



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0100207
(43) 공개일자 2013년09월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-7019809(분할)

(22) 출원일자(국제) 2006년02월14일
심사청구일자 2013년08월26일

(62) 원출원 특허 10-2007-7021213
원출원일자(국제) 2006년02월14일
심사청구일자 2011년02월14일

(85) 번역문제출일자 2013년07월25일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/005313

(87) 국제공개번호 WO 2006/088950
국제공개일자 2006년08월24일

(30) 우선권주장
60/653,078 2005년02월14일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
유니버시티 오브 아이오와 리씨치 파운데이션
미국 아이오와 아이오와 시티 유니버시티 캐피톨
센터 2660 아이오와 센터스 포 엔터프라이즈 (우: 52242-5500)

(72) 발명자
하계맨, 그레고리, 에스.
미국 52241 아이오와 코랄빌 어번 힐즈 드라이브
500
스미쓰, 리차드 제이.
미국 52241 아이오와 아이오와 시티 체리 레인 11

(74) 대리인
특허법인 남앤드남

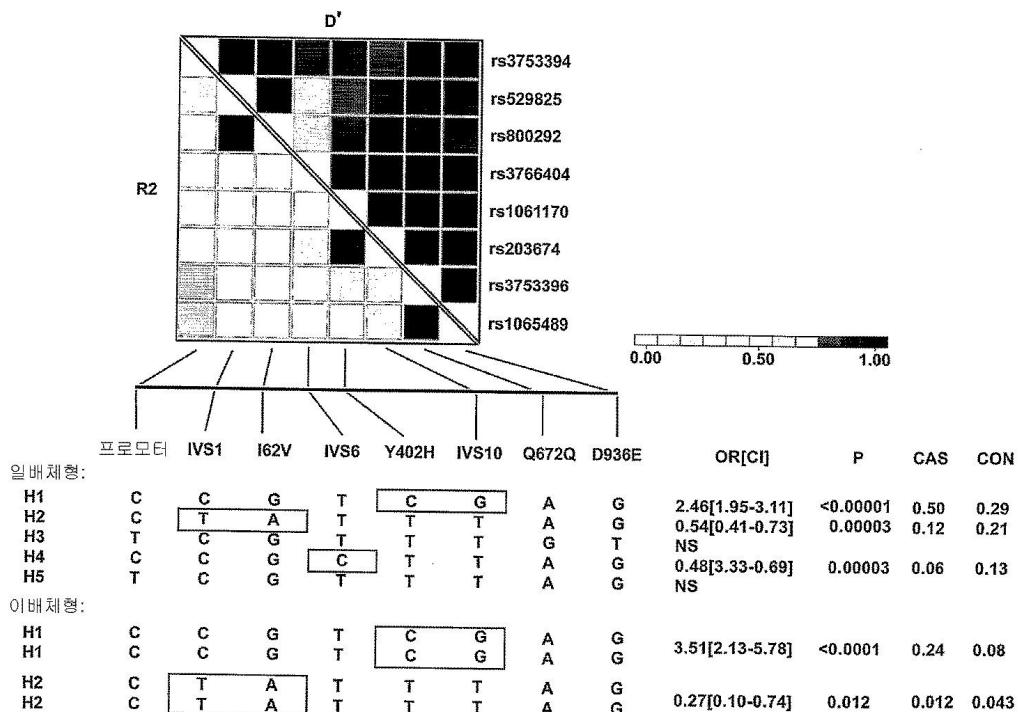
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 연령 - 관련 황반 변성의 치료 및 진단용 방법 및 시약

(57) 요 약

본 발명은 AMD의 증가되거나 감소된 위험성과 관련된 인자 H 유전자 다형성 및 일배체형에 관한 것이다. 본 발명은 AMD를 진단 및 치료하기 위한 방법 및 시약을 제공한다.

대 표 도



(30) 우선권주장

60/715,503 2005년09월09일 미국(US)

60/717,861 2005년09월16일 미국(US)

60/735,697 2005년11월09일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

분리된 보체 인자 H (CFH) 폴리펩티드, CFH 폴리펩티드를 발현하는 분리된 세포, 또는 프로모터에 작동가능하게 연결된 CFH 폴리펩티드를 엔코딩하는 서열을 포함하는 분리된 폴리뉴클레오티드, 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 연령-관련 황반 변성 (AMD)을 예방하거나 치료하기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 CFH 폴리펩티드가 서열번호 2의 잔기 402에 해당하는 위치에 티로신을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 CFH 폴리펩티드가, (a) 서열번호 2와 적어도 90%의 서열 동일성을 지니는 아미노산 서열을 포함하거나; (b) 보체 성분 3b (C3b)에 결합하는 상기 (a)의 생물학적 활성 단편인, 약제학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 CFH 폴리펩티드가 잔기 62에 해당하는 위치에서 이소류신을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 CFH 폴리펩티드가 서열번호 5의 잔기 19 내지 1231을 포함하는 단백질인, 약제학적 조성물.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CFH 폴리펩티드가 재조합적으로 생성된 것인, 약제학적 조성물.

청구항 6

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로모터가 망막 안료 상피(RPE)에 특이적인 약제학적 조성물.

청구항 7

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CFH 폴리펩티드가 안내 주사에 의해 투여되기 위한 것인 약제학적 조성물.

청구항 8

AMD를 발생시키는 증가된 위험성과 연관된 CFH 변이체 폴리펩티드의 발현 또는 활성을 감소시키는 작용제 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, AMD를 치료하거나 예방하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 작용제가 위치 402에 히스티딘을 지니는 CFH 폴리펩티드에 결합하나, 위치 402에 티로신을 지니는 CFH 폴리펩티드에는 결합하지 않는 모노클로날 항체인 약제학적 조성물.

청구항 10

제 8항에 있어서, 상기 작용제가 CFH 폴리펩티드의 누클레오티드 서열의 일부에 상보적인 안티센스 RNA 또는 단기 간섭 RNA (siRNA)인 약제학적 조성물.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 인간 보체 인자 H가 혈액으로부터 유래한 것인 약제학적 조성물.

청구항 12

재조합 변이체 인간 보체 인자 H를 발현하는 분리된 숙주 세포로서, 상기 변이체가 위치 62에 이소류신을 포함

하는 분리된 숙주 세포.

청구항 13

변이체가 아미노산 402에 티로신 대신 히스티딘을 지니거나 (Y402H), 변이체가 아미노산 1210에 아르기닌 대신 시스테인을 지니는 (R1210C) 재조합 변이체 인간 CFH를 발현하는 분리된 숙주 세포.

청구항 14

제 13항의 숙주 세포를 AMD의 치료에 유용한 작용제와 접촉시키고, 변이체의 발현 또는 프로세싱을 모니터링하는 것을 포함하는, AMD의 치료에 유용한 작용제를 스크리닝하는 방법.

명세서

배경기술

- [0001] 선진국에서 연령-관련 황반 변성(AMD)은 60세가 넘는 개체의 약 15%에서 발병하는 되돌릴 수 없는 실명을 이끄는 원인이다 (Zarbin, 1998, 2004; Klein et al., 2004; Ambati et al., 2003; de Jong, 2004; van Leeuwen et al., 2003). 인구 통계학의 6억으로 추정되는 개체가 이러한 단계에 있다. AMD의 이환율은 연령에 따라 증가하며; 75세 이상인 개체군의 약 30%에서 가볍거나 조기 형태가 발생하고, 약 7%에서 진보된 형태가 발생한다 (Klein et al., 1992; Vingerling et al., 1995a, 1995b). 임상적으로, AMD는 망막 신경 및 근원적인 조직의 분화된 영역인 황반에서 발생하는 퇴행성 변화에 기여할 수 있는 중추 시력의 점진적인 손실을 특징으로 한다. 대부분의 심각하거나 삼출성인 질병 형태에서, 신생혈관 않은 맥락막 맥관구조 파괴 브러치(Bruch) 막 및 망막 안료 상피 (RPE)로부터 유도되며 통상적으로 망막의 탈착 및 후속적인 퇴행을 초래한다.
- [0002] 후발성 복합 질병인 AMD는 유전적 및 환경적 인자의 조합에 의해 야기되고/거나 조절되는 것으로 나타났다 (Seddon and Chen, 2004; Tuo et al., 2004; Klein and Francis, 2003). 가족 집단 연구는 근본적으로 유전적 소인이 질병의 25%에 관여하는 것으로 예측하였다 (Klaver et al., 1998a). 우세한 가설에 따르면, 대부분의 AMD 병증은 다발성 단일-유전자 질병의 집합이 아니라 다발성 감수성 유전자좌의 상호작용의 발현인, 정량적인 표현형을 나타낸다. 관련 유전자좌의 수, 제공된 기여하는 위험성 및 다양한 유전자좌 사이의 상호작용은 알려지지 않은 채로 남아 있다.
- [0003] 결합 및 후보 유전자 스크리닝 분석은 AMD의 유전학에 대한 제한된 통찰을 제공한다. AMD에 대한 위험성을 증가시키는 하나의 유전자인 *ABCA4* (Allikmets et al., 1997) 및 위험성을 감소시키는 하나의 유전자인 *ApoE4* (Klaver et al., 1998b, Souied et al., 1998)의 확실한 관련성이 보고되었다. 또한, 여러 개의 그룹이 전 범위-개념 결합 분석 결과를 보고하였다 (Tuo et al., 2004; Weeks et al., 2004). 특정 염색체 영역인 1q25-q31 (ARMD1)에 대해 AMD 표현형을 지니는 한 패밀리의 연계가 문서화되어 있다 (Klein et al., 1998). HEMICENTIN-1은 비록 이의 역할이 확실하게 확인되지는 않았으나 원인이 되는 유전자인 것으로 제안되었다 (Schultz et al., 2003). 여러 연구에서 염색체 1q에 대한 중복 유전자좌의 동정은 (Weeks et al., 2001; Iyengar et al., 2003; Weeks et al., 2004) 이러한 유전자좌가 AMD-관련 유전자(들)를 포함할 수 있음을 제안한다.
- [0004] AMD의 개시와 관련된 검증적인 안구 병변인 드루젠(drusen)의 최근 연구는 조기 및 후발성 형태의 AMD의 병인론에서, 특히 보체 활성화시에, 염증 및 다른 면역-매개 과정에 대한 역할을 관련시켰다 (Hageman et al., 1999, 2001; Mullins et al., 2000, 2001; Russell et al., 2000; Anderson et al., 2002, 2004; Johnson et al., 2000, 2001; Crabb et al., 2002; Ambati et al., 2003; Penfold et al., 2001; Espinosa-Heidman et al., 2003). 이러한 연구들은 브러치 막을 따라 드루젠내 (RPE 및 이의 맥락막을 분리시키는 콜라겐 및 엘라스틴으로 구성된 세포외 층) 및 드루젠 위를 덮는 RPE 세포내 말단 경로 보체 성분들 (C5, C6, C7, C8 및 C9) 및 말단 경로의 활성화-특이적인 보체 단백질 단편 (C3b, iC3b, C3dg 및 C5b-9) 뿐만 아니라 다양한 보체 경로 조절인자 및 억제제 (인자 H, 인자 I, 인자 D, CD55 및 CD59 포함)를 개시하였다 (Johnson et al., 2000, 2001; Mullins et al. 2000, 2001; Crabb et al., 2002). 이러한 드루젠-관련 분자 중의 다수가 이전에 간에서 주로 합성되는 것으로 여겨지는 순환 혈장 단백질이다. 흥미롭게도, 다수는 RPE 및/또는 맥락막 세포에 의해 국소적으로 합성되는 것으로 나타났다.
- [0005] 보체 시스템의 활성화는 정상적인 숙주 방어 및 상해에 대한 반응에서 중요한 역할을 한다 (Kinoshita, 1991). 죽상경화증 (Torzewski et al., 1997; Niculescu et al., 1999), 알츠하이머병 (Akiyama et al., 2000) 및 사

구체신염 (Schwartz et al., 2001)에서 제시된 대로, 특정 보체-관련 유전자에서의 돌연변이에 의해 종종 야기되는 이 시스템의 부적절한 활성화 및/또는 조절은 자가면역 속발 및 국소 조직 파괴에 영향을 미칠 수 있다 (Holers, 2002; Liszewski and Atkinson, 1991; Morgan and Walport, 1001; Shen and Meri, 2003).

[0006] 막증식성 사구체신염 타입 2 (MPGN II)는 보체 연쇄증폭반응의 대안적인 경로의 비조절된 전신 활성화와 관련된 희귀 질병이다. 이 질병은 신장 사구체 지하막내에서 보체의 대안적인 경로에 수반되는 단백질인 C3 및 C3c로 이루어진 비정상적인 전자-밀집 물질의 침착을 특징으로 하며, 궁극적으로 신부전을 일으킨다. 흥미롭게도, MPGNII에 걸린 많은 환자들이 비록 20년이 지나 종종 검출되긴 하나, 임상적으로 및 구성적으로 AMD에서의 형태와 구별할 수 없는 황반 드루젠, RPE 탈착 및 맥락막 신생혈관 막을 발생시킨다 (Mullins et al., 2001; O'Brien et al., 1993; Huang et al., 2003; Colville et al., 2003; Duvall- Young et al., 1989a, 1989b; Raines et al., 1989; Leys et al., 1990; McAvoy and Silvestri, 2004; Bennett et al., 1989; Orth and Ritz, 1998; Habib et al., 1975).

[0007] MPGNII에 걸린 대부분의 환자에서, 보체 연쇄증폭반응을 조절할 능력이 없음은 C3bBb에 대해 유도된 자가항체에 의해 막개된다. 그러나 다른 MPGNII 환자들은 대안적인 보체 경로의 주요 억제제인 인자 H (Ault et al., 1997; Dragon-Durey et al., 2004)에서의 돌연변이를 포함한다. 인자 H (I1166R)에서의 점 돌연변이는 요크셔 피그에서 MPGNII를 야기하고 (Jansen et al., 1998) 인자 H 결핍 마우스는 심각한 사구체신염을 발생시킨다 (Pickering et al., 2002). 더욱이, 관련 질병인 MPGNII에 걸린 몇몇 광범한 가족내에서 질병에 걸린 개체들은 AMD에 대한 전 범위-계놈 결합 연구에서 동정되었던 유전자와 중복되는 영역인 염색체 1q31-32 (Neary et al., 2002)와의 연계를 나타낸다 (상기 참조). 이 특정한 유전자자는 다수의 보체 경로-연관된 유전자를 함유한다. 보체 활성화(RCA) 유전자 클러스터의 조절인자로서 언급되는 이러한 유전자 중 한 그룹은 인자 H, 5개의 인자 H-관련 유전자 (CFHR1, CFHR2, CFHR3, CFHR4 및 CFHR5), 및 응고 인자 XIII의 베타 서브유닛을 엔코딩하는 유전자를 함유한다. C4BPA, C4BPB, C4BPAL2, DAF (CD55) CR1, CR2, CR1L 및 MCP (CD46)를 포함하는 보체 경로-연관된 유전자의 두번째 클러스터는 1q25-31 유전자자의 바로 옆에 있다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0008] 발명의 개요

[0009] 본 발명은 연령-관련 황반 변성(AMD) 및 막증식성 사구체신염 타입 2(MPGNII)의 발생과 연관된 보체 인자 H 유전자의 다형성 및 일배체형에 관한 것이다. 본 발명은 또한 AMD 및 MPGNII의 발생과 연관된 보체 인자 H-관련 5 (CFHR5) 유전자의 다형성 및 일배체형에 관한 것이다. 본 발명은 상기 질병 및 다른 질병을 진단, 모니터링 및 치료하는 방법을 제공한다.

[0010] 일 측면에서, 본 발명은 인자 H 유전자의 다형성 부위 또는 다형성 부위들에서 변이 또는 변이들의 존재 또는 부재를 검출하는 것을 포함하여, 연령-관련 황반 변성(AMD)을 발생시키는 피검체의 성향을 결정하는 진단 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 본 발명은 개체의 인자 H 유전자에서 다형성의 존재 또는 부재를 검출하는 것을 포함하여 AMD를 발생시키는 증가된 감수성을 진단하는 방법을 제공한다. 이 방법들은 DNA가 인자 H 유전자의 다형성을 함유하는지를 결정하기 위해 개체로부터 DNA를 수득하고 개체로부터의 DNA를 분석하는 것을 포함할 수 있다. 특정 다형성은 개체가 대조 개체군에 비해 AMD를 발생시키는 증가된 감수성을 지님을 나타낸다. 특정 다형성은 개체가 AMD를 발생시킬 가능성성이 낮음을 나타낸다. 특정 다형성은 개체가 AMD를 발생시킬 가능성이 높지도 않고 낮지도 않음을 나타낸다.

[0011] 일 구체예에서, 피검체에서 연령-관련 황반 변성 (AMD)이 발생될 성향을 진단하는 방법은 피검체로부터 DNA 샘플을 수득하고 환자의 DNA에서 AMD의 발생과 관련된 다형성의 존재 또는 부재를 검출하는 것을 포함하고, 다형성의 존재는 피검체가 AMD를 발생시키는 증가된 성향을 지님을 나타내고 다형성의 부재는 피검체가 감소된 AMD 발생 성향을 지님을 나타낸다.

[0012] 관련 측면에서, 본 발명은 개체의 인자 H 일배체형을 측정하는 것을 포함하여 AMD 발생에 대한 감수성을 진단하는 방법을 제공한다. 이 방법은 개체로부터 DNA를 수득하고 개체의 DNA를 분석하여 이들의 인자 H 일배체형을 측정하는 것을 포함한다. 특정 일배체형 (위험 일배체형)은 개체가 AMD 발생에 대해 증가된 감수성을 지님을 나타낸다. 특정 일배체형 (보호 일배체형)은 개체가 AMD 발생에 대해 감소된 감수성을 지님을 나타낸다. 특정 일배체형 (중성 일배체형)은 개체의 AMD 발생 가능성이 높지도 않고 낮지도 않음을 나타낸다.

- [0013] 관련 구체예에서, 인자 H 유전자의 다형성 부위에서 변이의 존재 또는 부재는 유전자에 의해 엔코딩되는 RNA 또는 인자 H 단백질 (예컨대, 단백질 이소형)과 같은 유전자 생성물을 분석함에 의해 결정된다. 변이 단백질의 발현은 인자 H 유전자에서의 변이를 나타내고 AMD를 발생시키는 증가되거나 감소된 성향을 나타낼 수 있다. 단백질은 면역검정 및 다른 방법을 이용하여 검출될 수 있다.
- [0014] 또 다른 관련 측면에서, 본 발명은 개체의 생물학적 샘플에서 변이 인자 H 폴리펩티드를 검출함에 의해 AMD 및 다른 질환을 발생시킬 감수성을 진단하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 항체-기재 검정을 이용하여 개체의 생물학적 샘플, 예컨대 혈청 샘플을 항체와 접촉시키고 변이 인자 H 폴리펩티드의 존재 또는 부재를 검출함에 의해 개체의 AMD 또는 다른 질환을 진단한다. 일 구체예에서, 항체는 변이 인자 H 폴리펩티드에 특이적인 에피토프(즉, 야생형 인자 H 폴리펩티드에서는 발견되지 않음)와 특이적으로 상호작용한다. 일 구체예에서, 분리-기재 검정 (예컨대, PAGE)을 이용하여 개체의 생물학적 샘플, 예컨대 혈청 샘플에서 변이 인자 H 폴리펩티드의 존재 또는 부재를 검출함에 의해 개체의 AMD 또는 다른 질환을 진단한다.
- [0015] 일 측면에서, 본 발명은 전신 및/또는 안구의 인자 H 수준의 유형 및/또는 양을 조절함에 의해 변이 인자 H 유전자와 관련된 AMD 또는 다른 질환에 걸린 개체(예컨대, AMD 증상을 발생시킬 위험이 높음을 나타내는 다형성 또는 일배체형이 검출된 개체)를 치료하는 방법을 제공한다. 인자 H 폴리펩티드는 야생형 인자 H 폴리펩티드 또는 변이 인자 H 폴리펩티드일 수 있다. 인자 H 폴리펩티드는 위험 일배체형과 연관된 대립유전자라기보다는 중성 또는 보호 대립유전자에 의해 엔코딩된 서열을 지니는 인자 H 폴리펩티드일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 방법은 개체에게 인자 H 폴리펩티드를 질환의 증상을 감소시키기에 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다. 일 구체예에서, 이 방법은 개체에게 인자 H 폴리펩티드를 질환의 증상을 발생시키는 성향을 감소시키고 질환의 발생 또는 진행을 지연시키기에 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다. 일 구체예에서, 이 방법은 인자 H를 함유하는 혈액을 투여하는 것을 포함한다. 일 구체예에서, 이 방법은 인자 H 폴리펩티드를 엔코딩하는 누클레오티드 서열을 포함하는 핵산 (예컨대, 이식유전자)을 투여하는 것을 포함한다. 일 구체예에서, 이 방법은 인자 H 폴리펩티드를 발현시키는 세포를 투여하는 것을 포함한다.
- [0016] 일 측면에서, 본 발명은 변이 인자 H 유전자와 관련된 AMD 또는 다른 질환에 걸린 개체(예컨대, AMD 증상을 발생시킬 위험이 높음을 나타내는 다형성 또는 일배체형이 검출된 개체)를 치료하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 상기 방법은 변이 인자 H의 양 또는 인자 H를 엔코딩하는 유전자의 발현을 감소시키는 작용제를 환자에서 질환의 증상을 감소시키기에 효과적인 양으로 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 관련 구체예에서, 개체의 변이 인자 H 폴리펩티드 억제제 (예컨대, 불활성화제)의 치료적 양을 투여한다.
- [0017] 일 구체예에서, 억제용 핵산 (예컨대, 적어도 변이 인자 H 폴리펩티드의 누클레오티드 서열의 일부에 상보적인 RNA)을 환자에게 투여한다. 일 구체예에서, 변이 인자 H 폴리펩티드를 엔코딩하는 RNA에 상보적인 정제된 안티센스 RNA를 투여한다.
- [0018] 또 다른 구체예에서, 개체에서 변이 인자 H 폴리펩티드를 부분적으로 불활성화시키기에 충분한 치료적 양의 항-CFH 항체를 투여한다.
- [0019] 또 다른 구체예에서, 개체를 치료하여 혈액으로부터 인자 H의 유해한 형태를 제거한다 (예컨대, 혈장반출, 항체-유도된 혈장반출, 또는 인자 H 결합 부분, 예컨대 혼합과의 복합체화).
- [0020] 일 측면에서, 본 발명은 변이 인자 H 폴리펩티드를 엔코딩하는 정제된 DNA, 변이 인자 H 폴리펩티드를 엔코딩하는 정제된 RNA, 변이 인자 H 폴리펩티드를 엔코딩하는 RNA에 상보적인 정제된 안티센스 RNA, 및 정제된 변이 인자 H 폴리펩티드를 제공한다. 관련 측면에서, 본 발명은 야생형 또는 변이 인자 H 폴리펩티드 또는 생물학적으로 활성인 인자 H의 단편을 발현시키는 핵산을 제공한다.
- [0021] 일 측면에서, 본 발명은 인자 H 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산을 포함하는 유전자 치료 벡터를 제공한다. 벡터는 다수의 세포 유형에서 인자 H 유전자의 발현을 유도하는 프로모터를 포함할 수 있다. 대안적으로, 벡터는 특정 세포 유형, 예를 들어 망막 세포 또는 신장 세포에서만 인자 H 유전자의 발현을 유도하는 프로모터를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 인자 H 단백질을 엔코딩하는 유전자 치료 벡터 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 함유하는 약제학적 조성물이 제공되며, 이 때 조성물에는 병원체가 없고 사람 환자에게 투여하기에 적합한다. 일 구체예에서, 엔코딩된 인자 H 폴리펩티드는 보호 변이체이다.
- [0022] 일 측면에서, 본 발명은 재조합 또는 정제된 인자 H 폴리펩티드를 함유하는 조성물을 제공하고, 이 때 폴리펩티드는 보호 변이체이다.

- [0023] 관련 측면에서, 본 발명은 재조합 또는 정제된 인자 H 폴리펩티드 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 함유하는 약제학적 조성물을 제공하고, 이 때 조성물에는 병원체가 없고 사람 환자에게 투여하기에 적합한다. 일 구체예에서, 엔코딩된 인자 H 폴리펩티드는 야생형 서열을 지닌다. 일 구체예에서, 엔코딩 인자 H 폴리펩티드는 보호 변이체이다.
- [0024] 일 측면에서, 본 발명은 변이 인자 H 폴리펩티드와 특이적으로 상호작용하나 야생형 인자 H 폴리펩티드와는 상호작용하지 않는 항체를 제공한다. 이러한 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날일 수 있고 빼기 기술에 의해 수득될 수 있다. 이러한 항체들은 변이 인자 H 폴리펩티드를 불활성화시키기에 충분할 수 있다. 관련 측면에서, 본 발명은 항-인자 H 항체 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 함유하는 약제학적 조성물을 제공하고, 이 때 조성물에는 병원체가 없고 사람 환자에게 투여하기에 적합하다.
- [0025] 일 측면에서, 본 발명은 AMD를 발생시킬 위험이 증가되거나 감소되는 것과 관련된 변이 인자 H 단백질을 동정하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 본 발명은 (a) 보호 일배체형을 갖는 개체를 동정하고 (b) 개체의 계놈에서 엔코딩된 인자 H의 아미노산 서열(들)을 결정함에 의해 보호 인자 H 단백질을 동정하는 방법을 제공하고, 이 때 보호 인자 H 단백질은 보호 일배체형을 갖는 대립유전자에 의해 엔코딩된다. 일 구체예에서, 본 발명은 (a) 중성 일배체형을 갖는 개체를 동정하고 (b) 개체의 계놈에서 엔코딩된 인자 H의 아미노산 서열(들)을 결정함에 의해 중성 인자 H 단백질을 동정하는 방법을 제공하고, 이 때 중성 인자 H 단백질은 중성 일배체형을 갖는 대립유전자에 의해 엔코딩된다. 관련 구체예에서, 본 발명은 (a) AMD를 발생시킬 위험의 감소와 관련된 일배체형 또는 이배체형을 갖는 개체를 동정하고; (b) 개체로부터 계놈 DNA 또는 RNA를 수득하고; (c) 개체의 계놈에서 엔코딩된 인자 H의 아미노산 서열(들)을 결정하는 것을 포함하여 AMD를 발생시킬 위험의 감소와 관련된 인자 H의 변이 형태를 동정하는 방법을 제공하고, 이 때 보호 인자 H 단백질은 AMD를 발생시킬 위험의 감소와 관련된 일배체형을 갖는 대립유전자에 의해 엔코딩된다. 일 구체예에서, 보호 또는 중성 인자 H 단백질은 야생형 인자 F 폴리펩티드의 아미노산 서열을 갖지 않는다.
- [0026] 관련 방법에서, AMD를 발생시킬 위험의 증가와 관련된 인자 H의 형태는 (a) 위험 일배체형을 갖는 개체를 동정하고 (b) 개체의 계놈에서 엔코딩된 인자 H의 아미노산 서열(들)을 결정함에 의해 동정되며, 이 때 위험 인자 H 단백질은 위험 일배체형을 갖는 대립유전자에 의해 엔코딩된다. 관련 구체예에서, 본 발명은 (a) AMD를 발생시킬 위험의 증가와 관련된 일배체형 또는 이배체형을 갖는 개체를 동정하고; (b) 개체로부터 계놈 DNA 또는 RNA를 수득하고; (c) 개체의 계놈에서 엔코딩된 인자 H의 아미노산 서열(들)을 결정하는 것을 포함하여 AMD를 발생시킬 위험의 증가와 관련된 인자 H 단백질은 AMD를 발생시킬 위험의 증가와 관련된 일배체형을 갖는 대립유전자에 의해 엔코딩된다. 일 구체예에서, 위험 인자 H 단백질은 야생형 인자 F 폴리펩티드의 아미노산 서열을 갖지 않는다.
- [0027] 일 측면에서, 본 발명은 전장 인자 H 대 환자의 생물학적 샘플에서 절단된 인자 H의 비를 검출함에 의해 AMD 또는 다른 질환을 발생시키는 성향 또는 감수성을 진단하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 피검체에서 AMD를 발생시키는 성향 또는 감수성을 진단하는 방법은 피검체로부터 RNA 샘플을 수득하고 환자의 RNA에서 엑손 10A (즉, 절단된 인자 H)에 대한 엑손 10 (전장 인자 H)의 발현 비를 검출하는 것을 포함하며, 비의 증가는 피검체가 AMD를 발생시키는 증가된 성향 또는 감수성을 지님을 나타내고 비의 감소는 피검체가 AMD를 발생시키는 감소된 성향 또는 감수성을 지님을 나타낸다. 일 구체예에서, 피검체에서 AMD를 발생시키는 성향 또는 감수성을 진단하는 방법은 피검체로부터 단백질 샘플을 수득하고 환자의 단백질에서 절단된 인자 H에 대한 전장 인자 H의 발현 비를 검출하는 것을 포함하며, 비의 증가는 피검체가 AMD를 발생시키는 증가된 성향 또는 감수성을 지님을 나타내고 비의 감소는 피검체가 AMD를 발생시키는 감소된 성향 또는 감수성을 지님을 나타낸다.
- [0028] 일 측면에서, 본 발명은 인자 H 유전자로부터 유도된 핵산과 같은, 인자 H 단백질을 엔코딩하는 재조합 또는 정제된 핵산 또는 이의 단편을 함유하는 세포를 제공한다. 세포는 세균 또는 효모, 또는 연구 및 약물 개발에 유용한 임의의 다른 세포일 수 있다. 따라서, 본 발명은 재조합 변이 사람 인자 H를 발현시키는 단리된 숙주 세포 또는 세포주를 제공한다. 일 구체예에서, 변이체는 위험 변이체이고 아미노산 위치 402에 히스티딘을 지닌다. 일 구체예에서, 변이체는 보호 변이체이고 아미노산 위치 62에 이소류신을 지닌다. 일 구체예에서, 변이체는 중성 변이체이다. 일 구체예에서, 위험, 보호 또는 중성 변이체 인자 H 단백질은 야생형 인자 H 폴리펩티드의 아미노산 서열을 갖지 않는다.
- [0029] 일 측면에서, 본 발명은 유전자 이식된 사람이 아닌 동물을 제공하고, 이의 체세포 및 배아 세포는 사람 변이 인자 H 폴리펩티드를 엔코딩하는 이식유전자를 함유한다. 본 발명의 유전자 이식된 동물은 AMD 모델로서 그리고 AMD를 치료하기에 유용한 작용제를 스크리닝하기 위해 사용된다. 동물은 마우스, 벌레, 또는 연구 및 약물

개발 (인자 H의 재조합 생성과 같은)에 유용한 임의의 다른 동물일 수 있다. 일 구체예에서, 인자 H는 변이 사람 인자 H이고, 이 때 상기 변이체는 아미노산 62에 이소류신을 지니거나 아미노산 402에 히스티딘을 지닌다.

- [0030] 일 측면에서, 본 발명은 표 1A, 1B 및 1C에 개시된 인자 H 유전자의 다형성 부위에 결합되는 다형성 부위들을 스크리닝하는 방법을 제공한다. 이 방법은 인자 H 유전자의 다형성 부위에 결합된 유전자의 다형성 부위를 동정하고, 결합된 다형성 부위가 AMD 표현형과 관련된 인자 H 유전자의 다형태와의 평형 비평형에서 다형태를 지니는지를 나타내는 개체군의 일배체형을 결정하는 것을 포함하고, 이 때 인자 H 유전자의 다형성 부위의 다형태는 AMD와 관련이 있다.
- [0031] 일 측면에서, 본 발명은 AMD에 대해 상기 기술된 대로 수행된, MPGNII의 진단, 치료 및 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0032] 일 측면에서, 본 발명은 CFHR5 유전자의 다형성 부위 또는 다형성 부위들에서 변이 또는 변이들의 존재 또는 부재를 검출하는 것을 포함하여, AMD 또는 MPGNII를 발생시키는 피검체의 성향을 결정하는 진단 방법을 제공한다. 일 측면에서, 본 발명은 개체의 CFHR5 유전자에서 다형성의 존재 또는 부재를 검출하는 것을 포함하여, AMD 또는 MPGNII를 발생시키는 증가된 감수성을 진단하는 방법을 제공한다. 이 방법은 개체로부터 DNA를 수득하고 개체로부터의 DNA를 분석하여 DNA가 CFHR5 유전자에 다형성을 함유하는지를 결정하는 것을 포함할 수 있다. 특정 다형성은 개체가 AMD 또는 MPGNII를 발생시키는 증가된 감수성을 지님을 나타낸다. 특정 다형성은 개체가 AMD 또는 MPGNII를 발생시킬 가능성이 증가되지도 않고 감소되지도 않았음을 나타낸다.
- [0033] 일 구체예에서, 피검체에서 AMD 또는 MPGNII를 발생시키는 성향을 진단하는 방법은 피검체로부터 DNA 샘플을 수득하고 환자의 DNA에서 AMD 또는 MPGNII의 발생과 연관된 다형성의 존재 또는 부재를 검출하는 것을 포함하며, 다형성의 존재는 피검체가 AMD 또는 MPGNII를 발생시키는 증가된 성향을 지님을 나타내고 다형성의 부재는 피검체가 AMD 또는 MPGNII를 발생시키는 감소된 성향을 지님을 나타낸다.
- [0034] 관련 구체예에서, CFHR5 유전자의 다형성 부위에서 변이의 존재 또는 부재는 유전자에 의해 엔코딩된 RNA 또는 CFHR5 단백질 (예컨대, 단백질 이소형)과 같은 유전자 생성물의 분석에 의해 결정된다. 변이 단백질의 발현은 CFHR5 유전자에서의 변이를 나타내며 AMD 또는 MPGNII를 발생시키는 증가되거나 감소된 성향을 나타낼 수 있다. 단백질은 면역검정 및 다른 방법을 이용하여 검출될 수 있다.
- [0035] 관련 측면에서, 본 발명은 개체의 CFHR5 일배체형을 측정하는 것을 포함하여 AMD 또는 MPGNII 발생에 대한 감수성을 진단하는 방법을 제공한다. 이 방법은 개체로부터 DNA를 수득하고 개체의 DNA를 분석하여 이들의 CFHR5 일배체형을 측정하는 것을 포함한다. 특정 일배체형 (위험 일배체형)은 개체가 대조 개체군에 비해 AMD 또는 MPGNII 발생에 대해 증가된 감수성을 지님을 나타낸다. 특정 일배체형 (보호 일배체형)은 개체가 AMD 또는 MPGNII 발생에 대해 감소된 감수성을 지님을 나타낸다. 특정 일배체형 (중성 일배체형)은 개체의 AMD 또는 MPGNII 발생 가능성이 높지도 않고 낮지도 않음을 나타낸다.
- [0036] 또 다른 관련 측면에서, 본 발명은 개체의 생물학적 샘플에서 변이 CFHR5 폴리펩티드를 검출함에 의해 AMD 또는 MPGNII 또는 다른 질환을 발생시킬 감수성을 진단하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 항체-기재 검정을 이용하여 개체의 생물학적 샘플, 예컨대 혈청 샘플을 항체와 접촉시키고 변이 CFHR5 폴리펩티드의 존재 또는 부재를 검출함에 의해 개체의 AMD 또는 MPGNII 또는 다른 질환을 진단한다. 일 구체예에서, 항체는 변이 CFHR5 폴리펩티드에 특이적인 에피토프(즉, 야생형 CFHR5 폴리펩티드에서는 발견되지 않음)와 특이적으로 상호작용한다. 일 구체예에서, 분리-기재 검정 (예컨대, PAGE)을 이용하여 개체의 생물학적 샘플, 예컨대 혈청 샘플에서 변이 CFHR5 폴리펩티드의 존재 또는 부재를 검출함에 의해 개체의 MPGNII 또는 다른 질환을 진단한다. 다양한 유형의 면역검정 포맷이 샘플 중 CFH 또는 CFHR5 폴리펩티드 또는 단백질을 검정하기 위해 사용될 수 있다. 여기에는 샌드위치 ELISA, 면역검정, 형광면역검정, 면역조직화학 검정, 도트-블롯, 딥-스티 및 웨스턴 블로트가 있다.
- [0037] 일 측면에서, 본 발명은 CFHR5의 전신 및/또는 신장 수준의 유형 및/또는 양을 조절함에 의해 변이 CFHR5 유전자와 관련된 AMD 또는 MPGNII 또는 다른 질환에 걸렸거나 그럴 위험이 있는 개체(예컨대, AMD 또는 MPGNII 증상을 발생시킬 위험이 높음을 나타내는 다형성 또는 일배체형이 검출된 개체)를 치료하는 방법을 제공한다. CFHR5 폴리펩티드는 위험 일배체형과 연관된 대립유전자라기보다는 중성 또는 보호 대립유전자에 의해 엔코딩된 CFHR5 폴리펩티드일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 방법은 개체에게 CFHR5 폴리펩티드를 질환의 증상을 감소시키기에 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다. 일 구체예에서, 이 방법은 개체에게 CFHR5 폴리펩티드를 질환의 증상을 발생시키는 성향을 감소시키고 질환의 발생 또는 진행을 지연시키기에 효과적인 양으로 투여하는

것을 포함한다. 일 구체예에서, 이 방법은 CFHR5를 함유하는 혈액을 투여하는 것을 포함한다. 일 구체예에서, 이 방법은 CFHR5 폴리펩티드를 엔코딩하는 누클레오티드 서열을 포함하는 핵산 (예컨대, 이식유전자)을 투여하는 것을 포함한다.

- [0038] 일 측면에서, 본 발명은 변이 CFHR5 유전자와 관련된 AMD 또는 MPGNII 또는 다른 질환에 걸린 개체(예컨대, AMD 또는 MPGNII 증상을 발생시킬 위험이 높음을 나타내는 다형성 또는 일배체형이 검출된 개체)를 치료하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 상기 방법은 변이 CFHR5의 양 또는 CFHR5를 엔코딩하는 유전자의 발현을 감소시키는 작용제를 환자에서 질환의 증상을 감소시키기에 효과적인 양으로 환자에게 투여하는 것을 포함한다. CFHR5 폴리펩티드는 야생형 CFHR5 폴리펩티드 또는 변이 CFHR5 폴리펩티드일 수 있다.
- [0039] 일 구체예에서, 억제용 핵산 (예컨대, 적어도 변이 CFHR5 폴리펩티드의 누클레오티드 서열의 일부에 상보적인 RNA)을 개체에게 투여한다. 일 구체예에서, 변이 CFHR5 폴리펩티드를 엔코딩하는 RNA에 상보적인 정제된 안티센스 RNA를 투여한다.
- [0040] 또 다른 구체예에서, 개체에서 변이 CFHR5 폴리펩티드를 부분적으로 불활성화시키기에 충분한 치료적 양의 항-CFHR5 항체를 투여한다.
- [0041] 관련 구체예에서, 치료적 양의 변이 CFHR5 폴리펩티드의 억제제 (예컨대, 불활성화제)를 환자에게 투여한다.
- [0042] 또 다른 구체예에서, 개체를 치료하여 혈액으로부터 CFHR5의 유해한 형태를 제거한다 (예컨대, 혈장반출, 항체-유도된 혈장반출, 또는 CFHR5 결합 부분, 예컨대 혜파린과의 복합체화).
- [0043] 일 측면에서, 본 발명은 변이 CFHR5 폴리펩티드를 엔코딩하는 정제된 DNA, 변이 CFHR5 폴리펩티드를 엔코딩하는 정제된 RNA, 변이 CFHR5 폴리펩티드를 엔코딩하는 RNA에 상보적인 정제된 안티센스 RNA, 및 정제된 변이 CFHR5 폴리펩티드를 제공한다. 관련 측면에서, 본 발명은 야생형 또는 변이 CFHR5 폴리펩티드 또는 생물학적으로 활성인 CFHR5의 단편을 발현시키는 핵산을 제공한다.
- [0044] 일 측면에서, 본 발명은 CFHR5 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산을 포함하는 유전자 치료 벡터를 제공한다. 벡터는 다수의 세포 유형에서 CFHR5 유전자의 발현을 유도하는 프로모터를 포함할 수 있다. 대안적으로, 벡터는 특정 세포 유형, 예를 들어 맘막 세포 또는 신장 세포에서만 (예컨대, 내피 세포, 혈관사이 세포, 발세포) CFHR5 유전자의 발현을 유도하는 프로모터를 포함할 수 있다. 일 측면에서, CFHR5 단백질을 엔코딩하는 유전자 치료 벡터 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 함유하는 약제학적 조성물이 제공되며, 이 때 조성물에는 병원체가 없고 사람 환자에게 투여하기에 적합한다. 일 구체예에서, 엔코딩된 CFHR5 폴리펩티드는 보호 변이체이다.
- [0045] 일 측면에서, 본 발명은 재조합 또는 정제된 CFHR5 폴리펩티드를 함유하는 조성물을 제공하고, 이 때 폴리펩티드는 보호 변이체이다.
- [0046] 관련 측면에서, 본 발명은 재조합 또는 정제된 CFHR5 폴리펩티드 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 함유하는 약제학적 조성물을 제공하고, 이 때 조성물에는 병원체가 없고 사람 환자에게 투여하기에 적합한다. 일 구체예에서, 엔코딩된 CFHR5 폴리펩티드는 보호 변이체이다.
- [0047] 일 측면에서, 본 발명은 변이 CFHR5 폴리펩티드와 특이적으로 상호작용하나 야생형 CFHR5 폴리펩티드와는 상호작용하지 않는 항체를 제공한다. 이러한 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날일 수 있고 빼기 기술에 의해 수득될 수 있다. 이러한 항체들은 변이 CFHR5 폴리펩티드를 불활성화시키기에 충분할 수 있다. 관련 측면에서, 본 발명은 항-CFHR5 항체 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 함유하는 약제학적 조성물을 제공하고, 이 때, 조성물에는 병원체가 없고 사람 환자에게 투여하기에 적합하다.
- [0048] 일 측면에서, 본 발명은 AMD 또는 MPGNII를 발생시킬 위험이 증가되거나 감소되는 것과 관련된 변이 CFHR5 단백질을 동정하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 본 발명은 (a) 보호 일배체형을 갖는 개체를 동정하고 (b) 개체의 게놈에서 엔코딩된 CFHR5의 아미노산 서열(들)을 결정함에 의해 보호 CFHR5 단백질을 동정하는 방법을 제공하고, 이 때 보호 CFHR5 단백질은 보호 일배체형을 갖는 대립유전자에 의해 엔코딩된다. 일 구체예에서, 본 발명은 (a) 중성 일배체형을 갖는 개체를 동정하고 (b) 개체의 게놈에서 엔코딩된 CFHR5의 아미노산 서열(들)을 결정함에 의해 중성 CFHR5 단백질을 동정하는 방법을 제공하고, 이 때 중성 CFHR5 단백질은 중성 일배체형을 갖는 대립유전자에 의해 엔코딩된다. 관련 구체예에서, 본 발명은 (a) AMD 또는 MPGNII를 발생시킬 위험의 감소와 관련된 일배체형 또는 이배체형을 갖는 개체를 동정하고; (b) 개체로부터 게놈 DNA 또는 RNA를 수득하고; (c) 개체의 게놈에서 엔코딩된 CFHR5의 아미노산 서열(들)을 결정하는 것을 포함하여 AMD 또는 MPGNII를 발생시

킬 위험의 감소와 관련된 CFHR5의 변이 형태를 동정하는 방법을 제공하고, 이 때 보호 CFHR5 단백질은 AMD 또는 MPGNII를 발생시킬 위험의 감소와 관련된 일배체형을 갖는 대립유전자에 의해 엔코딩된다. 일 구체예에서, 보호 또는 중성 CFHR5 단백질은 야생형 CFHR5 폴리펩티드의 아미노산 서열을 갖지 않는다.

[0049] 관련 방법에서, AMD 또는 MPGNII를 발생시킬 위험의 증가와 관련된 CFHR5의 형태는 (a) 위험 일배체형을 갖는 개체를 동정하고 (b) 개체의 게놈에서 엔코딩된 CFHR5의 아미노산 서열(들)을 결정함에 의해 동정되며, 이 때 위험 CFHR5 단백질은 위험 일배체형을 갖는 대립유전자에 의해 엔코딩된다. 관련 구체예에서, 본 발명은 (a) AMD 또는 MPGNII를 발생시킬 위험의 증가와 관련된 일배체형 또는 이배체형을 갖는 개체를 동정하고; (b) 개체로부터 게놈 DNA 또는 RNA를 수득하고; (c) 개체의 게놈에서 엔코딩된 CFHR5의 아미노산 서열(들)을 결정하는 것을 포함하여 AMD 또는 MPGNII를 발생시킬 위험의 증가와 관련된 CFHR5의 변이 형태를 동정하는 방법을 제공하고, 이 때 위험 CFHR5 단백질은 AMD 또는 MPGNII를 발생시킬 위험의 증가와 관련된 일배체형을 갖는 대립유전자에 의해 엔코딩된다. 일 구체예에서, 위험 CFHR5 단백질은 야생형 CFHR5 폴리펩티드의 아미노산 서열을 갖지 않는다.

[0050] 일 측면에서, 본 발명은 CFHR5 유전자로부터 유도된 재조합 또는 정제된 핵산을 함유하는 세포를 제공한다. 세포는 세균 또는 효모, 또는 연구 및 약물 개발에 유용한 임의의 다른 세포일 수 있다. 따라서, 본 발명은 재조합 변이 사람 CFHR5를 발현시키는 단리된 숙주 세포 또는 세포주를 제공한다. 일 구체예에서, CFHR5 변이체는 위험 변이체이고 아미노산 위치 46에 세린을 지닌다. 일 구체예에서, CFHR5 변이체는 중성 변이체이다. 일 구체예에서, 위험, 보호 또는 중성 변이체 CFHR5 단백질은 야생형 CFHR5 폴리펩티드의 아미노산 서열을 갖지 않는다.

[0051] 일 측면에서, 본 발명은 유전자 이식된 사람이 아닌 동물을 제공하고, 이의 체세포 및 배아 세포는 사람 변이 CFHR5 폴리펩티드를 엔코딩하는 이식유전자를 함유한다. 본 발명의 유전자 이식된 동물은 AMD 또는 MPGNII 모델로서 그리고 AMD 또는 MPGNII를 치료하기에 유용한 작용제를 스크리닝하기 위해 사용된다. 동물은 마우스, 벌레, 또는 연구 및 약물 개발 (CFHR5의 재조합 생성과 같은)에 유용한 임의의 다른 동물일 수 있다. 일 구체예에서, CFHR5는 변이 사람 CFHR5이고, 이 때 상기 CFHR5 변이체는 아미노산 46에 세린을 지닌다.

[0052] 일 측면에서, 본 발명은 표 14 또는 표 15에 개시된 CFHR5 유전자의 다형성 부위에 결합되는 다형성 부위들을 스크리닝하는 방법을 제공한다. 이 방법은 CFHR5 유전자의 다형성 부위에 결합된 유전자의 다형성 부위를 동정하고, 결합된 다형성 부위가 AMD 또는 MPGNII 표현형과 관련된 CFHR5 유전자의 다형태와의 평형 비평형에서 다형태를 지니는지를 나타내는 개체군의 일배체형을 결정하는 것을 포함하고, 이 때 CFHR5 유전자의 다형성 부위의 다형태는 AMD 또는 MPGNII와 관련이 있다.

[0053] 일 측면에서, 본 발명은 인자 H 일배체형을 분석하기 위한 키트를 제공한다. 키트는 환자의 AMD를 진단하는데 사용될 수 있다. 키트는 하나 이상의 인자 H 인자 H 대립유전자-특이적인 올리고누클레오티드 (예컨대, 대립유전자-특이적인 프라이머 또는 프로브), 또는 인자 H 폴리펩티드를 특이적으로 인식하는 항체를 포함할 수 있다. 인자 H 대립유전자-특이적 올리고누클레오티드는 인자 H 유전자의 코딩 (엑손) 또는 비-코딩 (프로모터, 5' 비번역됨, 인트론 또는 3'비번역됨) 영역으로부터 유도된 서열을 포함할 수 있다. 인자 H-특이적인 항체는 보통 또는 야생형 H 폴리펩티드 또는 변이 인자 H 폴리펩티드를 인식할 수 있고, 여기에서 하나 이상의 동일하지 않은 단일 누클레오티드 다형성(SNP)이 인자 H 코딩 영역에 존재한다. 키트는 AMD, 및 MPGNII와 같은 인자 H 유전자에서 SNP와 연관된 다른 질병을 진단하는데 사용될 수 있다. 키트는 CHFR5 폴리펩티드를 특이적으로 인식하는 하나 이상의 인자 H-관련 5 (CFHR5) 대립유전자-특이적인 올리고누클레오티드 (예컨대, 프라이머 및 프로브)를 대신 또는 추가로 포함할 수 있다. CFHR5 대립유전자-특이적인 프라이머 및 인자 H-관련 5 대립유전자-특이적인 올리고누클레오티드는 인자 H-관련 5 유전자의 코딩 (엑손) 또는 비-코딩 (프로모터, 5' 비번역됨, 인트론 또는 3' 비번역됨) 영역으로부터 유도된 서열을 포함할 수 있다. 인자 H-관련 5-특이적인 항체는 보통 또는 야생형 H 폴리펩티드 또는 변이 인자 H-관련 5 폴리펩티드를 인식할 수 있고, 여기에서 하나 이상의 동일하지 않은 단일 누클레오티드 다형성(SNP)이 인자 H-관련 5 코딩 영역에 존재한다.

[0054] 일 구체예에서, 키트는 표 1A, 표 1B 및/또는 표 1C에 나열된 다형성 부위에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 함유한다. 일 구체예에서, 프로브는 표 1A, 표 1B 및/또는 표 1C에 나열된 인자 H 유전자 다형성 부위에 걸치는 영역의 핵산 중복을 위한 프라이머이다. 일 구체예에서, 키트는 표 1A, 표 1B 및/또는 표 1C에 나열된 하나 이상의 다형성 부위에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 지닌다. 일 구체예에서, 키트는 하나 이상의 다형성 부위에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 지니고, 이 때 다형성 부위는 (a) rs529825; (b) rs800292; (c) rs3766404; (d) rs1061147; (e) rs1061170; (f) rs203674; (g)

rs529825 및 rs800292 중 적어도 하나; (h) rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 적어도 하나; (i) rs529825 및 rs800292 중 적어도 하나; 및 rs3766404; 및 rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 적어도 하나; 또는 Q) 적어도 rs529825, rs800292, rs3766404, rs1061170 및 rs203674를 포함한다.

[0055] 관련 구체예에서, 키트는 하나 이상의 다형성 부위에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 지니고, 이 때 다형성 부위는 (a) rs529825; (b) rs800292; (c) 인트론 2 (IVS2 또는 insTT) (d) rs3766404; (e) rs1061147; (f) rs1061170; (g) 엑손 10A; (h) rs203674; (i) rs375046; Q) rs529825 및 rs800292; (k) rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 적어도 둘 또는 셋; (l) rs529825 및 rs800292 중 적어도 하나; 및 인트론 2; 및 rs3766404; 및 rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 적어도 하나; 및 엑손 10A; 및 rs375046; (m) 적어도 rs529825; rs800292; 인트론 2; rs3766404; rs1061170; 엑손 10A; rs203674; 및 rs375046; (n) rs529825, rs800292, 인트론 2; rs3766404, rs1061170, 엑손 10A, rs203674, 및 rs375046 중 적어도 둘, 또는 적어도 셋, 또는 적어도 넷; (o) 엑손 22 (1210); 또는 (p) 임의의 상기 언급된 변이 또는 변이의 세트 (a-o)와 조합된 엑손 22 (1210)를 포함한다. 일 구체예에서, 키트는 rs460897 및 rs460184 중 하나 또는 둘 모두에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 지닌다. 일 구체예에서, 키트는 하나 이상의 다형성 부위에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 대립유전자를 지니고, 이 때 다형성 부위는 (a) rs3753394; (b) rs529825; (c) rs800292; (d) 인트론 2 (IVS2 또는 insTT); (e) rs3766404; (f) rs1061147; (g) rs1061170; (h) rs2274700; (i) rs203674; (j) rs3753396; 및 (k) rs1065489로부터 선택된다.

[0056] 일 구체예에서, 키트는 상기 개시된 프로브 대신 또는 이에 추가하여 CFHR5 유전자에서 다형성 부위를 구별하는 프로브, 프라이머, 항체 등을 함유한다. 일 측면에서, 본 발명은 CFHR5 유전자의 변이에 기초하여 환자에서 AMD 또는 MPGNII를 진단하기 위한 키트를 제공한다. 키트는 하나 이상의 CFHR5-특이적인 프로브 또는 CFHR5 대립유전자-특이적인 올리고누클레오티드, 또는 CFHR5 폴리펩티드를 특이적으로 인식하는 항체를 포함할 수 있다. CFHR5-특이적인 프라이머 및 CFHR5 대립유전자-특이적인 올리고누클레오티드는 CFHR5 유전자의 코딩 (엑손) 또는 비-코딩 (프로모터, 5' 비번역됨, 인트론 또는 3' 비번역됨) 영역으로부터 유도된 서열을 포함할 수 있다. CFHR5-특이적인 항체는 보통 또는 야생형 H 폴리펩티드 또는 변이 CFHR5 폴리펩티드를 인식할 수 있고, 여기에서 하나 이상의 동일하지 않은 단일 누클레오티드 다형성(SNP)이 CFHR5 코딩 영역에 존재한다. 키트는 AMD 또는 MPGNII, 또는 CFHR5 유전자에서 SNP와 관련된 다른 질환을 진단하는데 이용될 수 있다.

[0057] 일 구체예에서, 키트는 표 14 또는 표 15에 나열된 다형성 부위에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 함유한다. 일 구체예에서, 프로브는 표 14 또는 표 15에 나열된 CFHR5 유전자 다형성 부위에 걸치는 영역의 핵산 증폭을 위한 프라이머이다. 일 구체예에서, 키트는 표 14 또는 표 15에 나열된 하나 이상의 다형성 부위에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 지닌다. 일 구체예에서, 키트는 하기 다형성 부위 중 하나, 둘 또는 모두에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 포함한다: rs9427661 (-249T>C); rs9427662 (-20T>C); 및 rs12097550 (P46S).

[0058] 일 구체예에서, 키트는 CFH 유전자의 다형성 부위 및 CFHR5와 같은 CFHR 유전자의 다형성 부위에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 함유한다.

[0059] 일 측면에서, 본 발명은 피검체의 일배체형을 결정하는 장치를 제공한다. 장치는, 예를 들어 환자에서 AMD 또는 다른 질병을 진단하는데 유용하다. 일 구체예에서, 장치는 표 1A, 1B 및/또는 1C에 나열된 다형성 부위에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 함유한다. 일 구체예에서, 프로브는 표 1A, 1B 및/또는 1C에 나열된 인자 H 유전자 다형성 부위에 걸치는 영역의 핵산 증폭을 위한 프라이머이다. 일 구체예에서, 장치는 표 1A, 1B 및/또는 1C에 나열된 하나 이상의 다형성 부위에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 지닌다. 일 구체예에서, 장치는 하나 이상의 다형성 부위에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 지니고, 이 때 다형성 부위는 (a) rs529825; (b) rs800292; (c) rs3766404; (d) rs1061147; (e) rs1061170; (f) rs203674; (g) rs529825 및 rs800292 중 적어도 하나; (h) rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 적어도 하나; (i) rs529825 및 rs800292 중 적어도 하나; 및 rs3766404; 및 rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 적어도 하나; 또는 (j) 적어도 rs529825, rs800292, rs3766404, rs1061170 및 rs203674를 포함한다.

[0060] 키트는 임의의 목적을 위해 MPGNII를 발생시키는 성향을 확인하거나 인자 H 일배체형을 결정하는데 사용될 수도 있다.

[0061] 관련 구체예에서, 장치는 하나 이상의 다형성 부위에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 지니고, 이 때 다형성 부위는 (a) rs529825; (b) rs800292; (c) 인트론 2 (IVS2 또는 insTT) (d) rs3766404; (e) rs1061147; (f) rs1061170; (g) 엑손 10A; (h) rs203674; (i) rs375046; Q) rs529825 및 rs800292; (k)

rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 적어도 둘 또는 셋; (1) rs529825 및 rs800292 중 적어도 하나; 및 인트론 2; 및 rs3766404; 및 rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 적어도 하나; 및 엑손 10A; 및 rs375046; (m) 적어도 rs529825; rs800292; 인트론 2; rs3766404; rs1061170; 엑손 10A; rs203674; 및 rs375046; (n) rs529825, rs800292; 인트론 2; rs3766404, rs1061170, 엑손 10A, rs203674, 및 rs375046 중 적어도 둘, 또는 적어도 셋, 또는 적어도 넷; (o) 엑손 22 (1210); 또는 (p) 임의의 상기 언급된 변이 또는 변이의 세트 (a-o)와 조합된 엑손 22 (1210)를 포함한다. 일 구체예에서, 장치는 rs460897 및 rs460184 중 하나 또는 둘 모두에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 지닌다. 일 구체예에서, 장치는 하나 이상의 다형성 부위에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 지니고, 이 때 다형성 부위는 (a) rs3753394; (b) rs529825; (c) rs800292; (d) 인트론 2 (IVS2 또는 insTT); (e) rs3766404; (f) rs1061147; (g) rs1061170; (h) rs2274700; (i) rs203674; (j) rs3753396; 및 (k) rs1065489로부터 선택된다. 일 구체예에서, 장치는 하나 이상의 다형성 부위에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 지니고, 이 때 다형성 부위는 (a) rs3753394; (b) rs529825; (c) rs800292; (d) 인트론 2 (IVS2 또는 insTT); (e) rs3766404; (f) rs1061147; (g) rs1061170; (h) rs2274700; (i) rs203674; (j) rs3753396; 및 (k) rs1065489로부터 선택된다.

[0062] 일 측면에서, 본 발명은 환자에서 AMD 또는 MPGNII를 진단하기 위한 장치를 제공한다. 일 구체예에서, 장치는 표 14 또는 표 15에 나열된 다형성 부위에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 함유한다. 일 구체예에서, 프로브는 표 14 또는 표 15에 나열된 CFHR5 유전자 다형성 부위에 걸치는 영역의 핵산 중폭을 위한 프라이머이다. 일 구체예에서, 장치는 표 14 또는 표 15에 나열된 하나 이상의 다형성 부위에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 지닌다. 본 발명의 장치는 상기 기술된 부위 및 달리 기술된 부위의 임의의 조합을 포함하여, 인자 H 및 CFHR5 변이 둘 모두를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 함유할 수 있다.

[0063] 상기 기술된 장치 및 이들의 용량은 임의의 목적으로 MPGNII를 발생시키는 성향을 확인하거나 인자 H 일배체형을 결정하는데 사용될 수도 있다.

[0064] 일 구체예에서, 장치는 상기 개시된 프로브 대신 또는 이에 추가하여 CFHR5 유전자에서 다형성 부위를 구별하는 프로브, 프라이머, 항체 등을 함유한다. 일 측면에서, 본 발명은 CFHR5 유전자의 변이에 기초하여 환자에서 AMD 또는 MPGNII를 진단하기 위한 장치를 제공한다. 장치는 하나 이상의 CFHR5-특이적인 프로브 또는 CFHR5 대립유전자-특이적인 올리고누클레오티드, 또는 CFHR5 폴리펩티드를 특이적으로 인식하는 항체를 포함할 수 있다. CFHR5-특이적인 프라이머 및 CFHR5 대립유전자-특이적인 올리고누클레오티드는 CFHR5 유전자의 코딩 (엑손) 또는 비-코딩 (프로모터, 5' 비번역됨, 인트론 또는 3' 비번역됨) 영역으로부터 유도된 서열을 포함할 수 있다. CFHR5-특이적인 항체는 보통 또는 야생형 H 폴리펩티드 또는 변이 CFHR5 폴리펩티드를 인식할 수 있고, 여기에서 하나 이상의 동일하지 않은 단일 누클레오티드 다형성(SNP)이 CFHR5 코딩 영역에 존재한다. 키트는 AMD 또는 MPGNII, 또는 CFHR5 유전자에서 SNP와 관련된 다른 질환을 진단하는데 이용될 수 있다.

[0065] 일 구체예에서, 장치는 표 14 또는 표 15에 나열된 다형성 부위에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 함유한다. 일 구체예에서, 프로브는 표 14 또는 표 15에 나열된 CFHR5 유전자 다형성 부위에 걸치는 영역의 핵산 중폭을 위한 프라이머이다. 일 구체예에서, 장치는 표 14 또는 표 15에 나열된 하나 이상의 다형성 부위에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 지닌다. 일 구체예에서, 키트는 하기 다형성 부위 중 하나, 둘 또는 모두에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 포함한다: rs9427661 (-249T>C); rs9427662 (-20T>C); 및 rs12097550 (P46S).

[0066] 일 구체예에서, 장치는 CFH 유전자의 다형성 부위 및 CFHR5와 같은 CFHR 유전자의 다형성 부위에서 대립유전자를 구별하는 프로브 또는 프라이머를 함유한다.

[0067] 본 발명의 추가의 측면이 전체 설명을 이해함에 의해 명백해질 것이다.

[0068] 도면의 간단한 설명

[0069] 도 1A-1L은 사람 망막 안료화된 상피에서 인자 H (도 1A-1H) 및 말단 보체 복합체 (C5b-9) (도 1I-1L)의 면역국소화를 도시한다. 약어: (RPE)-맥락막 (Chor) 복합체; 브리치 막 (BM); 망막 (Ret); 드루젠 (Dr).

[0070] 도 2는 사람 눈에서 추출된 RNA를 이용하여 인자 H 유전자 발현 (CFH 및 절단된 형태 HFL1)의 RT-PCR 분석을 도시한다.

[0071] 도 3은 분석에 사용된 12개 SNP, 인자 H 유전자의 22 엑손, 20개 단기 컨센서스 반복 (SCR), 병원체 및 다른 기질에 대한 결합 부위, 및 연계 비평형(LD) 차단의 대략적인 위치를 도시하는 사람 인자 H 유전자의 다이아그램

이다. CFH의 모든 22 엑손(인트론은 아님)을 도시하는 다이아그램은 일정한 비례로 그려진 것이 아니다.

[0072] 도 4는 원의 크기 및 위치에 의해 표시된 대로, 위험 (검은 원), 보호 (줄을 친 원), 중성 (빈 원) 및 조상 (표시됨) 일배체형 간의 상관관계 및 일배체형의 상대 빈도를 도시하는 사람 인자 H 유전자 SNP의 일배체형 네트워크 다이아그램이다.

[0073] 도 5는 사람 인자 H 유전자 일배체형 및 이배체형의 관련 분석을 도시한다. AMD 병증 및 대조군에서 8개의 유익한 SNP를 짹 결합 비평형에 대해 분석하였다. 비-코딩 가닥 상의 누클레오티드가 도시된 VIS1을 제외하고, 지시된 다형성 부위에 코딩 가닥상의 누클레오티드가 도시된다.

[0074] 도 6은 사람 인자 H cDNA (젠햄크 수탁 번호 Y00716 [서열번호 1])의 참조 형태의 3926개 염기 누클레오티드 서열을 도시한다. ATG 개시 코돈이 누클레오티드 위치 74에서 시작되며 TAG 종료 코돈이 누클레오티드 3769에서 끝난다.

[0075] 도 7은 서열번호 1에 의해 엔코딩된 폴리펩티드 서열(젠햄크 수탁 번호 Y00716 [서열번호 2])을 도시한다. 1231개 아미노산의 인자 H 폴리펩티드가 18개 아미노산의 N-말단 시그널 웨프티드를 포함한다.

[0076] 도 8은 사람 인자 H의 절단된 형태인 HFL1의 참조 형태의 1658개 염기 누클레오티드 서열을 도시한다 (젠햄크 수탁 번호 X07523 [서열번호 3]). ATG 개시 코돈이 누클레오티드 위치 74에서 시작되며 TGA 종료 코돈이 누클레오티드 1423에서 끝난다.

[0077] 도 9는 서열번호 3에 의해 엔코딩된 HFL1의 참조 형태의 폴리펩티드 서열(젠햄크 수탁 번호 X07523 [서열번호 4])을 도시한다. 449개 아미노산 HFL1 폴리펩티드가 18개 아미노산의 N-말단 시그널 웨프티드를 포함한다.

[0078] 도 10은 사람 인자 H의 예시적인 보호 변이체의 폴리펩티드 서열을 도시한다 [서열번호 5]. 상기 보호 변이 인자 H 폴리펩티드는 아미노산 위치 62에 이소류신 및 아미노산 위치 402에 티로신을 지닌다 (굵게 표시됨).

[0079] 도 11은 사람 인자 H의 절단된 형태인 HFL1의 예시적인 보호 변이체의 폴리펩티드 서열을 도시한다 (서열번호 6). 상기 보호 변이 절단된 인자 H 폴리펩티드는 아미노산 위치 62에 이소류신 및 아미노산 위치 402에 티로신을 지닌다 (굵게 표시됨).

[0080] 도 12는 (A) 광 현미경 및 (B) 전자 현미경에 의해 조사된, MPGNII에 걸린 환자에서 모세관벽을 두껍게 하는 조밀한 막내 침착을 지닌 두드러진 사구체 과세포충실성을 도시한다. 침착은 사구체 지하막(GBM)의 박막 반점에서 분절, 불연속 또는 확산 패턴을 형성할 수 있다. 광 현미경에 의해, 이들은 호산성 및 굴절성이고, 주기적인 산-시프를 이용하여 밝게 염색되며, 고도로 삼투성이고, 이는 이들의 전자-밀집 외형(A)을 설명한다. 전자 현미경에 의해서도, 침착에는 하부구조가 없고 매우 짙은 균질한 얼룩(B)처럼 보인다. 밀집 침착의 정확한 조성은 알려지지 않았다 (바, 5 μ m)

[0081] 도 13은 보체 연쇄증폭반응의 대안적인 경로의 활성화 및 조절을 도시하는 다이아그램이며, 이는 AMD 및 MPGNII 환자에서 높은 수준으로 전신적으로 활성화된다. 보체 연쇄증폭반응인 경로는 MPGNII/DDD 환자에서 높은 수준으로 전신적으로 활성화된다. 정상적으로, C3의 연속적인 저-수준 활성화가 틱-오버(tick-over)로서 공지된 자발적인 가수분해 공정에 의해 일어난다. C3 가수분해는 다이아그램의 상부에 도시된 큰 구조적 단백질 변화와 연관된다. 구조적 변화는 C3 절단 생성물인 C3b와 유사한 C3(H2O)을 만든다. 초기 전환효소, C3(H2O)Bb는 C3을 활성화시켜 C3b를 형성한다. C3b는 빨리 지나가는 반감기를 지니나, 이것이 IgG, 세포 또는 지하막에 결합하는 경우, 즉시 불활성화로부터 보호된다. (C3b)2-IgG 복합체는 유체상에서 형성되며 본원에서 Bb(C3b)2-IgG-프로페르딘 복합체로서 제시된, 대안적인 경로의 전환효소인, 인자 B 결합 및 C3bBb의 생성을 촉진하는 프로페르딘(P)에 결합된다. 증폭 루프는 화살표로 도시되어 있다. C3NeF는 C3 전환효소의 반감기를 연장시키며 삽입으로 표시되어 있다. C3 전환효소를 퇴화시키는 한 메커니즘은 오른쪽 하부에 fH로서 도시된, 보체 인자 H (CFH)와 이의 상호작용을 통한 것이다. 인자 H에서 말단 돌연변이의 결핍은 MPGNII/DDD와 관련이 있다.

[0082] 도 14는 염색체 1q32상에서 조절인자-의-보체-활성화 (RCA) 유전자 클러스터의 구성 및 보체 인자 H (CFH), 인자 H-유사 1 (CFHL1) 및 인자 H-관련 1, 2, 3, 4 및 5 (CFHR1, CFHR2, CFHR3, CFHR4 및 CFHR5)에서 단기 컨센서스 반복 (SCR)으로 공지되어 있는 대략 60개-아미노산 도메인의 정렬을 도시하는 다이아그램이다. CFH는 20개의 SCR을 지닌다. 이러한 SCR 중 일부를 지닌 상호작용 파트너가 결정되었고 오른쪽 상부에 도시된다 (CRP, C 반응 단백질; Hep, 혜파린). 보체 인자 H-유사 1(CFHL1)은 CFH의 스플라이스 이소형인 반면, 보체 인자 H-관련 단백질 1-5 (CFHR1-5)는 각각 독특한 유전자(CFHR1-5)에 의해 엔코딩된다. CFHR1-5의 SCR은 타원체의 수로 표시한 대로 CFH의 SCR 중 일부와 유사하다. 예를 들어, CFHR5는 9개의 SCR을 지니고, 처음 2개는 인자 H의

SCR 6 및 7과 유사하므로 CRP 및 헤파린 결합 특성을 지닌다. CFHR5의 SCR 5-7는 이들의 SCR이 인자 H의 SCR 12-14와 유사하고 C3b 및 헤파린 결합 특성을 지니기 때문에 상응하는 타원체내에 숫자 12-14를 지닌다.

[0083] 도 15는 A307A 및 Y402H가 인자 H에서 연계 비평형이고 -249T>C 및 -20T>C가 CFHR5에서 연계 비평형임을 나타내는 연계 비평형 플롯을 도시한다.

[0084] 도 16은 사람 CFHR5의 참조 형태의 2821개 염기 누클레오티드 서열을 도시한다 (젠햄크 수탁 번호 AF295327 [서열번호 7]). ATG 개시 코돈은 누클레오티드 위치 94에서 시작되며 TGA 종료 코돈은 누클레오티드 위치 1803에서 끝난다.

[0085] 도 17은 서열번호 7에 의해 엔코딩된 폴리펩티드 서열을 도시한다 (젠햄크 수탁 번호 AAK15619 [서열번호 8]). 569개 아미노산 CFHR5 폴리펩티드는 18개 아미노산 N-말단 시그널 펩티드를 포함한다.

[0086] 도 18은 CFH 및 인자 H-관련 단백질에 대한 유전자에서 게놈 중복을 도시한다. 엑손은 수직선으로 표시된다. 동일한 문자 (예컨대, A, A' 및 A")로 표지된 영역은 실질적으로 동일한 서열을 지닌다.

[0087] 발명의 상세한 설명

I. 도입

[0089] 본 발명은 인자 H 유전자, 및 인자 H-관련 5 유전자와 같은 인자 H-관련 유전자에서의 다양한 변이로 구성된 다형성 및 일배체형의 집합을 제공한다. 이러한 다형성 및 일배체형은 연령 관련 황반 변성(AMD) 및 다른 인자 H-관련 질환과 관련된다. 이러한 특정 다형성 및 일배체형은 변이 인자 H 폴리펩티드를 초래한다. 상기 및 기타 다형성 및 다형성 세트 (예컨대, 일배체형)의 검출은 AMD에 대한 진단 검정을 고안하고 수행하는데 유용하다. 다형성 및 다형성 세트는 핵산 분석, 인자 H 코딩 서열에 의해 엔코딩된 폴리펩티드(스플라이스 변이체에 의해 엔코딩된 폴리펩티드 포함) 분석, 또는 당 분야에 공지된 다른 수단에 의해 검출될 수 있다. 이러한 다형성 및 일배체형의 분석은 AMD에 대한 예방 및 치료적 섭생을 고안하는데에도 유용하다.

[0090] 인자 H는 보체 시스템의 중요한 조절인자로서 기능하는 다기능성 단백질이다. 참조 문헌[Zipfel, 2001, "Factor H and disease: a complement regulator affects vital body functions" Semin Thromb Hemost. 27:191-9]. 인자 H 단백질 활성은 하기를 포함한다: (1) C-반응 단백질 (CRP)에 대한 결합, (2) C3b에 대한 결합, (3) 헤파린에 대한 결합, (4) 시알산에 대한 결합; (5) 내피 세포 표면에 대한 결합, (6) 세포 인테그린 수용체에 대한 결합, (7) 미생물을 포함하는 병원체에 대한 결합 (도 3 참조), 및 (8) C3b 공통-인자 활성. HF1, CFH 및 HF로서 공지되어 있는 인자 H 유전자는 위치 1q32에서 사람 염색체 1에 위치한다. 1q32 특유의 유전자좌는 다수의 보체-경로 연관된 유전자를 함유한다. 보체 활성화(RCA) 유전자 클러스터의 조절인자로서 언급되는, 이러한 유전자 중 하나의 그룹은 인자 H, 5 인자 H-관련 유전자 (각각 FHR-1, FHR-2, FHR-3, FHR-4 및 FHR-5 또는 CFHR1, CFHR2, CFHR3, CFHR4 및 CFHR5)를 엔코딩하는 유전자, 및 응고 인자 XII의 베타 서브유닛을 엔코딩하는 유전자를 함유한다. 인자 H 및 인자 H 관련 유전자는 대개 전체가 단기 컨센서스 반복 (SCR)으로 구성된다. 인자 H 및 FHL1은 각각 SCR 1-20 및 1-7로 구성된다. FHR-1, FHR-2, FHR-3, FHR-4 및 FHR-5는 각각 5, 4, 5, 5 및 8 SCR로 구성된다 (도 14 참조). 중심절에서 끝분절까지 유전자의 순서는 FH/FHL1, FHR-3, FHR-1, FHR-4, FHR-2 및 FHR-5이다.

인자 H 유전자

[0092] 사람 인자 H cDNA의 참조 형태 (서열번호 1) (참조 Ripoche et al., 1988, Biochem J 249:593-602) 및 게놈 서열이 결정되었다. 인자 H cDNA는 겉보기 분자량이 155 kDa인 1231개 아미노산 길이의 폴리펩티드 (서열번호 2)를 엔코딩한다. 인자 H의 대안적으로 스플라이싱된 형태가 FHL-1로서 공지되어 있다 (및 HFL1 또는 CFHT로서도 언급됨). FHL-1 (서열번호 3)은 본질적으로 인자 H의 엑손 1 내지 9에 상응한다 (참조 Ripoche et al., 1988, Biochem J 249:593-602). FHL1 cDNA는 겉보기 분자량이 45-50 kDa인 449개 아미노산 길이의 폴리펩티드 (서열번호 4)를 엔코딩한다. FH1 및 FHL1의 처음 445개 아미노산은 독특한 C-말단 4개 아미노산을 지니는 FHL1과 동일하다 (엑손 10A). 대안적인 엑손 10A는 엑손 9 및 엑손 10 사이의 인트론에 위치한다. 사람 인자 H 및 FHL1에 대한 cDNA 및 아미노산 서열이 EMBL/젠햄크 데이터 라이브러리에서 수탁 번호 Y00716 및 X07523로 각각 발견된다. 사람 인자 H cDNA의 참조 형태의 3926개 염기 누클레오티드 서열(젠햄크 수탁 번호 Y00716 [서열번호 1])이 도 6에 도시되어 있고, 서열번호 1에 의해 엔코딩된 폴리펩티드 서열 (젠햄크 수탁 번호 Y00716 [서열번호 2])이 도 7에 도시되어 있다. 사람 인자 H의 절단된 형태인, HFL1의 참조 형태의 1658개 염기 누클레오티드 서열(젠햄크 수탁 번호 X07523 [서열번호 3])이 도 8에 도시되어 있고, 서열번호 3에 의해 엔코딩된 폴리펩티드 서열 (젠햄크 수탁 번호 X07523 [서열번호 4])이 도 9에 도시되어 있다. 인자 H 유전자 서열 (150626개

염기 길이)이 젠뱅크 수탁 번호 AL049744로 발견된다. 인자 H 프로모터가 인자 H 유전자의 코딩 영역의 5'에 위치한다.

[0093] FHR-1 유전자

[0094] FHR-1 유전자가 또한 CHFR1, CFHL1, CFHL, FHR1 및 HFL1로서 공지되어 있다. 사람 HFR-1 cDNA의 참조 형태 (참조 Estaller et al., 1991, *J Immunol.* 146:3190- 3196) 및 게놈 서열이 결정되었다. FHR-1 cDNA는 예상되는 분자량이 39 kDa인 330개 아미노산 길이의 폴리펩티드를 엔코딩한다. 사람 FHR-1에 대한 cDNA 및 아미노산 서열이 EMBL/젠뱅크 데이터 라이브러리에서 수탁 번호 M65292로 발견된다. FHR-1 유전자 서열이 젠뱅크 수탁 번호 AL049741로 발견된다.

[0095] FHR-2 유전자

[0096] FHR-2 유전자가 또한 CHFR2, CFHL2, FHR2 및 HFL3으로서 공지되어 있다. 사람 HFR-2 cDNA의 참조 형태 (참조 Strausberg et al., *Proc. Natl. Acad. Sd USA* 99:16899-16903) 및 게놈 서열이 결정되었다. FHR-2 cDNA는 예상되는 분자량이 31 kDa인 270개 아미노산 길이의 폴리펩티드를 엔코딩한다. 사람 FHR-2에 대한 cDNA 및 아미노산 서열 데이터가 EMBL/젠뱅크 데이터 라이브러리에서 수탁 번호 BC022283로 발견된다. FHR-2 유전자 서열이 젠뱅크 수탁 번호 AL139418로 발견된다.

[0097] FHR-3 유전자

[0098] FHR-3 유전자가 또한 CFHR3, CFHL3, FHR3 및 HLF4로서 공지되어 있다. 사람 HFR-3 cDNA의 참조 형태 (참조 Strausberg et al., *Proc. Natl. Acad. Sd USA* 99:16899-16903) 및 게놈 서열이 결정되었다. FHR-3 cDNA는 예상되는 분자량이 38 kDa인 330개 아미노산 길이의 폴리펩티드를 엔코딩한다. 사람 FHR-3에 대한 cDNA 및 아미노산 서열 데이터가 EMBL/젠뱅크 데이터 라이브러리에서 수탁 번호 BC058009로 발견된다. FHR-3 유전자 서열이 젠뱅크 수탁 번호 AL049741로 발견된다.

[0099] FHR-4 유전자

[0100] FHR-4 유전자가 또한 CFHR4, CFHL4 및 FHR4로서 공지되어 있다. 사람 HFR-4 cDNA의 참조 형태 (참조 Skerka et al., 1991, *J. Biol. Chem.* 272:5627-5634) 및 게놈 서열이 결정되었다. FHR-4 cDNA는 예상되는 분자량이 38 kDa인 331개 아미노산 길이의 폴리펩티드를 엔코딩한다. 사람 FHR-4에 대한 cDNA 및 아미노산 서열 데이터가 EMBL/젠뱅크 데이터 라이브러리에서 수탁 번호 X98337로 발견된다. FHR-4 유전자 서열이 젠뱅크 수탁 번호 AF190816 (5' 말단), AL139418 (3' 말단) 및 BX248415로 발견된다.

[0101] FHR-5 유전자

[0102] FHR-5 유전자가 또한 CFHR5, CFHL5 및 FHR5로서 공지되어 있다. CHFR5 cDNA (서열번호 83)의 참조 형태 (참조 McRae et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6747-6754) 및 게놈 서열이 결정되었다. CHFR5 cDNA는 겉보기 분자량이 65 kDa인 569개 아미노산 길이의 폴리펩티드(서열번호 8)를 엔코딩한다. 사람 CFHR5에 대한 cDNA 및 아미노산 서열 데이터가 EMBL/젠뱅크 데이터 라이브러리에서 수탁 번호 AF295327로 발견된다. 사람 CFHR5의 참조 형태의 2821개 염기 누클레오티드 서열 (젠뱅크 수탁 번호 AF295327 [서열번호 7])이 도 16에 도시되어 있고, 서열번호 7에 의해 엔코딩된 폴리펩티드 서열 (젠뱅크 수탁 번호 AAK15619 [서열번호 8])이 도 17에 도시되어 있다. CFHR5 유전자 서열이 젠뱅크 수탁 번호 AL139418 (5' 말단) 및 AL353809 (3' 말단)로 발견된다. FHR-5 프로모터는 CFHR5 유전자의 코딩 영역의 5'에 위치한다.

[0103] II. 정의

[0104] 하기 정의는 본 발명의 이해를 돋기 위해 제공된 것이다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어, 기호 및 다른 과학적 또는 의학적 용어 또는 전문용어는 의학 및 분자생물학 분야의 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 갖도록 의도된다. 일부 경우에, 일반적으로 이해되는 의미의 용어가 명료하고/거나 신속한 참조를 위해 본원에서 정의되며, 본원에 이러한 정의를 포함시키는 것이 당 분야에서 일반적으로 이해되는 것과 실질적인 차이를 나타내는 것으로 여겨져서는 안된다.

[0105] "핵산", "폴리누클레오티드" 또는 "올리고누클레오티드"는 임의의 길이의 누클레오티드의 고분자 형태이며, DNA 또는 RNA일 수 있고, 단일- 또는 이중-가닥일 수 있다. 핵산은 프로모터 또는 다른 조절용 서열을 포함할 수 있다. 올리고누클레오티드는 합성 수단에 의해 일반적으로 제조된다. 핵산은 DNA의 세그먼트, 또는 표 1A, 표 1B 및/또는 표 1C에 도시되거나 인자 H 유전자에 달리 공지되어 있는 다형성 부위의 보체 스패닝되거나 플랭킹

된 임의의 것을 포함한다. 세그먼트는 일반적으로 5 내지 100개의 연속적인 염기이며, 종종 하한이 5, 10, 12, 15, 20, 또는 25개 뉴클레오티드이고 상한이 10, 15, 20, 25, 30, 50 또는 100개 뉴클레오티드의 범위이다 (여기에서 상한은 하한 보다 크다). 5-10, 5-20, 10-20, 12-30, 15-30, 10-50, 20-50 또는 20-100개 염기의 핵산이 일반적이다. 다형성 부위는 세그먼트의 임의의 위치에서 발생할 수 있다. 이중-가닥 핵산의 한 가닥의 서열에 대한 참조는, 본문으로부터 명백한 경우, 핵산의 한 가닥에 대한 참조가 이의 보체를 언급하기도 한다는 것을 제외하고는, 상보적 서열을 정의한다. 특정 적용에서, 핵산 (예컨대, RNA) 분자는 세포내 안정성 및 반감기를 증가시키도록 개질될 수 있다. 가능한 개질로는 분자의 백본내에서 포스포다이에스테라제 결합이라기 보다는 포스포로티오에이트 또는 2'-0-메틸의 이용이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 개질된 핵산으로는 웹티드 핵산 (PNA) 및 이노신, 퀴에오신 및 위부토신과 같은 비전통적인 염기를 갖는 핵산 및 내인성 엔도뉴클레아제에 의해 용이하게 인식되지 않는 아세틸-, 메틸-, 티오- 및 유사하게 개질된 형태의 아데닌, 시티딘, 구아닌, 티민 및 우리딘이 있다.

[0106] "하이브리드화 프로브"는 핵산의 상보적인 가닥에 염기-특이적인 방식으로 결합할 수 있는 핵산이다. 이러한 프로브는 핵산 및 웹티드 핵산을 포함한다 (Nielsen et al., 1991). 하이브리드화는 당 분야에 공지된 엄격한 조건하에 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Berger and Kimmel (1987) Methods In Enzymology, Vol. 152: Guide To Molecular Cloning Techniques, San Diego: Academic Press, Inc.; Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., VoIs. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory; Sambook (2001) 3rd Edition; Rychlik, W. and Rhoads, R.E., 1989, Nucl. Acids Res. 17, 8543; Mueller, P.R. et al. (1993) In: Current Protocols in Molecular Biology 15.5, Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley and Sons, New York; and Anderson and Young, Quantitative Filter Hybridization in Nucleic Acid Hybridization (1985)]을 참조한다. 본원에서 사용된 "프로브"라는 용어는 프라이머를 포함한다. 프로브 및 프라이머는 때로 "올리고뉴클레오티드"로서 언급된다.

[0107] "프라이머"라는 용어는 적절한 조건하에 적절한 완충액 및 적합한 온도에서 주형-유도된 DNA 합성의 개시점으로서 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드를 언급한다. 프라이머의 적절한 길이는 프라이머의 의도된 용도에 따라 다르나, 통상적으로 15 내지 30개 뉴클레오티드이다. 프라이머 서열은 주형에 정확히 상보적일 필요는 없으나 주형과 하이브리드화하기에 충분히 상보적이어야 한다. "프라이머 부위"라는 용어는 프라이머가 하이브리드화되는 표적 DNA 영역을 언급한다. "프라이머 쌍"이라는 용어는 중폭되는 DNA 서열의 5' 말단에 하이브리드화되는 5' 업스트림 프라이머 및 중폭되는 서열의 3' 말단의 보체와 하이브리드화되는 3' 다운스트림 프라이머를 포함하는 프라이머 세트를 의미한다.

[0108] 짧은 프로브 및 프라이머에 대한 예시적인 하이브리드화 조건은 산출된 T_m 보다 약 5 내지 12°C 낮다. T_m 를 산출하는 식은 공지되어 있고 올리고<14 염기에 대해 $T_m = 4^\circ\text{C} \times (\text{프라이머의 G 및 C의 수}) + 2^\circ\text{C} \times (\text{프라이머의 A 및 T의 수})$ 를 포함하고 50 mM의 1가 양이온의 존재하에 반응을 수행하는 것으로 가정한다. 더 긴 올리고에 대하여, 하기 식을 이용할 수 있다: $T_m = 64.9^\circ\text{C} + 41^\circ\text{C} \times (\text{프라이머의 G 및 C의 수} - 16.4)/N$ (여기에서, N은 프라이머의 길이이다). 또 다른 일반적으로 이용되는 식은 반응의 염 농도를 고려한 것이다 (Rychlik, 상술함, Sambrook, 상술함, Mueller, 상술함): $T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6^\circ\text{C} \times (\log_{10}[\text{Na}^+] + [\text{K}^+]) + 0.41^\circ\text{C} \times (\%GC) - 675/N$ (여기에서, N은 올리고내 뉴클레오티드의 수이다). 상기 언급된 식은 특정 적용을 위한 시작점을 제공한다; 그러나 특정 프로브 및 프라이머의 고안은 추가 인자 또는 다른 인자들을 고려할 수 있다. 본 발명의 방법에 사용하기 위한 프로브 및 프라이머의 고안 방법은 당 분야에 널리 공지되어 있다.

[0109] "위험", "보호" 및 "중성"이라는 용어는 변이, SNP, 일배체형, 이배체형, 및 그러한 패턴의 변이를 특징으로 하는 유전자에 의해 엔코딩된 개체군의 단백질을 기술하기 위해 사용된다. 위험 일배체형은 유전자의 대립유전자 형태이고, 본원에서 AMD를 발생시키는 위험성의 증가와 연관된, 하나 이상의 변이 다형성 및 바람직하게는 변이 다형성의 세트를 포함하는 인자 H 또는 인자 H-관련 유전자이다. 인자 H 또는 인자 H-관련 유전자에 사용된 "변이"라는 용어는 본원에서 유럽-미국 인종인 개체군에서 가장 널리 보급된 서열과 상이한 뉴클레오티드 서열을 언급한다. 변이 다형성은 유전자의 코딩 또는 비-코딩 부분에 존재할 수 있다. 위험 인자 H 일배체형의 예로는 아미노산 402에서 히스티딘 및/또는 아미노산 1210에서 시스테인을 엔코딩하는 인자 H 유전자의 대립유전자가 있다. 위험 일배체형은 천연적으로 발생하거나 재조합 기술에 의해 합성될 수 있다. 보호 일배체형은 유전자의 대립유전자 형태이고, 본원에서 AMD를 발생시키는 위험성의 감소와 연관된, 하나 이상의 변이 다형성 및 바람직하게는 변이 다형성의 세트를 포함하는 인자 H 또는 인자 H-관련 유전자이다. 예를 들어, 하나의 보호 인자 H 일배체형은 아미노산 62에서 이소류신을 엔코딩하는 인자 H 유전자의 대립유전자를 지닌다. 보호 일배체형은 천연적으로 발생하거나 재조합 기술에 의해 합성될 수 있다. 중성 일배체형은 유전자의 대립유전자 형

태이고, 개체군 또는 인종 그룹에서 AMD를 발생시키는 위험성의 증가 또는 감소와 연관된 변이 다형성을 함유하지 않는다. "중성" 일배체형에서 엔코딩된 단백질이 AMD 또는 다른 질환의 치료 또는 예방이 필요한 환자에게 투여될 때 보호성일 수 있음을 하기 논의로부터 명백해질 것이다. 즉, CFH 또는 CFHR5의 "중성" 및 "보호" 형태 둘 모두는 AMD를 지닌 환자 또는 AMD를 발생시킬 위험이 있는 환자에게 투여될 때 치료적 이익을 제공하여 질병으로부터 피검체를 "보호"할 수 있다.

- [0110] "야생형"이라는 용어는 서열이 본원에서 유럽-미국 인종인 개체군에서 널리 보급된 형태인 핵산 또는 폴리펩티드를 언급한다 (대략 40% 보급률; 도 5 참조). 설명을 목적으로, "야생형" 인자 H 단백질은 위치 402의 아미노산이 티로신(Y; [서열번호 337])인 것을 제외하고, 서열번호 2 (도 7)의 서열을 갖는다. 설명을 목적으로, 야생형 인자 H 단백질을 엔코딩하는 인자 H 유전자는 위치 402의 아미노산에 상응하는, 염기 1277에서 시작되는 코돈이 티로신을 엔코딩하는 것을 제외하고 (TAT [서열번호 336]), 서열번호 1 (도 6)의 서열을 갖는다.
- [0111] 인자 H 또는 인자 H-관련 폴리펩티드에 사용된 "변이"라는 용어는 엔코딩된 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변화시키는 위치에서 서열이 보통 또는 야생형 서열과 상이한 폴리펩티드를 언급한다. 예를 들어, 인자 H 유전자의 누클레오티드 서열에서 일부 변이 또는 치환은 코돈을 변경시켜 상이한 아미노산을 엔코딩하고 (예를 들어 비체 한적으로 I62V, Y402H, D936E 중 하나 이상에서 대안적인 대립유전자를 지님) 변이 폴리펩티드를 초래한다. 변이 폴리펩티드는 위험 (예컨대, 위치 402에 히스티딘을 지님), 보호 (예컨대, 위치 62에 이소류신을 지님)와 연관되거나, 중성 일배체형 (예컨대, 위치 936에 아스파르트산을 지님)에 의해 엔코딩될 수 있다. 변이 CFHR5 폴리펩티드는 위험 (예컨대, 위치 46에 세린을 지님), 보호와 연관되거나 중성일 수 있다.
- [0112] 인자 H 폴리펩티드를 언급할 때 "참조"라는 용어는 아미노산 서열이 전장 (FH1, 서열번호 2) 또는 절단된 (FHL1, 서열번호 4) 사람 인자 H에 대해 문헌 [Ripoche et al., 1988, Biochem J. 249:593-602]에 기술된 서열과 동일한 폴리펩티드를 의미한다. CFHR5 폴리펩티드를 언급할 때 "참조"라는 용어는 아미노산 서열이 전장 사람 CFHR5 (서열번호 8)에 대해 문헌 [McRae et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6747-6754]에 기술된 서열과 동일한 폴리펩티드를 의미한다. 최초로 동정된 대립유전자 형태는 임의로 지정된 참조 형태 또는 대립유전자이고; 다른 대립유전자 형태는 대안적이거나 변이 대립유전자로서 지정된다. 야생형 및 변이 형태는 참조 형태와 실질적인 서열 동일성을 지닐 수 있다 (예컨대, 야생형 또는 변이 형태는 야생형 또는 변이체의 90% 이상의 아미노산 위치에서, 때로 95% 이상의 위치에서 및 때로 98% 또는 99% 이상의 위치에서 참조 형태와 동일할 수 있다). 변이체는 구조이동 돌연변이 또는 스플라이스 변이로 인해 단백질의 특정 영역에서 참조 형태와 상이할 수 있다.
- [0113] "다형성"이라는 용어는 개체군에서 유전학적으로 결정된 둘 이상의 대안적인 서열 또는 대립유전자의 발생을 언급한다. "다형성 부위"는 서열 분기가 발생하는 유전자좌이다. 다형성 부위는 둘 이상의 대립유전자를 지닌다. 2대립유전자 다형성은 2개의 대립유전자를 지닌다. 3대립유전자 다형성은 3개의 대립유전자를 지닌다. 이배체 유기체는 대립유전자 형태가 동형접합이거나 이형접합일 수 있다. 다형성 부위는 하나의 염기 쌍 만큼 작을 수 있다. 다형성 부위의 예로는 제한 단편 길이 다형성 (RFLP); 가변적인 수의 일렬 반복 (VNTR); 과가변성 영역; 미니위성; 디누클레오티드 반복; 트리누클레오티드 반복; 테트라누클레오티드 반복; 및 단순 서열 반복이 있다. 본원에서 사용된 "다형성"에 대한 언급은 다형성의 세트 (즉, 일배체형)를 포함할 수 있다.
- [0114] "단일 누클레오티드 다형성 (SNP)"은 단일 누클레오티드가 점유한 다형성 부위에서 발생하며, 이는 대립유전자 서열간의 변이 부위이다. 이 부위는 일반적으로 고도로 보존된 대립유전자 서열에 선행하며 상기 서열이 뒤를 잇는다. SNP는 일반적으로 다형성 부위에서 한 누클레오티드가 다른 것으로 치환됨에 의해 발생한다. 푸린의 또 다른 푸린에 의한 대체 또는 퍼리미딘의 또 다른 퍼리미딘에 의한 대체를 전이라고 부른다. 푸린의 퍼리미딘에 의한 대체 또는 그 반대를 전위라고 한다. 유사한 SNP는 엔코딩된 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 코딩 영역에서 하나의 누클레오티드를 또 다른 것으로 치환시키는 것을 언급한다. 유사하지 않은 SNP는 엔코딩된 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변화시키는 코딩 영역에서 한 누클레오티드를 또 다른 것으로 치환시키는 것을 언급한다. SNP는 참조 대립유전자와 비교하여 누클레오티드 또는 누클레오티드들의 결실 또는 삽입으로부터 발생할 수도 있다.
- [0115] 다형성의 "세트"는 표 1A, 표 1B 및/또는 표 1C에 도시되거나 인자 H 유전자 또는 다른 유전자에서 달리 공지된 다형성 중 하나 이상, 예컨대, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 또는 6 보다 많은 다형성을 의미한다.
- [0116] "일배체형"이라는 용어는 개체의 유전자내에 있는 다형성 세트 또는 다형성 부위의 대립유전자의 지정과 관련된다. 예를 들어, "112" 인자 H 일배체형은 처음 두 다형성 부위 각각에 대립유전자 1을 포함하고 세번째 다형성

부위에 대립유전자 2를 포함하는 인자 H 유전자를 언급한다. "이배체형"은 일배체형 쌍이다.

[0117] "단리된" 핵산은 조성물에 존재하는 유력한 종으로서의 핵산 종을 의미한다. 단리된다라는 것은 핵산과 사실상 관련이 있는 하나 이상의 화합물로부터 핵산을 분리하는 것을 의미한다. 정제된 핵산은 (물 기재로) 적어도 약 50, 80 또는 90%의 존재하는 모든 거대분자 종을 포함한다.

[0118] 두 아미노산 서열이 적어도 약 80%, 바람직하게는 적어도 약 90%, 보다 바람직하게는 적어도 약 95%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99% 동일할 때 이들을 "실질적인 동일성"을 지닌 것으로 간주한다. % 서열 동일성은 통상적으로 두 서열간의 최적 정렬을 결정하고 두 서열을 비교함에 의해 산출된다. 서열들의 최적 정렬은 검사에 의해, 또는 문헌[Smith and Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2: 482]의 국소 상동성 알고리즘을 이용하거나, 문헌[Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443]의 상동성 정렬 알고리즘을 이용하거나, 문헌[Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444]의 유사성 방법에 대한 검색을 이용하거나, 아미노산 비교에 대한 디폴트 파라미터를 이용하여 (예컨대, 간격-기록 등) 상기 알고리즘들의 컴퓨터 임플리멘테이션 (예컨대, Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.)에 의해 수행될 수 있다. 특정 길이 또는 영역을 언급하여 두 서열간의 서열 동일성을 기술하는 것이 때로 바람직할 수 있다 (예컨대, 두 서열이 적어도 500개 염기쌍의 길이에 걸쳐 95% 이상의 동일성을 지닌다고 기술될 수 있다). 일반적으로 길이는 적어도 약 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 또는 1000개 아미노산, 또는 참조 단백질의 전장일 것이다. 두 아미노산 서열은 이들이 1, 2 또는 3개 잔기, 또는 2-20개 잔기, 2-10개 잔기, 3-20개 잔기, 또는 3-10개 잔기 만큼 상이한 경우 실질적인 동일성을 지니는 것으로 고려될 수도 있다.

[0119] "연계(linkage)"는 유전자, 대립유전자, 유전자좌 또는 유전적 마커의 경향이 동일한 염색체 상의 이들의 위치 때문에 함께 유전되는 것을 기술한다. 연계는 두 유전자, 대립유전자, 유전자좌 또는 유전적 마커 간의 재조합%에 의해 측정될 수 있다. 통상적으로, 서로 50 센티모르간 (cM)의 간격내에서 발생하는 유전자좌가 결합된다. 결합된 마커는 동일한 유전자 또는 유전자 클러스터 내에서 발생할 수 있다. "연계 비평형" 또는 "대립유전자 연합"은 개체군에서 우연히 예상되는 임의의 특정 대립유전자 빈도 보다 더 빈번히 일어나는 가까운 염색체 위치에서 특정 대립유전자 또는 유전적 마커와 특이적 대립유전자 또는 유전적 마커의 우선적인 연합을 의미한다. 연계 비평형의 마커는, 비록 마커 자체가 질병을 초래하지 않는 경우조차도, 질병에 대한 감수성을 검출하는데 특히 유용할 수 있다.

[0120] "진단한다" 및 "진단"이라는 용어는 개체가 질병 (정후 또는 증상을 갖거나 갖지 않음)을 발생시키는 성향을 갖는지를 결정하는 능력을 언급한다. 질병을 발생시키는 성향의 진단은 "스크리닝"이라고 말할 수도 있으며, 본원에서 사용된 대로, 진단 및 스크리닝은 상호교환적으로 사용된다. 질병을 발생시키는 증가되거나 감소된 성향을 지닌다는 것이 질병에 걸리지 않은 개체군의 개체와 비교하여 질병을 발생시킬 가능성을 언급하는 것임을 이해할 것이다.

III. 표

[0122] 본원에 언급된 특정 표들이 하기 실시예에 제공된다. 다음 설명은 독자를 돋기 위해 제공된다:

[0123] 표 1A-1C는 사람 인자 H 유전자 다형성 및 연령-관련 황반 변성과 이들의 연합을 도시한다. (1A) 사람 인자 H 유전자의 1 SNP에 대한 dbSNP 번호, 위치, 다형성에 걸쳐있는 코딩 (상부, 5'에서 3' 방향) 및 비-코딩 (바닥) 가닥의 서열, 아미노산 변화, 대조군 및 AMD 병증에 대한 대립유전자 빈도, 및 χ^2 및 P-값을 도시한다. (1B) 사람 인자 H 유전자의 11 SNP에 대한 dbSNP 번호, 지령된 서열, 침프(chimp) 인자 H에서 상응하는 누클레오티드, 위치, 아미노산 변화, 및 프라이머 및 프로브 세트를 도시한다. (1C) 존재하는 경우, dbSNP 데이터베이스에서 발견되지 않는 사람 인자 H 유전자의 14 SNP에 대한 위치, 다형성에 걸쳐있는 서열, 아미노산 위치 및 아미노산 변화가 도시된다.

[0124] 표 2는 AMD 병증 및 대조군의 코호트에서 사람 인자 H 유전자의 8 SNP의 일배체형 분석을 도시한다.

[0125] 표 3은 사람 인자 H 유전자의 6 SNP의 일배체형 분석 및 AMD와의 관련성을 도시한다.

[0126] 표 4는 연령-관련 황반 변성을 지닌 11 사람 인자 H 유전자 SNP의 관련성을 도시한다.

[0127] 표 5는 사람 인자 H에 대한 SSCP, DHPLC 및 DNA 서열화 분석에 사용된 프라이머를 도시한다.

[0128] 표 6은 AMD 환자 및 대조군의 유전형 데이터를 도시한다.

- [0129] 표 7은 다양한 인종 그룹에서 위험-상태 일배체형의 빈도를 도시한다.
- [0130] 표 8은 여러 인자 H 이배체형을 도시한다. 일반적인 위험 및 보호 이배체형이 명시된다.
- [0131] 표 9는 인자 H 코딩 서열을 증폭하는데 사용된 프라이머 서열을 도시한다.
- [0132] 표 10은 CFHR5 코딩 서열을 증폭하는데 사용된 프라이머 서열을 도시한다.
- [0133] 표 11은 22명 MPGNII 환자에서 인자 H SNP의 분석을 도시한다.
- [0134] 표 12는 22명 MPGNII 환자 및 AMD-네거티브, 인종에 의해 매칭된 대조군에서 인자 H SNP 빈도의 비교를 도시한다.
- [0135] 표 13은 MPGNII 및 이들의 관련 SCR과 연합된 인자 H SNP를 나열한다.
- [0136] 표 14는 22명 MPGNII 환자에서 CFHR5 SNP의 분석을 도시한다.
- [0137] 표 15는 22명 MPGNII 환자 및 AMD-네거티브, 인종에 의해 매칭된 대조군에서 CFHR5 SNP 빈도의 비교를 도시한다.
- [0138] 표 16은 인자 H 유전자에서 다형성을 검출하는데 유용한 예시적인 대립유전자-특이적인 프로브 (16A) 및 프라이머 (16B)를 도시한다.
- [0139] **IV. 보체 인자 H 다형성**
- [0140] 일 측면에서, 본 발명은 보체 인자 H (HF1) 유전자가 AMD의 발생 및 이에 대한 감수성과 관련이 있다는 발견과 관련된 신규한 진단, 치료 및 약물 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0141] AMD와 연관된 인자 H 다형성은 표준 프로토콜에 따라 SSCP 분석, DHPLC 분석, 및 직접 서열화를 이용하여 변이에 대한 인자 H (인자 H 이소형 FHL1에 대해 전사된 엑손 10A 포함)의 코딩 영역 및 인접한 인트론 영역을 조사함에 의해, 실시예 1에 개시된 대로 동정되었다. 나머지 다형성은 5' 누클레아제 (Taqman, ABI) 방법에 의해 유형화하였다. 태크맨(Taqman) 유전형 및 연합 분석을 기술된 대로 (Gold et al., 2004) 수행하였다. SSCP 및 DNA 서열화 분석에 대한 프라이머를 고안하여 각 엑손 및 이의 인접한 인트론 영역을 맥 벡터 (Mac Vector) 소프트웨어를 이용하여 증폭시켰다. PCR-유도된 암플리콘을 표준 프로토콜에 따른 SSCP 및 DHPLC에 의해 서열 변이에 대해 스크리닝하였다. SSCP 및 DHPLC에 의해 검출된 모든 변화를 표준 프로토콜에 따른 이방향 서열화에 의해 확인하였다. 카이-스퀘어 (χ^2) 및 피셔 정밀 시험 (P 값)을 이용하여 통계적 분석을 수행하였다.
- [0142] AMD 병증 및 연령-매칭된 대조군의 두 독립적인 그룹을 이용하였다. 참여한 모든 개체는 유럽-미국인이었고, 60세가 넘었으며, 동의를 얻은 후에 IRB-승인된 프로토콜에 기록하였다. 이들 그룹은 임상적으로 증명된 AMD를 지닌 352명의 비혈연 환자 (평균 연령 79.5 ± 7.8 세) 및 아이오와 대학으로부터의 113명의 비혈연 대조군 환자 (평균 연령 78.4 ± 7.4 세; 연령 및 인종에 의해 매칭됨), 및 임상적으로 증명된 AMD를 지닌 550명의 비혈연 환자 (평균 연령 71.32 ± 8.9 세) 및 콜롬비아 대학으로부터의 연령 및 인종에 의해 매칭된 275명의 비혈연 대조군 (평균 연령 68.84 ± 8.6 세)으로 구성되었다. 환자들은 망막 협회-양성된 안과의사에 의해 간접적 검안경검사 및 슬릿-램프 현미경에 의해 조사되었다.
- [0143] 표준화된 국제 분류 시스템에 따라 펀다스(fundas) 사진을 채점하였다 (Bird et al., 1995). 대조군 환자를 선택하여 이들이 황반 질병의 임의의 구별되는 징후를 나타내지 않는지 또는 AMD의 공지된 가족력을 지니는지를 포함시켰다. AMD 환자를 표현형 범주로 세분하였다: 이들이 연구에 도입되는 시점에 가장 심각한 안구의 분류에 기초하여, 조기 AMD (ARM), 지도형 위축 (GA), 및 삼출성 (CNV) AMD. 아이오와 대학의 ARM 및 GA 병증을 별개의 표현형으로 추가로 세분하였다 (RPE 변화 단독, >10 황반 경질 드루젠, 황반 연질 드루젠, BB (표피) 드루젠, PED, "체로키" 위축, 반도형 지도형 위축 및 패턴 지도형 위축). 모든 병증에 대해 가장 일찍 입증될 수 있는 표현형을 또한 기록하였고 분석에 이용하였다.
- [0144] 표 1A에 도시된 대로, 인자 H 유전자에서 AMD와 고도로 현저한 다형성 부위의 연합이 약 900 AMD 병증 및 400 매칭된 대조군을 함께 포함하는 두 독립적인 코호트의 조사에서 발견되었다. 인자 H 유전자 중 16개의 다형성이 표 1A-1B에 나열된다. 이 중 12개는 내셔널 센터 포 바이오테크놀로지 인포메이션 (NCBI)에서 발견될 수 있는 SNP 데이터베이스 (dbSNP)에서 발견된다. dbSNP는 인자 H 유전자의 22 코딩 엑손을 따라, 그리고 인자 H 유전자의 프로모터, 5' 비변역된 영역, 인트론, 및 3' 비변역된 영역을 따라 분산되는 사람 인자 H 유전자의 SNP의 집합이다. dbSNP 데이터베이스에서 발견되는 사람 인자 H 유전자의 379 SNP에 대한 수탁 번호가 하기에 나

열된다. 이러한 SNP는 본 발명을 방법을 수행하는데 사용될 수 있다.

[0145]

표 A

rs17575212	rs11582939	rs7551203	rs5014736	rs2019724	rs534479	rs395963
rs17573867	rs11580821	rs7546015	rs5014735	rs1984894	rs534399	rs395544
rs16840522	rs11579439	rs7540032	rs5014734	rs1928433	rs529825	rs395129

[0146]

rs16840465	rs11539862	rs7539005	rs5014733	rs1928432	rs528298	rs393955
rs16840462	rs11398897	rs7537967	rs5003626	rs1887973	rs521605	rs386258
rs16840422	rs11390840	rs7535653	rs5003625	rs1831282	rs520992	rs385892
rs16840419	rs11340441	rs7535263	rs5003624	rs1831281	rs519839	rs385543
rs16840410	rs11339120	rs7529589	rs5002880	rs1831280r	rs518957	rs383191
rs16840401	rs11318544	rs7526622	rs5002876	rs1410997	rs551397	rs405306
rs16840397	rs11285593	rs7524776	rs5002875	rs1410996	rs544889	rs403846
rs16840394	rs10922109	rs7522681	rs5002874	rs1329429	rs543879	rs402991
rs16840381	rs10922108	rs7519439	rs4658046	rs1329428	rs536564	rs402056
rs16840379	rs10922107	rs7514261	rs4657826	rs1329427	rs536539	rs399469
rs12756364	rs10922106	rs7513157	rs4350148	rs1329424	rs515299	rs398248
rs12746361	rs10922105	rs7415913	rs4044888	rs1329423	rs514756	rs381974
rs12740961	rs10922104	rs7413999	rs4044884	rs1329422	rs514591	rs380390
rs12726401	rs10922103	rs7413137	rs4044882	rs1329421	rs513699	rs380060
rs12566629	rs10922102	rs6695321	rs3834020	rs1299282	rs512900	rs379489
rs12565418	rs10922101	rs6691749	rs3766405	rs1292487	rs508505	rs375046
rs12406047	rs10922100	rs6690982	rs3766404	rs1292477	rs499807	rs374896
rs12405238	rs10922099	rs6689826	rs3766403	rs1292476	rs495968	rs374231
rs12402808	rs10922098	rs6689009	rs3753397	rs1292475	rs495222	rs371647
rs12238983	rs10922097	rs6688272	rs3753396	rs1292474	rs493367	rs368465
rs12144939	rs10922096	rs6685249	rs3753395	rs1292473	rs491480	rs364947
rs12136675	rs10922095	rs6682138	rs3753394	rs1292472	rs490864	rs203688
rs12134975	rs10922094	rs6680396	rs3043115	rs1292471	rs488738	rs203687
rs12134598	rs10922093	rs6677604	rs3043113	rs1292466	rs487114	rs203686
rs12127759	rs10922092	rs6677460	rs3043112	rs1156679	rs482934	rs203685
rs12124794	rs10801561	rs6677089	rs3043111	rs1156678	rs480266	rs203684
rs12116702	rs10801560	rs6675088	rs2878649	rs1089031	rs466287	rs203683r
rs12096637	rs10801559	rs6674960	rs2878648	rs1065489	rs464798	s203682
rs12085209	rs10801558	rs6673106	rs2878647	rs1061171	rs463726	rs203681
rs12081550	rs10801557	rs6664877	rs2860102	rs1061170	rs460897	rs203680
rs12069060	rs10801556	rs6664705	rs2746965	rs1061147	rs460787	rs203679
rs12047565	rs10801555	rs6660100	rs2336225	rs1061111	rs460184	rs203678
rs12047106	rs10801554	rs6428357	rs2336224	rs1060821	rs459598	rs203677
rs12047103	rs10801553	rs6428356	rs2336223	rs1048663	rs454652	rs203676
rs12045503	rs10754200	rs5779848	rs2336222	rs1040597	rs436337	rs203675
rs12042805	rs10754199	rs5779847	rs2336221	rs800295	rs435628	rs203674
rs12041668	rs10737680	rs5779846	rs2300430	rs800293	rs434536	rs203673
rs12040718	rs10737679	rs5779845	rs2300429	rs800292	rs430173	rs203672
rs12039905	rs10733086	rs5779844	rs2284664	rs800291	rs428060	rs203671
rs12038674	rs10688557	rs5022901	rs2284663	rs800290	rs424535	rs203670
rs12038333	rs10685027	rs5022900	rs2274700	rs800280	rs422851	rs203669
rs12033127	rs10664537	rs5022899	rs2268343	rs800271	rs422404	rs70621
rs12032372	rs10616982	rs5022898	rs2173383	rs800269	rs420922	rs70620
rs12030500	rs10545544	rs5022897	rs2143912	rs766001	rs420921	rs15809
rs12029785	rs10540668	rs5016801	rs2104714	rs765774	rs419137	rs14473
rs12025861	rs10536523	rs5014740	rs2064456	rs742855	rs414539	rs3645
rs11809183	rs10489456	rs5014739	rs2020130	rs731557	rs412852	
rs11801630	rs10465603	rs5014738	rs2019727	rs572515	rs410232	
rs11799956	rs10465586	rs5014737	rs1803696	rs570618	rs409953	
rs11799959	rs9970784	rs5002879	rs1587325	rs569219	rs409319	

[0147]

rs11799380	rs9970075	rs5002878	rs1576340	rs564657	rs409308	
rs11584505	rs9427909	rs5002877	rs1474792	rs559350	rs407361	

[0148]

[0149] 빈번한 두 유사하지 않은 변이체, 엑손 2의 162V 및 엑손 9의 Y420H, 및 덜 빈번한 변이체, 엑손 22의 R1210C가 AMD와 가장 현저한 관련성을 나타내었다.

[0150]

표 1A-1B에서 추가의 세 다형성이 SNP 데이터베이스에서 발견되지 않는다: 프로모터의 다형성 (표 1A의 프로모터 1); 두 T 누클레오티드가 삽입된 인트론 2의 다형성; 및 엑손 10A의 다형성.

[0151]

표 1A의 첫번째 열은 인자 H 유전자의 다형성에 대한 dbSNP 번호를 나열한다. 예를 들어 rs800292는 인자 H 유전자의 다형성에 대한 dbSNP 지정이다. 상기 다형성 및 dbSNP에서 다른 인자 H 유전자 다형성의 설명은 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=snp&cmd=search&term="](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=snp&cmd=search&term=))에서 찾아볼 수 있다. 두번째 열은 다형성의 위치를 나열한다. 예를 들어, rs800292 다형성은 인자 H 유전자의 엑손 2에 위치한다. 데이터베이스 번호에 의해 확인되지 않는 다형성은 위치 (예컨대, "인트론 2")를 참조할 수 있다. 세번째 열은 다형성에 걸쳐있는 DNA의 코딩 (상부, 5'에서 3; 방향) 및 비-코딩 (바닥) 가닥의 핵산 서

열을 나열한다. 예를 들어, 코딩 가닥에 대한 팔호에 표시된 rs800292 다형성, G 또는 A는 다형성의 5' 및 3'에 도시된 20개 누클레오티드에 의해 플랭킹된다. 엑손 10A 다형성에 걸쳐있는 서열의 "N"은 변이 대립유전자에서 단일 누클레오티드 A, C, G 또는 T의 삽입을 나타낸다. 네번째 열은 서열의 서열번호를 나열한다. 다섯 번째 열은 존재하는 경우 다형성과 연관된 아미노산 변화를 나열한다. 예를 들어, rs800292 다형성은 인자 H 폴리펩티드의 위치 62에서 발린 (V)에서 이소류신 (I)으로의 아미노산 서열 변화를 초래한다. 여섯번째 열은 대조 개체군에서 다형성의 대립유전자 빈도를 나열한다. 숫자 1 및 2는 세번째 열의 다형성 부위에서 각각 첫 번째 및 두번째 누클레오티드에 상응하는 대립유전자를 언급하나. 예를 들어, rs800292 다형성의 경우, G는 대조 개체군으로부터 서열화된 대립유전자의 78%에 존재하고 A는 22%에 존재한다. 일곱번째 열은 AMD 개체군에서 다형성의 대립유전자 빈도를 나열한다. 예를 들어, rs800292 다형성의 경우, G는 AMD 개체군으로부터 서열화된 대립유전자의 91%에 존재하고 A는 9%에 존재한다. 여덟번째 열은 대조군 및 AMD 개체군에서 다형성의 대립유전자 빈도를 비교하기 위한 카이-제곱 및 피셔 정밀 시험 (각각, χ^2 및 P 값)을 나열한다. 예를 들어, rs800292 다형성의 경우, χ^2 값은 16.19이고 P 값은 5.74×10^{-5} 이며, 이것은 G 대립유전자가 AMD와 연관됨을 나타낸다.

[0152] 표 1B 부분 (1), (2) 및 (3)의 첫번째 열은 인자 H 유전자의 다형성에 대한 dbSNP 번호를 나열한다. 부분 (1)의 경우, 두번째 열은 다형성에 걸쳐있는 핵산 서열을 나열한다 (지령된 서열). rs529825 (인트론 1), rs800292 (엑손 2), 및 rs203674 (인트론 10) 다형성의 경우, 사람 인자 H 유전자의 비-코딩 가닥의 서열이 도시된다. 세번째 열은 서열에 대한 서열번호를 나열한다. 네번째 열은 침프 인자 H 유전자에 존재하는 대립유전자를 나열한다. 다섯번째 열은 SNP의 위치를 나열한다. 여섯번째 열은 존재하는 경우 다형성과 관련된 아미노산 변화를 나열한다. 부분 (2)의 경우, 두번째 및 네번째 열은 순행 및 역행 프라이머 또는 다형성을 증축시키는 AOD 수를 나열한다. 세번째 및 다섯번째 열은 프라이머에 대한 서열번호를 나열한다. 부분 (3)의 경우, 두번째 및 네번째 열은 다형성을 검출하는데 사용된 프로브를 나열한다. 세번째 및 다섯번째 열은 프로브에 대한 서열번호를 나열한다.

[0153] *표 1A-1B에 나열되지 않은, 인자 H 유전자 중 추가의 다형성이 AMD와 연관될 수 있음을 이해하여야 한다. 인자 H 유전자의 예시적인 다형성 부위는 예를 들어 비제한적으로 상기에 나열되어 있다. 표 1C는 dbSNP 데이터베이스에서 발견되지 않은 AMD 또는 다른 질병과 관련될 수 있는 인자 H 유전자의 추가의 14개 다형성 부위를 나열한다. 첫번째 열은 SNP의 위치를 나열한다. 두번째 열은 다형성에 걸쳐있는 핵산 서열을 나열한다. 엑손 5 다형성에 걸쳐있는 서열의 "notG"는 변이 대립유전자에 A, C 또는 T 누클레오티드의 존재를 나타낸다. 엑손 6 다형성에 걸쳐있는 서열의 "notC"는 변이 대립유전자에 A, G 또는 T 누클레오티드의 존재를 나타낸다. 엑손 21 다형성에 걸쳐있는 서열의 "N"은 변이 대립유전자에 단일 누클레오티드 A, C, G 또는 T의 삽입을 나타낸다. 세번째 열은 존재하는 경우 다형성과 관련된 아미노산 변화를 나열한다. 네번째 열은 서열에 대한 서열번호를 나열한다. 이러한 SNP는 본 발명의 방법을 수행하는데 사용될 수도 있다. 더욱이, 이러한 CFH 다형성이 결합 및 연합 연구, 유전형 임상적 개체군, 표현형 정보에 대한 유전형 정보의 상관관계, 이형접합 분석의 손실, 및 세포 샘플 공급원의 동정에 유용하다.

[0154] 표 2는 AMD 병증 및 대조군에서 사람 인자 H 유전자의 8 SNP의 일배체형 분석을 도시한다. 위험-상태의 일배체형이 점으로 그린 박스로 도시되며, 일배체형 결정 SNP (Y402H 및 IVS10)가 조밀한 점으로 도시되어 있다. 보호 일배체형이 사선 박스로 도시되며, 일배체형 결정 SNP (IVS1, 162V 및 IVS6)가 조밀한 사선으로 도시되어 있다. 첫번째 열은 프로모터(Prom)의 다형성의 대립유전자를 나열한다. 두번째 열은 인트론 1 (IVS1)의 다형성의 비-코딩 가닥의 대립유전자를 나열한다. 세번째 열은 엑손 2 (I62V)의 다형성의 비-코딩 가닥의 대립유전자를 나열한다. 네번째 열은 인트론 6 (IVS6)의 다형성의 대립유전자를 나열한다. 다섯번째 열은 엑손 9 (Y402H)의 다형성의 대립유전자를 나열한다. 여섯번째 열은 인트론 10 (IVS10)의 다형성의 비-코딩 가닥의 대립유전자를 나열한다. 일곱번째 열은 엑손 13 (Q672Q)의 다형성의 대립유전자를 나열한다. 여덟번째 열은 엑손 18 (D936E)의 다형성의 대립유전자를 나열한다. 상기 8개 SNP에 대한 dbSNP 지정이 표 1A-1B에 나열되어 있다. 아홉번째 열은 일배체형에 대한 홀수 비율(OR)을 나열한다. 열번째 열은 위험-상태 및 두 보호 일배체형에 대한 P 값을 나열한다. 열한번째 및 열두번째 열은 AMD 병증 및 대조군에서 일배체형에 대한 빈도를 나열한다.

[0155] 표 3은 AMD를 지닌 6개 인자 H 다형성의 일배체형 분석을 도시한다. 첫번째 열은 프로모터에서 다형성의 특정 대립유전자를 나열한다 (rs3753394). 두번째 열은 인트론 1에서 다형성의 대립유전자를 나열한다 (rs529825). 세번째 열은 인트론 6에서 다형성의 대립유전자를 나열한다 (rs3766404). 네번째 열은 인트론 10의 다형성을

나열한다 (rs203674). 다섯번째 열은 엑손 13에서 다형성의 대립유전자를 나열한다 (rs3753396). 여섯번째 열은 엑손 18에서 다형성의 대립유전자를 나열한다 (rs1065489). 열 1 내지 6의 숫자 1과 2는 각각의 다형성 부위에서 각각 제1 및 제2 누클레오티드에 상응하는 대립유전자를 언급한다 (표 1A 참조). 따라서, 열 1 내지 6은 인자 H 유전자에서 5'에서 3'으로의 다형성의 대립유전자를 나열한다. 일곱번째 열은 열 1 내지 6에 나열된 다형성에 기초하여 인자 H 일배체형을 나열한다. 여덟번째 열은 대조 개체군에서 지시된 인자 H 일배체형의 빈도를 나열한다. 아홉번째 열은 AMD 개체군에서 지시된 인자 H 일배체형의 빈도를 나열한다. 표 3에 도시된 대로, 일배체형 분석은 다수의 변이가 연합에 기여하며 AMD 위험성을 증가시키거나 감소시킬 수 있음을 제안한다.

[0156] 표 8은 7 인자 H 다형성의 이배체형 분석을 도시한다. 첫번째 열은 이배체형이 AMD를 발생시키는 증가되거나 (위험 이배체형) 또는 감소된 (보호 이배체형) 위험성과 관련이 있는지를 나타낸다. 일반적인 위험 및 보호 이배체형이 표시된다. 두번째 열은 엑손 2에서 다형성의 대립유전자를 나열한다 (I62V). 세번째 열은 인트론 2에서 다형성의 대립유전자를 나열한다 (IVS2-18). 네번째 열은 엑손 9에서 다형성의 대립유전자를 나열한다 (Y402H). 다섯번째 열은 엑손 18에서 다형성의 대립유전자를 나열한다 (D936E). 여섯번째 열은 인트론 20에서 다형성의 대립유전자를 나열한다 (IVS20).

[0157] 위험-관련 ("위험") 다형성 및 일배체형

[0158] AMD에 대한 증가된 위험성과 관련된 다형성을 포함하는 부위들이 표 1A 및 표 2에 도시되어 있다. 특히 증가된 위험성과 관련된 다형성은 rs1061170 (402H; 엑손 9); rs203674 (인트론 10)에서 변이 대립유전자를, 그리고 찬기 1210 (R1210C; 엑손 22)에서 다형성을 포함한다.

[0159] AMD에 대한 증가된 위험성과 관련된 특정 일배체형이 표 2 및 6 및 도 5에 도시되어 있다. 표 2 및 도 5에 도시된 대로, 한 일반적인 위험-상태 일배체형은 H1 일배체형이고, 이것은 위치 402 (히스티딘 엔코딩)에 변이 대립유전자 및 IVS10 (인트론 10, rs203674)에 변이 대립유전자를 포함하며, AMD 병증의 49%에서 발견되나 대조군에서는 단지 26%이다. 위험 이배체형 (H1/H1)에 대한 동형접합체가 현저히 위험하다. 다른 위험-상태 일배체형 및 이배체형이 표 2 및 8에 도시되어 있다. 유사한 데이터가 표 3에 제시되며, 이것은 위험-상태 일배체형 (111211)이 AMD 병증의 48%에서 발견되나 대조군에서는 단지 28%임을 나타낸다.

[0160] 주목할 만하게도, 70%의 MPGNII (막증식성 사구체신염 타입 2) 환자가 이러한 위험-상태 일배체형을 지니며 (표 7 참조), 이것은 MPGNII를 발생시키는 성향이 AMD에 대해 본원에 기술된 대로 검출되고 치료될 수 있음을 나타낸다.

[0161] 실시예 1에 개시된 대로 다양한 AMD 아류형에 대하여 이러한 다형성 부위의 현저한 관련성이 발견되었다.

[0162] 인자 H 유전자의 엑손 22의 아미노산 위치 1210에 존재하는 유사하지 않은 다형성이 AMD와 강력하게 연관된다 (표 1A 참조). 아르기닌 대신 시스테인을 엔코딩하는 변이 대립유전자가 아이오와 대학에서 조사된 919명의 개체로 구성된 코호트에서 AMD 병증의 5%에서 이형접합 상태로 발견되며, 대조군에는 없었다. 1210C 동형접합체는 아직 동정되지 않았다. 따라서 인자 H의 아미노산 위치 1210에서의 시스테인의 존재는 개체가 AMD를 지니는지 또는 AMD를 발생시킬 수 있는지에 대한 강력한 징후를 제공한다. 현저하게는, 1210C는 달리 보호성인 (예컨대, Y402) 대립유전자 상에서 검출된 경우에서조차도 AMD 또는 다른 보체 매개된 질환을 발생시키는 성향의 징후이다. CFH 위치 1210 (R1210C)에서의 변이는 신장 소견의 보체 매개된 질병인 비정형 용혈 요독 증후군 (aHUS)을 야기하는 것으로 공지되어 있다. 확대하면, aHUS를 야기하는 것으로 공지된 다른 CFH 변이 또는 돌연변이들이 AMD를 발생시키는 증가된 위험성과 관련될 수 있다. 가장 일반적인 확립된 aHUS-야기 변이로는 T956M, Q1076E, D1119G, W1183L, T1184R, L1189R, L1189F, S1191W, S1191L, V1197 A, 및 R1215G (Esparza-Gordillo et al 2005; Perez-Caballero et al 2001; Richards et al 2001; Sanchez-Corral et al 2002)가 있으나, 이로 제한되지 않으며; 추가의 aHUS-야기 돌연변이가 Saunders (Saunders et al 2006)에 개시되어 있다. 본 발명의 일 측면에서, 피검체 (예컨대, 단백질 또는 핵산)로부터의 생물학적 샘플을 하나 이상의 aHUS-관련 변이 또는 돌연변이의 존재에 대해 검정하며, 이의 존재는 AMD를 발생시키는 성향의 징후이다.

[0163] 표 1A-1C에 나열되지 않은, 인자 H 유전자의 추가의 다형성 부위가 상기 일배체형 분석을 추가로 상세히 논할 수 있음을 이해할 것이다. 인자 H 유전자의 유사하지 않은 다형성을 이용하는 일배체형 분석은 변이 인자 H 폴리펩티드를 동정하는데 유용하다. 위험성과 관련된 다른 일배체형이 중성 또는 보호 일배체형에 의해 엔코딩된 단백질과 동일한 서열을 지닌 단백질을 엔코딩할 수 있으나, 예를 들어 인자 H 발현 수준 또는 부위를 변화시키는 프로모터 또는 인트론에 대립유전자를 함유한다. 인자 H 유전자, 또는 인자 H-관련 유전자의 다형성은 이웃하는 유전자의 변이와 연결될 수 있음을 이해할 것이다. 이웃하는 유전자의 변이는 엔코딩된 단백질의 발현 또

는 형태의 변화를 초래할 수 있고 담체에서 유해한 효과 또는 보호 효과를 지닌다.

[0164] 보호 다형성 및 일배체형

[0165] 예상치 못하게도, 보호 다형성 및 일배체형이 또한 발견되었다. 예를 들어, 표 2 및 도 5에 도시된 대로, IVS6 (인트론 6, rs3766404)에 변이 대립유전자를 포함하는 보호 H2 일배체형이 대조군의 12%에서 발생하며, AMD 병증에서는 단지 6%이다. 보호 H4 일배체형은 IVS1 (인트론 1, rs529825)에 변이 대립유전자 및 변이 대립유전자 (I62) (액손 2, rs800292)를 포함하며 대조군의 18%에서 발생하나, AMD 병증에서는 단지 12%이다. 유사한 데이터가 표 3에 제시되며, 여기에서 일배체형 121111은 대조군의 21%에서 발생하나, AMD 병증에서는 단지 13%이고, 일배체형 112111은 대조군의 13%에서 발생하나, AMD 병증에서는 단지 6%이다. 도 5에 도시된 대로, 보호 일배체형을 지니는 동형접합은 현저하게 보호된다.

[0166] 일부 경우에, 보호 일배체형을 특징으로 하는 유전자에 의해 엔코딩된 단백질은 위험 일배체형 단백질과 상이한 서열을 지닌다 (예컨대, 유사하지 않은 SNP의 존재로 인해). 예를 들어, 인자 H 단백질의 보호 형태는 일반적으로 위치 402에 헤스티딘을 지니지 않는다. 일부 구체예에서, 보호 형태는 위치 62에 이소류신을 지닌다. 추가의 보호 형태가 (1) 보호 일배체형을 지니는 개체 또는 개체들을 동정하고 (2) 개체로부터 인자 H cDNA 또는 단백질의 서열(들)을 결정함에 의해 동정될 수 있다. 다른 보호 형태가 하기 섹션 VIII에 개시된 대로 동정된다.

[0167] 중성 다형성 및 일배체형

[0168] 특정 일배체형은 AMD를 발생시키는 증가된 위험성 또는 감소된 위험성을 지니지 않은 개체군과 연관되며 이를 "중성"으로서 언급한다. 백인 개체군에서 동정된 중성 일배체형의 예가 도 5 (H3 및 H5)에 도시되어 있다. 추가의 또는 상이한 중성 일배체형이 종족/인종이 상이한 개체군에서 동정될 수 있다. 중성 일배체형을 특징으로 하는 유전자에 의해 엔코딩된 단백질은 "중성" 인자 H 단백질이다. 상기 설명된 대로, "중성" 인자 H 단백질은 위험 일배체형을 지니거나 AMD로 진단된 환자에게 투여시 치료적 이익을 제공할 수 있었다. 예를 들어, 중성 일배체형을 특징으로 하는 유전자에 의해 엔코딩된 예시적인 단백질은 위치 402에 헤스티딘을 지니지 않고 /거나 위치 62에 이소류신을 지니지 않는 단백질을 포함한다. 위치 402에 헤스티딘을 지니지 않는 단백질은 그 위치에 티로신을 지닐 수 있거나, 헤스티딘 또는 티로신 이외의 아미노산을 지닐 수 있다. 위치 62에 이소류신을 지니지 않는 단백질은 그 위치에 발린을 지닐 수 있거나, 발린 또는 이소류신 이외의 아미노산을 지닐 수 있다. 인자 H 단백질의 중성 형태는 일반적으로 위치 1210에 시스테인을 지니지 않는다.

[0169] V. 인자 H 관련 5 (CFHR5) 유전자 다형성

[0170] 일 측면에서, 본 발명은 인자 H 및 CFHR5 유전자의 다형성 부위가 MPGNII에 대한 감수성 및 이의 발생과 관련된다는 발견에 관한 신규한 진단, 치료 및 약물 스크리닝 방법을 제공한다.

[0171] MPGNII와 관련된 인자 H 및 CFHR5 다형성이, 변이에 대해 PCR 증폭을 이용하여 인자 H 또는 CFHR5의 코딩 및 인접 인트론 영역을 조사한 후에, 아가로스 겔 전기영동 및 표준 프로토콜에 따라 2방향 서열화를 수행하여 PCR 생성물을 입증함에 의해 실시예 2에 개시된 대로 동정되었다. 보고된 신규한 SNP를 변성 고성능 액체 크로마토그래피 (DHPLC)에 의해 대조 개체군에서 유형화하였다. 인자 H 및 CFHR5 코딩 서열을 증폭하는데 사용된 프라이머를 각각 표 9 및 10에 도시한다.

[0172] 생검-입증된 MPGNII를 지닌 환자로 구성된 시험군은 신장학과에서 규명되었으며 IRB 승인된 가이드라인하의 본 연구에 등록되었다. 대조군은 AMD가 안과 시험에 의해서 배제된 인종-매치 및 연령 비매치된 비혈연 사람으로 구성되었다.

[0173] 표 11 및 표 12에서 알 수 있는 바와 같이, MPGNII를 지닌 인자 H 유전자에서의 다형성 부위의 상당한 연관이 22 MPGNII 병증 및 131 인종-매치된 대조군의 시험에서 밝혀졌다. 인자 H 유전자에서의 열한 개(11)의 다형성들이 표 11 및 12에 열거되어 있다. 이들 중 여섯 개(6)는 내셔널 센터 포 바이오테크놀러지 인포메이션 (National Center for Biotechnology Information (NCBI))에서 발견될 수 있는 SNP 데이터베이스(dbSNP)에서 발견된다. dbSNP는 사람 게놈에서의 SNP 모음(collection)이다. 인자 H 유전자에서의 SNP는 인자 H 유전자의 22 코딩 액손들 사이에 및 인자 H 유전자의 프로모터, 5' 비번역된 영역, 인트론 및 3' 비번역된 영역 사이에 분산된다. dbSNP 데이터베이스에서 발견되는 사람 인자 H 유전자중의 379 SNP에 대한 수납번호가 상기 열거되어 있다. 이들 SNP는 본 발명의 방법을 수행하는데 사용될 수 있다.

[0174] 표 11 및 표 12에 열거된 5개의 추가의 다형성이 SNP 데이터베이스에서 발견되지 않는다: 두 개의 T 누클레오티

드가 삽입된 인트론 2에서의 다형성(IVS2 - 18insTT); 인트론 7에서의 다형성(IVS7 - 53G>T); 인트론 15에서의 다형성(IVS15 - 30C>A); 인트론 18에서의 다형성(IVS18 - 89T>C); 및 엑손 20에서의 다형성(N1050Y). 이들 다형성은 본 발명의 방법에 유용하다. 또한, 이들 CFHR5 다형성이 연관 및 연결을 연구하고, 임상 집단의 유전형을 분석하고, 표현형 정보에 대해서 유전형 정보를 상호관련시키고, 이형접합의 소실을 분석하고, 세포 샘플 공급원을 확인하는데 있어서 유용함을 인지할 수 있을 것이다.

- [0175] 표 11의 첫 번째 열은 인자 H 유전자에서의 SNP의 엑손 또는 인트론 위치를 열거하고 있다. 엑손 SNP의 경우, 아미노산 위치 및 변화(있는 경우)가 열거되어 있다. 예를 들어, 엑손 2 SNP는 인자 H 폴리펩티드의 위치 62에 있으며, 발린(V)로부터 이소류신(I)으로의 변화가 있다. 인트론 SNP의 경우, SNP의 특성이 표시되어 있다. 예를 들어, 인트론 2 SNP는 두 개의 누클레오티드, TT의 삽입을 나타낸다. 표 11의 두 번째 열은 다형성에 대한 dbSNP 번호로서 존재하는 경우의 dbSNP 번호를 열거하고 있다. 예를 들어, rs800292는 인자 H 유전자중의 엑손 2에서의 다형성에 대한 dbSNP 지정 번호이다. dbSNP에서의 이러한 다형성 및 그 밖의 인자 H (CFH) 유전자 다형성의 설명은 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=snp&cmd=search&term=>)에서 찾아 볼 수 있다. 표 11의 세 번째 내지 다섯 번째 열은 22 MPGNII 환자중에 존재하는 특정의 이배체형(diplototype)의 횟수를 기재하고 있다. 예를 들어, 엑손 2 SNP의 경우, GG는 20 명의 환자에서 존재하며, GA는 2 명의 환자에 존재하고, AA는 MPGNII와 함께 존재하는 환자가 없다. 표 11의 여섯 번째 및 일곱 번째 열은 특정의 일배체형이 22 MPGNII 환자중에 존재하는 빈도를 열거하고 있다. 예를 들어, 엑손 2 SNP의 경우, 22 MPGNII 환자의 대립유전자 중 G는 95%로 존재하며, A는 5%로 존재한다. 여덟 번째 열은 22 MPGNII 환자에 대한 인자 H 유전자에서의 공통 일배체형의 누클레오티드를 열거하고 있다. 예를 들어, G는 엑손 2 SNP중의 더욱 빈번한 누클레오티드이며, 9 T 누클레오티드는 22 MPGNII 환자에 대한 인자 H 유전자에서의 인트론 2 SNP에서 11 T 누클레오티드 보다 더욱 빈번하게 관찰된다. 나머지 열은 22 MPGNII 환자 각각에 대한 인자 H 유전자에서 11 SNP에 대한 이배체형을 열거하고 있다.

[0176] 표 11에 열거되지 않은 인자 H 유전자중의 추가의 다형 부위가 MPGNII와 연관될 수 있음을 이해해야 한다. 인자 H 유전자에서의 예시적인 다형성 부위가 예를 들어 열거되고 있으며, 그에 제한되지 않음을 이해해야 한다.

[0177] 표 12는 환자에서의 SNP 빈도를 MPGNII 대 AMD-음성의 인종 매치된 대조 개체와 비교하고 있다. 표 12의 첫 번째 컬럼은 인자 H 유전자에서의 SNP를 열거하고 있다. 표 12의 두 번째 및 세 번째 컬럼은 특정의 일배체형이 22 MPGNII 환자 사이에 존재하는 빈도를 열거하고 있다. 표 12의 네 번째 및 다섯 번째 컬럼은 특정의 일배체형이 131 대조 개체 사이에 존재하는 빈도를 열거하고 있다. 표 12의 여섯 번째 컬럼은 각각의 데이터 셋에 대해서 계산된 P-값을 열거하고 있다.

[0178] 표 11 및 12에서 나타내고 있는 바와 같이, 두 개의 빈번한 비-동의 변이체, 즉, 엑손 2에서의 I62V 및 엑손 9에서의 Y420H, 동의 변이체, 즉, 엑손 10에서의 A307A 및 인트론 2에서의 다형성은 MPGNII와의 상당한 연관을 나타냈다.

[0179] 표 14 및 표 15에 나타낸 바와 같이, CFHR5 유전자에서의 다형성 부위의 MPGNII와의 상당한 연관은 22 MPGNII 경우 및 103 인종-매치된 대조군의 시험에서 밝혀졌다. CFHR5 유전자에서의 다섯(5) 개의 다형성이 표 14 및 표 15에 열거되어 있으며; 이들은 NCBI의 dbSNP에서 밝혀졌다. CFHR5 유전자에서의 SNP는 CFHR5 유전자의 10 코딩 엑손 사이에, 및 CFHR5 유전자의 프로모터, 5' 비번역된 영역, 인트론 및 3' 비번역된 영역 사이에 분산되어 있다. 이하 열거된 것은 dbSNP 데이터베이스에서 밝힌되는 사람 CFHR5 유전자중의 82 SNP에 대한 수납번호이다. 이들 SNP는 본 발명의 방법을 수행하는데 사용될 수 있다.

[0180] 표 B

rs16840956	rs12116643	rs10922151	rs9427662	rs7535993	rs6694672	rs1332664
rs16840946	rs12097879rs	rs10801584	rs9427661	rs7532441	rs6692162	rs1325926
rs16840943	12097550	rs10801583	rs9427660	rs7532068	rs6657256	rs1170883
rs12755054	rs12092294	rs10622350	rs9427659	rs7528757	rs6657171	rs1170882
rs12750576	rs12091602	rs10614978	rs7555407	rs7527910	rs5779855	rs1170881
rs12745733	rs12064805	rs10613146	rs7555391	rs7522952	rs3748557	rs1170880
rs12736097	rs12049041	rs10588279	rs7554757	rs7522197	rs2151137	rs1170879
rs12736087	rs12039272	rs9727516	rs7550970	rs7419075	rs2151136	rs1170878
rs12735776	rs11583363	rs9427942	rs7550735	rs7366339	rs1855116	rs928440
rs12731848	rs11306823	rs9427941	rs7550650	rs6702632	rs1759016	rs928439
rs12731209	rs10922153	rs9427664	rs7547265	rs6702340	rs1750311	
rs12142971	rs10922152	rs9427663	rs7537588	rs6674853	rs1412636	

[0181]

- [0182] 표 14의 첫 번째 열은 CFHR5 유전자중의 SNP의 엑손, 프로모터 또는 인트론 위치를 열거하고 있다. 엑손 SNP의 경우에, 아미노산 위치 및 변화는 이들이 있는 경우에 열거되고 있다. 예를 들어, 엑손 2 SNP는 CFHR5 폴리펩티드의 위치 46에 존재하며, 변화는 프롤린 (P)로부터 세린 (S) 사이에 존재한다. 프로모터 및 인트론 SNP의 경우에, SNP의 특성이 표시되어 있다. 예를 들어, 위치 -249에서의 프로모터 SNP는 T를 C로 대체하고 있다. 표 14의 두 번째 열은 다형성에 대한 존재하는 경우의 dbSNP 번호를 열거하고 있다. 예를 들어, rs9427661은 CFHR5 유전자의 프로모터 영역에서의 다형성에 대한 dbSNP 지정이다. dbSNP에서의 이러한 다형성, 및 그 밖의 CFHR5 유전자 다형성의 설명은 인터넷 사이트 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=snp&cmd=search&term=>)을 이용할 수 있다. 표 14의 세 번째 내지 다섯 번째 열은 특정의 이배체형이 22 MPGNII 환자 사이에 존재하는 횟수를 열거하고 있다. 예를 들어, 엑손 2 SNP의 경우에, MPGNII와 함께, CC는 19명의 환자에서 존재하며, CT는 3명의 환자에서 존재하고, TT는 존재하는 환자가 없다. 표 14의 여섯 번째 및 일곱 번째 열은 특정의 일배체형이 22 MPGNII 환자 중에 존재하는 빈도를 열거하고 있다. 예를 들어, 엑손 2 SNP의 경우에 22 MPGNII 환자의 대립유전자 중, C(프롤린을 엔코딩)는 93%로 존재하고, T(세린을 엔코딩)는 7%로 존재한다. 여덟 번째 열은 22 MPGNII 환자에 대한 CFHR5 유전자에서의 공통 일배체형의 누클레오티드를 열거하고 있다. 예를 들어, C는 22 MPGNII 환자에 대한 CFHR5 유전자중의 엑손 2 SNP중의 더욱 빈번한 누클레오티드이다. 나머지 열은 22 MPGNII 환자의 각각에 대한 CFHR5 유전자에서의 5 SNP에 대한 이배체형을 열거하고 있다.
- [0183] 표 14에 열거되지 않은 CFHR5 유전자중의 추가의 다형성 부위가 MPGNII와 연관될 수 있음을 이해해야 한다. CFHR5 유전자중의 예시적인 다형 부위가 예를 들어 열거되고 있으며, 그에 제한되지 않는다.
- [0184] 표 15는 환자에서의 SNP 빈도를 MPGNII 대 AMD-음성의 인종 매치된 대조 개체와 비교하고 있다. 표 15의 첫 번째 컬럼은 CFHR5 유전자에서의 SNP를 열거하고 있다. 표 15의 두 번째 및 세 번째 컬럼은 특정의 일배체형이 22 MPGNII 환자 사이에 존재하는 빈도를 열거하고 있다. 표 15의 네 번째 및 다섯 번째 컬럼은 특정의 일배체형이 103 대조 개체 사이에 존재하는 빈도를 열거하고 있다. 표 15의 여섯 번째 컬럼은 각각의 데이터 셋에 대해서 계산된 P-값을 열거하고 있다.
- [0185] 표 14 및 표 15에 나타낸 바와 같이, 하나의 비-동의 변이체, 즉, 엑손 2중의 P46S 및 두 개의 프로모터 다형성, 즉, -249T>C 및 -2-T>C는 MPGNII와의 상당한 연관을 나타냈다.
- [0186] MPGNII 환자에서 확인된 위험-관련 ("위험") 다형성 및 일배체형
- [0187] MPGNII에 대한 증가된 위험과 연관된 인자 H 및 CFHR5에서의 다형성을 포함하는 부위가 표 11, 표 12, 표 14 및 표 15에 각각 기재되어 있다. 인자 H 및 CFHR5에서의 증가된 위험과 특별히 연관된 다형성은 각각 rs1061170 (엑손 9중의 Y420H) 및 rs12097550(엑손 2중의 P46S)에서의 변이성 대립유전자를 포함한다.
- [0188] MPGNII에 대한 증가된 위험과 연관된 특정의 일배체형이 표 12 및 표 15에 기재되어 있다. 표 12에서 기재하고 있는 바와 같이, 인자 H유전자에서의 하나의 위험상태 일배체형은 위치 402에서의 변이성 대립유전자(히스티딘을 엔코딩함)를 포함하며, MPGNII 경우의 64%로 발견되지만, 대조군의 경우는 단지 33%로 발견되고 있다. 표 15에 나타내고 있는 바와 같이, CFHR5 유전자중의 하나의 위험상태 일배체형은 위치 46에서의 변이성 대립유전자(세린을 엔코딩함)를 포함하며, MPGNII 경우의 7%로 발견되지만, 대조군의 경우는 단지 <1%로 발견되고 있다.
- [0189] 표 11, 표 12, 표 14 및 표 15에 열거되지 않은 인자 H 및 CFHR5 유전자중의 추가의 다형성 부위가 이를 일배체형 분석을 추가로 보완할 것이라는 것이 이해될 것이다. 인자 H 또는 CFHR5 유전자에서의 비-동의 다형성을 사용한 일배체형 분석은 변이성 인자 H 또는 CFHR5 폴리펩티드를 확인하는데 유용하다. 위험과 관련된 그 밖의 일배체형은 중성 또는 보호 일배체형에 의해서 엔코딩된 단백질과 동일한 서열을 지니는 단백질을 엔코딩할 수 있지만, 프로모터 또는 인트론, 예를 들어, 인자 H 또는 CFHR5 발현의 수준 또는 부위를 변경시키는 프로모터 또는 인트론에서의 대립유전자를 함유할 수 있다.
- [0190] 보호 다형성 및 일배체형
- [0191] 예상치 못하게, 보호 다형성 및 일배체형을 또한 발견하였다. 예를 들어, 표 12에 기재된 바와 같이, 엑손 2(rs800292, 162V)중의 변이성 대립유전자를 지닌 일배체형이 대조군의 23%에서 발생하지만, MPGNII 경우는 단지 <3%로 발생하며, IVS2중의 변이성 대립유전자를 지닌 일배체형(인트론 2, -18insTT)은 대조군에서 26%로 발생하지만, MPGNII 경우는 단지 <3%로 발생한다. 엑손 10에서의 변이성 대립유전자를 지닌 일배체형 (rs2274700, A473A)은 MPGNII 경우에서 보다 대조군에서 더 높은 빈도로 발생한다.

- [0192] 일부의 경우에, 보호 일배체형에 의해서 특성화된 유전자에 의해서 엔코딩된 단백질은 위험 일배체형 단백질과 서열이 다르다. 예를 들어, 인자 H 단백질의 보호 형태는 일반적으로 위치 402에서 히스티딘을 지니지 않는다. 일부 구체예에서, 보호 형태는 위치 62에서 이소류신을 지닌다. 추가의 보호 형태는 (1) 개체 또는 개체들을 보호 일배체형으로 동정하고 (2) 개체로부터의 인자 H cDNA 또는 단백질의 서열(들)을 동정함으로써 확인될 수 있다. 일부 보호 형태는 전장 형태 보다 짧다. CFHR5 단백질의 보호 형태가 유사하게 확인될 수 있다.
- [0193] 중성 다형성 및 일배체형
- [0194] 특정의 일배체형은 MPGNII를 발병하는 증가된 위험 또는 감소된 위험과 연관이 없으며, "중성"으로 일컬어진다. 중성 일배체형에 의해서 특성화된 유전자에 의해서 엔코딩된 단백질은 "중성" 인자 H 또는 CFHR5 단백질이다. 예를 들어, 중성 일배체형에 의해서 특성화된 유전자에 의해서 엔코딩된 예시적인 단백질은 위치 402에서 히스티딘을 지니지 않거나 위치 62에서 이소류신을 지니지 않는 인자 H 단백질, 및 위치 46에서 세린을 지니지 않는 CFHR5 단백질을 포함한다.
- [0195] MPGNII 환자에서의 다형성의 중요성
- [0196] 실시예 2에 기재된 바와 같이, AMD를 발병시키는 경향과 연관된 동일한 CFH 다형성이 또한 막증식성 사구체신염 타입 2(MPGN II)의 발병과 연관되어 있다. 사실, AMD 환자에서 최초로 발견되는 위험 일배체형(Y402H 및 IVS10)이 또한 막증식성 사구체신염 타입 2(MPGN II)를 앓고 있는 시험된 환자의 70%에서 발견되어, 본 발명의 진단 방법이 이러한 질환을 검사하는데 유용함을 나타내고 있다. 또한, CFHR5 유전자에서의 변이체 및 일배체형은 MPGNII를 지니는 증가된 위험과 강하게 연관되었다. 이를 데이터로부터 도출되는 한 가지 결론은 MPGNII 및 AMD가 동일한 유전자 병변의 또 다른 표시라는 것이다. 명백하게는, MPGNII를 앓고 있는 환자는 AMD에서 형성되는 드루젠(drusen)과는 임상적으로 및 조성적으로 구별되지 않는 드루젠을 생성시킨다. 이들 두 근본적 표현형을 구분하는 한 가지 특징은 개시 연령으로, MPGNII에서의 드루젠은 조기에 발생되며, 종종 10대에 발생되지만, AMD에서의 드루젠은 그 후의 생애 동안 발생된다. 본 발명자들은 두 집단 (AMP 또는 MPGNII)중 한 집단에서 확인된 인자 H 유전자 및 CFHR5 유전자종의 다형성이 두 질환 모두에 대한 민감성을 예측하는 것으로 결론을 내리고 있다. MPGNII에 기여하고 조기 징후를 나타내는 그 밖의 인자가 있는 듯하다. AMD는 아주 일반적이며 MPGNII는 드물기 때문에, CFH 및 CFHR5 유전자 둘 모두의 일배체형 분석 및 본원에 기재된 그 밖의 방법은 AMD를 앓고 있는 환자, 또는 AMD 발병 가능성의 증가된 환자의 검진 및 치료에 유용할 것이다.
- [0197] 기능 상실
- [0198] 정상 또는 야생형 인자 H 또는 CFHR5의 기능 상실은 AMD와 연관될 수 있다. AMD와 강한 연관을 보이며 변이성 인자 H 폴리펩티드 또는 변이성 CFHR5 폴리펩티드를 생성시키는 인자 H 유전자에서의 비-동의 다형성, 예컨대, 표 1A, 1B, 1C, 11, 14 및 15에 나타낸 다형성들은 AMD의 원인성 역할을 지니는 듯하다. 그러한 역할은 그러한 비-동의 다형성(들)을 지닌 사람 인자 H 또는 CFHR5를 발현하는 유전자 이식 비-사람 동물을 생성시키고 그러한 동물이 AMD를 발생시키는지를 측정함으로써 확인될 수 있다. 정지 코돈을 도입시키는 인자 H 또는 CFHR5 코딩 영역에서의 다형성은 기능성 인자 H 또는 CFHR5 단백질을 감소시키거나 제거함으로써 AMD를 발생시킬 수 있다. 정지 코돈은 또한 전장 단백질에 비한 비정상적 활성을 지니는 절단된 인자 H 또는 CFHR5 웨პ티드의 생성을 유발시킬 수 있다. 조절 영역, 예컨대, 프로모터 및 인트론에서의 다형성은 인자 H 또는 CFHR5 유전자 발현을 감소시킴으로써 AMD를 유발시킬 수 있다. 인트론(예, CFH의 인트론 2)에서의 다형성은 변경된 인자 H 또는 CFHR5 단백질을 생성시키는 유전자 스플라이싱(splicing) 패턴을 변경시킴으로써 AMD를 유발시킬 수 있다. CFH RNA 또는 단백질은 스플라이스 변이체의 발현에서의 변화를 검사하기 위해서 검정될 수 있으며, 그러한 변화는 AMD를 발병하는 경향의 표시이다. 또 다른 스플라이스 패턴이 인자 H 유전자 그 자체에 대해서 보고되어 있다.
- [0199] AMD에 대한 인자 H 유전자 또는 CFHR5 유전자에서의 다형성의 효과는 몇 가지 수단에 의해서 측정될 수 있다. 변이성 인자 H 또는 CFHR5 폴리펩티드의 발현 수준에서의 변경은 AMD 또는 AMD의 다양한 아류형을 지니거나 지니지 않는 개체의 군들로부터의 샘플에서 단백질 수준을 측정함으로써 측정될 수 있다. 변이성 인자 H 또는 CFHR5 폴리펩티드의 생물학적 활성에서의 변경은 상기 개체의 군들로부터의 샘플에서, 예를 들어, C3b 또는 헤파린에 결합하는 인자 H 또는 CFHR5의 시험관내 활성을 측정함으로써 검사될 수 있다.
- [0200] VI. 개놈성 복사 부위에서의 다형성
- [0201] 도 18에 예시된 바와 같이, CFH에 대한 유전자 및 인자 H 관련된 (CFHR) 1-5 유전자는 개놈성 복사로부터 발생되는 듯한 공유성의 고도로 보존된 서열 영역을 지닌다. CFH 또는 CFHR5에서 발견되는 특정의 SNP 및 그 변이체, 예컨대, 본원에 기재된 바와 같은 것들이 CFHR1, CFHR2, CFHR3, 및 CFHR4의 상응하는 서열에서 예상된다.

예를 들어, CFH 엑손 22에 상응하는 서열은 CFH, CFHR1 및 CFHR2에서 발견되며, CFH의 엑손 22에서 확인된 다형성(예, R1210C)이 CFHR1 및/또는 CFHR2에서 발견되는 것이 가능하며, 이들 변이체는 AMD, MPGNII 및 그 밖의 보체 관련된 상태의 발병에 대한 경향과 연결될 수 있다. CFH 및 CFHR5에서 확인된 다형성 부위를 플랭킹 (flanking)하는 서열의 동종성 차단이 그들 영역에서의 cDNA 또는 게놈성 서열의 정렬에 의해서 확인될 수 있다. 다형성 부위를 플랭킹하는 보존된 서열은 일반적으로 누클레오티드 수준의 95% 동일성, 및 때로는 98% 이상의 동일성, 99% 이상의 동일성 또는 100% 동일성으로 10bp이상 (다형성 부위의 어느쪽 상에) 및 더욱 빈번하게는 20bp 이상, 또는 50bp 이상 또는 100bp이상을 포함한다. 동일성은 검사에 의해서 또는 공지된 알고리즘을 이용함으로써 측정될 수 있다(Smith and Waterman, 1981 or Needleman and Wunsch, 1970, both supra). 따라서, 본 발명은 CFH 또는 CFHR5 유전자에서의 동종 다형성 부위에 상응하는 인자 H-관련된 유전자의 다형성 부위에서의 변이의 존재 또는 부재를 검사함으로써 연령 관련된 황반변성(AMD) 또는 그 밖의 질환을 발병하는 대상자의 경향을 측정하는 방법을 제공한다.

[0202] CFH 및 인자 H 관련된 유전자에 대한 서열은 본 기술 분야에 공지되어 있다(본원에 기재된 서열 및 수납번호 참조). 또한 문헌[Rodriquez de Cordoba, S., et al, 2004, *Mol Immunol* 41 :355-67; Zipfel et al, 1999, *Immunopharmacology* 42:53-60; Zipfel et al., Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases, *Biochem Soc Trans.* 2002 Nov;30(Pt 6):971-8; Diaz-Guillen MA, et al., A radiation hybrid map of complement factor H and factor H-related genes, *Immunogenetics*, 1999 Jun;49(6):549-52; Skerka C, et al., A novel short consensus repeat-containing molecule is related to human complement factor H, *J Biol Chem.* 1993 Feb 5;268(4):2904-8; Skerka C, et al., The human factor H-related gene 2 (FHR2): structure and linkage to the coagulation factor XIIIb gene, *Immunogenetics*, 1995;42(4):268-74; Male DA, et al., Complement factor H: sequence analysis of 221 kb of human genomic DNA containing the entire fH, fHR-1 and fHR-3 genes, *Mol Immunol.* 2000 Jan-Feb;37(1-2):41-52; Hellwage J, et al., Biochemical and functional characterization of the factor-H-related protein 4 (FHR-4), *Immunopharmacology*. 1997 Dec;38(1-2): 149-57; Skerka C, et al., The human factor H-related protein 4 (FHR-4). A novel short consensus repeat-containing protein is associated with human triglyceride-rich lipoproteins, *J Biol Chem.* 1997 Feb 28;272(9):5627-34; Hellwage J, et al., Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin, *FEBS Lett.* 1999 Dec 3;462(3):345-52; Jozsi M, et al., FHR-4A: a new factor H-related protein is encoded by the human FHR-4 gene, *Eur J Hum Genet.* 2005 Mar;13(3):321-9; McRae JL, et al., Location and structure of the human FHR-5 gene, *Genetica.* 2002 Mar;114(2):157-61; McRae JL, et al., Human factor H-related protein 5 has cofactor activity, inhibits C3 convertase activity, binds heparin and C- reactive protein, and associates with lipoprotein, *J Immunol.* 2005 May 15;174(10):6250-6; Murphy B, et al., Factor H-related protein-5: a novel component of human glomerular immune deposits, *Am J Kidney Dis.* 2002 Jan;39(1):24-7].

[0203] VII. AMD와 연관된 인자 H 다형성의 검출 및 분석

[0204] 인자 H 유전자 및 CFHR5 유전자에서의 다형성 부위 및 일배체형이 AMD(및 MPGNII)와 연관되어 있다는 발견은 AMD를 앓고 있거나 이의 증가된 발병 위험에 있는 개체에 대한 신규의 및 최적의 치료방법에 대한 동정 및 AMD의 발병 위험의 확인을 위한 개체의 검진을 포함한 많은 특이적 적용이 있다. 특정의 메카니즘으로 한정되는 것은 아니지만, 인자 H 유전자에서의 다형성은 상이한 경로에서의 개체의 표현형에 기여할 수 있다. 인자 H의 단백질 코딩 영역내에서 발생하는 다형성은 단백질 구조 및/또는 기능에 영향을 줌으로써 표현형에 기여할 수 있다. 인자 H의 비-코딩 영역에서 발생하는 다형성은 복사, 전사 및/또는 번역에 대한 이들의 영향을 통해서 직접적으로 표현형에 영향을 줄 수 있다. 인자 H 유전자에서의 특정의 다형성은 개체를 특정의 AMD 표현형과 원인적으로 연관되는 독특한 돌연변이 발생에 용이하게 한다. 또한, 상기 주지된 바와 같이, CFH 유전자, 또는 CFHR5에서의 다형성은 이웃하는 유전자(CFHR-1, 2, 3, 또는 4를 포함하지만 이로 한정되는 것은 아님)에서의 변이와 연관될 수 있다. 이웃하는 유전자에서의 변이는 엔코딩된 단백질의 발현 또는 형태에서의 변화를 초래할 수 있으며, 담체에서의 유해한 효과 또는 보호 효과를 지닐 수 있다.

[0205] A. 분석을 위한 샘플의 제조

[0206] 다형성은 검정되는 개체로부터 분리된 표적 핵산에서 검출된다. 전형적으로 게놈성 DNA가 분석된다. 게놈성 DNA의 검정의 경우에, 실질적으로, 게놈성 DNA 또는 RNA를 함유하는 어떠한 생물학적 샘플, 예를 들어, 핵화된 세포가 적합하다. 예를 들어, 실시예 1에 기재된 실험에서, 게놈성 DNA는 케이스 대상 또는 대조 대상으로부터

수집된 말초혈액 백혈구로부터 얻었다(QIAamp DNA Blood Maxi kit, Qiagen, Valencia, CA). 그 밖의 적합한 샘플은 태액, 볼 스크랩핑, 망막, 신장 또는 간의 생검물, 또는 그 밖의 기관 또는 조직의 생검물; 피부 생검물; 및 양수 또는 CVS 샘플; 등을 포함한다. 또한, RNA 또는 cDNA가 검정될 수 있다. 또한, 이하 기재된 바와 같이, 검정은 변이성 인자 H 단백질을 검사할 수 있다. 진단 및 그 밖의 검정에 유용한 환자 샘플로부터의 핵산 또는 단백질의 정제 또는 부분적 정제 방법이 공지되어 있다.

[0207] B. 표적 핵산에서의 다형성의 검출

[0208] 표 1A, 1B, 1C, 11, 14 및 15에 나타낸 인자 H 유전자 및 인자 H-관련된 5 유전자에서의 다형성 부위를 차지하고 있는 염기의 동일성, 및 인자 H 또는 CFHR5 유전자(상기 설명 참조)내에 위치하거나 그에 인접한 dbSNP 수거물에서의 그 밖의 것이 본 기술분야에 공지된 몇몇의 방법중 어떠한 방법을 이용함으로써 분석되는 개체, 예를 들어, 환자에서 측정될 수 있다. 그러한 예는 대립유전자-특이적 프로브의 사용; 대립유전자-특이적 프라이머의 사용; 직접적인 서열 분석; 변성구배겔전기영동(DGGE) 분석; 단일가닥구조다형성(single strand conformation polymorphism, SSCP) 분석; 및 변성고성능액체크로마토그래피(DHPLC) 분석을 포함한다. DNA에서의 다형성을 검출하는 그 밖의 공지된 방법은 문자 비콘 기술(Molecular Beacons technology)[참조예: Piatek et al., 1998; *Nat. Biotechnol.* 16:359-63; Tyagi, and Kramer, 1996, *Nat. Biotechnology* 14:303-308; and Tyagi, et al., 1998, *Nat. Biotechnol.* 16:49-53], 인베이더 기술(Invader technology)[참조예: Neri et al., 2000, *Advances in Nucleic Acid and Protein Analysis* 3826: 117-125 and U.S. Patent No. 6,706,471], 핵산 서열 기재 증폭(Nasba)(Compton, 1991), 스코르피온 기술(Scorpion technology)[문헌: Thelwell et al., 2000, *Nuc. Acids Res.* 28:3752-3761 and Solinas et al., 2001, "Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications" *Nuc. Acids Res.* 29:20.], 및 제한 단편 길이 다형성(restriction fragment length polymorphism, RFLP) 분석 등의 이용을 포함한다. 추가의 방법은 본 기술분야의 전문가에게는 자명할 것이다.

[0209] 다형성을 분석하는 대립유전자-특이적 프로브의 디자인 및 사용은 문헌예(Saiki et al., 1986; Dattagupta, EP 235,726, Saiki, WO 89/11548)에 기재되어 있다. 요약하면, 두 개의 세그먼트가 상이한 다형성 형태를 나타내는 경우, 대립유전자-특이적 프로브는 한 개체로부터의 표적 DNA의 세그먼트에 하이브리드화되지만 다른 개체로부터의 상응하는 세그먼트에는 하이브리드화되지 않도록 디자인된다. 충분히 엄격한 하이브리드화 조건이 선택되어서 주어진 프로브가 필수적으로 두 대립유전자 중 단지 하나에만 하이브리드화되게 한다. 전형적으로는, 대립유전자-특이적 프로브는 표적 DNA의 세그먼트에 하이브리드화되도록 디자인되어서, 다형성 부위가 프로브의 중심 위치에 맞춰 조정된다.

[0210] 인자 H 다형성을 분석하는 예시적인 대립유전자-특이적 프로브가 표 16A에 기재되어 있다. 예시로서 다형성 dbSNP 번호 rs1061170을 이용하면, 대립유전자-특이적 프로브의 예는 5'-TTCTTCCATAATTTG-3' [서열번호 234] (참조 대립유전자 프로브) 및 5'-TTCTTCCATGATTTG-3' [서열번호 235] (변이성 대립유전자 프로브); 및 5'-TAATCAAAATTATGGAA-3' [서열번호 232] (참조 대립유전자 프로브) 및 5'-TAATCAAAATCATGGAA-3' [서열번호 233] (변이성 대립유전자 프로브)를 포함한다. 이러한 예에서, 대립유전자-특이적 프로브의 첫 번째 세트는 엑손 9 다형성을 스패닝(spanning)하는 인자 H 유전자의 비-코딩 가닥에 하이브리드화된다. 대립유전자-특이적 프로브의 두 번째 세트는 엑손 9 다형성을 스패닝하는 인자 H의 코딩 가닥에 하이브리드화된다. 이들 프로브는 길이가 17 염기이다. 대립유전자-특이적 프로브의 최적의 길이는 본 분야에 공지된 방법을 이용함으로써 용이하게 결정될 수 있다.

[0211] 대립유전자-특이적 프로브는 종종 쌍으로, 표적 서열의 참조 대립유전자에 하이브리드화되도록 디자인된 쌍 중의 한 구성원 및 변이성 대립유전자에 하이브리드화되도록 디자인된 다른 구성원으로 이용된다. 몇몇의 프로브 쌍이 동일한 표적 유전자 서열내의 다중의 다형성의 동시 분석을 위해서 동일한 지지체 상에 고정될 수 있다.

[0212] 다형성을 분석하기 위한 대립유전자-특이적 프라이머의 디자인 및 사용이 예를 들어 WO93/22456호 및 갑스(Gibbs, 1989)에 기재되어 있다. 요약하면, 대립유전자-특이적 프라이머는 프라이머가 특정의 대립유전자 형태에 완전한 보체성을 나타내는 경우에만 다형성을 중첩하고 있는 표적 DNA상의 한 부위에 하이브리드화되고 표준 PCR 원안에 따라서 DNA 증폭을 프라이밍하도록 디자인된다. 단일-염기 미스매치(single-base mismatch)는 DNA 증폭을 방지하며, 검출 가능한 PCR 생성물이 형성되지 않는다. 이러한 방법은 다형성 부위가 프라이머의 최극단 3'-말단에 있는 경우에 최상으로 수행되며, 그 이유는 이러한 위치가 프라이머의 신장에 가장 탈안정화되기 때문이다.

[0213] 인자 H 다형성을 분석하기 위한 예시적인 대립유전자-특이적 프라이머가 표 16B에 기재되어 있다. 예시로서 다

형성 dbSNP 번호 rs1061170을 사용하면, 대립유전자-특이적 프라이머의 예는 5'-CAAACTTCTTCATA-3' [서열번호 294] (참조 대립유전자 프라미머) 및 5'-CAAACTTCTTCATG-3' [서열번호 295] (변이성 대립유전자 프라이머); 및 5'-GGATATAATC AAAATT-3' [서열번호 292] (참조 대립유전자 프라미머) 및 5'-GGATATAATCAAATC-3' [서열번호 293] (변이성 대립유전자 프라미머)를 포함한다. 이러한 예에서, 대립유전자-특이적 프라이머의 첫 번째 세트는, 표시된 바와 같이 참조 또는 변이성 다형성 대립유전자에 상보성인 최종 누클레오티드에 의해서, 엑손 9에서의 다형성에 직접적으로 인접한 인자 H 유전자의 비-코딩 가닥에 하이브리드화된다. 이들 프라이머는 다형성으로부터의 하류에 있는 특정된 위치에서 인자 H 유전자의 코딩 가닥에 하이브리드화되는 또 다른 공통의 프라이머와 함께 표준 PCR 원안에서 사용된다. 대립유전자-특이적 프라이머의 두 번째 세트는, 표시된 바와 같이 참조 또는 변이성 다형성 대립유전자에 상보성인 최종 누클레오티드에 의해서, 엑손 9에서의 다형성 부위에 직접적으로 인접한 인자 H 유전자의 코딩 가닥에 하이브리드화된다. 이들 프라이머는 다형성으로부터 하류의 특정된 위치에서 인자 H 유전자의 비-코딩 가닥에 하이브리드화되는 또 다른 공통 프라이머와 함께 표준 PCR 원안에서 사용된다. 공통의 프라이머가 선택되어서, 생성되는 PCR 생성물이 그 길이에서 약 100 내지 약 300 염기, 또는 약 150 내지 약 250 염기로 다양할 수 있지만, 더 작거나(길이 약 50 내지 약 100 염기) 더 큰(길이 약 300 내지 약 500 염기) PCR 생성물이 가능하게 한다. 프라이머의 길이는 그 길이가 약 10 내지 30 염기, 또는 약 15 내지 25 염기로 다양할 수 있다. 공통 프라이머의 서열은 진뱅크 수납번호 AL049744호(GenBank accession number AL049744) 하에 발견되는 인자 H 계놈 서열의 조사에 의해서 측정될 수 있다.

- [0214] 다형성을 검출하는 많은 방법은 표적 샘플로부터의 DNA 또는 RNA를 증폭(인자 H-특이적 프라이머를 사용한 개체의 인자 H 유전자의 세그먼트를 증폭)시키고, 증폭된 유전자를 분석함을 포함한다. 이러한 방법은 표준 폴리머라제 연쇄 반응(PCR & RT-PCR) 원안 또는 본 기술분야에 공지된 그 밖의 방법에 의해서 수행될 수 있다. 증폭은 인자 H 유전자에서의 단일 누클레오티드 다형성 부위를 스패닝하는 인자 H 대립유전자-특이적 올리고누클레오티드의 생성을 초래할 수 있다. 인자 H-특이적 프라이머 서열 및 인자 H 대립유전자-특이적 올리고누클레오티드는 인자 H 유전자의 코딩 (엑손) 또는 비코딩 (프로모터, 5' 비번역된, 인트론 또는 3' 비번역된) 영역으로부터 유도될 수 있다.
- [0215] PCR을 사용함으로써 생성된 증폭 생성물이 변성 구배 겔 전기영동(DGGE)의 사용에 의해서 분석될 수 있다. 상이한 대립유전자가 서열-의존성 용융 성질 및 용액중의 전기영동적 이동을 기초로 확인될 수 있다. 참조 [Erlich, ed., PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification, Chapter 7 (W.H. Freeman and Co, New York, 1992)]
- [0216] 표적 서열의 대립유전자는 단일-가닥 구조 다형성(SSCP) 분석을 이용함으로서 분화될 수 있다. 상이한 대립유전자가 단일 가닥 PCR 생성물(Orita et al., 1989)의 서열- 및 구조-의존성 전기영동 이동을 기초로 확인될 수 있다. 증폭된 PCR 생성물은 표준 원안에 따라서 생성되며, 가열되거나 달리 변성되어 염기 서열에 부분적으로 의존적인 이차 구조를 형성하거나 리폴딩(refolding)될 수 있는 단일 가닥 생성물을 형성할 수 있다.
- [0217] 표적 서열의 대립유전자는 변성 고성능 액체 크로마토그래피(DHPLC) 분석을 사용함으로써 분화될 수 있다. 상이한 대립유전자가 단일 가닥 PCR 생성물의 크로마토그래피 이동에서의 변경에 의한 염기 차이를 기초로 확인될 수 있다(Frueh and Noyer-Weidner, 2003). 증폭된 PCR 생성물은 표준 원안에 따라서 생성되며, 가열 또는 달리 변성되어, 염기 서열에 부분적으로 의존적인 이차 구조를 형성하거나 리폴딩될 수 있는 단일 가닥 생성물을 형성할 수 있다.
- [0218] 다형성의 직접적인 서열 분석은 본 기술 분야에 공지된 DNA 서열화 과정을 이용함으로써 수행될 수 있다. 참조 [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd Ed., CSHP, New York 1989) and Zyskind et al., Recombinant DNA Laboratory Manual (Acad. Press, 1988)].
- [0219] 광범위하게 다양한 그 밖의 방법이 생물학적 샘플중의 다형성을 검출하는 본 기술 분야에 공지되어 있다. 참조 예[Ullman et al. "Methods for single nucleotide polymorphism detection" U.S. Pat. No. 6,632,606; Shi, 2002, "Technologies for individual genotyping: detection of genetic polymorphisms in drug targets and disease genes" *Am J Pharmacogenomics* 2:197-205; Kwok et al., 2003, "Detection of single nucleotide polymorphisms" *Curr Issues Biol.* 5:43-60].
- [0220] 본 기술분야의 실무자라면 본 개시사항에 의해서 다양한 다형성 및 일배체형이 인자 H 관련된 질환을 발병하는 개체의 경향을 검정하도록 검출될 수 있다는 것이 자명할 것이다. 이하 실시예 및 그 조합, 및 본원에 기재된 그 밖의 사항은 예시를 위한 것이며 그들로 제한되는 것이 아니다. 본 발명의 한 가지 특징으로, 인자 H 유전자종의 하나 이상의 하기 다형성 부위에서의 환자의 대립유전자가 측정된다: rs529825; rs800292; rs3766404;

rs1061147; rs1061170; 및 rs203674. 한 가지 구체예에서, rs529825에서의 환자의 대립유전자가 측정된다. 한 가지 구체예에서, rs800292에서의 환자의 대립유전자가 측정된다. 한 가지 구체예에서, rs3766404에서의 환자의 대립유전자가 측정된다. 한 가지 구체예에서, rs1061147에서의 환자의 대립유전자가 측정된다. 한 가지 구체예에서, rs1061170에서의 환자의 대립유전자가 측정된다. 한 가지 구체예에서, rs529825 및 rs800292중 하나 이상에서의 대립유전자가 측정된다. 한 가지 구체예에서, rs1061147, rs1061170 및 rs203674중 하나 이상에서의 대립유전자가 측정된다. 한 가지 구체예에서, rs529825 및 rs800292중 하나 이상에서의 대립유전자가 측정되며, rs3766404에서의 대립유전자가 측정되며, rs1061147, rs1061170 및 rs203674중 하나 이상에서의 대립유전자가 측정된다. 한 가지 구체예에서, rs529825, rs800292, rs3766404, rs1061170 및 rs203674에서의 대립유전자가 측정된다. 상기된 다형성 및 다형성들의 조합이 예시를 위해서 본원에서 제공되고 있으며, 이들은 본 발명을 어떠한 방법으로든 제한하고자 하는 것이 아니다. 즉, 본 발명을 수행하는데 유용한 그 밖의 다형성 및 일배체형이 본 개시사항으로부터 자명할 것이다.

[0221] 본 발명의 관련된 특징으로, 인자 H 유전자에서의 하나 이상의 하기 다형성 부위에서의 환자의 대립유전자가 측정된다: rs529825; rs800292; 인트론 2 (IVS2 또는 insTT); rs3766404; rs1061147; rs1061170; 엑손 10A; rs203674; rs375046; 및 엑손 22 (1210). 한 가지 구체예에서, rs529825에서의 환자의 대립유전자가 측정된다. 한 가지 구체예에서, rs800292에서의 환자의 대립유전자가 측정된다. 한 가지 구체예에서, 인트론 2에서의 환자의 대립유전자가 측정된다. 한 가지 구체예에서, rs3766404에서의 환자의 대립유전자가 측정된다. 한 가지 구체예에서, rs1061147에서의 환자의 대립유전자가 측정된다. 한 가지 구체예에서, rs1061170에서의 환자의 대립유전자가 측정된다. 한 가지 구체예에서, 엑손 10A에서의 환자의 대립유전자가 측정된다. 한 가지 구체예에서, rs203674에서의 환자의 대립유전자가 측정된다. 한 가지 구체예에서, rs375046에서의 환자의 대립유전자가 측정된다. 한 가지 구체예에서, 엑손 22 (1210)에서의 환자의 대립유전자가 측정된다. 한 가지 구체예에서, rs529825 및 rs800292중 하나 이상에서 측정되며; 인트론 2에서 측정되고; rs3766404에서 측정되며; rs1061147, rs1061170 및 rs203674중 하나 이상에서 측정되고; 엑손 10A에서 측정되며; rs375046에서 측정되고; 엑손 22 (1210)에서 측정된다. 한 가지 구체예에서, rs529825, rs800292, 인트론 2; rs3766404, rs1061170, 엑손 10A, rs203674, rs375046, 및 엑손 22 (1210)에서의 대립유전자가 측정된다. 한 가지 구체예에서, 인자 H 유전자중의 다음 다형성 부위중 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯, 또는 다섯 이상이 측정된다: rs529825; rs800292; 인트론 2 (IVS2 또는 insTT); rs3766404; rs1061147; rs1061170; rs2274700; 엑손 10A; rs203674; rs375046; 및 엑손 22 (1210). 상기된 다형성 및 이들 다형성의 조합은 예시를 위해서 제공되고 있는 것이며, 본 발명을 어떠한 방법으로든 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0222] 상기된 바와 같이, 인자 H 유전자의 엑손 22에서의 아미노산 위치 1210에서의 비-동의 다형성은 AMD와 강하게 연관되어 있으며, 따라서, 인자 H의 아미노산 위치 1210에서의 시스테인의 존재는 개체가 AMD를 지니거나 AMD를 발생시키기에 용이하다는 강한 지표이다. 주목할만하게는, 1210C는 달리 보호(예, Y402)인 대립유전자상에서 검출된 경우에도 AMD 또는 그 밖의 보체 중재된 질환을 발병하는 경향의 지표이다. 따라서, 엑손 22(1210)에서의 환자의 대립형질은 AMD 발병 위험 또는 그 밖의 인자 H-연관된 질환과 관련하여 큰 정보를 제공한다.

[0223] 본 발명의 관련된 특징으로, CFHR5 유전자에서의 하나 이상의 하기 다형성 부위에서의 개체의 대립형질이 측정된다: rs9427661 (-249T>C); rs9427662 (-20T>C); 및 rs12097550 (P46S). 한 가지 구체예에서, rs9427661에서의 환자의 대립형질이 측정된다. 한 가지 구체예에서, rs9427662에서의 환자의 대립형질이 측정된다. 한 가지 구체예에서, rs12097550에서의 환자의 대립형질이 측정된다. 한 가지 구체예에서, rs9427661 및 rs9427662중 하나 이상에서 측정된다. 한 가지 구체예에서, rs9427661 및 rs9427662중 하나 이상에서 측정되며, rs12097550에서 측정된다. 한 가지 구체예에서, rs9427661, rs9427662 및 rs12097550에서 측정된다. 상기된 다형성 및 다형성들의 조합이 예시를 위해서 본원에서 제공되고 있으며, 이들은 본 발명을 어떠한 방법으로든 제한하고자 하는 것이 아니다. 즉, 본 발명을 수행하는데 유용한 그 밖의 다형성 및 일배체형이 본 개시사항으로부터 자명할 것이다.

C. 단백질 변이체의 검출

[0225] 본 발명의 한 가지 구체예에서, 단백질 검정은 대상자의 CFH 또는 CFHR5 유전자에서의 다형성을 특정하도록 수행된다. 변이성 CFH, HFL1 및 CFHR5의 검출을 위해서 조절될 수 있는 방법이 공지되어 있다. 이를 방법은 분석 생화학 방법, 예컨대, 전기영동(모세관 전기영동 및 2-차원 전기영동을 포함함), 크로마토그래피 방법, 예컨대, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 박층 크로마토그래피(TLC), 과학산 크로마토그래피, 질량 분광분석, 및 다양한 면역학적 방법, 예컨대, 유체 또는 겔 침전 반응, 면역화산(단일 또는 이중), 면역전기영동, 방사성면역

검정(RIA), 효소-연결된 면역흡착 검정(ELISA), 면역형광 검정, 위스턴 블로팅 및 그 밖의 검정 방법을 포함한다.

[0226] 예를 들어, 본 발명의 실행에 적합한 많은 확립된 면역학적 결합 검정 형태가 공지되어 있다[참조예: Harlow, E.; Lane, D. *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988; and Ausubel et al., (2004) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York NY]. 이러한 검정은, 예를 들어, 경쟁적이거나 비경쟁적일 수 있다. 전형적으로는, 면역 결합 검정(또는 면역 검정)은 분석물에 특이적으로 결합시키기 위한 및 종종 이를 고정시키기 위한 "포획제(capture agent)"를 사용한다. 한 가지 구체예에서, 포획제는 변이성 CFH 또는 CFHR5 폴리펩티드 또는 서브서열에 특이적으로 결합하는 잔기이다. 결합된 단백질은, 예를 들어, 검출 가능한 표지된 항-CFH/CFHR5 항체를 사용함으로써 검출될 수 있다. 한 가지 구체예에서, 하나 이상의 항체가 변이성 형태에 특이적이다(예를 들어, 야생형 CFH 또는 CFHR5 폴리펩티드에 결합하지 않는다). 한 가지 구체예에서, 변이성 폴리펩티드는 면역블롯(웨스턴 블롯) 포맷을 사용함으로써 검출된다.

[0227] D. AMD 환자 스크리닝/진단

[0228] AMD 또는 AMD의 특정의 서브타입과 상호관련되는 인자 H 유전자에서의 다형성, 예컨대, 본원에 기재된 바와 같이 확인된 다형성 또는 표 1A, 표 1B, 표 1C에 기재된 다형성이 AMD 또는 AMD의 서브타입을 진단하는데 유용하거나 이에 대한 민감성을 진단하는데 유용하다. AMD 또는 AMD의 특정의 서브타입과 상호관련되는 CFHR5 유전자에서의 다형성, 예컨대, 본원에 기재된 바와 같이 확인된 다형성 또는 표 14 및 표 15에 기재된 다형성이 AMD 또는 AMD의 서브타입을 진단하는데 유용하거나 이에 대한 민감성을 진단하는데 유용하다. 이들 다형성은 MPGNII 및 그 밖의 인자 H-관련된 질환을 검진하는데 유용하다.

[0229] AMD의 높은 발병 위험에 있는 것으로 확인된 개체는 이하 기재되어 있거나, 본 기술분야에 공지되었거나, 장래에 개발될 일반적인 안과학적 시험 및 치료를 포함한 위험 감소 단계가 취해질 수 있다.

[0230] 실시예 1에 기재된 바와 같이, 촉발 요인(예, 감염)과 결부된 위험 상태의 CFH 일배체형은 질환의 징표로 충분한 듯하다. AMD에 대한 위험 상태에 있는 것으로 확인된 환자는 감염의 초기 징후 단계에서 적극적인 치료(예, 항체, 항-염증제의 사용, CFH/CFHR5의 보호 형태에 의한 치료, 또는 그 밖의 CFH 활성 조절인자에 의한 치료)를 받을 수 있다.

[0231] 표 1A, 표 1B 및/또는 표 1C에 열거된 인자 H 유전자에서의 몇몇의 그러한 다형성 형태, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 모든 이들 다형성 단독의 조합된 검출(즉, 특정된 부위에서의 다형성의 존재 또는 부재) 또는 표 1A 내지 표 1C에 포함되지 않은 추가의 인자 H 유전자 다형성과의 조합된 검출은 정확한 진단의 확율을 증가시킬 수 있다. 유사하게, 표 14 및 표 15에 열거된 CFHR5 유전자에서의 몇몇의 다형성 형태, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 모든 이들 다형성 단독의 조합된 검출 또는 표 14 및 표 15에 포함되지 않은 추가의 CFHR5 유전자 다형성과의 조합된 검출은 정확한 진단의 확율을 증가시킬 수 있다. 한 가지 구체예에서, 검진은 인자 H 유전자에서의 하나 이상의 다형성 및 CFHR5 유전자에서의 하나 이상의 다형성의 존재 또는 부재를 측정함을 포함한다. 한 가지 구체예에서, 검진은 인자 H 유전자에서의 2, 3 또는 4 이상의 다형성의 존재 또는 부재를 CFHR5 유전자에서의 2, 3, 또는 4 이상의 다형성의 존재 또는 부재와 함께 측정함을 포함한다.

[0232] 인자 H 및 CFHR5 유전자에서의 다형성은 AMD를 앓고 있는 환자의 가족 및 일반적인 집단에서 AMD 또는 AMD의 특이적 서브타입, 또는 이에 대한 민감성을 진단하는데 유용하다.

[0233] 진단 방법에서, 인자 H 다형성 및/또는 CFHR5 다형성의 분석은 AMD와 연관된 그 밖의 유전자에서의 다형성의 분석, AMD의 단백질 마커의 검출(참조예: 하게만(Hageman)등의 특허공보 US20030017501; US20020102581; WO0184149; 및 WO0106262), AMD의 그 밖의 위험 인자(예컨대, 가족력)의 검정, 안과학적 시험, 및 그 밖의 검정 및 과정과 조합될 수 있다.

[0234] E) 약물 치료를 위한 환자의 확인

[0235] 인자 H 유전자 및 CFHR5 유전자에서의 다형성은 또한 AMD에 대한 약물 후보를 위한 임상시험을 수행하기에 적합한 환자를 확인하는데 유용하다. 그러한 시험은 인자 H 유전자 및/또는 CFHR5 유전자에서의 다형성 부위의 규정된 집합에서의 유사하거나 동일한 다형성 프로필, 또는 유사하거나 동일한 인자 H 일배체형 및/또는 CFHR5 일배체형을 지니는 처리된 집단 또는 대조 집단에서 수행된다. 유전적으로 매치된 집단의 사용은 유전적 인자에 기인하여 발생되는 치료에서의 변수를 제거하거나 감소시켜서, 가능한 약물의 보다 정확한 효능 검정을 유도한

다.

[0236] F) 이식을 위한 공여체 조직의 선별

[0237] 기관(예, 간) 및 조직(예, 혈액, 간세포)의 이식은 점점 일반화되고 있다. 그러한 이식을 수행하는데 있어서, 인자 H 또는 인자 H-관련된 단백질의 유해한 형태를 수용자에게 도입시키고 그로 인해서 수용자의 AMD 발병 위험을 증가시키는 것을 피하는 것이 요구되고 있다. 따라서, 본 발명의 한 가지 특징으로, 공여체 조직은 위험 일배체형 또는 그 밖의 유해한 서열을 지니는 숙주 조직을 확인하기 위해서 인자 H 또는 CFHR5 유전자의 다형성 부위에서의 변이의 존재 또는 부재를 검출하기 위해 시험된다. 또한, 또는 다르게는, 기관 및 조직은, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 면역학적 검정을 이용함으로써, 인자 H 또는 CFHR 단백질의 형태의 발현에 대해서 시험될 수 있다. 한 가지 구체예에서, 이식된 조직은 혈액 또는 혈장이다(즉, 수혈 또는 혈장 대체의 경우). 위험과 연관된 단백질(예, CFH의 1210C 형태)의 투여를 피하기 위한 공여된 혈액의 통상의 스크리닝은 수용자와의 타협을 피할 수 있다.

[0238] G) 표현형 범주

[0239] *AMD의 특이적 서브타입에 대한 민감성을 특정의 일배체형과의 연관을 기초로 확인할 수 있다. 따라서, 스크리닝이 AMD의 상이한 유전적 서브타입을 앓고 있는 환자 군에 대한 적합한 치료법을 결정하기 위해서 이용될 수 있다.

[0240] 방법은 표현형 범주 내로 세분될 수 있는 AMD(예, 초기 AMD(ARM), 지도형 위축(GA) 및 삼출성 AMD(CNV))의 진단에 이용될 수 있다. ARM 및 GA 표현형은 독특한 표현형(예를 들어, RPE 변화 단독, >10 황반 경성 드루젠, 황반 연성 드루젠, BB (표피) 드루젠, 망막색소상피박리(pigment epithelial detachment: PED), "체로키족(Cherokee)" 위축, 반도 지도형 위축(peninsular geographic atrophy) 및 패턴 지도형 위축)으로 추가로 세분될 수 있다. 이들 표현형에 대한 설명은 문헌[Bird et al., 1995, *Surv Ophthalmol* 39, 367-74; and Klaver et al., 2001, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 2237-41]을 참조할 수 있다.

[0241] H) 그 밖의 질환

[0242] 인자 H 및 CFHR5 유전자에서의 다형성, 예컨대, 표 1A, 1B, 1C, 11, 14 및 15에 나타낸 다형성은 또한 현재 알려져는 있지만 유전 성분이 매핑되지 않은(unmapped) 또 다른 보체 경로의 조절이상을 포함하는 그 밖의 질환(예, 알츠하이머 질환, 다발성 경화증, 루프스 및 천식) 및 상태(예, 화상, 이식 및 뇌졸중)와의 연관에 대해서 시험될 수 있다. 어떠한 특정의 작용 메카니즘으로 한정하고자 하는 것은 아니지만, 변이성 인자 H 및/또는 CFHR5 폴리펩티드의 발현은 또 다른 보체 경로의 조절이상과 연관되어 있음이 제시되고 있다. 인자 H 및/또는 CFHR5의 변이성 형태는 또 다른 보체 경로에서의 결합을 포함하는 질환에 대한 인과적인 효과를 지닐 수 있거나, 인자 H 및/또는 CFHR5의 변이성 형태의 존재는 또 다른 보체 경로에 연루된 또 다른 유전자가 인과적인 효과를 지님을 나타낼 수 있다.

[0243] 인자 H 유전자에서의 다형성은 또한 염색체 1q으로, 특히, 인자 H 유전자가 위치하는 1q32에서 또는 그 주위에서 매핑(mapping)하는 질환을 매핑 또는 치료하는데 유용할 수 있다. 이러한 특정의 유전자좌는 많은 보체 경로-연관된 유전자를 포함한다. 보체 활성화(RCA) 유전자 클러스터라 칭하는 이들 유전자 중 한 그룹은 인자 H, 다섯개의 H-관련된 유전자 및 응집 인자 XIII의 베타 서브단위를 엔코딩하는 유전자를 함유한다. C4BPA, C4BPB, C4BPAL2, DAF (CD55) CR1, CR2, CR1L 및 MCP (CD46)를 포함한 보체-연관된 유전자의 제 2 클러스터는 1q25-31 유전자좌에 아주 인접하고 있다.

[0244] VIII. AMD의 예방 및 치료

[0245] 인자 H 다형성을 지닌 환자는 이들에게 변이성 인자 H 폴리펩티드 및/또는 변이성 CFHR5 폴리펩티드의 길항제를 투여함으로써 치료될 수 있다. 길항제는 변이성 인자 H 폴리펩티드 및/또는 변이성 CFHR5 폴리펩티드의 활성화 특이적으로 상호작용하고 이들을 중화시키는 항체 또는 변이성 인자 H 폴리펩티드 및/또는 변이성 CFHR5 폴리펩티드의 누클레오티드 서열에 대해 상보성인 치료량의 RNA를 포함할 수 있다. 대안적으로는, 인자 H 다형성 및/또는 CFHR5 다형성과 연관된 AMD는 환자에게 증가된 위험과 연관되지 않은 인자 H 및/또는 CFHR5의 형태, 예컨대, 정상 또는 야생형 인자 H 단백질 및/또는 정상 또는 야생형 CFHR5 폴리펩티드를 투여함으로써 치료될 수 있다. 본 발명의 한 가지 방법으로, 인자 H의 보호 변이 형태 및 CFHR5의 보호 변이 형태가 환자에게 투여된다.

[0246] AMD에 대한 높은 위험에 있는 것으로 확인되는 대상에서의 치료 및 예방 방법은, 이로 한정되는 것은 아니지만,

(1) 인자 H의 중성 또는 보호 형태 및/또는 CFHR5의 중성 또는 보호 형태의 양 또는 발현을 증가시키고; (2) 인자 H의 위험-연관된 형태 및/또는 CFHR5의 위험-연관된 형태의 양 또는 발현을 감소시키고; (3) 보체 대체 경로의 활성화를 감소시킴을 포함한다. 그러한 치료학적 및 예방학적 방법의 예는 (1) 인자 H 단백질 또는 이의 치료학적 활성 단편의 중성 또는 보호 형태 및/또는 CFHR5 또는 이의 치료학적 활성 단편의 중성 또는 보호 형태의 투여; (2) 달리, 인자 H의 중성 및 보호 형태의 발현 또는 활성의 증가; (3) (예를 들어, 안티센스 RNA의 투여에 의한) 위험 일배체형을 지닌 개체에 의해서 엔코딩된 변이성 인자 H 및/또는 변이성 CFHR5 단백질의 발현의 억제; (4) 유해한 변이성 형태의 활성량의 감소를 포함한다.

[0247] 치료제(예, 야생형 또는 변이성 인자 H의 수준을 증가 또는 감소시키거나 이의 활성을 조절하는 작용제, 또는 야생형 또는 변이성 CFHR5의 수준을 증가 또는 감소시키거나 이의 활성을 조절하는 작용제)는 전신(예, 정맥내 주사 또는 주입) 또는 국소(예, AMD의 치료를 위한 안내 RPE 주변에)적으로 투여될 수 있다. 작용제를 눈에 투여하는 방법은 본 의학 분야에서 공지되어 있으며, 본원에 기재된 AMD 치료제를 투여하는데 이용될 수 있다. 예시적인 방법은 안내 주사(예, 안구뒤, 망막하, 유리체내 및 맥락막내), 이온삼투법, 점안제, 및 안내 이식(예, 유리체내, 테논하(sub-Tenons), 및 결막하)를 포함한다. 예를 들어, 항-VEGF 항체가 유리체내 주사에 의해서 시노몰거스 원숭이(cynomolgus monkey)에게 도입되고[참조예: Gaudreault et al., 2005, "Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration" *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:126-33], 생활성 VEGF 및 bFGF가 서방형 펠럿의 유리체내 이식을 통해서 눈에 주입된다[문헌: Wong et al., 2001, "Intravitreal VEGF and bFGF produce florid retinal neovascularization and hemorrhage in the rabbit" *Curr Eye Res.* 22:140-7]. 중요하게는, 인자 H는 망막 색소 상피에 의해서 합성되어(실시예 1), 작용제의 국소 투여가 치료적으로 유리함을 발견하였다.

[0248] A. 치료학적 인자 H 폴리펩티드의 투여

[0249] 인자 H 폴리펩티드의 중성 또는 보호 형태 및/또는 CFHR5 폴리펩티드의 중성 또는 보호 형태를 AMD(및/또는 초기 단계 질환)의 발병 위험이 있는 대상에게 투여하면 질환의 진행을 완화시킬 수 있다.

[0250] 한 가지 방법으로, 재조합 인자 H 폴리펩티드가 환자에게 투여된다. 한 가지 구체예에서, 재조합 인자 H는 전장(CFH/HF1)이거나, 절단(FHL1)되거나, 달리 스플라이싱된 형태, 또는 이의 생물학적 활성 단편일 수 있는 중립의 일배체형 서열에 의해서 엔코딩된다. 또 다른 구체예에서, 재조합 인자 H는 보호 대립유전자, 전장 또는 절단된 형태 중 하나, 또는 이의 보호 생물학적 활성 단편의 서열을 지닌다. 치료학적 재조합 단백질의 생성을 위한 방법은 공지되어 있으며, 본원에 기재된 방법을 포함한다. 치료학적 폴리펩티드는 전신(예, 정맥내 또는 주입에 의해서) 또는 국소(예, 기관 또는 조직, 예컨대, 눈 또는 간 내로 직접)적으로 투여될 수 있다.

[0251] 인자 H 및 CHFL1 단백질의 일부 보호 형태는 전장 형태 보다 짧다. 예를 들어, 인자 H의 중성 또는 보호 형태의 단편이 AMD 또는 MPGNII의 치료 또는 예방을 위해서 투여될 수 있다. 특정의 구체예에서, 보호된 표현형으로 개체에서 발현된 CFH 스플라이스 변이체에 의해서 엔코딩된 폴리펩티드가 투여된다. 이들 단백질은 보호된 또는 중립의 일배체형에 대해 동종 접합성의 개체에서의 CFH-관련된 RNA의 발현을 스크리닝함으로써 확인될 수 있다.

[0252] 특정의 구체예에서, 보호 단백질은 CFH 유전자 서열의 하나 이상의 엑손에 상응하는 서열을 지닌다. 예를 들어, 보호 단백질은, 1, 2, 3 또는 그 이상의 엑손(인접하거나 그렇지 않을 수 있다)에 의해서 엔코딩된 아미노산 잔기가 삭제됨을 제외하고는, 전장(full-length) 또는 절단된 CFH 단백질의 서열을 지닐 수 있다.

[0253] 한 가지 구체예에서, 본 발명의 보호된 인자 H 단백질은, 위치 402에서의 잔기가 히스티딘이 아니고 위치 1210에서의 잔기가 시스테인이 아님을 제외하고는, 서열번호 2와 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 지닌다. 한 가지 구체예에서, 위치 62에서의 잔기는 발린이 아니다. 바람직하게는, 위치 62에서의 잔기는 이로류신이다. 바람직하게는 위치 62에서의 잔기는 이소류신이고, 위치 402에서의 잔기는 티로신이고, 위치 1210에서의 잔기는 아르기닌이다. 바람직하게는, 보호 인자 H 단백질은 서열번호 2 또는 이의 단편에 95% 아미노산 상동성을 지니며; 서열번호 2의 참조 인자 H 폴리펩티드에 대해서 때로는 95% 이상의 아미노산 상동성, 때로는 98% 이상의 상동성, 및 때로는 99% 이상의 상동성을 지닌다. 사람 인자 H의 예시적인 보호 변이체의 폴리펩티드 서열[서열 번호 5]이 도 10에 도시되어 있다. 이러한 보호 변이 인자 H 폴리펩티드는 아미노산 위치 62에서 이소류신 및 아미노산 위치 402(굵은 선으로 표시됨)에서 티로신을 지닌다. HFL1의 예시적인 보호 변이체, 즉, 사람 인자 H의 절단된 형태의 폴리펩티드 서열(서열번호 6)이 도 11에 도시되어 있다. 이러한 보호 변이 절단된 인자 H 폴리펩티드는 아미노산 위치 62에서 이소류신 및 아미노산 위치 402(굵은 선으로 표시)에서 티로신을 지닌다.

- [0254] 한 가지 구체예에서, 본 발명의 보호 인자 H 단백질은 서열번호 4(FHL1)과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 지닌다. 한 가지 구체예에서, 위치 62에서의 잔기는 발린이 아니다. 바람직하게는, 위치 62에서의 잔기는 이소류신이다. 바람직하게는, 보호 인자 H 단백질은 서열번호 4 또는 이의 단편에 대해서 95% 아미노산 상동성; 서열번호 4의 참조 인자 H 폴리펩티드에 대해서 때로는 95% 이상의 아미노산 상동성, 때로는 98% 이상의 아미노산 상동성, 및 때로는 99% 이상의 아미노산 상동성을 지닌다.
- [0255] 일부 구체예에서, 보호 인자 H 단백질은 참조 인자 H 폴리펩티드의 하나 이상의 활성을 지닌다. 한 가지 구체예에서, 활성은 헤파린에 대한 결합이다. 한 가지 구체예에서, 활성은 CRP에 대한 결합이다. 한 가지 구체예에서, 활성은 C3b에 대한 결합이다. 한 가지 구체예에서, 활성은 내피세포 표면에 대한 결합이다. 한 가지 구체예에서, 활성은 C3b 보조-인자 활성이다. 한 가지 구체예에서, 보호 인자 H 단백질은 이의 정상 기능과 관련하여 서열번호 2의 단백질 보다 더 높은 활성을 지닌다. 한 가지 구체예에서, 보호 인자 H 단백질은 서열번호 4의 단백질 보다 높은 이의 정상 기능과 관련한 활성을 지닌다.
- [0256] 인자 H 활성을 위한 검정은 공지되어 있으며 과학 문헌에 기재되어 있다. 검정의 예들은 예시를 위해서 간략하게 기재하고 있는 것이며 이로써 본 발명을 제한하고자 하는 것이 아니다.
- [0257] *C3b 또는 CRP에 대한 보호 단백질 (CFH 변이체)의 결합.*
- [0258] C3b와 CFH 단백질 사이의 상호작용이 앞서 기재된 바와 같은 바이아코어 3000 시스템(Biacore 3000 system (Biacore AB, Uppsala, Sweden))을 사용함으로써 표면 공명에 의해서 분석될 수 있다[문헌: Manuelian et al., 2003, Mutations in factor H reduce binding affinity to C3b and heparin and surface attachment to endothelial cells in hemolytic uremic syndrome. *J Clin Invest* 111, 1181-90]. 요약하면, C3b (CalBiochem, Inc)은 표준 아민-커플링을 이용함으로써 센서 칩의 흐름 셀(flow cell)에 커플링된다[문헌: Carboxylated Dextran Chip CM5, Biacore AB, Uppsala, Sweden]. 두 셀은 활성화되고, C3b (50 μ g/ml, 10 mM 아세테이트 완충액에 대해서 투석됨, pH 5.0)가 하나의 흐름 셀에 주입되는데, 4000 공명 단위에 상응하는 수준이 도달될 때까지 주입된다. 비거리 군은 에탄올아민-HCl을 사용함으로써 불활성화된다. 그 밖의 셀은 C3b 없이 커플링 완충액을 주입함으로써 참조 셀로서 제조된다. 각각의 결합 검정 전에, 흐름 셀을 10mM 아세테이트 완충액, pH4.6중의 2M NaCl의 2회 주입 및 런닝 완충액(running buffer)(PBS, pH7.4)에 의해서 완전히 세척될 것이다. 인자 H 단백질은 25°C에서 5 μ l/분의 유속으로 C3b와 커플링된 흐름 셀내로 또는 대조 셀내로 주입된다. C3b에 대한 인자 H의 결합은 상기 문헌(Manuelian et al., 2003)에 기재된 바와 같이, 시간에 대해서 공명 단위를 측정함으로써 정량화될 수 있다.
- [0259] CRP와 CFH 단백질 사이의 상호작용은 센서 칩의 흐름 셀에서 C3b를 CRP로 대체함으로써 동일한 방법으로 표면 공명에 의해서 분석될 수 있다.
- [0260] **내피세포 표면으로의 결합**
- [0261] CFH 단백질의 내피세포 표면으로의 결합을 HUVEC의 면역형광 염색 및 FACS 검정에 의해 분석하였다. HUVEC 세포를 분석 전에 24시간 동안 혈청 비함유 DMEM (Bio Whittaker)에 유지시켰다. DPBS/EDTA로 세포를 표면으로부터 분리시키고, DPBS로 2회 세척하였다; 5×10^5 세포를 플라스틱 튜브에 이동시키고, 비특이적 결합 부위를 15분 동안 1% BSA/DPBS로 차단 한 후, 인자 H의 정제된 대립유전자 변이체 (5 μ g)와 인큐베이션시켰다. 대조군은 인자 H 이소형의 부재하에 수행하였다. 인자 H의 결합 후, 세포를 DPBS로 완전히 세척하였다. 폴리클로날 염소 항-인간 FH 항혈청을 일차 항체 (CalBiochem) (1:100 희석)로서 사용하고, 4°C에서 15분 동안 인큐베이션 시켰다. 차단 완충제에서 1:100으로 희석된 알렉사-플루오르 488 (Alexa-fluor 488)-컨쥬게이팅된 염소 항혈청을 이차 항체로서 사용하였다. 세포를 유세포분류기로 시험하였다 (FACScalibur, Becton-Dickinson Immunocytometry, Mountain View, California, USA). 전형적으로, 10,000개가 계수되었다.
- [0262] **유체상의 보조 인자 활성**
- [0263] 유체상 보조인자 검정에 있어서, 전체 부피 30 μ l중 C3b 바이오틴 (100ng/반응), 인자 I (200ng/반응) 및 100ng의 정제된 인자 H를 사용하였다. 인자 I의 첨가 전 및 후에 취해진 샘플을 환원 조건하에 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 웨스턴 블로트으로 검정하고, 스트렙파비딘-POD-컨쥬게이션 (1:10000)에 의해 C3b 분해 생성물을 검출하고 정량하였다. 제조업체의 지시에 따라 바이오틴 라벨링 키트 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 사용하여 C3b (40 μ g) (CalBiochem)를 바이오틴화시켰다. 간단하게는, 30 μ g의 C3b (CalBiochem)을 25°C에서 2시간 후 D-바이오틴-엡실론-아미노카프로산-N-히드록시숙신이미드 에스테르로 라벨링시켰다. PBS 평균화된 PD10 칼럼 (Amersham Biosciences)을 사용하여 과량의 바이오틴을 겔 여과에 의해 제거하였다. 또한, 문헌

[Sanchez-Corral et al., 2002, Am J.Hum.Genet. 71:1285-95] 참조.

[0264] 헤파린 결합 검정

[0265] 헤파린으로의 정제된 CFH 단백질 (CFH402Y 및 CFH402H)의 결합을 고성증 액체 크로마토그래피 (HPLC) 시스템에서 헤파린 친화성 크로마토그래피를 이용하여 분석하였다. 10 μ g의 CFH 단백질을 1/2xPBS로 희석하고, 0.5m1/분의 유속으로 헤파린-세파로오스 친화성 칼럼 (HiTrap, Amersham Biosciences)에 가하였다. 칼럼을 1/2xPBS로 완전히 세척하고, 총 10m1 부피 및 0.5m1/분의 유속으로 75mM에서 500mM으로의 NaCl 선형 염 구배를 이용하여 결합된 CFH 단백질을 용출시켰다. 용출된 분획물을 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 검정에 의해 분석하였다. 여러 분획물중의 이소형의 용출은 CFH 단백질의 특이적 아미노산 변형이 단백질의 헤파린으로의 결합을 조절한다는 것을 나타낸다. 문헌[Pangburn et al., 1991, Localization of the heparin-binding site on complement Facotor H, J Biol Chem. 266:16847-53] 참조.

[0266] CFHR5 투여

[0267] 또 다른 양태에서, 재조합 CFHR5 폴리펩티드를 환자에 투여하였다. 한 구체예에서, 재조합 CFHR5는 중성형 서열 또는 이의 생물학적 활성 단편을 갖는다. 또 다른 구체예에서, 재조합 CFHR5는 보호 대립유전자 또는 이의 보호 생물학적 활성 단편의 서열을 갖는다. 치료학적 재조합 단백질의 생성 방법은 널리 공지되어 있으며, 하기 기술된 방법을 포함한다. 치료학적 폴리펩티드는 전신 (예를 들어, 정맥내 또는 주입) 또는 국소적 (예를 들어, 기관 또는 조직 예컨대, 눈 또는 간에 직접적으로) 투여될 수 있다.

[0268] CFH 또는 CFHR5 폴리펩티드를 함유하는 치료 조성물

[0269] 본 발명은 인자 H 폴리펩티드의 치료용 제조물을 제공하며, 상기 폴리펩티드는 야생형 또는 변이형 (예를 들어, 중성 또는 보호 변이체)일 수 있으며, 전장 형태, 절두된 형태 또는 변이성 인자 H 폴리펩티드의 생물학적 활성 단편일 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, 보호 인자 H 단백질 (및 이를 엔코딩하는 유전자)는 보호 일배체형을 갖는 개체를 확인하고, 이러한 개체의 계놈에서 엔코딩된 인자 H의 아미노산 서열을 측정함으로써 확인될 수 있으며, 여기서 보호 인자 H 단백질은 보호 일배체형을 갖는 대립유전자에 의해 엔코딩된다. 생물학적 활성 단편은 변이성 단백질에 생물학적 작용을 부여하는 전장 인자 H 폴리펩티드의 일부를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 보호 일배체형은 예를 들어, 유전자중의 미성숙 종료 코돈의 존재로 인해 인자 H (즉, FHL-1 이외)의 전장 미만의 길이의 발현과 관련될 것이다.

[0270] 치료학적 활성 단편은 또한, AMD 바이오마커의 발현시 단백질의 효과를 시험함으로써 확인될 수 있다. 예시적인 AMD 바이오마커는 상보적 경로 성분 (예를 들어, 인자 I, 인자 H, C1r, C3, C3a), C 반응성 단백질, 해프토글로빈, 아포리포프로테인 E, 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄, 알파 1 안티트립신, 알파 2 마크로글로불린, 트랜스티레틴, 크레아티닌 및 공동 계류중인 분할 출원 No. 60/715,503 ("Biomarkers Associated With Age-Related Macular Degeneration")에 기술된 기타 성분을 포함한다.

[0271] 본 발명은 CFHR5 폴리펩티드의 치료학적 제조물을 제공하며, 상기 폴리펩티드는 야생형 또는 변이형 (예를 들어, 중성 또는 보호 변이형)일 수 있으며, 전장 형태의 변이성 CFHR5 폴리펩티드 또는 이의 생물학적 활성 단편일 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, 보호 CFHR5 단백질 (및 이를 엔코딩하는 유전자)는 보호 일배체형을 갖는 개체를 확인하고, 이러한 개체의 계놈에서 엔코딩된 CFHR5의 아미노산 서열을 측정함으로써 확인될 수 있으며, 여기서 보호 CFHR5 단백질은 보호 일배체형을 갖는 대립유전자에 의해 엔코딩된다. 생물학적 활성 단편은 변이성 단백질에 생물학적 작용을 부여하는 전장 CFHR5 폴리펩티드의 일부를 포함할 수 있다. 또한, 치료학적 활성 단편은 인자 H에 대해 상기 기술된 바와 같이 AMD 바이오마커의 발현에 대한 단백질의 효과를 시험함으로써 확인될 수 있다.

[0272] 일부 형태의 인자 H 및 CFHR5는 유전자형 도너의 혈액, 유전자형 안구 기증자로부터 유래된 배양되거나 형질전환된 RPE 세포, 또는 내인성 인자 H를 발현하는 세포주 (예를 들어, 신경교 또는 간장)로부터 분리될 수 있다. 대안적으로, 치료 단백질은 당해분야에 공지되고 본원에 기술된 방법에 의해 재조합적으로 생성되고 (예를 들어, 배양된 박테리아 또는 진핵세포에서) 정제될 수 있다. 상기 지적된 바와 같이, 일부 형태의 인자 H 및 CFHR5는 연구 목적으로 재조합적으로 발현되었다. 그러나, 이러한 연구용 제조물은 치료학적 용도에 적합하지 않다. 본 발명은 의약품 제조 품질 관리 기준 (GMP)에 부합하게 생성되고 시험된 폴리펩티드를 포함하는, 환자 투여에 적합한 재조합 폴리펩티드를 제공한다. 예를 들어, FAD 승인을 필요로하는 재조합 단백질은 효능 및 아이덴티티에 대해 시험해야 하며, 멸균되고, 외부 물질이 존재하지 않아야 하며, 생성물중의 모든 성분 (즉, 보존제, 희석제, 애주번트 등)은 순도, 품질 기준을 충족시켜야 하며, 환자에 해롭지 않아야 한다.

- [0273] 본 발명은 인자 H 폴리펩티드 또는 CFHR5 폴리펩티드, 및 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 용어 "약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체"는 목적하는 투약 형태의 화합물을 제조하는데 사용되는 매질이다. 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체는 하나 이상의 용매, 희석제, 또는 다른 액체 비히클; 분산 또는 혼탁 보조제; 표면 활성제; 등장화제; 농밀화제 또는 에멀션화제; 보존제; 고형물 결합제; 윤활제 등을 포함한다. 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Fifteenth Edition, E.W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, PA, 1975) and Handbook of Pharmaceutical Excipients, Third Edition, A.H. Kibbe ed. (American Pharmaceutical Assoc. 2000)]에는 약제 조성물을 제형화시키는데 사용되는 다양한 담체 및 이의 제조를 위한 공지된 기법이 기술되어 있다. 한 구체예에서, 약제학적으로 허용되는 부형제는 눈 (예를 들어, 안구 주입에 의해)에 투여되는 경우 포유동물 (예를 들어, 인간)에 해롭지 않다. 안구 투여에 있어서, 예를 들어, 그러나 비제한적으로 치료제는 평형염액 (BSS) 또는 평형염액 플러스 (BSS Plus) 중에 투여될 수 있다 (Alcon Laboratories, Fort Worth, Texas, USA). 관련 양태에서, 본 발명은 예를 들어, 치료학적으로 허용되는 인자 H 단백질, 선택적으로 동결건조된 제조물을 함유하는 멸균 컨테이너 예를 들어, 바이알을 제공한다. 치료학적 인자 H 단백질 또는 CFHR5 폴리펩티드는 상기 기술된 바와 같이 재조합적으로 제조될 수 있다. 대안적으로, 인자 H 단백질 또는 CFHR5 폴리펩티드는 배양된 RPE 세포 (예를 들어, 일차 배양물) 또는 기타 내생적으로 인자 H 또는 CFHR5를 발현하는 기타 세포로부터 분리될 수 있다.
- [0274] 개체에 투여되는 중성 또는 보호 형태의 인자 H 또는 절두된 인자 H, 또는 이의 생물학적 활성 단편, 또는 중성 또는 보호 형태의 CFHR5 또는 이의 생물학적 활성 단편의 양이 결정될 수 있다. 인자 H의 일반적인 혈장 농도는 116 내지 562 마이크로그램/ml이며, 혈장에서 인자 H의 반감기는 약 6 1/2 일이다 (문헌 [Esparza-Gordillo et al., 2004 "Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels" Immunogenetics 56:77-82] 참조). 한 구체예에서, 외인성 인자 H는 건강한 개체에서 인자 H의 혈장 농도와 유사한 수준을 달성하기에 충분한 양 즉, 50 내지 600mg/ml 예컨대, 100 내지 560mg/ml의 혈장 수준을 달성하는데 충분한 양으로 투여될 수 있다. 개체 (예를 들어, 160 파운드 피검체)로 투여되는 인자 H의 양은 예를 들어, 그러나 비제한적으로, 용량당 10mg 내지 5000mg, 50mg 내지 2000mg, 100mg 내지 1500mg, 200mg 내지 1000mg, 또는 250mg 내지 750mg이다. 인자 H가 개체에 투여될 수 있는 빈도는 예를 들어, 그러나 비제한적으로, 일일 2회, 일일 1회, 주 2회, 주 1회, 매 2주당 1회, 한달 1회, 매 두달마다 1회, 매 6달마다 1회 또는 1년당 1회일 수 있다. 인자 H의 개체로의 투여량 및 투여 빈도는 처리 과정을 모니터링함으로써 담당의에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0275] B) 유전자 치료법
- [0276] 또 다른 접근법에서, 인자 H 단백질 또는 CFHR5 폴리펩티드는 외인성 폴리누클레오티드에 의해 엔코딩된 단백질의 생체내 발현에 의해 투여된다 (즉, 유전자 치료를 통해). 한 예에서, 유전자 치료는 인자 H 폴리펩티드 또는 생물학적 활성 단편 또는 CFHR5 폴리펩티드 또는 생물학적 활성 단편을 발현하는 벡터를 세포에 유입시키는 것을 포함한다.
- [0277] 벡터는 바이러스 또는 비바이러스일 수 있다. 동물성 바이러스로부터 유래된 많은 벡터가 유용하며, 예컨대, 아데노바이러스, 아데노-부속 바이러스, 레트로바이러스, 폭스 바이러스, 알파 바이러스, 라드보바이러스 및 파필로마바이러스를 포함한다. 일반적으로, 바이러스는 더이상 복제되지 않도록 감약되었다 (예를 들어, 문헌 [Kay et al. 2001, Nature Medicin 7:33-40] 참조).
- [0278] 인자 H 폴리펩티드 또는 CFHR5 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산은 전형적으로 조절 엘리먼트 예컨대, 프로모터 및 인핸서에 연결되며, 이들은 개체의 표적 세포에서 DNA의 전사를 유도한다. 프로모터는 모든 세포 유형에서 인자 H 유전자 또는 CFHR5 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 대안적으로, 프로모터는 특정 세포 유형에서만 예를 들어, 망막 또는 신장에서만 인자 H 유전자 또는 CFHR5 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 인자 H 폴리펩티드 또는 CFHR5 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산에 작동적으로 연결된 조절 엘리먼트는 종종 벡터로 클로닝된다.
- [0279] 당업자에게 자명한 바와 같이, 유전자 치료 벡터는 삽입된 코딩 서열의 전사 및 번역에 필요한 엘리먼트를 함유한다 (그리고, 예를 들어, 프로모터, 인핸서, 기타 조절 엘리먼트를 포함할 수 있다). 프로모터는 구성형 또는 유도형일 수 있다. 프로모터는 표적 조직 예컨대, RPE에서 우선적인 유전자 발현을 위해 선택될 수 있다 (문헌 [Sutanto et al., 2005, "Development and evalution of the specificity of a cathepsin D proximal promoter in the eye" Curr Eye Res. 30:53-61; Zhang et al., 2004, "Concurrent enhancement of transcriptional activity and specificity of a retinal pigment epithelial cell-preferential promoter" Mol Vis. 10:208-14; Esumi et al., 2004, "Analysis of the VMD2 promoter and implication of E-box

binding factors in its regulation" *J Biol Chem* 279:19064-73; Camacho-Hubner et al., 2000, "The Fugu rubripes tyrosinase gene promoter targets transgene expression to pigment cells in the mouse" *Genesis*. 28:99-105] 및 이들 문헌의 참조문헌 참조).

[0280] 적합한 바이러스 벡터는 DNA 바이러스 벡터 (예컨대, 아데노바이러스 벡터, 아데노-부속 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 및 박시니아 바이러스 벡터) 및 RNA 바이러스 벡터 (예컨대, 레트로바이러스 벡터)를 포함한다. 한 구체예에서, 아데노-부속 바이러스 (AAV) 벡터가 사용된다. (문헌 [Auricchio et al., 2005, "Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer and treatment of retinal diseases" *Curr Gene Ther.* 5:339-48; Martin et al., 2004, Gene therapy for optic nerve disease, *Eye* 18:1049-55; AIi, 2004, "Prospects for gene therapy" *Novartis Found Symp.* 255:165-72; Hennig et al., 2004, "AAV-mediated intravitreal gene therapy reduces lysosomal storage in the retinal pigmented epithelium and improves retinal function in adult MPS VII mice" *MoI Ther.* 10:106-16; Smith et al., 2003, "AAV-Mediated gene transfer slows photoreceptor loss in the RCS rat model of retinitis pigmentosa" *MoI Ther.* 8:188-95; Broderick et al., 2005, "Local administration of an adeno-associated viral vector expressing IL-10 reduces monocyte infiltration and subsequent photoreceptor damage during experimental autoimmune uveitis" *MoI Ther.* 12:369-73; Cheng et al., 2005, "Efficient gene transfer to retinal pigment epithelium cells with long-term expression. *Retina* 25:193-201; Rex et al., "Adenovirus-mediated delivery of catalase to retinal pigment epithelial cells protects neighboring photoreceptors from photo-oxidative stress. *Hum Gene Ther.* 15:960-7] 및 이들 문헌의 참조문헌 참조).

[0281] 유전자 치료 벡터는 의약품 제조 품질 관리 기준 (GMP)에 부합되도록 생성되어 생성물이 환자에 투여되기에 적합해야 한다. 본 발명은 GMP 요건에 부합하도록 생성되고 시험된 유전자 치료 벡터를 포함하는, 환자에 투여되기에 적합한 유전자 치료 벡터를 제공한다. FDA 승인을 필요로 하는 유전자 치료 벡터는 효능 및 아이덴티티에 대해 시험되어야 하며, 멸균되고, 외부 물질이 존재하지 않아야 하며, 생성물중의 모든 성분 (즉, 보존제, 희석제, 애주번트 등)은 순도, 품질 기준을 충족시켜야 하며, 환자에 해롭지 않아야 한다. 예를 들어, 핵산 제조물에 마이코플라즈마가 존재하지 않음이 입증되어야 한다. 예를 들어, 문헌 [Islam et al., 1997, An academic centre for gene therapy research and clinical grade manufacturing capability, *Ann Med* 29, 579-583] 참조.

[0282] 유전자 치료 벡터를 투여하기 위한 방법은 공지되어 있다. 한 구체예에서, 인자 H 또는 CFHR5 발현 벡터는 전신 유입된다 (예를 들어, 정맥내 또는 주입에 의해). 한 구체예에서, 인자 H 또는 CFHR5 발현 벡터는 국소적으로 유입된다 (즉, 특정 조직 또는 기간 예를 들어, 간에 직접적으로). 한 바람직한 구체예에서, 인자 H 또는 CFHR5 발현 벡터는 눈에 직접적으로 유입된다 (예를 들어, 안구 주입). (예를 들어, 문헌 [Dinculescu et al., 2005, "Adeno-associated virus- vectored gene therapy for retinal disease" *Hum Gene Ther.* 16:649-63; Rex et al., 2004, "Adenovirus-mediated delivery of catalase to retinal pigment epithelial cells protects neighboring photoreceptors from photo-oxidative stress" *Hum Gene Ther.* 15:960-7; Bennett, 2004, "Gene therapy for Leber congenital amaurosis" *Novartis Found Symp.* 255:195-202; Hauswirth et al., 2004, "Range of retinal diseases potentially treatable by AAV- vectored gene therapy" *Novartis Found Symp.* 255:179-188] 및 이들 문헌의 참조 문헌 참조).

[0283] 이와 같이, 한 양태에서, 본 발명은 인자 H 단백질 또는 CFHR5 폴리펩티드를 엔코딩하는, 인간 피검체에 투여되기에 적합한 유전자 치료 벡터, 선택적으로 바이러스 벡터 및 인간 피검체에 투여되기에 적합한 부형제를 포함하는 제조물을 제공한다 (예를 들어, GLP 기법으로 생성됨). 선택적으로, 유전자 치료 벡터는 망막 염색된 상피 세포에서 우선적으로 또는 특이적으로 발현되는 프로모터를 포함한다.

[0284] 바이러스를 사용하지 않고 인자 H 또는 CFHR5 서열을 유입하는 방법 예컨대, 생분해성 중합체 (예를 들어, 폴리락트산 (PLA); 폴리글리콜산 (PGA); 및 공중합체 (PLGA))에서의 캡슐화가 이용될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Bejjani et al., 2005, "Nanoparticles for gene delivery to retinal pigment epithelial cells" *MoI Vis.* 11:124- 32; Mannermaa et al., 2005, "Long-lasting secretion of transgene product from differentiated and filter-grown retinal pigment epithelial cells after nonviral gene transfer" *Curr Eye Res.* 2005 30:345-53] 및 이들 문헌의 참조 문헌 참조). 대안적으로, 인자 H 폴리펩티드 또는 CFHR5 폴리펩티드를 엔코디하는 핵산은 리포좀으로 패킹될 수 있거나, 핵산은 벡터를 사용하지 않고 패킹되지 않은 채 개체로 전달될 수 있다.

[0285] C) DNA 복구

또 다른 방법에서, AMD에 걸릴 위험성이 있는 (그리고/또는 질환의 초기 단계에 있는) 피검체는 DNA 복구에 의해 중성 또는 보호 형태의 인자 H 또는 CFHR5로 대체된 위험 인자 H 또는 CFHR5를 가질 수 있다. 한 구체예에서, 위험 일배체형과 관련된 인자 H 또는 CFHR5 유전자의 다형성 부위에 특이적으로 결합하도록 고안된 삼중 형성 올리고누클레오티드가 바이러스 또는 비바이러스 방법에 의해 개체에 투여될 수 있다. 삼중-형성 올리고누클레오티드는 이중 DNA의 주요 그루브에 서열 특이적 방식으로 결합하여, DNA 복구를 촉발시켜, 계놈의 목적하는 변형을 초래한다 (예를 들어, 문헌 [Kuan et al., 2004, "Targeted gene modification using triplex-forming oligonucleotides" Methods Mol Biol. 262:173-94] 참조). 위험 일배체형과 관련된 다형성부에 걸친 서열에 결합하는 삼중-형성 올리고누클레오티드는 DNA 복구를 촉발시켜, 위험 대립유전자를 중성 또는 보호 대립유전자로 서열 변형시키고, 질환의 발병 또는 진행을 완화시킬 수 있다.

[0287] D) 중성 또는 보호 형태의 인자 H 단백질 또는 CFHR5 폴리펩티드를 발현하는 세포, 조직 또는 기관의 유입

또 다른 방법에서, 중성 또는 보호 형태의 인자 H 또는 인자 H-관련 단백질 (예를 들어, CFHR5)를 발현하는 세포를 환자에 투여하였다. 한 구체예에서, 수용자는 위험 일배체형에 대해 이형접합체성을 띠거나, 더욱 종종 동종접합성을 띤다. 예를 들어, 간세포 이식은 많은 형태의 간기능부전을 보완하기 위해 전체-기관 이식에 대한 대안법으로써 사용되었다 (예를 들어, 문헌 [Ohashi et al., Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application, J Mol Med. 2001 79:617-30] 참조). 본 방법에 있어서, 간세포 또는 기타 CFH 또는 CFHR5-발현 세포는 치료가 필요한 환자에 투입 (예를 들어, 주입)된다. 이를 세포는 간 또는 다른 기관으로 확산되고, 치료학적 단백질을 생성한다. 또한, 예를 들어, 문헌 [Alexandrova et al., 2005, "Large-scale isolation of human hepatocytes for therapeutic application" Cell Transplant. 14(10):845-53; Cheong et al., 2004, "Attempted treatment of factor H deficiency by liver transplantation" Pediatr Nephrol. 19:454-8; Ohashi et al., 2001, "Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application" J Mol Med. 79:617-30; Serralta et al., 2005, "Influence of preservation solution on the isolation and culture of human hepatocytes from liver grafts" Cell Transplant. 14(10):837-43; Yokoyama et al., 2006, "hi vivo engineering of metabolically active hepatic tissues in a neovascularized subcutaneous cavity" Am. J. Transplant. 6(1):50-9; Dhawan et al., 2005, "Hepatocyte transplantation for metabolic disorders, experience at King's College hospital and review of literature." Acta Gastroenterol. Belg. 68(4):457-60; Brans et al., 2005, "Injectable liver: a novel approach using fibrin gel as a matrix for culture and intrahepatic transplantation of hepatocytes" Tissue Eng. 11(11-12) :1718-26] 참조. 사용될 수 있는 다른 세포 유형은 예를 들어, 그러나 비제한적으로 신장 및 췌장 세포를 포함한다. 한 구체예에서, 투여된 세포는 재조합 형태의 단백질을 발현하도록 조작된다.

[0289] 또 다른 관련 방법에서, 치료학적 기관 이식이 사용된다. 대부분의 신체계 인자 H는 간에 의해 생성되므로, 간 조직의 이식이 바람직한 방법이다. 예를 들어, 문헌 [Gerber et al., 2003, "Successful (?) therapy of hemolytic-uremic syndrome with factor H abnormality" Pediatr Nephrol. 18:952-5] 참조.

[0290] 또 다른 방법에서, 보호 형태의 CFH 단백질은 안구 (예를 들어, 유리체강내) 주입에 의해 눈 후방으로 또는 캡슐화된 세포에 의해 전달된다. 예를 들어, 뉴로테크스 인캡슐레이트디 셀 테크놀로지 (Neurotech's Encapsulated Cell Technology (ECT))가 치료학적 인자를 눈의 후방으로 지속적이고 장기간 전달하는 유일한 기법이다. (<http://www.neurotech.fr>) 참조. ECT 이식물은 반투과성 공동 섬유막에 캡슐화된 특이적 치료 단백질을 생성하도록 유전적으로 변형된 세포로 이루어진다. 세포는 이식물로부터 눈으로 확산되는 치료학적 단백질을 연속적으로 생성한다 (Bush et al 2004). ECT 장치에 의해 인간 눈으로 전달된 CNTF는 최근 I 단계 임상 상태에서 참여한 10명의 환자에서 완전히 성공적이고, 최소 합병증과 관련된 것으로 입증되었다 (Sieving et al 2005). 또한, 문헌 [Song et al., 2003; Tao 2002., and Hammang et al., U.S. Pat. No. 6,649,184] 참조. 본 발명의 한 구체예에서, 보호 형태의 인자 H (소위 중성 형태 포함)가 세포에서 발현되며, 캡슐화된 형태로 투여된다. 한 구체예에서, 사용된 세포는 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션 (the American Type Culture Collection P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108)으로부터 입수가능한 NTC-201 인간 RPE 주 (ATCC # CRL-2302)이다.

[0291] E) 인자 H 또는 CFHR5의 위험 변이체의 수준을 감소시키는 치료법

인자 H 또는 CFHR5의 정상적 또는 보호 작용의 손실은 AMD와 관련이 있을 수 있다. 인자 H 또는 CFHR5 유전자에서 비동의적 다형성 예컨대, AMD와 가장 강한 상호관계를 나타내며, 변이형 인자 H 폴리펩티드 또는 CFHR5 폴리펩티드를 초래하는 표 1A, 1B, 1C, 11, 14 및 15에 기재된 것은 AMD를 일으키는 역할을 하는 것으로

여겨진다. 예를 들어, 변이형 인자 H 또는 CFHR5는 정상적인 인자 H 또는 CFHR5 작용을 방해하는 소위 "우성-네거티브" 변이체로서 작용할 수 있다.

[0293] 눈 또는 전신에서 위험 형태의 인자 H 또는 CFHR5의 수준을 감소시키는 방법은 예를 들어, 인자 H 또는 CFHR5 유전자의 전사를 억제하거나, 인자 H 또는 CFHR5 RNA의 번역을 억제하거나, 중성 또는 보호 형태의 인자 H 또는 절두된 인자 H 또는 이의 생물학적 활성 단편의 양 또는 활성을 증가시키거나, 중성 또는 보호 형태의 CFHR5 폴리펩티드 또는 이의 생물학적 활성 단편의 양 또는 활성을 증가시키거나, 인자 H 단백질 또는 CFHR5 폴리펩티드의 양 또는 활성을 감소시키는 것을 포함하는 처리에 사용될 수 있다 (예를 들어, 혈장교환술, 항체-유도된 혈장교환술에 의해 또는 인자 H 또는 CFHR5 결합 부위 예를 들어, 혜파린 또는 변이체 특이적 항체와의 착화에 의해). 일부 구체예에서, 인자 H 또는 CFHR5의 수준은 우선적으로 다른 조직에 비해 눈 (예를 들어, RPE)에서 감소한다. 비제한적인 예로서, 일부 방법이 하기에 간단히 설명되어 있다.

[0294] 한 방법에서, AMD에 대한 위험성이 있는 것으로 확인된 피검체는 혜파린 투여에 의해 치료된다. 혜파린 및 혜파린 유도체 (레파리노이드 포함)는 MPGNII를 포함하는 다양한 상보성 관련 질환의 치료학적 특성을 가질 수 있다 (Floege et al., 1993; Girardi, 2005; Diamond and Karnovsky, 1986; Striker, 1999; Rops et al., 2004). 본원에 기술된 AMD와 MPGNII 간의 관계에 있어서, 혜파린 및 혜파린 유도체 (혜파리노이드 포함)는 AMD의 치료에 효과적일 수 있다. 1년에 걸쳐 매일 혜파린이 피하내 주입된 만성 증식성 사구체신염을 갖는 환자의 임상적 실험에서, 캐이드 (Cade)와 동료들은 개선된 크레아티닌 제거 및 사구체 다세포성의 역행을 보고하였다 (Cade et al., 1971). 혜파린 및 저분자량 혜파린 (에녹사파린: Enoxaparin)은 보체 활성화 대체 및 고전 경로를 차단함으로써 마우스에서 항포스포리피드 항체 증후군의 진행을 억제하는 것으로 입증되었다 (Girardi et al., 2004). 혜파린의 항-보체 활성은 대체 경로에 의해 C3bBb 중폭 전환효소의 형성을 차단하는 것을 포함한다; 유체상 혜파린은 C3b와 인자 B 및 인자 D와의 상호작용을 억제함으로써 C3bBb의 생성을 억제한다 (Weiler et al., 1976).

F) 억제성 핵산의 투여

[0295] 안티센스 핵산-안티센스 핵산, 예컨대 변이체 인자 H 폴리펩티드를 엔코딩하는 RNA에 상보적인 정제된 안티센스 RNA를 사용하여 위험 일배체형과 관련된 인자 H 유전자의 발현을 억제할 수 있다. 이에 대한 최근의 고찰은, 예를 들어 문헌 (Gomes et al., 2005, "Intraocular delivery of oligonucleotides" *Curr Pharm Biotechnol* 6:7-15; and Henry et al., 2004, "Setting sights on the treatment of ocular angiogenesis using antisense oligonucleotides" *Trends Pharmacol Sci* 25:523-7)으로부터 확인되며, 상기 문헌은 본원에 참고로 인용된다.

[0297] RNA 간섭 - 이중 가닥의 RNA (dsRNA) 억제 방법이 또한 사용되어 HF1의 발현을 억제할 수 있다. 이 방법에 사용된 RNA는, dsRNA의 적어도 하나의 영역이 HF1 유전자에 의한 영역과 사실상 동일해지도록 설계된다; 일부 예에서, 상기 영역은 HF1 유전자와 100% 동일하다. 포유동물에서 사용하기 위해, dsRNA의 길이는 전형적으로 약 19 내지 30 누클레오티드이며 (즉, 짧은 간섭성의 RNA가 사용된다 (siRNA 또는 RNAi)), 가장 흔하게는 그 길이가 약 21 누클레오티드이다. dsRNAi 및 siRNA를 수행하는 테 유용한 방법 및 조성물이 예를 들어 PCT 공보 WO 98/53083; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/44914; WO 01/36646; WO 01/75164; WO 02/44321; 및 US 6,107,094호에 논의되어 있다. 가능한 siRNA가 시험관 내에서 합성되어, 환자에게 투여된다. 대안적으로, RNAi 전략은 DNA 주형으로부터 소형 RNA의 형질감염된 세포에서 합성이 수행되도록 벡터 기초한 방법과 성공적으로 조합될 수 있다 (참조: Sui et al., 2002, "A DNA vector-based RNAi Technology to suppress gene expression in mammalian cells" *Proc Natl Acad Sci USA* 99:5515-20; and Kasahara and Aoki, 2005, "Gene silencing using adenoviral RNAi vector in vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes" *Methods Mol Med.* 112: 155-72).

[0298] 리보자임 - 리보자임은 RNA의 특이적 분할을 촉매화할 수 있는 효소 RNA 분자이다. 리보자임 작용 메커니즘은 상보적 표적 RNA으로의 리보자임 분자의 서열 특이적인 부합화에 이어, 누클레오티드내 분할을 포함한다. 본 발명의 범위 내에서, 사람 인자 H를 엔코딩하는 서열의 누클레오티드내 분할을 특이적으로 그리고 효율적으로 촉매화할 수 있는 해머헤드 모티프 리보자임 분자가 조작된다. 임의의 잠재적인 RNA 표적 내의 특이적 리보자임 분할 위치는, 표적 분자를 GUA, GUU 및 GUC와 같은 서열을 포함하는 리보자임 분할 위치에 대해 스캐닝함으로써 초기에 동정된다. 일단 동정되지만 하며, 분할 위치를 함유하는 표적 유전자 영역에 상응하는 15 내지 20 리보누클레오티드의 짧은 RNA 서열은, 올리고누클레오티드를 조작불가능하게 만들 수 있는 2차 구조적 특징을 평가할 수 있다. 후보물질 표적의 적합성은 또한 리보누클레아제 보호 검정법을 사용하여 상보적인 올리고누클

레오티드를 사용한 부합화로의 접근가능성을 시험함으로써 평가될 수 있다. 리보자임의 특성 또한 공지되어 있다; 일반적인 설명에 대해서는 케크 (Cech)에 의한 특허를 참조하길 바란다 (US 6,180,399; US 5,869,254; US 6,025,167; US 5,854,038; US 5,591,610; US 5,667,969; US 5,354,855; US 5,093,246; US 5,180,818; US 5,116,742; US 5,037,746; 및 US 4,987,071호). 리보자임 및 기타 억제성 핵산은 위험 일배체형과 관련된 서열을 갖는 유전자의 발현을 우선적으로 억제하도록 설계될 수 있다. 따라서, 다형성을 스패닝(spanning) 하고 GUA에 인접하여 분할하는 서열을 인지하는 리보자임은 중성적이거나 보호적인 형태가 아닌 위험 형태를 인지하여 선택적인 분할을 가능케 한다 (Dawson et al., 2000, "Hammerhead ribozymes selectively suppress mutant type I collagen mRNA in osteogenesis imperfecta fibroblasts" *Nucleic Acids Res.* 28: 4013-20; Blalock et al., 2004 "Hammerhead ribozyme targeting connective tissue growth factor mRNA blocks transforming growth factor-beta mediated cell proliferation" *Exp Eye Res.* 78: 1127-36).

[0299] 삼중-형성 올리고누클레오티드 - 삼중-형성 올리고누클레오티드는 서열 특이적인 방식으로 이중 DNA의 주 흄에 결합하여 DNA 손상을 유발시켜, 결과적으로 게놈의 표적화된 변형을 초래한다 [최근의 고찰에 대해서는, 문헌 (Kuan et al., 2004, "Targeted gene modification using triplex-forming oligonucleotides" *Methods Mol Biol.* 262: 173-94)을 참조]. 올리고누클레오티드는 위험 일배체형과 관련된 인자 H 유전자내의 다형성 위치에 특이적으로 결합하도록 설계될 수 있다. 위험 일배체형과 관련된 다형성을 스패닝하는 서열에 결합하는 삼중-형성 올리고누클레오티드는 DNA 손상을 유발시켜, 결과적으로 중성 또는 보호형 대립유전자에 대한 위험 대립유전자로부터 서열의 변형을 초래한다.

[0300] 상기 기술된 유사 안티센스 핵산, RNA 간섭, 리보자임 및 삼중-형성 폴리오그누클레오티드 방법은 AMD의 치료를 위해 전신적으로 또는 눈 내에 CFHR5의 위험 형태의 수준을 감소시키는 데 사용될 수 있다.

[0301] 억제성 핵산이 약제 조성물로서 또는 유전자 치료 방법을 사용하여 투여될 수 있음이 이해될 것이다.

G) 항체 치료

[0303] 일 양태에서, 변이체 인자 H 폴리펩티드의 활성과 특이적으로 상호작용하며 이를 중화시키는 항-HF1 항체가 AMD가 이미 발병되었거나 이의 발병 위험을 지니고 있는 개체에게 투여된다. 일 구체예에서, 항체는 야생형 및 변이체 인자 H 단백질 모두를 인지한다. 일 구체예에서, 항체는 변이체는 인지하나 야생형 인자 H 단백질은 인지하지 않는다. 다른 양태에서, 변이체 CFHR5 폴리펩티드의 활성과 특이적으로 상호작용하며 이를 중화시키는 항-CFHR5 항체가 AMD가 이미 발병되었거나 이의 발병 위험을 지니고 있는 개체에게 투여된다. 일 구체예에서, 항체는 야생형 및 변이체 CFHR5 단백질 모두를 인지한다. 일 구체예에서, 항체는 변이체는 인지하나 야생형 CFHR5 단백질은 인지하지 않는다. 항체는 전신적으로 또는 국소적으로 투여될 수 있다 [예를 들어 문헌 (Gaudreault et al., 2005, "Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rhuFab V2) after a single intravitreal administration" *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46: 726-33) 참조]. 항 HF1 및 항-CFHR5 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 여기에는 하기 기술된 방법이 포함된다. 관련된 일 양태에서, 변이체 인자 H 폴리펩티드 및/또는 CFHR5 폴리펩티드의 활성과 우선적으로 상호작용하며 이를 감소시키는 제제가, AMD가 이미 발병되었거나 이의 발병 위험을 지니고 있는 개체에게 투여된다.

H) 대안적 경로의 조절제

[0305] 일 양태에서, 본 발명은 보체 연쇄증폭반응의 대안적 경로 (AP)의 조절에서 지시된 제제 (예를 들어, 천연 단백질, 재조합 단백질, 항체 또는 소분자)를 눈에 국소적으로 또는 전신적 수준에서 투여함으로써 AMD를 치료하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 상기 치료법은 AP를 직접적으로 조절하는 제제를 투여하는 것을 포함한다. 일 구체예에서, 상기 처리법은 AP의 유발을 조절하는 제제 (예를 들어, 미생물)를 투여하는 것을 포함한다. 일 구체예에서, 상기 처리법은 AP로부터 하류에서 경로를 조절하는 제제를 투여하는 것을 포함한다. AP를 조절하는 예시적인 제제들은 당업계에 공지되어 있으며, 여기에는 DFP, PR226, BCX-1470, FUT-175, sMCP, PS-올리고, 컴프스타틴, 푸칸 및 GCRF가 포함되나 이들에 한정되는 것은 아니다 [이에 대해서는 예를 들어, 문헌 (Makrides, 1998, "Therapeutic inhibition of the complement system," *Pharmacol Rev.* 50: 59-87; Holland et al., 2004, "Synthetic small molecule complement inhibitors" *Curr Opin Investig Drugs* 5: 1163-73; Holers et al., 2004 "The alternative pathway of complement in disease: opportunities for therapeutic targeting" *Mol Immunol.* 41: 147-52) 참조]. AP 조절제는 전신적으로 또는 안내 주입에 의해 또는 화합물의 눈으로의 전달을 위해 공지된 기타 방법으로 투여될 수 있다.

I) 위험 변이체 인자 H 또는 변이체 CFHR5의 약물 스크리닝/길항제

- [0307] 본 발명은 변이체 단백질, 숙주 세포, 또는 인자 H 또는 CFHR5 변이체를 발현하는 형질전환 동물을 접촉시키고, 상기 변이체의 결합, 발현, 조작 또는 활성을 감시함으로써, AMD의 치료를 위해 효과적인 제제의 스크리닝 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 인자 H 변이체는 아미노산 62에서 발린을 갖고/갖거나, 아미노산 402에서 히스티딘을 가지고/가지거나 아미노산 1210에서 시스테인을 갖는다. 일 구체예에서, CFHR5 변이체는 아미노산 46에서 세린을 갖는다.
- [0308] 변이체 인자 H 폴리펩티드의 길항제 (예를 들어, 위험 일배체형과 관련된 변이체)가 AMD를 치료하는 데 사용될 수 있다. 길항제는 변이체 인자 H의 발현을 억제하고, 활성을 억제하거나, RNA 또는 단백질 안정성을 감소시킨다. 길항제는, 다양한 유형의 화합물을 단계적으로 그리고 고처리량 방식으로 생성시킬 수 있는 큰 조합 라이브러리를 생성시키고 이를 스크리닝함으로써 얻을 수 있다. 상기 화합물에는 펩티드, 폴리펩티드, 베타-턴(beta-turn) 유사작용체, 다당류, 인지질, 호르몬, 프로스타글란딘, 스테로이드, 방향족 화합물, 헤테로시클릭 화합물, 벤조디아제핀, 올리고머성의 N-치환된 글리신 및 올리고카르바메이트 등이 포함된다. 상기 화합물들의 큰 조합 라이브러리는 당업계에 공지된 방법으로 자체될 수 있다. 이에 대해서는, 예를 들어 WO 95/12608; WO 93/06121; WO 94/08051; WO 95/35503; WO 95/30642; 및 WO 91/18980호를 참고하길 바란다. 화합물의 라이브러리는 변이체 인자 H 폴리펩티드로의 특이적 결합을 위해 초기에 스크리닝된다. 시험관내 결합 활성을 갖는 화합물은 또한 예를 들어 C3b 또는 해파린에 결합하는 변이체 인자 H 폴리펩티드의 생물학적 활성을 간접시키는 이들의 능력에 대해 검정될 수 있다. 길항제의 활성은 세포 기초 시스템으로, 또는 외인성 변이체 인자 H 폴리펩티드가 발현되는 형질전환된 동물 모델에서 검정될 수 있다.
- [0309] 변이체 CFHR5 폴리펩티드의 길항제 (예를 들어, 위험 일배체형과 관련한 변이체)는 AMD를 치료하는 데 사용될 수 있고, 변이체 인자 H 길항제에 대해 상기 기술된 바와 같이 수득될 수 있다.
- [0310] J) 환자 특이적 치료
- [0311] 개인최적화된 치료는, AMD에서 원인 역할을 지니며 변이체 인자 H 폴리펩티드 또는 CFHR5 폴리펩티드의 발현 수준 및/또는 생물학적 활성에 대해 추정된 다형성 효과를 갖는 인자 H 유전자 또는 CFHR5 유전자에서 특정 다형성의 존재를 기초로, AMD의 다양한 유전자 표현형을 지니는 환자 그룹을 위해 고안될 수 있다. 예를 들어, 인자 H 또는 CFHR5에서의 다형성이 변이체 인자 H 폴리펩티드 또는 CFHR5 폴리펩티드의 생물학적 활성 및/또는 발현 수준을 증가시킴으로써 동물 모델에서 AMD를 유발시키는 경우, 인자 H 또는 CFHR5 다형성과 관련된 AMD는, 환자에게 변이체 인자 H 폴리펩티드 또는 변이체 CFHR5 폴리펩티드의 길항제를 투여하여 치료될 수 있다.
- [0312] K) AMD 바이오마마커를 사용한 치료적 효능의 평가
- [0313] 상기 주지된 바와 같이, CFH 또는 CFHR 단백질의 특정 분절의 치료적 효능은 AMD 바이오마마커의 발현에 대한 단백질의 효과를 시험함으로써 결정될 수 있다. 예시적 AMD 바이오마마커에는 본원에서 상기 기술된 것들이 포함된다. 이들 AMD-관련된 단백질 (바이오마마커)은 건강한 개체와 비교하여 다양한 수준에서 (증가되거나 감소된) AMD를 앓는 개체에서 존재한다. 본 발명은 AMD에 대해 치료중인 개체에서 바이오마마커의 수준을 측정하고 이 바이오마마커의 수준을 바이오마마커의 기준 수준 또는 초기 측정된 수준과 비교함으로써, AMD의 치료 효능을 평가하고 AMD의 진행을 감시하는 방법을 제공한다. 본원과 공동 계류중인 가 출원 제 60/715,503호에 기재된 바와 같이, 바이오마마커의 수준은, 임의의 적합한 방법, 예컨대 분리에 기초한 방법 (예를 들어, 겔 전기영동), 면연검정법 (예를 들어, 항체 기초한 검출) 및 기능에 기초한 방법 (예를 들어, 효소적 또는 결합 활성)을 포함하나 이들에 제한되지 않은 당업자에게 공지된 통상의 기술로 측정될 수 있다. 일 구체예에서, 개체에서 AMD의 치료 효능을 평가하는 방법은, 기체로부터 샘플을 취하고, 2차원 겔 전기영동 (DIGE)에 의해 단백질을 분리함으로써 바이오마마커의 수준을 측정하는 것을 포함한다.
- [0314] VIII. 인자 H 및 CFHR5 핵산
- [0315] A) 프라이머 및 프로브
- [0316] 본 발명은 다형성 위치에 인접하거나 이를 스패닝하는 핵산을 제공한다. 핵산은 인자 H 다형성을 검출하기 위한 프로브 또는 프라이머 (인바데르 (Invader) 사의 몰리클러 비콘 (Molecular Beacon), 및 기타 형광 공명 에너지 전달 (FRET) 타입 프로브를 포함하여)로서 사용될 수 있다. 일 구체예에서, 상기 프로브 또는 프라이머는 인트론 2에서의 삽입을 인지하나, 야생형 서열은 인지하지 않는다. 예시적인 핵산은 표 1A, 1B, 1C, 11, 14 및 15에 기재된 다형성 중 하나 이상을 스패닝하는 서열을 포함하며, 상기 표에서 다형성 위치는 이 위치에 대해 대안적인 염기로 점유된다. 대조 집단에서 더욱 빈번하게 확인되는 상기 위치에 대한 염기는 정상 또는 야생형 서열로 지칭되는 반면, 대조 집단에서 덜 빈번하게 확인되는 상기 위치에 대한 대안적인 염기는 변이체 서열로

서 지칭된다. 핵산은 또한 인자 H 및 CFHR5 유전자에서 공지된 다른 다형성, 예컨대 상기 표 A 및 B에서 확인된 다형성을 스패닝하는 서열을 포함한다.

[0317] **B) 인자 H 및 CFHR5 폴리펩티드의 발현 벡터 및 재조합 생성**

[0318] 본 발명은 인자 H 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 인자 H 폴리펩티드는 야생형이거나 변이체 (예를 들어, 보호 변이체)일 수 있으며, 전장 형태 (예를 들어, HF1) 또는 끝잘린 형태 (truncated form)일 수 있다. 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있으며, 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다.

[0319] 일부 핵산은 전장의, 인자 H 폴리펩티드의 변이체 형태를 엔코딩한다. 변이체 인자 H 폴리펩티드는 인자 H 유전자에서 알려진 임의의 비-유사성 다형성 위치 중 하나를 포함하는 코돈에 의해 엔코딩된 아미노산 내의 정상 또는 야생형 인자 H와는 상이할 수 있다. 일 구체예에서, 변이체 인자 H 폴리펩티드는 표 1A, 표 1B 및/또는 표 1C에 기재된 비-유사성 다형성 위치 중 하나를 포함하는 코돈에 의해 엔코딩된 아미노산에서 정상 또는 야생형 인자 H 폴리펩티드와는 상이하며, 상기 위치는 표 1A, 표 1B 및/또는 표 1C에 기재된 아미노산으로 점유된다. 인자 H 유전자 내의 다중 다형성 위치에서 대안적 아미노산을 갖는 변이체 인자 H 폴리펩티드를 엔코딩하는 변이체 인자 H 유전자가 형성될 수 있음이 이해된다.

[0320] 본 발명은 CFHR5 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 포함한다. 상기 CFHR5 폴리펩티드는 야생형 또는 변이체 (예를 들어, 보호 변이체)일 수 있다. 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있으며, 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다.

[0321] 일부 핵산은 CFHR5 폴리펩티드의 전장, 변이체 형태를 엔코딩한다. 변이체 CFHR5 폴리펩티드는, CFHR5 유전자에서 알려진 임의의 비-유사성 다형성 위치 중 하나를 포함하는 코돈에 의해 엔코딩된 아미노산에서 정상 또는 야생형 CFHR5와는 상이할 수 있다. 일 구체예에서, 변이체 CFHR5 폴리펩티드는, 표 14 및 15에 기재된 비-유사성 다형성 위치 중 하나를 포함하는 코돈에 의해 엔코딩된 아미노산에서 정상 또는 야생형 CFHR5 폴리펩티드와는 상이하며, 상기 위치는 표 14 및 15에 기재된 아미노산에 의해 점유된다. CFHR5 유전자 내의 다중 다형성 위치에서 대안적 아미노산을 갖는 변이체 CFHR5 폴리펩티드를 엔코딩하는 변이체 CFHR5 유전자가 형성될 수 있음이 이해된다.

[0322] 재조합 단백질 및 펩티드를 생성시키는 발현 벡터 또한 공지되어 있다 (Ausubel et al., 2004, *Current Protocols In Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). 그러한 발현 벡터에는 조절 요소, 예컨대 프로모터에 연결된 인자 H 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는데, 상기 조절 요소는 DNA의 전사를 유도하며 원핵 (예를 들어, *E. Coli*) 및 진핵 (예를 들어, 효모, 곤충 또는 포유동물 세포) 숙주에서의 발현을 위해 구성된다. 변이체 인자 H 또는 CFHR5 폴리펩티드는, 변이체 인자 H 또는 CFHR5 유전자가 프로모터에 조작가능하게 연결되는 발현 벡터에서 발현될 수 있다. 대체로, 상기 프로모터는 포유동물 세포에서의 발현을 위한 진핵 프로모터이다. 대체로, 전사 조절 서열은 이중 프로모터 및 임의로 인핸서를 포함하는데, 상기 인핸서는 숙주 세포에 의해 인지된다. 시판되는 발현 벡터가 사용될 수 있다. 발현 벡터는 숙주 인지된 복제 시스템, 증폭가능한 유전자, 선택가능한 마아커, 숙주 계놈으로 삽입시키는 데 유용한 숙주 서열 등을 포함할 수 있다.

[0323] 적합한 숙주 세포에는 *E. Coli*와 같은 박테리아, 효모, 곤팡이, 곤충 세포; 및 마우스, 햄스터, 사람 및 원숭이 세포주, 및 이들의 유도체를 포함하여 전형적으로 불멸화된 포유동물 세포가 포함된다. 숙주 세포는 적절하게 가공된, 성숙 폴리펩티드를 생성시키도록 변이체 인자 H 또는 CFHR5 유전자 생성물을 가공할 수 있다. 그러한 과정에는 글리코실화, 유비퀴틴화, 디스파이드 결합 형성 등이 포함될 수 있다.

[0324] 구체적인 구성 및 표적 숙주에 따라 다르나, 변이체 인자 H 또는 CFHR5 유전자를 함유하는 발현 작제물이 숙주 세포 내로 도입된다. 적당한 방법 및 숙주 세포, 진핵 및 원핵 둘다가 당업계에 널리 공지되어 있다. 재조합 전장 사람 인자 H가 *Sf9* 곤충 세포에서 연구 목적을 위해 발현되었다 (참조: Sharma and Pangburn, 1994, *Biologically active recombinant human complement factor H: synthesis and secretion by the baculovirus system*, *Gene* 143: 301-2). 사람 인자 H의 재조합 분절이 다양한 세포 유형에서 연구 목적으로 발현되었다 (참조: Cheng et al., 2005, "Complement factor H as a marker for detection of bladder cancer" *Clin Chem.* 5: 856-63; Vaziri-Sani et al., 2005, "Factor H binds to washed human platelets" *J Thromb Haemost.* 3: 154-62; Gordon et al., 1995 "Identification of complement regulatory domains in human factor H" *J Immunol.* 155: 348-56). 재조합 전장 사람 CFHR5는 *sf9* 곤충 세포에서 연구 목적으로 발현되었다 (참조: McRae et al., 2001, *Human Factor H-related Protein 5 (FHR-5)*, *J. Biol. Chem.* 276: 6747-6745).

- [0325] 변이체 인자 H 또는 CFHR5 폴리펩티드는 단백질 생화학의 통상적인 수단에 의해 단리 및 정제되어 실질적으로 순수한 생성물을 얻을 수 있다. 일반적인 방법에 대해서는 문헌 (Jacoby, Methods in Enzymology Volume 104, Academic Press, Springer-Verlag, New York (1984); Scopes, Protein Purification, Principles and Practice, 2nd Edition, Springer-Verlag, New York (1987); and Deutscher (ed) Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology, Vol. 182 (1990))을 참조하길 바란다. 인자 H 또는 CFHR5와 같은 분비된 단백질이, 숙주 세포가 배양되는 배지로부터 단리될 수 있다. 변이체 인자 H 또는 CFHR5 폴리펩티드가 분비되지 않는 경우, 이는 세포 용해물로부터 단리될 수 있다.
- [0326] 일 구체예에서, 벡터는 표 1A, 1B 및/또는 1C에 기재된 다형성 위치 중 하나 이상에서 비-야생형 서열을 갖는 서열을 지니는 변이체 인자 H 단백질의 생성을 위한 발현 벡터이다.
- [0327] 일 구체예에서, 벡터는 인자 H의 보호 변이체의 서열을 갖는 변이체 인자 H 단백질의 생성을 위한 발현 벡터이다.
- [0328] 일 구체예에서, 벡터는 표 14 및 15에 기재된 다형성 위치중 하나 이상에서 비-야생형 서열을 갖는 서열을 지닌 변이체 CFHR5 단백질의 생성을 위한 발현 벡터이다.
- [0329] 일 구체예에서, 벡터는 인자 H의 보호 변이체의 서열을 갖는 변이체 CFHR5 단백질의 생성을 위한 발현 벡터이다.
- [0330] C) 유전자 치료 벡터
- [0331] 유전자 치료를 위한 인자 H 폴리펩티드 또는 CFHR5 폴리펩티드의 발현 방법은 공지되어 있고, 이는 상기 섹션 IV(A)에 기술되어 있다.
- [0332] XI. 항체
- [0333] 본 발명은, 하나 이상의 비-유사성의 단일 누클레오티드 다형성 (SNP)가 인자 H 코딩 영역에 존재하는 정상 또는 야생형 인자 H 폴리펩티드 또는 변이체 인자 H 폴리펩티드를 인지할 수 있는 인자 H-특이적 항체를 제공한다. 일 구체예에서, 본 발명은 변이체 인자 H 폴리펩티드 또는 이의 분절은 특이적으로 인지하나 다형성 위치에서 변이체를 갖지 않는 인자 H 폴리펩티드는 인지하지 않는 항체를 제공한다.
- [0334] 본 발명은, 하나 이상의 비-유사성의 단일 누클레오티드 다형성 (SNP)가 CFHR5 코딩 영역에 존재하는 정상 또는 야생형 CFHR5 폴리펩티드 또는 변이체 CFHR5 폴리펩티드를 인지할 수 있는 CFHR5 -특이적인 항체를 제공한다. 일 구체예에서, 본 발명은 변이체 CFHR5 폴리펩티드 또는 이의 분절은 특이적으로 인지하나 다형성 위치에서 변이체를 갖지 않는 CFHR5 폴리펩티드는 인지하지 않는 항체를 제공한다.
- [0335] 상기 항체들은 다클론이거나 단클론일 수 있으며, 이들은 표준 프로토콜에 따라 제조된다. 항체들은 변이체 H 인자 또는 변이체 CFHR5 폴리펩티드, 또는 이들의 분절, 또는 이들의 합성 웨პ티드 분절과 함께 적합한 동물에게 주입함으로써 제조될 수 있다. 단클론 항체는 표준 프로토콜에 따라 스크리닝된다 (Koehler and Milstein 1975, *Nature* 256: 495; Dower et al., WO 91/17271 and McCafferty et al., WO 92/01047; and Vaughan et al., 1996, *Nature Biotechnology*, 14: 309). 일 구체예에서, 단클론 항체는 각각 상응하는 야생형 인자 H 또는 CFHR5 폴리펩티드가 아니라 변이체 인자 H 또는 CFHR5 폴리펩티드와의 특이적인 면역반응성에 대해 검정된다. 변이체 폴리펩티드에 특이적으로 결합하나 상응하는 야생형 폴리펩티드에는 결합하지 않는 항체를 동정하는 방법은 당업계에 잘 공지되어 있다. 항체 스크리닝 및 제거 방법을 포함하는 방법에 대해서는, 문헌 (Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York (1988); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1999, including supplements through 2005); Goding, *Monoclonal Antibodies, Principles and Practice* (2d ed.) Academic Press, New York (1986); Burioni et al., 1998, "A new subtraction technique for molecular cloning of rare antiviral antibody specificities from phage display libraries" *Res Virol.* 149(5): 327-30; Ames et al., 1994, Isolation of neutralizing anti-C5a monoclonal antibodies from a filamentous phage monovalent Fab display library. *J Immunol.* 152(9): 4572-81; Shinohara et al., 2002, Isolation of monoclonal antibodies recognizing rare and dominant epitopes in plant vascular cell walls by phage display subtraction. *J Immunol Methods* 264 (1-2): 187-94)을 참조하길 바란다. 면역화 또는 스크리닝은 전장 변이체 단백질에 대해 또는, 대안적으로는 (및 종종 더욱 편리하게는) 변이체와 야생형 사이를 구분하는 것으로 공지된 에피토프를 포함하는 웨პ티드 또는 폴리펩티드 분절에 대해 유도될 수 있다. 구체적인 변이체에는 CFH 및 HFL1의 Y402H 또는 I62V 변이체, CFH의

R1210C 변이체, CFHR5의 P46S 변이체, 및 CFH의 끝잘린 형태가 포함된다. 일 구체예에서, HF1이 측정된다. 상기 논의된 바와 같이, 일 구체예에서, HFL1과 CHF의 비가 측정된다. 변이체 인자 H 또는 CFHR5 폴리펩티드에 대해 특이적인 (즉, 야생형 단백질에 결합하지 않거나, 낮은 친화도로 결합하는) 단클론 항체가, 인자 H 또는 CFHR5의 변이체 형태의 검출을 위한 진단 검정에, 또는 약제 조성물 내의 활성 성분으로서 유용하다.

- [0336] 본 발명은 의약품 제조 품질 관리 기준 (GMP) 요건에 준수하여 제조되고 시험되는 항체를 포함하는 환자에게 투여하기에 적합한 재조합 폴리펩티드를 제공한다. 예를 들어, FDA 승인을 위해 재조합 항체는 효능 및 정체성에 대해 시험되고, 멸균되고, 외인성 물질을 제거해야 하며, 제품 중의 모든 성분 (즉, 보존제, 희석제, 보조제 등)은 순도, 품질 기준을 충족해야 하며, 환자에게 유해하지 않아야 한다.
- [0337] 본 발명은 인자 H 또는 CFHR5 폴리펩티드 (예를 들어, 정상 또는 야생형 인자 H 폴리펩티드 또는 변이체 인자 H 폴리펩티드, 또는 정상 또는 야생형 CFHR5 폴리펩티드 또는 변이체 CFHR5 폴리펩티드)를 특이적으로 인지하는 항체, 및 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0338] 관련된 양태에서, 본 발명은 치료학적으로 허용되는 인자 H-특이적인 항체 또는 CFHR5-특이적인 항체를 함유하는 멸균 용기, 예를 들어 바이얼을 제공한다. 일 구체예에서, 이는 동결건조된 제제이다.
- [0339] 관련된 양태에서, 본 발명은 환자로의 투여를 위한 사람 또는 사람화된 항-인자 H 또는 항-CFHR5 항체의 약제 제조물을 제공한다. 사람화된 항체는 실질적으로 사람 항체 (수용자 항체로서 지칭됨)로부터 가변적인 영역 프레임워크 잔기, 및 실질적으로 마우스 항체 (이는 공여자 면역글로불린으로 지칭됨)로부터 상보성 결정 영역을 갖는다 [참조: Peterson, 2005, Advances in monoclonal antibody technology: genetic engineering of mice, cells, and immunoglobulins, *ILAR J.* 46:314-9, Kashmire et al., 2005, SDR grafting - a new approach to antibody humanization, *Methods* 356: 25-34, Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033 (1989), WO 90/07861, US 5,693,762, US 5,693,761, US 5,585,089, US 5,530,101, and Winter, US 5,525,539]. 존재하는 경우 일정 영역(들)은 실질적으로 또는 전체적으로 사람 면역글로불린으로부터 비롯된다. 사람의 가변 도메인은 일반적으로, 프레임워크 서열이 CDR이 유도되는 뮤린의 가변 영역 도메인과 높은 서열 동일성을 나타내는 사람 항체로부터 선택된다. 중량 및 경량 (heavy and light)의 사슬 가변 영역 프레임워크 잔기가 동일하거나 상이한 사람 항체 서열로부터 유도될 수 있다. 사람 항체 서열은 자연 발생하는 사람 항체의 서열일 수 있거나, 다수의 사람 항체의 컨센서스 (consensus) 서열일 수 있다 [참조: Carter et al., WO 92/22653]. 사람의 가변 영역 프레임워크 잔기로부터의 특정 아미노산은 CDR 형태에 대한 이들의 가능한 영향 및/또는 항원으로의 결합을 토대로 치환을 위해 선택된다. 그러한 가능한 영향의 조사는 특정 아미노산의 모델링, 특정 위치에서 아미노산의 특성 조사, 또는 특정 아미노산의 돌연변이 또는 치환의 효과를 경험적으로 관찰함으로써 이루어진다.
- [0340] 예를 들어, 아미노산이 뮤린의 가변 영역 프레임워크 잔기와 선택된 사람의 가변 영역 프레임워크 잔기 사이에서 상이할 경우에, 사람 프레임워크 아미노산은 대체로, 아미노산이 (1) 항원에 직접 비공유적으로 결합되고, (2) CDR 영역에 인접하며, (3) CDR 영역 (즉, CDR 영역의 약 6A 이내에 있는)과 상호작용하거나, (4) VL-VH 계면에 참여할 것임이 합리적으로 예상되는 경우 마우스 항체로부터 등가의 프레임워크 아미노산으로 대체되어야 한다.
- [0341] 치환을 위한 다른 후보물질은, 그 위치에서 사람 면역글로불린에 대해서 특이적인 수용자 사람 프레임워크 아미노산이다. 이들 아미노산은 마우스 공여자 항체의 등가 위치로부터 또는 더욱 전형적인 사람 면역글로불린의 등가 위치로부터의 아미노산으로 대체될 수 있다. 치환을 위한 다른 후보물질은, 그 위치에서 사람 면역글로불린에 대해 특이적인 수용자 사람 프레임워크 아미노산이다. 사람화된 면역글로불린의 가변 영역 프레임워크는 사람 가변 영역 프레임워크 서열 또는 이 서열의 컨센서스에 대해 일반적으로 85 % 이상의 서열 동일성을 나타낸다.
- [0342] IX. 위험, 보호 및 중성 변이 및 일배체형의 동정
- [0343] 본 발명은 표 1A, 1B, 1C, 11, 14 및 15에 기술된 인자 H 유전자 및/또는 CFHR5 유전자에서 다형성 부위에 연결된 다형성 부위를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 인자 H 유전자 또는 CFHR5 유전자에서 다형성 부위에 연결된 유전자 중 다형성 부위를 동정하는 단계로서, 인자 H 유전자 또는 CFHR5 유전자에서 다형성 부위의 다형태가 AMD와 관련된(예를 들어, 위험을 증가시키거나 감소시키는) 단계, 및 연결된 다형성 부위가 AMD 표 현형과 관련된 인자 H 유전자 또는 CFHR5 유전자의 다형태와 평형이거나 비평형의 다형태를 갖는 지의 여부를 지시하기 위해 개개의 개체의 일배체형을 결정하는 단계를 포함한다.

- [0344] 표 1A, 1B, 1C, 11, 14 및 15에 나타낸 바와 같은 인자 H 유전자 및/또는 CFHR5 유전자의 다형성은 고려되는 형질과 관련된 유전자 자리와, 형질과 관련되지 않은 다형성 마커 사이에 물리적 연결을 형성시키는데 사용될 수 있지만, 유전자 자리 부근에서 형질을 초래하고 이와 동시에 분리된다. 고려되는 형질과 관련된 유전자 자리의 지도화(mapping)는 당업계에 널리 공지된 하기 형질 과정을 초래하는 유전자를 클로닝시킴을 촉진한다.
- [0345] 표 1A, 1B, 1C, 11, 14 및 15에 나타낸 바와 같은 인자 H 유전자 및/또는 CFHR5 유전자의 다형성은 다형성이 표 현형 형질과 동시에 분리됨을 결정하고, 치료를 요구하는 개개인을 결정하고, 치료의 효과를 결정하기 위해 가족적 연관 연구에서 사용될 수 있다.
- [0346] 연관은 LOD(log of the odds) 스코어의 계산에 의해 분석되며, 이는 두개가 재조합 분율 세타에 위치되는 경우 마커와 유전자 위치에 대한 관찰된 분리 데이터를 수득하는 가능성 대 두개가 연결되지 않은 상황(독립적으로 분리됨)의 비율의 \log_{10} 이다[Thompson & Thompson, Genetics in Medicine (5th ed, W.B.Saunders Company, Philadelphia, 1991) 및 Strachan, "Mapping the human genome" in The Human Genome (BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford) Chapter 4]. 3의 LOD 스코어는 일치하는 명확하게 관찰된 연결에 대한 1000 대 1 오드(odds)를 지시한다. +3 이상의 LOD 스코어는 두개의 자리가 연결된 결정적인 증거로 여겨지는 반면, -2 이하의 LOD 스코어는 연결에 불리한 결정적 증거로 여겨진다.
- [0347] X. 비-인간 유전자이식 동물
- [0348] 본 발명은 인간 변종 H 인자 또는 CFHR5 폴리펩티드를 발현시킬 수 있는 비-인간 유전자이식 동물을 제공한다. 비-인간 유전자이식 동물은 비활성화된 내생 H 인자 또는 CFHR5 유전자의 대립 유전자 중 하나 또는 둘모두를 갖을 수 있다. 외인성 변종 H 인자 또는 CFHR5 유전자의 발현은 대개 실시가능하게는 하기 표준 프로토콜로 프로모터 및 임의적으로 증강제에 유전자를 연결한 후, 구성체를 접합체로 미세주사하므로써 달성된다[Hogan et al., "Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory]. 내생 H 인자 또는 CFHR5 유전자는 당업계에 공지된 방법에 의해 비활성화될 수 있다[Capecchi, 1989]. 인자 H 결핍 마우스는 외인성 인간 변종 인자 H 유전자의 도입을 위해 이용가능하다. 유전자이식 동물은 AMD 및 다른 보체 관련 질환의 모델로서 유용한 약물 스크린 시스템을 제공한다. 유전자이식 동물을 또한 본 발명의 재조합 CFH 및 CFHR5 단백질의 생산을 위해 사용될 수 있다[미국특허번호 제6,066,725호; 제6,013,857호; 제5,994,616호; 및 제5,959,171호; Lillico et al., 2005; Houdebine, 2000].
- [0349] XI. 키트
- [0350] 본 발명은 H 인자 또는 CFHR5 다형성 및 일배체형을 검출하는 시약, 장치 및 키트를 제공한다. 피검체에 AMD를 발달시킬 위험을 스크리닝하고/거나 AMD를 예방하거나 경감시키기 위한 적절한 치료법을 동정하는데 특히 적합하지만, 특정 구체예에서, 이들 시약, 장치 및 키트가 MPGNII 또는 임의의 다른 보체 관련된 상태를 발달시킬 위험을 측정함을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 목적을 위하여 인자 H 및 CFHR5 다형성 및 일배체형의 분석을 위해 사용될 수 있는 것으로 이해될 것이다.
- [0351] 여러 검정 시스템은 당업계에서 공지되어 있으며, 당업계에서 AMD와 관련된 변이의 존재를 결정하기 위한 수단에 도달한다. 키트 제제, 예를 들어 복합 프라이머, 복합 프로브, 프라이머의 조합, 또는 프로브의 조합은 진단 또는 스크리닝을 위한 이들의 사용 전에 별도의 용기에 함유될 수 있다. 일 구체예에서, 키트는 본원에 기술된 제 1 CFH 또는 CFHR5 대립유전자에 대한 프로브, 프라이머, 또는 프라이머 쌍을 함유한 제 1 용기, 및 본원에 기술된 제 2 CFH 또는 CFHR5 대립유전자에 대한 프로브, 프라이머, 또는 프라이머 쌍을 함유한 제 2 용기를 포함한다.
- [0352] 일 구체예에서, 본 발명은 H 인자 또는 CFHR5 유전자에서 특정 다형성에 하이브리드화하는 적어도 하나의 H 인자 또는 CFHR5 대립유전자-특이적 올리고누클레오티드를 포함하는 키트를 제공한다. 이러한 키트는 다형성의 상이한 형태에 하이브리드화하는 H 인자 또는 CFHR5 대립유전자-특이적 올리고누클레오티드의 하나 이상의 쌍을 함유할 수 있다. H 인자 또는 CFHR5 대립유전자-특이적 올리고누클레오티드는 H 인자 또는 CFHR5 유전자의 코딩(엑손) 또는 비-코딩(프로모터, 5' 비번역된, 인트론 또는 3' 비번역된) 구역으로부터 유래된 서열을 포함할 수 있다. H 인자 또는 CFHR5 대립유전자-특이적 올리고누클레오티드는 기재 상에 고정되게 제공될 수 있다. 기재는 표 1A, 1B, 1C, 11, 14 및 15에 나타낸 적어도 2, 3, 4, 5, 5 초과(예를 들어, 적어도 6, 7, 또는 8) 또는 모든 다형성 및/또는 H 인자 또는 CFHR5 유전자 중 다른 다형성(예를 들어, SNP 데이터베이스에서 발견되는 상술된 다형성을 포함)을 검출하기 위한 인자 H 또는 CFHR5 대립유전자-특이적 올리고누클레오티드 프로브를 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 키트는 AMD를 진단하는데 사용된다. 관련된 구체예에서, 키트는 H 인자 또는

CFHR5 유전자에서 변종과 관련된 다른 질환을 스크리닝하는데 사용된다.

[0353] 키트는 H 인자 또는 CFHR5 유전자에서 스패닝(spanning)을 하이브리드화시키거나 특정 다형성에 인접한 적어도 하나의 H 인자 또는 CFHR5 유전자를 포함할 수 있다. 인자 H- 또는 CFHR5-특이적 프라이머는 H 인자 또는 CFHR5 유전자의 코딩(액손) 또는 비-코딩(프로모터, 5' 비번역된, 인트론 또는 3' 비번역된) 구역으로부터 유래된 서열을 포함할 수 있다. 종종, 키트는 H 인자 또는 CFHR5 유전자에서 특정 다형성에 인접한 핵산의 반대편 가닥에 하이브리드화하는 인자 H- 또는 CFHR5-특이적 프라이머의 하나 이상의 쌍을 함유한다. 적절한 완충액 및 효소의 존재하에서, 인자 H- 또는 CFHR5-특이적 프라이머 쌍은 H 인자 또는 CFHR5 유전자에서 특정 다형성을 증폭시키는데 유용하다.

[0354] 다양한 다형성 및 일배체형이 인자 H 관련 병태를 발달시키기 위한 개개의 성향을 평가하기 위해 검출될 수 있다는 것은 본 설명에 의해 가이딩되는 당업자에게 자명할 것이다. 하기 실시예 및 조합은 설명을 위해 제공되는 것으로 이로 제한되지 않는다. 몇몇 경우에서, 시험은 H 인자 또는 CFHR5 유전자에서 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5 또는 적어도 6개의 다형성 부위에서 대립유전자를 동정한다. 몇몇 경우에서, 시험은 표 1A, 1B, 1C, 11, 14 및 15에 기술된 H 인자 또는 CFHR5 유전자의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 모든 다형성에서 대립유전자를 동정한다. 일 구체예에서, 이러한 사이트는 rs529825; rs800292; rs3766404; rs1061147; rs1061170; rs203674; 및 임의적으로 액손 22(R120C)를 포함하는 것으로부터 선택된다. 일 구체예에서, 이러한 사이트는 rs529825; rs800292; 인트론 2 (IVS2 또는 insTT); rs3766404; rs1061147; rs1061170; 액손 10A; rs203674; rs375046; 및 임의적으로 액손 22(R120C)를 포함하는 것으로부터 선택된다. 일 구체예에서, 이러한 사이트는 rs3753394; rs529825; rs800292; 인트론 2 (IVS2 또는 insTT); rs3766404; rs1061147; rs1061170; rs2274700; rs203674; rs3753396; rs1065489; 및 임의적으로 액손 22(R1210C)를 포함하는 것으로부터 선택된다. 일 구체예에서, 이러한 사이트는 rs800292 (162V); IVS 2 (-18insTT); rs1061170 (Y402H); 및 rs2274700 (A473A)로부터 선택된다. 일 구체예에서, 이러한 사이트는 rs9427661 (-249T>C); rs9427662 (-20T>C); 및 rs12097550 (P46S)로부터 선택된다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 진단/스크리닝 시험은 H 인자 또는 CFHR5 유전자의 적어도 두개의 다형성 부위에서 대립유전자를 동정한다. 바람직한 구체예에서, 본 발명은 진단/스크리닝 시험은 H 인자 또는 CFHR5 유전자의 적어도 세개의 다형성 부위에서 대립유전자를 동정한다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 진단/스크리닝 시험은 H 인자 또는 CFHR5 유전자의 적어도 네개의 다형성 부위에서 대립유전자를 동정한다.

[0355] 몇몇 경우에서, 키트는 표 1A, 1B, 1C, 11, 14 및 15에 기술된 H 인자 또는 CFHR5 유전자의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 모든 다형성에서 대립유전자를 동정하기 위한 프라이머 또는 프로브("올리고누클레오티드")를 포함한다. 일 구체예에서, 이러한 키트는 하기 다형성 부위 중 적어도 하나에서 대립유전자를 측정하기 위한 프라이머 또는 프로브를 포함한다: rs529825; rs800292; rs3766404; rs1061147; rs1061170; rs203674; 및 임의적으로 액손 22(R120C)를 포함. 일 구체예에서, 이러한 키트는 하기 다형성 부위 중 적어도 하나에서 대립유전자를 측정하기 위한 프라이머 또는 프로브를 포함한다: rs529825; rs800292; 인트론 2 (IVS2 또는 insTT); rs3766404; rs1061147; rs1061170; 액손 10A; rs203674; rs375046; 및 임의적으로 액손 22 (R120C). 일 구체예에서, 이러한 키트는 하기 다형성 부위 중 적어도 하나에서 대립유전자를 측정하기 위한 프라이머 또는 프로브를 포함한다: rs3753394; rs529825; rs800292; 인트론 2 (IVS2 또는 insTT); rs3766404; rs1061147; rs1061170; rs2274700; rs203674; rs3753396; rs1065489; 및 임의적으로 액손 22 (R120C)를 포함. 일 구체예에서, 이러한 사이트는 rs800292 (162V); IVS 2 (-18insTT); rs1061170 (Y402H); 및 rs2274700 (A473A)로부터 선택된다. 일 구체예에서, 이러한 사이트는 rs9427661 (-249T>C); rs9427662 (-20T>C); 및 rs12097550 (P46S)로부터 선택된다.

[0356] 키트는 두개, 적어도 세개, 적어도 네개, 적어도 다섯개 또는 적어도 여섯개의 상기 사이트에서 대립유전자를 측정하기 위한 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs529825에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs800292에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs3766404에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs1061147에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs1061170에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs203674에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 액손 22(R1210C)에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs529825 및 rs800292에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 두개 또는 세개에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs529825 및 rs800292 중 적어도 하나; 및 rs3766404; 및 rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중

적어도 하나에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs529825, rs800292, rs3766404, rs1061170 및 rs203674에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 엑손 22 (R1210C)에서, 및 (a) rs529825; rs800292; rs3766404; rs1061147; rs1061170; rs203674; rs529825 rs800292에서; (b) rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 두개 또는 세개에서; rs529825 및 rs800292, rs3766404에서, 및 rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 두개 또는 세개에서; 또는 rs529825, rs800292, rs3766404, rs1061170 및 rs203674에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs529825 및 rs800292 중 적어도 하나; 및 rs3766404;에서, 및 rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 적어도 하나에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs529825, rs800292, rs3766404, rs1061170 및 rs203674에서 대립유전자를 구별한다.

[0357] 키트는 상기 사이트 중 두개에서, 또는 상기 사이트 중 적어도 세개에서 대립유전자를 측정하기 위한 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs800292에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs1061170에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 엑손 22(R1210C)에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 엑손 22(R1210C) 및 rs800292 및/또는 엑손 22 및 rs1061170 및 엑손 22에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs800292, rs1061170 및 엑손 22 (R1210C)에서 대립유전자를 구별한다.

[0358] 키트는 상기 사이트 중 두개, 적어도 세개, 적어도 네개, 적어도 다섯개, 또는 적어도 여섯개에서 대립유전자를 측정하기 위한 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs529825에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs800292에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 인트론 2 (IVS2 또는 insTT)에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs3766404에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs1061147에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs1061170에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs2274700에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 엑손 10A에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs203674에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs375046에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 엑손 22 (R1210C)에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs529825 및 rs800292에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 두개 또는 세개에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs529825 및 rs800292에서, 인트론 2에서, rs3766404에서, rs1061147, rs1061170 및 rs203674에서, rs2274700에서, 엑손 10A에서, rs375046에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs529825, rs800292, 인트론 2 (IVS2 또는 insTT), rs3766404, rs1061170, rs2274700, 엑손 10A, rs203674, 및 rs375046에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 엑손 22 (R1210C)에서 및 rs529825; rs800292; 인트론 2 (IVS2 또는 insTT); rs3766404; rs1061147; rs1061170; rs2274700, 엑손 10A; rs203674; rs375046; rs529825 및 rs800292 중 임의의 하나 이상에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 엑손 22 (R1210C)에서, 및 (a) rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 임의의 두개 또는 세개에서; (b) rs529825 및 rs800292, 인트론 2 (IVS2 또는 insTT), rs3766404; rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 두개 또는 세개, rs2274700, 엑손 10A, 및 rs375046에서; 또는 rs529825, rs800292, 인트론 2 (IVS2 또는 insTT), rs3766404, rs1061170, rs2274700, 엑손 10A, rs203674, 및 rs375046에서 대립유전자를 구별한다.

[0359] 일 구체예에서, 키트는 인자 H 유전자에서 하나 이상의 변종을 검출하기 위한 프로브 또는 프라이머, 및 CHFR-5 유전자에서 하나 이상의 변종을 검출하기 위한 프로브 또는 프라이머를 함유한다. 이러한 구체예에서, 키트는 임의적으로 H 인자 및 CHFR-5 유전자 각각 또는 둘모두에서 한개를 초과하는 변종, 예를 들어 두개, 세개 또는 세개 초과의 변종을 검출하기 위한 프로브 또는 프라이머를 함유한다.

[0360] 다수의 시험 형태는 일배체형을 측정하기 위해 공지된 것이며, 본 발명을 위해 개조될 수 있다[Gorgens et al., 2004, One-Step Analysis of Ten Functional Haplotype Combinations of the Basic RET Promoter with a LightCycler Assay" Clinical Chemistry 50:1693-1695; Dawson, 1989, "Carrier identification of cystic fibrosis by recombinant DNA techniques." Mayo Clin Proc 64:325-34; Lee et al., 2005, "Gene SNPs and mutations in clinical genetic testing: haplotype-based testing and analysis." J. Clin. Genet. 42:204-209.].

[0361] 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 (a) 임의의 하나 이상의 rs529825; rs800292; rs3766404; rs1061147;

rs1061170; 및 rs203674; (b) 임의의 하나 이상의 인트론 2 (IVS2 또는 insTT); rs2274700; 엑손 10A; 및 rs375046; (c) rs529825 및 rs800292 중 하나 또는 둘 모두; (d) 하나 이상의 rs1061147, rs1061170 및 rs203674; (e) rs529825 및 rs800292 중 적어도 하나; 및 rs3766404; 및 rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 적어도 하나; (f) 적어도 rs529825, rs800292, rs3766404, rs1061170, 및 rs203674; (g) 엑손 22 (R1210C); (h) 엑손 22 (R1210C) 및 (a) 내지 (g) 중 임의의 것; 또는 (i) 임의의 하나 이상의 rs529825; rs800292; rs3766404; rs1061147; rs1061170; rs203674; 인트론 2 (IVS2 또는 insTT); rs2274700; 엑손 10A; rs375046; and 엑손 22 (R1210C) 및 임의의 하나 이상의 rs9427661, rs9427662 및 rs12097550에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 키트는 장치의 내용 중 하기에 기술된 사이트에서 대립유전자의 임의의 조합을 구별하기에 충분한 올리고누클레오티드를 포함한다.

[0362] 키트는 상세하게는 H 인자 또는 CFHR5 폴리펩티드를 인식하는 항체를 포함할 수 있다. 인자 H- 또는 CFHR5-특이적 항체는 정상적인 기능성 인자 H 또는 CFHR5 폴리펩티드 또는 상이한 인자 H 또는 CFHR5 폴리펩티드를 인식할 수 있으며, 여기서 하나 이상의 비-동의어 단일 누클레오티드 다형성(SNP)가 인자 H 또는 CFHR5 코딩 구역에 존재한다.

[0363] XII. 진단 장치

[0364] 진단, 예후, 약물 스크리닝 및 기타 방법을 위해 유용한 장치 및 시약이 제공된다. 일 양태에서, 하나 이상의 인자 H 및/또는 CFHR5 다형성 부위에 대해 특이적인 고정된 프라이머 또는 프로브를 포함하는 장치가 제공된다. 일 구체예에서, 인자 H 및/또는 CFHR5 다형성 부위는 AMD와 관련하여 본원에 기술된 것이다.

[0365] 일 구체예에서, 하나 이상의 인자 H 및/또는 CFHR5 유전자 생성물(폴리누클레오티드 또는 단백질)에 대해 특이적인 고정된 프라이머 또는 프로브를 포함하는 장치가 제공된다. 프라이머 또는 프로브는 폴리누클레오티드(예를 들어 특정 다형성 부위에 하이드리드화를 기초로 함) 또는 폴리펩티드(예를 들어, 상이한 폴리펩티드에 특이적 결합을 기초로 함)를 결합할 수 있다.

[0366] 일 구체예에서, 어레이(array) 형태는 다수(적어도 2, 대개 적어도 3개 이상)의 상이한 프라이머 또는 프로브가 고정되게 사용된다. 용어 "어레이"는 이의 통상적인 의미로서 다수의 프라이머 또는 프로브 각각이 대개 기재 상에 고정되고, 예를 들어 기재 상에 제한된 위치(address)를 갖음을 의미한다. 어레이 상에 프라이머 또는 프로브의 수는 장치의 특성 및 용도에 따라 변경될 수 있다. 예를 들어, 계량봉(dipstick) 형태 어레이는 2개의 별도 프라이머 또는 프로브를 갖을 수 있지만, 대개 2개 초과, 및 종종 이를 초과하는 프라이머 또는 프로브가 존재할 것이다. 표면에 핵산을 부착시키기 위한 한 방법은 고밀도 올리고누클레오티드 어레이를 제조함에 의한 것이다[Fodor et al., 1991, Science 251:767-73; Lockhart et al., 1996, Nature Biotech 14:1673; and U.S. Pat. Nos. 5,578,832; 5,556,752; and 5,510,270]. 또한, 몇몇 구체예에서, 단일 고정된 프로브를 포함하는 장치가 사용될 수 있음이 고려된다.

[0367] 일 구체예에서, 어레이 형태가 사용되는데, 이는 다수(적어도 2, 대개 3개 이상)의 상이한 프라이머 또는 프로브가 고정되어 있다. 용어 "어레이"는 통상적인 의미로 사용되고, 다수의 프라이머 또는 프로브 각각이 대개 기재 상에 고정되고, 예를 들어 기재 상에 규정된 위치(address)를 갖는다. 어레이 상에 프라이머 또는 프로브의 수는 장치의 특성 및 용도에 따라 변경될 수 있다.

[0368] 일 구체예에서, 고정된 프로브는 항체 또는 기타 인자 H 또는 CFHR5 결합 부분이다.

[0369] 다양한 다형성 및 일배체형이 인자 H 관련 병태를 발달시키기 위한 개개의 성향을 평가하기 위해 검출될 수 있음이 본 설명에 의해 가이딩되는 당업자에게 자명하게 될 것이다. 하기 실시예 및 조합은 설명을 위해 제공되며, 이로 제한되지 않는다. 몇몇 경우에서, 어레이는 표 1A, 1B, 1C, 11, 14 및 15에 기술된 H 인자 또는 CFHR5 유전자의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 모든 다형성에서 대립유전자를 동정하기 위한 프라이머 또는 프로브를 포함한다. 일 구체예에서, 이러한 어레이는 하기 다형성 부위 중 적어도 하나에서 대립유전자를 측정하기 위한 프라이머 또는 프로브를 포함한다: rs529825; rs800292; rs3766404; rs1061147; rs1061170; rs203674; 및 임의적으로 엑손 22(R120C)를 포함. 일 구체예에서, 이러한 어레이는 하기 다형성 부위 중 적어도 하나에서 대립유전자를 측정하기 위한 프라이머 또는 프로브를 포함한다: rs529825; rs800292; 인트론 2 (IVS2 또는 insTT); rs3766404; rs1061147; rs1061170; 엑손 10A; rs203674; rs375046; 및 임의적으로 엑손 22 (R120C). 일 구체예에서, 이러한 어레이는 하기 다형성 부위 중 적어도 하나에서 대립유전자를 측정하기 위한 프라이머 또는 프로브를 포함한다: (a) rs3753394; (b) rs529825; (c) rs800292; (d) 인트론 2 (IVS2 또는 insTT); (e) rs3766404; (f) rs1061147; (g) rs1061170; (h) rs2274700; (i) rs203674; (j) rs3753396; (j)

rs1065489; 및 임의적으로 엑손 22 (R1210C) 포함. 일 구체예에서, 이러한 어레이에는 하기 다형성 부위 중 적어도 하나에 대립유전자를 측정하기 위한 프라이머 또는 프로브를 포함한다: rs800292 (I62V); IVS 2 (-18insTT); rs1061170 (Y402H); 및 rs2274700 (A473A). 일 구체예에서, 어레이에는 하기 다형성 부위 중 적어도 하나에 대립유전자를 측정하기 위한 프라이머 또는 프로브를 포함한다: rs9427661 (-249T>C); rs9427662 (-20T>C); 및 rs12097550 (P46S).

[0370] 어레이는 상기 사이트 중 두개, 적어도 세개, 적어도 네개, 적어도 다섯개 또는 적어도 여섯개에서 대립유전자를 측정하기 위한 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs529825에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs800292에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs3766404에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs1061147에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs1061170에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs203674에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 엑손 22 (R1210C)에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs529825 및 rs800292에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 두개 또는 세개에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs529825 및 rs800292에서, rs3766404에서, rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 두개 또는 세개에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs529825, rs800292, rs3766404, rs1061170, 및 rs203674에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 엑손 22 (R1210C)에서 및 rs529825; rs800292; rs3766404; rs1061147; rs1061170; rs203674; rs375046; rs529825 및 rs800292에서; rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 두개 또는 세개에서; rs529825 및 rs800292에서, rs3766404에서, 및 rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 두개 또는 세개에서; 또는 rs529825, rs800292, rs3766404, rs1061170 및 rs203674에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 (a) 임의의 하나 이상의 rs529825; rs800292; rs3766404; rs1061147; rs1061170; 및 rs203674; (b) 임의의 하나 이상의 인트론 2 (IVS2 또는 insTT); rs2274700; 엑손 10A; 및 rs375046; (c) rs529825 및 rs800292 중 하나 또는 둘모두; (d) 하나 이상의 rs1061147, rs1061170 및 rs203674; (e) 하나 이상의 rs529825 및 rs800292; 및 rs3766404; 및 하나 이상의 rs1061147, rs1061170 및 rs203674; (f) 적어도 rs529825, rs800292, rs3766404, rs1061170, 및 rs203674; (g) 엑손 22 (R1210C); (h) 엑손 22 (R1210C) 및 (a)-(g) 중 임의의 하나; 또는 (i) 임의의 하나 이상의 rs529825; rs800292; rs3766404; rs1061147; rs1061170; rs203674; 인트론 2 (IVS2 또는 insTT); rs2274700; 엑손 10A; rs375046; 및 엑손 22 (R1210C) 및 임의의 하나 이상의 rs9427661, rs9427662 및 rs12097550에서 대립유전자를 구별한다.

[0371] 어레이는 상기 사이트 중 두개, 적어도 세개, 적어도 네개, 적어도 다섯개, 또는 적어도 여섯개에서 대립유전자를 측정하기 위한 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs529825에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs800292에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 인트론 2 (IVS2 또는 insTT)에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs3766404에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs1061147에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs1061170에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 엑손 10A에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs2274700에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs375046에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 엑손 22 (R1210C)에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs529825 및 rs800292에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 두개 또는 세개에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 rs529825 및 rs800292에서, 인트론 2에서, rs3766404에서, rs1061147, rs1061170 및 rs203674에서, 엑손 10A에서, rs2274700에서, rs375046에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 프라이머 또는 프로브는 엑손 22 (R1210C)에서 및 rs529825; rs800292; 인트론 2 (IVS2 또는 insTT); rs3766404; rs1061147; rs1061170; rs2274700, 엑손 10A; rs203674; rs375046; rs529825 및 rs800292에서, rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 임의의 두개 또는 세개에서, rs529825 및 rs800292, 인트론 2 (IVS2 또는 insTT), rs3766404; rs1061147, rs1061170 및 rs203674 중 두개 또는 세개, rs2274700, 엑손 10A, 및 rs375046에서; 또는 rs529825, rs800292, 인트론 2 (IVS2 또는 insTT), rs3766404, rs1061170, rs2274700, 엑손 10A, rs203674, 및 rs375046에서 대립유전자를 구별한다. 일 구체예에서, 장치는 키트 단원에서 상술된 사이트에서 대립유전자의 임의의 조합을 구별한다.

[0372] 일 구체예에서, 기재는 약 1000 미만의 별도의 프라이머 또는 프로브, 종종 약 100 미만의 별도의 프라이머 또

는 프로브, 약 50 미만의 별도의 프라이머 또는 프로브, 또는 약 10 미만의 별도의 프라이머 또는 프로브를 포함한다. 본 단원에서 사용되는 프라이머는, 두개의 프라이머가 동일한 폴리누클레오티드(예를 들어 상이한 유전자에 대한 cDNA 프라이머들)를 특이적으로 결합하지 않는 경우 제 2 프라이머와 "구별된다". 본 단원에서 사용되는 프로브는 두개의 프로브가 동일한 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드(예를 들어 상이한 유전자에 대한 cDNA 프라이머들)를 특이적으로 결합하지 않는 경우 제 2 프로브와 "구별된다". 프라이머 또는 프로브는 또한 이들이 동일한 유전자의 상이한 대립 유전자(즉, CFH 또는 CFHR5)를 인식하는 경우와는 대비적으로 기술될 수 있다. 따라서, 일 구체예에서 본 발명의 진단 장치는 CFH 단독, CFHR5 단독, CFH 및 CFHR5 단독, 또는 CFH, CFHR5 및 CFH 및/또는 CFHR5 이외의 20 이하, 바람직하게는 10 이하, 또는 5 이하의 유전자의 대립유전자를 검출한다. 즉, 이러한 장치는 특히 AMD 및 관련된 보체 관련 질환에 대한 스크리닝에 적합하다. 일 구체예에서, 장치는 CFH 및/또는 하나 이상의 CFHR1-5 단독을 인식하는 프라이머 또는 프로브를 포함한다. 관련된 구체예에서, 장치는 CFH 또는 CFHR1-5 이외에 20 이하, 바람직하게는 10 이하, 또한 바람직하게는 5 이하의 유전자에 대한 프라이머 및 프로브를 함유한다.

[0373] 일 구체예에서, 고정된 프라이머는 H 인자 또는 CHRF5 유전자의 다형성 부위에서 대립유전자 간을 구별할 수 있는 대립유전자-특이적 프라이머이다. 인자 H 유전자의 다형성 부위에서 대립유전자를 동정하기 위한 대표적인 대립유전자-특이적 프라이머는 표 16A에 나타내었다. 고정된 대립유전자-특이적 프라이머는 프라이머에 대해 상보적인 서열을 갖는 RNA 또는 DNA와 같은 핵산에 우선적으로 하이브리드화한다. 하이브리드화는 형광 검출을 지닌 단일 염기 확장, 올리고누클레오티드 결찰 검정 등을 포함하는 다양한 방법에 의해 검출될 수 있다[Shi, M.M., 2001, Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies" *Clan. Chem.* 47(2):164-172]. 아페매트릭스(Affymetrix; Santa Catar, CA), 프로토젠(Protogene; Menlo Park, CA), 제노매트릭스 (Genometrix; The Woodland, TX), 모토롤라 바이오칩 시스템스(Motorola BioChip Systems; Northbrook, IL), 및 펠레젠 사이언스(Perlegen Sciences; Mountain View, CA)를 포함하는 다형성 부위를 검출하기 위한 마이크로어레이-계열 장치는 상업적으로 입수 가능하다.

[0374] 일 구체예에서, 고정된 프로브는 H 인자 또는 CFHR5 유전자의 다형성 부위에서 대립유전자 간을 구별할 수 있는 대립유전자-특이적 프로브이다. 인자 H 유전자의 다형성 부위에서 대립유전자를 동정하기 위한 대표적인 대립유전자-특이적 프로브는 표 16B에 나타내었다. 고정된 대립유전자-특이적 프로브는 프로브에 대해 상보적인 서열을 갖는 RNA 또는 DNA와 같은 핵산에 우선적으로 하이브리드화한다. 하이브리드화는 하이브리드화된 핵산의 형광을 포함하는 다양한 방법에 의해 검출될 수 있다[Shi, M.M., 2001, Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies" *Clan. Chem.* 47(2):164-172]. 아페매트릭스(Affymetrix; Santa Catar, CA), 프로토젠(Protogene; Menlo Park, CA), 제노매트릭스 (Genometrix; The Woodland, TX), 모토롤라 바이오칩 시스템스(Motorola BioChip Systems; Northbrook, IL), 및 펠레젠 사이언스(Perlegen Sciences; Mountain View, CA)를 포함하는 다형성 부위를 검출하기 위한 마이크로어레이-계열 장치는 상업적으로 입수 가능하다.

[0375] 특정 구체예에서, 구체적인 SNP 및 변종에 대해 특이적인 프로브 또는 프라이머는 본 발명의 키트 또는 장치로부터 제외된다. 예를 들어, 몇몇 구체예에서, 키트 또는 장치는 제외될 수 있는 하나 이상의 하기 SNP를 포함하지 않는다: (i) rs529825; (ii) rs900292; (iii) 인트론 2 (IVS2 또는 insTT); (iv) rs3766404; (v) rs1061147; (vi) rs1061170; (vii) rs2274700; (viii) 엑손 10A; (ix) rs203674; (x) rs375046; (xi) rs3753396; (xii) rs1065489; 또는 (xiii) 엑손 22 (R1210C).

도면의 간단한 설명

[0376] 엑손 2-3 내의 3개의 SNP는 엑손 7 및 9 내의 A307A 및 Y402H 변이체, 및 엑손 13 및 18 내의 Q672Q 및 D936E 변이체와 같이 실질적으로 완전한 LD 상태로 존재한다 (표 6 및 도 5).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0377] X III. 실시예

[0378] 실시예 1

[0379] 인자 H 유전자 (HFI/CFH) 내의 일반적인 일배체형은 개체가 연령-관련 황반변성에 걸리기 쉽게 한다.

[0380] 연령-관련 황반변성 (AMD)은 개발도상국에서의 노인의 비가역적 시력상실의 가장 주요한 원인으로, 전세계적으로 5000만명 이상이 이에 걸린다. 본 발명자들의 이전의 연구는 AMD의 특징적 병변인 황반 드루젠 (drusen)의

형성에서의 대안적인 보체 경로의 활성화에 관한 것이었다. 본 발명자들은 또한 AMD 환자에서의 황반 드루젠이 보체 연쇄증폭반응의 대안적 경로의 조절되지 않는 활성화를 특징으로 하는 질병인 막증식성 사구체신염 타입 2 (MPGN II)에 걸린 개체에서 어린 나이에 형성되는 황반 드루젠과 구별되지 않는 것을 발견하였다. 본원에서, 본 발명자들은 대안적 보체 경로의 주요 억제제인 인자 H 단백질 (HF1)이 드루젠 내에서 축적되고, 망막색소상피에 의해 국소적으로 합성되는 것을 제시한다. 기준의 연관 분석은 주요 AMD 민감 유전자좌로서 인자 H 유전자 (*HF1/CFH*)를 지니고 있는 염색체 1q25-32를 확인하였다. 본 발명자들은 약 900명의 AMD 환자 및 400명의 짹지는 대조군으로 구성된 두개의 독립적 코호트에서 유전자 변이에 대해 *HF1*를 분석하였다. 본 발명자들은 상기 코호트에서 8개의 일반적인 *HF1* SNP와 AMD의 매우 유의한 연관성을 발견하였고; 두개의 일반적인 미스센스 변이가 매우 유의한 연관성을 나타냄을 발견하였다 (*I62V*; $\chi^2=36.1$, $p=3.2 \times 10^{-7}$ 및 *Y402H*; $\chi^2=54.4$, $p=1.6 \times 10^{-13}$). 일배체형 분석은 다수의 *HF1* 변이가 AMD의 위험을 증가시키거나 감소시키는 것을 암시한다. 하나의 일반적인 위험 (at-risk) 일배체형은 AMD 환자에서 49%의 빈도와 대조군에서 26%의 빈도로 존재한다 ($OR=2.67$, 95%CI [1.80-2.85]). 이러한 일배체형에서 동형접합체는 AMD 환자에서 22.1%였고, 대조군에서 5.1%였다 ($OR=5.26$, 95%CI [2.84-9.76]). 여러 보호 일배체형이 또한 확인되었다 ($OR=0.44-0.55$). MPGN II 환자의 70%에서 위험 일배체형이 발견된 것은 상기 데이터를 추가로 뒷받침한다. 본 발명자들은 감염과 같은 트리거링 (triggering) 사건과 조합시 보체 시스템의 조절에서의 유전적으로 미리 결정된 변이가 인간 집단에서의 AMD의 대부분의 비율의 기초가 된다는 것 제안한다.

[0381]

서문

[0382]

연령-관련 황반변성 (AMD)은 개발도상국에서 비가역적 시력상실의 주요 원인으로 (Klein et al., 2004; van Leeuwen et al., 2003), 60세 이상의 연령에서 15% 또는 6억명으로 추정되는 개체가 이에 걸린다. AMD는 갑각 신경망막과 이의 기저를 이루는 맥락막 사이의 계면에서 발생하는 퇴행성이고 혈관신생적 변화에 기인한 중심시력의 진행성 상실을 특징으로 한다. 이 위치에 광수용체, 인접한 망막색소상피 (RPE), 브루크막 (Bruch's membrane, BM)으로 공지된 기저막 복합체, 및 맥락막 모세혈관의 네트워크가 위치하고 있다.

[0383]

AMD는 다수의 유전적 및 환경적 위험 인자의 상호작용에 기인하는 복합 장애라는 것이 우세한 시각이다 (Klein et al., 2003; Tuo et al., 2004). 가족집적성 연구는 유전적 구성요소가 AMD 환자의 25% 이하에서 확인될 수 있다는 것을 나타낸다 (Klaver et al., 1998). 이와 같이, AMD는 단일 유전자 장애의 집합이 아니라 다수의 민감한 유전자좌 사이의 상호작용의 결과인 듯하다. 연관된 유전자좌의 수, 질병에 기여하는 위험요소, 및 다양한 유전자좌의 상호작용은 밝혀지지 않았다.

[0384]

연관 연구 및 후보 유전자 스크리닝은 AMD의 유전적 특질에 대한 제한된 통찰을 제공하였다. *ABCA4* (Allikmets et al., 1997; Allikmets, 2000)인 하나의 유전자와 위험 증가, 및 *ApoE4* (Klaver et al., 1998; Souied et al., 1998)인 하나의 유전자와 위험 감소의 확실한 연관성이 보고되었다. 여러 그룹이 유전체 연관 분석 (genome-wide linkage analysis)으로부터의 결과를 보고하였다 (Tuo et al., 2004; Weeks et al., 2001). 지금까지, 한 특정 염색체 영역인 1q25-q31에 대한 하나의 AMD 표현형 (ARMD1; MIM 603075)의 연관성이 문서화되었다 (Klein et al., 1998). *Fib16*으로도 공지된 HEMICENTIN-1이 원인 유전자로서 시험적으로 확인되었으나 (Schultz et al., 2003), 이는 현저한 질병 부하 (load)를 설명하지 못한다 (Abecasis et al., 2004; Hayashi et al., 2004). 여러 그룹에 의한 염색체 1q 상의 중첩 유전자좌의 확인 (Weeks et al., 2001; Iyengar et al., 2003)은 이러한 유전자좌가 주요 AMD 관련 유전자를 지닐 수 있다는 것을 나타낸다.

[0385]

AMD 뿐만 아니라 알츠하이머병 (Akiyama et al., 2000), 죽상경화증 (Torzewski et al., 1997), 및 사구체신염 (Schwartz et al., 2001)과 같은 다수의 기타 질병에서, 특징적인 병변 및 침착물은 질병의 병인 및 진행에 기인된다. 이를 질병의 문자적 병인은 다양할 수 있으나, 침착물은 부분적으로 국소적 염증 및 선천성 면역계의 숙주 방어의 주요 요소인 보체 연쇄증폭반응의 활성화에 기인되는 다수의 공유된 문자 성분을 함유한다. 드루젠은 초기 AMD와 관련된 특징적 침착물이고, 최근 연구는 또한 이의 형성이 국소적 염증 및 보체 연쇄증폭반응의 활성화와 관련되어 있음을 나타낸다 (Hageman et al., 1999; Espinosa-Heidmann et al., 2003). 드루젠은 다양한 보체 활성인자, 억제제, 활성화 특이적 보체 단편, 및 보체 활성화의 결과로서 형성된 세포 용해 복합체인 막공격 복합체 (MAC)를 포함하는 말기 경로 성분을 함유한다. MAC은 외래 병원체 뿐만 아니라 숙주 세포 및 조직에 대해서 잠재적으로 치명적이다.

[0386]

보체의 대안적 활성화 경로의 조절되지 않는 전신 활성화를 특징으로 하는 희귀한 신장 질병인 막증식성 사구체신염 타입 2 (MPGN II)를 지니는 다수의 개체는 또한 AMD 환자로부터의 성분 및 외관과 구별되지 않는 황반에서의 안구 드루젠이 발달한다 (Mullins et al., 2001; O'brien et al., 1993; McAvoy et al., 2004). 더욱이,

MPGN II로 진단된 한 환자는 보체 활성화의 대안적 경로의 주요 억제제인 *HF1* (*HF1*)에 돌연변이를 지닌다 (Zipfel, personal communication). 추가로, 관련 장애인 MPGNIII를 지니는 소수의 광범위한 일족에서의 개체는 AMD에 대한 유전체 연관 연구에서 확인된 유전자좌와 중첩되는, 1q31-32에 위치한 염색체의 영역과의 연관성을 나타낸다 (Neary et al., 2002). 집합적으로, 이러한 발견은 *HF1*이 AMD 및 MPGN II의 발달과 관련되는 지의 여부를 시험하기 위한 추진력을 제공한다.

[0387] 본 연구에서, 본 발명자들은 AMD 및 MPGN II 환자 및 짹지은 대조군에서의 *HF1* 서열 변이의 빈도를 결정하였고, 질병 표현형과 이들의 연관성을 분석하였다. 본 발명자들은 또한 정상 및 AMD 공여자로부터의 황반 RPE-맥락막 복합체에서의 *HF1* 전사 및 *HF1* 단백질의 분포를 검사하였다.

[0388] 방법

[0389] 환자, 표현형 및 DNA - AMD 환자 및 연령에 의해 짹지어진 대조군의 두개의 독립된 그룹을 본 연구를 위해 이용하였다. 모든 참가자들은 60세 이상의 유럽-아메리카 혈통이었고, 사전동의후 IRB 승인 프로토콜 하에 병적에 올렸다. 이들 그룹은 아이오와 대학으로부터의 임상적으로 문서화된 AMD를 지닌 404명의 비혈연 환자 (평균 연령 79.5 ± 7.8) 및 131명의 비혈연 대조 개체 (평균 연령 78.4 ± 7.4; 연령 및 인종에 의해 짹지어짐), 및 콜럼비아 대학으로부터의 임상적으로 문서화된 AMD를 지닌 550명의 비혈연 환자 (평균 연령 71.32 ± 8.9세) 및 연령 및 인종에 의해 짹지어진 275명의 비혈연 대조군 (평균 연령 68.84 ± 8.6세)로 구성되었다. 환자를 간접 검안경검사 및 망막 분야의 특별 연구원에 의해 훈련된 안과의사에 의한 세극등 현미경 검사법으로 검사하였다.

[0390] 캐롤린 클레이버 박사 (Dr. Caroline Klaver), 및 클레이버 박사에 의해 훈련된 이후의 연구원은 표준화된 국제 분류 시스템에 따라 두 협회에서 기저 사진을 등급화시켰다 (Bird et al., 1995). 대조군 환자들은 이들이 임의의 황반 질병의 특징적인 증상을 나타내지 않거나 AMD의 공지된 가족력을 지니지 않는 경우에 선택하고 포함시켰다. AMD 환자를 이들을 연구에 포함시키는 시점에서 이들의 가장 심각한 안구의 등급 분류법을 기초로 하여 초기 AMD (eAMD), 지도형 위축 (GA) 및 삼출성 (CNV) AMD의 표현형 카테고리로 세분하였다. 아이오와 대학의 eAMD 및 GA 환자를 구별되는 표현형으로 추가로 세분하였다 (RPE 변화 단독, > 10의 황반 경성 드루젠, 황반 연성 드루젠, BB (소피) 드루젠, PED, "체로키 (Cherokee)" 위축증, 반도형 위축증 및 패턴형 위축증). 모든 환자에 대해 가장 먼저 문서화된 표현형을 또한 기록하고, 분석에 이용하였다.

[0391] 유전체 DNA를 키아앰프 DNA 블러드 맥시 (QIAamp DNA Blood Maxi) 키트 (Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 환자 및 대조군 피검체로부터 수거된 말초혈액 백혈구로부터 생성시켰다.

[0392] 라파누이 (Rapanui) - 사전동의후, Unidad de Bioetica, Ministerio de Salud (Santiago, Chile)에 의해 승인된 방법에 따라, 447명 (66% 여성; 34% 남성)의 이스터섬 주민에게 확장안저검사 (dilated funduscopic examination)가 포함된 완전한 안구 검사를 제공하였다. 병력, 가족력 및 안구병력을 수집하고, 기록하고, 피검체의 인종을 분류하기 위해 지역 의사와 공동체 지도자의 협조를 받았다. 검사된 환자의 49%가 순수한 라파누이이고, 9%가 혼혈 (라파누이 및 유럽인의 혼혈, 칠레인, 마푸치 (Mapuchi) 및/또는 최근의 폴리네시아인)이고, 42%가 대륙인 (주로 칠레계 유럽인)이었다. 말초정맥 혈액 및 혈청을 201명의 노인으로부터 수거하였고; 이들 개체중 114명은 순수한 라파누이였다 (108명이 50세 이상이고; 89명이 60세 이상이었음). 65세 이상의 60명의 순수한 라파누이 주민 및 13명의 칠레 주민으로부터의 DNA를 본 연구를 위해 이용하였다.

[0393] 인간 공여자 안구 - 인간 공여자 안구를 사망후 5시간 이내에 아이오와 라이온스 안구 은행 (Iowa Lions Eye Bank, Iowa City, IA), 오레곤 라이온스 안구 은행 Oregon Lions Eye Bank, Portland, OR) 및 중앙 플로리다 라이온스 안구 및 조직 은행 (Central Florida Lions Eye and Tissue Bank, Tampa, FL)으로부터 수득하였다. 이들 안구의 육안의 병리학적 특징 뿐만 아니라 가능한 경우 기저 사진 및 혈관조영상을 판독하고, 망막 전문가가 분류하였다. 기저를 적어도 2명의 개체에 의해 국제 AMD 등급화 시스템 (Bird et al., 1995)의 변형된 형태에 따라 등급화시켰다.

[0394] 전체 RNA를 알앤이지 미니 (RNeasy Mini) 키트 (Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 안구로부터 유래된 망막, RPE/맥락막, 및 RPE 세포로부터 제조하였다. 유전체 DNA를 키아슈레더 (QiaShredder, Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 전단시키고, 나머지 유전체 DNA를 DNA 분해효소 (Promega)로 분해시켰다. RNA 완전성을 아질린트 바이오애널라이저 (Agilent BioAnalyzer)를 이용하여 측정하였다.

[0395] 임상적으로 문서화된 AMD를 지니는 38명의 비혈연 공여자 (평균 연령 81.5 ± 8.6) 및 19명의 비혈연 대조군 공여자 (평균 연령 80.5 ± 8.8세; 연령 및 인종에 의해 짹지어짐)으로부터 유래된 DNA를 SSCP 분석 및 잠재적 유전형-표현형 상호관계를 측정하기 위해 사용하였다.

- [0396] 면역조직화학 - 거상연 및 황반을 포함하는 후극의 쇄기를 고정시키고, 이전에 기술 (Hageman et al., 1999)된 바와 같이 처리하였다. 몇몇 후극을 사전 고정 없이 OCT에서 직접 엠베딩 (embedding)시켰다. 조직을 냉동미세절단기 상에서 6-8 μm 의 두께로 절단하고, 이전에 기술 (Hageman et al., 1999)된 바와 같이 면역표지화 (immunolabeling)를 수행하였다. 대조군으로 제공하기 위해 인접한 절단면을 이차 항체 단독과 인큐베이션시켰다. 몇몇 면역표지된 표본을 제조하고, 이전에 기술 (Anderson et al., 2002)된 바와 같이 동일초점 레이저 스캐닝 현미경 검사법으로 관찰하였다.
- [0397] 중합효소 연쇄 반응 (PCR) - 수퍼스크립트 (Superscript) 역전사효소 (Gibco BRL) 및 무작위 핵사머를 이용하여 전체 RNA로부터 첫번째 가닥의 cDNA를 합성하였다. PCR 반응을 하기의 프라이머 세트를 이용하여 수행하였다: FH1 (액손 8 내지 액손 10) 5'-GAACATTTGAGACTCCGTC-3' [서열번호 324] 및 5'-ACCATCCATCTTCCCAC-3' [서열번호 325]; FH1 (액손 9 내지 액손 10) 5'-TCCTGGCTACGCTCTC-3' [서열번호 326] 및 5'-ACCATCCATCTTCCCAC-3' [서열번호 325]; HFL1 (액손 8 내지 액손 10) 5'-TCCGTCAGGAAGTTACTGG-3' [서열번호 327] 및 5'-AGTCACCATACTCAGGACCC-3' [서열번호 328]; HFL1 (액손 9 내지 액손 10), 5'-GGCTACGCTCTCCAAAAG-3' [서열번호 329] 및 5'-AGTCACCATACTCAGGACCC-3' [서열번호 330]. PCR 프라이머 (IDT, Coralville, IA)를 맥벡터 (MacVector) 소프트웨어 (San Diego, CA)를 이용하여 고안하였다. 반응 파라미터는 3분 동안 94°C의 1주기, 45초 동안 94°C, 1분 동안 51.4°C (FH1)/55°C (HFL1), 1분 동안 72°C의 40주기, 및 3분 동안 72°C의 1주기였다. PCR 생성물을 2% 아가로오스 젤에서 영동시키고, 퀄티티 원 (Quantity One®) 소프트웨어가 수반된 젤 닥 2000™ 문서화 시스템 (Gel Doc 2000™ Documentation System) (Bio-Rad, Hercules, CA)을 이용하여 기록하였다.
- [0398] 마이크로어레이 분석: 사망후 5시간 미만에 수거된 천연 인간 RPE 또는 RPE-맥락막 복합체로부터 추출된 전체 RNA (RNeasy minikit, Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 DNA 마이크로어레이 분석을 수행하였다. 세개의 상이한 플랫폼을 사용하였다: 18,380개의 비중복 DNA 마이크로어레이 (Incyte Pharmaceuticals; St. Louis, MO); 어피메트릭스 (Affymetrix) 유전자 칩 시스템; 및 전체 인간 유전체 또는 인간 1 A V2 올리고-마이크로어레이 (Agilent Inc., Palo Alto, CA). 개별적 프로토콜을 각각의 제조업체의 설명서에 따랐다. 인사이트 (Incyte) 분석을 위해, 황반 및 중앙-말초 영역의 6mm 펀치 (punch)로부터 유래된 cDNA를 무작위 프라이밍 반응에서 33-P로 표지화시키고, 정제시키고, 18,380개의 비중복 cDNA를 함유하는 나일론 기재 어레이에 하이브리드화시켰다. 막을 포스포이미지화 (phosphoimage)시키고, 신호를 정상화시키고, 데이터를 유전체 발견 소프트웨어 패키지를 이용하여 분석하였다. 어피메트릭스 분석을 위해, RPE 및 RPE-맥락막 (6-8mm의 황반 및 말초 펀치로부터 유래) cRNA를 표준화된 프로토콜을 이용하여 어피메트릭스 유전자칩 (HG-U133A)에 직접적으로 하이브리드화시켰다. 이러한 과정을 응용유체역학 스테이션 및 유전자 어레이 스캐너가 장비된 아이오와 대학의 DNA 코어 시설에서 수행하였다. 아질런트 데이터를 황반 및 중앙 말초의 펀티로부터 수득하였다. 동일한 공여자로부터의 황반 및 말초 RNA를 이용하는 아질런트 로우 인풋 (Agilent Low Input) RNA 증폭 키트를 이용하여 맥락막 및 말초 RPE/맥락막으로부터 유래된 CY3 및 CY5가 표지된 증폭 cRNA를 생성시켰다. 버스어레이 (VersArray) 스캐너를 이용하여 아질런트 어레이 데이터를 3명의 정상적인 어린 공여자, 3명의 AMD 공여자, 및 3명의 연령에 의해 짹지어진 비-AMD 대조군으로부터 수득하고; 버스어레이 분석기 소프트웨어 (BioRad)를 이용하여 데이터를 정량화시켰다. 각각의 지점의 정중 정량 강도를 전체 백그라운드 공제를 이용하여 계산하고, 데이터를 국소 회귀 방법을 이용하여 정상화시켰다.
- [0399] 돌연변이 스크리닝 및 분석 - HF1의 코딩 및 인접 인트론 영역 (전사되어 절단된 FHL1 이소형 (isoform)을 생성시키는 액손 10A를 포함)을 단일 가닥 구조 다형성 (SSCP) 분석, 변성 고성능 액체 크로마토그래피 (DHPLC) 및 직접 서열분석을 이용하여 변이에 대해 검사하였다. 잔류하는 SNP를 5' 누클레아제 (Taqman, ABI) 방법으로 유형조사하였다. 택맨 (Taqman) 유전형 및 연관 분석을 문헌 [Gold et al., 2004]에 기술된 바와 같이 수행하였다. SSCP, DHPLC 및 DNA 서열분석을 위한 프라이머 (표 5)를 맥벡터 소프트웨어 (San Diego, CA)를 이용하여 각각의 액손 및 이의 인접 인트론 영역을 증폭시키기 위해 고안하였다. PCR에 의해 유래된 앰플리콘을 이전에 기술 (Allikmets et al., 1997; Hayashi et al., 2004)된 바와 같이 SSCP 및 DHPLC로 서열 변이에 대해 스크리닝하였다. SSCP 및 DHPLC에 의해 검출된 AU 변화를 표준 프로토콜에 따른 양방향성 서열분석에 의해 확증하였다. 카이 제곱 및 피셔 직접 확률계산법 (fisher's exact test)을 이용하여 수행하였다.
- [0400] 결과
- [0401] RPE-맥락막 계면에서의 인자 H
- [0402] 황반 및 황반외로부터의 RPE/맥락막 복합체에서의 인자 H 단백질의 분포를 초기 AMD의 병력을 지닌 6명의 공여

자 및 AMD 또는 드루젠을 지니지 않는 유사한 연령의 3명의 공여자로부터 수득된 안구에서 측정하였다 (도 1A-1L). AMD를 지닌 공여자에서, 강한 HF1 면역반응력 (IR)이 드루젠, RPE 및 (즉, RPE 공간 밑), 및 맥락막 모세혈관 주위에 존재하였다 (도 1A-1D, 1E, 1G). 일차 항원의 부재하에서, RPE/맥락막에서의 표지가 존재하지 않았다 (도 1F). 모든 인자 H 항체는 동일의 방식으로 약간의 정도로 드루젠을 표지화시켰다 (도 1C 및 1E). 하나의 항체는 또한 드루젠 내의 하위구조 성분을 표지화시켰다 (도 1A 및 1B). 이러한 구조는 또한 HF1에 결합하는 활성화된 보체 성분 C3b/iC3b에 대한 항체를 이용하여 표지화된다 (Anderson et al., 2004; Johnson et al., 2001). 인자 H 면역반응성은 연령에 의해 짹지어진 대조군에 비해 AMD를 지닌 공여자에서 더욱 강하였고; 이는 또한 말초에서 보다 AMD 공여자의 황반에서 더욱 명백하였다 (도 1G 및 1H). 황반에서의 항-HF1 패턴 (도 1G)은 둘 모두의 환자에서 항-C5b-9 패턴에 대해 더욱 유사하였고 (도 1I 및 1K), 표지는 통상적으로 맥락막 모세혈관을 포함하였다. 황반외 위치는 보다 적은 항-C5b-9 면역반응성을 나타내었다 (도 1J). RPE-맥락막에서의 적은 또는 전무한 C5b-9 면역반응성이 50세 이하의 연령의 AMD를 지니지 않은 공여자에서 관찰되었다 (도 1L).

- [0403] (G-H) 황반에서의 HF1의 면역국소화. G) 광범위한 표지가 AMD를 지닌 공여자에서의 BM, 맥락막 모세혈관벽, 및 모세혈관간 기둥 (화살표)에 따라 존재하였다. H) AMD를 지니지 않은 공여자의 황반으로부터의 대조군 절단면; 훨씬 적은 표지가 동일한 구조에서 명백하였다. 확대 막대 = 20 μ m.
- [0404] (I-J) 동일한 AMD 공여자 안구로부터의 맥락막 (도 1I) 및 맥락막외 (도 1J) 밑에 존재하는 RPE-맥락막에서의 보체 막 공격 복합체 (C5b-9)의 면역조직화학 국소화. 맥락막에서, 강한 항-C5b-9 표지는 드루젠, 브루크막, 및 맥락막 모세혈관 내피와 관련이 있다. 맥락막 외부의 항-C5b-9 표지는 브루크막 근처의 협소한 구역에 제한된다. RPE 세포질 및 맥락막 내의 갈색 색소는 멜라닌 색소 침착이다. 확대 막대 = 20 μ m.
- [0405] (K-L) AMD를 지니는 공여자 (도 1K) 및 AMD를 지니지 않는 이차 공여자 (도 1L)로부터의 맥락막 내의 C5b-9의 면역조직화학 위치. RPE 세포질 및 맥락막 내의 갈색 색소 침착은 멜라닌이다. 항-C5b-9 표지는 맥락막 모세혈관벽 (검정색 화살표) 및 모세혈관간 기둥 (백색 화살표)과 주로 관련이 있다. 표지는 AMD 안구에서 훨씬 더 강하였다. 도 G에 나타낸 바와 같이 동일한 공여자로부터의 황반에서의 항-HF1 표지 패턴과의 강한 유사성에 주목해야 한다. 확대 막대. K = 15 μ m; L = 20 μ m.
- [0406] 망막 색소 내피는 인자 H의 국소적 궁극원이다.
- [0407] RPE, RPE/맥락막 및 망막에서의 HF1 및 FHL1의 발현을 RT-PCR 및 DNA 마이크로어레이 분석으로 측정하였다. 둘 모두의 유전자 생성물에 대해 적절한 크기의 PCR 생성물이 새로이 분리된 RPE 및 RPE/맥락막 복합체에 존재하였으나, AMD를 지니거나 지니지 않는 공여자로부터 유래된 인간 안구의 감각신경 망막에는 존재하지 않았다 (도 2). HF1 코딩 서열의 엑손 8, 9, 10A (절단된 이소형 FHL1을 생성시키는데 사용되는 엑손) 및 10 내에서 프라이머를 선택하였다. PCR 반응을 AMD의 임상적으로 문서화된 병력을 지닌 공여자로부터 유래된 인간 감각신경 망막 (레인 2), RPE 및 맥락막 (레인 3), 및 새로이 분리된 RPE 세포 (레인 4)로부터 추출된 RNA로부터 제조된 cDNA를 이용하여 수행하였다. 증폭을 위해 주형으로 유전체 DNA를 사용하였다 (레인 5); 레인 6에 도시된 혼합물에는 주형을 추가하지 않았다. 레인 1은 100 bp 래더를 함유하였다. HF1의 엑손 8에서 엑손 10 (좌측 패널), 및 엑손 9에서 엑손 10 (우측 패널), 및 FHL1의 엑손 8에서 엑손 10A (좌측 패널), 및 엑손 8에서 엑손 10A (우측 패널)의 앰플리며 스파닝은 예상 크기였다 (각각 376, 210, 424 및 248 bp). FHR 1-5에 대한 전사체는 RPE 또는 RPE/맥락막에서 검출되지 않았으나, FHR 1-4는 RT-PCR에 의해 감각신경 망막에서 검출되었다 (데이터는 나타내지 않음).
- [0408] 세개의 플랫폼으로부터 유래된 유전자 빌현 어레이 데이터는 HF1 및 FHL1 전사체, 그러나 임의의 HF1 관련 단백질 전사체가 존재하는 경우 소수 (FHR1은 제외될 수 있음)가 RPE 및 맥락막 세포에 의해 국소적으로 빌현된다는 것을 증명한다. AMD를 지니는 9명의 공여자 및 3명의 연령에 의해 짹지어진 대조군으로부터 유래된 RPE/맥락막 cDNA로 프로빙된 인사이트 (Incyte) 어레이로부터 유래된 데이터는 AMD를 지닌 공여자에서의 HF1 mRNA의 수준의 평균 2-3배의 상승된 수준을 나타내었다. 황반외 영역에 비해 황반 영역에서 약간 높은 수준으로 존재하는 경향이 있으나, 그 차이는 통계적으로 유의하지는 않았다. 어피메트릭스 어레이를 이용하여 AMD를 지니는 2명의 공여자 및 연령에 의해 짹지어진 2명의 대조군 공여자로부터 단리된 RPE 및 인접 RPE/맥락막 제조물의 검사로부터 생성된 데이터는 상기 조직에서의 HF1 전사체의 존재를 증명하고, HF1 메세지의 유의한 비율이 RPE 층 내에 존재한다는 것을 나타낸다 (데이터는 나타내지 않음).
- [0409] HF1의 변이는 AMD 및 MPGN II와 관련이 있다.

- [0410] *HF1* 유전자의 대립 유전자 변이가 AMD와 관련이 있는지의 여부를 시험하기 위해, 아이오와 대학에서 404명의 AMD 환자 및 131명의 짹지어진 대조군의 코호트에서 모든 22개의 코딩 엑손 및 50-100bp의 플랭킹 (flanking) 인트론 서열을 스크리닝하였다. 5개의 동일 (synonymous) 치환 및 12개의 비-동일 치환을 포함하는 코딩 영역에서의 17개의 SNP (cSNP), 및 9개인 인트론 SNP의 전체 26개의 서열 변이가 검출되었다 (변이체중 일부는 도 3에 도시되어 있음). 도 3은 분석에 사용된 11개의 SNP, 20개의 짧은 공통 반복 (SCR), 및 연관 불균형 (LD) 블록의 대략의 위치를 도시하고 있고, 병원체 및 기타 기질에 대한 대략의 결합 부위가 이전에 공개된 데이터 (Zipfel et al, 2002; Rodriguez de Cordoba et al, 2004)를 기초로 하여 도표 아래에 도시되어 있다. cSNP는 이전에 기술된 공통 비-동일 변이체, 예를 들어 엑손 2의 I62V, 엑손 9의 Y402H, 및 엑손 18의 D936E을 포함하였다 (도 3). 잠재적으로 가능적인 효과를 지니는 공통 인트론 SNP의 예는 IVS2-18insTT 변이체이다. 5개의 희귀 (<0.5%) 변이체가 또한 AMD 환자 및 대조군 둘 모두에서 검출되었고 (데이터는 나타내지 않음), 이는 질병 표현형이 희귀 *HF1* 대립유전자에 의해 야기 (즉, 질병 야기 돌연변이)되는 가능성을 배제한다. 404명의 환자 및 13명의 대조군중 일부 또는 전부에서 6 SNP에 대해 상세한 유전형 데이터를 입수하고 (표 4 및 6A-6C), 환자-대조군 연구 계획을 이용하여 연관 분석을 수행하였다. I62V ($\chi^2=15.0$, $P=1.1 \times 10^{-4}$) 및 Y402H ($\chi^2=49.4$, $p=2.1 \times 10^{-12}$)을 포함하는 여러 개별적 변이체에서 매우 유의한 연관성이 발견되었다. 이러한 코호트에서 AMD과의 가장 강한 연관성이 엑손 10의 동일 A473A 변이에서 관찰되었고, 이는 3.42의 교차비 (OR)를 생성시켰다 (95% 신뢰 구간 (CI) [2.27-5.15]).
- [0411] 이들 결과는 콜럼비아 대학 (Columbia University, New York)에서 수득된 AMD 환자 (n=550) 및 짹지어진 대조군 (n=275)의 독립 코호트에서 확증되었다 (표 4). 동일한 2개의 비-동일 SNP가 또한 이러한 두번째 코호트에서 AMD와 매우 관련이 있었다 (I62V; $\chi^2=36.1$, $p=3.2 \times 10^{-7}$ 및 Y402H; $\chi^2=54.4$, $p=1.6 \times 10^{-13}$). 또한, 여러 다른 인트론 SNP가 시판되는 분석법의 빈도 및 이용가능성에 기초하여 선택되었다 (전체 11개의 SNP). 이러한 코호트에서의 가장 강한 연관성은 인트론 10의 SNP rs203674에서 관찰되었다 ($\chi^2=66.1$, $p=4.29 \times 10^{-16}$). 이러한 변이체는 AMD와의 2.44의 OR을 나타내었다 (95% CI=1.97-3.03). OR은 적당하였으나, 변이체는 매우 공통적이었다; 환자의 30.5%가 대립유전자 B에 대해 동형접합이었으나, 대조군은 12.9% 만이 동형접합이었다. 엑손 13 및 18의 Q672Q 및 D936E 대립유전자는 통계적으로 유의한 연관성을 나타내지 않았고, 이는 병원체 및 기질 분자 인지와 관련된 도메인 (도 3, 또한 하기 참조)을 포함하는 *HF1*의 N-말단 절반에서의 변이가 AMD와 관련되는 것을 암시한다. 두개의 세트의 데이터는 현저하게 유사하였고, 유전자형 조사된 SNP는 매우 유의한 방식으로 AMD와 연관될 뿐만 아니라, 관련의 빈도 및 범위는 두개의 코호트에서 매우 유사하였다 (표 4 및 6).
- [0412] 전체 AMD 환자 코호트가 대조군과 비교되는 경우 관련성이 매우 유의할 만하다 (표 4). AMD의 주요 하위-표현형(sub-phenotype), 예를 들어 초기 AMD (eAMD, 황반 드루젠(drusen) 및/또는 색소 비정상을 특징으로 함), CNV (신생혈관막 및/또는 원반형 자국), 및 GA (지도형 위축)이 개별적으로 분석되는 경우, 관련성은 eAMD 및 CNV의 경우 특히 두드러진다. GA 군은 일부 경우에서 전반적 경향으로부터의 약간의 편차를 나타내는데, 특히 엑손 13 (Q672Q) 및 18 (D936E) 대립유전자에 의해 규정되는 일배체형의 경우에 그러하다 (데이터는 제시되지 않음). 이러한 편차는 다양한 병인의 견지에서 유의할 만할 수 있지만, 통계적 유의성에는 미치지 못하는데, 이는 거의 확실하게는 GA를 지닌 환자의 수가 비교적 적기 때문이다.
- [0413] 연관 불균형 (LD) 분석은 전체 *HF1* 유전자에 걸친 광범위한 LD를 나타내었다 (표 2 및 도 3). 엑손 2-3 내의 3개의 SNP는 엑손 7 및 9 내의 A307A 및 Y402H 변이체, 및 엑손 13 및 18 내의 Q672Q 및 D936E 변이체와 같이 실질적으로 완전한 LD 상태로 존재한다 (표 6 및 도 5). 환자 및 대조군에서의 일배체형 평가는 대조군의 단지 26%에 대해 환자의 49%에서 가장 빈번한 위험 일배체형을 확인해주었다 (OR=2.93 95%CI [2.29-3.74]). 이러한 일배체형에 대한 동형접합체는 콜롬비아 환자의 22.1% 및 대조군의 5.1%에 존재한다 (OR=5.26, 95% CI [2.84-9.76]). 2개의 통상적인 보호 일배체형은 대조군의 30% 및 환자의 18%에서 발견된다 (OR=0.476 95%CI [0.349-0.650] 및 OR=0.472, 95%CI [0.320-0.698]). 이러한 일배체형은 엑손 2-3 유전자와 SNP 및 인트론 10 SNP에서만 상이하다. 도 4 및 표 2에 제시된 바와 같이, 이러한 보호 일배체형은 서로 밀접하게 관련되어 있고, 둘 모두 위험 일배체형으로부터 5 단계 이상 떨어져 있다. 흥미롭게도, HUS와 관련된 것으로 이미 밝혀진 3개의 SNP (프로모터 -257C>T, A473A 및 D936E) 모두는 AMD 위험에 대해 중성인 하나의 비교적 통상적인 일배체형상에 존재한다 (하기 검토 참조). 각각의 SNP에 대해, 본 발명자들은 공통(consensus) 침팬지 계놈에 존재하는 염기를 확인하였다. 발생된 일배체형은 가능한 인간 조상 일배체형을 나타내고, 보호 일배체형과 밀접하게 관련된다 (데이터는 제시되지 않음).
- [0414] SNP IVS2-18insTT 및 Y402H가 또한 20명의 무관한 MPGNII 환자, 52명의 라파누이(Rapanui) 원주민 및 소수 코

호트의 라틴계 미국인, 아프리카계 미국인 및 유럽계 미국인에서 유전형분석되었다 (표 7). 위험 일배체형의 빈도는 Y402H 변이체 및/또는 IVS10 유전자좌의 유전형과 상이한 집단으로부터의 샘플에서 평가되었다. 이들로는 65세가 넘는 라파누이 원주민 (이러한 이스터(Easter) 섬 집단에서는 AMD가 극히 드물고, 거의 확실하게는 없음), 콜롬비아 대학으로부터의 대조군 (65세 초과), 라틴계 일반 집단, 아이오와 대학으로부터의 대조군 (65세 초과), 아프리카계 미국인 일반 집단, 콜롬비아 대학으로부터의 AMD 환자, 유럽계 미국인 일반 집단, 아이오와 대학으로부터의 AMD 환자 및 MPGNII를 지닌 개인들이 있다. N = 개인들의 명수이다. MPGNII 코호트의 경우, 위험 일배체형의 빈도는 약 70%이다. 또한, 위험 일배체형은 AMD 발병률이 낮은 그룹인 라틴계 미국인 및 아프리카계 미국인 (35-45%)에서 빈도가 낮은 것으로 여겨진다. 그러나, 이러한 집단에서 유형이 분석된 샘플의 수는 적다. 이스터 섬의 라파누이 집단은 현저하게 낮은 수준의 AMD를 지녔다. 65세가 넘는 52명의 AMD가 없는 라파누이 원주민의 분석으로부터, 본 발명자들은 위험 일배체형의 빈도가 단지 19%인 것으로 평가한다.

- [0415] 검토
- [0416] 인자 H 다형성 및 AMD
- [0417] 본원에 제시된 데이터는 2개의 독립적인 코호트에서의 AMD 환자의 주요 비율을 보체 조절 유전자인 인자 H의 특정 다형성 (*HF1/CFH*)에 결부시킨다 (Zipfel, 2001; Rodriguez de Cordoba et al., 2004). 일배체형 분석은 가장 빈번한 위험 일배체형이, 대조군의 약 25%에 비해 AMD를 지닌 개인들의 거의 절반에 존재함을 나타낸다. SNP 관련성의 빈도 및 정도는 2개의 코호트에서 매우 유사하며, 유전형분석된 SNP는 각각의 경우 AMD와 매우 유의할 만한 관련성을 나타낸다. 관련성은 초기 AMD 또는 맥락막 혈관신생의 환자에서 특히 두드러지는데, 지도형 위축의 경우에는 덜 그러하다. 특정 *HF1* 일배체형과 AMD의 관찰된 관련성의 크기는 AMD에 이미 결부된 유전자 비정상과 비교해 볼 때 현저하다.
- [0418] 특정 *HF1* 일배체형이 AMD 질병 표현형에 대해 증가된 위험을 부여한다는 결론의 추가적 지지자료는, 환자들이 초기 개시 횡반 드루젠을 일으키는 *HF1* 돌연변이와 관련된 신장 질환인 MPGNII를 지닌 무관한 환자 20명, 및 존재하는 경우 현저하게 낮은 AMD 발병률을 나타내는 종족인 라파누이 원주민 52명에서 SNP IVS2-18insTT 및 Y402H를 유전형분석함으로써 수득되었다. MPGN II 환자의 약 70% 및 라파누이 원주민의 19%가 본 연구에서 *HF1* 위험 일배체형을 함유하는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 확인하기 위해서는 보다 큰 샘플 세트의 분석이 필요하지만, 데이터는 *HF1*의 AMD와의 관련성이 유럽계 집단에 국한되지 않을 수 있다는 것을 사실상 시사한다. 본 발명자들이 또한 확인한 보호 일배체형은 AMD의 근저에 있는 발병 기전에서의 *HF1* 기능을 추가로 암시한다.
- [0419] 인자 H 다형성의 기능적 관련
- [0420] 인간에서 인자 H 결핍은 MPGN II 및 비정형 용혈성 요독 증후군 (aHUS)과 관련이 있다 (Zipfel et al., 2001). *HF1* 결핍은 세포질 세망에서 단백질을 보유시키는 아미노산 치환 또는 단백질 절단을 초래하는 돌연변이로부터 발생한다. 계속해서 혈장 *HF1* 수준이 감소되고, 이는 C3 및 다른 보체 성분의 소비를 동반하는 또 다른 보체 경로의 조절되지 않은 활성화를 초래한다. 대조적으로 aHUS를 초래하는 *HF1* 돌연변이는, 세포 표면에서 *FH1*의 보체-억제 기능을 제한하는 전형적으로 미스센스(missense) 돌연변이이다. 최근 연구는 *FH1* 돌연변이를 지니거나 지니지 않는 개인 둘 모두에서 3개의 통상적인 SNP 및 aHUS 사이의 관련성을 밝혀내었다 (Caprioli et al., 2003). 또한, 감염과 같은 손상이 aHUS의 징후를 촉발시키는 것으로 입증되었다.
- [0421] 대부분의 유전형분석된 *HF1*의 SNP는 엔코딩된 단백질의 중요한 기능적 도메인내에 위치하는데 (도 3), 이는 60개 아미노산으로 된 20개의 짧은 공통 반복체 (SCR)로 구성된다. SCR은 C3b (SCR1-4, SCR12-14 및 SCR19-20), 헤파린, 시알산 (SCR7, SCR13 및 SCR19-20) 및 C-반응성 단백질 (CRP) (SCR7)에 대한 결합 부위를 함유한다. 따라서, 기능적 도메인내에 위치한 SNP는 통상적이라 하더라도 아마도 발현 수준의 가변성, 결합 효율 및 다른 분자 특성을 통해 단백질 기능에 영향을 미칠 것이다. 예를 들어, 엑손 2 I62V 변이체는 SCR2에 위치하는데, 이는 최초의 C3b 결합 부위에 포함되어 있고, 엑손 9 Y402H 변이체는 SCR7 도메인내에 위치하는데, 이는 헤파린 및 CRP 둘 모두와 결합한다. IVS2-18insTT 변이체와 같은 인트론 SNP는 스플라이싱에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, TT 삽입의 효과의 분석 (참조 웹 사이트: <https://splice.cmh.edu/server>)은 천연 수용체 부위의 6bp 업스트림에서 새로운 숨은 스플라이스 억셉터가 생성됨을 시사하였다 (데이터는 제시되지 않음). 연구된 SNP의 일부가 *HF1* 이소형의 발현에 영향을 미치는 것이 또한 가능하다. 예를 들어, I62V는 추정된 엑손 스플라이스 인핸서에 존재한다 (Wang et al., 2004) (데이터는 제시되지 않음).
- [0422] 통상적인 SNP의 기능적 결과는 적당할 수 있는데, 이는 이러한 SNP가 후기-개시 표현형에 관련되고, (엄격한) 진화 제약을 받지 않기 때문이다. 보다 실질적인 효과, 즉, 질병 유발 돌연변이를 지닌 *HF1* 변이체는 초기-개

시 중증 (퇴행) 질병, 예를 들어 *HF1* 결핍 및 aHUS에 관련된다 (Zipfel et al., 2002; Rodriguez de Cordoba et al., 2004; Caprioli et al., 2003; Zipfel, 2001). 관심을 끄는 것은 실제의 질병 유발 돌연변이가 *HF1* 유전자의 완전한 스크리닝 후에 HUS 환자의 단지 약 25% 내지 35%에서 확인되었다는 사실이다 (Caprioli et al., 2003). 동시에, 변이체 -257C>T (프로모터), A473A (액손 13) 및 D936E (액손 18)에 의해 규정된 질병-관련 일배체형이 HUS 환자에서 확인되었는데, 주로 질병 유발 돌연변이가 없는 사람에서 확인되었다 (Caprioli et al., 2003). 더욱이, 동일한 연구는 영향을 받은 프로랜드(proband)가 하나의 모체(parent)로부터의 돌연변이된 대립유전자 및 또 다른 모체로부터의 감수성 대립유전자를 유전시킨 수 개의 일족(family)을 확인하였다. 대조적으로, 질병-유발 돌연변이의 보인자인 영향을 받은 프로랜드의 건강한 동기(sibling)들은 보호 대립유전자를 유전시켰다. 이러한 일족으로부터의 영향을 받은 개인에서, 환자의 60% 초과에서의 세균 또는 바이러스 감염으로서 특정되는 질병-촉발 효과는 모든 환자의 80% 초과 및 명백한 질병-관련 돌연변이가 없는 환자의 90% 초과에서 확인되었다 (Caprioli et al., 2003).

[0423] 종합해 보면, 이러한 데이터는 감염성 촉발 사건과 결부된 위험 *HF1* 일배체형이 질병 정후를 위해 충분하다는 것을 강력하게 시시한다. 흥미롭게도, HUS에서의 위험 *HF1* 일배체형 (주로 C-말단)은 AMD 및/또는 MPGNII에서의 위험 *HF1* 일배체형과 중복되지 않는다는 (표 2), 이는 MPGNII 및 AMD와 대조되는 HUS에서의 상이한 촉발작용을 시사한다. HUS에서가 아닌 MPGNII에서의 초기-개시 드루젠의 관찰 및 AMD에서의 동일한 구성의 관찰은 이러한 질병에 대한 상이한 병인을 뒷받침해준다.

[0424] *HF1*에서의 질병 유발 돌연변이는 MPGN II에서 드물고, AMD에서 보고된 바가 없고, 본 발명자들도 본 연구에서의 광범위한 스크리닝 후에 발견하지 못했다. 그러나, 본 발명자들은 MPGN II를 지닌 환자의 70% 및 AMD를 지닌 환자의 약 50%의 빈도에서 동일한 위험 일배체형을 관찰하였다. 이러한 데이터는, 감염제에 의해 촉발된 경우 질병에 대한 감수성을 상당히 증가시키는 위험 *HF1* 일배체형과 일치한다. 이들 인자의 병합된 효과는 AMD에서 MPGN II에 이르는 생성된 표현형의 중증도를 결정해준다.

[0425] *HF1* 일배체형의 진화적 분석은 위험 일배체형이 침팬지에서 발견되는 조상(ancestral) 일배체형으로부터 유의할 만하게 진화하였음을 나타낸다. 도 4는 일배체형 및 원의 크기 사이의 관계가 일배체형의 빈도에 비례함을 보여주는 *HF1* SNP의 일배체형 망상조직 도해를 도시한다. 커다란 흑색 원은 주요 위험 일배체형을 나타내고, 수직선이 그어진 원은 2개의 유의할 만한 보호 일배체형이고, 커다란 비어있는 원은 AMD 위험에 대해 중성인 비정형 용혈성 요독 증후군 (aHUS)과 관련된 3개의 SNP를 함유하는 일배체형이다. 추정 조상 일배체형이 또한 표시되어 있다. 다양한 형태의 *HF1* 유전자가 또 다른 보체 경로를 활성화시키는 병원체에 반응하여 나타나는 것이 가능하다. 약하게 작용하는 *HF1* 일배체형은 세균 감염에 대해 보다 강력한 보호 및 감소된 보체 억제를 제공할 수 있다. 그러나, 이러한 약한 대립유전자는 개인들을 보체 시스템 기능장애의 결과에 영향받기 쉽게 하는 결과를 나타낼 수 있다. AMD 위험 일배체형이 전장 *HF1* 및 *FHL1* 단백질 둘 모두를 생성시키는 유전자의 5' 단부에서 주로 상이하다는 것이 관심을 끈다. 대조적으로, HUS 돌연변이는 *HF1*에서만 발견되는 유전자의 3' 부분에서 클러스터(cluster)를 이룬다. 따라서, 질병에서 이러한 두 가지 형태의 단백질의 역할을 결정하는 것이 중요할 것이다.

[0426] AMD에서 인자 H 기능장애의 생물학적 모형

[0427] 보체 시스템의 1차적 기능 중 하나는 이러한 감염제에 대해 방어를 제공하는 것이다. 이는 미생물의 읍소닌화 및 용해, 외래 입자의 제거, 염증 세포의 보충, 항체 생성의 조절, 및 면역 복합체의 제거를 매개한다 (Morgan et al., 1991; Kinoshita, 1991). 시스템의 활성화는 활성화 표면의 변형, 염증 세포를 자극하는 가용성 아나필락시스독소의 방출, 및 궁극적으로 경막 포어의 형성을 통해 세포 용해를 촉진하는 거대분자 복합체인 막 공격 복합체 (MAC)의 형성을 초래하는 순차적인 증폭성 단백분해 케스케이드를 촉발시킨다. 보체의 조절되지 않은 활성화는 숙주 세포 및 조직에 대한 방관자 상해 (bystander damage)를 초래할 수 있다. 결과적으로, *HF1* 뿐만 아니라 다른 순환성 막-결합된 단백질도 시스템을 조절하도록 진화해 왔다 (Morgan, 1999).

[0428] 보체 성분의 스펙트럼은 브루치(Bruch) 막을 따라 드루젠 (및/또는 이들을 플랭킹하거나 이들 상에 위치하는 RPE 세포)내에서 및/또는 맥락막 내피 세포막상에서 확인되었다 (Hageman et al., 2001; Mullins et al., 2000; Mullins et al., 2001; Anderson et al., 2002; Johnson, et al., 2000; Johnson et al., 2001; Crabb et al., 2002; Johnson et al., 2002; Mullins et al., 1997). 이들로는 말단 경로 보체 성분, 말단 경로의 활성화-특이적 단편 뿐만 아니라 다양한 보체 조절인자가 있다. 세포 매개성 사건이 이러한 작용에 또한 기여할 수 있다는 증거가 있다 (Penfold et al., 2001; Seddon et al., 2004; Miller et al., 2004).

[0429] 본 발명자들은 *HF1*이 AMD의 이전 병력을 지닌 인간 공여자에서 드루젠의 구성요소임을 제시한다. 다음으로, 본

발명자들은 HF1이 드루젠페인의 아밀로이드 함유 부분구조 요소에서 이의 리간드 C3b와 공동-국제화됨을 제시하며, 이는 추가로 이를 구조를 후보 보체 활성화인자로서 암시한다 (Anderson et al., 2004; Johnson et al., 2002). 또한, 본 발명자들은 C5b-9 면역반응성에 의해 제시된 바와 같이 HF1 및 MAC가 RPE-맥락막 계면에 공동-분포되어 있고, 이러한 침착물이 AMD의 이전 병력을 지닌 공여자로부터의 눈에서 더욱 강함을 입증하였다. 마지막으로, HF1 및 C5b-9 면역반응성은 동일한 눈으로부터의 보다 주변인 위치와 비교하여 황반에서 더욱 강렬하다. 이러한 모든 결과는 AMD 병상이 주로 황반에서 나타난다는 사실과 일치하고, 브루치 막의 수준에서 보체 활성화가 드루젠페인 형성 작용에서 핵심 요소일 뿐만 아니라 AMD 발병에서 기여 인자라는 결론을 내리게 한다 (Hageman et al., 2001; Anderson et al., 2002).

[0430] RPE-맥락막 계면에서 HF1의 분포는 C5b-9의 분포와 매우 유사한데, 이는 상당량의 MAC가 RPE-맥락막 계면에서 생성되고 침착됨을 암시한다. 이는 위험 HF1 일배체형(들)과 관련된 단백질이 정상적인 능력의 감소를 겪어서 보체 활성화를 약화시킬 수 있음을 시사한다. 따라서, AMD와 관련된 HF1 변이체는 RPE 및 맥락막 세포를 또 다른 경로-매개된 보체 공격, 드루젠페인 형성 및 후기-단계 신생혈관 AMD와 관련된 브루치 막 온전성의 파괴에 대해 지속적 위험 상태에 있게 한다. 브루치 막이 다른 곳에서 보다 황반에서 현저하게 얇기 때문에 (Chong et al., 2005), 이는 후속 신생혈관 침습에 더욱 민감할 수 있다. 브루치 막이 주변부에서 보다 황반에서 현저하게 얇기 때문에, 이것이 신생혈관 침습에 민감해지는 정도까지 분해될 것으로 여겨질 수 있다.

[0431] 요약하면, 이러한 조사의 결과는 HF1에서의 통상적인 일배체형이 개인들로 하여금 AMD에 걸리기 쉽게 한다는 강력한 증거를 제공한다. 본 발명자들은 보체 케스케이드의 또 다른 경로를 조절하는 유전자의 변화가 시스템을 활성화시키는 사건과 함께 인간 집단에서 대부분의 AMD의 기초를 이루고 있음을 제안한다.

[0432] 실시예 2

[0433] 보체 조절 유전자 인자 H (*CFH*) 및 인자 H 관련 5 (*CFHR5*)의 변화는 막증식성 사구체신염 타입 2 (고밀도 침착병)과 관련된다

[0434] 도입

[0435] 막증식성 사구체신염은 소아 및 성인에서 신(nephrotic) 증후군의 원발성 신장 원인의 각각 4% 및 7%를 차지하는 다양하고 종종 모호한 병인을 지닌 질병이다 (Orth et al., 1998). 신장 면역병리학 및 미세구조 연구를 기초로 하여, 3가지 하위유형(subtype)이 인식되어 있다. 막증식성 사구체신염 (MPGN) 유형 I 및 III은 면역복합체 매개된 질병의 변이형이고; 대조적으로 MPGNII는 면역복합체와의 관련성이 알려져 있지 않다 (Appel et al., 2005).

[0436] MPGNII는 소아에서 MPGN의 환자의 20% 미만을 차지하고, 성인 환자의 단지 소수 비율을 차지한다 (Orth et al., 1998; Habib et al., 1975; Habib et al., 1987). 남녀 모두 동일하게 영향을 받으며, 진단은 보통 혈뇨, 단백뇨, 급성 신염 증후군 또는 신 증후군과 같은 비특이적 결과를 나타내는 5세 내지 15세의 소아에서 이루어진다 (Appel et al., 2005). MPGNII를 지닌 환자의 80% 이상이 또한 보체 케스케이드의 또 다른 경로의 전환효소인 C3bBb에 대해 유도된 자가항체인 혈청 C3 신염 인자 (C3NeF)에 대해 포지티브하다 (Schwartz et al., 2001). C3NeF는 MPGN 유형 I 및 III을 지닌 사람의 1/2 이하 및 또한 건강한 개인에서 발견되고, 이는 사구체기저막 (GBM)에서의 고밀도 침착물의 전자 현미경적 증명이 MPGN II의 명확한 진단을 위해 필요하게 한다 (Appel et al., 2005). 이러한 형태학적 특성은 MPGN II의 특징이어서 질병은 더욱 정확하게는 고밀도 침착병 (MPGNII/DDD)로서 일컬어진다 (도 12).

[0437] MPGNII/DDD의 자연적 완화는 보기 드물다 (Habib et al., 1975; Habib et al., 1987; Cameron et al., 1983; Barbiano di Belgiojoso et al., 1977). 보다 통상적인 결과는 신장 기능의 만성 악화이며, 이는 진단 10년내에 환자의 약 절반에서 말기 신장병 (ESRD)을 초래한다 (Barbiano di Belgiojoso et al., 1977; Swanson et al., 1983). 일부 환자에서, 단백뇨의 빠른 변동이 명백한 촉발 사건의 부재하에서 급성 신장 악화의 에피소드와 함께 나타났고; 다른 환자에서는 지속적인 단백뇨에도 불구하고 질병이 수 년간 안정하였다.

[0438] C3NeF는 MPGNII/DDD를 지닌 환자의 50% 이상에서 질병 경과 내내 지속된다 (Schwartz et al., 2001). 이의 존재는 전형적으로 보체 활성화의 증거, 예를 들어 CH50의 감소, C3의 감소, C3dg/C3d의 증가 및 보체 케스케이드의 또 다른 경로의 지속적으로 높은 활성화 수준과 관련된다. 혈청에서 가장 풍부한 (~1.2 mg/ml) 보체 단백질인 C3는 정상적으로는 틱-오버(tick-over)로서 공지된 작용에서 이의 티오에스테르의 가수분해에 의한 저수준의 연속 자가활성화를 겪는다. C3 가수분해는 커다란 형태적 단백질 변화를 유도하며, 이는 C3의 분해 생성물인 C3b와 유사한 C3(H₂O)를 생성시킨다. C3(H₂O)는 인자 B와 결합하여 C3(H₂O)Bb를 형성시키고, 이는 C3를 소비하

고 C3bBb²를 생성시키는 증폭 루프에서 C3를 C3b로 분해시킨다 (도 13).

- [0439] MPGNII/DDD에서, C3NeF는 C3bBb (또는 조립된 전환효소)에 결합하여 이러한 효소의 반감기를 연장시키며, 이는 정상적인 조절 기전을 압도하여 C3bBb 및 보체 활성화의 수준을 조절하는 C3 소비를 지속시킨다 (Appel et al., 2005). 정상적인 조절은 7개 이상의 단백질을 포함하며, 이들 중 4개는 혈청에 존재하고 (보체 인자 H (CFH), 보체 인자 H-유사 단백질 1 (CFHL1), 보체 인자 I (CFI) 및 C4 결합 단백질 (C4BP)), 3개는 세포막-결합되어 있다 (막 보조인자 단백질 (MCP, CD46), 봉과 가속 인자 (DAF, CD55) 및 보체 수용체 1 (CR1, CD35)) (Appel et al., 2005; Meri et al., 1994; Pascual et al., 1994).
- [0440] MPGNII/DDD에 특히 관련이 있는 것은 인자 H 족의 7개 단백질 중의 하나인 인자 H이다. 돼지 및 마우스에서, 이의 결핍은 광 및 전자 현미경 수준에서 MPGNII/DDD와 유사한 신장 질환의 발병과 관련되고, 인간에서 이의 결핍 뿐만 아니라 인자 H 유전자의 돌연변이가 MPGNII/DDD를 지닌 환자에서 보고되었다 (Meri et al., 1994; Dragen-Durey et al., 2004; Zipfel et al., 2005) (도 14).
- [0441] 인자 H 족의 다른 6개 일원은 인자 H의 스플라이스 이소형인 FHL1 및 별개의 유전자에 의해 엔코딩되는 5개의 CFH-관련 단백질 (CFHR1-5)을 포함한다. 후자의 5개 단백질에 대해서는 거의 알려진 바가 없지만, 이들 단백질은 사실상 인자 H와 다양한 정도의 구조적 유사성을 나타낸다 (Appel et al., 2005). MPGNII/DDD와 관련하여 이러한 군에서 가장 관심을 끄는 것은 CFHR5인데, 이는 인자 H와 최대 유사성을 나타내며 다른 사구체신염 유형을 지닌 환자의 신장 생검에서 입증되었다 (Appel et al., 2005; Murphy et al., 2002). 또한, 시험관내 연구 결과, V가 보체 공격에 노출된 표면상에 존재하는 것으로 밝혀졌는데, 이는 보체 케스케이드의 가능한 역할을 시사한다 (Murphy et al., 2002).
- [0442] 인자 H/CFHR5 및 MPGNII/DDD 사이의 가능한 관계가 MPGNII/DDD를 지닌 환자가 드루젠이라 일컬어지는 안구 (ocular) 표현형을 발생시킨다는 결과에 의해 추가로 강화된다. 드루젠은 망막 색소 상피 아래의 안구 브루치막내에서 망막에서의 비정상적 세포외 침착물의 침착으로부터 일어난다. MPGNII/DDD의 드루젠은 장년층에서 시각 장애의 가장 통상적인 형태인 노화 관련 황반 변성 (AMD) (Klein et al., 2004; van Leeuwen et al., 2003)에서 형성되는 드루젠과 임상적으로 및 조성면에서 구별가능하지 않다 (Mullins et al., 2001; Anderson et al., 2002). 이러한 두 가지 유형의 드루젠을 구별짓는 하나의 특징은 개시 연령인데, MPGNII/DDD에서의 드루젠은 초기에, 종종 10대에서 발생하고, AMD에서의 드루젠은 장년층에서 발견된다.
- [0443] 4가지 최근 연구는 인자의 특정 대립유전자 변이체를 AMD와 관련시켰고, 이는 보체의 또 다른 경로의 인자 H 매개된 조절의 미세한 차이가 상당한 비율의 AMD 환자에서 역할을 할 수 있음을 시시한다 (Hageman et al., 2005; Edwards et al., 2005; Haines et al., 2005; Klein et al., 2005). 또한, 이들 연구 중 하나는 MPGNII/DDD 및 AMD 환자가 동일한 인자 H 위험 대립유전자 중 수 개를 분리시킴을 밝혀내었다 (Hageman et al., 2005). 이러한 연구에서, 본 발명자들은 인자 H 및 CFHR5의 대립유전자 변이와 MPGNII/DDD의 관련성을 정교하게 하고자 하였다.
- [0444] **재료 및 방법**
- [0445] 환자 및 대조군. 생검-증명된 MPGNII/DDD를 지닌 환자를 신장내과에서 확인하고, IRB-승인된 지침을 따르는 본 연구에 등록시켰다. 대조군은 안과적 조사에 의해 AMD를 배제시킨 인종적으로 합치되지만 연령적으로 합치되지 않는 무관한 사람들로부터 확인하였다.
- [0446] 돌연변이 스크리닝 및 분석. 인자 H 및 CFHR5의 코딩 및 인접 인트론 영역을 94°C 변성, 61°C 어닐링 및 70°C 신장에서 각각 30초의 35 사이클 동안 PCR 증폭시켰다. 인자 H 및 CFHR5 코딩 서열을 증폭시키기 위해 사용된 프라이머의 서열은 각각 표 10 및 11에 제시되어 있다. 생성물 생성을 아가로오스 겔 전기영동에 의해 확인한 후, 앰플리콘을 MPGNII/DDD를 지닌 환자에서 양방향으로 서열분석하였다. 데이터 마이닝(mining) (Ensemble database, dbSNP, Applied Biosystems)을 통해 확인된 모든 신규한 SNP 및 보고된 SNP를 변성 고성능 액체 크로마토그래피 (DHPCL)에 의해 대조 집단에서 유형분석하였다 (표 9 및 10). 요약하면, 각각의 앰플리콘의 DHPCL 분석을 3가지 상이한 온도에서 수행하였다. 앰플리콘을 웨이브메이커(Wavemaker) 소프트웨어를 이용하여 분석하여, 최적 온도, 수행 시간 및 아세토니트릴 구배를 평가하였다. 추정 온도에 +/- 2°C를 가감하여, 감도를 최적화하고, 신규 돌연변이가 검출될 가능성을 최대화하였다 (Prasad et al., 2004).
- [0447] 일배체형 분석. 일배체형의 분포를 지닌 블록 구조를 구성하는 것은 화이트헤드 인스티튜트 (Whitehead Institute)에서 개발된 공개적으로 이용가능한 소프트웨어 프로그램인 하플로뷰(Haplovie) (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haplovie/>)를 이용하여 완성하였다 (참조: Barrett et al.). 하나는 각각의

대조군의 성별 및 유전형으로 구성되고, 나머지 하나는 SNP 확인 및 염색체 위치를 포함하는 마커 정보를 설명하는 2개의 데이터세트를 엑셀 파일로 전환시키고, 이를 하플로뷰 프로그램으로 업-로딩시켰다. 출력은 연관 불균형 (LD) 플롯 및 교차율에 따른 상응하는 집단 빈도로 구성되었다.

[0448] 통계 분석. 독립성 카이제곱(chi-square) 검정을 이용하여 MPGNII/DDD를 지닌 환자와 대조군 사이의 SNP 빈도의 차이를 검출하였다. 0.05 이하의 P-값이 유의할 만한 것으로 간주되었다. 인자 H 및 CFHR5에 대한 LD 플롯은 대조 집단을 사용하여 생성시켰다.

[0449] 결과

[0450] 환자 및 대조군. 생검-증명된 MPGNII/DDD를 지닌 22명의 환자 및 AMD가 없는 131명의 사람이 본 연구에 참가하였다. 대조군의 평균 연령은 78.4세였는데, 이는 AMD를 배제시키기 위한 본 발명자들의 확인 기준을 반영한다.

[0451] 인자 H, CFHR5 및 MPGN II/DDD. MPGNII/DDD 환자군 및 대조 집단에서 유전형분석된 7개의 인자 H SNP 중 4개의 대립유전자 빈도는 $p<0.05$ 에서 MPGNII/DDD 질병 표현형과의 유의할 만한 관련성을 나타내었다. 이러한 SNP는 엑손 2 I62V, IVS 2-18insTT, 엑손 9 Y402H 및 엑손 10 A473A를 포함하였다. 엑손 7 A307A, 엑손 13 Q672Q 및 엑손 18 D936E에 대한 대립유전자 빈도는 군들 사이에서 유의할 만하게 차이가 있지 않았다 (표 11 내지 13).

[0452] 5개의 CFHR5 SNP를 MPGNII/DDD 환자군 및 대조 집단에서 유전형분석하였는데, 이를 SNP는 하나의 비-동의적 (non-synonymous) SNP (엑손 2 P46S), 2개의 프로모터 SNP (-249T>C, -20T>C) 및 2개의 인트론 SNP (IVS1+75T>A, IVS2+58C>T)를 포함하였다. 3개의 SNP, 즉, 엑손 2 P46S, -249T>C 및 -20T>C의 대립유전자 빈도는 $p<0.05$ 에서 군들 사이에서 유의할 만하게 차이가 있었다 (표 14 및 15).

[0453] 하플로블록. 일배체형 블록은 A307A 및 Y402H가 인자 H에서 연관 불균형 상태로 존재하고, -249T>C 및 -20T>C는 CFHR5에서 연관 불균형 상태로 존재한다 (도 15).

[0454] 검토

[0455] 보체의 또 다른 경로는 인간을 병원체로부터 보호하기 위한 정밀한 시스템을 나타낸다. 이의 중심 성분인 C3는 혈장에서 고농도로 순환하고, 체액 전체에 걸쳐 분포되어 있다 (Walport, 2001). 이의 활성화는 외래 표면에 상해를 입혀서 미생물을 제거하는 독성 국소 환경을 생성시킨다. 무제한적 보체 활성화를 방지하기 위해, 숙주 세포 및 조직 표면은 표면-결합된 및 막-결합된 보체 조절인자의 조합을 이용하여 중폭 루프를 하향조절한다. 일부 숙주 세포는 하나의 막-결합된 보체 조절인자를 높은 복사체수로 발현시키며, 다른 세포는 수 개의 막-결합된 조절인자를 발현시키고 또한 가용성 유체상 조절인자를 부착시킨다. 몇몇 조직은 막-결합된 조절인자가 없어서, 전적으로 가용성 조절인자의 부착에 의존한다 (Appel et al., 2005).

[0456] 신장에서 내피 세포 및 혈관사이 세포는 보체의 막-결합된 두 조절인자인 MCP 및 DAF를 발현시킨다 (van den Dobbelaer et al., 1994; Timmerman et al., 1996). 발세포는 MCP, DAF, CR1 및 CD59 4개를 발현시킨다. 혈관사이 세포 및 발세포 둘 모두는 보체 활성화 및 염증에 반응하여 막 신장병증에서 상향-조절되는 가용성 조절인자, 인자 H를 분비하기도 한다 (Angaku et al., 1998; Bao et al., 2002). 인자 H는 분비되는 혈관사이 세포 및 발세포에 직접 결합하여 자가분비 양상으로 작용한다.

[0457] 대조적으로 GBM은 독특하다. 이것은 이를 보체-매개된 손상으로부터 보호하는 내인성 막-결합된 조절인자가 결여되어 있으나, 이의 고도로 네거티브 하전된 표면은 인자 H와 결합하여 이를 흡수한다 (Zipfel et al., 2005). 국소 보체 조절에 있어서 인자 H에 대한 GBM의 의존성은 MPGNII/DDD를 지닌 소수의 사람의 인자 H에서의 병리적 돌연변이의 발견과 일관된다 (Ault et al., 1997; Draken-Durey et al., 2004).

[0458] MPGNII/DDD와 연관된 인자 H 및 CFHR5의 수 개의 대립유전자 변이를 동정한 본 발명자들의 데이터는 보체 조절이 상기 질병의 병인론에서 역할을 담당한다는 가설과 일관된다. 본 발명자들의 데이터와 보고된 AMD 데이터의 비교는 인자 H에서 본 발명자들이 관찰한 각각의 동정된 위험-상태 SNP 변이체에 대한 대립유전자 빈도가 AMP 환자 코호트에서 보다 MPGNII/DDD 환자 코호트에서 더 높았기 때문에 추가의 증거를 부가하고, 강력한 증거가 인자 H를 AMD에 관련시킨다 (Hageman et al., 2005; Edwards et al., 2005; Haines et al., 2005; Klein et al., 2005). 아미노산이 인자 H 영향력의 엑손 2 및 9에서 변화되는지는 공지되어 있지 않지만, 이러한 변화는 C3b 및 혜파린과 상호작용하는 도메인에서 발견되며, C3b/C3d 및 혜파린 결합에서의 차이는 또 다른 신장병인, 비정형 용혈 요독 증후군 (Manuelian et al., 2003)과 연관된 인자 H에서의 수 개의 아미노산 변화로 입증되었다 (표 12 및 13).

- [0459] 인자 H를 제외하고, H-관련 패밀리의 다른 막의 기능은 대개 알려져 있지 않고, 이들의 발현 패턴도 조사되지 않았으나, CFHR5의 연구는 이것이 헤파린, CRP 및 C3b 결합을 포함하여, 인자 H와 유사한 성질을 지님을 나타내었다 (Murphy et al., 2002)(도 14). 이러한 유사성은 유사 인자 H인 CFHR5가 MPGNII/DDD에서 역할을 담당함을 제안한다. MPGNII/DDD를 지닌 두 환자로부터의 신장 생검에서 CFHR5 발현에 대한 본 발명자들의 발견은 이와 일관된다 (데이터는 도시하지 않음).
- [0460] 본 발명자들의 유전형 데이터는 CFHR5의 일부 대립유전자 변이체가 MPGNII/DDD 질병 표현형과 우선적으로 연관됨을 나타낸다. 전사를 수행할 수 있는 CFHR5의 프로모터 영역에 두 SNP가 포함되며, 하나는 C/EBP베타에 대한 결합 부위를 제거함에 의한 것이고, 다른 하나는 GATA-1 결합 부위를 부가함에 의한 것이다. 다른 현저한 연합이 엑손 2에서 프롤린을 세린으로 변화시킨다. CFHR5의 엑손 1 및 2가 인자 H의 단기 컨센서스 반복 6 (SCR6)에 대해 상동인 도메인을 엔코딩하고, 이는 헤파린 및 CRP 결합에 필수적이므로, 상기 변화는 보체 활성화 및 조절에 영향을 미칠 수 있었다.
- [0461] 실시예 3
- [0462] 인자 H 단백질의 보호 형태의 생성
- [0463] 사람 보체 인자 H (CFH)의 예시적인 보호 형태를 일배체형 H2에 기초하여 제조하였다 (도 5). 간단히 말해, RNA는 네 공여자의 안구 조직 (RPE/맥락막 복합체)으로부터 단리되었다. RNA를 하기 프라이머를 이용하여 역전사-중합효소 연쇄 반응에 의해 증폭시켰다:
- [0464] 5'-GAAGATTGCAATGAACCTCCTCCAAG-3' [서열번호 331]
- [0465] 5'-AAGTTCTGAATAAAGGTGTGC-3' [서열번호 332].
- [0466] RT-PCR 반응을, 제조자 (Invitrogen, Carlsbad, CA)가 기술한 대로, 백금 태크를 지닌 수퍼스크립트 III 원-스텝 하이 피델리티를 이용하여 수행하였다. 적합한 크기의 생성물 (3,769 bp)을 아가로스 겔로부터 잘라내고 스펀 컬럼을 이용하여 단리시켰다.
- [0467] PCR 생성물을 제조자 (Invitrogen)가 추천한 대로, TOPO-TA 클로닝 시스템을 이용하여 벡터 pCR2.1-TOPO에서 클로닝시켰다. 네 명의 환자 각각에서 유도된 클론의 완전한 유전자 서열을 직접 서열화에 의해 결정하였다. 한 명의 환자 (환자 #498-01)로부터 유도된 DNA는 예시적인 보호 참조 서열 (H2)과 비교하여 가장 작은 수의 누클레오티드 다형성을 지녔으나, 이 DNA는 아미노산 위치 402에서 위험 서열을 엔코딩하고 (히스티딘) 아미노산 위치 62에서 발린을 엔코딩하였다. CFH의 보호 형태를 엔코딩하는 유전자를 제조하기 위해, 본 발명자들은 콰체 인지 뮤타제네시스 시스템 (Stratagene, La Jolla, CA)을 이용하여, 아미노산 62를 엔코딩하는 염기를 변화시켜 이것이 이소류신에 대해 코딩되게 하고 위치 402의 염기를 변화시켜 이들이 티로신을 엔코딩하게 함으로써, 서열번호 335를 생성하였다. 상기 단백질의 위치 1210에서의 아미노산은 아르기닌이다. 적용된 올리고누클레오티드는 다음과 같다 (적절한 안티센스 버전과 함께):
- [0468] 62: 5'-TATAGATCTCTGGAAATATAATAATGGTATGCAGG-3' [서열번호 333]
- [0469] 402: 5'-ATGGATATAATCAAATTATGGAAGAAAGTTGTAC-3' [서열번호 334].
- [0470] 도입된 돌연변이의 충실성을 전체 유전자의 직접 서열화에 의해 확인하였다. 생성된 보호 유전자를 시토메갈로바이러스 프로모터의 조절하에 진핵 발현 벡터 pcDNA3.1 (Invitrogen)에 클로닝시켰다. 이 발현 벡터를 엑스젠 (Exgen) 500 트랜스펙션 시약 (Fermentas, Hanover, MD)을 이용하여 사람 폐암종 세포주 A549 (ATCC, Manassas, VA)에 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션에 후속하여, 세포를 무-혈청 배지에서 성장시켰다 (하이브리도 미-SFM, Invitrogen).
- [0471] 트랜스펙션 48시간 후에 상청액을 수집하고 웨스턴 블로트 분석을 수행하였다. 사람 CFH에 대해 유도된 모노클로날 및 폴리클로날 항체를 이용하여 적절한 크기의 생성물 (약 150 kDa)의 존재를 확인하였다 (Quidel, San Diego, CA).

[0472]

환자 #498-01 (62I, 402Y) CFH 유전자 [서열번호 335]

AGTTAGCTGGTAAATGTCCTCTAAAAGATCCAAAAATGAGACTCTAG
 CAAAGATTATTCGCCTTATGTATGGGCTATTTGTGTAGCAGAAGATTGC
 AATGAACCTCCTCAAGAAGAAATACAGAAATTCTGACAGGTTCTGGTC
 TGACCAAACATATCCAGAAGGCACCCAGGCTATCTATAATGCCGCCCTG
 GATATAGATCTCTGGAAATATAATAATGGTATGCAGGAAGGGAGAATGG
 GTTGCTCTTAATCCATTAAAGGAATGTCAAGAAAAGGCCCTGTGGACATCC
 TGGAGATACTCCTTTGGTACTTTACCCCTACAGGAGGAAATGTGTTG
 AATATGGTGTAAAAGCTGTATACATGTAATGAGGGGTATCAATTGCTA
 GGTGAGATTAATTACCGTGAATGTGACACAGATGGATGGACCAATGATAT
 TCCTATATGTGAAGTTGTGAAGTGTACCTACAGTGACAGCACAGAGAATG
 GAAAAATTGTCAGTAGTCAATGGAACCAGATCGGAATACCATTGGAA
 CAAGCAGTACGGTTGTATGTAACTCAGGCTACAAGATTGAAGGGAGATGA
 AGAAATGCATTGTCAGACGATGGTTTGAGTAAGAGAAACCAAAGT
 GTGTGGAAATTCATGCAAATCCCCAGATGTTATAATGGATCTCCTATA
 TCTCAGAAGATTATTTATAAGGAGAATGAACGATTCAATATAATGTAA
 CATGGGTTATGAATACAGTGAAGAGGGAGATGCTGTATGCACTGAATCTG
 GATGGCGTCCCGTGCCTCATGTGAAGAAAAATCATGTGATAATCCTTAT
 ATTCCAAATGGTACTACTCACCTTAAGGATTAACACAGAACTGGAGA
 TGAAATCAGTACAGTGTAGAAATGGTTTATCCTGCAACCCGGGAA
 ATACAGCAAAATGCACAAGTACTGGCTGGATACCTGCTCCGAGATGTACC
 TTGAAACCTTGTGATTATCCAGACATTAACATGGAGGTCTATATCATGA
 GAATATGCGTAGACCATACTTCCAGTAGCTGTAGGAAATATTACTCCT
 ATTACTGTGATGAACATTTGAGACTCCGTAGGAAGTTACTGGGATCAC
 ATTCAATGCAACACAAGATGGATGGTCGCCAGCAGTACCATGCCTCAGAAA
 ATGTTATTTCTTATTTGGAAAATGGATATAATCAAATTATGGAAGAA
 AGTTGTACAGGGAAATCTATAGACGTTGCCTGCCATCCTGGCTACGCT
 CTTCCAAAAGCGCAGACACAGTTACATGTATGGAGAATGGCTGGCTCC
 TACTCCCAGATGCATCCGTGTCAAAACATGTTCAAATCAAGTATAGATA
 TTGAGAATGGGTTATTTCTGAAATCTCAGTATACATATGCCTTAAAGAA
 AAAGCGAAATATCAATGCAAACTAGGGATATGTAACAGCAGATGGTGAAC
 ATCAGGATCAATTACATGTGGAAAGATGGATGGTCAGCTCAACCCACGT
 GCATTAATCTGTGATATCCAGTATTTGAAATGCCAGAAACTAAAAAT
 GACTTCACATGGTTAAGCTGAATGACACATTGGACTATGAATGCCATGA
 TGGTTATGAAAGCAATACTGGAAGCACCACGGTTCCATAGTGTGTGGTT
 ACAATGGTTGGTCTGATTTACCCATATGTATGAAAGAGAATGCGAACTT

[0473]

CCTAAAATAGATGTACACTTAGTCCTGATCGCAAGAAAGACCAGTATAA
 AGTTGGAGAGGTGTTGAAATTCTCCTGAAACCAGGATTACAATAGTTG
 GACCTAATTCCGTCACTGCTACCACTTGGATTGTCCTGACCTCCAA
 ATATGTAAAGAGCAAGTACAATCATGTGGTCCACCTCCTGAACTCCTCAA
 TGGGAATGTTAAGGAAAAACGAAAGAAGAATATGGACACAGTGAAGTGG
 TGGAAATATTATTGCAATCTAGATTCTAATGAAGGGACCTAATAAAATT
 CAATGTGTTGATGGAGAGTGGACAACTTACCACTGTTGATTTGGAGGA
 GAGTACCTGTGGAGATATACTGAACTTACCAACTGGCTGGGCCCAGCTTT
 CTTCCCCCTCCTTATTACTATGGAGATTCACTGGAAATTCAATTGCTCAGAA
 TCATTTACAATGATTGGACACAGATCAATTACGTGTAATTGAGTATG
 GACCCAACCTCCCCAGTGTGGCAATAGATAAACTTAAGAAGTGCAAAT
 CATCAAATTAAATTATACTTGAGGAACATTAAAAAAACAAGAAGGAATT
 GATCATAATTCTAACATAAGGTACAGATGTAGAGGAAAAGAAGGAATGGAT
 ACACACAGTCTGCATAATGGAAGATGGGATCCAGAAGTGAACGTGCTCAA
 TGGCACAAATAACATTATGCCACCTCCACCTCAGATTCCAATTCTC
 AATATGACAACCACACTGAATTATCGGGATGGAGAAAAAGTATCTGTTCT
 TTGCCAAGAAAATTATCTAACATTCAAGGAGAAGAAGAATTACATGCAAAG
 ATGGAAGATGGCAGTCATAACCAACTCTGTTGAAAAAAATTCCAATGTTCA
 CAACCCACCTCAGATAGAACACCGGAACCATTAATTCACTCAGGTCTTCACA
 AGAAAAGTTATGCACATGGGACTAAATTGAGTTATACTTGTGAGGGTGGTT
 TCAGGATATCTGAAGAAAATGAAACAACATGCTACATGGAAAATGGAGT
 TCTCCACCTCAGTGTGAAGGCCCTTGTAAATCTCCACCTGAGATTTC
 TCATGGTGTGAGCTCACATGTCAGACAGTTACGTATGGAGAAGAAG
 TTACGTACAAATGTTGAAGGTTTGGATTGATGGGCTGCAATTGCA
 AAATGCTTAGGAGAAAATGGTCTCACCTCCATCATGCCATAAAACAGA
 TTGCTCAGTTAACCTAGCTTGAAATGCCATACCCATGGGAGAGAAGA
 AGGATGTTGATAAGGCGGGTGAGCAAGTGAACACTTGTGCAACATAT
 TACAAAATGGATGGAGCCAGTAATGTAACATGCATTATAGCAGATGGAC
 AGGAAGGCCAACATGCAGAGACACCTCTGTGAATCCGCCACAGTAC
 AAAATGCTTATATAGTGTGAGACAGATGAGTAAATATCCATCTGGTGAG
 AGAGTACGTTATCAATGTAGGAGCCCTATGAAATGTTGGGATGAAGA
 AGTGATGTTAAATGGAAACTGGACGGAACCACCTCAATGCAAAGATT
 CTACAGGAAAATGTGGCCCCCTCACCTATTGACAATGGGACATTACT
 TCATTCCCGTTGTCAGTATATGCTCCAGCTTCATCAGTTGAGTATCAATG
 CCAGAACCTGTATCAACTTGAGGGTAACAAGCGAATAACATGTAGAAATG
 GACAATGGTCAGAACCCACAAAATGCTTACATCCGTGTGTAATATCCC
 GAAATTATGGAAAATTAAACATAGCATTAAAGGTGGACAGCCAAACAGAA
 GCTTTATTCGAGAACAGGTGAATCAGTTGAATTGTTGTAACACGGGGAT
 ATCGTCTTCATCAGTTCTCACACATTGCGAACAAACATGTTGGGATGGG
 AAAACTGGAGTATCCAACTTGTGCAAAAAGATAGAATCAATCATAAAGTGC
 ACACCTTATTCAAGAACATT

[0474]

dbSNP 번호	위치	디렉션에 걸쳐 있는 서열	서열 번호	AA 변화	대립유전자 번호 CTG	대립유전자 번호 AMD	Ch12 & P 값
프로모터 1		GGGGTTTGTGGATGTTAA[T/A/G]AGCTTCACTGGTTGGACCTT GCCCTAAAGGACCCPACHTTA[T/C]TACAGTCACAAACGAA	9	1-0.94:2-0.056	1-0.96:2-0.04		
프로모터 4		TTCGAAATCCAGGATTC[C/T]ACACCTCTCTTGACCA TAACTCTTGTGGCTCCTAA[G/A]TGGGGAGGAGCTTACCTT	10	1-0.31:2-0.69	1-0.25:2-0.75	6.485:0.039	
rs2753394	인트론 1	AGTCGAGTTTAACACATAC[G/A]AGACCTACCCATTGCGA TCAGGTTGAACTGGAC[G/C]TTCATGTTGAGGTTGAGCTT	11	1-0.74:2-0.26	1-0.84:2-0.16	26.07:2.18E-06	
rs529825	엑손 2	CTATAGATCTCTGGAA[T/G]TAACTGGTGGAGG CTATCTTGTAGAGACCTTA[C/T]ATTGGTACCAACCTTC	12	1-0.78:2-0.22	1-0.91:2-0.09	16.19:5.74E-05	
rs800282	인트론 2	TAACTCTTACTTTCTTCTTCTT[-T/T]CTTTAGAAAGCCTTCTG ATTTAGGTTGAACTGGAA[G/-A]GAACTTCTTGGACAC	13	1-0.77:2-0.23	1-0.89:2-0.11	22.19:2.47E-06	
rs2768404	인트론 6	AAAGGAACTCTTGGAC[C/C]TAACTGGTGGAGCTTACAA TTCCTTCTTCTGAACTGGAA[G/A]TAACTGGTGGAGCTTACAA	14	1-0.83:2-0.17	1-0.91:2-0.09	23.82:6.71E-06	
rs1061147	엑슨 7	CTGGGGCCCTTGTGGCT[G/T]TTTACGTTGCTGGCTGG GTTGGGGCTTGTGGCT[G/T]TTTACGTTGCTGGCTGG	15	A307A	1-0.34:2-0.66	1-0.59:2-0.41	50.39:1.26E-12
rs061170	엑슨 9	TTTACCTTATTTGTTT[A/G]TACCTCTTACACGTC TTTACCTTATTTGTTT[A/G]TACCTCTTACACGTC	16	Y402H	1-0.68:2-0.34	1-0.46:2-0.54	55.20:1.03E-12
rs2274700	엑슨 10	ATGGCGTAAAGGAACTGGCT[G/A]TAACTGGTGGAGCTT ATGGCGTAAAGGAACTGGCT[G/A]TAACTGGTGGAGCTT	17	A473A	1-0.54:2-0.46	1-0.80:2-0.20	36.48:1.55E-09
	엑슨 10A	CTGGGAACTTCTCTTC[C/-N]ACATCTCCCTTACCTGG CTGGGAACTTCTCTTC[C/-N]ACATCTCCCTTACCTGG	18		1-1.00:2-0.00	1-0.933:2-0.057	
rs203674	인트론 10	AGGGACCTTTTGTGAG[G/T]ACACACACACCTCTT TCCCTGTTAACTAACTT[C/C]TACAGTGTGTTTCTAA	19		1-0.66:2-0.34	1-0.44:2-0.55	66.97:2.86E-15
rs203674	인트론 10*	AAAGCTTCTTGTGGTGGAA[T/A/C]TACAAATTTGCTT AAAGCTTCTTGTGGTGGAA[T/A/C]TACAAATTTGCTT	63		1-0.66:2-0.34	1-0.44:2-0.55	66.97:2.86E-15
rs2753398	엑슨 13	TTGGCTGGATTTAGT[G/T]ACACACACACCTCTT TTCCTGTTAACTAACTT[C/C]TACAGTGTGTTTCTAA	20	Q672Q	1-0.84:2-0.16	1-0.86:2-0.14	0.308:0.579
rs375046	인트론 15	AAAGCTTCTTGTGGTGGAA[T/A/C]TACAAATTTGCTT AAAGCTTCTTGTGGTGGAA[T/A/C]TACAAATTTGCTT	21		1-0.67:2-0.31	1-0.85:2-0.14	
rs1066499	인트론 18	CCCTGGAACTCTTGGCT[G/T]TTTACGTTGCTGGAC GGGGAACTTGTGGCTGGCT[G/C]TAACTGGTGGAGCTT	22	D988E	1-0.87:2-0.13	1-0.85:2-0.15	0.155:0.694
	엑슨 22	GGGGAACTTGTGGCTGGCT[G/A]GAACTGGTGGAGCTT	23	R1210C	1-1.00:2-0.00	1-0.95:2-0.05	

(*) 개는 서열의 비-코딩 기능을 나타냅니다

(1)

SNP	염기	기법 및 시설	서열번호	정프	위자	
rs3755394	A	AAATCCAGAGGATATGCTTACCAAGCTGCTGATT	24	C	프로모터	AA
rs529825	T	ATGGGTAAGCTGATCTCTGTTGAACTT	25	T	인트론 1	
rs80282	T	TGCATACCAATTATATATGTTCCAGAGATCT	26	T	외손 2	162V
Intron 2 ins TT	ACATACATATTCTAACCTTTTTCTGTTAG	27			인트론 2	
rs376594	A	ATACATTAGGACTTCTATTTGAAGTAGTGT	28	C	인트론 6	
rs61147	C	CGGGAAATACAGCICAMATGCAACAGTACT	29	A	외손 7	A307A
rs1061170	T	GGATATACCAATTCTGAGAAGAAGTTG	30	T	외손 9	Y402H
rs2214700	C	CTAAAGAAAAGCAGAAATCATGCAAA	31	G	외손 10	A473A
rs203674	C	CTTATGATTTAGTACGTTAGTAAATAGT	32	A	인트론 10	
rs3755396	ACCTAATAAATCAAGTGTGATGGACAG	33	A	외손 13	Q372Q	
rs1065489	TAATCTCCACGCTGAGTATTCTGATGGCTT	34	G	외손 18	D356E	

(2)

SNP	염기	순환 프로토이데 또는 AOD 번호	서열번호	순환 프로토이데	서열번호
rs3755394	C	2330587_10			
rs529825	C	2250476_10			
rs80282	C	2330582_10			
Intron 2 ins TT	ACTTGTTCCTCCACTCTAC		35	CTCTTTCGTTGGACTAC	36
rs376594	C	189005_10			
rs1061147	T	TTAAATGCGTACCGTGTAGAAATGG	37	CAAGTATCCAGCCAGTACTTGT	38
rs2214700	C	CTTATATTATCATTGTTATGGCTTGGAAATGTTATT	39	GGCGGGCAAGCTCATAGATTAC	40
rs203674	T	TCACATCCTGCTTACATCTTGT	41	TGGTTTATTCGATCTCAGTATACATATGC	42
rs3755396	C	2330586_10			
rs1065489	C	2330274_10			

(3)

SNP	염기	VIC	프로토	서열번호	FAM	프로토	서열번호
rs1061147	A	AATACAGGCAAAATGC	43	ATACAGGCAAAATGC	46		
rs1061170	T	TTCTCTGATGATTTG	44	TTCTCTGATGATTTG	47		
rs2214700	A	AGAAAGAGGAAATAT	45	AGAAAGAGGAAATAT	48		

위치	다형성에 걸쳐 있는 서열	AA	위치	서열번호
액손 2	CCAGGCTATCTATAATGCC [G/A] CCCTGGATATAGATCTCTTG TGGTACTTTACCCCTACA [G/T] GAGGAAATGTGTTGAATAT	R53H	49	
액손 3		G100R	50	
액손 5	ACGGATGGGTTTGGAGTAA [G/notG] AGAAACCAAGTGTGTTGGT	201	51	
액손 6	TTATTATAGGAGATGAA [G/notC] GATTCAATATAATGTAC	R232X	52	
액손 6	CACTGAATCTGGATGGGTCTC [G/notC] GTGCCCTCATGTGAG (종로 액손 6)	258	53	
액손 8	AAGATGGATGGTCGCCAGCA [G/C] TACCATGCCTCA (종로 액손 8)	V383L	54	
액손 16	ACAATTATGCCACCTCCAC [C/G] TCAGATCCCAATTCTCACA	815	55	
액손 17	CAACCACCTCAGATAACA [C/T] GGAACCATTAATTCATCCAG	H878H	56	
액손 17	GTCTCACAAAGAAGTTATG [C/T] ACATGGGACTAAATTGAGTT	A892V	57	
액손 18	CACATGTGAGACAGTTATCA [G/T] TATGGAGAAGAGTTACGTA	Q950H	58	
액손 18	TCAGTATGGAGAAGAGTTA [C/T] GTACAAATGTTGAAGGTT	S956L	59	
인트론 18	{ 시작 NS18) GTATGG [G/T] GCATTGAATTATTATATG		60	
액손 20	{ 시작 액손 20) ACACCTCCTGTGTG [A/T] ATCCGCCACAGTACAAAT	N1050Y	61	
액손 21	CTTGTATCAACTTGAGGGTA [-N] A [-N] CAAGCGAATTAACATGTAGAAA	1147	62	

[0481] 표 2

프로모터	AMD 병증 및 대조군에서 HF1 SNP의 일배제형 분석								P	병증	대조군
	IVS1	I62V	IVS6	Y402H	IVS10	Q572Q	D936E	OR est			
IVS1	C	C	T	C	A	A	G	2.57	<0.000001	0.49	0.23
I62V	C	T	C	T	A	A	G	0.48	<0.00001	0.95	0.12
IVS6	T	C	T	C	A	A	G	0.63	0.00035	0.12	0.18
Y402H	C	C	T	C	T	C	A	2.59	0.48	0.25	0.12
IVS10	C	T	C	T	T	A	A	0.50	0.05	0.12	0.18
Q572Q	T	C	T	C	T	A	A	0.62	0.12	0.18	0.12
D936E	A	A	T	T	T	C	C	2.65	0.49	0.25	0.12
OR est	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.58	0.03	0.12	0.18
IVS1	C	C	C	C	C	C	C	2.53	0.49	0.27	0.12
I62V	C	T	C	T	C	T	C	0.49	0.05	0.12	0.19
IVS6	T	C	T	C	T	C	A	0.58	0.12	0.18	0.12
Y402H	C	C	T	C	T	C	A	2.33	0.51	0.31	0.12
IVS10	C	T	C	T	C	T	A	0.51	0.08	0.12	0.18
Q572Q	T	C	T	C	T	C	A	0.56	0.13	0.21	0.12
D936E	A	A	T	T	T	C	C	2.54	0.51	0.29	0.14
OR est	0.58	0.48	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.57	0.12	0.19	0.12
IVS1	C	C	C	C	C	C	C	2.55	0.51	0.29	0.14
I62V	C	T	C	T	C	T	C	0.48	0.07	0.14	0.19
IVS6	T	C	T	C	T	C	A	0.58	0.12	0.20	0.12
Y402H	C	C	T	C	T	C	A	2.48	0.51	0.30	0.14
IVS10	C	T	C	T	C	T	A	0.56	0.07	0.14	0.20
Q572Q	T	C	T	C	T	C	A	2.47	0.51	0.30	0.14
D936E	A	A	T	T	T	C	C	0.48	0.07	0.14	0.20
OR est	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.12	0.20	0.14
IVS1	C	C	C	C	C	C	C	2.12	0.76	0.60	0.14
I62V	C	T	C	T	C	T	C	0.51	0.08	0.13	0.21
IVS6	T	C	T	C	T	C	A	0.53	0.13	0.21	0.12
Y402H	C	C	T	C	T	C	A	2.49	0.52	0.30	0.14
IVS10	C	T	C	T	C	T	A	0.45	0.29	0.47	0.19
Q572Q	T	C	T	C	T	C	A	0.58	0.12	0.20	0.14
D936E	A	A	T	T	T	C	C	0.49	0.52	0.30	0.14
OR est	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.12	0.20	0.14

[0482]

[0483] 표 3

프로모터	rs3753384	rs529825	rs3766404	rs203674	rs3753396	rs1055489	일반체형	빈도	CTL	빈도	AMD
	인트론 1	인트론 1	인트론 6	인트론 10	액손 13	액손 18					
1	1	1	2	2	1	1	111211	0.28436	0.478059	0.478059	
1	1	2	1	1	1	1	121111	0.210856	0.131313	0.131313	
2	2	1	1	1	1	1	211122	0.149247	0.126697	0.126697	
1	1	1	2	2	1	1	112111	0.128893	0.061917	0.061917	
2	2	1	1	1	1	1	211111	0.094861	0.07125	0.07125	
2	2	1	2	2	1	1	211211	0.046438	0.06834	0.06834	
1	1	2	2	2	1	1	122111	0.026677	0.014859	0.014859	
2	2	1	2	2	1	1	212111	0.012731	0.01473	0.01473	
1	1	1	1	1	1	1	111111	0.012686	0.007305	0.007305	
1	1	1	2	2	1	1	121211	0.012684	0.004723	0.004723	
2	2	1	2	2	1	1	121122	0.009249	0.000945	0.000945	
1	1	2	2	2	1	1	111122	0.007487	0.008705	0.008705	
2	2	1	2	2	1	1	212121	0.002049	0.000488	0.000488	
1	1	1	2	2	2	2	122211	0.0078	0.000001	0.000001	
2	2	2	1	1	1	2	212122	0.002175	0.001869	0.001869	
1	1	2	1	1	1	1	211122	0.00169	0.001061	0.001061	
2	2	1	2	1	1	1	221111	0.00096	0.00095	0.00095	
1	1	1	2	2	2	2	121222	0.00095	0.00069	0.00069	
2	2	1	2	2	1	1	112112	0.00069	0.000322	0.000322	
1	1	1	2	2	2	2	211211	0.00001			
2	2	2	1	2	2	2	122112				

[0484]

연령-관련 홍반 변성과 *HFI1* SNP 관련성

아이오와	프로모터		IVS1	외손 2	IVS2	외손 7/9	외손 10	IVS6	외손 7/9	rs203674	외손 13	외손 18	
	#	대조군	rs3753394	rs529825	I62V	insTT	rs3766404	A307A/Y402H	A473A	Q672Q	D93E		
#	병증												
X ²					68	126	131	68	129	67			
P					228	390	404	221	404	223			
OR					15	22.21	49.4	35.14	0.21	0.64			
95%CI					0.000108	2.44X10 ⁻⁰⁵	2.09X10 ⁻¹²	3.07X10 ⁻⁰⁹	0.65	0.8			
콜론비아	#	대조군			2.79	2.38	2.82	3.42	1.12	0.89			
X ²	#	병증			1.67-4.65	1.65-3.44	2.11-3.78	2.27-5.16	0.76-1.64	0.51-1.56			
P					126	266	261	273	272	264	265	264	
OR					329	547	546	549	542	545	536	536	
95%CI					8.61	25.4	36.12	28.4	54.4	66.1	2.05	0.53	
					0.00334	4.66X10 ⁻⁰⁷	3.21X10 ⁻⁰⁷	9.87X10 ⁻⁰⁸	1.59X10 ⁻⁰⁸	1.60X10 ⁻¹¹	4.29X10 ⁻¹⁶	0.15	0.46
					0.70	1.92	1.95	2.042	2.105	2.10	2.44	1.24	1.12
					0.56-0.89	1.49-2.48	1.51-2.52	1.57-2.63	1.56-2.85	1.79-2.75	1.89-2.61	1.97-3.03	0.937-1.65
													0.846-1.49

각 SNP로부터의 대립유전자 1 및 대립유전자 2의 빈도를 병증과 대조군에서 비교하고 흔수 비율(OR) 및 95% 신용 간격 (95% CI)을 구한다. 예이즈 카이 제곱(X²) 및 P 값을 계산하였다. 각 유전형의 실질적인 계수는 표 6A-6C에 제공된다.

[0487] 표 5

SSCP, DHPLC 및 서열화 프라이머

번호	영 역	순행 프라이머 (5'-3')	서열번호	역행 프라이머 (5'-3')	서열번호
1	5' 일스트립 -int1	GCAAAAGTTCTGATAGGC	64	AATCTTACCTCTGCTACAC	65
2	int1-int2	TTAGATAGACCTGTGACTG	66	TCAGGCATAATTGCTAC	67
3	int2-int3	ACTTGTTCCCCACTCTAC	68	CCTCTTTICGTATGGACTAC	69
	int2-ex3	TTGTTCCCCACTCTAC	70	ACACATTTCCCTGTAAAGG	71
	ex3-int3	CCCTGTGGACATCTGG	72	AACCTCTTCGTATGGACTAC	73
4	int3-ex4	ATGCTGTTCATTTTC	74	CCATCCATCTGTGTAC	75
	ex4-int4	ATTACCGTGAATGTGAC	76	TTGTATGAGAAAAAAAAC	77
5	int4-int5	TCCAATCTATCTGAGG	78	TCTTACCCACACTTIG	79
6	int5-ex6	GTCCTGGTCACAGTCC	80	GCATACAGCATCTCCTC	81
	ex6-int6	GCACTGAATCTGGATG	82	ATGAACCTTGAACACAG	83
7	int6-ex7	CGGATACTTATTCTG	84	CGTGATTTCATCTCCAG	85
	ex7-int7	AGAACTGGAGATGAAATC	86	TGAATGGAACITACAGG	87
8	int7-ex8	GTGAAACCTTGTGATTATC	88	TCCCAGTAACCTCTG	89
	ex8-int8	CTGTGATGAAACATTGAG	90	TGCTCTCCATTCTCG	91
9	int8-int9	CATTGTTATGTCCTTAGG	92	ACATGCTAGGATTTCAGAG	93
10	int9-ex9	CTTTTCTTATTCCTCTCC	94	TCACCATCTGCTGTTAC	95
	ex9-int10	TGTAACAGCAGATGGTG	96	CCCACAAAAGACTAAAG	97
11	int10-ex11	GGGAAATACTCAGATTG	98	ATGGCATTATCAGATTC	99
	ex11-ex11	CCAGAACTAAATGACTTC	100	GGTAAATCAGACCAACC	101
	ex11-int11	ATAGTGTGTTGACAATG	102	GTTTATGTCAAATCAGGAG	103
12	int11-int12	CAAGAAAGAGAATCGAAC	104	AGATTACAGGCAATGGG	105
13	int12-ex13	TTGATTGTTAGGATGC	106	TTGAGGAGTICAGGAGGTGG	107
	ex13-int13	CTGAACCTCTCAATGG	108	ATTACCAATACACACTGG	109
14	int13-int14	TTACATAGTGAGGAGAG	110	TGAAAATGTTGAGGC	111
15	int14-int15	AGTTGTTGATTCCTATC	112	TTGAGCAGTTCACCTCTG	113
16	int15-ex16	TTATGCCAACCTCCAC	114	ATACACTACTGACCAACAC	115
	ex16-int16	GTCTATGAGAATACAAGCC	116	GAATCTGAGGTGGAGG	117
17	int16-ex17	CCCTTGATTTCATTC	118	AGAACTCCATTCTCCC	119
	ex17-int17	CACACCACCTCAGATAG	120	GCCTAACCTTCACACTG	121
18	int17-ex18	GTCTAGTAGCTCTGTATTG	122	ACGTAACCTCTCTCCATAC	123
	ex18-int18	CTTCCCTGTAAATCTCCAC	124	CAATGCACCATACTTATGC	125
19	int18-ex19	TAAAGAATTGCGGAAC	126	GGCTCCATCCATTCTG	127
	ex19-int19	TTACAAAATGGATGGAG	128	AAGTGTGGGATTACAGGGG	129
20	int19-ex20	CTACTCAAATGAACACTAGG	130	TTAAACCCGTATAACTCC	131
	ex20-int20	TAAATGGAAACTGGAG	132	ACCCATTACTTGTGTTCTG	133
21	int20-int21	GTGTTGCGTTGCC	134	GAGATTTTCCAGGCCAC	135
22	int21-ex22	TCTCACACATTGCGAAC	136	ACCGTTAGTTTCAGG	137
	ex22-3' 다른스트립	GGTTTGGATAGTGTGTTGAG	138	ATGTTGTCCTAACATGTG	139

[0488]

코호트 1	프로모터	프로모터	rs3753394	인트론 1	IVS1	rs529825	액손 2	IVS2	rs800292	인트론 2	IVS2	인트론 1
총 개체				GG	CON	CON	GG	CON	AMD	AMD	GG	AMD
대립유전자 1 개수				44	AMD	AMD	44	GG	SS	SS	44	SS
대립유전자 2 개수				18	GA	GA	18	GA	SL	SL	18	SL
대립유전자 1 빈도				6	AA	AA	6	AA	L.	L.	6	L.
대립유전자 2 빈도				63	228	228	63	228	126	126	63	390
AMD 관련성				G	0.783	0.91	S	0.77	0.89	0.89	G	0.89
카이 제곱				A	0.222	0.039	L	0.23	0.111	0.111	A	0.111
대립유전자 1 개수					X2	P	X2	P	22.19	2.4657E-06		
대립유전자 2 개수					16.19	5.73703E-05	2.79	2.38	2.38	194	693	
대립유전자 1 빈도					106	414	106	414	106	58	87	
대립유전자 2 빈도					30	42	30	42	30	22.21	2.44398E-06	
OR(95%CI)					15	0.00010751	2.79	2.38	2.38	1.65	3.44	
코호트 2					1.57-4.65							
	CON	All AMD	CON	CON	All AMD	CON	CON	All AMD	CON	All AMD	CON	All AMD
	CC	CC	GG	GG	GG	GG	GG	GG	SS	SS	GG	GG
총 개체	11	291	11	149	392	148	149	392	160	409	409	409
대립유전자 1 빈도	12	CT	GA	GA	GA	GA	GA	GA	SL	95	133	133
대립유전자 2 빈도	22	TT	AA	AA	AA	AA	AA	AA	L.	18	7	7
대립유전자 1 번도												
대립유전자 2 번도												
대립유전자 1 개수												
대립유전자 2 개수												
OR(95%CI)												
대립유전자 1 개수	366	807	393	924	386	925	415	951				
대립유전자 2 개수	162	291	139	170	136	167	131	147				
대립유전자 1 빈도												
대립유전자 2 빈도												
대립유전자 1 번도												
대립유전자 2 번도												
대립유전자 1 개수	2.84	0.089	25.4	2.18E-06	26.12	3.20849E-07	28.4	9.86653E-08				
대립유전자 2 개수	1.23	0.977-1.52	1.922	1.49E-2.48	1.95	1.57-2.52	2.042	1.57-2.63				

	인트론 6	IVS6	rs378644	액순 7	A307A rs1051147/ Y492H	액순 7	A307A rs1051147/ Y492H	액순 9	Y492H rs1061170	액순 9	Y492H rs1061170	
코호트 1				CON	AMD	CON	AMD	CON	AMD	CON	AMD	
				AA/CC	AA	16	146	CC	16	146	146	
				AC/CT	AC	16	146	CT	56	183	183	
				CC/TT	CC	56	183	TT	59	74	74	
합계				131	404	59	75	131	403	403	403	
대립유전자 1 빈도				A/C	0.34	0.59	0.34	C	0.34	0.59	0.59	
대립유전자 2 빈도				C/T	0.66	0.41	0.66	T	0.66	0.41	0.41	
AMD 관찰성				X2	P	X2	P	X2	P	X2	P	
카이 제곱						50.4	1.2593E-12			50.4	1.2593E-12	
대립유전자 1 계수						2.82	2.82			2.82	2.82	
대립유전자 2 계수						88	475	88	475	88	475	
액 0102 Z ² P ²						174	333	174	333	174	2.08740E-12	
OR99%CI						49.4	2.08740E-12	49.4	2.08740E-12	49.4	2.08740E-12	
2.82						2.82	2.11E-3.78	2.82	2.11E-3.78	2.82	2.11E-3.78	
코호트 2												
	CON	All AMD	CON	All AMD	CON	All AMD	CON	All AMD	CON	All AMD	CON	All AMD
	TT	TT	CC	CC	TT	TT	CC	CC	TT	TT	CC	CC
	11	11	120	120	114	114	122	122	118	118	121	121
	12	CT	AC	AC	109	109	275	275	113	113	271	271
	22	CC	AA	AA	33	33	158	158	37	37	160	160
합계					262	262	547	547	272	272	549	549
대립유전자 1 빈도					C	0.67	0.46	T	0.66	0.46	0.46	0.46
대립유전자 2 빈도					A	0.33	0.54	C	0.34	0.54	0.54	0.54
대립유전자 1 계수						23.82449569	6.70774E-06			55.198	1.03234E-12	
대립유전자 2 계수						448	993	349	503	38	507	
액 0102 Z ² P ²						94	99	175	591	187	591	
OR99%CI						23.04	1.58668E-06	59.6	1.16235E-14	54.4	1.63665E-13	
						2.105	1.56E-85	2.24	1.89E-2.91	2.25	1.79E-2.75	

코호트 1	액수 10	A473A	rs2274700	인트론 10	IVS10	rs203674	액수 13	Q572Q	rs3753396	액수 18	D936E	rs1065489
							CON	AMD	CON	AMD	CON	AMD
총 개		GG	22	145	AA	92	295	GG	51	162		
대립유전자 1 번도		GA	30	65	GA	33	101	GT	14	56		
대립유전자 2 번도		AA	16	11	GG	4	8	TT	2	5		
AMD 관련성		GG	68	221	AA	129	404	GG	67	223		
카이 제곱		G	0.54	0.80	A	0.84	0.86	G	0.87	0.85		
대립유전자 1 개수		A	0.46	0.20	G	0.14	0.16	T	0.13	0.15		
대립유전자 2 개수		X2	36.5	1.54526E-09	X2	0.309	0.579	X2	0.155	0.694		
예이즈 ZTR 값			3.42			1.12			0.833			
OR95%CI			74	365		217	691		116	380		
			62	87		41	117		18	66		
			36.14	3.08833E-09		0.21	0.65		0.64	0.8		
			3.42	2.27E-15		1.12	0.78E-164		0.89	0.51E-1.56		
코호트 2		CON	All AMD	CON	All AMD	CON	All AMD	CON	All AMD	CON	All AMD	
총 개		GG	77	269	TT	11	118	GG	9	TT	9	10
대립유전자 1 번도		GA	131	233	GT	12	112	GA	72	TG	69	140
대립유전자 2 번도		AA	56	40	GG	22	34	AA	184	GG	186	386
대립유전자 1 번도		G	0.54	0.71	T	0.66	0.44	G	0.17	T	0.16	0.15
대립유전자 2 번도		A	0.46	0.29	G	0.34	0.56	A	0.83	G	0.84	0.85
대립유전자 1 개수			46.2	9.24391E-11		6.69745	8	2.86191E-15				
대립유전자 2 개수			243	313		348	482	90	154	57	160	
예이즈 ZTR 값			45.4	1.60834E-11		46.1	4.28616E-16		2.05	0.15	0.53	0.46
OR95%CI			2.10	1.69E-2.61		2.44	1.97E-3.03		1.24	0.937E-1.65		1.12

[0492]

AMD를 지니거나 지니지 않은 다양한 인종 그룹에서 위험-상태 대립유전자의 빈도

우험 율배제형	라파누이	콜롬비아 대조군	스페인계 대조군	아이오와 대조군	흑인	콜롬비아 병증	유럽인 미국인	아이오와 병증	MPGN II
	0.20	0.35	0.35	0.36	0.47	0.55	0.57	0.60	0.69
N	52	272	24	131	49	549	56	404	20

Y402H 변이 체 및/또는 IVS10 유전자-좌의 유전형이 상이한 개체군으로부터의 샘플에서 위험-상태 일배체형의 빈도를 산정하였다. 이들은 65세가 넘는 라파누이 원주민 (AMD가 극히 드물고, 대부분 부재할 것이다, 동아일랜드 개체군), 콜롬비아-대학으로부터의 대조군 (연령 >65), 스페인계 일반 개체군, 아이오와 대학으로부터의 대조군 (연령 >65), 흑인 미국인 일반 개체군, 콜롬비아 대학으로부터의 AMD 병증, 유럽인 미국인 일반 개체군, 아이오와 대학으로부터의 AMD 병증 및 MPGNII 개체를 포함한다. N=개체의 수

[0495] 표 8

인자 H 이배체형

	I62V	IVS2-18	Y402H	D936E	IVS20
위험	GG	SS	CC	GG	TT
보호	AA	LL	TT	GG	CC
보호	AA	LL	CT	GG	CC
보호	AA	LL	TT	GG	CC
보호	AA	LL	TT	GT	TT
보호	AA	LS	CT	GG	CC
보호	AA	SS	CC	GG	TT
보호	GA	LS	CT	GG	TT
보호	GA	LS	CT	GG	CT
보호	GA	LS	CT	GG	CC
보호	GA	LS	CT	GG	CC
보호	GA	LS	CT	GT	CT
보호	GA	LS	TT	GG	CT
보호	GA	LS	TT	GG	CC
보호	GA	LS	TT	GG	TT
보호	GA	LS	TT	GT	CC
보호	GA	LS	TT	TT	CC
보호	GA	SS	CT	GG	CC
보호	GG	SS	CT	GT	CC
보호	GG	SS	TT	GT	TT
보호	GG	SS	TT	TT	CT
위험	GG	LL	TT	GG	TT
위험	GG	SS	CC	GG	TT
위험	GG	SS	CT	GG	CT
위험	GG	SS	CT	GG	CC
위험	GG	SS	CT	GT	TT
위험	GG	SS	CT	GT	CT
위험	GG	SS	CT	GT	CC
위험	GG	SS	CT	GT	CC
위험	GG	SS	CT	GT	CT
위험	GG	SS	CT	GT	CC
위험	GG	SS	CT	GT	TT
위험	GG	SS	TT	GG	CT
위험	GG	SS	TT	GG	CT
위험	GG	SS	TT	GT	TT
위험	GG	SS	TT	GT	CT
위험	GG	SS	TT	GT	GT
위험	GG	SS	TT	GT	CC
위험	GG	SS	TT	TT	CT
위험	GG	SS	TT	GT	CC
위험	GG	SS	TT	TT	CC
위험	GG	SS	CC	GG	TT
위험	GG	SS	CT	GG	TT
위험	GG	SS	CT	GT	CC

G, A, T, C는 지시된 다형성에서의 누클레오티드를 언급한다. S, L은 인트론 2 다형성의 짧거나 긴 (2 T 누클레오티드의 삽입) 대립유전자를 언급한다.

[0496]

[0497] 표 9

인자 H 코딩 서열을 증폭시키는데 사용된 프라이머

번호	순행	서열번호	역행	서열번호
1	TGGGAGTCAGATGAGAATTG	140	GCTAATGATGCTTTACAGGA	141
2	CCITGTACTGTCTAGGCATT	142	TATGCCGAATTATATCACTATTGCC	143
3	GCTTGGCTAIGTAAATTCTCTT	144	AACATAGATGGAAATAATTAAAATCTGG	145
4	TGCATATGCTGTCATTTC	146	GTCTTACATTTAAATCTTAAAGTC	147
5	TTTCCTCCAACTTATCTCTGAG	148	CGTTCAATTCTAAAGGAATATCAGCA	149
6	CCGTATGGAAACACATTCTCTG	150	AAACAGGGCAAGGAAGTCTCA	151
7	TGTICATTAAATGGCCATTITG	152	AGTTTCGAAGTTGCCGAAA	153
8	CCTAGAAACCTTAATCGAATGTG	154	TGTTCAAGCAAAGTGACCAA	155
9	TGAGCAAATTATGTTCTCAATT	156	ATGTCACCTGTTTACCAATGG	157
10	TGAATGCTTATGGTTATCCAGT	158	AAAACCTGCAAGGAACAAAGC	159
11	TCTTAGAATGGAAATACTCAGATG	160	TGGTTTTTCGAAATTCTATTTC	161
12	ATGTAAAAATTAACCTGGCAATGA	162	TGCTGAAATAAGAATTAGAACCTTG	163
13	TGAAATAGAAAGAAATCTTCCA	164	ATCTAAAACACATACATCATGTTTCA	165
14	AAAACACATACATCATGTTTCAACAA	166	GATATGCCCTCAACATTTCAGTC	167
15	GTTGGTTTGTATTCTTACATTG	168	TTGAAAAGTAAAGTGTATGTTGTC	169
16	CTATGAGAAATACAAGCCAAAAGTC	170	TCTCTTGTGCTTCGTTAAACAA	171
17	AAACCTTTGATTTCATTTCTCA	172	TCAAAGTGAAGGGGAATAATGAA	173
18	AATTATGAGTTAGTGAACCTGAAT	174	TCTTCATTCAAAAGTGTAAAGTGGTAC	175
19	ACAAAATGGCTAAATATTTCTCAAG	176	TAATGTGTGGCCCCAGGCC	177
20	CAAAATGAAACACTAGGTGGAAACC	178	ATTTGGGGAGGTATAGCAGG	179
21	CIGCTTIGCGTTGCCCTTA	179	TTCACCGTGGCTGGAAAAATC	181
22	TGAAAACCTGAAGCTATGAAGA	182	TCAATCATAAAGTGCACACCTT	183

[0498]

[0499]

표 10

CFHRS 코딩 서열을 증폭시키는데 사용된 프라이머

서열번호	상	하	서열번호	
1	CAGTCCCATTCTGATTGTTCCA	184	GCTGAGGATAATTGAAGGGG	185
2	GTGATTICATCGATGTAGCTCTT	186	AATGACCAAGAGGAGCCCTGGAA	187
3	TGATGTCAGTTTCAAGTTTCC	188	ACCACTCTCAGTTTGCTAATTAT	189
4	CACATTTAACTTGTGAACTGA	190	AGAAGTGATGAAACAGAAATTGTA	191
5	CCATTTAAAGCTTATTATGGTTTC	192	AAACAGGAGCAGTTACTATTACCTTCA	193
6	AAATATTTTCAGAGTAAGCACTCATTT	194	TTTATCATTTGATTGGGATTGT	195
7	TGGAGATTTTATGACATAATTGTT	196	GTGATGCTTGTGCTTACAAAGA	197
8	CCATTTCTGAAACACTACCC	198	TCTGTTGCACTGTAACCCCAA	199
9	AATTATTTGAATTCCAGACACCTT	200	TTTGGACTAATTCTATAGAATAACCC	201
10	CTTAAATGCAATTCACTATTCTATGA	202	TAGCCATTATGTAGCC	203

[0500]

표 11

위험-상태 일정재현	MPGNII로 분리된 22명 환자의 CFH-SNP											
	(유전형에 의해 환자와 대립유전자 번호(t1 및 t2) 및 수가 도시됨)											
1	MPGN2-1	G,G	9,9	A,C	G,T	C,T	G,G	G,A	C,A	G,T	T,T	A,A
2	MPGN2-2	G,G	9,9	A,C	T,T	C,T	G,G	G,A	C,A	G,T	T,T	A,A
3	MPGN2-3	G,G	9,9	A,C	G,T	C,T	G,G	G,A	C,A	G,T	T,T	A,A
4	MPGN2-4	G,G	9,9	A,C	G,T	C,T	G,G	G,A	C,A	G,T	T,C	A,A
5	MPGN2-5	G,G	9,9	A,C	G,T	C,T	G,G	G,A	C,A	G,T	T,T	A,T
6	MPGN2-6	G,G	9,9	A,C	G,T	C,T	G,G	G,A	C,A	G,T	T,T	A,A
7	MPGN2-7	G,G	9,9	A,C	G,T	C,T	G,G	G,A	C,A	G,T	T,T	A,A
8	MPGN2-8	G,G	9,9	A,C	G,T	C,T	G,G	G,A	C,A	G,T	T,T	A,A
9	MPGN2-9	G,G	9,9	A,C	G,T	C,T	G,G	G,A	C,A	G,T	T,T	A,A
10	MPGN2-10	G,G	9,9	A,C	G,T	C,T	G,G	G,A	C,A	G,T	T,C	A,A
11	MPGN2-11	G,G	9,9	A,C	G,T	C,T	G,G	G,A	C,A	G,T	T,T	A,T
12	MPGN2-12	G,G	9,9	A,A	T,T	C,C	G,G	G,A	C,A	G,C	G,G	A,A
13	MPGN2-13	G,G	9,9	A,C	G,T	C,T	G,G	G,A	C,A	G,T	T,T	A,A
14	MPGN2-14	G,G	9,9	A,C	G,T	C,T	G,G	G,A	C,A	G,T	T,T	A,A
15	MPGN2-15	G,G	9,9	A,A	G,T	C,T	G,G	G,A	C,A	G,T	T,T	A,A
16	MPGN2-16	G,G	9,9	C,C	T,T	T,T	G,A	G,A	C,C	G,C	T,C	A,A
17	MPGN2-17	G,G	9,9	A,A	G,G	C,C	G,G	G,A	A,A	G,C	G,G	A,A
18	MPGN2-18	G,G	9,9	A,C	G,T	C,T	G,G	G,A	C,A	G,C	T,T	A,A
19	MPGN2-19	G,G	9,9	A,A	G,G	C,C	G,G	G,A	C,C	G,G	T,T	A,A
20	MPGN2-20	G,G	9,9	A,A	G,G	C,C	G,G	G,A	C,C	G,G	T,T	A,A
21	MPGN2-21	G,A	9,11	C,C	T,T	T,T	G,A	G,A	A,A	G,T	T,T	A,A
22	MPGN2-22	G,G	9,9	A,A	G,G	C,C	G,G	G,A	A,A	G,G	T,T	A,A
23	MPGN2-23	G,G	9,9	A,A	G,G	C,C	G,G	G,A	A,A	G,G	T,T	A,A
24	MPGN2-24	G,G	9,9	A,C	G,T	C,T	G,G	G,A	A,A	G,G	T,T	A,A
25	MPGN2-25	G,A	9,11	A,C	G,T	C,T	G,G	G,A	A,A	G,G	T,T	A,A
26	MPGN2-26	G,G	9,9	A,C	G,T	C,T	G,G	G,A	A,A	G,G	T,T	A,A
27	MPGN2-27	G,G	9,9	A,C	G,T	C,T	G,G	G,A	A,A	G,G	T,T	A,A
28	MPGN2-28	G,G	9,9	A,C	G,T	C,T	G,G	G,A	A,A	G,G	T,T	A,A
29	MPGN2-29	G,G	9,9	A,C	G,T	C,T	G,G	G,A	A,A	G,G	T,T	A,A
30	MPGN2-30	G,G	9,9	A,C	G,T	C,T	G,G	G,A	A,A	G,G	T,T	A,A

[0502]

[0503] 표 12

22명 MPGNII 환자 대 대조군에서 인자 H SNP 빈도의 비교
(대립유전자 빈도가 f1 및 f2로서 제공됨)

SNP	f1 MPGNII	f2 MPGNII	f1	f2	P
액손 2 I62V	42 (G)	2 (A)	202 (G)	60 (A)	0.0051
IVS2 -18insTT	42 (腺嘌呤)	2 (腺嘌呤)	194 (腺嘌呤)	58 (腺嘌呤)	0.0018
액손 7 A307A	16 (C)	28 (A)	88 (A)	174 (C)	0.72
액손 9 Y402H	28 (H)	16 (Y)	88 (H)	174 (Y)	0.00014
액손 10 A473A	40 (G)	4 (A)	74 (G)	62 (A)	0.000013
액손 13 Q672Q	35 (A)	9 (G)	217 (A)	41 (G)	0.45
액손 18 D936E	35 (D)	9 (E)	115 (D)	19 (E)	0.32

[0504]

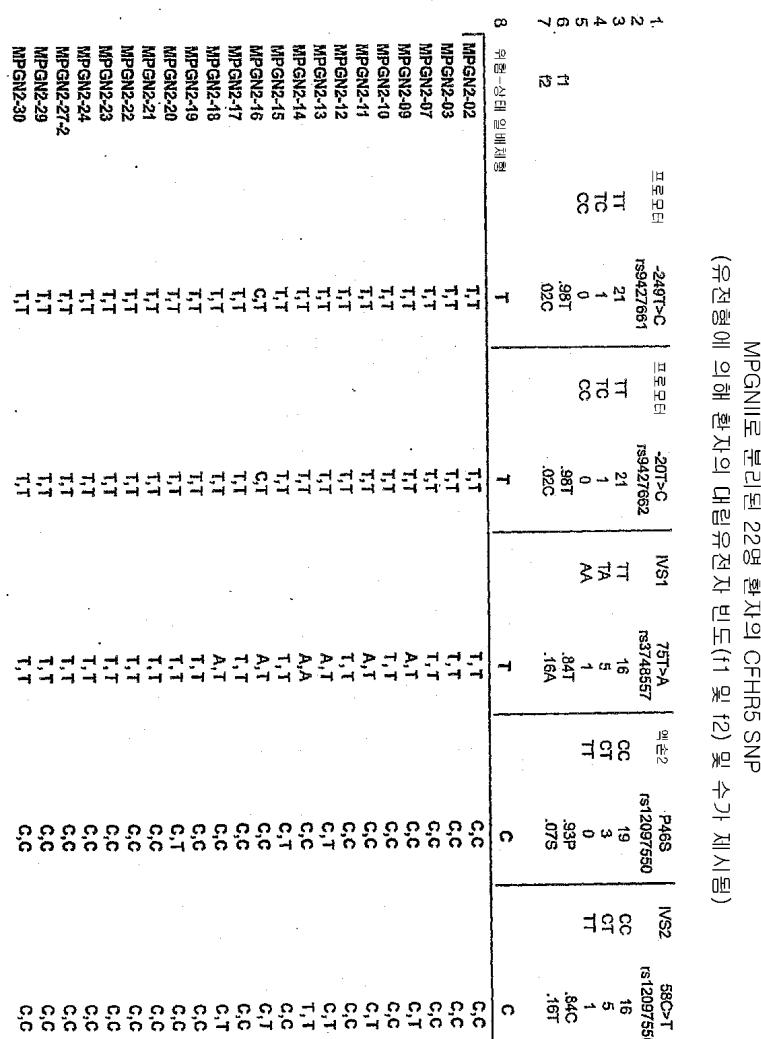
[0505] 표 13

MPGNII와 관련된 코딩 SNP 및 인자 H의 관련 단기 컨센서스 반복(SCR)

SNP	SCR	SCR의 기능
액손 2 I62V	1	C3b와의 상호작용
액손 9 Y402H	7	해파린 결합
액손 10 A473A	8	C 반응 단백질과의 상호작용

[0506]

[0507] 표 14



[0508]

[0509] 표 15

22명 MPGNII 환자 대 대조군에서 CFHR5 SNP 빈도의 비교
(대립유전자 빈도가 f1 및 f2로서 제공됨)

SNP	f1 MPGN II	f2 MPGN II	f1 대조군	f2 대조군	P-값
프로모터 -249T>C	43 (T)	1 (C)	178 (G)	28 (A)	0.033
프로모터 -201T>C	43 (T)	1 (C)	178 (G)	28 (A)	0.033
IVS1 +75T>A	37 (T)	7 (A)	161 (A)	41 (C)	0.38
엑손 2 P46S	41 (P)	3 (S)	205 (P)	1 (S)	0.00023
IVS2 +58C>T	37 (C)	7 (T)	158 (C)	28 (T)	0.28

[0510]

[0511] 표 16A

SNP	총 2 대립유전자		서열번호	프로브	
	f1 MPGN II	f2 MPGN II		변이체 대립유전자	서열번호
rs3753394	프로모터 4	5'-GAAACATTATTACAGATCC-3'	204	5'-TCCTGGGATGTTAGATGATG-3'	205
		5'-GAGGAGATTCATTCAGCC-3'	206	5'-GAGGAGATTCATTCAGCC-3'	207
rs529825	인트론 1	5'-TACACAGTACGATAGAC-3'	210	5'-AGGAGCTGGTAAATATCC-3'	211
		5'-TAAGCTTATCCGACTG-3'	212	5'-TACACAGTACGATAGAC-3'	213
rs800292	엑손 2	5'-CTTGGAAATGTTAA-3'	214	5'-TAACCTATGTACTGT-3'	215
		5'-ACCATTTACATTCG-3'	216	5'-CTTGGAAATGTTAA-3'	217
rs3766404	인트론 6	5'-TTTGGACTCATTTGAA-3'	218	5'-ACCATTTATATTCG-3'	219
		5'-TACTCTCAATGAGTCG-3'	220	5'-TTTTTTTTCGTT-3'	221
rs1061147	엑손 7	5'-GAATAGAGCAAATGG-3'	222	5'-TCTAAACGAAAAAA-3'	223
		5'-ACTTGTGCAATTGCTG-3'	224	5'-TTTGGACTTATTGAA-3'	225
rs1061170	엑손 9	5'-TAATCAAATATGGAA-3'	226	5'-TAATCTCAAATAGTCC-3'	227
		5'-TTCTCTCCATAATTGCG-3'	228	5'-GAATAGAGCAAATGG-3'	229
rs2274700	엑손 10	5'-AAGAAAGGAAATA-3'	230	5'-ACTTGTGCAATTGCTG-3'	231
		5'-TTGATATTGCTCTT-3'	232	5'-TAATCAAATATGGAA-3'	233
	엑손 10A	5'-GGATCAAGAGATTGACAA-3'	234	5'-TTCTCTCCATGATTGCG-3'	235
		5'-GCCTCTGCAATTGCTG-3'	236	5'-AAGAAAGGAAATA-3'	237
rs203674	인트론 10	5'-TTGATATTGCTCTT-3'	238	5'-TTGATATTGCTCTT-3'	239
		5'-GGATCAAGAGATTGACAA-3'	240	5'-GGATCAAGAGATTGACAA-3'	241
rs3753396	엑손 13	5'-ATAAAATTCATGCTG-3'	248	5'-ATAAAATTCATGCTG-3'	249
		5'-CCATCAAGACATGAT-3'	250	5'-CCATCAAGACATGAT-3'	251
rs375046	인트론 15	5'-TTTAAATACATAA-3'	252	5'-TTTAAATAAATAA-3'	253
		5'-TATAATAATTATAA-3'	254	5'-TATAATAATTATAA-3'	255

[0512]

SNP 명칭	위치	프로트			
		침조 대립유전자	서열번호	변이체 대립유전자	서열번호
rs1065489	액손18	5'-CTCCACCTGAGAATCT-3'	256	5'-CTCCACCTGATATTCT-3'	257
	5'-CAATGAGAAATTCAGGT-3'	258	5'-CAATGAGAAATTCAGGT-3'	259	
	액손22	5'-CTCTTCATCACGTCIC-3'	260	5'-CTCTTCATCATGTCIC-3'	261
	5'-GTTGAGAACCTGATGA-3'	262	5'-GTTGAGAACATGATGA-3'	263	

[0513]

[0514]

표 16B

SNP 명칭	위치	프리미엄			
		침조 미림유전자	시술번호	번이체 미림유전자	시술번호
	프로모티 1	5'-TTCTCTGGGATGATAATG-3' (순행)	264	5'-TTCGGGATGATAATG-3' (순행)	265
		5'-CAAAACACTGACATC-3' (역행)	266	5'-CAAAACACTGACATC-3' (역행)	267
rs3753394	프로모티 4	5'-AAATCAGCATGGATATC-3' (순행)	268	5'-AAATCAGCATGGATATC-3' (순행)	269
		5'-AAATCAGCATGGATATC-3' (역행)	270	5'-AAATCAGCATGGATATC-3' (역행)	271
rs529825	인트론 1	5'-AAGTTACACATACAGC-3' (순행)	272	5'-AAGTTACACATACAGC-3' (순행)	273
		5'-AATGGTAAAGCTATC-3' (역행)	274	5'-AATGGTAAAGCTATC-3' (역행)	275
rs800292	액손 2	5'-AGATCTCTGGAAATG-3' (순행)	276	5'-AGATCTCTGGAAATG-3' (순행)	277
		5'-TGATACATTATATAC-3' (역행)	278	5'-TGATACATTATATAC-3' (역행)	279
	인트론 2	5'-TCATACTTTTTT-3' (순행)	280	5'-ATACTTTTTT-3' (순행)	281
		5'-GGGCCTCTAAACG-3' (역행)	282	5'-GCTTCTAAACGQA-3' (역행)	283
rs376604	인트론 6	5'-ATACTATTAGACTC-3' (순행)	284	5'-ATACTATTAGACTC-3' (순행)	285
		5'-ACACTAACTCTAAATG-3' (역행)	286	5'-ACACTAACTCTAAATG-3' (역행)	287
rs1061147	액손 7	5'-CCGGGGAAATACAGCA-3' (순행)	288	5'-CCGGGGAAATACAGCA-3' (순행)	289
		5'-AGTACTTGCGATTTG-3' (역행)	290	5'-AGTACTTGCGATTTG-3' (역행)	291
rs1061170	액손 9	5'-GGATATAATCAAAATG-3' (순행)	292	5'-GGATATAATCAAAATG-3' (순행)	293
		5'-CAAACTCTCACAATG-3' (역행)	294	5'-CAAACTCTCACAATG-3' (역행)	295
rs2274700	액손 10	5'-CTTAAAGAAAAAGCG-3' (순행)	296	5'-CTTAAAGAAAAAGCG-3' (순행)	297
		5'-TTGATGATGATTTG-3' (역행)	298	5'-TTGATGATGATTTG-3' (역행)	299
	액손 10A	5'-TGTAGTGGATCAAGAATG-3' (순행)	300	5'-TGTAGTGGATCAAGAATG-3' (순행)	301
		5'-CATGGGCCCTTCATG-3' (역행)	302	5'-CATGGGCCCTTCATG-3' (역행)	303
rs203674	인트론 10	5'-ACCTTTTATGATGAG-3' (순행)	304	5'-ACCTTTTATGATGAG-3' (순행)	305
		5'-CTTATGATGATGAG-3' (역행)	306	5'-CTTATGATGATGAG-3' (역행)	307
rs3753396	액손 13	5'-ACCTAAATAATCAAA-3' (순행)	308	5'-ACCTAAATAATCAAA-3' (순행)	309
		5'-CTCTCCATCAACACAT-3' (역행)	310	5'-CTCTCCATCAACACAT-3' (역행)	311
rs375046	액손 15	5'-TATTTTATTAAC-3' (순행)	312	5'-TATTTTATTAAC-3' (순행)	313
		5'-AAAAATAATAATTAATG-3' (역행)	314	5'-AAAAATAATAATTAATG-3' (역행)	315

[0515]

SNP 명칭	위치	프리미어		
		증조 대립유전자	서열번호	증이체 대립유전자
rs1065489	액손 18	5'-TAATCTCCACCTGAG-3' (순열)	316	5'-TAATCTCCACCTGAT-3' (순열)
		5'-AACACCATGAGAAATC-3' (역열)	318	5'-AACACCATGAGAAATG-3' (역열)
	액손 22	5'-TATCGTCTTCATCAC-3' (순열)	320	5'-TATCGTCTTCATCAT-3' (순열)
		5'-GCAATGGTGGAGAACG-3' (역열)	322	5'-GCAATGGTGGAGAACG-3' (역열)
			323	

[0516]

[0517] XV. 참조문헌

Full citations are provided below for references cited by by author and date above:

Abecasis et al. "Age-related macular degeneration: a high-resolution genome scan for susceptibility loci in a population enriched for late-stage disease." *American Journal of Human Genetics* 74, 482-94 (2004).

Akiyama et al. "Inflammation and Alzheimer's disease." *Neurobiol. Aging* 2000; 21:383-421.

Allikmets et al. "Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration." *Science* 1997; 277:1805-1807.

Allikmets. "Further evidence for an association of ABCR alleles with age-related macular degeneration. The International ABCR Screening Consortium." *Am J Hum Genet* 67, 487-91 (2000).

Ambati et al. "Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies." *Surv Ophthalmol* 2003; 48(3):257-293.

Anderson et al. "A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye." *Am J Ophthalmol* 2002, 134:411-431.

Anderson et al. "Characterization of β -amyloid assemblies in drusen: the deposits associated with aging and age-related macular degeneration." *Exp. Eye Res.* 2004; 78:243-256.

Angaku-. "Complement regulatory proteins in glomerular diseases." *Kidney Int* 1998; 54:1419-1428.

Appel et al. "Membranoproliferative glomerulonephritis type II (Dense Deposit Disease): an update." *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:1392-1403.

Ault et al. "Human factor H deficiency. Mutations in framework cysteine residues and block in H protein secretion and intracellular catabolism." *J Biol Chem* 1997; 272:25168-25175.

Bao et al. "Decay-accelerating factor expression in the rat kidney is restricted to the apical surface of podocytes." *Kidney Int* 2002;62:2010-2021.

Barbiano di Belgiojoso et al. "The prognostic value of some clinical and histological parameters in membranoproliferative glomerulonephritis." *Nephron* 1977;19:250-258.

Barrett et al. "Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps." *Bioinformatics* 2004;21:263-5.

[0518]

- Bennett et al. "Mesangiocapillary glomerulonephritis type 2 (dense deposit disease): Clinical features of progressive disease." *Am J Kidney Dis* 1989; 13:469-476.
- Bird et al. "An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group." *Surv Ophthalmol* 1995, 39: 367-374.
- Bush RA, Lei B, Tao W, Raz D, Chan CC, Cox TA, Santos-Muffley M, Sieving PA. 2004. Encapsulated cell-based intraocular delivery of ciliary neurotrophic factor in normal rabbit: dose-dependent effects on ERG and retinal histology. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 45:2420-30.
- Cade JR, DeQuesada AM, Shires DL, Levin DM, Hackett RL, Spooner GR, Schlein EM, Pickering MJ, Holcomb A. 1971. The Effect of Long Term High Dose Heparin Treatment on the Course of Chronic Proliferative Glomerulonephritis. *Nephron*. 8:67-80.
- Cameron et al. "Idiopathic mesangiocapillary glomerulonephritis. Comparison of types I and II in children and adults and long-term prognosis." *Am J Med* 1983;74:175-192.
- Capecchi. *Science* 1989; 244:1288-1292.
- Caprioli et al. "Complement factor H mutations and gene polymorphisms in haemolytic uraemic syndrome: the C-257T, the A2089G and the G2881T polymorphisms are strongly associated with the disease." *Hum Mol Genet* 12, 3385-95 (2003).
- Chong et al. "Decreased thickness and integrity of the macular elastic layer of Bruch's membrane correspond to the distribution of lesions associated with age-related macular degeneration" *Am J Pathol* 166, 241-51 (2005).
- Colville et al. "Visual impairment caused by retinal abnormalities in mesangiocapillary (membranoproliferative) glomerulonephritis type II ("dense deposit disease")." *Am J Kidney Dis* 2003; 42:E2-5.
- Compton. *Nature* 1991; 350:91-91.
- Cousins et al. "Monocyte activation in patients with age-related macular degeneration: a biomarker of risk for choroidal neovascularization?" *Arch Ophthalmol* 122, 1013-8 (2004).
- Crabb et al. "Drusen proteome analysis: An approach to the etiology of age-related macular degeneration." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99:14682-14687.
- de Jong. "Risk profiles for ageing macular disease." *Ophthalmologia* 2004; 218 Suppl 1:5-16.

Diamond JR, Karnovsky MJ. 1986. Nonanticoagulant Protective Effect of Heparin in Chronic Aminonucleoside Nephrosis. *Renal Physiol. Basel* 9:366-374.

Dragon-Durey et al. "Heterozygous and homozygous factor H deficiencies associated with hemolytic uremic syndrome or membranoproliferative glomerulonephritis: report and genetic analysis of 16 cases." *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:787-795.

Droz et al. "Évolution a long terme des glomérulonéphrites membranoproliferative de l'adulte: remissions spontanée durable chez 13 malades avec étude de biopsies rénales itératives dans 5 cas." *Nephrologie* 1982;3:6-11.

Duvall-Young et al. "Fundus changes in (type II) mesangiocapillary glomerulonephritis stimulating drusen: a histopathologocal report." *Br J Ophthalmol* 1989a; 73(4):297-302.

Duvall-Young et al. "Fundus changes in mesangiocapillary glomerulonephritis type II: clinical and fluorescein angiographic findings." *Br J Ophthalmol* 1989b; 73(11):900-906.

Edwards et al. "Complement factor H Polymorphism and age-related macular degeneration." *Science* 2005;308:421-424.

Esparza-Gordillo J, Goicoechea de Jorge E, Buil A, Carreras Berges L, Lopez-Trascasa M, Sanchez-Corral P, Rodriguez de Cordoba S. 2005. Predisposition to atypical hemolytic uremic syndrome involves the concurrence of different susceptibility alleles in the regulators of complement activation gene cluster in 1q32. *Human Mol. Genetics* 14:703-712.

Espinosa-Heidman et al. "Macrophage depletion diminishes lesion size and severity in experimental choroidal neovascularization." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003; 44:3586-3592.

Estaller et al. "Cloning of the 1.4-kb mRNA species of human complement factor H reveals a novel member of the short consensus repeat family related to the carboxy terminal of the classical 150-kDa molecule." *J Immunol* 1991; 146(9):3190-3196.

Floege J, Eng E, Young BA, Couser WG, Johnson RJ. 1993. Heparin suppresses mesangial cell proliferation and matrix expansion in experimental mesangioproliferative glomerulonephritis. *Kidney International* 43:369-380.

Frueh et al. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41(4):452-461.

Gibbs. *Nucl Acids Res* 1989; 17:2427-2448.

Girardi G, Redecha P, Salmon JE. 2004. Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. *Nature Medicine* 10:1222-1226.

- Girardi G. 2005. Heparin treatment in pregnancy loss: Potential therapeutic benefits beyond anticoagulation. *J. Reproduc. Immunol.* 66:45-51.
- Gold et al. "Estrogen receptor genotypes and haplotypes associated with breast cancer risk." *Cancer Res* 2004; 64:8891-8900.
- Habib et al. "Dense deposit disease. A variant of membranoproliferative glomerulonephritis." *Kidney Int* 1975; 7:204-15.
- Habib et al. "Glomerular lesions in the transplanted kidney in children." *Am J Kidney Diseases* 1987;10:198-207.
- Hageman et al. "An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration." *Prog Retin Eye Res* 2001; 20: 705-732.
- Hageman et al. "Common haplotype in the complement regulatory gene, factor H (*HFI/CFH*), predisposes individuals to age-related macular degeneration." *Proc Nat Acad Sci* 2005; 102: 7227-32.
- Hageman et al. "Vitronectin is a constituent of ocular drusen and the vitronectin gene is expressed in human retinal pigmented epithelial cells." *FASEB Journal* 1999; 13:477-484.
- Haines et al. "Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration." *Science* 2005;308:419-421.
- Hayashi et al. "Evaluation of the ARMD1 locus on 1q25-31 in patients with age-related maculopathy: genetic variation in laminin genes and in exon 104 of HEMICENTIN-1." *Ophthalmic Genetics* 25, 111-9 (2004).
- Houdebine, 2000, Transgenic animal bioreactors, *Transgenic Res.* 9:305-20
- Holers. "The complement system as a therapeutic target in autoimmunity." *Clin Immunol* 2003; 107:140.
- Holz. et al. "Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease." *Am J Ophthalmol* 2004;137:504-510.
- Huang et al. "Peripheral drusen in membranoproliferative glomerulonephritis." *Retina* 2003; 23(3):429-431.
- Iyengar et al. "Model Free Linkage Analysis in Extended Families Confirms a Susceptibility Locus for Age Related Macular Degeneration (ARMD) on 1q31 [ARVO Abstract]." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:2113.

- Jansen et al. "In situ complement activation in porcine membranoproliferative glomerulonephritis type II." *Kidney Int* 1998; 53(2):331-349.
- Johnson et al. "A potential role for immune complex pathogenesis in drusen formation." *Exp Eye Res* 2000; 70:441-449.
- Johnson et al. "Complement activation and inflammatory processes in drusen formation and age-related macular degeneration." *Exp. Eye Res.* 2001; 73:887-896.
- Johnson et al. "The Alzheimer's A beta -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration." *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 11830-5 (2002).
- Kinoshita. "Biology of complement: the overture." *Immunol.Today* 1991; 12:291.
- Klaver et al. "Genetic risk of age-related maculopathy. Population-based familial aggregation study." *Arch Ophthalmol* 1998a; 116:1646-1651.
- Klaver et al. Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* 1998b; 63:200-206.
- Klein et al. "Age-related macular degeneration. Clinical features in a large family and linkage to chromosome 1q." *Arch Ophthalmol* 1998; 116:1082-1088.
- Klein et al. "Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration." *Science* 2005; 308:385-389.
- Klein et al. "Genetics of age-related macular degeneration." *Ophthalmol Clin North Am* 2003; 16(4):575-582.
- Klein et al. "Prevalence of age-related maculopathy." *Ophthalmol* 1992; 99(6):933-943.
- Klein et al. "The epidemiology of age-related macular degeneration." *Am J Ophthalmol* 2004; 137(3):504-510.
- Leys et al. "Subretinal neovascular membranes associated with chronic membranoproliferative glomerulonephritis type II." *Graefe's Arch Clin Exper Ophthalmol* 1990; 228:499-504.
- Lillico et al., 2005, Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. *Drug Discov Today*. 10:191-6
- Liszewski et al. "The role of complement in autoimmunity." *Immunol Ser* 1991; 54:13.

Manuelian et al. "Mutations in factor H reduce binding affinity to C3b and heparin and surface attachment to endothelial cells in hemolytic uremic syndrome." *J Clin Invest* 2003;111:1181-1190.

McAvoy et al. "Retinal changes associated with type 2 glomerulonephritis." *Eye* 2005 19:985-9

McEnery. "Membranoproliferative glomerulonephritis: The Cincinnati experience cumulative renal survival from 1957 to 1989." *J Pediatr* 1990;116:S109-S114.

McRae et al. "Human factor H-related protein 5 (FHR-5). A new complement-associated protein." *J Biol Chem* 2001; 276 (9):6747-6754.

Meri et al. "Regulation of alternative pathway complement activation by glycosaminoglycans: specificity of the polyanion binding site on factor H." *Biochem Biophys Res Commun* 1994;198:52-59.

Miller et al. "The association of prior cytomegalovirus infection with neovascular age-related macular degeneration." *Am J Ophthalmol* 138, 323-8 (2004).

Morgan et al. "Complement deficiency and disease." *Immunol Today* 1991; 12:301.

Morgan. "Regulation of the complement membrane attack pathway." *Crit Rev Immunol* 19, 173-98 (1999).

Mullins et al. "Characterization of drusen-associated glycoconjugates." *Ophthalmology* 104, 288-94 (1997).

Mullins et al. "Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain molecular constituents common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis and dense deposit disease." *FASEB J.* 2000; 14:835-846.

Mullins et al. "Structure and composition of drusen associated with glomerulonephritis: Implications for the role of complement activation in drusen biogenesis." *Eye* 2001; 15:390-395.

Murphy et al. "Factor H-related protein-5: a novel component of human glomerular immune deposits." *Am J Kid Dis* 2002;39:24-27.

Neary et al. "Linkage of a gene causing familial membranoproliferative glomerulonephritis type III to chromosome 1." *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13(8):2052-2057.

Neri et al. *Adv. Nucl Acid Prot Analysis* 2000; 3826:117-125.

Niculescu et al. "Complement activation and atherosclerosis." *Mol. Immunol.* 1999; 36:949-955.

- Nielsen et al. *Science* 1991; 254:1497-1500.
- O'Brien et al. "Electrophysiology of type II mesangiocapillary glomerulonephritis with associated fundus abnormalities." *Br J Ophthalmol* 1993; 77:778-80.
- Orita et al. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:2766-2770.
- Orth et al. The nephrotic syndrome. *New Engl J Med* 1998; 338:1202-1211.
- Pascual et al. "Identification of membrane-bound CR1 (CD35) in human urine: evidence for its release by glomerular podocytes." *J Exp Med* 1994; 79:889-899.
- Penfold et al. "Immunological and aetiological aspects of macular degeneration."
- Progress in Retinal and Eye Research* 2001; 20:385-414.
- Perez-Caballero D, Gonzalez-Rubio C, Gallardo ME, Vera M, Lopez-Trascasa M, Rodriguez de Cordoba S, Sanchez-Corral P. 2001. Clustering of Missense Mutations in the C-Terminal Region of Factor H in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 68:478-484.
- Piatek et al. *Nat Biotechnol* 1998; 16:359-363.
- Pickering et al. "Uncontrolled C3 activation causes membranoproliferative glomerulonephritis in mice deficient in complement factor H." *Nat Genet* 2002; 31:424-428.
- Prasad et al. "Pendred syndrome and DFNB4 - Mutation screening of SLC26A4 by denaturing high-performance liquid chromatography and the identification of seven novel mutations." *Am J Med Genet* 2004; 124A:1-9.
- Raines et al. "Fundus changes in mesangiocapillary glomerulonephritis type II: vitreous fluorophotometry." *Br J Ophthalmol* 1989; 73:907-910.
- Richards A, Buddles MR, Donne RL, Kaplan BS, Kirk E, Venning MC, Tielemans CL, Goodship JA, Goodship THJ. 2001. Factor H Mutations in Hemolytic Uremic Syndrome Cluster in Exons 18-20, a Domain Important for Host Cell Recognition. *Am. J. Hum. Genet.* 68:485-490.
- Ripoche et al. "The complete amino acid sequence of human complement factor H." *Biochem J* 1988, 249:593-602.
- Rodriguez de Cordoba et al. "The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations." *Mol Immunol* 41, 355-67 (2004).

- Rops Angelique L.W.M.M., Van Der Vlag J, Lensen Joost F.M., Wijnhoven Tessa J.M., Van Den Heuvel Lambert P.W.J., van Kuppevelt TH, Berden Jo H.M. 2004. Heparan sulfate proteoglycans in glomerular inflammation. *Kidney International* 65:768-785.
- Russell et al. "Location, substructure and composition of basal laminar drusen compared with drusen associated with aging and age-related macular degeneration." *Am. J. Ophthalmol.* 2000; 129:205-214.
- Saiki et al. *Nature* 1986; 324:163-166.
- Sanchez-Corral P, Perez-Caballero D, Huarte O, Simckes AM, Goicoechea E, Lopez-Trascasa M, Rodriguez de Cordoba S. 2002. Structural and Functional Characterization of Factor H Mutations Associated with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Am. J. Genet.* 71:1285-1295.
- Saunders RE, Goodship THJ, Zipfel PF, Perkins SJ. An Interactive Web Database of Factor H-Associated Hemolytic Uremic Syndrome Mutations: Insights Into the Structural Consequences of Disease-Associated Mutations. *Human Mutation* 2006. 27:21-30.
- Schultz et al. "Analysis of the ARMD1 locus: evidence that a mutation in HEMICENTIN-1 is associated with age-related macular degeneration in a large family." *Hum Mol Genet* 2003; 12(24):3315-3323.
- Schwartz et al. "Complement analysis in children with idiopathic membranoproliferative glomerulonephritis: A long-term follow-up." *Pediatr Allergy Immunol* 2001; 12:166-172.
- Seddon et al. "Association between C-reactive protein and age-related macular degeneration." *Jama* 291, 704-10 (2004).
- Seddon et al. "The epidemiology of age-related macular degeneration." *Ophthalmol Clin* 2004; 44:17-39.
- Sharma et al. "Biologically active recombinant human complement factor H: synthesis and secretion by the baculovirus system." *Gene* 143:301-302.
- Sharma et al. "Identification of three physically and functionally distinct binding sites in human complement factor H by deletion mutagenesis." *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:10996-11001.
- Shen et al. "Ying and Yang: complement activation and regulation of Alzheimer's disease." *Prog Neurobiol* 2003; 70(6):463-472.

Sieving, P.A., R.C. Caruso, W. Tao, D.J.S. Thompson, K.R. Fullmer, H. Rodriguez Coleman and R.A. Bush. 2005. Phase I study of ciliary neurotrophic factor (CNF) delivered by intravitreal implant of encapsulated cell technology (ECT) device in patients with retinitis pigmentosa.

Skerka et al. "The human factor H-related protein 4 (FHR-4). A novel short consensus repeat-containing protein is associated with human triglyceride-rich lipoproteins." *J Biol Chem* 1997; 272(9):5627-5634.

Song Y, Zhao L, Tao W, Laties AM, Luo Z, and Wen R. Photoreceptor protection by cardiotrophin-1 in transgenic rats with the rhodopsin mutation s334ter. *IOVS*, 44(9):4069-75. 2003.

Souied et al. "The epsilon4 allele of the apolipoprotein E gene as a potential protective factor for exudative age-related macular degeneration." *Am J Ophthalmol.* 1998; 125:353-359.

Strausberg et al. "Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences." *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(26):16899-16903.

Striker GE. 1999. Therapeutic uses of heparinoids in renal disease patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 14:540-543.

Swainson et al. "Mesangiocapillary glomerulonephritis: A long-term study of 40 cases." *J Pathol* 1983;141:449-468.

Tao W, Wen R, Goddard MB, Sherman S, O'Rourke PJ, Stabila PF, Bell WJ, Dean BJ, Kauper KA, Budz VA, Tsiaras WG, Acland GM, Pearce-Kelling S, Laties AM, and Aguirre GD. Encapsulated Cell-Based Delivery of CNTF Reduces Photoreceptor Degeneration in Animal Models of Retinitis Pigmentosa. *IOVS*, Vol. 43 (10) 3292-3298. 2002.

Thelwell et al. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:3752-3761.

Timmerman et al. "Differential expression of complement components in human fetal and adult kidneys." *Kidney Int* 1996;49:730-740.

Torzserki et al. "Processes in atherogenesis complement activation." *Atherosclerosis*. 1997; 132:131-138.

Tuo et al. "Genetic factors in age-related macular degeneration." *Prog Retin Eye Res* 2004; 23(2):229-249.

van den Dobbelaer et al. "Regulation of C3 and factor H synthesis of human glomerular mesangial cells by IL-1 and interferon-gamma." *Clin Exp Immunol* 1994;95:173-180.

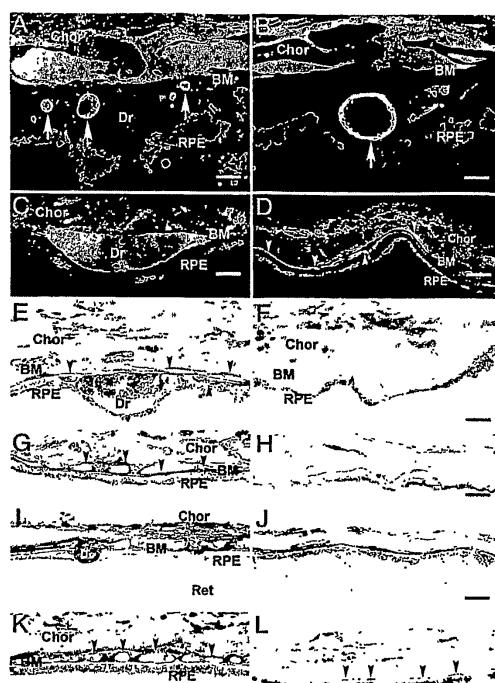
- Van Leeuwen et al. "Epidemiology of age-related macular degeneration." *Eur J Epidemiol* 2003; 18(9):845-854.
- Vingerling et al. "Epidemiology of age-related maculopathy." *Epidemiol Rev.* 1995;17(2):347-360.
- Vingerling et al. "The prevalence of age-related maculopathy in the Rotterdam Study." *Ophthalmol* 1995 Feb;102(2):205-210.
- Walport. "Complement. First of two parts." *N Engl J Med* 2001;344:1058-1066.
- Wang et al. "Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers." *Cell* 119, 831-45 (2004).
- Weeks et al. "Age-related maculopathy: a genomewide scan with continued evidence of susceptibility loci within the 1q31, 10q26, and 17q25 regions." *Am J Hum Genet* 2004; 75:174.
- Weeks et al. "Age-related maculopathy: an expanded genome-wide scan with evidence of susceptibility loci within the 1q31 and 17q25 regions." *Am J Ophthalmol* 2001; 132:682-692.
- Weiler JM, Daha MR, Austen KF, Fearon DT. 1976. Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein β 1H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:3268-3272.
- Zarbin. "Age Related Macular Degeneration: a review of pathogenesis." *Eur J Ophthalmol* 1998, 8:199-206.
- Zarbin. "Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration." *Arch Ophthalmol* 2004; 122(4):598-614.
- Zipfel et al. "Complement factor H and hemolytic uremic syndrome." *Int Immunopharmacol* 1, 461-8 (2001).
- Zipfel et al. "Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases." *Biochem Soc Trans* 30, 971-8 (2002).
- Zipfel et al. "The role of complement in membranoproliferative glomerulonephritis." In *Complement and Kidney Disease* 2005
- Zipfel. "Complement factor H: physiology and pathophysiology." *Semin Thromb Hemost* 27, 191-9 (2001).
- Zipfel. "Hemolytic uremic syndrome: how do factor H mutants mediate endothelial damage?" *Trends Immunol* 22, 345-8 (2001).

[0527]

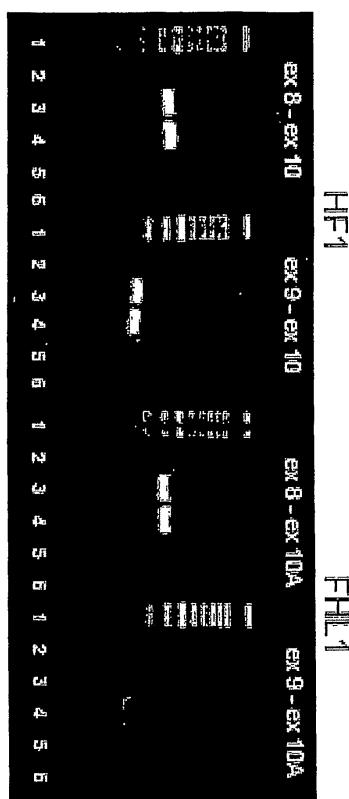
- 본 발명이 특정 구체예를 참조로 하여 상세하게 기술되었으나, 당업자는 개질 및 개선이 첨부된 청구범위에 개시된 본 발명의 범위 및 정신내에 있음을 인식할 것이다. 본원에서 인용된 모든 간행물 및 특허 문헌은 각 간행물 또는 문헌이 구체적으로 및 개별적으로 본원에 참조로서 포함된다고 명시된 바와 같이 본원에 참조로서 포함된다. 간행물 및 특허 문헌 (특허, 공개된 특허 출원, 및 비공개된 특허 출원)의 인용은 임의의 그러한 문헌이 타당한 종래 기술임을 시인하거나, 이들의 내용 또는 날짜에 관한 임의의 용인을 구성하려는 의도가 아니다. 본 발명은 지금까지 서면으로 기술되었으며, 당업자는 본 발명이 다양한 구체예로 실시될 수 있고, 상기 설명이 실례를 목적으로 하는 것이며 하기 청구범위를 제한하는 것은 아님을 인식할 것이다.

도면

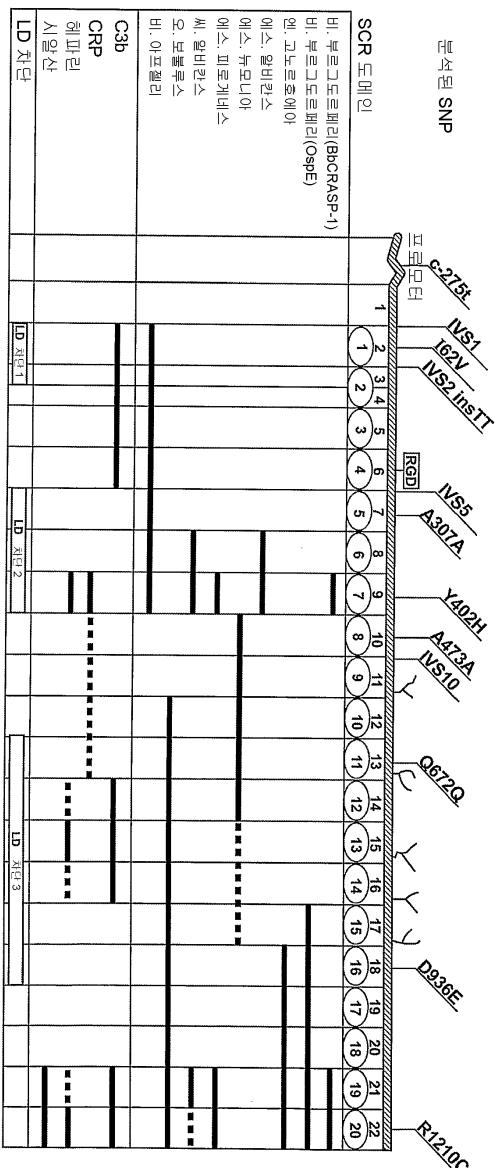
도면1



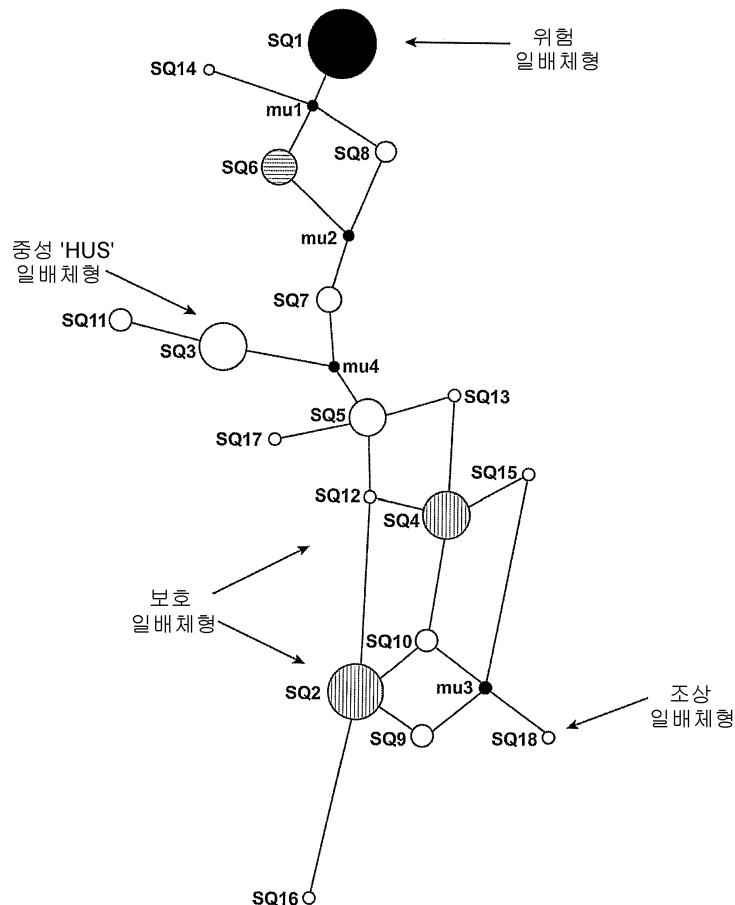
도면2



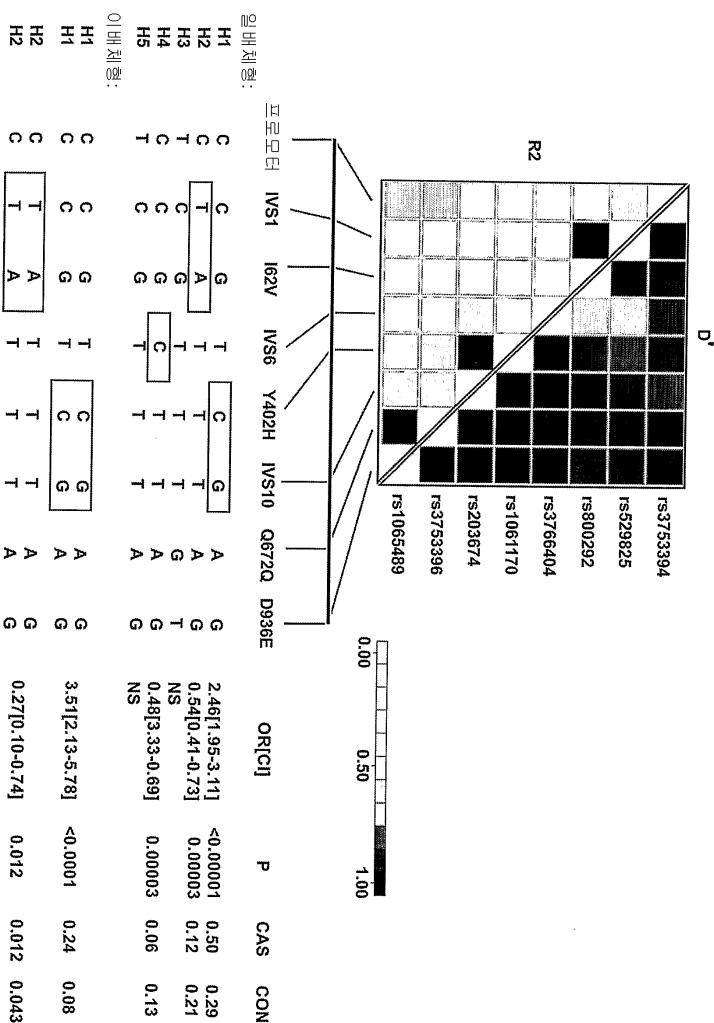
도면3



도면4



도면5



도면6a

AATTCTTGGAAAGAGGAGAACTGGACGTGTGAAACAGAGTTAAGCTGGTAAATGTCCCTCTAAAAGATCCAA
 AAAATGAGACTTCTAGCAAAGATTATTGCTTATGTTATGGGCTATTGTGTAGCAGAAGATTGCAATG
 AACCTCCCTCAAAGAAGAAATACAGAAATCTGACAGGTCTGGTCTGACCAAACATATCCAGAAGGCAC
 CCAGGCTATCTATAAAATGCCGCCCTGGATAGATCTCTGGAAATGTAATAATGGTATGAGGAGGG
 GAATGGGTTGCTCTTAATCCATAAGGAATGTCAGAAAAGGCCCTGGGACATCTGGAGATACTCCCT
 TTGGTACTTTACCCCTAACGGAGAAATGTTGAAATATGGTGTAAAAGCTGTATACATGTAATG
 GGGGTATCAATTGCTAGGTGAGATTAATTACCGTGAATGTGACACAGATGGATGGACCAATGATAATTCT
 ATATGTGAAGTTGTTGAGGTGTTACCACTGACAGCACCAGAGAATGCAAAATTGTCAGTAGTGCATGG
 AACAGATCGGAAATCACCATTGGACAGCAGCTACGGTTGTTGTAACTCAGGCTACAAAGATGAAAG
 AGATGAGAAGAAATGATTGCTACAGCTGGGATTTGGAGATAAGGAAACCAAAGTGTGTGAAATTCA
 TGCAATCCCCAGATGTTATAATGGATCTCTATATCTCAGAAGATTATTATAAGGAGAATGACGAT
 TTCAATATAATGTAACATGGGTATGAAATACAGTGAAGAGGAGATGCTGTATGCACTAATCTGGATG
 GCGCTTGTGCTTCATGTAAGGAAAATCATGTTGATAATCCTTACATTCCTAAATGGTGAATCTACCT
 TTAAGGATTAACACAGAACAGGAGATAAACATGCTTACAGTACAGCTGAGAAATGTTTATCTGCAACCC
 GGGGAAATACAGCCTAAAGTACAAGTACTGGCTGGATACCTGCTCCGAGATGTAACCTGAAACCTTGTGA
 TTATCAGACATTAACATGGAGGTCTATATCATGAGAAATGCGTAGACCATACTTCCAGTAGCTGT
 GGAAAATTAATCTCTATTACTGTGATGACATTTGAGACTCCGTGAGAAGTTACTGGGATCACATTC
 ATTGCGACACAAAGTGGATGTCGGCAGACTACCCCTCAGAAATGTTTATTTCTTATTTGAAA
 TGGATATAATCAAATCATGGAAGAAAGTTGTCAGGGTAAATCTATAGCTGTTGCTGCATCTGG
 TACCGCTCTCCAAAAGCCAGCACACATTCTACATGTTGAGAATGGCTGTTCTACTCCAGATGCA
 TCCGTGCTAAACATGTTCAAATCAAGTATAGATATTGAGAATGGGTTATTCTGATCTCAGTATAC
 ATATGCTTAAAGAAAAGCAAAATCAATGCAAACTAGGATATGTAACAGCAGATGGTGAACATCA
 GGATCAATTAGATGTTGAAAGATGGATGGTCAGCTCAACCCACGTGCAATTAAATCTGTATATCCAG
 TATTATTAAGTGGCAGAACTTAAATGTTGACTACATGGTTAAGCTGAAATGACACATTGGACTATGAAATG
 CCATGATGGTTATGAAAGCAATCTGGAGGACCAACTGGTTCATAGTGTGTTTACATGGTTGCT
 GATTACCCATATGTTGAAAGAGAAATGCAACTTCTAAATAGATGTCACACTTGTCTGATCGCA
 AGAAAGACCAAGTATAAAGTTGAGAGGTGTTGAAATCTCTGCAAAACCAGGATTACAAATAGTTGACC
 TAAATCCGTCAGTGTGACTTGGGAGTTGCTCTGACCTCCAAATGTAAGGAGCAAGTACAATCA
 TGTGTCACCTCTGAATGGGAATGTTGAGGAAATCTCTAGATGAAAGGGACCTAATAAAATTCAATGTTGATGG
 AAGTGGTGAATATTGCAATCTAGATTCTAATGAAAGGGACCTAATAAAATTCAATGTTGATGG
 AGATGGGACAACCTTACCACTGTTGAGATGTTGAGGAGAGTACCTGTTGAGATATCTGGAACAT
 GGCTGGGCCAGCTTCTCCCTCTTATTACTATGGAGATTCTGAGATTCAATTGCTCAGAATCAT
 TTCAATGATTGGACACAGATTAATGGTGTATTCTGGAGATGTCAGGACCAACTTCCAGTGTG
 AATAGATAACCTAAGAAGTGCACATCAAAATTAAATTAACATTGAGGAACATTAAAAAAGAAG
 GAATTCGATCATAAATTCTAACATAAGGATCACAGTGTAGGAGAAAAGGAGATGGATACACAGTCTGCA
 TAAATGGAAGATGGGATCAGAGTGAATGCTCAATGGCACAATACAAATTATGCCACCTCCACCTCA
 GATTCCCAATTCTCACAAATATGACAACCCACACTGAATTATCGGGATGGAGAAAATGTTGCTTGC
 CAAGAAAATTATCTAACATTAGGAAGGAGAAGAAATTACATGCAAGATGGAAGATGGCAGTCACACC
 TCTGTGAAAGAAATTCTCATGCAACACCCTCAGATGAAACAGGAAACCATTAATTCTCAGGTC
 TTCAACAAGGATGTTGACTCATGGACTAATTGAGTTACTGTGAGGGGGTTTCAGGATATCTGAA
 GAAAATGAAACACATGCTACATGGGAAATGGAGTTCTCACCTCAGTGTGAAAGGCTTCTGTA
 CTCCACCTGAGATTCTCATGGTTGAGCTCACATGTCAGACAGCTTACAGTATGGAGAGAAGTTAC
 GTGTAATTGTTGAGGTTGAGATTGATGGGAGATGAGTGGAAATGCTTAGGAGAAAATGGTCT
 CACCCCTCATCATGCTAACAAACAGATTGCTCAGTTACCTAGTTGAAATGCCATACCCATGGGAG
 AGAAGAAGGATGTTGAAAGGGGGTGGAGCAAGTGTACTACACTTGTGCAACATATTACAAATGGATGG
 AGCCAGTAATGTAACCTGATTAATGAGAGTGGAGGAGAAGCCACATGCAAGAGACACCTCTGTG
 AATCCGCCCCAGTACAAATGCTTATAGTGTGAGAGACAGATGAGTAAATATCCATCTGGTGAGAG
 TACGTTTACATGAGGAGCCCTTATGAAATGTTGGGAGATGAGAAGTGTGTTAAATGAAACATG
 GACGGAAACACCTCAATGCAAGATTCTACAGGAAAATGTTGGGCCCTCCACCTATTGACAATGGGAC
 ATTACTCATTCCCGTTGTCAGTATATGCTCCAGCTCATGAGTTGAGTACCAATGCCAGACTGTATC
 AACTTGAGGGTAACAAGCGAATAACATGAGAAATGGGACATGGTCAAGAACACCAAAATGCTTACATCC

도면6b

GTGTGTAATATCCGAGAAATTATGAAATTATAACATAGCATTAAAGTGGACGCCAACAGAAGCTT
 TATTGAGAAACAGGTGAACTGTTGAAATTGTTGCTAAACGGGATATGTCCTTCATCACGTTCTCACA
 CATTGCGAACACATGTTGGGATGGGAAACTGGAGTATCCAACCTGTGCAAAAGATGAAATCAATCATA
 AAGTGCACACCTTATTGAGACTTGTAGTATTAAATCACTGTCATTCATTGTTATGTTGTTA
 CTCCTTTTATTCTACAGTAAATTGGGATTAATTGTTGAAATGTAATTATAAGCTGAGACCGGTGGC
 TCTCTT

도면7

MRLAKIICLMLWAI CVAEDCNELPPRNTEILTGSWSQDQTYPEGTOIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGE
 WVALNPLRKQKRPCGHPGDPFTLTTGGNVF EYGVKAVYTCNEGYQLLGEIN YRECDT DGWTNDIPI
 CEVVKCLPVTAPENGIVSSAMEPDREYHFGQAVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWSEKEPKC
 EISCKSPDVSPISQKIIYKENERFQYKCNMVEYSERGDAVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPYIPNGD
 YSPLRIKHRTGDEITYQCRNFGYPATRGNNTAKCTSTGWIPAPRCTLKPCDYPDIKHGGLYHN
 MRRGFLYFPVAVG
 KYYSYCCDEHFETPSGSYWDHHTCQDGSWPAVPLRKCYFPYLENGYNQNHGRKFVQGKSID
 VACHPGY
 ALPKAQTTVTCMENGWSPTRPRCIRVKTCQKSSIDIENGFISSEQYTYALKEKAKYQCKL
 GYVTADGETSG
 SIRCGKDGWSAQPTC1KSCD1PVFMNARTKNDFTWFKLNDTLDYECHD
 GYESNTGTTG
 SIVCGYNGWSD
 LPICYERECECLPKIDVHLVDPKKDQYKVGEVLKFSCPKGFTIVGPNSV
 QCYHFGLSPDL
 PICKEQVQSC
 GPPPELNGNVKEKTK
 KEYGHSEVVEYYCNPRFLMKGP
 NPKIQCVDGEW
 TLP
 VCIVEESTCGD
 IPELEHG
 WAQLSSPPYYGDS
 VFNCS
 FTMIGHRS
 ITCIHG
 VWTQLP
 QCV
 AID
 DKL
 KKCK
 SNN
 L
 I
 L
 E
 E
 H
 L
 K
 N
 K
 E
 FDHNSN
 I
 RYRCRG
 KEG
 WI
 H
 T
 V
 C
 I
 N
 G
 R
 W
 D
 P
 E
 V
 N
 C
 S
 M
 A
 Q
 I
 Q
 L
 C
 P
 P
 P
 Q
 I
 P
 N
 S
 H
 N
 M
 T
 T
 L
 N
 Y
 R
 D
 G
 E
 K
 V
 S
 V
 L
 C
 Q
 ENYLIQEG
 E
 E
 I
 T
 C
 K
 D
 G
 R
 W
 Q
 S
 I
 P
 L
 C
 V
 E
 K
 I
 P
 C
 S
 Q
 P
 P
 Q
 I
 E
 H
 G
 T
 I
 N
 S
 R
 S
 Q
 E
 S
 Y
 A
 H
 G
 T
 K
 L
 S
 Y
 T
 C
 E
 G
 G
 F
 R
 I
 S
 E
 E
 N
 E
 T
 T
 C
 Y
 M
 G
 K
 W
 S
 S
 P
 P
 Q
 C
 E
 G
 L
 P
 C
 K
 S
 P
 P
 E
 I
 S
 H
 G
 V
 V
 A
 H
 M
 D
 S
 Y
 Q
 Y
 G
 E
 E
 V
 T
 Y
 K
 C
 F
 E
 G
 F
 I
 D
 G
 P
 A
 I
 A
 K
 C
 L
 G
 E
 K
 W
 S
 H
 P
 P
 S
 C
 I
 K
 T
 D
 C
 L
 S
 L
 P
 S
 F
 E
 N
 A
 I
 P
 M
 G
 E
 K
 D
 V
 Y
 K
 A
 G
 E
 Q
 V
 T
 Y
 T
 C
 A
 T
 Y
 Y
 K
 M
 D
 G
 A
 S
 N
 V
 T
 C
 I
 N
 S
 R
 W
 T
 G
 R
 P
 T
 C
 R
 D
 T
 S
 C
 V
 N
 P
 P
 T
 V
 Q
 N
 A
 Y
 I
 V
 S
 R
 Q
 M
 S
 K
 Y
 P
 S
 G
 E
 R
 V
 R
 Y
 Q
 C
 R
 S
 P
 Y
 E
 M
 F
 D
 E
 E
 V
 M
 C
 L
 N
 G
 W
 T
 E
 P
 P
 Q
 C
 D
 S
 T
 G
 K
 C
 G
 P
 P
 P
 I
 D
 N
 G
 D
 I
 T
 S
 F
 P
 L
 S
 V
 Y
 A
 P
 A
 S
 S
 V
 E
 Y
 Q
 C
 Q
 N
 L
 Y
 Q
 L
 E
 G
 N
 K
 R
 I
 T
 C
 R
 N
 G
 O
 W
 S
 E
 P
 P
 K
 C
 L
 H
 P
 C
 V
 I
 S
 R
 E
 I
 M
 E
 N
 Y
 N
 I
 A
 R
 W
 T
 A
 K
 Q
 K
 L
 Y
 R
 T
 C
 W
 D
 G
 K
 L
 E
 Y
 P
 C
 A
 R
 K

도면8

AATTCTTGGAAAGAGGAGAACTGGACGTTGTGAACAGAGTTAGCTGGTAAATGTCCTTAAAGATCCAA
 AAAATGAGACTTCTAGCAAAGATTATTGCTTATGTATGGCTATTGCTGAGCAGGAGGGTCTGACAGAAACATATCCAGAAGGCAC
 AACTTCCCTCAAGAAGAAATACAGAAATTCTGACAGGTTCTGGTCTGACAGAAACATATCCAGAAGGCAC
 CCAGGCATATCTAAATGCCGCGCTGGATATAGATCTTGGAAATGTAATAATGTTATCAGGAAGGG
 GAATGGGTGCTCTTAATCCATTAAGGAAATGTCAGAAAAGGCCCTGTTGACATCCTGGAGATACTCCTT
 TTGCTTACAGGAGGAATGCTTGTGATGGTAAAGCTGTGATACATGTAATG
 GGGGTATCAATTGCTAGGTGAGATTAATACCGTGAATGTGACACAGATGGATGGACCAATGATATTCC
 ATATGTAAGTTGTGAAGTTACCGTGAAGCAGCAGAGAAATGGAAAATGTCAGTAGTCATGG
 AACCATGCGGAATACCCATTGGACAGCAGTACCGTTGTATGTAACTCAGGCTAACAGATTGAG
 AGATGAGAAATGTCAGGATGGTAAAGGAAACCAAGTGTGGAATTCTA
 TGCAAACTTCCAGATGTTATAATGGATCTCTATACTCAGAGATTATTAAAGGAATGACAGAT
 TTCAATAATAATGTAACATGGTTATGAAATACAGTGAAGAGGAGATGCTGATGCACTGAATCTGGATG
 GCGTCCGTGCTTCATGTAAGAAAATCATGTAATCTTATATTCCAAATGGTGAACTACTCACCT
 TTAAGGATTAACACAGAACACTACGTTGAGATGAAATCACGTTACCGAGTGTAGAAATGGTTTATCCTGCAACCC
 GGGGAATACAGCAAATGCAAGACTGGCTGGATACCTGCTGGAGATGTAACCTTGAACACCTTGTGA
 TTATCCAGACATTAACATGGAGGTCTATATCATGAGAAATGCGTAGACCAACTTCCAGTAGCTGTA
 GAAAATATTACTCTTACCTGAGACTCCGTCAGGAAGGTTACTGGGATCACATT
 ATTGACACAAAGGATGGTGGCCAGCTACCATGGCCTCAGAAAATGTTATTTCCTTATTTGGAAAAA
 TGGATATAATCAAATTGAAAGAAATTTGACAGGTAATCTAGACGTTGCTCCATCTGG
 TACGCTTCCAAAAGCGCAGACCACAGTTACATGTAATGGAGAAATGGCTGGTCTCTACTCCAGATGCA
 TCCGTCAGCTTACCTCTGAACTCTGATCGAAGGTACCCCTCTCAGCTTGAAGTGGATCAAAGAT
 GACAAGGGCCAATGAAAGCAACTTGTGACTCTGCCAGGTCAATACTGGGTCTGAGTATGTTGACTAGT
 ATCTGTTTGTGTTATGTTGATATTCCAGCCAGAATGGGAATGCTAATTCTGCTCCAGGAGCCA
 ATGGGCTGGTGGCTTGTGAGATTATTAAACTCTCTGGATCCTCTACG

도면9

MRLLAKIICLMLWAICVAEDCNELPPRNTEILTGSWSQDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIMVCRKGE
 WVALNPLRKQOKRPCGHPGDTFTLGGNVFVEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPI
 CEVVKCLPVTAPEKGIVVSAMEPDREYHFGQAVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWSEKPKCWEIS
 KSPDVINGSPISQKIIYKENERFQYKCNMGYEVYERGDAVCTESGWRLPLSCEEKSCDNPYIPNGDYSPL
 RIKHRTGDEITYQCRNGFYPATRGNTAKCTSTGWIPAPRCTLKPCDYDPIKHGGLYHENMRRPYFPVAVG
 KYYSYCCDEHFTPSGSYWDHIHCTQDGWSPAVPLRKCYFPYLENGYNQNYGRKFVQGKSIDVACHPGY
 ALPKAQTVTMCENGWSPTPRCIRVSFTL

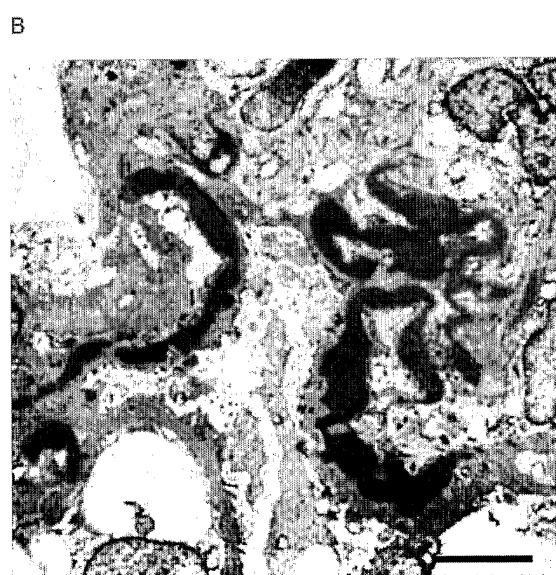
도면10

MRLLAKIICLMLWAICVAEDCNELPPRNTEILTGSWSQDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIMVCRKGE
 WVALNPLRKQOKRPCGHPGDTFTLGGNVFVEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPI
 CEVVKCLPVTAPEKGIVVSAMEPDREYHFGQAVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWSEKPKCWEIS
 KSPDVINGSPISQKIIYKENERFQYKCNMGYEVYERGDAVCTESGWRLPLSCEEKSCDNPYIPNGDYSPL
 RIKHRTGDEITYQCRNGFYPATRGNTAKCTSTGWIPAPRCTLKPCDYDPIKHGGLYHENMRRPYFPVAVG
 KYYSYCCDEHFTPSGSYWDHIHCTQDGWSPAVPLRKCYFPYLENGYNQNYGRKFVQGKSIDVACHPGY
 ALPKAQTVTMCENGWSPTPRCIRVSFTL

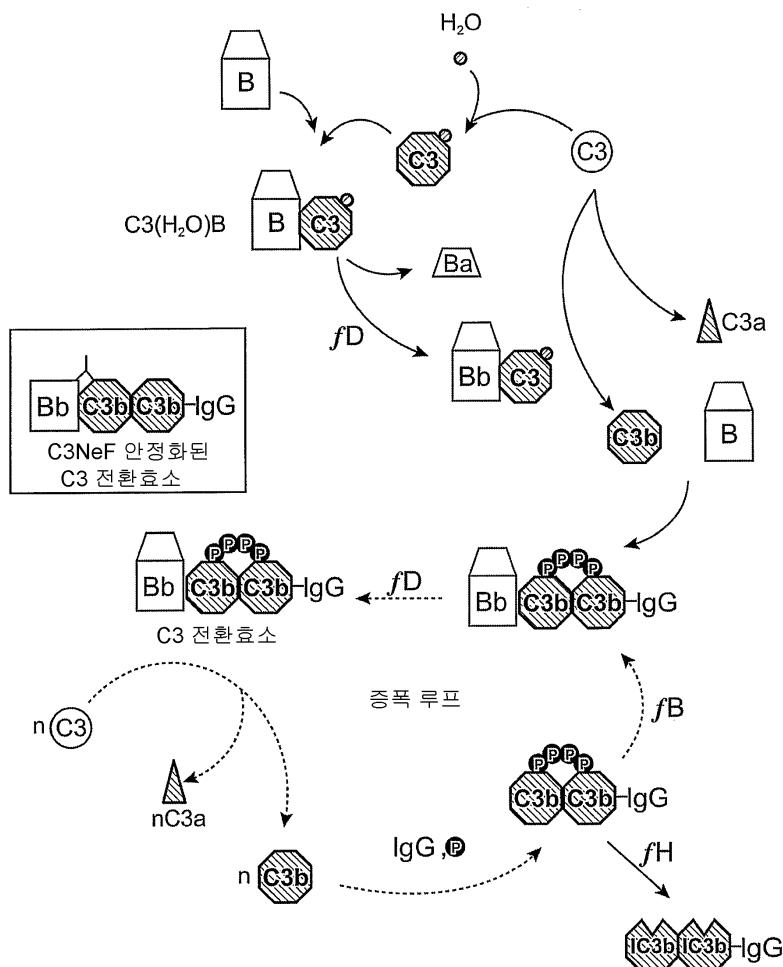
도면11

MRLLAKIICLMLWAICVAEDCNELPPRNTEILTGSWSQDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIMVCRKGE
 WVALNPLRKQOKRPCGHPGDTFTLGGNVFVEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPI
 CEVVKCLPVTAPEKGIVVSAMEPDREYHFGQAVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWSEKPKCWEIS
 KSPDVINGSPISQKIIYKENERFQYKCNMGYEVYERGDAVCTESGWRLPLSCEEKSCDNPYIPNGDYSPL
 RIKHRTGDEITYQCRNGFYPATRGNTAKCTSTGWIPAPRCTLKPCDYDPIKHGGLYHENMRRPYFPVAVG
 KYYSYCCDEHFTPSGSYWDHIHCTQDGWSPAVPLRKCYFPYLENGYNQNYGRKFVQGKSIDVACHPGY
 ALPKAQTVTMCENGWSPTPRCIRVSFTL

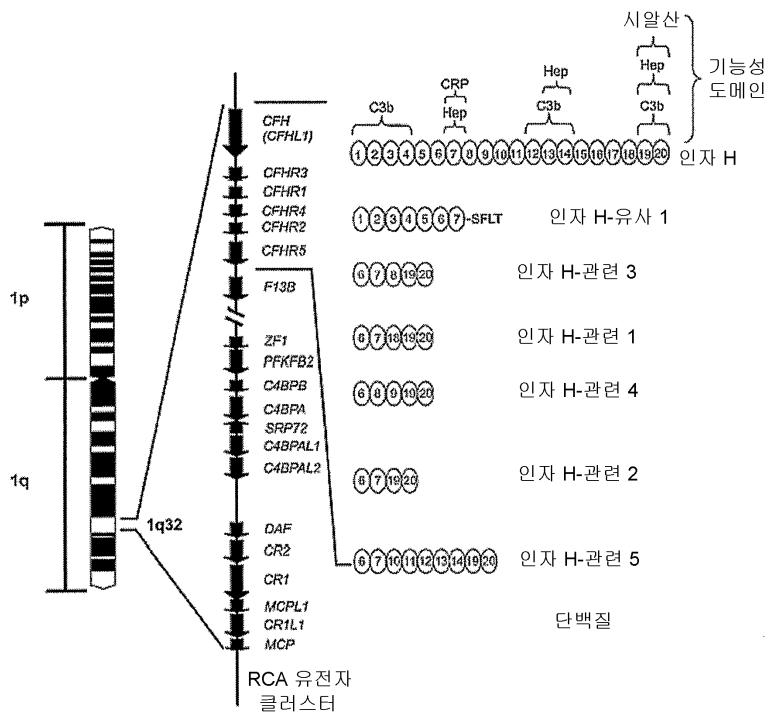
도면12



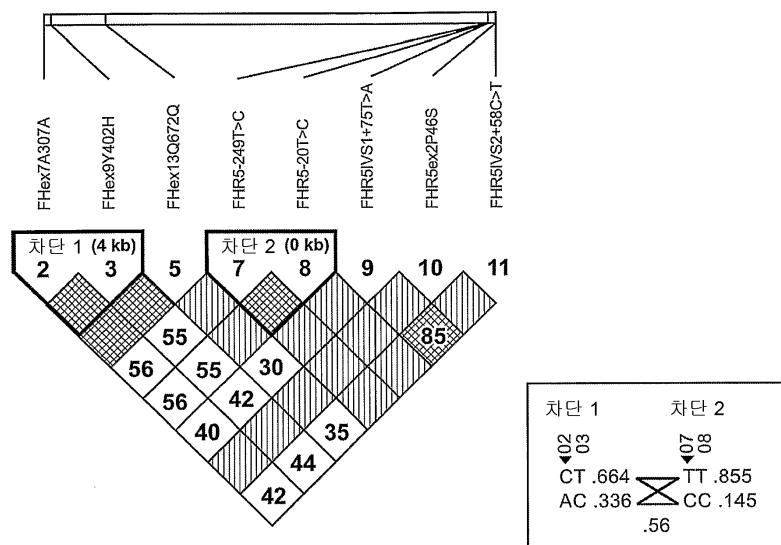
도면13



도면14



도면15



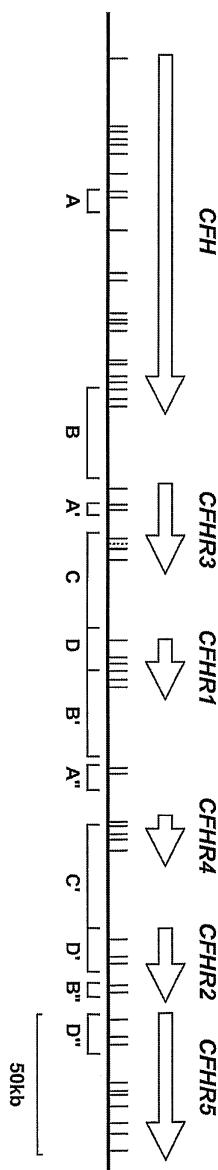
도면16

GGCAGGTGTTGTTACTGTAATGAAACGAGATTAAAGCAACACCCATCACTGGAGTATTTAGTT
 ATATACGATTGAGACTACCAAGCATGTTGCTTATTCTAGTGAATCTTAATCTCATGGGTATCCACTGT
 TGGGGAGAAAGGAACACTTTGTGATTTCACAAAATACACCATGGATTCTGTATGATGAAGAAGATTAT
 AACCCCTTTCCAAAGTCTCACAGGGAGTTCTATTACTCTGTGAATAATAATTGTGTCCTCCT
 CAAAATCTTTGGACTCGCATAACATGCCACAGAAGAAGGATGGTACCCAACACCGAAGTGTCTCAGAAT
 GTGTTCTTCCCTTGTGAAAAATGGTCATTCTGAATCTCAGGACTAAATACATCTGGAAGGTGATACT
 GTACAAATTATTGCAACACAGGATAACAGCCTCAAAACAAATGAGAAAAAACATTCTGTGTAGAACGGG
 GCTGGTCACTCCCTCCATATGCAGCTTCACTAAAGGAGAATGTCATGTTCCAATTAGAGCCAATGT
 AGATGCTCAGGAAAAAGGAGCTAACAAAGTTGGAGACGTGTTGAAATTCTCTGCAAGAAAAAAATCTT
 ATAAGAGTTGGATCAGACTCAGTTCAATGTTACCAATTGGGGTGGTCACCTAACCTCAACATGCAAAG
 GACAAGTACGATCATGTTGCAACACCAACTTAAGAGGTGAAATAGCAGGAGTTAATAAAACATTACTCA
 AGATGGACACAAATGAAGTAGTGGAAATATGTCATCCTAATTATAATAAAACGGGCTAAGAAAATA
 CAATGTTGGATGGAGAAATGGACAACCTTACCCACTCTGTTGAAACAAGTGAACATGTTGAGATACATAC
 CTGAACTCAGACTGCTTGTGTTGAGCTGCTCAGGCTCTGCCCCCTATCAACATGGAGTTTCAGTCAGGTTGAA
 TTGAGAAATGAAATGCAATGATTGAAATAACATGATTACCTGTATTATGAAATATGGACAGAGCTT
 CCTATGTTGTTGCAACACCAACTTAAGAGGTGAAATAGCAGGAGTTAATAAAACATTACTCA
 AGTACATCTGGAAAGAATTAACATATACTGAGAATACGTTACAGATGTTGAGACATCTCAGATAACAG
 GCACTCAGTGTATAAACGGGAAATGGAACTCTGAGAAGTAGACTGCAGCAGAAAAAAGGGAACAAATTCTGC
 CCACCGCACCTCAGATACTAATGCTCAGAATATGCAACCCAGCTGAATTATCAGGATGGAGAAAAG
 TAGCTTCTCTGTAAGAAAATCTACTTCCAGAAGCAGAAAAGAATTCTATGTAAGAGTGGAGATG
 GCAACTTACCCAGCTGTTGAGCTGCTGAGTGTGAAATTCCAGTGTAAATTCCACATAAGCGATGATCATCACCAC
 ACCACCTTACCTCCATTACAGTATATCTCAGGTCAAACAGTGCAGTACCGGTTGCCAGTCTCTATA
 AACTCAGGGCTGTAACTGTCAGAAATAAACAGTGGTCAGAACACCAAGAATGCCAGATCC
 ATGIGTGGTATCTGAAGAAAACATGAAACAAAAATAACATACAGTTAAATGGAGAACGATGGAAAACCTC
 TATGCAAAACAGGGGATGTTGAGTGTGAAATTCCAGTGTAAATTCCACATAAGCGATGATCATCACCAC
 CATTGAGCAATCTGCAAGGAGAAATTGAAATACCTATATGTAAGTGAAGCAAGGATAATTCC
 TGAATATATTCTCAACATCCATCTACGCTAAAGTAGCATTATGTAAGCCAATTCTGTAGTTACTCT
 TTTATTCTTCAGGTGTTAACTGTTTTATTAGAAACTCTGGATTTTAGAGCTTTAGAAATTG
 TAAGCTGAGAGAAACATGAAACAAAAATAACATACAGTTAAATGGAGAACGATGGAAAACCTC
 ATCACAGACTGGATAACTCTAACCAATTGTTCTCTGATAATCTAAAGCTGAGAAGTCCAAGA
 TGGGGGCTGCCTCTGGTGGGGCTTCTCGAAGCATCATAATATGCTGGAAGGCATCACACATGGTG
 GAAGGGATCACGTGGCAAAGAGCATGACATGGAGAGAAAAGAGAGAGAGAGACAGAGTGGCG
 GGGCCGGGGAGGAGCCAAACTCATCTTATAAAAGACACCACTCTGAGATAACAAATCCAATCCCATG
 ATAATGACATTAACTCATCTAACAGATGAGCTCTCTGACTTAATCACCTTCTAAAGATCTCACCTGA
 CAAACACTGTTGCATTGGCAGTTAAGTTCCACGAAACTTCTGGGGACACATTCAAACACAGGAGAAC
 TCAAATTGTTCTGGCAAATCACAACTGGGAATTCTTATCATAAAATGTCACAGAAACAGTAAATG
 TCTCGCTCTGAAACTTAATCTCATCTAACCTCTGTTGTCCTAAATATAGGATAACTTGAACATT
 CTGAATTAACGTTATTAAAAGGAAATGAGTGTATTAGTCTATCTCAGGTATTATCACTTA
 AAAACCTGCGAAAGCTGCAACTTTGTTGTTGAGCAAGTTAAATAATATTATAATCCTCTAAATG
 TAAGCTGACTACCTATCCAAACTAAATACCCCTAAAGTATTAAATGCACATCTGCTGAAACGGAA
 AAAA

도면17

MLLFLSUILISWVSTVGGEGLCDFPKIHGFYDEEDYNPFSQVPTGEVFYYSCEYNFVSPSKSFWTRI
 TCTEEGWSPTPKCLRMCSFFVKNGHSESSGLIHLLEGDTVQIICNTGYSLQNNEKNISVERGWSTPPIC
 SFTKGECHVPILEANVDAQPKKESYKVGDVLFKFSRKNLIRVGSDSVQCYQFGWSPNFTCKGQVRSCGP
 PPQLSNGEVKEIRKEEYGHNEVVEYDCNPNFIIINGPKKIQCVDGEWTLPLTCVEQVKTCCGYIPELEYGYV
 QPSVPPYQHGVSVENCRNEYAMIGNNMITCINGIWTIELPMCVATHOLKRCKIAGVNIKTLKLKLSKEFN
 HNSRIRYRCSDFRYRH SVCINGKWNPEVDCTEKREQFCPPPPQTPNAQNMTTVNYQDGEKVAVLCKEN
 YLLPEAKEIVCKDGRWQSLPVCVESTAYCGPPPSINNGDTTSEPLSVYPPGSTVTVRCQSFYKLQGSVTV
 TCRNKQWSEPPRCLDPVVSEENMNKNNIQLKWRNDGKLYAKTGDAVEFQCKFPHKAMISSPPFRAICQE
 GKFEYPICE

도면18



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> University of Iowa Research Foundation

Hageman, Gregory S.

<120> Methods and Reagents for the Treatment of Age-Related Macular

Degeneration

<130> 020618-001220KR

<140> KR 0000000

<141> 2006-02-14

<150> WO PCT/US2006/005313

<151> 2006-02-14
 <150> US 60/650,078
 <151> 2005-02-14
 <150> US 60/717,861
 <151> 2005-09-09
 <150> US 60/735,697
 <151> 2005-11-09
 <160> 337
 <170> PatentIn version 3.3

<210>

1

<211> 3926

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

aattcttgga agaggagaac tggacgttgt	gaacagagtt	agctggtaaa	tgcctctta	60
aaagatccaa aaaatgagac ttctagcaaa	gattattgc	cttatgttat	ggcttatttg	120
tgttagcagaa gattgaatg aacttcctcc	aagaagaaat	acagaaattc	tgacaggttc	180
ctggctgtac caaacatatac	cagaaggcac	ccaggctatc	tataaatgcc	240
tagatctttt gaaaaatgtaa	taatggatg	caggaaggga	gaatgggttg	300
attaaaggaaa tgcagaaaaa	ggccctgtgg	acatcctggaa	gatactcctt	360

tacccttaca ggagggaaatg	tgttgaaata	tgggtaaaaa	gctgtgtata	catgtaatga	420
ggggtatcaa ttgcttagtg	agattaatta	ccgtgaatgt	gacacagatg	gatggaccaa	480
tgtatattcct atatgtgaag	ttgtgaagtg	tttaccagtg	acagcaccag	agaatggaaa	540
aattgtcagt agtgcattgg	aaccagatcg	ggaataccat	tttggacaag	cagtacggtt	600
tgtatgtaac tcaggctaca	agattgaagg	agatgaagaa	atgcattgtt	cagacgatgg	660
tttttggagt aaagagaaac	caaagtgtgt	ggaaatttca	tgcaaatccc	cagatgttat	720
aaatggatct cctataatctc	agaagattat	ttataaggag	aatgaacgat	ttcaatataaa	780

atgtaacatg ggttatgaat	acagtgaaag	aggagatgt	gtatgcactg	aatctggatg	840
gcgtccgttg cttcatgtg	aagaaaaatc	atgtgataat	cttatattc	caaatggtgaa	900
ctactcacct ttaaggatta	aacacagaac	tggagatgaa	atcacgtacc	agtgtagaaa	960
tggttttat cctgcaaccc	gggaaatac	agccaaatgc	acaagtactg	gctggatacc	1020
tgctccgaga tgtacccgt	aacccgtga	ttatccagac	attaaacatg	gaggtctata	1080

tcatgagaat atgcgttagac catacttcc agtagctgta gaaaaatatt actcctatta	1140
ctgtgatgaa catttgaga ctccgtcagg aagttactgg gatcacattc attgcacaca	1200
agatggatgg tcgccagcag taccatgcct cagaaaatgt tatttcctt atttgaaaaa	1260
tggatataat caaaatcatg gaagaaagtt tgtacagggtaaatctatag acgttgccctg	1320
ccatcctggc tacgctttc caaaagcgca gaccacagtt acatgtatgg agaatggctg	1380
gtctcctact cccagatgca tccgtgtcaa aacatgttcc aaatcaagta tagatattga	1440
gaatgggaaa atttctgaat ctcagtatac atatgcctta aaagaaaaaag cgaaatatac	1500
atgcaaacta ggatatgtaa cagcagatgg taaaacatca ggtcaatta gatgtggaa	1560
agatggatgg tcagctcaac ccacgtgcat taaatcttgt gatatcccag tatttatgaa	1620
tgccagaact aaaaatgact tcacatggtt taagctgaat gacacattgg actatgaatg	1680
ccatgatggt tatgaaagca atactggaag caccactggt tccatagtgt gtggttacaa	1740
tgggggtct gatcacca tatgttatga aagagaatgc gaacttccta aaatagatgt	1800
acacttagtt cctgatcgca agaaagacca gtataaagtt ggagagggtgt taaaattctc	1860
ctgcaaacca ggatttacaa tagtggacc taattccgtt cagtgcattt accttggatt	1920
gtctcctgac ctcccaatat gtaaagagca agtacaatca tgggtccac ctccctgaact	1980
cctcaatggg aatgttaagg aaaaacgaa agaagaatat ggacacagtg aagtggtgaa	2040
atattattgc aatcctagat ttctaatgaa gggacctaataa aaaaattcaat gtgttgatgg	2100
agagtggaca actttaccag tgtgtattgt ggaggagagt acctgtggag atatacctga	2160
acttgaacat ggctggcccc agcttcttc ccctccttat tactatggag attcagtggaa	2220
attcaatgc tcagaatcat ttacaatgat tggacacaga tcaattacgt gtattcatgg	2280
agatggacc caactcccc agtgtgtggc aatagataaa cttaagaagt gcaaatcatc	2340
aaatttaattt atacttgagg aacatttaaa aaacaagaag gaattcgatc ataattctaa	2400
cataaggtac agatgttagag gaaaagaagg atggatacac acagtctgca taaatggaa	2460
atgggatcca gaagtgaact gctcaatggc acaaatacaa ttatgccac ctccaccta	2520
gattcccaat tctcacaata tgacaaccac actgaattat cgggatggag aaaaagtatc	2580
tgttcttgc caagaaaattt atctaattca ggaaggagaa gaaattacat gcaagatgg	2640
aagatggcag tcaataccac tctgtgtga aaaaattcca tggcacaac cacctcagat	2700
agaacacgga accattaattt catccaggc ttcacaagaa agttatgcac atggactaa	2760
attgagttat acttgtagg gtggttcag gatatctgaa gaaaatgaaa caacatgcta	2820

catggaaaaa tggagttctc cacctcagtg tgaaggcctt ccttgtaat ctccacctga 2880

gatttctcat ggtgtttagt ctcacatgtc agacagttat cagttatggag aagaagttac 2940
 gtacaaatgt tttgaaggtt ttggattga tggcctgca attgcaaaat gcttaggaga 3000
 aaaatggctt caccctccat catgcataaa aacagattgt ctcatgttac ctatgttga 3060
 aaatgccata cccatggag agaagaagga tggatataag gcgggtgagc aagtgactt 3120
 cacttgcata acatattaca aaatggatgg agccagtaat gtaacatgca ttaatagcag 3180
 atggacagga aggccaacat gcagagacac ctccatgtgt aatccgccc cagtacaaa 3240
 tgcttatata gtgtcgagac agatgagtaa atatccatct ggtgagagag tacgttatca 3300

atgttaggagc cttatgaaa tggttggga tgaagaagtg atgtgtttaa atggaaactg 3360
 gacggaacca cctcaatgca aagattctac agaaaaatgt gggccccctc cacctattga 3420
 caatggggac attacttcat tcccggtgtc agtataatgtt ccagttcat cagttgagta 3480
 ccaatgccag aacttgcatac aacttgaggtaaacaagcga ataacatgta gaaatggaca 3540
 atggtcagaa ccacaaaaat gcttacatcc gtgtgtataa tcccgagaaa ttatggaaaa 3600
 ttataacata gcattaaggt ggacagccaa acagaagctt tattcgagaa caggtgaatc 3660
 agttgaattt gtgtgtaaac gggatatcg tcttcatca cgttctcaca cattgcgaac 3720

aacatgttgg gatggaaac tggagtatcc aacttgcataaaaatgataga atcaatcata 3780
 aagtgcacac ctatttcag aactttagta ttaatcgtt tctcaatttc atttttatg 3840
 tattgttta ctcctttta ttcatcgtt aaattttggaa ttaatttggaaaatgttaat 3900
 tataagcttga gaccggggc tctttt 3926

<210> 2

<211> 1231

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Leu Leu Ala Lys Ile Ile Cys Leu Met Leu Trp Ala Ile Cys

1 5 10 15

Val Ala Glu Asp Cys Asn Glu Leu Pro Pro Arg Arg Asn Thr Glu Ile

20 25 30

Leu Thr Gly Ser Trp Ser Asp Gln Thr Tyr Pro Glu Gly Thr Gln Ala

35 40 45

Ile Tyr Lys Cys Arg Pro Gly Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Val Ile Met

50	55	60	
Val Cys Arg Lys Gly Glu Trp Val Ala Leu Asn Pro Leu Arg Lys Cys			
65	70	75	80
Gln Lys Arg Pro Cys Gly His Pro Gly Asp Thr Pro Phe Gly Thr Phe			
85	90	95	
Thr Leu Thr Gly Gly Asn Val Phe Glu Tyr Gly Val Lys Ala Val Tyr			
100	105	110	
Thr Cys Asn Glu Gly Tyr Gln Leu Leu Gly Glu Ile Asn Tyr Arg Glu			
115	120	125	
Cys Asp Thr Asp Gly Trp Thr Asn Asp Ile Pro Ile Cys Glu Val Val			
130	135	140	
Lys Cys Leu Pro Val Thr Ala Pro Glu Asn Gly Lys Ile Val Ser Ser			
145	150	155	160
Ala Met Glu Pro Asp Arg Glu Tyr His Phe Gly Gln Ala Val Arg Phe			
165	170	175	
Val Cys Asn Ser Gly Tyr Lys Ile Glu Gly Asp Glu Glu Met His Cys			
180	185	190	
Ser Asp Asp Gly Phe Trp Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Val Glu Ile			
195	200	205	
Ser Cys Lys Ser Pro Asp Val Ile Asn Gly Ser Pro Ile Ser Gln Lys			
210	215	220	
Ile Ile Tyr Lys Glu Asn Glu Arg Phe Gln Tyr Lys Cys Asn Met Gly			
225	230	235	240
Tyr Glu Tyr Ser Glu Arg Gly Asp Ala Val Cys Thr Glu Ser Gly Trp			
245	250	255	
Arg Pro Leu Pro Ser Cys Glu Glu Lys Ser Cys Asp Asn Pro Tyr Ile			
260	265	270	
Pro Asn Gly Asp Tyr Ser Pro Leu Arg Ile Lys His Arg Thr Gly Asp			
275	280	285	
Glu Ile Thr Tyr Gln Cys Arg Asn Gly Phe Tyr Pro Ala Thr Arg Gly			
290	295	300	

Asn Thr Ala Lys Cys Thr Ser Thr Gly Trp Ile Pro Ala Pro Arg Cys
 305 310 315 320
 Thr Leu Lys Pro Cys Asp Tyr Pro Asp Ile Lys His Gly Gly Leu Tyr
 325 330 335
 His Glu Asn Met Arg Arg Pro Tyr Phe Pro Val Ala Val Gly Lys Tyr
 340 345 350
 Tyr Ser Tyr Tyr Cys Asp Glu His Phe Glu Thr Pro Ser Gly Ser Tyr
 355 360 365
 Trp Asp His Ile His Cys Thr Gln Asp Gly Trp Ser Pro Ala Val Pro
 370 375 380
 Cys Leu Arg Lys Cys Tyr Phe Pro Tyr Leu Glu Asn Gly Tyr Asn Gln
 385 390 395 400
 Asn His Gly Arg Lys Phe Val Gln Gly Lys Ser Ile Asp Val Ala Cys
 405 410 415
 His Pro Gly Tyr Ala Leu Pro Lys Ala Gln Thr Thr Val Thr Cys Met
 420 425 430
 Glu Asn Gly Trp Ser Pro Thr Pro Arg Cys Ile Arg Val Lys Thr Cys
 435 440 445
 Ser Lys Ser Ser Ile Asp Ile Glu Asn Gly Phe Ile Ser Glu Ser Gln
 450 455 460
 Tyr Thr Tyr Ala Leu Lys Glu Lys Ala Lys Tyr Gln Cys Lys Leu Gly
 465 470 475 480
 Tyr Val Thr Ala Asp Gly Glu Thr Ser Gly Ser Ile Arg Cys Gly Lys
 485 490 495
 Asp Gly Trp Ser Ala Gln Pro Thr Cys Ile Lys Ser Cys Asp Ile Pro
 500 505 510
 Val Phe Met Asn Ala Arg Thr Lys Asn Asp Phe Thr Trp Phe Lys Leu
 515 520 525
 Asn Asp Thr Leu Asp Tyr Glu Cys His Asp Gly Tyr Glu Ser Asn Thr
 530 535 540
 Gly Ser Thr Thr Gly Ser Ile Val Cys Gly Tyr Asn Gly Trp Ser Asp

545	550	555	560
Leu Pro Ile Cys Tyr Glu Arg Glu Cys Glu Leu Pro Lys Ile Asp Val			
565	570	575	
His Leu Val Pro Asp Arg Lys Lys Asp Gln Tyr Lys Val Gly Glu Val			
580	585	590	
Leu Lys Phe Ser Cys Lys Pro Gly Phe Thr Ile Val Gly Pro Asn Ser			
595	600	605	
Val Gln Cys Tyr His Phe Gly Leu Ser Pro Asp Leu Pro Ile Cys Lys			
610	615	620	
Glu Gln Val Gln Ser Cys Gly Pro Pro Pro Glu Leu Leu Asn Gly Asn			
625	630	635	640
Val Lys Glu Lys Thr Lys Glu Glu Tyr Gly His Ser Glu Val Val Glu			
645	650	655	
Tyr Tyr Cys Asn Pro Arg Phe Leu Met Lys Gly Pro Asn Lys Ile Gln			
660	665	670	
Cys Val Asp Gly Glu Trp Thr Thr Leu Pro Val Cys Ile Val Glu Glu			
675	680	685	
Ser Thr Cys Gly Asp Ile Pro Glu Leu Glu His Gly Trp Ala Gln Leu			
690	695	700	
Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Glu Phe Asn Cys Ser			
705	710	715	720
Glu Ser Phe Thr Met Ile Gly His Arg Ser Ile Thr Cys Ile His Gly			
725	730	735	
Val Trp Thr Gln Leu Pro Gln Cys Val Ala Ile Asp Lys Leu Lys Lys			
740	745	750	
Cys Lys Ser Ser Asn Leu Ile Ile Leu Glu Glu His Leu Lys Asn Lys			
755	760	765	
Lys Glu Phe Asp His Asn Ser Asn Ile Arg Tyr Arg Cys Arg Gly Lys			
770	775	780	
Glu Gly Trp Ile His Thr Val Cys Ile Asn Gly Arg Trp Asp Pro Glu			
785	790	795	800

Val Asn Cys Ser Met Ala Gln Ile Gln Leu Cys Pro Pro Pro Gln
 805 810 815
 Ile Pro Asn Ser His Asn Met Thr Thr Thr Leu Asn Tyr Arg Asp Gly
 820 825 830
 Glu Lys Val Ser Val Leu Cys Gln Glu Asn Tyr Leu Ile Gln Glu Gly
 835 840 845
 Glu Glu Ile Thr Cys Lys Asp Gly Arg Trp Gln Ser Ile Pro Leu Cys
 850 855 860
 Val Glu Lys Ile Pro Cys Ser Gln Pro Pro Gln Ile Glu His Gly Thr
 865 870 875 880
 Ile Asn Ser Ser Arg Ser Ser Gln Glu Ser Tyr Ala His Gly Thr Lys
 885 890 895
 Leu Ser Tyr Thr Cys Glu Gly Gly Phe Arg Ile Ser Glu Glu Asn Glu
 900 905 910
 Thr Thr Cys Tyr Met Gly Lys Trp Ser Ser Pro Pro Gln Cys Glu Gly
 915 920 925
 Leu Pro Cys Lys Ser Pro Pro Glu Ile Ser His Gly Val Val Ala His
 930 935 940
 Met Ser Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Glu Glu Val Thr Tyr Lys Cys Phe
 945 950 955 960
 Glu Gly Phe Gly Ile Asp Gly Pro Ala Ile Ala Lys Cys Leu Gly Glu
 965 970 975
 Lys Trp Ser His Pro Pro Ser Cys Ile Lys Thr Asp Cys Leu Ser Leu
 980 985 990
 Pro Ser Phe Glu Asn Ala Ile Pro Met Gly Glu Lys Lys Asp Val Tyr
 995 1000 1005
 Lys Ala Gly Glu Gln Val Thr Tyr Thr Cys Ala Thr Tyr Tyr Lys
 1010 1015 1020
 Met Asp Gly Ala Ser Asn Val Thr Cys Ile Asn Ser Arg Trp Thr
 1025 1030 1035
 Gly Arg Pro Thr Cys Arg Asp Thr Ser Cys Val Asn Pro Pro Thr

1040 1045 1050
 Val Gln Asn Ala Tyr Ile Val Ser Arg Gln Met Ser Lys Tyr Pro
 1055 1060 1065
 Ser Gly Glu Arg Val Arg Tyr Gln Cys Arg Ser Pro Tyr Glu Met
 1070 1075 1080
 Phe Gly Asp Glu Glu Val Met Cys Leu Asn Gly Asn Trp Thr Glu
 1085 1090 1095
 Pro Pro Gln Cys Lys Asp Ser Thr Gly Lys Cys Gly Pro Pro Pro

1100 1105 1110
 Pro Ile Asp Asn Gly Asp Ile Thr Ser Phe Pro Leu Ser Val Tyr
 1115 1120 1125
 Ala Pro Ala Ser Ser Val Glu Tyr Gln Cys Gln Asn Leu Tyr Gln
 1130 1135 1140
 Leu Glu Gly Asn Lys Arg Ile Thr Cys Arg Asn Gly Gln Trp Ser
 1145 1150 1155
 Glu Pro Pro Lys Cys Leu His Pro Cys Val Ile Ser Arg Glu Ile

1160 1165 1170
 Met Glu Asn Tyr Asn Ile Ala Leu Arg Trp Thr Ala Lys Gln Lys
 1175 1180 1185
 Leu Tyr Ser Arg Thr Gly Glu Ser Val Glu Phe Val Cys Lys Arg
 1190 1195 1200
 Gly Tyr Arg Leu Ser Ser Arg Ser His Thr Leu Arg Thr Thr Cys
 1205 1210 1215
 Trp Asp Gly Lys Leu Glu Tyr Pro Thr Cys Ala Lys Arg

1220 1225 1230
 <210> 3
 <211> 1658
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 aattcttgg aaggagaac tggacgttgt gaacagagtt agctggtaaa tgccttta 60
 aaagatccaa aaaaatgagac ttcttagcaaa gattattgc cttatgttat gggctatttgc 120

tgttagcagaa gattgaatg aacttcctcc aagaagaaat acagaaattc tgacagggtc	180
ctggctcgac caaacatatac cagaaggcac ccaggctatc tataaatgcc gccctggata	240
tagatctctt ggaaatgtaa taatggatg caggaaggga gaatgggttg ctcttaatcc	300
attaaggaaa tgtcagaaaa ggcctgtgg acatcctgga gatactcctt ttggacttt	360
tacccttaca ggagggaaatg tggttaata tggtgtaaaa gctgtgtata catgtaatga	420
ggggtatcaa ttgcttagtg agattaatta ccgtgaatgt gacacagatg gatggaccaa	480
tgatattcct atatgtgaag ttgtgaagtg ttaccagtg acagcaccag agaatggaaa	540
aattgtcagt agtgcaatgg aaccagatcg ggaataccat tttggacaag cagtacggtt	600
tgtatgtaac tcaggctaca agattgaagg agatgaagaa atgcattgtt cagacgtgg	660
tttttggagt aaagagaaaac caaagtgtgt gggaaattca tgcaaatccc cagatgttat	720
aatggatct cctataatctc agaagattat ttataaggag aatgaacgt ttcaatataa	780
atgtaacatg ggttatgaat acagtgaaag aggagatgct gtatgcactg aatctggatg	840
gcgtccgttg cttcatgtg aagaaaaatc atgtgataat ctttatattc caaatggta	900
ctactcacct ttaaggattt aacacagaac tggagatgaa atcacgtacc agttagaaaa	960
tggttttat cctgcaaccc gggaaatac agccaaatgc acaagtactg gctggatacc	1020
tgctccgaga tgtacccgtt aacccgttga ttatccagac attaaacatg gaggtctata	1080
tcatgagaat atgcgttagac catacttcc agtagctgtt gggaaatatt actcctatta	1140
ctgtgtatgaa cattttgaga ctccgtcagg aagttactgg gatcacattc attgcacaca	1200
agatggatgg tcgccagcag taccatgcct cagaaaatgt tattttcctt atttggaaaa	1260
tggatataat caaaattatg gaagaaagtt tgtacagggt aaatctatag acgttgctg	1320
ccatcctggc tacgctttc caaaagcgca gaccacagtt acatgtatgg agaatggctg	1380
gtctcctact cccagatgca tccgtgtcag ctttaccctc tgaacttctg atcgaaggc	1440
atccctctcc agctttagt gatcaaagat gacaagggcc aatggAACCA agttttagt	1500
ttgccaggc aataacttggg tcctgagttt ggtgacttagt atctgttttgg ttatgtgtt	1560
attattccag ccagaatggg aaatgctaat tcagctccctc caggcagccaa atggggctgg	1620
tggctttagt attattaaac tcttctggat cctctacg	1658
<210> 4	
<211> 449	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 4	

Met Arg Leu Leu Ala Lys Ile Ile Cys Leu Met Leu Trp Ala Ile Cys
 1 5 10 15
 Val Ala Glu Asp Cys Asn Glu Leu Pro Pro Arg Arg Asn Thr Glu Ile
 20 25 30
 Leu Thr Gly Ser Trp Ser Asp Gln Thr Tyr Pro Glu Gly Thr Gln Ala
 35 40 45

 Ile Tyr Lys Cys Arg Pro Gly Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Val Ile Met
 50 55 60
 Val Cys Arg Lys Gly Glu Trp Val Ala Leu Asn Pro Leu Arg Lys Cys
 65 70 75 80
 Gln Lys Arg Pro Cys Gly His Pro Gly Asp Thr Pro Phe Gly Thr Phe
 85 90 95
 Thr Leu Thr Gly Asn Val Phe Glu Tyr Gly Val Lys Ala Val Tyr
 100 105 110

 Thr Cys Asn Glu Gly Tyr Gln Leu Leu Gly Glu Ile Asn Tyr Arg Glu
 115 120 125
 Cys Asp Thr Asp Gly Trp Thr Asn Asp Ile Pro Ile Cys Glu Val Val
 130 135 140
 Lys Cys Leu Pro Val Thr Ala Pro Glu Asn Gly Lys Ile Val Ser Ser
 145 150 155 160
 Ala Met Glu Pro Asp Arg Glu Tyr His Phe Gly Gln Ala Val Arg Phe
 165 170 175

 Val Cys Asn Ser Gly Tyr Lys Ile Glu Gly Asp Glu Glu Met His Cys
 180 185 190
 Ser Asp Asp Gly Phe Trp Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Val Glu Ile
 195 200 205
 Ser Cys Lys Ser Pro Asp Val Ile Asn Gly Ser Pro Ile Ser Gln Lys
 210 215 220
 Ile Ile Tyr Lys Glu Asn Glu Arg Phe Gln Tyr Lys Cys Asn Met Gly
 225 230 235 240

 Tyr Glu Tyr Ser Glu Arg Gly Asp Ala Val Cys Thr Glu Ser Gly Trp

245	250	255
Arg Pro Leu Pro Ser Cys Glu Glu Lys Ser Cys Asp Asn Pro Tyr Ile		
260	265	270
Pro Asn Gly Asp Tyr Ser Pro Leu Arg Ile Lys His Arg Thr Gly Asp		
275	280	285
Glu Ile Thr Tyr Gln Cys Arg Asn Gly Phe Tyr Pro Ala Thr Arg Gly		
290	295	300
Asn Thr Ala Lys Cys Thr Ser Thr Gly Trp Ile Pro Ala Pro Arg Cys		
305	310	315
Thr Leu Lys Pro Cys Asp Tyr Pro Asp Ile Lys His Gly Gly Leu Tyr		
325	330	335
His Glu Asn Met Arg Arg Pro Tyr Phe Pro Val Ala Val Gly Lys Tyr		
340	345	350
Tyr Ser Tyr Tyr Cys Asp Glu His Phe Glu Thr Pro Ser Gly Ser Tyr		
355	360	365
Trp Asp His Ile His Cys Thr Gln Asp Gly Trp Ser Pro Ala Val Pro		
370	375	380
Cys Leu Arg Lys Cys Tyr Phe Pro Tyr Leu Glu Asn Gly Tyr Asn Gln		
385	390	395
Asn Tyr Gly Arg Lys Phe Val Gln Gly Lys Ser Ile Asp Val Ala Cys		
405	410	415
His Pro Gly Tyr Ala Leu Pro Lys Ala Gln Thr Thr Val Thr Cys Met		
420	425	430
Glu Asn Gly Trp Ser Pro Thr Pro Arg Cys Ile Arg Val Ser Phe Thr		
435	440	445
Leu		

<210> 5
 <211> 1231
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Factor H variant

<400> 5

Met Arg Leu Leu Ala Lys Ile Ile Cys Leu Met Leu Trp Ala Ile Cys

1 5 10 15

Val Ala Glu Asp Cys Asn Glu Leu Pro Pro Arg Arg Asn Thr Glu Ile

20 25 30

Leu Thr Gly Ser Trp Ser Asp Gln Thr Tyr Pro Glu Gly Thr Gln Ala

35 40 45

Ile Tyr Lys Cys Arg Pro Gly Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Ile Ile Met

50 55 60

Val Cys Arg Lys Gly Glu Trp Val Ala Leu Asn Pro Leu Arg Lys Cys

65 70 75 80

Gln Lys Arg Pro Cys Gly His Pro Gly Asp Thr Pro Phe Gly Thr Phe

85 90 95

Thr Leu Thr Gly Gly Asn Val Phe Glu Tyr Gly Val Lys Ala Val Tyr

100 105 110

Thr Cys Asn Glu Gly Tyr Gln Leu Leu Gly Glu Ile Asn Tyr Arg Glu

115 120 125

Cys Asp Thr Asp Gly Trp Thr Asn Asp Ile Pro Ile Cys Glu Val Val

130 135 140

Lys Cys Leu Pro Val Thr Ala Pro Glu Asn Gly Lys Ile Val Ser Ser

145 150 155 160

Ala Met Glu Pro Asp Arg Glu Tyr His Phe Gly Gln Ala Val Arg Phe

165 170 175

Val Cys Asn Ser Gly Tyr Lys Ile Glu Gly Asp Glu Glu Met His Cys

180 185 190

Ser Asp Asp Gly Phe Trp Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Val Glu Ile

195 200 205

Ser Cys Lys Ser Pro Asp Val Ile Asn Gly Ser Pro Ile Ser Gln Lys

210 215 220

Ile Ile Tyr Lys Glu Asn Glu Arg Phe Gln Tyr Lys Cys Asn Met Gly

225 230 235 240

Tyr Glu Tyr Ser Glu Arg Gly Asp Ala Val Cys Thr Glu Ser Gly Trp
 245 250 255
 Arg Pro Leu Pro Ser Cys Glu Glu Lys Ser Cys Asp Asn Pro Tyr Ile
 260 265 270
 Pro Asn Gly Asp Tyr Ser Pro Leu Arg Ile Lys His Arg Thr Gly Asp
 275 280 285

 Glu Ile Thr Tyr Gln Cys Arg Asn Gly Phe Tyr Pro Ala Thr Arg Gly
 290 295 300
 Asn Thr Ala Lys Cys Thr Ser Thr Gly Trp Ile Pro Ala Pro Arg Cys
 305 310 315 320
 Thr Leu Lys Pro Cys Asp Tyr Pro Asp Ile Lys His Gly Gly Leu Tyr
 325 330 335
 His Glu Asn Met Arg Arg Pro Tyr Phe Pro Val Ala Val Gly Lys Tyr
 340 345 350

 Tyr Ser Tyr Tyr Cys Asp Glu His Phe Glu Thr Pro Ser Gly Ser Tyr
 355 360 365
 Trp Asp His Ile His Cys Thr Gln Asp Gly Trp Ser Pro Ala Val Pro
 370 375 380
 Cys Leu Arg Lys Cys Tyr Phe Pro Tyr Leu Glu Asn Gly Tyr Asn Gln
 385 390 395 400
 Asn Tyr Gly Arg Lys Phe Val Gln Gly Lys Ser Ile Asp Val Ala Cys
 405 410 415

 His Pro Gly Tyr Ala Leu Pro Lys Ala Gln Thr Thr Val Thr Cys Met
 420 425 430
 Glu Asn Gly Trp Ser Pro Thr Pro Arg Cys Ile Arg Val Lys Thr Cys
 435 440 445
 Ser Lys Ser Ser Ile Asp Ile Glu Asn Gly Phe Ile Ser Glu Ser Gln
 450 455 460
 Tyr Thr Tyr Ala Leu Lys Glu Lys Ala Lys Tyr Gln Cys Lys Leu Gly
 465 470 475 480

 Tyr Val Thr Ala Asp Gly Glu Thr Ser Gly Ser Ile Arg Cys Gly Lys

485	490	495	
Asp Gly Trp Ser Ala Gln Pro Thr Cys Ile Lys Ser Cys Asp Ile Pro			
500	505	510	
Val Phe Met Asn Ala Arg Thr Lys Asn Asp Phe Thr Trp Phe Lys Leu			
515	520	525	
Asn Asp Thr Leu Asp Tyr Glu Cys His Asp Gly Tyr Glu Ser Asn Thr			
530	535	540	
Gly Ser Thr Thr Gly Ser Ile Val Cys Gly Tyr Asn Gly Trp Ser Asp			
545	550	555	560
Leu Pro Ile Cys Tyr Glu Arg Glu Cys Glu Leu Pro Lys Ile Asp Val			
565	570	575	
His Leu Val Pro Asp Arg Lys Lys Asp Gln Tyr Lys Val Gly Glu Val			
580	585	590	
Leu Lys Phe Ser Cys Lys Pro Gly Phe Thr Ile Val Gly Pro Asn Ser			
595	600	605	
Val Gln Cys Tyr His Phe Gly Leu Ser Pro Asp Leu Pro Ile Cys Lys			
610	615	620	
Glu Gln Val Gln Ser Cys Gly Pro Pro Pro Glu Leu Leu Asn Gly Asn			
625	630	635	640
Val Lys Glu Lys Thr Lys Glu Glu Tyr Gly His Ser Glu Val Val Glu			
645	650	655	
Tyr Tyr Cys Asn Pro Arg Phe Leu Met Lys Gly Pro Asn Lys Ile Gln			
660	665	670	
Cys Val Asp Gly Glu Trp Thr Thr Leu Pro Val Cys Ile Val Glu Glu			
675	680	685	
Ser Thr Cys Gly Asp Ile Pro Glu Leu Glu His Gly Trp Ala Gln Leu			
690	695	700	
Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Glu Phe Asn Cys Ser			
705	710	715	720
Glu Ser Phe Thr Met Ile Gly His Arg Ser Ile Thr Cys Ile His Gly			
725	730	735	

Val Trp Thr Gln Leu Pro Gln Cys Val Ala Ile Asp Lys Leu Lys Lys
 740 745 750
 Cys Lys Ser Ser Asn Leu Ile Ile Leu Glu Glu His Leu Lys Asn Lys
 755 760 765
 Lys Glu Phe Asp His Asn Ser Asn Ile Arg Tyr Arg Cys Arg Gly Lys
 770 775 780
 Glu Gly Trp Ile His Thr Val Cys Ile Asn Gly Arg Trp Asp Pro Glu
 785 790 795 800

 Val Asn Cys Ser Met Ala Gln Ile Gln Leu Cys Pro Pro Pro Pro Gln
 805 810 815
 Ile Pro Asn Ser His Asn Met Thr Thr Thr Leu Asn Tyr Arg Asp Gly
 820 825 830
 Glu Lys Val Ser Val Leu Cys Gln Glu Asn Tyr Leu Ile Gln Glu Gly
 835 840 845
 Glu Glu Ile Thr Cys Lys Asp Gly Arg Trp Gln Ser Ile Pro Leu Cys
 850 855 860

 Val Glu Lys Ile Pro Cys Ser Gln Pro Pro Gln Ile Glu His Gly Thr
 865 870 875 880
 Ile Asn Ser Ser Arg Ser Ser Gln Glu Ser Tyr Ala His Gly Thr Lys
 885 890 895
 Leu Ser Tyr Thr Cys Glu Gly Gly Phe Arg Ile Ser Glu Glu Asn Glu
 900 905 910
 Thr Thr Cys Tyr Met Gly Lys Trp Ser Ser Pro Pro Gln Cys Glu Gly
 915 920 925

 Leu Pro Cys Lys Ser Pro Pro Glu Ile Ser His Gly Val Val Ala His
 930 935 940
 Met Ser Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Glu Glu Val Thr Tyr Lys Cys Phe
 945 950 955 960
 Glu Gly Phe Gly Ile Asp Gly Pro Ala Ile Ala Lys Cys Leu Gly Glu
 965 970 975
 Lys Trp Ser His Pro Pro Ser Cys Ile Lys Thr Asp Cys Leu Ser Leu

980	985	990
Pro Ser Phe Glu Asn Ala Ile Pro Met Gly Glu Lys Lys Asp Val Tyr		
995	1000	1005
Lys Ala Gly Glu Gln Val Thr Tyr Thr Cys Ala Thr Tyr Tyr Lys		
1010	1015	1020
Met Asp Gly Ala Ser Asn Val Thr Cys Ile Asn Ser Arg Trp Thr		
1025	1030	1035
Gly Arg Pro Thr Cys Arg Asp Thr Ser Cys Val Asn Pro Pro Thr		
1040	1045	1050
Val Gln Asn Ala Tyr Ile Val Ser Arg Gln Met Ser Lys Tyr Pro		
1055	1060	1065
Ser Gly Glu Arg Val Arg Tyr Gln Cys Arg Ser Pro Tyr Glu Met		
1070	1075	1080
Phe Gly Asp Glu Glu Val Met Cys Leu Asn Gly Asn Trp Thr Glu		
1085	1090	1095
Pro Pro Gln Cys Lys Asp Ser Thr Gly Lys Cys Gly Pro Pro Pro		
1100	1105	1110
Pro Ile Asp Asn Gly Asp Ile Thr Ser Phe Pro Leu Ser Val Tyr		
1115	1120	1125
Ala Pro Ala Ser Ser Val Glu Tyr Gln Cys Gln Asn Leu Tyr Gln		
1130	1135	1140
Leu Glu Gly Asn Lys Arg Ile Thr Cys Arg Asn Gly Gln Trp Ser		
1145	1150	1155
Glu Pro Pro Lys Cys Leu His Pro Cys Val Ile Ser Arg Glu Ile		
1160	1165	1170
Met Glu Asn Tyr Asn Ile Ala Leu Arg Trp Thr Ala Lys Gln Lys		
1175	1180	1185
Leu Tyr Ser Arg Thr Gly Glu Ser Val Glu Phe Val Cys Lys Arg		
1190	1195	1200
Gly Tyr Arg Leu Ser Ser Arg Ser His Thr Leu Arg Thr Thr Cys		
1205	1210	1215

Trp Asp Gly Lys Leu Glu Tyr Pro Thr Cys Ala Lys Arg

1220 1225 1230

<210>

6

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Truncated Factor H variant

<400> 6

Met Arg Leu Leu Ala Lys Ile Ile Cys Leu Met Leu Trp Ala Ile Cys

1 5 10 15

Val Ala Glu Asp Cys Asn Glu Leu Pro Pro Arg Arg Asn Thr Glu Ile

20 25 30

Leu Thr Gly Ser Trp Ser Asp Gln Thr Tyr Pro Glu Gly Thr Gln Ala

35 40 45

Ile Tyr Lys Cys Arg Pro Gly Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Ile Ile Met

50 55 60

Val Cys Arg Lys Gly Glu Trp Val Ala Leu Asn Pro Leu Arg Lys Cys

65 70 75 80

Gln Lys Arg Pro Cys Gly His Pro Gly Asp Thr Pro Phe Gly Thr Phe

85 90 95

Thr Leu Thr Gly Gly Asn Val Phe Glu Tyr Gly Val Lys Ala Val Tyr

100 105 110

Thr Cys Asn Glu Gly Tyr Gln Leu Leu Gly Glu Ile Asn Tyr Arg Glu

115 120 125

Cys Asp Thr Asp Gly Trp Thr Asn Asp Ile Pro Ile Cys Glu Val Val

130 135 140

Lys Cys Leu Pro Val Thr Ala Pro Glu Asn Gly Lys Ile Val Ser Ser

145 150 155 160

Ala Met Glu Pro Asp Arg Glu Tyr His Phe Gly Gln Ala Val Arg Phe

165 170 175

Val Cys Asn Ser Gly Tyr Lys Ile Glu Gly Asp Glu Glu Met His Cys

180	185	190
Ser Asp Asp Gly Phe Trp Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Val Glu Ile		
195	200	205
Ser Cys Lys Ser Pro Asp Val Ile Asn Gly Ser Pro Ile Ser Gln Lys		
210	215	220
Ile Ile Tyr Lys Glu Asn Glu Arg Phe Gln Tyr Lys Cys Asn Met Gly		
225	230	235
240		
Tyr Glu Tyr Ser Glu Arg Gly Asp Ala Val Cys Thr Glu Ser Gly Trp		
245	250	255
Arg Pro Leu Pro Ser Cys Glu Glu Lys Ser Cys Asp Asn Pro Tyr Ile		
260	265	270
Pro Asn Gly Asp Tyr Ser Pro Leu Arg Ile Lys His Arg Thr Gly Asp		
275	280	285
Glu Ile Thr Tyr Gln Cys Arg Asn Gly Phe Tyr Pro Ala Thr Arg Gly		
290	295	300
Asn Thr Ala Lys Cys Thr Ser Thr Gly Trp Ile Pro Ala Pro Arg Cys		
305	310	315
320		
Thr Leu Lys Pro Cys Asp Tyr Pro Asp Ile Lys His Gly Leu Tyr		
325	330	335
His Glu Asn Met Arg Arg Pro Tyr Phe Pro Val Ala Val Gly Lys Tyr		
340	345	350
Tyr Ser Tyr Tyr Cys Asp Glu His Phe Glu Thr Pro Ser Gly Ser Tyr		
355	360	365
Trp Asp His Ile His Cys Thr Gln Asp Gly Trp Ser Pro Ala Val Pro		
370	375	380
Cys Leu Arg Lys Cys Tyr Phe Pro Tyr Leu Glu Asn Gly Tyr Asn Gln		
385	390	395
400		
Asn Tyr Gly Arg Lys Phe Val Gln Gly Lys Ser Ile Asp Val Ala Cys		
405	410	415
His Pro Gly Tyr Ala Leu Pro Lys Ala Gln Thr Thr Val Thr Cys Met		
420	425	430

Glu Asn Gly Trp Ser Pro Thr Pro Arg Cys Ile Arg Val Ser Phe Thr

435 440 445

Leu

<210> 7

<211> 2823

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ggcaggtgct tgttactgtt aatgaaagca gattaaagc aacaccacca tcactggagt	60
attttttagtt atatacgatt gagactacca agcatgtgc tcttattcag tctaattccta	120
atctcatggg tatccactgt tggggagaa ggaacacttt gtgatttcc aaaaatacac	180
catggatttc tgtatgtga agaagattat aaccctttt cccaagttcc tacagggaa	240

gttttctatt actcctgtga atataatttt gtgtcctt caaaatcctt ttggactcgc	300
ataacatgca cagaagaagg atggtcacca acaccgaagt gtctcagaat gtgtcctt	360
ccttttgcgaaaatggtca ttctgaatct tcaggactaa tacatctgga aggtgatact	420
gtacaaatata ttgcaaacac aggatacagc cttcaaaaaca atgagaaaaa cattcgtgt	480
gtagaacacgg gctggccac tcctccata tgcagctca ctaaaggaga atgtcatgtt	540
ccaatttttag aagccaatgt agatgctcag ccaaaaaaag aaagctacaa agttggagac	600
gtgttgaat tctcctgcag aaaaatctt ataagagttt gatcagactc agttcaatgt	660

taccaatitg ggtggcacc taactttcca acatgcaag gacaagtacg atcatgtgg	720
ccaccccttc aactctcaa tggtaagtt aaggagataa gaaaagagga atatggacac	780
aatgaagtag tggatatgtt ttgcaatctt aatttataa taaaacggcc taagaaaata	840
caatgtgtgg atggagaatg gacaacttta cccacttgc ttgacaactgtt gaaaacatgt	900
ggatacatac ctgaactcga gtacggttat gttcagccgt ctgtccctcc ctatcaacat	960
ggagtttcag tcgagggtgaa ttgcagaaat gaatatgcaaa tgattggaaa taacatgatt	1020
acctgttata atgaaatgtt gacagagctt cctatgtgtt ttgcaacaca ccaacttaag	1080

aggtgcaaaa tagcaggagt taatataaaa acattactca agctatctgg gaaagaattt	1140
aatcataattt ctgaaatcgtt acatgtt tcagacatct tcagatacag gcactcagtc	1200
tgtataaaacggaaatggaa tcctgaagta gactgcacag aaaaaaggaa acaattctgc	1260
ccaccggccac ctcagatacc taatgctcag aatatgacaa ccacagtgaa ttatcaggat	1320
ggagaaaaaag tagctgttct ctgtaaagaa aactatctac ttccagaagc aaaagaaatt	1380

gtatgtaaag atggacgatg gcaatcatta ccacgctgtg ttgagtctac tgcataattgt	1440
ggggccccctc catctattaa caatggagat accacctcat tcccattatac agtataatcct	1500
ccagggtaa cagtgacgta ccgttgccag tccttctata aactccaggg ctctgtaact	1560
gtaacatgca gaaataaaca gtggtcagaa ccaccaagat gcctagatcc atgtgtggta	1620
tctgaagaaa acatgaacaa aaataacata cagttaaaat ggagaaacga tggaaaactc	1680
tatgcaaaaa caggggatgc tggtaattc cagtgtaat tcccacataa agcgatgata	1740
tcatcaccac catttcgagc aatctgtcag gaagggaaat ttgaatatcc tatatgtgaa	1800
tgaagcaagc ataatttcc tgaatatatt ctcaaacat ccatctacgc taaaagttagc	1860
cattatgtag ccaattctgt agttacttct ttattcttt caggtgtgt ttaactcagt	1920
tttattttaga actctggatt ttttagagctt tagaaatttg taagctgaga gaacaatgtt	1980
tcaacttaata ggaggggtgc ttagtccata ttacattgtt ataacagagt atcacagact	2040
ggataacttc taaccaatag tttatttggtt tcataaatct aaaagctgag aagtccaaga	2100
tggtgggct gcctctggtg agggcttct cgaagcatca taatatgctg gaaggcatca	2160
caacatggtg gaagggatca cgtggcaaaa gagcatgtac atgggagtga gagaaaaaaga	2220
gagagagaga cagagtggcg gggccgggg aggagcgc当地 actcatcctt tataaagaca	2280
ccactcctga gataacaatc caatccatg ataatgacat taatccattc aagaagatag	2340
agctctcgta acttaatcac ctctaaaga ttcacactga caacactgtt gcattggcag	2400
ttaagttcc acgttaaactt tcggggacac attcaaacca caggagaaac tcaaattgtt	2460
cctggcaaa tcacaacatg ggaaattttt ttcataatg tccacagaaa cagtaatgt	2520
tctcgctca gaacttaatt catctaattcc ctccgtttg tctcaaattt taggataact	2580
ttgaaacttt ctgaattaac gttataaa aggaaatgtt gatgttattt tagtctctat	2640
cttcaggta ttatcactta aaaacctgc当地 aaagctgtca actttgtgg ttgttagcaag	2700
tattaataaa tatttataaa tcctctaattt taagtcttagc tacctatcca atactaaata	2760
cccccttaaag tattaaatgc actatctgtt gtaaacggaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2820
aaa	2823

<210> 8

<211> 569

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Leu Leu Leu Phe Ser Val Ile Leu Ile Ser Trp Val Ser Thr Val

1	5	10	15
Gly Gly Glu Gly Thr Leu Cys Asp Phe Pro Lys Ile His His Gly Phe			
20	25	30	
Leu Tyr Asp Glu Glu Asp Tyr Asn Pro Phe Ser Gln Val Pro Thr Gly			
35	40	45	
Glu Val Phe Tyr Tyr Ser Cys Glu Tyr Asn Phe Val Ser Pro Ser Lys			
50	55	60	
Ser Phe Trp Thr Arg Ile Thr Cys Thr Glu Glu Gly Trp Ser Pro Thr			
65	70	75	80
Pro Lys Cys Leu Arg Met Cys Ser Phe Pro Phe Val Lys Asn Gly His			
85	90	95	
Ser Glu Ser Ser Gly Leu Ile His Leu Glu Gly Asp Thr Val Gln Ile			
100	105	110	
Ile Cys Asn Thr Gly Tyr Ser Leu Gln Asn Asn Glu Lys Asn Ile Ser			
115	120	125	
Cys Val Glu Arg Gly Trp Ser Thr Pro Pro Ile Cys Ser Phe Thr Lys			
130	135	140	
Gly Glu Cys His Val Pro Ile Leu Glu Ala Asn Val Asp Ala Gln Pro			
145	150	155	160
Lys Lys Glu Ser Tyr Lys Val Gly Asp Val Leu Lys Phe Ser Cys Arg			
165	170	175	
Lys Asn Leu Ile Arg Val Gly Ser Asp Ser Val Gln Cys Tyr Gln Phe			
180	185	190	
Gly Trp Ser Pro Asn Phe Pro Thr Cys Lys Gly Gln Val Arg Ser Cys			
195	200	205	
Gly Pro Pro Pro Gln Leu Ser Asn Gly Glu Val Lys Glu Ile Arg Lys			
210	215	220	
Glu Glu Tyr Gly His Asn Glu Val Val Glu Tyr Asp Cys Asn Pro Asn			
225	230	235	240
Phe Ile Ile Asn Gly Pro Lys Lys Ile Gln Cys Val Asp Gly Glu Trp			
245	250	255	

Thr Thr Leu Pro Thr Cys Val Glu Gln Val Lys Thr Cys Gly Tyr Ile
 260 265 270
 Pro Glu Leu Glu Tyr Gly Tyr Val Gln Pro Ser Val Pro Pro Tyr Gln
 275 280 285
 His Gly Val Ser Val Glu Val Asn Cys Arg Asn Glu Tyr Ala Met Ile
 290 295 300
 Gly Asn Asn Met Ile Thr Cys Ile Asn Gly Ile Trp Thr Glu Leu Pro
 305 310 315 320
 Met Cys Val Ala Thr His Gln Leu Lys Arg Cys Lys Ile Ala Gly Val
 325 330 335
 Asn Ile Lys Thr Leu Leu Lys Leu Ser Gly Lys Glu Phe Asn His Asn
 340 345 350
 Ser Arg Ile Arg Tyr Arg Cys Ser Asp Ile Phe Arg Tyr Arg His Ser
 355 360 365
 Val Cys Ile Asn Gly Lys Trp Asn Pro Glu Val Asp Cys Thr Glu Lys
 370 375 380
 Arg Glu Gln Phe Cys Pro Pro Pro Gln Ile Pro Asn Ala Gln Asn
 385 390 395 400
 Met Thr Thr Thr Val Asn Tyr Gln Asp Gly Glu Lys Val Ala Val Leu
 405 410 415
 Cys Lys Glu Asn Tyr Leu Leu Pro Glu Ala Lys Glu Ile Val Cys Lys
 420 425 430
 Asp Gly Arg Trp Gln Ser Leu Pro Arg Cys Val Glu Ser Thr Ala Tyr
 435 440 445
 Cys Gly Pro Pro Pro Ser Ile Asn Asn Gly Asp Thr Thr Ser Phe Pro
 450 455 460
 Leu Ser Val Tyr Pro Pro Gly Ser Thr Val Thr Tyr Arg Cys Gln Ser
 465 470 475 480
 Phe Tyr Lys Leu Gln Gly Ser Val Thr Val Thr Cys Arg Asn Lys Gln
 485 490 495
 Trp Ser Glu Pro Pro Arg Cys Leu Asp Pro Cys Val Val Ser Glu Glu

500	505	510
Asn Met Asn Lys Asn Asn Ile Gln Leu Lys Trp Arg Asn Asp Gly Lys		
515	520	525
Leu Tyr Ala Lys Thr Gly Asp Ala Val Glu Phe Gln Cys Lys Phe Pro		
530	535	540
His Lys Ala Met Ile Ser Ser Pro Pro Phe Arg Ala Ile Cys Gln Glu		
545	550	555
Gly Lys Phe Glu Tyr Pro Ile Cys Glu		
565		

<210> 9

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Factor H gene polymorphism

<400> 9

ggggtttctt gggatgtaat ratgttcagt gttttgacct t 41

<210> 10

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Polymorphism

<400> 10

ttatgaaatc cagaggatat yaccagctgc tgatttgac a 41

<210> 11

<211>

> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Polymorphism

<400> 11

agtccaagtt tacacagtac ratagactta cccattgcca a 41

<210> 12

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Factor H gene polymorphism

<400> 12

gatatagatc tcttgaaat rtaataatgg tatgcaggaa g 41

<210> 13

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Factor H gene polymorphism

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(22)

<223> Residues 21-22 may be absent

<400> 13

taattcataa cttttttttt ttcggttag aaaggccctg tg 42

<210> 14

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Factor H gene polymorphism

<400> 14

aaaggaatac atttaggact yattgaagt tagtgtcaac a 41

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Factor H gene polymorphism

<400> 15

caacccgggg aaatacagcm aaatgcacaa gtactggctg 40

<210> 16

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Factor H gene polymorphism

<400> 16
aaaatggata taatcaaaat yatggaagaa agtttgtaca g 41
<210> 17
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Factor H gene polymorphism
<400> 17
tatgccttaa aagaaaaagc raaatatcaa tgcaaactag g 41
<210> 18
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Factor H gene polymorphism
<220><221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> Residue 21 is optionally absent
<400> 18
cagcttgagt ggatcaaaga ntgacaaggg ccaatggaac c 41

<210> 19
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Factor H gene polymorphism
<400> 19
acggtaccta tttatttagta katctaatacataaaagcttt t 41
<210> 20
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Factor H gene polymorphism
<400> 20
aaggcaccta ataaaattca rtgtgttgat ggagagtgga c 41
<210> 21

<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Factor H gene polymorphism
<400> 21
tttttattt tttattataa mattaattat attttaata t 41

<210> 22
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Factor H gene polymorphism
<400> 22
ccttgtaaat ctccacctga katttctcat ggtgtttag c 41

<210> 23
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Factor H gene polymorphism
<400> 23
ggggatatcg tcttcatca ygttctcaca cattgcgaac a 41

<210> 24
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Factor H gene polymorphism
<400> 24
aaatccagag gatatyacca gctgctgatt t 31

<210> 25
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Factor H gene polymorphism
<400> 25

aatgggttaag tctatygtac tgtgtaaact t	31
<210> 26	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Factor H gene polymorphism	
<400> 26	
tgcataccat tattayattt ccaagagatc t	31
<210> 27	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Factor H gene polymorphism	
<220><221> misc_feature	
<222> (18)..(19)	
<223> Residues 18-19 may be optionally absent	
<400> 27	
acatactaatt tcataacttt tttttttcg ttttag	36
<210> 28	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Factor H gene polymorphism	
<400> 28	
aatacattt ggactyattt gaagtttagtg t	31
<210> 29	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Factor H gene polymorphism	
<400> 29	
ccggggaaat acagcmaaat gcacaagtac t	31
<210> 30	

<211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Factor H gene polymorphism
 <400> 30
 ggatataatc aaaatyatgg aagaaagttt g 31
 <210> 31
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Factor H gene polymorphism
 <400> 31
 cttaaaagaa aaagcraaat atcaatgcaa a 31
 <210> 32
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Factor H gene polymorphism
 <400> 32
 ctttattgtat tagatmtact aataaatagg t 31
 <210> 33
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Factor H gene polymorphism
 <400> 33
 acctaataaaa attcartgtg ttgatggaga g 31
 <210> 34
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Factor H gene polymorphism
 <400> 34
 taaatctcca cctgakattt ctcatggtgt t 31

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 35

acttgttccc ccactcctac

20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 36

cctctttcgtatggactac

20

<210> 37

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 37

tgaatcactaccaggatgtatgg

27

<210> 38

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 38

caggtatcca gccagtagtt gt

22

<210> 39

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 39

ctttatttat ttatcattgt tatggtcctt agaaaaatgt tattt 45

<210> 40

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 40

ggcaggcaac gtctatagat ttacc 25

<210> 41

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 41

tcaccatctg ctgttacata tcctagt 27

<210> 42

<211> 33

<212> DNA

<213>

 Artificial

<220><223> Primer

<400> 42

tgggttatt tctgaatctc agtatacata tgc 33

<210> 43

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 43

aatacagcaa aatgc 15

<210> 44

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe	
<400> 44	
tttcttccat gattttg	17
<210> 45	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Probe	
<400> 45	
aagaaaaagc gaaatat	17
<210> 46	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 46	
atacagccaa atgc	14
<210> 47	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 47	
ttcttccata attttg	16
<210> 48	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 48	
aagaaaaagc aaaatat	17
<210> 49	
<211> 41	

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Polymorphism

<400> 49

ccaggctatc tataaatgcc rccctggata tagatctttt g 41

<210> 50

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Polymorphism

<400> 50

ttggtactttt tacccttaca kgagggaaatg tgtttgaata t 41

<210> 51

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Polymorphism

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Residue 21 is G or H

<400> 51

acgatggttt ttggagtaaa nagaaccaa agtgtgtggg t 41

<210> 52

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Polymorphism

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Residue is C or D

<400> 52

ttatattataa ggagaatgaa ngattcaat ataaatgtaa c 41

<210> 53

<211> 38

<212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Polymorphism
 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(21)

<223> Residue is C or D
 <400> 53

cactgaatct ggatggcgtc ngtgccttc atgtgaag 38

<210> 54

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Polymorphism

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Residue 21 is optionally absent

<400> 54

aagatggatg gtcgcagca staccatgcc tca 33

<210> 55

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Polymorphism

<400> 55

acaattatgc ccacccac stcagattcc caattctcac a 41

<210> 56

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Polymorphism

<400> 56

caaccaccc agatagaaca yggaccatt aattcatcca g 41

<210> 57

<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Polymorphism
<400> 57
gtcttcacaa gaaaggtagt yacatggac taaattgagt t 41
<210> 58
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Polymorphism
<400> 58
cacatgtcag acagttatca ktatggagaa gaagttacgt a 41

<210> 59
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Polymorphism
<400> 59
tcagtatgga gaagaagtta ygtacaaatg tttgaaggt t 41
<210> 60
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Polymorphism
<400> 60
gtatggkgca ttgaattta ttatatg 27
<210> 61
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Polymorphism
<400> 61

acacctctcg tgtgwatccg cccacagttac aaaat 35

<210> 62

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Polymorphism

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Residue 21 may be optionally absent

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> Residue 23 may be optionally absent

<400> 62

cttgtatcaa cttgaggta nancaagcga ataacatgtt gaaa 44

<210> 63

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Polymorphism

<400> 63

aaaagctta ttgatttagat mtactaataa ataggtaccg t 41

<210> 64

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 64

gcaaaagttt ctgataggc 19

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 65	
aatcttacct tctgctacac	20
<210> 66	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 66	
ttagatagac ctgtgactg	19
<210> 67	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 67	
tcaggcataa ttgctac	17
<210> 68	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 68	
acttgttccc ccactc	16
<210> 69	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 69	
cctctttcg tatggactac	20
<210> 70	
<211> 18	
<212> DNA	
<213>	

Artificial

<220><223> Primer

<400> 70

ttgttcccc actcctac 18

<210> 71

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 71

acacatttcc tcctgttaagg 20

<210> 72

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 72

ccctgtggac atcctgg 17

<210> 73

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

><223> Primer

<400> 73

aacctcttt cgtatggact ac 22

<210> 74

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 74

atgctgttca ttttcc 16

<210> 75

<211> 17

<212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 75
 ccatccatct gtgtcac 17
 <210> 76
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <
 400> 76
 attaccgtga atgtgac 17
 <210> 77
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 77
 ttgtatgaga aaaaaaaac 19
 <210> 78
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 78
 tccaaatctta tcctgagg 18
 <210> 79
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 79
 tcttaccac acacttg 18

<210> 80
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 80
 gtcctggta cagtc
 16

<210> 81
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 81
 gcatacagca ttcctc
 17

<210> 82
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 82
 gcactgaatc tggatc
 16

<210> 83
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 83
 atgaaccttg aacacag
 17

<210> 84
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 84

cggatactta tttctgc	17
<210> 85	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 85	
cgtagttca tctccag	17
<210> 86	
<211> 18	
<212> DNA	
<213>	
Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 86	
agaactggag atgaaatc	18
<210> 87	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 87	
tgaatgaaac ttacagg	17
<210> 88	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 88	
gtgaaacctt gtgattatc	19
<210> 89	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	

><223> Primer

<400> 89

tccccagtaac ttccctg 16

<210> 90

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 90

ctgtgatgaa catttttag 19

<210> 91

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 91

tgctctcctt tcttcg 16

<210> 92

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<

400> 92

cattgttatg gtccttagg 19

<210> 93

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 93

acatgctagg atttcagag 19

<210> 94

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 94

ctttttctta ttctcttccc

20

<210> 95

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 95

tcaccatctg ctgttac

17

<210> 96

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 96

tgtaacagca gatggtg

17

<210> 97

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 97

cccacaaaaa gactaaag

18

<210> 98

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 98

gggaaatact cagattg

17

<210> 99

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 99

atggcattca tagtcc

16

<210> 100

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 100

ccagaactaa aaatgacttc

20

<210> 101

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 101

ggtaaatcag accaacc

17

<210> 102

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 102

atagtgttg gttacaatg

19

<210> 103

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 103

gttatgtca aatcaggag	19
<210> 104	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 104	
caagaaaagag aatgcgaac	19
<210> 105	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 105	
agattacagg caatggg	17
<210> 106	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 106	
ttgattgtt aggatgc	17
<210> 107	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 107	
ttgaggagg t caggagg t gg	20
<210> 108	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	

<220><223> Primer

<400> 108

ctgaactcct caatgg 16

<210> 109

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 109

attaccaata cacactgg 18

<210> 110

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 110

ttacatagtg gaggagag 18

<210> 111

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 111

tggaaatgtt gaggc 15

<210> 112

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 112

agttggtttg attcctatc 19

<210> 113

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 113

ttgagcgtt cacttctg

18

<210> 114

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 114

ttatgccac ctccac

16

<210> 115

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 115

atacactact gaccaacac

19

<210> 116

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 116

gtctatgaga atacaagcc

19

<210> 117

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 117

gaatctgagg tggagg

16

<210> 118

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 118

cccttgatt ttcattc

17

<210> 119

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 119

agaactccat ttccc

16

<210> 120

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 120

cacaaccacc tcagatag

18

<210> 121

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 121

gcctaacctt cacactg

17

<210> 122

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 122
 gtcatagtag ctcctgtatt g 21
 <210> 123
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 123
 acgtaactc ttctccatac 20
 <210> 124
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 124
 cttccttgta aatctccac 19
 <210> 125
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 125
 caatgcacca tacttatgc 19
 <210> 126
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 126
 taaagatttgcggaac 16
 <210> 127
 <211> 16
 <212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 127

ggctccatcc attttg

16

<210> 128

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 128

ttacaaaatg gatggag

17

<210> 129

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 129

aagtgcgtggg attacaggcg

20

<210> 130

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 130

ctactcaaaa tgaacactag g

21

<210> 131

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 131

tttaaccctg ctatactcc

19

<210> 132

<211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 132

taaatggaaa ctggacg 17

<210> 133
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 133

accctattac ttgtgttctg 20

<210> 134
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 134

gtgtttgcgt ttgcc 15

<210> 135
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 135

gagattttc cagccac 17

<210> 136
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 136

tctcacacat tgcgaac

17

<210> 137

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 137

accgttagtt ttccagg

17

<210> 138

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 138

ggtttggata gtgttttag

20

<210> 139

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 139

atgttgttcg caatgtg

17

<210> 140

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 140

tgggagtgca gtgagaattg

20

<210> 141

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer
<400> 141
gctaatgatg ctttcacag ga 22
<210> 142
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Primer
<400> 142
cctgtgactg tcttaggcatt tt 22
<210> 143
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Primer
<400> 143
tatgcctgaa ttatatact attgcc 26
<210> 144
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Primer
<400> 144
gcttgctat gtttaattt cctt 24
<210> 145
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Primer
<400> 145
aactatgatg gaaataat aatctgg 27
<210> 146
<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 146

tgcatatgct gttcatttc

20

<210> 147

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 147

gtcttacatt aaaatatctt aaagtctc

28

<210> 148

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 148

tttcctccaa tcttacctg ag

22

<210> 149

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 149

cgttcatctt aaggaatatc agca

24

<210> 150

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 150

cctgatggaa acaacattc tg

22

<210> 151
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Primer
<400> 151
aacaggcca gaaaagttca 20
<210> 152
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Primer
<400> 152
tggcattt aatgcattt tg 22
<210> 153
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Primer
<400> 153
agtttcgaa gttgccgaaa 20
<210> 154
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Primer
<400> 154
cctagaaacc ctaatggat gtg 23
<210> 155
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Primer

<400> 155

tgttcaagca aagtgaccaa a 21

<210> 156

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 156

tgagcaaatt tatgttctc attt 24

<210> 157

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 157

atgtcaccctt gtttaccaa tgg 23

<210> 158

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 158

tgaatgccta tggttatcca ggt 23

<210> 159

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 159

aaaacctgca ggaacaaagc 20

<210> 160

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 160

tcttagaatg ggaaatactc agattg 26

<210> 161

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 161

tggttttca gaaattcatt ttca 24

<210> 162

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 162

atgtaaaatt aacttggca atga 24

<210> 163

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 163

ttgctgaaat aagaattaga actttg 26

<210> 164

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 164

tgaataaaag aagaaaatct ttcca 25

<210> 165

ttggaaaagt aataggatg tgtgtc	26
<210> 170	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 170	
ctatgagaat acaaggccaaa agttc	25
<210> 171	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 171	
tctcttggtgc ttcgtgtaaa caa	23
<210> 172	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 172	
aacccttiga ttttcatctt tca	23
<210> 173	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 173	
tcaaagttag ggaaataatt ga	22
<210> 174	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	

<220><223> Primer

<400> 174

aatttatgag ttagtcaaac ctgaat 26

<210> 175

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 175

tcttcattca aagtgtaaat ggtacc 26

<210> 176

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 176

acaaaatggc taatatatcc tctcaag 27

<210> 177

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 177

taatgtgtgg gcccagcc 18

<210> 178

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 178

caaaaatggc actagggtgg acc 23

<210> 179

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 179

attttgggg agtatacgag g

21

<210> 180

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 180

ctgtgttgc gtttgcccta

20

<210> 181

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 181

ttcacgtggc tggaaaaatc

20

<210> 182

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 182

ttgaaaacct gaaagtctat gaaga

25

<210> 183

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 183

tcaatataaa agtgcacacc ttt

23

<210> 184

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 184

cagtccatt tctgattgtt cca

23

<210> 185

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 185

gctgaggata atttgaaggg g

21

<210> 186

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 186

gtgattcatc gatgtagctc ttt

23

<210> 187

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 187

aatgaccaga ggagcctgga a

21

<210> 188

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 188

tgatgtcagt tttcaaagtt ttcc 24

<210> 189

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 189

accactctct cagtttgct aattat 26

<210> 190

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 190

cacattaaat ttgtttctgc aatga 25

<210> 191

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 191

agaagtgtatg aaacaagaat ttga 24

<210> 192

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 192

ccatattaaggc attattttatg gtttc 25

<210> 193

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 193

aacacaggaca gttactatta ctttgc 27

<210> 194

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 194

aatattttc agagtaagca ctcattt 27

<210> 195

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 195

tttatcattt tgattggat tgt 23

<210> 196

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 196

tgcgatattt ttattgacat aattgtt 27

<210> 197

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 197

tttgatcttg ttgcttctt acaaga 26

<210> 198

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 198

ccatttcct gaaacactac cc 22

<210> 199
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 199

aattatttga atttccagac acctt 25

<210> 200
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 200

aattatttga atttccagac acctt 25

<210> 201
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 201

ttttggacta atttcataga ataaccc 27

<210> 202
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 202

cttaaatgca attcactat tctatga

27

<210> 203

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 203

tagccattat gtagcc

16

<210> 204

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 204

tctggatgt aataatg

17

<210> 205

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 205

tctggatgt aatgatg

17

<210> 206

<

211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 206

gaacattatt acatccc

17

<210> 207

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 207

gaacatcatt acatccc 17

<210> 208

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 208

cagaggatat caccagc 17

<210> 209

<211> 17

<212>

> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 209

cagaggatat taccagc 17

<210> 210

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 210

agcagctgg t gatatcc 17

<210> 211

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 211

agcagctgg t aatatcc 17

<210> 212

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 212

tacacagtac gatagac

17

<210> 213

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 213

tacacagtac aatagac

17

<210> 214

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 214

taagtctatc gtactgt

17

<210> 215

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 215

taagtctatt gtactgt

17

<210> 216

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 216

tcttgaaat gtaataa

17

<210> 217

<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 217	
tcttggaaat ataataa	17
<210> 218	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 218	
accattattta catttcc	17
<210> 219	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 219	
accattattta tatttcc	17
<210> 220	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 220	
tttttttttc gtttttag	17
<210> 221	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 221	
tttttttttt tcgtttt	17

<210> 222

<211

> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 222

ctttctaaaa cgaaaaaa

17

<210> 223

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 223

ttctaaaaacg aaaaaaaa

17

<210> 224

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 224

tttaggactc atttgaa

17

<210> 225

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 225

tttaggactt atttgaa

17

<210> 226

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 226	
taacttcaaa tgagtcc	17
<210> 227	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 227	
taacttcaaa taagtcc	17
<210> 228	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 228	
gaaatacagc aaaatgc	17
<210> 229	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 229	
gaaatacagc caaatgc	17
<210> 230	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 230	
acttgtgcat ttgctg	17
<210> 231	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	

<220><223> Probe

<400> 231

acttgtgcat ttggctg

17

<210> 232

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 232

taatcaaaat tatggaa

17

<210> 233

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 233

taatcaaaat catggaa

17

<210> 234

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 234

tttcttccat aattttg

17

<210> 235

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 235

tttcttccat gattttg

17

<210> 236

<211> 17

<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 236	
aagaaaaagc gaaatat	17
<210> 237	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 237	
aagaaaaagc aaaatat	17
<210> 238	
<211>	
> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 238	
ttgatattc gctttt	17
<210> 239	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 239	
ttgatattt gctttt	17
<210> 240	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 240	
ggatcaaaga tgacaa	16
<210> 241	

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 241

ggatcaaaga ntgacaa

17

<210> 242

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 242

gcccttgta tctttg

16

<210> 243

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 243

gcccttgta ntctttg

17

<210> 244

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 244

tttatttagta gatctaa

17

<210> 245	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 245	
tttattagta tatctaa	17
<210> 246	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 246	
ttgattagat ctactaa	17
<210> 247	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 247	
ttgattagat atactaa	17
<210> 248	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 248	
ataaaattca atgtgtt	17
<210> 249	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 249	

ataaaattca gtgtgtt	17
<210> 250	
<211	
> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 250	
ccatcaacac attgaat	17
<210> 251	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 251	
ccatcaacac actgaat	17
<210> 252	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 252	
tttattataa cattaat	17
<210> 253	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe	
<400> 253	
tttattataa aattaat	17
<210> 254	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	

<220><223> Probe
 <400> 254
 tataattaat gttataa 17
 <210> 255
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Probe
 <400> 255
 tataattaat tttataa 17
 <210> 256
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220><223> Probe
 <400> 256
 ctccacctga gatttct 17
 <210> 257
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Probe
 <400> 257
 ctccacctga tatttct 17
 <210> 258
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Probe
 <400> 258
 catgagaaat ctcagg 17
 <210> 259
 <211> 17
 <212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 259

catgagaaat atcaggat

17

<210> 260

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 260

tctttcatca cgttctc

17

<210> 261

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 261

tctttcatca tgttctc

17

<210> 262

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 262

gtgtgagaac gtgatga

17

<210> 263

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Probe

<400> 263

gtgtgagaac atgatga

17

<210> 264

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 264

tttctggat gtaata

16

<210> 265

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 265

tttctggat gtaatg

16

<210> 266

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 266

caaaacactg aacatt

16

<210> 267

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 267

caaaacactg aacatc

16

<210> 268

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 268

aaatccagag gatatc

16

<210> 269

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 269

aaatccagag gatatt

16

<210> 270

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 270

aaatcagcag ctggtg

16

<210> 271

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 271

aaatcagcag ctggta

16

<210> 272

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 272

aagtttacac agtacg

16

<210> 273

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 273	
aagtttacac agtaca	16
<210> 274	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 274	
aatggtaag tctatc	16
<210> 275	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 275	
aatggtaag tctatt	16
<210> 276	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 276	
agatctcttg gaaatg	16
<210> 277	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 277	
agatctcttg gaaata	16
<210> 278	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	

<220><223> Primer

<400> 278

tgcataccat tattac 16

<210> 279

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 279

tgcataccat tattat 16

<210> 280

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 280

tcataactt tttttt 16

<210> 281

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 281

ataactttt tttttt 16

<210> 282

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 282

gggccttctt aaaaacg 16

<210> 283

<211> 16

<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 283	
gccttctaa aacgaa	16
<210> 284	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 284	
aatacattt a gggactc	16
<210> 285	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 285	
aatacattt a ggactt	16
<210> 286	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 286	
acactaactt caaatg	16
<210> 287	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 287	
acactaactt caaata	16

<210> 288

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 288

ccggggaaat acagca

16

<210> 289

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 289

ccggggaaat acagcc

16

<210> 290

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 290

agtacttgtg catttt

16

<210> 291

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 291

agtacttgtg catttg

16

<210> 292

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 292	
ggatataatc aaaatt	16
<210> 293	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 293	
ggatataatc aaaatc	16
<210> 294	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 294	
caaacttct tccata	16
<210> 295	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 295	
caaacttct tccatg	16
<210> 296	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 296	
cttaaaagaa aaagcg	16
<210> 297	
<211> 16	
<212> DNA	

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 297

cttaaaaagaa aaagca

16

<210> 298

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 298

tttgcattga tatttc

16

<210> 299

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 299

tttgcattga tatttt

16

<210> 300

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 300

tgagtggatc aaaga

15

<210> 301

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 301	
tgagtggatc aaagan	16
<210> 302	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 302	
catggccct tgtca	15
<210> 303	
<211	
> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<220><221> misc_feature	
<222> (16)..(16)	
<223> n is a, c, g, or t	
<400> 303	
catggccct tgtcan	16
<210> 304	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 304	
acctatttat tagtag	16
<210> 305	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 305	
acctatttat tagtat	16

<210> 306
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Primer
<400> 306
ctttattgat tagatc 16
<210> 307
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Primer
<400> 307
ctttattgat tagata 16
<210> 308
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Primer
<400> 308
acctaataaaa attcaa 16
<210> 309
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Primer
<400> 309
acctaataaaa attcag 16
<210> 310
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Primer
<400> 310

ctctccatca acacat	16
<210> 311	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 311	
ctctccatca acacac	16
<210> 312	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 312	
tatttttat tataac	16
<210> 313	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 313	
tatttttat tataaa	16
<210> 314	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 314	
aaaaatataa ttaatg	16
<210> 315	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	

<220><223> Primer

<400> 315

aaaaatataa ttaatt

16

<210> 316

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 316

taaatctcca cctgag

16

<210> 317

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 317

taaatctcca cctgat

16

<210> 318

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 318

aacaccatga gaaatc

16

<210> 319

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 319

aacaccatga gaaata

16

<210> 320

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 320

tatcgcttt catcac

16

<210> 321

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 321

tatcgcttt catcat

16

<210> 322

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 322

gcaatgtgtg agaacgc

16

<210> 323

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 323

gcaatgtgtg agaacgc

16

<210> 324

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 324

gaacatttg agactccgtc

20

<210> 325

<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 325	
accatccatc ttccccac	18
<210> 326	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 326	
tcctggctac gctcttc	17
<210> 327	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 327	
tccgtcagga agttactgg	19
<210> 328	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 328	
agtaccata ctcaggaccc	20
<210> 329	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer	
<400> 329	
ggctacgctc ttccaaaag	19

<210> 330
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Primer
<400> 330
agt caccata ctcaggaccc 20
<210> 331

<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Primer
<400> 331
gaagattgca atgaacttcc tccaag 26
<210> 332
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Primer
<400> 332
aagttctgaa taaagggtgtc c 21
<210> 333
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Primer
<400> 333
tatagatctc ttggaaatat aataatggta tgcagg 36
<210> 334
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Primer

<400> 334

atggatataa tcaaattat ggaagaaagt ttgtac	36
<210> 335	
<211> 3769	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic human CFH variant	
<400> 335	
agtttagctgg taaatgtcct cttaaaagat ccaaaaaatg agacttctag caaagattat	60
ttgcctttagt ttatgggcta tttgtgtagc agaagattgc aatgaacttc ctccaagaag	120
aaatacagaa attctgacag gttcctggtc tgaccaaaca tatccagaag gcacccaggc	180
tatctataaa tgccgccctg gatatagatc tcttggaaat ataataatgg tatgcaggaa	240
gggagaatgg gttgcttta atccattaag gaaatgtcag aaaaggccct gtggacatcc	300
tggagatact cctttggta ctttaccct tacaggagga aatgtgttg aatatgggt	360
aaaagctgtg tatacatgtt atgagggta tcaattgcta ggtgagatta attaccgtga	420
atgtgacaca gatggatgca ccaatgatat tcctatatgt gaagttgtga agtgttacc	480
agtgacagca ccagagaatg gaaaaattgt cagtagtgca atggaaccag atcgggaata	540
ccattttggta caagcagtac ggttgtatg taactcaggc tacaagattg aaggagatga	600
agaaaatgcat tgttcagacg atggttttg gagtaaagag aaaccaaagt gtgtggaaat	660
ttcatgcaaa tccccagatg ttataatgg atctcctata tctcagaaga ttatttataa	720
ggagaatgaa cgatttcaat ataaatgtaa catgggtat gaatacagtg aaagaggaga	780
tgctgtatgc actgaatctg gatggcgtcc gttgcctca tgtgaagaaa aatcatgtga	840
taatccttat attccaaatg gtgactactc accttaagg attaacaca gaactggaga	900
tgaaaatcag taccagtgtt gaaatggttt ttatcctgca acccggggaa atacagcaaa	960
atgcacaagt actggctgga tacctgctcc gagatgtacc ttgaaacctt gtgattatcc	1020
agacattaaa catggaggc tatcatgtt gaatatgcgt agaccatact ttccagtagc	1080
tgttagaaaa tattactcct attactgtga tgaacattt gagactccgt caggaagtt	1140
ctgggatcac attcattgca cacaagatgg atggcgtcc gcagtaccat gcctcagaaa	1200
atgttatttt ctttattgg aaaatggata taatcaaaat tatggaaagaa agtttgtaca	1260
ggtaaatct atagacgtt cctgccatcc tggctacgct cttccaaag cgccagaccac	1320
agtttacatgt atggagaatg gctggctcc tactccaga tgcattccgt tcaaaacatg	1380
ttccaaatca agtatagata ttgagaatgg gtttattct gaatctcagt atacatatgc	1440

cttaaaagaa aaagcgaaat atcaatgcaa actaggatat gtaacagcag atggtaaac	1500
atcaggatca attacatgtg ggaaagatgg atggtcagct caacccacgt gcattaaatc	1560
ttgtgatatc ccagtattt tgaatgccag aactaaaaat gacttcacat ggtaaagct	1620
gaatgacaca ttggactatg aatgccatga tggttatgaa agcaatactg gaagcaccac	1680
tggttccata gtgtgtggtt acaatggttg gtctgattt cccatatgtt atgaaagaga	1740
atgcgaacct cctaaaatag atgtacactt agttcctgat cgcaagaaag accagtataa	1800
agttggagag gtgtgaaat tctcctgcaa accaggatt acaatagttt gacctaattc	1860
cgttcagtc taccacttg gattgtctcc tgacctccca atatgtaaag agcaagtaca	1920
atcatgtggt ccacccctg aactcctcaa tggaaatgtt aaggaaaaaa cgaaagaaga	1980
atatggacac agtgaagtgg tggaaatatta ttgcaatctt agatttctaa tgaaggacc	2040
taataaaattt caatgtgtt atggagagtg gacaactta ccagtgtta ttgtggagga	2100
gagtagctgtt ggagatatac ctgaacttga acatggctgg gcccagctt cttccctcc	2160
ttattactat ggagattcag tggaaattcaa ttgctcagaa tcattacaa tgattggaca	2220
cagatcaatt acgtgtattc atggagatgt gacccaactt cccagtgta tggcaataga	2280
taaacttaag aagtgcaaat catcaaattt aattatactt gaggaacatt taaaaacaa	2340
gaaggaattt gatcataattt ctaacataag gtacagatgt agaggaaaag aaggatggat	2400
acacacagtc tgcataaatg gaagatggaa tccagaagtg aactgctcaa tggcacaaat	2460
acaattatgc ccaccccttcc acatgttttcc caattctcac aatatgacaa ccacactgaa	2520
ttatcggtt ggagaaaaat tatctgttct ttgccaagaa aattatctaa ttctggagg	2580
agaagaaattt acatgcaag atgaaagatg gcagtcaata ccactctgtt ttgaaaaat	2640
tccatgttca caaccaccc agatagaaca cggaaaccatt aattcatcca ggtcttcaca	2700
agaaagtttat gcacatggaa ctaaatttgc ttatacttgtt gagggtgggtt tcaggatatc	2760
tgaagaaaaat gaaacaacat gctacatggg aaaatggagt tctccaccc agtgtgaagg	2820
ccttccttgtt aaatctccac ctgagatttc tcatgggtttt gtagtcaca tgcagacag	2880
ttatcgatgtt ggagaagaag ttacgtacaa atgtttgaa ggtttggaa ttgtatggcc	2940
tgcaatttgc aatgtttttag gagaaaaaatg gtctcaccc tccatcatgca taaaaacaga	3000
ttgtctcagt ttaccttagt ttgaaaatgc cataccatg ggagagaaga aggatgtgtt	3060
taaggcggtt gagcaagtga cttacacttg tgcaacatat tacaaaatgg atggagccag	3120
taatgttaaca tgcattataa gcagatggac aggaaggcca acatgcagag acacccctg	3180

tgtgaatccg cccacagtac aaaatgctta tatagtgtcg agacagatga gtaaatatcc 3240
 atctggtgag agagtagttt atcaatgttag gagcccttat gaaatgtttg gggatgaaga 3300
 agtgatgtgt tttaatggaa actggacgga accacctaacc tgcaaagatt ctacaggaaa 3360
 atgtggccccc cctccaccta ttgacaatgg ggacattact tcattccgt tgtcagtata 3420
 tgctccagct tcacatgtt agtataatg ccagaacttg tatcaacttg agggtaacaa 3480
 gcaataaca tgttagaaatg gacaatggtc agaaccacca aaatgcttac atccgtgt 3540
 aatatcccgaaaaattatgg aaaattataa catagcatta aggtggacag ccaaacagaa 3600

gctttattcg agaacagggtg aatcagttga atttgtgtgt aaacggggat atcgctttc 3660
 atcacgttct cacacattgc gaacaacatg ttggatggg aaactggagt atccaaacttg 3720
 tgcaaaaaga tagaatcaat cataaagtgc acacctttat tcagaactt 3769

<210> 336

<211> 3926

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 336

aattcttggaa agaggagaac tggacgttgtt gaacagagtt agctggtaaa tgccttta 60
 aaagatccaa aaaatgagac ttcttagcaaa gattattgc cttatgttat gggctattt 120
 tgttagcagaa gattgcaatg aacttcctcc aagaagaaat acagaattc tgacaggttc 180

ctggcttgac caaacatatac cagaaggcac ccaggctatc tataaatgcc gccctggata 240
 tagatctttt ggaaatgtaa taatggatgtt caggaaggaa gaatgggttg ctcttaatcc 300
 attaaggaaa tgtcagaaaa ggcctgtgg acatccgtt gatactcctt ttggacttt 360
 tacccttaca ggagggaaatg ttttgaata tgggtaaaa gctgtgtata catgtatga 420
 ggggtatcaa ttgcttaggtt agattaatta ccgtgaatgtt gacacagatg gatggaccaa 480
 tgatattcctt atatgtgaag ttgtgaagtgtt accaggatgtt acagcaccatg agaatggaaa 540
 aattgtcagt agtgcataatgg aaccagatcg ggaataaccat tttggacaag cagtacggtt 600

tgtatgtaaatc tcaggctaca agatgttggg agatgttgggaa atgcattgtt cagacgttgg 660
 tttttggagt aaagagaaac caaagtgtgtt gggaaatttca tgcaaatccc cagatgttat 720
 aatggatctt cctataatctc agaagattat ttataaggag aatgttggatgtt ttcaatataa 780
 atgttggatgtt ggtttagatgtt acagtgttggg aggatgtgtt gtatgttggatgtt aatgttggatgtt 840
 cggtccgttgc ctttcatgtt gggaaaatc atgttggatgtt ctttataatcc caaatgggtga 900
 ctactcacctt ttaaggatgtt aacacagaac tggatgttgggaa atcagttaccatgttggatgtt 960

tggttttat cctgcaaccc gggaaatac agccaaatgc acaagtactg gctggatacc	1020
tgctccgaga tgtacccgtga aacccgtgtga ttatccagac attaaacatg gaggtctata	1080
tcatgagaat atgcgttagac catactttcc agtagctgtaa gaaaaatattt actccttata	1140
ctgtgtatgaa cattttgaga ctccgtcagg aagttactgg gatcacattc attgcacaca	1200
agatggatgg tcgccagcag taccatgcct cagaaaatgt tatttcctt atttggaaaa	1260
tggatataat caaaattatg gaagaaagtt tgtacagggt aaatctatag acgttgctg	1320
ccatcctggc tacgctttc caaaagcgca gaccacagtt acatgtatgg agaatggctg	1380
gtctcctact cccagatgca tccgtgtcaa aacatgttcc aaatcaagta tagatattga	1440
gaatgggtt atttctgaat ctcaatatac atatgcctta aaagaaaaag cgaaatatac	1500
atgcaaaacta ggatataatc cagcagatgg taaaacatca gatgtggaa	1560
agatggatgg tcagctcaac ccacgtgcat taaatctgt gatatcccag tatttatgaa	1620
tgcagaact aaaaatgact tcacatggtt taagctgaat gacacattgg actatgaatg	1680
ccatgatgg tatgaaagca atactggaag caccactgg tccatagtgt gtggttacaa	1740
tggttggct gatttacca tatgttatga aagagaatgc gaacttccta aaatagatgt	1800
acacttagtt cctgatcgca agaaagacca gtataaagtt ggagaggtgt tggaaatttc	1860
ctgcaaacca ggatttacaa tagttggacc taattccgtt cagtgttacc acttggatt	1920
gtctcctgac ctcccaatataat gtaaagagca agtacaatca tgtggccac ctccctgaact	1980
cctcaatggg aatgttaagg aaaaacgaa agaagaatat ggacacagtgg aagtgggtgaa	2040
atattatgc aatccttagat ttctaatgaa gggacctaataa aaaaattcaat gtgttgcgttgg	2100
agagtggaca actttaccag tgttattgtt ggaggagagt acctgtggag atatacctgaa	2160
acttgaacat ggctggccccc agcttcttc ccctcccttataatgatggg attcagtgaa	2220
attcaattgc tcagaatcat ttacaatgtat tggacacaga tcaattacgt gtattcatgg	2280
agtatggacc caactcccc agtgtgtggc aatagataaa ctttggaaatgtt gcaatcatc	2340
aaatttaattt atacttgagg aacatttaaa aaacaagaag gaattcgatc ataattctaa	2400
cataaggtagtac agatgttagag gaaaagaagg atggatacac acagtctgca taaatggaa	2460
atgggatcca gaagtgaact gctcaatggc acaaatacaa ttatgcccac ctccacccatca	2520
gattcccaat tctcacaata tgacaaccac actgaattat cgggatggag aaaaagtatc	2580
tgttcttgc caagaaaattt atctaattca ggaaggagaa gaaattacat gcaagatgg	2640
aagatggcag tcaataccac tctgtgtga aaaaattcca tggcacaac cacctcagat	2700

agaacacgga accattaatt catccaggc ttcacaagaa agttatgcac atggactaa 2760
 attgagttat acttgcgagg gtggtttcag gatatctgaa gaaaatgaaa caacatgcta 2820
 catggaaaaa tggaggctc cacccagtg tgaaggcctt ccttgtaat ctccacctga 2880
 gatttctcat ggtgtttagt ctcacatgtc agacagttat cagttatggag aagaagttac 2940
 gtacaaatgt tttgaaggtt ttgaaattga tggcctgca attgaaaat gcttaggaga 3000
 aaaatggctt caccctccat catgcataaa aacagattgt ctcagttac ctatgttga 3060
 aatgccata cccatggag agaagaagga tttgtataag gcgggtgagc aagtgactta 3120

cacttgcac acatattaca aatggatgg agccagtaat gtaacatgc ttaatagcag 3180
 atggacagga aggccaacat gcagagacac ctccgtgt aatccccc cagtacaaaa 3240
 tgcttatata gtgtcgagac agatgagtaa atatccatct ggtgagagag tacgttatca 3300
 atgttaggac ctttatgaaa ttgtgggta tgaagaagtg atgtgttta atgaaactg 3360
 gacggaaacc cctcaatgc aagattctac agaaaaatgt gggccccctc caccttgc 3420
 caatggggac attactcat tcccggtgtc agtataatgtt ccagttcat cagttgatg 3480
 ccaatgccat aacttgcata aacttgcggg taacaagcga ataacatgt aaaaatggaca 3540

atggtcgaaa ccacaaaaat gtttacatcc gtgtgtataa tcccgagaaa ttatggaaaa 3600
 ttataacata gcattaaagg ggacagccaa acagaagctt tattcgagaa caggtgaatc 3660
 agttaatgtt gtgtgtaaac gggatatcg tcttcatca cgttctcaca cattgcgaac 3720
 aacatgttgg gatggaaac tggatgtcc aacttgcataaaaatgata atcaatcata 3780
 aagtgcacac cttaatccat aacttgcata ttaatcgtt tctcaatttc atttttatg 3840
 tattgtttta ctccctttta ttcatatgtt aaattttgaa ttaattgtt aaaaatgtt 3900
 tataaggcata gaccggggc tctttt 3926

<210> 337

<211> 1231

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 337

Met Arg Leu Leu Ala Lys Ile Ile Cys Leu Met Leu Trp Ala Ile Cys

1 5 10 15

Val Ala Glu Asp Cys Asn Glu Leu Pro Pro Arg Arg Asn Thr Glu Ile

20 25 30

Leu Thr Gly Ser Trp Ser Asp Gln Thr Tyr Pro Glu Gly Thr Gln Ala

35 40 45

Ile Tyr Lys Cys Arg Pro Gly Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Val Ile Met

50 55 60

Val Cys Arg Lys Gly Glu Trp Val Ala Leu Asn Pro Leu Arg Lys Cys

65 70 75 80

Gln Lys Arg Pro Cys Gly His Pro Gly Asp Thr Pro Phe Gly Thr Phe

85 90 95

Thr Leu Thr Gly Asn Val Phe Glu Tyr Gly Val Lys Ala Val Tyr

100 105 110

Thr Cys Asn Glu Gly Tyr Gln Leu Leu Gly Glu Ile Asn Tyr Arg Glu

115 120 125

Cys Asp Thr Asp Gly Trp Thr Asn Asp Ile Pro Ile Cys Glu Val Val

130 135 140

Lys Cys Leu Pro Val Thr Ala Pro Glu Asn Gly Lys Ile Val Ser Ser

145 150 155 160

Ala Met Glu Pro Asp Arg Glu Tyr His Phe Gly Gln Ala Val Arg Phe

165 170 175

Val Cys Asn Ser Gly Tyr Lys Ile Glu Gly Asp Glu Glu Met His Cys

180 185 190

Ser Asp Asp Gly Phe Trp Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Val Glu Ile

195 200 205

Ser Cys Lys Ser Pro Asp Val Ile Asn Gly Ser Pro Ile Ser Gln Lys

210 215 220

Ile Ile Tyr Lys Glu Asn Glu Arg Phe Gln Tyr Lys Cys Asn Met Gly

225 230 235 240

Tyr Glu Tyr Ser Glu Arg Gly Asp Ala Val Cys Thr Glu Ser Gly Trp

245 250 255

Arg Pro Leu Pro Ser Cys Glu Glu Lys Ser Cys Asp Asn Pro Tyr Ile

260 265 270

Pro Asn Gly Asp Tyr Ser Pro Leu Arg Ile Lys His Arg Thr Gly Asp

275 280 285

Glu Ile Thr Tyr Gln Cys Arg Asn Gly Phe Tyr Pro Ala Thr Arg Gly

290	295	300	
Asn Thr Ala Lys Cys Thr Ser Thr Gly Trp Ile Pro Ala Pro Arg Cys			
305	310	315	320
Thr Leu Lys Pro Cys Asp Tyr Pro Asp Ile Lys His Gly Gly Leu Tyr			
325	330	335	
His Glu Asn Met Arg Arg Pro Tyr Phe Pro Val Ala Val Gly Lys Tyr			
340	345	350	
Tyr Ser Tyr Tyr Cys Asp Glu His Phe Glu Thr Pro Ser Gly Ser Tyr			
355	360	365	
Trp Asp His Ile His Cys Thr Gln Asp Gly Trp Ser Pro Ala Val Pro			
370	375	380	
Cys Leu Arg Lys Cys Tyr Phe Pro Tyr Leu Glu Asn Gly Tyr Asn Gln			
385	390	395	400
Asn Tyr Gly Arg Lys Phe Val Gln Gly Lys Ser Ile Asp Val Ala Cys			
405	410	415	
His Pro Gly Tyr Ala Leu Pro Lys Ala Gln Thr Thr Val Thr Cys Met			
420	425	430	
Glu Asn Gly Trp Ser Pro Thr Pro Arg Cys Ile Arg Val Lys Thr Cys			
435	440	445	
Ser Lys Ser Ser Ile Asp Ile Glu Asn Gly Phe Ile Ser Glu Ser Gln			
450	455	460	
Tyr Thr Tyr Ala Leu Lys Glu Lys Ala Lys Tyr Gln Cys Lys Leu Gly			
465	470	475	480
Tyr Val Thr Ala Asp Gly Glu Thr Ser Gly Ser Ile Arg Cys Gly Lys			
485	490	495	
Asp Gly Trp Ser Ala Gln Pro Thr Cys Ile Lys Ser Cys Asp Ile Pro			
500	505	510	
Val Phe Met Asn Ala Arg Thr Lys Asn Asp Phe Thr Trp Phe Lys Leu			
515	520	525	
Asn Asp Thr Leu Asp Tyr Glu Cys His Asp Gly Tyr Glu Ser Asn Thr			
530	535	540	

Gly Ser Thr Thr Gly Ser Ile Val Cys Gly Tyr Asn Gly Trp Ser Asp
 545 550 555 560
 Leu Pro Ile Cys Tyr Glu Arg Glu Cys Glu Leu Pro Lys Ile Asp Val
 565 570 575
 His Leu Val Pro Asp Arg Lys Lys Asp Gln Tyr Lys Val Gly Glu Val
 580 585 590
 Leu Lys Phe Ser Cys Lys Pro Gly Phe Thr Ile Val Gly Pro Asn Ser
 595 600 605
 Val Gln Cys Tyr His Phe Gly Leu Ser Pro Asp Leu Pro Ile Cys Lys
 610 615 620
 Glu Gln Val Gln Ser Cys Gly Pro Pro Glu Leu Leu Asn Gly Asn
 625 630 635 640
 Val Lys Glu Lys Thr Lys Glu Glu Tyr Gly His Ser Glu Val Val Glu
 645 650 655
 Tyr Tyr Cys Asn Pro Arg Phe Leu Met Lys Gly Pro Asn Lys Ile Gln
 660 665 670
 Cys Val Asp Gly Glu Trp Thr Thr Leu Pro Val Cys Ile Val Glu Glu
 675 680 685
 Ser Thr Cys Gly Asp Ile Pro Glu Leu Glu His Gly Trp Ala Gln Leu
 690 695 700
 Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Glu Phe Asn Cys Ser
 705 710 715 720
 Glu Ser Phe Thr Met Ile Gly His Arg Ser Ile Thr Cys Ile His Gly
 725 730 735
 Val Trp Thr Gln Leu Pro Gln Cys Val Ala Ile Asp Lys Leu Lys
 740 745 750
 Cys Lys Ser Ser Asn Leu Ile Ile Leu Glu Glu His Leu Lys Asn Lys
 755 760 765
 Lys Glu Phe Asp His Asn Ser Asn Ile Arg Tyr Arg Cys Arg Gly Lys
 770 775 780
 Glu Gly Trp Ile His Thr Val Cys Ile Asn Gly Arg Trp Asp Pro Glu

785	790	795	800
Val Asn Cys Ser Met Ala Gln Ile Gln Leu Cys Pro Pro Pro Gln			
805	810	815	
Ile Pro Asn Ser His Asn Met Thr Thr Leu Asn Tyr Arg Asp Gly			
820	825	830	
Glu Lys Val Ser Val Leu Cys Gln Glu Asn Tyr Leu Ile Gln Glu Gly			
835	840	845	
Glu Glu Ile Thr Cys Lys Asp Gly Arg Trp Gln Ser Ile Pro Leu Cys			
850	855	860	
Val Glu Lys Ile Pro Cys Ser Gln Pro Pro Gln Ile Glu His Gly Thr			
865	870	875	880
Ile Asn Ser Ser Arg Ser Ser Gln Glu Ser Tyr Ala His Gly Thr Lys			
885	890	895	
Leu Ser Tyr Thr Cys Glu Gly Gly Phe Arg Ile Ser Glu Glu Asn Glu			
900	905	910	
Thr Thr Cys Tyr Met Gly Lys Trp Ser Ser Pro Pro Gln Cys Glu Gly			
915	920	925	
Leu Pro Cys Lys Ser Pro Pro Glu Ile Ser His Gly Val Val Ala His			
930	935	940	
Met Ser Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Glu Glu Val Thr Tyr Lys Cys Phe			
945	950	955	960
Glu Gly Phe Gly Ile Asp Gly Pro Ala Ile Ala Lys Cys Leu Gly Glu			
965	970	975	
Lys Trp Ser His Pro Pro Ser Cys Ile Lys Thr Asp Cys Leu Ser Leu			
980	985	990	
Pro Ser Phe Glu Asn Ala Ile Pro Met Gly Glu Lys Lys Asp Val Tyr			
995	1000	1005	
Lys Ala Gly Glu Gln Val Thr Tyr Thr Cys Ala Thr Tyr Tyr Lys			
1010	1015	1020	
Met Asp Gly Ala Ser Asn Val Thr Cys Ile Asn Ser Arg Trp Thr			
1025	1030	1035	

Gly Arg Pro Thr Cys Arg Asp Thr Ser Cys Val Asn Pro Pro Thr
 1040 1045 1050
 Val Gln Asn Ala Tyr Ile Val Ser Arg Gln Met Ser Lys Tyr Pro
 1055 1060 1065
 Ser Gly Glu Arg Val Arg Tyr Gln Cys Arg Ser Pro Tyr Glu Met

 1070 1075 1080
 Phe Gly Asp Glu Glu Val Met Cys Leu Asn Gly Asn Trp Thr Glu
 1085 1090 1095
 Pro Pro Gln Cys Lys Asp Ser Thr Gly Lys Cys Gly Pro Pro Pro
 1100 1105 1110
 Pro Ile Asp Asn Gly Asp Ile Thr Ser Phe Pro Leu Ser Val Tyr
 1115 1120 1125
 Ala Pro Ala Ser Ser Val Glu Tyr Gln Cys Gln Asn Leu Tyr Gln

 1130 1135 1140
 Leu Glu Gly Asn Lys Arg Ile Thr Cys Arg Asn Gly Gln Trp Ser
 1145 1150 1155
 Glu Pro Pro Lys Cys Leu His Pro Cys Val Ile Ser Arg Glu Ile
 1160 1165 1170
 Met Glu Asn Tyr Asn Ile Ala Leu Arg Trp Thr Ala Lys Gln Lys
 1175 1180 1185
 Leu Tyr Ser Arg Thr Gly Glu Ser Val Glu Phe Val Cys Lys Arg

 1190 1195 1200
 Gly Tyr Arg Leu Ser Ser Arg Ser His Thr Leu Arg Thr Thr Cys
 1205 1210 1215
 Trp Asp Gly Lys Leu Glu Tyr Pro Thr Cys Ala Lys Arg
 1220 1225 1230