠주 02176 멜로즈 59 마빈 로드
파우셋 라이언
미국 매사추세츠주 02176 멜로즈 29 버치 힐 로드
무사타파 굴 엠.
미국 웨스트버지니아주 26505 모건타운 1311 파인 뷰 드라이브
즈젝 마크
미국 웨스트버지니아주 26505 모건타운 1311 파인 뷰 드라이브

명 세 서

청구범위

청구항 1

생물학적 샘플에서 절단된 고분자량 키니노겐(high molecular weight kininogen: HMWK)을 검출하는 방법으로서,

(ⅰ) HMWK를 함유하는 것으로 의심되는 샘플을 제공하는 단계,

(ii) 상기 샘플을 프로테아제와 접촉시켜 복수의 분해된 펩타이드를 생성하는 단계; 및

(iii) 상기 복수의 분해된 펩타이드에서 절단된 HMWK의 46 kDa 경쇄 또는 절단된 HMWK의 56 kDa 경쇄를 나타내는 서명 펩타이드(signature peptide)의 수준을 측정하는 단계를 포함하되,

상기 절단된 HMWK의 46 kDa 경쇄를 나타내는 서명 펩타이드는

KHNLGHGH (서열 번호 1),

KHNLGHGHKHE (서열 번호 2),

KHNLGHGHK (서열 번호 3),

KHNLGHGHKHER (서열 번호 4)이고; 또는 상기 절단된 HMWK의 56 kDa 경쇄를 나타내는 서명 펩타이드는 SSRIGE (서열 번호 5)인, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 프로테아제는 키모트립신, 엔도프로테이나제 Glu-C, 엔도프로테이나제 Asp-N, 카텝신 G 및 엔도프로테이나제 Lys-C로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 전장 HMWK를 나타내는 서명 펩타이드의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 전장 HMWK를 나타내는 서명 펩타이드는,

GHEKQRKH(서열 번호 6);

KQRKHNLGHGHKHE(서열 번호 7);

DWGHEKQRKHNLGHGHKHER(서열 번호 17);

HNLGHGHK(서열 번호 9); 또는

SYYFDLTDGLS(서열 번호 10)인, 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 절단된 HMWK를 나타내는 서명 펩타이드의 수준, 상기 전장 HMWK를 나타내는 서명 펩타이드의 수준, 또는 둘 다는 액체 크로마토그래프-질량 분광법(LC-MS)에 의해 측정되는, 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 인간 대상체로부터 얻은 생물학적 샘플인, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 혈액 샘플 또는 혈장 샘플인, 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 인간 대상체는 유전성 혈관부종(hereditary angioedema: HAE)을 갖거나 갖는 것으로 의심되는, 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 (ii)는

(a) 환원제의 존재 하에서; 그리고/또는

(b) 프로테아제 저해제의 부재, 항응고제의 부재, 또는 프로테아제 저해제와 항응고제 둘 다의 부재 하에서,

수행되는, 방법.

청구항 10

제6항에 있어서,

(iv) 상기 인간 대상체가 HAE를 갖는지를 결정하는 단계를 추가로 포함하되, 미리 결정된 기준 값과 비교하여 상기 인간 대상체로부터 얻은 생물학적 샘플에서의 절단된 HMWK의 상승된 수준은 상기 인간 대상체가 HAE를 갖는다는 것을 나타내거나; 또는

(v) 상기 인간 대상체가 HAE 발작의 위험이 있는지를 결정하는 단계를 추가로 포함하되, 미리 결정된 기준 값과 비교하여 상기 인간 대상체로부터 얻은 생물학적 샘플에서의 절단된 HMWK의 상승된 수준은 상기 인간 대상체가 HAE 발작의 위험에 있다는 것을 나타내는, 방법.

청구항 11

샘플에서 전장 고분자량 키니노겐(HMWK) 및 절단된 HMWK를 구별하는 방법으로서,

(i) 전장 HMWK 및/또는 절단된 HMWK를 함유하는 것으로 의심되는 샘플을 제공하는 단계;

(ii) 상기 샘플을 프로테아제와 접촉시켜 복수의 분해된 펩타이드를 생성하는 단계;

(iii) 상기 단계 (ii)로부터 얻은 제1의 분해된 펩타이드의 수준을 측정하는 단계로서, 상기 제1의 분해된 펩타이드는 전장 HMWK와 비교하여 절단된 HMWK에 고유한, 상기 제1의 분해된 펩타이드의 수준을 측정하는 단계;

(iv) 상기 단계 (ii)로부터 얻은 제2의 분해된 펩타이드의 수준을 측정하는 단계로서, 상기 제2의 분해된 펩타이드는 저분자량 키니노겐(LMWK)과 비교하여 HMWK에 고유한, 상기 제2의 분해된 펩타이드의 수준을 측정하는 단계;

(v) 상기 제1의 분해된 펩타이드와 상기 제2의 분해된 펩타이드 사이의 비율을 결정하는 단계; 및

(vi) 상기 단계 (v)에서 결정된 비율을 기준으로, 상기 샘플에서 전장 HMWK로부터 절단된 HMWK를 구별하는 단계를 포함하되,

상기 제1의 분해된 펩타이드는 SSRIGE(서열 번호 5)이고 제2의 분해된 펩타이드는 SYYFDLTDGLS(서열 번호 10)인, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 프로테아제는 글루타메이트 산 잔기 이후를 절단하는, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 프로테아제는 엔도프로테이나제 Glu-C인, 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 제1의 분해된 펩타이드 및 상기 제2의 분해된 펩타이드는 LC-MS(liquid chromatography-

mass spectrometry)에 의해 측정되는, 방법.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 샘플은 인간 대상체로부터 얻은 생물학적 샘플인, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 혈액 샘플 또는 혈장 샘플인, 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 인간 대상체는 유전성 혈관부종(HAE)을 갖거나 갖는 것으로 의심되는, 방법.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 프로테아제 저해제의 혼합물을 포함하는 액체 제제를 포함하는 진공 혈액 수집 관에서 수집된 혈장 샘플인, 방법.

청구항 19

제15항에 있어서, 단계 (ii)는 환원제의 존재 하에 수행되는, 방법.

청구항 20

제11항에 있어서, 단계 (ii)는 프로테아제 저해제의 부재, 항응고제의 부재, 또는 프로테아제 저해제와 항응고제 둘 다의 부재 하에 수행되고; 그리고/또는

단계 (ii)에서 프로테아제/단백질의 비율은 1:20인, 방법.

청구항 21

제15항에 있어서, 상기 방법은,

(vii) 상기 인간 대상체가 HAE를 갖는지를 결정하는 단계로서, 여기서 미리 결정된 기준 값과 비교하여 상기 인간 대상체로부터 얻은 생물학적 샘플에서의 절단된 HMWK의 상승된 수준은 상기 인간 대상체가 HAE를 갖는다는 것을 나타내는, 상기 단계; 또는

(vii) 상기 인간 대상체가 HAE 발작의 위험이 있는지를 결정하는 단계로서, 여기서 미리 결정된 기준 값과 비교하여 상기 인간 대상체로부터 얻은 생물학적 샘플에서의 절단된 HMWK의 상승된 수준은 상기 인간 대상체가 HAE 발작의 위험에 있다는 것을 나타내는, 상기 단계;

를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 22

유전성 혈관부종(HAE)을 갖거나 이의 위험이 있는 대상체를 확인하는데 필요한 정보를 제공하는 방법으로서,

(ⅰ) 대상체의 생물학적 샘플을 제공하는 단계;

(ii) 상기 샘플을 프로테아제와 접촉시켜 복수의 분해된 펩타이드를 생성하는 단계;

(iii) 상기 복수의 분해된 펩타이드에서 제1 서명 펩타이드의 수준을 측정하는 단계로서, 상기 제1 서명 펩타이드는 절단된 HMWK를 나타내는, 상기 측정하는 단계; 및

(iv) 상기 절단된 HMWK의 수준을 기준으로, 상기 대상체가 HAE를 갖거나 HAE 발작의 위험이 있는지를 결정하는 단계로서, 여기서 미리 결정된 기준 값과 비교하여 상기 생물학적 샘플에서의 절단된 HMWK의 상승된 수준은 상기 대상체가 HAE를 갖거나 HAE 발작의 위험에 있다는 것을 나타내는, 상기 단계;

를 포함하되, 상기 제1 서명 펩타이드는 KHNLGHGH(서열 번호 1) 또는 SSRIGE (서열 번호 5)인, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 프로테아제는 키모트립신인, 방법.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 복수의 분해된 펩타이드에서 제2 서명 펩타이드의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하되, 상기 제2 서명 펩타이드는 HMWK를 나타내는, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 제1 서명 펩타이드와 상기 제2 서명 펩타이드 사이의 비율을 결정하는 단계를 추가로 포함하되, HAE를 갖거나 HAE 발작의 위험이 있는 대상체는 상기 제1 서명 펩타이드와 상기 제2 서명 펩타이드 사이의 비율을 기준으로 확인되는, 방법.

청구항 26

제24항에 있어서, 상기 프로테아제는 엔도프로테이나제 Glu-C 또는 카텝신이고; 상기 제1 서명 펩타이드는 SSRIGE(서열 번호 5)이고, 상기 제2 서명 펩타이드는 SYYFDLTDGLS(서열 번호 10)인, 방법.

청구항 27

제24항에 있어서,

(ⅰ) 상기 제1 서명 펩타이드, 상기 제2 서명 펩타이드, 또는 둘 다는 LC-MS(liquid chromatography-mass spectrometry)에 의해 측정되고; 그리고

(ii) 상기 생물학적 샘플은 혈액 샘플 또는 혈장 샘플인, 방법.

청구항 28

제7항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 정상 혈장 샘플, FXIIa에 의해 활성화된 혈장 샘플, 또는 비-활성화된 혈장 샘플인, 방법.

청구항 29

제9항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 환원제와 함께 90℃에서 1시간 동안 배양되는, 방법.

청구항 30

제16항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 정상 혈장 샘플, FXIIa에 의해 활성화된 혈장 샘플, 또는 비-활성화된 혈장 샘플인, 방법.

청구항 31

제19항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 환원제와 함께 90℃에서 1시간 동안 배양되는, 방법.

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본원은 2015년 12월 15일자로 출원된 미국 가출원 제62/267,734호(이의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함됨)의 출원일의 이익을 주장한다.

배 경 기 술

[0003] 키니노겐은 브래디키닌 및 칼리딘과 같은 키닌의 전구체이다. 스플라이싱 변이체인 저분자량 키니노겐(low molecular-weight kininogen: LMWK) 및 고분자량 키니노겐(high molecular-weight kininogen: HMWK)인 인간 키니노겐의 2가지 종류가 있다. HMWK는 응고 및 염증에서 보인자로서 주로 작용하고, 혈장 칼리크레인(plasma kallikrein: pKal) 매개된 브래디키닌 생성을 위한 바람직한 기질이다. HMWK 및 LMWK 둘 다는 시스테인 프로테이나제 저해제이다.

[0004] HMWK는 혈액 응고의 개시에 참여하는 순환하는 혈장 단백질이다. HMWK는 또한 칼리크레인-키닌 시스템을 통해 혈관확장제 브래디키닌을 생성한다. HMWK는 내피세포, 단핵구 및 혈소판에서 세포 표면 수용체에 부착하여서,

응고 및 브래디키닌 생성을 국소화한다. HMWK로부터 방출된 활성 펩타이드 브래디키닌은 다양한 생리학적 효과를 보여준다. 평활근 수축, 저혈압, 이뇨, 혈당 수치의 감소와 같이, 이것은 염증의 매개자이고, 직접적으로 브래디키닌 작용을 통해, 간접적으로 내피세포 유래 이완 인자 작용을 통해 심장 보호 효과를 갖는다. 브래디키닌은 통증, 염증, 부종 및 혈관신생의 중요한 매개자이다.

[0005] 혈장 칼리크레인(pKal)은 순환 시 주요 브래디키닌 생성 효소이다. pKal의 활성화는 접촉 시스템을 통해 발생하고, 이 시스템은 유전성 혈관부종(hereditary angioedema: HAE)과 연관된 질환 병리학과 연결된다. pKal은 HMWK(단쇄 폴리펩타이드)를 절단하여서 브래디키닌 및 절단된 형태 HMWK를 생성하고, 이는 다이설파이드 결합에 의해 함께 보유된 2개의 폴리펩타이드 사슬(중쇄 및 경쇄)을 함유한다. Cugno et al., Blood (1997) 89:3213-3218. 초기 절단된 HMWK에서의 경쇄는 대략 56kDa이고, 46kDa의 더 짧은 형태를 형성하도록 추가로 절단될 것이다.

[0006] 절단된 HMWK는 유전성 혈관부종(HAE) 발작 동안 총 키니노겐의 약 47%로 증가하여서, 이것이 HAE 발작을 모니터링하기 위한 바이오마커가 되게 한다. Cugno et al., 1997. 생물학적 샘플에서 절단된 HMWK의 수준을 검출하기 위한 민감하고 신뢰할만한 검정을 개발하는 것이 따라서 관심 있다.

발명의 내용

[0007] 본 개시내용은, 적어도 부분적으로, 민감하고 선택적인 검정 방법의 개발에 기초하고, 상기 방법은 전장 HMWK 및 절단된 HMWK를 구별하기 위해 예를 들어 다중 반응 모니터링(multiple reaction monitoring: MRM)을 이용한 액체 크로마토그래피-질량 분광법(LC-MS)을 수반할 수 있다. 이러한 검정 방법은 절단된 HMWK(예를 들어, 중쇄로부터의 C 말단 펩타이드 또는 경쇄로부터의 N 말단 펩타이드), 및/또는 (예를 들어, 저분자량 키니노겐에 대비된) 전장 HMWK를 나타내는 서명 펩타이드(signature peptide)를 이용한다.

[0008] 따라서, 본 개시내용의 일 양태는 샘플에서 절단된 고분자량 키니노겐(HMWK)을 검출하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 (ⅰ) HMWK를 함유하는 것으로 의심되는 샘플을 제공하는 단계, (ii) 샘플을 프로테이나제와 접촉시켜 복수의 분해된 펩타이드를 생성하는 단계; 및 (iii) 복수의 분해된 펩타이드에서 서명 펩타이드의 수준을 측정하는 단계(여기서, 서명 펩타이드는 절단된 HMWK를 나타냄)를 포함한다.

[0009] 몇몇 실시형태에서, 서명 펩타이드는 KHNLGHGH(서열 번호 1), KHNLGHGHKHE(서열 번호 2); KHNLGHGHK(서열 번호 3); 또는 KHNLGHGHKHER(서열 번호 4)(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 절단된 HMWK의 46kDa 경쇄를 나타낸다.

[0010] 몇몇 실시형태에서, 서명 펩타이드는 절단된 HMWK의 56kDa 경쇄, 예를 들어 SSRIGE(서열 번호 5)를 나타낸다.

[0011] 본 명세서에 기재된 방법은 GHEKQRKH(서열 번호 6); KQRKHNLGHGHKHE(서열 번호 7); DWGHKQRKHNLGHGHKHER(서열 번호 8); HNLGHGHK(서열 번호 9); 또는 SYYFDLTDGLS(서열 번호 10)(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 전장 HMWK를 나타내는 서명 펩타이드의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0012] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 샘플에서 전장 고분자량 키니노겐(HMWK) 및 절단된 HMWK를 구별하는 방법을 특징으로 하고, 상기 방법은 (ⅰ) 전장 HMWK 및/또는 절단된 HMWK를 함유하는 것으로 의심되는 샘플을 제공하는 단계; (ii) 샘플을 프로테이나제와 접촉시켜 복수의 분해된 펩타이드를 생성하는 단계; (iii) 단계 (ii)로부터 얻은 제1의 분해된 펩타이드(예를 들어, SSRIGE; 서열 번호 5)의 수준을 측정하는 단계(여기서, 제1의 분해된 펩타이드는 전장 HMWK(예를 들어, 절단된 HMWK에 대한 서명 펩타이드)와 비교할 때 절단된 HMWK에 고유함); (iv) 단계 (ii)로부터 얻은 제2의 분해된 펩타이드의 수준을 측정하는 단계(여기서, 제2의 분해된 펩타이드(예를 들어, SYYFDLTDGLS; 서열 번호 10)는 저분자량 키니노겐(LMWK)(예를 들어, HMWK에 대한 서명 펩타이드)과 비교하여 HMWK에 고유함); (ⅴ) 제1의 분해된 펩타이드와 제2의 분해된 펩타이드 사이의 비율을 결정하는 단계; 및 (vi) 단계 (ⅴ)에서 결정된 비율에 기초하여, 샘플에서 전장 HMWK로부터 절단된 HMWK를 구별하는 단계를 포함한다.

[0013] 본 명세서에 기재된 임의의 검정 방법에서, 샘플에서 HMWK를 분해시키는데 사용하기 위한 프로테이나제는 엔도프로테이나제, 키모트립신, 엔도프로테이나제 Glu-C, 엔도프로테이나제 Asp-N, 카텝신 G 또는 엔도프로테이나제 Lys-C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 임의의 서명 펩타이드는 액체 크로마토그래피-질량 분광법(LC- MS), 예를 들어 MRM-MS에 의해 측정될 수 있다.

[0014] 본 명세서에 기재된 임의의 검정 방법에서 분석하고자 하는 샘플은 인간 대상체, 예를 들어 유전성 혈관부종(HAE)을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 인간 환자로부터 얻은 생물학적 샘플(예를 들어, 혈액 샘플 또는 혈장 샘

플 또는 혈청 샘플)일 수 있다. 몇몇 예에서, 생물학적 샘플은 정상 혈장 샘플, FXIIa에 의해 활성화된 혈장 샘플 또는 비활성화된 혈장 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플이 혈장 샘플일 때, 이것은 프로테이나제 저해제의 혼합물을 포함하는 액체 제제를 포함하는 진공 혈액 수집 관(예를 들어, 샘플 수집 항응고제 관, "SCAT 관")에서 수집될 수 있다.

[0015] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 검정 방법의 프로테이나제 분해 단계는 환원제, 예를 들어 DTT, BME 또는 TCEP의 존재 하에 수행될 수 있다. 예를 들어, 생물학적 샘플은 1시간 동안 90℃에서 환원제와 항온처리될 수 있다. 몇몇 예에서, 프로테이나제 분해 단계는 프로테이나제 저해제, 항응고제(예를 들어, 시트레이트), 또는 둘 다의 부재 하에 수행될 수 있다. 몇몇 예에서, 프로테이나제/단백질의 비율은 약 1:20이고, 예를 들어 Glu C/단백질은 1:20이다.

[0016] 임의의 검정 방법은 HAE 진단 및/또는 예후에 적용될 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 또한 HAE를 갖는 인간 대상체 또는 HAE 발작의 위험이 있는 HAE 환자를 확인하는 방법을 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 검정 방법에 의해 결정된 절단된 HMWK(예를 들어, 중쇄-경쇄 이합체, 중쇄 또는 경쇄, 예컨대 46kDa 경쇄 또는 56kDa 경쇄)의 수준은 인간 대상체가 HAE를 갖거나 HAE 발작의 위험이 있는지를 결정하기 위해 의존될 수 있고, 여기서 절단된 HMWK의 수준의 상승은 HAE 또는 HAE 발작의 위험을 나타낸다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 검정 방법에 의해 결정된 절단된 HMWK의 서명 펩타이드와 HMWK의 서명 펩타이드 사이의 비율은 인간 대상체가 HAE를 갖거나 HAE 발작의 위험이 있는지를 결정하기 위해 의존될 수 있고, 여기서 이러한 비율의 수준의 상승은 HAE 또는 HAE 발작을 나타낸다.

[0017] 본 발명의 하나 이상의 실시형태의 상세내용이 하기 설명에 기재되어 있다. 본 발명의 다른 특징 또는 이점은 하기 도면 및 몇몇 실시형태의 상세한 설명, 및 또한 첨부된 청구범위로부터 명확할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0018] **도 1**은 MRM 분석에 의해 최적 온도에서 혈장에서 발견된 절단된 HMWK(예를 들어, 56kDa 경쇄) 및 상업적으로 구입 가능한 HMWK(HK) 샘플의 효소 분해로부터 얻은 예시적인 펩타이드를 보여주는 다이어그램이다. 이 도면은 각각 상부로부터 하부로 서열 번호 5, 19, 24 및 21을 도시한다.

도 2는 HMWK 표준품의 25℃ 및 37.5℃에서의 Glu C 분해에 의해 생성된 펩타이드를 보여주는 다이어그램이고, 이 표준품은 Sigma(HK_Sigma) 또는 Enzyme Research(HK_Enzyme Research)로부터 얻었다. 이 도면은 각각 상부로부터 하부로 서열 번호 5, 19, 24, 30, 29 및 7을 도시한다.

도 3은 표적화 검정 MRM을 이용한 정상 및 HAE 혈장 샘플에서의 56kDa 경쇄의 프로테이나제 분해로부터 유래한 펩타이드 SSRIGE(서열 번호 5)의 정량화를 보여주는 챠트를 포함한다.

도 4는 표적화 검정 MRM을 이용한 정상 및 HAE 혈장 샘플에서의 HMWK 긴 펩타이드의 정량화를 보여주는 챠트를 포함한다.

도 5는 Glu C 분해된 HMWK 및 혈장 샘플에서의 SSRIGE(서열 번호 5)/SYYFDLTDGLS(서열 번호 10)의 비율을 보여주는 챠트이다.

도 6은 피크의 곡선 하 면적을 이용하여 SSRIGE(서열 번호 5)/SYYFDLTDGLS(서열 번호 10)의 평균 비율을 보여주는 챠트이다.

도 7은 건강한 개인으로부터 HAE 환자를 구별하기 위한 (46kDa 경쇄로 표시된) 절단된 HMWK의 농도를 보여주는 챠트이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 혈장 칼리크레인(pKal)은 접촉 시스템의 세린 프로테이나제 성분이고, 순환 시 1차 브래디키닌 생성 효소이다. 접촉 시스템은 프롤릴카복시펩티타제에 의해 외래 또는 음으로 하전된 표면 또는 내피 세포 표면에 대한 노출 시 XIIa 인자(XII 또는 FXII 인자의 활성 형태) 중 어느 하나에 의해 활성화된다(Sainz I.M. et al., Thromb Haemost 98, 77-83, 2007). 혈장 칼리크레인의 활성화는 XII 인자의 이의 피드백 활성화를 통해 내인성 응고를 증폭시키고, 키니노겐 전구체, 고분자량 키니노겐(HMWK)을 단백질분해로 절단하여서, 전염증성 노나펩타이드 브래디키닌 및 절단된 HMWK를 방출하고, 이는 다이설파이드 결합에 의해 연결된 2개의 폴리펩타이드 사슬(2-사슬 HMWK로도 공지됨)을 함유한다.

[0020] 순환에서의 주요 키니노게나제로서, 혈장 칼리크레인은 주로 맥관구조에서 브래디키닌의 생성을 담당한다. C1-저해제 단백질(C1-INH)의 유전자 결핍증은 유전성 혈관부종(HAE)을 발생시킨다. HAE를 갖는 환자는 미지의 촉발 물질이 대개 참여하는 통증이 있는 부종의 급성 발작을 겪는다(Zuraw B.L. et al., N Engl J Med 359, 1027-1036, 2008). 동물 모델에서의 약리학적 물질 또는 유전자 연구의 사용을 통해, 혈장 칼리크레인-키닌 시스템(혈장 KKS)은 다양한 질환에 연루된다.

[0021] 고분자량 키니노겐(HMWK)은 대략 110kDa의 분자량으로 단일 폴리펩타이드(1-사슬) 다중-도메인(도메인 1-6) 단백질로서 혈장에 존재한다. HMWK는 9개의 아미노산, 전염증성 펩타이드 브래디키닌 및 HMWK의 2-사슬 형태(절단된 키니노겐)를 방출하기 위해 도메인 4 내에 pKal에 의해 절단될 수 있다. HMWK의 2개의 사슬은 HMWK의 도메인 1-3을 함유하는 중쇄 및 HMWK의 도메인 5 및 6을 함유하는 경쇄이다. 중쇄는 대략 65kDa의 분자량을 갖는 한편, 경쇄는 대략 56 및 46kDa의 분자량으로 2개의 종으로서 존재한다.

[0022] 절단된 HMWK(예를 들어, 2-사슬 HMWK)의 수준은 HAE 발작, 및 다른 pKal 연관된 장애에서 상승한 것으로 발견되었다. 따라서, 절단된 HMWK는 질환 발생 및/또는 치료 효능을 모니터링하기 위한 바이오마커로서 작용할 수 있다. 그러나, 당해 분야는 이의 절단된 버전으로부터 온전한 HMWK를 효과적으로 구별할 수 있는 적합한 물질 및/또는 적합한 검정이 결여된다.

[0023] 본 개시내용은, 적어도 부분적으로, 절단된 HMWK, 예를 들어 2-사슬 HMWK의 경쇄(예를 들어, 46kDa 경쇄)를 나타내는 서명 펩타이드 및 HMWK(예를 들어, 전장 HMWK)를 나타내는 서명 펩타이드의 발견에 기초한다. 달리 기재되지 않는 한, 용어 "절단된 HMWK"는 본 명세서에 기재된 2-사슬 이합체, 이합체의 중쇄 또는 이합체의 경쇄(56kDa 경쇄 및 46kDa 경쇄 포함)를 의미한다. 이러한 서명 펩타이드의 발견에 기초하여, 민감하고 선택적인 검정 방법은 HMWK에 대비하여 절단된 HMWK를 측정하기 위해 개발되었다. 본 명세서에 기재된 검정 방법은 임상학적 분야, 예를 들어 HAE의 진단 또는 예후, 및 비임상학적 분야, 예를 들어 조사 및 전임상 약물 개발 목적 둘 다에 사용될 수 있다.

[0024] **I. 절단된 HMWK를 측정하는 방법**

[0025] 몇몇 양태에서, 샘플에서 절단된 HMWK를 측정하는 방법, 예를 들어 샘플에서 전장 HMWK로부터 절단된 HMWK를 구별하는 방법이 본 명세서에 기재된다. 이러한 방법은 전장 HMWK, 절단된 HMWK 또는 둘 다를 함유하는 것으로 의심되는 적합한 샘플을 적합한 프로테이나제에 의해 처리하여 복수의 분해된 펩타이드를 생성하는 단계 및 절단된 HMWK 및/또는 전장 HMWK를 나타내는 하나 이상의 서명 펩타이드의 수준을 측정하는 단계를 수반할 수 있다. 절단된 HMWK의 수준 또는 절단된 HMWK와 전장 HMWK 사이의 비율은, HAE 또는 HAE 발작의 위험과 상관되는, 샘플에서의 pKal 활성을 나타내도록 사용될 수 있다.

[0026] *(i) 전장 HMWK 및 절단된 HMWK*

[0027] HMWK를 코딩하는 인간 유전자는 키니노겐 1(KNG1)이다. KNG1은 전사되고 대안적으로 스플라이싱되어 HMWK 또는 저분자량 키니노겐(LMWK)을 코딩하는 mRNA를 형성한다. 인간 HMWK 및 LMWK의 예시적인 단백질 서열이 하기 제공된다(브래디키닌의 영역은 강조되고 볼드체임):

[0028] >gi|156231037|ref|NP_001095886.1| 키니노겐-1 아이소폼 1 전구체[호모 사피엔스]

[0029] MKLITILFLC SRLLLSLTQE SQSEEIDCND KDLFKAVDAA LKKYNSQNQS NNQFVLYRIT
EATKTVGSDT FYSFKYEIKE GDCPVQSGKT WQDCEYKDAA KAATGECTAT VGKRSSTKFS
VATQTCQITP AEGPVVTAQY DCLGCVHPIS TQSPDLEPIL RHGIQYFNNN TQHSSLFMLN
EVKRAQRQVV AGLNFRITYS IVQTNCSKEN FLFLTPDCKS LWNGDTGECT DNAYIDIQLR
IASFSQNCDI YPGKDFVQPP TKICVGCPRD IPTNSPELEE TLTHTITKLN AENNATFYFK
IDNVKKARVQ VVAGKKYFID FVARETTCSK ESNEELTESC ETKKLGQSLD CNAEVYVVPW
EKKIYPTVNC QPLGMISLMK **RPPGFSPFRS SRIGEIKEET TVSPPHTSMA PAQDEERDSG
KEQGHTRRHD WGHEKQRKHN LGHGHKHERD QGHGHQRGHG LGHGHEQQHG LGHGHKFKLD
DDLEHQGGHV LDHGHKHKHG HGHGKHKNKG KKNGKHNGWK TEHLASSSED STTPSAQTQE
KTEGPTPIPS LAKPGVTVTF SDFQDSDLIA TMMPPISPAP IQSDDDWIPD IQIDPNGLSF
NPISDFPDTT SPKCPGRPWK SVSEINPTTQ MKESYYFDLT DGLS** (서열 번호 11)

[0030] >gi|4504893|ref|NP_000884 | 키니노겐-1 아이소폼 2 전구체[호모 사피엔스]

mklitilflc srlllsltqe sqseeidcnd kdlfkavdaa lkkynsqnqs nnqfvlyrit
eatktvgsdt fysfkyeike gdcpvqsgkt wqdceykdaa kaatgectat vgkrsstkfs
vatqtcqitp aegpvvtaqy dclgcvhpis tqspdlepil rhgiqyfnnn tqhsslfmln
evkraqrqvv aglnfritys ivqtncsken flfltpdcks lwngdtgect dnayidiqlr
iasfsqncdi ypgkdfvqpp tkicvgcprd iptnspelee tlthtitkln aennatfyfk
idnvkkarvq vvagkkyfid fvarettcsk esneeltesc etkklgqsld cnaevyvvpw
ekkiyptvnc qplgmislmk rppgfspfrs srigeikeet tshlrsceyk grppkagaep
aserevs (서열 번호 12)

[0031]

[0032] 절단된 키니노겐의 중쇄 및 경쇄의 예시적인 서열은 하기 제공된다.

[0033] > 절단된 키니노겐-1 중쇄(상기 서열 번호 11에서의 이탤릭체의 영역)

QESQSEEIDC NDKDLFKAVD AALKKYNSQN QSNNQFVLYR ITEATKTVGS DTFYSFKYEI
KEGDCPVQSG KTWQDCEYKD AAKAATGECT ATVGKRSSTK FSVATQTCQI TPAEGPVVTA
QYDCLGCVHP ISTQSPDLEP ILRHGIQYFN NNTQHSSLFM LNEVKRAQRQ VVAGLNFRIT
YSIVQTNCSK ENFLFLTPDC KSLWNGDTGE CTDNAYIDIQ LRIASFSQNC DIYPGKDFVQ
PPTKICVGCP RDIPTNSPEL EETLTHTITK LNAENNATFY FKIDNVKKAR VQVVAGKKYF
IDFVARETTC SKESNEELTE SCETKKLGQS LDCNAEVYVV PWEKKIYPTV NCQPLGMISL MK
(서열 번호 13)

[0034]

[0035] > 절단된 키니노겐-1 경쇄(56kDa)(상기 서열 번호 11에서의 볼드체 영역)

SSRIGEIKEE TTVSPPHTSM APAQDEERDS GKEQGHTRRH DWGHEKQRKH NLGHGHKHER
DQGHGHQRGH GLGHGHEQQH GLGHGHKFKL DDDLEHQGGH VLDHGHKHKH GHGHGKHKNK
GKKNGKHNGW KTEHLASSSE DSTTPSAQTQ EKTEGPTPIP SLAKPGVTVT FSDFQDSDLI
ATMMPPISPA PIQSDDDWIP DIQIDPNGLS FNPISDFPDT TSPKCPGRPW KSVSEINPTT
QMKESYYFDL TDGLS (서열 번호 14)

[0036]

[0037] > 절단된 키니노겐-1 경쇄(46KD)(상기 서열 번호 11에서의 이탤릭체 및 볼드체의 영역)

KHNLGHGHKH ERDQGHGHQR GHGLGHGHEQ QHGLGHGHKF KLDDDLEHQG GHVLDHGHKH
KHGHGHGKHK NKGKKNGKHN GWKTEHLASS SEDSTTPSAQ TQEKTEGPTP IPSLAKPGVT
VTFSDFQDSD LIATMMPPIS PAPIQSDDDW IPDIQIDPNG LSFNPISDFP DTTSPKCPGR
PWKSVSEINP TTQMKESYYF DLTDGLS (서열 번호 15)

[0038]

[0039] *(ii) 샘플 제조*

[0040] HMWK(예를 들어, 전장 HMWK, 절단된 HMWK, 또는 둘 다)를 함유할 수 있는 임의의 샘플을 본 명세서에 기재된 방법에 의해 분석할 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 "샘플"은 관심 대상 분석물질(본 경우에 HMWK)을 포함할 수 있는 조성물을 의미한다. 샘플은 대상체로부터의 조직, 예를 들어 혈액, 혈장 또는 단백질을 포함할 수 있다. 샘플은 대상체로부터 취한 초기 공정처리되지 않은 샘플, 및 예를 들어 면역침전을 통해 후속하여 공정처리된, 예를 들어 부분적으로 정제되거나 보존된 형태 둘 다를 포함할 수 있다. 예시적인 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 눈물 또는 점액을 포함한다. 다른 예에서, 샘플은 시험관내 검정의 조성물일 수 있다.

[0041] 몇몇 실시형태에서, 샘플은 체액 샘플, 예컨대 혈청 또는 혈장 샘플이다. 이러한 샘플은 분석을 요하는 대상체로부터 얻은 생물학적 샘플일 수 있다. 본 방법에 의해 치료하고자 하는 "환자", "대상체" 또는 "숙주"(이 용어는 상호 호환되어 사용됨)는 인간 또는 비인간 동물을 의미할 수 있다. 몇몇 경우에, 대상체는 접촉 시스템과 연관된 질환을 갖거나 갖는 것으로 의심되거나 이의 위험이 있는 인간 환자이다. 예를 들어, 인간 환자는 이전의 HAE 발생을 가질 수 있거나, HAE의 위험에 있을 수 있다. 이러한 인간 환자는 이전에 치료될 수 있거나, 접촉 시스템의 성분(예를 들어, pKal 또는 FXIIa 또는 고분자량 키니노겐)을 표적화하는 약물에 의한 치료의 과정에 있다.

[0042] 생물학적 샘플은 체액 샘플, 예를 들어 혈액 샘플 또는 혈장 샘플일 수 있다. 본 명세서에 기재된 방법에서 사용하기 위한 혈장 샘플은 다양한 용도를 위해 혈액 샘플을 수집하기 위한 의학 실행에서 흔히 사용되는 진공 혈액 수집 관(예를 들어, 샘플 수집 항응고제 관 또는 SCAT 관)에서 수집되고 공정처리될 수 있다. 본 명세서에 기재된 관은 프로테이나제 저해제의 혼합물(프로테이나제 저해제 칵테일)을 포함하는 액체 제제를 포함하는 비유리 관일 수 있다.

[0043] 몇몇 실시형태에서, 프로테이나제 저해제 칵테일은 적어도 1종의 세린 프로테이나제 저해제 및 적어도 1종의 시

스테인 프로테이나제 저해제를 포함할 수 있다. 적어도 1종의 세린 프로테이나제 저해제는 혈장 칼리크레인 저해제일 수 있다. 이러한 프로테이나제 저해제 칵테일은 다수(예를 들어, 2종, 3종, 4종 또는 5종)의 세린 프로테이나제 저해제를 포함할 수 있고, 이들 중 적어도 1종은 트립신 또는 인간 플라스민 저해제일 수 있다. 바람직하게는, 본 명세서에 기재된 프로테이나제 저해제 칵테일은 수용액 중에 불안정한 프로테이나제 저해제를 실질적으로 함유하지 않고, 즉 수용액 중에 불안정한 프로테이나제 저해제의 활성은 프로테이나제 칵테일의 총 저해 활성에 비해 비실질적이다. 몇몇 경우에, 수용액 중에 불안정한 프로테이나제 저해제의 양은 칵테일 중의 총 프로테이나제 저해제의 5% (w/w) 미만, 예를 들어 2% 미만, 1% 미만 또는 0.5% 미만일 수 있다. 몇몇 경우에, 프로테이나제 저해제 칵테일은 수용액(예를 들어, 4 내지 6의 pH를 갖는 수용액) 중에 불안정한 프로테이나제 저해제를 완전히 함유하지 않는다. 수용액 중에 안정하지 않은 프로테이나제 저해제의 일 예는 H-D-Phe-Phe-Arg-클로로메틸 케톤으로도 공지된 PPACK II이다.

[0044] 예시적인 세린 프로테이나제 저해제, 시스테인 프로테이나제 저해제 및 트립신 프로테이나제 저해제가 하기 표에 기재되고, 이는 본 명세서에 기재된 프로테이나제 저해제 칵테일을 제조하기 위해 사용될 수 있다.

카테고리	예시적인 저해제
세린 프로테이나제 저해제	* 벤즈아미딘 * 4-(2-아미노에틸) 벤젠설포닐 플루오라이드 하이드로클로라이드 (AEBSF); * * 키모스타틴; * N알파-토실-Lys 클로로메틸 케톤(TLCK); * Tos-Phe-CH2Cl; N-p-토실-L-페닐알라닌 클로로메틸 케톤(TPCK) * 1-({(6R,7S)-3-[(아세틸옥시)메틸]-7-메톡시-5,5-다이옥시도-8-옥소-5-티아-1-아자바이사이클로[4.2.0]옥트-2-엔-2-일}카보닐)-L-프롤린 * 파타모스타트 메실레이트; * 가벡세이트 메실레이트; * Msaapvck(Meosuc-aapv-cmk; MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-CMK) * 나파모스타트 메실레이트; * 로즈마린산; * 푸르푸르갈린; * 2-(4-((1-아세트이미도일-3-피롤리디닐)옥시)페닐)-3-(7-아미디노-2-나프틸)프로판산 하이드로클로라이드 5수화물 * 4-(4-브로모페닐설포닐카바모일)벤조일-L-발릴-L-프롤린-1(RS)-(1-트라이플루오로아세틸-2-메틸프롤릴)아미드 * L-658758; CHEMBL446371; L 658758 * 시벨레스타트; * 파타모스타트; * 황산 콜레스테롤; * 엘라스타제 저해제 III; * 가벡세이트; * 4',6-다이아미디노-2-페닐인돌; * 4-아미노벤즈아미딘; * 3,4-다이클로로아이소쿠마린; * 비발리루딘 트라이플루오로아세테이트 * 프라닥사; * 히루딘(HIRUDIN); * 지멜라가트란; * 레피루딘; 레플루단; Hbw 023 * 비발리루딘; * 레탁사반; * 에를리박사반;

[0045]

	* 다비가트란 에텍실레이트 메실레이트; * 이픽사반; * 타넥사반; * 리바록사반; 자렐토; 366789-02-8 * 혈장 칼리크레인 저해제, 예컨대 EPL-KAL2, DX-88, DX-2930 등. *하기 예는 트립신 및/또는 인간 플라스민 저해제이다:* * 대두 트립신 저해제 * 4-(2-아미노에틸)벤젠설포닐플루오라이드 * 4-아미노벤즈아미딘 * 알파 1-항트립신 * 아프로티닌 * 카모스타트 * Eco 단백질(E 콜라이) * 인터-알파-저해제 * 나파모스타트 * NCO 650 * 오보뮤신 * 소마토메딘 B * 트립신 저해제(보우만-벅크 대두) * 트립신 저해제(쿠니츠 대두) * 우리나스타틴
시스테인 프로테이나제 저해제	* 겔다나마이신; 30562-34-6; AKOS022185390 * 칼파스타틴; * L-프롤린,N-[[(2S,3S)-3-[(프로필아미노)카보닐]-2-옥시라닐]카보닐]-L-아이소류실-; * 프로테아솜 저해제 I; * (L-3-트랜스-(프로필카바밀)옥시란 -2-카보닐)-L-아이소류실-L-프롤릴; * 칼파인 저해제 III; * [L-3-트랜스-(프로필카바모일)옥시란 -2-카보닐]-L-아이소류실-L-프롤린; * 오뮤랄라이드; * (S)-MG132; * 락타시스틴;

[0046]

	* Z-Phe-ala-다이아조메탄; * 류펩틴; * 4-하이드록시노네날; * 트랜스-에폭시숙시닐-L-류실아미노(4-구아니디노)뷰탄; * 록시스타틴; * 클라스토-락타시스틴베타-락톤; * L-프롤린, * Z-FA-FMK; * N-아세틸류실-류실-메티오니날; * 니트로아스피린; * 알날(Allnal); * 알록시스타틴; * 에틸 3-({4-메틸 -1-[(3-메틸뷰틸)아미노]-1-옥소펜탄-2-일}카바모일)옥시란-2-카복실레이트; * (+/-)4-하이드록시논-2-엔알;

[0047]

[0048] 몇몇 예에서, 진공 혈액 수집 관에 함유된 프로테이나제 저해제 칵테일은, 적어도 1종(예를 들어, 1종, 2종 또는 3종)의 트립신/플라스민 저해제, 및 적어도 1종(예를 들어, 1종, 2종 또는 3종)의 시스테인 프로테이나제 저해제를 포함할 수 있는, 적어도 1종(예를 들어, 1종, 2종 또는 3종)의 세린 프로테이나제 저해제를 포함한다. 이러한 프로테이나제 저해제 칵테일은 3종의 세린 프로테이나제 저해제(예를 들어, 벤즈아미딘, AEBSF 및 트립신/플라스민 저해제, 예컨대 대두 트립신 저해) 및 1종의 시스테인 프로테이나제 저해제(예를 들어, 류펩틴)를

포함할 수 있다.

[0049] 다른 예에서, 프로테이나제 저해제 칵테일은 적어도 1종의 세린 프로테이나제 저해제(예를 들어, 혈장 칼리크레인 저해제) 및 적어도 1종의 시스테인 프로테이나제 저해제(예를 들어, 류펩틴)를 포함할 수 있다. 혈장 칼리크레인 저해제는 EPI-KAL2(Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp; 서열 번호 16)일 수 있고, 이것은 예를 들어 관이 면역검정을 이용한 활성화된 혈장 칼리크레인의 검출을 허용하는 시약을 함유하는 능력을 제공하는, 재조합 프로테이나제 저해제인 특이적 혈장 칼리크레인이다.

[0050] 임의의 프로테이나제 저해제 칵테일은 액체 제제를 형성하기에 적합한 용액 중에 용해될 수 있다. 적합한 용액은 트라이시트르산나트륨, 시트르산 및 덱스트로스를 포함할 수 있는 산-시트레이트-덱스트로스 용액일 수 있다. 용액은 약 4 내지 6, 예를 들어 4.5의 pH 값을 가질 수 있다. 액체 제제는 양이온성 중합체, 예컨대 헥사다이메트린 브로마이드 분자(폴리브렌(polybrene)(등록상표))를 추가로 포함할 수 있고, 이것은 메탈로프로테이나제를 저해할 수 있는 음으로 하전된 표면 및 킬레이트제(예를 들어, EDTA)와의 상호작용에 의해 접촉 시스템 활성화를 감소시킬 수 있다.

[0051] 칵테일에서의 각각의 프로테아제 저해제의 농도는, 실제로 희석 배수에 따라, 상응하는 프로테아제를 저해하는 데 있어서 사용하기 위한 이러한 저해제의 최종 농도보다 5배 또는 10배 더 높을 수 있다. 특정한 상업적인 프로테아제 저해제의 최종 농도는 당해 분야에 공지되어 있고, 제조사의 프로토콜로부터 얻어질 수 있다. 몇몇 예에서, EPI-KAL2의 농도는 5 내지 15㎛M(예를 들어, 5 내지 10㎛M 또는 10 내지 15㎛M)의 범위일 수 있고, 류펩틴의 농도는 200 내지 300㎛M(예를 들어, 200 내지 250, 240 내지 270 또는 250 내지 300㎛M)의 범위일 수 있고, 대두 트립신 저해제의 농도는 1 내지 3㎎/㎖(예를 들어, 1 내지 2 또는 2 내지 3㎎/㎖)의 범위일 수 있고, 벤즈아미딘의 농도는 80 내지 120mM(예를 들어, 80 내지 100 또는 100 내지 120mM)의 범위일 수 있고/있거나, AEBSF의 농도는 10 내지 30mM(예를 들어, 10 내지 20 또는 20 내지 30mM)의 범위일 수 있다.

[0052] 펩타이드 기반 프로테아제 저해제(예를 들어, EPI-KAL2)가 사용될 때, 이것은 종래의 방법론에 따라 바이오티닐화될 수 있다. 예를 들어, 펩타이드 저해제는 하기한 바대로 바이오티닐화될 수 있다. 간단히 말하면, 펩타이드 저해제는 적합한 용액, 예컨대 포스페이트 완충 식염수(PBS) 중에 용해될 수 있다. 새로 제조된 설포-NHS-LC-바이오틴은 펩타이드 저해제 용액에 첨가되고 적합한 시간 기간 동안 얼음에서 항온처리될 수 있다. 과도한 미반응 바이오틴 및 가수분해된 바이오틴은 스핀 탈염 칼럼을 이용하여 제거될 수 있다. 펩타이드 저해제의 표지는 ELISA에 의해 확인될 수 있고, 단백질 농도는 예를 들어 브래드포드(Bradford) 검정에 의해 결정될 수 있다.

[0053] 본 명세서에 기재된 임의의 액체 제제는 일상적 방법, 예를 들어 적합한 용액으로 적절한 성분을 용해시키고 바람직하게는 비유리인 진공 혈액 수집 관에 배치하는 것에 의해 제조될 수 있다. 관은 -20℃에서 저장될 수 있고, 사용 전에 적합한 시간 기간 내에 얼음에서 또는 냉장고에서 해동될 수 있다.

[0054] 구체적인 예에서, 본 명세서에 기재된 방법에서 사용된 진공 혈액 수집 관은 하기 기재된 바와 같은 SCAT 169 및 SCAT 153을 포함하는 SCAT 관이다:

[0055] • SCAT169: 산-시트레이트-덱스트로스(100mM 트라이나트륨 시트레이트, 67mM 시트르산 및 2% 덱스트로스(pH 4.5)) 중에 용해된 (0.5㎖) 100mM 벤즈아미딘, 400㎍/㎖의 폴리브렌(등록상표), 2㎎/㎖ 대두 트립신 저해제, 20mM EDTA, 263㎛M 류펩틴 및 20mM AEBSF(4-(2-아미노에틸) 벤젠설포닐 플루오라이드 하이드로클로라이드)를 함유하는 진공 5㎖ 전체 용적 플라스틱 관.

[0056] • SCAT153: 산-시트레이트-덱스트로스(100mM 트라이나트륨 시트레이트, 67 mM 시트르산 및 2% 덱스트로스(pH 4.5)) 중에 용해된 (0.5㎖) 10㎛M 바이오티닐화 EPI-KAL2, 400㎍/㎖의 폴리브렌(등록상표), 20mM EDTA 및 263㎛M 류펩틴을 함유하는 진공 5㎖ 전체 용적 플라스틱 관.

[0057] 혈액 수집 후, 혈액 샘플은 적합한 시간 기간(예를 들어, 1시간 이하) 내에 혈장 샘플을 생성하도록 공정처리될 수 있다. 혈장 샘플은 초기 혈액 샘플이 얻어지는 대상체의 접촉 시스템과 연관된 특징을 평가하기 위해 추가의 분석으로 처리될 수 있다.

[0058] *(iii) 프로테이나제 분해*

[0059] 본 명세서에 기재된 생물학적 샘플, 예를 들어 본 명세서에 기재된 공정에 따라 제조된 바와 같은 전체 혈장 샘

플은 복수의 분해된 펩타이드를 생성하도록 적합한 프로테이나제에 의해 처리될 수 있다. 대안적으로, 전장 형태 및 절단된 형태 둘 다를 포함하는 HMWK 단백질은 예를 들어 면역침전을 통해 샘플로부터 농후화되거나, 프로테이나제 분해 전에 메탄올 크래쉬에 의해 변성될 수 있다.

[0060] 임의의 적합한 프로테이나제는 본 명세서에 기재된 방법에서 사용될 수 있다. 바람직하게는, 프로테이나제는 분해된 펩타이드가 단백질의 아미노산 서열에 기초하여 확인될 수 있도록 특이적 모티프/잔기에서 단백질을 절단한다. 몇몇 예에서, 상기 방법에서 사용된 프로테이나제는 글루탐산 잔기 뒤에 절단한다. 예시적인 프로테이나제는 엔도프로테이나제 Glu-C 또는 카텝신 G를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 다른 예에서, 본 명세서에 기재된 검정 방법에서 사용된 프로테이나제는 아스파르트산 잔기, 예를 들어 엔도뉴클레아제 Asp-N 앞에 또는 라이신 잔기, 예를 들어 엔도뉴클레아제 Lys-C 뒤에 절단한다. 또 다른 예에서, 본 명세서에 기재된 검정 방법에서 사용된 프로테이나제는 큰 소수성 측쇄를 보유하는 아미노산(예를 들어, 타이로신, 트립토판 또는 페닐알라닌) 뒤에 절단한다. 이러한 프로테이나제의 하나의 예는 키모트립신이다.

[0061] 프로테이나제 절단 반응은 샘플에서 전장 및 절단된 HMWK 단백질의 완전한 분해를 허용하는 적합한 조건 하에 수행될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 프로테이나제 절단 반응 혼합물은 적합한 농도(예를 들어, 1mM, 0.5mM, 0.1mM 또는 0.05mM)에서 환원제, 예컨대 다이티오트레이톨(DTT), b-머캅토에탄올(BME) 또는 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP)을 함유할 수 있다. 예를 들어, DTT가 사용될 때, 이의 농도는 0.1mM 또는 0.05mM일 수 있다. 프로테이나제 절단 반응은 적합한 기간(예를 들어, 30분, 60분, -90분 또는 180분) 동안 적합한 온도(예를 들어, 25℃, 37℃, 50℃, 55℃ 또는 90℃)에서 수행될 수 있다.

[0062] 몇몇 예에서, 환원제를 함유하는 혼합물은 샘플에서의 단백질의 완전한 변성을 허용하도록 적합한 시간 기간(예를 들어, 30초 또는 60초 동안 55℃, 또는 30초 또는 60초 동안 90℃) 동안 고온에서 항온처리될 수 있다. 이후, 프로테이나제는 혼합물에 첨가될 수 있고, 분해 반응은 적합한 시간 기간 동안 적합한 온도 하에 수행될 수 있다. 정확한 분해 온도/시간은 상기 방법에서 사용된 특이적 프로테이나제에 따라 달라질 것이고, 이것은 당해 분야의 숙련자의 지식 내에 있다. 일 예에서, Glu C 효소가 사용되고, 분해 반응은 밤새 25℃ 또는 37℃ 밤새(예를 들어, 12시간, 14시간, 17시간 또는 19시간) 25℃ 또는 37℃에서 수행될 수 있다. 또 다른 예에서, 키모트립신이 사용되고, 분해 반응은 적합한 기간, 예를 들어 2 내지 5시간(예를 들어, 3시간) 동안 40℃ 내지 60℃(예를 들어, 50℃)에서 수행될 수 있다.

[0063] 반응 혼합물은 프로테이나제 저해제, 항응고제, 예컨대 시트레이트 또는 둘 다가 없을 수 있다. 반응에서 효소/단백질 비율은 1:5 내지 1:30의 범위, 예를 들어 1:5, 1:10, 1:20, 1:25 또는 1:30일 수 있다. 온도, 반응 시간 기간, 효소/단백질 비율, 프로테이나제 저해제의 존재/부재, 항응고제의 존재/부재 및 환원제의 존재/부재를 포함하는 특이적 반응 조건의 선택은 사용된 프로테이나제의 유형 및 처리하고자 하는 샘플에 따라 달라질 수 있고, 이는 당해 분야에 공지된 방법 또는 본 명세서에 기재된 것을 통해 결정될 수 있다.

[0064] *(iv) 서명 펩타이드의 측정*

[0065] 서명 펩타이드는 프로테이나제 반응으로부터 생성된 분해된 펩타이드에 관한 것이고, 키니노겐의 또 다른 유형과 비교하여 키니노겐의 하나의 유형에 고유하다. 이러한 펩타이드는 본 명세서에 기재된 방법에서 사용된 프로테이나제의 특이성 및 키니노겐의 상이한 유형의 아미노산 서열을 기준으로 확인될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서의 본 개시내용을 참조한다. 제2 유형의 키니노겐(예를 들어, 절단된 키니노겐)에 대비된 제1 유형의 키니노겐(예를 들어, 전장 키니노겐)에 고유한 펩타이드(서명 펩타이드)는 프로테이나제를 사용하여 제2 유형의 키니노겐을 절단함으로써 생성되지 않고 오직 동일한 프로테이나제를 사용하여 제1 유형의 키니노겐을 절단하여 생성될 수 있는 펩타이드를 의미한다. 예를 들어, 절단된 HMWK(예를 들어, 절단된 HMWK의 중쇄 또는 경쇄, 예컨대 46kDa 경쇄)의 서명 펩타이드는 절단된 HMWK(예를 들어, 절단된 HMWK의 중쇄 또는 경쇄)의 프로테이나제 분해로부터 오직 생성될 수 있지만, 동일한 프로테이나제에 의해 전장 HMWK의 분해에 의해 생성될 수 없는 펩타이드를 의미한다. 유사하게, 전장 HMWK의 서명 펩타이드는 1-사슬 HMWK의 프로테이나제 분해에 의해 오직 생성될 수 있지만, 동일한 프로테이나제를 사용하여 절단된 HMWK의 분해에 의해 생성될 수 없는 펩타이드이다. HMWK의 서명 펩타이드는 HMWK(1-사슬 HMWK, 2-사슬 HMWK, 또는 둘 다)의 프로테이나제 분해에 의해 생성되지만, 동일한 프로테이나제를 사용하여 LMWK의 분해에 의해 생성될 수 없는 펩타이드를 의미한다.

[0066] 절단된 HMWK에 대한 예시적인 서명 펩타이드는 (a) Glu-C 분해에 의해 생성될 수 있는 SSRIGE(서열 번호 5)와 같은 56kDa 경쇄에 대한 서명 펩타이드, 및 (b) 각각 키모트립신 분해, Glu-C 분해, Asp-N 분해 및 Lys-C 분해에 의해 생성될 수 있는 KHNLGHGH(서열 번호 1), KHNLGHGHKHE(서열 번호 2); KHNLGHGHKHER(서열 번호 4) 또는 KHNLGHGHK(서열 번호 3)와 같은 46kDa 경쇄에 대한 서명 펩타이드를 포함한다.

[0067] 하기 표 1은 상이한 프로테이나제에 의해 생성된 절단된 HMWK의 46kDa 경쇄에 대한 예시적인 서명 펩타이드를 기재한다:

표 1

다양한 효소에 의한 HMWK의 분해로부터 유래된 서명 펩타이드

효소	46K 경쇄 펩타이드	HMWK 펩타이드
키모트립신	KHNLGHGH (서열 번호 1)	GHEKQRKH (서열 번호 6)
Glu-C	KHNLGHGHKHE (서열 번호 2)	KQRKHNLGHGHKHE (서열 번호 7)
Asp-N	KHNLGHGHKHER (서열 번호 4)	DWGHEKQRKHNLGHGHKHER (서열 번호 17)
Lys-C	KHNLGHGHK (서열 번호 3)	HNLGHGHK (서열 번호 9)

[0068]

[0069] HMWK(예를 들어, 전장 HMWK)에 대한 예시적인 서명 펩타이드는 키모트립신 분해에 의해 생성될 수 있는 GHEKQRKH(서열 번호 6); Glu-C 분해에 의해 생성될 수 있는 KQRKHNLGHGHKHE(서열 번호 7) 및 SYYFDLTDGLS(서열 번호 10); Asp-N 분해에 의해 생성될 수 있는 DWGHKQRKHNLGHGHKHER(서열 번호 8); 및 Lys-C 분해에 의해 생성될 수 있는 HNLGHGHK(서열 번호 9)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0070] 관심 대상 분해된 펩타이드의 수준은 당해 분야에 공지되거나 본 명세서에 기재된 바와 같은 적합한 접근법을 이용하여 측정될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 관심 대상 이러한 펩타이드는 관심 대상 펩타이드에 특이적인 항체, 예를 들어 KHNLGHGH(서열 번호 1), SSRIGE(서열 번호 5) 및/또는 SYYFDLTDGLS(서열 번호 10)에 특이적인 항체를 사용하여 면역검정에 의해 측정될 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 관심 대상 펩타이드의 수준을 평가하기 위해 사용될 수 있는 면역 검정은 웨스턴 블롯, 효소 결합 면역흡착 검정(enzyme linked immunosorbent assay: ELISA)(예를 들어, 샌드위치 ELISA), 방사면역검정, 전기화학발광 기반 검출 검정, 및 관련 기법을 포함한다. 웨스턴 블롯 검정과 같은 검정은 정량적 영상화 시스템, 예를 들어 상업적으로 구입 가능한 LICOR 영상화 기술(예를 들어, LI-COR Biosciences로부터의 Odyssey(등록상표) CLx 적외선 영상화 시스템 참조)의 사용을 추가로 수반할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 전기화학발광 검출 검정 또는 전기화학발광 및 패턴화 어레이 기술의 조합에 의존하는 검정(예를 들어, Meso Scale Discovery(MSD)로부터의 ECL 또는 MULTI-ARRAY 기술 검정)을 이용한다.

[0071] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "측정하는 것" 또는 "측정," 또는 대안적으로 "검출하는 것" 또는 "검출"은 샘플 내의 물질의 정성적 또는 정량적 농도 수준의 편차를 비롯하여 이 물질의 존재, 부재, 분량 또는 양(유효량일 수 있음)을 평가하는 것, 또는 달리 대상체의 값 또는 분류를 평가하는 것을 의미한다.

[0072] 관심 대상 펩타이드에 "특이적으로 결합하는" 항체는 당해 분야에서 널리 이해되는 용어이고, 이러한 특이적 결합을 결정하는 방법은 또한 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 항체가 대안적인 펩타이드가 하는 것보다 더 빈번히, 더 신속하게, 더 긴 기간에 의해 및/또는 특정한 표적 펩타이드와의 더 높은 친화도로 결합하거나 회합하는 경우 항체는 "특이적 결합"을 나타낸다고 말해진다. 이 정의를 읽음으로써, 예를 들어 제1 표적 펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체가 제2 표적 펩타이드에 특이적으로 또는 우선적으로 결합하거나 결합하지 않을 수 있는 것으로 또한 이해된다. 그러므로, "특이적 결합" 또는 "우선적 결합"은 (배타적인 결합을 포함할 수 있지만) 반드시 배타적인 결합을 요하지는 않는다. 반드시는 아니지만, 일반적으로, 결합의 언급은 우선적 결합을 의미한다. 몇몇 예에서, 표적 펩타이드 또는 이의 에피토프에 "특이적으로 결합하는" 항체는 동일한 항원에서 다른 펩타이드 또는 다른 에피토프에 결합하지 않을 수 있다.

[0073] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "항체"는 적어도 하나의 면역글로불린 가변 도메인 또는 면역글로불린 가변 도메인 서열을 포함하는 단백질을 의미한다. 예를 들어, 항체는 중쇄(H) 가변 구역(본 명세서에서 V_H로 축약), 및 경쇄(L) 가변 구역(본 명세서에서 V_L이라 축약)을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 항체는 2개의 중쇄(H) 가변 구역 및 2개의 경쇄(L) 사슬 가변 구역을 포함한다. 용어 "항체"는 항체의 항원 결합 단편(예를 들어, 단쇄 항체, Fab 및 sFab 단편, $F(ab')_2$, Fd 단편, Fv 단편, scFv 및 도메인 항체(dAb) 단편(de Wildt et al., Eur J Immunol. 1996; 26(3):629-39) 및 완전한 항체를 포함한다. 항체는 IgA, IgG, IgE, IgD, IgM(및 이의 아형)의 구조적 특징을 가질 수 있다. 항체는 임의의 공급원 유래일 수 있지만, 영장류(인간 및 비인간 영장류) 및 영장류화가 바람직하다.

[0074] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체는 검출 가능한 라벨에 접합될 수 있고, 관심 대상 펩타

이드에 대한 검출 시약의 결합은 검출 가능한 라벨로부터 방출된 신호의 강도를 기준으로 결정될 수 있다. 대안적으로, 검출 시약에 특이적인 2차 항체를 사용할 수 있다. 하나 이상의 항체는 검출 가능한 라벨에 커플링될 수 있다. 당해 분야에 공지된 임의의 적합한 라벨은 본 명세서에 기재된 검정 방법에서 사용될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 검출 가능한 라벨은 형광단을 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "형광단"("형광성 라벨" 또는 "형광성 염료"로도 불림)은 한정된 여기 파장에서 광 에너지를 흡수하고 상이한 파장에서 광 에너지를 방출하는 모이어티를 의미한다. 몇몇 실시형태에서, 검출 모이어티는 효소이거나 효소를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 효소는 무색의 기질로부터 유색 산물을 생산하는 것(예를 들어, β-갈락토시다제)이다.

[0075] 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 관심 대상 펩타이드는 액체 크로마토그래피의 물리적 분리 역량을 질량 분광법(MS)의 질량 분석 역량과 조합한 분석 기법인 액체 크로마토그래피-질량 분광법(LC-MS) 접근법에 의해 측정될 수 있다.

[0076] 다중 반응 모니터링(MRM) - 질량 분광법은 다중 생물학적 샘플에서 단백질/펩타이드 풍부도의 표적화된 정량화를 위한 매우 민감하고 선택적인 방법이다. MRM 질량 분광법은 소분자의 분석에 흔히 사용된다. 여기서, MRM은 다중 혼합물에서 단백질의 정량화가 가능하게 하여서, 질환 과정에서 후보 바이오마커를 검증하기 위한 민감하고 선택적인 도구를 제공한다. 이 접근법을 위해, 적합한 기구, 예컨대 ABSciex 5500 또는 6500 QTrap 질량 분광계가 사용될 수 있고, 다양한 유형의 혈장 샘플 사이의 차이는 방법 최적화 후 평가된다. 개별 혈장 샘플은 본 명세서에 기재된 바와 같은 HWMK 또는 절단된 HWMK에 대한 서명 펩타이드를 얻기 위해 적합한 프로테이나제, 예컨대 키모트립신 또는 Glu-C에 의해 분해된다.

[0077] (예를 들어, AUC로 표시된) 각각의 서명 펩타이드의 수준(예를 들어, 농도)은 종래의 방법을 통해 결정될 수 있다. 필요할 때, 전장 HMWK에 대비된 절단된 HMWK에 대한 서명 펩타이드 대 LMWK에 대비된 HMWK에 대한 서명 펩타이드의 비율 이렇게 계산될 수 있다. 이러한 비율은 절단된 HMWK 대 전장 HMWK의 존재를 구별하도록 사용될 수 있다.

[0078] 예를 들어, 키모트립신 분해에 의해 생성된 KHNLGHGH(서열 번호 1)인 2-사슬 HMWK의 46kDa 경쇄에 대한 서명 펩타이드의 농도는 건강한 인간 대상체로부터의 혈장 샘플에 비해 HAE 환자로부터의 혈장 샘플에서 훨씬 더 높은 것으로 발견되었다. 이 결과는 이러한 서명 펩타이드로 표시된 2-사슬 HMWK의 46kDa 경쇄가 HAE 진단 및 예후에 대한 신뢰할만한 바이오마커라는 것을 나타낸다.

[0079] 또 다른 예에서, Glu C 분해된 HMWK 표준품 및 샘플에서 MRM에 의한 SYYFDLTDGLS(서열 번호 10)인 LMWK 서명 펩타이드에 대한 HMWK를 포함하는 모든 펩타이드의 확인으로 인해, 본 연구에서 혈장에서 발견된 표적화된 펩타이드가 HMWK에 기여한다는 것이 발견되었다. HAE SCAT 혈장에서의 SSRIGE(서열 번호 5) 펩타이드의 유의미한 증가는 정상 SCAT 혈장과 비교할 때 관찰되고, HMWK 펩타이드의 변경 없이, FXIIa에 의해 활성화된 혈장 대 비활성화된 혈장 사이의 차이에서 증가가 또한 관찰되었다. 또한, SSRIGE(서열 번호 5)/SYYFDLTDGLS(서열 번호 10) 사이의 비율은 정상 SCAT 혈장 샘플과 비교할 때 HAE SCAT 혈장 샘플에서 및 또한 활성화된 혈장 대 비활성화된 혈장에서 더 높은 것으로 발견되었다. SSRIGE(서열 번호 5) 및 SYYFDLTDGLS(서열 번호 10)에 대한 비율을 이용한 상대 풍부도 비율은 각각 정상 SCAT 혈장 대 HAE SCAT 혈장에 대해 4.4 및 8.9이고, 각각 정상 시트레이트화 및 FXIIa에 의해 활성화된 시트레이트에 대해 19.02 및 48.63이다.

[0080] 키니노겐 결핍 혈장(음성 대조군) 샘플은, 가능하게는 LMWK의 존재로 인해 예상되는, SSRIGE(서열 번호 5) 펩타이드에 대한 검출 한계 근처의 낮은 강도 피크를 나타냈다. 혈장 샘플에서의 KKIYPTVNC QPLGMISLMKRPPGFSPFRSSRIGE(서열 번호 18)인 HMWK 긴 펩타이드는 표적화된 검정(MRM)을 이용하여 또한 측정된다. 정상 SCAT 혈장 샘플과 HAE SCAT 혈장 샘플 사이에 및 활성화된 샘플과 비활성화된 샘플 사이에 HMWK 긴 펩타이드의 변경이 거의 없다.

[0081] **II. 키트**

[0082] 본 개시내용은 또한 절단된 HMWK에 대한 서명 펩타이드의 수준을 측정하는 것 및/또는 인간 환자로부터의 샘플, 예를 들어 생물학적 샘플에서 절단된 HMWK 대 전장 HMWK를 구별하는 것에서 사용하기 위한 키트를 제공한다. 이러한 키트는 적합한 프로테이나제(예를 들어, 키모트립신 또는 Glu C), 적합한 프로테이나제의 분해에 의해 생성될 수 있는 서명 펩타이드에 특이적인 검출제, 진공 혈액 수집 관, 및 임의로, 표준품 절단된 키니노겐 및/또는 대조군으로서의 온전한 키니노겐 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 키트는 관심 대상 펩타이드에 대한 검출 시약의 결합을 검출하기 위한 2차 항체 및/또는 시약을 추가로 포함한다.

[0083] 몇몇 실시형태에서, 키트는 본 명세서에 기재된 임의의 방법에 따라 사용하기 위한 설명서를 포함할 수 있다.

포함된 설명서는 프로테이나제에 의해 처리되는 샘플에서 서명 펩타이드의 수준을 측정하기 위해 키트에 함유된 성분을 어떻게 사용하는지의 설명을 포함할 수 있다.

[0084] 키트의 사용에 관한 설명서는 일반적으로 본 명세서에 기재된 검정 방법을 수행하기에 적합한 조건 및 각각의 성분의 양에 관한 정보를 포함한다. 본 발명의 키트에 제공된 설명서는 통상적으로 라벨 또는 패키지 인서트(예를 들어, 키트에 포함된 종이 시트)에서의 서면 설명서이지만, 기계 판독 가능한 설명서(예를 들어, 자기 또는 광학 저장 디스크에 보유된 설명서)가 또한 허용 가능하다.

[0085] 라벨 또는 패키지 인서트는 키트가 절단된 HMWK에 대한 서명 펩타이드의 수준을 측정하는 것 및/또는 절단된 HMWK 대 전장 HMWK를 구별하는 것에 사용된다는 것을 나타낸다. 설명서는 본 명세서에 기재된 임의의 방법을 실행하기 위해 제공될 수 있다.

[0086] 본 발명의 키트는 적합한 패키징에 있다. 적합한 패키징은 바이알, 병, 단지(jar), 가요성 패키징(예를 들어, 밀봉 Mylar 또는 플라스틱 백) 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0087] 키트는 임의로 추가의 성분, 예컨대 완충제 및 해석 정보를 제공할 수 있다. 보통, 키트는 용기 및 용기 상의 또는 용기와 연관된 라벨 또는 패키지 인서트(들)를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 본 개시내용은 상기 기재된 키트의 내용물을 포함하는 제조 물품을 제공한다.

[0088] **III. 검정 방법의 적용**

[0089] *(i) 임상학적 적용: 질환 진단 및 예후*

[0090] 순환하는 프리칼리크레인의 대략 75% 내지 90%는 HMWK의 도메인 6과의 비활성 부위 상호작용을 통해 HMWK에 결합한다. 유리 및 HMWK-결합된 활성 pKal은 절단된 HMWK 및 브래디키닌을 생성한다. 바이오마커의 적합성은 HAE의 급성 발작의 존재 및 부재 하에 이의 수준을 따름으로써 입증될 수 있다. 이 바이오마커의 수준은 브래디키닌 매개된 부종의 발작 또는 pKal 활성에 의해 매개된 다른 질환 동안 또한 변경될 수 있다.

[0091] 본 명세서에 기재된 검정 방법 및 키트는 질환의 평가, 예를 들어 질환의 진단 또는 예후에 적용될 수 있다. 평가는 본 명세서에 기재된 바와 같은 질환, 예를 들어 pKal 매개된 장애, 예컨대 HAE를 갖거나 이의 위험이 있는 대상체를 확인하는 것을 포함할 수 있다. 평가는 또한 질환의 치료의 모니터링, 예컨대 PKal 매개된 장애, 예컨대 HAE에 대한 치료의 유효성을 평가하는 것을 포함할 수 있다. 추가로, 평가는 pKal 저해제에 의해 치료될 수 있는 질환을 확인하는 것을 포함할 수 있다.

[0092] A. 진단

[0093] 몇몇 실시형태에서, 검정 방법 및 키트는 후보 대상체(예를 들어, PKal 매개된 장애, 예컨대 HAE를 갖는 것으로 의심되는 인간 환자)로부터 수집된 생물학적 샘플(예를 들어, 혈액 샘플 또는 혈장 샘플)에서 절단된 키니노겐 및/또는 온전한 키니노겐의 수준을 결정하도록 수행된다. 절단된 HMWK(예를 들어, 2-사슬 HMWK, 또는 56kDa 경쇄 및 46kDa 경쇄를 포함하는 이의 중쇄 및/또는 경쇄)의 수준 및/또는 절단된 HMWK 대 온전한 HMWK의 수준 사이의 비율은 본 명세서에 기재된 바와 같은 절단된 HMWK에 대한 서명 펩타이드의 수준 및/또는 (예를 들어, LMWK에 대비된) 절단된 HWMK에 대한 서명 펩타이드와 본 명세서에 기재된 HMWK에 대한 서명 펩타이드 사이의 비율에 기초하여 결정될 수 있다. 이러한 서명 펩타이드 농도 또는 비율은 대상체가 PKal 매개된 장애, 예를 들어 HAE를 갖거나 이의 위험이 있는지를 결정하도록 미리 결정된 기준 값 또는 기준 비율과 비교될 수 있다. 예를 들어, 후보 대상체의 샘플에서의 서명 펩타이드 농도 또는 2개의 서명 펩타이드의 비율이 기준 값/비율이거나 이보다 높은 경우, 대상체는 pKal 매개된 장애, 예컨대 HAE를 갖거나 이의 위험이 있는 것으로 확인될 수 있다.

[0094] 기준 값/비율은 서명 펩타이드의 조절 수준 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 2개의 서명 펩타이드의 비율일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 조절 값/비율은, 바람직하게는 후보 대상체와 동일한 종인, 건강한 대상체 또는 건강한 대상체의 집단으로부터 얻은 대조군 샘플, 예컨대 샘플(예를 들어, 혈액 또는 혈장 샘플)에서의 서명 펩타이드(들)의 값/비율을 나타낸다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, 건강한 대상체는 절단된 및/또는 온전한 키니노겐의 수준이 측정되는 시간에 표적 질환(예를 들어, PKal 매개된 장애, 예컨대 HAE)이 명백히 없거나 질환의 병력을 갖지 않는 대상체이다.

[0095] 몇몇 실시형태에서, 대조군 샘플은 휴면 질환 병기에 있는 인간 HAE 환자로부터 얻어질 수 있다. 이러한 대조군 샘플로부터 얻은 기준 값/비율에 대비된, 절단된 HMWK에 대한 서명 펩타이드의 상승된 수준 또는 절단된 HMWK에 대한 서명 펩타이드와 HMWK에 대한 서명 펩타이드 사이의 상승된 비율은 HAE 발작의 위험을 나타낼 수 있다.

[0096] 기준 값/비율은 또한 미리 결정된 값 또는 비율일 수 있다. 이러한 미리 결정된 값/비율은 표적 질환을 갖지 않거나 이의 위험에 있지 않는 대상체의 집단에서의 절단된 HWMK에 대한 서명 펩타이드의 값(예를 들어, 2-사슬 HMWK의 46kDa 경쇄에 대한 서명 펩타이드) 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 2개의 서명 펩타이드의 비율을 나타낼 수 있다. 이것은 또한 (예를 들어, 휴먼 질환 병기에서의) 표적 질환을 갖는 대상체의 집단에서의 절단된 HWMK(예를 들어, 46kDa 경쇄)에 대한 서명 펩타이드의 값(예를 들어, 농도) 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 2개의 서명 펩타이드의 비율을 나타낼 수 있다.

[0097] 미리 결정된 값/비율은 다양한 형태를 취할 수 있다. 예를 들어, 이것은 단일 컷오프 값, 예컨대 중앙치 또는 평균일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 이러한 미리 결정된 수준은 비교 그룹에 기초하여 확립될 수 있고, 예컨대 여기서 하나의 한정된 그룹은 표적 질환을 갖는 것으로 공지되어 있고, 또 다른 한정된 그룹은 표적 질환을 갖지 않는 것으로 공지되어 있다. 대안적으로, 미리 결정된 수준은 미리 결정된 백분위 내의 대조군 집단에서의 관심 대상 2개의 펩타이드의 비율을 나타내는 범위와 같은 범위일 수 있다.

[0098] 본 명세서에 기재된 바와 같은 대조군 값/비율은 일상적 기술에 의해 결정될 수 있다. 몇몇 예에서, 대조군 값/비율은 본 명세서에 또한 기재된 바와 같은 대조군 샘플에서 종래의 방법(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 시험 샘플에서 관심 대상 2개의 펩타이드의 수준을 결정하기 위한 동일한 검정)을 수행함으로써 얻어질 수 있다. 다른 예에서, 관심 대상 서명 펩타이드의 수준은 대조군 집단의 구성원으로부터 얻어질 수 있고, 결과는 대조군 집단에서 절단된 및/또는 온전한 키니노겐의 수준을 나타내는 대조군 수준(미리 결정된 수준)을 얻기 위해 예를 들어 컴퓨터 프로그램에 의해 분석될 수 있다.

[0099] 본 명세서에 기재된 바와 같은 절단된 HWMK에 대한 서명 펩타이드의 농도 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 기준 비율에 대한 후보 대상체로부터 얻은 샘플에서의 본 명세서에 또한 기재된 바와 같은 관심 대상 2개의 서명 펩타이드의 비율을 비교함으로써, 후보 대상체가 PKal 매개된 질환(예를 들어, HAE)을 갖거나 이의 위험이 있는지, 또는 HAE 환자가 HAE 발작의 위험이 있는지에 대해 결정될 수 있다. 예를 들어, 절단된 HMWK에 대한 서명 펩타이드의 값 또는 후보 대상체의 샘플에서의 관심 대상 2개의 서명 펩타이드의 비율이 기준 값 또는 비율(예를 들어, 기준 값 또는 비율과 비교하여 증가)로부터 편차가 있는 경우, 후보 대상체는 질환을 갖거나 이의 위험이 있는 것으로 또는 HAE 발작의 위험이 있는 HAE 환자로서 확인될 수 있다. 기준 값 또는 비율이 표적 질환을 갖는 대상체의 집단에서 본 명세서에 기재된 바와 같은 서명 펩타이드의 값 또는 비율 범위를 나타낼 때, 범위에 해당하는 후보의 샘플에서 관심 대상 서명 펩타이드의 값 또는 비율은 후보 대상체가 질환을 갖거나 이의 위험에 있다는 것을 나타낸다.

[0100] 본 명세서에 사용된 바와 같은, "기준 값/비율보다 큰 상승한 값/비율 또는 값/비율"은 서명 펩타이드의 값 또는 2개의 서명 펩타이드의 비율이 대조군 샘플에서의 기준 값 또는 비율, 예컨대 동일한 서명 펩타이드 또는 동일한 2개의 서명 펩타이드의 미리 결정된 한계치보다 높다는 것을 의미한다. 대조군 수준은 본 명세서에 자세히 기재되어 있다. 서명 펩타이드의 상승한 값 또는 관심 대상 2개의 서명 펩타이드의 상승한 비율은 기준 값/비율보다 예를 들어 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% 또는 이것 초과 높은 값/비율을 포함한다.

[0101] 본 명세서에 사용된 바와 같은, "기준 값/비율보다 낮은 감소한 값/비율"은 서명 펩타이드의 수준 또는 관심 대상 2개의 서명 펩타이드의 비율이 대조군 샘플에서의 기준 값/비율, 예컨대 동일한 서명 펩타이드 또는 관심 대상 동일한 2개의 서명 펩타이드의 미리 결정된 한계치보다 낮다는 것을 의미한다. 대조군 수준은 본 명세서에 자세히 기재되어 있다. 서명 펩타이드의 감소한 값 또는 2개의 서명 펩타이드의 감소한 비율은 관심 대상 2개의 펩타이드의 기준 비율보다 예를 들어 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% 또는 이것 초과 더 낮은 값/비율을 포함한다.

[0102] 몇몇 실시형태에서, 후보 대상체는 pKal 매개된 장애, 예를 들어 HAE 등의 증상을 갖는 인간 환자이다. 예를 들어, 대상체는 부종, 종창(여기서, 상기 종창은 완전히 또는 주로 말초임); 두드러기; 감염의 증거의 부재 하의 발적, 통증 및 종창; 비히스타민 매개된 부종, 종창의 재발성 발작, 또는 이들의 조합을 갖는다. 다른 실시형태에서, 대상체는 샘플이 수집되는 시간에 pKal 매개된 장애의 증상을 갖지 않거나, pKal 매개된 장애의 증상의 병력을 갖지 않거나, pKal 매개된 장애, 예컨대 HAE의 병력이 없다. 더 다른 실시형태에서, 대상체는 항히스타민 치료제, 코르티코스테로이드 치료제, 또는 둘 다에 내성이다.

[0103] B. 치료 효과의 평가

[0104] 본 명세서에 기재된 검정 방법은 또한 PKal 매개된 장애(예를 들어, HAE)에 대한 치료의 효과를 평가하도록 적

용될 수 있다. 예를 들어, 다수의 생물학적 샘플(예를 들어, 혈액 또는 혈장 샘플)은 치료 전에 및 후에 또는 치료의 과정 동안에 치료가 수행되는 대상체로부터 수집될 수 있다. 서명 펩타이드의 수준은 본 명세서에 기재된 바와 같은 임의의 검정 방법에 의해 측정될 수 있고, 절단된 HMWK(예를 들어, 46kDa 경쇄)에 대한 서명 펩타이드의 수준 또는 절단된-HMWK-특이적 펩타이드 대 HMWK-특이적 펩타이드의 비율은 이렇게 결정될 수 있다. (예를 들어, 46kDa에 대한) 절단된 HMWK에 대한 서명 펩타이드의 값 또는 2개의 서명 펩타이드의 비율이 치료 후에 또는 치료의 과정에 걸쳐 감소하는 경우(절단된 HMWK(예를 들어, 46kDa 경쇄)에 대한 서명 펩타이드의 수준 또는 전에 수집된 샘플에서의 것과 비교하여 후에 수집된 샘플에서의 관심 대상 2개의 서명 펩타이드의 비율), 이것은 치료가 효과적이라는 것을 나타낸다. 몇몇 예에서, 치료는 치료제, 예컨대 본 명세서에 기재된 바와 같은 칼리크레인 결합제, 본 명세서에 기재된 바와 같은 브래디키닌 B2 수용체 길항제 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 C1-INH 대체 물질을 수반한다. 치료제의 예는 DX-2930, SHP643 또는 DX88을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0105] 대상체가 치료에 반응성이 아닌 것으로 확인되면, 치료제의 투약량의 더 높은 용량 및/또는 빈도가 확인된 대상체에게 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 치료제의 투약량 또는 치료제의 투약량의 빈도는 치료에 반응성인 것으로 확인되거나 추가의 치료를 요하지 않는 대상체에서 유지되거나 감소하거나 중단된다. 대안적으로, 상이한 치료는 제1 치료에 반응성이 아닌 것으로 밝혀진 대상체에게 적용될 수 있다.

[0106] *(ii) 비임상학적 용도*

[0107] 추가로, 본 명세서에 기재된 검정 방법은 예를 들어 조사 목적 및/또는 전임상 약물 개발 목적을 위해 비임상학적 분야를 갖는다. pKal과 연관된 많은 질환이 확인되었지만, 다른 질환이 유사한 기전에 의해 매개되거나 유사한 성분을 수반할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법은 pKal과 연관된 것으로서 질환을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법은 질환의 기전(예를 들어, 질환 발생에 관여한 새로운 생물학적 경로 또는 과정의 개발) 또는 진행을 연구하기 위해 사용될 수 있다.

[0108] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 검정 방법에 의해 결정된 서명 펩타이드의 수준 또는 비율은 pKal과 연관된 질환을 위한 새로운 치료제의 개발에 의존할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 서명 펩타이드의 수준 또는 비율은 새로운 치료제(예를 들어, 임상학적 실험)가 투여된 대상체로부터 얻은 샘플에서, 또는 시험관내 검정으로부터 얻은 샘플에서 측정될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 서명 펩타이드의 수준 또는 비율은 시험관내 검정에서의 새로운 치료제의 활성 또는 임상학적 실험 환경에서의 새로운 치료제의 효능을 나타낼 수 있다.

[0109] 추가 노력 없이, 당해 분야의 숙련자가, 상기 설명에 기초하여, 본 발명을 이의 가장 완전한 정도로 이용할 수 있다고 생각된다. 따라서, 하기 구체적인 실시형태는 단지 예시적이고, 무엇이든 어떤 방식으로도 본 개시내용의 나머지를 제한하지 않는 것으로 해석되어야 한다. 본 명세서에서 인용된 모든 공보는 본 명세서에 언급된 목적 또는 대상을 위해 참고로 포함된다.

[0110] **실시예**

[0111] **실시예 1: 전장 HMWK로부터 절단된 고분자량 키니노겐(HMWK)을 구별하는 방법**

[0112] 이 실시예의 전체 목표는 전장 키니노겐(HK; 단쇄 또는 1-사슬 HK) 및 칼리크레인 절단된 키니노겐(2-사슬 생성물 또는 2-사슬 HK, 및 2-사슬 생성물의 중쇄 및/또는 경쇄)을 구별하기 위한 LC-MS 기반 펩타이드 정량화 검정을 위한 튼튼한 방법을 개발하는 것이다. 몇몇 예에서, 이 반정량적 검정은 혈장 칼리크레인과 연관된 질환, 예컨대 HAE를 갖는 환자와 비교하여 건강한 지원자의 생물학적 샘플(예를 들어, 혈장)에서 2-사슬 HK 컷-포인트를 결정하기 위해 2-사슬 HK 생성물 대 1-사슬 HK 기질의 비율을 측정하였다.

[0113] 단쇄 HMWK(1-사슬 HK) 및 2-사슬 HMWK(2HK)(Enzyme Research Laboratories 및 Sigma)는 하기 기재된 실시예에서 표준품으로서 사용되었다. 상이한 유형의 혈장 샘플(시트레이트, 시트레이트 + 프로테이나제 저해제(PI), 정상 SCAT 혈장(SCAT 관에서 수집된 건강한 대상체 혈장 샘플) 및 HAE SCAT 혈장(SCAT 관에서 수집된 HAE 환자 혈장 샘플)을 하기 기재된 실시예에서 사용하였다. 예를 들어 제PCT/US2016/046681호(여기서 관련 개시내용은 본 명세서에 참고로 포함됨)를 참조한다. 품질 관리는 실행 사이에 실행되고, 재현가능성 확인은 상이한 날짜 및 상이한 실행에 공정처리 가변성에 대해 수행되었다. EDTA-혈장(Biochem Services)은 방법 최적화에 대한 대조군으로서 사용되었다.

[0114] 이 실시예에 기재되고 개발된 검정은 질환 과정에서 후보 바이오마커를 검증하기 위해 민감하고 선택적인 방법을 제공한다. 이 접근법을 위해, ABSciex 5500 또는 6500 QTrap 질량 분광계를 사용하고, 방법 최적화 후 다양

한 유형의 혈장 샘플 사이의 차이를 평가하였다. 개별 혈장 샘플(정상 SCAT 및 HAE SCAT 혈장, 키니노겐 결핍 혈장, 정상 시트레이트화 혈장, XIIa 인자에 의해 활성화된 정상 시트레이트화 혈장 및 HK 표준품 포함)을 Glu C에 의해 분해시키고, 관심 대상 펩타이드에서 다중 반응 모니터링(MRM) 분석을 하였다. Glu C는 2-사슬 HK(서명 펩타이드)로부터 1-사슬 HK를 구별하는 고유한 펩타이드를 얻도록 예시적인 프로테이나제로서 사용된다. 간단히 말하면, 초기 실험은 특이적 펩타이드에 대한 MRM 모드를 이용하여 단백질 표준품의 품질을 검증하도록 설계되었다. 10㎍의 단백질을 함유하는 10㎕의 샘플을 C18 칼럼에 로딩한다. Glu C 분해된 혈장 키니노겐에 고유한, Skyline 소프트웨어에 의해 예측된 전구체 및 프로테이나제 분해 생성물 이온을 선택하였다. 혈장 키니노겐에 대해 SSRIGE(서열 번호 5), SSRIGEIKE mis 2(서열 번호 19), KKIYPTVNCQPLGMISLMKRPPGFSPFRSSRIGE(서열 번호 20), KKIYPTVNCQPLGMISLMK(서열 번호 21) 및 SYYFDLTDGLS(서열 번호 10)의 표적 후보 펩타이드, 및 3개 내지 5개의 생성물 이온을 경험적으로 검증하였다. 단편화 에너지 및 충돌 에너지는 MRM을 수행하기 위한 가이드라인에 대해 skyline을 사용한 후 펩타이드에 개별적으로 최적화되었다. Analyst 소프트웨어(ABSciex)를 이용하여 데이터를 분석하였다. 방법 개발은 샘플 제조, 상이한 유형의 혈장 샘플 및 HK 표준품에 대한 효소 분해, 크로마토그래피, 및 질량 분광법 매개변수를 최적화하는 데 초점을 두었다.

[0115] *(i) 면역침전 샘플 대 전체 혈장 샘플*

[0116] 개념 증명 연구를 검증하기 위해, 면역침전에 의해 얻은 4개의 단백질 샘플(IP 샘플) 및 4개의 전체 혈장 샘플(비-IP 샘플)을 연구에 사용하였다. 샘플을 SDS에 의해 용리시키고, 이것을 이후 세제 제거 칼럼에 의해 제거하였다. 표적화된 검정을 AB Sciex 5500 Qtrap 트리플 쿼드 질량 분광계에서 수행하여서, 샘플에서 관심 대상 펩타이드를 검사하였다.

[0117] SSRIGE(서열 번호 5), SSRIGEIKE(서열 번호 19), KKIYPTVNC QPLGMISLMKRPPGFSPFRSSRIGE(서열 번호 18) 및 KKIYPTVNCQPLGMISLMK(서열 번호 21)인 관심 대상 모든 4개의 펩타이드는 비-IP 샘플에서 발견되었지만, IP 혈장 샘플에서 검출되지 않았다. (FXIIa에 의해 처리된) 활성화된 혈장 샘플과 비활성화된 혈장 샘플 사이에 피크 차이가 발견되지 않았다. 하기 표 2는 IP 및 비-IP 샘플에서의 펩타이드의 피크 강도를 보여준다. 활성화된 샘플 또는 비활성화된 샘플(박스 친 열)에서 SSRRIGE(Glu C 분해에 의해 생성된 2HK의 경쇄에 고유한 펩타이드; 서열 번호 22) 또는 KKIYPTVNC QPLGMISLMKRPPGFSPFRSSRIGE(Glu C 분해에 의해 생성된 HK 긴 펩타이드에 고유한 펩타이드; 서열 번호 18)에 대한 피크 강도의 차이가 없었다.

[0118] EDTA 혈장은 IP/비-IP 샘플에 의한 양성 조절로서 실행되고, 관심 대상 모든 펩타이드는 샘플의 유형 둘 다에서 발견되었다.

표 2

IP 및 비-IP 샘플에서 관심 대상 5 개의 펩타이드의 피크 강도

샘플 유형	SSRIGE 강도 (실온)	SSRIGEIKE mis 2 강도 (실온)	RPPGFSPFR 강도 (실온)	KKIYPTVNCQPLGMISLMK 강도 (실온)	긴 HK 펩타이드 강도 (실온)
오래된 혈장	6000 (5.1)	1.2E4 (5.8)	x	600 (17.5)	6.4E4 (16.5)
샘플 1 (HMW)	4800 (4.5)	3000 (5)	x	1300 (17.7)	2900 (15.5)
샘플 2 (LMW)	2.9E4 (4.6)	6500 (5)	x	2380 (17.7)	7400 (15.4)
샘플 3 ≧ 3 (정상 인간 혈장)	4.7E4 (4.8)	X	x	x	9000 (15.3)
샘플 4 (활성화된 인간 혈장)	4.2E4 (4.8)	X	x	x	9000 (15.2)
샘플 5 (HMW-IP)	x	x	x	x	x
샘플 6 (LMW-IP)	x	X	x	x	x
샘플 7 (정상 인간 혈장-IP)	500 (4.5)	1.4E4 (5.1) 높은 하나의 이형	x	x	x
샘플 8 (활성화된 인간 혈장)	640 (4.5)	2.2E4 (5) 높은 하나의 이형	x	x	x

높은 강도
중간 강도
낮은 강도

[0119]

[0120] 결과는 Glu C에 의한 전체 혈장 샘플 분해물이 1-사슬 HK 및 2-사슬 HK 펩타이드 둘 다를 검출하기 위한 충분한 민감도를 제공한다는 것을 입증하였다. 따라서, 예시적인 Glu C 프로테이나제에 의해 분해된 전체 혈장 샘플이

하기 기재된 실험에서 사용되었다.

[0121] *(ii) 샘플 제조 최적화*

[0122] (a) 분해 프로토콜

[0123] 혈장 Glu C 분해를 최적화하기 위해, 다양한 프로토콜을 이용하여 GluC 분해를 최적화하였다. 프로토콜의 상이한 매개변수를 하기 요약된 바대로 변형시켰다:

[0124] - 프로토콜 1: 분해 전에 변성 단계 추가(예를 들어, 0.1M에서 DTT의 존재 하에)

[0125] - 프로토콜 2: 상이한 농도의 환원제 사용(0.05M DTT).

[0126] - 프로토콜 3: 분해 전에 샘플의 10배 희석; 및

[0127] - 프로토콜 4: 19시간으로 효소 항온처리 시간 증가.

[0128] 프로토콜 2는 피크 강도 및 피크 형사에 기초하여 SSRIGE(서열 번호 5) 및 KKIYPTVNCQPLGMISLMK(서열 번호 21)의 더 양호한 검출을 발생시켰다. 따라서, 후속하는 실험에서 프로토콜 2 분해 방법을 사용하였다.

[0129] (b) 환원 온도 및 항온처리 시간

[0130] 환원 온도 및 항온처리 시간을 또한 최적화하였다. 간단히 말하면, 분해 동안 샘플을 환원시키기 위한 온도(55℃ 내지 90℃) 및 항온처리 시간(30분 대 60분)을 평가하도록 HK 표준품 및 EDTA 혈장을 사용하였다.

[0131] - HK: 1시간 동안 90℃

[0132] - HK: 30분 동안 55℃

[0133] - 혈장 EDTA(Biochem): 1시간 동안 90℃

[0134] - 혈장 EDTA(Biochem): 30분 동안 55℃

[0135] 샘플은 sing 다중 반응 모니터링(MRM) 분석에 의해 분석되어서, SSRIGE(서열 번호 5) 및 KKIYPTVNCQPLGMISLMKRPPGFSPFRSSRIGE(서열 번호 20) 펩타이드를 검출하였다. 피크 강도는 30분 동안 55℃에서 환원된 샘플과 비교하여 1시간 동안 90℃에서 환원된 샘플(HK 표준 샘플 및 혈장 샘플 둘 다)에서 더 높은 것으로 발견되었다. 1시간 동안 90℃에서의 항온처리를 포함하는 조건은 후속하는 실험에서 샘플을 환원시키기 위해 사용되었다.

[0136] (c) 혈장에서의 프로테이나제 저해제(PI) 및 항응고제

[0137] 분해 효율에 대한 혈장에서의 PI 및 항응고제의 존재의 효과는 또한 평가되었다. 분해 효율은, EDTA에 대하여, PI가 있고 없는 혈장에 대해 및 또한 항응고제로서 시트레이트를 함유하는 혈장 사이에 분석되었다. AB Sciex 5500 Qtrap LC-MS/MS 시스템을 사용하여 MRM 분석에 의해 샘플을 평가하고, 도 3에서 화살표로 표시된, SSRIGE(서열 번호 5)에 대해 피크 강도를 비교하였다. 이 결과는 하기를 나타낸다:

[0138] ***PI가 없는 혈장 EDTA > PI가 있는 혈장 EDTA > PI 없이 시트르화된 혈장 > PI에 의해 시트르화된 혈장.***

[0139] 이 결과는, 펩타이드의 반응의 감소가 시트레이트, PI 또는 둘 다를 함유하는 샘플에서 보이면서, 시트레이트 및 프로테이나제 저해제가 Glu C 분해에 부정적인 효과를 가진다는 것을 또한 나타낸다.

[0140] *(iii) 서열 커버리지를 확인하기 위한 상이한 효소 분해*

[0141] 서열 커버리지가 효소 의존적인지를 조사하기 위해, 트립신인 상이한 효소를 사용하였다. Sigma로부터의 HK 표준 샘플 및 Biochem으로부터의 EDTA-혈장 샘플을 트립신에 의해 분해시키고, 고해상 정밀 질량 기구(HRAM)에서 실행시키고, proteome discoverer를 사용하여 분석을 수행하였다. Proteome Discoverer(상표명) 소프트웨어를 사용하여 결과를 분석하였다.

[0142] 양호한 서열 커버리지에 의해 트립신에 의해 분해된 HK 및 혈장 샘플 둘 다에서 전장 키니노겐을 검출하였다.

[0143] *(iv) EDTA-혈장 및 HK 샘플의 단일 이온 모니터링(SIM)*

[0144] 더 높은 농도를 갖는 HK 및 혈장 샘플은 SIM에 사용되고, 고해상 정밀 질량(HRAM) 기구를 사용하여 관심 대상 펩타이드를 검출하였다. EDTA 혈장 및 HK sigma 샘플에서 SIM-MS^2 데이터 분석을 수행하였다.

[0145] HRAM 기구에서의 Glu C 분해된 EDTA 혈장 샘플의 분석은 SSRIGE(서열 번호 5), KKIYPTVNCQPLGMISLMK(서열 번호 21), HK 긴 펩타이드 및 브래디키닌인 모든 4개의 펩타이드의 검출을 발생시켰다. HK 표준 샘플과 관련하여, 펩타이드 SSRIGE(서열 번호 5), KKIYPTVNCQPLGMISLMK(서열 번호 21) 및 브래디키닌은 발견되지만, HK 긴 펩타이드는 발견되지 않았다.

[0146] 표준품의 동일성을 확인하기 위해, HK의 2개의 상이한 공급원(Enzyme research 및 Sigma)을 사용하였다. 그러나, 이 실험에서 2개의 표준품 사이에 확인된 검출 가능한 차이가 없었고, 어떤 표준 샘플에서도 HK 긴 펩타이드가 검출되지 않았다.

[0147] *(v) 상이한 유형의 혈장, 상이한 Glu C 및 상이한 효소 대 단백질 비율*

[0148] Glu C 분해를 추가로 최적화하기 위해, 상이한 유형의 혈장 샘플(EDTA, 시트르화, PI 유 및 무), 상이한 Glu C 공급원(Protea 및 Promega) 및 상이한 효소:단백질 비율(1:20 및 1:10)을 분석하였다. 추가로, 풀 스캔, (HRAM 에서의) SIM-MS^2, (QQQ; 트리플 Quad 기구에서의) MRM을 포함하는 다양한 검출 플랫폼은 상이한 샘플에서 관심 대상 펩타이드를 검출하도록 사용되었다. 표 3은 이 실험에 사용된 샘플 유형, 효소 및 희석의 다양한 조합의 요약을 보여준다.

표 3

시험된 조건의 요약

[0149]

샘플 유형	분해에 사용된 효소	효소: 단백질
EDTA 혈장(Biochem)	Protea Glu C 및 Promega Glu C	1:20 및 1:10
시트르화 혈장(Sponsor)	Protea Glu C 및 Promega Glu C	1:20 및 1:10
HK Sigma	Protea Glu C 및 Promega Glu C	1:20 및 1:10
EDTA 혈장(Biochem) + PI	Protea Glu C 및 Promega Glu C	1:20
시트레이트화 혈장 (Sponsor) + PI	Protea Glu C 및 Promega Glu C	1:20

[0150] (a) 풀 스캔 및 SIM-MS^2(HRAM)

[0151] 상기 기재된 상이한 유형의 혈장 및 표준 샘플을 Glu C에 의해 분해시키고, 분해 절차를 풀 스캔 및 SIM-MS^{2}에 대해 HRAM 기구에서 실행하였다. 샘플 정보는 범례 색상 지도의 오른손 측에 도시되어 있다. Proteome Discoverer(상표명) 소프트웨어 및 Xcalibur(상표명) 소프트웨어를 사용하여 분석을 수행하여 관심 대상 각각의 펩타이드에 대해 피크 강도를 결정하였다.

[0152] 혈장 샘플에 대해, SSRIGE(서열 번호 5)에 대한 펩타이드 강도의 하기 반응이 관찰되었다:

[0153] ***PI가 없는 혈장 EDTA > PI를 갖는 혈장 EDTA > PI 없이 시트르화된 혈장 > PI에 의해 시트르화된 혈장.***

[0154] 1:20(효소:단백질) 비율이 1:10(효소:단백질) 비율보다 더 양호한 반응을 발생시켰다는 것이 결정되었다. HK 긴 펩타이드에 대해, 강도는 혈장의 유형 또는 효소:단백질 비율에 의해 오직 최소로 영향을 받았다. HK 긴 펩타이드는 어떠한 표준 샘플에서도 관찰되지 않았지만, KKYIPTVNCQPLGMISLMK 펩타이드(서열 번호 23) 및 브래디키닌은 모든 표준품에서 검출되어서, HK 긴 펩타이드가 저하될 수 있다는 것을 나타낸다. 임의의 특정한 이론에 구속되지 않으면서, 이것은 KKIYPTVNCQPLGMISLMK(서열 번호 21), RPPGFSPFR(서열 번호 24) 및 SSRIGE(서열 번호 5)를 포함하는 HK 긴 펩타이드의 다양한 단편의 관찰을 설명할 수 있다.

[0155] 하기 표 4는 (샘플 종류에 의해 구별된) HRAM 기구에서 풀 스캔 및 SIM-MS^2 데이터를 이용하여 관심 대상 펩타이드의 강도를 보여준다.

표 4

관심 대상 펩타이드의 강도

샘플 유형	SSRIGE (서열 번호 5)	SSRIGEIKE-mis[2] (서열 번호 19)	KKIYPTVNCQPLGMISLMK(서열 번호 21)	브래디키닌	KKIYPTVNCQPLGMISLMKRPPGFSPFRSSRIGE (서열 번호 20)
A1: 혈장 EDTA(Biochem) Protea Glu C 1:20	++++	+/-	+++	-	++++
B1: 혈장 EDTA(Biochem) Promega Glu C 1:20	++++	+/-	+++	-	++++
E1: 혈장 EDTA(Biochem) Protea Glu C 1:10	+++	+/-	+++	-	++++
F1: 혈장 EDTA(Biochem) Promega Glu C 1:10	+++	+/-	+++	-	++++
A2: 혈장 시트르화, Protea Glu C:1:20	++++	+/-	+++	-	++++
B2: 혈장 시트르화, Promega Glu C:1:20	++++	+/-	+++	-	++++
E2: 혈장 시트르화, Protea Glu C:1:10	+++	+/-	+++	-	++++
F2: 혈장 시트르화, Promega Glu C:1:10	+++	+/-	+++	-	++++
C1: 혈장 EDTA (Biochem) + PI, protea Glu C 1:20	++	+/-	+++	-	++++

[0156]

C2: 혈장 시트르화 + PI, proea Glu C 1:20	++	+/-	+++	-	++++
D1: 혈장 EDTA (Biochem) + PI, Promega Glu C 1:20	++	+/-	+++	-	++++
D2: 혈장 시트르화 + PI, promega Glu C 1:10	++	+/-	+++	-	++++
A3: HK Sigma, Protea Glu C 1:20	++++	+/-	+++	+	-
B3: HK Sigma, Promega Glu C 1:20	++++	+/-	+++	+	-
E3: HK Sigma, Protea Glu C 1:10	+++	+/-	+++	+	-
F3: HK Sigma, Promega Glu C 1:10	+++	+/-	+++	+	-

++++: 높은 풍부도
+++: 중간 풍부도
++: 낮은 풍부도
+: 매우 낮은 풍부도
+/-: 무시할만한 풍부도
-: 부재

[0157]

[0158] (b) 다중 반응 모니터링(MRM) 표적화된 검정

[0159] 상기 기재된 샘플의 동일한 세트를 사용하여 표적화된 검정(MRM)을 이용하여 관심 대상 펩타이드를 검출하였다. AB Sciex Qtrap 5500 기구를 사용한 검출에 따라 AB Sciex Analyst 소프트웨어를 사용하여 샘플을 분석하였다. 샘플 정보는 색상 지도의 오른쪽 측에 제시된다.

[0160] SSRIGE 펩타이드(서열 번호 5)의 검출은 샘플 유형 및 조건에 무관하게 일치하게 관찰되었다. 최적화된 샘플 제조에 의해, SSRIGEKE(서열 번호 25) 펩타이드가 검출되지 않았다. 그러나, HK 긴 펩타이드는 HK 표준 샘플에서가 아니라 오직 혈장 샘플에 존재하였다. KKYIPTVNCQPLGMISLMK(서열 번호 23) 펩타이드 및 브래디키닌 펩타이드는 모든 HK 표준 샘플에 존재하지만, HK 긴 펩타이드는 검출되지 않았다. 이 결과는 상기 기재된 풀 스캔 및 MS^2로부터의 데이터 세트와 유사하고, HK 긴 펩타이드가 저하될 수 있다는 것을 제안하여서, 상기 기재된 HK 긴 펩타이드 단편의 관찰을 추가로 설명한다.

[0161] 하기 표 5는 (샘플 목록에 의해 구별된) AB Sciex Qtrap 5500 기구에서의 MRM 데이터를 이용하여 관심 대상 펩타이드의 강도를 보여준다.

표 5

관심 대상 펩타이드의 강도

샘플 유형	SSRIGE (서열 번호 5)	SSRIGEIKE-mis[2] (서열 번호 19)	KKIYPTVNCQPL GMISLMK(서열 번호 21)	브래디키닌	KKIYPTVNCQPL GMISLMKRPPGF SPFRSSRIGE (서열 번호 20)
A1: 혈장 EDTA(Biochem) Protea Glu C 1:20	++++	-	+++	+/-	++++
A2: 혈장 시트르화, Protea Glu C:1:20	++++	-	+++	-	++++
A3: HK Sigma, Protea Glu C 1:20	++++	-	+++	+	-
B1: 혈장 EDTA(Biochem) Promega Glu C 1:20	++++	-	+++	-	++++
B2: 혈장 시트르화, Promega Glu C:1:20	++++	-	+++	-	++++
B3: HK Sigma, Promega Glu C 1:20	++++	-	+++	+	-
C1: 혈장 EDTA (Biochem) + PI, protea Glu C 1:20	++++	-	+++	-	++++
C2: 혈장 시트르화 + PI, proea Glu C 1:20	++++	-	+++	+	++++
D1: 혈장 EDTA (Biochem) + PI, Promega Glu C 1:20	++++	-	+++	-	++++
D2: 혈장	++++	-	+++	-	++++

[0162]

시트르화 + PI, promega Glu C 1:10					
E1: 혈장 EDTA(Biochem) Protea Glu C 1:10	++++	-	+++	-	++++
E2: 혈장 시트르화, Protea Glu C:1:10	++++	-	+++	-	++++
E3: HK Sigma, Protea Glu C 1:10	++++	-	+++	+	-
F1: 혈장 EDTA(Biochem) Promega Glu C 1:10	++++	-	+++	-	++++
F2: 혈장 시트르화, Promega Glu C:1:10	++++	-	+++	-	++++
F3: HK Sigma, Promega Glu C 1:10	++++	-	+++	+	-

++++: 높은 풍부도
+++: 중간 풍부도
++: 낮은 풍부도
+: 매우 낮은 풍부도
+/-: 무시할만한 풍부도
-: 부재

[0163]

[0164] (c) HRAM 및 Proteome Discoverer(상표명) 소프트웨어를 사용한 서열 커버리지

[0165] 단백질 분해에 대한 최적 Glu C 농도를 결정하기 위해, HK 표준 샘플의 서열 커버리지를 상이한 공급원(Protea 및 Promega) 및 상이한 효소:단백질 농도(1:20 및 1:10)로부터의 Glu C에 의한 분해에 따라 HRAM 기구에서 풀 스캔에 의해 분석하였다. 서열 커버리지가 더 관심 대상 영역에 있으므로, 어느 한 공급원으로부터 Glu C의 1:20 희석은 분해에 대해 최적으로 수행되었다. 하기 제공된 바대로, 1:10 희석은 또한 관심 대상 영역에서의 커버리지를 제공하였지만, 펩타이드는 낮은 신뢰도 점수를 가졌다.

MKLITILFLCSRLLLSLTQESQSEEIDCNDKDLFKAVDAALKKYNSQNQSNNQFVLYRITEATKTVGSDT
FYSFKYEIKEGDCPVQSGKTWQDCEYKDAAKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTCQITPAEGPVVTAQY
DCLGCVHPISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSLFMLNEVKRAQRQVVAGLNFRITYSIVQTNCSKEN
FLFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQLRIASFSQNCDIYPGKDFVQPPTKICVGCPRDIPTNSPELEE
TLTHTITKLNAENNATFYFKIDNVKKARVQVVAGKKYFIDFVARETTCSKESN**EELTE**SCETKKLGQSLD
CNAE**VYVVPWE**KKIYPTVNCQPLGMISLMK***RPPGFSPFR***SSRIGEIKEETTVSPPHTSMAPAQDEERDSG
KEQGHTRRHDWGHEKQRKHNLGHGHKHERDQGHGHQRGHGLGHGHEQQHGLGHGHKFKLDDDLEHQGGHV
LDHGHKHKHGHGHGKHKNKGKKNGKHNGWKTEHLASSSEDSTTPSAQTQEKTEGPTPIPSLAKPGVTVTF
SDFQDSDLIATMMPPISPAPIQSDDDWIPDIQIDPNGLSFNPISDFPDTTSPKCPGRPWKSVSEINPTTQ
MKESYYFDLTDGLS (서열 번호 11)

[0166]

[0167] 1-사슬 HMWK의 상기 아미노산 서열에서, 볼드체의 Glu-C 유래한 펩타이드는 단일 이온에 의해 확인되는 한편, 밑줄 친 펩타이드는 다수의 이온에 의해 확인되었다. 브래디키닌은 이택릭체이고 볼드체이다.

[0168] *(vi) 고분자량 키니노겐(HMWK) 및 저분자량 키니노겐(LMWK)의 서열 정렬*

[0169] LMWK와 비교하여 HMWK에 대한 고유한 펩타이드를 확인하기 위해, 키니노겐의 이 2개의 유형의 서열 정렬을 UniProt 소프트웨어를 이용하여 수행하고, 하기 제공된다(hHMWK: 서열 번호 11; hLMWK: 서열 번호 12):

```
hHMWK   1    MKLITILFLCSRLLLSLTQESQSEEIDCNDKDLFKAVDAALKKYNSQNQSNNQFVLYRIT  60
             ************************************************************
hLMWK   1    MKLITILFLCSRLLLSLTQESQSEEIDCNDKDLFKAVDAALKKYNSQNQSNNQFVLYRIT  60

hHMWK   61   EATKTVGSDTFYSFKYEIKEGDCPVQSGKTWQDCEYKDAAKAATGECTATVGKRSSTKFS  120
             ************************************************************
hLMWK   61   EATKTVGSDTFYSFKYEIKEGDCPVQSGKTWQDCEYKDAAKAATGECTATVGKRSSTKFS  120

hHMWK   121  VATQTCQITPAEGPVVTAQYDCLGCVHPISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSLFMLN  180
             ************************************************************
hLMWK   121  VATQTCQITPAEGPVVTAQYDCLGCVHPISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSLFMLN  180

hHMWK   181  EVKRAQRQVVAGLNFRITYSIVQTNCSKENFLFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQLR  240
             ************************************************************
hLMWK   181  EVKRAQRQVVAGLNFRITYSIVQTNCSKENFLFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQLR  240

hHMWK   241  IASFSQNCDIYPGKDFVQPPTKICVGCPRDIPTNSPELEETLTHTITKLNAENNATFYFK  300
             ************************************************************
hLMWK   241  IASFSQNCDIYPGKDFVQPPTKICVGCPRDIPTNSPELEETLTHTITKLNAENNATFYFK  300

hHMWK   301  IDNVKKARVQVVAGKKYFIDFVARETTCSKESNEELTESCETKKLGQSLDCNAEVYVVPW  360
             ************************************************************
hLMWK   301  IDNVKKARVQVVAGKKYFIDFVARETTCSKESNEELTESCETKKLGQSLDCNAEVYVVPW  360

hHMWK   361  EKKIYPTVNCQPLGMISLMKRPPGFSPFRSSRIGEIKEETTVSPP---------HTSMAP  411
             ****************************************                *
hLMWK   361  EKKIYPTVNCQPLGMISLMKRPPGFSPFRSSRIGEIKEETTSHLRSCEYKGRPPKAGAEP  420

hHMWK   412  AQDEERDSGKEQGHTRRHDWGHEKQRKHNLGHGHKHERDQGHGHQRGHGLGHGHEQQHGL  471
             *   *
hLMWK   421  ASEREVS-------------------------------------------------------

hHMWK   412  GHGHKFKLDDDLEHQGGHVLDHGHKHKHGHGHGKHKNKGKKNGKHNGWKTEHLASSSEDS  531
hLMWK   427  ------------------------------------------------------------

hHMWK   532  TTPSAQTQEKTEGPTPIPSLAKPGVTVTFSDFQDSDLIATMMPPISPAPIQSDDDWIPDI  591
hLMWK   427  ------------------------------------------------------------

hHMWK   592  QIDPNGLSFNPISDFPDTTSPKCPGRPWKSVSEINPTTQMKESYYFDLTDGLS         644
```

[0170]

[0171] 4개의 펩타이드는 LMWK와 비교하여 HMWK에 고유한 것으로 발견되었다:

[0172] 1. SYYFDLTDGLS(서열 번호 10)

[0173] 2. INPTTQMKE(서열 번호 26)

[0174] 3. KQRKHNLGHGHKHE(서열 번호 7)

[0175] 4. EDSTTPSAQTQE(서열 번호 27)

[0176] a. HRAM에서 풀 스캔 및 MS^2를 이용한 HK 샘플에서의 HMWK에 대한 고유한 펩타이드의 검출

[0177] 고유한 펩타이드 SYYFDLTDGLS(서열 번호 10)에 의해 시작하여, 풀 스캔 및 MS^2는 Glu C 분해된 HK 표준품을 사용하여 실행되었다. 풀 스캔 및 MS^2는 HRAM 기구에서 실행되고, Proteome Discoverer(상표명) 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 하기 기재된 바대로, HMWK에 대한 고유한 펩타이드는 HK 표준품에서 검출되어서, HK 표준품이 HMWK를 함유한다는 것을 제안한다.

[0178]
```
MKLITILFLCSRLLLSLTQESQSEEIDCNDKDLFKAVDAALKKYNSQNQSNNQFVLYRITEATKTVGSDT
FYSFKYEIKEGDCPVQSGKTWQDCEYKDAAKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTCQITPAEGPVVTAQY
DCLGCVHPISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSLFMLNEVKRAQRQVVAGLNFRITYSIVQTNCSKEN
FLFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQLRIASFSQNCDIYPGKDFVQPPTKICVGCPRDIPTNSPELEE
TLTHTITKLNAENNATFYFKIDNVKKARVQVVAGKKYFIDFVARETTCSKESNEELTESCETKKLGQSLD
CNAEVYVVPWEKKIYPTVNCQPLGMISLMKRPPGFSPFRSSRIGEIKEETTVSPPHTSMAPAQDEERDSG
KEQGHTRRHDWGHEKQRKHNLGHGHKHERDQGHGHQRGHGLGHGHEQQHGLGHGHKFKLDDDLEHQGGHV
LDHGHKHKHGHGHGKHKNKGKKNGKHNGWKTEHLASSSEDSTTPSAQTQEKTEGPTPIPSLAKPGVTVTF
SDFQDSDLIATMMPPISPAPIQSDDDWIPDIQIDPNGLSFNPISDFPDTTSPKCPGRPWKSVSEINPTTQ
MKE SYYFDLTDGLS (서열 번호 11)
```

[0179] HMWK 특이적 펩타이드의 위치는 하기 기재된 HMWK의 아미노산 서열에서 볼드체이고 밑줄 쳐 있다.

[0180] b. MRM에 의한 HK 샘플 및 EDTA 혈장에서의 HMWK에 대한 고유한 펩타이드의 검출

[0181] 표준품에서의 HMWK의 존재를 검출하고, 이것을 혈장 샘플과 비교하기 위해, Glu C 분해된 HK 및 Glu C 분해된

혈장을 표적화된 분석을 이용하여 AB Sciex 5500 Qtrap에서 실행하였다. HMWK 고유한 펩타이드(SYYFDLTDGLS; 서열 번호 10)는 MRM 검정을 이용하여 샘플 둘 다에서 검출되었지만, 펩타이드의 피크 강도는 HK 표준품과 비교하여 혈장에서 더 낮았다. 이것은 혈장에서의 복잡함 및 높은 배경 노이즈로 인한 것으로 예상되었다. 이 결과는 펩타이드가 HMWK 기원이라는 것을 확인시켜주었다.

[0182] *(vii) 분해 조건*

[0183] a. 25℃ 및 37℃에서의 Glu C에 의한 HK 및 혈장 분해

[0184] 37℃에서보다 25℃에서의 Glu C에 의해 HK 및 혈장 샘플을 분해시키는 것의 효능을 평가하였다. HMWK에 대한 고유한 펩타이드는 HK 표준품에서 검출되었지만, HK 긴 펩타이드는 표준품에서 검출되지 않았다. 불완전한 분해가 있는지 또는 고온이 브래디키닌 및 KKYIPTVNCQPLGMISLMK(2HK 중쇄 펩타이드에 특이적; 서열 번호 23)로 HK 표준품을 저하시키는지를 시험하기 위해, 혈장 및 HK 샘플을 37℃에서보다 25℃에서 Glu C에 의해 분해시켰다. MRM 분석을 이용하여, HMWK 고유한 펩타이드를 포함하는 관심 대상 펩타이드를 표적화하고 검출하였다. 피크 강도는 하기와 같다:

[0185] HK Sigma Glu C 25℃:

[0186] • SSRIGE(서열 번호 5): 5960

[0187] • KKIYPTVNCQPLGMISLMKRPPGFSPFRSSRIGE(서열 번호 20): 4000

[0188] • SYYFDLTDGLS(서열 번호 10): 7.6 e4

[0189] HK Enzyme research Glu C 25℃:

[0190] • SSRIGE(서열 번호 5): 4.5 e5

[0191] • SSRIGEIKE mis^{2}(서열 번호 19): 1.5 e5

[0192] • KKIYPTVNCQPLGMISLMKRPPGFSPFRSSRIGE(서열 번호 20): 2.3 e5

[0193] • SYYFDLTDGLS(서열 번호 10): 4.6 e5

[0194] 25℃에서의 (Enzyme research 및 Sigma로부터의) HK 표준품의 Glu C 분해가 HK 긴 펩타이드를 포함하는 관심 대상 모든 3개의 펩타이드(이는 고온이 표준품을 저하시킨다는 것을 나타냄) 및 이에 따라 37℃에서 분해될 때 검출되지 않은 HK 긴 펩타이드의 검출을 발생시킨다는 것이 발견되었다. Enzyme research로부터 얻은 표준품은 Sigma로부터 얻은 표준품과 비교하여 더 높은 피크 강도를 생성시켰다. mis 2 절단된 펩타이드 SSRIGEIKE(서열 번호 19)는 Enzyme research 표준품에서 발견되었다. 혈장 샘플에 관해서, 결과는 37℃에서의 Glu C 분해가 25℃에서의 Glu C 분해보다 더 양호한 분해 효율을 발생시켰다는 것을 나타냈다. 도 1. 25℃에서의 표준품을 사용한 긴 펩타이드 및 다른 HMWK 고유한 펩타이드의 확인은 혈장 샘플에서 관찰된 펩타이드가 HK 유래라는 것을 나타낸다.

[0195] 25℃에서 혈장 샘플에서 SSRIGE(서열 번호 5)를 제외한 펩타이드가 검출되지 않았지만, 예상된 바와 같은 관심 대상 모든 펩타이드는 37℃에서 분해된 혈장 샘플에서 관찰되었다(도 1). 37℃에서가 아니라 25℃에서 표준품 둘 다에서 HK 긴 펩타이드가 관찰되었다.

[0196] 이 결과는 25℃에서의 Glu C에 의한 분해가 표준 샘플에 대해 더 양호한 한편, 37℃ 분해에서의 분해가 혈장에 대해 더 양호하게 작용한다는 것을 제안하였다.

[0197] a. 고해상 정밀 질량 기구(HRAM)를 이용한 최적화된 분해 방법

[0198] 또 다른 검출 플랫폼이 25℃에서 분해된 혈장 샘플에서 관심 대상 펩타이드를 검출하기 위해 사용될 수 있는지를 결정하기 위해, HK 긴 펩타이드 및 HMWK 고유한 펩타이드를 포함하는 관심 대상 펩타이드를 검출하기 위해 풀 스캔에 대해 25℃ 및 37℃ Glu C 분해된 샘플(HK 및 혈장 둘 다)을 HRAM 기구에서 또한 분석하였다.

[0199] 관심 대상 모든 펩타이드 및 HMWK 고유한 펩타이드는 25℃에서 분해된 HK 표준 샘플 및 37℃에서 분해된 혈장 샘플에서 검출되었다. 이 데이터 세트는, Enzyme research로부터의 HK 표준품에서 보통 보이는 mis 2 절단된 펩타이드 SSRIGEIKE(서열 번호 19)를 제외하고, 상기 기재된 MRM 데이터와 일치하였다. LMWK 고유한 펩타이드

YKGRPPKAGAE(서열 번호 28)는 또한 이 검정에 포함되었고, 예상된 것과 일치하게 HK 표준품에서가 아니라 혈장 샘플에서 발견되었다(도 2. 3).

[0200] b. 25℃에서의 HK-풀 스캔의 서열 커버리지

[0201] HK 표준품의 서열 커버리지는 최적화된 HK Glu C 분해, Glu C 공급원, 및 효소 대 단백질 비율을 이용하여 평가되었다. 간단히 말하면, 1:20의 효소:단백질 비율에 의해 25℃에서 수행된 Glu C 분해는 특히 관심 대상 영역(HK 긴 펩타이드)에서 높은 신뢰도 점수에 의해 유의미하게 개선된 HK의 서열 커버리지를 발생시켰다(Enzyme research 및 Sigma 둘 다).

MKLITILFLCSRLLLSLTQESQSEEIDCNDKDLFKAVDAALKKYNSQNQSNNQFVLYRITEATKTVGSDT
FYSFKYEIKEGDCPVQSGKTWQDCEYKDAAKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTCQITPAEGPVVTAQY
DCLGCVHPISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSLFMLNEVKRAQRQVVAGLNFRITYSIVQTNCSKEN
FLFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQLRIASFSQNCDIYPGKDFVQPPTKICVGCPRDIPTNSPELEE
TLTHTITKLNAENNATFYFKIDNVKKARVQVVAGKKYFIDFVARETTCSKESNEELTESCETKKLGQSLD
CNAEVYVVPWE**KKIYPTVNCQPLGMISLMKRPPGFSPFRSSRIGE**IKEETTVSPPHTSMAPAQDEERDSG
KEQGHTRRHDWGHEKQRKHNLGHGHKHERDQGHGHQRGHGLGHGHEQQHGLGHGHKFKLDDDLEHQGGHV
LDHGHKHKHGHGHGKHKNKGKKNGKHNGWKTEHLASSSEDSTTPSAQTQEKTEGPTPIPSLAKPGVTVTF
SDFQDSDLIATMMPPISPAPIQSDDDWIPDIQIDPNGLSFNPISDFPDTTSPKCPGRPWKSVSEINPTTQ
MKESYYFDLTDGLS (서열 번호 11)

[0202]

[0203] HK 긴 펩타이드의 위치는 하기 표시된 HMWK의 아미노산 서열에서 볼드체이고 밑줄 쳐 있다.

[0204] c. HRAM 기구에서의 풀 스캔 및 SIM

[0205] HRAM 기구를 사용한 SIM 및 풀 스캔은 HK 긴 펩타이드를 검출하기 위해 25℃에서 분해된 HK 표준품에서 또한 수행되었다. HK 긴 펩타이드는 25℃에서의 분해 후 HRAM 기구에서 풀 스캔 및 SIM에 의해 HK 표준품에서 관찰되었다.

[0206] *(viii) 25℃ 분해에서의 Glu C에 대한 HMWK 대 LMWK-고유한 펩타이드*

[0207] (LMWK와 대비된) INPTQMKE(서열 번호 29) 및 SYYDDGLS(서열 번호 30)인 HMWK의 2개의 추가의 고유한 펩타이드를 첨가하고, MRM 분석을 수행하여 이 고유한 펩타이드를 검출하였다. 25℃에서의 HK 표준품(HK Sigma 및 HK Enzyme research)의 분해 후, 추가의 HMWK 고유한 펩타이드가 관찰되어서, HK의 존재를 확인시켜주었다.

[0208] *(ix) 최적화된 방법에 의한 상이한 유형의 샘플 사이의 차이의 분석*

[0209] a. 표적화된 검정(MRM)을 이용한 혈장 샘플에서의 SSRIGE(서열 번호 5)의 정량화

[0210] 개별 혈장 샘플을 Glu C에 의해 분해시키고, MRM 분석을 수행하여 SSRIGE(서열 번호 5)인 관심 대상 펩타이드를 검출하였다. 샘플은 정상 SCAT 및 HAE SCAT 혈장 샘플, 키니노겐 결핍 혈장 샘플, 정상 시트르화된 혈장 샘플, XIIa 인자에 의해 활성화된 정상 시트르화된 혈장 샘플 및 HK 표준 샘플품을 포함하였다.

[0211] 도 3에 도시된 바대로, SSRIGE(서열 번호 5) 펩타이드는 분석물질 소프트웨어의 정량화 마법사를 이용하여 정량화되었다. SSRIGE(서열 번호 5) 펩타이드의 유의미한 증가는 정상 SCAT 혈장 샘플과 비교하여 HAE SCAT 혈장 샘플에서 검출되었다. 비활성화된 혈장 샘플과 비교하여 활성화된 혈장에서 SSRIGE(서열 번호 5) 펩타이드의 주목할만한 증가가 또한 있었다. 키니노겐 결핍 혈장 샘플은 HMWK가 부재한 후로 예상된 최소 SSRIGE(서열 번호 5) 펩타이드를 나타냈다.

[0212] b. 표적화된 검정(MRM)을 이용한 혈장 샘플에서의 HK 긴 펩타이드의 정량화

[0213] 혈장 샘플을 Glu C에 의해 분해시키고, MRM 분석을 수행하여 HK 긴 펩타이드를 검출하였다. 샘플은 정상 SCAT 및 HAE SCAT 혈장 샘플, 키니노겐 결핍 혈장 샘플, 정상 시트르화된 혈장 샘플, XIIa 인자에 의해 활성화된 정상 시트르화된 혈장 샘플 및 HK 표준품을 포함하였다. 정상 SCAT 혈장 샘플과 HAE SCAT 혈장 샘플 사이에 검출된 HK 긴 펩타이드에서 매우 최소의 변경이 있었다. 추가로, 활성화된 샘플과 비활성화된 샘플 사이에 차이가 관찰되지 않았다. 도 4.

[0214] *(x) Glu C 분해에 대한 일치성 및 재현가능성의 평가*

[0215] 일마다의 Glu C 분해의 재현가능성을 평가하기 위해, HK 표준품 및 혈장(혈장 시트레이트 + PI) 샘플은 연속 3일에 분해되었고, MRM 분석은 관심 대상 펩타이드를 검출하기 위해 수행되었다(하기 표 6A 및 표 6B 참조). 관심 대상 모든 펩타이드는 표시된 피크 강도로 HK 표준품 및 혈장 샘플에 존재하였다. 표 6A 및 표 6B. HK 표준

품 및 혈장(혈장 시트레이트 + PI)에 대한 Glu C 분해 데이터의 각각의 3일은 일치하는 결과를 가졌다.

표 6A. 연속 3일에 Glu C에 의해 분해된 HK

HK-Sigma 분해	SSRIGE 피크 강도	KKIYPTVNCQPLGMISLMK 피크 강도	SYYFDLTDGLS 피크 강도
1일	3660	700	4.9 E4
2일	3900	920	4.5 E4
3일	3000	1200	4.8 E4

[0216]

표 6B. 연속 3일에 Glu C에 의해 분해된 혈장 시트레이트 + PI

혈장 시트레이트 + PI 분해	SSRIGE 피크 강도	긴 HK 펩타이드 피크 강도	SYYFDLTDGLS 피크 강도
1일	720	1.5 E4	3000
2일	750	1.4 E4	2200
3일	440	1.7 E4	2173

[0217]

[0218] *(xi) SSRIGE(서열 번호 5)와 SYYFDLTDGLS(서열 번호 10) 사이의 비율*

[0219] a. SSRIGE(서열 번호 5) 및 SYYFDLTDGLS 펩타이드(서열 번호 10)의 비율의 계산

[0220] 정상 혈장 대 HAE를 갖는 개인으로부터의 혈장에서 표적화 검정(MRM)에 의해 SSRIGE(서열 번호 5)와 SYYFDLTDGLS(서열 번호 10) 펩타이드 사이의 비율을 계산하기 위해 Glu C 분해된 HK 및 혈장 샘플을 사용하였다. HMWK 고유 펩타이드에 대항한 SSRIGE(서열 번호 5) 펩타이드의 비율의 측정은 예를 들어 진단학적 검정에서 사용될 수 있다. 모든 비율 및 평균 비율은 Analyst(등록상표) 소프트웨어를 사용한 정량화에서 펩타이드의 피크 하 면적을 취함으로써 계산되었다.

[0221] SSRIGE(서열 번호 5)/ SYYFDLTDGLS(서열 번호 10)의 비율의 전체 증가가 정상 SCAT 혈장 샘플과 비교할 때 HAE SCAT 혈장 샘플에서 관찰되었다. 활성화된 혈장 대 비활성화된 혈장에서 SSRIGE(서열 번호 5)/ SYYFDLTDGLS(서열 번호 10)의 비율의 유의미한 증가가 또한 있었다(도 5).

[0222] b. SSRIGE(서열 번호 5)와 SYYFDLTDGLS 펩타이드(서열 번호 10) 사이의 평균 비율

[0223] SSRIGE(서열 번호 5)/SYYFDLTDGLS(서열 번호 10)의 평균 비율을 MRM 표적화 검정을 이용하여 피크 하 면적에 의해 상이한 샘플 유형에서 계산하였다(도 6). SSRIGE(서열 번호 5)/SYYFDLTDGLS(서열 번호 10) 사이의 평균 비율은 정상 SCAT 혈장 샘플과 비교하여 HAE SCAT 혈장 샘플에서 더 높은 것으로 발견되었다. HMWK에 대항한 SSRIGE(서열 번호 5) 펩타이드 대 LMWK 고유 펩타이드 SYYFDLTDGLS(서열 번호 10)의 이 비율은 절단된 키니노겐과 연관된 질환 또는 장애를 진단하거나, 건강한 개인 및 이환된 개인으로부터의 샘플 사이를 구별하기 위한 검정에서 사용될 가능성을 가진다.

[0224] *(xii) HK 표준품을 사용한 LC-MS 실행 최적화*

[0225] 상기 방법의 효율을 증가시키기 위해, LC-MS 실행을 구배를 최적화함으로써 최적화하고, 실행 시간을 단축시켰다. LC-MS 최적화는 주로 HK 표준품을 사용하여 수행되었다. 도 6에 도시된 바대로, 몇몇 방법의 결과는 사용된 다양한 LC 구배 및 실행 시간으로부터 제시된다. LC-MS 방법은 10분 실행으로 성공적으로 단축되었다. 하부 왼쪽 크로마토그램은 분할된 피크 대신에 단일 피크로 보이는 SYYFDLTDGLS 펩타이드(서열 번호 10)로서 "최적화된

방법"을 제시한다. 비율 계산에 필요한 SSRIGE(서열 번호 5) 및 SYYFDLTDGLS(서열 번호 10)인 펩타이드 둘 다는 실행 시간에 유의미한 감소로 발견되었다.

[0226] *(xiii) 혈장 샘플을 사용한 LC-MS 실행 최적화*

[0227] 혈장 샘플을 사용하여 상기 기재된 더 짧은 LC-MS를 검증하고, 여기서 관심 대상 펩타이드(SSRIGE(서열 번호 5) 및 SYYFDLTDGLS(서열 번호 10))를 검출하였다. HK 표준품 및 혈장 샘플 둘 다에서의 관심 대상 펩타이드의 검출은 16.5분 실행 방법을 이용하여 검출하였고, 이것은 원래의 방법론(42분)에 비해 유의미한 개선이다. 펩타이드 둘 다의 강도는 혈장 샘플의 복잡함이 증가하면서 감소하였다: EDTA 혈장 > 시트레이트화 혈장 > SCAT 혈장.

[0228] **실시예 2: 서명 펩타이드 및 LC-MS/MS를 사용한 HAE 혈장에서의 절단된 HWMK의 46kDa 경쇄의 정량화**

[0229] 이 실시예에 기재된 예시적인 방법은 인간 혈장에서 (46kDa 경쇄의 수준에 의해 표시될 수 있는) 내인성 2-사슬 HMWK 농도를 결정하도록 설계되었다. 상기 방법은 25㎕의 혈장을 부은 후, 펠렛을 분해시키고, MCX SPE를 사용하여 추가로 정제하는 것을 수반하고, 액체 크로마토그래피-탠덤 질량 분광법(LC-MS/MS)에 의해 분석되었다. 2차원 HPLC(Agilent Metasil AQ C18 칼럼, 5.0㎛, 2.1㎜ x 100㎜(C/N A0530100X020) 및 AB Sciex QTrap 6500 질량 분광기를 전기분무 이온화에 의해 형성된 양이온을 사용하여 안정하게 표지된 내부 표준품(SLIS)(KHNL[$^{13}C_6$]GHGH) 및 H_2N-KHNLGHGH-OH(서열 번호 1)인 2-사슬 HMWK의 서명 펩타이드의 검출을 위한 최적화된 조건 하에 선택 반응 모니터링(SRM) 모드에서 조작하였다.

[0230] 25㎕의 인간 혈장의 분취량을 2.5㎕의 10% SDS, 5㎕의 DTT(500mM)와 혼합하고, 단백질을 60분 동안 37℃에서 환원시켰다. 용액에 75㎕ 및 600㎕의 메탄올을 순차적으로 첨가하여서 단백질을 침전시켰다. 상청액을 버리고, 단백질 펠렛을 700㎕의 메탄올에 의해 다시 세척하였다. 원심분리 후, 펠렛을 10분 동안 강한 와류에 의해 500㎕의 중탄산암모늄 완충제(100mM) 중에 재구성하였다. 25㎕의 내부 표준품(KHNL[$^{13}C_6$]GHGH, 30ng/㎖)의 분취량 용액 및 5.0㎕의 요오도아세트아마이드 용액(500mM)을 첨가하고, 혼합물을 30분 동안 암소에서 유지시켰다. 10㎕의 키모트립신(8㎎/㎖)을 첨가하고, 온화한 와류에 의해 3시간 동안 50℃에서 유지시킴으로써 단백질을 후속하여 분해시켰다.

[0231] 생성된 혼합물을 산성화하고, 탈염을 위해 MCX 96웰 원심분리기(30㎛, 10㎎)에 로딩하였다. 원심분리기를 각각 900㎕의 2.0% 폼산 용액, 900㎕의 물 및 900㎕의 메탄올에 의해 세척하고, 생성된 펩타이드를 메탄올 중의 600㎕의 약 5.0% 수산화암모니아에 의해 용리시켰다. 용리된 용액을 질소 가스 중에 건조시키고, 1.0% HFBA를 함유하는 100㎕의 메탄올:물(10:90; v/v) 중에 재구성하였다.

[0232] 샘플 분석을 위해, 펩타이드를 MRM 모드로 조작되는 LC-MS/MS 기구에 로딩하고, 여기서 서명 펩타이드 KHNLGHGH(서열 번호 1) 및 이의 내부 표준품 KHNL[$^{13}C_6$]GHGH의 이온 강도를 기록하였다. 혈장 샘플 내의 2-사슬 HMWK의 46kDa 경쇄의 상대 양을 따라서 계산하였다.

[0233] *(i) 검정 검증(정밀도 및 정확도):*

[0234] 인간 혈장(SCAT169)에서의 46kDa 경쇄를 정량화하기 위한 1일내(n=6) 및 1일간(n=18) 정밀도(R.S.D.(%)) 및 정확도(RE(%))를 본 명세서에 기재된 방법을 이용하여 결정하였다. 하기 표 7에 도시된 바대로, 본 명세서에 기재된 방법을 이용하여 1일내 검정 및 1일간 검정 둘 다에서 결정된 46kD의 수준은 시험된 샘플에서의 46kD의 이론적 농도에 매우 가깝다. 이 결과는 바이오마커로서 상기 기재된 46kDa 경쇄 서명 펩타이드를 사용한 본 명세서에 기재된 검정 방법의 정확도를 표시한다.

표 7

인간 혈장(SCAT169)에서의 46kDa 경쇄를 정량화하기 위한 하루내(n=6) 및 하루간(n=18) 정밀도(R.S.D.(%)) 및 정확도(RE(%))

분석물질	이론적 농도 (ng/mℓ)	1일내			1일간		
		측정된 농도±S.D. (μg/mℓ)	R.S.D. (%)	RE (%)	측정된 농도±S.D. (μg/mℓ)	R.S.D. (%)	RE (%)
46KD 경쇄	2.08(EL)	1.97 ± 0.162	8.2	-5.3	2.04 ± 0.176	8.6	-1.9
	2.28(LLQC)	1.98 ± 0.056	2.8	-13.2	2.00 ± 0.123	6.2	-12.3
	2.68(LQC)	2.42 ± 0.303	12.5	-9.7	2.31 ± 0.293	12.7	-13.8
	7.08(MQC)	6.86 ± 0.509	7.4	-3.1	6.49 ± 0.594	9.1	-8.3
	17.1(HQC)	17.2 ± 0.367	2.1	0.6	16.5 ± 0.957	5.8	-3.5

[0235]

[0236] *(ii) 안정성 평가*

[0237] 인간 혈장 샘플을 본 명세서에 기재된 방법에 따라 SCAT169 관에서 수집하였다. 샘플은 4회 냉동-해동 사이클을 거치거나, 8시간 동안 벤치 탑(4℃)에서 유지되었다. 46kDa 경쇄 서명 펩타이드를 사용한 상기 기재된 검정 방법은 샘플 둘 다에서의 46kD 경쇄의 수준을 측정하도록 수행되었다. 이렇게 얻은 결과는 (46kDa 경쇄로 표시된) 2-사슬 HMWK가 인간 혈장 샘플에서 안정하다는 것을 보여준다.

표 8

인간 혈장(SCAT169)에서의 2-사슬 HMWK의 안정성 시험 (n=3)

분석물질	안정성	이론적 농도 (μg/mℓ)	측정된 농도±S.D. (μg/mℓ)	R.S.D. (%)	상대 오차 (%)
2HK	4회 동결-해동 사이클	2.68	2.44 ± 0.158	6.5	-9.0
		17.1	15.6 ± 0.450	2.9	-8.8
	벤치 탑 (4℃, 8h)	2.68	2.49 ± 0.143	5.7	-7.1
		17.1	15.8 ± 0.346	2.2	-7.6

[0238]

[0239] *(iii) 질환 진단 및 예후에서의 검정 방법의 적용*

[0240] SCAT169 관에서 건강한 인간 대상체 및 HAE 환자로부터 혈장 샘플을 수집하였다. 상기 기재된 검정 방법은 이 인간 혈장 샘플에서 2-사슬 HMWK 수준을 측정하도록 수행되었다. 도 7에 도시된 바대로, HAE 환자에서의 2-사슬 HMWK의 수준은 건강한 인간 대상체에서보다 유의미하게 높았다. 결과는 2-사슬 HMWK, 및 이의 임의의 성분(예를 들어, 46kDa 경쇄)이 HAE 진단 및/또는 예후에 대한 신뢰할만한 바이오마커로서 작용할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0241] 다른 실시형태

[0242] 본 명세서에 개시된 모든 특징은 임의의 조합으로 조합될 수 있다. 본 명세서에 개시된 각각의 특징은 대안적인 특징에 의해 대체되어 동일한, 동등한 또는 유사한 목적을 제공할 수 있다. 따라서, 달리 명확히 기재되지 않은 한, 개시된 각각의 특징은 오직 동등한 또는 유사한 특징의 총체적 시리즈의 유일한 예이다.

[0243] 상기 설명으로부터, 당해 분야의 숙련자는 본 발명의 필수적인 특징을 쉽게 확신할 수 있고, 이의 사상 및 범위를 벗어남이 없이, 본 발명의 다양한 변화 및 변형을 다양한 용법 및 조건에 적용하도록 이것을 만들 수 있다.

따라서, 다른 실시형태가 또한 청구범위 내에 있다.

[0244] 균등물

[0245] 본 발명의 몇몇 실시형태가 본 명세서에서 기재되고 예시되어 있지만, 당해 분야의 숙련자는 기능을 수행하고/하거나, 본 명세서에 기재된 이점 중 하나 이상 및/또는 결과를 얻기 위해 다양한 다른 수단 및/또는 구조를 용이하게 고안할 것이고, 이러한 변경 및/또는 변형의 각각은 본 명세서에 기재된 본 발명의 실시형태의 범위 내에 있는 것으로 간주된다. 더 일반적으로, 당해 분야의 숙련자는, 본 명세서에 기재된 모든 매개변수, 치수, 재료 및 구성이 예시적인 것으로 의도되고, 실제 매개변수, 치수, 재료 및/또는 구성이 본 발명의 교시내용이 사용되는 특정한 출원 또는 출원들에 의존할 것이라는 것을 용이하게 이해할 것이다. 당해 분야의 숙련자는, 단지 일상적 실험을 이용하여, 본 명세서에 기재된 특정한 본 발명의 실시형태에 대한 많은 균등물을 인식하거나, 확신할 수 있을 것이다. 따라서, 상기 실시형태가 오직 예로서 제시되고, 첨부된 청구범위 및 이의 균등물의 범위 내에, 본 발명의 실시형태가 구체적으로 기재되고 청구된 것과 달리 실행될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 본 개시내용의 본 발명의 실시형태는 본 명세서에 기재된 각각의 개별 특징, 시스템, 물품, 재료, 키트 및/또는 방법에 관한 것이다. 또한, 2개 이상의 이러한 특징, 시스템, 물품, 재료, 키트 및/또는 방법의 임의의 조합은, 이러한 특징, 시스템, 물품, 재료, 키트 및/또는 방법이 서로 불일치하지 않는 경우, 본 개시내용의 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0246] 모든 정의는, 본 명세서에서 정의되고 사용되는 바대로, 사전적 정의에 비해 지배적인 것으로 이해되어야 하고, 문헌 내의 정의는 참조문헌 및/또는 정의된 용어의 일반 의미로 포함된다.

[0247] 본 명세서 및 청구범위에서 본 명세서에 사용된 바와 같은 부정 관사 "일" 및 "하나"는 명확히 반대로 표시되지 않는 한, "적어도 하나"를 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0248] 본 명세서 및 청구범위에서 본 명세서에 사용된 바와 같은 구절 "및/또는"은, 이렇게 결합된 구성요소의 "어느 하나 또는 둘 다"를 의미하는 것으로 이해되어야 하고, 즉 구성요소는 몇몇 경우에 공동으로 존재하고 다른 경우에 분리하여 존재한다. "및/또는"과 함께 기재된 다수의 구성요소는 동일한 방식으로, 즉 이렇게 결합된 구성요소의 "하나 이상"으로 해석되어야 한다. 다른 구성요소는, 구체적으로 확인된 이 구성요소와 관련되든 또는 관련되지 않든, "및/또는" 절에 의해 구체적으로 확인된 구성요소 이외에 임의로 존재할 수 있다. 따라서, 비제한적인 예로서, "A 및/또는 B"의 언급은, "포함하는"과 같은 제약을 두지 않는 언어와 함께 사용될 때, 일 실시형태에서, A 단독(B 이외의 구성요소를 임의로 포함); 또 다른 실시형태에서, B 단독(A 이외의 구성요소를 임의로 포함); 훨씬 또 다른 실시형태에서, A 및 B 둘 다(다른 구성요소를 임의로 포함) 등을 의미할 수 있다.

[0249] 본 명세서 및 청구범위에서 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "또는"은 상기 정의된 바대로 "및/또는"과 동일한 의미를 가지는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 목록에서 항목을 분리할 때, "또는" 또는 "및/또는"은 포괄적인, 즉 구성요소의 번호 또는 목록, 및 임의로, 부가적인 목록에 없는 항목 중 적어도 하나의 포함, 및 이들 중 하나 초과의 포함인 것으로 해석되어야 한다. "중 오직 하나" 또는 "중 정확히 하나", 또는, 청구범위에서 사용될 때, "이루어지는"과 같은, 명확히 반대로 표시된 용어만이 구성요소의 번호 또는 목록 중 정확히 하나의 구성요소의 포함을 의미할 것이다. 일반적으로, 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "또는"은 "어느 하나", "중 하나", "중 오직 하나", 또는 "중 정확히 하나"와 같은 배타성의 용어가 선행할 때, 배타적인 대안(즉, "하나 또는 다른 하나 및 둘 다")을 표시하는 것으로 오직 해석되어야 한다. "필수적으로 이루어진"은, 청구범위에서 사용될 때, 특허법의 범위에서 사용되는 이의 통상적인 의미를 가져야 한다.

[0250] 본 명세서 및 청구범위에서 본 명세서에 사용된 바와 같은 구절 "적어도 하나"는, 하나 이상의 구성요소의 목록을 참조하여, 구성요소의 목록에서 구성요소 중 임의의 하나 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 구성요소를 의미하는 것으로 이해되어야 하지만, 구성요소의 목록 내에 구체적으로 기재된 각각의 및 모든 구성요소 중 적어도 하나를 반드시 포함하지 않고 구성요소의 목록에서 구성요소의 임의의 조합을 배제하지 않는다. 이 정의는 또한, 구체적으로 확인된 이 구성요소와 관련되든 또는 관련되지 않든, 구절 "적어도 하나"가 언급하는 구성요소의 목록 내에 구체적으로 확인된 구성요소 이외에 구성요소가 임의로 존재할 수 있도록 허용한다. 따라서, 비제한적인 예로서, "A 및 B 중 적어도 하나"(또는, 동등하게, "A 또는 B 중 적어도 하나", 또는, 동등하게, "A 및/또는 B 중 적어도 하나")는, 일 실시형태에서, B가 존재하지 않으면서 하나 초과의 A를 임의로 포함(및 B 이외의 구성요소를 임의로 포함)하는 적어도 하나; 또 다른 실시형태에서, A가 존재하지 않으면서 하나 초과의 B를 임의로 포함(및 A 이외의 구성요소를 임의로 포함)하는 적어도 하나; 훨씬 또 다른 실시형태에서, 하나 초과의 A, 및 적어도 하나를 임의로 포함하고, 하나 초과의 B를 임의로 포함(및 구성요소를 임의로 포함)하는 적어도 하나; 등을 의미할 수 있다.

[0251] 명확히 반대로 표시되지 않는 한, 하나 초과의 단계 또는 조항을 포함하는 본 명세서에 청구된 임의의 방법에서, 방법의 단계 또는 조항의 순서가 방법의 단계 또는 조항이 기재된 순서로 반드시 제한되지는 않는 것으로 또한 이해되어야 한다.

[0252] 청구범위 및 상기 명세서에서, "포함하는", "포함", "보유하는", "가지는", "함유하는", "수반하는", "갖는", "이루어진" 등과 같은 모든 전환 구절은 제약을 두지 않는인 것으로, 즉 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는 것을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. "이루어진" 및 "본질적으로 이루어진"의 전환 구절만이, 특허 심사 절차의 미국 특허청 매뉴얼, 부문 2111.03에 기재된 바대로, 각각 폐쇄 또는 반폐쇄 전환 구절이어야 한다.

도면

도면1

	펩타이드	*HK_* 엔자임 리서치	*HK_* 시그마	혈장 *EDTA*	혈장 시트레이트
분해_25℃	SSRIGE				
	SSRIGEIKE mis 2		▨	▨	▨
	RPPGFSPFR	▨	▨	▨	▨
	KKIYPTVNCQPLGMISLMK	▨	▨	▨	▨
	긴 HK 펩타이드			▨	▨
분해_37℃	SSRIGE				
	SSRIGEIKE mis 2		▨	▨	▨
	RPPGFSPFR			▨	▨
	KKIYPTVNCQPLGMISLMK				
	긴 HK 펩타이드	▨	▨		

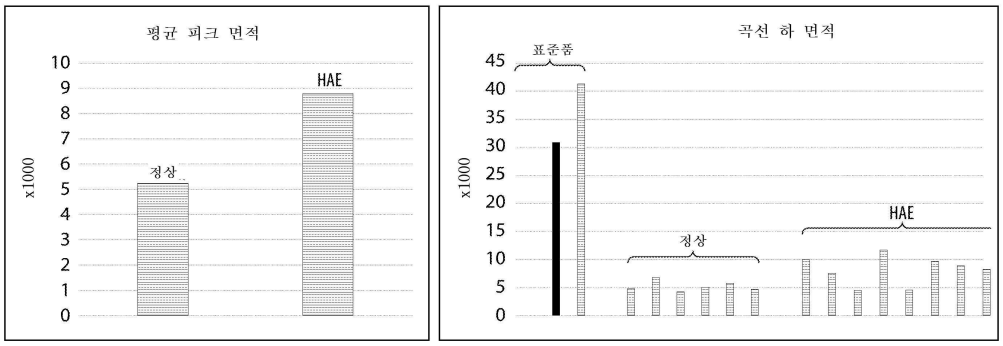
□ 존재
▨ 부재

도면2

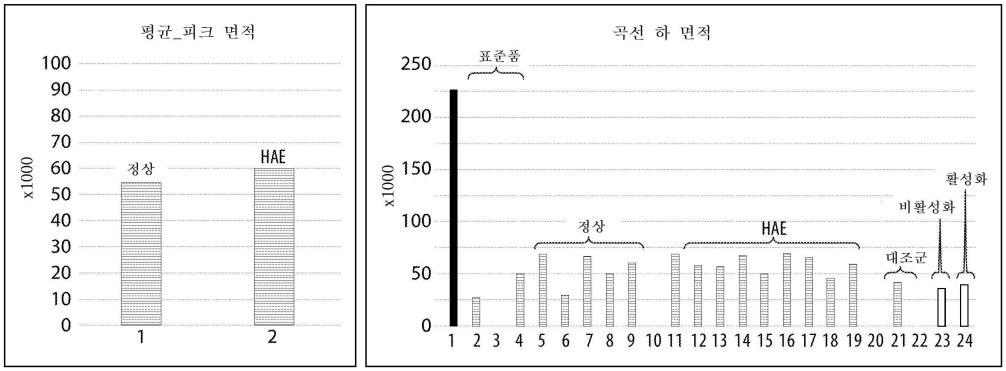
펩타이드	*HK_* 엔자임 리서치	*HK_* 시그마	혈장 *EDTA*	혈장 시트레이트 *(PI)*	혈장 시트레이트
SSRIGE	*Y*	*Y*	*Y*	*Y*	*Y*
SSRIGEIKE mis 2	*N*	*N*	*N*	*N*	*N*
KKIYPTVNCQPLGMISLMK	*N*	*N*	*Y*	*Y*	*Y*
긴 HK 펩타이드	*Y*	*Y*	*N*	*N*	*Y*
SYYD-DGLS	*Y*	*Y*	*N*	*N*	*Y*
INPT-QMKE	*Y*	*Y*	*N*	*N*	*Y*
KQRH-HKE	*Y*	*Y*	*Y*	*Y*	*Y*
LMWK	*N*	*N*	*Y*	*N*	*Y*
			분해_25℃		분해_37℃

▨ 존재
□ 부재

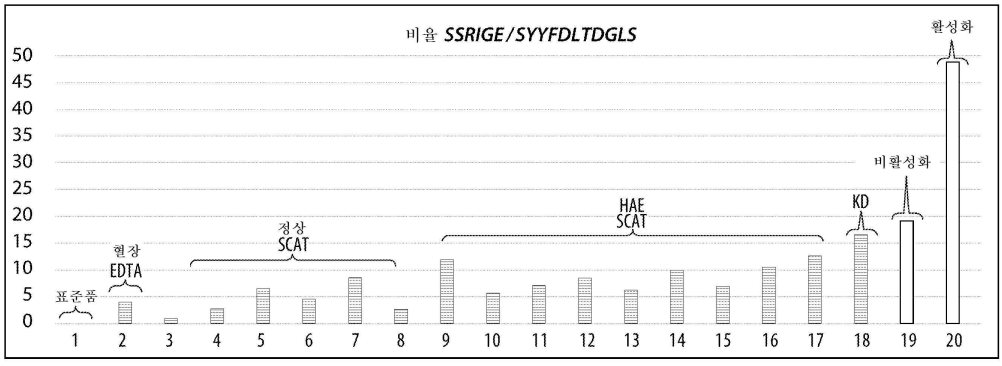
도면3


평균 피크 면적
x1000
정상
HAE
곡선 하 면적
x1000
표준품
정상
HAE

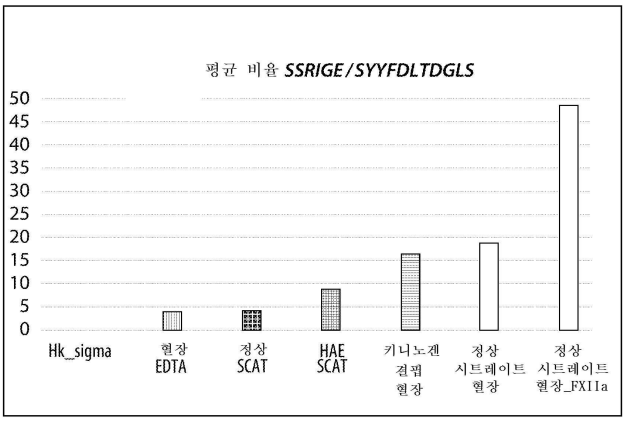
도면4


평균_피크 면적
x1000
정상
HAE
1
2
곡선 하 면적
x1000
표준품
정상
HAE
대조군
비활성화
활성화

도면5

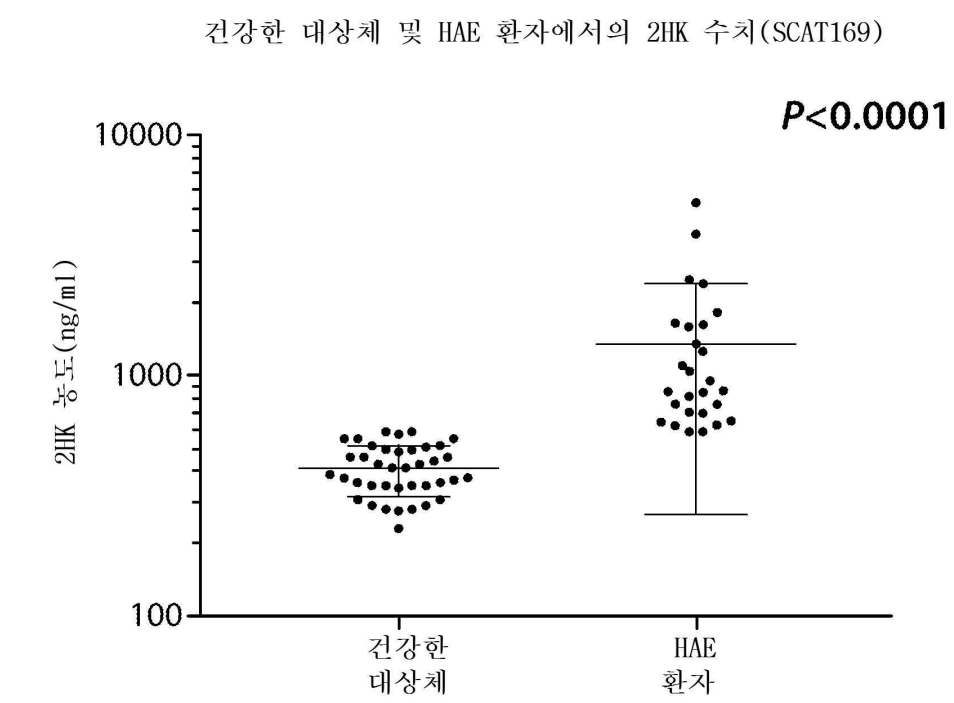

비율 SSRIGE/SYYFDLTDGLS
표준품
혈장
EDTA
정상
SCAT
HAE
SCAT
KD
비활성화
활성화

도면6



샘플	평균 비율
Hk_Sigma	0.156475
혈장 EDTA	4.08775
정상 SCAT	4.419305
HAE SCAT	8.891574
키니노겐 결핍 혈장	16.63053
정상 시트레이트 혈장	19.02843
정상 시트레이트 혈장_FXIIa	48.63492

도면7



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Dyax Corp.

Protea Biosciences, Inc.

<120> PEPTIDE QUANTITATION ASSAY FOR DIFFERENTIATING FULL-LENGTH HIGH MOLECULAR WEIGHT KININOGEN (HMWK) AND CLEAVED HMWK

<130> WO2017/106504

<140> PCT/US2016/066936

<141> 2016-12-15

<150> US 62/267,734

<151> 2015-12-15

<160> 30

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 1

Lys His Asn Leu Gly His Gly His

1 5

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 2

Lys His Asn Leu Gly His Gly His Lys His Glu

1 5 10

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 3

Lys His Asn Leu Gly His Gly His Lys

1 5

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 4

Lys His Asn Leu Gly His Gly His Lys His Glu Arg

1 5 10

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 5

Ser Ser Arg Ile Gly Glu

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 6

Gly His Glu Lys Gln Arg Lys His

1 5

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 7

Lys Gln Arg Lys His Asn Leu Gly His Gly His Lys His Glu

1 5 10

<210> 8

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 8

Asp Trp Gly His Lys Gln Arg Lys His Asn Leu Gly His Gly His Lys

1 5 10 15

His Glu Arg

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 9

His Asn Leu Gly His Gly His Lys

1 5

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 10

Ser Tyr Tyr Phe Asp Leu Thr Asp Gly Leu Ser

1 5 10

<210> 11

<211> 644

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Lys Leu Ile Thr Ile Leu Phe Leu Cys Ser Arg Leu Leu Leu Ser

1 5 10 15

Leu Thr Gln Glu Ser Gln Ser Glu Glu Ile Asp Cys Asn Asp Lys Asp

20 25 30

Leu Phe Lys Ala Val Asp Ala Ala Leu Lys Lys Tyr Asn Ser Gln Asn

35 40 45

Gln Ser Asn Asn Gln Phe Val Leu Tyr Arg Ile Thr Glu Ala Thr Lys

50 55 60

Thr Val Gly Ser Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Lys Tyr Glu Ile Lys Glu

65 70 75 80

Gly Asp Cys Pro Val Gln Ser Gly Lys Thr Trp Gln Asp Cys Glu Tyr

85 90 95

Lys Asp Ala Ala Lys Ala Ala Thr Gly Glu Cys Thr Ala Thr Val Gly

100 105 110

Lys Arg Ser Ser Thr Lys Phe Ser Val Ala Thr Gln Thr Cys Gln Ile

115 120 125

Thr Pro Ala Glu Gly Pro Val Val Thr Ala Gln Tyr Asp Cys Leu Gly

130 135 140

Cys Val His Pro Ile Ser Thr Gln Ser Pro Asp Leu Glu Pro Ile Leu

145 150 155 160

Arg His Gly Ile Gln Tyr Phe Asn Asn Asn Thr Gln His Ser Ser Leu

165 170 175

Phe Met Leu Asn Glu Val Lys Arg Ala Gln Arg Gln Val Val Ala Gly

180 185 190

Leu Asn Phe Arg Ile Thr Tyr Ser Ile Val Gln Thr Asn Cys Ser Lys

195 200 205

Glu Asn Phe Leu Phe Leu Thr Pro Asp Cys Lys Ser Leu Trp Asn Gly

210 215 220

Asp Thr Gly Glu Cys Thr Asp Asn Ala Tyr Ile Asp Ile Gln Leu Arg

225 230 235 240

Ile Ala Ser Phe Ser Gln Asn Cys Asp Ile Tyr Pro Gly Lys Asp Phe

245 250 255

Val Gln Pro Pro Thr Lys Ile Cys Val Gly Cys Pro Arg Asp Ile Pro

260 265 270

Thr Asn Ser Pro Glu Leu Glu Glu Thr Leu Thr His Thr Ile Thr Lys

275 280 285

Leu Asn Ala Glu Asn Asn Ala Thr Phe Tyr Phe Lys Ile Asp Asn Val

290 295 300

Lys Lys Ala Arg Val Gln Val Val Ala Gly Lys Lys Tyr Phe Ile Asp
305 310 315 320
Phe Val Ala Arg Glu Thr Thr Cys Ser Lys Glu Ser Asn Glu Glu Leu
325 330 335
Thr Glu Ser Cys Glu Thr Lys Lys Leu Gly Gln Ser Leu Asp Cys Asn

340 345 350
Ala Glu Val Tyr Val Val Pro Trp Glu Lys Lys Ile Tyr Pro Thr Val
355 360 365
Asn Cys Gln Pro Leu Gly Met Ile Ser Leu Met Lys Arg Pro Pro Gly
370 375 380
Phe Ser Pro Phe Arg Ser Ser Arg Ile Gly Glu Ile Lys Glu Glu Thr
385 390 395 400
Thr Val Ser Pro Pro His Thr Ser Met Ala Pro Ala Gln Asp Glu Glu

405 410 415
Arg Asp Ser Gly Lys Glu Gln Gly His Thr Arg Arg His Asp Trp Gly
420 425 430
His Glu Lys Gln Arg Lys His Asn Leu Gly His Gly His Lys His Glu
435 440 445
Arg Asp Gln Gly His Gly His Gln Arg Gly His Gly Leu Gly His Gly
450 455 460
His Glu Gln Gln His Gly Leu Gly His Gly His Lys Phe Lys Leu Asp

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

530 535 540
Pro Thr Pro Ile Pro Ser Leu Ala Lys Pro Gly Val Thr Val Thr Phe

545 550 555 560

Ser Asp Phe Gln Asp Ser Asp Leu Ile Ala Thr Met Met Pro Pro Ile

565 570 575

Ser Pro Ala Pro Ile Gln Ser Asp Asp Asp Trp Ile Pro Asp Ile Gln

580 585 590

Ile Asp Pro Asn Gly Leu Ser Phe Asn Pro Ile Ser Asp Phe Pro Asp

595 600 605

Thr Thr Ser Pro Lys Cys Pro Gly Arg Pro Trp Lys Ser Val Ser Glu

610 615 620

Ile Asn Pro Thr Thr Gln Met Lys Glu Ser Tyr Tyr Phe Asp Leu Thr

625 630 635 640

Asp Gly Leu Ser

<210> 12

<211> 427

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Lys Leu Ile Thr Ile Leu Phe Leu Cys Ser Arg Leu Leu Leu Ser

1 5 10 15

Leu Thr Gln Glu Ser Gln Ser Glu Glu Ile Asp Cys Asn Asp Lys Asp

20 25 30

Leu Phe Lys Ala Val Asp Ala Ala Leu Lys Lys Tyr Asn Ser Gln Asn

35 40 45

Gln Ser Asn Asn Gln Phe Val Leu Tyr Arg Ile Thr Glu Ala Thr Lys

50 55 60

Thr Val Gly Ser Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Lys Tyr Glu Ile Lys Glu

65 70 75 80

Gly Asp Cys Pro Val Gln Ser Gly Lys Thr Trp Gln Asp Cys Glu Tyr

85 90 95

Lys Asp Ala Ala Lys Ala Ala Thr Gly Glu Cys Thr Ala Thr Val Gly

100 105 110

Lys Arg Ser Ser Thr Lys Phe Ser Val Ala Thr Gln Thr Cys Gln Ile
115 120 125
Thr Pro Ala Glu Gly Pro Val Val Thr Ala Gln Tyr Asp Cys Leu Gly
130 135 140

Cys Val His Pro Ile Ser Thr Gln Ser Pro Asp Leu Glu Pro Ile Leu
145 150 155 160
Arg His Gly Ile Gln Tyr Phe Asn Asn Asn Thr Gln His Ser Ser Leu
165 170 175
Phe Met Leu Asn Glu Val Lys Arg Ala Gln Arg Gln Val Val Ala Gly
180 185 190
Leu Asn Phe Arg Ile Thr Tyr Ser Ile Val Gln Thr Asn Cys Ser Lys
195 200 205

Glu Asn Phe Leu Phe Leu Thr Pro Asp Cys Lys Ser Leu Trp Asn Gly
210 215 220
Asp Thr Gly Glu Cys Thr Asp Asn Ala Tyr Ile Asp Ile Gln Leu Arg
225 230 235 240
Ile Ala Ser Phe Ser Gln Asn Cys Asp Ile Tyr Pro Gly Lys Asp Phe
245 250 255
Val Gln Pro Pro Thr Lys Ile Cys Val Gly Cys Pro Arg Asp Ile Pro
260 265 270

Thr Asn Ser Pro Glu Leu Glu Glu Thr Leu Thr His Thr Ile Thr Lys
275 280 285
Leu Asn Ala Glu Asn Asn Ala Thr Phe Tyr Phe Lys Ile Asp Asn Val
290 295 300
Lys Lys Ala Arg Val Gln Val Val Ala Gly Lys Lys Tyr Phe Ile Asp
305 310 315 320
Phe Val Ala Arg Glu Thr Thr Cys Ser Lys Glu Ser Asn Glu Glu Leu
325 330 335

Thr Glu Ser Cys Glu Thr Lys Lys Leu Gly Gln Ser Leu Asp Cys Asn
340 345 350
Ala Glu Val Tyr Val Val Pro Trp Glu Lys Lys Ile Tyr Pro Thr Val

355 360 365

Asn Cys Gln Pro Leu Gly Met Ile Ser Leu Met Lys Arg Pro Pro Gly

370 375 380

Phe Ser Pro Phe Arg Ser Ser Arg Ile Gly Glu Ile Lys Glu Glu Thr

385 390 395 400

Thr Ser His Leu Arg Ser Cys Glu Tyr Lys Gly Arg Pro Pro Lys Ala

405 410 415

Gly Ala Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Val Ser

420 425

<210> 13

<211> 362

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Gln Glu Ser Gln Ser Glu Glu Ile Asp Cys Asn Asp Lys Asp Leu Phe

1 5 10 15

Lys Ala Val Asp Ala Ala Leu Lys Lys Tyr Asn Ser Gln Asn Gln Ser

20 25 30

Asn Asn Gln Phe Val Leu Tyr Arg Ile Thr Glu Ala Thr Lys Thr Val

35 40 45

Gly Ser Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Lys Tyr Glu Ile Lys Glu Gly Asp

50 55 60

Cys Pro Val Gln Ser Gly Lys Thr Trp Gln Asp Cys Glu Tyr Lys Asp

65 70 75 80

Ala Ala Lys Ala Ala Thr Gly Glu Cys Thr Ala Thr Val Gly Lys Arg

85 90 95

Ser Ser Thr Lys Phe Ser Val Ala Thr Gln Thr Cys Gln Ile Thr Pro

100 105 110

Ala Glu Gly Pro Val Val Thr Ala Gln Tyr Asp Cys Leu Gly Cys Val

115 120 125

His Pro Ile Ser Thr Gln Ser Pro Asp Leu Glu Pro Ile Leu Arg His

130 135 140

Gly Ile Gln Tyr Phe Asn Asn Asn Thr Gln His Ser Ser Leu Phe Met
145 150 155 160

Leu Asn Glu Val Lys Arg Ala Gln Arg Gln Val Val Ala Gly Leu Asn
165 170 175
Phe Arg Ile Thr Tyr Ser Ile Val Gln Thr Asn Cys Ser Lys Glu Asn
180 185 190
Phe Leu Phe Leu Thr Pro Asp Cys Lys Ser Leu Trp Asn Gly Asp Thr
195 200 205
Gly Glu Cys Thr Asp Asn Ala Tyr Ile Asp Ile Gln Leu Arg Ile Ala
210 215 220

Ser Phe Ser Gln Asn Cys Asp Ile Tyr Pro Gly Lys Asp Phe Val Gln
225 230 235 240
Pro Pro Thr Lys Ile Cys Val Gly Cys Pro Arg Asp Ile Pro Thr Asn
245 250 255
Ser Pro Glu Leu Glu Glu Thr Leu Thr His Thr Ile Thr Lys Leu Asn
260 265 270
Ala Glu Asn Asn Ala Thr Phe Tyr Phe Lys Ile Asp Asn Val Lys Lys
275 280 285

Ala Arg Val Gln Val Val Ala Gly Lys Lys Tyr Phe Ile Asp Phe Val
290 295 300
Ala Arg Glu Thr Thr Cys Ser Lys Glu Ser Asn Glu Glu Leu Thr Glu
305 310 315 320
Ser Cys Glu Thr Lys Lys Leu Gly Gln Ser Leu Asp Cys Asn Ala Glu
325 330 335
Val Tyr Val Val Pro Trp Glu Lys Lys Ile Tyr Pro Thr Val Asn Cys
340 345 350

Gln Pro Leu Gly Met Ile Ser Leu Met Lys
355 360

<210> 14
<211> 255
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ser Ser Arg Ile Gly Glu Ile Lys Glu Glu Thr Thr Val Ser Pro Pro
1 5 10 15

His Thr Ser Met Ala Pro Ala Gln Asp Glu Glu Arg Asp Ser Gly Lys
20 25 30

Glu Gln Gly His Thr Arg Arg His Asp Trp Gly His Glu Lys Gln Arg
35 40 45

Lys His Asn Leu Gly His Gly His Lys His Glu Arg Asp Gln Gly His
50 55 60

Gly His Gln Arg Gly His Gly Leu Gly His Gly His Glu Gln Gln His
65 70 75 80

Gly Leu Gly His Gly His Lys Phe Lys Leu Asp Asp Asp Leu Glu His
85 90 95

Gln Gly Gly His Val Leu Asp His Gly His Lys His Lys His Gly His
100 105 110

Gly His Gly Lys His Lys Asn Lys Gly Lys Lys Asn Gly Lys His Asn
115 120 125

Gly Trp Lys Thr Glu His Leu Ala Ser Ser Ser Glu Asp Ser Thr Thr
130 135 140

Pro Ser Ala Gln Thr Gln Glu Lys Thr Glu Gly Pro Thr Pro Ile Pro
145 150 155 160

Ser Leu Ala Lys Pro Gly Val Thr Val Thr Phe Ser Asp Phe Gln Asp
165 170 175

Ser Asp Leu Ile Ala Thr Met Met Pro Pro Ile Ser Pro Ala Pro Ile
180 185 190

Gln Ser Asp Asp Asp Trp Ile Pro Asp Ile Gln Ile Asp Pro Asn Gly
195 200 205

Leu Ser Phe Asn Pro Ile Ser Asp Phe Pro Asp Thr Thr Ser Pro Lys
210 215 220

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

225 230 235 240

Gln Met Lys Glu Ser Tyr Tyr Phe Asp Leu Thr Asp Gly Leu Ser
245 250 255

<210> 15

<211> 207

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Lys His Asn Leu Gly His Gly His Lys His Glu Arg Asp Gln Gly His
1 5 10 15

Gly His Gln Arg Gly His Gly Leu Gly His Gly His Glu Gln Gln His
20 25 30

Gly Leu Gly His Gly His Lys Phe Lys Leu Asp Asp Asp Leu Glu His
35 40 45

Gln Gly Gly His Val Leu Asp His Gly His Lys His Lys His Gly His
50 55 60

Gly His Gly Lys His Lys Asn Lys Gly Lys Lys Asn Gly Lys His Asn
65 70 75 80

Gly Trp Lys Thr Glu His Leu Ala Ser Ser Ser Glu Asp Ser Thr Thr
85 90 95

Pro Ser Ala Gln Thr Gln Glu Lys Thr Glu Gly Pro Thr Pro Ile Pro
100 105 110

Ser Leu Ala Lys Pro Gly Val Thr Val Thr Phe Ser Asp Phe Gln Asp
115 120 125

Ser Asp Leu Ile Ala Thr Met Met Pro Pro Ile Ser Pro Ala Pro Ile
130 135 140

Gln Ser Asp Asp Asp Trp Ile Pro Asp Ile Gln Ile Asp Pro Asn Gly
145 150 155 160

Leu Ser Phe Asn Pro Ile Ser Asp Phe Pro Asp Thr Thr Ser Pro Lys
165 170 175

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

180 185 190

Gln Met Lys Glu Ser Tyr Tyr Phe Asp Leu Thr Asp Gly Leu Ser

195 200 205

<210> 16

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 16

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala

1 5 10 15

Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu

20 25 30

Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu

35 40 45

Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp

50 55

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 17

Asp Trp Gly His Glu Lys Gln Arg Lys His Asn Leu Gly His Gly His

1 5 10 15

Lys His Glu Arg

20

<210> 18

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 18

Lys Lys Ile Tyr Pro Thr Val Asn Cys Gln Pro Leu Gly Met Ile Ser
1 5 10 15
Leu Met Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg Ser Ser Arg Ile
20 25 30
Gly Glu

<210> 19

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polypeptide
<400> 19
Ser Ser Arg Ile Gly Glu Ile Lys Glu
1 5
<210> 20
<211> 34
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polypeptide
<400> 20
Lys Lys Ile Tyr Pro Thr Val Asn Cys Gln Pro Leu Gly Met Ile Ser
1 5 10 15
Leu Met Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg Ser Ser Arg Ile
20 25 30

Gly Glu

<210> 21
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polypeptide
<400> 21
Lys Lys Ile Tyr Pro Thr Val Asn Cys Gln Pro Leu Gly Met Ile Ser

1 5 10 15

Leu Met Lys

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 22

Ser Ser Arg Arg Ile Gly Glu

1 5

<210> 23

<211> 19

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 23

Lys Lys Tyr Ile Pro Thr Val Asn Cys Gln Pro Leu Gly Met Ile Ser

1 5 10 15

Leu Met Lys

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 24

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg

1 5

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 25

Ser Ser Arg Ile Gly Glu Lys Glu

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 26

Ile Asn Pro Thr Thr Gln Met Lys Glu

1 5

<210> 27

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 27

Glu Asp Ser Thr Thr Pro Ser Ala Gln Thr Gln Glu

1 5 10

<210> 28

<211> 11

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 28

Tyr Lys Gly Arg Pro Pro Lys Ala Gly Ala Glu

1 5 10

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 29

Ile Asn Pro Thr Gln Met Lys Glu

1 5

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 30

Ser Tyr Tyr Asp Asp Gly Leu Ser

1 5