(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12Q 1/68
C07K 14/745
G01N 33/86

(45) 공고일자 2003년09월19일
(11) 등록번호 10-0384251
(24) 등록일자 2003년05월02일

(21) 출원번호	10-1995-0704470	(65) 공개번호	특1996-0702007
(22) 출원일자	1995년10월13일	(43) 공개일자	1996년03월28일
번역문제출일자	1995년10월13일		
(86) 국제출원번호	PCT/EP1995/00553	(87) 국제공개번호	WO 1995/21938
(86) 국제출원일자	1995년02월14일	(87) 국제공개일자	1995년08월17일
(81) 지정국	국내특허 : 오스트레일리아 캐나다 일본 대한민국 미국 EP 유럽특허 : 핀랜드		

(30) 우선권주장 94200377.3 1994년02월14일 EP(EP)

(73) 특허권자 리엑스 유니버시타이트 라이덴
네덜란드 엔엘-2300 알에이라이덴 스테이션스베그46
(72) 발명자 베르티나,로지에르,마리아
네덜란드왕국,엔엘-2313에이취비라이덴,티.시겐비크스트라트30
라이츠마,피터,헨드릭
네덜란드왕국,엔엘-2333엑스제이라이덴,메렐스트라트5
(74) 대리인 신정건, 나영환, 이상섭

심사관 : 한형미

(54) 활성화된단백질C에대한약한항응고반응및/또는혈전증과관련된유전자결함의존재를검색하는방법

명세서

<1> 본 발명은 지혈 분야에 관한 것이며, 구체적으로 혈전의 측면에 관한 것이다. 더욱 구체적으로 본 발명은 혈전발현경향(thrombophilia), 특히 유전성 혈전발현 경향의 진단 및 검색 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 방법은 개개인에 있어서의 혈전증의 발병 위험성을 측정하는데 사용할 수 있다.

<2> **발명의 배경**

<3> 심정맥(deep vein) 혈전증은 흔한 질병이다. 잘 확립된 위험 인자에는 최근의 수술, 악성 질환, 임신 및 출산, 장기간의 운동 부족, 및 응고 시스템의 주요 억제 인자중 하나의 결핍등이 있다(참고 문헌 1). 주요 억제인자는 단백질 C, 단백질 S 및 항트롬빈으로 알려져 있다. 다수의 환자에서 심정맥 혈전증의 원인은 아직 불명이다. 그러나 활성화된 단백질 C(APC)에 대한 약한 항응고 반응이 정맥 -혈전증의 유전적 경향을 가진 몇몇 가계에서 나타난 것으로 최근에 확립되었다(참고 문헌 2).

<4> APC의 항응고성은 제한된 단백질 분해에 의해 활성화된 보조인자 Va 및 VIIIa를 불활성하하는 그 능력 때문이다(참고 문헌 3), 보조인자 Va 및 VIIIa의 상기 불활성화는 응고의 주효소인 트롬빈의 형성속도의 감소를 야기한다. 생체외에서, 이 효과는 APC를 정상 혈장에 첨가하고, 따라서 응고 시험에서, 예를 들면 APTT(활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간)를 측정하는 시험에서 그 효과를 측정하므로써 가시화할 수 있다. 단백질 C의 활성화는 트롬빈-트롬보모듈린 복합체를 통해 내피 세포 표면에서 일어난다(참고 문헌 27). 트롬보모듈린은 트롬빈과 결합할 수 있는 막 당단 백질이다. 이 결합으로 트롬빈은 피브리노겐을 피브린으로 전환하는 능력과 혈소판을 활성화하는 능력을 상실한다. 달리 말하면, 트롬빈은 그 응고성을 상실하며, 단백질C를 활성화하므로써 그 자신의 추가적 생산(소위 음성 피드백)을 감소시킨다. 생체내에서(칼슘의 존재하에) 단백질 C의 활성화는 내피상의 트롬보모듈린의 이용률에 거의 전적으로 의존한다. 이어서 APC는 APC 억제인자(PCI)와 α_1 항트립신의 복합체의 형성으로 중화되는데, 이것은 정상 조건에서 APC 가 순환중 단시간 동안만 존재하며, 항응고 효과는 일반적으로 국부적으로 발현된다는 것을 의미한다.

<5> APC에 의한 보조인자 Va 및 VIIIa의 불활성화가 Ca^{2+}, 인지질 및 APC 보조인자 단백질 S의 존재하에서만 최적으로 진행한다는 것이 일반적으로 용인되었다.(참고 문헌 2, 28, 29). 그러나, 보다 최근에 이 개념은 정제된 단백질 시스템에서 단백질 S 가 APC에 대한 보조인자 활성을 거의 갖지 않는다는 발견으로 도전받고 있다(참고 문헌 5, 6) 생체내에서의 관찰(유전적 단백질 S 결핍시의 혈전증 경향)과 생체외 관찰(정제된 단백질계의 단백질 S의 약학 APC 보조인자 활성)사이의 상기 외관강의 불일치의 가능한 해결책은 Dahlbäck 등의 발견에 의해 제공될 수 있는데, 이들의 문헌(참고 문헌 2)에는 비정상적인 플라스미노겐, 비정상적인 피브리노겐 또는 낭창(lupus) 항응고제의 전조는 없이 항트롬빈 활성, 단백질 C(면역학적으로 및 기능적으로) 및 단백직 S(면역학적으로 및 기능적으로)의 정상치를 가진 환자의 경우

단백질 C에 대한 항응고 반응은 감소된 것으로 보고되어 있다. 상기 항응고 반응의 감소는 Dahlbäck 이 개발한 새로운 시험법(참고 문헌 2)으로 확인하였는데, 이 시험에서 그는 정제된 인간 APC의 생체외 첨가후 혈장의 반응(응고 시간, APTT)을 연구하였다. 이들 혈전증 환자의 혈장에 활성화된 단백질의 첨가는 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간(APTT)의 예상된 연장을 야기하지는 않았다. 이 현상에 관한 다수의 메카니즘을 가설화한 후, 단 하나만이 APC에 대해 약한 항응고 반응, 즉 상기 환자에 결핍된 APC에 대한 지금까지 공지되지 않은 보조인자의 존재를 자극하는 것으로 생각되었다.

<6> 다음의 메카니즘은 APC에 대한 약한 항응고 반응의 원인으로서는 현재까지 부정되고 있다 :

<7> 1, APC에 대한 자기 항체의 존재

<8> 2. APC와 반응하는 신속 작용 프로테아제 억제인자

<9> 3. 기능적 단백질 S의 결핍

<10> 4. 인자 V 또는 인자 VIII 유전자에서의 돌연변이

<11> Dahlbäck (참고 문헌 2)은 연구한 상기 가계에서 단백질 S 와는 무관하게 작용하는 것으로 알려진 지금까지 공지되지 않은 APC 보조인자의 유전적 결함이 APC 내성의 원인임을 가정하였다. Dahlbäck 등(참고 문헌 2)은 또한 국제 특허 출원 WO93/10261호에 응고 인자를 함유하는 환자 샘플에 활성화된 단백질 C를 첨가한 후, APC의 첨가에 의해 영향을 받은 효소 활성을 측정하므로써 혈전 색전 질환을 진단하는 시험 방법을 개시하였다. Dahlbäck 등의 출원에는 제시한 실험결과가 문제의 질환이 현재까지 공지되지 않은 응고 인자(들) 또는 공지된 인자의 공지되지 않은 상호작용과 관련되어 있음을 나타냈다고 언급되어 있다. 비공지 인자는 APC에 의한 분해에 내성이 있는 인자 Va 또는 VIIIa 도 아니고, APC에 대한 면역 글로불린형의 억제인자도 아니다. 또한 그것은 단백질 S 결핍과도 관련이 없다. Dahlbäck 등(참고 문헌 2)은 그들의 발명이 유전성 또는 비유전성 혈전발현 경향과 같은 혈전 색전 질병의 추가적 진단용으로, 그리고 피임약 복용, 수술등을 받은 경우 임신과 관련된 혈전증의 발병 위험성 측정용으로 특히 유용한 방법임을 천명하고 있다. 그들은 그 방법을 샘플내 응고 시스템이 자체 공지된 방법으로 전체적으로 또는 부분적으로 활성화되고, 활성화된 단백질 C와 함께 항온처리되며, 이때, 색소 생산성 기질의 전환 또는 응고와 같은 기질 전환 반응 속도를 측정하는 것을 특징으로 하는 방법으로 기술하고 있다. 수득된 전환 속도는 정상 혈장 샘플에 대해 수득한 값과 비교된다. 속도가 증가되면, 샘플을 취한 환자가 응고 질병에 걸릴 수 있음을 상기 비교는 나타낸다. 이 질병은 단백질 S의 결핍에 의해, 또는 APC에 의한 분해에 내성이 있는 인자 Va 또는 인자 VIIIa의 형성에 의해, 또는 APC에 대한 면역 글로불린형의 억제 인자에 의해 발현되지는 않는다. 상기 국제 출원에서, Dahlbäck 등은 이 출원의 데이타는 문제의 환자가 문헌 [Thromb. Haemostas, 65, Abstract 39, 658 (1991)]에 이미 언급된 것과 대조적으로 결함성 인자 VIII/VIIIa를 보유할 수 없음을 나타내고 있다고 언급하였는데, 상기 문헌에는 환자의 혈장 샘플에 활성화된 단백질 C의 첨가, 및 산출된 효과의 연구가 활성 단백질 C에 의해 분해되지 않은 결함성 인자 VIIIa 분자를 예시하였던 것으로 주장되었다. 또한 상기 국제 특허 출원에서는 APC에 의한 인자 Va 및 VIIIa의 억제를 직접 측정하는 분석법을 사용하였다. 상기 출원에 기술된 인자 Xa 계 응고 분석법을 사용하여, APC에 의한 환자의 인자 Va의 억제가 정상적이었음을 확인하였는데, 이것은 환자의 혈장의 인자 Va 가 외부에서 첨가된 APC에 의해 정상적인 방식으로 분해되었음을 암시한다.

<12> Dahlbäck 등(참고 문헌 2)에 의한 공개 이후, 이 분야에서 다른 그룹들이 연구를 시작하였다. 문헌 [Blood Vol. 82, nr. 7, 1993, 1989-1993 면]에서 Griffin 등은 APC 내성 시험의 결과가 혈액 응고 이상을 확인할 수 없는 25 명의 정맥 혈전증 환자와 이형접합 단백질 C 또는 단백질 S의 결핍증이 있는 것으로 사전 확인된 22 명의 환자들에서 실시했다. 상기 환자들에 대한 활성화된 부분적 트롬보플라스틴 시간 분석의 APC에 의해 유도된 연장은 35 명의 정상인의 결과와 비교되는 것이었다. APC의 대한 항응고 반응에서의 이 새로운 결함은 놀랍게도 25 명의 환자 중 52 내지 64 % 에서, 즉 사전 진단하지 않은 혈전발현 경향 환자의 대다수에서 존재하였음을 상기 결과는 나타냈다. 결손은 22 개 이형접합 단백질 C 또는 단백질 S 결핍 환자중 20 명에서는 나타나지 않았다. 이것은 상기 신규 인자가 단백질 C 또는 단백질 S 결손과는 무관한 위험 인자임을 암시하는 것이다. 2 개의 극도로 결함이 있는 현장(APTT의 APC-유도 연장 〈20S) 각각과 정상 혈장을 혼합하고, APTT 분석을 실시하여 정상 혈장이 결함 혈장의 약한 반응을 교정하는 능력을 평가하였다, 그 결과는 Dahlbäck 등(참고 문헌 2)의 결과와 유사하였다. 이것은 또한 정상 혈장이 결함 환자의 혈장에는 없는 인자를 함유한다는 것을 암시한다. APC 존재하의 APTT 값에서 APC 부재하의 APTT 값을 뺀 값으로 간단히 정의되는, APTT 에서의 계산된 순연장 값이 상기 문헌에 제시되어 있다. 상기 문헌에는 또한 APC 존재하의 APTT 값 대 APC 부재하의 APTT의 비가 기재되어 있으며, 이 변수가 APC 유도된 APTT 연장값과 비교된다는 사실을 기술하고 있다. 이 비교는 정상인에 대한 상기 변수들 사이에 월등한 상호관련성을 나타냈으며, 극히 낮은 APTT 비 값이 비정상 환자의 지표이다. 그러므로 APC-유도 APTT 연장 변수나 APC 존부하의 APTT 값의 비의 변수 또는 두 변수 모두를 진단용 변수로 사용할 수 있다고 기술하고 있다. 이들 변수중 어느것도 상기 문헌에 따른 다른 변수보다 상기 목적에 더 유용한것 같지는 않았다. 또한 상기 문헌에는 사용된 APTT 분석의 APC-유도 연장이 Potzsch 등의 문헌 [Blood 80 : 267a 1992)(Abstract)]에 보고된 낭창 항응고제를 사용하여 환자들의 혈장내 내인성 인자 VIII의 APC-유도 불활성화를 포함하는 분석법을 상기시키는 것으로 언급하고 있다. 상기 후자의 분석법에 근거하여, 혈전증을 가진 낭창 항응고성 활자의 혈장이 APC에 대한 약한 반응을 제공했으며, 따라서 혈전증을 가진 환자가 혈전증 없는 환자와 구별될 수 있음이 Griffin 등의 논문에 보고되었다. Griffin 등은 새로운 가설상의 APC-보조인자에 대한 자기-항체가 낭창 항응고제를 가진 환자들에서 혈전증을 일으키는데 있어서 역할을 한다고 생각하였다. 이들은 새로운 APC-보조인자의 후천적 결핍은 혈전증의 후천적 발병에 관계할 수 있다고 추가로 언급하고 있다.

<13> 문헌 [Lancet, 1993년 12월 18일, 342권, 1503-1506면]에서 Koster 등은 활성화된 단백질 C(APC)에 대한 약한 항응고 반응을 특징으로 하는 응고 시스템에서의 비정상의 임상적 중요성을 시험하기 위

하여 인구에 근거한 환자의 조절 연구를 어떻게 실시하는지를 기술하므로써 APC-내성과 혈전증 사이의 연관성을 더욱 연구하였다. 가계내 연구로부터 볼때 APC에 대한 상기 약한 반응은 상염색체 우성 형질로서 유전되는것 같다(참고 문헌 2, 7 및 47). 응고 단위로 언급된 환자들중에서, 설명되지 않은 혈전증으로 인해 상기 이상은 약 40 %의 발병률의 혈전발현경향의 주원인이었다(참고 문헌 8 및 9). Koster 등의 문헌 [Lancet, 1993년 12월 18일, 342권, 1503-1506 면]에 기술된 연구에서, APC에 대한 상기 약한 반응의 임상적 중요성은 70 세 미만이고, 심정맥 혈전증의 최초로 객관적으로 확인된 에피소드를 가지며, 잠재 종양이 없는 선별하지 않은 연속 환자에서 연구하였다. APC에 대한 이들 환자의 혈장의 민감성은 한 조의 건강 대조군의 민감성과 비교되었다. 활성화된 단백질 C(APC)에 대한 이들의 혈장 APTT의 민감성은 단백질 S 활성 분석에 대해 이미 개발된 시약과 반응 조건을 사용하여 Dahlbäck 등의 문헌(참고 문헌 2)에 기술된 것과 거의 동일하게 측정하였다(참고 문헌 11). 그 결과는 APTT(+APC)/APTT(-APC)의 값으로 정의되는 APC 민감성 비(APC-SR)로 표현하였다.

<14> Koster 등의 논문(Lancet, 1993년 12월 18일, 342 권, 1503-1506 면)에는 프로트롬빈 및/또는 인자 X의 감소된 레벨(〈0.5 u/ml)이 APC-SR을 증가시킬 것임을 언급하고 있다. 이런 이유로 상기 시험은 경구적 항응고 치료에 관한 환자의 혈장의 평가에 사용할 수 없다. 98개 샘플의 시리즈에서, Koster 등(Lancet, 1993년 12월 18일, 342 권, 1503-1506 면)의 시험으로 얻은 APC-SR과 WO93/10261호에 기술된 크로모제닉스(Chromogenix)에 의해 개발된 시험으로 얻은것 사이에 양호한 상호 관계를 발견하였다. APC 민감성비의 기준 범위는 건강한 대조군 환자에서 유도하였다. 데이타의 대수적 변형 및 평균의 3 표준 편차(SD) 외부값을 가진 10 명의 환자를 제외한 후, 정규 분포의 하한치는 2.17(평균-1.96 SD)이였다. 혈전증 발병 위험과 반응 정도 사이의 역관계를 확인하였다. 혈전증 환자들중 APC에 대한 약한 반응의 21% 발생률 및 혈전증의 확률(odds ratio) 6.6 사이의 역비례 관계는 APC에 대한 약한 반응이 심정맥 혈전증의 공통적이고 강력한 위험 인자로 생각될 수 있다는 결론을 유도했다. 약 1.10의 APC 민감성비를 가진 환자는 동형 접합성 또는 이중 이형 접합성일 수 있는 반면, 약 1.50의 APC 민감성비를 가진 환자는 이상에 대해 이형 접합성일 수 있는 것으로 생각되었다. 이상의 발생률은 건강한 대조군 환자중 5% 였다. APC-SR의 분포는 명백히 이정점을 나타내기 때문에, Koster 등은 환자들이 실제로 정상 범위내 매우 낮은 값보다는 APC에 대한 비정상적 반응을 가지는 것으로 생각했다. 그러므로 혈전증 발병 위험과 APC에 대한 그 반응 사이의 관계는 단순한 단일 유전자 결함 유형을 따르는 것 같지는 않았다. 이상은 건강한 환자에서도 자주 발생하는 것으로 확인되었기 때문에 Koster 등은 자체의 결함이 단백질 C 결핍에 대한 것과 마찬가지로 혈전증을 일으키기에 충분할 것으로는 생각하지 않았다(참고 문헌 15, 16). 추가의 원인 인자가 특정 환자내에서 혈전증의 진행에 필요한 것 같다. 이들 요소는 후천적 인자일 수 있고 또한 아직 공지되지 않은 유전적 결함 또는 변이일 수도 있다. 그러나, 일단 기타 원인 인자가 존재하면, 약한 APC 반응은 상대적 위험도의 6 내지 7 배 증가하는 것으로 나타난 혈전증의 강력한 위험도를 제공한다. 상기 논문에는 APC에 대한 약한 반응의 근원적인 결함은 활성화된 단백질 C에 대한 보조인자의 상염색체 우성 유전의 결정을 가정하더라도, 정화할 필요가 있는 것으로 언급되어 있다(참고 문헌 7). APC에 대한 약한 반응은 단백질 C, 단백질 S 또는 항트롬빈 결핍의 빈도가 5 내지 10 배인 것으로 보이는 반면, 그것은 혈전증의 대략적으로 유사한 상대적 위험도를 부여하는데(참고 문헌 17 및 18), 이 사실은 Koster 등에 따르면 상기 이상에 대해 심정맥 혈전증을 가진 모든 환자를 시험하는 것을 가치있게 만든다.

<15> 요약하면, 당해 기술 분야의 상태에서는 단백질 C 항응고 경로의 결함이 비교적 높은 혈전증 발병률과 관계있는 것으로 확인되었다. 활성화된 단백질 C에 대한 약한 항응고 반응의 원인은 불명이지만 활성화된 단백질 C에 대한 약한 항응고 반응은 상세히 논의되어 왔다. 다수의 이론이 가정되어 왔으나, 용인되는 유일한 이론은 활성화된 단백질 C에 대한 약한 항응고 반응을 나타내는 환자에서는 분명히 결핍된 APC의 미공지 보조인자의 존재이다. APC의 가정된 보조인자의 실체는 알려지지 않았다. 또한 APC에 대한 변화된 반응을 검출하는 최근의 시험은 항응고제를 이미 사용한 시험 환자에서는 사용할 수 없다.

<16> **발명의 상세한 설명**

<17> 놀랍게도 약한 항응고 단백질 C 반응을 담당하는 미확인 보조인자의 실체가 발견되었다. 부정되었던 메카니즘중 하나가 사실상 대다수의 혈전발현 경향의 환자에서 단백질 C 항응고 경로의 결함의 원인인 것으로 발견되었다. 결핍의 원인은 인자 V 또는 인자 VIII을 암호화하는 핵산 물질에서의 돌연변이의 존재와 관계가 있었는데, 이 돌연변이는 발현시 상기 인자 V 및/또는 인자 Va(상기 인자 V의 활성화 생성물) 또는 상기 인자 VIII 및/또는 인자 VIIIa(상기 인자 VIII의 활성화 생성물)의 APC에 의한 불활성화도의 감소와 상관된다. 그러므로 상기 결핍은 아직 미확인된 APC 보조인자에서의 돌연변이의 결과가 아니라, 사실상 인자 V 또는 인자 VIII의 결함 또는 보다 구체적으로는 그 활성화 생성물로 인한 것이다.

<18> 당해 기술 분야에서 이미 나타난 바와 같이, 혈전증의 위험도와 APC-내성의 존재를 관련 짓는 것은 이미 이루어졌고, 또한 그러한 결핍의 검색이 사실상 혈전증의 증가된 위험도를 가진 환자의 진단에 매우 유용한 것으로 제안된 바 있다. 이제 어느 인자가 원인이 되는 유전자 결함을 보유하는 지가 알려졌으므로, 이제는 실제로 APC-내성을 측정하는 크로모제닉스 시험이외의 방법으로 군집을 검색할 수 있게 되었다.

<19> APC에 대한 내성과 관련된 돌연변이된 인자 V 또는 인자 VIII을 검색할 경우 돌연변이 단백질의 존재를 측정하는 항체를 사용하거나 DNA 기술을 사용할 수 있게 되었다. 그러므로 본 발명은 활성화된 단백질 C(APC)에 대한 혈전 및/또는 약한 항응고 반응과 관련된 유전자 결함의 존재를 검색하는 방법에 관한 것이며. 이때, 상기 유전자 결함은 혈전증의 증가된 위험도의 지표이거나 또는 환자에서 혈전증을 실제로 일으키는 것이며, 상기 방법은 인자 V 또는 인자 VIII을 암호화하는 핵산 물질에서의 돌연변이의 존재를 자체 공지된 방법으로 측정하는 단계를 포함하는데, 여기서 상기 돌연변이는 핵산 물질의 발현시 상기 인자 V 및/또는 인자 Va(상기 인자 V의 활성화 생성물) 또는 상기 인자 VIII 및/또는 인자 VIIIa(상기 인자 VIII의 활성화 생성물)의 APC에 의한 활성화도의 감소와 상관되며, 상기 방법은 또한 단백질 인자 V 및/또는 인자 Va에 존재하고/하거나 단백질 인자 VIII 및/또는 인자 VIIIa에 존재하는 돌연변이를 상기 인자 V 및/또는 인자 Va, 또는 인자 VIII 및/또는 인자 VIIIa의 분석, 또는 상기 인자 V 및/또는 상기 인자 Va, 및/또는 인자 VIII 및/또는 인자 VIIIa의 분석에 의해 자체 공지된 방법으로 측정하는 단계를 포함하는데, 상기 돌연변이는 상기 인자 V 및/또는 상기 인자 Va 및/또는, 인자 VIII 및/또는 인자 VIIIa의

APC에 의한 불활성화도의 감소와 상관된다. 구체적으로 본 발명에 따른 방법은 인자 V 및/또는 인자 VIII을 암호화하는 핵산 서열의 돌연변이가 인자 V 및/또는 Va 및/또는 인자 VIII 및/또는 인자 VIIIa 상의 APC의 절단 부위 또는 결합 부위를 암호화하는 핵산 서열의 일부내의 위치에 위치하며, APC에 의해 약하게 불활성화되는 인자 V 및/또는 인자 Va 및/또는 인자 VIII 및/또는 VIIIa를 산출하는 방법이다. 인자 V, VIII, Va 및 VIIIa 에서의 APC의 결함 및 절단 부위가 다수 공지되어 있다(표 1 참조. 참고 문헌 34, 35, 36, 48, 49, 52 논문(Odegaard B 및 Mann K. G의 J. Biol. Chem 262, 11233-11238(1987)) 및 초록(Kalafatis M., Haley P. E. 및 Mann K.G.의 Blood 82. Suppl. 1, 58a 면, 1993).

<20> 표 1

<21> 인자 Va 및 인자 VIIIa 에서 활성화된 단백질 C의 절단 및 결합 부위

절단 또는 결합 부위	인간 인자 V(a)서열	소의 인자 V(a)서열	절단 또는 결합 부위	인간 인자 VIII 또는 VIIIa
APC-절단	R^{306}-N^{307} (참고문헌 51)	R^{306}-N^{307} (참고문헌. 48)	APC-절단	R^{336}-M^{337} (참고문헌. 49)
APC-절단	R^{506}-G^{507} (참고문헌. 51)	R^{505}-G^{506} (참고문헌. 48, 50)	APC-절단	R^{562}-G^{563} (참고문헌. 49)
APC-절단	R^{679}-K^{680}	R^{662}-N^{663} (참고문헌. 48, 34)	APC-절단	R^{740}-S^{741} (참고문헌 49)
APC-절단	?	R^{1752}-R^{1753} (참고문헌. 48)	APC-절단	H^{2009}AGMSTLFIV (참고문헌. 35)
APC-절단	?	R^{1753}-A^{1754} (참고문헌 48)		
APC-절단	R^{1861}AGMQTPELI (참고문헌. 35)	R^{1852}AGMQTPELI (참고문헌. 35)		
APC-절단	K^{994} (참고문헌. 52)			

<23> 결합부위가 반드시 절단 부위가 되는 것은 아니다. 그러한 인자에 대한 APC의 감소된 결합을 야기하는 임의의 효과는 또한 그러한 인자의 APC 내성에 관한 효과를 가질것이 명백하지만, 일반적으로 말하면 상기 인자는 이어서 APC에 의해 절단 할 수 있기 전에 APC에 의해 결합되어야 한다. 결합 및/또는 절단 부위에 영향을 미치는 돌연변이는 결합 부위에 위치한 아미노산들의 1 차 아미노산 서열에 존재할 수 있거나, 또는 돌연변이로 인해 APC 결합 및/또는 절단에 대해 감소된 친화도를 가진 3 차 구조를 생성시키는 분자의 다른 곳에 존재할 수 있다. APC 결합 및/또는 절단의 다수의 부위가 명확해졌기 때문에, 전체 분자에서보다는 이들 위치에서의 돌연변이를 검색하는 것이 가장 용이하다. APC의 다수의 절단 부위는 인자 V, Va, VIII 및 VIIIa의 중쇄에 위치하는 것으로 알려져 있으며, 검출할 돌연변이는 중쇄상의 APC의 절단 부위를 암호화하는 핵산 서열의 일부 이내의 위치에 존재할 것이다.

<24> 인자 V 및 VIII의 활성화는 트롬빈 인자 Xa에 의해 일어날 수 있고, 인자 V의 경우에도 일부 뱀독에 의해 일어날 수 있다 "특정 인자에 의해 활성화된"이란 말에 대해, 당업자는 또한 "특정 인자를 통해 활성화된"으로 이해할 수도 있다. 생성된 활성화된 인자는 그들이 활성화된 방법으로 인해 약간 상이하다. 그러므로, 트롬빈에 의해 활성화된 인자 Va의 APC에 의한 결합 및/또는 절단의 감소를 초래하는 돌연변이는 Xa에 의해 활성화된 인자 Va의 APC에 의한 감소된 결합 및/또는 절단을 초래하지는 않을 가능성이 있으며, 그 반대도 마찬가지다. 인자 Va는 다음과 같은 도메인 구조 A1A2/BA3C1C2를 가지고, Xa에 의해 활성화된 인자 Va는 구조 A1A2/B'A3C1C2를 가진 반면, 트롬빈에 의해 활성화된 인자 Va는 구조 A1A2/A3C1C2를 가진다. 3 차 구조는 이들이 상이한 방법으로 활성화된 경우 변이로 인해 인자들의 경쇄 구조에서 상이해질 것 같다. 본원의 실시예에서, 활성화가 Xa를 통해 개시되고, 트롬빈을 통해 활성화된 인자 Va의 APC 불활성화에 관한 효과를 갖지 못할 경우 예시된 특정 돌연변이는 사실상 인자 Va의 APC 불활성화만을 억제한 것으로 예시하고 있다. 이 특정 돌연변이는 인자 V의 중쇄상에 위치하고, 따라서 트롬빈을 통해 활성화된 인자 Va 및 Xa를 통해 활성화된 인자 Va에 존재하지만, 활성화된 2 가지 형태의 인자의 3 차 구조의 상이함으로 인해 활성화된 2 가지 형태의 활성화된 인자에서 동일한 효과를 나타내는 것 같지는 않다.

<25> 실제로 APC에 의한 불활성화는 활성화된 인자 V 또는 활성화된 인자 VIII 에서 일어나기 때문에, 본 발명의 방법은 APC의 결합 친화도의 감소 및/또는 인자 Va 또는 VIIIa 상에서 APC에 의한 절단의 감소를 초래하는 돌연변이의 검출법을 지향하는 것이 바람직하다. 일반적으로 말하면, 인자 Va 및 인자 VIIIa에 존재하는 돌연변이는 활성화 생성물을 유도한 인자 V 또는 인자 VIII상에도 존재한다. 그러므로 인자 V 또는 인자 VIII을 암호화하는 핵산 서열의 분석은 활성화된 인자 Va 또는 VIIIa에 존재할 수도 있는 돌연변이를 나타낼 것이다. 그러므로 본 방법에 따른 분석은 핵산 레벨에서, 예를 들면, 인자 V 및 VIII의 DNA 및/또는 mRNA 레벨에서, 그리고 인자 Va, VIIIa, V 및 VIII, 또는 이들에서 유래한 단편들중 하나이상의 단백질 레벨에서 수행할 수 있다.

<26> 인자 Va DNA는 HepG2 세포(참고문헌 20) 및 인간의 태아의 간(참고 문헌 21 및 22)으로부터 클로닝되었다. 완전한 인자 V 아미노산 서열이 알려졌고(참고 문헌 20,23), 인자 V 유전자의 구성도 규명되었다(참고문헌 23). Shen 등(The Journal or Immunology, 150권, 2992-3001, No. 7, 1993 년 4 월 1 일)은 그들 이 인간 인자 V의 세포원을 어떻게 발견했는지를 기술하였다. 그들은 역전사시키고 폴리머라제 연쇄반응(RT-PCR)시키므로써 인간 임파구 세포에서 인자 V mRNA를 동정하였다. PCR의 결과는 T-세포 cDNA 라이브러리로부터 인자 V cDNA의 독립적인 클로닝으로 확인하였다. 인자 V cDNA의 서열은 실제로 간의 인자

V mRNA와 동일하였다. 인자 V 단백질의 연결 영역의 일부를 암호화하는 mRNA의 한정된 길이는 6 개 뉴클레오티드 치환을 근거로 한 뉴클레오티드 다형태성을 포함하는 것으로 확인되었다. Shen 등은 증폭후 유래한 14 개 독립 클론에 존재하는 증폭된 F7/F8 인자 V cDNA 단편이 6 개 뉴클레오티드 염기 치환을 포함하는 것으로 기술하였다. 2 개의 치환은 각각 무증후 돌연변이로서 위치 2209 및 2236 에서 티민을 시토신으로, 시토신을 티민으로 치환한 것이었다. 4 개의 치환은 위치 2302 에서의 무증후 돌연변이를 일으킨 구아닌의 아데닌으로의 치환과, 위치 2573 에서 아르기닌을 라이신으로, 위치 2595 에서 아르기닌을 히스티딘으로, 그리고 위치 2773 에서 글루타민산을 라이신으로 치환한 것이었다. 이들 추론된 아미노산 변화는 인자 V 기능에는 큰 영향을 끼치지 않는 보존적 치환으로서 상기 논문에 개시되어 있다. 클론중절반(14 개중 7 개)은 또한 위치 2290 에서 아네닌이 구아닌으로 치환된 것으로 나타났는데, 이 치환은 EcoRI 부위를 제거한 또 다른 무중후 치환이다. 상기 돌연변이는 어느것도 APC 결합 또는 절단 친화도의 감소와는 관계가 없었다.

<27> Shen 등의 논문에는, 인자 V mRNA 가 예를 들면 폴리머라제 연쇄 반응을 수행하기에 충분한 양으로 인간 임파구 세포로부터 회수할 수 있음을 예시하고 있다. 이런 정보로써, 당업자라면, 인간으로부터 핵산을 본 발명의 방법을 실시하기에 충분한 양으로 회복하는데에 있어 어려움이 없을 것이다. Shen 등의 논문에는 인간 인자 V 핵산의 핵산 증폭 반응에 사용할 수 있는 다수의 올리고뉴클레오티드가 제시되어 있다.

<28> Bruce Odegaard 및 Mann의 문헌[The Journal of Biological Chemistry, 262권, No. 23, 1987년 8월 15일, 11233-11238 면]에는 트롬빈에 의한 인자 V의 절단이 M_r=94,000의 중쇄(D쇄) 및 M_r=74,000의 경쇄(E쇄)를 산출하는 두 인자 V 및 Va에 대해 기술하고 있다. 각 쇄는 자체가 활성화된 단백질 C 및 인자 Xa에 의한 단백질 분해에 민감하다. 활성화된 단백질 C 또는 인자 Xa에 의한 E쇄의 절단은 2 개의 주 단편, 즉 M_r=30,000 인 것과 Mr=48,000 인 것을 생성시킨다. 상기 문헌은 또한 활성화된 단백질 C 및 단백질 Xa 가 동일한 위치에A-1 E 쇄를 절단함을 나타내었다. D 쇄의 활성화된 단백질 C 절단은 2 개의 생성물, 즉 M_r=70,000 인 것과 M_r=24,000 인 것을 생성시킨다. M_r=70,000 인 단편은 본래의 D 쇄와 동일한 NH_2-말단을 가지나, M_r=24,000 인 단편은 그렇지 않다. 상기 문헌에는 활성화된 단백질 C에 의한 D 쇄의 절단이 인자 Va의 부분적 불활성화의 원인임이 설명되어 있다. 경쇄가 보다 느린 속도로 절단되는 바와 같이, 인자 V_a의 불활성화가 그 중쇄의 절단과 관계 있다는 증거는 또한 참고문헌(10,12,13,14 및 48)에서 나타난다.

<29> Odegaard 및 Mann은 또한 인자 Va와 인자 VIIIa 사이에 상당한 유사성이 있음을 개시하였다. 인자 VIIIa는 그 활성이 단백질 분해에 의해 조절되는 응고 다단계의 또 다른 보조인자이다. 인자 VIIIa 및 Va는 다수의 유사한 구조적 및 기능적 특성을 가진다. 이들은 둘다 트롬빈 또는 인자 Xa에 의한 절단을 통해 큰 전보조인자로부터 생성되고, 둘다 거의 동일한 크기를 가지며, 중쇄 및 경쇄로 구성된다. 이들은 둘다 그 자체적으로는 단백질 분해 활성을 나타내지는 않지만 단백질 분해 복합체의 활성에 크게 영향을 미치며, 둘다 활성화된 단백질 C에 의해 불활성화된다. 이러한 공통성의 근거는 역시 1 차 구조의 외관상 상동성이다(참고문헌 24, 25 및 26). 이들은 또한 스스로 인자 V와 VIII 사이에 추가의 서열 상동성을 확인하였다. 구체적으로 이들은 절단이 일어나는 인자 V 분자의 위치와 합당하게 잘 대응하는 인자 VIII 분자의 여러 위치에서 소 인자 V와 인간 인자 VIII 사이의 서열 상동성의 분절이 명백히 존재함을 언급하였다. 인간 인자 V에 대해 본 발명자들에 의해 예시된 효과(실시예 1)는 인자 V 및 인자 VIII의 등가성으로 인해 특정 양태에서는 또한 인자 VIII 및/또는 VIIIa에 대해서도 동시에 기대될 수 있다. Odegaard 및 Mann은 또한 APC에 의한 인자 Va의 절단후 중쇄가 잔존하지 않을 경우에도 보조인자의 잔류 활성이 존재함을 나타냈다. 이것은 인자 Va의 불활성화가 단일 결합의 단순한 절단이라기 보다는 더욱 복잡한 현상이어서, 인자 V분자의 APC 결합 및/또는 절단 부위에서의 돌연변이가 사실 APC에 의한 불활성화에 대한 친화도의 감소를 일으키기에 충분하다는 상기 문헌의 실시예의 설명을 더욱 놀라운 것으로 만든다. 인자 VIII의 경우 APC 절단 부위는 Arg 562, Arg 336 및 Arg 740(참고문헌 49)에 있는 것으로 가정되었고, APC 결합 부위는 잔기 2009-2018 상의 A3 도메인(참고 문헌 35,36) (표 1도 참조)에 있는 것으로 가정되었다.

<30> 본 발명에 따른 방법은 인자 V 및/또는 인자 Va의 APC 전단 및/또는 결합 부위중 하나 이상에서, 인자 VIII 및/또는 VIIIa 에서는 핵산 또는 단백질 레벨 또는 둘다에서 하나 이상의 돌연변이를 검출하는 방법을 지향한다. 구체적으로, 중쇄를 암호화하는 핵산상에 또는 단백질의 중쇄상에 위치하는 APC 결합 및/또는 절단 부위는 관련이 있는 것으로 생각된다.

<31> Kalafatis 등의 문헌(Elood 82, Suppl. 1, 58A 면, 1993)에는 막에 결합된 인간 인자 Va 가 Arg 506 및 Arg 306 에서 중쇄의 절단후 활성화된 단백질 C에 의해 불활성화되었음이 예시되어 있다. 이들은 인간 인자 Va의 중쇄의 절단 유형이 PCPS 소포의 존부 여하에 달려 있음을 예시하였다. 막의 표면의 부재시에 또는 PC 로만 구성된 인지질 소포의 존재하에, 절단은 잔기 1-506을 포함하는 단편 및 잔기 507 로 시작하는 단편(이것은 COOH-말단에서 APC에 의해 더 절단됨)을 산출하였다. 대조적으로, PCPS 소포의 존재하에, 활성의 완전한 상실은 M_r=75,000 인 단편의 절단과 M_r=40,000 및 M_r=30,000 인 단편의 외관과 관계가 있다. M_r=30,000 인 단편은 Arg306 에서 APC에 의한 절단을 입증하는 잔기 307 내지 506에 상응한다. 보조인자의 경쇄의 절단은 APC 와의 항온처리후 PCPS 소포의 부재하에서 뿐만 아니라 존재하에서도 관찰되지 않는다. 따라서, 보조인자가 PCPS에 결합하는 경우 특이적 APC 절단 부위가 노출된다. 막의 존재는 APC에 의한 인간 인자 Va의 완전한 불활성화에 필수적이고, Arg 506 에서의 절단은 상기 보조인자를 단지 부분적으로 불활성화하고, Arg 306 에서의 절단은 음이온 지질 의존성이며 인간 인자 Va의 완전한 불활성화에 필요하다. 최근에, APC에 의한 소 인자 Va의 불활성화에 관한 유사한 데이타가 발행되었다(참고 문헌48). 따라서 인간 인자 Va 에서 APC에 대한 2 개 이상의 잠재적 절단 부위가 존재한다는 것은 당해 기술 분야의 상태로 보아 명백하다. Kalafatis 등은 또한 인간 인자 V의 라이신 994 에서의 부가적 APC 절단 부위를 검출하였다(참고문헌 52). 그러므로, 본 발명에 따른 방법은 인자 V 및/또는 Va 에서 APC의 하나 이상의 상기 결합 부위에서의; 핵산 또는 단백질 레벨에서 또는 그 두가지 레벨에서의 돌연변이를 검출하는 것을 지향한다. APC의 절단 부위는 중쇄상의 Arg 506 및 Arg 306에 위치한다. 추가의 부위가 아미노산 Arg679 및 Lys994에 존재하는 것으로 밝혀졌다.

<32> 상기 사항을 고려하면, 활성화된 단백질 C(APC)에 대한 약한 항응고 반응 및/또는 혈전증과 관련

된 유전자 결함의 존재를 검색하는 본 발명의 방법은 인자 V 가 Xa에 의해 활성화된 인자 V 로부터 유도되었을 경우에, 특히 관심의 대상이 되는데, 여기서 상기 유전자 결함은 혈전증의 위험 증가의 지표이거나 또는 상기 유전자 결함이 실제로 환자에 혈전증을 일으키며, 상기 방법은 인자 V를 암호화하는 핵산 물질에서의 돌연변이의 존재를 자체 공지된 방법으로 측정하는 것을 포함하며, 여기서 핵산물질의 발현시 돌연변이는 상기 인자 V 및/또는 인자 Va의 APC의 불활성화도의 감소와 상관 관계가 있다.

<33> 구체적으로 본 발명의 방법은 혈장 인자 V(참고 문헌 21)의 서열의 아미노산 506에 상응하는 위치에 변경된 아미노산을 포함하는 돌연변이된 아미노산 서열을 가진 인간 인자 V 또는 Va를 암호화하는 핵산 서열에서의 돌연변이를 측정하는 것을 지향한다. 구체적으로는 전술한 돌연변이가 아미노산 아르기닌이 혈장 인자 V의 서열의 아미노산 506 에서의 아미노산 글루타민으로 대체된 돌연변이를 측정하는 것이다. 이것은 아미노산 506에 상응하는 아미노산 코돈의 두 번째 뉴클레오티드 G 가 돌연변이된 경우에 해당한다. 구체적으로는 뉴클레오티드 G 가 혈장 인자 V의 서열의 아미노산 506에 상응하는 아미노산 코돈의 두 번째 뉴클레오티드에 상응하는 위치에서 A 로 돌연변이된 경우이다.

<34> 실시예들로부터 명백해지는 바와 같이, 본 발명은 또한 시험 대상자가 인자 V 및/또는 인자 Va, 또는 인자 VIII 및/또는 인자 VIIIa 에서의 돌연변이에 대해 동형접합성인지 이형 접합성인지 여부를 측정하는 방법에 관한 것으로, 이 방법은 결함이 APC에 대한 항응고 반응에 존재하는 지 여부를 측정하고, 이어서 (APTT + APC)/(APTT - APC) 값과 같은 결함의 진단에 유용한 것으로 알려진 변수값을 측정하고, 얻어진 값을 정상인의 샘플 또는 동형 접합성 또는 이형 접합성인 사람의 샘플에 대해 동일한 방법으로 얻은 값과 비교하고, 이에 따라 시험 대상이 APC에 대한 항응고 반응의 결함에 대해 동형 접합성인지 또는 이형 접합성인지 여부를 확인하는 자체 공지된 방법과, 실시예 1에 예시된 실시양태 및 이 실시예의 임의의 동등한 실시 양태에서는 APC에 대한 변화된 항응고 반응을 야기하는 인자 V, Va, VIII 및/또는 VIIIa 에서의 기타 돌연변이, 가장 구체적으로는 APC 결합 및/또는 절단 부위에서의 돌연변이로 인한 인자 V 및/또는 Va, 또는 인자 VIII 및/또는 인자 VIIIa 에서의 돌연변이의 존재 및 때로는 그 성질을 측정하는 임의의 공지된 방법을 수행하는 것을 포함한다.

<35> 본 발명의 방법은 핵산 표적 증폭 반응을 수행하므로써 돌연변이를 검출하여 수행할 수 있다. 상기 표적 증폭 반응은 당업자에게는 널리 공지되어 있다. 돌연변이가 위치할 수 있는 핵산 연장체의 5' 및 3' 단부에 인접한 핵산 연장체를 인지하고 거기에 하이브리드화하는데 특이적인 1 종 이상의 프라이머를 사용할 필요가 있으며, 이때 하이브리드화는 돌연변이가 위치할 수 있는 핵산 연장체의 증폭에 충분한 정도로 일어나는 것이다. 필요한 하이브리드화의 정도 역시 핵산의 표적 증폭 분야의 당업자에게는 널리 공지되어 있다. NASBA(핵산 서열계 증폭 : Nucleic Acid Sequence Based Amplication), PCR(폴리머라제 연쇄 반응 : Ploymerase Chain Reaction), LCR(리가제 연쇄 반응 : Ligase Chain Reaction) 및 RCR(복구 연쇄 반응 : Repair Chain Reaction)을 포함하는 당해 분야에서 일반적으로 실시되는 다수의 표적 증폭 반응이 있다. PCR 표적 증폭 방법의 경우 앰플리콘(Amplicon®) 반응 키트가 시판되고 있다. 돌연변이 자체가 위치할 수 있는 핵산 연장체를 인지하고 거기에 하이브리드화하는 데에 충분히 특이적인 프라이머를 사용할 수도 있다. 또 다른 증폭 방법은 표적보다는 프로브가 증폭되는 키론(Chiron)이 개발한 분지쇄 증폭 방법이다.

<36> 핵산의 증폭 반응후, 돌연변이의 존재 및 때로는 그 성질을 검출하는 자체 공지된 방법의 증폭된 핵산의 분석을 본 발명의 방법에서 실시할 수 있다.

<37> 핵산 물질의 증폭 없이 돌연변이를 측정할 수도 있다. 핵산상의 돌연변이의 존재를 측정하기 위해 핵산 증폭 반응을 개발하기 전에 사용된 당업자에게는 공지된 다수의 기술이 있으며, 이들은 모두 본 발명의 방법의 다양한 실시 양태에 사용될 수 있다. 예를들면 측정할 돌연변이는 정상 내지 엄격한 하이브리드화 조건, 예를들면, 블로팅 기술과 돌연변이의 존재 및 때로는 그 성질을 검출하기 위해 자체 공지된 방법으로 분리된 핵산의 분석법을 사용하여 분석할 인자를 암호화하는 핵산 서열의 적어도 일부에 하이브리드화하기에 충분히 특이적인 1 종 이상의 핵산 서열에 대한 하이브리드화 반응으로 검출할 수 있다.

<38> 돌연변이의 존재 및 때로는 그 성질의 검출은 상기와 같이 분리된 핵산을 생거(Sanger) 서열 반응같은 것을 사용하여 서열 분석하여 핵산 서열을 확인하고, 이 서열 분석 결과를 돌연변이되지 않은 인자에 대해 공지된 서열과 비교하므로써 수행할수 있다. 분리된 핵산 서열은 추가의 하이브리드화 시험에 적용할 수도 있다. 추가의 하이브리드화 시험은 돌연변이를 포함하는 핵산 물질의 단편에 하이브리드화하기에 충분한 길이와 특이성을 가진 상응하는 상보 서열을 가진 핵산 물질의 연장체를 사용하여 수행하므로써 돌연변이의 존재 및 때로는 그 성질을 검출한다. 첫번째 하이브리드화 단계는 돌연변이되거나 또는 돌연변이되지 않은 인자를 암호화하는 핵산만을 분리하고, 두 번째 하이브리드화 단계는 분리된 핵산 물질상의 상기 돌연변이의 존부 여하를 측정하고자 하는 실제로 돌연변이된 핵산 서열의 성보적 서열에 분리된 서열을 실제로 하이브리드화시키는 것을 포함한다. 상기 후자의 하이브리드화 반응은 신뢰할만한 결과를 위해 엄격한 조건하에서 수행하여야 하며, 이때 기타 하이브리드화 단계는 정상 내지 엄격한 조건하에서 수행할 수 있다. 따라서 특정 핵산상의 돌연변이의 존재를 측정하는 두 고전적인 방법을 예시하며, 당업자는 다수의 공지된 방법을 사용할 수 있다. 분자 생물학 분야의 다양한 표준 서적에는 그러한 기술이 광범위하게 예시되어 있다(예 : Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T의 Molecular Cloning : a Laboratory Manual(Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1980)).

<39> 증폭 반응에 적용시키지 않았던 분리한 핵산 물질의 분석에 대해 상기에 예시한 바와 같이, 돌연변이를 포함하는 핵산 물질의 단편에 적어도 하이브리드화하기에 충분한 길이와 특이성을 갖는 상응하는 상보적 서열에 대한 하이브리드화 또는 서열 분석 반응을 사용한 후속 분석 시험을 사용함으로써 본 발명의 검색 방법에서 얻은 증폭된 핵산 물질을 분석하여 돌연변이의 존재 및 때로는 그 성질을 검출할 수도 있다.

<40> 구체적으로 인자 V 에서의 돌연변이의 존재를 분석하기 위해, 분리되고/ 되거나 증폭된 핵산 물질을 서열 목록의 서열 번호 12 및 13을 가진 서열에서 선택된 핵산 물질의 연장체에 대한 하이브리드화 시험에 적용시킬 수 있다. 예를들면 하이브리드화에 극히 적합한 프라이머 또는 핵산은 인간 인자 V를 암

호화하는 핵산 서열중 인트론 10의 적어도 일부와 엄격한 조건하에서 인트론 10의 상기 일부에 하이브리드화할 수 있는 상기 핵산 서열의 유도체를 포함한다. 이러한 유도체는 인트론 10의 상응하는 부분과 90% 이상의 상동성을 가진 것이 바람직하다. 인간 인자 V의 핵산 서열은 공지되었고, 서열 목록의 서열 번호 1에 인간 인자 V를 암호화하는 핵산 서열을 예시한다. 그서열은 참고문헌 21에서 유래한 것이다. 인트론 10의 적어도 일부를 포함하는 하이브리드화용 핵산 서열을 사용하므로써, 인자 V를 암호화하는 핵산, 구체적으로 APC 결합 및/또는 절단부위를 암호화하는 핵산 서열에 존재하는 돌연변이를 분리하고/하거나 증폭하고/하거나 이어서 검출하는 것은 매우 간단히 행해진다. 중쇄에 위치한 돌연변이를 검출하는 것이 특히 적합하다(서열 10, 14 참조). 또한, 하이브리드화 및/또는 증폭용의 핵산 서열의 프라이머는 서열 목록의 서열 목록 번호 2-11을 가진 서열로부터 선택할 수 있다. 상기에 나타낸 바와 같이, 다수의 기타 올리고뉴클레오티드 프라이머 역시 당해분야에는 공지되어 있다. 증폭용 또는 하이브리드화 반응용의 상기 프라이머를 사용하여 인자 V 및/또는 Va를 암호화하는 핵산을 분리할 수도 있다. 돌연변이된 인자에 대한 서열과 마찬가지로 정상 인자를 암호화하는 서열이 공지된 본 발명의 방법에서 검색하고자 하는 돌연변이의 존재 및 때로는 그 성질을 분리하고/하거나 증폭하고/하거나 측정하는 데에 가장 적합한 올리고뉴클레오티드 서열을 선택하는 것은 당업자의 몫이다.

<41> 본 발명의 방법에서, 구체적으로 분석할 핵산을 표적 증폭 반응시킬 경우, 분리되고/되거나 증폭되고/되거나 하이브리드화된 핵산 물질을 서열 분석한 후, 그 서열을 상응하는 돌연변이되지 않은 인자의 핵산 서열과 비교한다. 증폭되거나 분리되고/되거나 하이브리드화된 핵산 물질을 제한 단편 분석을 통해 분석할 수도 있다. 구체적으로 돌연변이된 인자 V를 사용한 실시예에서 예시한 돌연변이의 경우, 사용할 수 있는 효소는 MnlⅠ이다. 당연히 제한 단편 분석용으로 사용할 수 있는 제한 효소는 검출한 돌연변이의 성질 및 그 위치에 따라 달라진다. 제한 효소의 결정은 추가의 발명 단계를 포함하지 않고, 단순히 당업자에게 부당한 짐을 지우지 않는 통상의 실험 절차로서 당업자의 몫이다.

<42> 상기와 같이 본 발명의 방법은 또한 그 단백질을 암호화하는 핵산 서열 보다는 단백질을 분석하므로써 수행할 수 있다. 구체적으로 이것은 단백질내 돌연변이가 인자 V 또는 Va 상의 APC의 결합 및/또는 절단 부위를 제공하는 아미노산 서열의 부분내의 일정 위치에 위치하여, APC에 의해 약하게 불활성화된 인자 V 및/또는 인자 Va를 산출하거나, 또는 인자 VIII 또는 VIIIa의 APC의 결합 및/또는 절단 부위를 제공하는 핵산 서열의 일부상에 위치하여 APC에 의해 약하게 불활성화되는 인자 VIII 및/또는 인자 VIIIa를 산출하는 경우의 본 발명의 유용한 실시양태이다.

<43> 상기와 같이 인자 V, Va, 인자 VIII 또는 VIIIa 상의 APC의 절단 부위를 제공하는 아미노산 서열의 일부에 돌연변이의 존재는 APC에 의한 불활성화에 대한 돌연변이된 인자의 변경된 내성을 매우 명확히 유도하는 돌연변이이며, 따라서 그러한 돌연변이의 측정은 본 발명의 방법의 바람직한 실시양태이다. 당해 분야에서 이미 나타난 바와 같이, 인자 Va 또는 인자 VIIIa의 불활성화는 일반적으로 APC 가 인자의 중쇄를 절단할 경우 일어난다. 그러므로, 돌연변이된 인자의 절단 정도의 수정을 산출하는 그러한 절단 부위의 돌연변이의 검출은 본 발명의 바람직한 실시 양태이다.

<44> 돌연변이에 대해 단백질을 분석할 때 그것은 절단부위 자체의 1 차 아미노산 서열뿐만 아니라, 단백질의 3차 구조가 결합 부위 및/또는 절단 부위와 직접 관련되지 않은 1차 서열의 특정 위치의 돌연변이로 인해 뒤틀릴 수 있다. 단백질의 실제 결합 부위 또는 절단 부위에서 매우 멀리 떨어져 위치한 돌연변이가 단백질의 3 차 구조에 큰 영향을 나타내어 또한 상기 단백질에의 결합, 이 경우 APC에 의한 결합을 제거하거나 감소시키는 것은 널리 공지되어 있다. 그러므로 본 발명의 방법은 APC의 절단 및/또는 결합 부위의 1 차 핵산 서열에서의 돌연변이의 검출을 지향할 뿐 아니라, APC 에 의한 인자의 결합 및/또는 절단의 감소를 야기하는 변화된 3 차 구조를 갖는 돌연변이된 인자를 생성시키는 돌연변이의 검출을 지향한다.

<45> 인자 V 및 VIII은 둘다 상이한 메카니즘에 의해 활성화될 수 있고 산출되는 활성화된 인자는 이들의 원래의 인자와 3 차 구조에 있어 둘다 상이한 것으로 알려져 있기 때문에, 인자 V 또는 인자 VIII의 돌연변이는 상기 분자의 APC 결합 및/또는 절단 부위상에 영향을 끼치지 않으나 활성화된 인자들의 상기 부위상에 영향을 끼칠 수 있고, 그 반대도 성립할 수 있음은 명백하다. 그럼에도 불구하고, 활성화된 인자 V 또는 VIII의 변화된 결합 및/또는 절단의 원인이 되는 1 차 아미노산 서열의 돌연변이는 또한 인자 V 또는 인자 VIII에 존재할 수도 있다. 돌연변이된 단백질의 검출이 특이 항체를 사용하여 일어날 경우, 돌연변이의 존재 및 때로는 그 성질의 검출을 위해 돌연변이를 포함하는 활성화된 인자에 대한 특이 항체를 사용할 수 있다. 한편 분석할 단백질을 단백질 분해 효소에 의해 절단하여 선형 또는 부분적 선형 구조를 얻을 수도 있어서 인자 V 및/또는 Va, 또는 인자 VIII 및/또는 VIIIa의 1 차 아미노산 서열에서의 돌연변이에 특이적인 항체를 사용할 수 있다. 따라서 돌연변이의 검출 방법은 활성화된 인자의 분석에 제한될 필요는 없으나, 사실 아직 활성화되지 않은 인자 V 또는 인자 VIII 에서 수행할 수도 있다.

<46> 돌연변이가 APC의 결합 및/또는 절단 부위에 존재하는 경우, 인자 V, Va, VIII, VIIIa의 APC에 의한 처리 및 자체 공지된 방법에 의한 단편들의 분석은 인자가 정상인 경우보다는 상이한 단편을 나타내야 한다.

<47> 예를 들면, 인자 V의 경우, 아미노산 506의 돌연변이는 거기서 APC의 절단 및/또는 결합을 방해한다. 따라서 활성화된 APC에 의한 처리는 부위 306,679 및 994 에서의 절단을 야기하여 aa307-aa679의 하나의 단편과 1-306, 680-994 및 995-말단의 서열을 포함하는 다른 3 개의 단편을 제공한다. 관심을 끄는 단편은 307-679 이다. 정상 인자 V은 이 단편을 포함하지 않으나, aa506의 활성 절단 부위로 인해 다른 2 개의 단편, 즉 aa307-506 및 aa507-679를 포함한다. 따라서 aa307-aa679의 검출은 아미노산 506 에서의 돌연변이된 APC 부위의 존재를 나타낸다.

<48> 매우 정교한 시험은 APC 처리후 인자 V를 2 개의 항체의 존재에 노출시키는 것을 포함할 수 있다. APC에 의한 처리는 혈청 제조중 자연적으로 이루어진다. 상기 시험에서 하나의 항체는 아미노산 506의 단백질 상류의 특정 부위에 특이적이며, 이 부위는 aa306의 하류에 위치하며, 가장 인접한 절단 부위는 aa506의 상류이다. 두번째 항체는 아미노산 506의 하류의 단백질 부위에 특이적이며, 이 부위는 aa679의 상류에 위치하며, 가장 인접한 APC 절단 부위는 aa506의 하류이다. 상기 시험은 두 항체에 의해 검출되는 단편의 검출을 포함한다. 상기 시험은 샌드위치 면역분석법일 수도 있다. 하나의 항체를 고정화

시키거나, 또는 다른 항체에 면역 분석법 분야의 당업자에게는 널리 공지된 방법으로 검출용 마커를 구비시킬 수도 있다. 상기 시험에서 단편 307-506의 일부를 특이적으로 인지하는 항체의 사용 방법은 본 발명의 범위에 속한다. 단편 507-679의 일부를 인지하는 항체 및 이것의 상기 시험에서의 사용 방법 역시 본 발명의 범위에 속한다. 항체는 단일클론 항체가 바람직하다. 2개의 항체, 즉 하나는 단편 1-306의 일부에 특이적인 것이고 다른 하나는 단편 307-506의 일부에 특이적인 것을 사용하여 유사한 방법으로 Arg 306에 위치한 APC 절단 부위에서의 돌연변이를 검출하기에 적합한 시험을 수행할 수 있다. 상기 시험에서 단편 307-506의 일부를 특이적으로 인지하는 항체의 사용방법은 본 발명의 범위에 속한다. 단편 1-306의 일부를 특이적으로 인지하는 항체 자체 및 이것의 상기 시험에서의 사용 방법 역시 본 발명의 범위에 속한다. 아미노산 679에 위치한 APC 절단 부위에서의 돌연변이의 검출을 위해 상기한 것과 유사한 방법으로 시험을 수행할 수도있다. 이 돌연변이의 경우 단편 507-679의 일부에 특이적인 하나의 항체가 필요하고, 아미노산 680의 하류 단편의 일부에 특이적인 하나의 항체가 필요하다. 상기 시험에서 단편 507-679의 일부를 특이적으로 인지하는 항체의 사용방법은 본 발명의 범위에 속한다. 단편 507-569의 일부를 특이적으로 인지하는 항체 및 단편 570-994의 일부를 특이적으로 인지하는 항체 및 상기한 바와 유사한 시험에 이들 항체의 1 종 이상을 사용하는 방법도 본 발명의 범위에 속한다. 라이신 994의 APC 절단 부위에서 돌연변이의 검출 시험도 유사하게 설명할 수 있다. 단편 994-말단 및 680-994는 이들을 인지할 수 있는 항체들과 마찬가지로 관련 단편이다.

<49> 일반적인 관점에서 보면, 인자 V,Va,VIII 또는 VIIIa 에서의 돌연변이 시험은 자체 공지된 방법으로 면역 분석에서 2개의 항체를 사용하므로써 특정 APC 절단 부위에서 APC에 의한 절단을 감소시키거나 억제하는 돌연변이의 존재 또는 부재를 검출할 수 있는데, 여기서 하나의 항체는 상기 APC 절단 부위의 상류 단편을 인지하고, 두 번째 항체는 상기 APC 절단 부위의 하류 단편을 인지하며, 둘 중 하나의 항체가 인지하는 인자의 부분과, 돌연변이의 존부 여하를 측정해야 하는 특정 APC 절단 부위 사이에는 다른 APC 절단 부위는 위치하지 않는다. 이러한 돌연변이 검출 원리를 따른 다양한 실시 양태는 면역 분석법 분야의 당업자에게는 분명히 이해될 것이다.

<50> 따라서 예를들면, 하나 이상의 추가의 프로테아제를 APC와 함께 사용할 수 있으며, 상기 APC는 어느 유형의 샘플을 사용하는가에 따라 샘플에 이미 존재하거나 또는 첨가되어야 함도 분명한 사실이다. 인자상에서 검출할 활성 APC 절단 부위의 부재는 불활성 APC 절단 부위를 포함하는 단백질 분해 단편에의 두 항체의 결합을 일으키는 반면, 검출할 활성 APC 절단 부위의 존재는 항체들이 단백질 분해 단편에 결합할 수 없도록 하는 단백질 분해 단편을 산출하도록 추가의 프로테아제(들)를 선택한다. 이것은 1종 이상의 프로테아제를 선택하므로써 간단히 이루어지는데, 여기서 상기 프로테아제는 분석할 APC 절단 부위의 상류와 하류에서 상기 인자를 절단하며, 두 항체 중 하나는 측정할 APC 절단 부위 상류 단편의 일부를 인지하고 그 위치의 하류에서 프로테아제는 APC 절단 부위 상류를 절단하며, 두 항체중 다른 하나는 측정할 APC 절단 부위의 하류 단편의 일부를 인지하고, 그 위치의 상류에서 프로테아제는 APC 절단 부위의 하류를 절단하며, 상기 프로테아제(들)은 상기 절단 부위들이 측정할 APC 절단 부위와 돌연변이되지 않은 인자상에 존재하는 인접 APC 절단 부위 사이에 위치하도록 상기 인자를 절단한다. 또다른 실시 양태에서는 APC 대신에 돌연변이된 APC 절단 부위를 절단할 수 있으나 돌연변이되지 않은 APC 절단 부위를 절단할 수 없는 프로테아제 또는 그 반대의 프로테아제를 사용할 수 있다. 측정할 돌연변이의 성질이 일단 확인되면, 프로테아제들에 대해 공지된 인지 부위를 검색하여 적합한 프로테아제를 선택하는 것은 당업자의 일상적인 실험중의 하나이다.

<51> 돌연변이를 검출할 추가의 가능성은 아미노산 서열 분석의 보다 오래된 기술에 있다. 돌연변이되지 않은 인자의 아미노산 서열이 일단 알려지면, 분석할 인자의 아미노산 서열을 측정하고, 그 서열을 상응하는 돌연변이되지 않은 인자의 공지된 서열과 비교하는 것은 매우 간단하다. 그러나, 돌연변이의 존재에 대해 단백질을 분석하는 간단하고 효과적인 방법은 항체를 사용하는 것인데, 예를들면, 당업자에게는 공지된 ELISA 또는 RIA 또는 다양한 기타 면역학적 시험을 사용하다.

<52> 인자 V 및 인자 VIII의 활성화된 형태가 하나의 특정 메카니즘에 의해 활성화될 경우 APC 결합 및/또는 절단의 감소를 나타내는 것 역시 가능하다. 이것은 인자 V에 대해 실시예 1에 예시하는데, 여기서는 트롬빈을 사용하여 활성화된 형태가 APC에 대해 어떠한 결합 및/또는 절단능도 나타내지 않는 반면, 인자 Xa에 의해 활성화된 형태는 APC에 의한 결합 및/또는 절단의 감소를 나타낸다. 그러나, 상기와 같이, 돌연변이만의 효과가 활성화된 형태중 하나에서 나타나는지 여부와 상관없이, 물론 인자 V, 트롬빈에 의해 활성화된 인자 Va 또는 Xa에 의해 활성화된 인자 Va상의 돌연변이의 존재를 검출하는 것이 가능하다.

<53> 실시예 1에서 예시하는 바와 같이, 인자 V에서 특이적인 돌연변이가 발견되었는데, 이것은 그 원인을 사전에 측정하지 않고 혈전발현경향을 나타내는 환자에서 고비율로 나타낸다. 이것은 혈장 인자V(참고 문헌 21에 개시되어 있음)의 아미노산 서열의 아미노산 506에 상응하는 위치의 아미노산의 돌연변이와 관련되었고, 따라서 아미노산 506의 돌연변이를 측정할 수 있는 방법은 본 발명의 바람직한 실시 양태를 이룬다. 일반적으로 검출할 돌연변이가 APC 절단 부위에, 특히 인자 V(a) 및/또는 인자 VIII(a)의 중쇄상에 위치한 아르기닌 아미노산의 변경을 포함하는 방법은 적절하게 수행할 수 있는 본 발명의 실시 양태이다.

<54> 돌연변이를 검출하기 위해서는 돌연변이 단백질 인자 V 및/또는 Va에 결합할 수 있거나 또는 돌연변이 단백질 인자 V 및/또는 Va의 선형 단백질 분해 단편에 결합할 수 있는 특히 항체를 사용할 수 있는데, 이 항체는 돌연변이되지 않은 단백질 또는 이것의 상응하는 단백질 분해 단편에의 결합 활성이 낮다. 항체를 사용한 방법은 단백질 인자 VIII 및/또는 VIIIa에 대해, 그리고 이들의 선형 단백질 분해 단편에 대해 사용할 수 있다.

<55> 대안으로서 단백질 인자 V 및/또는 Va 또는 단백질 인자 VIII 및/또는 인자 VIIIa에 결합할 수 있는 항체를 사용할 수도 있는데, 이 단백질은 APC에 의한 불활성화도의 감소를 나타내지 않으며, 이 항체는 상응하는 인자에 대해 및/또는 APC에 의한 불활성화도의 감소를 나타내는 돌연변이된 단백질을 산출하는 돌연변이를 포함하는 상기 인자의 단백질 분해 단편에 대해 낮은 결합 친화도를 가진다. 이 경우 분리된 단백질 또는 단백질 분해 단편에 대한 항체의 비결합이 돌연변이의 존재를 나타내는 시험을 개발할

수 있다. 본 발명은 상기한 항체를 사용한 방법 뿐만 아니라 항체 자체에 관한 것이기도 하다.

<56> 본 발명의 방법에서는 APC의 첨가시 변화된 응고 시간에 대해 정상 표준 혈장의 응고 시간과 비교하여 샘플을 먼저 검색하고, 일단 심플이 표준에 비해 변화된 APC 내성을 나타내는 것으로 진단되면, 인자 V 또는 인자 VIII을 암호화하는 핵산 서열 및/또는 인자 V, Va, VIII 또는 VIIIa의 아미노산 서열을 분석하고/하거나 인자 V, Va, VIII 또는 VIIIa 자체를 분석할 수 있다. 샘플을 특정 돌연변이, 예를들면, 하기 실시예들에 예시된 인자 V에서의 돌연변이의 존재에 대해 즉시 분석할 수도 있다. 사용할 방법은 환자의 상태 및 시험의 목적에 따라 달라진다. 예를들면, 대형 군집을 검색할 경우 사용할 방법은 가장 저렴한 것이 바람직할 것이다. 일부 경우에, 검출할 돌연변이는 항체를 사용하여 측정하기가 어렵고, 핵산 서열 또는 제한 단편 분석법을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 또한 제한 단편 시험에 사용할 효소가 저렴하면, 그러한 시험을 수행하기는 매우 간단하며 수행하기에 저렴하여 확실히 적합할 것이다. 그러므로, 본 발명은 또한 샘플이 APC에 의한 변화된 결합 및/또는 절단을 나타내는지 여부를, 정상 인자 V 및/또는 인자 VIII 및/또는 인자 VIIIa 및/또는 인자 Va를 포함하는 샘플과 비교하여 측정하고, 상기한 방법으로 이 변화를 야기하는 돌연변이를 추가 분석하는 시험의 사용 방법에 관한 것이다.

<57> 본 발명의 또다른 양태는 동형 접합성이거나 이형 접합성인 인자 V,Va,VIII 또는 VIIIa에서의 돌연변이의 검출에 관한 것이다. 이것은 Koster 등의 문헌[Lancet, 1993,12,18, 34권]에 기술된 시험 프로토콜을 사용하여 시험 대상이 APC 내성을 나타내는지 여부에 대해 수행할 수 있다. 기본적으로 Koster는 33㎜ $CaCl_2$, 25㎜ 트리스(pH 7.5), 50㎜ NaCl 및 0.05% 오발부민을 함유하는 시약(APTT-APC) 50㎕를 사용하거나 또는 2.0㎍/㎖의 인간 APC 및 0.6% 글리세롤을 함유하는 동일한 시약(APTT+APC)을 50㎕를 사용하여 응괴 형성을 개시한 후, 50㎕의 APTT 시약(Cephotest?, 배치 103029)과 함께 37℃ 에서 360초 동안 항온처리한 50㎕의 비희석 혈장의 사용을 개시하였다. 그는 그 결과를 APTT(+APC) 및 APTT(-APC)의 비로 정의되는 APC 민감성비(APC-SR)로 표현하였다. 이들 조건하에서 APC-SR은 정상 혈장에 대해 달성된다. 프로트롬빈 및/또는 인자 X의 감소된 레벨(〈0.5U/㎖)은 APC-SR을 증가시킬 것이다. 그러므로 이 방법은 경구적 항응고 치료에 관한 환자의 평가에는 사용할 수 없다. Koster는 추가로 상기 시험으로 그 결과와 서두에 논급했던 크로모제닉스 분석법을 사용하여 얻은 결과(피어슨 상관계수 0.54)사이에 양호한 상관 관계가 있음을 발견하였다고 언급하고 있다. 놀랍게도 본 발명자들은 시험 대상이 인자 V에 대해 이형 접합성인 지 동형 접합성인지 여부를 평가하는데 사용되는 코스터(Koster)시험은 이형 접합체의 거의 절반을 빠뜨리는 크로모제닉스 시험보다 훨씬 더 양호하게 이상을 검출한다는 것을 발견하였다. 제14도는 코스터 시험 결과를 나타낸 것이고 제11도는 크로모제닉스 시험 결과를 나타낸 것이다. 본 발명자들은 1691 GG(정상체) 또는 1691 AG(이형 접합체)로 유전자형이 분류되는 개인의 무작위적 선별로부터 얻은 샘플에 관해, 상업적으로 이용되는 코스터 방법 및 크로모제닉스 시험을 사용하여 시험을 2회 실시하였다. 크로모제닉스 시험에서는 정상체와 이형 접합체에서 얻은 민감성비 사이에 상당한 중첩이 있었고, 결국 이형 접합체의 50% 이상이 크로모제닉스 시험에서 APC 내성으로 확인될 수 없었다. 그러므로 본 발명자들은 시험 대상자가 APC 내성을 산출하는 인자 V 돌연변이에 대해 비정상인지 정상인지 여부를 측정하는데 적합한 부가 시험을 발견하였다. 종래에 코스터 시험은 시험 대상자가 일반적으로 APC 내성과 관련하여 정상인지 비정상인 지 여부를 측정하는데 유용할 것으로만 가정되었던 반면에, 본 발명자 들은 그것이 사실 APC 내성을 야기하는 인자 V 돌연변이를 검출하며, 또한 크로모제닉스 시험보다 훨씬 신뢰도가 높다는 것을 발견하였다. 0.84 미만의 값은 본 시험에서 비정상이고, 정상 개체와 이형 접합체 사이에시 중첩은 일어나지 않는다. 이것은 크로모제닉스 시험을 능가하는 상당한 향상이다. 본 발명자들은 이 향상이 상이한 활성화인자의 사용으로 인한 것이고, 보다 중요하게는 크로모제닉스 시험에서보다 상이한 칼슘 농도의 사용으로 인한 것으로 믿는다. 상기 개량된 시험은 샘플에 25㎜ $CaCl_2$ 이상의 칼슘 농도를 적용시키는 것을 포함한다. 칼슘 농도는 바람직하게는 45㎜ 미만, 보다 바람직하게는 30-40㎜, 특히 31-35㎜ 이다. 상기 높은 농도는 아마도 크로모제닉스 제형에서보다 더 양호한 정도로 샘플에서 시트레이트를 중화시키는 것 같다. 추가의 개량은 활성화인자로 쎄포테스트(Cephotest)시약의 사용에 따른다. 이 방법은 크로모제닉스 시험과 더욱 유사하며, 그것의 상당한 개량으로 간주된다. APC 민감성비에 대해 얻은 값을 표준화할 때(실시예 1 참조), 0.84 이하의 값은 이상의 지표이며, 0.84 이상의 값은 APC 내성, 특히 인자 V 돌연변이와 관련하여 정상의 지표이다. 동형 접합체 측정의 경우 0.50 이하의 값이 기록되며, 이형 접합체는 0.50 내지 0.70의 값을 나타낸다. 그러나 상기 개량 방법은 항응고제로 처리한 환자에는 사용할 수 없다.

<58> 실시예1에서 검출된 돌연변이는 인자 V의 아미노산 506의 코돈에서의 G→A 돌연변이였다. 돌연변이의 발생 빈도수 및 관련된 혈전증의 높은 위험도는 부모가 돌연변이된 인자를 그 자손에게 전달하는 위험도를 평가할때 시험 대상자가 동형 접합성인지 이형 접합성인지 여부의 측정이 큰 연관성이 있음을 뜻한다. 실시예 2에서, 우리는 인자 V의 돌연변이, 구체적으로 G → A 돌연변이의 존재가 사실 혈전증 진행의 위험 인자임을 예시한다. 또한 1기 심근 경색증을 가진 환자의 6%가 1691 G → A 돌연변이의 보균자라는 사전 관찰은 상기 돌연변이 역시 동맥 혈전증의 약한 위험 인자(상대 위험도 1.5-2.0)임을 나타냈다. 심장마비의 증가된 위험도의 적시 검출은 사람이 생활 유형을 조정하고 그러한 사태를 방지하기 위한 예방 조치를 취할 수 있게 한다. 정맥 혈전증과 관련된 중요성은 이미 서두에서 논급한 바 있다.

<59> 본 발명은 또한 예시한 모든 실시 양태에서 본 발명의 방법을 실시하는데 필요한 부재를 포함하는 키트에 관한 것이다. 이것은 예를들면 시험 키드인데, 전술한 1종 이상의 특이 항체, 구체적으로 APC 절단 및/또는 결합 부위 사이의 부위를 인지 하는 항체쌍을 포함하며/하거나, 전술한 표적 증폭 반응 및/또는 하이브리드화 반응용의 1종 이상의 프로브 또는 프라이머 또는 프라이머쌍을 포함한다. 구체적으로 본 발명은 인자 V 및/또는 인자 Va의 아미노산 506을 암호화하는 핵산 서열의 돌연변이를 포함하는 핵산 서열의 증폭용 프라이머(들)를 포함하는 키트에 관한 것이다. 이 키트는 하나의 특정 돌연변이의 검출을 위해 또는 다수의 돌연변이를 위해 프라이머 및/또는 항체를 포함할 수 있다. 키트가 APC에 의한 결합 및/또는 절단의 감소 및/또는 제거를 야기하는 것으로 특정 집단에 유행하는 주요 돌연변이를 검출하는데 필요한 부재를 포함하는 것이 바람직하다.

<60> **실시예 1**

<61> 최근에 APC에 대한 약한 항응고 반응("APC-내성"(참고문헌2)이 혈전증을 가진 비선택 연속 환자 중 21%(Lancet, 1993년 12월 18일, 342권, 1503-1506면, T.Koster등)와 혈전증의 개인적 또는 가계 병력

이 있는 선택 환자중 약 50%(참고 문헌 8 및 Blood, 82권, No7(10월 1일), 1993: 1989-1993면, J.H. Griffin 등)의 혈장에서 발견되었다. 본 실시예에서 우리는 APC-내성의 표현형이 인자 V 유전자에서 단일의 점 돌연변이(1691,G →A)에 대해 이형 접합성 또는 동형 접합성과 관련되는 지를 입증하여, APC에 의한 불활성화에 대해 내성인 인자 V분자 - FV(Q506)또는 FV 라이덴(Leiden)의 합성을 예측한다. 네덜란드의 인구중에서 돌연변이의 대립 유전자 빈도는 약 2%이며, 혈전증의 모든 공지된 유전적 위험 인자(단백질 C-(참고문헌 17), 단백질 S-(참고 문헌 30), 항트롬빈III(참고문헌 31)-결핍)의 빈도의 10배 이상이다.

<62> 외관상 건강한 사람의 5%가 APC에 대해 약한 항응고 반응을 가지며, 이 APC-내성은 심정맥 혈전증(Lancet, 1993년 12월 18일, 342권, 1503-1506면, T.Koster등)의 위험도의 7배 증가와 관계 있다는 우리의 이전의 발견은 상기 표현형의 분자적 기초를 연구하는 기폭제가 되었다.

<63> APC에 대한 혈장의 반응성은 하나는 APC의 존재하에 측정된 것과 다른 하나는 그 부재하에 측정된 것인 두개의 활성화된 부분적 트롬보플라스틴 시간(APTT)의 비로서 측정된다(Lancet, 1993년 12월 18일, 342권, 1503-1506면 T. Koster등; Blood, 82권, No 7(10 월 1일), 1993: 1989-1993, J.H. Griffin 등 및 참고 문헌 2). 표준화를 이유로, 상기 비(APC-민감성비 또는 APC-SR)는 기준 혈장으로 얻은 비(n-APC-SR)로 표준화된다. APC에 대한 내성은 n-APC-SR이 0.84 미만인 것으로 정의된다(분리물 제거후 100명의 건강인 대조군의 평균 n-APC-SR 이하의 표준편차 1.96).

<64> 14명의 무관련성 APC-내성 환자의 부모의 분석은 APC-내성(또는 APC-보조 인자 II 결핍증(참고문헌 2))의 가계적 형태의 개념을 도출하였는데, 동형 접합체와 이형 접합체는 n-APC-SR을 근거로 하여 확인할 수 있다(제1도 참조), 혼합 실험으로부터 상기 개념의 추가적 증거를 얻었다(제1도); 동형 접합성 APC-보조인자 II 결핍(n-APC-SR 0.38)으로 분류되는 환자의 혈장의 일정 부피에 정상 혈장 일정 부피를 첨가하면 0.57의 n-APC-SR이 산출된다. 이것은 결핍증(평균 n-APC-SR 0.58)에 대해 이형 접합성으로 분류되는 환자의 혈장에서 발견되는 비와 동일하다. 동형 접합성 APC-보조인자II 결핍(평균 n-APC-SR 0.40)으로 분류된 4명의 무관련성 환자으이 혈장의 혼합은 상기 비를 정확히 나타내지 못했는데, 이 사실은 4명의 환자 모두에서 동일한 혈장 단백질이 없거나 또는 결함이 있음을 나타냈다(참고 문헌2 및 Blood, 82권, No. 7(10월 1일), 1993 : 1989-1993면, J.H. Griffin 등).

<65> APC-보조인자II 활성이 공지된 혈액 응고 단백질중 하나의 기능적 특성일 가능성을 조사하기 위해, APC-보조인자II 레벨을 하나의 단일 단백질이 결핍된 일련의 혈장에서 측정하였다(제2도). 이들 혈장은 모두 인자 V 결핍 혈장(<5%)을 제외하고는 정상의 APC-보조인자II 레벨(60-155%)을 함유하였다. 인자 V결핍 혈장에 분리한 인간 인자 V의 상이한 양의 첨가는 인자 V 응고 활성과 APC-보조인자 II 활성 둘다를 유도하였다.

<66> APC-보조인자II로서 인자V의 후보에 대한 독립된 증거는 APC-내성을 가진 대규모 가계에서 연관 연구로부터 얻었다(제3도).

<67> 인간의 인자 V 유전자(F)좌를 염색체 1(1q 21-25)(참고 문헌 33)에 지도로 만들었다. 간편한(PCR-가능한) 다형태성 F5 마커에 관한 보고는 없었다. 그러나, 공개된 인자 V cDNA 및 게롬 서열(참고문헌 20-23 및 The Journal of Immunology, 150권, 2992-3001, No. 7. 1993년 4월 1일, N.L.L. Shen등)을 변형시키므로써 우리는 인자 V유전자의 두개의 새로운 다형태성을 확인하였다. 불행하게도, 둘다 APC-내성 가계에서는 알 수 없었다. 그러므로, 우리는 상기 가계에서 1q21-25 영역(제4도 참조)의 몇 개 좌에 대해 미소부수체(microsatellite)마커의 분리를 시험하였다. 제5도의 표는 상기 마커와 APC-내성 사이의 연관에 대한 조별 로드값(lodscore)을 나타낸다. 상당히 큰 양(+)의 결과가 D1S61 좌에서만 얻어졌는데(Θ=0.00에서의 Zmax 7.27), 이 좌는 F5 좌로부터 4cM내에 위치한다.

<68> 이 시점에서 우리는 APC -내성이 관련 돌연변이(들)을 찾기 위한 인자 V 유전자의 결함과 관계있다는 충분한 지표를 얻었다고 믿었다. 우리는 우리의 연구를 인자 V의 두 영역, 즉 추정 APC 절단 부위(잔기 1865-1874)(참고문헌 35,36) 및 추정 APC 결합 부위(Arg-506)(참고 문헌 21 및 The Journal of Biological chemistry, 262권, No. 23. 8월 15일, 11233-11238면, 1987년, Bruce Odegaard 및 Kenneth Mann)을 각각 함유하는 영역에 집중하였다.

<69> 첫번째 시도로서, 말초형 임파구에서 분리한 인자 V 유전자의 이소성 전사체를 APC 결합 및 절단 부위를 암호화하는 두 영역의 제1 가닥 cDNA 합성 및 후속 증폭에 사용하였다. PCR-단편의 직접 서열 분석은 APC-보조인자 II가 결핍된 동형 접합성으로 분류되는 2명의 무관련성 환자가 둘다 1691, G →A 전이에 대해 동형 접합성이었음을 나타낸다(제6도). 이 돌연변이는 Gln(CAA)(FV(Q506) 또는 FV 라이덴)에 의한 Arg-506(CGA)의 대체를 예측한다. 1691A 주위의 225bp 및 추정 APC 결합 부위를 암호화하는 영역 주위의 275 bp에서는 다른 서열 이상이 관찰되지 않았다.

<70> Arg-506 다음의 절단이 APC에 의한 인간 인자 Va의 불황성화의 수단이라면, 위치 506에 Gln의 도입은 억제성 절단을 방지할 것으로 예측할 수 있다. 응고 과정 중에 혈장 인자 V는 인자 Xa에 의해 초기에 활성화되고(105/220kDa 헤테로다이머(참고 문헌 37)의 형성), 다음에 트롬빈에 의해 추가로 처리된다(105/74 kDa의 헤테로다이머(참고 문헌 38)의 형성)참고 문헌 39). 흥미롭게도, 우리는 Gln에 의한 Arg-506의 대체는 단지 APC에 의한 인자V의 Xa-활성화된 형태의 불활성화를 방지하지만(제8도), 트롬빈-활성화된 형태의 불활성화는 방지하지 못하는(데이타 제시하지 않음) 것을 발견했다.

<71> 두개의 무관한 APC-내성 환자가 동일한 돌연변이에 대해 동형 접합성이라는 관찰은 이 변경이 대다수의 APC-내성 환자에 존재함을 암시하였다. 이러한 가능성을 조사하기 위해, 1691 G →A 전이의 존재에 대해 게놈 DNA를 검색하는 시험을 고안하였다. 이 돌연변이가 인트론 10의 개시부로부터 엑손 10,11 nt 51에 위치하고, 인트론 10의 처음 8개 뉴클레오티드만이 공개(참고 문헌 23)되었기 때문에, 그 이상의 인트론 10 서열은 헤미-네스티드(hemi-nested) 역 PCR로 생성시켰다(참고 문헌 40)(서열 14 역시 참조). 이 정보로부터 유전자형 분류에 사용할 수 있는 두개의 중첩하는 게놈 단편의 증폭용 프라이머가 고안되었다.

<72> 267 bp 단편의 Mn1 I에 의한 처리는 정상(1691 G) 또는 돌연변이의 대립 유전자의 존재를 입증한

반면, 정상 또는 돌연변이된 대립 유전자에 특이적인 올리고뉴 클레오티드와 222bp 단편의 하이브리드화를 1691A의 양성 확인에 사용하였다. 이런 방법을 사용하여 우리는 최초로 제3도의 가계의 모든 구성원들을 연구하였다.

<73> APC 내성(n-APC-SR 〈0.84)을 갖는 1691, G →A 전이에 대한 이형 접합성의 완전한 공동분리는 상기 가계의 일부에 대해 제10도에 나타낸 바와 같이 입증되었다. 또한, n-APC-SR을 이용할 수없는 4명의 환자(II.6, II.8, II.14, III.22)는 경구적 항응고제로 치료되었기 때문에 이형 접합성으로 확인되었다.

<74> 심정맥 혈전증의 최초로 객관적으로 확인된 에피소드를 가진 301명의 연속 환자와 301명의 나이 및 성별에 따라 조를 이룬 군집 대조군의 사전 연구에서, 64명의 APC-내성 혈전증 환자를 확인하였다(Lancet, 1993년 12월 18일, 342권, 1503-1506면, T. Koster등). 이들 64명의 환자와 그 64명의 대조군을 G →A 전이의 존재에 대해 검색하였다. 128명중 70명이 n-APC-SR이 0.84미만(64명의 환자와 6명의 대조군)이었다. 이들중 56명은 상기 돌연변이를 보유하였는데(53명의 환자와 3명의 대조군), 이들중 6명은 두 대립 유전자(평균 n-APC-SR 0.43; 범위 0.41-0.44)에 나머지 50명은 하나의 대립 유전자(평균 n-APC-SR 0.57 ; 범위 0. 50-0.67)에 보유하였다. 나머지 14명의 APC-내성인 사람들은 상기 돌연변이를 보유하지 않았고, 끝부분에 감소된 n-APC-SR (평균 n-APC-SR 0.78; 범위 0.70-0.83)만을 가졌다. 모든 58명의 비 APC-내성인 사람들은 상기 돌연변이를 보유하지 않았다(평균 n-APC-SR 0.99 : 범위 0.83-1.19). 0.84보다 큰 n-APC-SR을 가진 100명의 연속 혈전증 환자는 아무도 그 돌연변이의 보균자가 아닌 반면, 예상대로 그들의 100조의 대조군중 3명만이 보균자였다. 이들 3명(n-APC-SR : 0.57, 0.58 및 0.59)은 0.84 미만의 n-APC-SR을 가진 유일한 대조군이었다.

<75> 우리의 데이타는 0.84 미만의 n-APC-SR을 가진 사람들중 80% 및 0.70 미만의 n-APC-SR을 가진 사람들중 100%가 1691, G →A 전이에 대해 이형접합성 또는 동형 접합성이며, 반대로 이 돌연변이의 모든 보균자는 0.7 미만의 n-APC-SR 을 가짐을 입증한다. 네덜란드 인구중 돌연변이의 대립 유전자의 상대적 고빈도(약 2%)는 APC 내성이 심정맥 혈전증의 통상적이고 강력한 위험 인자이며, 이 유전성 인자 V의 결함을 지금까지 가장 통상적인 유전성 혈액 응고 질환으로 만든다는 우리의 이전의 발견(Lancet, 1993년 12월 18일, 342권, T. Koster등)과 부합된다.

<76> 제1도 및 제2도

<77> 혈장내 APC-보조인자II 레벨의 측정.

<78> 제1도는 혈장내 APC-보조인자 II 활성 분석의 측정곡선이다.

<79> APC-보조인자II는 APC-내성이 있는 사람에 없거나 결손된 APC의 가설적 신규의 보조인자(참고문헌2)를 말한다. n-APC-SR은 APC-보조인자 II가 결핍된 (0%의 APC-보조인자II) 동형 접합성 환자의 혈장에서 정상 혈장(100%의 APC-보조 인자II)을 희석하여 측정하였다. 제1도의 곡선은 9회의 상이한 실험 결과이다. APC-보조인자 II가 결핍된 동형 접합성 또는 이형 접합성의 분류는 APC 내성(n-APC-SR 〈0.84)을 가진 14명의 시조(始祖)에 대해 부모의 분석 결과를 토대로 한다. 2명의 시조(n-APC-SR 0.38/0.41)의 경우, 두 부모는 APC-내성이었고(평균 n-APC-SR 0.55); 11명의 시조(평균 n-APC-SR 0.57)의 경우, 부모의 한쪽이 APC 내성이었고(평균 n-APC-SR 0.59), 반면에 다른쪽 부모는 APC 내성이 아니었으며(평균 n-APC-SR 0.96); 1명의 시조(n-APC-SR 0.74)의 경우 양 부모는 영향을 받지 않았다(n-APC-SR 0.96/0.99). 우리는 사람들을 그 n-APC-SR을 근거로(동형 접합체 : 평균 0.40, n=2 ; 이형 접합체: 평균 0.58, 범위 0.51-0.67, n=26), APC -보조인자 II에 대해 동형 접합체 또는 이형 접합체로 분류할 수 있음을 제시한다.

<80> 제2도는 단일의 응고 인자가 결핍된(〈5%) 혈장에서의 APC-보조인자 II 활성 레벨을 나타낸 것이다.

<81> 혈장은 선천적인 결핍증을 가진 환자로부터 얻거나 (a,g,f,m,g,r,s,t) 또는 면역 고갈법으로 제조하였다(b,c,d,e,j,h,i,k,l,P). 혈장들은 인자 II(a), 인자 VII(b), 인자 IX(c), 인자 X(d), 인자 XI(e), 인자 XII(j), 인자 XIII(g), 단백질 C(I), 단백질 S(i), β2-당단백질(j), 항트롬빈(k), 인자 V(l,m), 인자 VIII(p,q) 또는 폰 빌레브란트(von Willebrand) 인자(r,s,t)가 결핍된 것들이었다. 인자 V 결핍혈장(m)은 두가지 상이한 농도-54%(n) 및 90%(o)의 정제된 인간 인자V(Serbio, Gennevilllers, 프랑스)로 보충하고, 20mM 시트르산 나트륨, 150mM NaCl, 4mM $CaCl_2$에 대해 투석하고, APC-보조인자II 활성에 대해 시험하였다.

<82> **방법 :**

<83> 두번의 APTT 측정, 즉 한번은 APC의 존재하에서 그리고 또 한번은 그 부재하에서의 측정 결과로부터 전술한 바(Lancet, 1993년 12월 18일, 342권, T.Koster등)와 같이 APS-SR을 계산하였다. n-APC-SR은 시험 샘플에 대한 APC-SR을 수집된 정상 혈장에 대한 APC-SR로 나누어서 계산하였다. APC-보조인자 II 활성은 제1도에 나타낸 측정 곡선상에서 APC-보조 인자 II 결핍 혈장내 시험 혈장의 두가지 상이한 희석률(1:1, 3:4)에 대한 n-APC-SR을 판독하여 측정하였다.

<84> 제3도 내지 제5도 APC-내성을 가진 가계의 연관 분석

<85> 제3도는 APC-내성(또는 APC-보조인자 II 결핍증)을 가진 가계의 계통도이다.

<86> ●, ■, 0.84 미만의 큰 n-APC-SR을 가진 사람(평균 0.65; 범위 0.59-0.71 ; n=13); ○, □, 0.84보다 큰 n-APC-SR을 가진 사람(평균 1.03; 범위 0.87-1.29; n=20); ◍, ▨, 경구용 항응고제 처리 환자(이들 환자에서 n-APC-SR의 측정은 의미없음); ⊙, ⊡, 시험하지 않은 사람.

<87> 제4도는 염색체 1의 g21-25영역의 통합된 유전자 연관지도이다.

<88> APOA2, D1S104, D1S61, AT3, LAMB 및 F13B좌의 상대 위치는 N1H/CEPH 콜래버러티브 매핑 그룹 연관 지도(참고 문헌 41)에서 유도되었다. 인접 좌들 사이의 유전자 거리는 cM으로 주어진다. F5 좌는 상기

지도상에 두 마커를 알려주는 3CEPH 가계에서 F5 및 D1S61 좌에 대한 마커의 분리를 연구하므로써 D1S61 좌의 4cM 내에 위치하였다(55회의 감수분열에서, 상기 두 유전자 좌 사이에는 재조합이 관찰되지 않았다: Θ=0.00에서 Zmax 16.6).

<89> 제5도는 염색체 1마커를 사용한 APC 내성의 조별 로드값을 나타낸 것이다.

<90> 제3도의 가계도의 가능한 모든 사람을 분석하였다 ApoA2, D1S104, D1S61, LAMB 및 F13B 좌에 대한 마커들의 올리고뉴클레오티드 서열은 게놈 데이타 뱅크(Genome Data Bank)에서 입수 가능하다. 네덜란드 프라이머 베이스에서 프라이머들을 얻었다. AT3좌에 대한 3가지 상이한 다형태성 마커는 상기 가계에서 알 수는 없었다. J.Ott. 박사로부터 입수한 링키지(LINKAGE) 패키지 버젼 5.3으로부터의 MLINK 프로그램을 사용하여 2지점 연관 분석을 실시하였다.

<91> **방법:**

<92> ApoA2, D1S104, D1S61, LAMB 및 F13B에 대한 미소부수체 마커를 PCR로 증폭시켰다. 조건: 50mM NaCl, 10mM 트리스-HCl(pH 9.6), 10mM $MgCl_2$, 0.01% BSA, 200μM dGTP, dATP 및 dTTP, 20μM dCTP, 0.7μCi α^{32}P dCTP, 0.43U Taq 폴리머라제(Cetus, Emeryville, 미합중국 캘리포니아), 50ng의 각 프라이머 및 30ng의 게놈 DNA. 최종 연장 단계는 10분으로 94℃(1'), 55℃(2'), 72℃(1')에서 27 사이클을 수행했다. PCR 생성물을 6% 변성 폴라아크릴아미드 서열 겔상에서 분리한 후, 겔을 건조시키고 X-선 필름에 노출시켰다.

<93> F5 다형태성: 인자 V유전자(참고 문헌 23)의 엑손 13에서 유래한 636bp 단편을 서열 목록의 프라이머 번호 2(PR-766, nt 2253-2272(참고 문헌 21)) 및 번호 3(PR-768, nt 2870-2899(참고 문헌 21))을 사용하여 PCR로 증폭시켰다. PCR 조건에 대해서는 제10도와 제11도를 참조하면 된다. Hinf I을 사용한 제한은 nt 2298에서 C/T 이형태성(C: 0.68; T:0.32) 및 nt 2411에서 드문 A/G 이형태성(A:0.98: G:0.02)을 검출한다. 이들 마커는 제3도의 가계도에서는 알 수 없다.

<94> 제6도 내지 제8도. APC-보조 인자 II가 결핍된 동형 접합성 환자에서의 인자 V 유전자 돌연변이의 동정.

<95> 제6도는 APC-보조인자 II가 결핍된 동형 접합성으로 분류되는 환자에서 뉴클레오티드 치환을 나타내는 자동 방사성 사진이다.

<96> cDNA PCR-단편(인간 인자 V(참조 문헌 21)에서 아미노산 417 내지 572를 암호화함)의 비해독 가닥의 뉴클레오티드 서열의 일부를 한명의 환자(P)와 한명의 비APC-내성 대조군(C)에 대해 나타낸다. 화살표는 Gln에 의한 Arg 506의 대체를 예측하는 1691, G →A 전이의 위치를 나타낸다.

<97> 제7도는 인자 V분자의 개략도이다.

<98> 인간 인자 V는 몇가지 유형의 내부 반복 서열을 포함하는 330kDa 당단백질이다 (참고 문헌 21). 인자 Xa에 의한 활성화는 105/220kDa의 헤테로다이머(A_1A_2/B'$A_3C_1C_2$) (참고 문헌 38)의 형성을 야기하는 반면, 트롬빈에 의한 활성화는 105/74kDa의 헤테로다이머(A_1A_2/$A_3C_1C_2$)(참고 문헌 37)의 형성을 야기한다. APC는 인자 Va (참고 문헌 35,36)의 A3 도메인에 결합하고, Arg-505(The Journal of Biological Chemistry, 262권, No. 23, 8월 15일, 11233-11238, 1987년, Bruce Odegaard 및 Kenneth Mann) 다음의 A2 도메인에서의 절단에 의해 소 인자 Va를 억제한다.

<99> 인간(Arg-506) 및 소(Arg-505)인자 Va의 추정(참고 문헌 43) APC 절단 부위 주변의 아미노산 서열을 나타냈다. APC-내성 환자에서, Arg-506은 Gln에 의해 대체되었다.

<100> 제8도는 APC에 의한 불활성화에 대한 인자 Xa-활성화된 인자 V(Q506)의 내성을 나타낸 것이다.

<101> 인자 V(R506) 또는 인자 V(Q506)를 함유하는 $Al(OH)_3$-흡착 및 피브리노겐 고갈된 혈장(37℃에서 2시간: 0.3U ml^{-1} Arvin)을 20mM $CaCl_2$ 및 20μM PS/PC(27/75)의 존재하에 인자 Xa(2nM)로 처리하였다. 8분 후, 인자 V 활성화가 완료 되었을 때, 1.9nM의 APC 또는 완충액을 첨가하였다. 상이한 시간 간격으로 10μl의 샘플을 정지 완충액(50mM 트리스-HCl, pH 7.9, 180mM NaCl, 0.5mg ml^{-1} OVA, 5mM $CaCl_2$)에서 1/100로 희석하고, Pieters 등에 의해 기술된 방법(참고 문헌 44)을 사용하여 인자 Va 활성에 대해 직접 분석하였다. 0.70U ml^{-1} FV(R506)(0.64μM 트롬빈 min^{-1}) 또는 0.49U ml^{-1} FV(Q506)(0.20μM 트롬빈min^{-1})의 활성화를 완료한 후 측정된 인자 Va 화성은 임의로 100%로 놓았다.

○, -APC; ●, +APC.

<103> **방법:**

<104> cDNA 합성: 동의 환자 및 비 APC-내성 대조군의 10ml의 시트레이트화된 혈액의 임파구 분획으로부터 RNA를 분리하였다(참고 문헌), 1μg의 RNA를 슈퍼스크립트 키트(BRL, Bethesda, 미합중국 매릴랜드)를 사용하여 혼합된 무작위 헥사머의 존재하에 제1 가닥 cDNA 합성의 주형으로 사용하였다. cDNA 단편의 증폭. 프라이머 서열 4(PR-764, nt 1421-1440(참고 문헌 21)) 및 서열 5(PR-856, nt 1867-1891(참고 문헌 21))는 추정 APC 절단 부위를 포함하는 잔기 417 내지 572 를 암호화하는 영역을 증폭시키며; 프라이머 서열 6(PR-849 nt 5608-5627(참고 문헌 21)) 및 서열 7(PR-848, nt 6040-6063(참고 문헌 21))은 APC 결합 영역을 포함하는 아미노산 잔기 1812 내지 1963을 암호화하는 영역을 증폭시킨다. PCR 조건은 제9도 및 제10도에도시된 바와 같다. 극저온의 겔화 온도 아가로스 상에서 PCR 단편을 정제하고, PCR 반응에서와 동일한 프라이머를 사용하여 전술한 바와 같이(참고 문헌 42) 직접 서열 분석하였다. APC-결합 영역의 서열 분석을 보조하기 위해 하나의 추가 프라이머를 합성하였다: 서열 8(PR-847, nt 5905-5927(참고 문헌

21))

<105> 제9도 및 제10도. 인자 V의 1691A 대립 유전자의 존재와 APC-내성의 관련

<106> 제9도는 APC 내성을 가진 1691A의 동시 분리를 나타낸 것이다.

<107> 윗부분을 가계도(제3도)의 사람들의 위치, 및 이용하는 경우의 n-APC-SR(I16는 경구용 항응고제 처리에 관한 것임)을 제시한다.

<108> 중간 부분은 267bp의 PCR 단편의 Mn1 I 처리 결과를 나타낸다.

<109> 아래 부분은 1691A 대립 유전자(PR 1005)에 특이적인 비오티닐화된 올리고 뉴클레오티드와 222bp 단편의 도트 블롯 하이브리드화 결과를 나타낸다.

<110> 제10도는 0.84 미만의 n-APC-SR을 가진 64명의 혈전증 환자, 및 1691A 대립 유전자(PR 1005)에 특이적인 비오티닐화된 올리고뉴클레오티드를 가진 64조의 대조군의 222bP의 PCR 단편의 도트 블롯 하이브리드화를 나타낸 것이다.

<111> 모든 환자(P) 및 대조군(C)은 동의하였다. 슬래시는 본 실험에서 실패한 PCR 반응의 위치를 나타낸다.

<112> **방법:**

<113> 1691 G/A를 포함하는 게놈 단편의 증폭. Mn1-I 처리의경우, 5' 프라이머 서열 9(PR-6967: nt 1518-1602(참고 문헌 21)) 및 3' 프라이머 서열 10(PR-990: 인트론 10중 nt 127-146)로서 사용하여 267bp 단편을 증폭시켰다. 도트 블롯 하이브리드화의 경우, 5'-프라이머 서열 11(PR-6966, nt 1626-1647(참고 문헌 21))로서 그리고 3' 프라이머 PR-990(서열 10)으로서 사용하여 222bp 단편을 증폭시켰다. 조건: 54mM 트리스-HCl(pH 8.8), 5.4mM $MgCl_2$, 5.4μM EDTA, 13.3mM$(NH_4)_2SO_4$, 8% DMSO, 8mM β-메르캅토에칸올, 0.4mg ml^{-1} BSA, 0.8mM의 각 뉴클레오시드 트리포스페이트, 400ng의 각 프라이머, 200-500ng의 DNA 및 2U Taq 폴리머라제(Cetus Emeryville, 미합중국, 캘리포니아)를 함유하는 혼합물 125μl를 91℃(40"), 55℃(40") 및 71℃(2')에서 36사이클에 적용시켰다. 267bp 단편(7-10μl)을 0.4U Mn1 I(Biolabs, Cambridge, 미합중국 매사츄세츠)로 처리하고; 1691 G 단편은 67, 37 및 163bp의 단편을 제공하는 반면, 1691A 단편은 67 및 200bp의 단편을 제공한다. 222bp 단편(약 100ng)은 1691G의 검출을 위한 비오티닐화된 서열 특이적 올리고뉴클레오티드 서열 12(PR 1006: nt 1682-1699(참고 문헌 21)) 및 1691A의 검출을 위한 비오티닐화된 서열 특이적 올리고뉴클레오티드 서열 13(PR 1005)을 사용한 도트 블롯 하이브리드화에 사용하였다. 절차는 전술한 바와 완전히 동일하였다(참고 문헌 46). 하이브리드화후 PR-1006을 사용한 세척은 53℃에서, PR-1005를 사용한 세척은 52℃에서 실시했다.

<114> **실시예 2**

<115> 본 발명자들은 응고 인자 V(인자 V라이덴) 이상의 돌연변이에 대해 이형 접합성 및 동형 접합성인 사람에서 정맥 혈전증의 위험도를 조사하였다. 우리는 최초로 객관적으로 확인된 심정맥 혈전증을 가진 70세 이하의 471명의 연속 환자 및 474명의 건강인 대조군에서 인자 V 라이덴 유전자형을 측정하였다. 우리는 혈전증을 가진 환자들중에서는 85명이 이형 접합성이고 7명이 동형 접합성이며, 대조군중에서는 14명이 이형 접합성으로 확인하였다.

<116> 상대 위험도는 이형 접합성인 사람에서 7배 증가한 반면, 동형 접합성인 사람에서는 80배 증가하였다. 이들은 훨씬 젊은 나이에(32세 대 44세) 혈전증을 나타냈다. 동형 접합성인 사람은 주로 여자로서 주로 혈액형이 A형이었다.

<117> 나이에 따른 혈전증 위험도의 증가로 인해, 절대 위험도 차이는 이형 접합성 및 동형 접합성인 보다 나이가 많은 사람들에서 가장 현저하였다. 동형 접합성인 사람의 경우, 절대 위험도는 매년 몇 %에 이른다. 이것은 인자 V 라이덴에 대해 대부분의 동형 접합성인 사람은 그 생존 기간중에 1회 이상 혈전증을 나타낼 것임을 의미한다.

<118> 돌연변이된 인자 V유전자의 높은 대립 유전자 빈도로 인해, 동형 접합성 보균자는 기타 유형의 유전성 혈전발현경향에서와 같이 매우 드물 것이다. 동형 접합 상태가 이형 정합 상태보다 더 높은 시험도를 제공하는 지 여부는 아직 알려지지 않았다. 우리는 인자 V 라이덴에 대해 동형 접합성인 환자들의 임상적 특징 및 혈전증 위험도를 평가하였다. 이들은 심정맥 혈전증에 관한 대규모 환자-대조군 연구에서 확인되었다(라이덴 혈전발현경향: LETS)(Koster T 등, Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. Lancet 1993: 342: 1503-1506).

<119> **방법**

<120> **연구 계획**

<121> LETS 계획의 상세한 것은 전술한 바 있다(Koster T 등 Venous thrombosis due to poor anticoagulant responser to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. Lancet 1993: 342: 1503-1506).

<122> 우리는 70세 미만의 연속 환자를 포함시켰는 데, 이들은 공지된 악성 질환은 없이 심정맥 혈전증의 최초로 객관적으로 확인된 에피소드를 나타낸 후 라이덴, 암스테르담 및 로데르담의 항응고 클리닉에서의 항응고 치료의 외래 환자 모니터에 위탁되었다. 환자들은 급성 혈전 증세후 6개월 이상(6-19 개월) 후에 관찰하였다. 적격 환자중 90%가 연구에 참가할 의사를 표명했다. 474명의 혈전증 환자외에도, 우리는 정맥 혈전 색전증의 병력이 없고, 알려진 악성 질환을 앓지 않았고, 동일한 성과 거의 비슷한 나이(+/- 5세)의 474명의 대조군을 포함시켰다.

<123> **데이타 수집 및 실험실 분석**

<124> 모든 대상자들은 표준 질문서를 작성하였는데, 이 질문서에는 지표일, 즉 혈전증상 발일 이전의 특정 기간에 한해 과거의 후천적 위험 상태의 존재에 대한 질문이 포함되었다. 우리가 고려한 후천적 위험 상태로는 수술, 수술없는 입원 또는 가정에서의 지속적인 운동 부족(2주 이상)이 있었는데, 이들은 모두 지표일 전년에 관한 것이었고, 상기 상태로는 또한 지표일 시점에서의 임신이 있었다.

<125> 전완전부(antecubital) 정맥으로부터 0.106mmol/L의 트리소듐 시트레이트를 함유하는 Sarstedt Monovette?튜브속으로 혈액을 수집하였다. 고분자량의 DNA를 백혈구에서 분리하고, 4℃에서 보관하였다. 돌연변이 인자 V-라이덴 유전자(1691, G →A 전이)의 존재는 전술한 대로 측정하였다. 이 방법으로 우리는 각 환자에 대해 그가 인자 V 라이덴 돌연변이에 대해 동형 접합성 정상인(GG)인지, 이형 접합성(AG)인지 또는 이러한 이상의 동형 접합성 보균자(AA)인지 여부를 설정하였다. 기술자들은 모든 경우에 샘플의 상태를 몰랐는 데, 즉 샘플이 환자에서 유래한 것인지 대조군에서 유래한 것인지를 몰랐다. DNA 분석용 세포를 471명의 환자 및 474명의 대조군에 이용하였다.

<126> **분석 및 통계**

<127> 환자 및 대조군의 인자 V 라이덴 돌연변이의 이형 접합성 및 동형 접합성 보균자의 빈도는 간단한 교차 도표에 의해 비교되었다. 이형 접합상태와 관련된 위험도의 분석에서 성별 및 나이는 그들이 상염색체 유전자 이상의 원인으로 예상되지는 않듯이 혼동성 변수로는 보이지 않기 때문에, 이형 접합 상태에 대한 상대 위험도 평가는 비교되지 않는 노출 기능비의 계산에 의해 얻어졌다. 95% 신뢰 구간을 Woolf의 문헌(Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. Ann Hum Genet 1955; 19; 251-253)에 따라 만들었다.

<128> 동형 접합 상태와 관련된 위험도는 동형 접합성인 사람이 대조군중에서는 발견되지 않기 때문에 이러한 표준 방식으로 평가될 수는 없다. 그러므로, 하디-바인베르크 평형(대조군에서)의 가정하에 대조군 군집내 동형 접합인 사람의 예상수를 계산하고, 이어서 표준 방식으로 가능성비(odds ratio)를 평가하였다. 동형 접합 상태에 대한 (log) 가능성비의 분산은 Woolf의 방법의 수정에 의해 평가되었다. 세포 함량 a, b, c 및 d를 가진 2-2 표의 각 세포가 프와송(Poisson) 분포를 실현할 것으로 간주될 때, log(OR)의 분산은 1/a + 1/b + 1/c + 1/d이다(Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. Ann Hum Genet 1955: 19; 251-253) GG 및 AA 유전자형을 가진 개체의 수를 상기 환자들에서 계수하고, 2차 방정식의 변형을 요하는 대조군에 대한 하디-바인베르크 평형으로부터 계산될 때, log(OR)의 분산은 1/AA(환자) + 1/GG(환자) + 4/A(대조군) +4/A(대조군) + 4/G(대조군)이 되며, 이때 AA 및 GG는 유전자형의 수(개체수) 이며, A 및 G는 대립 유전자수이다.

<129> 다양한 유전자형 및 나이에 대한 혈전증의 절대 위험도는 하디-바인베르크 평형의 가정하에 기원 집단에서의 사람-연평수(자치 단체의 정보에서 유래함)를 먼저 분할하므로써 계산하였다. 각 아군(유전자형, 나이)의 환자수를 상기 사람-연령수로 나누므로써 절대 위험도 값을 얻는다. 이어서, 이들 초기 발병률 데이타를 가중 최소 평방 회귀 모델에서 로그 변형후 3개 연령 부류(0-29: 25세: 30-49: 40세: 50-69: 60세)로 각 계층의 환자수에 대해 가중된, 이형 접합(0.1) 및 동형 접합 상태(0.1)에 대한 지시 변수로 모델화하였다. 계층-특이적 발병률을 먼저 측정하고, 가중 최소 평방 회귀에 의해 보정('Smooth-last[Greenland S. Multivariate estimation of exposure- specific incidence from case-control studies, J. Chron, Dis. 1981; 34,445-453])하는 상기 방법은 Grizzle 등(Grizzle JE, Starmer CF, Koch GG. Analysis of categorical data by linear models. Biometrics 1969; 25: 489-504)에 의해 개시되었다. 프와송 분포의 경우 환자수의 분산이 환자수와 같아지기 때문에, 이것은 거의 프와송 회귀 모델의 최적화와 동일하다. 이 모델은 동형 접합 상태(및 이형 접합 상태)에 대한 발병률비가 log(발병률)에 대한 나이층에 대해 일정하다는 가정하에 더욱 안정한 값, 특히 동형 접합 상태에 대한 값을 유도할 것이다.

<130> 이 모델은 다음과 같이 표현할 수 있다:

$$\log(I) = \alpha + \beta_1 * \text{나이} + \beta_2 * AG(0.1) + \beta_3 * AA(0.1)$$

<132> 상기 식은 이어서 절대 위험도 및 상대 위험도(계수의 역대수로서) 값을 계산하는데 사용할 수 있다.

<133> **결과**

<134> 471명의 환자중에서, 우리는 그 결함에 대해 85명(18%)이 이형 접합성이며, 7명(1.5%)이 동형 접합성인 반면, 나머지 379명(80%)은 인자 V 라이덴 돌연변이를 보유하지 않았음을 확인했다. 474명의 대조군중에서는, 14명(2.9%)이 이형 접합성이고, 나머지 460명은 정상이었다; 즉, 대조군중에서 동형 접합성인 사람은 없었다.

<135> 동형 접합성인 사람은 다른 환자보다 현저히 젊은 나이에서 혈전증을 가졌고: 혈전증의 평균 나이는 이형 접합성의 44세, 및 돌연변이 없는 환자의 46세에 비해 32세였다(표 2) .

<136> 동형 접합성 환자의 심정맥 혈전증의 임상적 과정은 특별하지 않았다. 모두 다리의 심정맥 혈전증을 앓았다. 4명은 단기간 입원하여 헤파린을 투여받았으며, 3명은 외래 환자로서 쿠마린 유도체만으로 치료하였다. 7명의 환자는 아무도 명백한 동맥 질환(심근 경색, 발작 또는 말초 동맥 질환) 병력이 없었다(표 3).

<137> 7명의 동형 접합성 환자중 6명(86%)은 여자였으며, 이형 접합성의 46명(54%) 및 돌연변이 없는 개체의 217명(57%)와 비교되었다. 또한 이들 7명의 환자중 6명은 다른 464명의 환자중 249명(54%)에 비해 혈액형이 A였다. 45세이며 보다 젊은 5명의 동형 접합성 여자중에서, 3명은 혈전증상 발현시에 모든 환자에서 현재 사용법과 유사한 경구 피임약을 사용하였다. 비-O혈액형, 및 경구 피임약의 사용은 자체가 정맥 혈전증의 위험 인자이기 때문에, 이들 숫자는 상기 위험 인자와 다중성을 갖는 동형 접합성 인자 V라

이덴 사이에서의 상호 작용을 암시한다.

<138> 7명의 동형 접합성 환자중 2명(29%)에서 증상 발현 전년에 혈전증의 소인성인자가 있었다(한 사람은 혈전증 45일전에 둔부 수술을 받았고, 또 한명은 혈전증 발현 60일전에 출생한 후 하루밤 동안 입원하였다). 85명의 이형 접합성 개체중에서, 후천성 위험 인자는 25명(29%)의 환자에 존재하였고, 정상 환자중에서는 379명중 131명 (35%)에 존재하였다.

<139> 혈전증의 발현 없는 사전 위험 상태(수술, 임신, 입원)는 다른 환자에서 보다 인자 V라이덴에 대해 이형 접합성인 환자에서 빈도가 더 낮았다. 여전히, 7명의 동형 접합성 환자중 5명은 후속 혈전증없이 과거에 위험 상황을 격었다(2명은 수술을 받았고, 4명은 5명의 아이를 출산하였다).

<140> 5명의 환자는 최초 혈전증 발현후 장기간 경구 항응고 과정없이 평균 2년을 경과하였다. 한명의 환자는 재발성 혈전증을 가졌다(1/13.4년: 연간 7.4%), 14명의 환자중 3명은 예상보다 약 5 배 더 높은 정맥 혈전증의 병력을 가졌다.

<141> 하디-바인베르크 평형하에, 정상인: 이형 접합체: 동형 접합체의 상대 빈도는 P^2: 2pq: q^2이며, 여기서 p는 정상 유전자의 대립 유전자 빈도이며 q는 이상 유전자의 대립 유전자 빈도이다. P^2: 2pq가 460/474: 14/474이므로, 인자 V 라이덴의 대립 유전자 빈도(q)는 0.015 이다. p=0.985 및 q= 0.015의 대립 유전자 빈도는 474명의 비선택 개체중에서 459.9(GG), 14.0(AG) 및 0.107(AA)의 분포를 따른다.

<142> 474명의 대조군중에서 0.107의 동형 접합성 개체(q^2)의 예상 숫자는 (7/379)/(0.107/460)=79의 동형 접합 상태에 대한 가능성을 유도한다. 그래서, 동형 접합성 개체의 혈전증 위험도는 정상 개체(CI 95%: 22 내지 289)에 비해 거의 80배 증가된다.

<143> 표 4는 0.015의 대립 유전자 빈도를 사용하여 각 나이군에서 동형 접합성 대조군의 예상 숫자를 계산할 때 3개 나이군에 대한 가능성비를 나타낸다. 나이의 증가에 따라 동형 접합성 개체의 혈전증의 높은 상대 위험도가 감소되는 것이 명백하다. 이것은 나이에 대해 다소 일정한 이형 접합성 개체의 상대 위험도와 대조된다.

<144> 계속해서, 우리는 기원 군집에서 나이-분포에 관한 데이타를 사용하여, 하디-바인베르크 평형의 가정하에 상이한 나이군 및 유전자형에 대한 절대 위험도(발병률)를 계산하였다. 표 4에 나타낸 바와 같이, 발병률은 GG 유전자형을 가진 최연소 나이군에서 매년 10,000명당 단 0.55명으로부터 보다 연장층 나이에서 이형 접합성 개체에 대해 매년 10,000명당 16.3명까지 증가한다. 표 4의 숫자로부터는 동형 접합성 개체에 대한 위험도가 모든 나이군에서 이형 접합성 개체에 대한 것보다 훨씬 높다(매년 10,000명당 78 내지 176명)는 것도 명백하다. 그러나, 이들 숫자는 3개 나이군에 대해 나누어진 단 7명의 개체를 기준으로 한 것이기 때문에, 그 값은 불안정하고, 최연장 나이군에서 예기치 못한 낮은 발병률을 나타낸다. 우리가 사용한 회귀 모델은 그것이 나이군에 대해 일정한 상대 위험도를 가정하므로 이들 값을 보정한다. 제12도가 나타내는 바와 같이, 이 모델은 정상 및 이형 접합성 개체에 대해 매우 잘 들어맞는다(계수: 상수. -10.06, 나이: 0.0293, AG: 1.96, AA:4.52), 동형 접합성 개체에 대한 보정된 발병률 산정치는 30세 이하의 10,000명의 나이당 82명으로부터 50 내지 69세의 10,000명의 환자의 나이당 227명까지 증가한다(제13도), 이들 산정치는 대부분의 동형 접합성 환자가 그 생존 기간중 1회 이상의 혈전증세를 겪는다는 것을 의미한다.

<145> **논의**

<146> APC에 대한 내성은 돌연변이 인자 V 유전자에 대한 약 1.5%의 대립 유전자 빈도를 갖는 통상의 이상이다. 이것은 군집의 3%가 이형 접합성이고, 동형 접합성 개체는 10,000명의 출생당 약 2명의 빈도로 예측될 수 있음을 의미한다.

<147> 본 연구에서 우리는 동형 접합성 개체가 이형 접합성 개체의 위험도보다 상당히 더 높은 혈전증 위험도를 가짐을 보여준다. 이 결론은 동형 접합성 개체가 그 최초의 혈전증세를 나타낸 젊은 나이에서 증거를 찾는다.

<148> 동형 접합성 인자 V 라이덴에서 혈전증의 위험도는 동형 접합성 단백질 C 또는 단백질 S 결핍에서 혈전증의 위험도 부근에서는 없음이 명백하다. 이들 이상은 신생아 전격성자반을 유도한다(Branson HE 등, Inherited protein C deficiency and coumarin-responsive chronic relapsing purpura fulminans in a newborn infant, Lancet 1983; ii: 1165, Mahasandana C 등. Neonatal purpura fulminans associated with homozygous protein S deficiency. Lancet 1990; 335: 61-62). 동형 접합성 인자 V라이덴을 가진 개체는 모두 최초의 혈전 증세가 나타나기 전 성인이 될 때까지 생존하였으며, 한명은 중년 후반기까지도 생존했다. 대부분의 동형 접합성 개체는 혈전증 없는 과거의 위험 상태를 겪었는데, 대부분 항응고 예방을 처방하지 않은 상황(임신, 산욕기)이었다. 이것은 APC-내성이 동형 접합성 단백질 C 결핍에서와 같은 질적 결함(단백질 C 활성이 없음)이라기 보다는 양적 결함(인자 Va의 불활성화 속도의 감소)로 나타나야 함을 보여준다.

<149> 본 인구에서 현저한 발견은 동형 접합성 환자중에서는 여자가 우세하다는 것이다. 이들 여자중 경구 피임약의 사용이 다른 환자들 만큼 많았기 때문에, 이 사용은 APC-내성과 상승 효과를 나타내는 작용을 한 것 같다. 환약 사용 및 APC-내성은 통상적인 것이므로, 추가 연구를 통해 이 연관성, 특히 이형 접합성 보균자(모든 여자중 3%)에 대해 연구하여야 한다.

<150> 이형 접합성 개체의 상대 위험도는 상이한 나이군에 대해 일정한 것으로 보인다. 이 관찰은 나이와 함께 증가하는 배경 발병률의 견지에서 나타나야 한다. 이것은 제12도 및 제13도에 나타낸 바와 같이, 혈전증의 절대 위험도 또는 APC-내성에 의해 부가되는 절대 위험도가 보다 연장인 이형 접합성 개체에서 문제가 됨을 의미한다.

<151> 매년 10,000 명당 약 2 명의 발병률에 대한 우리의 전체적 산정치는 1,000 명의 나이당 약 0.5 내지 1 명의 통상적 산정치보다 낮음을 주목할 수 있다(Branson HE 등, Inherited protein C deficiency

and coumarin-responsive chronic relapsing purpura fulminans in a newborn infant. Lancet 1983; ii:1165; Koster T, More objective diagnoses of venous thromboembolism Neth, J. Med. 1991: 38:246-248). 이것은 본 연구에서의 나이 제한(70세 미만)으로, 확인된 혈전증에의 제한으로, 악성 질환 환자의 배제로 그리고 최초 혈전 증세 발현의 제한(70세 미만)으로 가장 쉽게 설명된다.

<152> 동형 접합성 효과는 80 배 증가된 혈전증의 위험도를 가졌는데, 이 위험도는 매년 약 1%의 전체 발병률을 유도한다. 보다 연장자군에서 속도의 감소가 관찰되는 것은 최초의 혈전증세를 겪지 않은 군집에서 그 나이의 개체의 부족으로 설명될 수 있다. 그것은 또한 동형 접합성 환자의 작은 수(즉, 최연장자군에서 단 한명)의 결과였을 수도 있다. 두 경우 모두, 가중 회귀 모델에서 재 계산된 발병률 수치는 위험도의 최선의 산정치, 즉 50 세 이상의 환자에서 매년 2%를 넘게 되는 것으로 보인다.

<153> 우리는 동형 접합성 인자 V 라이덴에 의해 야기된 APC-내성이 심정맥 혈전증의 높은 위험도를 유도한다는 결론을 내렸다. 이 혈전증은 성인이 되기 전에는 나타나지 않는 것으로 보이며, 임신 및 산욕기와 같은 위험 상태에서도 변함없이 나타나지 않는다. 그러므로, 우리는 이들 환자가 위험 상태에서 항응고제로 단기간 예방을 받아야 하는 것으로 확신하지만, 인자 V 라이덴에 대해 동형 접합성인 개체의 장기간 예방이 반드시 필요하지 않을 수도 있다.

<154> 표 2 - 인자 V 유전자형에 의한 471 명의 혈전증 환자의 일반적 특성

	GG	AG	AA
n	379	85	7
나이			
평균(년)	46	44	31
범위(년-년)	15-69	17-69	22-55
성별			
남성(%)	162 (43)	39 (46)	1 (14)
여성(%)	217 (57)	46 (54)	6 (86)

<156> GG ; 동형 접합성 정상 인자 V

<157> AG ; 인자 V 라이덴에 대해 이형 접합성

<158> AA : 인자 V 라이덴에 대해 동형 접합성

<159> 표 3 -7 명의 동형 접합성 환자의 상세한 특성

환자	성별	나이	APC-SR	혈액형	OCC[1]	소인 1년<VT	인자[2] 간격[3]	DVT 부모[4]	동맥 질환[5]
90	F	55	1.13	A	-	N	-	0	N
124	F	24	1 14	A	N	Y[6]	60	0	N
266	F	30	1.20	A	Y	N	-	0	N
173	F	22	1.14	O	Y	N	-	0	N
583	F	44	1.23	A	N	Y[7]	45	1	N
589	F	42	1.21	A	Y	N	-	1	N
944	M	31	1 19	A	-	N	-	1	N

<161> [1] 혈전증 발병 전달에 경구 피임약 사용

<162> [2] 수술, 병원 입원, 혈전증 발병 전년의 무활동, 혈전증 1 개월전 출산, 혈전증 발명시의 임신

<163> [3] 위험 상태와 혈전증 사이의 일수

<164> [4] 정맥 혈전증의 병력을 가진 부모수

<165> [5] 이전의 심근 경색, 발작 또는 말초 동맥 질환

<166> [6] 출산후 하루밤 병원 체류

<167> [7] 둔부 수술

<168> 표 4 - 나이에 의한 최초 혈전증의 가능성비 및 절대 위험도

나이	환자 GG/AG/AA	대조군 GG/AG	E_{AA}	OR_{AA}(CI95)	OR_{AG}(CI95)	사람-나이	연간 1 만명당 발병률		
							AG	AG	AA
0-29	61/17/2	70/3	.0164	140(1.8≡23)	6.5(1.8≡23)	1,134,681	0.6	5.1	78.4
30-49	176/35/4	217/6	.0502	98(15≡650)	7.2(3.0≡17)	1,006,733	1.8	11.8	176.2
50+	142/33/1	173/5	.0400	30(2.2≡429)	8.0(3.1≡21)	682,939	2.1	16.4	110.0

<170> E_{AA} : 전체 하디-바인베르크 평형식($q^2 n$ 나이 계층별 대조군, q=0.015)에 근거하며 대조군중 동형 접합성 개체의 예상 수치

<171> OR_{AA} : 동형 접합성 개체의(동형 접합성 정상인에 대한) 가능성비

<172> OR_{AG} : 이형 접합성 개체의(동형 접합성 정상인에 대한) 가능성비

<173> CI95 : 95%-신뢰 구간

<174> [1] : 관찰 환자수/하디-바인베르크 평형식에 따라 분할된 환자-나이 수치에 근거한 초기 발병률

<175> 제12도 및 제13도는 나이에 따른 인자 V 라이덴 유전자형에 대한 초기 (제12도) 및 보정된(제13도) 발병률 산정치를 도시한 것이다.

<176> 가장 아래 라인은 GG 유전자형에 대한 산정치를 나타내고, 위쪽 라인은 AG 유전자형에 대한 것이다. 제13도는 또한 AA 유전자형(동형 접합성 인자 V 라이덴)에 대한 산정치를 나타낸 것이다. 초기 발병률 산정치는 +로 나타낸 반면, 보정 발병률은 □로 나타냈다. 10,000 명의 나이당 보정 발병률은 GG에 대해 0.9(0-20세), 1.4(30-49 세), 및 2.5(50-69 세); AG에 대해 : 6.3 (0-29 세), 9.8(30-49세), 17.6(50-69 세); AA에 대해 : 81.5(0-29 세), 126.5(30-49 세) 및 227.3(50-69 세)이었다.

<177> **실시예 3**

<178> **플라스미드 및 생체외 RNA**

<179> 건강인(동형 접합성 야생형) 및 두명의 환자 ID90 및 ID137 (동형 접합성 돌연변이, 둘다)의 PBMC 로부터 분리한 RNA를 네덜란드왕국 라이덴 소재의 헤모스타시스 앤드 트롬보시스 리서치 센터에서 입수하였다. 아미노산 506 위치의 돌연변이 주위의 297 nt의 단편을 제한 효소 EcoRI 및 Csp 451을 사용하여 벡터 PG 30에 클로닝하였다. 생성되는 플라스미드를 pG30/FVwt 및 pG30/FVmut 로 각각 야생형 및 돌연변이 클론에 대해 명명하였다.

<180> 정확한 서열의 클로닝은 서열 분석으로 확인하였고, 플라스미드를 생체외 RNA 합성용 CsCl 구배에 의해 정제하였다. 공급원으로 플라스미드 PG30/FVwt를 사용하여 시스템 대조군 플라스미드(pG30/FVE2)를 프로브 서열(21 nt)의 결실 및 E2 서열(144 nt)의 삽입에 의해 제작하였다. 전술한 3 개의 플라스미드를 표준 프로토콜에서 T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 생체외 RNA 전사에 사용하였다. 상기 플라스미드들을 BamH1으로 선형화하였는데, 이들은 T7 RNAP 로 전사한 후, wt, mut의 297 nt 및 420 nt 로 구성되는 RNA, 및 700 nt의 벡터 서열이 뒤따르는 시스템 대조군 클론을 산출하여 생체외 RNA의 전체 길이는 약 1 kb 가 된다. 생체외 전사후 RNA를 DNase I 로 처리하고, Tip 100 컬럼(Qiagen) 프로토콜을 사용하여 정제하고, 분광 광도계로 정량 분석하였다. 물에서 적절한 일련의 희석액을 만들고 생체외 RNA를 -70℃ 에서 보관하였다.

<181> **프라이머 및 프로브**

<182> ELGA 및 ECL 검출용 프로브 및 NASBA 증폭 프라이머 서열을 표 5에 제시한다.

<183> 표 5 - 인자 V NASBA 용 프라이머 및 프로브

명칭	서열	길이 (nt)	논평
P1	5′ATT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAA GGT ACC AGC TTT TGT TCT CA 3′ (SEQ. ID. NO. 15)	47	
P2	5′AGT GCT TAA CAA GAC CAT ACT A 3′ (SEQ. ID. NO. 16)	22	
일반 ELGA-프로브	5′TGA CGT GGA CAT CAT GAG AGA 3′ (SEQ. ID. NO. 17)	21	HRP-표지됨
일반 ECL-프로브	5′CAG CAG GCT GTG TTT GCT GTG 3′ (SEQ. ID. NO. 18)	21	ECL-표지됨
WT-프로브	5′CTG GAC AGG CGA GGA ATA CAG 3′ (SEQ. ID. NO. 19)	21	HRP-표지된 또는 비오틴-표지됨
Mut-프로브	5′CTG GAC AGG CAA GGA ATA CAG 3′ (SEQ. ID. NO. 20)	21	HRP-표지된 또는 비오틴-표지됨
SC-프로브	5′GAC ACC AAG GAA GCT TTA GAC 3′ (SEQ. ID. NO. 21)	21	비오틴-표지됨

<185> a. P1 서열내 밑줄친 부분이 T7 RNAP 프로모터 서열임.

<186> P1은 인자 V 암호 서열의 엑손 10에 위치하는 반면에, P2 서열은 엑손 11에 위치한다. 그 결과 이 프라이머 세트는 인트론 10 서열이 접속 (splicing)에 의해 제거되는 mRNA 서열만을 증폭시킬 수 있다. ELGA 또는 ECL 에서의 보다 양호한 성능으로 인해 두개의 일반 프로브가 있다. 그러나, ELGA 및 ECL 둘다에 대한 하나의 일반 프로브측 선택할 수도 있다. 증폭 프라이머는 20% 아크릴아미드, 7M 우레아 슬랩 겔상에서 정제하였다. 용출시키고 EtOH 침전시킨 후, 이들 프라이머를 500 μl의 H_2O에 용해시키고, 그 농도를 분광 광도계(OD260)로 측정하였다.

<187> 합성기 상에서 비오틴 올리고를 만들고, EtOH 침전 및 H_2O 에의 용해후 사용하였다. HRP 표지를 NH_2-올리고에 결합시키는 것은 표준 프로토콜에 따라 실시하였고, 프로브는 추가 정제없이 사용하거나(일반 ELGA 프로브), 또는 슬랩 겔상에서 정제하였다(야생형 및 돌연변이 특이적 ELGA 프로브), ECL 올리고를 합성하고 추가 정제없이 사용하였다.

<188> **핵산의 분리**

<189> Boom 등에 의해 기술된 방법(1990. J. Clin, Microbiol, 28:495-503)을 사용하여 모든 핵산 분리를 수행하였다. 핵산은 100 μl의 전혈(임상 샘플 참조)로부터 추출하고, 100 μl의 H_2O 에서 용출시키고, 통상 5 μl의 용출액을 NASBA 증폭용 첨가물로 사용하였다. 용출액의 나머지를 -70℃ 에서 보관하였다.

<190> **NASBA 증폭**

<191> NASBA 증폭은 다음과 같이 실시하였다. 5 μl의 RNA에 18 μl의 사전 혼합 용액을 첨가하였는데, 이 용액은 다음 성분들로 구성되었다 : 10 μl의 2.5 ×NRG 완충액(1 ×완충액내 최종 농도 : 40 mM 트리스, pH=8.5, 70 mM KCl, 1 mM의 각 dNTP, 2 mM ATP/CTP/UTP, 1.5 mM GTP, 0.5 mM ITP, 12 mM $MgCl_2$), 6.25 μl의 4 ×프라이머 혼합물(1 ×완충액내 최종 농도 : 15% v/v DMSO, 0.2 μM P1 및 0.2 μM P2) 및 1.75 μl의 H_2O 샘플을 65℃ 에서 5 분 동안 항온처리한 후 41℃ 에서 5 분 동안 항온처리하였다. 튜브를 가능한 한 41℃ 로 유지하면서 2 μl의 효소 혼합물(8 단위의 AMV-RT, 40 단위의 T7 RNAP, 0.1 단위의 이.콜리 RNase H, 2.6 μg BSA, 1.5 M 소르비톨)을 첨가하고, 부드럽게 혼합하고(즉, 가볍게 두드리고), 41℃ 에서 90 분 동안 항온처리하였다.

<192> **ELGA 검출**

<193> ELGA 검출을 위해 일반 프로브, 야생형 프로브 및 돌연변이 프로브를 각각 함유하는 3 종의 상이한 프로브 용액을 사용하였다. 야생형 및 돌연변이 HRP 표지된 프로브의 특이성을 증가시키기 위해, 이들 표지된 프로브를 그 짝 비-표지 프로브와 혼합하였다(표 6 참조).

<194> 표 6 - ELGA 검출을 위해 하이브리드화의 특이성을 증가시키기 위한 표지 및 비표지 프로브의 비

검출하기 위한 증폭체	HRP-표지된 프로브 (molec/hyb)	비-표지된 프로브 (molec/hyb)
일반[a]	ELGA 일반(2×10^{10})	-
야생형	야생형(2×10^{11})[b]	돌연변이(5×10^{13})
돌연변이	돌연변이(2×10^{11})[b]	야생형(2×10^{13})

<196> a. 이것은 야생형, 돌연변이 및 시스템 대조군 증폭체를 포함함.

<197> b. 정제 공정(슬랩 겔)으로 인해 야생형 및 돌연변이 HRP 프로브의 특이 활성은 정상형보다 더 낮았다.

<198> 증폭후, 1 μl의 증폭체를 4 μ1의 적합한 프로브 혼합물(5 μl 중의 최종 농도 : 1 ×SSC, BFB, XCFF, 5% v/v 글리세롤 및 적합한 프로브, 표 2 참조)에 첨가하고, 혼합하고, 45℃ 에서 15 분 동안 항온처리하였다. 이어서, 2.5 μl의 샘플을 0.5 ×NASBA 엘포 완충액에서 150 V 로 가동되는 아크릴아미드 겔(5% 아크릴/비스 아크릴, 0.04% 덱스트란 설페이트, NASBA 엘포 완충액=25 mM 트리스, 25 mM 붕산, 500 μM EDTA, pH=8.3)상에서 분석하였다. 전기 영동시킨 후, 표준 TMB/UP 기질 용액(1:1 비로 혼합)을 사용하여 겔을 약 6 분 동안 염색하였다. 보통 겔을 50% 메탄올(0/N)에 고정시키고, 투명 호일 2 장 사이에서 공기 건조시켰다.

<199> **ECL 검출**

<200> ECL을 위해, 역시 증폭체의 검출에 3 종의 상이한 프로브 용액을 사용하였다(표 7 참조).

<201> 표 7 - ECL 검출을 위해 하이브리드화 특이성을 증가시키기 위한 표지 및 비표지 프로브의 비율

검출할 증폭체	ECL-표지된 프로브 (molec/hyb)	비오틴 포획 프로브 (molec/hyb)	비-표지된 프로브 (molec/hyb)
야생형	ECL 일반(2×10^{12})	야생형(2×10^{12})[a]	돌연변이(2×10^{13})
돌연변이	ECL 일반(2×10^{12})	돌연변이(2×10^{12})[a]	야생형(8×10^{12})
시스템 대조군	ECL 일반(2×10^{12})	SC (2×10^{12})	-

<203> a. 100 하이브리드화(200 μl의 다이날 비드) 반응용 스트렙트아비딘 코팅된 비드를 2×10^{14} 분자의 비오틴 포획 프로브와 함께 적재함.

<204> 하이브리드화 반응을 설정하기 위해, 10 μl의 ECL 혼합물(0.1% w/v BSA, 12.5 ×SSC, 2×10^{12} 분자 ECL 일반 프로브), 10 μl의 비드 혼합물(0.1 w/v BSA, 1 ×PBS, 2 μl의 적합한 비드 용액 및 적합한 비표지된 프로브) 및 5 μl의 21 배 희석(물에서) 된 증폭체를 혼합하고, 스토브에서 일정하게 진탕하면서 45℃ 에서 30 분 동안 항온처리하였다. 이어서 300 μl의 ECL 분석 완충액을 첨가하고, 튜브를 ECL 신호의 판독용 ECL 장치에 배치하였다.

<205> **결과**

<206> **민감성**

<207> 인자 V mRNA의 NASBA 증폭에 사용된 프라이머는 야생형 및 돌연변이 서열에 대해 182 nt의 증폭체를 생성시킨다. 프라이머를 생체의 RNa 에서 시스템 대조군 (SC)의 증폭에 사용할 때, 결과는 길이 305 nt의 증폭체이다. 증폭의 민감도는 생체외에서 생성된 야생형, 돌연변이 및 SC RNA의 일련의 희석액을 사용하여 조사하였다(표 8).

<208> 표 8 - 일반 ELGA 프로브를 가진 ELGA 검출법을 사용한 인자 V mRNA NASEA의 민감성

첨가 RNA	양 (분자)	ELGA 결과
야생형	10^4	+
	10^3	+
	10^2	+
	10^1	-
	10^0	-
돌연변이	10^4	+
	10^3	+
	10^2	+
	10^1	+
	10^0	-
SC	10^4	+
	10^3	+
	10^2	+
	10^1	±
	10^0	-

<210> 3 종의 첨가 RNA 모두, 분석 민감도가 100 분자 이상이다. 10 분자의 첨가에 의한 반응은 경우에 따라 양성인데, 이것은 민감도가 실제로 10 내지 100 분자 사이에 있음을 나타낸다.

<211> 실시예 4

<212> 사용된 방법은 실시예 3에 기술한 바와 같다.

<213> 존재하는 돌연변이 RNA의 야생형과 경쟁하지 않고 핵산 분리에서 고정되어야 하는 SC RNA의 양을 측정하기 위해, 몇 가지 양의 SC RNA를 분석하였다. 이들 SC RNA의 양은 100 μl의 전혈의 첨가와 함께 샘플을 첨가하지 않고 분리하였으며, 대조군으로서 일련의 희석률의 SC RNA 증폭시켰다. 증폭후 ELGA 분석의 결과는 표 5에 나타냈다. 핵산 분리중 핵산의 약간의 손실이 있음이 명백하다(레인 3 분리시 및 비분리시 각각 A 및 C와 비교).

<214> A 시리즈(표 9)로부터 용해 완충액에 고정되어야 하는 SC RNA의 최소량이 1×10^5 개 분자라는 결론을 내릴 수 있다. SC RNA의 이 양은 100 μl 전혈에서 분리한 야생형 또는 돌연변이 RNA의 증폭을 억제하지는 않는다. 사실, SC RNA의 10 배 더 많은 양을 사용할 때도, 100 μl 전혈에서 분리한 야생형 또는 돌연변이 RNA를 억제하지 않는다(표 5, B시리즈). 모든 추가 실험에서, 적합한 경우 10^5개의 분자의 SC RNA가 핵산 분리전에 용해 완충액에 고정되었다.

<215> 표 9 - 핵산 분리전 고정된 시스템 대조군 RNA의 상이한 양의 증폭의 ELGA 결과

첨가	설정	SC 신호	WT/Mut 신호
1	A	+	-
2	A	+	-
3	A	-	-
4	A	-	-
1	B	-	+
2	B	-	+
3	B	-	+
4	B	-	+
1	C	+	-
2	C	+	-
3	C	+	-
4	C	-	-

<217> 핵산 분리전에 고정된 CS RNA의 상이한 양의 증폭의 ELCA 결과

<218> A. 샘플 첨가 없는 핵산 분리

<219> B. 100 μl의 전혈을 사용한 핵산 분리

<220> C. 대조군, SC RNA의 직접 증폭

<221> 1. 용해 완충액중 1×10^{6} 개 분자 SC RNA($\pm5\times10^{4}$/증폭)

<222> 2. 용해 완충액중 1×10^{4} 개 분자 SC RNA($\pm5\times10^{3}$/증폭)

<223> 3. 용해 완충액중 1×10^{4} 개 분자 SC RNA($\pm5\times10^{2}$/증폭)

<224> 하이브리드화에 사용된 프로브는 일반 ELGA 프로브였다.

<225> 실시예 5

<226> 실시예 3과 동일한 방법을 사용하였다.

<227> 인자 V mRNA 내의 돌연변이, 즉 G →A 단일 염기 돌연변이의 성질 때문에, 야생형 프로브는 돌연변이성 증폭체에 대해 상당한 바탕 신호를 부여하며, 그 반대도 동일할 것으로 생각된다. 이는 ELGA 및 ECL 검출에 대한 경우일 것이다. 복잡한 하이브리드화 프로토콜을 피하기 위해, 표지한 프로브를 비-상동 증폭체상에서 바탕 하이브리드화를 억제하는 비-표지된 대응물과 혼합시켰다. 하기 표 10에 프로브 혼합물을 이용하는 ELGA 검출 방법을 사용하여 수득한 야생형 및 돌연변이 증폭의 특이 검출 결과를 나타냈다.

<228> 표 10 - HRP 로 표지한 특이 야생형(WT) 및 돌연변이성(Mut)

<229> 프로브를 이용하는 야생형 및 돌연변이성 증폭체의 ELGA 검출

표지된 프로브	비-표지된 프로브	과량의 비-표지된 프로브	WT 신호	Mut 신호
WT	Mut	1	++	++
		5	++	++
		10	++	+
		100	++	±
		250	++	-
		500	+	-
Mut	WT	1	+	++
		5	+	++
		10	±	++
		100	-	++
		250	-	±

<231> WT : 야생형 HRP-표지된 프로브;

<232> Mut : 돌연변이성 HRP-표지된 프로브.

<233> 야생형 HRP-표지된 프로브의 경우, 250 배 초과량의 비-표지된 돌연변이성 프로브가 바탕을 충분히 감소시키기 위해 첨가되어야 함은 명백하다. HRP- 표지된 돌연변이성 프로브가 사용되는 경우, 100 배 초과량의 비-표지된 야생형 프로브가 적정 수준으로 바탕을 감소시키는데 충분하였다. ECL 검출 방법을 이용하여 유사 실험을 수행하였다. ECL 법에서, 비-표지된 프로브는 자석 비드에서 특이성 비오틴 결합된 포획 프로브와 경합해야만 한다. 상이한 비의 초과량의 비-표지된 프로브를 이용하는 ECL 검출 방법의 결과는 표 11에 나타냈다.

<234> 표 11 -특이 야생형(WT) 및 돌연변이성(Mut) 프로브를 이용하는 야생형 및 돌연변이성 증폭물의 ECL 검출

표지된 프로브	비-표지된 프로브	초과량의 비-표지된 프로브	WT-신호 (x1000)	Mut 신호 (x1000)
WT	Mut	0	620	250
		1	250	20
		2.5	300	1
		5	200	1
		10	100	0
Mut	WT	0	300	600
		1	2	200
		2.5	3	100
		5	0	80
		10	0	30

<236> WT = 야생형 HRP-표지된 프로브; Mut=돌연변이성 HRP-표지된 프로브

<237> 후속 ECL 검출을 위해, 비드에서 비오틴 결합된 야생형 프로브와 함께 10 배 초과량의 비-표지된 돌연변이성 프로브 및 비오틴 결합된 돌연변이성 프로브와 함께 4배 초과량의 비-표지된 야생형 프로브를 사용하였다. ELGA 및 ECL 검출을 위해 첨가되어야 하는 비-표지된 프로브 양의 차이는 하이브리드화 형식에 따라 이루어져야 한다. ECL 형식에서, 특이 프로브는 자석 비드에 결합하므로 용액내 프로브와 비교하는 경우 더 느린 하이브리드화 속도를 나타낼 것이다. 결과적으로 용액내에서 적은 초과량의 비-표지된 프로브를 첨가하여야 한다. ELCA 형식에서는, 용액내에서 2 개의 프로브 사이에 경합이 발생하므로 비교적 다량의 비-표지된 프로브를 첨가할 필요가 있다.

<238> 참고 문헌

1. Hirsh, J., Hull, R., Raskob, G.E. Epidemiology and pathogenesis of venous thrombosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1986; 8:104B-113B

2. Dahlbäck, B., Carlsson, M., Svensson, P.J. *Proc. Natl. Acad.Sci.* 1993; 90:1004-8

3. Clouse, L.H., Comp, P.C. *New Engl. J. Med.* 1986; 314:1298-1304

4. Esmon, C.T., Protein-C: biochemistry, physiology, and clinical implications. *Blood* 1993; 62:1155-1158

5. Bakker, H.M., Tans, G., Janssens-Claessen, T., Thomassen, M.C.L.G.D., Hemker, H.C., Griffin, J.H., Rosing, *J. Eur. J. Biochem.* 1992; 208:171-1786

6. Koedam, J.A., Meijers, J.C.M., Sixma, J.J., Bouma, B.N. *J. Clin. Invest.* 1988; 82:1236-1243

7. Svensson, P.J., Dahlbäck, B. *Thromb. Haemostas.* 1993; 69:1252

8. Svensson, P.J., Dahlbäck, B., *Thromb. Haemostas.* 1993; 69:999

9. Dahlbäck B., Malm J., *Thromb. Haemostas.* 1993; 69:529

10. Walker, F.J., Sexxton, P.W. & Esmon, C.J. Biochim. Biophys. Acta 1979; 571: 333-342

11. Boyer-Neumann, C., Bertina, R.M., Tripodi, A., D'Angelo A., Wolf M., Vigano D'Angelo, S., Mannucci, P.M., Meyer, D., Larrieu, M.J. Comparison of functional assays for protein S; European collaborative study of outpatients with congenital and acquired deficiency. *Thromb. Haemostas.* 1993; 70(6):946-950.

12. Canfield, W., Nesheim, M., Kisiel, W. & Mann, K.G. Circulation. 1978; 58: II-210.

13. Suzuki, Kl, Stenflo, J., Dahlbäck, B & Teodorsson, B. J. Biol. Chem. 1983; 258: 1914-1920.

14. Tracy, P.B., Nesheim, M.E., and Mann, K.G. J. Biol. Chem. 1983; 258: 662-669.

15. Miletich, J., Sherman, L., Broze, G., *N. Engl. J. Med.* 1987; 317:991-996

16. Miletich, J.P., Prescott, S.M., White R., Majerŭs, P.W., Bovill, E.G., *Cell* 1993; 72:477-480

17. Allaart, C.F., Poort, S.R., Rosendaal, F.R., Reitsma, P.H., Bertina, R.M., Briët, E., *Lancet* 1993; 341:134-138

18. Heijboer, H., Brandjes, D.P.M., Büller, H.R., Sturk, A., ten Cate, J.W., *N. Engl. J. Med.* 1990; 323:1512-1516

19. Potzsch, B., Kawamura, H., Preissner, K.T., Schmidt, M., Seelig, C., Muller-Berghaus, G. *Blood* 1992; 80:267A (Abstr.)

20. Kane, W.H., Davie, E.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83:6800

21. Jenny, J.R., Pittman, D.D., Toole, J.J., Kriz, R.W., Aldape, R.A., Hewick, R.M., Kaufman, R.J., Mann, K.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84:4846

22. Kane, W.H., Ichinose, A., Hagen, F.S. and Davie, E.W. *Biochemistry* 1987; 26:6508-6514

23. Cripe, L.D., Moore, K.D., and Kane, W.H. *Biochemistry* 1992; 31:3777-3785

24. Fass, D.N., Hewick, R.M., Knutson, G.J., Nesheim, M.E., and Mann, K.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985; 82:1688-1691

25. Toole, J.J., Knopt, J.L., Wozney, J.M., Sultzman, L.A., Buecker, J.L., Pittman, D.D., Kaufman, R.J., Brown, E., Shoemaker, C., Orr, E.C., Amphlett, G.W., Foster, W. B., Coe, M.L., Knutson, G.J., Fass, D.N., and Hewick, R.M. *Nature* 1984; 312:342-347

26. Church, W.R., Jernigan, R.L., Toole, J., Hewick, R.M., Knopf, J., Knutson, G.J., Nesheim, M.E., Mann, K.G., and Fass, D.N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984; 81:6934-6937

27. Esmon, C.T. *Arterioscl. and Thromb.* 1992; 12:135-145

28. Walker, F.J. & Fay P.J. *FASEB. J.* 1992; 6:2561-2567

29. Walker, F.J. *J. Biol. Chem.* 1980; 255:5521-5524

30. Engesser, L., Broekmans, A.W., Briët, E., Brommer, E.J.P. & Bertina, R.M. *Ann. Int. Med.* 1987; 106:677-682

31. Hirsh, J., Piovella, F. & Pini, M. *Am. J. Med.* 1989; 87:345-385

32. Allaart, C.F. & Briët, E. In: *Haemostasis and Thrombosis* (Eds. Bloom, A.L., Forbes, C.D. & Thomas, D.P. & Tuddenham E.G.D.) 1349-1360 (Churchill Livingstone London, 1994).

33. Wang, H., Riddell, D.C., Quinto, E.R. & MacGillivray, R.T.A. *Genomics* 1988; 2:324

34. Kalafatis, M. Rand, M.D., Jenny, R.J., Ehrlich, Y.M. & Mann, K.G., Blood 1993; 81: 704-719

35. Walker, F.J., Scandella, D. & Fay, P.J. *J. Biol. Chem.* 1990; 265:1484-1489

36. Walker, F.J. & Fay, P.J., *J. Biol. Chem.* 1990; 265:1834-1836

37. Suzuki, K., Dahlbäck, B & Stenflo, J. *J. Biol. Chem.* 1982; 257:6556-6564

38. Monkovic, D.D. & Tracey, P.B. *Biochemistry* 1990; 29:1118-1128 (1990).

39. Yang, X.J., Blajchman, M.A., Craven, S., Smith, L.M., Anvari, N. & Ofosu, F.A. *Biochem J.* 1990; 272:399-406

40. Triglia, T., Peterson, M.G., & Kemp, D.J. *Nucl. Acids Res.* 1988; 16:8186

41. NIH/CEPH collaborative mapping group. *Science* 1992: 258;67-86

42. Reitsma, P.H., Poort, S.R., Allaart, C.F., Briët, E. & Bertina, R.M. *Blood* 1991: 78: 890-894

43. Guinto E.R., Esmon C.T., Mann K.G. & MacGillivray R.T.A. *J. Biol. Chem.*. 1992; 267:2971-2978

44. Pieters J. & Lindhout, T. *Blood* 1988; 72:2048-2052

45. Chromczynski, P. & Sacchi, N. *Anal. Biochem.* 1987; 162:156-159

46. Verduyn, W., Doxiadis, I.I.N., Anholts J., Drabbels, J.J.M., Naipal, A., D'Amaro, J., Persyn, G.G., Giphart, M.J. & Schreuder, M.Th. *Hum. Immunol.* 1993: 37: 59-67

47. Faioni, E.M., Franchi, F., Asti, D., Sacchi, E., Bernardi, F., & Mannucci, P.M. *Thromb. Haemostas.* 1993; 70:1067-1071

48. Kalafatis, M., & Mann, K. *J. Biol. Chem.* 1993; 268:27246-27257

49. Fay, P.J., Smudzin, T.M. & Walker, F.J. *J. Biol. Chem.* 1991; 266:20139-20145

50. Odegaard, B., Mann, K.G.: Proteolysis of factor Va by factor Xa and activated protein C. J. Biol. Chem. 262: 11233-11238; 1987

51. Kalafatis, M., Haley, P.E., Mann, K.G.: Membrane-bound human factor Va is inactivated by activated protein C after cleavage of the heavy chain at Arg506 and Arg306. Blood 82, suppl. 1, p. 58a; 1993

52. Kalafatis, M., Rand, M.D., Mann, K.G.: Journ. of biological Chem. vol. 269, (1994), p31869-31880.

<244> 서열 목록

(1)일반 정보

(i) 출원인 :

(A) 명칭 : 리엑스 유니버시타이트 라이덴

(B) 거리 : 스테이션스베그 46

(C) 도시 : 라이덴

(E) 국가 : 네덜란드왕국

(F) 우편번호 : 2300 알에이

(ii) 발명의 명칭 : 활성화된 단백질 C에 대한 약한 항응고 반응 및/또는 혈전증과 관련된 유전자 결함의 존재를 검색하는 방법

(iii) 서열의 수 : 14

(iv) 컴퓨터 판독 종류 :

(A) 매체유형 : 플로피 디스크

(B) 컴퓨터 : IBM PC 호환기종

(C) 운영 체계 : PC-DOS/MS-DOS

(D) 소프트웨어 : 페이턴트인 릴리즈 #1.0, 버전 #1.25(EPO)

(2)서열 번호 : 1에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 6909 개의 염기쌍

(B) 종류 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 2본쇄

(D) 토폴로지 : 불명

(ii) 분자 유형 : cDNA

(xi) 서열 : 서열 번호 : 1 :

GAATTCCGCA GCCCGGAGTG TGGTTAGCAG CTCGGCAAGC GCTGCCCAGG TCCTGGGGTG 60

GTGGCAGCCA GCGGGAGCAG GAAAGGAAGC ATGTTCCCAG GCTGCCCACG CCTCTGGGTC 120

CTGGTGGTCT TGGGCACCAG CTGGGTAGGC TGGGGGAGCC AAGGGACAGA AGCGGCACAG 180

CTAAGGCAGT TCTACGTGGC TGCTCAGGGC ATCAGTTGGA GCTACCGACC TGAGCCCACA 240

AACTCAAGTT TGAATCTTTC TGTAACTTCC TTTAAGAAAA TTGTCTACAG AGAGTATGAA 300

CCATATTTTA AGAAAGAAAA ACCACAATCT ACCATTTCAG GACTTCTTGG GCCTACTTTA 360

TATGCTGAAG TCGGAGACAT CATAAAAGTT CACTTTAAAA ATAAGGCAGA TAAGCCCTTG 420

AGCATCCATC CTCAAGGAAT TAGGTACAGT AAATTATCAG AAGGTGCTTC TTACCTTGAC 480

CACACATTCC CTGCGGAGAA GATGGACGAC GCTGTGGCTC CAGGCCGAGA ATACACCTAT 540

GAATGGAGTA TCAGTGAGGA CAGTGGACCC ACCCATGATG ACCCTCCATG CCTCACACAC 600

ATCTATTACT CCCATGAAAA TCTGATCGAG GATTTCAACT CGGGGCTGAT TGGGCCCCTG 660

CTTATCTGTA AAAAAGGGAC CCTAACTGAG GGTGGGACAC AGAAGACGTT TGACAAGCAA 720

ATCGTGCTAC TATTTGCTGT GTTTGATGAA AGCAAGAGCT GGAGCCAGTC ATCATCCCTA 780

ATGTACACAG TCAATGGATA TGTGAATGGG ACAATGCCAG ATATAACAGT TTGTGCCCAT 840

GACCACATCA GCTGGCATCT GCTGGGAATG AGCTCGGGGC CAGAATTATT CTCCATTCAT 900

TTCAACGGCC AGGTCCTGGA GCAGAACCAT CATAAGGTCT CAGCCATCAC CCTTGTCAGT 960

GCTACATCCA CTACCGCAAA TATGACTGTG GGCCCAGAGG GAAAGTGGAT CATATCTTCT 1020

CTCACCCCAA AACATTTGCA AGCTGGGATG CAGGCTTACA TTGACATTAA AAACTGCCCA 1080

AAGAAAACCA GGAATCTTAA GAAAATAACT CGTGAGCAGA GGCGGCACAT GAAGAGGTGG 1140

GAATACTTCA TTGCTGCAGA GGAAGTCATT TGGGACTATG CACCTGTAAT ACCAGCGAAT 1200

ATGGACAAAA AATACAGGTC TCAGCATTTG GATAATTTCT CAAACCAAAT TGGAAAACAT 1260

TATAAGAAAG TTATGTACAC ACAGTACGAA GATGAGTCCT TCACCAAACA TACAGTGAAT 1320

CCCAATATGA AAGAAGATGG GATTTTGGGT CCTATTATCA GAGCCCAGGT CAGAGACACA 1380

CTCAAAATCG TGTTCAAAAA TATGGCCAGC CGCCCCTATA GCATTTACCC TCATGGAGTG 1440

ACCTTCTCGC CTTATGAAGA TGAAGTCAAC TCTTCTTTCA CCTCAGGCAG GAACAACACC 1500

ATGATCAGAG CAGTTCAACC AGGGGAAACC TATACTTATA AGTGGAACAT CTTAGAGTTT 1560

GATGAACCCA CAGAAAATGA TGCCCAGTGC TTAACAAGAC CATACTACAG TGACGTGGAC 1620

ATCATGAGAG ACATCGCCTC TGGGCTAATA GGACTACTTC TAATCTGTAA GAGCAGATCC 1680

CTGGACAGGC GAGGAATACA GAGGGCAGCA GACATCGAAC AGCAGGCTGT GTTTGCTGTG 1740

TTTGATGAGA ACAAAAGCTG GTACCTTGAG GACAACATCA ACAAGTTTTG TGAAAATCCT 1800

GATGAGGTGA AACGTGATGA CCCCAAGTTT TATGAATCAA ACATCATGAG CACTATCAAT 1860

GGCTATGTGC CTGAGAGCAT AACTACTCTT GGATTCTGCT TTGATGACAC TGTCCAGTGG 1920

CACTTCTGTA GTGTGGGGAC CCAGAATGAA ATTTTGACCA TCCACTTCAC TGGGCACTCA 1980

TTCATCTATG GAAAGAGGCA TGAGGACACC TTGACCCTCT TCCCCATGCG TGGAGAATCT 2040

GTGACGGTCA CAATGGATAA TGTTGGAACT TGGATGTTAA CTTCCATGAA TTCTAGTCCA 2100

AGAAGCAAAA AGCTGAGGCT GAAATTCAGG GATGTTAAAT GTATCCCAGA TGATGATGAA 2160

GACTCATATG AGATTTTTGA ACCTCCAGAA TCTACAGTCA TGGCTACACG GAAAATGCAT 2220

GATCGTTTAG AACCTGAAGA TGAAGAGAGT GATGCTGACT ATGATTACCA GAACAGACTG 2280

GCTGCAGCAT TAGGAATTAG GTCATTCCGA AACTCATCAT TGAACCAGGA AGAAGAAGAG 2340

TTCAATCTTA CTGCCCTAGC TCTGGAGAAT GGCACTGAAT TCGTTTCTTC GAACACAGAT 2400

ATAATTGTTG GTTCAAATTA TTCTTCCCCA AGTAATATTA GTAAGTTCAC TGTCAATAAC 2460

CTTGCAGAAC CTCAGAAAGC CCCTTCTCAC CAACAAGCCA CCACAGCTGG TTCCCCACTG 2520

AGACACCTCA TTGGCAAGAA CTCAGTTCTC AATTCTTCCA CAGCAGAGCA TTCCAGCCCA 2580

TATTCTGAAG ACCCTATAGA GGATCCTCTA CAGCCAGATG TCACAGGGAT ACGTCTACTT 2640

TCACTTGGTG CTGGAGAATT CAGAAGTCAA GAACATGCTA AGCGTAAGGG ACCCAAGGTA 2700

GAAAGAGATC AAGCAGCAAA GCACAGGTTC TCCTGGATGA AATTACTAGC ACATAAAGTT 2760

GGGAGACACC TAAGCCAAGA CACTGGTTCT CCTTCCGGAA TGAGGCCCTG GGAGGACCTT 2820

CCTAGCCAAG ACACTGGTTC TCCTTCCAGA ATGAGGCCCT GGGAGGACCC TCCTAGTGAT 2880

CTGTTACTCT TAAAACAAAG TAACTCATCT AAGATTTTGG TTGGGAGATG GCATTTGGCT 2940

TCTGAGAAAG GTAGCTATGA AATAATCCAA GATACTGATG AAGACACAGC TGTTAACAAT 3000

TGGCTGATCA GCCCCCAGAA TGCCTCACGT GCTTGGGGAG AAAGCACCCC TCTTGCCAAC 3060

AAGCCTGGAA AGCAGAGTGG CCACCCAAAG TTTCCTAGAG TTAGACATAA ATCTCTACAA 3120

GTAAGACAGG ATGGAGGAAA GAGTAGACTG AAGAAAAGCC AGTTTCTCAT TAAGACACGA 3180

AAAAAGAAAA AAGAGAAGCA CACACACCAT GCTCCTTTAT CTCCGAGGAC CTTTCACCCT 3240

CTAAGAAGTG AAGCCTACAA CACATTTTCA GAAAGAAGAC TTAAGCATTC GTTGGTGCTT 3300

CATAAATCCA ATGAAACATC TCTTCCCACA GACCTCAATC AGACATTGCC CTCTATGGAT 3360

TTTGGCTGGA TAGCCTCACT TCCTGACCAT AATCAGAATT CCTCAAATGA CACTGGTCAG 3420

GCAAGCTGTC CTCCAGGTCT TTATCAGACA GTGCCCCCAG AGGAACACTA TCAAACATTC 3480

CCCATTCAAG ACCCTGATCA AATGCACTCT ACTTCAGACC CCAGTCACAG ATCCTCTTCT 3540

CCAGAGCTCA GTGAAATGCT TGAGTATGAC CGAAGTCACA AGTCCTTCCC CACAGATATA 3600

AGTCAAATGT CCCCTTCCTC AGAACATGAA GTCTGGCAGA CAGTCATCTC TCCAGACCTC 3660

AGCCAGGTGA CCCTCTCTCC AGAACTCAGC CAGACAAACC TCTCTCCAGA CCTCAGCCAC 3720

ACGACTCTCT CTCCAGAACT CATTCAGAGA AACCTTTCCC CAGCCCTCGG TCAGATGCCC 3780

ATTTCTCCAG ACCTCAGCCA TACAACCCTT TCTCCAGACC TCAGCCATAC AACCCTTTCT 3840

TTAGACCTCA GCCAGACAAA CCTCTCTCCA GAACTCAGTC AGACAAACCT TTCCCCAGCC 3900

CTCGGTCAGA TGCCCCTTTC TCCAGACCTC AGCCATACAA CCCTTTCTCT AGACTTCAGC 3960

CAGACAAACC TCTCTCCAGA ACTCAGCCAT ATGACTCTCT CTCCAGAACT CAGTCAGACA 4020

AACCTTTCCC CAGCCCTTGG TCAGATGCCC ATTTCTCCAG ACCTCAGCCA TACAACCCTT 4080

TCTCTAGACT TCAGCCAGAC AAACCTCTCT CCAGAACTCA GTCAAACAAA CCTTTCCCCA 4140

GCCCTCGGTC AGATGCCCCT TTCTCCAGAC CCCAGCCATA CAACCCTTTC TCTAGACCTC 4200

AGCCAGACAA ACCTCTCTCC AGAACTCAGT CAGACAAACC TTTCCCCAGA CCTCAGTGAG 4260

ATGCCCCTCT TTGCAGATCT CAGTCAAATT CCCCTTACCC CAGACCTCGA CCAGATGACA 4320

CTTTCTCCAG ACCTTGGTGA GACAGATCTT TCCCCAAACT TTGGTCAGAT GTCCCTTTCC 4380

CCAGACCTCA GCCAGGTGAC TCTCTCTCCA GACATCAGTG ACACCACCCT TCTCCCGGAT 4440

CTCAGCCAGA TATCACCTCC TCCAGACCTT GATCAGATAT TCTACCCTTC TGAATCTAGT 4500

CAGTCATTGC TTCTTCAAGA ATTTAATGAG TCTTTTCCTT ATCCAGACCT TGGTCAGATG 4560

CCATCTCCTT CATCTCCTAC TCTCAATGAT ACTTTTCTAT CAAAGGAATT TAATCCACTG 4620

GTTATAGTGG GCCTCAGTAA AGATGGTACA GATTACATTG AGATCATTCC AAAGGAAGAG 4680

GTCCAGAGCA GTGAAGATGA CTATGCTGAA ATTGATTATG TGCCCTATGA TGACCCCTAC 4740

AAAACTGATG TTAGGACAAA CATCAACTCC TCCAGAGATC CTGACAACAT TGCAGCATGG 4800

TACCTCCGCA GCAACAATGG AAACAGAAGA AATTATTACA TTGCTGCTGA AGAAATATCC 4860

TGGGATTATT CAGAATTTGT ACAAAGGGAA ACAGATATTG AAGACTCTGA TGATATTCCA 4920

GAAGATACCA CATATAAGAA AGTAGTTTTT CGAAAGTACC TCGACAGCAC TTTTACCAAA 4980

CGTGATCCTC GAGGGGAGTA TGAAGAGCAT CTCGGAATTC TTGGTCCTAT TATCAGAGCT 5040

GAAGTGGATG ATGTTATCCA AGTTCGTTTT AAAAATTTAG CATCCAGACC GTATTCTCTA 5100

CATGCCCATG GACTTTCCTA TGAAAAATCA TCAGAGGGAA AGACTTATGA AGATGACTCT 5160

CCTGAATGGT TTAAGGAAGA TAATGCTGTT CAGCCAAATA GCAGTTATAC CTACGTATGG 5220

CATGCCACTG AGCGATCAGG GCCAGAAAGT CCTGGCTCTG CCTGTCGGGC TTGGGCCTAC 5280

TACTCAGCTG TGAACCCAGA AAAAGATATT CACTCAGGCT TGATAGGTCC CCTCCTAATC 5340

TGCCAAAAAG GAATACTACA TAAGGACAGC AACATGCCTG TGGACATGAG AGAATTTGTC 5400

TTACTATTTA TGACCTTTGA TGAAAAGAAG AGCTGGTACT ATGAAAAGAA GTCCCGAAGT 5460

TCTTGGAGAC TCACATCCTC AGAAATGAAA AAATCCCATG AGTTTCACGC CATTAATGGG 5520

ATGATCTACA GCTTGCCTGG CCTGAAAATG TATGAGCAAG AGTGGGTGAG GTTACACCTG 5580

CTGAACATAG GCGGCTCCCA AGACATTCAC GTGGTTCACT TTCACGGCCA GACCTTGCTG 5640

GAAAATGGCA ATAAACAGCA CCAGTTAGGG GTCTGGCCCC TTCTGCCTGG TTCATTTAAA 5700

ACTCTTGAAA TGAAGGCATC AAAACCTGGC TGGTGGCTCC TAAACACAGA GGTTGGAGAA 5760

AACCAGAGAG CAGGGATGCA AACGCCATTT CTTATCATGG ACAGAGACTG TAGGATGCCA 5820

ATGGGACTAA GCACTGGTAT CATATCTGAT TCACAGATCA AGGCTTCAGA GTTTCTGGGT 5880

TACTGGGAGC CCAGATTAGC AAGATTAAAC AATGGTGGAT CTTATAATGC TTGGAGTGTA 5940

GAAAAACTTG CAGCAGAATT TGCCTCTAAA CCTTGGATCC AGGTGGACAT GCAAAAGGAA 6000

GTCATAATCA CAGGGATCCA GACCCAAGGT GCCAAACACT ACCTGAAGTC CTGCTATACC 6060

ACAGAGTTCT ATGTAGCTTA CAGTTCCAAC CAGATCAACT GGCAGATCTT CAAAGGGAAC 6120

AGCACAAGGA ATGTGATGTA TTTTAATGGC AATTCAGATG CCTCTACAAT AAAAGAGAAT 6180

CAGTTTGACC CACCTATTGT GGCTAGATAT ATTAGGATCT CTCCAACTCG AGCCTATAAC 6240

AGACCTACCC TTCGATTGGA ACTGCAAGGT TGTGAGGTAA ATGGATGTTC CACACCCCTG 6300

GGTATGGAAA ATGGAAAGAT AGAAAACAAG CAAATCACAG CTTCTTCGTT TAAGAAATCT 6360

TGGTGGGGAG ATTACTGGGA ACCCTTCCGT GCCCGTCTGA ATGCCCAGGG ACGTGTGAAT 6420

GCCTGGCAAG CCAAGGCAAA CAACAATAAG CAGTGGCTAG AAATTGATCT ACTCAAGATC 6480

AAGAAGATAA CGGCAATTAT AACACAGGGC TGCAAGTCTC TGTCCTCTGA AATGTATGTA 6540

AAGAGCTATA CCATCCACTA CAGTGAGCAG GGAGTGGAAT GGAAACCATA CAGGCTGAAA 6600

TCCTCCATGG TGGACAAGAT TTTTGAAGGA AATACTAATA CCAAAGGACA TGTGAAGAAC 6660

TTTTTCAACC CCCCAATCAT TTCCAGGTTT ATCCGTGTCA TTCCTAAAAC ATGGAATCAA 6720

AGTATTACAC TTCGCCTGGA ACTCTTTGGC TGTGATATTT ACTAGAATTG AACATTCAAA 6780

AACCCCTGGA AGAGACTCTT TAAGACCTCA AACCATTTAG AATGGGCAAT GTATTTTACG 6840

CTGTGTTAAA TGTTAACAGT TTTCCACTAT TTCTCTTTCT TTTCTATTAG TGAATAAAAT 6900

TTTATACAA 6909

(2) 서열 번호 : 2에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 20 개의 염기쌍

(B) 종류 : 핵산

(C) 쇄의 수: 2본쇄

(D) 토폴로지 : 불명

(ii) 분자 유형 : cDNA

(xi) 서열 : 서열 번호 : 2 :

TGCTGACTATGATTACCAGA 20

(2)서열 번호 : 3에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 20 개의 염기쌍

(B) 종류 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 2본쇄

(D) 토폴로지 : 불명

(ii) 분자 유형 : cDNA

(xi) 서열 : 서열 번호 : 3 :

GAGTAACAGATCACTAGGAG 20

(2)서열 번호 : 4에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 20 개의 염기쌍

(B) 종류 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 2본쇄

(D) 토폴로지 : 불명

(ii) 분자 유형 : cDNA

(xi) 서열 : 서열 번호 : 4 :

GCATTTACCCTCATGGAGTG 20

(2)서열 번호 : 5에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 25 개의 염기쌍
(B) 종류 : 핵산
(C) 쇄의 수 : 2본쇄
(D) 토폴로지 : 불명

(ii) 분자 유형 : cDNA

(xi) 서열 : 서열 번호 : 5 :

CAAGAGTAGTTATGCTCTCAGGCAC 25

(2)서열 번호 : 6에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :
(A) 길이 : 20 개의 염기쌍
(B) 종류 : 핵산
(C) 쇄의 수 : 2본쇄
(D) 토폴로지 : 불명

(ii) 분자 유형 : cDNA

(xi) 서열 : 서열 번호 : 6 :

CACGTGGTTCACTTTCACGG 20

(2)서열 번호 : 7에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :
(A) 길이 : 24 개의 염기쌍
(B) 종류 : 핵산
(C) 쇄의 수 : 2본쇄

(D) 토폴로지 : 불명

(ii) 분자 유형 : cDNA

(xi) 서열 : 서열 번호 : 7 :

TGTGGTATAGCAGGACTTCAGGTA 24

(2)서열 번호 : 8에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 18 개의 염기쌍

(B) 종류 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 2본쇄

(D) 토폴로지 : 불명

(ii) 분자 유형 : cDNA

(xi) 서열 : 서열 번호 : 8 :

TATAAGATCCACCATTGT 18

(2)서열 번호 : 9에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 22 개의 염기쌍

(B) 종류 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 2본쇄

(D) 토폴로지 : 불명

(ii) 분자 유형 : cDNA

(xi) 서열 : 서열 번호 : 9 :

TGCCCAGTGCTTAACAAGACCA 22

(2)서열 번호 : 10에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 20 개의 염기쌍

(B) 종류 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 2본쇄

(D) 토폴로지 : 불명

(ii) 분자 유형 : DNA

(xi) 서열 : 서열 번호 : 10 :

TGTTATCACACTGGTGCTAA 20

(2)서열 번호 : 11에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 22 개의 염기쌍

(B) 종류 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 2본쇄

(D) 토폴로지 : 불명

(ii) 분자 유형 : cDNA

(xi) 서열 : 서열 번호 : 11 :

GAGAGACATCGCCTCTGGGCTA 22

(2)서열 번호 : 12에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 18 개의 염기쌍

(B) 종류 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 2본쇄

(D) 토폴로지 : 불명

(ii) 분자 유형 : cDNA

(xi) 서열 : 서열 번호 : 12 :

TGGACAGGCGAGGAATAC 18

(2)서열 번호 : 13에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 18 개의 염기쌍

(B) 종류 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 2본쇄

(D) 토폴로지 : 불명

(ii) 분자 유형 : cDNA

(xi) 서열 : 서열 번호 : 13 :

TGGACAGGCAAGGAATAC 18

(2)서열 번호 : 14에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 149 개의 염기쌍

(B) 종류 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 2본쇄

(D) 토폴로지 : 불명

(ii) 분자 유형 : cDNA

(xi) 서열 : 서열 번호 : 14 :

GTATTTTGTC CTTGAAGTAA CCTTTCAGAA ATTCTGAGAA TTTCTTCTGG GTAGAACATG 60

TTAGGTCTCC TGGCTAAATA ATGGGGCATT TCCTTCAAGA GAACAGTAAT TGTCAAGTAG 120

TCCTTTTTAG CACCAGTGTG ATAACATTT 149

(57) 청구의 범위

청구항 1

활성화된 단백질 C(APC)에 대한 약한 항응고 반응 및/또는 혈전증과 관련된 유전자 결함의 존재를 검색하는 방법으로서, 상기 유전자 결함은 혈전증의 증가된 위험도의 지표이거나 또는 실제로 환자에서 혈전증을 일으키는 것이며,

상기 방법은 인자 V를 암호화하는 핵산 물질의 돌연변이의 존재를 측정하는 단계로서, 상기 돌연변이는 인간 인자 V의 아미노산 서열의 위치 506에서 아미노산을 암호화하는 코돈의 돌연변이를 포함하고 그리고 상기 돌연변이는 상기 핵산 물질의 발현시에 활성화된 인간 인사 V (인자 Va)의 APC에 의한 불활성화도의 감소와 상관 관계가 있는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

혈장 인자 V의 아미노산 서열의 위치 506에서 아미노산을 암호화하는 코돈이 아미노산 글루타민을 암호화하는 코돈으로 돌연변이되는 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

핵산 서열에서 측정하고자 하는 돌연변이가 인간 인자 V의 서열의 아미노산 506에 상응하는 아미노산을 암호화하는 코돈의 제2 뉴클레오티프에 상응하는 위치의 뉴클레오티드 G의 돌연변이인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 뉴클레오티드 G의 돌연변이가 G의 A로의 돌연변이인 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

인긴 인자 V의 아미노산 서열의 아미노산 506을 암호화하는 코돈의 돌연변이는, 상기 돌연변이를 포함하는 핵산 연장체의 핵산 표적 증폭 반응을 수행함으로써 검출하는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 돌연변이를 포함하는 핵산 연장체의 5' 및 3' 단부에 인접한 핵산 연장체를 인지하고 거기에 하이브리드화하기에 충분히 특이적인 프라이머들을 사용하고/하거나, 상기 돌연변이를 포함하는 핵산 연장체를 인지하고 거기에 하이브리드화하기에 충분히 특이적인 프라이머를 사용하여 증폭 반응을 수행한

다음, 생성된 증폭 핵산을 분석하는 것인 방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

분리되고/되거나 증폭된 핵산 물질을, 돌연변이를 포함하는 핵산 물질의 단편에 적어도 하이브리드화할 만큼의 길이 및 특이성을 가진 상응하는 상보적 서열을 사용하여 핵산 물질 연장체에의 하이브리드화 시험에 적용시키는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

분리되고/되거나 증폭된 핵산 물질을 서열 번호 12 및 서열 번호 13에서 선택되는 핵산 물질의 연장체에의 하이브리드화 시험에 적용시키는 것인 방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

하이브리드화용 프라이머 또는 핵산 서열이 인간 인자 V를 암호화하는 핵산 서열의 인트론 10의 적어도 일부, 또는 상기 인트론 10의 일부의 유도체를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제6항에 있어서,

하이브리드화용 프라이머 또는 핵산 서열이 인간 인자 V를 암호화하는 서열 번호 1에 따른 뉴클레오티드 서열의 적어도 일부, 또는 인자 V를 암호화하는 서열로부터 유전 암호의 퇴화로 인해 상이하게 된 유도체의 일부, 또는 인자 V를 암호화하는 서열의 상보적 서열이나 그 유도체의 일부를 포함하며, 여기서, 상기 하이브리드화용 프라이머 또는 핵산이 엄격한 조건하에 상기 일부에 또는 상기 일부의 상보적 서열에 하이브리드화할 수 있으며, 상기 일부는 10개 이상의 뉴클레오티드의 길이를 가지며, 서열 번호 1의 상응하는 일부 또는 서열 번호 1의 상보적 서열에 90% 이상의 상동성이 있는 것이 바람직한 것인 방법.

청구항 11

제6항에 있어서,

하이브리드화용 프라이머 또는 핵산 서열은 서열 번호 2-11, 14 또는 이들의 상보적 서열에서 선택되는 것인 방법.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 따른 방법에 사용하기 위한 키트로서,

인간 인자 V의 아미노산 서열의 아미노산 506을 암호화하는 코돈에서 돌연 변이를 포함하는 핵산 연장체를 인지하고 하이브리드화할 만큼 충분히 특이적인 하나 이상의 프라이머,

서열 번호 12 또는 서열 번호 13에서 선택되는 핵산 서열의 적어도 일부를 포함하는 하나 이상의 프로브,

적합한 증폭 시약

을 포함하는 키트.

청구항 13

활성화된 단백질 C(APC)에 대한 약한 항응고 반응 및 혈전증과 관련된 유전적 결함의 존재를 검색하는 방법으로서, 상기 유전적 결함은 혈전증의 증가된 위험도의 지표이거나 또는 실제로 환자에서 혈전증을 일으키는 것이며, 상기 방법은 단백질 인자 V 및/또는 인자 Va에 존재하는 돌연변이의 존재를 측정하는 것을 포함하며. 이 때 상기 돌연변이는 아미노산 서열의 위치 506에 상응하는 아미노산 아르기닌이 글루타민으로 돌연변이되는 것을 포함하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

돌연변이 단백질 인자 V 및/또는 인자 Va 또는 이들의 단백질 분해 단편에 결합할 수 있고 비돌연변이된 단백질 또는 이것의 단백질 분해 단편에 대해 더 낮은 결합 친화도를 갖는 항체를 사용하거나, 또는 비돌연변이된 단백질 인자 V 및/또는 인자 Va 또는 이들의 단백질 분해 단편에 결합할 수 있고 돌연변이 단백질 또는 이것의 단백질 분해 단편에 대해 더 낮은 결합 친화도를 갖는 항체를 사용함으로써 상기 돌연변이를 검출하는 것인 방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

시험할 샘플을 APC 로, 선텍적으로는 1종 이상의 프로테아제와의 배합물로 처리하여, 돌연변이가 없을 때에는 위치 306, 506 및 679에서 샘플에 존재하는 임의의 인자 V 또는 Va를 절단하고 상기 돌연변이가 존재할 때에는 위치 306 및 679에서 절단시키며, 생성된 샘플을 2개의 항체, 즉 인자 V또는 Va의 아

미노산 306-506 단편의 부위를 특이적으로 인식할 수 있는 한 항체와 인자 V 또는 Va의 아미노산 507~679 단편의 부위를 특이적으로 인식할 수 있는 다른 항체와 접촉시키며, 상기 방법은 추가로 면역 분석에서 샘플내 단백질 분해 단편에의 상기 두 항체의 결합을 측정하는 것을 포함하며, 상기 결합의 검출은 돌연변이의 지표인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

시험할 샘플을 프로테아제로 처리하며, 여기서 상기 프로테아제는 위치 506 의 돌연변이된 APC 절단 부위에서는 절단할 수 없고 위치 506의 비돌연변이된 APC 절단 부위에서 절단할 수 있으며, 상기 항체와의 결합의 검출은 돌연변이의 지표인 방법.

청구항 17

제15항에 있어서,

시험할 샘플을 프로테아제로 처리하며, 여기서 상기 프로테아제는 위치 506의 돌연변이된 APC 절단 부위에서는 절단할 수 있고 위치 506의 비돌연변이된 APC 절단 부위에서는 절단할 수 없으며, 상기 항체와의 결합의 검출은 정상 인자 V의 지표이며, 상기 방법은 비돌연변이 APC 절단 부위를 절단할 수 있는 프로테아제를 포함하지 않는 샘플에만 적용될 수 있는 것인 방법.

청구항 18

위치 506의 아미노산 아르기닌이 글루타민으로 돌연변이된 돌연변이 단백질 인자 V 및/또는 인자 Va에 결합할 수 있는 항체로서, 상기 돌연변이 단백질은 비돌연변이된 인자 V 및/또는 인자 Va와 비교하여 APC에 의한 불활성 화도의 감소를 나타내며, 상기 항체는 상기 돌연변이를 포함하는 돌연변이 단백질 인자 V 및/또는 인자 Va의 단백질 분해 단편에 결합할 수 있고, 상기 항체는 상기 돌연변이 단백질 또는 그것의 상응하는 단백질 분해 단편에 대한 것 보다 비돌연변이된 단백질 또는 비돌연변이된 단백질의 상응하는 단백질 분해 단편에 대해 더 낮은 결합 친화도를 갖는 것인 항체.

청구항 19

단백질 인자 V 및/또는 인자 Va 및/또는 상기 단백질의 단백질 분해 단편에 결합할 수 있는 항체로서, 상기 단백질은 APC에 의한 불활성화도의 감소를 나타내지 않으며, 상기 항체는 위치 506의 아미노산 아르기닌이 글루타민으로 변화된 것으로 이루어진 돌연변이를 갖는 돌연변이 단백질 인자 V및/또는 인자 Va에 대하여, 및/또는 상기 돌연변이를 포함하는 이들의 단백질 분해 단편에 대하여 더 낮은 결합 친화도를 갖는 것으로서, 상기 돌연변이는 APC에 의한 불활성화도의 감소를 일으키는 것인 항체.

청구항 20

인자 V 및/또는 Va의 아미노산 306-506 단편의 부위를 특이적으로 인식할 수 있는, 제15항에 따른 방법에 사용하기 위한 항체.

청구항 21

인자 V 및/또는 Va의 아미노산 507-679 단편의 부위를 특이적으로 인식할 수 있는, 제15항에 따른 방법에 사용하기 위한 항체.

청구항 22

제14항에 따른 방법에 사용하기 위한 키트로서,

위치 506의 아미노산 아르기닌이 글루타민으로 변화된 단백질 인자 V 및/또는 인자 Va에 결합할 수 있고 비돌연변이된 단백질 인자 V 및/또는 인자 Va에 대하여 더 낮은 결합 친화도를 갖는 하나 이상의 항체, 또는 비돌연변이된 단백질 인자 V 및/또는 인자 Va에 결합할 수 있고 돌연변이된 단백질 인자 V 및/또는 인자 Va에 대하여 더 낮은 결합 친화도를 갖는 하나 이상의 항체.

항체의 결합 반응을 검출하기 위한 다른 시약

을 포함하는 키트.

청구항 23

제15항 내지 제17항 중 어느 하나의 항에 따른 방법에 사용하기 위한 키트로서,

비돌연변이된 APC 절단 부위에서는 절단할 수 있고 돌연변이된 APC 절단 부위에서는 절단할 수 없는 하나 이상의 프로테아제, 또는 돌연변이된 APC 절단 부위에서는 절단할 수 있고 비돌연변이된 APC 절단 부위에서는 절단할 수 없는 하나 이상이 프로테아제,

인자 V 및/또는 인자 Va의 아미노산 306-506 단편의 부위를 특이적으로 인식할 수 있는 항체.

인자 V 및/또는 인자 Va의 아미노산 507-679 단편의 부위를 특이적으로 인식할 수 있는 항체

를 포함하는 키트.

청구항 24

서열 번호 14에 따른 뉴클레오티드 서열.

청구항 25

서열 번호 12에 따른 뉴클레오티드 서열.

청구항 26

서열 번호 13에 따른 뉴클레오티드 서열.

청구항 27

인간 인자 V 및/또는 인자 Va의 아미노산 서열의 위치 506에서 아미노산을 암호화하는 코돈에서의 돌연변이에 대해 시험 대상자가 동형 접합성인자 이형 접합성인지 여부를 측정하는 방법으로서, 상기 돌연변이가 APC에 대한 열등한 항응고 반응에 관련된 것이고, 상기 방법은

자체 공지된 방법을 이용하여 APC에 대한 항응고 반응을 측정하고, (APTT+APC)/(APTT-APC) 값과 같이 상기 반응의 진단에 유용한 것으로 공지된 변수값을 얻으며,

얻어진 값을 정상 개체의 샘플 또는 상기 돌연변이에 대해 동형 접합성 또는 이형 접합성으로 알려진 개체의 샘플에 대해 동일한 방법으로 얻은 값과 비교하는 것을 포함하며, 상기 돌연변이는 제1항 또는 제2항에 따른 방법에 의하여 확립되는 것인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서,

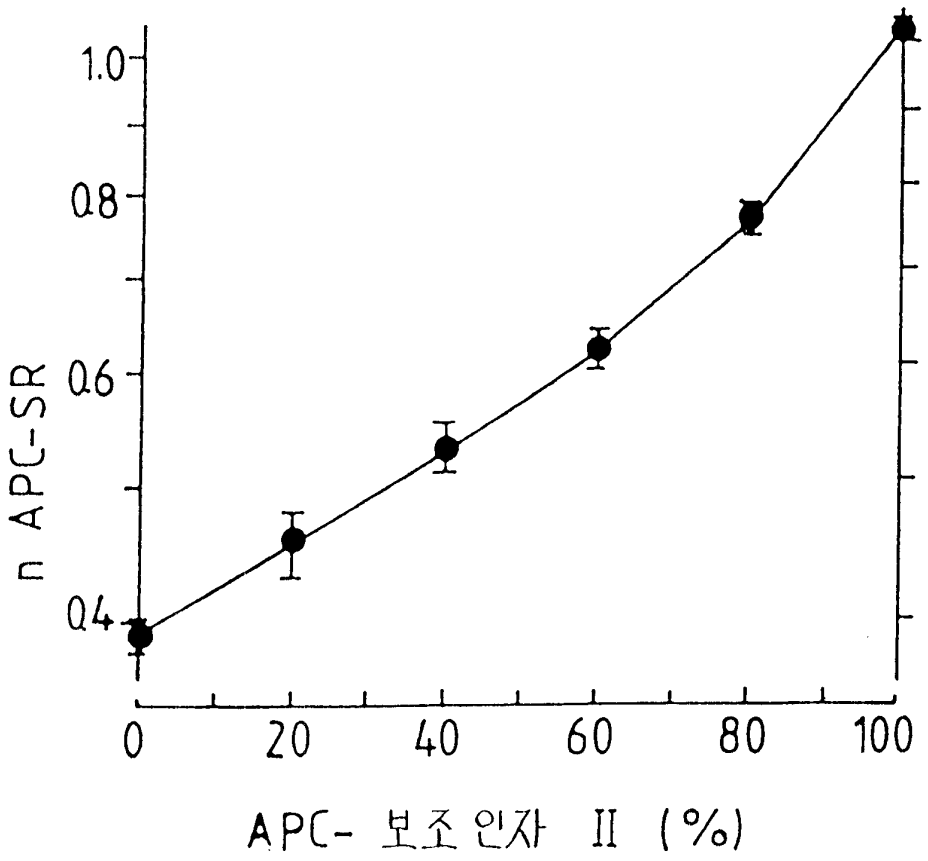
APC에 대한 항응고 반응을 측정하는 상기 방법은 25 mM 이상, 바람직하게는 40 mM 미만, 보다 바람직하게는 30-35 mM의 양으로 써포테스트(Cephotest) 시약 $CaCl_2$를 시험할 샘플에 첨가하고 코스터(Koster) 방법과 유사한 방법으로 (APTT+APC)/(APTT-APC) 값을 측정하며, 그 결과가 0.84 이하의 값일 경우는 시험 대상자가 비정상임을, 보다 구체적으로는 결과가 0.50 이하의 값일 경우에는 그 돌연변이에 대해 동형 접합체이며, 0.50 내지 0.70의 값일 경우에는 이형 접합체임을 확인하는 것을 포함하는 방법.

요약

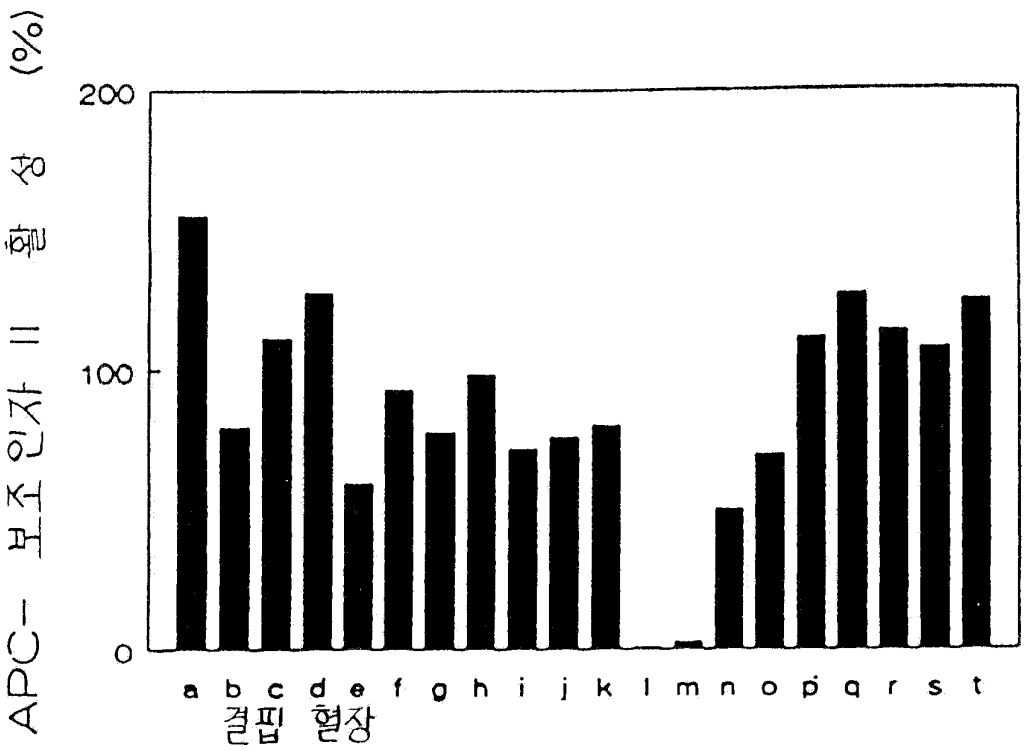
본 발명은 활성화된 단백질 C(APC)에 대한 약한 항응고 반응 및/또는 혈전증과 관련된 유전자 결함의 존재를 검색하는 방법에 관한 것이다. 본 방법은 인자 V 및/또는 인자 Va, 또는 VIII 및/또는 인자 VIIIa의 APC의 1종 이상의 절단 및/또는 결합 부위에서 1종 이상의 돌연변이를 핵산 또는 단백질 레벨에서 또는 그 두 레벨 모두에서 검출하는 방법에 관한 것이다.

도면

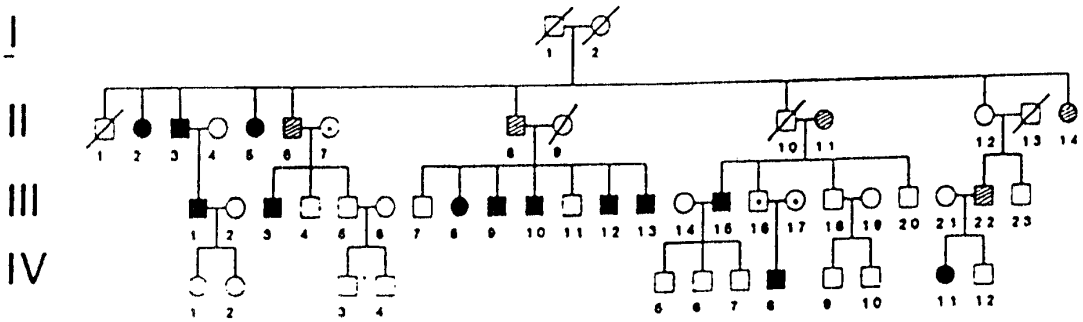
도면1



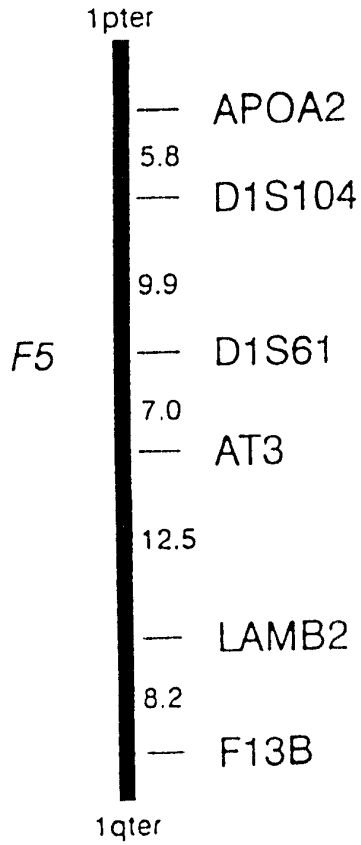
도면2


APC- 보조인자 II 활성 (%)
200
100
0
a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t
결핍 혈장

도면3


I
II
III
IV

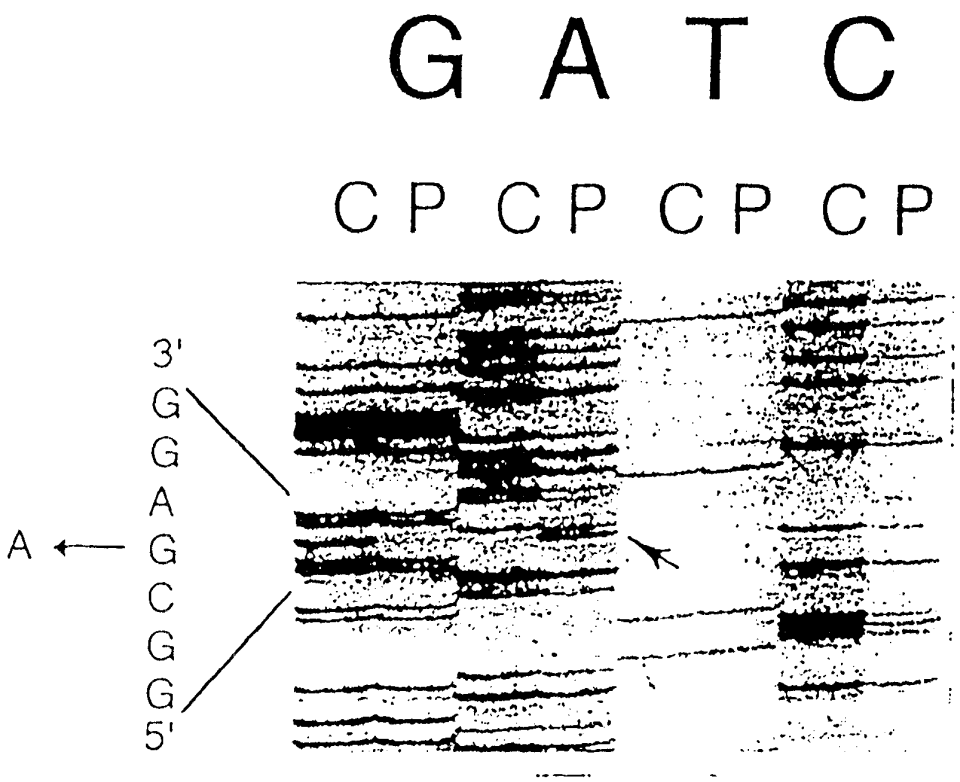
도면4



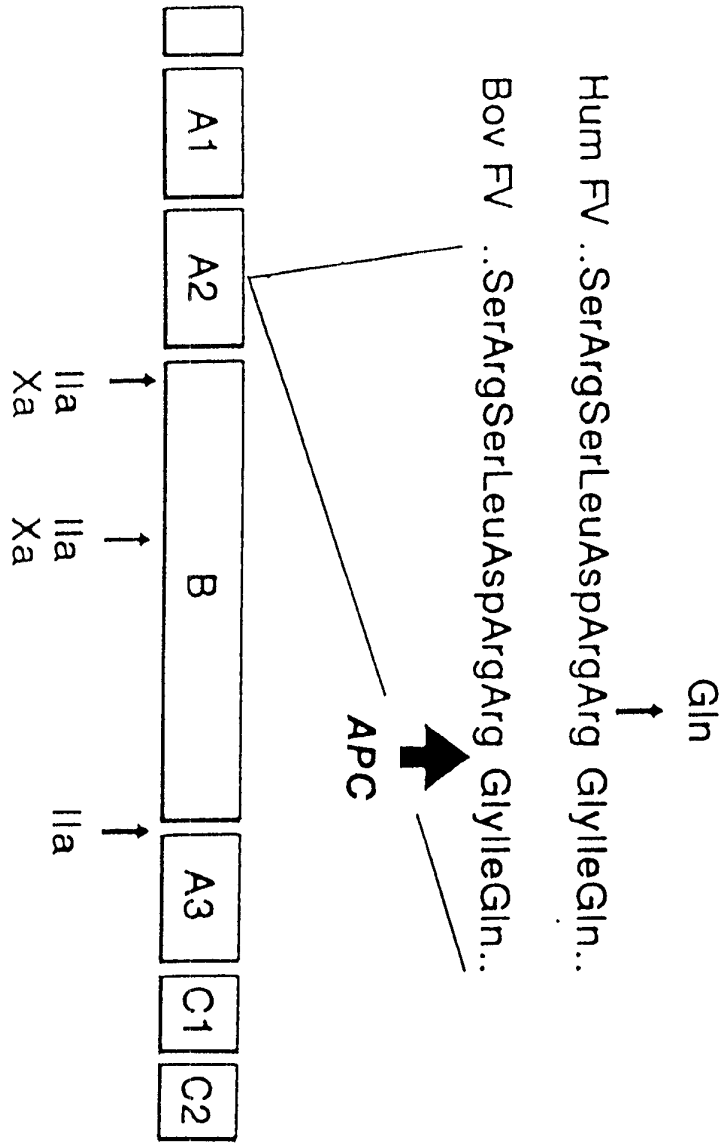
도면5

좌 마커	각θ에서의 2-지점 로드값									
	0.0	.001	.01	.05	.10	.20	.30	.40	Zmax	θ
APOA2	-∞	-3.162	-1.181	0.119	0.617	0.965	0.833	0.432	0.974	0.22
D1S104	0.952	0.953	0.972	1.160	1.272	1.137	0.762	0.304	1.276	0.11
D1S61	7.270	7.258	7.152	6.668	6.034	4.659	3.114	1.393	7.270	0.00
LAMB2	-∞	0.006	0.963	1.463	1.503	1.246	0.827	0.356	1.513	0.08
F13B	-∞	-0.812	1.350	2.862	3.152	2.776	1.919	0.829	3.152	0.11

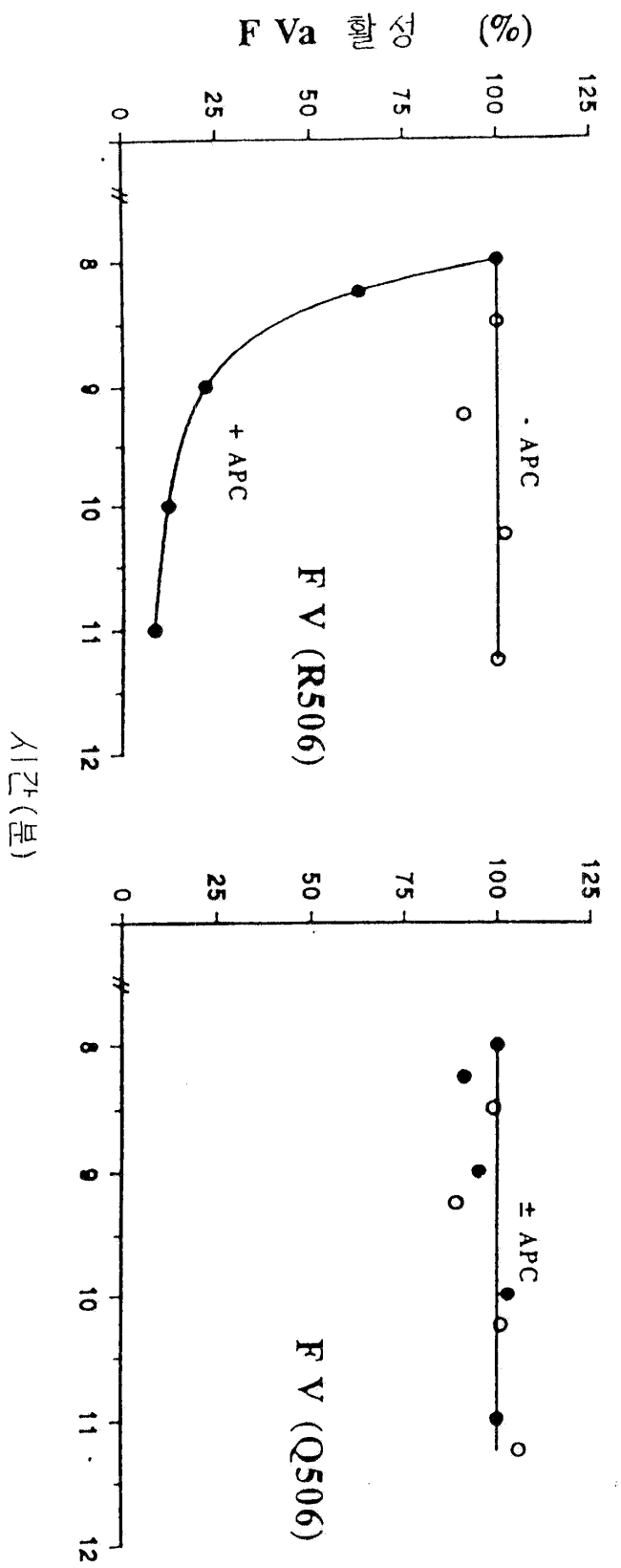
도면6



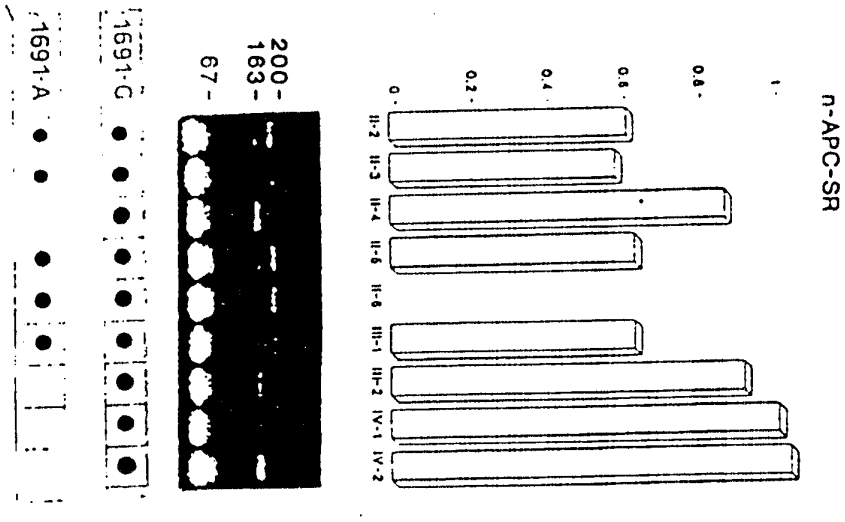
도면7


Gln
Hum FV ..SerArgSerLeuAspArgArg GlylleGln..
Bov FV ..SerArgSerLeuAspArgArg GlylleGln..
APC
A1
A2
B
A3
C1
C2
IIa
Xa
IIa
Xa
IIa

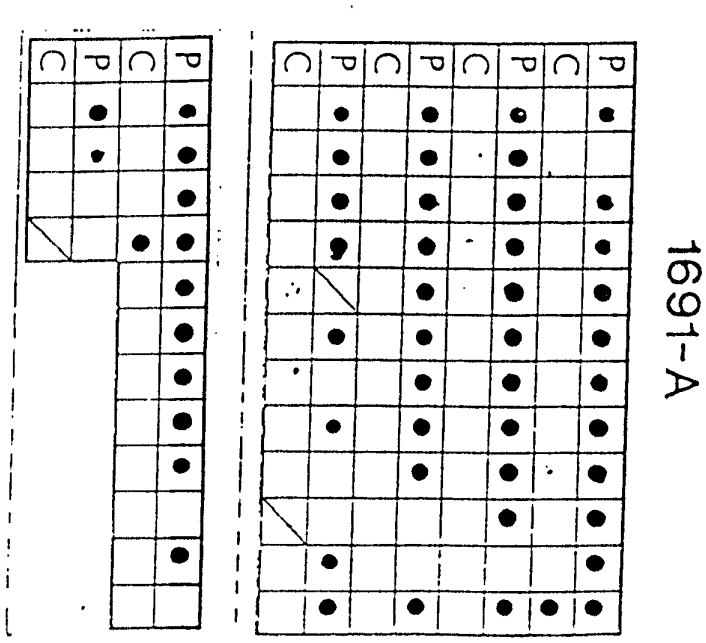
도면8


F Va 활성 (%)
0
25
50
75
100
125
8
9
10
11
12
시간(분)
+ APC
- APC
F V (R506)
± APC
F V (Q506)

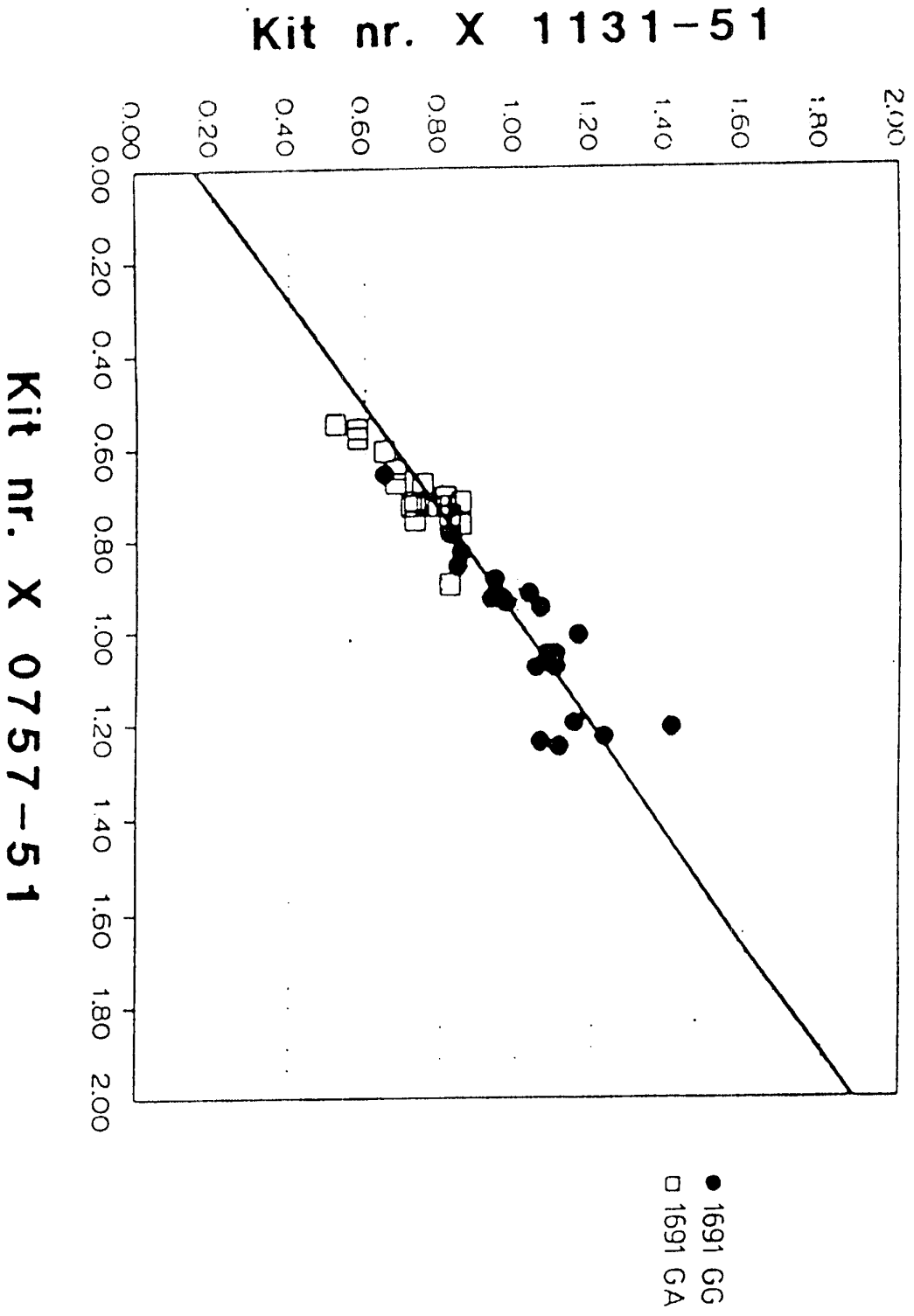
도면9


n-APC-SR
0.8
0.6
0.4
0.2
0
II-2
II-3
II-4
II-5
II-6
III-1
III-2
IV-1
IV-2
200-
163-
67-
1691-G
1691-A

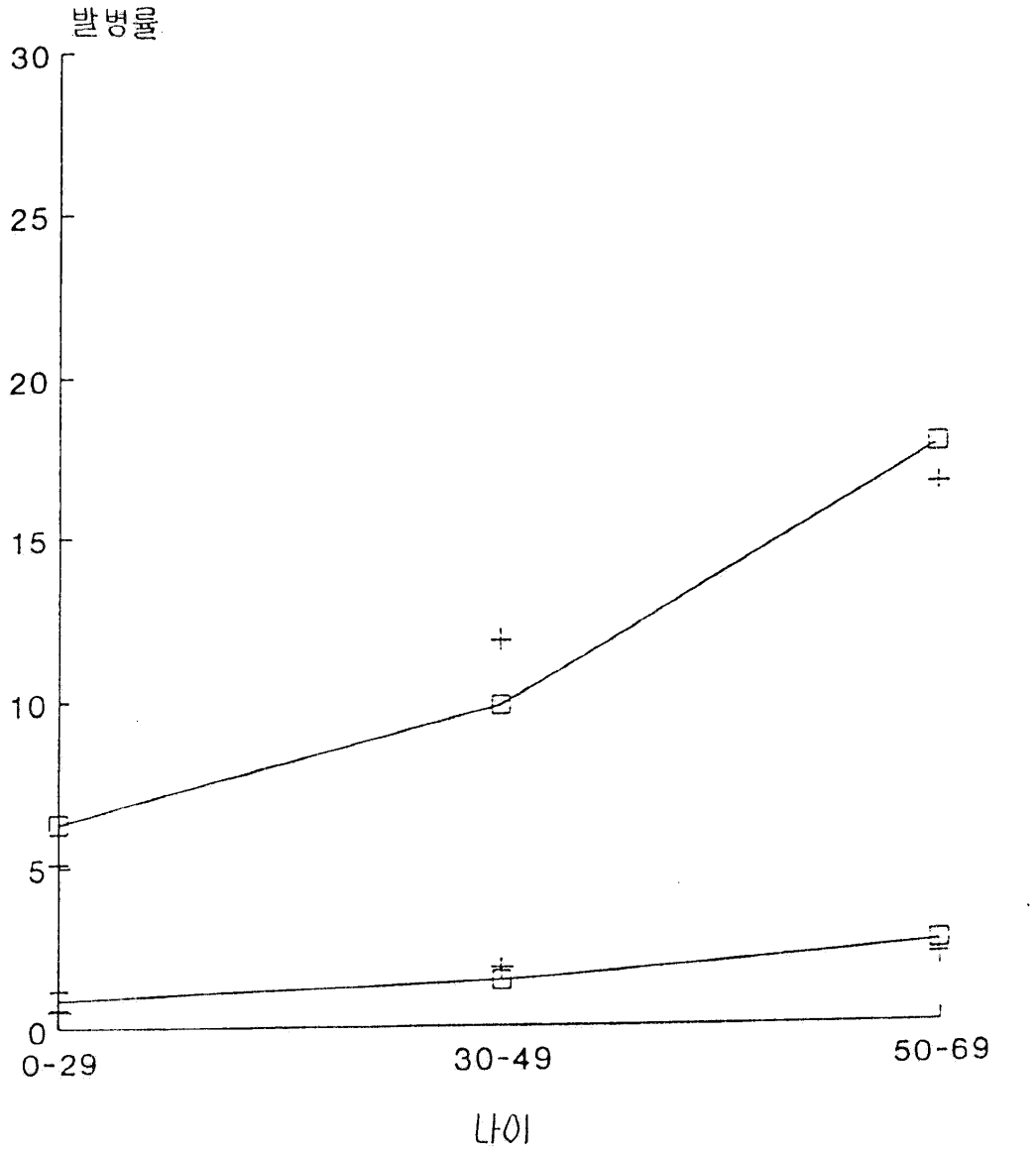
도면10


P
C
1691-A

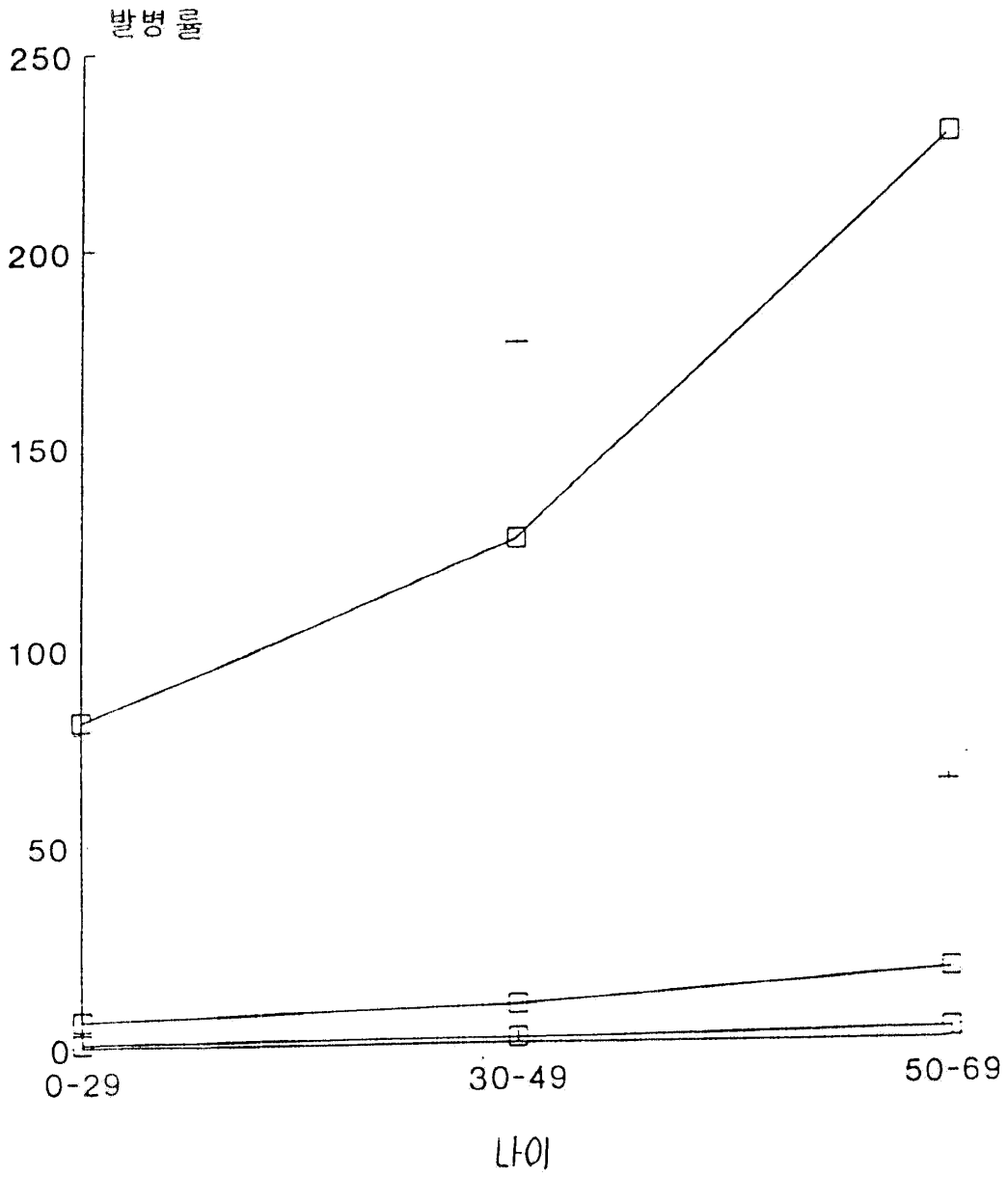
도면11


Kit nr. X 1131-51
Kit nr. X 0757-51
0.00
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
1.40
1.60
1.80
2.00
1691 GG
1691 GA

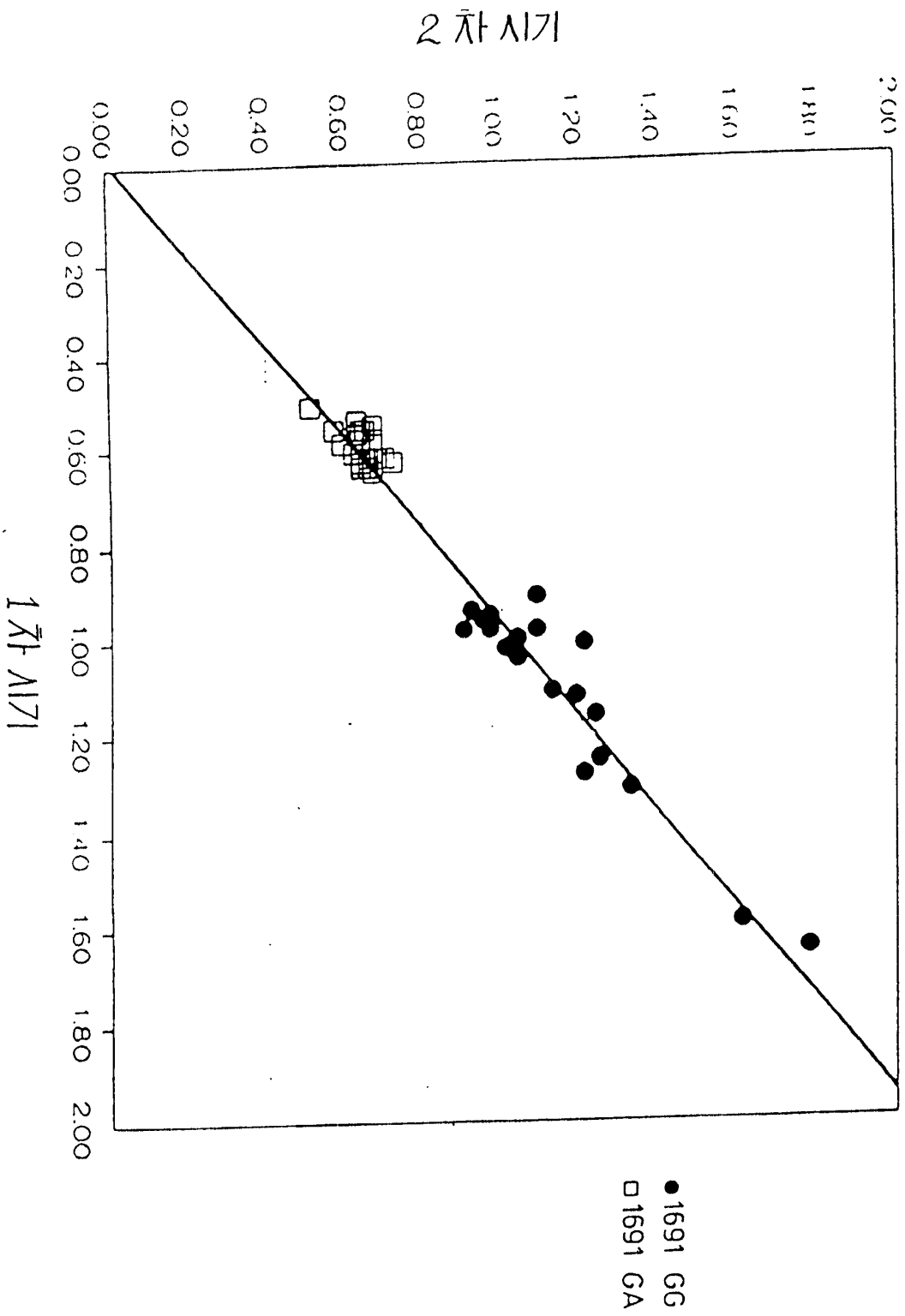
도면12



도면13



도면14


2 차 시기
1 차 시기
0.00
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
1.40
1.60
1.80
2.00
● 1691 GG
□ 1691 GA