



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0138953
(43) 공개일자 2015년12월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/11 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0066033

(22) 출원일자 2014년05월30일

심사청구일자 2014년05월30일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

이상학

서울 강남구 압구정로39길 58, 61동 508호 (압구정동, 현대3차아파트)

이지영

서울특별시 서대문구 모래내로 143, (남가좌동, 창덕에버빌)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현

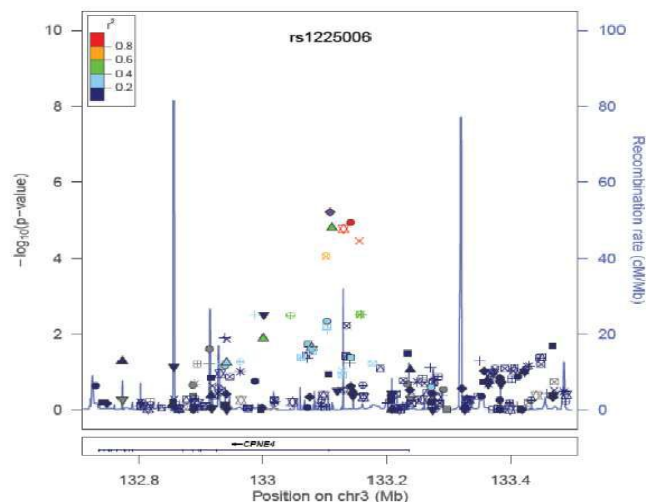
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **관상동맥질환의 중증도에 연관된 유전변이 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 관상동맥질환의 중증도와 관련된 단일염기다형성 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 보다 자세히는 전장유전체 연관성 연구(GWAS)에 의한 관상동맥질환의 병변 특징 또는 중증도와 연관된 *TRPS1* 유전자 단일염기다형성 rs231150 및 *CPNE4* 유전자 단일염기다형성 rs125006으로 구성된 군에서 관상동맥질환의 중증도와 관련이 있는 단일염기다형성 부위를 포함하는 키트에 관한 것이다. 본 발명에 따른 관상동맥질환 중증도와 관련된 단일염기다형성 부위를 포함하는 키트를 이용하여, 관상동맥질환 중증도를 진단 또는 예측할 수 있고, 상기 키트를 이용하여 얻어진 관상동맥질환과 관련된 유전정보를 통해 맞춤의학, 예측의학을 실현할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김광실

대전광역시 서구 청사서로 70, 101동 403호(월평동, 무궁화아파트)

장양수

서울 서초구 방배중앙로 207-10, 방배대림 아크로리버 101-701 (방배동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345197896

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원(교육부)

연구과제명 다양한 심혈관계 위험 환경에서 대식세포에 대한 HDL의 항동맥경화 기전 연구

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711005700

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 기초기술연구회

연구사업명 기초기술연구회연구운영비지원

연구과제명 메타볼로믹스와 생체영상 융합 연구를 통한 심혈관계 질환의 다중 진단 및 치료 기술 개발

기 여 율 1/2

주관기관 한국기초과학지원연구원

연구기간 2013.07.27 ~ 2014.07.26

명세서

청구범위

청구항 1

8번 염색체의 *TRPS1*(*Trichorhinophalangeal syndrome type 1*) 유전자의 단일염기다형성(SNP) 부위로서 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열의 501 번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs231150) 및 3번 염색체의 *CPNE4*(*Copine-4*) 유전자의 단일염기다형성(SNP) 부위로서 서열목록 제4서열의 뉴클레오타이드 서열의 뉴클레오타이드 서열의 575 번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs1225006)로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단일염기다형성 부위를 포함하는 10-100개의 연속 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 관상동맥질환의 중증도 진단용 키트.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 단일염기다형성 부위를 가진 인간은 관상동맥에서 혈관병변의 중증도(modified duke score)와 연관된 위험도를 나타내는 것을 특징으로 하는 관상동맥질환의 중증도 진단용 키트.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 관상동맥에서 혈관병변의 중증도(modified duke score)와 관련된 감소된 위험도를 나타내는 인간은 상기 rs231150 SNP에서 AT 또는 TT의 유전자형을 갖는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 4

제 2 항에 있어서, 상기 관상동맥에서 혈관병변의 중증도(modified duke score)와 관련된 감소된 위험도를 나타내는 인간은 상기 rs1225006 SNP에서 AG 또는 GG의 유전자형을 갖는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 5

관상동맥질환의 중증도의 진단 또는 예후에 필요한 정보를 제공하기 위하여 인간의 생물학적 시료에 있는 8번 염색체의 *TRPS1*(*Trichorhinophalangeal syndrome type 1*) 유전자의 단일염기다형성(SNP) 부위로서 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열의 501 번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs231150) 및 3번 염색체의 *CPNE4*(*Copine-4*) 유전자의 단일염기다형성(SNP) 부위로서 서열목록 제4서열의 뉴클레오타이드 서열의 뉴클레오타이드 서열의 575 번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs1225006)로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단일염기다형성 부위를 검출하는 단계를 포함하는 관상동맥질환에서 혈관병변의 중증도의 마커를 검출하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 방법은 마이크로어레이 방식 또는 유전자 증폭 방식으로 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 관상동맥질환의 중증도는 심외막 관상동맥에 발병된 협착증과 관련된 관상동맥질환의

중증도인 것을 특징으로 하는 관상동맥질환에서 혈관병변의 중증도의 마커를 검출하는 방법.

청구항 8

제 5 항에 있어서, 상기 단일염기다형성 부위를 가진 인간은 관상동맥에서 혈관병변의 중증도의 감소된 위험도를 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 관상동맥에서 혈관병변의 중증도의 감소된 위험도를 나타내는 인간은 상기 rs231150 SNP에서 AT 또는 TT의 유전자형을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 상기 관상동맥에서 혈관병변의 중증도의 감소된 위험도를 나타내는 인간은 상기 rs1225006 SNP에서 AG 또는 GG의 유전자형을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 관상동맥질환에서 혈관병변의 중증도에 연관된 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 죽상경화성 심장혈관병은 다인성 병인에 의하여 야기되는 것이 잘 알려져 있다. 수많은 노력들이 임상적 위험인자를 초월하는 관상동맥질환(coronary artery disease, CAD)의 병리생리학적 원인요소를 연구하기 위하여 수십 년간 수행되었다. 현재 관상동맥질환의 유전율(heritability)은 30% 내지 50%로 다양하다는 것이 대부분의 평가에 의하여 잘 알려져있다.

[0003] 최근에 전장유전체 연관성 연구(genome-wide association studies, GWAS) 또는 관상동맥질환과 관련된 다수의 유전자 좌위의 복합 분석은 유전자 좌위의 생물학적 기능을 시사한다. 상기 연구들에서 일부 후보 유전자들은 관상동맥질환의 결정인자로서 제시되었고 그 연구 결과에 대한 해석은 아직 진행 중에 있다.

[0004] 복합성 관상동맥 병변, 예컨대 광범위 병변(diffuse lesion)의 치료는 여전히 심장병 전문의에게 주요한 관심 중의 하나이다. 그러나, 죽상동맥경화증 또는 관상동맥질환의 더 구체적인 표현형과 연관된 유전적 변이체들을 탐구하기 위한 연구는 극히 제한적이다. 다양한 임상적 및 혈관병변적 특징은 현실세계에서 죽상동맥경화증의 관리에 있어서 결정적인 사항으로 고려되기 때문에, 특이적 혈관의 표현형과 관련된 변이체들에 대한 지식은 매우 도움이 될 수 있다.

[0005] 따라서, 본 발명자들은 전장유전체 연관성 연구 및 반복 지노타이핑(replication genotyping)을 이용한 관상동맥질환의 혈관병변의 유전적 결정인자 및 중증도(severity)를 연구하였다. 전장유전체 연관성 연구로부터 5개의 SNP(single nucleotide polymorphism) 후보군과의 연관성이 반복성에 있어서 유효하지는 않더라도, 본 발명자들은 상기 후보군들의 조합 분석에서 관상동맥질환의 중증도와 관련된 두 개의 변이체를 발견하였다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명

의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명자들은 전장유전체 연관성 연구(GWAS)에 의한 관상동맥질환의 병변 특징 또는 중증도와 연관된 변이체들을 동정한 후, 동정된 후보 변이체의 반복 지노타이핑을 수행하였고, 본 발명의 SNP 후보군 중 *TRPS1*의 rs231150 및 *CPNE4*의 rs125006는 관상동맥질환의 중증도와 연관되어 있었음을 입증하였으며, 상기 본 발명의 SNP는 관상동맥질환에서 혈관병변의 중증도를 진단하는데 유용하게 이용될 수 있다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [0008] 따라서, 본 발명의 목적은 관상동맥질환의 중증도 진단용 키트를 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 관상동맥질환의 중증도 마커를 검출하는 방법을 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 *TRPS1*(*Trichorhinophalangeal syndrome type 1*) 유전자의 단일염기다형성(SNP) 부위로서 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열의 501 번째 위치 및 *CPNE4*(*Copine-4*) 유전자의 단일염기다형성(SNP) 부위로서 서열목록 제4서열의 뉴클레오타이드 서열의 575 번째 위치로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단일염기다형성 부위를 포함하는 10-100개의 연속 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 관상동맥질환의 중증도 진단용 키트를 제공한다.
- [0012] 본 발명자들은 관상동맥질환에 관한 간편하고 신뢰성 높은 체외진단 시스템을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다.
- [0013] 본 발명자들은 본 발명의 관상동맥질환의 중증도의 측정은 제1단계로, 전장유전체 연관성 연구에 의한 병변 특징 또는 관상동맥질환의 중증도와 관련된 변이체들을 동정하였고, 제2단계로, 동정된 후보 변이체의 반복 지노타이핑을 수행하였다.
- [0014] 발굴 세트(discovery set)는 한국에 관상동맥질환의 유전체 연구를 위하여 설립된 심혈관계질환 유전체 연구소(Genomics Research in Cardiovascular Disease, GenRIC) 콘소시움에 등록된 관상동맥질환 환자로 구성되어 있다. 상기 환자들은 혈관조영술을 수행하였다. 관상동맥질환은 최소 하나의 심외막 관상동맥에서 유의한 협착증(50% 이상)을 보여주는 혈관병변의 진찰소견을 기초로 하였다. 반복 연구(replication study)에서, 관상동맥질환 환자들을 연세대학교 의료시스템에 있는 심혈관 계층 센터의 환자 데이터베이스로부터 선별하였다.
- [0015] 제1단계의 전장유전체 연관성 연구로부터 5개의 SNP 후보군, 즉, *TRPS1* 유전자로부터 GenBank SNP 데이터베이스 rs12917449(서열목록 제1서열), GenBank SNP 데이터베이스 rs231150(서열목록 제2서열) 및 GenBank SNP 데이터베이스 rs10152898(서열목록 제3서열)을 발굴하였고, *CPNE4*(*Copine-4*) 유전자로부터 GenBank SNP 데이터베이스 rs1225006(서열목록 제4서열) 및 GenBank SNP 데이터베이스 rs6745588(서열목록 제5서열)을 발굴하였다.
- [0016] 제2단계에서, 상기 동정된 5개의 후보 변이체의 반복 지노타이핑을 수행하였고, 그 결과 *TRPS1*(*Trichorhinophalangeal syndrome type 1*) 유전자 및 *CPNE4*(*Copine-4*) 유전자를 포함하는 유전좌위에서 일련의 SNP들, 즉 GenBank SNP 데이터베이스 rs231150(서열목록 제2서열) 및 GenBank SNP 데이터베이스 rs1225006(서열목록 제4서열)가 관상동맥질환에 유의한 연관성을 갖는 것을 입증하였다.

- [0017] 본 발명은 관상동맥질환(coronary artery disease)의 중증도(severity)와 관련된 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 제시한다.
- [0018] 본 명세서에서 용어 “단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)”은 게놈에서 단일염기(A, T, C 또는 G)가 종의 멤버들 간 또는 한 개체(individual)의 쌍 염색체 간에 다른 경우에 발생하는 DNA 서열의 다양성을 의미한다. 예를 들어, 서로 다른 개체의 세 개의 DNA 단편들(예: AAGT[A/A]AG, AAGT[A/G]AG, AAGT[G/G]AG)처럼 단일염기에서 차이를 포함하는 경우, 두 개의 대립 유전자(C 또는 T)라고 부르며, 일반적으로 거의 모든 SNPs는 두 개의 대립 유전자를 가진다. 한 집단(population)내에서, SNP는 소수 대립인자 빈도(minor allele frequency, MAF; 특정 집단에서 발견되는 유전자위치(locus)에서 가장 낮은 대립인자 빈도)로 할당될 수 있다. 인간 집단 내에서 변이성(variations)이 존재하며, 지질학적 또는 민족적 군에서 공통적인 하나의 SNP 대립 유전자는 매우 희귀하다. 단일염기는 폴리뉴클레오타이드 서열에 변화(대체), 제거(결실) 또는 첨가(삽입)될 수 있다. SNP는 번역 프레임의 변화를 유발할 수 있다.
- [0019] 단일염기다형성은 유전자의 코딩 서열, 유전자의 비-코딩 부위 또는 유전자 사이의 내부 지역(intergenic regions)에 포함될 수 있다. 유전자의 코딩 서열 내의 SNP는 유전암호의 중복성(degeneracy)으로 인해 반드시 타겟 단백질의 아미노산 서열 상에 변화를 일으키지는 않는다. 동일한 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP는 동의적(synonymous)이라 하고(침묵 돌연변이라고도 불리움), 다른 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP의 경우 비-동의적(non-synonymous)이라고 한다. 비-동의적 SNP는 미스센스 또는 넌센스일 수 있으며, 미스센스 변화는 다른 아미노산을 발생시키는 반면에 넌센스 변화는 비정숙 종결코돈을 형성한다. 단백질-코딩 부위가 아닌 곳에 존재하는 SNP는 유전자 사일런싱, 전사인자 결합 또는 비-코딩 RNA 서열을 유발시킬 수 있다.
- [0020] 인간의 DNA 서열 상의 변이성은 병의 발병 및 인간이 어떻게 병원체, 화학물질, 약물, 백신 및 다른 시약에 반응하는가에 영향을 미칠 수 있다. 또한, SNP는 맞춤형 의학의 개념을 실현하기 위한 중요한 도구(key enabler)로 생각된다. 무엇보다도, 최근에 마커로서 활발하게 개발되고 있는 SNP는 질병을 가지거나 또는 가지지 않는 군들 간에 게놈 부위를 비교함으로써 질병을 진단하는 생의학적 연구에서 가장 중요하다. SNP는 인간 게놈의 가장 많은 변이이며, 1.9 kb 당 하나의 SNP 비율로 존재하는 것으로 추측되고 있다(Sachidanandam et al., 2001). SNP는 매우 안정된 유전적 마커이고, 때때로 표현형에 직접적인 영향을 미치며, 자동화된 유전자형규명 시스템에 매우 적합하다(Landegren et al., 1998; Isaksson et al., 2000). 또한, SNP 연구는 곡식 및 가축 육성 프로그램에서도 중요하다.
- [0021] 본 발명의 키트는 관상동맥질환(coronary artery disease)의 중증도(severity) 진단용 키트이다.
- [0022] 본 명세서에서, “관상동맥질환”은 심장에 혈액을 공급하는 혈관이 동맥경화 등의 원인에 의하여 막히거나 좁아져 심장 근육에 혈액을 충분하게 공급하지 못하는 것과 관련된 질환이 포함될 수 있다. 상기 관상동맥질환에는 협심증, 심근경색증, 죽상경화증 등이 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 본 명세서에서, “관상동맥질환의 중증도 진단”이란 관상동맥 질환의 발병 위험이 정상인 군에 비하여 증가되어 있는지, 또는 감소되어 있는지를 진단하는 것으로, 상기 관상동맥질환의 중증도는 다양하게 판단될 수 있으며, 예를 들어 최소 하나의 심의막 관상동맥에서 유의한 협착증(50% 이상)을 보여주는 혈관병변으로 판단되고, 보다 구체적으로 관상동맥에서 혈관병변의 중증도는 변형 듀크 스코어(modified duke score)를 이용하여 SNP의 연관성을 측정하여 판단된다.
- [0024] 본 발명에서 제시하는 SNP는 관상동맥질환의 중증도, 특히 관상동맥에서 혈관병변의 중증도의 감소된 위험도와 연관성(association)을 나타내는 SNP이다.
- [0025] 본 명세서에서, SNP를 언급하면서 사용되는 용어 “연관성”은 특정한 유전자의 다형성과 당해 유전자를 가진 개체의 표현형 간의 관계가 통계학적으로 유의한 경우를 의미하며, 보다 구체적으로는 특정 SNP의 존재와 혈관조영술을 통해 측정된 관상동맥의 광범위 병변의 관계를 나타내는 통계학적 결과의 p -값(p -value)의 크기가 5×10^{-3} 이하인 경우를 말한다.
- [0026] 본 발명의 키트는, 상기 SNP를 포함하는 10-100개의 연속 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함한다.
- [0027] 본 명세서에서, 용어 “뉴클레오타이드”는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 다르게 특별하게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*,

90:543-584(1990)).

- [0028] 본 명세서에서 사용되는 용어 “프라이머”는 올리고뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합제의 존재, 그리고 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용할 수 있다. 바람직하게는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드이며 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 프라이머는 타겟 핵산에 어닐링 되어 주형-의존성 핵산 중합효소에 의해 타겟 핵산에 상보적인 서열을 형성하는 연장 프라이머(extension primer)일 수 있으며, 이는 고정화 프로브가 어닐링 되어 있는 위치까지 연장되어 프로브가 어닐링 되어 있는 부위를 차지한다.
- [0030] 본 발명에서 이용되는 연장 프라이머는 타겟 핵산의 한 위치에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 용어 “상보적”은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다. 본 명세서에서, 프라이머 서열과 관련하여 사용되는 용어, “실질적으로 상보적인 서열”은 완전히 일치되는 서열뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 프라이머 역할을 할 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함되는 의미이다.
- [0031] 프라이머는, 중합제의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, 응용분야 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정되지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다. 용어 “어닐링” 또는 “프라이밍”은 주형 핵산에 올리고디옥시뉴클레오타이드 또는 핵산이 병치(apposition)되는 것을 의미하며, 상기 병치는 중합효소가 뉴클레오타이드를 중합시켜 주형 핵산 또는 그의 일부분에 상보적인 핵산 분자를 형성하게 한다.
- [0032] 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화 되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 상술한 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 이러한 프라이머의 디자인은 상술한 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 키트에는 분석하고자 하는 핵산 분자를 포함하는 다양한 인체 시료(예컨대, 조직, 혈액, 혈청 또는 혈장)가 적용될 수 있다.
- [0034] 본 명세서에서, 용어 “핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).
- [0035] 본 발명의 키트에서 출발물질이 gDNA인 경우, gDNA의 분리는 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)).
- [0036] 출발물질이 mRNA인 경우에는, 당업계에 공지된 통상의 방법에 총 RNA를 분리하여 실시된다(참조: Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Tesniere, C. et al., *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9:242(1991); Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons(1987); 및 Chomczynski, P. et al., *Anal. Biochem.* 162:156(1987)). 분리된 총 RNA는 역전사효소를 이용하여 cDNA로 합성된다. 상기 총 RNA는 인간(예컨대, 비만 또는 당뇨병 환자)으로부터 분리된 것이기 때문에, mRNA의 말단에는 폴리-A 테일을 갖고 있으며, 이러한 서열 특성을 이용한 올리고 dT 프라이머 및 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 용이하게 합성할 수 있다(참조: *PNAS USA*, 85:8998(1988); Libert F, et al., *Science*, 244:569(1989); 및 Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)).

- [0037] 본 발명의 키트에 있어서, 상기 SNP를 규명하는 것은 당업계에 공지된 다양한 방법을 응용하여 실시될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 응용될 수 있는 기술은, 직접적 DNA 서열결정, 서던 블롯 분석, 단일-가닥 컨퍼메이션 분석(SSCA, Orita et al., *PNAS, USA* 86:2776(1989)), RNase 보호 분석(Finkelstein et al., *Genomics*, 7:167(1990)), 닛트 블롯 분석, DNA 마이크로어레이, PCR, 실시간 PCR 및 대립형-특이 PCR을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 상술한 기술들 중 일부는, 본 발명의 SNP들을 포함하는 서열에 상보적인 프로브 또는 프라이머를 이용한다. 예를 들어, RNase 보호 분석에서, 본 발명의 SNP들을 포함하는 서열에 상보적인 리보프로브가 이용된다. 상기 리보프로브와 인간으로부터 분리한 DNA 또는 mRNA를 혼성화시키고, 이어 미스매치를 검출할 수 있는 RNase A 효소로 절단한다. 만일, 미스매치가 있어 RNase A가 인식을 한 경우에는, 보다 작은 밴드가 관찰된다. 혼성화 시그널을 이용하는 분석에서, 본 발명의 SNP를 포함하는 서열에 상보적인 프로브가 이용된다.
- [0039] 본 명세서에서, 용어 “프로브”는 특정 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 자연 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 선형의 올리고머를 의미한다. 바람직하게는, 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일가닥이다. 프로브는 바람직하게는 디옥시리보뉴클레오타이드이다.
- [0040] 본 발명에 이용되는 프로브로서, 상기 SNP를 포함하는 서열에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 바람직하게는, 본 발명에 이용되는 프로브는 본 발명의 SNP를 포함하는 10-30개의 연속 뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 서열에 혼성화될 수 있는 서열을 포함한다. 보다 바람직하게는, 상기 프로브의 3' -말단 또는 5' -말단은 상기 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 3' -말단 또는 5' -말단에 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는 프로브에서 말단 부분이 혼성화되지 않으면, 이러한 듀플렉스는 엄격한 조건에서 해제될 수 있다.
- [0041] 혼성화 방식에 의한 SNP 검출 또는 핵산 증폭 방식에 의한 SNP 검출에서, 혼성화(hybridization 또는 annealing) 과정이 관여된다. 혼성화에 적합한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시된 사항을 참조하여 결정할 수 있다. 혼성화에 이용되는 엄격한 조건(stringent condition)은 온도, 이온세기(완충액 농도) 및 유기 용매와 같은 화합물의 존재 등을 조절하여 결정될 수 있다. 이러한 엄격한 조건은 혼성화되는 서열에 의존하여 다르게 결정될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 키트가 PCR 증폭에 이용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus* (Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0043] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것(예컨대, 대사 이상 또는 당뇨병의 동정), 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.
- [0044] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단일염기다형성 부위를 가진 인간은 관상동맥에서 혈관병변의 중증도의 감소된 위험도를 나타낸다.
- [0045] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 관상동맥에서 혈관병변의 중증도의 감소된 위험도를 나타내는 인간은 상기 rs231150 SNP에서 AT 또는 TT의 유전자형을 갖는다.
- [0046] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 관상동맥에서 혈관병변의 중증도의 감소된 위험도를 나타내는 인간은 상기 rs1225006 SNP에서 AG 또는 GG의 유전자형을 갖는다.
- [0047] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 단일염기 다형성 부위를 가진 인간은 증가된 관상동맥질환 중

증도를 나타낸다. 보다 구체적으로는, 관상동맥질환은 부정맥, 고혈압, 뇌졸중, 동맥경화증, 죽상경화증, 협심증, 심근경색증 또는 심부전증이다.

[0048] 부정맥은 비정상적인 심장의 리듬으로 불규칙적이고, 너무 빠르거나 너무 느린 박동수를 나타낸다. 심장 전도계에 어떤 이상이 있어 심장박동이 불규칙하거나 가슴이 가만히 있어도 심장이 빨리 뛰거나 또는 너무 천천히 뛰는 상태를 부정맥이라 하는데, 이런 부정맥의 원인으로는 동맥경화증, 바이러스, 약물, 전해질이상, 알코올, 선천성 또는 각종 심장병이 있다.

[0049] 고혈압은 혈압이 올라가서 내려가지 않고 높은 상태가 계속되는 것으로 혈압을 쟀 때의 자세, 측정시간 및 계절, 운동, 정서 등 여러 가지 요인에 따라서 상당히 변동이 있을 수 있지만 고혈압이라고 하면 항상 높은 상태가 유지될 때를 말한다. 상세하게는 수축기 혈압이 120-139 mmHg 또는 이완기 혈압이 80-89 mmHg인 경우 직전고혈압, 수축기 혈압이 140-159 mmHg 또는 이완기 혈압이 90-99 mmHg인 경우 경증고혈압, 수축기 혈압이 160-179 mmHg 또는 이완기 혈압이 100-109 mmHg인 경우 경증중고혈압 및 수축기 혈압이 180 mmHg 이상 또는 이완기 혈압이 110 mmHg인 경우 중증고혈압으로 구분된다.

[0050] 뇌졸중은 뇌의 혈류장애로 발생하는 뇌의 손상을 말하는데 출혈성 뇌졸중, 혈전성 뇌졸중 및 색전성 뇌졸중으로 구분된다. 출혈성 뇌졸중은 뇌 실질 내 또는 뇌 및 두개골 사이에서 출혈이 발생하면 출혈 주위 혈관들이 경련에 의해 수축되고 주변 지역의 혈류량이 부족하게 되어 발생하는 뇌 손상을 말한다. 혈전성 뇌졸중은 뇌혈관 안에 생긴 혈전이 혈류를 막아 발생하는데, 보통 지방성분이 혈관벽에 들러붙는 동맥경화증에 의해 좁아진 동맥 안에서 발생한다. 색전성 뇌졸중은 혈전이나 작은 덩어리가 혈관을 따라 뇌로 이동하여 뇌혈관을 막아 발생하는데 보통 심장 내에서 느려진 혈류로 인해 생성된 혈전 때문에 발생한다. 이는 부정맥의 일종인 심방세동이나 심한 심부전으로부터 발생할 수 있다.

[0051] 동맥경화증은 동맥이 여러 이유로 그 내면에 지방질이 끼기 시작하고 점차 그 양이 많아지며, 동맥 내벽 역시 비정상적으로 계속 두꺼워져 동맥의 내경이 좁아지고, 탄력성을 잃는 증상을 말한다. 동맥경화증은 정상적인 노화 현상, 지질대사 이상이나 호르몬대사 이상, 유전적 요인, 식생활, 운동 부족 등 여러 가지 요인에 의해 발생하는데, 보통 한가지만의 원인이 아니라 여러 원인이 서로 겹쳐서 발생되며 구체적인 요인으로 고혈압, 고지혈증, 당뇨병, 흡연, 비만 스트레스 등이 있다.

[0052] 협심증은 심장 근육이 일시적으로 충분한 혈액을 공급받지 못하여 흉부압박감 또는 흉통을 느끼는 것으로 심장에 혈액을 공급하는 관상동맥이 부분적으로 좁아져 발생하는 관상동맥질환의 하나로 안정협심증, 불안정협심증 및 이형 협심증(프린즈메탈 협심증) 등으로 나눈다. 안정협심증은 동맥경화증 등이 주된 원인으로 운동을 하거나 과식할 때, 정서적으로 불안하거나 흥분상태에 있을 때 또는 겨울철 집안에 있다가 갑자기 찬 공기에 노출되었을 때 주로 통증이 나타난다. 불안정협심증은 쉬고 있거나 야간수면중에도 통증이 발생하거나 기존에 있던 흉통의 빈도나 강도가 점차 증가하는 것으로 심장마비의 위험이 있으므로 불안정협심증이 의심될 때에는 반드시 의사의 진찰 및 검사를 받고 적절한 조치를 취해야 한다. 이형협심증은 관상동맥이 경련처럼 수축하여 흉통이 발생하는 경우로 야간 수면중이나 새벽에 흉통이 발생하고 낮에 활동 중에는 괜찮은 경우가 많고 심근경색증, 돌연사의 원인이 될 수 있으며 흡연이 중요한 위험요인으로 남자에서 많이 발생한다.

[0053] 심근경색증은 심장으로 가는 혈액의 공급이 원활하지 못하게 되어 어느 순간 혈관이 혈전 등으로 완전히 막히면 피가 통하지 못하여 심장 근육의 일부분이 파괴되어 죽는 것을 말한다. 흔히 심장 마비로 급사하는 경우는 대개 심근경색증 때문이다. 심근경색증의 원인은 대부분 관상동맥경화증이며, 위험 인자로서 고혈압, 흡연, 당뇨병, 고지혈증, 비만증이 있다. 관상동맥이 동맥경화로 인하여 약 70%이상 막히게 되면 협심증이 생기고, 심하게 좁아진 부위에 혈전 등으로 꼭 막히게 되면 심근경색증이 유발된다.

[0054] 심부전증은 심장의 펌프작용이 저하되어 필요한 양의 혈액을 신체의 다른 기관에 내보내지 못하게 된 상태를 말하며, 많은 심장질환들이 심장의 수축능력과 이완능력에 장애를 일으켜 심부전을 일으킬 수 있다. 심부전은 보통 수년에 걸쳐 느리게 진행되며 심장이 점차적으로 펌프하는 능력을 잃게 된다. 심부전의 가장 흔한 원인은 고혈압이다.

[0055] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 관상동맥질환의 중증도의 진단 또는 예후에 필요한 정보를 제공하기 위하여 인간의 생물학적 시료에 있는 *TRPS1*(*Trichorhinophalangeal syndrome type 1*) 유전자의 단일염기다형성(SNP) 부위로서 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열의 481 번째 위치 및 *CPNE4*(*Copine-4*) 유전자의 단일염기다형성(SNP) 부위로서 서열목록 제4서열의 뉴클레오타이드 서열의 575 번째 위치로 구성되는 군으로 부터

선택되는 하나 이상의 단일염기다형성 부위를 검출하는 단계를 포함하는 관상동맥질환의 중증도 마커를 검출하는 방법을 제공한다.

[0056] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면 본 발명의 방법은 마이크로어레이 방식 또는 유전자 증폭 방식으로 실시된다. 보다 구체적으로는, 본 발명의 증폭은 PCR(polymerase chain reaction)에 따라 실시된다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 프라이머는 유전자 증폭 반응(amplification reactions)에 이용된다.

[0057] 본 명세서에 기재된 용어 “증폭 반응”은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에 보고되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(PCR)(미국 특허 제4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등(EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR)(17, 18), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-중재 증폭(transcription-mediated amplification; TMA)(19)(WO 88/10315), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication)(20)(WO 90/06995), 타겟 폴리뉴클레오티드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences)(미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction; CP-PCR)(미국 특허 제4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction; AP-PCR)(미국 특허 제5,413,909호 및 제5,861,245호), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification; NASBA)(미국 특허 제5,130,238호, 제5,409,818호, 제5,554,517호, 및 제6,063,603호), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification)(21, 22) 및 고리-중재 항온성 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)(23)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 사용 가능한 다른 증폭 방법들은 미국특허 제5,242,794, 5,494,810, 4,988,617호 및 미국 특허 제09/854,317호에 기술되어 있다.

[0058] PCR은 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있다. 예를 들어, PCR의 특이성 또는 민감성을 증진시키기 위해 전통적인 PCR 절차를 변형시켜 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR 및 부스터(booster) PCR이 개발되었다. 또한, 실시간(real-time) PCR, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 멀티플렉스 PCR, 인버스 중합효소 연쇄반응(inverse polymerase chain reaction: IPCR), 벡토레트(vectorette) PCR 및 TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR)이 특정한 응용을 위해 개발되었다. PCR에 대한 자세한 내용은 McPherson, M.J., 및 Moller, S.G. *PCR*. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, N.Y. (2000)에 기재되어 있으며, 그의 교시사항은 본 명세서에 참조로 삽입된다.

[0059] 본 발명의 방법을 프라이머를 이용하여 실시하는 경우에는, 유전자 증폭 반응을 실시하여 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열을 분석하여 진단한다. 본 발명은 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열을 검출하는 것이기 때문에, 분석 대상의 시료(예컨대, 게놈 DNA)에서 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열을 결정함으로써 조사하여 마커(즉, SNP)의 존재 여부를 결정할 수 있다.

[0060] 본 발명의 가장 구체적인 구현예에서, 증폭 과정은 미국특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,800,159호에 개시된 PCR(polymerase chain reaction)에 따라 실시된다.

[0061] 본 발명의 방법은 마이크로어레이 방식으로 실시될 수도 있다. 본 발명의 방법이 마이크로어레이 방식에 의하는 경우에는, 마이크로어레이의 고상표면에 프로브가 고정화 되어 있다.

[0062] 본 발명의 방법에서 이용되는 프로브는 상기 나열한 본 발명의 SNP들을 포함하는 각 유전자상의 10-100개의 연속 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열을 갖는다.

[0063] 프로브 제작 시 참조하여야 하는 본 발명 마커의 뉴클레오타이드 서열은 GenBank에서 확인할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 마커 중 하나인 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드는 GenBank SNP 데이터베이스 rs2071090, 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드는 GenBank SNP 데이터베이스 rs10500279에 뉴클레오타이드 서열이 개시되어 있으며, 이 서열을 참조하여 프로브를 디자인할 수 있다.

[0064] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 상기한 프로브는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기체(substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기체는 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 젤, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함한다. 상기한 혼성화 어레이 요소는 상기의 기체 상에 배열되고 고정화 된다. 이

와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 실시된다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기체에 결합될 수 있다.

[0065] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료 DNA는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화된다. 혼성화 조건은 다양하게 할 수 있다. 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.

[0066] 프로브의 표지는 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 이는 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 적합한 표지는 형광단(예컨대, 플루오리신 (fluorescein), 피코에리트린 (phycoerythrin), 로다민, 리사민 (lissamine), 그리고 Cy3와 Cy5 (Pharmacia)), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사능동위원소(P^{32} 및 S^{35}), 매스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스레디쉬 퍼옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 중금속(예컨대, 금) 그리고 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌과 킬레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 헵텐을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, 닉 트랜스레이션 (nick translation) 방법, 무작위 프라이밍 방법(Multiprime DNA labelling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법 (Maxam & Gilbert, *Methods in Enzymology*, 65:499(1986))을 통해 실시될 수 있다. 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.

[0067] 분석 대상이 되는 핵산 시료는 다양한 생시료(biosamples)에서 얻은 mRNA를 이용하여 제조할 수 있다. 프로브 대신에 분석 대상이 되는 cDNA를 표지하여 혼성화 반응-기초 분석을 실시할 수도 있다.

[0068] 프로브를 이용하는 경우, 프로브를 cDNA 분자와 혼성화시킨다. 본 발명에서, 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다. 예를 들어, 상기 엄격조건 중에서 고 엄격조건은 0.5 M $NaHPO_4$, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1 mM EDTA에서 65°C 조건으로 혼성화하고, 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 또는, 고 엄격조건은 6 x SSC/0.05% 소듐 파이로포스페이트에서 48°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 저 엄격조건은 예를 들어, 0.2 x SSC/0.1% SDS에서 42°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다.

[0069] 혼성화 반응 이후에, 혼성화 반응을 통하여 나오는 혼성화 시그널을 검출한다. 혼성화 시그널은 예컨대, 프로브에 결합된 표지(예컨대, 형광표지, 동위원소 표지 또는 효소 표지)의 종류에 따라 다양한 방법으로 실시할 수 있다. 본 발명의 SNP를 검출하는 방법을 혼성화에 기초하여 실시하는 경우에는, 구체적으로 (i) 본 발명의 SNP의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 프로브를 핵산 시료에 혼성화시키는 단계; (ii) 상기 혼성화 반응 발생 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 혼성화 과정에 의한 혼성화 시그널의 세기를 분석함으로써, 관상동맥질환의 중증도 여부를 판단할 수 있다. 즉, 시료에서 본 발명의 SNP의 뉴클레오타이드 서열에 대한 혼성화 시그널이 정상 시료보다 강하게 나오는 경우에는 관상동맥에서 혈관병변의 중증도의 감소된 위험도를 갖는다고 결정할 수 있다.

발명의 효과

[0070] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0071] (a) 본 발명은 전장유전체 연관성 연구에 의한 관상동맥질환의 병변 특징 또는 중증도와 관련된 변이체들을 동정한 후, 동정된 후보 변이체의 반복 지노타이핑을 수행하였다.

[0072] (b) 본 발명의 SNP 후보군 중 *TRPS1*의 rs231150 및 *CPNE4*의 rs125006는 관상동맥질환의 중증도와 연관되어 있

있음을 입증함으로써, 상기 본 발명의 SNP는 관상동맥질환에서 혈관병변의 중증도를 진단하는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 지역 그래프(regional plot)를 다섯 개의 SNP에 대한 HapMap phase II JPT+CHB에 기초하여 LocusZoom standalone version 1.1에 의하여 나타낸 도이다. rs1225006에 대해 가장 강한 결합 신호(-log P)를 다이아몬드로 표시하였다. 파란색바는 HapMap phase II release 22 JPT 및 CHB 집단에 기초한 재조합 비율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실험 재료 및 실험 방법

1. 연구 집단

본 발명자들은 2 단계의 접근방법을 이용하였다.

제1단계로, 전장유전체 연관성 연구에 의한 병변 특징 또는 관상동맥질환의 중증도와 관련된 변이체들 동정하였고, 제 2단계로, 동정된 후보 변이체의 반복 지노타이핑을 수행하였다.

발굴 세트(discovery set)는 한국에 관상동맥질환의 유전체 연구를 위하여 설립된 심혈관계질환 유전체 연구소(Genomics Research in Cardiovascular Disease, GenRIC) 콘소시움에 등록된 667명의 관상동맥질환 환자로 구성되어 있다. 55 미만의 남성 및 65세 미만의 여성이 본원 발명의 연구에 포함되었다. 상기 환자들은 흉부 불편감 또는 흉부통증으로 혈관조영술을 수행하였다. 관상동맥질환은 최소 하나의 심외막 관상동맥에서 유의한 협착증(50% 이상)을 보여주는 혈관조영술의 진찰소견을 기초로 하였다. 반복 연구에서, 837명의 연령 및 성별로 맞춘 관상동맥질환 환자들을 연세대학교 의료시스템에 있는 심혈관 계통 센터의 환자 환자 데이터베이스로부터 선별하였다. 선정 기준은 두 세트 모두 동일하였다. 본 발명은 의학연구윤리심의위원회에 의하여 승인되었고, 모든 환자들 또는 이들의 대리인의 동의를 서면으로 받았다.

2. 전장유전체 연관성 연구(Genome Wide Association Study, GWAS) 및 반복 지노타이핑(replication genotyping)

전장유전체 연관성 연구에서, 샘플을 Affymetrix Genome-Wide Human SNP array 6.0를 이용하여 지노타이핑을 하였다. 버드시드(BirdSeed) 지노타이핑 알고리즘을 유전형 분석에 이용하였다. 지노타이핑을 상술한 바와 같이 수행하였다.

간략해서, 샘플들을 NanoDrop ND-1000 분광광도계(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 상에서 순도, 수율 및 농도에 대한 분석을 수행하였고 1% 아가로오스젤 상에서 정제를 위하여 분리하였다. 순도는 A260/A280 및 A260/A230의 비율에 의하여 결정되었다. 전장유전체 연관성 연구 이후, 1.0×10^{-5} 미만의 p값을 갖는 추가적인 모델을 수득한 변이체를 반복연구를 위하여 선별하였다. 게놈 DNA를 5ml의 말초혈액 샘플로부터 상업적으로 이용가능한 키트(QuickGene SNP Kit DNA whole blood; Fujifilm, Tokyo, Japan)를 이용하여 추출하였다. 지노타이핑을 5 ' 엑스뉴클리에이즈(Taqman) 화학 반응을 이용하여 ABI Prism 7000(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 상에서 수행하였다.

3. 통계분석

기준치 인구통계학적 및 실험적 데이터를 연속적 변수들에 대해 평균 \pm 표준편차로 나타내었고, 별개의 변수들

에 대해서는 빈도로 나타내었다. 추가적인 모델은 SNP, 병변 특징 및 관상동맥질환 사이의 연관성을 연령 및 성별에 맞춘 로지스틱 회귀분석을 이용하여 조사하였다. 품질검사 기준을 통과한 일반적인 SNP(N = 542,675)를 분석하였다(Plink v1.07). 조합된 통계수치를 메타분석으로부터 R(version 3.0.2)값을 이용함으로써 고정 효과 모델을 가정하여 계산하였다.

지역 그래프를 다섯 개의 SNP에 대한 HapMap phase II JPT+CHB에 기초하여 LocusZoom standalone version 1.1에 의해 도시하였다(도 1). 검증력을 높이기 위해, 발굴 및 반복 세트를 변형 듀크 스코어(modified Duke score)를 이용하여 SNP의 연관성을 측정하기 위하여 조합하였다. 상기 스코어를 변이체와의 연관성을 평가할 때 낮음(42 이하) 또는 높음(42 초과)의 카테고리로 분류하였다. 연령, 성별, 체중비만지수 및 다른 혼잡 요소에 대한 조정 후, 연관성 분석을 위하여 다변량 로지스틱 회귀분석을 이용하였다. 오즈비(odds ratio, OR)를 측정하는 통계적 검증력은 Quanto version 1.2.4에 의해 계산되었다.

실험 결과

1. 연구집단의 임상적 특징

연구집단의 임상적 특징을 하기 표 1로 나타내었다.

표 1

연구집단의 임상적 특징

	발굴 세트(N=667)	반복 세트(N=853)	p
연령	49.9 ± 7.9	49.5 ± 7.6	0.35
남성	399 (59.8)	517 (60.6)	0.80
고혈압	306 (46.0)	462 (54.2)	0.001
당뇨병	143 (21.5)	249 (29.2)	0.001
고지혈증	101 (15.2)	237 (27.8)	<0.001
최근 흡연자	169 (24.2)	179 (21.0)	0.002
신체비만지수(kg/m ²)	25.1 ± 3.2	25.4 ± 3.3	0.79
관상동맥질환의 임상 상태			
안정협심증	222 (33.7)	272 (31.9)	
불안정협심증	197 (29.9)	277 (32.5)	
심근경색증	240 (36.4)	304 (35.6)	0.59
병변 특징			
비광범위	336(51.1)	417 (48.9)	
광범위	321(48.9)	436 (51.1)	0.21
질환혈관의 수			
단일	430(65.7)	331 (38.8)	
다수	224(34.3)	522 (61.2)	<0.001
변형 듀크 스코어 (Modified Duke score)	39.0 ± 1937	44.6 ± 20.6	<0.001

** 수치는 평균 ± 표준편차 또는 값(%)으로 나타내었고, 없어진 공변량은 제외하였다.

상기 표 1에 나타난 바와 같이, 발굴 세트의 평균연령은 49.9세이었고, 남성 환자는 발굴 세트 중의 60%로 구성되었다. 발굴 세트의 64 퍼센트는 급성관상동맥 증후군을 가졌고, 48%는 광범위 병변을 가졌으며, 34%는 다중혈관질환을 가졌다.

최근의 흡연자들은 상기 발굴 세트에서 보다 흔한 반면에 고혈압, 당뇨병, 고지혈증, 다중혈관질환 및 듀크 스코어(Duke score)의 유병률은 반복 세트에서 더 높았다.

2. 관상동맥질환의 병변 특성 및 중증도와 SNP의 연관성

상위 5개의 SNP의 병변 특성 또는 질환혈관의 수의 사이의 연관성을 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

SNP의 병변 특성 또는 질환혈관과의 연관성

염색체	SNP	유전자	게놈 위치 ^a	발굴 세트			반복 세트		조합 세트	
				위험성 유전자 좌위	OR (95%CI) ^b	p	OR (95%CI) ^b	p	OR (95%CI) ^b	p
병변 특징										
15	rs12917449	PML	72118712	C	2.22 (1.57-3.12)	5.58 x 10 ⁻⁶	1.02 (0.77-1.36)	8.87 x 10 ⁻¹	1.43 (1.15-1.79)	1.19 x 10 ⁻³
8	rs231150	TRPS1	116489503	A	0.55 (0.42-0.71)	6.37 x 10 ⁻⁶	1.19 (0.98-1.45)	8.21 x 10 ⁻²	0.84 (0.72-0.99)	3.58 x 10 ⁻²
15	rs10152898		72042174	T	2.17 (1.53-3.07)	1.52 x 10 ⁻⁵	0.95 (0.71-1.26)	7.03 x 10 ⁻¹	1.49 (1.18-1.86)	5.89 x 10 ⁻⁴
질환혈관의 수(단일 vs 다수)										
3	rs1225006	CPNE4	133108849	A	0.47 (0.34-0.65)	8.74 x 10 ⁻⁶	0.86 (0.66-1.11)	2.30 x 10 ⁻¹	0.65 (0.52-0.80)	4.88 x 10 ⁻⁵
2	rs6745588	STK39	1688664268	G	1.95 (1.44-2.64)	1.75 x 10 ⁻⁵	1.13 (0.87-1.47)	3.70 x 10 ⁻¹	1.45 (1.19-1.77)	3.01 x 10 ⁻⁴

** a: 게놈위치는 NCBI Build 37에 기초함; b: 연령 및 성별에 의해 조정됨; OR: 오즈비(odds ratio); CI: 신뢰구간

상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 15번 염색체에 있는 PML의 rs12917449의 열성 유전자위는 광범위 병변과 양성적인 연관성을 나타내었다(OR: 2.22, $p = 5.58 \times 10^{-6}$). rs10152898과 광범위 병변의 특성간의 연관성의 방향성 및 강도는 rs12917449 변이체와 유사한 반면에 또 다른 변이체인 8번 염색체에 있는 TRPS1의 rs231150는 광범위 병변과 음성적인 연관성을 나타내었다(OR: 0.55, $p = 6.37 \times 10^{-6}$).

2번 염색체에 존재하는 CPNE4의 rs1225006 변이체의 유전형은 다중혈관질환과 음성적인 연관성을 나타낸(OR: 0.47, $p = 8.74 \times 10^{-6}$) 반면에 2번 염색체에 있는 STK39의 rs6745588 변이체는 양성적인 연관성을 입증하였다(OR: 1.95, $p = 1.75 \times 10^{-5}$). 그러나, 상기 연관성의 어떤 것도 전장유전체 연관성 연구 유의수준에 도달하지 못하였다($p < 5 \times 10^{-8}$, 표 2 참고).

흥미롭게도, rs1225006 변이체는 높은 p값을 갖는 다수의 다른 SNP와 모여있었다(도 1). 반복 지노타이핑에서, 상술한 5개의 SNP 중 어떤 것도 광범위 병변 또는 다중혈관질환과 유의한 연관성을 나타내지 않았다.

3. 조합 분석

상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 발굴 세트 및 반복 세트의 조합 집단에서, 5개의 SNP 중 어떤 것도 병변 특성 또는 질환 혈관의 수와 유의하게 연관되어 있지 않았다. 그러나, SNP의 연관성을 분석한 일변량 로지스틱 회귀분석 및 변형 듀크 스코어는 낮은 스코어 그룹에서 rs231150, rs1225006 및 rs6745588의 유전형 빈도가 높은 스코어 그룹의 유전형 빈도와 상이하다는 것을 입증하였다. AA 유전형은 참고자료로서 이용하였고, rs231150의 AT 또는 TT 유전형은 변형 듀크 스코어와 음성적 연관성을 나타내었다.

[0102] 조합 세트에서 다섯 개의 SNP 및 변형 듀크 스코어간의 연관성을 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0103] SNP 및 변형 듀크 스코어간의 연관성

유전형	변형 듀크 스코어		일변량 분석		다변량 분석	
	낮음 (N = 859)	높음 (N = 658)	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p
rs12917449						
AA	657 (76.7)	487(74.1)	1.00	0.25	1.00	0.49
AG+GG	200 (23.3)	170(25.9)	1.15 (0.91.45)			
rs231150						
AA	338(40.1)	302(46.2)	1.00	0.01	1.00	0.03
AT+TT	504(59.9)	352(53.8)	0.78 (0.64.96)			
rs10152898						
GG	668(78.4)	495(75.7)	1.00	0.21	1.00	0.51
GT+TT	185(21.6)	159(24.3)	1.17(0.92149)			
rs1225006						
AA	550(64.3)	456(69.3)	1.00	0.04	1.00	0.01
AG+GG	202(35.7)	202(30.7)	0.80(0.640.96)			
rs6745588						
AA	601(70.2)	4285(65.1)	1.00	0.03	1.00	0.26
AG+GG	255(29.8)	230(34.9)	1.27(1.021.57)			

[0104] ** 스코어는 낮음(42 이하) 또는 높음(42 초과)로 정의하였고, CI는 신뢰구간을 나타내고, 각각의 SNP에 대하여 없어진 유전자형은 분석에서 제외함.

[0105] 상기 표 3에 나타낸 바와 같이, AA과 비교해서, rs125006의 AG 또는 GG 유전형은 스코어와 음성적 연관성을 보여주었다. 반대로, rs6745588의 AG 또는 GG를 갖는 환자는 스코어와 양성적 연관성을 보여주었다.

[0106] 다변량 로지스틱 회귀분석에서, rs231150 및 rs1225006의 유전형 분포는 변형 듀크 스코어와 유의하게 연관되어 있다는 것을 발견하였다. rs231150의 AT 또는 TT 유전형은 스코어와 음성적인 연관관계를 나타내었고(OR: 0.77, $p = 0.03$), rs1225006의 AG 또는 GG 유전형은 유사한 결과를 나타내었다(OR: 0.74, $p = 0.01$). 혼재 변수에 대한 하기의 수직값 및, rs6745588 유전형과 스코어간의 연관성은 더 이상 유의하지 않았다.

[0107] 4. 결론

[0108] 본 발명의 rs12917449(서열번호 1), rs231150(서열번호 2) 및 rs10152898(서열번호 3)의 SNP는 광범위 병변과 연관성이 있었고, rs1225006(서열번호 4) 및 rs6745588(서열번호 5)의 SNP는 다중혈관질환과 연관성이 있었다. 한편, GWAS에 의해 동정된 상기 5개의 SNP와 병변 특성 또는 관상동맥질환 중증도 사이의 상관성은 유의성이 없었다.

[0109] 그러나, 본 발명의 발굴 세트 및 반복 세트의 조합 집단의 분석에서, *TRPS1*의 rs231150 및 *CPNE4*의 rs125006의 유전자형은 변형 듀크 스코어, 즉 CAD의 중증도와 유의하게 연관되어 있음을 보여주었다.

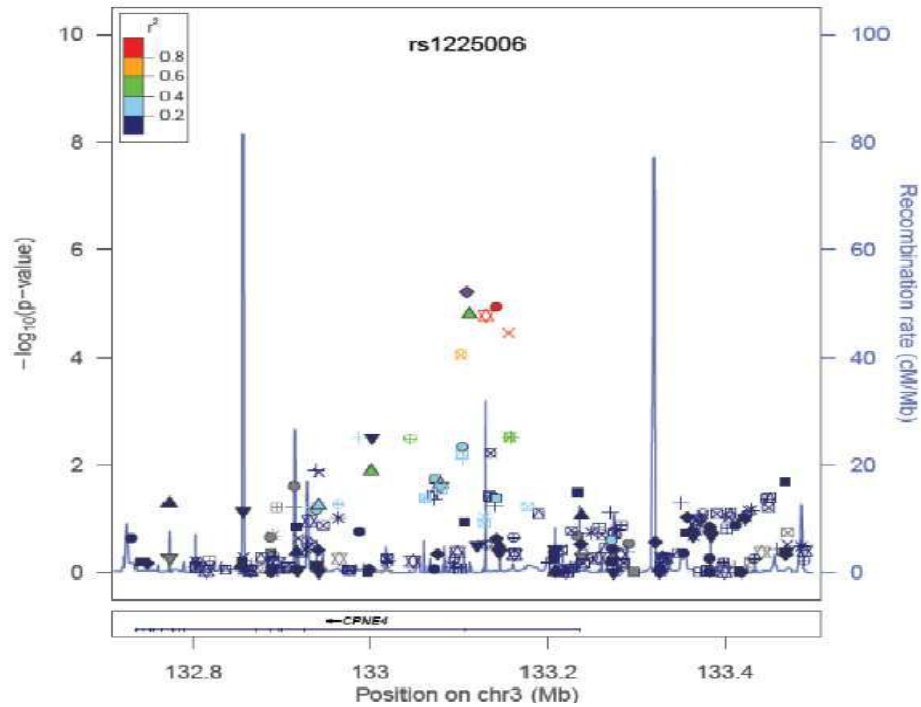
[0110] 결론적으로, 전장유전자 연관성 연구에 의하여 혈관병변의 특징과 동정된 5개의 SNP의 연관성은 반복연구에서 유의하지 않았다. 그러나, rs231150 및 rs1225006는 조합세트에서 관상동맥질환의 중증도와 연관되어 있었음을 나타낸다.

[0111] 상기 결과는 관상동맥질환의 위해도에서 rs231150 및 rs1225006의 변이체가 잠재적 임상적 효과를 갖는다는 것을

입증한 것이다.

도면

도면1



서열목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, Yonsei University
- <120> Genetic Variants associated with Severity of Coronary Artery Disease and Use Thereof
- <130> PN140261
- <160> 5
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 1001
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <220><221> gene
- <222> (1)..(1001)
- <223> TRPS1 SNP rs12917449
- <400> 1

cctcccttga gcttcacctg tgtcctaggg attcagtgag agactgtttg tgcaagaagg

60

agcgagagggc agcaggggcat agtcatgggg tggagcagtg agtccccag gcctggttgt	120
ggagtacctg gggtagggac tttgcttaaa aactgccaga gtgggtcagc agtgcgcctg	180
ccctggggccc cctgcttttag gatccaaagt ggaaaagata ggtgttttca cccactcttg	240
tgacagatta ctggctccgg tgccttggtg gcagcagcaa caggaggggg ccaaggtgag	300
ggggcagcct gtggcagaag tggcagtggg gacggcggag gaaggaggc ctgtggggaa	360
tggctgatcc aggggagggg ccgtggcact ggtgagtgtg catctgagaa aatgaaacgg	420
aggtgctggc caagaggctg gagctaggca gaagggcagc agaggccaca ggctggccga	480
gtttatggtc cagttcactc mtaacatgtg cagtattcct ggggtctttg aggctttgca	540
agagctgggg ttttgtgtct gcagaaagat agcaatgcat gtgtcttgcc aaactgatcc	600
cagctgtagc tgatgcttaa gtgctcagaa agttcttcag gagcttgagg gctcttgata	660
agcatgaatg tcagatgttc tgtatcttcc agaggctgga tgctgactat cagagtttgg	720
cttgtgtttg gctgatgagc aaacctggaa tgaatcagtg ataaggacaa ttgttctcaa	780
gctggctgta cactggggag ttttccaac tacagattcc taggtcctac gccctgagat	840
tctaatacga tcagtccttg gtgcagcctg ggctcagtt ttttcttaaa gctatgaatg	900
cctaacaaaa gtcaagaacc actgaatcgg gggattcatt gcatgtctgt ggtagaggaa	960
tgctgctcat ttgtttatag atgtggcagt cttgaatgca g	1001
<210> 2	
<211> 1001	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220><221> gene	
<222> (1)..(1001)	
<223> TRPS1 SNP rs231150	
<400> 2	
acattgcctc cagctgcaaa gcaagggcat tgccattatg aaagccctc aaagactctc	60
tgctattttc aaaacatgga aagaaaaagg gaaaaaagaa aaaaaataa taattagaag	120
gatttgttcc ttaatttggg ctcccaaaaa tgagaaatga agattgtata atgaggggag	180
atactaatta ttttaactc tccaagcaaa tcttctgaag caatcaatta tttatatact	240
ttatgttctg tctttttgta ttttcttc tggttaaaaa catgcaggtg agtcttgcca	300
acgtccttc ctatctggat ctgttctgcc tcatttctct ttcaaagtca tcttcaggg	360
aacttgcctt gattaatttg attttaacca aacaataag atatttgata tattaattta	420

aactttttga gatgattgat taggaattgc atcatgttca catgagtata ccgaattcaa 480
 agttaaaactt cataagcagg wgtttttaca catcgtaaca taatcattac ccaataactcg 540
 aactcaata ttgtatactc aactgaatgt ttttgaaata aacacatttt tatgttatct 600
 ctctggagaa agtagtatat atctttttac acaaaatata tcagtggagag agtgtttgtt 660

taagaaaaaa aatcaaagca caacaagttg agagagtcca ggctttatca atataagtaa 720
 taatttttta gaatggtgat ttgatttcac catttcaatt cagcagagcc tgtatatata 780
 tatatatata tatatatata tatatatata tatatatata tatatattac aatgatctgt 840
 atttcctatt gctagaagga tgaaagttaa tccatataaa ccataccaac gccgttatgt 900
 gtaactggtg gtaaaacttt attattcaag ttttagatgta acagacatct ttgctgcctg 960
 aagattgttt gcataagaaa tacaccaaga acatgtttgt g 1001

<210> 3

<211> 1001

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> gene

<222> (1)..(1001)

<223> TRPS1 SNP rs10152898

<400> 3

actgattcca ggactcctga aaataggaaa ccccgggcat gctcaagtcc ctgatataaa 60
 atagtgcagc gtttgcataat aaccaggca cataaccgc tctactttaa tttatctcta 120
 gattacttat gatccctaat ataatttaaa tgctatgtaa atcgttgtta tgctgtattg 180
 tttttatttg tatgtttttt attgttgtat tgttattttt ttcaatattt tttatctgtg 240
 tgttcactgt gcagttgggt gaatccgtgg atgtggaacc cgtagatacc gagggctgac 300
 tgtatttcat tctggtttaa attttcattt ccctagtac taacaatgtt gagcatgtgt 360

tcatgtggtt gtttgccagg atatctcttc ttgatgaaa tttctgttca gatcctttgc 420
 ccatttttaa ttgcttgggt tgtctcatta ttgagttgga agaattcttt atctattctg 480
 gatacaagtt attcatcagt katatgtttt gcaaatattt tttcccaatc tgtcgtttgt 540
 cttctcattt tttactagta ctttctaaag agcggaggtt ttttaattttg ataagagcca 600
 atttatcggg ttttttctt tttatgggct gtgttttttg tcctatctaa atcttaactt 660
 aaacaatgtc acaagattt tctgtaagca ctgcaataaa tggatccca tgagttttta 720
 ggactaagtt ctaatttttg attttgccta aatttctatc taagggatct agggagtcac 780

gccctacaaa tcctaaattc tcatcagatg ggttttatnt atatattgtg acttactttt 840
 caatctgact ctggtataac attacgagac aaggaaaaaa tattaaccc caaaatatat 900
 ttccttgcca tagcttgaaa ttgccctgca agtctcttgt gggaaaaatc cacattctat 960
 agagaatccc ctgccccctt tgttttctt ccttcctttc c 1001

<210> 4
 <211> 1792
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> gene
 <222> (1)..(1792)
 <223> CPNE4 SNP rs1225006
 <400> 4

actaatttcc caacacatat taaaaccaga attgcaactc tccaaaaacta caaatttccc 60

taacctaagg gaactgaggt tccttttacc taagggaact gaggttggt aacattttct 120
 gaagagggcc acataataaa ttttttaggc tttgtggtac ttgcaatctc tattgcaact 180
 actcaattct gccattgtag tgaaagcaac cgcagataaa tacataaata tataaatgaa 240
 taagcatgcc tgtgttccaa taaaacgcta ttggtgtgca ggagtgagtg tgtgtgcttg 300
 tgtgtgaaat acataaatat ataaatgaat aagcatgcct gtgttccaat aaaatgctat 360
 tgggtgtgatt gagtgtgtgt gtgtgtgtct gtgtgatgcg taatgctgag gcatagccat 420
 catcctgtaa aagaggtggc atgctgtact cagttaaacc tgggttagtg ctggtaccaa 480

ggggaagctc actaatatt tgtggaagaa ggggaaggaga gagagaggaa ttattcccat 540
 tttatagatg aagaaattcc actgcagagc accartgcca tgtgaggttg aggaagccat 600
 tgtcattttc cctaatgaat ctacaaagaa acagaattcc ataagcaagg tattgaattt 660
 tgctcctaag agaattttat acgttcagtc gtcttcagag aaggagagca ctgatggcct 720
 ctggtgggac actggggctc tgggatgcaa agtgttatta taaaggatat cacatggaga 780
 gcatttcttc atgtgttttt tggctgcata aatgtcttct tttgagaagt gtctgttcag 840
 gtccttcccc ccttttttga tggggttgtt tgtttttttc ttgtaaattt gtttgagttc 900

attgtagatc aaaaccacaa tgagatacca tctcacacca gttagaatgg caatcattaa 960
 aaagttagga aacaacaggt gctggagagg atgtggagaa ataggaacac ttttacttg 1020
 ttggtgggac tgtaaacatg ttcaaccatt gtggaagtca gtgtggcgat tcctcaggga 1080
 tctagaactg gaaataccat ttgacccagc catccattat ctgggtatat acccaaagga 1140
 ctataaatca tgctgctata aagacacatg cacacgtatg tttattgcgg cactattcac 1200

gatagcaaag acttggaaac aacccaaatg tccaacaatg atagactgga ttaagaaaat 1260
gtggcacata cacaccatgg aatactatgc agccataaaa aatgatgagt tcatgtcctt 1320

tgtagggaca tggatgaagc tggaaacat cattctcagt aaactatcgc aagaacaaaa 1380
aaccaaacac cgcgtgttct cactcaggtg ggaactgaac aatgagaaca catggacaca 1440
ggaagggcaa catcatactc tggggactgt tgtgggtgg ggggaggggg ggagggatag 1500
cattaggaga tataccta atgctaatgat gagttaatgg gtgcagcaca gcggcatggc 1560
acatgtatac atatgtaact aacctgcaca ttgtgcccat gtaccctaaa acttaaagta 1620
taataataat aaaacaaaaa aacaaaaaca aaataaaaaca aaacaaaaaca acaacaacaa 1680
aaaaaaacaa aaaataaaat aaaggatatc acatggaaat gggcaggggg cctgcagtgc 1740

ttaaagttag ctgctgttcc cacaagtcca gaataggaag ctttgtgctt tt 1792

<210> 5
<211> 1001
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> gene
<222> (1)..(1001)
<223> CPNE4 SNP rs6745588
<400> 5

gagaggtcag gtgtagggtg ccagctgaca tctcagttga ggtcccagca aatggctatc 60
tacaattgcc tccagccatg tgagtggcaa gccttgagaa gccaccagtc actcacaggt 120
acaacgcat gagagagccc atgcaaaggc tgcccagctc agcccagcca agcccagaa 180
ccaagagaga caataataaa atggctgttg ctgagctaag ccaataagtg atggggtgat 240

tattatgca gcaatagata atgatcatca atagtgaact aatacatcag agtgtttctt 300
aacatctaga gagcgaaatc accaatccaa acacaaaagg ggttgtagg ttgaagagtt 360
aatttcttg ttagcttttt attaatgttt attaccaagt ggctactttt atggtcccaa 420
gaagagtcct atggcttcat tccctaacta cttctaagaa aagaaagcta ttctggaaac 480
ctgggtattc ctgacatcta rttatcagaa agcttaaat ttaccatagt atttgtcaat 540
aacctcagct gtacctatag gggaccaaac ttttgacaat gtaagttaaa catacatgtt 600
tttcagggtg tgacaattca tacacttctt aacaccagtt tagagaaaat taatataatt 660

caagttatag aaaatcttgt cagtttact gaattgagaa taccaggttg atactgacct 720
tcagaatttc ttcattgtcac aataatttgg caatgcccat gtgcagtga caaaaagca 780

tgtttttagc agcataacaa aaacatacca gaaaaaaacc ataataggag acccaaattt	840
cacttcatag caacaatgca atttcaaaaa gttatgccag gcttgctact gagaaaactc	900
aagagacaag agtctccatt gcttttgaaa tggagaccca tctgtccagc ctatttcaag	960
tggaacaatt tgaaagtcaa agggccaaag acaggccaca t	1001