



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0052662
(43) 공개일자 2008년06월11일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7008790

(22) 출원일자 2008년04월11일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년04월11일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2006/009517

국제출원일자 2006년09월30일

(87) 국제공개번호 WO 2007/042165

국제공개일자 2007년04월19일

(30) 우선권주장

10 2005 048 899.4 2005년10월12일 독일(DE)

(71) 출원인

사노피-아벤티스

프랑스 75013 파리 에비뉴 드 프랑스 174

(72) 발명자

코치안 데틀레프

독일 65926 프랑크푸르트 암 마인 사노피-아벤티스
도이칠란트게엠베하

헤르만 마티아스

독일 65926 프랑크푸르트 암 마인 사노피-아벤티스
도이칠란트게엠베하

(74) 대리인

장훈

전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 혈전색전증 및 관상동맥 심장 질환의 진단 방법

(57) 요약

본 발명은 혈전색전증 및 관상동맥 심장 질환의 시험관내 진단 방법에 관한 것이다. 사람 샘플의 사람 EGLN2 단백질의 암호화하는 핵산의 470번 위치의 뉴클레오타이드 또는 사람 샘플의 사람 EGLN2 단백질의 58번 위치의 아미노산이 판정된다.

대표도 - 도1

```

1  gctttccctt gctgctgt ctctagtttct tctcaatcc ctttttttt ttcttttct
61  tagcacacct gaaggtctt tctcaagcc cttaggagcc gaagagact tgggaacag
121  caagcaaccc caggggcaag aagagagctt ttctgtctgt cctgtctctc cctgtcccca
181  cgcagagccc gctgcccctt agtctgtctc atgtgagggc gaaggggagc cggagaggg
241  tggcaacatg ggcgcggggc gtgcctcca tgcgcggggc atgaagacac tgcctgcatg
301  gacagccagt gcaagccgca gccctaaagt caggtctctc ctagttacc aggtctctg
361  caagagccct tggagctgca gctgtgccc gcaagatgg agtgggagc taactgtccc
421  tgtccctctg tccctctcta cactgtcca aagtgctca gtgagggctc ggcagggagt
481  gggaccccca gagcacagc cactctacc actgcaagcc ctcttcggga cgtttttg
541  gggcagatg gtgtgagct cgcgcctgt caggtgaag ggcgtgagc gctgtcac
601  aaggggtgac agcatgtgc agccagggc gacggctg aggcctcaca accgaatgg
661  gccagagatg gtgggatgc cctctaccc agcaacggc cgtgggcaag gcaagagaac
721  caggaagcag agcgggaggg tggcatgagc tgcagctgca gactggcag tggtagggc
781  agtgcggggc tgatgagga ggcgtgccc tctgcccgc agcgtctg cctgagctat
841  atcgtccctt gactgctga ctaggcatc tgcctaaag aacgtctctt gggggcaga
901  ctggggcggt gctgctgga caggtgga ggcctcaaac ggggtgggc cctgcagac
961  gggcagctag tgagcagag ggcgctccc cgcgcagca tccgtgggga cagagtgcc
1021  tgggtgag gcatgaccc aggtctgca agcatgtgt cctcatggc ccatgtggc
1081  gccgtctc gccactgccc agggcggtg ggcagctat tcatcaagg ggcacacaag
1141  gccatgtgt cgtgttacc aggcacggg ctcgggtacg taaggcagc tgcacatcc
1201  caggggagc ggcgtgcat cactgtctc tcttactga atcagaacty ggcgttaag
1261  gtgcatggc gctgctgca gatctctct gaggcgccc cgtgtgtag caacatgag
1321  ccatctttt accggttgt cttttctgt tctgacggc ggaaccccca caggtgag
1381  ccagctctg ccacaggtg cgcctctct gtctgtatt ttgatgcaa ggcggggca
1441  gcaagcaag acagatgca gtagatgca ggcagaaag gtgtcaagt accgtatca
1501  cagcgccta cgcacacta gtgcccagc cagagagc atggcagca gcttaataa
1561  ctcaagaga gccctgggccc tgtgtggtc gctctctcc tgcacagct gctgtctgt
1621  acttctctc tgtctgctt ggtgtggag gctctgtctc ttgttgaga caagagaga
1681  gaagagact ttgtgccc atcatggggc ctgggtgtg caactggca cggggcagc
1741  gtggagcca cgttaccaa ctgaagctgg ggcctgggt cctacctgt ctggtatga
1801  cccatctag tatggagagc tggagagag cactgtact tccacagag atgcagact
1861  tgggttgag gtgagctag gctctctgt ggaatgggt tggagaggt accccaagt
1921  cctctactc ctcaagcgt gaatgtgag tgaatccca acccttttg ccatggcag
1981  caacttttg actggctgc cactgttg gtagagtaa agtgccagc aagagcatg
2041  gtgtgagat cctgtcagc aagatata agtttactc agagctgca aaaaaaaa
2101  aaaaaaaa a

```

특허청구의 범위

청구항 1

사람 샘플의 사람 EGLN2 단백질을 암호화하는 핵산의 470번 위치의 뉴클레오티드 또는 사람 샘플의 사람 EGLN2 단백질의 58번 위치의 아미노산을 판정함을 특징으로 하는 혈전색전증 및/또는 관상동맥 심장 질환의 시험관내 진단 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 혈전색전증 질환이 졸중, 지연된 가역적 허혈성 신경 결손 (PRIND) 및/또는 일과성 허혈 발작 (TIA)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 관상동맥 심장 질환이 심근경색인 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 졸중, PRIND 및/또는 TIA의 위험에 대해, 470번 위치의 뉴클레오티드가 염색체 DNA 중에서 티미딘으로 또는 mRNA 중에서 우라실로 판정되거나, 또는 58번 위치의 아미노산이 류신으로 판정되는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 심근경색, 특히 조기 심근경색의 위험에 대해, 470번 위치의 뉴클레오티드가 시티딘으로 판정되거나, 또는 58번 위치의 아미노산이 세린으로 판정되는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 있어서, 사람 EGLN2 단백질을 암호화하는 핵산이 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열을 가지는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 있어서, 사람 EGLN2 단백질이 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제4항 또는 제6항 중의 어느 한 항에 있어서, 470번 위치의 뉴클레오티드를 핵산 서열결정(sequencing) 방법, 핵산의 질량 분광분석법, 하이브리드화 방법 및/또는 증폭 방법으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방법에 의해 판정하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 핵산 서열결정 방법이, 방사성 및/또는 형광 표지된 뉴클레오티드를 이용한 서열결정(sequencing) 및/또는 피로시퀀싱(pyrosequencing)으로부터 선택되는 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 하이브리드화 방법이 서던 블롯 분석, 노던 블롯 분석 및/또는 DNA-마이크로어레이 상의 하이브리드화 방법으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 증폭 방법이 TaqMan 분석, 차등 RNA 디스플레이 분석(differential RNA display analysis) 및/또는 발현 차이 분석(RDA: representational difference analysis)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제3항, 제5항 또는 제7항 중의 어느 한 항에 있어서, 58번 위치의 아미노산 서열을 특정 단백질의 양을 측정하는 방법 및/또는 특정 단백질의 활성을 측정하는 방법으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방법에 의해 판정하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 특정 단백질의 양을 웨스턴 블롯 분석 및/또는 ELISA로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방법에 의해 측정하는 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 특정 단백질의 활성을, 사람 세포, 동물 세포, 세균 세포 또는 효모 세포를 이용한 시험관내 전세포 시험 검정 및/또는 시험관내 시험 검정에 의해 측정하는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중의 어느 한 항에 있어서, 샘플이 세포, 조직 및/또는 체액으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중의 어느 한 항에 있어서, 추가 단계에서, 사람이 혈전색전증 및/또는 관상동맥 심장 질환을 앓을 위험을 판정하는 방법.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중의 어느 한 항에 있어서, 추가 단계에서, 약제의 투여량을 결정하는 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중의 어느 한 항에 있어서,

- (a) 검사되어야 할 사람으로부터 샘플을 수득하는 단계;
- (b) 상기 샘플로부터 핵산 프로브, 특히 DNA 프로브를 분리하는 단계;
- (c) ENGL2 유전자의 470번 위치를 포함하는 특정 영역을 프라이머를 이용하여 증폭시키는 단계;
- (d) 상기 증폭된 영역을 서열결정 (sequencing)하는 단계;
- (e) 상기 서열결정된 영역을 분석하는 단계; 및
- (f) 혈전색전증 및/또는 관상동맥 심장 질환, 특히 심근경색, 졸중, PRIND, TIA 및/또는 관상동맥 심장 질환의 위험을 평가하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 심근경색이 조기 심근경색인 방법.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 프라이머가 서열번호 3 및/또는 서열번호 4로부터 선택되는 방법.

청구항 21

제1항 내지 제3항, 제5항, 제7항 또는 제12항 내지 제17항 중의 어느 한 항에 있어서,

- (a) 검사되어야 할 사람 또는 환자로부터 샘플, 특히 세포, 조직, 체액, 또는 혈액, 내피 세포 또는 평활근 세포의 세포 성분을 수득하는 단계;
- (b) 상기 샘플로부터 ENGL2 단백질을 분리하는 단계;

(c) EGLN2 단백질의 58번 위치의 아미노산을 판정하는 단계; 및

(d) 혈전색전증 및/또는 관상동맥 심장 질환, 특히 조기 심근경색, 졸중, PRIND, TIA 및/또는 관상동맥 심장 질환의 위험을 평가하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 심근경색이 조기 심근경색인 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

- <1> 본 발명은, 사람 샘플의 사람 EGLN2 단백질을 암호화하는 핵산의 470번 위치의 뉴클레오티드 또는 사람 샘플의 사람 EGLN2 단백질의 58번 위치의 아미노산을 판정함을 특징으로 하는 혈전색전증 및 관상동맥 심장 질환의 시험관내 진단 방법에 관한 것이다.
- <2> EGLN2는, 이의 HIF 프롤릴 하이드록실라제 활성으로 인해 프롤릴 하이드록실라제 도메인-함유 단백질 1 (PHD1; prolyl hydroxylase domain-containing protein 1)로도 공지되어 있고, 5개의 암호화 엑손으로 이루어진 보존된 계놈 구조를 갖는 Egl-Nine 유전자 계열의 밀접하게 관련된 단백질의 그룹에 속한다. 저산소증 유도 인자 (HIF; Hypoxia-Inducible Factor)는 산소 항상성의 많은 양상에서 중요한 역할을 하는 전사 조절인자이지만, EGLN 동종형(isoform) EGLN1 (PHD1), EGLN2 (PHD2) 및 EGLN3 (PHD3)이 HIF의 생리학적 조절에 관여하는 지는 아직 불확실하다[참조: Appelhoff, R. J. et al. (2004) J. Biol. Chem., 279, 38458-38465, No. 37]. 모든 EGLN 동종형은 상이한 세포 특이적 및 유도성 작용을 나타내고, 이것이 저산소상태에 대한 HIF 반응의 조절에서 유연성을 가능하게 할 것이라고 보고되어 있다. 이는 특정한 EGLN 동종효소의 특이적인 약리학적 억제제, 치료학적 용도에서 유용한 HIF 반응의 선택적 조절에 대한 가능성을 가질 수 있다는 것을 의미할 것이다[참조: Appelhoff, R. J. et al. (2004), supra]. EGLN2 억제는, 예를 들면, 휴지 상태 하에서 다양한 세포 종류에 걸쳐 광범위하게 HIF 반응을 활성화시킬 것이다. 대조적으로, EGLN3의 특이적인 억제는 고 수준의 효소를 발현하는 특정한 조직에서 저산소상태에 대한 반응을 선택적으로 증가시킬 것이다[참조: Appelhoff, R. J. et al. (2004), supra]. 이는 허혈/저산소 질환을 치료하는데 대한 가능성을 열어줄 수 있다. EGLN2 및 EGLN3과 대조적으로, EGLN1의 생리학적 역할에 관해서는 많이 알려져 있지 않다.
- <3> 관상동맥 심장 질환의 발생 및 진행에서 EGLN2의 잠재적인 관여를 보다 충분히 이해하기 위하여, 유전자형-표현형 연관 분석을 익히 특성규명된 환자 그룹에서, 본 발명에 따라 참조 번호 NM_053046.2 하에 공개된 EGLN2 참조 서열의 470번 위치에서 EGLN2 유전자의 변이에 관하여 수행하였다. EGLN2 유전자의 상이한 유전자 변이체는 이미 SNP (단일 뉴클레오티드 다형성)로서 공지되어 있고 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=112398 하에 공개되어 있다.
- <4> 놀랍게도, 사람 EGLN2 단백질을 암호화하는 핵산의 470번 위치의 뉴클레오티드의 변이, 특히 시토신에서 티미딘으로의 변이, 또는 사람 EGLN2 단백질의 58번 위치의 아미노산의 변이, 특히 세린에서 류신으로의 변이는 혈전색전증 및/또는 관상동맥 심장 질환의 발생과 관련이 있다는 것이 밝혀졌다.
- <5> 따라서, 본 발명의 대상은, 사람 또는 환자 샘플의 사람 EGLN2 단백질을 암호화하는 핵산의 470번 위치의 뉴클레오티드 또는 사람 또는 환자 샘플의 사람 EGLN2 단백질의 58번 위치의 아미노산을 판정함을 특징으로 하는, 혈전색전증 및/또는 관상동맥 심장 질환의 시험관내 또는 생체내 진단에 관한 것이다.
- <6> 본 발명의 바람직한 양태에서, 혈전색전증 질환은 졸중, 지연된 가역적 허혈성 신경 결손 (PRIND) 및/또는 일과성 허혈 발작 (TIA)이고, 관상동맥 심장 질환은 심근경색이다.
- <7> 특히, 470번 위치의 뉴클레오티드가 염색체 DNA 중에서 티미딘으로 또는 mRNA 중에서 우라실로 판정되거나, 또는 58번 위치의 아미노산이 류신으로 판정되는 경우에, 졸중, PRIND 및/또는 TIA의 위험이 보다 더 높다. 그러나, 470번 위치의 뉴클레오티드가 시티딘으로 판정되거나, 또는 58번 위치의 아미노산이 세린이 판정되는 경우에, 심근경색, 특히 조기 심근경색의 위험이 보다 더 높다.
- <8> 본 발명에 있어서, "EGLN2-C470C"라는 용어는 EGLN2를 암호화하는 유전자의 두 대립유전자(allele) 상에서 참조 서열 NM_053046.2의 470번 위치에 시티딘 (이는 상응하는 단백질의 58번 위치의 아미노산이 세린이 되게 한다)

을 갖는 사람의 그룹을 말한다. 이러한 사람들은 상기 EGLN2 변이체에 대하여 동형접합성이다. 따라서, "EGLN2-C470T"라는 용어는 EGLN2를 암호화하는 유전자의 하나의 대립유전자에는 시티딘 (이는 상응하는 단백질의 58번 위치가 세린이 되게 한다)을 갖고, EGLN2를 암호화하는 유전자의 다른 대립유전자에는 티미딘 (이는 상응하는 단백질의 58번 위치가 류신이 되게 한다)을 갖는 사람의 그룹을 말한다. 이러한 사람들은 상기 EGLN2 변이체에 대하여 이형접합성이다.

- <9> 사람 EGLN2 단백질을 암호화하는 참조 서열의 핵산 서열은 바람직하게는 서열번호 1의 핵산 서열을 가지며, 사람 EGLN2 단백질의 아미노산 서열은 바람직하게는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는다. 하지만, 상기 참조 서열의 470번 위치에 상응하는 위치에서 시티딘으로부터 티미딘으로의 뉴클레오티드 교환 및/또는 상기 참조 서열의 58번 위치에 상응하는 위치에서 세린으로부터 류신으로의 아미노산 교환이 존재하고, 또한 상응하는 단백질이 프롤릴 하이드록실라제 활성, 특히 HIF 프롤릴 하이드록실라제 활성을 갖는 경우, 본 발명은 사람 EGLN2의 다른 변이체 및 이의 비-사람 동족체, 예를 들면 다른 포유동물 EGLN2 동족체 또는 캐노하디티스 엘레간스(*Caenorhabditis elegans*), 마우스 또는 래트로부터의 EGLN2 동족체도 포함한다. 상기 효소 활성은, 예를 들면 Pro (예: HIF-1 α 의 Pro⁵⁶⁴)의 산화가 검출될 수 있는 질량 분광 분석, 또는 당업자에게 공지된 효소적 검정에 의해 측정될 수 있다.
- <10> 일반적으로, 470번 위치의 특정 뉴클레오티드는 핵산 서열결정 (sequencing) 방법, 핵산의 질량 분광 분석, 하이브리드화 방법 및/또는 증폭 방법으로 판정할 수 있다. 핵산 서열결정 방법의 예로는 방사성 및/또는 형광 표지된 뉴클레오티드를 사용한 피로시퀀싱 (pyrosequencing) 및/또는 서열결정 (sequencing)이 있다. 하이브리드화 방법의 예로는 서던 블롯 분석, 노던 블롯 분석 및/또는 DNA-마이크로어레이 상에서의 하이브리드화 방법이 있다. 증폭 방법의 예로는 TaqMan 분석, 차등 RNA 디스플레이 분석 (differential RNA display analysis) 및/또는 발현 차이 분석 (RDA: representational difference analysis)이 있다[참조: Shi M. M. (2002) *Am J Pharmacogenomics.*, 2(3), 197-205; Kozian & Kirschbaum (1999) *Trends Biotechnol.*, 17(2), 73-8].
- <11> 또한, 58번 위치의 아미노산 서열은 특정 단백질의 양을 측정하는 방법 및/또는 특정 단백질의 활성을 측정하는 방법에 의해 판정할 수 있다. 특정 단백질의 양을 측정하는 방법의 예로는 웨스턴 블롯 분석 및/또는 ELISA가 있다. 특정 단백질의 활성을 측정하는 방법의 예로는 사람 세포, 동물 세포, 세균 세포 또는 효모 세포를 이용한 시험관내 전세포 시험 검정 및/또는 시험관내 시험 검정이 있고, 이들은 모두 당업자에게 공지되어 있다.
- <12> 각각의 변이체의 검출을 위한 샘플의 예로는 세포, 조직 또는 체액, 특히 혈액, 내피 세포 또는 평활근 세포의 세포 성분이 있다. 바람직하게는, 샘플을 당업자에게 공지된 통상적인 방법으로 예비처리하여, 추가적인 분석을 위한 샘플의 핵산 또는 염색체 DNA, 또는 단백질을 분리하고/하거나 정제한다.
- <13> 임의적 추가 단계에서, 사람이 혈전색전증 및/또는 관상동맥 심장 질환을 앓을 위험성 및/또는 연령을 실시예에 제시된 바와 같이 판정한다.
- <14> 또 다른 임의적 추가 단계에서, 혈전색전증 및/또는 관상동맥 심장 질환에 대한 약제의 투여량을 결정할 수 있다.
- <15> 일반적으로, 본 발명에 있어서, EGLN2 유전자에서 발견된 유전자 변이는 혈전색전증 및/또는 관상동맥 심장 질환 ("심혈관 질환"으로도 알려짐), 특히, 조기 심근경색, 졸중, PRIND, TIA 및/또는 관상동맥 심장 질환의 위험 평가 및/또는 예방적 조치를 위한 유전자 마커로서 사용될 수 있다.
- <16> 게다가, 본 발명에 있어서, 상기 유전자 변이는 색전증 및/또는 관상동맥 심장 질환, 특히, 조기 심근경색, 졸중, PRIND, TIA 및/또는 관상동맥 심장 질환의 위험 증가에 관한 임상 시험 연구하에 있는 또는 이러한 연구하에 선택되는 사람, 개체 또는 환자의 확인 및/또는 이러한 사람, 개체 또는 환자의 치료를 위한 치료제의 유효 투여량의 적용을 위한 유전자 마커로서 사용될 수 있다. 또한, 본 발명에 있어서, 상기 유전자 변이는 특정 사람, 개체 또는 환자의 약제학적 활성 물질의 관용성, 안전성 및 효능의 평가에 또는 상기 질환의 특정 치료에 적합한 사람, 개체 또는 환자를 확인하는데 사용될 수 있다.
- <17> 또한, 본 발명에 있어서, 상기 유전자 변이는 상기 질환의 치료를 위한 약제학적 활성 화합물의 검출 및 평가를 위한 고-효율 스크리닝 검정의 일부로서 사용될 수 있다.
- <18> 본 발명은 또한 치료되거나 권고될 각 사람, 개체 또는 환자에게서 상기 질환에 대한 위험 인자를 확인하는데 사용될 수 있다.
- <19> 본 발명에 따른 혈전색전증 및/또는 관상동맥 심장 질환의 진단을 위한 바람직한 방법은 아래의 단계를 포함한

다:

- <20> (a) 검사되어야 할 사람 또는 환자로부터 샘플, 특히 세포, 조직, 체액, 또는 혈액, 내피 세포 또는 평활근 세포의 세포 성분을 수득하는 단계;
- <21> (b) 상기 샘플로부터 핵산 프로브, 특히 DNA 프로브를 분리하는 단계;
- <22> (c) ENGL2 유전자의 470번 위치를 포함하는 특정 영역을 프라이머, 특히 실시예에 구체화된 프라이머를 이용하여 증폭시키는 단계;
- <23> (d) 상기 증폭된 영역을 서열결정 (sequencing)하는 단계;
- <24> (e) 상기 서열결정된 영역을 분석하는 단계;
- <25> (f) 혈전색전증 및/또는 관상동맥 심장 질환, 특히 조기 심근경색, 졸중, PRIND, TIA 및/또는 관상동맥 심장 질환의 위험을 평가하는 단계.
- <26> 본 발명에 따른 혈전색전증 및/또는 관상동맥 심장 질환의 진단을 위한 대안적인 방법은 아래의 단계를 포함한다:
- <27> (a) 검사되어야 할 사람 또는 환자로부터 샘플, 특히 세포, 조직, 체액, 또는 혈액, 내피 세포 또는 평활근 세포의 세포 성분을 수득하는 단계;
- <28> (b) 상기 샘플로부터 ENGL2 단백질을 분리하는 단계;
- <29> (c) ENGL2 단백질의 58번 위치의 아미노산을 판정하는 단계; 및
- <30> (d) 혈전색전증 및/또는 관상동맥 심장 질환, 특히 조기 심근경색, 졸중, PRIND, TIA 및/또는 관상동맥 심장 질환의 위험을 평가하는 단계.
- <31> 보다 바람직한 단계는 실시예에서 개별적으로 또는 총체적으로 구체화되고 각 단계에 참조로서 본원에 인용된다.
- <32> 다음의 도면, 표, 서열 및 실시예는 본 발명의 범위를 제한하지 않으면서 본 발명을 설명할 것이다.

실시예

<41> 서열결정 및 분석에 의한 SNP 검출

<42> 증폭을 위한 올리고뉴클레오타이드 (프라이머):

<43> 다음의 프라이머를 사용하여 참조 번호 NM_053046.2의 ENGL2 서열의 470번 위치에서의 C에서 T로의 뉴클레오타이드 교환을 검출하였다:

<44> 프라이머 1: 5'- CTGTCCAGGAGTGCCTAGTG -3' (참조 서열 NM_053046.2의 뉴클레오타이드 444번 내지 463번; 서열번호 3);

<45> 프라이머 2: 5'- GGGCTGGCAGTGGTAGAG -3' (참조 서열 NM_053046.2의 염기 504번 내지 521번의 상보적 서열; 서열번호 4).

<46> 증폭을 위한 PCR 프로토콜:

<47> 사용된 시약은 Applied Biosystems(Foster City, USA)로부터 구입하였다: 20ng의 게놈 DNA; 1 단위의 TaqGold DNA 폴리머라제; 1x Taq 폴리머라제 완충액; 500 μ M dNTP; 2.5mM MgCl₂; 200nM의 위에 제시된 각각의 증폭 프라이머쌍; H₂O ad 5 μ l.

<48> 유전자형분석(genotyping)을 위한 PCR의 증폭 프로그램:

<49> 10분 동안 95℃ x 1 사이클

<50> 30초 동안 95℃

<51> 30초 동안 70℃ x 2 사이클;

<52> 30초 동안 95℃

- <53> 30초 동안 65℃ x 2 사이클;
- <54> 30초 동안 95℃
- <55> 30초 동안 60℃ x 2 사이클;
- <56> 30초 동안 95℃
- <57> 30초 동안 56℃
- <58> 30초 동안 72℃ x 40 사이클;
- <59> 10분 동안 72℃
- <60> 30초 동안 4℃ x 1 사이클;
- <61> 미니시퀀싱(minisequencing)을 위한 프로토콜 및 SNP의 검출
- <62> 사용된 시약은 Applied Biosystems(Foster City, USA)로부터 구입하였다. 2 μ l의 정제된 PCR 산물; 1.5 μ l의 BigDye-Terminator-키트; 200nM의 위에 제시된 서열결정 프라이머; H₂O ad 10 μ l.
- <63> 서열결정을 위한 증폭 프로그램:
- <64> 2분 동안 96℃ x 1 사이클;
- <65> 10초 동안 96℃
- <66> 10초 동안 55℃
- <67> 4분 동안 65℃ x 30 사이클;
- <68> 7분 동안 72℃
- <69> 30초 동안 4℃ x 1 사이클;
- <70> 서열결정 산물의 분석:
- <71> 서열을, 먼저 Sequenz Analyse 소프트웨어[판매원: Applied Biosystems, Foster City, USA]로 분석하여 예비 데이터를 얻고 나서, Phred, Phrap, Polyphred und Consed 소프트웨어로 처리하였다. Phred, Phrap, Polyphred und Consed는 워싱턴 대학교의 필 그린(Phil Green)에 의해 작성되었다 (<http://www.genome.washington.edu>).
- <72> 결과
- <73> 사람들의 그룹의 특징
- <74> 표 1은 연구된 사람들의 그룹의 특징을 보여준다.

표 1

		n	%
합계		2074	
성별	여성	603	29.07
	남성	1471	70.93
연령		61.8 (+/- 10.5)	
BMI (체질량지수)		29.1 (+/- 4.4)	
혈압		1214	58.7
흡연자		1372	66.41
제 2 형 당뇨병		361	17.46
심근 경색		830	40.59
졸중		145	7.01

<75>

<76>

EGLN2 유전자의 변이체의 빈도 및 분포

<77>

표 2는 연구된 환자 그룹에서 참조 서열 NM_053046.2의 470번 위치에서의 EGLN2 유전자의 유전자 변이체의 빈도 및 분포를 보여준다.

표 2

	빈도	%
EGLN2-C470C (EGLN2 Ser58Ser)	1253	96.31
EGLN2-C470T (EGLN2 Ser58Leu)	47	3.61
EGLN2-T470T (EGLN2 Leu58Leu)	1	0.08
누락된 값	773	

<78>

<79>

아래에서는 EGLN2-C470C (EGLN2 Ser58Ser) 및 EGLN2-C470T (EGLN2 Ser58Leu)를 갖는 개체만을 고려한다.

<80>

조기 심근경색의 발병에 미치는 EGLN2의 변이체의 영향

<81>

표 3은 연구된 환자 그룹에서 조기 심근경색 (남성의 경우 55세 미만, 그리고 여성의 경우 60세 미만) 및 졸중/지연된 가역적 허혈성 신경 결손(PRIND; prolonged reversible ischemic neurological deficit)/일과성 허혈 발작(TIA; transitoric ischemic attack)의 발병에 미치는 참조 서열 NM_053046.2의 470번 위치에서의 EGLN2의 유전자형의 영향을 보여준다. 0.05 미만의 P-값은 통계적으로 유의적이다.

표 3

임상 변수	EGLN2		p-값
	C470C / Ser58Ser	C470T / Ser58Leu	
	n (%)	n (%)	
조기 심근경색이 있는 환자 (남성 55 세 미만 / 여성 60 세 미만)	215 (17.16)	2 (4.26%)	0.0199
조기 심근경색이 없는 환자 (남성 55 세 미만 / 여성 60 세 미만)	1038 (82.84)	45 (95.74)	
졸중 /PRIND/TIA 가 있는 환자	88 (7.23)	7 (14.89)	0.0418
졸중 /PRIND/TIA 가 없는 환자	1165 (92.77)	40 (85.11)	

<82>

<83> 결과:

<84> 1. EGLN2-C470C를 갖는 환자는 EGLN2-C470T를 갖는 환자와 비교하여 조기 심근경색에 대해 통계적으로 높은 발병률을 보였다.

<85> 2. EGLN2-C470T를 갖는 환자는 EGLN2-C470C를 갖는 환자와 비교하여 졸중, PRIND 및/또는 TIA가 발생할 위험성의 유의적인 증가를 보였다.

<86> 관상동맥 심장 질환이 있는 환자의 연령에 미치는 EGLN2의 변이체의 영향

<87> 도 3은 환자 그룹에서 관상동맥 심장 질환의 발생 연령에 미치는 참조 서열 NM_053042.2의 470번 위치에서의 EGLN2의 유전자형의 영향을 보여준다.

<88> 결과:

<89> 관상동맥 심장 질환의 조기 발생에 대한 EGLN2-C470C (EGLN2 Ser58Ser)을 갖는 환자의 연령의 유의적인 의존도가 EGLN2-C470T (EGLN2 Ser58Leu)를 갖는 환자의 연령과 비교하여 관찰되었다.

<90> 결론:

<91> 앞서 제시된 EGLN2를 암호화하는 유전자 및/또는 단백질 EGLN2의 유전자 변이체들 간의 통계적으로 유의적인 관련성은, 혈전색전증 및/또는 관상동맥 심장 질환의 발생에 상기 유전자 변이체들이 관련되어 있다는 것을 명확하게 보여준다. 따라서, 상기 유전자 변이체는 혈전색전 및/또는 관상동맥 심장 질환의 진단을 위한, 특히 조기 심근경색 및/또는 졸중, PRIND 및/또는 TIA의 진단을 위한 생물학적 마커이다.

서열 번호: 1

```

1 gctttccctt gcctgcctgt ctctagtctt totcacatcc cttttttttt ttcctttctc
61 tagccaccct gaagggtccc ttcccaggcc cttagggaac gcagaggact tggggaccac
121 caagcaaccc ccagggcacg agaagagctc ttgctgtctg ccctgcctca cctgccccca
181 cggcaggccc ggtggccccc agctgcatca agtggaggcg gaggaggagg cggaggaggg
241 tggcaccatg ggcccggggc gtgcccctca tgcccggggg atgaagacac tgcctgcatg
301 gacagcccggt gccagccgca gccctaaagt caggctctcc ctcagttacc agggctctcg
361 tcagagccct tggagcctga gcctggccgg gccaggatgg gaggaggagg ttacctgccc
421 tgtcccctgc tcccctccta ccagtgtcca ggagtgccta gtgaggccto ggcaggaggat
481 gggacccccca gagccacagc cactctctac actgccagcc ctcttcggga cggttttggc
541 gggcaggatg gtggtgagct gcggccgctg cagagtgaag gcgctgcagc gctggtcacc
601 aaggggtgcc agcgattggc agcccagggc gcacggcctg aggcccccaa acggaatgg
661 gccaggatg gtggggatgc ccttcacccc agcaaacggc cctgggccag gcaagagaac
721 caggaggcag agcgggaggg tggcatgagc tgcagctgca gcagtggcag tggtagggcc
781 agtgctgggc tgatggaggg ggcgctgccc tctgcgcccg agcgctggc cctggactat
841 atcgtgcctt gcatgctgta ctacggcatc tgcgtcaagg acagcttctt gggggcagca
901 ctggcggtgc gcgtgctggc cgaggtggag gccctcaaac ggggtgggag cctgcgagac
961 gggcagctag tgagccagag ggcgatcccg ccgocgagca tccgtgggga ccagattgcc
1021 tgggtggaag gccatgaacc aggtgctcga agcattgggt cctcatggcc ccatgtggag
1081 gccgtcatcc gccactgcgc agggcggtcg ggcagctatg tcatcaacgg gcgcaccaag
1141 gccatggtgg cgtgttaccg aggcaacggg ctccgggtacg taaggcacgt tgacaatccc
1201 caggcgatg ggcgctgcat cactgtatc tattacctga atcagaactg ggacgttaag
1261 gtgcatggcg gctgctgca gatcttccct gagggccggc cctgtgtagc caacatcgag
1321 ccaactcttg accggttgct cttttctggt tctgaccggc ggaaccccca cgaggtgaag
1381 ccagcctatg ccaccaggta cgccatcact gtctggtatt ttgatgccaa ggagcgggca
1441 gcagccaaag acaagtatca gctagcatca ggacagaaag gtgtccaaat acctgtatca
1501 cagccgccta cgcacaccta gtggccagtc ccagagccgc atggcagaca gcttaaatga
1561 cttcaggaga ggcctgggct tgtgctggct gctccttccc tgccaccgct gctgcttctg
1621 actttgcctc tgcctgctt ggtgtggagg gctctgtctg ttgctgagga ccaaggagga
1681 gaagagacct ttgctgcccc atcatggggg ctggggttgt cactgggaca gggggcagcc
1741 gtggaggcca ccgttaccac ctgaagctgg gggcctgggt cctaccctgt ctggtcatga
1801 cccattagg tatggagagc tgggaggagg cattgtcact tcccaccagg atgcaggact
1861 tggggttag gtgagtcagt gcctcttctg ggcaatggg tgggaggagt acccccagt
1921 cctctcactc ctccagcctg gaatgtgaag tgactcccca acccctttgg ccatggcagg
1981 caccctttgg actgggctgc cactgcttgg gcagagtaaa aggtgccagg aggagcatgg
2041 gtgtgggaagt cctgtcagcc aagaaataaa agtttacctc agagctgcaa aaaaaaaaaa
2101 aaaaaaaaaa a

```

<92>

서열 번호: 2

```

MDSFCQPQLSQALPQLPGSSSEPLEPEFGRARMGVESYLPCLLPSPYHCPGVPSEASAGSG
TPRATATSTTASPLRDGFGGQDGGELRPLQSEGAALVTKGQCRLAAQGARPEAPKRKWAED
GGDAPSPSKRPWARQENQEAREEGGMSCSGSGSEASAGLMEEALPSAPERLALDYIVPCM
RYYGICVKDSFLGAALGGRVLAEEVALKRGRLRDGQLVSQRAIPPRSIRGDQIAWVEGHEP
GCRSIGALMAHVDVIRHCAGRLGSYVINGRTKAMVACYPGNGLGYVRHVDNPHGDGRCITC
IYYLNQNWVDVKVHGGLLQIFPEGRPVVANIEPLFDRLLIFWSDRRNPHEVKPAYATRYAITV
WYFDAKERAALKDKYQLASGQKGVQVPVSQPPTPT

```

<93>

서열 번호: 3

1 CTGTCCAGGA GTGCCTAGTG

<94>

서열 번호: 4

1 GGGCTGGCAG TGGTAGAG

<95>

도면의 간단한 설명

<33>

도 1은 NCBI 번호 NM_053046의 사람 EGLN2 유전자의 핵산 서열을 도시한다. 470번 위치(굵은 글씨)에서 C→T의 유전자 변이를 갖는 유전자 단편의 증폭에 사용된 프라이머에 밑줄을 그었다.

<34>

도 2는 NCBI 번호 NM_053046의 핵산 서열로부터 유래된 사람 EGLN2의 아미노산 서열을 도시한다. EGLN2 단백질의 58번 아미노산 위치를 굵게 표시하였다.

<35>

도 3은 환자 그룹에서 관상동맥 심장 질환의 발병 연령에 미치는 참조 서열 NM_053042.2의 470번 위치에서의 EGLN2의 유전자형 (EGLN2 단백질의 58번 위치에서 아미노산 교환을 일으킴)의 영향을 보여준다. 0.05 미만의 P-값은 통계적으로 유의적이다.

<36>

서열의 설명

<37>

서열번호 1은 NCBI 번호 NM_053046의 사람 EGLN2 단백질의 핵산 서열을 보여준다.

<38>

서열번호 2는 NCBI 번호 NM_053046의 핵산 서열로부터 유래된 사람 EGLN2의 아미노산 서열을 보여준다.

<39> 서열번호 3은 참조 서열 NM_053046.2의 뉴클레오타이드 444 - 463의 제1 프라이머 서열을 보여준다.

<40> 서열번호 4는 참조 서열 NM_053046.2의 염기 504 - 521의 상보적 서열의 제2 프라이머 서열을 보여준다.

도면

도면1

```

1 gctttccctt gctgacctgt ctctagtttc tctcacatcc cttttttttt ttcttttttc
61 tagccaccct gaagggtccc ttcccaagcc cttagggacc gcagaggact tggggaccag
121 caagcaaccc ccaggggcacg agaagagctc ttgctgtctg ccttgccctc ccttgcccca
181 cgccaggccc ggtggccccc agctgcatca agtggaggcg gaggaggagg cggaggaggg
241 tggcaccatg ggcccgggcg gtgacctcca tgcccggggg atgaagacac tggcgccatg
301 gacagcccggt gccagccgca gccctaagt caggctctcc ctcagttacc agggctcttcg
361 tcagagccct tggagcctga gcttgcccg gccaggatgg gaggggagag ttacctgccc
421 tgtccctgc tccccctca ccactgtcca ggagtgccta gtgaggccta ggcaggaggt
481 gggaccccca gagccacagc cactctacc actgccagcc ctcttcggga cggttttggc
541 gggcaggatg gtggtgagct gcggccgctg cagagtgaag gcgctgcagc gctggtcacc
601 aagggggtgc agcgattggc agcccagggc gcacggcctg agggcccca acggaatgg
661 gccgaggatg gtggggatgc ccttccacc agcaaacggc cctgggcccag gcaagagaac
721 caggaggcag agcgggaggg tggcatgagc tgcagctgca gcagtggcag tggtagggcc
781 agtgctgggc tgatggagga ggcgctgccc tctgcgcccg agcgccctgg cctggactat
841 atcgtgcctt gcatgcggta ctacggcatc tgcgtcaagg acagcttctt gggggcagca
901 ctgggcggtc gcgtgctggc cgagggtggg gccctcaaac ggggtgggcg cctgcgagac
961 gggcagctag tgagccagag ggcgatcccg ccgcgcagca tccgtgggga ccagattgcc
1021 tgggtggaag gccatgaacc aggcctgtga agcattgggt cctcatggc ccatgtggag
1081 gccgtcatcc gccactgcgc agggcggtcg ggcagctatg tcatcaacgg gcgcaccaag
1141 gccatggtgg cgtgttacc aggcaacggg ctcggttacg taaggcacgt tgacaatccc
1201 cagggcgatg ggcgctgcat cactgtatc tattacctga atcagaactg ggaggttaag
1261 gtgcatggcg gctgctgca gatcttccct gagggccggc cgtggttagc caacatcgag
1321 cactctttg accggttgct cttttctgg tctgaccggc ggaaccccca cgaggtgaag
1381 ccagcctatg ccaccaggta cgccatcact gtctggtatt ttgatgcaa ggcggggca
1441 gcagccaaag acaagtatca gctagcatca ggacagaaag gtgtccagt acctgtatca
1501 cagccgccta cgcacaccta gtggccagtc ccagagccgc atggcagaca gcttaaatga
1561 ctccaggaga gccctgggct tgtgctggct gctccttccc tgccaccgct gctgctcttg
1621 actttgcctc tgctctgctt ggtgtggagg gctctgtctg ttgctgagga ccaaggagga
1681 gaagagacct ttgctgcccc atcatggggg ctgggggtgt cactggaca gggggcagcc
1741 gtggaggcca ccgttaccaa ctgaagctgg ggcctgggt cctaccctgt ctggtcatga
1801 ccccattagg tatggagagc tgggaggagg cattgtcact tcccaccagg atgcaggact
1861 tgggggttag gtgagtcagc gcctcttgct ggcaatgggg tgggaggagt acccccaagt
1921 cctctcactc ctccagcctg gaatgtgaag tgaactccca accctttgg coatggcagg
1981 cactttttgg actgggctgc cactgcttgg gcagagtaaa aggtgocagg aggagcatgg
2041 gtgtggaagt cctgtcagcc aagaaataaa agtttacctc agagctgcaa aaaaaaaaaa
2101 aaaaaaaaaa a

```

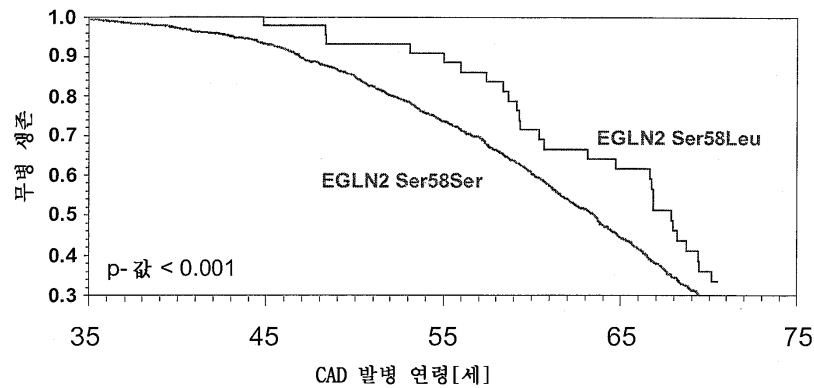
도면2

```

MDSPCQPQPLSQALPQLPGSSSEPLEPEPEGRARMGVESYLPCLLPSPYHCPGVPSEASAGSG
TPRATATSTTASPLRDGFGGQDGGELRPLQSEGAALVTKGCQRLAAQGARPEAPKRKWAED
GGDAPSPSKRPWARQENQEAEREGLMSGSCSSSGSEASAGLMEEALPSAPERLALDYIVPCM
RYYGICVKDSFLGAALGGRVLAEEVLEALKRGGRLRDGQLVSQRAIPPRSIRGDQIAWVEGHEP
GCRSIGALMAHVDAVIRHCAGRLGSYVINGRTKAMVACYPGNGLGYVRHVDNPHGDGRCITC
IYYLNQNWVDKVGGLLQIFPEGRPVVANIEPLFDRLLIFWSDRRNPHEVKPAYATRYAITV
WYFDAKERAAAKDKYQLASGQKGVQVPVSPPTPT

```

도면3



서열목록

<110> Sanofi-Aventis

<120> Method for the diagnosing thromboembolic disorders and
coronary heart diseases

<130> DE2005/049

<150> DE 10 2005 048 899.4

<151> 2005-10-12

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 2111

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gctttccct gctgcctgt ctctagtttc tctcacatcc cttttttttt ttcctttctc 60
tagccaccct gaagggtccc ttccaagcc cttagggacc gcagaggact tggggaccag 120
caagcaacc ccagggcacg agaagagctc ttgctgtctg cctgcctca cctgcccc 180
cgccaggccc ggtggccccc agctgcatca agtggaggcg gaggaggagg cggaggagg 240
tggcaccatg ggcccggcg gtgcctcca tgcccggggg atgaagacac tgctgcatg 300
gacagccct gccagccgca gccctaagt caggctctcc ctgattacc aggtcttcg 360
tcagagccct tggagcctga gcctggccgg gccaggatgg gattggagag
ttacctgcc 420

tgtccctgc tcccctcta ccaactgtca ggagtgccta gtgaggcctc ggcaggagg 480
gggaccccc gagccacagc cactctacc actgccagcc ctcttcggga cggttttg 540
gggcaggatg gtggtgagct gcggccgctg cagagtgaag gcgctgcagc gctggtcacc 600
aaggggtgcc agcattggc agcccaggc gcacggcctg agggccccc acggaatgg 660
gccgaggatg gtgggatgc ccttcaccc agcaaacggc cctgggccag gcaagagaac 720

```

caggaggcag agcgggaggg tggcatgagc tgcagctgca gcagtggcag tggtagggcc 780
 agtgcctgggc tgatggagga ggcgtgccc tctgcgccc
 agcgcctggc cctggactat 840
 atcgtgccct gcatgcggtg ctacggcatc tgcgtcaagg acagcttcct gggggcagca 900
 ctggcggtgc gctgctggc cgaggtggag gccctcaaac ggggtgggcg cctgcgagac 960
 gggcagctag tgagccagag ggcgatcccg ccgcgcagca tccgtgggga ccagattgcc 1020
 tgggtggaag gccatgaacc aggtgtgca agcattggtg cctcatggc ccatgtggac 1080
 gccgtcatcc gccactgccc agggcggtg ggcagctatg tcatcaacgg gcgcaccaag 1140
 gccatggtgg cgtgttacc aggcaacggg ctgggtacg taaggcacgt tgacaatccc 1200
 caggcgatg ggcgtgcat cacctgtatc
 tattacctga atcagaactg ggacgttaag 1260
 gtgcatggcg gctgctgca gatcttcct gagggccggc ccgtggtagc caacatcgag 1320
 ccactcttg accggttgct cattttctgg tctgaccggc ggaaccccca cgaggtgaag 1380
 ccagcctatg ccaccaggta cgccatcact gtctggtatt ttgatgcaa ggagcgggca 1440
 gcagccaaag acaagtatca gctagcatca ggacagaaag gtgtccaagt acctgtatca 1500
 cagccgcta cggccaccta gtggccagtc ccagagccgc atggcagaca gcttaaatga 1560
 cttcaggaga gccctgggccc tgtgctggct gctcctccc tgccaccgct gctgcttctg 1620
 actttgcctc tgcctgcct
 ggtgtggagg gctctgtctg ttgctgagga ccaaggagga 1680
 gaagagacct ttgctgccc atcatggggg ctggggtgt cacctggaca gggggcagcc 1740
 gtggaggcca ccgttacaa ctgaagctgg ggcctgggt cctaccctgt ctggtcatga 1800
 cccattagg tatggagagc tgggaggagg cattgtcact tcccaccagg atgcaggact 1860
 tggggttag gtgagtcag gcctcttgc ggcaatgggg tgggaggagt accccaagt 1920
 cctctcactc ctccagcctg gaatgtgaag tgactccca accctttgg ccatggcagg 1980
 caccttttg actgggtgc cactgcttgg gcagagtaaa aggtgccagg aggagcatgg 2040
 gtgtggaagt
 cctgtcagcc aagaaataaa agtttacctc agagctgcaa aaaaaaaaaa 2100
 aaaaaaaaaa a 2111

<210> 2
 <211> 407
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Asp Ser Pro Cys Gln Pro Gln Pro Leu Ser Gln Ala Leu Pro Gln
 1 5 10 15
 Leu Pro Gly Ser Ser Ser Glu Pro Leu Glu Pro Glu Pro Gly Arg Ala
 20 25 30
 Arg Met Gly Val Glu Ser Tyr Leu Pro Cys Pro Leu Leu Pro Ser Tyr
 35 40 45
 His Cys Pro Gly Val Pro Ser Glu Ala Ser Ala Gly Ser Gly Thr Pro
 50 55 60
 Arg Ala Thr Ala Thr Ser Thr Thr Ala Ser Pro Leu Arg Asp Gly Phe

65	70	75	80
Gly Gly Gln Asp Gly Gly Glu Leu Arg Pro Leu Gln Ser Glu Gly Ala	85	90	95
Ala Ala Leu Val Thr Lys Gly Cys Gln Arg Leu Ala Ala Gln Gly Ala	100	105	110
Arg Pro Glu Ala Pro Lys Arg Lys Trp Ala Glu Asp Gly Gly Asp Ala	115	120	125
Pro Ser Pro Ser Lys Arg Pro Trp Ala Arg Gln Glu Asn Gln Glu Ala	130	135	140
Glu Arg Glu Gly Gly Met Ser Cys Ser Cys Ser Ser Gly Ser Gly Glu	145	150	155
Ala Ser Ala Gly Leu Met Glu Glu Ala Leu Pro Ser Ala Pro Glu Arg	165	170	175
Leu Ala Leu Asp Tyr Ile Val Pro Cys Met Arg Tyr Tyr Gly Ile Cys	180	185	190
Val Lys Asp Ser Phe Leu Gly Ala Ala Leu Gly Gly Arg Val Leu Ala	195	200	205
Glu Val Glu Ala Leu Lys Arg Gly Gly Arg Leu Arg Asp Gly Gln Leu	210	215	220
Val Ser Gln Arg Ala Ile Pro Pro Arg Ser Ile Arg Gly Asp Gln Ile	225	230	235
Ala Trp Val Glu Gly His Glu Pro Gly Cys Arg Ser Ile Gly Ala Leu	245	250	255
Met Ala His Val Asp Ala Val Ile Arg His Cys Ala Gly Arg Leu Gly	260	265	270
Ser Tyr Val Ile Asn Gly Arg Thr Lys Ala Met Val Ala Cys Tyr Pro	275	280	285

Gly Asn Gly Leu Gly Tyr Val Arg His Val Asp Asn Pro His Gly Asp
290 295 300

Gly Arg Cys Ile Thr Cys Ile Tyr Tyr Leu Asn Gln Asn Trp Asp Val
305 310 315 320

Lys Val His Gly Gly Leu Leu Gln Ile Phe Pro Glu Gly Arg Pro Val
325 330 335

Val Ala Asn Ile Glu Pro Leu Phe Asp Arg Leu Leu Ile Phe Trp Ser
340 345 350

Asp Arg Arg Asn Pro His Glu Val Lys Pro Ala Tyr Ala Thr Arg Tyr
355 360 365

Ala Ile Thr Val Trp Tyr Phe Asp Ala Lys Glu Arg Ala Ala Ala Lys
370 375 380

Asp Lys Tyr Gln Leu Ala Ser Gly Gln Lys Gly Val Gln Val Pro Val
385 390 395 400

Ser Gln Pro Pro Thr Pro Thr
405

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 3

ctgtccagga gtcctagt

20

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 4

gggctggcag tggtagag

18