



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) **EP 1 348 761 A1**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:  
**01.10.2003 Patentblatt 2003/40**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C12N 9/64, C12Q 1/56**

(21) Anmeldenummer: **03005228.6**

(22) Anmeldetag: **10.03.2003**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR  
HU IE IT LI LU MC NL PT RO SE SI SK TR**  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
**AL LT LV MK**

(30) Priorität: **19.03.2002 DE 10212246  
16.08.2002 DE 10238429**

(71) Anmelder: **Aventis Behring GmbH  
35002 Marburg (DE)**

(72) Erfinder:  
• **Kiechl, Stefan  
6170 Zirl (AT)**

- **Willeit, Johann  
6020 Innsbruck (AT)**
- **Wiedermann, Christian Josef  
6020 Innsbruck (AT)**
- **Römisch, Juergen, Dr.  
2331 Vösendorf (AT)**
- **Weimer, Thomas  
35075 Gladenbach (DE)**
- **Feussner, Annette  
35043 Marburg (DE)**
- **Stoehr, Hans-Arnold  
35083 Wetter (DE)**
- **Doersam, Volker  
35041 Marburg (DE)**

(54) **Marburg I Mutante der Faktor VII aktivierenden Protease (FSAP) als Risikofaktor für arterielle Thrombose**

(57) Es wird ein neuer Risikofaktor für arterielle Thrombosen beschrieben, der aus besonders einer der identifizierten Mutanten der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease (=FSAP) besteht. Außerdem

werden diagnostische Bestimmungsmethoden zum Nachweis dieser als Risikofaktoren erkannten Mutante beschrieben.

**EP 1 348 761 A1**

**Beschreibung**

**[0001]** Die Erfindung betrifft Mutanten der den Faktor VII aktivierenden Protease (FSAP) sowie erniedrigte Blutplasmaspiegel des FSAP als Indikatoren eines erhöhten Risikos zur Entwicklung und Progression von Atherosklerose und der sich daraus ergebenden pathophysiologischen Folgeerscheinungen.

**[0002]** Atherosklerose ist eine krankhafte Veränderung der Arterien, die u.a. mit ihrer Verhärtung, Verdickung und Elastizitätsverlust verbunden ist und als die Hauptursache für Herzinfarkt und Hirnschlag sowie andere Erkrankungen anzusehen ist. Zahlreiche exogene und endogene Faktoren werden für die Auslösung und Förderung der Atherosklerose verantwortlich gemacht, zum Beispiel Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes, Toxine, Nikotin, exzessiver Alkoholenuss und Entzündungen. Diese Einflüsse werden als Risikofaktoren bezeichnet. Mit fortschreitender Anzahl von Studien und verbesserten analytischen Methoden sind jedoch in den letzten Jahren noch weitere Risikofaktoren für Atherosklerose ermittelt worden.

**[0003]** Risikofaktoren werden in epidemiologischen Studien untersucht, wie in der in Fachkreisen bekannt gewordenen Bruneck-Studie. Im Jahre 1990 wurden 1.000 Einwohner von Bruneck/Italien in diese Studie einbezogen. Ultraschall-Untersuchungen der Arteria carotis sowie Analysen einer Anzahl von Blutparametern und die Befragung der Probanden ermöglichte die Etablierung einer breiten Datenbasis für die weitere Verfolgung der Atherosklerose-Entstehung und -Progression. In Abständen von 5 Jahren wurden diese Untersuchungen an denselben Probanden fortgesetzt und analysiert. Hieraus wurde ein Modell der Atheroskleroseentstehung und ihrer Progression abgeleitet. Als ein erstes Ergebnis dieser Studie wurde ein Zusammenhang der Entstehung der Atherosklerose mit den bekannten, traditionellen Risikofaktoren wie der vorstehend genannte Hyperlipidämie und anderen Faktoren festgestellt. Erreicht der atherosklerotische Plaque jedoch ein Ausmaß, dass das Blutgefäß bereits bis zu 40% verschlossen wird, treten andere Risikofaktoren in den Vordergrund, die den weiteren Verlauf der Atherosklerose und des Gefäßverschlusses signifikant beeinflussen können. Zu diesen Faktoren zählen vor allem plasmatische Proteine, die in die Hämostase eingreifen. Hierzu trägt ein vermindertes gerinnungs-inhibitorisches Potential bei, z. B. verminderte Antithrombin- oder Protein C-Spiegel oder auch die sog. APC-Resistenz (aktiviertes Protein C). Deshalb kann die Verminderung des fibrinolytischen Potentials einen entscheidenden Einfluss auf die Progression des Gefäßverschlusses haben, wie es beispielsweise bei erhöhten Blutspiegeln des Lipoproteins (a) beobachtet wird.

**[0004]** Bisher sind vor allem Risikofaktoren von venösen Verschlusskrankheiten identifiziert worden, wie die APC-Resistenz (FV-Leiden), die eine sog. Odds-Ratio bei Heterozygoten für diese Mutation, also ein Maß für die Erhöhung des Risikos, von "8" hat, verglichen mit Probanden ohne eine APC-Resistenz. Im arteriellen Bereich hat dagegen dieser Risikofaktor nur eine Odds-Ratio von ungefähr "2".

**[0005]** Die aus der Bruneck-Studie zur Verfügung stehenden Plasmaproben und DNAs der Probanden wurden deshalb noch einmal auf das Vorhandensein anderer Atherosklerose-Risikofaktoren untersucht und dabei das besondere Augenmerk auf kürzlich aufgefundene Mutanten der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease (=FSAP) gerichtet, die im folgenden als FSAP Marburg I Mutation bezeichnet werden.

**[0006]** Aus der deutschen Patentanmeldung 199 03 693.4 ist eine aus dem Blutplasma isolierbare Protease bekannt, die den Blutgerinnungsfaktor VII aktivieren kann. Diese Protease wird auch als Faktor Sieben Aktivierende Protease (FSAP) bezeichnet (oder als PHBP oder PHBSP, entsprechend Plasma Hyaluronsäure-bindende (Serin-) Protease). Deshalb hat FSAP gerinnungsfördernde Eigenschaften. FSAP hat im Besonderen die Eigenschaft, Einketten-Plasminogen-Aktivatoren, wie die Prourokinase oder Einketten-Gewebe-Plasminogen-Aktivator (sct-PA), zu aktivieren. Allein oder in Kombination mit Plasminogen-Aktivatoren kann FSAP aber entsprechend auch zur Unterstützung der Fibrinolyse Anwendung finden, beispielsweise bei thrombotischen Komplikationen.

**[0007]** Die inzwischen zur Verfügung stehenden und in den deutschen Patentanmeldungen 199 03 693.4 und 199 26 531.3 beschriebenen Testsysteme ermöglichen nicht nur die Detektion von FSAP, sondern auch die Quantifizierung des FSAP-Antigengehaltes sowie die Bestimmung ihrer Aktivität im Plasma. Die Antigenbestimmung wird dabei vorzugsweise mittels eines ELISA-Tests durchgeführt. Die Aktivität dagegen kann prinzipiell durch Aktivierung von Prourokinase zur Urokinase und der Umsetzung eines chromogenen Substrats mit anschließender Differenzmessung der Extinktion gemessen werden.

**[0008]** Aus der deutschen Patentanmeldung 100 52 319.6 ist bekannt, dass durch Anwendung dieser Testsysteme bei Untersuchungen von gesunden Blutspendern 5 bis 10% Probanden identifiziert werden konnten, die bei einem durchschnittlichen FSAP Antigengehalt ein deutlich vermindertes Potential zur Aktivierung von Prourokinase aufwiesen. Da diese Eigenschaft auch für die isolierten, individuellen Proteasen zutrif, wurden die entsprechenden DNAs zur weiteren Untersuchung aus Blutzellen analysiert. Überraschenderweise konnte dabei besonders eine Mutation (single nucleotide polymorphism; SNP; G/A in Position 1601) identifiziert werden. Diese Modifikation führt im Protein zu einem Aminosäureaustausch Gly/Glu in der Position 511 des reifen Proteins oder in der Aminosäureposition 534 des FSAP-Proenzym einschließlich des Signalpeptides. Dieser Aminosäureaustausch hat zur Folge, dass FSAP die Fähigkeit zur Aktivierung von Prourokinase zu Urokinase verliert oder zumindest eine erhebliche Aktivitätseinbuße erleidet. Die vorstehend genannte Mutation, genannt FSAP Marburg I, wurde bisher in allen Proben gefunden, die bei

durchschnittlichem Antigengehalt eine verminderte Aktivität bei der Bildung von Urokinase aus Prourokinase aufweisen.

**[0009]** Mit Hilfe eines etablierten PCR-Tests für diese Mutation wurden die DNAs der in die Bruneck-Studie eingeschlossenen Probanden untersucht. Dabei wurden in 4,5% aller analysierten Proben die FSAP Marburg I-Mutation gefunden. Diese Befunde wurden dann mit den im Rahmen der Studie erhobenen individuellen Daten zur Bewertung von Atherosklerose-Entstehung und -Progression bewertet. Dabei wurde gefunden, dass die FSAP Marburg I-Mutation einen Risikofaktor für die Evolution und Progression der arteriellen Thrombose und Atherosklerose darstellt.

**[0010]** Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein Atherosklerose-Risikofaktor, der aus einer Mutante der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease (=FSAP) besteht. Ein besonders wichtiger Risikofaktor ist dabei offensichtlich die Mutante, bei der das FSAP Proenzym einschließlich des Signalpeptides an der Aminosäureposition 534 einen Gly/Glu-Austausch aufweist.

**[0011]** Die entsprechende DNA-Sequenz des FSAP-Proenzyms einschließlich des Signalpeptids zeigt dabei an der Nukleotidposition 1601 einen G/A-Basenaustausch.

**[0012]** Überraschenderweise korreliert diese Mutation mit einem erhöhten Risiko, besonders arterielle Thrombose zu entwickeln. Eine Odds-Ratio von "6,6" wurde dabei errechnet, also ein Risiko, das auf der arteriellen Seite vergleichbar ist mit dem Risiko der APC-Resistenz im venösen Bereich. Besonders überraschend ist dabei, dass diese Mutation einen unabhängigen Risikofaktor darstellt, also nach Abzug aller bisher bekannten Risikofaktoren einen eigenen, deutlichen Beitrag zur Entstehung und zur Progression der Atherosklerose leistet. Diese Erkenntnis und die Bestimmung besonders der FSAP Marburg I-Mutation kann deshalb die Chancen verbessern, Herzkrankheiten und atherosklerotisch bedingte Gefäßkrankheiten zu erkennen und zu behandeln. So tritt als Folge von Atherosklerose beispielsweise Angina pectoris auf, häufig gefolgt von Herzinfarkten. Abhängig davon, welche Gefäße betroffen sind, wird das durch dieses versorgte Organ in Mitleidenschaft gezogen. Im Fall der Arteria carotis hat dies eine Unterversorgung des Gehirns mit Nährstoffen und Sauerstoff zur Folge und kann im schlimmsten Fall zu einem Schlaganfall führen. Aber auch andere durch Atherosklerose betroffene Organe, die dem Risiko einer Gefäßverschlusskrankheit und den daraus sich ergebenden Folgen unterliegen, sind durch die FSAP Marburg I-Mutante betroffen. Daraus können sich Probleme bei Nieren-, Leber-, Lungen- und anderen Krankheiten ergeben.

**[0013]** Methoden zur Bestimmung der FSAP Marburg I-Mutante sind bereits in den vorstehend genannten deutschen Patentanmeldungen, vor allem in der deutschen Patentanmeldung 100 52 319.6 beschrieben. Diese Methoden schließen die Aktivitätsmessung der Protease ein, bevorzugt in Kombination mit einem FSAP Antigentest, sowie die Bestimmung der Nukleotidsequenz in dem mutierten Bereich durch geeignete Testsysteme.

**[0014]** Der erfindungsgemäße Atherosklerose-Risikofaktor kann somit als eine Mutante des FSAP beschrieben werden, die die Fähigkeit zur Aktivierung von Einketten-Plasminogen-Aktivatoren verloren hat oder bei der diese Fähigkeit zumindest beeinträchtigt ist. Insbesondere ist der Risikofaktor durch eine Mutante von FSAP gekennzeichnet, die die Fähigkeit zur Aktivierung von Prourokinase verloren hat oder bei der diese Fähigkeit vermindert ist. Eine genetisch bedingte Veranlagung zur Entstehung arterieller Atherosklerosen kann somit durch den Nachweis der vorstehend genannten Mutanten des FSAP erkannt werden. Insbesondere auch die Veranlagung zur Entstehung besonders arterieller Thrombosen sowie die Veranlagung zur Entstehung von atherosklerotischen oder thrombotischen Erkrankungen und deren Folgeerscheinungen wie arterielle und venöse Verschlusskrankheiten werden durch den Nachweis der genannten FSAP-Mutanten angezeigt. Die Veranlagung zur Entstehung von atherosklerotisch oder thrombotisch bedingten Einschränkungen von Organfunktionen ist eine häufige Ursache für Angina pectoris, Herzinfarkt oder Schlaganfälle. Typisch ist in allen Fällen, dass das Potential zur Aktivierung von Einketten-Plasminogen-Aktivatoren, insbesondere Potential zur Aktivierung von Prourokinase, reduziert ist. Die Reduktion dieses Aktivierungspotentials kann im Blut, vor allem aber im Plasma nachgewiesen werden.

**[0015]** Angesichts der großen Bedeutung der FSAP-Mutanten als Atherothrombose-Risikofaktoren kommen diagnostischen Verfahren zu ihrem Nachweis große Bedeutung zu. Sie beruhen darauf, dass man in den Körperflüssigkeiten des Spenders, insbesondere im Blutplasma, eine verminderte FSAP-Antigenkonzentration und/oder eine verminderte Aktivität von FSAP bestimmt. Dabei wird in den genannten Körperflüssigkeiten das Potential zur Aktivierung von Einketten-Plasminogen-Aktivatoren, insbesondere das Potential zur Aktivierung von Prourokinase, bestimmt.

**[0016]** Ein besonders zuverlässiges Verfahren besteht darin, dass hetero- oder homozygote Mutanten des FSAP-Proenzyms mit einem G/A-Basenaustausch an der Nukleotidposition 1601 durch Analyse der genomischen DNA des Spenders oder in einer davon abgeleiteten mRNA nachgewiesen werden.

**[0017]** Ebenso ist es aber auch möglich, die genannten FSAP-Mutanten auf der Proteinebene nachzuweisen. Hierfür eignet sich vor allem die Anwendung von spezifischen monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern. Schließlich stehen aber auch histologische Untersuchungsmethoden an Geweben oder in aus Geweben extrahierten Lösungen zur Verfügung.

**[0018]** Ein zuverlässiges diagnostisches Verfahren besteht darin, dass man eine Probe, die die FSAP Mutante(n) enthalten könnte, mit einem auf einem festen Träger fixierten ersten Antikörper inkubiert und danach wäscht, dann einen zweiten, markierten Antikörper oder einen gegen den Wildtyp gerichteten markierten Antikörper zugibt, abermals

auswäscht und das vom zweiten Antikörper hervorgerufene Signal misst.

[0019] Eine andere Methode besteht darin, das man eine Probe, die die FSAP Mutante(n) enthalten könnte, mit einem auf einem festen Träger fixierten ersten Antikörper gegen den Wildtyp inkubiert und danach wäscht, dann einen zweiten, markierten Antikörper zugibt, abermals auswäscht und das vom zweiten Antikörper hervorgerufene Signal misst.

[0020] Weiterhin steht ein Verfahren zur Verfügung, bei dem man auf einem Träger die auf das Vorliegen der FSAP Mutante(n) zu untersuchende Probe fixiert und sie mit einem markierten Antikörper allein oder in Mischung mit einem unmarkierten Antikörper und anschließendem Nachweis des markierten Antikörpers detektiert.

[0021] Schließlich kann man auch einen auf einem Träger fixierten Antikörper mit einer auf das Vorliegen der FSAP Mutante(n) zu untersuchenden Probe in Gegenwart einer markierten Mutante versetzen und das durch die Markierung hervorgerufene Signal messen.

[0022] Bewährt hat sich auch ein diagnostisches Verfahren, bei dem man die Aktivität der FSAP misst, indem man die die Protease enthaltende Probe an einem festen Träger inkubiert, an den zuvor gegen die Protease gerichteter Antikörper gekoppelt wurde und dann nach dem Auswaschen des freien Trägers die daran fixierte Protease mit Reagentien inkubiert, die deren Aktivitätsbestimmung erlauben.

[0023] Weiterhin stehen diagnostische Verfahren zur Verfügung, bei denen man Antikörper zur Detektion der Mutanten auf Westernblots zur Immunhistologie, das "fluoreszenz-activated Cell Sorting (FACS)" oder vergleichbare Methoden verwendet.

[0024] Vorzugsweise wird das erfindungsgemäße diagnostische Verfahren mit der ELISA-Technik durchgeführt. Dabei wird FSAP und/oder die FSAP-Mutante an eine Matrix gebunden, zum Beispiel an eine Mikrotiterplatte. Zur optimalen Präsentation des FSAP und/oder der FSAP-Mutante kann zuvor eine Beschichtung der Platte mit monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern oder deren  $F(ab')_2$  oder Fab' vorgenommen werden, um danach mit FSAP und/oder der FSAP-Mutante beladen zu werden. Da FSAP und die Mutante sehr gut an Dextransulfat, Heparin und ähnliche Substanzen binden, ist auch die vorherige Beschichtung mit diesen Agentien zur FSAP-Bindung möglich. Nach Waschen des Trägers oder der Mikrotiterplatte wird diese ggf. mit den hierfür bekannten Agentien wie Detergenz oder Albumin, blockiert, gewaschen und anschließend mit der zu testenden Lösung inkubiert. Bei den FSAP-Antikörpern enthaltenden Lösungen kann es sich um Blutserum, Plasma und andere Körperflüssigkeiten wie auch Synovialflüssigkeiten, Liquor, Speichel, Tränen, Seminalplasma oder auch Zelllysate handeln.

[0025] Nach Inkubation und Waschen des Trägers findet dann ein geeignetes Nachweisreagenz Verwendung. Die zur Detektion der verschiedenen Antikörperklassen wie IgG, IgM, IgA, IgE und den dazugehörigen Subklassen erforderlichen Testsubstanzen sind als markierte Reagentien im Handel erhältlich. Der Nachweis und die Quantifizierung des Antikörpertiters kann dann durch eine photometrische Bestimmung erfolgen, bei der die Extinktion gemessen wird, die durch die Spaltung eines chromogenen Substrats durch ein an den Anti-Human-Antikörper gekoppeltes Enzym bewirkt wird. Es ist aber auch möglich, die Fluoreszenz zu messen, die die mit dem zum Nachweis verwendeten Antikörper verbundene fluoreszierende Gruppe ausstrahlt. Schließlich ist es auch möglich, den Nachweis mit einer radiometrischen Messung durchzuführen, wenn die zur Detektion verwendete Substanz mit einer radioaktiven Gruppe markiert ist. Diagnostische Verfahren, bei denen die gebundenen Human-Antikörper mit einem markierten Anti-Human-Immunglobulin oder deren Fragmenten oder markierten Protein A oder Protein G inkubiert werden und bei denen das von der gebundenen, markierten Substanz ausgesendete Signal bestimmt wird, haben sich schon vielfach gut geeignet erwiesen.

[0026] Ebenso ist es möglich, die Antikörper durch eine photometrische Messung der Extinktion nachzuweisen, die durch die mit einem Enzym gekoppelten Anti-Human-Antikörper oder deren Fragmente oder Protein A oder Protein G durch Spaltung eines geeigneten chromogenen oder fluorogenen Substrats verursacht wird. Geeignet sind auch diagnostische Verfahren, bei denen man die Antikörper durch die Messung der Fluoreszenz nachweist, die von der mit fluoreszierenden Gruppen markierte gebundene Substanz verursacht wird.

### **Bruneck Studie**

[0027] Studienprobanden: Bei der Bruneck-Studie handelt es sich um eine prospektive Populationsuntersuchung, die darauf zielt, Epidemiologie und Ätiologie von Carotis-Atherosklerose zu erhellen (1-6). Die Studienpopulation wurde 1990 als nach Geschlecht und Alter geschichtete Stichprobe aller Einwohner von Bruneck im Alter von 40 bis 79 Jahren (aus den Altersdekaden 5 bis 8 jeweils 125 Frauen und 125 Männer, n=1000) rekrutiert. Insgesamt nahmen 93,6% teil, wobei 919 die Datenerhebung absolvierten. Während der Nachuntersuchungsperiode zwischen Sommer 1990 und 1995 (Quinquennium<sub>1</sub> - Q<sub>1</sub>) verstarb eine Untergruppe von 62 Individuen, während ein Proband verzog. Follow-up in der verbliebenen Population war zu 96,5% komplett (n=826) (1-3). Vor der Aufnahme in die Studie gaben alle Teilnehmer, nachdem sie über die Studie informiert worden waren, ihre Einwilligung. Als Teil der Nachuntersuchung 1995 wurden Blutproben für die DNA-Gewinnung entnommen. In 16 Fällen wurden keine zufriedenstellenden PCR-Produkte erhalten, d.h. für die Hauptanalyse verblieben 810 Männer und Frauen. Von diesen Probanden verstarben zwi-

schen Sommer 1995 und 2000 (Quinquennium<sub>2</sub> - Q<sub>2</sub>) 94. Insgesamt 675 Probanden wurden 2000 nochmals ultraschalluntersucht (Follow-up-Quote bei den Überlebenden 94,3%) (6).

**[0028]** Klinische Anamnese und Untersuchung: Zum Studienprotokoll gehörte eine klinische Untersuchung mit kardiologischen und neurologischen Schwerpunkten und standardisierten Fragebögen zur gegenwärtigen oder vergangenen Gefährdung durch potentielle Gefäßrisikofaktoren (3-5). Bei Rauchern und ehemaligen Rauchern wurde die pro Tag durchschnittlich gerauchte Anzahl an Zigaretten und die Packungsjahre festgehalten. Der Alkoholkonsum wurde als Gramm pro Tag quantifiziert und in vier Kategorien eingeteilt (3). Systolischer und diastolischer Blutdruck waren die Mittelwerte von drei Messungen, die jeweils nach  $\geq 10$  Minuten Ruhe gemessen wurden. Bluthochdruck wurde als ein Blutdruck von  $\geq 160/95$  bzw. Einnahme von blutdrucksenkenden Mitteln (WHO-Definition) definiert. Bei allen Probanden mit Ausnahme der vorbekannten Diabetiker wurde ein standardisierter oraler Glucosetoleranztest durchgeführt. Diabetes mellitus wurde bei denjenigen Probanden als vorliegend eingetragen, die Nüchternblutzuckerspiegel von  $\geq 140$  mg/dl (7,8 mmol/l) und/oder einen 2-Stunden-Wert (oraler Glucosetoleranztest)  $\geq 200$  mg/dl (11,0 mmol/l) aufwiesen.

**[0029]** Labormethoden: Nachdem die Probanden wenigstens 12 Stunden lang keine Nahrung zu sich genommen und nicht geraucht hatten, wurden aus der Ellenbeugenevene Blut entnommen (3-6). Gesamtcholesterin und Cholesterin mit Lipoprotein hoher Dichte wurden enzymatisch bestimmt (CHOD-PAP-Methode, Merck, Darmstadt, Deutschland), und Lipoprotein(a)-Konzentrationen wurden mit einem ELISA gemessen (Immuno, Wien, Österreich). Das Cholesterin mit Lipoprotein niedriger Dichte wurde über die Friedewald-Formel berechnet. Fibrinogen wurde gemäß der Methode von Claus und Antithrombin III mit einem chromogenen Assay gemessen. Die Leiden-Mutation des Faktors V wurde durch allelspezifische PCR-Amplifikation nachgewiesen (3).

**[0030]** FSAP-Antigenkonzentrationen und scuPA-aktivierende Wirkung wurden wie vor kurzem beschrieben bestimmt (7, 8). Kurz gesagt wurde ein ELISA mit monoklonalen Antikörpern (mAb) gegen FSAP zur Antigenquantifizierung verwendet. Der Assay auf Aktivität beinhaltete eine Immunadsorption an mit Antikörpern beschichteten Mikrotiterplatten, einen Waschschriff und die anschließende Aktivierung von Prourokinase durch FSAP, die durch photometrische Beobachtung der Amidolyse eines chromogenen Substrats für Urokinase quantifiziert wurde. Als willkürlicher Standard für beide Assays diente ein Plasmapool von mehr als 200 gesunden Blutspendern. Eine Plasmaäquivalenteinheit (PÄE) wurde als die in einem Milliliter des Plasmapools enthaltene FSAP-Antigenaktivität definiert, die im Durchschnitt 12  $\mu\text{g/ml}$  entspricht (8).

**[0031]** DNA-Extraktion und FSAP-Genotyping: Qualitativ hochwertige DNA wurde mit einem GenomicPrep Blood DNA Isolation Kit (Amersham Pharmacia Biotech) aus gefrorenem Vollblut erhalten. Zehn  $\mu\text{l}$  extrahierte DNA wurden in 100  $\mu\text{l}$  1x PCR-Standardreaktionspuffer mit 50 pmol des entsprechenden exonspezifischen Vorwärts- und Rückwärtsprimers, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTP und 2,5 Einheiten Taq-DNA-Polymerase (Perkin Elmer, Langen, Deutschland) amplifiziert; einer ersten 2minütigen Denaturierung bei 94°C folgten 35 Thermozyklen mit jeweils 30-Sekunden bei 94°C, 30 Sekunden bei 50°C und 40 Sekunden bei 72°C, woran sich ein abschließender Elongationsschritt von 5 Minuten bei 72°C anschloß. Die verwendeten Primer-Paare wurden vor kurzem ausführlich beschrieben.

**[0032]** Scanning-Protokoll und Definition der Ultraschall-Endpunkte: Bei der Ultraschalluntersuchung wurden A. carotis interna (bulböse und distale Abschnitte) und A. carotis communis (proximale und distale Abschnitte) beider Seiten mit einem 10-MHz-Schallkopf und einem 5-MHz-Doppler (1,2) gescannt. Atherosklerotische Läsionen wurden durch zwei Ultraschallkriterien definiert: 1) Wandoberfläche (Herausragen in das Lumen) und 2) Struktur der Wand (Echo-genität). In 16 Gefäßabschnitten wurde jeweils der maximale axiale Plaque-Durchmesser bestimmt (Intraobservationskoeffizient der Variation je nach Gefäßabschnitt 10% bzw. 15%). Die Dicke der Intima media wurde an den entfernt liegenden Wänden der A. carotis communis gemessen (Intraobservationskoeffizient der Variation 7,9% (n=100)) (2). Die Scans wurden in den Jahren 1990, 1995 und 2000 vom selben erfahrenen Ultraschallspezialisten durchgeführt, wobei dem Ultraschallspezialisten die klinischen Befunde und Laborwerte der Probanden nicht bekannt waren.

**[0033]** Das Entstehen von Atherosklerose war durch das Auftreten von neuen Plaques in zuvor normalen Abschnitten charakterisiert. Bei der Definition von entstehender Atherosklerose wurden Schwellenwerte von 0,7 mm (A. carotis communis) bzw. 1,0 mm (A. carotis interna) als Minimalanforderungen bezüglich der Plaquesdurchmesser eingeführt, da kleinere Läsionen schwer von fokalen/diffusen Wandverdickungen zu unterscheiden waren (1). Ein Fortschreiten von nicht-stenotischen Läsionen wurde als relative Vergrößerung des Plaque-Durchmessers von mehr als zweimal dem Meßfehler der Methode definiert (1). Bei der gegenwärtigen Analyse wurden die beiden Vorgänge zu einer einzigen Ergebniskategorie zusammengefaßt, die zur einfacheren Darstellung und aufgrund der Tatsache, daß bei diesen Vorgängen die meisten der beschriebenen Risikofaktoren gemeinsam vorlagen, als "frühe Atherogenese" bezeichnet wurde. Eine "fortgeschrittene Atherogenese" wurde immer dann angenommen, wenn das Fortschrittskriterium erfüllt wurde und das Lumen um  $> 40\%$  verengt war. Wie andernorts beschrieben (1-5), schien der Schnitt bei 40% einem biologischen Schwellenwert in unserer Population zu entsprechen, bei dem deutliche Änderungen in der Wachstumskinetik der Plaques (kontinuierliches, langsames und diffuses Wachstum kontra gelegentlichen und fokalen Expansionen prominenter Läsionen), bei den Risikoprofilen (gewöhnliche Risikofaktoren kontra Prokoagulationsrisikofaktoren) und beim Erneuerungsprozeß in den Gefäßen (kompensierend bzw. überkompensierend kontra unzureichend oder sogar

abwesend) auftraten, die indikativ für eine Umstellung der zugrundeliegenden pathogenen Mechanismen von gewöhnlicher Atherogenese zu Atherothrombose waren.

**[0034]** Die Reproduzierbarkeit der Ultraschallkategorien war "nahezu perfekt" (kappa-Koeffizienten von  $>0,8$ , erhalten aus zwei unabhängigen Messungen, die vom selben Ultraschallspezialisten in einer Stichprobe zur Reproduzierbarkeit von  $n = 100$  (1-3) durchgeführt wurde).

**[0035]** Statistische Analyse: Mögliche Assoziationen zwischen FSAP-Mutationen und den verschiedenen Atherogenesestadien wurden mittels logistischer Regressionsanalyse untersucht. Ein Basismodell wurde lediglich in bezug auf Alter und Geschlecht angeglichen. Multivariate Gleichungen wurden durch einen schrittweise fortschreitenden Selektionsvorgang angepaßt, wie bereits beschrieben (p-Werte für Aufnahme und Ausschluß 0,10 bzw. 0,15) (3, 10). Alter und Geschlecht wurden zusätzlich in diese Modelle eingeführt, um die Alters- und Geschlechtsstruktur der Stichprobe aus der Bevölkerung mit zu berücksichtigen. Die Hauptanalyse konzentrierte sich auf den Zeitraum zwischen 1990 und 1995 ( $Q_1$ ). Die Analyse bei fortgeschrittener Atherogenese beschränkte sich auf Probanden, die zu Beginn der Studie bereits an Atherosklerose litten ( $n=326$ ).

**[0036]** Die regressionsstandardisierten Atherogeneserisiken wurden für eine Reihe von Risikofaktoren berechnet. Zur Anwendung kam die Randmethode des Regressionsangleichungsverfahrens, da hierbei nicht von der Annahme seltener Krankheiten ausgegangen wird (11).

## ERGEBNISSE

**[0037]** Aus der Bruneck-Studienkohorte ( $n=810$ ) waren 36 Probanden heterozygot für die Marburg I Mutante von FSAP (17 Männer und 20 Frauen) und ein Proband war homozygot, was einer Gesamtträgerquote [95% VI] in der Allgemeinbevölkerung von 4,4% [3,0% bis 5,8%] entspricht. Eine Kosegregation der Marburg II Mutante (E370Q) von FSAP wurde in 16 der 37 Individuen (43 Prozent, 8 Männer und 8 Frauen) beobachtet, während bei den verbliebenen 21 Probanden (57 Prozent, 9 Männer und 12 Frauen) die Marburg I Mutante isoliert auftrat.

**[0038]** Plasmaproben einer Teilpopulation ( $n=82$ ) wurden auf FSAP-Antigenkonzentrationen und entsprechende prourokinase-aktivierende Wirkungen untersucht. Bei 76 Probanden mit Wildtyp-FSAP betrug die mittleren ( $\pm 2xSD$ ) Antigenkonzentrationen, Aktivitätskonzentrationen und Aktivitäts/Antigen-Verhältnisse 0,991 (0,552 bis 1,430) PÄE/ml, 1,036 (0,614 bis 1,458) PÄE/ml bzw. 1,07 (0,63 bis 1,51). Im Gegensatz dazu zeigten alle sechs Träger der Marburg I Mutante in dieser Untergruppe eine deutlich reduzierte in-vitro-Kapazität zur Aktivierung von Prourokinase ( $<0,150$  bis 0,626) und Aktivitäts/Antigen-Verhältnisse von 0,38 bis 0,58. Bei der Verteilung dieser Parameter in den beiden genetischen Gruppen gab es kaum eine Überschneidung.

**[0039]** Während der fünfjährigen Nachuntersuchungsperiode zwischen 1990 und 1995 ( $Q_1$ ) kam es bei insgesamt 384 der 810 Probanden in der Studie (47,4%) zur Entstehung neuer atherosklerotischer Läsionen bzw. zu einer Ausweitung nichtstenotischer Läsionen (frühe Atherogenese), und bei 92 von 326 Individuen (28,2%) mit bereits vorhandenen Plaques zeigten sich stenotische Transformationen (fortgeschrittene Atherogenese). Wie erwartet wurde kein Zusammenhang zwischen Marburg I Mutante und früher Atherogenese gefunden (alters-/geschlechtsangepaßt, multivariate Chancenverhältnisse [95% VI] von 0,6 [0,3 bis 1,4] bzw. 0,7 [0,3 bis 1,7]. Im Einklang damit gab es zwischen den Trägern von Wildtyp-FSAP (0,95 mm) und der Marburg I Mutante von FSAP (0,94 mm;  $P=0,853$  für die Differenz) keine Unterschiede bei der Dicke der Intima media der A. carotis communis. Es stellte sich jedoch heraus, daß die Mutante ein starker Risikofaktor für das fortgeschrittene putative Atherothrombosestadium bei der Atherogenese ist (alters-/geschlechtsangepaßtes Chancenverhältnis [95% VI] 3,5 [1,1 bis 11,4],  $P=0,036$ ). Der Zusammenhang blieb bei Anpassung des logistischen Regressionsmodells auf andere relevante Risikofaktoren statistisch signifikant (Tab. 1). Zum Risikoprofil für fortgeschrittene stenotische Atherosklerose gehörten ferner Diabetes, eine hohe Fibrinogenkonzentration, eine niedrige Antithrombinkonzentration, eine hohe Thrombozytenzahl, Rauchen, Alkoholkonsum (geringe Mengen protektiv), Lp(a)  $>0,32$  g/l und Leiden-Mutation des Faktors V. Bei den Risikofaktoren gab es keine geschlechtsspezifischen Unterschiede, und Belege für differentielle Wirkungen der Marburg I Mutante in nach Alter, Risikohöhe und Lebensgewohnheiten geordneten Teilpopulationen wurden nicht gefunden. Ein Ausschluß von Probanden, die Aspirin, Mittel gegen Bluthochdruck, Antidiabetika oder Lipidsenker einnahmen, beeinflusste die Ergebnisse ebenfalls nicht. Die regressionsstandardisierten Risiken fortgeschrittener Atherogenese für eine Reihe von Hauptrisikofaktoren (Marburg I Mutante, IGT/Diabetes, hohe Lipoprotein(a)-Konzentration, Rauchen, Faktor V Mutation, hohe Fibrinogenkonzentration und niedrige Antithrombinkonzentration) sind in Tabelle 2 angeführt. Bei Probanden mit keinem der Risikofaktoren bestand ein geringes Risiko für das Entstehen/Fortschreiten von Carotisstenose, während es bei Probanden mit einem Cluster von mehr als zwei Faktoren schon fast zwingend zu fortgeschrittener Atherogenese kam.

**[0040]** Die Marburg II Mutante hatte keine Wirkung auf die in-vitro-Aktivierung von Einketten-Plasminogen-Aktivatoren durch FSAP. Dementsprechend war es nicht unerwartet, daß in unseren Analysen kein Zusammenhang zwischen dieser Mutation und Atherogenese gefunden werden konnte. Beim Vergleich von Probanden mit Wildtyp-FSAP und Trägern der Marburg II Mutante, der Marburg I Mutante und Trägern beider genetischer Abweichungen betrug die

## EP 1 348 761 A1

multivariaten Chancenverhältnisse [95% VI] für fortgeschrittene Atherosklerose 1,6 [0,2 bis 13,7], P=0,669, 6,2 [1,1 bis 36,0], P=0,048, bzw. 7,1 [1,1 bis 45,1], P=0,037.

Zum Nachweis, daß unsere Befunde auch über längere Zeiträume konsistent sind, wurden die Berechnungen mit den Daten aus der zehnjährigen Nachuntersuchungsperiode zwischen 1990 und 2000 (Q<sub>1+2</sub>) wiederholt. Bei diesen Gleichungen war die multivariate Beziehung zwischen der Marburg I Mutante von FSAP und fortgeschrittener Atherosklerose (gleiche Anpassungen wie bei der ursprünglichen Analyse) wiederum statistisch signifikant (multivariates Chancenverhältnis [95% VI] 4,1 [1,1 bis 14,8], P=0,045).

Table 1.

Multivariate logistische Regressionsanalyse fortgeschrittener Atherogenese nach Alter, Geschlecht, Marburg I Mutante von FSAP und anderen potentiellen Gefäßrisikofaktoren					
Mittelwerte ± Standardabweichung / (%)					
Variable	AS - (n=234)	AS + (n=92)	Chancenverhältnis (95% VI)	P-Wert	Schritt
Alter, J	64,9±9,2	67,8±8,0	1,87 (1,19-2,92)	,0064	0
Weibliches Geschlecht	109 (46,6%)	32 (34,8%)	0,56 (0,25-1,25)	,1555	0
Glucosetoleranz				<,0001	1
IGT	20 (8,5%)	16 (17,4%)	3,31 (1,37-7,99)	,0081	
DM	10 (8,1%)	21 (22,8%)	6,38 (2,71-14,99)	<,0001	
Zigaretten/Tag	3,2±7,2	6,6±9,6	1,77 (1,30-2,40)	,0003	2
Lp(a)>0,32 g/l	36 (15,4%)	25 (27,2%)	4,06 (1,83-8,96)	,0005	3
Alkoholkonsum				,0043	4
<1 g/d	114 (48,7%)	42 (45,6%)	1,00		
1-50 g/d	60 (25,7%)	15 (16,3%)	0,26 (0,10-0,66)	,0046	
51-99 g/d	57 (15,8%)	17 (18,5%)	1,03 (0,40-2,70)	,9475	
≥100 g/d	23(9,8%)	18(19,6%)	1,90(0,63-5,69)	,2535	
Fibrinogen, g/l	2,7±0,6	2,9±0,6	1,53 (1,12-2,09)	,0083	5
<b>Marburg I FSAP Mutation</b>	<b>5(2,1%)</b>	<b>8(8,7%)</b>	<b>6,63 (1,58-27,72)</b>	<b>,0099</b>	<b>6</b>
Faktor V Mutation	5 (2,1%)	7 (7,6%)	4,70 (1,19-18,55)	,0291	7
Antithrombin III, %	96,3±13,0	92,8±16,4	0,74 (0,55-1,00)	,0500	8
Thrombozytenzahl, x10 <sup>9</sup> /l	217,4±56,5	230,3±56,6	1,32 (0,98-1,77)	,0769	9

**[0041]** Chancenverhältnisse (CV), 95% Vertrauensintervall (95% VI) und p-Werte (P) wurden aus der logistischen Regressionsanalyse von fortgeschrittener Atherosklerose (Entstehen/Fortschreiten von stenotischer Carotisatherosklerose) bezüglich Alter, Geschlecht und Gefäßrisikofaktoren abgeleitet. Das Modell wurde durch einen schrittweise fortschreitenden Selektionsvorgang angepaßt (Schritt... Eintrittsschritt). Die CV wurden für eine 1-SD Einheitveränderung gegebener Variablen berechnet. AS-: Gruppe ohne fortgeschrittene Atherogenese, AS+: Gruppe mit fortgeschrittener Atherogenese. Diese Analyse konzentrierte sich auf die 326 Probanden, die 1990 zu Beginn der Studie bereits an Atherosklerose

### LITERATURANGABEN

**[0042]**

1. Kiechl S, Willeit J. The natural course of atherosclerosis. Part I: incidence and progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1484-90.
2. Kiechl S, Willeit J. The natural course of atherosclerosis. Part II: vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1491-8.
3. Willeit J, Kiechl S, Oberhollenzer F, et al. Distinct risk profiles of early and advanced atherosclerosis. Prospective results from the Bruneck Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:529-37.

## EP 1 348 761 A1

4. Kiechl S, Egger G, Mayr M, et al. Chronic infections and the risk of carotid atherosclerosis. Prospective results from a large population study. *Circulation* 2001;103:1064-70.
5. Kiechl S, Willeit J, Egger G, Poewe W, Oberhollenzer F. Body iron stores and the risk of carotid atherosclerosis. Prospective results from the Bruneck Study. *Circulation* 1997;96:3300-7.
6. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis in humans. *N Engl J Med* 2002;347 (in press).
7. Roemisch J, Feussner A, Stohr HA. Quantitation of the factor VII- and single-chain plasminogen activator-activating protease in plasmas of healthy subjects. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2001;12:375-83.
8. Kannemeier C, Feussner A, Stohr HA, Weisse J, Preissner KT, Roemisch J. Factor VII and single-chain plasminogen activator-activating protease: activation and autoactivation of the proenzyme. *Eur J Biochem*. 2001;268:3789-96.
9. Roemisch J, Feussner A, Nerlich C, Stoehr HA, Weimer T. The frequent Marburg I polymorphism impairs the prourokinase activating potency of the factor VII-activating protease (FSAP). *Blood Coag Fibrinol* 2002; 13. in press.
10. Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied Logistic Regression*. New York: John Wiley & Sons, 1988.
11. Wilcosky TC, Chambless LE. A comparison of direct adjustment and regression adjustment of epidemiologic measures. *J Chron Dis* 1985;38:849-56.

### LEGENDE ZU DER ABBILDUNG

[0043] Abbildung 1: Die Abbildung zeigt die regressionsangepaßten Risiken fortgeschrittener Atherogenese als Funktion der bei einem Individuum vorhandenen Gefäßrisikofaktoren (Marburg I Mutante der Faktor VII aktivierenden Protease, IGT/Diabetes, Lipoprotein(a)-Konzentration >0,32 g/l, Rauchen, Leiden-Mutation des Faktors V, Fibrinogenkonzentration (Q<sub>5</sub>, >3,2 g/l) und Antithrombinkonzentration (Q<sub>1</sub>, <84%)).

### Patentansprüche

1. Atherosklerose-Risikofaktor, **dadurch gekennzeichnet, dass** er aus einer Mutante der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease (=FSAP) besteht.
2. Risikofaktor nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Mutante des FSAP-Proenzymen einschließlich des Signalpeptides an der Aminosäureposition 534 einen Gly/Glu-Austausch aufweist.
3. Risikofaktor nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Mutante der DNA-Sequenz des FSAP-Proenzymen einschließlich des Signalpeptides an der Nukleotidposition 1601 einen G/A-Basenaustausch aufweist.
4. Risikofaktor nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Mutante von FSAP die Fähigkeit zur Aktivierung von Einketten-Plasminogen-Aktivatoren verloren hat oder diese vermindert ist.
5. Risikofaktor nach den Ansprüchen 1 und 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Mutante von FSAP die Fähigkeit zur Aktivierung von Prourokinase verloren hat oder diese vermindert ist.
6. Risikofaktor nach den Ansprüchen 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** er insbesondere eine genetisch bedingte Veranlagung zur Entstehung arterieller Atheroskerosen anzeigt.
7. Risikofaktor nach den Ansprüchen 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** er eine genetisch bedingte Veranlagung zur Entstehung von Thrombosen, insbesondere arterieller Thrombosen anzeigt.
8. Risikofaktor nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** er die Veranlagung zur Entstehung von atherosklerotischen oder thrombotischen Erkrankungen und deren Folgeerscheinungen wie arterielle und venöse Verschlusskrankheiten anzeigt.
9. Risikofaktor nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** er die Veranlagung zur Entstehung von atherosklerotisch oder thrombotisch bedingten Einschränkungen von Organfunktionen anzeigt.
10. Risikofaktor nach den Ansprüchen 8 und 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** er die Veranlagung zur Entstehung von Angina pectoris, Herzinfarkt oder Schlaganfällen anzeigt.

## EP 1 348 761 A1

11. Atherosklerose-Risikofaktor, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Potential zur Aktivierung von Einketten-Plasminogen-Aktivatoren, insbesondere Prourokinase, reduziert ist,
- 5 12. Atherosklerose-Risikofaktor nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Potential zur Aktivierung von Einketten-Plasminogen-Aktivatoren, insbesondere Prourokinase, durch eine erniedrigte FSAP-Konzentration im Blut, vor allem im Plasma, reduziert ist.
- 10 13. Diagnostisches Verfahren zur Erkennung einer genetisch bedingten Veranlagung zum Entstehen von Atherosklerose oder einer Bildung von Thrombosen, **dadurch gekennzeichnet, dass** man in Körperflüssigkeiten des Spenders, insbesondere im Blutplasma, eine verminderte FSAP-Antigenkonzentration oder eine verminderte Aktivität von FSAP bestimmt.
- 15 14. Diagnostisches Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet, dass** man in Körperflüssigkeiten des Spenders das Potential zur Aktivierung von Einketten-Plasminogen-Aktivatoren bestimmt.
- 20 15. Diagnostisches Verfahren nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet, dass** man in Körperflüssigkeiten des Spenders das Potential zur Aktivierung von Prourokinase bestimmt.
- 25 16. Diagnostisches Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet, dass** hetero- oder homozygote Mutanten des FSAP-Proenzym mit einem G/A-Basenaustausch an der Nukleotidposition 1601 durch Analyse der genomischen DNA des Spenders oder in der davon abgeleiteten mRNA nachgewiesen werden.
- 30 17. Diagnostisches Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet, dass** man die Mutanten auf der Proteinebene nachweist.
- 35 18. Diagnostisches Verfahren nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet, dass** man die Mutanten durch Anwendung von spezifischen monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern nachweist.
- 40 19. Diagnostisches Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Mutanten durch histologische Untersuchungen an Geweben oder in aus Geweben extrahierten Lösungen nachgewiesen werden.
- 45 20. Diagnostisches Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet, dass** man
- 50 a) eine Probe, die den Risikofaktor enthalten könnte, mit einem auf einem festen Träger fixierten ersten Antikörper inkubiert und danach wäscht, dann einen zweiten, markierten Antikörper oder einen gegen den Wildtyp gerichteten markierten Antikörper zugibt und abermals auswäscht und das vom zweiten Antikörper hervorgerufene Signal misst oder
- 55 b) eine Probe, die den Risikofaktor enthalten könnte, mit einem auf einem festen Träger fixierten ersten Antikörper gegen den Wildtyp inkubiert und danach wäscht, dann einen zweiten, markierten Antikörper zugibt und abermals auswäscht und das vom zweiten Antikörper hervorgerufene Signal misst oder
- c) auf einem Träger die auf das Vorliegen des Risikofaktors zu untersuchende Probe fixiert und sie mit einem markierten Antikörper allein oder in Mischung mit einem unmarkierten Antikörper und anschließendem Nachweis des markierten Antikörpers detektiert oder
- d) einen auf einem Träger fixierten Antikörper mit einer auf das Vorliegen des Risikofaktors zu untersuchende Probe in Gegenwart einer markierten Mutante versetzt und das durch die Markierung hervorgerufene Signal misst.
21. Diagnostisches Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet, dass** man die Aktivität der FSAP misst, indem man die
- die Protease enthaltende Probe an einem festen Träger inkubiert, an den zuvor ein gegen die Protease gerichteter Antikörper gekoppelt wurde, und
  - nach Auswaschen des freien Trägers die daran fixierte Protease mit Reagenzien inkubiert, die deren Aktivitätsbestimmung erlauben.

## EP 1 348 761 A1

22. Diagnostisches Verfahren nach den Ansprüchen 13 bis 21, **dadurch gekennzeichnet, dass** man Antikörper zur Detektion der Mutanten auf Western Blots zur Immunhistologie, fluoreszenz-aktivierte Cell Sorting (FACS) oder vergleichbaren Methoden verwendet.

5 23. Testsystem zur Durchführung diagnostischer Verfahren nach den Ansprüchen 13 bis 22.

10 24. Diagnostisches Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen die den Faktor VII aktivierende Protease (=FSAP) und/oder gegen eine durch den Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren gebildete Mutante der FSAP, **dadurch gekennzeichnet, dass** man eine Probe, die die Antikörper enthalten könnte, auf die an einen festen Träger fixierte FSAP und/oder FSAP-Mutante einwirken lässt, danach wäscht und die an die Protease(n) gebundenen Antikörper nachweist.

15 25. Diagnostisches Verfahren nach Anspruch 24, **dadurch gekennzeichnet, dass** die gebundenen Human-Antikörper mit einem markierten anti-Human-Immunglobulin oder deren Fragmenten oder markierten Protein A oder Protein G inkubiert werden und das von der gebundenen, markierten Substanz ausgesendete Signal bestimmt wird.

20 26. Diagnostisches Verfahren nach Anspruch 24, **dadurch gekennzeichnet, dass** man die Antikörper durch eine photometrische Messung der Extinktion nachweist, die durch die mit einem Enzym gekoppelten anti-Human-Antikörper oder deren Fragmente oder Protein A oder Protein G durch Spaltung eines geeigneten chromogenen oder fluorogenen Substrates verursacht wird.

25 27. Diagnostisches Verfahren nach Anspruch 24, **dadurch gekennzeichnet, dass** man die Antikörper durch eine Messung der Fluoreszenz nachweist, die von der mit einer fluoreszierenden Gruppe markierte, gebundene Substanz verursacht wird.

30 28. Diagnostisches Verfahren nach Anspruch 24, **dadurch gekennzeichnet, dass** man die Antikörper durch eine radiometrische Messung der mit einer radioaktiven Gruppe markierten, gebundene Substanz nachweist.

35

40

45

50

55

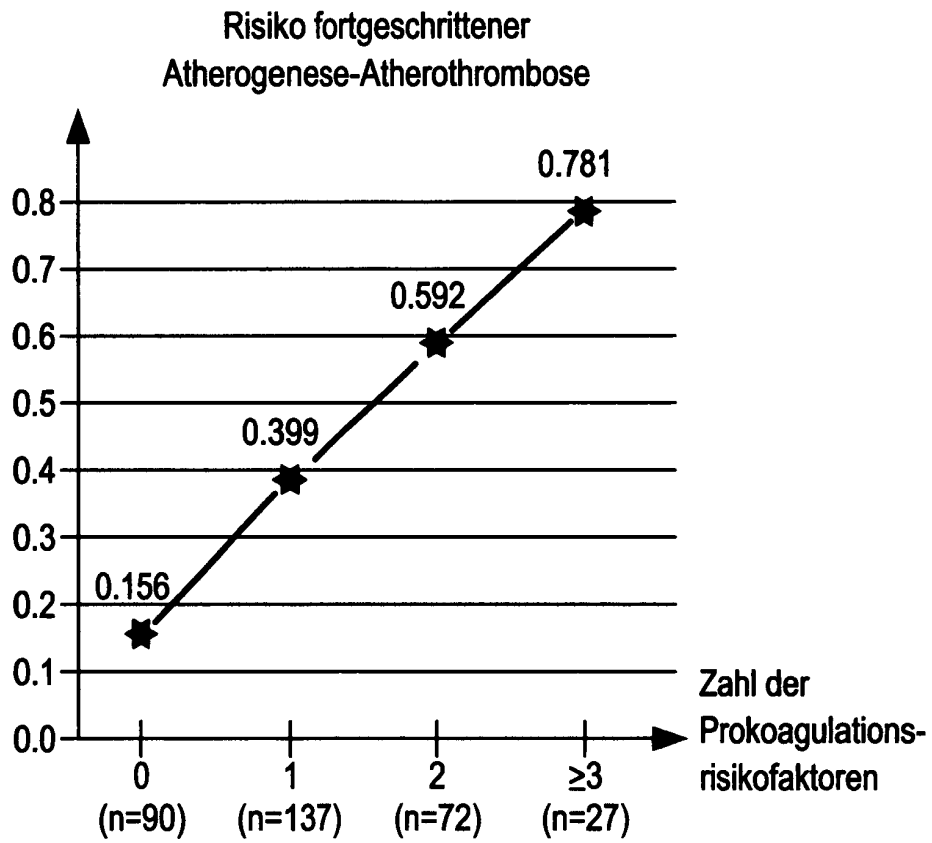


Fig. 1



Europäisches  
Patentamt

**EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT**

der nach Regel 45 des Europäischen Patent-  
übereinkommens für das weitere Verfahren als  
europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung

EP 03 00 5228

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
X	ROEMISCH J ET AL: "Quantitation of the factor VII- and single-chain plasminogen activator-activating protease in plasmas of healthy subjects." BLOOD COAGULATION & FIBRINOLYSIS, Bd. 12, Nr. 5, Juli 2001 (2001-07), Seiten 375-383, XP009013812 ISSN: 0957-5235 * das ganze Dokument * ---	1,4-15, 17-28	C12N9/64 C12Q1/56
X	EP 1 059 359 A (AVENTIS BEHRING GMBH) 13. Dezember 2000 (2000-12-13) * Seite 2, Zeile 29 - Zeile 41 * * Seite 3, Zeile 22 - Zeile 37; Abbildung 1; Beispiel 3 * --- -/--	13,21,23	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
			C12N
UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE			
<p>Die Recherchenabteilung ist der Auffassung, daß ein oder mehrere Ansprüche, den Vorschriften des EPÜ in einem solchen Umfang nicht entspricht bzw. entsprechen, daß sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik für diese Ansprüche nicht, bzw. nur teilweise, möglich sind.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Unvollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Nicht recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Grund für die Beschränkung der Recherche: Siehe Ergänzungsblatt C</p>			
Recherchenort <b>MÜNCHEN</b>		Abschlußdatum der Recherche <b>18. Juli 2003</b>	Prüfer <b>Strobel, A</b>
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument &amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			

EPO FORM 1503 03 82 (P04C09)



Vollständig recherchierte Ansprüche:  
1-10,12-28

Unvollständig recherchierte Ansprüche:  
11

Grund für die Beschränkung der Recherche:

Der geltende Patentanspruch 11 bezieht sich auf ein Produkt, das durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft charakterisiert ist, nämlich ein Potential zur Aktivierung von Einketten-Plasminogen-Aktivatoren. Der Patentanspruch umfasst daher alle Produkte etc., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 83 EPÜ nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlt dem Patentanspruch die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 84 EPÜ geforderte Klarheit, weil in ihm versucht wird, das Produkt über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, dass er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend einen Atherosklerose-Risikofaktor, der aus einer Mutante von FSAP besteht, wie in der Beschreibung dargestellt (Bruneck-Studie, Seite 10-18).



Europäisches  
Patentamt

EUROPÄISCHER  
TEILRECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 03 00 5228

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	
A	<p>CHOI-MIURA N H ET AL: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL HYALURONAN-BINDING PROTEIN (PHBP) FROM HUMAN PLASMA: IT HAS THREE EGF, A KRINGLE AND ASERINE PROTEASE DOMAIN, SIMILAR TO HEPATOCYTE GROWTH FACTOR ACTIVATOR" JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, JAPANESE BIOCHEMICAL SOCIETY, TOKYO, JP, Bd. 119, Nr. 6, 1996, Seiten 1157-1165, XP000960750 ISSN: 0021-924X * Zusammenfassung; Abbildung 6 * * Seite 1164, linke Spalte, Absatz 1 - Absatz 2 *</p>	1-12	
	---		RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
A	<p>CHOI-MIURA NAM-HO ET AL: "Proteolytic activation and inactivation of the serine protease activity of plasma hyaluronan binding protein." BIOLOGICAL &amp; PHARMACEUTICAL BULLETIN, Bd. 24, Nr. 5, Mai 2001 (2001-05), Seiten 448-452, XP002248254 ISSN: 0918-6158 * Zusammenfassung * * Seite 451, linke Spalte, Absatz 2 - Seite 451, rechte Spalte *</p>	1-12	
	---		
		-/--	





Europäisches  
Patentamt

EUROPÄISCHER  
TEILRECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 03 00 5228

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	
P,X	ROEMISCH JUERGEN: "Factor VII activating protease (FSAP): A novel protease in hemostasis." BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 383, Nr. 7-8, Seiten 1119-1124, XP009013814 ISSN: 1431-6730 * das ganze Dokument * ---	1-28	
P,X	ROEMISCH J ET AL: "The frequent Marburg I polymorphism impairs the pro-urokinase activating potency of the factor VII activating protease (FSAP)." BLOOD COAGULATION & FIBRINOLYSIS, Bd. 13, Nr. 5, Juli 2002 (2002-07), Seiten 433-441, XP009013813 July, 2002 ISSN: 0957-5235 * Zusammenfassung * * Seite 436, linke Spalte, Absatz 3 - Seite 440, linke Spalte, Absatz 1; Abbildung 1; Tabellen 1,2 * -----	1-28	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 03 00 5228

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

18-07-2003

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 1059359 A	13-12-2000	DE 10023923 A1	14-12-2000
		AU 3941000 A	14-12-2000
		CA 2311479 A1	10-12-2000
		EP 1059359 A2	13-12-2000
		JP 2001029098 A	06-02-2001
		US 2003124622 A1	03-07-2003
-----			

EPO FORM P0461

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

专利名称(译)	Marburg I因子VII活化蛋白酶 ( FSAP ) 的突变体是动脉血栓形成的危险因素		
公开(公告)号	<a href="#">EP1348761A1</a>	公开(公告)日	2003-10-01
申请号	EP2003005228	申请日	2003-03-10
申请(专利权)人(译)	AVENTIS BEHRING GMBH		
当前申请(专利权)人(译)	杰特贝林GMBH		
[标]发明人	KIECHL STEFAN WILLEIT JOHANN WIEDERMANN CHRISTIAN JOSEF ROMISCH JUERGEN WEIMER THOMAS FEUSSNER ANNETTE STOEHR HANS ARNOLD DOERSAM VOLKER		
发明人	KIECHL, STEFAN WILLEIT, JOHANN WIEDERMANN, CHRISTIAN JOSEF RÖMISCH, JUERGEN, DR. WEIMER, THOMAS FEUSSNER, ANNETTE STOEHR, HANS-ARNOLD DOERSAM, VOLKER		
IPC分类号	G01N33/53 C12N9/64 C12N15/09 C12Q1/37 C12Q1/68 G01N21/76 G01N21/77 G01N21/78 G01N33/543 G01N33/573 G01N33/577 G01N33/86 C12Q1/56		
CPC分类号	C12N9/647 G01N33/86		
优先权	10212246 2002-03-19 DE 10238429 2002-08-16 DE		
其他公开文献	EP1348761B1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

用于诊断动脉粥样硬化的遗传易感性的风险因子 ( RF1 ) 包括凝血因子 VII活化蛋白 ( FSAP ) 中的突变。以下还包括以下独立权利要求：( 1 ) 动脉粥样硬化的危险因素 ( RF2 ) ，其激活单链纤溶酶原激活剂 ( A ) ，特别是尿激酶原的激活可能性降低；( 2 ) 通过检测体液，尤其是血浆，降低FSAP抗原浓度或降低FSAP活性，识别发生动脉粥样硬化或血栓形成的遗传依赖性倾向；( 3 ) 方法 ( 2 ) 的测试系统；( 4 ) 通过将测试样品与FSAP和/或其突变体结合的固相孵育，然后洗涤并检测结合的抗体，确定针对FSAP和/或其突变体的抗体。

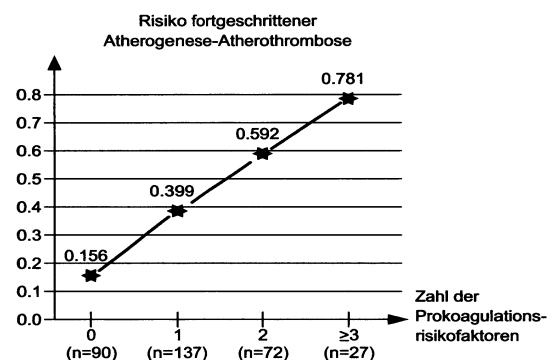


Fig. 1