



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년03월23일
 (11) 등록번호 10-1719376
 (24) 등록일자 2017년03월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *C07K 16/22* (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2011-7010284
 (22) 출원일자(국제) 2009년11월05일
 심사청구일자 2014년11월04일
 (85) 번역문제출일자 2011년05월04일
 (65) 공개번호 10-2011-0081836
 (43) 공개일자 2011년07월14일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2009/063434
 (87) 국제공개번호 WO 2010/054110
 국제공개일자 2010년05월14일
 (30) 우선권주장
 61/111,667 2008년11월05일 미국(US)
 61/174,856 2009년05월01일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 Brantley Milam A et al., Ophthalmology,
 Vol.114(12), pp.2168-2173 (2007. 12.)
 Brantley Milam A et al., American Journal of
 Ophthalmology, Vol.144(3), pp.404-408 (2007.
 8. 29.)
 WO2006062716 A1

(73) 특허권자
제넨테크, 인크.
 미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
 쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
 (72) 발명자
그레이햄, 로버트 알.
 미국 94118 캘리포니아 샌 프랜시스코 맥켈리스터
 스트리트 2001 넘버 씨240
베렌스, 티모시 더블유.
 미국 94010 캘리포니아 벨링게임 팜 드라이브
 1133
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
양영준, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 신원혜

(54) 발명의 명칭 **연령-관련 황반 변성에서 유전자 다형성**

(57) 요약

환자에서 습성 AMD가 발생할 수 있는 위험이 증가되는지, 및 환자가 고친화성 항-VEGF 항체를 사용하는 치료법으
 로부터 유익함을 얻을 가능성이 증가되는지를 결정하는 방법.

(72) 발명자

이안출레브, 손트초

미국 94123 캘리포니아 샌 프랜시스코 필모어 스트리트 3721.

샤피로, 하워드

미국 80220 콜로라도 덴버 매그놀리아 스트리트 1170

명세서

청구범위

청구항 1

습성 AMD 환자로부터 단리된 샘플을 rs17611에 상응하는 C5 보체 성분 유전자 (C5) I802V 대립유전자 중의 게놈 다형성에 대하여 스크리닝하는 것을 포함하며, 여기서 상응하는 유전자형이 AA 또는 AG를 포함하는 경우, 상기 환자는 고친화성 항-VEGF 항체를 사용하는 치료법으로부터 유익함을 얻을 가능성이 증가되는 것인, 습성 AMD 환자가 고친화성 항-VEGF 항체를 사용하는 치료법으로부터 유익함을 얻을 가능성이 증가되는지를 예측하기 위해 요구되는 정보를 제공하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항-VEGF 항체가 하이브리도마 ATCC® HB 10709에 의해 생산된 모노클로날 항-VEGF 항체 A4.6.1과 동일한 에피토프에 결합하는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 항-VEGF 항체가 하기 중쇄 상보성 결정 영역 (CDR) 아미노산 서열: CDRH1 (GYDFTHYGMN; 서열 1), CDRH2 (WINTYTGEPITYAADFKR; 서열 2) 및 CDRH3 (YPPYYGTSHWYFDV; 서열 3)을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 하기 경쇄 CDR 아미노산 서열: CDRL1 (SASQDISNYLN; 서열 4), CDRL2 (FTSSLHS; 서열 5) 및 CDRL3 (QQYSTVPWT; 서열 6)을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 갖는 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 항-VEGF 항체가 Y0317의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 갖는 것인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항-VEGF 항체가 라니비주맙인 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상응하는 유전자형이 AA를 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상응하는 유전자형이 AG를 포함하는 것인 방법.

청구항 8

습성 AMD 환자가 rs17611에 상응하는 C5 I802V 대립유전자 중의 A/G 다형성에 대하여 특이성을 갖는 제1 올리고뉴클레오티드 및 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하는 항-VEGF 항체를 사용하는 치료법으로부터 유익함을 얻을 가능성이 증가되는지를 예측하는 키트.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 제1 올리고뉴클레오티드 및 상기 제2 올리고뉴클레오티드를 사용하여 I802V C5 대립유전자 중의 A/G 다형성을 포함하는 C5 유전자의 일부를 증폭시킬 수 있는 것인 키트.

청구항 10

환자로부터 단리된 샘플을 rs17611에 상응하는 C5 I802V 대립유전자 중의 게놈 다형성에 대하여 스크리닝하는 것을 포함하며, 여기서 상응하는 유전자형이 대립유전자 T (ile)를 포함하는 경우, 환자에서 AMD가 발생할 수 있는 가능성이 증가되는 것인, 개체에서 습성 AMD 또는 GA를 동반한 건성 AMD가 발생할 수 있는 가능성이 증가되는지를 예측하기 위해 요구되는 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 35 USC 119(e) 하에 2008년 11월 5일에 출원된 미국 가출원 제61/111,667호, 및 2009년 5월 1일에 출원된 미국 가출원 제61/174,856호 (상기 문헌의 내용이 본원에서 참고로 인용된다)에 대한 이점을 주장한다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 일반적으로 인간 질환의 치료법에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 습성 연령-관련 황반 변성 (AMD)에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] AMD는 노인들에게 있어 중증의 비가역적인 시력 상실을 일으키는 주된 원인이 된다 (문헌 [Bressler (2004) JAMA 291:1900-01]). 드루젠으로 알려져 있는 열은 황색 반점, 망막 색소 상피 (RPE) 파괴, 맥락막 혈관신생 (CNV), 및 원반 황반 변성을 비롯한, 매우 광범위한 스펙트럼의 임상적 및 병적 소견을 특징으로 한다. 본 질

환의 소견은 2가지 형태로 분류된다: 비-삼출형 (건성) 및 삼출형 (습성 또는 혈관신생). 최근에는 습성 AMD를 치료하기 위한 수개의 요법-베르테포르핀 (비쥬다인(Visudyne)®); VEGF-결합 압타머인 페가타닙(마큐젠 (Macugen)®); 및 항-VEGF 항체 단편인 라니비주맙 (루센티스(Lucentis)®)을 사용하는 광역학적 요법이 승인을 받은 상태이다.

[0006] 유전자 다형성은 개체군 중에서 특정 유전자에서의 상이한 대립유전자가 질환 발생 또는 진행 및 치료 약물에 대한 반응을 비롯한 상이한 표현형을 야기할 경우에 생긴다. AMD의 발생 또는 진행과 관련된 다중 다형성이 확인된 바 있다 (예로서, 문헌 ([Despriet et al. (2007) *Arch. Ophthalmol.* 125:1270-71]; [Seddon et al. (2007) *JAMA* 297: 1793-99, 2585]; [Boon et al. (2008) *Am. J. Human Genet.* 82:516-23])). 종래 연구를 통해 보체 인자 H (CFH) 유전자 중 아미노산 위치 402에서의 특정 다형성이 베르테포르핀을 사용하는 PDT 또는 AMD를 위한 FDA 승인 없이 처방된(off-label) 베바시주맙 요법에 대한 반응과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다 (문헌 ([Brantley et al. (2008) *Eye* published online 22 February, pp. 1-6]; [Brantley et al. (2007) *Ophthalmology* 114:2168-73])). 특정 요법에 대한 효능 또는 안전성을 예측할 수 있는 다형성 확인을 사용함으로써 상기 요법으로부터 최상의 유익함을 얻고자 하는 환자들에게 더 나은 맞춤 요법을 제공할 수 있다.

발명의 내용

[0007] **발명의 요약**

[0008] 본 발명은 부분적으로는 AMD 위험을 예측하거나, 또는 고친화성 항-VEGF 항체를 사용하는 치료법이 AMD 환자에게 유익함을 줄 수 있는 가능성이 증가되는지를 예측하는, 유전자 다형성을 확인하는 것을 기초로 한다.

[0009] 한 측면에서, 본 발명은 습성 AMD 환자로부터 단리된 샘플을 rs1061170에 상응하는 보체 인자 H 유전자 (CFH) Y402H 대립유전자 중의 게놈 다형성에 대하여 스크리닝하는 것을 포함하며, 여기서 상응하는 유전자형이 CC 또는 CT를 포함하는 경우, 상기 환자는 고친화성 항-VEGF 항체를 사용하는 치료법으로부터 유익함을 얻을 가능성이 증가되는 것인, 습성 AMD 환자가 고친화성 항-VEGF 항체를 사용하는 치료법으로부터 유익함을 얻을 가능성이 증가되는지를 예측하는 방법을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 습성 AMD 환자로부터 단리된 샘플을 rs17611에 상응하는 C5 보체 성분 유전자 (C5) I802V 대립유전자 중의 게놈 다형성에 대하여 스크리닝하는 것을 포함하며, 여기서 상응하는 유전자형이 AA 또는 AG를 포함하는 경우, 상기 환자는 항-VEGF 항체를 사용하는 치료법으로부터 유익함을 얻을 가능성이 증가되는 것인, 습성 AMD 환자가 항-VEGF 항체를 사용하는 치료법으로부터 유익함을 얻을 가능성이 증가되는지를 예측하는 방법을 제공한다. 추가의 또 다른 측면에서, 본 발명은 습성 AMD 환자로부터 단리된 샘플을 rs10490924에 상응하는 HrtA 세린 프로테아제 1 (HTRA1) A69S 대립유전자 중의 게놈 다형성에 대하여 스크리닝하는 것을 포함하며, 여기서 상응하는 유전자형이 GT를 포함하는 경우, 상기 환자는 항-VEGF 항체를 사용하는 치료법으로부터 유익함을 얻을 가능성이 증가되는 것인, 습성 AMD 환자가 항-VEGF 항체를 사용하는 치료법으로부터 유익함을 얻을 가능성이 증가되는지를 예측하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 추가로 환자를 항-VEGF 항체로 치료하는 단계를 포함한다.

[0010] 일부 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 하이브리도마 ATCC® HB 10709에 의해 생산된 모노클로날 항-VEGF 항체 A4.6.1과 동일한 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 하기 중쇄 상보성 결정 영역 (CDR) 아미노산 서열: CDRH1 (GYDFTHYGMN; 서열 1), CDRH2 (WINTYTGEPITYAADFKR; 서열 2) 및 CDRH3 (YPYYGTSHWYFDV; 서열 3)을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 하기 경쇄 CDR 아미노산 서열: CDRL1 (SASQDISNYLN; 서열 4), CDRL2 (FTSSLHS; 서열 5) 및 CDRL3 (QQYSTVPWT; 서열 6)을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 Y0317의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 라니비주맙이다.

[0011] 또 다른 측면에서, 본 발명은 습성 AMD 환자가 rs1061170에 상응하는 CFH Y402H 대립유전자 중의 C/T 다형성에 대하여 특이성을 갖는 제1 올리고뉴클레오티드 및 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하는 라니비주맙을 사용하는 치료법으로부터 유익함을 얻을 가능성이 증가되는지를 예측하는 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드를 사용하여 CFH Y402H 대립유전자 중의 C/T 다형성을 포함하는 CFH 유전자의 일부를 증폭시킬 수 있다.

[0012] 또 다른 측면에서, 본 발명은 습성 AMD 환자가 rs17216529에 상응하는 C5 I802V 대립유전자 중의 A/G 다형성에 대하여 특이성을 갖는 제1 올리고뉴클레오티드 및 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하는 항-VEGF 항체를 사용하는 치료법으로부터 유익함을 얻을 가능성이 증가되는지를 예측하는 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 올리고

뉴클레오티드를 사용하여 C5 I802V 대립유전자 중의 A/G 다형성을 포함하는 CFH 유전자의 일부를 증폭시킬 수 있다.

[0013] 또 다른 측면에서, 본 발명은 습성 AMD 환자가 rs10490924에 상응하는 *HTRA1 A69S* 대립유전자 중의 G/T 다형성에 대하여 특이성을 갖는 제1 올리고뉴클레오티드 및 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하는 항-VEGF 항체를 사용하는 치료법으로부터 유익함을 얻을 가능성이 증가되는지를 예측하는 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드를 사용하여 *HTRA1 A69S* 대립유전자 중의 G/T 다형성을 포함하는 CFH 유전자의 일부를 증폭시킬 수 있다.

[0014] 또 다른 측면에서, 본 발명은 환자로부터 단리된 샘플을 rs17216529에 상응하는 C5 I145V 대립유전자 중의 게놈 다형성에 대하여 스크리닝하는 것을 포함하며, 여기서 상응하는 유전자형이 GG 또는 AG를 포함하는 경우, 상기 환자에서 AMD가 발생할 수 있는 가능성이 증가되는 것인, 개체에서 AMD가 발생할 수 있는 가능성이 증가되는지를 예측하는 방법을 제공한다.

[0015] 또 다른 측면에서, 본 발명은 환자로부터 단리된 샘플을 rs17611에 상응하는 C5 I802V 대립유전자 중의 게놈 다형성에 대하여 스크리닝하는 것을 포함하며, 여기서 상응하는 유전자형이 대립유전자 T (ile)를 포함하는 경우, 환자에서 AMD가 발생할 수 있는 가능성이 증가되는 것인, 개체에서 습성 AMD 또는 GA를 동반한 건성 AMD가 발생할 수 있는 가능성이 증가되는지를 예측하는 방법을 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] **바람직한 실시양태에 관한 상세한 설명**

[0017] 달리 명시하지 않는 한, 본 발명의 실시는 당업계에 포함되어 있는, 분자 생물학 (제조합 기법 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학, 및 면역학의 종래 기법을 사용할 것이다. 그러한 기법은 예로서, 문헌 ([*"Molecular Cloning: A Laboratory Manual"*, second edition (Sambrook et al., 1989)]; [*"Oligonucleotide Synthesis"* (M. J. Gait, ed., 1984)]; [*"Animal Cell Culture"* (R. I. Freshney, ed., 1987)]; [*"Methods in Enzymology"* (Academic Press, Inc.)]; [*"Current Protocols in Molecular Biology"* (F. M. Ausubel et al., eds., 1987), 및 정기 갱신판]); [*"PCR: The Polymerase Chain Reaction"*, (Mullis et al., eds., 1994)])에 상세히 설명되어 있다.

[0018] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 당업계의 숙련인에게 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 문헌 ([Singleton et al., *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, N. Y. 1994)], 및 [March, *Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure* 4th ed., John Wiley & Sons (New York, N. Y. 1992)])은 당업자에게 본 출원에서 사용된 많은 용어들에 대한 일반적인 지침을 제공한다.

[0019] 특허출원 및 공개문헌을 비롯한, 본원에서 인용된 모든 참조문헌은 그 전문이 참고로 인용된다.

[0020] **정의**

[0021] 본원에서 사용되는 바, 단수형 ("a," "an" 및 "the")라는 것은 문맥에서 달리 명확히 기술되지 않는 한, 복수의 의미를 포함한다. 예를 들어, "하나의" 세포는 또한 "세포들"을 포함할 것이다.

[0022] "포함하는"이라는 용어는 조성물 및 방법이 언급된 요소들을 포함하지만, 다른 요소들을 배제하지는 않음을 의미하는 것으로 의도된다.

[0023] "VEGF" 및 "VEGF-A"라는 용어는 165-아미노산 혈관 내피 세포 성장 인자 및/또는 관련 121-, 189- 및 206-아미노산 혈관 내피 세포 성장 인자(문헌 ([Leung et al. *Science*, 246:1306 (1989)] 및 [Houck et al. *Mol. Endocrin.*, 5:1806 (1991)])에 기재된 바와 같다)와 함께 천연적으로 발생된 대립유전자 및 그의 가공 형태를 지칭하는데 상호교환적으로 사용된다.

[0024] "항-VEGF 항체"는 충분한 친화성도 및 특이성으로 VEGF에 결합하는 항체이다. 바람직하게, 본 발명의 항-VEGF 항체는 VEGF 활성이 관여하는 질환 또는 병증을 표적화하고 간섭하는 치료제로서 사용될 수 있다. 항-VEGF 항체는 통상 다른 VEGF 상동체, 예컨대, VEGF-B 또는 VEGF-C, 또는 다른 성장 인자, 예컨대, PIGF, PDGF 또는 bFGF에는 결합하지 않을 것이다. 바람직한 항-VEGF 항체는 하이브리도마 ATCC® HB 10709에 의해 생성된 모노클로날 항-VEGF 항체 A4.6.1과 동일한 에피토프에 결합하고, 고친화성 항-VEGF 항체인 것인 모노클로날 항체이다. "고친화성 항-VEGF 항체"는 VEGF에 대하여 모노클로날 항-VEGF 항체 A4.6.1보다 적어도 10배 더 우수한 친

화성을 갖는 것이다. 바람직하게, 항-VEGF 항체는 Y0317의 CDR 또는 가변 영역을 포함하는 항체를 비롯한, WO 98/45331에 따라 생성된 재조합 인간화된 항-VEGF 모노클로날 항체 단편이다. 더욱 바람직하게, 항-VEGF 항체는 라니비주맙 (루센티스®)으로서 알려져 있는 항체 단편이다.

- [0025] "항체"라는 용어는 가장 광범위한 의미로 사용되며, 모노클로날 항체 (전장 또는 무손상 모노클로날 항체 포함), 폴리클로날 항체, 다가 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 항체 단편을 포함한다.
- [0026] "치료"는 요법적 치료 및 방지적 또는 예방적 처치 모두를 지칭한다. 치료가 필요한 대상은 이미 질병에 걸린 대상 및 질병이 예방되어야 할 대상 모두를 포함한다.
- [0027] "다형성"이라는 용어는 군집 내에서 변하는 유전자의 서열에서의 배치를 지칭한다. 다형성은 상이한 "대립유전자"로 구성된다. 이러한 다형성의 배치는 유전자에서의 그의 위치 및 그에서 발견되는 상이한 아미노산 또는 염기에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어, *Y402H CFH*는 *CFH* 유전자 중 아미노산 위치 402가 티로신 (Y)과 히스티딘 (H) 사이에서 변화됨을 나타낸다. 이러한 아미노산 변이는 2개의 상이한 대립유전자인, 2개의 가능한 변이체 염기, C 및 T의 결과이다. 유전자형은 2개의 다른 별개의 대립유전자로 구성되기 때문에, 여러 가능한 변이체 중 임의의 변이체가 어느 한 개체에서 관찰될 수 있다 (예를 들어, 이 예에서, CC, CT 또는 TT). 개개의 다형성은 또한 당업자에게 공지되어 있고, 예를 들면, NCBI 웹사이트 상에서 이용가능한 뉴클레오티드 염기 변이의 단일 뉴클레오티드 다형성 데이터베이스(Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) of Nucleotide Sequence Variation)에서 사용되는 것인, 지정된 독특한 식별자 ("기준 SNP", "refSNP" 또는 "rs#")이다.
- [0028] "유전자형"이라는 용어는 세포 또는 조직 샘플에서 특정 유전자의 특이적 대립유전자를 지칭한다. 상기 예에서, CC, CT 또는 TT가 *Y402H CFH* 다형성에서의 가능한 유전자형이다.
- [0029] "샘플"이라는 용어는 환자로부터 채취한 세포 또는 조직 샘플을 포함한다. 예를 들어, 샘플은 피부 샘플, 헤파측 세포(cheek cell) 샘플, 또는 혈액 세포를 포함할 수 있다.
- [0030] 샘플 중 특정 유전자형의 확인은 당업자에게 주지된 수많은 방법 중 임의의 방법에 의해 수행할 수 있다. 예를 들어, 다형성의 확인은 당업계에 주지된 기법을 사용하여 대립유전자를 클로닝하고 그의 서열을 분석함으로써 수행할 수 있다. 별법으로, 유전자 서열은 예를 들어, PCR을 사용하여 게놈 DNA로부터 증폭시킬 수 있고, 생성물의 서열을 분석할 수 있다. 소정의 유전자좌에서의 돌연변이에 대한 환자의 DNA를 분석하는 여러 비제한적인 방법은 하기에 기재한다.
- [0031] DNA 마이크로어레이 기술, 예를 들어, DNA 칩 장치 및 고처리량 스크리닝용의 고밀도 마이크로어레이 및 저밀도 마이크로어레이가 사용될 수 있다. 마이크로어레이 제작 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 다양한 잉크젯 및 마이크로젯 침착 또는 스폿팅 기술 및 공정, 계내 또는 칩상 포토리소그래피 올리고뉴클레오티드 합성 공정, 및 전자 DNA 프로브 어드레싱 공정을 포함한다. DNA 마이크로어레이 하이브리드화 적용은 점 돌연변이, 단일 뉴클레오티드 다형성 (SNP) 및 단연쇄 반복 (STR)에 대한 유전자 발현 분석 및 유전자형 분석의 분야에 성공적으로 적용되어 왔다. 추가의 방법에는 간접 RNA 마이크로어레이 및 마이크로어레이와 다른 방법, 예컨대 레이저 포획 미세절단 (LCM), 비교 게놈 하이브리드화 (CGH) 및 크로마틴 면역침전 (ChIP)의 조합을 포함한다. 예를 들어, 문헌 ([He et al. (2007) *Adv. Exp. Med. Biol.* 593: 117-133] 및 [Heller (2002) *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4: 129-153])을 참조한다. 다른 방법에는 PCR, xMAP, 칩락자 분석법, 질량 분광법 및 실시간 서열분석을 포함된다 (문헌 [Wang et al. (2007) *Microarray Technology and Cancer Gene Profiling Vol 593 of book series Advances in Experimental Medicine and Biology*, pub. Springer New York]).
- [0032] 또 다른 검출 방법은 다형성 부위와 중복되며 다형성 영역 주위에 약 5개, 또는 다르게는 10개, 또는 다르게는 20개, 또는 다르게는 25개, 또는 다르게는 30개의 뉴클레오티드를 갖는 프로브를 사용한 대립유전자에 특이적인 하이브리드화이다. 예를 들어, 대립유전자 변이체와 특이적으로 하이브리드화할 수 있는 여러 프로브를 고체상 지지체, 예를 들어, "칩"에 부착시킨다. 리소그래피를 비롯한 다양한 공정에 의해 올리고뉴클레오티드를 고체 지지체에 결합시킬 수 있다. "DNA 프로브 어레이"로도 명명되는, 올리고뉴클레오티드를 포함하는 칩을 사용한 돌연변이 검출 분석법은 예를 들어 문헌 [Cronin et al. (1996) *Human Mutation* 7:244]에 기재되어 있다.
- [0033] 다른 검출 방법에서는, 대립유전자 변이체를 확인하기 전에 먼저 유전자의 적어도 일부분을 증폭시키는 것이 필요하다. 증폭은 예를 들면, PCR 및/또는 LCR 또는 당업계에 주지된 다른 방법에 의해 수행할 수 있다.
- [0034] 몇몇 경우에서, 피험체로부터 유래된 DNA 중의 특이적인 대립유전자의 존재는 제한 효소 분석에 의해 나타낼 수

있다. 예를 들어, 특이적인 뉴클레오티드 다형성은 또 다른 대립유전자 변이체의 뉴클레오티드 서열이 존재하지 않는 제한 부위를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 생성할 수 있다.

[0035] 추가의 실시양태에서, 절단제 (예컨대, 뉴클레아제, 하이드록실아민 또는 오스뮴 테트록시드, 및 피페리딘 함유)로부터의 보호를 사용하여 RNA/RNA, DNA/DNA, 또는 RNA/DNA 이중이중체에서의 미스매치된 염기를 검출할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Myers et al. (1985) *Science* 230:1242] 참조). 일반적으로, "미스매치된 절단" 기법은, 유전자의 대립유전자 변이체의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 임의로 표지된 대조군 핵산, 예를 들어 RNA 또는 DNA를 조직 샘플로부터 수득된 샘플 핵산, 예를 들어, RNA 또는 DNA와 하이브리드화함으로써 형성된 이중이중체를 제공함으로써 출발한다. 대조군과 샘플 스트랜드 사이의 염기쌍 미스매치를 기초로 형성된 이중체와 같은 이중체의 싱글 스트랜드 영역을 절단하는 작용제로 더블 스트랜드 이중체를 처리한다. 예를 들어, RNA/DNA 이중체는 RNase로 처리하고, DNA/DNA 하이브리드는 S1 뉴클레아제로 처리하여, 미스매치된 영역을 효소적으로 분해할 수 있다. 별법으로, DNA/DNA 또는 RNA/DNA 이중체는 하이드록실아민 또는 오스뮴 테트록시드 및 피페리딘으로 처리하여 미스매치된 영역을 분해할 수 있다. 미스매치된 영역을 분해시킨 후, 생성된 물질을 변성 폴리아크릴아미드 겔 상에서 크기에 의해 분리하여, 대조군 및 샘플 핵산이 동일 또는 상이한 뉴클레오티드 서열을 갖는지를 결정한다. 예를 들어, (미국 특허 제6,455,249호, [Cotton et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397]; [Saleeba et al. (1992) *Meth. Enzymol.* 217:286-295])을 참조한다.

[0036] 또한, 전기영동 이동성의 변화가 특정 대립유전자 변이체를 확인하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 싱글 스트랜드 구조 다형성 (SSCP)을 사용하여 돌연변이체와 야생형 핵산 사이의 전기영동 이동성 차이를 검출할 수 있다 (문헌 ([Orita et al. (1989) *Proc Natl. Acad. Sci USA* 86:2766]; [Cotton (1993) *Mutat. Res.* 285:125-144] 및 [Hayashi (1992) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9:73-79])). 샘플 및 대조군 핵산의 싱글 스트랜드 DNA 단편을 변성시키고 재생시킬 수 있다. 싱글 스트랜드 핵산의 2차 구조는 서열에 따라 변하며, 이에 따른 전기영동 이동성의 변화를 통해 심지어는 단일 염기 변화도 검출할 수 있다. DNA 단편은 표지된 프로브에 의해 표지 또는 검출될 수 있다. 분석의 감도는 (DNA 보다는) RNA (2차 구조가 서열 변화에 더 민감함)를 사용하여 향상될 수 있다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 주 방법은 전기영동 이동성의 변화에 기초하여 더블 스트랜드 이중이중체 분자를 분리하는 이중이중체 분석을 이용한다 (문헌 [Keen et al. (1991) *Trends Genet.* 7:5]).

[0037] 또한 변성제의 구배를 함유하는 폴리아크릴아미드 겔 중에서의 다형성 영역을 포함하는 핵산의 이동을 분석함으로써 (변성 구배 겔 전기영동 (DGGE)을 사용하여 분석됨) 대립유전자 변이체를 확인할 수 있다 (문헌 [Myers et al. (1985) *Nature* 313:495]). DGGE가 분석 방법으로서 사용되는 경우, DNA는 예를 들어, PCR에 의해 대략 40 bp의 고융점 GC-풍부 DNA의 GC 클램프를 첨가함으로써 완전히 변성되지 않도록 변형될 것이다. 추가의 실시양태에서, 대조군 및 샘플 DNA의 이동성의 차이를 확인하기 위해 변성제 구배 대신에 온도 구배가 사용된다 (문헌 [Rosenbaum and Reissner (1987) *Biophys. Chem.* 265:1275]).

[0038] 2개의 핵산 사이에서 적어도 하나의 뉴클레오티드의 차이를 검출하기 위한 기법의 예로는 선택적 올리고뉴클레오티드 하이브리드화, 선택적 증폭, 또는 선택적 프라이머 연장을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 공지된 다형성 뉴클레오티드가 중심에 놓인 올리고뉴클레오티드 프로브 (대립유전자-특이적 프로브)를 제조할 수 있으며, 이어서 완벽한 매치가 발견되는 경우에만 하이브리드화를 허용하는 조건하에서 표적 DNA에 하이브리드화될 수 있다 (문헌 [Saiki et al. (1986) *Nature* 324:163]; [Saiki et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6230]). 그러한 대립유전자 특이적 올리고뉴클레오티드 하이브리드화 기법은 유전자의 다형성 영역 중 뉴클레오티드 변화를 검출하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 특이적 대립유전자 변이체의 뉴클레오티드 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 하이브리드화 막에 부착시킨 다음, 이 막을 표지된 샘플 핵산과 하이브리드화시킨다. 이어서, 하이브리드화 신호의 분석을 통해 샘플 핵산의 뉴클레오티드의 신원을 나타낼 것이다.

[0039] 별법으로, 선택적 PCR 증폭에 좌우되는 대립유전자 특이적 증폭 기술이 본 발명과 함께 사용될 수 있다. 특이적 증폭을 위한 프라이머로서 사용되는 올리고뉴클레오티드는 분자 중심에 관심의 대상이 되는 대립유전자 변이체를 보유할 수 있거나 (이에 의해 증폭이 차별적인 하이브리드화에 좌우된다) (문헌 [Gibbs et al. (1989) *Nucl. Acids Res.* 17:2437-2448]), 또는 적절한 조건하에서 미스매치가 폴리머라제 연장을 방지 또는 감소시킬 수 있는 경우, 프라이머의 최대 3' 말단에 관심의 대상이 되는 대립유전자 변이체를 보유할 수 있다 (문헌 [Prossner (1993) *Tibtech* 11 :238] 및 [Newton et al. (1989) *Nucl Acids Res.* 17:2503])). 이러한 기법은 프로브 올리고 염기 연장(Probe Oligo Base Extension)에 대해 "프로브(PROBE)"로도 지칭된다. 또한, 돌연변이 영역에 신규의 제한 부위를 도입하여 절단에 기반한 검출이 이루어지도록 하는 것이 바람직할 수 있다 (문헌 [Gasparini et al. (1992) *Mol. Cell. Probes* 6:1]).

- [0040] 또 다른 실시양태에서, 예를 들어, 미국 특허 번호 제4,998,617호 및 [Laridegren, U. et al. *Science* 241:1077-1080 (1988)]에 기재되어 있는 것과 같은 올리고뉴클레오티드 결합 분석법 (OLA)를 사용하여 대립유전자 변이체의 확인을 수행할 수 있다. OLA 프로토콜은 표적 싱글 스트랜드의 인접 서열에 하이브리드화될 수 있도록 디자인된 2개의 올리고뉴클레오티드를 사용한다. 올리고뉴클레오티드 중 하나는 분리 마커에 연결되고, 예를 들어, 비오틴화되고, 다른 하나는 검출가능하게 표지된다. 정확한 상보성 서열이 표적 분자에서 발견되는 경우, 올리고뉴클레오티드는 그의 말단이 인접하고 결합 기질을 생성하도록 하이브리드화될 것이다. 이어서, 결합은 표지된 올리고뉴클레오티드가 아비딘 또는 또 다른 비오틴 리간드를 사용하여 회수될 수 있도록 한다. 니커슨, D. A. 등(Nickerson, D. A. et al.)은 PCR과 OLA의 특성을 조합한 핵산 검출 분석법을 기재하였다 (문헌 [[Nickerson, D. A. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8923-8927]). 이 방법에서는 PCR을 사용하여 표적 DNA를 기하급수적으로 증폭시킨 후, OLA를 사용하여 표적 DNA를 검출한다.
- [0041] 본 발명은 *CFH* 및 *C5*에서 단일 뉴클레오티드 다형성 (SNP)을 검출하는 방법을 제공한다. 단일 뉴클레오티드 다형성은 불변 서열의 영역에 접해 있기 때문에, 그의 분석을 위해서는 단일 변이체 뉴클레오티드의 신원을 결정하는 것 이외에는 어떤 것도 필요하지 않고, 각 환자에 대한 완전한 유전자 서열을 측정하는 것은 불필요하다. SNP의 분석을 용이하게 하는 여러 가지 방법이 개발되었다.
- [0042] 단일 염기 다형성은 예를 들어, 미국 특허 번호 제4,656,127호에 개시된 바와 같은 특수화된 엑소뉴클레아제 내성 뉴클레오티드를 사용함으로써 검출할 수 있다. 그 방법에 따라, 다형성 부위의 3' 바로 가까이 존재하는 대립유전자 서열에 상보적인 프라이머는 특정 동물 또는 인간으로부터 수득된 표적 분자에 하이브리드화하도록 허용된다. 표적 분자 상의 다형성 부위가, 존재하는 특정 엑소뉴클레아제 내성 뉴클레오티드 유도체에 상보적인 뉴클레오티드를 함유한다면, 그 유도체는 하이브리드화된 프라이머의 말단부에 혼입될 것이다. 이러한 혼입을 통해 프라이머는 엑소뉴클레아제에 대해 내성을 갖게 되고, 이로써 검출될 수 있다. 샘플의 엑소뉴클레아제 내성 유도체의 신원은 공지되어 있기 때문에, 프라이머가 엑소뉴클레아제에 대해 내성을 갖는다는 발견은, 표적 분자의 다형성 부위에 존재하는 뉴클레오티드가 반응에 사용된 뉴클레오티드 유도체의 뉴클레오티드에 상보적이었음을 나타낸다. 이러한 방법은 다량의 외부 서열 데이터를 측정할 필요가 없다는 이점을 갖고 있다.
- [0043] 또한, 용액 기반 방법은 다형성 부위의 뉴클레오티드의 신원을 결정하는데 사용될 수 있다 (WO 91/02087). 상기와 같이, 다형성 부위의 3' 바로 가까이 존재하는 대립유전자 서열에 상보적인 프라이머가 사용된다. 그 방법은, 다형성 부위의 뉴클레오티드에 상보적이라면 프라이머의 말단에 혼입하게 될 표지된 디데옥시뉴클레오티드 유도체를 사용하여 다형성 부위의 뉴클레오티드의 신원을 결정한다.
- [0044] 대체 방법은 WO 92/15712에 기재되어 있다. 이 방법은 표지된 종결인자의 혼합물 및 다형성 부위의 3' 서열에 상보적인 프라이머를 사용한다. 따라서, 혼입되는 표지된 종결인자는 평가될 표적 분자의 다형성 부위에 존재하는 뉴클레오티드에 의해 결정되고, 그에 상보적이다. 상기 방법은 통상적으로 프라이머 또는 표적 분자가 고체상에 고정되어 있는 이중 상 분석법이다.
- [0045] DNA 중의 다형성 부위를 분석하기 위한 다수의 다른 프라이머로 안내되는 뉴클레오티드 혼입 방법이 기재되었다 (문헌 ([Komher, J. S. et al. (1989) *Nucl. Acids. Res.* 17:7779-7784]; [Sokolov, B. P. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:3671]; [Syvanen, A. -C, et al. (1990) *Genomics* 8:684-692]; [Kuppuswamy, M. N. et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1143-1147]; [Prezant, T. R. et al. (1992) *Hum. Mutat.* 1:159-164]; [Ugozzoli, L. et al. (1992) *GATA* 9:107-112]; [Nyren, P. et al. (1993) *Anal. Biochem.* 208:171-175])). 이러한 방법은 모두 다형성 부위에서 염기들을 구별하기 위해 표지된 데옥시뉴클레오티드의 혼입에 의존한다.
- [0046] 또한, 유전자 또는 유전자 생성물 또는 다형성 변이체에서의 변화를 검출하기 위한 상기 방법 중 임의의 방법을 사용하여 치료 또는 요법의 과정을 모니터링할 수 있음을 이해할 것이다.
- [0047] 예를 들어 편리하게 사용될 수 있는 적어도 하나의 프로브 또는 프라이머 핵산을 포함하는, 하기 기재되는 것과 같은 사전 포장된 진단용 키트를 이용하여 본원에 기술된 방법을 수행함으로써, 예를 들면, 개체에서 AMD가 발생할 수 있는 가능성이 증가되는지 또는 습성 AMD 환자가 항-VEGF 항체를 사용하는 치료법으로부터 유익함을 얻을 가능성이 증가되는지를 결정할 수 있다.
- [0048] 상기 기술된 진단 및 예후 방법에서 사용하기 위한 샘플 핵산은 피험체의 임의의 세포 유형 또는 조직으로부터 수득할 수 있다. 예를 들어, 피험체의 체액 (예를 들어, 혈액)은 공지된 기법에 의해 수득할 수 있다. 별법으로, 핵산 시험은 건성 샘플 (예를 들어, 모발 또는 피부) 상에서 수행할 수 있다.

- [0049] 본원에 기술된 발명은 Y402H CFH, I145V C5, 및 I802V C5 대립유전자를 비롯한, 수개의 대립유전자에 존재하는 대립유전자를 결정하고 확인하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 프로브는 샘플의 유전자형을 직접 결정하는데 사용될 수 있거나, 또는 증폭과 동시에 또는 증폭 이후에 사용될 수 있다. "프로브"라는 용어는 천연적으로 발생된 또는 제조합의 싱글 또는 더블 스트랜드 핵산 또는 화학적으로 합성된 핵산을 포함한다. 이들은 닉(nick) 변역, 클레노우 필-인(Klenow fill-in) 반응, PCR 또는 당업계에 공지된 다른 방법에 의해 표지될 수 있다. 본 발명의 프로브, 그의 제조 및/또는 표지는 문헌 [Sambrook et al. (1989) *싱기 문헌과 동일*]에 기재되어 있다. 프로브는 본 발명의 다형성 영역을 함유하는 핵산에 선택적으로 하이브리드화하는 데 적합한 임의 길이의 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 사용되는 프로브의 길이는 부분적으로는 분석법의 성질 및 사용되는 하이브리드화 조건에 따라 달라질 것이다.
- [0050] 표지된 프로브는 또한 다형성의 증폭과 함께 사용될 수 있다 (문헌 [Holland et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7276-7280]). 미국 특허 번호 제5,210,015호에는 PCR을 수행하는 동안 증폭 생성물을 실시간으로 측정하는 형광-기반 접근법이 기재되어 있다. 이러한 접근법은 더블 스트랜드 DNA의 존재량을 나타내기 위해 삽입 염료 (예로서, 에티딤 브로마이드)를 사용하거나, 또는 형광-소광제 쌍을 함유하는 프로브를 사용하는데 ("택맨(TaqMan)®" 접근법으로도 지칭됨), 여기서, 증폭되는 동안 프로브는 절단되어 형광 분자를 방출하며, 그 분자의 농도는 더블 스트랜드 DNA의 존재량에 비례한다. 증폭되는 동안, 프로브는 표적 서열에 하이브리드화될 때 폴리머라제의 뉴클레아제 활성에 의해 분해되어, 형광 분자가 소광제 분자로부터 분리되도록 함으로써, 리포터 분자로부터 형광이 나타나도록 한다. 택맨® 접근법은 다형성을 함유하는 표적 폴리뉴클레오티드의 영역에 특이적으로 어닐링하는, 리포터 분자-소광제 분자 쌍을 함유하는 프로브를 사용한다.
- [0051] 프로브는 "유전자 칩"으로서 사용하기 위해 표면에 고정될 수 있다. 이러한 유전자 칩은 당업자에게 공지된 다수의 기법에 의해 유전 변이를 검출하는데 사용될 수 있다. 한가지 기법에서, 올리고뉴클레오티드는 미국 특허 번호 제6,025,136호 및 동 제6,018,041호에 약술된 바와 같은 하이브리드화 접근법에 의한 서열 분석에 의해 DNA 서열을 결정하고자 유전자 칩 상에 정렬된다. 또한, 본 발명의 프로브는 유전 서열의 형광 검출에 사용될 수 있다. 이러한 기법은 예를 들면, 미국 특허 번호 제5,968,740 및 제5,858,659호에 기재되어 있다. 또한, 프로브는 미국 특허 번호 제5,952,172호 및 문헌 [Kelley, S. O. et al. (1999) *Nucl. Acids Res.* 27:4830-4837]에 기재된 바와 같은 핵산 서열의 전기화학적 검출을 위해 전극 표면에 고정될 수 있다.
- [0052] 추가로, 프로브 또는 프라이머로서 사용되는 단리된 핵산은 보다 안정해지기 위해 변형될 수 있다. 변형된 핵산 분자의 예로는 DNA의 포스포라미데이트, 포스포티오에이트 및 메틸포스포네이트 유사체를 포함한다 (또한, 미국 특허 번호 제5,176,996호, 제5,264,564호 및 제5,256,775호도 참조한다).
- [0053] 본원에 설명된 바와 같이, 본 발명은 또한 CFH 또는 C5에 존재하는 다형성 영역의 대립유전자 변이체 유형을 결정하기 위한 진단 방법을 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 그 방법은 CFH 또는 C5의 다형성 영역에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 프로브 또는 프라이머를 사용한다. 따라서, 본 발명은 이들 방법을 수행하기 위한 키트를 제공한다.
- [0054] 일부 실시양태에서, 본 발명은 습성 AMD 환자가 고친화성 항-VEGF 항체를 비롯한, 항-VEGF 항체를 사용하는 치료법으로부터 유익함을 얻을 가능성이 증가되는지를 결정하기 위한 키트를 제공한다. 이러한 키트는 본원에 기술된 하나 이상의 조성물 및 사용 설명서를 포함한다. 단지 하나의 일례로서, 본 발명은 또한 습성 AMD 환자가 Y402H CFH 대립유전자 중의 C/T 다형성에 특이적인 제1 올리고뉴클레오티드 및 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하는 라니비주맙을 사용하는 치료법으로부터 유익함을 얻을 가능성이 증가되는지를 결정하기 위한 키트를 제공한다. 유전자좌에 "특이적인" 올리고뉴클레오티드는 좌위의 다형성 영역에 결합하거나 또는 좌위의 다형성 영역의 인접부에 결합한다. 증폭을 위한 프라이머로서 사용되는 올리고뉴클레오티드의 경우, 다형성 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 생성하는 데 사용되기 위해 충분히 근접해 있다면, 프라이머는 인접해 있다. 하나의 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 다형성으로부터 약 1-2 kb, 예를 들면, 1 kb 미만 이내에 결합하는 경우에 인접해 있다. 특이적 올리고뉴클레오티드는 서열에 하이브리드화될 수 있으며, 적합한 조건하에서 하나의 뉴클레오티드가 상이한 서열에 결합하지 않을 것이다.
- [0055] 키트는 CFH 또는 C5의 다형성 영역에 특이적으로 하이브리드화될 수 있는 적어도 하나의 프로브 또는 프라이머 및 사용 설명서를 포함할 수 있다. 키트는 통상적으로 적어도 하나의 상기 기재된 핵산을 포함한다. CFH 또는 C5의 적어도 일부분을 증폭시키기 위한 키트는 일반적으로 2개의 프라이머를 포함하며, 이 중 적어도 하나는 대립유전자 변이 서열에 하이브리드화될 수 있다. 이러한 키트는 예를 들어, 형광 검출, 전기화학 검출 또는 다른 검출에 의한 유전자형의 검출에 적합하다.

- [0056] 키트에 포함되어 있는 올리고뉴클레오티드는 프로브로서 사용되든지 또는 프라이머로서 사용되든지 간에 검출가능하게 표지될 수 있다. 표지는 예를 들어, 형광 표지의 경우, 직접적으로, 또는 간접적으로 검출될 수 있다. 간접적 검출은 당업자에게 공지된 임의의 검출 방법, 예를 들어, 비오틴-아비딘 상호작용, 항체 결합 등을 포함할 수 있다. 형광 표지된 올리고뉴클레오티드는 또한 소광 분자를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 표면에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표면은 실리카 또는 유리이다. 일부 실시양태에서, 표면은 금속 전극이다.
- [0057] 본 발명의 또 다른 키트는 분석을 수행하는 데 필요한 적어도 하나의 시약을 포함한다. 예를 들어, 키트는 효소를 포함할 수 있다. 별법으로, 키트는 완충제 또는 임의의 다른 필요한 시약을 포함할 수 있다.
- [0058] 키트는 *CFH* 또는 *C5*의 다형성 영역에서 피험체의 유전자형을 결정하기 위해 본원에 기술된 양성 대조군, 음성 대조군, 시약, 프라이머, 서열 분석 마커, 프로브 및 항체, 이들 모두 또는 그 일부를 포함할 수 있다.
- [0059] 하기 실시예는 단지 본 발명의 실시를 예시하고자 하는 것이며, 제한하려고 제공된 것은 아니다.
- [0060] **실시예**
- [0061] **실시예 1. *CFH*, *HTRA1* 및 *C5*에서의 유전자 다형성, 및 그와 AMD 발생, 및 치료 결과과의 연관성**
- [0062] *다형성*
- [0063] 본 발명자들은 라니비주맙을 사용하여 항-VEGF 요법을 수행하는 동안 바람직한 결과와 연관성이 있는 변이에 대한 각종의 다형성을 시험하였다. AMD 감수성과 연관성이 있는 것으로 앞서 보고된 바 있는 5개의 좌위로부터 8개의 대립유전자가 존재하기 때문에 이들 다형성을 선택하였고, 조사하였다 (표 1). 구체적으로, 택맨® 시스템을 통한 정량적 PCR을 사용하여 DAWN 시험으로부터의 352개의 AMD 샘플 중에서 보체 인자 H (*CFH*)로부터 2개의 대립유전자, HTRa 세린 펩티다제/연령-관련 황반병증 감수성 2 (*HTRA1/ARMS2*), 보체 인자 2/보체 인자 B 프리단백질 (*C2/BF*), 및 보체 인자 3 (*C3*)으로부터의 단일 대립유전자, 및 케모카인 (C-X3-C 모티프) 수용체 1 (*CX3CR1*)의 유전자형을 분석하였다. 또한, 본 발명자들은 보체 성분 5 (*C5*)에 대한 2개의 대립유전자를 시험하였다 (표 2). 표 1의 모든 분석의 유전자형 분석을 위해 ABI에 의해 제공되는 표준 실험 프로토콜을 사용하였다. 간략하면, 하기 사이클 조건: 50°C에서 2분, 95°C에서 10분, 이어서, 92°C에서 15초 및 60°C에서 1분인 것으로 구성된 40회 사이클을 이용하여 ABI 7500 기계 상에서 분석을 실시하였다.

표 1

시험한 단일 뉴클레오티드 다형성 (SNP)

좌위	SNP	염색체	염색체 위치*	미스센스 대립유전자 정보	참고문헌
CFH	rs1061170	1	193,390,894	Y402H	[Maller et al. (2006) <i>Nature Genet.</i> 38:1055-59]
CFH	rs1410996	1	193,428,590	--	[Maller et al. 상기 문헌과 동일]
HTRA1	rs11200638	10	124,210,534	--	[(Dewan et al. (2006) <i>Science</i> 314:989-92); [Yang et al. (2006) <i>Science</i> 314:992-93]]
HTRA1	rs10490924	10	124,204,438	A69S	[Kanda et al. (2007) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 104:16227-32]
C3	rs2230199	19	6,669,387	--	[Yates et al. (2007) <i>NEJM</i> 357:553]
C2/BF	rs547154	6	32,018,917	C2 인트론 (BF 중 L9H 를 포함하는 LD)	[Gold et al. (2006) <i>Nature Genet.</i> 38:458-62]
C2/BF	rs9332739	6	32,011,783	E318D (C2)	[Gold et al. 상기 문헌과 동일]
CX3CR1	rs3732378	3	39,282,166	M280T	[Chan et al. (2005) <i>Histol. Histopath.</i> 20:857-63]

* 인간 게놈 어셈블리 (2004 년 5 월 당시)로부터의 염기쌍 중의 위치

[0064]

표 2

C5 에 대해 시험한 단일 뉴클레오티드 다형성 (SNP)

좌위	SNP	염색체	염색체 위치*	미스센스 대립유전자 정보	참고문헌
C5	rs17216529	9	120,879,772	I145V	
C5	rs17611	9	120,848,754	I802V	

* 인간 게놈 어셈블리 (2004 년 5 월 당시)로부터의 염기쌍 중의 위치

[0065]

샘플

[0066]

[0067]

HORIZON 연장 시험 중 DAWN 유전자 후속 연구(substudy)에 참여한, 루센티스® 중요 시험 (MARINA, ANCHOR, 및 FOCUS)으로부터의 352명의 미확인 피험체로부터 말초 혈액 샘플을 수집하고, 게놈 DNA를 단리시켰다. 샘플 모두 신생혈관 AMD라는 확인 진단을 받았고, 여성 환자는 60%였으며, 기준선에서의 평균 연령은 모의/PDT의 경우, 75.0세이고, 라니비주맙 처리군의 경우, 75.6세였다. 본 연구에서 개체 모두로부터 서면 사전 동의를 받고, 연구 프로토콜은 임상시험 심사 위원회(institutional review board)로부터 승인을 받았다. DNeasy® 조직 키트(DNeasy® Tissue kit) (캘리포니아주 발렌시아에 소재하는 퀴아젠(Qiagen))를 사용하여 DNA를 추출하였다. 택맨® 기반 실시간 PCR을 사용하여 SNP의 유전자형을 분석하였다. 두 SNP에 대하여 기성 프라이머를 사용하고 (표 4), 나머지 6개에 대해서는 ABI 특허 프라이머를 사용하였다 (표 3). 2개의 C5 SNP (표 5에 제시되어 있는 올리고뉴클레오티드)는 일루미나® 골든게이트 플랫폼(Illumina® GoldenGate platform)을 사용하여 기성 96 SNP 분석 패널의 일부로서 분석하였다.

표 3

SNP의 유전자형 분석에 사용된 분석법

SNP 기준 서열번호	유전자 기호	ABI 분석법 ID*
rs1061170	CFH	기성의 것
rs1410996	CFH	C__2530294_10
rs11200638	HTRA1; ARMS2	기성의 것
rs10490924	HTRA1; ARMS2	C__29934973_20
rs2230199	C3	C__26330755_10
rs547154	RDBP; CFB; C2	C__940286_10
rs9332739	CFB; C2	C__29531804_10
rs3732378	CX3CR1	C_____5687_1_

*대립유전자들 중 6 개에 대해서는 사전 디자인된 택맨® SNP 유전자형 분석을 위한 분석법 (캘리포니아주 포스터 시티에 소재하는 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems))을 이용할 수 있다. 프라이머 서열이 특허물이기 때문에 사전 디자인된 분석법을 ABI 분석법 ID 로 나타내었다. 나머지 2 개의 대립유전자에 대해서는 기성 택맨®을 디자인하였고, 프라이머는 표 4 에 제시되어 있다.

[0068]

표 4

rs1061170 및 rs11200638의 유전자형 분석에 사용된 프라이머

SNP ID	rs1061170	rs11200638
전방향 프라이머	CTTTATTATTTATCATTGTT ATGGTCCTTAGGAAAATGTT ATT (서열 7)	GGCGCGGGCTTTCTG (서열 11)
역방향 프라이머	GGCAGGCAACGTCCTATAGAT TTACC (서열 8)	CGCGGGACCCTGACC (서열 12)
리포터 1_VIC	TTCTTCCATAATTTTG (서열 9)	CTTCGTCCAGCCGCA (서열 13)
리포터 2_FAM	TTCTTCCATAATTTTG (서열 10)	TTCGTCCGGCCGCA (서열 14)

[0069]

표 5

C5 SNP rs17216529 및 rs17611의 유전자형 분석에 사용된 프라이머

SNP ID	rs17216529	rs17611
프라이머	ATATCCTTGTTTTTAGCAGAG TTTTTGATTATATCAATTATT CTTACAGTAAAAGTTAGA[A/ G]TTTATTTCGTTGAATGACGA CTTGAAGCCAGCCAAAAGAG AAACTGTCCTAACTTTCATAG (서열 15)	TCCAGAAAACAGTTGCAGTTTG CCCTACCTGATTCTCTAACCACC TGGGAAATTCAAGGC[A/G]TTGG CATTCAAACACTGGTAAGCAG GTTTAAAGTGATATATGCATTTAA ATAGTGATTTG (서열 16)

[0070]

[0071] 임상 정보

[0072] MARINA, ANCHOR 및 FOCUS 루센티스 시험으로부터 임상 정보를 조사하였다. 구체적으로, 정보는 자신이 밝힌 인종, 성별, 개시 연구 기준선에서의 연령, 개시 연구 치료군, 루센티스 투여량, 2년 경과 후 치료 암으로의 교차, 투약 오류의 존재, 기준선 (BL)에서 연구안의 최적의 보정 시력 (VA) 점수 (문자), BL에서 타안 VA 점수 (문자), 12개월째 연구안 VA 점수 (문자), 12개월째 타안 VA 점수 (문자), BL에서 타안 중의 신생혈관 AMD의 존재 여부, 및 연구안 BL CNV 분류화에 관한 것이었다.

[0073] 감수성 분석과의 연관성

[0074] 공개적으로 이용가능한 공급원으로부터 입수한 대조군 샘플에 대해 상대적인 DAWN 사례에서의 대립유전자의 빈도를 비교함으로써 8개의 대립유전자를 질환 감수성과의 연관성에 대하여 조사하였다. rs10490924, rs1410996, rs9332739, 및 rs3732378의 경우, 대조군 대립유전자 빈도에 관한 정보는 웰컴 트러스트 케이스 컨트롤 컨소시엄(Wellcome Trust Case Control consortium) (문헌 [WTCCC (2007) *Nature* 447:661-78])으로부터 자유롭게 이용할 수 있는 요약 통계학적 값으로부터 입수하였다. 나머지 SNP에 대한 대조군 대립유전자 빈도 및 유전자형 계수는 rs11200638 3, rs2230199 6, rs547154 1에 대한 연관성을 보고한 논문으로부터 입수하였다. 표준 2x2 결과표를 사용하여 연관성에 대한 통계학적 값을 계산하였다.

[0075] 유전자형과 기준선에서의 임상적 특성과의 연관성

[0076] 공변수로서 기준선에서의 연령을 부가하거나, 부가하지 않고, 정량적 형질로서 기준선에서의 연구안의 VA (문자)를 사용하여 8개의 대립유전자와 기준선에서의 시력 (VA)과의 연관성에 대한 시험을 수행하였다. 기준선에서의 VA 중앙값의 유의차에 대해 3가지 유전자형 부류를 시험하였다. 분석은 PLINK 소프트웨어 (문헌 [Purcell et al. (2007) *Am. J. Hum. Genet.* 81 :559-75])를 사용하여 수행하였다. 8개의 대립유전자와 타안 중 신생혈관 AMD의 존재, 및 기준선에서의 연구안의 신생혈관 질환 분류화 (최소로 전형적, 지배적으로 전형적, 및 비전형적이며 잠재적)와의 연관성을 시험하였다. 유전자형 및 t 검정에 의해 측정된 유의도에 의해 임상적 특성의 빈도를 계층화하였다.

[0077] DAWN에서 AMD 위험 대립유전자의 강화

[0078] 앞서 공개된 관찰결과를 확인하였을 때, 8개의 좌위 모두로부터의 대립유전자는 신생혈관 AMD의 위험과 연관성이 있었다 ($P < 0.05$). 그러나, 유일하게 *CX3CR1* 좌위로부터의 대립유전자만 원 보고 기록과 일치하는 연관성을 나타내지 않았다. DAWN 샘플에서, *CX3CR1* 좌위는 1.12의 교차비를 가진 반면, 대조적으로 원 보고 기록에서의 교차비는 >3이었다. rs17216529 (*C5 I145V*)와, AMD를 앓는 개체의 타안에서 맥락막 혈관신생 (CNV)의 발생 사이에서 유의적인 연관성이 관찰되었다 (표 6). 또한, rs17611 (*C5 I802V*)과 습성 AMD, GA를 동반한 건성 AMD, 또는 그 둘 모두의 발생 사이에서 연관성이 관찰되었다 (표 7). 이러한 연관성은 GA를 동반한 건성 AMD 사례에 서보다 AMD 사례 ($p = 0.0014$)에서 더 강력하게 나타났다.

표 6

rs17216529 (*C5 I145V*)에서의 유전자형과 CNV와의 연관성

	<i>C5 I145V</i>		
	AA	AG	GG
기준선에서 타안에 CNV를 갖는 환자 비율(%)	38.7	44.3	54.8
개체 수	93	140	62

[0079]

표 7

rs17611 (C5 I802V)에서의 유전자형과 습성 AMD; GA를 동반한 건성 AMD; 및 습성 AMD, GA를 동반한 건성 AMD 중 어느 하나, 또는 그 둘 모두와의 연관성

AMD 유형	I802V 대립유전자	샘플수		대립유전자 빈도수		교차비	P 값
		사례	대조군	사례	대조군		
습성 AMD	T (ile)	1136	8236	0.420	0.454	0.87	0.0021
GA를 동반한 건성 AMD	T (ile)	400	8236	0.448	0.454	0.97	0.7168
습성 AMD 및/또는 GA를 동반한 건성 AMD	T (ile)	1536	8236	0.423	0.455	0.88	0.0014

[0080]

[0081]

대립유전자와 기준선에서의 임상 특징과의 연관성

[0082]

8개의 대립유전자와 기준선에서의 시력과의 유의적인 연관성은 관찰되지 않았다. CFH Y402H 대립유전자 및 HTRA1 A69S 대립유전자 중 위험 대립유전자의 수가 샘플 중 타안에 신생혈관 AMD가 발생하는 유병률과 연관성이 있었는데, 이는 이들 좌위의 유전자형과 질환 중증도의 연관성을 제안한다. CFH Y402H 대립유전자는 기준선에서 연구안에 "지배적으로 전형적인" 서브유형의 신생혈관 AMD를 갖는 것과 연관성이 있었다. rs1410996 인트론 CFH 대립유전자는 CNV 및 전형적 CNV에서 병변의 면적과 연관성이 있었고, C5 I802V 대립유전자는 전형적 CNV에서 병변의 면적과 연관성이 있었다.

[0083]

유전자형과 라니비주맙 요법에 대한 반응과의 연관성

[0084]

MARINA, ANCHOR 및 FOCUS 시험을 수행하는 동안 처리 상태에 준하여 DAWN 샘플을 3개의 군으로부터 분리하였다. 라니비주맙 처리군은 0.3 mg, 0.5 mg 또는 0.5 mg+PDT의 투여량으로 투여를 받은 개체를 포함하였다. 모의/PDT 군은 모의 주사를 받았거나 (모의), 또는 오직 광역학적 요법 (PDT)만을 받은 개체로 구성되었다. 처리 후 12개월이 경과하였을 때, 8개의 대립유전자 각각의 유전자형과의 연관성에 대하여 시력 (VA, 문자로 측정) 변화와의 연관성을 시험하였다. 처리 반응에서의 유의적인 차이는 CFH Y402H, C5I802V, 및 HTRA1 A69S 대립유전자에서의 유전자형과 연관성이 있었다 (표 8, 9 및 10). 이러한 변이체는 매달 라니비주맙으로 치료를 받은 환자에서의 VA의 변화와 연관성이 있었다: 12개월째 VA의 평균 변화량은 Y402H CC, CT 및 TT 유전자형의 경우, 각각 +14.5, +10.8 및 +7.0 (문자); I802V AA, AG 및 GG 유전자형의 경우, 각각 +15.6, +12.2 및 +8.8 (문자); 및 A69S GG, GT 및 TT 유전자형의 경우, 각각 +9.3, +14.1 및 +10.5였다. CFH Y402H 대립유전자의 경우, 대조군 (모의/PDT)에서는 12개월째에 Y402H CC, CT, 및 TT 유전자형에 대하여 각각 BCVA의 평균 변화량이 -4.8, -10.2 및 -11.5으로 상응하는 상반된 경향이 관찰되었다. 대조군과 라니비주맙 처리군 사이의 12개월째 평균 BCVA 결과상의 차이는 모든 Y402H 위험 유전자형 간에 동일하였다.

표 8

CFH Y402H에서의 유전자형과 라니비주맙 요법에 대한 반응과의 연관성

		Y402H CFH		
		CC	CT	TT
모의 또는 PDT	VA의 평균 변화량	-4.8	-10.2	-11.5
	개체수	30	36	10
라니비주맙 처리군 (0.3 mg + 0.5 mg)	VA의 평균 변화량	14.5	10.8	7.0
	개체수	58	93	23

[0085]

표 9

C5 1802V 에서의 유전자형과 라니비주맙 요법에 대한 반응과의 연관성

		<i>1802V C5</i>		
		AA	AG	GG
모의 또는 PDT	VA 의 평균 변화량	-11.6	-9.4	-4.8
	개체수	16	50	44
라니비주맙 처리군 (0.3 mg + 0.5 mg)	VA 의 평균 변화량	15.1	10.6	9.1
	개체수	36	125	80

[0086]

표 10

HTRA1 A69S 에서의 유전자형과 라니비주맙 요법에 대한 반응과의 연관성

		<i>HTRA1 A69S</i>		
		GG	GT	TT
모의 또는 PDT	VA 의 평균 변화량	-8.0	-9.0	-4.4
	개체수	24	60	14
라니비주맙 처리군 (0.3 mg + 0.5 mg)	VA 의 평균 변화량	9.3	14.1	10.5
	개체수	68	80	49

[0087]

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC. et al.

<120> GENETIC POLYMORPHISMS IN AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION

<130> P4285R1

<150> US 61/111,667

<151> 2008-11-05

<150> US 61/174,856

<151> 2009-05-01

<160> 16

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 1

<400> 5

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser

5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 6

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr

5

<210> 7

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 7

ctttatttat ttatcattgt tatggtcctt aggaaaatgt tatt 44

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 8

ggcaggcaac gtctatagat ttacc 25

<210> 9

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 9

ttcttcata attttg 16

<210> 10

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 10

ttcttcata atttg 16

<210> 11

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400>

> 11

ggcgcgggct ttctg 15

<210> 12

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 12

cgcgggaccc tgacc 15

<210> 13

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 13

cttcgtccag ccgca 15

<210> 14

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 14

ttcgtccggc cgca 14

<210> 15

<211> 122

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 15

```
atatccttgt ttttagcaga gtttttgatt atatcaatta ttcttacagt 50
aaaagttaga agtttattcg ttgaatgacg acttgaagcc agccaaaaga 100
gaaactgtct taactttcat ag 122
```

<210> 16

<211> 122

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 16

```
tccagaaaac agttgcagtt tgcctacct gattctctaa ccacctggga 50
aattcaagc agttggcatt tcaaacactg gtaagcaggt ttaagtata 100
tatgcattta aatagtgatt tg 122
```